



# 旱柳*SmGAD*基因在响应淹水胁迫中的功能研究

邓明超, 李梦茹, 阚思蔚, 梅艳东, 刘国元, 陈艳红\*, 张 健\*

(南通大学生命科学学院/南通市观赏植物遗传育种重点实验室, 江苏南通 226019)

**摘要:**【目的】研究旱柳*SmGAD*基因在响应淹水胁迫中的功能,为解析柳树耐淹机制及耐淹柳树育种提供理论依据和候选靶基因。【方法】以一年生柳树枝条为材料,利用生物信息学工具分析*SmGAD*蛋白理化特性、保守结构域、蛋白结构域、亲/疏水性及启动子区顺式作用元件,并构建系统发育树。通过实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测*SmGAD*基因的表达变化。克隆*SmGAD*基因,构建原核表达载体pET32a-*SmGAD*和沉默载体pYL156-*SmGAD*,采用病毒诱导基因沉默(VIGS)技术沉默*SmGAD*,经淹水处理验证基因功能,同时进行原核表达,诱导蛋白表达并测定H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>胁迫下菌液OD<sub>600 nm</sub>变化。【结果】旱柳*SmGAD*基因编码区(CDS)全长为1497 bp, *SmGAD*蛋白由498个氨基酸残基组成,理论分子量为56512.01 Da,理论等电点为5.80,脂肪指数为90.80,不稳定系数为35.82,总平均亲/疏水性系数为-0.221。系统发育分析结果显示, *SmGAD*蛋白与茶树、水稻、拟南芥和棉花等6个物种的*GAD*同源蛋白均具有高度相似性。启动子区顺式作用元件分析结果显示, *SmGAD*基因启动子区包含茉莉酸甲酯响应元件、生长素响应元件、光响应元件、干旱响应元件及醇溶蛋白代谢响应元件等。实时荧光定量PCR分析结果显示,淹水处理后不同柳树品种中*SmGAD*基因的表达趋势存在差异。VIGS试验结果显示,沉默株系在淹水胁迫下叶片脱落及腐烂现象较严重,细胞膜遭受严重的过氧化损伤,根系生长情况较差。原核表达试验表明*SmGAD*蛋白在清除H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>中发挥重要功能。【结论】*SmGAD*基因是旱柳响应淹水和缺氧胁迫调控网络中的正调控因子,可通过减轻氧化胁迫损伤等机制增强植株对淹水胁迫的抵抗力。原核表达试验证实*SmGAD*蛋白具有清除H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的能力。

**关键词:**旱柳; *SmGAD*基因; 淹水胁迫; 病毒诱导基因沉默(VIGS); 原核表达

中图分类号:S792.12

文献标志码:A

文章编号:2095-1191(2026)06-1899-11

## Functional study of *SmGAD* gene in *Salix matsudana* in response to waterlogging stress

DENG Ming-chao, LI Meng-ru, KAN Si-wei, MEI Yan-dong, LIU Guo-yuan,  
CHEN Yan-hong\*, ZHANG Jian\*

(College of Life Sciences, Nantong University/Nantong Key Laboratory of Ornamental Plant Genetics and Breeding,  
Nantong, Jiangsu 226019, China)

**Abstract:**【Objective】The study aimed to investigate the functions of *SmGAD* gene in *Salix matsudana* in response to waterlogging stress, provide theoretical basis and candidate target genes for elucidating willow waterlogging tolerance mechanism and breeding willows tolerant to waterlogging. 【Method】Using one-year-old willow branches as materials, bioinformatic tools were employed to analyze physicochemical properties, conserved domains, protein domains, hydrophilicity/hydrophobicity, and promoter cis-acting elements of the *SmGAD* protein, and a phylogenetic tree was constructed. Real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression changes of *SmGAD* gene. The *SmGAD* gene was cloned, and the prokaryotic expression vector pET32a-*SmGAD* and silencing vector pYL156-*SmGAD* were constructed. Virus-induced gene silencing (VIGS) technology was used to silence *SmGAD*, and the gene

收稿日期:2025-09-15

基金项目:国家自然科学基金项目(31971681);江苏省碳达峰碳中和科技创新专项资金(江苏省现代农业)项目(BE2022420);江苏省研究生科研与实践创新计划项目(KYCX24-3616);江苏省大学生创新创业训练计划项目(202510304027)

通信作者:陈艳红(1973-), <https://orcid.org/0000-0002-9744-0314>, 博士,教授,主要从事林木遗传育种研究工作, E-mail: chenyh@ntu.edu.cn; 张健(1974-), <https://orcid.org/0000-0002-6662-4911>, 博士,教授,主要从事林木遗传育种研究工作, E-mail: yjnky@ntu.edu.cn

第一作者:邓明超(1999-), <https://orcid.org/0009-0008-3707-9492>, 研究方向为园林植物抗逆分子调控机制与育种, E-mail: Dmcntu@163.com

function was verified through waterlogging treatment. Meanwhile, prokaryotic expression was performed to induce protein expression, and the changes in bacterial culture OD<sub>600 nm</sub> under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress were measured. 【Result】The coding sequence (CDS) of *SmGAD* gene in *Salix matsudana* was 1497 bp in full length, and SmGAD protein consisted of 498 amino acid residues, with a theoretical molecular mass of 56512.01 Da, a theoretical isoelectric point of 5.80, an aliphatic index of 90.80, an instability index of 35.82, and a grand average of hydropathicity hydrophobicity coefficient of -0.221. Phylogenetic analysis revealed that the SmGAD protein shared high similarity with GAD homologous proteins in six species, including *Camellia sinensis* L., *Oryza sativa* L., *Arabidopsis thaliana* L., and *Gossypium hirsutum* L. Promoter cis-acting element analysis showed that the promoter region of *SmGAD* gene contained methyl jasmonate -responsive elements, auxin-responsive elements, light-responsive elements, drought-responsive elements, prolamin-metabolism-responsive elements, and so on. Real-time fluorescence quantitative PCR analysis results revealed that the expression trends of *SmGAD* gene differed among various willow varieties after waterlogging treatment. VIGS experiment results showed that the silenced lines exhibited more severe leaf abscission and decay under waterlogging stress, with substantial peroxidative damage to cell membranes, along with poor root growth. Prokaryotic expression experiments demonstrated that the SmGAD protein played an important role in scavenging H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 【Conclusion】*SmGAD* gene, a positive regulatory factor in regulatory network of *Salix matsudana* in response to waterlogging and hypoxia stresses, can enhance plant resistance to waterlogging stress through mechanisms such as alleviating oxidative stress damage. Prokaryotic expression experiments confirm that the SmGAD protein can scavenge H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Key words:** *Salix matsudana*; *SmGAD* gene; waterlogging stress; virus-induced gene silencing (VIGS); prokaryotic expression

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (31971681); Jiangsu Carbon Peak and Carbon Neutral Science and Technology Innovation Special Fund (Modern Agriculture) Project (BE2022420); Jiangsu Postgraduate Scientific Research and Practice Innovation Project (KYCX24-3616); Jiangsu College Student Innovation and Entrepreneurship Training Plan Project (202510304027)

## 0 引言

【研究意义】旱柳(*Salix matsudana*)作为一种抗性较强的园林植物,兼具较高的观赏价值和生态价值,在复杂恶劣环境中表现出良好的适应能力(郑凌泽,2023)。柳树常被种植于河流两岸,发挥防风固土作用,但在雨季或洪水来临时易遭受淹水胁迫。淹水胁迫使植物根系周围土壤含水量急剧上升,大幅降低土壤中的氧气含量,根系无法进行正常的有氧呼吸,转而进行无氧呼吸(赵婷等,2021)。无氧呼吸不仅会阻碍植物发挥吸收、运输水分与养分的功能(刘俊婷等,2023),还会积累乙醇和活性氧(ROS)等有毒有害物质,对植物细胞产生毒害,严重时会导致植株死亡(Xu et al., 2024)。同时,根系受损导致养分吸收受阻,进而影响地上部分,表现为植株矮小、叶片黄化和枯萎(Du et al., 2024)。淹水胁迫还影响植物的光合作用,如根系缺氧促使叶片气孔关闭,光合速率显著降低;叶绿体因水分含量过高而受到破坏,影响光能的吸收与转化。此外,淹水胁迫会破坏植物体内的激素平衡,如乙烯含量增加可导致植物器官提前衰老和叶片脱落,从而抑制植物生长发育(Li and Rao, 2024)。柳树在应对淹水胁迫时具有较强的抗逆性,其通气组织较为发达,受到淹水胁迫时可产生大量气生根,吸收更多氧气供给根系,减轻根系损伤,保障有氧呼吸的进行(de Souza et al., 2017)。内源激素在淹水胁迫条件下亦发挥调控作用,如脱落酸含量在淹水初期显著上升,促使气孔关

闭以降低能量消耗(Liu et al., 2001)。激素还能促进通气组织和不定根的形成,增强植株的氧气吸收能力,避免无氧呼吸产物对细胞造成毒害(项洪涛等, 2022)。因此,开展柳树响应淹水胁迫相关基因的功能研究,对于阐明柳树耐淹性机制及耐淹柳树育种具有重要意义。【前人研究进展】*GAD*基因与植物生长发育密切相关,在种子萌发、开花和结果等过程中均发挥重要功能。对拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)的研究表明,*GAD*家族5个基因的表达模式各不相同,在不同生长发育阶段呈现组织特异性(李承龙, 2021)。对水稻(*Oryza sativa* L.)*OsGAD2*过表达株系及突变株系的研究发现,*OsGAD2*基因在授粉后种子中的表达量较高,可调控水稻籽粒的生长发育(张登, 2023)。*GAD*基因编码谷氨酸脱羧酶,该酶主要以磷酸吡哆醛为辅因子,催化谷氨酸脱羧生成γ-氨基丁酸(GABA),而谷氨酸脱羧酶正是GABA合成的限速酶(雷敏等, 2024)。GABA作为动植物中广泛存在的天然非蛋白氨基酸,可经转氨酶及琥珀酸脱氢酶作用进入三羧酸循环(宋红苗等, 2010)。研究表明,GABA与植物激素存在一定相互作用,可调控相关信号通路,进而影响植物生长发育。乙烯信号通路是最早发现的与GABA相关的激素信号通路,GABA可激活乙烯合成前体*ACC*基因的表达(张海龙等, 2020)。GABA与脱落酸和赤霉素之间存在一定的互作,可帮助种子打破休眠期,并在植株生长发育过程中发挥作用(Wang et al., 2025)。

*GAD* 基因在植物响应非生物胁迫(如低温胁迫、盐碱胁迫和重金属胁迫等)中也发挥重要功能。在非生物胁迫下,细胞膜透性被破坏,细胞受到损伤,而 GABA 可调节细胞中的离子运输,降低植物所受的伤害(李瑶等,2024)。对 5 个耐盐性不同的棉花(*Gossypium hirsutum* L.)品种在种子萌发期进行盐胁迫后,发现强耐盐性品种中的 *GAD* 活性及 GABA 含量均较高(Dong et al., 2024)。在拟南芥中,通过 HLN1 稳定 *GAD2* 基因的表达,可增强拟南芥对于旱胁迫的耐受性(Liu et al., 2025)。已有研究表明,外源施加 GABA 对植物的生长发育及非生物胁迫应对能力均有较好的提升作用。对小麦(*Triticum aestivum* L.)的研究发现,外源施加 GABA 可提升冬小麦的耐寒性(陈惠婵,2023)。在黄瓜(*Cucumis sativus* L.)幼苗受到盐胁迫时外源施加 GABA,可显著提升种子发芽率,并改善幼苗生长状况(蔡琳等,2024)。盐胁迫条件下喷施外源 GABA,可保障水稻的光合作用能力和抗氧化能力(束晨晨等,2025)。在番茄(*Solanum lycopersicum* L.)幼苗应对重金属胁迫时,外源施加 GABA 可缓解幼苗所受的损伤(Shoaib et al., 2025)。此外,GABA 的合成与三羧酸循环相关,植物在低氧生长条件下 *GAD* 基因表达上调,而低氧环境是淹水胁迫的重要影响因子,由此推测 *GAD* 基因可能在植物响应淹水胁迫中发挥功能(Wu et al., 2021)。【本研究切入点】目前,有关 *GAD* 基因功能的研究主要集中于植物生长发育及响应盐胁迫和低温胁迫等方面,而关于 *GAD* 基因在木本植物响应淹水胁迫中的研究鲜见报道。【拟解决的关键问题】基于转录组数据初步判定旱柳 *SmGAD* 基因在响应淹水胁迫中发挥重要功能。利用实时荧光定量 PCR 分析不同柳树品种中 *SmGAD* 基因的表达水平,采用病毒诱导基因沉默(VIGS)技术沉默 *SmGAD* 基因,并通过原核表达试验和酶活性测定解析 *SmGAD* 蛋白的功能,旨在阐明旱柳 *SmGAD* 基因在响应淹水胁迫中的重要功能,以期为培育耐淹旱柳提供重要的分子靶点和理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为一年生柳树枝条,包括旱柳 9901、苏柳 795、苏柳 172、旱垂柳 287 和盐柳一号,种植于南通市观赏植物遗传育种重点实验室苗木基地。将采集的枝条(直径约 0.5 cm)剪成长度为 8 cm 的小段,于人工气候室进行水培。培养温度为 25 °C,光周期为 16 h 光照/8 h 黑暗。

### 1.2 *SmGAD* 蛋白特性和启动子区顺式作用元件分析及系统发育树构建

利用 Expasy(<http://web.expasy.org/>)分析 *SmGAD* 蛋白的氨基酸组成与基本理化特性;利用 SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org/>)构建蛋白结构模型;通过 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)分析 *SmGAD* 蛋白的保守结构域;使用 ProtScale(<https://web.expasy.org/protscale/>)在线工具预测 *SmGAD* 的跨膜结构域及亲/疏水性。从 NCBI 获取茶树(*Camellia sinensis* L.)、水稻、拟南芥和棉花等 6 个物种的 *GAD* 蛋白序列,利用 MEGA 11.0 构建系统发育树。使用 TBtools 截取 *SmGAD* 基因编码区(CDS)上游 2000 bp 序列作为启动子,经 PlantCARE 分析启动子区顺式作用元件,并通过 TBtools 进行可视化。

### 1.3 RNA 提取及实时荧光定量 PCR 分析

采用 TaKaRa MiniBEST 植物 RNA 提取试剂盒[宝日医生物技术(北京)有限公司]提取 RNA,通过琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性与浓度。利用 TaKaRa PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)[宝日医生物技术(北京)有限公司]将提取的 RNA 反转录为 cDNA,作为后续试验模板。反应体系 20.0 μL: cDNA 模板 1.0 μL, SYBR Mix 10.0 μL,上、下游引物各 0.5 μL,无菌水补足至 20.0 μL。扩增程序:95 °C 预变性 1 min;95 °C 10 s,60 °C 5 s,72 °C 12 s,进行 40 个循环。每样品设 3 个生物学重复,采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算目的基因相对表达量(钱超楠等,2024)。引物序列见表 1。

### 1.4 *SmGAD* 基因克隆

根据旱柳 9901 的 *SmGAD* 基因序列,借助 Oligo 7 设计基因上游引物 F1 和下游引物 R1,委托苏州金唯智生物科技有限公司合成。以反转录所得 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,反应体系 50.0 μL: cDNA 模板 2.0 μL,上、下游引物各 2.0 μL,2×pfm PCR Master-Mix 25.0 μL,ddH<sub>2</sub>O 补足至 50.0 μL。扩增程序:98 °C 预变性 2 min;98 °C 10 s,62 °C 5 s,72 °C 10 s,进行 36 个循环;72 °C 延伸 2 min。PCR 产物经回收处理后,采用 TaKaRa pMD™ 18-T Vector Cloning Kit[宝日医生物技术(北京)有限公司]进行连接克隆,委托苏州金唯智生物科技有限公司测序,以确认克隆准确性(华炫等,2024)。引物序列见表 1。

### 1.5 *SmGAD* 基因表达载体构建

根据 pWM101 载体和 pET32a 载体的序列特征及 *SmGAD* 基因序列,借助 Oligo 7 设计 2 对特异性引物,分别命名为 F1-101/R1-101 和 F1-156/R1-156。以

pMD18-T-*SmGAD* 质粒为模板进行 PCR 扩增,反应体系 50.0  $\mu$ L:质粒模板 2.0  $\mu$ L,上、下游引物各 2.0  $\mu$ L, 2 $\times$ Pfm PCR MasterMix 25.0  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足至 50.0  $\mu$ L。扩增程序:98  $^{\circ}$ C 预变性 2 min;98  $^{\circ}$ C 10 s, 62  $^{\circ}$ C 5 s, 72  $^{\circ}$ C 5 s, 进行 36 个循环;72  $^{\circ}$ C 延伸 2 min。引物序列见表 1。

### 1.6 *SmGAD* 基因的 VIGS 试验

将测序正确的 pYL156-*SmGAD* 载体转化至农杆菌 GV3101,同时制备含有 pYL156 空载、pYL156-*SmPDS* 和 pTRV1 (辅助质粒) 的农杆菌菌株。将 pYL156-*SmGAD*、pYL156 空载、pYL156-*SmPDS* 和 pTRV1 菌株分别接种于含 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素和 25  $\mu$ g/mL 利福平的 LB 液体培养基中,于 28  $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养 12 h 至 OD<sub>600 nm</sub> 介于 1.5~2.0。随后以 4000 r/min 离心收集菌体,用预冷缓冲液重悬并调节 OD<sub>600 nm</sub> 至 1.5~2.0。将 pTRV1 菌液分别与 pYL156 空载、pYL156-*SmPDS* 和 pYL156-*SmGAD* 菌液按 1:1 比例充分混匀,作为注射用混合菌液,其中 pTRV1 与 pYL156 空载的混合液记为 pTRV2 (对照组), pTRV1 与 pYL156-*SmGAD* 的混合液记为 pTRV2-*SmGAD* (试验组)。将混合菌液分别注入旱柳 9901 的叶片和根部组织,待注射 pYL156-*SmPDS* 的植株出现明显白化表型后,分别提取对照组和试验组样本的 RNA,利用实时荧光定量 PCR 验证目标基因的表达水平。确认目的基因被成功敲降后,参照 Chen 等(2025)的方法,在黑暗条件下对旱柳 9901 进行淹水处理(淹没植株顶端),以进一步分析基因功能。引物序列见表 1。

### 1.7 *SmGAD* 基因原核表达及酶活性测定

通过特异性引物从 pMD18-T-*SmGAD* 质粒中扩增 *SmGAD* 基因。使用限制性内切酶 *Bam* HI 和 *Xho* I 对 pET32a 载体进行线性化处理,将 *SmGAD* 基因片段连接至该载体,转化至大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞。筛选阳性菌落,转接至含有 10 mL LB 培养

基(含 50  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素)的试管中,37  $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。随后在 37  $^{\circ}$ C、220 r/min 条件下培养至 OD<sub>600 nm</sub> 约为 0.4,添加 0.1 mmol/L IPTG 诱导蛋白表达。在菌液 OD<sub>600 nm</sub> 为 0.2 时加入 0.1 mmol/L IPTG (诱导组),以未添加 IPTG 诱导的菌液为对照(未诱导组),1.5 h 后向诱导组和未诱导组中分别添加 3 mmol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,每 0.5 h 测定菌液 OD<sub>600 nm</sub> (Wei et al., 2024)。引物序列见表 1。

### 1.8 统计分析

采用 GraphPad Prism 进行数据处理、统计分析和制图,利用双尾 Student's *t* 检验评估组间差异的显著性水平。

## 2 结果与分析

### 2.1 *SmGAD* 基因的 PCR 扩增结果

通过实时荧光定量 PCR 从旱柳 9901 的 cDNA 中成功扩增出 *SmGAD* 基因,获得其 CDS 序列,片段长度为 1497 bp。将该序列与旱柳基因组中 *SmGAD* 基因的 CDS 区域进行比对,结果(图 1)显示 *SmGAD* 基因已成功克隆。

### 2.2 旱柳 *SmGAD* 基因的生物信息学分析结果

#### 2.2.1 *SmGAD* 蛋白理化性质分析及蛋白结构预测

*SmGAD* 蛋白由 498 个氨基酸残基组成,理论分子量为 56512.01 Da,分子式为 C<sub>2537</sub>H<sub>3993</sub>N<sub>675</sub>O<sub>741</sub>S<sub>22</sub>,原子总数为 7968。ProtParam 预测分析显示,其理论等电点为 5.80,脂肪指数为 90.80,不稳定系数为 35.82,总平均亲/疏水性系数为 -0.221。上述结果表明,*SmGAD* 蛋白可能具有较高的结构稳定性和适度的疏水性。氨基酸组成分析显示,缬氨酸(Val)的相对丰度最高(8.8%),亮氨酸(Leu)次之(8.6%),半胱氨酸(Cys)最低(1.2%)。

采用 SOPMA 工具预测 *SmGAD* 蛋白二级结构,结果(图 2-A)显示  $\alpha$ -螺旋占 37.55%,无规则卷曲占 47.59%, $\beta$ -折叠占 14.86%,表明  $\alpha$ -螺旋和无规则卷曲

表 1 引物序列信息

Table 1 Primer sequence information

| 引物 Primer               | 引物序列 Primer sequence                          |
|-------------------------|-----------------------------------------------|
| qPCR- <i>SmGAD</i> -F   | 5'-CCTTATTTCATCAACACT-3'                      |
| qPCR- <i>SmGAD</i> -R   | 5'-ATATCTCGAGGCAAAGGT-3'                      |
| <i>SmGAD</i> -F         | 5'-ATGGTTCTCTCCAAGACAGC-3'                    |
| <i>SmGAD</i> -R         | 5'-CTAGCACACTCCATTCATCT-3'                    |
| pYL156- <i>SmGAD</i> -F | 5'-TAAGGTTACCGAATTCGGCCAATAAAGAGAAGAGGGA-3'   |
| pYL156- <i>SmGAD</i> -R | 5'-CGAGACGCGTGAGCTCCCAAAACACAGAGTCAAGTAG-3'   |
| pET32a- <i>SmGAD</i> -F | 5'-CAGCCCAGATCTGGGTACCATGGTTCTCTCCAAGACAGC-3' |
| pET32a- <i>SmGAD</i> -R | 5'-TGGTGGTGGTGTCTCGAGCTAGCACACTCCATTCATCT-3'  |
| <i>SmPDS</i> -F         | 5'-AATCAATGGGCCATGCCTTG-3'                    |
| <i>SmPDS</i> -R         | 5'-GCGGAGAAGAGCGAAAGGAT-3'                    |

是该蛋白的主要构象单元。基于SWISS-MODEL的三级结构预测结果(图2-B)显示,以A0A836XSZ1.1.A为模板建立的蛋白结构与*SmGAD*蛋白序列的相似性为99.60%,全域模型质量估计值(GMQE)为0.93。通过NCBI在线工具预测*SmGAD*蛋白保守结构域,

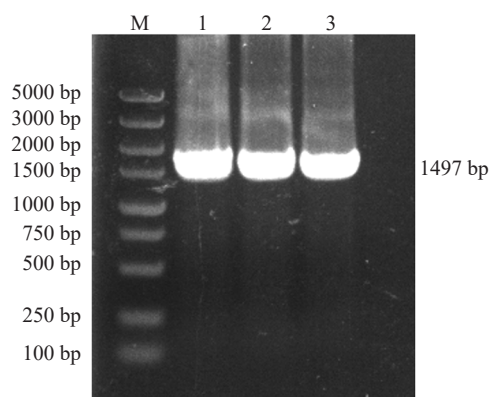


图1 *SmGAD* 基因的PCR扩增结果

Fig. 1 PCR amplification results of *SmGAD* gene

M: DL5000 DNA Marker; 1~3: PCR 扩增产物

M: DL5000 DNA Marker; 1-3: PCR amplification product

发现*SmGAD*蛋白含有谷氨酸脱羧酶特征性功能域,并包含磷酸吡哆醛(PLP)结合位点的关键保守残基(图2-C),该结果与AAT-I超家族(依赖PLP的酶类)的催化机制特征高度吻合。跨膜结构域分析结果(图2-D)显示,*SmGAD*蛋白无跨膜结构域。亲/疏水性分析结果(图2-E)显示,第206位氨基酸(Val)的分值最高(2.444),第141位氨基酸(Trp)的分值最低(-3.611),表明*SmGAD*蛋白具有两亲性特征。

2.2.2 *SmGAD* 蛋白系统发育、保守基序及启动子区顺式作用元件分析 系统发育分析结果(图3-A)显示,早柳9901的*SmGAD*蛋白与毛果杨(*Populus trichocarpa*)、茶树和棉花的GAD同源蛋白亲缘关系较近。多重序列比对结果(图3-B)显示,*SmGAD*蛋白与其他6个物种的GAD同源蛋白均具有高度相似性,表明谷氨酸脱羧酶在不同物种中高度保守。启动子区顺式作用元件分析结果(图3-C)显示,其启动子中包含茉莉酸甲酯响应元件、生长素响应元件、

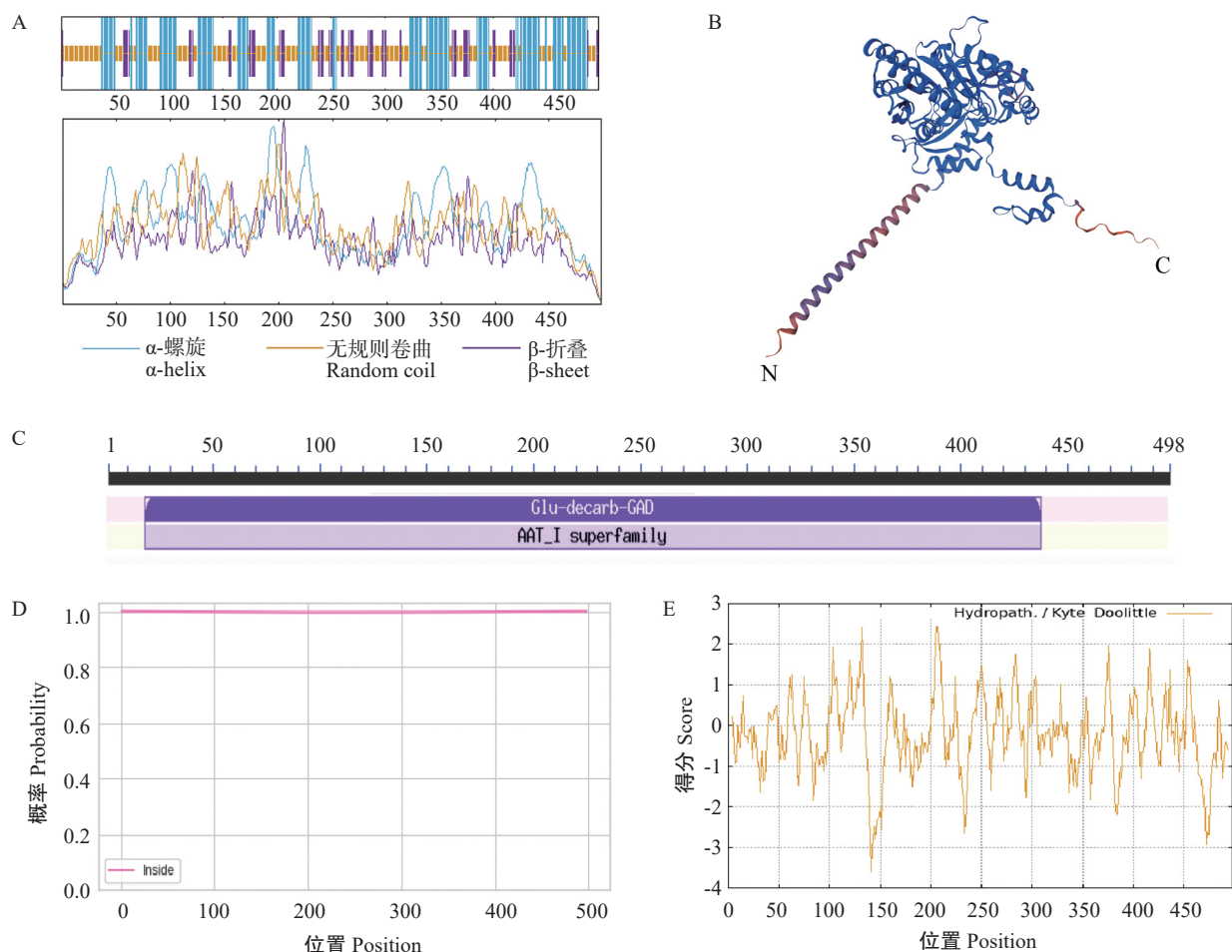


图2 *SmGAD* 蛋白的二级结构(A)、三级结构(B)、保守结构域(C)、跨膜结构域(D)和亲/疏水性(E)预测

Fig. 2 Prediction of secondary structure (A), tertiary structure (B), conserved domain (C), transmembrane domain (D), and hydrophilicity/hydrophobicity (E) of *SmGAD* protein

光响应元件、干旱响应元件及醇溶蛋白代谢响应元件等。其中,生长素响应元件和光响应元件的存在提示*SmGAD*基因可能参与植物对淹水胁迫的响应。

### 2.3 不同品种柳树中*SmGAD*基因响应淹水胁迫的表达分析结果

为探究不同品种柳树中*SmGAD*基因在响应淹水胁迫中的表达变化,分别提取苏柳172、旱垂柳287、苏柳795、盐柳一号和旱柳9901淹水0、4和12 h的RNA,进行实时荧光定量PCR分析。结果(图4)显示,*SmGAD*基因在不同品种中的表达趋势存在差异。苏柳172和苏柳795中,*SmGAD*基因的表达趋势较为相似,即淹水0~4 h上调不明显,但淹水4~12 h出现极显著( $P<0.01$ 或 $P<0.001$ )上调。旱垂柳287、盐柳一号和旱柳9901的*SmGAD*基因表达趋势基本相同,即淹水4 h较0 h极显著( $P<0.01$ 或 $P<0.001$ )上调,淹水4~12 h持续上调。以上结果表明,*SmGAD*基因在不同品种柳树响应淹水胁迫中均发挥重要的调控作用。

### 2.4 *SmGAD*基因沉默对旱柳耐淹能力的影响

以pMD18-T-*SmGAD*质粒为模板,扩增获得216 bp的特异性*SmGAD*基因片段(图5-A)。接种后2周,注射pYL156-*SmPDS*的植株表现出明显白化表型。实时荧光定量PCR分析结果(图6-A)显示,与对照组相比,试验组*SmGAD*基因的相对表达量降幅超过50%,表明基因沉默效率在50%以上。为探究*SmGAD*基因在淹水胁迫中的功能,对2组植株进行

淹水处理。

柳树淹水前后的表型结果(图6-B)显示,试验组在淹水胁迫下叶片脱落及腐烂现象较严重,根冠出现大面积褐化。对照组叶片的相对电导率约为试验组的20%,表明沉默株系叶片受到严重损伤,细胞膜遭受严重的过氧化损伤(图6-C)。根干重和根鲜重测定结果(图6-D和图6-E)显示,试验组的根干重约为对照组的40%,根鲜重约为对照组的25%,表明淹水胁迫后沉默株系根系生长情况较差,含水量降低。丙二醛(MDA)含量测定结果(图6-F)显示,试验组的MDA含量较对照组提高约200%,表明沉默株系细胞受损程度更高。上述结果表明,*SmGAD*基因在旱柳响应淹水胁迫中发挥重要功能。

### 2.5 旱柳*SmGAD*蛋白对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>清除的影响

通过原核表达试验构建pET32a-*SmGAD*载体(图5-B),经诱导后进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测,其理论分子量为56.51 kD,确认蛋白成功表达(图7-A)。酶活性测定结果(图7-B)显示,在1.5 h测定OD<sub>600 nm</sub>后,将H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>添加至诱导组和未诱导组菌液中,OD<sub>600 nm</sub>均明显下降,且未诱导组下降更明显;2.5 h时诱导组回升速度较未诱导组更快。在添加H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>后2.0和2.5 h时,诱导组和未诱导组的OD<sub>600 nm</sub>均存在极显著差异( $P<0.01$ 或 $P<0.001$ ),表明IPTG诱导组菌液繁殖速度较快,清除H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的能力较强。以上结果表明,*SmGAD*蛋白在清除H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>中发挥重要功能。

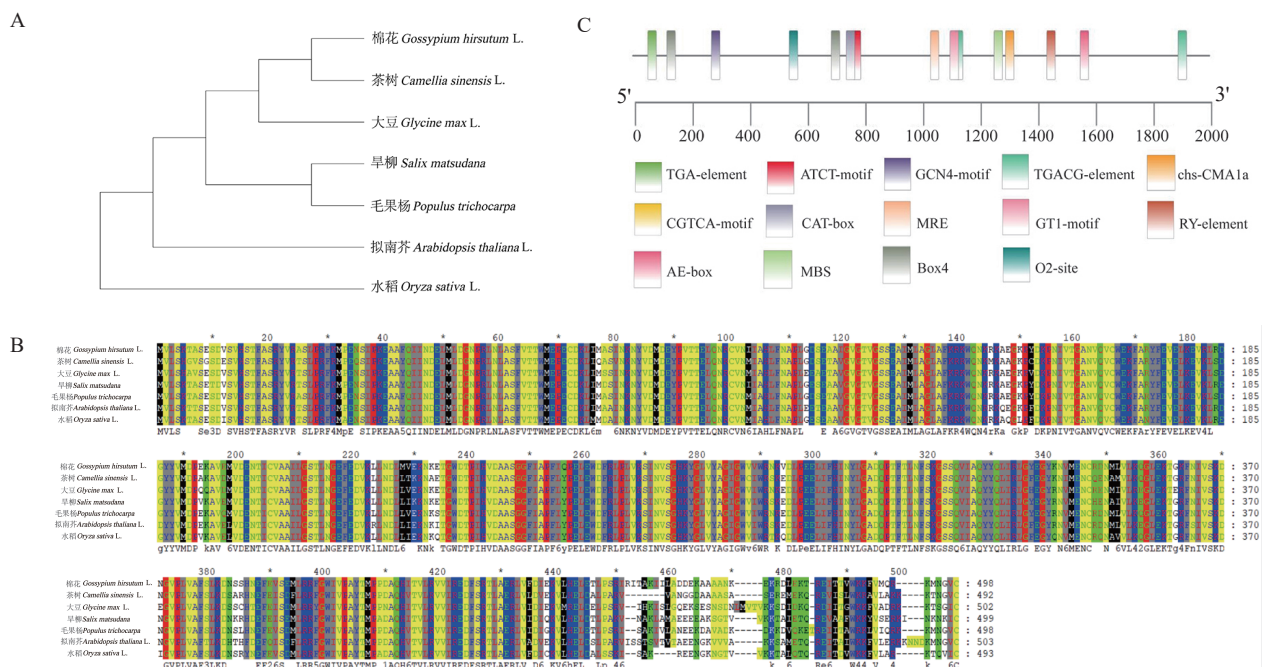


图3 *SmGAD*蛋白系统发育(A)、保守基序(B)及启动子区顺式作用元件(C)分析

Fig. 3 Analysis of phylogeny (A), conserved motif (B), and promoter cis-element (C) of *SmGAD* protein

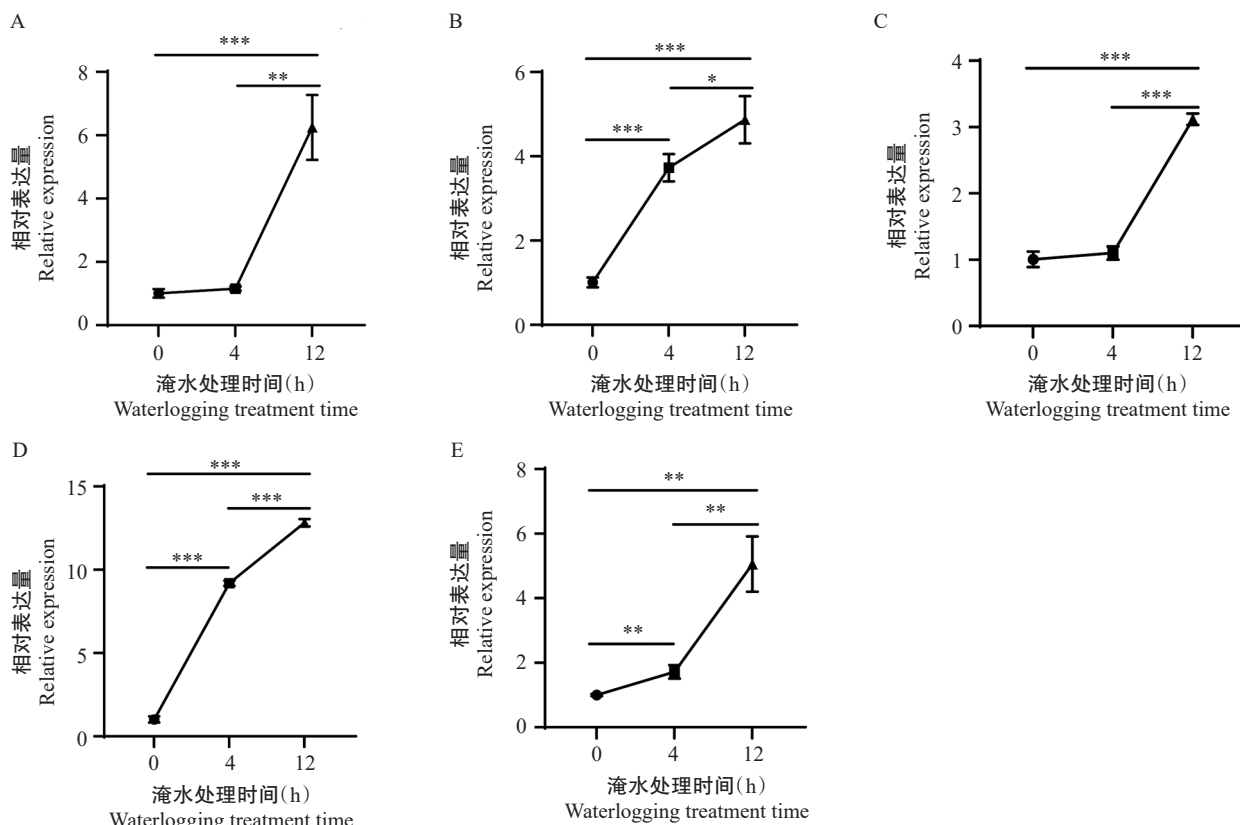


图4 不同品种柳树中 *SmGAD* 基因响应淹水胁迫的相对表达量

Fig. 4 Relative expression of *SmGAD* gene in response to waterlogging stress of different willow varieties

A~E 分别表示苏柳 172、早垂柳 287、苏柳 795、盐柳一号和早柳 9901 中 *SmGAD* 基因响应淹水胁迫的相对表达量。\*表示差异显著 ( $P<0.05$ ), \*\*表示差异极显著 ( $P<0.01$ ), \*\*\*表示差异极显著 ( $P<0.001$ )

A-E represented relative expression of *SmGAD* genes in response to waterlogging stress in Suliu 172, Hanchuiliu 287, Suliu 795, Yanliu No. 1, and Hanliu 9901 respectively. \* indicated significant difference ( $P<0.05$ ), \*\* indicated extremely significant difference ( $P<0.01$ ), and \*\*\* indicated extremely significant difference ( $P<0.001$ )

### 3 讨论

本研究探讨了早柳 *SmGAD* 基因在响应淹水胁迫中的重要功能。已有研究表明, *GAD* 基因在植物生长发育及种子萌发中发挥重要功能。在水稻中, 解析与 GABA 合成相关的基因可为选育高 GABA 含量品种打下基础(孙志勇等, 2024); 在玉米 (*Zea mays* L.) 中, 外源施加 *GAD* 基因催化产物 GABA 能够提升老化玉米种子的发芽率, 促进种子活性(焦芳菊等, 2025)。同时, 受 *GAD* 基因调控的 GABA 在植物应对非生物胁迫(如盐胁迫、低温胁迫、干旱胁迫及重金属胁迫)中也发挥重要功能。盐碱胁迫可诱导番茄 *GAD* 活性显著提高和内源 GABA 积累, GABA 合成关键基因 *SIGAD1* 的相对表达量也显著上调, 植株清除过氧化物的能力随之增强(Wu et al., 2020)。此外, 番茄 *SIGAD2* 基因在响应低温胁迫中发挥调控作用, 外源施加 GABA 可显著提高番茄的低温耐受性, 并降低植株过氧化物含量(张勇, 2024)。

*GAD* 基因在不同物种中参与响应多种非生物胁迫, 但有关其响应淹水胁迫的报道较为有限。本研究通过转录组数据挖掘与早柳耐淹性相关的基因 *SmGAD*, 并对不同品种柳树进行实时荧光定量 PCR 分析, 发现该基因在淹水处理不同时间点呈特异性表达。在西瓜 (*Citrullus lanatus* L.) 响应盐胁迫的研究中, 3 个 *GAD* 基因家族成员存在组织特异性表达, 且在不同盐胁迫时间点的表达趋势不一致(李明轩等, 2023), 本研究结果与之相似。淹水胁迫与低氧胁迫密切相关。当植物遭受淹水胁迫时, 土壤中氧气含量迅速下降, 引发组织缺氧。在低氧条件下, 外源施加 GABA 可显著提升超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)活性, 降低 ROS 含量。研究表明, 低氧状态下植物组织中的 GABA 含量显著提高, 有助于维持细胞膜电位并缓解过氧化损伤, 从而增强植物对低氧环境的适应性(张海龙, 2020)。GABA 在应对多种非生物胁迫中均发挥功能。山定子 (*Malus baccata* Borkh.) 响应低温胁迫的研究表明, GABA 的产生可有效清除植株

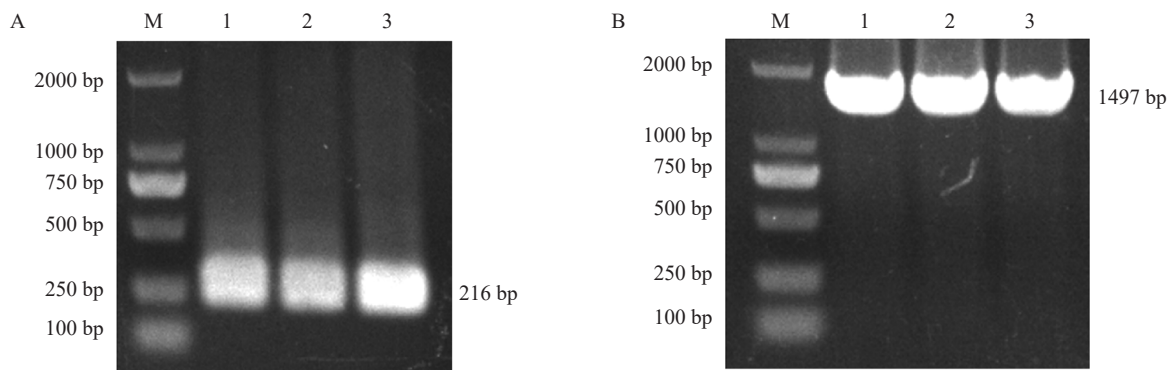


图5 沉默载体pYL156-*SmGAD*和原核表达载体pET32a-*SmGAD*构建

Fig. 5 Construction of silencing vector pYL156-*SmGAD* and prokaryotic expression vector pET32a-*SmGAD*

M: DL2000 DNA Marker; 1~3: PCR 扩增产物; A: pYL156-*SmGAD* 载体; B: pET32a-*SmGAD* 载体

M: DL2000 DNA Marker; 1-3: PCR amplification product; A: pYL156-*SmGAD* vector; B: pET32a-*SmGAD* vector

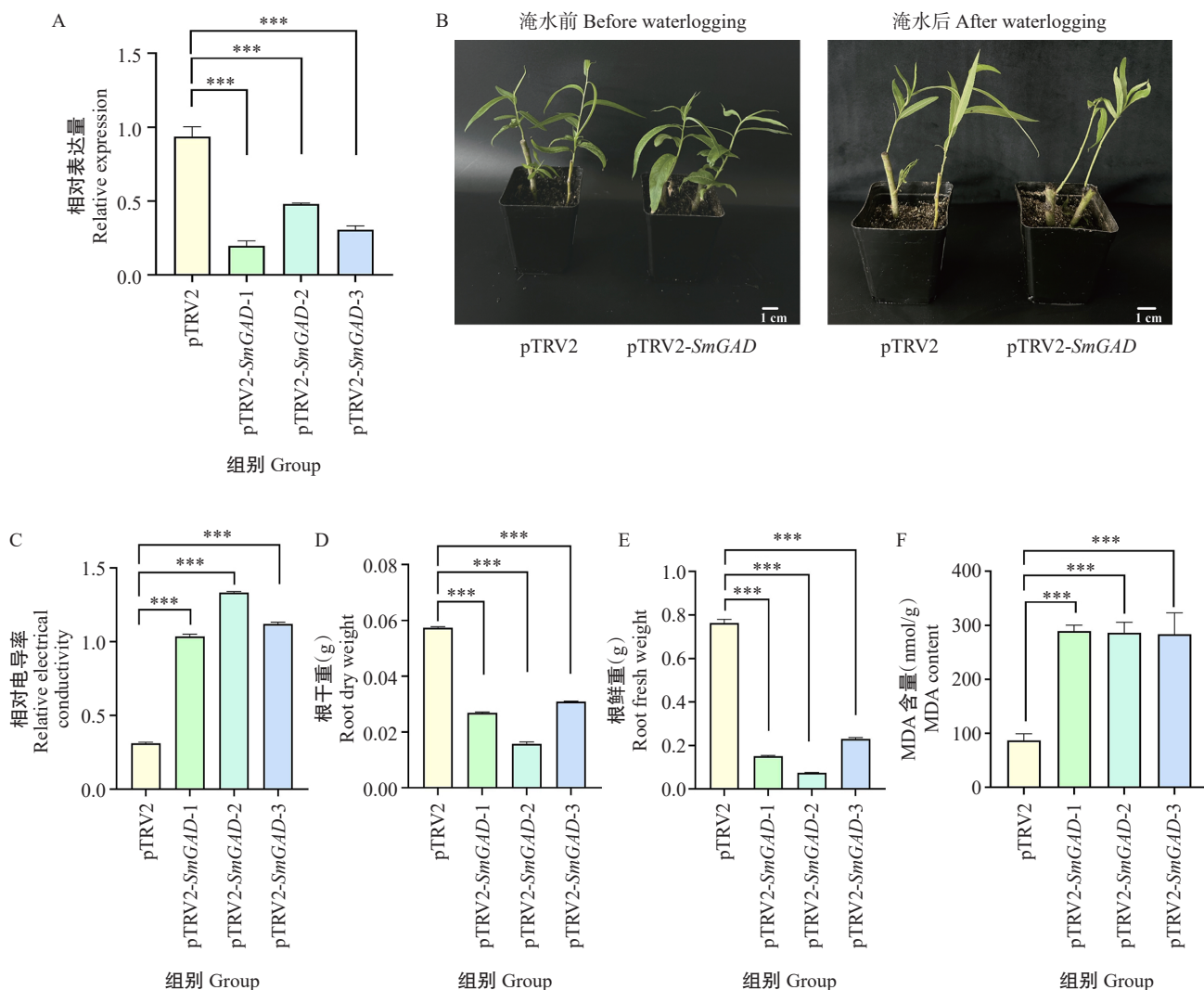


图6 *SmGAD* 沉默效率检测、淹水前后的表型及相关指标测定结果

Fig. 6 *SmGAD* silencing efficiency detection, phenotypes before and after waterlogging, and determination results of relative indicators

A为*SmGAD*基因沉默后的相对表达量;B为柳树淹水胁迫前后表型;C-F分别为柳树淹水胁迫后的相对电导率、根干重、根鲜重和MDA含量。

\*\*\*表示差异极显著 ( $P < 0.001$ )

A was relative expression of *SmGAD* gene after silencing; B was phenotype before and after waterlogging stress; C-F were relative electrical conductivity, root dry weight, root fresh weight, and MDA content of willow after waterlogging stress. \*\*\* indicated extremely significant difference ( $P < 0.001$ )

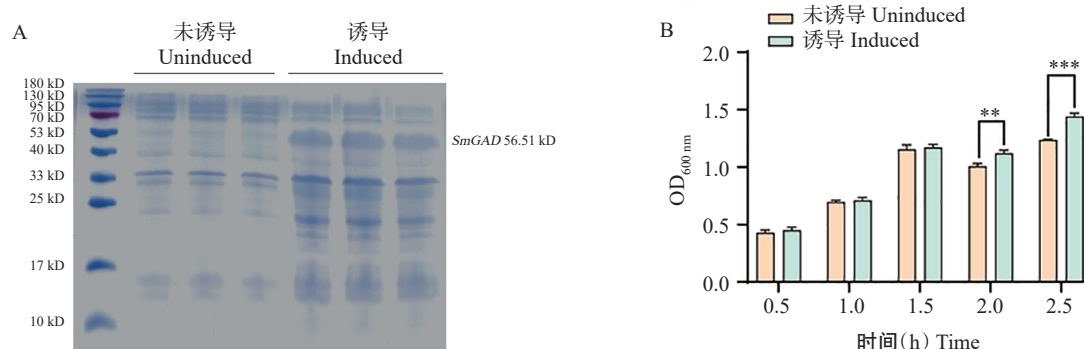


图7 SmGAD蛋白原核表达及酶活性测定结果

Fig. 7 Prokaryotic expression of SmGAD protein and determination results of enzymatic activity

A: SmGAD蛋白凝胶电泳检测; B: SmGAD蛋白清除H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>能力测定。 \*\*表示差异极显著 ( $P < 0.01$ ), \*\*\*表示差异极显著 ( $P < 0.001$ )

A: Gel electrophoresis detection of SmGAD protein; B: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging ability of SmGAD protein. \*\* indicated extremely significant difference ( $P < 0.01$ ), \*\*\* indicated extremely significant difference ( $P < 0.001$ )

中积累的ROS,帮助其适应低温环境(陆晓晨等, 2019)。菰蓝(*Isatis tinctoria* L.)幼苗在盐胁迫下会产生大量超氧阴离子等ROS,喷施GABA后CAT、POD和SOD活性均显著提高,进一步证实GABA在ROS清除中的功能(韩多红等, 2021)。本研究通过原核表达诱导SmGAD蛋白过表达,验证了SmGAD具有清除H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的功能,并在大肠杆菌BL21中的异源过表达体系中得到了证实。

深入挖掘柳树耐淹关键基因并解析其功能机制,对于开发耐淹种质资源、推动湿地生态系统的恢复与重建具有重要意义。本研究以淹水胁迫为切入点,验证了*SmGAD*基因在柳树应对淹水胁迫中发挥关键作用。然而,关于*GAD*基因在柳树淹水胁迫中的具体调控网络和作用机制,仍需进一步研究。

## 4 结论

*SmGAD*基因是早柳响应淹水和缺氧胁迫调控网络中的正调控因子,可通过减轻氧化胁迫损伤等机制增强植株对淹水胁迫的抵抗力。原核表达试验证实SmGAD蛋白具有清除H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的能力。

### 参考文献(References):

- 蔡琳,李建奇,汤志洪. 2024. 外源GABA对NaCl胁迫下黄瓜种子萌发及幼苗生长的影响[J]. 种子科技, 42(22): 26-28. [Cai L, Li J Q, Tang Z H. 2024. Effects of exogenous GABA on cucumber seed germination and seedling growth under NaCl stress [J]. Seed Science & Technology, 42(22): 26-28.] doi: 10.19904/j.cnki.cn14-1160/s.2024.22.008.
- 陈惠婵. 2023. GABA在冬小麦抗寒方面的应用研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学. [Chen H C. 2023. Study on GABA regulation of cold resistance in winter wheat[D]. Harbin: Northeast Agricultural University.] doi: 10.27010/d.cnki.gdbnu.2023.000743.

- 韩多红,王恩军,张勇,路瑞霞,王红霞,王艳. 2021. 外源γ-氨基丁酸对盐胁迫下菰蓝幼苗活性氧和抗氧化系统的影响[J]. 北方园艺, (6): 111-116. [Han D H, Wang E J, Zhang Y, Lu R X, Wang H X, Wang Y. 2021. Effects of exogenous γ-aminobutyric acid (GABA) on reactive oxygen species and antioxidant system of *Isatis indigotica* Fort. seedlings under salt stress[J]. Northern Horticulture, (6): 111-116.] doi: 10.11937/bfy.20201151.

- 华炫,田博雯,周欣彤,江梓涵,王诗琦,黄倩慧,张健,陈艳红. 2024. 早柳*SmERF B3-45*的克隆及耐盐功能研究[J]. 生物技术通报, 40(12): 124-135. [Hua X, Tian B W, Zhou X T, Jiang Z H, Wang S Q, Huang Q H, Zhang J, Chen Y H. 2024. Cloning *SmERF B3-45* from *Salix matsudana* and functional analysis on its tolerance to salt [J]. Biotechnology Bulletin, 40(12): 124-135.] doi: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2024-0385.

- 焦芳菊,郝晓佳,王晶艺,边建文,王子铭,陈明飞,文钧民,王芳. 2025. 外源褪黑素、吲哚丁酸钾、γ-氨基丁酸引发对老化玉米种子萌发及生理特性的影响[J]. 草地学报, 33(8): 2494-2501. [Jiao F J, Hao X J, Wang J Y, Bian J W, Wang Z M, Chen M F, Wen J M, Wang F. 2025. The influence of exogenous melatonin, potassium indolebutyrate, and γ-aminobutyric acid on the germination and physiological traits of aging maize seeds[J]. Acta Agrestia Sinica, 33(8): 2494-2501.] doi: 10.11733/j.issn.1007-0435.2025.08.009.

- 雷敏,许源,蔡俊. 2024. 谷氨酸脱羧酶的克隆表达与酶学性质[J]. 食品研究与开发, 45(21): 195-202. [Lei M, Xu Y, Cai J. 2024. Cloning, expression, and enzymatic characterization of glutamate decarboxylase[J]. Food Research and Development, 45(21): 195-202.] doi: 10.12161/j.issn.1005-6521.2024.21.025.

- 李承龙. 2021. 拟南芥GAD家族基因的时空表达和突变体表型分析[D]. 武汉: 中南民族大学. [Li C L. 2021. Spatio-temporal expression of GAD family genes and their multiple mutant phenotype analysis in *Arabidopsis thaliana* [D]. Wuhan: South-Central University for Nationalities.]

- doi:10.27710/d.cnki.gznmc.2021.000485.
- 李明轩,刘颖,杨柏明,张帆,宋嘉欣,栗柴静,张卫华,吴颖. 2023. 西瓜谷氨酸脱羧酶 GADs 的克隆与表达分析[J]. 华北农学报, 38(6): 18-25. [Li M X, Liu Y, Yang B M, Zhang F, Song J X, Su C J, Zhang W H, Wu Y. 2023. Cloning and expression analysis of glutamate decarboxylase GADs from watermelon [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 38(6): 18-25.] doi:10.7668/hbxb.20194340.
- 李瑶,王雷,孙鑫,孙尧,吴琼. 2024.  $\gamma$ -氨基丁酸生物学功能研究进展[J]. 农业与技术, 44(10): 12-14. [Li Y, Wang L, Sun X, Sun Y, Wu Q. 2024. Advances in biological functions of  $\gamma$ -aminobutyric acid[J]. Agriculture and Technology, 44(10): 12-14.] doi:10.19754/j.nyyjs.20240530003.
- 刘俊婷,罗杰,李若溪,王佳敏,刘锦春. 2023. 不同降雨时间格局下喀斯特垂直异质生境中桉楠幼苗光响应曲线的拟合及分析[J]. 西南大学学报(自然科学版), 45(3): 122-130. [Liu J T, Luo J, Li R X, Wang J M, Liu J C. 2023. Fitting and analysis of light response curve of *Phoebe zhennan* seedlings in Karst vertical heterogeneous habitats under different rainfall time patterns [J]. Journal of Southwest University (Natural Science Edition), 45(3): 122-130.] doi:10.13718/j.cnki.xdzk.2023.03.010.
- 陆晓晨,李丽杰,胡小鹿,马怀宇,吕德国. 2019. 根区亚低温胁迫下外源 GABA 对山定子根系抗氧化功能的影响[J]. 西北植物学报, 39(2): 285-293. [Lu X C, Li L J, Hu X L, Ma H Y, Lü D E. 2019. Effects of exogenous GABA on antioxidant function of *Malus baccata* Borkh. roots under suboptimal root-zone temperature [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 39(2): 285-293.] doi:10.7606/j.issn.1000-4025.2019.02.0285.
- 钱超楠,徐孙然,李梦茹,邓明超,孙硕,刘国元,连博琳,张健,陈艳红. 2024. 旱柳 NAC 基因家族的全基因组鉴定及其在淹水和盐胁迫下的表达分析[J]. 南方农业学报, 55(10): 3056-3070. [Qian C N, Xu S R, Li M R, Deng M C, Sun S, Liu G Y, Lian B L, Zhang J, Chen Y H. 2024. Whole genomic identification of NAC gene family and expression analysis under flooding stress and salt stress in *Salix matsudana* [J]. Journal of Southern Agriculture, 55(10): 3056-3070.] doi:10.3969/j.issn.2095-1191.2024.10.018.
- 束晨晨,周天阳,顾逸彪,崔瑞龙,刘畅,顾骏飞. 2025. 盐胁迫下喷施外源  $\gamma$ -氨基丁酸对不同耐盐性水稻生长及产量的影响[J]. 中国稻米, 31(2): 35-42. [Shu C C, Zhou T Y, Gu Y B, Cui R L, Liu C, Gu J F. 2025. Effects of spraying exogenous  $\gamma$ -aminobutyric acid on growth and yield of rice with different salt tolerance under salt stress [J]. China Rice, 31(2): 35-42.] doi:10.3969/j.issn.1006-8082.2025.02.006.
- 宋红苗,陶跃之,王慧中,徐祥彬. 2010. GABA 在植物体内的合成代谢及生物学功能[J]. 浙江农业科学, (2): 225-229. [Song H M, Tao Y Z, Wang H Z, Xu X B. 2010. Biosynthesis, metabolism, and biological functions of GABA in plants [J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, (2): 225-229.] doi:10.16178/j.issn.0528-9017.2010.02.001.
- 孙志勇,杜怀东,刘阳,马嘉欣,于雪然,马伟,姚鑫杰,王敏,李培富. 2024. 水稻籽粒  $\gamma$ -氨基丁酸含量的全基因组关联分析[J]. 生物技术通报, 40(8): 53-62. [Sun Z Y, Du H D, Liu Y, Ma J X, Yu X R, Ma W, Yao X J, Wang M, Li P F. 2024. Genome-wide association analysis of  $\gamma$ -aminobutyric acid in rice grains [J]. Biotechnology Bulletin, 40(8): 53-62.] doi:10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2024-0058.
- 项洪涛,李琬,何宁,刘佳,曾玲玲,王诗雅,王曼力,刘美玲. 2022. 外源脱落酸缓解小豆幼苗水分胁迫效应研究[J]. 西南农业学报, 35(1): 74-80. [Xiang H T, Li W, He N, Liu J, Zeng L L, Wang S Y, Wang M L, Liu M L. 2022. Effects of exogenous abscisic acid on alleviating water stress of adzuki bean seedlings [J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 35(1): 74-80.] doi:10.16213/j.cnki.scjas.2022.1.010.
- 张登. 2023. *OsGAD2* 影响水稻籽粒的生长发育[D]. 南昌:南昌大学. [Zhang D. 2023. *OsGAD2* influences grain growth and development in rice[D]. Nanchang: Nanchang University.] doi:10.27232/d.cnki.gnchu.2023.004302.
- 张海龙,陈迎迎,杨立新,沈应柏. 2020.  $\gamma$ -氨基丁酸对植物生长发育和抗逆性的调节作用[J]. 植物生理学报, 56(4): 600-612. [Zhang H L, Chen Y Y, Yang L X, Shen Y B. 2020. Regulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid on plant growth and development and stress resistance [J]. Plant Physiology Journal, 56(4): 600-612.] doi:10.13592/j.cnki.ppj.2019.0543.
- 张海龙. 2020. 外源 GABA 对植物根系生长和低氧胁迫的调节作用[D]. 北京:北京林业大学. [Zhang H L. 2020. Regulation of exogenous GABA on plant root growth and hypoxia stress [D]. Beijing: Beijing Forestry University.] doi:10.26949/d.cnki.gblyu.2020.001678.
- 张勇. 2024. *SIGAD2* 调控 GABA 的积累增强番茄低温耐受性的机理[D]. 杨凌:西北农林科技大学. [Zhang Y. 2024. The mechanism of *SIGAD2* regulates GABA accumulation to enhance low-temperature tolerance in tomato [D]. Yangling: Northwest A&F University.] doi:10.27409/d.cnki.gxbnu.2024.000497.
- 赵婷,李琴,潘学军,花秀芬,张文娥. 2021. 陆生植物对淹水胁迫的适应机制[J]. 植物生理学报, 57(11): 2091-2103. [Zhao T, Li Q, Pan X J, Hua X F, Zhang W E. 2021. Adaptive mechanism of terrestrial plants to waterlogging stress [J]. Plant Physiology Journal, 57(11): 2091-2103.] doi:10.13592/j.cnki.ppj.2021.0095.
- 郑凌泽. 2023. 柳树耐旱机制及耐旱品种研究进展[J]. 安徽农学通报, 29(8): 79-81. [Zheng L Z. 2023. Advances in drought resistant mechanisms and varieties of willow [J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 29(8): 79-81.] doi:10.16377/j.cnki.issn1007-7731.2023.08.041.
- Chen Y H, Deng M C, Huang Q H, Liu G Y, Zhang J. 2025.

- SmDREB A1-10 is required for SmTTF30-mediated hypoxia stress tolerance in *Salix matsudana* [J]. *Plant, Cell & Environment*, 48(6): 4415-4429. doi: 10.1111/PCE.15442.
- de Souza K R D, de Oliveira Santos M, Andrade C A, da Silva D M, Campos N A, Alves J D. 2017. Aerenchyma formation in the initial development of maize roots under waterlogging [J]. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 29: 165-175. doi: 10.1007/s40626-017-0092-z.
- Dong Z D, Huang J, Qi T, Meng A J, Fu Q P, Fu Y B, Xu F. 2024. Exogenous  $\gamma$ -aminobutyric acid can improve seed germination and seedling growth of two cotton cultivars under salt stress [J]. *Plants*, 13(1): 82. doi: 10.3390/plants13010082.
- Du P Z, Lynch J P, Sun Z L, Li F M. 2024. Does root respiration and root anatomical traits affect crop yield under stress? A meta-analysis and experimental study [J]. *Plant and Soil*, 509: 763-777. doi: 10.1007/S11104-024-06892-4.
- Li S Y, Rao L Y. 2024. Response of growth and chlorophyll fluorescence parameters of mulberry seedlings to waterlogging stress [J]. *Scientific Reports*, 14: 25078. doi: 10.1038/S41598-024-76455-1.
- Liu C F, Wang Y, Peng J L, Shao Z Y, Liu Y J, Zhang Z Q, Mo X Y, Yang Y L, Qin T, Xia Y J, Xiong L M. 2025. The mRNA-binding protein HLN1 enhances drought stress tolerance by stabilizing the *GAD2* mRNA in *Arabidopsis* [J]. *Stress Biology*, 5: 39. doi: 10.1007/S44154-025-00239-4.
- Liu L, McDonald A J S, Stadenberg I, Davies W J. 2001. Absciscic acid in leaves and roots of willow: Significance for stomatal conductance [J]. *Tree Physiology*, 21(11): 759-764. doi: 10.1093/treephys/21.11.759.
- Shoaib S, Iqbal R K, Ashraf H, Younis U, Rasool M A, Ansari M J, Alarfaj A A, Alharbi S A. 2025. Mitigating effect of  $\gamma$ -aminobutyric acid and gibberellic acid on tomato plant cultivated in Pb-polluted soil [J]. *Scientific Reports*, 15: 12469. doi: 10.1038/S41598-025-96450-4.
- Wang X T, Zong N, Wang X, Niu J P, Zhang X, Shu K, Wang G D, Hui W. 2025. Gamma-aminobutyric acid (GABA) releases seed dormancy by orchestrating abscisic acid and gibberellin metabolism and signaling [J]. *BMC Plant Biology*, 25: 676. doi: 10.1186/S12870-025-06707-3.
- Wei H, Chen J X, Lu Z X, Zhang X Y, Feng Y, Liu G Y, Lian B L, Zhong F, Zhang J. 2024. A systematic analysis of GASA family members in the *Salix matsudana* genome: Characterization, expression profile, and putative function in antioxidation [J]. *Industrial Crops and Products*, 220: 119264. doi: 10.1016/j.indcrop.2024.119264.
- Wu Q, Su N N, Huang X, Cui J, Shabala L, Zhou M X, Yu M, Shabala S. 2021. Hypoxia-induced increase in GABA content is essential for restoration of membrane potential and preventing ROS-induced disturbance to ion homeostasis [J]. *Plant Communications*, 2(3): 100188. doi: 10.1016/j.xplc.2021.100188.
- Wu X L, Jia Q Y, Ji S X, Gong B B, Li J R, Lü G Y, Gao H B. 2020. Gamma-aminobutyric acid (GABA) alleviates salt damage in tomato by modulating  $\text{Na}^+$  uptake, the *GAD* gene, amino acid synthesis and reactive oxygen species metabolism [J]. *BMC Plant Biology*, 20: 465. doi: 10.1186/s12870-020-02669-w.
- Xu Z Y, Ye L Z, Shen Q F, Zhang G P. 2024. Advances in the study of waterlogging tolerance in plants [J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 23(9): 2877-2897. doi: 10.1016/j.jia.2023.12.028.

(责任编辑: 李洪艳, 庞 茜)