

组成型过表达 *PagPYL4* 基因对 84K 杨耐旱性与生长的影响

刘上 王锦华 哈斯 刘畅*

(东北林业大学林学院, 林木遗传育种全国重点实验室(东北林业大学), 哈尔滨 150040)

摘要 在气候变化和耕地资源日益紧张背景下, 提升林木抗旱性成为重要育种目标。然而, 抗旱性改良不应以牺牲生物量积累为代价。该研究在 84K 杨 (*Populus alba* × *P. glandulosa* '84K') 中构建了组成型过表达 *PagPYL4* 基因株系, 系统分析其在气孔调控、光合效率、生长性状及干旱响应方面的综合表现。结果表明, 在外源 ABA 影响下, 过表达 *PagPYL4* 基因使植株气孔开度变化显著。短期干旱处理下, 相较于野生型, 过表达 *PagPYL4* 基因能够减少水分散失, 提升耐旱性; 但抑制气孔导度和光合速率, 造成株高与地径增长速率显著下降。该研究揭示了在林木抗逆改良中, 仅依赖组成型表达难以实现理想育种目标, 应探索更精准的表达调控策略以实现抗性与生长的协同优化。

关键词 84K 杨; *PagPYL4*; 耐旱; 生长; 气孔; 光合作用

中图分类号: Q945 文献标志码: A doi: 10.7525/j.issn.1673-5102.2025.05.007

Effects of Constitutive Overexpression of *PagPYL4* Gene on Drought Tolerance and Growth of 84K poplar

LIU Shang WANG Jinhua YU Hasi LIU Chang*

(College of Forestry, State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding (Northeast Forestry University), Harbin 150040)

Abstract In the context of climate change intensification and increasing limitation of arable land, improving drought tolerance in forest trees has emerged as a critical breeding goal. However, achieving enhanced stress resistance without compromising growth and biomass production remains a major challenge. In this study, transgenic 84K poplar (*Populus alba* × *P. glandulosa* '84K') lines constitutively overexpressing *PagPYL4* gene, an abscisic acid (ABA) receptor gene, were developed, and their physiological and growth responses were evaluated under drought stress. The results showed that under the influence of exogenous ABA, the overexpression of *PagPYL4* gene significantly altered stomatal aperture in plants. Under short-term drought treatment, compared with the wild type, the overexpression of *PagPYL4* gene reduced water loss and improved drought tolerance; however, it also inhibited stomatal conductance and photosynthetic rate, leading to a significant decrease in growth rate of plant height and ground diameter. Our findings demonstrated that while *PagPYL4* overexpression effectively enhanced drought resistance, its indiscriminate activation can impose substantial growth penalties. This highlighted the importance of spatially and temporally regulated gene expression strategies to balance stress resilience and biomass productivity in future tree breeding programs.

Key words *Populus alba* × *P. glandulosa* '84K'; *PagPYL4*; drought tolerance; growth; stomata; photosynthesis

随着气候变化加剧, 可利用土地资源日益紧张, 干旱已成为制约林木生长的主要环境因素之一^[1-2]。我国可用于困难地造林的林木品种仍较为

匮乏, 培育具备良好抗旱能力且兼顾材积产量的林木新品种, 已成为实现林业可持续发展的关键目标^[3-4]。

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目(LH2024C050); 林木遗传育种全国重点实验室(东北林业大学)创新项目(2022A04); 中央高校基本科研业务费专项资金项目(2572024AW16)。

第一作者简介: 刘上(2000—), 男, 硕士研究生, 主要从事林木遗传育种研究。

* 通信作者: E-mail: changliu0110@163.com。

收稿日期: 2025年4月30日。

近年来,通过基因工程手段提升林木抗逆性的研究逐渐成为热点,特别是以脱落酸(Abscisic acid, ABA)合成与信号通路为核心的调控机制,已被广泛用于开展提升植物干旱响应性与耐受性的研究^[5-6]中。ABA 信号通路中, PYR/PYL/RCAR 受体(Pyrabactin resistance, pyrabactin resistance-like, and the regulatory component of ABA receptors)能够感知内源 ABA 积累并迅速调控气孔关闭,进而降低水分蒸腾损失^[7-8]。其中, PYL4 作为 ABA 受体,在模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中已被证实与抗旱反应密切相关^[9-10]。然而,对于其在木本植物中的功能及其组成型表达可能对树木生长发育造成的影响仍缺乏系统认识。

前期研究^[11]表明,组成型过表达 ABA 合成或信号转导相关基因,在提升抗旱能力的同时,通常伴随着生物量下降和光合作用受抑制等不良生长表现。例如,在番茄(*Solanum lycopersicum*)中过表达 *LeNCED1* (9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 1) 基因导致 ABA 积累,抑制植株生长^[12]。过表达 *PYL9* 基因增强植株抗旱性,同时,也加速拟南芥衰老^[12-13]。在三倍体毛白杨(*Populus tomentosa*)中,过表达 *PePYL4* 基因可增强 ABA 响应性,但亦造成净光合速率下降,限制其应用性^[14]。因此,在提升林木抗旱性的同时,避免抑制生长和碳同化能力,是林木抗性育种中亟待解决的重要科学问题。

本研究以我国广泛应用的杂交杨品种 84K 杨(*Populus alba* × *P. glandulosa* '84K')为研究对象,构建了 *PagPYL4* 基因的组成型过表达株系(OE-*PagPYL4*),并系统评估其在气孔调控、抗旱能力、水分利用效率及生长性状方面的变化。通过对气孔开度、蒸腾速率、光合能力、株高和地径等指标的综合评价,揭示 *PagPYL4* 基因组成型过表达在提升耐旱性的同时对植物生长发育的影响。该研究旨在明确 *PagPYL4* 基因非特异性表达对杨树生长和光合能力的潜在副作用,为后续开展组织特异性调控和抗逆性精准改良提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料及处理方法

野生型 84K 杨组培苗由林木遗传育种国家重点实验室(东北林业大学)提供。组培条件为光照周期 16 h/8 h, 温度 (25±2) °C, 光合有效辐

射为 400 μmol·m⁻²·s⁻¹。盆栽土培条件为光照周期 16 h/8 h, 温度 (25±2) °C, 光合有效辐射为 400 μmol·m⁻²·s⁻¹, 盆栽土配方为 V(黑土):V(蛭石):V(腐殖质)=2:1:2(高温灭菌后体积比)。

1.2 试验试剂

本研究所用试剂主要包括:高保真 DNA 聚合酶 2×Phanta Max Master Mix-P515 和反转录试剂盒 HiScript III RT SuperMixfor qPCR, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; DNA 聚合酶 2×Taq Master Mix、全能型植物 RNA 提取试剂盒, 江苏康为世纪生物科技股份有限公司; 大肠杆菌(*Escherichia coli*)感受态 DH5α 和农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)感受态 GV3101, 上海生工生物工程股份有限公司; 质粒小量提取试剂盒, 上海惠凌生物技术有限公司; DAB(20×)显色试剂盒与 GUS 染色预混液, 北京酷来搏科技有限公司; 胶回收试剂盒, 美国 Omega Bio-tek 公司; 限制性核酸内切酶和 T4 DNA 连接酶, 美国 New England Biolabs 公司。pCAMBIA1300-NOS 载体、pCAMBIA1301-GUS 载体均由本实验室保存。

气孔打开缓冲液(stomatal-opening buffer): 0.01 mol·L⁻¹氯化钾、0.1 mol·L⁻¹氯化钙和 0.01 mmol·L⁻¹ MES-KOH^[15]。

84K 杨愈伤组织分化液体培养基: 2.41 g·L⁻¹ WPM, 20 g·L⁻¹ 蔗糖, 0.03 mg·L⁻¹ 6-BA, 0.02 mg·L⁻¹ IBA, pH=5.8。

84K 杨共培养培养基: 2.41 g·L⁻¹ WPM, 20 g·L⁻¹ 蔗糖, pH=5.9, 5 g·L⁻¹ 琼脂; 灭菌后加 80 μmol·L⁻¹ 乙酰丁香酮。

84K 杨芽诱导培养基: 2.41 g·L⁻¹ WPM, 20 g·L⁻¹ 蔗糖, 0.03 mg·L⁻¹ 6-BA, 0.02 mg·L⁻¹ IBA, 5 g·L⁻¹ 琼脂, pH=5.8。

84K 杨芽生根培养基: 2.41 g·L⁻¹ WPM, 25 g·L⁻¹ 蔗糖, 0.1 mg·L⁻¹ IBA, pH=5.8, 5 g·L⁻¹ 琼脂。

84K 杨抗性芽生根培养基: 2.41 g·L⁻¹ WPM, 25 g·L⁻¹ 蔗糖, 0.1 mg·L⁻¹ IBA, pH=5.8, 5 g·L⁻¹ 琼脂; 灭菌后加 10 mg·L⁻¹ Hygromycin, 125 mg·L⁻¹ Cefotaxime。

1.3 引物序列

根据已公布的 84K 杨基因组序列信息, 利用 Geneious 9.0 软件设计特异性的上、下游引物^[16]。试验涉及的所有引物命名、序列和用途见表 1。

表1 引物序列
Table 1 Primer sequence

引物名称 Primer name	序列(5'→3') Sequence(5'→3')	应用 Application
84KPYL4-F	CAGGTCGACTCTAGAGGATCCATGCCTGCTAATCCTCCGAG	PCR/Identification
84KPYL4-R	GGGAAATTCGAGCTCGGTACCTCACGATGATGATTATTATTGCGTC	PCR
Semi-PagPYL4-F	CGGTGGTCTCCTCTACCACGC	Semi-quantitative PCR
Semi-PagPYL4-R	GCTCATCGTCGAGGATCTCGAGG	Semi-quantitative PCR
UBQ7-F	CCTAACTGGCAAGACCATCAC	Semi-quantitative PCR
UBQ7-R	AGCCTCAGAACCAGATGCAGT	Semi-quantitative PCR
NOSR	CATCGCAAGACCGGCAACAG	Identification

1.4 *PagPYL4*基因CDS序列扩增

以土培30 d的84K杨cDNA为模板,根据已知的84K杨cDNA文库序列设计引物序列,用引物84KPYL4-F与84KPYL4-R(表1)进行PCR扩增,产物纯化后连接pCAMBIA1300-35S-NOS载体,并将重组质粒转入大肠杆菌感受态。待长出单菌落时,随机挑取多个单菌落进行PCR验证并进行琼脂糖电泳凝胶检测。以农杆菌菌落为模板,选择特异性引物84KPYL4-F与NOS-R(表1)对pCAMBIA1300-35S-*PagPYL4*-NOS进行PCR扩增。将阳性克隆送至北京睿博兴科生物技术有限公司测序;将测序结果与已知CDS序列比对,二者相一致,说明pCAMBIA1300-35S-*PagPYL4*-NOS载体已经构建成功。测序成功后,将重组质粒转入农杆菌感受态中;待长出单菌落时,随机挑取多个单菌落进行PCR扩增并进行琼脂糖电泳凝胶检测。

1.5 组成型过表达*PagPYL4*基因株系遗传转化

将过夜培养的农杆菌菌液添加到100 mL YEB液体培养基(含100 mg·L⁻¹卡那霉素,33 mg·L⁻¹利福平),在培养箱中培育至菌液OD值在0.3~0.5后进行离心集菌。在84K杨愈伤组织分化液体培养基内重新悬浮收集农杆菌沉淀,孵育2 h;将84K杨愈伤组织放入已经悬浮有农杆菌液体的分化培养基,共培养20 min。控干水分后,放入84K杨共培养培养基,置于暗处共培养48 h。将愈伤组织放入无菌组培瓶中,加入200 mL无菌水,轻微振荡,期间根据水体浑浊度更换无菌水,重复2次。再次加入200 mL含有2% Timentin的无菌水并进行轻微振荡;重复2次后,将控干水分的愈伤组织转移至84K杨芽诱导培养基中;每隔14 d更换培养基直至出现幼嫩丛生芽后,将丛生芽剥离成单独的芽,放置在84K杨抗性芽生根培养基中,待其生根后进行转基因苗DNA鉴定^[16]。

1.6 *PagPYL4*基因表达量鉴定

提取野生型84K杨和转基因阳性株系叶片RNA,将其反转录成cDNA,以野生型为对照,通过半定量PCR技术检测*PagPYL4*基因表达量在野生型84K杨和转基因84K杨中差异。选择semi-PagPYL4-F、semi-PagPYL4-R对pCAMBIA1300-35S-*PagPYL4*-NOS转基因株系和野生型84K杨进行PCR扩增。同时选择UBQ7作为内参基因,选择UBQ7-F、UBQ7-R对pCAMBIA1300-35S-*PagPYL4*-NOS转基因株系和野生型84K杨进行PCR扩增,根据琼脂糖电泳凝胶结果保留表达量高的转基因株系。

1.7 光响应曲线测量

利用便携式光合作用测量系统(Li-cor 6400XT,美国)测量野生型和转基因株系叶片光合速率(P_n)、蒸腾速率(T_r)、气孔导度(G_s)和饱和蒸汽压亏缺(VPD)。在干旱处理前后,选取各株系第6~7茎节处成熟叶片,测量净光合速率。测量光响应曲线时,设置的光合有效辐射(PAR)水平依次为1 800、1 500、1 200、900、600、400、200、100、50、20、0 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,每次测量的时间间隔为5 min,参比气空气湿度为50%,利用外接CO₂钢瓶并将外部CO₂摩尔分数设定为400 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$,选择晴朗天气在上午08:00—11:00进行测量。

1.8 短期干旱处理

土培条件下各株系84K杨生长60 d后进行干旱胁迫处理。在干旱处理前浇足水,当天作为干旱第1天,在10 d内不再浇水,10 d后植株出现萎蔫进行复水,观察复水后植株表型变化。在此期间,每天08:00—11:00,利用Li-cor 6400XT测定过表达株系和野生型84K杨的6~7茎节处叶片光响应曲线,获取光饱和点、光补偿点^[17];然后,在光饱和点光强下,测定不同处理下野生型和转基因株

系的光合速率、蒸腾速率、气孔导度。浇足水后当天作为干旱第 1 天,分别检测正常浇水,干旱 2、4、6、8、9 d 的植株光合参数并拍照。

1.9 ABA 诱导气孔关闭测试

选择土培生长 60 d 的野生型和转基因 84K 杨株系 OE-*PYL4-1*、OE-*PYL4-2*,每个株系取 3 个生物学重复,取每株第 6~7 茎节处成熟叶片中下部,避开主叶脉两侧区域,切成 1 cm×1 cm 小块并置于气孔打开缓冲液(Stomatal-opening buffer)中,冷光补光灯光照 3 h,将叶片刮去上表皮并将余下部分置于载玻片上,滴加适量气孔打开缓冲液,盖上盖玻片,在 20 倍物镜下进行显微观察(Olympus, 日本)。收集 10~15 个清晰视野,确保收集到足够数量的气孔。之后,将 ABA 溶液浓度梯度设置为 0、5、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,将试验样本分为 2 组,第 1 组用于在缓冲液处理后,计量气孔的最大开放程度;第 2 组在气孔完全开放后,分别转移到含有 5、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA 缓冲液中继续放回培养箱中,分别光照培养 1、2 h,然后分别观察并拍照。

1.10 水分散失速率测量

为了验证 *PagPYL4* 基因功能对 84K 杨气孔开度的影响,选取土培生长 60 d 的 OE-*PagPYL4-1*、OE-*PagPYL4-2* 转基因株系及野生型(WT)植株,选取植株第 6~7 茎节处叶片,每个株系选取 10 个生物学重复。将采集的叶片置于补光灯照射下,在气孔打开缓冲液浸泡 30 min。擦干叶片多余水分,转移至人工气候温室。该温室环境参数设定为温度 24 $^{\circ}\text{C}$ 、光合有效辐射 75~100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、相对湿度 70%。在上述条件下,每隔 1 h 称量叶片质量,并记录相关数据。通过对不同时间点叶片质量变化的统计与分析,探究在该特定环境条件下,不同株系叶片水分变化规律。

1.11 DAB 染色

为了进一步评估过表达 *PagPYL4* 基因对活性氧(ROS)积累的影响,本研究将组培 30 d 的野生型(WT)及组成型过表达 *PagPYL4* 基因株系的第 5 茎节处叶片浸入无菌水处理 2 h 为空白对照,另一组浸入 200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇溶液处理 2 h,采用 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)染色法,染色 2 h 后,浸入 70% 乙醇溶液直至完全脱色后观察并拍照,根据棕色反应产物的颜色深度,分析过氧化氢浓度。

1.12 数据处理

采用 GraphPad Prism 10 和 Excel 2013 对数据

进行统计分析,使用单因素方差分析(one-way ANOVA)、双因素方差分析(two-ways ANOVA)进行数据间两两比较并进行 Tukey 多重比较检验,利用 GraphPad Prism 10 作图。所有数据采用 3 次以上生物学重复的平均值 \pm 标准误表示,不同小写字母表示差异达到显著水平($P<0.05$)。

2 结果与分析

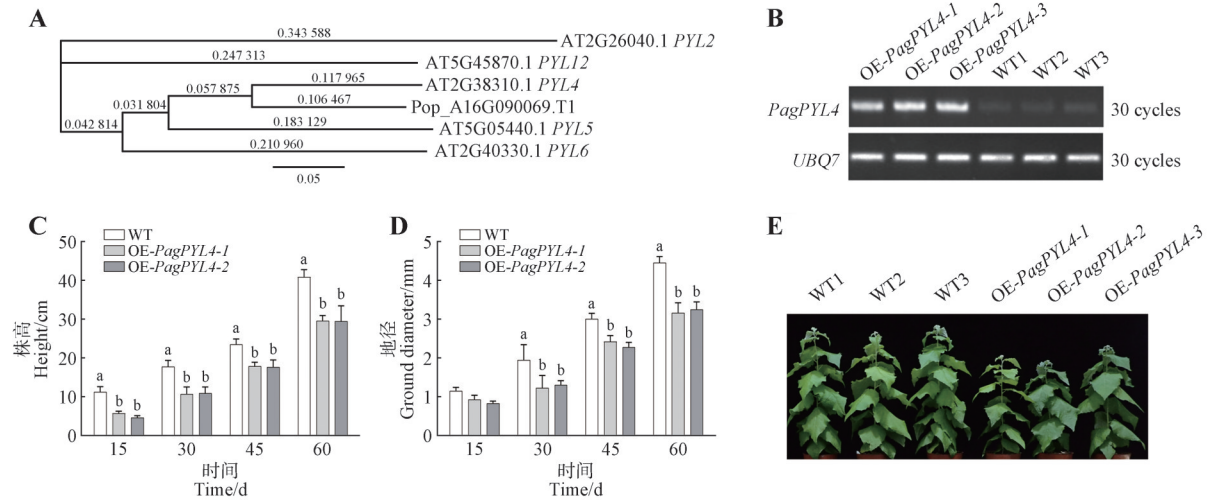
2.1 组成型过表达 *PagPYL4* 基因株系的鉴定与表型分析

根据 NCBI(www.ncbi.nlm.nih.)提供的基因序列和蛋白质序列,利用 Geneious 9.0 对 84K 杨蛋白质序列文库进行 BLAST,将比对结果用于进化树分析。选择同源度最高的基因 *Pop_A16G090069.T1* (图 1A),并将其命名为 *PagPYL4*。随后,通过半定量 PCR 鉴定组成型过表达株系 *PagPYL4* 基因表达水平,选择 *UBQ7* 作为内参基因^[17]。经过 30 个循环数的扩增后,过表达株系 *PagPYL4* 基因表达水平明显超过野生型(图 1B),成功获得 3 个 84K 杨过表达 *PagPYL4* 基因株系(OE-*PagPYL4-1*、OE-*PagPYL4-2*、OE-*PagPYL4-3*)。组成型过表达 *PagPYL4* 基因株系株高、地径均显著低于野生型(图 1C、1D),表明持续性过表达 *PagPYL4* 基因对 84K 杨生物量积累具有明显的抑制作用(图 1E)。

不同光照条件下,各组成型过表达 *PagPYL4* 基因株系的蒸腾速率均显著低于野生型植株(图 2A);在低于饱和光条件(400、600 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)下,组成型过表达 *PagPYL4* 基因株系的净光合速率与野生型植株无显著差异(图 2B);但在高光(1 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)条件下,组成型过表达 *PagPYL4* 基因株系的净光合速率、气孔导度均显著低于野生型植株(图 2C)。该结果表明,在高光条件下,过表达 *PagPYL4* 基因对植株的光合效率具有显著抑制作用。在不同光照条件下,转基因株系与野生型植株的饱和水汽压差值均无显著差异(图 2D)。

2.2 组成型过表达 *PagPYL4* 基因株系对外源 ABA 的响应特征

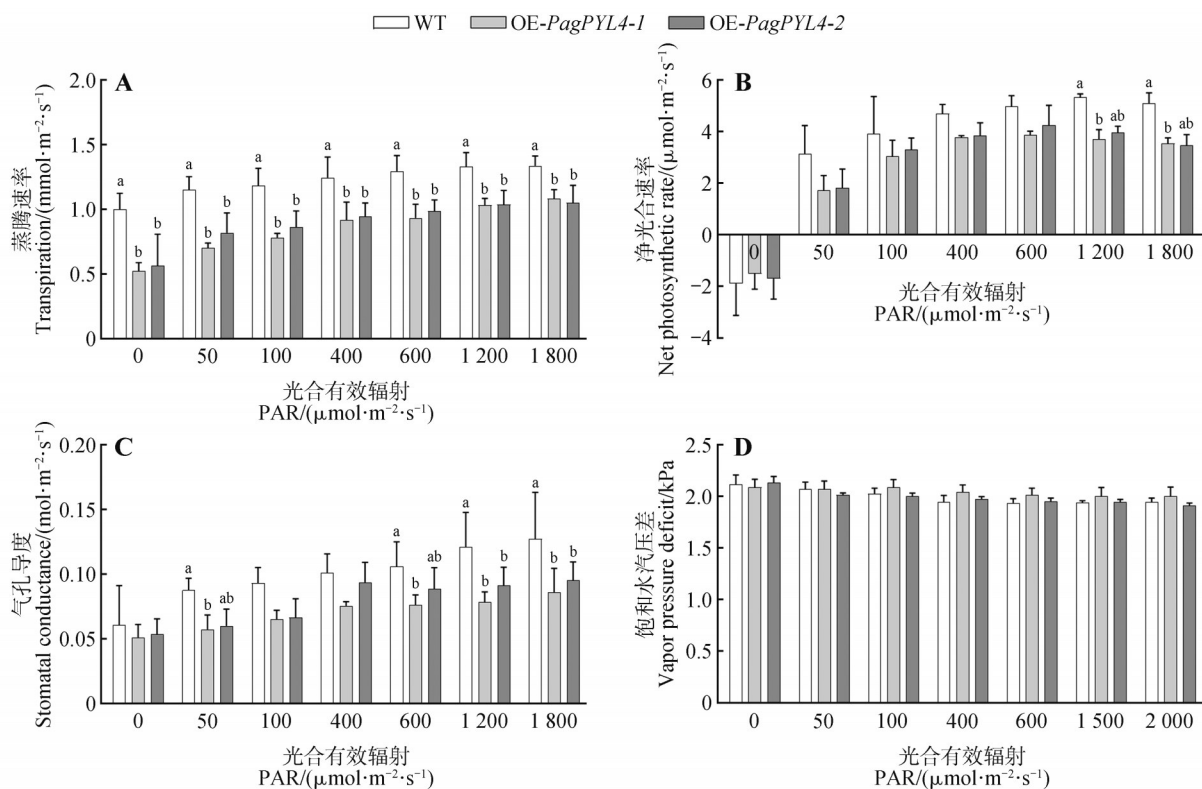
在外源施加 ABA(5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 或 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理后,与野生型相比,组成型过表达 *PagPYL4* 基因株系气孔开度均显著降低(图 3)。组成型过表达 *PagPYL4* 基因株系对 ABA 更为敏感,能够快速响应 ABA 信号,进而有效减小气孔开度。



A. *PYL4* 进化树分析; B. 转基因 84K 杨半定量 PCR 电泳图; C. 株高统计数据; D. 地径统计数据; E. 转基因 84K 杨表型。图 1C、1D 采用双因素方差分析; 数据表示为平均值 \pm SE; 误差线代表 3 个生物学重复的标准误差, 不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 条件下不同株系之间存在显著差异。
A. Phylogenetic tree analysis of *PYL4*; B. Semi-quantitative PCR electrophoretogram of transgenic 84K poplar; C. Plant height statistics; D. Ground diameter statistics; E. Phenotypic diagram of transgenic 84K poplar. In Figs. 1C and D, two-way analysis of variance (ANOVA) was used. Data were expressed as mean \pm SE; the error line represented the standard error of three biological replicates, different lowercase letters indicated significant differences between lines at $P < 0.05$.

图 1 84K 杨 *PagPYL4* 基因鉴定与过表达株系表型分析

Fig.1 Identification of 84K poplar *PagPYL4* gene and phenotype analysis of the transgenic lines

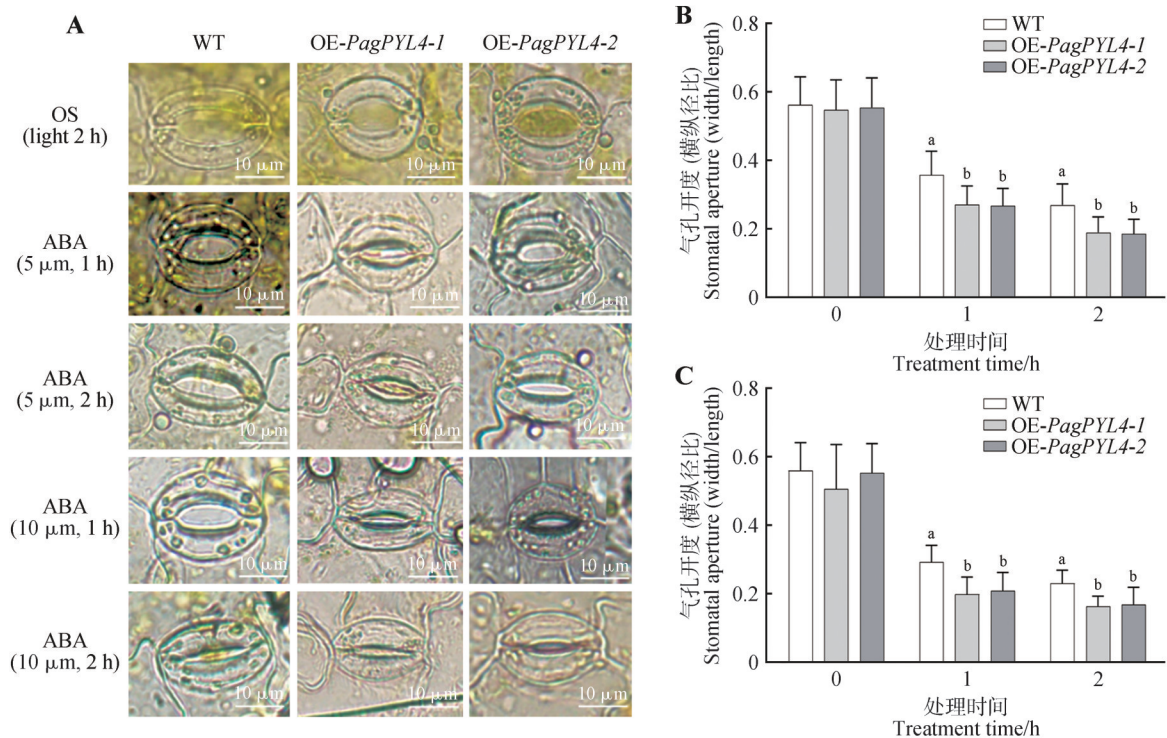


误差线代表 3 个生物学重复的标准误差, 不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 条件下不同株系之间存在显著差异。

The error lines represented standard error of three biological replicates, different lowercase letters indicated significant differences between lines at $P < 0.05$.

图 2 不同光强条件下 84K 杨不同株系叶片光合参数

Fig.2 Photosynthetic parameters of 84K poplar lines under different irradiances



A. ABA 处理前后气孔开度; B. $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA 处理后 0 h 和 2 h 的气孔孔径; C. $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA 处理后 0 h 和 2 h 的气孔孔径; OS. 气孔打开缓冲液。不同小写字母表示在 $P<0.05$ 条件下不同株系之间存在显著差异。

A. The stomatal opening before and after ABA treatment; B. Stomatal aperture after $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA treatment for 0 and 2 h; C. Stomatal aperture after $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA treatment for 0 and 2 h. OS. Open solution buffer. Different lowercase letters indicated significant differences between lines at $P<0.05$.

图 3 不同浓度 ABA 处理下不同株系的气孔开度

Fig.3 Stomatal aperture indexes of different lines under different ABA concentrations

2.3 组成型过表达 *PagPYL4* 基因株系抗旱性分析

过表达株系的水分散失效率显著低于野生型 (图 4A), 表明其对水分亏缺更敏感, 进一步证明了组成型过表达 *PagPYL4* 基因植株能够通过快速响应 ABA 信号调节气孔关闭, 减少水分散失。

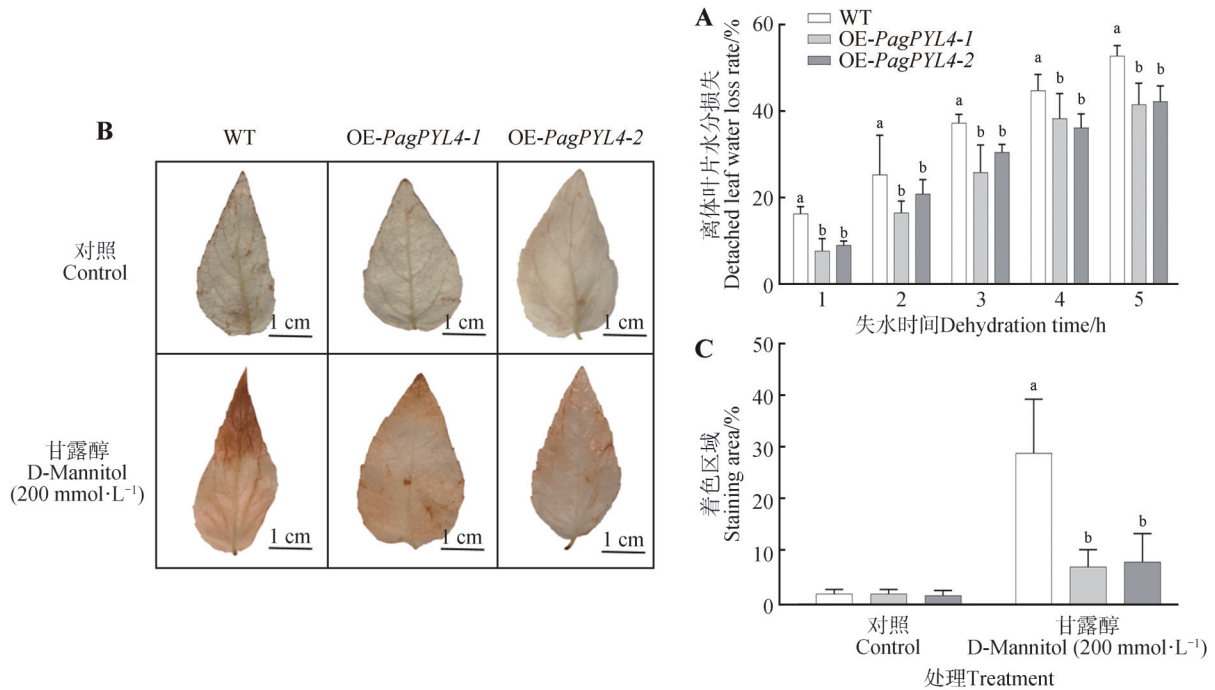
DAB 组织化学染色结果显示, 在正常生长条件下, 野生型与组成型过表达 *PagPYL4* 基因株系叶片均呈现微弱染色, 二者未表现出明显差异。而在渗透胁迫条件下, 相较于组成型过表达 *PagPYL4* 基因株系, 野生型植株叶片染色程度更深、染色区域更为广泛 (图 4B)。进一步通过定量分析染色区域发现, 胁迫处理后, 组成型过表达 *PagPYL4* 基因植株叶片过氧化氢积累量显著低于野生型植株 (图 4C)。

野生型植株和组成型过表达 *PagPYL4* 基因株系在干旱处理第 7 天出现叶片萎蔫的表型 (图 5A)。持续干旱处理 10 d 后, 野生型植株所有叶片呈现严重萎蔫, 组成型过表达 *PagPYL4* 基因株系

仅在基部叶片出现明显萎蔫。复水处理后, 与野生型相比, 组成型过表达 *PagPYL4* 基因株系更快地恢复。该结果表明, 过表达 *PagPYL4* 基因能够显著提升 84K 杨对干旱胁迫的耐受性。对比分析野生型与组成型过表达 *PagPYL4* 基因株系的光响应相关数据, 结果表明, 随着处理时间的增长, 两者净光合速率均降低 (图 5B)。干旱处理 1~4 d, 组成型过表达 *PagPYL4* 基因株系净光合速率、气孔导度显著低于野生型; 处理 5~8 d, 二者净光合速率、气孔导度均无显著差异 (图 5B、5C)。野生型和转基因株系的蒸腾速率均随干旱加剧呈现降低的趋势, 且组成型过表达 *PagPYL4* 基因株系的蒸腾速率在前 7 d 显著低于野生型 (图 5D)。

3 讨论

ABA 是植物应答干旱胁迫的重要信号分子。在拟南芥中, 干旱条件会诱导 ABA 含量上升, 在受体 PYL 介导下, SnRK2 激酶被激活, 通过磷酸化下

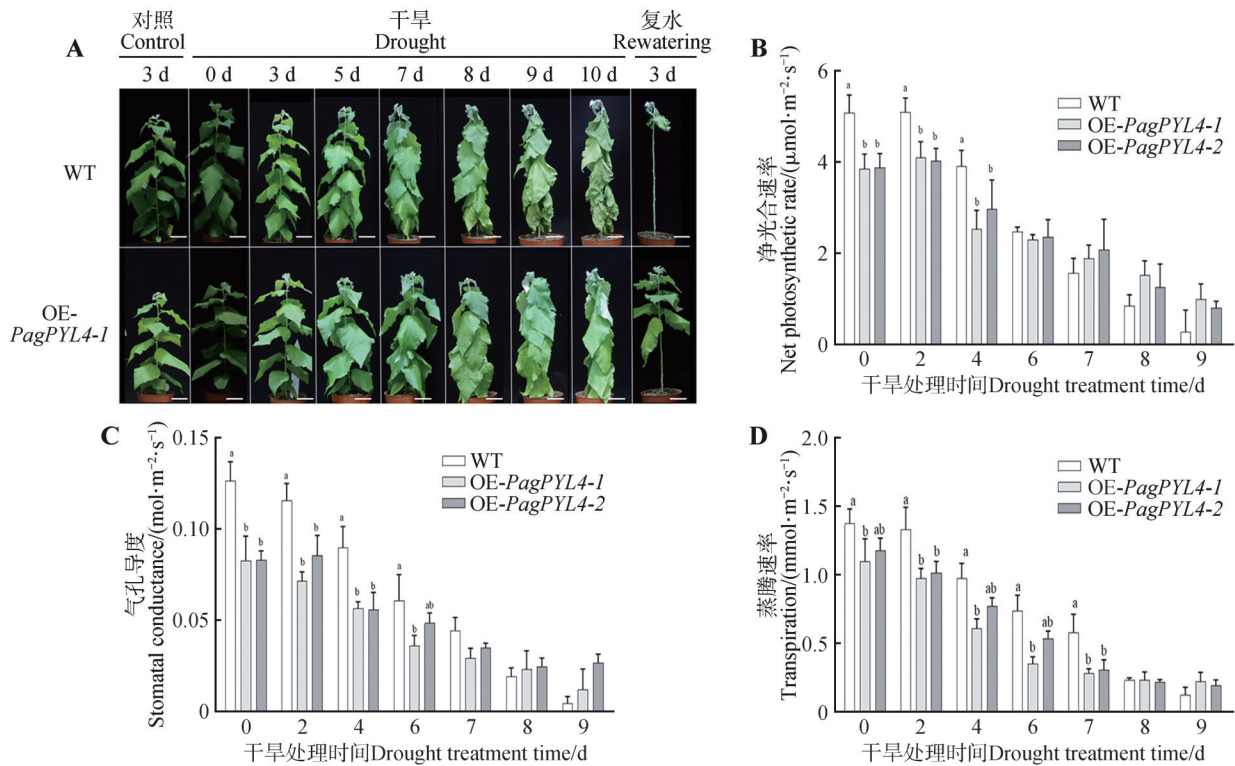


A. 离体叶片失水速率; B. 甘露醇处理下的 DAB 染色; C. 甘露醇处理下的 DAB 染色水平。不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 条件下不同株系之间存在显著差异。

A. Determination of the water loss rate of detached leaves; B. DAB staining under mannitol treatment; C. The level of DAB staining under mannitol treatment. Different lowercase letters indicated significant differences between 84K poplar lines at $P < 0.05$.

图 4 不同株系抗旱生理指标分析

Fig.4 Analysis of drought-resistant physiological indices of 84K poplar lines



A. 短期干旱胁迫下的表型观察; B. 净光合速率; C. 气孔导度; D. 蒸腾速率; 不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 条件下不同株系之间存在显著差异。

A. Phenotypic observation under short-term drought stress; B. Net photosynthetic rate; C. Stomatal conductance; D. Transpiration rate. Different lowercase letters indicated significant differences between 84K poplar lines at $P < 0.05$.

图 5 短期干旱胁迫下 84K 杨不同株系光合参数、表型分析

Fig.5 Photosynthetic parameters and phenotypic analysis of 84K poplar lines under short-term drought stress

游效应因子,主要包括 SLAC1 (slow anion channel-associated 1) 和 SLAC1 相关的阴离子通道,促进 SLAC1 通道开放,导致保卫细胞钾离子、氯离子和阴离子的流出^[18];保卫细胞渗透压降低,水分随之流出细胞,引发保卫细胞收缩,导致气孔关闭^[18]。本研究中,84K 杨组成型过表达 *PagPYL4* 基因株系的保卫细胞对 ABA 敏感度增强(图 3),但在杨树中 ABA 是否通过激活阴离子通道 SLAC1 介导气孔关闭,仍需进一步探索。此外,ABA 还可通过 Ca^{2+} 依赖和 Ca^{2+} 非依赖的途径促进气孔关闭。ABA 促使细胞内钙离子浓度升高,这一过程主要通过部分环核苷酸门控通道(cyclic nucleotide-gated ion channels, CNGC)介导的钙通道实现^[19]。细胞内钙浓度升高进一步激活一系列阴离子通道和钾离子通道,从而加速气孔关闭^[19]。在转基因 84K 杨中,过量表达 *PagPYL4* 基因是否会影响胞内 Ca^{2+} 信号仍有待明确。

干旱胁迫通常会导致植物体内活性氧(ROS),特别是过氧化物(如 H_2O_2)的积累。适量的过氧化物可作为信号分子,激活非生物胁迫相关的信号转导通路,增强植物防御能力;但若 ROS 过量积累,则会对细胞膜、蛋白质和核酸等造成氧化损伤,危害植物正常生理功能^[20]。在本研究中,过表达 *PagPYL4* 基因的 84K 杨表现出较强的过氧化物清除能力(图 4B、4C),提示其具有较高的抗氧化防御水平。然而,在过表达 *PagPYL4* 基因植株中,ROS 如何被清除,是否有抗氧化酶参与其中,仍有待进一步研究。

在非胁迫条件下,组成型过表达 *PagPYL4* 基因株系的株高和地径显著低于野生型,表明其生长发育受到一定程度的抑制。组成型过表达 *PagPYL4* 基因可以减少 84K 杨水分散失,同时,也会抑制叶片光合作用,这可能导致植株碳分配模式发生改变。另外,气孔导度下降限制了叶片碳源的输入,进而可能通过下调蔗糖转运蛋白的表达,抑制光合产物向根系的转运,从而影响根系生长与水分吸收能力。例如,ABA 信号可以激活糖外排转运蛋白(如 SWEET11/12),增强蔗糖向根部的运输,促进根系发育。因此,碳分配失衡可能是转基因植株生物量下降的主要原因,而不仅仅是光合效率的降低所致^[21-22]。此外,ABA 信号的持续激活还可能诱导木质素或黄酮类次生代谢物积累,导致碳资源从生长相关通路转向防御反应,进一步

削弱植株生物量积累^[23-24]。因此,需进一步深入研究 *PagPYL4* 基因介导的 ABA 信号通路及其相关基因互作网络,以系统解析“抗逆-生长”平衡调控的分子机制^[25-26]。

参 考 文 献

- [1] AITKEN S N, YEAMAN S, HOLLIDAY J A, *et al.* Adaptation, migration or extirpation: climate change outcomes for tree populations [J]. *Evolutionary Application*, 2008, 1(1):95-111.
- [2] SCHNABEL F, PURRUCKER S, SCHMITT L, *et al.* Cumulative growth and stress responses to the 2018—2019 drought in a European floodplain forest [J]. *Global Change Biology*, 2022, 28(5):1870-1883.
- [3] 安元强, 郑勇奇, 林富荣, 等. 林木种质资源调查技术规范研制 [J]. *林业调查规划*, 2016, 41(3):1-6.
AN Y Q, ZHENG Y Q, LIN F Q, *et al.* Development of technical regulations for forest tree germplasm resources investigation [J]. *Forest Inventory and Planning*, 2016, 41(3):1-6.
- [4] 顾万春. 中国林木遗传(种质)资源保存与研究现状 [J]. *世界林业研究*, 1999(2):50-57.
GU W C. Current situation of conservation and research on forest tree genetic (germplasm) resources in China [J]. *World Forestry Research*, 1999(2):50-57.
- [5] MATSUI A, ISHIDA J, MOROSAWA T, *et al.* *Arabidopsis* transcriptome analysis under drought, cold, high-salinity and ABA treatment conditions using a tiling array [J]. *Plant Cell Physiology*, 2008, 49(8):1135-1149.
- [6] YANG Y, LI H G, WANG J, *et al.* *ABF3* enhances drought tolerance via promoting ABA-induced stomatal closure by directly regulating *ADF5* in *Populus euphratica* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2020, 71(22):7270-7285.
- [7] SOON F F, NG L M, ZHOU X E, *et al.* Molecular mimicry regulates ABA signaling by SnRK2 kinases and PP2C phosphatases [J]. *Science*, 2012, 335(6064):85-88.
- [8] CUTLER S R, RODRIGUEZ P L, FINKELSTEIN R R, *et al.* Abscisic acid: emergence of a core signaling network [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2010, 61:651-679.
- [9] PIZZIO G A, RODRIGUEZ L, ANTONI R, *et al.* The *PYL4 A194T* mutant uncovers a key role of PYR1-LIKE4/PROTEIN PHOSPHATASE 2CA interaction for abscisic acid signaling and plant drought resistance [J]. *Plant Physiology*, 2013, 163(1):441-455.
- [10] PARK S Y, FUNG P, NISHIMURA N, *et al.* Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins [J]. *Science*, 2009, 324(5930):1068-1071.

- [11] WANG S, FAN Y, DU S, *et al.* *PtaERF194* inhibits plant growth and enhances drought tolerance in poplar [J]. *Tree Physiology*, 2022, 42(8):1678-1692.
- [12] TUNG S A, SMEETON R, WHITE C A, *et al.* Over-expression of *LeNCED1* in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) with the *rbcS3C* promoter allows recovery of lines that accumulate very high levels of abscisic acid and exhibit severe phenotypes [J]. *Plant Cell & Environment*, 2008, 31(7):968-981.
- [13] ZHAO Y, CHAN Z L, GAO J H, *et al.* ABA receptor PYL9 promotes drought resistance and leaf senescence [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(7):1949-1954.
- [14] LI Q, SHEN C, ZHANG Y, *et al.* *PePYL4* enhances drought tolerance by modulating water-use efficiency and ROS scavenging in *Populus* [J]. *Tree Physiology*, 2023, 43(1):102-117.
- [15] HE F, WANG H L, LI H G, *et al.* *PeCHYR1*, a ubiquitin E3 ligase from *Populus euphratica*, enhances drought tolerance via ABA-induced stomatal closure by ROS production in *Populus* [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, 16(8):1514-1528.
- [16] WEN S S, GE X L, WANG R, *et al.* An efficient agrobacterium-mediated transformation method for hybrid poplar 84K (*Populus alba* × *P. glandulosa*) using calli as explants [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(4):2216.
- [17] 金思雨, 彭祚登, 张舒乐. 不同程度干旱胁迫和复水处理对刺槐苗木生理指标的影响 [J]. *东北林业大学学报*, 2024, 52(10):27-39.
- JIN S Y, PENG Z D, ZHANG S L. Effects of drought stress at different levels and rewatering treatments on the physiological indexes of *Robinia pseudoacacia* seedlings [J]. *Journal of Northeast Forestry University*, 2024, 52(10):27-39.
- [18] VAHISALU T, KOLLIST H, WANG Y F, *et al.* *SLAC1* is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling [J]. *Nature*, 452 (7186):487-491.
- [19] TAN Y Q, YANG Y, SHEN X, *et al.* Multiple cyclic nucleotide-gated channels function as ABA-activated Ca^{2+} channels required for ABA-induced stomatal closure in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2023, 35(1):239-259.
- [20] CRUZ DE CARVALHO M H. Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signalling [J]. *Plant Signal & Behavior*, 2008, 3(3):156-165.
- [21] CHEN Q, HU T, LI X, *et al.* Phosphorylation of SWEET sucrose transporters regulates plant root: shoot ratio under drought. *Nature Plants*, 2022, 8(1):68-77.
- [22] Braun D M. Plant science. SWEET! The pathway is complete. *Science*, 2012, 335(6065):173-174.
- [23] GAO J, ZHANG Y, XU C, *et al.* Abscisic acid collaborates with lignin and flavonoid to improve pre-silking drought tolerance by tuning stem elongation and ear development in maize (*Zea mays* L.). *Plant Journal*, 2023, 114(2):437-454.
- [24] DONG N Q, LIN H X. Contribution of phenylpropanoid metabolism to plant development and plant-environment interactions. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2021, 63(1):180-209.
- [25] LIU H, GAO X, FAN W, *et al.* Optimizing carbon and nitrogen metabolism in plants: from fundamental principles to practical applications. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2025, 67(6):1447-1466.
- [26] CHEN X, YAO Q, GAO X, *et al.* Shoot-to-root mobile transcription factor HY5 coordinates plant carbon and nitrogen acquisition. *Current Biology*, 2016, 26 (5):640-646.