

• 药材与资源 •

白木香 JAZ1 基因全长 cDNA 克隆及其在愈伤组织中的伤害诱导表达分析

廖永翠^{1*}, 章文春¹, 魏建和², 黄磊³

1. 江西中医药大学中医学院生命科学院, 江西 南昌 330004

2. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

3. 中共凉山州喜德县党委组织部, 四川 喜德 616750

摘要: 目的 克隆国产沉香基原植物白木香 *Aquilaria sinensis* 茉莉酸 (JA) 信号途径核心抑制蛋白基因 (jasmonate-zim-domain protein, JAZ), 为深入研究其在沉香倍半萜合成途径中的功能奠定基础。方法 以白木香总 RNA 为模板, 采用 RACE 法和 RT-PCR 方法, 克隆 JAZ 基因 cDNA 全长, 并进行生物信息学的分析; 采用实时荧光定量 (qRT-PCR) 方法分析经茉莉酸甲酯 (MeJA) 和机械伤害处理的白木香愈伤组织中 JAZ 基因的表达模式。结果 获得白木香 JAZ 基因全长 cDNA, 命名为 AsJAZ1, GenBank 登录号为 KP677281。序列分析表明, 该基因的序列全长为 1 507 bp, 包含一个 990 bp 的开放阅读框, 编码 330 个氨基酸, 蛋白质相对分子质量为 34 280, 等电点为 6.89。qRT-PCR 结果显示, 经 MeJA 处理 0.5 h 后 AsJAZ1 基因相对表达量最高, 约是对照组 (未经 MeJA 处理的白木香愈伤组织) 的 27 倍, 随后显著下降; 经机械处理 2 h 后 AsJAZ1 基因相对表达量最高, 约是对照组 (未经机械处理的白木香愈伤组织) 的 17 倍, 随后又快速降低, 到 24 h 基本恢复正常。结论 获得 AsJAZ1 基因全长 cDNA 序列, 该基因对伤害诱导极敏感, 且能在伤害早期响应。

关键词: 白木香; AsJAZ1 基因; cDNA 快速末端扩增; 序列分析; 表达分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)13-3162-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.13.024

Full-length cDNA cloning of AsJAZ1 gene and damage-induced expression analysis in *Aquilaria sinensis* callusLIAO Yong-cui¹, ZHANG Wen-chun¹, WEI Jian-he², HUANG Lei³

1. College of Traditional Chinese Medicine & Life Science, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

3. CPC Liangshan Prefecture Xide County Party Committee Organization Department, Xide 616750, China

Abstract: Objective To clone the full-length cDNA of jasmonate-zim-domain protein (JAZ) gene in *Aquilaria sinensis* to provide the basic information for further study on gene function in sesquiterpenes biosynthesis pathway. **Methods** With the total RNA as template, the full-length cDNA of JAZ in *A. sinensis* was cloned through rapid amplification of cDNA ends (RACE) technique and reverse transcription PCR (qRT-PCR) method. The bioinformatics of the JAZ gene was analyzed as well. The expression of this gene was detected by qRT-PCR method with MeJA and mechanical wounding treatment in *A. sinensis* callus. **Results** The full-length cDNA (1 507 bp) of JAZ gene was named AsJAZ1; GenBank registration number was KP677281. AsJAZ1 was obtained with an open reading frame (ORF) of 990 bp and encoding 330 amino acids. The relative molecular mass of AsJAZ1 calculated was 34 280, and the isoelectric point was 6.89. Real time PCR results indicated that both MeJA treatment and mechanical wounding could stimulate the increase of mRNA expression of AsJAZ1; There was a sharp rise at 0.5 h with about 27 times higher than the control (without MeJA treatment) with MeJA treatment, then dropped significantly. In mechanical wounding treatment, the highest peak presented in 2 h about 17 times compared to the control, then dropped significantly too. The expression of AsJAZ1 gene returned to be normal in 24 h. **Conclusion** We have obtained the full-length cDNA sequence of AsJAZ1 gene firstly, which was extremely sensitive to wounding and responded to the early damage.

Key words: *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg; AsJAZ1; rapid amplification of cDNA ends; sequence analysis; expression analysis

收稿日期: 2019-01-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81173481); 国家自然科学基金资助项目 (31100220); 国家自然科学基金资助项目 (31000136); 江西省卫计委中医药科研课题 (2016A033)

*通信作者 廖永翠 (1985—), 女, 讲师, 研究方向为诱导型药用植物形成机制研究。Tel: (0791)87118937 E-mail: liao.yong.cui@163.com

白木香 *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg 又称土沉香, 是我国生产名贵芳香类药材沉香的唯一正品植物来源^[1], 属瑞香科沉香属植物。沉香味辛、苦, 性微温, 具有行气止痛、温中止呕、纳气平喘等功效^[2]。白木香是一种典型的伤害诱导型药用植物, 其只有在受到伤害情况下才能产生沉香^[3-4], 且沉香的产生也被认为是白木香树防御反应的产物^[5]。沉香的化学主要组分是倍半萜类和苯乙基色酮类衍生物^[6-7]。沉香应用广泛, 市场需求量大; 但天然沉香的形成需要较长的周期, 且产量极低, 长期以来处于严重供不应求的现状。因此, 提高白木香结香的产量, 揭示沉香形成的机制迫在眉睫且至关重要; 现国内外一些专家学者陆续开展了沉香结香机制的研究^[8-10]。但至今为止, 沉香结香的机制未得到很好地诠释。

前期研究表明, 茉莉酸 (JA) 在诱导白木香结香的过程中扮演重要角色^[10-12], JA 是热诱导沉香倍半萜生物合成的关键信号分子^[13]。茉莉酸类物质 (JAs) 是植物内一种重要的植物激素, 是信号转导途径中远距离运输的重要信号分子, 依赖于 JA 作为调节反应信号的防御应答也是植物次生代谢物质积累的前提^[14-15]。JAZ (jasmonate ZIM-domain, JAZ) 蛋白 (JAZs) 是调节 JA 应答的关键因子。当植物未受到外界胁迫时, 体内的 JA 含量较低, JAZs 阻抑相应的转录因子, 如 MYC2、MYC3、MYC4 等的活性, 从而 JA 响应基因被抑制, 不能启动 JA 信号途径; 当受到外界胁迫时, 体内的 JA 含量迅速增加, JAZs 阻遏蛋白被 COI1 (coronatine-insensitive protein 1) 结合并通过 SCFCOI1/26S 蛋白酶体, 经泛素化作用降解, 转录因子被释放, 从而启动相应的 JA 应答基因的转录^[16]。JA 应答启动的同时, JAZs 也被诱导表达, 再次抑制转录因子的活性, 这种反馈调节的作用避免植物体产生过于猛烈的 JA 应答反应对本身的伤害^[17-19]。

本实验首次研究了白木香 JAZ1 (AsJAZ1) 基因 cDNA 全长的克隆及表达分析, 为进一步研究 AsJAZ1 蛋白的功能及揭示 JA 信号在沉香倍半萜形成中的作用机制奠定基础。前期的研究表明^[20], JA 信号途径中的 AsMYC2 转录因子是调控沉香倍半萜合成的核心转录因子, 研究 AsJAZ1 蛋白与 AsMYC2 转录因子之间的相互作用及调控沉香倍半萜生物合成的机制是下一步

研究的重点。

1 材料与试剂

1.1 材料

样品为中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所温室栽培的 4 年生白木香茎诱导产生, 生长良好且基本一致, 由中国医学科学院药用植物研究所魏建和研究员鉴定为白木香 *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg 愈伤组织。

1.2 试剂

植物总 RNA 提取试剂盒、DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒、TOP10 大肠杆菌菌株感受态细胞、克隆载体 pGM-T、pZeroBack/blunt 零背景连接试剂盒购于天根生化科技有限公司; GoldenTaq DNA 聚合酶购自北京泛基诺科技有限公司; SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech), 1×SYBR Premix 和 RNase-free DNase I 购自日本 TaKaRa 公司; 反转录试剂盒购自 Thermo Fisher Scientific 公司; 高纯度质粒提取试剂盒购自于北京康为世纪生物科技有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。本研究所用引物合成及产物测序均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成。

2 方法

2.1 茉莉酸甲酯 (MeJA) 处理

将生长良好且基本一致的白木香愈伤组织, 转接到含有 100 μmol/L MeJA 的 MS 固体培养基中, 25 °C 暗培养, 7 个不同时间段 (0、0.5、2、4、8、12、24 h) 取样, 分别设置 3 个生物学重复。以同一批生长一致的白木香愈伤组织同时转接到不含 MeJA 的 MS 培养基中 25 °C 暗培养, 分别在相同时间段取样, 均设 3 个重复, 作为对照。

2.2 机械伤害处理

将生长良好且基本一致的白木香愈伤组织, 经医用镊子捣碎后, 置于 25 °C 暗培养, 7 个不同时间段 (0、0.5、2、4、8、12、24 h) 取样, 分别设置 3 个生物学重复。同时将同一批生长一致的健康白木香愈伤组织, 25 °C 暗培养, 同样时间段取样, 分别设置 3 个生物学重复。所有的材料取样后均置于液氮中速冻后, -80 °C 冰箱保存备用。

2.3 总 RNA 的提取和 cDNA 合成

将经 MeJA 化学处理、机械损伤的白木香愈伤组织材料及未处理的健康白木香愈伤组织材料置于液氮中研磨, 根据天根生化科技 (北京) 有限公

司的植物总 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA, 利用 1% 琼脂糖电泳检测 RNA 的完整性和分光光度计 NanoDrop 2000 (Thermo Scientific 公司, 美国) 测定 RNA 浓度。健康的白木香愈伤组织在相同的各时间段取样后混合提取总 RNA, 利用 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech 公司) 试剂盒合成 5'- 和 3'-RACE cDNA, 反转录的条件及程序均按照试剂盒说明书进行, 用于 AsJAZ1 基因全长的克隆。经 MeJA 化学处理、机械伤害和健康的白木香愈伤组织提取总 RNA, 利用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher Scientific 公司) 反转录成 cDNA 第 1 链, 作为 qRT-PCR 的模板。

2.4 AsJAZ1 基因全长克隆

基于白木香转录组数据库得到 AsJAZ1 基因的 UniGene 片段, 通过 NCBI Blast 比对发现该序列并不是全长, 运用引物设计软件 Primer 5.0 分别设计 AsJAZ1 的两对引物, 5'- 和 3'-末端的扩增的特异性引物 JAZ-5'GSP1、JAZ-5'GSP2、JAZ-3'GSP1、JAZ-3'GSP2 (表 1), 进行巢式 PCR 扩增。以健康的不经 MeJA 处理不同时间段的白木香愈伤组织混样提取的总 RNA 反转录得到的

RACE cDNA 为模板, 反应体系和 PCR 程序按照 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech 公司) 试剂盒说明书进行操作。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 切胶, 用天根公司 DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒回收目的片段。将回收的 PCR 目的产物与 pGM-T 载体连接, 转化 TPO10 菌株, 在含有氨苄青霉素的 LB 平板上进行培养, 挑取单克隆摇菌, 经菌液 PCR 扩增和电泳检测后选择阳性克隆送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。

将测序结果在 NCBI 基因预测工具 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 上寻找完整的开放阅读框 (open reading frame, ORF), 通过设计全长引物扩增全长 (表 1)。反应体系: 快速高产聚合酶 0.5 μ L, 5 $\times$ 快速高产 PCR 缓冲液 5 μ L, dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 2 μ L, JAZ-LF (10 μ mol/L) 1 μ L, JAZ-LR (10 μ mol/L) 1 μ L, cDNA 1.0 μ L, ddH₂O 14.5 μ L, 终体系为 25 μ L。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C、5 min; 94 $^{\circ}$ C、30 s, 63 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、70 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物回收后用 pZeroBack/blunt 零背景连接试剂盒进行连接、转化、涂平板, 菌液 PCR 同上。

表 1 基因克隆及实时荧光定量 PCR 检测引物

Table 1 Primers for gene cloning and real-time PCR detection

引物用途	引物名称	引物序列 (5'→3')
5'-RACE 扩增引物	JAZ-5'GSP1	GGCTCGACTTTGCTAATGCTGTTTGAAG
	JAZ-5'GSP2	GTTGACTGGGTTGACGCCGGCTATGGC
3'-RACE 扩增引物	JAZ-3'GSP1	CCTGGCTGGGAATGGGGCTTCTGTGCCAC
	JAZ-3'GSP2	TTCGTGACGCGGATTGGTGGCCCTCGCTG
基因克隆	JAZ-LF	ATGGCACTTGCAAAAGAAAGTATGAGC
	JAZ-LR	TCATATCGAAACACTATTAGGCACACC
内参基因实时荧光定量 PCR 引物	TUA-f	GCCAAGTGACACAAGCGTAGGT
	TUA-r	TCCTTGCCAGAAATAAGTTGCTC
AsJAZ1 基因实时荧光定量 PCR 引物	JAZ-1f	GCAGGAGCAGTGTGCGTCTT
	JAZ-1r	GGCTTTACTTGCGGTTTAGG

2.5 AsJAZ1 基因的生物信息学分析及进化树的构建

基因编码蛋白的理化性质预测采用 ExPASy Proteomics Server 提供的在线工具 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>); 蛋白质的信号肽用 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 进行在线预测。蛋白的跨膜结构

用 TMHMM Server v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 软件在线预测; 利用 WOLF PSORT (<http://wolfsort.org/>) 分析亚细胞定位。利用 NCBI Conserved Domain Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 和 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 分析基因编码蛋白

序列的保守结构域。蛋白基序 (Motif) 的预测分析采用 MEME (<http://meme.nbcr.net/meme/>) 在线软件进行。氨基酸序列比对利用 NCBI 的蛋白质序列数据库进行, 通过 MEGA 5.05 构建 NJ 系统进化树, bootstrap 重复次数为 1 000 次。

2.6 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)

利用 qRT-PCR (美国伯乐公司的 iQTM5 实时 PCR 检测系统) 的方法检测经 MeJA 处理的白木香愈伤组织中 AsJAZ1 基因不同时间段的表达量。反应体系如下: 2×UltraSYBR 预混液 20 μL, 正反向引物 (10 μmol/L, 扩增目的片段 122 bp) 各 0.4 μL, cDNA 模板 0.8 μL, 加水至终体积 20 μL, 每个反应体系设置 3 个重复。实时 PCR 反应程序: 95 ℃、10 min; 95 ℃、15 s, 60 ℃、1 min, 40 个循环; qRT-PCR 反应以 α 微管蛋白基因 TUA 为内参^[21], 不同时间段基因的表达以健康不进行 MeJA 处理或机械损伤的白木香愈伤组织中的表达量为对照。将 Real-time PCR 仪所得的样品 C_t 值, 利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法转化为基因相对表达量值。应用 Excel 软件进行数据录入及表的绘制, 采用 SPSS 16.0 软件进行统计与 One-way ANOVA 方差分析, 并用 Duncan 检验法进行多重比较。

3 结果与分析

3.1 白木香总 RNA 的提取

总 RNA 的提取效果用电泳检测, 取 4 μL 总 RNA 在 1% 琼脂糖凝胶中电泳, 结果如图 1 所示。RNA 电泳检测图显示所提的 RNA 相对完整, 有 28 S、18 S 和 5 S 3 条带, 3 条带都比较亮, 且无明显拖尾的现象; 其次, Nano-Drop 2000 测定 RNA 的浓度和质量, 其 A_{260}/A_{280} 值为 1.8~2.0, 符合后续实验使用的要求。

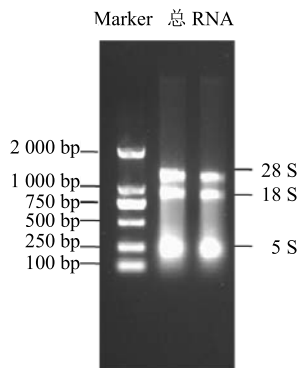


图 1 白木香总 RNA

Fig. 1 Total RNA of *A. sinensis*

3.2 AsJAZ1 基因全长的克隆

根据前期转录组测序得到的 AsJAZ1 基因的 UniGene 序列设计特异引物, 通过 RACE-PCR 技术获得 5'端序列和 3'端序列克隆测序的结果与已知的序列片段拼接得到全长 cDNA 序列为 1 507 bp (图 2)。为验证全长的结果, 根据拼接后得到的全长序列设计引物, 以 cDNA 为模板, 扩增白木香 AsJAZ1 基因全长序列并测序, 与预计的片段大小一致, 克隆后测序, 结果与拼接结果一致。

从得到的白木香 AsJAZ1 基因 cDNA 序列全长, 通过 NCBI 基因预测工具 (ORF Finding) 在线查找分析软件, 获得一个完整的 ORF, 长为 990 bp, 命名为 AsJAZ1 基因, 编码 330 个氨基酸。并将序列提交在 NCBI GeneBank 中, 获得 GenBank 登录号为 KP677281。经过 PCR 扩增得到的 AsJAZ1 基因编码区 (CDS) 序列检测电泳图见图 3。

3.3 AsJAZ1 基因编码蛋白特性分析

3.3.1 理化性质分析 利用 ExPASy Proteomics

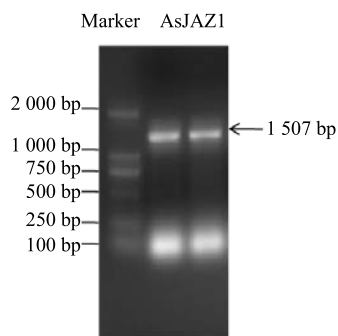


图 2 AsJAZ1 基因 cDNA 序列全长

Fig. 2 Full-length cDNA of AsJAZ1 gene

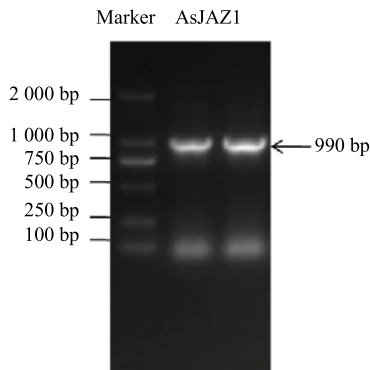


图 3 AsJAZ1 基因 CDS 序列全长

Fig. 3 Full-length CDS of AsJAZ1 gene

Server 提供的在线工具 PtotParam 分析 AsJAZ1 基因编码蛋白的理化性质, 结果表明 AsJAZ1 编码的蛋白分子式为 $C_{2992}H_{4993}N_{993}O_{1250}S_{242}$, 相对分子质量为 34 280, 等电点为 6.89。该蛋白的不稳定系数为 42.12, 属于不稳定蛋白; 平均亲水系数为 0.788, 表明其为亲水性蛋白。

3.3.2 信号肽、跨膜区及亚细胞定位预测分析 SignalP 4.1 Server 预测结果显示 AsJAZ1 蛋白为非分泌蛋白, 不具有信号肽。TRMHMM server v2.0 跨膜区预测 AsJAZ1 编码的蛋白没有跨膜区域, 为非膜蛋白。亚细胞预测定位结果表明该蛋白定位在细胞核中。

3.3.3 结构域预测 NCBI Conserved Domain Search 和 SMART 在线预测 AsJAZ1 蛋白的保守结构域 1 个, 是 TIFY 结构域 (图 4)。因 JAZ 蛋白在模式植物拟南芥中的研究较为深入, 因此利用

MEME 在线预测分析了 AsJAZ1 蛋白与拟南芥 JAZ 蛋白家族, 共 12 个成员间蛋白基序 (Motif), 结果显示 AsJAZ1 蛋白与拟南芥的 JAZ3 (别名 JAI3) 具有相同的基序 (图 5), 表明这 2 个蛋白的功能可能有一定程度的相似性。

3.4 AsJAZ1 氨基酸序列的分子系统进化分析

通过 NCBI 在线工具 Blast 进行数据比对, 结合相关文献的查阅, 筛选出包括白木香 AsJAZ1 在内的 10 个物种, 属 JAZ 家族蛋白, 共 10 种蛋白, 并下载它们的蛋白质序列。使用 MEGA5.05 进行多序列的比对, 采用相邻连接法构建 HDR 进化树, 进行聚类分析。结果如图 6 所示, 白木香 AsJAZ1 与可可 JAZ3 蛋白聚为一类, 两者亲缘关系最近, 2 蛋白相似性为 62%, 表明这 2 个蛋白可能在功能上有一定的相似性, 但 AsJAZ1 具体的生物学功能还需要进一步验证。

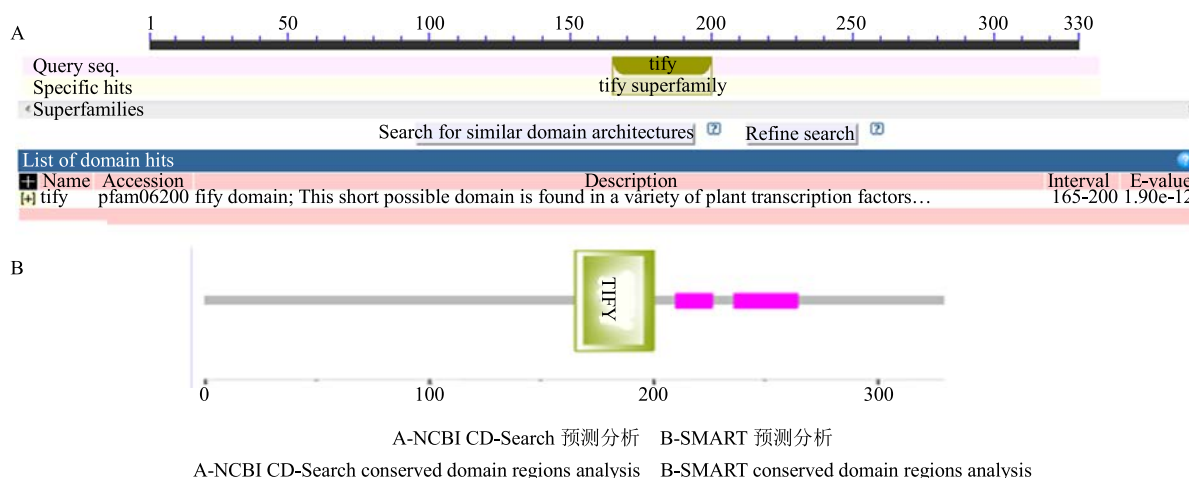


图 4 AsJAZ1 蛋白结构域的分析

Fig. 4 Conserved domain regions analysis of AsJAZ1 protein

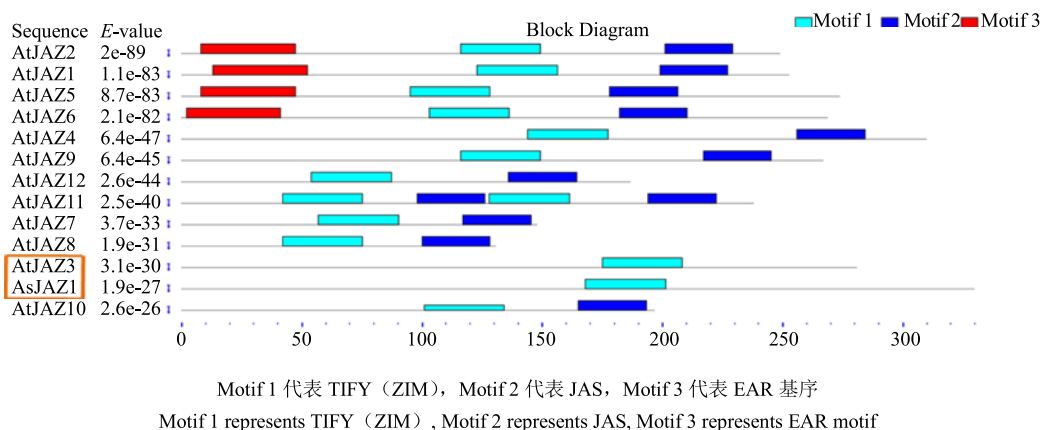


图 5 AsJAZ1 蛋白与拟南芥 JAZ 蛋白家族间的基序分析

Fig. 5 Conserved motifs of JAZ proteins from *A. sinensis* and *A. thaliana* identified with MEME search tool

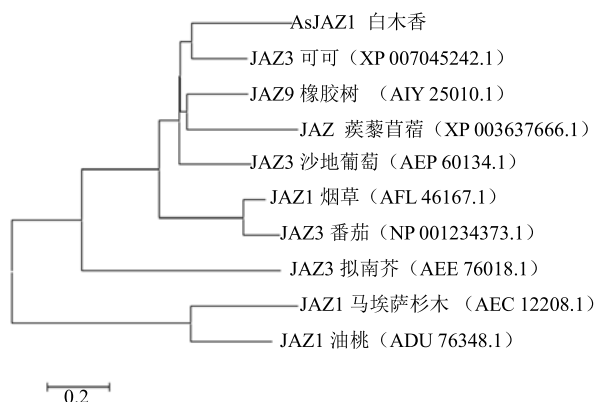


图 6 AsJAZ1 系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree of AsJAZ1

3.5 AsJAZ1 基因表达分析

3.5.1 AsJAZ1 基因在机械伤害下的表达分析
qRT-PCR 检测结果表明, 白木香愈伤组织在机械伤害的诱导下, AsJAZ1 基因的表达量显著增加, 在 2 h 时达到最高, 约为对照的 17 倍, 随后又快速降低, 到 24 h 时基本恢复正常 (图 7), 这一结果表明该基因属于响应早期伤害的基因, 且其表达水平受机械伤害的正调控。

3.5.2 AsJAZ1 基因在 MeJA 胁迫下的表达分析
白木香愈伤组织经 100 $\mu\text{mol/L}$ MeJA 处理后, AsJAZ1 基因表达水平显著上调, 在伤害后 0.5 h 达到最高峰, 约为对照的 27 倍。随后呈现缓慢的下降趋势, 在 24 h 左右基本恢复正常 (图 8)。该结果表明, 该基因显著响应 MeJA 处理, 且受 MeJA 正调控, 基因的表达量增加。

4 讨论

在植物中, 具有一套有机完整的抵御胁迫的防御系统, JA 信号途径是其中一条非常重要的伤害诱导信号通路。JAZ 基因蛋白家族是 JA 信号通路中

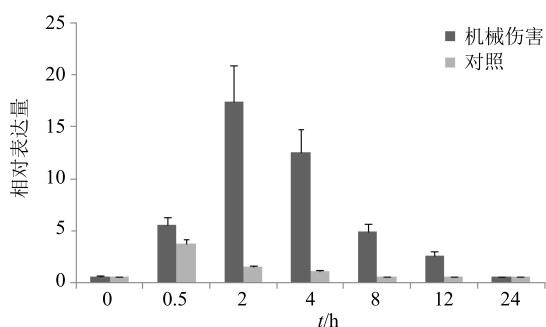


图 7 机械伤害胁迫下 AsJAZ1 基因的表达情况

Fig. 7 Expression of AsJAZ1 gene in response to mechanical wounding (MW)

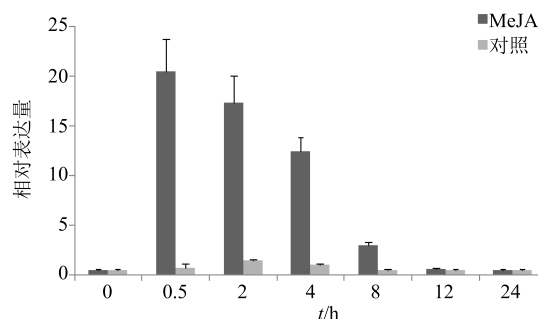


图 8 MeJA 胁迫下 AsJAZ1 基因的表达情况

Fig. 8 Expression of AsJAZ1 gene in response to MeJA

重要的抑制因子, 在 JA 信号通路未启动时, JAZ 抑制相关转录因子的转录作用^[11], 从而抑制 JA 响应相关基因的表达; 当植物在受到来自于生物和非生物的胁迫时, JA 信号被启动, 通过 26 S 的蛋白酶体的泛素化作用将 JAZ 抑制蛋白降解, 释放出转录因子, 启动 JA 响应相关基因的表达。目前, 对于 JAZs 的研究已经在水稻、橡胶树、大豆、葡萄、番茄和烟草等植物中展开。研究结果表明, JAZs 的功能在不同的植物中有所不同。在大豆中过表达 GsJAZ2, 可增加其对盐碱的敏感性^[22]; 在水稻中过表达 TIFY11b, 可增加籽粒的大小^[23]。JAZs 的功能除了在物种间存在差别外, 其家族成员间的功能也不尽相同。烟草中过表达 NaJAZd 和 NaJAZh, 可分别抑制花蕾脱落和促进尼古丁的合成^[24-25]。JAZ 与不同的互作的因子结合时, 可发挥不同的功能。因此, 鉴定与 JAZs 互作的因子是研究 JAZs 基因功能的关键。

本研究首次从白木香中克隆得到了 JA 信号途径中的一个核心抑制蛋白基因 AsJAZ1。生物信息学分析表明, 该基因编码的氨基酸序列具有典型的 JAZ 蛋白家族的结构域。

为了研究 AsJAZ1 基因如何响应外界胁迫作用, 采用白木香愈伤组织为受试材料, 分别进行了物理伤害和 MeJA 处理, 分析 AsJAZ1 基因 RNA 转录水平的变化情况。总体上, AsJAZ1 基因的表达均出现上调的趋势, AsJAZ1 基因对 MeJA 的响应强度比机械伤害更剧烈, 且持续时间更长, 但在伤害后 24 h 左右均缓慢恢复至正常表达水平。这一结果表明, AsJAZ1 基因属于伤害诱导表达基因, 且属于早期伤害应答基因。

前期研究结果表明, AsMYC2 转录因子通过 JA 途径参与调控沉香倍半萜的生物合成。因此, 推测

AsJAZ1 蛋白可能作为 JA 信号通路中的一个负调控因子与转录因子 AsMYC2 发生相互作用,共同调控沉香倍半萜生物合成相关基因的表达。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2005.
- [3] Persoon G A, Heuveling van B H. Growing 'the wood of the gods': Agarwood production in Southeast Asia [J]. *Small Tree Grow Rural Devel Envir Serv*, 2008, 2(5): 245-262.
- [4] Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al.* MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Mol Biol Evol*, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [5] 张兴丽. 伤害诱导的白木香防御反应与沉香形成的关系研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2013.
- [6] Chen H Q, Wei J H, Yang J S, *et al.* Chemical constituents of agarwood originating from the endemic genus *Aquilaria* plants [J]. *Chem Biodiv*, 2012, 9(2): 236-250.
- [7] Chen H Q, Yang Y, Wei J H, *et al.* Comparison of compositions and antimicrobial activities of essential oils from chemically stimulated agarwood, wild agarwood and healthy *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg trees [J]. *Molecules*, 2011, 16(6): 4884-4896.
- [8] Ng L T, Chang Y S, Azizol L K. A review on agar (gaharu) producing *Aquilaria* species [J]. *J Trop Forest Prod*, 1997, 2(2): 272-285.
- [9] 张 争, 杨 云, 魏建和, 等. 白木香结香机制研究进展及其防御反应诱导结香假说 [J]. *中草药*, 2010, 41(1): 156-159.
- [10] Xu Y H, Zhang Z, Wei J H, *et al.* Identification of genes related to agarwood formation: Transcriptome analysis of healthy and wounded tissues of *Aquilaria sinensis* [J]. *BMC Genom*, 2013, 14(5): 227.
- [11] Kumeta Y, Ito M. Characterization of δ -guaiene synthases from cultured cells of *Aquilaria*, responsible for the formation of the sesquiterpenes in agarwood [J]. *Plant Physiol*, 2010, 154(2): 1998-2007.
- [12] 张 争, 杨 云, 魏建和, 等. 白木香茎中内源茉莉酸类和倍半萜类物质对机械伤害的响应 [J]. *园艺学报*, 2013, 40(1): 163-168.
- [13] Xu Y H, Liao Y C, Zhang Z, *et al.* Jasmonic acid is a crucial signal transducer in heat shock induced sesquiterpene formation in *Aquilaria sinensis* [J]. *Sci Rep*, 2016, doi:10.1038/srep21843.
- [14] Glauser G, Dubugnon L, Mousavi S A R, *et al.* Farmer EE. Velocity estimates for signal propagation leading to systemic jasmonic acid accumulation in wounded *Arabidopsis* [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(2): 34506-34513.
- [15] Koo A J, Gao X, Jones A D, *et al.* A rapid wound signal activates the systemic synthesis of bioactive jasmonates in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2009, 59(3): 974-986.
- [16] Chico J M, Chini A, Fonseca S, *et al.* JAZ repressors set the rhythm in jasmonate signaling [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2008, 11(5): 486-494.
- [17] Figueroa P. 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): 330-343.
- [18] Leon J. Role of plant peroxisomes in the production of jasmonic acid-based signals [J]. *Subcell Biochem*, 2013, 69(1): 299-313.
- [19] Thines B, Katsir L, Melotto M, *et al.* JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signaling [J]. *Nature*, 2007, 448(7154): 661-665.
- [20] Xu Y H, Liao Y C, Lv F F, *et al.* Transcription factor AsMYC2 controls the jasmonate-responsive expression of ASS1 regulating sesquiterpene biosynthesis in *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg [J]. *Plant Cell Physiol*, 2017, 58(11): 1924-1933.
- [21] Gao Z H, Wei J H, Yang Y, *et al.* Selection and validation of reference genes for studying stress-related agarwood formation of *Aquilaria sinensis* [J]. *Plant Cell Rep*, 2012, 31(9): 1759-1768.
- [22] Zhu D, Cai H, Luo X, *et al.* Over-expression of a novel JAZ family gene from *Glycine soja*, increases salt and alkali stress tolerance [J]. *Bioch Biophys Res Commun*, 2012, 426(2): 273-279.
- [23] Hakata M, Kuroda M, Ohsumi A, *et al.* Overexpression of a rice TIFY gene increases grain size through enhanced accumulation of carbohydrates in the stem [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2012, 76(11): 2129-2134.
- [24] Oh Y, Baldwin I T, Gális I. NaJAZh regulates a subset of defense responses against herbivores and spontaneous leaf necrosis in *Nicotiana attenuata* plants [J]. *Plant Physiol*, 2012, 159(4): 769-788.
- [25] Oh Y, Baldwin I T, Gális I. A jasmonate ZIM-domain protein NaJAZd regulates floral jasmonic acid levels and counteracts flower abscission in *Nicotiana attenuata* plants [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e57868.