



# 大豆 JAZ 基因家族的鉴定及其对疫霉胁迫的响应

黄建丽, 邓肃霜, 沈甲诚, 卜远鹏, 赵晋铭, 郭娜, 邢邯

(南京农业大学 农学院/国家大豆改良中心/农业部大豆生物学与遗传育种重点实验室/作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏 南京 210095)

**摘要:** JAZ (Jasmonate ZIM-domain) 蛋白是茉莉酸信号途径中重要的负调控因子, 对植物的防御反应具有重要意义。然而, 鲜有关于大豆 JAZ 基因的报道, 为了揭示大豆中 JAZ 基因家族的特征和潜在功能, 本研究利用生物信息学方法从大豆基因组中鉴定到 24 个 JAZ 基因, 分别命名为 *GmJAZ1* ~ *GmJAZ24*, 并对这 24 个基因进行基因结构分析、保守基序分析、系统进化树构建、染色体定位、启动子顺式作用元件分析以及大豆疫霉菌胁迫下的响应分析。结果表明: (1) 24 个 *GmJAZs* 基因不均匀的分布在大豆的 14 条染色体上, 其中 9 号染色体上分布的数目最多, 为 4 个; (2) 大豆、拟南芥和水稻的 JAZ 基因家族可分成 5 个亚组 (C1 ~ C5), 其中大豆与拟南芥的 JAZ 基因亲缘关系最近; (3) 该家族成员大多含有响应茉莉酸和脱落酸等激素的顺式作用元件, 少数含有响应逆境胁迫的顺式作用元件; (4) 大豆疫霉菌处理后, C4 亚组成员显著上调表达, C1 亚组成员微弱上调, 而 C2、C3 和 C5 亚组成员下调表达, 表明大豆 JAZ 基因家族成员对大豆疫霉菌的胁迫具有不同的响应模式。

**关键词:** 大豆; JAZ 基因家族; 生物信息学; 大豆疫霉; qRT-PCR

## Identification and Response to *Phytophthora sojae* Infections of JAZ Gene Family in Soybean

HUANG Jian-li, DENG Su-shuang, SHEN Jia-cheng, BU Yuan-peng, ZHAO Jin-ming, GUO Na, XING Han

(College of Agriculture, Nanjing Agricultural University/National Center for Soybean Improvement/Key Laboratory of Biology and Genetics and Breeding for Soybean, Ministry of Agriculture/State Key Laboratory for Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** JAZ (Jasmonate ZIM-domain) protein, a key transcriptional repressor in JA signaling pathway, plays an important role in plant defense. However, there is limited information about this family. In order to study the characteristic and potential function of the JAZ gene family in soybean, this study identified a total of 24 JAZ genes in the soybean genome by bioinformatics, named as *GmJAZ1* to *GmJAZ24*. We extensively analyzed intron-exon distribution and protein motif organization, built phylogenetic tree, and analyzed chromosome localization, cis-acting regulatory elements and response to *Phytophthora sojae* infections for JAZ family in soybean. The results showed that a total of 24 *GmJAZs* was unevenly distributed on the fourteen chromosomes with maximum number of genes (four JAZs) on chromosome 9. The JAZ family divided into five clusters (C1 ~ C5) including soybean, *Arabidopsis* and rice in the phylogenetic tree, The JAZ genes of soybean were the most closely related to *Arabidopsis*. Promoter analysis revealed that most of soybean JAZ genes contained jasmonic acid (JA) and abscisic acid (ABA) responsive cis-acting elements, and some with defense and stress related cis-acting elements. After *Phytophthora sojae* infections, C4 subgroup members were significantly upregulated, C1 subgroup members were weakly upregulated, while the C2, C3 and C5 subgroup members were downregulated, which indicated that the soybean JAZ genes exhibited divergent expression patterns in response to *Phytophthora sojae* treatment. The results of the present study provide valuable information for functional characterization of *GmJAZ* in response to *Phytophthora sojae* in soybean.

**Keywords:** Soybean; JAZ gene family; Bioinformatics; *Phytophthora sojae*; qRT-PCR

茉莉酸 (jasmonic acid, JA) 是植物体内天然的信号分子, 当植物受到生物或非生物胁迫时可诱导体内 JA 的积累, 激活响应基因的表达, 从而参与到植物的生长发育过程以及病菌侵染、昆虫伤害等防御应答过程中<sup>[1]</sup>。JAZ (jasmonate ZIM-domain) 蛋白

是茉莉酸信号通路中重要的抑制因子。植物体内 JA 含量较低时, JAZ 蛋白与 MYC2 (myelocytomatosis protein 2) 等转录因子结合从而抑制应答基因的转录; 若植物体内 JA 含量升高, COI1 (coronatine insensitive 1) 与 JAZ 蛋白结合成为茉莉酸甲酯的复合受

收稿日期: 2019-05-23

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFD0101500); 转基因生物新品种培育重大专项 (2016ZX08004002); 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-004-PS10); 中央高校基本科研业务费专项资金 (KYT201801, Y0201700146); 长江学者和创新团队发展计划 (PCSIRT\_17R55); 江苏省现代作物生产协同创新中心。

第一作者简介: 黄建丽 (1994-), 女, 硕士, 主要从事大豆分子遗传育种研究。E-mail: 2017101136@njau.edu.cn。

通讯作者: 郭娜 (1984-), 女, 博士, 副教授, 主要从事大豆分子遗传研究。E-mail: guona@njau.edu.cn;

邢邯 (1963-), 男, 博士, 教授, 主要从事菜用大豆育种与大豆分子遗传研究。E-mail: hanx@njau.edu.cn。

体,同时 JAZ 蛋白被 26S 蛋白酶体降解,释放 MYC2 等转录因子的转录活性,启动茉莉酸信号通路<sup>[2,3]</sup>。JAZ 基因在 2007 年首次被发现<sup>[4,6]</sup>,已从拟南芥中鉴定到了 12 个 JAZ 基因家族成员<sup>[7]</sup>。JAZ 基因在烟草、水稻、玉米和棉花等作物都有报道<sup>[8-11]</sup>,其中在拟南芥和水稻中研究较为深入,但是在大豆中鲜见报道。

JAZ 蛋白是植物中特有的锌指蛋白,属于 TIFY 家族。JAZ 蛋白都含有 2 个保守结构域,N 端的 ZIM(又称 TIFY)结构域和 C 端的 Jas(又称 CCT<sub>2</sub>)结构域。ZIM 结构域含有保守的 TIFY 基序(TIF[F/Y]XG),JAZs 二聚体的构成及与其它抑制因子(如 NINJA、TOPLESS)的结合都与该结构域相关<sup>[12]</sup>;Jas 结构域由 12~29 个氨基酸组成,保守序列为 SLX<sub>2</sub>FX<sub>2</sub>KRX<sub>2</sub>RX<sub>5</sub>PY,具有抑制活性,JAZ 蛋白与 COII 的结合依赖于该结构域,同时介导 JAZ 蛋白的降解<sup>[13]</sup>。植物 JAZ 基因家族广泛响应植物的逆境胁迫,是植物响应病原菌胁迫过程中的关键调控因子。拟南芥 *AtJAZ7* 的 T-DNA 插入突变体表现出对尖镰孢菌易感性增强,推测其可能参与拟南芥对尖镰孢菌的防御反应<sup>[14]</sup>。烟草接种烟草黑胫病菌后,*NtJAZ1* 基因在抗感品种中差异表达,烟草黑胫病的发生可能与 *NtJAZ1* 的高表达抑制 JA 响应基因的转录有关<sup>[15]</sup>。在水稻中过表达缺失 Jas 结构域的 *OsJAZ8ΔC*,表现出对 JA 不敏感表型,对 JA 介导的白粉病抗性起到负调控作用<sup>[16]</sup>。而在棉花中过表达 *GhJAZ2* 基因,JA 敏感性减弱,对黄萎病菌的敏感性增强<sup>[17]</sup>。

大豆疫霉根腐病是大豆生产上最严重的病害之一<sup>[18]</sup>,由大豆疫霉菌(*Phytophthora sojae* Kaufmann & Gerdemann)引起,可在大豆的任何生育期发病,2007 年报道称每年因大豆疫霉根腐病造成的经济损失高达 10 亿美元<sup>[19]</sup>。选育抗大豆疫霉根腐病的大豆品种是防御该病害最经济有效的方法,而抗性基因的鉴定及其调控通路的研究是大豆疫霉根腐病抗性遗传改良的关键。植物体内水杨酸(salicylic acid, SA)、茉莉酸和乙烯(ethylene, ET)等激素信号传导网络,在植物抵抗病原物的免疫反应中起着重要作用<sup>[20-21]</sup>。其中 JA 信号途径和 SA 信号途径存在拮抗作用,有研究表明:SA 信号正调节植物对活体营养型病原物和半活体营养型病原物的防御,而 JA 信号正调节植物对死体营养型病原物的抗性<sup>[22]</sup>。但是近年来也有研究发现,JA 信号也可参与植物与半活体营养型病原物的互作<sup>[23]</sup>。大豆疫霉菌属于半活体营养型病原物,有关 JA 信号对大豆疫霉根腐病抗性的研究甚少。JAZ 基因是

JA 信号的主要负调控因子,对大豆 JAZ 基因进行研究,将有利于阐明 JA 信号在大豆抗大豆疫霉根腐病中的作用机制。本研究利用生物信息学的分析方法,在全基因组范围内鉴定 JAZ 基因家族成员,解析 JAZ 基因家族的结构特征与大豆疫霉菌感染下的表达模式,为进一步探究 *GmJAZ* 的功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

大豆的全基因组数据文件均来自 Ensembl 数据库(<http://plants.ensembl.org/index.html>)。拟南芥、水稻、棉花和杨树的 JAZ 基因序列均来自于 Phytozome 数据库(<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#>)。

本研究所使用的大豆品种为 Williams 82(含 *Rps1k*),由南京农业大学国家大豆改良中心提供;所用疫霉菌株为 P6497,由南京农业大学植物保护学院王源超教授提供。

### 1.2 方法

1.2.1 大豆 JAZ 基因家族成员的鉴定 从 Pfam 数据库(<http://pfam.xfam.org/>)中下载 JAZ 基因家族保守结构域的隐马尔科夫模型文件,即 TIFY(编号:PF06200)和 Jas(编号:PF09425)。利用 HMMER 3.1 软件中的 hmsearch 程序查找大豆转录本中含有这两个结构域的候选蛋白。以水稻、拟南芥、棉花和杨树的 JAZ 基因序列为种子序列,通过 BLAST 查找大豆基因组中的同源基因。将这两种方法的查询结果合并作为候选基因,使用 Pfam 数据库的查找工具和 NCBI 中的 CDD 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/index.shtml>)查阅候选蛋白的保守结构域,确认同时含有 TIFY domain、Jas domain 这两个保守区域。

1.2.2 大豆 JAZ 基因家族的序列分析 利用 ExPASy(<https://www.expasy.org/>)的 ProtParam tool 在线工具查询 JAZ 基因家族的理化性质。WoLF PSORT(<https://wolfpsort.hgc.jp/>)预测 JAZ 基因家族成员的亚细胞定位。使用 MEME 5.0.5(<http://meme-suite.org/tools/meme>)分析 JAZ 基因家族的保守基序,查找个数为 5。使用 Clustal Omega(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)对 JAZ 基因家族进行多序列比对,将比对结果导入 MEGA 7 构建大豆 JAZ 基因家族成员的进化树。使用 Jalview 2.10.5 软件处理 Clustal Omega 的多重序列比对结果,找出 JAZ 基因家族的保守区域。将大豆 JAZ 基因家族成员内含子和外显子信息导入到

GSDS 2.0 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 绘制 *JAZ* 基因家族的基因结构分布图。

1.2.3 大豆 *JAZ* 基因家族的系统进化树构建 运用 MEGA 7 对水稻、拟南芥和大豆的 *JAZ* 序列构建系统进化树。首先运用 Clustal W 进行多重序列比对,参数默认,比对结果运用最大似然法(maximum likelihood, ML)构建系统进化树,使用泊松校正法计算遗传距离,Bootstrap 值(步长检验)设置为1 000 次。构建所得到的进化树用 Evolvew<sup>[24]</sup> 在线工具进行进一步处理。

1.2.4 大豆 *JAZ* 基因家族的染色体定位 利用大豆基因组的 GFF3 文件提取出 *JAZ* 基因家族成员在染色体上的位置,将提取结果与大豆各染色体长度提交至 MG2C ([http://mg2c.iask.in/mg2c\\_v2.0/](http://mg2c.iask.in/mg2c_v2.0/)) 网站,绘制大豆 *JAZ* 基因在染色体上的分布情况。利用 ncbi-magicblast-1.4.0 工具包构建大豆 *JAZ* 基因的本地数据库,以大豆 *JAZ* 基因序列为种子序列进行 BLAST,找出同源基因。同源基因判定标准为:两个基因序列相似度大于 75%,同时比对长度大于较长序列的 75%<sup>[25]</sup>。

1.2.5 大豆 *JAZ* 基因家族的启动子分析 利用大

豆基因组数据文件提取 *JAZ* 基因家族成员起始密码子上游2 000 bp 序列作为启动子区域。将该启动子区域序列提交到 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 网站分析家族成员的顺式作用元件。

1.2.6 大豆 *JAZ* 基因家族疫霉胁迫下的表达分析

将饱满的大豆 Williams 82 种子于 25 ℃、16 h 光照/8 h 黑暗光周期条件下的温室培养 7 d 左右,待子叶张开时利用下胚轴创伤接种法<sup>[18, 26]</sup> 接种新鲜的 P6497 疫霉菌块,接种后黑暗保湿。分别于处理后 0,3,12,24 和 36 h 对接种部位及上下 0.5 cm 进行取样,设置 3 次重复。样品经液氮速冻后,于 -80 ℃ 保存备用。使用 TIANGEN 公司的 RNA simple Total RNA kit 试剂盒提取总 RNA,使用 PrimeScript<sup>®</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒合成 cDNA,使用 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II (TaKaRa, Japan) 试剂盒配制荧光定量反应体系,在 LightCycler<sup>®</sup> 480 II real-time PCR system (Roche, Switzerland) 仪器上进行实时荧光定量 PCR,内参基因为 *Gmcons4*,所用引物序列如表 1。

表 1 qRT-PCR 引物  
Table 1 Primers for qRT-PCR

基因 Gene	正向引物序列(5' - 3') Forward primer sequence(5' - 3')	基因 Gene	正向引物序列(5' - 3') Reverse primer sequence(5' - 3')
<i>GmJAZ1-F</i>	GGATAGAATTGCTGCCAGAG	<i>GmJAZ1-R</i>	AGCTGGAGCTGCTATCAGA
<i>GmJAZ2-F</i>	CGAGCTCACTGGCGGAGAAG	<i>GmJAZ2-R</i>	GGCAATGCAATCCCCAGGGT
<i>GmJAZ3-F</i>	GGACCCTCACCATCAACAGCA	<i>GmJAZ3-R</i>	GGTGTCAATCACCCTTCTCTCCGT
<i>GmJAZ4-F</i>	GAATTTCTGGCTGCTAAAC	<i>GmJAZ4-R</i>	TTGTTGAGGTTGTATGCTGC
<i>GmJAZ5-F</i>	GGCATTGGCCACCAAGGGAA	<i>GmJAZ5-R</i>	TGCTGTGGATGCTGCTTGAGG
<i>GmJAZ6-F</i>	GATATGAGGTACCCAAGGAG	<i>GmJAZ6-R</i>	ACTGTTTGGAACACTGATCT
<i>GmJAZ8-F</i>	GTCGCCCACCATCAACAGCA	<i>GmJAZ8-R</i>	CCGTTGGTGTCACTACTCTT
<i>GmJAZ9-F</i>	AAGGGATCCCCAAAGCCAG	<i>GmJAZ9-R</i>	CACAAACAACAGGTCTGGATG
<i>GmJAZ10-F</i>	CCTGACAGGCTTGGGAGCAA	<i>GmJAZ10-R</i>	GGCAGAGACCGTTGGCTGAA
<i>GmJAZ11-F</i>	TGCGGGCACTGTGAATGTCT	<i>GmJAZ11-R</i>	GGCGCTGAACATTGGGTGA
<i>GmJAZ12-F</i>	GCTCAGCCAGTTTGCTTGCC	<i>GmJAZ12-R</i>	TGCTGTATCCAGAAGAGCTGCAT
<i>GmJAZ13-F</i>	ACCGTAGCCATGCTCAACCTC	<i>GmJAZ13-R</i>	CACTAGTTGCACACCCTTTG
<i>GmJAZ15-F</i>	TGGTATTTTCGGCCACCAC	<i>GmJAZ15-R</i>	TTGTTTCGGCAGTGCAAGTC
<i>GmJAZ16-F</i>	TTCCACTGGCTCGAAGGCAA	<i>GmJAZ16-R</i>	TCTGGCGTCTCGTCAGGAGA
<i>GmJAZ17-F</i>	CACCACCACTCAATGGTTGA	<i>GmJAZ17-R</i>	CCTGAAGCTCTGTGACATCC
<i>GmJAZ18-F</i>	ATGGTTGACAACGTTGAAGA	<i>GmJAZ18-R</i>	ATCGATTTGGCCTGAAGCTC
<i>GmJAZ19-F</i>	AGGGGGGATCCCCAAAGCC	<i>GmJAZ19-R</i>	AAACAACAGGTCTGGATGATG
<i>GmJAZ20-F</i>	GTCTGTGCCAGCATCTGGAC	<i>GmJAZ20-R</i>	CAATCTTCTTCATTTCACTG
<i>GmJAZ21-F</i>	GTTGGTTCAGATATGAGGTA	<i>GmJAZ21-R</i>	CTGTTGGGAATCTTCAGGTTT
<i>GmJAZ23-F</i>	CGGCATTTTCGGCCCCCGC	<i>GmJAZ23-R</i>	AAGTATCGGGGTGCGAGTC
<i>GmJAZ24-F</i>	GCTCCTCCCCCTCCACCTC	<i>GmJAZ24-R</i>	CTAGCAACGTTGTTGTTGG

1.2.7 大豆 JAZ 基因家族的共表达网络分析 利用 STRING 数据库 ([https://string-db.org/cgi/input.pl?sessionId=s3gqo80KbNR8&input\\_page\\_show\\_search=off](https://string-db.org/cgi/input.pl?sessionId=s3gqo80KbNR8&input_page_show_search=off)) 构建大豆 JAZ 基因的共表达网络,定位大豆疫霉菌胁迫下的关键 JAZ 基因,互作依据来源选择实验项,其它参数均是默认值。

1.3 数据分析

荧光定量数据按照  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法,用 Excel 2016 软件分析;显著分析采用 T-test 法,用 SPSS 21.0 软件分析,极显著性水平为  $P < 0.01$ ,显著性水平为  $P < 0.05$ ;使用 GraphPad Prism 7 进行作图。

2 结果与分析

2.1 大豆 JAZ 基因家族成员的鉴定

利用 TIFY domain 查找得到 84 个转录本,其中

包含 Jas domain 的所有搜索结果;通过 BLAST 搜索得到 60 个转录本,两次结果取交集一共得到 89 个转录本结果。进一步分析这些转录本的结构域,最终确定 24 个基因同时含有 TIFY domain 和 Jas domain,将其定义为大豆 JAZ 基因家族成员,命名为 *GmJAZ1* ~ *GmJAZ24*。ExPASy 网站分析显示:大豆 JAZ 基因家族成员的基因长度范围为 402 ~ 1 161 bp,预测分子量为 15.20 ~ 41.54 kD;pI 为 6.43 ~ 9.89,均为亲水性蛋白。亚细胞定位结果显示:绝大部分成员定位于细胞核,而 *GmJAZ7* 定位于细胞质,*GmJAZ14* 定位于叶绿体,*GmJAZ20* 则定位于细胞骨架,*GmJAZ10* 和 *GmJAZ11* 则得到两个最高分的定位结果,分别是叶绿体和细胞核,以及细胞核和细胞质(表 2)。

表 2 大豆 JAZ 基因家族的基本信息

Table 2 Basic information of JAZ gene family in soybean

基因 Gene	基因序列号 Gene ID numbers	基因长度 Gene length/bp	氨基酸 Amino acid	等电点 pI	分子量 Molecular mass/kD	染色体定位 Chromosome	亚细胞定位 Subcellular location
<i>GmJAZ1</i>	<i>Glyma01G204400</i>	588	195	8.99	21.67	1	细胞核
<i>GmJAZ2</i>	<i>Glyma04G013800</i>	606	201	8.75	21.93	4	细胞核
<i>GmJAZ3</i>	<i>Glyma05G141200</i>	405	134	9.30	15.54	5	细胞核
<i>GmJAZ4</i>	<i>Glyma05G235500</i>	1116	371	8.76	39.01	5	细胞核
<i>GmJAZ5</i>	<i>Glyma06G013700</i>	483	160	9.56	17.75	6	细胞核
<i>GmJAZ6</i>	<i>Glyma07G041400</i>	699	232	9.18	25.09	7	细胞核
<i>GmJAZ7</i>	<i>Glyma08G043000</i>	1110	369	8.98	39.39	8	细胞质
<i>GmJAZ8</i>	<i>Glyma08G096500</i>	453	150	9.81	17.34	8	细胞核
<i>GmJAZ9</i>	<i>Glyma09G071600</i>	777	258	8.83	27.83	9	细胞核
<i>GmJAZ10</i>	<i>Glyma09G077500</i>	621	206	6.90	22.11	9	细胞核/叶绿体
<i>GmJAZ11</i>	<i>Glyma09G123600</i>	960	319	9.37	33.64	9	细胞核/细胞质
<i>GmJAZ12</i>	<i>Glyma09G174200</i>	1161	386	9.44	41.54	9	细胞核
<i>GmJAZ13</i>	<i>Glyma10G244400</i>	1041	346	8.89	38.10	10	细胞核
<i>GmJAZ14</i>	<i>Glyma11G038600</i>	588	195	9.21	21.626	11	叶绿体
<i>GmJAZ15</i>	<i>Glyma13G112000</i>	729	242	7.74	26.29	13	细胞核
<i>GmJAZ16</i>	<i>Glyma13G116100</i>	624	207	9.89	22.71	13	细胞核
<i>GmJAZ17</i>	<i>Glyma13G219100</i>	417	138	9.10	15.91	13	细胞核
<i>GmJAZ18</i>	<i>Glyma15G093100</i>	402	133	8.68	15.20	15	细胞核
<i>GmJAZ19</i>	<i>Glyma15G179600</i>	777	258	9.03	27.65	15	细胞核
<i>GmJAZ20</i>	<i>Glyma15G184900</i>	606	201	6.43	21.48	15	细胞骨
<i>GmJAZ21</i>	<i>Glyma16G010000</i>	693	230	9.00	24.90	16	细胞核
<i>GmJAZ22</i>	<i>Glyma17G043700</i>	594	197	9.79	21.47	17	细胞核
<i>GmJAZ23</i>	<i>Glyma17G047700</i>	729	242	9.00	26.36	17	细胞核
<i>GmJAZ24</i>	<i>Glyma20G150000</i>	1053	350	8.89	38.31	20	细胞核

2.2 大豆 JAZ 基因家族的结构分析

为了明确大豆 JAZ 基因的进化关系,利用 24 个 JAZ 全长蛋白质构建进化树,结果显示 24 个蛋白分成 5 个亚组。24 个 JAZ 基因的内含子、外显子信息分析结果显示: *GmJAZ* 基因外显子个数为 3 ~ 9, *GmJAZ13* 和 *GmJAZ24* 外显子个数最多, *GmJAZ3*、*GmJAZ8*、*GmJAZ17* 和 *GmJAZ18* 基因外显子个数最少,可以看出在进化树中位置相近的基因,结构也相似(图 1A)。

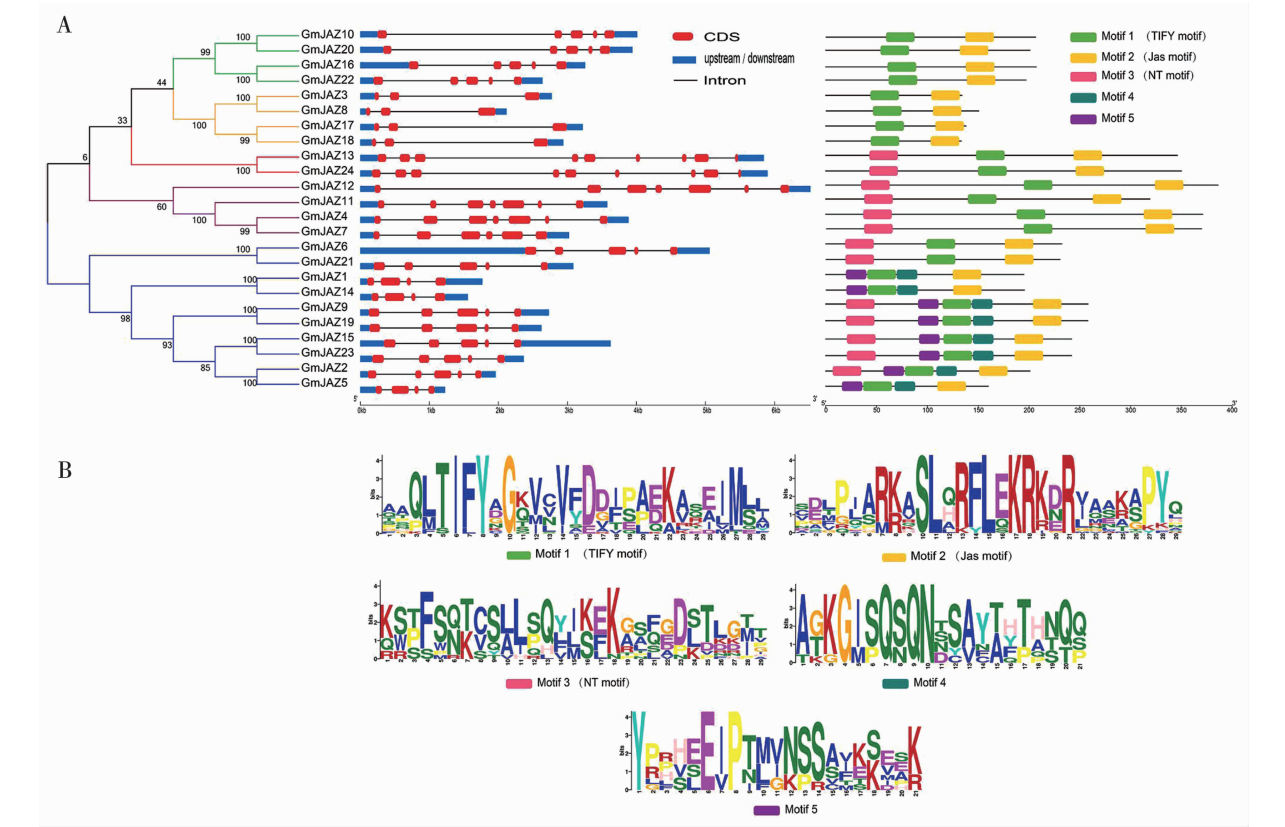
为了探索 *GmJAZ* 的功能,分析 24 个蛋白的保守基序,结果显示:所有成员都含有 TIFY motif 和 Jas motif,13 个基因含有 NT motif, Motif 4 和 Motif 5 结伴出现在 8 个 *GmJAZ* 基因上,并且紧临 TIFY motif 的两侧(图 1)。

多重序列比对结果显示: *GmJAZ* 存在两个十分明显的保守区域,分别是 N 端的 TIFY domain 和 C 端的 Jas domain,对比发现 *GmJAZ3*、*GmJAZ8*、*GmJAZ17* 和 *GmJAZ18* 编码蛋白中在这两个保守区域

的序列与其它 JAZ 基因编码蛋白存在氨基酸差异(图 2)。

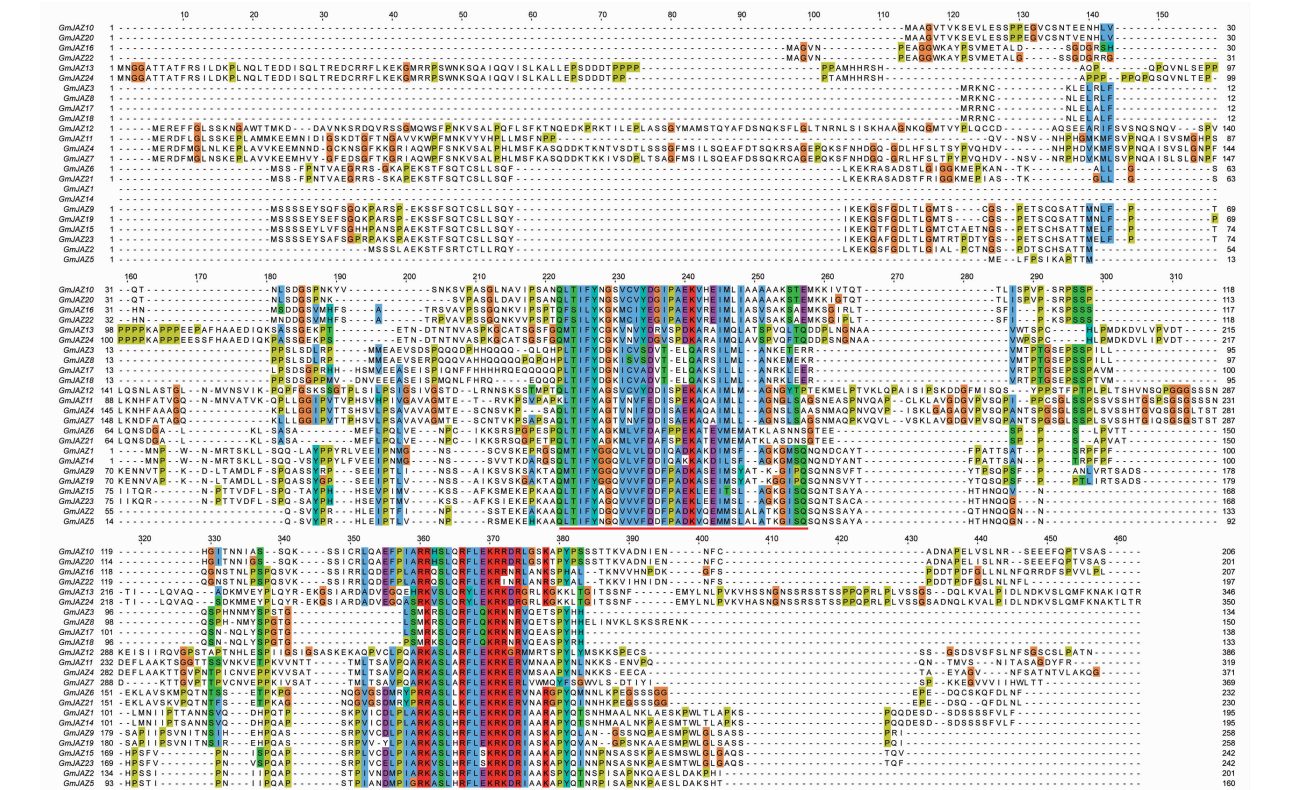
2.3 大豆 JAZ 基因家族的系统进化分析及分类

为了研究大豆 JAZ 与其它物种 JAZ 的进化关系,将拟南芥(12 个)、水稻(15 个)的 JAZ 序列与大豆 JAZ 进行多重序列比对,构建系统进化树。结果显示: JAZ 基因家族被分成 5 个亚组(C1 ~ C5); C1 亚组成员最多,包括 10 个 *GmJAZ* 基因、4 个 *AtJAZ* 基因和 10 个 *OsJAZ* 基因; C3 亚组成员最少,包括 2 个 *GmJAZ* 基因,1 个 *AtJAZ* 基因和 1 个 *OsJAZ* 基因;与拟南芥和水稻 JAZ 分组相似, *GmJAZ* 分在 C1 亚组的成员最多,分在 C3 亚组成员最少(图 3)。大豆 JAZ 基因与拟南芥 JAZ 基因进化关系最近,因此 JAZ 基因在这两个物种中的功能可能更加相似。进化树中每个亚组均含有水稻、拟南芥和大豆的 JAZ 基因,说明该家族起源于在单、双子叶植物分化之前。



A(左):大豆 JAZ 基因的进化树,树枝同色为同一亚组;A(中):内含子、外显子分布情况;A(右):motif 分布情况;B: motif 的 logo 图。  
A(left): The phylogenetic tree of JAZ genes in soybean, the same color of branches represents the same subgroup; A(middle): The distribution of introns and exons; A(right): The distribution of motifs. B: The logos of motif.  
图 1 大豆 JAZ 基因家族的结构分析  
Fig. 1 Gene structures of JAZ gene family in soybean





红色横线区域为 TIFY domain;蓝色横线区域为 Jas domain。  
Read horizontal line area represents TIFY domain; Blue horizontal line area represents Jas domain.

图 2 大豆 JAZ 基因家族的多重序列比对

Fig. 2 Multiple alignments of JAZ gene family in soybean

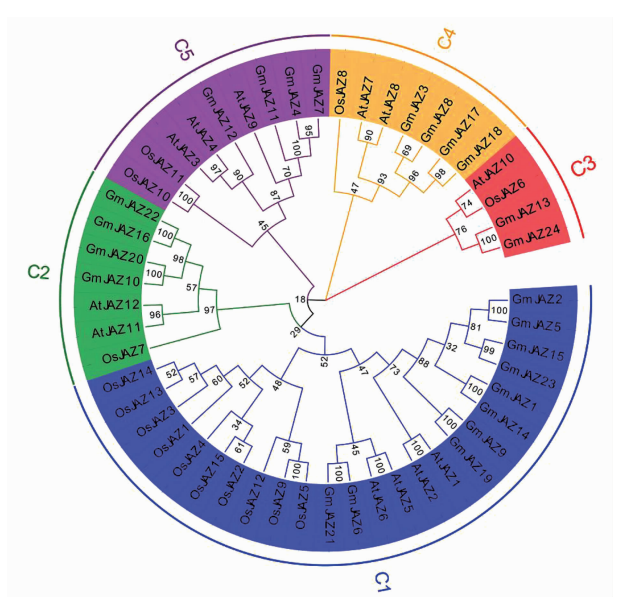


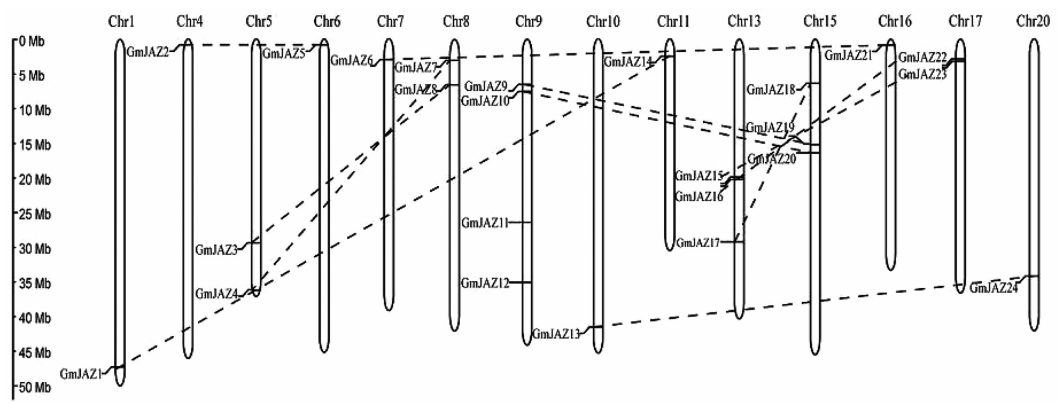
图 3 拟南芥、水稻、大豆 JAZ 基因的系统进化树及分组  
Fig. 3 Phylogenetic tree and subgroup of JAZ genes from Arabidopsis, rice and soybean

## 2.4 大豆 JAZ 基因家族在染色体上的分布

根据 *GmJAZ* 的位置信息绘制染色体定位图,结果显示:24 个 *GmJAZ* 不均匀的分布在除 2、3、12、14、18 和 19 号染色体外的 14 条染色体上。其中,9 号染色体上有 4 个 *GmJAZ* 基因,数目最多;其它染色体各含有 1~3 个 *GmJAZ* 基因。比对 *GmJAZ* 之间的同源性,发现 11 对同源基因,只有 *GmJAZ11* 和 *GmJAZ12* 未存在同源基因(图 4)。

## 2.5 大豆 JAZ 基因家族的启动子分析

将大豆 JAZ 基因起始密码子上游 2 000 bp 作为启动子区域进行顺式作用元件分析,结果显示:*GmJAZ* 含有多个转录因子作用元件以及参与激素/环境胁迫的顺式作用元件。所有的 *GmJAZ* 都含有 MYB 元件,22 个 *GmJAZ* 含有 MYC 元件,都属于转录因子作用元件。22 个 *GmJAZ* 含有乙烯响应元件 ERE,21 个 *GmJAZ* 含有脱落酸响应元件 ABRE,15 个 *GmJAZ* 含有茉莉酸响应元件 CGTCA-motif,9 个 *GmJAZ* 含有水杨酸响应元件 TCA-element,说明大豆 JAZ 基因家族与激素信号紧密相关(表 3)。



同源基因用虚线连接表示。  
Homologous genes are connected by dotted lines.

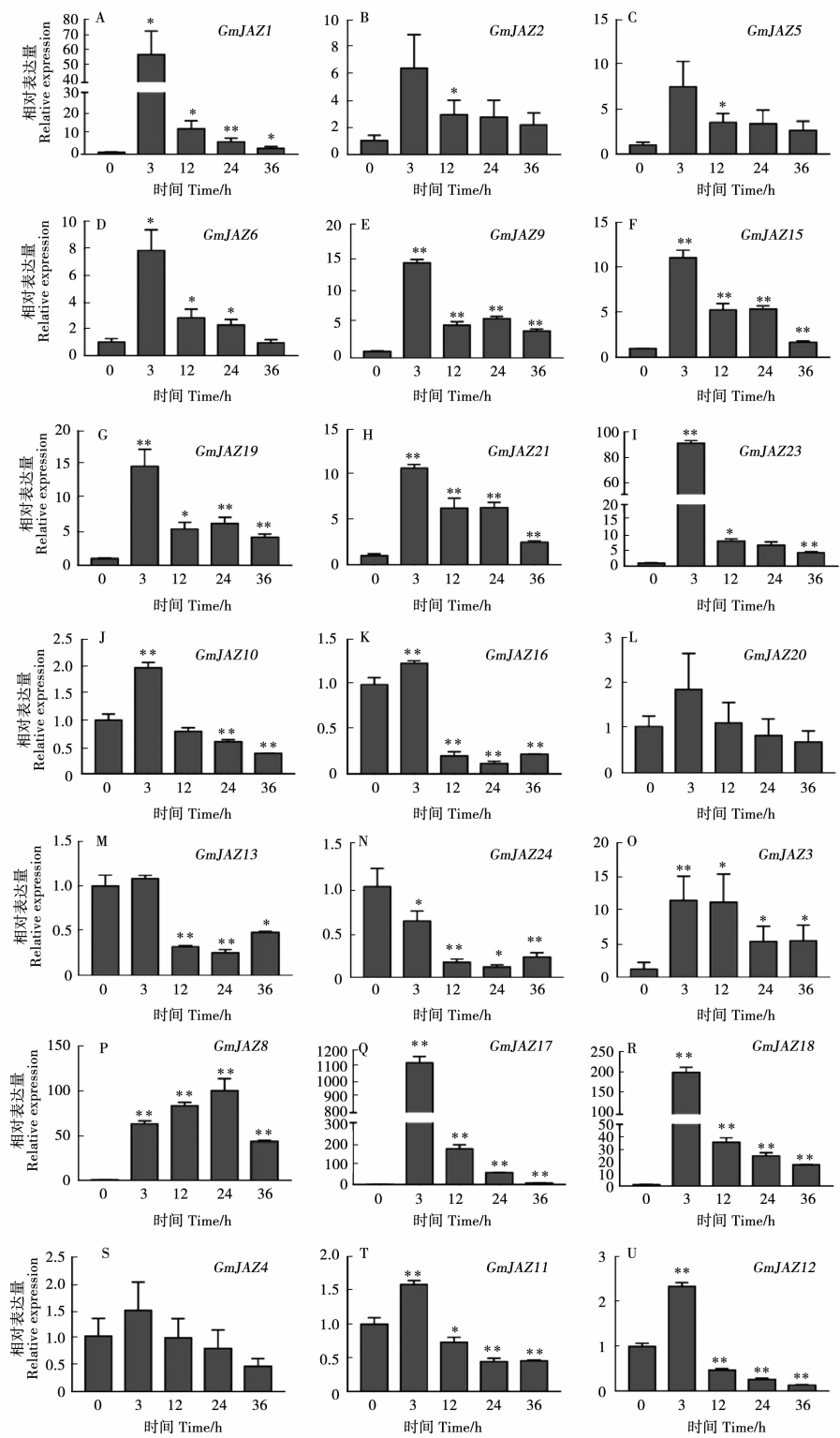
图 4 大豆 JAZ 基因家族的染色体定位及同源基因

Fig. 4 Chromosomal locations and homologous genes of JAZ gene family in soybean

表 3 大豆 JAZ 基因家族启动子中顺式作用元件的数量分布

Table 3 Distribution of cis-acting elements in the promoter of JAZ gene family in soybean

基因 Gene	茉莉酸响应元件 MeJA-responsive	脱落酸响应元件 ABA-responsive	乙烯响应元件 ETH-responsive	水杨酸响应元件 SA-responsive	其它元件 Other elements			
	MeJA-responsive	ABA-responsive	ETH-responsive	SA-responsive	Other elements			
	CGTCA-motif	ABRE	ERE	TCA-element	WUN-motif	TC-rich repeats	MYB	MYC
GmJAZ1	1	5	2	0	1	0	4	3
GmJAZ2	1	1	2	0	0	0	2	4
GmJAZ3	1	6	4	0	1	2	1	2
GmJAZ4	4	9	4	0	1	0	2	0
GmJAZ5	1	1	3	3	2	0	9	0
GmJAZ6	1	2	1	0	2	0	2	1
GmJAZ7	0	6	2	0	1	0	1	1
GmJAZ8	3	5	5	1	1	0	1	2
GmJAZ9	1	7	1	0	1	1	5	4
GmJAZ10	1	2	3	2	1	0	3	2
GmJAZ11	2	8	1	0	0	0	4	5
GmJAZ12	0	5	4	0	0	2	4	4
GmJAZ13	0	0	1	1	1	3	3	5
GmJAZ14	2	9	1	1	0	1	5	2
GmJAZ15	0	0	3	1	1	0	4	3
GmJAZ16	1	1	0	2	0	0	4	6
GmJAZ17	0	3	4	0	2	0	1	5
GmJAZ18	0	5	2	1	1	1	1	3
GmJAZ19	0	3	1	0	1	1	2	5
GmJAZ20	0	0	2	0	0	0	5	1
GmJAZ21	0	2	3	0	0	0	2	3
GmJAZ22	3	5	0	0	2	0	7	4
GmJAZ23	1	3	1	1	2	0	4	2
GmJAZ24	1	1	1	0	2	0	2	6
总计 Total	24	89	51	13	23	11	78	73



A ~I 属于 C1 亚组;J ~L 属于 C2 亚组;M 和 N 属于 C3 亚组;O ~R 属于 C4 亚组;S ~U 属于 C5 亚组。  
\* :处理间存在显著差异, $P < 0.05$ ; \* \*:处理间存在极显著差异, $P < 0.01$ 。  
A-I: C1 subgroup; J-L: C2 subgroup; M and N: C3 subgroup; O-R: C4 subgroup; S-U: C5 subgroup.  
\* indicated significant difference between treatments at  $P < 0.05$ ; \* \* indicated extremely significant difference between treatments at  $P < 0.01$ .

图5 大豆 JAZ 基因家族在大豆疫霉菌胁迫下的表达模式  
Fig. 5 Expression profiles of JAZ gene family under *P. sojae* stress in soybean



2.6 大豆 JAZ 基因家族在疫霉胁迫下的表达模式和基因共表达网络

为了探究大豆 JAZ 基因是否参与大豆响应大豆疫霉菌胁迫的防御过程,通过荧光定量检测 21 个 *GmJAZ* 在不同处理时间下的表达水平,结果发现不同 *GmJAZ* 成员具有不同的表达模式:C4 亚组成员 (*GmJAZ3*、*GmJAZ8*、*GmJAZ17*、*GmJAZ18*) 的转录水平在大豆疫霉菌处理后显著上调且幅度最大。相对于未处理的 0 h, *GmJAZ17* 的转录水平在 3 h 达到峰值,上调倍数高达 962 倍,其同源基因 *GmJAZ18* 同样也在 3 h 达到转录峰值且上调倍数为 196 倍; *GmJAZ8* 的转录水平在 24 h 达到峰值且上调 63 倍而其同源基因 *GmJAZ3* 在 3 h 达到转录峰值且上调 9 倍。C1 亚组成员 (*GmJAZ1*、*GmJAZ2*、*GmJAZ5*、*GmJAZ6*、*GmJAZ9*、*GmJAZ15*、*GmJAZ19*、*GmJAZ21*、*GmJAZ23*) 同样也响应大豆疫霉菌的处理,但除 *GmJAZ1*、*GmJAZ23* 之外大部分上调幅度较小。相对于 0 h, *GmJAZ1* 的表达水平在其峰值上调 56 倍, *GmJAZ23* 在其峰值上调 91 倍。其它亚组的基因并不响应大豆疫霉菌的处理,处理后 12 ~ 36 h JAZ 基因都下调表达,在 3 h 有十分微弱的上调但可以忽略不计。

通过 STRING 网站构建的互作网络显示:部分 *GmJAZ* 之间存在互作关系,其中 *GmJAZ1*、*GmJAZ2*、*GmJAZ9* 和 *GmJAZ19* 分别与 C4 亚组成员存在互作关系。

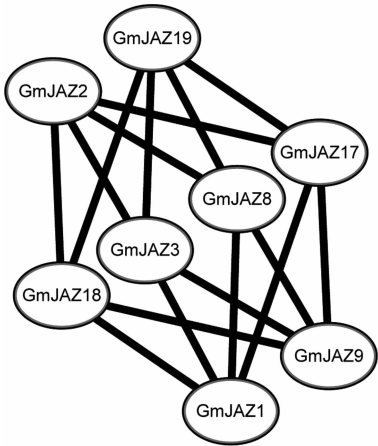


图6 大豆 JAZ 基因家族的共表达网络  
Fig. 6 Co-expression network of JAZ gene family in soybean

3 讨论

JAZ 蛋白除了是 JA 信号中的重要组分,在 JA 信号与其它激素信号的互作中发挥重要作用。JAZ 可以和 DELLA 蛋白发生互作,从而间接调控赤霉素 (gibberellin, GA) 信号,DELLA 蛋白是 GA 信号中重

要的阻遏蛋白<sup>[27]</sup>。SA 受体 NPR3 (nonexpressor of pathogenesis-related genes 3) 和 NPR4 通过促进 JAZ 蛋白降解来诱导 JA 信号早期响应基因的表达和 JA 合成<sup>[28]</sup>。此外 JAZ 蛋白在 JA 与 ETH、生长素 (auxin, AUX)、ABA 的互作中也被报道<sup>[29-30]</sup>。可见 JAZ 在激素信号的传导中具有重要地位,对其进行研究有利于理解植物激素信号在植物的生长发育和抗病防御中的作用机制。

本研究在大豆中鉴定到的 JAZ 基因数目大约是拟南芥、水稻 JAZ 基因个数的 2 倍,这可能是因为在进化过程中大豆发生了 2 次全基因组复制事件,而水稻和拟南芥只发生了 1 次<sup>[31-33]</sup>。JAZ 基因家族在单双子叶植物中都有报道,其中大豆 JAZ 基因个数与同为双子叶纲的棉花<sup>[34]</sup> (25 个)、芜菁<sup>[35]</sup> (21 个) 相近。

JAZ 基因家族具有两个保守的 ZIM、Jas 功能域,本研究鉴定的大豆 JAZ 基因同样具有这两个保守结构域且保守性高。除了这两个功能域之外,个别成员之间还含有功能域之外其它的保守基序,而这些基序可能使得大豆 JAZ 基因具有功能差异性。基因结构以及 motif 分布相似的 JAZ 基因在进化树上相距较近,说明结构相似的基因在功能上可能具有相似性。NT motif 保守性较弱,可以和 DELLA 蛋白互作<sup>[29]</sup>,推测含有该基序的 *GmJAZ* 可能与 GA 信号相关,并且也有研究提出存在 COI1-JAZ-DELLA-PIF 信号传导模块,级联调控被子植物 JA 介导的植物防御反应和 GA 介导的生长发育<sup>[36]</sup>。此外 NT domain 并不是 JAZ 蛋白调控 JA 信号的必需结构域,但在水稻中可以使 JAZ 被 MeJA 快速诱导<sup>[37]</sup>,本研究发现大豆 JAZ 基因家族的大部分成员都含有 NT motif (图 1A)。进化分析显示,大豆 JAZ 基因被分成了 5 个亚组,拟南芥 *AtJAZ* 在本研究中的分组结果与前人的研究相同<sup>[3, 38]</sup>,大豆 *GmJAZ* 的分组结果也与上述基因结构的分析结果相对应,证明本研究中系统进化树结果的可靠性。24 个 *GmJAZ* 不均匀分布于 14 条染色体上,且大部分基因存在同源现象,那么 JAZ 基因家族可能存在功能冗余,同时也说明大豆 *GmJAZ* 基因家族可能是通过全基因组复制的方式扩展。

*GmJAZ* 启动子分析发现大量与激素和胁迫相关的作用元件,但是不同成员间所含元件的种类和个数有所差异,表明不同的大豆 JAZ 基因可能响应不同的激素或者响应程度不一,从而导致功能的差异分化。此外胁迫响应元件 WUN-motif、TC-rich repeats 也在部分成员中出现,推测 *GmJAZ* 可能是作为中间转录因子调控不同激素信号间的联系从而

应答环境胁迫。大豆 JAZ 基因的功能差异在响应大豆疫霉菌胁迫时有十分明显的体现,属于 C4 亚组的 *GmJAZ3*、*GmJAZ8*、*GmJAZ17* 和 *GmJAZ18* 在大豆抗大豆疫霉菌时被显著诱导,因此 C4 亚组的4 个 JAZ 基因可能参与大豆抗大豆疫霉根腐病的防御过程。在水稻中,C4 亚组的 *OsJAZ8* 被报道参与了水稻抗半活体病原物黄单胞菌的过程<sup>[16]</sup>。共表达网络分析结果再次表明 C4 亚组可能是大豆抗大豆疫霉菌的 *GmJAZ* 核心成员,其它 JAZ 基因可能是通过与这 4 个核心成员直接或者间接联系来发挥作用,从而参与到大豆与大豆疫霉菌的互作当中。但这些基因对大豆抗大豆疫霉根腐病的作用机制并不清楚,还需要进一步分析。近年来,关于 SA 信号参与大豆抵抗大豆疫霉菌的报道增多<sup>[39-40]</sup>,而关于 JA 信号是否参与其中尚不明确。本研究通过分析大豆 JAZ 基因响应大豆疫霉菌胁迫的表达模式,推测 JA 信号很有可能同样参与大豆与大豆疫霉菌的互作反应,本研究结果将为大豆对大豆疫霉根腐病的抗性研究提供新的思路。进一步对 *GmJAZ3*、*GmJAZ8*、*GmJAZ17* 和 *GmJAZ18* 进行功能分析,将有助于解析 JA 信号在植物抵抗半活体病原物感染时的作用机制。

#### 4 结 论

本研究通过生物信息学分析,鉴定到 24 个大豆 JAZ 基因,均含有保守的 TIFY 结构域和 Jas 结构域,启动子区域都分布着转录因子作用元件和激素响应元件。研究将大豆 JAZ 家族成员分成了 5 个亚组,不同亚组间对大豆疫霉菌的应答模式有所不同,C4 亚组上调程度最为显著,C1 亚组则弱于 C4 亚组,而其它亚组为下调表达。此外,共表达网络显示 C1 亚组部分成员与 C4 亚组所有成员都存在互作关系。本研究系统的阐述了大豆 JAZ 基因的特征和潜在功能,挖掘到 *GmJAZ3*、*GmJAZ8*、*GmJAZ17*和 *GmJAZ18* 可能为参与大豆与大豆疫霉菌互作的关键 JAZ 基因。同时,该研究为进一步研究 JAZ 基因在植物抗病中的作用提供参考。

#### 参考文献

[1] 宋云,李林宣,卓凤萍,等. 茉莉酸信号传导在植物抗性方面研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2015, 17(2): 17-24. (Song Y, Li L X, Zhou F P, et al. Progress on jasmonic acid signaling in plant stress resistant[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2015, 17(2): 17-24.)

[2] Chico J M, Chini A, Fonseca S, et al. JAZ repressors set the rhythm in jasmonate signaling[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2008, 11(5): 486-494.

[3] Browse J. Jasmonate passes muster: A receptor and targets for the defense hormone[J]. Annual Review of Plant Biology, 2009, 60: 183-205.

[4] Thines B, Katsir L, Melotto M, et al. JAZ repressor proteins are targets of the SCF<sup>COI1</sup> complex during jasmonate signalling[J]. Nature, 2007, 448(7154): 661-665.

[5] 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): 666-671.

[6] Yan Y, Stolz S, Chetelat A, et al. A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway[J]. The Plant Cell, 2007, 19(8): 2470-2483.

[7] Pauwels L, Goossens A. The JAZ proteins: A crucial interface in the jasmonate signaling cascade[J]. The Plant Cell, 2011, 23(9): 3089-3100.

[8] Oh Y, Baldwin I T, Galis I. NaJAZh regulates a subset of defense responses against herbivores and spontaneous leaf necrosis in *Nicotiana attenuata* plants[J]. Plant Physiology, 2012, 159(2): 769-788.

[9] Taniguchi S, Hosokawa-Shinonaga Y, Tamaoki D, et al. Jasmonate induction of the monoterpene linalool confers resistance to rice bacterial blight and its biosynthesis is regulated by JAZ protein in rice [J]. Plant, Cell and Environment, 2014, 37(2): 451-461.

[10] Zhang Z, Li X, Yu R, et al. Isolation, structural analysis, and expression characteristics of the maize TIFY gene family[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2015, 290(5): 1849-1858.

[11] Sun H, Chen L, Li J, et al. The JASMONATE ZIM-domain gene family mediates JA signaling and stress response in cotton[J]. Plant and Cell Physiology, 2017, 58(12): 2139-2154.

[12] 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]. The Plant Cell, 2009, 21(1): 131-145.

[13] Sheard L B, Tan X, Mao H, et al. Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor [J]. Nature, 2010, 468(7322): 400-405.

[14] 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]. Journal of Experimental Botany, 2016, 67(8): 2367-2386.

[15] 潘婷, 胡利伟, 王中, 等. 烟草 JAZ1 基因的克隆和功能分析[J]. 烟草科技, 2018, 51(12): 15-22. (Pan T, Hu L W, Wang Z, et al. Cloning and function analysis of JAZ1 gene from *Nicotiana tabacum*[J]. Tobacco Science and Technology, 2018, 51(12): 15-22.)

[16] Yamada S, Kano A, Tamaoki D, et al. Involvement of OsJAZ8 in jasmonate-induced resistance to bacterial blight in rice[J]. Plant and Cell Physiology, 2012, 53(12): 2060-2072.

[17] He X, Zhu L, Wassan G M, et al. GhJAZ2 attenuates cotton resistance to biotic stresses *via* the inhibition of the transcriptional activity of GhbHLH171[J]. Molecular Plant Pathology, 2018, 19(4): 896-908.

[18] 张海鹏, 郭娜, 牛景萍, 等. 大豆品种郑 97196 对疫霉根腐病的抗性遗传分析及基因定位[J]. 大豆科学, 2016, 35(3):

- 373-379. (Zhang H P, Guo N, Niu J P, et al. Genetic analysis of resistance to *Phytophthora sojae* and mapping of resistance gene in soybean cultivar Zheng 97196[J]. Soybean Science, 2016, 35 (3) : 373-379.
- [19] Tyler B M. *Phytophthora sojae*: Root rot pathogen of soybean and model oomycete[J]. Molecular Plant Pathology, 2007, 8 (1) : 1-8.
- [20] Berens M L, Berry H M, Mine A, et al. Evolution of hormone signaling networks in plant defense[J]. Annual Review of Phytopathology, 2017, 55:401-425.
- [21] Pieterse C M, Leon-Reyes A, van der Ent S, et al. Networking by small-molecule hormones in plant immunity[J]. Nature Chemical Biology, 2009, 5(5) : 308-316.
- [22] Glazebrook J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens[J]. Annual Review of Phytopathology, 2005, 43:205-227.
- [23] Zhang X, Bao Y, Shan D, et al. *Magnaporthe oryzae* induces the expression of a microRNA to suppress the immune response in rice [J]. Plant Physiology, 2018, 177(1) : 352-368.
- [24] Subramanian B, Gao S, Lercher M J, et al. Evolvview v3: A web-server for visualization, annotation, and management of phylogenetic trees[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47 (W1) : W270-W275.
- [25] Gu Z, Cavalcanti A, Chen F C, et al. Extent of gene duplication in the genomes of *Drosophila*, nematode, and yeast[J]. Molecular Biology and Evolution, 2002, 19(3) : 256-262.
- [26] Dorrance A E, Schmitthenner A F. New sources of resistance to *Phytophthora sojae* in the soybean plant introductions [J]. Plant Disease, 2000, 84(12) : 1303-1308.
- [27] Hou X, Lee L Y, Xia K, et al. DELLAs modulate jasmonate signaling via competitive binding to JAZs[J]. Developmental Cell, 2010, 19(6) : 884-894.
- [28] Liu L, Sonbol F M, Huot B, et al. Salicylic acid receptors activate jasmonic acid signalling through a non-canonical pathway to promote effector-triggered immunity[J]. Nature Communications, 2016, 7:13099.
- [29] Kazan K, Manners J M. JAZ repressors and the orchestration of phytohormone crosstalk[J]. Trends in Plant Science, 2012, 17 (1) : 22-31.
- [30] Ju L, Jing Y, Shi P, et al. JAZ proteins modulate seed germination through interaction with ABI5 in bread wheat and *Arabidopsis* [J/OL]. The New Phytologist[2019-03-22]. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.15757>.
- [31] Blanc G, Barakat A, Guyot R, et al. Extensive duplication and reshuffling in the *Arabidopsis* genome[J]. The Plant Cell, 2000, 12(7) : 1093-1101.
- [32] Schlueter J A, Dixon P, Granger C, et al. Mining EST databases to resolve evolutionary events in major crop species[J]. Genome, 2004, 47(5) : 868-876.
- [33] Wang X, Shi X, Hao B, et al. Duplication and DNA segmental loss in the rice genome: Implications for diploidization[J]. The New Phytologist, 2005, 165(3) : 937-946.
- [34] Sun Q, Wang G, Zhang X, et al. Genome-wide identification of the TIFY gene family in three cultivated *Gossypium* species and the expression of JAZ genes[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 42418.
- [35] Saha G, Park J I, Kayum M A, et al. A genome-wide analysis reveals stress and hormone responsive patterns of TIFY family genes in *Brassica rapa*[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 936.
- [36] Yang D L, Yao J, Mei C S, et al. Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(19) : E1192-E1200.
- [37] Ye H, Du H, Tang N, et al. Identification and expression profiling analysis of TIFY family genes involved in stress and phytohormone responses in rice[J]. Plant Molecular Biology, 2009, 71 (3) : 291-305.
- [38] 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) : 128-136.
- [39] Shine M B, Yang J W, El-Habbak M, et al. Cooperative functioning between phenylalanine ammonia lyase and isochorismate synthase activities contributes to salicylic acid biosynthesis in soybean [J]. The New Phytologist, 2016, 212(3) : 627-636.
- [40] Zhang C, Gao H, Li R, et al. GmBTB/POZ, a novel BTB/POZ domain-containing Nucleus protein, positively regulates the response of soybean to *Phytophthora sojae* infection[J]. Molecular Plant Pathology, 2019, 20(1) : 78-91.