

紫花苜蓿抗旱机制研究进展

权文利¹ 产祝龙²

(1. 湖北工程学院生命科学技术学院, 孝感 432000; 2. 中国科学院武汉植物园, 武汉 430074)

摘要: 紫花苜蓿是我国种植面积最大的人工牧草, 具有重要的经济价值和社会效益。干旱是影响紫花苜蓿分布及产量的主要环境因子之一。土壤水分不足可导致紫花苜蓿的形态结构发生一定改变, 从而使植株能够更好地适应胁迫环境。同时, 苜蓿植株体内可通过一系列生理生化反应来减缓或降低干旱胁迫造成的损伤。近年来, 人们对于紫花苜蓿转基因植株的培育以及苜蓿自身胁迫相关基因的研究报道较多。主要对紫花苜蓿抗旱的形态、生理和分子机制等方面的研究结果进行综述和讨论, 发现干旱胁迫导致紫花苜蓿植株体内激素含量的变化, 影响相应转录因子的活性, 从而激活相应的功能基因, 引起体内生理生化的变化。建议今后的研究在于阐述紫花苜蓿抗逆应答网络, 挖掘更多的基因资源, 通过分子育种手段培养高抗性新品种。

关键词: 紫花苜蓿; 干旱胁迫; 形态结构; 生理生化反应; 分子机制

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2016.10.003

Research Progress on Drought Resistance Mechanism of Alfalfa

QUAN Wen-li¹ CHAN Zhu-long²

(1. College of Life Science and Technology, Hubei Engineering University, Xiaogan 432000; 2. Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074)

Abstract: Alfalfa (*Medicago sativa*) is a forage grass with the largest cultivation area in China and has important economic value and social benefits. Drought is one of the major environmental factors influencing the production and distribution of alfalfa. Soil water deficiency could lead to alfalfa's morphological structure changes, which makes plant better adapt to the stress environment. Meanwhile, a series of physiological and biochemical responses in alfalfa plants are activated to alleviate or reduce the damage caused by drought stress. In recent years, scientists have identified drought-related genes in alfalfa and created drought tolerant transgenic plants. In this paper, alfalfa morphological, physiological and molecular mechanism in response to drought stress are reviewed and discussed. Drought stress affects phytohormone metabolism, resulting in regulation of transcription factors, which in turn modulates expression of metabolism related and stress responsive genes in alfalfa, leading to physiological and biochemical changes. Future researches should pay more attention to the regulation network in response to stresses and the excavation of new gene resources, which are beneficial to breeding programs of novel alfalfa varieties with enhanced resistance.

Key words: alfalfa; drought stress; morphological structure; physiological and biochemical response; molecular mechanism

干旱是影响植物生长、发育、生产力和分布的主要环境因子之一。旱灾发生范围广, 历时长, 对农业生产影响最大, 已成为世界上最严重的自然灾害之一。紫花苜蓿是世界上栽培最广的一种优良豆科牧草, 具有较高的经济价值和农业性状。紫花苜

蓿发达的根系统可有效防止水土流失, 其抗旱性也优于其他农作物^[1], 是我国西北干旱和半干旱地区主栽牧草, 对该地区畜牧业的发展和生态环境的改善发挥重要作用。然而, 随着西北地区环境的变化, 降水不足已成为限制紫花苜蓿产量的主要因素^[2]。

收稿日期: 2016-07-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31370302)

作者简介: 权文利, 女, 博士研究生, 研究方向: 植物水分胁迫生物学; E-mail: quanwenli0426@163.com

通讯作者: 产祝龙, 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 植物水分胁迫生物学; E-mail: zhulongch@wbgcas.cn

近年来,人们对于紫花苜蓿抗旱机制开展了很多的研究,研究领域也逐渐从形态水平过渡到生理生化以及分子水平,这对培育高抗性的苜蓿新品种,提高西北地区苜蓿的生产力具有重要意义。本文综述了目前紫花苜蓿应答干旱胁迫的不同机理以及分子调控网络方面的研究进展。

1 紫花苜蓿形态结构对干旱胁迫的响应

植物通过根系吸收水分、矿物质等养料,因此根系的生长状况将影响到植株的地上部分。紫花苜蓿具有发达的直根系统,随土壤水分减少其根系生长深度有时可达7-9 m或者更深;同时,根系直径逐渐变细,以利于吸收利用土壤深层水分^[3, 4]。陈积山等^[5]研究表明根颈的新枝高度、根的干重和根间夹角是最能反映苜蓿抗旱性的根系形态结构指标。在干旱胁迫下,紫花苜蓿主根伸长生长受到抑制、主根直径变细、侧根和根系总长度的伸长生长受到促进、根系表面积和直径 ≥ 1 mm的侧根数目明显增多、根系生物量下降,这都是紫花苜蓿为降低水分消耗、避免和忍耐水分亏缺而采取的适应策略。紫花苜蓿根系形态性状(总根长、根系生物量与根冠比)与植株水分利用效率间具有显著相关性,其中根重对水分利用效率的影响最大^[6]。

苜蓿根系体积越大,所接触的土壤面积就越大,越有利于苜蓿大范围地吸收土壤中的水分。苜蓿根系越发达、伸展的越深,受到的水分胁迫的影响就越小^[7]。干旱胁迫条件下,苜蓿的根系生长和茎秆生长均会减慢,但是相对茎秆来说根系受到的影响较小^[8]。紫花苜蓿在不同水分处理下根系的生长规律保持基本一致,在其生长季节内都呈现增加的趋势;但是适度干旱可以促进根系的伸长生长^[6]。

植物的功能叶对干旱胁迫最敏感,因此可作为植物对干旱感知的检测部位,其表皮蜡质是覆盖于植物表皮角质层上的一层可见的蜡状突起,在调控植物表皮渗透性、限制非气孔性水分散失以及抵御水分胁迫等不利环境影响方面起着重要作用^[9]。紫花苜蓿表皮蜡质分别由41.7%-54.2%的伯醇,13.2%-26.9%的烷类,17.5%-28.9%的萜类,1.4%-3.4%的少量醇类和4.5%-18.4%的其他组分构成^[10]。有研究表明逆境胁迫下,紫花苜蓿可通过叶表皮蜡

质的含量、成分或结构的改变而提高抗逆性^[11]。蜡质含量与紫花苜蓿品种的抗旱性无直接关系;与总蜡质含量相比,蜡质成分对于干旱胁迫处理更敏感。干旱导致伯醇含量的下降,烷类的增加。烷类含量的增加对于提高紫花苜蓿的抗旱性发挥重要作用,可以作为筛选和培育高抗性品种的指标^[10]。周玲艳等^[12]用质量分数为20%的PEG-6000进行模拟干旱处理,研究发现苜蓿王的叶片表面蜡质分布较密集,含量较高,而WL525叶片表面蜡质分布较稀疏,含量较少。模拟干旱处理发现苜蓿王对干旱敏感性最低,表明苜蓿品种叶片表面蜡质覆盖量与其抗旱能力呈正相关。另外,干旱可通过降低叶面积比和比叶面积来调整植株的形态结构,使植株叶片保持较高的蛋白含量,从而维持较高的光合作用能力。Erice等^[13]研究发现4种抗旱性和生长气候不同的紫花苜蓿的叶面积比、比叶面积和叶干重比存在不同;Tafilalet品种在干旱胁迫下叶干重比和比叶面积较小,表现出较高的抗旱性。

随着干旱胁迫时间的延长,苜蓿幼苗株高、根长、分枝、根颈直径和叶面积等都不同程度地呈减小趋势。根长减小幅度较小,且抗旱性不同的植株减小的幅度也不同,抗旱性强的品种减小的幅度较小,因此也可以作为一个抗旱的测定指标。

2 紫花苜蓿应答干旱胁迫的生理生化变化

2.1 渗透调节

干旱胁迫导致植物细胞失水,产生渗透胁迫。渗透调节作为植物抵抗干旱胁迫的有效生理机制之一,在细胞内产生大量的渗透调节物质,降低渗透势^[14],维持细胞膨压,稳定蛋白和细胞结构,保护和调节植物正常的生理过程^[15]。渗透调节物质分为两大类,一是小分子有机化合物,如脯氨酸、甜菜碱、可溶性糖等;另一类是蛋白质,如晚期胚胎丰富蛋白、水通道蛋白、热激蛋白等。

对于紫花苜蓿在干旱胁迫下渗透调节物质的积累研究主要集中于脯氨酸,其在苜蓿的根、叶、根瘤和韧皮汁液中都有积累^[16, 17]。另外,受干旱胁迫的紫花苜蓿植株中可溶性糖含量也呈现增加趋势^[16]。随着土壤胁迫强度的增加,脯氨酸和可溶性糖含量增加,且胁迫愈严重,脯氨酸和可溶性糖积

累愈多,在中度和重度胁迫下脯氨酸积累量较多,重度胁迫下其积累量达到最大值。同时,研究发现脯氨酸和可溶性糖积累与植株细胞膜透性密切相关,脯氨酸和可溶性糖积累愈多膜透性增加愈小,这说明脯氨酸和可溶性糖除作为渗透调节物质外,可保护细胞膜结构的完整性^[18]。Slama等^[19]研究了8种起源于地中海盆地的紫花苜蓿对水分胁迫的反应,结果表明大多数品种在水分胁迫下,植株体内脯氨酸和可溶性糖浓度显著增加,其中,起源于阿尔及利亚的Tamantit品种有更好的积累脯氨酸和可溶性糖的能力,表现出较强的抗旱性。在离体脱水处理下,带有活性根瘤的紫花苜蓿根和叶片中积累的自由脯氨酸和可溶性糖的含量明显低于不带有根瘤的植株,这表明脯氨酸和可溶性糖在这些植株的渗透调节中发挥着有限的作用,活性根瘤在紫花苜蓿响应干旱胁迫中可能同样起一定积极作用^[14]。另有研究发现,根瘤菌共生紫花苜蓿根、茎、叶中脯氨酸和可溶性糖含量在空气干旱后期明显高于不接种根瘤菌紫花苜蓿,根瘤菌共生紫花苜蓿具有更强的渗透调节能力^[20]。干旱胁迫导致两个抗旱性不同的紫花苜蓿品种Wisfal和Chilean中脯氨酸的大量积累,但两品种间差别不明显,说明脯氨酸并不是造成两者抗性存在差异的主要原因;然而,棉籽糖和甜菜苷的含量在抗性强的品种Wisfal中两倍高于抗性弱的品种Chilean,这表明棉籽糖和甜菜苷对Wisfal具有较强的抗旱性发挥一定的功能作用^[2]。

2.2 活性氧及氧化调节

正常生长条件下,植物体内活性氧(ROS)的产生与清除保持动态平衡^[21]。但在胁迫下,不断产生的ROS作为有氧代谢的产物,大量积累,损伤细胞内大分子的结构及其功能,导致膜质过氧化,生物酶失活,抑制细胞周期等^[22, 23]。植物为应对这一胁迫损伤,启动体内一套复杂的抗氧化防御系统,包括抗氧化剂,如抗坏血酸和谷胱甘肽,以及抗氧化酶,如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)和谷胱甘肽还原酶(GR)等^[24],来维持细胞在不同代谢途径中的正常生理功能。

利用PEG模拟干旱处理两种抗旱性不同的

紫花苜蓿品种,抗旱性强的品种Yazdi中SOD、APX、CAT和POD的活性明显高于抗旱性弱的品种Gharayonje,表现出较低的电导率(EL)和丙二醛(MDA)含量,说明Yazdi有更好的抵御氧化胁迫损伤的能力。研究结果表明抗氧化系统在清除活性氧方面发挥重要作用,其中抗旱性强的品种中抗氧化系统功能更强^[25]。霍学敏等^[26]采用改良空气干旱法对紫花苜蓿金皇后进行0-6 h的干旱处理,发现轻度干旱胁迫下,随着干旱时间的延长,紫花苜蓿地上部分和地下部分的MDA含量,抗坏血酸(AsA)含量均在短时间内增加,地下部分的POD活性也在短时间内增强,地上部分则无明显变化,研究表明紫花苜蓿地下部分比地上部分对干旱胁迫反应更为敏感。我们的研究表明,干旱胁迫导致紫花苜蓿细胞膜受损,体内H₂O₂大量积累,抗氧化酶活性明显增强,其中,SOD活性随干旱时间的延长而增强,POD活性随干旱时间的延长而降低,CAT活性随干旱时间的延长变化不明显,但是陇东品种所受的细胞膜损伤较小,活性氧积累量较低,抗氧化酶活性较高,表现出比阿尔冈金品种较强的抗旱性^[27]。

2.3 紫花苜蓿内源激素对干旱胁迫的响应

植物内源激素在植物生长及发育过程中发挥重要的调节作用。在正常环境条件下,各种激素间保持一种动态平衡;但当植物受到逆境环境胁迫时,这种平衡会受到破坏,导致植物生长规律的紊乱和正常代谢功能的失调^[28]。研究发现在干旱胁迫下,紫花苜蓿品种陇东和BL-02-329的叶片中IAA、ABA含量均呈不同程度的上升,GA₃和ZR的含量均呈下降趋势;4种内源激素之间的协调总趋势是向着气孔关闭、促进根系发展的方向进行^[29]。Xu等^[30]将转农杆菌*ipt*基因的中华根瘤菌接种到紫花苜蓿中,干旱胁迫下,植株叶片中玉米素含量增加,抗氧化酶基因表达量提高,活性氧含量下降;然而,根瘤中细胞分裂素的含量和对照相比,相差较小。该研究表明中华根瘤菌工程菌可合成更多的细胞分裂素,提高了紫花苜蓿对于干旱胁迫的耐受性,但并不影响紫花苜蓿结瘤或固氮作用。

ABA是植物响应环境胁迫的重要激素。当植物面临水分胁迫时,植株体内ABA含量增加,一方面

通过抑制气孔的开放,另一方面通过促进气孔的关闭,有效地控制植株水分平衡;同时,ABA通过信号转导途径,诱导调控相关基因的表达,产生渗透调节物质、功能蛋白和调节蛋白等,保护植株免受干旱胁迫的不利影响^[31, 32]。正常供水条件下,紫花苜蓿根部ABA含量低于叶片;干旱胁迫3 h后,叶片ABA含量显著高于对照,之后呈下降趋势,而根部ABA含量呈增加趋势,干旱6 h时根部ABA含量增加至最高,为对照ABA含量的3倍多^[33]。在植株不同生长阶段,非充分灌溉处理显著影响根部ABA含量。随着非充分灌溉程度的增加,紫花苜蓿根中ABA含量显著增加;且不同紫花苜蓿品种中ABA含量不同^[31]。

3 紫花苜蓿抗旱相关基因的研究

随着对干旱诱导基因和基因组学的深入研究,人们已成功克隆到紫花苜蓿中多种与干旱胁迫相关的基因,并对其功能进行了研究。

目前,一些转录因子已被发现参与了苜蓿应答干旱胁迫的研究。Wang等^[34]根据抑制差减杂交方法(SSH)构建紫花苜蓿cDNA文库以用来鉴定在胁迫条件下差异表达的基因;再根据特定长度的表达序列标签(ESTs)利用cDNA末端快速扩增(RACE)的方法从SSH cDNA文库中克隆特定基因。其中,NAC是植物特殊的转录因子大家族之一,在植物发育和响应环境胁迫方面发挥重要作用。从紫花苜蓿SSH cDNA文库中根据503 bp EST片段克隆到一个新的NAC基因,大小为1 115 bp,其中包括816 bp ORF,编码271个氨基酸。根据亚细胞定位可知这一NAC蛋白定位于细胞核,为一转录因子。根据荧光定量RT-PCR结果发现,该基因可被干旱诱导表达,转NAC基因拟南芥植株的抗旱性高于野生型植株。

WRKY转录因子是植物特有的转录因子,广泛参与植物对多种逆境胁迫的反应。紫花苜蓿中*MsWRKY33*基因全长1 536 bp,编码512个氨基酸,属于WRKY1族WRKY转录因子。亚细胞定位预测该基因产物定位于细胞核。盐、干旱和冷胁迫可诱导*MsWRKY33*的表达,表明该基因可能参与了这些逆境胁迫的调控过程^[35]。同时,根据460 bp EST片段,

一段长为1 652 bp的cDNA被成功克隆,且命名为*MsPBL*,其编码434个氨基酸蛋白,定位于洋葱表皮细胞的细胞核。300 mmol/L NaCl, 0.1 mmol/L ABA和20% PEG-6000处理能够显著提高该基因的表达,这表明*MsPBL*在细胞核内可能作为一种信号转导蛋白使紫花苜蓿对环境胁迫信号作出快速响应^[36]。

另外,一些与代谢及激素相关的基因也参与了紫花苜蓿对干旱胁迫应答。在高等植物抗坏血酸生物合成途径中,GME可将GDP-D-甘露醇催化生成GDP-L-半乳糖。研究表明紫花苜蓿中*MsGME*的表达受盐、PEG和酸胁迫诱导。拟南芥中*MsGME*的超表达可提高转基因植株对盐、干旱和酸的耐受性;同时,转基因拟南芥中抗坏血酸含量增加^[37]。醛糖还原酶可代谢多种由脂质过氧化产生的细胞毒素化合物。将紫花苜蓿中的*MsALR*基因转入到拟南芥中,结果表明转基因植株对乙醛底物的解毒作用比野生型高出1.5–4.3倍;且在干旱条件下,转基因植株的单株种子产量比野生型高^[38]。紫花苜蓿中*MsSIK1*基因在脱水条件下大量表达。26 d干旱处理后,超表达*MsSIK1*基因的拟南芥植株株高分别高于野生型和*MsSIK1*突变体植株;且不同转基因株系间的花絮长度在192–213 mm之间,明显长于野生型平均长度100 mm和突变体平均长度60 mm。与野生型和突变体植株相比,转基因拟南芥具有较高的长期CO₂同化率,较低的蒸腾作用,较高的水分利用效率和内源GA含量^[39]。

活性氧是植物应答逆境环境的信号分子。研究发现土壤干旱胁迫处理后,耐旱的Wisfal和干旱敏感的Chilean植株根和茎中ROS基因变化趋势上没有质的差别,对于ROS合成酶基因中,NADPH氧化酶受干旱诱导,而乙醇酸氧化酶基因则被抑制;在ROS清除蛋白基因中,铁蛋白、Cu/Zn SOD、大多数谷胱甘肽过氧化物酶家族成员在两紫花苜蓿品种的根和茎中受干旱诱导表达,相反,Fe-SOD、CC-类型谷氧还蛋白和硫氧还蛋白被下调表达^[40]。ZFP因参与ABA的生物合成和叶黄素循环,对植物响应不同环境胁迫信号起重要作用。紫花苜蓿中*MsZEP*基因包含1 992 bp核苷酸,编码663个氨基酸多肽链。在干旱、冷、热和ABA处理下,茎中*MsZEP*基因表达量呈下降趋势。烟草中该基因的异位表达

可通过生理途径, ABA 水平和胁迫响应基因的表达量的变化来提高转基因植株的抗旱和耐盐性^[41]。

4 基因工程技术在提高紫花苜蓿抗旱性中的应用

在干旱条件下, 植株的产量明显下降, 培育出抗性且产量、品质较高的牧草是改良牧草抗旱性的最终目标。随着对苜蓿研究的不断发展, 苜蓿品种改良和抗性育种已成为当下的研究重点。虽然传统育种方法仍在为提高植株对非生物胁迫的抗性作出一定的贡献, 但其育种周期较长。随着基因工程的发展, 转基因技术已是改良植株产量和质量的新途径。

自 1986 年首次成功获得苜蓿转基因技术后^[42], 近年来, 人们已培育出多种高抗性的不同转基因紫花苜蓿植株^[1, 43-45]。2005 年, 将从蒺藜苜蓿中克隆得到的 *WXPI* 基因转到紫花苜蓿中, 转基因植株叶片表皮蜡质覆盖度显著增加。扫描电子显微镜观察发现在新叶的下表皮可较早地积累蜡质晶体; 在成熟叶的上下表皮具有较高密度的蜡质晶体结构。超表达 *WXPI* 基因的紫花苜蓿植株表现出较低的叶片失水率, 干旱后叶片萎蔫延迟, 复水后能够较快较好的恢复^[46]。转细菌 *codA* 基因的紫花苜蓿在整个植株水平上表现出较高的抗旱性。干旱胁迫下, 与非转基因植株相比, 转基因植株具有较高的相对含水量, 较高的甜菜碱和脯氨酸含量; 在正常生长条件下, 转基因植株体内生长素相关的 IAA 基因表达量比野生型高, 表现出较好的生长表型^[47]。*GsWRKY20* 基因的异位表达使转基因紫花苜蓿与野生型相比, 在水分缺失条件下表现出较低的相对膜透性, 较少的 MDA 含量, 较多的自由脯氨酸和可溶性糖积累量; 同时, 转基因紫花苜蓿具有较厚的角质层, 能够降低植株在干旱条件下的水分散失, 显著提高了转基因植株的抗旱性^[48]。将旱生植物霸王中的 *ZxNHX* 和 *ZxVPI-1* 基因共同转入到紫花苜蓿中, 无论在正常生长条件还是干旱胁迫条件下, 转基因植株都具有较高的株高和干重; 而且, 在大田条件下, 共表达 *ZxNHX* 和 *ZxVPI-1* 基因的紫花苜蓿植株比野生型生长速度快, 光合作用能力强, 具有较高的净光合速率, 气孔导度和水分利用效率^[49]。

地瓜橙色基因 *IbOr* 参与类胡萝卜素积累过程, 能够提高植株对多种非生物胁迫的抗性。将该基因转入到紫花苜蓿中, 转基因植株具有较高的类胡萝卜素, 抗旱性得到提高^[50]。*EsMcsu1* 基因编码钼辅因子硫化酶, 受非生物胁迫或 ABA 处理后其表达量明显上调。干旱胁迫条件下, 超表达 *EsMcsu1* 基因的紫花苜蓿植株体内 ABA 含量明显高于野生型植株; ROS 水平, 离子渗透和 MDA 含量则低于野生型植株, 这表明转基因植株受到较轻的活性氧损伤^[51]。

5 结论与展望

随着人口增加和全球气候变暖, 干旱已成为影响植物生长和产量的重要因素^[52]。为减缓或减轻干旱胁迫造成的损伤, 植物自身已进化出多种复杂的响应策略, 包括一系列形态、生理和生化反应等^[53]。在干旱胁迫条件下, 植物能够快速积累一些重要的代谢物, 如 ABA、抗坏血酸和渗透调节物质等^[54]。对紫花苜蓿抗旱性的研究一直以来都是牧草学研究的热点之一。近年来, 国内外学者对紫花苜蓿在干旱条件下的形态结构变化, 渗透调节物质积累, 抗氧化酶活性以及内源激素含量等做了大量研究报道, 初步了解了紫花苜蓿响应干旱胁迫的生理机制, 为筛选抗性强的优良种质资源奠定了一定的理论基础。

综上所述, 在紫花苜蓿中, 干旱胁迫诱导相关激素的代谢, 调控下游 WRKY、ZEP、NAC 以及 ERF 等转录因子, 从而激活下游功能基因, 影响植株体内的生理生化代谢以及生长 (图 1)。然而, 相对其他栽培作物而言, 紫花苜蓿抗旱的深层机制及其调控网络的研究还较为薄弱^[55]。虽然传统育种仍在继续, 但随着基因工程的发展, 通过构建转基因紫花苜蓿植株可大大提高转基因植株的抗旱性, 成为培育高产高抗性苜蓿品种的新途径; 但是转基因植株的抗性仍需在大田中进一步验证。另外, 紫花苜蓿干旱胁迫相关基因的不断挖掘, 尤其是与逆境胁迫相关的苜蓿转录因子的研究已是植物分子生物学家们关注的焦点。

目前, 人们对于苜蓿转录因子的研究取得了较大的进展, 但是由于转录因子的多功能性和调控网络的复杂性, 使得苜蓿转录因子的研究中仍存在很多待解决的问题; 同时, 相当大部分新的转录因子

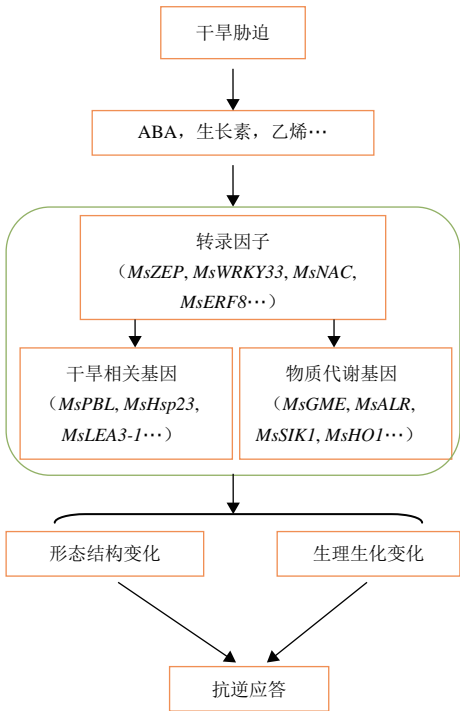


图 1 紫花苜蓿抗旱机制

仍有待发现及对其功能进行鉴定^[56]。另外，植物激素在逆境应答中扮演着重要的作用。不同的激素如何协同或拮抗地参与紫花苜蓿抗逆性，相关机理目前仍不清楚。更好地了解苜蓿应答逆境胁迫相关基因的表达模式，阐述植物激素及转录因子对苜蓿基因表达、转录调控的机制，将会为苜蓿的抗旱育种提供广阔的基因资源，通过 CRISP-Cas9 等新的生物技术，提高苜蓿的抗旱性。

参考文献

[1] Tang L, Cai H, Ji W, et al. Overexpression of *GsZFP1* enhances salt and drought tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2013, 71 : 22-30.

[2] Kang Y, Han Y, Torres-Jerez I, et al. System responses to long-term drought and re-watering of two contrasting alfalfa varieties [J]. *The Plant Journal*, 2011, 68 (5) : 871-889.

[3] Wan S, Hu J, Hu S, et al. The study on water use efficiency of alfalfa cultivars in Weibei High Plateau [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2003, 13 (2) : 133-137.

[4] Hund A, Ruta N, Liedgens M. Rooting depth and water use efficiency of tropical maize inbred lines, differing in drought tolerance [J].

Plant and Soil, 2009, 318 (1-2) : 311-325.

[5] 陈积山, 李锦华, 常根柱, 等. 不同苜蓿品种根系形态结构的抗旱性分析 [J]. *内蒙古草业*, 2008, 20 (2) : 41-44.

[6] 白文明, 左强, 黄元仿, 等. 乌兰布和沙区紫花苜蓿根系生长及吸水规律的研究 [J]. *植物生态学报*, 2001, 25 (1) : 35-41.

[7] 王富贵. 18 份苜蓿材料根系形态特征及与地上生物量关系的研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2011.

[8] Liu F, Stützel H. Biomass partitioning, specific leaf area, and water use efficiency of vegetable amaranth (*Amaranthus* spp.) in response to drought stress [J]. *Scientia Horticulturae*, 2004, 102 (1) : 15-27.

[9] Riederer M, Schreiber L. Protecting against water loss : analysis of the barrier properties of plant cuticles [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2001, 52 (363) : 2023-2032.

[10] Ni Y, Guo YJ, Han L, et al. Leaf cuticular waxes and physiological parameters in alfalfa leaves as influenced by drought [J]. *Photosynthetica*, 2012, 50 (3) : 458-466.

[11] 郭彦军, 倪郁, 郭芸江, 等. 水热胁迫对紫花苜蓿叶表皮蜡质组分及生理指标的影响 [J]. *作物学报*, 2011, 37 (5) : 911-917.

[12] 周玲艳, 刘胜洪, 秦华明, 等. 5 个苜蓿品种叶片表面蜡质覆盖与抗旱性的关系 [J]. *草业科学*, 2013, 30 (4) : 596-601.

[13] Erice G, Louahia S, Irigoyen JJ, et al. Biomass partitioning, morphology and water status of four alfalfa genotypes submitted to progressive drought and subsequent recovery [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2010, 167 (2) : 114-120.

[14] Yang P, Zhang P, Li B, et al. Effect of nodules on dehydration response in alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2013, 86 : 29-34.

[15] Szabados L, Savouré A. Proline : a multifunctional amino acid [J]. *Trends in Plant Science*, 2010, 15 (2) : 89-97.

[16] Aranjuelo I, Molero G, Erice G, et al. Plant physiology and proteomics reveals the leaf response to drought in alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62 (1) : 111-123.

[17] Antolín MC, Muro I, Sánchez-Díaz M. Application of sewage sludge improves growth, photosynthesis and antioxidant activities of nodulated alfalfa plants under drought conditions [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2010, 68 (1) : 75-82.

[18] 罗永忠. 新疆大叶苜蓿对土壤水分胁迫的生理响应及生态适

- 应性研究 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2011.
- [19] Slama I, Tayachi S, Jdey A, et al. Differential response to water deficit stress in alfalfa (*Medicago sativa*) cultivars: Growth, water relations, osmolyte accumulation and lipid peroxidation [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2011, 10 (72): 16250-16259.
- [20] 张攀, 杨培志, 王卫栋, 等. 干旱胁迫下根瘤菌共生紫花苜蓿抗旱生理变化研究 [J]. *草地学报*, 2013, 21 (5): 938-944.
- [21] Gill SS, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2010, 48 (12): 909-930.
- [22] Chakrabarty A, Aditya M, Dey N, et al. Antioxidant signaling and redox regulation in drought-and salinity-stressed plants [M] // Hossain MA, Wani SH, Bhattacharjee S, et al. Drought stress tolerance in plants, volume 1. Springer International Publishing, 2016: 465-498.
- [23] Zang Q, Ma C, Xue X, et al. Overexpression of a cytosolic ascorbate peroxidase gene, *OsAPX2*, increases salt tolerance in transgenic alfalfa [J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2014, 13 (11): 2500-2507.
- [24] Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2004, 55: 373-399.
- [25] Boldaji SAH, Khavari-Nejad RA, Sajedi RH, et al. Water availability effects on antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation, and reducing sugar contents of alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2012, 34 (3): 1177-1186.
- [26] 霍学敏, 呼天明, 杨培志, 等. 干旱胁迫对苗期紫花苜蓿 3 种生理指标的影响 [J]. *草业科学*, 2010, 27 (4): 89-92.
- [27] Quan WL, Liu X, Wang HQ, et al. Comparative physiological and transcriptional analyses of two contrasting drought tolerant alfalfa varieties [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 1256.
- [28] Davies WJ, Metcalfe J, Lodge TA, et al. Plant growth substances and the regulation of growth under drought [J]. *Functional Plant Biology*, 1986, 13 (1): 105-125.
- [29] 韩瑞宏, 张亚光, 田华, 等. 干旱胁迫下紫花苜蓿叶片几种内源激素的变化 [J]. *华北农学报*, 2008, 23 (3): 81-84.
- [30] Xu J, Li XL, Luo L. Effects of engineered *Sinorhizobium meliloti* on cytokinin synthesis and tolerance of alfalfa to extreme drought stress [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78 (22): 8056-8061.
- [31] Fadul GMA, Wan L, He F, et al. Absciscic acid content in roots and root characteristics of alfalfa under deficit irrigation [J]. *African Journal of Agricultural Research*, 2016, 11 (11): 935-940.
- [32] 李跃, 万里强, 李向林. 内源脱落酸生理作用机制及其与苜蓿耐旱性关系研究进展 [J]. *草业学报*, 2015, 24 (11): 195-205.
- [33] 任敏, 何金环. 自然干旱胁迫下紫花苜蓿叶片和根部 ABA 的代谢变化 [J]. *安徽农业科学*, 2010, 38 (4): 1771-1772.
- [34] Wang YX. Characterization of a novel *Medicago sativa* NAC transcription factor gene involved in response to drought stress [J]. *Molecular Biology Reports*, 2013, 40 (11): 6451-6458.
- [35] 冯光燕, 王学敏, 付媛媛, 等. 紫花苜蓿 *MsWRKY33* 转录因子的分离及遗传转化研究 [J]. *草业学报*, 2015, 24 (11): 48-57.
- [36] Zhang JY, Broeckling CD, Blancaflor EB, et al. Overexpression of *WXPI*, a putative *Medicago truncatula* AP2 domain-containing transcription factor gene, increases cuticular wax accumulation and enhances drought tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa*) [J]. *The Plant Journal*, 2005, 42 (5): 689-707.
- [37] Li H, Wang Z, Ke Q, et al. Overexpression of *codA* gene confers enhanced tolerance to abiotic stresses in alfalfa [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2014, 85: 31-40.
- [38] Tang L, Cai H, Zhai H, et al. Overexpression of Glycine soja *WRKY20* enhances both drought and salt tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2014, 118 (1): 77-86.
- [39] Guo P, Wei H, Zhang W, et al. The dehydration-induced *ERECTA* gene, *MsSIK1*, from alfalfa improved water use efficiency in transgenic *Arabidopsis* [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2016, 38 (2): 1-12.
- [40] Kang Y, Udvardi M. Global regulation of reactive oxygen species scavenging genes in alfalfa root and shoot under gradual drought stress and recovery [J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2012, 7 (5): 539-543.
- [41] Zhang Z, Wang Y, Chang L, et al. *MsZEP*, a novel zeaxanthin epoxidase gene from alfalfa (*Medicago sativa*), confers drought and salt tolerance in transgenic tobacco [J]. *Plant Cell Reports*, 2016, 35 (2): 439-453.
- [42] Webb KJ. Transformation of forage legumes using *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1986, 72 (1):

- 53-58.
- [43] Zhang J, Duan Z, Zhang D, et al. Co-transforming *bar* and *CsLEA* enhanced tolerance to drought and salt stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J] . Biochemical and Biophysical Research Communications, 2016, 472 (1) : 75-82.
- [44] Wang Z, Li H, Ke Q, et al. Transgenic alfalfa plants expressing *AtNDPK2* exhibit increased growth and tolerance to abiotic stresses [J] . Plant Physiology and Biochemistry, 2014, 84 : 67-77.
- [45] Duan Z, Zhang D, Zhang J, et al. Co-transforming *bar* and *CsALDH* genes enhanced resistance to herbicide and drought and salt stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J] . Frontiers in Plant Science, 2015, 6 : 1115.
- [46] Long R, Yang Q, Kang J, et al. Molecular cloning and characterization of a novel stress responsive gene in alfalfa [J] . Biologia Plantarum, 2012, 56 (1) : 43-49.
- [47] Ma L, Wang Y, Liu W, et al. Overexpression of an alfalfa GDP-mannose 3, 5-epimerase gene enhances acid, drought and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* by increasing ascorbate accumulation [J] . Biotechnology Letters, 2014, 36 (11) : 2331-2341.
- [48] Fehér-Juhász E, Majer P, Sass L, et al. Phenotyping shows improved physiological traits and seed yield of transgenic wheat plants expressing the alfalfa aldose reductase under permanent drought stress [J] . Acta Physiologiae Plantarum, 2014, 36 (3) : 663-673.
- [49] Bao AK, Du BQ, Touil L, et al. Co-expression of tonoplast Cation/H⁺ antiporter and H⁺-pyrophosphatase from xerophyte *Zygophyllum xanthoxylum* improves alfalfa plant growth under salinity, drought and field conditions [J] . Plant Biotechnology Journal, 2016, 14 (3) : 964-975.
- [50] Wang Z, Ke Q, Kim MD, et al. Transgenic alfalfa plants expressing the sweetpotato *Orange* gene exhibit enhanced abiotic stress tolerance [J] . PLoS ONE, 2015, 10 (5) : e0126050.
- [51] Zhou C, Ma ZY, Zhu L, et al. Overexpression of *EsMcsu1* from the halophytic plant *Eutrema salsugineum* promotes abscisic acid biosynthesis and increases drought resistance in alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J] . Genetics and Molecular Research : GMR, 2015, 14 (4) : 17204.
- [52] Bohnert HJ, Gong Q, Li P, et al. Unraveling abiotic stress tolerance mechanisms-getting genomics going [J] . Current Opinion in Plant Biology, 2006, 9 (2) : 180-188.
- [53] Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance [J] . Journal of Experimental Botany, 2007, 58 (2) : 221-227.
- [54] Gómez-Cadenas A, Arbona V, Jacas J, et al. Abscisic acid reduces leaf abscission and increases salt tolerance in citrus plants [J] . Journal of Plant Growth Regulation, 2002, 21 (3) : 234-240.
- [55] 包爱科, 杜宝强, 王锁民. 紫花苜蓿耐盐、抗旱生理机制研究进展 [J] . 草业科学, 2011, 28 (9) : 1700-1705.
- [56] 张立全, 李慧, 张凤英, 等. 苜蓿属植物转录因子研究进展 [J] . 中国草地学报, 2014 (2) : 108-116.

(责任编辑 李楠)