

PagTIP1;3 基因调控 84K 杨盐胁迫响应的光合生理特性研究

胡咏琪^{1,2} 张 瑞^{1,2} 张艺森^{1,2} 宋跃朋^{1,2*}

(1. 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083; 2. 林木资源高效生产全国重点实验室, 北京 100083)

摘 要 液泡膜内在蛋白(tonoplast intrinsic proteins, TIPs)是水通道蛋白家族的重要成员,在植物水分平衡及逆境胁迫响应中发挥关键作用。本研究以 *PagTIP1;3* 基因为对象,利用野生型 84K 杨(*Populus alba*×*P. glandulosa*)及其 *PagTIP1;3* 敲除株系,解析 *PagTIP1;3* 基因在杨树盐胁迫响应中的功能及分子机制。结果表明:正常条件下,*PagTIP1;3* 基因敲除导致植株叶片叶绿素含量降低,净光合速率及株高下降。盐胁迫下,敲除株系萎蔫与黄化症状加剧,株高显著降低;最大光化学效率、电子传递速率及叶绿素相对含量等光合生理指标均显著低于野生型。转录组分析显示,光合作用通路关键基因(*PagLHCB7*、*PagGAPCP-2*、*PagPSY*、*PagRCA*)在 *PagTIP1;3* 敲除株系响应盐胁迫时的表达模式与野生型存在显著差异。综上所述,*PagTIP1;3* 基因缺失可能通过影响盐胁迫下杨树光合作用相关基因的转录响应,损伤光合电子传递与光保护能力,破坏生长及光合生理稳态,从而显著降低杨树的耐盐性。

关键词 水通道蛋白;转录组;盐胁迫;光合特性;基因敲除

中图分类号:Q943.2;S502.3 文献标志码:A doi:10.7525/j.issn.1673-5102.2026.04.008

PagTIP1;3 Regulates Photosynthetic Physiological Characteristics of 84K Poplar in Response to Salt Stress

HU Yongqi^{1,2} ZHANG Rui^{1,2} ZHANG Yisen^{1,2} SONG Yuepeng^{1,2*}

(1. College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083; 2. State Key Laboratory of Efficient Production of Forest Resources, Beijing Forestry University, Beijing 100083)

Abstract Tonoplast intrinsic proteins (TIPs), as important members of the aquaporin family, play crucial roles in plant water balance and stress responses. In this study, the function and molecular mechanism of the *PagTIP1;3* gene in response to salt stress were investigated in the leaves of wild-type 84K poplar (*Populus alba*×*P. glandulosa*) and *PagTIP1;3* knockout lines. The results showed that under normal conditions, knockout of the *PagTIP1;3* gene led to decreases in chlorophyll content, net photosynthetic rate, and plant height. Under salt stress, the knockout lines exhibited aggravated wilting and yellowing, significantly reduced plant height, and marked decreases in photosynthetic physiological parameters, including maximum photochemical efficiency, electron transport rate, and relative chlorophyll content, compared with the wild type. Transcriptome analysis revealed that the expression patterns of key genes involved in the photosynthetic pathway (including *PagLHCB7*, *PagGAPCP-2*, *PagPSY*, and *PagRCA*) were significantly altered in the *PagTIP1;3* knockout lines in response to salt stress. In summary, it is speculated that *PagTIP1;3* deficiency disrupted the transcriptional response of photosynthesis-related genes in poplar under salt stress, thereby impairing photosynthetic electron transport and photoprotection capacity, disturbing growth and photosynthetic physiological homeostasis, and ultimately significantly reducing salt tolerance in poplar.

Key words aquaporin; transcriptome; salt stress; photosynthetic characteristics; gene knockout

基金项目:国家自然科学基金面上项目(32470381)。

第一作者简介:胡咏琪(2002—),女,硕士研究生,主要从事杨树基因组及分子育种研究。

* 通信作者:E-mail:Yuepengsong@bjfu.edu.cn。

收稿日期:2026年5月1日。

土壤盐渍化作为全球性生态危机,已成为限制植物分布范围及影响农林业生产的核心非生物胁迫因素^[1]。在我国,盐渍化土地面积呈持续扩张趋势,严重破坏相关区域植物生存条件并加剧生态系统稳定性的退化。盐碱胁迫会导致植物遭受渗透损伤与离子毒害,扰乱细胞渗透压平衡、代谢酶活性及信号传导通路,最终抑制植株生长发育与限制产量形成^[2-3]。植物的适应机制主要围绕缓解上述伤害展开。根系会优先积累脯氨酸、甜菜碱及可溶性蛋白等小分子有机化合物,以抵御渗透胁迫的不利影响。例如,羊草(*Leymus chinensis*)根系可通过富集可溶性糖与可溶性蛋白,增强对盐碱环境的耐受性^[4]。光合系统作为植物能量转化与碳固定的核心,对盐胁迫尤为敏感,其功能受损是盐胁迫抑制植物生长的关键因素^[5-6]。因此,解析植物响应盐胁迫的光合调控机制,挖掘关键抗逆基因,对盐碱地生态修复与耐盐植物遗传改良具有重要的理论价值与实践意义。在此调控网络中,水通道蛋白(aquaporin, AQP)作为介导水分与小分子物质跨膜运输的关键蛋白家族,在水分运输、离子转运及光合调控中发挥重要作用,成为解析植物盐胁迫响应机制的切入点^[7-8]。液泡膜内在蛋白(tonoplast intrinsic proteins, TIPs)是 AQP 家族的重要亚类,主要定位于液泡膜,参与植物生长发育与逆境响应过程^[9-10]。近年研究证实, TIP 基因在植物耐盐、抗旱等非生物胁迫响应中具有重要调控功能。*VrTIP1;1* 过表达可通过增强水分保持能力、提高叶绿素含量及减少氧化损伤,显著提升绿豆(*Vigna radiata*)在干旱及盐胁迫下的光合效率与发芽率^[11];白桦(*Betula platyphylla*)*BpTIP1;3* 在干旱胁迫下表达显著上调,通过提高活性氧(reactive oxygen species, ROS)清除能力,缓解光合系统损伤^[12]。盐胁迫下水通道蛋白的差异表达可通过调节水分利用效率间接影响光合生理特性,进一步证实 TIP 基因在光合与抗逆协同调控中的重要作用^[13-14]。目前,关于木本植物中 TIP 基因在盐胁迫下调控光合生理的分子机制仍有待深入解析。

尽管已有研究探讨了水通道蛋白在其他物种中的功能,但针对杨树的研究仍显不足。基于此,本研究以 *PagTIP1;3* 基因为对象,利用 CRISPR/Cas9 技术在 84K 杨(*Populus alba*×*P. glandulosa*)中获得了敲除株系(KO)。以野生型(WT)为对照,测定 2 组植株在正常条件及盐胁迫下的生长指标

与光合生理参数,并结合转录组测序数据,重点挖掘光合相关通路基因的表达变化,解析 *PagTIP1;3* 基因敲除对盐胁迫下杨树光合特性的影响及分子调控机制。研究表明, *PagTIP1;3* 基因介导了盐胁迫下杨树光合生理的调控过程,可作为林木耐盐性遗传改良的潜在靶点,同时也丰富了植物 AQP 家族基因抗逆功能的研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料与生长条件

试验材料包括 2 种:一是以 84K 杨为受体,利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术获得的 *PagTIP1;3* 基因敲除株系(KO25、KO35);二是野生型 84K 杨。所有植株均为体外组织培养的组培苗。试验于 2025 年 6 月 24 日在北京林业大学植物科学中心进行。

1.2 基因敲除载体构建及杨树遗传转化

利用 CRISPOR 在线工具(<https://crispr.dbcls.jp/>)设计特异性 sgRNA。选用植物专用 CRISPR/Cas9 敲除载体 PHsbdcas9i,根据其酶切位点合成对应的 sgRNA 寡核苷酸链,通过分子克隆技术构建重组敲除载体。将连接产物转化至大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 感受态细胞,经 PCR 筛选及测序验证后,提取正确重组质粒并转化至农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)GV3101 感受态细胞。选取健康无病害的 84K 杨组培苗幼嫩叶片,切割成均匀叶盘。活化培养含有敲除载体的农杆菌,重悬制备侵染菌液。将叶盘浸入菌液完成侵染,随后转移至分化培养基,在 25℃、光照 16 h/黑暗 8 h 的条件下培养,促进不定芽分化。待不定芽生长至适宜大小,转接至生根培养基诱导生根,并利用载体携带的筛选标记基因筛选阳性转基因植株。提取阳性植株 DNA,通过 PCR 扩增检测确认编辑效果,引物序列见表 1。

1.3 盐胁迫处理试验及光合指标测定

将 2 月龄的野生型及 *PagTIP1;3* 基因敲除株系从组培瓶转移至含有 Hoagland 营养液的水培箱中,在温室条件下适应培养 2 个月。培养条件:温度(25±2)℃,光照周期 16 h 光照/8 h 黑暗,光照强度约为 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。适应培养结束后进行盐胁迫处理。试验组在 Hoagland 营养液中加入 NaCl,使终浓度达到 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$;对照组使用不含 NaCl 的 Hoagland 营养液培养。盐胁迫处理持续

表 1 引物序列
Table 1 Primers sequence

引物名称 Primer name	上游引物(5'→3') Upstream primer(5'→3')	下游引物(5'→3') Downstream primer(5'→3')
<i>PagTIP1</i> ;3-KO	ACAGCAACAACAGAGCTCCTC	CGAAGGTCACAGCCGGATTC
<i>PagLHCB7</i> -qPCR	TCTTTCTTGCGACGACCGAT	GGGTCAATGGACAGACCCAG
<i>PagGAPCP-2</i> -qPCR	TCTTGTTGAAGCTTCCCGCT	CCTGCTGGAATTGAAGTGCC
<i>PagPSY</i> -qPCR	TCTCGGATGTCATAGCAGGA	ATTGCCCAGACAGCTCTTCG
<i>PagRCA</i> -qPCR	GACAATGTTCCCGAGGACGA	GCTCAAAAGTTGGGGGTCCT
<i>Actin</i>	ACACGGGGAGGTAGTGACAA	CCTCCAATGGATCCTCGTTA

7 d,其间观察植株生长状态。处理结束后,立即采集样品进行各项指标测定。使用叶绿素仪(SPAD-502PLUS,日本)测量植株上部第3~5片完全展开的功能叶,每片叶子随机选取3个点测量,计算叶绿素相对含量平均值。使用便携式光合测定系统(LI-6800,美国)和超便携式调制叶绿素荧光仪(MINI-PAM-II,德国)测定植株的光合和荧光参数。测定时选择植株第3~5片完全展开的功能叶,每株测定3片叶,计算平均值。

1.4 转录组测序及生物信息学分析

野生型及*PagTIP1*;3基因敲除株系的根、茎、叶组织作为测序材料,每个样品设置3次生物学重复。样品采集后立即用液氮速冻,并于超低温冰箱中-80℃保存。采用BGISEQ-500测序平台进行PE150双端测序,获取高质量测序数据。利用FastQC(v0.11.9)(<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>)软件完成数据质量评估,采用默认参数进行碱基质量、GC含量及接头污染分析,对原始测序数据进行质控过滤。采用HISAT2 2.2.0软件,将质控后的高质量reads比对至84K杨参考基因组,完成序列定位。利用feature-Counts 2.0.1软件^[15]对比对后的序列进行基因水平定量,设置默认比对与计数参数,统计各基因的有效测序读数。采用DESeq2 1.62.0软件^[16]对盐胁迫下比较组(KO vs WT)进行基因表达量差异分析,筛选2组间的差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs),筛选阈值设定为差异倍数绝对值|log₂Fold Change|≥1, FDR *P*<0.05。

1.5 荧光定量PCR试验

采用FastPure Plant Total RNA Isolation Kit试剂盒(诺唯赞生物科技有限公司,中国)分别提取正常条件及盐胁迫后野生型和*PagTIP1*;3基因敲除株系叶片RNA。采用HiScript II Q Select RT

SuperMix for qPCR试剂盒(诺唯赞生物科技有限公司,中国)按照说明书流程进行逆转录反应。采用Real Master Mix PCR试剂盒(宝日医生物技术有限公司,中国)进行PCR试验,具体步骤参考说明书。本研究检测的基因为光系统II光捕获复合体蛋白B7(light-harvesting complex protein B7)基因(*LHCB7*)、八氢番茄红素合酶(phytoene synthase)基因(*PSY*)、Rubisco活化酶(Rubisco activase)基因(*RCA*)及甘油醛-3-磷酸脱氢酶CP-2(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of plastid 2)基因(*GAPCP-2*),选用引物见表1。每个处理设置3个生物学重复。最后使用2^{-ΔΔCt}法分析光合相关基因的相对表达量。

1.6 数据处理

使用Microsoft Excel 2019对数据进行初步整理,用GraphPad Prism 9.0软件进行统计分析和作图。统计方法为双因素方差分析,多重显著性检验采用Dunnett多重比较法。*.*P*<0.05; **.*P*<0.01; ***.*P*<0.001; ****.*P*<0.000 1; ns.*P*>0.05,即无显著差异。

2 结果与分析

2.1 *PagTIP1*;3基因敲除株系鉴定结果

经生物信息学分析,在*PagTIP1*;3基因的第1、2个外显子上分别选择2个特异性靶位点a、b(图1A)。为验证CRISPR/Cas9介导的基因编辑效果,对遗传转化后得到的2个株系*PagTIP1*;3基因靶点区域进行测序,并与野生型序列进行比对分析,结果如图1B所示。DNA序列比对显示,2个株系均在目标位点a发生有效编辑,具体表现为在第205位均插入1个单碱基A,发生移码突变致使蛋白质翻译提前终止;在目标位点b上,KO25株系存在3个碱基缺失,KO35株系存在6个碱基缺失(图1B)。综上所述,此次基因敲除影响了基因的正常编码,最终获得了*PagTIP1*;3基因功能缺失突变体。

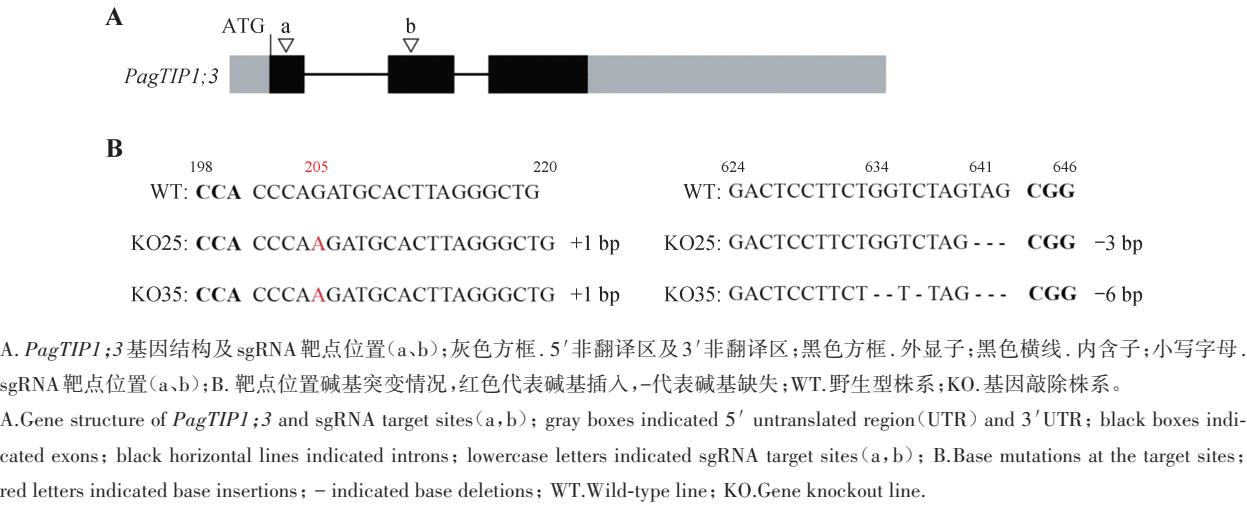


图1 *PagTIP1;3* 基因敲除阳性苗鉴定结果

Fig.1 Identification of positive KO-*PagTIP1;3* plants

2.2 *PagTIP1;3* 基因敲除对 84K 杨生长性状与光合生理特性的影响

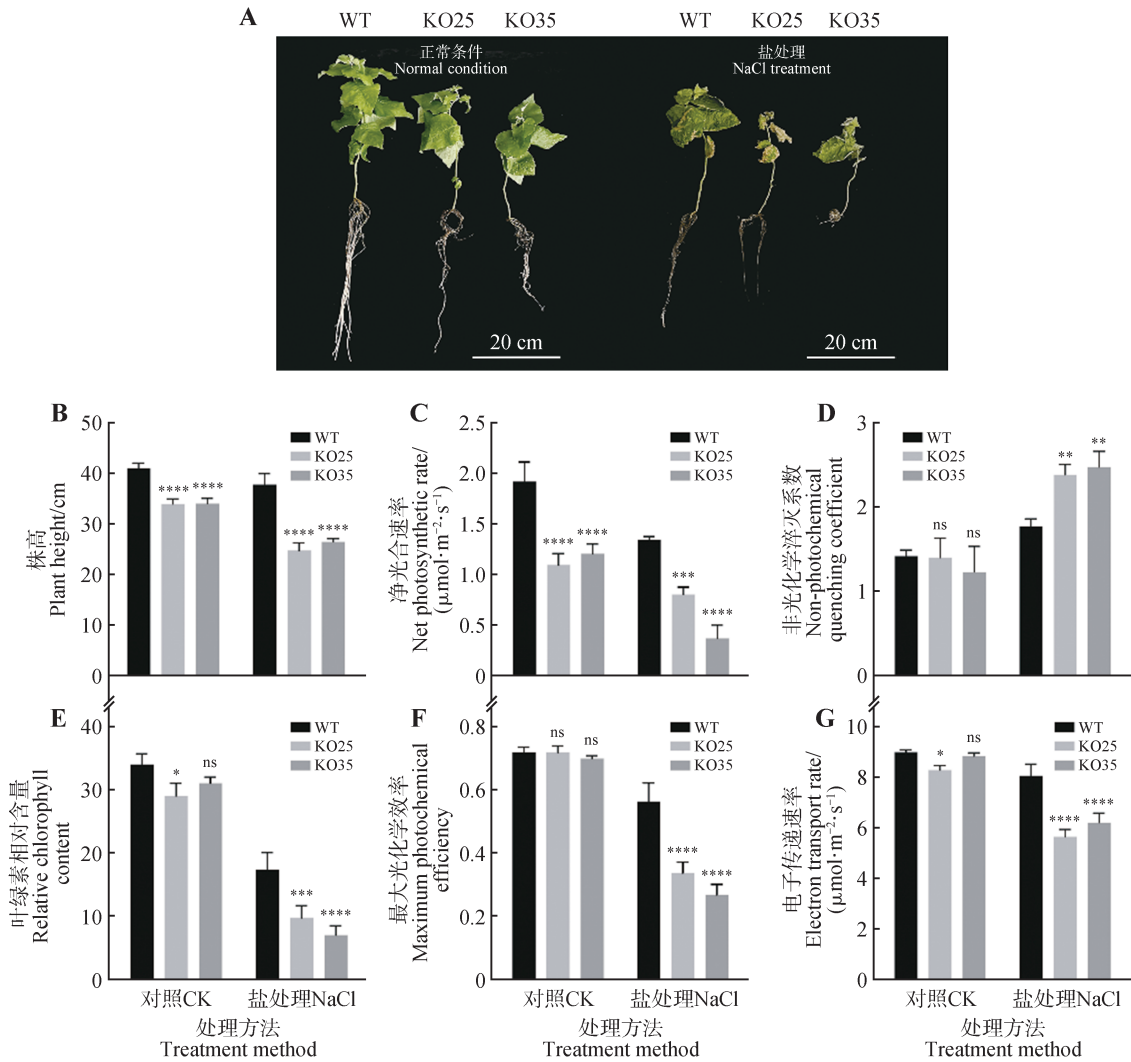
在正常生长条件下,测定并分析了野生型(WT)与基因敲除株系的生长及光合相关指标,结果如图2所示。生长指标显示,*PagTIP1;3* 基因敲除株系的株高较 WT 显著降低,降幅约为 17%~18%,表明 *PagTIP1;3* 基因敲除抑制了植株的基础营养生长(图 2B)。光合生理指标显示,基因敲除株系的净光合速率(P_n)显著下降,较 WT 降低约 37%~43%,光合能力受到抑制(图 2C)。野生型与基因敲除株系的最大光化学效率(F_v/F_m)无显著差异,基因敲除株系较 WT 仅降低约 1%~3%(图 2D)。基因敲除株系的非光化学淬灭系数(N_{pq})与电子传递速率(R_{et})与 WT 相比均无显著差异(图 2E、2G)。此外,WT 叶片的叶绿素相对含量显著高于基因敲除株系,后者较 WT 降低约 9%~15%,这与 KO35 株系叶片轻微发黄的表型一致(图 2A、2F)。

综上所述,在正常条件下,*PagTIP1;3* 基因敲除导致株系叶绿素含量降低和净光合速率下降,进而抑制生长,使基因敲除株系表现为植株矮小及叶片轻微黄化。然而,部分叶绿素荧光参数(F_v/F_m 、 N_{pq} 、 R_{et})无显著变化,表明 *PagTIP1;3* 基因敲除并未对光系统 II 造成明显损伤。

2.3 *PagTIP1;3* 基因敲除对 84K 杨盐胁迫下光合作用的影响

在正常条件下,*PagTIP1;3* 敲除株系仅部分光合作用相关指标受到抑制。为进一步验证非生物逆境胁迫对 *PagTIP1;3* 敲除株系光合作用的影

响,本研究对野生型和基因敲除株系进行了盐胁迫处理。结果表明,盐胁迫条件下,野生型与基因敲除株系的生长与光合功能均受到明显抑制;其中,基因敲除株系对盐胁迫的耐受能力下降更为显著。盐胁迫处理 7 d 后,各株系表现出明显的表型差异:WT 仅有部分叶片脱落,少数叶片边缘出现轻微黄化,顶端仍保留绿色幼叶,整体萎蔫程度较轻;相比之下,基因敲除株系受盐胁迫影响更为严重,植株整体表现出明显的萎蔫现象,叶片失水卷曲甚至干枯,并从下部叶片开始出现大面积黄化(图 2A)。生长指标显示,盐胁迫后,基因敲除株系的株高较其正常条件下降约 22%~27%,显著高于 WT 的降幅(8%)(图 2B)。光合生理指标显示,盐胁迫后基因敲除株系 P_n 显著下降,其中 KO35 的下降幅度达 70% 以上(图 2C)。基因敲除株系 N_{pq} 较 WT 显著升高,且上升幅度远高于 WT(图 2D)。WT 叶片的叶绿素相对含量显著高于基因敲除株系;盐胁迫下,基因敲除株系的叶绿素降解率达 67%~77%,显著高于 WT 的叶绿素降解率(49%),这与表型观察中基因敲除株系叶片严重黄化的现象相符,说明 *PagTIP1;3* 基因敲除显著提高了盐胁迫诱导的叶绿素降解(图 2E)。WT 的 F_v/F_m 下降幅度约为 22%,而基因敲除株系的下降幅度更大,说明 *PagTIP1;3* 基因缺失使植株在盐胁迫下受损更严重,光抑制程度更高(图 2F)。此外,盐胁迫下基因敲除株系的 R_{et} 较正常条件下降约 30%,降幅显著高于 WT,表明其光合电子传递效率受损严重(图 2G)。



A.野生型(WT)及基因敲除株系(KO)在第7天正常条件(CK)及NaCl胁迫下的表型;B~G.正常条件及盐胁迫后野生型与基因敲除株系的株高、净光合速率、非光化学淬灭系数、叶绿素相对含量、最大光化学效率、电子传递速率;图中数据为“平均值±标准差”;*. $P<0.05$,**. $P<0.01$,***. $P<0.001$,****. $P<0.0001$,ns. $P>0.05$ 。

A.Phenotypes of wild type(WT) and knockout lines(KO) under normal conditions(CK) and NaCl stress on the 7th day;B~G.Plant height, net photosynthetic rate, non-photochemical quenching coefficient, relative chlorophyll content, maximum photochemical efficiency, and electron transport rate of wild-type and knockout lines under normal conditions and salt stress; data in the figures were presented as “mean±standard deviation”; *. $P<0.05$,**. $P<0.01$,***. $P<0.001$,****. $P<0.0001$, ns. $P>0.05$.

图2 野生型与基因敲除株系在正常条件及盐胁迫下的表型及生理指标

Fig.2 Phenotypes and physiological indicators of WT and KO lines under normal conditions and salt stress

上述研究结果表明, *PagTIP1;3* 基因敲除显著增强了植株对盐胁迫的敏感性, 导致基因敲除株系在盐胁迫下生长受抑制、光合功能严重破坏, 暗示 *PagTIP1;3* 基因是植物盐胁迫耐受性的正向调控因子。

2.4 盐胁迫下基因敲除株系与野生型的转录组分析

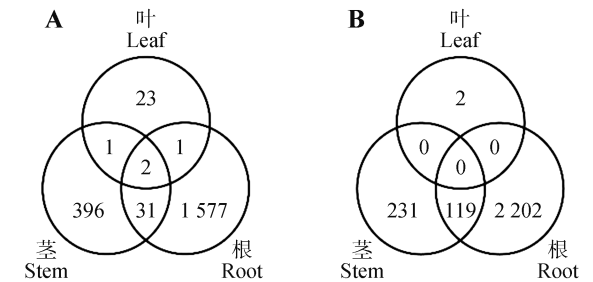
为阐明 *PagTIP1;3* 敲除株系在盐胁迫下的整体转录调控机制, 对盐胁迫处理下的WT及KO-*PagTIP1;3* 的根、茎、叶组织进行转录组测序, 并利

用生物信息学方法筛选差异表达基因(DEGs)。如表2所示, 不同组织中DEGs的数量差异显著: 根系包含1 611个上调基因和2 321个下调基因; 茎部包含430个上调基因和350个下调基因; 叶片仅检测到27个上调基因和2个下调基因。图3显示, 在上调DEGs中, 根与茎共有33个, 根与叶共有3个, 叶与茎共有3个, 而3种组织共同上调的核心胁迫响应基因仅有2个。在下调DEGs中, 根与茎共有119个, 叶片与其他组织无共同下调基因, 且3种组织间不存在共同下调的基因。

表 2 盐胁迫下基因敲除株系与野生型株系的差异表达基因分布

Table 2 Distribution of DEGs between KO and WT plants under salt stress

差异表达基因组分 DEGs	差异表达基因数量 Number of DEGs		
	根 Root	茎 Stem	叶 Leaf
上调 Up-regulated	1 611	430	27
下调 Down-regulated	2 321	350	2
总数 Total number	3 932	780	29



A. 上调差异表达基因; B. 下调差异表达基因。
A. Up-regulated DEGs; B. Down-regulated DEGs.

图 3 盐胁迫下不同组织共有与特有上调和下调差异表达基因的分布

Fig.3 Shared and unique distributions of up-regulated and down-regulated genes in different tissues under salt stress

盐胁迫下,上调差异表达基因的 GO 富集分析(表 3)显示,在生物学过程层面,这些基因主要参与 DNA 模板化转录调控(GO:0006355)、氧化还原过程(GO:0055114)及碳水化合物代谢过程(GO:0005975)等。此外,翻译过程(GO:0006412)亦显著富集,提示上调基因在蛋白质合成中发挥重要作用。在分子功能方面,上调基因显著富集于序列特异性 DNA 结合转录因子活性(GO:0003700)、氧化还原酶活性(GO:0016491)、抗氧化活性(GO:0016209)及阳离子结合(GO:0043169)等功能。细胞组分分析表明,上调基因主要定位于核糖体、质外体及无膜细胞器。同时,下调基因的 GO 富集分析(表 4)显示,这些基因主要富集于核酸结合转录因子活性(GO:0001071)及碳水化合物代谢相关过程(GO:0005984、GO:0016052、GO:0009311)。在分子功能方面,下调基因显著富集于蛋白丝氨酸/苏氨酸磷酸酶活性(GO:0004722),且主要定位于细胞膜及膜组分。综上所述,上调基因主要富集于转录调控、抗氧化防御、碳水化合物代谢及跨膜转运等过程;下调基因主要富集于转录调控、蛋白质去磷酸化、碳水化合物代谢及大分子合成调控等过程。整体呈现转录抑制、信号减弱及基础代谢放缓的特征,这可能是导致基因敲除株系耐盐性下降的原因。

表 3 盐胁迫下基因敲除株系与野生型上调差异表达基因的 GO 功能富集分析

Table 3 GO enrichment analysis of up-regulated differentially expressed genes between knockout line and wild type under salt stress

GO 编号 GO ID	GO 注释 GO description	基因数量 Gene number	P
GO:0003700	序列特异性 DNA 结合转录因子活性 Transcription factor activity, sequence-specific DNA binding	32	8.92×10^{-9}
GO:0006355	DNA 模板化转录调控 Regulation of transcription, DNA - templated	45	6.75×10^{-7}
GO:0016491	氧化还原酶活性 Oxidoreductase activity	28	3.14×10^{-6}
GO:0055114	氧化还原过程 Oxidation-reduction process	51	1.89×10^{-5}
GO:0005975	碳水化合物代谢过程 Carbohydrate metabolic process	36	4.27×10^{-5}
GO:0019752	羧酸代谢过程 Carboxylic acid metabolic process	29	7.53×10^{-5}
GO:0055085	跨膜转运 Transmembrane transport	38	9.16×10^{-5}
GO:0043169	阳离子结合 Cation binding	41	1.24×10^{-4}
GO:0016209	抗氧化活性 Antioxidant activity	18	2.68×10^{-4}
GO:0006412	翻译 Translation	25	3.95×10^{-4}

表 4 盐胁迫下基因敲除株系与野生型下调差异表达基因的 GO 功能富集分析

Table 4 GO enrichment analysis of down-regulated differentially expressed genes between knockout line and wild type under salt stress

GO 编号 GO ID	GO 注释 GO description	基因数量 Gene number	P
GO:0001071	核酸结合转录因子活性 Nucleic acid binding transcription factor activity	43	7.84×10^{-8}
GO:0006355	DNA 模板化转录调控 Regulation of transcription, DNA-templated	62	5.77×10^{-5}
GO:0003700	序列特异性 DNA 结合转录因子活性 Transcription factor activity, sequence-specific DNA binding	43	7.84×10^{-8}
GO:0004722	蛋白丝氨酸/苏氨酸磷酸酶活性 Protein serine/threonine phosphatase activity	14	5.23×10^{-6}
GO:0006470	蛋白质去磷酸化 Protein dephosphorylation	15	2.74×10^{-5}
GO:0005984	二糖代谢过程 Disaccharide metabolic process	10	6.35×10^{-7}
GO:0016052	碳水化合物分解代谢过程 Carbohydrate catabolic process	11	2.39×10^{-5}
GO:0009311	寡糖代谢过程 Oligosaccharide metabolic process	10	3.25×10^{-6}
GO:0044723	单生物体碳水化合物代谢过程 Single-organism carbohydrate metabolic process	23	1.08×10^{-5}
GO:2000112	细胞大分子生物合成过程调控 Regulation of cellular macromolecule biosynthetic process	62	7.83×10^{-5}

2.5 光合作用相关基因的转录调控模式

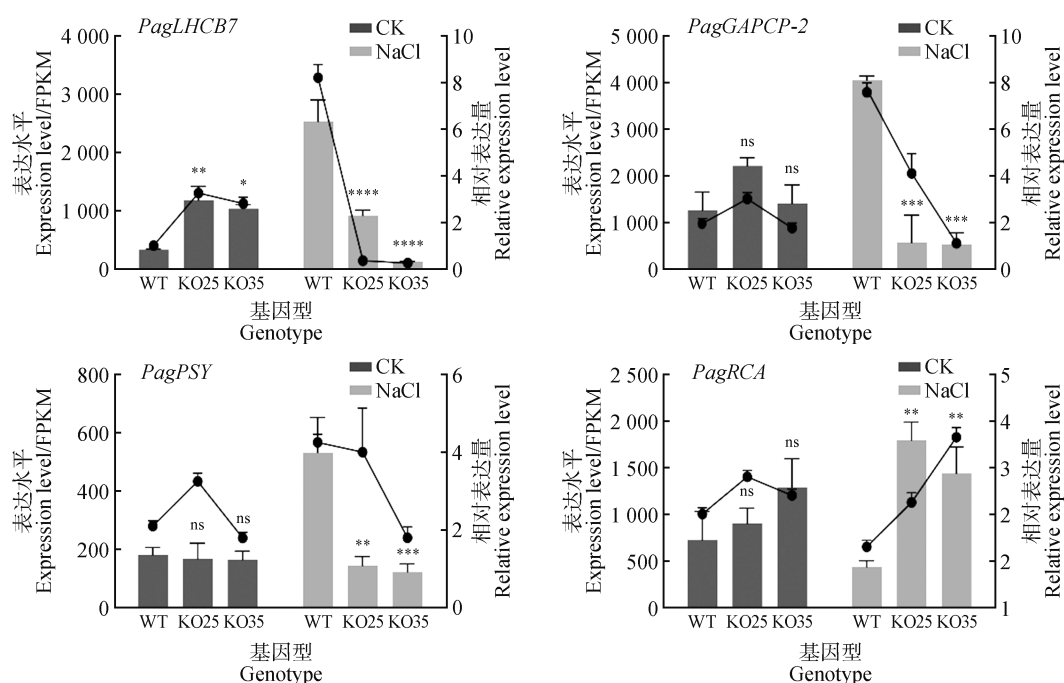
前期光合生理指标检测结果表明, *PagTIP1;3* 基因敲除导致植株在盐胁迫条件下的部分光合功能严重受损。因此, 本研究进一步聚焦光合相关基因的表达模式, 系统探究盐胁迫条件下该类基因的转录调控特征, 以解析植株光合功能与基因表达之间的内在关联。本研究选取叶片转录组中 4 个光合相关差异表达基因 *PagLHCB7*、*PagPSY*、*PagRCA* 及 *PagGAPCP-2* 进行 qRT-PCR 荧光定量分析(图 4)。结果显示, 这 4 个候选基因的 qRT-PCR 相对表达量变化趋势与转录组测序获得的 FPKM 变化趋势基本一致。根据各基因在野生型与基因敲除株系盐胁迫处理前后的表达变化特征, 可将 4 个候选基因的表达模式划分为 3 类(A、B、C)。A 类基因为 *PagLHCB7*, 其在正常条件下基因敲除株系的表达水平约为 WT 的 3 倍, 而在盐胁迫下显著下调。B 类基因包括 *PagPSY* 和 *PagGAPCP-2*, 在正常条件下, 其在基因敲除株系与 WT 中的表达量无显著差异; 但在盐胁迫下, 与

WT 相比显著下调。C 类基因为 *PagRCA*, 其在正常条件下基因敲除株系与 WT 的表达量无显著差异; 但在盐胁迫下, 与 WT 相比显著上调约 40%。以上结果表明, *PagTIP1;3* 基因的缺失改变了部分光合相关基因的基础表达水平, 并削弱了部分基因对盐胁迫的正常响应能力, 使其无法像 WT 那样在盐胁迫后有效上调表达, 这可能是敲除株系光合功能受损的重要原因。

3 讨论

3.1 敲除水通道蛋白基因减缓植株生长及降低其耐盐性

近年来, 诸多研究^[17-19]证实, 水通道蛋白家族的大部分成员是调控植株水分平衡、增强非生物胁迫耐受性的核心靶点, 其中部分基因可增强耐寒性或正向参与耐热性调控。作为负责水分和小分子跨膜运输的关键蛋白^[20], 水通道蛋白不仅通过调节体内渗透压以应对生物胁迫, 还通过运输过氧化氢、金属离子等小分子物质在胁迫响应中



柱状图为转录组信息分析得到的表达量(FPKM);线状图为qRT-PCR测定的相对表达量。样品均来自同一时间采集的相同株系。

The bar chart represented the expression levels (FPKM) obtained from transcriptome analysis; the line chart represented the relative expression levels determined by qRT-PCR. The samples were all derived from the same lines collected at the same time.

图4 在正常条件及盐胁迫下光合相关基因的表达变化趋势及相对表达量分析

Fig.4 Analysis of expression trends and relative expression levels of photosynthesis-related genes under normal conditions and salt stress

发挥重要作用^[21-23]。例如,香蕉(*Musa acuminata*) *MaPIP1;1* 的过表达可降低盐胁迫下植株的 Na^+/K^+ , 缓解细胞膜结构损伤^[24]; 在甘蓝型油菜(*Brassica napus*) 中, *BnaGRP3* 直接与水通道蛋白 *BnaPIPs* 相互作用, 促进盐胁迫下 H_2O_2 的外排, 从而减轻氧化损伤^[25]。在水稻(*Oryza sativa*) 中, E3 泛素连接酶 *OsRFP2-16* 通过降解水通道蛋白 *OsPIP1;1* 负调控耐盐性; 敲除 *OsRFP2-16* 后, *OsPIP1;1* 蛋白稳定性增加, 植株表现出更强的耐盐性及更低的 Na^+ 积累^[26]。此外, 毛竹(*Phyllostachys edulis*) *PeTIP4-3* 的过表达也能显著提高植株的耐盐与耐旱性^[27]。本研究发现, 盐胁迫下, *PagTIP1;3* 敲除株系的生长势与耐盐性较野生型显著降低, 具体表现为株高显著矮化, 净光合速率、最大光化学效率等光合指标下降, 叶绿素相对含量降低。这些数据表明, *PagTIP1;3* 可能在杨树盐胁迫响应中发挥关键的正调控作用, 其缺失导致植株对盐胁迫更为敏感, 受损程度加剧。这一结果与水通道蛋白家族在植物抗逆中发挥的保守功能基本一致。

3.2 *PagTIP1;3* 调控盐胁迫响应光合基因的表达模式

已有研究^[28-29]表明, *LHCB7*、*RCA* 等光合基因在毛竹、兴安落叶松(*Larix gmelinii*) 等木本植物叶片中高表达。盐胁迫下光合相关基因的表达调控是植物响应逆境的重要机制。本研究中, 盐胁迫导致野生型体内部分光合相关基因的表达量发生显著变化。Peterson 和 Schultes^[30] 的研究表明, *AtLHCB7* 参与调控光合作用的光保护响应与电子传递过程, 其表达水平的变化会影响光饱和和光合速率及诱导非光化学淬灭所需的辐照度阈值。在正常条件下, 敲除 *PagTIP1;3* 导致植株非光化学淬灭诱导的光强阈值升高; 而在盐胁迫后, 敲除株系中 *PagLHCB7* 表达水平下降, 进而引起非光化学淬灭提前激活。

PSY 基因编码的八氢番茄红素合成酶是类胡萝卜素生物合成途径中的限速酶, 负责催化类胡萝卜素合成的第一步关键反应, 决定植物体内胡萝卜素的基础合成能力^[31-32]。过表达枸杞(*Lycium chinense*) *LmPSY* 基因可提高转基因植株的类胡萝卜

卜素含量,使其在盐胁迫下维持更高的 F_v/F_m 和抗氧化酶活性,验证了 *PSY* 介导的类胡萝卜素积累在光保护中的关键作用^[33]。从 *PagPSY* 基因表达水平来看,正常条件下敲除 *PagTIP1;3* 并不影响 *PagPSY* 表达,推测体内类胡萝卜素含量未发生显著变化,表明 *PagTIP1;3* 对 *PagPSY* 的调控主要体现于逆境胁迫下。盐胁迫下,敲除 *PagTIP1;3* 导致 *PagPSY* 表达水平下降,类胡萝卜素合成速率减慢,削弱了光保护能力。此外,质体定位的 *GAPCP-2* 基因编码植物糖酵解的关键酶,该酶参与维持糖代谢稳态及根系丝氨酸合成前体的供应^[34]。盐胁迫下敲除 *PagTIP1;3* 可能导致可溶性糖和淀粉积累增加,影响丝氨酸合成,进而抑制根系正常发育。研究^[35-36]表明, *RCA* 催化 CO_2 固定,并参与茉莉酸介导的叶片衰老。相关研究^[37]发现,在干旱与盐分联合胁迫下,茉莉酸可通过调控 *RcaA* 表达维持光合效率,其表达和活性与复合胁迫耐受性呈正相关。本研究发现, *PagTIP1;3* 可能是胁迫诱导型 *PagRCA* 的负调控因子:正常情况下不发挥作用,盐胁迫下抑制 *PagRCA* 表达;敲除后解除这种抑制,使 *PagRCA* 表达上升。综上所述,盐胁迫下敲除 *PagTIP1;3* 对光合相关基因的影响呈现多样性: *PagLHCB7*、*PagPSY* 及 *PagGAPCP-2* 表达下降,而 *PagRCA* 表达上升,表明 *PagTIP1;3* 基因的缺失改变了盐胁迫下光合相关基因的正常表达模式。

4 结论

本研究以 *PagTIP1;3* 基因敲除株系与野生型为材料,在盐胁迫处理 7 d 后,结合表型鉴定、转录组测序及光合相关基因表达分析,旨在揭示 *PagTIP1;3* 基因在杨树响应盐胁迫中的功能及其对光合生理特性的调控机制。综合以上结果,得出以下结论:

(1) 表型与生理层面:在正常条件下,敲除株系的株高、净光合速率及叶绿素相对含量均显著低于野生型,而 F_v/F_m 、 N_{PQ} 及 R_{ET} 与野生型无显著差异。盐胁迫下, *PagTIP1;3* 敲除株系生长势明显弱于野生型,植株长势受损严重,同时光合生理指标显著下降,叶绿素荧光参数、净光合速率等核心指标均低于野生型。这表明敲除株系的盐胁迫耐受性大幅降低,光合系统受盐胁迫损伤更为严重。

(2) 分子机制层面:盐胁迫下转录组分析显

示,敲除株系中上调基因主要富集于转录调控、抗氧化防御、碳水化合物代谢及跨膜转运等生物学过程;下调基因显著集中于转录调控、糖代谢及水分胁迫响应通路。这表明其基础抗逆调控能力受损,可能导致敲除株系耐盐性下降。

(3) 光合调控层面: *PagTIP1;3* 敲除对光合相关基因的表达调控产生 3 类不同影响。A 类 (*PagLHCB7*): 基因敲除导致其基础表达水平显著升高,但丧失盐胁迫下的上调能力。B 类 (*PagPSY*、*PagGAPCP-2*): 敲除不影响基础表达,但完全抑制了盐胁迫诱导的上调响应。C 类 (*PagRCA*): 敲除不影响基础表达,但抑制了盐胁迫诱导的下调响应。 *PagTIP1;3* 基因缺失影响了光合相关基因的盐胁迫响应网络,改变了杨树光合相关基因的转录表达特征,进而干扰植株正常的光合调控,这可能是其光合功能严重受损的分子基础。

综上,本研究结果为深入理解林木响应盐胁迫的光合调控机制提供了新的理论依据,同时证实 *PagTIP1;3* 基因可作为林木耐盐性遗传改良的潜在靶点,为盐碱地生态修复和抗逆林木品种选育提供重要的基因资源和理论支撑。

参 考 文 献

- [1] Zhang H M, Zhu J H, Gong Z Z, *et al.* Abiotic stress responses in plants [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2022, 23 (2): 104-119.
- [2] 罗子敬, 孙宇涵, 卢楠, 等. 杨树耐盐机制及转基因研究进展 [J]. *核农学报*, 2017, 31 (3): 482-492.
Luo Zijing, Sun Yuhan, Lu Nan, *et al.* Research advances on salt-tolerance mechanism and genetic transformation of poplar [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2017, 31 (3): 482-492.
- [3] 肖雯丽, 王含瑞, 王梦亮, 等. 盐碱胁迫下植物响应机制的研究进展 [J]. *中国农学通报*, 2024, 40 (33): 78-85.
Xiao Wenli, Wang Hanrui, Wang Mengliang, *et al.* Mechanisms of plant response to saline-alkali stress: a review [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2024, 40 (33): 78-85.
- [4] Yan G, Shi Y J, Chen F F, *et al.* Physiological and metabolic responses of *Leymus chinensis* seedlings to alkali stress [J]. *Plants*, 2022, 11 (11): 1494.
- [5] Jungklang J, Usui K, Matsumoto H. Differences in physiological responses to NaCl between salt-tolerant *Sesbania rostrata* Brem. & Oberm. and non-tolerant *Phaseolus vulgaris* L. [J]. *Weed Biology and Management*, 2003, 3 (1): 21-27.

- [6] Kalaji H M, Jajoo A, Oukarroum A, *et al.* Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2016, 38(4):102.
- [7] Ahmed S, Kouser S, Asgher M, *et al.* Plant aquaporins: a frontward to make crop plants drought resistant[J]. *Physiologia Plantarum*, 2021, 172(2):1089-1105.
- [8] Alam M M, Rafi A, Rahman M A, *et al.* Aquaporins as natural stress integrator: coordinating transport, signals, and tolerance mechanisms in plants[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2026, 49(4):2311-2325.
- [9] Liu L H, Ludewig U, Gassert B, *et al.* Urea transport by nitrogen-regulated tonoplast intrinsic proteins in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2003, 133(3):1220-1228.
- [10] Maurel C, Verdoucq L, Luu D T, *et al.* Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2008, 59: 595-624.
- [11] Saha B, Patnaik A, Yadav N, *et al.* Mungbean tonoplast intrinsic protein gene (*VrTIP1;1*) regulates drought and salinity responses in *Arabidopsis* [J]. *Discover Plants*, 2026, 3(1):32.
- [12] Jia Y Q, Li H, Zhao H M. Characterisation of tonoplast intrinsic proteins in birch: *BpTIP1;3* confers drought tolerance by regulating the scavenging of reactive oxygen species [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2025, 327: 147276.
- [13] 李远航, 贺康宁, 张潭, 等. 盐胁迫对黑果枸杞光合生理指标的影响[J]. *中国水土保持科学*, 2019, 17(1): 82-88.
- Li Yuanhang, He Kangning, Zhang Tan, *et al.* Effects of salt stress on the photosynthetic and physiological indexes of *Lycium ruthenicum* [J]. *Science of Soil and Water Conservation*, 2019, 17(1):82-88.
- [14] Zheng F X, Xu Z T, Deng X J, *et al.* Comprehensive identification of aquaporins under salt stress, and functional characterization of DoTIP1-1 in *Dendrobium officinale* [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2026, 231:110952.
- [15] Liao Y, Smyth G K, Shi W. FeatureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30 (7): 923-930.
- [16] Love M I, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. *Genome Biology*, 2014, 15(12):550.
- [17] He W, Liu M Y, Qin X Y, *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of the aquaporin gene family in *Lycium barbarum* during fruit ripening and seedling response to heat stress [J]. *Current Issues in Molecular Biology*, 2022, 44(12):5933-5948.
- [18] Feng Z J, Liu N, Zhang G W, *et al.* Investigation of the AQP family in soybean and the promoter activity of *TIP2;6* in heat stress and hormone responses [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20 (2):262.
- [19] Zeng R, Zhang X Y, Song G S, *et al.* Genetic variation in the aquaporin tonoplast intrinsic protein 4;3 modulates maize cold tolerance [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2024, 22(11):3037-3050.
- [20] 王博之, 赵琼. 植物内膜系统中的水通道蛋白研究进展[J]. *生物学教学*, 2023, 48(5):2-5.
- Wang Bozhi, Zhao Qiong. Progress in research on aquaporic proteins in the piano endomembrane system [J]. *Biology Teaching*, 2023, 48(5):2-5.
- [21] Sun Q, Liu X, Kitagawa Y, *et al.* Plant aquaporins: their roles beyond water transport [J]. *The Crop Journal*, 2024, 12(3):641-655.
- [22] Chaumont F, Tyerman S D. Aquaporins: highly regulated channels controlling plant water relations [J]. *Plant Physiology*, 2014, 164(4):1600-1618.
- [23] Sudhakaran S, Thakral V, Padalkar G, *et al.* Significance of solute specificity, expression, and gating mechanism of tonoplast intrinsic protein during development and stress response in plants [J]. *Physiologia Plantarum*, 2021, 172(1):258-274.
- [24] Xu Y, Hu W, Liu J H, *et al.* A banana aquaporin gene, *MaPIP1;1*, is involved in tolerance to drought and salt stresses [J]. *BMC Plant Biology*, 2014, 14(1):59.
- [25] Li O Q, Zou M, Hou X F, *et al.* BnaGRP3 mediates salt tolerance via Na⁺/K⁺ homeostasis and BnaPIPs interactions in *Brassica napus* [J/OL]. *Journal of Advanced Research*, 2026-01-06. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090123226000184>.
- [26] Kim J H, Kim J H, Park G B, *et al.* Rice E3 ligase OsRF-PH2-16 acts as a negative regulator to mediate the degradation of OsPIP1;1 under salt stress [J]. *The Plant Journal*, 2025, 124(1):e70491.
- [27] Zhu C L, Lin Z M, Yang K B, *et al.* A bamboo 'PeSAPK4-PeMYB99-PeTIP4-3' regulatory model involved in water transport [J]. *New Phytologist*, 2024, 243(1):195-212.
- [28] Umate P. Genome-wide analysis of the family of light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins in *Arabidopsis* and rice [J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2010, 5(12):1537-1542.
- [29] 刘梅朔, 王传宽, 全先奎. 兴安落叶松叶光合与氮代谢对环境变化响应的转录组分析[J]. *应用生态学报*,

- 2022, 33(4):957-962.
- Liu Meishuo, Wang Chuankuan, Quan Xiankui. Transcriptome analysis on responses of leaf photosynthesis and nitrogen metabolism of *Larix gmelinii* to environmental change [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2022, 33(4):957-962.
- [30] Peterson R B, Schultes N P. Light-harvesting complex B7 shifts the irradiance response of photosynthetic light-harvesting regulation in leaves of *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of Plant Physiology, 2014, 171(3/4):311-318.
- [31] Sun T H, Hazra A, Lui A, *et al.* GLKs directly regulate carotenoid biosynthesis via interacting with GBFs in plants [J]. New Phytologist, 2025, 246(2):645-665.
- [32] Navarro-Carcelen J, Rodriguez-Concepcion M. Experimental validation of computationally predicted phytoene synthase isoforms encoded by the *Arabidopsis thaliana* *PSY* gene [J]. Plant Cell Reports, 2025, 44(4):93.
- [33] 季静, 曹海燕, 王罡, 等. 过表达枸杞 *LmPSY* 基因提高洋桔梗抗逆性的研究 [J]. 天津大学学报, 2015, 48(3):262-268.
- Ji Jing, Cao Haiyan, Wang Gang, *et al.* Overexpression of *Lycium chinense* miller phytoene synthase (*LmPSY*) gene to enhance the resistance of *Eustoma grandiflorum* [J]. Journal of Tianjin University, 2015, 48(3):262-268.
- [34] Muñoz-Bertomeu J, Cascales-Miñana B, Irlés-Segura A, *et al.* The plastidial glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is critical for viable pollen development in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2010, 152(4):1830-1841.
- [35] Kim S Y, Stessman D J, Wright D A, *et al.* *Arabidopsis* plants expressing only the redox-regulated Rca- α isoform have constrained photosynthesis and plant growth [J]. The Plant Journal, 2020, 103(6):2250-2262.
- [36] Shan X Y, Wang J X, Chua L, *et al.* The role of *Arabidopsis* rubisco activase in jasmonate-induced leaf senescence [J]. Plant Physiology, 2011, 155(2):751-764.
- [37] Aliakbari M, Tahmasebi S, Sisakht J N. Jasmonic acid improves barley photosynthetic efficiency through a possible regulatory module, *MYC₂-RcaA*, under combined drought and salinity stress [J]. Photosynthesis Research, 2024, 159(1):69-78.