

doi:10.11733/j.issn.1007-0435.2026.07.007

引用格式:岳诗瑶,梁燕霞,闫依诺,等. 蒺藜苜蓿响应盐和碱胁迫的转录组学分析[J]. 草地学报, 2026, 34(7):2415—2428
YUE Shi-yao, LIANG Yan-xia, YAN Yi-nuo, et al. Transcriptomic Analysis of Salt and Alkali Stress-Responsive Genes in *Medicago truncatula*[J]. Acta Agrestia Sinica, 2026, 34(7):2415—2428

蒺藜苜蓿响应盐和碱胁迫的转录组学分析

岳诗瑶^{1,2}, 梁燕霞², 闫依诺², 代淑杰², 李文翔², 解鑫磊²,
肖素娟², 王玉祥^{1*}, 江文波^{2,3*}

(1. 新疆农业大学草业学院西部干旱区草地资源与生态重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 833052; 2. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193; 3. 国家盐碱地综合利用技术创新中心, 山东 东营 257300)

摘要:本研究采用高通量转录组测序技术,分析蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)在盐胁迫(150 mmol·L⁻¹ NaCl)和碱胁迫(135 mmol·L⁻¹ NaHCO₃+15 mmol·L⁻¹ Na₂CO₃)下,0 h,6 h,12 h,24 h,48 h 五个时间点的基因表达变化。结果显示,碱胁迫诱导的基因变化更剧烈,下调基因普遍多于上调基因;差异表达基因显著富集于脱落酸信号转导、渗透调节、抗氧化防御及离子平衡等通路。盐与碱胁迫下共上调基因60个、共下调基因16个,上调基因涉及激素调控、信号转导等抗逆机制,下调基因涵盖激素信号、细胞壁重构等多个功能类别。本研究揭示了蒺藜苜蓿响应盐碱胁迫的关键基因,筛选出耐盐耐碱候选基因资源,为苜蓿分子育种提供理论基础。

关键词:蒺藜苜蓿;盐和碱胁迫;转录组分析;耐逆机制;差异表达基因

中图分类号:S542.9

文献标识码:A

文章编号:1007-0435(2026)07-2415-14

Transcriptomic Analysis of Salt and Alkali Stress-Responsive Genes in *Medicago truncatula*

YUE Shi-yao^{1,2}, LIANG Yan-xia², YAN Yi-nuo², DAI Shu-jie², LI Wen-xiang², XIE Xin-lei²,
XIAO Su-juan², WANG Yu-xiang^{1*}, JIANG Wen-bo^{2,3*}

(1. Key Laboratory of Grassland Resources and Ecology of Western Arid Region, College of Grassland Science, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 833052, China; 2. Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 3. The National Center of Technology Innovation for Comprehensive Utilization of Saline-Alkali Land, Dongying, Shandong Province 257300, China)

Abstract: This study employed high-throughput transcriptome sequencing to analyze gene expression changes in *Medicago truncatula* under salt stress (150 mmol·L⁻¹ NaCl) and alkali stress (135 mmol·L⁻¹ NaHCO₃+15 mmol·L⁻¹ Na₂CO₃) at five time points: 0 h, 6 h, 12 h, 24 h and 48 h. The results showed that alkali stress induced more drastic gene expression changes, with downregulated genes generally outnumbering upregulated ones. Differentially expressed genes were significantly enriched in pathways related to ABA signaling transduction, osmotic regulation, antioxidant defense, and ion homeostasis. A total of 60 genes were commonly upregulated and 16 genes were commonly downregulated under both salt and alkali stresses. The commonly upregulated genes were mainly involved in stress-resistance mechanisms such as hormone regulation and signal transduction, whereas the commonly downregulated genes covered multiple functional categories including hormone signaling and cell wall remodeling. This study elucidates key genes involved in the responses of *M. truncatula* to salt and alkali stresses and identifies candidate genes for salt and alkali tolerance, providing a theoretical basis for molecular breeding of alfalfa.

Key words: *Medicago truncatula*; Salt and alkali stress; Transcriptome analysis; Mechanisms of stress tolerance; Differentially expressed genes

收稿日期:2025-09-05;修回日期:2025-10-29

基金项目:北方特色经济作物种质资源精准鉴定(2023YFD1200203);国家盐碱地综合利用技术创新中心资助

作者简介:岳诗瑶(2001-),女,汉族,山东东营人,硕士研究生,主要从事牧草种质资源研究,E-mail:1606019547@qq.com;*通信作者
Author for correspondence, E-mail:jiangwenbo@caas.cn;wyx9868@163.com

苜蓿属植物在我国干旱及半干旱地区(如甘肃、新疆)具有重要生态与经济价值,其耐旱、抗寒及再生能力突出^[1]。蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)作为豆科模式植物,具有二倍体基因组小(454~526 Mb)、再生快、突变体资源丰富及遗传转化技术成熟等优势,且是继水稻(*Oryza sativa*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)后第三个完成全基因组测序的植物,与紫花苜蓿亲缘关系近,成为豆科植物研究的重要材料^[2-4]。

当前,土壤盐碱化已成为全球农业生产的重大威胁,全球约95 438万公顷土地受盐碱影响,20%耕地和50%灌溉农田面临盐碱化风险^[5-6];我国盐碱地面积达9900万公顷,其中新疆占全国1/3,盐碱荒地面积达 $2.81 \times 10^7 \text{ hm}^2$ ^[7-8]。盐碱胁迫会导致植物渗透胁迫、离子稳态失衡、有毒活性氧(Reactive oxygen species, ROS)积累,破坏细胞膜通透性与叶绿体结构,降低光合作用效率,抑制植物生长^[9-10]。为应对盐碱胁迫,植物进化出复杂适应机制,如合成可溶性糖、脯氨酸等渗透保护剂^[11-12];苜蓿也已被证实可通过改变细胞壁果胶结构与含量[如Myo-Inositol Oxygenase 2(*MsMIOX2*)基因诱导果胶和半纤维素积累]^[13],调节根系 Na^+ 吸收与 K^+/Na^+ 比、激活生物钟基因[*Late Elongated Hypocotyl*(*MeLHY*), *Elongation Factor 1 Alpha 1*(*MeEF1A1*)],及抗氧化酶系统[超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(Peroxidase, POD),过氧化氢酶(Catalase, CAT)]等方式增强耐盐性^[14-17],同时紫花苜蓿中 *WRKY Transcription Factor 11*(*MsWRKY11*), *Homeodomain Leucine Zipper Transcription Factor 7*(*MsHB7*), *WRKY Transcription Factor 33*(*MsWRKY33*), *NAC Transcription Factor*(*NAC*)等基因也通过调控离子平衡、ROS清除等参与耐逆过程^[18-21]。此外,基因组编辑技术(如CRISPR-Cas9)、植物和微生物互作(根瘤菌共接种)及外源物质(独脚金内酯、草酸、褪黑素、一氧化氮、硅)添加等手段,也被证实可提升苜蓿耐盐性^[22-32]。

近年来,高通量RNA测序(RNA-Seq)技术为解析植物逆境响应机制提供了有力工具,可同时检测大量基因在胁迫下的表达变化,挖掘关键功能基因。然而,现有研究仍存在明显不足:一方面,多数研究聚焦于盐胁迫或碱胁迫单一胁迫类型,对盐、碱胁迫下蒺藜苜蓿基因表达动态变化的系统性对比分析不足,尤其对两者差异响应机制(如基因表达幅度、下调基因比例差异)及关键响应时间节点

等仍缺乏深入探索;另一方面,虽已鉴定出部分苜蓿耐逆基因,但盐、碱胁迫下共同响应基因的功能及调控网络尚未清晰解析,难以全面揭示蒺藜苜蓿应对盐和碱同时胁迫的响应基因,也无法为分子育种提供同时耐盐和耐碱的候选基因资源。

基于上述研究现状与不足,本研究旨在利用RNA-Seq技术,系统分析蒺藜苜蓿在盐($150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$)和碱($135 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaHCO}_3 + 15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$)胁迫下不同时间点(0 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h)的基因表达变化规律。通过鉴定盐、碱胁迫下的差异表达基因(Differentially expressed genes, DEGs),解析其功能富集通路,明确盐、碱胁迫响应的差异与共性,挖掘关键耐逆相关基因及调控网络,最终筛选出具有潜在应用价值的耐盐、耐碱候选基因,为苜蓿耐盐和耐碱分子育种提供坚实的理论基础与基因资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料与胁迫处理

本试验供试材料为蒺藜苜蓿 A17,种子来源于 Samuel Roberts Noble Foundation,保存于中国农业科学院北京畜牧兽医研究所。将种子使用砂纸摩擦,使种皮表面微破,将处理好的种子放入直径15.5 cm 垫有滤纸的玻璃培养皿,倒入适量1/2 Hoagland 营养液。 4°C 低温处理2天,后放入光照培养箱培养4天,培养箱设置为光照时间16 h/8 h(光照/黑暗),光照强度为 $80 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,温度为 24°C ,湿度为60%。待子叶全部展开后,将幼苗移到96孔PCR离心管架中,继续使用1/2 Hoagland 营养液培养。为防止培养液中长杂菌,需每天更换培养液。6天后分别用盐和碱进行处理,对照组继续采用1/2 Hoagland 营养液处理,盐处理采用1/2 Hoagland 营养液加 $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的NaCl(pH值为5.8),碱处理采用1/2 Hoagland 营养液加 $135 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaHCO_3 和 $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Na_2CO_3 (pH值为9.5),分别处理0 h, 6 h, 12 h, 24 h和48 h后取全株(根、茎、叶),液氮速冻后保存于 -80°C 冰箱中。

1.2 RNA提取与测序

使用Promega的Easstep Super总RNA提取试剂盒,提取各样品的总RNA,并采用琼脂糖凝胶电泳和分光光度计检测RNA的完整性和纯度。合格的RNA样品($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 在1.8~2.2之间,

28S/18S rRNA 条带清晰)用于后续文库构建。每个样品取约 5 μg 总 RNA,利用 Oligo(dT)磁珠富集 mRNA(去除 rRNA),然后加 Fragmentation 缓冲液将 mRNA 打断成 200 nt 左右片段。以断裂的 mRNA 为模板,用随机六聚体引物合成第一链 cDNA,再经 DNA 聚合酶 I 和 RNaseH 合成第二链 cDNA。双链 cDNA 经纯化后末端修复,加 A 尾并连接测序接头,利用 AMPureXP 磁珠筛选 200 bp 左右片段作为插入片段。最后进行 PCR 扩增,并用 AMPure XP beads 纯化 PCR 产物,得到最终的文库。文库构建完成后,先使用 Qubit 2.0 进行初步定量,将稀释文库至 1.5 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$,随后使用 Agilent 2100 对文库的插入片段取长度进行检测,插入片段取长度符合预期后,使用 Q-PCR 方法对文库的有效浓度进行准确定量(文库有效浓度 $>2\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$),以保证文库质量。

1.3 转录组数据分析

原始测序数据首先进行质量控制和过滤。利用 FastQC 软件评估测序质量,采用 Trimmomatic 软件去除接头序列和低质量读段,获得 Clean reads 数据。然后将 Clean reads 比对到蒺藜苜蓿参考基因组(NCBI 数据库登录号:GCF_003473485.1,2018 年 9 月公布)。比对采用 HISAT2 软件包,允许最多 2 个碱基错配,以获得每个 read 在基因组上的定位。在获得比对结果的基础上,使用 StringTie 软件对比对到基因组的 reads 进行组装和基因表达定量,计算每个基因在各样品中的 FPKM 值和原始 reads 计数。随后采用 R 语言 DESeq2 包对各处理组与对照组间的表达差异进行统计检验。差异表达基因的判定标准为:校正后的显著性水平 $P<0.05$,且 Fold Change >2 (即表达倍数上调或下调至少 2 倍)。满足上述条件的基因被定义为差异表达基因(DEGs),根据 $\log_2(\text{FC})$ 值的正负判断上调或下调。

1.4 功能注释与富集分析

利用本地 Blast 比对和 Annotate 脚本,将蒺藜苜蓿基因序列注释到公共功能数据库,包括 NR,SwissProt, GeneOntology(GO)和 KEGG 等。重点获取所有基因的 GO 分类注释和 KEGG 代谢通路注释信息。对于鉴定的差异表达基因集合,分别进行 GO 富集分析和 KEGG 富集分析,以挖掘显著富集的功能类别和通路。GO 富集分析使用 FunRich v3.1.3 软件,采用 Fisher 精确检验评估富集显著性,并结合

多重假设检验校正(Bonferroni, BH 和 Q-value 方法)筛选显著富集的 GO 条目(校正后 $P\leq 0.05$)。KEGG 通路富集分析基于超几何分布检验,设置显著性阈值 $P\leq 0.05$,统计 DEGs 在各植物通路中的富集情况。对于显著富集的 GO 功能项和 KEGG 通路,提取其中代表性的抗逆相关功能进行分析。最后,对部分具有代表性的差异表达基因采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)技术进行表达模式验证,以确认 RNA-Seq 结果的可靠性。

1.5 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)技术

为了验证 RNA-Seq(转录组测序技术)测序结果的准确性,提取 RNA(普洛麦格公司 EastepSuper 总 RNA 提取试剂盒),并使用 FastKing 一步法合成反转录 cDNA 第一链。根据总 RNA 测得浓度,吸取相应体积 RNA 样品,使 RNA 总量达到 1000 ng,加入 $5\times$ Fast-RT super Mix 进行孵育,稀释 10 倍后备用。选取部分具有代表性的差异表达基因使用 $2\times$ Real Star 酶进行荧光定量(qRT-PCR)试验(表 1),以 Actin 基因作为内参基因(表 2),反应过程如下: 95°C 2 min, 94°C 15 s, 60°C 15 s, 72°C 30 s,共 40 个循环。每个处理采用 3 次生物学重复,用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算基因的相对表达量。

表 1 荧光定量 PCR 反应体系

Table 1 RT-qPCR reaction system

试剂 Reagent	体积 Volume/ μL
$2\times$ Realstar green fast Mixture with ROX II	10
正向引物 Forward primer($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.4
反向引物 Reverse primer($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.4
DNA 模板 DNA template	1
RNase-free H_2O	补足至 20
Adjusted to a total volume of 20	

2 结果与分析

2.1 测序数据质量评估

本研究共对蒺藜苜蓿不同处理的 30 份样品(包括对照 0 h 和 48 h 各 3 个重复,盐处理 6 h, 12 h, 24 h, 48 h 各 3 个重复,碱处理 6 h, 12 h, 24 h 和 48 h 各 3 个重复)构建转录组文库并进行 Illumina 测序。测序共获得约 6.5 亿对原始读长为 150 bp 的双端 reads。对原始数据进行质量控制后,每个样品获得 Clean reads 约 0.22 亿对, Q30 碱基百分比均在 92% 以上, GC 含量约为 41%~45%(表 3),选取高质量 Clean reads 用于后续比对和分析。

表 2 荧光定量引物

Table 2 Primers for RT-qPCR analysis

基因 Gene	正向引物/反向引物(5'-3') Forward primer/ Reverse primer(5'-3')
<i>MtActin</i>	GCTGACCGTATGAGCAAGGA TGCCAAGATAGACCCACCAA
<i>qMtAHA6 (Plasma Membrane H⁺-ATPase 6)</i>	TGGCTGCTCGGGCTTCCAGA CTCCGGCGCACCTTTGCTGA
<i>qNCED(9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase)</i>	TCTACAAAAAGCCGCCGCCA GGCGCCGTTACGGAGGTAAA
<i>qMIPS(Myoinositol-1-Phosphate Synthase)</i>	TGCACCACAAACCTTCCGCT GCTCTCTTGCTGTCCCCAC
<i>qNFYB8(Nuclear Factor Y subunit B8)</i>	AAGCGTTACCGACGAGAGCA AGCCAAGTGTAGTCATGGCCC
<i>qPYL4 (Pyrabactin Resistance-Like 4)</i>	TCTCCGCCGTATGGCCTGTA GCGCCGACGGTGATGTTTTTC
<i>qPER5(Peroxidase 5)</i>	TTCACTCAACCCCGCATCG TGCCGCCACTAACTTTGCGA

表 3 测序质量表

Table 3 Sequencing quality data

样品名 Sample	过滤后有效测序读数 Clean reads	Clean Reads 的总碱基数 Clean base/Gb	Q20/%	Q30/%	GC/%
0- I	20 087 349	6.03	97.75	93.53	42.57
0- II	24 082 902	7.22	97.85	93.74	42.67
0- III	24 248 770	7.27	97.93	93.98	42.47
48- I	24 095 110	7.23	97.96	94.03	42.42
48- II	20 115 485	6.03	97.5	92.85	41.86
48- III	24 102 210	7.23	97.86	93.86	42.52
A6- I	23 287 033	6.99	98.04	94.22	42.18
A6- II	20 406 189	6.12	97.98	94.02	42.16
A6- III	23 587 791	7.08	97.85	93.75	42.57
A12- I	21 375 312	6.41	97.95	94.02	42.61
A12- II	21 566 965	6.47	97.96	94.06	42.19
A12- III	21 457 810	6.44	97.97	94.02	42.1
A24- I	20 357 325	6.11	97.81	93.81	42.37
A24- II	25 222 990	7.57	97.75	93.51	43.32
A24- III	23 990 072	7.2	97.61	93.34	43.33
A48- I	17 808 507	5.34	97.6	93.66	44.99
A48- II	19 432 628	5.83	96.86	92.66	42.65
A48- III	21 624 380	6.49	96.95	92.67	41.84
N6- I	20 994 644	6.3	97.84	93.75	42.34
N6- II	20 609 593	6.18	97.84	93.7	42.48
N6- III	20 422 519	6.13	97.83	93.75	42.44
N12- I	19 764 304	5.93	97.79	93.72	41.58
N12- II	19 733 274	5.92	97.79	93.69	41.82
N12- III	22 179 430	6.65	97.82	93.72	42.18
N24- I	21 296 941	6.39	97.71	93.52	42.23
N24- II	19 783 519	5.94	97.85	93.77	42.46
N24- III	22 744 037	6.82	98.08	94.32	42.27
N48- I	21 059 956	6.32	97.96	94.03	42.73
N48- II	22 177 038	6.65	97.73	93.52	42.48
N48- III	23 850 934	7.16	97.81	93.72	42.51

注: A 表示碱处理组 (Alkali treatment), N 表示盐处理组 (NaCl treatment, Salts tress); 6, 12, 24, 48 表示处理后的时间点, 单位为小时; Clean reads 是指经过质控之后的测序 reads 数; Clean base 是指经过质控之后的测序数据的总碱基数, 以 G 为单位; Q20 是指质量值大于 20 的碱基占总碱基的百分比; Q30 是指质量值大于 30 的碱基占总碱基的百分比; GC 含量是指碱基 G 和 C 占总碱基数的百分比; 其中 Q20, Q30 和 GC 含量都是 Clean data 的统计结果

Note: A represents the alkaline treatment group (alkaline treatment), and N represents the salt treatment group (NaCl treatment, salt stress); 6, 12, 24, and 48 represent the time points after processing, with the unit being hours. "Clean reads" refer to the number of sequencing reads after quality control. "Clean base" refers to the total number of bases in the sequencing data after quality control, measured in G. Q20 refers to the percentage of bases with a mass value greater than 20 among the total bases. Q30 refers to the percentage of bases with a mass value greater than 30 among the total bases. The GC content refers to the percentage of bases G and C in the total number of bases. Among them, Q20, Q30 and GC content are all the statistical results of Clean data

2.2 转录组数据与参考基因组序列比对

将 Clean reads 比对至蒺藜苜蓿 A17 参考基因组,如表 4 所示,比对结果显示大部分样品的比对效率在 90%~96% 之间,表明参考基因组与测序

数据具有良好的匹配度,测序数据可以有效代表样品转录本信息。但是碱胁迫 48 h 处理下的样品 A48,其比对率和样本间相关性明显偏低(仅 53% 左右)。

表 4 比对效率统计表

Table 4 Mapped reads and rate data

样品名 Sample	总测序片段 Total reads	比对上的测序片段 Mapped reads	未比对上的测序片段 Unmapped reads	唯一比对上的测序片段 Unique mapped reads	多重比对的测序片段 Multiple mapped reads	比对率 Mapped rate
0- I	20 087 349	19 230 843	856 506	17 813 767	1 417 076	95.736 09%
0- II	24 082 902	22 381 486	1 701 416	20 590 498	1 790 988	92.935 17%
0- III	24 248 770	23 164 778	1 083 992	21 656 701	1 508 077	95.5297%
48- I	24 095 110	23 004 576	1 090 534	21 589 850	1 414 726	95.474 04%
48- II	20 115 485	19 209 402	906 083	18 460 059	749 343	95.495 59%
48- III	24 102 210	22 103 995	1 998 215	20 370 936	1 733 059	91.709 41%
A6- I	23 287 033	22 212 769	1 074 264	20 587 450	1 625 319	95.386 86%
A6- II	20 406 189	19 528 775	877 414	18 174 597	1 354 178	95.700 26%
A6- III	23 587 791	22 467 640	1 120 151	20 334 922	2 132 718	95.251 14%
A12- I	21 375 312	19 377 508	1 997 804	17 906 695	1 470 813	90.653 68%
A12- II	21 566 965	20 286 937	1 280 028	18 797 724	1 489 213	94.064 87%
A12- III	21 457 810	20 180 918	1 276 892	18 824 629	1 356 289	94.049 29%
A24- I	20 357 325	17 846 800	2 510 525	16 041 703	1 805 097	87.667 71%
A24- II	25 222 990	21 092 418	4 130 572	18 551 399	2 541 019	83.623 78%
A24- III	23 990 072	18 834 864	5 155 208	16 418 780	2 416 084	78.511 08%
A48- I	17 808 507	10 460 743	7 347 764	9 388 071	1 072 672	58.740 15%
A48- II	19 432 628	8 311 362	11 121 266	7 546 575	764 787	42.770 14%
A48- III	21 624 380	12 442 462	9 181 918	11 473 763	968 699	57.539 05%
N6- I	20 994 644	20 068 669	925 975	18 627 712	1 440 957	95.589 47%
N6- II	20 609 593	19 784 890	824 703	18 468 921	1 315 969	95.998 45%
N6- III	20 422 519	19 286 153	1 136 366	18 042 022	1 244 131	94.435 72%
N12- I	19 764 304	18 654 014	1 110 290	17 488 114	1 165 900	94.382 35%
N12- II	19 733 274	18 826 973	906 301	17 702 579	1 124 394	95.407 24%
N12- III	22 179 430	21 088 443	1 090 987	19 779 662	1 308 781	95.081 09%
N24- I	21 296 941	20 171 532	1 125 409	18 719 292	1 452 240	94.715 63%
N24- II	19 783 519	18 585 249	1 198 270	17 386 992	1 198 257	93.943 09%
N24- III	22 744 037	21 621 810	1 122 227	20 214 789	1 407 021	95.065 84%
N48- I	21 059 956	19 243 054	1 816 902	18 079 642	1 163 412	91.372 72%
N48- II	22 177 038	20 702 306	1 474 732	19 359 371	1 342 935	93.350 18%
N48- III	23 850 934	22 146 755	1 704 179	20 630 670	1 516 085	92.854 88%

注: Total reads 代表 Clean reads 数目; Unmapped reads 代表未比对到参考基因组上的 Reads; Mapped reads 代表比对到参考基因组上的 Reads; Unique mapped reads 代表比对到参考基因组唯一位置的 Reads; Multiple mapped reads 代表比对到参考基因组多个位置的 Reads

Note: Total reads represent the number of clean reads; Unmapped reads represent reads that were not aligned to the reference genome; Mapped reads represent reads aligned to the reference genome; Unique mapped reads represent reads aligned to a unique position in the reference genome; and Multiple mapped reads represent reads aligned to multiple positions in the reference genome

从图 1a 可以看出,其余样品重复间表达量具有一致性(相关系数 $R>0.95$),不同处理间相关性较低,这表明测序数据具有较高的重复性和可信度,各处理对基因表达的影响具有可辨析的差异。

主成分分析(PCA)表明,主成分 1(PC1)贡献率为 50.29%,PC2 贡献率为 10.32%(图 1b)。相同处理下的生物学重复聚类紧密,盐处理下不同时期

间主成分差异性较低,碱处理下不同时期主成分差异性较高,说明相较于盐胁迫,碱胁迫对蒺藜苜蓿的胁迫作用更强,且该影响随胁迫时间延长而显著增强。

2.3 基因表达概况

对照样品中有约 2.7 万个基因表达;胁迫后,

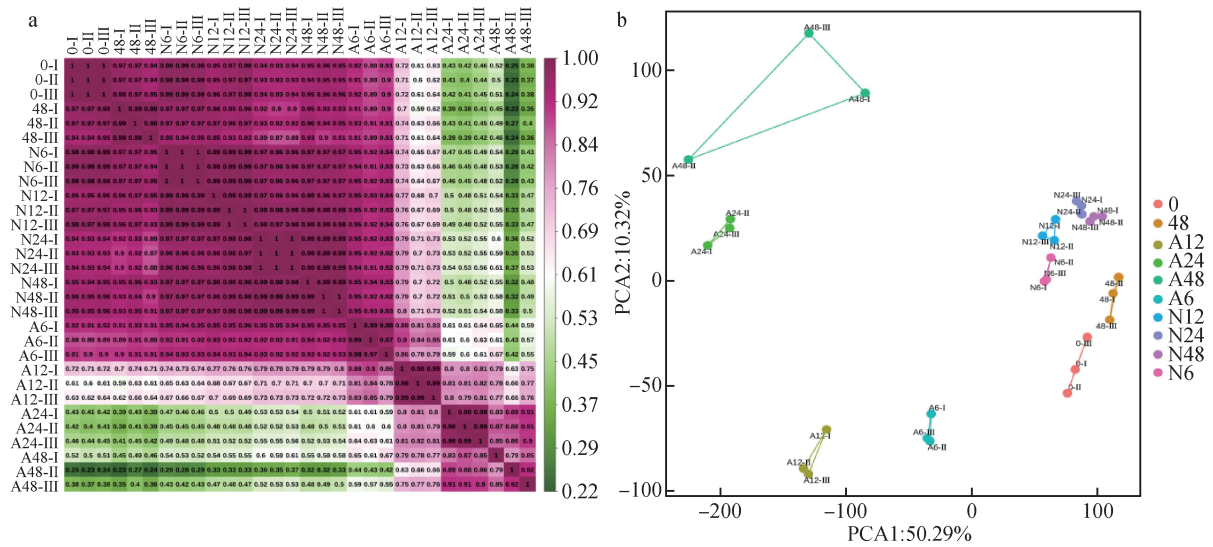


图 1 样品基因表达谱的相关性图(a)样品基因表达谱的PCA聚类分析(b)

Fig. 1 Correlation diagram of gene expression profiles (a) and PCA analysis of gene expression profiles (b)

2.8万~3万个基因表达。如图3所示,大多数基因的FPKM值集中在0.2~6之间,符合转录组常见的长尾分布。聚类分析结果显示样品首先按处理类型(盐、碱对照)分为不同簇,其中盐胁迫和碱胁迫样品彼此之间也分开聚为两组(图2),这表明不同胁迫类型引发了明显不同的基因表达响应模式。同时,各处理组内不同时间点的样品也较为接近,反映出胁迫作用随时间推进引起的连续变化特征。

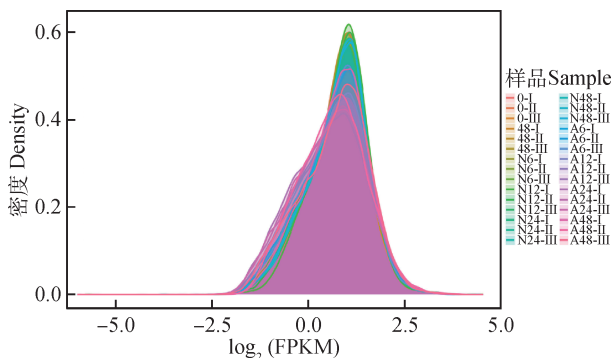


图 2 样品 Normalized expression value 分布密度图

Fig. 2 Density plot of normalized expression value distribution
注:图中不同颜色的曲线代表不同的样品,曲线上的横坐标表示对应样品基因表达量的对数值,点的纵坐标表示概率密度

Note: In the figure, curves of different colors represent different samples. The x-axis values of the points on the curves indicate the logarithmic values of gene expression levels for the corresponding samples, and the y-axis values indicate the probability density

2.4 差异表达基因分析

差异表达基因(DEGs)分析的统计结果如表5所示,盐胁迫下的差异基因数量相对较少,而碱胁迫

的基因表达变化更为剧烈,差异基因数量显著高于盐胁迫。

表 5 差异表达基因统计

Table 5 Statistics analysis of differentially expressed genes

处理组别 Group	差异表达基因总数 Total DEGs	上调基因数 Up regulated	下调基因数 Down regulated
48_vs_0	323	119	204
A6_vs_0	2084	1076	1008
A12_vs_0	4476	2040	2436
A24_vs_0	6548	2541	4007
A48_vs_0	4889	2135	2754
N6_vs_0	600	338	262
N12_vs_0	824	423	401
N24_vs_0	881	387	494
N48_vs_0	733	316	417

盐胁迫时DEGs总数在初期逐步增加,并在24小时达到峰值后略有下降;在24 h达到最高点,为881个DEGs。这个结果表明,蒺藜苜蓿对盐胁迫的应答在24 h左右最为剧烈。碱胁迫时DEGs数量明显增多,且随处理时间延长呈持续上升趋势,说明碱胁迫对基因表达的干扰更强烈;同样地,24 h的DEGs达到峰值6548;碱胁迫在所有时间点均表现出下调基因多于上调基因,尤其在24 h差距最大。这些结果表明,盐和碱胁迫响应的最关键节点为处理后24 h。

深入分析了在盐和碱胁迫条件下不同时间点的共有基因表达情况,结果显示,在碱处理过程中,共有661个基因呈现持续上调趋势,而392个基因则持续下调(参见图3a和3b),表明这些基因对碱胁迫具有显著的持续响应特性。相较之下,

在盐处理条件下, 仅有 119 个基因持续上调, 122 个基因持续下调 (参见图 3c 和 d)。通过对比发

现, 相较于盐胁迫, 碱胁迫所诱导的差异表达基因数量明显更多。

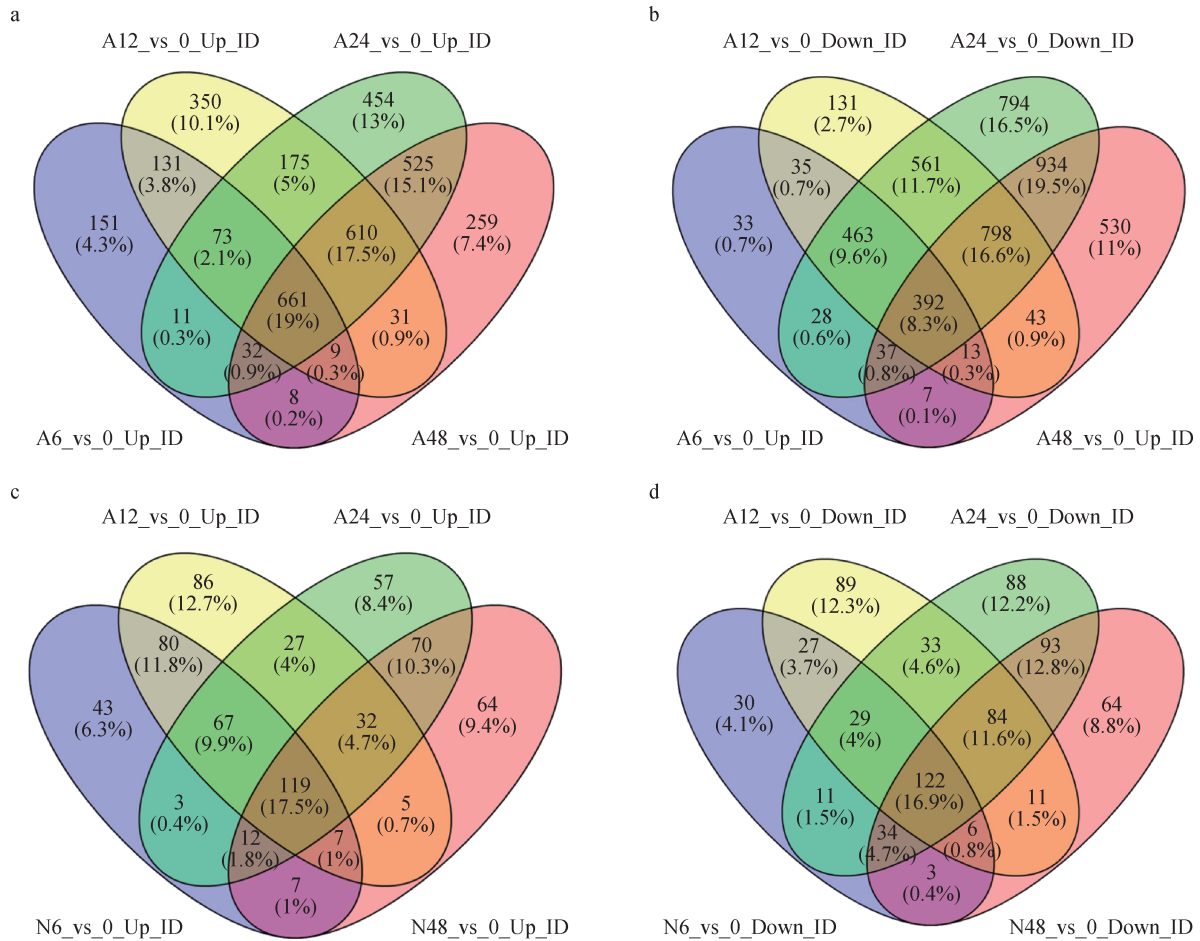


图 3 差异表达基因的韦恩图

Fig. 3 Venn diagram of differentially expressed genes

2.5 差异基因功能富集分析

GO 分析 (图 4) 表明, 在盐胁迫条件下, 植物通过激活多条与逆境响应相关的关键通路以适应高盐环境。在早期 (6 h), 植物迅速上调“响应盐胁迫 (GO:0009651)”“响应脱落酸 (GO:0009737)”和“响应干旱 (GO:0009414)”等通路, 并增强质膜 (GO:0005886)、细胞壁 (GO:0005618) 等膜壁系统的表达, 同时提升“铁离子结合 (GO:0005506)”“氧化还原酶活性 (GO:0016491)”和“转运蛋白活性 (GO:0005215)”等通路的表达水平, 显示出以渗透调节、离子稳态和氧化还原平衡为核心的应急机制。中期 (12~24 h) 植物进一步富集“低氧响应 (GO:0001666)”“脱落酸与茉莉酸信号 (GO:0009737, GO:0009753)”“渗透胁迫 (GO:0006970)”以及“跨膜转运 (GO:0055085)”等通路, 配合膜系统 (GO:0016020)、自噬体 (GO:0005776)

与液泡 (GO:0005773) 功能的增强, 反映出对盐胁迫的持续调控与代谢重编程。至 48 h, 植物显著上调“高渗透盐胁迫响应 (GO:0009652)”“氧化还原过程 (GO:0055114)”“铁离子稳态 (GO:0055072)”“脯氨酸代谢 (GO:0006560)”与“脱落酸信号 (GO:0009737)”等核心通路, 同时增强“膜结构 (GO:0016020)”“液泡膜 (GO:0005774)”“线粒体 (GO:0005739)”等应答结构功能, 系统地协调水盐平衡、抗氧化防御与能量适应, 以缓解盐胁迫带来的伤害。

碱处理 6 h, 显著富集的通路包括“对盐胁迫的正调控 (GO:0010105)”“对脱落酸的响应 (GO:0009737)”“对渗透胁迫的响应 (GO:0006970)”及“细胞对缺氧的响应 (GO:0071456)”, 同时增强肽类转运 (GO:0015833) 与氧化还原相关功能 (GO:0055114)。在 12 h 处理下, 这些通路持续激活, 并伴随“细胞对低氧的响应 (GO:0071456)”增强, 反

映植物持续进行渗透调节和信号转导调控;而“钙信号通路(GO:0007270)”等部分信号识别途径则被抑制。至24 h,植物系统性激活“盐胁迫响应(GO:0009651)”“脱落酸和茉莉酸信号通路(GO:0009737、GO:0009753)”“跨膜转运(GO:0055085)”“氧化还原调控(GO:0055114)”等核心路径,膜系统(GO:0016020)与抗氧化机制协同调

节以维持稳态。48 h下,持续上调“高渗透盐胁迫响应(GO:0009652)”“脱落酸响应(GO:0009737)”“铁离子稳态(GO:0055072)”“硝酸盐转运(GO:0015706)”和“氧化还原过程(GO:0055114)”等关键通路,同时显著抑制“水杨酸合成调节(GO:0009697)”“防御反应(GO:0006952)”和“脯氨酸代谢(GO:0006560)”。

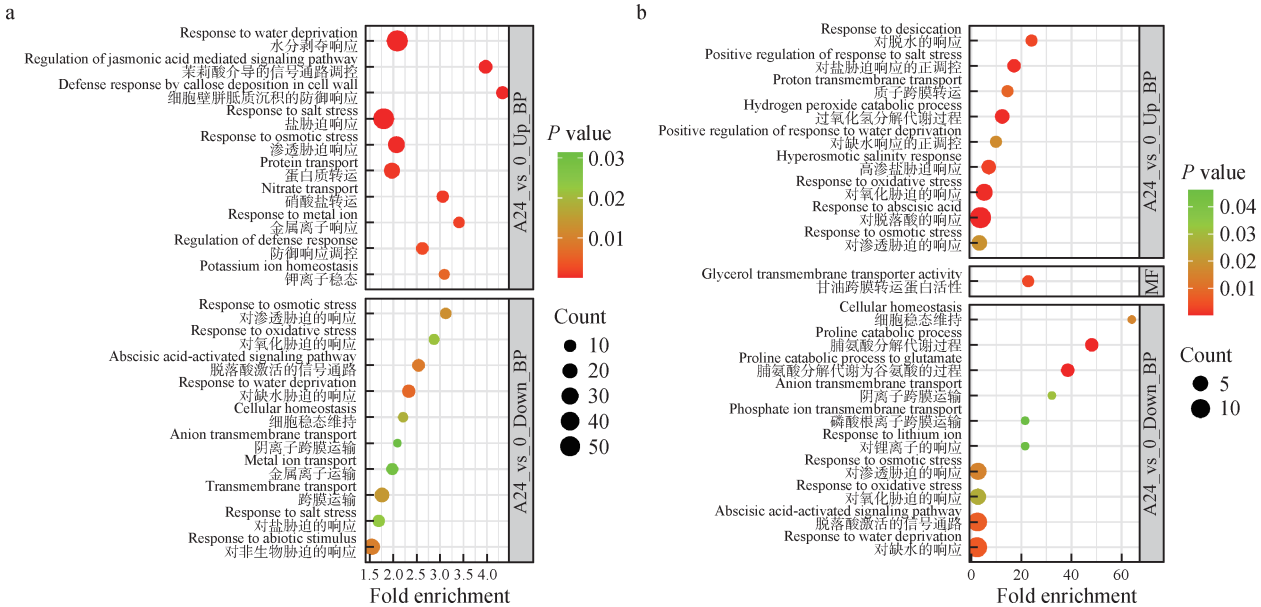


图4 盐和碱胁迫差异基因的GO富集分析

Fig. 4 GO enrichment analysis of differentially expressed genes under salt and alkali stresses

在盐和碱胁迫条件下,KEGG富集分析(图5)显示6 h时,上调基因显著富集于转运蛋白通路

(ko02000)、植物激素信号转导通路(ko04075)和MAPK信号通路(ko04016),同时伴随糖酵解/糖异

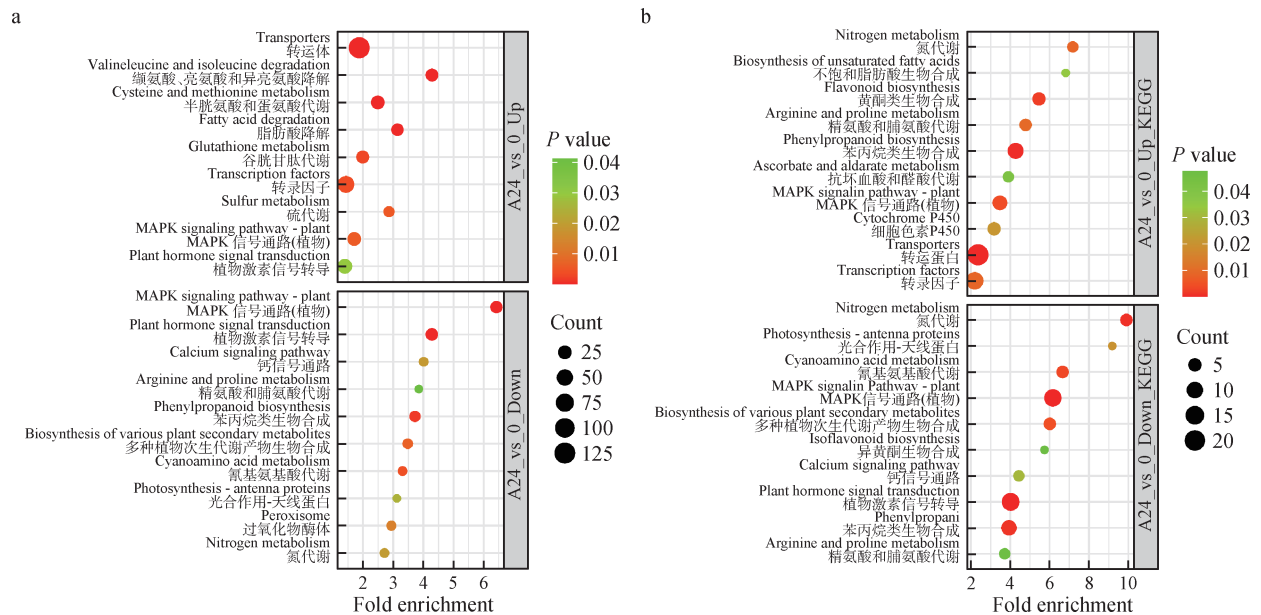


图5 盐和碱胁迫差异基因的KEGG通路分析

Fig. 5 KEGG pathway analysis of differentially expressed genes under salt and alkali stresses

生等能量代谢通路的富集。下调基因主要富集于细胞周期、DNA 复制和类黄酮生物合成等通路。12 h 时,转运蛋白和信号通路持续富集,上调基因显著富集于脯氨酸代谢(ko00330)、谷胱甘肽代谢(ko00480)等渗透调节与抗氧化相关通路,部分碱处理组上调酚丙烷和类黄酮合成通路(ko00940,ko00941)。24 h 时,转运蛋白通路仍富集,上调基因继续富集于脯氨酸、谷胱甘肽代谢等通路,光合作用和碳固定等能量代谢通路富集于下调基因。48 h 时,转运蛋白、氮代谢(ko00910)、脯氨酸与谷胱甘肽代谢通路持续富集于上调基因,核糖体生物合成(ko03010)、蛋白翻译与光合作用等通路富集于下调基因。

进一步分析发现,盐和碱胁迫时均上调表达的

基因有 60 个,均下调表达的基因有 16 个(表 6)。为了证实这些差异基因的表达水平,我们挑选了 *NCED*, *MIPS*, *AHA6*, *NF-YB8*, *PYL4* 和 *Peroxidase 5* 基因,分析了它们在盐和碱处理不同时间点的基因表达水平。如图 7 所示, *NCED*, *MIPS*, *AHA6* 和 *NF-YB8* 均在盐和碱处理时被诱导表达,而 *PYL4* 和 *Peroxidase 5* 基因均在盐和碱处理时被抑制表达。进一步分析了荧光定量数据与转录组数据的相关系数,分别为 0.98 (*NCED*), 0.98 (*MIPS*), 0.99 (*AHA6*), 0.95 (*NF-YB8*), 0.89 (*PYL4*), 0.93 (*Peroxidase 5*)。这些数据显示,转录组数据与荧光定量数据之间具有较高的相关性,表明转录组数据的准确性和可靠性。

表 6 盐和碱胁迫时均上调和下调表达的基因

Table 6 Genes up-regulated and down-regulated under salt and alkali stresses

上调的基因 Upregulated genes			下调的基因 Downregulated genes		
基因 ID Gene ID	描述 Description	基因 ID GeneID	描述 Description	基因 ID Gene ID	描述 Description
11443124	heat shock 70k Da protein	11412582	protein JINGUBANG	11413056	abscisic acid receptor PYL4 like
25487063	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED)	11414756	beta-galactosidase 8	11413806	abscisic acid receptor PYL4
11436220	protein phosphatase 2C			11413840	Peroxidase 5
11408102	protein phosphatase 2C	11420145	protein NRT1/ PTR FAMILY 3.1	25490864	ammonium transporter AMT1;3
25482353	protein phosphatase 2C	11421661	18 kDa seed maturation protein	25500555	caffeoyl-CoA O-methyltransferase
11411180	myo-inositol-1-phosphate synthase (MIPS)	11423089	non-specific lipid-transfer protein	25495100	glutamine amidotransferase GAT1
11417689	myo-inositol transporter	11425012	non-specific lipid-transfer protein	11425066	probable aspartic proteinase GIP2
11433093	inositol 3-alpha-galactosyltransferase	11425619	protein SIEVE ELEMENT OCCLUSION B	25479874	7-deoxyloganetin glucosyltransferase
25499633	inositol 3-alpha-galactosyltransferase	11425899	phospholipase A1 PLIP2, chloroplastic	11422589	albumin-1
11408932	RING/U-box domain-containing protein	11427095	zinc finger CCH domain-containing protein 20	11412408	2-methylene-furan-3-one reductase
11421298	receptor expression-enhancing protein	11431892	thaumatin-like protein 1b	11416050	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 9
11429341	zinc metalloprotease EGY	11432152	putative receptor-like protein kinase At3g47110	11416757	2-methylene-furan-3-one reductase
11430769	polyphenol oxidase	11437338	18 kDa seed maturation protein	11426319	
11442519	nucleoredoxin	11437936	18 kDa seed maturation protein	11427618	
25484824	Ras-related protein Rab-18	11438219	late embryogenesis abundant protein D-29	25499551	
25487687	E3 ubiquitin-protein ligase UNKL	11441262	late embryogenesis abundant protein At3g53040	11407736	
25490743	amino acid permease	11444966	kunitz-type trypsin inhibitor-like 2 protein		
25494319	nuclear transcription Y subunit beta (NF-YB8)	25485072	low-temperature-induced 65 kDa protein		
25495267	H ⁺ -transporting ATPase (AHA6)	25485262	cysteine-rich receptor-like protein kinase 25		
25497444	solute carrier family 50 (sugar transporter)	25491142	cation/H(+) antiporter 4		
25498173	serine/threonine-protein kinase OXII	25491334	late embryogenesis abundant protein 2		
25496855	dehydrin DHN1	25491336	late embryogenesis abundant protein 2		
25499829	probable leucine-rich repeat receptor-like protein kinase At1g35710				
25501241	NAC domain-containing protein 72	25493377			
25491475	UPF0098 protein CPn_0877/CP_0992/CPj0877/CpB0906	25501965			
112422319	5S ribosomal RNA	11405634			
120575797	non-specific lipid-transfer protein	11412046			
120580484	probable beta-D-xylosidase 7	11420081			
11407700	(-)-isopiperitenol/(-)-carveol dehydrogenase, mitochondrial	11442485			
11409423	salicylic acid-binding protein 2	11442614			
11411871	late embryogenesis abundant protein D-34	25489285			

注:空格为无法注释部分
Note: Blank spaces indicate regions that can not be annotated

在盐和碱胁迫条件下均上调的 60 个基因,涉及多种功能类别(表 6)。其中,介导脱落酸(Abscissic acid, ABA)合成的关键酶 9-顺式环氧类胡萝卜素双加氧酶(9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, NCED)和 ABA 信号的负调控因子蛋白磷酸酶 2C(PP2C)家族基因均上调。同时,肌醇-1-磷酸合酶等基因上调, E3 泛素连接酶基因 *XERICO* 表达增强, 质膜 H^+ -ATPase 质子泵 *AHA6* 基因、热激蛋白 *HSP70* 基因和 *NF-YB8* 基因等也被盐和碱诱导表达。

盐碱胁迫下共同下调的 16 个基因(表 6)涉及多个关键功能类别及代谢过程,具体包括:激素信号

转导通路(如 *PYL4* 及 *PYL4 like* 基因);细胞壁重构过程(如 *XTH9* 基因,可参与细胞壁结构的动态调节);抗氧化防御反应(如过氧化物酶 5 基因,参与活性氧清除);木质素合成代谢(由咖啡酰辅酶 A O-甲基转移酶基因介导);氮代谢相关过程(*AMT1*; 3 基因参与铵离子吸收, *GAT1* 基因参与氨基酸转化);此外还涵盖贮藏蛋白合成及非编码 RNA 调控等功能类别。综上,在盐和碱胁迫时,苜蓿可能通过共同调控的基因,影响激素信号调控、细胞壁结构、抗氧化活性和一些代谢反应等,协同提高自身的耐盐和耐碱能力。

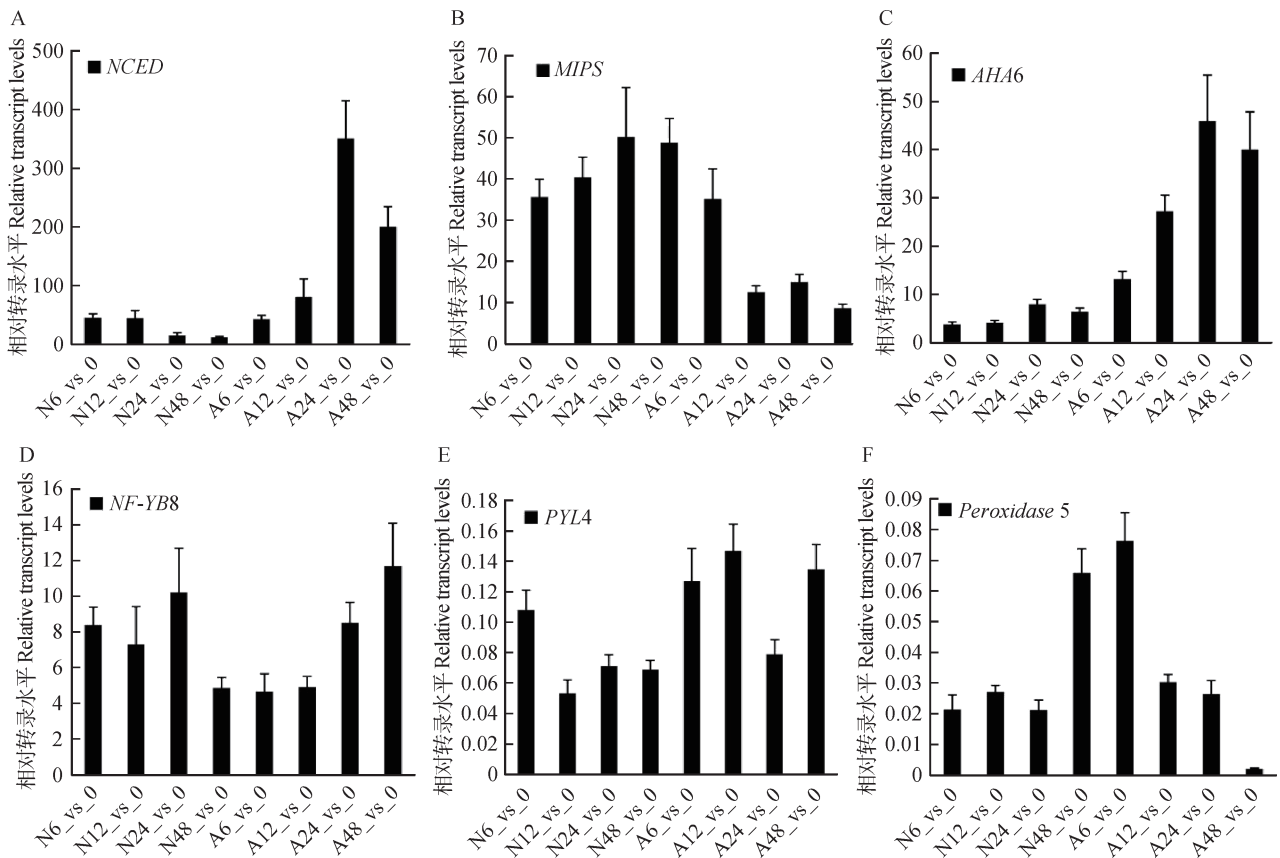


图 6 差异表达基因的 qRT-PCR 验证

Fig. 6 qRT-PCR validation of differentially expressed genes

3 讨论

3.1 盐胁迫与碱胁迫下基因响应的差异

本研究的转录组分析表明,在相同处理时间和近似渗透强度下,蒺藜苜蓿对碱胁迫的基因应答强度显著高于盐胁迫:碱胁迫 24 h 时差异表达基因(DEGs)数量达 6548 个(上调 2541 个、下调 4007 个),而盐胁迫 24 h 时仅检测到 881 个 DEGs(上调 387 个、下调 494 个),且碱胁迫大部分时段表现出

“下调基因占比更高”的特征(如 A24_vs_0 中下调 4007 个、上调 2541 个, A48_vs_0 中下调 2754 个、上调 2135 个)。这一结果与燕麦、藜麦等物种的研究结论一致,燕麦叶片在高 pH 碳酸盐胁迫下诱导 32 784 个 DEGs,显著多于等渗中性盐胁迫的 9123 个^[33];藜麦碱胁迫 DEGs (2233 个)也多于盐胁迫(1833 个)^[34]。

但本研究进一步揭示了蒺藜苜蓿作为豆科模式植物的特异性:碱胁迫 48 h 样品(A48A/A48B/

A48C)的基因组比对率仅为42.77%~58.74%,远低于其他样品的78.51%~95.99%,结合PCA分析中碱胁迫组随时间推移与对照组差异显著扩大的结果(图1b),推测高pH(9.5)可能破坏蒺藜苜蓿细胞结构完整性,导致RNA提取过程中杂质污染增加,或引发基因组序列局部降解。此外,本研究发现盐胁迫的关键响应节点为24 h(DEGs数量峰值),而碱胁迫则在24 h后仍维持高DEGs水平(48 h仍有4889个),说明蒺藜苜蓿对盐胁迫的应答存在“24 h峰值后缓解”的趋势,而对碱胁迫的适应需要更长时间的基因重编程。

3.2 差异表达基因的功能富集与核心耐盐和耐碱机制

在ABA信号转导通路中,本研究检测到ABA合成关键酶基因*NCED*在盐、碱胁迫下均显著上调(qRT-PCR相关系数0.98,图7-A),且“响应ABA”GO条目(GO:0009737)在盐胁迫24 h(N24_vs_0)和碱胁迫24 h(A24_vs_0)均显著富集(图3),这与拟南芥、水稻中“ABA信号是盐碱胁迫核心调控网络”的结论一致^[35]。本研究进一步发现,*PP2C*作为ABA信号的负调控因子,苜蓿中多个*PP2C*家族基因(如11436220,11408102)也随*NCED*同步上调。相关研究发现,盐和碱胁迫可调控紫花苜蓿*PP2C*家族基因表达,其中4个基因上调、1个基因下调;拟南芥中亦存在类似趋势,其*PP2C*基因表达量会随盐、碱胁迫发生相应变化^[36-37]。

在渗透调节与离子稳态方面,本研究中*MIPS*(肌醇-1-磷酸合成酶)基因的表达量在盐、碱胁迫下均上调(qRT-PCR相关系数0.98,图7B),且“脯氨酸代谢通路”(ko00330)在盐胁迫24 h显著富集(图4),这与苹果*MdMIPS1*过表达增强盐耐受性的机制一致^[38]。同时,质膜质子泵基因*AHA6*在盐、碱下表达量均上调(qRT-PCR相关系数0.99,图7C),其编码的H⁺-ATPase可通过泵出质子为Na⁺/H⁺逆向转运提供动力,这与水稻*OsAHA3*介导盐碱耐受性的功能呼应^[39],但本研究首次在苜蓿中证实*AHA6*对碱胁迫的响应,说明其在“盐和碱双逆境”离子平衡中的保守作用。抗氧化防御通路中,本研究发现“氧化还原过程”(GO:0055114)在盐、碱胁迫全时段富集,但具体抗氧化基因表现出特异性:除文献中普遍上调的*SOD*和*CAT*相关基因外,*Peroxidase 5*(基因ID:11413840)在盐、碱下

均显著下调(qRT-PCR验证,图7E),这与“过氧化物酶家族均上调清除ROS”的传统认知不同。结合蒺藜苜蓿在盐碱胁迫下AsA-GSH循环相关基因上调的报道^[39-40],推测蒺藜苜蓿可能通过“抑制Peroxidase 5激活AsA-GSH循环”的方式优化ROS清除效率,避免单一酶系过度消耗。

3.3 盐和碱共同响应基因的功能比较分析

本研究鉴定出60个共同上调基因和16个共同下调基因。共同上调基因中,E3泛素连接酶基因*XERICO*(同源基因ID:25487687)的响应尚未在苜蓿中报道。在拟南芥、玉米中*XERICO*过表达可通过促进ABA合成增强抗逆性^[41],在本研究中,*XERICO*与*NCED*呈现出同步上调的趋势,且qRT-PCR结果显示两者的表达模式高度一致,表明苜蓿中的*XERICO*可能通过泛素化修饰来调控*NCED*的稳定性,从而增强ABA的合成^[36]。此外,在‘中苜一号’的干旱胁迫相关研究中,*NCED*也表现出上升趋势,这一变化有助于促进ABA的合成,进而触发植物的抗逆反应^[42]。*NF-YB8*(基因ID:25494319)在盐、碱胁迫下均显著上调(qRT-PCR相关系数0.95,图7-D)。*NF-Y*转录因子家族参与植物胁迫信号及发育调控,其亚基基因可响应干旱、高温、盐等胁迫。如拟南芥过表达部分*NF-YB*亚基可提高抗旱性,水稻*OsNF-YC5*负调控盐响应,玉米*ZmNF-YB10*在盐胁迫下上调、碱胁迫下受抑^[43-44]。

共同下调基因中,*PYL4*(基因ID:11413806)及其同源基因*PYL4-like*(11413056)在盐、碱胁迫下均下调(图7E)。蒺藜苜蓿在盐胁迫下表达量下调的基因有*MtPYL14*, *MtPYL11*, *MtPYL13*和*MtPYL10*,葡萄*VvPYL3*在干旱(PEG模拟)和盐胁迫后转录水平显著下降,水稻部分*PYL*基因在胁迫下也呈下调趋势^[45-46]。本研究发现*PYL4*的下调与*PP2C*的上调同步——*PYL4*作为ABA信号的上游受体,其下调可减少对*PP2C*的抑制,进而与*PP2C*共同维持ABA信号平衡。此外,细胞壁重构相关基因*XTH9*(木聚糖内转糖基酶)和咖啡酰辅酶A O-甲基转移酶(基因ID:25500555)均下调,*XTH9*下调意味着植物可能在盐和碱胁迫下降低木质素或其他次生壁组分的合成,但一些研究表明盐胁迫往往提高木质素合成以限制离子在细胞中的自由流动、保护细胞壁^[47]。我们在碱胁迫条件下观察到咖啡酰辅酶A O-甲基转移酶基因的表达受到

抑制,这可能反映了碱胁迫对次生代谢分配的不同影响。高碱环境可能迫使植物将更多资源投入调整细胞内pH和离子平衡,而相对减少了次生细胞壁的构建^[48]。氮代谢相关基因 $AMT1;3$ (铵转运蛋白,基因ID:25490864)和 $GAT1$ (谷氨酰胺转移酶,基因ID:25495100)的共同下调,与大豆、水稻中表达规律一致^[49]。共同下调基因含lncRNA等非编码RNA,参与植物逆境响应调控(如ceRNA作用、转录和表观遗传调控)。水稻盐碱胁迫中,特异表达lncRNA通过miRNA结合或染色质修饰参与耐盐碱机制^[35]。

4 结论

本研究在不同时间下比较了盐和碱胁迫的转录组响应,碱胁迫诱导的差异表达基因数量显著多于盐胁迫,且以下调为主,24 h为关键响应节点。盐和碱胁迫均激活ABA信号转导、渗透调节、抗氧化防御及离子稳态等共同核心抗逆通路,同时筛选出60个盐和碱胁迫共同上调基因[如 $NCED$ (NCBI登录号:25487063)、 $MIPS$ (NCBI登录号:11411180)、 $AHA6$ (NCBI登录号:25495267)、 $NF-YB8$ (NCBI登录号:25494319)等],以及16个共同下调基因[如 $PYL4$ (NCBI登录号:11413806)、 $AMT1;3$ (NCBI登录号:25490864)等]。综上所述,本研究整体揭示了蒺藜苜蓿响应盐和碱胁迫的转录组差异特征及关键调控节点,为苜蓿耐盐和耐碱分子育种提供了候选基因资源与理论依据,对改良培育抗逆苜蓿品种具有重要意义。

参考文献

- [1] 王玉庭. 农业部发布《全国苜蓿产业发展规划(2016—2020)》[J]. 中国乳业, 2017(2):74
WANG Y T. The ministry of agriculture has issued the "National alfalfa industry development plan (2016-2020)" [J]. China Dairy, 2017(2):74
- [2] ENDRE G, KERESZT A, KEVEI Z, et al. A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development [J]. Nature, 2002, 417(6892):962-966
- [3] STACEY G, LIBAULT M, BRECHENMACHER L, et al. Genetics and functional genomics of legume nodulation [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2006, 9(2):110-121
- [4] 黄思源. 干旱胁迫下蒺藜苜蓿的转录组分析及醛脱氢酶基因 $MtALDH7A1$ 初步功能研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2019:1
HUANG S Y. Transcriptome analysis of alfalfa terrestris under drought stress and preliminary functional study of the aldehyde dehydrogenase gene $MtALDH7A1$ [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2019:1
- [5] 王笛, 李达, 孙萍萍, 等. 拓面增量-盐碱地种草改良现状及对策[J]. 农业与技术, 2024, 44(17):1-4
WANG D, LI D, SUN P P, et al. Increment of extension-present situation and countermeasures of planting grass in saline-alkali land [J]. Agriculture and Technology, 2024, 44(17):1-4
- [6] 梁成刚, 汪燕, 李天, 等. 过表达 $AngdhA$ 对水稻生长与氮素利用效率的影响[J]. 植物营养与肥科学报, 2023, 29(6):1060-1069
LIANG C G, WANG Y, LI T, et al. Influence of over-expression of $AngdhA$ gene on growth and nitrogen use efficiency of transgenic rice lines [J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizers, 2023, 29(6):1060-1069
- [7] 徐子龙, 刘波, 李艳伟, 等. 不同浓度NaCl胁迫对洋葱种子发芽的影响[J]. 山东农业科学, 2024, 56(8):74-79
XU Z L, LIU B, LI Y W, et al. Effects of NaCl stress at different concentrations on germination of onion seeds [J]. Shandong Agricultural Sciences, 2024, 56(8):74-79
- [8] 李文昊, 王振华, 郑旭荣, 等. 新疆绿洲盐碱滴灌区域荒地土壤盐分变化[J]. 排灌机械工程学报, 2016, 34(8):722-729
LI W H, WANG Z H, ZHENG X R, et al. Variation of soil salinity in wasteland of oasis saline drip irrigation area in Xinjiang [J]. Journal of Drainage and Irrigation Machinery Engineering, 2016, 34(8):722-729
- [9] HU L P, XIANG L X, ZHANG L, et al. The photoprotective role of spermidine in tomato seedlings under salinity-alkalinity stress [J]. PLoS One, 2014, 9(10):e110855
- [10] 吴旭红, 陈晓娥. 混合盐碱胁迫条件下甜瓜幼苗的生理响应[J]. 齐齐哈尔大学学报(自然科学版), 2015, 31(6):83-86
WU X H, CHEN X E. Physiological response of melon seedlings under the condition of mixed salt stress [J]. Journal of Qiqihar University (Natural Science Edition), 2015, 31(6):83-86
- [11] ZULFIQAR F, NAFEES M, CHEN J J, et al. Chemical priming enhances plant tolerance to salt stress [J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13:946922
- [12] LIU X, FU L S, QIN P, et al. Overexpression of the wheat trehalose 6-phosphate synthase 11 gene enhances cold tolerance in Arabidopsis thaliana [J]. Gene, 2019, 710:210-217
- [13] GUO W L, CHEN J X, LIU L, et al. $MsbMIOX2$, encoding a $MsbZIP53$ -activated myo-inositol oxygenase, enhances saline-alkali stress tolerance by regulating cell wall pectin and hemicellulose biosynthesis in alfalfa [J]. The Plant Journal, 2024, 120(3):998-1013
- [14] 刘海洋. 生物钟基因 $MtLHY$ 在蒺藜苜蓿盐胁迫中的功能研究[D]. 济南:山东大学, 2023:39
LIU H Y. The function study of circadian clock gene $MtLHY$ in medica [D]. Jinan: Shandong University, 2023:39
- [15] XU L, ZHANG L X, LIU Y J, et al. Overexpression of the elongation factor $MtEF1A1$ promotes salt stress tolerance in

- Arabidopsis thaliana* and *Medicago truncatula* [J]. BMC Plant Biology, 2023, 23(1):138
- [16] STEPHAN A B, KUNZ H H, YANG E, et al. Rapid hyperosmotic-induced Ca^{2+} responses in *Arabidopsis thaliana* exhibit sensory potentiation and involvement of plastidial KEA transporters[J]. PNAS, 2016, 113(35):E5242-E5249
- [17] ZHANG Z, ZHANG H J, YAO T T, et al. The homeostasis of ions and reactive oxygen species in root and shoot play crucial roles in the tolerance of alfalfa to salt alkali stress [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2024, 216:109175
- [18] 王如月, 文武武, 赵恩华, 等. 紫花苜蓿 *MsWRKY11* 基因的克隆及其耐盐功能分析[J]. 草业学报, 2021, 30(11):157-169
- WANG R Y, WEN W W, ZHAO E H, et al. Cloning and salt-tolerance analysis of *MsWRKY11* in alfalfa[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2021, 30(11):157-169
- [19] 李霄. 紫花苜蓿 HD-Zip 转录因子 MsHB7 盐胁迫响应机制研究[D]. 北京:中国农业科学院, 2022:72-75
- LI X. Study on salt stress responsive mechanism of HD-Zip transcription factor MsHB7 in *Medicago sativa* L. [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2022:72-75
- [20] 李心. 紫花苜蓿 MsWRKY33 转录因子调控耐盐性的分子机制研究[D]. 北京:中国农业科学院, 2023:51
- LI X. Study on the molecular mechanism of salt tolerance regulation by *MsWRKY33* transcription factor in alfalfa [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2023:51
- [21] 荣梦茹, 余如刚, 韦英铭, 等. 紫花苜蓿耐盐性相关 NAC 转录因子的挖掘及表达分析[J]. 草地学报, 2024, 32(4):1055-1067
- RONG M R, YU R G, WEI Y M, et al. Excavation and expression analysis of NAC transcription factors related to salinity resistance of *Medicago sativa* [J]. Acta Agrestia Sinica, 2024, 32(4):1055-1067
- [22] ZHANG A N, LIU Y, WANG F M, et al. Enhanced rice salinity tolerance via CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the *OsRR22* gene[J]. Molecular Breeding, 2019, 39:47
- [23] SLIMANI A, RAKLAMI A, OUFDOU K, et al. Isolation and characterization of PGPR and their potencial for drought alleviation in barley plants [J]. Gesunde Pflanzen, 2023, 75(2):377-391
- [24] RAKLAMI A, OUFDOU K, TAHIRI A I, et al. Safe cultivation of *Medicago sativa* in metal-polluted soils from semi-arid regions assisted by heat- and metallo-resistant PGPR [J]. Microorganisms, 2019, 7(7):212
- [25] BECHTAOUIN, RAKLAMI A, TAHIRI A I, et al. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria and their benefits on growth and phosphate nutrition of faba bean and wheat [J]. Biology Open, 2019, 8(7):bio043968
- [26] 梅亭. 合成菌群(SynComs)提高苜蓿耐盐性的体系构建及其转录组分析[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学, 2023:27
- MEI T. Construction of a synthetic microbial community (SynComs) system for enhancing salt tolerance in alfalfa and its transcriptome analysis [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2023:27
- [27] YU W Z, LUO L, QI X Y, et al. Insights into the impact of trans-Zeatin overproduction-engineered *Sinorhizobium meliloti* on alfalfa (*Medicago sativa* L.) tolerance to drought stress[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(15):8650-8663
- [28] 卢俊峰. 喷施独脚金内酯缓解紫花苜蓿盐胁迫生理机制研究[D]. 扬州:扬州大学, 2024:47-52
- LU J F. Study on the Physiological Mechanism of Alleviating Salt Stress in Alfalfa by Spraying Strigolactone [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2024:47-52
- [29] CHEN J X, TANG L, GUO W L, et al. Oxalic acid secretion alleviates saline-alkali stress in alfalfa by improving photosynthetic characteristics and antioxidant activity[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2024, 208:108475
- [30] GUO X Q, SHI Y, ZHU G L, et al. Melatonin mitigated salinity stress on alfalfa by improving antioxidant defense and osmoregulation[J]. Agronomy, 2023, 13(7):1727
- [31] 李泉盛. 外源 NO 对盐胁迫下紫花苜蓿生理性状的调控效应[D]. 呼和浩特:内蒙古大学, 2023:24-39
- LI Q S. The regulatory effect of exogenous NO on the physiological traits of alfalfa under salt stress [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2023:24-39
- [32] ZHANG W H, XIE Y, WU Y, et al. Amelioration of salt-induced damage on alfalfa by exogenous application of silicon[J]. Grassland Science, 2022, 68(1):60-69
- [33] BAI J H, LU P N, LI F, et al. Metabolome and transcriptome analyses reveal the differences in the molecular mechanisms of oat leaves responding to salt and alkali stress conditions [J]. Agronomy, 2023, 13(6):1441
- [34] BAO Q H, WU Y, WANG Y, et al. Comparative transcriptomic analysis reveals transcriptional differences in the response of quinoa to salt and alkali stress responses [J]. Agronomy, 2024, 14(7):1596
- [35] YANG S, XU Y Q, TANG Z Z, et al. The impact of alkaline stress on plant growth and its alkaline resistance mechanisms[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(24):13719
- [36] XU M Z, XU Z P, LIU Y R, et al. Transcriptome analysis reveals the vital role of ABA plays in drought tolerance of the ABA-insensitive alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. Agronomy, 2024, 14(3):406
- [37] WANG X J, YANG L L, GENG X, et al. Integrative analysis of metabolome and transcriptome reveals the different metabolite biosynthesis profiles related to palatability in winter and spring shoot in moso bamboo [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2023, 202:107973
- [38] HU L Y, ZHOU K, LIU Y, et al. Overexpression of *MdMIPS1* enhances salt tolerance by improving osmosis, ion balance, and antioxidant activity in transgenic apple [J]. Plant Science, 2020, 301:110654
- [39] HOFFMANN R D, PORTES M T, OLSEN L I, et al.

- Plasma membrane H^+ -ATPases sustain pollen tube growth and fertilization[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 2395
- [40] LISKÓ K A, TORRES R, HARRIS R S, et al. Elevating vitamin C content via overexpression of myo-inositol oxygenase and l-gulonolactone oxidase in *Arabidopsis* leads to enhanced biomass and tolerance to abiotic stresses[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 2013, 49 (6): 643-655
- [41] IM J H, KIM W C, HAN K H, et al. *XERICO* as a target for engineering stress-resilient crops: mechanisms, applications, and future directions[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2025, 225: 110013
- [42] 陈力, 王靖, 邱晓, 等. 不同耐旱性紫花苜蓿干旱胁迫下生理响应和转录调控的差异研究[J]. *作物学报*, 2023, 49(8): 2122-2132
- CHEN L, WANG J, QIU X, et al. Differences of physiological responses and transcriptional regulation of alfalfa with different drought tolerances under drought stresses [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2023, 49(8): 2122-2132
- [43] YAN X, HAN M T, LI S, et al. A member of NF-Y family, *OsNF-YC5* negatively regulates salt tolerance in rice [J]. *Gene*, 2024, 892: 147869
- [44] WANG Y M, JIAO P, WU C Y, et al. *ZmNF-YB10*, a maize NF-Y transcription factor, positively regulates drought and salt stress response in *Arabidopsis thaliana* [J]. *GM Crops & Food*, 2025, 16(1): 28-45
- [45] 黄思源, 呼天明, 杨培志. 蒺藜苜蓿 PYL 基因家族的全基因组鉴定、表达和功能分析[J]. *草业科学*, 2019, 36(2): 422-433
- HUANG S Y, HU T M, YANG P Z. Identification and function analysis of the PYL gene family in *Medicago truncatula* [J]. *Pratacultural Science*, 2019, 36(2): 422-433
- [46] AN Y L, MI X Z, XIA X B, et al. Genome-wide identification of the PYL gene family of tea plants (*Camellia sinensis*) revealed its expression profiles under different stress and tissues [J]. *BMC Genomics*, 2023, 24(1): 362
- [47] DABRAVOLSKI S A, ISAYENKOV S V. The regulation of plant cell wall organisation under salt stress [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14: 1118313
- [48] BACHIR I H, PLOYET R, TEULIÈRES C, et al. Regulation of secondary cell wall lignification by abiotic and biotic constraints [M]// *Lignin and hydroxycinnamic acids: biosynthesis and the buildup of the cell wall*. Amsterdam: Elsevier, 2022: 363-392
- [49] HOBAN S, ARCHER F I, BERTOLA L D, et al. Global genetic diversity status and trends: towards a suite of Essential Biodiversity Variables (EBVs) for genetic composition [J]. *Biological Reviews*, 2022, 97(4): 1511-1538

(责任编辑 闵芝智)