北京林业大学学报
JOURNAL OF BEIJING FORESTRY UNIVERSITY

毛白杨*PtoGRF*9基因的克隆及其调控杨树耐旱性的功能解析

牛梦雪 路竣翔 张孜纯 孟祥润 张箫航 李鹏

Cloning of *PtoGRF*9 from *Populus tomentosa* and functional characterization of its role in drought tolerance

Niu Mengxue, Lu Junxiang, Zhang Zichun, Meng Xiangrun, Zhang Xiaohang, Li Peng

引用本文:
牛梦雪, 路竣翔, 张孜纯, 孟祥润, 张箫航, 李鹏. 毛白杨*PtoGRF*9基因的克隆及其调控杨树耐旱性的功能解析[J]. 北京林业大学学报, 2026, 48(6):84–93. doi: 10.12171/j.1000–1522.20250432
Niu Mengxue, Lu Junxiang, Zhang Zichun, Meng Xiangrun, Zhang Xiaohang, Li Peng. Cloning of *PtoGRF*9 from *Populus tomentosa* and functional characterization of its role in drought tolerance[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2026, 48(6):84–93. doi: 10.12171/j.1000–1522.20250432

在线阅读 View online: https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20250432

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

胡杨PeMAX2调控拟南芥耐旱性

Populus euphratica PeMAX2 regulating drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*

北京林业大学学报, 2024, 46(6): 106–117. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20220494

毛白杨碱性/中性转化酶基因*PtoNIN*1的克隆与功能研究

Cloning and functional study of the alkaline/neutral invertase gene *PtoNIN*1 in *Populus tomentosa*

北京林业大学学报, 2023, 45(5): 35–46. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20220171

毛白杨*PtYABBY*基因家族3个成员的克隆与表达分析

Cloning and expression analysis of three members of *PtYABBY*s in *Populus tomentosa*

北京林业大学学报, 2022, 44(1): 48–57. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20210277

日本落叶松*LkERF*5过表达增强烟草耐旱性

Overexpression of *LkERF*5 in *Larix kaempferi* to enhance drought tolerance in tobacco

北京林业大学学报, 2025, 47(6): 101–110. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20240419

毛白杨耐寒种质资源遗传鉴定及评价

Genetic identification and evaluation of cold-resistant germplasm resources in *Populus tomentosa*

北京林业大学学报, 2023, 45(12): 59–67. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20220363

欧李果肉酵母cDNA文库构建及*PhLDOX*基因上游调控因子筛选

Construction of yeast cDNA library of *Prunus humilis* flesh and screening for upstream regulatory factors of *PhLDOX* gene

北京林业大学学报, 2026, 48(3): 191–202. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20250293

DOI:10.12171/j.1000−1522.20250432

毛白杨 *PtoGRF*9 基因的克隆及其调控杨树耐旱性的功能解析

牛梦雪[1,2]　路竣翔[1]　张孜纯[1]　孟祥润[1]　张箫航[1]　李　鹏[1]
（1. 山东农业大学林学院，山东 泰安 271017；2. 河南科技大学农学院（牡丹学院），河南 洛阳 471023）

摘要:【目的】GRF 转录因子在植物发育与胁迫应答中功能保守，但其在杨树耐旱性中的分子作用尚未见系统报道。本研究解析毛白杨 *PtoGRF*9 的生物学功能，为阐释杨树“生长—抗逆”平衡机制及耐旱分子育种提供理论依据与基因资源。**【方法】**从毛白杨中克隆 *PtoGRF*9，进行系统进化、蛋白结构、启动子及表达模式分析；利用农杆菌介导的叶盘转化法创制过表达（*PtoGRF*9-OE）与沉默（*PtoGRF*9-RNAi）84K 杨树株系，测定干旱胁迫下光合生理指标及抗氧化酶活性；结合 DNA 亲和纯化测序（DAP-seq）数据筛选并初步验证下游靶基因。**【结果】**（1）PtoGRF9 编码 457 个氨基酸，包含 1 个 QLQ 结构域和 2 个 WRC 结构域。（2）*PtoGRF*9 启动子含有多个与植物生长发育、应激响应及生物与非生物胁迫相关的顺式作用元件。反转录荧光定量 PCR（RT-qPCR）分析表明 *PtoGRF*9 在发育叶片中表达量较高，且受干旱胁迫显著诱导。（3）*PtoGRF*9-OE 株系在短期干旱胁迫下的光合参数及过氧化物酶活性等生理指标显著高于 WT，而 *PtoGRF*9-RNAi 株系则表现相反。（4）DAP-seq 及 RT-qPCR 共同验证 *PtoSHN*1、*PtoERD*7、*PtoERECTA* 和 *PtoPIP*1 等参与蜡质合成和气孔发育的基因为 PtoGRF9 的潜在靶基因。**【结论】***PtoGRF*9 是正向调控杨树耐旱性的转录因子，在维持叶片发育与抗逆性平衡中发挥关键作用。研究结果不仅为理解杨树生长发育与抗逆的分子机制提供了新视角，也为耐旱分子育种鉴定了关键候选基因。

关键词：毛白杨；*PtoGRF*9；耐旱性；叶片发育；转录因子
中图分类号：S722　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1000−1522(2026)06−0084−10
引文格式：牛梦雪，路竣翔，张孜纯，等. 毛白杨 *PtoGRF*9 基因的克隆及其调控杨树耐旱性的功能解析［J］. 北京林业大学学报，2026，48(6)：84−93. Niu Mengxue, Lu Junxiang, Zhang Zichun, et al. Cloning of *PtoGRF*9 from *Populus tomentosa* and functional characterization of its role in drought tolerance［J］. Journal of Beijing Forestry University, 2026, 48(6): 84−93.

Cloning of *PtoGRF*9 from *Populus tomentosa* and functional characterization of its role in drought tolerance

Niu Mengxue[1,2]　Lu Junxiang[1]　Zhang Zichun[1]　Meng Xiangrun[1]　Zhang Xiaohang[1]　Li Peng[1]
(1. College of Forestry, Shandong Agricultural University, Taian 271017, Shangdong, China;
2. College of Agriculture / Tree Peony, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, Henan, China)

Abstract:［**Objective**］GRF transcription factors play conserved roles in plant development and stress responses, yet their molecular contributions to drought tolerance in poplar remain unclear. Here, we functionally characterize *PtoGRF*9 in *Populus tomentosa*, elucidate its role in the growth-defence balance and provide a target for molecular breeding of drought resistant poplar.［**Method**］We first cloned *PtoGRF*9 from *Populus tomentosa*, performed phylogenetic, structural, promoter and expression analyses; then,

收稿日期: 2025−11−05　**修回日期:** 2026−01−13
基金项目: 山东省自然科学基金青年科学基金项目（ZR2024QC117）。
第一作者: 牛梦雪，讲师。主要研究方向：植物逆境生物学。Email：ayniumengxue@163.com　地址：471023 河南省洛阳市开元大道 263 号河南科技大学农学院（牡丹学院）。
责任作者: 李鹏，副教授。主要研究方向：林木遗传育种。Email：lipeng0706@sdau.edu.cn　地址：271017 山东省泰安市岱宗大街 61 号山东农业大学林学院。
本刊网址: https://j.bjfu.edu.cn；https://journal.bjfu.edu.cn

Agrobacterium-mediated leaf-disc transformation was employed to generate both over-expression (*PtoGRF*9-OE) and RNAi-silenced (*PtoGRF*9-RNAi) 84K poplar lines, which were then subjected to drought stress to evaluate photosynthetic performance and antioxidant enzyme activities. Finally, DNA affinity purification sequencing (DAP-seq) data were integrated to identify and preliminarily validate the downstream target genes of *PtoGRF*9. [**Result**] (1) PtoGRF9 encodes a protein of 457 amino acids that contains one QLQ domain and two WRC domains. (2) The *PtoGRF*9 promoter contains multiple cis-acting elements involved in plant growth and development, stress signaling, and biotic/abiotic stress responses. Reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR) assays showed that *PtoGRF*9 has a relatively high expression level in developing leaves and is significantly induced by drought stress. (3) Under short-term drought, *PtoGRF*9-OE lines exhibited significantly higher photosynthetic performance and peroxidase activities than WT, whereas *PtoGRF*9-RNAi lines displayed the opposite trend. (4) DNA affinity purification sequencing (DAP-seq) and RT-qPCR analyses identified the wax-biosynthesis and stomatal-development genes *SHN*1, *ERD*7, *ERECTA* and *PIP*1 as potential PtoGRF9 targets. [**Conclusion**] PtoGRF9 is a transcription factor that positively regulates drought tolerance in poplar and plays a key role in maintaining the balance between leaf development and stress resistance. Our findings not only provide new insights into the molecular mechanisms underlying poplar growth, development, and stress tolerance but also identify a key candidate gene for drought-tolerant molecular breeding.

Key words: *Populus tomentosa*; *PtoGRF*9; drought tolerance; leaf development; transcription factor

杨树(*Populus*)是我国重要的速生用材和生态造林树种，在林业生产和生态环境建设中发挥着关键作用。然而，干旱作为全球范围内最普遍的非生物胁迫之一，严重制约了杨树的分布、生长及生物量积累。因此，深入解析杨树的耐旱分子机制并挖掘关键耐旱基因，对于通过遗传改良培育节水耐旱型杨树新品种具有重要意义。

生长调节因子(growth-regulating factor，GRF)是一类植物特有的转录因子，在调控叶片、茎、花、种子发育以及生长与抗逆平衡中扮演关键角色[1]。首个 GRF 基因在水稻中被发现，该基因介导赤霉素诱导的茎伸长[2]。典型的 GRF 蛋白包含两个高度保守的结构域：N 端的 QLQ 结构域由谷氨酰胺(Glutamine)、亮氨酸(Leucine)和谷氨酰胺(Glutamine)组成，用于蛋白互作；C 端的 WRC 结构域由色氨酸(Tryptophan)、精氨酸(Arginine)和半胱氨酸(Cysteine)组成，负责与 DNA 的结合，并包含核定位信号区(nuclear localization signal，NLS)[3]。然而，GRF 家族成员间存在功能分化，其独特的蛋白结构和表达模式往往决定了特定的生物学功能。

相较于其他基因家族，GRF 家族规模较小，在杨树中包含 19 个成员[4]。其经典功能是作为植物生长发育的关键调控因子。在杨树中，过表达 *PpnGRF5*-1 一方面通过增加细胞数目与面积使叶片显著增大[5]；另一方面，可增加叶绿素含量、促进叶绿体发育，并延缓胁迫诱导的叶绿素降解[6]。过表达 *PagGRF*11 促进杨树茎部发育，但导致植株矮化[7]。过表达 *GRF*15 则使杨树植株矮小且叶片更大[4]。模式植物拟南芥和杨树的 GRF9 相较于其他家族成员多一个 WRC 结构域，且在进化关系上与其他家族成员相对较远[8]。拟南芥研究[9]表明，*AtGRF*9 通过激活 *OBP*3-*RESPONSIVE GENE* 3(*ORG*3)的表达，抑制叶片发育过程中的细胞增殖。杨树中 *PtoGRF*9 的功能与拟南芥类似，均抑制叶片发育中的细胞增殖。但在杨树中存在另一条通路，即 PtoGRF9 通过调控 *PtoHB*21 和 *PtoLD* 的表达抑制叶片发育[10]。此外，*AtGRF*9 可能参与拟南芥的冷胁迫响应[11]，表明该基因在平衡生长发育与胁迫响应中可能起一定作用，但关于杨树 *PtoGRF*9 响应非生物胁迫尤其是干旱胁迫的研究仍属空白。

近年来越来越多的研究表明，GRF 家族成员在植物响应生物与非生物胁迫过程中同样发挥关键作用。过表达 *PopGRF*3 株系对胶孢炭疽菌的敏感性降低，发病叶片病斑面积显著减小，显著增强了杨树对胶孢炭疽菌的抗性[12]。过表达 *PagGRF*15 可激活抗氧化系统，增强盐胁迫下的质子泵活性，进而提高其对盐胁迫的耐受性[13]。*PdbGRF*1 过表达显著降低了过氧化氢和丙二醛含量，提高了抗氧化酶活性及脯氨酸含量，增强了杨树对盐胁迫的耐受性[14]；此外，杨树 *GRF*15 mRNA 缺失 miR396a 靶位点，表现出比野生型植株更强的耐热能力和光合效率[15]。尽管 GRF 家族在植物非生物胁迫应答中的功能已被深入揭示，但关于其参与杨树耐旱分子机制的研究仍鲜有报道。

本研究首先分析了毛白杨中 PtoGRF9 编码蛋白的结构特征及启动子区域的顺式作用元件。随后通过检测 *PtoGRF*9 的表达模式，揭示其在杨树干旱胁迫响应中的潜在功能。为明确其生物学功能，创制了 *PtoGRF*9 过表达（*PtoGRF*9-OE）和沉默（*PtoGRF*9-RNAi）转基因株系，并在短期干旱胁迫下，系统比较转基因植株与野生型在光合特性、过氧化物酶活性等关键生理指标上的差异，分析潜在下游基因的表达模式，验证 *PtoGRF*9 正调控杨树耐旱性的生物学功能。本研究旨在深入理解 GRF 转录因子在林木中的功能，为杨树耐旱性的遗传改良提供基因资源。

1 材料与方法

1.1 GRF9 进化树构建与蛋白结构域分析

在 PlantTFDB（https://planttfdb.gao-lab.org/）和 Phytozome（https://phytozome-next.jgi.doe.gov/）数据库中比对获得毛白杨 PtoGRF9 在拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）、毛果杨（*Populus trichocarpa*）、红皮柳（*Salix purpurea*）、苹果（*Malus domestica*）、葡萄（*Vitis vinifera*）、水稻（*Oryza sativa*）、小麦（*Thinopyrum intermedium*）和玉米（*Zea mays*）中的同源基因。结合 SMART（https://smart.embl.de/）网站分析 GRF9 的蛋白结构域。使用 MEGA 软件[16]，利用邻接法构建不同物种间 *GRF*9 的系统发育树。

1.2 PtoGRF9 蛋白结构与启动子分析

使用 Expasy 网站（https://www.expasy.org/）分析 PtoGRF9 蛋白理化性质；采用基于序列比对的自优化蛋白质二级结构预测方法（self-optimized prediction method with alignment，SOPMA）预测 PtoGRF9 蛋白二级结构。使用 AlphaFold3（https://link.zhihu.com/?target=https%3A//alphafoldserver.com/）预测 PtoGRF9 蛋白三维结构；使用 PlantCARE 网站（https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/）预测 *PtoGRF*9 启动子区域（ATG 上游 2 000 bp）中的顺式作用元件。

1.3 RNA 提取、建库和测序

采用总 RNA 提取试剂盒（DP419，天根生化科技，北京），按说明书从发育叶、成熟叶、叶柄、木质部、韧皮部和根中提取 RNA。使用 Illumina Hiseq 2500 平台进行双末端测序。用 HISAT 2 软件[17]将测序数据比对到毛白杨参考基因组[18]。

1.4 反转录荧光定量 PCR

采用总 RNA 提取试剂盒（DP419，天根生化科技，北京），按其说明书从发育叶片中提取 RNA。使用 SYBR Premix Dimer Eraser（Perfect Real Time）（TaKaRa）试剂盒进行反转录荧光定量 PCR（reverse transcription-quantitative PCR，RT-qPCR），具体方法参见产品说明书。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对基因表达进行定量。其中，PtoGRF9 潜在下游靶基因（*PtoERECTA*、*PtoPIP*1、*PtoSHN*1、*PtoERD*7）的定量引物分别为 *PtoERECTA* 基因 F 端正向引物：CAACTGACGGGGAAGATTCC，R 端反向引物：GGGATGGATCCAGTCAGCTG；*PtoPIP*1 基因 F 端引物：CGCAGGAGTTGTTCAGGATG，R 端引物：CATCCAAGCCCAGAATCCTG；*PtoSHN*1 基因 F 端引物：CTGAGATCCTCCATGCTAAGC，R 端引物：TCTCTGTCCAAGCTGCACTC；*PtoERD*7 基因 F 端引物：CAGAAGCCATTTCTGCCACT，R 端引物：CTTCTTCACGGGGTTCAGAG。

1.5 转基因杨树获得

以毛白杨 cDNA 为模板，克隆 *PtoGRF*9 CDS 序列，通过 *Xba*I 酶切位点连接到 *pBI*121-*EGFP*-1 载体上，构建 35*S::PtoGRF*9-*pBI*121-*EGFP*-1 重组质粒。为构建 *PtoGRF*9 的 RNAi 载体，如前人所述[19]，将 *PtoGRF*9 的 173 个碱基对片段克隆到 *pBI*121-*EGFP*-1 载体中，并导入农杆菌 EHA105 中，具体方法参考文献 [19]。为评估该片段在试验宿主 84K 杨中的沉默适用性，将其与 84K 杨基因组[20]进行比对。结果显示，该片段在所有分析序列中完全保守（序列一致性为 100%）。

利用农杆菌（EHA105）介导的叶盘法侵染 84K 杨树。将携带目的基因的农杆菌经小摇后转大摇，摇至 OD_{600} 达到 0.8，离心后使用 WPM 液体培养基（含 AS）悬浮，侵染叶片 10 min，随后在共培养基上暗培养 2 d，转移至选择培养基中，每两周继代培养一次。约 1 个月后，待愈伤组织长出，转移至生芽培养基，每两周继代培养一次。约 1 个月后，转移至伸长培养基，待茎明显伸长后转移至生根培养基，培养基配方及详细操作见文献 [21]。

1.6 不同土壤相对含水量处理

取 30 d 龄杨树组培苗，移栽于 $V_{蛭石}$∶$V_{营养土}$∶$V_{草炭}$ = 1∶1∶1 的花盆中，在培养室中培养 3 个月（16 h 光照/8 h 黑暗，温度 20 ~ 25 ℃，湿度 40% ~ 50%）。随后每盆移栽 3 棵于顶部直径 28 cm、高 38 cm、底部直径 18 cm 的花盆中。在干旱处理前，每两周施加 1 次 1 L 霍格兰（Hoagland）营养液，持续两个月。

按照前人的方法[22]，将毛白杨置于 3 个土壤相对含水量（relative soil moisture content，RSMC）梯度（70% ~ 75%、50% ~ 55%、35% ~ 40%，各 6 株）下处理 45 d，每日补水维持设定水平。对照组保持 RSMC 为 70% ~ 75%，此为植物生长的最适环境[23]。使用 6 个无植物容器来估算蒸发量，并根据 RSMC

每天称质量以补充流失的水分[21]。45 d 后，每种处理取相同发育时期、相同位置的叶片混合后，液氮速冻保存。

1.7　短期干旱试验

取 30 d 龄杨树组培苗，移栽于统一规格（10 cm × 10 cm × 10 cm）的花盆中。WT、*PtoGRF*9-OE 及 *PtoGRF*9-RNAi 3 种基因型的转基因株系各取 6 株作为生物学重复，置于培养间进行为期 45 d 的适应性培养（16 h 光照/8 h 黑暗，温度 20 ~ 25 ℃，湿度 40% ~ 50%）。

适应性培养后，进行为期 7 d 的短期干旱胁迫试验。对照组 RSMC 始终维持在 70%（土壤水势约 –0.30 MPa），干旱处理组则停止供水，让土壤水分从 70% 自然干旱。在停止供水后的第 5 天，处理组土壤 RSMC 降至约 40%（土壤水势约–0.83 MPa），达到中度干旱胁迫状态；持续干旱至第 7 天试验结束，此时处理组土壤 RSMC 降至约 30%（土壤水势约 –1.11 MPa），达到重度干旱胁迫状态。土壤水势使用美国 WESCOR 植物水势仪 Psypro 测定。

1.8　生理指标测定

使用 Li-6 400 便携式光合作用系统测量并记录光合作用参数，选取 WT、*PtoGRF*9-OE 及 *PtoGRF*9-RNAi 杨树植株的第 3 至第 5 片叶。将光照强度和二氧化碳浓度分别设定为 800 μmol/(m^2·s) 和 400 μmol/mol，从 08：00—10：00 测量叶片的净光合速率（Pn）、气孔导度（Gs）和蒸腾速率（Tr）。

采用过氧化物酶（peroxidase，POD）和超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）相应生化试剂盒测定其活性（货号分别为 BC0095 和 BC5165，北京索莱宝科技有限公司）。

1.9　统计学分析方法

采用 Microsoft Excel 2010（Microsoft Corp, Redmond, WA）进行数据整理。采用 SPSS（version 25, IBM Corporation, Armonk, NY, USA）进行统计分析，采用 LSD 法比较不同处理间均值的差异（*表示 $P < 0.05$，**$P < 0.01$，one-way ANOVA）。

2　结果与分析

2.1　PtoGRF9 基因进化分析

已有研究表明，GRF 家族成员的蛋白结构多包含一个 QLQ 和一个 WRC 结构域，而 GRF9 较为特殊，其 C 端比其他家族成员多 1 个 WRC 结构域[1]。为分析蛋白结构域的种间保守性，利用蛋白序列比对，鉴定了来自多个物种与 PtoGRF9 相似性最高的同源基因，包括近缘种（如毛果杨、红皮柳）、双子叶远缘种（如苹果、葡萄、拟南芥）以及单子叶植物（如水稻、小麦、玉米）。系统发育树分析发现，除拟南芥中的 AT2G45480 外，其他基因与 PtoGRF9 的蛋白序列同源性随物种分化逐步降低，表现为在杨柳科内进化关系最近，在单子叶植物中进化关系最远（图 1a）。进一步分析蛋白结构域发现，PtoGRF9 在双子叶植物中的同源基因，其 C 端均多一个完整的 WRC 结构域；但该现象在单子叶植物中消失（图 1b）。

2.2　PtoGRF9 蛋白结构分析

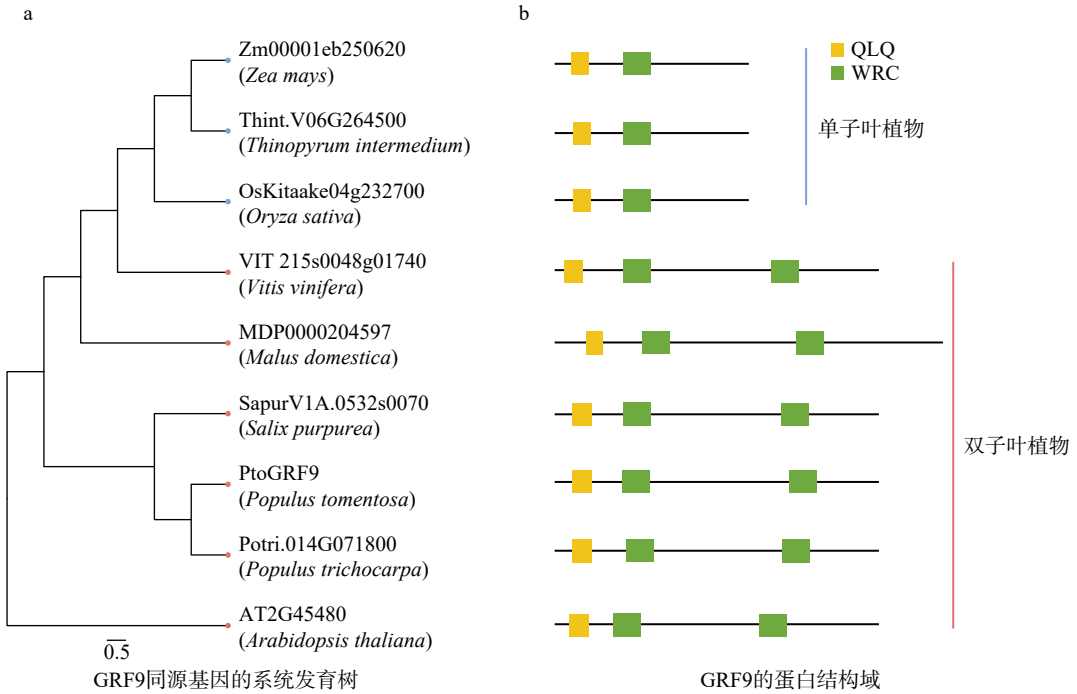
PtoGRF9 基因编码 457 个氨基酸，等电点为 8.99，不稳定指数为 44.4，表明该蛋白在体外可能易降解。利用 ExPASy 在线工具分析 PtoGRF9 蛋白的亲疏水性，结果显示其疏水性最大值为 2.067（第 53 位氨基酸），最小值为−3.233（第 27 位氨基酸），平均亲水系数为−0.15（图 2a）。其中，QLQ 结构域附近出现显著的亲疏水性波动，这可能与该结构域参与蛋白互作有关。SOPMA 预测结果表明，PtoGRF9 蛋白二级结构中无规则卷曲占 90.81%，而 α-螺旋占 5.69%（图 2b）。AlphaFold3 三级结构预测结果显示，PtoGRF9 在 QLQ 和 WRC 结构域附近的置信度较高（图 2c、d），特别是其 QLQ 结构域的 α-螺旋结构与二级结构预测结果一致（图 2c）。

2.3　*PtoGRF9* 启动子及表达模式分析

提取 *PotGRF*9 基因（上游 2 kb 区域）的启动子序列，并进行顺式作用元件预测。结果显示，该区域包含多个与植物生长发育、激素响应及胁迫响应相关的顺式作用元件（图 3a）。其中，19 个生长发育相关元件涉及光照、生长素和赤霉素等调控过程；15 个胁迫响应元件包含脱落酸、茉莉酸、低温、厌氧和复合胁迫等响应途径。进一步分析 *PtoGRF*9 在不同组织中的表达模式发现，该基因在发育叶片（第 3 片叶）中呈高表达状态，而在成熟叶片（第 7 片叶）及维管组织等中的表达量较低（图 3b）。RT-qPCR 分析表明，在不同土壤含水量条件下，发育叶片中 *PtoGRF*9 的表达水平发生显著变化：相较于 70% ~ 75% 相对含水量的对照组，当土壤相对含水量降至 50% ~ 55% 时，*PtoGRF*9 表达量上调约 1.1 倍；当土壤相对含水量下降到 35% ~ 40% 时，*PtoGRF*9 表达量上调约 2.7 倍（图 3c）。上述结果表明，*PtoGRF*9 可能参与叶片发育过程中的干旱胁迫响应。

2.4　过表达 *PtoGRF9* 提高抗旱性

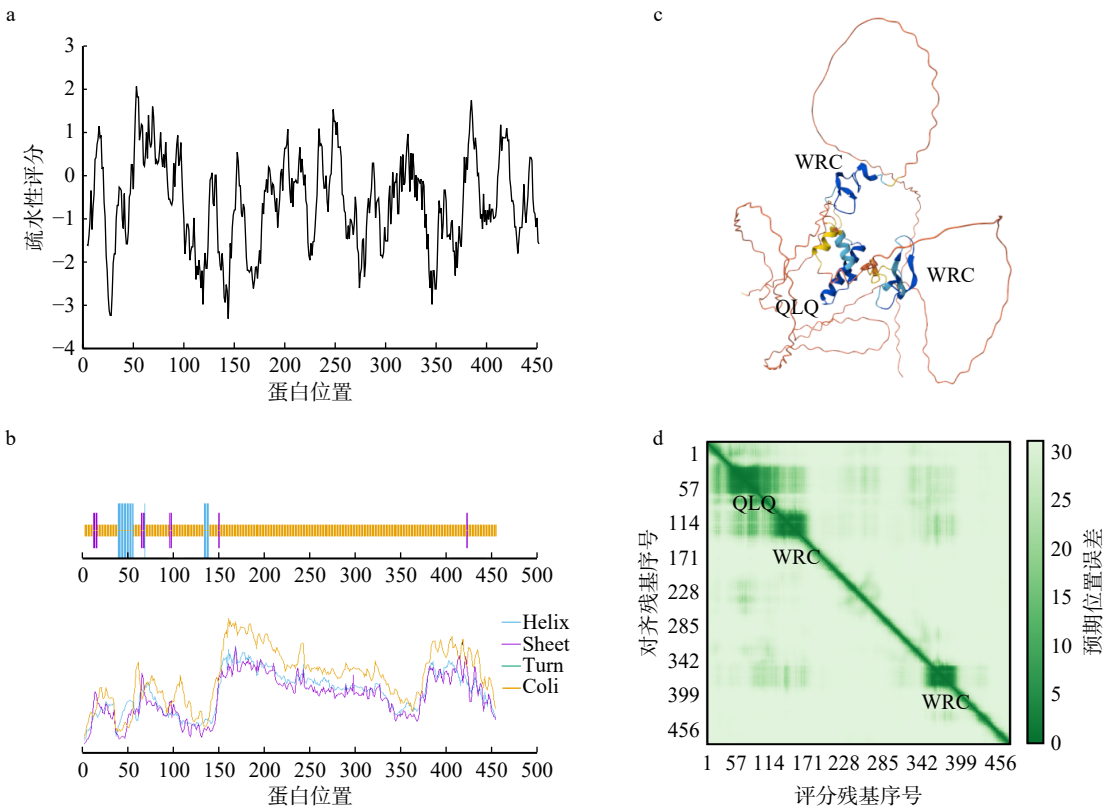
为深入研究 *PtoGRF*9 在协调发育与环境适应性中的功能，本研究在 84K 杨中构建了 *PtoGRF*9 过表达和沉默株系，分别获得过表达株系（*PtoGRF*9-OE7 和 *PtoGRF*9-OE8）和沉默株系（*PtoGRF*9-RNAi3 和 *PtoGRF*9-RNAi23），并进行了短期干旱胁迫处理（图 4a）。干旱处理第 5 天，*PtoGRF*9-RNAi 株系叶



Arabidopsis thaliana. 拟南芥；*Populus trichocarpa.* 毛果杨；*Populus tomentosa.* 毛白杨；*Salix purpurea.* 红皮柳；*Malus domestica.* 苹果；*Vitis vinifera.* 葡萄；*Oryza sativa.* 水稻；*Thinopyrum intermedium.* 小麦；*Zea mays.* 玉米。

图 1 GRF9 同源基因进化树

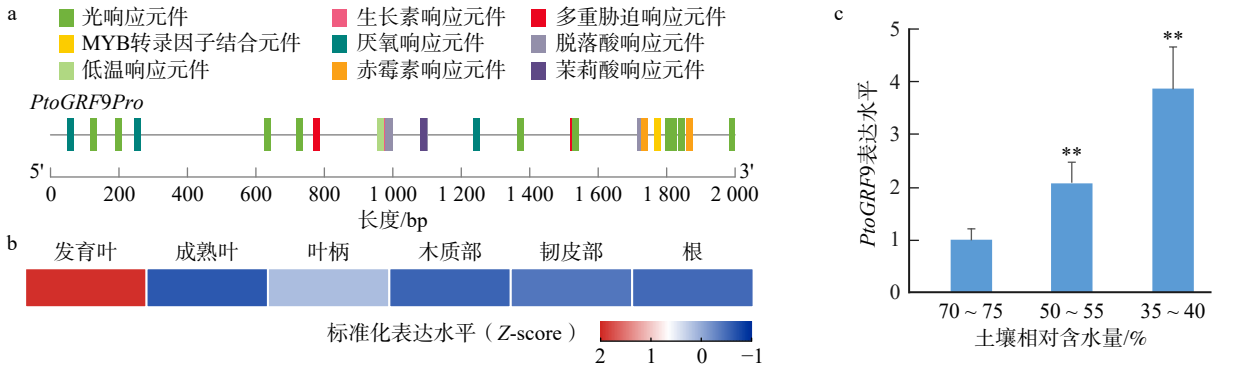
Fig. 1 Phylogenetic tree of GRF9 orthologs



a. PtoGRF9 蛋白疏水性分析；b. PtoGRF9 蛋白二级结构预测中，Helix 代表 α- 螺旋，Sheet 代表 β- 折叠，Turn 代表转角结构，Coil 代表无规则卷曲。c. PtoGRF9 蛋白三级结构预测中，蓝色表示保守性最高（plDDT > 90），橙色表示保守性最低（plDDT < 50）。d. 预测置信度热图。

图 2 PtoGRF9 蛋白结构

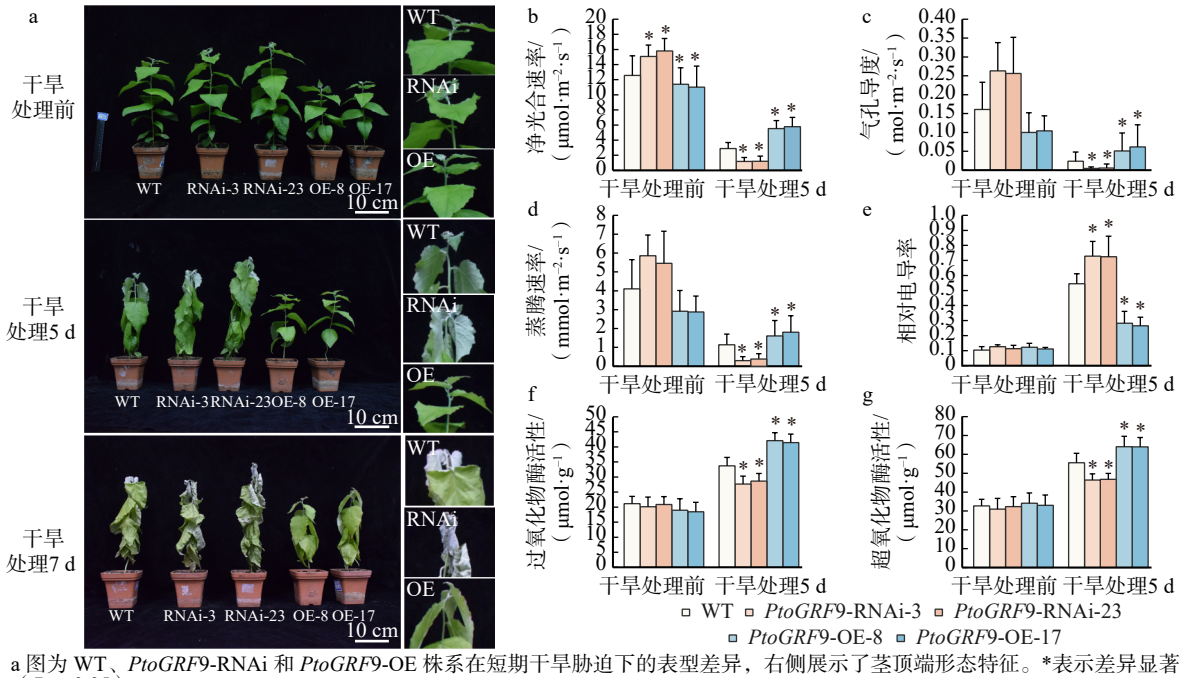
Fig. 2 Protein architecture of PtoGRF9



** 表示差异显著性（$P < 0.01$）。

图 3　*PtoGRF9* 启动子及表达模式分析

Fig. 3　Analysis of cis-acting elements and expression patterns in *PtoGRF9*



a 图为 WT、*PtoGRF9*-RNAi 和 *PtoGRF9*-OE 株系在短期干旱胁迫下的表型差异，右侧展示了茎顶端形态特征。*表示差异显著（$P < 0.05$）。

图 4　过表达 *PtoGRF9* 显著提高杨树在短期干旱下的耐旱性

Fig. 4　Overexpression of *PtoGRF9* significantly enhances the drought tolerance of poplar under short-term drought stress

片已枯萎，WT 株系叶片开始枯萎，而 *PtoGRF9*-OE 株系叶片保持正常；至干旱第 7 天，*PtoGRF9*-RNAi 株系叶片已经完全干枯，WT 株系叶片接近干枯，而 *PtoGRF9*-OE 株系叶片仅出现轻微萎蔫（图 4a）。

进一步分析光合参数、相对电导率（relative electric conductivity，REC）及抗氧化酶活性等生理指标。在正常条件下，生长较快的 *PtoGRF9*-RNAi 株系光合速率高于 WT，而生长较慢的 *PtoGRF9*-OE 株系光合速率低于 WT。干旱胁迫后，*PtoGRF9*-OE 株系表现出比 WT 和 *PtoGRF9*-RNAi 株系更强的光合速率（图 4b）。此外，干旱导致各株系的气孔导度和蒸腾速率均下降，但 *PtoGRF9*-OE 株系的气孔导度和蒸腾速率较 WT 分别显著高出约 116.67% 和 58.33%；相比之下，*PtoGRF9*-RNAi 株系的这两项指标较 WT 分别显著降低约 66.67% 和 54.17%（图 4c、d）。REC 反映膜损伤程度，干旱前各株系 REC 无显著差异；干旱后，*PtoGRF9*-OE 株系 REC 较 WT 显著降低约 50%，而 *PtoGRF9*-RNAi 株系较 WT 显著升高约 51.85%（图 4e）。过氧化物酶（POD）和超氧化物歧化酶（SOD）能有效清除植物体内过量的活性氧（reactive oxygen species，ROS），维持细胞氧化还原平衡，从而减轻干旱胁迫造成的氧化损伤。试验表明，干旱前，WT、*PtoGRF9*-OE 和 *PtoGRF9*-RNAi 植株体内 POD，SOD 活性无显著差异；干旱后，各株系体内 POD 和 SOD 活性均升高，其中 *PtoGRF9*-OE 株系的 POD 和 SOD 活性较 WT 分别显著增加

约 27.27% 和 14.29%，而 *PtoGRF*9-RNAi 株系则较 WT 分别显著降低约 16.67% 和 19.64%（图 4f、g）。综上所述，短期干旱胁迫下，*PtoGRF*9-OE 株系在光合能力、膜稳定性及抗氧化酶活性等生理指标上均显著优于 WT，而 *PtoGRF*9-RNAi 株系表现相反。这些结果证实，*PtoGRF*9 在维持叶片发育与抗逆性平衡中起着关键作用。

2.5 PtoGRF9 潜在下游靶基因的表达量分析

基于该基因的 DNA 亲和纯化测序（DNA affinity purification sequencing，DAP-seq）数据[10]及植物耐旱相关文献，筛选出 *SHN*1、*ERD*7（early-responsive to dehydration 7）、*ERECTA* 和 *PIP*1（plasma membrane intrinsic protein 1）这 4 个潜在下游靶基因。其中，*SHN*1 参与叶片蜡质合成[24]；*ERD*7 响应多种胁迫[25]；过表达 *ERECTA* 可改变气孔密度，提高杨树耐旱性[26]；*PIP*1 作为水通道蛋白，影响叶片水分转运[27]。为进一步探究 *PtoGRF*9 在干旱胁迫响应中的调控作用，采用 RT-qPCR 检测了上述潜在下游靶基因的表达水平。结果表明，*PtoSHN*1、*PtoERD*7、*PtoERECTA* 和 *PtoPIP*1 等这 4 个潜在下游基因在 *PtoGRF*9 过表达株系中的表达量显著上调（图 5）。这表明 *PtoGRF*9 可能通过影响叶片发育过程中的蜡质合成、气孔发育及水分转运，进而调控杨树的耐旱性。

3 讨 论

3.1 *PtoGRF*9 的分子进化特征与蛋白结构解析

本研究系统探索了杨树 *PtoGRF*9 基因的生物学功能。进化分析表明，*PtoGRF*9 在毛果杨中的同源基因为 *Potri*.014G071800。其所属的 GRF9 亚群在双子叶植物中具有独特的 C 端额外 WRC 结构域，而在单子叶植物中该结构域基本缺失（图 1），这一发现与 Omidbakhshfard 等[1]的研究结果一致。这种结构域的种间差异暗示，GRF9 蛋白在双子叶与单子叶植物分化后可能经历了不同的功能进化；其在杨柳科近缘种中的高度保守性，进一步说明该基因在木本双子叶植物中可能具有重要且特化的功能。蛋白结构分析显示 PtoGRF9 蛋白具有不稳定性，且二级结构以无规则卷曲为主（图 2b），这符合许多转录因子快速响应内外信号的特性。值得注意的是，QLQ 结构域附近亲疏水性的剧烈波动可能与其介导蛋白质相互作用的功能相关（图 2b）。此外，AlphaFold3 预测的高置信度三维结构，特别是 QLQ 结构域的 α-螺旋构象，为理解 PtoGRF9 与其互作蛋白作用的分子基础提供了可靠的结构模型（图 2c、d）。

3.2 GRF 转录因子在植物生长发育及逆境胁迫中的功能分化

GRF 转录因子在植物根、叶、花等器官发育中主要作为正向调控因子发挥作用。例如，在拟南芥中，*AtGRF*1/2/3 是促进叶片细胞增殖与扩张的关键因子；其三重突变体叶片显著变小，而过表达 *AtGRF*1 或 *AtGRF*2 则能形成更大的叶片[28]。在水稻中，miR396 通过靶向抑制 *OsGRF*4/6/8 等成员，协同负调控籽粒大小与穗型[29]。此外，过表达 *GRF*5 可以显著促进枫香胚性愈伤组织增殖，但抑制体细胞胚胎形成[30]。少数 GRF 成员则表现出抑制生长的功能。拟南芥 AtGRF9 通过直接激活细胞周期抑制因子 *ORG*3，以剂量依赖方式限制叶原基细胞增殖，从而负调控叶片大小[9]。玉米中自然截短的 *ZmGRF*10 同样作为负调控因子，其过表达会抑制细胞增殖，导致

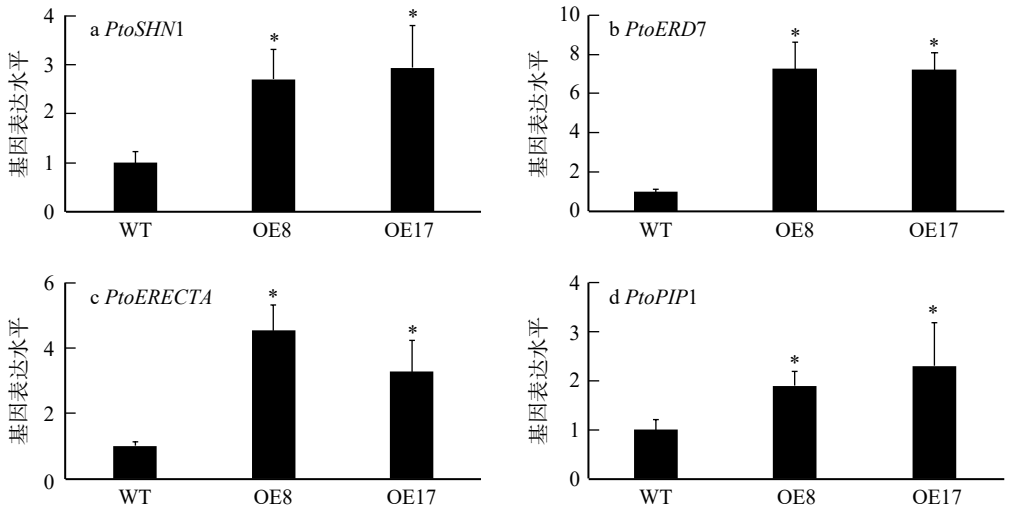


图 5 WT 与过表达 *PtoGRF*9 株系中 4 个潜在下游基因的表达水平

Fig. 5 Expression levels of four potential downstream genes in WT and *PtoGRF*9-OE poplar lines

叶面积和株高降低[31]。既往研究[10]表明 *PtoGRF*9 通过抑制细胞增殖、影响细胞数目，进而抑制叶片发育。

GRF 家族成员在植物“生长−抗逆平衡”过程中同样发挥关键作用。提高 *OsGRF*7 的表达（*GRF*7-OE）可促进水稻对盐胁迫的耐受性，并促使籽粒变大；而抑制其表达（*GRF*7-*Ri*）或敲除该基因（*grf*7）则降低耐盐性，导致籽粒变小[32]。GA 处理可以正向或反向调节冷胁迫诱导的基因表达。在寒冷刺激下，DELLA 与 GRF 互作对 GA 依赖性植物的叶片生长和根的伸长、发育具有重要作用；*GRF*5 在冷处理条件下也会影响 GA 的生物合成途径[11]。*PtoGRF*9 启动子中含有丰富的与生长发育、激素及胁迫响应相关的顺式作用元件（图 3a）。结合其在发育叶片中高表达且受干旱胁迫诱导的特点（图 3b、c），说明 *PtoGRF*9 在连接叶片发育程序与干旱胁迫应答中扮演桥梁角色。

3.3　*PtoGRF*9 协调杨树“生长−抗逆”平衡的调控机制

在正常条件下，*PtoGRF*9-OE 株系生长较慢且光合速率较低，而 *PtoGRF*9-RNAi 株系生长较快且光合速率较高（图 4a、b）。在干旱胁迫下，*PtoGRF*9 的抗旱功能突显：*PtoGRF*9-OE 株系不仅保持了更高的光合速率，其气孔导度和蒸腾速率也较 WT 显著增加。此外，*PtoGRF*9-OE 株系在干旱时具有较高的瞬时水分利用效率（iWUE，光合速率/蒸腾速率），表明该株系在水分受限条件下仍能高效利用水分，表现出较强的耐旱性和水分调节能力。相比之下，*PtoGRF*9-RNAi 株系的光合速率、气孔导度和蒸腾速率显著降低，光合碳同化能力严重受限，对干旱更加敏感（图 4b、c、d）。相对电导率（REC）测定结果进一步证实了 *PtoGRF*9 在维持细胞膜稳定性中的重要作用。干旱胁迫后，*PtoGRF*9-OE 株系的 REC 较 WT 显著降低 50%，而 *PtoGRF*9-RNAi 株系则增加 51.85%（图 4e），说明 *PtoGRF*9 能够有效减轻干旱引起的膜系统损伤，这对于维持细胞完整性和生理功能至关重要。在活性氧清除系统方面，*PtoGRF*9-OE 株系在干旱后表现出更强的抗氧化酶活性，其 POD 和 SOD 活性较 WT 显著提高，而 *PtoGRF*9-RNAi 株系则相反（图 4f、g）。这一结果明确显示，*PtoGRF*9 通过增强抗氧化防御能力，有效缓解了干旱胁迫引发的氧化损伤，为细胞提供了更为稳定的氧化还原环境。综上所述，在干旱胁迫下，*PtoGRF*9 通过维持杨树光合能力、优化气孔行为、增强膜稳定性和提升抗氧化防御等多重途径，正调控杨树的抗旱性。

进化上保守的 GRF 控制着植物不同组织和器官的生长，改变植物中 GRF 的表达似乎可以平衡生长和抗逆。在盐胁迫条件下，ZmMPK3 激酶活性增强，从而磷酸化 ZmGRF1，通过调控与细胞增殖相关基因的表达来促进玉米在盐胁迫下的生长[33]。然而，过表达 *PtoGRF*9 在一定程度上抑制了植物的正常生长发育，该现象与拟南芥中同源基因的相关研究[9]结论一致。前期研究[10]证实，在叶片发育的细胞增殖阶段，PtoGRF9 通过促进 *PtoHB*21 基因的表达，进而激活 ABA 通路，抑制叶片发育。这表明，*PtoGRF*9 可能在维持叶片发育和抗旱性的平衡中起着至关重要的作用。DAP-seq 数据与 RT-qPCR 结果共同表明，*PtoSHN*1、*PtoERD*7、*PtoERECTA* 和 *PtoPIP*1 可能是 PtoGRF9 的下游基因（图 5）。这些基因分别参与叶片蜡质合成、早期脱水响应、气孔密度调控及水分运输[24−27]。因此，我们推测 PtoGRF9 可能通过协同上调这些功能各异的靶基因，从减少水分流失、增强胁迫耐受和维持水分运输等多个层面，增强杨树的整体抗旱性。

*PtoGRF*9 在叶片发育早期通过激活 ABA 通路抑制细胞增殖[10]，我们推测，ABA 作为关键的胁迫激素，在干旱条件下大量积累，可能进一步强化 PtoGRF9 对下游靶基因的转录激活，同时抑制生长相关靶标，从而实现“生长发育”与“抗逆响应”的平衡。在育种方面，构建胁迫诱导型启动子驱动的 *PtoGRF*9 表达系统，可在干旱条件下特异性激活其抗旱功能而不影响正常生长。

综上所述，本研究证实 *PtoGRF*9 是干旱胁迫响应中协调杨树“生长−抗逆”平衡的关键转录因子。其独特的蛋白结构、受胁迫诱导的表达特性以及通过调控下游多种功能基因来增强抗旱性的作用模式，为理解 GRF 家族基因在林木中的功能多样性提供了新视角。当然，本研究的部分结论有待拓展与深化。例如本研究通过 DAP-seq 与 RT-qPCR 初步筛选出 *PtoSHN*1、*PtoERD*7、*PtoERECTA* 和 *PtoPIP*1 等潜在下游基因，但尚未进行 ChIP-qPCR、EMSA 或双荧光素酶报告试验以证实 PtoGRF9 与这些靶标启动子的直接结合。同时，当前基于温室盆栽的表型数据，需在未来通过多年多点田间试验予以验证，以评估 *PtoGRF*9-OE 和 *PtoGRF*9-RNAi 株系在真实立地条件下的成材性状、生物量及抗旱稳定性，从而验证其生产应用潜力。

4　结　　论

本研究初步阐明了 *PtoGRF*9 在干旱胁迫下通过提高光合性能、增强膜稳定性和提高抗氧化防御能力等途径，增强杨树的抗旱性，从而在杨树叶片发育与抗旱性平衡中发挥核心调控作用。主要结论包括

*PtoGRF*9 参与干旱响应与叶片发育过程；在正常条件下抑制生长，而在干旱胁迫下通过提升光合性能、气孔调节能力、膜稳定性及抗氧化防御水平正向调控耐旱性；其可能通过激活 *PtoSHN*1、*PtoERD*7、*PtoERECTA* 和 *PtoPIP*1 等下游靶基因，整合蜡质合成、脱水响应、气孔发育与水分运输，形成多维度抗旱调控网络。这些发现为解析木本植物生长与抗逆的平衡机制提供了新见解，也为抗旱杨树新品种的遗传改良提供了关键候选基因与理论依据。

参 考 文 献

[1] Omidbakhshfard M A, Proost S, Fujikura U, et al. Growth-regulating factors (GRFs): a small transcription factor family with important functions in plant biology [J]. Molecular Plant, 2015, 8(7): 998−1010.

[2] van der Knaap E, Kim J H, Kende H. A novel gibberellin-induced gene from rice and its potential regulatory role in stem growth [J]. Plant Physiology, 2000, 122(3): 695−704.

[3] Meng L Y, Li X M, Hou Y, et al. Functional conservation and divergence in plant-specific GRF gene family revealed by sequences and expression analysis [J]. Open Life Sciences, 2022, 17(1): 155−171.

[4] Zhou H J, Song X Q, Wei K L, et al. Growth-regulating factor 15 is required for leaf size control in *Populus* [J]. Tree Physiology, 2019, 39(3): 381−390.

[5] Wu W Q, Li J, Wang Q, et al. Growth-regulating factor 5 (*GRF*5)-mediated gene regulatory network promotes leaf growth and expansion in poplar [J]. New Phytologist, 2021, 230(2): 612−628.

[6] Chen H, Wu W Q, Du K, et al. The interplay of growth-regulating factor 5 and BZR1 in coregulating chlorophyll degradation in poplar [J]. Plant, Cell & Environment, 2024, 47(10): 3766−3779.

[7] Tian Y T, Zhao Y, Sun Y H, et al. *PagGRF*11 overexpression promotes stem development and dwarfing in *Populus* [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(14): 7858.

[8] Wang J N, Zhou H J, Zhao Y Q, et al. Characterization of poplar growth-regulating factors and analysis of their function in leaf size control [J]. BMC Plant Biology, 2020, 20(1): 509.

[9] Omidbakhshfard M A, Fujikura U, Olas J J, et al. GROWTH-REGULATING FACTOR 9 negatively regulates *Arabidopsis* leaf growth by controlling ORG3 and restricting cell proliferation in leaf primordia [J]. PLoS Genetics, 2018, 14(7): e1007484.

[10] Li P, He Y L, Xiao L, et al. Temporal dynamics of genetic architecture governing leaf development in *Populus* [J]. New Phytologist, 2024, 242(3): 1113−1130.

[11] Lantzouni O, Alkofer A, Falter-Braun P, et al. GROWTH-REGULATING FACTORS interact with DELLAs and regulate growth in cold stress [J]. The Plant Cell, 2020, 32(4): 1018−1034.

[12] Tan S X, Chen S S, Zhang H Y, et al. The PopbZIP2-PopMYB4 regulatory module enhances disease resistance in poplars by modulating proanthocyanidin accumulation [J]. New Phytologist, 2025, 246(1): 218−236.

[13] Xu W J, Wang Y, Xie J B, et al. Growth-regulating factor 15-mediated gene regulatory network enhances salt tolerance in poplar [J]. Plant Physiology, 2023, 191(4): 2367−2384.

[14] Liu Z Y, Han Y T, Wang C Y, et al. The growth-regulating factor PdbGRF1 positively regulates the salt stress response in *Populus davidiana* × *P. bolleana* [J]. Plant Science, 2023, 326: 111502.

[15] Zhao Y Y, Xie J B, Wang S, et al. Synonymous mutation in Growth Regulating Factor 15 of miR396a target sites enhances photosynthetic efficiency and heat tolerance in poplar [J]. Journal of Experimental Botany, 2021, 72(12): 4502−4519.

[16] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1596−1599.

[17] Kim D, Langmead B, Salzberg S L. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements [J]. Nature Methods, 2015, 12(4): 357−360.

[18] Li P, Xiao L, Du Q Z, et al. Genomic insights into selection for heterozygous alleles and woody traits in *Populus tomentosa* [J]. Plant Biotechnology Journal, 2023, 21(10): 2002−2018.

[19] Xiao L, Fang Y Y, Zhang H, et al. Natural variation in the prolyl 4-hydroxylase gene PtoP4H9 contributes to perennial stem growth in *Populus* [J]. The Plant Cell, 2023, 35(11): 4046−4065.

[20] Qiu D Y, Bai S L, Ma J C, et al. The genome of *Populus alba* x *Populus tremula* var. glandulosa clone 84K [J]. DNA Research, 2019, 26(5): 423−431.

[21] Niu M X, Feng C H, He F, et al. The miR6445-NAC029 module regulates drought tolerance by regulating the expression of glutathione S-transferase U23 and reactive oxygen species scavenging in *Populus* [J]. New Phytologist, 2024, 242(5): 2043−2058.

[22] Li B S, Qin Y R, Duan H, et al. Genome-wide characterization of new and drought stress responsive microRNAs in *Populus euphratica* [J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(11): 3765−3779.

[23] Wang C P, Liu S, Dong Y, et al. PdEPF1 regulates water-use efficiency and drought tolerance by modulating stomatal density in poplar [J]. Plant Biotechnology Journal, 2016, 14(3): 849−860.

[24] Oshima Y, Shikata M, Koyama T, et al. MIXTA-like transcription factors and WAX INDUCER1/SHINE1 coordinately regulate cuticle development in *Arabidopsis* and *Torenia fournieri* [J]. The Plant Cell, 2013, 25(5): 1609−1624.

[25] Wu R R, Pan X L, Li W, et al. Phosphorylation of thr-225 and Ser-262 on ERD7 promotes age-dependent and stress-induced leaf senescence through the regulation of hydrogen peroxide accumulation in *Arabidopsis thaliana* [J]. International Journal of

Molecular Sciences, 2024, 25(2): 1328.

[26] Li H G, Yang Y L, Wang H L, et al. The receptor-like kinase ERECTA confers improved water use efficiency and drought tolerance to poplar via modulating stomatal density [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(14): 7245.

[27] Sade N, Shatil-Cohen A, Attia Z, et al. The role of plasma membrane aquaporins in regulating the bundle sheath-mesophyll continuum and leaf hydraulics [J]. Plant Physiology, 2014, 166(3): 1609−1620.

[28] Kim J H, Choi D, Kende H. The AtGRF family of putative transcription factors is involved in leaf and cotyledon growth in *Arabidopsis* [J]. The Plant Journal, 2003, 36(1): 94−104.

[29] Zhang J S, Zhou Z Y, Bai J J, et al. Disruption of MIR396e and MIR396f improves rice yield under nitrogen-deficient conditions [J]. National Science Review, 2020, 7(1): 102−112.

[30] Li Y, Ma W H, Wang P T, et al. BZR2-GRF5 acts as a hub module in regulating in vitro regeneration through brassinosteroid−auxin crosstalk in hybrid sweetgum [J]. New Phytologist, 2025, 247(4): 1694−1711.

[31] Wu L, Zhang D F, Xue M, et al. Overexpression of the maize *GRF10*, an endogenous truncated growth-regulating factor protein, leads to reduction in leaf size and plant height [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2014, 56(11): 1053−1063.

[32] Chen Y P, Dan Z W, Li S Q. GROWTH REGULATING FACTOR 7-mediated arbutin metabolism enhances rice salt tolerance [J]. The Plant Cell, 2024, 36(8): 2834−2850.

[33] Yin P, Wang H Y, Ye Z K, et al. The ZmMPK3-ZmGRF1 module promotes maize growth by enhancing cell proliferation under salt stress [J]. Science Bulletin, 2026, 71(2): 269−272.

（责任编辑　赵田芸　孟　瑶
责任编委　卢孟柱）