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

胡杨*PeHINT2*过表达提高植物耐盐性

代新仁 杨艳飞 任星榕 马庆华 李建波

Overexpression of *Populus euphratica PeHINT2* to enhance plant salt tolerance

Dai Xinren, Yang Yanfei, Ren Xingrong, Ma Qinghua, Li Jianbo

引用本文:
代新仁, 杨艳飞, 任星榕, 马庆华, 李建波. 胡杨*PeHINT2*过表达提高植物耐盐性[J]. 北京林业大学学报, 2025, 47(10):96–107. doi: 10.12171/j.1000–1522.20250262
Dai Xinren, Yang Yanfei, Ren Xingrong, Ma Qinghua, Li Jianbo. Overexpression of *Populus euphratica PeHINT2* to enhance plant salt tolerance[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2025, 47(10):96–107. doi: 10.12171/j.1000–1522.20250262

在线阅读 View online: https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20250262

您可能感兴趣的其他文章
Articles you may be interested in

过表达胡杨*PeCPK7*提高拟南芥耐盐性
Overexpression of *Populus euphratica PeCPK7* enhancing salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*
北京林业大学学报, 2024, 46(11): 62–75. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20230302

过表达胡杨*PePKS5*提高拟南芥耐盐性
Overexpression of *Populus euphratica PePKS5* enhancing salt tolerance of *Arabidopsis thaliana*
北京林业大学学报, 2024, 46(2): 62–74. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20220480

胡杨*PeCSP1*过表达负调控拟南芥耐盐性
Overexpression of *Populus euphratica PeCSP1* negatively regulating salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*
北京林业大学学报, 2023, 45(7): 9–17. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20220020

胡杨*PeREM6.5*调控拟南芥水分胁迫耐受机制
Populus euphratica PeREM6.5 regulating tolerance mechanism to water stress in *Arabidopsis thaliana*
北京林业大学学报, 2022, 44(9): 40–51. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20210195

过表达胡杨*PEPKR2*负调控拟南芥的镉耐受性
Overexpression of *Populus euphratica PEPKR2* negatively regulates cadmium tolerance in *Arabidopsis thaliana*
北京林业大学学报, 2025, 47(4): 21–36. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20240376

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

DOI:10.12171/j.1000−1522.20250262

胡杨 *PeHINT2* 过表达提高植物耐盐性

代新仁[1,2] 杨艳飞[3] 任星榕[3] 马庆华[1] 李建波[1]

（1. 中国林业科学研究院华北林业实验中心，北京 102300；2. 中国林业科学研究院林木遗传育种全国重点实验室，北京 100091；3. 山西农业大学林学院，山西 太谷 030801）

摘要:【目的】胡杨因其显著的耐盐能力成为耐盐机理研究的模式物种，然而目前已知基因数量仍不足以解析其完整的耐盐调控网络。本研究拟通过鉴定并探究胡杨 *PeHINT2* 基因在盐胁迫中的作用，旨在为胡杨耐盐分子调控机制的解析和林木抗逆分子育种奠定理论基础。**【方法】**从胡杨中克隆 *PeHINT2* 基因并分析其蛋白序列特征，构建进化树并进行亚细胞定位，采用农杆菌介导的花序浸染法和叶盘转化法将 *PeHINT2* 基因分别转化拟南芥和 84K 杨，从表型、生理和分子水平上对比分析过表达 *PeHINT2* 对植物耐盐性的影响。**【结果】**(1)胡杨 PeHINT2 属于 HINT2 亚家族，携带典型“His-X-His-X-His-XX”组氨酸三联体结构，与毛果杨和拟南芥的 HINT2 亲缘关系最近。(2)亚细胞定位结果显示 PeHINT2 定位在叶绿体中。(3)通过对胡杨组培苗进行盐胁迫处理发现，*PeHINT2* 表达量明显升高，且随着处理时间的增加，*PeHINT2* 表达量呈现先上升后下降的趋势。(4)盐胁迫下，过表达 *PeHINT2* 的拟南芥株系叶片生长、根长和鲜质量均显著优于野生型拟南芥，转基因杨的株高和地径降幅亦显著低于野生型杨树。(5)*PeHINT2* 的过表达能增强盐胁迫下杨树 PSⅡ的光合电子传递效率、实际光化学效率、光合作用效率和对光的适应能力，并通过减少活性氧积累、提升超氧化物歧化酶、过氧化物酶和过氧化氢酶等抗氧化酶活性来缓解氧化损伤。(6)盐胁迫下，过表达 *PeHINT2* 杨树中氧化还原系统相关基因 *CSD2*、*APX2*、*FNR* 和 *NTRC* 的表达量显著提高，表明 *PeHINT2* 可能通过影响这 4 个基因的表达进而调控转基因杨树在盐胁迫下的抗氧化能力。**【结论】***PeHINT2* 能够响应盐胁迫，可能通过提高叶绿体光合效率和增强其抗氧化调节能力，进而提升植株耐盐性。本研究不仅为解析胡杨 *PeHINT2* 功能提供了重要依据，并为林木耐盐种质资源的育种改良提供了关键的基因靶点。

关键词：胡杨；*PeHINT2*；过表达；盐胁迫；84K 杨；拟南芥；抗逆育种

中图分类号：S718.46；S792.11 **文献标志码：**A **文章编号：**1000−1522(2025)10−0096−12

引文格式：代新仁，杨艳飞，任星榕，等. 胡杨 *PeHINT2* 过表达提高植物耐盐性［J］. 北京林业大学学报，2025，47(10)：96−107. Dai Xinren, Yang Yanfei, Ren Xingrong, et al. Overexpression of *Populus euphratica PeHINT2* to enhance plant salt tolerance［J］. Journal of Beijing Forestry University, 2025, 47(10): 96−107.

Overexpression of *Populus euphratica PeHINT2* to enhance plant salt tolerance

Dai Xinren[1,2] Yang Yanfei[3] Ren Xingrong[3] Ma Qinghua[1] Li Jianbo[1]

(1. Experimental Centre of Forestry in North China, Chinese Academy of Forestry, Beijing 102300, China;
2. State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China;
3. College of Forestry, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi, China)

Abstract:［**Objective**］*Populus euphratica*, renowned for its exceptional salt tolerance, serves as a model for understanding salt stress mechanisms. However, the currently identified genes remain insufficient to fully elucidate the regulatory network underlying its salt tolerance. This study aims to identify and investigate the

收稿日期: 2025−07−09 **修回日期:** 2025−07−21

基金项目: 林木遗传育种全国重点实验室基本科研业务费(TGBFRF202402)。

第一作者: 代新仁，助理研究员。主要研究方向：林木重要性状形成的分子机制。Email：xinrend@caf.ac.cn 地址：100091 北京市海淀区东小府 1 号中国林业科学研究院林木遗传育种全国重点实验室。

责任作者: 李建波，副研究员。主要研究方向：林木重要性状形成的分子机制。Email：lijb2017@caf.ac.cn 地址：102300 北京市门头沟区水闸西路 1 号华北林业实验中心。

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

function of *PeHINT*2 gene of *P. euphratica* under salt stress, with the goal of providing a theoretical foundation for elucidating the molecular regulatory mechanisms of salt tolerance and advancing molecular breeding for stress resistance in forest. [**Method**] The *PeHINT*2 gene was cloned from *P. euphratica*, and its protein sequence features were analyzed. A phylogenetic tree was constructed and subcellular localization was determined. Using *Agrobacterium*-mediated floral-dip and leaf-disc transformation, *PeHINT*2 was introduced separately into *Arabidopsis thaliana* and 84K poplar. The effects of *PeHINT*2 overexpression on plant salt tolerance were then comparatively analyzed at phenotypic, physiological, and molecular levels. [**Result**] (1) *PeHINT*2 belongs to the HINT2 subfamily and carries the typical "His-X-His-X-His-XX" histidine triad motif, showing the closest phylogenetic relationship to HINT2 from *Populus trichocarpa* and *Arabidopsis thaliana*. (2) Subcellular localization revealed that *PeHINT*2 was targeted to chloroplast. (3) Under salt stress, the expression of *PeHINT*2 in tissue-culture seedlings of *P. euphratica* increased significantly, showing a rise-then-fall pattern as treatment time progressed. (4) Under salt stress, *Arabidopsis thaliana* lines overexpressing *PeHINT*2 exhibited significantly greater leaf growth, root length, and fresh mass than wild type, and the reductions in plant height and stem diameter of transgenic poplars were also markedly smaller than those of wild-type poplars. (5) Overexpression of *PeHINT*2 enhanced the efficiency of PSII electron transport, actual photochemical efficiency, photosynthetic performance, and light adaptability in poplar under salt stress, while alleviating oxidative damage by reducing reactive oxygen species accumulation and increasing the activities of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase, peroxidase and catalase. (6) Expression levels of redox-related genes (*CSD*2, *APX*2, *FNR*, and *NTRC*) were significantly up-regulated in *PeHINT*2-overexpressing poplars under salt stress, indicating that *PeHINT*2 may regulate antioxidant capacity by influencing these genes. [**Conclusion**] *PeHINT*2 responds to salt stress and may enhance plant salt tolerance by improving chloroplast photosynthetic efficiency and strengthening antioxidant regulation. This study provides important evidence for elucidating the function of *PeHINT*2 and offers a key genetic target for the breeding and improvement of salt-tolerant forest germplasm.

Key words: *Populus euphratica*; *PeHINT*2; overexpression; salt stress; 84K poplar; *Arabidopsis thaliana*; stress-resistant breeding

胡杨(*Populus euphratica*)是我国西北荒漠盐碱地区的优势树种，其在固定沙丘、农田林网建设、防风固沙等方面具有不可替代的作用。与其他杨树相比，胡杨以其极高的耐旱性和耐盐性而闻名，能在450 mmol/L NaCl 胁迫下保持正常生长，是研究木本植物耐盐机制的理想模型[1]。尽管通过基因组学及全基因组关联分析(GWAS)已鉴定出 *PeERF*1[2]、*DBRH*57[3]、*PePKS*5[4]、*PeBZR*1[5]和 *GLABRA*3[6]等胡杨耐盐相关基因，但目前已知基因数量仍不足以解析其完整的耐盐网络。深入探究胡杨耐盐基因在离子转运、渗透调节及抗氧化防御中的作用机制，将为耐盐林木育种提供关键理论支撑。

组氨酸三联体核苷酸结合蛋白(histidine triad nucleotide-binding protein，HINT)属于古老的 HIT 超家族，作为高度保守的核苷酸结合蛋白分支，广泛存在于动物、真菌和植物等生物中[7−8]。HINT 最初从牛脑中分离并被鉴定为潜在的蛋白激酶 C 抑制剂(inhibitor of protein kinase C，PKCI)[9]。后续研究[10−11]发现该蛋白含有保守的 His-X-His-X-His(HIT)基序，并具有结合和水解腺苷和 AMP 等核苷酸的能力，因此被重新命名为 HINT。在哺乳动物中，人和小鼠基因组均包含多个 *HINT* 同源基因。人类已知存在 3 种 HINT 蛋白：HINT1(主要定位于细胞质)、HINT2(定位于线粒体)和 HINT3(定位于细胞核)。目前研究较多的是 HINT1 和 HINT2：HINT1 具有肿瘤抑制和 DNA 损伤应答作用，其在神经系统中的作用日益受到关注[12]；HINT2 在肝脏、胰腺和肾上腺中高表达，作为线粒体蛋白参与调控线粒体依赖性凋亡、蛋白质乙酰化以及类固醇生成等过程[13]。

植物 HINT 蛋白的研究相对较少，其中玉米(*Zea mays*)*Zm-HINT*1 是当前研究较为深入的植物 *HINT* 同源基因。Wu 等[14]研究表明，Zm-HINT1 定位在细胞核；*Zm-HINT*1 的表达量在水杨酸(salicylates，SA)或茉莉酸(jasmonic acid，JA)处理后显著上调；在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中异源过表达 *Zm-HINT*1 可显著增强植株对禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)的抗性。Zu 等[8]进一步报道，过表达 *Zm-HINT*1 的拟南芥对盐胁迫和干旱胁

迫也表现出更强的耐受性；胁迫处理后，过表达植株积累了更多脯氨酸，具有更高的超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）活性，同时丙二醛（malondialdehyde，MDA）和过氧化氢（H_2O_2）含量更低，表明 Zm-HINT1 可能通过调控渗透平衡和抗氧化途径参与植物逆境响应。此外，在甘蔗（*Saccharum officinarum*）中研究发现 ScHINT1 可能通过形成 ScHINT1-SBT-PAL 功能模块，调控活性氧（reative oxygen species，ROS）水平，进而影响甘蔗茎尖分生组织的生殖转换。这初步揭示了非生物胁迫（如光周期、干旱）与开花信号之间的联系，为作物环境适应性研究提供了新视角[15]。在盐地碱蓬（*Suaeda salsa*）中研究发现，硝酸盐转运体 SsNRT1.1C 通过与 SsHINT1 互作，调控 K^+/Na^+比值和 SOS 信号通路，以增强耐盐性[16]。值得注意的是，在水稻（*Oryza sativa*）[17]、拟南芥[17]和绿豆[18]（*Vigna radiata*）中均发现 HINT1 蛋白定位于过氧化物酶体，这一亚细胞定位结果在动物或酵母的 HINT 蛋白中尚未见报道。

前期研究通过对胡杨进行全基因组重测序和 GWAS 分析，鉴定出 38 个与胡杨种子耐盐性显著相关的单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphism，SNP）。后续功能验证实验证实，*PeuDBRH57* 和 *CCG*029559 在拟南芥中过表达能显著提高转基因植株的耐盐性[6]。本研究基于上述工作，聚焦于另一个 GWAS 显著关联 SNP 位点对应的基因 *CCG*022 381（*PeHINT*2）。本研究拟通过克隆胡杨 *PeHINT*2，对其进行生物信息学分析、亚细胞定位和表达模式研究，并采用农杆菌介导的花序浸染法和叶盘转化法将 *PeHINT*2 基因分别转化拟南芥和 84K 杨（*Populus alba* × *P. glandulosa*），从表型、生理和分子水平上系统地解析过表达 *PeHINT*2 对植物耐盐性的影响，进而揭示胡杨 *PeHINT*2 在盐胁迫响应过程中的功能。研究结果将为解析胡杨 *PeHINT*2 功能提供重要依据，并为林木耐盐种质资源的育种改良提供关键的基因靶点。

1 材料与方法

1.1 实验材料

胡杨材料取自新疆塔里木胡杨林公园，拟南芥和 84K 杨（*Populus alba* × *P. glandulosa*）材料均种植于中国林业科学研究院华北林业实验中心温室，生长条件均为 16 h 光照/8 h 黑暗，培养温度 25 ℃。

1.2 研究方法

1.2.1 目的基因的克隆与生物信息学分析

使用 RNeasy Plant Mini Kit（Qiagen）提取胡杨叶片的总 RNA，并通过 FastKing cDNA 第一链合成试剂盒（天根生化），将总 RNA 反转录为 cDNA，稀释 40 倍作为 PCR 模板。将胡杨 *PeHINT*2 基因（CCG022381）测序序列与毛果杨中同源基因（Potri.015G124700）进行序列比对，后根据 *PeHINT*2 序列使用 primer 5.0 软件设计引物 PeHINT2-F 和 PeHINT2-R（表 1），通过 PCR 进行基因全长扩增。利用胶回收试剂盒（诺唯赞）进行产物回收，将回收得到的目的片段连接 pMD19-T 载体（Takara），连接产物转化大肠杆菌 DH5α，挑取单克隆进行菌落 PCR 验证，阳性菌落测序鉴定。

将 *PeHINT*2 的氨基酸序列进行 NCBI BLASTP（https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi）和 phytozome BLASTP（https://phytozome-next.jgi.doe.gov/blast-search）比对，选取毛果杨（*P. trichocarpa*）、拟南芥和玉米的同源 HINT 蛋白序列，并选取已发表文章的甘蔗 ScHINT1 序列[15]，使用 DNAMAN 7.0 进行蛋

表 1 引物名称及序列

Tab. 1 Primer names and sequences

引物名称	引物序列
PeHINT2-F	ATGGCTGCAATTGGGTCTTT
PeHINT2-R	TTAACCAGGCGGCCATTTC
qRT-PeHINT2-F	GGAGCTCCAACCATTTTTGA
qRT-PeHINT2-R	CCCAACACCTCTCCATGTCT
PeHINT2ox-F	GGACTCTTGACCATGATGGCTGC AATTGGGTCTTT
PeHINT2ox-R	TTCTCCTTTACTAGTTTAACCAG GCGGCCATTTC
qFNR-F	GGTTGTAGTTTTTGGCTAGAAAATCC
qFNR-R	GTGTGCTTGAAACTGAAAGATTC
qNTRC-F	ATCACAAAGCATAAGGGCCAG
qNTRC-R	TCCAGCTGCTTCTGCTATCTC
qPRXA-F	TGCCTGGGCAGTATAATCAGC
qPRXA-R	AGCCCACCCAAATCTCAGTC
qPRXB-F	AGGTCCATTGACTCCTGCAAC
qPRXB-R	TGGGAAGCAGGTAGAGTGTTC
qCSD2-F	CCATCAGGGGAACTTCTTCA
qCSD2-R	AATCCCAAACAAGGGGATTC
qAPX2-F	GGCATTCTGCTGGTACGTTT
qAPX2-R	GACCTTCTGGAGGTGGATCA
α-actin-F	ACCCTCCAATCCAGACACTG
α-actin-R	TTGCTGACCGTATGAGCAAG
Hyg-F	ATTGACTGGAGCGAGGCG
Hyg-R	CTTCTGCGGGCGATTTGT

注：下划线为载体同源臂序列。

白多序列比对，利用 MEGA 11.0 软件构建进化树。利用 Cell-PLoc 2.0（http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/）和 BUSCA（http://busca.biocomp.unibo.it/）进行亚细胞定位预测。

1.2.2　盐胁迫下 *PeHINT2* 基因的表达分析

为了确定胡杨 *PeHINT2* 是否可在其苗期响应盐胁迫，将正常生长的胡杨组培苗转移至含有 100 mmol/L NaCl 的液体培养基中分别处理 1 h、6 h 和 12 h，采用实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）检测不同处理时间下的 *PeHINT2* 表达量。采集不同处理组的胡杨组培苗叶片，经液氮快速冷冻后，保存于−80 ℃冰箱中，后提取总 RNA，并反转录成 cDNA。利用 TBtools-Ⅱ v2.119[19]将克隆得到的 *PeHINT2* 基因全长序列与胡杨转录本进行 blast 比对，依据 *PeHINT2* 的特异序列使用 primer 5 设计实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）引物 qRT-PeHINT2-F 和 qRT-PeHINT2-R（表 1）。以 cDNA 为模板，以 *α-actin* 为内参基因，进行 qRT-PCR。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 *PeHINT2* 的相对表达量。

1.2.3　亚细胞定位分析

利用 pCAMBIA1300-GFP 载体，构建 *PeHINT2*-GFP 亚细胞定位载体，根据 Yoo 等[20]的方法进行烟草原生质体转化，通过 LSM 510 激光共聚焦显微镜（ZEISS，德国）观察 PeHINT2 的亚细胞定位。

1.2.4　表达载体的构建与植物遗传转化

根据克隆得到的 *PeHINT2* 基因 CDS 序列设计引物 PeHINT2ox-F 和 PeHINT2ox-R（表 1），进行 PCR 扩增后，回收产物；同时，将 pCAMBIA1302 载体用 *Nco*I 和 *Spe*I（NEB）进行双酶切并胶回收，以线性化载体。将胶回收的片段和载体使用 ClonExpress II One Step Cloning Kit（诺唯赞）试剂盒重组连接，转化大肠杆菌，测序正确后得到 pCAMBIA1302-PeHINT2 过表达载体，提取质粒，通过热激法将 pCAMBIA1302-PeHINT2 过表达载体转入农杆菌 GV3101。

按照 Clough 等[21]的方法，采用农杆菌介导的花序浸染法对拟南芥进行遗传转化。按照 Wang 等[22]的方法，利用农杆菌介导的叶盘法对 84K 杨树进行遗传转化。在含潮霉素的培养基上筛选抗性芽，将阳性植株继代培养，并进行 DNA 鉴定，通过 PCR 进行抗性基因（引物为 Hyg-F 和 Hyg-R，序列见表 1）检测，最后得到拟南芥和 84K 杨树转基因植株。以各转基因株系叶片 cDNA 为模板，利用 qRT-PCR 测定各转基因株系中 *PeHINT2* 基因表达量，计算方法和内参基因同 1.2.2。筛选表达量较高的株系，进行后续的耐盐性分析。

1.2.5　转基因株系耐盐性分析

1.2.5.1　拟南芥转基因株系表型分析

选择 2 个 *PeHINT2* 表达水平较高的纯合 T3 代拟南芥（AtOE-3 和 AtOE-5）进行耐盐性分析，先用 70% 乙醇溶液清洗 5 min，再用 2.6% 次氯酸钠溶液清洗 10 min，分别对野生型（WT）和过表达拟南芥种子消毒后，播种在 1/2 MS 固体培养基上（1/2 MS + 10 g/L 蔗糖 + 10 g/L 琼脂，pH 5.8 ~ 6.0）正常生长 7 d，转移到含有 100 mmol/L NaCl 的 1/2 MS 固体培养基上生长 7 d。观察盐胁迫后 WT 和转基因株系生长情况，测定并记录其鲜质量和根长。

1.2.5.2　转基因 84K 杨表型分析

将 1 月龄的 WT 和 *PeHINT2* 转基因 84K 杨株系组培苗移栽到混合土壤中（进口草炭土和珍珠岩体积比为 3∶1），2 个月后，选择大小和生长状况相似的 84K 杨 WT 和转基因植株，按照 Tang[23]的方法分别进行盐胁迫处理，并在 20 d 和 30 d 观察记录。对照组植株每 3 d 浇水 100 mL，处理组 NaCl 初始处理浓度设置为 25 mmol/L，以每 3 d 递增 25 mmol/L 的梯度逐步提升，直到第 9 天达到 100 mmol/L，分别继续处理 11 d 和 21 d 后，用清水灌溉植株并恢复培养 3 d，随后进行表型观察，并统计株高和地径来评估杨树植株生长情况，每个株系分别测量 5 棵苗木，取平均值。

1.2.5.3　转基因 84K 杨光合效率分析

由于 PSⅡ对环境胁迫（强光、干旱和盐胁迫等）极为敏感，因此本研究参考刘金秀等[24]方法，采用便携式 Yaxin-1161G 叶绿素荧光仪对叶绿素荧光指标进行测定。分别选取正常或 NaCl 处理条件下的 84K 杨 WT 和 *PeHINT2* 转基因植株中上部第 4 ~ 6 片完全展开的叶片，使用叶片夹夹住叶片，暗处理 20 min；随后 4 000 μmol/(m^2·s)光强饱和脉冲处理 1 s，1 500 μmol/(m^2·s)的作用光处理 9 s。依次测量以下参数：初始荧光（F_0）、最大荧光（F_m）、PSⅡ光化学猝灭系数（qP）、PSⅡ非光化学猝灭系数（qN）和 PSⅡ实际光化学效率（$\Phi_{PSⅡ}$），并计算得出 PSⅡ最大光化学效率（F_v/F_m），其中 F_v 为 F_m 与 F_0 的差值。每个株系测定 3 株，每株测量 3 片叶子。

1.2.5.4　转基因 84K 杨活性氧检测

根据 Yang 等[25]的方法，分别收集生长于正常或 NaCl 处理条件下的 84K 杨 WT 和转基因株系第 4 ~ 6 片完全伸展的叶片，使用打孔器（孔径为 1 cm）打孔后，将叶片置于培养皿中（直径 9 cm），每皿放置至少 30 片叶片。随后向每个培养皿中加入 10 mL、1 mg/mL 的二氨基联苯胺（DAB）和硝基四氮唑蓝（NBT）（上海生工）染色液。样品在 37 ℃下染色

12 h，然后用 95 ℃ 的 95% 酒精脱色。观察叶片着色情况。每个株系 3 次生物学重复。

1.2.5.5 转基因 84K 杨抗氧化酶活性分析

分别使用超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化物酶（POD）和过氧化氢酶（CAT）活性检测试剂盒测定正常生长和 NaCl 处理下 84K 杨 WT 和各转基因株系 SOD、POD 和 CAT 活性，选择每个株系的第 4 片完全展开叶进行测定，利用紫外分光光度计进行检测。每个实验设置 3 个生物学重复，3 次技术重复。

1.2.5.6 转基因 84K 杨叶绿体氧化还原系统关键基因表达模式分析

将正常生长的 1 月龄 84K 杨 WT 和转基因组培苗转移至含有 100 mmol/L NaCl 培养基中处理 24 h，然后分别提取正常和盐处理条件下 WT 和转基因植株叶的 RNA，反转录为 cDNA，利用 qRT-PCR 检测叶绿体氧化还原系统相关关键基因 *FNR*、*NTRC*、2-*CysPRX-A*（*PRXA*）、2-*CysPRX-B*（*PRXB*）、*CSD*2 和 *APX*2 在不同处理、不同株系中的表达水平。

将拟南芥中对应的各基因序列分别与 84K 杨转录本序列进行 BLAST，找到对应的同源基因。根据课题组之前发表的 84K 杨基因组序列[26]，上述 6 个基因相对应的 84K 杨转录本 ID 分别为 Pag_G_030753-RA、Pag_A_032251-RA、Pag_G_027377-RA、Pag_A_029669-RA、Pag_G_025508-RA 和 Pag_A_014217-RA，根据序列设计定量引物进行 qRT-PCR，引物序列见表 1。

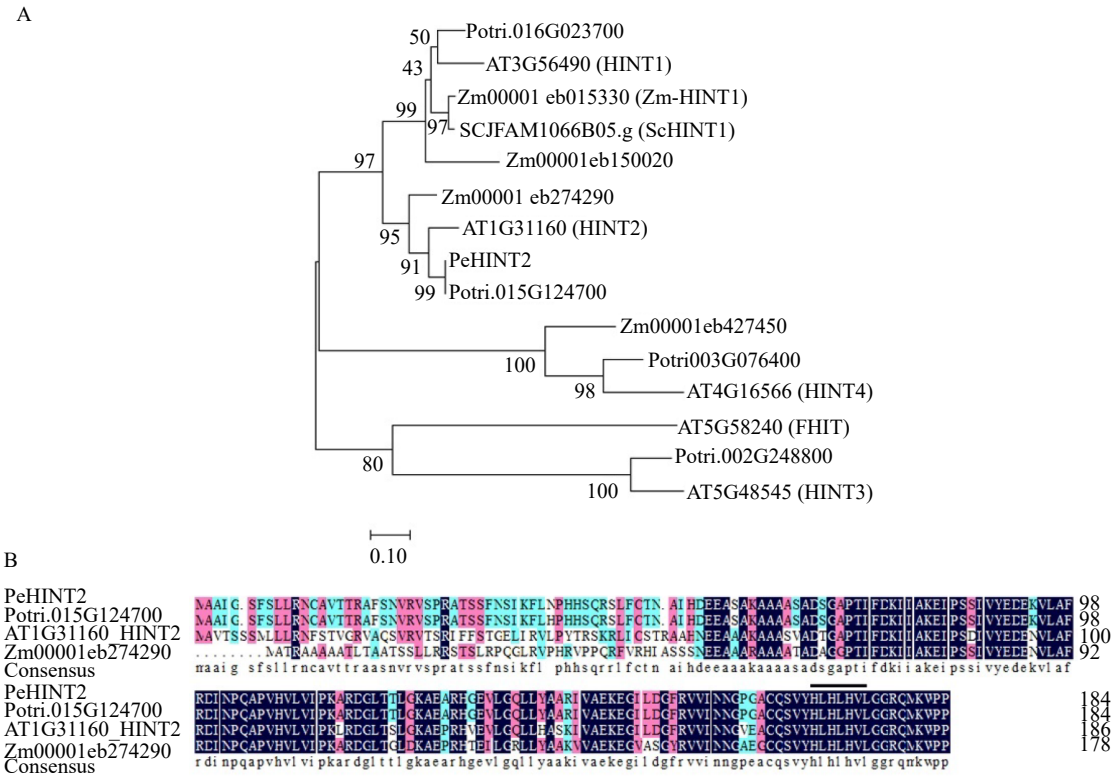
1.3 数据分析

使用 Excel、Prism8.0 和 SPSS26.0 软件对实验数据进行统计和绘图，采用 *T* 检验（Student's *t*-test）对数据进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 PeHINT2 氨基酸序列比对与系统发育树

通过前期对胡杨天然种质进行全基因组关联分析，关联到一个与耐盐性状密切相关的基因（CCG022381）[6]，经基因全长扩增并测序检测后，发现其 DNA 序列长度为 558 bp。将其氨基酸序列与毛果杨序列进行 BLAST 后发现，其分别与毛果杨 Potri.015G124700 和拟南芥 AT1G31160（*HINT*2）为同源基因，所以将其命名为 *PeHINT*2。分别选取毛果杨、拟南芥、玉米和甘蔗的 HINT 蛋白构建系统发育树，发现 PeHINT2 与毛果杨和拟南芥的 HINT2 亲缘关系最近，且不同物种的 HINT1、HINT2、HINT3 和 HINT4 同源蛋白被聚类到一起，并形成不同的分支（图 1A）。氨基酸序列进一步比对发现，不同物种的 HINT2 蛋白均存在保守的 C 端，且均包含保守的组氨酸三联体（HIT）基序（“His-X-His-X-His-XX”）及侧翼序列（图 1B）。值得注意的是，胡杨



At 为拟南芥，Zm 为玉米，Sc 为甘蔗，Potri 为毛果杨。黑色横线表示保守的组氨酸三联体（HIT）基序。

图 1 PeHINT2 系统发育树（A）及蛋白多序列比对（B）

Fig. 1 Phylogenetic tree (A) of PeHINT2 and protein multiple sequence alignment (B)

PeHINT2 与毛果杨同源蛋白(Potri.015G124700)保守性非常高，仅有 1 个氨基酸的差异(图 1B)。

2.2　盐处理下胡杨 *PeHINT2* 基因的表达模式

qRT-PCR 分析发现，在盐胁迫处理下，*PeHINT2* 表达量明显升高，并且随着处理时间的增加，*PeHINT2* 表达量呈现先上升后下降的趋势，推测 *PeHINT2* 在胡杨响应盐胁迫过程中发挥作用(图 2)。

2.3　PeHINT2 亚细胞定位

亚细胞定位发现，PeHINT2 定位在叶绿体上，而空载的 GFP 荧光定位在细胞质或细胞核(图 3)，这与 Cell-PLoc 2.0 和 BUSCA 亚细胞定位预测结果一致。

2.4　*PeHINT2* 转基因拟南芥表型分析

利用构建的 pCAMBIA1302-PeHINT2 过表达载体对拟南芥进行遗传转化，一共获得超过 20 个转基因株系，然后选择两个具有较高 *PeHINT2* 表达水平的 T3 代纯合子株系(AtOE-3 和 AtOE-5)进行后续的分析。在正常情况下，所有拟南芥幼苗正常生长，WT 和转基因株系(AtOE-3 和 AtOE-5)根长和鲜质量无明显差异(图 4A、C 和 D)。盐胁迫处理后，与未处理相比，所有拟南芥株系的生长均受到一定程度的抑制，而 WT 相较于转基因株系受到的损伤程度更大，其叶片明显失绿，根长显著变短，鲜质量也明显降低($P < 0.05$，图 4A ~ D)。以上表型结果表明，过表达 *PeHINT2* 增强了拟南芥的耐盐胁迫能力。

2.5　*PeHINT2* 转基因杨树表型分析

对同属于杨属的 84K 杨进行遗传转化，获得了 20 个 *PeHINT2* 转基因杨树株系。对各株系叶片进行 qRT-PCR 分析发现，有 17 个转基因株系的表达量显著高于 84K 野生型(WT)，但转基因株系间的表达量也存在较大差异(图 5)。选取表达量较高的

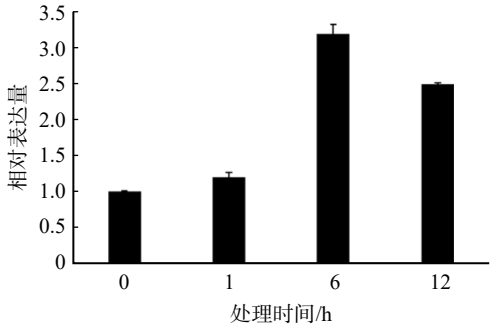


图 2　盐胁迫处理下胡杨 *PeHINT2* 基因的表达模式

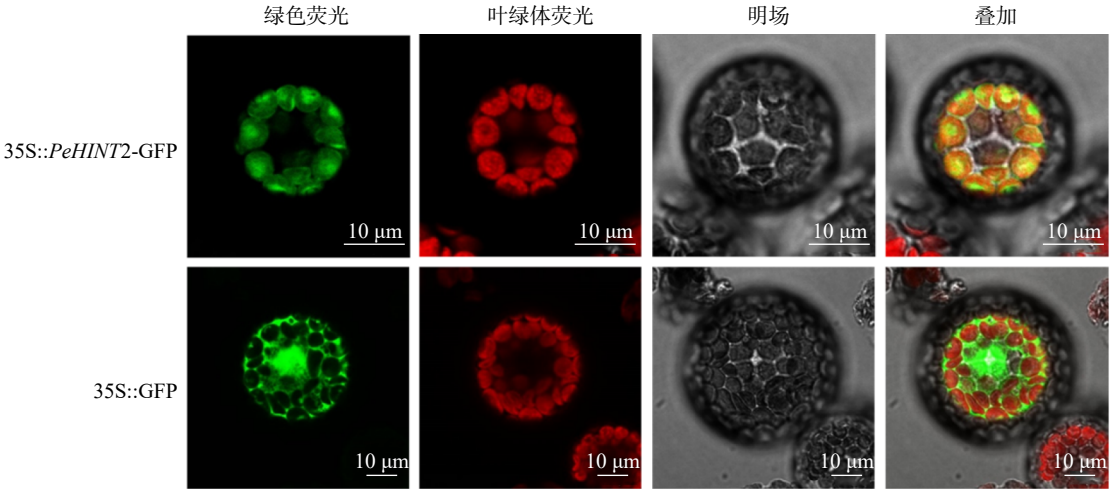
Fig. 2　Expression pattern of *PeHINT2* in *Populus euphratica* under salt stress treatment

OE-1 和 OE-7 转基因株系用于后续表型分析。

在正常条件下，84K 杨和 *PeHINT2* 转基因杨的表型差异不显著(图 6A 和 B)；盐胁迫处理 20 d 后发现，OE-1 和 OE-7 转基因株系的生长状态明显优于 WT(图 6A)；盐胁迫处理 30 d 后表型差异更加明显(图 6B)。进一步对盐胁迫处理 30 d 后的各杨树株系进行株高和地径的分析，发现盐处理组 WT 的株高相较于对照组下降了 18.58%，而处理组的 *PeHINT2* 转基因杨树的株高下降程度降低至 11.64% ~ 11.88%(图 6C)；盐处理组 WT 的地径相较于对照组下降了 21.00%，而处理组的转基因杨树的地径仅下降了 3.74% ~ 6.47%(图 6D)。此外，在盐处理下，转基因株系的株高和地径显著高于 WT($P < 0.05$)。以上结果表明，*PeHINT2* 的过表达增强了植株的耐盐性，受损程度显著降低。

2.6　*PeHINT2* 转基因杨树光合效率分析

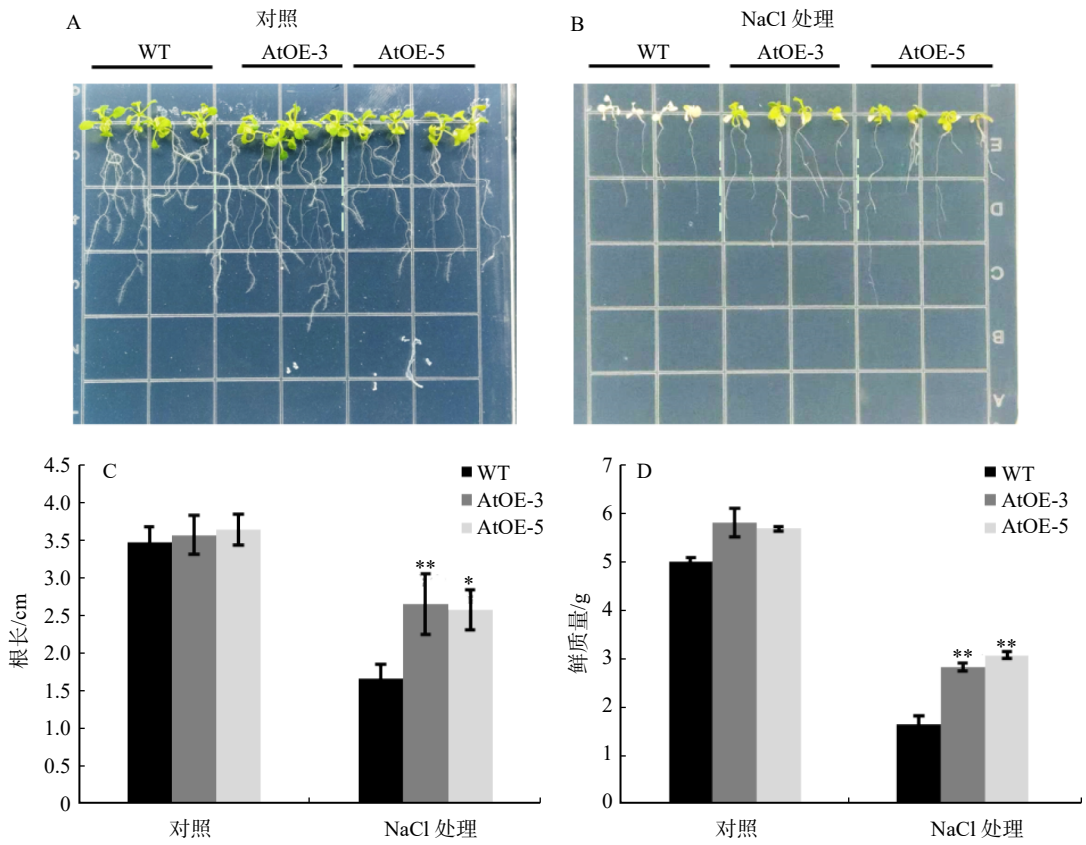
在正常生长条件下，WT 和 *PeHINT2* 转基因杨树的叶绿素荧光参数(F_v/F_m、$\Phi_{PS\,II}$、qP 和 qN)没有显著差异；盐胁迫处理 30 d 后，*PeHINT2* 转基因株



35S::PeHINT2-GFP 为 PeHINT2 和 GFP 融合蛋白载体，35S::GFP 为空载体。

图 3　PeHINT2 亚细胞定位

Fig. 3　Subcellular localization of PeHINT2



*表示在相同生长条件，与 WT 相比在 0.05 水平上存在显著差异；**表示在相同生长条件，与 WT 相比在 0.01 水平上存在显著差异。下同。

图 4 过表达 *PeHINT2* 拟南芥表型分析

Fig. 4 Phenotypic analysis of *PeHINT2*-overexpressing *Arabidopsis thaliana*

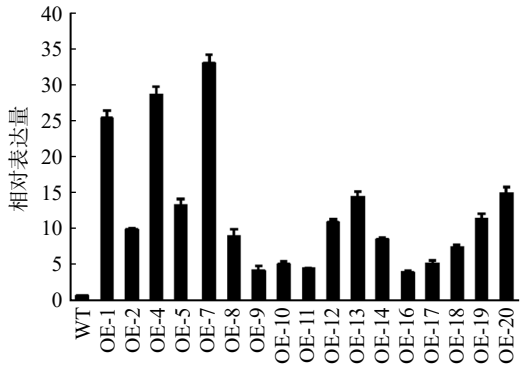


图 5 转基因杨树 *PeHINT2* 表达量分析

Fig. 5 Expression analysis of *PeHINT2* in transgenic poplar

系的各叶绿素荧光参数均显著高于 WT(图 7)。这表明在盐胁迫条件下，*PeHINT2* 转基因杨树 PSⅡ的光合电子传递效率、实际光化学效率、光合作用效率和对光的适应能力均明显强于野生型，推测过表达 *PeHINT2* 增强了盐胁迫下杨树的光合效率，进而提升了植株的生长适应性。

2.7 *PeHINT2* 转基因杨树抗氧化能力分析

通过 DAB 和 NBT 染色分析发现：在盐胁迫处理下，WT 着色较深，而 *PeHINT2* 转基因株系的着色较浅；而正常情况下无明显差异(图 8A)。说明在盐胁迫下，相比于 WT，*PeHINT2* 转基因杨树中积累的 ROS 含量更少。

在抗氧化酶活性分析方面，在正常条件下，WT 与转基因株系的 POD、SOD 和 CAT 活性均处于较低水平，且无明显差异；盐胁迫后，*PeHINT2* 转基因株系的 POD、SOD 和 CAT 活性显著高于 84K 杨($P < 0.01$，图 8B)。这表明 *PeHINT2* 转基因株系具有更高的抗氧化活性以缓解氧化损伤。

2.8 叶绿体氧化还原相关基因表达情况

综合以上亚细胞定位、表型分析、抗氧化分析结果，推测 *PeHINT2* 可能通过影响叶绿体氧化还原调控系统相关基因的表达来影响转基因株系在盐胁迫下的氧化还原能力。为验证此假设，本研究选取氧化还原系统中的关键基因进行 qRT-PCR 检测。结果(图 9)发现，在正常条件和 NaCl 处理条件下，相较于 WT，*PeHINT2* 转基因杨树中 *PRXA* 和 *PRXB* 的相对表达量均有所升高，因而并不能说明 *PeHINT2* 在盐胁迫下特异影响 *PRXA* 和 *PRXB* 的表达。而 *FNR*、*NTRC*、*CSD2* 和 *APX2* 基因与之不同：正常条件下，这 4 个基因的表达量在野生型和转基因株系间均无显著差异；而在盐处理后，转基因株系中这 4 个基因的表达量均显著高于野生型($P < 0.05$)，尤其是 *CSD2* 和 *APX2*，达到 2 倍及 2 倍以上差异(图 9)。

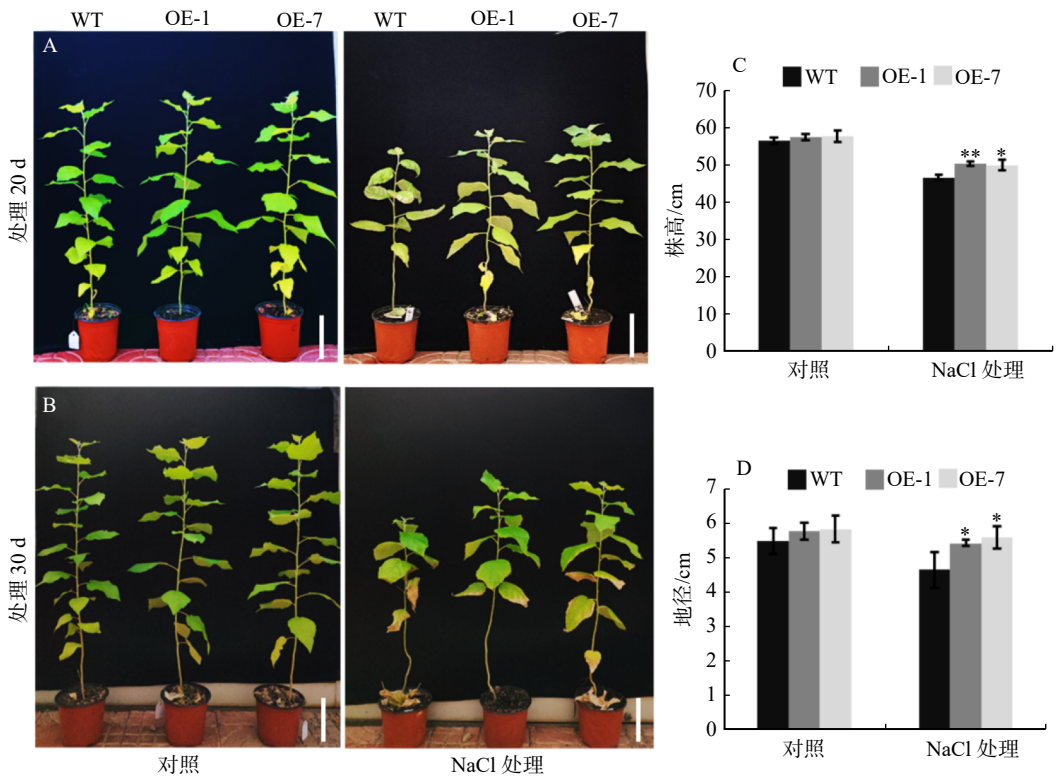
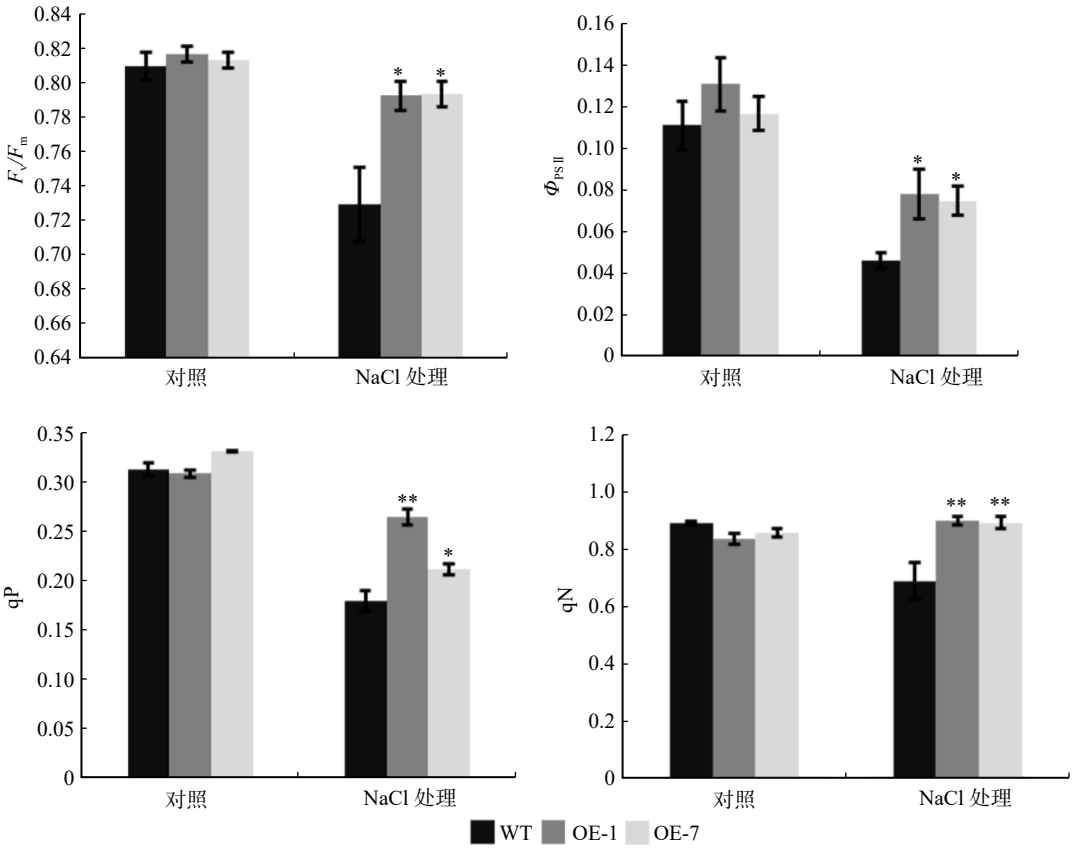


图 6　*PeHINT2* 转基因杨树表型分析

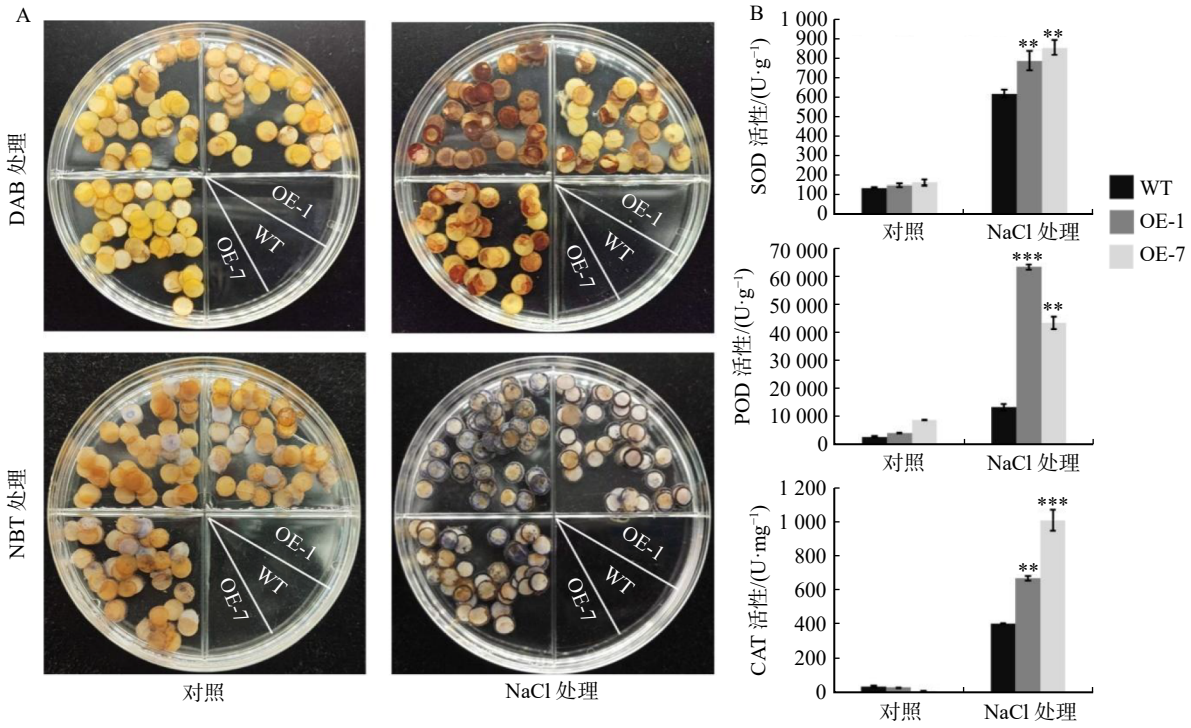
Fig. 6　Phenotypic analysis of *PeHINT2* transgenic poplar



F_v/F_m. 最大光化学效率；$\Phi_{PS\,II}$. 实际光化学效率；qP. 光化学猝灭系数；qN. 非光化学猝灭系数。

图 7　*PeHINT2* 转基因杨树叶绿素荧光参数

Fig. 7　Chlorophyll fluorescence parameters of *PeHINT2* transgenic poplar



***表示在相同生长条件下，与 WT 相比在 0.001 水平上存在显著差异。

图 8 *PeHINT*2 转基因杨树抗氧化能力分析

Fig. 8 Antioxidant capacity analysis of *PeHINT*2 transgenic poplar

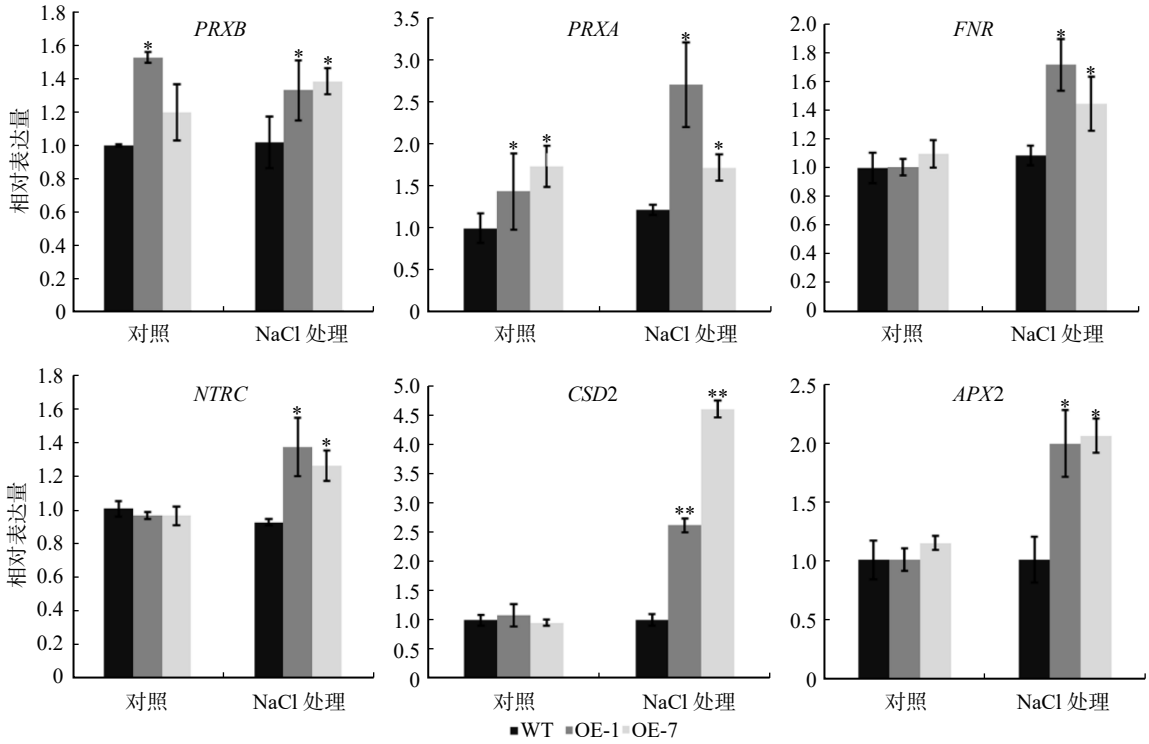


图 9 叶绿体氧化还原相关基因表达情况

Fig. 9 Expression of chloroplast redox-related genes

这表明 *FNR*、*NTRC*、*CSD*2 和 *APX*2 这 4 个叶绿体氧化还原基因在盐胁迫下可积极地响应 *PeHINT*2 的调控，推测 *PeHINT*2 可能通过影响 *CSD*2、*APX*2、*FNR* 和 *NTRC* 的表达来调控转基因杨树在盐胁迫下的抗氧化能力。

3 讨 论

盐渍化土壤是全球农业生产和生态恢复面临的严峻挑战。胡杨作为荒漠河岸林的建群种和关键生态屏障植物，以其在极端盐碱环境中（高达 450

mmol/L NaCl）仍能维持正常生长的卓越耐盐性，成为解析木本植物耐盐分子机制、挖掘关键耐盐基因资源的理想模型[1]。近年来，虽然通过多组学手段已从胡杨中鉴定出一些耐盐基因，但现有基因库仍难以全面解析其复杂精密的耐盐调控网络。在植物中，*HINT*1 同源基因（如玉米[14]*Zm-HINT*1、甘蔗[15]*ScHINT*1、盐地碱蓬[16]*SsHINT*1）被证明参与抗病、抗旱及耐盐胁迫响应。然而，HINT 蛋白家族中的 HINT2 亚家族在植物中的功能研究近乎空白。本研究前期通过 GWAS 工作成功锁定了一个与胡杨种子耐盐性显著关联的 SNP 位点对应的基因 *CCG*022381[6]。通过生物信息学分析，确定该基因属于 HINT2 亚家族成员。因此，深入探究这一尚未被认知的 HINT2 亚家族成员（*PeHINT*2）在盐胁迫响应中的具体功能及其作用机制，不仅对填补植物 HINT 家族功能研究的空白，拓展对胡杨核心耐盐模块的理解具有重要意义，更可为发掘林木耐盐育种关键靶点提供全新视角和基因资源。

先前在对拟南芥叶绿体蛋白质组的研究[27]，以及拟南芥叶绿体 ATP 合酶 γ 亚基的功能研究[28]中，均检测到 HINT2 蛋白的存在。本研究通过生物信息学预测和 PeHINT2-GFP 融合蛋白的共聚焦显微成像实验进一步直观证实了 PeHINT2 主要定位于叶绿体（图 3）。这一发现与目前已报道的其他植物 HINT 蛋白定位存在显著差异。目前植物 HINT 研究主要集中于 HINT1 亚家族：例如，玉米 Zm-HINT1 被报道定位于细胞核，其过表达可增强拟南芥的抗真菌[7]、抗盐[8]及抗旱能力[14]；而在水稻[17]、拟南芥[17]和绿豆[18]中，HINT1 蛋白均被证实定位于过氧化物酶体，这一亚细胞定位特征在动物或酵母 HINT 蛋白中尚未见报道。此外，甘蔗[15]ScHINT1 被证明调控茎尖分生组织 ROS 稳态，盐地碱蓬[16]SsHINT1 则通过与硝酸盐转运体互作影响 K^+/Na^+ 比值。这些 HINT1 家族成员普遍通过调节胞质或膜上的信号传导及离子稳态途径来缓解胁迫。相比之下，PeHINT2 定位于叶绿体，表明其功能机制很可能区别于 HINT1 亚家族。鉴于叶绿体是植物细胞内 ROS 产生与清除的关键场所之一，PeHINT2 在叶绿体中的特异性定位，为其调控抗氧化酶活性并维持 ROS 稳态提供了空间基础。虽然不同物种的 HINT 蛋白结构相对保守（图 1），但上述定位差异表明定位在不同细胞器的植物 HINT 蛋白（如过氧化物酶体/细胞核的 HINT1 与叶绿体的 PeHINT2）可能执行着不同的生物学功能，细胞器靶向的特异性可能是区分 PeHINT2 与 HINT1 家族功能的关键因素。

为了验证 *PeHINT*2 的功能，本研究通过异源转化拟南芥和 84K 杨分别研究了其在植物响应盐胁迫过程中发挥的作用。结果显示，在正常情况下，所有拟南芥幼苗正常生长，WT 和转基因株系（AtOE-3 和 AtOE-5）根长和鲜质量无明显差异（图 4A、C 和 D）。盐胁迫处理后，与未处理相比，所有拟南芥株系的生长均受到一定程度的抑制，而 WT 相较于转基因株系受到的损伤程度更大，其叶片明显失绿，根长显著变短，鲜质量也明显降低（$P < 0.05$，图 4A ~ D）。同样，在正常条件下，84K 杨和 *PeHINT*2 转基因杨的表型差异不显著（图 6A 和 B）；盐胁迫处理 20 d 后发现，OE-1 和 OE-7 转基因株系的生长状态明显优于杨树 WT（图 6A），盐胁迫处理 30 d 后表型差异更加明显（图 6B）。这些结果证明了 *PeHINT*2 在植物响应盐胁迫过程中发挥着正向调控的作用，且未影响正常生长条件下植株的生长发育和产量。这与其他植物中已知的 *HINT*1 家族基因的功能相似，玉米[14]、甘蔗[15]和盐地碱蓬[16]中 *HINT*1 均可参与逆境响应。

本研究揭示了 *PeHINT*2 在植物耐盐性中的关键作用及其分子机制。与 Zm-HINT1[14]和 SsHINT1[16]等 HINT1 类基因不同，*PeHINT*2 主要通过直接调控叶绿体氧化还原系统来增强植物在盐胁迫下的抗氧化能力。本研究表明，*PeHINT*2 过表达植株在盐胁迫下表现出更高的 PSII 最大光化学效率（F_v/F_m）、实际光化学效率（Φ_{PSII}）、光化学猝灭系数（qP）和非光化学猝灭系数（qN）（图 7），并伴随着 ROS 积累的显著减少以及 SOD、POD 和 CAT 活性的增强（图 8）。进一步分析发现，*PeHINT*2 显著上调了叶绿体氧化还原相关关键基因 *FNR*、*NTRC*、*CSD*2 和 *APX*2 的表达（图 9），其中 *CSD*2 和 *APX*2 的表达水平增幅超过两倍。这些基因在叶绿体中的功能至关重要：*FNR* 负责将电子传递给 $NADP^+$ 生成 NADPH，为卡尔文循环和抗氧化系统提供还原力[29]；*NTRC* 则通过其 NADPH-硫氧还蛋白还原酶活性，驱动 2-Cys 过氧化物酶（PRX）清除 H_2O_2，维持基质氧化还原平衡[30]；*CSD*2 和 *APX*2 则协同清除超氧自由基和过氧化氢，构成叶绿体抗氧化防御网络的核心环节[31-32]。*PeHINT*2 的亚细胞定位结果显示其定位于叶绿体，且在盐胁迫下，*PeHINT*2 过表达的拟南芥叶片仍能保持绿色，而野生型已出现失绿现象（图 4），这可能与 *PeHINT*2 通过调控上述基因表达维持叶绿体结构与功能稳定性密切相关。与 *HINT*1 类基因通过离子稳态或渗透调节间接影响 ROS 水平的机制不同，*PeHINT*2 可能通过结合并水解腺苷或 AMP 等核苷酸，直接调控下游抗氧化相关基因的表达，从而在叶绿体内部维持还原稳态，直接保护光系统免受氧化

损伤[10−11]。已有研究在玉米[14]、甘蔗[15]和盐地碱蓬[16]中发现 *HINT*1 同源基因参与氧化还原调控以应对非生物胁迫，而本研究首次在 HINT2 亚家族成员中验证了这一机制，进一步拓展了 HINT 家族在植物抗逆调控中的分子功能认知，也为未来耐盐分子育种提供了“离子稳态 + 光系统保护”双重强化的新策略。

然而，本研究仍存在不足：其一，*PeHINT*2 功能验证主要在拟南芥与 84K 杨中完成，缺乏胡杨本体的直接证据；其二，*PeHINT*2 与下游基因的直接调控关系及潜在互作关系尚待解析。未来工作可在胡杨中构建过表达或敲除材料，结合 ChIP-seq、RNA-seq 及蛋白互作技术，深入揭示其核苷酸结合特性及调控网络，并进一步探索其在干旱、高温等多重逆境下的作用。

4 结　　论

本研究针对木本植物耐盐基因资源匮乏的科学问题，首次在胡杨中鉴定并功能解析了 HINT2 亚家族成员基因 *PeHINT*2。通过生物信息学分析、双物种（拟南芥/84K 杨）遗传转化、生理生化检测及分子机制探究，初步阐明了 *PeHINT*2 在植物盐胁迫响应中的功能与作用机制。研究主要得到以下结论：PeHINT2 属于 HINT2 蛋白亚家族，定位于叶绿体，*PeHINT*2 在盐胁迫下可通过增强光合电子传递和抗光损伤能力来提高光合效率，通过调控叶绿体氧化还原系统增强植物在盐胁迫下的抗氧化能力，进而显著提高植物耐盐性。研究结果为林木耐盐分子育种提供了新靶点，未来可进一步解析 *PeHINT*2 调控的分子互作网络，创制 *PeHINT*2 协同其他耐盐基因的多基因编辑林木，拓展其在盐碱地生态修复中的应用潜力。

参 考 文 献

[1] Ma T, Wang J Y, Zhou G K, et al. Genomic insights into salt adaptation in a desert poplar[J]. Nature Communications, 2013, 4(1): 2797.

[2] Ge X L, Zhang L, Du J J, et al. Transcriptome analysis of *Populus euphratica* under salt treatment and *PeERF*1 gene enhances salt tolerance in transgenic *Populus alba* × *Populus glandulosa*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(7): 3727.

[3] Zhang Y, Yin K X, Yao J, et al. *Populus euphratica GLABRA*3 binds *PLDδ* promoters to enhance salt tolerance[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(9): 8208.

[4] 温馨, 殷可欣, 马思圆, 等. 过表达胡杨 *PePKS*5 提高拟南芥耐盐性 [J]. 北京林业大学学报, 2024, 46(2): 62−74.
Wen X, Yin K X, Ma S Y, et al. Overexpression of *Populus euphratica PePKS*5 enhancing salt tolerance of *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2024, 46(2): 62−74.

[5] 张国燕, 陈子豪, 李文君, 等. 异源过表达胡杨 *PeBZR*1 基因提高烟草对盐胁迫的耐受性 [J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(8): 3593−3599.
Zhang G Y, Chen Z H, Li W J, et al. Heterologous overexpression of *Populus euphratica PeBZR*1 gene enhanced tolerance of tobacco to salt stress[J]. Genomics and Applied Biology, 2020, 39(8): 3593−3599.

[6] Jia H X, Liu G J, Li J B, et al. Genome resequencing reveals demographic history and genetic architecture of seed salinity tolerance in *Populus euphratica*[J]. Journal of Experimental Botany, 2020, 71(14): 4308−4320.

[7] Wu L J, Wang X T, Wu L C, et al. Molecular cloning and expression analysis of an HINT1 homologue from maize (*Zea mays* L.)[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2011, 29(4): 1006−1012.

[8] Zu X F, Liu P, Wang S X, et al. Overexpression of *Zm-HINT*1 confers salt and drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2018, 36(2): 310−325.

[9] Pearson J D, Dewald D B, Mathews W R, et al. Amino acid sequence and characterization of a protein inhibitor of protein kinase C[J]. Journal of Biological Chemistry, 1990, 265(8): 4583−4591.

[10] Brenner C, Garrison P, Gilmour J, et al. Crystal structures of HINT demonstrate that histidine triad proteins are GalT-related nucleotide-binding proteins[J]. Nature Structural & Molecular Biology, 1997, 4(3): 231−238.

[11] Jung A, Yun J S, Kim S, et al. Crystal structure of histidine triad nucleotide-binding protein from the pathogenic fungus *Candida albicans*[J]. Molecules and Cells, 2019, 42(1): 56−66.

[12] Amor-Barris S, Høyer H, Brauteset L V, et al. HINT1 neuropathy in Norway: clinical, genetic and functional profiling[J]. Orphanet Journal of Rare Diseases, 2021, 16(1): 116.

[13] Yao J Q, Miao Y F, Zhu L, et al. Histidine triad nucleotide-binding protein 2: from basic science to clinical implications[J]. Biochemical Pharmacology, 2023, 212: 115527.

[14] Wu L J, Zhang H M, Zhang J, et al. Overexpression of *Zm-HINT*1 in *Arabidopsis thaliana* enhances resistance to *Fusarium graminearum*[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2015, 121(2): 511−518.

[15] Morais E R C, de Medeiros N M C, da Silva F L, et al. Redox homeostasis at SAM: a new role of HINT protein[J]. Planta, 2022, 257(1): 12.

[16] Xiong Y, Wang S S, Cui C J, et al. *Suaeda salsa* NRT1.1 is involved in the regulation of tolerance to salt stress in transgenic arabidopsis[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(16): 12761.

[17] Kaur N, Hu J P. Defining the plant peroxisomal proteome: from arabidopsis to rice[J]. Frontiers in Plant Science, 2011, 2: 103.

[18] Saha S, Samanta I, Tarafdar S, et al. Predicting the peroxisome proteome in the legume *Vigna radiata*: exploring peroxisomal roles in abiotic stress tolerance[J]. Journal of Plant Biochemistry

and Biotechnology, 2025, 34(1): 149−166.

[19] Chen C J, Wu Y, Li J W, et al. TBtools-II: a “one for all, all for one” bioinformatics platform for biological big-data mining[J]. Molecular Plant, 2023, 16(11): 1733−1742.

[20] Yoo S D, Cho Y H, Sheen J. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis[J]. Nature Protocols, 2007, 2(7): 1565−1572.

[21] Clough S J, Bent A F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*[J]. The Plant Journal, 1998, 16(6): 735−743.

[22] Wang Q, Dai X R, Pang H Y, et al. BEL1-like homeodomain protein BLH6a is a negative regulator of *CAld5H2* in sinapyl alcohol monolignol biosynthesis in poplar[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 695223.

[23] Tang R J, Yang Y, Yang L, et al. Poplar calcineurin B-like proteins PtCBL10A and PtCBL10B regulate shoot salt tolerance through interaction with PtSOS2 in the vacuolar membrane[J]. Plant, Cell & Environment, 2014, 37(3): 573−588.

[24] 刘金秀, 张松彦, 周建. 镉胁迫对刺槐幼苗生长与光合生理特性的影响 [J]. 林业科学研究, 2023, 36(3): 168−178.
Liu J X, Zhang S Y, Zhou J. Effects of cadmium stress on growth and photosynthetic physiological characteristics of *Robinia pseudoacacia* seedlings[J]. Forest Research, 2023, 36(3): 168−178.

[25] Yang Y F, Zhao J N, Ren X R, et al. *PsDUF6A* from *Populus simonii* enhances drought tolerance in transgenic arabidopsis and poplar by increasing ROS scavenging[J]. Plant Stress, 2025, 15: 100706.

[26] Huang X, Chen S, Peng X P, et al. An improved draft genome sequence of hybrid *Populus alba* × *Populus glandulosa*[J]. Journal of Forestry Research, 2021, 32(4): 1663−1672.

[27] dal Bosco C, Lezhneva L, Biehl A, et al. Inactivation of the chloroplast ATP synthase γ subunit results in high non-photochemical fluorescence quenching and altered nuclear gene expression in *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(2): 1060−1069.

[28] Zybailov B, Rutschow H, Friso G, et al. Sorting signals, N-terminal modifications and abundance of the chloroplast proteome[J]. PLoS ONE, 2008, 3(4): e1994.

[29] Lintala M, Schuck N, Thormählen I, et al. *Arabidopsis tic*62 *trol* mutant lacking thylakoid-bound ferredoxin–$NADP^+$ oxidoreductase shows distinct metabolic phenotype[J]. Molecular Plant, 2014, 7(1): 45−57.

[30] Cejudo F J, Ojeda V, Delgado-Requerey V, et al. Chloroplast redox regulatory mechanisms in plant adaptation to light and darkness[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 380.

[31] Foyer C H, Kunert K. The ascorbate-glutathione cycle coming of age[J]. Journal of Experimental Botany, 2024, 75(9): 2682−2699.

[32] Zhuang Y, Wei M, Ling C C, et al. EGY3 mediates chloroplastic ROS homeostasis and promotes retrograde signaling in response to salt stress in *Arabidopsis*[J]. Cell Reports, 2021, 36(2): 109384.

（责任编辑　赵田芸
责任编委　卢孟柱）