

AaPIF3 对青蒿素生物合成基因及 *AaERF1* 的转录调控研究

扎西次仁^{1,2}, 张巧卓¹, 杨春贤¹, 兰小中³, 廖志华¹

1. 西南大学 生命科学学院, 重庆 400715; 2. 西藏自治区藏医院, 拉萨 850000;

3. 西藏农牧学院 食品科学学院, 西藏 林芝 860000

摘要: AaPIF3 是药用植物黄花蒿(*Artemisia annua*)中正调控青蒿素生物合成的一个 bHLH 转录因子, 但其具体的调控机制并不清楚. 综合采用分子生物学和生物化学方法研究 AaPIF3 调控青蒿素生物合成的机制, 采用酵母单杂交(Yeast One-hybrid)技术研究 AaPIF3 与青蒿素生物合成途径中 4 个基因(*ADS*, *CYP71AV1*, *DBR2* 和 *ALDH1*)和 *AaERF1* 启动子的相互作用; 采用实时荧光定量 PCR 技术检测 *AaERF1* 的表达量; 采用双荧光素酶(Dual-Luciferase)技术研究 AaPIF3 对 *AaERF1* 的转录激活作用. 结果表明, AaPIF3 均不能与青蒿素生物合成途径中 4 个基因启动子中的顺式作用元件结合, 但能与 *AaERF1* 启动子结合; 过表达 AaPIF3 的青蒿中 *AaERF1* 的表达量为野生型对照的 3.34~6.30 倍; 双荧光素酶实验表明, AaPIF3 能显著提高 *AaERF1* 启动子活性, 为对照的 1.67 倍. 得出 AaPIF3 对青蒿素生物合成的调控是属于间接调控, 其具体调控机制为 AaPIF3 通过直接转录激活 *AaERF1* 而参与青蒿素生物合成的调控.

关键词: AaPIF3; *AaERF1*; 黄花蒿; 酵母单杂交; 双荧光素酶; 转录调控

中图分类号: O784

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2020)10-0065-09

黄花蒿(*Artemisia annua*)是菊科蒿属 1 年生草本植物, 其药材名为青蒿, 已使用近 2000 年^[1]. 青蒿素(Artemisinin)是从青蒿中提取出的一种倍半萜内酯化合物(Sesquiterpene Lactone), 是治疗疟疾的特效药, 具有速效和低毒的特点^[2-4]. 青蒿素生物合成起始于植物中普遍存在的法尼烯焦磷酸(Farnesyl diphosphate, FPP), 随后在 4 个特异性青蒿素生物合成酶作用下被转化为青蒿素. 编码这 4 个酶的基因分别是紫槐二烯合成酶基因(*ADS*)^[5]、细胞色素 P450 单加氧酶基因(*CYP71AV1*)^[6]、青蒿醛 $\Delta 11(13)$ 还原酶基因(*DBR2*)^[7]和醛脱氢酶 1 基因(*ALDH1*)^[8]. 青蒿素生物合成基因表达水平的高低决定了青蒿素含量的高低, 而这些基因表达受到转录因子的严格调控. 迄今为止, 已经报道了多个调控青蒿素生物合成的转录因子, 如 *AaERF1*^[9], *AaORA*^[10], *AabZIP1*^[11], *AaMYC2*^[12], *AaGSW1*^[13], *AabHLH112*^[14]和 *AaPIF3*^[15]等不同家族转录因子. 有些转录因子如 *AaERF1*, *AaGSW1*, *AaMYC2*和 *AabZIP1*通过与青蒿素生物合成基因启动子中的相关顺式作用元件(Cis-element)直接结合并激活其表达, 从而实现对青蒿素生物合成基因的直接正调控; 有的转录因子如 *AaORA*和 *AabHLH112*是通过直接结合转录因子启动子并激活其表达, 从而实现对青蒿素生物合成基因的间接正调控.

转录调控是植物次生代谢相关基因表达的主要调控方式之一, 转录因子在其中作用明显^[16]. bHLH 是

收稿日期: 2020-03-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(81973420).

作者简介: 扎西次仁(1975—), 男, 助理研究员, 主要从事藏药资源的研究.

通信作者, 廖志华, 教授, 博士研究生导师.

植物中最大的转录因子家族之一,在发育和生理过程中发挥重要作用,如腺体的形成^[17]、激素与光信号转导^[18]以及对次生代谢的调节等^[19]. 迄今为止,已发现了 4 个正调控青蒿素生物合成的 bHLH 类转录因子,包括 AabHLH1^[20], AaMYC2^[12], AabHLH112^[14] 和 AaPIF3^[15], 其中 AabHLH1, AaMYC2 和 AabHLH112 调控青蒿素生物合成的机制研究较为清楚. AabHLH1 和 AaMYC2 能够直接结合青蒿素生物合成基因启动子中的 G-box 元件并激活这些基因表达,从而实现对青蒿素生物合成基因的直接调控^[12, 20]; AabHLH112 则是能够结合 *AaERF1* 启动子区域的 G-box 元件并激活 *AaERF1* 表达,而 AabHLH112 并不能结合青蒿素生物合成基因启动子中的 G-box 元件;过表达 AabHLH112 能够大幅度提高青蒿素含量,该研究表明 AabHLH112 是通过直接激活 *AaERF1* 表达而实现对青蒿素生物合成的调控^[14], 因此, AabHLH112 对青蒿素生物合成的转录调控是间接调控. AaPIF3 同样属于 bHLH 转录因子家族,能够激活青蒿素生物合成基因表达,在青蒿中过表达 AaPIF3 能够大幅度提高 *ADS*, *CYP71AV1*, *DBR2* 和 *ALDH1* 的表达水平,从而促进青蒿素生物合成^[15]. 但关于 AaPIF3 是否直接调控青蒿素生物合成基因并不清楚,同时 AaPIF3 是否调控 *AaERF1* 也未知.

为解析 AaPIF3 调控青蒿素生物合成的分子机制,采用酵母单杂交(Yeast One-hybrid, Y1H)技术研究了 AaPIF3 与青蒿素生物合成基因(*ADS*, *CYP71AV1*, *DBR2* 和 *ALDH1*)和 *AaERF1* 启动子的相互作用,分析了过表达 AaPIF3 青蒿中 *AaERF1* 的表达量,并采用双荧光素酶(Dual-Luciferase, Dual-Luc)报告系统评价了 AaPIF3 对 *AaERF1* 启动子的调控作用,从而明确了 AaPIF3 转录调控青蒿素生物合成的机制.

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用的烟草为本生烟,本生烟种子由西南大学生命科学学院实验室收获保存,本生烟种植于该实验室温室 10cm×10cm 小方钵内,室温 25 ℃,光照周期为光照/黑暗 16 h/8 h. 本生烟在水肥充足的情况下,生长 2~3 周即可使用. 所用青蒿材料为本团队已经报道的过表达 AaPIF3 的转基因青蒿和非转基因青蒿^[15].

1.2 质粒与菌株

酵母单杂交菌株为 EGY48,质粒为 pB42AD 和 p178; Dual-Luciferase 载体 PHB 及 pGreenII0800-LUC 均为该实验室保存^[21].

1.3 方 法

1.3.1 酵母单杂交实验

酵母单杂交实验可以验证蛋白质和 DNA 序列能否结合,本实验构建酵母单杂交载体时,将转录因子 AaPIF3 通过酶切位点 EcoRI 和 XhoI 构建到 pB42AD 载体上,根据 G-box 元件截段的启动子序列通过 XhoI 酶切后构建到 p178 载体上(表 1),包含启动子片段的 p178 结构如下: pADS(-1 718~-1 127), pADS(-1 144~-539), pADS(-562~-1); pCYP71AV1(-1 150~-840), pCYP71AV1(-844~-560), pCYP71AV1(-286~-1); pDBR2(-1 651~-1 128), pDBR2(-1 219~-448), pDBR2(-467~-1); pALDH1(-2 004~-1 406), pALDH1(-1 490~-934), pALDH1(-1 015~-437), pALDH1(-538~-1); pAaERF1(-1 384~-922), pAaERF1(-994~-448), pAaERF1(-532~-1). 通过测序验证重组载体的正确性,杂交实验方法如 Zhang 等所述^[11],将 pB42AD-AaPIF3 与 p178-pADS/pCY71AV1/pDBR2/pALDH1/pERF1 的质粒共转化至酵母菌株 EGY48,并于 Trp,Ura 缺陷型固体培养基上 30 ℃倒置培养 2~3 d 后挑取 5 个酵母单菌落再于 Trp,Ura 缺陷型固液体培养基中 30 ℃, 200 r/min 培养 24 h,离心(12 000 r/min, 15 s)收集酵母细胞并用 100 μL 无菌水重悬,取 10 μL 重悬菌液滴到 X-gal 显色培养基上,空的 pB42AD 及 p178 质粒作为阴性对照. 30 ℃避光倒置培养 48~72 h 后观察显色情况并拍照记录.

表 1 实验所用引物

基因名	引物序列	应 用
<i>pAaERF1F</i>	AATTCATAACAAAAATCCACAC	启动子克隆
<i>pAaERF1R</i>	AAAGGAAGATAATGGTGTGT	启动子克隆
<i>AaqERF1F</i>	CGTGATGCCGTTAGTGTGGATGG	q-PCR
<i>AaqERF1R</i>	GATGTTGAAGCCGAAGCCGAAGAC	q-PCR
<i>β-ACTINF</i>	CCAGGCTGTTCAGTCTCTGTAT	q-PCR
<i>β-ACTINR</i>	CGCTCGGTAAGGATCTTCATCA	q-PCR
<i>AaPIF3-42ADF</i>	CGCCAATTGATGCCACTTTCAGAGCTGTA	酵母单杂交
<i>AaPIF3-42ADR</i>	CGCCTCGAGTCAATCAATACCAGCTGTACTAC	酵母单杂交
<i>pADS-1F</i>	CC CTCGAGTTTGAAAATGAAAAATCAAAAACACCATC	酵母单杂交
<i>pADS-1R</i>	TG CTCGAGTTCATTTTCATTCGACACAAAAATAAAG	酵母单杂交
<i>pADS-2F</i>	CC CTCGAGTGTCGAATGAAAATGAAATCGTGAG	酵母单杂交
<i>pADS-2R</i>	TG CTCGAG CAATGCAAGTCTAACACCACCAAGCC	酵母单杂交
<i>pADS-3F</i>	CC CTCGAGTTGGTGGTGTAGACTTGCATTG	酵母单杂交
<i>pADS-3R</i>	TG CTCGAGGAAAGACAGTAGCACACTCAATAAG	酵母单杂交
<i>pCYP71AV1-1F</i>	CC CTCGAGAATGGGTCAATTTCTGGGTTGAG	酵母单杂交
<i>pCYP71AV1-1R</i>	TG CTCGAGATGATGTTTTGTAGTGTGCTTG	酵母单杂交
<i>pCYP71AV1-2F</i>	CC CTCGAGCACTACTGACATCTTTATGTGTTTTAAC	酵母单杂交
<i>pCYP71AV1-2R</i>	TG CTCGAGATGGACCATTGCTATCCTTATTTG	酵母单杂交
<i>pCYP71AV1-3F</i>	CC CTCGAGTTTGTACAAACTCAGTAGCATAACATG	酵母单杂交
<i>pCYP71AV1-3R</i>	TG CTCGAGACCTTAATTAGATTCAAAAGTTG	酵母单杂交
<i>pCYP71AV1-4F</i>	CC CTCGAGCACTCACAAACTAAAACTTTCG	酵母单杂交
<i>pCYP71AV1-4R</i>	TG CTCGAGGCTTTTAGTTACTCTTCATGG	酵母单杂交
<i>pDBR2-1F</i>	TAAGTATAGTAGAAAGCAAATACG	酵母单杂交
<i>pDBR2-1R</i>	TG CTCGAG AATTTTCTCCAAACGACAGGGAC	酵母单杂交
<i>pDBR2-2F</i>	CC CTCGAG ACATAAATGGTCCCTGTCGTTTGG	酵母单杂交
<i>pDBR2-2R</i>	TG CTCGAG TGGCACCATGTTGACTTGAC	酵母单杂交
<i>pDBR2-3F</i>	CC CTCGAG TCAAGTCAACATGGTGCCAC	酵母单杂交
<i>pDBR2-3R</i>	TG CTCGAG TGAGTTTGATGTTGACCAGGATC	酵母单杂交
<i>pALDH-1F</i>	CC CTCGAG ACATGAACCACTAGAAGGGAAG	酵母单杂交
<i>pALDH1-1R</i>	TG CTCGAG TGGAAATGGAGTTTTGCGAATTCTC	酵母单杂交
<i>pALDH1-2F</i>	CC CTCGAG AGTGACATTGAACCCTCGAATAC	酵母单杂交
<i>pALDH1-2R</i>	TG CTCGAG TGCATGTAAGTTTACGGATGTTTC	酵母单杂交
<i>pALDH1-3F</i>	ACC CTCGAG AGACCCTAATATATGTTTGTATGC	酵母单杂交
<i>pALDH1-3R</i>	TG CTCGAG TCGAAATACGAAAGTACCCACTAG	酵母单杂交
<i>pALDH1-4F</i>	CC CTCGAG TGTTACAATTATATCCCTTTTGGTAAC	酵母单杂交
<i>pALDH1-4R</i>	TG CTCGAG CTTTGTTTTTTATGAAATTTTTATTCAAGG	酵母单杂交
<i>pERF1-pG-F</i>	TTCCTGCAGGAGTTGGAATCGTGTTACCAC	荧光双分子
<i>pERF1-pG-R</i>	GTGGATCCTAAAGGAAGATAATGGTGTG	荧光双分子
<i>PHB-AaPIF3-F</i>	CG CCTGCAGGA ATGCCACTTTCAGAGCTGTA	荧光双分子
<i>PHB-AaPIF3-R</i>	CG GGATCC TCAATCAATACCAGCTGTACTAC	荧光双分子

1.3.2 双荧光素酶检测实验

Dual-Luc 报告系统被广泛用于研究调控蛋白对目标基因启动子的调控作用,该实验室也曾采用该方法评价 AabZIP1, AaAPK1 和 AabHLH112 对青蒿素生物合成基因或相关转录因子启动子的激活活性^[11, 14, 22], 因此研究将继续采用 Dual-Luc 评价 AaPIF3 对 *AaERF1* 启动子的调控作用. 将 *AaERF1* (JQ513909) 启动子序列克隆并插入到 pGreenII0800-LUC 质粒的 LUC 基因上游, 得到重组质粒 pAaERF1::LUC 作为报告基因, *CaMV* 35S 启动子控制的转录因子(AaPIF3)形成的重组质粒 PHB-AaPIF3 作为效应基因, *CaMV* 35S 启动子控制的黄色荧光蛋白(YFP)形成的质粒 PHB-YFP 作为阴性对照. 将质粒分别转至农杆菌菌株 GV3101 中, 并将包含 PHB-AaPIF3 及 pAaERF1::LUC 菌株共转化至烟草叶片中, PHB-YFP 及 pAaERF1::LUC 菌株共转化至烟草叶片作为阴性对照. 48~72 h 后取烟草叶片用 Dual-Luciferase^R 试剂盒(Promega, WI)进行测定, 采集同一生长条件下的 5 个样本进行统计分析.

2 结果与分析

2.1 AaPIF3 不能结合青蒿素生物合成基因启动子

许多研究表明 bHLH 类转录因子, 如 AaMYC2 和 AabHLH1, 通过识别青蒿素生物合成基因启动子区域的顺式作用元件 G-box, 并与之结合来调控青蒿素的生物合成^[12, 20]. 虽然我们已报道的 Dual-Luc 实验和转基因结果表明 AaPIF3 能够正调控青蒿素生物合成基因的表达^[15], 但并不知道 AaPIF3 对青蒿素生物合成基因的调控是直接调控还是间接调控. Y1H(酵母单杂交)是常用的研究转录因子和启动子相互作用的技术之一, 本研究采用 Y1H 系统研究了 AaPIF3 对 pADS, pCYP71AV1, pDBR2 和 pALDH1 的相互作用.

分别以 ADS 基因启动子的 3 个重叠片段, 即 pADS(-562~-1), pADS(-1 144~-539)和 pADS(-1 718~-1 127), 与 AaPIF3 进行 Y1H 实验, 结果发现在 X-Gal 培养基上这些转基因酵母并没有变蓝(图 1a). 分别以 CYP71AV1 基因启动子的 4 个重叠片段, 即 pCYP71AV1(-286~-1), pCYP71AV1(-565~-270), pCYP71AV1(-844~-560)和 pCYP71AV1(-1 150~-840), 与 AaPIF3 进行 Y1H 实验, 结果发现在 X-Gal 培养基上这些转基因酵母也没有变蓝(图 1b). 分别以 DBR2 基因启动子的 3 个重叠片段, 即 pDBR2(-538~-1), pDBR2(-1 015~-437)和 pDBR2(-1 490~-934), 与 AaPIF3 进行 Y1H 实验, 结果发现在 X-Gal 培养基上这些转基因酵母也没有变蓝(图 1c). 分别以 ALDH1 基因启动子的 4 个重叠片段, 即 pALDH1(-538~-1), pALDH1(-1 015~-437), pALDH1(-1 490~-934)和 pALDH1(-2 004~-1 406), 与 AaPIF3 进行 Y1H 实验, 结果发现在 X-Gal 培养基上这些转基因酵母也没有变蓝(图 1d). Y1H 实验结果表明 AaPIF3 不能结合青蒿素生物合成基因启动子, 对青蒿素生物合成基因的转录调控属于间接调控.

2.2 AaPIF3 能够转录激活 AaERF1

我们先前研究报道 AabHLH112 能够直接与 *AaERF1* 启动子中 G-box 结合并激活 *AaERF1* 表达^[14], 由于 AaPIF3 和 AabHLH112 同属于 bHLH 转录因子家族, 因此推测 *AaERF1* 可能是 AaPIF3 的直接作用靶标基因. 通过基因表达量分析发现, 过表达 AaPIF3 的转基因青蒿中 *AaERF1* 表达量均比对照显著提高. 在转基因株系 OE10, OE21 和 OE26 中, *AaERF1* 表达量分别比对照提高了 4.30, 6.30 和 3.34 倍

(图 2). 基因表达分析结果表明, AaPIF3 对 AaERF1 的表达具有正调控作用.

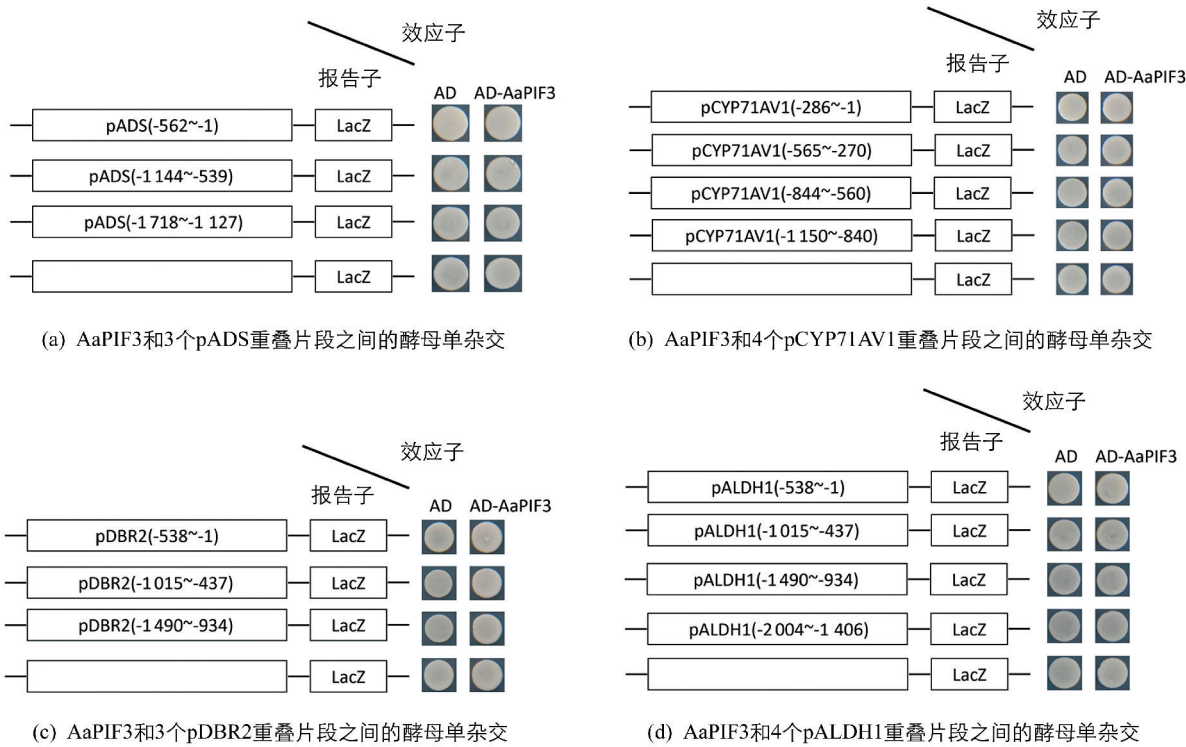


图 1 AaPIF3 与青蒿素生物合成基因启动子的酵母单杂交分析

采用 Dual-Luc 实验进一步研究了 AaPIF3 对 pAaERF1 的转录激活作用. 在 Dual-Luc 实验中, 构建 pAaERF1 驱动 LUC 表达的载体(pAaERF1::LUC)作为报告子, 构建 p35S 驱动 AaERF3 表达的载体(p35S::AaPIF3)作为效应子(图 3a). 在共表达 pAaERF1::LUC 和 p35S::AaPIF3 的烟草叶片细胞中, REN/LUC 值为 0.060 ± 0.006 ; 在共表达 pAaERF1::LUC 和 p35S::YFP 的烟草叶片细胞中(对照), REN/LUC 值为 0.036 ± 0.003 (图 3b). Dual-Luc 实验结果显示当 AaPIF3 表达时, pAaERF1 活性得到显著增强, 为对照的 1.67 倍(图 3b). Dual-Luc 研究结果与 AaERF1 基因表达分析结果吻合, 均表明 AaPIF3 能够转录激活 AaERF1.

2.3 AaPIF3 能够结合 AaERF1 启动子

为进一步研究 AaPIF3 对 AaERF1 的转录激活作用是否属于直接作用, 开展了 AaPIF3 与 AaERF1 启动子(pAaERF1)的酵母单杂交研究. 将 pAaERF1 分成 3 个重叠片段, 即 pAaERF1(-532~-1), pAaERF1(-994~-448) 和 pAaERF1(-1 384~-922), 与 AaPIF3 进行 Y1H 实验, 结果发现在 X-Gal 培养基上只有 pAaERF1(-532~-1)截段与 AD-AaPIF3 的互作片段变蓝(图 4). 表明 AaPIF3 对 AaERF1 确实有转录激活作用, 且通过与 AaERF1 启动子的 G-box 作用元件结合调控 AaERF1 的转录.

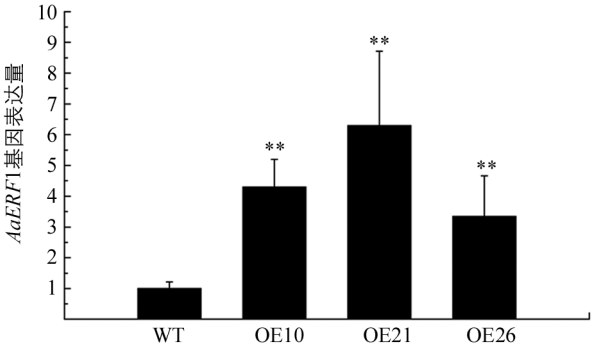
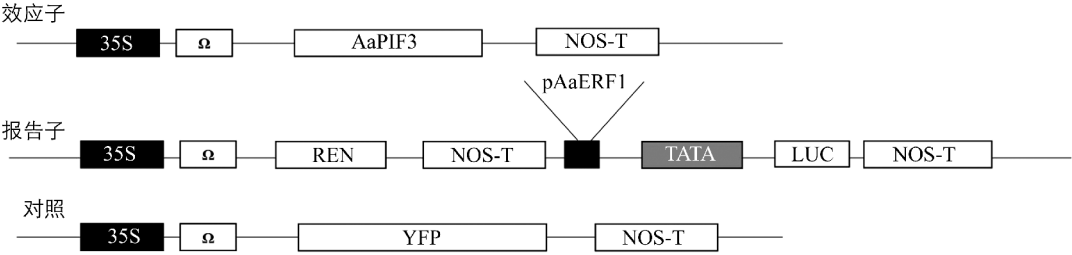
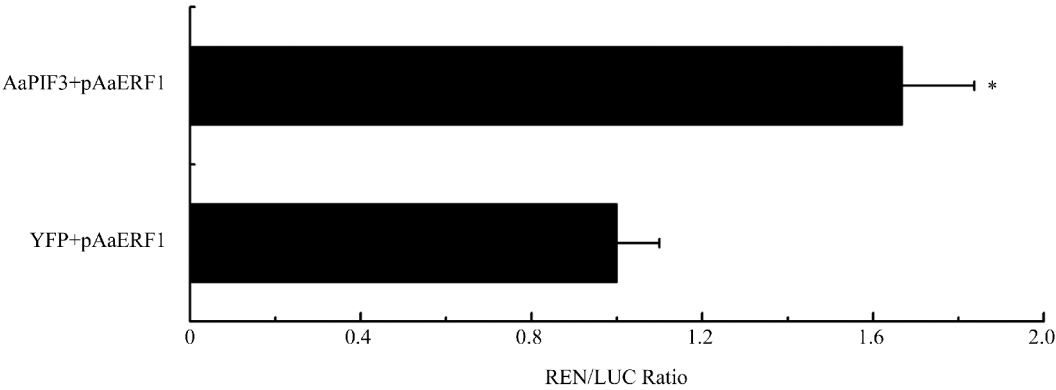


图 2 野生型(WT)和 AaPIF3 过表达青蒿叶片中 AaERF1 的表达水平



(a) 效应器和报告器构造图



(b) AaPIF3与*AaERF1*基因启动子双荧光素酶检测结果

$M \pm SD$, $n=5$, 采用独立样本 t 检验, * 表示 $p<0.05$, 差异有统计学意义.

图 3 双荧光素酶法研究 AaPIF3 对 *AaERF1* 的激活作用

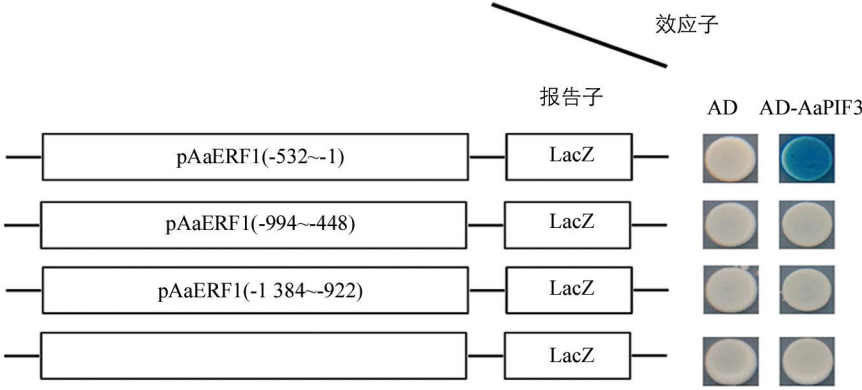


图 4 转录因子 AaPIF3 与 3 个 pAaERF1 启动子重叠片段之间的酵母单杂交分析

3 讨 论

青蒿作为一种富含以青蒿素为代表萜类化合物的药用植物,在不同条件下,需要不同的转录因子来调节包括青蒿素在内的萜类化合物的生物合成^[23]. AaPIF3 属于含保守 HLH 结构域的 bHLH 类家族的转录因子,能与靶基因启动子的 G-box 顺式作用元件结合^[24-25]. 因此, *AaERF1* 和青蒿素生物合成基因启动子中的 G-box 顺式作用元件为 AaPIF3 提供了可能的结合位点^[12, 20]. 酵母单杂交结果表明, AaPIF3 直接与 *AaERF1* 启动子结合(图 4),但不能与青蒿素生物合成基因的启动子结合(图 1). 这些结果表明 *AaERF1* 是 AaPIF3 的直接靶基因,而青蒿素生物合成基因不是. 虽然在青蒿素生物合成基因启动子区域也具有 G-box,但由于转录因子在结合 DNA 的时候,核心的顺式作用元件的保守性只是转录因子与 DNA 结合的前

提条件,同时该核心顺式作用元件侧翼序列,甚至处于其远端的其他 DNA 序列都可能会对转录因子与 DNA 的结合作用产生影响^[26].这也是 AaPIF3 能够直接调控 AaERF1,而不能够直接调控青蒿素生物合成基因的原因.

根据以往的研究,转录因子可以直接或间接地调控生物合成基因.转录因子 AaERF1,AaMYC2,AabZIP1 和 AaGSW1 通过与青蒿素合成途径关键酶基因的启动子结合来积极调节青蒿素的生物合成^[9, 11-12].而另一种 ERF 类转录因子 AaORA 间接调控了这些基因,但其过度表达极大地促进了青蒿素在转基因植物中的生物合成^[10].双荧光素酶检测为支持 AaPIF3 在调节青蒿素生物合成中发挥积极作用提供了证据^[15].当 AaPIF3 被表达时,AaERF1 的启动子活性显著增加(图 3).AaPIF3 的过度表达显著提高了 AaERF1 的表达水平,而 AaERF1 通过与 ADS 和 CYP71AV1 的启动子结合,直接调控了青蒿素生物合成基因^[9].综上所述,我们提出 AaPIF3 调控青蒿素生物合成的模型:AaPIF3 直接结合 AaERF1 启动子并激活其表达,AaERF1 直接激活青蒿素生物合成基因表达,也就是 AaPIF3 通过直接转录激活 AaERF1 而间接调控了青蒿素的生物合成(图 5).

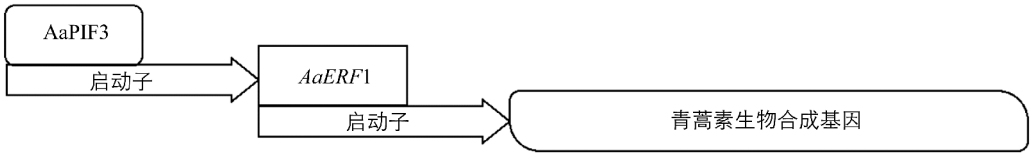


图 5 AaPIF3 通过直接激活 AaERF1 调控青蒿生物合成基因

参考文献:

[1] 伍晓丽,谭 均,崔广林,等. 深绿木霉对青蒿的促生作用 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2019, 41(7): 36-42.

[2] NOSTEN F, WHITE N J. Artemisinin-Based Combination Treatment of Falciparum Malaria [J]. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 2007, 77(6_Suppl): 181-192.

[3] WHITE N J. Qinghaosu (Artemisinin): The Price of Success [J]. Science, 2008, 320(5874): 330-334.

[4] TU Y Y. The Discovery of Artemisinin (qinghaosu) and Gifts from Chinese Medicine [J]. Nature Medicine, 2011, 17(10): 1217-1220.

[5] MERCKE P, BENGTSSON M, BOUWMEESTER H J, et al. Molecular Cloning, Expression, and Characterization of Amorpha-4, 11-diene Synthase, a Key Enzyme of Artemisinin Biosynthesis in *Artemisia annua* L [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2000, 381(2): 173-180.

[6] TEOH K H, POLICHUK D R, REED D W, et al. *Artemisia annua* L. (Asteraceae) Trichome-specific cDNAs Reveal CYP71AV1, a Cytochrome P450 with a Key Role in the Biosynthesis of the Antimalarial Sesquiterpene Lactone Artemisinin [J]. FEBS Letters, 2006, 580(5): 1411-1416.

[7] ZHANG Y S, TEOH K H, REED D W, et al. The Molecular Cloning of Artemisinic Aldehyde Δ 11(13) Reductase and Its Role in Glandular Trichome-dependent Biosynthesis of Artemisinin in *Artemisia annua* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(31): 21501-21508.

[8] TEOH K H, POLICHUK D R, REED D W, et al. Molecular cloning of an aldehyde dehydrogenase implicated in artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. Botany, 2009, 87(6): 635-642.

[9] YU Z X, LI J X, YANG C Q, et al. The Jasmonate-Responsive AP2/ERF Transcription Factors AaERF1 and AaERF2

- Positively Regulate Artemisinin Biosynthesis in *Artemisia annua* L [J]. *Molecular Plant*, 2012, 5(2): 353-365.
- [10] LU X, ZHANG L, ZHANG F Y, et al. AaORA, a Trichome-specific AP2/ERF Transcription Factor of *Artemisia annua*, is a Positive Regulator in the Artemisinin Biosynthetic Pathway and in Disease Resistance to *Botrytis Cinerea* [J]. *New Phytologist*, 2013, 198(4): 1191-1202.
- [11] ZHANG F Y, FU X Q, LV Z, et al. A Basic Leucine Zipper Transcription Factor, AabZIP1, Connects Absciscic Acid Signaling with Artemisinin Biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. *Molecular Plant*, 2015, 8(1): 163-175.
- [12] SHEN Q, LU X, YAN T X, et al. The Jasmonate-responsive AaMYC2 Transcription Factor Positively Regulates Artemisinin Biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. *New Phytologist*, 2016, 210(4): 1269-1281.
- [13] CHEN M H, YAN T X, SHEN Q, et al. GLANDULAR TRICHOME-SPECIFIC WRKY 1 Promotes Artemisinin Biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. *New Phytologist*, 2017, 214(1): 304-316.
- [14] XIANG L E, JIAN D Q, ZHANG F Y, et al. The Cold-induced Transcription Factor bHLH112 Promotes Artemisinin Biosynthesis Indirectly Via ERF1 in *Artemisia annua* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2019, 70(18): 4835-4848.
- [15] ZHANG Q Z, WU N Y, JIAN D Q, et al. Overexpression of AaPIF3 Promotes Artemisinin Production in *Artemisia annua* [J]. *Industrial Crops and Products*, 2019, 138: 111476.
- [16] 马凯恒, 李子仪, 李大培, 等. 核桃 JrEFM1 转录因子响应逆境及激素的表达模式 [J]. *西南师范大学学报(自然科学版)*, 2019, 44(6): 46-53.
- [17] PAYNE C T, ZHANG F, LLOYD A M. GL3 Encodes a bHLH Protein that Regulates Trichome Development in Arabidopsis through Interaction with GL1 and TTG1 [J]. *Genetics*, 2000, 156(3): 1349-1362.
- [18] LAU O S, DENG X W. Plant Hormone Signaling Lightens Up: Integrators of Light and Hormones [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2010, 13(5): 571-577.
- [19] TOLEDO-ORTIZ G, HUQ E, QUAIL P H. The Arabidopsis Basic/Helix-Loop-Helix Transcription Factor Family [J]. *The Plant Cell*, 2003, 15(8): 1749-1770.
- [20] JI Y P, XIAO J W, SHEN Y L, et al. Cloning and Characterization of AabHLH1, a bHLH Transcription Factor that Positively Regulates Artemisinin Biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2014, 55(9): 1592-1604.
- [21] HELLENS R, ALLAN A C, FRIEL E, et al. Transient Expression Vectors for Functional Genomics, Quantification of Promoter Activity and RNA Silencing in Plants [J]. *Plant Methods*, 2005, 1(1): 1-14.
- [22] ZHANG F Y, XIANG L E, YU Q, et al. Artemisinin Biosynthesis Promoting Kinase 1 Positively Regulates Artemisinin Biosynthesis through Phosphorylating AabZIP1 [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2018, 69(5): 1109-1123.
- [23] HASSANI D, FU X Q, SHEN Q, et al. Parallel Transcriptional Regulation of Artemisinin and Flavonoid Biosynthesis [J]. *Trends in Plant Science*, 2020, 25(5): 466-476.
- [24] JAKOBY M, WEISSHAAR B, DRÖGE-LASER W, et al. BZIP Transcription Factors in Arabidopsis [J]. *Trends in Plant Science*, 2002, 7(3): 106-111.
- [25] SUN H, FAN H J, LING H Q. Genome-wide Identification and Characterization of the bHLH Gene Family in Tomato [J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 9.
- [26] BLACKWOOD E M, KADONAGA J T. Going the distance: A current view of enhancer action [J]. *Science*, 1998, 281(5373): 60-63.

Transcriptional Regulation of AaPIF3 on Artemisinin Biosynthesis Genes and AaERF1 in *Artemisia annua*

TASHI Tsering^{1,2}, ZHANG Qiao-zhuo¹, YANG Chun-xian¹,
LAN Xiao-zhong³, LIAO Zhi-hua¹

1. School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China;
2. Hospital of Traditional Tibetan Medicine, Lhasa 850000, China;
3. School of Food Science, Tibet Agricultural and Animal Husbandry University, Nyingchi, Tibet 860000, China

Abstract: AaPIF3 is a bHLH transcription factor (TF) that positively regulates artemisinin biosynthesis in the medicinal plant *Artemisia annua*. However, its regulatory mechanism is still unknown. In this study, methods of molecular biology and biochemistry were used to unveil the molecular mechanism of AaPIF3 on regulating artemisinin biosynthesis. Yeast one-hybrid (Y1H) assay was performed to investigate the interaction between AaPIF3 and the promoters of all the four artemisinin biosynthesis genes (*ADS*, *CYP71AV1*, *DBR2* and *ALDH1*) as well as the *AaERF1* promoter (pAaERF1). Real-time quantitative PCR was employed to analyze the expression levels of *AaERF1*. Dual-luciferase assay was used to study the effect of AaPIF3 on transactivating pAaERF1. AaPIF3 could bind to the promoter pAaERF1, but not bind to the cis-acting elements of any of the four promoters of artemisinin biosynthesis genes. The expression levels of *AaERF1* were 3.34-6.30 folds in AaPIF3-overexpressing *A. annua* plants of those in the wild-type control. Dual-luciferase assays indicated that AaPIF3 substantially promoted the transactivity of pAaERF1, being 1.67 folds of control. AaPIF3 indirectly regulates artemisinin biosynthesis. It participates in the regulation of artemisinin biosynthesis via directly transactivating *AaERF1*.

Key words: AaPIF3; *AaERF1*; *Artemisia annua*; yeast one-hybrid; dual luciferase; transcriptional regulation

责任编辑 周仁惠