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

日本落叶松*LkERF*5过表达增强烟草耐旱性

田明 王建洲 景一凡 盖颖

Overexpression of *LkERF*5 in *Larix kaempferi* to enhance drought tolerance in tobacco

Tian Ming, Wang Jianzhou, Jing Yifan, Gai Ying

引用本文:
田明, 王建洲, 景一凡, 盖颖. 日本落叶松*LkERF*5过表达增强烟草耐旱性[J]. 北京林业大学学报, 2025, 47(6):101–110. doi: 10.12171/j.1000–1522.20240419
Tian Ming, Wang Jianzhou, Jing Yifan, Gai Ying. Overexpression of *LkERF*5 in *Larix kaempferi* to enhance drought tolerance in tobacco[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2025, 47(6):101–110. doi: 10.12171/j.1000–1522.20240419

在线阅读 View online: https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20240419

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

过表达细叶百合*LpNAC*6基因增强烟草的耐盐性
Overexpression of *LpNAC*6 gene in *Lilium pumilum* enhancing salt tolerance in transgenic tobacco
北京林业大学学报, 2020, 42(4): 69–79. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20190342

胡杨*PeREM*1.3过表达提高烟草耐盐性的机制
Overexpression mechanism of *PeREM*1.3 from *Populus euphratica* enhancing salt tolerance in transgenic tobacco
北京林业大学学报, 2019, 41(1): 1–9. https://doi.org/10.13332/j.1000–1522.20180338

过表达毛白杨线粒体*APX*基因烟草提高抗逆能力的研究
Tobacco overexpression *Populus tomentosa* mitochondria ascorbate peroxidase improving stress resistance
北京林业大学学报, 2020, 42(7): 33–39. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20190390

过表达胡杨*PeAnn*1负调控拟南芥的抗旱性
Overexpression of *PeAnn*1 from *Populus euphratica* negatively regulates drought resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana*
北京林业大学学报, 2020, 42(6): 14–25. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20200031

日本落叶松不同种源及家系生长性状变异分析
Variance analyses on growth traits of *Larix kaempferi* in different seed sources
北京林业大学学报, 2018, 40(11): 19–27. https://doi.org/10.13332/j.1000–1522.20170478

白桦*BpPAT*1基因的表达模式及耐盐性分析
Expression patterns and salt tolerance analysis of *BpPAT*1 gene in *Betula platyphylla*
北京林业大学学报, 2021, 43(10): 18–27. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20200302

DOI:10.12171/j.1000−1522.20240419

日本落叶松 *LkERF5* 过表达增强烟草耐旱性

田　明　　王建洲　　景一凡　　盖　颖
（林木遗传育种全国重点实验室，树木花卉育种生物工程国家林业和草原局重点实验室，北京林业大学生物科学与技术学院，北京 100083）

摘要:【目的】日本落叶松是中国东北地区重要的造林树种，具有重要的生态和经济价值，但干旱胁迫严重影响其生长发育。ERF 转录因子对日本落叶松响应干旱胁迫的影响尚不明确，本研究拟通过探究日本落叶松 *LkERF5* 基因在烟草干旱胁迫响应中的功能，为日本落叶松耐旱机制的解析和林木抗逆分子育种奠定理论基础。**【方法】**从日本落叶松中克隆 *LkERF5* 基因并分析其序列特征；通过在烟草中瞬时表达，确定 LkERF5 的亚细胞定位；利用酵母系统检测 *LkERF5* 的转录激活活性；采用叶盘转化法将 *LkERF5* 基因转化烟草，对比分析野生型（WT）和 *LkERF5* 转基因烟草在干旱胁迫下的表型和生理生化指标差异。**【结果】**（1）LkERF5 含有 1 个 AP2/ERF 保守结构域，属于 DREB-A5 亚家族。（2）LkERF5 定位在细胞核，具有转录激活活性。（3）干旱处理 14 d 后，WT 植株的叶片枯萎或死亡，而 *LkERF5* 转基因烟草的顶部叶片保持正常的生长状态。（4）干旱胁迫下，过表达 *LkERF5* 植株的可溶性糖和脯氨酸含量显著高于 WT，渗透调节作用增强；过表达 *LkERF5* 植株的叶绿素含量、净光合速率和水分利用率显著高于 WT，气孔导度、胞间 CO_2 浓度和蒸腾速率显著低于 WT，光合作用增强；过表达 *LkERF5* 植株的超氧化物歧化酶、过氧化物酶和过氧化氢酶活性显著高于 WT，活性氧和丙二醛含量显著低于 WT，细胞损伤减轻。**【结论】**过表达 *LkERF5* 烟草通过增加细胞渗透调节物质，提高光合作用，清除活性氧积累来提高植株的抗旱性。本研究不仅为解析日本落叶松的 *LkERF5* 基因功能提供了重要依据，并为日本落叶松种质资源的创新与改良提供了关键的候选基因资源。

关键词：日本落叶松；*LkERF5* 基因；转基因烟草；抗旱性；光合作用；基因表达
中图分类号：S791.223　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1000−1522(2025)06−0101−10
引文格式：田明，王建洲，景一凡，等. 日本落叶松 *LkERF5* 过表达增强烟草耐旱性［J］. 北京林业大学学报，2025，47(6)：101−110. Tian Ming, Wang Jianzhou, Jing Yifan, et al. Overexpression of *LkERF5* in *Larix kaempferi* to enhance drought tolerance in tobacco［J］. Journal of Beijing Forestry University, 2025, 47(6): 101−110.

Overexpression of *LkERF5* in *Larix kaempferi* to enhance drought tolerance in tobacco

Tian Ming　Wang Jianzhou　Jing Yifan　Gai Ying
(State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Tree and Ornamental Plant Breeding and Biotechnology Laboratory of National Forestry and Grassland Administration, School of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract:［**Objective**］*Larix kaempferi* is an important tree species for afforestation in Northeast China, with significant ecological and economic value. However, drought stress severely affects its growth and development. The role of ERF transcription factors in the drought stress response of *L. kaempferi* remains unclear. This study aims to explore the function of *LkERF5* gene from *L. kaempferi* in drought stress response of tobacco, thereby providing a theoretical basis for elucidating drought tolerance mechanism of *L. kaempferi* and for molecular breeding of stress-resistant forest trees.［**Method**］The *LkERF5* gene was

收稿日期: 2024−12−06　**修回日期:** 2025−01−17
基金项目: 科技创新 2030-农业生物育种重大项目（2023ZD040580203）。
第一作者: 田明。主要研究方向：树木分子生物学。Email: 18731228379@163.com　地址：100083 北京市海淀区清华东路 35 号北京林业大学生物科学与技术学院。
责任作者: 盖颖，博士，教授。主要研究方向：树木分子生物学。Email: gaiying@bjfu.edu.cn　地址：同上。
本刊网址: http://j.bjfu.edu.cn; http://journal.bjfu.edu.cn

cloned from *L. kaempferi*, and its sequence characteristics were analyzed. Subcellular localization of LkERF5 was determined via transient expression in tobacco. Transcriptional activation activity was assessed using a yeast system. The *LkERF*5 gene was transformed into tobacco via leaf disk transformation, and the phenotypic and physiological differences between wild-type (WT) and *LkERF*5-overexpressing transgenic tobacco were analyzed under drought stress. [**Result**] (1) LkERF5 encoded 207 amino acids and contained one AP2/ERF conserved domain. (2) LkERF5 was localized in nucleus and had transcriptional activation activity. (3) After 14 d of drought treatment, the leaves of WT plants withered or died, while the top leaves of *LkERF*5 transgenic tobacco remained normal growth state. (4) Under drought stress, *LkERF*5 transgenic plants showed significantly higher soluble sugar and proline contents, indicating enhanced osmotic regulation. Additionally, chlorophyll content, photosynthetic rate, and water use efficiency were significantly increased in transgenic plants, while stomatal conductance, intercellular CO_2 concentration, and transpiration rate were markedly reduced, suggesting enhanced photosynthesis. Furthermore, superoxide dismutase, peroxidase, and catalase activities were significantly enhanced in transgenic plants, accompanied by reduced reactive oxygen species (ROS) accumulation and malondialdehyde content, indicating reduced cellular damage. [**Conclusion**] Overexpression of *LkERF*5 in tobacco enhances drought tolerance by increasing osmotic adjustment substances, improving photosynthetic efficiency, and scavenging ROS content. This study not only provides critical insights into the functional characterization of *LkERF*5 in *L. kaempferi*, but also identifies valuable candidate genetic resources for the improvement of *L. kaempferi* germplasm.

Key words: *Larix kaempferi*; *LkERF*5 gene; transgenic tobacco; drought resistance; photosynthesis; gene expression

AP2/ERF 是一类在植物中广泛存在的转录因子家族，因其含有 60 ~ 70 个氨基酸残基组成的高度保守的 AP2/ERF 结构域而命名[1]。该结构域包括 N 端的 YRG 元件和 C 端的 RADY 元件，其中 YRG 元件含有保守的 YRG 基序，能形成 3 个反平行的 β-折叠，在 ERF 识别顺式作用元件的过程中发挥着重要作用；RADY 元件形成 1 个两亲性的 α-螺旋，影响 ERF 与其他转录因子之间的相互作用[2]。根据保守结构域的数量和结合序列的不同，AP2/ERF 家族被划分为 AP2、ERF 和 RAV 3 大类[3−4]。AP2 亚家族包含 2 个 AP2/ERF 保守结构域，主要负责调控植物的生长发育过程，可细分为 AP2 亚族[5]和 ANT 亚族[6]。ERF 亚家族包含 1 个 AP2/ERF 结构域[7]，主要参与植物对胁迫的响应过程，可细分为 DREB 和 ERF 亚族，每个亚族又分别细分为 A1 ~ A6 和 B1 ~ B6[8]。RAV 亚家族包含 1 个 AP2/ERF 结构域和 1 个 B3 结构域，在植物的胁迫响应中扮演着重要角色[9]。

ERF 转录因子不仅参与植物的生长发育和次级代谢调控，而且在植物适应不利环境中发挥着关键作用。例如，杨树（*Populus tomentosa*）*PtoERF*15 通过调控 *PtoMYC*2*b* 的表达，影响细胞壁的厚度和木质化，进而提高植株对干旱胁迫的耐受性[10]。平邑甜茶（*Malus hupenensis*）*MdDREB*2*A* 正向调控氮的利用和根系发育，显著增强了植株耐旱性[11]。在拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）中，过表达 *AtERF*34 可提高转基因植物对盐胁迫的耐受性[12]。在枸橘（*Poncirus trifoliata*）中，*PtrERF*108 通过激活 *PtrRafS* 基因的表达，促进棉子糖的积累，进而增强植株的耐寒性[13]。长白落叶松（*Larix olgensis*）的 *LoERF*017 在盐胁迫（NaCl）、聚乙二醇（$PEG_{6\,000}$）和脱落酸（ABA）的诱导下表达量显著增加，且在拟南芥中过表达该基因可以显著提高植株对盐胁迫和渗透胁迫的耐受性[14]。马尾松（*Pinus massoniana*）的 *PmERF*1 能通过提高水分利用效率，显著增强转基因植株的耐旱性[15]。

乙烯作为一种重要的信号分子，在植物干旱胁迫响应过程中扮演着重要的角色，其功能主要包括调节植物生长发育、调节气孔运动、激活抗氧化系统、参与渗透调节等[16]。在乙烯信号转导途径中，乙烯与细胞表面的乙烯受体结合，通过级联反应将干旱信号传递到细胞内部，最终激活 EIN3/EIL1 等转录因子[17−18]。ERF 处于乙烯信号通路的下游，EIN3/EIL1 等转录因子能够结合 *ERF* 基因的启动子区域，激活 ERF 的表达。一方面，*ERF* 可调控乙烯合成途径中关键基因的表达，控制乙烯的生物合成，形成一个负反馈调控通路。另一方面，*ERF* 能够激活其他抗逆相关基因的表达来响应胁迫。例如，在枸橘中，低温胁迫诱导了乙烯生成，进而激活 *PtrERF*9 的表达。*PtrER*F9 不仅能激活 *PtrGSTU*17 的表达来调节活性氧（ROS）稳态，还能激活 *PtrACS*1 基因来调控

乙烯合成，形成一个反馈调控回路，最终提高植物的抗寒性[19]。在水稻（*Oryza sativa*）中，*OsERF3* 通过负调控乙烯合成相关基因 *OsACO2* 和 *OsACO3* 的表达来影响乙烯合成，进而降低水稻的耐旱性[20]。

日本落叶松（*Larix kaempferi*）是中国东北地区主要的造林树种，具有耐压、耐弯、耐腐蚀等优点，广泛应用于建筑工业和造纸工业，具有重要的生态价值和经济价值[21]。然而，日本落叶松经常面临干旱等不利环境胁迫，严重限制和影响了其正常生长发育[22]。尽管近年来对日本落叶松的研究逐渐增多，但关于 ERF 转录因子对其抗逆性的影响仍不明确。本研究拟从日本落叶松中克隆 *LkERF5* 基因序列，分析其序列特征、亚细胞定位和转录激活活性，并通过在烟草中异源表达 *LkERF5* 基因，对比分析野生型植株和过表达植株在干旱胁迫下的表型变化及光合作用、抗逆性等生理生化指标，旨在解析 *LkERF5* 基因在植物抵御干旱胁迫过程中的功能。研究结果将为揭示日本落叶松的耐旱机制提供重要参考，也将极大丰富林木遗传改良的候选基因资源。

1　材料与方法

1.1　试验材料

日本落叶松针叶采集于辽宁省大孤家林场国家落叶松良种基地。本氏烟草（*Nicotiana benthamiana*）为本实验室保存。EASYspin Plus 多糖多酚/复杂植物 RNA 快速提取试剂盒、反转录试剂盒购于北京艾德莱生物科技有限公司。

1.2　研究方法

1.2.1　日本落叶松 *LkERF5* 基因克隆和序列分析

从日本落叶松针叶中提取 RNA 并反转录为 cDNA。根据实验室前期的落叶松体细胞胚胎发育 3 个阶段（原胚团、单胚和子叶胚）的转录组数据（未发表），筛选出显著上调的差异表达基因 *LkERF5*（TRINITY_DN53323_c0_g4），利用 Primer 5.0 设计引物（表 1），以反转录的 cDNA 为模板，进行 PCR 扩增。PCR 反应体系（50 μL）为 LA Taq 0.5 μL、LA Taq Buffer 5 μL、dNTP 4 μL、10 μmol/L 上下游引物各 1 μL、cDNA 1 μL，水补齐至 50 μL。PCR 反应程序为 95 ℃ 预变性 5 min；95 ℃ 变性 30 s，52 ℃ 退火 30 s，72 ℃ 延伸 40 s，共 35 个循环；72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物经胶回收后连接到 pTOPO-T 载体上，送至生工公司测序。从 NCBI（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi）和 TAIR（https://www.arabidopsis.org/）在线网站下载北美云杉（*Picea sitchensis*）、柳杉（*Cryptomeria japonica*）、毛果杨（*Populus trichocarpa*）、大豆（*Glycine max*）、玉米（*Zea mays*）和拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）ERF 氨基酸序列，利用 DNAMAN 进行序列比对，并借助 MEGA 7.0 构建系统进化树。

1.2.2　亚细胞定位分析

根据 pBI121-GFP 载体上的多克隆位点，设计带有 *Bam*HI 和 *Xba*I 酶切位点的引物（表 1），通过 PCR 扩增，获得不含终止密码子的 ORF 区域，并连接到酶切后的 pBI121-GFP 载体上，构建植物表达载体 *LkERF5*-GFP。经测序验证无误后，利用液氮冷冻法将重组质粒转化到农杆菌 GV3101 中。随后，将 pBI121-GFP 空载体（阴性对照）或 *LkERF5*-GFP 载体（实验组）与 NLS-mCherry（核定位 Marker）混合的农杆菌菌液一起注射到 4 周龄左右的本氏烟草叶片中，暗培养 16 h，后转入光下培养 2 d，通过激光共聚焦显微镜检测烟草叶片 GFP 信号和核定位 Marker

表 1　本试验所用引物序列

Tab. 1　Primer sequences used in this study

引物名称	引物序列（5′—3′）	试验用途
LkERF5-F	ATGGAGATATTCCCCCAG	基因克隆
LkERF5-R	TCAAACGTCCTGGAAGTT	
LkERF5-pBI121-F	GAGAACACGGGGGACTCTAGAATGGAGATATTCCCCCAG	亚细胞定位
LkERF5-pBI121-R	TCACCATACCTCCTCCTCCGGATCCAACGTCCTGGAAGTT	
LkERF5-pGBKT7-F	TGGCCATGGAGGCCGAATTCATGGAGATATTCCCCCAG	转录激活活性检测
LkERF5-pGBKT7-R	CGCTGCAGGTCGACGGATCCTCAAACGTCCTGGAAGTT	
LkERF5-qPCR-F	CAGCCCTCTCCGAACACTAAT	qRT-PCR
LkERF5-qPCR-R	TTTGGTAATTCAGGGCCGTCT	
NtActin-F	AATGGAACTGGAATGGTCAAGG	
NtActin-R	TGCCAGATCTTCTCCATGTCATC	

信号。

1.2.3 转录激活活性分析

利用限制性内切酶 *Eco*RI 和 *Bam*HI 酶切 pGBKT7 载体，将 *LkERF5* 基因连接到 pGBKT7 载体上，通过醋酸锂转化法将质粒转入酵母感受态 Y2H 中，并涂在 SD/-Trp 培养基(缺失色氨酸 Trp，但含有其他酵母生长所需的营养成分)上，30 ℃倒置培养 3 d。从 SD/-Trp 平板上挑取 3 个单克隆溶于 10 μL 灭菌水中，将重悬液点在 SD/-Trp 和 SD/-Trp-His-Ade(同时缺失色氨酸 Trp、组氨酸 His 和腺嘌呤 Ade)以及添加 X-α-gal(MEL1 的显色底物)的 SD/-Trp-His-Ade 培养基上，观察酵母菌落的生长情况。若酵母能在 SD/-Trp-His-Ade + X-α-gal 培养基上生长并且变蓝，表示有活性。

1.2.4 转基因烟草的遗传转化

利用叶盘转化法获得转基因烟草，具体步骤如下：首先，使用 *LkERF5*-GFP 农杆菌菌液侵染烟草无菌叶片，随后将侵染过的叶片置于筛选培养基上进行培养，直至长出愈伤组织和抗性芽；将抗性芽切下并转入生根培养基中诱导生根，最终获得 *LkERF5* 转基因烟草。分别提取野生型(WT)和转基因烟草叶片的 DNA，利用基因特异性引物进行 PCR 检测，其中以 *LkERF5*-GFP 质粒作为阳性对照，WT 烟草的 DNA 作为阴性对照。然后提取 WT 和转基因烟草叶片的 RNA 并反转录为 cDNA，利用 qRT-PCR 筛选出 3 个表达量较高的转基因株系作为后续的实验材料，其中 *NtActin* 为内参基因。

1.2.5 *LkERF5* 转基因烟草的抗旱性分析

选取 4 周龄的野生型和 *LkERF5* 转基因烟草(3 个 T3 代株系)的土培苗，进行不浇水 14 d 的干旱处理，拍照记录表型，进行形态观察。

在上午 09:00－12:00，利用 LI-6400 光合仪测定干旱处理前后的 WT 和转基因烟草的第 4 片完全展开叶的光合指标，包括光合速率(P_n)、气孔导度(G_s)、胞间 CO_2 浓度(C_i)、蒸腾速率(T_r)和水分利用效率(P_n 与 T_r 的比值，WUE)。测量时，保持红蓝光源，叶室温度设定为 25 ℃，CO_2 浓度为 400 μmol/mol，CO_2 流速设置为 500 μmol/s，光照强度为 1 000 μmol/(m^2·s)。以上指标测定均进行 3 次生物学重复，每个生物学重复包含 1 个植株。

利用分光分度法测定叶片叶绿素含量，茚三酮显色法测定叶片脯氨酸含量，TBA 比色法测定叶片 MDA 含量。利用南京建成生物公司的植物可溶性糖含量测试盒(比色法)、总超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒(羟胺法)、过氧化物酶(POD)测定试剂盒(比色法)、过氧化氢酶(CAT)测定试剂盒(可见光法)、过氧化氢(H_2O_2)测定试剂盒(比色法)和超氧阴离子自由基(O_2^-)测定试剂盒(比色法)分别测定烟草的可溶性糖含量、SOD 活性、POD 活性、CAT 活性、H_2O_2 含量和O_2^-含量等各项抗逆性生理指标。

1.3 数据分析

利用 Excel、GraphPad Prism8.0 等软件对实验数据进行统计和绘图。利用 GraphPad Prism8.0 的 *T* 检验对数据进行显著性分析，显著性水平设定为 $p < 0.05$。

2 结果与分析

2.1 *LkERF5* 的克隆和序列分析

提取日本落叶松的 RNA(图 1A)，并反转录为 cDNA，利用 PCR 克隆得到了基因长度为 624 bp 的 *LkERF5*(图 1B)。序列比对结果表明：LkERF5 与北美云杉、柳杉、毛果杨、大豆、玉米和拟南芥这些物种的序列相似度较高，均含有 1 个保守的 AP2/ERF 保守结构域，符合 ERF 家族的典型特征(图 1C)。进化树结果表明，LkERF5 归类于 DREB-A5 亚家族(图 1D)。

2.2 LkERF5 的亚细胞定位

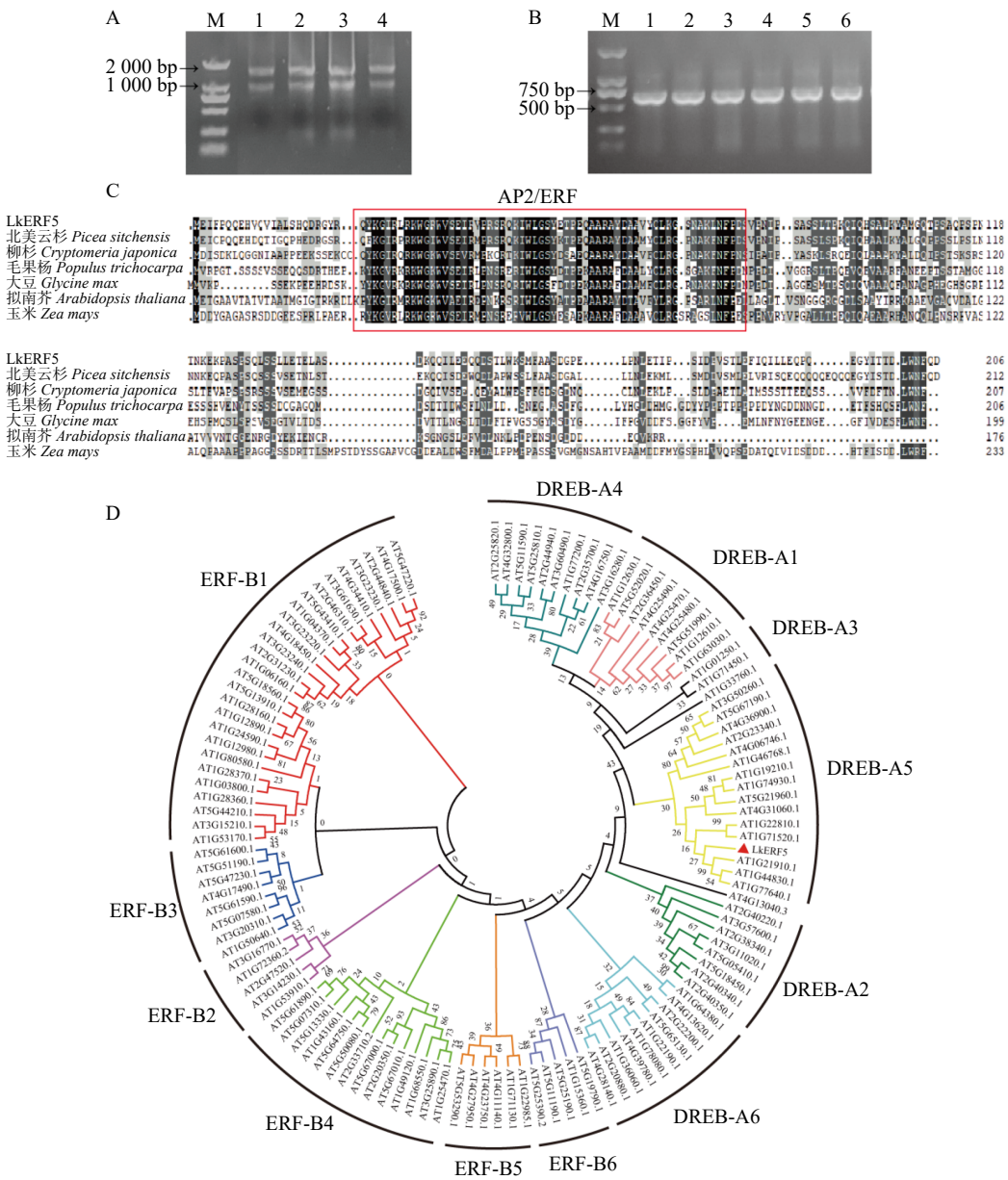
利用共聚焦显微镜观察瞬时转化后的烟草叶片荧光信号，结果显示：35S::GFP 空载体的绿色荧光信号遍布整个细胞，而 35S::*LkERF5*-GFP 的绿色荧光只在细胞核中观察到，并且与细胞核定位 Marker 的红色荧光信号重叠在一起形成黄色荧光，说明 LkERF5 定位在细胞核，符合转录因子的典型特征(图 2)。

2.3 *LkERF5* 的转录激活活性

图 3 显示，酵母菌落能在 SD/-Trp 培养基上正常生长，表明所有质粒均成功转化酵母。而在 SD/-Trp-His-Ade 培养基上，空载体 pGBKT7 和阴性对照 pGBKT7-Lam 不能生长，pGBKT7-*LkERF5* 和阳性对照 pGBKT7-P53 能正常生长，证明 *LkERF5* 能够激活下游报告基因(*Trp*、*His* 和 *Ade* 基因)的表达。另外，pGBKT7-*LkERF5* 能在添加 X-α-gal 的培养基上生长并且变蓝，证明 *LkERF5* 还能激活 *MEL* 基因表达。这些结果表明 *LkERF5* 在酵母中具有转录激活活性。

2.4 *LkERF5* 转基因烟草的分子鉴定

提取 WT 和转基因烟草的 DNA 进行 PCR 鉴定，结果(图 4A)发现，转基因株系中都能扩增出约 624 bp 大小的目的条带，与阳性质粒的条带大小一致，表明 *LkERF5* 已经整合到烟草基因组中。qRT-PCR 检测发现，5-6、5-8、5-9 株系相较于 WT 表达量更高，因而选择这 3 个株系进行后续的抗旱性实验(图 4B)。



A. 日本落叶松的 RNA 提取结果；B. *LkERF5* 的 PCR 扩增结果；C. LkERF5 与其他物种 ERF 的蛋白序列比对；D. LkERF5 与 121 个拟南芥 ERFs 的进化树分析。

图 1　*LkERF5* 的基因克隆和序列分析

Fig. 1　Gene cloning of *LkERF5* and sequence analysis

2.5　*LkERF5* 转基因烟草的抗旱性分析

2.5.1　表型分析

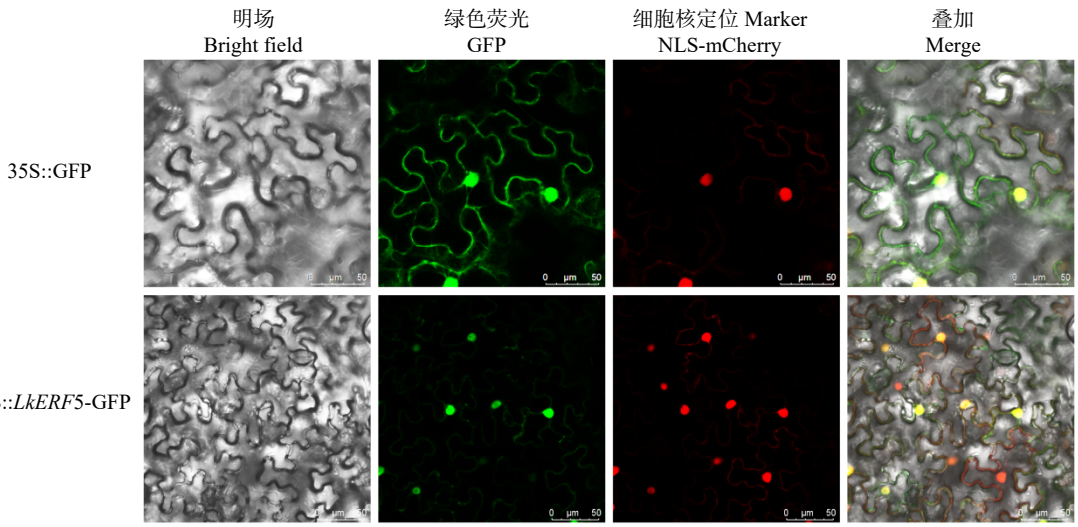
正常生长条件下，WT 与 *LkERF5* 转基因烟草没有表现出明显的差异。干旱处理 14 d 以后，WT 植株的整体叶片枯萎严重，甚至死亡，而 *LkERF5* 转基因烟草的顶部叶片仍能保持正常的生长状态，只有底部部分叶片出现枯萎，这表明在烟草中过表达 *LkERF5* 能显著提高植株对干旱胁迫的抵抗能力（图 5）。

2.5.2　光合指标和叶绿素含量分析

干旱处理前，WT 与 *LkERF5* 转基因株系的光合指标没有显著差异；在干旱处理后，与 WT 相比，*LkERF5* 转基因株系的叶绿素含量、净光合速率和水分利用效率均显著提高，而气孔导度、胞间 CO_2 浓度和蒸腾速率显著降低（图 6）。这些结果表明 *LkERF5* 可能通过提升烟草的光合作用来增强植物的抗旱性。

2.5.3　抗逆生理指标分析

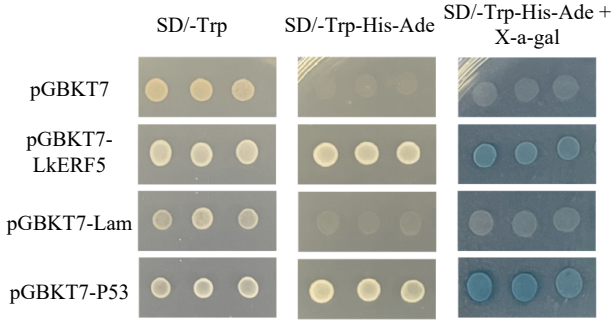
正常情况下，WT 与 *LkERF5* 转基因烟草的可溶性糖、脯氨酸和 MDA 含量没有表现出明显的差异；干旱处理 14 d 后，与 WT 相比，*LkERF5* 转基因株系的可溶性糖和脯氨酸含量显著增加，MDA 含量显著降低（图 7）。说明 *LkERF5* 可能通过增加细胞渗透调节物质含量和降低细胞膜通透性来增加植株抗旱性。



35S::GFP 为阴性对照，35S::*LkERF*5-GFP 为实验组。

图 2 LkERF5 的亚细胞定位

Fig. 2 Subcellular localization of LkERF5



pGBKT7 和 pGBKT7-Lam 为阴性对照，pGBKT7-P53 为阳性对照。

图 3 *LkERF*5 的转录激活活性

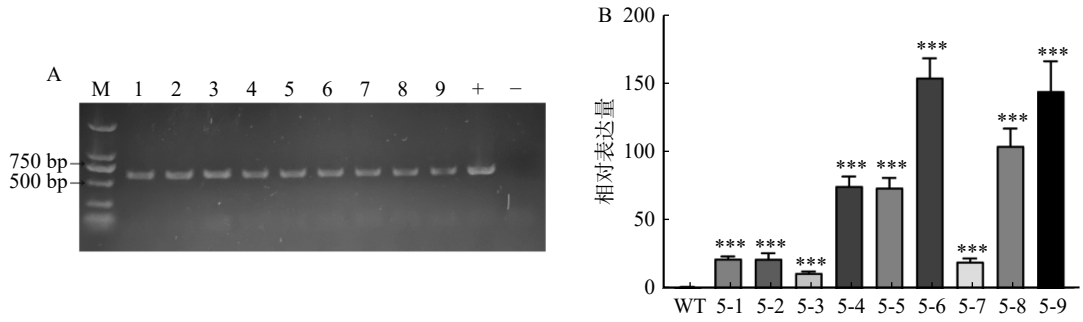
Fig. 3 Transcriptional activation activity of *LkERF*5

正常生长情况下，*LkERF*5 转基因株系中的 SOD、POD、CAT 活性略高于 WT，但差异未达到显著水平；干旱处理后，与 WT 相比，*LkERF*5 转基因株系中的 SOD、POD、CAT 活性均显著上升（图 8A ~ C）。干旱处理前，WT 和 *LkERF*5 转基因株系中的 H_2O_2 和 O_2^- 含量未表现出显著差异；干旱处理后，WT 和 *LkERF*5 转基因株系中的 H_2O_2 和 O_2^- 含量都增加，但是 *LkERF*5 转基因株系中的 H_2O_2 和 O_2^- 含量显著低于 WT，说明转基因株系受到的损伤程度更低（图 8D ~ E）。这些结果表明过表达 *LkERF*5 植株在干旱胁迫下表现出更高的抗氧化酶活性，能够更有效地清除活性氧。

3 讨 论

ERF 作为 AP2/ERF 转录因子家族的重要成员，通过调控下游抗逆基因的表达，在植物响应胁迫过程中发挥关键作用。然而，日本落叶松作为典型的针叶树种，其 ERF 家族基因的抗旱机制尚不明确。本研究以 *LkERF*5 为切入点，通过在烟草中异源表达探究其在干旱胁迫中的功能，旨在为林木抗旱育种提供理论依据和候选基因资源。

本研究通过系统解析 *LkERF*5 的分子特性和功能，揭示了其在抗旱过程中的多重调控作用。首先，序列分析表明 *LkERF*5 属于 DREB-A5 亚家族（图 1D），该亚家族成员普遍参与非生物胁迫响应。其中，与



A. 转基因烟草的 PCR 鉴定结果；1 ~ 9 代表不同的 *LkERF*5 转基因株系，+ 代表阳性对照 *LkERF*5-GFP 质粒，−代表阴性对照 WT。B. qRT-PCR 检测结果；***表示与野生型相比在 0.001 水平上存在极显著差异。下同。

图 4 *LkERF*5 转基因烟草鉴定

Fig. 4 Identification of *LkERF*5 transgenic tobacco

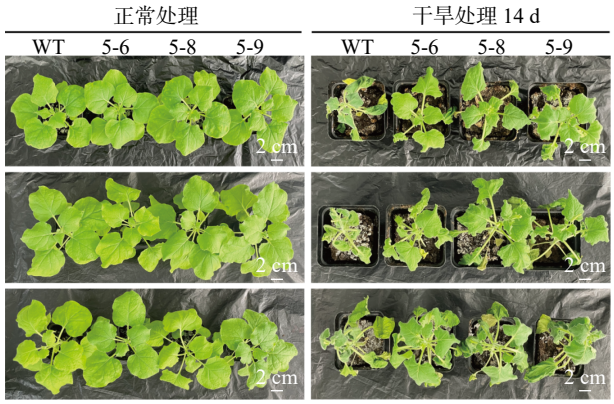
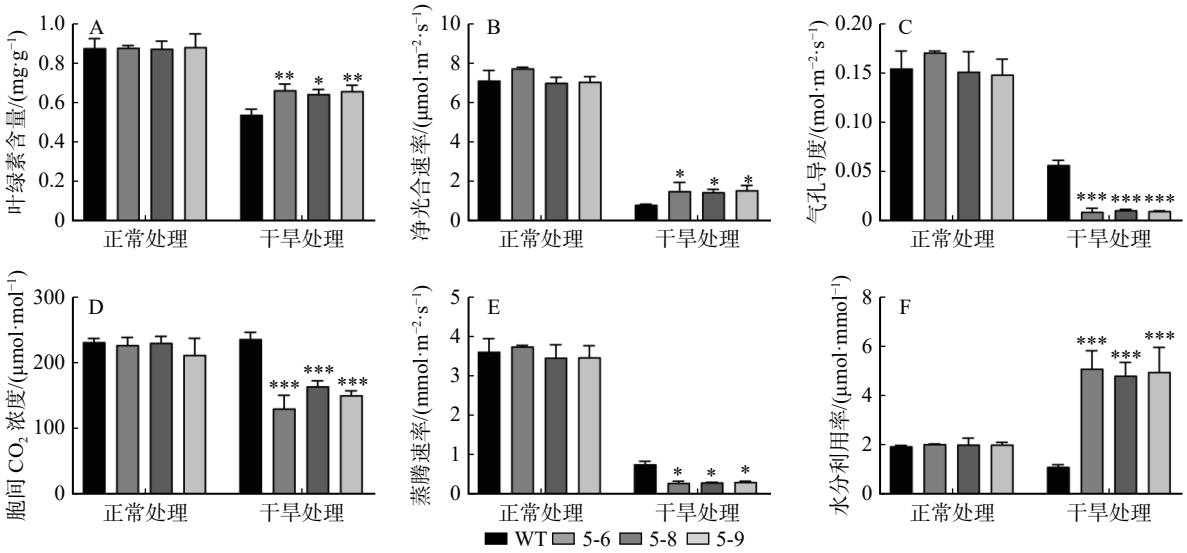


图 5　干旱胁迫前后的 WT 和 *LkERF5* 转基因烟草的表型

Fig. 5　Phenotypes of WT and *LkERF5* transgenic tobacco before and after drought stress

LkERF5 亲缘关系最近的 AtDREB26（AT1G21910）通过调控脯氨酸和蜡质合成基因的表达，影响脯氨酸含量和表皮蜡沉积，从而增强拟南芥对干旱胁迫的耐受性[23−24]。本研究发现，在干旱处理 14 d 后，*LkERF5* 转基因株系的可溶性糖和脯氨酸含量显著增加，表明 *LkERF5* 能够有效促进渗透调节物质的积累，调节细胞渗透压，维持细胞渗透平衡，从而增强植株的抗旱能力。与本研究类似，过表达 *StCDPK*13 的转基因马铃薯（*Solanum tuberosum*）中的脯氨酸和中性糖的积累显著增加，显著提高了植株对干旱胁迫的耐受性[25]。Liu 等[26]发现 *SlP5CR* 的 S-亚硝基化修饰的转基因番茄（*Solanum lycopersicum*）中具有更高的 P5CR 活性和脯氨酸合成能力，从而表现出更强的生长特性和对干旱胁迫的耐受性。另外，MDA 是细胞膜脂过氧化的产物，其含量的高低可以反映细胞膜的损伤程度和细胞的氧化应激水平。在干旱处理后，*LkERF5* 转基因株系的 MDA 含量显著低于 WT，表明 *LkERF5* 能够有效降低细胞膜的通透性，减轻细胞膜的氧化损伤，进而增强植株的抗旱性。这些结果揭示了 *LkERF5* 可能通过协同调控细胞渗透调节物质的积累和细胞膜的保护机制，来增强植株的抗旱性。

在生理层面，过表达 *LkERF5* 显著影响了烟草干旱胁迫下的光合作用指标。干旱胁迫通常导致植物光合作用受阻，表现为叶绿素降解，气孔关闭及光合速率下降。然而，本研究发现，过表达 *LkERF5* 转基因烟草在干旱胁迫下仍能维持较高的叶绿素含量



*表示在 0.05 水平上存在显著差异；**表示在 0.01 水平上存在极显著差异；均以野生型为对照。下同。

图 6　干旱胁迫前后的不同株系烟草的光合指标和叶绿素含量

Fig. 6　Photosynthetic indices and chlorophyll contents of different tobacco lines before and after drought stress

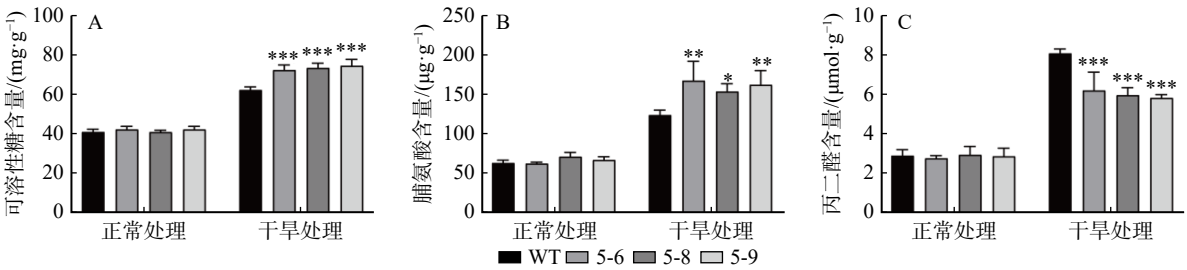


图 7　干旱胁迫前后不同株系烟草的可溶性糖（A）、脯氨酸（B）和丙二醛含量（C）

Fig. 7　Soluble sugar (A), proline (B) and MDA content (C) of different tobacco lines before and after drought stress

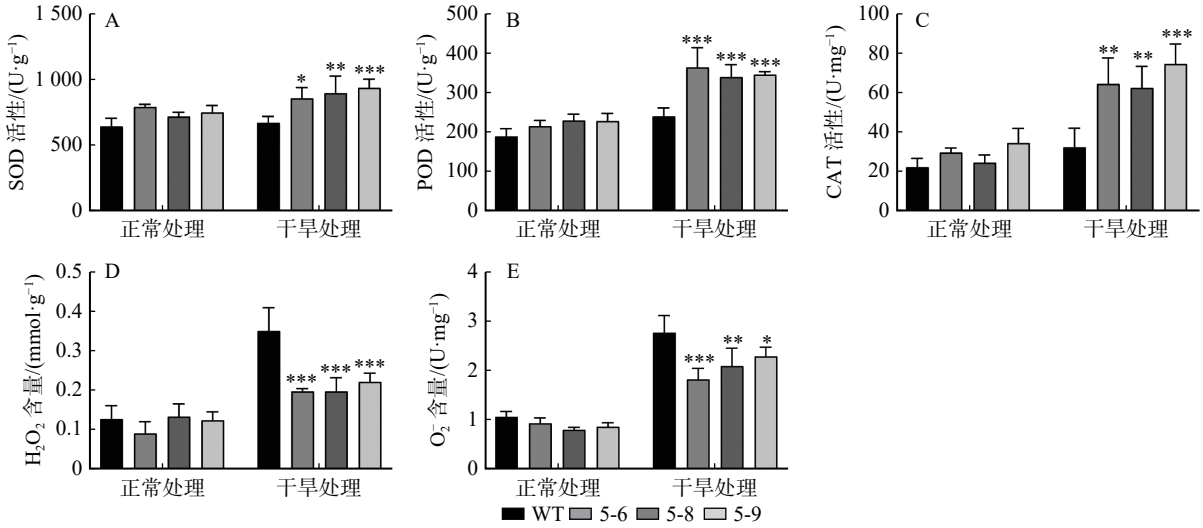


图 8 干旱胁迫前后的不同株系烟草的抗氧化酶活性和活性氧含量

Fig. 8 Antioxidant enzymes activities and reactive oxygen contents of different tobacco lines before and after drought stress

(图 6)，这为增强光合作用奠定了物质基础。与本研究相似，过表达凤丹(*Paeonia ostii*)*PoWRKY*71 显著提高了转基因烟草对干旱胁迫的耐受性，表现为叶绿素含量显著高于 WT，而 *PoWRKY*71 敲除植株表现为叶绿素含量显著降低[27]。刘波等[28]研究显示：正常生长情况下，马铃薯 *StuPPO*9 转基因烟草和 WT 烟草的叶绿素含量并未表现出显著差异，而干旱处理后转基因植株的叶绿素含量始终显著高于 WT 烟草。除此之外，干旱胁迫下过表达 *LkERF*5 植株的净光合速率显著高于 WT，气孔导度和蒸腾速率显著低于 WT，这一现象可能与其对气孔运动的调控密切相关，表明 *LkERF*5 可能通过抑制气孔开放减少水分流失，从而维持较高的光合速率。类似机制在杨树[29]中被报道：*PdGNC* 基因通过调控一氧化氮信号通路抑制气孔开放，从而在减少蒸腾的同时维持较高的光合速率。付玉祺等[30]发现：干旱胁迫下，*PtrNAC*006 转基因小黑杨具有更高的光合速率以及更低的蒸腾速率和气孔导度，进而提高植株的抗旱性。此外，水分利用效率的显著提升表明 *LkERF*5 在平衡光合作用和蒸腾作用中具有关键作用。较低的气孔导度和蒸腾速率减少了水分的散失，而较高的净光合速率保证了在有限水分条件下仍能固定较多的 CO_2，从而实现了水分利用效率的提升。这些结果共同揭示了 *LkERF*5 能够多维度调控光合作用，使植物在干旱胁迫下维持较好的生长状态。

干旱胁迫会打破植物体内活性氧产生与清除的动态平衡，导致活性氧(ROS)大量积累，破坏细胞膜结构，引发细胞氧化损伤，严重影响植物的生长发育。而抗氧化酶系统作为植物抵御 ROS 伤害的重要防线，在维持细胞内氧化还原平衡中发挥着关键作用[31−32]。SOD 作为抗氧化防御的第一道防线，能够催化 O_2^- 发生歧化反应，生成 H_2O_2 和 O_2，从而有效降低 O_2^- 的浓度。在干旱胁迫下，*LkERF*5 转基因株系的 SOD 活性显著高于 WT 植株，意味着其能够更快地将细胞内产生的 O_2^- 进行转化，减少 O_2^- 对细胞造成的直接伤害。POD 和 CAT 则主要负责将 SOD 催化产生的 H_2O_2 进一步分解为 H_2O 和 O_2，避免 H_2O_2 在细胞内积累造成伤害。*LkERF*5 转基因株系在干旱胁迫下 POD 和 CAT 活性的显著增强，表明其具备更高效的 H_2O_2 清除能力。另外，干旱胁迫后，WT 和 *LkERF*5 转基因株系中的 H_2O_2 和 O_2^- 含量都有所增加，但 *LkERF*5 转基因株系中的 H_2O_2 和 O_2^- 含量显著低于 WT，这与抗氧化酶活性的变化趋势一致，充分说明 *LkERF*5 转基因株系能够更有效地清除 ROS，减轻氧化损伤。牟舒敏等[33]发现过表达 Cu/Zn SOD 的甘薯(*Ipomoea batatas*)通过提高抗氧化酶活性来减轻氧化伤害，从而增强抗旱性，这与本研究的结果相同。类似地，*NtERF*172 通过增强 CAT 活性来降低 H_2O_2 含量，从而增强转基因烟草的抗旱性[34]。这些结果共同揭示了 *LkERF*5 通过增强抗氧化酶的活性来降低干旱胁迫下细胞内的 ROS 水平，减少氧化损伤，增强植株的抗旱性。

4 结　论

本研究从日本落叶松中鉴定到 *LkERF*5 基因，其具有 1 个 AP2/ERF 保守结构域，属于 DREB-A5 亚族，定位在细胞核，具有转录激活活性。干旱胁迫下，与 WT 相比，过表达 *LkERF*5 转基因烟草生长良好，叶片仍能保持正常生长状态，净光合速率、水分利用率、叶绿素、可溶性糖和脯氨酸含量显著提高，气孔导度、胞间 CO_2 浓度和蒸腾速率显著降低。干旱胁迫下，过表达 *LkERF*5 显著增加了抗氧化酶活

性（SOD、POD 和 CAT）和降低了活性氧（H_2O_2 和 O_2^-）水平。

本研究首次明确了日本落叶松 *LkERF5* 在干旱胁迫中的功能，从理论上拓展了 ERF 转录因子功能网络，证实了其通过协同渗透调节、光合效率提升及活性氧清除等多重机制来增强抗旱性。研究结果为林木抗旱分子育种提供了关键基因资源，未来有望借助基因编辑技术来提升林木干旱适应性。然而，当前研究的功能验证仅基于模式植物烟草，未在日本落叶松本体深入探究，且 *LkERF5* 下游靶基因和调控网络尚不明确，其与其他转录因子的互作关系也有待挖掘。未来研究需借助体细胞胚胎发生、CRISPR/Cas9 基因编辑，结合 RNA-seq、ChIP-seq 等多组学技术，系统解析 *LkERF5* 在针叶树中的调控机制，以期为应对气候变化下的林业可持续发展提供坚实的理论与技术支撑。

参　考　文　献

[1] Ohme-Takagi M, Shinshi H. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element[J]. The Plant Cell, 1995, 7(2): 173−182.

[2] 苟艳丽, 张乐, 郭欢, 等. 植物 AP2/ERF 类转录因子研究进展 [J]. 草业科学, 2020, 37(6): 1150−1159.
Gou Y L, Zhang L, Guo H, et al. Research progress on the AP2/ERF transcription factor in plants[J]. Pratacultural Science, 2020, 37(6): 1150−1159.

[3] Licausi F, Ohme-Takagi M, Perata P. APETALA2/Ethylene Responsive Factor (AP2/ERF) transcription factors: mediators of stress responses and developmental programs[J]. New Phytologist, 2013, 199(3): 639−649.

[4] Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, et al. Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice[J]. Plant Physiology, 2006, 140(2): 411−432.

[5] 冯小燕, 王其凤, 岳柯昕, 等. 紫苏 AP2 基因家族 PfWRI1 促进植物种子油脂积累 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2024, 40(8): 1161−1172.
Feng X Y, Wang Q F, Yue K X, et al. Perilla AP2 gene family PfWRI1 promotes oil accumulation in plant seeds[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2024, 40(8): 1161−1172.

[6] 黄霞, 柯笑楠, 胡海超, 等. 全基因组鉴定和分析水稻 AP2 基因家族 [J]. 分子植物育种, 2021, 19(11): 3489−3498.
Huang X, Ke X N, Hu H C, et al. Genome-wide identification and characterization of the AP2 gene family in *Oryza staiva*[J]. Molecular Plant Breeding, 2021, 19(11): 3489−3498.

[7] 王艺, 陈明堃, 欧悦, 等. AP2/ERF 转录因子调控兰科植物生长发育和非生物胁迫响应的研究进展 [J]. 分子植物育种, 2022, 20(23): 7778−7784.
Wang Y, Chen M K, Ou Y, et al. Research progress on AP2/ERF transcription factors regulating the growth and development of orchids and their response to abiotic stress[J]. Molecular Plant Breeding, 2022, 20(23): 7778−7784.

[8] 兰孟焦, 后猛, 肖满秋, 等. AP2/ERF 转录因子参与植物次生代谢和逆境胁迫响应的研究进展 [J]. 植物遗传资源学报, 2023, 24(5): 1223−1235.
Lan M J, Hou M, Xiao M Q, et al. Research progress of AP2/ERF transcription factors participating in plant secondary metabolism and stress response[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2023, 24(5): 1223−1235.

[9] 岳晓琦, 杨成坤, 张月, 等. 荔枝 RAV 家族转录因子的全基因组鉴定及表达分析 [J]. 植物生理学报, 2022, 58(6): 1092−1104.
Yue X Q, Yang C K, Zhang Y, et al. Genome-wide identification and expression analysis of transcription factors of RAV family in litchi[J]. Plant Physiology Journal, 2022, 58(6): 1092−1104.

[10] Kong L F, Song Q, Wei H B, et al. The AP2/ERF transcription factor PtoERF15 confers drought tolerance via JA-mediated signaling in *Populus*[J]. New Phytologist, 2023, 240(5): 1848−1867.

[11] Zhang T T, Lin Y J, Liu H F, et al. The AP2/ERF transcription factor MdDREB2A regulates nitrogen utilisation and sucrose transport under drought stress[J]. Plant, Cell & Environment, 2024, 47(5): 1668−1684.

[12] Park S J, Park S, Kim Y, et al. Ethylene responsive factor34 mediates stress-induced leaf senescence by regulating salt stress-responsive genes[J]. Plant, Cell & Environment, 2022, 45(6): 1719−1733.

[13] Khan M, Hu J B, Dahro B, et al. ERF108 from *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. functions in cold tolerance by modulating raffinose synthesis through transcriptional regulation of *PtrRafS*[J]. The Plant Journal, 2021, 108(3): 705−724.

[14] 胡晓晴. 一氧化氮处理后长白落叶松转录组测序及 *LoERF*017 基因功能研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2017.
Hu X Q. Transcriptome sequencing of *Larix olgensis* Henry induced by nitric oxide and functional characterization of *LoERF*017 gene[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2017.

[15] Zhang J F, Wang D B, Chen P Z, et al. The transcriptomic analysis of the response of *Pinus massoniana* to drought stress and a functional study on the ERF1 transcription factor[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(13): 11103.

[16] Tipu M M H, Sherif S M. Ethylene and its crosstalk with hormonal pathways in fruit ripening: mechanisms, modulation, and commercial exploitation[J]. Frontiers in Plant Science, 2024, 15: 1475496.

[17] Iqbal N, Khan N A, Ferrante A, et al. Ethylene role in plant growth, development and senescence: interaction with other phytohormones[J]. Frontiers in Plant Sscience, 2017, 8: 475.

[18] 肖士奎. 乙烯信号转导关键基因 *PlEIN3/EIL*1 调控芍药切花衰老的分子机制 [D]. 洛阳: 河南科技大学, 2022.
Xiao S K. Molecular mechanism of ethylene signal transduction key gene *PlEIN3/PlEIL*1 in regulating the senescence of cut flowers of *Paeonia lactiflora* Pall[D]. Luoyang: Henan University of Science and Technology, 2022.

[19] Zhang Y, Ming R, Khan M, et al. ERF9 of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. undergoes feedback regulation by ethylene and modulates cold tolerance via regulating a *glutathione S-transferase U*17 gene[J]. Plant Biotechnology Journal, 2022, 20(1): 183−200.

[20] Zhang H W, Zhang J F, Quan R D, et al. EAR motif mutation of rice *OsERF*3 alters the regulation of ethylene biosynthesis and drought tolerance[J]. Planta, 2013, 237(6): 1443−1451.

[21] Sun C, Xie Y H, Li Z, et al. The *Larix kaempferi* genome reveals new insights into wood properties[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2022, 64(7): 1364−1373.

[22] 马苗苗, 李成浩, 刘晓, 等. 日本落叶松 *LoERF*017 基因的克隆及生物信息学分析 [J]. 植物研究, 2020, 40(4): 602−612.
Ma M M, Li C H, Liu X, et al. Cloning and bioinformatics analysis of *LoERF*017 gene from *Larix kaempferi*[J]. Bulletin of Botanical Research, 2020, 40(4): 602−612.

[23] Kazama D, Kurusu T, Mitsuda N, et al. Involvement of elevated proline accumulation in enhanced osmotic stress tolerance in *Arabidopsis* conferred by chimeric repressor gene silencing technology[J]. Plant Signaling & Behavior, 2014, 9(3): e28211.

[24] Urano K, Oshima Y, Ishikawa T, et al. *Arabidopsis* DREB26/ERF12 and its close relatives regulate cuticular wax biosynthesis under drought stress condition[J]. The Plant Journal, 2024, 120(5): 2057−2075.

[25] Bi Z Z, Dekomah S D, Wang Y H, et al. Overexpression of *StCDPK*13 in potato enhances tolerance to drought stress[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(23): 12620.

[26] Liu W, Wei J W, Shan Q, et al. Genetic engineering of drought- and salt-tolerant tomato via Δ1-pyrroline-5-carboxylate reductase S-nitrosylation[J]. Plant Physiology, 2024, 195(2): 1038−1052.

[27] Luan Y T, Chen Z J, Fang Z W, et al. PoWRKY71 is involved in *Paeonia ostii* resistance to drought stress by directly regulating light-harvesting chlorophyll a/b-binding 151 gene[J]. Horticulture Research, 2023, 10(11): uhad194.

[28] 刘波, 池明, 曹梦琦, 等. 过表达马铃薯 *StuPPO*9 基因对烟草抗旱能力的影响 [J]. 作物学报, 2024, 50(9): 2237−2247.
Liu B, Chi M, Cao M Q, et al. Impact of potato *StuPPO*9 gene overexpression on drought resistance in *Nicotiana benthamiana*[J]. Acta Agronomica Sinica, 2024, 50(9): 2237−2247.

[29] Shen C, Zhang Y, Li Q, et al. PdGNC confers drought tolerance by mediating stomatal closure resulting from NO and H_2O_2 production via the direct regulation of *PdHXK*1 expression in *Populus*[J]. New Phytologist, 2021, 230(5): 1868−1882.

[30] 付玉祺, 赵雪, 何旭, 等. PtrNAC006 转录因子提高白城小黑杨抗旱性的功能分析 [J]. 分子植物育种, 2024: 1−18.
Fu Y Q, Zhao X, He X, et al. Functional analysis of PtrNAC006 transcription factor to improve drought resistance of *Populus* × *Xiaohei* CV. 'Baicheng'[J]. Molecular Plant Breeding, 2024: 1−18.

[31] 王家豪. OsU496A 调控水稻幼苗应答渗透逆境的生理与分子机制 [D]. 扬州: 扬州大学, 2021.
Wang J H. Physiological and molecular regulation of OsU496A in rice seedlings response to osmotic stress[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2021.

[32] 魏嘉, 蔡勤安, 李源, 等. 植物对盐碱胁迫响应机制的研究进展 [J]. 山东农业科学, 2022, 54(4): 156−164.
Wei J, Cai Q A, Li Y, et al. Research progress on response mechanism of the plant to saline-alkali stress[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2022, 54(4): 156−164.

[33] 牟舒敏, 张丽娟, 李红兵, 等. 三种转基因甘薯响应 PEG-6000 模拟干旱胁迫的生理性差异 [J]. 植物生理学报, 2023, 59(7): 1339−1350.
Mou S M, Zhang L J, Li H B, et al. Physiological differences of three transgenic sweet potatoes in response to PEG-6000-imitated drought stress[J]. Plant Physiology Journal, 2023, 59(7): 1339−1350.

[34] Zhao Q, Hu R S, Liu D, et al. The AP2 transcription factor NtERF172 confers drought resistance by modifying *NtCAT*[J]. Plant Biotechnology Journal, 2020, 18(12): 2444−2455.

（责任编辑 赵田芸
责任编委 康向阳）