

DOI: 10.16861/j.cnki.zggc.2025.0287

马铃薯 *StWRKY15* 基因克隆与表达特征分析

史梦祥¹, 汪政¹, 陈豪¹, 丁丽丽², 杨志辉^{1,3}, 李倩^{1,3}

(1. 河北农业大学植物保护学院 河北保定 071000; 2. 河北省农林科学院生物技术与食品科学研究所 石家庄 050057;
3. 河北省农作物病虫害生物防治技术创新中心 河北保定 071000)

摘要: WRKY 转录因子在植物抗病信号转导途径中起重要作用。为探究 *StWRKY15* 的性质及功能, 以马铃薯为研究对象, 通过 RNA-seq 筛选到 1 个受马铃薯早疫病显著诱导的转录因子 *StWRKY15*。采用 PCR 技术成功克隆出 *StWRKY15*, 全长 1002 bp, 共编码 333 个氨基酸, 亚细胞定位于细胞核内。*StWRKY15* 属于不稳定亲水性蛋白, 分子质量约 33.6 kDa, 理论等电点(PI)约为 9.45, 与 CaWRKY15 的同源性最高, 都属于 WRKY 家族。利用 qRT-PCR 分析了 *StWRKY15* 在马铃薯不同组织中的表达水平, 发现其在茎中表达量最高; 接种茄链格孢后不同时间测定 *StWRKY15* 的表达量, 发现接种 24 h 时, *StWRKY15* 表达量显著上升, 接种 48 h 时, *StWRKY15* 表达量最高, 表明 *StWRKY15* 受马铃薯早疫病的显著诱导。利用瞬时过表达方式明确了 *StWRKY15* 与烟草对茄链格孢的抗性增强有相关性。研究结果为进一步探究 *StWRKY15* 在马铃薯抗早疫病过程中的功能提供了理论依据。

关键词: 马铃薯; *StWRKY15*; 生物信息学; 亚细胞定位; 瞬时过表达

中图分类号:S532

文献标志码:A

文章编号: 1673-2871(2025)11-026-10

Cloning and expression pattern analysis of *StWRKY15* gene in potato

SHI Mengxiang¹, WANG Zheng¹, CHEN Hao¹, DING Lili², YANG Zhihui^{1,3}, LI Qian^{1,3}

(1. College of Plant Protection, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei, China; 2. Institute of Biotechnology and Food Science, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050057, Hebei, China; 3. Technological Innovation Center for Biological Control of Crop Diseases and Insect Pests of Hebei Province, Baoding 071000, Hebei, China)

Abstract: WRKY transcription factors play a crucial role in the signal transduction pathways of plant disease resistance. Potato was selected as the model organism to investigate the properties and functions of *StWRKY15*. RNA-seq analysis identified one transcription factor, *StWRKY15*, as being significantly induced by potato early blight. *StWRKY15* was successfully cloned using PCR techniques. The full-length sequence spans 1002 bp and encodes 333 amino acids. Subcellular localisation was confirmed to be within the nucleus. *StWRKY15* belongs to the unstable hydrophilic protein family. It has a molecular mass of approximately 33.6 kDa and a theoretical pI of around 9.45. It exhibits the highest homology with CaWRKY15. Both proteins are members of the WRKY family. Analysis of *StWRKY15* expression levels in various potato tissues using qRT-PCR revealed the highest expression in stems. The expression levels of *StWRKY15* were measured at various time points after inoculation with *Alternaria solani*. The results indicated a significant increase in *StWRKY15* expression at 24 hours post-inoculation, with peak expression observed at 48 hours. This demonstrates that *StWRKY15* is strongly induced by potato early blight. Transient overexpression established that *StWRKY15* is associated with enhanced resistance to *Alternaria solani* in tobacco. These results lay the groundwork for further research into the role of *StWRKY15* in conferring resistance to early blight in potato.

Key words: Potato; *StWRKY15*; Bioinformatics; Subcellular localization; Transient expression

马铃薯早疫病是一种由茄链格孢(*Alternaria solani*)引起的真菌性病害, 主要危害马铃薯叶片, 主

要特征为产生明显的同心轮纹病斑^[1]。该病害对马铃薯产量及品质造成严重影响, 在世界各个马铃薯

收稿日期: 2025-04-10; 修回日期: 2025-08-06

基金项目: 国家重点研发计划项目(2024YFD1401204); 国家现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-09-P18); 河北省薯类产业技术创新团队专项基金(HBCT2023060205); 河北农业大学引进人才科研专项(YJ2020041)

作者简介: 史梦祥, 男, 在读硕士研究生, 主要从事马铃薯病害致病机制与防控研究。E-mail: 2565547392@qq.com

通信作者: 杨志辉, 男, 教授, 主要从事马铃薯病害致病机制与防控研究。E-mail: bdyzh@hebau.edu.cn

李倩, 女, 讲师, 主要从事马铃薯病害致病机制与防控研究。E-mail: liqian@hebau.edu.cn

产区均有发生,每年造成的经济损失高达1000亿美元^[2]。该病潜伏期短,再感染频繁,患病率高,可造成马铃薯严重减产^[3]。我国年均马铃薯发病面积90万hm²^[4]。马铃薯早疫病发生的严重程度取决于病原菌的生存环境,湿度大、气温适中时更有利于马铃薯早疫病的发生^[5]。

WRKY转录因子广泛存在于植物中,其名称来源于其结构特点中的保守区域WRKYGQK。WRKY转录因子可分为三类:①2个WRKY结构域,2个锌指结构;②2个WRKY结构域,1个锌指结构;③1个WRKY结构域和1个锌指结构^[6]。WRKY转录因子的结构域是与下游靶基因结合的关键位置,可以特异性地与靶基因的W-box(TT-GACT/C)结合^[7]。WRKY转录因子家族在植物体应对生物和非生物胁迫以及胁迫诱导途径中发挥着重要作用^[8],其生物学功能多种多样,可以参与到植物生长发育、开花结果等多个环节^[9]。为了在此如此多样且多变的生理微环境中做到精准且高效,植物进化出以小分子为信使的天空网络系统——植物激素调控网络。在众多的植物激素中,水杨酸(SA)、脱落酸(ABA)、茉莉酸(JA)、乙烯(ET)脱颖而出,他们发挥着重要的调控作用,串联起了植物体的生长发育及对环境变化的应答,还在植物体抗病中发挥重要作用。一般认为,植物体在经历漫长的进化过程中,逐渐形成了两条极为重要的抗病信号通路,即SA信号通路、JA/ET信号通路,而在植物生长过程中,WRKY转录因子可以参与调节各种信号网络^[10]。

WRKY转录因子的调节作用在抵御生物病害方面更为明显^[11],可以在调节抗病信号通路中发挥作用。研究表明,*MdWRKY17*被苹果炭疽病菌显著诱导,当过表达*MdWRKY17*时,苹果植株对炭疽病的敏感性显著升高,而当利用RNAi技术沉默*MdWRKY17*后,苹果对炭疽病的抗性增强^[12]。菊花中*CmWRKY15-1*可正向调控SA水平,增强对白色锈病的抗性^[13]。在马铃薯中,*StS6K2*与*StWRKY59*转录因子之间存在互作关系,过表达时提高了马铃薯对致病疫霉的抗性^[14]。

在本研究中,笔者基于前期转录组分析发现,当茄链格孢侵染马铃薯叶片时,*StWRKY15*表达量显著上升,因此,对*StWRKY15*进行了进一步的研究。利用PCR克隆到该基因后进行了理化性质和蛋白结构分析;通过qRT-PCR分析*StWRKY15*的表达模式并进行亚细胞定位,利用瞬时过表达方法对*StWRKY15*的生物学功能进行验证,以期为后续探

究*StWRKY15*在马铃薯抗早疫病中的生物学功能提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验于2025年2—4月在河北农业大学植物保护学院实验室进行。试验用马铃薯品种为费乌瑞它,大肠杆菌菌株为DH5α,农杆菌菌株为GV3101,植物表达载体为pCAMBIA3301及pCAMBIA1301,均由河北农业大学植物保护学院马铃薯病害实验室保存并提供;所需引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 总RNA提取及*StWRKY15*表达量分析 利用RNA提取试剂盒提取马铃薯RNA,使用反转录试剂盒合成cDNA。利用cDNA进行*StWRKY15*表达量的测定,以马铃薯*StActin7*为内参基因,以q*StWRKY15-F*、q*StWRKY15-R*为引物进行qRT-PCR分析,引物序列见表1,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算*StWRKY15*表达量。

1.2.2 马铃薯*StWRKY15*的克隆 借助Primer5等软件设计特异性引物*StWRKY15-F1*、*StWRKY15-R1*,完成后续PCR试验,引物如表1所示。PCR扩增中以1.2.1中的cDNA为模板,加入25 μL的高保真酶,引物*StWRKY15-F1*和*StWRKY15-R1*各1 μL,cDNA 1 μL,ddH₂O补至50 μL。PCR反应程序为预变性1 min,变性10 s,退火30 s,延伸30 s,35个循环,终延伸10 min。对PCR扩增产物进行电泳后胶回收,步骤参照说明书,将*StWRKY15*连接至pEASY®-Blunt Simple Cloning vector载体并测序,将测序正确的重组质粒命名为pEASY-*StWRKY15*。

1.2.3 *StWRKY15*基因生物信息学分析 通过在线网址NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载*StWRKY15*蛋白序列,进行Blast比对。利用MEGA7.0软件进行序列比对及分析,使用邻接法(NJ)构建*StWRKY15*的系统发育树,利用DNAMAN软件进行氨基酸序列间的多序列比对。通过在线网址对*StWRKY15*的三级结构、亲水性与疏水性、理化性质、跨膜结构域、二级结构进行预测。

1.2.4 病原菌的培养与接种 将茄链格孢菌接种在PDA平板上,于25 °C培养箱中扩繁培养,待PDA上长满茄链格孢菌后接种至番茄培养基置于25 °C培养箱中培养,菌丝长满培养基后用灭菌的刀

片轻轻刮去菌丝,在超净工作台中用紫光灯照射20 min,在25 °C和20 °C恒温培养箱中交替培养3 d。向培养基中加入1 mL无菌水,用载玻片轻轻刮培养基表面,收集菌悬液用纱布过滤除掉杂质。吸取1 μL菌悬液在显微镜下镜检,调节茄链格孢孢子浓度至 1×10^5 个·mL⁻¹。将马铃薯或烟草叶片正面朝上插入到水琼脂中,在每个叶片滴加20 μL茄链格孢孢子悬液后立即暗处理12 h,暗处理结束将其放入25 °C光照培养箱中培养约7 d,取出发病的叶片利用ImageJ软件进行病斑面积的统计,采用软件GraphPad prism 8.0.1作图。

1.2.5 马铃薯*StWRKY15*表达模式分析 在马铃薯出苗30 d后,不做任何处理,分别取根、茎、叶部位的样品,液氮速冻后保存,每个样品3个重复,进行不同组织部位*StWRKY15*表达水平的测定。参照1.2.4方法接种病原菌,对照组的马铃薯叶片滴加20 μL无菌水后做相同处理,3次生物学重复。在侵染后的0、12、24、48、72、96 h分别取样,取未侵染的叶片作为对照。将所取样品迅速放入液氮中速冻,研磨成粉末,用于后续RNA提取。

1.2.6 pCAMBIA1301-*StWRKY15*载体构建 以pEASY-*StWRKY15*为模板,利用引物*StWRKY15-F2*和*StWRKY15-R2*扩增*StWRKY15*,引物见表1。利用限制性内切酶*Bam*H I与*Sa*I对pCAMBIA1301载体及*StWRKY15*进行双酶切后再进行琼脂糖凝胶电泳,胶回收后利用T4连接酶将*StWRKY15*与表达载体pCAMBIA1301进行重组并转化至DH5α中。挑取单克隆进行摇菌并对菌液进行PCR鉴定,将鉴定正确的菌液送测序。将测序正确的菌液存菌并转化至GV3101农杆菌感受态中培养2~3 d,挑取单菌落进行菌落PCR鉴定,选取正确的菌液存菌,用于后续注射本氏烟。

1.2.7 StWRKY15亚细胞定位分析 以pCAMBIA1301空载体为对照,将含有pCAMBIA1301-*StWRKY15*的农杆菌菌悬液调节OD₆₀₀至0.6~0.8之间,室温下静置1.5 h后注射本氏烟烟草叶片,暗培养3 d后制作临时玻片,利用激光共聚焦显微镜观察*StWRKY15*蛋白的亚细胞定位情况。

1.2.8 pCAMBIA3301-*StWRKY15*载体构建 以pEASY-*StWRKY15*为模板,参照表1中的*StWRKY15-F3*和*StWRKY15-R3*序列扩增*StWRKY15*,利用限制性内切酶*Nco* I和*Bst*E II对pCAMBIA3301载体及*StWRKY15*进行双酶切后再进行连接,具体方法参照1.2.6。

表1 试验所需引物序列

Table 1 Primer sequences for the experiment

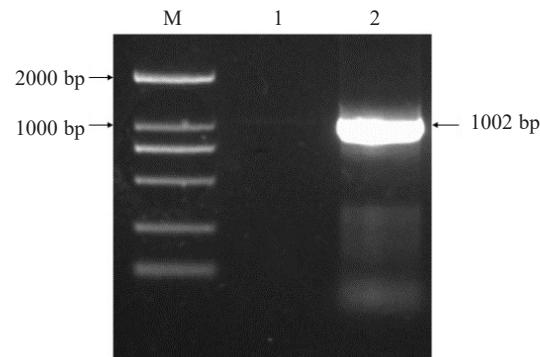
引物名称 Primer name	序列 Sequence
<i>StWRKY15-F1</i>	ATGGCTGTAGAGCTCATGATGA
<i>StWRKY15-R1</i>	CTAGTTACAATGATATTGCCAC
<i>StWRKY15-F2</i>	GATGCCATGGATGGCTGTAGAGCTCATGATGA
<i>StWRKY15-R2</i>	GGGTGACCCTAGTTACAATGATATTGCCAC
<i>StWRKY15-F3</i>	CGGGATCCATGGCTGTAGAGCTCATGATGA
<i>StWRKY15-R3</i>	GCGTCGACGTTACAATGATATTGCCAC
q <i>StWRKY15-F</i>	GAGATTGAAATAGTGGCGGATGC
q <i>StWRKY15-R</i>	ATATGCCCTTGGATGTGGAGATC
<i>StActin7-F</i>	AGGCTGTGCTTICCTGTAT
<i>StActin7-R</i>	AGTAAGGTCACGACCAGCAA

1.2.9 *StWRKY15*瞬时过表达植株的获得与抗病性分析 以pCAMBIA3301空载体为对照,将含有pCAMBIA3301-*StWRKY15*的农杆菌菌悬液调节OD₆₀₀至0.6~0.8之间,室温下静置1.5 h后注射本氏烟烟草叶片,培养3 d后进行*StWRKY15*表达量的测定,选取*StWRKY15*表达量较高的植株分别命名为OE-1、OE-2,参照1.2.4方法接种病原菌后进行抗病性分析。

2 结果与分析

2.1 *StWRKY15*的克隆

以马铃薯cDNA为模板,成功克隆得到了马铃薯*StWRKY15*。用1%琼脂糖凝胶电泳进行检测,获得了一条大小约为1000 bp的DNA片段(图1)。回收目的片段并测序,通过NCBI ORF Finder分析显示,该段序列包含一个完整的开放阅读框(ORF),全长共计1002 bp,共编码333个氨基酸(图2)。



注:M. Marker DL2000;1. 阴性对照;2. PCR扩增产物。

Note: M. Marker DL2000; 1. Negative control; 2. PCR amplification product.

图1 *StWRKY15* PCR扩增Fig. 1 *StWRKY15* PCR amplification

```

1 AUGGCUGUAGAGCUCAUGAUGAAUUACAUUACCCACCUAGUAUACUAACAAUAGCUUC 60
M A V E L M M N Y I T T P S N T N N S F
61 ACAAGAAAUUAGAAGAAAAGGCAGUUAUACAAGAACGUCGCCUCGGCGUAGAGCGUU 120
T R N L E E K A V I Q E A A S G V E S V
121 GAAAAACUCAUCAAAUUAUACAGACAGCUAACACUUAACAGAACAGAACAGAAAACAGGGG 180
E K L I K L L S Q T Q Q L E Q K Q K Q G
181 AAUUUUACUUGUUCUCAAUAUCAAGAAAUAUCAUCCCCAUGGAGAUUAGUGGGC 240
N F T C F L N Q E K S S P M E I E I V A
241 GAUGCCGCGUUAACAAAGGUUAAGAAAGUAUUCUUCUUGGGGGAUCAAGAACUGGA 300
D A A V T K F K V I S L L G G S R T G
301 UAUGCUUCAGAAGAGCACCAAUUGCUCUCCUCUCCUACAGAUCAUUAAGAAA 360
Y A R F R R A P I A S P L P T D H F K K
361 GAUUAUGCUAGAAGGUUAUUGGUCCUGCUCCAAUCAACAACUCCCCUCAAUUGCC 420
D Y A D S K V Y C P A P I Q Q L P P I A
421 UAUGGUUUUAUAAAUAUUGAAAACAGGAUUCGUUAACAAAUCAGGUUAUUUUUCG 480
Y E F Y N K F E K Q E S V T N T I N F S
481 UAUGGUCCUGAAUUGGUUCUAAAUCGUUCAAAUUCUACAAUACAGGGAAACA 540
Y A P E I C S N F N I S T I T G E T
541 GAGAGUAAAUAUAAAUCUUCUUCUUCAGUUGUAAAACCUCUCCUUGUCUUCUUC 600
E S K Y I S N L S S V V K P P L S S S S
601 UUUAAAUAUAGAGGUACUUCGUCCGGAGAAUGGACUCUCCGGCAUGUGCAGGGCUCC 660
F K I R K C T S S E N G L S G M C S G S
661 UCCGGUGCGAUGCACAUUGCUCAGGAGAAAGGAAUAGACUAAAAGUAGUAGGUU 720
S G R C H C S R R K L R K K V V R V
721 CCAGCAUAAGCAUGAAGGUUCAGACAUCCACCUAGAUUAUCAUGGGAGGAAAU 780
P A I S M K L S D I P P D D Y S W R K Y
781 GGUCAAAAGCCAAUAAAAGGAUCUCCACAUCCAAGGGCAUUAACAAAGUAGUAGUG 840
G Q K P I K G S P H P R A Y Y K C S S V
841 AGAGGGGUUCAGCACGUAAACAGUAGAAAAGACGUUAGAACCACAAUGCUGUAUG 900
R G C P A R K H V E R A L D E P T M L M
901 GUACGUACGAAGGAGAGCAUACCAUUCGUUUCUAAUUCAGAAAACAAGUUGUGUCAU 960
V T Y E G E H N H S L S I S E T S C V I
961 UUAGAGUCUGAUCAUUUGGGCAUUAUCAUUGAACUAG 1002
L E S D Q F V G N I I V N

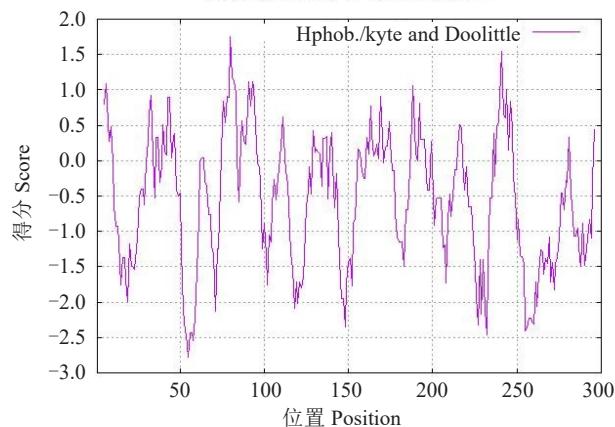
```

图 2 *StWRKY15* ORF 与预测的氨基酸序列Fig. 2 *StWRKY15* ORF and predicted amino acid sequence

2.2 StWRKY15 蛋白生物信息学分析

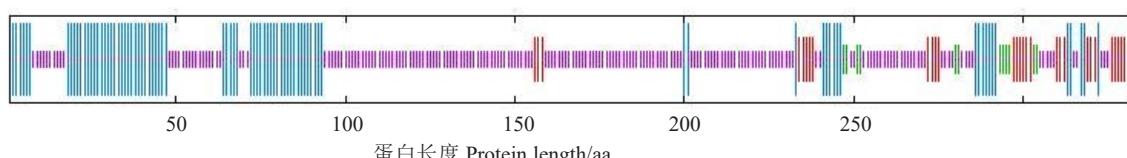
2.2.1 *StWRKY15* 蛋白理化性质分析 使用在线分析工具 ProtParam, 预测并分析了 *StWRKY15* 蛋白的理化性质。*StWRKY15* 蛋白分子式为 $C_{1476}H_{2367}N_{413}O_{446}S_{18}$, 相对分子质量 33.6 kDa, 理论等电点(pI)为 9.45, 半衰期为 30 h, 不稳定指数为 48.39(>40), 即 *StWRKY15* 蛋白为不稳定蛋白。脂肪族指数为 69.57, 该蛋白亲水性平均数为 -0.503, 为亲水蛋白。利用在线工具 ProtScale 分析该蛋白的亲疏水性得到相同的预测结果, 在 N 端和 C 端各有一个明显的疏水峰, 为亲水性蛋白(图 3)。分析 *StWRKY15* 蛋白的氨基酸序列后可知, *StWRKY15* 蛋白包含了 20 种氨基酸, 丝氨酸含量最高, 为 12.3%。

2.2.2 *StWRKY15* 蛋白质二级结构和三级结构预测 利用 SOPMA 在线软件预测 *StWRKY15* 蛋白的二级结构, 结果(图 4)表明, 无规卷曲是主要的构成部分, 占比为 61.26%, 另外 3 种的占比由大到小

图 3 *StWRKY15* 蛋白亲水性分析Fig. 3 Hydrophilicity analysis of *StWRKY15* protein

为 α -螺旋(25.83%)、延伸链(9.31%)、 β -转角(3.60%)。利用 SWISS-MODEL 在线网站预测 *StWRKY15* 蛋白的三维构象(图 5), 可以看到, 其含有丰富的无规卷曲, 与二级结构的预测结果一致。

2.2.3 *StWRKY15* 蛋白结构域预测 使用在线工



注:紫色表示无规卷曲,蓝色表示 α -螺旋,红色表示延伸链,绿色表示 β -转角。

Note: Purple indicates random coil, blue denotes α -helix, red represents extended strand, and green signifies β -turn.

图 4 *StWRKY15* 蛋白质二级结构预测Fig. 4 Secondary structure prediction of *StWRKY15*



图 5 StWRKY15 蛋白质三级结构预测

Fig. 5 Tertiary structure prediction of StWRKY15

具 TMHMM 2.0 预测 StWRKY15 的氨基酸序列的跨膜结构域,结果显示,StWRKY15 蛋白不具备跨膜区(图 6),不存在跨膜结构域,说明 StWRKY15 不是典型的跨膜蛋白。

2.2.4 StWRKY15 蛋白的保守功能域预测分析
使用 NCBI 网站上的 Blast 工具, 对马铃薯 *St-*

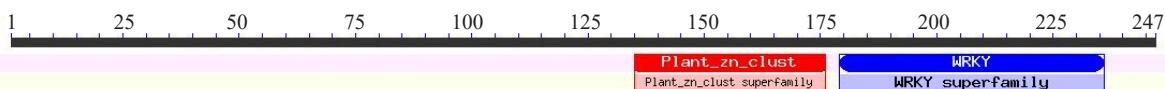


图 7 StWRKY15 蛋白保守功能域分析
Fig. 7 Conserved domain analysis of StWRKY15

2.2.5 StWRKY15 氨基酸序列同源性比对 使用 NCBI 网站上的 Blast 工具进行序列对比分析,结果(图 8)显示,StWRKY15 蛋白与弱叶烟草(*Nicotiana attenuata*)WRKY 蛋白(XP_019241749.1)、烟草

WRKY15 基因编码的氨基酸序列的保守功能域查找, 结果表明, 马铃薯 *StWRKY15* 编码的蛋白属于 WRKY 转录因子(图 7), 与 InterProScan 在线工具得到的结论相同。*StWRKY15* 蛋白的 N 端 256~309 氨基酸位置具有 WRKY 转录因子结构域的保守特征序列 WRKYGQK。

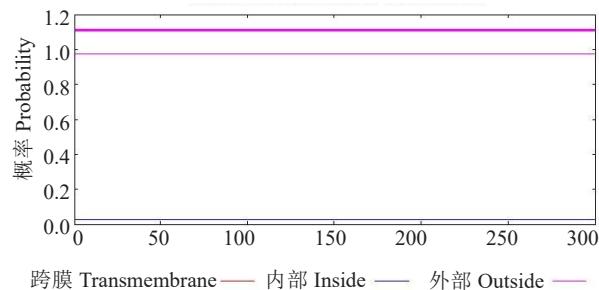


图 6 StWRKY15 蛋白质结构域预测

Fig. 6 Transmembrane region prediction of StWRKY15

(*Nicotiana tomentosiformis*) WRKY 蛋白 (XP_009600092.1)、辣椒 (*Capsicum annuum*) WRKY 蛋白 (KAF3628131.1)、大叶菊 (*Ipomoea triloba*) WRKY 蛋白 (XP_031109330.1)、樟子松烟草 (*Nico-*

ItWRKY15	MAEVLMMSSYRNVDVNGGGGRI GFVKS LEESSAVVKEAASGFESVEEFIRLLSGKKKQG-----	DREKAAMEIDVVADAVVNKFKKVIDLIL	88
SpWRKY7	MAEVLMMDYRSTRNNNT-NCINFVA KLEE KS VVQEAASGLSVEKLI RLLSQSOSQDQI-----	QCNKSPVIEIMVAEEAVT FKKKVISL I	86
StWRKY15	MAEVLMMNYI TTFSNTN --NS E TRNLEE-KAVI QEAASG VE S VEKLIK L LSQTQQL-EOKQKGNF T CFINQ K SSPMEIEIVADAAT V FKKKVISL	94	
CaWRKY15	MAEVLMMNYI TTFSNTN --NS E TRNLEE-KAVI QEAASG VE S VEKLIK L LSQTQQL-EOKQKGNF T CFINQ K SSPMEIEIVADAAT V FKKKVISL	94	
NsWRKY15	MAEVLMMDYRNTSRNNF--- TIFNTKLEE -KAVVQEAASGLS V EKL L LLSQTOSQSQQQQKQGNLSSFLKQF-NSPMIEIMVADAAT V FKFNVISL	21	
NaWRKY15	MAEVLMMDYRNTSRNNF--- TIFNTKLEE -KAVVQEAASGLS V EKL L LLSQTOSQSQQQQKQGNLSSFLKQF-NSPMIEIMVADAAT V FKFNVISL	94	
NtWRKY15	MAEVLMMDYRNTSRNNC--- TIFNTKLEE -KAVVQEAASGLS V EKL L LLSQTOSQSQQQQKQGNLSSFLKQF-NSPMIEIEIVADAAT V FKFNVISL	94	
ItWRKY15	GRTRTGHARFRRGPVASSSEV-----EAFADNKVY SP TIQVVP E ASYDYSAAAHRRFFQSAAA-----AATA APMTISFTCSPEI RANSFN IS SLTGET	179	
SpWRKY7	DRRTG H ARFRRAPIES-----NSSKDFEVDTKVY SP TIQVVFITYHE-----NPL-----VKTISFSYSP E SRTNFN IS SLTGET	162	
StWRKY15	GESRTG H ARFRRAPIASPLTD E FKKDYADSKVYC P PIQLPPIAYE Y -----NKEEKQF-----SVINTINF S YAPEICCSNSFN IS LTGET	180	
CaWRKY15	DRRTG H ARFRRAPID-----NLKKDYYDFEVYCL T PIQQLPPIAS Y DIN-----NNQI F QNP K QELIV-----TKSINF S YAPEIW C ANSFNM IS LTGET	105	
NsWRKY15	GRT T GHARFRRAPI T SP-----KVKND F DSK V C P TP I QVPPVAYE Y -----DHQFF I PRDG V VENQEL V TK S INF S YQDISRSNSFNMS IS LTGET	188	
NaWRKY15	GRT T GHARFRRAPI T SP-----KVKND F DSK V C P TP I QVPPVAYE Y -----NHQFFQNPRDG V VEKQEL V TK S INF S YQDISRSNSFNMS IS LTGET	188	
NtWRKY15	GRT T GHARFRRAPI T SP-----KIKKDF E DT V YC P TP I QVPPVAYE Y -----NHQFFQNPRDG V VEKQEL V TK S INF S YQDISRSNSFNMS IS LTGET	188	
ItWRKY15	ESK P M L SSAFAQLTNLSQ-----VSSAGK P PL S TSS-----LRKRC S SEN N LSGKCSGSSRCHCSKR K LR L LR V TRPAISM K LDIPPDDY W RKYQ K P I	275	
SpWRKY7	ESKQHSSNSAFAQMTNLSSQVS N SAGK P PL S SS-----LRKRC S SEN V VS G KCSGSSRCHCSKR K LR L LR V TRPAISM K LDIPPDDY W RKYQ K P I	260	
StWRKY15	ESKYI----S-----N-----LSSVV K PL S SS-----LRKRC S SEN V VS G KCSGSSRCHCSKR K LR L LR V TRPAISM K LDIPPDDY W RKYQ K P I	265	
CaWRKY15	ES E QIS N S-----Q-----VSSAV K PL S SSSSFK E RKCT S SEN G VS G KCSGSSRCHCSKR K LR L LR V TRPAISM K LDIPPDDY W RKYQ K P I	194	
NsWRKY15	ESSSF - KIS-----N-----LSSAGK P PL S SSSSFK E RKCC S SEN G LSGKCSGSSRCHCSKR K LR L LR V TRPAISM K MSDIPPDDY W RKYQ K P I	275	
NaWRKY15	ESSSF - KIS-----N-----LSSAGK P PL S SSSSFK E RKCC S SEN G LSGKCSGSSRCHCSKR K LR L LR V TRPAISM K MSDIPPDDY W RKYQ K P I	275	
NtWRKY15	ESSSF - KIS-----N-----LSSAGK P PL S SSSSFK E RKCC S SEN G LSGKCSGSSRCHCSKR K LR L LR V TRPAISM K MSDIPPDDY W RKYQ K P I	275	
ItWRKY15	KGS P H P R G YYKC S SVRGC P A K HVERA V D D PTML I V T Y E GE H NHS V S V A E T N C I LESS-----	334	
SpWRKY7	KGS P H P R G YYKC S SVRGC P A K HVERA V D D PTML I V T Y E GE H NHS V S V A E T S L I LESS-----	319	
StWRKY15	KGS P H P R G YYKC S SVRGC P A K HVERA V D D PTML I V T Y E GE H NHS V S V A E T S C V I L E S Q F V G N I I V N	333	
CaWRKY15	KGS P H P R G YYKC S SVRGC P A K HVERA V D D PTML I V T Y E GE H NHS V S V A E T S L I LESS-----	253	
NsWRKY15	KGS P H P R G YYKC S SVRGC P A K HVERA V D D PTML I V T Y E GE H NHS V S V A E T S L I LESS-----	334	
NaWRKY15	KGS P H P R G YYKC S SVRGC P A K HVERA V D D PTML I V T Y E GE H NHS V S V A E T S L I LESS-----	334	
NtWRKY15	KGS P H P R G YYKC S SVRGC P A K HVERA V D D PTML I V T Y E GE H NHS V S V A E T S L I LESS-----	334	

图 8 StWRKY15 同源性比对

tiana sylvestris)WRKY蛋白(XP_009804436.1)、龙葵(*Solanum pennellii*)WRKY蛋白(XP_015063634.1)等有较高的同源性。进行同源比对发现,*StWRKY15*蛋白与辣椒的WRKY蛋白的同源性最高,且都含有WRKY保守结构域(图8中框选部分)。

2.3 StWRKY15系统进化树构建

使用NCBI网站上的Blast工具,寻找*StWRKY15*

编码的氨基酸同源序列,下载与*StWRKY15*蛋白序列相似度较高的辣椒(KAF3628131.1)、烟草(XP_019241749.1)、猕猴桃(PSS21265.1)、丁香草(XP_027151585.1)等共13种植物的氨基酸序列后,利用MEGA 7.0构建系统发育树,Bootstrap值设置为1000。结果显示,*StWRKY15*蛋白与茄科植物辣椒共聚一支(图9),亲缘性最高。

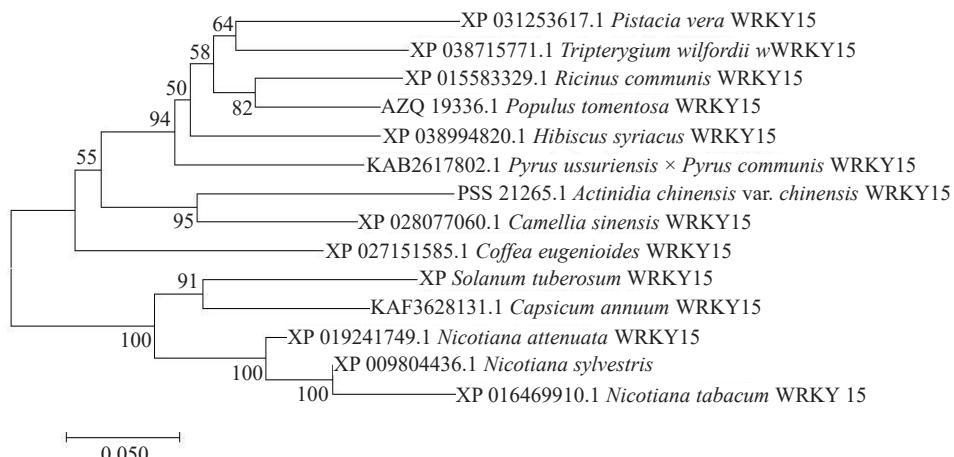


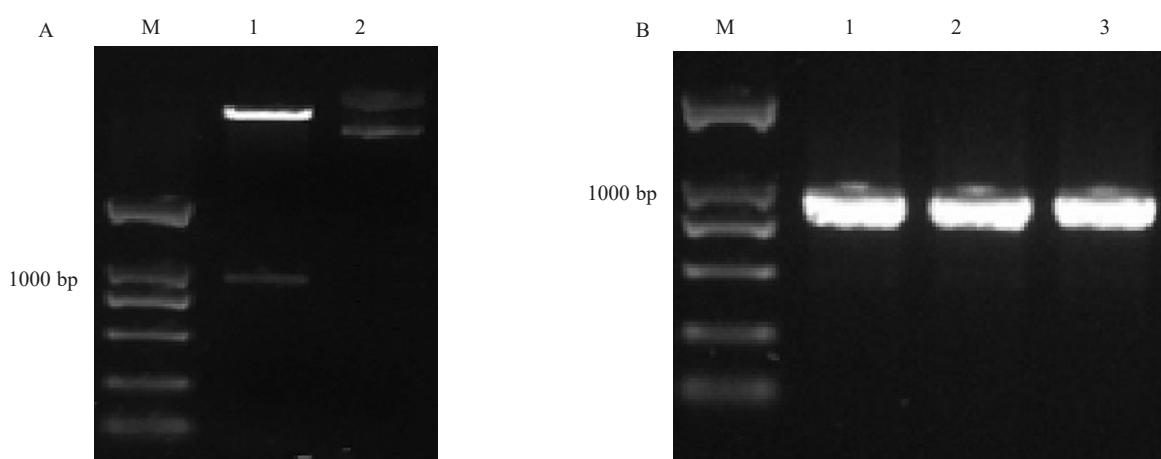
图9 *StWRKY15*系统进化树
Fig. 9 Phylogenetic tree of *StWRKY15*

2.4 植物表达载体pCAMBIA1301-*StWRKY15*的构建

对构建的植物表达载体酶切验证结果如图10-A所示,在1000 bp位置有明显的条带,将重组质粒转化至农杆菌并进行菌落PCR鉴定,在1000 bp处有明显条带(图10-B),证明重组质粒pCAMBIA1301-*StWRKY15*构建成功并成功转入农杆菌中。

2.5 StWRKY15亚细胞定位

为验证*StWRKY15*在细胞中发挥功能的位置,将含有*StWRKY15*的农杆菌活化后扩大培养,将准备好的菌悬液注射本氏烟烟草叶片进行表达,然后利用激光共聚焦显微镜观察*StWRKY15*的亚细胞定位情况,结果如图11所示,对照组中的细胞膜与细胞核均发出绿色荧光,而试验组中只在细胞核中可以观察到绿色荧光信号,可以证明*StWRKY15*



注:M. Marker DL2000;左侧1. 酶切产物;左侧2. 阳性对照;右侧1. 阳性对照;右侧2~3. PCR验证。

Note: M. Marker DL2000; 1(Left side). Digest product; 2(Left side). Positive control; 1(Right side). Positive control; 2-3(Right side). PCR identification.

图10 pCAMBIA1301-*StWRKY15*质粒酶切鉴定(A)及菌落PCR鉴定(B)

Fig. 10 pCAMBIA1301-*StWRKY15* plasmid digestion identification(A) and colony PCR identification(B)

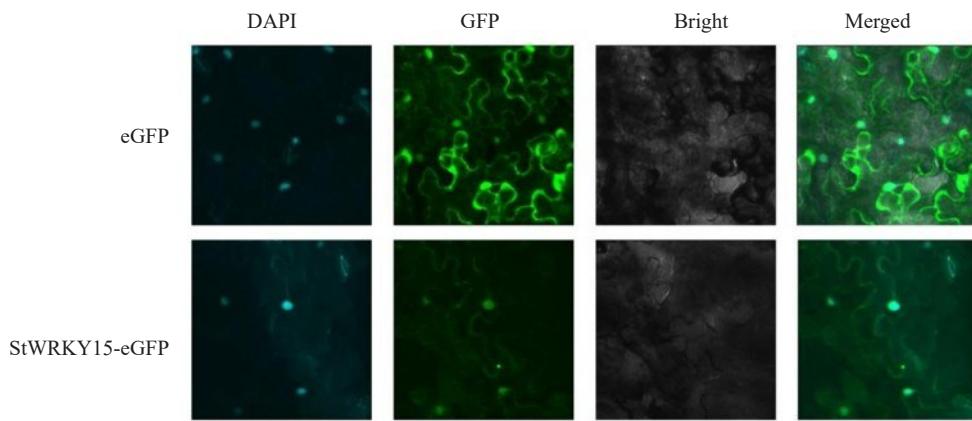
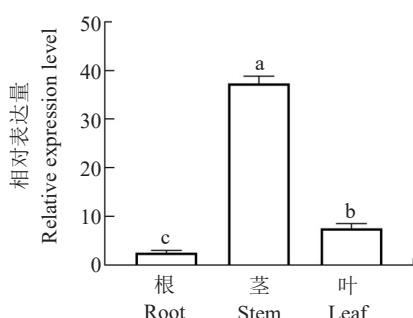


图 11 StWRKY15 亚细胞定位
Fig. 11 Subcellular localisation of StWRKY15

亚细胞定位于细胞核中,符合 WRKY 转录因子特性。

2.6 StWRKY15 表达模式分析

2.6.1 StWRKY15 在马铃薯不同组织的表达分析
StWRKY15 在马铃薯不同组织的表达具有显著差异,如图 12 所示,*StWRKY15* 在马铃薯的茎中表达量最高,约为叶片的 5 倍,根的 30 倍,其次是叶片,在根中的表达量最低。



注:不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。

Note: Different small letters indicate significant difference at 0.05 level.

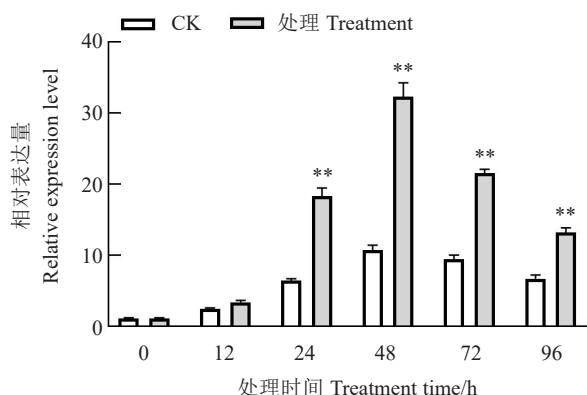
图 12 StWRKY15 在马铃薯各组织中的表达模式分析

Fig. 12 Analysis of the expression pattern of *StWRKY15* in various tissues of potato

2.6.2 马铃薯叶片在早疫病病菌胁迫下 *StWRKY15* 表达模式分析 由图 13 可知,在马铃薯叶片上接种茄链格孢菌悬液 24 h 后,*StWRKY15* 的表达量极显著升高,且随着侵染时间的延长,表达量呈先升高后降低的变化趋势。

2.7 StWRKY15 对马铃薯早疫病抗病性分析

2.7.1 植物表达载体 pCAMBIA3301-*StWRKY15* 的构建 利用 *Nco* I 和 *Bst*E II 对 pCAMBIA3301-*StWRKY15* 质粒进行双酶切,并利用 1% 琼脂糖凝胶



注:**表示与对照在 0.01 水平差异极显著。下同。

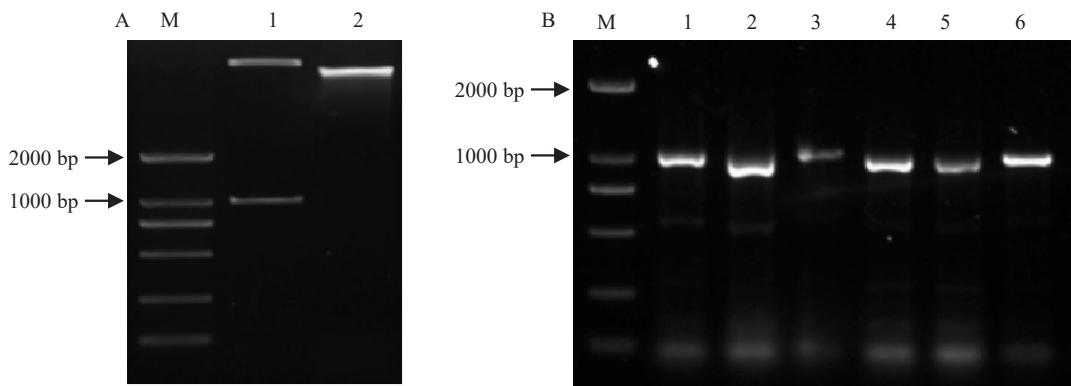
Note: ** indicate extremely significant difference between experimental group and CK at 0.01 level. The same below.

图 13 早疫病菌侵染马铃薯叶片后 *StWRKY15* 的表达模式分析

Fig. 13 Analysis of the expression pattern of *StWRKY15* after infestation of potato leaves by phytophthora early blight

电泳进行检测,在 1000 bp 左右有一条明显的条带(图 14-A),证明 pCAMBIA3301-*StWRKY15* 构建成功。将 pCAMBIA3301-*StWRKY15* 质粒转化农杆菌后,进行菌落 PCR 鉴定,结果显示在 1000 bp 处有 1 条明显条带(图 14-B)。

2.7.2 瞬时过表达 *StWRKY15* 烟草抗病性分析 将含有 pCAMBIA3301-*StWRKY15* 的农杆菌注射烟草,培养 3 d 后对烟草的 *StWRKY15* 表达量进行测定,结果如图 15-A 所示,瞬时过表达植株 OE-1、OE-2 中的 *StWRKY15* 相对表达量极显著高于 CK,约是 CK 的 20 倍,表明 *StWRKY15* 在烟草中瞬时过表达。对瞬时过表达烟草接种茄链格孢培养 7 d 后,CK 与试验组病斑面积出现明显差异(图 15-B~C),利用 ImageJ 软件进行病斑面积测量,CK



注:M. Marker DL2000;左侧 1. 酶切产物;左侧 2. 阳性对照;右侧 1. 阳性对照;右侧 2~6. PCR 验证。

Note: M. Marker DL2000; 1(Left side). Digest product; 2(Left side). Positive control; 1(Right side). Positive control; 2-6(Right side). PCR identification.

图 14 pCAMBIA3301-StWRKY15 质粒酶切鉴定(A)及菌落 PCR 鉴定(B)

Fig. 14 pCAMBIA3301-StWRKY15 plasmid digestion identification(A) and colony PCR identification(B)

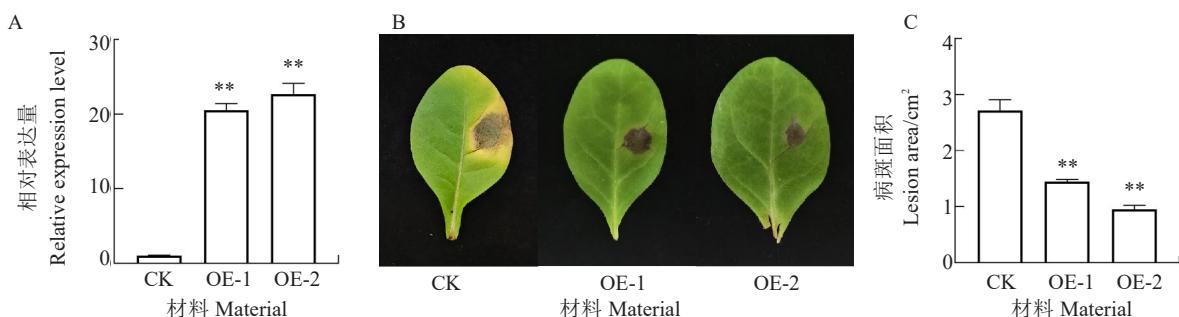


图 15 马铃薯 $StWRKY15$ 瞬时过表达烟草表达量分析(A)、表型分析(B)和病斑面积(C)

Fig. 15 Potato $StWRKY15$ transient overexpression tobacco expression analysis (A), phenotypic analysis (B), lesion area (C)

的病斑面积为 2.718 cm^2 ,过表达植株 OE-1 的病斑面积为 1.446 cm^2 ,过表达植株 OE-2 的病斑面积为 0.955 cm^2 ,即瞬时过表达 $StWRKY15$ 的烟草植株病斑面积极显著小于 CK,表明 $StWRKY15$ 在烟草中的瞬时过表达增强了其对茄链格孢的抗性。

3 讨论与结论

WRKY 转录因子在植物的生理过程以及抗性反应中都发挥着至关重要的作用。许多已知的 WRKY 转录因子在病原菌侵染宿主植物的过程中被激活,并参与了植物对病原体的防御反应。*At-WRKY33* 在拟南芥中参与了对病原菌的识别和抵御^[15];*OsWRKY13* 可以通过激活水杨酸(SA)合成相关基因,从而调控 SA 含量,增强水稻抗性^[16]。笔者在本研究中成功从费乌瑞它马铃薯中克隆获得了 $StWRKY15$,核苷酸序列分析结果显示,该基因的编码区开放阅读框长为 1002 bp,共编码 333 个氨基酸。利用生物信息学分析网站进行预测和分析,结果显示, $StWRKY15$ 蛋白属于亲水性蛋白质,没有跨膜结构区,为结构高度保守的胞内蛋白。笔者通

过与 13 种不同植物物种的 WRKY 氨基酸序列进行系统树构建,发现马铃薯 $StWRKY15$ 蛋白与辣椒 $CaWRKY15$ 蛋白亲缘关系最近,研究表明, $CaWRKY15$ 在抵御细菌性枯萎病(*Ralstonia solanacearum*)中发挥重要作用^[17],因此笔者推测马铃薯 $StWRKY15$ 同样具有抵御细菌性枯萎病的作用。WRKY 转录因子具有高度保守的 WRKY 结构域,依据结构域及其锌指结构的不同进行分类^[5]。 $St-WRKY15$ 含有典型的 WRKY 结构域,属于第 II 大类 WRKY 转录因子。同属于第二大类的 WRKY 转录因子 $GhWRKY$ 可以提升植物体对盐胁迫的抗性^[18],因此推测 $StWRKY15$ 也可以提升马铃薯对盐胁迫的抗性。WRKY 转录因子具有高度特异性的 DNA 结合能力,在植物中表达量丰富,并且存在多种类型的 WRKY 转录因子,因此,笔者认为 WRKY 转录因子在抵御病原物侵染的过程中所发挥的作用对植物抗病育种具有重要启发。有关马铃薯品种青薯九号的研究表明, $StWRKY15$ 可以响应低温胁迫,在逆境胁迫下可以有效地减轻植株受到的伤害,一定程度上增强了转基因烟草的抗逆能力^[19]。

当茄链格孢侵染马铃薯叶片时, *StWRKY15* 高度上调表达。因此, 笔者认为在费乌瑞它中, *StWRKY15* 同样会增强马铃薯的耐寒性, 但还需要进一步研究。

当植物体受到外界胁迫时, 本身会迅速做出反应, 从而保证自身的生长。笔者对 *StWRKY15* 基因在马铃薯不同部位的表达情况进行了表达模式分析, 发现其在马铃薯茎中的表达量显著高于根和叶, 而茎作为植物地上部分的重要支撑和物质运输通道, 推测其对一些逆境因素(如干旱、盐胁迫等)的感知和响应方式可能与根和叶有所不同, *StWRKY15* 在茎中的高表达可能使其在茎中的逆境信号转导和防御反应中发挥主导作用。本研究中的 *StWRKY15* 与 *OsWRKY28* 在水稻中的表达模式相似, 后者在稻瘟病感染时表达量增加^[20], *CaWRKY30* 基因在辣椒响应 TSWV 菌胁迫的过程中发挥着重要作用^[21], 对马铃薯叶片接种茄链格孢后发现, *StWRKY15* 基因表达量显著上调, 笔者在本研究证明了与 *WRKY28*、*CaWRKY30* 基因同属于 WRKY 家族的 *StWRKY15* 基因在马铃薯中受到早疫病病菌的显著诱导。已有研究表明, *VvWRKY56* 定位于细胞核中^[22], 本研究中同属于 WRKY 转录因子的 *StWRKY15* 同样定位在细胞核内, 结合其亚细胞定位情况, *StWRKY15* 可能通过其 WRKY 转录因子活性参与调控马铃薯对茄链格孢菌的抗性。

笔者在本研究中发现, *StWRKY15* 受到茄链格孢的显著诱导, 通过构建过表达载体 pCAMBIA3301-*StWRKY15*, 利用瞬时过表达方式对 *StWRKY15* 的生物学功能进行了验证, 结果表明, *StWRKY15* 瞬时过表达后烟草对茄链格孢的抗性提高, 表明 *StWRKY15* 与烟草对病原菌抗性的提升有相关性。植物激素在植物生长发育以及对环境胁迫的响应中发挥着重要作用, 植物激素与抗病性之间的关系是植物生理学和分子生物学研究的重要领域。SA 和 JA 是 2 种在植物防御反应中起核心作用的激素。而关于 WRKY 转录因子调控 SA、JA 信号通路的研究较多, *VvWRKY6* 可以与 *VvZIP1* 互作, 通过调控 SA 信号通路, 抵御葡萄白粉病菌的侵染^[23]; *CsWRKY55* 通过调控 JA 生物合成信号的转导, 从而抵御病原菌的侵染^[24]。已有研究表明, JA 可增强马铃薯对茄链格孢的抗性^[25]。当前许多研究表明了 WRKY 转录因子可以调节 SA、JA 合成相关基因的表达, 如向过表达 *GhWRKY70* 的拟南芥转基因植株接种黄萎病菌后, 转基因植株生长情况优于野生株, 且提高了 JA 合成基因 *AOS* 的表达水

平^[25]; 在烟草中, 沉默 *NaWRKY70* 后, 烟草中的 JA、ABA 含量显著降低, 同时, *NaWRKY70* 可以与 JA 合成基因 *NaAOS*、*NaJAR4* 与 ABA 合成基因 *NaNCED1* 与 *NaXDI* 的 W-box 结合, 促进 JA 与 ABA 的合成^[26]。本研究后续将对相关激素的变化以及激素通路相关基因的表达量进行测定, 进一步明确 *StWRKY15* 在马铃薯抗早疫病中的抗性机制。

综上所述, 笔者成功克隆并鉴定了马铃薯 WRKY 家族转录因子 *StWRKY15*, 其编码 333 个氨基酸, 定位于细胞核, 具有不稳定亲水性特征。表达分析显示 *StWRKY15* 在茎中优势表达, 并受早疫病菌显著诱导。同时通过瞬时过表达试验证明了 *StWRKY15* 可以增强烟草对茄链格孢的抗性。然而, *StWRKY15* 是如何增强马铃薯对早疫病的抗性, 以及是否会影响相关激素等含量的变化从而增强烟草对茄链格孢的抗性还需进一步明确, 其调控网络仍需进一步验证。本研究结果为后续 *StWRKY15* 的功能、机制研究以及可能调控的信号网络奠定了基础, 也为深入了解马铃薯抗早疫病的分子机制提供了理论依据。

参考文献

- [1] 王怡凡, 刘巍, 朱其立, 等. 马铃薯早疫病的发生规律及防治研究进展[J]. 黑龙江农业科学, 2021(9):129-133.
- [2] 夏善勇. 马铃薯早疫病及综合防治研究进展[J]. 农业科技通讯, 2023(4):152-156.
- [3] 李秀华, 梁瑞萍, 张仙保, 等. 马铃薯早疫病病原菌的分离鉴定及品种早疫病抗性评价[J]. 安徽农业科学, 2022, 50(22): 86-88.
- [4] 高玉林, 徐进, 刘宁, 等. 我国马铃薯病虫害发生现状与防控策略[J]. 植物保护, 2019, 45(5):106-111.
- [5] 台莲梅. 马铃薯早疫病菌多样性和侵染过程及品种抗病机制研究[D]. 黑龙江大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2011.
- [6] JAVED T, GAO S J. WRKY transcription factors in plant defense[J]. Trends in Genetics, 2023, 39(10):787-801.
- [7] 董悦, 王远达, 王志敏, 等. *WRKY12* 调控植物发育的分子机制[J]. 生物工程学报, 2021, 37(1):142-148.
- [8] ZHU J H, QU L, ZENG L W, et al. Genome-wide identification of *HbVQ* proteins and their interaction with *HbWRKY14* to regulate the expression of *HbSRPP* in *Hevea brasiliensis*[J]. BMC Genomics, 2025, 26(1):53.
- [9] EL-ESAWI M A, AL-GHAMDI A A, ALI H M, et al. Overexpression of *AtWRKY30* transcription factor enhances heat and drought stress tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Genes, 2019, 10(2):163.
- [10] JANG G, YOON Y, CHOI Y D. Crosstalk with jasmonic acid integrates multiple responses in plant development[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(1):305.
- [11] 司爱君, 陈红, 余渝, 等. WRKY 转录因子在植物非生物胁迫

- 抗逆育种中的应用[J].江苏农业科学,2019,47(16):9-13.
- [12] SHAN D, WANG C, ZHENG X, et al. MKK4-MPK3-WRKY17-mediated salicylic acid degradation increases susceptibility to *Glomerella* leaf spot in apple[J]. Plant Physiology, 2021, 186(2):1202-1219.
- [13] 高歌,李雪莹,何姗,等.菊花‘C029’转录因子基因*CmWRKY15-1*的抗病功能分析[J].植物病理学报,2022,52(4):583-591.
- [14] WEI Y M, TAN X, TIAN T T, et al. Ribosomal S6 kinases 2 mediates potato resistance to late blight, through *WRKY59* transcription factor[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 277(P4):134581.
- [15] QIU D Y, XIAO J, DING X H, et al. *OsWRKY13* mediates rice disease resistance by regulating defense-related genes in salicylate and jasmonate-dependent signaling[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2007, 20(5):492-499.
- [16] ZHENG J Y, LIU F, ZHU C H, et al. Identification, expression, alternative splicing and functional analysis of pepper WRKY gene family in response to biotic and abiotic stresses[J]. PLoS One, 2019, 14(7):e0219775.
- [17] YAN H R, JIA H H, CHEN X B, et al. The cotton WRKY transcription factor *GhWRKY17* functions in drought and salt stress in transgenic *Nicotiana benthamiana* through ABA signaling and the modulation of reactive oxygen species production[J]. Plant Cell Physiology, 2017, 55(12):2060-2076.
- [18] 冯月娟,杨振红,王芳.马铃薯*StWRKY15*在转基因烟草的耐寒性分析[J].分子植物育种,2021,19(21):7101-7112.
- [19] 徐如梦.*OsWRKY28*转录因子在水稻抗病信号转导中的作用[D].浙江金华:浙江师范大学,2021.
- [20] ANSAR H, MUHAMMAD I K, MOHAMMED A, et al. *CaWRKY30* positively regulates pepper immunity by targeting *CaWRKY40* against *Ralstonia solanacearum* inoculation through modulating defense-related genes[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(21):12091.
- [21] WANG Y, WANG X H, FANG J H, et al. *VqWRKY56* interacts with *VqbZIPC22* in grapevine to promote proanthocyanidin biosynthesis and increase resistance to powdery mildew[J]. The New Phytologist, 2023, 237(5):1856-1875.
- [22] 张洁,姜长岳,王跃进.中国野生毛葡萄转录因子*VqWRKY6*与*VqbZIP1*互作调控抗白粉病功能分析[J].中国农业科学,2022,55(23):4626-4639.
- [23] XIAN B H, FU J, SU L Y, et al. The WRKY transcription factor *CsWRKY55* positively regulates citrus bacterial canker resistance in *Citrus sinensis*[J]. Scientia Horticulturae, 2024, 338: 113714.
- [24] ZHENG L J, YANG P, NIU Z J, et al. Dissecting *in vivo* responses of phytohormones to *Alternaria solani* infection reveals orchestration of JA- and ABA-mediated antifungal defenses in potato[J]. Horticulture Research, 2022, 9:188.
- [25] ZHANG S L, DONG L J, ZHANG X, et al. The transcription factor *GhWRKY70* from *Gossypium hirsutum* enhances resistance to *Verticillium* wilt via the jasmonic acid pathway[J]. BMC Plant Biology, 2023, 23(1):141.
- [26] SONG N, WU J S. *NaWRKY70* is a key regulator of *Nicotiana attenuata* resistance to *Alternaria alternata* through regulation of phytohormones and phytoalexins biosynthesis[J]. New Phytologist, 2024, 242(3):1289-1306.