



任文才,岳杨,丁柏水,等. 菊芋 14-3-3 基因家族的鉴定及其对非生物胁迫响应的分析[J]. 南京农业大学学报,2024,47(3):477-488.

REN Wencai, YUE Yang, DING Boshui, et al. Identification of 14-3-3 gene family and analysis of its response to abiotic stress in Jerusalem artichoke[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2024, 47(3): 477-488.

菊芋 14-3-3 基因家族的鉴定及其对非生物胁迫响应的分析

任文才,岳杨,丁柏水,高秀美,周兆胜*

(南京农业大学资源与环境科学学院/江苏省海洋生物学重点实验室,江苏 南京 210095)

摘要:[目的]本文旨在鉴定菊芋 14-3-3 基因家族成员并分析它们对高温、低温、盐和干旱胁迫响应的表达模式,为研究 14-3-3 蛋白功能及菊芋育种提供依据。[方法]采用克隆和生物信息学研究基因性质,采用 RNA-seq 数据分析和 RT-qPCR 研究基因对非生物胁迫的响应模式。[结果]从菊芋中克隆到 14-3-3 基因家族的 10 个成员 *HtGRF1*—*HtGRF10*, GenBank 登录号为 OP132618—OP132627。根据进化关系将其分为 2 个亚家族:*HtGRF1*—*HtGRF7* 属于非 ϵ 组,*HtGRF8*—*HtGRF10* 属于 ϵ 组,通常形成同源或异源二聚体。组织表达分析表明,*HtGRF2/3/6/9* 在芽、根、茎、叶中的表达丰度较高,*HtGRF3/5/9* 在块茎发育过程中前高后低。综合分析根和叶中 *HtGRF* 对非生物胁迫响应时发现,*HtGRF6* 表达水平在高温、盐和干旱胁迫下下降;*HtGRF2/3/7/8/9* 表达水平在盐胁迫下下降,而在干旱胁迫下上升;*HtGRF1* 表达水平在低温胁迫下上升;*HtGRF4/5* 表达水平在干旱胁迫下下降;而 *HtGRF10* 表达水平变化不显著。[结论]菊芋 14-3-3 蛋白是一个高度保守的多基因编码家族,在菊芋的生长发育和适应复杂环境中起着重要作用。

关键词:菊芋;14-3-3 蛋白;基因克隆;组织表达;非生物胁迫

中图分类号:Q785

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2024)03-0477-12

Identification of 14-3-3 gene family and analysis of its response to abiotic stress in Jerusalem artichoke

REN Wencai, YUE Yang, DING Boshui, GAO Xiumei, ZHOU Zhaosheng*

(College of Resources and Environmental Sciences/Jiangsu Provincial Key Laboratory of Marine Biology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract:[Objectives] The paper aimed to provide a basis for studying the function of 14-3-3 protein and breeding of Jerusalem artichoke, we identified the 14-3-3 gene family of Jerusalem artichoke and analyzed their expression patterns in response to high temperature, cold, salt and drought stresses. [Methods] Cloning and bioinformatics analysis were used to study gene properties, and RNA-seq data analysis and RT-qPCR were used to study gene response patterns to abiotic stress. [Results] Ten members of the 14-3-3 gene family, namely *HtGRF1*—*HtGRF10* (GenBank accession No. OP132618—OP132627), were cloned from Jerusalem artichoke. According to the evolutionary relationship, these genes were divided into two subfamilies, *HtGRF1*—*HtGRF7* belonged to the non- ϵ group, and *HtGRF8*—*HtGRF10* belonged to the ϵ group, which usually formed homologous or heterodimers. The expression level of *HtGRF2/3/6/9* in sprouts, roots, stems and leaves was higher than those of other genes. The expression level of *HtGRF3/5/9* was higher in stolon and tuber formation stages than that in the tuber rapid intumescence and maturity stages during the tuber development. Comprehensive analysis of *HtGRF* in response to abiotic stress in roots and leaves showed that *HtGRF6* expression level decreased under high temperature, salt and drought stresses, while *HtGRF2/3/7/8/9* expression level decreased under salt stress, but increased under drought stress. *HtGRF1* expression level increased under cold stress, *HtGRF4/5* expression level decreased under drought stress, and *HtGRF10* expression level did not change significantly. [Conclusions] The 14-3-3 protein family in Jerusalem artichoke was highly conserved and encoded by multiple genes, and played an important role in the growth and development and in coping with complex environments.

Keywords: Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.); 14-3-3 protein; gene cloning; tissue expression; abiotic stress

1967 年 Moore 和 Perez 首次从牛脑中分离 14-3-3 蛋白,依据在 DEAE 纤维素柱层析中的流分及在淀粉凝胶电泳中的位置而得名^[1]。后来陆续在人类、其他动物、植物和真菌等真核生物中发现,广泛分布于质膜、细胞核、线粒体、高尔基体、叶绿体和细胞质中^[2]。植物中,14-3-3 蛋白较早是在菠菜 (*Spinacia*

收稿日期:2023-05-01

基金项目:国家重点研发计划项目(2019YFD0900702);江苏省科技计划项目(BE2022304);江苏省沿海开发集团研发项目(2022YHTDJB01)

*通信作者:周兆胜,副教授,研究方向为植物逆境生态,E-mail:zszhou@njau.edu.cn。

oleracea)、月见草(*Oenothera biennis*)、大麦(*Hordeum vulgare*)和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中发现。它们通常由多基因编码,是组成 G-box 蛋白复合体的一部分,故编码 14-3-3 蛋白的基因被命名为 *GRF*(G-box regulatory factor 或 general regulatory factor)或 *GF14*(G-box factor 14-3-3 homologs),但至今并未形成统一的命名方式。例如:拟南芥中命名为 *GRF1-13*;水稻(*Oryza sativa*)中命名为 *GF14a-h*;番茄(*Lycopersicon esculentum*)中命名为 *TFT1-12*^[3-5]。

植物 14-3-3 蛋白可以形成同源或异源二聚体,单体相对分子质量在 $(25 \sim 30) \times 10^3$,由 9 个反向平行的 α -螺旋($\alpha A-\alpha I$,从 N-末端至 C-末端)组成,每个单体可以通过识别磷酸化的丝氨酸/苏氨酸独立结合一个靶蛋白,14-3-3 蛋白可以同时与 2 个靶蛋白或同一靶蛋白的 2 个结构域结合^[2]。这种特征构象是 14-3-3 蛋白复杂细胞功能的基础,可与蛋白激酶、磷酸酶、转录因子、转运蛋白、代谢酶、离子通道等多种靶蛋白相互作用,参与许多重要的生物学过程,如细胞周期调节、代谢调控、细胞凋亡、蛋白质运输、基因转录调控等,在植物生长发育和逆境响应中发挥重要作用^[6]。

菊芋(*Helianthus tuberosus* L.)俗称洋姜、鬼子姜,为菊科(Compositae)向日葵属多年生草本植物,对生境要求较低,具有耐贫瘠、耐干旱、耐盐碱的特点^[7]。菊芋具有重要的药用价值和经济价值,其块茎富含菊糖,具有促进双歧杆菌、乳酸菌等益生菌生长,调节肠道菌群,提高免疫功能的作用,还可用于生产生物质能源,叶中含有多种活性物质,如黄酮类、萜类等,具有抗氧化及抗炎等活性^[8]。近年来,随着高通量测序技术的发展,越来越多植物完成了基因组测序,很多物种的 14-3-3 蛋白编码基因也被鉴定,但菊芋 14-3-3 基因家族研究还未见报道。本研究从菊芋中克隆了 10 个 14-3-3 蛋白基因,对其蛋白理化性质、亚细胞定位、进化关系等进行了生物信息学分析。利用转录组和 RT-qPCR 分析了该基因家族在各组织和块茎发育中的表达情况,并探究其对高温、低温、盐和干旱 4 种非生物胁迫的响应模式,以期深入研究 14-3-3 蛋白生物学功能及培育优良菊芋品种提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 菊芋培养与处理

选用‘南菊芋 1 号’(*Helianthus tuberosus* L. cv. NY1)为试验材料,块茎采自江苏省盐城市新洋农业试验站(33.53°N,120.44°E)。参考 Wen 等^[9]的方法,将菊芋块茎用纯水冲洗干净,切取具有新鲜腋芽的芽眼(约 10 mm×10 mm×3 mm),种入盛有石英砂的周转箱,置于植物培养箱中避光培养,培养温度为 22 °C,块茎萌发后开始光照培养,光/暗培养时间为 12 h/12 h,昼、夜温度分别为(25±1)°C 和(18±1)°C。以 1/2 Hoagland 营养液(pH5.8)浇灌。4 周后,选取长势较好且一致的幼苗,移至装有 1/2 Hoagland 营养液的周转箱中培养 2 d,然后进行胁迫处理,使用含 0% 和 15% PEG6000 的营养液模拟干旱胁迫,用于后续 RT-qPCR,胁迫时间为 3 和 6 h,各剪取 9 株胁迫和对照苗的根和叶,液氮速冻后存于-80 °C 冰箱备用。3 个生物学重复。

1.2 基因引物设计

结合本实验室转录组数据拼接的菊芋转录本以及从 NCBI 下载的菊芋 EST,使用 TransDecoder 软件^[10]识别候选编码区域;利用 14-3-3 蛋白结构域的隐马尔可夫模型(Hidden Markov Model, HMM, PF00244)(<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>),使用 HMMER 3.0 软件^[11]筛选出菊芋中可能的编码 14-3-3 蛋白的转录本,并与向日葵等植物中已知的 14-3-3 基因进行本地 BLASTn(ncbi-blast-2.12.1),去除冗余序列,再利用 Primer 6.0 软件设计特异性克隆引物,最后根据克隆测序结果设计 RT-qPCR 的特异性表达引物,以 *HtActin* 为内参基因(表 1),所有引物由北京擎科生物科技有限公司合成。

1.3 RNA 提取及基因克隆和测序

总 RNA 提取参照 TRIzol 法,利用 12 g·L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳检测核酸的完整性,用 Nanodrop 2000 超微量分光光度计检测核酸的纯度及浓度。RNA 质检合格后,利用 TaKaRa 反转录试剂盒(RR047A)将 RNA 反转成 cDNA。在反转录之前按试剂盒说明书去除基因组 DNA,反应程序:42 °C 2 min,4 °C 保存;RNA 反转程序:37 °C 15 min,85 °C 5 s,4 °C 保存。

以 cDNA 为模板,利用表 1 中克隆引物进行 RT-PCR。反应程序:95 °C 2 min;95 °C 20 s,52 °C 30 s,72 °C 1 min,40 个循环;72 °C 7 min,4 °C 保温。PCR 产物经电泳检测后切胶回收(TSP601-200 胶回收试剂盒, Tsingke),连接到 pMD-19T 载体上,转化大肠杆菌,涂氨苄青霉素平板,挑取菌落,PCR 验证,测序。

表 1 基因克隆及表达引物序列
Table 1 Primers sequence of cloning and expression of genes

基因名称 Gene name	克隆引物序列 Cloning primers sequence(5'→3')	长度/bp Length	表达引物序列 Expression primers sequence(5'→3')	长度/bp Length
<i>HtGRF1</i>	F:TTCACTCCAATCCTCACATC R:GGTGCCAAATTCTCCTAAAC	929	F:CCCAGCCCAATCAGTTCT R:ACCGCAATTTTGACAAGTTCGT	146
<i>HtGRF2</i>	F:ACCGTTTCTCCTTCCAATCA R:TGGTGTGGTTATCATTCTCT	826	F:TCTTACTTTGTGGACATCTGAT R:TGGTGTGGTTATCATTCTCT	97
<i>HtGRF3</i>	F:TTCAACGATAACCGCTACT R:GGAACCTTGGAAAGTCGATTAAG	991	F:ACCGTACTGTGTTTGTAAAT R:GGAACCTTGGAAAGTCGATTAAG	132
<i>HtGRF4</i>	F:AGCGAGTAATCAACCACAA R:CAAGCAGCAACCCTAAATG	863	F:ACAGGGGACGAGATCAAGGA R:CAAGCAGCAACCCTAAATGAA	110
<i>HtGRF5</i>	F:TCTCTCTCCGATCATTCA R:CATTCCGTCCTCATTGAGA	920	F:TCTCTCTCCGATCATTCA R:GCTTGGCCATGTACACATT	110
<i>HtGRF6</i>	F:TTATTCCACCACCACCATC R:CATCATCAGCCGCTTTGT	825	F:CTCCATCAATGGTGGCTCCG R:TGGTGGAGTGAGGTTGAGGA	158
<i>HtGRF7</i>	F:TTCTCCGTCATCATCATCC R:CCAGCCCATTCAGTTCTAA	854	F:TGCACAGGTCAATACTCCCC R:CCAGCCCATTCAGTTCTAAAT	91
<i>HtGRF8</i>	F:CTTGAAGATCAGCATCCATG R:GCATTCCGCAACTGTTA	912	F:GAGGACGAGAAGACCAT R:ACAAATACAATACCAAGGGC	124
<i>HtGRF9</i>	F:GACACCTTCTTCATCTTCATC R:CCATCACATCACCACCTT	887	F:ATGGAGCTACAAAACTGGC R:CCATCACATCACCACCTT	94
<i>HtGRF10</i>	F:GATCACCAAAAATGTCTAACGA GAAGGTAGTAAGATGGACAAGA	998	F:CCCAGCCCAATCAGTTCT R:ACCGCAATTTTGACAAGTTCGT	121
<i>HtActin</i>			F:ATGTATGTAGCCATCCAGG R:TGTTAGGTCACGCCAG	166

1.4 RT-qPCR 分析

实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, RT-qPCR) 使用 SYBR *Premix Ex Taq* 试剂盒 (TaKaRa, RR420A), 在荧光定量 PCR 仪 (Quantagene, q225) 上进行, 试剂盒和仪器的使用参考说明书。将 cDNA 模板稀释 10 倍, 确保各基因的扩增效率误差小于 10%, 反应体系为: SYBR *Premix Ex Taq* 5 μL , 正向引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.4 μL , 反向引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.4 μL , cDNA 模板 1 μL , 灭菌蒸馏水 3.2 μL 。反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环。生物学重复 3 次, 每个生物学重复至少包含 3 次技术重复, 试验数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法^[12] 计算分析。

1.5 RNA-seq 表达谱分析

从 NCBI 下载菊芋相关转录组数据, 一共 4 组: 第 1 组, PRJNA856301, 25 个文库, 对应菊芋芽 3 个、根 2 个、茎 2 个和叶 18 个重复 (美国佐治亚大学, 2022); 第 2 组, PRJNA593328, 12 个文库, 对应‘青芋 1 号’ (QY1) 4 个发育时期的块茎 T1、T2、T3 和 T4, 每个时期 3 个重复 (青海大学, 2019); 第 3 组, PRJNA674681, 12 个文库, 对应 25% PEG6000 干旱处理 0、18、24 和 36 h 的‘青芋 2 号’ (QY2) 叶片, 每个处理 3 个重复 (青海省农林科学院, 2020); 第 4 组, PRJNA579243, 24 个文库, 对应对照和停止浇水干旱处理 2、4 和 10 d 的‘青芋 1 号’ (QY1) 和‘青芋 3 号’ (QY3) 叶片, 每个处理 2 个重复 (青海大学, 2019)。本实验室备有的‘南菊芋 1 号’ (NY1) 转录组数据, 包括 300 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 处理 0、6、12、24 和 48 h 的根和叶各 5 个文库 (PRJNA793515)^[13]; 高温 42 $^{\circ}\text{C}$ 处理 0、3 和 6 h 的根和叶, 每个处理 3 个重复; 低温 4 $^{\circ}\text{C}$ 处理 0、3 和 6 h 的根和叶, 每个处理 3 个重复。使用 Bowtie2 (version 2.4.4) 将每个文库的 clean reads 比对到基因序列上^[14], 然后利用 RSEM 统计每个文库比对到每个基因上的 reads 数目^[15], 再进行 FPKM (fragments per kb per million reads) 转换, 最终获得每个基因的表达水平。FPKM 数据用于基因表达相关性分析, 使用 Hiplot Pro 在线工具 (<https://hiplot.com.cn/cloud-tool/drawing-tool/detail/254>) 计算 Pearson 相关性指数并进行可视化。

1.6 生物信息学分析

采用 NCBI 的 ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 查找开放阅读框; 采用 InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) 在线软件预测蛋白保守结构域。采用 NCBI 上的 BLASTx 和 BLASTp 分别对核酸序列和蛋白序列进行同源性分析; 蛋白质理化性质分析和亲疏水性采用 ExPASy-ProtParam

tool (<https://web.expasy.org/protparam/>) 在线软件分析。蛋白序列的保守基序采用 MEME5.4.1 (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) 在线预测,最大输出个数为 7,基序宽度设定为 6~50。采用 GORIV (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html) 进行蛋白质二级结构预测;采用 AlphaFold 2 软件和 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 进行蛋白质三级结构预测;采用 Wolfpsort (<https://wolfpsort.hgc.jp/>) 进行亚细胞定位预测;采用 NetPhos (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetPhos-3.1>) 在线软件预测蛋白磷酸化位点。采用 MEGA 7.0 软件构建系统进化树,校验参数 Bootstrap,重复 1 000 次。

1.7 数据处理

采用 Microsoft Office Excel 2016、Word 2016、GraphPad Prism 8、Adobe Illustrator CC 2020、Tbtools 和 R 软件包中的 pheatmap 等软件绘制图表,采用 SPSS 22 软件进行标准误差和显著性分析。

2 结果与分析

2.1 菊芋 14-3-3 基因家族的克隆与蛋白理化性质分析

以‘南菊芋 1 号’根和叶的 cDNA 为模板,利用特异性引物,经 RT-PCR 扩增、转化和测序,共克隆到 10 个 14-3-3 基因,克隆长度为 825~998 bp (表 1)。ORF Finder、Pfam 和 NCBI BLASTx 在线分析表明,这 10 个基因序列皆包含完整的开放阅读框(open reading frame, ORF) 和 14-3-3 保守结构域(PF00244),依次命名为 *HtGRF1*—*HtGRF10*,提交到 GenBank 上并获得登录号:OP132618—OP132627 (表 2)。这 10 个菊芋 14-3-3 基因编码序列(coding sequence, CDS)长度接近,为 774~798 nt,编码 257~265 个氨基酸。其蛋白相对分子质量为 $(28.88 \sim 29.85) \times 10^3$,主要平均疏水性(grand average of hydropathy, GRAVY) 值为 -0.317 (*HtGRF6*) ~ -0.682 (*HtGRF10*),皆为亲水性蛋白;等电点偏酸性,变化幅度较小,为 4.64~5.50。通过亚细胞定位预测可知,*HtGRF1/2/3/4/8/10* 定位于细胞核/质膜,*HtGRF5/7* 定位于叶绿体/质膜,*HtGRF6* 定位于内质网/线粒体,*HtGRF9* 定位于细胞质。此外,利用在线软件 CBS 预测蛋白磷酸化位点,结果显示磷酸化位点主要为苏氨酸(Threonine)、丝氨酸(Serine)和酪氨酸(Tyrosine)。

表 2 菊芋 14-3-3 蛋白家族理化性质预测

Table 2 Predicted physical and chemical properties of 14-3-3 protein family in Jerusalem artichoke

蛋白名称 Protein name	编码序列/nt CDS	氨基酸 Amino acid	相对分子质量/ 10^3 Molecular mass	等电点 pI	疏水性指数 H index	亚细胞定位 Subcellular localization	登录号 Accession No.
<i>HtGRF1</i>	786	261	29.51	4.83	-0.583	细胞核/质膜 Nucleus/plasma membrane	OP132618
<i>HtGRF2</i>	783	260	29.39	4.78	-0.576	细胞核/质膜 Nucleus/plasma membrane	OP132619
<i>HtGRF3</i>	777	258	28.88	4.66	-0.458	细胞核/质膜 Nucleus/plasma membrane	OP132620
<i>HtGRF4</i>	780	259	29.33	4.69	-0.455	细胞核/质膜 Nucleus/plasma membrane	OP132621
<i>HtGRF5</i>	780	259	29.20	4.64	-0.378	叶绿体/质膜 Chloroplast/plasma membrane	OP132622
<i>HtGRF6</i>	774	257	29.27	4.70	-0.317	内质网/线粒体 Endoplasmic reticulum/mitochondria	OP132623
<i>HtGRF7</i>	798	265	29.85	5.50	-0.334	质膜/叶绿体 Plasma membrane/chloroplast	OP132624
<i>HtGRF8</i>	774	257	29.28	4.66	-0.554	细胞核/质膜 Nucleus/plasma membrane	OP132625
<i>HtGRF9</i>	789	262	29.64	4.77	-0.578	细胞质 Cytoplasm	OP132626
<i>HtGRF10</i>	789	262	29.73	4.80	-0.682	细胞核/质膜 Nucleus/plasma membrane	OP132627

2.2 菊芋 14-3-3 蛋白进化和结构分析

为探究菊芋 14-3-3 蛋白家族的进化关系,下载 13 条拟南芥和 8 条水稻 14-3-3 蛋白氨基酸序列,与菊芋中鉴定的 10 条 14-3-3 蛋白氨基酸序列一起,运用 MEGA 7.0 软件通过 NJ(Neighbor joining)法构建系统进化树(图 1-A)。结果表明,与拟南芥类似,菊芋中所有鉴定的 14-3-3 蛋白都被分为 ϵ 组和非 ϵ 组,*HtGRF1*—*HtGRF7* 属于非 ϵ 组,*HtGRF8*—*HtGRF10* 属于 ϵ 组。从图中可以看出,非 ϵ 组中,*HtGRF1* 与 *AtGRF1/2* 处于同一分支,*HtGRF4/5/6/7* 与拟南芥成员相距较近,暗示其亲缘关系较近,可能发挥相似的功能,而 *HtGRF2/3* 独成一支,处于拟南芥 *AtGRF3/4/5/7* 和水稻 *OsGFa/b/c/d/e/f* 之间。 ϵ 组中 *HtGRF8/9* 与 *AtGRF9*、*HtGRF10* 与 *AtGRF12* 各位于一个分支,位于拟南芥 *AtGRF10/11/13* 和 *OsGF14h* 分支与 *OsGF14g* 分支之间,相距较远。菊芋、拟南芥和水稻共有 31 个 14-3-3 蛋白,属于 ϵ 类蛋白的 10 个位于同一分支,而属于非 ϵ 类蛋白的 21 个位于 5 个分支,表明非 ϵ 类蛋白在进化过程中可能发生了较大的分化。

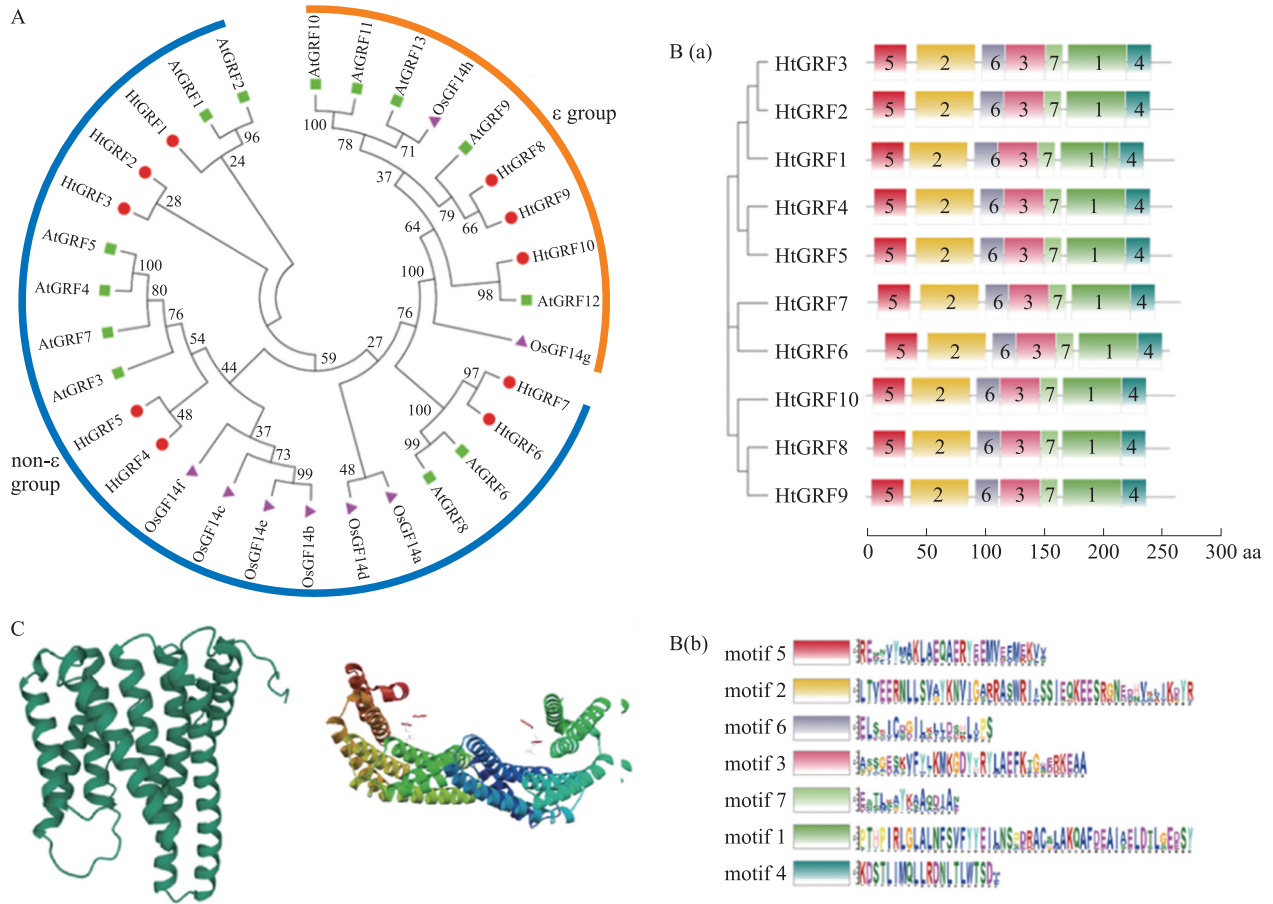


图 1 菊芋 14-3-3 蛋白进化关系分析和保守基序分析及三级结构预测

Fig. 1 Phylogenetic analysis, conservative motif analysis and a predicted tertiary structure of 14-3-3 proteins in Jerusalem artichoke

A. 14-3-3 蛋白进化关系分析[红色圆点、绿色方块和紫色三角分别代表菊芋(Ht)、拟南芥(At)和水稻(Os)的 14-3-3 蛋白。拟南芥 (<https://www.arabidopsis.org/>) 和水稻 (<http://rice.uga.edu/>) 的 14-3-3 蛋白来自基因组注释]; B(a). 14-3-3 蛋白保守基序预测图(不同的颜色代表不同的基序); B(b). 保守基序氨基酸特征分析; C. 以 HtGRF7 为例预测 14-3-3 蛋白三级结构(左侧为单体,右侧为二聚体)。

A. Phylogenetic analysis of 14-3-3 protein[The 14-3-3 proteins from *Helianthus tuberosus* (Ht), *Arabidopsis thaliana* (At) and *Oryza sativa* (Os) are marked with red dots, green squares and purple triangles, respectively. 14-3-3 of *Arabidopsis thaliana* (<https://www.arabidopsis.org/>), *Oryza sativa* (<http://rice.uga.edu/>) are downloaded from their genome annotation]; B(a). Prediction plot of 14-3-3 protein motif(Different colours represent different motifs); B(b). Characterization of motif amino acid sequence; C. HtGRF7 is used as an example for the prediction of the tertiary structure of 14-3-3 protein(the monomer on the left and the dimer on the right).

通过 MEME 5.4.1 在线工具进行保守基序分析,共发现 7 个保守 motif,出现在每一条菊芋 14-3-3 蛋白序列中,表明菊芋 14-3-3 蛋白具有高度保守性(图 1-B)。Prabi 分析表明,菊芋 10 个 14-3-3 蛋白的二级结构皆由延伸链 α-螺旋、延伸链和无规则卷曲构成。α-螺旋比例最高,为 48.09%~66.54%,HtGRF2 的最高,HtGRF10 的最低,除 HtGRF10 外,其余的均超过 50%;无规则卷曲的比例为 27.69%~38.17%,与 α-螺旋正好相反,HtGRF2 的最低,HtGRF10 的最高,除 HtGRF2 和 HtGRF5 外,其余均超过 30%;延伸链比例最小,为 5.45%~15.27%。

进一步利用 AlphaFold 2 软件预测了 14-3-3 蛋白的三级结构,10 个蛋白的单体结构相似,HtGRF7 主要由 9 个反向平行的 α-螺旋构成,每个 α 螺旋间通过 1 个短环连接(图 1-C)。利用 SWISS-MODEL 软件分析发现,10 个菊芋 14-3-3 蛋白均以同源二聚体形式存在,2 个亚基反向平行,形成了 1 个可以容纳靶蛋白的不规则螺旋肽结合槽(peptide binding grooves)的结构(图 1-C)。

2.3 菊芋 14-3-3 基因的组织表达分析

利用 NCBI 公布的转录组数据,研究了菊芋 14-3-3 基因在芽、根、茎、叶、块茎(分 4 个阶段,包括匍匐茎生长期、块茎形成期、块茎膨大期、块茎成熟期)等组织的表达情况(图 2)。结果表明,大多数 14-3-3 基因在不同组织中的表达水平不同,推测它们的功能具有多样性。从 10 个 HtGRF 在各组织中的表达水平

来看, *HtGRF1/7/10* (茎除外) 非常低, *HtGRF4/5/8* 居中; *HtGRF2/3/6/9* 较高, 为低丰度的几十至上百倍, 芽中 *HtGRF9*、根中 *HtGRF3*、茎和叶中 *HtGRF6* 中丰度最高 (图 2-A)。 *HtGRF2/3/5/6/8/9* 在块茎发育的前期 (匍匐茎生长期和块茎形成期) 表达水平普遍高于块茎发育的后期 (块茎膨大期和块茎成熟期), 其中 *HtGRF3/5/9* 在块茎形成期至膨大期剧烈下降, *HtGRF1/4/7/10* 在块茎发育过程中较低, 且变化相对较小 (图 2-B)。

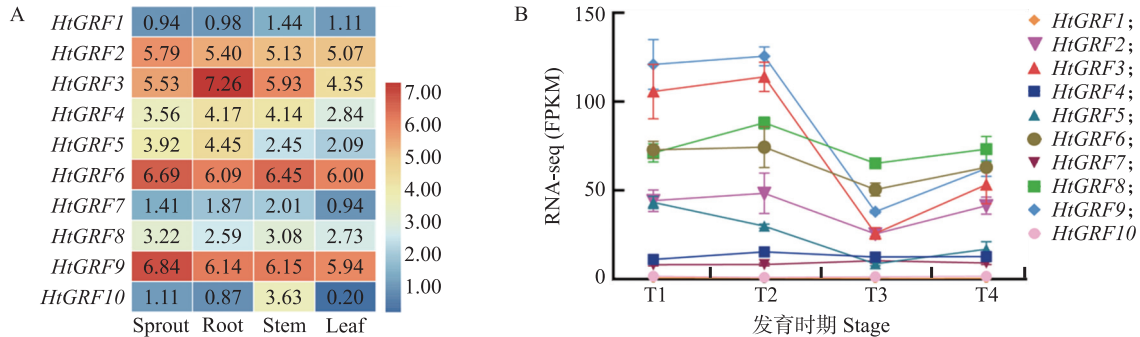


图 2 菊芋 14-3-3 基因在不同组织 (A) 及不同发育时期 (B) 的表达分析

Fig. 2 Expression analysis of 14-3-3 genes in different tissues (A) and developmental stages (B) of Jerusalem artichoke

A. 菊芋 14-3-3 基因在芽、根、茎和叶中的表达, 以 $\text{Log}_2(1+\text{FPKM})$ 值制作热图, 颜色变化 (红/黄/蓝) 代表基因表达水平由高至低; B. 菊芋 14-3-3 基因在块茎发育不同时期的表达 (T1: 匍匐茎生长期; T2: 块茎形成期; T3: 块茎膨大期; T4: 块茎成熟期)。

A. Expression of Jerusalem artichoke 14-3-3 gene in sprout, root, stem and leaf. Log_2 -based (1+FPKM) values are used to make the heat map. The color gradient (red/yellow/blue) indicates the gene expression level (from high to low). B. Expression of Jerusalem artichoke 14-3-3 gene at different stages of tuber development (T1: Stolon growth stage; T2: Tuber at formation stage; T3: Tuber at rapid intescentia stage; T4: Tuber at maturity stage).

2.4 菊芋 14-3-3 基因对非生物胁迫的响应

通过‘南菊芋 1 号’ (NY1) 转录组数据分析发现, 幼苗在 42 °C 高温处理 3 和 6 h 后, 相对于 25 °C, 除了叶中 *HtGRF4* 表达水平稍有上升外, 其他 *HtGRF* 表达水平基本处于略微下调的趋势, 仅 *HtGRF6* 显著下调 (图 3)。而在 4 °C 低温处理 3 和 6 h 后, 相对于 25 °C, 叶中 *HtGRF9* 表达水平下降, 而根和叶中 *HtGRF1* 表达水平上升, 叶中显著, 其他 *HtGRF* 表达水平变化均不显著 (图 4)。在 300 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 处理 6、12、24 和 48 h 后, 相对于正常培养, 除了 *HtGRF10* 表达水平在叶中略微上升外, 其他 *HtGRF* 基本处于下调的趋势, 根中 6 h 处理尤其明显, *HtGRF2/3/6/7/8/9* 表达水平都发生显著变化, 随着处理时间的延长, 变化均不显著 (图 5)。

通过 NCBI 公布的菊芋转录组数据, 研究不同菊芋品种‘青芋 1 号’ (QY1)、‘青芋 2 号’ (QY2)、‘青芋 3 号’ (QY3) 叶片在不同干旱处理时间下 14-3-3 基因的表达情况 (图 6)。干旱处理 18、24 和 36 h 时, QY2 中 *HtGRF6* 表达水平逐渐下降, 在 24 h 时变化显著; 其他 *HtGRF* 表达水平变化不显著。干旱处理 2、4 和 10 d 时, *HtGRF7* 表达水平在 QY1 中上升、在 QY3 中先下降后上升; *HtGRF9* 水平表达在 QY1 和 QY3 中先下降后上升, 但均不显著。干旱胁迫 2、10 d 时, QY1 中 *HtGRF5*、*HtGRF4/6* 与 QY3 中 *HtGRF8*、*HtGRF5* 表达水平显著下降, 其余变化不显著。3 个青芋品种 (QY1、QY2、QY3) 在不同干旱胁迫时间条件下, *HtGRF1/2/3/7/9/10* 的表达水平均未发生显著变化, 而 *HtGRF4/5/6/8* 都表达下降 (图 6)。

利用 RT-qPCR, 研究‘南菊芋 1 号’ (NY1) 根和叶中 14-3-3 基因家族成员对干旱胁迫 3 和 6 h 响应模式。组织表达分析已表明 *HtGRF10* 表达水平非常低, 其 CT 值过高且不稳定, 因此只考察 *HtGRF1*—*HtGRF9* 的表达 (图 7)。在叶中, 干旱处理 3 h 时, *HtGRF5* 表达显著下调, 而 *HtGRF8* 表达显著上调, 其他 7 个 *HtGRF* 无显著变化; 干旱处理 6 h 时, *HtGRF1/4/5/7* 表达显著下调, 其他 5 个 *HtGRF* 无显著变化。在根中, 干旱处理 3 h 时, *HtGRF1* 表达显著下调, *HtGRF2/3/4/7/8/9* 表达显著上调, *HtGRF5/6* 表达无显著变化; 干旱处理 6 h 时, *HtGRF1/5* 表达显著下调, *HtGRF2/3/4/7/8* 表达显著上调, *HtGRF6/9* 表达无显著变化。总体上, 3 和 6 h 干旱胁迫导致根和叶中 *HtGRF1/5* 表达显著下调; 根中 *HtGRF2/3* 表达显著上调, 叶中无明显变化。根中 *HtGRF4/7/8* 表达在干旱胁迫 3 和 6 h 均显著上调, 而叶中 *HtGRF4/7* 在 3 h 时变

化不显著,至 6 h 时显著下调,*HtGRF8* 则相反,3 h 时显著上调,至 6 h 时恢复正常。根中 *HtGRF9* 在胁迫 3 h 时显著上调,6 h 恢复正常,叶中未发生显著变化(图 7)。

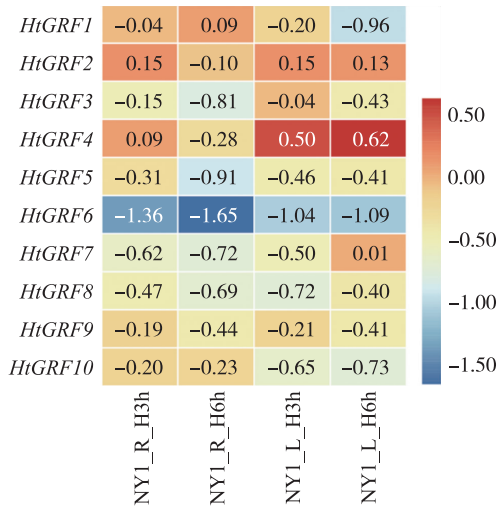


图 3 菊芋 14-3-3 基因在对热胁迫下的表达变化

Fig. 3 Expression changes of 14-3-3 genes of Jerusalem artichoke under heat stress

以 \log_2 [处理组(1+FPKM)/对照组(1+FPKM)] 值制作热图,对照组为热胁迫 0 h 的根和叶。NY1:南菊芋 1 号;R:根;L:叶;H:热胁迫。下同。

\log_2 [based treatment(1+FPKM)/control(1+FPKM)] values are used to make the heat map. Root and leaf samples treated with heat stress for 0 h are taken as controls. NY1:Nanyu 1;R:Root;L:Leaf;H:Heat stress. The same as follows.

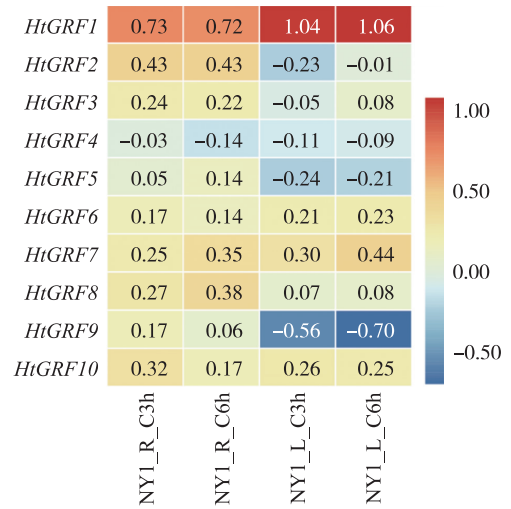


图 4 菊芋 14-3-3 基因对冷胁迫下的表达变化

Fig. 4 Expression changes of 14-3-3 genes of Jerusalem artichoke under cold stress

对照组为冷胁迫 0 h 的根和叶。C:冷胁迫。

Root and leaf samples treated with cold stress for 0 h are taken as controls. C: Cold stress.

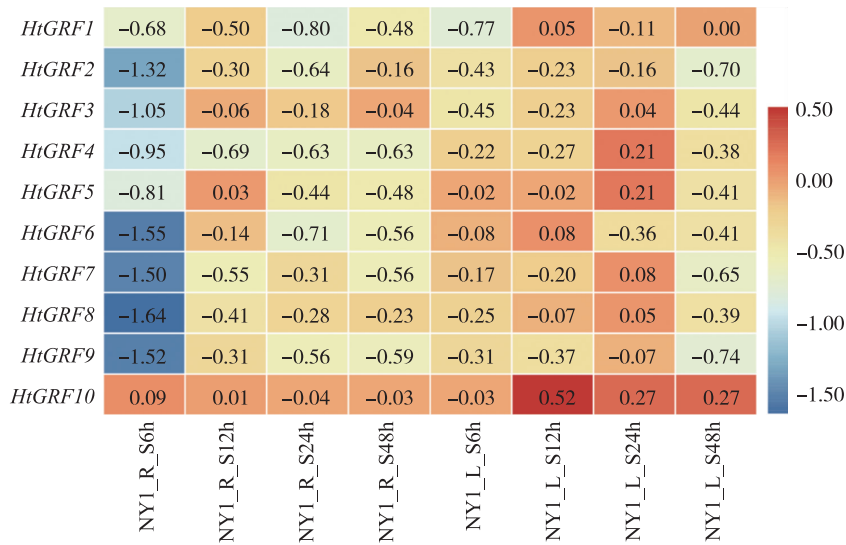


图 5 菊芋 14-3-3 基因在盐胁迫下的表达变化

Fig. 5 Expression changes of 14-3-3 genes of Jerusalem artichoke under salt stress

对照组为 300 mmol·L⁻¹ NaCl 处理 0 h 的根和叶。S:盐胁迫。

Root and leaf samples treated with 300 mmol·L⁻¹ NaCl for 0 h are taken as controls. S: Salt stress.

利用 FPKM 数据计算不同组织及非生物胁迫下 14-3-3 基因表达之间相关性(图 8)。结果表明,*HtGRF2*—*HtGRF9* 基因之间呈现较强的正相关,它们与 *HtGRF1* 呈现负相关,与 *HtGRF10* 的相关性较弱。此外,非生物胁迫下 *HtGRF1/10* 与 *HtGRF4/9* 呈现较强的负相关,*HtGRF2/3/5*、*HtGRF3* 与 *HtGRF1/9*、*HtGRF4/9*、*HtGRF6/8* 间呈现较强的正相关。

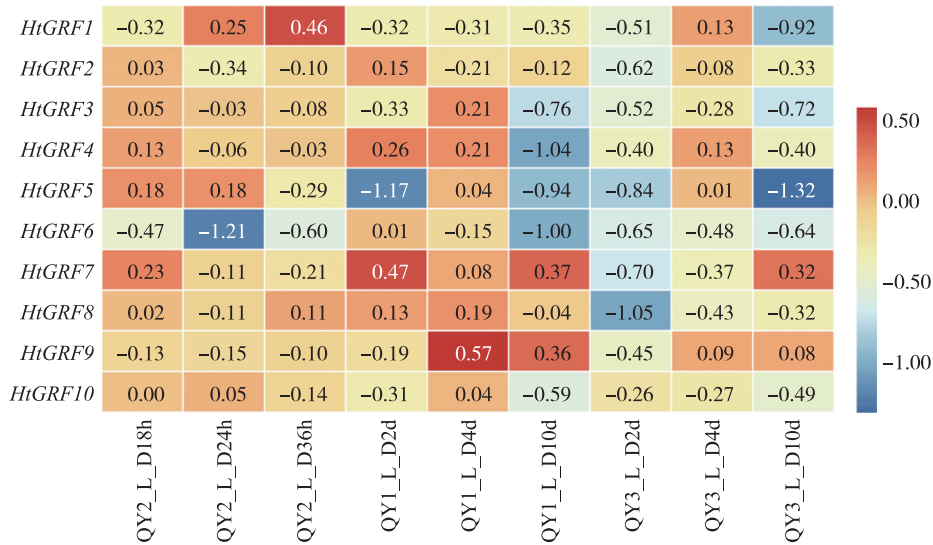


图 6 3 个青芋品种 14-3-3 基因在对于旱胁迫下的表达变化

Fig. 6 Expression changes of 14-3-3 genes of three varieties of Qingyu under drought stress

青芋 2 号(QY2)对照组为干旱胁迫 0 h 的叶片;青芋 1 号(QY1)和青芋 3 号(QY3)对照组为未经干旱胁迫 2、4 和 10 d 的叶片。L:叶,D:干旱胁迫。

For Qingyu 2 (QY2), leaf samples under drought stress for 0 h are taken as controls. For Qingyu 1 (QY1) and Qingyu 3 (QY3), leaf samples without drought stress for 2,4,10 d are taken as controls, respectively. L: Leaf, D: Drought stress.

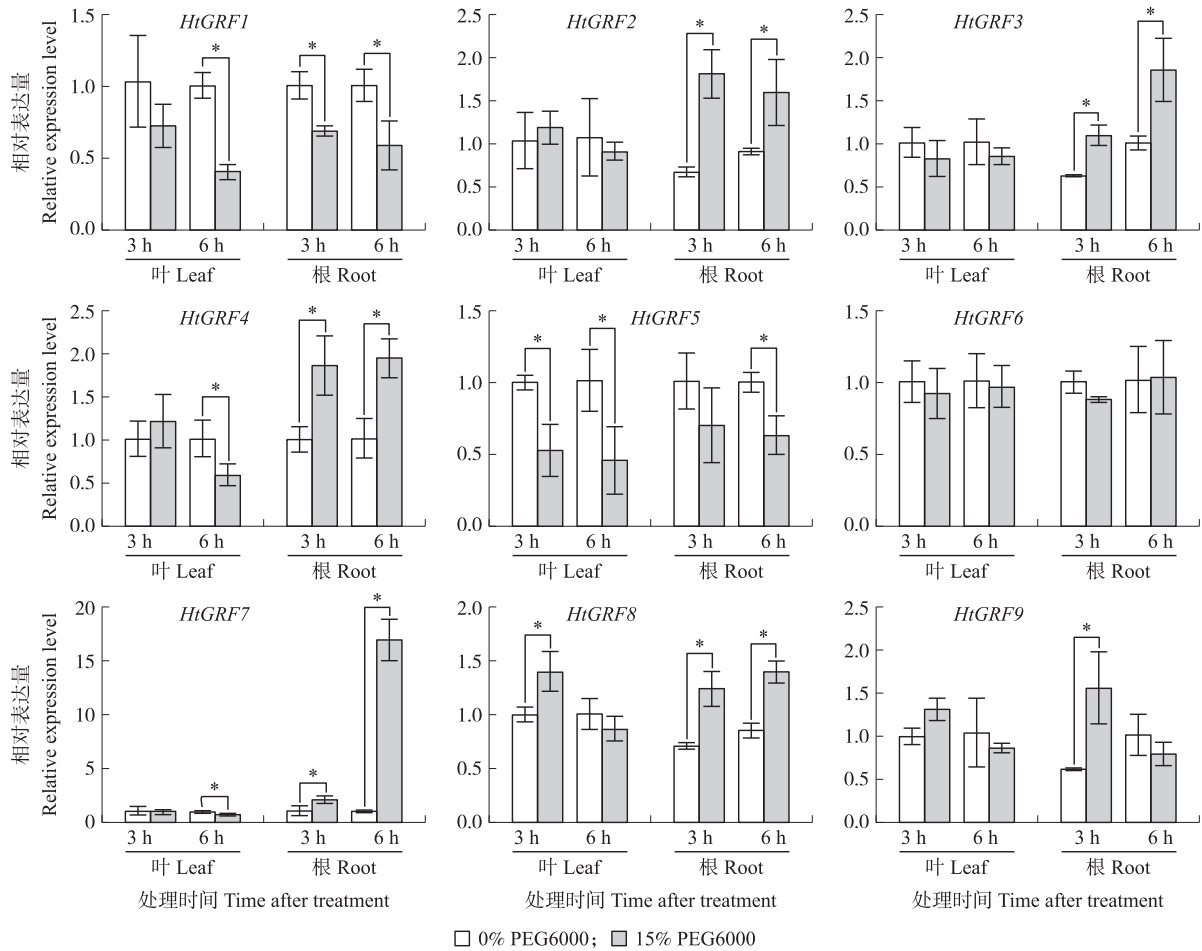


图 7 ‘南菊芋 1 号’ 14-3-3 基因在干旱胁迫下的表达变化

Fig. 7 The expression changes of 14-3-3 genes of ‘Nanyu 1’ under drought stress

RT-qPCR 以 0% PEG6000 处理的根和叶作为对照组 (设为 1),以 *HtActin* 为内参基因。* $P < 0.05$ 。

These RT-qPCR experiments are performed with roots and leaves without PEG6000 as the reference samples (set to 1). *HtActin* is used as the reference for normalization. * $P < 0.05$.

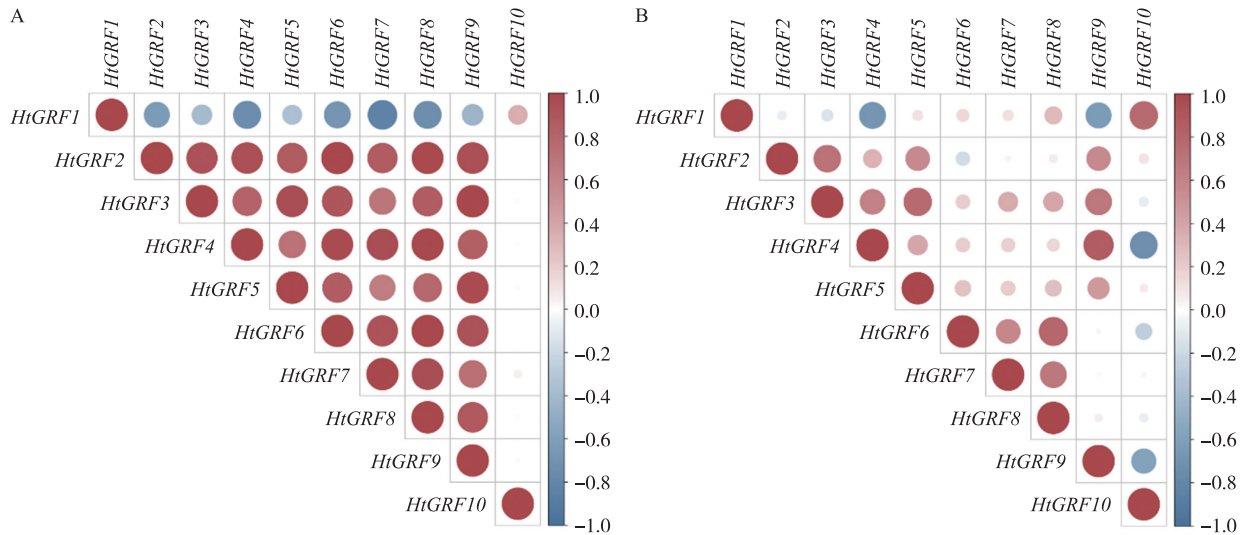


图8 不同组织(A)及非生物胁迫下(B)菊芋 14-3-3 基因表达相关性分析

Fig. 8 Correlation analysis of 14-3-3 gene expression in Jerusalem artichoke in different tissues(A) and under abiotic stresses(B)

红色为正相关,蓝色为负相关。圆点的大小和颜色密度与 Pearson 相关系数成比例。

Positive correlations are displayed in red, negative correlations are displayed in blue. The size of the circle and the color intensity are proportional to the Pearson's correlation coefficients.

3 讨论

14-3-3 蛋白在植物中广泛分布,是一类高度保守的蛋白通用调节因子,分为 ϵ 类和非 ϵ 类两类^[16]。本研究基于转录组数据分析,从菊芋中克隆了 14-3-3 基因家族的 10 个成员,其中 3 个归为 ϵ 类,7 个归为非 ϵ 类,属于 ϵ 类的数量远少于非 ϵ 类的。类似情况也发生在其他物种中,例如:拟南芥有 13 个 14-3-3 基因,其中 5 个 ϵ 类和 8 个非 ϵ 类;水稻有 8 个,有 2 个 ϵ 类,6 个非 ϵ 类^[3-4]。从系统进化树可以看出,菊芋、拟南芥和水稻的 14-3-3 由共同的被子植物祖先进化而来。菊芋 14-3-3 为多基因家族,结构预测表明它们可形成同源或异源二聚体,每个单体由 9 个 α -螺旋构成核心区域,保守基序均匀分布,所有成员氨基酸序列相似度为 72.78%,体现了菊芋 14-3-3 蛋白的高度保守性,赋予 14-3-3 蛋白功能特异性。

14-3-3 蛋白广泛参与植物细胞过程以及生长发育,如种子萌发、营养生长和生殖生长等。大麦种子萌发过程中,14-3-3A/B/C 被诱导表达,并表现出不同的空间表达模式^[17]。过表达竹子(*Phyllostachys edulis*) *Pe14-3-3b* 的拟南芥根系更长,茎更粗,抽苔更早,生长速度更快^[18]。菊芋发芽时,14-3-3 基因呈现较高的表达丰度。14-3-3 蛋白通过介导植物激素信号转导调节植物生长、发育和胁迫反应,拟南芥 14-3-3 蛋白介导 NPH3 定位变化,从而调节生长素依赖的向光性生长^[19]。14-3-3 蛋白与 RSG 结合,调控赤霉素 GA 合成^[20]。14-3-3 蛋白可能通过与油菜素甾醇 BR 受体激酶 BRI1 相互作用调控拟南芥叶片发育^[21]。水稻 qGL3 诱导 OsGF14b 的磷酸化,从而调节 OsBZR1 的核质穿梭和转录激活活性,最终负调控 BR 信号通路和水稻粒长^[22]。成花是种子植物生命周期从营养生长到生殖生长转变的关键,菊花(*Chrysanthemum morifolium*) Cm14-3-3 μ 与 CCT 转录因子 CmNRRa 协同作用抑制开花^[23]。拟南芥中,14-3-3 作为支架蛋白,与成花素 FT (Florigen) 和 FD 蛋白(1 个在茎顶端分生组织中特异表达的 bZIP 转录因子),相互作用形成成花素激活复合物(florigen activation complex, FAC),FAC 激活 APETALA1 的表达,进而刺激花器官的形成,完成开花转变^[24-25]。水稻中,Hd3a 在茎尖细胞质中先与 14-3-3 蛋白 GF14c 形成复合物,随后进入细胞核与 FD1 蛋白形成 FAC,诱导 MADS15 的转录,导致开花^[26]。OsCEN2 与 Hd3a 竞争,形成成花素抑制复合物 OsCEN2-GF14f-OsFD2,GF14f 对籽粒发育和灌浆起负调控作用^[27]。马铃薯(*Solanum tuberosum*) 中,14-3-3 蛋白 St14f 与 StSP6A 和 StFDL1 形成 FAC,可以激活马铃薯块茎形成,St14f 的螺旋 I 的柔韧性对 StFDL1 识别起着重要的作用^[28]。番茄 14-3-3 蛋白 TFT1 和 TFT10 可能通过调节蔗糖磷酸合成酶 (SPS) 活性来调节果实发育过程中的糖代谢^[29]。在芒果(*Mangifera indica*) 中,14-3-3 基因表达在果实发育期间增加,在果实成熟期间减少^[30]。14-3-3 基因在许多植物的不同组织及不同发育时期具有不同的表

达模式^[31],菊芋 *HtGRF* 在芽、根、茎、叶和块茎发育中具有不同的表达水平,*HtGRF2/3/6/9* 表达水平较高,推测它们在调节菊芋多种生物过程中发挥重要作用。

植物 14-3-3 蛋白广泛参与高温和低温胁迫反应。过表达 *Sl14-3-3* 家族基因 *SITFT6* 可以提高番茄植株的耐热性^[32]。正常条件下,拟南芥 bZIP18 和 bZIP52 与 14-3-3 ϵ 蛋白结合,存在于细胞质中,高温胁迫下,bZIP18 和 bZIP52 去磷酸化,解除与 14-3-3 ϵ 蛋白结合,bZIP18 和 bZIP52 定位到细胞核中,共同调节下游基因的表达^[33]。在高温条件下,拟南芥 14-3-3 蛋白介导细胞气孔开放的调节^[34]。拟南芥 RCI1A 即 14-3-3 ψ 蛋白,通过抑制乙烯生物合成,负向调节冷驯化和耐寒性^[35]。水稻 14-3-3 蛋白 OsGF14d 被 RING E3 Ub 连接酶 OsATL38 单泛素化而负调控冷胁迫反应^[36]。14-3-3 蛋白也通过 BR 信号通路响应冷胁迫,在没有 BR 的情况下,14-3-3 蛋白结合到 BZR1/2 上,阻止 BZR1/2 向细胞核的转移,抑制 BR 诱导基因的表达。在 BR 的诱导下,14-3-3 蛋白与 BKI1 结合,使得 BRI1 从 BKI1 的抑制中释放,以此同时,胞质中 BKI1 拮抗 14-3-3 蛋白,促进 BZR1 在细胞核内的积累,促进 BR 诱导基因的表达。过表达 *BRI1* 增强拟南芥的耐寒性,而 *14-3-3 ψ ϕ ϵ* 的突变削弱了这个作用^[21]。本研究中,高温胁迫下菊芋根中 *HtGRF6* 显著下调,多数 *HtGRF* 略有下降;低温胁迫下菊芋叶中 *HtGRF1* 显著上调,多数 *HtGRF* 稍有上升,*HtGRF1/6* 在菊芋响应温度胁迫中可能具有重要作用。

盐胁迫刺激水稻 *OsGF14b—OsGF14g* 的表达,OsGF14b 与 OsPLC1 相互作用,抑制 OsPLC1 泛素化,提高其活性和稳定性,从而提高水稻的耐盐性^[37]。小麦 (*Triticum aestivum*) TaGRF6-A 通过与 MYB 转录因子 TaMYB64 相互作用,正向调控盐胁迫忍受力^[38]。盐胁迫降低了拟南芥 14-3-3 非 ϵ 类基因四重敲除突变体 *klpc* 幼苗中 Na⁺、还原糖、葡萄糖、果糖、6-磷酸葡萄糖和 6-磷酸果糖的含量,揭示 14-3-3 蛋白调节离子稳态和代谢物组成,且功能有冗余^[39]。8 个马铃薯 14-3-3s 可与 StABI5 相互作用,而 ABF3 和 14-3-3 ω 的共表达可以诱导 ABI5 的表达,从而通过脱落酸 ABA 依赖的信号通路增强耐盐性^[40]。在正常条件下,拟南芥 14-3-3 λ/κ 通过结合激酶 SOS2 来抑制 SOS 通路,在盐胁迫下,这 2 个 14-3-3 基因降解,从而释放 14-3-3 蛋白对 SOS2 束缚,后者激活 SOS1 并促进 Na⁺ 外流^[41]。本研究中,几乎所有菊芋 *HtGRF* 表达在盐胁迫下均发生下调,以 *HtGRF2/3/6/7/8/9* 在盐胁迫 6 h 的根中最为显著,推测这些 *HtGRF* 在菊芋响应盐胁迫中可能起负调控作用。

随着全球变暖和淡水资源的减少,干旱胁迫已成为抑制植物生长、减少分布甚至导致植物死亡的最严重的限制因素之一,很多 14-3-3 蛋白参与了干旱胁迫的响应。水稻 OsGF14b 部分以 ABA 依赖的方式负调控耐旱性^[42]。*Hv14-3-3A* 沉默导致大麦干旱敏感性和气孔密度显著增加^[43]。然而,更多的研究表明 14-3-3 蛋白具有正调控干旱的作用,水稻 *GF14c/f* 的过表达增强了其耐旱性^[44]。干旱胁迫下,菊芋 *HtGRF8* 表达显著上调,*HtGRF1/5* 表达显著下调,且短时间内的变化更为剧烈,很可能在菊芋应对干旱胁迫初期阶段发挥重要作用。

同一种 14-3-3 蛋白可能调控多种非生物胁迫,几乎所有马铃薯 14-3-3 基因的表达受到干旱、盐和低温胁迫的影响,并且响应不同^[45]。籼稻的 *Os14-3-3f* 和 *Os14-3-3g* 受到寒冷、盐和干旱胁迫的显著刺激^[46]。大豆 (*Glycine max*) 14-3-3 蛋白 GmSGF141 与 GmMYB138a 在寒冷、盐胁迫和干旱下,表现出协同或拮抗作用^[47-48]。综合分析发现,菊芋 *HtGRF6* 在各组织中都具有较高的表达水平,在高温、盐和干旱胁迫下表达显著下调,*HtGRF2/3/7/8/9* 同时响应盐和干旱胁迫,趋势相反,推测这些 *HtGRF* 在菊芋抗逆中起重要作用,研究结果为进一步研究 14-3-3 蛋白功能提供了线索。

参考文献 References:

- [1] Moore B W, Perez V J, Gehring M. Assay and regional distribution of a soluble protein characteristic of the nervous system [J]. *Journal of Neurochemistry*, 1968, 15(4): 265-272.
- [2] Muslin A J, Tanner J W, Allen P M, et al. Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine [J]. *Cell*, 1996, 84(6): 889-897.
- [3] DeLille J M, Sehnke P C, Ferl R J. The *Arabidopsis* 14-3-3 family of signaling regulators [J]. *Plant Physiology*, 2001, 126(1): 35-38.
- [4] Chen F, Li Q, Sun L X, et al. The rice 14-3-3 gene family and its involvement in responses to biotic and abiotic stress [J]. *DNA Research*, 2006, 13(2): 53-63.
- [5] Xu W F, Shi W M. Expression profiling of the 14-3-3 gene family in response to salt stress and potassium and iron deficiencies in young tomato (*Solanum lycopersicum*) roots: analysis by real-time RT-PCR [J]. *Annals of Botany*, 2006, 98(5): 965-974.

- [6] Fu H, Subramanian R R, Masters S C. 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation[J]. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2000, 40(1): 617–647.
- [7] Long X H, Shao H B, Liu L, et al. Jerusalem artichoke: a sustainable biomass feedstock for biorefinery[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2016, 54: 1382–1388.
- [8] Wang Y, Zhao Y G, Xue F G, et al. Nutritional value, bioactivity, and application potential of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) as a neotype feed resource[J]. *Animal Nutrition*, 2020, 6(4): 429–437.
- [9] Wen F L, Yue Y, He T F, et al. Identification of miR390-TAS3-ARF pathway in response to salt stress in *Helianthus tuberosus* L.[J]. *Gene*, 2020, 738: 144460.
- [10] Haas B J, Papanicolaou A, Yassour M, et al. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis[J]. *Nature Protocols*, 2013, 8(8): 1494–1512.
- [11] Eddy S R, Pearson W R. Accelerated profile HMM searches[J]. *PLoS Computational Biology*, 2011, 7(10): e1002195.
- [12] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [13] Yue Y, Wang J Y, Ren W C, et al. Expression of genes related to plant hormone signal transduction in Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) seedlings under salt stress[J]. *Agronomy*, 2022, 12(1): 163.
- [14] Langmead B, Salzberg S L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2[J]. *Nature Methods*, 2012, 9(4): 357–359.
- [15] Li B, Dewey C N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome[J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12: 323.
- [16] Gökirmak T, Paul A L, Ferl R J. Plant phosphopeptide-binding proteins as signaling mediators[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2010, 13(5): 527–532.
- [17] Testerink C, van der Meulen R M, Oppedijk B J, et al. Differences in spatial expression between 14-3-3 isoforms in germinating barley embryos[J]. *Plant Physiology*, 1999, 121(1): 81–88.
- [18] Guo D, Zhu C L, Yang K B, et al. Identification of the 14-3-3 gene family in bamboo and characterization of Pe14-3-3b reveals its potential role in promoting growth[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(19): 11221.
- [19] Sullivan S, Waksman T, Paliogianni D, et al. Regulation of plant phototropic growth by NPH3/RPT2-like substrate phosphorylation and 14-3-3 binding[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 6129.
- [20] Ishida S, Fukazawa J, Yuasa T, et al. Involvement of 14-3-3 signaling protein binding in the functional regulation of the transcriptional activator repression of shoot growth by gibberellins[J]. *The Plant Cell*, 2004, 16(10): 2641–2651.
- [21] Lee J H, Kwak G, Lim Y P, et al. 14-3-3 proteins contribute to leaf and root development via brassinosteroid insensitive 1 in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Genes & Genomics*, 2020, 42(3): 347–354.
- [22] Gao X Y, Zhang J Q, Cai G, et al. qGL3/OsPPKL1 induces phosphorylation of 14-3-3 protein OsGF14b to inhibit OsBZR1 function in brassinosteroid signaling[J]. *Plant Physiology*, 2022, 188(1): 624–636.
- [23] Cheng H, Zhang J X, Zhang Y, et al. The Cm14-3-3 μ protein and CCT transcription factor CmNRRa delay flowering in chrysanthemum[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2023, 74(14): 4063–4076.
- [24] Wigge P A, Kim M C, Jaeger K E, et al. Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*[J]. *Science*, 2005, 309(5737): 1056–1059.
- [25] Kaufmann K, Wellmer F, Muiño J M, et al. Orchestration of floral initiation by APETALA1[J]. *Science*, 2010, 328(5974): 85–89.
- [26] Tsuji H, Nakamura H, Taoka K, et al. Functional diversification of FD transcription factors in rice, components of florigen activation complexes[J]. *Plant & Cell Physiology*, 2013, 54(3): 385–397.
- [27] Zhang Z P, Zhao H, Huang F L, et al. The 14-3-3 protein GF14f negatively affects grain filling of inferior spikelets of rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *The Plant Journal*, 2019, 99(2): 344–358.
- [28] Harada K I, Furuita K, Yamashita E, et al. Crystal structure of potato 14-3-3 protein St14f revealed the importance of helix I in StFDL1 recognition[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12(1): 11596.
- [29] Wang L, Cui N, Zhao X C, et al. Accumulation of carbohydrate and regulation of 14-3-3 protein on sucrose phosphate synthase (SPS) activity in two tomato species[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2014, 13(2): 358–364.
- [30] Pandit S S, Kulkarni R S, Giri A P, et al. Expression profiling of various genes during the fruit development and ripening of mango[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2010, 48(6): 426–433.
- [31] Chang L L, Tong Z, Peng C Z, et al. Genome-wide analysis and phosphorylation sites identification of the 14-3-3 gene family and functional characterization of *MeGRF3* in cassava[J]. *Physiologia Plantarum*, 2020, 169(2): 244–257.
- [32] Liang Y F, Ma F, Zhang R L, et al. Genome-wide identification and characterization of tomato 14-3-3 (*SITFT*) genes and functional analysis of *SITFT6* under heat stress[J]. *Physiologia Plantarum*, 2023, 175(2): e13888.
- [33] 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[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(2): 530.
- [34] Kostaki K I, Coupel-Ledru A, Bonnell V C, et al. Guard cells integrate light and temperature signals to control stomatal aperture[J]. *Plant Physiology*, 2020, 182(3): 1404–1419.

- [35] Catalá R, López-Cobollo R, Mar Castellano M, et al. The *Arabidopsis* 14-3-3 protein RARE COLD INDUCIBLE 1A links low-temperature response and ethylene biosynthesis to regulate freezing tolerance and cold acclimation[J]. *The Plant Cell*, 2014, 26(8):3326–3342.
- [36] Cui L H, Min H J, Yu S G, et al. OsATL38 mediates mono-ubiquitination of the 14-3-3 protein OsGF14d and negatively regulates the cold stress response in rice[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2022, 73(1):307–323.
- [37] Wang N G, Shi Y Y, Jiang Q, et al. A 14-3-3 protein positively regulates rice salt tolerance by stabilizing phospholipase C1[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2023, 46(4):1232–1248.
- [38] Shao W N, Chen W, Zhu X G, et al. Genome-wide identification and characterization of wheat 14-3-3 genes unravels the role of TaGRF6-A in salt stress tolerance by binding MYB transcription factor[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(4):1904.
- [39] Gao J, van Kleeff P J M, de Boer M H, et al. Ion homeostasis and metabolome analysis of *Arabidopsis* 14-3-3 quadruple mutants to salt stress[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12:697324.
- [40] Wang Q Q, Yan C C, Fu Y Y, et al. Genome-wide identification of 14-3-3 gene family reveals their diverse responses to abiotic stress by interacting with StABI5 in potato(*Solanum tuberosum* L.)[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 13:1090571.
- [41] Yang Z J, Wang C W, Xue Y, et al. Calcium-activated 14-3-3 proteins as a molecular switch in salt stress tolerance[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1):1199.
- [42] Liu J P, Sun X J, Liao W C, et al. Involvement of OsGF14b adaptation in the drought resistance of rice plants[J]. *Rice*, 2019, 12(1):82.
- [43] Jiang W, Tong T, Li W, et al. Evolution of plant 14-3-3 proteins and function of Hv14-3-3A in stomatal regulation and drought tolerance[J]. *Plant & Cell Physiology*, 2023, 63(12):1857–1872.
- [44] Liu Q, Zhang S H, Liu B. 14-3-3 proteins: macro-regulators with great potential for improving abiotic stress tolerance in plants[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, 477(1):9–13.
- [45] He F Y, Duan S G, Jian Y Q, et al. Genome-wide identification and gene expression analysis of the 14-3-3 gene family in potato(*Solanum tuberosum* L.)[J]. *BMC Genomics*, 2022, 23(1):811.
- [46] Yashvardhini N, Bhattacharya S, Chaudhuri S, et al. Molecular characterization of the 14-3-3 gene family in rice and its expression studies under abiotic stress[J]. *Planta*, 2018, 247(1):229–253.
- [47] 滕卫丽, 史飞飞, 林峰, 等. 大豆种质耐碱性状全基因组关联分析[J]. *东北农业大学学报*, 2023, 54(4):1–13.
Teng W L, Shi F F, Lin F, et al. Genome-wide association analysis of alkali tolerance traits in soybean germplasm[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2023, 54(4):1–13(in Chinese with English abstract).
- [48] Bian S M, Jin D H, Li R H, et al. Genome-wide analysis of CCA1-like proteins in soybean and functional characterization of GmMYB138a[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(10):2040.

责任编辑:刘怡辰