

doi:10.11733/j.issn.1007-0435.2026.08.009

引用格式:张伟燕,李云,刘艳昆,等.紫花苜蓿 *EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15* 基因克隆、表达及功能分析[J].草地学报,2026,34(8):2847–2856

ZHANG Wei-yan, LI Yun, LIU Yan-kun, et al. Cloning, Expression, and Functional Analysis of *EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15* gene from *Medicago sativa* L. [J]. Acta Agrestia Sinica, 2026, 34(8):2847–2856

紫花苜蓿 *EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15* 基因克隆、表达及功能分析

张伟燕¹, 李云¹, 刘艳昆¹, 王皓^{1*}, 刘青松²

(1. 沧州职业技术学院, 河北 沧州 061000; 2. 沧州市农林科学院, 河北 沧州 061000)

摘要: ERD15 (*EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15*) 是植物逆境响应的重要调控因子。本研究克隆紫花苜蓿 (*Medicago sativa* L.) *MsERD15* 基因, 并通过生物信息学、表达模式及功能分析探讨其抗逆作用。利用 RT-PCR 克隆 *MsERD15* 基因并分析蛋白理化性质、结构域及系统进化关系; qRT-PCR 检测干旱、高盐及脱落酸 (Abscisic acid, ABA) 处理下的表达模式; 构建 *MsERD15*-YFP 融合载体进行亚细胞定位; 通过酵母异源表达验证抗逆功能。结果表明: *MsERD15* 编码区全长 402 bp, 编码 134 个氨基酸; 该基因受干旱、高盐及 ABA 显著诱导; 蛋白定位于细胞质。酵母表达 *MsERD15* 可显著提高对高盐和聚乙二醇 (Polyethylene glycol, PEG) 胁迫的耐受性。*MsERD15* 参与逆境响应, 可作为紫花苜蓿抗逆分子育种的候选基因。

关键词: 紫花苜蓿; *MsERD15*; 表达分析; 细胞质定位; 酵母; 非生物胁迫

中图分类号: S541.9

文献标识码: A

文章编号: 1007-0435(2026)08-2847-10

Cloning, Expression, and Functional Analysis of *EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15* gene from *Medicago sativa* L.

ZHANG Wei-yan¹, LI Yun¹, LIU Yan-kun¹, WANG Hao^{1*}, LIU Qing-song²

(1. Cangzhou Technical College, Cangzhou, Hebei Province 061000, China; 2. Cangzhou Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Cangzhou, Hebei Province 061000, China)

Abstract: ERD15 (*EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15*) is an important regulatory factor involving in plant stress responses. In this study, the *MsERD15* gene from alfalfa (*Medicago sativa* L.) was cloned, and its potential role in stress tolerance was investigated through bioinformatics, expression profiling, and functional analyses. The *MsERD15* gene was cloned by RT-PCR, and the physicochemical properties, conserved domains, and phylogenetic relationships of the encoded protein were analyzed. The expression patterns of *MsERD15* under drought, high salinity, and abscisic acid (ABA) treatments were examined using qRT-PCR. A *MsERD15*-YFP fusion construct was generated for subcellular localization analysis, and heterologous expression in yeast was performed to evaluate its stress tolerance function. The results showed that the coding sequence of *MsERD15* was 402 bp in length, encoding a protein of 134 amino acids. The gene was significantly induced by drought, high salinity, and ABA treatments. Subcellular localization indicated that the protein was localized in the cytoplasm. Expression of *MsERD15* in yeast significantly enhanced tolerance to high salinity and polyethylene glycol (PEG) stress. These results indicated that *MsERD15* participated in stress responses and might serve as a candidate gene for improving stress tolerance in alfalfa through molecular breeding.

Key words: Alfalfa; *MsERD15*; Expression analysis; Cytoplasm localization; Yeast; Abiotic stress

收稿日期: 2025-09-15; 修回日期: 2025-12-16

基金项目: 田菁改良盐碱地技术研究 (CCPTZX2024GJ02-1-4) 资助

作者简介: 张伟燕 (1979-), 女, 汉族, 河北沧州人, 硕士, 副教授, 主要从事园林专业植物育种研究, E-mail: 601328274@qq.com; *通信作者 Author for correspondence, E-mail: 1315337220@qq.com

在全球气候变化加剧与水资源短缺问题日益严峻的双重压力下,干旱胁迫已成为制约农业可持续发展的关键环境因子。据联合国粮农组织统计,全球干旱半干旱地区占陆地总面积的41%,每年因干旱导致的作物减产损失超过其他自然灾害的总和^[1]。植物在长期进化中形成了复杂的应答机制,涵盖渗透调节物质积累、抗氧化系统激活、气孔运动调控及逆境相关基因表达调控等^[2]。其中,逆境响应基因的表达调控是植物适应非生物胁迫的分子基础,解析这些基因的功能与作用机制,对培育具有抗逆性状的作物新品种具有重要理论意义和应用价值^[3-4]。

干旱胁迫是限制植物生长和地理分布的主要非生物胁迫因素之一。当植物遭遇干旱时,其体内会发生一系列复杂的生理生化变化,包括气孔关闭以减少水分散失、渗透调节物质的积累以维持细胞膨压、抗氧化防御系统的激活以清除活性氧等。这些生理响应的背后,是众多基因表达调控和信号转导通路的协同作用^[5]。其中,脱落酸(Abscicic acid, ABA)作为一种重要的植物激素,在干旱胁迫信号转导过程中发挥着核心调控作用^[6]。ABA能够诱导一系列抗逆相关基因的表达,增强植物的抗旱能力^[7]。例如,ABA可以激活特定的转录因子,这些转录因子进一步结合到下游抗逆基因的启动子区域,启动基因的转录,从而促使植物产生相应的抗逆反应^[8]。除了干旱胁迫,盐胁迫也是农业生产中常见的非生物胁迫之一。高盐环境会导致土壤溶液渗透势降低,使植物根系吸水困难,同时盐离子在植物体内的过量积累还会对细胞产生毒害作用,干扰植物的正常生理代谢过程^[9]。植物在应对盐胁迫时,也会启动一系列复杂的适应机制,包括离子转运蛋白的调控以维持细胞内离子平衡、渗透调节物质的合成以适应渗透胁迫、抗氧化系统的激活以减轻氧化损伤等^[10]。ABA信号通路在植物应对盐胁迫过程中同样扮演着重要角色^[11]。盐胁迫能够诱导植物体内ABA含量的增加,进而激活ABA信号通路,调控相关抗逆基因的表达,增强植物对盐胁迫的耐受性^[12]。

紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)作为豆科苜蓿属多年生草本植物,是全球栽培面积最广、营养价值最高的豆科牧草之一,被誉为“牧草之王”^[13]。其不仅具有高蛋白、高矿物质及丰富维生素等优良饲用特性,还能通过根瘤菌进行生物固氮,改善土壤肥力,在畜牧业发展和生态环境保护中发挥着不可替代的作用^[14-15]。然而,紫花苜蓿根系虽发达,但在幼苗期及干旱频发地区,其生长发育和产量品质仍受干旱、

高盐等胁迫严重制约^[16-18]。研究表明,干旱可导致紫花苜蓿种子萌发率下降30%~50%,株高降低20%~40%,干草产量减少25%~60%,且蛋白质含量显著降低,粗纤维含量升高,严重影响其饲用价值^[19]。因此,挖掘紫花苜蓿抗逆相关基因、解析其抗逆分子机制,并通过分子育种改良其抗性,已成为当前牧草遗传改良领域的研究热点。植物在遭受逆境胁迫时,会迅速启动一系列信号传导途径,诱导大量逆境响应基因的表达。根据响应速度和功能,这些基因可分为两类:一类是直接参与逆境胁迫缓解的功能基因,如编码渗透调节物质合成酶(脯氨酸合成酶、甜菜碱醛脱氢酶)、抗氧化酶(超氧化物歧化酶、过氧化氢酶)及脱水保护蛋白(晚期胚胎发生丰富蛋白、热激蛋白)的基因;另一类是参与信号传导和基因表达调控的调节基因,如编码转录因子(MYB, bZIP, NAC)、蛋白激酶(MAPK, CDPK)及胁迫响应激素合成相关酶(ABA合成酶)的基因,这些基因通过协同作用,共同提高植物对逆境的抵抗能力。

EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION(ERD)基因是一类在逆境胁迫早期快速响应表达的基因,最早在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中被发现。研究表明,ERD基因在植物应对干旱、低温、高盐等非生物胁迫过程中发挥重要作用^[20]。拟南芥*AtERD15*基因作为ERD家族的重要成员,其表达受干旱、ABA、高盐等胁迫诱导,过表达*AtERD15*可显著提高拟南芥的抗旱性,而敲除*AtERD15*则降低拟南芥的抗旱能力^[21-22]。进一步研究发现,*AtERD15*可能通过与*ABI2*(ABA INSENSITIVE 2)相互作用,参与ABA信号传导途径,调节气孔关闭,减少水分散失,从而增强植物的抗旱性^[23-24]。此外,*AtERD15*还可能通过调控下游逆境响应基因的表达,如*RD29A*(RESPONSIVE TO DESICCATION 29A), *COR15A*(COLD-REGULATED 15A)等,参与植物的胁迫应答过程。除拟南芥外,在其他植物中也陆续发现了ERD15同源基因的存在及其抗旱功能。例如,水稻(*Oryza sativa* L.)*OsERD15*基因的表达受干旱和ABA诱导,过表达*OsERD15*可提高水稻的抗旱性和ABA敏感性^[25];小麦(*Triticum aestivum* L.)*TaERD15*基因在干旱胁迫下表达上调,其过表达植株的抗旱性显著增强,且叶片相对含水量和脯氨酸含量升高,丙二醛含量降低^[26]。这些研究表明,ERD15基因在不同植物中可能具有保守的抗旱功

能,但其具体作用机制可能因植物种类不同而存在差异。尽管 *ERD15* 基因在拟南芥、水稻、小麦等植物中的研究已取得一定进展,但在紫花苜蓿中的研究尚未见报道。紫花苜蓿作为重要的豆科牧草,其抗旱机制与其他植物可能存在差异,尤其是豆科植物特有的根瘤共生固氮系统可能与抗旱性存在协同调控关系。因此,克隆紫花苜蓿 *ERD15* 基因,分析其序列特征、表达模式及在干旱胁迫下的功能,对于揭示紫花苜蓿的抗旱分子机制具有重要意义。

本研究以紫花苜蓿为材料,旨在克隆 *MsERD15* 基因,分析其基因结构和进化关系;通过 qRT-PCR 技术检测该基因在干旱、ABA、高盐等胁迫处理下的表达模式;构建酵母表达载体,获得表达 *MsERD15* 酵母菌,研究其在高盐和干旱胁迫下的生长状态,明确 *MsERD15* 基因的抗逆功能,初步探讨其作用机制。研究结果将为深入理解紫花苜蓿的抗旱分子机制提供理论依据,为紫花苜蓿抗旱分子育种提供候选基因和技术支持。

1 材料与方法

1.1 植物材料

试验中所用植物材料为‘中苜 4 号’紫花苜蓿

(Zhongmu No. 4),由中国农业科学院北京畜牧兽医研究所提供。选取健康饱满的紫花苜蓿种子,置于含有无菌滤纸的培养皿中,加入适量的无菌水,放置于植物培养箱中,条件设置为 25℃/16 h 光照,22℃/8 h 黑暗。种子萌发后,移栽至花盆中继续培养。选取 20 d 幼苗,使用 200 mmol·L⁻¹ NaCl 和 20% PEG 进行胁迫处理;使用 10 μmol·L⁻¹ ABA 对植物进行激素诱导,收集不同时间点的植物材料,每个处理进行 3 次生物学重复,经液氮速冻后放入 -80℃ 冰箱保存,用于后续实验。

1.2 引物设计

以紫花苜蓿‘中苜 4 号’基因组数据库中 *MsERD15* 基因 (ID: Msa0859120) 为参考,使用 Primer Premier 5.0 进行引物设计,引物名称及序列如表 1 所示: *MsERD15*-1/2 用于 *MsERD15* 基因克隆; *MsERD15*-RT-f/r 用于 *MsERD15* 基因的表达分析, *MsActin*-f/r 用于内参基因 *MsActin* 的表达分析; *YFP*-*MsERD15*-f/r 用于构建 *MsERD15* 亚细胞定位载体, *YFP*-f/r 用于亚细胞定位载体鉴定; *pYES2*-*MsERD15*-f/r 用于构建酵母表达载体; *T7 promoter* 和 *Cyc-r* 用于酵母表达载体鉴定。

表 1 引物序列及名称

Table 1 Primer sequences and names

引物名称 Primer name	引物序列(5'—3') Primer sequence (5'-3')
<i>MsERD15</i> -1	CTTTACTCTTTTCTCCATCACCCAC
<i>MsERD15</i> -2	CCCTGAAATCAAATCATAACTCTAG
<i>MsERD15</i> -RT-f	TGGTGGAACCTCGTTCATTC
<i>MsERD15</i> -RT-r	TTCGGAGCCTTCTCAGCATA
<i>MsActin</i> -F	TGATCTGGCTGGTCGTGACCTTA
<i>MsActin</i> -R	ATGCCTGCTGCTTCCATTCTAT
<i>YFP</i> - <i>MsERD15</i> -f	AGAACACGGGGGACTCTTGAATGGAAGTTCTTTCTGCTAC
<i>YFP</i> - <i>MsERD15</i> -r	CGCGTACTAGTCAGATCTACCCTGGGCTGATGAATAGCCC
<i>YFP</i> -f	TGACGCACAATCCCACTATCCTT
<i>YFP</i> -r	CCGTCCAGCTCGACCAGGAT
<i>pYES2</i> - <i>MsERD15</i> -f	TGTACGACGATGACGATAAGATGGAAGTTCTTTCTGCTAC
<i>pYES2</i> - <i>MsERD15</i> -r	ACTGTGCTGGATATCTGCAGCTACCTGGGCTGATGAATAG
<i>T7 promoter</i>	TAATACGACTCACTATAGG
<i>Cyc-r</i>	GAGGGCGTGAATGTAAGC

1.3 基因克隆及测序

为了分离紫花苜蓿 *MsERD15* 基因,以 PEG 处理的紫花苜蓿为材料,采用 Trizol 试剂提取植物总 RNA,去除基因组 DNA 污染后,利用 PrimeScript™ RT Reagent Kit(TaKaRa)进行反转录,合成第一链 cDNA。以第一链 cDNA 为模板, *MsERD15*-1/2 为引物,进行

PCR 扩增,PCR 反应程序为: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 循环; 72℃ 5 min; 12℃ 保温。PCR 产物纯化回收后,连接至 pGEM-T 载体中。将连接产物转化至大肠杆菌中,经氨苄青霉素筛选及菌体 PCR 鉴定后,挑选阳性克隆送交测序公司进行测序,将测序正确的质粒命名为 pGEM-*MsERD15*。

1.4 生物信息学分析

在NCBI数据库中执行MsERD15蛋白序列的BLAST比对,并获取相关同源蛋白序列。采用MEGA 12构建系统发育树,设置Bootstrap重抽样参数为1000次以验证拓扑结构稳定性。运用DNAMAN 8.0对MsERD15及其跨物种同源蛋白开展多序列比对分析。通过SOPMA (https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html)在线平台预测蛋白质二级结构,并利用SWISS-MODEL (<https://swiss-model.expasy.org/interactive/QdTzAC/models/>)进行三级结构同源建模。使用ExPASy-ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>)工具计算蛋白理化参数,SignalP 4.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-4.1>)用于信号肽预测,TMHMM 2.0 ([https://services.healthtech.dtu.dk/service.php TMHMM-2.0](https://services.healthtech.dtu.dk/service.php%20TMHMM-2.0))分析跨膜结构域,ExPASy平台 (<https://www.expasy.org/>)评估氨基酸亲疏水性特征。磷酸化位点预测通过NetPhos 3.1 ([https://services.healthtech.dtu.dk/service.php NetPhos-3.1](https://services.healthtech.dtu.dk/service.php%20NetPhos-3.1))完成。

1.5 表达分析

对提取的紫花苜蓿RNA进行反转录,获得cDNA,使用荧光定量试剂SYBR® Premix Ex Taq™ (TaKaRa),MsERD15-RT-f/r为特异性引物,进行基因表达的相对定量分析,每个样品进行3次生物学重复,并以*MsActin*作为内参基因,最后利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行数据分析。

1.6 亚细胞定位

为了明确MsERD15蛋白的亚细胞定位,以YFP标记法进行亚细胞定位检测。以pGEM-MsERD15为模板,YFP-MsERD15-f/r为引物进行PCR扩增,PCR产物待纯化回收后,使用无缝连接酶连接至亚细胞定位载体pYFP中。连接产物经大肠杆菌转化、卡那霉素筛选、菌体PCR鉴定,选择阳性克隆送交生物技术公司进行测序,结果显示序列与*MsDER15*基因一致,且不存在移码情况,能够与YFP正确融合,将序列正确的质粒命名为YFP-MsERD15。将测序正确的质粒保存于农杆菌EHA105中,使用农杆菌介导的方法,将农杆菌重悬液注射至烟草叶片下表皮。转化后的烟草植株放

置于植物培养箱中,条件为20℃黑暗培养3d,通过激光共聚焦显微镜观察YFP荧光信号,分析MsERD15蛋白的亚细胞定位情况。

1.7 酵母异源表达功能鉴定

为进一步验证*MsERD15*对高盐和干旱的抗性功能,以酵母菌为受体细胞,进行*MsERD15*诱导表达。以pGEM-MsERD15为模板,pYES2-MsERD15-f/r为引物进行PCR扩增,PCR产物待纯化回收后,使用无缝连接酶连接至酵母表达载体pYES2中。连接产物经大肠杆菌转化、氨苄青霉素筛选、菌体PCR鉴定,选择阳性克隆送交生物技术公司进行测序。将序列正确的质粒命名为pYES-MsERD15,并将测序正确的质粒保存于酵母菌INVSC1中。将含有pYES-MsERD15和空白载体pYES2的酵母菌,分别进行NaCl和PEG的抗性分析。对于PEG抗性分析,将实验组pYES-MsERD15和空白载体pYES2的酵母菌用SG/-Ura+0 mmol·L⁻¹ PEG3350,SG/-Ura+60 mmol·L⁻¹ PEG3350,SG/-Ura+90 mmol·L⁻¹ PEG3350,SG/-Ura+120 mmol·L⁻¹ PEG3350及SG/-Ura+135 mmol·L⁻¹ PEG3350液体培养基振荡培养1天后接种至SG/-Ura平板上。对于NaCl抗性分析,将含有pYES-MsERD15和空白载体pYES2的酵母菌用2 mL无菌水重悬,稀释(10,10⁻¹,10⁻²)接种至SG/-Ura+0 mol·L⁻¹ NaCl,SG/-Ura+1.3 mol·L⁻¹ NaCl,SG/-Ura+1.5 mol·L⁻¹ NaCl和SG/-Ura+2.0 mol·L⁻¹ NaCl平板上。将所有平板置于30℃培养箱中培养,5d后观察菌落生长情况并拍照记录。

2 结果与分析

2.1 *MsERD15*基因克隆及测序分析

PCR反应后,1%琼脂糖凝胶电泳结果显示,PCR扩增获得一条单一清晰的条带,大小约为500 bp (图1-a),与预期结果大小一致,初步判断分离得到紫花苜蓿*MsERD15*基因。将纯化后的PCR产物连接至克隆载体pGEM-T后,转化至大肠杆菌,经菌体PCR鉴定后,挑选阳性克隆进行测序分析,测序结果显示,克隆的*MsERD15*基因与‘中苜4号’基因组数据库序列完全一致,包含完整编码区,CDS全长402 bp,编码134个氨基酸(图1-b),可以用于后续试验。

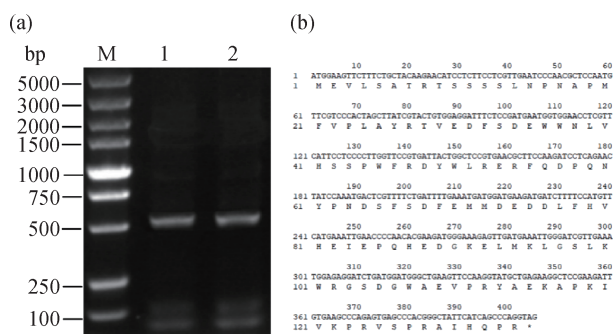


图1 *MsERD15* 基因 PCR 扩增及序列

Fig. 1 PCR amplification of *MsERD15* gene and the sequence

注:(a)为PCR扩增产物琼脂糖凝胶电泳图片;(b)为*MsERD15*基因及蛋白质序列。M为DNA Marker;1,2为*MsERD15*基因PCR扩增产物

Note: (a) is the agarose gel electrophoresis image of PCR amplification products. (b) is the gene and protein sequence of *MsERD15*. M is the DNA Marker. 1 and 2 indicate PCR amplification products specific to the *MsERD15* gene

2.2 MsERD15蛋白生物信息学分析

使用 MEGA 构建系统发育进化树,结果表明紫花苜蓿 MsERD15 蛋白与蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*)、红三叶 (*Trifolium pratense*)、毛苕子 (*Vicia villosa*) 及鹰嘴豆 (*Cicer arietinum*) 等豆科植物中氨基酸序列最相似(图 2-a)。蛋白理化性质分析表明, MsERD15 分子式为 $C_{712}H_{1055}N_{195}O_{210}S_5$, 相对分子量为 15.866 kD, 理论等电点 5.18, 含 23 个带负电残基和 16 个带正电残基。生物信息学预测, 该蛋白不含跨膜结构域, 不稳定指数为 39.44, 脂溶性指数为 57.46, 平均亲水性系数为 -0.875, 表明其属于稳定的亲水性蛋白。蛋白结构预测分析显示, MsERD15 的二级结构主要由无规则卷曲 (50.75%)、 α -螺旋 (43.28%) 和延伸链 (5.97%) 组成(图 2-b、c)。进一步分析显示, MsERD15 蛋白无信号肽(图 2-d)。Cell-PLoc 网站预测显示其定位于细胞质中。根据 NetPhos 网站预测, MsERD15 蛋白具有 12 个磷酸化位点, 其中有 10 个丝氨酸磷酸化位点, 1 个苏氨酸磷酸化位点, 1 个酪氨酸磷酸化位点, 说明丝氨酸磷酸化位点最可能是潜在的磷酸化位点。

2.3 *MsERD15* 基因表达分析

为了探索 *MsERD15* 基因的表达特征, 收集紫花苜蓿不同组织(根、茎、叶、花)进行 qRT-PCR 分析, 结果显示: *MsERD15* 基因在所选组织中均有表

达,但在根中表达水平最高,叶和茎中表达水平次之,花中表达水平最低(图 3-a);通过喷施 ABA,对植物材料进行处理,在不同的时间点收集植物材料进行 qRT-PCR 分析,结果显示:*MsERD15* 基因能够明显受到 ABA 的诱导,在 6 h 时到达峰值,为未诱导的植物材料的 3.19 倍(图 3-b);对于 NaCl 胁迫处理,*MsERD15* 基因表达水平在 30 min 至 12 h 呈现连续上升的趋势,在 12 h 达到峰值,在 24 h 明显回落,但仍然显著高于未处理的植物材料(图 3-c);对于 PEG 胁迫处理,*MsERD15* 基因表达水平呈现先增长再下降的趋势,在 1~3 h 处达到第一个峰值,随后持续下降,但 12 h 时表达水平仍为未处理的 1.26 倍,在 24 h 处达到第二个峰值(图 3-d)。

2.4 MsERD15 定位于细胞质

将 YFP-MsERD15 及 YFP 空载分别转化至农杆菌后,注射到烟草下表皮细胞,暗培养 3 d 后,使用激光共聚焦显微镜观察荧光信号结果显示:YFP 空载在细胞核和细胞质中均能检测到荧光信号,而 MsERD15-YFP 实验组仅在细胞质中观察到荧光信号(图 4),以上结果表明 MsERD15 蛋白定位于细胞质中。

2.5 *MsERD15* 基因提高酵母对 NaCl 和 PEG 的抗性

将构建的用于酵母表达的载体 pYES-MsERD15 和 pYES2 空载分别转化至酵母菌 INVSC1 后,分别进行 NaCl 和 PEG 胁迫处理。经 5 d 培养后,对培养基进行拍照分析。NaCl 胁迫结果显示:在不额外添加 NaCl 培养基上, pYES-MsERD15 和 pYES2 两种酵母均能够正常生长,且两种菌落生长状态一致;而在含有 NaCl 的 SG/-Ura 培养基上, pYES-MsERD15 酵母菌的生长状态明显好于对照 pYES2 酵母菌,在含有 $1.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 培养基上,对照酵母仅仅有零星菌落,而超过 $1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl,对照酵母则不能生长(图 5)。PEG 胁迫结果显示:没有 PEG 胁迫处理, pYES-MsERD15 和 pYES2 两种酵母菌生长状态一致,而经过 PEG 处理后, pYES-MsERD15 能够正常生长,而 pYES2 仅有几个零星的酵母菌斑(图 6)。上述结果表明,异源表达紫花苜蓿 *MsERD15* 基因可显著提高酵母菌对高盐和渗透胁迫的耐受性。

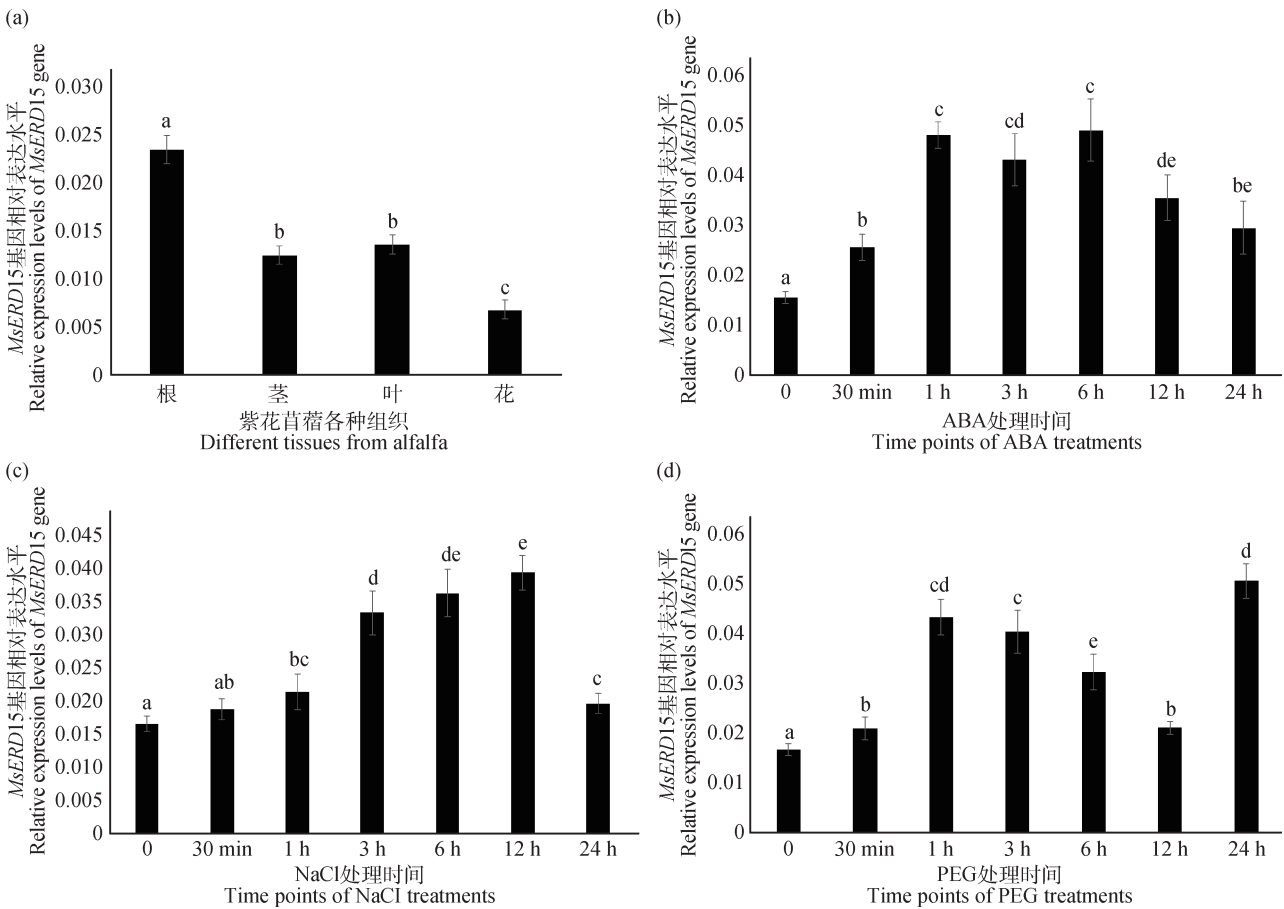


图 3 *MsERD15* 表达分析

Fig. 3 Expression analysis of *MsERD15*

注:(a)为 *MsERD15* 在根、茎、叶及花中的表达水平;(b)为 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA 诱导 *MsERD15* 表达水平;(c)为 $200\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 处理 *MsERD15* 表达水平;(d)为 20 % PEG 处理 *MsERD15* 表达水平;不同的小写字母代表了显著性差异 ($P<0.05$)

Note: (a) is the differential expression of *MsERD15* in roots, stems, leaves and flowers; (b) is the relative expression of *MsERD15* induced by ABA; (c) is the relative expression of *MsERD15* under NaCl; (d) is the relative expression of *MsERD15* under by PEG. Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$)

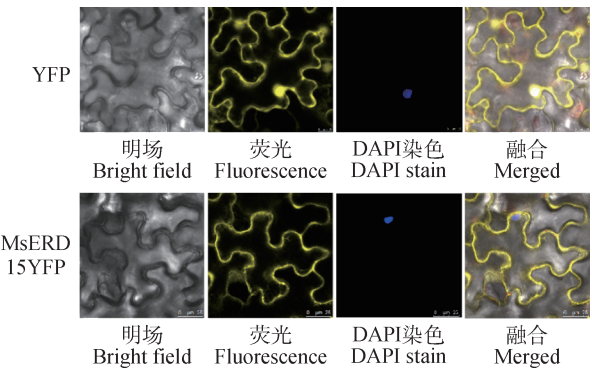


图 4 *MsERD15* 亚细胞定位

Fig. 4 Subcellular localization of *MsERD15*

氨基酸)^[25]接近,印证了 *ERD15* 基因在编码区长度上的进化稳定性。其编码蛋白的相对分子量为 15.866 kD,理论等电点 5.18,不稳定指数 39.44,平均亲水性系数 -0.875,符合“稳定亲水性蛋白”特征,亲水性使其能在细胞质水环境中高效结合信号

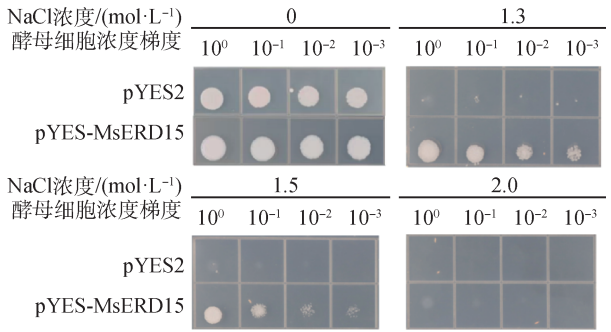


图 5 *MsERD15* 表达提高酵母对盐的抵抗能力

Fig. 5 Expression of *MsERD15* in yeast enhances tolerances to NaCl

分子或互作蛋白,结构稳定性则保证其在胁迫条件下维持功能活性,这与多数植物逆境调控蛋白的理化特征高度一致^[29-30]。系统进化树分析显示, *MsERD15* 与蒺藜苜蓿、红三叶、毛苕子等豆科植物的 *ERD15* 同源蛋白聚类关系最近,既符合植物亲缘

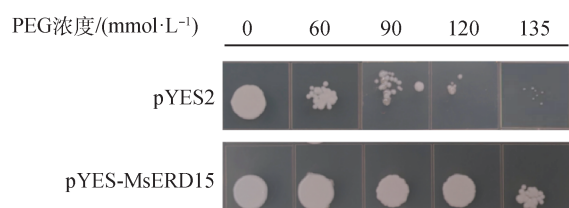


图6 *MsERD15*表达提高酵母对PEG的抵抗能力

Fig. 6 Expression of *MsERD15* in yeast enhances tolerances to PEG

关系规律,也暗示豆科植物的ERD15可能在长期进化中形成了适应豆科特有生理过程(如根瘤共生固氮)的序列特征。值得注意的是,*MsERD15*含有12个潜在磷酸化位点,其中丝氨酸位点占10个,这与拟南芥*AtERD15*(8个丝氨酸磷酸化位点)的修饰特征高度相似,提示丝氨酸磷酸化可能是ERD15蛋白的保守调控方式。已有研究表明,植物胁迫响应中,丝氨酸磷酸化可通过激活MAPK、CDPK等激酶通路调控蛋白活性^[28],结合本研究中*MsERD15*受干旱、高盐及ABA显著诱导表达的结果推测,*MsERD15*可能通过丝氨酸残基的磷酸化/去磷酸化动态变化响应胁迫信号,进而启动下游抗逆反应,这为后续解析其活性调控机制提供了明确方向。

基因表达模式直接反映其功能定位,本研究qRT-PCR检测的组织特异性与胁迫诱导性结果,清晰揭示了*MsERD15*与紫花苜蓿抗逆响应的紧密关联。在组织表达分析中,*MsERD15*在根中表达量最高,叶、茎次之,花中最低,这一模式与植物应对非生物胁迫的生理需求高度匹配:根是感知土壤干旱、高盐胁迫的“首要器官”,也是水分和矿质吸收的核心部位,当遭遇逆境时,根系需优先启动防御机制维持功能稳定^[29-30]。*MsERD15*在根中高表达,暗示其可能在根系胁迫信号感知、渗透调节或细胞保护中发挥核心作用,如通过调控根系脯氨酸合成相关基因或抗氧化酶基因的表达,增强根系抗逆能力^[31],这与水稻*OsERD15*^[25]、小麦*TaERD15*^[26]“根中高表达”的特征一致,印证了ERD15基因在抗逆中的保守功能。*MsERD15*对ABA、NaCl和PEG三种处理的响应模式存在显著差异,且与酵母功能验证结果形成呼应,反映其可能通过多元信号通路参与胁迫应答。在ABA处理下,*MsERD15*于6 h到达峰值(为未诱导的3.19倍),随后回落,这与ABA作为“胁迫信号枢纽”的作用一致——ABA可快速诱导抗逆基因表达,启动应急防御。拟南芥

*AtERD15*通过与ABA信号通路的ABI2蛋白互作调控气孔关闭^[21],推测*MsERD15*可能通过类似机制,在ABA诱导下激活下游抗逆基因表达,这也为其后续在酵母中增强抗逆性提供了分子基础。NaCl胁迫下,*MsERD15*表达持续上升,至12 h达峰,24 h仍高于对照,这与盐胁迫的“渐进性伤害”特征匹配,高盐导致的离子毒害和渗透胁迫需基因持续表达以维持离子平衡^[27],而这一持续诱导的表达特征,恰好解释了酵母异源表达*MsERD15*后,在1.3和1.5 mol·L⁻¹ NaCl胁迫下仍能正常生长的表型结果。在PEG模拟的干旱胁迫中,*MsERD15*呈现“双峰值”(1~3 h和24 h),可能对应干旱响应的两个阶段:早期峰参与气孔快速关闭等应急反应,晚期峰则与脱水保护蛋白表达、细胞壁重构等长期适应过程相关^[32-33],这种“双峰值”模式有别于拟南芥*AtERD15*的“单峰值”^[21],可能是紫花苜蓿适应干旱的物种特异性调控策略,同时也为酵母中*MsERD15*能抵抗高浓度PEG胁迫提供了合理解释。

亚细胞定位结果显示,*MsERD15*定位于细胞质,与Cell-PLoc预测结果一致。对比其他植物ERD15的定位(拟南芥定位于细胞核和细胞质^[21],小麦主要定位于细胞核^[26]),*MsERD15*的细胞质定位提示其可能通过“细胞质信号传导”发挥作用,而非直接调控核内转录。结合本研究中*MsERD15*受ABA诱导表达的结果推测,其可能与细胞质中的ABI2同源蛋白结合,抑制其磷酸酶活性,进而激活SnRK2激酶,启动下游抗逆反应;或与MAPK激酶相互作用,通过磷酸化级联反应放大胁迫信号^[34],最终实现对干旱、高盐胁迫的响应。细胞质定位使其能更快速地感知胞内胁迫信号变化,与该基因在PEG和NaCl胁迫下快速启动表达的特征相契合,形成“信号感知-快速表达-信号传导”的功能链条。

酵母功能验证结果直接证实了*MsERD15*的抗逆功能,且与qRT-PCR的胁迫诱导表达特征形成强关联。本研究中,过表达*MsERD15*的酵母在NaCl和PEG处理下生长显著优于对照:在1.3 mol·L⁻¹ NaCl培养基上,对照酵母仅有零星菌落,而*MsERD15*过表达酵母生长状态良好;在135 mmol·L⁻¹ PEG胁迫下,对照酵母仅出现少量菌斑,而过表达菌株能正常生长。这一表型结果与qRT-PCR检测到的“*MsERD15*受高盐和PEG显著诱导

表达”形成逻辑闭环——胁迫条件下基因的诱导表达正是其发挥抗逆功能的前提,而酵母异源表达系统中该基因的高效表达,直接转化为抗逆表型的增强。酵母与植物的胁迫适应机制存在差异(如酵母通过合成甘油调节渗透,植物主要依赖脯氨酸),但 *MsERD15* 仍能发挥作用,说明其可能调控真核生物共有的基础抗逆通路——例如维持细胞膜稳定性、增强氧化还原平衡能力,或激活应激蛋白(如热激蛋白)表达^[35]。该结果与拟南芥 *AtERD15*^[21]、水稻 *OsERD15*^[25] 的功能验证结果一致,表明 *ERD15* 基因的抗逆功能具有进化保守性。

4 结论

本研究首次克隆并解析了紫花苜蓿 *MsERD15* 基因,证实其为豆科保守的细胞质定位蛋白,具有根中高表达及受 ABA、干旱、高盐诱导的特征,且能增强酵母的抗盐和抗渗透胁迫能力。这些结果不仅为理解紫花苜蓿抗逆分子机制提供了新视角,更为抗逆分子育种提供了重要候选基因。后续通过转基因紫花苜蓿验证及分子机制深入解析,有望为 *MsERD15* 在紫花苜蓿抗逆品种培育中的应用提供支撑。

参考文献

- [1] Food and Agriculture Organization of the United Nations. Innovative solutions to water scarcity: Building drought resilience for sustainable land and livelihoods [R]. Rome: FAO, 2024. [2026.06.18]. <https://www.fao.org/family-farming/detail/en/c/1730915/>. <https://hdl.handle.net/10568/162845>
- [2] 刘升学,马爱芳,秦峰,等. 植物抗旱性研究进展[J]. 科学通报,2025,70(25):4297-4314
LIU S X, MA A F, QIN F, et al. Research advances in plant drought resistance[J]. Chinese Science Bulletin, 2025, 70(25): 4297-4314
- [3] 杨翠苹,段俊枝,燕照玲,等. 植物抗旱功能基因研究进展[J]. 现代农业科技,2024(6):157-161,172
YANG C P, DUAN J Z, YAN Z L, et al. Research progress of drought-resistant functional genes in plants[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2024(6): 157-161, 172
- [4] 张帆,程玉臣,伍建辉,等. 植物抗旱途径及相关基因研究进展[J]. 现代农业,2022,47(6):38-41
ZHANG F, CHENG Y C, WU J H, et al. Research progress on drought resistance pathway and related genes in plants[J]. Modern Agriculture, 2022, 47(6): 38-41
- [5] ZHU J K. Salt and drought stress signal transduction in plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2002, 53: 247-273
- [6] CUTLER S R, RODRIGUEZ P L, FINKELSTEIN R R, et al. Absciscic acid: emergence of a core signaling network[J]. Annual Review of Plant Biology, 2010, 61: 651-679
- [7] YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses[J]. Annual Review of Plant Biology, 2006, 57: 781-803
- [8] FUJITA Y, FUJITA M, SHINOZAKI K, et al. ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants[J]. Journal of Plant Research, 2011, 124(4): 509-525
- [9] MUNNS R, TESTER M. Mechanisms of salinity tolerance[J]. Annual Review of Plant Biology, 2008, 59: 651-681
- [10] DEINLEIN U, STEPHAN A B, HORIE T, et al. Plant salt-tolerance mechanisms[J]. Trends in Plant Science, 2014, 19(6): 371-379
- [11] RAGHAVENDRA A S, GONUGUNTA V K, CHRISTMANN A, et al. ABA perception and signalling[J]. Trends in Plant Science, 2010, 15(7): 395-401
- [12] ZHANG H M, HAN W, DE SMET I, et al. ABA promotes quiescence of the quiescent centre and suppresses stem cell differentiation in the *Arabidopsis* primary root meristem[J]. The Plant Journal, 2010, 64(5): 764-774
- [13] 周鹏. “牧草之王”——紫花苜蓿[J]. 新疆畜牧业, 2013, 29(7): 56
ZHOU P. “King of forage”-alfalfa[J]. Animal Husbandry in Xinjiang, 2013, 29(7): 56
- [14] 张云春. 紫花苜蓿应用价值及丰产优质栽培技术科学实施关键分析[J]. 种子世界, 2025(8): 54-56
ZHANG Y C. Application value of alfalfa and key analysis of scientific implementation of high yield and high quality cultivation techniques[J]. Seed World, 2025(8): 54-56
- [15] 李雪,裴薇薇. 紫花苜蓿对土壤速效养分的影响及其地理气候调控机制[J]. 安徽农业科学, 2025, 53(14): 217-220
LI X, PEI W W. Effects of alfalfa cultivation on soil available nutrients and the regulatory role of geographic and climatic factors[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2025, 53(14): 217-220
- [16] 路之娟,张永清,张楚,等. 不同基因型苦荞苗期抗旱性综合评价及指标筛选[J]. 中国农业科学, 2017, 50(17): 3311-3322
LU Z J, ZHANG Y Q, ZHANG C, et al. Comprehensive evaluation and indicators of the drought resistance of different genotypes of *Fagopyrum tataricum* at seedling stage[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2017, 50(17): 3311-3322
- [17] 汪灿,周棱波,张国兵,等. 蕲艾种质资源苗期抗旱性鉴定及抗旱指标筛选[J]. 中国农业科学, 2017, 50(15): 2872-2887
WANG C, ZHOU L B, ZHANG G B, et al. Drought resistance identification and drought resistance indices screening of Job's tears (*Lacryma-jobi* L.) germplasm resources at seedling stage[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2017, 50(15): 2872-2887
- [18] 蔺豆豆,赵桂琴,琚泽亮,等. 15份燕麦材料苗期抗旱性综合评价[J]. 草业学报, 2021, 30(11): 108-121
LIN D D, ZHAO G Q, JU Z L, et al. Comprehensive evaluation of drought resistance of 15 oat varieties at the seedling stage[J].

- Acta Prataculturae Sinica, 2021, 30(11):108-121
- [19] 郭湘, 郭一帆, 黄思怡, 等. 干旱和盐胁迫对 14 个紫花苜蓿品种种子萌发特性的影响[J]. 草业科学, 2019, 36(9): 2292-2303
- GUO X, GUO Y F, HUANG S Y, et al. Effects of drought and salt stress on seed germination characteristics of 14 *Medicago sativa* varieties[J]. Pratacultural Science, 2019, 36(9): 2292-2303
- [20] WU G F, TIAN N F, SHE F W, et al. Characteristics analysis of Early Responsive to Dehydration genes in *Arabidopsis thaliana* (AtERD)[J]. Plant Signaling & Behavior, 2023, 18(1): 2105021
- [21] KARIOLA T, BRADER G, HELENIUS E, et al. EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15, a negative regulator of abscisic acid responses in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2006, 142(4):1559-1573
- [22] 熊慧, 吕桂珍, 李冬兵, 等. 拟南芥 ERD15 基因缺失突变体的分子鉴定和表型分析[J]. 热带亚热带植物学报, 2020, 28(5): 505-512
- XIONG H, LÜ G Z, LI D B, et al. Molecular identification and phenotype of *Arabidopsis thaliana* mutant erd15[J]. Journal of Tropical and Subtropical Botany, 2020, 28(5):505-512
- [23] KIYOSUE T, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K. Cloning of cDNAs for genes that are early-responsive to dehydration stress (ERDs) in *Arabidopsis thaliana* L.: identification of three ERDs as *HSP* cognate genes[J]. Plant Molecular Biology, 1994, 25(5):791-798
- [24] AALTO M K, HELENIUS E, KARIOLA T, et al. ERD15—An attenuator of plant ABA responses and stomatal aperture[J]. Plant Science, 2012, 182:19-28
- [25] 李冬鹏, 李宛鸿, 吴浩, 等. 水稻 ERD15 基因家族成员鉴定及表达分析[J/OL]. <https://link.cnki.net/urlid/46.1068.S.20240514.1541.010,2024-05-11/2025-09-15>
- LI D P, LI W H, WU H, et al. Identification and expression analysis of rice ERD15 gene family members[J/OL]. <https://link.cnki.net/urlid/46.1068.S.20240514.1541.010,2024-05-11/2025-09-15>
- [26] 张艳菲. 小麦 TaSnRK_{2.10} 磷酸化 TaERD15 与 TaENO1 增强水稻抗旱性[D]. 郑州:河南农业大学, 2022:46
- ZHANG Y F. TaSnRK_{2.10} from wheat phosphorylates TaERD15 and TaENO1 and confers drought tolerance in rice[D]. Zhengzhou:Henan Agricultural University, 2022:46
- [27] 张婷婷, 杨美英, 王春红, 等. 盐碱胁迫下不同水稻品种渗透调节物质及相关基因的变化[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2016, 44(4):39-47
- ZHANG T T, YANG M Y, WANG C H, et al. Changes in osmolytes and related genes of different rice varieties under saline-alkali stress[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2016, 44(4):39-47
- [28] ZHANG M M, ZHANG S Q. Mitogen-activated protein kinase cascades in plant signaling[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2022, 64(2):301-341
- [29] 高嵩, 林广宇, 孙航, 等. 干旱胁迫及复水对甘草早期实生苗根系生长的影响[J]. 东北师大学报(自然科学版), 2025, 57(2):104-108
- GAO S, LIN G Y, SUN H, et al. Effects of drought and rehydration on root growth in early seedling of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch[J]. Journal of Northeast Normal University (Natural Science Edition), 2025, 57(2):104-108
- [30] 杨佳伟, 辜忠春, 胡琦, 等. 干旱胁迫对 5 种不同根型树种幼苗干物质分配和根系形态的影响[J]. 生态环境学报, 2025, 34(10):1547-1557
- YANG J W, GU Z C, HU Q, et al. Effects of drought stress on dry matter distribution and root morphology in seedlings of five tree species with varying root types[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2025, 34(10):1547-1557
- [31] 李丽华, 薛冰洁, 王亚乐, 等. 干旱-复水对烤烟‘YY021’苗期生理指标及干旱相关基因表达量的影响[J]. 中国农学通报, 2025, 41(8):57-62
- LI L H, XUE B J, WANG Y L, et al. Effects of drought-rehydration on physiological indexes and drought-related gene expression of ‘YY021’ seedlings[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2025, 41(8):57-62
- [32] SHAO H B, LIANG Z S, SHAO M G. *LEA* proteins in higher plants: structure, function, gene expression and regulation[J]. Colloids and Surfaces B:Biointerfaces, 2005, 45(3/4):131-135
- [33] TENHAKEN R. Cell wall remodeling under abiotic stress[J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 5:771
- [34] HIRAYAMA T, UMEZAWA T. The PP2C - SnRK2 complex[J]. Plant Signaling & Behavior, 2010, 5(2):160-163
- [35] 邵玲, 陈向荣. 热激蛋白与植物的抗逆性[J]. 北方园艺, 2005(3):73-74
- SHAO L, CHEN X R. Study of the heat - shock protein and the plant stress resistance physiology [J]. Northern Horticulture, 2005(3):73-74

(责任编辑 刘婷婷)