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

过表达胡杨*PePKS5*提高拟南芥耐盐性

温馨 殷可欣 马思圆 张小萌 赵楠 周晓阳 赵瑞 陈少良

Overexpression of *Populus euphratica PePKS5* enhancing salt tolerance of *Arabidopsis thaliana*

Wen Xin, Yin Kexin, Ma Siyuan, Zhang Xiaomeng, Zhao Nan, Zhou Xiaoyang, Zhao Rui, Chen Shaoliang

引用本文:
温馨, 殷可欣, 马思圆, 张小萌, 赵楠, 周晓阳, 赵瑞, 陈少良. 过表达胡杨*PePKS5*提高拟南芥耐盐性[J]. 北京林业大学学报, 2024, 46(2):62–74. doi: 10.12171/j.1000–1522.20220480
Wen Xin, Yin Kexin, Ma Siyuan, Zhang Xiaomeng, Zhao Nan, Zhou Xiaoyang, Zhao Rui, Chen Shaoliang. Overexpression of *Populus euphratica PePKS5* enhancing salt tolerance of *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2024, 46(2):62–74. doi: 10.12171/j.1000–1522.20220480

在线阅读 View online: https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20220480

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

胡杨*PeREM*1.3过表达提高烟草耐盐性的机制

Overexpression mechanism of *PeREM*1.3 from *Populus euphratica* enhancing salt tolerance in transgenic tobacco

北京林业大学学报, 2019, 41(1): 1–9. https://doi.org/10.13332/j.1000–1522.20180338

过表达胡杨*PeRIN*4基因拟南芥提高质膜H^+–ATPase活性和耐盐性

Over–expression of *PeRIN*4 enhanced salinity tolerance through up–regulation of PM H^+–ATPase in *Arabidopsis thaliana*

北京林业大学学报, 2017, 39(11): 1–8. https://doi.org/10.13332/j.1000–1522.20170124

过表达胡杨*PeAnn*1负调控拟南芥的抗旱性

Overexpression of *PeAnn*1 from *Populus euphratica* negatively regulates drought resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana*

北京林业大学学报, 2020, 42(6): 14–25. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20200031

胡杨*PeAPY*1和*PeAPY*2调控拟南芥耐盐机制研究

*PeAPY*1 and *PeAPY*2 of *Populus euphratica* regulating salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*

北京林业大学学报, 2017, 39(6): 13–21. https://doi.org/10.13332/j.1000–1522.20170034

胡杨*PePEX*11基因参与调节盐胁迫下拟南芥的抗氧化能力

*PePEX*11 functions in regulating antioxidant capacity of *Arabidopsis thaliana* under salt stress

北京林业大学学报, 2018, 40(5): 19–28. https://doi.org/10.13332/j.1000–1522.20180086

过表达细叶百合*LpNAC*6基因增强烟草的耐盐性

Overexpression of *LpNAC*6 gene in *Lilium pumilum* enhancing salt tolerance in transgenic tobacco

北京林业大学学报, 2020, 42(4): 69–79. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20190342

DOI:10.12171/j.1000−1522.20220480

过表达胡杨 *PePKS5* 提高拟南芥耐盐性

温 馨[1] 殷可欣[1] 马思圆[1] 张小萌[1] 赵 楠[2] 周晓阳[2] 赵 瑞[1] 陈少良[1]
（1. 北京林业大学生物科学与技术学院，林木、花卉遗传育种教育部重点实验室，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】盐胁迫是影响植物生长发育的不利环境因子。蛋白激酶 PKS5 作为植物盐超敏感信号转导途径的重要组分，在植物响应盐胁迫过程中具有重要调节功能。本文旨在生理水平和分子水平上，探究胡杨 *PePKS5* 基因在植物耐受盐胁迫过程中的调节作用。**【方法】**克隆胡杨 *PePKS5* 基因，并在拟南芥中过表达，获得 T_3 代转基因拟南芥纯合体。观察盐胁迫下转基因拟南芥株系的耐盐表型，测定其过氧化物酶（POD）、过氧化氢酶（CAT）和超氧化物歧化酶活性及盐胁迫响应基因的表达量。利用非损伤微测技术测定转基因拟南芥株系根尖 Na^+、K^+动态离子流，利用激光共聚焦显微镜观测转基因拟南芥株系根尖 Na^+和 H_2O_2 含量。测定盐处理后转基因拟南芥土培幼苗的叶绿素荧光参数、光合参数等生理指标，揭示 *PePKS5* 基因在盐胁迫下对拟南芥的生理调节作用。构建亚细胞定位载体，通过瞬时转化烟草，对 PePKS5 蛋白进行亚细胞定位观测。**【结果】**（1）*PePKS5* 基因的 CDS 序列编码 417 个氨基酸，PePKS5 氨基酸序列与毛白杨 PtPKS5 相似度最高，并且亲缘关系最近。（2）PePKS5 定位于细胞质和细胞核中。（3）NaCl 处理 6 h 后，胡杨叶片 *PePKS5* 基因表达量上调，72 h 后逐渐恢复至正常水平。（4）盐胁迫下过表达 *PePKS5* 基因的拟南芥株系（PePKS5-OE10 和 PePKS5-OE15）的生存率和根长均明显高于野生型（WT）和转空载体（VC）株系。（5）与 WT 和 VC 株系相比，PePKS5-OE10 和 PePKS5-OE15 株系的 POD 和 CAT 活性增强，*APX1* 和 *CAT2* 基因的表达量均升高。（6）盐胁迫下 PePKS5-OE10 和 PePKS5-OE15 株系的 Na^+外排和 K^+的内流明显高于 WT 和 VC 株系，并且在根尖中积累的 Na^+浓度和 H_2O_2 浓度明显低于 WT 和 VC 株系。（7）盐胁迫下 PePKS5-OE10 和 PePKS5-OE15 株系的叶绿素相对含量、PSⅡ最大光量子效率、实际光合量子产量和相对电子传递速率均高于 WT 和 VC 株系。（8）盐胁迫下 PePKS5-OE10 和 PePKS5-OE15 的净光合速率高于 WT 和 VC 株系，而胞间 CO_2 浓度、气孔导度和蒸腾速率均低于 WT 和 VC 株系。**【结论】**过表达胡杨 *PePKS5* 基因能够增强拟南芥对 Na^+的外排能力，维持植物活性氧的平衡状态，以及保持相对稳定的光合作用能力，从而提高拟南芥的耐盐能力。

关键词：胡杨；蛋白激酶；盐胁迫；PKS5；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)02−0062−13
引文格式：温馨，殷可欣，马思圆，等. 过表达胡杨 *PePKS5* 提高拟南芥耐盐性［J］. 北京林业大学学报，2024，46(2)：62−74.
Wen Xin, Yin Kexin, Ma Siyuan, et al. Overexpression of *Populus euphratica PePKS5* enhancing salt tolerance of *Arabidopsis thaliana*［J］. Journal of Beijing Forestry University, 2024, 46(2): 62−74.

Overexpression of *Populus euphratica PePKS5* enhancing salt tolerance of *Arabidopsis thaliana*

Wen Xin[1] Yin Kexin[1] Ma Siyuan[1] Zhang Xiaomeng[1] Zhao Nan[2]
Zhou Xiaoyang[2] Zhao Rui[1] Chen Shaoliang[1]
(1. Key Laboratory of Forest and Flower Genetics and Breeding of Ministry of Education, School of Biological Science and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;
2. Public Analysis and Testing Center, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

收稿日期: 2022−11−28 **修回日期:** 2023−02−14
基金项目: 国家自然科学基金项目（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: 温馨。主要研究方向：植物逆境生物学。Email: 553779056@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

Abstract: [**Objective**] Salt stress is an adverse environmental factor affecting plant growth and development. As an important component of plant salt overly sensitive signal transduction pathway, protein kinase PKS5 plays an important regulatory role in plant response to salt stress. The aim of this study was to investigate the regulation mechanism of *PePKS5* gene in plant tolerance to salt stress at physiological and molecular levels. [**Method**] The *PePKS5* gene from *Populus euphratica* was cloned and overexpressed in *Arabidopsis thaliana* to obtain a T_3 generation transgenic *A. thaliana* homozygous. We observed the salt tolerance phenotype of transgenic *A. thaliana* lines under salt stress, measured their peroxidase (POD), catalase (CAT), and superoxide dismutase activities, as well as the expression levels of salt stress responsive genes. Non-invasive micro measurement technology was used to measure the dynamic ion flow of Na^+ and K^+ in the root tips of transgenic *A. thaliana* lines, and the Na^+ and H_2O_2 contents in the root tips of transgenic *A. thaliana* lines were observed using laser confocal microscopy. We measured the physiological indicators such as chlorophyll fluorescence parameters and photosynthetic parameters of transgenic *A. thaliana* seedlings cultured in soil after salt treatment, and revealed the physiological regulatory effect of *PePKS5* gene on *A. thaliana* under salt stress. A subcellular localization vector was constructed and the subcellular localization of PePKS5 protein was observed by transient transformation of tobacco. [**Result**] (1) The CDS sequence of *PePKS5* gene encoded 417 amino acids, and the amino acid sequence of PePKS5 was the most similar to PtPKS5 of *Populus tomentosa*. (2) PePKS5 was localized in cytoplasm and nucleus. (3) The expression of *PePKS5* gene in leaves of *P. euphratica* was up-regulated after 6 h of NaCl treatment, and gradually recovered to normal level after 72 h. (4) Under salt stress, the survival rate and root length of *PePKS5* gene overexpressing *A. thaliana* lines (PePKS5-OE10 and PePKS5-OE15) were significantly higher than those of wild-type (WT) and vector control (VC) lines. (5) Compared with WT and VC lines, the activity of POD and CAT and the expression of *APX1* and *CAT2* in PePKS5-OE10 and PePKS5-OE15 lines were increased. (6) Under salt stress, the Na^+ efflux and K^+ influx of PePKS5-OE10 and PePKS5-OE15 lines were significantly higher than those of WT and VC lines, and the accumulated Na^+ and H_2O_2 concentration in roots tips were significantly lower than those of WT and VC lines. (7) Under salt stress, the relative chlorophyll content, maximum photoquantum efficiency of PSⅡ, actual photosynthetic quantum yield and relative electron transport rate of PePKS5-OE10 and PePKS5-OE15 lines were higher than those of WT and VC lines. (8) Under salt stress, the net photosynthetic of PePKS5-OE10 and PePKS5-OE15 lines was higher than that of WT and VC lines, while the intercellular CO_2 concentration, stomatal conductance and transpiration rate were lower than those of WT and VC lines. [**Conclusion**] Overexpression of *PePKS5* gene in *P. euphratica* can enhance the Na^+ efflux ability of *A. thaliana*, maintain the balance of reactive oxygen species and relatively stable photosynthetic capacity, thus improving the salt stress tolerance in *A. thaliana*.

Key words: *Populus euphratica*; protein kinase; salt stress; PKS5; ion homeostasis; reactive oxygen (ROS)

盐胁迫是影响植物生长发育的不利环境因子。面对盐胁迫，植物通过体表盐腺、叶片肉质化、渗透调节、离子区隔化等方式，降低体内钠离子(Na^+)水平，排出体内过量的 Na^+[1−3]。另一方面，植物通过活性氧(ROS)、钙离子(Ca^{2+})、胞外 ATP(eATP)、硫化氢(H_2S)、一氧化氮(NO)等信号调节分子，激活植物体内的抗氧化物酶系统及相应的耐盐分子调控通路[4−8]。

在分子水平上，植物的耐盐性是由多个基因决定的[9]。盐胁迫下，不同种类的抗逆基因编码的蛋白质，通过参与各种生理代谢过程，构建了植物耐盐的调控网络[10]。其中蛋白激酶在植物响应盐胁迫的信号转导过程中发挥了重要作用。植物促分裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase，MAPK)级联途径能被干旱、高盐、低温等多种胁迫信号激活[11−12]。Wang 等[13]在水稻(*Oryza sativa*)中发现：OsMKK1 和 OsMPK4 共同构成调控水稻响应盐胁迫的一个信号通路。植物类受体蛋白激酶(receptor-like protein kinases，RLKs)通过配体结合区感应胁迫信号，经跨膜磷酸基团传递，进行信号转导[14]。Zhou 等[15]鉴定得到水稻耐盐基因 *STRK1*，并证明了该基因提高水稻耐盐性的分子机制是由 RLKs

磷酸化过程调控的。Miyata 等[16]发现：在拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）中过表达类受体蛋白激酶基因 *OsRLK*2 可降低拟南芥的耐盐性。钙依赖蛋白激酶（calcium-dependent protein kinase，CDPK）是一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，作为 Ca^{2+}信号感受器参与了多种逆境信号通路[17−19]。Asano 等[20]发现：*OsCPK*12 参与激素的信号转导，并对水稻抗逆性有正调控作用。

SOS2-LIKE 蛋白激酶 5（salt overly sensitive 2-like protein kinase 5，PKS5），也称为 CBL 互作蛋白（CIPK11）、SNF1 相关蛋白激酶 3 型蛋白激酶（SNRK3.22），是 CBLs 相互作用蛋白激酶家族成员之一，是盐超敏感信号通路（salt overly sensitive，SOS）中非常重要的调控因子[21−22]。PKS5 不仅参与植物盐胁迫信号传递，也参与响应其他非生物胁迫[23−25]。PKS5 在拟南芥对镉的耐受性中起正向调控作用，但是过表达 *PKS*5 降低了拟南芥对干旱胁迫和碱胁迫的抗性[26−28]。同时 PKS5 通过磷酸化 ABI5、MYB、NAC 和 ERF 等转录因子，参与脱落酸（ABA）信号转导[29−33]。

SOS 信号通路是调控植物耐受盐胁迫的重要途径之一，在植物中较为保守，可调节盐胁迫下 Na^+的稳态[21]。植物受到盐胁迫时，胞内 Ca^{2+}浓度升高，Ca^{2+}传感器 SOS3/CBL4 与 Ca^{2+}结合，激活丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 SOS2/CIPK24[34−36]。受到激活的 SOS2/CIPK24 将位于细胞膜上的 Na^+/H^+逆向转运蛋白 SOS1/NHX7 磷酸化，有活性的 SOS1/NHX7 把细胞内 Na^+转运至胞外，使植物细胞保持离子平衡[37−38]。

PKS5 也能够负调控 SOS 信号通路，PKS5 可以与 SOS2 相互作用并使其 Ser294 位点磷酸化，促进 SOS2 与 14-3-3 蛋白的相互作用，抑制 SOS2 活性。然而盐胁迫可诱导胞质 Ca^{2+}浓度增加，降低了 14-3-3 与 SOS2 的相互作用，增强了 14-3-3 与 PKS5 的相互作用，抑制了 PKS5 对 SOS2 的磷酸化作用[39−42]。此外，PKS5 是质膜 H^+-ATP 酶的负调节因子[41]。PKS5 可磷酸化质膜 H^+-ATP 酶 AHA2 的 C 端 Ser-931 位点，负向调控质膜 H^+-ATP 酶的活性，并且在 Ca^{2+}结合蛋白 SCaBP1 存在的情况下，这种磷酸化作用降低[41−42]。

胡杨（*Populus euphratica*）是典型的耐盐乔木。本实验室前期研究发现，胡杨 *PeRIN*4、*PeAPY*1/2、*PeREM*1.3、*PeJ*3、*PeJRL* 基因均能够提高拟南芥的耐盐性。*PeRIN*4 可以增强 H^+泵的质子动力势，抑制质膜的去极化，从而提高转基因拟南芥的耐盐性[43]。*PeAPY*1/2 能够提高三磷酸腺苷双磷酸酶的活性，下调 eATP 浓度和活性氧水平，同时通过保持抗氧化酶活性来抑制 H_2O_2 的水平，提高植物的耐盐性[44]。过表达 *PeREM*1.3 的烟草（*Nicotiana tabacum*）的过氧化物酶（POD）、过氧化氢酶（CAT）和超氧化物歧化酶（SOD）活性显著提高，并且与耐盐相关的基因 *SOS*1、*HAK*、*NHA*1、*VAG*1 和 *PMA*4 的转录水平也显著增高[45]。*PeJRL* 能够上调 *SOS*1、*AHA*1 和 *AHA*2 基因的表达，通过限制超氧阴离子的产生、增强抗氧化酶的活性，使拟南芥在盐胁迫下保持离子平衡[46]。*PeJ*3 会激活 H^+-ATP 酶，促进 Na^+/H^+在质膜上的交换，减少去极化引起的 K^+外流，刺激 H_2O_2 信号的产生，从而增加胞质 Ca^{2+}浓度，并通过 SOS 途径促进 Na^+的外排，提高植物耐盐性[47]。本文在实验室研究背景与已有成果基础上，在胡杨中鉴定得到 *PePKS*5 基因，研究了胡杨 *PePKS*5 基因在盐胁迫下的表达量变化，以及转 *PePKS*5 基因的拟南芥在盐胁迫下的表型和生理生化反应，明确了 *PePKS*5 在植物耐盐性中的作用，为培育优良的耐盐杨树品种、拓展其在生态修复中的应用、有效提升盐碱地治理效果提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

胡杨幼苗（1 年生）于 2021 年 4 月栽种于北京林业大学苗圃。拟南芥野生型种子、亚细胞定位载体 pGreen1300GFP 和 ABA 受体 PYR1-mCherry 菌株保存于实验室。pK2GW7 表达载体、Na^+特异性荧光探针（CoroNa-Green AM）及 H_2O_2 特异性荧光探针（H_2DCFDA/DCFH-DA）购买自 Invitrogen 公司。大肠杆菌 DH5α 感受态细胞和农杆菌 GV3101 购买自上海唯地生物技术有限公司，RNA 提取试剂盒购买自艾德莱科技有限公司，抗氧化物酶检测试剂盒购买自索莱宝生物技术有限公司，其他试剂由北京擎科生物公司提供，引物合成及测序由北京睿博兴科公司完成。

1.2 *PePKS*5 基因克隆与序列分析

1.2.1 *PePKS*5 基因克隆

根据 NCBI 基因组数据库中胡杨 *PKS*5 的基因序列，以其 cDNA 序列为模板，使用 primer5 软件设计引物（表 1）。提取胡杨叶片总 RNA，反转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，反应体系为：KOD 酶 25 μL；ddH_2O 18 μL；cDNA 5 μL；前后引物（10 μmol/L）各 1 μL。PCR 反应程序为：第 1 阶段 98 ℃ 30 s；第 2 阶段 98 ℃ 15 s，56 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s，30 个循环；第 3 阶段 72 ℃ 10 min；第 4 阶段 4 ℃ 恒温。回收扩增产物，将纯化后的产物与 pMD18-T 连接，转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细

表 1　本文实验所用引物序列

Tab. 1　Primer sequence used in this study

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′)
*PeActin*7	ATTGGCCTTGGGGTTAAGAG	CACACTGGAGTGATGGTTGG
*AtActin*2	GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC
*AtSOD*1	AAGGAGAAACAAATCTTCAT	GAGTTTGGTCCAGTAAGAGG
*AtCAT*2	AGGATCAAACTTTGAGGGGTAG	CTTGTGGTTCCTGGAATCTACT
*AtAPX*1	AGTTTTGGATTTGATCTGTGCGTT	GACGCCATCAACAACGAGTC
PePKS5	ATGCCGGAGATCGAAAGTGTATCGG	CTAAGTAGCCATAATCCAGGCTTA
PePKS5-RT-qPCR	CTGCTTATGTTGCTCCTGAG	TCCTTGTCTCCGGATTCGTA

胞，在含有氨苄青霉素的 LB 平板上筛选阳性克隆并测序鉴定。

1.2.2　PePKS5 氨基酸序列分析

利用生物信息学数据库（NCBI，http://www.ncbi.nhn.nih.gov/blast）获取不同植物 PKS5 同源氨基酸序列。利用 Mega 6 软件对 PKS5 氨基酸序列进行比对并构建系统进化树。

1.3　盐胁迫下胡杨叶片 *PePKS5* 基因表达量分析

用 100 mmol/L NaCl 溶液处理胡杨苗，分别在处理 0、3、6、12、24、48、72 h 时取胡杨叶片，提取总 RNA，并反转录为 cDNA。用特异性引物检测胡杨叶片 *PePKS5* 基因表达量，胡杨 *PeActin*7 为内参基因（表 1）。荧光定量 PCR 反应程序为：第 1 阶段 95 ℃ 1 min；第 2 阶段 95 ℃ 10 s，55 ℃ 15 s，72 ℃ 30 s，40 个循环。熔解曲线分析为：95 ℃ 15 s，60 ℃ 1 min，95 ℃ 15 s，60 ℃ 15 s。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算 *PePKS5* 基因表达量。

1.4　转基因拟南芥阳性植株的获取和筛选

1.4.1　植物表达载体的构建

用 Gateway 方法构建植物表达载体。设计带有 attB 位点的引物，PCR 扩增获得带有 attB 位点的基因片段，通过 BP 反应连入 pDONR221 载体，形成入门克隆。反应体系为：attB-PCR 产物 2 μL，pDONR221（150 ng/μL）0.5 μL，BP Clone™II 0.5 μL，TE buffer 2 μL；反应条件为 25 ℃ 1 h。回收扩增产物，并转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞，在含有卡那霉素的 LB 平板上筛选阳性克隆并测序鉴定。将测序正确的菌株接种在含有卡那霉素的 LB 液体培养基中，37 ℃，200 r/min 过夜培养，提取质粒。构建 LR 反应体系：attL1 入门克隆产物（100 ng/μL）2 μL，PK2GW7 表达载体（100 ng/μL）0.5 μL，LR Clonase™II 1 μL，TE buffer 1.5 μL；反应条件为 25 ℃ 1 h。回收重组产物，并转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞，在含有壮观霉素的 LB 平板上筛选阳性克隆并测序鉴定。

1.4.2　转基因植株的获得

将已构建的重组质粒 pPK2GW7-*PePKS5* 和空的表达载体 pPK2GW7 分别转化至农杆菌 GV3101 感受态细胞中。在加入利福平和壮观霉素的 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，通过沾花法侵染 T_0 代拟南芥，收获的种子为 T_1 代。将获得的拟南芥 T_1 代种子播种到含有壮观霉素（50 mg/L）的 MS 培养基上，长出 4 片真叶后移栽到土中，收获的种子继续用壮观霉素筛选，直至获得 T_3 代纯合体种子。使用 Trizol 法提取 T_3 代野生型、转基因和转空载体株系总 RNA，反转录得到 cDNA 后，进行半定量 PCR 检测和荧光定量 PCR 检测。荧光定量 PCR 反应程序为：第 1 阶段 95 ℃ 1 min；第 2 阶段 95 ℃ 10 s，55 ℃ 15 s，72 ℃ 30 s，40 个循环。熔解曲线分析为：95 ℃ 15 s，60 ℃ 1 min，95 ℃ 15 s，60 ℃ 15 s。半定量反应程序为：第 1 阶段 94 ℃ 5 min；第 2 阶段 94 ℃ 30 s，56 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s，28 个循环；第 3 阶段 72 ℃ 10 min；4 ℃ 恒温。扩增产物长度为 200 bp，琼脂糖（1%）凝胶电泳检测。

1.5　pGreen1300GFP-*PePKS5* 定位载体的构建和亚细胞定位

设计去除终止密码子的引物，上游引物 5′端加上 *Spe*I 酶切位点，下游引物 5′端加上 *Kpn*I 酶切位点（表 1）。以 *PePKS5* 基因序列为模板进行 PCR，同时使用 *Spe*I 和 *Kpn*I 对载体 pGreen1300GFP 进行双酶切。回收并纯化酶切产物和 PCR 产物，用同源重组酶连接后转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中，在含有卡那霉素的 LB 平板上筛选阳性克隆并测序鉴定。提取质粒并转化至农杆菌 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，将保存于−80 ℃ 冰箱的 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，将混合后的菌液瞬时转化烟草叶片，室温暗培

养 2 d 后，用激光共聚焦显微镜观测 PePKS5 的亚细胞定位。

1.6 盐胁迫下转基因拟南芥种子生存率和根长测定

将野生型、转空载体和转基因株系的种子分别播种于含有 0 和 100 mmol/L 的 NaCl 的 MS 培养基上。4 ℃ 处理 2 d 后置于恒温培养箱中，培养条件为 22 ℃，16 h 光照/8 h 黑暗，记录 7 d 后幼苗生存率，竖直生长 10 d 后，拍照并记录植株的根长。实验均重复 3 次。

1.7 盐胁迫下拟南芥根尖 Na^+和 K^+离子流测定

将野生型、转空载体和转基因株系的种子分别播种于 MS 培养基上生长 7 d，然后移至含有 0 和 100 mmol/L NaCl 的 MS 液体培养基中处理 12 h。使用非损伤微测技术检测各株系幼苗根尖分生区的 Na^+和 K^+离子流。每个株系测定 3 个重复。

1.8 盐胁迫下转基因拟南芥 Na^+含量和 H_2O_2 含量测定

Na^+含量测定。将在 MS 固体培养基上生长 7 d 的拟南芥各株系幼苗移至含有 0 和 100 mmol/L NaCl 的 MS 液体培养基中处理 12 h。将幼苗移至含有 Na^+特异性荧光探针的 10 mmol/L MS 缓冲液中，室温黑暗孵育 2 h，蒸馏水清洗 4 次，用 Leica SP8 激光共聚焦显微镜（德国 Leica）观察并测定 Na^+特异性荧光探针的荧光强度，激发波长为 488 nm，发射波长为 510~530 nm，相对荧光强度通过 Image J 软件计算。

H_2O_2 含量测定。将在 MS 固体培养基上生长 7 d 的拟南芥各株系幼苗移至含有 0 和 100 mmol/L NaCl 的 MS 液体培养基中处理 12 h。将幼苗移至含有 H_2O_2 特异性荧光探针的 10 mmol/L MS 缓冲液中，室温黑暗孵育 15 min，蒸馏水清洗 4 次，用 Leica SP8 激光共聚焦显微镜（德国 Leica）观察并测定 H_2O_2 特异性荧光探针的荧光强度，激发波长为488 nm，发射波长为 510~530 nm，相对荧光强度通过 Image J 软件计算。

1.9 盐胁迫下转基因拟南芥抗氧化酶活性及相关基因表达水平测定

将拟南芥各株系种子播种在含有 0 和 100 mmol/L NaCl 的培养基上，生长 10 d 后取样。测定过氧化物酶（POD）、过氧化氢酶（CAT）和超氧化物歧化酶（SOD）活性；提取总 RNA 并反转录合成 cDNA，通过荧光定量 PCR 仪检测抗氧化酶相关基因 *AtSOD*1、*AtAPX*1 和 *AtCAT*2 基因的转录水平，以拟南芥 *AtActin*2 基因为内参。

1.10 盐胁迫下转基因拟南芥生理参数测定

将野生型、转空载体和转基因拟南芥株系的种子播种在 MS 固体培养基上，低温处理后置于培养箱中正常生长，分化出 4 片真叶时，挑选长势一致的幼苗分别移栽到土中正常浇水培养 15 d，用 100 mmol/L NaCl 溶液处理 15 d，测定叶绿素荧光参数、叶绿素相对含量和光合参数。

用调制叶绿素荧光仪 Junior-PAM（德国 WALZ）对暗处理 30 min 后的拟南芥叶片进行叶绿素荧光参数的测定，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）。每株系重复测定 3 次，取平均值。用手持式叶绿素仪 SPAD-502-PLUS（日本 Minolta）测定植物 SPAD 值，作为叶绿素相对含量值。每个株系重复 3 次，取平均值。用 LI-6800 便携式光合测量仪（美国 LI-COR）检测各株系拟南芥的光合参数，包括净光合速率（P_n）、蒸腾速率（T_r）、气孔导度（G_s）和胞间二氧化碳浓度（C_i）。每个株系重复测定 3 次，记录平均值。

1.11 数据分析

实验数据通过 Excel、Graphpad Prism8、Mega 6、DNAMAN 软件进行处理、统计和绘图。通过 SPSS 19.0 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 *PePKS*5 基因序列分析

*PePKS*5 基因的 CDS 序列编码 417 个氨基酸。序列比对结果表明：PePKS5 氨基酸序列与拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）、毛果杨（*Populus trichocarpa*）、毛白杨（*Populus tomentosa*）、萝卜（*Raphanus sativus*）、水稻（*Oryza sativa*）、玉米（*Zea mays*）、甘蓝（*Brassica oleracea*）、棉花（*Gossypium hirsutum*）、大豆（*Glycine max*）、番茄（*Solanum lycopersicum*）、白桦（*Betula platyphylla*）、芥菜（*Capsella rubella*）和可可（*Theobroma cacao*）的 PKS5 氨基酸序列的同源性保持在 53.19%～98.08% 之间，说明 PePKS5 在进化过程中较为保守（图 1A）。系统进化树分析结果表明：胡杨 PePKS5 与毛白杨 PtPKS5 氨基酸亲缘关系最近（图 1B）。

2.2 盐胁迫下 *PePKS*5 基因在胡杨叶片中的表达量变化

分别计算盐处理 0、3、6、12、24、48、72 h 后胡杨叶片 *PePKS*5 基因的表达量发现：随着 NaCl 处理时间的增加，胡杨 *PePKS*5 的表达量在处理 6 h 后显著上升，12 h 后达到最高值，约为 0 h 时表达量的 2 倍，24 h 后开始下降，至 72 h 时恢复至最初状态（图 2）。

2.3 *PePKS*5 转基因拟南芥的筛选与鉴定

使用 Trizol 法提取 T_3 代转基因拟南芥、转空载

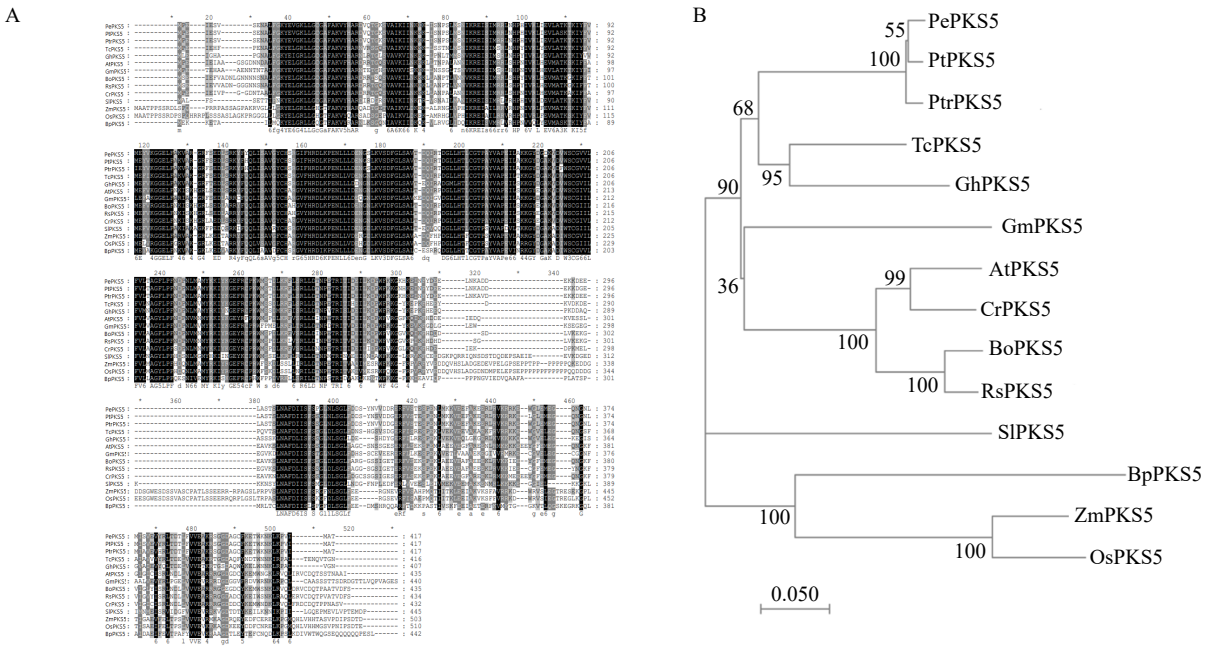
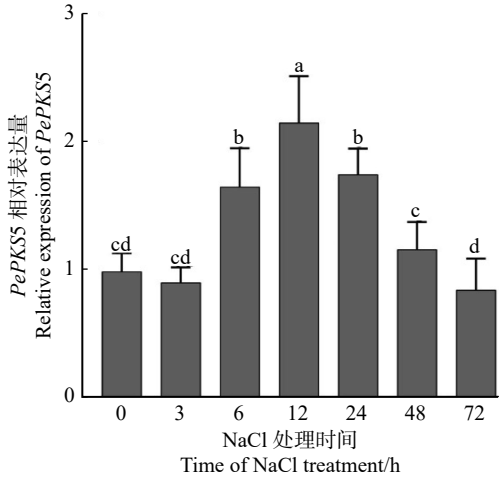


图 1　胡杨 PePKS5 氨基酸序列比对(A)与进化树构建(B)

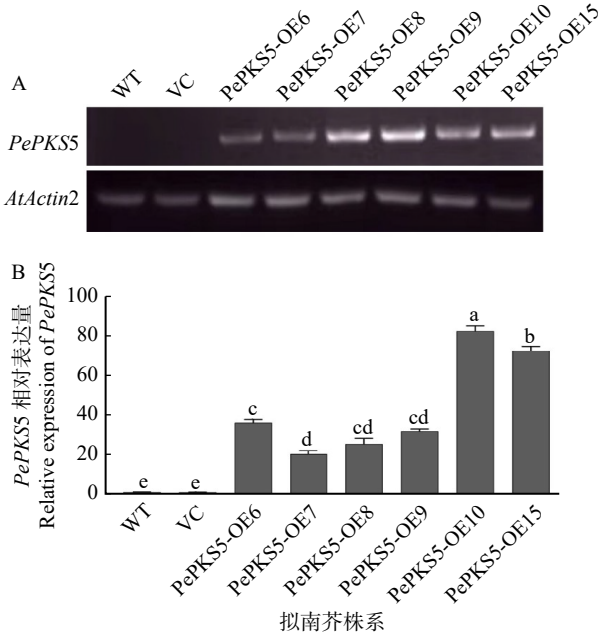
Fig. 1　Amino acid sequence alignment of PePKS5 in *Populus euphratica* (A) and construction of evolutionary tree (B)



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

图 2　盐胁迫(100 mmol/L NaCl)下胡杨叶片中 *PePKS5* 基因表达量的变化

Fig. 2　Changes of *PePKS5* gene expression in leaves of *Populus euphratica* under salt stress (100 mmol/L NaCl)



WT. 野生型; VC. 转空载体株系; OE. 转基因株系。下同。WT, wild type; VC, empty vector line; OE, transgenic line.The same below.

图 3　*PePKS5* 转基因拟南芥株系的筛选(A)与 *PePKS5* 表达量测定(B)

Fig. 3　Screening of *PePKS5* transgenic lines of *Arabidopsis thaliana* (A) and determination of *PePKS5* expression (B)

体(VC)拟南芥和野生型(WT)拟南芥叶片的总 RNA，进行荧光定量 PCR 和半定量 PCR 检测。结果显示：各株系拟南芥内参基因 *AtActin2* 表达一致，并且 6 个转基因株系均扩增出目的片段(200 bp)，WT 和 VC 株系中没有检测到目的基因 *PePKS5* 的表达(图 3A)。选择相对表达量高的 2 个转基因株系(PePKS5-OE10 和 PePKS5-OE15)进行后续实验(图 3B)。

2.4　PePKS5 的亚细胞定位

将带有 GFP 标签的重组载体瞬时转化至烟草中，观察绿色荧光在细胞内的分布情况。结果显示 PePKS5 与 GFP 的融合蛋白定位于细胞质与细胞核中。为了进一步确定 PePKS5 的定位，将 PePKS5 与 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。PYR1-mCherry 定位于细胞质与细胞核中[48]，PePKS5-GFP 的绿色荧光与 PYR1-mCherry 的红色荧光重叠，说明 PePKS5 定位于细胞质与细胞核中(图 4)。

2.5 *PePKS5* 过表达拟南芥株系的耐盐表型分析

在无盐培养基上，各株系拟南芥长势差别不大；经过 NaCl 处理后，各株系拟南芥的生长均受到抑制，然而转基因株系（PePKS5-OE10 和 PePKS5-OE15）的主根明显长于野生型（WT）与转空载体（VC）株系（图 5A，B），并且 PePKS5-OE10 和 PePKS5-OE15 株系的生存率为 81.51% ~ 83.54%，高于 WT（60.5%）和 VC（58%）株系（图 5C，D），推测 *PePKS5* 基因能够提高拟南芥的耐盐性。

2.6 盐胁迫下拟南芥根尖 Na^+含量的测定

无 NaCl 处理时，WT 和 VC 株系与 PePKS5-OE10 和 PePKS5-OE15 株系根尖 Na^+含量较低且无显著差异。经 NaCl 处理后，各株系荧光强度增强，但 PePKS5-OE10 和 PePKS5-OE15 株系的荧光强度显著低于 WT 和 VC 株系，说明 NaCl 处理后，转基因株系根尖细胞积累的 Na^+更少（图 6）。

2.7 盐胁迫下拟南芥根尖 H_2O_2 含量的测定

无 NaCl 处理时，WT 和 VC 株系与 PePKS5-OE10

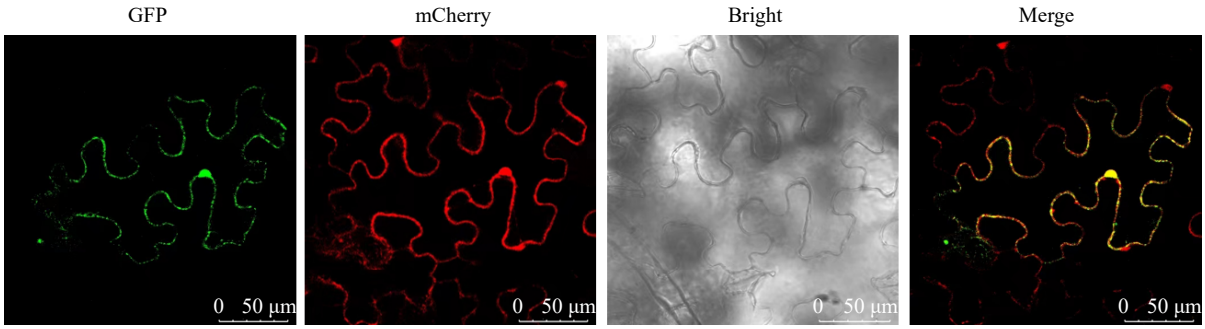
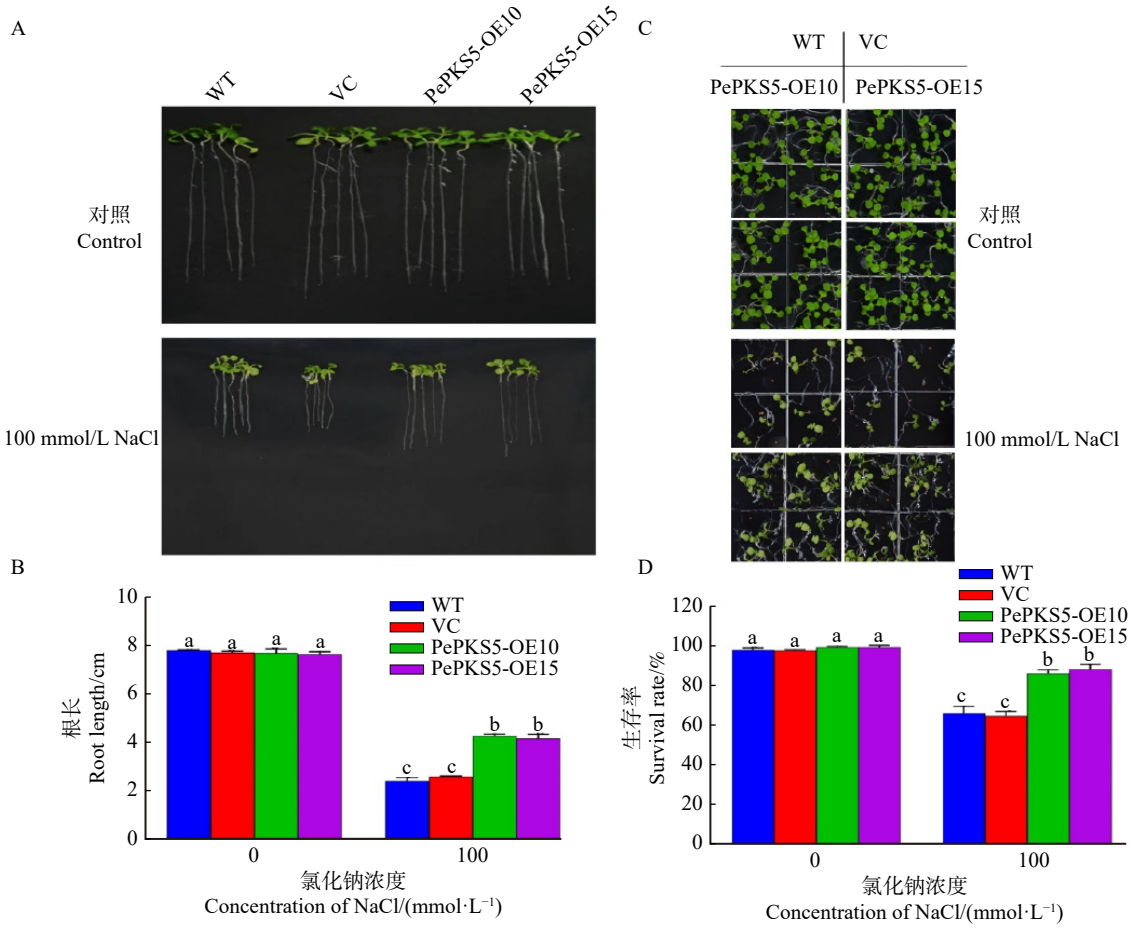


图 4 PePKS5 的亚细胞定位

Fig. 4 Subcellular localization of PePKS5



A. NaCl 对根系生长的影响；B.根系生长分析；C. NaCl 对幼苗生存率的影响；D.幼苗生存率统计分析。A, effects of NaCl on root growth; B, statistical analysis of root growth; C, effects of NaCl on seedling survival rate; D, statistical analysis of seedling survival rate.

图 5 NaCl 处理对拟南芥幼苗生存率和根长生长的影响

Fig. 5 Effects of NaCl treatment on seedling survival rate and root growth of *Arabidopsis thaliana*

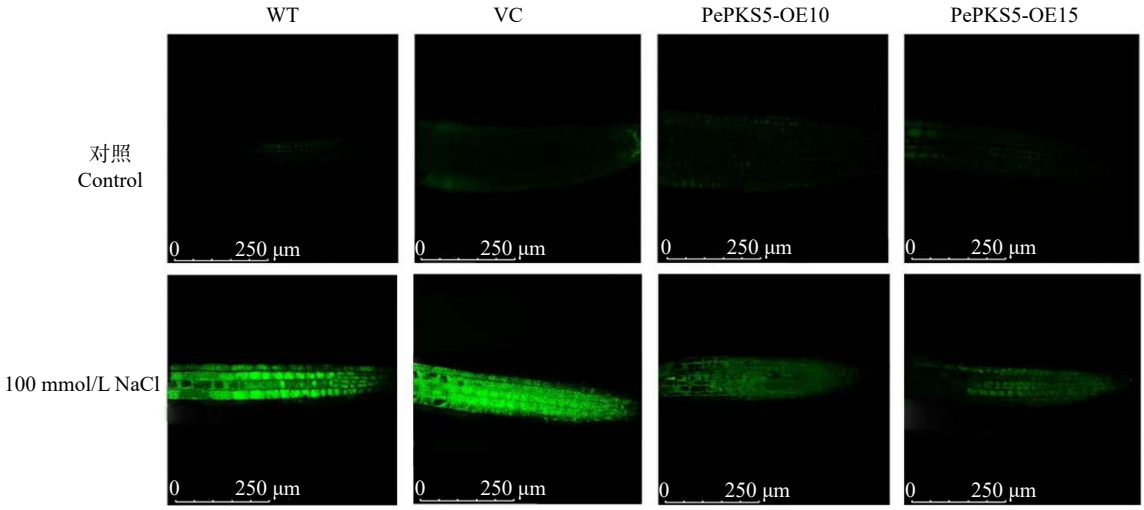


图 6　NaCl 处理对拟南芥根尖细胞 Na^+荧光强度的影响

Fig. 6　Effects of NaCl treatment on Na^+ fluorescence intensity in root tip cells of *Arabidopsis thaliana*

和 PePKS5-OE15 株系根尖 H_2O_2 含量较低且无显著差异。经 NaCl 处理后，各株系荧光强度增强，但 PePKS5-OE10 和 PePKS5-OE15 株系的荧光强度显著低于 WT 和 VC 株系，说明 NaCl 处理后，转基因株系根尖细胞中积累的 H_2O_2 更少(图 7)。

2.8　盐胁迫下拟南芥根尖离子流测定

Na^+流测定结果显示：无 NaCl 处理时，各株系拟南芥根尖 Na^+表现出轻微外流，且相差不大。经 NaCl 处理后，各株系 Na^+外流速度均大幅度提高，并且 PePKS5-OE10 和 PePKS5-OE15 株系的 Na^+外流速度显著高于 WT 和 VC 株系，说明 *PePKS5* 能显著提高拟南芥外排 Na^+的能力(图 8A)。

K^+流测定结果显示：无 NaCl 处理时，各株系拟南芥根尖 K^+表现出轻微内流，且相差不大。经 NaCl 处理后，各株系 K^+的内流现象明显增强，并且 PePKS5-OE10 和 PePKS5-OE15 株系的 K^+内流现象更为明显，说明 *PePKS5* 能够减少拟南芥根尖 K^+流失(图 8B)。

2.9　盐胁迫下拟南芥的抗氧化酶活性及基因表达量的变化

POD、CAT 和 SOD 活性测定结果显示：经 NaCl 处理后，PePKS5-OE10 和 PePKS5-OE15 株系的 POD 活性呈上升趋势，而 WT 和 VC 株系呈下降趋势(图 9A)；WT 和 VC 株系的 CAT 活性无明显变化，但 PePKS5-OE10 和 PePKS5-OE15 株系的 CAT 活性显著升高(图 9B)；WT 和 VC 株系的 SOD 活性无显著变化，但 PePKS5-OE10 和 PePKS5-OE15 株系的 SOD 活性略微下降(图 9C)。*APX*1、*CAT*2 和 *SOD*1 基因表达量测定结果显示：经 NaCl 处理后，WT 和 VC 株系的 *APX*1 和 *CAT*2 基因表达量无明显变化，但 PePKS5-OE10 和 PePKS5-OE15 株系的 *APX*1 和 *CAT*2 基因表达量显著提高(图 9D，E)；WT 和 VC 株系的 *SOD*1 基因表达量显著上升，但 PePKS5-OE10 和 PePKS5-OE15 株系的 *SOD*1 基因表达量略微下降(图 9F)。以上结果说明转基因株系的抗氧化能力较强，可以清除体内过多的 H_2O_2。

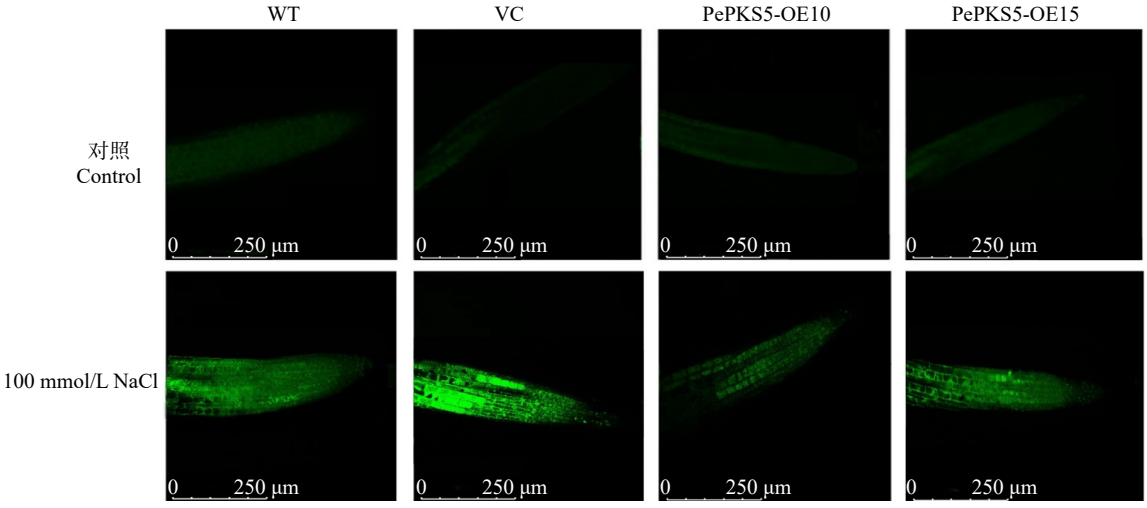
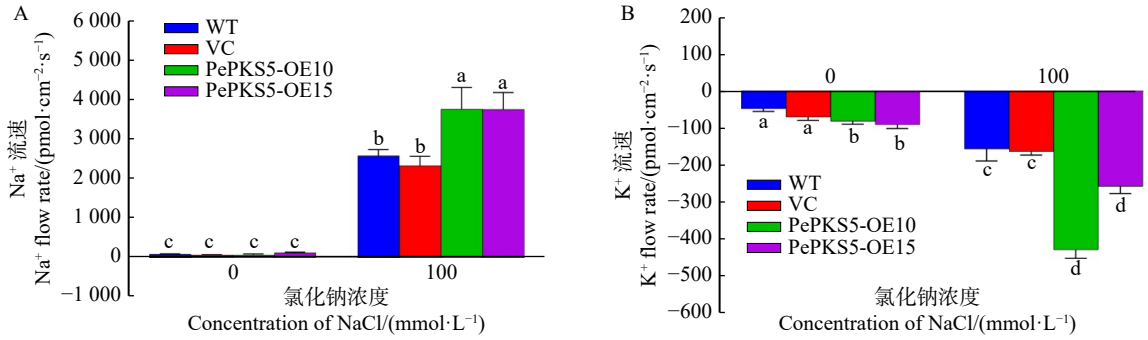


图 7　NaCl 处理对拟南芥根尖细胞 H_2O_2 荧光强度的影响

Fig. 7　Effects of NaCl treatment on H_2O_2 fluorescence intensity in root tip cells of *Arabidopsis thaliana*



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

图 8 NaCl 处理对拟南芥根尖 Na^+（A）和 K^+（B）离子流的影响

Fig. 8 Effects of NaCl treatment on Na^+ (A) and K^+ (B) fluxes in root tips of *Arabidopsis thaliana*

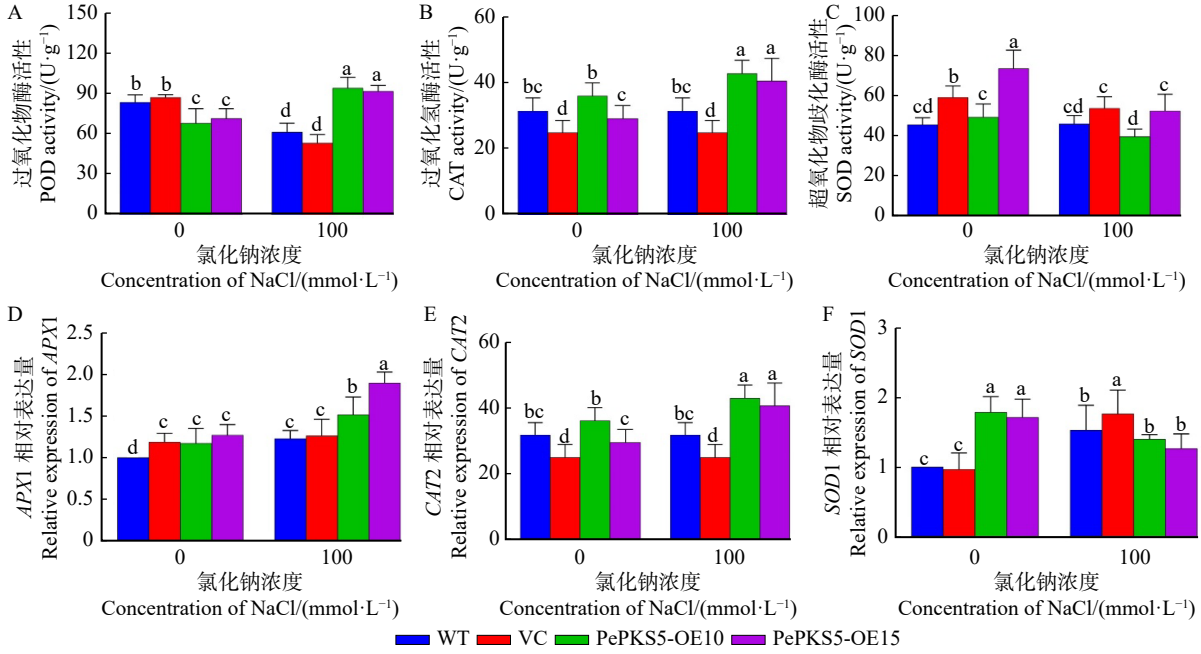
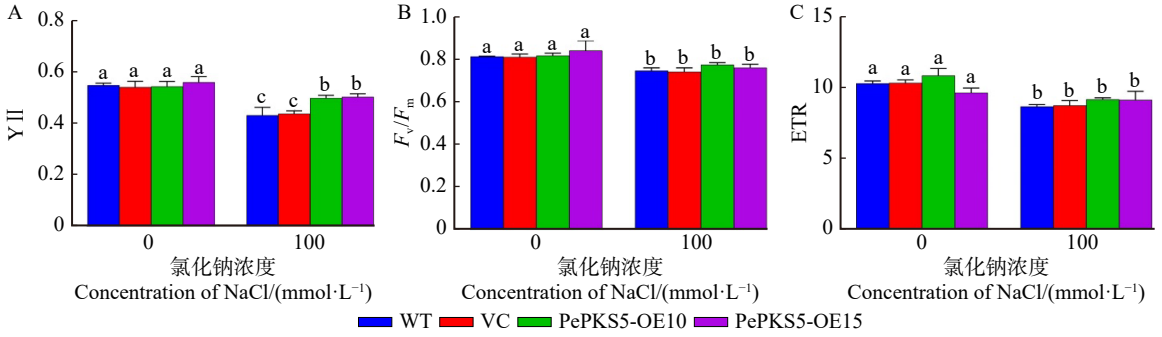


图 9 NaCl 处理对拟南芥抗氧化酶活性及相关基因表达量的影响

Fig. 9 Effects of NaCl treatment on the activity of antioxidant enzyme and the expression of related genes in *Arabidopsis thaliana*

2.10 盐胁迫下拟南芥叶绿素荧光参数和叶绿素相对含量变化

图 10 显示，无 NaCl 处理时，各株系拟南芥的叶绿素荧光参数没有明显差异。经 NaCl 处理 15 d 后，各株系拟南芥的叶绿素荧光参数均呈下降趋势，但 PePKS5-OE10 和 PePKS5-OE15 株系的实际光合量子产量高于 WT 和 VC 株系，说明转基因株系的捕光蛋白复合体在盐胁迫下破坏程度相对较小，光能转化效率较高，盐胁迫对转基因株系的光反应阶段影响较小。



YⅡ. 实际光合量子产量；F_v/F_m. PSⅡ最大光量子效率；ETR. 相对电子传递速率。YⅡ, actual photosynthetic quantum yield; F_v/F_m, maximum photochemical quantum efficiency of PSⅡ; ETR, relative electron transfer rate.

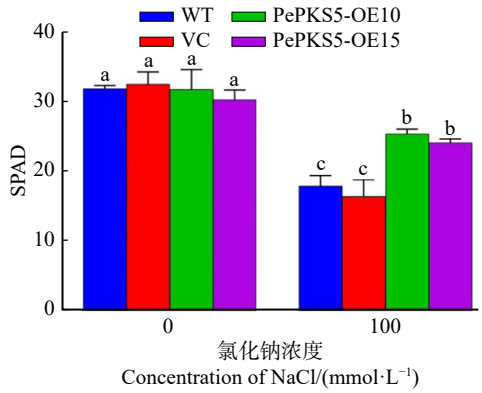
图 10 NaCl 处理对拟南芥叶绿素荧光参数的影响

Fig. 10 Effects of NaCl treatment on the chlorophyll fluorescence parameters of *Arabidopsis thaliana*

无 NaCl 处理时，各株系拟南芥的叶绿素相对含量没有显著差异。经 NaCl 处理 15 d 后，各株系拟南芥的叶绿素相对含量都有所下降，但 PePKS5-OE10 和 PePKS5-OE15 株系的叶绿素相对含量高于 WT 和 VC 株系，说明转基因株系的叶绿素合成过程受到的影响较小，对盐胁迫的耐受能力较强(图 11)。

2.11　盐胁迫下拟南芥的光合参数变化

无 NaCl 处理时，与 WT 和 VC 株系相比，PePKS5-OE10 和 PePKS5-OE15 株系的净光合速率(P_n)、蒸腾速率(T_r)和气孔导度(G_s)均存在显著差异。经 NaCl 处理 15 d 后，各株系拟南芥的 P_n 值均降低(图 12A)。G_s 与 T_r 成正比，经 NaCl 处理 15 d 后，PePKS5-OE10 和 PePKS5-OE15 株系的 T_r 和 G_s 保持相对稳定，而 WT 和 VC 株系的 T_r 和 G_s 显著上升(图 12B, D)，说明过表达 *PePKS5* 株系在盐胁迫下能保持相对稳定的蒸腾速率，减少植物的水分消耗。胞间二氧化碳浓度(C_i)与净光合作用有关，经 NaCl 处理 15 d 后，PePKS5-OE10 和 PePKS5-OE15 株系的 C_i 保持相对稳定，而 WT 和 VC 株系的 C_i 则显著升高(图 12C)，说明 WT 和 VC 株系的碳同化作用受到抑制，不能正常同化 CO_2，而转基因株系的碳同化作用保持相对稳定，在一定程度上能维持正常光合作用。



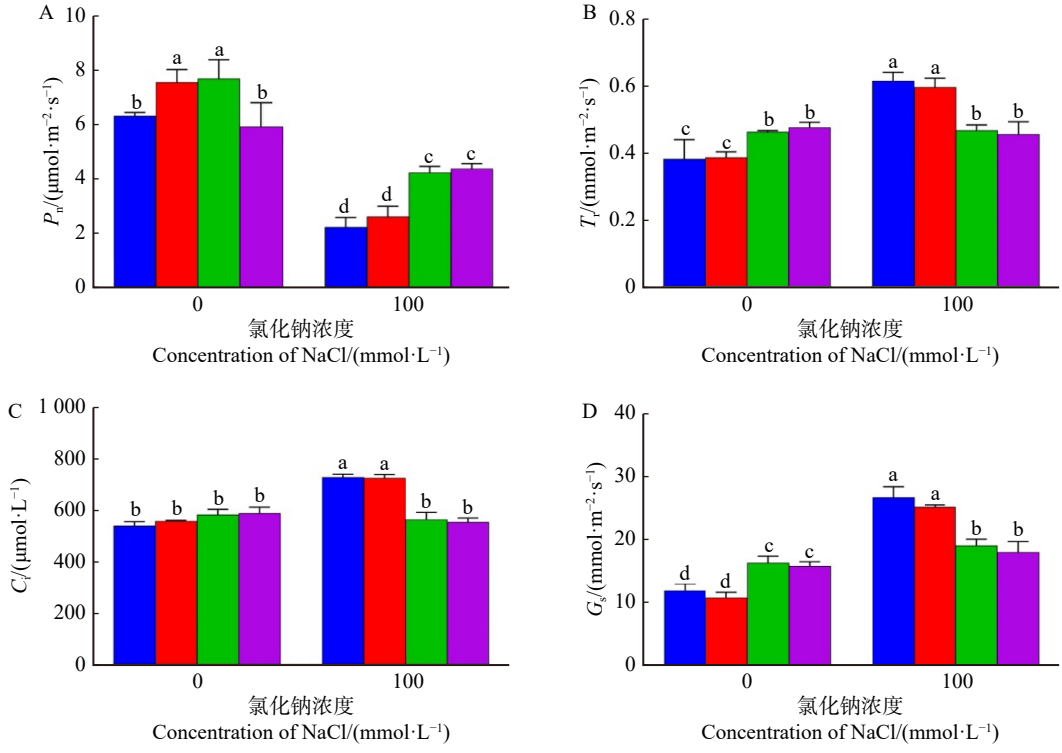
SPAD. 叶绿素相对含量。SPAD, relative chlorophyll content.

图 11　NaCl 处理对拟南芥叶绿素相对含量的影响

Fig. 11　Effects of NaCl treatment on the relative chlorophyll content in *Arabidopsis thaliana*

3　讨论与结论

盐处理 6 h 后胡杨叶片 *PePKS5* 基因表达量上调，72 h 后逐渐恢复至正常水平，说明胡杨 *PePKS5* 基因能对盐胁迫做出响应(图 2)。蛋白质的亚细胞定位与其功能密切相关，胡杨 PePKS5 定位于细胞核和细胞质中(图 4)，推测其可能在细胞核或细胞质中发挥功能。不同物种 PKS5 氨基酸序列的比对结果显示胡杨 PePKS5 在进化上较为保守，并且系统进化树分析结果显示胡杨 PePKS5 与毛白杨 PtPKS5



P_n. 净光合速率；T_r. 蒸腾速率；C_i. 胞间二氧化碳浓度；G_s. 气孔导度。P_n, net photosynthetic rate; T_r, transpiration rate; C_i, intercellular carbon dioxide concentration; G_s, stomatal conductance.

图 12　NaCl 处理对拟南芥光合参数的影响

Fig. 12　Effects of NaCl treatment on the photosynthetic parameters of *Arabidopsis thaliana*

家族亲缘关系最近(图 1A 和图 1B)。

为了探究胡杨 *PePKS5* 调节植物耐盐的生理与分子机制，本文从胡杨叶片中克隆得到 *PePKS5* 基因，将其在拟南芥中过表达并得到稳定转化的纯合体植株(图 3)。初步分析各株系拟南芥的耐盐表型发现：在盐胁迫下，过表达 *PePKS5* 拟南芥株系(PePKS5-OE10 和 PePKS5-OE15)的根长和生存率受到的抑制程度显著低于野生型(WT)和转空载体(VC)株系，说明过表达 *PePKS5* 拟南芥株系的耐盐性更强(图 5)。

盐胁迫导致植物根尖积累大量 Na^+，Na^+过度积累引起植物体内活性氧积累，并抑制体内抗氧化酶的活性[49]。SOD 能够催化超氧阴离子自由基歧化生成 H_2O_2，H_2O_2 可被 CAT 和 POD 分解成氧和水，使得 H_2O_2 不与 O^{2-}在铁螯合物作用下反应生成非常有害的—OH，从而使细胞免于遭受 H_2O_2 的毒害[50]。通过进一步分析盐胁迫下各株系拟南芥的生理及分子水平的生理指标发现：一方面，与 WT 和 VC 株系相比，过表达 *PePKS5* 拟南芥株系根尖 Na^+含量和 H_2O_2 含量较低(图 6 和图 7)，并且 Na^+外流和 K^+内流现象较为明显(图 8)。另一方面，过表达 *PePKS5* 拟南芥株系的 POD 和 CAT 的活性以及 *APX1* 和 *CAT2* 基因表达水平均显著高于 WT 和 VC 株系(图 9)。说明盐胁迫下过表达 *PePKS5* 拟南芥株系具有较强的排出 Na^+、吸收 K^+的能力及较强的分解 H_2O_2 的能力，从而降低了体内活性氧的积累，减弱了 H_2O_2 对抗氧化酶系统的损伤，增强了植物抗氧化能力，从而抵御盐胁迫带来的生理伤害。

盐胁迫会抑制植物对叶绿素的吸收和利用，影响类囊体的超微结构并破坏植物光合色素和光合膜系统[51]。叶绿素相对含量和叶绿素荧光参数能反映叶片吸收、传递和转换光能的能力，因此常被用作表示受到环境胁迫程度的生理指标[52]。对盐胁迫下各株系拟南芥的光合作用指标进行分析发现：一方面，过表达 *PePKS5* 拟南芥株系的叶绿素相对含量、PSⅡ最大光量子效率、实际光合量子产量和相对电子传递速率均显著高于 WT 和 VC 株系(图 10 和图 11)，说明盐胁迫下过表达 *PePKS5* 拟南芥株系的叶绿素合成和光合电子传递过程受到的影响相对较小，光能转化效率相对较高。另一方面，过表达 *PePKS5* 拟南芥株系的净光合速率相对较高，而胞间 CO_2 浓度、气孔导度、蒸腾速率均低于 WT 和 VC 株系(图 12)，说明盐胁迫下过表达 *PePKS5* 拟南芥株系能通过调节气孔开度，减少对水分的消耗，保持较稳定的碳同化能力，从而维持相对稳定的光合作用和蒸腾作用。

综上，本文从离子平衡、活性氧平衡及光合作用 3 个角度对胡杨 *PePKS5* 基因的耐盐性进行研究，得出结论：过表达 *PePKS5* 提高了转基因拟南芥的耐盐性，主要通过增强 Na^+的外排能力，维持活性氧平衡状态，以及保持相对稳定的光合作用能力。本研究初步明确了胡杨 *PePKS5* 在植物响应盐胁迫中的作用，为培育优良的耐盐杨树品种、拓展其在生态修复中的应用、有效提升盐碱地治理效果提供了参考。

目前对于 PKS5 在植物响应盐胁迫中的作用研究较少。Fuglsang 等[41]发现：拟南芥 PKS5 是质膜 H^+-ATP 酶的负调节因子，在拟南芥对盐胁迫的耐受性中起负向调控作用。胡杨 PKS5 与拟南芥 PKS5 的功能不一致，推测可能是由于胡杨与拟南芥亲缘关系较远而导致彼此功能不同。因此，胡杨 *PePKS5* 调控体内活性氧平衡及离子平衡的机制还有待更深一步的研究。后续研究一方面可以在胡杨中验证 *PePKS5* 基因的功能，另一方面可以鉴定出与 PePKS5 相互作用的底物蛋白，在转录调控与翻译后修饰的分子水平上，建立 PePKS5 参与调节胡杨耐盐的信号通路，并阐明 PePKS5 调控胡杨耐盐的分子机理。

参 考 文 献

[1] Zhu J K. Plant salt tolerance[J]. Trends Plant Science, 2001, 6(2): 66−71.

[2] Flowers T J, Colmer T D. Plant salt tolerance: adaptations in halophytes[J]. Annals of Botany, 2015, 115(3): 327−331.

[3] Zhu J K, Hasegawa P M, Bressan R A. Molecular aspects of osmotic stress in plants[J]. Plant Science, 1996, 16(2): 253−277.

[4] Chung J S, Zhu J K, Bressan R A, et al. Reactive oxygen species mediate Na^+-induced SOS1 mRNA stability in arabidopsis[J]. Plant Journal, 2008, 53(3): 554−565.

[5] Rentel M C, Knight M R. Oxidative stress-induced calcium signaling in Arabidopsis[J]. Plant Physiology, 2004, 135(3): 1471−1479.

[6] Sun J, Li L, Liu M, et al. Hydrogen peroxide and nitric oxide mediate K^+/Na^+ homeostasis and antioxidant defense in NaCl-stressed callus cells of two contrasting poplars[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2010, 103(2): 205−215.

[7] Qiao W, Fan L M. Nitric oxide signaling in plant responses to abiotic stresses[J]. Plant Biology, 2008, 50(10): 1238−1246.

[8] Kim S Y, Sivaguru M, Stacey G. Extracellular ATP in plants. visualization, localization, and analysis of physiological significance in growth and signaling[J]. Plant Physiology, 2006, 142(3): 984−992.

[9] Zhu J K, Liu J, Xiong L X. Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*: evidence for a critical role for potassium nutrition[J]. Plant Cell, 1998, 10(7): 1181−1191.

[10] Xiong L, Zhu J K. Abiotic stress signal transduction in plants: molecular and genetic perspectives[J]. Plant Physiology, 2001, 112(2): 152−166.

[11] Munnik T, Meijer H G. Osmotic stress activates distinct lipid and MAPK signaling pathways in plants[J]. FEBS Letters, 2001, 498(2−3): 172−178.

[12] Mizoguchi T, Ichimura K, Yoshida R, et al. MAP kinase cascades in Arabidopsis: their roles in stress and hormone responses[J]. Results and Problems of Cell Differentiation, 2000, 27: 29−38.

[13] Wang F Z, Wen J, Zhang W H. The mitogen-activated protein kinase cascade MKK1-MPK4 mediates salt signaling in rice[J]. Plant Science, 2014, 227: 181−189.

[14] Goff K E, Raminell K M. The role and regulation of receptor-like kinases in plant defense[J]. Gene Regulation and Systems Biology, 2007, 1: 167−175.

[15] Zhou Y B, Liu C, Tang D Y, et al. The receptor-like cytoplasmic kinase STRK1 phosphorylates and activates CatC, thereby regulating H_2O_2 homeostasis and improving salt tolerance in rice[J]. Plant Cell, 2018, 30(5): 1110−1118.

[16] Miyata K, Hayafune M, Kobae Y, et al. Evaluation of the role of the LysM receptor-like kinase, OsNFR5/OsRLK2 for AM symbiosis in rice[J]. Plant Cell, 2017, 57(11): 2283−2290.

[17] Sheen J. Ca^{2+} dependent protein kinases and stress signal transduction in plants[J]. Science, 1996, 274: 1900−2000.

[18] Sun J, Dai S, Wang R, et al. Calcium mediates root K^+/Na^+ homeostasis in poplar species differing in salt tolerance[J]. Tree Physiology, 2009, 29(9): 1175−1186.

[19] Sun J, Wang M J, Ding M Q, et al. H_2O_2 and cytosolic Ca^{2+} signals triggered by the PM H^+-coupled transport system mediate K^+/Na^+ homeostasis in NaCl-stressed *Populus euphratica* cells[J]. Plant Cell Environ, 2010, 33(6): 943−958.

[20] Asano T, Hayashi N, Kobayashi M, et al. A rice calcium-dependent protein kinase OsCPK12 oppositely modulates salt-stress tolerance and blast disease resistance[J]. Plant Journal, 2012, 69(1): 26−36.

[21] Zhu J K. Salt and drought stress signal transduction in plants[J]. Plant Biology, 2002, 53: 247−273.

[22] Zhu J K. Regulation of ion homeostasis under salt stress[J]. Plant Biology, 2003, 6(5): 441−445.

[23] Yang Q, Chen Z, Zhou X F, et al. Overexpression of SOS (salt overly sensitive) genes increases salt tolerance in transgenic Arabidopsis[J]. Molecular Plant, 2009, 2(1): 22−31.

[24] Quan R, Lin H, Mendoza I, et al. SCABP8/CBL10, a putative calcium sensor, interacts with the protein kinase SOS2 to protect Arabidopsis shoots from salt stress[J]. Plant Cell, 2007, 19(4): 1415−1431.

[25] Sun T, Wang Y, Wang M, et al. Identification and comprehensive analyses of the CBL and CIPK gene families in wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. BMC Plant Biology, 2015, 15: 269.

[26] Ma Y L, Cao J, Chen Q Q, et al. The Kinase CIPK11 functions as a negative regulator in drought stress response in arabidopsis[J]. Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(10): 24−29.

[27] Gu S B, Wang X, Bai J Y, et al. The kinase CIPK11 functions as a positive regulator in cadmium stress response in arabidopsis[J]. Gene, 2021, 772: 175−189.

[28] Yang Y Q, Wu Y J, Ma L, et al. The Ca^{2+} Sensor SCaBP3/CBL7 modulates plasma membrane H^+-ATPase activity and promotes alkali tolerance in Arabidopsis[J]. The Plant Cell, 2019, 31(6): 1367−1384.

[29] Liu J, Guo Y. The alkaline tolerance in arabidopsis requires microfilament partially through inactivation of PKS5 kinase[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2011, 38(7): 307−313.

[30] Koornneef M, Léon-Kloosterziel K M, Schwartz S H, et al. The genetic and molecular dissection of abscisic acid biosynthesis and signal transduction in arabidopsis[J]. Plant Physiology, 1998, 36(6): 83−89.

[31] Liotenberg S, North H, Marion-Poll A. Molecular biology and regulation of abscisic acid biosynthesis in plants[J]. Plant Physiology, 1999, 37(6): 359−369.

[32] Zhou X N, Deng X W, Guo Y. PKS5, a SNF1-related kinase, interacts with and phosphorylates NPR1, and modulates expression of WRKY38 and WRKY62[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2010, 37(6): 359−369.

[33] Zhou X N, Hao H M, Guo Y. SOS2-like protein kinase5, an SNF1-related protein kinase3-type protein kinase, is important for abscisic acid responses in arabidopsis through phosphorylation of abscisic acid-insensitive[J]. Plant Physiology, 2015, 168(2): 659−676.

[34] Ishitani M, Liu J, Zhu J K, et al. SOS3 function in plant salt tolerance requires myristoylation and calcium-binding[J]. Plant Cell, 2000, 12(9): 1667−1678.

[35] Du W, Lin H, Chen S, et al. Phosphorylation of SOS3-like calcium-binding proteins by their interacting SOS2-like protein kinases is a common regulatory mechanism in arabidopsis[J]. Plant Physiology, 2011, 156(4): 2235−2243.

[36] Liu J, Kim C S, Zhu J K, et al. The *Arabidopsis thaliana SOS*2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance[J]. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 2000, 97(7): 3730−3734.

[37] Wu S J, Lei D, Zhu J K. SOS1, a genetic locus essential for salt tolerance and potassium acquisition[J]. Plant Cell, 1996, 8(4): 617−627.

[38] Shi H, Quintero F J, Zhu J K. The putative plasma membrane Na^+/H^+ antiporter SOS1 controls long distance Na^+ transport in plants[J]. Plant Cell, 2002, 14(2): 223−250.

[39] Zhou H, Lin H, Chen S, et al. Inhibition of the arabidopsis salt overly sensitive pathway by 14-3-3 proteins[J]. Plant Cell, 2014, 26(3): 1166−1182.

[40] Yang Z J, Wang C W, Xue Y, et al. Calcium-activated 14-3-3 proteins as a molecular switch in salt stress tolerance[J]. Nature Communications, 2019, 10: 1199.

[41] Fuglsang A T, Guo Y, Cuin T A, et al. Arabidopsis protein kinase PKS5 inhibits the plasma membrane H^+-ATPase by preventing interaction with 14-3-3 protein[J]. Plant Cell, 2007, 19(5):

1617−1634.

[42] Xie C G, Lin H X, Deng X W, et al. Roles of SCaBP8 in salt stress response[J]. Plant Signaling & Behavior, 2009, 4(10): 956−958.

[43] 张一南, 王洋, 张会龙, 等. 过表达胡杨 *PeRIN*4 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 *PeRIN*4 enhanced salinity tolerance through up-regulation of PM H^+-ATPase in *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2017, 39(11): 1−8.

[44] 邓佳音, 张艳丽, 张一南, 等. 胡杨 *PeAPY*1 和 *PeAPY*2 调控拟南芥耐盐机制研究 [J]. 北京林业大学学报, 2017, 39(6): 13−21.
Deng J Y, Zhang Y L, Zhang Y N, et al. *PeAPY*1 and *PeAPY*2 of *Populus euphratica* regulating salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2017, 39(6): 13−21.

[45] 张会龙, 武霞, 尧俊, 等. 胡杨 *PeREM*1.3 过表达提高烟草耐盐性的机制 [J]. 北京林业大学学报, 2019, 41(1): 1−9.
Zhang H L, Wu X, Yao J, et al. Overexpression mechanism of *PeREM*1.3 from *Populus euphratica* enhancing salt tolerance in transgenic tobacco[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2019, 41(1): 1−9.

[46] Zhang H, Deng C, Yao J, et al. *Populus euphratica JRL* mediates ABA response, ionic and ROS homeostasis in arabidopsis under salt stress[J]. International Journal of Molecular Science, 2019, 20(4): 815.

[47] Zhang Y N, Wang Y, Sa G, et al. *Populus euphratica J*3 mediates root K^+/Na^+ homeostasis by activating plasma membrane H^+-ATPase in transgenic arabidopsis under NaCl salinity[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2017, 131(1): 75−88.

[48] Sang-Youl P, 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: 1068−1071.

[49] Acosta-Motos J R, Ortuño M F, Bernal-Vicente A, et al. Plant responses to salt stress: adaptive mechanisms[J]. Agronomy, 2017, 7(1): 18.

[50] Tewari R K, Kumar P, Sharma P N. Antioxidant responses to enhanced generation of superoxide anion radical and hydrogen peroxide in the copper-stressed mulberry plants[J]. Planta, 2006, 233(6): 1145−1153.

[51] Sudhir P, Murthy S D. Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis[J]. International Journal for Photosynthesis Research, 2004, 42(4): 481−486.

[52] Lang Y, Wang M, Zhang G C, et al. Experimental and simulated light responses of photosynthesis in leaves of three tree species under different soil water conditions[J]. Photosynthetica, 2013, 51: 370−378.

（责任编辑 范 娟 赵田芸
责任编委 康向阳）