

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2021.01.004

# ‘84K’杨组氨酸激酶基因 *PaHK3b* 的克隆及功能分析

鲁俊倩, 武舒, 钟姍辰, 张伟溪, 苏晓华, 张冰玉\*

(林木遗传育种国家重点实验室, 国家林业和草原局林木培育重点实验室, 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091)

**摘要:** [目的] 本研究克隆了银腺杨‘84K’ (*Populus alba* × *P. glandulosa* ‘84K’) 组氨酸激酶基因 *PaHK3b* 启动子及编码区, 并对其表达进行检测及功能鉴定, 为深入研究 *PaHK3b* 基因在杨树生长发育的调控作用提供线索, 为杨树分子育种及品种改良奠定基础。[方法] 根据毛果杨 (*P. trichocarpa* Torr. & Gray) 基因组信息, 设计引物克隆‘84K’杨组氨酸激酶基因 *PaHK3b* 启动子及 CDS 序列, 并对其保守结构域和启动子顺式作用元件进行分析; 同时, 对‘84K’杨进行植物激素处理 (10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ABA、10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA、10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  IBA、10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  GA3 及 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  水杨酸 (SA)) 及非生物胁迫处理 (42℃ 高温、0℃ 低温、200  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl 和 5% PEG6000), 利用实时定量 PCR (qRT-PCR) 方法检测 *PaHK3b* 基因表达情况与表达响应差异, 并采用原核表达方法初步确定 *PaHK3b* 基因的生物学功能。[结果] *PaHK3b* 基因编码框区长度为 3060 bp, 编码 1019 个氨基酸, *PaHK3b* 蛋白具有 CHASE、HisKA 和 REC 等典型的细胞分裂素受体结构域。*PaHK3b* 基因启动子序列中不仅含有大量 TATA 框和 CAAT 框常见核心元件, 还包含低温响应元件 LTR、防御与胁迫响应元件 TC-rich repeats、赤霉素响应元件 GARE-motif、水杨酸响应元件 TCA-element 等顺式作用元件, 这些元件与杨树的激素响应和逆境胁迫响应密切相关。qRT-PCR 分析表明: *PaHK3b* 基因在叶片中表达最高, 根部中等, 茎中最少; 另外, 与正常条件下相比, 在高温、低温、NaCl 及 PEG 处理时, *PaHK3b* 基因表达量与对照明显增高, 分别为对照的 2.67、2.61、2.28、1.87 倍; 用 IBA 诱导处理时, 基因表达量与对照相比差异不大, 而在 6-BA、ABA、GA3 及 SA 处理时, 基因表达量与对照相比均呈下调表达; 在添加 5%PEG6000 的 LB 液体培养基中, 转入 *PaHK3b* 基因原核表达载体的大肠杆菌菌株生长速度显著高于对照, 在添加 50~150  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl 的 LB 固体培养基上, 转入 *PaHK3b* 基因原核表达载体的大肠杆菌菌株单克隆生长均好于对照。[结论] ‘84K’杨 *PaHK3b* 基因启动子含有逆境和激素响应元件, 表明 *PaHK3b* 基因与杨树植物激素信号及非生物胁迫信号响应密切相关。经非生物胁迫处理、激素处理及原核表达证实, 杨树 *PaHK3b* 基因参与杨树植物激素信号响应, 并在其抗逆境胁迫过程中发挥重要调控作用。

**关键词:** 银腺杨‘84K’; 组氨酸激酶; 表达模式; 原核表达;

**中图分类号:** S792.11

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1001-1498(2021)01-0026-09

细胞分裂素是植物生长过程中的一类重要调控激素, 其主要通过双组分系统进行信号感知与传递, 参与芽的分化、根的生长、种子发育等过程, 且在低温、干旱及高盐等非生物胁迫的逆境响应中也发挥重要作用<sup>[1-4]</sup>。

植物双组分系统由组氨酸激酶 (Histidine Kinase, HK) 蛋白、组氨酸磷酸转移 (Histidine Phosphotransfer, HPT) 蛋白和反应调节 (Response Regulator, RR) 蛋白组成<sup>[5-6]</sup>。拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 组氨酸激酶由 *AHK2*、

收稿日期: 2020-03-12 修回日期: 2020-10-27

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31770710); 转基因生物新品种培育重大课题 (2018ZX08020002)

\* 通讯作者: 张冰玉, 博士, 研究员. 主要研究方向: 林木遗传育种. 电话: 010-62889654. E-mail: byzhang@caf.ac.cn

*AHK3* 和 *AHK4* (又名 *CRE1*) 编码, 与细胞分裂素结合对下游的 AHP (Arabidopsis HPTs) 蛋白和 ARR (Arabidopsis Response Regulators) 调节蛋白进行调节, 进而传递植物激素 (细胞分裂素、乙烯) 和非生物胁迫信号<sup>[2, 7-11]</sup>。研究表明, 组氨酸激酶基因在植物的生长发育中发挥重要的调控作用, 如 *AHK4* 对植物根的发育具有明显的调控作用<sup>[12]</sup>, *AHK3* 则对植物叶片的衰老和细胞分化起主导作用<sup>[13-15]</sup>, *AHK2* 和 *AHK3* 共同调节拟南芥的种子萌发和芽的生长<sup>[16]</sup>。另外, 组氨酸激酶基因在植物应对低温、干旱及高盐等非生物胁迫过程中也发挥重要作用<sup>[3-4]</sup>。Kang 等<sup>[17]</sup>发现, 拟南芥 *ahk2* 和 *ahk3* 单突变体比野生型个体抗旱性明显增强, 并且 *ahk2/ahk3* 和 *ahk3/ahk4* 双突变体比相应的单突变体抗旱。低温胁迫时, *ahk2/ahk3* 和 *ahk3/ahk4* 双突变体比野生型个体具有较高的抗冻性<sup>[18]</sup>, *ahk2* 和 *ahk3* 单突变体对干旱、盐胁迫、低温和强光等非生物胁迫的抗性比野生型植株显著增强<sup>[3, 18]</sup>。另外, 通过萌发试验发现, *ahk2*、*ahk3* 及 *ahk4* 单突变体对外源 ABA 高度敏感, 外源 ABA 对拟南芥组氨酸激酶基因具有负调控作用<sup>[3]</sup>。通过 *ahk2/ahk3* 双突变体和野生型植株全基因组表达分析比较发现, 组氨酸激酶基因在植物 ABA 调控的抗逆反应及非 ABA 调控的抗逆反应中均起重要作用<sup>[19]</sup>。在毛果杨 (*P. trichocarpa* Torr. & Gray) 基因组中鉴定出 1 个 *AHK2* 同源基因 *PtHK2*、2 个 *AHK3* 同源基因 *PtHK3a* 和 *PtHK3b*, 研究表明, 毛果杨 *PtHK2*、*PtHK3a* 和 *PtHK3b* 在杨树形成层发育过程中具有重要调控作用<sup>[20]</sup>。然而, 组氨酸激酶基因是否参与林木抗逆反应尚未见报道。

银腺杨‘84K’ (*P. alba* × *P. glandulosa* ‘84K’) 是我国从韩国引进的白杨派优良品种, 生长快、材质好、抗性强、适应性广, 是优良的绿化树种、生态树种和用材树种, 且因其易于组培及遗传转化, 成为林木基因工程的理想材料。本研究以银腺杨‘84K’为材料, 克隆了拟南芥 *AHK3* 同源基因 (*PaHK3b*) 的启动子及全长 CDS (coding sequence), 对其启动子元件及蛋白结构域进行了分析, 并对 *PaHK3b* 基因在高温、干旱、盐胁迫等非生物胁迫及不同植物激素处理下的表达进行了 qPCR 检测; 同时, 通过原核表达初步确定其生物学功能。该研究为利用组氨酸激酶基因进行杨树抗逆分子改良奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

银腺杨‘84K’。

### 1.2 试验方法

1.2.1 *PaHK3b* 基因的启动子克隆及序列分析 根据 Phytozome 网站上公布的毛果杨基因组信息, 查找基因上游启动子序列, 设计 *PaHK3b* 基因启动子区域特异性引物 *PaHK3b-pro-F* 和 *PaHK3b-pro-R* (表 1)。采用植物基因组 DNA 提取试剂盒 (TIANGEN, 北京) 提取‘84K’杨叶片总 DNA, 用常规 PCR 方法进行目的片段扩增, 用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳检测, 用胶回收试剂盒 (Axygen, 美国) 回收并纯化目的片段, 并连接到克隆载体 pMD<sup>TM</sup>19-T Vector (Takara, 日本) 转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  (TIANGEN, 北京), 经过蓝白斑培养基 (Amp<sup>+</sup>) 筛选, 挑取阳性单克隆送至生物公司 (中美泰和, 北京) 进行序列测定。利用在线软件 plantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 分析该基因启动子中含有的顺式作用元件。

1.2.2 *PaHK3b* 基因 CDS 的克隆及序列分析 采用 EASY spin Plus 植物 RNA 快速提取试剂盒 (Aidlab, 北京) 提取‘84K’杨叶片总 RNA, 并用 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (takara, 日本) 试剂盒进行反转录, 合成单链 cDNA。根据 Phytozome 网站上公布的毛果杨基因组信息, 设计 *PaHK3b* 基因全长 cDNA 的 PCR 扩增引物 *PaHK3b-F* 和 *PaHK3b-R* (表 1), 以单链 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增程序为 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 57 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 38 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min; 4 $^{\circ}$ C 保温。用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳检测, 用胶回收试剂盒 (Axygen, 美国) 回收纯化目的片段, 并连接到克隆载体 PLB-Vector (TIANGEN, 北京) 转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 涂含抗性 (Amp<sup>+</sup>) 平板, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养。挑取阳性单克隆送至生物公司 (中美泰和, 北京) 进行序列测定。利用在线软件 ExpasyProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 对 *PaHK3b* 基因序列特征进行分析, 使用 GOR4 在线工具 ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred\\_gor4.pl](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_gor4.pl)) 进行蛋白的二级结构进行预测, 利用 NCBI 在线工具 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 进行蛋白结构域分析。

1.2.3 ‘84K’杨非生物胁迫处理和激素处理 将带有顶端的‘84K’杨组培苗嫩茎(2~3 cm)切下,转接到生根培养基(1/2MS+0.02 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.05 mg·L<sup>-1</sup> IBA)中,培养于温度 24℃、光周期 16 h/8 h(光照/黑暗)、光照强度为 50 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> 人工气候培养室,28 d后,选取生长状态一致的组培苗,转移到装有 5 mL 1/2MS 液体培养基的玻璃管(直径 4 cm,高 20 cm)中继续培养。培养 5 d后,进行非生物胁迫处理和植物激素处理。非生物

胁迫处理分别为 42℃ 高温、0℃ 低温、200 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 和 5% PEG6000 处理,植物激素为脱落酸(ABA)、6-苄氨基嘌呤(6-BA)、吲哚丁酸(IBA)、赤霉素(GA3)及水杨酸(SA),浓度均为 10 μmol·L<sup>-1</sup>。NaCl、PEG6000 及植物激素处理方法为将药剂添加到 1/2MS 液体培养基中,以培养于 1/2MS 培养基中的组培苗为对照。各处理的时间均为 3 h,每个处理 3 个生物学重复,处理后取成熟叶片,液氮速冻保存于 -80℃ 超低温冰箱。

表 1 相关引物序列及产物大小

Table 1 The sequences and PCR product size of primers used in this study

基因 Gene	引物序列 Primer sequence (5'→3')	产物长度 Product length/bp
<i>PaHK3b</i> -F	ATGAGTTTGCTTCATGTATTTGGG	3 060
<i>PaHK3b</i> -R	TAAATTCGCACTGGAAGTTGGC	
<i>PaHK3b</i> -pro-F	GTGGCTTTGGGAGGAAGGAAT	1 600
<i>PaHK3b</i> -pro-R	CCACATCTTGCCACCATCACC	
<i>PaHK3b</i> -q-F	ATGAGTTTGCTTCATGTATTTGG	243
<i>PaHK3b</i> -q-R	CTATAAATTCGCACTGGAAGTTG	
Actin-F	AAACTGTAATGGTCTCCCTCCG	193
Actin-R	GCATCATACAATCACTCTCCGA	
pET-28a- <i>PaHK3b</i> -F	cgagctcctcgacaagcttATGAGTTTGCTTCATGTATTTGGG	3 060
pET-28a- <i>PaHK3b</i> -R	tcgagtgcggcccaagcttTAAATTCGCACTGGAAGTTGGC	

1.2.4 *PaHK3b* 基因的表达分析 提取‘84K’杨根、茎、叶以及不同处理植株叶片总 RNA,反转录为 cDNA。设计 *PaHK3b* 基因实时定量 PCR(qRT-PCR)引物 *PaHK3b*-q-F 和 *PaHK3b*-q-R(表 1)。将合成的 cDNA 稀释 10 倍作为实时定量 PCR 模板,参照 TB Green TM Premix Ex Taq™ II(TliRNaseH Plus)(TaKaRa,日本)试剂盒说明配制反应体系:TB Green Premix TaqII(TliRNaseH Plus, 2 × ) 10 μL, Primer-F(10 μmol·L<sup>-1</sup>) 0.8 μL, Primer-R(10 μmol·L<sup>-1</sup>) 0.8 μL, cDNA 模板 2 μL, ddH<sub>2</sub>O 补足至 20 μL。用 Roche Light Cycle 480 II 型荧光定量 PCR 仪(Roche,瑞士)进行 qRT-PCR 反应,反应程序为:预变性 95℃ 30 s,变性 95℃ 5 s,退火 60℃ 30 s,40 个循环;溶解曲线为 95℃ 5 s,65℃ 1 min。以 *Actin* 为内参基因,采用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 算法计算 *PaHK3b* 基因的相对表达量<sup>[21]</sup>。利用 Excel2010 和 Spass23.0 软件对数据进行整理制图和差异分析。

1.2.5 *PaHK3b* 基因原核表达载体的构建 根据

TIANGEN 公司在线无缝克隆引物设计工具(<http://123.56.75.19>)设计含酶切位点的原核表达载体引物 pET-28a-*PaHK3b*-F 和 pET-28a-*PaHK3b*-R(表 1),PCR 扩增‘84K’杨 *PaHK3b* 基因的 cDNA 序列,回收扩增产物。原核表达载体 pET-28a(索莱宝,北京)经 *Hind* III(Thermo Fisher Scientific,美国)单酶切,胶回收纯化,根据 EasyGeno 快速重组克隆试剂盒(TIANGEN,北京)操作流程,将二者回收产物进行重组反应,将重组质粒转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中,经抗性(Kan<sup>+</sup>)筛选,挑取单克隆进行 PCR 验证,并送至生物公司测序验证,提取阳性菌株质粒,获得重组载体(pET-28a-*PaHK3b*)并转化至表达菌株 BL21(DE3)(TIANGEN,北京)。

1.2.6 重组菌 *E.coli* BL21(pET-28a-*PaHK3b*)的盐及干旱胁迫处理 将转化后的表达菌株 BL21(DE3)接种于 5 mL 含有 50 mg·L<sup>-1</sup> 的卡那霉素的 LB 液体培养基,37℃ 摇床震荡培养至 OD<sub>600</sub> 0.6~0.8,加入终浓度为 0.5 mmol·L<sup>-1</sup> 的 IPTG 诱

导 4 h, 稀释菌液  $10^4$  倍, 取 5  $\mu\text{L}$  至含有 0、50、100、150、200  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl LB 固体培养基上涂抹直径约为 1 cm 的 9 个点, 超净台吹干菌液,  $37^\circ\text{C}$  倒置过夜培养<sup>[22]</sup>。同时, 取诱导后的产物 1 mL 加入到 1 mL 含有 PEG6000 的 LB 液体培养基中使 PEG 终浓度为 5% (W/V), 放置  $37^\circ\text{C}$  摇床震荡培养, 0~7 h 内每隔 1 h 测 1 次  $OD_{600}$  值, 每个时间点测 3 个重复<sup>[23-25]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 ‘84K’杨 *PaHK3b* 基因 CDS 和启动子的获得及生物信息学分析

通过 PCR 扩增、克隆得到‘84K’杨 *PaHK3b* 基因全长 CDS。CDS 全长为 3060 bp, 编码 1019 个氨基酸, 蛋白分子量为 113 564.85 kDa, 等电点为 6.53, 蛋白不稳定指数为 37, 为稳定蛋白; 脂肪族指数为 92.31, 蛋白疏水性平均值为 -0.088。蛋白主要以无规则卷曲为主,  $\alpha$ -螺旋与延伸链则散布在蛋白中, 其中, 无规则卷曲 416 个 (40.82%)、 $\alpha$ -螺旋 377 个 (37%)、延伸链则有 226 个 (22.18%)。蛋

白结构域分析结果表明, *PaHK3b* 蛋白具有典型的细胞分裂素受体结构域, 包含 CHASE (Cyclase and histidine kinase associated sensing extracellular) 结构域、HisKA (His kinase A domain) 结构域及 REC (CheY-homologous receiver domain) 结构域, 其中, CHASE 结构域使细胞分裂素与其相应的受体结合, HisKA 结构域感知信号和 His 残基自身磷酸化, REC 结构域与磷酸基团相结合, 并向下游的信号蛋白进行传递。

克隆得到全长 1600 bp 的‘84K’杨 *PaHK3b* 基因启动子序列, 并采用 plantCARE 对其进行生物信息学分析。结果表明: *PaHK3b* 启动子不仅具有 TATA-box 和 CAAT-box 核心基本元件, 还包括 G-box、GA-motif、TCT-motif 等光响应元件。另外, *PaHK3b* 启动子区域还包含多个与逆境响应及激素调控相关的顺式作用元件, 如低温响应元件 LTR、防御与胁迫响应元件 TC-rich repeats、赤霉素响应元件 GARE-motif、水杨酸响应元件 TCA-element 等 (表 2), 表明该基因可能参与杨树逆境胁迫及激素信号响应。

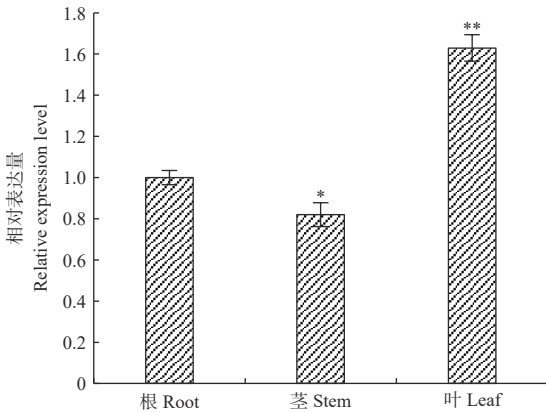
表 2 PlantCARE 预测 *PaHK3b* 启动子的主要顺式作用元件

Table 2 The main cis-elements in *PaHK3b* promoter predicted by PlantCARE

顺式作用元件 Cis-element	起始位点(方向) Start site/bp(direction)	序列 Sequence	特性 Characteristic
ARE	1 150(+)	AAACCA	厌氧诱导 Essential for the anaerobic induction
GARE-motif	346(-)	TCTGTTG	赤霉素响应 Gibberellin-responsive element
LTR	318(-)	CCGAAA	低温响应 Low-temperature responsiveness
TC-rich repeats	88(+)	ATTCTCTAAC	防卫及胁迫响应 Defense and stress responsiveness
TCA-element	288(-)/818(+)	CCATCTTTT	水杨酸响应 Salicylic acid responsiveness
GATA-motif	171(-)	GATAGGA	光响应元件 Light responsive element
GATA-motif	439(+)	GATAGGG	
TCCC-motif	1511(+)	TCTCCCT	
TCT-motif	1 462(+)/1 551(-)	TCTTAC	
GT1-motif	677(+)	GTGTGTGA	
GT1-motif	1 409(-)/1 353(-)	GGTTAA	
GA-motif	706(+)	ATAGATA	
G-box	9(-)	CACGAC	
CAAT-box	619(-)/575(-)/993(-)/103(-)	CCAAT	启动子和增强子区域常见的顺式作用元件 Common cis-acting element in promoter and enhancer regions
TATA-box	27(+)/195(+)/150(+)/1 067(-)	TATA	核心启动子 Core promoter element around -30 of transcription start
	148(-)/1 065(+)/193(-)	TATAAA	
	147(-)	TATAAAT	
	136(+)	ATATAA	
	1 109(-)	ccTATAAAaa	
	192(-)	TATAAAA	

## 2.2 ‘84K’杨 *PaHK3b* 基因器官表达差异性

采用 qRT-PCR 技术对‘84K’杨 *PaHK3b* 基因在根、茎、叶的表达进行检测。结果表明：该基因在根、茎、叶中均有表达，以根表达量作为参照，茎表达量低于根组织，为根表达量的 82%，叶片的表达量高于根，为根表达量的 1.63 倍（图 1）。以上结果表明，*PaHK3b* 基因在‘84K’杨叶片表达量最高。



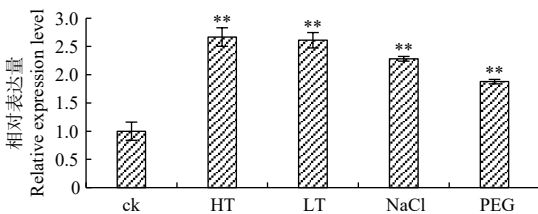
注：\*：  $P < 0.05$ ；\*\*：  $P < 0.01$ 。下同。

Notes: \*：  $P < 0.05$ ；\*\*：  $P < 0.01$ 。The same below.

图 1 ‘84K’杨 *PaHK3b* 基因在根、茎、叶片中的表达差异  
Fig. 1 Expression difference of *PaHK3b* gene in root, stem and leaf of ‘84K’ poplar

## 2.3 非生物胁迫下‘84K’杨 *PaHK3b* 基因的表达情况

高温、低温、盐胁迫和干旱胁迫条件下，‘84K’杨 *PaHK3b* 基因表达量均明显高于对照，并且温度胁迫下 *PaHK3b* 基因表达量高于盐胁迫和干旱胁迫下的表达量（图 2），其中，42℃ 高温胁迫、0℃ 低温胁迫时，*PaHK3b* 基因表达量分别为对照的 2.67、2.61 倍；200  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl 胁迫、



注：HT：42℃ 高温处理，LT：0℃ 低温处理。

Note: HT represents 42℃ high temperature treatment, LT 0℃ low temperature treatment.

图 2 非生物胁迫处理下‘84K’杨叶片 *PaHK3b* 基因的表达差异

Fig. 2 Expression difference of *PaHK3b* in leaf of ‘84K’ poplar under abiotic stresses

5%PEG6000 胁迫时，*PaHK3b* 基因表达量分别为对照的 2.28、1.87 倍。以上结果说明，*PaHK3b* 基因参与了非生物胁迫响应，在杨树的逆境胁迫反应过程中起作用。

## 2.4 ‘84K’杨 *PaHK3b* 基因对外源生长素及细胞分裂素处理的表达反应

图 3 表明：*PaHK3b* 基因对不同植物激素的响应有差异。生长素 IBA 处理时，*PaHK3b* 基因表达量与对照相似，而其他激素处理时，*PaHK3b* 基因表达量均不同程度的低于对照，其中，6-BA、ABA、GA3、SA 处理时，*PaHK3b* 基因表达量分别为对照的 35%、39%、61%、66%。可见，外源赤霉素、脱落酸、细胞分裂素及水杨酸均能抑制杨树 *PaHK3b* 基因的表达，表明 *PaHK3b* 基因参与植物激素响应。

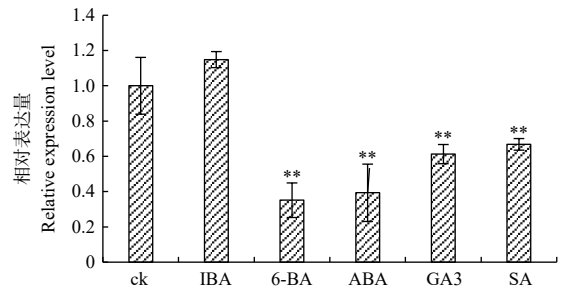


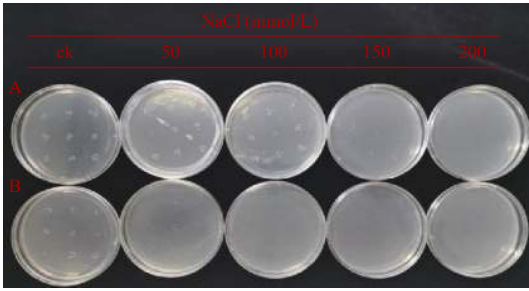
图 3 不同植物激素处理下‘84K’杨叶片 *PaHK3b* 基因的表达差异

Fig. 3 Expression difference of ‘84K’*PaHK3b* under several plant hormone treatments

## 2.5 重组菌 *E.coli* BL21 ( pET-28a-*PaHK3b* ) 的抗逆检测

利用斑点法对 *PaHK3b* 基因的抗盐性进行了检测。结果表明：在未添加 NaCl 的 LB 固体培养基上，转入 pET-28a-*PaHK3b* 重组质粒的大肠杆菌 BL21 菌株（重组菌株）与转入 pET-28a 空载体的菌株（对照菌株）生长速度基本一致。在含有 50、100、150  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 NaCl LB 固体培养基上，重组菌株与对照菌株生长均受到抑制，且随着 NaCl 浓度的增加菌落生长减少；但重组菌生长速度较对照快，菌落多且菌斑大。当培养基中 NaCl 浓度为 200  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  时，2 种菌株均停止生长（图 4）。因此，*PaHK3b* 基因通过原核表达能够提高大肠杆菌菌株的抗盐能力。

利用 PEG 模拟干旱胁迫对 *PaHK3b* 基因的抗旱性进行评价，结果表明：在 LB 液体培养基中，

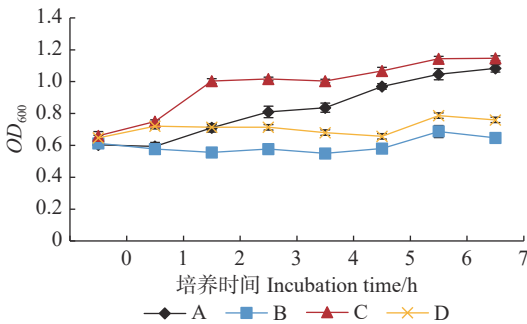


注: A: *E. coli* BL21 (pET-28a-*PaHK3b*) ; B: *E. coli* BL21 (pET-28a)  
 Note: A: *E. coli* BL21 (pET-28a-*PaHK3b*) ; B: *E. coli* BL21 (pET-28a)

图 4 大肠杆菌 *E. coli* BL21 (pET-28a) 和 *E. coli* BL21 (pET-28a-*PaHK3b*) 菌株耐盐性差异

Fig. 4 Difference in salt tolerance of *E. coli* BL21 (pET-28a) and *E. coli* BL21 (pET-28a-*PaHK3b*)

重组菌株的生长速度较对照菌株要快; 在添加 5%PEG6000 的 LB 液体培养基中, 重组菌株和对照菌株生长均受到抑制。培养 1 h 时, 重组菌株和对照菌株生长没有差异, 之后转入 pET-28a-*PaHK3b* 重组质粒的菌株较转入 pET-28a 空载的大肠杆菌生长速度快, 培养 7 h 后, 含重组质粒菌株的  $OD_{600}$  值是初始的 1.8 倍, 含空载质粒菌株的  $OD_{600}$  值是初始的 1.1 倍 (图 5)。因此, *PaHK3b* 基因原核表达不仅能够提高大肠杆菌菌株生长速度, 而且还能够提高其抗脱水能力。



注: A: LB-5%PEG6000 液体培养基中 *E. coli* BL21 (pET-28a-*PaHK3b*) 菌株的生长情况; B: LB-5%PEG6000 液体培养基中 *E. coli* BL21 (pET-28a) 菌株的生长情况; C: LB 液体培养基中 *E. coli* BL21 (pET-28a-*PaHK3b*) 菌株的生长情况; D: LB 液体培养基中 *E. coli* BL21 (pET-28a) 菌株的生长情况。

Note: A: *E. coli* BL21 (pET-28a-*PaHK3b*) in LB-5%PEG6000 liquid medium; B: *E. coli* BL21 (pET-28a) in LB-5%PEG6000 liquid medium; C: *E. coli* BL21 (pET-28a-*PaHK3b*) in LB liquid medium; D: *E. coli* BL21 (pET-28a) in LB liquid medium.

图 5 大肠杆菌 *E. coli* BL21 (pET-28a) 和 *E. coli* BL21 (pET-28a-*PaHK3b*) 菌株在 LB 及 LB-5%PEG6000 液体培养基生长曲线

Fig. 5 Growth curve of *E. coli* BL21 (pET-28a) and *E. coli* BL21 (pET-28a-*PaHK3b*) in LB and LB-5%PEG6000 liquid medium respectively

### 3 讨论

组氨酸激酶基因在植物激素信号响应及非生物逆境胁迫响应中发挥重要作用<sup>[3,26]</sup>。如拟南芥组氨酸激酶 *AHK3* 参与其对干旱、高盐及冷胁迫的抗逆反应<sup>[3-4]</sup>, 转玉米 (*Zea mays* L.) 组氨酸激酶基因 *ZmHK9* 的拟南芥抗旱性明显增强<sup>[27]</sup>。本研究, 在高温、低温、高盐和 PEG 模拟干旱等处理条件下, *PaHK3b* 基因表达量均增加, 其中, 基因上调程度呈高温>低温>盐胁迫>干旱胁迫的模式; 在 6-BA、ABA、GA3 及 SA 处理条件下, *PaHK3b* 基因表达量均下降, 基因下调程度呈 6-BA>ABA>GA3>SA 的模式。因此表明, *PaHK3b* 基因能够不同程度的参与植物激素信号响应及非生物胁迫信号响应。另外, SA 是植物防卫反应的重要内源植物激素, 作为一种信号分子, 在植物生物胁迫响应过程中发挥重要作用<sup>[28-29]</sup>。ABA 在植物抗逆胁迫反应及在生物胁迫和非生物胁迫中均具有重要调控作用。因此, *PaHK3b* 基因可能通过 ABA 及 SA 途径的负调节提高了杨树对逆境胁迫的耐受性。

通过分析 *PaHK3b* 基因 CDS 序列发现, ‘84K’杨组氨酸激酶 *PaHK3b* 蛋白具有典型的 CHASE 细胞分裂素受体结构域。在植物外源激素 6-BA 处理下, *PaHK3b* 基因下调表达, 表明该基因能够感知细胞分裂素信号并参与响应, 这与组氨酸激酶基因具有 CHASE 结构域, 通过该结构域与细胞分裂素的结合, 感知植物激素信号并进行传导是一致的<sup>[7,10]</sup>。对 *PaHK3b* 基因启动子序列分析发现, 该区域包含低温响应、防御与胁迫响应、赤霉素响应、水杨酸响应等多个参与胁迫响应及激素调控的顺式作用元件。这与组氨酸激酶基因启动子区域有多个植物激素信号响应及非生物逆境胁迫相关的顺式作用元件是一致的<sup>[30-31]</sup>。另外, 结合在植物激素 6-BA、ABA、GA3、SA 和非生物胁迫高温、低温、高盐、PEG 处理下, *PaHK3b* 基因均不同程度参与响应的表达, 表明 *PaHK3b* 基因参与植物激素信号响应及非生物胁迫响应与其基因结构密切相关。

已有研究表明, 通过构建基因的原核表达载体, 并利用大肠杆菌表达系统可以对基因的功能进行初步鉴定。如将小麦 (*Triticum aestivum* L.) 脱水蛋白编码基因——*DHN14* 基因的原核表达载体转入大肠杆菌后, 大肠杆菌菌株对重金属胁迫及过

氧化氢胁迫的耐受性显著增强, 推测小麦脱水蛋白基因 *DHN14* 在其响应非生物胁迫的过程中起作用<sup>[23]</sup>。转入谷子 (*Setaria italica* L.) 类受体蛋白激酶基因 *SiRLK35* 原核表达载体的大肠杆菌菌株生长状态较阴性对照好, 同时获得的转 *SiRLK35* 基因水稻植株对盐胁迫的耐受性高于对照<sup>[22]</sup>。以上研究说明, 原核表达结果能对克隆基因功能进行有效鉴定。在本研究中, 转入 *PaHK3b* 基因原核表达载体的菌株在 50~150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 的 LB 固体培养基及 5% PEG6000 的 LB 液体培养基中生长状态均好于转入空载体的对照菌株。因此可得, 杨树 *PaHK3b* 基因能够促进大肠杆菌的生长, 同时能够提高其耐盐和抗旱能力, 推测该基因可能在杨树生长及抗逆境胁迫的过程中发挥作用。

## 4 结 论

本研究从‘84K’杨中克隆了组氨酸激酶基因 *PaHK3b* 及其启动子, 生物信息学分析表明, 该基因编码蛋白具有典型的细胞分裂素受体结构域, 其启动子区域有多个参与胁迫响应和激素信号转导的顺式作用元件。在高温、低温、高盐 and PEG 模拟干旱等非生物胁迫下, *PaHK3b* 基因表达量增加, 而在 6-BA、ABA、GA3 及水杨酸等植物激素处理条件下, 其表达量下降。原核表达 *PaHK3b* 基因可以提高受体大肠杆菌的生长及抗旱耐盐能力。初步生物学功能研究表明, 该基因参与杨树植物激素信号响应, 并在其抗逆境胁迫过程中发挥重要调控作用。本研究结果为深入研究 *PaHK3b* 基因在激素信号转导及逆境胁迫下杨树生长发育的调控作用提供线索, 为杨树抗逆分子育种及品种改良奠定基础。

## 参 考 文 献:

- [ 1 ] Muller B, Sheen J. *Arabidopsis* cytokinin signaling pathway[J]. Science Signaling STKE, 2007(407): cm5.
- [ 2 ] Werner T, Schmulling T. Cytokinin action in plant development[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2009, 12(5): 527-538.
- [ 3 ] Tran L S, Urao T, Qin F, *et al.* Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in *Arabidopsis*[J]. PNAS, 2007, 104(51): 20623-20628.
- [ 4 ] Jeon J, Kim N Y, Kim S, *et al.* A subset of cytokinin two-component signaling system plays a role in cold temperature stressresponse in *Arabidopsis*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(30): 23371-23386.
- [ 5 ] Maruyama-Nakashita A, Nakamura Y, Yamaya T, *et al.* A novel regulatory pathway of sulfate uptake in *Arabidopsis* roots: implication of CRE1/WOL/AHK4 mediated cytokinin-dependent regulation[J]. Plant Journal, 2004, 38(5): 779-789.
- [ 6 ] Chefedor F, Héricourt F, Koudounas K, *et al.* Highlighting type A RRs as potential regulators of the dkHK1 multi-step phosphorelay pathway in *Populus*[J]. Plant Science Elsevier, 2018, 277: 68-78.
- [ 7 ] Hwang I, Chen H C, Sheen J. *et al.* Two-component signal transduction pathways in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiol, 2002, 129(5): 500-515.
- [ 8 ] Schaller F, Zerbe P, Reinbothe S, *et al.* The allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana* localization and cyclization[J]. Febs Journal, 2008, 275: 2428-2441.
- [ 9 ] Shan X, Yan J, Xie D, *et al.* Comparison of phytohormone signaling mechanisms[J]. Curr Opin Plant Biol, 2012, 15(10): 84-91.
- [ 10 ] Hwang I, Sheen J, Müller B, *et al.* Cytokinin signaling networks[J]. Annual Review Plant Biology, 2012, 63(1): 353-380.
- [ 11 ] Argyros R D, Mathews D E, Chiang Y H, *et al.* Type B response regulators of *Arabidopsis* play key roles in cytokinin signaling and plant development[J]. Plant Cell, 2008, 20(8): 2012-2116.
- [ 12 ] Masayuki H, Melissa S. Pischke, *et al.* In planta functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family[J]. PNAS, 2004, 101(23): 8821-8826.
- [ 13 ] Kim H J, Ryu H, Hong S H, *et al.* Cytokinin-mediated control of leaf longevity by *AHK3* through phosphorylation of *ARR2* in *Arabidopsis*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(3): 814-819.
- [ 14 ] Riefler M, Novsk O, Strnad M, *et al.* *Arabidopsis* cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism[J]. Plant Cell, 2006, 18(1): 40-54.
- [ 15 ] Dello I R, Linhares F S, Scacchi E, *et al.* Cytokinins determine *Arabidopsis* root meristem size by controlling cell differentiation[J]. Current Biology, 2007, 17(8): 678-682.
- [ 16 ] Barrina I, Jensen H, Novák O, *et al.* Gain-of-function mutants of the cytokinin receptors *AHK2* and *AHK3* regulate plant organ size, flowering time and plant longevity[J]. Plant Physiology, 2007, 173(3): 1783-1797.
- [ 17 ] Kang N Y, Cho C, Kim N Y, *et al.* Cytokinin receptor-dependent and receptor-independent pathways in the dehydration response of *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Physiol, 2012, 169(14): 1382-1391.
- [ 18 ] Cortleven A, Nitschke S, Klaumünzer M, *et al.* A novel protective function for cytokinin in the light stress response is mediated by the *Arabidopsis* histidine kinase2 and *Arabidopsis* histidine kinase3 receptors[J]. Plant Physiology, 2014, 164(3): 1470-1483.
- [ 19 ] Tran L S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, *et al.* Role of cytokinin responsive two-component system in ABA and osmotic stress signaling[J]. Plant Signal & Behavior, 2010, 5(2): 148-150.
- [ 20 ] Nieminen K, Immanen J, Laxell M, *et al.* Cytokinin signaling regulates cambial development in poplar[J]. Proceedings of the National

- Academy of Sciences, 2008, 105(50): 20032-20037.
- [21] Sun J, Niu Q W, Tarkowski P, *et al.* The *Arabidopsis AtIPT8/PGA22* gene encodes an isopentenyl transferase that is involved in de novo cytokinin biosynthesis[J]. *Plant Physiology*, 2003, 131(1): 167-176.
- [22] 王一帆, 李臻, 潘教文, 等. 谷子 *SiRLK35* 基因克隆及功能分析[J]. *遗传*, 2017, 39(5): 413-422.
- [23] 史学英, 田野, 李核, 等. 小麦K2型脱水蛋白 *DHN14* 响应非生物胁迫的功能分析[J]. *西北农林科技大学学报*, 2019, 47(5): 1-10.
- [24] 林琳, 李健, 李慧玉, 等. 逆境胁迫下柞柳脂质转运蛋白基因 (*ThLTP*) 的克隆与功能初步分析[J]. *林业科学研究*, 2012, 25(4): 492-499.
- [25] 雷世康, 徐刚. 麻疯树 *BRI1* 基因的鉴定及其在不同发育时期花蕾中的表达分析[J]. *林业科学研究*, 2019, 32(5): 121-129.
- [26] Ramsong N, Praveen S, Ratna K, *et al.* Histidine kinases in plants: Cross talk between hormone and stress responses[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2012, 7(10): 1230-1237.
- [27] Wang B, Guo B, Xie X, *et al.* A novel histidine kinase gene, *ZmHK9*, mediate drought tolerance through the regulation of stomatal development in *Arabidopsis* [J]. *Gene*, 2012, 501(2): 171-179.
- [28] Bilal A, Farrukh A, Muhammad A A, *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of two component system genes in *Cicer arietinum* [J]. *Genomics*, 2020, 112(2): 1371-1382.
- [29] He Y, Liu X, Ye L, *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of two-component system genes in tomato [J]. *International journal of molecular sciences*, 2016, 17(8): 1204.
- [30] Vernooij B, Friedrich L, Weymann K, *et al.* A central role of salicylic acid in plant disease resistance [J]. *Science (Washington D C)*, 1994, 266(5188): 1247-1250.
- [31] Yusuf M, Hasan S A, Ali B, *et al.* Effect of salicylic acid on salinity-induced changes in *Brassica juncea* [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2008, 50(9): 1096-1102.



# Cloning and Functional Analysis of Histidine Kinase Gene *PaHK3b* in Poplar '84K'

LU Jun-qian, WU Shu, ZHONG Shan-chen, ZHANG Wei-xi, SU Xiao-hua, ZHANG Bing-yu

(State Key Laboratory of Forest Genetics and Tree Breeding, Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation of National Forestry and Grassland Administration, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry Beijing 100091, China)

**Abstract:** [Objective] Using Poplar '84K' (*Populus alba* × *P. glandulosa*) as material to clone the promoter region and coding sequence (CDS) of histidine kinase gene *PaHK3b*, then to detect its expression and identify its functions, so as to provide clues for analyzing the function of *PaHK3b* in growth and development regulation of poplars and for molecular breeding and genetic improvement of poplar. [Method] Based on the published genome information of *P. trichocarpa* Torr. & Gray, the promoter region and CDS were cloned using the specific primers designed. The conservative structure domain and promoter *cis*-acting element were analyzed. At the same time, *in vitro* plants of Poplar '84K' were treated with several plant hormones (10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ABA, 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA, 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  IBA, 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  GA3, and 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  SA) under various abiotic stresses (42°C, 0°C, 200  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl, and 5% PEG6000). Differences in expression and response of *PaHK3b* gene were detected. Furthermore, the prokaryotic expression system was used to study the biological function of *PaHK3b* gene *in vitro*. [Result] The *PaHK3b* gene was 3060 bp in length and encoded 1019 amino acids. *PaHK3b* protein had a typical cytokinin receptor domain, a CHASE domain, a HisKA domain, and a REC domain. Besides, a large number of common core elements of TATA box and CAAT box, a number of stress-related and hormone-related regulatory elements, such as low temperature response element LTR, defense and stress responsive element TC-rich repeats, gibberellin responsive element GARE-motif, salicylic acid responsive element TCA-element etc. were predicted in the promoter sequence of *PaHK3b* gene, that closely related to the plant hormone and stress response regulations. The qRT-PCR results showed that *PaHK3b* gene was expressed the highest in leaf, medium in root, and least in stem. The transcriptional levels of *PaHK3b* gene were about 2.67, 2.61, 2.28, 1.87 times that of the control respectively under 42°C, 0°C, 200  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl, and 5% PEG treatments. Under IBA treatment, the transcripts of *PaHK3b* were not significantly different from that of the control. The expression of *PaHK3b* were down-regulated under the treatments of 6-BA, ABA, GA3 and SA respectively. The growth of the *Escherichia coli* strain with *PaHK3b* prokaryotic expression construction in LB liquid medium supplemented with 5% PEG6000 were faster than that of the control. Meanwhile, the growth of the *E. coli* strain with *PaHK3b* prokaryotic expression construction on solid LB contained 50~150  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl was better than that of the control. [Conclusion] The promoter of poplar '84K' *PaHK3b* gene contained *cis*-regulatory elements, such as stress response element and hormone responsive element etc, showing that *PaHK3b* gene is closely related to the response of poplar to hormones and abiotic stress. It is confirmed by abiotic stress treatment, hormone treatment and prokaryotic expression that *PaHK3b* gene participates in the signal response of plant hormones and plays an important role in poplar response to abiotic stresses.

**Keywords:** *Populus alba* × *P. glandulosa*; poplar '84K'; histidine kinase; expression pattern; prokaryotic expression

(责任编辑: 张 研)