

马铃薯 *StWRKY70* 基因启动子功能分析

耿德盈, 郭雨恒, 刘士鹏, 赵雅倩, 赵冬梅, 李倩, 杨志辉

(河北农业大学植物保护学院 河北保定 071000)

摘要: 转录因子 *StWRKY70* 参与植物抗病防御反应过程, 可以提高马铃薯早疫病抗性。为探究马铃薯 *StWRKY70* 基因启动子功能, 拟进一步通过 PCR 方法克隆 *StWRKY70* 基因启动子, 利用在线软件预测该启动子的顺式作用元件, 并分析调控元件分布特点; 构建启动子 5'端缺失表达载体(*pGreenII 0800-StWRKY70_{pro}::LUC*)并瞬时转化烟草叶片, 通过观察报告基因 LUC 情况, 明确启动子的活性区域。结果表明, 该启动子序列长 2000 bp, 含有脱水响应元件 MYB、干旱响应元件 AP2/ERF、高温响应元件 HSF 等多种顺式元件; LUC 荧光强度分析结果表明, 随着 *StWRKY70* 基因启动子 5'端缺失不同片段的长度增加, LUC 荧光强度逐渐增强, 明确了 *StWRKY70* 基因启动子的核心区域为 400~700 bp。综上所述, *StWRKY70* 基因启动子的核心区域及多种逆境响应元件可能通过调控基因转录效率参与马铃薯早疫病抗性应答过程, 为解析 *StWRKY70* 在植物抗病中的作用机制提供一定的理论支持。

关键词: 马铃薯; 启动子活性; *StWRKY70*; LUC 荧光强度; 烟草转化

中图分类号: S532

文献标志码: A

文章编号: 1673-2871(2025)12-045-07

Functional analysis of the *StWRKY70* gene promoter in potato

GENG Deying, GUO Yuheng, LIU Shipeng, ZHAO Yaqian, ZHAO Dongmei, LI Qian, YANG Zhihui

(College of Plant Protection, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei, China)

Abstract: The transcription factor *StWRKY70* is involved in plant disease resistance defense responses and can enhance potato early blight resistance. To investigate the promoter function of the potato *StWRKY70* gene promoter, this study cloned the promoter sequence using PCR method and predicted its cis-acting elements using online to analyze the distribution characteristics of regulatory elements. Additionally, 5'-end deletion expression vector of the promoter (*pGreenII 0800-StWRKY70_{pro}::LUC*) were constructed. The expression of the reporter gene LUC was observed through transient transformation of tobacco leaves to identify the promoter's active regions. The results showed that the length of the promoter sequence was 2000 bp, and contained various stress-responsive cis-elements, such as dehydration-responsive element MYB, drought-responsive element AP2/ERF, and high-temperature-responsive element HSF. The analysis results of LUC fluorescence intensity showed that with the increase of the length of different 5'-end deletion fragments of the *StWRKY70* gene promoter, the LUC fluorescence intensity gradually increased, indicating that the core region of the *StWRKY70* promoter was 400 bp to 700 bp. In conclusion, the core region and various stress-responsive cis-acting elements of the *StWRKY70* gene promoter may be involved in the potato's defense response against early blight by regulating gene transcription efficiency, thereby providing certain theoretical support for further elucidating the mechanism underlying the role of *StWRKY70* in plant disease resistance.

Key words: Potato; Promoter activity; *StWRKY70*; LUC fluorescence intensity; Tobacco conversion

马铃薯早疫病是由茄链格孢(*Alternaria solani*)引起的一种真菌性病害, 主要危害马铃薯的叶片, 是仅次于马铃薯晚疫病的第二大病害^[1-2]。在马铃薯主要的种植区域, 早疫病可导致 20%~25% 的产量损失, 严重时会造成马铃薯减产超 70%, 对马铃

薯产业造成了严重的威胁^[3]。当前, 早疫病主要依靠使用化学药剂进行控制, 然而化学药剂的过度使用对生态环境和人类健康造成了严重影响^[4]。因此, 探明马铃薯抗早疫病的分子机制, 并挖掘抗性基因是防治早疫病的根本途径。

收稿日期: 2025-03-04; 修回日期: 2025-09-10

基金项目: 河北省省属高等学校基本科研业务费研究项目(KY2022044); 国家自然科学基金(32101776); 河北农业大学引进人才科研专项(YJ2020041); 国家现代马铃薯产业技术体系建设专项(CARS-09-P18); 国家重点研发计划(2024YFD1401204)

作者简介: 耿德盈, 男, 在读硕士研究生, 研究方向为马铃薯主要病害致病机制与防控。E-mail: g18753412142@163.com

通信作者: 李倩, 女, 副教授, 主要从事马铃薯主要病害致病机制与防控研究。E-mail: liqian@hebau.edu.cn

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

WRKY 作为植物特有的转录因子,在植物生长发育、逆境胁迫应答和代谢调控等一系列生理生化过程中发挥重要作用。基于全基因组的 WRKY 转录因子家族结构和功能分析在多个已测序物种中广泛应用^[5],目前已完成拟南芥、水稻、萝卜、小麦和毛果杨等多个物种的 WRKY 基因家族分析^[6-10]。已有研究表明,葡萄中过表达 VqWRKY56,能与 VqbZIPC22 互作,激活花青素合成关键基因,进一步增加花青素含量,从而增强白粉病抗性^[11]。草莓中分离出的 FvWRKY50,参与 JA 信号通路及 PR 基因转录调控,正向调控灰霉病抗性^[12]。菊花转录因子 CmWRKY15-1 可正向调控 SA 水平,增强对白锈病的抗性^[13]。综上,WRKY 转录因子可介导多种信号级联反应,激活植物防御反应。

目前,对 WRKY 转录因子的研究多聚焦于基因功能层面,但是针对启动子功能的研究相对匮乏,而启动子作为基因表达的重要调控元件,分析其结构功能和活性有助于解析植物生长发育与防御机制^[14],所以对研究目标基因在植物抗病反应中的调控机制至关重要。目前,WRKY 转录因子在马铃薯抗旱疫病中调控作用的报道较少。本实验室(马铃薯病害与植物病原学创新团队)前期基于 RNA-seq 测序技术,对早疫病菌侵染下的马铃薯叶片进行了转录组分析,发现 *StWRKY70* 表达量显著上升,推测 *StWRKY70* 参与了马铃薯对早疫病的抗性。但 *StWRKY70* 基因启动子功能活性尚不明确,限制了对 *StWRKY70* 基因启动子在马铃薯抗旱疫病调控机制的解析。马铃薯 *StWRKY70* 启动子活性分析对 *StWRKY70* 抗旱疫病作用机制的探究至关重要,因此,本研究拟进一步从马铃薯基因组中扩增 *StWRKY70* 启动子序列,利用生物信息学工具分析顺式作用元件,并构建 *StWRKY70* 全长启动子及其多个 5'缺失启动子片段与 *pGreenII 0800-LUC* 载体的重组表达质粒,借助 LUC 荧光分析启动子的活性,为进一步揭示 *StWRKY70* 在植物抗病反应中的作用机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

马铃薯(*Solanum tuberosum*)品种为费乌瑞它,由河北慧谷农业科技有限公司提供;本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)由河北农业大学植物保护学院马铃薯病害研究室保存并提供。试验于 2024 年 1—10 月在河北农业大学进行,以上植物材料均种

植于河北农业大学温室中,温度为 25 ℃;光照 12 h,黑暗 12 h 交替培养;相对湿度为 60%。

1.2 方法

1.2.1 马铃薯 DNA 的提取及 *StWRKY70* 基因启动子的克隆 采集长势良好的 45 d 苗龄的马铃薯叶片。采用自北京金沙生物科技有限公司的普通植物样品基因组 DNA 提取试剂盒提取马铃薯叶片的 DNA。以马铃薯基因组 DNA 为模板,设计带有 *Bam*HI 和 *Kpn*I-HF 酶切位点的不同长度启动子片段引物(表 1),通过 PCR 技术克隆 *StWRKY70* 启动子 5'缺失不同片段。PCR 程序为 94 ℃ 5 min; 94 ℃ 30 s, 62 ℃ 45 s, 72 ℃ 45 s, 32 个循环; 72 ℃ 延伸 8 min。反应结束后,得到 PCR 扩增产物,进行凝胶电泳分离,并在紫外凝胶成像下观察目的条带大小,根据选自生工生物工程股份有限公司的 San-Prep 柱式 DNA 胶回收试剂盒对 PCR 产物进行回收与纯化。

表 1 引物信息
Table 1 Primer information

引物名称 Primer name	序列 Primer sequences
2000-F	GGGGTACCGAATAGATTATTAACCCGTTCAAAC
1700-F	GGGGTACCCAAGGAATTTGAAGGGCTAG
1350-F	GGGGTACCGATACATGCAAATCTACTTGGAT
1000-F	GGGGTACCAATAACGGGTTGATCGATTG
700-F	GGGGTACCATAATGCAAGTAGGACACCAT
400-F	GGGGTACCATAGTGTATGCACACTCAA AATT
P-R	CGGGATCCACTTAGTTGATCGATCTAGTTGG

1.2.2 马铃薯 *StWRKY70* 重组基因启动子顺式作用元件分析 将测序正确的 *StWRKY70* 基因启动子序列导入 PlantCARE 网站(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>),分析启动子上的顺式作用元件。

1.2.3 启动子不同 5'缺失片段和质粒 *pGreenII 0800* 双酶切以及连接 琼脂糖凝胶电泳回收目的条带,利用 *Bam*HI 和 *Kpn*I-HF 内切酶,分别对启动子不同 5'缺失片段和质粒 *pGreenII-0800* 进行双酶切,回收产物通过 T4 连接酶构建重组表达载体。启动子不同 5'缺失片段酶切反应体系如下(表 2)。

在 37 ℃条件下静置 2 h。质粒 *pGreenII 0800* 酶切反应体系表 3 所示。

在 37 ℃条件下静置 2 h。T4 连接酶连接体系如表 4 所示。

连接体系放置于 16 ℃条件下过夜。

1.2.4 连接产物转化大肠杆菌及菌落 PCR 检测

表 2 启动子不同 5'缺失片段酶切反应体系

Table 2 Enzyme digestion reaction system for different 5' deletion fragments of the promoter

组分 Component	体积 Volume/ μL
不同片段 PCR 产物	20.0
PCR products of different fragments	
<i>Bam</i> HI	1.5
<i>Kpn</i> I-HF	1.5
Buffer 3.1	5.0
ddH ₂ O	22.0
总计 Total	50.0

表 3 质粒 pGreenII 0800 酶切反应体系

Table 3 Plasmid pGreenII 0800 enzymatic reaction system

组分 Component	体积 Volume/ μL
pGreenII 0800	20.0
<i>Bam</i> HI	2.5
<i>Kpn</i> I-HF	2.5
Buffer 3.1	10.0
ddH ₂ O	65.0
总计 Total	100.0

表 4 不同 5'缺失片段-LUC 连接体系

Table 4 Different 5' deletion fragment-LUC linkage system

组分 Component	体积 Volume/ μL
不同 5'缺失片段的酶切产物	
Enzymatic digestion products of different 5' missing fragments	3.0
质粒 pGreenII 0800 酶切产物	5.0
Enzyme digestion product of plasmid pGreenII 0800	
T4 Buffer	2.0
T4 DNA Ligase	1.0
ddH ₂ O	9.0
总计 Total	20.0

在 100 μL 大肠感受态细胞中加入双酶切产物 5~10 μL ,混匀,冰浴 30 min;42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅热激 45 s,再冰浴 2 min;加入 300 μL 不含抗生素的液体 LB,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温摇床中以 250 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速度振荡培养 1 h;4000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 1 min,弃上清液,剩 100 μL 漩涡振荡,涂在含卡那(Kan)的固体 LB 琼脂平板培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。用无菌的白枪头挑取单菌进行 PCR 检测,将条带清晰的阳性克隆产物提取质粒并进行测序检测。

1.2.5 重组质粒转化农杆菌感受态细胞 将 2 μL 的重组质粒溶液加入到 50 μL 的农杆菌感受态细胞中,混合后,置于冰上 30 min。放入液氮速冻 5 min;加入 400 μL 液体 LB 培养基,置于 28 $^{\circ}\text{C}$,

200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养 3~4 h;涂在含利福平(Rif)和 Kan 的固体 LB 琼脂平板培养基,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养,不封口。对单菌落进行鉴定,鉴定成功后挑单菌落在 28 $^{\circ}\text{C}$ 、200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养。添加甘油于-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.6 *StWRKY70* 基因启动子活性分析 挑选含有表达质粒的农杆菌单菌落,将其接种到液体 LB 培养基中,在 28 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温摇床中,以 250 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速度振荡培养 24 h。这个过程允许农杆菌在含有抗生素的环境中生长,筛选出成功转化了质粒的菌株,同时促进质粒的表达。在含有相应抗生素的液体 LB 中,接种 50 μL 农杆菌菌液,于 28 $^{\circ}\text{C}$ 条件下在摇床中以 250 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的转速培养至 OD_{600} 于 0.9 左右,时间维持 12~18 h;将培养好的菌液放入离心管中,4000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 常温离心 10 min,以收集菌体,用 0.01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 重悬至 OD_{600} 于 0.9 左右,以 1 mL 菌液加入 2 μL 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AS 的比例加入其中,静置至少 3 h。

用注射器将 200 μL 菌液注射入健康本氏烟草,然后放置 24~48 h 即可进行后续试验;通过农杆菌介导的基因传递技术将不同 5'缺失启动子重组载体(*pGreenII 0800-StWRKY70_{pro (1-6)::LUC}*)导入烟草叶片。随后,借助植物活体分子成像技术以及荧光检测设备,对叶片中荧光强度报告基因的表达水平进行定量分析,通过测量叶片发出的荧光强度和数值,评估各个缺失片段对启动子活性的具体影响。

1.3 数据分析

采用 GraphPad Prism 10 进行数据分析及绘制柱状图。

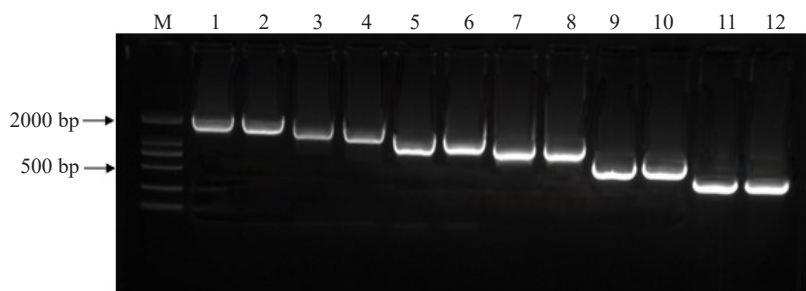
2 结果与分析

2.1 *StWRKY70* 启动子的克隆

以马铃薯 DNA 为模板,使用特异性引物进行 PCR 扩增,得到目的条带,成功通过 PCR 的方法克隆出马铃薯 *StWRKY70* 启动子,启动子序列全长 2000 bp,电泳结果如图 1 所示。将目的条带送至测序公司进行测序,测序结果与预测结果一致。

2.2 *StWRKY70* 启动子序列分析

通过 PlantCARE 和 PLACE 数据库对 *StWRKY70* 启动子序列进行分析,发现 *StWRKY70* 启动子响应元件不仅包括常见的决定转录起始与转录效率的 TATA 和光响应元件 GATA,在非生物胁迫方面还包括与脱水相关的响应元件 MYB,与干旱相关的响应元件 AP2;ERF,与高温相关的响应元



注:M. DNA Marker DL2000;泳道 1~12. PCR 扩增获得的 *StWRKY70* 启动子;其中泳道 1~2. 2000 bp;泳道 3~4. 1700 bp;泳道 5~6. 1350 bp;泳道 7~8.1000 bp;泳道 9~10.700 bp;泳道 11~12. 400 bp。

Note: M. DNA Marker DL2000; Gel electrophoresis swim lane 1-12. *StWRKY70* promoter obtained by PCR amplification; Gel electrophoresis swim lane 1-2. 2000 bp; Gel electrophoresis swim lane 3-4. 1700 bp; Gel electrophoresis swim lane 5-6. 1350 bp; Gel electrophoresis swim lane 7-8. 1000 bp; Gel electrophoresis swim lane 9-10. 700 bp; Gel electrophoresis swim lane 11-12. 400 bp.

图 1 *StWRKY70* 启动子 5'端缺失不同长度片段克隆电泳图

Fig. 1 Electrophoresis map of clones of different-length fragments with 5' end deletion of *StWRKY70* promoter

件 HSF,与光信号传导相关的响应元件 bZIP,与衰老、激素信号传导等相关的响应元件 TCR; CPP,与激素响应、光响应相关的元件 Dof,与乙烯信号相关转导响应元件 EIN3; EIL,与逆境应答相关的响应元件 HD-ZIP,与调控植物抗病性以及激素信号转

导相关的响应元件 NAC(NAM、ATAFI、ATA2),与花器官形成相关的响应元件 SBP,参与植物细胞分裂、分化和叶片发生及发育的响应元件 WOX,与开花相关的响应元件 MADS box,以及其他作用的响应元件(图 2)。

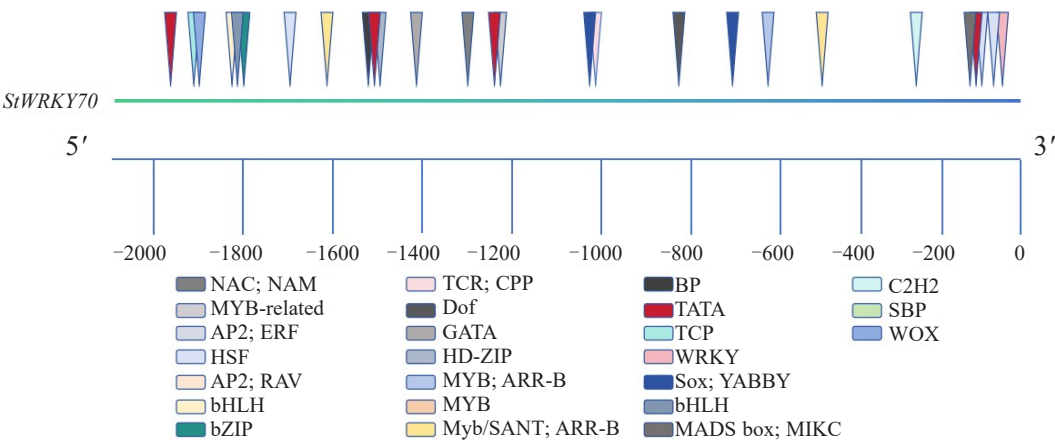


图 2 *StWRKY70* 启动子顺式作用元件

Fig. 2 *StWRKY70* promoter cis-acting element

2.3 构建重组质粒

将扩增得到的不同片段 5'启动子片段连接到 LUC 载体,随后转入大肠杆菌,进行 PCR 鉴定。电泳结果显示,条带分别位于 400、700、1000、1350、1700、2000 bp 处(图 3),表明重组质粒构建成功并成功转化至大肠杆菌。

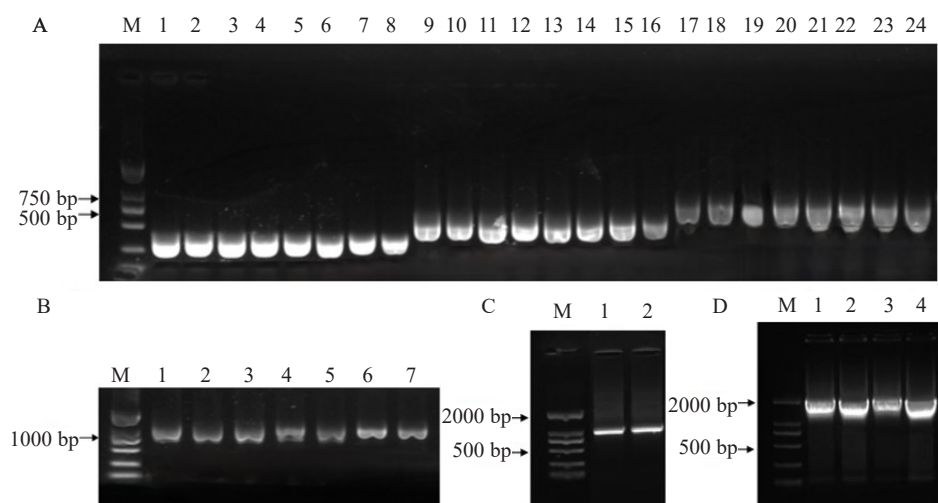
2.4 重组质粒转入农杆菌

将构建好的重组质粒(*pGreenII 0800- StWRKY70_{pro} (1-6)::LUC*)转入农杆菌并进行 PCR 鉴定。电泳结果显示,条带分别在 400、700、1000、

1350、1700、2000 bp 处(图 4),结果表明重组质粒成功转入农杆菌中。

2.5 LUC 荧光强度分析

利用农杆菌转化法将不同 5'缺失启动子重组质粒导入烟草叶片,利用植物活体分子成像系统和荧光发光检测仪检测并记录下荧光信号的强度、分布等特征,进而生成荧光图(图 5)。通过荧光强度分析和 *StWRKY70* 基因启动子 5'端缺失不同长度片段 LUC 荧光强度的相对表达量柱状图(图 6)可知,LUC 荧光强度随着 5'端缺失不同片段长度增加而

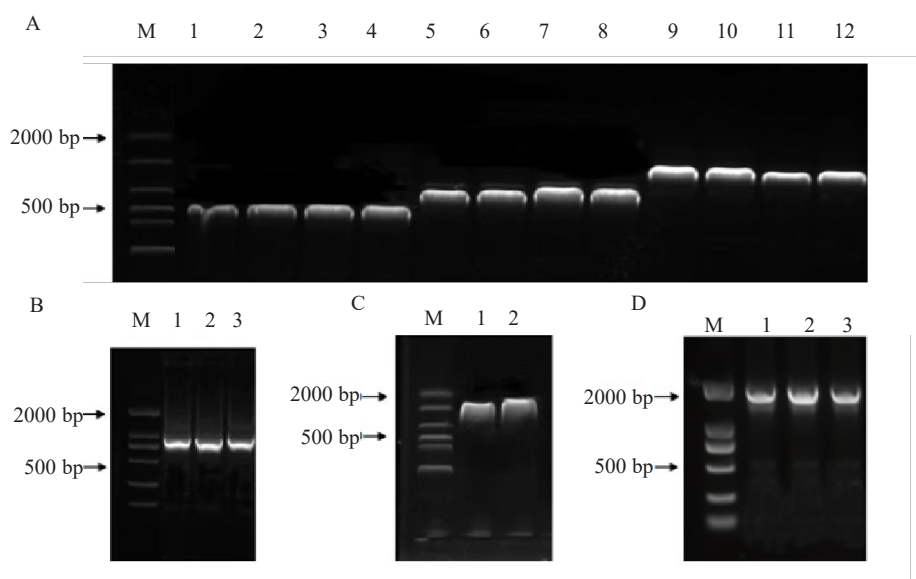


注: A. M. DNA Marker DL2000;泳道 1~8. 扩增得到的 400 bp 启动子;泳道 9~16. 扩增得到的 700 bp 启动子;泳道 17~24. 扩增得到的 1000 bp 启动子;B. M. DNA Marker DL2000;泳道 1~7. 扩增得到的 1350 bp 启动子;C. M. DNA Marker DL2000;泳道 1~2. 扩增得到的 1700 bp 启动子;D. M. DNA Marker DL2000;泳道 1~4. 扩增得到的 2000 bp 启动子。

Note: A. M. DNA Marker DL2000; Gel electrophoresis swim lane 1-8. 400 bp promoter fragment amplified; Gel electrophoresis swim lane 9-16. 700 bp promoter fragment amplified; Gel electrophoresis swim lane 17-24. 1000 bp promoter fragment amplified; B. M. DNA Marker DL2000; Gel electrophoresis swim lane 1-7. 1350 bp promoter fragment amplified; C. M. DNA Marker DL2000; Gel electrophoresis swim lane 1-2. 1700 bp promoter fragment amplified; D. M. DNA Marker DL2000; Gel electrophoresis swim lane 1-4. 2000 bp promoter fragment amplified.

图3 大肠杆菌菌落 PCR 鉴定电泳图

Fig. 3 Electrophoresis image of colony PCR for *E. coli* identification

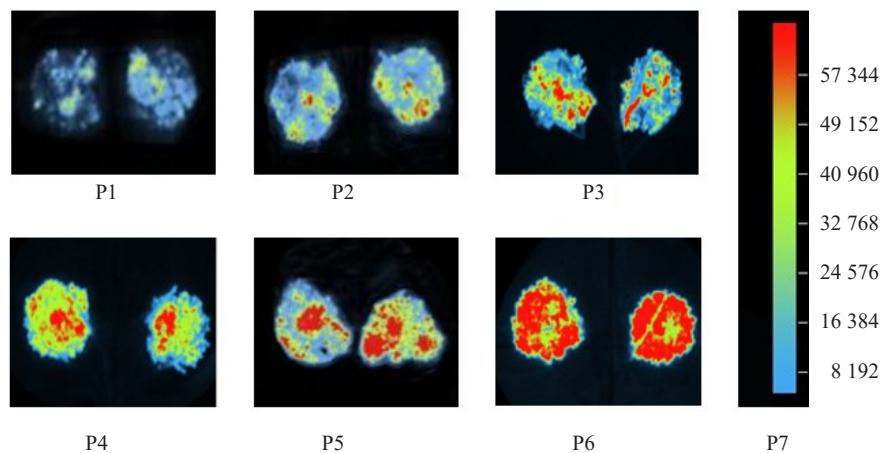


注: A. M. DNA Marker DL2000;泳道 1~4. 扩增得到的 400 bp 启动子;泳道 5~8. 扩增得到的 700 bp 启动子;泳道 9~12 扩增得到的 1000 bp 启动子;B. M. DNA Marker DL2000;泳道 1~3. 扩增得到的 1350 bp 启动子;C. M. DNA Marker DL2000;泳道 1~2. 扩增得到的 1700 bp 启动子;D. M. DNA Marker DL2000;泳道 1~3. 扩增得到的 2000 bp 启动子。

Note: A. M. DNA Marker DL2000; Gel electrophoresis swim lane 1-4. 400 bp promoter fragment amplified; Gel electrophoresis swim lane 5-8. 700 bp promoter fragment amplified; Gel electrophoresis swim lane 9-12. 1000 bp promoter fragment amplified; B. M. DNA Marker DL2000; Gel electrophoresis swim lane 1-3. 1350 bp promoter fragment amplified; C. M. DNA Marker DL2000; Gel electrophoresis swim lane 1-2. 1700 bp promoter fragment amplified; D. M. DNA Marker DL2000; Gel electrophoresis swim lane 1-3. 2000 bp promoter fragment amplified.

图4 农杆菌菌落 PCR 鉴定电泳图

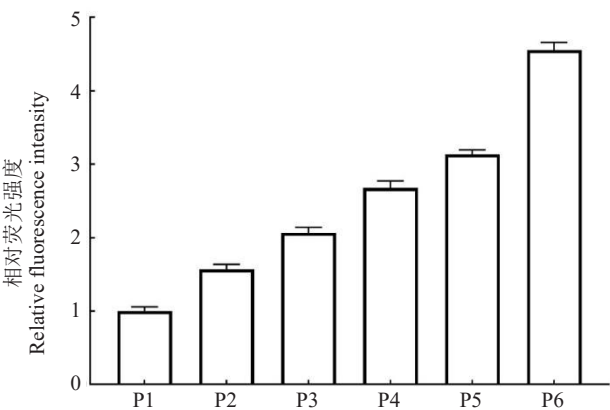
Fig. 4 Electrophoresis image of *Agrobacterium* colony PCR identification



注: P1. 400 bp; P2. 700 bp; P3. 1000 bp; P4. 1350 bp; P5. 1700 bp; P6. 2000 bp; P7. LUC 荧光强度 marker(荧光单位: RLU)。
Note: P1. 400 bp; P2. 700 bp; P3. 1000 bp; P4. 1350 bp; P5. 1700 bp; P6. 2000 bp; P7. LUC fluorescence intensity marker (fluorescence unit. RLU).

图 5 *StWRKY70* 启动子 5'端缺失不同长度片段荧光强度图

Fig. 5 Fluorescence intensity of different length fragments with deletion at the 5' end of *StWRKY70* promoter



注: P1. 400 bp; P2. 700 bp; P3. 1000 bp; P4. 1350 bp; P5. 1700 bp; P6. 2000 bp。
Note: P1. 400 bp; P2. 700 bp; P3. 1000 bp; P4. 1350 bp; P5. 1700 bp; P6. 2000 bp.

图 6 *StWRKY70* 基因启动子 5'端缺失不同长度片段 LUC 相对荧光强度

Fig. 6 The relative fluorescence intensity of LUC of different length fragments deleted from the 5' end of the *StWRKY70* gene promoter

活性逐渐增强, 400 bp 到 700 bp 区域是 *StWRKY70* 基因启动子的核心区域。

3 讨论与结论

基因启动子是位于基因编码区上游的 DNA 序列, 含有多种顺式作用元件, 参与基因转录起始和调控, 并响应外界生物和非生物因素^[15-16]。启动子功能分析是解析植物基因表达调控的基础, 鉴定其

顺式作用元件对理解基因转录调控机制至关重要。有研究表明, 大豆 *GmCBL6* 基因启动子包含与逆境胁迫诱导、植物激素响应和光调控相关的顺式元件, 初步推测 *GmCBL6* 基因启动子能够对逆境做出响应^[17]。赵兴奎^[18]研究发现, 高粱 *SbWRKY28* 启动子的 HSE 元件通过响应干旱胁迫诱导的细胞内热激信号, 协同调控抗旱与抗病通路。在本研究中, 通过分析马铃薯 *StWRKY70* 基因启动子, 结果显示 *StWRKY70* 基因启动子不仅包括常见的决定转录起始与转录效率的 TATA 和光响应元件 GAYA, 在非生物胁迫方面还包括与脱水相关的响应元件 MYB, 与干旱相关的响应元件 AP2; ERF, 与高温相关的响应元件 HSF, 与光信号转导相关的响应元件 bZIP, 与逆境应答相关的响应元件 HD-ZIP, 与调控植物抗病性, 以及激素信号转导相关的响应元件 NAC。这表明 *StWRKY70* 基因启动子可能会调控马铃薯早疫病抗性。

启动子作为基因表达调控的关键序列, 包含了大量不同功能的顺式调控元件^[19], 在基因转录调控过程中, 这些元件扮演着至关重要的角色, 因此研究启动子中的顺式作用元件对揭示基因功能具有重要意义^[20]。在刺葡萄 *VdERD6L15* 基因克隆及功能分析中, 通过启动子截短试验确定 *VdERD6L15* 启动子的核心区域, 对启动子顺式元件进行分析, 然后通过 GUS 染色分析进一步确定启动子关键调控区域^[21-22]。因此, 启动子缺失分析是启动子功能研究的重要方法。目前已有研究发现, 决定基因启

动子有无的核心区域对维持基因的正常表达和精细调控具有重要意义。例如当对拟南芥某基因启动子^[23]进行逐步截短时,其转录活性随着关键顺式作用元件的缺失或减少而下降。在水稻 *OsPHY2*^[24] 基因启动子的研究中,启动子的长度变化会影响基因的正常表达。在本研究中,通过 5'端不同缺失片段为目的片段构建表达载体,进行烟草瞬时转化和 LUC 荧光检测,LUC 荧光强度分析结果表明,随着 5'端缺失不同片段长度增加,LUC 荧光强度逐渐增强,明确 *StWRKY70* 基因启动子的核心区域为 400~700 bp。进一步分析发现,该核心区域包含与植物抗病性及激素信号转导相关的响应元件 NAC。有研究报道 NAC 家族转录因子在植物免疫中起关键作用,Song 等^[25]研究表明,拟南芥中 ANAC019/055/072 可通过调控水杨酸和茉莉酸信号通路增强抗病性,本研究中核心区域也包括 NAC 元件,推测可能与 *StWRKY70* 基因的转录激活相关,进而影响马铃薯对早疫病的抗性,为深入解析 *StWRKY70* 在植物抗病中的作用机制提供基础。

笔者成功获得了 *StWRKY70* 基因启动子 5'端缺失不同长度的片段。通过分析启动子序列的顺式作用元件。结果显示,该序列包含与调控植物抗病性以及激素信号转导密切相关的响应元件;将扩增得到的不同长度缺失片段,构建到带有 LUC 报告基因的表达载体上,通过 LUC 荧光强度分析发现,随着 *StWRKY70* 基因启动子 5'端缺失片段长度增加,LUC 荧光强度逐渐增强。确定 400~700 bp 区域为决定 *StWRKY70* 基因启动子活性的核心区域,为马铃薯 *StWRKY70* 基因在马铃薯抗早疫病过程中的功能分析提供了一定的理论依据。

参考文献

- [1] 贺英,霍治军,艾海舰,等.榆林市马铃薯早疫病病原分离鉴定与化学药剂室内毒力测定[J].中国马铃薯,2021,35(5):438-443.
- [2] SAJEEVAN R S, ABDELMEGUID I, SARIPELLA G V, et al. Comprehensive transcriptome analysis of different potato cultivars provides insight into early blight disease caused by *Alternaria solani*[J]. BMC Plant Biology, 2023, 23(1): 130.
- [3] 于水清,杨毅清,张岱,等.马铃薯早疫病拮抗细菌的筛选、鉴定及抑菌物质研究[J].西南农业学报,2021,34(6):1234-1241.
- [4] 冉平,王玉娟,李继明,等.生物源农药对马铃薯产量及病害防效的影响[J].中国马铃薯,2020,34(2):114-120.
- [5] 任媛,赵玉洁,张心慧,等.石榴 WRKY 基因家族全基因组鉴定与表达分析[J].西北植物学报,2020,40(2):218-231.
- [6] WANG Q S, WANG M H, ZHANG X Z. WRKY gene family evolution in *Arabidopsis thaliana*[J]. Genetica, 2011, 139(8): 973-983.
- [7] RAMAMOORTHY R, JIANG S Y, KUMR N. A comprehensive transcriptional profiling of the WRKY gene family in rice under various abiotic and phytohormone treatments[J]. Plant and Cell Physiology, 2008, 49(6): 865-879.
- [8] KARANJA B K, FAN L X, XU L. Genome-wide characterization of the WRKY gene family in radish (*Raphanus sativus* L.) reveals its critical functions under different abiotic stresses[J]. Plant Cell Reports, 2017, 36(11): 1757-1773.
- [9] GUPTA S, MISHRA V K, KUMARI S. Deciphering genome-wide WRKY gene family of *Triticum aestivum* L. and their functional role in response to abiotic stress[J]. Genes Genomics, 2019, 41(1): 79-94.
- [10] HE H S, DONG Q, SHAO Y H. Genome-wide survey and characterization of the WRKY gene family in *Populus trichocarpa*[J]. Plant Cell Reports, 2012, 31(7): 1199-1217.
- [11] WANG Y, WANG X H, FANG J H. *VqWRKY56* interacts with *VqbZIPC22* in grapevine to promote proanthocyanidin biosynthesis and increase resistance to powdery mildew[J]. New Phytologist, 2023, 237(5): 1856-1875.
- [12] MA C J, XIONG J S, LIANG M. Strawberry WRKY transcription factor WRKY50 is required for resistance to necrotrophic fungal pathogen *Botrytis cinerea*[J]. Agronomy, 2021, 11(12): 2377.
- [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] 沈悦,沈一,刘永惠,等.花生 *AhGPAT9* 基因启动子克隆及其功能分析[J].中国油料作物学报,2023,45(3):533-541.
- [15] 张小辉,祁艳霞.真核生物启动子 TATA-box·GC-box 和 CAAT-box 的分析[J].安徽农业科学,2008,36(4):1380-1381.
- [16] PEREMARTI A, TWYMAN R M, GÓMEZ-GALERA S. Promoter diversity in multigene transformation[J]. Plant Molecular Biology, 2010, 73(4/5): 363-378.
- [17] 李静.大豆 *GmCBL6* 基因启动子的克隆及功能分析[D].哈尔滨:哈尔滨师范大学,2021.
- [18] 赵兴奎.高粱抗旱性相关 WRKY 转录因子的挖掘及 *SbWRKY28* 的克隆[D].山西晋中:山西农业大学,2022.
- [19] POTENZA C, ALEMAN L, SENGUPTA-GOPALAN C. Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: Promoters used in plant transformation[J]. In *Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 2004, 40(1): 1-22.
- [20] 杨晓娜,赵昶灵,李云,等.启动子序列克隆和功能分析方法的研究进展[J].云南农业大学学报(自然科学版),2010,25(2): 283-290.
- [21] 刘洁,杨盛迪,曾雅婷,等.刺葡萄 *VdERD6L15* 基因克隆及功能分析[J].果树学报,2024,41(9): 1770-1780.
- [22] XIN S, TAO C C, LI H B. Cloning and functional analysis of the promoter of an ascorbate oxidase gene from *Gossypium hirsutum*[J]. PLoS One, 2016, 11(9): e0161695.
- [23] 金太成,李一荻,丁晓月,等.拟南芥中 *AtACO3* 基因启动子 DNA 甲基化的调控机制[J].分子植物育种,2023,21(20): 6739-6745.
- [24] 杜小明,李瑞娟,路文静,等.水稻植酸酶基因 *OsPHY2* 启动子的克隆及生物信息学分析[J].河北农业大学学报,2011,34(6): 10-15.
- [25] 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.