

DOI:10.12171/j.1000-1522.20230302

过表达胡杨 *PeCPK7* 提高拟南芥耐盐性

张小萌¹ 殷可欣¹ 安珂悦¹ 赵紫焱¹ 赵瑞¹ 陈少良¹ 赵楠² 周晓阳²

(1. 北京林业大学生物科学与技术学院, 林木资源高效生产全国重点实验室, 北京 100083;

2. 北京林业大学实验室与设备管理处, 北京 100083)

摘要:【目的】研究胡杨 *PeCPK7* 在植物耐盐过程中的作用, 旨在进一步揭示植物耐盐的生理与分子调控机制。【方法】根据 NCBI 基因组数据库中胡杨 *PeCPK7* CDS 序列, 克隆 *PeCPK7* 基因, 利用 DNAMAN 进行氨基酸序列比对, 并用 Mega 7 软件进行进化树构建。以过表达 *PeCPK7* 拟南芥(*PeCPK7*-OE1、*PeCPK7*-OE2 和 *PeCPK7*-OE3)、野生型(WT)和转空载体对照(VC)拟南芥株系为试验材料, 对各基因型拟南芥进行不同盐浓度处理, 从生理生化和分子生物学水平研究胡杨 *PeCPK7* 在盐胁迫中的响应机制。【结果】(1) *PeCPK7* 蛋白与其他物种中的 CPK7 有高度相似性, 并与毛果杨 *PtrCPK7* 家族亲缘关系最近。(2) 盐处理胡杨幼苗, *PeCPK7* 的相对表达量在盐胁迫 6 h 后达到最大值, 至 48 h 时恢复至最初状态。(3) *PeCPK7* 定位于细胞质中。(4) 在盐处理后, 过表达 *PeCPK7* 拟南芥株系的生存率和根长均显著高于野生型(WT)和转空载体(VC)拟南芥; 并且根细胞膜受损程度显著低于 WT 和 VC。(5) 在根中积累的 Na^+ 和 H_2O_2 显著低于 WT 和 VC, Ca^{2+} 显著高于 WT 和 VC; 并且 Na^+ 外排和 K^+ 内流显著高于 WT 和 VC。(6) 盐胁迫下, 过表达株系的超氧化物歧化酶、过氧化物酶和过氧化氢酶活性升高幅度显著高于 WT 和 VC。(7) 过表达株系的叶绿素含量、PS II 最大光量子效率、实际光合量子产量、相对电子传递速率和光合速率高于 WT 和 VC, 而胞间 CO_2 浓度低于 WT 和 VC。【结论】过表达胡杨 *PeCPK7* 能够提高拟南芥的耐盐能力, 本研究将为利用基因工程提高植物的耐盐性提供理论依据。

关键词: 胡杨; 盐胁迫; 钙依赖型蛋白激酶; *PeCPK7*; 离子平衡; 活性氧

中图分类号: S792.11 文献标志码: A 文章编号: 1000-1522(2024)11-0062-14

引文格式: 张小萌, 殷可欣, 安珂悦, 等. 过表达胡杨 *PeCPK7* 提高拟南芥耐盐性 [J]. 北京林业大学学报, 2024, 46(11): 62-75. Zhang Xiaomeng, Yin Kexin, An Keyue, et al. Overexpression of *Populus euphratica PeCPK7* enhancing salt tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2024, 46(11): 62-75.

Overexpression of *Populus euphratica PeCPK7* enhancing salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*

Zhang Xiaomeng¹ Yin Kexin¹ An Keyue¹ Zhao Ziyang¹ Zhao Rui¹
Chen Shaoliang¹ Zhao Nan² Zhou Xiaoyang²

(1. State Key Laboratory of Efficient Production of Forest Resources, School of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;

2. Public Analysis and Testing Center, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: [Objective] This study aimed to reveal the physiological and molecular regulation mechanisms of *PeCPK7* in plant salt stress tolerance. [Method] According to the CDS of *PeCPK7* in NCBI genome database, the *PeCPK7* was cloned, DNAMAN was used for amino acid sequence alignment, and Mega 7 software was used for evolutionary tree construction. The mechanism of *PeCPK7* in salt stress was studied from the level of physiology, biochemistry and molecular biology by *Arabidopsis thaliana* overexpressed

收稿日期: 2023-11-02 修回日期: 2023-12-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(32371828、32071730、31770643), 高等学校学科创新引智计划项目(111 Project、B130007), 北京市自然科学基金项目(6182030、6172024), 中央高校基本科研业务费专项(2019ZY25)。

第一作者: 张小萌。主要研究方向: 植物逆境生物学。Email: 1410996904@qq.com 地址: 100083 北京市海淀区清华东路 35 号北京林业大学生物科学与技术学院。

责任作者: 赵瑞, 博士, 副教授。主要研究方向: 林木逆境生理。Email: ruizhao@bjfu.edu.cn 地址: 同上。

本刊网址: <http://j.bjfu.edu.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

lines (*PeCPK7*-OE1, *PeCPK7*-OE2 and *PeCPK7*-OE3), the wild-type (WT) and vector control (VC) as experimental materials. [Result] (1) *PeCPK7* was highly similar to *CPK7* in other species, and was closely related to *PtrCPK7* family of *Populus trichocarpa*. (2) In salt-treated *Populus euphratica* seedlings, the relative expression of *PeCPK7* reached the maximum after 6 h of salt stress, and recovered to the initial state at 48 h. (3) *PeCPK7* was localized in the cytoplasm. (4) After salt treatment, the survival rate and root length of overexpression lines were significantly higher than those of WT and VC. (5) Na^+ and H_2O_2 accumulated in the root were significantly lower than those of WT and VC, and Ca^{2+} was significantly higher than WT and VC. The Na^+ efflux and K^+ influx were significantly higher than WT and VC. (6) Under salt stress, the activity of antioxidant enzymes (SOD, POD, CAT) of overexpression lines were significantly higher than WT and VC. (7) The decrease of chlorophyll content, PSII maximum optical quantum efficiency, actual photosynthetic quantum yield, relative electron transfer rate and the photosynthetic rates of overexpression lines were higher than those of WT and VC, while the intercellular CO_2 concentration was lower than WT and VC. [Conclusion] Overexpression of *PeCPK7* gene can improve salt stress tolerance of *Arabidopsis thaliana*, which will provide a theoretical basis for improving plant salt tolerance through genetic engineering.

Key words: *Populus euphratica*; salt stress; calcium dependent protein kinase; *PeCPK7*; ion homeostasis; ROS

非生物胁迫是指在植物的生长发育过程中, 干旱、盐碱、重金属等非生物因素对植物产生的不良影响^[1]。其中, 盐胁迫是造成植物减产的主要因素之一。经过漫长的进化过程, 植物形成了复杂的分子调控机制来响应和抵御盐胁迫^[2-3]。

Ca^{2+} 是植物体内重要的第二信使, 在植物生长发育和逆境适应过程中起到重要的调控作用^[4]。钙调素 (Calmodulin, CAM)、钙调神经磷酸酶 B 蛋白 (Calcineurin B-like protein, CBL) 和钙依赖型蛋白激酶 (Calcium dependent protein kinases, CDPKs) 是植物中 3 类主要的 Ca^{2+} 信号感受器^[5-6]。其中 CDPKs 具有 4 种典型的结构域: N 末端的可变域、Ser/Thr 蛋白激酶域、自抑制域和类钙调素结合域^[7]。CDPKs 能够感知 Ca^{2+} 浓度的变化, 通过磷酸化底物蛋白进行信号转导, 调控植物响应非生物胁迫^[8]。在干旱和盐胁迫条件下, 增加 Ca^{2+} 的水平和内源性脱落酸 (ABA) 含量能激活 *AtCPK6* 信号转导, 过表达 *AtCPK6* 的拟南芥植株的耐旱性和耐盐性增强^[9]。过表达 *AtCPK23* 拟南芥植株的耐旱性和耐盐性降低^[10]。*AtCPK4* 和 *AtCPK11* 参与 ABA 信号通路, *AtCPK4* 和 *AtCPK11* 的过表达提高了植物的耐旱性; 且在盐胁迫下, *AtCPK4* 和 *AtCPK11* 过表达植株能提高植物耐盐性^[11]。

胡杨 (*Populus euphratica*) 属于杨柳科杨属, 是分布于干旱荒漠的盐碱地区并能成林的高大落叶乔木, 别名异叶杨, 是典型的异形叶植物, 雌雄异株, 具有耐盐碱、耐涝、抗干旱、抗贫瘠、抗风沙等抗逆的优良特性, 常被用作研究逆境胁迫响应的模式物

种^[12]。ABA、乙烯、一氧化氮、过氧化氢、胞外 ATP、硫化氢和 Ca^{2+} 等多种信号分子, 可参与介导盐胁迫反应^[13-15]。胡杨 *PeGLABRA3*、*PeWRKY1*、*PeRIN4*、*PeREM6.5* 均能提高植物的耐盐能力^[16-19]。本实验室前期的 RNA-seq 结果显示, 盐胁迫能够提高 *PeCPK7* 的表达, 暗示了 *PeCPK7* 可能参与调控胡杨响应盐胁迫信号。本文在实验室研究基础上, 克隆了 *PeCPK7* 基因, 并转化到拟南芥中, 研究了胡杨 *PeCPK7* 在植物盐胁迫中的作用, 旨在进一步揭示植物抗盐的生理与分子机制, 为抗逆良种的选育提供参考, 为利用基因工程提高植物的耐盐性提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

一年生胡杨苗, 栽种于北京林业大学苗圃。哥伦比亚型拟南芥 (*Columbia ecotype*, Col_0)、拟南芥转空载体 VC (pCAMBIA-1300)、亚细胞定位载体 pCAMBIA1300GFP 和 PYR1-mCherry 质粒为实验室前期保存。 Na^+ 特异性荧光探针 (CoroNa-Green AM)、 H_2O_2 特异性荧光探针 ($\text{H}_2\text{DCFDA/DCFH-DA}$) 和 Ca^{2+} 特异性荧光探针 (Rhod-2/AM) 购买于 Life technologies 公司。大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞、农杆菌 GV3101 和质粒小提试剂盒购自天根生化科技有限公司, 胡杨叶片提取试剂盒、反转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒由北京擎科生物公司提供, 引物合成由北京睿博兴科公司、北京擎科生物公司完成, 测序由北京华大基因科技有限公司完成。

1.2 基因克隆与序列分析

1.2.1 *PeCPK7* 基因克隆

从 NCBI 基因组数据库中获取胡杨 *PeCPK7* 基因序列, 以其编码序列(coding sequences, CDS)为模板, 使用 primer5 设计引物(表 1)。TRIzol 法提取胡杨叶片总 RNA, 去除基因组 DNA, 反转录成 cDNA 进行 PCR 扩增, 反应体系为 $2 \times$ Flash 酶 12.5 μ L, ddH₂O 8.5 μ L, cDNA 2 μ L, 上、下游引物各 1 μ L。PCR 扩增反应程序为第 1 阶段 95 $^{\circ}$ C 5 min; 第 2 阶段 90 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 33 个循环; 第 3 阶段 72 $^{\circ}$ C 5 min; 第 4 阶段 4 $^{\circ}$ C 恒温。胶回收扩增产物, 将纯化后的产物与 T 载体 16 $^{\circ}$ C 过夜连接, 连接体系为 pMD18-T Vector 0.5 μ L, 回收产物 5 μ L, Solution I 4.5 μ L。从 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱中取大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 将连接好的质粒转化到感受态细胞中, 在含有氨苄青霉素的 LB 平板上筛选阳性克隆, 菌液 PCR 鉴定并进行测序。

1.2.2 *PeCPK7* 氨基酸序列比对与系统进化树构建

利用 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)获取毛果杨(*Populus trichocarpa*)、毛白杨(*Populus tomentosa*)、可可(*Theobroma cacao*)、棉花(*Gossypium hirsutum*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、芥菜(*Capsella rubella*)、萝卜(*Raphanus sativus*)、甘蓝(*Brassica oleracea*)、番茄(*Solanum lycopersicum*)、大豆(*Glycine max*)、水稻(*Oryza sativa*)、玉米(*Zea mays*)等其他植物的 CPK7 同源蛋白序列。通过 DNAMAN 软件进行 CPK7 氨基酸序列比对, 系统进化树由 Mega7 软件(<http://www.megasoftware.net/index.php>)构建。

1.2.3 胡杨叶片 *PeCPK7* 表达

从北京林业大学苗圃挑选长势一致且良好的胡杨苗, 用 75 mmol/L NaCl 溶液处理胡杨苗, 检测 0、3、6、12、24、48 h 时胡杨叶片 *PeCPK7* 表达量, 将处理过的胡杨苗摘取叶片并迅速用液氮冻存, 及时提取总 RNA, 将得到的 RNA 去除基因组 DNA。以反

转录得到的 cDNA 为模板, 胡杨 *PeActin7* 为内参基因, 进行荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测。RT-qPCR 所用引物见表 1, 重复 3 次试验。荧光定量 PCR 反应程序为第 1 阶段 95 $^{\circ}$ C 10 min; 第 2 阶段 95 $^{\circ}$ C 10 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 32 s, 35 个循环。熔解曲线分析为 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 15 s。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算目的基因的表达量。

1.3 转基因拟南芥阳性植株的获取和筛选

1.3.1 植物表达载体的构建

将重组质粒 pMD18-T-*PeCPK7* 和表达载体 pCAMBIA1300 用 *Sal* I 和 *Kpn* I 双酶切 2 h, 琼脂糖凝胶回收、纯化 *PeCPK7* 的 CDS 区域和 pCAMBIA1300 载体酶切片段, 16 $^{\circ}$ C 过夜连接回收产物, 连接体系为载体 1 μ L, 目的片段 6 μ L, T4 DNA 连接酶 2 μ L, Buffer 1 μ L。然后转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 在含有卡那霉素的 LB 平板上筛选阳性克隆。菌液 PCR 鉴定及测序, 提取质粒, 用于后续试验。

1.3.2 转基因植株的获得

将重组质粒 pCAMBIA1300-*PeCPK7* 和表达载体 pCAMBIA1300 转入农杆菌 GV3101 感受态细胞中, 混匀并冰浴 30 min, 液氮 5 min, 37 $^{\circ}$ C 水浴 5 min, 冰浴 5 min。向上述液体中加入 500 μ L LB, 200 r/min、28 $^{\circ}$ C 振荡培养 3~4 h。将菌液涂在加入利福平和卡那霉素的 LB 平板培养基中, 筛选阳性克隆并测序鉴定。选取转化成功的农杆菌扩繁, 通过沾花法侵染 T0 代拟南芥, 收获的种子为 T1 代。

1.3.3 阳性植株的筛选

将 T1 代种子播种到含有潮霉素的 1/2MS 培养基上, 4 $^{\circ}$ C 低温层积 2 d 后放置在光照培养间培养, 生长 7~9 d 后将其移栽到土中继续生长, 收获 T2 代种子, 继续将 T2 代种子播种于含潮霉素的 1/2MS 培养基上生长, 之后进行 3:1 分离比筛选, 筛选出抗性植株转移到土壤, 待幼苗长大后提取叶片 DNA 进行鉴定, 收获 T3 代种子。使用 TRIzol 法提

表 1 本试验所用引物序列

Tab. 1 Primer sequences used in this experiment

引物名称 Primer name	上游引物 (5'-3') Forward primer (5'-3')	下游引物 (5'-3') Reverse primer (5'-3')
<i>PeActin7</i>	ATTGGCCTTGGGGTAAAGAG	CACACTGGAGTGATGGTTGG
<i>AtACTIN2</i>	GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC
<i>AtSOD</i>	AGGAAACATCACTGTTGGAGAT	GAGTTTGGTCCAGTAAGAGGAA
<i>AtPOD</i>	CGTGCCCTTCATATTGTTGG	GACGCCATCAACAACGAGTC
<i>AtCAT</i>	AGGATCAAACCTTTGAGGGGTAG	CTTGTGGTTCCTGGAATCTACT
<i>PeCPK7</i>	GGGGCCCGGGTTCGACATGGGT AATTGCTGTGTAACCC	CCCTTGCTCACCATGGTACCA CTGGCTACCTGCAGTGATCC
<i>PeCPK7</i> -RT-qPCR	TGCTGTAACCAATGAATCCGG	TAATGCGCCAAGATATCCCTTC

取 T3 代野生型、转基因和转空载体株系的总 RNA, 反转录为 cDNA 后, 进行 RT-qPCR 检测。反应程序同上, 扩增产物长度为 81 bp, 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 pCAMBIA1300GFP-*PeCPK7* 定位载体的构建和亚细胞定位

将载体 pCAMBIA1300GFP 用 *Sal* I 和 *Kpn* I 进行双酶切, 同时以 *PeCPK7* 基因序列为模板进行 PCR, 回收并纯化酶切产物和 PCR 产物, 连接后转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 在含有卡那霉素的 LB 平板上筛选阳性克隆, 菌液 PCR 并测序鉴定。提取质粒并转化到农杆菌 GV3101 感受态细胞中, 在加入利福平和卡那霉素的 LB 平板培养基中筛选阳性克隆并测序。选取转化成功的农杆菌扩繁, 同时将 PYR1-mCherry 农杆菌菌种扩繁, 将二者按照体积 1:1 的比例均匀混合, 测定 OD 值, 然后将混合后的菌液瞬时转化至烟草叶片, 室温暗培养 2 d 后, 用激光共聚焦显微镜观测 *PeCPK7* 的亚细胞定位。

1.5 盐胁迫下转基因拟南芥耐盐性检测

1.5.1 种子生存率

将筛选得到的 T3 代拟南芥各株系的种子分别播种于不同浓度梯度 (0、50、75、100 mmol/L) 的 NaCl 的 1/2MS 培养基上。以不含 NaCl (0 mmol/L NaCl) 作为对照, 每个株系播种 50 粒种子, 每种处理做 3 组重复。4 $^{\circ}$ C 低温层积处理 2 d 后置于培养箱中培养, 记录 7 d 后种子生存率。

1.5.2 根长

将筛选得到的 T3 代拟南芥各株系的种子分别播种于不同浓度梯度 (0、50、75、100 mmol/L) 的 NaCl 的 1/2MS 培养基上。以不含 NaCl (0 mmol/L NaCl) 作为对照, 每个株系播种 10 粒种子, 每种处理做 3 组重复。4 $^{\circ}$ C 低温层积处理 2 d 后置于培养箱中垂直生长, 拍照并使用 ImageJ 软件测量植株垂直生长 7 d 后的根长。

1.5.3 相对电导率

将筛选得到的 T3 代拟南芥各株系的种子分别播种于 0、75 mmol/L NaCl 的 1/2MS 培养基上。生长 7 d 后取出拟南芥幼苗, 加入去离子水, 室温放置 24 h 后测定溶液的电导率, 记为 EC1; 沸水浴 30 min, 冷却至室温后测定电导率, 记为 EC2; 细胞膜的透性用叶片的相对电导率 (EL) 来表征, EL 为 EC1 与 EC2 的比值乘以 100%。每种处理做 3 组重复。

1.6 非损伤微测技术测定拟南芥根尖 Na⁺和 K⁺离子流

将筛选得到的 T3 代拟南芥各株系的种子播种于 1/2MS 培养基上生长 7 d, 然后移至含有 0、75 mmol/L NaCl 的 1/2MS 液体培养基中处理 12 h。

使用非损伤微测技术检测各株系根尖分生区的 Na⁺和 K⁺离子流。每种处理做 3 组重复。

1.7 盐胁迫下转基因拟南芥 Na⁺、H₂O₂ 和 Ca²⁺含量的测定

将筛选得到的 T3 代拟南芥各株系种子播种于 1/2MS 固体培养基上生长 7 d, 然后移至含有 0、75 mmol/L NaCl 的 1/2MS 液体培养基中处理 12 h。首先, 各株系取 15 棵幼苗移至含有 10 mmol/L Na⁺特异性荧光探针 (CoroNa-Green AM) 溶液中, 避光孵育 2 h, ddH₂O 清洗 4 次后, 用 Leica SP8 激光共聚焦显微镜 (Leica, 德国) 检测 Na⁺荧光强度, 激发波长为 488 nm, 发射波长为 510 ~ 530 nm, 通过 ImageJ 软件计算相对荧光强度。其次, 各株系取 15 棵幼苗移至含 10 mmol/L H₂O₂ 特异性荧光探针 (H₂DCFDA/DCFH-DA) 的溶液中, 避光孵育 15 min, ddH₂O 清洗 4 次后, 用 Leica SP8 激光共聚焦显微镜检测 H₂O₂ 荧光强度, 激发波长为 488 nm, 发射波长为 510 ~ 530 nm, 通过 ImageJ 计算相对荧光强度。最后, 各株系取 15 棵幼苗移至含有 10 mmol/L Ca²⁺特异性荧光探针 (Rhod-2/AM) 的溶液中, 避光孵育 2 h, ddH₂O 清洗 4 次后, 用 Leica SP8 激光共聚焦显微镜检测 Ca²⁺荧光强度, 激发波长为 522 nm, 发射波长为 578 nm, 通过 ImageJ 计算相对荧光强度。以上每种处理均做 3 组重复。

1.8 盐胁迫下转基因拟南芥抗氧化酶活性的测定以及抗氧化酶相关基因表达水平的检测

将筛选得到的 T3 代拟南芥各株系种子分别播种于 0、75 mmol/L NaCl 的 1/2MS 培养基上。生长 10 d 后取 0.1 g 各株系幼苗并在液氮中研磨成粉末, 加入提取液, 用于测定超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶 (peroxidase, POD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 活性。TRIzol 法提取总 RNA 并反转录成 cDNA, 以拟南芥 *AtACTIN2* 基因为内参, 通过 RT-qPCR 检测 *AtSOD*、*AtPOD*、*AtCAT* 基因的表达水平。每种处理做 3 组重复。

1.9 盐胁迫下转基因拟南芥生理参数的测定

将在 1/2MS 培养基上生长 10 d 的拟南芥各株系移至营养土中, 保持土壤湿度。生长 15 d 后, 选取长势一致且良好的幼苗分别进行正常浇水处理和用 75 mmol/L NaCl 溶液处理 10 d, 以正常浇水的幼苗作为对照, 测定叶绿素荧光参数、叶绿素含量和光合参数。每个株系重复 3 次, 取平均值。

1.9.1 叶绿素荧光参数

挑选长势一致且良好的拟南芥幼苗, 用调制叶绿素荧光仪 Junior-PAM (德国 WALZ) 测定黑暗处理 30 min 的拟南芥叶片的叶绿素荧光参数, 包括

PS II最大光量子效率(F_v/F_m)、实际光合量子产量(Y II)和相对电子传递速率(ETR)。每个株系重复3次,取平均值。

1.9.2 叶绿素含量的测定

挑选长势一致且良好的拟南芥幼苗,用便携式叶绿素仪 SPAD-502-PLUS 测定叶绿素含量,以 SPAD 值表示。每个株系重复3次,取平均值。

1.9.3 光合参数的测定

挑选长势一致且良好的拟南芥幼苗,用便携式光合测量仪(Li-6400XT)测定光合参数,包括净光合速率(P_n)和胞间二氧化碳浓度(C_i)。每个株系重复测定3次,取平均值。

1.10 数据分析

试验数据通过 Excel、Mega7、DNAMAN、ImageJ 软件进行处理和统计,Graphpad Prism8 绘图。通过 SPSS 25.0 进行单因素方差分析,显著性水平均小于 0.05。

2 结果与分析

2.1 *PeCPK7* 基因的克隆与氨基酸序列分析

将胡杨 *PeCPK7* 与毛果杨、毛白杨、可可、棉花、拟南芥、芥菜、萝卜、甘蓝、番茄、大豆、水稻、玉米的 CPK7 同源蛋白进行氨基酸序列分析。*PeCPK7* 氨基酸与其他物种 CPK7 同源序列的同源性保持在 75.91%~99.06% 之间,说明 *PeCPK7* 在进化过程中具有高度保守性(图 1A)。系统进化树分析结果表明,*PeCPK7* 与其他物种中的 CPK7 有高度相似性,并与毛果杨 *PtrCPK7* 家族亲缘关系最近(图 1B)。

2.2 *PeCPK7* 基因在胡杨叶片中的表达模式

用 75 mmol/L NaCl 处理胡杨幼苗,测定在盐处理 0、3、6、12、24、48 h 后胡杨叶片 *PeCPK7* 的表达量,随着 NaCl 处理时间的增加,胡杨 *PeCPK7* 的表达量在处理 6 h 后达到最高值,并且显著高于对照,约为 0 h 时表达量的 2 倍,12 h 时开始下降,但仍显著高于对照,至 48 h 时恢复至最初状态,与对照无显著差异(图 2)。

2.3 *PeCPK7* 转基因拟南芥的筛选与鉴定

DNA 鉴定结果(图 3A)显示:目的片段为 1 605 bp,野生型(WT)和转空载(VC)没有条带,其他株系在 1 000~2 000 bp 之间有单一条带,之后继续培养至 T3 代。为确定不同株系 *PeCPK7* 的表达水平,提取 T3 代拟南芥各株系的总 RNA,反转录为 cDNA,用荧光定量的方法进行鉴定。相较于 WT 和 VC,*PeCPK7* 在所有转基因株系中的表达量均有显著提高,选取相对表达量较高株系 *PeCPK7*-OE1、*PeCPK7*-OE2 和 *PeCPK7*-OE3 进行后续试验(图 3B)。

2.4 *PeCPK7* 的亚细胞定位

将 *PeCPK7*-GFP 的融合蛋白与 ABA 的受体 PYR1-mCherry 同时在烟草细胞中瞬时表达。*PeCPK7* 与 GFP 的融合蛋白,定位于细胞质中, PYR1-mCherry 定位于细胞质和细胞核中,共定位后,*PeCPK7*-GFP 的绿色荧光与 PYR1-mCherry 的红色荧光在细胞质重叠,说明 *PeCPK7* 定位于细胞质中(图 4)。

2.5 盐胁迫下拟南芥在土壤中的生长状态

将 WT、VC 和过表达株系(*PeCPK7*-OE1、*PeCPK7*-OE2 和 *PeCPK7*-OE3)播种到 1/2MS 培养基上,生长 7 d 后移到土壤中培养 15 d 后,用 75 mmol/L NaCl 处理 10 d, WT 和 VC 的叶片小且出现了变黄现象,过表达株系长势良好,叶片较绿,没有明显变黄现象(图 5)。

2.6 盐胁迫下拟南芥的种子生存率

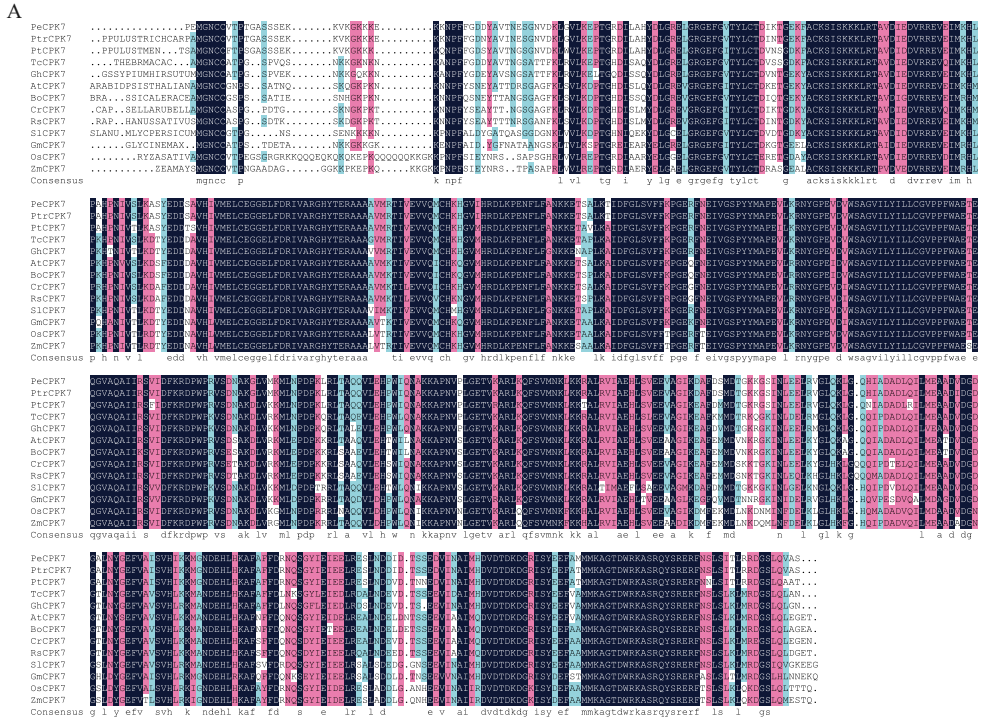
将拟南芥各株系分别播种到含 0、50、75、100 mmol/L NaCl 的 1/2MS 培养基上,生长 7 d。在无盐培养基上长势一致且无显著差异,而在加入 NaCl 的培养基上,*PeCPK7*-OE1、*PeCPK7*-OE2 和 *PeCPK7*-OE3 的长势均明显好于 WT 与 VC(图 6A)。50 mmol/L NaCl 处理后,过表达株系的种子生存率为 86%~96%,显著高于 WT(84%)和 VC(84%);当 NaCl 浓度达到 75 mmol/L 时,过表达株系种子生存率保持在 85%~92%,WT 和 VC 仅为 78% 和 76%;NaCl 浓度达到 100 mmol/L 时,过表达株系种子生存率在 76%~86%,WT 和 VC 仅为 72%、70%,过表达株系与 WT 和 VC 差异显著(图 6B)。以上结果说明,在盐胁迫处理下,拟南芥各株系的生长均受到抑制,但是过表达拟南芥的生存率明显高于野生型与转空载体。这说明 *PeCPK7* 基因能够提高拟南芥的耐盐性。

2.7 盐胁迫下拟南芥的根长变化

在无盐培养基上各株系拟南芥根长生长无显著差异,经过 NaCl 处理后,各浓度梯度的转基因株系(*PeCPK7*-OE1、*PeCPK7*-OE2 和 *PeCPK7*-OE3)的主根均显著长于 WT 与 VC 拟南芥,其中 75 mmol/L NaCl 处理下各株系的表型区别更为显著,并且不会严重抑制拟南芥生长,本文以 75 mmol/L NaCl 作为后续试验的处理浓度(图 7A、B)。

2.8 盐胁迫下转基因拟南芥相对电导率的变化

通过检测盐处理后各株系的相对电导率的变化,对盐处理条件下各株系细胞膜受损伤程度进行比较分析。图 8 显示:75 mmol/L NaCl 处理后,所有拟南芥株系的相对电导率与对照(0 mmol/L)相比都显著增加,说明高浓度的 NaCl 破坏了根细胞膜的完整性。其中 WT 和 VC 的相对电导率分别升高了 25%



A.胡杨 *PeCPK7* 氨基酸序列与其他物种 *CPK7* 多重序列比对。**B.**胡杨 *PeCPK7* 的系统进化树分析。Pe.胡杨; Ptr.毛果杨; Pt.毛白杨; Tc.可可; Gh.棉花; At.拟南芥; Cr.芥菜; Rs.萝卜; Bo.甘蓝; Sl.番茄; Gm.大豆; Os.水稻; Zm.玉米。A, comparison of *CPK7* amino acid sequences between *Populus euphratica* and other species; B, phylogenetic analysis of *Populus euphratica*. Pe, *Populus euphratica*; Ptr, *Populus trichocarpa*; Pt, *Populus tomentosa*; Tc, *Theobroma cacao*; Gh, *Gossypium hirsutum*; At, *Arabidopsis thaliana*; Cr, *Capsella rubella*; Rs, *Raphanus sativus*; Bo, *Brassica oleracea*; Sl, *Solanum lycopersicum*; Gm, *Glycine max*; Os, *Oryza sativa*; Zm, *Zea mays*.

图 1 胡杨 *PeCPK7* 蛋白序列分析

Fig. 1 Alignment and phylogenetic analysis of *PeCPK7*

和 24%，转基因株系的相对电导率分别增加了 12%、10% 和 13%，升高的幅度小于 WT 和 VC 这 2 个株系，说明根细胞膜受损伤程度较小。这些结果说明外源 *PeCPK7* 的表达能够减轻盐胁迫对细胞膜造成的损伤，提高植物抗盐的能力。

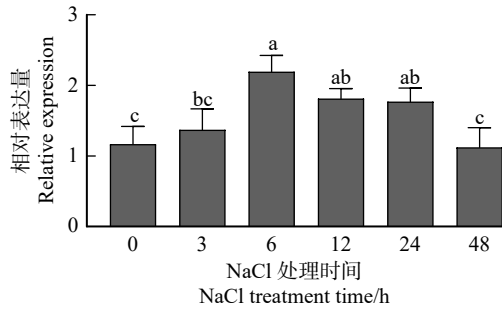
2.9 盐胁迫下拟南芥 Na^+ 含量的测定

在正常生长条件下，拟南芥各株系的 Na^+ 含量很弱且差异不大。经 75 mmol/L 盐胁迫处理后，各株系相对荧光强度增强，根中 Na^+ 含量增多(图 9)。但转基因株系的相对荧光强度上升幅度显著低于

WT 和 VC，说明 NaCl 处理后，转基因株系根细胞积累的 Na^+ 更少。

2.10 盐胁迫下拟南芥 H_2O_2 含量的测定

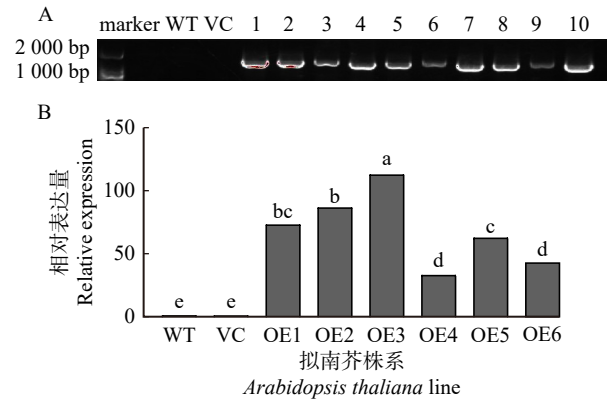
在正常生长条件下，拟南芥各株系的 H_2O_2 含量很弱且无显著差异。经 75 mmol/L NaCl 处理后，各株系相对荧光强度增强，但转基因株系的相对荧光强度上升幅度显著低于 WT 和 VC，说明 NaCl 处理后，转基因株系根细胞积累的 H_2O_2 更少，表明转基因株系在盐胁迫下有较强的分解 H_2O_2 的能力(图 10)。



不同小写字母表示差异显著, $P < 0.05$ 。下同。Different lowercase letters represent significant differences at $P < 0.05$ level. The same below.

图2 盐胁迫下(75 mmol/L)胡杨叶片中 *PeCPK7* 基因表达量的变化

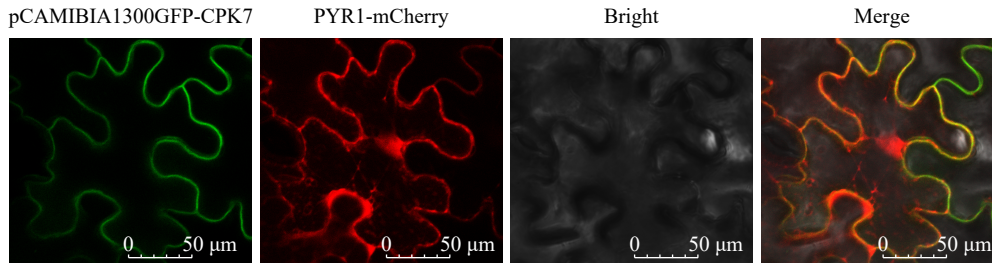
Fig. 2 Changes of *PeCPK7* gene expression in leaves of *Populus euphratica* under salt stress (75 mmol/L)



A. T2代株系 DNA 检测。B. *PeCPK7* 基因在野生型(WT)、转空载体(VC)、转基因(OE1~6)拟南芥中的表达量。A, DNA detection of T2 generation. B, expression level of *PeCPK7* gene in wild-type (WT), vector control (VC), *PeCPK7*-transgenic (OE1-6) *Arabidopsis thaliana*.

图3 *PeCPK7* 转基因拟南芥的鉴定

Fig. 3 Identification of *PeCPK7*-transgenic *Arabidopsis thaliana*



PeCPK7-GFP 与 PYR1-mCherry 共定位。标尺 = 50 μm。 *PeCPK7*-GFP co-localized with PYR1-mCherry. Scale bar = 50 μm.

图4 *PeCPK7* 的亚细胞定位

Fig. 4 Subcellular localization of *PeCPK7*

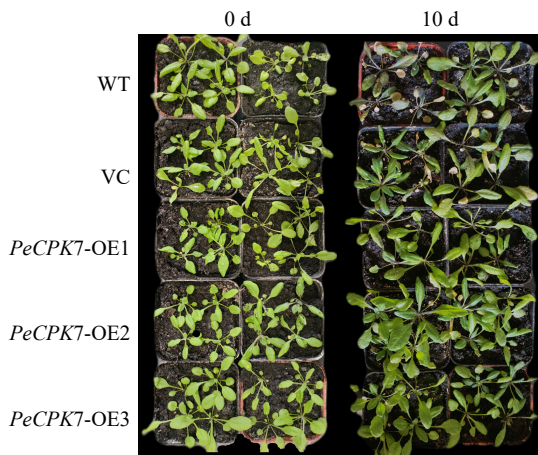


图5 拟南芥在 NaCl 处理后的生长状态

Fig. 5 Growth state of *Arabidopsis thaliana* after NaCl treatment

2.11 盐胁迫下拟南芥 Ca^{2+} 含量的测定

Ca^{2+} 作为细胞内的第二信使, 参与植物响应盐胁迫的信号转导过程。在正常生长条件下, 拟南芥各株系的 Ca^{2+} 含量很弱且差异不大。经 75 mmol/L 盐胁迫处理后, 转基因株系根尖 Ca^{2+} 的相对荧光强度上升幅度显著高于 WT 和 VC, 说明 NaCl 处理后, 转基因株系响应盐胁迫的能力增强, 有助于提高植物耐受盐胁迫的能力(图 11)。

2.12 拟南芥在盐胁迫下的 Na^+ 和 K^+ 流

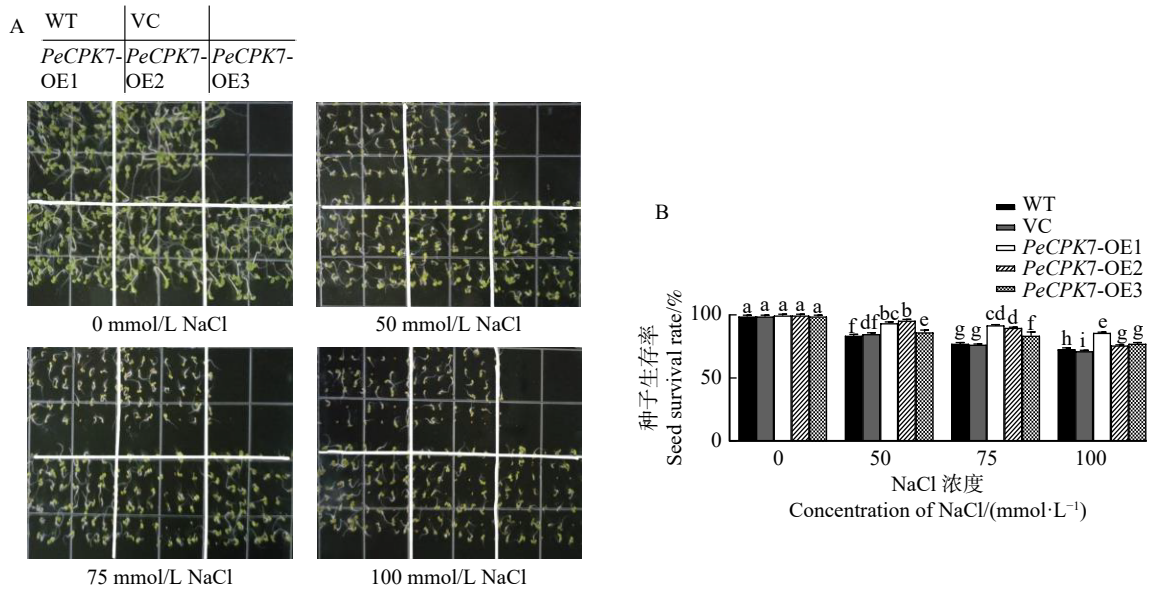
在 0 mmol/L NaCl 处理时, Na^+ 流速很低且各株系无显著差异。经 75 mmol/L 盐处理后, 各株系 Na^+ 外流速度均大幅度提高, 并且转基因株系的 Na^+ 外流速度显著高于 WT 和 VC(图 12A)。说明 *PeCPK7* 能显著提高拟南芥根外排 Na^+ 的能力。

在 0 mmol/L NaCl 处理时, K^+ 流速很低且各株系无显著差异。经 75 mmol/L 盐处理后, 各株系的 K^+ 的内流速度明显增强, 并且转基因株系的 K^+ 内流速度显著高于 WT 和 VC。表明 *PeCPK7* 能够减少拟南芥根的 K^+ 外流(图 12B)。

2.13 盐胁迫下拟南芥的抗氧化酶活性及其相关基因表达水平的变化

盐处理后, *PeCPK7*-OE1、*PeCPK7*-OE2 和 *PeCPK7*-OE3 的 SOD 活性较 0 mmol/L NaCl 处理显著上升, 而 WT 和 VC 则较 0 mmol/L NaCl 处理显著下降(图 13A); 盐处理后拟南芥各株系的 POD 和 CAT 活性较 0 mmol/L NaCl 处理均显著上升, *PeCPK7*-OE1、*PeCPK7*-OE2 和 *PeCPK7*-OE3 的上升幅度显著高于 WT 和 VC(图 13B, 图 13C)。

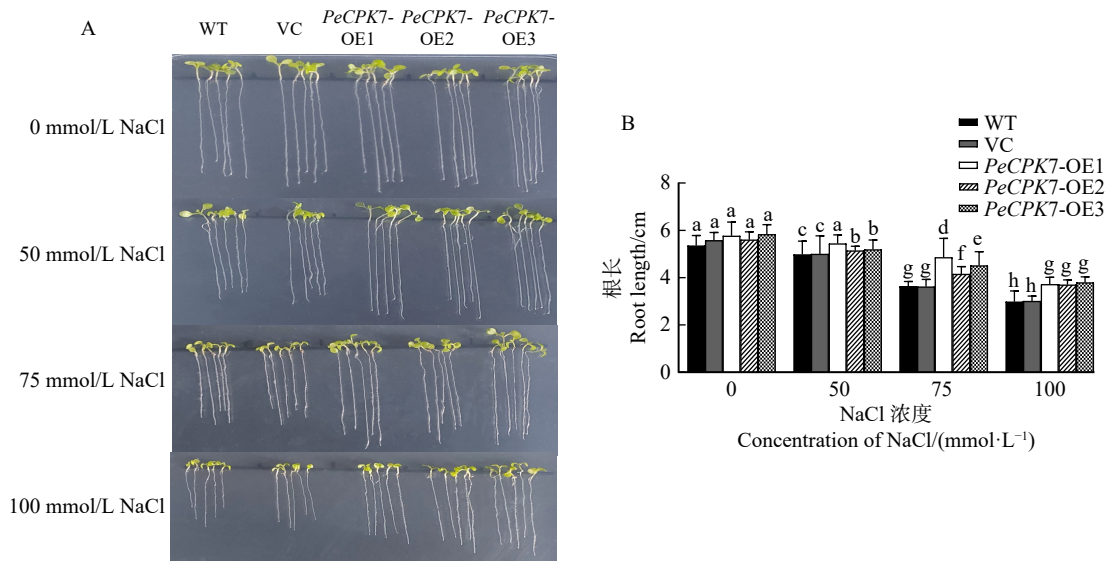
盐处理后, 各株系 SOD、POD、CAT 基因的表



A. NaCl 对幼苗生长的影响; B. 幼苗生存率统计分析。不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同。A, effects of NaCl on seed germination; B, statistical analysis of seed survival rate. Different lowercase letters represent significant differences at $P < 0.05$ level. The same below.

图 6 不同浓度 NaCl 处理对拟南芥种子生存率的影响

Fig. 6 Effects of different concentrations of NaCl treatment on seed survival rates of *Arabidopsis thaliana*



A. NaCl 对根生长的影响; B. 根系生长分析。A, effects of NaCl on root length growth; B, analysis of root growth.

图 7 NaCl 处理对拟南芥根生长的影响

Fig. 7 Effects of NaCl treatment on root length growth of *Arabidopsis thaliana*

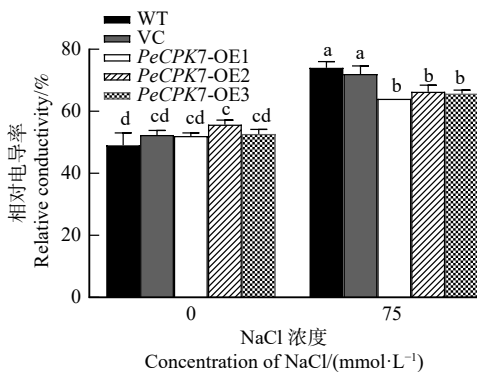


图 8 NaCl 处理对不同拟南芥株系相对电导率的影响

Fig. 8 Effects of NaCl treatment on relative conductivity of different *Arabidopsis thaliana* lines

达量较 0 mmol/L NaCl 处理均显著提高, 各基因在转基因株系中的提高幅度均大于 WT 和 VC, 在转基因株系中的表达量均显著高于 WT 和 VC (图 13D ~ F)。

2.14 盐胁迫下拟南芥的叶绿素荧光参数

盐处理后, WT 和 VC 的 F_v/F_m 值有所下降, 转基因株系的 F_v/F_m 值有小幅上升, 但与 0 mmol/L NaCl 处理相比, *PeCPK7*-OE1、*PeCPK7*-OE2 和 *PeCPK7*-OE3 均没有显著差异(图 14A)。这说明, 盐胁迫未显著影响 *PeCPK7* 过表达株系光反应中心。盐处理后, 拟南芥各株系的 ETR 值均下降, 但 WT 和 VC

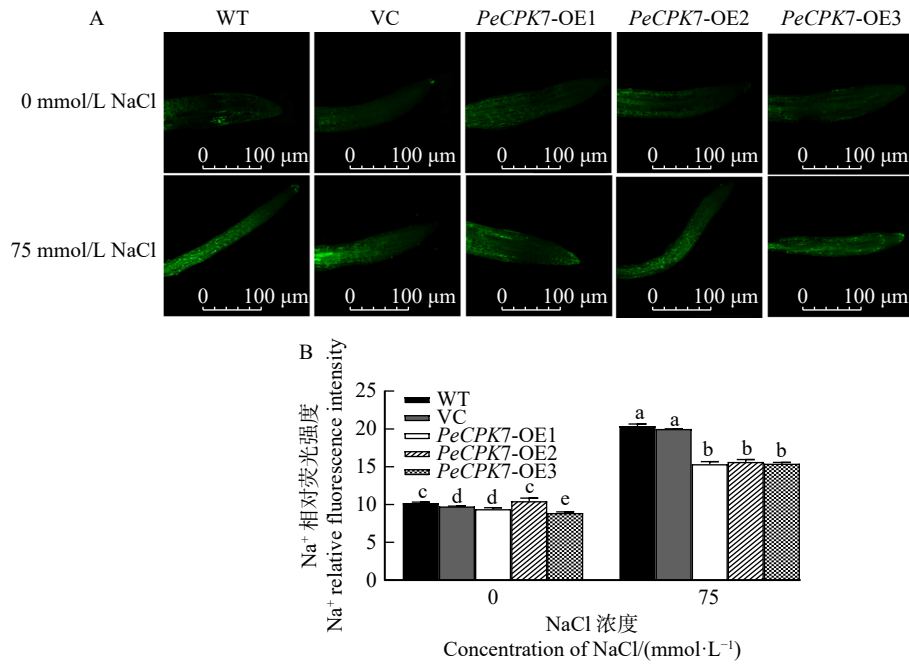


图9 NaCl处理后拟南芥各株系根细胞Na⁺相对荧光强度的变化

Fig. 9 Changes of Na⁺ relative fluorescence intensity in root cells of *Arabidopsis thaliana* under NaCl treatment

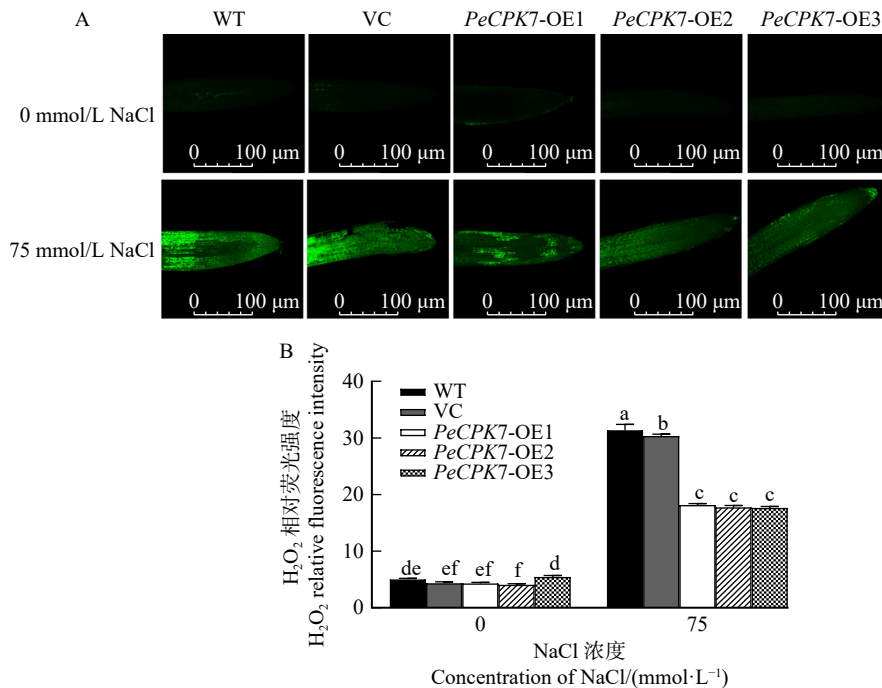


图10 NaCl处理后拟南芥各株系根细胞H₂O₂相对荧光强度的变化

Fig. 10 Changes of H₂O₂ relative fluorescence intensity in root cells of different *Arabidopsis thaliana* lines under NaCl treatment

的下降幅度更大,转基因株系与0 mmol/L NaCl处理相比差异不显著(图14B)。盐处理后,WT和VC拟南芥的Y II值有所降低,而转基因株系PeCPK7-OE1、PeCPK7-OE2和PeCPK7-OE3的Y II值升高,转基因株系与0 mmol/L NaCl处理相比差异不显著(图14C)。因此,盐处理未对拟南芥光反应中心造成不可逆伤害。

2.15 盐胁迫下拟南芥的叶绿素含量变化

在0 mmol/L NaCl处理时,拟南芥各株系的叶

绿素含量无显著差异。使用75 mmol/L NaCl溶液处理10 d后,拟南芥各株系的叶绿素含量都显著下降,但WT和VC下降幅度更大。说明盐胁迫会影响叶片叶绿素的含量,但转基因株系受到的影响较小(图15)。

2.16 盐胁迫下拟南芥的光合参数变化

为了进一步确定PeCPK7对盐胁迫下拟南芥碳同化作用的影响,对拟南芥各株系的光合参数进行测定。未经盐处理时,拟南芥各株系没有显著差异。

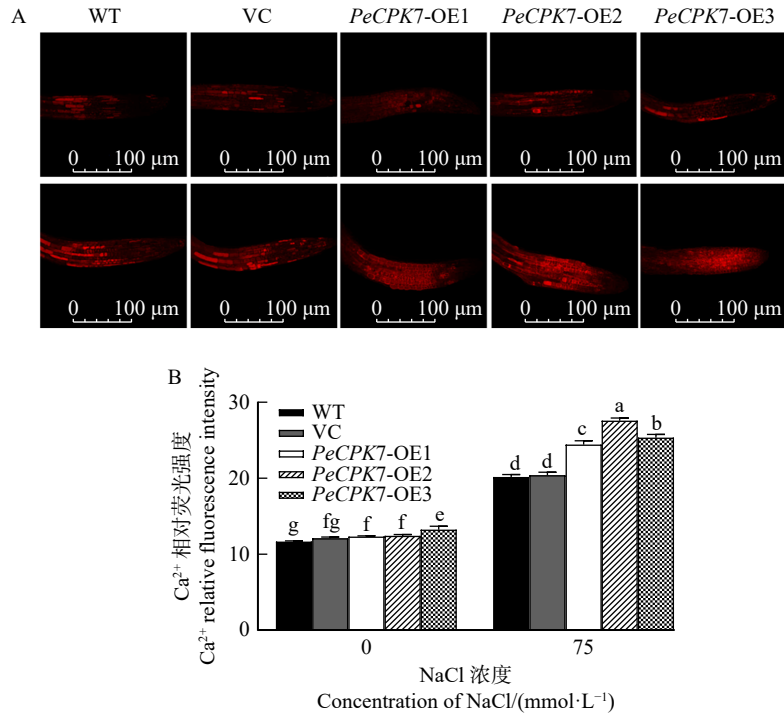
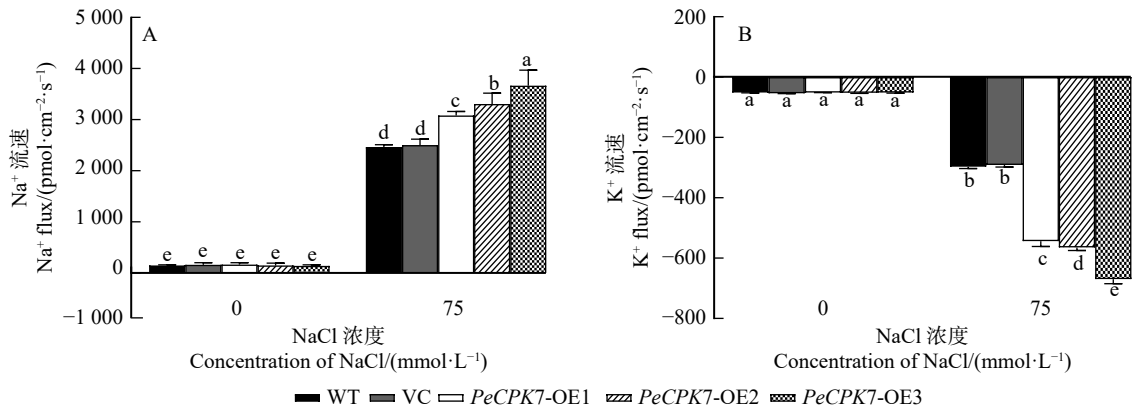


图 11 NaCl 处理后拟南芥各株系根细胞 Ca²⁺ 相对荧光强度的变化

Fig. 11 Changes of Ca²⁺ relative fluorescence intensity in root cells of different *Arabidopsis thaliana* lines under NaCl treatment



纵坐标正值表示外流, 负值表示内流。Positive values on vertical coordinate represent efflux, while negative values represent influx.

图 12 NaCl 处理对拟南芥根尖 Na⁺(A) 和 K⁺(B) 流速的影响

Fig. 12 Effects of NaCl treatment on Na⁺ and K⁺ fluxes in *Arabidopsis thaliana* root tips

在盐处理 10 d 后, 与 0 mmol/L NaCl 处理相比, 各株系拟南芥的 P_n 值均显著降低, 其中 *PeCPK7*-OE1、*PeCPK7*-OE2 和 *PeCPK7*-OE3 的 P_n 下降幅度显著低于 WT 和 VC(图 16A)。未经盐处理的各株系胞间二氧化碳浓度无显著差异, 经 75 mmol/L 盐处理后, 各株系 C_i 均升高, 且转基因株系的升高幅度明显小于 WT 和 VC(图 16B)。

3 讨论与结论

全球超过 8 亿 hm^2 的可耕地受到土壤盐碱化的不利影响, 占世界农业用地总量的 6% 以上。过度灌溉、森林砍伐、施肥和用盐污染水灌溉等人类活动会导致排水不良、地下水位升高、内涝和根部盐分积

累。土壤盐碱化严重威胁着植物的生命周期, 特别是种子萌发、幼苗生长和生殖阶段, 导致作物产量损失^[20]。因此, 探究植物在盐胁迫下的作用机制, 对培育抗逆新品种具有重要意义。

本文研究了胡杨 *PeCPK7* 在植物耐受盐胁迫中的作用。盐胁迫处理能够提高 *PeCPK7* 的表达量(图 2), 说明 *PeCPK7* 可能是胡杨耐盐信号转导过程中的信号分子。为了揭示 *PeCPK7* 在盐胁迫调节中的作用, 将 *PeCPK7* 基因转化到模式植物拟南芥中进行表型鉴定。盐处理下, 转基因植株的生存率、根长均显著高于 WT 和 VC; 转基因株系在盐胁迫下根细胞膜受损伤程度较轻。这些结果说明, *PeCPK7* 能够提高拟南芥耐盐性。Jiang 等^[21]发现玉米(*Zea*

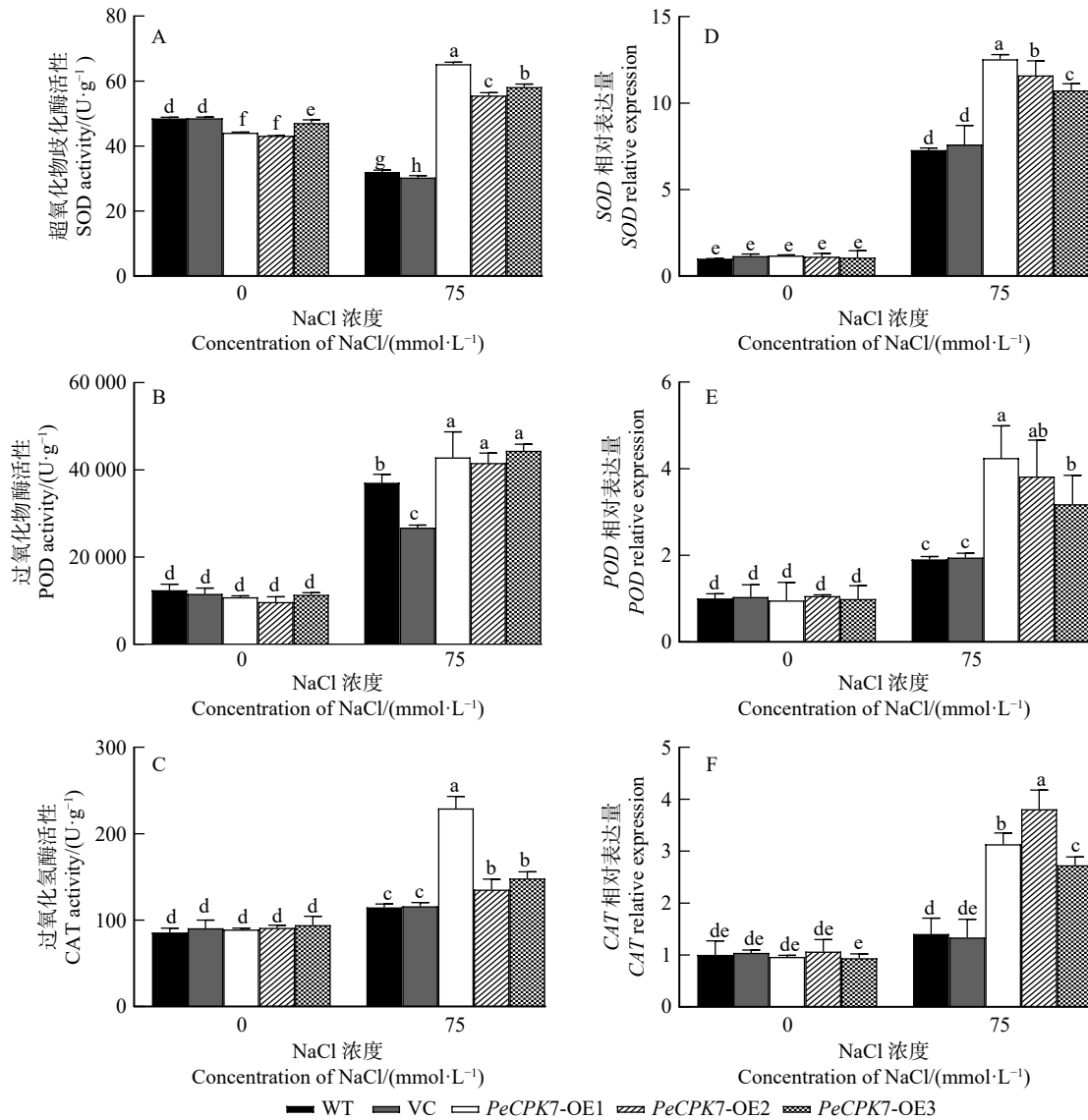


图 13 盐胁迫下各株系拟南芥中抗氧化酶活性及其相关基因表达量

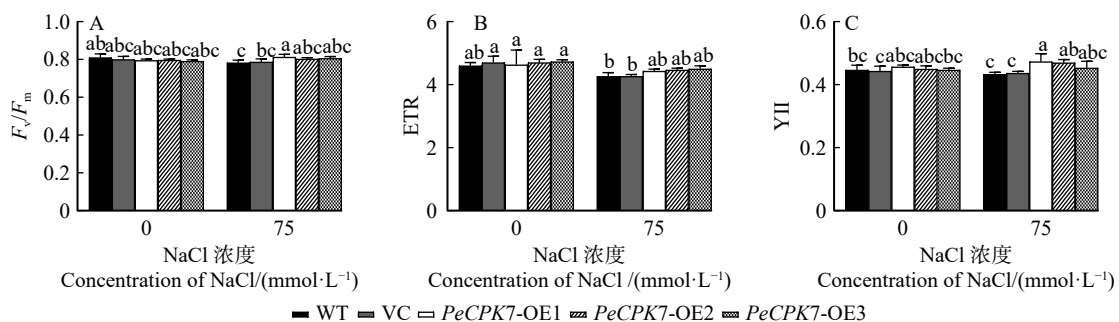
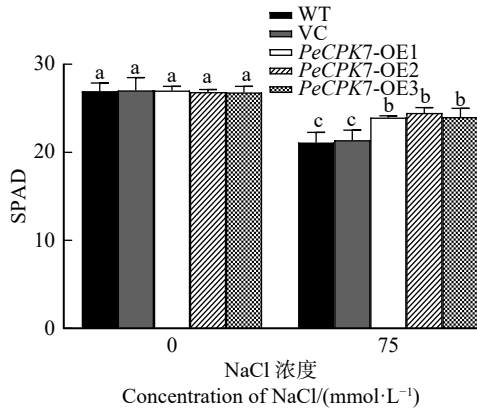
Fig. 13 Activity of antioxidant enzymes and expression of related genes in *Arabidopsis thaliana* under salt stress

图 14 盐胁迫下拟南芥各株系的叶绿素荧光参数

Fig. 14 Chlorophyll fluorescence parameters in *Arabidopsis thaliana* lines under NaCl treatment

mays)ZmCPK4 参与 Ca²⁺介导的 ABA 信号转导, 调节种子萌发和幼苗生长。本文研究结果表明, 胡杨 PeCPK7 能正向调节植物的耐旱性, 这与转基因拟南芥在盐胁迫下钙信号转导和维持 Na⁺/K⁺平衡、抗氧

化能力、光合作用有关。盐胁迫会打破植物细胞内的 Na⁺/K⁺平衡^[22]。在盐胁迫处理下, 转基因株系根细胞中 Na⁺含量显著低于野生型和转空载体株系 (图 9)。转基因株系根中 Na⁺外流与 K⁺内流也强于



SPAD: 叶绿素含量。SPAD, chlorophyll content.

图 15 NaCl 处理后拟南芥各株系叶绿素含量

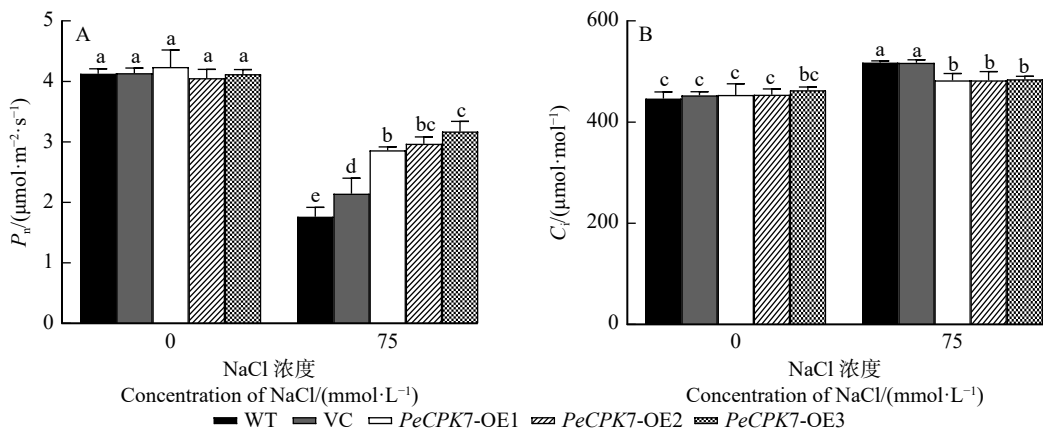
Fig. 15 Chlorophyll content in *Arabidopsis thaliana* lines under NaCl treatment

WT 和 VC(图 12), 这些结果说明 *PeCPK7* 具有维持细胞离子平衡的功能。有研究表明, 在拟南芥中, *AtCPK3* 使液泡钾离子通道被磷酸化, 可以促进其与 14-3-3 蛋白相互作用, 从而维持 Na^+/K^+ 平衡, 增强拟南芥对盐胁迫耐受性^[23]。在水稻 (*Oryza sativa*) 中, *OsCPK21* 也是通过与 14-3-3 蛋白相互作用来响应盐胁迫^[24]。同样, 盐胁迫也会扰乱植物细胞内的活性氧平衡状态^[25]。盐胁迫显著增加了各拟南芥株系的 H_2O_2 水平, 而转基因 *PeCPK7* 株系中 H_2O_2 的水平均显著低于野生型和转空载体株系(图 10)。在盐胁迫处理下, 转基因 *PeCPK7* 株系的 SOD、POD 和 CAT 的酶活、相关基因的转录水平显著提高, 并且明显高于 WT 和 VC(图 13), 这有利于快速清除体内的活性氧, 从而维持细胞膜稳定性(图 8)。与本研究类似, 侯梦娟等^[26]发现转基因 *GhCPK4* 的 SOD、POD 和 CAT 的酶活性增强, 相对电导率降低, *GhCPK4* 正向调控盐胁迫。盐胁迫下, 转基因 *PeCPK7* 株系细胞中 Ca^{2+} 含量显著高于野生型和转

空载体株系(图 11), 使细胞能够及时响应环境胁迫, 进行信号转导, 通过调节离子平衡与活性氧平衡提高植物的耐盐能力。Xu 等^[9]发现在干旱和盐胁迫条件下, 通过提高 Ca^{2+} 和 ABA 水平能激活 *AtCPK6* 信号通路, *AtCPK6* 过表达植株的耐旱性和耐盐性增强。

转基因 *PeCPK7* 株系与 WT 和 VC 相比长势较好(图 5), 这与其具有较高的叶绿素含量和光合作用有关^[27]。叶绿素荧光通常用于评估植物对盐胁迫、干旱胁迫等的反应^[28]。盐胁迫下, 转基因 *PeCPK7* 株系的 PSII 最大光化学效率和实际光合量子产量显著升高, 说明 *PeCPK7* 有助于缓解盐胁迫对拟南芥 PS II 光化学效率的不利影响。盐胁迫下转基因 *PeCPK7* 株系的相对电子传递效率和叶绿素含量显著高于野生型和转空载体株系(图 14、15), 说明转基因株系受到盐胁迫的影响相对较小。过表达 *PeCPK7* 株系的胞间 CO_2 含量相对较低(图 16), 说明转基因株系能较好地保持碳同化能力。有研究表明 *NbCIPK25* 同样能够促进盐胁迫下植物的光合作用^[29]。

CDPKs 通过感知钙信号的变化, 进行细胞信号转导, 调控植物对逆境胁迫的响应过程, 提高了转基因 *PeCPK7* 拟南芥的耐盐性。过表达 *OsCPK7* 的水稻, 在盐胁迫下的伤害指数明显低于对照水稻, 转基因水稻对盐胁迫的耐受性增强^[30]。*TaCPK7* 的过表达能够提高小麦的抗病性^[31]。*PeCPK7* 响应钙信号的变化, 使细胞减少 Na^+ 的积累, 维持胞内 Na^+/K^+ 平衡, 控制细胞中 H_2O_2 的水平, 缓解活性氧对膜脂造成的伤害, 维持细胞膜的完整性, 并且维持光合作用的相对稳定, 从而提高了植物的耐盐性。为了进一步阐明 *PeCPK7* 调控胡杨耐盐的分子机制, 可以鉴定并验证与 *PeCPK7* 互作的底物蛋白, 并进行磷酸化检测; 鉴定调控 *PeCPK7* 基因表达的 DNA 结合蛋



P_n : 净光合速率; C_i : 胞间二氧化碳浓度。 P_n , net photosynthetic rate; C_i , intercellular carbon dioxide concentration.

图 16 NaCl 处理后拟南芥各株系的光合参数变化

Fig. 16 Changes of photosynthetic parameters of *Arabidopsis thaliana* under NaCl treatment

白。最终在蛋白互作、转录调控与翻译后修饰的分子水平上,进一步阐明 *PeCPK7* 胡杨耐盐的调控机理。本研究通过探讨 *PeCPK7* 对盐胁迫的响应,进一步揭示了 *PeCPK7* 调控植物耐盐性的作用机制,为利用基因工程提高植物的耐盐性提供了理论依据。

参 考 文 献

- [1] Zhu J K. Abiotic stress signaling and responses in plants[J]. Cell, 2016, 167(2): 313–324.
- [2] Yang Y, Guo Y. Elucidating the molecular mechanisms mediating plant salt-stress responses[J]. New Phytologist, 2018, 217(2): 523–539.
- [3] Zhu J K. Plant salt tolerance[J]. Trends in Plant Science, 2001, 6(2): 66–71.
- [4] Valmonte G R, Arthur K, Higgins C M, et al. Calcium-dependent protein kinases in plants: evolution, expression and function[J]. Plant and Cell Physiology, 2014, 55(3): 551–569.
- [5] Luo Q, Feng J, Yang G, et al. Functional characterization of BdCIPK31 in plant response to potassium deficiency stress[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2022, 192: 243–251.
- [6] Kim K N, Cheong Y H, Grant J J, et al. CIPK3, a calcium sensor-associated protein kinase that regulates abscisic acid and cold signal transduction in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 2003, 15(2): 411–423.
- [7] Zou J J, Li X D, Ratnasekera D, et al. Arabidopsis calcium-dependent protein kinases 8 and catalase3 function in abscisic acid-mediated signaling and H₂O₂ homeostasis in stomatal guard cells under drought stress[J]. Plant Cell, 2015, 27(5): 1445–1460.
- [8] Grossi C E M, Santin F, Quintana S A, et al. Calcium-dependent protein kinase 2 plays a positive role in the salt stress response in potato[J]. Plant Cell Reports, 2022, 41(3): 535–548.
- [9] Xu J, Tian Y S, Peng R H, et al. *AtCPK6*, a functionally redundant and positive regulator involved in salt/drought stress tolerance in *Arabidopsis*[J]. Planta, 2010, 231(6): 1251–1260.
- [10] Ma S Y, Wu W H. *AtCPK23* functions in *Arabidopsis* responses to drought and salt stresses[J]. Plant Molecular Biology, 2007, 65(4): 511–518.
- [11] Zhu S Y, Yu X C, Wang X J, et al. Two calcium-dependent protein kinases, *CPK4* and *CPK11*, regulate abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 2007, 19(10): 3019–3036.
- [12] 孙阳. 密胡杨抗逆生理生态初步研究 [D]. 阿拉尔: 塔里木大学, 2021.
- Sun Y. Preliminary study on stress resistance physiology and ecology of *Euphratica* [D]. Alar: Tarim University, 2021.
- [13] Chen S, Hawighorst P, Sun J, et al. Salt tolerance in populus: significance of stress signaling networks, mycorrhization, and soil amendments for cellular and whole-plant nutrition[J]. Environmental and Experimental Botany, 2014, 107: 113–124.
- [14] Jia H, Liu G, Li J, et al. Genome resequencing reveals demographic history and genetic architecture of seed salinity tolerance in *Populus euphratica*[J]. Journal of Experimental Botany, 2020, 71(14): 4308–4320.
- [15] Zhao R, Yin K, Chen S. Hydrogen sulphide signalling in plant response to abiotic stress[J]. Plant Biology (Stuttgart), 2022, 24(4): 523–531.
- [16] Zhang Y, Yin K, Yao J, et al. *Populus euphratica* *GLABRA3* binds PLDdelta promoters to enhance salt tolerance[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(9): 8208.
- [17] Yao J, Shen Z, Zhang Y, et al. *Populus euphratica* *WRKY1* binds the promoter of H⁺-ATPase gene to enhance gene expression and salt tolerance[J]. Journal of Experimental Botany, 2020, 71(4): 1527–1539.
- [18] 张一南, 王洋, 张会龙, 等. 过表达胡杨 *PeRIN4* 基因拟南芥提高质膜 H⁺-ATPase 活性和耐盐性 [J]. 北京林业大学学报, 2017, 39(11): 1–8.
- Zhang Y N, Wang Y, Zhang H L, et al. Over-expression of *PeRIN4* enhanced salinity tolerance through up-regulation of PM H⁺-ATPase in *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2017, 39(11): 1–8.
- [19] Zhang H, Deng C, Wu X, et al. *Populus euphratica* remorin 6.5 activates plasma membrane H⁺-ATPases to mediate salt tolerance[J]. Tree Physiology, 2020, 40(6): 731–745.
- [20] Colin L, Ruhnnow F, Zhu J K, et al. The cell biology of primary cell walls during salt stress[J]. Plant Cell, 2023, 35(1): 201–217.
- [21] Jiang S, Zhang D, Wang L, et al. A maize calcium-dependent protein kinase gene, *ZmCPK4*, positively regulated abscisic acid signaling and enhanced drought stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2013, 71: 112–120.
- [22] Ding C, Zhang W, Li D, et al. Effect of overexpression of JERFs on intracellular K⁺/Na⁺ balance in transgenic poplar (*Populus alba* × *P. berolinensis*) under salt stress[J]. Front Plant Science, 2020, 11: 1192.
- [23] Latz A, Mehler N, Zapf S, et al. Salt stress triggers phosphorylation of the *Arabidopsis* vacuolar K⁺ channel TPK1 by calcium-dependent protein kinases (CDPKs)[J]. Molecular Plant, 2013, 6(4): 1274–1289.
- [24] Chen Y, Zhou X, Chang S, et al. Calcium-dependent protein kinase 21 phosphorylates 14-3-3 proteins in response to ABA signaling and salt stress in rice[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2017, 493(4): 1450–1456.
- [25] Zhang Y, Zhang Y, Yu J, et al. NaCl-responsive ROS scavenging and energy supply in alkaligrass callus revealed from proteomic analysis[J]. BMC Genomics, 2019, 20(1): 990.
- [26] 侯梦娟, 朱新霞, 孔辉, 等. *GhCDPK4* 基因的克隆和功能分

- 析 [J]. 西北农业学报, 2022, 31(2): 217–223.
- Hou M J, Zhu X X, Kong H, et al. Cloning and functional analysis of *GhCDPK4* gene [J]. Journal of Northwest Agricultural Sciences, 2019, 31(2): 217–223.
- [27] Wan Y, Zhang Y, Zhang M, et al. Shade effects on growth, photosynthesis and chlorophyll fluorescence parameters of three *Paeonia* species[J]. Peer Journal, 2020, 8: e9316.
- [28] Makhtoum S, Sabouri H, Gholizadeh A, et al. Genomics and physiology of chlorophyll fluorescence parameters in *Hordeum vulgare* L. under drought and salt stresses[J]. Plants (Basel), 2023, 12(19): 3515.
- [29] Lu L, Wu X, Tang Y, et al. Halophyte *Nitraria billardieri* *CIPK25* promotes photosynthesis in *Arabidopsis* under salt stress[J]. Front Plant Science, 2022, 13: 1052463.
- [30] 潘欣. 转 *OsMAPK4*、*OsCDPK7* 基因耐盐碱水稻的筛选与抗性分析 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2011.
- Pan X. Screening and resistance analysis of saline-alkali resistant rice with *OsMAPK4* and *OsCDPK7* genes [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2011.
- [31] 申芳嫡. 转 *TaCPK7* 和 *OpIAP-p35* 基因小麦的分子检测及纹枯病抗性鉴定 [D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2016.
- Shen F D. Molecular detection and resistance identification of wheat with *TaCPK7* and *OPIA-P35* genes [D]. Xianyang: Northwest A&F University, 2016.

(责任编辑 赵田芸
责任编辑 林金星)