

杨树脯氨酸合成关键基因 *PagP5CS1* 全长克隆及功能验证

任若寒¹,王海泽²,吴承生³,衡启蒙¹,陈文义¹,孙甜甜¹,张丽娟¹,贺浩冉¹,
李 想¹,张银燕¹,樊军锋¹,张 一^{1*}

(1. 西北农林科技大学 林学院,国家林业和草原局黄土高原林木培育重点实验室,陕西 杨陵 712100;

2. 陕西省安康市林业技术推广中心,陕西 安康 725000;3. 江西省赣州市崇义县农业农村局,江西 赣州 341399)

摘 要:杨树是重要的工业用材树种。我国北方干旱和半干旱地区水分匮乏,干旱已成为影响杨树人工林可持续发展的一个重要因素。游离脯氨酸的积累常常在植物应对干旱等渗透胁迫时出现,以缓解干旱胁迫带给植物的损害。*P5CS* 作为编码脯氨酸合成关键酶的基因,对于植物调控游离脯氨酸合成、增强耐干旱能力非常关键。该研究克隆 84K 杨脯氨酸合成代谢的关键基因 *PagP5CS1* 并在银中杨内进行遗传转化,从表型、分子和生理水平上对 *PagP5CS1* 转基因杨树株系进行了功能鉴定。本研究构建的 *PagP5CS1* 超表达载体通过叶盘法转化至银中杨叶片,成功获得 12 个 *PagP5CS1* 超表达杨树株系,其中 *P5CS1* 基因表达量最高的转基因株系为野生型表达量的 8.3 倍。经过干旱胁迫处理,相对于野生型,超表达株系叶片萎蔫程度更低;在干旱胁迫下,超表达株系中 *P5CS1* 基因表达量和脯氨酸含量均高于野生型,说明 *P5CS1* 超表达增强了杨树的耐旱性,*P5CS1* 基因在干旱胁迫下发挥了正向调控作用。综上所述,杨树 *P5CS1* 基因对于干旱胁迫高度响应,*PagP5CS1* 超表达杨树会通过增加脯氨酸积累来增强杨树的耐旱性。

关键词:杨树;脯氨酸;*P5CS1*;干旱

中图分类号:S792.11

文献标志码:A

文章编号:1001-7461(2023)04-0090-07

Full-Length Cloning and Functional Berification of *PagP5CS1* From *Populus alba* × *P. glandulosa*

REN Ruo-han¹, WANG Hai-ze², WU Cheng-sheng³, HENG Qi-meng¹, CHEN Wen-yi¹, SUN Tian-tian¹,
ZHANG Li-juan¹, HE Hao-ran¹, LI Xiang¹, ZHANG Yin-yan¹, FAN Jun-feng¹, ZHANG Yi^{1*}

(1. College of Forestry, Key Laboratory of Tree Cultivation on Loess Plateau, National Forestry and Grassland Administration, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China; 2. Shaanxi Ankang Forestry Technology Extension Center, Ankang 725000, Shannxi, China; 3. Ganzhou City, Jiangxi Province Chongyi County Bureau of Agriculture and Rural affairs, Ganzhou 341399, Jiangxi, China)

Abstract: Poplar (*Populus*) is an important timber production species for industry. Drought has become an important factor affecting the sustainable development of poplar plantations in arid and semi-arid areas in Northern China. Under osmotic stress, such as drought, plants often accumulate free proline to alleviate the damage caused by stress. *P5CS*, a gene encoding a key enzyme of proline synthesis, plays an important role in regulating free proline synthesis and enhancing drought tolerance in plants. In this study, *PagP5CS1*, a key gene of proline biosythesis, was cloned from *P. alba* × *P. glandulosa* and transformed into *P. alba* × *P. berolinensis*, and the function of *PagP5CS1* transgenic poplar was identified from phenotypic, molecular and physiological levels. The constructed *PagP5CS1* overexpression vector was transformed into *P. alba* × *P. berolinensis* by leaf disk method, and 12 poplar lines with *PagP5CS1* overexpression were successfully

收稿日期:2022-05-20 修回日期:2022-06-16

基金项目:国家自然科学基金(32171823)。

第一作者:任若寒。研究方向:林木遗传育种。E-mail: ruohan12062021@163.com

* 通信作者:张 一,博士,副研究员,博士生导师。研究方向:林木遗传育种。E-mail: zhangyi780711@163.com

obtained, among which the transgenic line with the highest expression level was 8.3 times that of the wild type. Compared with the wild type, leaf wilting degree of overexpression lines was lower after drought stress treatment. Under drought stress, the gene expression level of *P5CS1* and proline content in the overexpression lines were higher than those in the wild type, indicating that the overexpression of *P5CS1* enhanced the drought tolerance of poplar, and *P5CS1* played a positive regulatory role. In conclusion, *P5CS1* of poplar is highly responsive to drought stress, and *PagP5CS1* overexpression poplar can enhance drought tolerance by increasing proline accumulation.

Key words: poplar; proline; *P5CS1*; drought

受全球气候变暖的影响,干旱极端气候事件发生的越来越频繁、发生的范围也越来越广,严重制约了农作物及林木的生长与产量^[1-2]。杨树(*Populus*)作为世界上种植范围最广的树种之一,不仅是我国工业中重要的纸浆用材树种,也是速生丰产的造林树种,其人工林在短轮伐系统中具有巨大的生物能源潜力,具有根系发达、生长发育快和较强适应性等优势^[3-5]。由于杨树的地上部分生长快,生物量大,所以对水分的需求量大。而大多数杨树人工林种植在水分等资源有限的边缘地带,尤其在我国的干旱和半干旱地区,其经营管理方式比较粗放,杨树的生长发育受到了水分匮乏和干旱胁迫的严重抑制。这就对杨树的抗逆育种尤其是耐干旱遗传改良提出了更高要求。

植物经过长期的进化,已经演变出包括抗氧化代谢,渗透调节(OA)和离子稳态等代谢机制来缓解环境胁迫对植物的损害^[3-5]。脯氨酸(Proline)是植物中最重要的渗透调节剂之一^[6-7]。在应对渗透胁迫时,植物细胞通过合成和积累脯氨酸来维持体内渗透压平衡,并保持细胞膨胀,以便在不利环境中生长和发育^[8-10]。脯氨酸的生物合成一般由谷氨酸途径或鸟氨酸途径进行^[11-12]。在渗透胁迫条件下,谷氨酸途径在脯氨酸合成中占优势,在谷氨酸途径中,双功能酶P5CS除了起催化作用,也作为限速酶来控制脯氨酸的生物合成^[13]。所以我们推测编码P5CS酶的编码基因P5CS在植物应对渗透胁迫中扮演重要角色。在大多数植物物种中,已分离出P5CS基因。拟南芥中的P5CS酶由2个基因编码,AtP5CS1高度响应渗透胁迫,并受ABA信号的调节,而AtP5CS2被认为是一种管家基因,在整个植物中具有组成型表达^[12,14]。在水稻中,P5CS1基因受盐、干旱和低温的诱导,并在所有器官中普遍表达,而P5CS2则在成熟植株中表达,可被NaCl和甘露醇诱导表达^[15-16]。在梭梭中克隆出P5CS基因为后续培育抗逆新品种提供了新的基因资源^[17]。过表达乌头叶豇豆VaP5CS的转基因小麦对干旱胁迫的耐受性增强^[18]。过表达PvP5CS1和PvP5CS2提高了拟南

芥和柳枝稷的耐盐性^[19]。这些研究表明P5CS基因在渗透胁迫中发挥了重要作用。

由于P5CS基因在渗透胁迫中发挥的重要调控作用,选择以84K杨中的*PagP5CS1*基因作为研究对象,利用农杆菌介导的方法转化进银中杨中,获得超表达杨树株系,并对转基因杨树在表型、分子和生理水平上进行耐干旱胁迫功能验证,从而来探究杨树脯氨酸合成*PagP5CS1*基因对杨树耐受干旱胁迫的调控机制。本研究将为杨树抗逆遗传改良和分子育种提供理论依据和基因资源。

1 材料与方法

1.1 植物与载体材料

植物材料为优良白杨无性系84K(*Populus alba* × *P. glandulosa*)和银中杨(*Populus alba* × *P. berolinensis*)。其中84K杨为从韩国引进的银白杨×腺毛杨的杂种无性系,具有发达的根系、较高的插条育苗成活率和较强抗病性等特点,是白杨派杂交育种的重要亲本材料,因此本研究以84K杨的*PagP5CS1*基因作为目标基因进行研究。银中杨是人工选育的银白杨×中东杨的优良杂种无性系,常作为绿化行道树,具有较高的经济价值^[20]。本实验室中已建立起成熟的银中杨遗传转化体系,因此本试验用银中杨作为遗传转化的受体材料。所用的84K杨和银中杨的无菌组培苗以及表达载体pMDC32,均由本实验室保存。

1.2 试验方法

1.2.1 *PagP5CS1* 基因全长克隆 提取整株84K杨无菌苗的RNA(OmniPlant RNA Kit (DNase I), 康为世纪, 中国),并将所提取得到的84K杨RNA反转录为cDNA(HiFiScript cDNA Synthesis Kit, 康为世纪, 中国)。以经过基因组测序的毛果杨数据库中的*PtP5CS1*基因(登录号: POTRI.010G198400)的CDS序列作为参考,在Primer 5.0软件上设计*P5CS1*的全长扩增引物,并使用DNA-MAN软件进行比对来保证引物特异性。引物序列见表1中(*PtP5CS1*)。以84K杨cDNA为模板,进

行 PCR 基因扩增。扩增条带在凝胶成像系统下与 Marker 2000 plus 相对比,确认条带位置正确后,对

P5CS1 基因产物进行纯化回收,并将纯化回收产物送去测序。

表 1 *PagP5CS1* 基因克隆引物序列

Table 1 Cloning primer sequence of *PagP5CS1* gene

引物名称	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
<i>PtP5CS1</i>	ATGAACGGCACGGATCCT	CTAATCGACTGATTGCAAGGTCA
<i>HYG-P5CS1</i>	GTCGGTTTCCACTATCGGCGAGTAC	TGGAGCGAGGCGATGTTTCGG
<i>qpcr-P5CS1</i>	GATGGAAGATTAGCCCTTGGG	CGGCGAAGCTGCTGTAACT

1.2.2 *PagP5CS1* 超表达载体构建 根据 pMDC32 载体图谱,选取 pMDC32 载体上的 *Asc* I 和 *Sal* I 位点,使用相应的内切酶(NEB,美国)进行双酶切。酶切后的载体质粒使用 DNA 凝胶回收试剂盒(天根,中国)进行纯化,在凝胶成像系统下观察条带,检测是否得到线性化载体。

将目的基因与线性化载体进行重组,并将重组产物转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态中,并将产物送去测序,将测序结果正确的重组产物转化至农杆菌 GV3101 感受态中,同样对长出的单菌落进行 PCR 来验证是否转化成功。

1.2.3 遗传转化获得转基因银中杨株系 采用农杆菌介导的叶盘法来获得转基因杨树株系。

1.2.3.1 银中杨叶片预培养 选取长大约 4 周无污染且状态良好的银中杨无菌组培苗,在无菌超净工作台上剪取从上数第 3~5 片叶片深绿、叶面积较大、质地较厚、具有较强生命力的叶片,割伤叶片主脉,横向划 3~4 条伤口,将切好的叶片倒置放在分化培养基中在黑暗处预培养 2~3 d。

1.2.3.2 农杆菌浸染液的制备 小摇:取出一 80℃ 保存的转化好的农杆菌菌液,解冻,在含 200 mg/L Kan(Kanamycin)和 200 mg/L Rif(Rifampicin)的 LB 固体平板培养基上划线培养单克隆菌落,待培养出单克隆菌落,取含有 200 mg/L Kan(Kanamycin)和 200 mg/L Rif(Rifampicin)的 LB 液体培养基,挑取单克隆菌落至 10 mL 含有 200 mg/L Kan(Kanamycin)和 200 mg/L Rif(Rifampicin)的 LB 液体培养基中,28℃,200 r/m,摇菌 16 h。

大摇:吸取 1 000 μ L 小摇后的菌液到 100 mL 含有 200 mg/L Kan(Kanamycin)和 200 mg/L Rif(Rifampicin)的 LB 液体培养基中,28℃,200 r/m,摇菌大约 12 h。用紫外分光光度计测定大摇后的农杆菌菌液 OD₆₀₀ 值是否在 0.6~0.8。

1.2.3.3 农杆菌介导法遗传转化 将预培养后的叶片浸入制备好的浸染液中浸染 10~15 min,期间不断地摇动使叶片与菌液充分接触。

取出叶片用无菌滤纸吸干多余菌液,叶片正面朝下放入分化培养基中。黑暗下共培养 3 d 后转至

选择培养基中。

将叶片接入选择培养基后,每 15 d 更换 1 次选择培养基,每天观察,待不定芽出现并生长至 1 cm,再把不定芽转至含筛选抗生素(潮霉素)的银中杨生根培养基诱导生根。

1.2.4 超表达转基因杨树阳性鉴定 选取在潮霉素筛选培养基上生根且生长状态良好的转化杨树植株,取样叶片用于后续鉴定。

提取转化生根杨树的 DNA(Universal Genomic DNA Kit,康为世纪,中国),根据 pMDC32 载体序列和目的基因序列设计鉴定引物,鉴定引物序列见表 1(*HYG-P5CS1*)。利用鉴定引物和提取转化生根杨树的 DNA,进行 PCR 扩增来检验转化生根的杨树植株是否为阳性转基因植株。

1.2.5 超表达转基因杨树目的基因表达量测定 提取鉴定为阳性的转基因杨树的 RNA(OmniPlant RNA Kit (DNase I),康为世纪,中国)。并反转录为 cDNA(HiFiScript cDNA Synthesis Kit,康为世纪,中国)。以 20 μ L 反应体系(UltraSYBR Mixture,康为世纪,中国)、两步法扩增在 CFX96 定量 PCR 仪上进行荧光定量,通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 的方法对基因的相对表达量进行计算。在 Primer5.0 软件上设计目的基因荧光定量引物,序列见表 1(*qpcr-P5CS1*)。

1.2.6 脯氨酸含量测定 取 0.1 g 左右样品,参照茚三酮法进行脯氨酸测定。测定公式为

$$\text{脯氨酸}(\mu\text{g/g} \cdot F_w) = (C \times V_t) / (F_w \times V_s)$$

式中: C 为以标曲所得脯氨酸含量(μg); V_t 为样品提取液体积(mL); V_s 为测定时所用提取液体积(mL); F_w 为样品干重(g)。

1.2.7 数据分析 使用 Excel 2007 对数据进行统计分析。并采用 SAS 软件(SAS Institute, Cary, NC;1996)对试验数据进行 LSD 单因素方差分析和显著性分析。

2 结果与分析

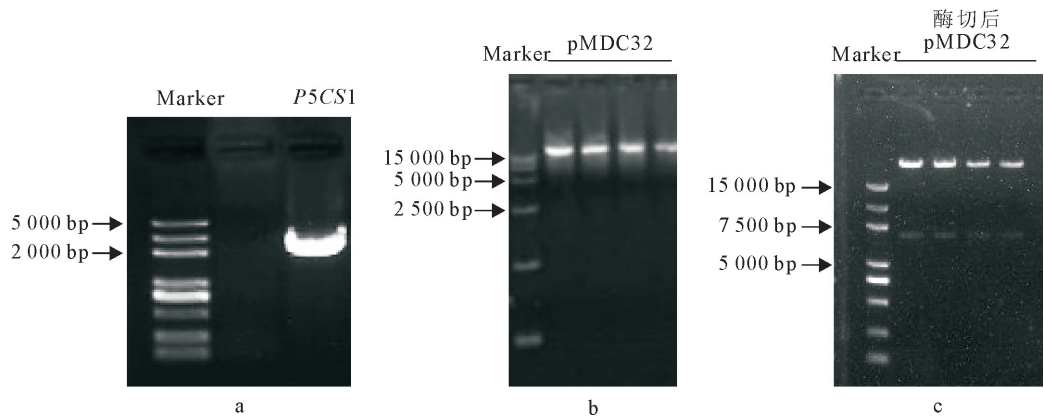
2.1 *PagP5CS1* 超表达载体构建

根据毛果杨数据库中 *P5CS1* 基因序列设计引物,克隆出 *PagP5CS1* 基因。毛果杨 *P5CS1* 基因

CDS 区域序列全长 2 160 bp,图 1a 显示,与 marker 相比,克隆出的目的基因条带在 2 000~3 000 bp,对基因产物测序,经过与毛果杨 *P5CS1* 基因 CDS 区域序列进行比对,结果与预期相一致,证明克隆的目的基因即为 *PagP5CS1*。*PagP5CS1* 基因开放阅读框有 2 160 bp,由 719 个氨基酸编码组成。

将提取得到的 pMDC32 植物表达载体进行电

泳凝胶检测,如图 1a 所示,可见在 15 000 bp 的 marker 上方出现清晰、明亮的条带,表明质粒提取成功。对提取出的质粒在 *Asc* I 和 *Sal* I 这 2 个位点进行双酶切,进行紫外凝胶成像显示,如图 1c 所示,经过双酶切的质粒跑出了 2 条带,一条在 > 15 000 bp 的位置,一条在 5 000~7 500 bp 的位置,表明载体质粒已被完全双酶切,获得了线性化载体。



a. *P5CS1* 全长序列;b. 植物表达载体 pMDC32;c. pMDC32 双酶切。

图 1 凝胶电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis map

2.2 重组载体转化至农杆菌

将得到的线性化载体与目的基因 *PagP5CS1* 产物进行连接,将重组载体转化至大肠杆菌感受态中。将构建成功的 *PagP5CS1* 超表达载体转化至农杆菌感受态内,为了确定超表达载体是否成功转化进农杆菌细胞中,后续进行了农杆菌菌液 PCR 来验证,如图 2 所示,超表达载体中目的基因大约处于 2 000 bp 上方的位置,表明载体 OE-*PagP5CS1* 成功转化至农杆菌中。

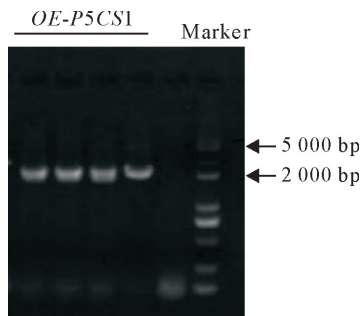


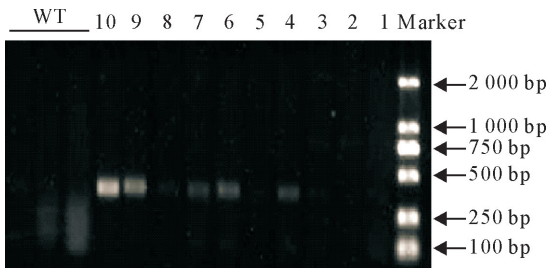
图 2 农杆菌菌液 PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of Agrobacterium by PCR

2.3 超表达 *PagP5CS1* 银中杨的获得

为了进一步探究 *PagP5CS1* 基因的功能,构建了该基因的超表达载体,并将其通过农杆菌介导的方法侵染银中杨叶脉的伤口,使目的基因导进银中杨植株中。再通过诱导分化、筛选生根等获得超表达 *PagP5CS1* 银中杨株系。

取经过初步抗性筛选的银中杨株系的叶片,提取其 DNA,在载体上取 346 bp 的片段来设计引物用作筛选,通过 PCR 扩增,结果如图 3 所示,可见在野生型 WT 处没有条带,在 1~10 号的株系中,有 5 株扩增条带在 250~500 bp,符合筛选产物片段长度,说明银中杨通过农杆菌介导法转化的阳性率达到 50%。



WT:野生型;1-10:转 *PagP5CS1* 杨树。

图 3 转 *PagP5CS1* 杨树在 DNA 水平上的检测

Fig. 3 Detection of transgenic poplar with *PagP5CS1* gene at DNA level

2.4 转基因银中杨基因表达量检测

对检测为阳性的超表达 *PagP5CS1* 转基因株系进一步通过 qPCR 试验,测定其基因表达量。结果如图 4 所示,共检测出 12 个株系呈现出 *P5CS1* 基因表达量增加的结果,其中 OE-1 株系过表达倍数最高,*P5CS1* 基因表达量为野生型的 8.3 倍,其次是 OE-8 和 OE-11 株系 *PtP5CS1* 基因表达量分别为野生型的 5.9 倍和 5.6 倍,*P5CS1* 基因表达量

相对较低的 OE-2 和 OE-3 株系分别是野生型的 1.9 倍和 2.6 倍。基因表达量在不同株系中出现高低不一致的情况可能是由于外植体叶片状态和活化的农杆菌菌液浓度不一致导致的。选取 *P5CS1* 基因表达量最高的 OE-1 株系和处于平均水平的 OE-7 株系进行后续的盆栽种植与耐干旱功能验证。

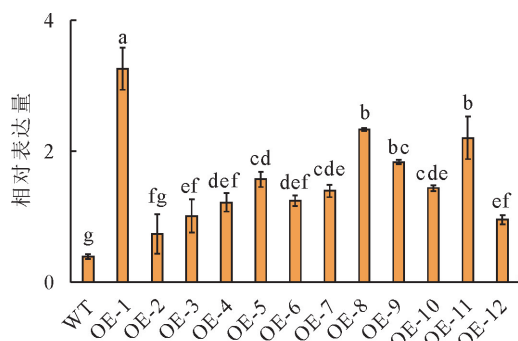


图 4 转 *PagP5CS1* 杨树的基因表达量测定

Fig. 4 Determination of gene expression in transgenic poplar with *PagP5CS1*

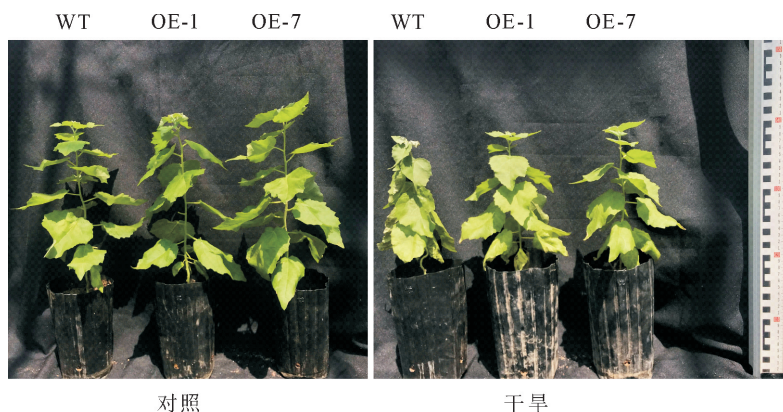
2.5 *PagP5CS1* 超表达杨树的耐干旱验证

我们通过种植 *PagP5CS1* 超表达杨树盆栽苗

和野生型盆栽苗进行对比,来验证 *P5CS1* 基因的耐干旱功能。在干旱胁迫 20 d 的情况下,野生型与 *PagP5CS1* 超表达株系表现不同(图 5)。在湿润处理下,野生型与 OE-1 和 OE-7 株系生长状况并无差别。而在干旱胁迫下,各个株系均出现萎蔫情况,但 *PagP5CS1* 超表达株系 OE-1 和 OE-7 萎蔫程度明显低于野生型株系。

后续对 *PagP5CS1* 超表达杨树与野生型杨树在干旱胁迫下茎干中的 *P5CS1* 目的基因相对表达量,结果如图 6A 所示。在干旱胁迫下,OE-1 株系和 OE-7 株系相对于野生型目的基因表达量均有提高,且 OE-1 株系基因表达量比 OE-7 株系更高。

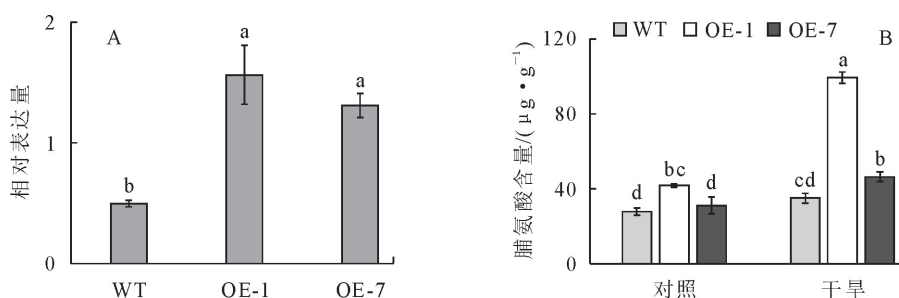
并且对转基因杨树在脯氨酸含量方面进行了验证,结果如图 6B 所示。在湿润处理下,OE-1 株系脯氨酸含量相对于野生型显著提高;而在干旱胁迫下,OE-1 和 OE-7 株系脯氨酸含量相对于野生型显著提升,其中 OE-1 株系的脯氨酸含量比 OE-7 株系更高,OE-1 株系在干旱胁迫下脯氨酸含量是野生型银中杨的近乎 3 倍,OE-7 株系中脯氨酸含量是野生型的 1.3 倍。



WT:野生型;OE-1:转基因杨树株系 1;OE-7:转基因杨树株系 7。

图 5 转 *PagP5CS1* 杨树耐干旱表型分析

Fig. 5 Phenotypic analysis of drought tolerance of transgenic poplar with *PagP5CS1*



A. 在干旱下, *PagP5CS1* 基因相对表达量; B. 脯氨酸含量。

图 6 转基因杨树耐干旱验证

Fig. 6 Verification of drought tolerance of transgenic poplar

3 结论与讨论

3.1 结论

渗透胁迫下脯氨酸会被大量积累以增强植物对胁迫的耐受性,所以编码脯氨酸合成的 *P5CS* 基因作为重要的抗逆基因在许多植物物种的基因工程中均有研究。在本研究中,通过遗传转化,获得超表达 *PagP5CS1* 转基因银中杨株系。经过干旱胁迫处理后发现,表型上,超表达 *PagP5CS1* 转基因杨树株系叶片萎蔫程度明显比野生型更低,基因表达水平上,*PagP5CS1* 基因表达水平相对比野生型有显著升高,且 OE-1 株系基因表达水平比 OE-7 株系更高。进一步测定脯氨酸分析发现,在干旱胁迫下,OE-1 株系和 OE-7 株系的游离脯氨酸含量相对于野生型也有明显提高,这些结果验证了脯氨酸积累与杨树耐旱性呈正相关的假设,表明 *P5CS1* 是杨树应对干旱胁迫的重要候选基因。这对进一步揭示杨树抗旱的分子机理,培育具有更强抗旱能力的杨树新品种,改善生态环境具有重要意义。

3.2 讨论

脯氨酸是一种在高等植物中合成的氨基酸,作为一种相容的渗透质,在胁迫条件下具有至关重要的作用。*P5CS* 作为编码脯氨酸合成的关键基因,在拟南芥^[12]、水稻^[15]和柠条^[21]等物种中受干旱等渗透胁迫诱导而表达水平显著上调,对渗透胁迫高度响应。因此,有关克隆 *P5CS* 基因并验证其在渗透胁迫下的功能研究越来越多。在本研究中,推测 *P5CS1* 在杨树的耐旱通路中有一定作用,所以采用同源克隆法,克隆了 84K 杨的 *PagP5CS1* 基因,通过农杆菌介导法转入银中杨中,获得了转基因株系,并初步验证了 *PagP5CS1* 基因的耐旱功能。

遗传转化技术目前多应用于草本植物中,而在木本植物中研究较少。在遗传转化过程中,阳性转基因植株的获得会受到多方面因素的影响,如外植体叶片的生长状态、预培养时长、农杆菌菌液浓度以及筛选抗生素的浓度等。结合贾小明等^[22]和乌日罕^[23]对河北杨遗传转化体系的研究,我们对银中杨的遗传转化体系进行了优化,以望获得更高的阳性株转化率。在本研究中,将 TDZ(噻苯隆)以 0.01 mg/L 的质量浓度应用于分化培养基中,既促进了不定芽的发生,又避免了不定芽假阳率的增加。并且我们选用 400 mg/L 的羧苄霉素应用于培养基和洗菌过程,在叶盘法培养中有效抑制了农杆菌的爆发,避免了过多农杆菌侵占叶片营养,显著提高了银中杨的遗传转化效率,为后续杨树转基因株系的获得奠定了技术基础。

基因工程的方法常用来验证某个基因的功能。研究表明,过表达朝鲜碱茅 *PuP5CS* 基因的柳枝稷株系表现出表型优势和更强的再生优势^[24];在羽衣甘蓝中异源过表达拟南芥 *AtP5CS1* 基因改善了其在干旱胁迫下的生长性状^[25];拟南芥突变体 *Atp5cs1* 生长速率降低,脯氨酸合成减少,出现对低水势的超敏反应^[26]。在本研究中,超表达 *PagP5CS1* 转基因杨树株系在干旱下叶片生长状态明显优于野生型,萎蔫程度更低,这一结果表明 *PagP5CS1* 基因通过过量表达,改善了杨树在干旱胁迫下的生长状态,增强了其耐旱能力。

当植物细胞在遭受渗透胁迫时,会产生大量脯氨酸以降低胁迫带给植物的损害。在许多物种中,植物抗逆性与脯氨酸积累之间存在高度正相关性。在拟南芥中异源表达菜豆 *PvP5CS1* 和 *PvP5CS2* 基因,过表达株系中脯氨酸的平均含量相对于对照植物增加了 177.1%^[19]。在柳枝稷内异源过表达黑麦草 *LpP5CS* 基因提高了脯氨酸水平^[27]。小叶杨 *P5CS* 基因转进杂种落叶松中,显著提高了落叶松的抗旱能力^[28]。在本研究中,超表达 *PagP5CS1* 杨树株系在干旱胁迫下,目的基因表达水平显著提高,脯氨酸含量相对于野生型增加最多达到几乎 3 倍。这一结果表明,*P5CS1* 基因的过量表达在杨树中会通过增强 Δ^1 -吡咯啉-5-羧酸盐合成酶(*P5CS*)的活性来增加脯氨酸含量的积累,从而明显提高了杨树的耐旱性,说明 *PagP5CS1* 高度响应干旱胁迫,在杨树抗旱通路中发挥重要作用。

参考文献:

- [1] TSAKIRIS G. Drought risk assessment and management[J]. *Water Resources Management*, 2017, 31(10): 3083-3095.
- [2] WANG J C, QIN X M, XU S Q, *et al.* Nitrogen availability affects stem development and response to differential root-zone drought stress in *Catalpa bungei* [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2021, 186(6488): 104429.
- [3] NADARAJAH K K. ROS homeostasis in abiotic stress tolerance in plants[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(15): 5208.
- [4] CLAEYS H, INZÉ D. The agony of choice: how plants balance growth and survival under water-limiting conditions[J]. *Plant physiology*, 2013, 162(4): 1768-1779.
- [5] THORPE G W, REODICA M, DAVIES M J, *et al.* Superoxide radicals have a protective role during H_2O_2 stress[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2013, 24(18): 2876-2884.
- [6] BEN REJEB K, ABDELLEY C, SAVOURÉ A. How reactive oxygen species and proline face stress together[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2014, 80: 278-284.
- [7] ZANDALINAS S I, MITTLER R, BALFAGÓN D, *et al.* Plant adaptations to the combination of drought and high tempera-

- tures[J]. *Physiologia Plantarum*, 2018, 162(1): 2-12.
- [8] PARIDA A K, DAS A B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2005, 60(3): 324-349.
- [9] SHARMA S S, DIETZ K. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57(4): 711-726.
- [10] BURG M B, FERRARIS J D. Intracellular organic osmolytes: function and regulation[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(12): 7309-7313.
- [11] MATTIOLI R, MARCHESE D, DANGELI S, *et al.* Modulation of intracellular proline levels affects flowering time and inflorescence architecture in *Arabidopsis*[J]. *Plant Molecular Biology*, 2008, 66(3): 277-288.
- [12] VERSLUES P E, SHARMA S. Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction[J]. *The Arabidopsis Book*, 2010, 8: e140.
- [13] DELAUNEY A J, VERMA D P S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants[J]. *Plant Journal for Cell & Molecular Biology*, 1993, 4(2): 215-223.
- [14] SZABADOS L, SAVOURE A. Proline: a multifunctional amino acid[J]. *Trends in Plant Science*, 2010, 15(2): 89-97.
- [15] HUR J, JUNG K H, LEE C H, *et al.* Stress-inducible OsP5CS2 gene is essential for salt and cold tolerance in rice[J]. *Plant Science*, 2004, 167(3): 417-426.
- [16] VENDRUSCOLO ECG, SCHUSTER I, PILEGGI M, *et al.* Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2007, 164(10): 1367-1376.
- [17] 马玉花, 冶贵生, 马娟, 等. 柴达木盆地梭梭 P5CS 基因的扩增及序列分析[J]. *西北林学院学报*, 2016, 31(1): 88-91.
- MA Y H, YE G S, MA J, *et al.* Amplification and sequence analysis of P5CS gene in *Haloxylon ammodendron* in Qaidam Basin[J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2016, 31(1): 88-91. (in Chinese)
- [18] CHEN J B, YANG J W, ZHANG Z Y, *et al.* Two P5CS genes from common bean exhibiting different tolerance to salt stress in transgenic *Arabidopsis* [J]. *Journal of Genetics*, 2013, 92(3): 461-469.
- [19] GUAN C, CUI X, LIU H Y, *et al.* Proline biosynthesis enzyme genes confer salt tolerance to switchgrass (*Panicum virgatum* L.) in cooperation with polyamines metabolism[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 46.
- [20] 刘璇, 屈海燕, 王康, 等. 沈阳市 3 种行道树冠层孔隙度研究[J]. *西北林学院学报*, 2021, 36(2): 54-60.
- LIU X, QU H Y, WANG K, *et al.* Canopy porosity of three greening tree species in the streets of Shenyang city[J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2021, 36(2): 54-60. (in Chinese)
- [21] 寇明刚. 柠条 P5CS 基因的克隆、表达分析及盐胁迫下生理指标的变化[D]. 兰州: 西北师范大学, 2015.
- [22] 贾小明, 樊军锋. 影响农杆菌介导的河北杨遗传转化的因素[J]. *西北林学院学报*, 2006, 21(5): 102-105.
- JIA X M, FAN J F. Factors Affecting agrobacterium mediated transformation of *Populus hopeiensis* [J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2006, 21(5): 102-105. (in Chinese)
- [23] 乌日罕. 河北杨再生体系及遗传转化体系建立研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2020.
- [24] GUAN C H, HUANG Y H, CUI X, *et al.* Overexpression of gene encoding the key enzyme involved in proline-biosynthesis (*PuP5CS*) to improve salt tolerance in switchgrass (*Panicum virgatum* L.) [J]. *Plant Cell Reports*, 2018, 37(8): 1187-1199.
- [25] 李鸿雁, 李大红. 转拟南芥 P5CS1 基因增强羽衣甘蓝的耐旱性[J]. *植物生理学报*, 2014, 50(7): 1009-1013.
- LI H Y, LI D H. Expression of *AtP5CS1* gene enhanced drought tolerance of transgenic *Brassica oleracea* plants[J]. *Plant Physiology Communications*, 2014, 50(7): 1009-1013. (in Chinese)
- [26] SZÉKELY G, ABRAHÁM E, CSÉPLO A, *et al.* Duplicated P5CS genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis[J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2008, 53(1): 11-28.
- [27] GUAN C, HUANG Y H, CEN H F, *et al.* Overexpression of the *Lolium perenne* L. delta1-pyrroline 5-carboxylate synthase (*LpP5CS*) gene results in morphological alterations and salinity tolerance in switchgrass (*Panicum virgatum* L.) [J]. *PLoS One*, 2019, 14(7): e219669.
- [28] 韩素英, 张守攻, 汪泉, 等. 小叶杨 Δ -1-吡咯琳-5-羧酸合成酶 (P5CS) 基因克隆及在杂种落叶松中的转化[J]. *生物技术通报*, 2006(3): 88-92.
- HAN S Y, ZHANG S G, WANG Q, *et al.* Transformation of hybrid larch (*Larix leptolepis* \times *L. olgensis*) with P5CS gene cloned from *Populus simonii* cDNA library[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2006(3): 88-92. (in Chinese)