

## DNA 拓扑异构酶基因 *PagTOP2b* 对银腺杨 ‘84K’ 生长发育的影响

郭雅琨<sup>1</sup>, 赵岩秋<sup>1</sup>, 杜娟<sup>2</sup>, 卢孟柱<sup>1</sup>

(1. 浙江农林大学 林业与生物技术学院 省部共建亚热带森林培育国家重点实验室, 浙江 杭州 311300; 2. 浙江大学 生命科学学院, 浙江 杭州 310058)

**摘要:** 【目的】DNA 拓扑异构酶基因是一类能够改变 DNA 拓扑结构的酶, 在基础生命活动如 DNA 复制、转录、有丝分裂等过程中发挥重要作用。研究 DNA 拓扑异构酶基因对杨树 *Populus* 生长发育的影响, 能够进一步了解 DNA 拓扑异构酶基因在木本植物中的作用机制, 评估其是否可作为林木分子育种的靶标。【方法】从银腺杨 ‘84K’ *Populus alba* × *P. glandulosa* ‘84K’ (84K 杨) 中克隆得到 DNA 拓扑异构酶基因 *PagTOP2b*, 利用生物信息学方法对其进行序列分析、蛋白理化性质及结构分析。实时荧光定量 PCR 分析 *PagTOP2b* 在杨树不同组织中的表达水平。利用农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 介导的叶盘转化法转化 84K 杨, 得到 *PagTOP2b* 过表达转基因植株。通过表型及茎段切片分析过表达 *PagTOP2b* 基因对 84K 杨植株生长的影响。【结果】以 84K 杨 cDNA 为模板, 克隆得到 *PagTOP2b* 基因全长序列, 该基因蛋白质编码区 (CDS) 长度为 4 449 bp, 编码 1 482 个氨基酸, 根据蛋白结构域分析属于 II A 型 DNA 拓扑异构酶。*PagTOP2b* 主要在杨树幼嫩组织中有较高的表达量。过量表达 *PagTOP2b* 基因会导致转基因植株高度、基部节间直径和木质部宽度显著增加。【结论】DNA 拓扑异构酶作为一类参与基础生命活动的重要功能酶, 在杨树中过量表达 II A 型 DNA 拓扑异构酶基因 *PagTOP2b* 可促进植株的纵向及径向生长, 增加植株生物量。图 4 表 1 参 28

**关键词:** DNA 拓扑异构酶; 银腺杨 ‘84K’; 过量表达; 生物量

中图分类号: S722; Q78 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2022)06-1155-08

## Effects of DNA topoisomerase *PagTOP2b* on growth and development of poplar ‘84K’

GUO Yakun<sup>1</sup>, ZHAO Yanqiu<sup>1</sup>, DU Juan<sup>2</sup>, LU Mengzhu<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, College of Forestry and Biotechnology, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 2. College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China)

**Abstract:** [Objective] DNA Topoisomerase, as a kind of enzyme that can change the topological structure of DNA, plays an important role in fundamental cellular activities such as DNA replication, transcription and mitosis, therefore, this study, with an investigation into the effects of DNA topoisomerase genes on the growth and development of poplar, is aimed to lay a solid foundation for further understanding of the mechanism of DNA topoisomerase in woody plants and to evaluate whether it can be used as a target for molecular breeding. [Method] First, DNA topoisomerase gene *PagTOP2b* was cloned from poplar ‘84K’ (*Populus alba* × *P. glandulosa* ‘84K’) before an analysis was conducted of its sequence and the protein physicochemical

收稿日期: 2022-05-31; 修回日期: 2022-07-30

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2021YFD2200205, 2021YFD2200700)

作者简介: 郭雅琨 (ORCID: 0000-0002-5742-5726), 从事林木遗传学研究。E-mail: LeafGuo777@126.com。通信作者: 卢孟柱 (ORCID: 0000-0001-9245-1842), 教授, 博士, 博士生导师, 从事林木遗传育种研究。E-mail: lumz@caf.ac.cn

properties and structure with the employment of Bioinformatic method. Then, with an exploration of the expression levels in different tissues of poplar by real-time quantitative PCR, *Agrobacterium tumefaciens*-mediated leaf disc transformation in poplar ‘84K’ was adopted to obtain *PagTOP2b*-overexpression transgenic plants with observations made of the effects of overexpression of *PagTOP2b* gene on the growth and development of plants employing a phenotypic and anatomic analysis. [Result] The coding sequence (CDS) length of the *PagTOP2b* gene cloned by using poplar ‘84K’ cDNA as the template was 4 449 bp, encoding 1 482 amino acids. According to protein domain analysis, it is classified as type II A DNA topoisomerase. *PagTOP2b* was mainly expressed in immature and younger tissues of poplar. Overexpression of *PagTOP2b* gene resulted in a significant increase in height, basal internode diameter and xylem width of transgenic plants. [Conclusion] As an important functional enzyme involved in basic life activities, the overexpression of type II A DNA topoisomerase gene *PagTOP2b* in poplar can significantly promote the longitudinal and radial growth in plant, thus increasing plant biomass. [Ch, 4 fig. 1 tab. 28 ref.]

**Key words:** DNA topoisomerase; *Populus alba* × *P. glandulosa* ‘84K’; overexpression; biomass

DNA 拓扑异构酶 (DNA topoisomerase, TOP) 是一类能够改变 DNA 拓扑结构的酶, 在细胞的一系列基础生命活动如 DNA 复制、转录和染色体分离等过程中发挥着重要作用<sup>[1-2]</sup>。DNA 拓扑异构酶在 1971 年被首次发现, 命名为  $\omega$  蛋白, 即 DNA 拓扑异构酶 I, 是大肠埃希菌 *Escherichia coli* 中能够特异性地将负超螺旋 DNA 解旋的一种拓扑异构酶<sup>[3-4]</sup>。根据 DNA 拓扑异构酶的功能和作用机制, 可以将其分成 I 型和 II 型 DNA 拓扑异构酶, I 型 TOP 只切割 DNA 的 1 条链, 不具有腺苷三磷酸 (ATP) 依赖性, II 型 TOP 能切割 DNA 的 2 条链并形成双链断裂, 具有 ATP 依赖性<sup>[5]</sup>。真核生物中, II 型 DNA 拓扑异构酶包括 II A 型 DNA 拓扑异构酶和 II B 型 DNA 拓扑异构酶: II A 型 DNA 拓扑异构酶在高等真核生物 (如哺乳动物) 中有 2 种异构体, 分别为 TOP2 $\alpha$  和 TOP2 $\beta$ , 在低等真核生物中通常只有 1 种; II B 型 DNA 拓扑异构酶在真核生物中主要是与酵母 Spo11 同源的 II B 型 DNA 拓扑异构酶, 以及植物中与古细菌 II B 型 DNA 拓扑异构酶同源的 TOPVI<sup>[6]</sup>。

在动物细胞中的研究表明: II 型 DNA 拓扑异构酶主要在复制和转录过程中对 DNA 双链进行解旋, 并且确保有丝分裂过程中姐妹染色单体的正确分离, 对染色质的结构和凝缩也有重要作用<sup>[7]</sup>。TOP2 $\alpha$  对细胞周期起重要调节作用, 保证分裂旺盛细胞的活性, 不分裂细胞中则没有 TOP2 $\alpha$ ; TOP2 $\beta$  对小鼠 *Mus musculus* 胚胎发育过程中神经元的形成具有重要影响, 缺失 TOP2 $\beta$  的小鼠出生后无法存活<sup>[6, 8]</sup>。DNA 拓扑异构酶还常被作为抗癌药物的靶标蛋白, 通过抑制 DNA 拓扑异构酶活性导致复制叉停滞, 形成双链断裂并干扰细胞周期, 进而抑制肿瘤细胞的快速增殖<sup>[9-11]</sup>。植物中已对拟南芥 *Arabidopsis thaliana*、小麦 *Triticum aestivum*、花椰菜 *Brassica oleracea* var. *botrytis* 等的 DNA 拓扑异构酶进行了分离和生化性质等方面的研究<sup>[12-17]</sup>, 但 DNA 拓扑异构酶的作用机制研究大多集中在动物和酵母系统里, 关于植物 DNA 拓扑异构酶作用机制的研究较少。研究表明: 在烟草 *Nicotiana tabaccum* 中过表达 II 型 DNA 拓扑异构酶能够改变烟草植株形态, 提高烟草的盐胁迫耐受性<sup>[18]</sup>。关于拟南芥中 DNA 拓扑异构酶 II 的研究表明: TOP II 和染色体运动有助于消除减数分裂过程中纠缠染色体之间的连锁<sup>[19]</sup>。研究发现: *top II* 突变体拟南芥幼苗的根生长受到明显抑制, 表明 TOP II 在根生长和细胞周期调控中发挥作用, 还可通过同源重组的方式进行有丝分裂中的 DNA 修复和减数分裂中的 DNA 双链断裂 (DSBs) 修复<sup>[20]</sup>, 并与 TOP II 结合蛋白 (TopBP1) 在 DNA 修复、有丝分裂和减数分裂过程中共同发挥作用<sup>[21]</sup>。

杨树 *Populus* 作为研究木本植株生长发育的模式树种, 在 DNA 拓扑异构酶的功能和作用机制等方面仍有许多空白。本研究以银腺杨 ‘84K’ *Populus alba* × *P. glandulosa* ‘84K’ (84K 杨) 为研究对象, 利用生物信息学及分子生物学方法, 对杨树 DNA 拓扑异构酶基因功能进行初步探究, 以期 DNA 拓扑异构酶基因在木本植物中的作用机制和木本植物分子育种提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

以 84K 杨组培苗为研究材料, 组培苗生长温度为  $(24\pm 2)^\circ\text{C}$ , 光照为 16 h/8 h (光照/黑暗)。土培苗为将生长约 4 周的组培苗从 1/2 MS 培养基移栽至营养土中, 在温度  $(24\pm 2)^\circ\text{C}$ , 光照 16 h/8 h (光照/黑暗), 相对湿度 60%~80% 的土培室中培养。

### 1.2 RNA 提取与 cDNA 合成

提前高温处理研钵、药匙等直接与样品接触的试验器具。用预冷的研钵将植物材料在液氮中快速研磨成细腻粉末, 取约 100 mg 粉末至 RNase-free 离心管中, 使用商业购买的 RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (TIANGEN #DP441) 提取 84K 杨不同组织的总 RNA。提取得到的 RNA 用商业购买的 FastKing cDNA 第一链合成试剂盒 (TIANGEN #KR116) 进行反转录合成 cDNA。

### 1.3 基因克隆与序列分析

84K 杨基因组数据来源于国家基因库序列归档系统 (CNGB Nucleotide Sequence Archive, CNSA), 项目号为 CNP0000339<sup>[22]</sup>。根据 *PagTOP2b* 基因蛋白质编码序列 (CDS), 用 Oligo 7 软件设计基因全长序列克隆扩增引物, 以从 84K 杨中提取的 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板进行 *PagTOP2b* 基因的克隆。

在 84K 杨基因组数据库的 GFF 文件中提取 *PagTOP2b* 基因非翻译区、外显子和内含子的长度及染色体位置信息, 使用 TBtools 软件绘制基因结构图<sup>[23]</sup>。在美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 的保守结构域数据库 (conserved domain database, CDD) 中搜索蛋白序列的保守结构域<sup>[24]</sup>。在 SOPMA ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa%20\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa%20_sopma.html)) 网站上进行 *PagTOP2b* 蛋白二级结构在线分析。并通过 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 在线预测 *PagTOP2b* 蛋白三级结构, 结合相关注释信息绘图分析<sup>[25]</sup>。

使用 ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>) 在线分析网站对 *PagTOP2b* 蛋白的序列长度、蛋白分子质量、等电点、亲水性平均系数、脂肪族氨基酸指数、不稳定指数等蛋白质理化性质进行分析<sup>[26]</sup>。并在 Cell-Ploc 2.0 网站中 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>) 选择 Plant-mPLOC 进行 *PagTOP2b* 蛋白亚细胞定位预测<sup>[27]</sup>。

### 1.4 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 分析

在 Primer3 (<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) 网站上以 *PagTOP2b* 基因 CDS 序列为模板设计实时荧光定量 PCR 特异性引物 (表 1)。以待分析样品的 cDNA 为模板, 根据商业购买的荧光定量 PCR 试剂 ChamQ SYBR qPCR Master Mix (Vazyme #Q311-02/03) 使用说明配置反应体系, 选择 *ACTIN* 基因为内参基因。在 Applied Biosystems QuantStudio 3 (Thermo Fisher Scientific) 实时荧光定量 PCR 系统中进行反应。设置 3 个生物学重复和 4 次技术重复, 取平均值作为后续计算的阈值循环数 ( $C_t$  值), 采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算目的基因的相对表达水平。

### 1.5 杨树遗传转化

遗传转化所用 *PagTOP2b* 基因过表达载体 pCAMBIA-S1300-flag-*PagTOP2b* 为实验室保存。农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 化学感受态细胞购自上海唯地生物 (#AC1001)。将载体转化至农杆菌 GV3101 中, 采用农杆菌介导法转化 84K 杨。对鉴定为阳性的转基因植株及 84K 杨对照植株的相同组织取材进行 RNA 提取、反转录及实时荧光定量 PCR 分析表达量变化。以 84K 杨植株表达量为对照计算转基因植株相对表达量。

### 1.6 生长指标测定及组织切片

选取相对表达量较高的株系, 组培苗扩繁至每个株系至少 15 棵重复。生长约 4 周后选取生长状态

表 1 基因克隆及实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 引物

| Table 1 Primers for gene clone and RT-qPCR |                               |
|--------------------------------------------|-------------------------------|
| 引物名称                                       | 引物序列(5'→3')                   |
| <i>PagTOP2b</i>                            | F: ATGGCGGCAGAGACCAAGAAAAT    |
|                                            | R: GTCAGAGGAAGAGTCAGAATCATCAT |
| <i>PagTOP2b</i>                            | qrtF: AGACTACTGGTGGGAGAAAAT   |
|                                            | qrtR: GTCACCTTGGTCCAATTCTC    |
| <i>ACTIN</i>                               | qrtF: AAAGTGAATGGTCTCCCTCCG   |
|                                            | qrtR: GCATCATCACAATCACTCTCCGA |

说明: F 表示基因克隆的正向引物; R 表示基因克隆的反向引物; qrtF 表示 RT-qPCR 的正向引物; qrtR 表示 RT-qPCR 的反向引物

良好且长势一致的植株,同具有相同遗传背景的84K杨对照植株一起移栽至营养土中。对移栽后的植株进行表型观察和记录,测定株高和地径。切取新鲜杨树茎段,用速干强力胶固定在样品架上,使用Leica VT1200S 振动式切片机,将茎段横切成厚度为40  $\mu\text{m}$  的薄片。切片平铺在载玻片上,滴加质量分数为0.1%的甲苯胺蓝(TBO)染液,染色30~60 s后洗去染液,需根据染色程度调整染色时间。将染色后的切片放在载玻片上,用Leica DM6 B 正置荧光显微镜观察并拍照记录,目镜放大倍数为10倍,物镜放大倍数为10倍。使用ImageJ软件测量木质部宽度。

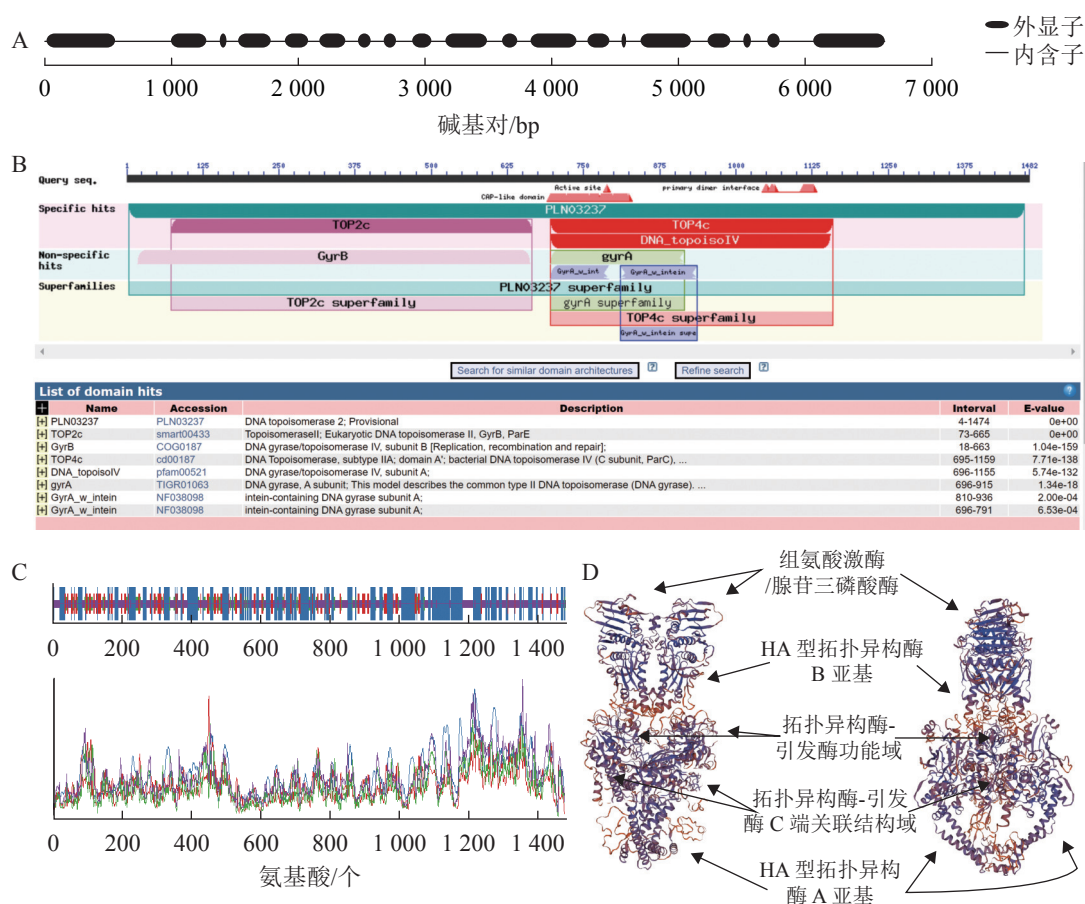
### 1.7 数据统计

用Excel软件进行数据统计,并对株高、地径和木质部宽度进行显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 *PagTOP2b* 基因克隆与序列分析

以84K杨cDNA为模板,克隆得到*PagTOP2b*基因全长序列,对其进行基因结构、蛋白理化性质、保守结构域及蛋白高级结构的分析。如图1A所示:*PagTOP2b*基因结构包含19个外显子,蛋白质编码区(CDS)长度为4 449 bp。如图1B所示:蛋白保守结构域主要包括PLN03237,目前被认为是跨越多个结构域的DNA拓扑异构酶II模块,此外特定匹配的保守结构域还包括靠近N端的TOP2c,是真核生物中II型拓扑异构酶具有的结构域;位于中部靠近C端的TOP4c,是II A亚型拓扑异构酶具有的结构域。如图1C所示:蛋白二级结构中, $\alpha$ -螺旋占40.08%,延伸链占14.51%, $\beta$ -折叠占5.20%,无规则卷曲占40.22%,即蛋白主要折叠方式为 $\alpha$ -螺旋和无规则卷曲。如图1D所示:蛋白三级结构为同型二聚体,包含组氨酸激酶/腺苷三磷酸酶结构域,2个II A型拓扑异构酶功能域,以及拓扑异构酶-引发酶功能域



A. 基因结构; B. 蛋白保守结构域; C. 蛋白二级结构分析, 其中, 蓝色表示 $\alpha$ -螺旋, 红色表示延伸链, 绿色表示 $\beta$ -折叠, 黄色表示无规则卷曲; D. 蛋白三级结构预测

图1 *PagTOP2b* 基因及其编码蛋白的特征分析

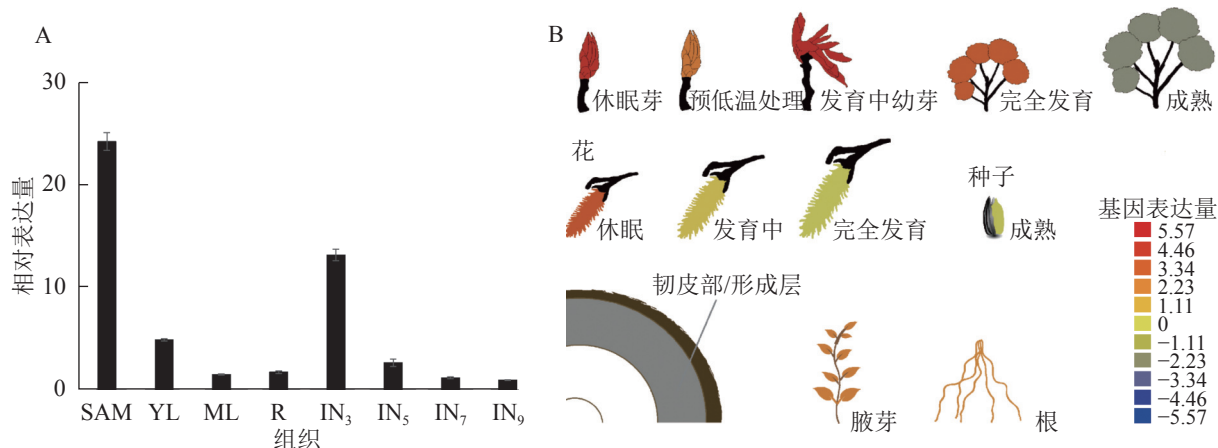
Figure 1 Characteristics of *PagTOP2b* gene and its coding protein

(topoisomerase-primase domain, TOPRIM domain), 该结构域是在 II 型拓扑异构酶等酶类中发现的核苷酸转移酶/水解酶功能域。

蛋白理化性质分析结果表明: *PagTOP2b* 蛋白共有 1 482 个氨基酸, 蛋白分子质量为 166.1 kDa。理论等电点为 7.54, 属碱性蛋白。亲水性平均系数为负数, 表明蛋白均具有较强的亲水性。脂肪族氨基酸指数 (蛋白中脂肪族侧链所占据的相对体积) 为 77.76, 不稳定指数为 41.04, 大于 40, 为不稳定蛋白。亚细胞定位预测结果显示: *PagTOP2b* 蛋白具有叶绿体和细胞核定位信号。

## 2.2 *PagTOP2b* 表达模式分析

为研究 *PagTOP2b* 基因在 84K 杨不同组织的表达情况, 分别取 84K 杨顶芽, 第 3、5、7、9 节间, 幼叶, 成熟叶和根进行 RNA 提取, 反转录合成 cDNA 后进行实时荧光定量分析。结果如图 2A 所示: *PagTOP2b* 在茎顶端分生组织 (SAM) 表达量最高, 其次在第 3 节间 (IN<sub>3</sub>) 表达量较高, 在幼叶 (YL) 中的表达量也高于在成熟叶 (ML), 即该基因在 84K 杨的幼嫩组织中有较高的表达量。同时在杨树资源数据库网站 PopGenIE (<https://popgenie.org/gene?id=Potri.009G058900>) 中, 查找毛果杨 *P. trichocarpa* 中 II 类 TOP 基因 *PtTOP2b* 在杨树不同组织中的表达情况, 如图 2B 所示: *PtTOP2b* 在休眠的叶芽、发育过程中的叶芽以及休眠的花芽中有较高的表达量, 与 84K 杨中定量分析结果相一致。



A. 84K 杨不同组织中 *PagTOP2b* 基因相对表达量, 其中, SAM 表示顶端分生组织, YL 表示幼叶, ML 表示成熟叶, R 表示根, IN<sub>3</sub> 表示第 3 节间, IN<sub>5</sub> 表示第 5 节间, IN<sub>7</sub> 表示第 7 节间, IN<sub>9</sub> 表示第 9 节间; B. 毛果杨 *PtTOP2b* 基因在不同组织中的表达情况

图 2 *TOP2b* 基因在毛果杨和 84K 杨不同组织中的表达情况

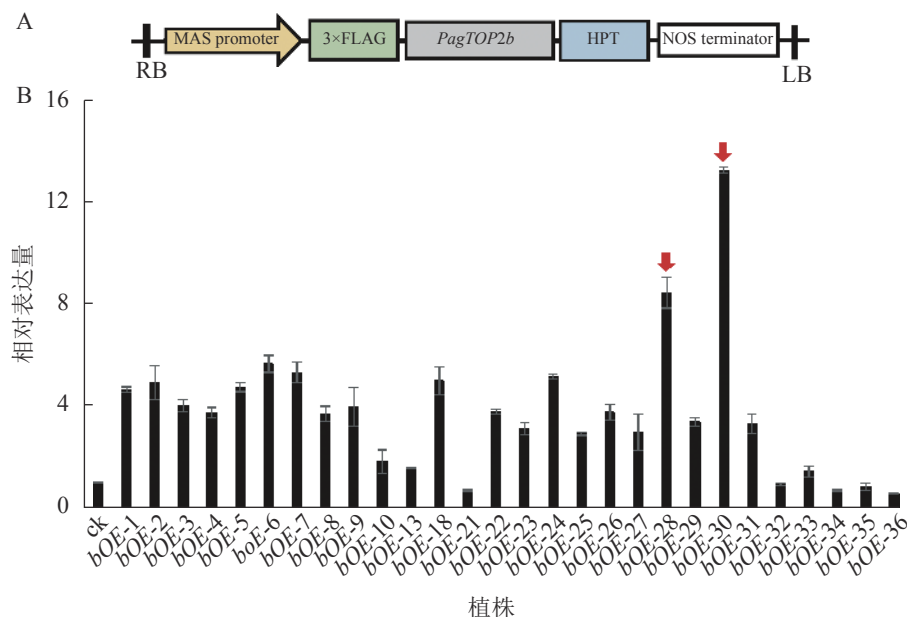
Figure 2 Expression of *TOP2b* gene in different tissues of black cottonwood and poplar '84K'

## 2.3 转基因杨树 *PagTOP2b* 表达水平

为进一步研究 *PagTOP2b* 基因对杨树生长发育的影响, 通过农杆菌介导的叶盘转化法获得 *PagTOP2b* 过表达的转基因 84K 杨植株。过表达载体图谱见图 3A, 对转基因植株进行转录水平分析, 选择表达量较高的株系用于后续试验。根据目的基因的相对表达量情况 (图 3B), 选择 *PagTOP2b* 过表达株系 *bOE-28* 和 *bOE-30* 进行后续实验。过表达株系 *bOE-28* 中目的基因相对表达量为对照植株中目的基因表达量的 8.46 倍, *bOE-30* 为 13.29 倍。

## 2.4 过表达 *PagTOP2b* 基因对杨树生长发育的影响

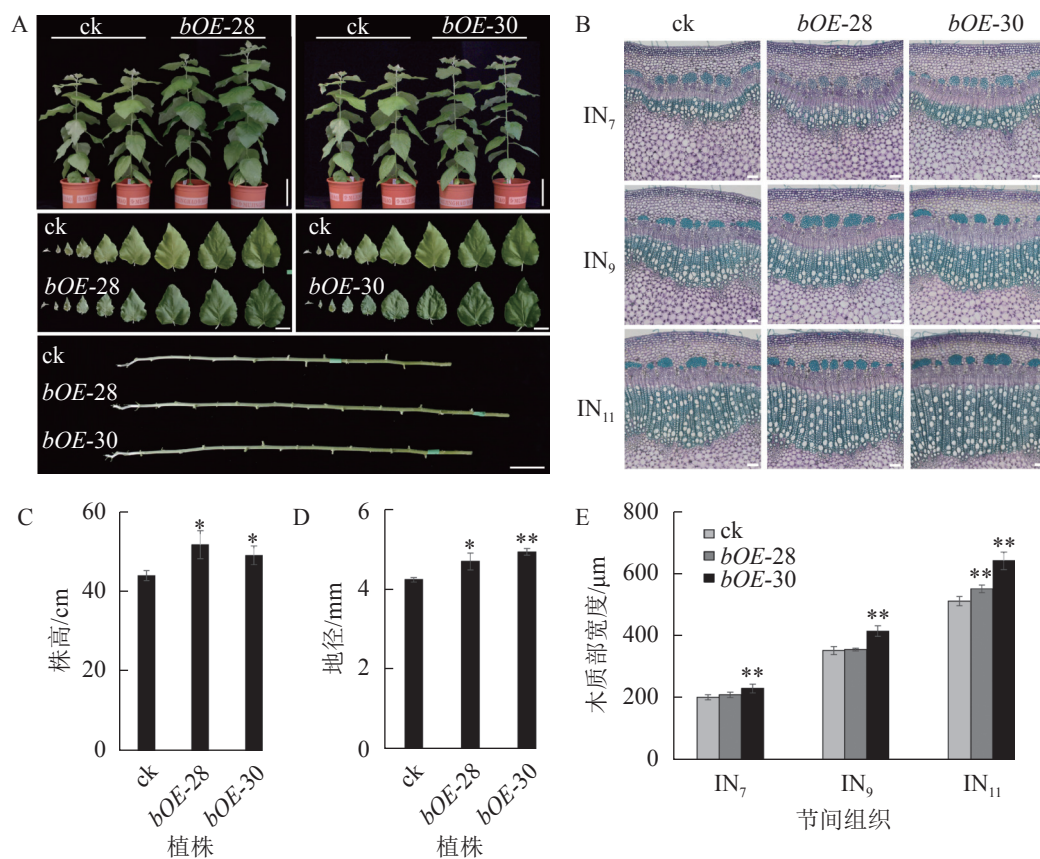
将过表达植株和对照植株移栽至土壤培养 3 个月后观察并记录表型 (图 4A)。取第 7、9、11 节间并对其进行横切面进行切片观察, 发现对照与过表达植株相比细胞形态无明显差异 (图 4B)。相比于对照, *PagTOP2b* 过表达株系 *bOE-28* 和 *bOE-30* 植株高度显著大于对照 ( $P < 0.05$ ), 相比对照分别增加了 17.5% 和 11.5% (图 4C); 过表达株系 *bOE-28* 植株的地径显著大于对照 ( $P < 0.05$ ), *bOE-30* 植株的地径极显著大于对照 ( $P < 0.01$ ), 相比对照分别增加了 10.7% 和 16.3% (图 4D)。通过统计其木质部宽度发现: *PagTOP2b* 过表达株系 *bOE-30* 自第 7 节间起木质部宽度极显著大于对照 ( $P < 0.01$ ), 过表达株系 *bOE-28* 第 11 节间木质部宽度极显著大于对照 ( $P < 0.01$ ) (图 4E)。



A. *PagTOP2b* 过表达载体图谱; B. *PagTOP2b* 过表达转基因植株转录水平, 其中, ck 表示对照植株; bOE-1 至 bOE-36 分别表示不同的 *PagTOP2b* 转基因株系

图 3 *PagTOP2b* 过表达载体及转基因植株转录水平分析

Figure 3 *PagTOP2b* overexpression vector and transcriptional level analysis of transgenic plants



A. 土培 3 个月对照和转基因植株表型 (整株苗比例尺为 10 cm, 叶片及茎段比例尺为 5 cm, ck 为 84K 杨对照植株); B. 茎段横切切片 (比例尺为 100 μm, 震荡切片厚度为 40 μm, 质量分数为 0.1% 的甲苯胺蓝染色, IN<sub>7</sub>、IN<sub>9</sub>、IN<sub>11</sub> 分别代表第 7、9、11 节间); C. 株高; D. 地径; E. 木质部宽度。\*表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), \*\*表示差异极显著 ( $P < 0.01$ )

图 4 *PagTOP2b* 过表达转基因杨树表型分析

Figure 4 Phenotypic analysis of *PagTOP2b* overexpression transgenic poplar

### 3 讨论

植物生长发育的过程,就是植物细胞、组织和器官在数量上不可逆增加以及细胞分化的过程。DNA 拓扑异构酶在染色体复制、细胞分裂及基因转录中发挥重要作用。本研究对 84K 杨中的 DNA 拓扑异构酶基因 *PagTOP2b* 进行克隆及序列分析,对序列长度、保守结构域及蛋白三级结构注释信息的分析显示:该基因包含腺苷三磷酸酶结构域、TOPRIM 结构域以及 II A 亚型拓扑异构酶具有的结构域,与先前研究中总结的动植物 II A 亚型拓扑异构酶结构相符<sup>[5,28]</sup>,因此判断该基因属于 II A 亚型 DNA 拓扑异构酶。

对 *PagTOP2b* 基因在 84K 杨不同组织中的表达模式分析表明:该基因在顶端分生组织和第 3 节间中表达量较高。相比于 84K 杨,毛果杨具有更丰富的转录组数据,能够对基因在杨树不同组织的表达情况进行详细分析,同时对 84K 杨中 DNA 拓扑异构酶基因的表达情况而言具有一定借鉴意义。因此,对毛果杨中直系同源基因 *PtTOP2b* 的表达模式进行分析显示:*PtTOP2b* 在叶芽及花芽中具有较高的表达量,即在幼嫩组织具有较高的表达量。有研究表明:豌豆 *Pisum sativum*、玉米 *Zea mays* 和拟南芥中发现 II 型 DNA 拓扑异构酶在生长活跃的植物组织中有较高的表达量<sup>[15]</sup>。本研究结果与前人研究结果一致,说明 *PagTOP2b* 基因主要在细胞活跃分裂、分化的组织中表达,推测其在植物的生长发育中起重要作用。同时,*PagTOP2b* 在杨树的第 3 节间高表达,表明其可能在杨树的径向生长中发挥作用。因此,需要进一步研究确认 *PagTOP2b* 对杨树树高生长和径向生长的影响。

为了进一步确定该基因的作用,采用农杆菌介导的基因转化方法,获得了 *PagTOP2b* 基因过表达 84K 杨植株。与对照植株相比,转基因植株高度显著增加,即促进了杨树生物量的增加,说明该基因具有进行定向分子育种的潜在应用价值。除了促进杨树树高生长外,茎段的直径及木质部宽度的增加,说明该基因还影响了杨树木质部的发育,可能来源于对形成层活动的调控,需要进一步的研究予以证实。有研究表明:过表达 II 型 DNA 拓扑异构酶 *NtTopo II $\alpha$*  会对烟草生长发育及植株形态产生影响,相比于野生型,过表达植株开花结籽提前 2~3 周,茎长增加但直径减小,节间长度变长,根系更加发达<sup>[18]</sup>。本研究与其在株高增加上的表型一致,但茎直径变化不同,可能由于草本植物与木本植物的茎段次生长存在差异。总而言之,*PagTOP2b* 基因能够同时促进杨树径向和纵向的生长。

### 4 结论

本研究通过克隆及序列分析确定 *PagTOP2b* 是 84K 杨中的一个 II A 型 DNA 拓扑异构酶基因,在幼嫩组织具有较高的表达量。通过转基因技术过表达 *PagTOP2b* 基因,能够显著促进植株增高,茎直径增大,促进杨树径向及纵向的生长,增加植株生物量。

### 5 参考文献

- [1] DURAND-DUBIEF M, SVENSSON J P, PERSSON J, *et al.* Topoisomerases, chromatin and transcription termination [J]. *Transcription*, 2011, **2**(2): 66 – 70.
- [2] OSHEROFF N, ASHLEY R E. Regulation of DNA topology by topoisomerases: mathematics at the molecular level[M]. ADAMS C, GORDON C, JONES V, *et al.* *Knots Low-Dimensional Topology and Applications*. Cham: Springer International Publishing, 2019: 411 – 433.
- [3] WANG J C. Interaction between DNA and an *Escherichia coli* protein  $\omega$  [J]. *J Mol Biol*, 1971, **55**(3): 523 – 533.
- [4] KRESGE N, SIMONI R D, HILL R. Unwinding the DNA topoisomerase story: the work of James C. Wang[J/OL]. *J Biol Chem*, 2007, **282**(22): e17-e19[2022-04-20]. doi: 10.1016/S0021-9258(20)64989-4.
- [5] CHAMPOUX J J. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism [J]. *Annu Rev Biochem*, 2001, **70**: 369 – 413.
- [6] NITISS J L. DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, **9**(5): 327 – 337.
- [7] CHEN S H, CHAN N L, HSIEH T S. New mechanistic and functional insights into DNA topoisomerases [J]. *Annu Rev Biochem*, 2013, **82**: 139 – 170.
- [8] AUSTIN C A, LEE K C, SWAN R L, *et al.* TOP2B: the first thirty years[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2018, **19**(9): 2765[2022-04-25]. doi: 10.3390/ijms19092765.

- [9] DELGADO J L, HSIEH C M, CHAN N L, *et al.* Topoisomerases as anticancer targets [J]. *Biochem J*, 2018, **475**(2): 373 – 398.
- [10] HEVENER K, VERSTAK T A, LUTAT K E, *et al.* Recent developments in topoisomerase-targeted cancer chemotherapy [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2018, **8**(6): 844 – 861.
- [11] LIANG Xiaoxia, WU Qiang, LUAN Shangxian, *et al.* A comprehensive review of topoisomerase inhibitors as anticancer agents in the past decade [J]. *Eur J Med Chem*, 2019, **171**: 129 – 168.
- [12] RUDENKO G N. Plant DNA-topoisomerase type II: isolation, characterization, and properties [J]. *Mol Biol*, 1992, **25**: 887 – 896.
- [13] FUKATA H, OHGAMI K, FUKASAWA H. Isolation and characterization of DNA topoisomerase II from cauliflower inflorescences [J]. *Plant Mol Biol*, 1986, **6**(3): 137 – 44.
- [14] XIE Shaoping, LAM E. Characterization of a DNA topoisomerase II cDNA from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Physiol*, 1994, **106**(4): 1701 – 1702.
- [15] MAKAREVITCH I, SOMERS D A. Purification and characterization of topoisomerase II A from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Sci*, 2005, **168**(4): 1023 – 1033.
- [16] XIE Shaoping, LAM E. Abundance of nuclear DNA topoisomerase II is correlated with proliferation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Nucleic Acids Res*, 1994, **22**(25): 5729 – 5736.
- [17] DYNAN W S, JENDRISAK J J, HAGER D A, *et al.* Purification and characterization of wheat germ DNA topoisomerase I (nicking-closing enzyme) [J]. *J Biol Chem*, 1981, **256**(11): 5860 – 5865.
- [18] JOHN R, GANESHAN U, SINGH B N, *et al.* Over-expression of topoisomerase II enhances salt stress tolerance in tobacco [J/OL]. *Front Plant Sci*, 2016, **7**: 1280 [2022-05-01]. doi: 10.3389/fpls.2016.01280.
- [19] MARTINEZ-GARCIA M, SCHUBERT V, OSMAN K, *et al.* TOP II and chromosome movement help remove interlocks between entangled chromosomes during meiosis [J]. *J Cell Biol*, 2018, **217**(12): 4070 – 4079.
- [20] MARTINEZ-GARCIA M, WHITE C I, FRANKLIN F C H, *et al.* The role of topoisomerase II in DNA repair and recombination in *Arabidopsis thaliana* [J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2021, **22**(23): 13115 [2022-05-04]. doi: 10.3390/ijms222313115.
- [21] PARRA-NUNEZ P, COOPER C, SANCHEZ-MORAN E. The role of DNA topoisomerase binding protein 1 (TopBP1) in genome stability in *Arabidopsis* [J/OL]. *Plants*, 2021, **10**(12): 2568 [2022-05-08]. doi: 10.3390/plants10122568.
- [22] QIU Deyou, BAI Shenglong, MA Jianchao, *et al.* The genome of *Populus alba* × *Populus tremula* var. *glandulosa* clone 84K [J]. *DNA Res*, 2019, **26**(5): 423 – 431.
- [23] CHEN Chengjie, CHEN Hao, ZHANG Yi, *et al.* TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. *Mol Plant*, 2020, **13**(8): 1194 – 1202.
- [24] LU Shennan, WANG Jiyao, CHITSAZ F, *et al.* CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020 [J/OL]. *Nucleic Acids Res*, 2020, **48**(D1): D265–D268 [2022-05-01]. doi: 10.1093/nar/gkz991.
- [25] WATERHOUSE A, BERTONI M, BIENERT S, *et al.* SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes [J/OL]. *Nucleic Acids Res*, 2018, **46**(W1): W296–W303 [2022-05-02]. doi: 10.1093/nar/gky427.
- [26] WILKINS M R, GASTEIGER E, BAIROCH A, *et al.* Protein identification and analysis tools in the ExPASy server [J]. *Methods Mol Biol*, 1999, **112**: 531 – 552.
- [27] CHOU K C, SHEN H B. Cell-PLoc 2.0: an improved package of web-servers for predicting subcellular localization of proteins in various organisms [J]. *Nat Sci*, 2010, **2**(10): 1090 – 1103.
- [28] SINGH B N, SOPORY S K, REDDY M K. Plant DNA topoisomerases: structure, function, and cellular roles in plant development [J]. *Crit Rev Plant Sci*, 2004, **23**(3): 251 – 269.