

文章编号:1671-4229(2024)02-0013-13

# 拟南芥转录因子 HAT1 负调控盐胁迫分子机制研究

方可, 李佳凤, 张大伟\*

(四川大学 生命科学学院/生物资源与生态环境教育部重点实验室, 四川 成都 610065)

**摘要:** 土壤盐碱化是目前全球农业面临的主要环境挑战之一, 为使植物在盐碱地上更好地生长, 开展植物盐胁迫响应机制的研究具有重大意义。植物特有的同源结构域-亮氨酸拉链(HD-ZIP)家族转录因子 HAT1 在拟南芥中调控多种胁迫应答, 到目前为止, HAT1 是否参与调控植物对盐胁迫的响应尚不清楚。文章围绕转录因子 HAT1 在拟南芥响应盐胁迫中的调控作用展开研究, 证明了 EIN3-HAT1-CSDs 分子模块可以调控植物对盐胁迫的响应, 以期拓展盐胁迫的分子调控网络。盐胁迫诱导 EIN3 的积累, EIN3 抑制 HAT1 的表达, 进而削弱 HAT1 对下游基因 CSD1 与 CSD2 的转录抑制, 使抗氧化系统得以激活并清除过量的活性氧, 从而增强植株的盐耐受能力。该信号通路为通过分子育种提高植物盐耐受性提供了一个新的潜在靶点。

**关键词:** 盐胁迫; HAT1; CSD; 转录调控

中图分类号: Q945 文献标志码: A

## Molecular mechanism of *Arabidopsis* transcription factor HAT1 negatively regulating salt stress

FANG Ke, LI Jia-feng, ZHANG Da-wei\*

(Key Laboratory of Bio-Resource and Eco-Environment of Ministry of Education,  
The College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

**Abstract:** Soil salinity is one of the major environmental challenges facing global agriculture today, and it is of great importance to conduct research on salt stress response mechanisms in order to make plants grow better. The plant-specific homologous structural domain-leucine zipper (HD-ZIP) family transcription factor HAT1 regulates multiple stress responses in *Arabidopsis*, and so far, it is not clear whether HAT1 is involved in regulating plant responses to salt stress. This paper focuses on the regulatory role of HAT1 in response to salt stress in *Arabidopsis*, with the aim of expanding the molecular regulatory network of salt stress. This study demonstrates that the EIN3-HAT1-CSDs molecular module regulates the plant response to salt stress. Salt stress induces the accumulation of EIN3, which inhibits the expression of HAT1, thereby weakening the transcriptional inhibition of HAT1 on downstream genes CSD1 and CSD2 and activating the antioxidant system to remove excess reactive oxygen species to enhance the salt tolerance of plants. This signaling pathway provides a new potential target for improving plant salt tolerance through molecular breeding.

**Key words:** salt stress; HAT1; CSD; transcriptional regulation

收稿日期: 2023-11-28; 修回日期: 2024-02-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(32070213, 32270258)

作者简介: 方可(1996—), 女, 博士研究生. E-mail: ke.fang@foxmail.com

\*通信作者. E-mail: zhdawei@scu.edu.cn

引文格式: 方可, 李佳凤, 张大伟. 拟南芥转录因子 HAT1 负调控盐胁迫分子机制研究[J]. 广州大学学报(自然科学版), 2024, 23(2): 13-25.

几乎所有对人类活动有作用的植物均对盐胁迫敏感,因此,盐胁迫成为农业活动中最严重的非生物胁迫之一<sup>[1]</sup>。土壤盐分升高会引发植物受到渗透胁迫、离子毒害和二次胁迫-氧化胁迫<sup>[2]</sup>,破坏植物细胞的细胞膜结构,使酶活性失活,破坏离子平衡等<sup>[3]</sup>,从而影响植物的生长发育。

离子毒害是盐胁迫对植物生长发育影响的关键因素<sup>[4]</sup>。为了应对外部环境造成的胁迫,植物已经进化出极其精细的调控网络来减缓胁迫环境引起的伤害<sup>[5-7]</sup>。铜锌超氧化物歧化酶 Cu/Zn-SOD(CSD)是植物体内最重要的超氧化物歧化酶(SOD)。长期的盐胁迫导致叶片中 Na<sup>+</sup> 的积累,提高了 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 水平及超氧化物歧化酶活性,并增加了编码铜锌超氧化物歧化酶 CSD 基因的转录诱导<sup>[8]</sup>。拟南芥中有 3 种 Cu/ZnSOD:CSD1(位于细胞质)、CSD2(位于叶绿体)以及 CSD3(位于过氧化物酶体)<sup>[9]</sup>。CSD1 响应氧化应激而被诱导<sup>[10]</sup>,在盐胁迫下 CSD2 蛋白更加稳定,从而维持叶绿体 ROS 的稳态来增强拟南芥对盐胁迫的耐受性<sup>[11]</sup>。MicroRNA(miRNA)是核苷酸的调节性 RNA,通过指导 mRNA 切割或翻译抑制作用在转录后调节基因表达。最初的研究是对 miR398 靶向 CSD1 和 CSD2 基因的研究,且 miR398 在 CSD1 和 CSD2 mRNA 上的靶位在双子叶植物和单子叶植物中是保守的<sup>[12]</sup>。在拟南芥中,miR398 可以通过沉默 CSD1 和 CSD2 的表达来调节氧化应激反应<sup>[10]</sup>。目前,植物中是否存在影响 CSDs 转录水平的转录因子还未有研究。

同源域-亮氨酸拉链蛋白(HD-Zip; homeodomain-leucine zipper)家族是植物所特有的转录因子<sup>[13]</sup>。拟南芥同源域-亮氨酸拉链蛋白 1(HAT1; homeodomain-leucine zipper protein 1)及其旁系同源物 HAT2 和 HAT3 属于 HD-Zip II 类家族<sup>[14]</sup>。HD-ZIP II 家族成员在植物生长发育和响应环境信号过程中起到了重要的调控作用<sup>[15]</sup>。HAT1 与 DELLAs 的相互作用会改变 HAT1 蛋白的稳定性以及影响 HAT1 对靶基因的结合活性,从而调控植物毛状体发生和子叶生长<sup>[16]</sup>。HAT1 作为负向调控因子参与脱落酸(ABA)诱导的植物抗旱性<sup>[15]</sup>。然而,HAT1 是否参与植物响应盐胁迫的响应以及相关分子调控机理还不清楚。

EIN3 是植物特异性转录因子,也是乙烯信号转导的关键调控因子<sup>[17]</sup>。在拟南芥中过表达

EIN3 显著提高植株的耐盐性。EIN3 与 EIL1 是功能同源蛋白,且两者的功能十分相似<sup>[17]</sup>。进一步有研究表明,盐胁迫诱导的 EIN3/EIL1 的稳定性通过避免活性氧(ROS)积累来提高对盐胁迫的耐受能力<sup>[17]</sup>。有趣的是,EIN3 在拟南芥中起正向作用,而在水稻中起负向作用<sup>[18]</sup>,但是 EIN3 不能改变盐度过度敏感(Salt Oversensitive, SOS)通路来调节耐盐性<sup>[19]</sup>。因此,盐胁迫下 EIN3 对于其他通路的作用研究有待完善。

在本研究中发现了转录因子 HAT1 作为核心元件负调控拟南芥盐胁迫的分子机制。生物化学、分子生物学以及遗传学实验表明,上游 EIN3 会抑制 HAT1 的表达水平,进而削弱 HAT1 对 CSD1、CSD2 基因的转录抑制,从而改变植物体内的 ROS 平衡来响应盐胁迫。综上,本文提出拟南芥通过 EIN3-HAT1-CSDs 转录级联分子模块调控植物的耐盐性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 植物材料

该实验中涉及的拟南芥材料 Col-0(Columbia)、*hat1*、*hat1hat2*、*hat1hat3*、*hat1hat2hat3*、*CSD2RNAi*、*HAT1OX#11*、*HAT1OX#13*、*proHAT1:GFP-HAT1*、*ein3-1eil1-1*、*EIN3OX#4*、*EIN3OX#9* 为本实验室原存贮。在野生型 Col-0 背景下构建 35S:*CSD1-HA-Flag* 与 35S:*CSD2-HA-Flag* 过表达株系。*csd1* 购自于欧洲拟南芥储存中心(NASC),对应 SALK 号为 SALK-024857C。将 *hat1hat2hat3* 与 *csd1*、*CSD2RNAi* 分别杂交获得四重缺失突变体 *hat1hat2hat3csd1* 与 *hat1hat2hat3CSD2RNAi*。通过花药浸染法对植物进行转化构建拟南芥转基因材料。

### 1.2 植物总 RNA 提取和实时荧光定量 PCR

参照 RNA 提取试剂盒(ProbeGene)方法提取总 RNA,参照 RNA 反转录试剂盒(诺唯赞生物)方法制备 cDNA。使用 SYBR 绿色 PCR 预混液(Invitrogen)在实时荧光定量 PCR 仪中进行 qPCR 定量。对于每个样品,进行 3 次重复,用软件 Bio-Rad 进行初步处理分析。引物序列见表 1。

### 1.3 Dual-luciferase 试验

将 HAT1 的 CDS 序列连接到载体 1300-eGFP 上构成效应基因,将 CSD1、CSD2 的全部启动子区域分别连接到载体 Pgreen II-0800-Luc 上形成报告

基因。取正常生长 28 d 的野生型拟南芥的幼嫩叶片收集拟南芥原生质体,将大量提取纯化后的质粒:35S:GFP、35S:GFP-HAT1 分别与 CSD1pro:LUC、CSD2pro:LUC 共转化进拟南芥原生质体中,孵育过夜后检测荧光信号。

#### 1.4 叶绿素含量测定

取 14 d 的拟南芥幼苗地上部分 0.1 g 左右,置于研钵中;加入 2 mL 80% 丙酮(v/v),将植物组织快速研磨成匀浆,然后用 80% 丙酮定容至 4 mL;室温,3 000 rpm,离心 10 min,吸取上清液备用;取 2 mL 液体于比色皿中,分别在 646、663 nm 处测定吸光度;计算叶绿素 a、叶绿素 b 以及总叶绿素的含量:

$$\text{叶绿素 a (mg/g FW)} = 12.21 * \text{OD663} - 2.81 * \text{OD646},$$

$$\text{叶绿素 b (mg/g FW)} = 20.13 * \text{OD646} - 5.03 * \text{OD663},$$

$$\text{总叶绿素 (mg/g FW)} = \text{叶绿素 a} + \text{叶绿素 b}.$$

#### 1.5 NBT 染色和 DAB 染色

通过 NBT 染色来检测超氧离子的含量,DAB 染色来检测过氧化氢的含量。配制 0.5 mg/mL NBT 溶液和 1 mg/mL DAB 溶液;取 28 d 的拟南芥幼苗的第七片叶子,分别放进 NBT、DAB 染液中;

真空抽取 10 min,NBT 染色叶片置于室温染色时间为 3 h,DAB 染色叶片置于室温染色时间为 8 h;将染色后的植株置于 95% 的乙醇煮沸 10 min,重复 3 次,彻底洗去浮色;扫描植株获得图片。

#### 1.6 植物蛋白提取和蛋白免疫印迹

蛋白质提取是将约 50 mg 组织样品置于 2 mL 塑料离心管中,并在液氮中研磨成细粉。之后,将 150  $\mu$ L 蛋白上样缓冲液(5% 十二烷基硫酸钠、0.25% 溴酚蓝、2.5%  $\beta$ -巯基乙醇及 25% 甘油)添加到粉末中,并在 100  $^{\circ}$ C 下煮沸 10 min,然后在 13 000 g、4  $^{\circ}$ C 下离心 10 min。上清液用作总蛋白提取物。提取的蛋白质溶液在 10% 十二烷基硫酸钠(SDS)凝胶上进行电泳,并转移到 PVDF 膜上与抗体一起孵育。

#### 1.7 ChIP-qPCR 测定

取 3 g 14 d 的 HAT1-GFP 幼苗分别用 0 mM 和 250 mM NaCl 溶液处理 24 h 后进行 ChIP 实验。方法参照以前的研究<sup>[20]</sup>进行:取样后,加入预冷的交联液抽真空,使蛋白质与 DNA 交联;超声裂解细胞,用 20  $\mu$ L 抗 GFP 或 IgG 抗体进行免疫沉淀反应;用 40  $\mu$ L 蛋白 A 珠收集免疫沉淀蛋白,反向交联后,使用特定的引物集通过 qPCR 对 DNA 片段进行定量,引物见表 1。

表 1 引物序列  
Table 1 Primer sequence

基因	F 引物	R 引物
qPCR-ACTIN2	CCCGCTATGTATGTCGC	AAGGTCAAGACGGAGGAT
qPCR-HAT1	ACGGAGGTGAGACTTGTAGGA	CAGATCGCTGTTGTGGTTAG
qPCR-HAT2	AGACAAGTGGAAGTGTGGTT	TGATGAGTGTAGTTGGTGGA
qPCR-HAT3	TTGGAGGAGCTAGAGTAGAA	GTGAGAGTAGTGGGAGGTTT
qPCR-CSD1	TGAACAGCAGTGAGGGTG	AGTGATTGTGAAGGTGGC
qPCR-CSD2	GTCTTCTCATTCTCTCTCC	CAACTGTCAACGCTTTCCG
qPCR-EIN3	ACCTGCCGAGAATCTTGGG	GAAACCTGGATGCTGCTG
HA-CSD1	ACGCGTGCACATGGCGAAAAGGAGTTG-CAGTTTTGA	CGGGGTACCTTAGCCCTGGAGACCAATGATGCCG
HA-CSD2	ACGCGTGCACATGGCTGCCACCAACA-CAATCCTCG	CGGGGTACCTTAGAGCGGCGTCAAGC-CAATCACA
ChIP-TA3	GATTCTTACTGTAAAGAACATGGCATTGAGAG	TCCAAATTTCTGAGGTGCTTGTAAACC
ChIP-CSD1-L1	TTTAAACTCAGTGATAGCACCCACG	GAAAAAGACAGTGACTTTTCACCCA
ChIP-CSD1-L2	GCTACATACAAATTTGACAGACTCTC	CTCTTCTCTGCTGATGTGGTA
ChIP-CSD2-L1	TCCTGTCCCGTTCCCATTTCCAT	GTGGAGAAACAACCTCAAAAAGGGCTC
ChIP-CSD2-L2	GGCAAAGTTTAAACATTTTCGCATAAG	TTGGAGGAAATGAGTAGGCACAAAT
RNAiCSD2	ACGCGTGCAGTCCGTGCAAAGCGTTGACAG	CCCAAGCTTATCCTTAAGCTCGTGAACCAC

### 1.8 EMSA 电泳迁移率转移测定

将纯化的 MBP-HAT1 蛋白与相应的探针一起孵育,将混合物在结合缓冲液(25 mM HEPES-KOH, pH 8.0, 50 mM KCl, 1 mM 二硫苏糖醇和 10% 甘油)中反应 30 min 并在聚丙烯酰胺凝胶中迁移。利用 EMSA 试剂盒 EMSA Kit \* with SYBR Green and SYPRO Ruby EMSA stains \* (Molecular probes TM, E33075) 按照说明避光染胶 30 min, 然后置于核酸显影仪上进行曝光拍照。

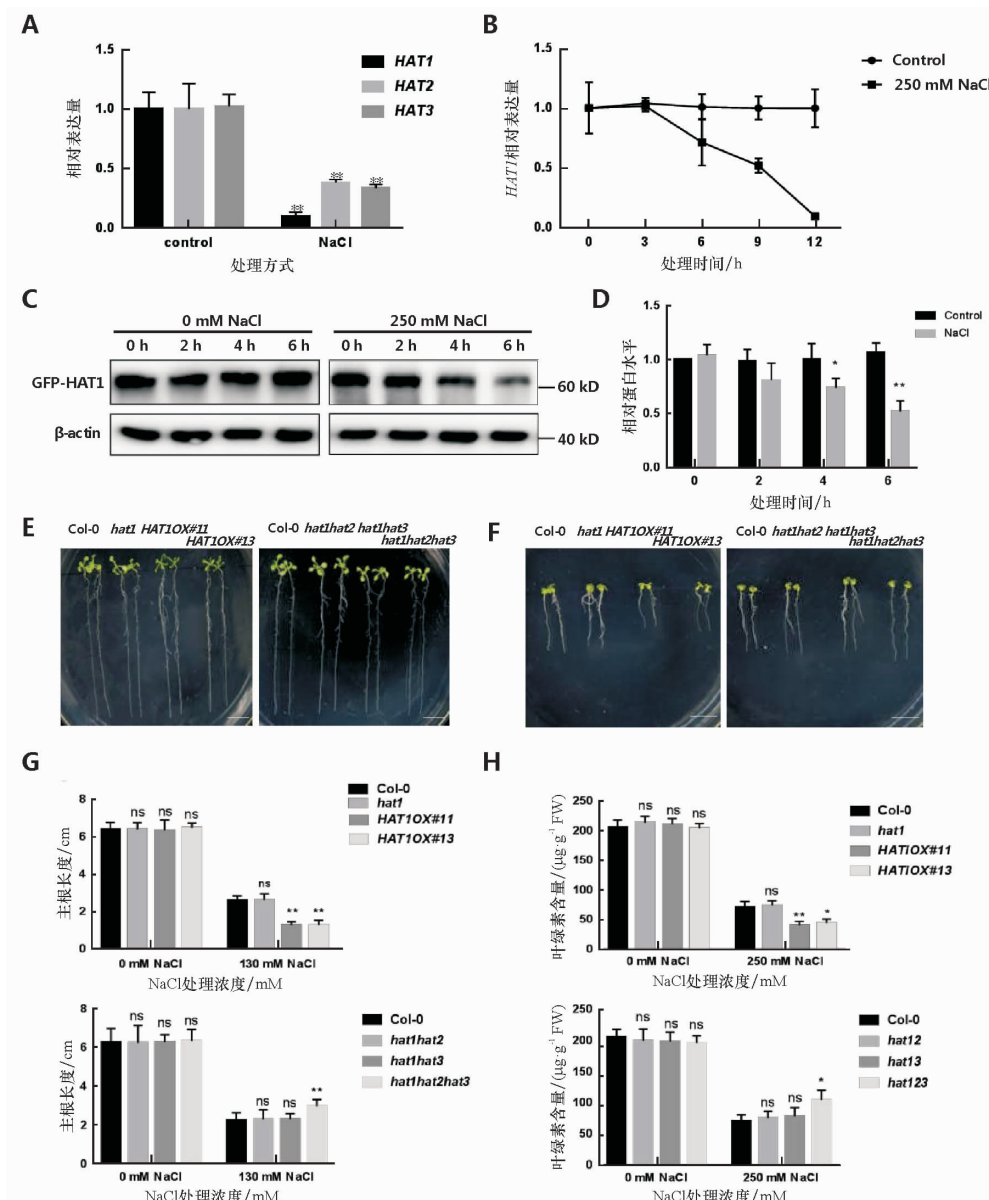
## 2 结果与分析

### 2.1 HAT1 在盐胁迫中起负调控作用

转录因子 HAT1 参与调控拟南芥的生物胁迫以及非生物胁迫响应。拟南芥的转录热图数据 (<http://bbc.botany.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) 显示,野生型拟南芥幼苗在盐胁迫处理后,HAT1 的表达显著降低,这意味着 HAT1 可能参与了盐胁迫响应。已有研究表明,在拟南芥中 HAT1 常与同源基因 HAT2、HAT3 具有功能冗余<sup>[13,15]</sup>。笔者猜想 HAT1、HAT2、HAT3 是否也功能冗余地调控拟南芥的盐胁迫响应。为了验证这一假设,用 250 mM NaCl 溶液处理 14 d 大的野生型拟南芥幼 12 h 后取样,检测了样品中 HAT1 及其同源基因 HAT2 和 HAT3 的表达水平。实验结果如图 1A 所示,与对照组相比,盐胁迫下,HAT1、HAT2、HAT3 的表达均下降。其中,HAT1 的变化最为显著,下降了 90%,HAT1 对盐胁迫的响应最为明显。笔者重点关注到 HAT1,并对 HAT1 响应盐胁迫的时间表达模式进行分析。将 14 d 的野生型拟南芥在含有 250 mM NaCl 的 1/2 MS 液体培养基中生长 0、3、6、9 和 12 h 后分析 HAT1 的表达变化。结果表明,在盐溶液处理 6 h 后,HAT1 的表达量显著下降,下降为 0 h 的 70%,9 h、12 h 持续下降,分别下降为 0 h 的 50% 和 10% (图 1B)。该结果说明,盐胁迫会使 HAT1 的表达水平持续降低。以上结果说明,盐胁迫会影响 HAT1、HAT2、HAT3 基因的表达,三者之间存在功能冗余,其中,HAT1 在盐胁迫调控中可能起主要作用。为了进一步探索盐胁迫如何影响 HAT1 蛋白水平变化,使用 14

d 的 *proHAT1*; *GFP-HAT1* 幼苗分别在不含与含有 250 mM NaCl 溶液的 1/2 MS 液体培养基中分别处理 0、2、4、6 h 后取样,利用 Western Blot 分析盐处理不同时间点后,植物体内 HAT1 蛋白的水平变化。如图 1C 及图 1D 所示,在不含 NaCl 溶液的 1/2 MS 液体培养基中处理后,拟南芥体内 HAT1 蛋白水平无显著变化。而在含有 250 mM NaCl 溶液的 1/2 MS 液体培养基中处理后,拟南芥体内的 HAT1 蛋白含量在盐处理 2 h 后,开始轻微下降。盐处理 2、4、6 h 后,HAT1 蛋白含量逐渐下降,分别下降了约 18%、25% 和 50%。结果说明,HAT1 在盐胁迫响应中蛋白量下降。

为了进一步研究 HAT1 在盐胁迫响应中的作用,在盐胁迫下,对拟南芥进行盐敏感表型测定。主根长度常作为测定盐敏感性的指标,在盐胁迫下,主根越长表明植株更加耐盐,反之则对盐胁迫更加敏感。将正常生长 4 d 的野生型 Col-0, HAT1 过表达突变体 *HAT1OX#11*、*HAT1OX#13* 和缺失突变体 *hat1*、*hat1hat2*、*hat1hat3*、*hat1hat2hat3* 幼苗转移到模拟盐胁迫生长环境的培养基上,继续生长 10 d。将生长在正常 1/2 MS 培养基上的幼苗作为对照,统计全部植株主根长度。图 1E ~ 图 1G 结果表明,正常 1/2 MS 培养基上生长的 *hat1*、*hat1hat2*、*hat1hat3*、*hat1hat2hat3*、*HAT1OX # 11*、*HAT1OX#13* 和野生型幼苗的主根长一致,没有显著差异。但是,在盐胁迫环境下生长时,与野生型相比,*HAT1OX#11*、*HAT1OX#13* 的主根长更短,而 *hat1hat2hat3* 更长,*hat1*、*hat1hat2*、*hat1hat3* 无明显差异。叶绿素含量下降是由盐胁迫引起的一种普遍现象。笔者测定盐胁迫下不同突变体中叶绿素含量的变化趋势与根长变化趋势基本一致(图 1H),正常 1/2 MS 培养基上生长的幼苗中叶绿素含量无显著差异。在盐胁迫条件下,与野生型的叶绿素含量相比,*HAT1OX#11* 幼苗的叶绿素含量极显著降低,而 *HAT1OX # 13* 含量显著降低,*hat1hat2hat3* 含量显著升高,*hat1* 无显著差异。综上所述表明,HAT1、HAT2、HAT3 功能冗余地参与了调控植物响应盐胁迫的过程,且 HAT1 在三者中作为主要的负调控因子发挥作用。

图1 *HAT1* 对盐胁迫的响应Fig. 1 Response of *HAT1* to salt stress

注:图中,A为 *HAT1*、*HAT2*、*HAT3* 在盐处理和对照组中的相对表达水平。*Actin 2* 作为内参基因。\*\*表示  $P < 0.01$ 。3次生物学重复实验。B为 *HAT1* 在盐处理和对照组中不同处理时间的相对表达水平。*Actin 2* 作为内参基因。3次生物学重复实验。C为 *proHAT1:GFP-HAT1* 幼苗经过0、2、4、6 h不同浓度盐处理后 GFP-HAT1 的蛋白水平变化。 $\beta$ -actin 为内参蛋白。3次生物学重复实验。D为图C中的蛋白定量分析,以对照组处理0 h的 GFP-HAT1 的蛋白水平为1。\*表示  $P < 0.05$ , \*\*表示  $P < 0.01$ 。E~F为野生型与相应植物材料在1/2 MS培养基上生长(E)和在含有130 mM NaCl的1/2 MS培养基上生长(F)10 d的表型,标尺为1 cm。G为图E与图F中拟南芥幼苗的根长测量。\*\*表示  $P < 0.01$ 。H为野生型与相应植物材料在有无NaCl处理的培养基上生长的总叶绿素含量。将正常1/2 MS培养基上生长4 d的Col-0、*hat1*、*hat1hat2*、*hat1hat3*、*hat1hat2hat3*、*HAT1OX#11*、*HAT1OX#13* 幼苗转移到不含有或含有250 mM NaCl的1/2 MS培养基上继续生长10 d,提取植物叶绿素,测定提取液在470、646、663 nm处的吸光值后,计算总叶绿素含量。\*表示  $P < 0.05$ , \*\*表示  $P < 0.01$ 。

2.2 *HAT1* 调控盐胁迫下拟南芥的氧化还原稳态  
长时间的盐胁迫会引起次级胁迫——氧化胁迫<sup>[21]</sup>。在植物体内积累过量的活性氧会使脂质和蛋白质以及核酸过度氧化,严重破坏正常细胞的

新陈代谢,导致氧化损伤<sup>[8,22]</sup>。为了调查 *HAT1* 参与调控的盐响应是否涉及氧化还原调控,将土壤中正常生长21 d的Col-0与 *HAT1* 基因突变体和过表达材料用含有或不含300 mM NaCl溶液处理

幼苗 7 d 后,分别用 NBT 与 DAB 染料对植株进行染色,测定了植株体内  $O_2^-$  和  $H_2O_2$  的含量。与之前的研究一致<sup>[16]</sup>,Col-0、*hat1hat2hat3*、*HAT1OX#11* 和 *HAT1OX#13* 的叶片形态有所区别。结果显示,盐胁迫处理后,与野生型相比,在 *HAT1* 过表达材料 *HAT1OX#11* 与 *HAT1OX#13* 植株的 NBT 和 DAB 染色程度最深,*hat1hat2hat3* 植株的染色程度最浅(图 2A ~ 图 2B)。

植物的抗氧化酶体系主要由超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)、过氧化氢酶(CAT)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)和谷胱甘肽还原酶(GR)组成<sup>[23]</sup>。抗氧化酶都积极参与了盐胁迫过程中活性氧的清除<sup>[7,24]</sup>。笔者测定了在

盐胁迫下,野生型 Col-0 与 *hat1hat2hat3* 突变体、过表达材料中 SOD、POD、APX 和 CAT 4 种抗氧化酶的活性。结果如图 2C ~ 图 2F 所示,正常条件下,*hat1hat2hat3* 突变体与野生型中的 SOD、POD、APX 及 CAT 的活性无显著差异。盐胁迫下,SOD、POD、APX 及 CAT 的活性均会增加。与野生型相比,这种增加在缺失突变体 *hat1hat2hat3* 中会进一步加强,在 *HAT1* 过表达株系中会受到抑制。值得注意的是,在 *hat1hat2hat3* 突变体中,SOD 的活性变化为极显著,POD、APX 及 CAT 均为显著差异。这些结果表明了 *HAT1* 在响应盐胁迫清除活性氧的过程中起负调控的作用。

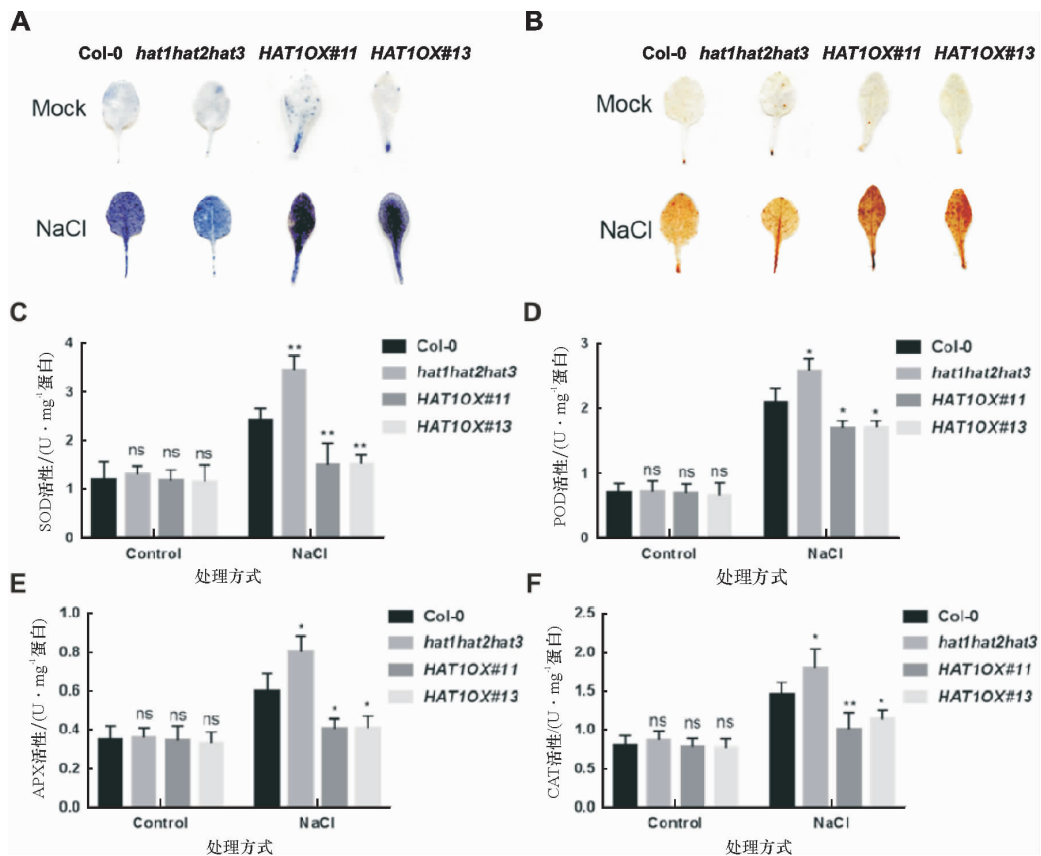


图 2 *HAT1* 调控盐胁迫下氧化还原稳态

Fig. 2 *HAT1* regulates redox homeostasis under salt stress

注:图中,A 为相应的植物材料叶片 NBT 染色图。取土壤中生长至 28 d 幼苗的第七片叶子进行 NBT 染色 3 h 后,脱色并扫描成片。

B 为相应的植物材料叶片 DAB 染色图。取土壤中生长至 28 d 幼苗的第七片叶子进行 DAB 染色 8 h 后,脱色并扫描成片。

C ~ F 为 28 d 大的相应植物材料进行提取粗酶液后的 SOD(图 C)、POD(图 D)、APX(图 E)、CAT(图 F)活性。

### 2.3 CSDs 在盐胁迫中起正调控作用

已有研究表明,在包含强光、臭氧等产生 ROS 的胁迫中,*CSD1* 与 *CSD2* 基因表达上调<sup>[25-26]</sup>。为了探究 *CSD1* 与 *CSD2* 是否参加拟南芥的盐胁迫

响应,笔者在野生型 Col-0 背景下构建了 35S:*CSD1-HA-Flag* 与 35S:*CSD2-HA-Flag* 过表达株系,如图 3A 所示,鉴定后选取了 *CSD1OX#3*、*CSD1OX#6* 与 *CSD2OX#1*、*CSD2OX#5* 进行后续实验。

*csd1*、*csd2* 缺失突变体鉴定如图 3B 所示。将野生型和 *CSD1*、*CSD2* 相关的突变体进行盐敏感表型测定,统计其主根长度。如图 3C ~ 图 3H 所示,与野生型相比,正常 1/2 MS 培养基上生长的 *CSD1*、*CSD2* 突变体均无显著差异。在含有盐的 1/2 MS

培养基上生长后,*CSD1* 与 *CSD2* 过表达植株幼苗的主根长均显著长于野生型,缺失突变体 *csd1* 和 *csd2* 的主根长均显著低于野生型。这些结果表明,在拟南芥中,*CSD1* 与 *CSD2* 是响应盐胁迫的正调控因子。

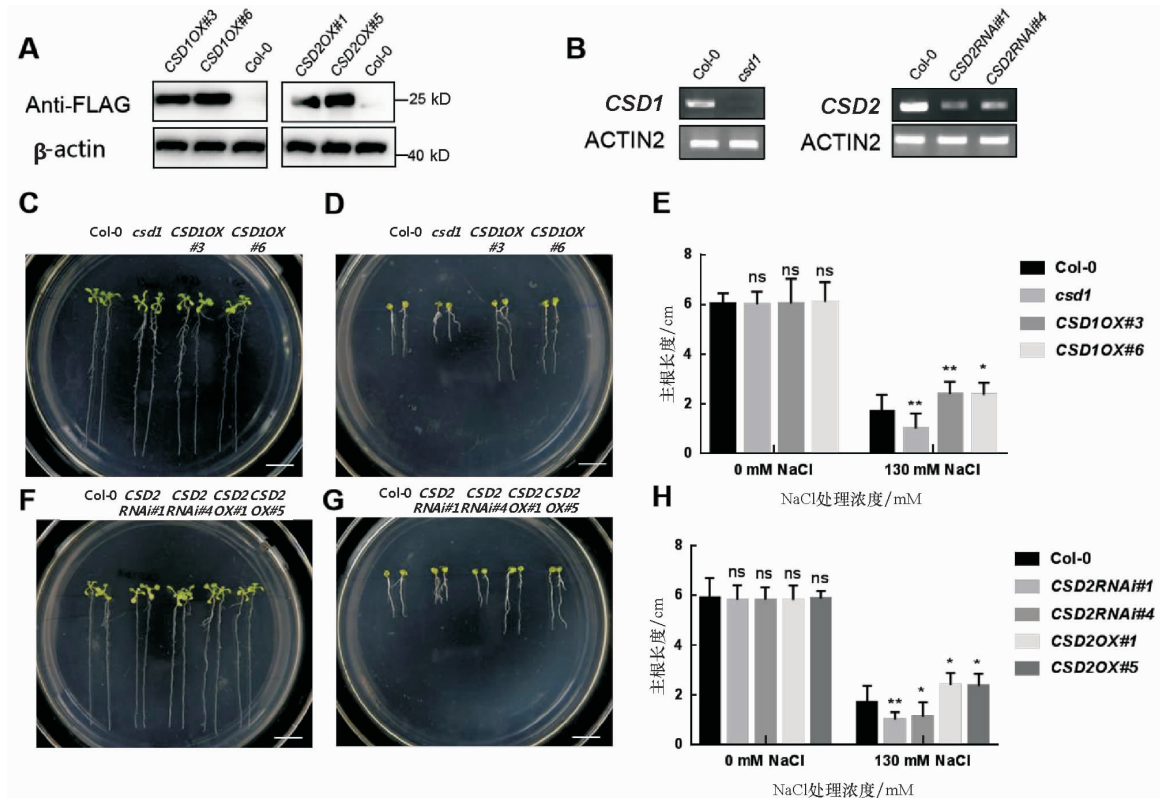


图 3 *CSD1*、*CSD2* 参与拟南芥的耐盐性调节

Fig. 3 *CSD1* and *CSD2* are involved in salt tolerance regulation of *Arabidopsis thaliana*

注:图中,A为*CSD1*、*CSD2*过表达植株的鉴定。取14 d大的*CSD1*过表达株系(*CSD1OX#3*和*CSD1OX#6*)与*CSD2*过表达株系(*CSD2OX#1*和*CSD2OX#5*)的幼嫩叶片通过Western Blot检测FLAG-*CSD1*与FLAG-*CSD2*的蛋白水平。 $\beta$ -actin为内参蛋白。3次生物学重复实验。

B为*CSD1*、*CSD2*缺失突变体的鉴定。取14 d大的*CSD1*的T-DNA插入突变体与*CSD2RNAi*植株的幼嫩叶片通过RT-PCR实验检测*CSD1*、*CSD2*的基因表达水平。*Actin 2*为内参基因。3次生物学重复实验。

C~D为野生型和相应植物材料在有无NaCl(130 mM)的1/2 MS培养基中生长的表型。将正常生长4 d的Col-0、*csd1*、*CSD1OX#3*、*CSD1OX#6*幼苗转移到有无NaCl(130 mM)的1/2 MS培养基上继续垂直生长10 d。标尺为1 cm。

E为图C与图D中相应植物材料的根长测量。\*表示 $P < 0.05$ , \*\*表示 $P < 0.01$ 。

F~G为野生型和相应植物材料在有无NaCl(130 mM)的1/2 MS培养基中生长的表型。将正常生长4 d的Col-0、*CSD2RNAi#1*、*CSD2RNAi#4*、*CSD2OX#1*、*CSD2OX#5*幼苗转移到有无NaCl(130 mM)的1/2 MS培养基上继续垂直生长10 d。标尺为1 cm。

H为图F与图G中相应植物材料的根长测量。\*表示 $P < 0.05$ , \*\*表示 $P < 0.01$ 。

## 2.4 HAT1 负调控 *CSD1*、*CSD2* 的表达

将 *hat1hat2hat3csd1*、*hat1hat2hat3CSD2RNAi* 两种四重缺突变体进行盐敏感表型测定。如图 4A ~ 图 4F 所示,在正常 1/2 MS 培养基上野生型、四重缺失突变体 *hat1hat2hat3csd1* (*hat1hat2hat3CSD2RNAi*)、三重缺失突变体 *hat1hat2hat3*、*csd1* (*CSD2RNAi*) 的根长均无显著差异,而在有盐条件下生长的幼

苗则有差异。与野生型的根长相比,三重缺失突变体 *hat1hat2hat3* 显著高于野生型, *csd1* (*CSD2RNAi*) 显著低于野生型,四重缺失突变体 *hat1hat2hat3csd1* (*hat1hat2hat3CSD2RNAi*) 均介于三重缺失突变体 *hat1hat2hat3* 和单缺 *csd1* (*CSD2RNAi*) 之间。以上结果说明,在植物响应盐胁迫时,*CSD1* 和 *CSD2* 作用于 HAT1 的下游。

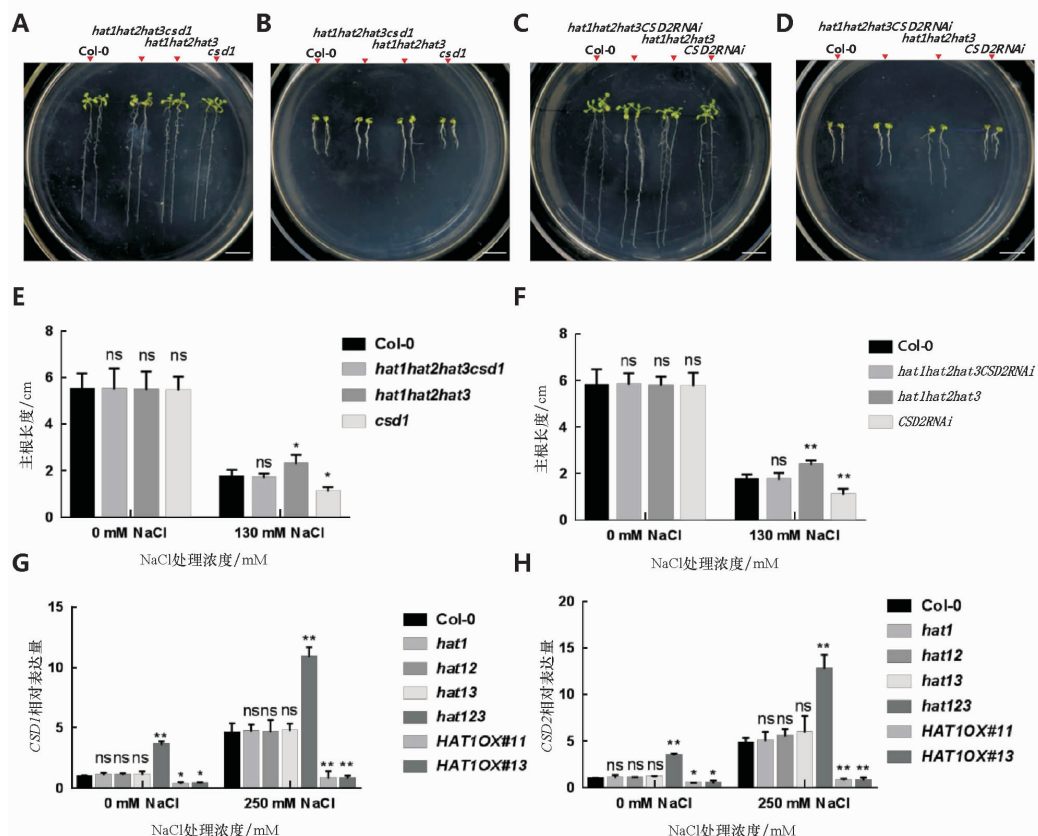


图 4 HAT1 通过负调控 *CSDs* 的表达来响应盐胁迫

Fig. 4 HAT1 negatively regulates the expression of *CSDs* in response to salt stress

注:图中, A~B 为野生型和相应突变体在有无(图 B)无(图 A) NaCl(130 mM)的 1/2 MS 培养基中生长的表现。将正常生长 4 d 的 Col-0、*hat1hat2hat3csd1*、*hat1hat2hat3* 及 *csd1* 幼苗转移到有无 NaCl(130 mM)的 1/2 MS 培养基上继续垂直生长 10 d。标尺为 1 cm。C~D 为野生型和相应突变体在有无(图 D)无(图 C) NaCl(130 mM)的 1/2 MS 培养基中生长的表现。将正常生长 4 d 的 Col-0、*hat1hat2hat3CSD2RNAi*、*hat1hat2hat3* 和 *CSD2RNAi* 幼苗转移到有无 NaCl(130 mM)的 1/2 MS 培养基上继续垂直生长 10 d。标尺为 1 cm。E 为图 A 与图 B 中植物材料的根长测量。\* 表示  $P < 0.05$ 。F 为图 C 与图 D 中植物材料的根长测量。\*\* 表示  $P < 0.01$ 。G~H 为野生型和相应植物材料在有无 NaCl(250 mM)处理下 *CSD1*(图 G)与 *CSD2*(图 H)的相对表达水平。取 14 d 正常生长的 Col-0、*hat1*、*hat1hat2*、*hat1hat3*、*hat1hat2hat3*、*HAT1OX#11* 和 *HAT1OX#13* 幼苗置于含有 0 mM 或 250 mM NaCl 的 1/2 MS 液体培养基中处理 8 h 后取样,检测 *CSD1* 与 *CSD2* 的转录水平。*Actin 2* 为内参基因,用含 0 mM NaCl 的 1/2 MS 液体培养基中处理的 Col-0 中的基因水平为 1。3 次生物学重复实验。\* 表示  $P < 0.05$ , \*\* 表示  $P < 0.01$ 。

为了探究 HAT1 对 *CSD1* 及 *CSD2* 基因表达的影响,将正常生长 14 d 的 Col-0 与 *HAT1* 基因缺失突变体和过表达材料幼苗置于含有或不含 250 mM NaCl 的 1/2 MS 溶液中处理。如图 4G~图 4H 所示,在正常生长环境下,*CSD1* 和 *CSD2* 基因的本底表达量在缺失突变体 *hat1hat2hat3* 中显著高于野生型,在 *HAT1* 过表达株系中显著低于野生型,*hat1*、*hat1hat2*、*hat1hat3* 与野生型无显著差异。盐胁迫会诱导拟南芥 *CSD1*、*CSD2* 基因的表达,在缺失突变体 *hat1hat2hat3* 中诱导的 *CSD1*、*CSD2* 表达量极显著高于野生型,与预想一致,在 *HAT1* 过表达株系中诱导的 *CSD1*、*CSD2* 表达量则极显著低

于野生型。以上结果说明,HAT1 抑制 *CSD1* 与 *CSD2* 的表达;在盐胁迫下 HAT1 对 *CSD1*、*CSD2* 的抑制会进一步加强。表明 HAT1 可能通过抑制 *CSD1*、*CSD2* 的表达来调节拟南芥对盐胁迫的响应。

## 2.5 HAT1 通过直接结合启动子对 *CSD1*、*CSD2* 进行转录抑制

为了研究 *CSD1* 与 *CSD2* 的表达是如何受到 HAT1 调控,利用数据库 (<http://jaspar.genereg.net/>) 在 *CSD1* 与 *CSD2* 基因启动子上预测出 HAT1 蛋白的可能结合基序,选择最高分结果,分别为 *CSD1* 启动子的 -1 657 bp 与 *CSD2* 启动子的

-241 bp 处的位点,设计野生型和突变探针(图 5A),进行体外 EMSA 实验验证,结果表明(图 5B),MBP-HAT1 融合蛋白可以在体外结合到

*CSD1* 和 *CSD2* 启动子的特定序列,这种结合会在突变探针中消失。该实验结果说明,在体外 HAT1 蛋白能够直接与 *CSD1*、*CSD2* 启动子结合。

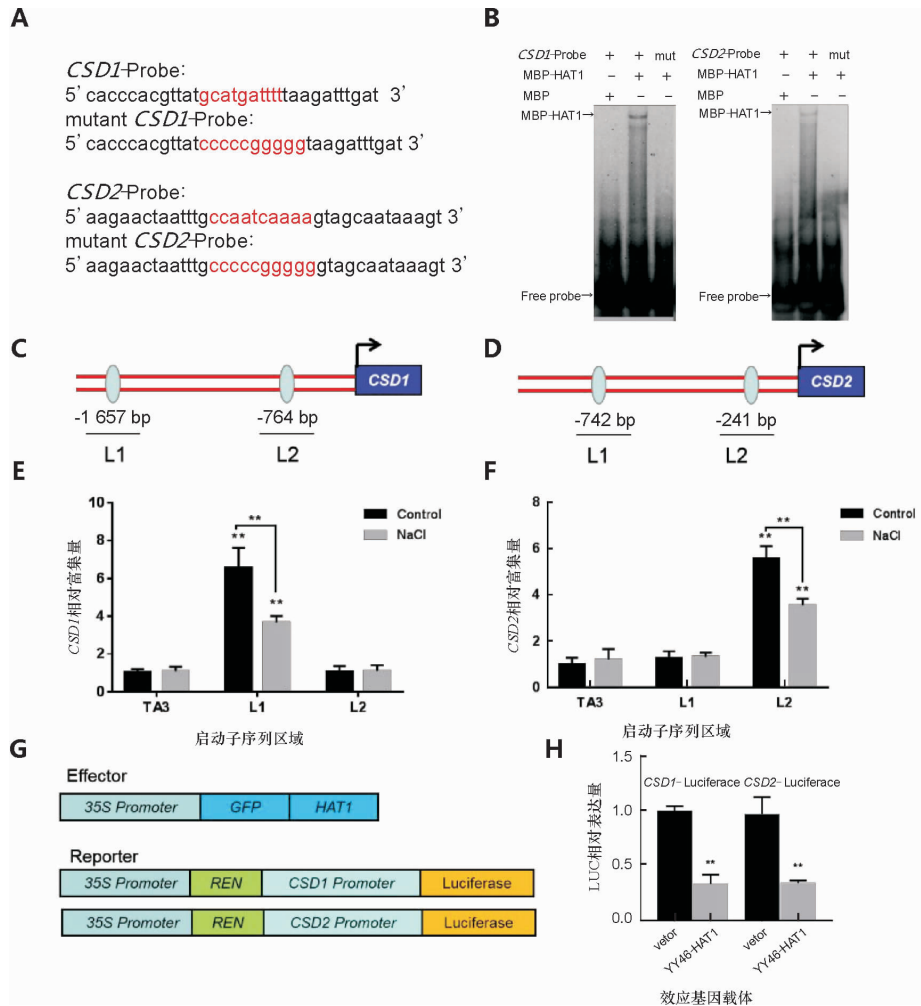


图 5 HAT1 蛋白通过结合启动子抑制 *CSD1*、*CSD2* 的表达

Fig. 5 HAT1 protein inhibits the expression of *CSD1* and *CSD2* by binding to their promoter

注:图中,A 为设计的野生型与突变探针序列。

B 为体外 EMSA 检测。

C ~ D 为预测 *CSD1* (图 C) 与 *CSD2* (图 D) 启动子上可能与 HAT1 蛋白结合的序列位置。

E ~ F 为体内 ChIP 实验检测在有无 NaCl 处理下 *CSD1* (图 E) 与 *CSD2* (图 F) 的富集丰度。实验以 TA3 为内参基因。3 次生物学重复试验。

\*\* 表示  $P < 0.01$ 。

G 为效应基因与报告基因的结构示意图。

H 为 *CSD1* 和 *CSD2* 的 LUC 荧光信号强度。35S:GFP,35S:GFP-HAT1 分别与 *CSD1pro*:LUC、*CSD2pro*:LUC 共转化进拟南芥原生质体中,孵育过夜后检测荧光信号。3 次生物学重复实验。\*\* 表示  $P < 0.01$ 。

通过 ChIP-qPCR 实验进一步在体内验证 HAT1 蛋白与 *CSD1* 和 *CSD2* 基因启动子结合关系的情况。参照上文预测结果,分别选定 *CSD1* 启动子的 -1 657 bp、-764 bp 与 *CSD2* 启动子的 -742 bp、-241 bp 作为检测位点(图 5C、图 5D)。将 28 d 的 *GFP-HAT1* 幼苗,用正常营养液与含有

300 mM NaCl 溶液的营养液持续浇水 7 d 后取样,进行 ChIP 实验。qPCR 结果表明(图 5E ~ 5F),只有在 *CSD1* 启动子区域的 -1 657 bp 与 *CSD2* 启动子区域的 -241 bp 位置存在与 HAT1 蛋白的结合区域。与正常生长的幼苗相比,盐胁迫条件下生长的幼苗,体内 HAT1 蛋白分别与 *CSD1*、*CSD2* 启

动子的结合作用下降了约 45% 和 37%。以上实验结果说明,在体内 HAT1 蛋白能够直接与 *CSD1*、*CSD2* 启动子结合,且盐胁迫会降低 HAT1 蛋白与 *CSD1*、*CSD2* 启动子的结合能力。

进一步用 Dual-Luciferase 实验研究 HAT1 对 *CSD1*、*CSD2* 转录水平的影响。如图 5G 所示,将 *CSD1*、*CSD2* 启动子区域分别连接到载体 *Pgreen II-0800-Luc* 上形成启动子荧光素酶报告基因,将 HAT1 的 CDS 序列连接到载体 *1300-eGFP* 上。选取正常生长 28 d 的野生型拟南芥叶片进行原生质体的转化试验,通过瞬时共表达测定细胞内荧光强度来反映 *CSD1*、*CSD2* 启动子的转录活性。实验结果表明(图 5H),与空载体相比,转化 GFP-HAT1 质粒进原生质体时,*CSD1*、*CSD2* 报告基因的荧光信号显著降低,分别降低了约 70% 和 66%。该结果说明,HAT1 蛋白显著抑制 *CSD1*、*CSD2* 基因的转录表达。

## 2.6 EIN3 抑制 HAT1 的表达

EIN3 与 EIL1 是功能同源蛋白,笔者使用二重

突变体 *ein3-1eil1-1* 作为 *EIN3* 的缺失突变体。如图 6A ~ 图 6C 所示,与野生型相比,正常 1/2 MS 培养基上生长的拟南芥幼苗均无差异。而在盐胁迫条件下,缺失突变体 *ein3-1eil1-1* 的根长显著低于野生型,而两个 *EIN3* 过表达系的根长均显著高于野生型,说明 *EIN3* 在盐胁迫调控中起正向作用。为了检测盐胁迫是否影响 *EIN3* 的表达水平,进行了 qRT-PCR 实验。结果显示(图 6D),盐处理 6 h 后,*EIN3* 的表达明显上调,盐处理 9 h 与 12 h 后,*EIN3* 的表达量上调约 2.4 倍与 4 倍。进一步分析 *EIN3* 对 *HAT1* 的调控,分析 *HAT1* 的表达水平。结果表明(图 6E),在无盐的情况下,缺失突变体 *ein3-1eil1-1* 中 *HAT1* 的本底水平显著高于野生型,而在 *EIN3* 过表达系中 *HAT1* 的本底水平极显著低于野生型。在盐胁迫下,缺失突变体 *ein3-1eil1-1* 中 *HAT1* 的表达水平极显著高于野生型;*EIN3* 过表达系中,*HAT1* 的表达水平极显著低于野生型。综上结果表明,*EIN3* 可能通过下调 *HAT1* 的表达来响应盐胁迫。

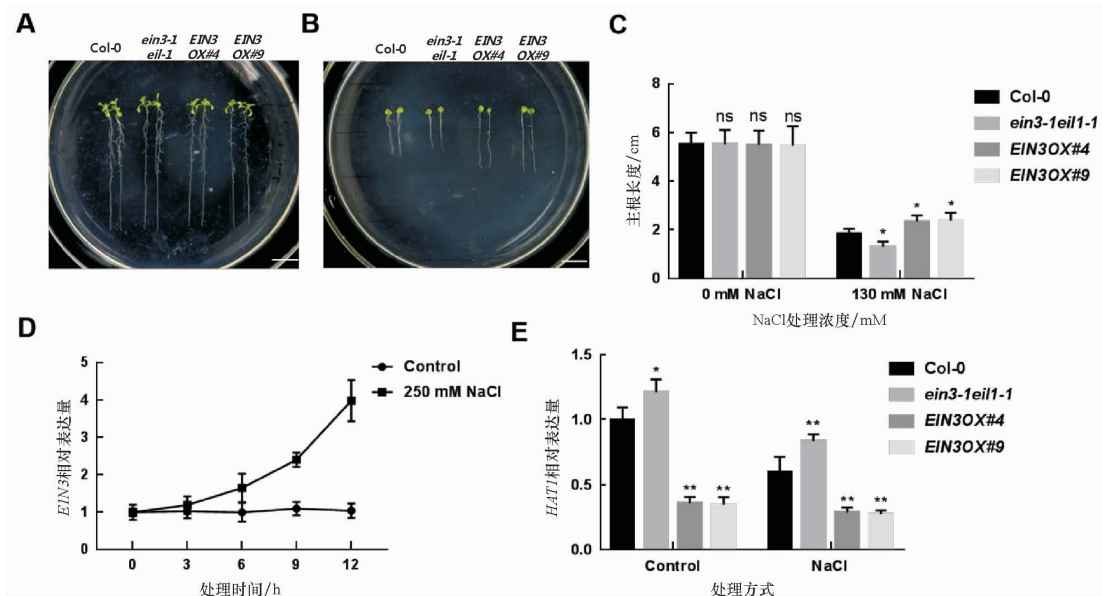


图 6 EIN3 通过调控 *HAT1* 的表达来响应盐胁迫

Fig. 6 EIN3 regulates *HAT1* expression in response to salt stress

注:图中,A~B 为相应植物材料在有(图 B)无(图 A)NaCl(130 mM)的 1/2 MS 培养基上生长的表型。将正常 1/2 MS 培养基上生长 4 d 的幼苗转移到有无 NaCl(130 mM)1/2 MS 培养基上继续生长 10 d。标尺为 1 cm。

C 为图 A 与图 B 中的植物材料的根长测量。\* 表示  $P < 0.05$ 。

D 为 *EIN3* 在有(250 mM)无(0 mM)NaCl 不同时间处理下表达水平的变化。正常生长 14 d 的野生型 Col-0 幼苗,置于有无 250 mM NaCl 的 1/2 MS 液体培养基中持续生长 0、3、6、9 和 12 h 后,取样检测 *EIN3* 在不同时间点的表达量。*Actin 2* 为内参基因。3 次生物学重复实验。

E 为 *HAT1* 在相应植物材料中经过有无 NaCl(250 mM)处理的相对表达水平。分别取 14 d 正常生长的相应植物材料置于含有 0 mM 或 250 mM NaCl 的 1/2 MS 液体培养基中处理 8 h 后取样,检测 *HAT1* 的表达水平。*Actin 2* 作为内参基因。用含 0 mM NaCl 的 1/2 MS 液体培养基中处理的 Col-0 中的基因水平作归一化处理。3 次生物学重复实验。\* 表示  $P < 0.05$ , \*\* 表示  $P < 0.01$ 。

### 3 讨论与展望

HD-ZIP II 亚家族中的 HAT1 在多种胁迫中均能发挥作用<sup>[27]</sup>。本文通过检测盐胁迫下 HAT1 的表达量和蛋白含量变化,发现 HAT1 参与盐胁迫响应。表型实验发现,HAT1 过表达系表现出盐敏感型,而缺失突变体表现出盐不敏感型,初步判断 HAT1 在盐胁迫响应中起负调控作用。在此过程中 HAT1 的蛋白减少,一方面是由于 HAT1 的表达水平降低,另一方面是蛋白翻译后修饰也有可能参与了调节,HAT1 蛋白降解的分子机制还需要进一步的研究。由于盐胁迫会引起渗透胁迫、离子毒害以及氧化胁迫<sup>[28]</sup>,这些均会引起活性氧的产生,于是检测了 HAT1 不同突变体在盐胁迫下的活性氧含量,确定在盐胁迫下 HAT1 会影响拟南芥的氧化还原稳态。由于 SOD 被认为是所有细胞中抵抗活性氧的第一道防线,其中,Cu/ZnSOD 是植物体内最重要的超氧化物歧化酶<sup>[29-31]</sup>。在盐胁迫下,HAT1 不同突变体中,SOD 的活性变化极为显著,表明 HAT1 在响应盐胁迫清除活性氧的过程中起负调控的作用。通过分析 CSD1、CSD2 不同突变体的盐敏感表型、HAT1 突变体中 CSD1、CSD2 的表达水平和突变体杂交材料的盐耐受表型,初步证明了 HAT1 通过影响 CSDs 的表达来响应拟南芥的盐胁迫。进一步的 EMSA、ChIP、Luciferase 等实验表明,盐胁迫下 HAT1 通过直接与 CSDs 启动子结合而转录调控 CSDs 的表达。另外,通过分析 EIN3 相关材料的盐敏感表型以及 EIN3 相关材料中 HAT1 的表达水平发现,EIN3 可能通过下调 HAT1 的表达来响应盐胁迫,未来将继续构建相关遗传材料来进一步验证 EIN3 通过 HAT1 响应盐胁迫。

本文研究主要以 HAT1 为中心,揭示了 EIN3-

HAT1-CSDs 信号轴调控拟南芥盐胁迫应答的分子机制,提出工作模型,见图 7。

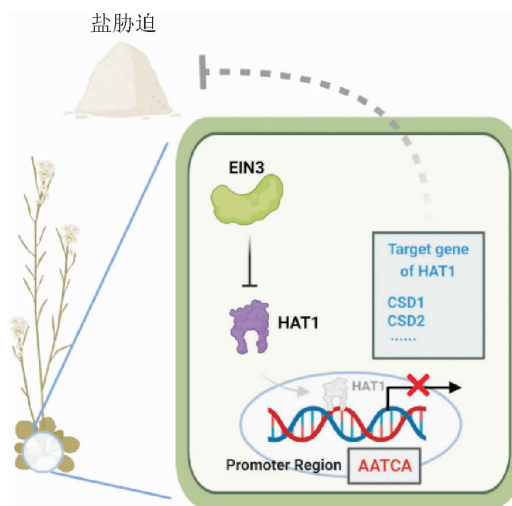


图 7 EIN3-HAT1-CSDs 信号轴在拟南芥响应盐胁迫中的作用机制

Fig. 7 The mechanism of EIN3-HAT1-CSDs signal axis in *Arabidopsis thaliana* response to salt stress

如图 7 所示,在盐胁迫条件下,植物会诱导 EIN3 的积累,EIN3 会抑制 HAT1 的表达,使植物体内 HAT1 蛋白水平降低,进而削弱 HAT1 对下游靶标基因 CSD1 与 CSD2 的转录抑制作用。同时,植物体内会产生更多的 CSD1 与 CSD2 来清除植物体内过多的活性氧,从而使植物在盐胁迫下缓解氧化损伤。该信号通路既揭示了植物中转录因子 HAT1 能调控 CSDs 的基因表达,又将植物抗盐耐盐调控网络中的乙烯信号和活性氧清除通路串联起来,挖掘了盐胁迫的未知板块,为今后全面解析植物盐胁迫响应的分子调控网络提供了一些理论基础,为分子育种提供了一个新的靶点,并为今后在农业上使用基因改良等手段培育新型作物,使作物在盐碱地上也能生长良好提供了一种新的思路。

#### 参考文献:

- [1] Liang W, Ma X, Wan P, et al. Plant salt-tolerance mechanism; A review[J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2018, 495(1): 286-291.
- [2] Yang Y Q, Guo Y. Elucidating the molecular mechanisms mediating plant salt-stress responses[J]. The New Phytologist, 2018, 217(2): 523-539.
- [3] Fang S M, Hou X, Liang X L. Response mechanisms of plants under saline-alkali stress [J]. Frontiers in Plant Science,

- 2021, 12: 667458.
- [4] Van Zelm E, Zhang Y X, Testerink C. Salt tolerance mechanisms of plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2020, 71: 403-433.
- [5] Ahmed M Z, Shimazaki T, Gulzar S, et al. The influence of genes regulating transmembrane transport of Na<sup>+</sup> on the salt resistance of *Aeluropus lagopoides*[J]. Functional Plant Biology, 2013, 40(9): 860-871.
- [6] Shabala S, Wu H H, Bose J. Salt stress sensing and early signalling events in plant roots: Current knowledge and hypothesis[J]. Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology, 2015, 241: 109-119.
- [7] Sun J K, He L, Li T. Response of seedling growth and physiology of *Sorghum bicolor* (L.) Moench to saline-alkali stress[J]. PLoS One, 2019, 14(7): e0220340.
- [8] Jing X S, Hou P C, Lu Y J, et al. Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase from mangrove *Kandelia candel* in tobacco enhances salinity tolerance by the reduction of reactive oxygen species in chloroplast[J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 23.
- [9] Guan Q M, Lu X Y, Zeng H T, et al. Heat stress induction of miR398 triggers a regulatory loop that is critical for thermotolerance in *Arabidopsis*[J]. The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology, 2013, 74(5): 840-851.
- [10] Sunkar R, Kapoor A, Zhu J K. Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance[J]. The Plant Cell, 2006, 18(8): 2051-2065.
- [11] Zhuang Y, Wei M, Ling C, et al. EGY3 mediates chloroplastic ROS homeostasis and promotes retrograde signaling in response to salt stress in *Arabidopsis*[J]. Cell Reports, 2021, 36(2): 109384.
- [12] Bonnet E, Wuyts J, Rouzé P, et al. Detection of 91 potential conserved plant microRNAs in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* identifies important target genes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(31): 11511-11516.
- [13] Zou L J, Deng X G, Han X Y, et al. Role of transcription factor HAT1 in modulating *Arabidopsis thaliana* response to cucumber mosaic virus[J]. Plant and Cell Physiology, 2016, 57(9): 1879-1889.
- [14] Sawa S, Ohgishi M, Goda H, et al. The HAT2 gene, a member of the HD-Zip gene family, isolated as an auxin inducible gene by DNA microarray screening, affects auxin response in *Arabidopsis*[J]. The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology, 2002, 32(6): 1011-1022.
- [15] Tan W R, Zhang D W, Zhou H P, et al. Transcription factor HAT1 is a substrate of SnRK<sub>2.3</sub> kinase and negatively regulates ABA synthesis and signaling in *Arabidopsis* responding to drought[J]. PLoS Genetics, 2018, 14(4): e1007336.
- [16] Tan W R, Han Q, Li Y, et al. A HAT1-DELLA signaling module regulates trichome initiation and leaf growth by achieving gibberellin homeostasis[J]. The New Phytologist, 2021, 231(3): 1220-1235.
- [17] Peng J Y, Li Z H, Wen X, et al. Salt-induced stabilization of EIN3/EIL1 confers salinity tolerance by deterring ROS accumulation in *Arabidopsis* [J]. PLoS Genetics, 2014, 10(10): e1004664.
- [18] Yang C, Ma B, He S J, et al. MAOHUZI6/ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 and ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE2 regulate ethylene response of roots and coleoptiles and negatively affect salt tolerance in rice[J]. Plant Physiology, 2015, 169(1): 148-165.
- [19] Quan R D, Wang J, Yang D X, et al. EIN3 and SOS2 synergistically modulate plant salt tolerance[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 44637.
- [20] Yu X, Li L, Zola J, et al. A brassinosteroid transcriptional network revealed by genome-wide identification of BES1 target genes in *Arabidopsis thaliana*[J]. The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology, 2011, 65(4): 634-646.
- [21] Demidchik V, Shabala S N, Davies J M. Spatial variation in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> response of *Arabidopsis thaliana* root epidermal Ca<sup>2+</sup> flux and plasma membrane Ca<sup>2+</sup> channels[J]. The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology, 2007, 49(3): 377-386.
- [22] Zhu J, Fu X, Koo Y D, et al. An enhancer mutant of *Arabidopsis* salt overly sensitive 3 mediates both ion homeostasis and the oxidative stress response[J]. Molecular and Cellular Biology, 2007, 27(14): 5214-5224.

- [23] Ahmad P, Abdel Latef A A, Hashem A, et al. Nitric oxide mitigates salt stress by regulating levels of osmolytes and antioxidant enzymes in chickpea[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016,7: 347.
- [24] Mäser P, Eckelman B P, Vaidyanathan R, et al. Altered shoot/root Na<sup>+</sup> distribution and bifurcating salt sensitivity in *Arabidopsis* by genetic disruption of the Na<sup>+</sup> transporter AtHKT1[J]. *FEBS Letters*, 2002, 531(2):157-161.
- [25] Gill S S, 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.
- [26] Sunkar R, Kapoor A, Zhu J K. Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance [J]. *The Plant Cell*, 2006, 18(8): 2051-2065.
- [27] Sharif R, Raza A, Chen P, et al. HD-ZIP gene family: Potential roles in improving plant growth and regulating stress-responsive mechanisms in plants[J]. *Genes*, 2021, 12(8): 1256.
- [28] Jiang C, Belfield E J, Cao Y, et al. An *Arabidopsis* soil-salinity-tolerance mutation confers ethylene-mediated enhancement of sodium/potassium homeostasis[J]. *The Plant Cell*, 2013, 25(9): 3535-3552.
- [29] Sreenivasulu N, Grimm B, Wobus U, et al. Differential response of antioxidant compounds to salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive seedlings of foxtail millet (*Setaria italica*) [J]. *Physiologia Plantarum*, 2000, 109(4): 435-442.
- [30] Gupta A S, Heinen J L, Holaday A S, et al. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, 90(4): 1629-1633.
- [31] Gupta A S, Webb R P, Holaday A S, et al. Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress (induction of ascorbate peroxidase in superoxide dismutase-overexpressing plants) [J]. *Plant Physiology*, 1993, 103(4): 1067-1073.

【责任编辑:卓祯雨】