

DOI:10.11686/cyxb2025359

<http://cyxb.magtech.com.cn>

李倩, 段伟, 张雪莉, 等. *MjERF053* 增强活性氧清除能力和抗逆相关基因表达提高拟南芥抗旱性. 草业学报, 2026, 35(8): 157—169.

LI Qian, DUAN Wei, ZHANG Xue-li, et al. *MjERF053* enhances drought resistance of *Arabidopsis thaliana* by improving reactive oxygen species scavenging capacity and promoting expression of stress-resistance-related genes. Acta Prataculturae Sinica, 2026, 35(8): 157—169.

MjERF053 增强活性氧清除能力和抗逆 相关基因表达提高拟南芥抗旱性

李倩^{**}, 段伟^{**}, 张雪莉, 刘丽君, 王玉祥

(西部干旱荒漠区草地资源与生态教育部重点实验室, 新疆农业大学草业学院, 新疆 乌鲁木齐 830052)

摘要: 干旱胁迫制约植物生长与农业生产, 挖掘抗旱基因并解析其机制对分子育种至关重要。黄花苜蓿 *MjERF053* 属于 *AP2/ERF* 家族, 前期发现其在干旱下表达上调且过表达拟南芥具有抗旱表型, 但机制未明。本研究以拟南芥 Col-0 野生型 (Col) 及 *MjERF053* 过表达株系 (#19、#20、#33) 为材料, 经自然干旱胁迫处理后, 测定植株表型、生理及分子指标, 以明确其抗旱机制。结果显示: 干旱胁迫下, 过表达株系萎蔫延迟、复水恢复好; 相对含水量显著高于 Col ($P < 0.05$), 相对电导率与丙二醛含量显著低于 Col ($P < 0.05$); 光系统 II 功能更稳定, 最大光化学效率、电子传递速率显著高于 Col ($P < 0.05$); 过表达株系叶片氯化硝基四氮唑蓝 (NBT)、3,3'-二氨基联苯胺 (DAB) 染色程度明显浅于 Col, 表明 $\cdot O_2^-$ 、 H_2O_2 积累减少, 且过氧化氢酶和过氧化物酶活性显著高于 Col ($P < 0.05$)。分子层面, 干旱胁迫下 *MjERF053* 过表达株系中, 活性氧 (ROS) 清除相关基因 (*AtCAT1*、*AtPOD3*、*AtSOD4*) 及干旱响应 (*AtRD22*、*AtRD29A*)、低温/干旱交叉响应 (*AtCOR15A*、*AtCOR47*)、钾离子转运 (*AtHAK5*)、脱落酸 (ABA) 信号通路 (*AtABI5*) 等抗逆相关基因的表达量均显著上调 ($P < 0.05$), 且多数基因表达量显著高于 Col ($P < 0.05$), 仅 *AtRD29A* 和 *AtABI5* 在个别过表达株系中与 Col 无显著差异。综上, *MjERF053* 可通过增强 ROS 清除能力、上调抗逆相关基因的表达、协同改善拟南芥干旱下的生理稳态与分子响应, 最终提高其抗旱性, 为耐旱作物/牧草分子育种提供重要的基因资源与理论依据。

关键词: *MjERF053*; 拟南芥; 抗旱性; 活性氧清除; 抗逆相关基因

MjERF053 enhances drought resistance of *Arabidopsis thaliana* by improving reactive oxygen species scavenging capacity and promoting expression of stress-resistance-related genes

LI Qian^{**}, DUAN Wei^{**}, ZHANG Xue-li, LIU Li-jun, WANG Yu-xiang

Key Laboratory of Grassland Resources and Ecology in Arid and Desert Areas of Western China, Ministry of Education, College of Grassland Science, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China

Abstract: Drought stress restricts plant growth and agricultural production, and mining drought-tolerance genes and analyzing their mechanisms are crucial for molecular breeding. *Medicago falcata* *MjERF053* belongs to the *AP2/ERF* transcription factor family. Previous studies have shown that its expression is upregulated under drought stress, and *Arabidopsis thaliana* overexpressing this gene exhibits a drought-tolerant phenotype. However, the underlying mechanism remains unclear. In this study, *A. thaliana* Col-0 wild type (Col) and *MjERF053*-overexpressing lines

收稿日期: 2025-09-03; 改回日期: 2025-10-20

基金项目: 自治区高校基本科研业务费科研项目 (XJEDU2023P054) 资助。

作者简介: 李倩 (1992—), 女, 山东郓城人, 讲师, 博士。E-mail: 540794898@qq.com。段伟 (2001—), 男, 湖南衡阳人, 在读硕士。E-mail: 1929674782@qq.com。 **共同第一作者 These authors contributed equally to this work.

(#19, #20, #33) were used as materials. After natural drought stress treatment, plant phenotypic, physiological, and molecular indicators were determined to clarify the drought-tolerance mechanism of *MjERF053*. The results showed that under drought stress: the overexpressing lines exhibited delayed leaf wilting and better recovery ability after rehydration; their relative water content (RWC) was significantly higher than that of Col ($P < 0.05$), while their relative electrical conductivity (REC) and malondialdehyde (MDA) content were significantly lower than those of Col ($P < 0.05$); the function of photosystem II (PS II) was more stable, with the maximum photochemical efficiency (F_v/F_m) and electron transport rate (ETR) significantly higher than those of Col ($P < 0.05$); the degree of nitroblue tetrazolium (NBT) [for superoxide anion ($\cdot O_2^-$) localization] and 3,3'-diaminobenzidine (DAB) [for hydrogen peroxide (H_2O_2) localization] staining in leaves of the overexpressing lines was significantly lighter than that in Col, indicating reduced accumulation of $\cdot O_2^-$ and H_2O_2 , and the activities of catalase (CAT) and peroxidase (POD) were significantly higher than those in Col ($P < 0.05$). At the molecular level, under drought stress, the expression levels of stress-tolerance-related genes in *MjERF053*-overexpressing lines, including reactive oxygen species (ROS)-scavenging-related genes (*AtCAT1*, *AtPOD3*, *AtSOD4*), drought-responsive genes (*AtRD22*, *AtRD29A*), cold/drought cross-responsive genes (*AtCOR15A*, *AtCOR47*), potassium ion transport gene (*AtHAK5*), and abscisic acid (ABA) signaling pathway gene (*AtABI5*), were all significantly up-regulated ($P < 0.05$). Most of these genes exhibited significantly higher expression levels in overexpressing lines than in Col ($P < 0.05$), except that *AtRD29A* and *AtABI5* in individual overexpressing lines showed no significant difference compared with Col. In conclusion, *MjERF053* was found to enhance ROS scavenging capacity, upregulate the expression of stress-tolerant-related genes, and synergistically improve the physiological homeostasis and molecular response of *A. thaliana* under drought, ultimately improving its drought tolerance. This study provides important genetic resources and a theoretical basis for the molecular breeding of drought-tolerant crops/forages.

Key words: *MjERF053*; *Arabidopsis thaliana*; drought resistance; reactive oxygen species scavenging; stress-resistant-related genes

干旱胁迫是全球农业生产面临的首要非生物胁迫因子,其通过破坏植物水分平衡、抑制光合代谢及诱导氧化损伤,导致作物生长受阻、生物量锐减及品质退化,对全球粮食安全构成严峻威胁^[1-3]。因此,解析植物干旱响应的分子调控网络、挖掘具有应用价值的抗旱关键基因,是培育耐旱作物/牧草品种、缓解干旱胁迫对农业生产制约的核心途径,具有重要的理论意义与实践价值^[4-5]。

在长期适应干旱环境的进化过程中,植物形成了多层次、复杂化的抗旱调控体系,其中转录因子作为信号通路的“核心开关”,通过特异性结合下游靶基因启动子的顺式元件(如 *GCC-box*、*DRE/CRT*),协调基因表达以启动抗旱响应,在调控网络中发挥不可替代的作用^[6-8]。*AP2/ERF*家族是植物特有的转录因子超家族,其成员广泛参与激素信号转导、生长发育及非生物胁迫(干旱、盐渍、低温等)响应过程,已成为植物抗逆研究领域的核心靶点之一^[9-11]。

近年来,大量研究证实 *ERF* 基因可通过多维度机制协同增强植物耐旱性:在激素信号整合层面,ERF 蛋白可交叉调控脱落酸(abscisic acid, ABA)、油菜素内酯(brassinosteroid, BR)及乙烯(ethylene)通路,如拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) *TINY* 通过抑制 BR 信号通路中 BIN2 激酶的磷酸化活性,解除其对干旱响应基因的抑制作用,同时激活 ABA 合成关键基因 *NCED3* 以促进 ABA 积累,最终调控气孔关闭^[12];杨树(*Populus* spp.) *PalERF2* 通过乙烯信号通路诱导抗旱相关基因 *PalRD20* 与 *PalSAG113* 的表达^[13];水稻(*Oryza sativa*) *OsERF48* 则通过钙信号通路调控 *OsCML16* 的表达,进而增强根系发育以提升水分吸收能力^[14]。在氧化应激防御层面,ERF 可通过上调抗氧化酶基因表达或直接激活酶活性,清除干旱诱导积累的活性氧(reactive oxygen species, ROS),如玉米(*Zea mays*) *ZmEREBP60* 过表达株系中过氧化物酶(peroxidase, POD)活性显著升高,导致过氧化氢(hydrogen

peroxide, H_2O_2)与丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量降低^[15];杨树 *ERF194* 通过上调氧化还原酶基因的表达,增强超氧阴离子(superoxide anion, $\cdot O_2^-$)的清除能力,减轻干旱导致的氧化损伤^[16]。在渗透调节与次生代谢方面, *ERF* 可调控脯氨酸、可溶性糖等渗透调节物质及花青素的合成,如大豆(*Glycine max*) *GmERF3* 过表达可显著提高转基因烟草(*Nicotiana tabacum*)叶片中脯氨酸与可溶性碳水化合物的积累量^[17];苹果(*Malus domestica*) *MdERF38* 通过与 MdMYB1 蛋白互作,促进花青素合成以增强干旱耐受性^[18]。在光合作用保护与气孔行为调控层面, *ERF* 可通过维持光系统稳定性、调控碳代谢及 ABA 依赖/非依赖通路的气孔运动,保障干旱条件下的光合效率,如水稻 *OsERF83* 过表达株系在干旱胁迫下仍保持较高的光化学效率^[19];番茄(*Solanum lycopersicum*) *TSRF1* 异源表达可上调水稻光合相关基因的表达^[20];拟南芥 *TINY*、番茄 *SlERF84* 分别通过 ABA 通路增强 ABA 敏感性,促进气孔闭合以减少水分蒸腾^[12,21];此外,拟南芥 *AtRAP2.4* 还可通过激活表皮蜡质合成基因,降低蒸腾速率并延缓叶绿素降解,揭示了 *ERF* 对气孔调节与光合保护的协同作用^[22]。

黄花苜蓿(*Medicago falcata*)是豆科苜蓿属多年生草本植物,具有极强的干旱耐受性与抗逆适应性,是挖掘抗旱基因的优质种质资源^[23]。前期研究通过转录组分析发现,黄花苜蓿 *AP2/ERF* 家族成员 *MjERF053* 在干旱胁迫下表达量显著上调;进一步通过花序侵染法将 *MjERF053* 基因转化拟南芥(Columbia-0 生态型, Col),获得的过表达株系(overexpression line, OE)相较于野生型(Columbia-0, Col)表现出根系发育增强(主根变长、侧根增多)及干旱胁迫下萎蔫延迟的表型^[24]。但该基因调控抗旱性的核心生理与分子机制尚未解析。本研究以拟南芥野生型(Col)及上述 *MjERF053* 高表达株系(OE)为材料,通过自然干旱胁迫处理,结合植株表型观察及水分生理、氧化应激、叶绿素荧光特性与抗逆相关基因表达的测定,明确 *MjERF053* 调控拟南芥抗旱性的关键环节,阐明其作用机制,为该基因在耐旱分子育种中的应用提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

使用拟南芥生态型 Columbia-0(Col)作为试验材料,通过花序侵染法^[25]将黄花苜蓿中的 *MjERF053* 基因转化至拟南芥中。利用该转化方法共获得 25 株转基因拟南芥纯合株系,通过荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测各株系的 *MjERF053* 基因表达量,筛选出 3 个高表达株系(命名为 #19、#20、#33)^[24],用于后续抗逆性分析。

1.2 试验方法

该验证试验于 2025 年 3—8 月在新疆农业大学西部干旱荒漠区草地资源与生态教育部重点实验室开展。将野生型(Col)和转基因拟南芥种子用 75% 乙醇消毒 5 min, 5% 次氯酸钠溶液浸泡 5 min, 无菌水清洗 3~4 次后,均匀播种于 1/2 MS 培养基(索莱宝科技有限公司,北京,中国)上。播种后将培养皿置于 4℃ 冰箱春化 3 d, 随后转移至人工气候培养箱中,在 16 h 光照/8 h 黑暗、22℃ 条件下培养。待种子萌发出子叶(约 7 d),将幼苗移栽至装有草炭土:蛭石=3:1 混合基质的花盆中。每个株系设置 9 个生物学重复(即 9 盆),每盆种植 9 株植株,置于培养箱培养,条件为 16 h 光照/8 h 黑暗、22℃,平均光照强度 $400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。期间采用定期浇水方式维持基质湿润,每 4 d 浇一次水。待植株生长至 30 d 时开始胁迫处理,对照组延续每 4 d 浇水一次的常规灌溉;处理组则停止人工补水,实施自然干旱胁迫,持续观察植株状态,直至叶片边缘呈现明显黄化表型,此时记录植株表型变化,并采集样品用于后续指标测定。

1.3 测定指标及方法

1.3.1 相对含水量(relative water content, RWC) 在干旱胁迫第 8 天时,分别收集对照组和处理组形状大小相似的叶片,测定鲜质量(fresh weight, W_f)后,将植物置于室温下密封管中的蒸馏水中浸泡 4 h,然后在 5℃ 下过夜,次日测定饱和质量(turgid weight, W_t)。随后,用锡箔包裹材料在 80℃ 干燥至恒定重量(约 72 h),这被视为干质量(dry weight, W_d)。按以下公式计算: $\text{RWC} = (W_f - W_d) / (W_t - W_d)$ ^[26],各株系重复 5 次。

1.3.2 相对电导率(relative electrical conductivity, REC) 在干旱胁迫第 8 天时,分别收集对照组和处理组形状大小相似的叶片,取 0.1 g 去杂质的样品,放入 25 mL 试管中,加入去离子水 20 mL,将样品浸没,静置 3 h,静置过程中每隔 30 min 振荡一次。在 20~25℃ 恒温下用电导仪(DDS-307,上海仪电科学仪器股份有限公司,上海,

中国)测定其电导率 C_1 ,再用 100 °C 水浴加热 10 min,取出静置冷却至室温,在 20~25 °C 恒温下测其煮沸电导率 C_2 。按以下公式计算: $REC(\%) = (C_1/C_2) \times 100^{[27]}$,各株系重复 5 次。

1.3.3 叶绿素荧光 采用植物光合表型测量系统 PlantExplorer XS[慧诺瑞德(北京)科技有限公司,北京,中国]测定叶绿素荧光参数;每次测量前,先将供试植物置于黑暗环境中适应 30 min,以确保光系统 II (photosystem II, PS II) 反应中心完全开放、消除前期光照对荧光信号的干扰,随后用弱测量光束诱导并记录最小荧光产量(minimum fluorescence yield, F_0),施加饱和脉冲(终止 PS II 反应中心电子传递)后测定最大荧光产量(maximum fluorescence yield, F_m),计算叶绿素可变荧光(variable fluorescence yield, F_v)= $F_m - F_0$,并依据最大光化学效率公式(maximum photochemical efficiency, F_v/F_m)= $(F_m - F_0)/F_m$ 测定 PS II 最大量子产额(反映光合系统潜在光化学活性);暗适应参数测定完成后,将叶片置于感光光线下暴露 5 min 以达到光适应稳态,再施加饱和光脉冲量化稳态荧光值(steady-state fluorescence yield, F_s)与光适应下最大荧光产量(maximum fluorescence yield under light adaptation, F_m'),接着依据公式测定非光化学淬灭(non-photochemical quenching, NPQ)= $(F_s/F_m') - (F_s/F_m)$,反映叶片耗散过剩光能以保护光合系统的能力,同步记录电子传递效率(electron transport rate, ETR)(表征 PS II 反应中心电子传递速率)与光能利用效率(light use efficiency, $Alpha$)(反映叶片对光能的捕获与转化效率);各株系重复 21 次。

1.3.4 生理指标 过氧化氢酶(catalase, CAT)、过氧化物酶(peroxidase, POD)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性,丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量,氯化硝基四氮唑蓝(nitroblue tetrazolium chloride, NBT)用于超氧阴离子(superoxide anion, $\cdot O_2^-$)定位染色,3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)用于过氧化氢(hydrogen peroxide, H_2O_2)定位染色,染色程度直观反映活性氧(reactive oxygen species, ROS)积累水平。均使用相应的试剂盒进行检测(索莱宝科技有限公司,中国北京),3 次重复。

1.3.5 RNA 提取和 RT-qPCR 分析 使用 TRIzol

试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司,上海,中国]提取每个样品的总 RNA,使用含有 gDNase 的 FastQuant RT 试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司,北京,中国]合成第一链 cDNA。RT-qPCR 反应在 ABI 7500 快速实时 PCR 系统进行(应用生物系统,福斯特,加利福尼亚州,美国),使用 2xSG Fast qPCR 主混合[生工生物工程(上海)股份有限公司,上海,中国]。引物使用 Primer 5.0 软件设计,经 NCBI BLAST 验证特异性(表 1);测定基因: *AtCAT1*(编码过氧化氢酶,参与 ROS 清除)、*AtPOD3*(编码过氧化物酶,参与 ROS 清除)、*AtSOD4*(编码超氧化物歧化酶,参与 ROS 清除)、*AtRD22/AtRD29A*(干旱响应基因,参与干旱信号通路)、*AtCOR15A/AtCOR47*(低温/干旱交叉响应基因,增强逆境适应性)、*AtHAK5*(钾离子转运基因,维持细胞内渗透压)、*AtABI5*(ABA 信号通路关键基因,调控抗逆响应),均为 3 次重复。所选基因均为拟南芥中被证实的抗逆通路关键成员,这些基因的功能(ROS 清除、干旱信号传导、渗透压维持等)与 *MjERF053* 介导的抗旱调控方向契合,因此推测其为 *MjERF053* 的下游潜在靶基因。

表 1 PCR 引物

Table 1 PCR primers

引物 Primer	正向引物/反向引物 Forward primer/reverse primer (5'—3')
<i>qAtactin-F</i>	CGCCATCCAAGCTGTTCTC
<i>qAtactin-R</i>	TCACGTCCAGCAAGGTCAAG
<i>AtCAT1-F</i>	GTCCTGGGATTTCAGACAGGC
<i>AtCAT1-R</i>	GGCTCACGTTAAGACGAGT
<i>AtPOD3-F</i>	CCAATCCAGAAACGGAAGTG
<i>AtPOD3-R</i>	TCTGACGCTTCTGACGACAC
<i>AtSOD4-F</i>	GAAGAACCTTGCTCCTTCCAG
<i>AtSOD4-R</i>	GATTGGCAGTTGTGTCAACAAC
<i>AtRD22-F</i>	ACTTGGTAAATATCACGTCAGGCT
<i>AtRD22-R</i>	CTGAGGTGTTCTTGTGGCATACC
<i>AtRD29A-F</i>	GATATCGACAAGGATGTGCCG
<i>AtRD29A-R</i>	GTATCCAGGTCTTCCCTTCGC
<i>AtCOR47-F</i>	GCTTCGTCGTCGTTTCTCT
<i>AtCOR47-R</i>	CCAATGTATCTGCGGTTTGA
<i>AtHAK5-F</i>	TGCATCACTGGGACGGAGGCA
<i>AtHAK5-R</i>	GTACGCAGCCTGCCCGCAAT
<i>AtABI5-F</i>	AGAGGGATAGCGAACGAGTCTAGTC
<i>AtABI5-R</i>	GTTCGGTTTGGATTAGGTTTAGG

1.4 数据处理

利用 Microsoft Excel 2010 软件整理所有数据;应用 SPSS 27.0 软件进行统计分析,采用单因素方差分析 (one-way ANOVA)结合 Duncan 多重比较法,检验不同株系(野生型与过表达株系)在相同处理(对照/干旱)下的差异显著性;采用独立样本 *t* 检验,比较同一株系在对照与干旱胁迫下的差异显著性($P<0.05$ 为差异显著);用 GraphPad Prism 9.5.1 软件进行图形绘制。

2 结果与分析

2.1 干旱胁迫下过表达 *MjERF053* 正向调控拟南芥的耐旱性

胁迫处理前,野生型(Col)与 *MjERF053* 过表达株系(#19、#20、#33)的生长状态一致,均表现为叶片舒展、色泽鲜绿,无明显表型差异(图 1)。自然干旱胁迫第 8 天,Col 叶片开始出现轻微萎蔫,叶缘略微卷曲;而过表达株系 #19、#20、#33 仍保持较好的挺立状态,仅少数株系下部叶片出现轻度失水迹象。胁迫第 12 天,Col 萎蔫程度明显加剧,叶片大面积卷曲且颜色变淡;过表达株系虽有部分叶片萎蔫,但整体株型仍较完整。胁迫持续至第 16 天,Col 叶片已完全萎蔫,部分开始黄化;过表达株系仅中下部叶片严重萎蔫,上部新叶仍保持一定的含水量。胁迫第 20 天,Col 植株整体枯萎,叶片全部黄化;过表达株系虽损伤加重,但仍有少量叶片维持绿色。复水后第 5 天, #19、#20、#33 株系的萎蔫叶片基本恢复舒展,株型逐渐恢复正常;而 Col 仅少数基部叶片略有恢复,大部分叶片仍处于枯萎状态,且无法恢复生长(图 1)。

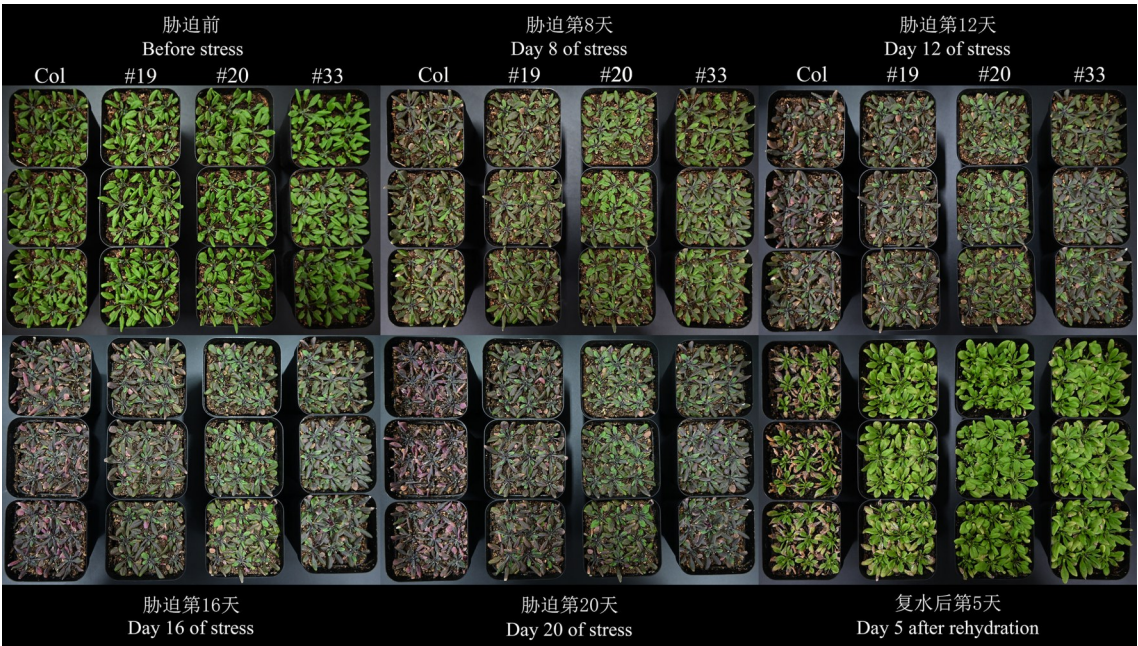


图 1 自然干旱胁迫下野生型和过表达 *MjERF053* 拟南芥的表型

Fig. 1 Phenotypes of wild-type and *MjERF053*-overexpressing *A. thaliana* under natural drought stress

Col: 野生型 Wild type; #19、#20、#33: *MjERF053* 过表达的 3 个独立株系 3 independent *MjERF053*-overexpressing lines; 下同 The same below.

干旱胁迫下,植株的相对含水量(RWC)、相对电导率(REC)及丙二醛(MDA)含量是反映水分状况与细胞膜完整性的核心指标。对照组,Col与过表达株系的 RWC、REC 及 MDA 含量均无显著差异($P>0.05$),其中 RWC 均维持在 0.90 以上,REC 低于 10%,MDA 含量处于较低水平(低于 $10\text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$),表明各组植株初始生理状态一致(图 2);且各株系干旱胁迫处理组与其对照组相比,RWC 显著降低、REC 与 MDA 含量显著升高($P<0.05$)。干旱胁迫第 8 天,Col 与过表达株系(#19、#20、#33)的水分生理及膜损伤相关指标呈显著差异(图 2):Col 的 RWC 下降至 0.56,而过表达株系 #19、#20、#33 的 RWC 分别维持在 0.75、0.85、0.84,显著高于 Col($P<0.05$);Col 的

REC 升高至 53.76%, 而过表达株系的 REC 仅为 21.91%~34.13%, 显著低于 Col ($P<0.05$); Col 的 MDA 含量上升至 $41.69 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$, 而过表达株系的 MDA 含量仅为 $17.20 \sim 20.75 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$, 显著低于 Col ($P<0.05$)。综合表型与生理指标(图 1 和图 2)可知, 过表达 *MjERF053* 能延缓拟南芥干旱损伤进程, 同时维持更高的含水量、降低膜损伤, 明确其具备正向调控拟南芥耐旱性的能力。

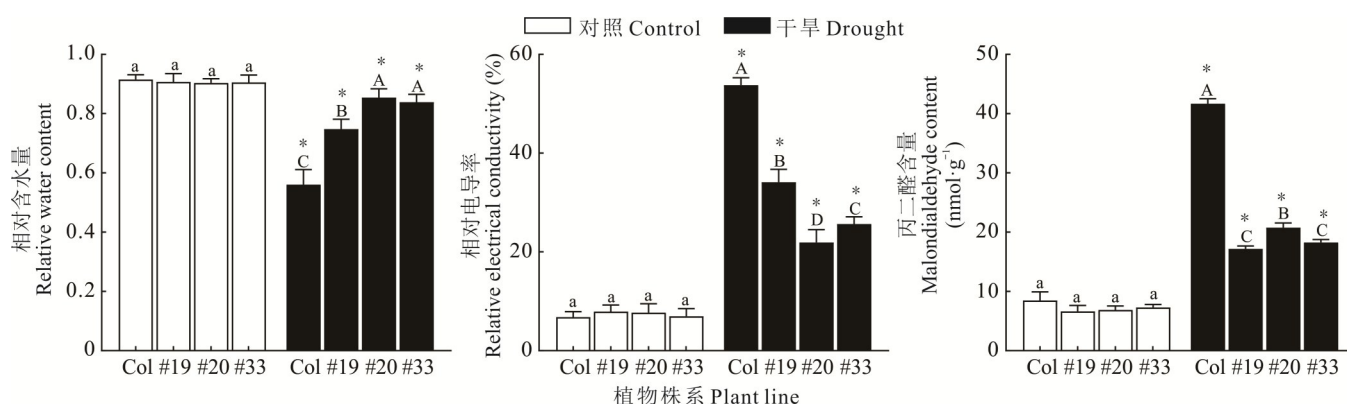


图 2 干旱胁迫下野生型和过表达 *MjERF053* 拟南芥的相对含水量、相对电导率及丙二醛含量对比

Fig. 2 Comparison of relative water content, relative electrical conductivity, and malondialdehyde content between wild-type and *MjERF053*-overexpressing *A. thaliana* under drought stress

表示同一株系在对照与干旱胁迫间差异显著 ($P<0.05$), 不同小写字母表示在对照中各株系之间差异显著 ($P<0.05$), 不同大写字母表示在干旱胁迫组中各株系之间差异显著 ($P<0.05$), 下同。 indicate a significant difference ($P<0.05$) between the control and drought stress group for the same line. Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$) among different plant lines in the control group, while different uppercase letters indicate significant differences ($P<0.05$) among different plant lines in the drought stress group, the same below.

2.2 干旱胁迫下过表达 *MjERF053* 提升拟南芥的叶绿素荧光参数

叶绿素荧光参数可直接反映光系统 II (PS II) 的功能状态及光合系统对逆境的适应能力。对照组, Col 与过表达株系的最大光化学效率 (F_v/F_m)、非光化学淬灭 (NPQ)、电子传递效率 (ETR) 及光能利用效率 ($Alpha$) 均无显著差异 ($P>0.05$), 其中 F_v/F_m 维持在 $0.75 \sim 0.77$, 表明各组植株的光合系统初始状态正常 (图 3); 且各株系干旱胁迫处理组与其对照组相比, F_v/F_m 、 ETR 、 $Alpha$ 显著降低 (#20 的 $Alpha$ 降低, 但不显著), NPQ 显著升高 ($P<0.05$)。干旱胁迫第 12 天, Col 与过表达株系 (#19、#20、#33) 的叶绿素荧光参数存在明显差异 (图 3): Col 的 F_v/F_m 下降至 0.58, 而过表达株系 #19、#20、#33 的 F_v/F_m 分别维持在 0.69、0.70、0.69, 显著高于 Col ($P<0.05$); Col 的 NPQ 升至 0.99, 而过表达株系的 NPQ 为 $0.35 \sim 0.41$, 显著低于 Col ($P<0.05$); Col 的 ETR 下降至 36.93, 而过表达株系的 ETR 维持在 $49.78 \sim 52.95$, 显著高于 Col ($P<0.05$); Col 的 $Alpha$ 下降至 0.79, 而过表达株系的 $Alpha$ 维持在 $0.85 \sim 0.87$, 显著高于 Col ($P<0.05$)。综上可知, 过表达 *MjERF053* 能减少干旱对 PS II 的破坏、维持电子传递效率与光能利用能力, 有效保护拟南芥的光合系统功能。

2.3 干旱胁迫下过表达 *MjERF053* 提高拟南芥抗氧化酶活性以增强 ROS 清除能力

干旱胁迫会诱导植物体内超氧阴离子 ($\cdot\text{O}_2^-$)、过氧化氢 (H_2O_2) 等活性氧 (ROS) 大量积累, NBT 染色 ($\cdot\text{O}_2^-$ 定位) 与 DAB 染色 (H_2O_2 定位) 可直观反映 ROS 积累程度 (染色越多, 含量越高)。由图 4A、B 可知, 对照组, Col 与 *MjERF053* 过表达株系 (#19、#20、#33) 叶片均仅轻微染色, $\cdot\text{O}_2^-$ 与 H_2O_2 含量低且无明显差异; 干旱胁迫第 12 天, Col 叶片经 NBT 染色呈深紫色、DAB 染色呈深褐色, 表明 $\cdot\text{O}_2^-$ 与 H_2O_2 大量积累, 而过表达株系仅叶脉附近出现少量浅色斑点, 染色程度明显更轻, 说明过表达 *MjERF053* 可显著抑制干旱下 $\cdot\text{O}_2^-$ 与 H_2O_2 的积累, 降低氧化损伤。同时, 超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD)、过氧化氢酶 (CAT) 是清除 ROS 的核心抗氧化酶, 由图 4C~E 可知, 对照组的 CAT、POD 活性表现为, Col 与部分过表达株系 (#19、#33) 存在显著差异 ($P<0.05$), 但 SOD 活性在 Col 与过表达株系间无显著差异 ($P>0.05$)。干旱胁迫情况下, 与对照组相比, 各株系 3 种酶活性显

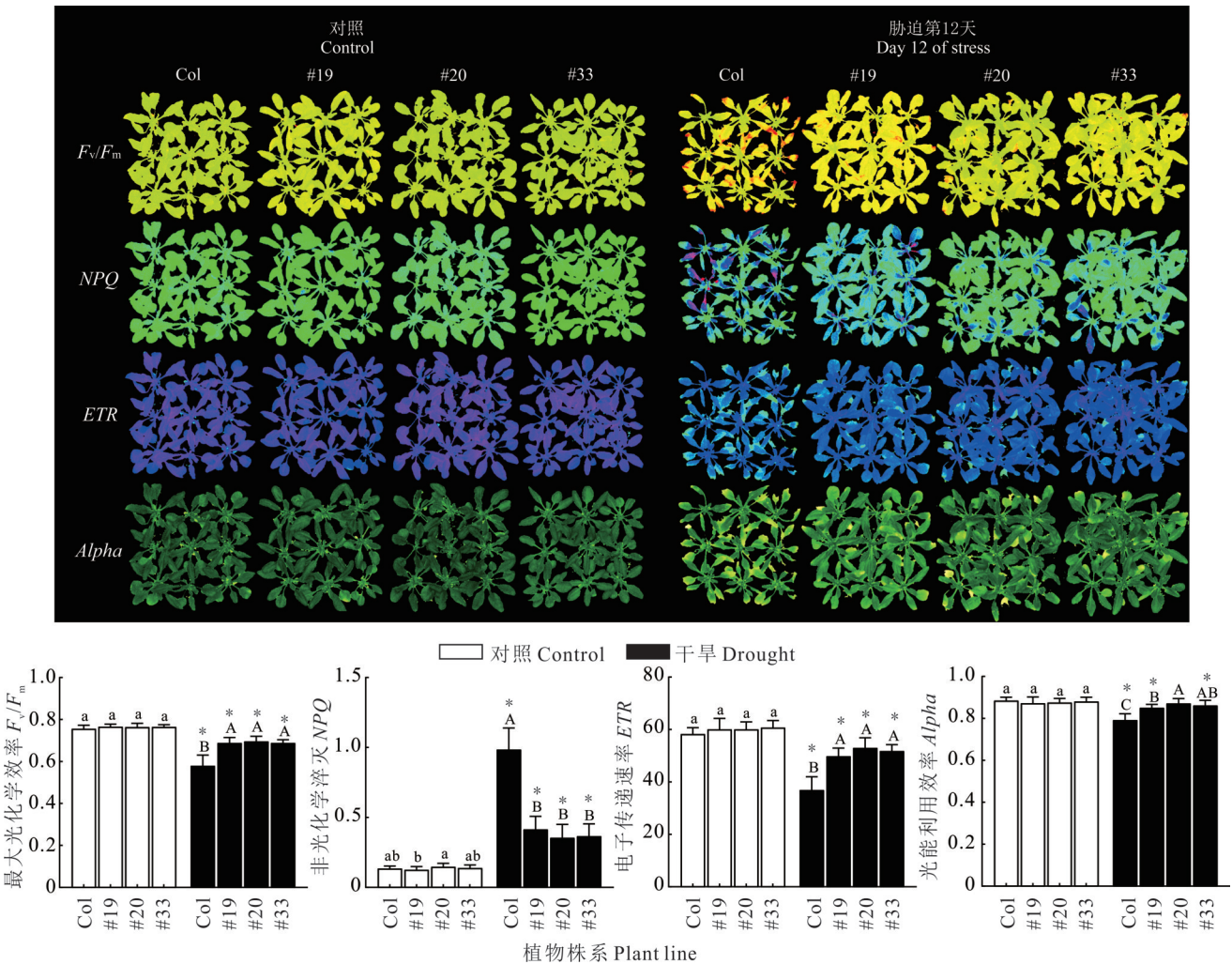


图3 干旱胁迫下野生型和过表达 *MjERF053* 拟南芥的叶绿素荧光对比
Fig. 3 Comparison of chlorophyll fluorescence between wild-type and *MjERF053*-overexpressing *A. thaliana* under drought stress

F_v/F_m : 最大光化学效率 Maximum photochemical efficiency; NPQ: 非光化学淬灭 Non-photochemical quenching; ETR: 电子传递效率 Electron transport rate; Alpha: 光能利用效率 Light use efficiency.

著上升 ($P < 0.05$); Col 的 CAT、POD、SOD 活性分别仅为 1030.56、3209.85、76.00 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$, 而过表达株系 3 种酶活性分别升高至 1539.06~2153.78、5394.93~10507.00、79.89~97.66 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$, 除 SOD 活性在 Col 与过表达株系 #19 无显著差异外 ($P > 0.05$), 过表达株系酶活性显著高于 Col ($P < 0.05$)。表明过表达 *MjERF053* 可通过提高抗氧化酶活性增强 ROS 清除能力。

为解析抗氧化酶活性升高的分子机制, 检测拟南芥抗氧化酶关键编码基因 (*AtCAT1*、*AtPOD3*、*AtSOD4*) 表达水平 (图 5), 结果显示, 对照组 Col 与过表达株系的 3 种基因相对表达量均处于低水平; 干旱胁迫后, 与对照组相比, 各株系 3 种基因相对表达量显著上升 ($P < 0.05$), Col 的 *AtCAT1*、*AtPOD3*、*AtSOD4* 相对表达量分别提高 5.93、3.18、3.69 倍, 而过表达株系 3 种基因的相对表达量分别提高 5.18~10.87 倍、6.02~32.87 倍、6.49~10.72 倍, 显著高于 Col ($P < 0.05$)。这一结果表明, 过表达 *MjERF053* 可通过上调 *AtCAT1*、*AtPOD3*、*AtSOD4* 的转录水平, 促进下游 CAT、POD、SOD 的合成与活性提升, 最终增强拟南芥的 ROS 清除能力。

2.4 过表达 *MjERF053* 促进拟南芥中抗逆相关基因的表达

抗逆相关基因的表达调控是植物应对干旱胁迫的核心分子机制, 本研究针对拟南芥中不同功能类型的抗逆相关基因展开检测, 包括干旱响应基因 (*AtRD22*、*AtRD29A*)、低温/干旱交叉响应的 *COR* 家族基因

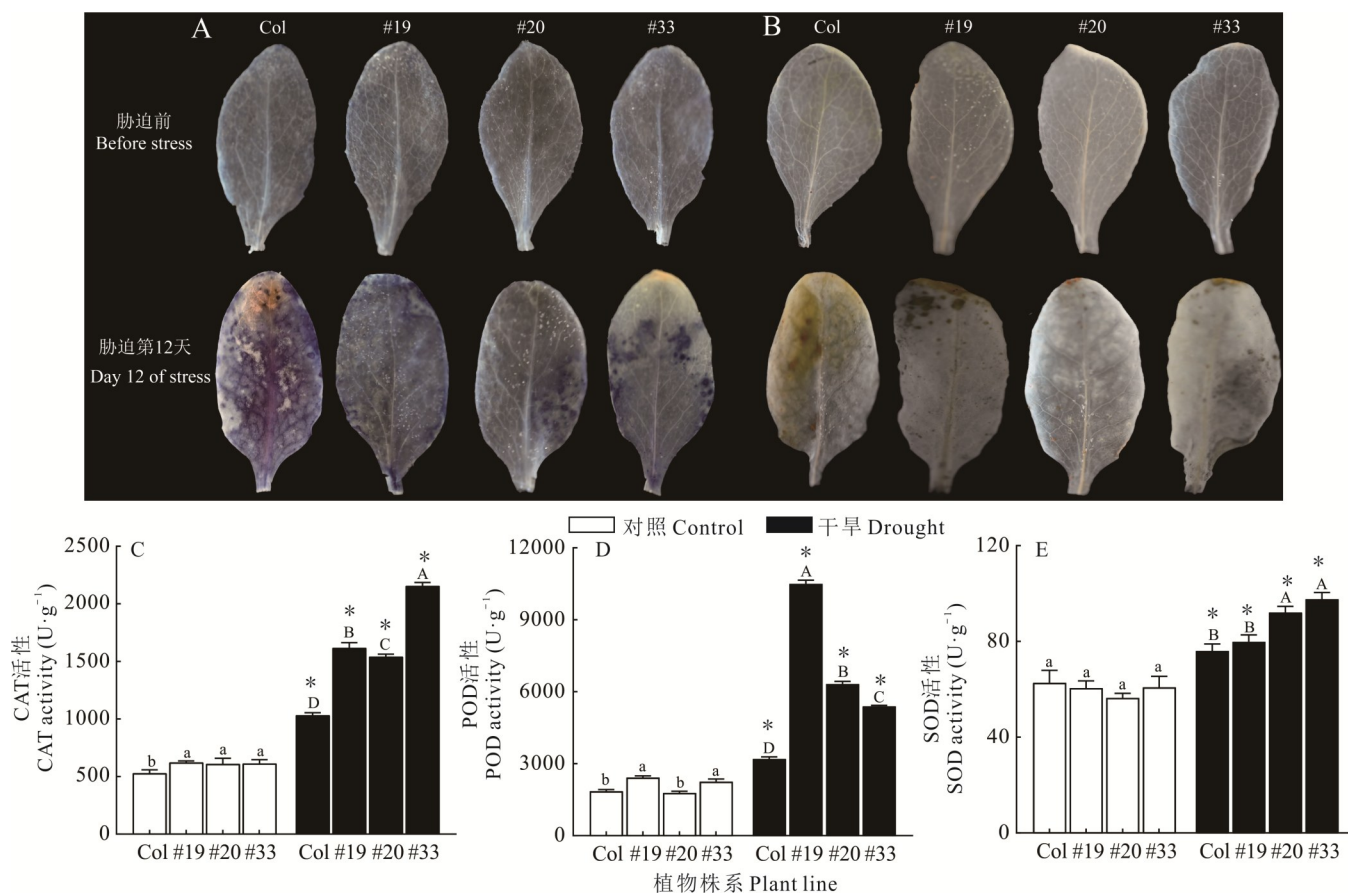


图4 干旱胁迫下野生型和过表达 *MfERF053* 拟南芥的活性氧含量及抗氧化酶活性对比

Fig. 4 Comparison of reactive oxygen species content and antioxidant enzyme activities between wild-type and *MfERF053*-overexpressing *A. thaliana* under drought stress

A: 氯化硝基四氮唑蓝染色[用于超氧阴离子($\cdot\text{O}_2^-$)定位检测] Nitroblue tetrazolium chloride (NBT) staining for localization detection of superoxide anion ($\cdot\text{O}_2^-$); B: 3,3'-二氨基联苯胺染色[用于过氧化氢(H_2O_2)定位检测] 3,3'-diaminobenzidine (DAB) staining for localization detection of hydrogen peroxide (H_2O_2); CAT: 过氧化氢酶 Catalase; POD: 过氧化物酶 Peroxidase; SOD: 超氧化物歧化酶 Superoxide dismutase.

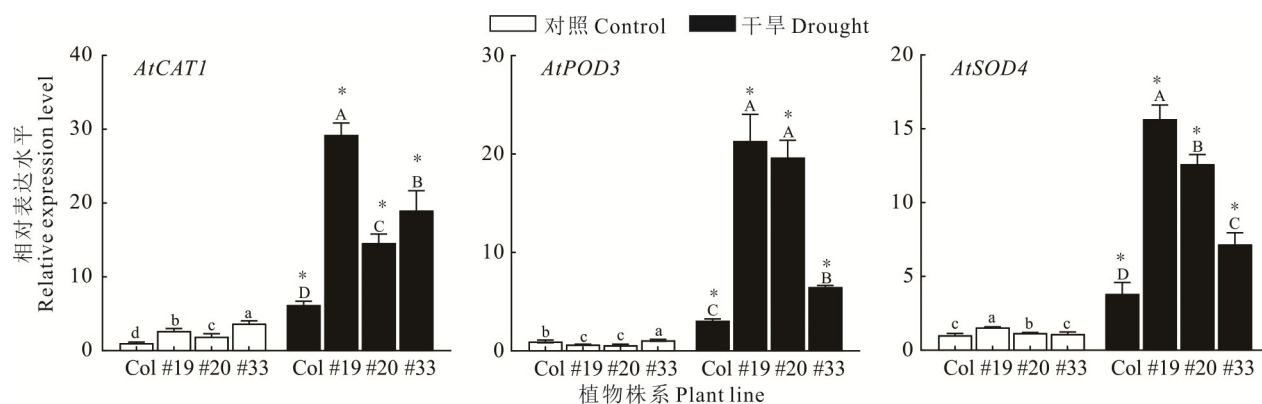


图5 干旱胁迫下野生型和过表达 *MfERF053* 拟南芥的抗氧化酶相关基因表达对比

Fig. 5 Comparison of antioxidant enzyme-related gene expression between wild-type and *MfERF053*-overexpressing *A. thaliana* under drought stress

AtCAT1: 拟南芥过氧化氢酶1基因 *A. thaliana* catalase 1 gene; *AtPOD3*: 拟南芥过氧化物酶3基因 *A. thaliana* peroxidase 3 gene; *AtSOD4*: 拟南芥超氧化物歧化酶4基因 *A. thaliana* superoxide dismutase 4 gene.

(*AtCOR15A*, *AtCOR47*), 钾离子转运基因(*AtHAK5*)及脱落酸(ABA)信号通路关键基因(*AtABI5*), 结果如图6所示。对照组, Col与过表达株系(#19, #20, #33)的上述基因均处于低表达状态, 表明各组植株初始基因表达水

平相对一致;这一现象符合 *AP2/ERF* 家族转录因子的调控特征—多数 *ERF* 成员需依赖胁迫信号(如干旱诱导的 ABA 积累、ROS 爆发)激活下游共调控因子(如 bZIP 类 *AtABI5*、MYB 类转录因子),或通过逆境触发的靶基因启动子区域修饰(如组蛋白乙酰化、DNA 甲基化动态调整)解除转录抑制,才能有效结合 DRE/CRT 等顺式元件并启动表达。非干旱条件下,缺乏上述胁迫信号与共激活因子,即使 *MjERF053* 过表达,也难以单独驱动抗逆相关基因的高表达。且各株系干旱胁迫处理组的抗逆相关基因表达量均显著高于对照组($P < 0.05$)。干旱胁迫后,Col 与过表达株系的基因表达水平呈明显差异:在干旱响应基因方面,*AtRD22* 在 Col 中的相对表达量提高 3.47 倍,而过表达株系 #19、#20、#33 的 *AtRD22* 相对表达量分别升高 3.14、47.91、52.81 倍(图 6A),*AtRD29A* 在 Col 中的相对表达量提高 3.91 倍,而过表达株系的 *AtRD29A* 相对表达量显著升高 8.53~50.07 倍(图 6B),除 *AtRD29A* 相对表达量在 Col 与过表达株系 #33 无显著差异外($P > 0.05$),二者的过表达株系基因相对表达量均显著高于 Col($P < 0.05$);在 *COR* 家族基因方面,*AtCOR15A* 在 Col 中的相对表达量提高 2.69 倍,而过表达株系的 *AtCOR15A* 相对表达量升高 10.79~30.59 倍(图 6C),*AtCOR47* 在 Col 中的相对表达量提高 3.75 倍,而过表达株系的 *AtCOR47* 相对表达量显著升高 9.38~39.36 倍(图 6D),2 个基因的相对表达量均表现为过表达株系显著高于 Col($P < 0.05$);在钾离子转运基因 *AtHAK5* 方面,Col 的 *AtHAK5* 相对表达量提高 24.11 倍,而过表达株系的 *AtHAK5* 相对表达量显著升高 37.43~142.78 倍(图 6E),且显著高于 Col($P < 0.05$);在 ABA 信号通路基因 *AtABI5* 方面,Col 的 *AtABI5* 相对表达量提高 1.91 倍,而过表达株系的 *AtABI5* 相对表达量显著升高 7.18~81.28 倍(图 6F),除过表达株系 #19 与 Col 无显著差异外($P > 0.05$),过表达株系 #20 和 #33 均显著高于 Col($P < 0.05$)。综上,过表达 *MjERF053* 可通过上调干旱响应、*COR* 家族、钾离子转运及 ABA 信号通路等多类抗逆相关基因的表达,强化拟南芥对干旱胁迫的分子响应机制。

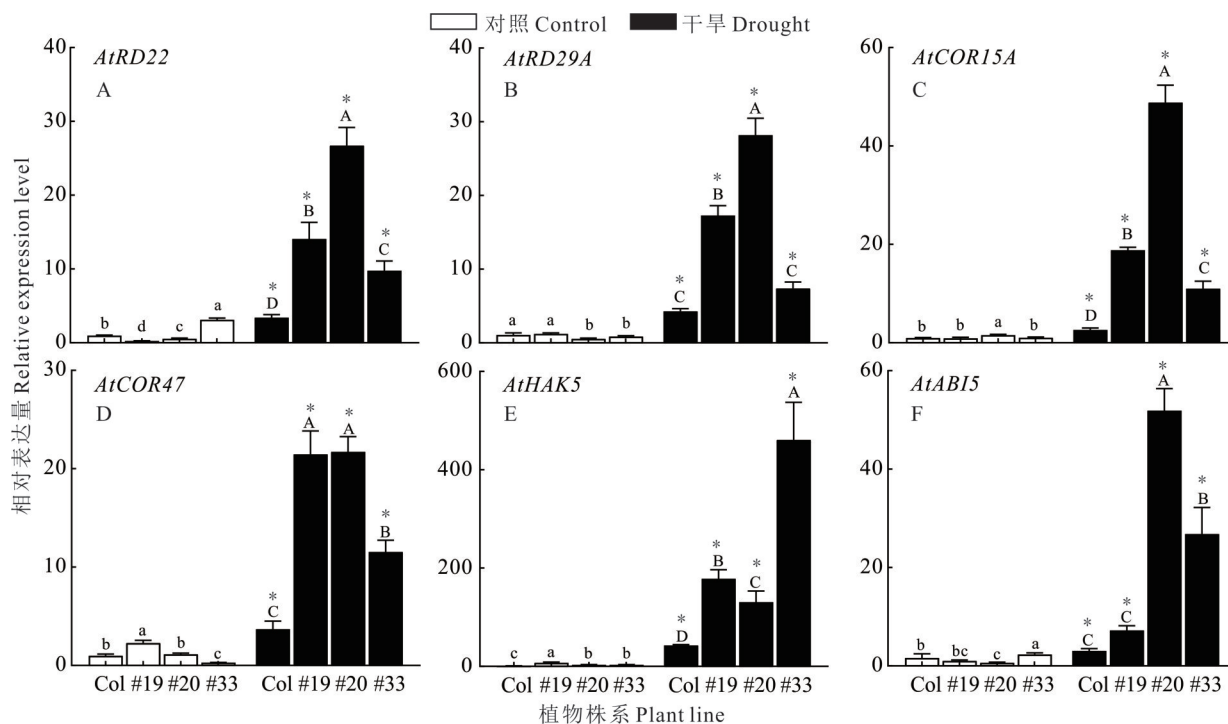


图 6 干旱胁迫下野生型和过表达 *MjERF053* 拟南芥中抗逆相关基因的相对表达量

Fig. 6 Relative expression of stress-resistant-related genes in wild-type and *MjERF053*-overexpressing *A. thaliana* under drought stress

AtRD22: 拟南芥干旱响应蛋白 22 基因 *A. thaliana* responsive to dehydration 22 gene; *AtRD29A*: 拟南芥干旱响应蛋白 29A 基因 *A. thaliana* responsive to dehydration 29A gene; *AtCOR15A*: 拟南芥冷调节蛋白 15A 基因 *A. thaliana* cold-regulated 15A gene; *AtCOR47*: 拟南芥冷调节蛋白 47 基因 *A. thaliana* cold-regulated 47 gene; *AtHAK5*: 拟南芥高亲和钾转运蛋白 5 基因 *A. thaliana* high-affinity K^+ transporter 5 gene; *AtABI5*: 拟南芥脱落酸不敏感 5 基因 *A. thaliana* abscisic acid insensitive 5 gene.

3 讨论

3.1 *MjERF053*通过“保水—膜保护”协同维持干旱下的水分平衡

水分平衡与细胞膜完整性是植物应对干旱的首要生理屏障,前者保障细胞代谢的基础水分供应,后者维持胞内生理环境稳定^[28]。本研究结果显示,干旱胁迫第8天,*MjERF053*过表达株系叶片相对含水量(RWC, 0.75~0.85)显著高于Col(0.56),而相对电导率(REC, 21.91%~34.13%)与丙二醛(MDA, 17.20~20.75 nmol·g⁻¹)含量显著低于Col(53.76%、41.69 nmol·g⁻¹)(图2)。这一结果表明,*MjERF053*可通过双重途径维持干旱下的细胞稳态:一方面减少细胞水分流失,确保代谢所需水分;另一方面抑制膜脂过氧化——MDA作为膜脂氧化的特征产物,其含量降低直接反映膜损伤减轻^[29],REC降低则说明细胞膜透性稳定,避免胞内电解质外渗导致的代谢紊乱,这与多数抗逆基因通过“水分保留—膜保护”协同提升抗逆性的核心逻辑一致^[30]。

从调控逻辑来看,*MjERF053*这种“保水—膜保护”的双重协同模式,与同类ERF基因的调控策略既有共性也存在差异。Zhu等^[15]研究玉米*ZmEREBP60*时发现,其过表达株系虽能通过降低MDA与REC减轻膜损伤,但对植株RWC的提升效果未达显著水平,推测该基因更侧重通过膜保护缓解干旱损伤,而缺乏对水分运输相关过程的调控;Liu等^[31]发现玉米*ZmSDD1*通过降低气孔密度减少蒸腾失水,虽能提升RWC,但对膜脂氧化的抑制作用较弱,表明其调控重心集中在水分保留环节。相比之下,*MjERF053*同时实现“高保水—低膜损伤”,可能源于其对水分运输基因(如水孔蛋白基因)与膜修复基因(如膜脂合成基因)的同步调控,这种多靶点调控模式进一步拓展了ERF基因调控水分平衡的维度。此外,拟南芥*TINY*基因通过激活ABA合成基因*NCED3*促进气孔关闭以减少水分流失^[12],但未检测到其对膜完整性的保护作用;拟南芥*AtRAP2.4*通过激活表皮蜡质合成同时实现“保水—膜保护”^[22],与*MjERF053*的调控逻辑相似,体现了ERF基因在多维度抗逆中的保守性。

3.2 *MjERF053*通过维持光系统Ⅱ功能稳定光合电子传递,保障干旱下的能量供应

光合作用是植物干旱胁迫下能量积累的核心来源^[32],光系统Ⅱ(PSⅡ)作为光合电子传递链的关键组件,其功能稳定性直接影响光合效率^[33]。本研究结果显示,干旱胁迫第12天,Col的PSⅡ最大光化学效率(F_v/F_m)降至0.58、电子传递速率(ETR)降至36.93,表明PSⅡ反应中心因干旱胁迫出现严重失活;而*MjERF053*过表达株系的 F_v/F_m 维持在0.69~0.70、ETR维持在49.78~52.95,且光能利用效率(α)更高、非光化学淬灭(NPQ)更低(图3)。这一结果表明,*MjERF053*可通过维持PSⅡ反应中心活性、优化光能分配,减轻干旱对光合系统的损伤,为植株生长发育提供必要的能量支撑。

已有研究中,不同物种ERF基因对光合系统的调控功能呈现差异,这主要源于各研究设定的核心观测方向与检测指标不同。Jung等^[19]在水稻*OsERF83*的研究中,仅将PSⅡ最大光化学效率(F_v/F_m)作为核心检测指标,未延伸分析电子传递速率(ETR)与光能利用效率(α),因此仅揭示了该基因对PSⅡ反应中心潜在活性的保护作用;Yang等^[22]研究拟南芥*AtRAP2.4*时,重点关注表皮蜡质合成与蒸腾失水过程,虽发现其可间接缓解光合抑制,但未针对PSⅡ功能相关指标展开深入检测,未能明确其对PSⅡ本身的调控作用。本研究中*MjERF053*对 F_v/F_m 、ETR、 α 及NPQ的同步调控效应,是基于对拟南芥干旱胁迫下PSⅡ功能多维度指标的系统检测所得,反映了该基因在本试验体系中对光合系统的直接调控作用。从潜在机制来看,PSⅡ反应中心的D1蛋白是干旱胁迫的敏感靶点,胁迫下易发生损伤降解,而*AtFTSH*家族基因编码的蛋白酶可促进受损D1蛋白降解与新蛋白合成,维持PSⅡ的结构稳定^[34];这一研究结果为理解*MjERF053*如何维持PSⅡ功能提供了参考方向,提示其可能通过调控PSⅡ修复相关基因表达发挥作用,但具体调控靶点仍需后续试验进一步验证。

3.3 *MjERF053*通过调控抗氧化酶相关基因与活性,增强拟南芥干旱下的ROS清除能力

干旱胁迫下,植物呼吸代谢紊乱与光合电子传递受阻会导致活性氧(ROS,如·O₂⁻、H₂O₂)过量积累,进而引发膜脂过氧化、蛋白质变性、核酸损伤,而抗氧化酶系统(CAT、POD、SOD)是植物清除ROS、维持细胞氧化还原稳态的关键防线^[35-36]。本研究结果显示,干旱胁迫第12天,通过NBT与DAB染色可直观观察到,*MjERF053*过表达株系叶片中·O₂⁻与H₂O₂的积累量低于Col(图4A、B);定量检测进一步证实,过表达株系的CAT活性(1539.06~2153.78 U·g⁻¹)、POD活性(5394.93~10507.00 U·g⁻¹)分别为Col(1030.56 U·g⁻¹、3209.85 U·g⁻¹)

的 1.5~2.1 倍、1.7~3.3 倍 ($P < 0.05$), 表明 *MjERF053* 的表达可提升拟南芥的 ROS 清除能力, 从而减轻氧化损伤。从分子调控来看, 过表达株系中抗氧化酶编码基因 *AtCAT1* (升高 5.18~10.87 倍)、*AtPOD3* (升高 6.02~32.87 倍)、*AtSOD4* (升高 6.49~10.72 倍) 的相对表达量显著高于 Col (5.93、3.18、3.69 倍) (图 5), 提示 *MjERF053* 可能通过上调这些基因的转录水平, 促进抗氧化酶蛋白合成, 进而提升酶活性, 最终增强 ROS 清除效率, 这一调控逻辑与 *ERF* 家族基因常通过激活抗氧化酶基因参与抗逆响应的报道相符^[37]。

不同物种中 *ERF* 基因对 ROS 清除系统的调控, 往往与研究中关注的基因类型、酶活性指标及胁迫条件相关, 呈现出不同的功能侧重点。Huan 等^[16]对杨树 *ERF194* 的研究, 重点分析了其对氧化还原酶基因及 ' O_2^- ' 清除的影响, 未涉及 CAT 与 POD 活性; Zhang 等^[17]对大豆 *GmERF3* 的研究, 则主要观测了 CAT、POD 活性及部分相关基因, 对 SOD 的调控分析较少, 这些差异更多源于研究设计的聚焦方向不同。本研究中 *MjERF053* 对 *AtCAT1*、*AtPOD3*、*AtSOD4* 及对应酶活性的调控, 是基于拟南芥干旱胁迫下 ROS 清除关键环节的检测结果, 反映了该基因在本试验体系中对 3 类抗氧化酶相关基因的调控作用。此外, 过表达株系 ROS 清除能力的增强, 与前文所述“相对电导率降低、MDA 含量下降”的膜损伤减轻表型形成关联——ROS 积累减少可直接降低膜脂过氧化程度^[15], 这一关联为理解 *MjERF053* 如何通过调控 ROS 清除过程, 辅助维持细胞稳态提供了试验依据, 也为后续深入验证其具体调控靶点 (如是否直接结合这些基因启动子) 奠定基础。

3.4 *MjERF053* 调控多类抗逆相关基因表达, 关联拟南芥干旱响应的关键生理过程

植物抗旱是多基因、多通路协同响应的复杂过程, 转录因子通过调控下游靶基因的表达, 整合胁迫信号并协调生理代谢适应逆境^[8,37]。本研究通过基因表达分析发现, *MjERF053* 可显著上调拟南芥中多类与抗逆功能相关的基因, 且这些基因的表达变化与前文观测到的生理表型存在明确关联: 在干旱信号响应层面, 过表达株系中 *AtRD22*、*AtRD29A* 的相对表达量显著高于 Col, 其中 *AtRD29A* 含 *ERF* 家族经典结合元件 DRE, 其表达上调通常与植物对干旱信号的感知和早期响应相关^[38], 这与过表达株系“萎蔫延迟、复水恢复好”的表型形成呼应; 在交叉胁迫适应层面, *AtCOR15A*、*AtCOR47* 的表达提升, 这类基因此前被报道可同时响应低温与干旱胁迫^[39], 暗示 *MjERF053* 可能参与拟南芥对多重非生物胁迫的适应性调控; 在离子平衡维持层面, 钾离子转运相关基因 *AtHAK5* 的高表达, 与过表达株系“相对含水量更高”的生理特征相匹配, 因 *AtHAK5* 介导的钾离子吸收可辅助维持胞内渗透压^[40], 减少干旱下的细胞水分流失; 在激素信号关联层面, ABA 通路相关基因 *AtABI5* 的上调, 结合 *AtABI5* 可调控气孔关闭相关基因 (如 *AtSLAC1*) 与抗氧化基因 (如 *AtCAT1*) 的报道^[41-42], 为过表达株系“ROS 积累少、膜损伤轻”的生理表型提供了分子层面的解释 (图 6)。

从已报道的 *ERF* 基因功能来看, 不同物种中 *ERF* 家族成员的抗逆调控方向存在研究重点的差异, 这与研究设计中关注的生理过程或基因类型相关。Jung 等^[14]在水稻 *OsERF48* 的研究中, 重点解析了其通过钙信号通路调控根系发育的机制, 该研究主要聚焦器官形态建成与水分吸收的关联; Huan 等^[16]对杨树 *ERF194* 的研究, 则以 ROS 清除相关指标与基因为核心, 揭示其在氧化应激防御中的作用。本研究中 *MjERF053* 调控的基因类型, 涵盖了干旱信号响应、离子平衡、激素信号关联等多个与抗旱相关的功能方向, 这种调控范围的差异, 本质是不同 *ERF* 基因在植物抗逆网络中功能分工的体现。值得注意的是, 拟南芥中 *AtDREB2A* 也被报道可调控多类抗逆相关基因^[43], 本研究中 *MjERF053* 的调控特征与其有相似之处, 但调控的基因类型和幅度有差异, 这可能与拟南芥不同基因型或试验胁迫条件的差异相关, 也反映了转录因子调控的物种特异性与环境依赖性。本研究中这些基因的协同表达, 为理解 *MjERF053* 如何通过分子层面的调控, 关联并优化拟南芥干旱下的生理适应过程提供了线索, 也为后续深入解析其具体调控靶点与信号关联机制奠定基础。

4 结论

本研究证实, 过表达黄花苜蓿 *MjERF053* 基因可从生理与分子层面协同增强拟南芥抗旱性: 生理上, 能延缓干旱胁迫下植株萎蔫进程, 维持更高的相对含水量, 减轻细胞膜损伤与氧化应激, 同时保护光系统 II 功能、维持光合效率; 分子上, 可显著上调抗氧化酶相关基因 (*AtCAT1*、*AtPOD3*、*AtSOD4*) 及干旱响应、*COR* 家族、钾离子转运、ABA 信号通路等抗逆相关基因的表达, 进而激活 ROS 清除机制与干旱响应通路。综上, *MjERF053* 是调控

植物抗旱性的关键基因,可为耐旱作物/牧草分子育种提供重要的基因资源与理论支撑。

参考文献 References:

- [1] D'Odorico P, Schonbeck L, Vitali V, *et al.* Drone-based physiological index reveals long-term acclimation and drought stress responses in trees. *Plant, Cell & Environment*, 2021, 44(11): 3552–3570.
- [2] Bao A K, Du B Q, Touil L, *et al.* Coexpression of tonoplast cation/ H^+ antiporter and H^+ -pyrophosphatase from xerophyte *Zygophyllum xanthoxylum* improves alfalfa plant growth under salinity, drought and field conditions. *Plant Biotechnology Journal*, 2016, 14(3): 964–975.
- [3] Luo D, Wu Y G, Liu J, *et al.* Comparative transcriptomic and physiological analyses of *Medicago sativa* L. indicates that multiple regulatory networks are activated during continuous ABA treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(1): 47.
- [4] Ma Y T, Zhai Q Y, Liu Z P, *et al.* Genome-wide identification and characterization of alfalfa-specific genes in drought stress tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2025, 220: 108945.
- [5] Luo D, Liu J, Wu Y G, *et al.* NUCLEAR TRANSPORT FACTOR 2-LIKE improves drought tolerance by modulating leaf water loss in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *The Plant Journal*, 2022, 112(2): 429–450.
- [6] Zhang W Y, Wang J, Xu L, *et al.* Drought stress responses in maize are diminished by *Piriformospora indica*. *Plant Signaling & Behavior*, 2018, 13(1): e1414121.
- [7] Cosme M. Mycorrhizas drive the evolution of plant adaptation to drought. *Communications Biology*, 2023, 6(1): 346.
- [8] Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, *et al.* Genome-wide analysis of the *ERF* gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiology*, 2006, 140(2): 411–432.
- [9] Ohme-Takagi M, Shinshi H. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *The Plant Cell*, 1995, 7(2): 173–182.
- [10] Xu Z S, Chen M, Li L C, *et al.* Functions of the ERF transcription factor family in plants. *Botany*, 2008, 86(10): 969–977.
- [11] Gasch P, Funderinger M, Müller J T, *et al.* Redundant ERF-VII transcription factors bind to an evolutionarily conserved cis-motif to regulate hypoxia-responsive gene expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2016, 28(1): 160–180.
- [12] Xie Z L, Nolan T, Jiang H, *et al.* The AP2/ERF transcription factor *TINY* modulates brassinosteroid regulated plant growth and drought responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2019, 31(8): 1788–1806.
- [13] Chen N N, Qin J J, Tong S F, *et al.* One AP2/ERF transcription factor positively regulates Pi uptake and drought tolerance in poplar. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(9): 5241.
- [14] Jung H, Chung P J, Park S H, *et al.* Overexpression of *OsERF48* causes regulation of *OsCML16*, a calmodulin-like protein gene that enhances root growth and drought tolerance. *Plant Biotechnology Journal*, 2017, 15(10): 1295–1308.
- [15] Zhu Y Q, Liu Y, Zhou K M, *et al.* Overexpression of *ZmEREBP60* enhances drought tolerance in maize. *Journal of Plant Physiology*, 2022, 275: 153763.
- [16] Huan X H, Wang X Q, Zou S Q, *et al.* Transcription factor *ERF194* modulates the stress-related physiology to enhance drought tolerance of poplar. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(1): 788.
- [17] Zhang G Y, Chen M, Li L C, *et al.* Overexpression of the soybean *GmERF3* gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60(13): 3781–3796.
- [18] An J P, Zhang X W, Bi S Q, *et al.* The ERF transcription factor *MdERF38* promotes drought stress-induced anthocyanin biosynthesis in apple. *The Plant Journal*, 2020, 101(3): 573–589.
- [19] Jung S E, Bang S W, Kim S H, *et al.* Overexpression of *OsERF83*, a vascular tissue-specific transcription factor gene, confers drought tolerance in rice. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(14): 7656.
- [20] Quan R D, Hu S J, Zhang Z L, *et al.* Overexpression of an ERF transcription factor *TSRF1* improves rice drought tolerance. *Plant Biotechnology Journal*, 2010, 8(4): 476–488.
- [21] Li Z J, Tian Y S, Xu J, *et al.* A tomato ERF transcription factor, *SIERF84*, confers enhanced tolerance to drought and salt stress but negatively regulates immunity against *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2018, 132: 683–695.
- [22] Yang S U, Kim H, Kim R J, *et al.* AP2/DREB transcription factor *RAP2.4* activates cuticular wax biosynthesis in *Arabidopsis* leaves under drought. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 895.
- [23] Li Q, Jiang W B, Jiang Z H, *et al.* Transcriptome and functional analyses reveal *ERF053* from *Medicago falcata* as key

- regulator in drought resistances. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 995754.
- [24] Li Q. Transcriptome analysis of *Medicago falcata* in response to drought stress and functional characterization of *MjERF053* gene. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2022.
李倩. 黄花苜蓿干旱胁迫响应的转录组分析及 *MjERF053* 基因的功能研究. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2022.
- [25] Clough S J, Bent A F. Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 1998, 16(6): 735–743.
- [26] Zhang Y G, Zhang Y, Wang C, *et al.* Enhancement of salt tolerance of alfalfa: physiological and molecular responses of transgenic alfalfa plants expressing *Syntrichia caninervis*-derived *ScABI3*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2024, 207: 108335.
- [27] Tao Q B, Sun J P, Nie Y T, *et al.* Evaluation of seed vigor and prediction of field seedling emergence of Chinese milk vetch (*Astragalus sinicus* L.) by conductivity method. *Chinese Journal of Grassland*, 2022, 44(4): 95–103.
陶奇波, 孙继鹏, 聂宇婷, 等. 电导率法评价紫云英种子活力并预测田间出苗表现. *中国草地学报*, 2022, 44(4): 95–103.
- [28] Liu Y, Zhang L N, Liu X H, *et al.* Research progress from individual plant physiological response to ecological model prediction under drought stress. *Acta Ecologica Sinica*, 2023, 43(24): 10042–10053.
刘燕, 张凌楠, 刘晓宏, 等. 干旱胁迫植物个体生理响应及其生态模型预测研究进展. *生态学报*, 2023, 43(24): 10042–10053.
- [29] Hao X R, Jiang Y, Wang Y Q, *et al.* Overexpression of poplar *PtoXTH34* gene to enhance drought resistance of tobacco. *Journal of Beijing Forestry University*, 2025, 47(1): 63–71.
郝玄瑞, 姜妍, 王宇倩, 等. 杨树 *PtoXTH34* 基因过表达提高烟草抗旱性. *北京林业大学学报*, 2025, 47(1): 63–71.
- [30] Kishor P B K, Hong Z, Miao G H, *et al.* Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiology*, 1995, 108(4): 1387–1394.
- [31] Liu Y B, Qin L J, Han L Z, *et al.* Overexpression of maize *SDD1* (*ZmSDD1*) improves drought resistance in *Zea mays* L. by reducing stomatal density. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2015, 122(1): 147–159.
- [32] Talbi S, Rojas J A, Sahrawy M, *et al.* Effect of drought on growth, photosynthesis and total antioxidant capacity of the saharan plant *Oudeneya africana*. *Environmental and Experimental Botany*, 2020, 176: 104099.
- [33] Chen J H, Chen S T, He N Y, *et al.* Nuclear-encoded synthesis of the D1 subunit of photosystem II increases photosynthetic efficiency and crop yield. *Nature Plants*, 2020, 6(5): 570–580.
- [34] Bassi R, Dall'Osto L. Dissipation of light energy absorbed in excess: The molecular mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, 2021, 72(1): 47–76.
- [35] Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, *et al.* Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 2004, 9(10): 490–498.
- [36] Gill S S, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2010, 48(12): 909–930.
- [37] Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 2012, 1819(2): 86–96.
- [38] Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Molecular responses to dehydration and low temperature: Differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, 2000, 3(3): 217–223.
- [39] Thomashow M F. *PLANT COLD ACCLIMATION: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms*. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1999, 50(1): 571–599.
- [40] Gierth M, Mäser P, Schroeder J I. The potassium transporter *AtHAK5* functions in K^{+} deprivation-induced high-affinity K^{+} uptake and *AKT1* K^{+} channel contribution to K^{+} uptake kinetics in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiology*, 2005, 137(3): 1105–1114.
- [41] Hsu P K, Dubeaux G, Takahashi Y, *et al.* Signaling mechanisms in abscisic acid-mediated stomatal closure. *The Plant Journal*, 2021, 105(2): 307–321.
- [42] Bi C, Ma Y, Wu Z, *et al.* *Arabidopsis ABI5* plays a role in regulating ROS homeostasis by activating *CATALASE1* transcription in seed germination. *Plant Molecular Biology*, 2017, 94(1/2): 197–213.
- [43] Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, *et al.* Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, *DREB2A*, involved in drought-responsive gene expression. *The Plant Cell*, 2006, 18(5): 1292–1309.