

茶树 *CsWAK12* 基因启动子核心区鉴定与 非生物胁迫的差异化应答

孙明慧,吴琼,刘丹丹,焦小雨,阮旭,王雷刚,王倩,王文杰

(安徽省农业科学院 茶叶研究所,安徽 合肥 230000)

【摘要】 **【目的】**探究茶树 *CsWAK12* 基因启动子活性及其在逆境胁迫下的表达差异与响应特征。**【方法】**利用 RT-PCR 技术克隆 *CsWAK12* 基因启动子上游 2 000 bp 的启动子序列,进行顺式作用元件分析;特异性设计 *CsWAK12* 基因 5' 端启动子截短片段(p1~p5),采用同源重组法将其定向连接至 pCAMBIA3301-35S-GUS 报告载体。借助烟草瞬时表达系统,结合 GUS 组织化学染色技术,检测各截短片段在常温及不同非生物胁迫(低温、干旱、盐、ABA)处理下转录活性的变化。**【结果】***CsWAK12* 基因启动子长度为 1 910 bp,包含激素响应、光响应及非生物胁迫响应等相关顺式作用元件。功能验证结果表明,该启动子具有转录活性,其活性受多区段协同调控,其中上游 -1 909~-1 488 bp 区段兼具激活、抑制元件,-1 101~-701 bp 区段存在强抑制元件,而下游 -726~-464 bp 是响应胁迫的必需核心区段。不同胁迫处理下各片段响应模式差异明显,即 p4 启动子片段在低温及盐胁迫处理下活性显著上调;p2 片段对干旱和 ABA 胁迫的响应程度最高;全长启动子 p1 在低温条件下活性维持稳定,同时可被干旱与盐胁迫有效诱导。*CsWAK12* 启动子可在不同环境信号下,通过不同的靶向顺式作用元件调控该基因的功能。**【结论】***CsWAK12* 在转录层面响应各类非生物胁迫的分子机制,为解析茶树抗逆调控网络提供了新的理论依据。

【关键词】 茶树;WAK 蛋白激酶;*CsWAK12* 基因;启动子活性;非生物胁迫

【中图分类号】 S571.103.4

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2027)03-0031-10

Identification of the core region of the *CsWAK12* promoter in tea plant and its differential responses to abiotic stresses

Sun Minghui, Wu Qiong, Liu Dandan, Jiao Xiaoyu, Ruan Xu,

Wang Leigang, Wang Qian, Wang Wenjie

(Tea Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei, Anhui 230000, China)

Abstract: **【Objective】** This study aims to explore the promoter activity of the *CsWAK12* gene in *Camellia sinensis*, as well as its differential expression and response characteristics under abiotic stresses. **【Method】** The 2 000 bp upstream promoter sequence of *CsWAK12* was cloned by RT-PCR and subjected to cis-acting element analysis. Five 5'-terminal truncated promoter fragments of *CsWAK12* (p1 - p5) were specifically designed and directionally ligated into the pCAMBIA3301-35S-GUS reporter vector via homologous recombination. With the combination of a tobacco transient expression system and GUS histochemical staining, changes in the transcriptional activity of each truncated fragment were detected under normal temperature and different abiotic stresses, including low temperature, drought, salt, and ABA treatments. **【Result】** The *CsWAK12* promoter was 1 910 bp in length and contained multiple cis-acting elements related to hormone, light, and abiotic stress re-

【收稿日期】 2026-01-21 **【修回日期】** 2026-02-28

【基金项目】 安徽省农业科学院科研计划项目(2025YL018);安徽省茶叶产业技术体系项目(AHCYJSTX-11)

【作者简介】 孙明慧(1994-),女,河南睢县人,助理研究员,硕士,主要从事茶树种质资源与遗传育种研究。E-mail:1510524344@qq.com

【通信作者】 王文杰(1968-),男,安徽泾县人,研究员,主要从事茶树新品种选育、茶叶加工与品质研究。E-mail:391590137@qq.com

sponses. Functional validation exhibited that this promoter possessed transcriptional activity, which was synergistically regulated by multiple regions. The upstream -1 909 bp to -1 488 bp region contained both activating and repressive cis-elements. The fragment spanning -1 101 bp to -701 bp harbored strong repressive elements, whereas the downstream -726 bp to -464 bp region acted as an indispensable core segment for stress response. Promoter fragments exhibited distinct response patterns under different abiotic stresses. Specifically, the p4 fragment performed significantly upregulated activity under low temperature and salt stress. The p2 fragment displayed the strongest response to drought and ABA stresses. The full-length promoter p1 maintained stable activity under low temperature and could be effectively induced by drought and salt stresses. The *CsWAK12* promoter modulated gene function by distinct target cis-acting elements in response to diverse environmental signals. 【Conclusion】 The molecular mechanism of *CsWAK12* in response to various abiotic stresses at the transcriptional level was revealed, providing a new theoretical basis for elucidating the stress regulatory network in tea plants.

Key words: tea plant; WAK protein kinase; *CsWAK12*; promoter activity; abiotic stresses

茶树(*Camellia sinensis*)作为重要的多年生经济作物,因其芽叶加工所得茶叶具有独特饮用价值,现已在全球多地广泛栽培^[1]。然而,茶产业的发展易受到多种胁迫的制约,如生物胁迫(病虫害^[2]等)和非生物胁迫(低温^[3]、干旱^[4]和高温^[5]等)严重影响茶树的生长、产量及品质,因此,系统解析茶树抗性基因功能、挖掘核心遗传资源,并以此培育抗性新品种,是应对生物与非生物胁迫、保障茶叶产业可持续发展的重要策略。由于茶树富含多酚类等活性物质,其外植体在组织培养过程中易褐化,再生体系建立难度较大,制约了基因功能的进一步研究^[6]。目前,根癌农杆菌介导的烟草瞬时表达技术因其试验周期短、结果可靠和操作简便的优势,已成为茶树功能基因研究的常见手段,广泛用于外源基因表达、蛋白质相互作用、启动子活性鉴定以及蛋白亚细胞定位等多个方面的研究^[7-8]。

WAK蛋白激酶(wall-associated kinase)是一类结构特殊的受体蛋白激酶,具有典型的胞外结构域、跨膜结构域和胞内结构域。作为目前已知的唯一连接细胞壁与质膜的受体样蛋白激酶^[9],其在感知细胞壁基质的变化并将信号传递到细胞质中发挥着重要作用,从而参与调控植物生长发育以及应对生物和非生物胁迫响应^[10]。WAK基因家族已在多种植物中得到研究,如棉花^[11-12]、芜菁^[10]、水稻^[13-14]、车前草^[15]、番茄^[16]、大麻^[17]、芝麻^[9]、苜蓿^[18]、月季^[19]和苋菜^[20]等。该家族基因的功能多种多样,如玉米 WAK 基因在低温、盐胁迫、干旱、涝害、病虫害等方面均起重要作用^[21]。在棉花中发现, *GhWAKL26* 上游启动子区域含有丰富的 ABA 响应元件,该基因通过平衡 Na^+/K^+ 积极调节棉花的耐盐

性,以抵消盐胁迫引起的损害^[22]。这些结果均表明, WAK 在植物响应非生物胁迫过程中扮演着重要角色。

课题组前期对茶树 WAK 基因家族进行了初步研究^[23],茶树 *CsWAK* 家族包含 27 个成员,且具有组织表达特异性,并在不同胁迫条件下表现出不同的表达模式。部分家族基因能响应多种逆境胁迫,其中 *CsWAK1*、*CsWAK8*、*CsWAK13*、*CsWAK14*、*CsWAK22*、*CsWAK23* 和 *CsWAK25* 等 7 个基因能同时响应低温和干旱胁迫。*CsWAK14* 对盐胁迫最为敏感,在高盐处理 4 h 后其表达量显著降低。Wu 等^[24]的研究表明,低温可快速诱导 *CsWAK12* 表达,其表达量在 4 °C 处理 3 h 后达到峰值。在拟南芥中异源过表达 *CsWAK12*,正常条件下可通过增加根长与种子大小促进植株生长,但与野生型相比其耐寒性有所降低。此外还发现, *CsWAK12* 通过介导 CBFs 通路降低转基因拟南芥的耐寒性。相似的结果在 *CsWAK8* 的相关研究中也观察到^[25]。*CsWAK* 家族基因功能的差异往往归因于启动子中调控元件的功能多样性^[26]。然而,启动子的功能鉴定较为困难,目前主要通过表达进行验证。在植物研究中,常用的外源报告基因包括 *GUS*、*GFP* 和 *LUC* 等。陈烨等^[27]通过构建连接 *GUS* 基因的全长和截短型启动子,分析了启动子的功能和活性,表明 *CsCAT2* 全长启动子具有最强的启动活性,而截短型启动子的活性随长度减少而降低。

纵观现有研究,现阶段尚无针对 *CsWAK12* 基因启动子的功能分析,其转录活性与逆境胁迫响应模式均未见报道。为此,本研究以 *CsWAK12* 为核心研究对象,通过克隆 *CsWAK12* (登录号:

CSS0006198.1)的上游启动子序列,构建启动子不同截短片载体,利用烟草叶片瞬时表达系统分析其活性,同时系统检测 CsWAK12 对多种胁迫和激素的响应特征,以期阐明 CsWAK12 在植物抗逆分子网络中的功能奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选取安徽省农业科学院茶叶研究所茶树种质资源圃种植的茶树品种‘冷敏1号’为试验材料,春季对其幼嫩新梢(一芽二叶)进行采样,样品采集后迅速液氮速冻处理,保存于-80℃超低温冰箱,用于后续基因组DNA的提取与启动子克隆。本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)种植于人工气候培养室中,培养条件为:温度(25±1)℃,湿度(60±5)%,光周期为16 h光照/8 h黑暗,光照强度为5 000 lx。本试验所用植物双元表达载体 pCambia3301-35S-GUS,由安徽省农业科学院茶叶研究所分子实验室保存。GUS 染色液和脱落酸(ABA),购自北京

酷来搏科技有限公司;聚乙二醇(PEG-6 000)和氯化钠及其他常规试剂,均为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 茶树 CsWAK12 基因启动子序列获取与顺式作用元件分析 基于 TPIA 数据库(<http://tpia.teaplants.cn/index.html>)中茶树基因组数据,使用生物信息学软件 TBtools 提取 CsWAK12 基因转录起始位点(TSS)上游2 000 bp的启动子序列,并于植物顺式作用元件在线分析平台 JASPAR(<https://jaspar.elixir.no/>),对该段启动子序列中顺式作用调控元件进行系统预测与分析,以确定潜在胁迫响应元件的种类及核心启动子元件的位置。

1.2.2 缺失启动子片段引物设计与合成 为构建用于功能验证的全长(命名为p1)和5'端缺失启动子片段(依次命名为p2、p3、p4和p5),利用NCBI的Primer-BLAST在线工具(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)设计特异性引物。本研究所用引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物具体信息详见表1。

表1 启动子序列克隆及载体构建引物
Table 1 Primers for promoter sequence cloning and vector construction

引物名称 Primer name	引物序列 5'→3' Primer sequences 5'→3'
CsWAK12-p1-F	aagtctggcgggctggtg
CsWAK12-p2-F	gacaaaaccaaccaatcaacc
CsWAK12-p3-F	ttgatgtgggaaaaagtgc
CsWAK12-p4-F	atgggggaaagtatagtaagatga
CsWAK12-p5-F	aggggctgatgagtagttatgagt
CsWAK12-p-R	agccgctttctgtgttc
CsWAK12-p1-F-GUS	AGCTATGACCATGATTACGCAAGCTTaagtctggcgggctggtg
CsWAK12-p2-F-GUS	AGCTATGACCATGATTACGCAAGCTTgacaaaaccaaccaatcaacc
CsWAK12-p3-F-GUS	AGCTATGACCATGATTACGCAAGCTTttgatgtgggaaaaagtgc
CsWAK12-p4-F-GUS	AGCTATGACCATGATTACGCAAGCTTatgggggaaagtatagtaagatga
CsWAK12-p5-F-GUS	AGCTATGACCATGATTACGCAAGCTTaggggctgatgagtagttatga
CsWAK12-p-R-GUS	ACGTAACATAAGGGACTGACCACCCGagccgctttctgtgttc

1.2.3 启动子序列的克隆和生物信息学分析 应用多糖多酚植物基因组DNA提取试剂盒(DP360,天根生化科技有限公司)提取茶树‘冷敏1号’叶片基因组DNA,并以此为启动子克隆的模板,使用高保真KOD酶(购自TOYOBO)进行扩增,以获取CsWAK12基因的启动子全长序列。PCR产物经凝胶回收后,连接至pEASY-Blunt载体(北京全式金生物技术有限公司),并转入大肠杆菌DH5α菌株(上海唯地生物技术有限公司),经平板抗性筛选、PCR菌落鉴定及测序验证,获得准确的启动子全长序列;基于此序列以及其顺式作用元件的生物信息学分析结果,设计4对截短引物p2~p5(表1),用于

扩增不同长度的5'端缺失型启动子片段。所有缺失型片段经测序确认后,进一步设计带有同源重组臂的引物(表1),用于后续报告基因载体的构建。

1.2.4 植物双元表达载体构建 将凝胶回收的启动子片段p1~p5,与经HindⅢ和BglⅡ限制性内切酶(生工生物工程股份有限公司)双酶切的pCAM-BIA3301-35S-GUS载体进行同源重组。随后,将重组产物转化至大肠杆菌DH5α菌株中,经测序验证序列正确的阳性克隆,命名为CsWAK12-p(1~5)-GUS。提取上述质粒,转化至根癌农杆菌GV3101(上海唯地生物技术有限公司)。将转化后的农杆菌涂布于含卡那霉素(50 mg/L)和利福平

(25 mg/L)的LB平板上,置于28℃培养箱中培养2 d。经菌落PCR验证,将阳性菌落置于28℃、200 r/min摇床过夜培养扩增,用于后续试验。

1.2.5 烟草叶片瞬时表达 参考已发表的烟草瞬时表达方法^[28],弃上清,离心收集活化后的根癌农杆菌菌液。用侵染缓冲液(100 μmol/L AS、10 mmol/L MgCl₂和10 mmol/L MES-KOH)将菌液OD₆₀₀调整至0.6~0.8,28℃静置0.5 h。选取生长4周龄本氏烟草完全展开的叶片,以1 mL注射器针头在叶片背面叶脉分支处穿刺,用无针头注射器吸取100 μL菌液,通过穿刺点注入叶片下表皮间隙。注射处理后的烟草植株置于人工气候室暗培养24~48 h,以促进农杆菌的早期附着与转化;随后转入正常光周期条件下培养48~72 h,使报告基因充分表达,之后取样用于后续试验。试验设3个生物学重复,每个生物学重复包括1株苗。

1.2.6 启动子截短片活性验证和胁迫处理 为分析CsWAK12启动子全长(p1)及其4个截短片(p2~p5)的活性,将1.2.5节中制备的瞬时转化烟草样本分为两组:一是活性验证组,进行GUS组织化学染色,以比较不同截短片的基础活性;二是胁迫处理组,经标准培养条件适应后,以探究启动子活性对不同胁迫的响应。进行如下非生物胁迫处理:(1)冷胁迫,将植株置于4℃恒温培养箱中;(2)盐胁迫,使用200 mmol/L NaCl溶液浸润新鲜的第4片叶;(3)模拟干旱胁迫,使用200 mg/L PEG-6000溶液浸润叶片;(4)植物激素胁迫,于叶片注射部位喷施0.1 mmol/L的脱落酸(ABA),控制喷施量至叶面充分润湿且水滴落。每个处理均设置阴性对照和阳性对照,其中阴性对照为无启动子的空载GUS载体,用于排除植物内源本底酶活干扰;阳性对照为35S::GUS载体,作为强启动子活性参照,验证检测体系的有效性。所有处理均施加于叶片单侧的注射区域,取样部位与处理区域一致,均于处理3 h后取样。除冷胁迫处理外,其余处理后的烟草均于人工气候室培养,条件均设置为:温度(25±1)℃,湿度(60±5)%,光周期16 h光照/8 h黑暗,光照强度5 000 lx。每种处理及对照均设置3个生物学重复,每个生物学重复包括1株苗。

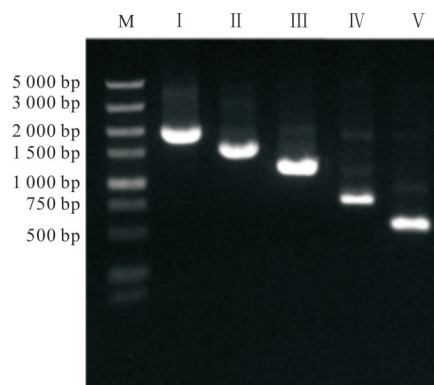
1.2.7 GUS组织化学染色 参考已报道的方法^[29]进行GUS染色,将处理后的烟草叶片浸泡于新配制的GUS染色试剂(北京酷来搏科技有限公司)中,并转移至真空干燥器中抽真空10 min,以确保染色液

充分渗入组织,随后于37℃恒温避光孵育24 h。染色结束后弃去染色液,用蒸馏水清洗烟草叶片1次,随即转入体积分数75%乙醇中,于37℃条件下进行脱色处理,其间多次更换乙醇,直至叶绿素完全脱除。脱色完成后对叶片进行拍照,并对染色结果进行记录与分析。

2 结果与分析

2.1 CsWAK12启动子克隆及双元表达载体的构建

以TPIA数据库中CsWAK12启动子上游2 000 bp为参考序列,使用NCBI设计特异引物,以‘冷敏1号’茶叶叶片基因组DNA为模板,进行CsWAK12启动子片段的PCR克隆。经琼脂糖凝胶电泳检测,获得长度约2 000 bp的条带(图1)。将该条带回收纯化后,连接至克隆载体并转化大肠杆菌DH5α感受态细胞,经菌落PCR筛选后进行测序验证。通过DNAMAN软件将测序所得序列与参考序列进行比对,结果为CsWAK12基因起始密码子ATG上游-1 933~-24 bp的启动子序列,长度共计1 910 bp,与参考基因组的匹配率为93.9%。将该克隆片段命名为CsWAK12-p1,并用于后续启动子功能分析。



M. 5 000 bp Maker; I ~ V. CsWAK12启动子全长p1及截短片p2~p5。

M. 5 000 bp Maker; I ~ V. The full length of p1 and truncated fragments p2~p5 of CsWAK12 promoter, respectively.

图1 CsWAK12启动子全长及截短片段的构建

Fig. 1 Construction of full length and truncated fragments CsWAK12 promoters

为解析CsWAK12启动子的潜在调控功能,采用JASPAR在线工具对其序列进行顺式作用元件分析。结果表明,该启动子片段共包含291个与茶树响应外界信号相关的顺式作用元件(表2),其中数量最多的是光响应(含光调控)元件(41个),其次

为开花相关元件(22 个)。此外,还包含多种非生物胁迫响应元件,如热激、盐、低温以及干旱等。同时,也检测到多种激素响应元件,包括细胞分裂素(34 个)、脱落酸(24 个)和赤霉素(7 个)等。

表 2 茶树 CsWAK12 的主要顺式作用元件
Table 2 Key cis-acting elements in the CsWAK12 promoter of tea plant

位点名称 Site name	序列 Sequence	频次 Frequency	功能 Function
ARR1AT	NGATT	34	ARR1 结合元件;细胞分裂素响应元件 ARR1 binding element;Cytokinin-responsive element
DOFCOREZM	AAAG	28	Dof 蛋白核心结合位点;碳代谢调控 Dof protein core binding site;Carbon metabolism regulation
CAATBOX1	CAAT	25	热激元件 Heat shock element
CACTFTPPCA1	YACT	24	叶肉表达模块关键组分 Key component of mesophyll expression module
GT1CONSENSUS	GRWAAW	23	光响应元件 Light-responsive element
POLLEN1LELAT52	AGAAA	15	花粉特异性表达相关 Pollen-specific expression-related element
MARTBOX	TTWTWTTWTT	15	开花植物基因表达调控元件 Regulatory element for gene expression in flowering plants
GTGANTG10	GTGA	13	果胶裂解酶启动子同源基序 Homologous motif of the pectate lyase promoter
POLASIG3	AATAAT	13	植物多腺苷酸化信号的共有序列 Consensus sequence of plant polyadenylation signals
EBOXBNNAPA	CANNTG	12	MYC 识别位点;低温/干旱/ABA 响应元件 MYC recognition site; Low temperature/drought/ABA-responsive element
TATABOX5	TTATTT	12	谷氨酰胺合成酶基因启动子同源基序 Homologous motif of the glutamine synthetase gene promoter
GATABOX	GATA	12	光响应元件 Light-responsive element
MYCONSENSUSAT	CANNTG	12	MYC 识别位点;低温/干旱/ABA 响应元件 MYC recognition site; Low temperature/drought/ABA-responsive element
ROOTMOTIFTAPOX1	ATATT	11	内质网免疫球蛋白结合蛋白基因启动子同源基序 Homologous motif of the endoplasmic reticulum immunoglobulin-binding protein gene promoter
CCAATBOX1	CCAAT	10	热激元件 Heat shock element
WRKY71OS	TGAC	7	赤霉素信号通路转录抑制因子 WRKY71 的结合位点 Binding site of WRKY71, a transcriptional repressor in the gibberellin signaling pathway
POLASIG1	AATAAA	7	开花植物基因表达调控元件 Regulatory element for gene expression in flowering plants
IBOXCORE	GATAA	6	光调控 Light-regulatory element
GT1GMSCAM4	GAAAAA	6	病原体和盐响应原件 Pathogen-and salt-responsive element
CURECORECR	GTAC	6	铜响应元件;氧响应元件 Copper-responsive element; Oxygen-responsive element

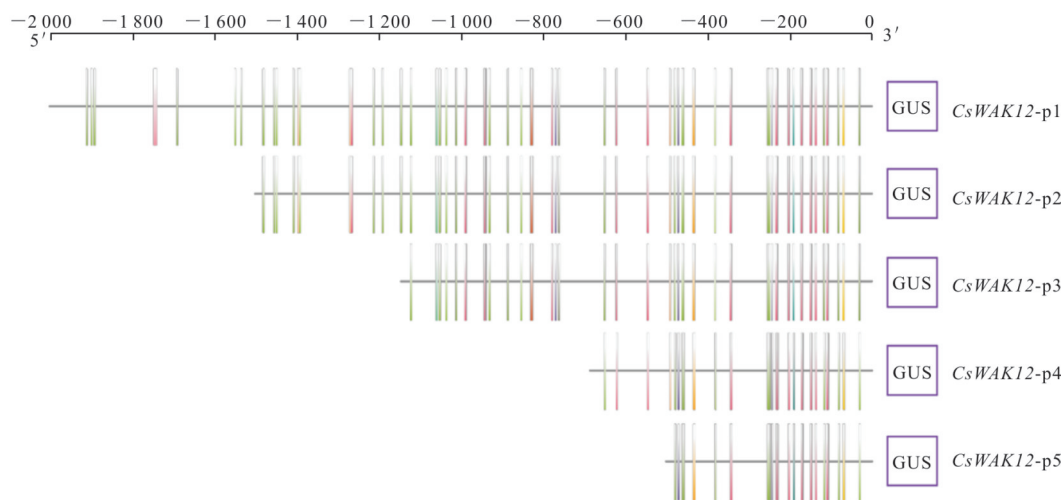
注:第 2 列“序列”中“R”为“A 或 G”;“W”为“A 或 T”;“N”为“A、C、G 或 T”;“Y”为“C 或 T”。
Note:In the “Sequence” column,R stands for A or G;W stands for A or T;N stands for A,C,G or T;Y stands for C or T.

基于已克隆的 CsWAK12 启动子顺式作用元件的分布情况,设计了 4 个 5′端截短的启动子突变体(图 1 和图 2)。通过 PCR 扩增获得启动子全长及一系列 5′端截短片段的克隆,分别命名为:CsWAK12-p1(−1 909~−24 bp)、CsWAK12-p2(−1 489~−24 bp)、CsWAK12-p3(−1 101~−24 bp)、CsWAK12-p4(−702~−24 bp)和 CsWAK12-p5(−464~−24 bp)。随后,使用同源重组法将扩增产物连接至 pCAMBIA3301-GUS 报告载体上,并对构建成功的单克隆进行测序验证,确认序列正确后,用于烟草瞬时表达试验以分析不同截短片段的启动子活性。结果显示,在−1 100~−700 bp 和−300~0 bp 区域,顺式作用元件分布较为密集(图 2)。基于上述结果,推测 CsWAK12 基因可能在植物

响应不同非生物胁迫过程中发挥着重要作用。
2.2 CsWAK12 启动子及截短突变体在烟草中的瞬时表达与 GUS 染色分析
为了探究 CsWAK12 启动子不同长度片段的功能,将测序验证成功的系列 5′端截短突变体(构建在 pCAMBIA3301-GUS 载体上)转化到根癌农杆菌 GV3101 中,利用烟草瞬时转化系统进行启动子的活性分析。结果(图 3,4)表明,全长启动子(CsWAK12-p1)及 2 个截短片段(CsWAK12-p2 和 CsWAK12-p4)瞬时侵染的烟草叶片均呈现出肉眼明显可见的蓝色,证实 CsWAK12 具备驱动下游 GUS 基因表达的启动子活性。其中,全长启动子处理中染色最深,且其活性显著高于其他启动子片段;CsWAK12-p2 的活性稍强于 CsWAK12-p4,表

明其启动子活性略高。值得注意的是,一个位于其上游特定位置(−1 101~−701 bp)的强效抑制元件几乎完全阻断了 *CsWAK12*-p3 的转录活性,同时压

制了下游区域(−702~−464 bp)本身存在的激活功能。此外,未检测到 *CsWAK12*-p5 的 GUS 染色信号,表明其不具备启动子活性。



彩色竖线标示启动子序列中各类顺式调控元件的位置。

Colored vertical bars indicate the positions of various cis-acting regulatory elements in the promoter sequence.

图 2 *CsWAK12* 启动子系列缺失片段载体构建示意图

Fig. 2 Schematic diagram of serial deletion fragments of the *CsWAK12* promoter

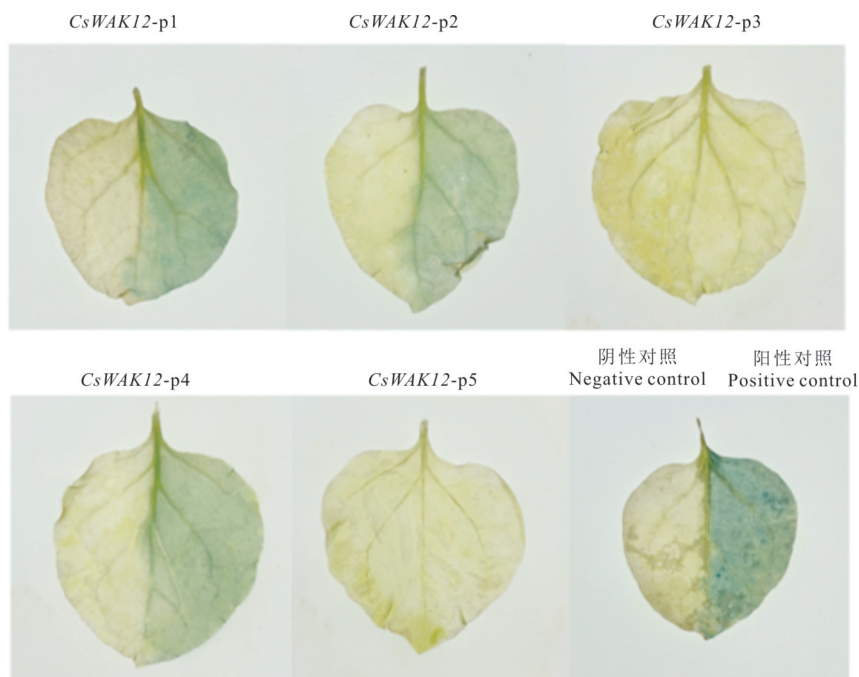


图 3 *CsWAK12* 启动子不同片段瞬时表达烟草的 GUS 染色

Fig. 3 GUS staining in tobacco leaves transiently transformed with different truncated fragments of the *CsWAK12* promoter

2.3 *CsWAK12* 基因启动子片段对不同胁迫和激素处理的响应

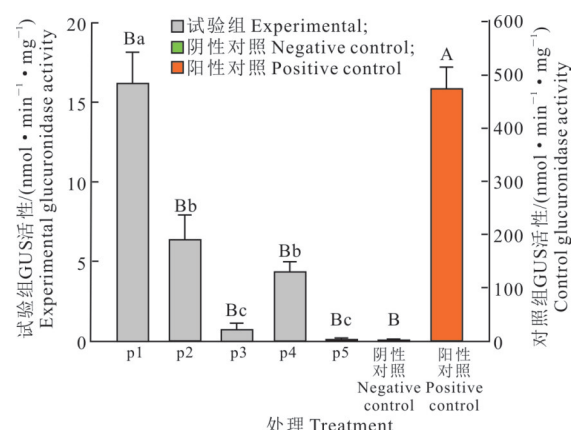
为深入探究启动子在激素和各种胁迫处理下的响应模式,本研究选取生长状态一致的 4 叶期烟草植株进行农杆菌介导的瞬时转化,并通过 GUS 组织化学染色分析各启动子片段于处理后的活性变

化。图 5 显示, *CsWAK12*-p3 和 *CsWAK12*-p5 在各种处理下的染色结果均与阴性对照无明显差异,因此后续分析主要聚焦于 *CsWAK12*-p1、*CsWAK12*-p2 和 *CsWAK12*-p4 等 3 个启动子片段。结合图 5 和图 6 可知,在 4 ℃ 低温处理下,与 *CsWAK12*-p1 和 *CsWAK12*-p2 相比, *CsWAK12*-p4 片段在烟草叶片

中的染色明显加深;同时与常温处理结果(图4)相比, *CsWAK12*-p4 片段活性上升明显,表明其启动子活性在冷胁迫下受到显著诱导。

图5还表明,在ABA处理下,不同启动子片段响应不一,其染色强度表现为 *CsWAK12*-p2 $\approx$ *CsWAK12*-p4>*CsWAK12*-p1;与对照(图4)相比, *CsWAK12*-p2 与 *CsWAK12*-p4 的启动子活性均有所增强,而 *CsWAK12*-p1 的活性则有所降低(图6)。由图6可知,各片段对盐胁迫处理也存在差异响应,其转录活性依次表现为 *CsWAK12*-p4>*CsWAK12*-p1>*CsWAK12*-p2,其中 *CsWAK12*-p4 的活性大于常温对照(图4),说明其活性在盐胁迫下被特异性诱导。在PEG模拟干旱胁迫下, *CsWAK12*-p1、*CsWAK12*-p2 和 *CsWAK12*-p4 的活性均高于其他处理,其中 *CsWAK12*-p2 的响应最为显著,且其GUS显色水平在所有处理中最高(图5和图6)。综上推测, *CsWAK12*-p2 可能在ABA和干旱胁迫下发挥主要调控作用,而 *CsWAK12*-p4 则更倾向于响应低温及盐胁迫。因此, *CsWAK12* 启动子内部不同区段可能参与调控多条逆境响应通路,

从而赋予该基因环境胁迫特异性的表达调控模式。



图柱上不同大写字母表示所有组相比差异显著($P<0.05$),不同小写字母表示各试验组间差异显著($P<0.05$)。图6同。

Different uppercase letters above the columns indicate significant differences among all groups ($P<0.05$), while different lowercase letters indicate significant differences among the experimental groups ($P<0.05$). Same as Fig. 6.

图4 *CsWAK12* 启动子不同片段瞬时表达烟草GUS活性的比较

Fig. 4 Comparison of GUS enzyme activities in transiently-expressed tobacco driven by different fragments of the *CsWAK12* promoter

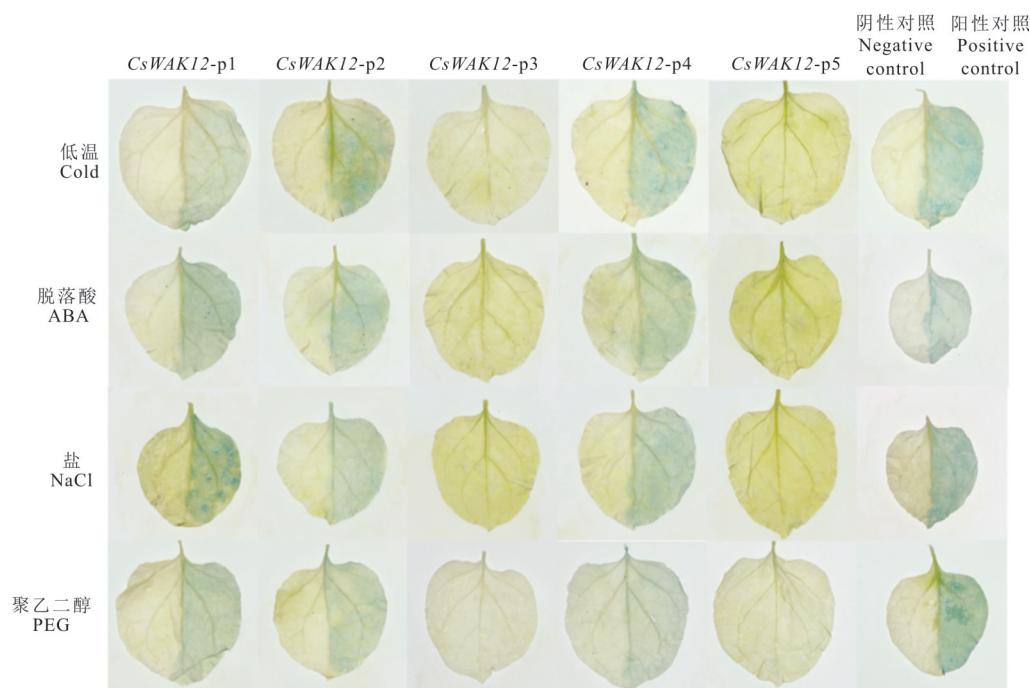


图5 不同胁迫下 *CsWAK12* 启动子片段烟草瞬时表达的GUS染色

Fig. 5 GUS staining of tobacco leaves transiently transformed with truncated *CsWAK12* promoter fragments under various stresses

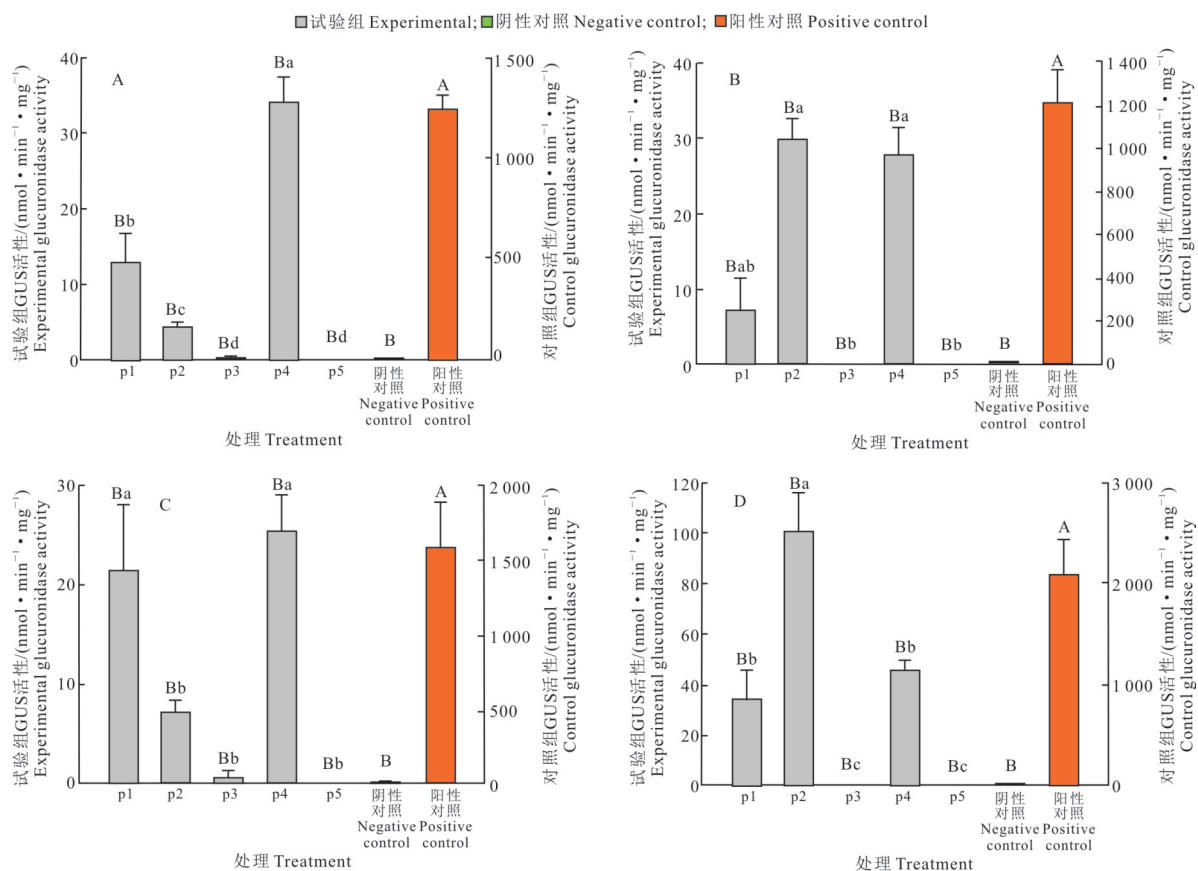
3 讨论

启动子是调控基因时空特异性表达的关键DNA元件^[30],在驱动基因表达中发挥着核心作用。

通常,通过解析基因上游约2 000 bp启动子区域的顺式作用元件,可预测基因的潜在生物学功能。植物细胞壁相关激酶(WAK)是类受体蛋白激酶(RLK)家族中一类特殊的激酶,参与植物对多种胁迫

迫的应答过程^[12-13]。本研究以茶树 *CsWAK12* 基因为研究对象,克隆其上游启动子序列并构建一系列截短突变体,结合烟草瞬时表达系统,系统解析了

该基因响应多种非生物胁迫的转录调控机制,旨在阐明茶树平衡生长发育与逆境抗性的分子策略。



A. 低温(4 °C); B. 脱落酸; C. 盐胁迫; D. 聚乙二醇。

A. Cold (4 °C); B. Absciscic acid (ABA); C. Salt stress; D. Polyethylene glycol (PEG).

图 6 不同胁迫下 *CsWAK12* 启动子片段烟草 GUS 活性分析

Fig. 6 GUS activity in tobacco leaves transiently transformed with truncated *CsWAK12* promoter fragments under various stresses

已有研究表明,棉花 *WAK* 家族基因的启动子区域包含植物激素及非生物胁迫响应相关元件^[11],本研究通过对 *CsWAK12* 基因上游 1 910 bp 克隆获得的启动子序列顺式作用元件进行系统分析,不仅发现该区域同样富含多种植物激素及非生物胁迫响应相关元件,还检测到多个光响应元件。这一特征与 *CsWAK* 基因家族在胁迫条件下呈现差异表达的特性^[23-25]高度一致,同时暗示 *CsWAK12* 可能在茶树适应复杂环境胁迫过程中发挥着重要调控作用。

启动子 5' 端系列截短片活性分析可初步定位核心调控区域与关键顺式元件,解析基因转录调控模式,为阐明其逆境应答及表达调控机制提供关键依据^[31]。本研究发现,在所有胁迫处理(低温、干旱、盐、ABA)下, *CsWAK12*-p3(-1 101~-24 bp)与 *CsWAK12*-p5(-464~-24 bp)均无活性,而

CsWAK12-p4(-726~-24 bp)则显著被诱导。据此推测, *CsWAK12* 启动子发挥功能所必需的核心响应模块位于 -726~-464 bp。缺失该模块的 *CsWAK12*-p5 片段不仅常温下完全丧失转录活性,低温、盐胁迫及 ABA 处理后亦无诱导激活效应,表明该区域是驱动 *CsWAK12* 基础转录不可或缺的结构基础,同时该序列内含有介导低温、盐胁迫及 ABA 应答的功能元件。尽管上述核心模块具有活性潜力,但其在启动子中的功能行使仍受到上游序列的严格约束与精准调控。这在本研究结果中得到证实,即 -1 101~-701 bp 存在一个强效抑制元件,其在常温下显著抑制下游转录,导致 p3 片段完全失活;相较于全长 *CsWAK12*-p1,截除 -1 909~-1 488 bp 区段的 *CsWAK12*-p2 活性已显著下降,说明 -1 909~-1 488 bp 区段包含正向激活元件。

在此基础上,去除-1 101~-701 bp抑制区段后得到的CsWAK12-p4活性明显回升,但仍显著低于全长启动子CsWAK12-p1,证明-1 909~-1 488 bp区段除激活元件外,同样存在转录抑制序列,整体形成拮抗调控效应。综上,CsWAK12基因启动子的转录活性受多区段协同调控:上游-1 909~-1 488 bp、-1 101~-701 bp构成兼具正向激活与负向抑制效应的调控框架,下游-726~-464 bp为启动子发挥功能必需的核心胁迫响应模块,二者共同决定该基因的转录水平。

启动子不同区域可响应不同逆境胁迫,呈现差异化的转录活性调控^[26]。低温与盐胁迫条件下,核心区域CsWAK12-p4表现出最为强烈的胁迫响应,而在脱落酸(ABA)及干旱胁迫(PEG)处理下,CsWAK12-p2的启动子活性最高,该结果表明不同环境信号可通过靶向不同顺式作用元件实现对CsWAK12基因的精准调控。全长启动子CsWAK12-p1能够整合各类调控元件的信号信息,在不同逆境胁迫下均表现出平衡且适中的活性波动,从而维持基因表达的稳定性与动态可塑性。这一调控结构赋予CsWAK12以相对简洁的序列,具有对多种环境信号的精确识别与差异化转录输出能力。

综上,本研究对不同胁迫处理下CsWAK12基因启动子及其缺失片段的GUS活性进行了检测,虽然筛选出了响应多种胁迫的关键核心区域,然而仍未鉴定出参与胁迫应答的关键顺式作用元件,亦未阐明下游基因表达的调控模式(促进或抑制)是源于单一顺式元件的独立调控,还是多个顺式元件的协同作用。未来可借助启动子元件缺失分析技术,系统解析顺式作用元件的生物学功能,精准定位CsWAK12启动子应答不同逆境胁迫的核心元件,为后续深入阐明CsWAK12启动子的功能及其表达调控的分子机制提供坚实的理论支撑。

4 结 论

本研究成功克隆并解析了CsWAK12上游启动子序列,证实其富含逆境响应顺式作用元件。功能分析表明,下游-726~-464 bp是逆境响应的必需区段,其缺失会导致转录活性丧失;-1 101~-701 bp区段具有显著抑制作用,且受胁迫信号的特异性调节。低温与盐胁迫可激活CsWAK12-p4片段,而干旱与ABA胁迫能增强CsWAK12-p2片段的活

性,全长启动子可整合调控信号以维持稳定表达。本研究从转录层面揭示了CsWAK12抗逆的分子基础,丰富了茶树WAK基因抗逆调控理论,为茶树抗性研究提供了重要基因资源。

[参考文献]

- [1] Chen R H, Lai X F, Wen S, et al. Analysis of tea quality of large-leaf black tea with different harvesting tenderness based on metabolomics[J]. Food Control, 2024, 163: 110474.
- [2] Wang J Z, Gong Y K, Li M, et al. A CsWRKY48 gene from tea plants intercropped with Chinese chestnut plays an important role in resistance to biotic and abiotic stresses[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(24): 13526.
- [3] Ban Q Y, Wang X W, Pan C, et al. Comparative analysis of the response and gene regulation in cold resistant and susceptible tea plants[J]. PLoS One, 2017, 12(12): e0188514.
- [4] Jin J Y, Zhao M Y, Gao T, et al. Amplification of early drought responses caused by volatile cues emitted from neighboring tea plants[J]. Horticulture Research, 2021, 8: 243.
- [5] 郭薪莹,陈强,连玲丽,等. 茶树TLP家族基因鉴定及其对高温干旱和炭疽菌侵染的响应[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2023, 52(3): 309-316.
- Guo X Y, Chen Q, Lian L L, et al. Identification of TLP gene family in *Camellia sinensis* and their expression pattern under high temperature, drought stress and *Colletotrichum gloeosporioides* infection[J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition), 2023, 52(3): 309-316.
- [6] 焦小雨,王雷刚,刘丹丹,等. 茶树遗传转化研究进展[J]. 植物科学学报, 2021, 39(4): 446-456.
- Jiao X Y, Wang L G, Liu D D, et al. Research progress on genetic transformation of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze[J]. Plant Science Journal, 2021, 39(4): 446-456.
- [7] 姜银银,唐亚楠,谭宇萍,等. 一种植物多基因表达体系的构建及功能验证[J]. 中国中药杂志, 2025, 50(12): 3291-3296.
- Jiang Y Y, Tang Y N, Tan Y P, et al. Construction of a multi-gene expression system for plants and verification of its function[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2025, 50(12): 3291-3296.
- [8] 李晓飞,周文菲,唐磊,等. 茶树CsMPC基因家族鉴定及胁迫表达分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2026, 54(5): 21-31.
- Li X F, Zhou W F, Tang L, et al. Identification of the CsMPC gene family and analysis of expression under stress in tea plants[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2026, 54(5): 21-31.
- [9] Yan W Q, Hu P L, Ni Y X, et al. Genome-wide characterization of the wall-associated kinase-like (WAKL) family in sesame (*Sesamum indicum*) identifies a SiWAKL6 gene involved in resistance to *Macrophomina phaseolina*[J]. BMC Plant Biology, 2023, 23(1): 624.
- [10] Zhang B, Su T B, Xin X Y, et al. Wall-associated kinase

- BrWAK1 confers resistance to downy mildew in *Brassica rapa* [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2023, 21(10): 2125-2139.
- [11] Zhang Z Q, Ma W Y, Ren Z Y, et al. Characterization and expression analysis of wall-associated kinase (WAK) and WAK-like family in cotton [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 187: 867-879.
- [12] Gao S Q, Zhang Z Q, Zhao Y H, et al. Cell wall-associated receptor kinase GhWAKL26 positively regulates salt tolerance by maintaining Na^+ and K^+ homeostasis in cotton [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2024, 226: 105926.
- [13] Huluka W, Kumsa L. Analysis of rice (*Oryza sativa* L. ssp. Japonica) wall associated receptor-like protein kinase gene's promoter region and regulatory elements [J]. *Current Plant Biology*, 2022, 31: 100254.
- [14] 田建红, 刘燕, 尹梦琪, 等. 水稻 *OsWAK16* 通过调节抗氧化酶活性调控种子抗老化能力 [J]. *植物学报*, 2025, 60(1): 17-32.
- Tian J H, Liu Y, Yin M Q, et al. *OsWAK16* regulates seed anti-aging ability by modulating antioxidant enzyme activity in rice [J]. *Bulletin of Botany*, 2025, 60(1): 17-32.
- [15] Chen P L, Giarola V, Bartels D. The *Craterostigma plantagineum* protein kinase CpWAK1 interacts with pectin and integrates different environmental signals in the cell wall [J]. *Planta*, 2021, 253(5): 92.
- [16] Sun Z Y, Song Y P, Chen D, et al. Genome-wide identification, classification, characterization, and expression analysis of the wall-associated kinase family during fruit development and under wound stress in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) [J]. *Genes*, 2020, 11(10): 1186.
- [17] Sipahi H, Whyte T D, Ma G, et al. Genome-wide identification and expression analysis of wall-associated kinase (WAK) gene family in *Cannabis sativa* L. [J]. *Plants*, 2022, 11(20): 2703.
- [18] Kong W Y, Shi J, Yang B, et al. Genome-wide analysis of the Wall-associated kinase (WAK) genes in *Medicago truncatula* and functional characterization of *MtWAK24* in response to pathogen infection [J]. *Plants*, 2023, 12(9): 1849.
- [19] Liu X T, Wang Z C, Tian Y, et al. Characterization of wall-associated kinase/wall-associated kinase-like (WAK/WAKL) family in rose (*Rosa chinensis*) reveals the role of *RcWAK4* in *Botrytis* resistance [J]. *BMC Plant Biology*, 2021, 21(1): 526.
- [20] 杨蓉芝. 苋菜 WRKY 转录因子家族成员鉴定及 *AtrWRKY42-2* 调控甜菜色素合成机制的研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2024.
- Yang R Z. Identification of WRKY transcription factor family members in amaranth and study on mechanism of *AtrWRKY42-2* regulation of betalain synthesis [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2024.
- [21] Li X N, Bi Y W, Feng H Y, et al. Roles of maize WAK gene family in responses to abiotic and biotic stresses, and hormonal treatments [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2025, 16: 1652811.
- [22] Yu Z P, Duan X B, Luo L, et al. How plant hormones mediate salt stress responses [J]. *Trends in Plant Science*, 2020, 25(11): 1117-1130.
- [23] 焦小雨, 吴琼, 刘丹丹, 等. 茶树细胞壁关联蛋白激酶基因家族的鉴定与表达分析 [J]. *农业生物技术学报*, 2023, 31(9): 1816-1831.
- Jiao X Y, Wu Q, Liu D D, et al. Identification and expression analysis of the wall-associated kinase gene family in *Camellia sinensis* [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2023, 31(9): 1816-1831.
- [24] Wu Q, Jiao X Y, Liu D D, et al. *CsWAK12*, a novel cell wall-associated receptor kinase gene from *Camellia sinensis*, promotes growth but reduces cold tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2024, 15: 1420431.
- [25] 焦小雨, 吴琼, 刘丹丹, 等. 茶树 *CsWAK8* 克隆及其在响应冷胁迫过程中的功能分析 [J]. *生物技术通报*, 2025, 41(2): 210-220.
- Jiao X Y, Wu Q, Liu D D, et al. Cloning and functional analysis of *CsWAK8* gene from *Camellia sinensis* during cold stress [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2025, 41(2): 210-220.
- [26] 宋想, 王璐瑶, 富博晓, 等. 高等植物启动子元件鉴定与合成研究进展 [J]. *植物学报*, 2024, 59(5): 691-708.
- Song X, Wang L Y, Fu B X, et al. Advances in identification and synthesis of promoter elements in higher plants [J]. *Bulletin of Botany*, 2024, 59(5): 691-708.
- [27] 陈烨, 单思杰, 钟磊坚, 等. 甜橙过氧化氢酶基因 *CsCAT2* 启动子克隆及活性分析 [J]. *农业生物技术学报*, 2024, 32(12): 2755-2763.
- Chen Y, Shan S J, Zhong L J, et al. Cloning and activity analysis of the *CsCAT2* promoter in *Citrus sinensis* [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2024, 32(12): 2755-2763.
- [28] 刘永惠, 沈一, 沈悦, 等. 花生干旱诱导型启动子 *AhMYB44-11-Pro* 的克隆与功能分析 [J]. *作物学报*, 2024, 50(9): 2157-2166.
- Liu Y H, Shen Y, Shen Y, et al. Cloning and functional analysis of drought-inducible promoter *AhMYB44-11-Pro* in peanut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2024, 50(9): 2157-2166.
- [29] Tang Y Q, Yan Y, Tie W W, et al. Transcriptional regulation of *MbACO2*-mediated ethylene synthesis during postharvest banana ripening [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2023, 200: 112325.
- [30] 刘路平, 胡雪洁, 祁金, 等. 大豆生育期基因 *E1* 和 *E2* 的启动子克隆及其表达模式分析 [J]. *中国农业科学*, 2025, 58(5): 840-850.
- Liu L P, Hu X J, Qi J, et al. Cloning of the promoters and analysis of expression patterns of maturity genes *E1* and *E2* in soybean [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2025, 58(5): 840-850.
- [31] Tang C N, Wan Abdullah W M A N, Wee C Y, et al. Promoter cis-element analyses reveal the function of α VPE in drought stress response of *Arabidopsis* [J]. *Biology*, 2023, 12(3): 430.

(责任编辑:温晓平)