

DOI:10.11937/bfyy.201519026

# ‘嘎啦’苹果 MYB12 基因启动子的克隆与功能分析

戚英伟<sup>1</sup>, 雷 琴<sup>2</sup>, 田建文<sup>1</sup>, 任小林<sup>2</sup>

(1. 宁夏大学 农学院, 宁夏 银川 750021; 2. 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100)

**摘 要:**以‘嘎啦’苹果基因组为模板,用 PCR 方法扩增得到苹果 MYB12 基因启动子(ProMYB12)。利用在线分析网站 Plant CARE 和 PLACE 对启动子上存在的顺式作用元件进行了预测。构建 pCAMBIO390-ProMYB12-GUS 植物瞬时表达载体并转化农杆菌,瞬时转染野生型番茄 Micro-Tom (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom)用以研究启动子的启动活性。结果表明:克隆获得的启动子长度为 1 290 bp。启动子序列中存在大量的顺式作用元件,既有转录必备的 TATA-box 和 CAAT-box,也存在非生物胁迫和植物激素响应元件以及大量的光调控元件,此外还存在一些组织特异性表达元件。‘嘎啦’苹果 MYB12 启动子驱动的 GUS 基因在番茄的花和种子处有较高的表达量,表现出一定的组织特异性。

**关键词:**苹果;MYB12;启动子;番茄;GUS

**中图分类号:**S 661.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)19-0106-06

MYB 基因家族是植物中成员最多的转录因子家族之一,它们参与了外界环境因子的应答并对植物内部的激素水平、此生代谢活动、细胞分化、细胞周期调控和叶片形态建成等生理活动起着重要的调节作用<sup>[1]</sup>,虽然已有涉及 MYB 转录因子的启动子及 MYB 转录因子表达调节对其下游基因功能影响的研究<sup>[2]</sup>,但是对 MYB 转录因子的启动子以及 MYB 转录因子自身表达的调节机制尚比较缺乏。该研究以‘嘎啦’苹果 MYB12 基因启动子为研究对象,克隆并分析了 MdMYB12 启动子可能含有的顺式作用调控元件,构建植物瞬时表达载体并进行瞬时转染分析以初步探究该启动子具有的启动活性,以期研究苹果 MYB12 基因的功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

植物材料野生型番茄 Micro-Tom (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom) 购自南京丰泰园艺有限公司,种植条件为 25℃,16 h 光照/8 h 黑暗;‘嘎啦’苹果种植于西北农林科技大学园艺场。

试验所用农杆菌工程菌株 GV3101、植物瞬时表达载体 pCAMBIA0390-GUS 和阳性对照 pCaMV35S-GUS 为宁夏大学农学院试验室保存;克隆载体 pMD19-T 购于大连宝生物有限公司;大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞、DNA 胶回收试剂盒以及质粒小提试剂盒均购于天根生物技术有限公司;构建载体所用限制性内切酶 XbaI、HindIII 和 T<sub>4</sub> DNA 连接酶购于 Fermentas;DNA Marker 和 2 $\times$  Taq master mix 购于康为世纪有限公司;参照“金冠”苹果 MYB12 基因转录起始位点(ATG)上游 1 500 bp 长度的序列设计扩增目的基因所用的左右引物由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成(Forward: cccaagcttgggAAACGCAAGACGACTGAG, cccaagcttggg 为 Hind III 酶切位点保护碱基; Reverse: gctctagagcTGCGAAGACAAATGGAGA, gctctagagc 为 XbaI 酶切位点保护碱基)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 启动子的克隆 以‘嘎啦’苹果果实为试验材料,基因组 DNA 采用 CTAB 方法提取<sup>[3]</sup>。以提取的基因组 DNA 为模板,扩增目的基因(扩增体系 50  $\mu$ L: 25  $\mu$ L 2 $\times$  Taq master mix、17.5  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O、左右引物各 2.5  $\mu$ L、模板 2.5  $\mu$ L;PCR 扩增条件:94℃预变性 3 min、94℃变性 30 s、57℃退火 30 s、72℃延伸 45 s 扩增 30 个循环;72℃终延伸 4 min)。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测,对预

**第一作者简介:**戚英伟(1989-),男,硕士研究生,研究方向为果蔬贮藏与加工。E-mail:1533568558@qq.com.

**收稿日期:**2015-05-20

期大小的单一条带进行胶回收。将回收产物与 pMD19-T 在 16℃ 条件下进行过夜连接,连接产物转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞。转化产物涂布在添加氨苄抗生素的 LB 固体培养平板上,挑取单克隆,PCR 鉴定为阳性的克隆交由北京奥科鼎盛生物科技有限公司进行测序。

**1.2.2 启动子瞬时表达载体的构建** 对测序结果正确的菌株以及包含瞬时表达载体 pCAMBI0390-GUS 的菌株进行扩繁并提取质粒。用 HindIII 和 XbaI 分别双酶切重组质粒 pMD19-T 和瞬时表达载体 pCAMBI0390-GUS,对酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳并回收目的片段。将回收的启动子片段和表达载体 pCAMBI0390-GUS 用 T<sub>4</sub>-DNA 连接酶在 4℃ 条件下过夜连接。连接产物转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞并涂布到含卡那霉素抗性的 LB 固体培养基上,37℃ 条件下静置过夜培养。挑取单克隆进行菌落 PCR 检测,对阳性菌株进行扩繁,提取质粒并利用 HindIII 和 XbaI 进行双酶切,对经双酶切鉴定正确的重组子利用冻融法转入农杆菌工程菌株 GV3101。

**1.2.3 启动子瞬时转染番茄** 参照钱锐<sup>[4]</sup>的方法对番茄的果实进行侵染,并稍有改动。注射液体积为 300  $\mu$ L,绿熟期和破色期番茄果实各 3 个;参照姜倩<sup>[5]</sup>的方法对番茄的叶片和花进行离体真空渗透侵染。

**1.2.4 GUS 组织化学染色** 试验材料浸染后培养 3 d,进行 GUS 组织化学染色。参照 RECH 等<sup>[6]</sup>的 GUS 组织化学染色法配置染液。染色时将果实沿中部横断面切成 1 mm 左右的薄片,叶片和花则直接放入染液中。做

好标记,置于 37℃ 培养箱内过夜。脱色参照 RIMA 等<sup>[7]</sup>的方法。

**1.2.5 启动子的生物信息学分析** 对克隆获得的启动子序列的比对分析通过 NCBI 的 BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 完成。启动子顺式作用元件预测分析采用 PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) 和 Plant CARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 在线分析数据库完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 MYB12 基因启动子克隆与序列分析

以‘嘎啦’苹果基因组 DNA 为模板,利用普通 PCR 方法克隆获得了 1 段 1 300 bp 左右的产物,大小与预计片段大小相符(图 2A)。测序结果(图 1)显示获得的启动子长度为 1 290 bp,与参考序列的相似性可达 99%。用 PLACE 和 Plant CARE 对序列进行顺式作用元件分析(表 1),结果显示克隆获得的启动子区不仅含有启动子区的核心元件 TATA-box 和 CAAT-box,还存在一些其它常见的启动子功能元件,如光响应元件、组织特异性表达元件、MYB 转录因子识别与结合位点、伤害应答元件、干旱响应元件和茉莉酸甲酯响应元件等。此外在获得的克隆序列的互补 DNA 链中存在多个压力响应元件和激素响应元件,如热激响应元件 HSE、防卫和应激响应元件 TC-rich repeats、ABA 激素响应元件 ABRE 等。所有存在的这些顺式调控元件为进一步了解和阐明该启动子的功能提供了一定的理论依据。

```

AAACGCAAGACGACTGAGCAAGAAGAAAAAGCAGCTGGTGGCGCTGGCGAAATCAAGCTAGTGACCCGTT
GCCTGACGCCCTCATCTTCGCTTCTCTCTCCTCACCTACTAAATCTTCATCGGCACCGTCGACATCTTCTCT
CCCGCTCCTCCCTCATTTGCCGCTCCGGTTGTCCGGTCCCTCTGCGCCACCCTCCCGCGCTCTCAAGGC
CTACATGTACGATCTCCACGTCGCTTCAACGTCGGAATTATAAACTGCCGAGTGAGCTGGAAGAGAGAGA
GAGAGAGAGAGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAAC
CGGTTGGGATGTAGAGGGAGAGTATAGAGGGTAGTGGAACCTGAAAGCCACTTACCTTTTGAAGGAAA
GAGAGCGTAGATTCGAGTCCATGAGGAGTGAAGGACGACAGCGAGAGAGACGAGGCGGTGAGAGGG
ATGTGAGAAACCAGAGAGAGAGAGAAGCATGATAGATTGACTAGGCTATTTTTTGTAGGGATGAAAATGC
TTTGGTCTATTACTGTTCACCTTGAGTGGATAAATGCGCTGGATGTTGGCGCAAGGCTTTAGGGTGGACTTG
CTCTCAATGCTCTCAGATTGAACTCTATTTTTTTTTTAAATATTGCAATATTTTCAAAACCTTCCACTCCTC
TTAATAATAATAATAATAAATGCAGGATTATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
AATGCTTAAAGCTACTAATAACTAAGAGATATACATCAAGTGATCTAATTAATATAGATGTACATAGCCACAA
TGGGAGAACTCCATACTGAAATTTGAAGTAAAAACATTGTGAGTGCATAAATTGATGCAATTTTTTTATGA
GGCATCACTTAGTCGGATCCGTAGAGTCATTCAATGAGAAATTGTACGTTGACACGAGTAAGACGGAATTA
ACCAGCTGCCTCTAAATTCAGTAGAGAAAATATAGCACTGGTAAAGCAAGTGGTGATAAAGCAATAGATAG
GCGCGTGAGAGTATATTCAGCTGCCCATCACAATATTATTACAACAAATATCCAGAGCTGTGTCTCGGCTCCCC
ATCTCTTATCTCTCGATCTCATCTCCCATCTCTCAATACCAAGTACAAACTATATCTACTTAAACACAAACA
AAAAAGAAAGAAAAACAAGATCAGGTTGTCAAGATATCAAAATCTCCATTGTCTTCGCA

```

图 1 ‘嘎啦’苹果 MYB12 基因启动子序列测序结果

Fig. 1 Sequence of MYB12 gene promoter cloned from ‘Gala’ apple

表 1 MdMYB12 启动子顺式作用元件与功能分析  
Table 1 Functional analysis of cis-elements of MdMYB12 promoter

| 顺式元件<br>Cis-elements | 序列<br>Sequence       | 数量<br>Number | 生物学功能<br>Function     |
|----------------------|----------------------|--------------|-----------------------|
| AAGAA-motif          | GGTAAAGAAA/GAAAGAA   | 2            | 未知                    |
| AT-rich element      | ATAGAAATCAA          | 1            | 富含 AT 的 DNA 结合蛋白的结合位点 |
| Box 4                | ATTAAT               | 2            | 参与光响应的保守 DNA 组件       |
| BoxI                 | TTTCAAA              | 1            | 光响应元件                 |
| CAAT-box             | CAAT/CAAAT/CAATT     | 10           | 常见的启动子和增强子区的顺式作用元件    |
| CAT-box              | GCCACT               | 1            | 与分生组织表达相关             |
| CGTCA-motif          | CGTCA                | 1            | 茉莉酸甲酯响应元件             |
| G-box                | CACGTT/CAGCTC        | 3            | 光响应元件                 |
| L-box                | CTCACCTACCAA         | 1            | 光响应元件的一部分             |
| Skn-1_motif          | GTCAT                | 2            | 胚乳表达需要的顺式元件           |
| Sp1                  | CC(G/A)CCC           | 3            | 光响应元件                 |
| TATA-box             | ATTATA /TATAAA /TATA | 10           | 核心启动子转录起始元素           |
| TGACG-motif          | TGACG                | 1            | 茉莉酸甲酯响应元件             |
| Unnamed_16           | GCTGCCCGTC           | 1            | 未知                    |
| Unnamed_4            | CTCC                 | 15           | 未知                    |
| chs-CMA2a            | TCACTTGA             | 1            | 光响应元件的一部分             |
| circadian            | CAANNNNATC           | 1            | 参与生物钟调控               |
| ACGTATERD 1          | AGCT                 | 3            | 干旱响应                  |
| ANAERO1CONSENSUS     | AAACAAA              | 1            | 参与厌氧代谢                |
| ARFAT                | TGTCTC               | 1            | 生长素响应基因结合位点           |
| CBFHV                | RYCGAC               | 1            | 脱水响应元件结合位点            |
| CGCGBOXAT            | VCGCGB               | 2            | 参与植物信号应答              |
| DOFCOREZM            | AAAG                 | 10           | 结合玉米 Dof 蛋白所需的核心位点    |
| DPBFCOREDCDC3        | ACACNNG              | 1            | 一类新的 bZIP 转录因子结合核心序列  |
| EECCRAH1             | GANTTNC              | 1            | MYB 转录因子 LCR1 的结合位点   |
| GAGA8HVBKN3          | GAGAGAGAGAGAGA       | 21           | GAGA 结合因子 BBR 的结合位点   |
| GATA-box             | GATA                 | 6            | 组织特异性表达元件             |
| MYCCONSENSUSAT       | CANNNTG              | 7            | MYC 转录因子识别位点          |
| MYBIAT               | WAACCA               | 2            | MYB 转录因子识别位点          |
| MYBCORE              | CNGTTR               | 3            | MYB 转录因子结合位点          |
| E-box                | CANNNTG              | 7            | 种子特异性表达元件             |
| OSE2ROOTNODULE       | CTCTT                | 2            | 与根瘤细胞中组织特异性表达启动子有关    |
| POLLENILELAT52       | AGAAA                | 6            | 番茄花粉特异性激活调控元件         |
| ROOTMOTIFTAPOX1      | ATATT                | 3            | 根特异性表达元件              |
| TATCCAOSAMY          | TATCCA               | 1            | 赤霉素响应元件               |
| WBOXNTERF3           | TGACY                | 3            | 伤害应答                  |
| WBOXHVISOI           | TGACT                | 2            | 糖响应元件                 |
| WRKY71OS             | TGAC                 | 5            | WRKY71 结合位点           |

2.2 植物表达载体的构建与鉴定

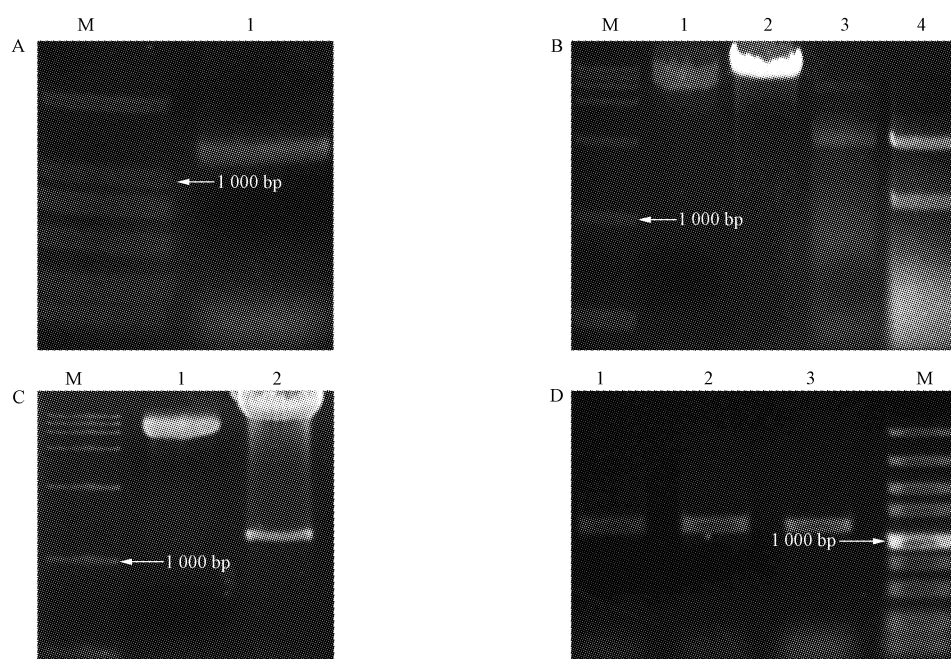
图 2B 为瞬时表达载体 pCAMBI0390 与重组质粒 pMD19-T 双酶切前后的凝胶电泳图。图片显示双酶切后表达载体成功实现了线性化,目标启动子片段从重组质粒分离出来。回收线性化的瞬时表达载体和启动子片段,经 T<sub>4</sub>DNA 连接酶连接并转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,涂布含卡那霉素的 LB 固体培养基,对菌液 PCR 为阳性的单克隆菌株进行扩繁并对提取的质粒用 HindIII 和 XbaI 双酶切,酶切前后的凝胶电泳结果如图 2C,酶切后出现一个约 1 300 bp 大小的目的片段和一个

大片段,说明 pCAMBI0390-ProMYB12-GUS 载体构建成功。将构建好的载体经冻融法转化农杆菌 GV3101。

2.3 启动子驱动 GUS 基因在番茄中的表达

通过农杆菌介导方法将构建好的植物表达载体 pCAMBI0390-ProMYB12-GUS 和 pCaMV35S 启动子驱动的阳性对照瞬时转染番茄。GUS 组织化学染色分析发现(图 3),在番茄生长成熟的不同阶段长度为 1 290 bp 的苹果 MYB12 启动子在番茄的花蕾和番茄果实种子处表达量较高,尽管在其它组织中也有一些表达,但其表达量较低,表现出一定的组织特异性。





注:A,启动子的克隆。M,DL 2000 DNA Marker,1,启动子的 PCR 产物。B,瞬时表达载体 pCAMBI0390 与重组质粒 pMD19-T 双酶切。M,DL 15 000 DNA Marker,1,2 分别为 pCAMBI0390 双酶切前、后;3,4 分别为重组质粒 pMD19-T 双酶切前、后。C,pCAMBI0390-ProMYB12-GUS 重组瞬时表达载体酶切验证。M,DL 15 000 DNA Marker,1,2 分别为 pCAMBI0390-ProMYB12-GUS 重组瞬时表达载体酶切前、后。D,农杆菌阳性菌株 PCR 验证。M,DL 5000 DNA Marker,1,2,3 均为农杆菌阳性菌株。

Note:A,the cloned promoter. M,DL 2000 DNA Marker;1,PCR product. B,restriction enzymes digestion of pCAMBI0390 and the recombinant pMD19-T. M,DL 15 000 DNA marker;1 and 2,before and after the digestion of pCAMBI0390;3 and 4,before and after the digestion of the recombinant pMD19-T. C,verification of recombinant pCAMBI0390-ProMYB12-GUS. M,DL 15 000 DNA marker;1 and 2,before and after the restriction enzymes digestion respectively. D,the verification of positive *Agrobacterium* strain by using PCR method. M,DL 5000 DNA marker;1,2 and 3,selected positive *Agrobacterium* strain.

图2 ‘嘎啦’苹果 MYB12 启动子的克隆与 GUS 融合双元载体的构建

Fig.2 The cloned MYB12 gene promoter of ‘Gala’ apple and the construction of promoter-GUS fusions in binary vector

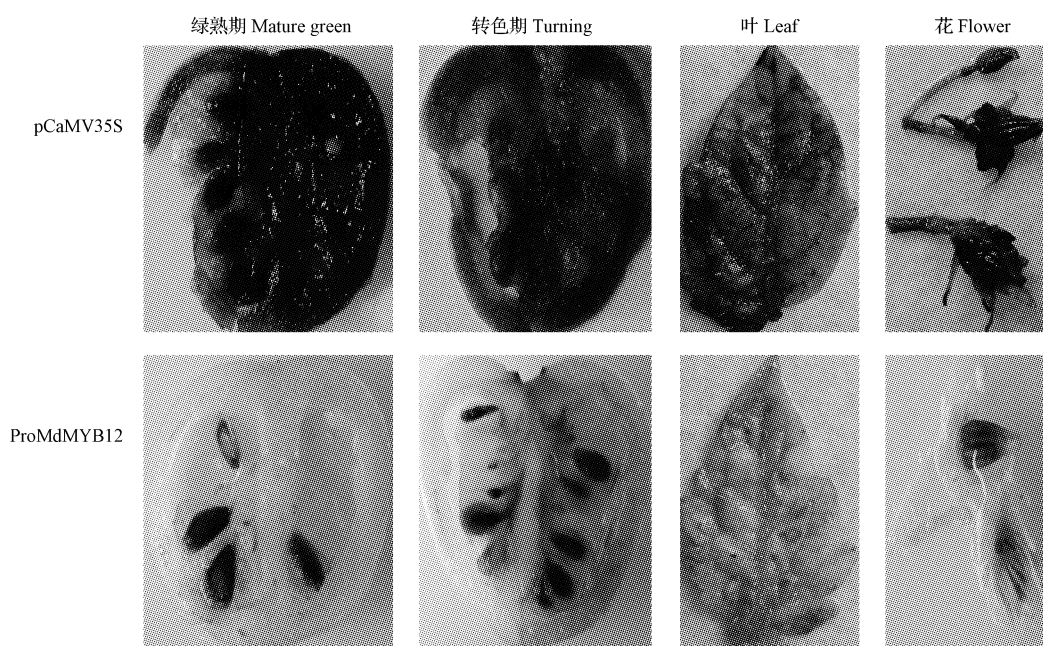


图3 GUS 基因在番茄花、叶片和果实中的表达

Fig.3 The expression of GUS gene in tomato fruit,leaf and flower

### 3 讨论与结论

启动子是一段位于基因上游并提供 RNA 聚合酶识别与结合的 DNA 序列, RNA 聚合酶结合到启动子序列上之后, 即可激活转录<sup>[8]</sup>。在基因功能调控方面启动子起着非常重要的作用<sup>[9]</sup>, 一定程度上启动子决定了基因的时空表达特性。该研究以‘嘎啦’苹果为试验材料, 借助 PCR 方法克隆了‘嘎啦’苹果 MYB12 基因的启动子并进行了测序。在对该启动子功能进行分析之前, 课题组首先通过启动子在线分析软件, 对启动子中存在的顺式作用元件进行了分析。TATA-box 位于转录起始位点 ATG 上游-138 处, CAAT-box 保守序列则出现在 ATG 上游-153 处。序列中存在的信号应答(CGCGBOXAT)和胁迫应答(ACGTATERD 1, CBFHV 和 WBOXNTERF3)顺式作用元件表明该启动子可能具有多重因子的诱导活性<sup>[10]</sup>。而序列中存在的茉莉酸甲酯响应元件(CGTCA-motif 和 TGACG-motif)、生长素响应基因结合位点(ARFAT)和赤霉素响应元件(TATCCAOSAMY)暗示该启动子的驱动活性可能受多种激素的诱导。序列中存在的众多光响应元件(2 个 BOX4、1 个 BOXI、3 个 G-box、1 个 L-box 和 3 个 Sp1 等)则说明该启动子的启动活性很可能受到光的调控, ARGUELLO-ASTORGA 等<sup>[11]</sup>研究认为 G-box 是常见的受光调节启动子中的顺式作用元件, 能够调节基因在光诱导条件下的转录活性。启动子序列中存在的保守序列 AAACAAA 与番茄中缺氧诱导的基因表达相关<sup>[12]</sup>, BHAT 等<sup>[13]</sup>认为该保守序列可能和果实成熟有一定的相关性。

研究发现, ‘嘎啦’苹果 MYB12 启动子可以驱动 GUS 基因进行表达, 与组成型强启动子 CaMV35S 表达活性相比较弱。MdMYB12 基因启动子在番茄种子处和番茄的花中表现出较高的 GUS 表达活性, 而在果实的其它组织中以及叶片当中其表达活性要低的多。研究证实 E-box 元件是存在于多个与种子贮藏蛋白相关的启动子上的保守序列<sup>[14]</sup>, 此外启动子顺式作用元件分析还显示, 该启动子含有 6 个与组织特异性表达相关的 GATA-box<sup>[15]</sup>。克隆获得的启动子能否驱动 GUS 基因在番茄种子内部表达, 有待于进一步研究。

综上所述, 该研究成功克隆了‘嘎啦’苹果基因 MYB12 的启动子, 分析了序列中存在的顺式作用元件并研究明

确了该启动子驱动 GUS 基因在番茄果实和花中的表达特点。克隆获得的‘嘎啦’苹果 MYB12 启动子有可能作为驱动转基因在植物的种子和花中进行特异性表达的重要工具。

### 参考文献

- [1] MARTIN C, PAZ-ARES J. MYB transcription factors in plants [J]. Trends Genet, 1997, 13(2): 67-73.
- [2] WANG Z, MENG D, WANG A, et al. The methylation of the Pc-MYB10 promoter is associated with green skinned sport in Max Red Bartlett pear [J]. Plant Physiology, 2013, 162(2): 885-896.
- [3] 李金璐, 王硕, 于倩, 等. 一种改良的植物 DNA 提取方法[J]. 植物学报, 2013, 48(1): 72-78.
- [4] 钱锐. 龙胆八氢番茄红素脱氢酶(PDS)和番茄红素  $\epsilon$ -环化酶(LYCE)基因启动子的功能分析[D]. 长春: 东北师范大学, 2008.
- [5] 姜倩. 百合花色形成关键基因(CHS)启动子功能分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2010.
- [6] RECH P, GRIMA-PETTENATI J, JAUNEAU A. Fluorescence microscopy: a powerful technique to detect low GUS activity in vascular tissues [J]. The Plant Journal, 2003, 33: 205-209.
- [7] RIMA S T, ISMANIZAN I, ZAMRI Z, et al. The stearyl-acyl-carrier-protein desaturase promoter (Des) from oil palm confers fruit-specific GUS expression in transgenic tomato [J]. Journal of Plant Physiology, 2010, 169(13): 1290-1300.
- [8] 夏江东, 程在全, 吴渝生, 等. 高等植物启动子功能和结构研究进展[J]. 云南农业大学学报(自然科学版), 2006, 21(1): 7-14.
- [9] 尹涛, 张上隆, 刘敬梅, 等. 果实特异性启动子研究现状及其应用[J]. 农业生物技术学报, 2009, 17(2): 355-360.
- [10] 柏亚男, 吴茂森, 何晨阳. 水稻基因启动子 OsBTF3p 的克隆和启动活性分析[J]. 中国农业科学, 2009, 42(3): 862-868.
- [11] ARGUELLO-ASTORGA G, HERRERA-ESTRELLA L. Evolution of light-regulated plant promoters[J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1998, 49: 525-555.
- [12] MOHANTRY B, KRISHNAN S P, SWARUP S, et al. Detection and preliminary analysis of motifs in promoters of anaerobically induced genes of different plant species[J]. Annals of Botany, 2005, 96: 669-681.
- [13] BHAT D S, ANJANASREE K N, LENKA S K, et al. Isolation and characterization of fruit-specific promoters ACS4 and EXP1 from tomato (*Solanum lycopersicum* L.) [J]. Plant Biochemistry and Biotechnology, 2010, 19(1): 51-57.
- [14] STALBERG K, ELLERSTAM M, EZCURRA I, et al. Disruption of an overlapping E-box/ABRE motif abolished high transcription of the napA storage-protein promoter in transgenic *Brassica napus* seeds [J]. Planta, 1996, 199: 515-519.
- [15] GIDONI D, BROSIO P, BOND-NUTTER D, et al. Novel cis-acting elements in Petunia Cab gene promoter [J]. Mol Gen Genet, 1989, 215: 337-344.

### Isolation and Characterization of the ‘Gala’ Apple MYB12 Gene Promoter

QI Yingwei<sup>1</sup>, LEI Qin<sup>2</sup>, TIAN Jianwen<sup>1</sup>, REN Xiaolin<sup>2</sup>

(1. Agricultural College, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021; 2. College of Horticulture, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

**Abstract:** MYB12 promoter (ProMYB12) fragment was cloned and identified from genomic DNA of ‘Gala’ apple using the method of PCR. The sequence of this cloned promoter was analyzed by using the online database of Plant CARE and

# 三十七种生物农药对西瓜细菌性果斑病菌的室内抑菌效果测定

王 雪, 王秀华, 刘晓畅, 解林昊, 杨丽娜, 高 洁

(吉林农业大学 农学院, 吉林 长春 130118)

**摘 要:**以 37 种生物药剂和西瓜细菌性果斑病菌为试材,采用抑菌圈法研究 37 种生物药剂对西瓜细菌性果斑病菌的抑菌效果。结果表明:80%乙蒜素 EC(消菌剑魔)、80%乙蒜素 EC(汉翔)、3 000 亿个/g 荧光假单胞杆菌 DP、0.15%四霉素 AS 4 种药剂对西瓜细菌性果斑病菌室内抑菌效果较好。该研究筛选出了对西瓜细菌性果斑病具有一定防效的生防药剂,对西瓜细菌性果斑病的科学防治具有指导意义。

**关键词:**西瓜;细菌性果斑病;生物农药;室内药剂筛选

**中图分类号:**S 436.5 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2015)19-0111-03

西瓜细菌性果斑病,又称西瓜细菌性果腐病(bacterial fruit blotch of cucurbits,简称 BFB),其病原菌为燕麦嗜酸菌西瓜亚种(*Acidovorax citrulli*,简称 Ac)<sup>[1]</sup>,是世界性的检疫性病害。西瓜苗期和成株期均可发病,可侵染植株叶部和果实,在我国新疆、山东、福建、海南、甘肃、吉林等多省均有不同程度的发生和危害<sup>[2-5]</sup>,是西瓜生产上的毁灭性病害之一。目前,对于瓜类细菌性果斑病种子处理的药剂主要仍是传统的农用硫酸链霉素和铜制剂<sup>[6-8]</sup>,药剂种类比较单一,而利用生物农药防治植物病害是目前发展的方向之一,为了进一步开发出有效的生防药剂,解决药剂种类单一的局面,该研究进行了 37 种

生物农药对西瓜细菌性果斑病菌室内抑菌效果测定试验,以期筛选出防治西瓜细菌性果斑病种子处理的有效药剂,为该病害的防治提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试菌株:西瓜细菌性果斑病菌菌株 ZG678,由吉林农业大学植物病害综合治理实验室提供。

供试药剂:供试生物农药共 37 种(表 1),对照药剂 72%农用硫酸链霉素 SPX(华北制药集团制剂有限公司)。

供试西瓜品种:“京甜超大 182”为感病品种,由北京金硕园农业贸易发展有限公司提供。

### 1.2 试验方法

参照赵斌等<sup>[9]</sup>的抑菌圈法,略有改动。配制  $10^8$  cfu/mL BFB 菌悬液,将温度降到 40℃左右的 NA 培养基与菌悬液(10:1)混合均匀,制成混菌平板。根据所选药剂浓度的使用范围,各选择 4 个浓度配制药液。

**第一作者简介:**王雪(1981-),女,博士,副教授,现主要从事植物病害综合治理等研究工作。E-mail:wangxue813@126.com.

**责任作者:**高洁(1964-),女,博士,教授,现主要从事植物病原细菌学及植物病害综合治理等研究工作。E-mail:jiegao115@126.com.

**基金项目:**农业部公益性行业(农业)科研专项资助项目(201003066)。

**收稿日期:**2015-06-10

PLACE. The plant expression vector pCambia0390-ProMYB12-GUS was constructed and transformed into Agrobacterium GV3101. Through Agrobacterium-mediated transformation, the constructed binary vector was introduced into wild type Micro-Tom (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom) tomato fruits, leaves and flowers in order to study the expression properties of this cloned promoter. The results showed that the cloned fragment was 1 290 bp long. Database searching showed that this fragment contained the essential elements such as TATA-box and CAAT-box, besides, there were several elements that responded to abiotic stress and hormones as well as many light responsive elements. Moreover, silico analysis of this isolated promoter sequence revealed the presence of some tissue specific cis-elements. Histochemical staining showed that GUS gene was highly expressed in the transgenic tomato flowers and around the tomato seeds which indicated the tissue specific characterization of the cloned promoter.

**Keywords:** apple; MYB12; promoter; tomato; GUS