

引用格式: 化文平, 孔维维, 韩立敏, 等. 表达 *SmERF1* 调节烟草种子大小及耐盐性[J]. 西北植物学报, 2024, 44(2): 0229-0235. [HUA W P, KONG W W, HAN L M, et al. Expression of *SmERF1* in tobacco improves plant salinity tolerance and regulates seed size[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2024, 44(2): 0229-0235.] DOI:10.7606/j.issn.1000-4025.20230444

表达 *SmERF1* 调节烟草种子大小及耐盐性

化文平^{1,2}, 孔维维², 韩立敏¹, 曹晓燕²

(1 陕西学前师范学院 生命科学与食品工程学院, 西安 710061; 2 陕西师范大学 生命科学学院, 西北濒危药材资源开发国家工程实验室, 药用资源与天然药物化学教育部重点实验室, 西安 710062)

摘要 【目的】ERF 转录因子生物功能广泛, 在调控植物生长发育和响应胁迫中发挥重要作用。前期研究显示, 丹参 *SmERF1* 参与植物响应胁迫反应。该研究旨在进一步明确 *SmERF1* 潜在的生物功能, 并为药用植物抗性及种子发育研究奠定基础。【方法】该研究采用农杆菌介导的方法在模式植物烟草中异源表达了丹参 *SmERF1* 基因; 通过抗性相关酶活性变化检测, 对转基因植株抗性进行评价; 通过酶联免疫方法和 qPCR 方法分析 GA 和 ABA 等激素含量及合成途径关键酶基因的表达变化。【结果】(1) 表达 *SmERF1* 的烟草植株在幼苗期表现出生长缓慢、生物量和叶绿素减少, 而在其他生长阶段与对照植株没有明显差异; 此外, 表达 *SmERF1* 的烟草植株种子比野生对照的种子小、轻; (2) 在盐处理下, 转基因烟草株系中脯氨酸含量、SOD 和 POD 活性高于对照株系, 而 MDA 含量低于对照株系, 转基因烟草株系表现出较高的耐盐性; (3) 在转烟草株系中, ABA 含量上调, GA 水平降低。实时定量 PCR 结果显示, 表达 *SmERF1* 调节了与植物激素生物合成相关的关键酶基因的表达, 如 *NtSDR*、*NtGA20ox*、*NtACO* 和 *NtACS*。【结论】*SmERF1* 通过 ABA 依赖途径增强了烟草对盐胁迫的耐受性, 并调控种子大小。

关键词 烟草; *SmERF1*; 植物抗性; 种子大小; ABA

中图分类号 Q943.2; S572 **文献标志码** A

Expression of *SmERF1* in tobacco improves plant salinity tolerance and regulates seed size

HUA Wenping^{1,2}, KONG Weiwei², HAN Limin¹, CAO Xiaoyan²

(1 Department of Life Sciences and Food Technology, Shaanxi Xueqian Normal University, Xi'an 710061, China; 2 Key Laboratory of Medicinal Resources and Natural Pharmaceutical Chemistry, Ministry of Education, National Engineering Laboratory for Resource Developing of Endangered Chinese Crude Drugs in Northwest of China, College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract [Objective] The transcription factor ERF has various biological functions, and plays important roles in regulating plant growth, development and responding to stress. Previous studies have shown that *SmERF1* from *Salvia miltiorrhiza* was involved in plant response to stress. This study aimed to further elucidate the potential function of *SmERF1* and lay a foundation for the study of resistance and seed development of medicinal plants. [Methods] *SmERF1* was heterologously expressed in the model plant tobacco

收稿日期: 2023-07-04; 修改稿收到日期: 2023-11-20

基金项目: 陕西省科技厅科研项目(2022NY-166, 2022ZDLSF05-01, 2023-JC-YB-210); 陕西省教育厅科研计划项目(22JK033); 陕西省科协青年人才托举计划项目(20220220)

作者简介: 化文平(1980—), 男, 博士, 教授, 主要从事药用植物资源研究。E-mail: huawenping@126.com

mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in this study. The resistance of transgenic plants was evaluated through determining the plant resistance-related enzyme activities. The levels of hormones such as GA and ABA were analyzed using enzyme-linked immunosorbent assays, and the expression of key enzyme genes involved in hormone biosynthesis were detected with qPCR methods. [Results] (1) *SmERF1*-expressing tobacco plants showed slower growth, less biomass, and decrease in chlorophyll at the seedling stage, with no significant difference in other growth stages. In addition, seeds of tobacco plants expressing *SmERF1* genes were smaller and lighter than those of wild plants. (2) Under NaCl treatment, the transgenic tobacco lines showed better tolerance to salinity, and the proline content, SOD and POD activities of transgenic lines were higher than those of wild type plants, while MDA content was lower than that of wild-type plants. (3) We determined the phytohormones related to plant resistance, and the results showed that transgenic tobacco plants had higher ABA levels but lower GA levels compared with wild type plants. The expression of *SmERF1* regulated the expression of the key enzyme genes related to plant hormone biosynthesis, such as *NtSDR*, *NtGA20ox*, *NtACO*, and *NtACS*. [Conclusion] *SmERF1* enhances tobacco tolerance to salt stress and may regulate seed size through the ABA-dependent pathway.

Key words tobacco; *SmERF1*; plant resistance; seed size; ABA

乙烯响应因子(ethylene-responsive factor, ERF)是植物特有的一大类转录因子,越来越多的研究表明,ERF家族成员参与植物的各类生物或非生物的胁迫反应^[1]。在拟南芥中 *AtORA59* 和 *AtERF1* 能激活 *PDF1.2* 基因表达从而提高对胁迫的抗性^[2];过表达 *GmERF113* 可以激活抗性基因 *PR1* 和 *PR10-1*, 增强大豆对大豆疫霉菌的抗性^[3];过表达 *MnERF2* 可以显著提高桑树对干旱胁迫的耐受性^[4]; *MsERF40* 和 *MsERF05* 在新疆野苹果抗腐烂病过程中发挥重要作用^[5]。

药用植物丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)以干燥根茎入药,被广泛应用于心脑血管疾病的治疗。目前已从丹参基因组数据库中鉴定得到 79 个 ERF 转录因子^[6],但仅 *SmERF6*、*SmERF1L1*、*SmERF73*、*SmERF128* 和 *SmERF115* 的功能被探明与丹参酮和丹酚酸的合成调控相关^[7-10],*SmORA1* 主要与植物的抗病性相关^[11]。前期研究发现 *SmERF1*(GenBank No. KC405081.1)在丹参中可以调节丹参的抗性^[12],为进一步探究 *SmERF1* 功能,该研究在模式植物烟草中过表达 *SmERF1*,发现它不仅调节植物激素合成,调节转基因烟草的抗性,而且还影响植物种子大小,预示在植物农艺学性状改良方面存在一定潜能。

1 材料和方法

1.1 植物材料培养

把烟草(*Nicotiana tabacum*)种子种植于含有蛭石、草木灰的花盆中,每周浇水 1 次,培养室内保

持湿度 60%,温度 22℃,每日光照 16 h。1 月龄的烟草幼苗用于转基因操作。鉴定得到的转基因烟草在 MS 培养基上继代培养 6 周后,进行炼苗,移栽在含腐殖质土的花盆中,在人工气候箱培养直至种子成熟。培养条件:24℃,湿度 60%,每日光照 14 h。收集种子(T_0)在花盆中种植,幼苗经 PCR 鉴定后直至种子成熟获得 T_1 代种子; T_1 代烟草种子同样条件种植,并再次进行 PCR 鉴定,成熟后获得 T_2 代烟草种子。

1.2 转基因烟草种子分析和转基因株系获得

用体式显微镜观察比较 T_2 代烟草种子大小,并称量 T_2 代种子的千粒重。以同批种植收获的未转基因的烟草种子为对照,分析转基因烟草种子变化。

用 Gateway 的方法构建表达 *SmERF1* 的植物表达载体 pO-ERF^[12]。将其以冻融法转入农杆菌 *GV3101*^[13],用叶脉注射法转化烟草^[14],在含 0.5 mg/L 有 IBA 和 10 mg/mL 草胺磷(Basta)的 1/2 MS 培养基上进行筛选培养。通过 PCR 方法检测随同转入的质粒载体上 *CaMV35S* 启动子序列片段(上游引物:5'-AATCTTCGTCAACATGGTGGAGC-3',下游引物:5'-GCTGTCTCGTCGCCGAGAATA-3'),鉴定转基因烟草植株^[12]。

1.3 基因表达检测

植物总 RNA 提取、cDNA 合成及实时定量分析方法参见课题组之前研究^[11]。用 Primer premier 5 软件设计实时定量 PCR 引物,以 *NtActin* 基因(U60495.1)为内参,用实时荧光定量 PCR 方法进行基因检测^[11]。检测引物见表 1。

表 1 实时定量 PCR 引物

Table 1 Primers used for the real time quantitative PCR

基因 (GenBank 注册号) Genes (GenBank accessions)	引物序列 Primer sequences
<i>SmERF1</i> (KC405081.1)	5'-GCCTAGCTCACATAATGACGTTCTGA-3' 5'-CGACGTTAATTACTGTAAGCCGACTTC-3'
<i>NtActin</i> (U60495.1)	5'-CGTTATGGTTGGAATGGGACAGAA-3' 5'-AAGAACAGGGTGCTCCTCGTGG-3'
<i>NtSDR</i> (AJ223177.1)	5'-GAAGAGGAGGTGCGCAAAGGCA-3' 5'-CACTGATGGGTATTTTCGGATGAGA-3'
<i>NtGA20ox</i> (JQ413251)	5'-GAAACCAGACCTCACTTTAGGGACA-3' 5'-TGAAAGAGCCATAAATGTATCGCCT-3'
<i>NtACS</i> (NM_001326220.1)	5'-TCGGGCTCGTTTCAACACAGA-3' 5'-GAACATCCCGTGTCTTTTCCCTA-3'
<i>NtACO</i> (NM_001325967)	5'-TCCAAGATGACAAAGTAAGCGGC-3' 5'-TGTTTCTCTCCGCTGCCTC-3'

1.4 T₂ 代转基因烟草中激素和叶绿素含量检测

T₂ 代转基因烟草种子萌发 1 个月后的幼苗用于检测 ABA 和 GA 浓度。取转基因植株及对照株系的新鲜叶片,按照植物脱落酸(ABA)酶联免疫分析试剂盒、植物赤霉素(GA)酶联免疫分析试剂盒(均购自陕西脉元生物技术公司)说明书要求检测相应激素含量。

用 T₂ 代烟草种子萌发后 2 周龄的幼苗进行生物量统计和叶绿素含量测定。叶绿素含量检测参照 Frank 等的方法^[15]:取 200 mg 新鲜幼苗植株,研磨成粉末状,然后转到 10 mL 离心管,加入 10 mL 80% 丙酮溶液,充分混合后 4 °C 提取 24 h。4 °C 下 12 000g 离心 3 min,得到的上清液用紫外分光光度计(SHIMADZU UV-2450,Japan)在 665 nm 和 649 nm 波长下检测 OD 值。总叶绿素(a 和 b)计算按照 Ren 等^[16]的方法进行。

1.5 转基因烟草抗性分析

T₂ 代烟草种子(即野生对照烟草种子)在无菌滤纸上萌发至约 1 cm,进行移栽至含有腐殖土的花盆中,在人工气候箱中按照上述条件培养。移栽后 2 个月的植株用于抗性处理分析。用 400 mmol/L NaCl 溶液进行盐胁迫处理(约 50 mL NaCl 溶液/盆),每 3 d 处理 1 次。开始处理后第 7 天观察烟草植株状态,并收集新鲜叶片(5 株烟草植株为 1 个样品),液氮速冻后 -80 °C 保存,用于抗性生理指标测定。

分别用南京建成生物科技有限公司的 CAT Assay Kit(A007-1)、植物 POD Assay Kit(A084-3)和 SOD Assay Kit(S0102)检测转基因烟草中过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)和超氧化物歧化酶(SOD)活性,检测方法按照试剂盒说明书进行。转基因烟草中 MDA 含量用硫代巴比妥酸试剂提取,通过测定上清液在 450 nm、532 nm 和 600 nm 处的吸光度进行定量^[17]。

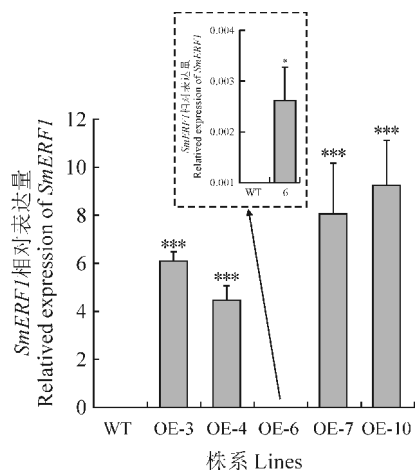
1.6 数据分析

所有数据用 SPSS 19.0 中一维方差分析,用 Turkey-Kramer test($P < 0.05$)分析样品间显著性差异,显著性结果分别用 * ($P < 0.05$)、** ($P < 0.01$)和 *** ($P < 0.001$)表示。

2 结果与分析

2.1 转化株系鉴定及形态观察

将 Gateway 的方法构建的植物表达载体 pO-ERF 用农杆菌叶脉注射法转入烟草后,以草胺磷为抗性筛选条件,筛选得到转基因的烟草株系(T₀代)。以过表达载体启动子 CaMV 35S 序列为检测片段,筛选鉴定得到阳性转基因株系;阳性株系种子成熟后再次种植的 T₁ 代植株进行 PCR 鉴定,共得到 15 个确切的阳性转基因株系。经实时定量 PCR 检测发现,在 OE-3、OE-4、OE-7 和 OE-10 4 个转基因烟草株系中,*SmERF1* 表达量比较高(图 1)。



WT 为未转基因烟草株系;OE-3,OE-4,OE-5,OE-6,OE-7,OE-10 为过表达 *SmERF1* 的烟草株系。

图 1 转基因烟草株系中 *SmERF1* 表达量
WT indicates wild type tobacco. OE-3, OE-4, OE-5, OE-6, OE-7, OE-10 indicate the overexpression lines of *SmERF1*.

Fig. 1 The expression levels of *SmERF1* in transgenic tobacco plants

在萌发阶段,野生对照烟草种子在播种第 7 天开始露白,但转基因烟草种子(T_2 代)在第 9 天才露白。在发芽后 2 周内,转基因烟草幼苗的生长速度低于野生对照株系(图 2, A),幼苗的生物总量是对照株系的 48%~53%(表 2)。转基因烟草的幼苗叶片偏黄(图 2, A),叶绿素含量是野生型对照的 82%~84%,但正常情况下,转基因烟草的种子萌发率与野生对照种子间没有差异(表 2)。在其他生长阶段,转基因烟草与对照植株间没有明显的差异。

2.2 表达 *SmERF1* 影响烟草种子大小分析

在显微镜下可以明显观察到,转基因烟草种子(T_2 代)比野生型种子小(图 2, B)。OE-3、OE-4、OE-7 和 OE-10 4 个转基因烟草株系的 T_2 代种子的千粒重分别是对照的 59%、63%、56% 和 58%(表 2)。

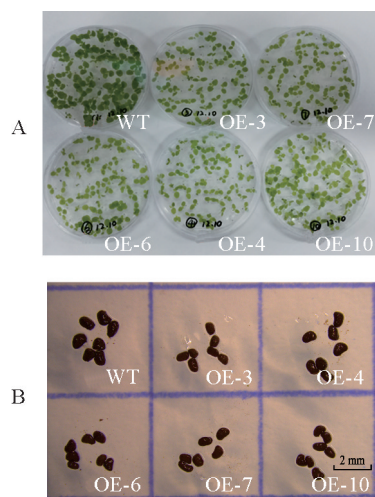


图 2 转基因烟草幼苗的形态(A)和种子大小(B)
Fig. 2 Growth morphology (A) and seed size (B) of transgenic tobacco

表 2 转基因烟草幼苗的形态指标分析

Table 2 Analysis of morphological indicators of transgenic tobacco seedlings

株系 Lines	每 100 株生物量 Per 100 biomasses/g	叶绿素含量 Chlorophyll contents/ ($\mu\text{g/g}$)	萌发率 Germination rates/%	种子千粒重 Thousand kernels weight/mg
WT	1.32 \pm 0.03a	22.23 \pm 0.13a	94.00 \pm 0.58a	111.60 \pm 1.71a
OE-3	0.64 \pm 0.02b	18.66 \pm 0.46b	94.00 \pm 0.58a	66.13 \pm 1.27bc
OE-4	0.67 \pm 0.02b	18.56 \pm 0.51b	94.00 \pm 0.58a	70.73 \pm 0.52b
OE-6	0.65 \pm 0.02b	18.66 \pm 0.46b	93.67 \pm 0.67a	61.93 \pm 0.85c
OE-7	0.67 \pm 0.02b	18.82 \pm 0.55b	94.33 \pm 0.88a	62.33 \pm 0.44c
OE-10	0.71 \pm 0.02b	18.23 \pm 0.47b	94.00 \pm 0.58a	65.07 \pm 0.82c

注:同列不同字母表示样品间在 0.05 水平存在显著性差异。

Note: The different letters within same column indicate significant difference among different samples at 0.05 level.

2.3 转基因株系耐盐性增强

400 mmol/L NaCl 溶液处理 7 d 后,野生型烟草对照株系的叶片卷曲、萎蔫,老叶变黄,而转基因植株仅部分老叶变黄,表现出较好的抗盐胁迫特性(图 3, A)。在正常和盐胁迫处理情况下,对转基因烟草植株中过氧化物酶(POD)活性、超氧化物歧化酶(SOD)活性、脯氨酸(Pro)含量和丙二醛(MDA)含量等抗性指标进行检测(图 3, B)。发现,盐胁迫下烟草转基因株系中 POD 活性显著高于对照株系,非胁迫状态转基因株系中 POD 活性高于对照株系,但不显著。转基因株系中 SOD 活性在正常状态下与对照没有差异,但在盐胁迫下显著高于对照株系。转基因株系中脯氨酸的含量在正常情况下与对照株系相比也没有明显差异,但在盐胁迫下脯氨酸含量是对照的 1.35~1.48 倍。MDA 含量则在 2

种情况下都显著低于对照株系。

2.4 表达 *SmERF1* 影响烟草激素含量

ABA 和 GA 是一对相互拮抗的植物激素,参与到植物种子萌发、种子成熟、根的发育、开花时间控制等多个生理过程。在转基因的烟草株系中 ABA 的浓度高于对照株系,为对照株系的 1.53~2.51 倍;而 GA 浓度明显下降,是对照的 0.60~0.74 倍(图 4)。

进一步用实时荧光定量 PCR 分析发现,在转基因株系中 ABA 合成途径中的关键酶编码基因 *NtSDR* (short-chain dehydrogenase/reductase, GenBank Accession No. AJ223177.1) 的表达显著高于对照株系,而烟草中 GA 合成途径的关键酶编码基因 *NtGA20ox* (GenBank Accession No. JQ413251) 的表达量则明显低于对照株系(图 4)。

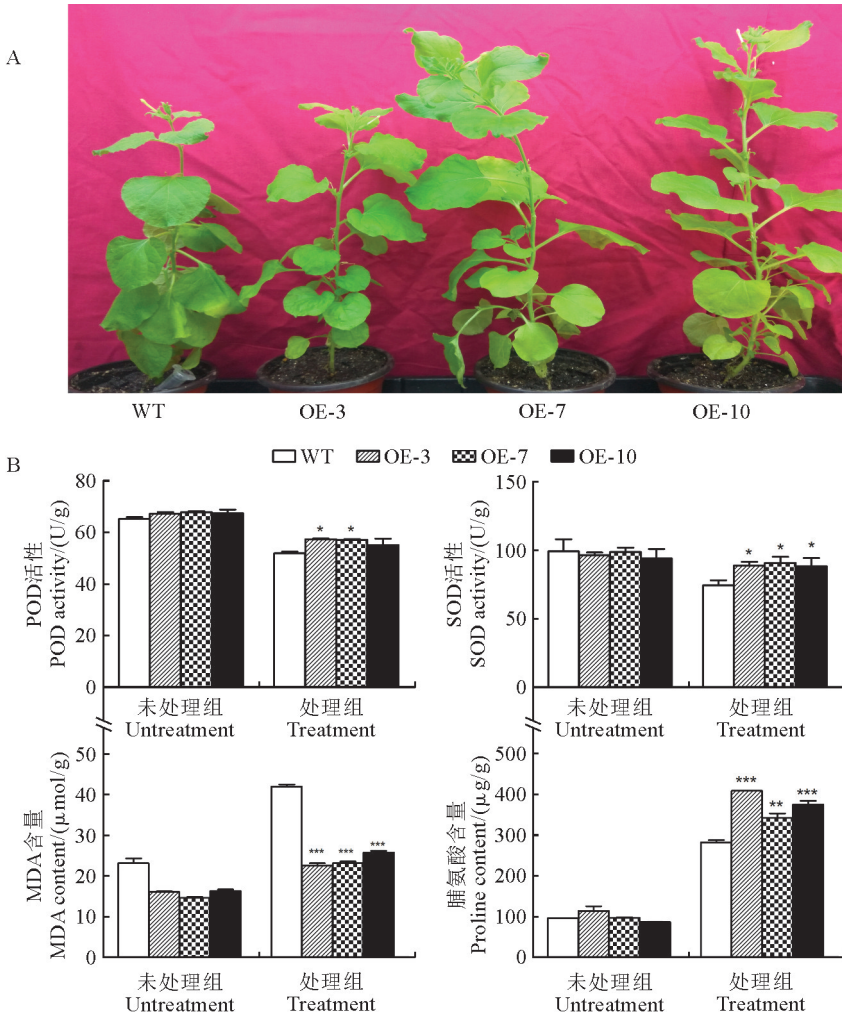


图3 盐胁迫下烟草株系形态和抗性生理指标

Fig. 3 Morphology and physiological indicators of resistance of tobacco lines under salt stress

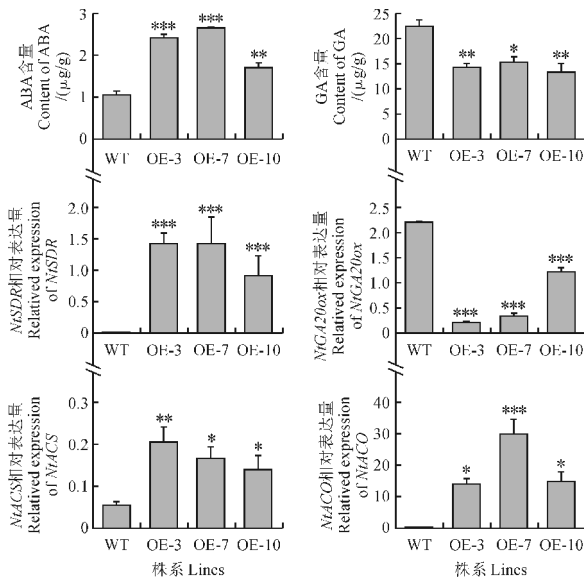


图4 烟草株系中 ABA 和 GA 含量及相关基因表达检测

Fig. 4 ABA and GA contents and related gene expressions in tobacco lines

以上结果表明,在烟草中表达 *SmERF1* 调节了植物激素 ABA 和 GA 表达;同时还发现,乙烯合成途径的关键酶编码基因 *NtACS* (GenBank Accession No. NM_001326220.1) 和 *NtACO* (GenBank Accession No. NM_001325967) 的表达量在转基因株系中也明显高于对照株系。

3 讨论

随着当今世界极端天气频发,药用植物中抗性基因的研究越来越受重视。因其在植物抗性胁迫中的重要作用,ERF 转录家族成员在抗性方面的研究逐渐成为研究的热点^[1]。如烟草中 *NtERF5*、*TaERF3*^[18]、*GmERF3*^[19] 和 *GmERF113*^[3] 等在过表达后都能增强对多种病害的抵抗能力,提升转基因植株抗旱、抗盐或抗冻等方面的抗性。前期研究显示,过表达 *SmERF1* 可以提高丹参的抗盐性^[12]。本研究中,盐胁迫下表达 *SmERF1* 的烟草株系的长势明

显好于野生型烟草,脯氨酸含量、SOD 活性和 POD 活性都高于野生型对照,MDA 含量低于对照株系,这些都显示表达 *SmERF1* 增强了烟草的抗盐性。

已有研究表明,ERF 蛋白能调节植物激素水平。如苹果 *MdERF2* 通过抑制乙烯合成途径关键酶编码基因 *MdACS1* 的转录,抑制乙烯的合成^[20]。水稻 *TSRF1* 激活 ABA 合成途径关键酶编码基因 *SDR* 的表达,提高 ABA 含量^[21]。过表达 *AtERF11* 可通过激活 *GA3ox1* 和 *GA20ox* 的表达上调拟南芥中 GA 合成^[22]。植物激素 ABA、GA 和乙烯都在介导植物生物或非生物胁迫的抗性反应中发挥着重要作用^[23]。转基因烟草中 ABA 合成途径的关键酶编码基因 *NtSDR* 表达上调,GA 合成途径关键酶编码基因 *NtGA20ox* 的表达下调。进一步分析也显示,转基因烟草中 ABA 含量上升而 GA 含量下降。这与在丹参中表达 *SmERF1* 的结果一致,也与 ABA 和 GA 两者具有相互拮抗作用的结果^[23]吻合。推测 *SmERF1* 可能通过上调 ABA 含量增加植物抗盐性。植物中 ABA 含量上升还会刺激乙烯合成^[24],在本研究中转基因烟草中乙烯合成途径的关键酶编码基因表达也高于对照植株,预示转基因株系中乙

烯含量也呈上升趋势。ABA 在植物幼苗发育期具有一定的抑制功能^[25],这也可能是表达 *SmERF1* 的烟草幼苗生长缓慢、生物量低的原因。

种子大小是一项重要的农艺性状,解析种子大小的调控机制对粮食生成具有重要意义。虽然研究表明,AP2 超家族中的 *AfAP2-2* 和 *SMOS1* 等转录因子都可以调控种子大小^[26-27],但 *AfAP2-2*、*SMOS1* 含有 2 个 AP2 结构域,*SmERF1* 仅含有 1 个 AP2 结构域^[12],属于不同的亚家族成员。研究也表明,植物激素 ABA^[27] 和 GA^[28] 的含量变化也影响种子大小,所以 *SmERF1* 可能是通过影响上述激素水平而使种子变小、变轻。

综上所述,在烟草中表达 *SmERF1* 调节了 ABA 和 GA 等植物激素合成途径的关键酶基因表达,转基因烟草中 ABA 含量升高,而 GA 含量降低。正是 ABA 含量上升导致烟草幼苗发育缓慢,植株抗盐性增强,而且植物激素含量变化进一步影响了烟草种子发育,导致种子变小、变轻。该研究进一步阐释了 *SmERF1* 的功能,为药用植物抗性研究及种子发育奠定了基础。

参考文献:

- [1] WU Y, LI X, ZHANG J N, *et al.* ERF subfamily transcription factors and their function in plant responses to abiotic stresses[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 1042084.
- [2] ZAREI A, KÖRBES A P, YOUNESSI P, *et al.* Two GCC boxes and AP2/ERF-domain transcription factor *ORA59* in jasmonate/ethylene-mediated activation of the *PDF1. 2* promoter in *Arabidopsis*[J]. *Plant Molecular Biology*, 2011, 75 (4): 321-331
- [3] ZHAO Y, CHANG X, QI D, *et al.* A novel soybean ERF transcription factor, *GmERF113*, increases resistance to *Phytophthora sojae* infection in soybean[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 299
- [4] 董亚茹, 赵东晓, 耿兵, 等. 桑树 *MnERF2* 的表达分析[J]. 生物技术通报, 2022, 38(11): 112-121.
DONG Y R, ZHAO D X, GENG B, *et al.* Expression analysis of *MnERF2* in mulberry[J]. *Biotech Bulletin*, 2022, 38 (11): 112-121.
- [5] 赵明奇, 刘晓洁, 梁玉青, 等. 新疆野苹果 AP2/ERF 转录因子家族鉴定与响应腐烂病的表达分析[J]. 西北植物学报, 2022, 42(6): 930-942.
- [6] ZHAO M Q, LIU X J, LIANG Y Q, *et al.* Identification and expression analysis of AP2/ERF transcription factor family in *Malus sieversii* upon *Valsa mali* infection[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2022, 42(6): 930-942.
- [7] JI A J, LUO H M, XU Z C, *et al.* Genome-wide identification of the AP2/ERF gene family involved in active constituent biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *The Plant Genome*, 2016, 9(2).
- [8] HUANG Q, SUN M H, YUAN T P, *et al.* The AP2/ERF transcription factor *SmERF1L1* regulates the biosynthesis of tanshinones and phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Food Chemistry*, 2019, 274: 368-375.
- [9] ZHANG Y, JI A J, XU Z C, *et al.* The AP2/ERF transcription factor *SmERF128* positively regulates diterpenoid biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Plant Molecular Biology*, 2019, 100(1): 83-93.
- [10] BAI Z Q, LI W R, JIA Y Y, *et al.* The ethylene response factor *SmERF6* co-regulates the transcription of *SmCPS1* and *SmKSL1* and is involved in tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots[J]. *Planta*, 2018, 248(1): 243-255.
- [11] ZHENG H, JING L, JIANG X H, *et al.* The ERF-VII tran-

- scription factor SmERF73 coordinately regulates tanshinone biosynthesis in response to stress elicitors in *Salvia miltiorrhiza*[J]. *New Phytologist*, 2021, 231(5): 1940-1955.
- [11] 化文平, 刘文超, 王喆之, 等. 干涉丹参 *SmORA1* 对植物抗病和丹参酮类次生代谢的影响[J]. 中国农业科学, 2016, 49(3): 491-502.
- HUA W P, LIU W C, WANG Z Z, *et al.* Effect of RNAi of *SmORA1* on disease resistance and tanshinones secondary metabolism in *Salvia miltiorrhiza*[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49(3): 491-502.
- [12] 化文平, 李世强, 孔维维, 等. 过表达 *SmERF1* 提高了丹参耐盐性[J]. 基因组学与应用生物学, 2021, 40(4): 1786-1792.
- HUA W P, LI S Q, KONG W W, *et al.* Overexpression of *SmERF1* improves salt tolerance in *Salvia miltiorrhiza*[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2021, 40(4): 1786-1792.
- [13] JYOTHISHWARAN G, KOTRESHA D, SELVARAJ T, *et al.* A modified freeze-thaw method for efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Current Science*, 2007, 93(6): 770-772.
- [14] SPARKES I A, RUNIONS J, KEARNS A, *et al.* Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants[J]. *Nature Protocols*, 2006, 1(4): 2019-2025.
- [15] FRANK W, RATNADEWI D, RESKI R. *Physcomitrella patens* is highly tolerant against drought, salt and osmotic stress[J]. *Planta*, 2005, 220(3): 384-394.
- [16] REN R H, WAN Z W, CHEN H W, *et al.* The effect of inter-varietal variation in sugar hydrolysis and transport on sugar content and photosynthesis in *Vitis vinifera* L. leaves[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2022, 189: 1-13.
- [17] WU Y C, LIU C L, KUANG J, *et al.* Overexpression of *SmLEA* enhances salt and drought tolerance in *Escherichia coli* and *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Protoplasma*, 2014, 251(5): 1191-1199.
- [18] RONG W, Qi L, WANG A Y, *et al.* The ERF transcription factor TaERF3 promotes tolerance to salt and drought stresses in wheat[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2014, 12(4): 468-479.
- [19] ZHANG G Y, CHEN M, LI L C, *et al.* Overexpression of the soybean *GmERF3* gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60(13): 3781-3796.
- [20] LI T, JIANG Z Y, ZHANG L C, *et al.* Apple (*Malus domestica*) MdERF2 negatively affects ethylene biosynthesis during fruit ripening by suppressing *MdACS1* transcription[J]. *The Plant Journal*, 2016, 88(5): 735-748.
- [21] QUAN R D, HU S J, ZHANG Z L, *et al.* Overexpression of an ERF transcription factor *TSRF1* improves rice drought tolerance[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2010, 8(4): 476-488.
- [22] ZHOU X, ZHANG Z L, PARK J, *et al.* The ERF11 transcription factor promotes internode elongation by activating gibberellin biosynthesis and signaling[J]. *Plant Physiology*, 2016, 171(4): 2760-2770.
- [23] VERMA V, RAVINDRAN P, KUMAR P P. Plant hormone-mediated regulation of stress responses[J]. *BMC Plant Biology*, 2016, 16(1): 86.
- [24] ZHANG M, YUAN B, LENG P. The role of ABA in triggering ethylene biosynthesis and ripening of tomato fruit[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60(6): 1579-1588.
- [25] HUMPLIK J F, BERGOUGNOUX V, VAN VOLKENBURGH E. To stimulate or inhibit: That is the question for the function of abscisic acid[J]. *Trends in Plant Science*, 2017, 22(10): 830-841.
- [26] LEI M, LI Z Y, WANG J B, *et al.* Ectopic expression of the *Aechmea fasciata* *APETALA2* gene *AfAP2-2* reduces seed size and delays flowering in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2019, 139: 642-650.
- [27] LI N, XU R, LI Y H. Molecular networks of seed size control in plants[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2019, 70: 435-463.
- [28] YE H, FENG J H, ZHANG L H, *et al.* Map-based cloning of seed dormancy1-2 identified a gibberellin synthesis gene regulating the development of endosperm-imposed dormancy in rice[J]. *Plant Physiology*, 2015, 169(3): 2152-2165.