



干旱胁迫对转*PtPIP2;8*基因84K杨苗木光合、生长和根系结构的影响

刘丽燕^{1,2} 冯锦霞¹ 刘文鑫³ 万贤崇^{1*}

¹中国林业科学研究院林业新技术研究所, 北京 100091; ²新疆林业科学院造林治沙研究所, 乌鲁木齐 830063; ³九江学院药学与生命科学学院, 江西九江 332000

摘要 为研究水通道蛋白*PtPIP2;8*基因功能, 了解其不同表达水平的转基因84K杨(*Populus alba* × *P. glandulosa*)应对干旱胁迫的响应, 该文以转*PtPIP2;8* 84K杨抑制表达株系(抑制表达)、野生型(WT)和转*PtPIP2;8* 84K杨超表达株系(超表达)为试验材料, 测定*PtPIP2;8*表达水平、根系导度、光响应曲线、气体交换参数、生长及根系形态指标。结果显示: (1) WT植株*PtPIP2;8*仅在根系表达; 超表达植株*PtPIP2;8*除在根部显著表达外, 在茎和叶片中也显著表达; 抑制表达植株*PtPIP2;8*仅在根部有微量表达, 表达量分别是WT和超表达植株的1/20和1/80。(2)根系结构分析发现, 超表达植株总根长、总根表面积、总根体积、总根尖数显著低于WT和抑制表达植株, 根系导水率显著高于WT和抑制表达植株, 表明*PtPIP2;8*参与了植物根系水分运输, 提高了水分运输效率。(3)正常水分条件下, 抑制表达植株苗高、叶面积显著低于WT和超表达植株, 根冠比显著高于WT和超表达植株。干旱胁迫后, 抑制表达植株净光合速率(P_n)、气孔导度(G_s)下降幅度小, 仍能维持较高的 P_n 。气体交换参数显示抑制表达植株 P_n 、 G_s 日变化为“单峰”型, 属气孔因素引起的净光合速率下降; WT和超表达植株 P_n 、 G_s 日变化为“双峰”型, 干旱胁迫后, 抑制表达植株 P_n 略微下降, WT和超表达植株 P_n 均下降, 尤其是13:00、15:00下降显著, 表明WT和超表达植株对于干旱胁迫更加敏感, 干旱对其影响更大。(4)干旱胁迫后, 抑制表达植株相对生长速率、总生物量降低的最少, 根冠比最高; 总根表面积、总根体积、总根尖数显著高于WT植株。表明*PtPIP2;8*直接参与水分运输并提高水分运输效率, 其转化影响了植株根系发育和生长。超表达植株根系发育的下降和叶面积的增大减弱了它的抗旱性, 而抑制表达植株矮小, 降低的叶面积, 增加的根系生长和根冠比提高了它的抗旱能力。从研究结果来看, 水通道蛋白提高了水分跨膜运输效率, 而非水通道蛋白导水机制对于干旱有较强的耐受性。

关键词 干旱胁迫; 转基因杨树; 光合特性; 根系结构

刘丽燕, 冯锦霞, 刘文鑫, 万贤崇 (2020). 干旱胁迫对转*PtPIP2;8*基因84K杨苗木光合、生长和根系结构的影响. 植物生态学报, 44, 677–686. DOI: 10.17521/cjpe.2020.0058

Effects of drought stress on photosynthesis, growth and root structure of transgenic *PtPIP2;8* poplar 84K (*Populus alba* × *P. glandulosa*)

LIU Li-Yan^{1,2}, FENG Jin-Xia¹, LIU Wen-Xin³, and WAN Xian-Chong^{1*}

¹Research Institute of Forestry New Technology, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; ²Afforestation and Sand Control Institute of Xinjiang Academy of Forestry, Ürümqi 830063, China; and ³School of Pharmacy and Life Sciences, Jiujiang University, Jiujiang, Jiangxi 332000, China

Abstract

Aims In this study, changes in growth, photosynthesis and root structure in response to drought were tested in transgenic poplar 84K (*Populus alba* × *P. glandulosa*) seedlings with different expression levels of aquaporin gene (*PtPIP2;8*). The function of aquaporin gene *PtPIP2;8* and its response to drought stress were analyzed.

Methods We selected *PtPIP2;8* silencing line of poplar 84K, *PtPIP2;8* overexpressing line of poplar 84K and wildtype (WT) as the experimental materials. The Real-time fluorescence quantitative PCR technique was used to detect the *PtPIP2;8* expression in roots, stems and leaves. Root hydraulic conductance was measured by high pressure liquid flow meter. The photosynthetic light-response curve, and gas exchange parameters were measured by a LI-6400 photosynthetic system. Growth indexes were determined, and the root length, root surface area, root

收稿日期Received: 2020-03-06 接受日期Accepted: 2020-04-23

基金项目: 国家自然科学基金(31270648)中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(CAFYBB2018SZ019)。Supported by the National Natural Science Foundation of China (31270648), and the Fundamental Research Funds (CAFYBB2018SZ019).

* 通信作者Corresponding author (wxc@caf.ac.cn)

volume and total root tips were scanned and then analyzed with the root analysis software.

Important findings The results showed that: (1) The gene *PtPIP2;8* was mainly expressed in the root system in WT, while its significant expression occurs not only in roots, but also in stems and leaves in *PtPIP2;8* overexpressing poplar lines. The *PtPIP2;8* RNAi-silence poplar lines only showed weak expression of *PtPIP2;8* in the root, and the expression level were 1/20 and 1/80 of WT and overexpression line, respectively. (2) The root structure analysis showed that overexpression lines had significantly lower total root length, total root surface area, total root volume and total root tips than RNAi-silence line and WT, but higher root hydraulic conductance compared with RNAi-silence line and WT. These results showed that the aquaporin gene *PtPIP2;8* participated in plant water transport and improved water transport efficiency. (3) Under normal water conditions, RNAi-silence lines showed lower plant height and leaf area but higher root-shoot ratio compared with overexpression line and WT. After drought stress, RNAi-silence lines only slightly decreased the net photosynthetic rate (P_n) and stomatal conductance (G_s), and maintained a relatively high P_n . Diurnal changes of P_n and G_s in RNAi-silence lines showed a single-peak pattern, in which the decrease of photosynthesis was caused by stomatal limitation. Diurnal changes of P_n in both overexpression lines and WT had a two-peak pattern, indicating the non-stomatal limitation of photosynthesis. Drought stress slightly decreased P_n of RNAi-silence lines, while largely decreased P_n of overexpression line and WT decreased, especially at 13:00 and 15:00, indicating that overexpression line and WT were more sensitive to drought stress compared with the RNAi-silence lines. (4) Under drought stress, RNAi-silence line showed the least decline in relative growth rate and total biomass, and the highest root-shoot ratio among the three poplar lines. The total root surface area, total root volume and total root tips of RNAi-silence line were significantly higher than those of WT. The results suggest that aquaporin gene *PtPIP2;8* directly participates in the water transport and helps to improve the water transport efficiency, thus the transformation of aquaporin *PtPIP2;8* gene may affect root development and growth of plants. Overexpression lines weaken their drought resistance with decreased root development and increased leaf area, while RNAi-silence line increases its drought resistance with reduced leaf area, increased root growth and root-shoot ratio. The results of this study indicate that aquaporin improves the efficiency of water transport across membranes, while the non-aquaporin water-conducting mechanism has greater tolerance to drought.

Key words drought stress; transgenic poplar; photosynthetic characteristics; root structure

Liu LY, Feng JX, Liu WX, Wan XC (2020). Effects of drought stress on photosynthesis, growth and root structure of transgenic *PtPIP2;8* poplar 84K (*Populus alba* × *P. glandulosa*). *Chinese Journal of Plant Ecology*, 44, 677–686. DOI: 10.17521/cjpe.2020.0058

植物的生长发育依赖于水分运输和平衡, 水分吸收、运输和蒸腾是维持水分平衡的基本元素。植物根系的水分吸收有三条途径: 质外体途径、共质体途径和跨膜运输途径。由于根系凯氏带的存在, 水通道蛋白介导的水分跨膜运输途径在根系吸水过程中起着重要作用(Steudle & Peterson, 1998)。转基因是重要的生物学技术, 其广泛用于生物性状改良以及作为生理机制研究的工具。杨树是用于遗传转化的一种木本模式植物(周熙莹, 2013)。由此, 利用转基因杨树揭示其水通道蛋白家族成员具体功能, 分析其在植物水分调控中的作用, 是最直接、有效的方法。

在植物的水通道蛋白中, 质膜水通道蛋白(PIPs)和液泡膜水通道蛋白(TIPs)最为重要, PIPs主要负责水分的吸收与外排, TIPs维持细胞膨压, 它们主要

参与了水分在根部、叶部的运输, 维持植物体内水分的平衡(Fotiadis *et al.*, 2001; Chaumont & Tyerman, 2014)。PIPs分布在细胞膜上, 每个单体蛋白会在中心形成具有高度选择性的通道, 水分、甘油等小分子溶质能够透过细胞膜, 它们存在于根系(Kammerloher *et al.*, 1994)、叶片(Martre *et al.*, 2002; Lopez *et al.*, 2003)、生殖器官(Bots *et al.*, 2005a, 2005b)、果实(O'Brien *et al.*, 2002)和种子(Schuermans *et al.*, 2003)等部位, 参与各种生理过程及应对非生物胁迫(包珠拉太等, 2017)。它们或通过表达量上调(Lovisol *et al.*, 2007; 蔡琼等, 2016), 或通过表达量的下调来应对各种胁迫(Martre *et al.*, 2001; Alexandersson *et al.*, 2005)。这些研究均表明水通道蛋白对非生物胁迫有着不同的响应方式, 而干旱是限制植物生长的一个普遍因素, 植物在干旱条件下, 形态

结构、光合性能、生物量、根系构型等都会发生变化(Knapp & Smith, 2001), 保持植物体内水分的平衡是保证植物生存的基本要素, 水通道蛋白的种类、表达和活性的调节可能是植物调控水分的方式之一(Johansson *et al.*, 2000; Suga *et al.*, 2001)。因此, 本研究以转*PtPIP2;8*基因不同表达水平的84K杨为切入点, 分析基因转化对其形态、根系结构的影响和转基因植物对于干旱胁迫的响应, 验证该基因的功能。

1 材料和方法

1.1 试验材料

本课题组于2012年采用同源克隆的方法构建毛白杨质膜内在*PtPIP2;8*的表达载体(MN795099), 通过农杆菌介导转化, 获得转*PtPIP2;8*超表达84K杨植株。同时运用RNAi技术将84K杨中的*PtPIP2;8*进行了沉默处理而获得了抑制表达84K杨植株。之后, 这些转基因材料通过试管苗, 以及移栽后扦插繁殖方式进行保存。本试验选取*PtPIP2;8*超表达转基因株系中的116株系(超表达)、*PtPIP2;8*抑制表达转基因株系中的521株系(抑制表达)和野生型84K杨(WT)为试验材料。我们将实验室保存的抑制表达、超表达和WT植株试管苗切取茎段接种至培养基, 苗长至3 cm左右转至生根培养基, 再生长一个月左右, 当瓶苗长至瓶口, 高约10 cm, 用于*PtPIP2;8*转录水平相对表达量的检测。2015年3月初, 选取超表达、抑制表达和WT的一年生枝条进行扦插, 试验植株生长在温室内, 试验期间温室内温度范围约19–28 °C, 相对湿度35%–55%。以草炭土:珍珠岩:砂子体积比3:1:1的比例, 将植株定植于高13 cm、直径15 cm的塑料花盆中。9月初, 选取健康、长势基本一致的超表达、抑制表达及WT植株各12株, 随机分为2组, 1组正常浇水, 1组干旱处理。

1.2 试验方法

1.2.1 实时荧光定量PCR检测*PtPIP2;8*转录水平表达量变化

取培养至10 cm左右的超表达、抑制表达和WT植株, 剪取其根、茎、叶片, 按照CTAB法提取总RNA, 反转录合成cDNA第一链。内参基因及引物参照冷华妮(2012)文献设计(表1), 实时定量PCR反应按照QIAGEN试剂盒提取步骤提取总RNA。通过各组织部位样品中内参基因和*PtPIP2;8*扩增曲线和溶

解曲线考证定量结果的可信度。每株系3个重复。

1.2.2 干旱处理方法

采用TRME-T3 TDR便携式土壤水分测定仪(IMKO, Ettlingen, Germany)测定土壤体积含水量, 测定部位为各植株主干与花盆边缘中间部分, 深度为6 cm。预实验发现, 干旱处理开始时土壤体积含水量为30% ± 3%, 干旱至土壤体积含水量低于10%以后, 野生型、超表达植株开始萎蔫并很快顶端叶片枯死, 土壤体积含水量达到6%左右, 抑制表达植株开始萎蔫。因此, 本试验的干旱胁迫程度选择土壤体积含水量达到6%–8%时, 进行光合、生长及根系结构的测定, 测定时采用称质量法保持各植株土壤体积含水量维持在6%–8%之间。正常浇水作为对照。

1.2.3 光响应曲线的测定

晴天, 温室内, 选取超表达、抑制表达和野生型扦插苗顶端叶往下第6片的健康叶, 用LI-6400便携式光合仪(LI-COR, Lincoln, USA)测定光响应曲线。测量时, 使用红蓝光源叶室, 设定CO₂浓度为400 μmol, 光强为2 000、1 800、1 500、1 200、1 000、800、500、200、100、50、20、0 μmol·m⁻²·s⁻¹, 测定前1 200 μmol·m⁻²·s⁻¹光诱导30 min, 每个光强值设定120 s等待时间。3个重复, 取平均值进行拟合。

1.2.4 气体交换参数的测定

晴天, 温室内, 选取超表达、抑制表达和野生型扦插苗顶端叶往下第6片健康叶用LI-6400便携式光合仪测定净光合速率、气孔导度、胞间CO₂浓度、蒸腾速率等, 测定时间为7:00–17:00, 每隔2 h测定一次。LI-6400便携式光合仪设定为红蓝光源叶室, 光合有效辐射强度为1 500 μmol·m⁻²·s⁻¹, 测定时, 叶片诱导10 min。6个重复。

1.2.5 根系导水率测定

采用高压液流仪(HPFM, Dynamax, Houston, USA)测定根系水力导度(单位时间, 单位压力条件下单株根系的水流量)。取各株系植株, 在水下在距离土痕以上6 cm处截去主干, 在剩余的根茎处迅速套上注满水的硅胶管, 平衡一段时间后测定根系水力导度。测完根系水力导度的植株根系用水洗净之后, 用Win-Rhizo根系分析仪(Regent Instruments, Quebec, Canada)测定根系表面积。根系导水率为根系水力导度除以根系表面积。6个重复。

表1 实时荧光定量PCR引物序列
Table 1 Primer sequences for real-time PCR

基因名称 Gene name	上游引物 Forward primer	下游引物 Reverse primer
<i>PtACTINrt</i>	5'-AAACTGTAATGGTCTCCCTCCG-3'	5'-GCATCATCACAATCACTCTCCGA-3'
<i>PtPIP2;8</i>	5'-GAGACTGTGAGGGACTACCAGGA-3'	5'-AATACCAAGAATGCCAACACCAC-3'

1.2.6 植株生物量测定

植株苗高为土痕处到苗最高点，使用直尺测量；基径为扦插后长出茎的基部直径，使用游标卡尺测量。用叶面积仪(LI-3100, Konica Minolta, Tokyo, Japan)测定叶面积。叶片装信封后放置75 °C烘箱烘干至恒质量。比叶面积(SLA)为总叶面积与叶片干质量的比值。地上生物量的测定是将茎和叶片采集后105 °C杀青30 min, 75 °C烘干至恒质量后称量；地下生物量测定同此方法。6个重复。

1.2.7 植株根系结构分析

植株根系在水中浸润，小刷轻刷洗干净后，采用Win-Rhizo根系分析仪，对根系总长、根系表面积等进行定量分析。分析完后的根系用于测定植株地下生物量，其方法同上。

1.3 数据处理

采用Excel进行数据整理，SPSS 20.0软件进行单、双因素方差分析，Duncan多重比较($p < 0.05$)，Sigmaplot 12.5作图。

2 结果和分析

2.1 *PtPIP2;8*基因转化对植株表达量的影响

本实验检测了*PtPIP2;8*转化后84K杨根部、茎部和叶片该基因的表达情况(图1)，WT主要在根部表达，茎部和叶片表达量可忽略不计；超表达植株在根部、茎部和叶片的基因转录水平的表达量均上调，分别是WT表达量的4倍、1.7倍和2.1倍，显著高于WT的表达量；抑制表达植株的*PtPIP2;8*在根部表达量最高，但仅为WT植株表达量的1/20，茎部和叶片的表达量很低，可忽略不计。

2.2 *PtPIP2;8*基因转化对植株根系导水率的影响

除超表达植株的*PtPIP2;8*基因在茎和叶部有所表达之外，抑制表达和WT植株主要在根系表达，可见该基因能调节根系水分的跨膜运输。根系导水率测定结果显示，在正常供水条件下，超表达植株根系导水率显著高于WT和抑制表达植株($p < 0.05$)(图2)，抑制表达植株根系导水率最低，WT植株居中，表明*PtPIP2;8*基因参与了根系导水率的调节。

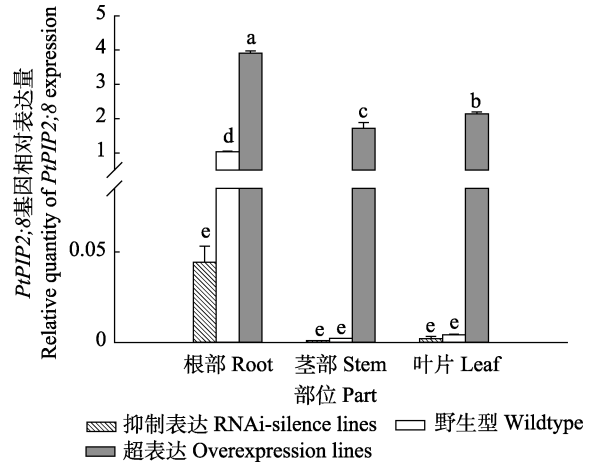


图1 84K杨转基因和野生型植株*PtPIP2;8*基因的相对表达量(平均值+标准偏差)。不同小写字母表示转基因和野生型植株不同部位之间相对表达量差异显著($p < 0.05$)。

Fig. 1 Relative quantity of *PtPIP2;8* gene expression in transgenic and wildtype poplar 84K (mean + SD). Different lowercase letters indicate significant differences in relative expression levels between different parts of transgenic and wildtype plants ($p < 0.05$).

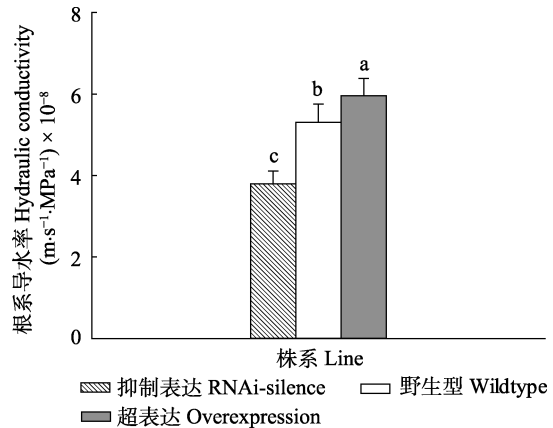


图2 正常水分条件下84K杨转基因和野生型植株根系导水率变化(平均值+标准偏差)。不同小写字母表示转基因和野生型植株之间根系导水率存在显著差异($p < 0.05$)。

Fig. 2 Changes of root hydraulic conductivity of transgenic and wildtype poplar 84K under normal watering condition (mean + SD). Different lowercase letters indicate significant differences in transgenic and wildtype plants ($p < 0.05$).

2.3 *PtPIP2;8*基因转化对植物生长和根系形态的影响

正常水分条件下，抑制表达苗高显著低于超表

达和WT ($p < 0.05$), 超表达和WT苗高无显著差异 ($p > 0.05$)(表2), 表明*PtPIP2;8*基因沉默抑制了苗高。WT植株基径大于($p < 0.05$)抑制表达和超表达植株, 后两者之间没有显著差别。抑制表达植株根冠比显著高于超表达和WT植株($p < 0.05$), 超表达植株根冠比最低, 显著低于WT和抑制表达植株($p < 0.05$)。抑制表达叶面积显著低于超表达和WT植株($p < 0.05$)。抑制表达、WT和超表达植株比叶面积无显著差异($p > 0.05$)。

正常水分条件下, 抑制表达植株总根表面积和总根体积显著大于WT和超表达植株($p < 0.05$)(图3)。抑制表达总根长和总根尖数略大于WT, 但不显著($p > 0.05$), 但显著高于超表达植株($p < 0.05$)。超表达植株总根长、总根表面积、总根体积和总根尖数显著低于WT和抑制表达植株($p < 0.05$), 与WT相比, 超表达植株总根长、总根表面积、总根体积和总根尖数比WT低29.5%、30.6%、34.2%和35.8%, 超表达植株根系显著小于WT。

表2 正常水分条件下84K杨转基因和野生型植株生物量变化(平均值±标准偏差)

Table 2 The change of biomass of transgenic and wildtype poplar 84K under normal water condition (mean ± SD)

株系 Line	基径 Basal diameter (mm)	苗高 Height (cm)	根冠比 Root-shoot ratio	叶面积 Leaf area (cm ²)	比叶面积 Specific leaf area (cm ² ·g ⁻¹)
抑制表达 RNAi-silence	4.93 ± 0.26 ^c	71.60 ± 4.57 ^b	0.54 ± 0.05 ^a	534.35 ± 32.47 ^b	254.33 ± 14.32 ^a
野生型 Wildtype	5.62 ± 0.43 ^a	82.55 ± 4.70 ^a	0.50 ± 0.03 ^b	565.23 ± 25.05 ^a	262.57 ± 20.49 ^a
超表达 Overexpression	5.02 ± 0.46 ^{bc}	83.85 ± 4.99 ^a	0.32 ± 0.02 ^c	576.75 ± 13.31 ^a	240.61 ± 11.19 ^a

不同小写字母表示转基因和野生型植株之间差异显著($p < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant differences of transgenic and wildtype plants ($p < 0.05$).

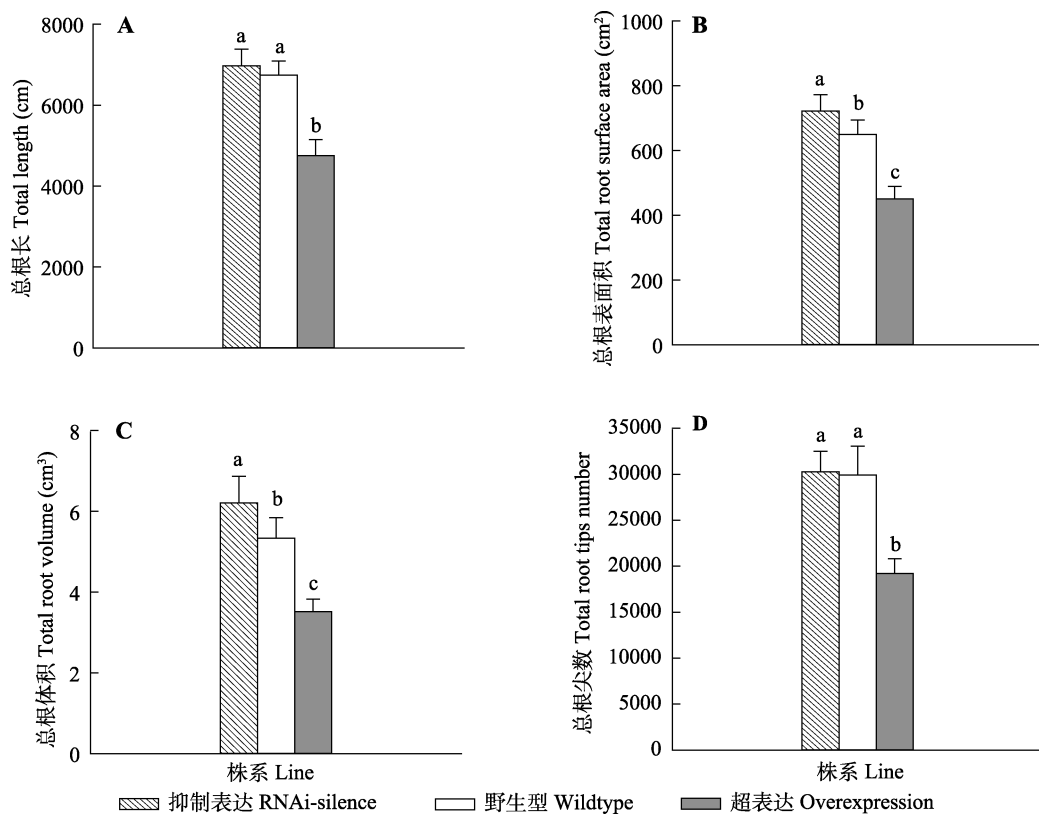


图3 正常水分条件下84K杨转基因和野生型植株根系形态变化(平均值+标准偏差)。不同小写字母表示转基因和野生型植株之间存在显著差异($p < 0.05$)。

Fig. 3 Changes in root morphological traits of transgenic and wildtype poplar 84K under normal water condition (mean + SD). Different lowercase letters indicate significant differences between transgenic and wildtype plants ($p < 0.05$).

2.4 干旱胁迫后, 转基因和WT植株光合反应变化

2.4.1 转基因和WT植株光响应曲线比较

转基因和WT植株光响应曲线用直角双曲线修正模型拟合后绘制(图4)。正常水分条件下, 转基因和WT植株表现相同趋势, 净光合速率(P_n)随着光照强度的增加而增大, 上升到最大值后, P_n 随着光照强度增加仅略微增加, 属饱和趋近型光响应曲线, 曲线从上往下依次为WT > 超表达 > 抑制表达; 干旱胁迫后, WT、超表达植株净光合速率下降幅度较大, 而抑制表达植株仍能保持较高的净光合速率, 光抑制现象不明显, 曲线从上往下变化为抑制表达 > WT > 超表达, 干旱胁迫后, 抑制表达植株对光强的利用能力强于WT和超表达植株。

2.4.2 转基因和WT植株气体交换参数变化

各基因型和WT净光合速率(P_n)和气孔导度(G_s)

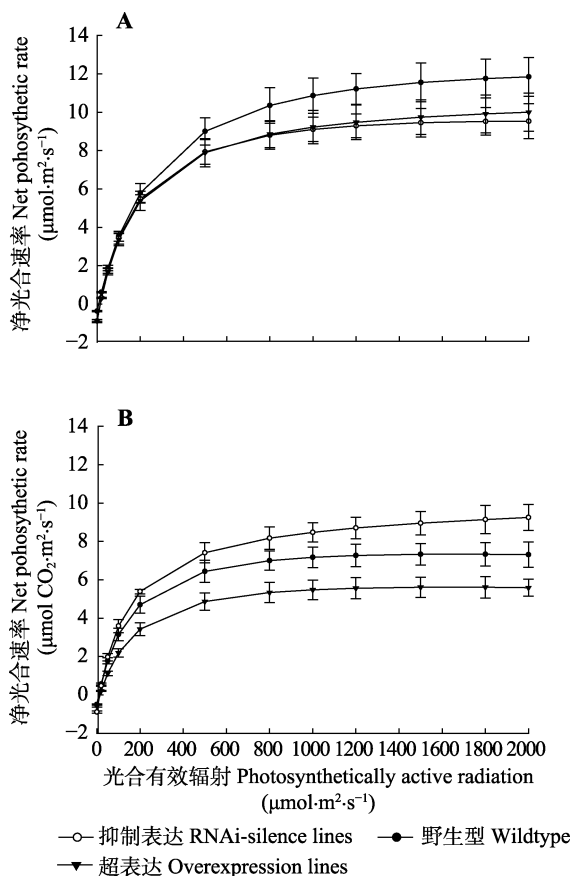


图4 84K杨转基因和野生型植株净光合速率的光响应曲线(平均值±标准偏差)。A, 正常水分条件下净光合速率的光响应曲线。B, 干旱胁迫后净光合速率的光响应曲线。

Fig. 4 Light response curve of net photosynthetic rate in transgenic and wildtype poplar 84K (mean \pm SD). A, Light response of net photosynthetic rate under normal watering conditions. B, Light response of net photosynthetic rate after drought stress.

的日变化规律趋势相同。超表达和WT植株 P_n 日变化呈“双峰”型, 中午均有明显的下降; 抑制表达植株 P_n 日变化呈“单峰”型(图5)。干旱胁迫后, WT和超表达植株在13:00、15:00, P_n 明显下降($p < 0.05$); 抑制表达 P_n 变化不显著, 仅在11:00略微下降, 且下降不显著($p > 0.05$)。

2.5 干旱胁迫后, 转基因和WT植株生长和根系形态的变化

2.5.1 干旱胁迫后, 转基因和WT植株生物量变化

干旱胁迫后, 转基因和WT植株生长速率均下降, 超表达和WT植株基茎、苗高下降的程度显著($p < 0.05$), 抑制表达植株下降最少, 相对生长速率显著高于WT和超表达植株(表3)。抑制表达植株地上生物量、叶面积和根冠比下降最少, 叶面积、根冠比显著高于WT和超表达植株($p < 0.05$)。超表达植株地上生物量、叶面积、根冠比下降最显著($p < 0.05$)。

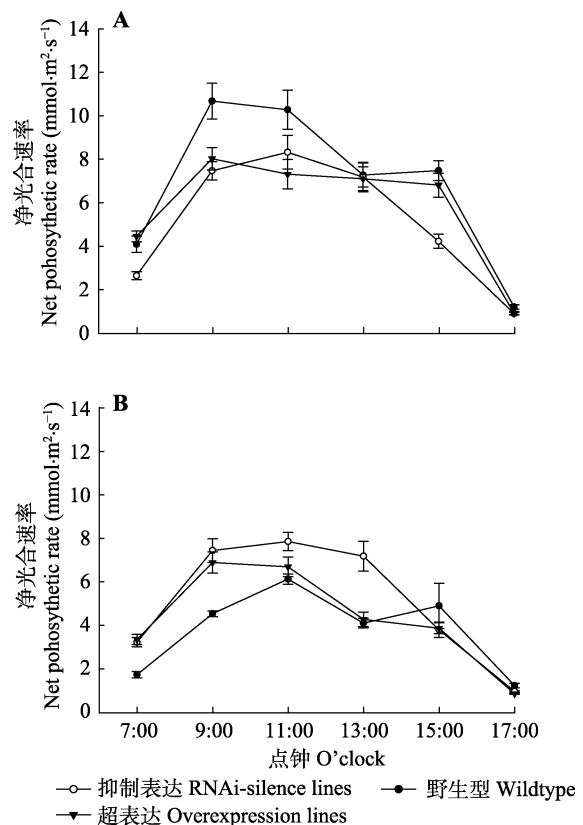


图5 84K杨转基因和野生型植株净光合速率日变化(平均值±标准偏差)。A, 正常水分条件下净光合速率日变化。B, 干旱胁迫后净光合速率日变化。

Fig. 5 Diurnal variations of net photosynthetic rate in transgenic and wildtype poplar 84K (mean \pm SD). A, Diurnal variations of net photosynthetic rate under normal watering conditions. B, Diurnal variations of net photosynthetic rate after drought stress.

表3 干旱胁迫后84K杨转基因和野生型植株相对生长速率及生物量变化(平均值±标准偏差)

Table 3 Changes of relative growth rate and biomass of transgenic and wildtype poplar 84K after drought stress (mean ± SD)

株系 Line	基径 Basal diameter (%)	苗高 Height (%)	地上生物量 Aboveground biomass (%)	地下生物量 Belowground biomass (%)	根冠比 Root shoot ratio	叶面积 Leaf area (%)
抑制表达 RNAi-silence	97 ± 3 ^a	94 ± 3 ^a	93 ± 2 ^a	84 ± 5 ^a	0.5 ± 0.02 ^a	68 ± 4 ^a
野生型 Wildtype	92 ± 3 ^b	88 ± 4 ^b	86 ± 7 ^b	77 ± 4 ^b	0.4 ± 0.03 ^b	44 ± 2 ^b
超表达 Overexpression	92 ± 2 ^b	87 ± 4 ^b	77 ± 3 ^c	76 ± 5 ^b	0.3 ± 0.02 ^c	43 ± 2 ^b

不同小写字母表示干旱胁迫后转基因和野生型植株之间差异显著($p < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant differences between transgenic and wildtype plants after drought stress ($p < 0.05$).

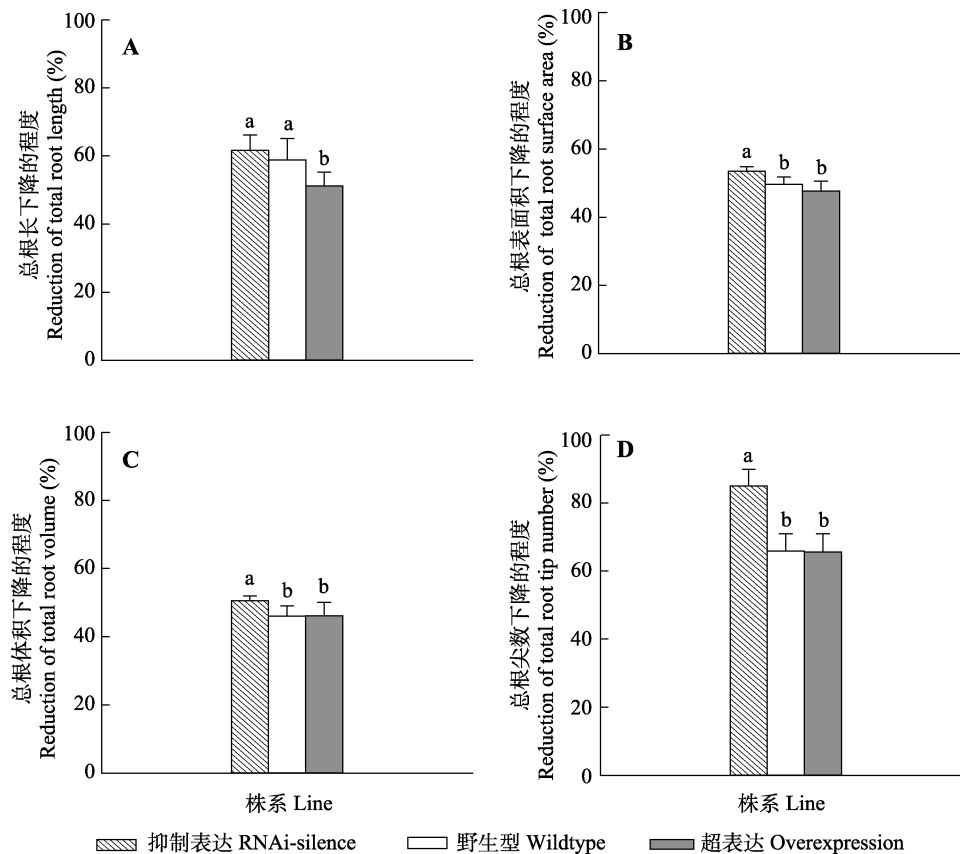


图6 干旱胁迫后转基因和野生型84K杨根系形态变化(平均值+标准偏差)。不同小写字母表示转基因和野生型植株之间存在显著差异($p < 0.05$)。

Fig. 6 Changes of root morphological traits of transgenic and wildtype poplar 84K after drought dress (mean + SD). Different lowercase letters indicate significant differences between transgenic and wildtype plants ($p < 0.05$).

2.5.2 干旱胁迫后, 转基因和WT植株根系形态变化

干旱胁迫后, 抑制表达植株总根表面积、总根体积和总根尖数显著高于超表达和WT植株($p < 0.05$)(图6)。抑制表达植株总根长显著高于超表达植株($p < 0.05$), 略高于WT, 但没有显著区别($p > 0.05$)。

3 讨论

在水通道蛋白研究中, PIP2s多表现为更强的水通道活性, 具有提高水分运输效率的功能(Weig *et al.*, 1997; Knipfer *et al.*, 2011; 江林娟等, 2018)。在根

系水通道蛋白研究中发现, 根尖和侧根包含大量水通道蛋白PIPs, 其表达位点与其功能有着直接关系(Javot & Maurel, 2002), 而*PtPIP2;8*基因在WT植株根部表达。*PtPIP2;8*基因超表达的植株表现出高单位面积根系导水率, 总根长、总根表面积、总根体积和总根尖数却显著低于WT和抑制表达的植株。这意味着*PtPIP2;8*基因超表达的植株仅需要少量的根系就可以维持植株的水分吸收。与此相反, *PtPIP2;8*基因沉默的抑制表达植株则表现为低单位面积根系导水率, 高总根表面积和总根体积。这表

明*PtPIP2;8*基因参与了根系水分运输,有提高水分运输效率的功能,在跨膜运输中起了重要的作用。同时,转基因植物中水通道蛋白的减少,明显影响了抑制表达植株的生长和根系的发育,其通过低的生长速率、小的叶面积,大的根系表面积和根体积来弥补水通道的不足,进而维持植株根系对水分的持续吸收。

正常水分条件下,植物会尽最大可能截获光能积累能量,促进植物的生长;干旱胁迫则会降低植物的生长活力,导致光合作用能力下降,进而影响植物的生长(Boughalleb & Hajlaoui, 2011)。光合作用变化是鉴定植物抗旱性的一个重要指标(赵通等, 2018)。光响应曲线则最能反映植物对光强和环境的适应能力,本研究中,正常水分下的WT植株净光合速率高于转基因植株,但干旱胁迫后,抑制表达植株净光合速率、气孔导度下降幅度最少,在干旱条件下仍表现出较高的光合作用能力。通常,干旱胁迫后,气孔导度和光合速率都下降,随着干旱胁迫的加深,叶肉细胞光合作用受到限制,气孔限制向非气孔限制转变。大量研究认为光合作用“午休”是非气孔因素引起的(姚庆群和谢贵水, 2005),而本研究抑制表达植株净光合速率日变化为“单峰”型,属气孔因素引起的净光合速率下降,气孔限制降低了蒸腾速率,提高了水分利用效率;野生型和超表达植株净光合速率日变化则为“双峰”型,表明光合速率下降是由非气孔因素引起的,表明其对干旱更加敏感,干旱对其影响更大。

本研究中超表达植株对干旱胁迫更敏感,究其原因应与水通道蛋白的表达有关。关于水通道蛋白对干旱胁迫的响应有2种观点:一种认为增加水通道蛋白的表达可以增强植物对水分的调控;另一种观点则相反,认为水通道蛋白过量表达会加剧水分的运输和流失,加剧了水分缺乏对植物的影响(Zelazny *et al.*, 2007)。干旱胁迫后,转基因和WT植株生长均受到影响,超表达植株增高、增粗生长和总生物量分别降低了12.5%、8.2%和47.0%,下降程度最高,对干旱胁迫更为敏感,这与Katsuhara等(2003)研究超表达*HvPIP2;1*基因的大麦(*Hordeum vulgare*)盐胁迫结果相同,超表达植株根系明显变小,根系导水率显著高于WT,对盐胁迫更敏感(Katsuhara *et al.*, 2003)。本研究结果与水通道蛋白响应干旱胁迫的第二种观点一致,干旱条件下,超表

达植株水通道蛋白的过量表达形成高效的水分供应导致植株水分损失过多,对干旱更加敏感,抗旱能力最差,这说明在干旱条件下,植物组织中水分运输的增加不利于植物的抗旱(Aharon *et al.*, 2003)。抑制表达植株苗高、基径、叶面积则显著小于WT,这与Siefritz等(2002)研究转*PIP1*抑制表达的烟草中抑制表达与WT植株表型无差异的结果是不同的。本研究中,水通道蛋白*PtPIP2;8*基因沉默影响了抑制表达植株的生长,其生长速率显著低于WT,但干旱胁迫后,抑制表达、超表达和WT植株总生物量分别减少了23.3%、47.0%和37.4%,叶面积分别减少了32.0%、57.0%和56.0%,抑制表达植株受干旱胁迫的影响更小,其具有更强抗旱能力(黄娟等, 2017)。

根系结构研究发现,正常水分条件下,抑制表达植株总根表面积、总根体积显著高于WT,根系的生长竞争抑制了地上部分生长,抑制表达显著低于WT和超表达植株,根冠比增加,这与转*PIP1*的拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)通过增加根系质量来弥补水通道蛋白的减少的研究结果(Kaldenhoff *et al.*, 1998)相同。根系在抵抗干旱和维持植株水平衡中,具有重要的作用(Prieto *et al.*, 2012),正常水分条件下,抑制表达植株具有大的根系表面积、高的根冠比;干旱胁迫后,其总表面积、总体积、总根尖数显著高于WT植株,其根系的发育有利于土壤的水分吸收(Matsunami *et al.*, 2016)。因此,维持较大的根冠比、总根表面积、总根尖数应该是抑制表达植株抵抗干旱的一种策略。总之,*PtPIP2;8*基因通过表达量的变化影响了超表达和抑制表达植株的生长和根系的发育,水通道蛋白的过多表达,增加了植物快速运输水分的能力,降低了植株抵抗干旱的能力;抑制表达非水通道蛋白的导水机制增强了其对干旱的耐受能力,这可以为新的耐旱转基因杨树的研究提供参考。

参考文献

- Aharon R, Shahak Y, Wininger S, Bendov R, Kapulnik Y, Galili G (2003). Overexpression of a plasma membrane aquaporin in transgenic tobacco improves plant vigor under favorable growth conditions but not under drought or salt stress. *The Plant Cell*, 15, 1–9.
- Alexandersson E, Fraysse L, Sjövall-Larsen S, Gustavsson S, Fellert M, Karlsson M, Johanson U, Kjellbom P (2005). Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. *Plant Molecular Biology*, 59, 469–484.

- Bao ZLT, Gao L, Wang SM (2017). Physiological functions of plant aquaporin. *Plant Physiology Journal*, 53, 1171–1178. [包珠拉太, 高丽, 王锁民 (2017). 植物水通道蛋白及其生理功能. *植物生理学报*, 53, 1171–1178.]
- Bots M, Feron R, Uehlein N, Weterings K, Kaldenhoff R, Mariani T (2005a). *PIP1* and *PIP2* aquaporins are differentially expressed during tobacco anther and stigma development. *Journal of Experimental Botany*, 56, 113–121.
- Bots M, Vergeldt F, Wolters-Arts M, Weterings K, van As H, Mariani C (2005b). Aquaporins of the *PIP2* class are required for efficient anther dehiscence in tobacco. *Plant Physiology*, 137, 1049–1056.
- Boughalleb F, Hajlaoui H (2011). Physiological and anatomical changes induced by drought in two olive cultivars (cv Zalmati and Chemlali). *Acta Physiologiae Plantarum*, 33, 53–65.
- Cai Q, Ding GJ, Wen XP (2016). Cloning of the *PmPIP1* gene from *Pinus massoniana* and its expression with drought stress. *Journal of Zhejiang A&F University*, 33, 191–200. [蔡琼, 丁贵杰, 文晓鹏 (2016). 马尾松水通道蛋白 *PmPIP1* 基因克隆及在干旱胁迫下的表达分析. *浙江农林大学学报*, 33, 191–200.]
- Chaumont F, Tyerman SD (2014). Aquaporins: highly regulated channels controlling plant water relations. *Plant Physiology*, 164, 1600–1618.
- Fotiadis D, Jenö P, Mini T, Wirtz S, Müller SA, Frayssé L, Kjellbom P, Engel A (2001). Structural characterization of two aquaporins isolated from native spinach leaf plasma membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 1707–1714.
- Huang J, Chen C, Zhang WX, Ding CJ, Su XH, Huang QJ (2017). Effects of drought stress on anatomical structure and photosynthetic characteristics of transgenic JERF36 *Populus alba* × *P. berolinensis* seedling leaves. *Scientia Silvae Sinicae*, 53(5), 8–15. [黄绢, 陈存, 张伟溪, 丁昌俊, 苏晓华, 黄秦军 (2017). 干旱胁迫对转JERF36银中杨苗木叶片解剖结构及光合特性的影响. *林业科学*, 53(5), 8–15.]
- Javot H, Maurel C (2002). The role of aquaporins in root water uptake. *Annals of Botany*, 90, 301–313.
- Jiang LJ, Chen CH, Yan X, Yang SM (2018). Research progress on responsive mechanism of aquaporins to drought stress in plants. *Guihaia*, 38, 672–680. [江林娟, 陈春华, 颜旭, 杨世民 (2018). 植物水通道蛋白的干旱应答机制研究进展. *广西植物*, 38, 672–680.]
- Johansson I, Karlsson M, Johanson U, Larsson C, Kjellbom P (2000). The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1465, 324–342.
- Kaldenhoff R, Grote K, Zhu JJ, Zimmermann U (1998). Significance of plasmalemma aquaporins for water-transport in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 14, 121–128.
- Kammerloher W, Fischer U, Piechottka GP, Schäffner AR (1994). Water channels in the plant plasma membrane cloned by immunoselection from a mammalian expression. *The Plant Journal*, 6, 187–199.
- Katsuhara M, Koshio K, Shibasaka M, Hayashi Y, Hayakawa T, Kasamo K (2003). Over-expression of a barley aquaporin increased the shoot/root ratio and raised salt sensitivity in transgenic rice plants. *Plant and Cell Physiology*, 44, 1378–1383.
- Knapp AK, Smith MD (2001). Variation among biomes in temporal dynamics of aboveground primary production. *Science*, 291, 481–484.
- Knipfer T, Besse M, Verdeil JL, Fricke W (2011). Aquaporin-facilitated water uptake in barley (*Hordeum vulgare* L.) roots. *Journal of Experimental Botany*, 62, 4115–4126.
- Leng HN (2012). *Cloning and Expression of PIPs Gene in Populus and Aquaporins Role in Embolism Recovery*. PhD dissertation, Chinese Academy of Forestry, Beijing. 23–95. [冷华妮 (2012). 植物栓塞修复机制与质膜内在水通道蛋白基因的克隆、表达和转基因研究. 博士学位论文, 中国林业科学研究院, 北京. 23–95.]
- Lopez F, Bousser A, Sissoëff I, Gaspar M, Lachaise B, Hoarau J, Mahé A (2003). Diurnal regulation of water transport and aquaporin gene expression in maize roots: contribution of *PIP2* proteins. *Plant and Cell Physiology*, 44, 1384–1395.
- Lovisolo C, Secchi F, Nardini A, Salleo S, Buffa R, Schubert A (2007). Expression of *PIP1* and *PIP2* aquaporins is enhanced in olive dwarf genotypes and is related to root and leaf hydraulic conductance. *Physiologia Plantarum*, 130, 543–551.
- Martre P, Morillon R, Barrieu F, North GB, Nobel PS, Chrispeels MJ (2002). Plasma membrane aquaporins play a significant role during recovery from water deficit. *Plant Physiology*, 130, 2101–2110.
- Martre P, North GB, Nobel PS (2001). Hydraulic conductance and mercury-sensitive water transport for roots of *Opuntia acanthocarpa* in relation to soil drying and rewetting. *Plant Physiology*, 126, 352–362.
- Matsunami M, Toyofuku K, Ishikawa-Sakurai J, Ogawa A, Matsunami T, Kokubun M (2016). Root development and the expression of aquaporin genes in rice seedlings under osmotic stress. *Plant Production Science*, 19, 315–322.
- O'Brien M, Bertrand C, Matton DP (2002). Characterization of a fertilization-induced and developmentally regulated plasma-membrane aquaporin expressed in reproductive tissues, in the wild potato *Solanum chacoense* Bitt. *Planta*, 215, 485–493.
- Prieto I, Armas C, Pugnaire FI (2012). Water release through plant roots: new insights into its consequences at the plant and ecosystem level. *New Phytologist*, 193, 830–841.
- Schuurmans JAMJ, van Dongen JT, Rutjens BPW, Boonman A, Pieterse CMJ, Borstlap AC (2003). Members of the aquaporin family in the developing pea seed coat include

- representatives of the *PIP*, *TIP*, and *NIP* subfamilies. *Plant Molecular Biology*, 53, 655–667.
- Siefritz F, Tyree MT, Lovisolo C, Schubert A, Kaldenhoff R (2002). PIP1 plasma membrane aquaporins in tobacco: from cellular effects to function in plants. *The Plant Cell*, 14, 869–876.
- Steudle E, Peterson CA (1998). How does water get through roots? *Journal of Experimental Botany*, 49, 775–788.
- Suga S, Imagawa S, Maeshima M (2001). Specificity of the accumulation of mRNAs and proteins of the plasma membrane and tonoplast aquaporins in radish organs. *Planta*, 212, 294–304.
- Weig A, Deswarte C, Chrispeels MJ (1997). The major intrinsic protein family of Arabidopsis has 23 members that form three distinct groups with functional aquaporins in each group. *Plant Physiology*, 114, 1347–1357.
- Yao QQ, Xie GS (2005). The photosynthetic stomatal and non-stomatal limitation under drought stress. *Chinese Journal of Tropical Agriculture*, 25(4), 80–85. [姚庆群, 谢贵水 (2005). 干旱胁迫下光合作用的气孔与非气孔限制. 热带农业科学, 25(4), 80–85.]
- Zelazny E, Borst JW, Muylaert M, Batoko H, Hemminga MA, Chaumont F (2007). FRET imaging in living maize cells reveals that plasma membrane aquaporins interact to regulate their subcellular localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 12359–12364.
- Zhao T, Cheng L, Wang C, You JQ, Zhu YF, Wang YX (2018). Effect of different apple scion-rootstock combinations on growth and photosynthesis characteristics. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 38, 1707–1716. [赵通, 程丽, 王城, 游继权, 朱燕芳, 王延秀 (2018). 不同苹果砧穗组合的生长及光合特性. 西北植物学报, 38, 1707–1716.]
- Zhou XY (2013). *Research on 84K Populus Regeneration and Genetic Transformation System*. Master degree dissertation, Northeast Forestry University, Harbin. 1–8. [周熙莹 (2013). 84K杨再生和遗传转化体系的研究. 硕士学位论文, 东北林业大学, 哈尔滨. 1–8.]

责任编辑: 杜 盛 责任编辑: 李 敏