

青蒿 JAZ 基因克隆及其功能分析

夏菁^{1,2}, 简东琴^{1,2}, 曾俊岚^{1,2}, 王焕燕^{1,2}, 廖志华^{1,2}, 杨春贤^{1,2*}

- (1. 西南大学生命科学学院三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400715;
2. 西南大学-西藏农牧学院药用植物联合研发中心, 重庆 400715)

摘要: 茉莉酸 (jasmonic acid, JA) 能诱导青蒿素生物合成, 为进一步解析青蒿 JA 信号通路, 本研究从青蒿中克隆并鉴定 2 个 JA 信号通路中的负调控因子 *JAZ* (jasmonate ZIM-domain) 基因, 分别命名为 *AaJAZ5* 和 *AaJAZ6*。这两者均含有 *JAZ* 家族特有的保守区域 ZIM 和 Jas。 *AaJAZ5* 在叶中表达量最高, 其他部位的表达量较低; *AaJAZ6* 在根中的表达量最高, 茎中的表达量最低。茉莉酸甲酯 (MeJA) 和机械伤害处理都能显著提高 *AaJAZ5* 和 *AaJAZ6* 的表达。通过双分子荧光互补 (bimolecular fluorescence complementation, BiFC) 证明, *AaJAZ5* 和 *AaJAZ6* 均能与 *AaMYC2* 相互作用, 而只有 *AaJAZ5* 与 *AaCOI1* 存在相互作用, 表明 *AaJAZ5* 在 JA 信号通路中可能具有更加重要的作用。本研究为进一步分析青蒿 *JAZ* 家族成员的功能分化和 JA 信号调控青蒿素生物合成的分子机制奠定了基础。

关键词: 青蒿素; 茉莉酸信号途径; *JAZ*; *COI1*; *MYC2*

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870 (2018) 05-0812-07

Cloning and functional analysis of JAZ genes in *Artemisia annua*

XIA Jing^{1,2}, JIAN Dong-qin^{1,2}, ZENG Jun-lan^{1,2}, WANG Huan-yan^{1,2},
LIAO Zhi-hua^{1,2}, YANG Chun-xian^{1,2*}

- (1. Key Laboratory of Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region (Ministry of Education), School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China;
2. TAAHC-SWU Medicinal Plant Joint R&D Centre, Chongqing 400715, China)

Abstract: Jasmonic acid (JA) can promote the biosynthesis of artemisinin. To have an insight into the JA signaling in *Artemisia annua*, two new genes belonging to JAZ family, namely *AaJAZ5* and *AaJAZ6*, were cloned from *Artemisia annua*, which might be the negative regulators involved in the JA signaling pathway. Bioinformatic analysis showed that *AaJAZ5* and *AaJAZ6* contained the conserved domains of ZIM and Jas specific to JAZ family. According to tissue profile analysis, *AaJAZ5* had the highest expression level in leaf and *AaJAZ6* had the highest expression level in root. The expression levels of both *AaJAZ5* and *AaJAZ6* were markedly elevated by methyl jasmonate and mechanical wounding. The BiFC results indicated that *AaJAZ5*, as well as *AaJAZ6*, physically interacted with *AaMYC2*. Importantly, only *AaJAZ5* could interact with *AaCOI1*. The interaction assays given by BiFC suggested that *AaJAZ5* might play a crucial role in JA signaling. This study facilitated the further analysis of the functional divergence of JAZ-family members and the understanding of molecular mechanism on JA signaling to regulate the artemisinin biosynthesis.

Key words: Artemisinin; JA signaling pathway; *JAZ*; *COI1*; *MYC2*

收稿日期: 2018-01-19; 修回日期: 2018-03-12.

基金项目: 国家“863”计划资助项目 (2011AA100605); 国家自然科学基金资助项目 (31370333); 教育部新世纪优秀人才计划资助项目 (NCET-12-0930); 西南大学中央高校基本科研业务费专项 (XDJK2013A024).

*通讯作者 Tel: 86-23-68367146, Fax: 86-23-68367637, E-mail: yangchx@swu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0075

青蒿素是从我国传统中药青蒿 (*Artemisia annua*) (分类学为黄花蒿) 中提取出来的一种具有独特过氧桥结构的倍半萜内酯, 国际卫生组织将基于青蒿素的联合疗法推荐为治疗疟疾的首选方案^[1]。随着对青蒿素研究的深入, 研究人员发现除了治疗疟疾之外, 还对红斑狼疮和糖尿病等疾病具有良好疗效。但是青蒿中青蒿素含量较低 (约占干重的 0.01% 至 0.8%)^[2], 研究人员通过多种策略尝试来提高青蒿素含量, 包括传统育种、分子育种和使用外源诱导子等。现在已有多种诱导子被报道能影响青蒿素生物合成, 例如茉莉酸甲酯 (MeJA)、脱落酸 (ABA)、赤霉素 (GA) 和氯化钠等^[3-7]。特别是 MeJA 能显著提高青蒿素生物合成途径关键酶基因的表达, 从而提高青蒿素含量。

JA 是一种十分重要的植物激素, 参与多种植物对生物胁迫或非生物胁迫的响应, 也能够诱导萜类、生物碱和黄酮类等次生代谢产物的生物合成^[8]。JAZ (jasmonate ZIM-domain) 蛋白是 JA 信号转导过程中重要的负调控蛋白, 该家族蛋白具有 2 个保守的功能结构域, 即 ZIM (又叫 TIFY) 结构域和 Jas (又叫 CCT_2) 结构域, ZIM 结构域一般位于 JAZ 中间, 在其近 N 末端侧含有 TIFY (TIF[F/Y]XG) motif, 属于 TIFY 转录因子超家族成员之一^[9,10]。JAZ 形成同源或异源二聚体依赖于 TIFY, JAZ 的 ZIM 结构域及其 TIFY 基序介导 JAZ 与共抑制子 NOVELINTERACTOR OF JAZ (NINJA) 相互结合进而共同抑制 JA 信号转导^[11,12]; Jas 结构域靠近 JAZ 的 C 端, JAZ 通过 Jas 结构域与 JA 信号受体 COI1 (CORONATINE INSENSITIVE1) 或其他下游转录因子相互作用。JAZ 通过以下几个步骤调控 JA 信号转导: ① 在低 JA 浓度时, JAZ 结合如 MYC2 等 JA 信号下游转录因子并抑制其活性; ② 植物受到胁迫时大量合成 JA, 然后转化为茉莉酸异亮氨酸 (JA-Ile) 从而介导 COI1 与 JAZ 的相互作用; ③ JAZ 随后被 SCF^{COI1} 类型的 E3 泛素连接酶介导泛素化修饰从而被 26S 蛋白酶体降解, 与 JAZ 结合的转录因子被释放; ④ 转录因子激活下游 JA 响应基因的转录^[10,13]。

虽然 JAZ 在 JA 信号转导途径中的重要地位已经被证明, 但是在植物中 JAZ 属于由多个成员组成的小基因家族, 例如在拟南芥中有 12 个 JAZ 家族成员, 其功能冗余又有差异^[12]。在丹参 (*Salvia miltiorrhiza*) 的研究表明 JAZ 在调控次生代谢的生物合成中也存在着冗余和功能差异, 例如 *SmJAZ8* 负调控丹参酚酸 B 的生物合成, 而 *SmJAZ3* 和 *SmJAZ9* 负调控丹参酮的生物合成^[14]。在青蒿中已报道了 4 条 JAZ 经酵母

双杂交结果显示均能与 MYC2 相互作用^[15]。然而在青蒿中是否还存在能与 AaMYC2 和 AaCOI1 都具有相互作用的其他 JAZ 家族成员还需要进一步的研究。本研究采用 RACE (rapid amplification of cDNA ends) 技术从青蒿中获得新的 JAZ 家族基因, 进行生物信息学分析, 研究新基因在不同组织、MeJA 诱导及伤害处理条件下的表达水平; 荧光双分子互补实验 (bimolecular fluorescence complementation, BiFC) 揭示其蛋白与 AaCOI1 和 AaMYC2 相互作用关系, 为进一步深入研究青蒿 JAZ 家族成员在 JA 信号转导机制和培育高含量青蒿奠定基础。

材料与方法

材料 青蒿 (*Artemisia annua*) 和本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 种子由本实验室保存。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM107 和农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101 由本实验室保存。质粒 pJET Vector 从 Fermentas 公司购买, BiFC 载体 pXY104 和 pXY106 由本实验室保存。

RNA 的提取与 cDNA 的合成 植物总 RNA 提取根据天根 RNA 提取试剂盒 (DP419) 的使用说明进行操作, 利用 NanoDrop2000C 检测 RNA 浓度, 同时利用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性和质量。按照 RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0 (TaKaRa) 试剂盒说明书反转录获得第一链 cDNA 用于核心片段 PCR 扩增和 3'RACE, 按照 BD SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 和 BD AdvantageTM 2 PCR Kit (CLONTECH) 试剂盒说明书反转录获得 cDNA 用于 5'RACE。

基因的克隆 根据青蒿的基因组序列通过 Vector NTI11.5 设计 RACE 引物, 用青蒿 cDNA 链作为模板进行 AaJAZ 5'端和 3'端的扩增, 胶回收产物与 PMD19-T 载体连接, 转化 JM107 感受态细胞并送测序, 将测序结果用 VectorNTI11.5 软件与基因组序列进行电子拼接并设计基因全长引物。以青蒿 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 回收相应条带, 连接 T 载体后转化大肠杆菌 DH5 α , 挑取阳性菌送测序。将测序结果在 NCBI 上进行 BLAST 比对, 判断其序列为 JAZ5 和 JAZ6 的电子全长序列, 获得两条基因的物理全长序列。以上步骤所用引物序列见表 1。

生物信息学分析 用 Vector NTI Suite 11.5 软件和 BlastP 进行序列分析; 在 Vector NTI Suite 11.5 软件查找 ORF 和翻译核苷酸; 使用 ExPASy 提供的 Proteomics Server 预测 AaJAZ5 和 AaJAZ6 蛋白的理

Table 1 Primers used in the study

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Purpose
JAZ5-5RACE-1 R	CTTCACAACACTACTGGTGGTTCGTTCA	5'RACE of AaJAZ5
JAZ5-5RACE-2 R	ACTGGTGGTTCGTTCAAGCAAT	
JAZ5-3RACE-1 F	GATTGCTTCTGCTTCGGCTTCTG	3'RACE of AaJAZ5
JAZ5-3RACE-2 F	TTCGGCTTCTGCATCTGCTAACTC	
JAZ6-5RACE-1 R	GGAACAGGCGTCTGAGGTTGAAC	5'RACE of AaJAZ6
JAZ6-5RACE-2 R	GGTTAGTTGAGCTGGAGCACAAAGAAG	
JAZ6-3RACE-1 F	CCCACTAACAGAGATGATGGTGCTAAA	3'RACE of AaJAZ6
JAZ6-3RACE-2 F	CTTCATCTCCTTACGGTGTGAGCAA	
JAZ5 qPCR F	AAGTCATCATTGTCACCTAAG	qPCR
JAZ5 qPCR R	CATAATCTGTTCCGCTTGA	
JAZ6 qPCR F	GTAGCAGCAGGCGAGCATT	qPCR
JAZ6 qPCR R	TCCTTACAGAGAACCGAACCCTA	
β -Actin F	CCAGGCTGTTTCAGTCTCTGTAT	qPCR
β -Actin R	CGCTCGGTAAGGATCTTCATCA	
MYC2 F	GCTCTAGAATGACGATGAATATATG	BiFC
MYC2 R	ACCTCGACCCTAGGATCTGACAT	BiFC
COI1 F	CGCGGATCCATGGATGATCGAACACCA	BiFC
COI1 R	AAACTGCAGTTATGGAGCAACGGAGAC	BiFC
JAZ5 F	GCTCTAGAATGTTGAGATCACCTC	BiFC
JAZ5 R	ACCTCGACTCAATGCAAAGACAAGT	BiFC
JAZ6 F	GCTCTAGAATGGAACGAGATTTTA	BiFC
JAZ6 R	ACCTCGACCTAATGCTCGCCGGCTG	BiFC

化性质, 使用 NCBI 预测 AaJAZ5 和 AaJAZ6 的保守结构域, 使用 PredictProtein 预测蛋白质的二级结构, 用 CLUSTALX 进行多重序列比对, 并借助于 MEGA7 软件采用邻位相联法 (neighbor-joining, NJ) 构建进化树, bootstrap 检验的重复次数为 1000 次。

组织表达谱分析 提取青蒿的根、茎、叶、花的总 RNA, 取质量合格的 RNA, 用 Promega Reverse Transcription System 进行 cDNA 第一链的合成, 得到 cDNA 第一链作为 qPCR 模板, 使用 BIO-RAD iQTM5 Multicolor Real-Time PCR 仪, 参照 iTaqTMUniversal SYBR 试剂盒说明书进行 qPCR 反应。qPCR 反应体系和程序, 参照本实验室之前的报道^[16,17]。 β -actin 作为内参, 根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算各基因的相对表达量^[18]。组织表达图谱采用 SPSS 16.0 软件中的单向方差分析 (ANOVA) 统计方法, 分析根、茎、叶、花之间的差异。其中, 小写字母代表在 0.05 水平下的比较, 差异显著; 大写字母代表在 0.01 水平下的比较, 差异极显著; 相同字母表示无显著性差异, 不同字母表示有显著差异。所用引物见 (表 1)。

诱导表达谱分析 配制浓度为 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA 作为实验组, 0.8% 乙醇作为对照组, 对 30 天苗龄的青蒿实生苗进行喷洒处理, 青蒿分别取上面的第三叶和第四叶, 青蒿样品在 0、0.5、1、3 和 6 h 分

别取样, 样品放于液氮中速冻, 用于后续实验。30 天苗龄的青蒿叶片用镊子夹叶片 3 次, 进行伤害处理, 取样方法同 MeJA 处理。MeJA 诱导和机械伤害诱导图谱采用 *t* 检测统计方法分析 0.5、1、3 和 6 h 的基因表达量与 0 h 对照组之间的差异。

AaJAZ 与 AaMYC2、AaCOI1 的 BiFC 分析 将 AaJAZ 基因编码区连接到 BiFC 载体 pXY106 上, 与黄色荧光蛋白的 C 端 (YFP^C) 融合。青蒿 AaMYC2 编码区连接到 BiFC 载体 pXY104 上, 与黄色荧光蛋白的 N 端 (YFP^N) 融合。采用农杆菌注射法瞬时转化烟草^[19], 并在激光共聚焦显微镜 Olympus FV1000 (Olympus Kyoto, Japan) 下观察荧光信号并拍照。AaJAZ 与 AaCOI1 基因的相互作用方法同上。

结果

1 AaJAZ5 和 AaJAZ6 编码蛋白质的生物信息学分析

1.1 理化性质分析 使用 ExPASy Proteomics Server 在线软件 ProtParam tool 预测, 结果为, AaJAZ5 蛋白的分子质量为 20.57 kD, 等电点是 9.52, 分子式为 $\text{C}_{897}\text{H}_{1458}\text{N}_{256}\text{O}_{286}\text{S}_5$, 带负电荷的残基 (Asp+Glu): 19, 带正电荷的残基 (Arg+Lys): 27, 不稳定系数为 61.59, 说明该蛋白属于不稳定蛋白; AaJAZ6 蛋白的分子质量为 33.48 kD, 等电点是 8.94, 分子式为

C₁₄₆₀H₂₃₁₅N₄₁₁O₄₆₅S₁₃, 带负电荷的残基 (Asp+Glu): 24, 带正电荷的残基 (Arg+Lys): 28, 不稳定系数为 45.58, 说明该蛋白也属于不稳定蛋白。

1.2 保守结构预测 使用 NCBI 预测的 AaJAZ5 蛋白的保守结构域为位于 C 端 154~178 之间的 24 个氨基酸的 Jas (CCT_2) 结构域 (pfam09425) 和位于 N 端 94~120 之间的 26 个氨基酸的 ZIM (TIFY) 结构域 (pfam06200); AaJAZ6 蛋白的保守结构域为位于 C 端 268~292 之间的 24 个氨基酸的 Jas (CCT_2) 结构域 (pfam09425) 和位于 N 端 144~175 之间的 31 个氨基酸的 ZIM (TIFY) 结构域 (pfam06200)。

1.3 氨基酸序列比对分析 将 AaJAZ5 和 AaJAZ6 氨基酸序列与已报道的 4 条青蒿 JAZ、12 条拟南芥 JAZ、3 条烟草 JAZ、以及一条单子叶植物水稻 JAZ1 和一条药用植物丹参 JAZ3 序列进行氨基酸序列比对分析。结果显示 AaJAZ5 和 AaJAZ6 均含有与其他物种中鉴定出的 JAZ 氨基酸序列中的保守结构域 ZIM 和 Jas (图 1)。其中位于 N 端的 ZIM 结构域包含比较保守的 TIFY 序列, 在 JAZ5/6 的保守结构域的预测中 ZIM (TIFY) 基序位于其 N 端的 26 个氨基酸的位置相吻合, 其主要功能是结合 JAZ 形成同源或异源二聚体^[20]; 而位于 C 端的 Jas (CCT_2) 结构域的位置也相吻合, 其主要功能是结合 JA 受体 COI1 或 JA 信号通路中的转录因子 MYC2 等^[21]。

1.4 二级结构预测 在 Predict Protein 上预测两个蛋白的二级结构。其结果显示 AaJAZ5 蛋白中 α -螺旋和无规卷曲是其主要结构元件, α -螺旋占 33.51%, 无规卷曲占 53.19%, 延伸链 13.3%; AaJAZ6 蛋白中 α -螺旋和无规卷曲也是其主要结构元件, α -螺旋占 22.96%, 无规卷曲占 60.38%, 延伸链 16.67%。

1.5 系统进化树分析 从 NCBI blastp 的比对结果中选取来源于其他植物的 26 条 JAZ 氨基酸序列构建系统进化树 (图 2)。从图 2 中可以看出 AaJAZ5 与拟南芥 JAZ10 同源性较高, 位于同一分支上; 而 AaJAZ6 与青蒿 JAZ1~JAZ4 明显位于另外一个分支上, 暗示 AaJAZ5 可能与青蒿其他 5 个 JAZ 在功能上有分化。

2 AaJAZ5 和 AaJAZ6 表达分析

采用实时荧光定量 PCR 分析了 AaJAZ5 和

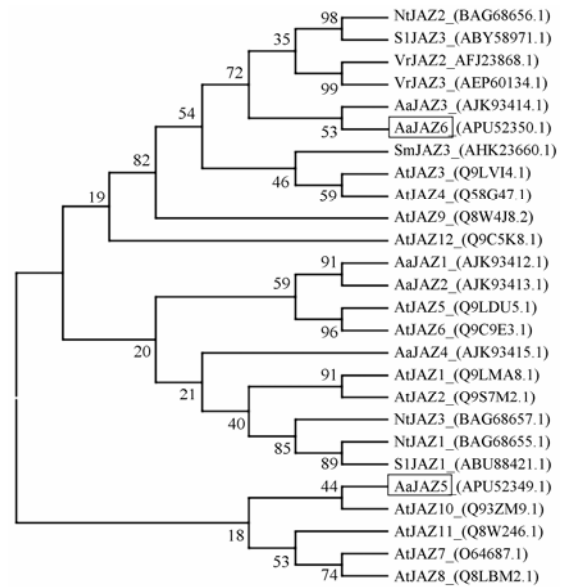


Figure 2 Phylogenetic tree analysis of AaJAZ5/AaJAZ6 proteins with other plant JAZ proteins. Aa: *Artemisia annua*; At: *Arabidopsis thaliana*; Nt: *Nicotiana tobaccum*; Sl: *Solanum lycopersicum*; Sm: *Salvia miltiorrhiza*; Vr: *Vitis rupestris*

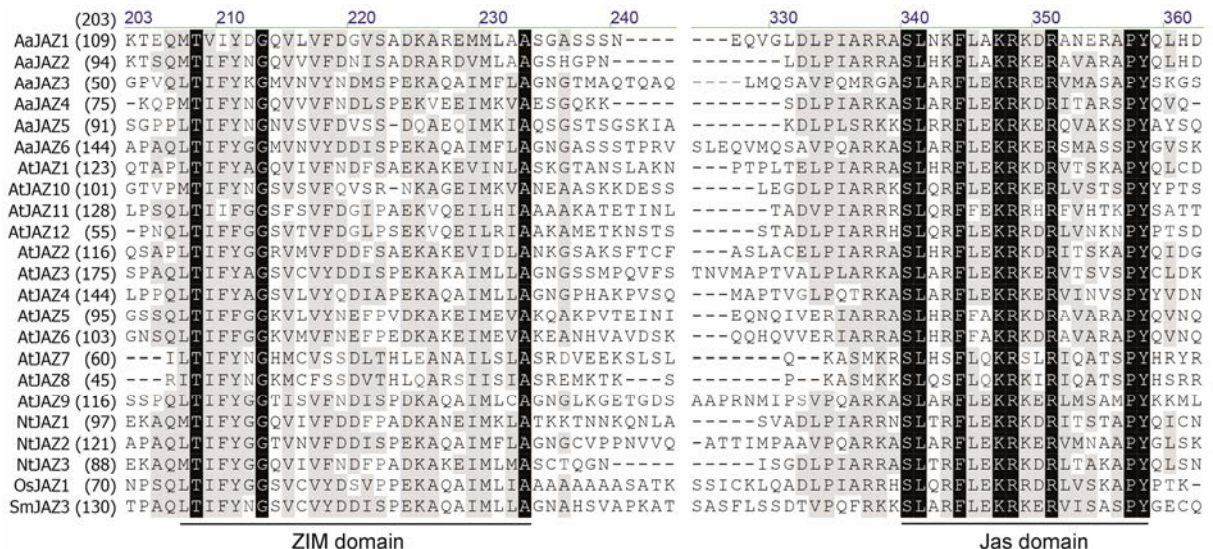


Figure 1 Multiple alignments of JAZ proteins from different plants. Aa: *Artemisia annua*; At: *Arabidopsis thaliana*; Nt: *Nicotiana tobaccum*; Os: *Oryza sativa*; Sm: *Salvia miltiorrhiza*

AaJAZ6 的组织表达和诱导表达模式。*AaJAZ5* 在青蒿根、茎、叶和花中均有表达 (图 3A)。*AaJAZ5* 在青蒿叶中表达量最高, 约为其他组织中表达量的 2.5 倍; 在青蒿根、茎、花中, 该基因表达量没有显著性差异 (图 3A)。在未经 MeJA 处理的青蒿中, *AaJAZ5* 表达水平较低; 经 MeJA 处理 0.5 h 后, 其表达量急剧上升; 1 h 后, *AaJAZ5* 表达量达到最高, 提高了约 140 倍; 3 h 后, *AaJAZ5* 表达量开始回调, 但仍然显著性高于处理前 (图 3B)。*AaJAZ5* 在机械伤害处理 0.5 和 1 h 后, 其表达量没有显著性变化; 机械伤害 3~6 h 后, 其表达量得到显著性提高, 提高 7.5 倍 (图 3C)。这些结果表明 *AaJAZ5* 快速响应 MeJA, 较慢响应机械伤害; MeJA 极大幅度诱导 *AaJAZ5* 表达, 机械伤害中等程度诱导 *AaJAZ5* 表达。

AaJAZ6 在青蒿根、茎、叶和花中均有表达 (图 3D)。*AaJAZ6* 在青蒿茎中表达量最低, 在根、叶、花中该基因表达量没有显著性差异 (图 3D)。在未经 MeJA 处理的青蒿中, *AaJAZ6* 表达水平较低; 经 MeJA 处理 0.5 h 后, 其表达量出现上升; 1 h 后, *AaJAZ6* 表达量达到最高, 提高了 19 倍以上; 3 h 后, *AaJAZ6* 表达量开始回调, 但仍然显著性高于处理前 (图 3E)。*AaJAZ6* 在机械伤害处理 0.5 h 后, 其表达量显著性提高; 1 h 后, 其表达量大幅度提高; 3 h 后, 其表达量达

到最高, 提高了 120 倍; 随后其表达量有所降低, 但仍远高于伤害前 (图 3F)。这些结果表明 *AaJAZ6* 较慢响应 MeJA, 快速响应机械伤害; MeJA 能中等程度诱导 *AaJAZ6* 表达, 机械伤害能大幅度诱导 *AaJAZ6* 表达。

3 *AaJAZ5/AaJAZ6* 与 *AaMYC2/AaCOI1* 的相互作用

采用 BiFC 在烟草细胞中研究了 *AaJAZ5/AaJAZ6* 与 *AaMYC2/AaCOI1* 的相互作用。在白光条件下, 没有检测到任何荧光信号, 但是能够呈现出清晰的细胞形态和边界。在激发光条件下, 同时表达 *AaJAZ5-YFP^C+AaMYC2-YFP^N* 的烟草细胞中检测到强烈的绿色荧光; 同时表达 *AaJAZ6-YFP^C+AaMYC2-YFP^N* 的烟草细胞中也检测到强烈的绿色荧光, 表明 *AaJAZ5* 和 *AaJAZ6* 都能够与 *AaMYC2* 相互作用 (图 4A)。在白光和激发光融合成像中, 荧光信号符合定位于细胞核的特征, 表明 *AaJAZ5* 和 *AaJAZ6* 与 *AaMYC2* 的相互作用发生在细胞核。

在激发光条件下, 同时表达 *AaJAZ5-YFP^C+AaCOI1-YFP^N* 的烟草细胞中检测到强烈的绿色荧光; 在同时表达 *AaJAZ6-YFP^C+AaCOI1-YFP^N* 的烟草细胞中没有检测绿色荧光, 表明只有 *AaJAZ5* 能够与 *AaCOI1* 相互作用 (图 4B)。在白光和激发光融合成

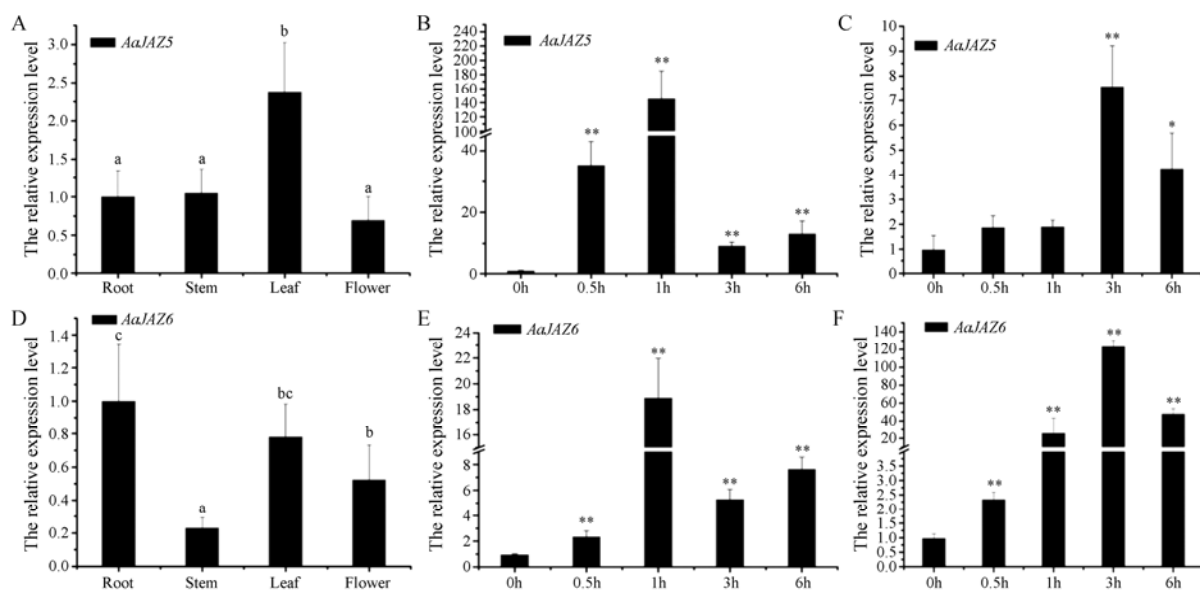


Figure 3 Relative expression levels of *AaJAZs* of *Artemisia annua*. A: *AaJAZ5* gene relative expression in different tissues; B: The relative expression level of *AaJAZ5* after treatment with MeJA in *Artemisia annua*; C: The relative expression level of *AaJAZ5* after treatment with wounding in *Artemisia annua*; D: *AaJAZ6* gene relative expression in different tissues; E: The relative expression level of *AaJAZ6* after treatment with MeJA in *Artemisia annua*; F: The relative expression level of *AaJAZ6* after treatment with wounding in *Artemisia annua*. The same letters represent the difference was not significant, and different letters represent the significant difference at the level of $P < 0.05$ given by one-way analysis variance (ANOVA) using SPSS 16.0 software; * Represents the significant difference at the level of $P < 0.05$ and ** Indicates the significant difference at the level of $P < 0.01$, given by *t*-test

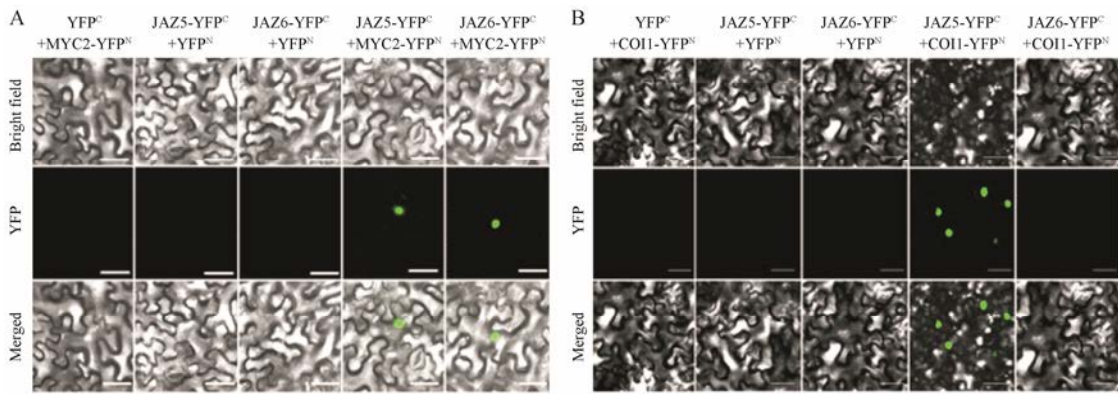


Figure 4 Either AaJAZ5 or AaJAZ6 interact with transcription factors of AaMYC2 and AaCOI1, respectively. A: AaJAZ5 or AaJAZ6 interact with transcription factors of AaMYC2; B: AaJAZ5 or AaJAZ6 interact with transcription factors of AaCOI1; Scale bar = 20 μm

像中, 荧光信号符合定位于细胞核的特征, 表明 AaJAZ5 与 AaCOI1 的相互作用发生在细胞核。BiFC 结果表明, AaJAZ5 和 AaJAZ6 两者都能够与正调控青蒿素生物合成的 AaMYC2 相互作用, 而只有 AaJAZ5 与 JA 受体 AaCOI1 有相互作用。

讨论

JAZ 作为 JA 信号途径中的抑制因子, 与 SCF^{COI1} 复合体结合激活 MYC2 调控 JA 信号通路中下游响应基因的表达^[13, 14]。喷施 MeJA 能够大幅度提高青蒿素含量, 这是由于青蒿中的 MeJA 响应转录因子如 MYC2、ORA 和 ERF 等经 MeJA 诱导后进一步上调青蒿素生物合成途径基因的表达所致。其中青蒿 MYC2 (AaMYC2) 是 JA 信号介导调控青蒿素超量积累最为重要的转录因子^[15]。随着对 JA 信号转导机制的解析, 发现 JAZ、COI1 和 MYC2 共同组成 JA 信号转导的核心元件。本研究得到的 AaJAZ5 和 AaJAZ6 的氨基酸序列中均具有保守的 ZIM 结构域和 Jas 结构域, 与已经报道的青蒿和拟南芥的 JAZ 家族成员的基本特征相符合^[22, 23]。但是进化树分析表明 AaJAZ5 与青蒿其他几个 JAZ 位于不同的分支上, 暗示青蒿的 JAZ 家族基因也存在着功能分化。随后的组织表达谱分析发现 AaJAZ5 和 AaJAZ6 具有不同的组织表达模式。而在诱导表达模式上, AaJAZ5 和 AaJAZ6 具有一定相似性: 外源 MeJA 和机械伤害处理, AaJAZ5 和 AaJAZ6 基因表达水平均显著提高, 这与拟南芥 JAZ 响应外源 MeJA 和机械伤害的报道一致^[22, 24]。然而在 MeJA 和机械伤害处理后, AaJAZ5 和 AaJAZ6 的表达存在明显差异, 出现了功能分化: AaJAZ5 是快速响应 MeJA 信号的 JAZ 基因; 而 AaJAZ6 是快速响应机械损伤的 JAZ 基因; 两者在对 JA 和机械损伤信号响应中具有一定程度的功能互补。JAZ 基因家族不同成员的功能

分化和冗余在拟南芥中也有相关报告^[12]。

基于 BiFC 发现 AaJAZ5 和 AaJAZ6 都能够与 AaMYC2 相互作用, 与已报道的其他 4 个青蒿 JAZ 与 AaMYC2 均有相互作用的结果一致^[15], 意味着 AaJAZ5 和 AaJAZ6 通过与 AaMYC2 相互作用影响 JA 调控青蒿素生物合成基因的表达。由于 JAZ 是负调控蛋白, 其与 AaMYC2 的相互作用的后果是导致 AaMYC2 对青蒿素生物合成基因的转录调控作用减弱。在 JA 信号作用下, JAZ 受到诱导后表达量大幅度提高, 其进一步与 COI1 蛋白结合形成 SCF^{COI1/JAZ} 复合体, JAZ 被降解后释放 MYC2 去激活下游相关基因表达^[9-12, 25]。在本文鉴定的两个 JAZ 中, 只有 AaJAZ5 既能与青蒿 COI1 (AaCOI1) 相互作用又能与 AaMYC2 相互作用。但是这并不能充分证明 AaJAZ5 在调控青蒿素生物合成中具有更重要的作用。在模式植物拟南芥中, 研究人员发现并不是所有能与 MYC2 相互作用的 JAZ 都能与 COI1 相互作用^[14]。然而, 除了使用 BiFC 证明 AaJAZ5 能与 AaCOI1 结合, 而 AaJAZ6 不能与 AaCOI1 相互作用之外, 对 AaJAZ5 和 AaJAZ6 的氨基酸序列的进化树分析、组织表达谱分析和诱导表达谱分析均表明 AaJAZ5 和 AaJAZ6 可能存在着功能分化。例如进化树分析表明 AaJAZ5 和青蒿其他 5 个 JAZ 明显不在同一分支上, AaJAZ5 与拟南芥 JAZ10 具有较高同源性, 而现有研究表明拟南芥 JAZ10 是 JAZ 家族中一个重要成员, 不仅介导了 JA 信号转导还与 JA 信号与其他信号途径的相互影响有密切关系。另外拟南芥 JAZ10 还存在着多个可变剪切的版本^[21, 25], 从而在 JA 信号的负反馈调控中具有重要作用。

综上所述, 本研究从青蒿中克隆了两个新的 JAZ 基因家族成员, 表明青蒿 JAZ 家族成员存在着功能分化, AaJAZ5 可能是青蒿中真正参与 JA 信号转导通

路的主效基因, 对其在 JA 信号介导调控青蒿素生物合成的详尽生物学功能有待进一步深入研究。

References

- [1] Graham IA, Besser K, Blumer S, et al. The genetic map of *Artemisia annua* L. identifies loci affecting yield of the anti-malarial drug artemisinin [J]. *Science*, 2010, 327: 328–331.
- [2] Weathers PJ, Elkholy S, Wobbe KK. Artemisinin: the biosynthetic pathway and its regulation in *Artemisia annua*, a terpenoid-rich species [J]. *In vitro Cell Dev Biol-Plant*, 2006, 42: 309–317.
- [3] Jing F, Zhang L, Li M, et al. Abscisic acid (ABA) treatment increases artemisinin content in *Artemisia annua* by enhancing the expression of genes in artemisinin biosynthetic pathway. [J]. *Biologia*, 2009, 64: 319–323.
- [4] Xiang L, Zhu S, Zhao T, et al. Enhancement of artemisinin content and relative expression of genes of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* by exogenous MeJA treatment [J]. *Plant Growth Regul*, 2015, 75: 435–441.
- [5] Banyai W, Mii M, Supaibulwatana K. Enhancement of artemisinin content and biomass in *Artemisia annua* by exogenous GA3 treatment [J]. *Plant Growth Regul*, 2011, 63: 45–54.
- [6] Guo XX, Yang XQ, Yang RY, et al. Salicylic acid and methyl jasmonate but not Rose Bengal enhance artemisinin production through invoking burst of endogenous singlet oxygen [J]. *Plant Sci*, 2010, 178: 390–397.
- [7] Irfanqureshi M, Israr M, Abdin M, et al. Responses of *Artemisia annua* L. to lead and salt-induced oxidative stress [J]. *Environ Exp Bot*, 2005, 53: 185–193.
- [8] Tian J, Liu Y, Fang MF. Review on the influence of jasmonates on medicinal plant secondary metabolism [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2015, 27: 185–190.
- [9] Vanholme B, Grunewald W, Bateman A, et al. The tify family previously known as ZIM [J]. *Trends Plant Sci*, 2007, 12: 239–244.
- [10] Browse J. Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2009, 60: 183–205.
- [11] Pauwels L, Barbero GF, Geerincx J, et al. NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling [J]. *Nature*, 2010, 464: 788–791.
- [12] Pauwels L, Goossens A. The JAZ proteins: a crucial interface in the jasmonate signaling cascade [J]. *Plant Cell*, 2011, 23: 3089–3100.
- [13] Chico JM, Chini A, Fonseca S, et al. JAZ repressors set the rhythm in jasmonate signaling [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2008, 11: 486–494.
- [14] Shi M, Zhou W, Zhang J, et al. Methyl jasmonate induction of tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots is mediated by JASMONATE ZIM-DOMAIN repressor proteins [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 20919.
- [15] Shen Q, Lu X, Yan TX, et al. The jasmonate-responsive AaMYC2 transcription factor positively regulates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. *New Phytol*, 2016, 210: 1269.
- [16] Wang YX, Long SP, Zeng LX, et al. Enhancement of artemisinin biosynthesis in transgenic *Artemisia annua* L. by overexpressed HDR and ADS genes [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2014, 49: 1346–1352.
- [17] Long SP, Lu Y, Wang YX, et al. Enhancement of tropane alkaloids production in transgenic hair roots of *Atropa belladonna* by overexpressing endogenous genes AbPMT and AbH6H [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2013, 48: 243–249.
- [18] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25: 402–408.
- [19] Rensing SA, Lang D, Zimmer AD, et al. The physcomitrella genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants [J]. *Science*, 2008, 319: 64–69.
- [20] Chini A, Fonseca S, Chico JM, et al. The ZIM domain mediates homo- and heteromeric interactions between Arabidopsis JAZ proteins [J]. *Plant J*, 2009, 59: 77–87.
- [21] Melotto M, Mecey C, Niu Y, et al. A critical role of two positively charged amino acids in the Jas motif of Arabidopsis JAZ proteins in mediating coronatine- and jasmonoyl isoleucine-dependent interactions with the COII F-box protein [J]. *Plant J*, 2008, 55: 979–988.
- [22] Kazan K, Manners JM. JAZ repressors and the orchestration of phytohormone crosstalk [J]. *Trends Plant Sci*, 2012, 17: 22–31.
- [23] Perez AC, Durand AN, Bossche RV, et al. The non-JAZ TIFY protein TIFY8 from *Arabidopsis thaliana* is a transcriptional repressor [J]. *PLoS One*, 2014, 9: e84891.
- [24] Chung HS, Koo AJ, Gao X, et al. Regulation and function of Arabidopsis Jasmonate ZIM-domain genes in response to wounding and herbivory [J]. *Plant Physiol*, 2008, 146: 952–964.
- [25] Fonseca S, Chini A, Hamberg M, et al. (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate [J]. *Nature Chem Biol*, 2009, 5: 344.