

网络出版时间:2026-04-10

网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/61.1359.S.20260409.1100.006

大麦*HvERECTA* 基因异源表达调控 拟南芥气孔发育及其抗旱分子机制研究

侯昌林, 杨泽亚, 韩 燚, 苟筱颖, 李 明, 曹高燚, 丁 博, 谢晓东, 陈小强

(天津农学院农学与资源环境学院, 天津 300392)

摘要: *ERECTA* 受体样激酶家族在植物气孔发育及非生物胁迫响应中具有重要作用。为明确大麦 *HvERECTA* 基因在气孔发育及干旱胁迫响应中的调控机制, 挖掘大麦抗旱分子育种新靶点, 克隆获得大麦 *HvERECTA* 基因并进行生物信息学分析, 构建异源过表达载体转化拟南芥, 系统测定转基因株系的气孔表型、关键基因表达水平及干旱胁迫下的生理指标。结果表明, *HvERECTA* 基因编码区全长 2 934 bp, 编码 977 个氨基酸, 编码蛋白定位于质膜且含典型丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶结构域, 在禾本科植物中高度保守; 该基因的启动子区域富含 ABRE、MBS 等逆境胁迫及激素响应元件。转基因拟南芥气孔密度显著降低, 气孔发育关键转录因子 SPCH、MUTE、FAMA 的编码基因表达量下调幅度均超 50%, MAPK 通路核心基因 YODA 表达上调 50%~80%; 干旱胁迫下, 转基因拟南芥株系超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)活性较对照提升 25%~40%, 丙二醛含量下降约 30%, 失水速率降低 20%, 胁迫响应基因 *AtKIN2*、*AtABF3*、*AtRD22* 表达量均显著上调。综上所述, 大麦 *HvERECTA* 基因通过调控 MAPK 信号通路降低气孔密度、增强植株抗氧化能力, 从而提升抗旱性, 为小麦抗旱分子育种提供了重要的功能基因资源。

关键词: 大麦; *HvERECTA* 基因; 气孔发育; 气孔密度; 气孔开度; 干旱胁迫

中图分类号: S512.3; S330

文献标识码: A

文章编号: 1009-1041(2026)08-1014-15

Molecular Mechanism of the Barley *HvERECTA* Gene in Regulating Stomatal Development and Drought Resistance through Heterologous Expression in *Arabidopsis*

Hou Changlin, Yang Zeya, Han Yi, Gou Xiaoying, Li Ming,

Cao Gaoyi, Ding Bo, Xie Xiaodong, Chen Xiaoqiang

(College of Agronomy and Resources Environment, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300392, China)

Abstract: The *ERECTA* family of receptor-like kinases (RLKs) plays a crucial regulatory role in plant stomatal development and responses to abiotic stresses. This study therefore focused on investigating the barley *HvERECTA* gene, aiming to clarify its regulatory roles in these biological processes and provide potential targets for barley drought resistance breeding. We first cloned the *HvERECTA* gene from barley and conducted comprehensive bioinformatics analyses to characterize its sequence and protein properties. Subsequently, we constructed a heterologous overexpression vector carrying the *HvERECTA* gene and transformed it into *Arabidopsis thaliana*. For the transgenic *Arabidopsis* lines, we systematically determined stomatal phenotypic traits, expression levels of the key related genes, and physiological indicators under drought stress conditions to evaluate the gene function. The bioinformatics analysis results showed that the full-length coding sequence (CDS) of *HvERECTA* is 2 934

收稿日期: 2025-11-23

修回日期: 2026-01-08

基金项目: 国家农业科技重大项目 (DK077701); 天津市大学生创新训练计划项目 (202510061232)

第一作者 E-mail: houcl0725@163.com (侯昌林)

通讯作者 E-mail: xiex@tjau.edu.cn (谢晓东); chenxia9663@126.com (陈小强)

bp, encoding a protein of 977 amino acids. The *HvERECTA* protein is localized to the plasma membrane and contains a typical serine/threonine protein kinase domain, which is a hallmark of the receptor-like kinase family. Sequence alignment and phylogenetic analysis revealed that *HvERECTA* is highly conserved among gramineous plants, with the highest homology to those from wheat (*Triticum aestivum*) and ryegrass (*Lolium perenne*). Additionally, analysis of *cis*-acting elements in the *HvERECTA* promoter region indicated that it is rich in regulatory elements associated with abiotic stress responses and plant hormone signaling, such as abscisic acid (ABA)-responsive elements (ABRE) and drought-responsive elements (MBS). Phenotypic observations on the transgenic *Arabidopsis* lines showed that overexpression of *HvERECTA* significantly reduced stomatal density compared with the wild-type control. Molecular analysis demonstrated that the expression levels of genes encoding key stomatal development transcription factors, namely SPCH (SPEECHLESS), MUTE, and FAMA, were all downregulated by more than 50% in the transgenic lines. In contrast, the expression level of *YODA*, a core gene in the mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade pathway that is involved in stomatal development regulation, was upregulated by 50%–80% in the transgenic plants. Under drought stress, the transgenic *Arabidopsis* lines showed enhanced drought resistance-related physiological performance. Specifically, the activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), and catalase (CAT) in the transgenic lines were increased by 25%–40% compared with the control. Meanwhile, the content of malondialdehyde (MDA), which is an indicator of lipid peroxidation and cellular damage under stress, was decreased by approximately 30% in the transgenic lines. Additionally, the water loss rate of the transgenic lines was reduced by 20%, and their relative water content was higher than that of the control. Furthermore, the expression levels of stress-responsive genes, including *AtKIN2*, *AtABF3*, and *AtRD22*, showed no abnormal changes under normal growth conditions but were significantly upregulated under drought stress in the transgenic lines. In conclusion, the barley *HvERECTA* gene enhances plant drought resistance by regulating the MAPK signaling pathway to reduce stomatal density and by improving the activity of the plant antioxidant defense system. These two regulatory pathways collectively enhance the water retention capacity of plants under drought stress, thereby improving their stress tolerance. This study clarifies the important regulatory role of *HvERECTA* in stomatal development and abiotic stress response, and provides an important functional gene resource for drought-resistant molecular breeding of barley.

Keywords: *Hordeum vulgare*; *HvERECTA* gene; Stomatal development; Stomatal density; Stomatal aperture; Drought stress

气孔作为表皮层特化的复合体^[1],是植物与外界环境进行气体交换的核心门户,在调控光合作用、碳同化效率、蒸腾作用以维持水分利用效率平衡中发挥着枢纽作用^[2-3]。由于气孔发育过程涉及细胞命运的调控、细胞极性分裂、细胞间通讯以及对内源信号和环境因子变化的响应,因而气孔发育已成为研究植物诸多发育过程的理想途径之一,气孔发育机制的解析也发展成植物发育生物学与生理生态学领域的重要研究方向,其研究结果对于理解植物表皮器官形成规律及其适应性调控具有重要的理论意义和应用价值。

植物通过动态调控气孔指数、密度及开度,实

现光合作用与水分利用之间的平衡^[4]。在模式植物拟南芥中,ERECTA (ER) 受体样激酶及其同源基因 *ERL1/2* 在气孔发育调控中发挥核心作用^[5-6]。该家族成员通过感知来源于表皮或叶肉组织的小肽信号,激活 MAPK 级联反应,从而精细调控气孔前体细胞的分裂与分化,维持气孔的合理密度与排列^[7-8]。ER 家族不仅参与气孔形成,还广泛调控植物的生长发育过程^[9-10],如茎伸长^[11]、花序形态^[12]、叶片发生、种子大小等^[13-15]。同时,ER 基因介导的信号途径在逆境响应中亦具有重要作用,参与植物的蒸腾调节^[16]、光照适应及干旱与高温胁迫耐受性形成^[17]。研究表明,

拟南芥 *AtERECTA* 通过调控气孔密度与开度,优化蒸腾效率,从而增强植株的干旱适应性^[16,18];其同源基因 *OsERL1* 在水稻中过表达可显著降低气孔密度并提高水分利用效率^[19-20],进一步支持了 *ERECTA* 通路在单、双子叶植物中对气孔发育与抗旱性的保守调控作用。目前在单子叶作物中,相对于水稻、玉米等作物,大麦 *ERECTA* 家族成员的相关研究仍相对有限。大麦 (*Hordeum vulgare*) 作为重要的粮食与饲用作物,其气孔结构特征与干旱适应能力密切相关,但 *HvERECTA* 基因的具体生物学功能及其在干旱胁迫响应中的调控机制仍不清晰。因此,系统解析大麦 *HvERECTA* 的结构特征与生物学功能,对于揭示禾本科植物气孔发育的分子机制及作物抗旱改良具有重要意义。

前期研究已成功克隆并获得大麦 *HvERECTA* 基因全长序列,开展了序列特征与表达模式分析,初步表明该基因可能参与大麦对非生物胁迫的响应过程^[21]。由于大麦转化体系复杂且周期较长, *HvERECTA* 在大麦植株体内的具体功能及分子作用机制尚未得到实验证实。为进一步解析大麦 *HvERECTA* 基因的生物学功能,本研究选择模式植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 作为异源表达系统,构建大麦 *HvERECTA* 基因过表达株系,系统分析其在干旱胁迫下的生理特征、气孔发育表型及胁迫响应相关基因的表达变化,以揭示大麦 *HvERECTA* 基因在气孔发育调控与干旱胁迫响应中的潜在分子机制,为阐明 *ERECTA* 基因通路在禾本科作物中的保守功能及其在抗旱育种中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料为2023年收获的大麦品种 Morex,由天津农学院天津-布里斯托环境变化对农作物影响研究中心提供。取50粒大小均匀、颗粒饱满的大麦种子,置于三角瓶中,依次进行以下消毒处理:75%酒精浸泡1 min,蒸馏水冲洗2~3次;5%次氯酸钠浸泡10 min,蒸馏水冲洗2~3次。将消毒后的种子均匀摆放于铺有两层湿润纱布的玻璃培养皿中,置于人工气候箱内进行萌发培养。培养条件:温度24℃,相对湿度70%,光照强度3 000 Lx,光周期为16 h光照/8 h黑暗,全程以蒸馏水保持纱布湿润。

1.2 大麦 *HvERECTA* 基因克隆及生物信息学分析

1.2.1 总RNA提取及cDNA合成

将生长3 d的大麦苗叶片剪下,迅速置于液氮中,快速研磨成粉末状,使用 FastPure Universal Plant Total RNA Isolation Kit 试剂盒(诺唯赞,南京)提取总RNA,用1%琼脂糖凝胶电泳检测质量,用 PrimeScript™ RT Master Mix 反转录试剂盒(Takara,北京)将RNA反转录为cDNA,于-20℃保存备用。

1.2.2 基因克隆及生物学信息分析

在 <https://plants.ensembl.org/index.html> 下载大麦 *HvERECTA* 基因序列(ID: HORVU. MOREX. r3. 7HG0662630. 1),利用 Primer3Plus 网站(<https://www.primer3plus.com>)设计大麦 *HvERECTA* 基因编码区 PCR 扩增引物(HvER-F: 5'-ATGGCGACCACGGCGAC-3'; HvER-R: 5'-CTACTCCGTGTTGTGGGAGATGG-3')。以反转录得到的大麦 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增体系:cDNA 模板 1 μL,引物 HvER-F 和 HvER-R 各 1 μL, PrimeSTAR® Max DNA Polymerase 25 μL, ddH₂O 22 μL,共 50 μL。扩增程序:98℃ 10 s, 55℃ 15 s, 72℃ 90 s, 35 个循环。将 PCR 产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后,用 MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit 柱式 DNA 胶回收试剂盒(Takara,北京)进行回收纯化处理后,将纯化样本送至上海生工生物工程股份有限公司开展测序分析。利用生物信息学分析相关网站对大麦 *HvERECTA* 基因序列特征与编码蛋白进行生物信息学预测分析(表1)。

1.2.3 亚细胞定位

采用 PEG 介导的原生质体转染法进行亚细胞定位分析。首先构建 pDH51-GFP-HvERECTA 融合表达载体(以 pDH51-GFP 空载体为阴性对照);选取生长 10 d 的大麦幼苗叶片,通过酶解法提取原生质体并调整浓度至 1×10^6 cells · mL⁻¹;分别将融合表达载体与空载体质粒转入原生质体,25℃避光孵育12~16 h后,利用透射荧光显微镜进行观察 GFP 荧光信号分布,具体方法参照相关文献^[22]。

1.2.4 启动子顺式作用元件分析

参考大麦基因组数据库信息,获取 *HvERECTA* 基因 ATG 上游 2.2 kb 的序列片段,作为该基因的候选启动子区,利用在线工具 Plant CARE 对

表 1 生物信息学分析相关网站
Table 1 Websites related to bioinformatics analysis

名称 Name	网址 Website	功能 Function
ORF	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/	查找大麦 <i>ERECTA</i> 基因所包含的编码区序列 Search for the coding region sequence contained in barley <i>ERECTA</i> gene
CDD	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml	分析蛋白的保守结构域 Analyzing the conserved domains of the protein
ProtParam tool	https://web.expasy.org/protparam/	预测蛋白理化性质 Predicting the physicochemical properties of the protein
TMHMM Server v. 2.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/	预测蛋白跨膜结构域 Predicting the transmembrane domains of the protein
SignalP-5.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/	预测蛋白信号肽 Predicting signal peptides
SOPMA	https://www.expasy.org/search/SOPMA	预测蛋白二级结构 Predicting the secondary structure of the protein
SWISS-MODEL	https://swissmodel.expasy.org/	预测蛋白三级结构 Predicting the tertiary structure of the protein
MEGA7.0		构建系统进化树 Constructing a phylogenetic tree

启动子序列的顺式作用元件进行分析。

1.3 大麦*HvERECTA* 基因异源过表达拟南芥的获得及生理指标分析

1.3.1 载体构建

为获得 p3301-121-*HvERECTA* 表达载体, 选用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切得到 p3301-121 线性载体。同时, 设计带有 p3301-121 载体同源臂引物(F: 5'-CACGGGGGACTCTAG-AATGGCGACACGGCGAC-3'; R: 5'-ATTC-GAGCTCAAGCTTCTACTCCGTGTTGTGGG AGATGG-3')对大麦*HvERECTA* 基因进行扩增, 回收目的条带通过同源重组法将大麦*HvERECTA* 基因连接到 p3301-121 载体上, 进行拟南芥遗传转化。

1.3.2 转基因植物的获取与分子鉴定

利用农杆菌热激转化法将载体 p3301-121-*HvERECTA* 转入农杆菌 GV3101, 通过农杆菌侵染法对生长三周拟南芥 Col-0 进行转化。将农杆菌接种于添加利福平和卡那霉素的液体 LB 培养基中, 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~1.0, 离心去上清, 用 5% 蔗糖溶液重悬溶液后加入适量 Silwet-L-77, SilwetL-77 浓度保持在 0.01%~0.05%, 混匀。将拟南芥花序完全浸没在菌液中, 避光处理 12 h。间隔 7 d 后进行二次浸染。待种子成熟后, 收取种子进行筛选。收获 T₀ 代转基因拟南芥种子, 按单株系进行后代鉴定与纯合化筛选; 首先将各株系种子分别播种, 通过抗除草剂筛选获

得对应株系的阳性植株; 随后选取各株系阳性植株, 提取基因组 DNA, 对目的基因进行 PCR 扩增验证, 进一步确认转基因阳性株系; 对鉴定正确的阳性株系提取拟南芥 RNA 并进行 qRT-PCR 检测。根据相应序列设计基因特异性引物(q*HvERECTA*-F: 5'-ATTGGCTGGTGTGTCCCT-3'; q*HvERECTA*-R: 5'-CAGCCTTCGAGATTGTGGTTT-3')。以引物 (Actin-F: 5'-TGGATCGGAGGGTCCATCCT-3'; Actin-R: 5'-GCACTTCCTGTGGACGATCGCTG-3') 作为对照。反应体系参照供应商所推荐的体系进行, 其中 2×UltraSYBR Mix 10 μL, 引物 q*HvERECTA*-F、q*HvERECTA*-R、Actin-F、Actin-R 各 1 μL, 模板 1 μL, 补水至 20 μL。所得数据采用 2^{-ΔΔCT} 法计算分析。筛选得到*HvERECTA* 高表达的阳性株系, 将其连续自交纯化, 待株系达到稳定纯合状态且后代无性状分离时, 分别采收各纯合株系种子, 供后续相关实验使用。

1.3.3 过表达拟南芥离体叶片的失水率测定

选生长状态一致的过表达拟南芥与野生型拟南芥植株, 取大小均一的莲座叶迅速称量并记录初始鲜重。将叶片正面朝上平铺放置, 设置环境条件为 25℃、相对湿度 40%~50%; 此后每隔 30 min 精准称量叶片鲜重并记录数据, 持续处理 5 h, 每个处理设置 3 次生物学重复。叶片失水率=(初始鲜重-处理后鲜重)/初始鲜重×100%。

1.3.4 气孔数量测定

各株系分别选取 3 株独立植株, 每株取 2 片

功能叶(如第4~第5片真叶),分别撕取叶片下表皮作为观察样本,使用PSM-1000型显微镜对每个样本随机拍摄10个不重叠视野,记录气孔分布及表型特征,统计所有视野的有效数据,整理后进行统计分析。

1.3.5 气孔表型及开度测定

各株系分别选取3株独立植株,每株取2片长势一致的完全展开功能叶(第4~第5片真叶),使用手术刀片和镊子撕取叶片下表皮作为观察样本。

(1)气孔表型及开度测定。将制备合格的下表皮条放入盛有Mes-KCl缓冲液($10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Mes、 $50\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl、 $0.1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 , pH=5.6)的培养皿($\Phi 12\text{ cm}$)中,在 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 光照培养箱中悬浮静置培养2 h。随后,将制备的叶片下表皮条分别转移至含有 $10\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA缓冲液中进行处理,另一组转移至不加ABA的缓冲液中作为对照组。在 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 光照培养箱悬浮静置培养1 h,培养结束后取样观察气孔开度。

(2)气孔开度测定。将制备合格的下表皮条,采用PSM-1000型正置荧光显微镜对不同处理组样本进行拍摄,每个表皮样本随机选取10~20个不重叠视野。利用Image J软件定量分析气孔开度,先通过标尺工具完成像素校准(校准参数:320 px=50 μm),再将气孔像素值换算为实际孔径,每个视野测定2~4个清晰气孔的孔径,每个处理组累计获得足量原始数据。数据统计采用中位数法结合箱线图分析,以反映气孔开度的集中趋势并直观呈现数据分布特征,统计结果用于后续实验分析^[23-24]。

1.3.6 干旱胁迫处理

将野生型Col-0与大麦*HvERECTA*基因过表达株系的种子经消毒灭菌后播于MS固体培养基中,待幼苗长至四叶期,选取长势一致的幼苗移栽至育苗穴盘(规格:54 cm×28 cm;单穴尺寸:6.5 cm×6.5 cm×3.5 cm),穴内装填营养土与蛭石的混合基质(营养土:蛭石=1:1,体积比),每穴定植1株幼苗。植株置于人工气候室培养4周,条件为16 h光照/8 h黑暗、温度 $22\text{ }^\circ\text{C}$ 、相对湿度65%。实验设置对照组与3种干旱胁迫处理组。对照组:每3 d浇蒸馏水500 mL,维持基质含水量稳定;自然干旱复水胁迫组:停止浇水10 d,期间不进行任何补水处理,之后浇蒸馏水

500 mL复水处理,复水3 d后取样;PEG6000模拟干旱胁迫组:每3 d向育苗盘浇灌500 mL 20% PEG6000溶液,持续处理6 d,处理结束后取样;甘露醇模拟干旱胁迫组:每3 d向育苗盘浇灌500 mL甘露醇溶液($200\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$),处理时长与PEG6000组一致。

1.3.7 表型观察与生理生化指标测定

胁迫处理结束后,对拟南芥植株的生长状态及可见表型进行记录。同时,采用生工生物商业试剂盒测定植株丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化氢酶(CAT)活性及过氧化物酶(POD)活性。

1.4 数据处理

采用SPSS 23.0与GraphPad Prism 10.3软件进行统计分析 & 双因素方差分析(two-way ANOVA)。所有图表的绘制与整理均用Origin 2024软件完成。

2 结果与分析

2.1 大麦*HvERECTA*基因克隆及生物信息学分析

2.1.1 *HvERECTA*基因的克隆

根据Ensembl Plants数据库提供的大麦*HvERECTA*基因编码序列,设计其全长CDS区特异引物,以反转录cDNA为模板进行PCR扩增。扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测,得到约3 000 bp条带(图1),与目标基因的预期大小一致。对PCR产物进行胶回收纯化并测序,结果显示,获得的大麦*HvERECTA*基因编码区长度为2 934 bp,序列完整且正确。

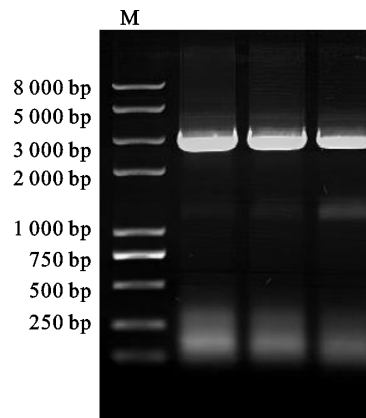


图1 大麦*HvERECTA*基因PCR扩增结果

Fig.1 Result of PCR amplification of *HvERECTA* gene in barley

2.1.2 *HvERECTA* 基因编码蛋白理化性质分析

通过 ProtParam 在线工具对大麦 *HvERECTA* 蛋白的理化性质进行分析,该蛋白由 977 个氨基酸组成,预测分子量约为 106.31 kD,理论等电点为 5.93,属于酸性蛋白。此蛋白不稳定指数为 32.29,低于 40,说明其结构较为稳定;平均亲水性指数为-0.017,呈弱亲水性(图 2);脂肪族氨基酸指数达到 104.29,表明该蛋白中脂肪族氨基酸比例较高。经亚细胞定位预测,*HvERECTA* 蛋白较可能定位于细胞膜,与其作为受体样激酶的功能特性相一致。

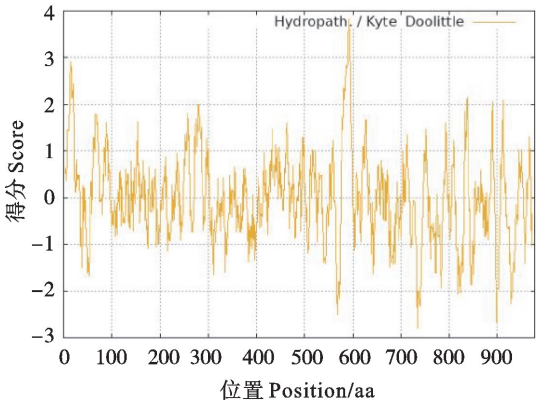


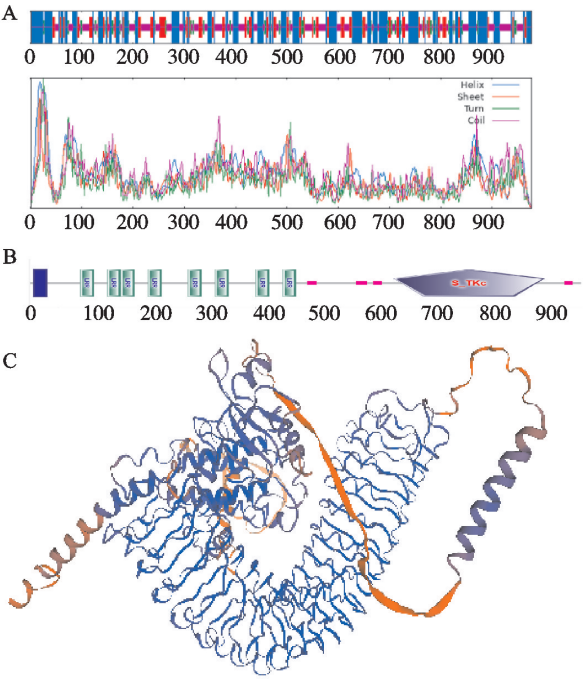
图 2 大麦 *HvERECTA* 蛋白亲水性分析
Fig.2 Hydrophilicity analysis of the *HvERECTA* protein in barley

2.1.3 *HvERECTA* 蛋白结构预测

通过 SOPMA 在线工具对大麦 *HvERECTA* 蛋白的二级结构进行预测(图 3A),该蛋白以 α 螺旋和无规则卷曲为主要结构形式,包含一定比例的延伸链和 β 转角。其中, α 螺旋数量最多,共包含 373 个氨基酸,占总长度的 38.18%;无规则卷曲由 354 个氨基酸组成,占 36.23%;延伸链含 173 个氨基酸,占 17.71%; β 转角最少,共 77 个氨基酸,占 7.88%。利用 PredictProtein 工具进行预测,所得结果与 SOPMA 分析一致,进一步验证了预测的可靠性。对大麦 *HvERECTA* 蛋白结构进行 SMART 在线分析(图 3B),发现该蛋白含有典型的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶结构域(S_TKc),表明其属于受体样激酶家族中丝氨酸/苏氨酸特异性激酶亚类,为其参与信号传导及胞外刺激感知提供了结构基础。

利用 SWISS-MODEL 在线工具对大麦 *HvERECTA* 蛋白进行同源建模,结果(图 3C)表明该蛋白的二级结构与上述预测结果一致。进一步比对蛋白质二级结构模型发现,*HvERECTA* 蛋白序列

与模板序列(I1Z695.1.A:梗稻 ER2)的序列覆盖率达 84.98%,同源性较高。



A: 二级结构; B: 结构域; C: 三级结构。
A: Secondary structure; B: Domain; C: Tertiary structure.

图 3 大麦 *HvERECTA* 蛋白结构预测

Fig.3 Protein structure prediction of *HvERECTA* in barley

2.1.4 *HvERECTA* 蛋白跨膜结构和信号肽预测

利用在线工具 TMHMM 和 Phobius 对大麦 *HvERECTA* 蛋白进行跨膜结构预测,结果(图 4)显示,该蛋白含有 1 个跨膜结构域,表明其为典型膜蛋白。具体结构分布:胞外区(1~577 aa)包括信号肽 N-region(1~4 aa)、H-region(5~20 aa,疏水段)和 C-region(21~25 aa,极性段)以及非胞内域(26~577 aa),结合 SWISS-MODEL 同源建模结果推测,非胞内域可能形成 LRR 或 L-domain 型折叠结构,进而参与小分子或蛋白配体的识别;跨膜区(578~598 aa)为单个 α 螺旋段,作为质膜锚定区,连接胞外识别区与胞内信号域;胞内区(599~977 aa)为完整激酶结构域,包括磷酸化催化核心和底物结合区,负责胞内信号转导。此外,信号肽预测显示该蛋白存在信号肽的概率为 99.24%,提示大麦 *HvERECTA* 蛋白可能通过分泌途径定位于质膜。

2.1.5 *HvERECTA* 蛋白亚细胞定位

为明确大麦 *HvERECTA* 蛋白的亚细胞定位特征,构建了大麦 *HvERECTA* 基因与绿色荧光蛋白(GFP)的融合表达载体,瞬时转化至大麦原

生质体。对转化后的原生质体荧光信号分布进行观察,结果(图 5)显示,GFP 对照原生质体的绿色荧光信号在细胞质和细胞核中均匀分布,而 HvERECTA-GFP 融合蛋白的绿色荧光信号主要集中于细胞膜,呈环状模式分布于细胞周缘,细胞质中未见明显荧光信号累积现象。该结果表明,大麦 HvERECTA 蛋白定位于细胞膜。

2.1.6 HvERECTA 同源蛋白序列比对及系统发育进化关系

借助 NCBI 数据库对大麦 HvERECTA 全长蛋白序列进行 BlastP 比对,构建系统进化树(图 6),结果发现大麦 HvERECTA 蛋白序列与小麦(*Triticum aestivum*)、黑麦草(*Lolium multiflorum*)相似性较高。

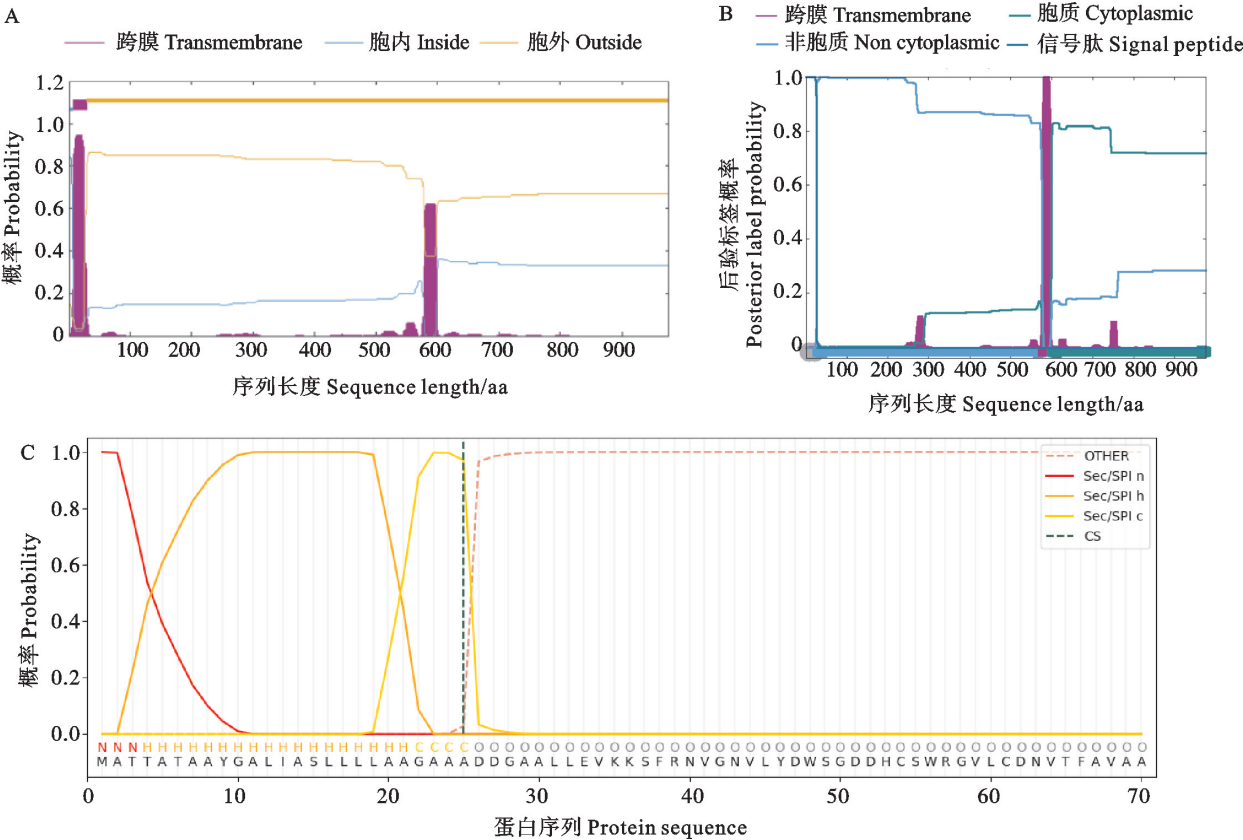


图 4 大麦 HvERECTA 蛋白跨膜结构域(A,B)和信号肽分析(C)

Fig. 4 Transmembrane domains(A, B) and signal peptide analysis(C) of the HvERECTA protein in barley

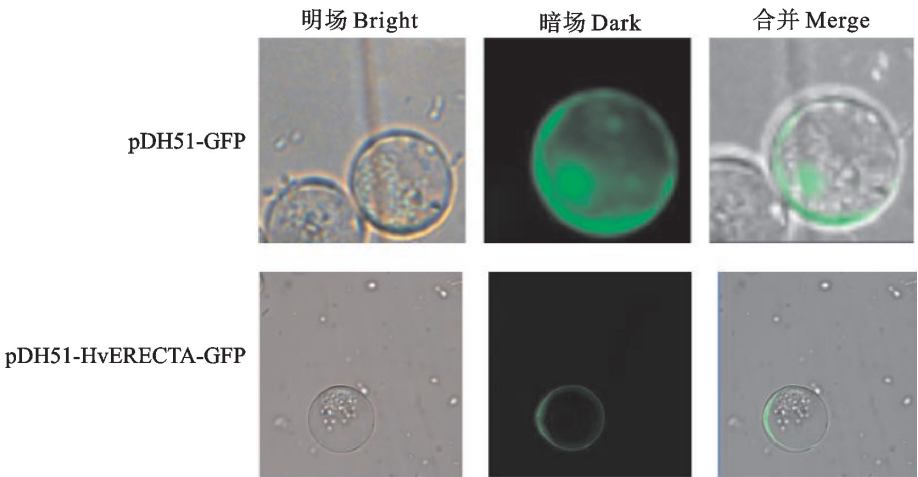


图 5 大麦 HvERECTA 亚细胞定位 (Bar=5 μm)

Fig. 5 Subcellular localization of the HvERECTA in barley (Bar=5 μm)

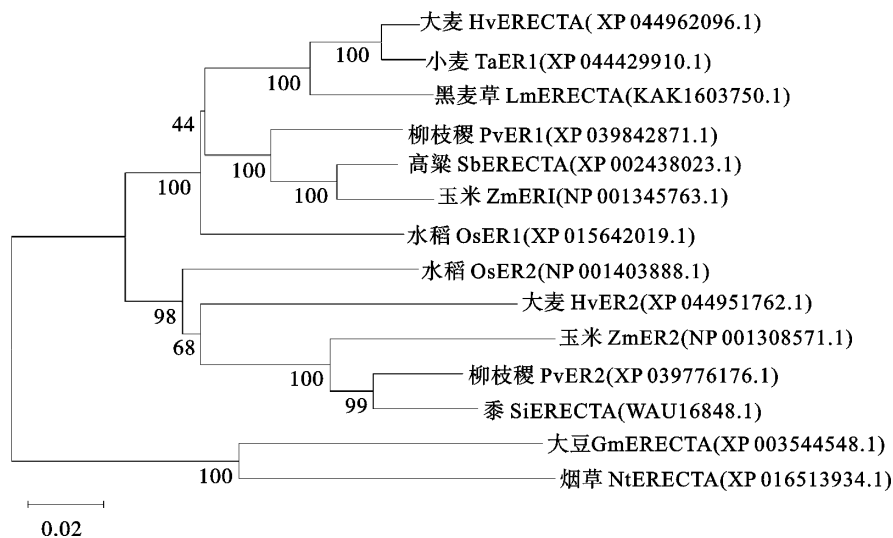


图 6 大麦 *HvERECTA* 蛋白进化树分析

Fig. 6 Phylogenetic tree analysis of the *HvERECTA* protein in barley

2.1.7 *HvERECTA* 基因启动子顺式作用元件分析

运用 Plant CARE 数据库,对大麦*HvERECTA* 基因翻译起始密码子(ATG)上游约 2.2 kb 的启动子序列展开分析。结果(图 7)显示,该启动子序列中分布有多种与激素信号应答、环境胁迫耐受及生长发育调控相关的潜在顺式作用元件。序列中检测到多个 CAAT-box 和 CAT-box 元件,表明其具有典型的核心启动子结构。在该区域内还鉴定到多种与 ABA 信号传导和胁迫响应相关的元件,包括 ABA 响应元件(ABRE)、脱水响应元件核心序列(DRE core)、MYB 转录因子结合位点(MYB/MBS)、MYC 转录因子结合位点(MYC)以及应激响应元件(STRE)等,这些元件可能参与植物对干旱、高盐等非生物胁迫以及 ABA 介导的信号通路的响应调控。此外,该启动子区域还包含多种植物激素应答相关顺式作用元件,包括赤霉素(GA)响应元件 GARE-motif、乙烯(ETH)响应元件 ERE、水杨酸(SA)响应元件 as-1、生长素(IAA)响应元件 TGA-element 及茉莉酸(JA)响应元件 TCA-element 等。上述结果

表明,大麦*HvERECTA* 基因的表达受到多种植物激素的协同调控,其启动子序列中含有多种参与激素信号转导及胁迫响应的顺式作用元件,可为解析该基因在激素调控网络及抗逆通路中的功能提供重要线索。

2.2 大麦*HvERECTA* 基因异源表达对拟南芥干旱耐受性及相关生理特性的影响

2.2.1 拟南芥转基因株系的筛选与鉴定

对通过蘸花法得到的转基因拟南芥植株进行抗性筛选,得到具有 Basta 除草剂抗性的幼苗,生长状态良好(图 8A)。通过 PCR 扩增进一步确认阳性转基因植株,结果(图 8B)表明,阳性转基因株系可扩增出与目的基因对应的特异性条带,而阴性对照(野生型)未出现相应条带。选取阳性株系,通过 qRT-PCR 检测基因表达量。结果(图 8C)显示,不同转基因株系中大麦*HvERECTA* 基因的表达量存在差异,转基因株系 L5 的目的基因表达水平最高。待各转基因株系成熟后,按株系单独收获种子,经扩繁扩增后保存,为后续相关实验提供稳定的材料支持。

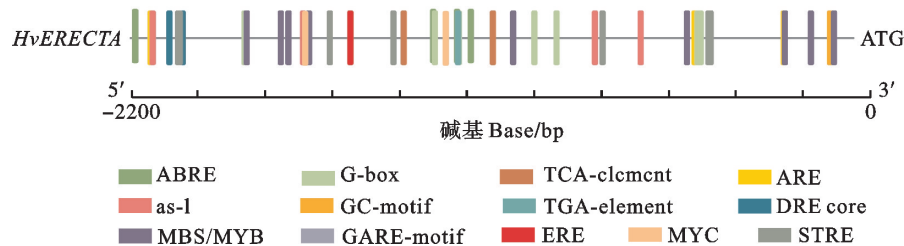


图 7 大麦*HvERECTA* 基因启动子顺式作用元件分析

Fig. 7 Analysis of *cis*-acting elements in the promoter of the *HvERECTA* gene in barley

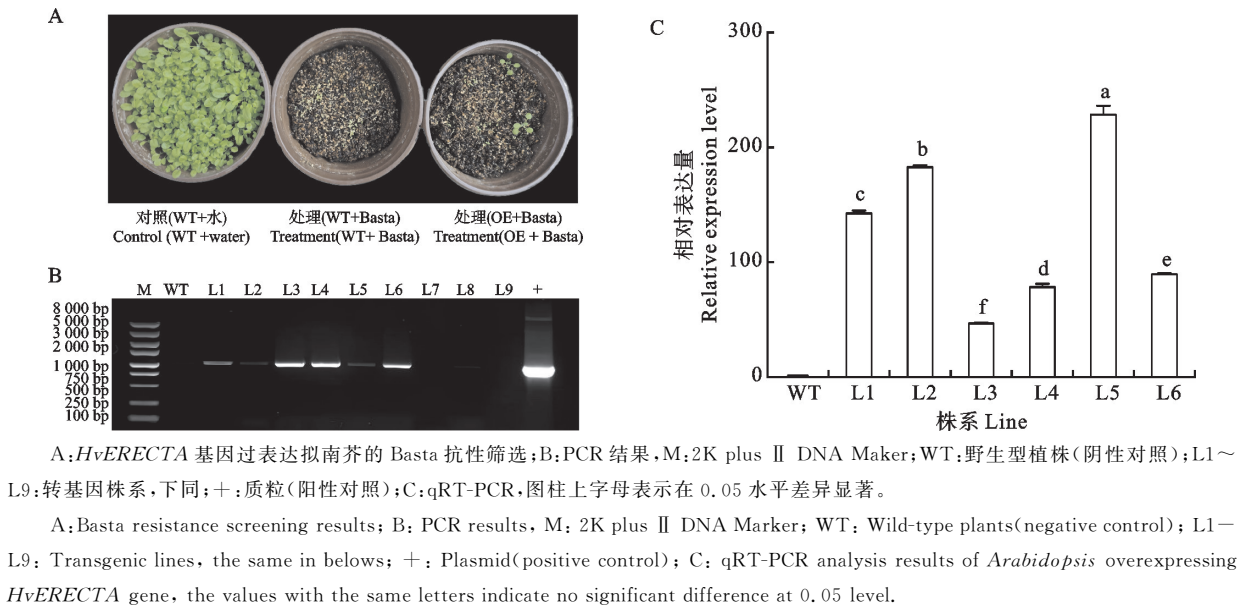


图 8 *HvERECTA* 基因过表达拟南芥株系鉴定

Fig. 8 Identification of *Arabidopsis* lines overexpressing *HvERECTA* gene

2.2.2 *HvERECTA* 基因过表达对拟南芥叶片形态表型及抗逆相关生理指标的影响

对叶片失水率进行测定后发现,在不同处理时间梯度下,转基因株系的水分散失率均低于野生型植株。尤其在处理进行至 5 h 后,转基因株系的水分散失率与野生型相比呈现出显著差异($P<0.05$),这一结果直观反映了转基因材料在保水能力上的优势。进一步的干旱胁迫实验观察发现,干旱处理后,野生型材料出现严重萎蔫现象,植株整体失水明显;而转基因植株仅部分叶片表现轻微萎蔫,缺水症状显著轻于野生型(图 9)。综合叶片失水率测定数据与干旱胁迫表型观察结果,可以明确过表达大麦 *HvERECTA* 基因转基因株系的抗旱性显著优于野生型材料,表明过表达株系具有较强的保水能力与干旱耐受趋势。

2.2.3 *HvERECTA* 基因过表达对拟南芥叶片气孔表型的影响

统计结果(图 10)表明,相比野生型拟南芥,3 个大麦 *HvERECTA* 基因过表达株系 L1、L4、L5 的叶片气孔密度均显著降低($P<0.05$)。测定结果(图 11)显示,经 MES-KCl 溶液处理,模拟气孔处于完全开放状态下,过表达 *HvERECTA* 基因株系的气孔开度显著大于野生型($P<0.05$);在 ABA 处理下,野生型和过表达株系的气孔开度均明显减小,但二者对 ABA 的响应程度存在显著差异,野生型气孔开度下降至对照的 28.98%,而过表达株系则保持在对照的 36.29%~44.71%之间,显著高于野生型($P<0.05$)。这说明,过表达大麦 *HvERECTA* 基因虽然可减少叶片气孔密度,但能够显著增加气孔开度,并削弱气孔对 ABA 诱导的敏感性,降低 ABA 诱导的气孔关闭程度。

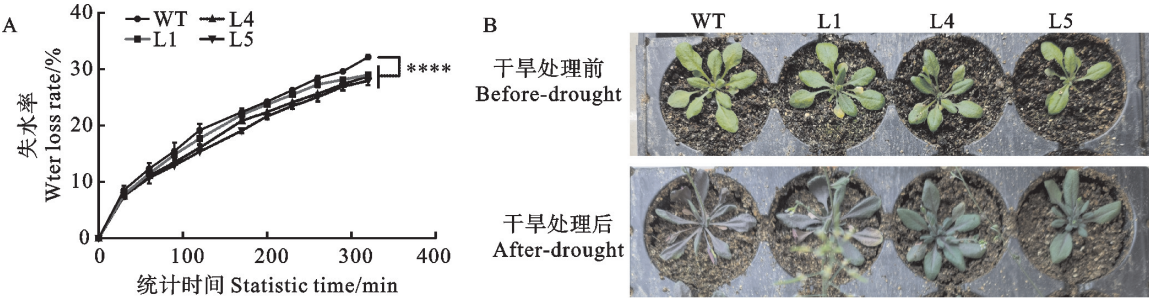


图 9 *HvERECTA* 基因过表达拟南芥叶片表型和生理指标鉴定

Fig. 9 Identification of leaf phenotypes and physiological indices of *Arabidopsis* lines overexpressing *HvERECTA* gene

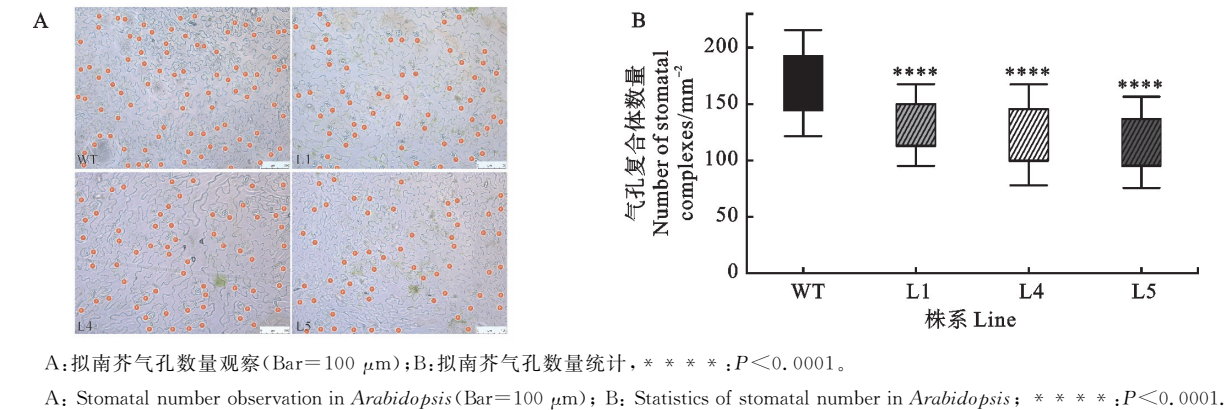


图 10 *HvERECTA* 基因过表达拟南芥叶片气孔表型检测

Fig. 10 Detection of leaf stomatal phenotype in *Arabidopsis* lines overexpressing *HvERECTA* gene

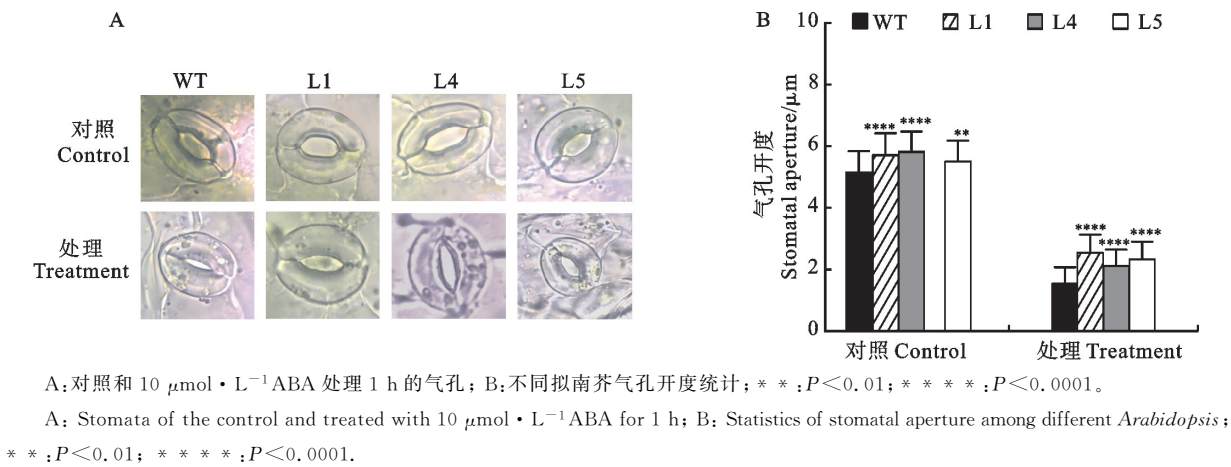


图 11 拟南芥气孔开度测定

Fig. 11 Determination of stomatal aperture in *Arabidopsis*

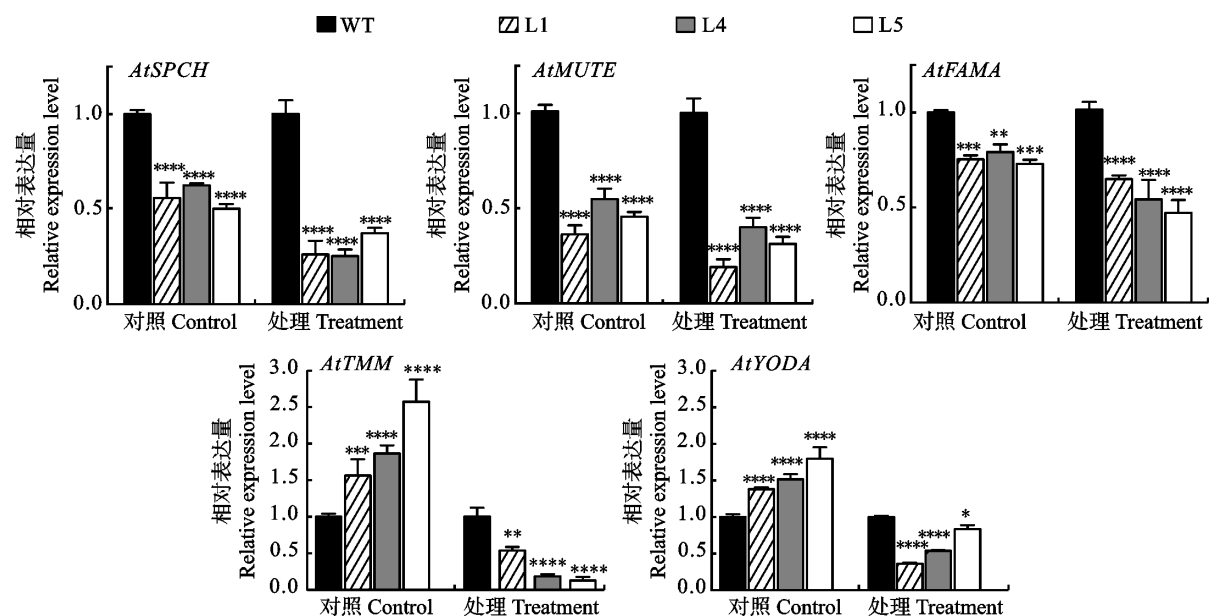
2.2.4 *HvERECTA* 基因过表达对拟南芥叶片气孔发育相关基因的影响

在拟南芥中过表达大麦 *HvERECTA* 基因后,正向调控气孔发育的关键转录因子 *AtSPCH*、*AtMUTE* 和 *AtFAMA* 的相对表达量在正常条件和 PEG6000 模拟干旱条件下均显著低于野生型 ($P < 0.05$) (图 12),说明大麦 *HvERECTA* 基因的过表达能够抑制气孔发育相关核心转录因子的转录活性,从而负调控气孔形成并降低气孔数量。进一步对与 *ERECTA* 受体复合物相关的 *AtTMM* 基因及其下游关键激酶基因 *AtYODA* 基因进行检测,结果显示,在正常条件下,两者的相对表达量均显著升高 ($P < 0.05$),而在干旱胁迫处理后则出现显著下降,表明在正常生长环境中,大麦 *HvERECTA* 基因过表达能够促进 *AtTMM* 基因与 *AtYODA* 基因的转录积累,从而增强下游信号传导,但在干旱胁迫下,受多重信号的协同影响,大麦 *HvERECTA* 基因过表达株系可通

过下调 *YODA* 等关键因子的转录水平,参与 MAPK 信号通路的转录层面调控。

2.2.5 *HvERECTA* 基因过表达对于干旱胁迫下拟南芥叶片抗氧化酶活性的影响

PEG6000、甘露醇模拟干旱和自然干旱-复水处理后,拟南芥野生型和大麦 *HvERECTA* 基因过表达株系的过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性较处理前均显著升高。相同胁迫条件下,大麦 *HvERECTA* 基因株系的三种酶活性均显著高于野生型(图 13)。这表明大麦 *HvERECTA* 基因可能通过上调抗氧化酶活性,增强植物的耐逆能力。经逆境胁迫处理后,拟南芥野生型与大麦 *HvERECTA* 基因过表达株系的丙二醛(MDA)含量均不同程度升高,但在相同条件下过表达株系的 MDA 量显著低于野生型植株,表明其膜脂过氧化损伤程度更轻,进一步佐证了该基因的耐逆调控功能。



对照: 正常生长 4 周的拟南芥正常加水培养; 处理: 正常生长 4 周的拟南芥施加 20% PEG6000 模拟干旱处理 3 d。*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$ 。下图同。

Control: *Arabidopsis* grown normally for 4 weeks were grown with normal water supplying; Treatment: *Arabidopsis* grown normally for 4 weeks were treated with 20% PEG6000 to simulate drought for 3 days. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$. The same in figure 13—figure 14.

图 12 *HvERECTA* 基因过表达拟南芥气孔发育相关基因相对表达水平

Fig. 12 Relative expression levels of stomatal development-related genes in *Arabidopsis* overexpressing *HvERECTA* gene

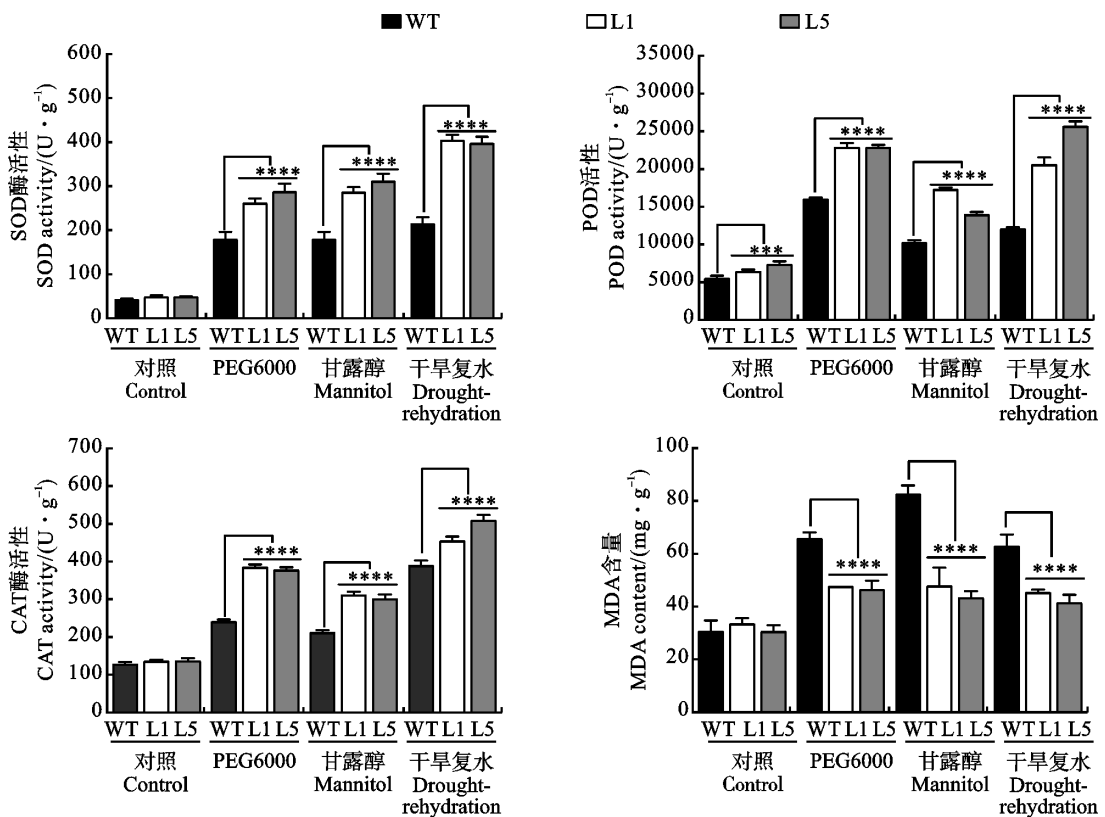


图 13 干旱胁迫下拟南芥叶片 SOD、CAT、POD 活性与 MDA 含量

Fig. 13 Activities of SOD, CAT, and POD, and MDA content in *Arabidopsis* leaves under drought stress

2.2.6 *HvERECTA* 基因过表达对拟南芥逆境响应基因的影响

在正常条件下,过表达*HvERECTA* 基因的拟南芥株系的*AtKIN2* 基因表达水平与野生型无显著差异,*AtABF3* 基因表达量较野生型有所下降,差异达到显著水平,而*AtRD22* 表达量则显著低于野生型(图 14)。这表明大麦*HvERECTA* 基因过表达不会在非胁迫条件下引发拟南芥 ABA 响应

基因的异常激活,仅部分基因表达出现轻微下调,未呈现 ABA 信号通路被异常启动的特征。

在干旱胁迫条件下,3 种基因在过表达株系中的表达水平均显著上调趋势。其中,*AtKIN2* 基因表达水平较野生型显著升高;*AtABF3* 基因在过表达株系中呈现显著增强的上调幅度;*AtRD22* 基因由正常条件下的低表达水平快速升高,并显著超过野生型在胁迫条件下的表达水平。

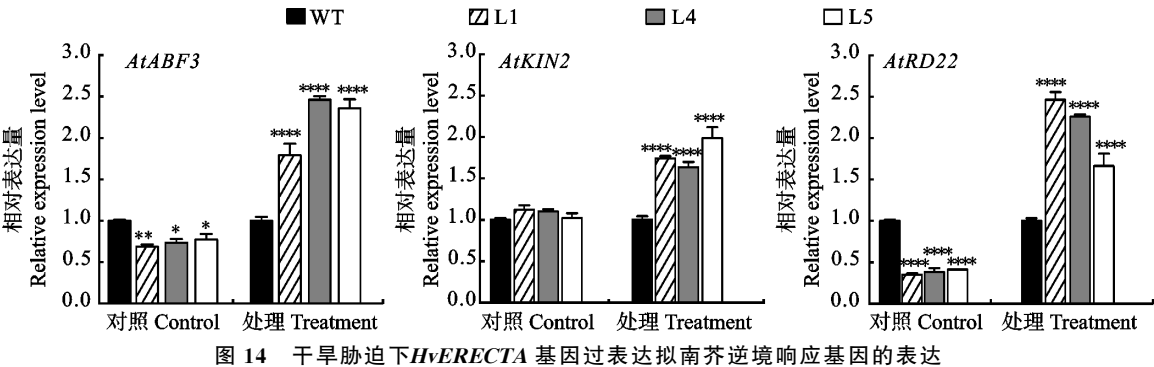


Fig. 14 Expression of stress-responsive genes in *Arabidopsis* lines overexpressing *HvERECTA* under drought stress

3 讨论

气孔是陆生植物叶片及其他器官表面的特化结构,由保卫细胞形成,在气体交换与蒸腾作用中发挥核心功能。气孔密度不仅影响气体交换效率和水分利用效率,还受到遗传调控与环境因子的共同作用,并在不同组织及同一器官的不同区域间表现出空间差异,其发育与分布受到遗传与环境因素的共同塑造^[3]。气孔形成受多层次分子网络精细控制,其中以 bHLH 转录因子 SPCH、MUTE 和 FAMA 为核心,协同 MAPK 信号通路及小肽-受体复合物共同维持气孔分化的时空精确性^[25-26]。*ERECTA* 家族受体激酶作为该网络的重要枢纽,可通过与 TMM 和 EPF 家族小肽互作,调控 YODA-MAPK 级联反应^[27],进而影响 SPCH 等关键转录因子的活性,在气孔发育和非生物胁迫适应中发挥关键作用^[28-29]。然而,*ERECTA* 通路在禾本科作物中的功能仍不完全清晰。

3.1 大麦*HvERECTA* 基因的结构与顺式作用元件特征表明其具备逆境信号感知与调控潜力

本研究以大麦*HvERECTA* 基因为对象,探讨了其在气孔发育调控及干旱胁迫响应中的生物学功能。为揭示其潜在的分子基础,首先对该基因进行了序列特征及结构分析。测序结果表明,大麦*HvERECTA* 基因的编码区(CDS)全长 2 934 bp,

可编码 977 个氨基酸残基,预测其编码蛋白的分子量约为 106 kD,理论等电点为 5.93,属于稳定型亲水蛋白。经结构域分析,该蛋白含有典型的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶结构域(S₂TKc),具备受体样激酶家族的特征。跨膜结构预测与原生质体瞬时表达观察结果均显示大麦 *HvERECTA* 蛋白定位于细胞膜,为单跨膜受体蛋白,其定位特征与已报道的 *ERECTA* 家族成员一致^[30]。通过序列比对及系统进化分析,大麦*HvERECTA* 基因与小麦、黑麦草等禾本科作物同源性最高,并在系统发育树上聚为同一分支,说明该基因在禾本科作物中具有较高保守性。大麦*HvERECTA* 基因的启动子中富含与逆境胁迫和植物激素相关的调控元件,包括 ABRE、MBS 等干旱与 ABA 响应元件,以及 GARE-motif、TGA-element 等激素响应元件,提示该基因可能受多种信号途径协同调控,在环境胁迫感知与应答中发挥重要作用。基于其膜定位特征、激酶结构域和顺式元件组成推测,大麦*HvERECTA* 基因可能通过感受外界信号并介导下游信号转导途径调控植物的逆境适应能力。

3.2 大麦*HvERECTA* 基因通过 MAPK-气孔发育通路调控气孔形成与运动,提高水分利用效率

气孔发育与运动的调节是大麦*HvERECTA* 基因介导抗旱性的关键环节。研究表明,细胞分裂素和生长素可促进气孔开放,而 ABA 则诱导

气孔关闭^[23,31]。本研究发现,大麦*HvERECTA*基因过表达株系气孔密度显著降低,说明其可能通过抑制气孔形成来减少蒸腾失水。在气孔运动层面,过表达植株在ABA处理后气孔开度显著高于野生型,说明过表达植株对ABA诱导关闭反应的敏感性降低。这表明大麦*HvERECTA*基因不仅调控气孔数量,还在气孔运动调节中建立了新的水分利用平衡机制。

通过分子水平分析进一步揭示了*HvERECTA*基因作用途径:气孔发育关键bHLH转录因子(SPCH、MUTE、FAMA)在转基因植株中显著下调,而YODA的表达显著上调,符合*HvERECTA*通过激活MAPK级联信号抑制下游转录因子、从而限制气孔形成的调控模型^[29]。然而,在干旱处理后,过表达株系*AtYODA*表达量反而下降,与前人研究结果^[32]不一致,这一差异可能源于物种特异性、基因异源表达特性及胁迫处理方式的不同。本研究中大麦*HvERECTA*基因在拟南芥中异源过表达,可能会重塑下游MAPK信号通路的响应模式;同时,不同干旱胁迫的强度、持续时间及处理方式也可能导致YODA基因表达调控呈现差异化特征^[33]。总体而言,相关表达变化进一步说明,*HvERECTA*基因是该信号通路的上游调控因子,通过调节MAPK模块的响应强度,实现对气孔发生过程及干旱适应策略的整体协调,而不是单一依赖某一信号成员。但本研究仅在转录水平揭示了*HvERECTA*对下游通路的调控关系,其对MAPK通路活性的具体影响,仍需结合YODA蛋白的丰度检测及磷酸化水平分析等后续实验进一步验证。

3.3 大麦*HvERECTA*基因协同ABA信号与抗氧化体系,提高干旱胁迫响应能力

非生物胁迫通常会引起植物一系列生理和分子反应,并最终反映在表型水平上^[34]。本研究结果显示,大麦*HvERECTA*基因过表达显著增强了拟南芥的抗旱性。转基因植株在干旱胁迫下表现出较强的生长活力、较高的抗氧化能力以及较低的失水速率,表明大麦*HvERECTA*基因在维持细胞稳定性和水分平衡中发挥重要作用。本研究结果进一步揭示,大麦*HvERECTA*基因可通过调控气孔发育及相关信号通路增强植物的干旱适应能力,体现其在抗旱性形成中的保守调控机制。

ABA信号相关基因的表达模式为大麦*HvERECTA*基因的抗旱功能提供了进一步证据。在正常

条件下,过表达株系的*AtKIN2*表达与野生型无差异,*AtABF3*略有下降,*AtRD22*显著降低,表明大麦*HvERECTA*基因过表达并未异常激活ABA信号通路。然而,在干旱胁迫下,上述基因在过表达株系中均显著上调,诱导幅度高于野生型,说明大麦*HvERECTA*基因可增强ABA依赖型下游基因的响应能力,从而使植株在逆境中更快、更强地启动应答反应。这与杨树^[35]、水稻中*ERECTA*家族成员参与ABA调控的研究结果一致,提示大麦*HvERECTA*基因在ABA信号途径中具有较强的保守性。

在生理层面,大麦*HvERECTA*基因的过表达显著增强了抗氧化系统活性。转基因植株在干旱胁迫下均具有较高的SOD、POD及CAT活性,可有效清除活性氧并减轻自由基对细胞膜的氧化损伤。同时,MDA含量显著降低,说明其膜脂过氧化程度减轻,细胞结构更为稳定。结合基因表达与生理指标结果,可以推断大麦*HvERECTA*基因通过提升抗氧化防御体系和渗透调节能力,增强了植株的耐旱性。

综合以上结果,大麦*HvERECTA*基因通过多层次的分子调控途径协调气孔发育与逆境响应。其一,大麦*HvERECTA*基因通过MAPK级联信号抑制气孔形成、降低气孔密度,并在气孔运动层面减弱ABA诱导关闭的敏感性,从而在蒸腾与水分利用之间建立新的平衡机制;其二,通过增强ABA依赖型下游基因的激活及抗氧化系统活性,大麦*HvERECTA*基因有效提高了植株在干旱胁迫下的防御与恢复能力。大麦*HvERECTA*基因在干旱胁迫下与马铃薯^[32]、谷子^[36]、杨树等物种中*ERECTA*家族基因的应激响应特性高度一致,显示该通路在不同物种中具有进化保守性。总体来看,大麦*HvERECTA*基因在气孔发育调控、信号转导及抗氧化稳态维持等多个层面协同作用,是植物干旱适应性形成的重要分子节点,为作物抗逆改良提供了新的理论依据与基因资源。

4 结论

异源过表达大麦*HvERECTA*基因可显著提升拟南芥的抗旱性,其调控机制具有路径特异性与胁迫依赖性的核心特征,为麦类作物抗旱遗传改良提供了理论依据与基因资源。

*HvERECTA*基因作为上游调控因子激活

MAPK 级联信号,特异性抑制气孔发育关键 bHLH 转录因子 SPCH/MUTE/FAMA 的表达,显著降低植株气孔密度,减少叶片水分散失总量,构建保水抗旱基础。

干旱胁迫下激活抗氧化防御系统,过表达株系可显著提升 SOD、CAT、POD 等抗氧化酶活性,有效清除活性氧积累,缓解细胞膜脂质过氧化损伤,增强细胞层面的干旱耐受能力,对 ABA 信号通路的调控具有严格胁迫依赖性。

总之,大麦*HvERECTA*基因通过“结构调控(气孔密度降低)+生理调控(抗氧化系统激活)”的双重路径介导抗旱性,其调控模式兼具稳定性与精准性,是麦类作物抗旱遗传改良的优质候选基因。

参考文献:

- [1] Zuch D T, Doyle S M, Majda M, et al. Cell biology of the leaf epidermis: Fate specification, morphogenesis, and coordination [J]. *The Plant Cell*, 2022, 34(1): 209.
- [2] Hou S G, Rodrigues O, Liu Z Y, et al. Small holes, big impact: Stomata in plant-pathogen-climate epic trifecta [J]. *Molecular Plant*, 2024, 17(1): 26.
- [3] Jalakas P, Tulva I, Bērziņa N M, et al. Stomatal patterning is differently regulated in adaxial and abaxial epidermis in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2024, 75(20): 6476.
- [4] Hunt L, Bailey K J, Gray J E. The signalling peptide EPFL9 is a positive regulator of stomatal development [J]. *New Phytologist*, 2010, 186(3): 609.
- [5] 刘梦龙, 魏健, 任姿蓉, 等. 气孔研究进展: 从保卫细胞到光合作用 [J]. *生命科学*, 2024, 36(10): 1289.
Liu M L, Wei J, Ren Z R, et al. Research progress of stomata: From guard cells to photosynthesis [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2024, 36(10): 1289.
- [6] 宫雅昕, 李刚, 余光辉. 气孔谱系细胞发育的分子基础及其调控机制 [J]. *植物生理学报*, 2019, 55(11): 1607.
Gong Y X, Li G, Yu G H. Molecular basis and regulatory mechanism of stomatal lineage cell development [J]. *Plant Physiology Journal*, 2019, 55(11): 1607.
- [7] Shpak E D, Mcabee J M, Pillitteri L J, et al. Stomatal patterning and differentiation by synergistic interactions of receptor kinases [J]. *Science*, 2005, 309(5732): 290.
- [8] Jewaria P K, Hara T, Tanaka H, et al. Differential effects of the peptides stowage, EPF1 and EPF2 on activation of MAP kinase MPK6 and the SPCH protein level [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2013, 54(8): 1253.
- [9] 赵雪雅, 张坤鹏, 张汇东, 等. *ERECTA* 基因家族调控植物形态发育机制研究进展 [J]. *沈阳农业大学学报*, 2023, 54(2): 231.
Zhao X Y, Zhang K P, Zhang H D, et al. Research progress on the mechanism of *ERECTA* gene family regulating plant morphological development [J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2023, 54(2): 231.
- [10] Shpak E D, Berthiaume C T, Hill E J, et al. Synergistic interaction of three *ERECTA*-family receptor-like kinases controls *Arabidopsis* organ growth and flower development by promoting cell proliferation [J]. *Development*, 2004, 131(7): 1491.
- [11] Qu X Y, Zhao Z, Tian Z X. *ERECTA* regulates cell elongation by activating auxin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1688.
- [12] Chen L L, Maes M, Cochran A M, et al. Preventing in appropriate signals pre- and post-ligand perception by a toggle switch mechanism of *ERECTA* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2025, 122(4): e2420196122.
- [13] Uchida N, Lee J S, Horst R J, et al. Regulation of inflorescence architecture by intertissue layer ligand; Receptor communication between endodermis and phloem [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(16): 6337.
- [14] Su H, Jiang X H, Liu Y F, et al. Advances in *ERECTA* family regulation of female gametophyte development in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plants*, 2025, 14(13): 1900.
- [15] Zhang H, Wang T, Gu J W, et al. Mutation of *ERECTA* homologous genes confers ideal plant architecture in *Brassica napus* [J]. *ABIOTECH*, 2025, 6(2): 249.
- [16] Masle J, Gilmore S R, Farquhar G D. The *ERECTA* gene regulates plant transpiration efficiency in *Arabidopsis* [J]. *Nature*, 2005, 436(7052): 866.
- [17] Du J B, Jiang H K, Sun X, et al. Auxin and gibberellins are required for the receptor-like kinase *ERECTA* regulated hypocotyl elongation in shade avoidance in *Arabidopsis* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 124.
- [18] 周慧, 李晓屿, RALF MÜLLER-XING, 等. 拟南芥 *ERECTA* 基因的研究进展 [J]. *中国农学通报*, 2018, 34(15): 93.
Zhou H, Li X Y, Müllerxing R, et al. Research progress of *ERECTA* in *Arabidopsis* [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2018, 34(15): 93.
- [19] Zhang Y C, Li S M, Xue S J, et al. Phylogenetic and CRISPR/Cas9 studies in deciphering the evolutionary trajectory and phenotypic impacts of rice *ERECTA* genes [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 473.
- [20] Mohammed U, Caine R S, Atkinson J A, et al. Rice plants over-expressing *OsEPFL* show reduced stomatal density and increased root cortical aerenchyma formation [J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 5584.
- [21] 韩燚, 侯昌林, 唐露, 等. 大麦*HvERECTA*基因的克隆及功能分析 [J]. *生物技术通报*, 2025, 41(7): 106.
Han Y, Hou C L, Tang L, et al. Cloning and preliminary functional analysis of *HvERECTA* gene in *Hordeum vulgare* [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2025, 41(7): 106.
- [22] Panda D, Karmakar S, Dash M, et al. Optimized protoplast

- isolation and transfection with a breakpoint: Accelerating Cas9/sgRNA cleavage efficiency validation in monocot and dicot [J]. *aBIOTECH*, 2024, 5(2):151.
- [23] Chen Z, An Y Y, Wang L J. ALA reverses ABA-induced stomatal closure by modulating PP2AC and SnRK_{2.6} activity in apple leaves [J]. *Horticulture Research*, 2023, 10(6):uhad067.
- [24] Wang P, Qi S J, Wang X H, *et al.* The OPEN STOMATA1-SPIRAL1 module regulates microtubule stability during abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2023, 35(1):260.
- [25] Chen L, Wu Z L, Hou S W. SPEECHLESS speaks loudly in stomatal development [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11:114.
- [26] Pillitteri L J, Bogenschutz N L, Torii K U. The bHLH protein, MUTE, controls differentiation of stomata and the hydathode pore in *Arabidopsis* [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2008, 49(6):934.
- [27] Wu M Y, Wang S Y, Ma P P, *et al.* Dual roles of the MPK3 and MPK6 mitogen-activated protein kinases in regulating *Arabidopsis* stomatal development [J]. *The Plant Cell*, 2024, 36(10):4576.
- [28] Lee J S, Hnilova M, Maes M, *et al.* Competitive binding of antagonistic peptides fine-tunes stomatal patterning [J]. *Nature*, 2015, 522(7557):439.
- [29] Giannoutsou E, Adamakis I S, Samakovli D, *et al.* Guardians of water and gas exchange: Adaptive dynamics of stomatal development and patterning [J]. *Plants*, 2025, 14(15):2405.
- [30] Li H S, Han X D, Liu X X, *et al.* A leucine-rich repeat-receptor-like kinase gene *SbER2-1* from sorghum (*Sorghum bicolor* L.) confers drought tolerance in maize [J]. *BMC Genomics*, 2019, 20(1):737.
- [31] Hauser F, Li Z X, Waadt R, *et al.* SnapShot: Abscisic acid signaling [J]. *Cell*, 2017, 171(7):1708.
- [32] Liu X, Yang W J, Zhang L, *et al.* Overexpression of StERECTA enhances drought tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2024, 303:154353.
- [33] Bergmann D C, Lukowitz W, Somerville C R. Stomatal development and pattern controlled by a MAPKK kinase [J]. *Science*, 2004, 304(5676):1494.
- [34] 陈柯岐, 邓星光, 林宏辉. 植物响应非生物胁迫的分子机制 [J]. *生物学杂志*, 2021, 38(6):1.
- Chen K Q, Deng X G, Lin H H. Molecular mechanisms of plant in response to abiotic stress [J]. *Journal of Biology*, 2021, 38(6):1.
- [35] Li H G, Yang Y L, Wang H L, *et al.* The receptor-like kinase *ERECTA* confers improved water use efficiency and drought tolerance to poplar *via* modulating stomatal density [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(14):7245.
- [36] Dai H J, Huang X Y, Wang Y R, *et al.* Overexpression of forage millet (*Setaria italica*) *SiER* genes enhances drought resistance of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Functional Plant Biology*, 2024, 51(9):FP23238.