

DOI: 10. 11686/cyxb2024403

<http://cyxb.magtech.com.cn>

刘媛媛, 王旭, 魏琪, 等. 梭梭 14-3-3 蛋白 HaFT-9 在高温-干旱胁迫信号交叉调控中的功能研究. 草业学报, 2025, 34(9): 134—146.

LIU Yuan-yuan, WANG Xu, WEI Qi, *et al.* The role of HaFT-9, a 14-3-3 protein from *Haloxylon ammodendron*, in the cross regulation of high temperature and drought stress. Acta Prataculturae Sinica, 2025, 34(9): 134—146.

梭梭 14-3-3 蛋白 HaFT-9 在高温-干旱胁迫信号交叉调控中的功能研究

刘媛媛, 王旭, 魏琪, 车丽娟, 袁梦, 王波*

(新疆农业大学生命科学学院, 新疆极端环境生物生态适应与进化重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830052)

摘要: 先前的研究表明, 梭梭幼苗在生长过程中通过胁迫锻炼而获得高温、干旱等胁迫耐受性, 并且 14-3-3 蛋白基因 *HaFT-9* 的表达受到高温和干旱胁迫的诱导, 提示 *HaFT-9* 可能参与高温与干旱胁迫信号的交叉调控。为此, 本研究探讨了 *HaFT-9* 在高温与干旱胁迫交叉调控作用中的功能。通过对梭梭幼苗进行高温胁迫锻炼后, 再施加干旱胁迫, 发现高温胁迫锻炼显著促进了 *HaFT-9* 在次级干旱胁迫下的表达。进一步的试验表明, 经过高温胁迫锻炼与次级干旱胁迫处理, *HaFT-9* 过表达的拟南芥株系表现出比野生型更高的存活率和更低的细胞死亡率。在次级干旱胁迫条件下, *HaFT-9* 过表达株系中 *P5CS1*、*P5CS2*、*CAT2*、*CHL11*、*HSP21*、*HsfA2* 及 *BI-1* 等抗逆相关基因的表达水平均显著升高。同时, 过表达株系中的过氧化氢酶 (CAT) 活性、脯氨酸和叶绿素含量也显著增加, 丙二醛 (MDA) 含量则显著降低, 而且过表达株系的二氨基联苯胺 (DAB) 与硝基氮蓝四唑 (NBT) 染色较浅。综上所述, *HaFT-9* 的过表达显著增强了拟南芥对次级干旱胁迫的适应性, 表明 *HaFT-9* 在高温与干旱胁迫信号交叉响应中发挥了关键的调控作用。本研究为深入理解梭梭幼苗的耐逆分子机制提供了理论依据, 并为保护其种质资源提供了参考。

关键词: 梭梭; 高温; 干旱; 交叉调控; *HaFT-9*

The role of HaFT-9, a 14-3-3 protein from *Haloxylon ammodendron*, in the cross regulation of high temperature and drought stress

LIU Yuan-yuan, WANG Xu, WEI Qi, CHE Li-juan, YUAN Meng, WANG Bo*

College of Life Sciences, Xinjiang Agricultural University, Xinjiang Key Laboratory for Ecological Adaptation and Evolution of Extreme Environment Biology, Urumqi 830052, China

Abstract: Previous research has demonstrated that *Haloxylon ammodendron* seedlings acquire resistance to stressors like high temperatures and drought through adaptive stress conditioning during their growth. Additionally, the expression of the 14-3-3 protein gene *HaFT-9* is significantly upregulated in response to high temperature and drought stress, suggesting a potential role in mediating crosstalk between these stress pathways. This study further investigates the role of *HaFT-9* in the cross-regulation of high temperature and drought stress signals. Pre-treatment of *H. ammodendron* seedlings with heat stress, followed by a subsequent drought stress challenge, significantly increased *HaFT-9* expression during drought stress. Comparative experiments demonstrated that *Arabidopsis thaliana* lines overexpressing *HaFT-9* showed higher survival rates and reduced cellular mortality under sequential

收稿日期: 2024-10-17; 改回日期: 2024-12-05

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32360079) 资助。

作者简介: 刘媛媛 (1999—), 女, 安徽安庆人, 在读硕士。E-mail: liuyuanyuan990821@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: wangbo@xjau.edu.cn

heat and drought stress compared to wild-type controls. Notably, the lines overexpressing *HaFT-9* exhibited enhanced expression of several key stress-responsive genes, including *P5CS1*, *P5CS2*, *CAT2*, *CHL11*, *HSP21*, *HsfA2* and *BI-1*, in response to subsequent drought stress. In addition, these lines showed significantly enhanced catalase (CAT) activity, increased proline and chlorophyll levels, while the content of malondialdehyde (MDA) was significantly reduced. Moreover, staining with diaminobenzidine (DAB) and nitroblue tetrazolium (NBT) in overexpressing lines was lighter. In conclusion, *HaFT-9* overexpression markedly improves drought tolerance in *A. thaliana*, underscoring its critical regulatory role in modulating the interplay between high temperature and drought stress responses. This study provides valuable insights into the molecular mechanisms underlying stress tolerance in *H. ammodendron* seedlings and provides data relevant to the conservation of its germplasm resources.

Key words: *Haloxylon ammodendron*; high temperature; drought; cross regulation; HaFT-9

14-3-3蛋白在植物体内主要以同源或异源二聚体的形式形成特殊的槽状结构,以序列特异性和磷酸化依赖的方式与其众多的靶蛋白结合,并通过改变靶蛋白的活性、稳定性、构象、亚细胞定位或者与其他蛋白的亲合力来调控靶标的信号转导,进而参与代谢调控、细胞周期调控、细胞凋亡、蛋白质转运、转录、应激反应和恶性转化等一系列过程^[1]。14-3-3蛋白在植物生长发育和胁迫适应过程中发挥重要作用,处于植物应答非生物胁迫信号网络的交叉点,能够响应多种不同的胁迫部分,14-3-3蛋白通过激素相关的信号通路调节植物对盐、碱、渗透、干旱、寒冷等环境胁迫和其他非生物胁迫的反应^[2],如14-3-3 λ 蛋白可正调控棉花(*Gossypium hirsutum*)的干旱耐受性,同时也可以负调控拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的耐盐性^[3]。

植物在整个生命周期中常常面临不同持续时间和强度的多种胁迫,如干旱与高温、低温与高温、高温与盐胁迫等。植物已进化出多样的机制以应对这些胁迫。基因型变异是植物长期适应外界环境和进化的主要动力,帮助植物更好地适应各种胁迫,提高存活率。表型可塑性是植物应对环境胁迫的另一种有效策略,而诱导表观遗传变化有助于植物快速适应短期环境变化^[4]。交叉胁迫耐受是指植物在经历一种初次胁迫后,能够改善其在其他类型次级胁迫下的代谢效率和表型^[5]。这种胁迫锻炼通常称为交叉锻炼或反式锻炼,其基于不同性质胁迫之间共享的协同信号通路的相互作用^[6]。因此,交叉胁迫耐受是交叉锻炼后的一种胁迫记忆现象。植物的胁迫记忆源于初始胁迫后产生的表观遗传修饰和基因重排,其表观遗传调控机制包括染色质重塑、DNA甲基化、核小体定位、组蛋白修饰以及非编码RNA介导的调节等^[7]。

梭梭(*Haloxylon ammodendron*),别名琐琐,为苋科(Amaranthaceae)梭梭属(*Haloxylon*)的超耐旱多年生小乔木。梭梭具有很强的抗逆性,对风蚀沙埋适应性强,对荒漠区防风固沙、保护生态平衡具有重要意义^[8]。研究发现,成年的梭梭对于外界环境变化具有较强的适应能力,然而,梭梭天然更新幼苗、播种幼苗以及移栽苗在高温、干旱等环境胁迫下的存活率极低,表明梭梭幼苗在生长过程中通过胁迫锻炼而获得胁迫耐受性^[9-10]。Cao等^[11]研究表明在信号传导、转录调控、生长发育等方面相关的基因在梭梭抵抗逆境胁迫中发挥着重要作用。目前对梭梭14-3-3蛋白家族的研究主要针对梭梭9个14-3-3蛋白家族成员(HaFT-1到HaFT-9),研究表明梭梭14-3-3蛋白家族成员的表达均受干旱和热胁迫诱导,其中*HaFT-3*、*HaFT-4*和*HaFT-7*过表达株系对干旱、盐和低温胁迫等逆境有更强的抵御能力^[12];Pan等^[10]研究发现HaFT-1是获得耐热性的正调节因子;刘栓栓等^[13]克隆了梭梭14-3-3蛋白家族*HaFT-9*基因,并证实*HaFT-9*基因在模拟干旱、高温、盐胁迫、脱落酸(abscisic acid, ABA)和吲哚乙酸(indoleacetic acid, IAA)处理下均有表达,且*HaFT-9*基因的表达还具有高温胁迫记忆的特征;魏琪^[14]研究发现*HaFT-9*的过表达增强了转基因拟南芥对干旱胁迫的耐受性。综上表明HaFT-9可能参与高温与干旱胁迫信号的交叉调控。因此,本研究对*HaFT-9*在高温与干旱胁迫信号交叉调控中的功能展开研究,分析了梭梭在高温胁迫锻炼一次级干旱胁迫处理下*HaFT-9*基因的表达水平,并探讨了*HaFT-9*过表达对转基因拟南芥幼苗和成株在高温胁迫锻炼一次级干旱胁迫处理下的表型、细胞死亡、生理指标及抗逆相关基因表达量的影响。本研究将为

揭示梭梭幼苗耐逆分子机理、保护梭梭种质资源提供参考。

1 材料与方法

1.1 植物材料

试验于2023年4至11月在新疆农业大学生命科学学院新疆极端环境生物生态适应与进化重点实验室进行。本研究使用的梭梭种子采集于新疆古尔班通古特沙漠南缘(44°28' N, 88°11' E), 梭梭种子首先在75%酒精中消毒3 min, 然后用无菌水洗涤3次, 接着用次氯酸钠消毒10 min, 并用无菌水冲洗9次。经过表面消毒的种子播种在MS(Murashige-Skoog)培养基(西美杰, 中国, 成分为: 0.1732 g MS+0.8 g 蔗糖+0.24 g 琼脂+40 mL ddH₂O)上, 放置在恒温光照培养箱中, 设置条件为22℃、16 h光/8 h暗循环、光照强度8000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、相对湿度60%, 培养60 d后进行高温胁迫锻炼一次级干旱胁迫处理。

本研究使用的野生型拟南芥生态型为哥伦比亚型(Col-0), *HaFT-9*转基因拟南芥的T₃代过表达纯合株种子来自魏琪^[14]的前期研究, 生态型同样为哥伦比亚型(Col-0)。拟南芥种子首先用75%的酒精消毒30 s, 然后用无菌水洗3次, 接着用10%次氯酸钠消毒10 min, 并用无菌水冲洗8次。经过表面消毒后的种子播种在MS培养基上, 4℃避光春化3 d, 之后置于恒温光照培养箱中, 设置条件为22℃、16 h光/8 h暗循环、光照强度8000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、相对湿度60%, 培养7 d后进行拟南芥幼苗的高温胁迫锻炼一次级干旱胁迫处理。对于成株拟南芥材料的获取, 将在恒温光照培养箱中生长10 d的幼苗移栽到装有珍珠岩、蛭石和营养土(珍珠岩:蛭石:营养土=1:2:2)的花盆中, 置于人工气候培养室, 条件设置为22℃、16 h光/8 h暗循环、相对湿度60%, 培养30 d后进行拟南芥成株的高温胁迫锻炼一次级干旱胁迫处理。

1.2 高温胁迫锻炼一次级干旱胁迫处理

本试验设置对照组、单一高温胁迫组、单一干旱胁迫组及高温胁迫锻炼一次级干旱胁迫组4个处理组。对正常生长60 d的梭梭进行如下处理: 1)对照组(CK组): 22℃ 12 h→22℃ 3 d→22℃ 19 d(处理结束时取样, 取样点为CK_h); 2)单一高温胁迫组(H组): 37℃ 12 h→22℃ 3 d→22℃ 19 d(处理结束时取样, 取样点为H_h); 3)单一干旱胁迫组(D组): 22℃ 12 h→22℃ 3 d→22℃ 480 mmol·L⁻¹山梨醇19 d(处理结束时取样, 取样点为D_h); 4)高温胁迫锻炼一次级干旱胁迫组(HD组): 37℃ 12 h→22℃ 3 d→22℃ 480 mmol·L⁻¹山梨醇19 d(处理结束时取样, 取样点为HD_h)。每个取样点设置了3个重复, 每个重复包含30株苗。

对拟南芥幼苗进行如下处理: 1)对照组(CK组): 22℃ 4 h→22℃ 3 d→22℃ 8 d(处理结束时取样, 取样点为CK_s); 2)单一高温胁迫组(H组): 37℃ 4 h→22℃ 3 d→22℃ 8 d(处理结束时取样, 取样点为H_s); 3)单一干旱胁迫组(D组): 22℃ 4 h→22℃ 3 d→22℃ 25% 聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)6000 8 d(处理结束时取样, 取样点为D_s); 4)高温胁迫锻炼一次级干旱胁迫组(HD组): 37℃ 4 h→22℃ 3 d→22℃ 25% PEG 6000 8 d(处理结束时取样, 取样点为HD_s)。在4组处理结束时观察表型与拍照记录, 并统计存活植株的数目。每个取样点设置了3个重复, 每个重复包含60株幼苗, 计算拟南芥幼苗的存活率, 公式如下:

$$\text{存活率}(\%) = (\text{存活植株数} / \text{试验植株总数}) \times 100$$

对拟南芥成株进行如下处理: 1)对照组(CK组): 22℃水分充足4 h→22℃水分充足3 d→22℃水分充足10 d(取样点为CK_a)→22℃水分充足10 d(处理结束时取样, 取样点为RCK_a); 2)单一高温胁迫组(H组): 37℃水分充足4 h→22℃水分充足3 d→22℃水分充足10 d(取样点为H_a)→22℃水分充足10 d(处理结束时取样, 取样点为RH_a); 3)单一干旱胁迫处理组(D组): 22℃水分充足4 h→22℃水分充足3 d→22℃自然干旱10 d(取样点为D_a)→22℃水分充足10 d(处理结束时取样, 取样点为RD_a); 4)高温胁迫锻炼一次级干旱胁迫处理组(HD组): 37℃水分充足4 h→22℃水分充足3 d→22℃自然干旱10 d(取样点为HD_a)→22℃水分充足10 d(处理结束时取样, 取样点为RHD_a)。在取样点CK_a、H_a、D_a、HD_a观察表型并取样, 在取样点RCK_a、RH_a、RD_a、RHD_a统计存活植株的数目。每个取样点设置了3个重复, 每个重复包含30株苗, 并计算拟南芥成株的存活率。本体系中梭梭与拟南芥的高温胁迫锻炼、干旱胁迫处理依据Pan等^[10]和Montero-Barrientos等^[15]的方法, 并略有改动。

1.3 细胞死亡染色及观察

取 4 个取样点 (CK_s、H_s、D_s、HD_s) 下拟南芥幼苗的叶片和根, 参照索莱宝科技有限公司的植物组织染色试剂盒 (台盼蓝法) 和 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 溶液 (即用型) (索莱宝, 中国) 试剂盒说明书进行染色, 制作玻片观察并统计细胞死亡率, 台盼蓝染色在 Carl Zeiss MicroImaging GmbH 光学显微镜 (卡尔蔡司, 德国) 下观察, DAPI 染色需用 AX NIS-Elements 5.4 激光共聚焦显微镜 (尼康, 日本) 观察。每个处理设置 3 个生物学重复, 每个重复包含 60 个细胞。

1.4 总 RNA 提取与反转录

取 4 个取样点 CK_h、H_h、D_h、HD_h 处的梭梭样品、取样点 CK_s、H_s、D_s、HD_s 处的拟南芥幼苗样品以及取样点 CK_a、H_a、D_a、HD_a 处的拟南芥成株样品, 用 Biospin 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (博日, 中国) 提取梭梭和拟南芥的总 RNA, 然后用琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop (ThermoFisher Scientific, 美国) 微量紫外/可见光分光光度计分析 RNA 的质量。参照 TransScript® One-Step gDNA Removal and cDNA synthesis SuperMix (全式金生物, 中国) 说明书, 在 20 μL 反应中将 2 μg 的总 RNA 反转录为 cDNA。

1.5 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析

采用 Primer Premier 5 软件设计梭梭 *Ha18SrRNA*、*HaFT-9* 以及拟南芥 *P5CS1*、*P5CS2*、*CAT2*、*CDS1*、*CHL11*、*DREB2a*、*HsfA2*、*HSP21*、*BI-1*、*At18SrRNA* 基因实时荧光定量 PCR (quantitative fluorescence real time-PCR, qRT-PCR) 引物, 以拟南芥 *At18SrRNA* 作为内参基因, 引物序列见表 1。以取样点 CK_h、H_h、D_h、HD_h 处的梭梭样品、取样点 CK_s、H_s、D_s、HD_s 处的拟南芥幼苗样品以及取样点 CK_a、H_a、D_a、HD_a 处的拟南芥成株样品 cDNA 为模板, 使用 TB Green Premix Ex Taq™ II 试剂盒 (TaKaRa, 日本) 和 7500 Fast Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific, 美国) 进行 qRT-PCR 检测, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[16] 计算相对表达量。每个样品取 3 个生物学重复。

表 1 本研究所用引物
Table 1 Primers used in this study

基因 Gene	正向引物 Forward primer (5'→3')	反向引物 Reverse primer (5'→3')
<i>Ha18SrRNA</i>	CTCTGCCCGTTGCTCTGATGAT	CCTTGATGTGGTAGCCGTTTC
<i>HaFT-9</i>	TACTTTGGGTGAAGAGTCTACA	TTTGATCCTGCATGTCTGATGT
<i>P5CS1</i>	GATACGGATATGGCAAAGCG	CCAAGTCCAAATCGGAAACC
<i>P5CS2</i>	GTAAAGCGTATCGTCGTCAAGGTT	CCTAAACGTCCAAGAGCCAATCT
<i>CAT2</i>	ACATTCGTTGACCCTTTTCAC	GGCCACACACGATAACAAC
<i>CDS1</i>	CTGCATCTCTACTGGACCTC	CCACATCCAACCTCTCGAGC
<i>CHL11</i>	TGTTGATGGGTTGAGAGGAG	AACGGTTGCAACATCATCTG
<i>DREB2a</i>	CAACAGCAGGATTCGCTATCTG	ACATCGTCGCCATTTAGGTCA
<i>HSP21</i>	TGGACGTCTCTCCTTTTCGATTGT	TGCACGAATCTCTGACACTCCACT
<i>HsfA2</i>	GAGATTTTCCGGCGTGATTT	ACATCGGACCTGAAAGAGAG
<i>BI-1</i>	ACATTCGTTGACCCTTTTCAC	GGCCACACACGATAACAAC
<i>At18SrRNA</i>	AAACGGCTACCACATCCAAG	CCTCCAATGGATCCTCGTTA

1.6 生理指标测定及二氨基联苯胺 (diaminobenzidine, DAB) 和硝基氮蓝四唑 (nitroblue tetrazolium, NBT) 染色

在拟南芥幼苗取样点 (CK_s、H_s、D_s、HD_s) 和成株取样点 (CK_a、H_a、D_a、HD_a) 取样用于各项生理指标测定和染色。测定各项生理指标时每个样品均取 3 个生物学重复。分别参照超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT)、过氧化物酶 (peroxidase, POD) 活性测定试剂盒 (A001-1-2、A007-1-1、A084-

3-1,南京建成生物工程研究所),及丙二醛(malondialdehyde,MDA)和脯氨酸含量测定试剂盒(A003-1-2和A107-1-1,南京建成生物工程研究所)说明书测定上述生理指标。每个生物学重复样品的总叶绿素含量测定方法为:将0.1 g植株浸泡在含丙酮:无水乙醇=2:1的离心管中,待脱色后测定上清液在OD₆₄₅和OD₆₆₃处的吸光值,总叶绿素含量(mg·g⁻¹)=8.02×OD₆₆₃+20.2×OD₆₄₅^[17]。分别参照植物过氧化氢染色液(DAB法)和植物超氧阴离子染色液(NBT法)试剂盒(G1022-100ML和G1023-100ML,武汉赛维尔生物科技有限公司)说明书,对取样点样品进行染色,然后分别使用AX NIS-Elements 5.4激光共聚焦显微镜(尼康,日本)和AxioCam ERc5s体视镜(蔡司集团,德国)观察幼苗和成株取样点染色样品。

1.7 数据处理

使用Excel 2019进行数据处理和作图,使用SPSS 26.0进行单因素方差分析(ANOVA),使用LSD算法分析显著性差异。

2 结果与分析

2.1 高温胁迫锻炼促进HaFT-9在次级干旱胁迫下的表达

为了探索HaFT-9在高温和干旱胁迫信号交叉调控中的表达特征,将梭梭进行高温胁迫锻炼一次级干旱胁迫处理(图1A),利用qRT-PCR分析HaFT-9基因在4个处理组(CK、H、D、HD组)下的表达水平。结果显示,HaFT-9在HD组处理后的表达水平显著高于D组(图1B),表明高温胁迫锻炼促进了HaFT-9在次级干旱胁迫下的表达。

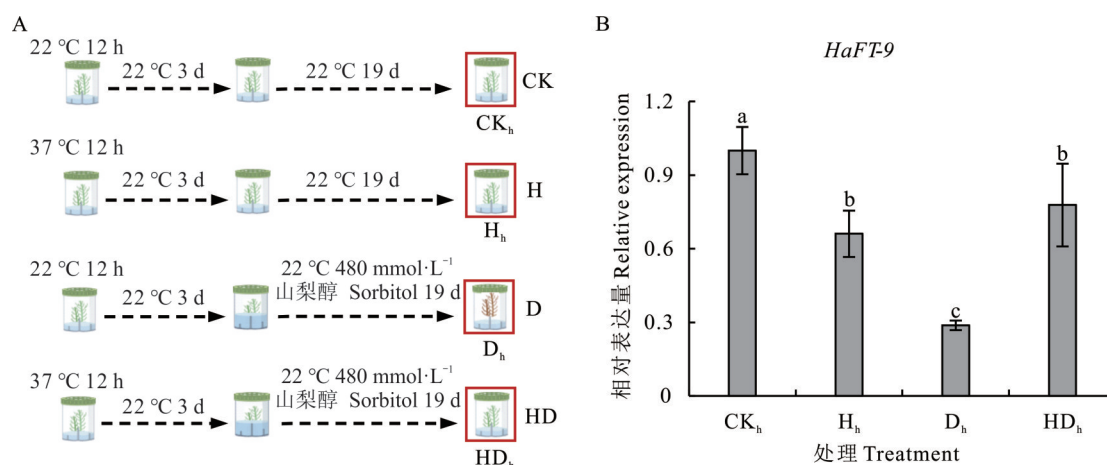


图1 HaFT-9基因在高温胁迫锻炼-次级干旱胁迫处理下的表达

Fig. 1 The expression of the HaFT-9 gene under the heat stress priming-the secondary drought stress treatment

A: 梭梭幼苗的高温胁迫锻炼一次级干旱胁迫处理,分为CK、H、D、HD组,每个红框表示取样点;B: HaFT-9在高温胁迫锻炼一次级干旱胁迫处理下的表达量;不同小写字母表示在 $P<0.05$ 水平上差异显著。A: The heat stress priming-the secondary drought stress treatment for *H. ammodendron* seedlings, divided into CK, H, D and HD group, and each red box indicates a sampling point; B: Expression level of HaFT-9 under the heat stress priming-the secondary drought stress treatment; Different lowercase letters indicate significant differences at $P<0.05$ level. 下同 The same below.

2.2 HaFT-9过表达提高了转基因拟南芥对次级干旱胁迫的耐受性

前期研究^[14]已获得10个HaFT-9转基因拟南芥T₃代纯合过表达株系,本研究选取HaFT-9表达水平较高的9-4和9-37株系^[14]用于HaFT-9在高温胁迫锻炼一次级干旱胁迫处理下的功能分析。对拟南芥幼苗及成株分别进行高温胁迫锻炼一次级干旱胁迫处理(图2A,B)。结果表明,野生型(wild type, WT)和HaFT-9过表达株系在CK和H组处理后生长表型无明显差异,但在D和HD组处理下的HaFT-9过表达株系的生长表型明显优于WT(图2C,D),统计存活率发现,拟南芥幼苗及成株在D组处理后,HaFT-9过表达株系的存活率显著高于WT($P<0.05$,图3C,F),而在HD组处理下,HaFT-9过表达株系中9-4株系幼苗的存活率显著高于WT(图3C),9-37株

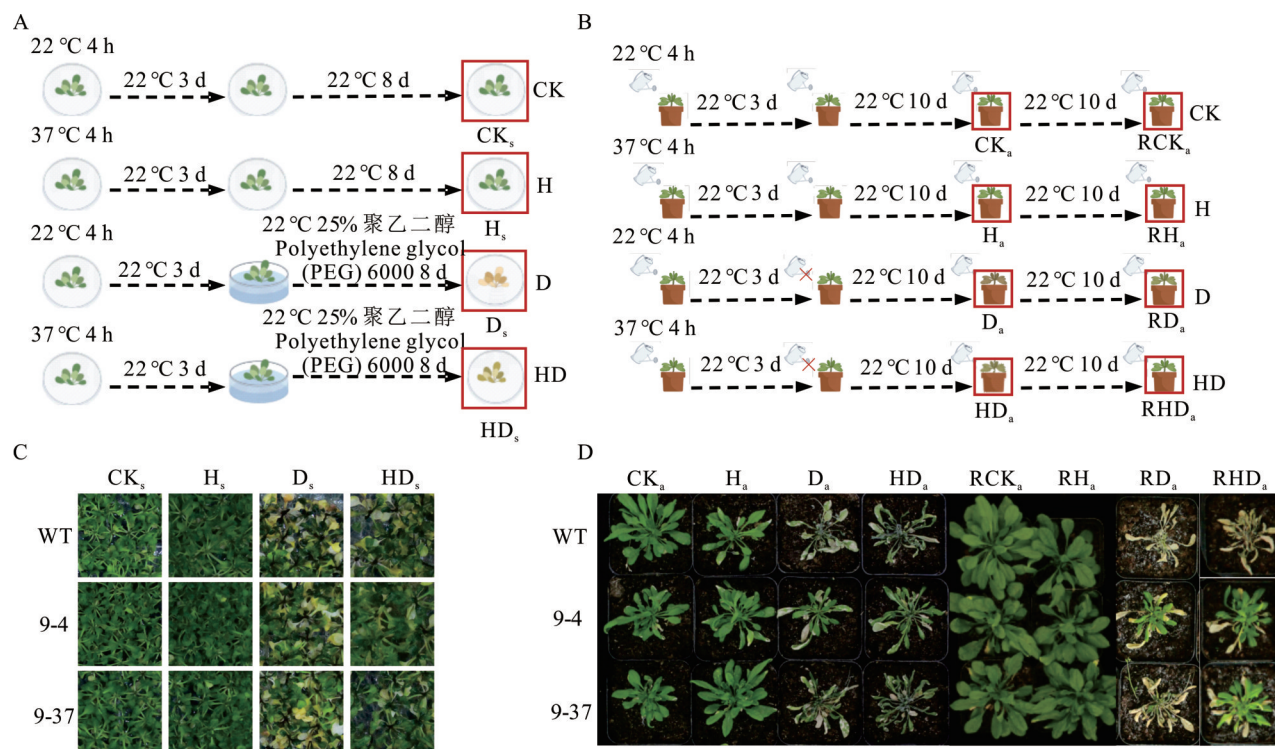


图 2 高温胁迫锻炼-次级干旱胁迫处理对拟南芥生长的影响

Fig. 2 The effects of the heat stress priming—the secondary drought stress treatment on the growth of *Arabidopsis*

A: 拟南芥幼苗的高温胁迫锻炼-次级干旱胁迫处理, 分为 CK、H、D、HD 组, 每个红框表示取样点; B: 拟南芥成株的高温胁迫锻炼-次级干旱胁迫处理, 分为 CK、H、D、HD 组, 每个红框表示取样点; C: 拟南芥幼苗的生长表型; D: 拟南芥成株的生长表型; WT 为野生型拟南芥, 9-4 和 9-37 为 *HaFT-9* 过表达株系。A: The heat stress priming—the secondary drought stress treatment for *Arabidopsis* seedlings, divided into group CK, H, D and HD, and each red box indicates a sampling point; B: The heat stress priming—the secondary drought stress treatment for mature *Arabidopsis*, divided into CK, H, D and HD group, and each red box indicates a sampling point; C: Growth phenotype of *Arabidopsis* seedlings; D: Growth phenotype of mature *Arabidopsis*; WT refers to the wild-type *Arabidopsis*, while 9-4 and 9-37 are the *HaFT-9* overexpression lines. 下同 The same below.

系成株存活率显著高于 WT (图 3F)。这些结果显示, *HaFT-9* 过表达有效提高了转基因拟南芥在次级干旱胁迫下的耐受性, 表明 *HaFT-9* 过表达提高了转基因拟南芥在次级干旱胁迫下的存活率。

为了探究高温胁迫锻炼-次级干旱胁迫处理对 *HaFT-9* 过表达拟南芥幼苗细胞死亡的影响, 对拟南芥幼苗进行了细胞死亡染色。对叶片和根分别进行台盼蓝 (trypan blue, TB) 染色和 DAPI 染色, 结果显示, 在 D 和 HD 组处理后, *HaFT-9* 过表达株系的 TB 和 DAPI 染色细胞数目较少 (图 3A, D)。统计分析表明, 在 D 组处理后, *HaFT-9* 过表达株系的叶片细胞死亡率显著低于 WT, 9-4 株系的根尖细胞死亡率要显著低于 WT ($P < 0.05$); 在 HD 组处理后 *HaFT-9* 过表达株系的叶片细胞和根尖细胞死亡率均显著低于 WT (图 3B, E)。TB 和 DAPI 染色结果表明, *HaFT-9* 过表达减少了转基因拟南芥幼苗在次级干旱胁迫下的细胞死亡率, 且 9-4 株系表现出更强的耐受性。

2.3 *HaFT-9* 过表达提高了拟南芥在次级干旱胁迫下抗逆途径相关基因的表达水平

为了探索 *HaFT-9* 在高温胁迫锻炼-次级干旱胁迫响应中的调控机制, 利用 qRT-PCR 分析拟南芥幼苗及成株在高温胁迫-次级干旱胁迫体系中的抗氧化酶合成 (*CAT2*、*CDS1*)、脯氨酸合成 (*P5CS1*、*P5CS2*)、叶绿素合成 (*CHL11*)、干旱胁迫响应 (*DREB2a*)、高温胁迫响应 (*HsfA2*、*HSP21*) 和细胞凋亡 (*BI-1*) 相关基因的表达水平, 拟南芥幼苗的相关基因表达水平结果显示, 在 D 组处理下, *HaFT-9* 过表达株系的 *CHL11*、*DREB2a*、*HSP21* 和 *BI-1* 基因表达量均显著高于 WT, 9-37 株系的 *P5CS1*、*P5CS2* 和 *CDS1* 基因表达量显著高于 WT ($P < 0.05$); 在 HD 组处理下, *HaFT-9* 过表达株系的 *P5CS1*、*P5CS2*、*CAT2*、*CHL11*、*DREB2a*、*HSP21*、*HsfA2*、*BI-1* 基因表达量均显著高于 WT, 且显著高于 D 组, 而 HD 组中 9-4 株系的 *CDS1* 基因表达量显著低于 WT, 并与 D 组相比无显著差异。

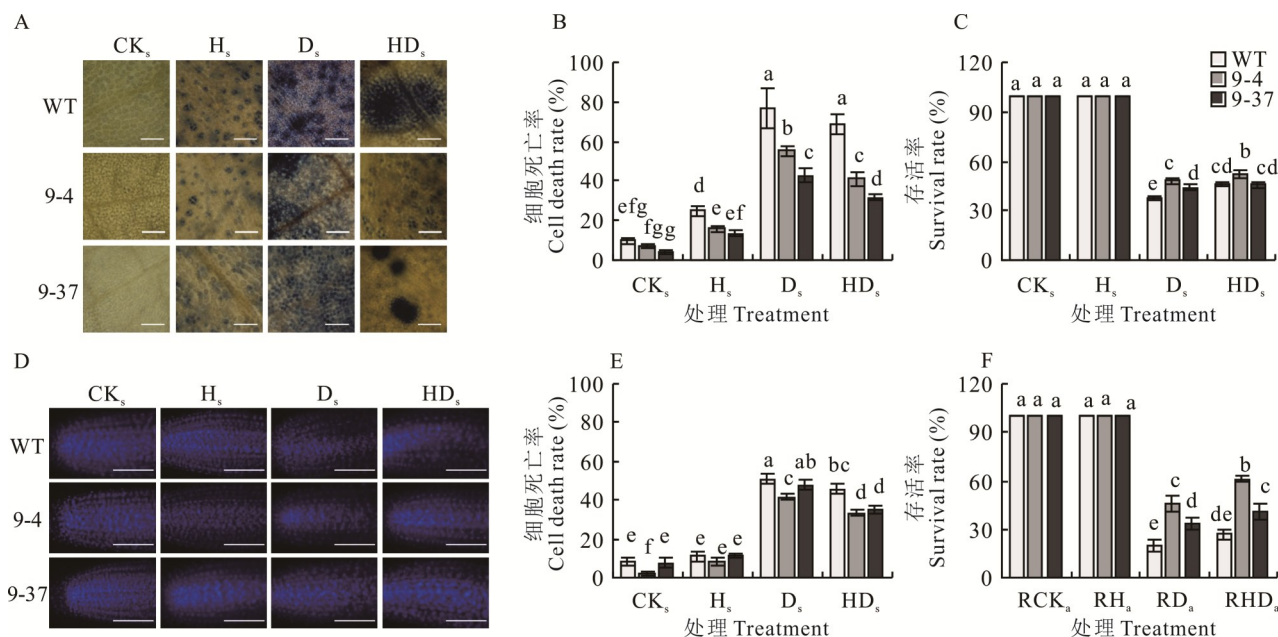


图3 高温胁迫锻炼-次级干旱胁迫处理对拟南芥存活率及细胞死亡率的影响

Fig. 3 The effects of the heat stress priming-the secondary drought stress treatment on the survival rate and cell death rate in *Arabidopsis*

A: 拟南芥幼苗台盼蓝染色(叶片, 标尺=50 μ m); B: 拟南芥幼苗台盼蓝染色后叶片的细胞死亡率; C: 拟南芥幼苗的存活率; D: 拟南芥幼苗DAPI染色(根尖, 标尺=50 μ m); E: 拟南芥幼苗DAPI染色后的根尖细胞死亡率; F: 拟南芥成株的存活率。A: Trypan blue staining in *Arabidopsis* seedlings (leaf, bar=50 μ m); B: Cell death rate of leaves in *Arabidopsis* seedlings after Trypan blue staining; C: Survival rate of *Arabidopsis* seedlings; D: DAPI staining in *Arabidopsis* seedlings (root tip, bar=50 μ m); E: Cell death rate in the root tips of *Arabidopsis* seedlings after DAPI staining; F: Survival rate of mature *Arabidopsis*.

($P>0.05$, 图4A)。拟南芥成株的相关基因表达水平结果显示, 在D组处理下, *HaFT-9*过表达株系的 *CAT2* 和 *BI-1* 基因表达量显著高于WT, 9-37株系的 *P5CS2* 和 *CHL11* 基因表达量显著高于WT, 9-4株系的 *DREB2a* 基因表达量显著高于WT; 在HD组处理下, *HaFT-9*过表达株系的 *P5CS2*、*CAT2*、*HSP21* 和 *HsfA2* 基因表达量均显著高于WT, 与D组处理相比, HD组中 *HaFT-9*过表达株系的 *P5CS1*、*P5CS2*、*CAT2* 和 *BI-1* 基因表达量均显著高于D组, 9-37株系的 *CDS1* 和 *HsfA2* 基因表达量显著高于D组, 9-4株系的 *HSP21* 基因表达量显著高于D组, 而HD组9-4株系的 *DREB2a* 基因表达量显著低于D组($P<0.05$, 图4B)。

对两种生长阶段拟南芥的相关基因表达量差异进行比较发现, D和HD组相比, 两种生长阶段拟南芥 *HaFT-9*过表达株系的 *DREB2a*、*CHL11*、*HsfA2* 和 *CDS1* 基因表达量变化趋势不一致(图4A, B)。推测造成相关基因变化趋势不一致的原因在于不同生长周期以及不同株系对干旱胁迫的调控方式和程度存在差异。

综上所述, 拟南芥经过高温锻炼后, 提高了在次级干旱胁迫下 *HaFT-9*过表达株系中抗逆途径相关基因的表达水平。提示 *HaFT-9*过表达能促进经过高温胁迫锻炼的拟南芥在次级干旱胁迫下的植物抗逆途径相关基因的表达, 从而增强转基因拟南芥对次级干旱胁迫的适应性。

2.4 *HaFT-9*过表达增强了拟南芥在次级干旱胁迫下的抗氧化能力

为了解析 *HaFT-9*过表达株系在高温胁迫锻炼-次级干旱胁迫处理下的抗氧化能力, 对拟南芥幼苗及成株分别进行高温胁迫锻炼-次级干旱胁迫处理, 测定其相关生理生化指标并进行DAB和NBT染色。DAB和NBT染色结果显示, 在CK和H组处理下, WT与 *HaFT-9*过表达株系拟南芥叶片的颜色无明显差异, 而在D和HD组处理下的WT颜色明显深于 *HaFT-9*过表达株系, 且D组处理下的颜色深于HD组处理(图5)。这表明HD组处理下叶片的 H_2O_2 和 $O_2^{\cdot-}$ 含量较低, 叶片所受到的伤害较小。结果表明, *HaFT-9*过表达可能增强了拟南芥在次级干旱胁迫下的活性氧清除能力。生理生化指标测定结果显示, 拟南芥幼苗及成株在D和HD组处理下, *HaFT-9*

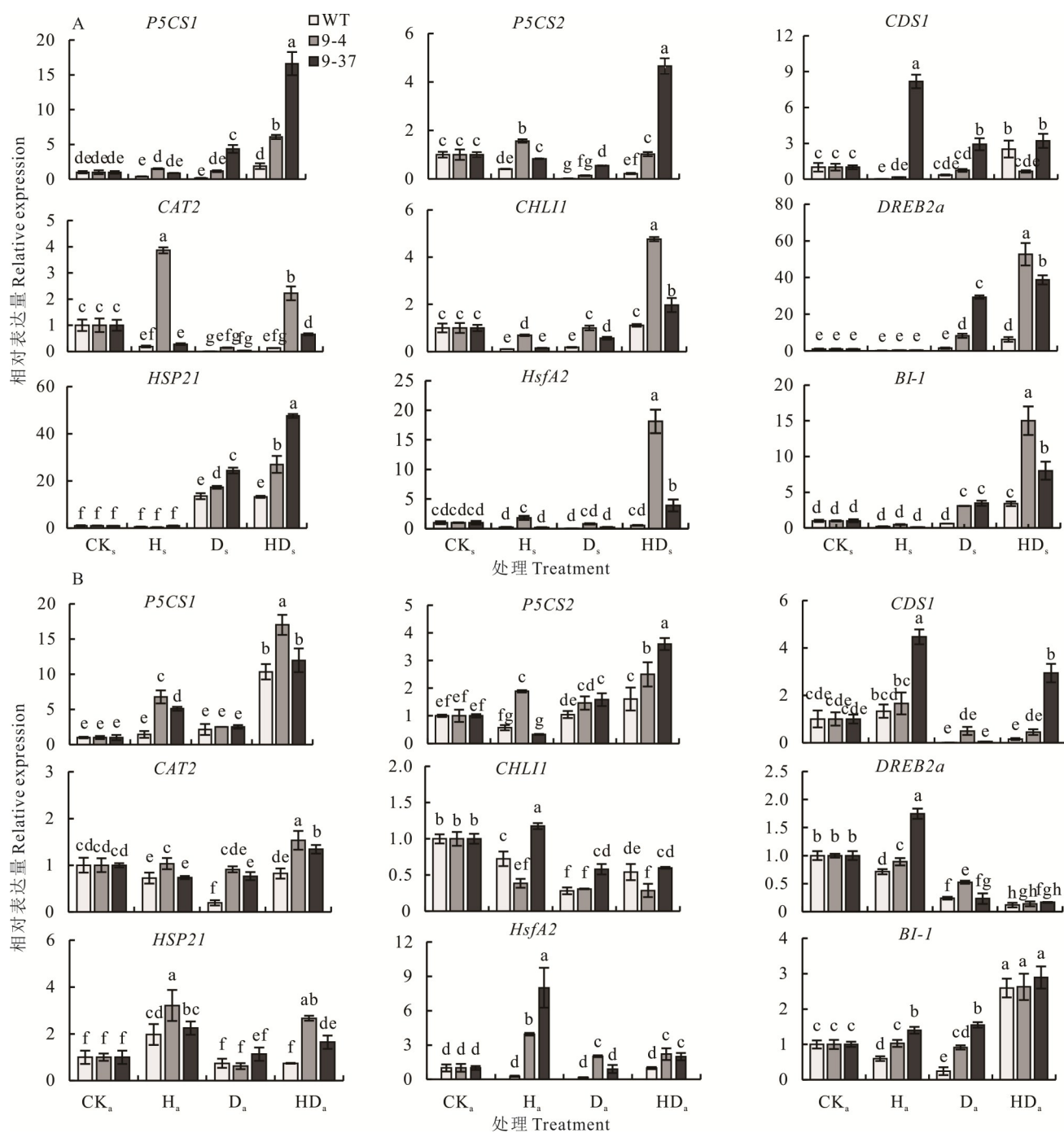


图 4 拟南芥在高温胁迫锻炼-次级干旱胁迫处理下的相关基因表达

Fig. 4 The expression of relevant genes under the heat stress priming—the secondary drought stress treatment in *Arabidopsis*

A: 拟南芥幼苗在高温胁迫锻炼-次级干旱胁迫处理下的相关基因表达; B: 拟南芥成株在高温胁迫锻炼-次级干旱胁迫处理下的相关基因表达。

A: The expression of related genes in *Arabidopsis* seedlings under the heat stress priming—the secondary drought stress treatment; B: The expression of related genes in mature *Arabidopsis* under the heat stress priming—the secondary drought stress treatment.

过表达株系的MDA含量显著低于WT, CAT活性显著高于WT($P < 0.05$);且在HD组处理下SOD活性以及脯氨酸和叶绿素含量也显著高于WT;与D组处理相比,HD组处理下HaFT-9过表达株系的CAT活性和脯氨酸含量高于D组,而POD活性无显著变化($P > 0.05$,图6A,B)。

对两种生长阶段拟南芥的生理指标差异进行比较发现,在幼苗阶段,HD组处理下,HaFT-9过表达株系POD活性与WT无显著差异($P > 0.05$),且HaFT-9过表达株系的SOD活性低于D组(图6A);而在成株阶段,在HD

组处理下,9-4株系的POD活性要高于WT,且HD组 *HaFT-9* 过表达株系的SOD活性高于D组(图6B)。推测造成拟南芥幼苗及成株相关生理生化指标变化不一致的原因是生长周期和转基因株系不同,导致应对干旱胁迫的调控方式有所不同。

综上所述, *HaFT-9* 过表达提高了转基因拟南芥在次级干旱胁迫下的抗氧化酶活性、脯氨酸和叶绿素含量,降低其MDA、 H_2O_2 和 O_2^{2-} 含量。提示 *HaFT-9* 过表达增强了拟南芥在次级干旱胁迫下的抗氧化酶活性和活性氧清除能力,从而降低了拟南芥受到干旱损伤的程度。

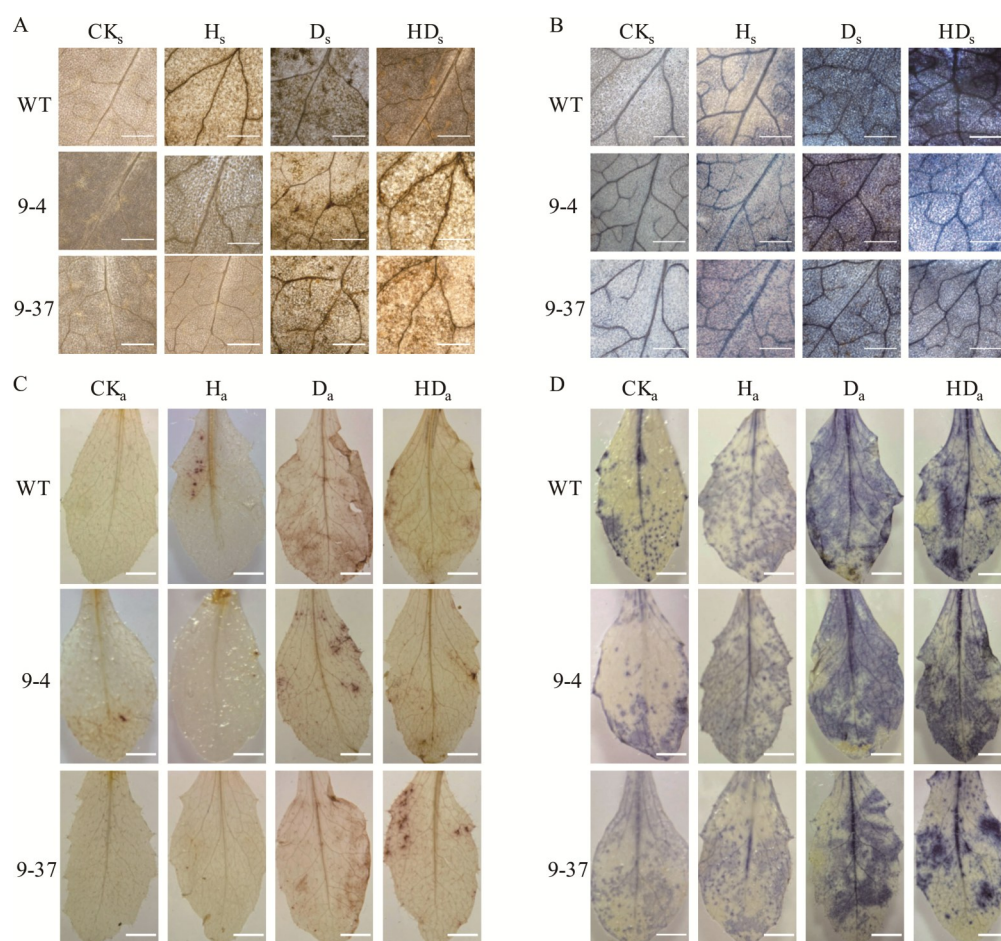


图5 高温胁迫锻炼-次级干旱胁迫处理下拟南芥的二氨基联苯胺(DAB)与硝基氮蓝四唑(NBT)染色

Fig. 5 Diaminobenzidine (DAB) and nitroblue tetrazolium (NBT) staining of *Arabidopsis* under the heat stress priming-the secondary drought stress treatment

A、B:分别为拟南芥幼苗在高温胁迫锻炼-次级干旱胁迫处理下的二氨基联苯胺(DAB)和硝基氮蓝四唑(NBT)染色(标尺=100 μ m);C、D:分别为拟南芥成株在高温胁迫锻炼-次级干旱胁迫处理下的二氨基联苯胺(DAB)和硝基氮蓝四唑(NBT)染色(标尺=2.5 mm)。A, B: Diaminobenzidine (DAB) and nitroblue tetrazolium (NBT) staining of *Arabidopsis* seedlings under the heat stress priming-the secondary drought stress treatment, respectively (Bar=100 μ m); C, D: Diaminobenzidine (DAB) and nitroblue tetrazolium (NBT) staining of mature *Arabidopsis* under the heat stress priming-the secondary drought stress treatment, respectively (Bar=2.5 mm).

3 讨论

植物进化出多样化的机制来应对各种环境胁迫,表型可塑性是植物应对环境胁迫的有效策略。诱导表观遗传变化有助于植物快速适应短期环境变化^[4]。李文杨等^[18]研究发现,经过高温锻炼的南方红豆杉(*Taxus wallichiana* var. *mairei*)比未经过高温锻炼的更能适应干旱环境,这表明南方红豆杉存在温度与干旱的交叉适应现象。本研究发现,经过高温锻炼的野生型拟南芥对次级干旱胁迫的耐受性有所提高,说明拟南芥在高温胁迫锻炼后体内会诱导表观遗传变化,从而增强对次级干旱胁迫的耐受性。14-3-3蛋白在非生物胁迫中发挥重要作用。

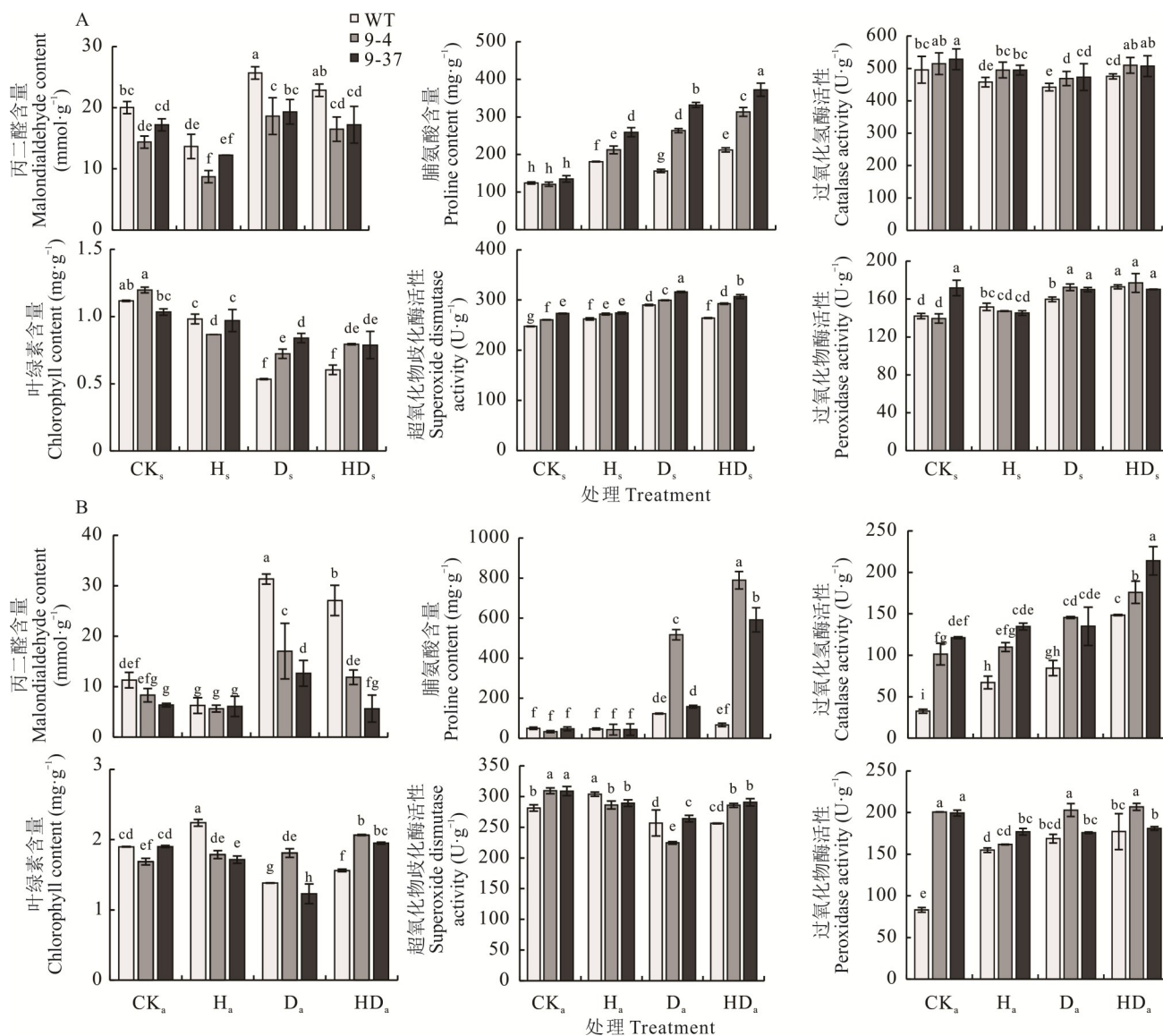


图6 高温胁迫锻炼-次级干旱胁迫处理下拟南芥的抗氧化酶活性、脯氨酸和叶绿素含量

Fig. 6 Antioxidant enzyme activity, proline content, and chlorophyll content under the heat stress priming-the secondary drought stress treatment in *Arabidopsis*

A: 高温胁迫锻炼-次级干旱胁迫处理下拟南芥幼苗的抗氧化酶活性、脯氨酸和叶绿素含量; B: 高温胁迫锻炼-次级干旱胁迫处理下拟南芥成株的抗氧化酶活性、脯氨酸和叶绿素含量。A: Antioxidant enzyme activity, proline content, and chlorophyll content under the heat stress priming-the secondary drought stress treatment in *Arabidopsis* seedlings; B: Antioxidant enzyme activity, proline content, and chlorophyll content under the heat stress priming-the secondary drought stress treatment in mature *Arabidopsis*.

魏琪^[14]的研究发现,拟南芥中的 *HaFT-9* 同源基因是 *GRF8*,而目前尚未有关于拟南芥 *GRF8* 参与胁迫的报道。然而,Fan等^[19]研究发现,苹果(*Malus domestica*)中的14-3-3蛋白MdGRF8与MdWRKY18的磷酸化形式结合,促进盐胁迫响应的调节机制。本研究发现,经过高温锻炼的梭梭可以提高14-3-3蛋白家族基因 *HaFT-9* 在次级干旱胁迫下的表达水平(图1B),表明梭梭的 *HaFT-9* 参与高温与干旱的交叉适应调控。此外,与野生型(WT)相比, *HaFT-9* 过表达拟南芥在次级干旱胁迫下表现出更好的生长表型(图2C,D),并显著提高了在次级干旱胁迫下 *HaFT-9* 过表达株系成株的存活率以及9-4株系幼苗的存活率(图3C,F)。通过对 *HaFT-9* 过表达拟南芥幼苗进行台盼蓝和DAPI染色分析,发现经过高温锻炼后, *HaFT-9* 过表达株系的叶片及根尖细胞死亡率在次级干旱胁迫下有所降低(图3B,E)。这表明 *HaFT-9* 过表达提高转基因拟南芥对次级干旱胁迫耐受性的机制与次级干旱胁迫下细胞死亡被抑制有关。14-3-3蛋白能够以序列特异性和磷酸化依赖的方式与众多靶蛋白结合,而

*HaFT-9*在拟南芥中过量表达,能够与更多转录因子和其他相关蛋白相互作用,形成更稳定的结合,诱导大量干旱胁迫相关基因的表达,从而使*HaFT-9*过表达的拟南芥在次级干旱胁迫处理中表现出更高的耐受性。

14-3-3蛋白在植物生长发育及胁迫响应方面发挥了重要作用,主要通过磷酸化的靶蛋白相互作用实现其功能。目前关于植物14-3-3蛋白应对非生物胁迫的分子机制已取得显著进展。Ren等^[20]研究发现,苹果14-3-3蛋白MdGRF11与MdAREB/ABF转录因子相互作用,能够上调活性氧(reactive oxygen species, ROS)清除和胁迫相关基因的表达水平,增强苹果对干旱胁迫的耐受性;Sirichandra等^[21]的研究表明,OST1对ABF3 T451的磷酸化提高了碱性亮氨酸拉链(bZIP)转录因子ABF3 C4结构域与14-3-3蛋白的亲合力,参与了ABA介导的非生物胁迫信号转导过程;大麦(*Hordeum vulgare*)中14-3-3蛋白能够与干旱响应的关键因子相互作用,如脱水响应元素结合蛋白HvDREB3和热激蛋白Hvhs90-1/2/5等^[22]。Wiese等^[23]对拟南芥中的两个转录因子bZIP18和bZIP52的研究发现,二者在细胞质中通过磷酸化基序与14-3-3 ϵ 结合,热胁迫后bZIP18和bZIP52发生去磷酸化,脱离了与14-3-3 ϵ 的结合,从而调控基因表达来响应热胁迫。本研究发现,在幼苗阶段,HD组处理下*HaFT-9*过表达株系的*P5CS1*、*P5CS2*、*CAT2*、*CHL1*、*DREB2a*、*HSP21*、*HsfA2*、*BI-1*基因表达水平均显著高于WT,且高于D组(图4A);在成株阶段,HD组处理下*HaFT-9*过表达株系的*P5CS2*、*CAT2*、*HSP21*和*HsfA2*基因表达水平均显著高于WT,且*P5CS1*、*P5CS2*、*CAT2*和*BI-1*基因表达水平显著高于D组(图4B)。Liu等^[24]的研究表明,HSFA2与H3K27me3去甲基化酶REF6形成正反馈回路,以调控拟南芥的高温胁迫记忆,而Kim等^[25]研究发现干旱响应基因的表达受组蛋白修饰的动态调控,干旱应答因子的启动子区通过富集H3K4me3和H3K9ac实现活性转录。推测拟南芥在经历高温胁迫后,H3K4me2和H3K4me3被高度修饰,招募干旱响应关键因子或相关蛋白,而过量的*HaFT-9*能与更多干旱响应关键因子磷酸化结合,从而提高下游干旱胁迫相关基因、抗氧化酶相关基因及细胞凋亡相关基因的表达水平,以应对次级干旱胁迫。

当植物遭受外界非生物胁迫时,植物会通过调节其内部生理生化反应等适应机制来应对胁迫,其中抗氧化酶系统是植物应对逆境胁迫的重要机制之一^[26]。干旱胁迫导致植物体内ROS积累和脯氨酸含量的增加,诱导植物体内抗氧化酶活性提高并加速ROS代谢,从而提高植物抵抗干旱胁迫的能力^[27]。Liu等^[28]研究发现水稻(*Oryza sativa*)14-3-3蛋白家族*OsGF14c*过表达可以提高水稻幼苗的耐旱性;Lukaszewicz等^[29]研究表明14-3-3蛋白的过表达导致马铃薯(*Solanum tuberosum*)块茎的抗氧化能力增加;本研究发现在次级干旱胁迫下,*HaFT-9*过表达能够使转基因拟南芥的抗氧化酶活性、脯氨酸和叶绿素含量进一步提高或是维持在较高水平,且*HaFT-9*过表达株系的MDA含量始终低于WT(图6A,B),说明*HaFT-9*过表达能减少转基因拟南芥的膜损伤程度,保持质膜和内膜的正常功能,维持细胞稳态;通过DAB和NBT染色结果进一步证明,*HaFT-9*过表达降低了拟南芥在次级干旱胁迫下的H₂O₂和O²⁻含量的积累(图5),有利于清除活性氧,降低次级干旱胁迫处理引起的氧化损伤。说明*HaFT-9*过表达能通过调节抗氧化酶系统和渗透调节物质以提高植物抗旱性。其中在D和HD组处理下的*HaFT-9*过表达株系拟南芥幼苗叶绿素含量高于WT,说明*HaFT-9*正向调控叶绿素的合成,而Wang等^[30]研究发现GRF8负调控叶绿素的合成,魏琪^[14]研究发现*HaFT-9*与其在拟南芥中的同源蛋白GRF8磷酸化位点数量和位置有明显差异。推测原因是*HaFT-9*与GRF8磷酸化位点数量和位置的差异导致二者与各自靶蛋白互作的调节机制并不完全相同。胁迫相关基因的表达、活性氧清除和脯氨酸合成之间存在密切关系。例如,Liu等^[31]研究表明蓝地毯碗柱草(*Craterostigma plantagineum*)在经过干旱胁迫后,4个代表性的胁迫相关基因和ROS途径相关基因的表达逐渐增加,同时伴随着SOD活性、脯氨酸和蔗糖含量的增加,以及H₂O₂含量和电解质渗漏(electrolyte leakage, EL)的减少。本研究也发现抗氧化酶基因表达水平与其酶活性的变化趋势相近,表明*HaFT-9*过表达通过提高抗氧化酶基因、脯氨酸合成基因以及细胞凋亡基因的表达水平来提高拟南芥在次级干旱胁迫处理下的抗氧化酶活性、脯氨酸及叶绿素含量,降低拟南芥细胞死亡的程度,以此来提高*HaFT-9*过表达拟南芥对次级干旱胁迫的耐受性。

4 结论

本研究发现在梭梭中高温胁迫锻炼促进了*HaFT-9*在次级干旱胁迫下的表达,高温胁迫锻炼能够提高

HaFT-9 过表达拟南芥在次级干旱胁迫下的存活率、抗氧化酶活性及抗逆相关基因表达,表明 *HaFT-9* 在梭梭的高温干旱胁迫信号交叉响应中起到重要调控作用。

参考文献 References:

- [1] Paul A L, Denison F C, Schultz E R, *et al.* 14-3-3 phosphoprotein interaction networks—does isoform diversity present functional interaction specification? *Frontiers in Plant Science*, 2012, 3: 190.
- [2] Li X D, Wu J H, Sun F, *et al.* Enhanced tolerance of *Arabidopsis* over expressing *Fa14-3-3C* from tall fescue (*Festuca arundinacea*) to low-nitrogen stress. *Acta Prataculturae Sinica*, 2017, 26(9): 104—112.
李小冬, 吴佳海, 孙方, 等. 过量表达 *Fa14-3-3C* 促进拟南芥对低氮胁迫耐受性的研究. *草业学报*, 2017, 26(9): 104—112.
- [3] Zhou H P, Lin H X, Chen S, *et al.* Inhibition of the *Arabidopsis* salt overly sensitive pathway by 14-3-3 proteins. *Plant Cell*, 2014, 26(3): 1166—1182.
- [4] Hilker M, Schmülling T. Stress priming, memory, and signalling in plants. *Plant Cell and Environment*, 2019, 42(3): 753—761.
- [5] Liang X H, Ai F F, Zhong T X, *et al.* Cross adaptation under drought and low temperature stress in perennial ryegrass. *Acta Prataculturae Sinica*, 2016, 25(1): 163—170.
梁小红, 艾非凡, 钟天秀, 等. 多年生黑麦草对干旱—低温交叉适应的生理响应. *草业学报*, 2016, 25(1): 163—170.
- [6] Liu H P, Able A J, Able J A. Priming crops for the future: rewiring stress memory. *Trends in Plant Science*, 2022, 27(7): 699—716.
- [7] Gallusci P, Agius D R, Moschou P N, *et al.* Deep inside the epigenetic memories of stressed plants. *Trends in Plant Science*, 2023, 28(2): 142—153.
- [8] Lu Y, Lei J Q, Zeng F J, *et al.* Effects of salt treatments on the growth and ecophysiological characteristics of *Haloxylon ammodendron*. *Acta Prataculturae Sinica*, 2014, 23(3): 152—159.
鲁艳, 雷加强, 曾凡江, 等. NaCl 处理对梭梭生长及生理生态特征的影响. *草业学报*, 2014, 23(3): 152—159.
- [9] Ma H, Zhang H, Ma L, *et al.* None-watering and tube-protecting planting technique for *Haloxylon ammodendron* under desert and its extension. *Scientia Sinica (Vitae)*, 2014, 44(3): 248—256.
麻浩, 张桦, 马林, 等. 无灌溉管件防护梭梭荒漠造林新技术及其示范推广. *中国科学(生命科学)*, 2014, 44(3): 248—256.
- [10] Pan R, Ren W J, Liu S S, *et al.* Ectopic over-expression of *HaFT-1*, a 14-3-3 protein from *Haloxylon ammodendron*, enhances acquired thermotolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 2023, 112(4/5): 261—277.
- [11] Cao Y H, Ren W, Gao H J, *et al.* *HaASR2* from *Haloxylon ammodendron* confers drought and salt tolerance in plants. *Plant Science*, 2023, 328: 111572.
- [12] Wang J. Expression patterns and functional analysis of 14-3-3 genes related to stress resistance of *Haloxylon ammodendron*. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2017.
王娇. 与抗逆相关的梭梭 14-3-3 蛋白基因的表达模式和功能分析. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2017.
- [13] Liu S S, Wang B, Zong X F, *et al.* Cloning and characterization analysis of *HaFT-9* gene in 14-3-3 protein in *Haloxylon ammodendron*. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2019, 56(6): 1083—1094.
刘栓栓, 王波, 宗兴凤, 等. 梭梭 14-3-3 蛋白基因 *HaFT-9* 的克隆及特性分析. *新疆农业科学*, 2019, 56(6): 1083—1094.
- [14] Wei Q. Functional analysis of heat stress memory key genes *HaHsfA2a* and *HaFT-9* under abiotic stress in *Haloxylon ammodendron*. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2023.
魏琪. 梭梭高温胁迫记忆关键基因 *HaHsfA2a* 与 *HaFT-9* 在非生物胁迫下的功能分析. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2023.
- [15] Montero-Barrientos M, Hermosa R, Cardoza R E, *et al.* Transgenic expression of the *Trichoderma harzianum hsp70* gene increases *Arabidopsis* resistance to heat and other abiotic stresses. *Journal of Plant Physiology*, 2010, 167(8): 659—665.
- [16] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402—408.
- [17] Xu M, Liu J, Ayiguli A. Comparative methods on chlorophyll extraction in plant physiology experiment teaching. *Experiment Science and Technology*, 2018, 16(4): 129—133.
徐敏, 刘君, 阿衣古力·阿布都瓦依提. 植物生理实验教学中叶绿素提取方法比较. *实验科学与技术*, 2018, 16(4): 129—133.
- [18] Li W Y, Chen Y F, He H, *et al.* Effects of high temperature exercise on growth and physiological and biochemical characters of

- Taxus wallichiana* var. *mairei* under drought stress. Shandong Agricultural Sciences, 2023, 55(9): 57—63.
- 李文杨, 陈亚飞, 何辉, 等. 高温锻炼对于旱胁迫下南方红豆杉生长和生理生化指标的影响. 山东农业科学, 2023, 55(9): 57—63.
- [19] Fan Z H, Zhu Y Q, Kuang W, *et al.* The 14-3-3 protein GRF8 modulates salt stress tolerance in apple via the WRKY18-SOS pathway. Plant Physiology, 2024, 194(3): 1906—1922.
- [20] Ren Y R, Yang Y Y, Zhang R, *et al.* MdGRF11, an apple 14-3-3 protein, acts as a positive regulator of drought and salt tolerance. Plant Science, 2019, 288: 110219.
- [21] Sirichandra C, Davanture M, Turk B E, *et al.* The *Arabidopsis* ABA-activated kinase OST1 phosphorylates the bZIP transcription factor ABF3 and creates a 14-3-3 binding site involved in its turnover. PLoS One, 2010, 5(11): e13935.
- [22] Jiang W, Tong T, Li W, *et al.* Molecular evolution of plant 14-3-3 proteins and function of Hv14-3-3A in stomatal regulation and drought tolerance. Plant Cell Physiology, 2023, 63(12): 1857—1872.
- [23] Wiese A J, Steinbachová L, Timofejeva L, *et al.* *Arabidopsis* bZIP18 and bZIP52 accumulate in nuclei following heat stress where they regulate the expression of a similar set of genes. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(2): 530.
- [24] Liu J Z, Feng L L, Gu X T, *et al.* An H3K27me3 demethylase-HSFA2 regulatory loop orchestrates transgenerational thermomemory in *Arabidopsis*. Cell Research, 2019, 29(5): 379—390.
- [25] Kim J M, To T K, Seki M. An epigenetic integrator: new insights into genome regulation, environmental stress responses and developmental controls by histone deacetylase 6. Plant and Cell Physiology, 2012, 53(5): 794—800.
- [26] Liu M Y, Guo L Z, Yue Y S, *et al.* Physiological and antioxidant enzyme gene expression differences between female and male *Buchloe dactyloides* plants under drought stress. Acta Prataculturae Sinica, 2023, 32(10): 93—103.
- 刘牧野, 郭丽珠, 岳跃森, 等. 干旱胁迫下不同性别野牛草生理及抗氧化酶基因表达差异. 草业学报, 2023, 32(10): 93—103.
- [27] Zhang J, Cheng K, Wang Y C. Analysis of the calcium-dependent protein kinase *RtCDPK16* response to abiotic stress in *Reaumuria trigyna*. Acta Prataculturae Sinica, 2023, 32(2): 97—109.
- 张洁, 程凯, 王迎春. 长叶红砂钙依赖蛋白激酶 *RtCDPK16* 的非生物胁迫应答分析. 草业学报, 2023, 32(2): 97—109.
- [28] Liu J P, Sun X J, Liao W C, *et al.* Involvement of *OsGF14b* adaptation in the drought resistance of rice plants. Rice, 2019, 12(1): 82.
- [29] Lukaszewicz M, Matysiak-Kata I, Aksamit A, *et al.* 14-3-3 protein regulation of the antioxidant capacity of transgenic potato tubers. Plant Science, 2002, 163(1): 125—130.
- [30] Wang L Y, Tian Y C, Shi W, *et al.* The miR396-GRFs module mediates the prevention of photo-oxidative damage by brassinosteroids during seedling de-etiolation in *Arabidopsis*. Plant Cell, 2020, 32(8): 2525—2542.
- [31] Liu X, Challabathula D K, Quan W L, *et al.* Transcriptional and metabolic changes in the desiccation tolerant plant *Craterostigma plantagineum* during recurrent exposures to dehydration. Planta, 2019, 249(4): 1017—1035.