

MeJA响应的人参*PgJAZ1*基因克隆、表达与功能分析

张儒^{1,2*} 谭时泉¹ 张变玲¹ 王媛媛¹ 曹颖¹ 胡颖婕¹¹湖南工程学院材料与化工学院, 湘潭 411104; ²湖南师范大学生命科学学院, 长沙 410081

摘要 茉莉酸类(jasmonates, JAs)是调控人参皂苷等次生代谢产物生物合成的重要激素, JAZ(jasmonate ZIM-domain)蛋白是茉莉酸信号途径中的重要调控因子。为了探究人参皂苷生物合成与JAZ基因及茉莉酸信号调控之间的关系, 从新鲜4年生人参根中提取RNA, 以其反转录合成的cDNA为模板, 根据茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)诱导后的人参发根转录组测序结果筛选候选基因并设计引物, 利用PCR扩增人参JAZ基因的cDNA全长, 从基因组文库中克隆JAZ基因的启动子序列, 对其进行生物信息学分析, 采用荧光定量PCR(qRT-PCR)分析人参不同组织和发根中JAZ基因表达水平, 并测定MeJA诱导的人参发根中皂苷、内源性JA和MeJA的含量。克隆得到人参JAZ基因, 将其命名为*PgJAZ1*, 其序列完整开放阅读框(ORF)长度为702 bp, 编码233个氨基酸。氨基酸序列分析显示, 该蛋白包含TIFY和CCT2(Jas结构域)两个保守的功能结构域。系统进化分析显示, *PgJAZ1*与黄花蒿AaJAZ1亲缘关系最近。qRT-PCR结果显示, *PgJAZ1*在人参的根、叶、花及种子等部位中都有表达, 在花中表达水平最高, 而在不定根中表达水平最低。用MeJA和SA(salicylic acid)进行处理后发现, *PgJAZ1*受MeJA的诱导和SA的抑制, 且在MeJA诱导12 h内达到最高表达水平。启动子分析显示, *PgJAZ1*基因启动子中包含MeJA、SA和激素响应元件, 以及MYB、MYC和WRKY转录因子结合位点; MeJA诱导后的人参皂苷、内源性JA和MeJA含量与*PgJAZ1*表达水平高度一致。结果提示, *PgJAZ1*可能参与MeJA介导的人参皂苷生物合成。

关键词 人参; *PgJAZ1*基因; 功能分析; 茉莉酸类; 人参皂苷

Cloning, Expression and Functional Analysis of MeJA Responsive *PgJAZ1* Gene from *Panax ginseng*

ZHANG Ru^{1,2*}, TAN Shiquan¹, ZHANG Bianling¹, WANG Yuanyuan¹, CAO Ying¹, HU Yingjie¹¹College of Materials and Chemical Engineering, Hunan Institute of Engineering, Xiangtan 411104, China;²College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract JAs (jasmonates) are important phytohormones involved in regulating the biosynthesis of ginsenosides and other secondary metabolites. JAZ (jasmonate ZIM-domain) protein is a key regulator in jasmonate signaling pathway. In order to explore the relationships among ginsenoside biosynthesis, JAZ gene and jasmonic acid signal regulation in *Panax ginseng*, the RNA from fresh 4-year roots of *P. ginseng* was extracted and the syn-

收稿日期: 2021-06-22 接受日期: 2021-07-27

国家自然科学基金(批准号: 81874332)、湖南省自然科学杰出青年基金(批准号: 2020JJ2012)、湖南省教育厅优秀青年基金(批准号: 18B387)和中国博士后科学基金特别资助和面上资助项目(批准号: 2017T100601, 2016M590746)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0731-58680016, E-mail: zhangru2002@126.com

Received: June 22, 2021 Accepted: July 27, 2021

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81874332), the Provincial Natural Science Foundation of Hunan (Grant No.2020JJ2012), the Scientific Research Fund of Hunan Provincial Education Department (Grant No.18B387), and the Project Funded by China Postdoctoral Science Foundation (Grant No.2017T100601, 2016M590746)

*Corresponding author. Tel: +86-731-58680016, E-mail: zhangru2002@126.com

thesized cDNA was used as template. The candidate genes were screened and primers were designed based on the transcriptomic sequencing results of ginseng hairy roots induced by MeJA (methyl jasmonate). The full ORF (open reading frame) of *JAZ* gene was cloned by RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction). The promoter sequence of *JAZ* gene was cloned from genomic library and analyzed by bioinformatics. The expression pattern of *JAZ* gene in different tissues and hairy roots of *P. ginseng* were analyzed by qRT-PCR, and the contents of ginsenoside, endogenous JA and MeJA were determined in MeJA-induced hairy roots of *P. ginseng*. The full ORF of *JAZ* has 702 bp and encoded 233 amino acids, and it was designated as *PgJAZ1*. Sequence analysis showed that *PgJAZ1* protein contained two conserved domains TIFY and CCT2 (Jas domain). The phylogenetic analysis showed that *PgJAZ1* was closely related to *AaJAZ1* of *Artemisia annua*. qRT-PCR results showed that *PgJAZ1* was expressed in roots, leaves, flowers, seeds and hairy roots of *P. ginseng*. The expression level of *PgJAZ1* was the highest in flowers and the lowest in adventitious roots. In addition, *PgJAZ1* was induced by MeJA and inhibited by SA (salicylic acid), and its expression level reached the highest after treatment by MeJA for 12 h. The *PgJAZ1* promoter contained multiple putative cis-acting elements involved in MeJA, SA and hormone response, as well as binding sites of transcription factor such as MYB, MYC and WRKY. Ginsenosides content, endogenous jasmonates (JA and MeJA) induced by MeJA were highly consistent with *PgJAZ1* expression. These results suggest that *PgJAZ1* is involved in MeJA-mediated ginsenoside biosynthesis.

Keywords *Panax ginseng*; *PgJAZ1* gene; function analysis; jasmonates; ginsenoside

人参(*Panax ginseng*)是我国的名贵中药资源,是亚洲国家几千年来最有价值的传统药材之一,其发挥药效作用的主要成分是人参皂苷。迄今为止,已经分离并确定了结构的人参皂苷有100余种^[1],研究发现许多人参皂苷单体在抗肿瘤、抗衰老和增强免疫力等方面具有独特的药理作用,且其临床应用十分广泛^[2-4]。然而,野生的人参资源匮乏,人工种植的人参中人参皂苷含量低,使得优质人参产业化发展受到限制。高品质人参具有高含量的人参皂苷等药效成分,而人参皂苷的组成与含量受人参皂苷生物合成关键酶及相关基因的调节。研究发现,施加外源茉莉酸及其衍生物可以显著提高人参皂苷的含量,并增强人参对环境的适应能力^[5-6]。然而,外源茉莉酸类(jasmonates, JAs)通常会对细胞的生长产生抑制。因此,可通过在分子水平调节人参内源性JAs的合成,进而实现对人参皂苷生物合成代谢相关基因的调控,以提高人参皂苷的含量和药用价值。

JAs化合物是高等植物体内一种重要的信号分子,在植物生长发育、病虫害等生物胁迫和许多非生物胁迫过程中发挥重要调控作用^[7-9]。JAs在诱导人参皂苷生物合成中扮演十分重要的角色,已经被广泛应用于人参皂苷等药用植物次生代谢产物的诱导^[10-12]。*JAZ*(jasmonate ZIM-domain)蛋白不仅是茉莉酸信号途径的重要组分,也是调节JAs应答的关键因子。在正

常情况下,植物体内JAs含量很低,此时,*JAZ*蛋白抑制MYC等转录因子的活性,JAs响应基因的表达受到抑制,JA应答反应关闭。当受到外界胁迫时,JA信号通路被激活,JA合成量迅速增加,并转变为异亮氨酸(Ile)衍生物JA-Ile,该衍生物作为信号分子与COI1(coronatinsensitive 1)结合,*JAZ*蛋白被COI1结合并经过泛素化作用降解,使得转录因子被释放,从而启动JA应答基因的转录。在JA应答开启时,JAs激活*JAZ*蛋白的降解,同时*JAZ*基因表达也会被JAs诱导,使得受调控的转录因子活性处于比较合适的水平,从而保护植物体自身免于过于强烈的JA应答反应的伤害^[13-14]。*JAZ*蛋白家族成员众多,它们之间的功能存在很大差异^[15]。在丹参中发现的*JAZ*基因家族成员*SmJAZ1*和*SmJAZ2*均通过与*SmMYC2a*和*SmMYC2b*相互作用正向调节丹参酮和丹酚酸B的合成^[16],而*SmJAZ3*和*SmJAZ9*则负调控丹参酮的生物合成和JA信号通路^[17]。本研究基于MeJA诱导的人参转录组测序数据,对人参*PgJAZ1*基因进行克隆和分析,探索其表达模式,旨在解析*PgJAZ1*基因在人参皂苷合成与调控中的功能,为进一步利用基因技术提高人参皂苷含量奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

4年生新鲜人参(*P. ginseng*)根采自吉林抚松县;新

鲜人参根经发根农杆菌A4(*Agrobacterium rhizogenes* A4)诱导、筛选后得到人参发根; *Escherichia coli* DH5 α 为本实验室保存。

1.2 试剂及仪器

AMV反转录酶、SYBR[®] Premix Ex Taq[™]和Genomewalker试剂盒购自TaKaRa公司; Taq酶、DNA Marker、连接酶、质粒提取试剂盒和pEASY-T1克隆试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司; TRIzol试剂盒购自Invitrogen公司; Rb1、Rb2、Rc、Rd、Re、Rg1和Rg3对照品购自成都瑞芬思生物科技有限公司; JA和MeJA购自Sigma公司; 色谱级甲醇购自Tedia公司; 乙腈、甲酸为色谱纯; 其他试剂均为国产分析纯。

LC-MS 8050液相色谱质谱联用仪购自日本Shimadzu公司; 1290高效液相色谱仪购自美国Agilent公司; SCIEX-6500 QTRAP质谱仪(MS/MS)购自美国AB公司; T100 PCR仪、CFX Connect荧光定量PCR仪、SmartSpec Plus分光光度计、电泳仪和ChemiDoc MP全能型凝胶成像分析系统购自美国Bio-Rad公司; 5418型高速离心机购自德国Eppendorf公司。

1.3 RNA提取与cDNA克隆

RNA提取与反转录参考文献[18]中的方法。以oligo(dT)₁₈为引物, 利用RevertAid[™] First Strand cDNA合成试剂盒反转录合成cDNA第一链, 合成的cDNA于-20 °C保存备用。对MeJA诱导后的人参发根进行转录组测序, 根据基因差异表达结果筛选受MeJA显著诱导的候选JAZ基因, JAZ基因PCR扩增引物为JAZ-F: 5'-ATG TTC TTC AAC GGC CGG AAA T-3'; JAZ-R: 5'-CTA TAA GTT GAG ATC AAA CTG-3'。引物由南京金斯瑞生物科技公司合成。PCR扩增条件为: 94 °C预变性3 min; 94 °C变性30 s, 50 °C退火20 s, 72 °C延伸30 s, 35个循环; 72 °C延伸7 min。PCR产物送至上海铂尚生物技术有限公司测序。利用NCBI网站的BLAST程序与GenBank的dbEST数据库和蛋白数据库进行序列比对。采用NCBI在线工具CCD对PgJAZ1蛋白保守结构域进行分析和预测; 用SignalP 5.0 Server预测信号肽, 用TMHMM 2.0预测蛋白的跨膜结构域, 用ProtScale预测蛋白的亲水性及疏水性, 用Cell-PLoc 2.0预测蛋白的亚细胞定位^[19], 用Netphos3.1预测蛋白的磷酸化位点。使用MEGA7.02软件以邻接法(Neighbor-Joining, NJ)进行系统进化分析。

1.4 JAZ基因启动子克隆与分析

以人参根总DNA为模板, 按照Genomewalker

试剂盒说明书, 构建Dra I文库(DL1)、EcoR V文库(DL2)、Pvu II文库(DL3)和Stu I文库(DL4)^[20]。根据已克隆的人参PgJAZ1基因的5'端序列, 设计外侧和巢式特异性引物如下: GSP(gene specific primer) (5'-TGA TGC CAA GAT GAT TCA GAT GTT C-3'); GSP-Nest(5'-CTT TCA AGT AGT GGG TGA AGA GC-3')。引物由南京金斯瑞生物科技公司合成。分别以构建的4个启动子文库(DL1、DL2、DL3和DL4)为模板, 利用基因特异性外侧引物GSP与试剂盒中的外侧引物AP1(5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3')进行第一轮PCR扩增。将上述第一轮PCR产物稀释50倍, 再分别以基因特异性巢式引物GSP-Nest与试剂盒中提供的巢式引物AP2(5'-ACT ATA GGG CAC GCG TGG T-3')进行第二轮扩增。PCR扩增条件为: 94 °C预变性3 min; 94 °C变性30 s, 58 °C退火30 s, 72 °C延伸2 min, 35个循环; 最后72 °C延伸10 min。将PCR产物送至上海铂尚生物技术有限公司测序。将测序后获得的基因序列与PgJAZ1基因5'端重叠区序列进行比对。用Promoter Finder和Promoter Prediction Server等一系列生物学软件对获得的序列进行分析; 利用在线分析工具PlantCARE和PLACE预测克隆序列的顺式作用元件。

1.5 PgJAZ1基因表达相对定量分析

将人参发根在1/2MS液体培养基中于25 °C、110 r/min条件下暗培养21天, 以MeJA(100 μ mol/L)、SA(200 μ mol/L)、ABA(20 μ mol/L)或4 °C低温处理, 处理不同时间后分别取出发根, 将其用于RNA、人参皂苷、内源性JA和MeJA的提取。根据参考文献[18]中的方法提取4年生新鲜人参的主根、不定根、叶、花、种子以及发根中的RNA, 并对其进行反转录以获得cDNA。用于荧光定量分析的PgJAZ1基因上游引物F: 5'-GAG AGA CCT GCT GCA ATG GA-3', 下游引物R: 5'-GGG GGC ATG TTG AGG AAA GA-3'; 以 β -actin作为内参基因, 其上游引物F: 5'-TGC CCC AGA AGA GCA CCC TGT-3', 下游引物R: 5'-AGC ATA CAG GGA AAG ATC GGC TTG A-3'。用CFX Connect荧光定量PCR仪进行分析检测, 按照SYBR[®] Premix Ex Taq[™]荧光定量PCR试剂盒说明书进行扩增。反应体系: 12.5 μ L 2 \times SYBR Premix Ex Taq II, 0.5 μ L cDNA模板, 上游和下游引物(10 μ mol/L)各0.5 μ L, 补足ddH₂O至25 μ L。反应条件为: 95 °C预变性30 s; 95 °C变性40 s, 60 °C退火

30 s, 40个循环; 95 °C变性15 s, 60 °C退火1 min, 95 °C变性15 s。每个样品均具有3个重复, 反应结束后, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析*PgJAZ1*基因的表达模式。

1.6 人参皂苷、JA和MeJA的提取和测定

人参皂苷提取及测定参考文献[21-22]中的方法。取新鲜的人参组织或发根, 自来水清洗2 min后用ddH₂O清洗, 60 °C干燥至恒重。将其研磨成细粉, 用80%甲醇60 °C浸提, 料液比为1 g:40 mL, 超声波处理3次, 每次15 min; 60 °C水浴蒸干甲醇, 水洗超声溶解, 乙醚萃取2次, 取水相, 用水饱和正丁醇萃取, 收集正丁醇层。60 °C水浴蒸干正丁醇, 即得到人参总皂苷, 用适量的甲醇超声溶解, 定容至刻度, 过0.45 μm的微孔滤膜, 得到样品溶液。

HPLC测定条件为: LC-MS 8050高效液相色谱仪; 色谱柱为ACQUITY UPLC BEH Shield RP18柱(1.7 μm, 2.1 mm×50 mm); 流动相为乙腈(A):1%甲酸(B), 洗脱条件为A:B (10:90)~(25:75) 2 min; A:B (25:75) 2~8 min; A:B (25:75)~(45:55) 8~16.5 min; A:B (45:55) 16.5~21.5 min; A:B (45:55)~(98:2) 21.5~21.6 min; A:B (98:2) 21.6~25 min; A:B (98:2)~(10:90) 25~25.1 min; A:B (10:90) 25.1~29 min。流速为1.0 mL/min, 柱温为35 °C, 进样量为3 μL, 检测波长为202 nm。

将新鲜样品送至南京卡文思检测技术有限公司以测定JA和MeJA含量。取新鲜的人参组织或发根于液氮中研磨至细粉状, 再称取适量细粉并加入异丙醇-水-盐酸混合提取液中, 添加8 μL 1 μg/mL的内标溶液, 于4 °C振荡30 min; 加入二氯甲烷, 低温振荡30 min; 4 °C、13 000 r/min离心5 min, 取下层有机相; 避光, 以氮气吹干有机相, 以甲醇(0.1%

甲酸)复溶, 4 °C、13 000 r/min离心10 min, 取上清液过0.22 μm滤膜, HPLC-MS/MS检测。

液相测定条件: Agilent 1290色谱仪, 色谱柱为Poroshell 120 SB-C₁₈反相色谱柱(2.1 mm×150 mm, 2.7 μm); 柱温为30 °C; 流动相为A:B=(甲醇/0.1%甲酸):(水/0.1%甲酸); 洗脱梯度为0~1 min, A=20%; 1~9 min, A递增至80%; 9~10 min, A=80%; 10~10.1 min, A递减至20%; 10.1~15 min, A=20%; 进样体积为2 μL。

质谱条件: AB SCIEX-6500 QTRAP质谱仪, 电喷雾电离源(electrospray ionization, ESI)雾化温度为400 °C, 气帘气(curtain gas, CUR)为15 psi, 喷雾电压(ionspray voltage, IS)为4 500 V, 雾化气压力(Gas1)为65 psi, 辅助气压力(Gas2)为70 psi, 监测模式为多反应监测模式(multiple reaction monitoring, MRM), 每个离子对根据优化的去簇电压(declustering potential, DP)和碰撞能(collision energy, CE)进行扫描检测。

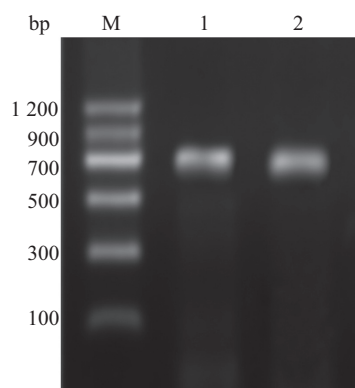
1.7 统计学分析

实验均重复3次, 实验数据以均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。差异显著性采用SPSS 17.0软件进行分析, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 *PgJAZ1*基因cDNA全长的克隆

提取新鲜的4年生人参根总RNA, 以反转录获得的cDNA为模板进行PCR, 产物琼脂糖凝胶电泳结果(图1)显示, PCR扩增出约700 bp的DNA条带。采用胶回收纯化该片段, 将其连接至pEASY-T1载体, 转化大肠杆菌*E. coli* DH5α, 挑取阳性克隆, 提取质粒, 并对其测序。



1、2: PCR产物; M: DNA Marker。

1,2: PCR product; M: DNA Marker.

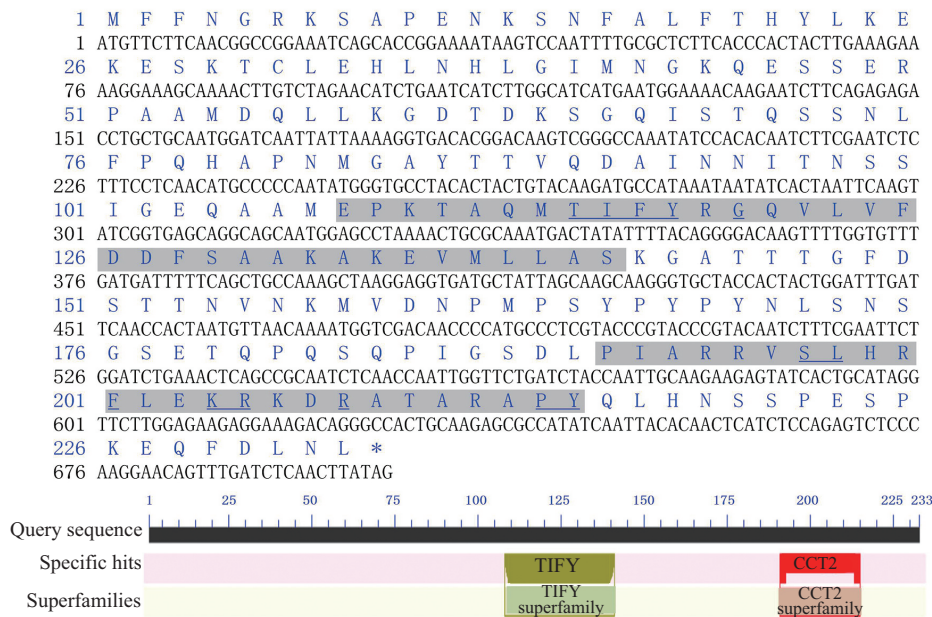
图1 *PgJAZ1*基因PCR扩增结果

Fig.1 The products of PCR amplification of *PgJAZ1* gene

2.2 PgJAZ1基因生物信息学分析

对测序的基因序列进行 ORF Finder 分析, 发现其 ORF 长度为 702 bp, 编码 233 个氨基酸。利用 NCBI 在线 CCD 分析工具对基因所编码蛋白的结构域进行预测 (图 2), 结果表明该蛋白在 108–141 和 191–215 氨基酸分别含有 TIFY 和 CCT2 两个保守的功能结构域, 这两个结构域是 JAZ 蛋白家族特有的结构, 因此该基因属于 JAZ 基因家族, 被命名为 *PgJAZ1* (*P. ginseng JAZ1*)。对其结构域进行深入分析发现, *PgJAZ1* 含有 JAZ 家族特有的 ZIM 结构域以

及 Jas 结构域^[23-25]。在 ZIM 结构域中含有 TIF[F/Y]XG 模体, Jas 结构域中含有 JAZ 家族具有的特征多肽序列: SLX2FX2KRX2RX5PY 模体^[12]。由 SignalP 5.0 Server 分析结果推测, *PgJAZ1* 基因编码蛋白不含信号肽, 不属于分泌蛋白。TMHMM 2.0 预测结果显示, *PgJAZ1* 蛋白不含有跨膜结构域, 不属于跨膜蛋白。ProtScale 预测结果显示, *PgJAZ1* 属于亲水性蛋白。Cell-PLoc 2.0 亚细胞定位分析结果表明, *PgJAZ1* 蛋白定位于细胞核中, 这与转录因子一般定位于细胞核中有关。磷酸化位点分析结果如图 3 所示,



阴影部分氨基酸: TIFY 和 CCT2 两个保守的功能结构域; 下划线部分氨基酸: 高度保守的氨基酸残基。* 代表终止密码子。

Shadow amino acids: two conserved functional domains of TIFY and CCT2; the underlined amino acids: highly conserved amino acid residues. * represents the stop codon.

图2 PgJAZ1蛋白序列和保守结构域分析

Fig.2 Analysis of PgJAZ1 protein sequence and conserved domains

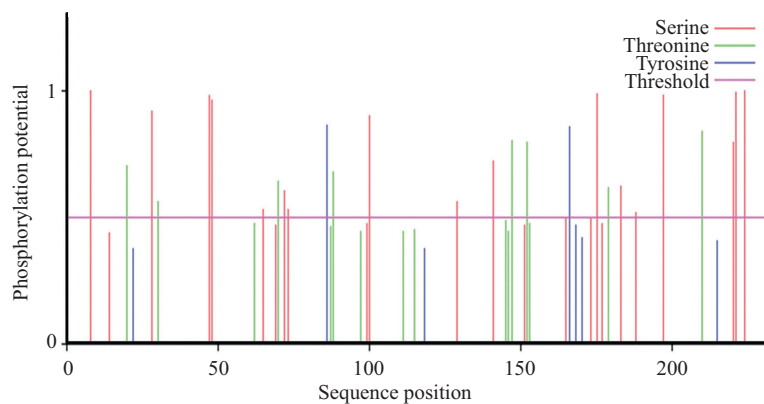


图3 PgJAZ1磷酸化位点分析

Fig.3 Phosphorylation site analysis of PgJAZ1

PgJAZ1含有多个磷酸化位点,其中丝氨酸磷酸化位点最多,并且PgJAZ1蛋白的磷酸化势能预测值大多在0.9以上,推测PgJAZ1的功能受磷酸化作用调控。

2.3 PgJAZ1同源进化分析

为探索PgJAZ1基因与其他植物同源基因间的进化关系,选取丹参(*Salvia miltiorrhiza*)、黄花蒿(*Artemisia annua*)、滇龙胆草(*Gentiana rigescens*)、长春花(*Catharanthus roseus*)、蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)、百脉根(*Lotus japonicus*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、马埃萨杉木(*Maesa lanceolata*)、水蜜桃(*Prunus persica*)、可可树(*Theobroma cacao*)、沙地葡萄(*Vitis rupestris*)、山茶树(*Camellia sinensis*)、番茄(*Solanum lycopersicum*)、红薯(*Ipomoea batatas*)、向日葵(*Helianthus annuus*)、捕蝇草(*Dionaea muscipula*)等10余种植物JAZ蛋白序列进行同源进化分析。进化树显示,PgJAZ1在进化上与黄花蒿AaJAZ1最为接近(图4)。

2.4 ProJAZ1启动子分析

利用Promoter Finder、Promoter Scan和Promoter Prediction Server等软件对PgJAZ1基因上游序列进行分析,结果表明,该序列为PgJAZ1基因的启动子序列,被命名为ProJAZ1。利用启动子分析工具PlantCARE和PLACE预测序列的顺式作用元件(图5)。ProJAZ1含有启动子核心元件TATA盒(TATA-box)、控制转录起始频率的启动子增强序列CAAT盒(CAAT-box)和高水平调控转录因子5'-UTR

Py-rich stretch元件。除了这些共同的顺式作用元件外,ProJAZ1启动子序列中还含有响应胁迫与激素等的MYB结合位点、MYC转录因子结合位点、WRKY转录因子结合位点(W-box)、SA响应元件(TCA-element)、激素响应元件(TGA-element)和MeJA响应元件(CGTCA-motif)。PgJAZ1基因是基于MeJA诱导的人参发根转录组测序结果筛选获得的,其表达受MeJA的诱导,分析发现ProJAZ1包含MeJA响应顺式作用元件,推测MeJA诱导过程与这些元件密切相关。

2.5 PgJAZ1基因组织特异性表达分析

利用qRT-PCR技术,以 β -actin基因为内参,分析了PgJAZ1基因在人参根、叶、花、种子和发根中的表达模式。结果表明,PgJAZ1基因在花中的表达量最高,是不定根的13.8倍,其次是主根,在叶、种子和发根中表达量最低。与PgJAZ1基因表达水平最低的不定根相比,花和主根中表达水平差异非常显著($P < 0.01$),叶和发根中表达水平差异显著($P < 0.05$),而种子中表达水平无显著变化(图6)。

2.6 不同胁迫下PgJAZ1基因表达模式

对培养21天的人参发根进行SA、MeJA、ABA和冷处理,处理后分别在0 h、12 h、24 h、48 h和72 h时取样,然后对PgJAZ1基因进行qRT-PCR分析。结果(图7)显示,经MeJA处理后,PgJAZ1基因表达水平立即增加,人参发根在处理后

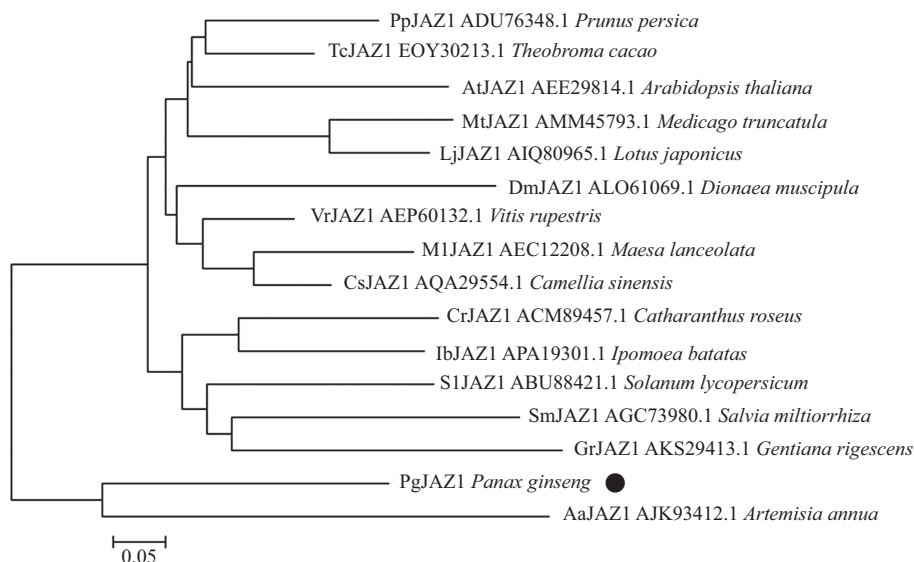
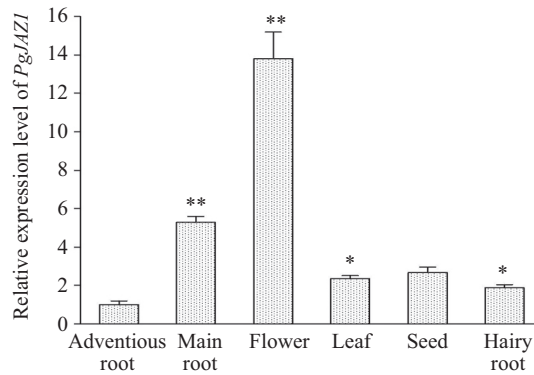


图4 人参与其他植物JAZ系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of JAZ from *P. ginseng* and other plants

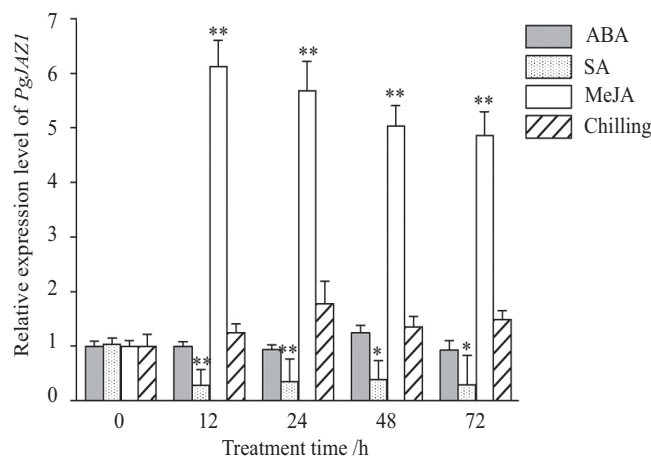


实验独立重复3次,数据以 $\bar{x}\pm s$ 形式表示。* $P<0.05$, ** $P<0.01$,与不定根中*PgJAZ1*基因表达水平相比。

Each point represents the $\bar{x}\pm s$ of three experiments independent. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with the *PgJAZ1* expression level in adventitious root.

图6 4年生人参的不同组织及发根中*PgJAZ1*基因表达水平

Fig.6 *PgJAZ1* gene expression levels in different tissues and hairy roots of 4-year *P. ginseng*



实验独立重复3次,数据以 $\bar{x}\pm s$ 形式表示。* $P<0.05$, ** $P<0.01$,与处理0 h的发根中*PgJAZ1*基因表达水平相比。

Each point represents the $\bar{x}\pm s$ of three experiments independent. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with the *PgJAZ1* expression level in hairy roots at 0 h after treatment.

图7 不同胁迫处理对人参发根中*PgJAZ1*基因表达的影响

Fig.7 Effects of different stress treatments on *PgJAZ1* expression in ginseng hairy roots

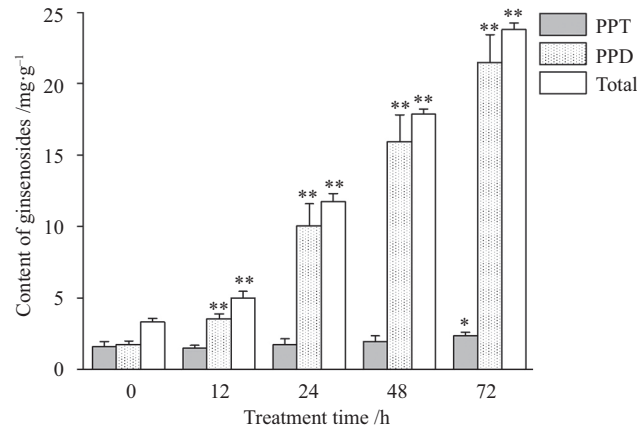
2.7 外源性MeJA对人参发根中人参皂苷含量的影响

以人参皂苷Rb1、Rb2、Rc、Rd、Re、Rg1和Rg3作为标准品测定样品中的PPD(protoanaxadiol)型、PPT(protoanaxatriol)型和总皂苷的含量。图8为在液体培养基中培养21天后的人参发根经100 $\mu\text{mol/L}$ MeJA处理不同时间后的人参皂苷含量。与对照组相比, MeJA诱导后, PPT型人参皂苷(Re和Rg1)含量未出现明显的增加,即使在72 h时,其含量为2.33 mg/g, 仅为对照的1.47倍。然而PPD型人参皂苷(Rb1、Rb2、Rc、Rd和Rg3)含量显著增加,与0 h相比,处理12 h、24 h、48 h和72 h后,其分别增加了2.01、5.74、9.10和12.27倍。在处理72 h后,总皂苷因为PPT型皂苷含

量的变化较小仅增加7.15倍。与之对应的是, *PgJAZ1*基因在MeJA处理后,其持续高水平的表达模式与PPD型人参皂苷的积累变化规律密切相关。基于上述qRT-PCR检测结果,推测*PgJAZ1*基因表达与人参皂苷的积累密切相关。

2.8 外源性MeJA对人参发根中JA和MeJA的影响

图9为用100 $\mu\text{mol/L}$ 外源性MeJA处理人参发根后,在不同诱导时间人参发根中内源性MeJA和JA含量分析结果。结果表明,外源性MeJA的加入,使得内源性JA和MeJA均出现急剧增加,其中JA含量分别增加了348、232、134和110倍, MeJA含量分别增加了778、708、672和650倍,两者的含量水平逐渐下降,但仍处于较高水平。相比而言, MeJA的

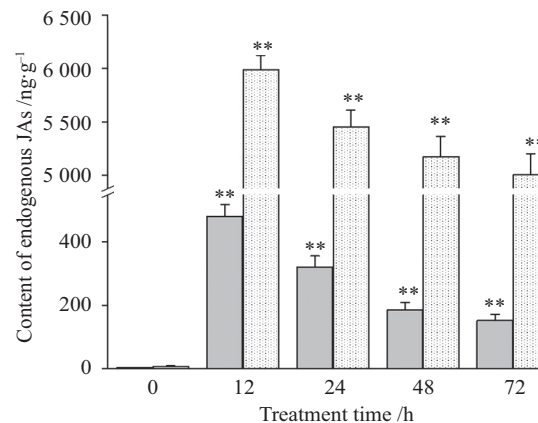


PPD: 原人参二醇型皂苷; PPT: 原人参三醇型皂苷。实验独立重复3次, 数据以 $\bar{x}\pm s$ 形式表示。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与处理0 h的发根中皂苷含量相比。

PPD: protopanaxadiol-type ginsenosides; PPT: protopanaxatriol-type ginsenosides. Each point represents the $\bar{x}\pm s$ of three experiments independent. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with the ginsenosides content in hairy roots at 0 h after treatment.

图8 外源MeJA处理对人参发根中人参皂苷含量的影响

Fig.8 The content of ginsenosides in hairy roots after MeJA treatment



实验独立重复3次, 数据以 $\bar{x}\pm s$ 形式表示。** $P<0.01$, 与处理0 h的发根中JA和MeJA含量相比。

Each point represents the $\bar{x}\pm s$ of three experiments independent. ** $P<0.01$ compared with the JA and MeJA contents in hairy roots at 0 h after treatment.

图9 外源MeJA处理对人参发根中JAs含量的影响

Fig.9 The content of endogenous JAs in hairy roots after MeJA treatment

下降趋势明显弱于JA。结果表明, MeJA激活了内源性JAs的合成, 并且内源性MeJA和JA的含量变化与PgJAZ1基因表达水平变化趋势一致, 进一步说明PgJAZ1基因与MeJA介导的人参皂苷生物合成与积累密切相关。

3 讨论

JA及其挥发性衍生物MeJA是植物体内重要的生物信息素, 是起整体性调控作用的植物生长调节物质, 也是植物受外界刺激后反应最快的植物激素。

JAs在植物信号转导和抗逆反应中发挥重要作用, 常作为外源性的诱导剂或信号物质, 以提高植物中的次生代谢产物^[17,26]。内源性JAs合成途径的激活对于应激信号的传递和放大是必不可少的, 其合成起始于细胞膜释放的 α -亚麻酸(α -linolenic acid), 在脂氧合酶(lipoxygenase, LOX)、丙二烯氧化物合酶(allylene oxide synthase, AOS)、丙二烯氧化物环化酶(allylene oxide cyclase, AOC)和12-氧-植物二烯酸还原酶(12-oxophytodienoic acid reductase, OPR)的催化下, 经过3个 β -氧化反应生成JA, JA再在茉莉酸羧基甲

基转移酶(jasmonic acid carboxyl methyltransferase, JMT)的催化下甲基化形成MeJA^[27]。JAZ蛋白是JA信号通路中的一种关键调控蛋白,抑制蛋白JAZ与转录因子MYC2结合,调控JA响应基因的表达,而且还能将JA的信号与其他信号相连接^[13]。

JAs作为一类非常重要的信号分子,在植物抗病、生长发育和次生代谢产物的生物合成中扮演着重要的角色。拟南芥*AtJAZ2*(JA早期应答基因)启动子含有一个G-box和5'-UTR Py-rich stretch,这些元件是MYC转录因子对茉莉酸依赖性激活和JAZ蛋白抑制所必需的,并且他们可以通过和MYC类转录因子结合来启动下游基因表达^[28]。长春花*ORCA3*基因启动子的茉莉酸反应元件在拟南芥中具有活性,受转录因子AtMYC2控制^[29]。这些研究结果暗示,*PgJAZ1*受MeJA的调节可能与*ProJAZ1*中MeJA响应元件有关。

研究发现,JAs的合成途径中所有基因包括*LOX*、*AOS*、*AOC*、*OPR*和*JMT*的转录均受JAs诱导,表明JAs的合成途径属于正反馈调控,包括调控JAs合成的*JAZ*基因亦受JAs的诱导^[30-31]。JA合成途径基因的过量表达又促进JA的合成,如番茄中的过表达*LeAOC*基因提升了花中JAs的含量^[32],这种正反馈回路使得信号效应逐级放大,进而诱导后续的反应。许多药用植物的药效成分含量很低,目前主要通过提高药效成分生物合成的一系列关键酶基因表达水平来调控整个代谢途径以增加目标产物的含量。鉴于JAs在植物体的重要性,因此通过内源JAs调控次生代谢产物生物合成途径中多个基因表达,进而提高目标次生代谢产物的合成与积累是一种可行的方式。与单纯加强代谢途径中单一或若干步骤中合成酶基因的表达相比,在转基因植物中过量表达信号分子和植物激素合成的关键酶基因,可能是一个更加有效的全面调控目标化合物合成的方法。特别是通过基因工程方法调控JAs生物合成途径,从而提高JAs的含量,使其从整体上调控受JAs诱导的目标次生代谢过程中多个关键酶基因的表达^[31]。

花是植物与外界环境信息传递的重要组织,在植物中的许多防御反应中非常重要。JAZ是茉莉酸合成途径中的重要调控因子,MeJA是JAs的重要衍生物,具有较强的挥发性,在茉莉酸信号转导中可以借助花通过空气传播而引起相关组织、器官和相邻植物间的防御反应^[33]。因此,*PgJAZ1*可能与花中

的茉莉酸信号传递有关。

为了能通过*JAZ*基因调控提高人参内源性JAs的含量,进而调节人参皂苷的合成与积累,我们基于MeJA诱导的转录组测序结果,克隆得到人参*PgJAZ1*基因cDNA,通过序列分析发现其编码序列包含JAZ蛋白家族的保守功能结构域TIFY和CCT2。此外,其保守氨基酸序列ZIM结构域中含有TIF[F/Y]XG模体,Jas结构域中含有JAZ蛋白家族的特征多肽序列:SLX2FX2KRX2RX5PY模体,由此我们推测*PgJAZ1*属于典型的*JAZ*家族基因。

人参是多年生植物,生长周期长,至少需要4~6年。大量的研究表明,4~6年生的人参中人参皂苷等活性成分的积累处于较高水平,且4年生人参作为实验对象有利于RNA等的提取,适合作为人参皂苷生物合成研究的材料^[5,20]。为了克服研究周期长等问题,我们以4年生新鲜人参根为材料,用农杆菌进行诱导获得人参发根,其生长周期仅为4周左右,且人参皂苷含量高,通常第4周为人参皂苷快速积累期,是体外研究人参皂苷生物合成的理想材料^[34]。为此,我们选取培养21天的人参发根作为实验材料,探讨*PgJAZ1*基因表达模式与JA信号、人参皂苷生物合成和积累的关系。我们发现*PgJAZ1*基因在人参根、叶、花、种子和发根中均有表达,在MeJA、SA、ABA和冷胁迫处理中,*PgJAZ1*基因主要受MeJA诱导而上调表达。组织表达分析亦显示,*PgJAZ1*基因主要在花中表达,而花是植物与外界进行信息交换的重要器官,结合*PgJAZ1*基因表达水平,我们推测*PgJAZ1*基因在人参应对外界胁迫的防御反应中起调控作用。研究发现,在表达*OsJAZ9*基因的水稻中,JA生物合成关键酶基因和标记基因如*OsAOS2*、*OsLOX5/7/8*、*OsJAO1*和*OsVSP2*的表达水平显著增加,JA合成水平提高^[35]。相似的是,在拟南芥中过表达*AtJAZ7*亦激活了JA信号^[36]。在烟草中,尼古丁生物合成也以COI1-JAZ依赖的方式受JA的诱导^[37]。在人参细胞、不定根和毛状根中,JAs诱导人参皂苷生物关键酶基因促进了人参皂苷的积累,且这些外源性的JAs也增加了内源JAs的生物合成^[38]。这些研究表明,*JAZ*、内源性JAs含量及合成相关基因表达与植物次生代谢产物含量密切相关,JAs通过调节茉莉酸生物合成介导细胞代谢和细胞周期进程的重编程。*PgJAZ1*基因表达水平与人参总皂苷、内源性JAs变化趋势一致。我们推断*PgJAZ1*在人参皂苷的

生物合成中亦扮演重要角色,是调节人参皂苷积累的重要基因。因此, *PgJAZ1* 是研究人参内源性JAs生物合成途径及其调控人参皂苷生物合成的重要目标基因。

参考文献 (References)

- [1] CHEN W, BALAN P, POPOVICH D G. Ginsenosides analysis of New Zealand-grown forest *Panax ginseng* by LC-QTOF-MS/MS [J]. *J Ginseng Res*, 2020, 44(4): 552-62.
- [2] PARK S Y, PARK J H, KIM H S, et al. Systems-level mechanisms of action of *Panax ginseng*: a network pharmacological approach [J]. *J Ginseng Res*, 2018, 42(1): 98-106.
- [3] HU M, YANG J, QU L, et al. Ginsenoside Rk1 induces apoptosis and downregulates the expression of PD-L1 by targeting the NF-kappaB pathway in lung adenocarcinoma [J]. *Food Funct*, 2020, 11(1): 456-71.
- [4] FAN S, ZHANG Z, SU H, et al. *Panax ginseng* clinical trials: current status and future perspectives [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 132: 110832.
- [5] LIU T, LUO T, GUO X, et al. PgMYB2, a MeJA-responsive transcription factor, positively regulates the dammarenediol synthase gene expression in *Panax ginseng* [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(9): 2219.
- [6] RAHIMI S, KIM Y J, SUKWEENADHI J, et al. *PgLOX6* encoding a lipoxygenase contributes to jasmonic acid biosynthesis and ginsenoside production in *Panax ginseng* [J]. *J Exp Bot*, 2017, 67(21): 6007-19.
- [7] WASTERNAK C, STRNAD M. Jasmonates are signals in the biosynthesis of secondary metabolites-pathways, transcription factors and applied aspects-a brief review [J]. *N Biotechnol*, 2019, 48: 1-11.
- [8] DELGADO C, MORA-POBLETE F, AHMAR S, et al. Jasmonates and plant salt stress: molecular players, physiological effects, and improving tolerance by using genome-associated tools [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(6): 3082.
- [9] WINGLER A, TIJERO V, MULLER M, et al. Interactions between sucrose and jasmonate signalling in the response to cold stress [J]. *BMC Plant Biol*, 2020, 20(1): 176.
- [10] HO T T, MURTHY H N, PARK S Y. Methyl jasmonate induced oxidative stress and accumulation of secondary metabolites in plant cell and organ cultures [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3): 716.
- [11] WANG K, ZHANG Z, LI S, et al. Transcriptome-wide analysis for ginsenoside Rb3 synthesis-related genes and study on the expression of methyl jasmonate treatment in *Panax ginseng* [J]. *Life*, 2021, 11(5): 387.
- [12] ALI M B, HAHN E J, PAK K Y. Methyl jasmonate and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolics in *Panax ginseng* bioreactor root suspension cultures [J]. *Molecules*, 2007, 12(3): 607-21.
- [13] CHINI A, FONSECA S, FERNANDEZ G, et al. The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling [J]. *Nature*, 2007, 448(7154): 666-71.
- [14] THINES B, KATSIR L, MELOTTO M, et al. JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling [J]. *Nature*, 2007, 448(7154): 661-5.
- [15] LI L, LIU Y, HUANG Y, et al. Genome-wide identification of the TIFY family in *Salvia miltiorrhiza* reveals that SmJAZ3 interacts with SmWD40-170, a relevant protein that modulates secondary metabolism and development [J]. *Front Plant Sci*, 2021, 12: 630424.
- [16] ZHOU Y, SUN W, CHEN J, et al. SmMYC2a and SmMYC2b played similar but irreplaceable roles in regulating the biosynthesis of tanshinones and phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 22852.
- [17] 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.
- [18] 张变玲, 黄雪梅, 刘心怡, 等. 人参查尔酮合成酶基因 *PgCHS1* 的克隆与表达分析 [J]. *中国细胞生物学学报* (ZHANG B L, HUANG X M, LIU X Y, et al. Cloning and expression analysis of chalcone synthase gene *PgCHS1* in *Panax ginseng* [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2018, 40(12): 2010-7.
- [19] CHOU K C, SHEN H B. Cell-PLoc: a package of Web servers for predicting subcellular localization of proteins in various organisms [J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(2): 153-62.
- [20] ZHANG R, ZHU J, CAO H Z, et al. Molecular cloning and expression analysis of PDR1-like gene in ginseng subjected to salt and cold stresses or hormonal treatment [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2013, 71: 203-11.
- [21] 张儒, 张变玲, 黄雪梅, 等. 镧对人参发根中皂苷积累及合成关键酶基因表达的影响 [J]. *中国稀土学报* (ZHANG R, ZHANG B L, HUANG X M, et al. Effects of lanthanum on accumulation of ginsenosides and expression of key enzymes genes of ginsenosides biosynthesis in hairy roots of *Panax ginseng* [J]. *Journal of the Chinese Society of Rare Earths*), 2019, 37(3): 361-70.
- [22] ZHANG R, TAN S Q, ZHANG B L, et al. Two key amino acids variant of alpha-L-arabinofuranosidase from *Bacillus subtilis* Str. 168 with altered activity for selective conversion ginsenoside Rg to Rd [J]. *Molecules*, 2021, 26(6): 1733.
- [23] CHUNG H S, HOWE G A. A critical role for the TIFY motif in repression of jasmonate signaling by a stabilized splice variant of the JASMONATE ZIM-domain protein JAZ10 in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2009, 21(1): 131-45.
- [24] 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 COI1 F-box protein [J]. *Plant J*, 2008, 55(6): 979-88.
- [25] BAI Y, MENG Y, HUANG D, et al. Origin and evolutionary analysis of the plant-specific TIFY transcription factor family [J]. *Genomics*, 2011, 98(2): 128-36.
- [26] DE GEYTER N, GHOLAMI A, GOORMACHTIG S, et al. Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism [J]. *Trends Plant Sci*, 2012, 17(6): 349-59.
- [27] CHEONG J J, CHOI Y D. Methyl jasmonate as a vital substance in plants [J]. *Trends Genet*, 2003, 19(7): 409-13.
- [28] FIGUEROA P, BROWSE J. The *Arabidopsis* JAZ2 promoter contains a G-Box and thymidine-rich module that are necessary and sufficient for jasmonate-dependent activation by MYC transcription factors and repression by JAZ proteins [J]. *Plant Cell Physiol*, 2012, 53(2): 330-43.

- [29] MONTIEL G, ZAREI A, KORBES A P, et al. The jasmonate-responsive element from the ORCA3 promoter from *Catharanthus roseus* is active in *Arabidopsis* and is controlled by the transcription factor AtMYC2 [J]. *Plant Cell Physiol*, 2011, 52(3): 578-87.
- [30] LI W, LI W, YANG S, et al. Transcriptome and metabolite joint analysis reveals that exogenous methyl jasmonate regulates monoterpene synthesis in grape berry skin [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(18): 5270-81.
- [31] 蒋科技, 皮妍, 侯嵘, 等. 植物内源茉莉酸类物质的生物合成途径及其生物学意义[J]. *植物学报* (JIANG K J, PI Y, HOU R, et al. Jasmonate biosynthetic pathway: its physiological role and potential application in plant secondary metabolic engineering [J]. *Chinese Bulletin of Botany*), 2010, 45(2): 137-48.
- [32] MIERSCH O, WEICHERT H, STENZEL I, et al. Constitutive overexpression of allene oxide cyclase in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Lukullus) elevates levels of some jasmonates and octadecanoids in flower organs but not in leaves [J]. *Phytochemistry*, 2004, 65(7): 847-56.
- [33] TAMOGAMI S, RAKWAL R, AGRAWAL G K. Interplant communication: airborne methyl jasmonate is essentially converted into JA and JA-Ile activating jasmonate signaling pathway and VOCs emission [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 376(4): 723-7.
- [34] ZHANG R, ZHANG B L, LI G C, et al. Enhancement of ginsenoside Rg1 in *Panax ginseng* hairy root by overexpressing the alpha-L-rhamnosidase gene from *Bifidobacterium breve* [J]. *Biotechnol Lett*, 2015, 37(10): 2091-6.
- [35] SINGH A P, PANDEY B K, MEHRA P, et al. *OsJAZ9* overexpression modulates jasmonic acid biosynthesis and potassium deficiency responses in rice [J]. *Plant Mol Biol*, 2020, 104(4/5): 397-410.
- [36] THATCHER L F, CEVIK V, GRANT M, et al. Characterization of a JAZ7 activation-tagged *Arabidopsis* mutant with increased susceptibility to the fungal pathogen *Fusarium oxysporum* [J]. *J Exp Bot*, 2016, 67(8): 2367-86.
- [37] SHOJI T, OGAWA T, HASHIMOTO T. Jasmonate-induced nicotine formation in tobacco is mediated by tobacco COI1 and JAZ genes [J]. *Plant Cell Physiol*, 2008, 49(7): 1003-12.
- [38] KIM O T, BANG K H, KIM Y C, et al. Upregulation of ginsenoside and gene expression related to triterpene biosynthesis in ginseng hairy root cultures elicited by methyl jasmonate [J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2009, 98: 25-33.