

网络出版时间: 2025-05-29

网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/61.1359.s.20250528.1530.010>

大麦 LRR 型类受体蛋白激酶基因 *HvLRR-RLK510* 启动子的克隆与功能验证

董陈文华, 周洪斌, 郎雨萌, 罗亮扎, 李仕金, 姜瑞梅,
毛孝强, 赵海云, 唐进, 李勇, 王玫邴, 陈升位

(云南农业大学农学与生物技术学院, 云南昆明 650201)

摘要: 为了解大麦 LRR 型类受体蛋白激酶基因 *HvLRR-RLK510* 启动子及其功能, 以特异性 PCR 引物扩增大麦材料 Morex 和保大麦 8 号的 *HvLRR-RLK510* 基因启动子并构建 pEASY[®]-510 重组质粒, 基于大肠杆菌 Trans1-T₁ 菌株的阳性克隆测定获得 2 368 bp 的启动子序列。结果表明, 通过在线软件 Plant CARE 预测, 该启动子携带茉莉酸甲酯、脱落酸、低温等非生物因素的响应元件。经拟南芥转基因阳性植株和本氏烟草瞬时表达植株的根、茎、叶和花的 GUS 染色分析, 所克隆启动子及其截短片段 (–1 458, –868 和 –460 bp) 可等效驱动 GUS 基因在花药中表达。qRT-PCR 检测发现, 茉莉酸甲酯 (JAs)、脱落酸 (ABA)、低温、聚乙二醇 (PEG-2000) 和光照能有效改变大麦叶片和根中 *HvLRR-RLK510* 基因的表达特性。*HvLRR-RLK510* 基因启动子属诱导型启动子, 携带茉莉酸、脱落酸、低温、干旱和光的响应元件, 其 –460 bp 的截断片段可替代全长启动子; 该启动子及其截断片段可用于 *HvLRR-RLK510* 基因转录调控机制解析。

关键词: 大麦; *HvLRR-RLK510* 基因; 启动子克隆; 遗传转化; 功能验证

中图分类号: S512.3; S330

文献标识码: A

文章编号: 1009-1041(2026)01-0090-11

Cloning and Functional Validation of the Promoter of the LRR-Type Receptor-Like Protein Kinase Gene *HvLRR-RLK510* in Barley

DONG-CHEN Wenhua, ZHOU Hongbin, LANG Yumeng, LUO Liangzha, LI Shijin, JIANG Ruimei,
MAO Xiaoqiang, ZHAO Haiyun, TANG Jin, LI Yong, WANG Meili, CHEN Shengwei

(College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201, China)

Abstract: To elucidate the promoter of the barley LRR-type receptor-like protein kinase gene *HvLRR-RLK510* and its function, specific PCR primers were used to amplify the promoter of the *HvLRR-RLK510* gene from Morex and Baodamai 8. The pEASY[®]-510 recombinant plasmid was constructed, and the promoter sequence of 2 368 bp was sequenced based on the positive colonies of the *Escherichia coli* Trans1-T₁ strain. The prediction results from the online software PlantCARE indicated that the promoter contains response elements to non-biotic factors such as methyl jasmonate, abscisic acid, and low temperature. GUS staining results in roots, stems, leaves, and flowers of transgenic *Arabidopsis thaliana* and transiently expressed *Nicotiana benthamiana* plants demonstrated that the cloned promoter and its truncated fragments (–1 458, –868, and –460 bp) can equivalently drive the expression of the GUS gene in anthers. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) results showed that methyl jasmonate (MeJA), abscisic acid (ABA), low temperature, polyethylene glycol (PEG-2000), and light can effectively alter the expression characteristics of the *HvLRR-RLK510* gene in barley

收稿日期: 2025-02-06

修回日期: 2025-03-28

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32360469); 云南省教育厅科学研究基金项目 (2025Y0498)

第一作者 E-mail: wenhuadc@ynau.edu.cn (董陈文华); yndl_zhb@126.com (周洪斌)

通讯作者 E-mail: ynkmcsw@ynau.edu.cn (陈升位)

leaves and roots. The promoter of the *HvLRR-RLK510* gene cloned in this study is an inducible promoter containing response elements to jasmonic acid, abscisic acid, low temperature, drought, and light. Its -460 bp truncated fragment can replace the full-length promoter. The promoter and its truncated fragments can be used to elucidate the transcriptional regulatory mechanisms of the *HvLRR-RLK510* gene.

Keywords: *Hordeum vulgare* L.; *HvLRR-RLK510* gene; Promoter; Genetic transformation; Functional validation

受体蛋白激酶是指位于细胞膜和细胞器膜中可与特定配体结合、具有激酶活性的蛋白。虽然已报道的大多数植物受体蛋白激酶的分子结构和功能与动物高度相似,但其天然配体未被发现或证实,因此被称为类受体蛋白激酶(receptor-like protein kinase, RLK)^[1-2]。RLK 大多具有相似的胞外域、跨膜结构域和胞内结构域^[1,3]。根据胞外域识别与受体的不同,常将 RLK 分为 S 结构域类、富含亮氨酸重复(leucine-rich repeat, LRR)类、类肿瘤坏死因子受体类、类表皮生长因子类、PR5K 和类凝集素类 6 种^[3-5]。与配体结合后,RLK 结构域的氨基酸常被磷酸化^[4-5]。通过所介导的磷酸化级联反应,RLK 可调控植物的生长发育及对生物与非生物胁迫的抗性^[3-8]。

LRR-RLK 的胞外域由多个富含亮氨酸的重复基序构成^[1,3,5-6]。每个重复基序由 23~25 个氨基酸组成,具有 LXXLXLXXNXL 保守序列,包含 1 个 β -折叠、1 个 α -螺旋和 1 个连接环,其中 β -折叠与 α -螺旋平行^[9-10]。所有 LRR 重复单元都相对于 1 个轴平行排列,可形成一个马蹄状的非球状结构^[9]。在 LRR 结构中还存在多对半胱氨酸和一些岛状结构^[11-12]。该岛状结构及其邻近区域与 LRR-RLK 的结合能力有关,其氨基酸突变可降低 LRR-RLK 的结合能力^[12-14]。总体而言,LRR-RLK 的跨膜结构域序列的保守性较差,而激酶域的保守性相对较高,且包含 11 个高度保守的次级结构域^[3,8-9]。其中,次级结构域 I、II 和 III 是 ATP 结合和催化的关键部位,也被称为活性环(或称 A 环)^[13-14]。已报道的 LRR-RLK 类受体蛋白激酶常以异源二聚体或多聚体发挥作用,但以异源二聚体居多^[2,7-10,14-15]。在不同遗传背景或生物进程中 LRR-RLK 的二聚体或多聚体结构也会改变,亚基之间可通过相互结合构成多个活性多聚体^[7-9,14]。

目前,有关 LRR-RLK 的研究较多,但大多数内容以结构鉴定、功能验证和组织表达特性为主^[1,3-11,15-18],少有其表达调控机制的报道。前人

研究表明,LRR-RLK 基因的表达具有时空特性,且大多可诱导^[3-8,10-13,15-17,19]。转录调控是基因表达调控的主要途径。植物基因转录由核心启动子及其侧翼顺式元件,以及与顺式元件结合的反式因子协同调控。因此,克隆 LRR-RLK 基因启动子、鉴定核心启动子及其侧翼顺式元件并验证其功能,有利于解析 LRR-RLK 基因的转录调控机制及其在不同生物进程中的作用机制。

基于大麦 Ynbs 突变体携带的穗分枝、多联小穗退化和小穗小花数等性状的共同基因位点侧翼连锁标记界定的 Morex 参考基因组序列^[20-22],贺军与等注解到 *HORVU. MOREX. r3. 2HG0114510* 基因通过其 CDS 序列、编码蛋白的同源性和结构域分析(待发表资料),已证明该基因属 LRR-RLK 的编码基因,并将其暂时命名为 *HvLRR-RLK510*。在此基础上,本研究拟克隆 *HvLRR-RLK510* 基因的启动子,通过瞬时表达、组织化学染色和 qRT-PCR 等检测技术验证 *HvLRR-RLK510* 基因启动子及其截断片段和茉莉酸(MeJA)、脱落酸(ABA)、低温等 5 种非生物因素响应元件的功能,为解析该基因的转录调控机制及其在大麦幼穗发育进程中的作用机制提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

供试大麦材料包括北青 7 号、保大麦 8 号、云南黑大麦、云南分枝穗(Ynbs)突变体、Morex、Bowman、Golden promise 和 Prbs 突变体。其中,北青 7 号、保大麦 8 号和云南黑大麦分别由云南省迪庆州农业科学研究所、云南省保山市农业科学研究所和云南省农业科学院提供,Ynbs 突变体由课题组利用 EMS 诱变青稞品种北青 7 号成熟种子创制,其余材料由浙江省农业科学院提供。所有材料均为纯合体,由课题组繁殖并保存。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取及检测

分别取 Golden promise、Bowman、Ynbs 突

变体等8个材料5叶期的幼嫩叶片置于牛皮纸袋内,于 -80°C 保存、备用。采用CTAB法提取基因组DNA。采用0.8%的琼脂糖凝胶电泳、紫外分光光度计(Tnano-700)分别测检DNA浓度。将合格的基因组DNAs置于 -20°C 储存、备用。

1.2.2 启动子克隆与顺式元件预测

通过序列比对将*HvLRR-RLK510*基因的CDS序列定位到Morex基因组上,下载*HvLRR-RLK510*基因起始密码子上游2.5 kb、下游200 bp的Morex基因组序列,采用Primer Premier 5.0软件设计特异性PCR扩增引物对(Pro510-F和Pro510-R,表1)。基于所设计引物和高保真酶(2×Phanta Flash Master Mix(Dye Plus))扩增Golden promise、Bowman、Ynbs等8个大麦材料的基因组DNA。采用1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。采用StarPrep Gel Extraction Kit StarPrep试剂盒参照使用说明回收目标片段。参照pEASY®-Blunt Zero Cloning vector使用说明,采用平末端连接法连接所扩增的*HvLRR-RLK510*基因启动子与pEASY®-Blunt Zero Cloning vector,构建pEASY®-510重组子。基于热激法将pEASY®-510重组子导入大肠杆菌菌株Trans1-T₁感受态。将转化大肠杆菌接种到含卡拉霉素的LB固体培养基上,37℃培养,然后采用原位PCR扩增技术筛选阳性克隆。将阳性克隆接种到LB液体培养基(含卡拉霉素)中,37℃培养至对数生长期,然后送到生工生物工程(上海)股份有限公司测序。分别采用DNAMAN 6.0软件和PlantCARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/#opennewwindow>)在线软件比对不同材料启动子序列,并预测候选启动子的顺式作用元件。

1.2.3 瞬时表达载体的构建与克隆

参照pBWA(V)HG载体使用说明,构建pBWA(V)HG-*HvLRR-RLK510::GUS*表达载体。采用热激转化法将表达载体导入大肠杆菌Trans1-T₁的感受态菌株。采用1.2.2部分描述的方法,培养转化大肠杆菌,采用基于BSF和BS510R引物对(表1)的菌落原位扩增技术筛选大肠杆菌阳性菌株。将解冻的阳性大肠杆菌接种到含卡那霉素的LB液体培养基中,置于在37℃、200 r·min⁻¹摇床上培养至OD值为0.6~0.8。采用StarPrep Plasmid Miniprep Kit试剂盒提取pBWA(V)HG-*HvLRR-RLK510::GUS*

重组质粒,然后以1%的琼脂糖凝胶电泳检测所提取质粒。

1.2.4 农杆菌遗传转化和阳性克隆筛选

采用冻融法将1.2.3中的表达载体导入农杆菌AG1感受态菌株。将转化菌株接种到YEB液体培养基上,28℃振荡培养2~3 h。6 000 r·min⁻¹离心1 min收集农杆菌。用100 μL左右YEB液体培养基重悬浮收集菌,将其涂布于含Kan和Rif抗生素的YEB固体培养基上,置于28℃培养箱培养2~3 d。采用Hg和Hg510R引物对(表1)扩增单克隆菌落,以1%的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,鉴定阳性克隆。

1.2.5 启动子截断片段的克隆和融合表达载体构建

根据*HvLRR-RLK510*基因启动子序列设计其-1 458、-868和-460 bp 3种截短片段的PCR扩增上游引物(表1),以扩增启动子的下游引物为共用引物扩增启动子截断片段。采用1.2.3部分描述的方法构建、克隆并鉴定融合表达载体,采用1.2.4部分描述方法将其转入农杆菌AG1菌株并鉴定农杆菌阳性克隆。

1.2.6 启动子及其截短片段活性验证

参考张悦婧等报道的本氏烟草^[23]和拟南芥^[24]的农杆菌浸染和GUS染色方法,检测本氏烟草不同组织器官中GUS基因的表达特性,验证启动子及其截短片段活性。农杆菌阳性克隆和拟南芥阳性转化植株鉴定的特异性PCR扩增引物见表1。

1.2.7 非生物因素诱导

依次采用75%酒精和10%NaClO消毒北青7号和Ynbs突变体种子,将消毒种子置于平铺于培养皿底部的湿润滤纸上。盖上培养皿后将其置于室温培养3~4 d。将幼苗转移到盛有1/2霍格兰(Hoagland)营养液的培养瓶中,在室温条件下培养至二叶一心,每隔3 d换一次培养液。选取生长状态高度相似的二叶一心幼苗进行诱导处理。将100 μmol·L⁻¹的脱落酸(ABA)、5 mmol·L⁻¹ MeJA和10 μmol·L⁻¹ IAA溶液分别喷施于幼苗叶片(直至有液滴从叶片滴下)进行激素诱导处理;将幼苗置于4℃低温培养箱进行低温诱导处理;采用20%的PEG-2000进行干旱诱导处理;将幼苗置于0 h/24 h、12 h/12 h、24 h/0 h 3种光周期(昼/夜)进行光诱导处理。分别取ABA、MeJA、IAA等5种因素处理0 h、12 h、24 h

表 1 本研究使用引物的代号、序列和用途
Table 1 Serial number, sequence, and use of the primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence(5′—3′)	引物用途 Primer usage
Pro510P2-F	CAACAAACTTAGGAATTTCAAAATGTGCATATAAAATATTTA	启动子截断片段扩增 Promoter truncation fragment am- plification
Pro510P3-F	CTAGAAGCGATTCCGGTGTATTTTCAAGTTCATG	
Pro510P4-F	CAACTTTTCTGCCGTGTGCTGTGC	
Pro510-R	ACAGGGAGAGGGATAGGGAC	启动全长扩增 Full-lengthpromoter amplification
Pro510-F	CTATTTCCTGCCTCCATGTCAGC	
BSF	5′-TTCATTTGGAGAGAACACGGGGGAC-3′	大肠杆菌克隆鉴定 <i>E. coli</i> cloning and identification
BS510R	5′-CGGTATCTGGCCGACGAG-3′	
Hg	5′-GCTCCA CCATGTTGGCAAGC-3′	农杆菌阳性克隆鉴定 Identification of positive agrobacte- rium colonies
Hg510R	5′-GCCTTTCCGAAACAGAAAA ATTGCTT-3′	
Gus-F	CGTCCCAAGCAGTTACAAT	拟南芥阳性植株检测 Identification of positive <i>Arabidop- sis thaliana</i> plants
Gus-R	GTTCAGTGGTTCCAGAGG	

和 48 h 以及不同光周期处理 48 h 的幼苗根、茎和叶,置于-80 ℃保存、备用。每个处理重复 3 次。

1.2.8 *HvLRR-RLK510* 基因的表达差异分析

采用 Fast Pure® Universal Plant TotalRNA Isolation Kit 和 Hiscript III®RT Supper Mix for qPCR(+gDNAwiper) 试剂盒,参照其使用说明分别提取试验材料的总 RNAs 并反转录合成 cD-NAs。采用 ChamQUniversal SYBR qPCRMas-ter Mix 试剂盒,参照其使用说明检测 1.2.7 部分采集样品的*HvLRR-RLK510* 基因的表达量。荧光定量 PCR 扩增引物见表 1。以茎中表达量为对照,采用 2^{-ΔΔCt} 法计算其他处理样品的*HvL-RR-RLK510* 基因的相对表达量。采用 SPSS 20.0 软件分析各处理的*HvLRR-RLK510* 基因的表达差异,以 GraphPad Prism 9.0 软件制图。

2 结果与分析

2.1 启动子克隆及其顺式元件预测

基于所提取的北青 7 号、Ynbs 突变体、Bow-man 等 8 个材料的基因组 DNAs(图 1A),扩增了*HvLRR-RLK510* 基因的启动子,但仅从 Morex 和保大麦 8 号的基因组 DNAs 中扩增出约 2 360 bp 的启动子片段(图 1B)。采用平末端连接,分别构建了携带 Morex 和保大麦 8 号启动子的 pEASY®-510 重组子。将热激转化重组子的大肠杆菌 Trans1-T₁ 菌株接种在含卡那霉素的 LB 固体培养基上,37 ℃培养。用 Pro510P4-F 和 Pro510P4-R 引物对筛选到携带 pEASY®-510 重组子的 5 个大肠杆菌阳性菌株,其中 2 个为

Morex 启动子菌株,3 个为保大麦 8 号启动子菌株(图 1C)。测序结果表明,5 个阳性菌株均携带 2 368 bp 的启动子扩增片段。通过序列比对,Morex 和保大麦 8 号的*HvLRR-RLK510* 启动子序列完全一致(图 2)。基于 Plant Care 在线软件的顺式元件预测结果显示,除多个拷贝的 TA-TA-box 和 CAAT-box 核心启动子元件外,该序列还包含光响应元件、脱落酸响应元件、茉莉酸甲酯响应元件、低温响应元件、干旱诱导元件和厌氧诱导元件,以及 MYB 蛋白的结合元件(图 1D)。除低温响应元件外,其余顺式元件均有 1 个以上的拷贝,在 2 194 bp 处还存在 1 个下游增强子(图 1D)。

2.2 *HvLRR-RLK510* 基因启动子的活性分析

2.2.1 基于拟南芥转基因阳性植株的启动子活性验证

采用平末端连接构建 pBWA(V)HG-*HvL-RR-RLK510*::*GUS* 融合表达载体(图 3A),将构建成功的融合表达载体导入农杆菌 AG1 菌株中,获得了农杆菌阳性菌株(图 3B~图 3C)。基于浸花法成功将农杆菌阳性菌株携带的融合表达载体 pBWA(V)HG-*HvLRR-RLK510*::*GUS* 导入西伯利亚拟南芥植株,获得了 1 株 T₀ 代阳性植株及 T₁ 代植株(图 3D~图 3E)。从 GUS 染色结果看,野生型植株的各组织未能被有效染色,而 T₁ 代阳性植株花药可被有效染色,但根、茎、叶、花瓣和果荚未被染色(图 4)。这说明在拟南芥转基因阳性植株花药中*HvLRR-RLK510* 基因全长启动子可有效驱动 *GUS* 基因表达。

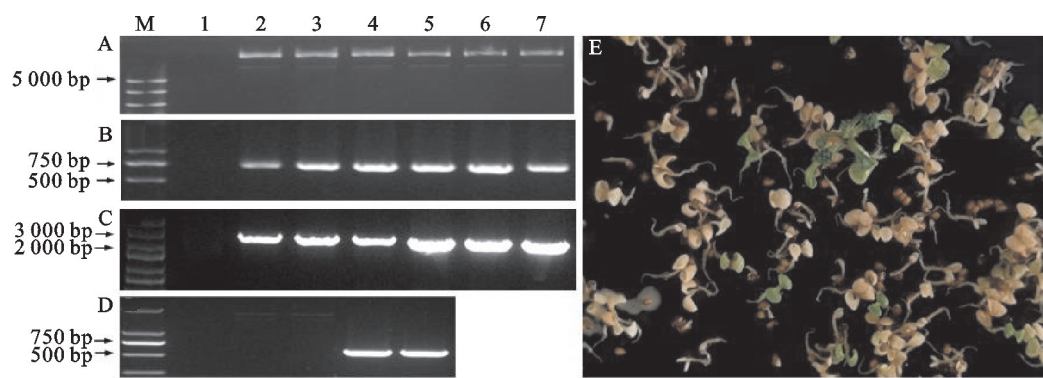


图 3A~图 3C 中,泳道 1: H₂O; 泳道 2~泳道 7: 不同农杆菌克隆的融合表达载体 DNAs、启动子和载体的部分序列的特异性标记片段、启动子序列的特异标记片段。图 3D 中,泳道 1: H₂O; 泳道 2 和泳道 3: 拟南芥野生植株; 泳道 4 和泳道 5: 拟南芥 T₁ 代阳性转化植株。图 3E: T₀ 转化拟南芥幼苗。

In Fig. 3A—Fig. 3C, lane 1: H₂O; Lane 2—lane 7: Fusion expression vector DNA of different *Agrobacterium tumefaciens* colonies, specific marker fragments based on the sequence of promoter and vector, specific marker fragments based on the vector. In Fig. 3D, lane 1: H₂O; Lane 2 and lane 3: Wild plants of *Arabidopsis thaliana*; Lane 4 and lane 5: T₁ generation positive plants of transformed *Arabidopsis thaliana*. Fig. 3E: T₀ generation seedlings of transformed *Arabidopsis thaliana*.

图 3 融合表达载体、农杆菌阳性克隆、拟南芥阳性转化植株的特异性分子标记示图

Fig. 3 Diagram of specific molecular marker fragments from fusion expression vector, positive colonies of transformed *Agrobacterium* and positive plants of transformed *Arabidopsis thaliana*

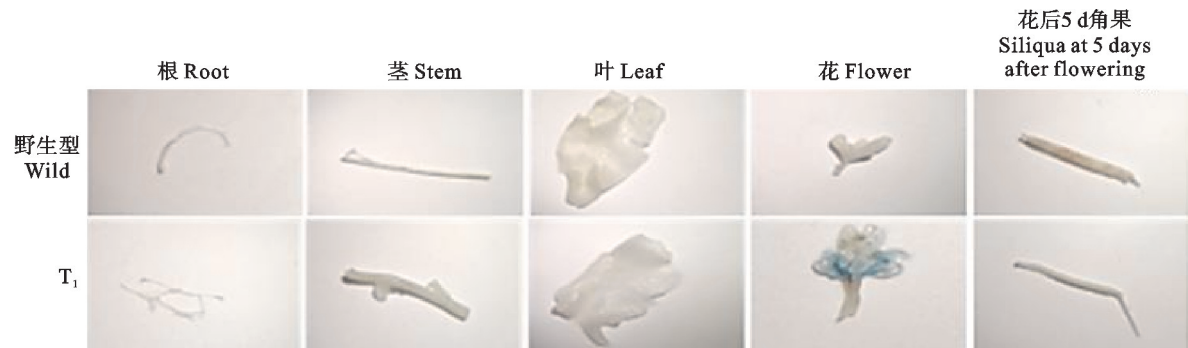


图 4 HvLRR-RLK510 基因启动子活性的拟南芥植株 GUS 染色验证

Fig. 4 GUS staining verification of *HvLRR-RLK510* gene promoter activity in *Arabidopsis thaliana* plants

2.2.2 基于瞬时表达本氏烟草植株验证启动子活性

为了进一步验证基于 *HvLRR-RLK510* 基因启动子的活性,将 pBWA(V)HG-35S::GUS 和 pBWA(V)HG-*HvLRR-RLK510*::GUS 导入本氏烟草植株,分析转化植株中 GUS 基因的瞬时表达特性。结果表明,在野生型烟草植株的根、茎、叶、花瓣和花药中未检测到 GUS 表达,35S 启动子驱动的 GUS 基因在上述组织中均高效表达(图 5)。 *HvLRR-RLK510* 基因启动子驱动的 GUS 报告基因仅在烟草花药中表达,但表达量明显低于 35S 启动子驱动的 GUS 基因的表达量(图 5)。这再次证明 *HvLRR-RLK510* 基因启动子可在花药中驱动 GUS 基因表达。

2.3 启动子截短片段的活性验证

设计特异性引物成功扩增 Morex 的 *HvL*-

RR-RLK510 基因启动子的截断片段 P1、P2 和 P3 (长度分别为 1 458、868 和 460 bp),每个截断片段至少携带 1 个位于转录起始点附近的通用顺式元件以及 1 个增强子(图 6)。

基于 pBWA(V)HG-35S::GUS 和 pBWA(V)HG-*HvLRR-RLK510*::GUS 融合表达载体的瞬时表达检测结果表明,野生型烟草植株的根、茎、叶、花药、花瓣和萼片均未被染色,35S 启动子在根、茎、叶、花药、花瓣和萼片中均可驱动 GUS 基因表达(图 7)。 *HvLRR-RLK510* 基因启动子及其 3 个截断片段可在花药中驱动 GUS 基因表达,但表达强度没有明显差异(图 7)。缺失片段(−461~−2 368 bp)对启动子活性没有明显影响,可用 460 bp 截断片段替换 *HvLRR-RLK510* 基因启动子。

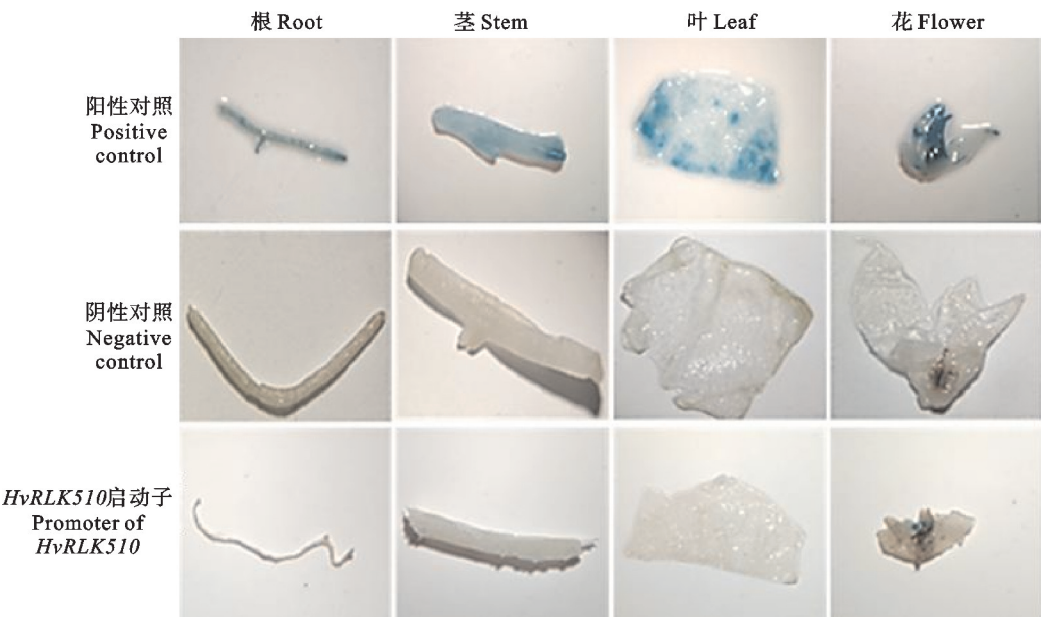


图 5 *HvLRR-RLK510* 基因启动子活性的本氏烟草植株 GUS 染色验证

Fig. 5 GUS staining verification of *HvLRR-RLK510* gene promoter activity in *Nicotiana benthamiana* plant

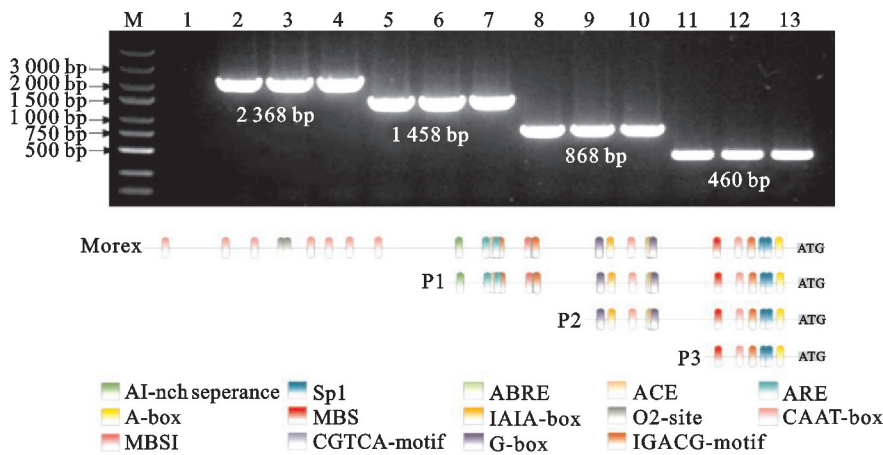


图 6 Morex 基因组中*HvLRR-RLK510* 基因启动子不同缺失片段的扩增及其顺式元件比较

Fig. 6 Amplification of different deletion fragments of the *HvLRR-RLK510* gene promoter in the Morex genome and comparison of their predicted cis-elements

2.4 非生物因素响应顺式元件的活性验证

在北青 7 号和 Ynbs 突变体叶中,随着 MeJA 处理时间的延长,*HvLRR-RLK510* 基因转录产物数量均呈先降后升的变化趋势,但不能恢复到对照水平;在 2 个材料根中该基因转录产物数量极显著减少后维持在较低水平(图 8 I)。在北青 7 号叶和根中,随着 ABA 处理时间的延长,*HvLRR-RLK510* 基因转录产物数量呈先降后升再降的变化趋势,处理 6 h 时叶中的降幅小于根中,处理 12 h 时叶中的增幅大于根中;在 Ynbs 突变体叶中该基因转录产物数量也呈先降后升再降的变化趋势,但在根中转录产物数量极显著减少后被

维持在较低水平(图 8 II)。在北青 7 号和 Ynbs 突变体叶中,随着低温处理时间的延长,*HvLRR-RLK510* 基因转录产物数量均极显著减少后维持在较低水平;北青 7 号根中该基因转录产物数量呈先降后升的变化趋势,Ynbs 突变体根中该基因转录产物数量极显著减少后虽然有增加的趋势,但未达到 0.05 显著水平(图 8 III)。北青 7 号和 Ynbs 叶片中,随着 PEG-2000 处理时间延长,*HvLRR-RLK510* 基因的转录产物数量均呈先降后升的变化趋势,在 2 个材料根中该基因转录产物数量均极显著减少后被维持在较低水平(图 8 IV)。在北青 7 号和 Ynbs 突变体叶中,随着光照

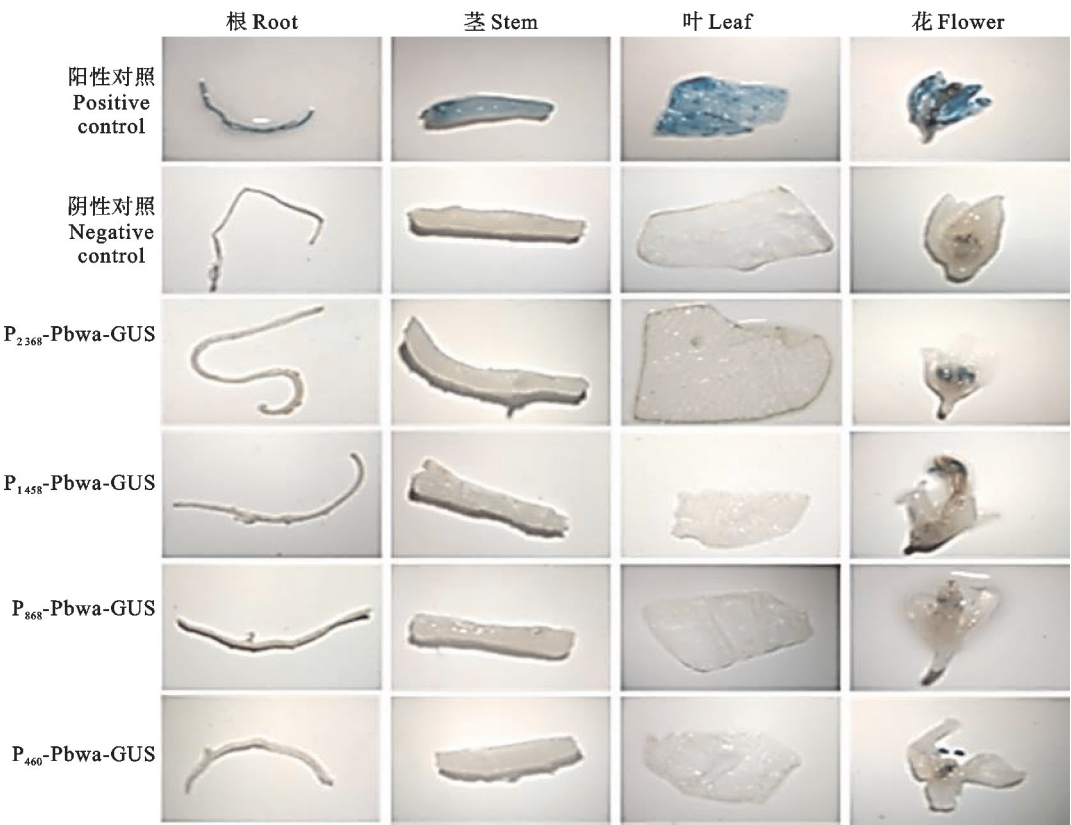


图 7 *HvLRR-RLK510* 基因缺失启动子片段活性的本氏烟草 GUS 染色验证

Fig. 7 GUS staining verification on deletion fragment activity of *HvLRR-RLK510* gene promoter in *Nicotiana benthamiana*

时间延长, *HvLRR-RLK510* 基因转录产物数量逐渐增加;在 2 个材料的根中该基因转录产物数量则呈先升后降的变化趋势,但均未能降至暗处理的水平(图 8 V)。

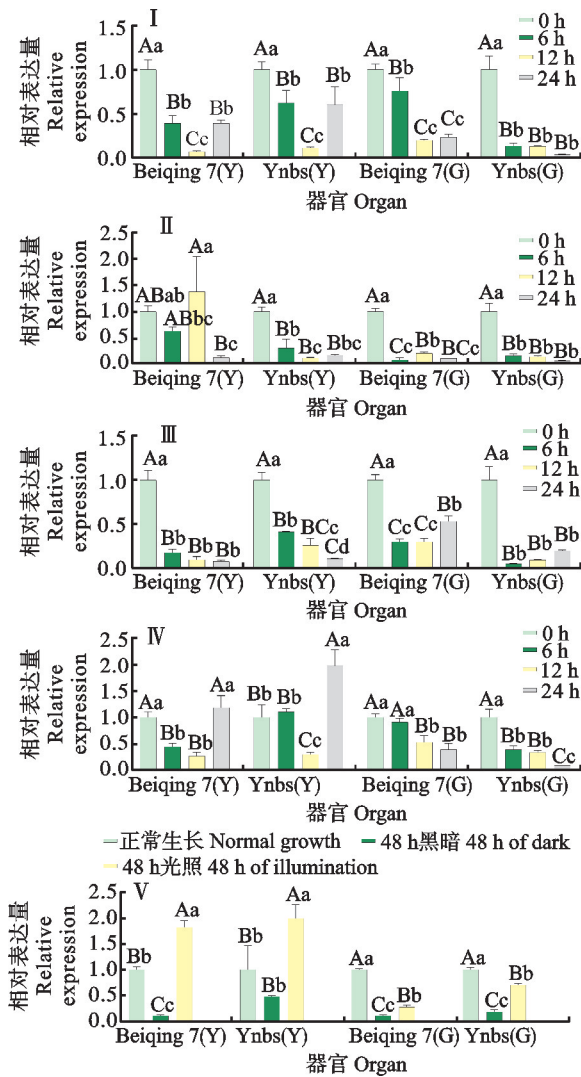
3 讨论

本研究基于所设计引物,以 Morex 和保大麦 8 号的基因组 DNA 为模板,扩增并测序了位于 *HvLRR-RLK510* 基因侧翼的 2 386 bp 的候选序列。基于 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 的预测结果表明,所克隆序列具有启动子的主要结构元件,如 TATA -box、CAAT-box 以及 MeJA、ABA 和低温等多种非生物因素的响应元件。虽然 3 个截断片段缺失了不同的顺式元件,但至少携带 1 个通用顺式元件和增强子(图 3)。所克隆序列及其 3 个截断片段在本氏烟草花药中均可有效驱动 *GUS* 基因表达,且 *GUS* 基因表达没有明显差异,该基因的转录起始效率主要由转录起始点及其附近的通用顺式元件(CAAT-box)和增强子决定。因此,我们认为所克隆的 2 386 bp 序列为 *HvL*-

RR-RLK510 基因启动子序列,可用 460 bp 的截断片段替代该基因启动子。

虽然在大麦根和叶中检测到 *HvLRR-RLK510* 基因的表达产物,但在拟南芥和本氏烟草中 *HvLRR-RLK510* 基因启动子及其截断片段只能在花药中驱动 *GUS* 基因表达,在单子叶植物大麦与双子叶植物本氏烟草、拟南芥中 *HvLRR-RLK510* 基因启动子的活性不同。Bakhsh 等发现在双子叶植物黄瓜、棉花和马铃薯中 35S 启动子的活性高于单子叶植物^[25-27],且具有明显的组织(或器官)和发育阶段特异性^[26-27]。与之相反,单子叶植物基因工程常用载体,如 Rice *Act1* promoter 和 RbcS promoter,在单子叶植物中的活性高于双子叶植物^[28-31]。已有文献报道了 C2H2 结构域、WOX 结构域、AP2 结构域等转录因子的 DNA 结合域序列在物种间存在差异,并导致了它们的遗传效应差异^[32-34]。因此推测,可能是反式转录因子的 DNA 结合域序列差异导致了拟南芥和本氏烟草与大麦的不同组织或器官中 *HvLRR-RLK510* 启动子的活性差异。

已有大量研究结果显示,植物类受体蛋白激酶



Beiqing 7(Y): 北青 7 号叶片; Ynbs(Y): Ynbs 叶片; Beiqing 7(G): 北青 7 号根; Ynbs(G): Ynbs 根。I: MeJA 处理; II: ABA 处理; III: 低温处理; IV: PEG-2000 处理; V: 光照处理。图柱上不同大小写字母分别表示同一材料不同取样时间间在 0.01 和 0.05 水平上差异显著。

Beiqing 7(Y): Beiqing 7 leaves; Ynbs(Y): Ynbs leaves; Beiqing 7(G): Beiqing 7 roots; Ynbs(G): Ynbs roots. I: MeJA treatment; II: ABA treatment; III: Low temperature treatment; IV: Drought treatment; V: Light treatment. Different capital and small letters on the columns indicate significant differences among different sampling stages for the same materials at 0.01 and 0.05 levels, respectively.

图 8 不同处理 *HvLRR-RLK510* 基因的
相对表达量及其差异

Fig. 8 Relative expression of *HvLRR-RLK510* and the
expression differences under different treatments

基因的转录受低温、干旱和激素等非生物因素诱导^[35-38]。在处理 6 h 内低温、干旱和激素等大多数非生物因素可促进类受体蛋白激酶基因转

录, 6 h 后转录被抑制。虽然在不同处理时间内非生物因素对类受体蛋白激酶基因转录的诱导作用可从促进转化为抑制, 但不同因素的诱导特性因组织(或器官)和被诱导的基因而异。王晨等发现, 在 MeJA 处理的北柴胡幼苗中 *BcMYC2* 表达量可在 0~2 h 内持续升高, 2~4 h 内持续下降, 随后在略有升高^[39], 但在 MeJA 处理的盐芥幼苗中 *MYC2* 的表达量可在 0~24 h 内持续下降^[40]。由于取样时间均不低于 6 h, 因此以上结果说明 MeJA、ABA、低温和 PEG-2000 均抑制了大麦根和叶中 *HvLRR-RLK510* 基因的转录。除上述因素外, 大麦叶片中 *HvLRR-RLK510* 基因转录产物数量随光照时间延长而逐渐增加, 但在根中 *HvLRR-RLK510* 基因转录产物数量呈现先升后降的变化趋势。因此, 作者认为 *HvLRR-RLK510* 基因转录受 5 种非生物因素诱导, 其启动子携带 5 种非生物因素的响应元件, 属于诱导型启动子。

在 MeJA 和 ABA 处理的 Ynbs 根中、低温处理的北青 7 号和 Ynbs 突变体叶中, 以及干旱处理的北青 7 号和 Ynbs 根中 *HvLRR-RLK510* 基因的转录被抑制后便处于较低水平, 该结果与王晨等^[39-42]的报道基本一致。在 MeJA 和干旱处理的北青 7 号和 Ynbs 突变体叶中、ABA 处理的北青 7 号根和叶中, 以及低温处理的北青 7 号叶中被抑制的 *HvLRR-RLK510* 基因转录随着处理时间的延长可被恢复, 转录产物的数量遵守先升后降再升的变化趋势。在不同器官中 MeJA、ABA、干旱等 5 种非生物因素对 *HvLRR-RLK510* 基因转录的诱导机制存在差异。真核生物基因的转录产物受反式因子的互作特性、材料的遗传背景、组织(或器官)生理状态等多种因素的影响。因此, 基于本研究结果还难以阐述上述 5 种非生物因素对 *HvLRR-RLK510* 基因转录的不同诱导机制。

参考文献:

[1] HANKS K, QUINN A M, HUNTER T. The protein kinase family: Conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains [J]. *Science*, 1988, 241(4861): 42.
[2] ULLRICH A, SCHLESSINGER J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity [J]. *Cell*, 1990, 61(2): 203.
[3] 马媛媛, 甘睿, 王宁宁. 植物富含亮氨酸重复序列类受体蛋白激酶的生物学功能[J]. 植物生理与分子生物学报, 2005, 31(4): 331.
MA Y Y, GAN R, WANG N N. Biological functions of leucine-rich repeat class of receptor-like protein kinases in plants

- [J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2005, 31(4): 331.
- [4] DAMBROZ C M D S, AONO A H, SILVA E M D, *et al.* Genome-wide analysis and characterization of the LRR-RLK gene family provides insights into anthracnose resistance in common bean [J]. *Scientific Reports*, 2023, 13(1): 13455.
- [5] STONE J M, WALKER J C. Plant protein kinase families and signal transduction [J]. *Plant Physiology*, 1995, 108(2): 451.
- [6] DIÉVART A, DALAL M, TAX F E, *et al.* CLAVATA1 dominant-negative alleles reveal functional overlap between multiple receptor kinases that regulate meristem and organ development [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(5): 1198.
- [7] DIÉVART A, CLARK S E. LRR-containing receptors regulating plant development and defense [J]. *Development*, 2004, 131(2): 251.
- [8] MORILLO S A, TAX F E. Functional analysis of receptor-like kinases in monocots and dicots [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2006, 9(5): 460.
- [9] KOBE B, DEISENHOFER J. Proteins with leucine-rich repeats [J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 1995, 5(3): 409.
- [10] ZHANG X R. Leucine-rich repeat receptor-like kinases in plants [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1998, 16(4): 301.
- [11] 阿依江·哈拜克, 杨敏, 韩玉珍. 拟南芥 LRR-RLKs 亚家族蛋白 RLK6 的亚细胞定位及 RLK6 的组织表达 [J]. 西北植物学报, 2014, 34(1): 1.
- AYIJIAN · HABAIKE, YANG M, HAN Y Z. Subcellular localization of RLK6, a protein of LRR-RLK subfamily and tissue expression pattern of the RLK6 in *Arabidopsis* [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2014, 34(1): 1.
- [12] HE Z, WANG Z Y, LI J, *et al.* Perception of brassinosteroids by the extracellular domain of the receptor kinase BRI1 [J]. *Science*, 2000, 288(5475): 2360.
- [13] NOGUCHI T, FUJIOKA S, CHOE S, *et al.* Brassinosteroid-insensitive dwarf mutants of *Arabidopsis* accumulate brassinosteroids [J]. *Plant Physiology*, 1999, 121(3): 743.
- [14] DIÉVART A, CLARK S E. Using mutant alleles to determine the structure and function of leucine-rich repeat receptor-like kinases [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2003, 6(5): 507.
- [15] LI J M, CHORY J. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction [J]. *Cell*, 1997, 90(5): 929.
- [16] DURBAK A R, TAX F E. CLAVATA signaling pathway receptors of *Arabidopsis* regulate cell proliferation in fruit organ formation as well as in meristems [J]. *Genetics*, 2011, 189(1): 177.
- [17] SU Y L, PENG X J, SHEN S H. Identification of leucine-rich repeat receptor-like protein kinase (LRR-RLK) genes in paper mulberry and their potential roles in response to cold stress [J]. *Computational Biology and Chemistry*, 2022, 97: 107622.
- [18] DASILVA-DAMBROZ C M, AONO A H, DEANDRADE SILVA E M, *et al.* Genome-wide analysis and characterization of the LRR-RLK gene family provides insights into anthracnose resistance in common bean [J]. *Scientific Reports*, 2023, 13: 13455.
- [19] WEI X, WANG Y L, ZHANG S, *et al.* Structural analysis of receptor-like kinase SOBIR1 reveals mechanisms that regulate its phosphorylation-dependent activation [J]. *Plant Communications*, 2022, 3(2): 100301.
- [20] ZHOU H B, HE J Y, WANG M Y, *et al.* Gene locus mapping and candidate gene screening for branched spike and its associated traits of the Ynbs mutant in barley [J]. *Agriculture*, 2023, 13(10): 1934.
- [21] WANG W B, HE J Y, CHEN S W, *et al.* Construction of a high-density genetic map and fine mapping of a candidate gene locus for a novel branched-spike mutant in barley [J]. *PLoS One*, 2020, 15(1): e0227617.
- [22] 王新天, 王卫斌, 陈升位, 等. 裸大麦突变体 Ynbs-1 的分枝穗特性及其遗传分析 [J]. 麦类作物学报, 2019, 39(5): 574.
- WANG X T, WANG W B, CHEN S W, *et al.* Characteristics of branched-spike of hullless barley mutant-Ynbs-1 and its genetic analysis [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2019, 39(5): 574.
- [23] 张悦婧, 李颖, 王娟娟, 等. 不同转化条件对 3 种农杆菌 GFP 基因在本氏烟草中瞬时表达的影响 [J]. 植物研究, 2022, 42(1): 121.
- ZHANG Y J, LI Y, WANG J J, *et al.* Effects of three kinds of *Agrobacterium* and different transformation conditions on the transient expression of GFP in *Nicotiana benthamiana* [J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2022, 42(1): 121.
- [24] 王丽平, 王晓钰, 傅竟也, 等. 玉米转录因子 ZmMYB12 提高植物抗旱性和低磷耐受性的功能鉴定 [J]. 作物学报, 2024, 50(1): 76.
- WANG L P, WANG X Y, FU J Y, *et al.* Functional identification of maize transcription factor ZmMYB12 to enhance drought resistance and low phosphorus tolerance in plants [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2024, 50(1): 76.
- [25] BAKHSH A, RAO A Q, SHAHID A A, *et al.* CaMV 35 S is a developmental promoter being temporal and spatial in expression pattern of insecticidal genes (*Cry 1 ac* & *Cry 2 a*) in cotton [J]. 2010, 4(1): 37.
- [26] SZWACKA M, SIEDLECKA E, ZAWIRSKA-WOJTASIAK R, *et al.* Expression pattern of the pre-prothaumatin II gene under the control of the CaMV 35S promoter in transgenic cucumber (*Cucumis sativus* L.) flower buds and fruits [J]. *Journal of Applied Genetics*, 2009, 50(1): 9.
- [27] KISELEV K V, ALEYNOVA O A, OGNEVA Z V, *et al.* 35S promoter-driven transgenes are variably expressed in different organs of *Arabidopsis thaliana* and in response to abiotic stress [J]. *Molecular Biology Reports*, 2021, 48(3): 2235.

- [28] MCELROY D, BLOWERS A D, JENES B, *et al.* Construction of expression vectors based on the rice actin 1 (Act1) 5' region for use in monocot transformation [J]. *Molecular and General Genetics MGG*, 1991, 231(1): 150.
- [29] LU J L, SIVAMANI E, LI X G, *et al.* Activity of the 5' regulatory regions of the rice polyubiquitin *ubi3* gene in transgenic rice plants as analyzed by both *GUS* and *GFP* reporter genes [J]. *Plant Cell Reports*, 2008, 27(10): 1587.
- [30] CHIBBAR R N, KARTHA K K, DATLA R S, *et al.* The effect of different promoter-sequences on transient expression of gus reporter gene in cultured barley (*Hordeum vulgare* L.) cells [J]. *Plant Cell Reports*, 1993, 12(9): 506.
- [31] NOMURA M, KATAYAMA K, NISHIMURA A, *et al.* The promoter of *rbcs* in a C_3 plant (rice) directs organ-specific, light-dependent expression in a C_4 plant (maize), but does not confer bundle sheath cell-specific expression [J]. *Plant Molecular Biology*, 2000, 44(1): 99.
- [32] 郭智滨, 张亚坤, 贺紫航, 等. 大豆 C_2H_2 型锌指蛋白转录因子家族全基因组鉴定及表达分析 [J]. 大豆科学, 2024, 43(2): 139.
- GUO Z B, ZHANG Y K, HE Z H, *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of C_2H_2 zinc finger protein gene family in soybean [J]. *Soybean Science*, 2024, 43(2): 139.
- [33] 冯珊珊, 王璐, 周益, 等. WOX 家族基因调控植物生长发育和非生物胁迫响应的研究进展 [J]. 生物技术通报, 2023, 39(5): 1.
- FENG S S, WANG L, ZHOU Y, *et al.* Research progresses on WOX family genes in regulating plant development and abiotic stress response [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2023, 39(5): 1.
- [34] 悦曼芳, 张春, 吴忠义. 植物转录因子 AP2/ERF 家族蛋白结构和功能的研究进展 [J]. 生物技术通报, 2022, 38(12): 11.
- YUE M F, ZHANG C, WU Z Y. Research progress in the structural and functional analysis of plant transcription factor AP2/ERF protein family [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2022, 38(12): 11.
- [35] SHIU S H, BLEECKER A B. Expansion of the receptor-like kinase/pelle gene family and receptor-like proteins in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2003, 132(2): 530.
- [36] HONG S W, JON J H, KWAK J M, *et al.* Identification of a receptor-like protein kinase gene rapidly induced by abscisic acid, dehydration, high salt, and cold treatments in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Physiology*, 1997, 113(4): 1203.
- [37] JUNG C G, HWANG S G, PARK Y C, *et al.* Molecular characterization of the cold- and heat-induced *Arabidopsis PXL1* gene and its potential role in transduction pathways under temperature fluctuations [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2015, 176: 138.
- [38] OUYANG S Q, LIU Y F, LIU P, *et al.* Receptor-like kinase OsSIK1 improves drought and salt stress tolerance in rice (*Oryza sativa*) plants [J]. *The Plant Journal*, 2010, 62(2): 316.
- [39] 王晨, 安立成, 李剑超, 等. 北柴胡 MYC2 转录因子的克隆及茉莉酸诱导的调控分析 [J]. 植物生理学报, 2021, 57(2): 439.
- WANG C, AN L C, LI J C, *et al.* Cloning of the MYC2 transcription factor from *Bupleurum chinense* and analysis of jasmonate-induced regulation [J]. *Plant Physiology Journal*, 2021, 57(2): 439.
- [40] 赵彤, 安慧, 李佳文, 等. 外源茉莉酸对盐芥芥子油苷含量与抗氧化特性的影响 [J]. 植物生理学报, 2021, 57(3): 614.
- ZHAO T, AN H, LI J W, *et al.* Effects of exogenous jasmonic acid on glucosinolate content and antioxidant properties of *Eutrema salsugineum* [J]. *Plant Physiology Journal*, 2021, 57(3): 614.
- [41] 冯飞雪, 吕瑞华, 李依民, 等. 北柴胡达玛烯二醇合成酶基因克隆及表达分析 [J]. 中草药, 2023, 54(23): 7815.
- FENG F X, LYU R H, LI Y M, *et al.* Cloning and expression analysis of dammarenediol synthase gene in *Bupleurum chinense* [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2023, 54(23): 7815.
- [42] 魏傲松, 李立群, 彭德, 等. 小麦 *TaPYL8* 基因的克隆与抗旱功能分析 [J]. 麦类作物学报, 2024, 44(6): 694.
- WEI A S, LI L Q, PENG D, *et al.* Cloning and drought resistance function analysis of wheat *TaPYL8* gene [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2024, 44(6): 694.