

# 马铃薯 *StWRKY51* 基因的克隆及在高温胁迫下的表达分析

牛苏燕<sup>1</sup>, 张珍华<sup>1</sup>, 陈曼<sup>2</sup>, 蒋素华<sup>1</sup>, 张燕<sup>1</sup>, 许申平<sup>1</sup>, 王默霏<sup>1</sup>, 崔波<sup>1</sup>

(1. 郑州师范学院 郑州 450044; 2. 郑州市农业科技研究院 郑州 450015)

**摘要:** 为研究马铃薯 *StWRKY51* 基因在高温胁迫下的响应特性, 利用 RT-PCR 技术从 Russet Burbank 马铃薯叶片中克隆得到 *StWRKY51* 基因, 并对其进行了生物信息学分析和高温胁迫下的表达分析。结果表明, 马铃薯 *StWRKY51* 基因开放阅读框为 696 bp, 编码 231 个氨基酸, 与潘那利番茄、番茄和辣椒的氨基酸序列相似性高于 80%。生物信息学分析表明, *StWRKY51* 属于酸性稳定亲水性蛋白, 其二级结构元件中无规则卷曲比例最高达 63.64%。结构域分析显示, *StWRKY51* 含有 1 个典型的 WRKY 保守结构域, 锌指结构为 C2H2 型, 属于第 II 亚家族。荧光定量 PCR 结果显示, 马铃薯 *StWRKY51* 基因在高温处理后被显著诱导表达, 表明 *StWRKY51* 基因可能在马铃薯抵御高温胁迫中起到一定的调控作用。该结果为进一步探究 *StWRKY51* 在马铃薯热胁迫中发挥的功能提供参考。

**关键词:** 马铃薯; *WRKY* 转录因子; 基因克隆; 表达分析

中图分类号: S532 文献标志码: A 文章编号: 1673-2871(2024)07-052-07

## Cloning and expression analysis of *StWRKY51* gene in potato under heat stress

NIU Suyan<sup>1</sup>, ZHANG Zhenhua<sup>1</sup>, CHEN Man<sup>2</sup>, JIANG Suhua<sup>1</sup>, ZHANG Yan<sup>1</sup>, XU Shenping<sup>1</sup>, WANG Mofei<sup>1</sup>, CUI Bo<sup>1</sup>

(1. Zhengzhou Normal University, Zhengzhou 450044, Henan, China; 2. Zhengzhou Academy of Agricultural Science and Technology, Zhengzhou 450015, Henan, China)

**Abstract:** To explore the response characteristics of potato *StWRKY51* gene under high temperature stress, the *StWRKY51* gene was cloned from leaf of the potato cultivar Russet Burbank by RT-PCR technology, and bioinformatics analysis of this gene and the real-time fluorescence quantitative PCR for *StWRKY51* expression in potato under the high temperature stress were performed in this study. The results were as follows: The open reading frame of *StWRKY51* gene is 696 bp, encoded 231 amino acids; the amino acid sequence of *StWRKY51* protein was more than 80% similar to that of *Solanum pennellii*, *Solanum lycopersicum* and *Capsicum annuum*; the *StWRKY51* was belong to an acidic and stable hydrophilic protein, and the ratio of irregular curl in the secondary structure of protein was up to 63.64%. The domain analysis showed that *StWRKY51* gene encoding protein had a typical WRKY conserved domain, and the zinc finger structure is C2H2 type, belonging to the Group II subfamily. The qPCR results showed that the expression of *StWRKY51* gene was significantly induced under high temperature treatment, indicating that *StWRKY51* gene may play a regulation role in potato resistance to high temperature stress. The research provided a reference for further study on the function of *StWRKY51* response to high temperature stress in potato.

**Key words:** Potato; *WRKY* transcription factor; Gene cloning; Expression analysis

全球气候变暖引起的高温是当前影响作物生长发育和产量最严重的自然灾害之一<sup>[1]</sup>。高温胁迫会影响细胞结构和代谢功能等多个生理过程, 如蛋

白质复合物结构的改变, 蛋白质合成和酶活性的变化, 细胞结构和细胞膜的功能, 有害物质活性氧的产生, 代谢途径的解耦联及光合系统的损害, 从而

收稿日期: 2023-08-20; 修回日期: 2024-03-27

基金项目: 河南省科技攻关计划项目(242102110258); 河南省高等学校重点科研项目(24A210027); 郑州师范学院高层次人才科研启动专项经费(2018); 郑州师范学院“提质工程”项目(ZHJX-2022001232253); 郑州师范学院开放研究基金资助项目(2019)

作者简介: 牛苏燕, 讲师, 主要研究方向为薯类作物育种及功能基因组学。E-mail: niusuyan@zznu.edu.cn

通信作者: 崔波, 教授, 主要研究方向为植物分子育种。E-mail: laocuibo@163.com

影响植物的生长发育、品质和产量<sup>[2]</sup>。WRKY 转录因子是一类主要存在于植物中的锌指型转录调控因子,参与植物生长发育和逆境响应等多种生理活动<sup>[3-6]</sup>。越来越多的研究证明,WRKY 转录因子参与了植物响应高温胁迫<sup>[7-8]</sup>。例如,热胁迫相关转录因子文心兰 *OnWRKY1* 和辣椒 *CaWRKY40* 基因在高温胁迫处理后表达量均显著升高<sup>[9-10]</sup>。此外,在高温胁迫下,拟南芥 *AtWRKY25* 和 *AtWRKY26* 的表达被诱导,而 *AtWRKY33* 的表达被抑制;通过对功能获得性突变体和功能缺失性突变体的分析,发现 *AtWRKY25*、*AtWRKY26* 和 *AtWRKY33* 蛋白能通过增强 *Hsps* 基因 *Hsp101* 和 *Zat10* 的表达提高拟南芥的耐热性,而缺失突变体植株对高温胁迫的敏感性也显著增强<sup>[11]</sup>。水稻 *OsWRKY11* 基因的表达也受高温的诱导,*HSP101* 启动子启动的 *OsWRKY11* 基因表达后提高了水稻的耐热性<sup>[7]</sup>。另外,拟南芥的 *AtWRKY39* 基因能够通过 SA (salicylic acid) 和 JA (jasmonic acid) 介导的信号途径促进高温胁迫应答<sup>[12]</sup>。

马铃薯是世界上仅次于水稻、小麦和玉米的第四大粮食作物,既可作为蔬菜也可作为主食,其可持续生产对全球粮食安全起着至关重要的作用。马铃薯对温度非常敏感,当土壤温度高于 18 °C,且环境气温白天高于 30 °C 或晚上高于 23 °C 时,就会导致马铃薯源库关系失衡,延迟块茎的形成和膨大,最终导致块茎畸形和坏死,从而严重影响马铃薯产量<sup>[13-16]</sup>。此外,课题组前期研究发现,在高温 (35 °C/28 °C, 白天/黑夜) 胁迫下,马铃薯叶片的叶绿素含量增加,叶片变小且叶片的长度和宽度比例下降,同时马铃薯地上部分徒长<sup>[8]</sup>;早熟型马铃薯品种的产量受高温胁迫的影响小于晚熟型马铃薯品种,且高温胁迫下多数品种的块茎被诱导发芽<sup>[17-18]</sup>。因此,发掘和克隆马铃薯耐热相关基因对培育耐热性马铃薯新品种具有重要意义。

笔者所在的山铃薯分子育种课题组前期对高温胁迫下 Russet Burbank 马铃薯品种的幼苗进行转录组分析,发现转录因子 *WRKY51* 在高温处理的品种中表达量显著上调<sup>[17]</sup>。笔者从马铃薯品种 Russet Burbank 中克隆获得 *StWRKY51* 基因,通过生物信息学网站和软件对该基因编码的蛋白进行了结构域预测、理化性质分析、多重序列比对、系统进化树构建等生物信息学分析,并通过荧光定量 PCR 技术对该基因进行了表达分析,以期为进一步开展对 *StWRKY51* 基因的研究和培育耐高温马铃薯新品种奠

定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验于 2021 年 3—8 月在郑州师范学院生物工程研究中心进行,马铃薯品种 Russet Burbank 由本实验室保存。植物生长条件为温度 22 °C/18 °C (白天/黑夜),湿度 70%,光周期 14 h/10 h (光照/黑暗)。生长 30 d 后,选取长势一致的植株分成 2 组进行不同温度处理,每组 3 盆,3 次重复。其中一组放置在 32 °C/26 °C (白天/黑夜) 作为高温处理,其余放置在 22 °C/18 °C (白天/黑夜) 作为对照。处理 3 d 后,分别收集不同植株的第 2 片展开叶,将液氮速冻后放置在 -80 °C 超低温冰箱中保存备用。

### 1.2 总 RNA 的提取及基因克隆

取 0.8 g 马铃薯叶片置于研钵中,加入液氮,快速研磨成粉末,严格按照 MOEGA Hp plant RNA Kit 植物总 RNA 提取试剂盒说明书进行叶片总 RNA 的提取。根据马铃薯基因组数据库 Spud DB 中的 *StWRKY51* 基因 (PGSC0003DMG400031140) 序列设计特异性引物 (表 1)。利用 M-MLV 反转录酶将 RNA 反转录成 cDNA,并以该 cDNA 为模板利用引物 *StWRKY51-F* 和 *StWRKY51-R* 进行目的片段的扩增。扩增结束后,取 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,将符合预期大小的片段回收并连接到 pMD19-T 载体后进行 DNA 测序。

### 1.3 马铃薯 WRKY51 蛋白序列的生物信息学分析

利用 ORF Finder ([http://www.bioinformatics.org/sms2/orf\\_find.html](http://www.bioinformatics.org/sms2/orf_find.html)) 在线软件预测目的基因的开放阅读框;利用 NCBI BlastP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp>) 在线分析软件对 WRKY51 蛋白进行同源性比对分析,采用 MEGA 7.0.14 软件构建系统进化树;利用 ExPasy 网站的 ProtParam (<https://web.expasy.org/cgi-bin/prot-param/>) 工具分析 WRKY51 蛋白的理化性质和 ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) 工具进行亲疏水性分析;利用 SOPMA ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html)) 工具预测马铃薯 WRKY51 的二级结构。

### 1.4 马铃薯高温胁迫处理及 *WRKY51* 基因的表达分析

根据获得的 *StWRKY51* 基因序列设计特异性引物,并以马铃薯 *EFla* 基因作为内参基因 (表 1)。利用荧光定量 PCR 技术,分析该基因在高温胁迫

(32 °C/26 °C,白天/黑夜)和正常温度(22 °C/18 °C,白天/黑夜)下的表达状况。采用 FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) (Roche Mannheim, Germany) 试剂盒,按照说明书的操作步骤进行。PCR 反应条件为 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 15 s; 60 °C 15 s; 72 °C 30 s,共 40 个循环,每个样本设 3 次重复。并计算基因的相对表达量,一般用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  的方法进行标准化计算。

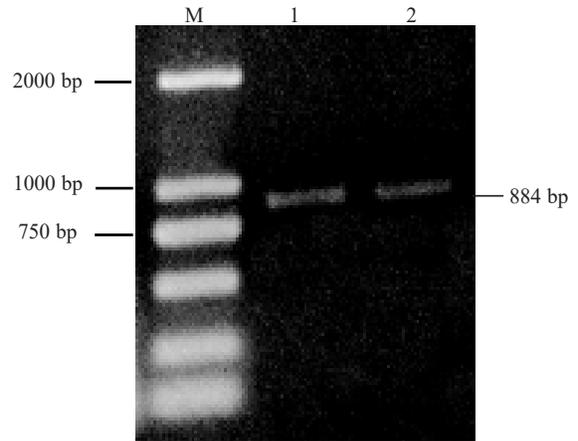
表 1 基因克隆和实时荧光定量 PCR 引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')	用途
Primer name	Primer sequence (5'-3')	Application
StWRKY51-F	TTCTATCAAAGACTCTCTAAAAG	基因克隆
StWRKY51-R	TATGTACCACAAAGTGAGTGATT	Gene cloning
qStWRKY51-F	TTCCAAGAAACAACAAATGTC	荧光定量 PCR
qStWRKY51-R	TCACCATCAACTAACAAATCA	qRT-PCR
EF1a-F	CTGTAAAGGATCTGAAGCGTGGT	内参基因
EF1a-R	AATGTGGGAAGTGTGGCAGTCG	Reference gene

## 2 结果与分析

### 2.1 马铃薯 WRKY51 基因的克隆及蛋白结构域分析

以 Russet Burbank 马铃薯叶片总 RNA 反转录 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,获得 1 个核苷酸序列长度为 884 bp 的片段(图 1)。将该条带回收纯化后,连接到 PMD9-T 载体,转化大肠杆菌后进行菌落 PCR 筛选,将获得的阳性克隆送到生物公司测序。序列分析显示,StWRKY51 基因开放阅读框为 696 bp,编码 231 个氨基酸(图 2)。通过 NCBI 保守



注: M: DL2000 bp DNA Marker; 1~2: StWRKY51 基因  
Note: M: DL2000 bp DNA Marker; 1-2: StWRKY51 gene

图 1 马铃薯 StWRKY51 基因 PCR 扩增  
Fig. 1 PCR amplification of StWRKY51 gene

```

10      20      30      40      50      60
1      ATGTTTGCCCTCTCCACTTTCCAAGAAACAACAAATGTCATTTCTCATCACCATTATCAA
1      M F A S S T F Q E T T N V I S H H H Y Q
      70      80      90      100     110     120
61     ACTATAAACCCTAATCTTTTGCTTTTCATGATCCCTCATCAACATGAATCAAGATTAT
21     T I N P N S F A F H D P L I N M N Q D Y
      130     140     150     160     170     180
121    GGCCATAACAATAGTAATAATAAAGTATCAAGATTATGACACTTTATTTCTTGATTTG
41     G H N N S N N N K Y Q D Y D T L F L D L
      190     200     210     220     230     240
181    TTAGTTGATGGTGATCAAGAATATTATTCCAATTACTCAAATAATAGTACAATAATGCT
61     L V D G D Q E Y Y S N Y S N N S Y N N A
      250     260     270     280     290     300
241    TCAATTTTTTCAGAAAATCTTTCATGAAACAAGAGATAAGTACTAGTACCATATAGTACT
81     S I F S E N L F M K Q E I S T S T Y S T
      310     320     330     340     350     360
301    AGTGAAACTCATCATCAGCTAGTTCATTTGATGCCACACCAACACATGTACACATGAAT
101    S G N S S S A S S F D A T P T H V H M N
      370     380     390     400     410     420
361    CATGAAAATTCAGCATGGGGATTGAGAAAGAAAAGGTGAAAAACATGCAATTGCT
121    H E N S S M G I E K E K K G E K H A I A
      430     440     450     460     470     480
421    TTTAGAACAAGACACAACCTTGAGACCTTGGATGATGGATACAAATGGAGGAAATATGGG
141    F R T K T Q L E T L D D G Y K W R K Y G
      490     500     510     520     530     540
481    AAAAAGAAAGTGAAAACCAACATAAATCTAAGGAATTACTACAAGTGTCAAGTGGAGAT
161    K K K V K T N I N L R N Y Y K C S S G D
      550     560     570     580     590     600
541    TGCAAAGTAAAGAAAAGGTAGAAAGAGATGGAAATGATTCAAGATATTTGATGACTACA
181    C K V K K K V E R D G N D S R Y L M T T
      610     620     630     640     650     660
601    TATGAAGGAAAACACAATCATGAAAGTCCCTTTATCATTTACTGCAATGAAAAGCCAGCA
201    Y E G K H N H E S P F I I Y C N E K P A
      670     680     690
661    AACAACTTTTGAATGAGTCATCTTCTTCCTATTGA
221    N N F L N E S S S S Y *
    
```

图 2 马铃薯 WRKY51 基因的氨基酸序列

Fig. 2 The amino acid sequence of StWRKY51 gene

结构域分析网站对该蛋白进行预测,结果显示,转录因子 *StWRKY51* 在 150~207 个氨基酸残基范围

内含有一个 WRKY 保守结构域(图 3),锌指结构为 C2H2 型,属于 WRKY 转录因子第II亚家族。

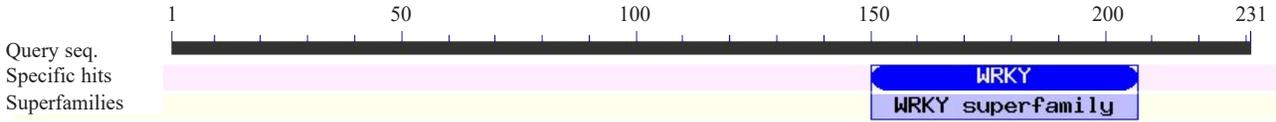


图 3 转录因子 *StWRKY51* 的结构域预测

Fig. 3 Domain predicts of transcription factor *StWRKY51*

2.2 WRKY51 氨基酸序列同源分析

利用 NCBI BlastP 在线分析软件对 WRKY51 蛋白进行同源性比对分析,结果表明,WRKY51 氨基酸序列与 NCBI 中报道的潘那利番茄(*Solanum pennellii*)序列一致性为 86.64%,与番茄(*Solanum lycopersicum*)序列一致性为 86.21%,与辣椒(*Capsi-*

*cum annuum*)的一致性为 81.06%,且都含有 WRKY 典型的保守结构域 WRKYGKK(图 4)。从 NCBI 下载了其他 11 种不同植物的 WRKY51 氨基酸序列,利用 MEGA 7.0.14 软件采用相邻连接法构建系统进化树(图 5)。结果显示,马铃薯 WRKY51 与茄科植物处于同一个分支上,与潘那利番茄和番茄进

马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i>	MFASSTFQETTNVISHHHYQTINPNSFAFHDPLINMNQDYGHNSNNNKYQDYDTLFLDLLVDG.DQEFY	69
潘那利番茄 <i>Solanum pennellii</i>	MFGSSTSQETTNVISHQHYQTINPNFYAFHDPLINMNQDGHVHNN.NYNKYQDYDTSFLLFVDG.DQEFY	68
番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	MFGSSTSQETTNVISHQHYQTINPNFYAFHDPLINMNQDGHVHNN.NYNKYQDYDTSFLLFVDG.DQEFY	68
辣椒 <i>Capsicum annuum</i>	MFGSSTFQETSNTVISH.HYQTINPN.FAFHDPLINMNQDGHGHN...NKYQDEDTSFLLMLLDGGDQEFY	65
烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	MFGSSTFQETIN.IISH...QTINPN.FAFS.PLINMNQDGHCHNM...YQDEDTSFLLQLIND..SEEFY	57
一致性 Consensus	m f s s t q e t n n s h q t i n p n f a f h d p l i n m n q d h n s n n n k y q d y d t l f l d l l v d g . d q e f y	
马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i>	SNYSNNSYN.NASIFSENTLPMQEIISTYSTSCNSSASSSASSFDATPTHVHMNHFNSSMGLIEKEKKGEKHA	138
潘那利番茄 <i>Solanum pennellii</i>	SNYTN...NASIYLENEFKQEISSSTYSTSCNSSASSSASSFDATPTHVHMNHFNNTSICIEKEKKGEKHA	134
番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	SNYTN...NASIYLENEFKQEISSSTYSTSCNSSASSSASSFDATPTHVHMNHFNSSSICIEKEKKGEKHA	134
辣椒 <i>Capsicum annuum</i>	SNYLNNSYNMMVSEFYSENEFKQEISSSTYSTSCNSSASSSASSFDATILTNHMHFNSSMGLIEKEKKGEKHA	135
烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	SNSNNS...FNISLYSCNEFKQEIISTYSTS...GSCSSASSSASSFDATPTNTHMNHFNSSKGLIEKEKKAEEKHA	121
一致性 Consensus	s n y s n n s y n . n a s i f s e n t l p m q e i i s t y s t s c n s s a s s s a s s f d a t p t h v h m n h f n s s m g l i e k e k k g e k h a	
马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i>	IAFRTKTQLETLDDGYKWRKYGKKVKVKTINLNRNYKCSGDCVKVKVERDGDSSRYLMTTYEGKHNE	208
潘那利番茄 <i>Solanum pennellii</i>	IAFRTKTQLETLDDGYKWRKYGKKVKVKTINLNRNYKCSGDCVKVKVERDGDSSRYLMTTYEGKHNE	204
番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	IAFRTKTQLETLDDGYKWRKYGKKVKVKTINLNRNYKCSGDCVKVKVERDGDSSRYLMTTYEGKHNE	204
辣椒 <i>Capsicum annuum</i>	IAFRTKTELETLDDGYKWRKYGKKVKVKTINLNRNYKCSGDCVKVKVERDGDSSRYLMTTYEGKHNE	205
烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	IAFRTKTELETLDDGYKWRKYGKKVKVKTINLNRNYKCSGDCVKVKVERDGDSSRYLMTTYEGKHNE	191
一致性 Consensus	i a f r t k t l e t l d d g y k w r k y g k k v k v k t i n l n r n y k c s s g d c k v k k v e r d g d s s r y l m t t y e g k h n e	
马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i>	SPFIIYCNK.PANNFLNESSSY....	231
潘那利番茄 <i>Solanum pennellii</i>	SPFIIYWNEKNQANNFLNESSSY....	228
番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	SPFIIYWNEKNQANNFLNESSSY....	228
辣椒 <i>Capsicum annuum</i>	SPFVIYCHDEMPSTSKYLR.....	223
烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	SPFIIYCOEK.STVSEHNDQWSLQLADSL	219
一致性 Consensus	s p f i i y c n e k . p a n n f l n e s s s y . . . . .	

图 4 马铃薯 *WRKY51* 与其他茄科物种氨基酸多序列对比

Fig. 4 Multiple sequences alignment analysis of *StWRKY51* and other Solanaceae plants

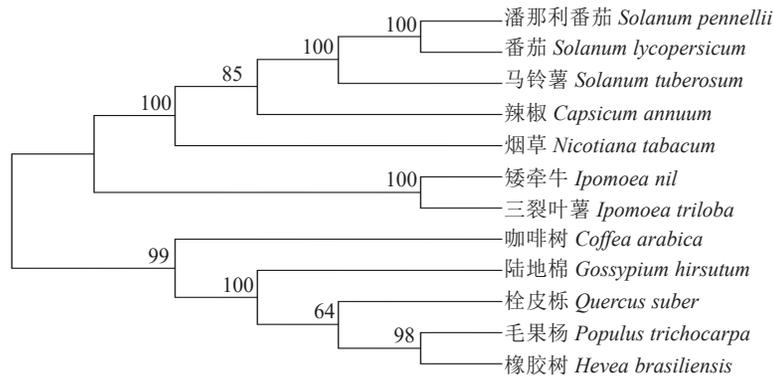


图 5 马铃薯 *StWRKY51* 蛋白的系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of *StWRKY51* protein

化距离最短,表明与番茄和潘那利番茄的亲缘关系最近,与辣椒和烟草(*Nicotiana tabacum*)次之,与咖啡树(*Coffea arabica*)、陆地棉(*Gossypium hirsutum*)、毛果杨(*Populus trichocarpa*)、栓皮栎(*Quercus suber*)和橡胶树(*Hevea brasiliensis*)等的亲缘关系较远。

### 2.3 WRKY51蛋白的理化性质和亲疏水性分析

通过 ExPASy ProtParam 对 WRKY51 蛋白进行分析,结果显示,WRKY51 蛋白的正电残基数目为

25,负电残基数目为 27。理论等电点为 6.59,相对分子质量为 26.68 kDa,不稳定系数为 34.42,预测为稳定性蛋白。利用 ExPASy ProtScale 软件分析显示,WRKY51 蛋白质序列具有较高的亲水性,其中第 60 位氨基酸的疏水性最强(异亮氨酸,1.644),第 133 位氨基酸的亲水性最强(赖氨酸,-3.300),亲水性平均值为-1.065。整体来看,亲水性氨基酸均匀分布在整条肽链中,且多于疏水性氨基酸,因此整个多肽链表现为亲水性,可以判断是亲水性蛋白(图 6)。

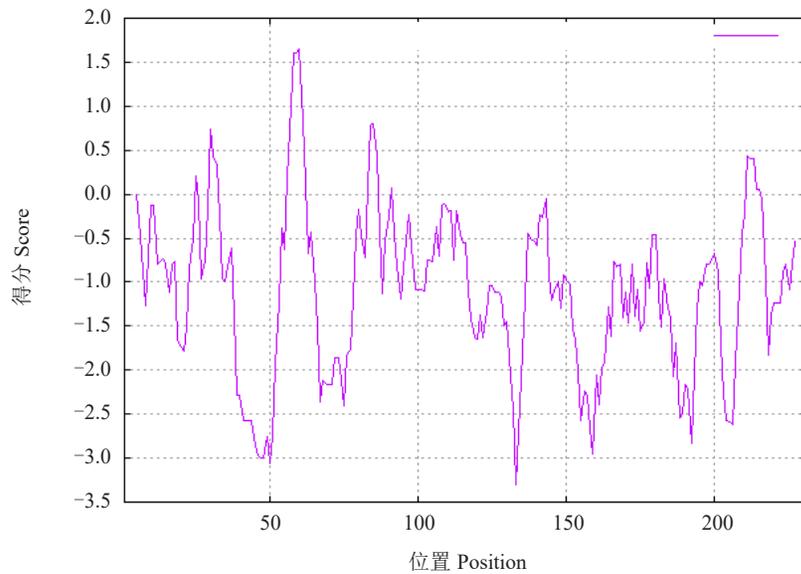


图 6 WRKY51 蛋白的亲疏水性分析

Fig. 6 Hydrophilic-hydrophobic property prediction of WRKY51 protein

### 2.4 WRKY51 的二级结构分析

利用 SOPMA 软件对马铃薯 WRKY51 蛋白的二级结构进行预测,结果显示, $\alpha$  螺旋占比为 12.99%、延伸占比为 18.18%、 $\beta$  折叠占比为 5.19%、无规则卷曲占比为 63.64%。无规则卷曲相较于其他 3 种结构所占比例最大(图 7)。

### 2.5 马铃薯 *StWRKY51* 基因在高温胁迫下的表达分析

通过荧光定量 PCR 技术分析了 *StWRKY51* 基因在高温处理下(32 °C/26 °C,白天/黑夜)和正常情况下(22 °C/18 °C,白天/黑夜,对照)马铃薯叶片中的表达情况。结果显示,马铃薯 *StWRKY51* 基因在

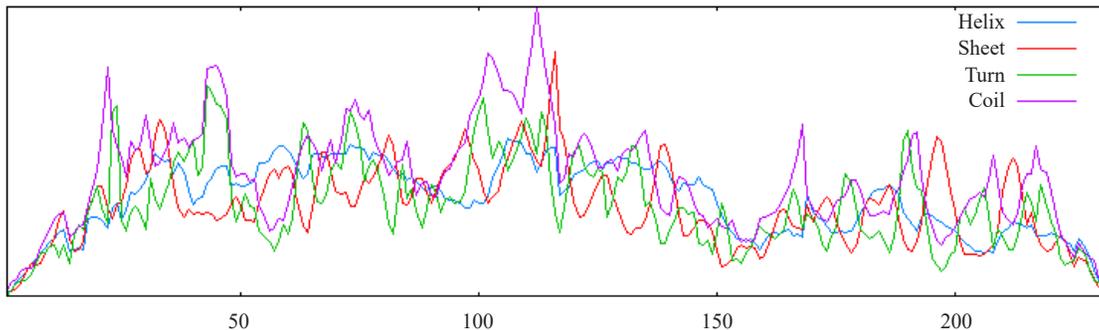


图 7 马铃薯 WRKY51 蛋白二级结构预测

Fig. 7 Secondary structure prediction of WRKY51 protein

高温处理后其相对表达量显著升高,是正常温度下相对表达量的3倍(图8),说明马铃薯 *WRKY51* 基因可以被高温胁迫诱导表达。

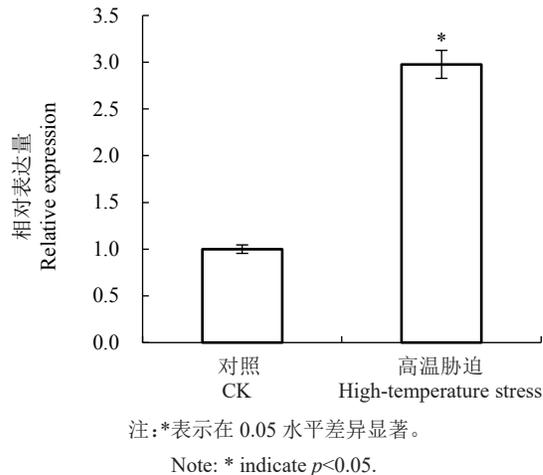


图8 高温胁迫下 *StWRKY51* 基因的表达分析  
Fig. 8 Expression analysis of *StWRKY51* gene under high-temperature stress

### 3 讨论与结论

马铃薯是一种粮菜兼用型作物,自农业部于2016年2月正式发布《关于推进马铃薯产业开发的指导意见》,马铃薯产业规模化发展开来,其种植面积逐年增加。马铃薯喜凉且不耐高温,对热胁迫非常敏感,当土壤温度高于18℃时,就会严重影响其块茎的产量和品质<sup>[15]</sup>,而我国夏季多地普遍高温,因此严重制约了马铃薯的生产。

*WRKY* 转录因子家族参与调控植物生长发育过程中遇到的多种生物胁迫和非生物胁迫,包括高温胁迫<sup>[3-4,19-20]</sup>。本课题组前期分析马铃薯高温胁迫转录组数据,筛选出响应高温胁迫的马铃薯转录因子 *StWRKY51*。为了进一步探究该基因的功能,利用RT-PCR技术成功克隆了马铃薯 *StWRKY51* 基因,该基因开放阅读框为696 bp,编码231个氨基酸。蛋白二级结构预测结果表明, $\alpha$ 螺旋占12.99%、延伸占18.18%、 $\beta$ 折叠5.19%、无规则卷曲占63.64%。*StWRKY51*蛋白的氨基酸序列与潘那利番茄、番茄和辣椒的氨基酸序列相似性分别为86.64%、86.21%和81.06%。亲缘关系分析的结果表明,马铃薯 *StWRKY51*蛋白与番茄和潘那利番茄的亲缘关系最近,表明马铃薯 *StWRKY51*蛋白可能与潘那利番茄和番茄 *WRKY51*蛋白具有相似的功能和作用机制。

根据 *WRKY* 转录因子结构域 N 端包含的七肽保守域(*WRKYGQK*)数量和 C 端的锌指结构类型,可将 *WRKY* 转录因子分为三大类。有研究表明,第 II 类 *WRKY* 转录因子的七肽保守域和锌指结构总是发生不同程度的变异,是由 I 类通过 N 端和 C 端 *WRKY* 保守结构域不断变异而演化来的<sup>[21-22]</sup>。在本研究中,笔者发现马铃薯 *WRKY51* 属于第 II 大类 *WRKY* 家族成员,且七肽保守结构域变异为 *WRKYGKK*,该现象和已报道的其他物种如水稻、拟南芥和高粱中出现的第 II 类 *WRKY* 成员中七肽保守域中 Q 突变为 K 的情况一致<sup>[22-24]</sup>。

*WRKY* 第 II 类家族成员的变异性决定了其功能的多样性,在拟南芥中, *AtWRKY51* 基因可通过 JA 或 ABA 信号途径实现对干旱和盐胁迫的正调控作用<sup>[25]</sup>;在小麦中, *TaWRKY51* 基因在不同的非生物胁迫(包括低温、氯化钠、ABA 等)条件下被显著诱导上调表达<sup>[26]</sup>;此外,在 TYZ.1 号油橄榄中,发现 *WRKY51* 基因可通过调节细胞中脯氨酸、丙二醛、可溶性糖和可溶性蛋白含量来抵御胁迫的危害<sup>[27]</sup>。在马铃薯中, *StWRKY51* 基因在高温胁迫植株中的表达量是正常生长条件下的3倍,与这些作物的基因表达趋势一致,表明其可能与他们有相似的功能,不仅仅局限于响应高温胁迫。本研究结果为马铃薯 *WRKY51* 转录因子的功能研究奠定了基础。

#### 参考文献

- [1] FAHAD S, BAJWA A A, NAZIR U, et al. Crop production under drought and heat stress: Plant responses and management options[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1147.
- [2] HU S S, DING Y F. Sensitivity and responses of chloroplasts to heat stress in plants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 375.
- [3] EULGEM T, RUSHTON P J, ROBATZEK S, et al. The *WRKY* super family of plant transcription factors[J]. *Trends Plant Science*, 2000, 5(5): 199-206.
- [4] JIANG J J, MA S H, YE N H, et al. *WRKY* transcription factors in plant responses to stresses[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2017, 59(2): 86-101.
- [5] LEE H Y, CHA J Y, CHOI C H, et al. Rice *WRKY11* plays a role in pathogen defense and drought tolerance[J]. *Rice*, 2018, 11(5): 12.
- [6] ZHANG J, PENG Y L, GUO Z J. Constitutive expression of pathogen-inducible *OsWRKY31* enhances disease resistance and affects root growth and auxin response in transgenic rice plants[J]. *Cell Research*, 2008, 18(4): 508-521.
- [7] WU X L, SHIROTO Y, KISHITANI S, et al. Enhanced heat and drought tolerance in transgenic rice seedlings overexpressing *OsWRKY11* under the control of *HSP101* promoter[J]. *Plant Cell Reports*, 2009, 28(1): 21-30.

- [8] TANG R M, GUPTA S K, NIU S Y, et al. Transcriptome analysis of heat stress response genes in potato leaves[J]. *Molecular Biology Reports*, 2020, 47(6): 4311-4321.
- [9] 孔倩倩. 高温胁迫下文心兰对外源水杨酸的生理响应及 *WRKY* 基因的克隆[D]. 福州: 福建农林大学, 2017.
- [10] DANG F F, WANG Y N, YU L, et al. CaWRKY40, a WRKY protein of pepper, plays an important role in the regulation of tolerance to heat stress and resistance to *Ralstonia solanacearum* infection[J]. *Plant Cell and Environment*, 2013, 36(4): 757-774.
- [11] LI S J, FU Q T, CHEN L G, et al. *Arabidopsis thaliana* WRKY25, WRKY26, and WRKY33 coordinate induction of plant thermotolerance[J]. *Planta*, 2011, 233(6): 1237-1252.
- [12] LI S J, ZHOU X, CHEN L G, et al. Functional characterization of *Arabidopsis thaliana* WRKY39 in heat stress[J]. *Molecular and Cells*, 2010, 29(5): 475-483.
- [13] LEVY D, VEILLEUX R E. Adaptation of potato to high temperatures and salinity—a review[J]. *American Journal of Potato Research*, 2007, 84(6): 487-506.
- [14] MONNEVEUX P, RAMIREZ D A, PINO M T. Drought tolerance in potato (*S. tuberosum* L.): Can we learn from drought tolerance research in cereals?[J]. *Plant Science*, 2013, 205: 76-86.
- [15] RYKACZEWSKA K. The effect of high temperature occurring in subsequent stages of plant development on potato yield and tuber physiological defects[J]. *American Journal of Potato Research*, 2015, 92(3): 339-349.
- [16] TANG R M, NIU S Y, ZHANG G D, et al. Physiological and growth responses of potato cultivars to heat stress[J]. *Botany*, 2018, 96(12): 897-912.
- [17] ZHANG G D, TANG R M, NIU S Y, et al. Heat-stress-induced sprouting and differential gene expression in growing potato tubers: Comparative transcriptomics with that induced by postharvest sprouting[J]. *Horticulture Research*, 2021, 8(1): 226.
- [18] ZHANG G D, JIN X, LI X B et al. Genome-wide identification of PEBP gene family members in potato, their phylogenetic relationships, and expression patterns under heat stress[J]. *Molecular Biology Reports*, 2022, 49(6): 4683-4697.
- [19] LI S J, FU Q T, HUANG W D, et al. Functional analysis of an *Arabidopsis transcription* factor *WRKY25* in heat stress[J]. *Plant Cell Reports*, 2009, 28(4): 683-693.
- [20] GOYAL P, DEVI R, VERMA B, et al. *WRKY* transcription factors: Evolution, regulation, and functional diversity in plants[J]. *Protoplasma*, 2022, 260(2): 331-348.
- [21] 谷彦冰, 冀志蕊, 迟福梅, 等. 苹果 *WRKY* 基因家族生物信息学及表达分析[J]. *中国农业科学*, 2015, 48(16): 3221-3238.
- [22] 赵兴奎, 范昕琦, 聂萌恩, 等. 高粱 *WRKY* 家族成员鉴定及生物信息学分析[J]. *分子植物育种*, 2020, 18(13): 4170-4181.
- [23] ZHANG Y J, WANG L J. The *WRKY* transcription factor superfamily: Its origin in eukaryotes and expansion in plants[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2005, 5(1): 1-12.
- [24] EULGEM T, SOMSSICH I E. Networks of *WRKY* transcription factors in defense signaling[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2007, 10(4): 366-371.
- [25] 邵沾沾. 拟南芥中 *WRKY50* 和 *WRKY51* 基因在非生物胁迫下的功能研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2016.
- [26] 栗颖. 8 个小麦 *WRKY* 转录因子基因的克隆、表达及转录活性分析[D]. 武汉: 华中科技大学, 2015.
- [27] 王丽娟, 王毅, 胡青, 等. 油橄榄 *WRKY* 转录因子的全基因组鉴定与分析[J]. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2021, 50(6): 759-766.