

· 植物保护 ·

DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20220074



主持人: 缪卫国

启动子 WY172 和 WY195 在 暹罗炭疽菌中的活性研究

董林朋, 殷金瑶, 赵文渊, 林春花, 刘文波, 缪卫国, 李 潇
(海南大学 植物保护学院/热带农林生物灾害绿色防控教育部重点实验室, 海口 570228)

摘要: 为了探究来自橡胶树白粉菌(*Erysiphe quercicola*)的 WY172 与 WY195 启动子在真菌内的功能, 以 pJNARG 载体为骨架, 分别构建 WY172 与 WY195 和绿色荧光蛋白(GFP)基因连接的重组表达载体(WY172-GFP 和 WY195-GFP 载体)。通过原生质体转化法将重组载体导入侵染橡胶树的暹罗炭疽菌(*Colletotrichum siamense*)内。荧光显微检测结果表明 WY172 与 WY195 均可驱动 GFP 基因的表达, 具有稳定的启动子活性。在暹罗炭疽菌侵染橡胶叶片不同进程中均可稳定驱动 GFP 表达; 在不同环境条件下测定 GFP 表达量, 发现长光照条件下可提高 WY172 启动子驱动 GFP 的活性, 并且 23℃ 低温处理和光处理可提高 WY195 的活性。本研究表明 WY172 与 WY195 在暹罗炭疽菌(*Colletotrichum siamense*)中具有稳定的启动子活性, 并且增加光照和低温处理能诱导启动子活性的提升。

关键词: 启动子; 暹罗炭疽菌; 原生质体转化

中图分类号: S432.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-7054(2023)05-0506-08

董林朋, 殷金瑶, 赵文渊, 等. 启动子 WY172 和 WY195 在暹罗炭疽菌中的活性研究 [J]. 热带生物学报, 2023, 14(5): 506-513. doi: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20220074

启动子(Promoter)为 DNA 分子上与 RNA 聚合酶结合形成转录起始复合物并起始 mRNA 合成所必需的保守序列。启动子有强、弱之分, 其对转录水平的控制程度差异较大, 按转录模式可将启动子分为组成型、组织特异型、诱导型等多种形式。强启动子对于基因工程的研究具有促进作用, 为转化体系的建立、互作机制的研究等提供有效的工具。例如小麦条锈菌效应蛋白 Pst14872 靶标的鉴定及功能分析^[1]中报道了利用大肠杆菌 Tac 启动子探究专性寄生真菌小麦条锈菌中 Pst14872 效应蛋白与靶标 TaClpS1 的互作机制; 农杆菌及 PEG 介导向日葵核盘菌遗传转化体系的研究^[2]中报道了利用大肠杆菌的 Lac 启动子驱动 *mgfp5* 基因的表达以探究向日葵核盘菌转化体系的建立; 启动子克隆概述^[3]中报道了丝状真菌启动

子可以高效表达内源基因可能得益于其具有强大的启动子工具。因此, 利用从真菌内分离的强启动子驱动基因的转录表达, 有望为丝状真菌转化体系的建立、侵染机制的研究等提供新的可能。

橡胶树白粉菌是一类专性寄生真菌, 目前尚不能离体培养^[4-5], 又因其寄主橡胶树的基因组过于庞大, 因此橡胶树白粉菌遗传转化体系仍是目前研究中的一个难点问题。本实验室从橡胶树白粉菌基因组中鉴定得到了 WY172^[6]与 WY195^[7]启动子, 但仅在外源寄主双子叶植物内验证过这两个启动子功能, 为进一步探究 WY172 与 WY195 是否有广泛应用于橡胶树白粉菌转化体系建立的可能性, 笔者所在的实验室通过原生质体转化法在与寄主相同的丝状真菌—暹罗炭疽菌内验证了这两个启动子功能^[8]。笔者拟构建以启动子

收稿日期: 2022-09-20

修回日期: 2022-12-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(31960518)

第一作者: 董林朋(1997-), 男, 海南大学植物保护学院 2020 级硕士研究生. E-mail: donglinoeng@163.com

通信作者: 缪卫国(1969-), 男, 博士, 教授. 研究方向: 分子植物病理学研究. E-mail: miao@hainanu.edu.cn; 李潇(1989-), 男, 博士, 讲师. 研究方向: 分子植物病理学研究. E-mail: 993773@hainanu.edu.cn

WY172、WY195 驱动绿色荧光蛋白(GFP)表达的载体,对 *GFP* 基因在暹罗炭疽菌内的表达情况进行探究,同时对转化子在不同环境条件下启动子的活性进行验证,旨在为 WY172、WY195 启动子的应用提供更多的可能,同时也为橡胶树白粉菌转化体系的建立提供优良的启动子工具。

1 材料与amp方法

1.1 菌株与质粒 供试菌株为笔者所在实验室分离纯化获得并经鉴定的橡胶树暹罗炭疽菌 (*Colletotrichum siamense*)HN08^[9]。pJNARG 质粒来自西北农林科技大学许金荣课题组,依据 pFL2 质粒改造而来^[10]。

1.2 培养基 TB3 培养基: 酵母提取物 1 g, 酸水解酪蛋白 1 g, 蔗糖 5 g, 加 ddH₂O 定容至 1 L, 121℃ 高温灭菌 20 min, 每 200 mL 加琼脂 1.5 g 制成固体培养基。CM 培养基: 酵母提取物 6 g, 酸水解酪蛋白 1 g, 蔗糖 10 g, 加 ddH₂O 定容至 1 L, 121℃ 高温灭菌 20 min, 每 200 mL 加琼脂 3 g 制成固体培养基。马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA): 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂粉 15 g, 加 ddH₂O 定容至 1 L, 121℃ 高温灭菌 20 min。马铃薯葡萄糖液

体培养基 (PDB): 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 加 ddH₂O 定容至 1 L, 121℃ 高温灭菌 20 min。

1.3 试剂 蜗牛酶 (Snailase) 购自北京索莱宝 (Solarbio) 科技有限公司, 溶壁酶 (lysing enzyme) 购自美国 Sigma Aldrich 公司。1×STC 缓冲液: 蔗糖 20 g, 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 0.785 g, 50 mmol·L⁻¹ CaCl₂ 0.555 g, 加 ddH₂O 定容至 100 mL, 121℃ 高温灭菌 20 min。PTC 缓冲液: 称取 3 g PEG 4000, 溶解于 1×STC 缓冲液, 定容至 5 mL, 利用细菌过滤器 (孔径 0.45 μm) 过滤除菌。酶解液配制: 细胞壁溶壁酶 0.2 g, 完全溶解于 0.7 mol·L⁻¹ 的 NaCl 溶液, 利用细菌过滤器 (孔径 0.45 μm) 过滤除菌。

1.4 表达载体的构建 利用限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Eco*R I 对 pJNARG 载体进行双酶切, 切除载体上的 *RP27* 启动子基因片段 (图 1), 并使用 DNA 回收试剂盒 (Magen, R6840-01) 回收载体片段。提取橡胶树白粉菌基因组 DNA, 以 WY172 F/R 和 WY195 F/R 引物, 从橡胶树白粉菌基因组中扩增出 WY172 (GenBank: MK049254.1) 与 WY195 (GenBank: MK049253.1) 启动子, 连接 pJNARG 骨架片段, 并转化 DH5α 感受态细胞, 涂布于 Amp⁺ 抗性的 LB 固体培养基上, 在 37℃ 的环境中培养

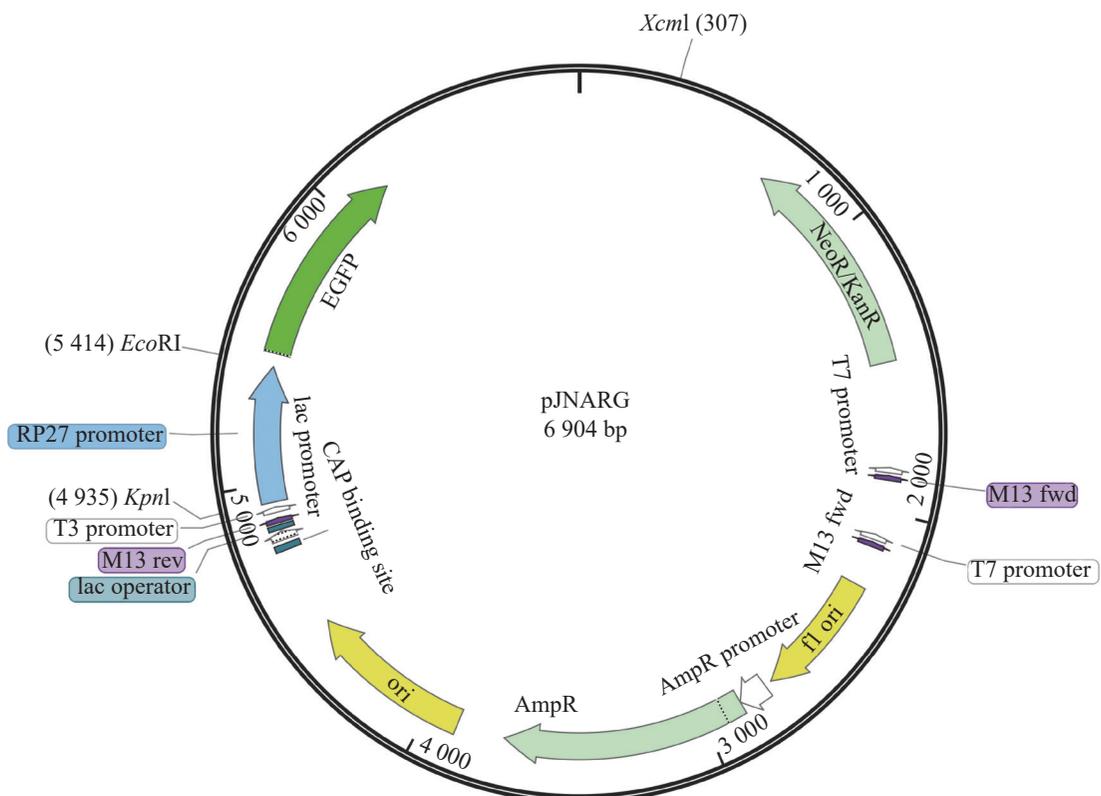


图 1 pJNARG 载体图谱

过夜,挑取单菌落进行 PCR 验证并筛选出阳性克隆转化子用于后续实验研究。本研究所用的引物见表 1。

LB 液体培养基中,37℃ 摇床振荡过夜后并提

取质粒进行 PCR 验证,验证正确的质粒送至华大生物公司测序。测序正确的菌株保存在甘油中并放置于-80℃ 保存。

表 1 本研究所用引物

编号	引物名称	引物序列(5'-3')	限制性内切酶
1	pJNARG-WY172-F	GGAACAAAAGCTGGGTACCC ATTCATCCATAAGAAATTTAAA	<i>Kpn</i> I
2	pJNARG-WY172-R	CCACGATTAATCGAGCCATGAATT CGATAAATATGCGATTTTATGCAA	<i>Eco</i> R I
3	pJNARG-WY195-F	GGAACAAAAGCTGGGTACCC AACCAATAATTTTCACGAGGG	<i>Kpn</i> I
4	pJNARG-WY172-R	CCACGATTAATCGAGCCATGAATT CTCTGCATGCTAGTGATTT	<i>Eco</i> R I
5	GFP-F	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA	
6	GFP-R	TCACTTGTACAGCTCGTCCA	
7	RT-GFP-F	TCGTGACCACCCTGACCTA	
8	RT-GFP-R	GTCCTCGCGTGGTAGAAG	

1.5 原生质体的制备 将野生型的暹罗炭疽菌接种至 CM 固体培养基上,5 d 后切取菌落边缘的菌块,在 250 mL 三角瓶中加入 150 mL CM 液体培养基,接入切除的菌块,28℃ 160 r·min⁻¹ 培养 48 h。收集菌丝,使用灭菌过滤纸过滤,用 0.7 mol·L⁻¹ NaCl 溶液反复冲洗,用滤纸吸干水分,将菌丝转移至 50 mL 离心管中(避免手直接接触菌丝)。称取菌丝质量,按照质量比为 1:1 的比例向菌丝中加入溶壁酶,置于摇床(28℃, 100 r·min⁻¹)上,酶解时长约 3.5 h。使用 4 层灭菌过滤纸过滤酶解液,将酶解后的菌丝溶液进行冰浴后用 0.7 mol·L⁻¹ NaCl 溶液洗涤,然后收集原生质体于 50 mL 离心管中,4℃ 4 600 r·min⁻¹ 条件下离心 15 min 后弃上清。再用 STC 溶液将原生质体重悬,4℃ 4 600 r·min⁻¹ 条件下离心 15 min,重复 1 次。最后利用 STC 溶液将原生质体浓度调至 1 × 10⁸ 个·mL⁻¹,分装为每管 200 μL,立即进行转化使用。

1.6 原生质体转化 取 60~100 μL 1.4 中构建的质粒,与 200 μL 制备成功的原生质体混合,冰浴 20~30 min,每 200 μL 原生质体中加入 2 mL PTC 溶液,在室温下静置 30 min,最后加入 TB3 复苏液体培养基,每 200 μL 的原生质体加入 3 mL 的 TB3 培养基,轻轻颠倒混匀,室温下振荡培养 2 h;随后将原生质体加入 10 mL 融化并冷却到约

50℃ 的 TB3 固体培养基上,并加入 Amp⁺与 G418 抗性药剂,轻轻混匀后倒入培养皿中,静置至下层板凝固;最后向培养基倒入 10 mL 含 Amp⁺和 G418 抗性的 TB3 培养基。28℃ 下培养 2~3 d,待培养基上长出菌落后,将菌丝挑取到新的 CM 固体培养基上培养并进行后期验证。

1.7 暹罗炭疽菌转化子的验证 分别取上述培养基中转化菌株与野生型的菌株的菌饼进行液体培养,26℃ 160 r·min⁻¹ 条件下培养 2~3 d,并提取转化子与野生型的 DNA 作为模板,利用 GFP F/R 引物进行 PCR 验证。PCR 反应程序:94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 5 min,56℃ 退火 35 s,72℃ 延伸 25 s,45 个循环,72℃ 延伸 10 min,4℃ 保存。PCR 扩增产物经过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。并将转化子以及野生型的菌丝、孢子制备成临时玻片,利用荧光显微镜(奥林巴斯 BX53 显微镜,配备 DP80CCD)观察。

1.8 GFP 基因表达量分析 将暹罗炭疽菌转化子在 CM 液体培养基中 28℃ 培养 2~3 d。利用真菌 RNA 提取试剂盒(Omega, R6840-01)提取转化子的 RNA,同时也提取野生型暹罗炭疽菌的 RNA,利用反转录试剂盒(Vazyme, R333-01)进行反转录得到 cDNA。以 RP27 启动子驱动 GFP 基因作为阳性对照,分别测定 WY172 与 WY195 驱

动 *GFP* 基因的表达量。

1.9 启动子在暹罗炭疽菌侵染阶段驱动 *GFP* 基因表达 挑取转化成功的暹罗炭疽菌丝放置于 PDA 培养基上培养 4~6 d, 再利用打孔器打取 5 mm 直径的暹罗炭疽菌的菌碟, 在 PDB 培养基中 28℃ 培养 3 d, 紧接着利用无菌过滤纸过滤, 12 000 r·min⁻¹ 离心, 加入无菌水制备成分生孢子悬浮液, 并利用血球计数板计数, 制备成 10⁶ 个·mL⁻¹ 悬浮液备用。

将上述制备好的孢子悬浮液喷洒在经过无菌水冲洗过的离体橡胶树叶片上。根据暹罗炭疽菌在橡胶树叶片上的发育进程及侵染结构变化, 分别选择在 0 h (非接种状态)、12 h (附着胞形成侵染钉)、24 h (分生孢子另一端的芽管产生附着胞)、48 h (附着胞分化产生次级附着胞)、72 h (菌丝网状分布) 这 5 个时间段, 将叶片和菌丝利用锡箔纸密封^[11], 液氮冷冻, -580℃ 保存。

利用真菌 RNA 试剂盒分别提取这 5 个时间段的暹罗炭疽菌 RNA, 利用反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA, 以 RP27、WY172、WY195 分别在 0 h 驱动 *GPF* 基因的表达量作为参考值, 探究不同启动子驱动下 *GFP* 基因表达含量在暹罗炭疽菌侵染不同时间的变化。

1.10 启动子 WY172 与 WY195 的诱导类型 将暹罗炭疽菌转化子接种于普通 CM 固体培养基

上, 28℃ 培养 7 d。将上述转化子分别接种于添加 H₂O₂(20 mmol·L⁻¹)、葡萄糖(1 mol·L⁻¹)、0.01% 的 SDS、山梨醇(1 mol·L⁻¹)、刚果红(200 μg·mL⁻¹) 的 CM 固体培养基以及普通 CM 固体培养基在 28℃ 培养 5 d, 再取上述转化子接种于普通 CM 固体培养基, 分别放置于长光照、黑暗和 23℃ 低温条件下培养 5 d。切取上述不同条件下 CM 平板中培养的转化菌株进行液体培养, 28℃ 160 r·min⁻¹ 培养 2~3 d。利用真菌 RNA 提取试剂盒(Omega, R6840-01)提取菌丝 RNA, 用反转录试剂盒(Vazyme, R333-01)将 RNA 反转录为 cDNA, 测定不同生长条件下 *GFP* 基因的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 表达载体的构建 对阳性菌株提取的质粒进行 PCR 验证, 结果显示与目的条带大小基本一致的条带(WY172 大小为 250 bp 左右, WY195 大小为 250 bp 左右), 进一步送至华大生物公司测序以及 NCBI 序列对比, 结果显示相似性为 100%, 表明表达载体构建成功。

2.2 WY172 与 WY195 启动子活性的检测 通过荧光显微镜观察, 发现启动子 WY172 与 WY195 驱动 *GFP* 基因表达出了类似于 RP27 驱动 *GFP* 基因的荧光强度, 而野生菌株未出现荧光表达(图 2), 表明构建的 3 种载体已成功转入, 并且初

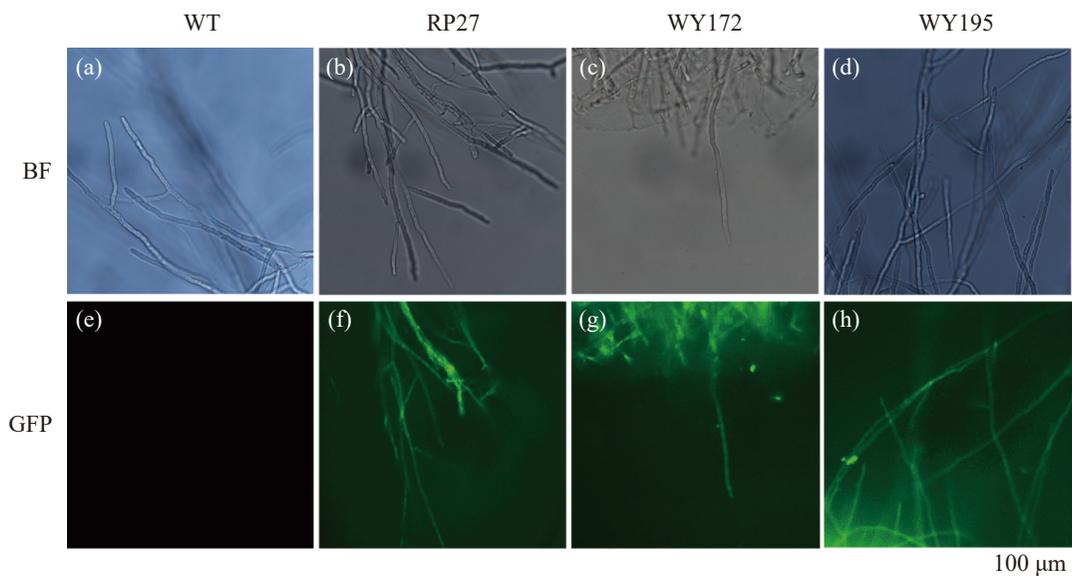


图 2 WY172 与 WY195 启动子驱动 *GFP* 基因表达菌丝荧光图

BF: 白光; GFP: 绿色荧光; WT: 野生型暹罗炭疽菌菌丝; RP27、WY172、WY195: 转入启动子的转化菌株菌丝; a 为白光通道下野生菌丝, b、c、d 为白光通道下转化子菌丝, c 为 GFP 荧光通道下野生菌丝, f、g、h 为 GFP 荧光通道下的转化子菌丝。

步证明启动子 WY172 与 WY195 均可在暹罗炭疽菌内驱动 *GFP* 基因的表达。

利用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)测定 3 种启动子(WY172、WY195 和 RP27)驱动 *GFP* 基因的表达量是否存在差异,结果发现 WY172 和 WY195 驱动 *GFP* 表达的能力分别约为 RP27 的 87% 和 91%,表现出与 RP27 类似的驱动 *GFP* 表达的能力,而野生型未检测到 *GFP* 基因的表达(图 3),这再次证明 WY172 与 WY195 启动子均可在暹罗炭疽菌内驱动 *GFP* 基因的表达,说明 WY172 与 WY195 在暹罗炭疽菌内具有启动子活性。

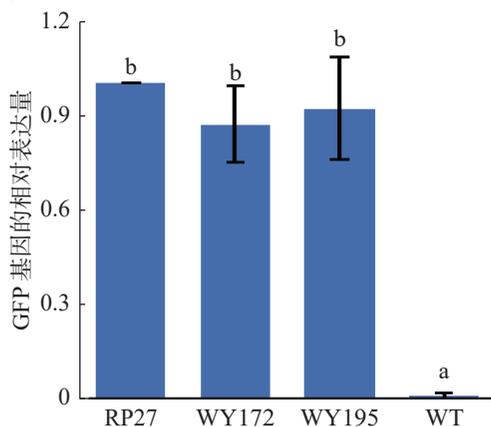


图 3 启动子驱动 *GFP* 基因的表达

a、b 表示显著性差异($P < 0.05$), 3 个生物学重复。

2.3 WY172 与 WY195 在暹罗炭疽菌感染寄主的不同感染阶段的启动子活性 以 3 种转化子(WY172、WY195 和 RP27)分别在 0 h 的 *GFP* 基因的表达量作为对照, RT-qPCR 结果显示启动子驱动 *GFP* 基因在 12、24、48、72 h 这 4 个时间段表现出的效率相差较小(图 4),如在 RP27 启动子驱动下, *GFP* 基因的表达量在 12、24、48、72 h 分别为 0 h 的 103%、127%、74%、131%,而在 WY172 启动子驱动下, *GFP* 基因的表达量在 12、24、48、72 h 分别为 0 h 的 110%、88%、127%、129%,在 WY195 启动子驱动下, *GFP* 基因的表达量在 12、24、48、72 h 分别为 0 h 的 101%、113%、134%、117%。这证明启动子在暹罗炭疽菌感染寄主的不同阶段均可以驱动 *GFP* 基因的表达。

2.4 环境条件对 WY172 与 WY195 活性的影响 提取不同生长条件处理下的暹罗炭疽菌 RNA,利用 RT-qPCR 测定发现 WY172 在 24 h 光处理条件下 *GFP* 表达量升高, WY195 在低温培养与 24 h 光处理条件下 *GFP* 表达量升高(图 5)。

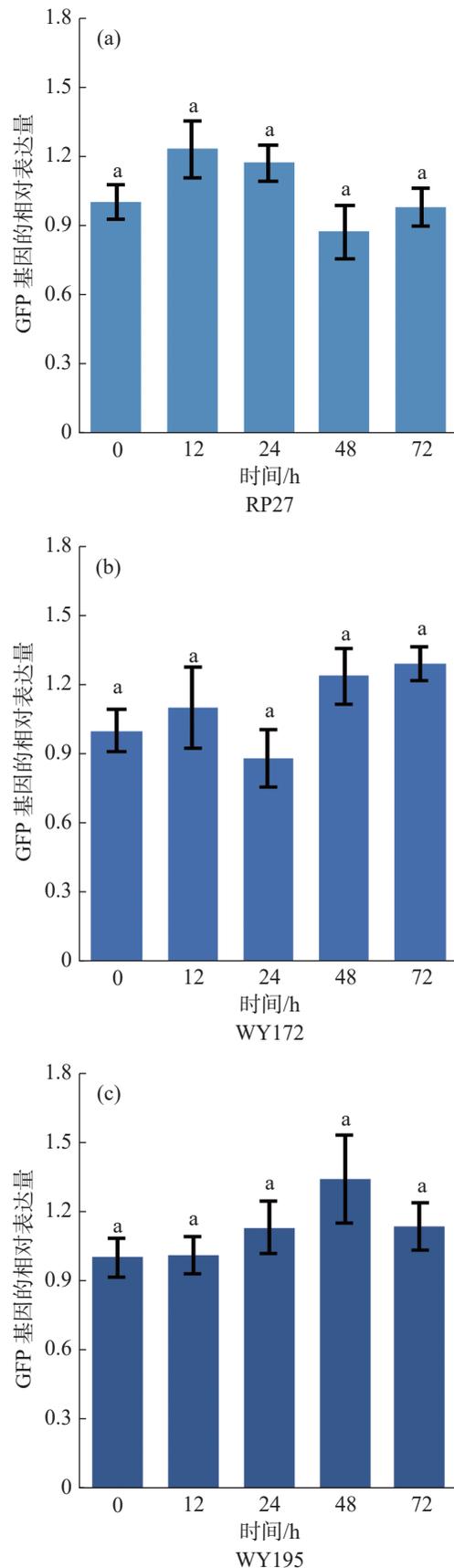


图 4 启动子在暹罗炭疽菌感染寄主阶段驱动 *GFP* 基因表达

a 表示显著性差异($P < 0.05$), 3 个生物学重复。

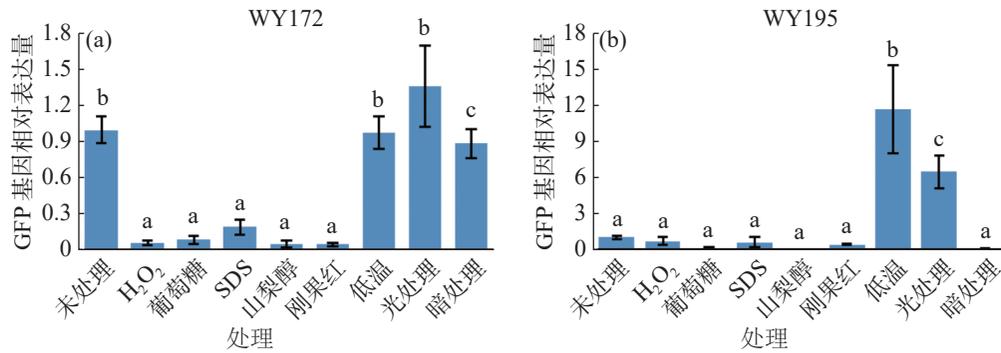


图5 不同环境条件对启动子驱动 *GFP* 基因表达的影响
a、b、c 表示显著性差异 ($P < 0.05$), 3 个生物学重复。

3 讨论

启动子作为转录调控的中心一直是研究热点, 优良启动子的发现是研究基因表达调控的基础, 加深对启动子的研究对基因工程具有很大的帮助。丝状真菌具有丰富的启动子资源^[12], 目前应用较多的丝状真菌诱导型启动子含有里氏木霉的 *cbhl* 启动子^[13]、曲霉属的 *glaA* 启动子^[14] 和构巢曲霉的 *alcA* 启动子^[15]。本研究以实验室前期结果为基础, 进一步加深对 WY172 与 WY195 启动子应用范围的探索, 旨在扩大橡胶树白粉菌启动子应用, 为橡胶树白粉菌转化体系建立和互作机制的研究提供可靠的启动子工具。

目前已经报道的启动子大多仅能在某种生物中发挥启动子作用, 较少可以在多种不同的生物内均可高效驱动基因的表达, 例如目前使用较为广泛的 35S 启动子仅适用于双子叶植物^[16], 单子叶植物经常使用水稻 ACT1 启动子^[17] 和玉米 Ubi1 启动子^[18]。在笔者所在的实验室的前期研究中, 通过 GUS 蛋白染色实验和 GUS 酶活性检测发现, 来源于橡胶树白粉菌的 WY172 与 WY195 启动子在双子叶植物和单子叶植物内均具有较强的启动子活性。这与来源于花椰菜花叶病毒的 35S 启动子^[16] 相类似, 虽然来源于病毒却能在植物中稳定高效表达。但此前研究中对 WY172、WY195 在丝状真菌中是否具有启动子活性尚未进行研究。由于橡胶树白粉菌目前尚无有效转化体系且具有无法离体培养的特点, 本研究选择丝状真菌中的暹罗炭疽菌作为研究对象, 对 WY172、WY195 的启动子功能进行探究, 研究结果表明 WY172 与 WY195 均具有可以驱动 *GFP* 表达的启动子功能。这证明 WY172 与 WY195 启动子不

仅可以应用于植物, 更可以在丝状真菌中发挥启动子功能。笔者推测, WY172、WY195 启动子可能具有广泛的启动子功能, 在多种生物体内均可以发挥启动子功能, 这可能与其自身具有广泛的表达调控元件有关。笔者实验室也将在接下来的实验中对 WY172、WY195 启动子序列中的表达调控元件进行进一步的鉴定及功能分析, 为基因工程提供更为有效的启动子工具。

本实验室前期的研究结果^[7-8] 表明, 在植物体内 WY172 为 IAA 诱导型启动子, WY195 为高温、干旱、盐诱导启动子, 经分析发现, 这可能与 WY172、WY195 启动子序列具有丰富的植物表达元件有关, 其中, WY172 不仅具有赤霉素响应、生长素响应等激素作用元件, 此外还有低温响应、光响应元件等非生物因素的作用元件^[7]; WY195 启动子也具有高等植物常见的创伤应答元件、厌氧诱导必须元件、干旱诱导元件、光应答元件等^[8]。此外, 除这些已报道的植物诱导条件外, 还发现 WY172 与 WY195 启动子存在一些未经报道的植物启动子诱导元件。由于 WY172、WY195 启动子在植物中的诱导条件会导致真菌的生长发育受到限制, 因此植物体内的启动子诱导条件并不适用于真菌体内, 为了进一步探究 WY172 与 WY195 启动子在真菌内的表达调控方式, 本研究将转化子置于不同的生长环境条件下, 测定启动子驱动 *GFP* 基因表达量的变化, 发现在光处理的条件下 WY172 驱动 *GFP* 基因的高效表达, 在 23℃ 低温培养和长光照处理下 WY195 启动子高效驱动 *GFP* 基因的表达。这些研究结果表明, WY172 与 WY195 启动子在真菌内也属于诱导型启动子, 但这些诱导条件与植物体内的条件完全

不同。这可能与真菌的生长环境有关,同时也可能与 WY172 与 WY195 启动子丰富的诱导元件有关。由于目前专门针对丝状真菌启动子的研究数据库及分析工具较少,主要依靠其他真核生物的数据库进行预测,并通过实验对预测结果加以验证^[12]。笔者实验室将在接下来的实验中对 WY172 与 WY195 启动子在真菌体内的诱导元件进行鉴定与分析,对以上 2 个启动子是否具有更多诱导条件的可能性进行进一步鉴定。

目前使用的真菌启动子多为组成型启动子,虽然组成型启动子不受外界影响,在菌株的不同生长阶段均可高效表达^[19],但是组成型启动子的使用也存在局限性,例如当驱动异源基因表达时,会导致宿主菌株内产生大量异源蛋白,从而影响菌株正常生长甚至导致死亡。诱导型启动子在未受到特定的诱导信号刺激时,驱动目的基因的表达量往往很低,只有施加可以响应的诱导信号时,目的基因的转录水平才可以迅速提高,因此,使用诱导型启动子可以满足对目的基因的实时、定量表达的研究需求。但实验时还应根据合适的实验条件选择合适的诱导型启动子,并非每个诱导型启动子的诱导条件都能给所选的模型生物带来最佳条件。例如,诱导型启动子 *cbh1* 的天然诱导剂为纤维素,而真菌通过纤维素酶将纤维素降解,最后进入真菌体内对启动子 *cbh1* 进行直接调控,因此宿主菌株体内必须有编码纤维素酶的基因^[20]。而 WY172 启动子与 WY195 启动子诱导条件为物理条件,不需要添加化学试剂来进行诱导,不仅避免化学试剂对寄主菌株正常生长产生影响,而且具有更广泛的使用范围。此外, WY172 启动子与 WY195 启动子在植物和真菌内均属于诱导型启动子,在植物和真菌内均可运用。这不仅为功能基因的研究提供了更多的思路,也为启动子的应用提供了更多的可能。

参考文献:

- [1] 赵嘉鑫. 小麦条锈菌效应蛋白 Pst14872 靶标的鉴定及功能分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2020.
- [2] 郑立秋. 农杆菌及 PEG 介导向日葵核盘菌遗传转化体系的研究[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2021.
- [3] 孙晓红, 陈明杰, 潘迎捷. 启动子克隆概述[J]. *食用菌学报*, 2002(3): 57 – 62.
- [4] LIYANAGE K K, KHAN S, BROOKS S, et al. Taxonomic revision and phylogenetic analyses of rubber powdery mildew fungi [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2017, 105: 185 – 195.
- [5] LIYANAGE K K, KHAN S, MORTIMER P E, et al. Powdery mildew disease of rubber tree [J]. *Forest Pathology*, 2016, 46(2): 90 – 103.
- [6] YIN J, WANG Y, ZHU L, et al. The determination of a novel inducible WY172 promoter derived from *Oidium heveae* HO-73 [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2020, 143(2): 377 – 387.
- [7] WANG Y, RAJAOFERA M, ZHU L, et al. WY195, a new inducible promoter from the rubber powdery mildew pathogen, can be used as an excellent tool for genetic engineering [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 610252.
- [8] 方思齐. 炭疽菌 *Colletotrichum siamense* 转录因子 CsATF1 功能分析及互作蛋白的筛选[D]. 海口: 海南大学, 2020.
- [9] CHUNHUA L, GUIXIU H, FUCONG Z, et al. Functional characterization of CgPBS2, a MAP kinase kinase in *Colletotrichum gloeosporioides*, using osmotic stress sensitivity as a selection marker [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2018, 152: 801 – 813.
- [10] JIANG C, CAO S, WANG Z, et al. An expanded subfamily of G-protein-coupled receptor genes in *Fusarium graminearum* required for wheat infection [J]. *Nat Microbiol*, 2019, 4(9): 1582 – 1591.
- [11] 龙明滕, 梁晓宇, 杜艳楠, 等. 胶孢炭疽菌侵染橡胶树叶片染色方法的建立及显微观察[J]. *热带作物学报*, 2021, 42(10): 7.
- [12] 张浩东, 赵清梅, 薛佳祺, 等. 丝状真菌的转录调控启动子及其功能研究进展[J]. *农业科学研究*, 2021, 42(4): 56 – 64.
- [13] 林涛, 黄建忠. 丝状真菌启动子研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2013, 41(7): 2862 – 2863.
- [14] WIEBE M G. Stable production of recombinant proteins in filamentous fungi—problems and improvements [J]. *Mycologist*, 2003, 17(3): 140 – 144.
- [15] MARGOLLES-CLARK E, HARMAN G E, PENTTILA M. Enhanced expression of endochitinase in *Trichoderma harzianum* with the *cbh1* promoter of *Trichoderma reesei* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(6): 2152 – 2155.
- [16] HULL R, COVEY S N, DALE P. Genetically modified plants and the 35S promoter: assessing the risks and enhancing the debate [J]. *Microbial Ecology in Health & Disease*, 2000, 12(1): 1 – 5.
- [17] MCELROY D, ZHANG W, CAO J, et al. Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation [J]. *The Plant Cell*, 1990, 2(2): 163 – 171.
- [18] CHRISTENSEN A H, SHARROCK R A, QUAIL P H. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electropora-

- tion [J]. *Plant molecular biology*, 1992, 18(4): 675 – 689.
- [19] KUMMARI D, PALAKOLANU S R, KISHOR P B K, et al. An update and perspectives on the use of promoters in plant genetic engineering [J]. *Journal of Biosciences*, 2020, 45(1): 1 – 24.
- [20] 王雨卓. 诱导型启动子 *cbh1* 在高山被孢霉中的应用研究[D]. 无锡: 江南大学, 2020.

Identification of WY172 and WY195 promoter activity in *Colletotrichum siamense*

DONG Linpeng, YIN Jinyao, ZHAO Wenyuan, LIN Chunhua, LIU Wenbo, MIAO Weiguo, LI Xiao
(School of Plant Protection/ Ministry of Education Key Laboratory of Green Prevention and Control of Tropical Plant Diseases and Pests, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: Our laboratory preliminarily identified WY172 and WY195 promoter sequences from the rubber tree powdery mildew fungus (*Erysiphe quercicola*), which could effectively drive *GUS* expression in both monocotyledonous rice and dicotyledonous tobacco. In order to investigate whether WY172 and WY195 have promoter activity in *E. quercicola*, the pJNARG vector was used as a backbone, linking WY172-*GFP* and WY195-*GFP* to construct recombinant expression vectors (WY172-*GFP* and WY195-*GFP* vectors). The recombinant vectors were introduced into *Colletotrichum siamense* infecting rubber trees by protoplast transformation method. Fluorescence microscopy showed that both WY172 and WY195 could stably drive the expression of *GFP* gene. And in different stages of *C. siamense*, WY172 and WY195 could play promoter roles to stably drive the expression of *GFP*. In addition, we changed the environmental conditions for the growth of anthracis and measured the *GFP* expression under different conditions. The results showed that the long light condition enhanced the activity of WY172 to drive *GFP* expression, and that the activity of WY195 was improved by the long light treatment and the low temperature treatment at 23°C. This indicates that WY172 and WY195 have stable promoter activities in *C. siamense*, and that their activities can be induced by changing light or temperature conditions.

Keywords: promoter; *Colletotrichum siamense*; protoplast transformation

(责任编辑:叶 静)