

甜菜 *BvWRKY23* 基因的 RNAi 载体构建

李国龙¹ 吴海霞² 孙亚卿¹

(¹ 内蒙古农业大学农学院, 010018, 内蒙古呼和浩特; ² 内蒙古自治区水利科学研究院, 010020, 内蒙古呼和浩特)

摘要 WRKY 转录因子家族成员在调控植物生长发育、应答生物与非生物胁迫等方面具有重要的生物学功能。以抗旱甜菜 (*Beta vulgaris* L.) 幼苗为材料, 提取叶片总 RNA 并反转录为 cDNA, 通过 RT-PCR 方法扩增获得甜菜 WRKY 转录因子家族成员 *BvWRKY23* 基因的 RNAi 靶片段, 以中间载体 PBSK-RTM 作为媒介, 利用传统的“酶切-连接”法构建了含有 CaMV 35S 启动子、*BvWRKY23* 基因片段反向重复序列的 RNAi (RNA interference) 植物表达载体 pCambia2301ky-*BvWRKY23*-RNAi。

关键词 甜菜; WRKY 转录因子; RNA 干扰; 抗旱

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



WRKY 转录因子是植物特有的最大的转录因子家族之一, 属于 DNA 结合蛋白。WRKY 转录因子最早发现于甘薯的 SPF1^[1], 其后相继在拟南芥^[2-3]、水稻^[4-5]、小麦^[6] 和大麦^[7]、玉米^[8]、大豆^[9]、马铃薯^[10]、谷子^[11]、甜菜^[12] 和棉花^[13] 等模式植物和多种作物上得到鉴定。在植物不同发育时期和多种环境因素诱导下, WRKY 转录因子可通过正负调控蛋白调控植物生长发育、生物与非生物胁迫应答等^[14-15]。WRKY 转录因子在增强植物抗旱性方面扮演着重要角色, 直接或间接参与植物抗旱应答调控。研究^[3, 16-20] 发现, 单独或协同调控拟南芥 *AtWRKY18*、*AtWRKY40*、*AtWRKY57* 和 *AtWRKY60* 等基因的表达, 可增强拟南芥的耐旱能力; 超表达 *OsWRKY11*、*OsWRKY30*、*OsWRKY45* 和 *OsWRKY47* 等基因可提高水稻的耐旱性^[21-25]; 在小麦中, 超表达 *Tawrky2* 可增强转基因植株的抗旱性^[26]; 在玉米中也发现, 过表达在水分胁迫响应中扮演重要角色的 WRKY 家族成员 *Zmwrky106* 基因有助于玉米耐旱能力的提高^[27]; 以大豆中克隆到的 WRKY 家族成员 *Gmwrky35* 基因转化烟草, 证实 *Gmwrky35* 具有增强抗旱能力作用^[28]。

甜菜 (*Beta vulgaris* L.) 是我国重要的糖料作物和经济作物之一。甜菜主要种植在我国东北、西北和华北等区域, 而周期性干旱天气频发、水资源相对匮乏等是这些地区的主要特点, 干旱是制约甜

菜产量和质量提升及产业可持续发展的主要因素之一^[29]。目前, 已经对甜菜 WRKY 转录因子全基因组进行了鉴定, 发现有 40 个成员在 9 条染色体上呈不均匀分布, 初步推测可能有 5 个基因参与盐胁迫调控, 7 个基因参与热胁迫调控^[12]; 而有关甜菜 WRKY 转录因子家族基因与抗旱相关的研究还鲜见报道。本课题组在对甜菜水分胁迫下转录组分析中发现, 甜菜 WRKY 转录因子家族成员 *BvWRKY23* 基因显著上调, 推测其可能参与甜菜的抗旱应答, 从甜菜中成功克隆了该基因, 并构建了表达载体。鉴于上述前期工作, 本研究构建以甜菜 *BvWRKY23* 为靶目标、含有反向重复发卡结构的 RNAi 表达载体, 为进一步鉴定 *BvWRKY23* 基因在甜菜抗旱中的功能及其作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为内蒙古农业大学甜菜生理研究所筛选的甜菜抗旱材料 HI0466, 品种抗旱性鉴定工作已先期开展^[30]。选取籽粒饱满的甜菜种子, 用紫外灯照射 2h 后在育苗盘内播种, 置于人工气候室培养, 16h 光照, 8h 暗期, 温度 25℃。在幼苗生长至 6 片真叶时进行胁迫处理, 其中对照 (CK) 保持正常供水, 胁迫处理停止浇水, 分别于处理后 4 (DS4)、8 (DS8)、10d (DS10) 和复水后 2d (RW2)

作者简介: 李国龙, 主要从事甜菜抗逆机制及栽培技术研究, E-mail: lgl9@sina.com

基金项目: 国家自然科学基金 (31760414, 31360355)

收稿日期: 2020-02-07; 修回日期: 2020-05-06; 网络出版日期: 2020-06-18

取对照和处理的甜菜叶片，于 -70℃ 保存用于转录组测序和 RNA 提取。

1.2 主要试剂

主要试剂有 RNA 提取试剂盒 RNAlant plus reagent、Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶和 AMV 反转录试剂盒、DNA 凝胶回收和质粒 DNA 提取试剂盒、pUCm-T 载体、PBSK-RTM 中间载体、植物表达载体 pCambia2301ky、氨苄青霉素 (Ampicillin, AMP)、卡那霉素 (Kanamycin)

和大肠杆菌 DH5α 感受态细胞等。

1.3 引物设计及干扰片段的扩增

根据已克隆到的 *BvWRKY23* 基因全长选取 RNAi 靶片段,靶片段起始于起始密码子后 10bp 处,止于起始密码子后 389bp 处,共 380bp。根据所选靶片段设计特异性正向引物 P1 和反向引物 P2,然后分别在引物的 5' 端添加酶切位点 *Bam*HI/*Xba*I 和 *Sac*I/*Not*I (下划线部分),并增加保护碱基 (表 1),保证正向片段和反向片段正确连接到中间载体

表 1 RNAi 片段及内含子扩增引物
Table 1 Amplifying primers of RNAi fragments and intron

引物类型 Primer type	引物名称 Primer name	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	酶切位点 Enzyme site
P1	<i>BvWRKY23</i> -F1	CGGGATCCGAACCAATTGAAGATTGAA	<i>Bam</i> HI
	<i>BvWRKY23</i> -R1	GCTCTAGAAGAGGTGGAGGGGTAGGA	<i>Xba</i> I
P2	<i>BvWRKY23</i> -F2	CGAGCTCGAACCAATTGAAGATTGAA	<i>Sac</i> I
	<i>BvWRKY23</i> -R2	ATTTGCGGCCGAGAGGTGGAGGGGTAGGA	<i>Not</i> I
内含子 Intron (RTM)	RTM-F	ACGTTGTAAGTCTATTTTG	
	RTM-R	TCTATCTGCTGGGTCCAAATC	

PBSK-RTM。

提取甜菜幼苗叶片总 RNA,反转录合成 cDNA,分别用引物 P1 和 P2 进行干扰靶片段的扩增。PCR 反应程序为:98℃ 预变性 2min;98℃ 变性 10s,55℃ 退火 15s,68℃ 延伸 48s,35 个循环;68℃ 延伸 10min,4℃ 保存。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。通过 DNA 凝胶回收试剂盒回收目的片段,并将其连接到 pUCm-T 载体,用连接产物转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,在 100μg/mL AMP 的 LB 平板上涂布 IPTG 和 X-gal,于 37℃ 倒置培养过夜,进行蓝白斑筛选,挑选白色菌落培养并进行 PCR 鉴定,将鉴定后的阳性克隆进行测序。引物合成和测序工作委托北京六合华大基因科技有限公司完成。

1.4 *BvWRKY23*-RNAi 表达载体的构建

连接至 pUCm-T 载体上的干扰片段经测序确认正确后,用限制性内切酶 *Bam*HI/*Xba*I 从 pUCm-T 载体上切下正向片段并将其连接到中间载体 PBSK-RTM,构建载体 PBSK-RTM-F。转化大肠杆菌 DH5α,挑取单菌落,提取质粒并进行菌液 PCR 验证后测序。用限制性内切酶 *Sac*I/*Not*I 从 pUCm-T 载体上切下反向片段,并将其连接至载体 PBSK-RTM-F 对应的多克隆位点之间,构建中间载体 PBSK-RTM-FR,转化大肠杆菌 DH5α,挑取单菌落,提取质粒并进行菌液 PCR 验证及测序。将

干扰片段以相反的方向连接到中间载体内含子两侧之后,用限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Sac*I 酶切已构建好的中间载体 PBSK-RTM-FR 和干扰表达载体 pCambia2301ky。将中间载体 PBSK-RTM-FR 上的正向干扰片段-内含子 (RTM)-反向干扰片段连接至表达载体 pCambia2301ky 对应酶切位点之间,构建干扰表达载体 pCambia2301ky-*BvWRKY23*-RNAi (图 1),转化大肠杆菌 DH5α,随机挑取 8 个转化子,通过正向片段和内含子引物进行菌液 PCR 验证,挑取阳性的转化子用于质粒提取,通过 *Bam*HI 和 *Sac*I 进行双酶切鉴定。

2 结果与分析

2.1 水分胁迫下 *BvWRKY23* 基因的表达情况

通过转录组测序 (RNA-seq) 技术对不同水分处理条件下甜菜幼苗叶片 *BvWRKY23* 基因进行表达定量分析,从以 FPKM (fragments per kilobase per million, 每千个碱基的转录每百万映射读取的片段数) 为单位的 *BvWRKY23* 基因表达定量结果 (图 2) 表明,随着水分胁迫程度的加剧,*BvWRKY23* 基因的表达量也逐步增强,在胁迫程度最严重的第 10 天表达量最高,为 CK 表达量的 5.3 倍。而复水后随着胁迫信号的解除,该基因的表达量显著降低,表明 *BvWRKY23* 基因对水分胁迫高度敏感,水分胁迫特异性诱导该基因的过量表达,由此推测该基因

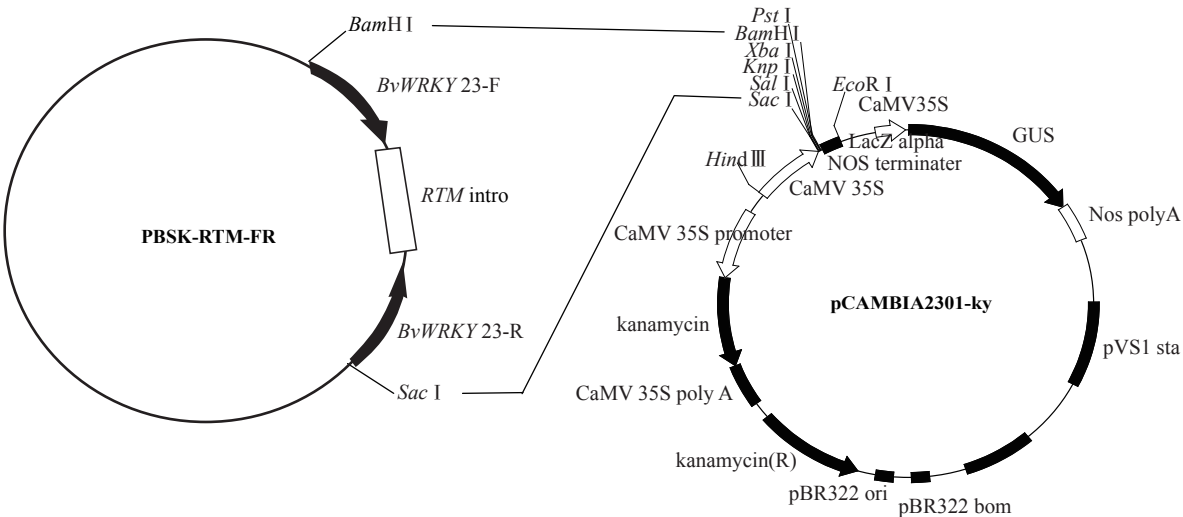


图 1 干扰载体构建策略
Fig.1 The construction strategy of RNAi expression vector

可能具有提高甜菜抗旱能力的作用。

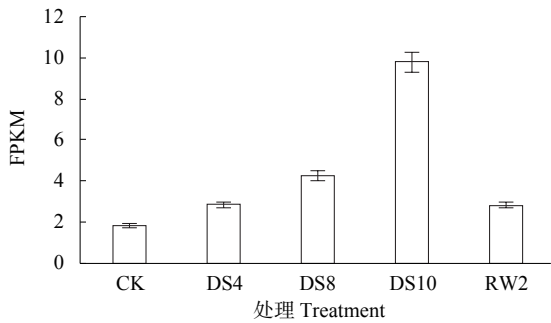


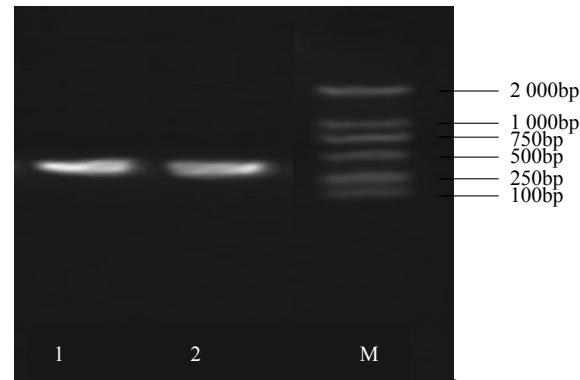
图 2 不同水分胁迫对甜菜叶片 *BvWRKY23* 基因表达的影响
Fig.2 Effects of water stress on *BvWRKY23* gene expression in sugar beet leaves

2.2 *BvWRKY23* 基因干扰片段的克隆

以甜菜叶片总 RNA 反转录所获得的 cDNA 为模板，通过正、反向引物进行 PCR 扩增，最终获得 2 条约 380bp 的干扰片段，与所选取干扰片段的大小相同（图 3）。将扩增片段分别进行胶回收、纯化，并连接到 pUCm-T 载体上进行测序，通过 GeneBank 的 BLAST（<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>）功能将测序结果与 *BvWRKY23* 的基因序列进行比对，结果显示比对结果完全吻合，表明已成功克隆到干扰片段。

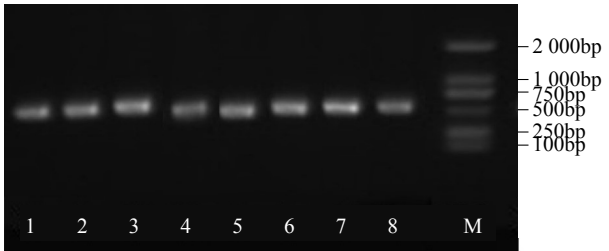
2.3 中间载体的构建

采用 *Bam*HI 和 *Xba*I 双酶切中间载体 PBSK-RTM 和测序正确的含有正向片段的 pUCm-T 载体，并将正向片段连接至 PBSK-RTM 载体，转化大肠杆菌 DH5α 后，随机挑取 8 个转化子进行菌液 PCR

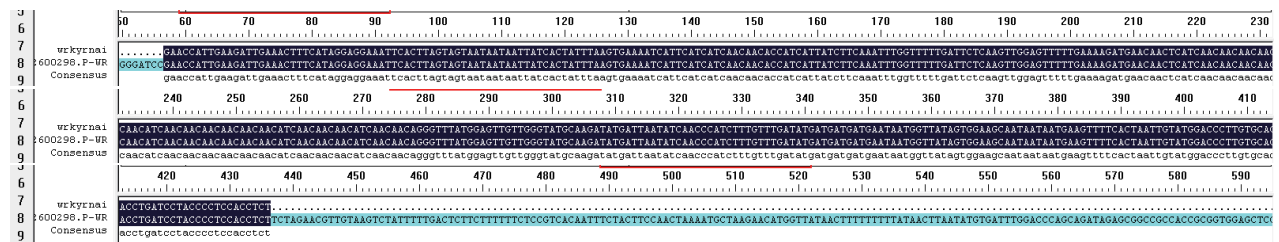


M: DL2000，下同；1~2: RNAi 片段产物
M: DL2000 Marker, the same below; 1-2: The products of RNAi fragments
图 3 PCR 产物 *BvWRKY23* 基因的 RNAi 片段
Fig.3 PCR products of *BvWRKY23* gene RNAi fragments

验证，均得到大小为 508bp 的条带，大小正好是正向片段与内含子之和（图 4）。挑取 1 个阳性转化子提取质粒后测序，将测序结果与原干扰片段进行比对，序列完全一致（图 5），表明正向干扰片段成功连接到 PBSK-RTM 载体上，命名为 PBSK-RTM-F。



1~8: PCR 扩增干扰片段。下同
1-8: The PCR products of interference fragment. The same below
图 4 中间载体 PBSK-RTM-F 阳性克隆菌落的 PCR 鉴定
Fig.4 The PCR identification of positive clones for intermediate vector PBSK-RTM-F



第一行为参考序列；第二行为测序序列。下同
The first line is the reference sequence, the second line is the sequencing. The same below

图 5 PBK-RTM-F 阳性质粒测序

Fig.5 Sequencing analyses of positive clones PBK-RTM-F

采用 *Sac* I 和 *Not* I 双酶切正向片段测序正确质粒 PBK-RTM-F 和含有反向片段的 pUCm-T 载体，并将反向片段连接至 PBK-RTM-F 载体，转化大肠杆菌 DH5 α 后，随机挑取 8 个转化子进行菌液 PCR 验证，同样得到大小为 508bp 的条带，大小正好是反向片段与内含子之和（图 6）。挑取 1 个阳性转化子提取质粒后测序，测序结果与原干扰片段序列比对结果完全一致（图 7），表明反向干扰片段已成功

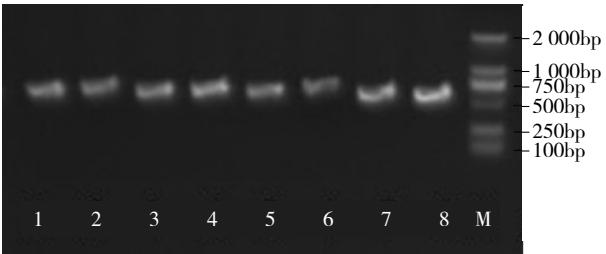


图 6 中间载体 PBK-RTM-FR 阳性克隆菌落 PCR 鉴定
Fig.6 The PCR identification of positive clones for intermediate vector PBK-RTM-FR

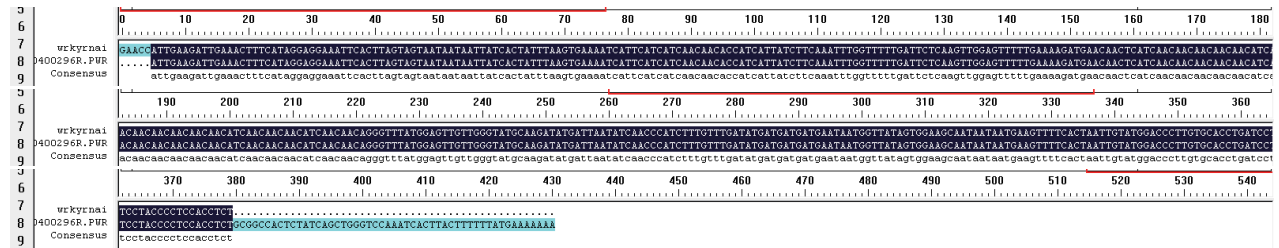


图 7 中间载体 PBK-RTM-FR 阳性质粒测序

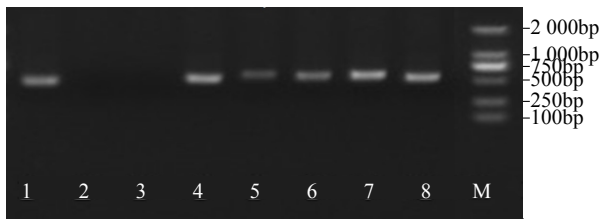
Fig.7 Sequencing analysis of positive clones of intermediate vector PBK-RTM-FR

连接到 PBK-RTM-F 载体上，即中间载体 PBK-RTM-FR 构建成功。

2.4 *BvWRKY23* RNAi 载体的构建及酶切鉴定

*Bam*HI/*Sac*I 双酶切 PBK-RTM-FR 中间载体，回收大片段（正向片段+RTM+反向片段）。同时 *Bam*HI/*Sac*I 双酶切 pCambia2301ky 质粒，将回收的大片段与表达载体连接后构建 pCambia2301ky-*BvWRKY23*-RNAi 载体，并转化大肠杆菌 DH5 α ，然后随机挑取 8 个转化子，通过正向片段和内含子（RTM）引物进行菌液 PCR 验证，获得 6 个阳性转化子，大小为 508bp，正好是正向片段与内含子之和（图 8）。

挑取 1 个 PCR 阳性的转化子进行质粒提取，通过 *Bam*HI/*Sac*I 双酶切 pCambia2301ky-*BvWRKY23*-RNAi 质粒进行鉴定，电泳结果显示，出现质粒骨架条带和干扰片段条带。其中在 750~1 000bp 的



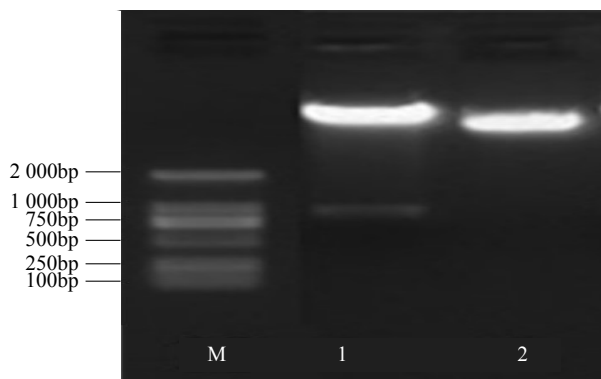
1-8: 不同转化子 PCR 鉴定
1-8: The PCR identification of different transformants

图 8 pCambia2301ky-*BvWRKY23*-RNAi 载体阳性重组 PCR 鉴定

Fig.8 The identification of positive recombinant clone for pCambia2301ky-*BvWRKY23*-RNAi by PCR

条带大小为 888bp，与正向干扰片段+RTM（内含子）+反向干扰片段大小相符，而双酶切空载体仅出现质粒骨架条带（图 9），表明从中间载体 PBK-RTM-FR 上切下的正向干扰片段+内含子（RTM）+反向干扰片段已经成功连接到表达载体 pCambia2301ky 质粒骨架上，即 RNAi 载体构建

完成。



1: *Bam*HI/*Sac*I 双酶切 pCambia2301ky-*BvWRKY23*-RNAi; 2: *Bam*HI/*Sac*I 双酶切空载体

1: Double enzyme digestion products of pCambia2301ky-*BvWRKY23*-RNAi by *Bam*HI/*Sac*I; 2: Double enzyme digestion products of pCambia2301ky by *Bam*HI/*Sac*I

图 9 pCambia2301ky-*BvWRKY23*-RNAi 载体 *Bam*HI/*Sac*I 双酶切鉴定

Fig.9 The identification of plasmid pCambia2301ky-*BvWRKY23*-RNAi vector by double digestion with *Bam*HI/*Sac*I

3 讨论

RNAi 技术是将外源双链 RNA 导入细胞后, 引起与其序列同源的特异 mRNA 降解而导致基因表达抑制的现象^[31-32]。RNAi 技术是继基因敲除技术之后又一项高效的基因沉默技术, 该技术因具有特异性强和沉默效率高等优点, 自 20 世纪 90 年代被发现以来, 已被作为基因功能分析与鉴定的有效手段。RNAi 技术成功在植物种质资源创新^[33]、高效生物防治^[34-35]、抗药性机理研究^[36-37]和各种疾病的预防与治疗^[38-42]等领域开展应用, 成为发掘基因未知功能的强有力辅助工具。

在利用 RNAi 技术开展相关研究过程中, 构建相应的 RNAi 表达载体至关重要。构建植物 RNAi 载体的方法包括传统的“酶切-连接”法^[43]、“零背景筛选”技术^[44]、Gateway 技术^[45]和人工 miRNA 技术^[46]。最早的构建 RNA 干扰载体的方法是传统的“酶切-连接”法, 已在多种植物中成功构建了 RNA 干扰表达载体^[47-50], 但该技术要求原始载体至少有 4 个可用酶切位点, 且仅可在载体上插入 1~2 个基因, 同时对目的片段的限制条件较多, 增加了原始载体和目的片段的选择难度; “零背景筛选”技术可大大降低对原载体可用酶切位点的要求, 通过简单的 2 步 PCR 反应就能形成干扰载体所需的“发夹”结构, 但该技术对引物设计和 DNA 聚

合酶有较高的要求; Gateway 技术虽然可以快速、高效地构建植物 RNAi 表达载体, 但高额的专用酶成本在一定程度上限制了其应用^[51]。人工 miRNA 技术具有高效、精确和可控等优点, 被认为是替代 RNAi 的有效工具, 但由于某些特定植物基因组信息的缺乏, 沉默效应还不能完全做到人为控制。因此, 在构建 RNAi 表达载体时, 应根据试验具体情况和要求选择适宜的载体构建方法。

4 结论

WRKY 转录因子家族成员在调控植物生长发育、应答生物与非生物胁迫等方面具有重要的生物学功能。通过传统的“酶切-连接”方法成功构建了甜菜 WRKY 转录因子家族成员 *BvWRKY23* 基因的 RNAi 表达载体。

参考文献

- [1] Ishiguro S, Nakamura K. Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein, SPF1, that recognizes SP8 sequences in the 5' upstream regions of genes coding for sporamin and beta-amylase from sweet potato. *Molecular Genetics and Genomics*, 1994, 244(6): 563-571.
- [2] Chen W Q, Provart N J, Glazebrook J, et al. Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *The Plant Cell*, 2002, 14(3): 559-574.
- [3] Xu X P, Chen C H, Fan B F, et al. Physical and functional interactions between pathogen-induced *Arabidopsis* WRKY18, WRKY40, and WRKY60 transcription factors. *The Plant Cell*, 2006, 18(5): 1310-1326.
- [4] Ramamoorthy R, Jiang S Y, Kumar N, et al. A comprehensive transcriptional profiling of the WRKY gene family in rice under various abiotic and phytohormone treatments. *Plant and Cell Physiology*, 2008, 49(6): 865-879.
- [5] Christian R, Shen Q X. The WRKY gene family in rice (*Oryza sativa*). *Journal of Integrative Plant Biology*, 2007, 49(6): 827-842.
- [6] Ning P, Liu C C, Kang J Q, et al. Genome-wide analysis of WRKY transcription factors in wheat (*Triticum aestivum* L.) and differential expression under water deficit condition. *PeerJ*, 2017, 5: e3232.
- [7] Mangelsen E, Kilian J, Berendzen K W, et al. Phylogenetic and comparative gene expression analysis of barley (*Hordeum vulgare*) WRKY transcription factor family reveals putatively retained functions between monocots and dicots. *BMC Genomics*, 2008, 9(1): 194.
- [8] Wei K F, Chen J, Chen Y F, et al. Molecular phylogenetic and expression analysis of the complete WRKY transcription factor family in maize. *DNA Research*, 2012, 19(2): 153-164.
- [9] Yang Y, Zhou Y, Chi Y, et al. Characterization of soybean WRKY gene family and identification of soybean WRKY genes that promote resistance to soybean cyst nematode. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 17804.
- [10] Dellagi A, Birch P R J, Heilbronn J, et al. A potato gene, erg-

- 1, is rapidly induced by *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica*, *Phytophthora infestans*, ethylene and salicylic acid. *Journal of Plant Physiology*, 2000, 157(2):201-205.
- [11] 祖倩丽, 尹丽娟, 徐兆师, 等. 谷子WRKY36转录因子的分子特性及功能鉴定. *中国农业科学*, 2015, 48(5):851-860.
- [12] 孔维龙, 于坤, 但乃震, 等. 甜菜WRKY转录因子全基因组鉴定及其在非生物胁迫下的表达分析. *中国农业科学*, 2017, 50(17):3259-3273.
- [13] Yao D X, Zhang X Y, Zhao X H, et al. Transcriptome analysis reveals salt-stress-regulated biological processes and key pathways in roots of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Genomics*, 2011, 98(1):47-55.
- [14] Ülker B, Somssich I E. WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. *Current Opinion in Plant Biology*, 2004, 7(5):491-498.
- [15] Rushton P J, Somssich I E, Ringler P, et al. WRKY transcription factors. *Trends in Plant Science*, 2010, 15(5):247-258.
- [16] Jiang Y J, Liang G, Yu D Q. Activated expression of WRKY57 confers drought tolerance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 2012, 5(6):1375-1388.
- [17] Chen H, Lai Z R, Shi J W, et al. Roles of *Arabidopsis* WRKY18, WRKY40 and WRKY60 transcription factors in plant responses to abscisic acid and abiotic stress. *BMC Plant Biology*, 2010, 10:281.
- [18] Pandey S P, Roccaro M, Schon M, et al. Transcriptional reprogramming regulated by WRKY18 and WRKY40 facilitates powdery mildew infection of *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 2010, 64(6):912-923.
- [19] Schon M, Toller A, Diezel C, et al. Analyses of *wrky18 wrky40* plants reveal critical roles of SA/EDS1 signaling and indole-glucosinolate biosynthesis for *Golovinomyces orontii* resistance and a loss-of resistance towards *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* AvrRPS4. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2013, 26(7):758-767.
- [20] Babitha K C, Ramu S V, Pruthvi V, et al. Co-expression of *AtBHLH17* and *AtWRKY28* confers resistance to abiotic stress in *Arabidopsis*. *Transgenic Research*, 2013, 22(2):327-341.
- [21] 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. *Plant Cell Reports*, 2009, 28(1):21-30.
- [22] Tao Z, Kou Y J, Liu H B, et al. *OsWRKY45* alleles play different roles in abscisic acid signalling and salt stress tolerance but similar roles in drought and cold tolerance in rice. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(14):4863-4874.
- [23] Shen H S, Liu C T, Zhang Y, et al. *OsWRKY30* is activated by MAP kinases to confer drought tolerance in rice. *Plant Molecular Biology*, 2012, 80(3):241-253.
- [24] Raineri J, Wang S H, Peleg Z, et al. The rice transcription factor *OsWRKY47* is a positive regulator of the response to water deficit stress. *Plant Molecular Biology*, 2015, 88(4):401-413.
- [25] Lee H, Cha J, Choi C, et al. Rice WRKY11 plays a role in pathogen defense and drought tolerance. *Rice*, 2018, 11(1):5.
- [26] Gao H M, Wang Y F, Xu P, et al. Overexpression of a WRKY transcription factor *Tawrky2* enhances drought stress tolerance in transgenic wheat. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9:997.
- [27] Wang C T, Ru J N, Liu Y W, et al. Maize WRKY transcription factor *Zmwrky106* confers drought and heat tolerance in transgenic plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(10):3046.
- [28] 李大红, 王春弘, 刘喜平, 等. 大豆GmWRKY35基因的克隆及其增强烟草耐旱能力研究. *大豆科学*, 2017, 36(5):685-691.
- [29] 韩凯虹, 张继宗, 王伟娟, 等. 水分胁迫及复水对华北旱区甜菜生长及品质的影响. *灌溉排水学报*, 2015, 34(4):63-68.
- [30] 李国龙, 吴海霞, 温丽, 等. 甜菜苗期抗旱鉴定指标筛选及其综合评价. *干旱地区农业研究*, 2011, 29(4):69-74.
- [31] 王伟伟, 刘妮, 陆沁, 等. RNAi技术的最新研究进展. *生物技术通报*, 2017, 33(11):35-40.
- [32] Fire A, Xu S, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, 391(6669):806-811.
- [33] Wang L Q, Li Z, Lu M Z, et al. ThNAC13, a NAC transcription factor from *Tamarix hispida*, confers salt and osmotic stress tolerance to transgenic *Tamarix* and *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8:635.
- [34] Xu H J, Xue J, Lu B, et al. Two insulin receptors determine alternative wing morphs in planthoppers. *Nature*, 2015, 519(7544):464-467.
- [35] Tang B, Wei P, Zhao L N, et al. Knockdown of five trehalase genes using RNA interference regulates the gene expression of the chitin biosynthesis pathway in *Tribolium castaneum*. *BMC Biotechnology*, 2016, 16:67.
- [36] Hu Z, Lin Q, Chen H, et al. Identification of a novel cytochrome *P450* gene, *CYP321E1* from the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) and RNA interference to evaluate its role in chlorantraniliprole resistance. *Bulletin of Entomological Research*, 2014, 104(6):716-723.
- [37] Guo Z J, Kang S, Zhu X, et al. The novel ABC transporter ABCH1 is a potential target for RNAi-based insect pest control and resistance management. *Scientific Reports*, 2015, 5:13728.
- [38] Li L, Li Q Y, Bao Y H, et al. RNAi-based inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in transgenic pigs. *Journal of Biotechnology*, 2014, 171:17-24.
- [39] Linke L M, Wilusz J, Pablonia K L, et al. Inhibiting avian influenza virus shedding using a novel RNAi antiviral vector technology: proof of concept in an avian cell model. *AMB Express*, 2016, 6(1):16.
- [40] Wu S H, Wen F F, Li Y Y, et al. PIK3CA and PIK3CB silencing by RNAi reverse MDR and inhibit tumorigenic properties in human colorectal carcinoma. *Tumor Biology*, 2016, 37:8799-8809.
- [41] Wang F J, Chen W C, Liu P F, et al. Lentivirus-mediated RNAi knockdown of *LMP2A* inhibits the growth of the Epstein-Barr-associated gastric carcinoma cell line GT38 in vitro. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2017, 13:187-193.
- [42] Weinstein S, Toker I A, Emmanuel R, et al. Harnessing RNAi-based nanomedicines for therapeutic gene silencing in B-cell malignancies. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*, 2015, 113(1):E16-E22.
- [43] 柴晓杰, 王丕武, 关淑艳, 等. 玉米淀粉分支酶基因反义表达载体的构建和功能分析. *作物学报*, 2005, 31(12):1654-1656.
- [44] Chen S B, Pattavipha S, Liu J L, et al. A versatile zero background T-vector system for gene cloning and functional genomics^{1[C][W][O]}. *Plant Physiology*, 2009, 150(3):1111-1121.
- [45] 姜玲, 秦长平, 伏卉. GatewayTM系统快速构建番木瓜环斑病毒CP基因反向重复序列表达载体. *农业生物技术学报*, 2008, 16(3):526-529.

- [46] Schwab R, Ossowski S, Riester M, et al. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2006, 18: 1121-1133.
- [47] 邢珍娟, 王振营, 何康来, 等. 转 *Bt* 基因玉米幼苗残体中 CryIAb 杀虫蛋白田间降解动态. *中国农业科学*, 2008, 41(2): 412-416.
- [48] 王镭, 才华, 柏锡, 等. 转 *OsCDPK7* 基因水稻的培育与耐盐性分析. *遗传*, 2008, 30(8): 1051-1052.
- [49] 吕品, 柴晓杰, 王丕武, 等. 大豆胰蛋白酶抑制剂 *KSTI3* 基因的克隆及其植物表达载体的构建. *吉林农业大学学报*, 2007, 29(3): 275-278.
- [50] 娄玲玲, 郑唐春, 曲冠证, 等. 可用于植物转化的 RNAi 载体构建方法. *安徽农业大学学报*, 2012, 39(1): 120-123.
- [51] Manamohan M, Sharath Chandra G, Asokan R, et al. One-step DNA fragment assembly for expressing intron-containing hairpin RNA in plants for gene silencing. *Analytical Biochemistry*, 2013, 433(2): 189-191.

Construction of RNAi Expression Vector of *BvWRKY23* Gene in Sugar Beet

Li Guolong¹, Wu Haixia², Sun Yaqing¹

(¹College of Agronomy, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, Inner Mongolia, China;

²Inner Mongolia Research Institute for Water Conservancy, Hohhot 010020, Inner Mongolia, China)

Abstract The WRKY transcription factor family members play an important role in regulating plant growth, development and responding to biotic and abiotic stress in plant. In our study, the leaves of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) seedling were used as the material for RNA extraction, the total RNA was extracted and reverse transcribed into cDNA. The RNAi target fragment of *BvWRKY23* gene in sugar beet was obtained by RT-PCR amplification. Based on the intermediate vector PBSK-RTM, the RNAi (RNA interference) plant expression vector pCambia2301ky-*BvWRKY23*-RNAi with inverted repeats of *BvWRKY23* driven by the promoter CaMV 35S was successfully constructed by traditional restriction enzyme digestion and ligation methods.

Key words Sugar beet; WRKY transcription factor; RNA interference; Drought stress

欢迎订阅 2021 年《农业科技通讯》杂志

农业农村部主管, 中国农业科学院主办, 国家新闻出版广电总局认定的第一批学术期刊 (2014)。刊号: ISSN1000-6400, CN11-2395/S, 邮发代号: 2-602, 月刊, 每月 17 日出版。单价: 20.00 元, 全年: 240.00 元。全国各地邮局及本刊编辑部均可订阅。

本刊及时报道种植业最新研究成果, 尤其是种子方面的新品种、新技术。侧重大田, 兼顾园艺。是种植业者首选刊物。主要栏目: 专题论述、试验研究、粮食作物、经济作物、蔬菜、果树、西甜瓜、林木花卉等。内容丰富翔实、信息量大、技术实用。

地址: 100081, 北京中关村南大街 12 号《农业科技通讯》编辑部

电话: 010-82109664、82109665、82106276

E-mail: tongxun@caas.cn