

· 研究论文 ·

旱柳 *SmTTF59* 基因在淹水胁迫中的功能

邓明超^{1,2}, 钱超楠^{1,2}, 李梦茹^{1,2}, 徐孙然^{1,2}, 陈艳红^{1,2*}, 张健^{1,2*}

¹南通大学生命科学学院, 南通 226019; ²南通市观赏植物遗传育种重点实验室, 南通 226019

摘要 淹水耐受性是木本园林植物关键抗逆性状之一。旱柳 (*Salix matsudana*) 作为典型的强耐淹树种, 其对淹水胁迫的适应机制具有重要研究价值。TTF (Trihelix) 是植物中特有的一类转录因子, 在应对各种非生物胁迫 (如淹水、盐和低温) 中发挥重要作用。该研究聚焦旱柳 Trihelix 家族基因 *SmTTF59*, 系统解析其在淹水胁迫中的分子功能。通过 PCR 扩增获得 *SmTTF59* 全长序列, 基于同源重组技术构建过表达载体 pWM101-*SmTTF59* 及病毒诱导基因沉默 (VIGS) 载体 pYL156-*SmTTF59*, 并通过遗传转化技术实现 *SmTTF59* 在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中的过表达以及在旱柳中的特异性沉默。结果表明, *SmTTF59* 过表达拟南芥在缺氧胁迫下的根长、鲜重和抗氧化酶活性显著高于野生型, 暗示该基因在植物响应缺氧胁迫过程中可能通过增强抗氧化防御系统来提升胁迫耐受性。进一步通过旱柳的 VIGS 实验证实, 沉默植株的淹水耐受性显著降低, 表明其作为正调控因子参与旱柳淹水胁迫应答。研究结果为解析木本植物耐淹机制及定向选育高抗性柳树品种提供了关键的分子靶点。

关键词 旱柳, *SmTTF59*, 淹水胁迫, 缺氧胁迫, VIGS

邓明超, 钱超楠, 李梦茹, 徐孙然, 陈艳红, 张健 (2026). 旱柳 *SmTTF59* 基因在淹水胁迫中的功能. 植物学报 61, 264–276.

旱柳 (*Salix matsudana*) 为杨柳科 (Salicaceae) 速生树种, 其凭借适应性广、抗逆性强等特点在全球温带至亚热带地区广泛分布 (郑凌泽, 2023)。该树种兼具显著的经济价值与景观应用潜力, 是城市绿化及河岸带生态重建的优选物种。尽管旱柳对异质生境具有较强适应性, 但其在季风性气候区或洪泛区常因持续性降水而遭受淹水胁迫, 淹水胁迫的主要因子是低氧胁迫, 淹水胁迫导致植物根系处于缺氧或无氧状态 (Mozo et al., 2021)。淹水胁迫通过多重途径影响植物生理稳态。(1) 土壤孔隙氧含量降低, 使根系代谢从有氧呼吸向厌氧发酵转换, 造成乙醇、乳酸及活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 过量积累, 引发膜脂过氧化与细胞器损伤 (李航, 2014); (2) 叶片气孔导度下降及光合色素合成受阻, 导致光能捕获效率降低和碳同化抑制 (王湘莹等, 2024); (3) 内源激素稳态失衡, 表现为乙烯合成增强与脱落酸信号激活, 加速器官衰老 (余婷和张望梅, 2020)。值得注意的是, 旱柳在

长期进化中形成了独特的耐淹适应策略, 其根系皮层细胞程序性死亡形成连续通气组织, 可实现地上部氧气的纵向运输, 维持根尖细胞有氧代谢 (杨杰等, 2022)。然而, 淹水胁迫触发的分子调控网络在木本植物中仍不明确 (吴亚男等, 2015)。基于此, 本研究聚焦 Trihelix 转录因子家族成员 *SmTTF59*, 系统解析其在旱柳淹水胁迫响应中的调控机制, 以期为林木抗逆分子育种提供理论依据。

Trihelix 转录因子是一类具有特征性三元螺旋结构 (triple-helix) 的 DNA 结合蛋白, 其 N 端保守结构域可通过螺旋-环-螺旋结构特异性识别并结合顺式作用元件, 进而调控下游靶基因的转录激活或抑制 (赵昱琳等, 2024)。作为植物特有的转录调控因子, Trihelix 家族成员通过动态响应非生物胁迫信号, 在植物抗逆反应分子网络中发挥枢纽作用 (于冰等, 2019)。系统进化分析表明, Trihelix 家族在陆生植物中高度保守且功能分化显著, 在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中已

收稿日期: 2025-03-20; 接受日期: 2025-06-03

基金项目: 江苏省碳达峰碳中和科技创新专项资金 (江苏省现代农业) (No. BE2022420)、南通市基础研究计划 (No. JC2023104) 和江苏省研究生科研与实践创新计划 (No. KYCX24-3616)

* 通讯作者。E-mail: chenyh@ntu.edu.cn; yjnkyy@ntu.edu.cn

鉴定出30余个成员,其功能涵盖光形态建成、气孔发育及多重胁迫响应;毛竹(*Phyllostachys pubescens*) *Trihelix*基因家族在低温、盐及渗透胁迫下呈现组织特异性差异表达模式,提示其参与竹类非生物胁迫适应的分子调控(Cheng et al., 2019)。木本植物中,白桦(*Betula pendula*) *Trihelix*成员通过调控病程相关蛋白(pathogenesis related protein, PR)基因表达增强抗病性(宁小萌等, 2022; 张悦婧等, 2024),而杨树(*Populus sp.*) *Trihelix*家族则参与渗透胁迫应答及病原体防御反应(Wang et al., 2016; 杜志焯等, 2024)。上述研究虽揭示了 *Trihelix*基因在抗逆中的多种功能,但其在木本植物淹水胁迫响应中的分子机制仍鲜有报道,尤其是典型耐淹物种旱柳中 *Trihelix*介导的低氧胁迫信号转导网络尚未阐明。

前期对旱柳TTF家族成员的鉴定和基因非生物胁迫响应表达谱的筛选分析表明, *Trihelix*转录因子家族成员有78个,通过对淹水胁迫下其表达模式进行分析,发现其中25个 *Trihelix*家族转录因子的编码基因为差异表达基因(Yang et al., 2023; 黄倩慧等, 2025)。本研究聚焦该家族核心成员 *SmTTF59*,通过以下实验系统解析其在旱柳淹水胁迫应答中的分子功能。(1) 克隆 *SmTTF59*基因并对其编码蛋白进行保守结构域与进化关系分析;(2) 解析 *TTF59*启动子区顺式作用元件,明确其胁迫响应调控潜能;(3) 构建 *TTF59*过表达载体pCAMBIA1302-*SmTTF59*及病毒诱导基因沉默(virus-induced gene silencing, VIGS)载体pTRV2-*SmTTF59*,结合拟南芥异源过表达与旱柳VIGS技术获得过表达拟南芥转基因植株和旱柳基因沉默株系;(4) 对2种转基因材料在缺氧和淹水胁迫下的表型和生理指标进行分析。

研究结果阐明了 *Trihelix*转录因子编码基因 *SmTTF59*增强旱柳耐淹性的分子机制,旨在为创制耐淹柳树新种质及湿地生态系统修复提供关键基因资源。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

本研究选取种植于南通大学生命科学学院植物园的旱柳9901 (*Salix matsudana* Koidz. cv. '9901')一年生枝条作为实验材料,要求枝条生长状况良好且无病

虫害。将枝条剪成直径为0.5 cm、长度为10 cm的小段后进行水培。水培实验于人工气候室内开展,气候室温度为25°C,光周期为16小时光照/8小时黑暗,所培养的材料主要用于RNA提取以及VIGS实验。

1.2 *SmTTF59*蛋白特性和启动子功能元件分析及系统进化树构建

利用Expasy网站(<http://web.expasy.org/>)对 *SmTTF59*蛋白的氨基酸组成和基本理化特性进行在线分析(袁方等, 2015)。借助SWISS-MODEL工具(<https://swissmodel.expasy.org/>)构建 *SmTTF59*蛋白三级结构模型(仇力平等, 2024)。利用NCBI网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)分析 *SmTTF59*蛋白保守结构域。同时使用ProtScale在线工具(<https://web.expasy.org/protscale/>)预测 *SmTTF59*跨膜结构域以及亲水性和疏水性(张润梅和乌凤章, 2024)。此外,本研究从NCBI网站获取毛果杨(*Populus trichocarpa*)、毛白杨(*P. tomentosa*)和葡萄(*Vitis vinifera*)等6种已鉴定的 *SmTTF59*同源蛋白序列,这些物种的 *Trihelix*家族基因均被报道在抗逆中发挥重要作用。利用ME-GA11.0软件构建系统进化树(杜明阳等, 2024)。最后,使用TBtools截取 *SmTTF59*基因的编码区(coding sequence, CDS)上游2 000 bp为启动子,通过PlantCARE分析 *SmTTF59*基因启动子顺式作用元件,并使用TBtools进行可视化(步洪凤等, 2024)。

1.3 RNA提取和qRT-PCR分析

使用TaKaRa MiniBEST植物RNA提取试剂盒从旱柳9901中提取RNA,采用琼脂糖凝胶电泳检测RNA质量和浓度;使用TaKaRa PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)将RNA反转录成cDNA(李青洋等, 2025)。qRT-PCR反应体系20 μL: 1 μL cDNA模板, 10 μL SYBR Mix, 10 μmol·L⁻¹上、下游引物各0.5 μL,用ddH₂O补足体积至20 μL。扩增程序: 95°C预变性1分钟; 95°C10秒, 60°C5秒, 72°C12秒, 40个循环。每个样品设3次生物学重复。采用2^{-ΔΔCT}法(Yang et al., 2023)计算目的基因的相对表达量。qRT-PCR引物序列见附表1。

1.4 *SmTTF59*基因克隆

根据旱柳 *TTF59*基因序列,使用Oligo7软件分别设计

基因上游(Forward primer1)和下游引物(Reverse primer1),引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成。以旱柳RNA反转录的cDNA为模板进行PCR,反应体系50 μL : 2 μL cDNA模板,上、下游引物各2 μL , 25 μL 2 \times Pfu PCR Master-Mix,用ddH₂O补足体积至50 μL 。扩增程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性2分钟;94 $^{\circ}\text{C}$ 30秒,56 $^{\circ}\text{C}$ 30秒,72 $^{\circ}\text{C}$ 3分钟,36个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸5分钟。将PCR产物回收后,采用pMDTM 18-T Vector Cloning Kit (TaKaRa)进行连接,由苏州金唯智生物科技有限公司进行测序。引物序列见附表1。

1.5 *SmTTF59*基因过表达载体以及沉默载体构建

根据pWM101和pYL156载体序列以及*SmTTF59*基因序列,分别设计5'端带有pWM101和pYL156载体同源序列的引物101-Forward primer和101-Reverse primer及引物156-Forward primer和156-Reverse primer。以pMD18-T-*SmTTF59*质粒为模板进行PCR扩增,反应体系50 μL : 2 μL 质粒模板,上、下游引物各2 μL , 25 μL 2 \times Pfu PCR MasterMix,用ddH₂O补足体积至50 μL 。扩增程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性2分钟;94 $^{\circ}\text{C}$ 30秒,56 $^{\circ}\text{C}$ 30秒,72 $^{\circ}\text{C}$ 3分钟,36个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸5分钟。使用KpnI和XbaI对pWM101载体进行双酶切;使用EcoRI和SacI对pYL156载体进行双酶切。使用2 \times Ultra Cloning MasterMix同源重组酶,将载体和各自胶回收产物进行连接,转化DH5 α 大肠杆菌感受态细胞,经菌落PCR验证后,摇菌送公司测序,选取序列正确的pWM101-*SmTTF59*和pYL156-*SmTTF59*进行后续实验。引物序列见附表1。

1.6 拟南芥侵染和*SmTTF59*转基因植株鉴定

将pWM101-*SmTTF59*转入农杆菌,通过菌落PCR筛选阳性农杆菌。挑取单菌落至50 mL含50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 卡那霉素(kan)、25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 利福平(Rif)的LB液体培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 过夜摇菌,当OD₆₀₀介于1.2–1.6之间时,离心沉淀菌体。随后,将菌体重悬于1/2MS液体培养基,OD₆₀₀调至0.6–0.8之间,并加入0.02%表面活性剂SilwettL-77,采用花序侵染法进行侵染(杨智敏等,2025)。将收获的T₀代转基因拟南芥种子清洗消毒后,在添加浓度为25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 潮霉素的1/2MS固体培养基上进行种子筛选,对筛选到的阳性植株提取DNA以及qRT-PCR验证,收获阳性种子为

T₁代,以此类推,直至筛选到纯合T₃代株系后进行表型分析。

1.7 *SmTTF59*转基因拟南芥缺氧胁迫实验

取在培养基上生长1周的拟南芥野生型和T₃代纯合转基因植株进行缺氧胁迫实验(Mathew et al., 2023)。在长约30 cm、宽约15 cm、高约10 cm的玻璃矩形密封盒子底部放置一个厌氧包(Thermo Scientific, OXAN0025A),将装有拟南芥的培养皿堆叠在厌氧包上方。在盒子的密封区域涂抹凡士林,确保其密封性。用铝箔将其完全包裹,并放置在黑暗处进行缺氧处理。处理12小时后,将培养皿取出,置于光照培养箱中正常培养。1周后,统计根长和鲜重,并测定相关生理指标。

1.8 旱柳*SmTTF59*基因的VIGS实验

选择测序正确的载体pYL156-*SmTTF59*转化农杆菌GV3101,同时准备含有pYL156空载体、pYL156-*SmPDS*-200和pTRV1(辅助质粒)的农杆菌。分别吸取pYL156-*SmTTF59*、pYL156空载体、pYL156-*SmPDS*和pTRV1菌液至50 mL含50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Kan和25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Rif的LB液体培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 培养12小时,将OD₆₀₀调至1.5–2.0之间。离心后收集菌体,用缓冲液(10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl₂, 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MES, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酰丁香酮)重悬,将OD₆₀₀调至1.5–2.0之间,室温静置。将pTRV1分别与pYL156-空载体、pYL156-*SmPDS*和pYL156-*SmTTF59*菌液按比例(1:1:1, v/v/v)混匀,注射至叶片和根中(Chen et al., 2025)。在沉默*SmPDS*的对照组出现明显的白化表型后,提取实验组和对照组的RNA,反转录为cDNA后进行qRT-PCR,验证成功敲降后进行黑暗淹水处理。PDS引物序列见附表1。

2 结果与分析

2.1 *SmTTF59*基因生物信息学分析

2.1.1 *SmTTF59*蛋白理化性质及结构预测

通过PCR扩增成功获得*SmTTF59*基因编码序列(CDS),长度为834 bp(附图1),与旱柳基因组中*TTF59*基因的CDS一致,说明成功克隆到*SmTTF59*基因。预测结果表明,*SmTTF59*编码277个氨基酸残基,分子式

为 $C_{1415}H_{2257}N_{435}O_{438}S_{21}$, 原子总数为4 566, *SmTTF59*蛋白分子量为33 044.40 Da, 理论等电点为7.72, 脂肪指数为54.26, 不稳定系数为49.14, 亲水指数为-1.143, 表明该蛋白质具有较高的亲水性但不够稳定。分析*SmTTF59*的氨基酸组成可知, 其中含量最高的氨基酸为谷氨酸(Glu) (13.7%), 其次为精氨酸(Arg) (9.0%), 含量最少的是酪氨酸(Tyr) (1.1%)。*SmTTF59*蛋白二级结构预测结果表明, *SmTTF59*蛋白含有53.07%的 α -螺旋, 46.21%的无规卷曲, 0.72%的延伸链(图1A), 说明 α -螺旋和无规则卷曲是*SmTTF59*蛋白的主要结构元件, 其中3个 α -螺旋可能是DNA结合结构域。三级结构预测结果显示, *SmTTF59*蛋白是1个以ID为A0A5C7HRG5结构为模板建立的蛋白结构, 这两个蛋白的序列相似性为80.95% (图1B)。全域模型质量估计值(global model quality estimate, GMQE)达0.72, 以上数据均证实了结果的可靠性。

保守结构域预测结果显示, *SmTTF59*蛋白含有单个GT1保守序列(图1C)。对跨膜结构进行预测, 结

果显示*SmTTF59*基因编码的蛋白质不含跨膜结构域(图1D)。*SmTTF59*蛋白亲/疏水性分析结果显示, 多肽链上的第242位氨基酸(异亮氨酸)的分值最高(1.578); 第194位氨基酸(谷氨酸)分值最低(-3.278), 并发现*SmTTF59*蛋白的亲水区多于疏水区(图1E), 表明其属于亲水性蛋白。

2.1.2 *SmTTF59*蛋白系统进化树、保守基序以及启动子元件分析

系统进化分析结果表明, 旱柳*SmTTF59*蛋白与毛果杨和毛白杨亲缘关系最近(图2A)。相关研究显示, 毛果杨Trihelix家族基因在抗逆反应中发挥作用(Wang et al., 2016), 而毛白杨Trihelix家族基因也在响应盐胁迫中具有重要功能(李孝红, 2021)。通过分析不同物种TTF59同源蛋白的多重序列比对结果, 我们发现*SmTTF59*蛋白与其它6个物种TTF59同源蛋白的序列相似性显著(图2C), 由此表明GT-1结构域在不同物种中高度保守。研究表明, 大豆(*Glycine max*)

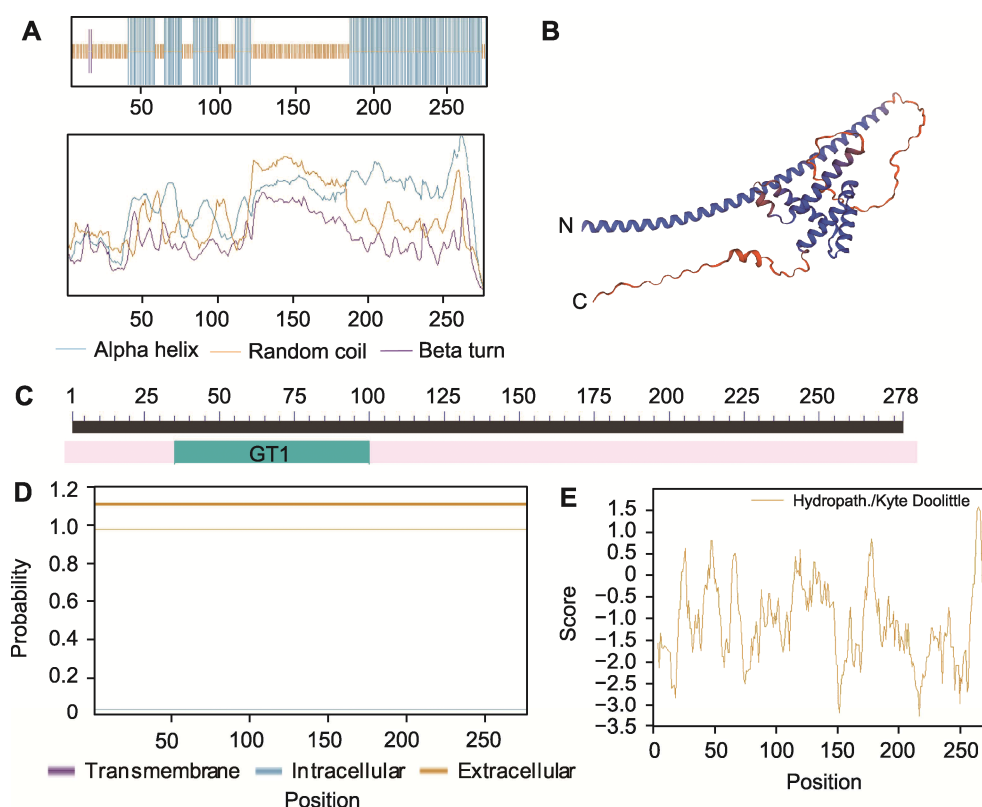


图1 *SmTTF59*蛋白二级结构(A)、三级结构(B)、保守结构域(C)、跨膜结构域(D)和亲/疏水性(E)预测

Figure 1 Prediction of secondary structure (A), tertiary structure (B), conserved domains (C), transmembrane domains (D), and hydrophilicity/hydrophobicity (E) of *SmTTF59* protein

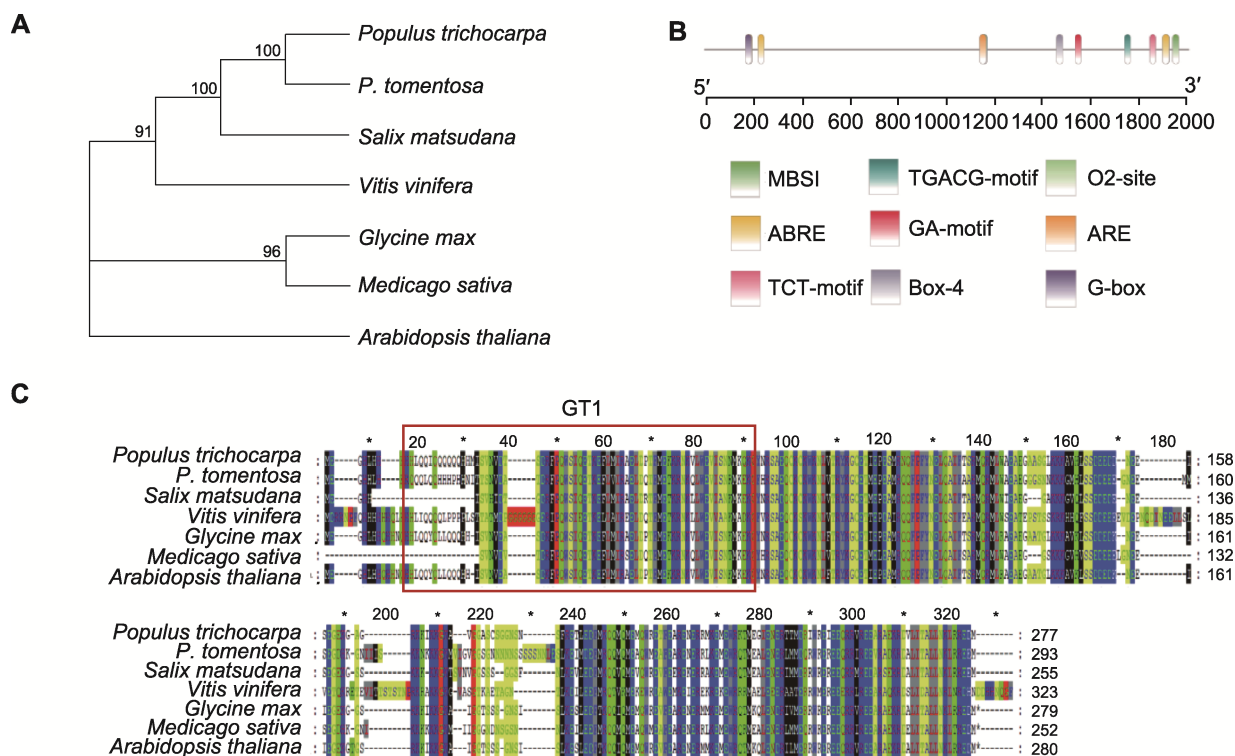


图2 基于TTF59氨基酸序列相似性构建的系统进化树(A)、TTF59启动子区顺式作用元件可视化分析(B)及TTF59蛋白同源序列比对(C)

Figure 2 Phylogenetic tree construction based on TTF59 sequence similarity (A), TTF59 promoter *cis*-element visualization analysis (B), and TTF59 protein homologous sequence comparison (C)

(Liu et al., 2020)、葡萄(卢世雄等, 2019)、苜蓿(*Medicago sativa*) (项继红等, 2020)和拟南芥(Wang et al., 2014)的Trihelix家族基因在响应非生物胁迫中行使重要功能。因此, 我们推测*SmTTF59*基因编码蛋白在功能上与其它物种的TTF59蛋白相似。

对*SmTTF59*基因启动子进行预测, 并且对相关顺式作用元件进行分析, 结果表明*SmTTF59*基因启动子中存在MeJA响应元件和脱落酸响应元件, 并且发现多个光响应元件、缺氧响应元件和醇溶蛋白代谢响应元件等(图2B), 推测*TTF59*基因有助于植物响应淹水胁迫, 降低光合作用减少能量消耗, 从而适应淹水缺氧环境。

2.2 转基因拟南芥在低氧胁迫下的表型和生理指标

通过PCR扩增获得834 bp特异性条带, 经菌落PCR及测序验证确认目的片段正确插入, 成功构建pWM-101-*SmTTF59*过表达载体(附图2A)。低氧胁迫处理

后恢复生长7天的表型观察显示, 野生型拟南芥(WT)出现严重的生长受抑制, 而*SmTTF59*过表达株系(*SmTTF59*-OE)维持正常表型(图3A)。进一步定量分析表明, 在有氧条件下, WT与OE株系的根长及鲜重无显著差异(图3B, C); 而在低氧胁迫后, OE株系根长较WT增加170%, 鲜重较WT提高87% (图3D, E)。生理指标测定显示, OE株系在低氧胁迫下过氧化物酶(peroxidase, POD)活性较WT升高110%, 过氧化氢酶(catalase, CAT)活性较WT显著提升2 300% (图3F, G)。上述结果表明, *SmTTF59*过表达通过增强抗氧化酶系统清除活性氧(ROS)的能力, 显著提升拟南芥的低氧耐受性, 间接支持该基因在旱柳淹水胁迫响应中的正向调控作用。

2.3 旱柳*SmTTF59*基因沉默降低柳树的耐淹能力

通过PCR扩增获得224 bp特异性条带, 经菌落PCR及测序验证确认目的片段正确插入, 成功构建pYL-

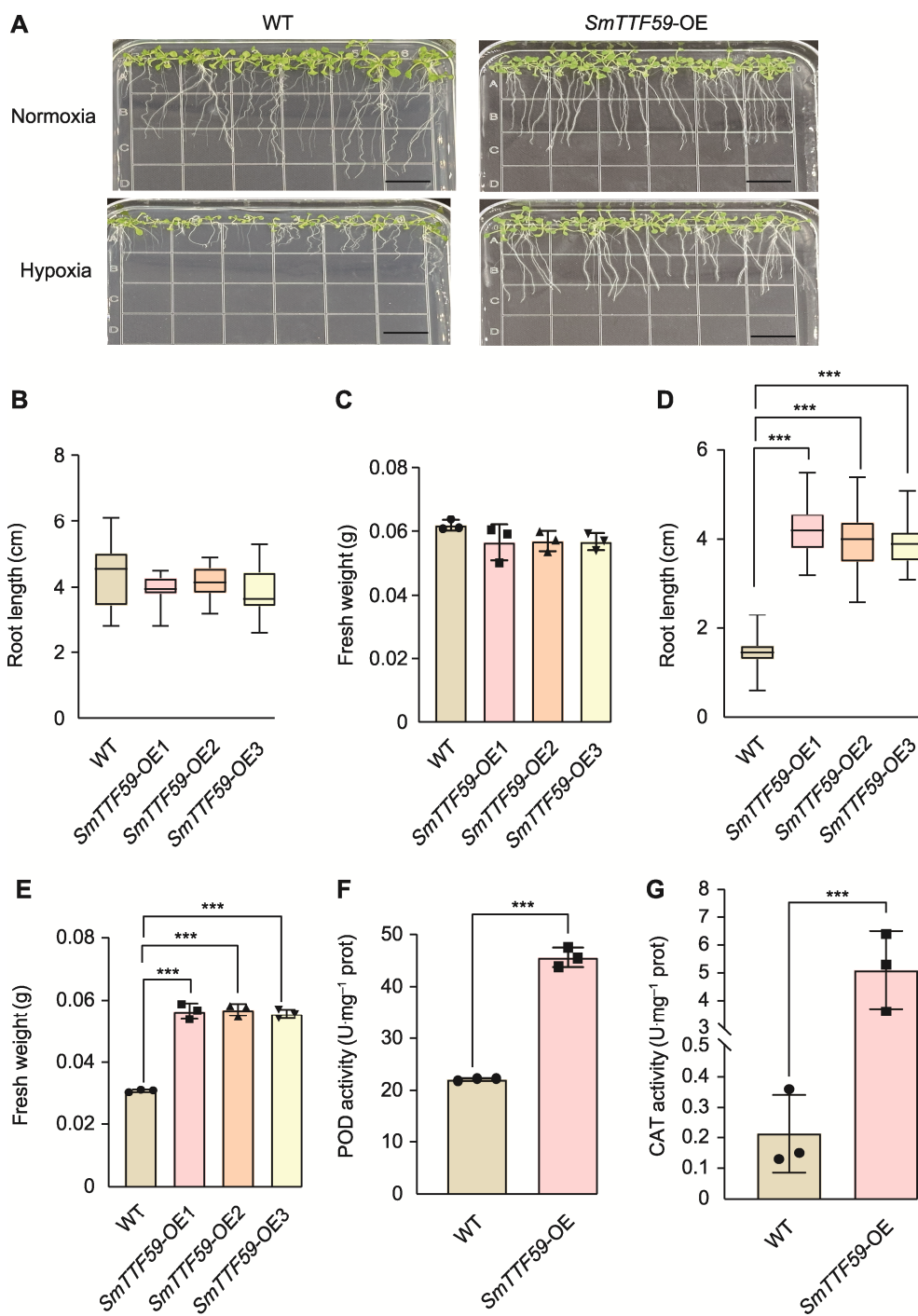


图3 正常氧和低氧条件下, 野生型(WT)和*SmTTF59*转基因拟南芥的表型、生理指标以及表型指标比较 (A) 表型(bars=1 cm); (B) 正常氧条件下的根长; (C) 正常氧条件下的鲜重; (D) 低氧条件下的根长; (E) 低氧条件下的鲜重; (F) 过氧化物酶(POD)活性; (G) 过氧化氢酶(CAT)活性。使用Student's *t*-test进行差异显著性分析(***P*<0.001)。

Figure 3 Comparisons of phenotype, physiological and phenotypic indices between wild type (WT) and *SmTTF59* transgenic *Arabidopsis thaliana* under normoxic and hypoxic conditions

(A) Phenotype (bars=1 cm); (B) Root length under normoxic conditions; (C) Fresh weight under normoxic conditions; (D) Root length under hypoxic conditions; (E) Fresh weight under hypoxic conditions; (F) Peroxidase (POD) activity; (G) Catalase (CAT) activity. Significant differences analysis using Student's *t*-test (***P*<0.001).

156-*SmTTF59* VIGS载体(附图2B)。通过农杆菌介导的VIGS技术,以*SmPDS*基因沉默为VIGS实验流程对照,分别获得 pTRV2 (空载体对照)与 pTRV2-*SmTTF59* (基因沉默)早柳株系。接种2周后,可见*SmPDS*基因沉默株系出现白化表型(附图3)。qRT-PCR 分析显示, pTRV2-*SmTTF59* 组中*SmTTF59*基因表达量较对照组显著降低30%,表明基因沉默效率达70% (图4A)。进一步对2组植株进行

淹水处理(淹没植株顶端), qRT-PCR检测发现,沉默组*SmTTF59*表达量仅为对照组的3.3%,证实该基因的表达在胁迫条件下仍持续受抑制(图4B)。

黑暗淹水处理(7天)后,表型分析显示沉默组植株叶片脱落较为严重,且根冠部出现大面积褐化腐烂,而对照组植株维持正常生长状态(图4C)。沉默组根鲜重较对照组降低47.5%,根干重较对照组下降42.0% (图4D, E); 沉默组叶片相对电导率较对照组

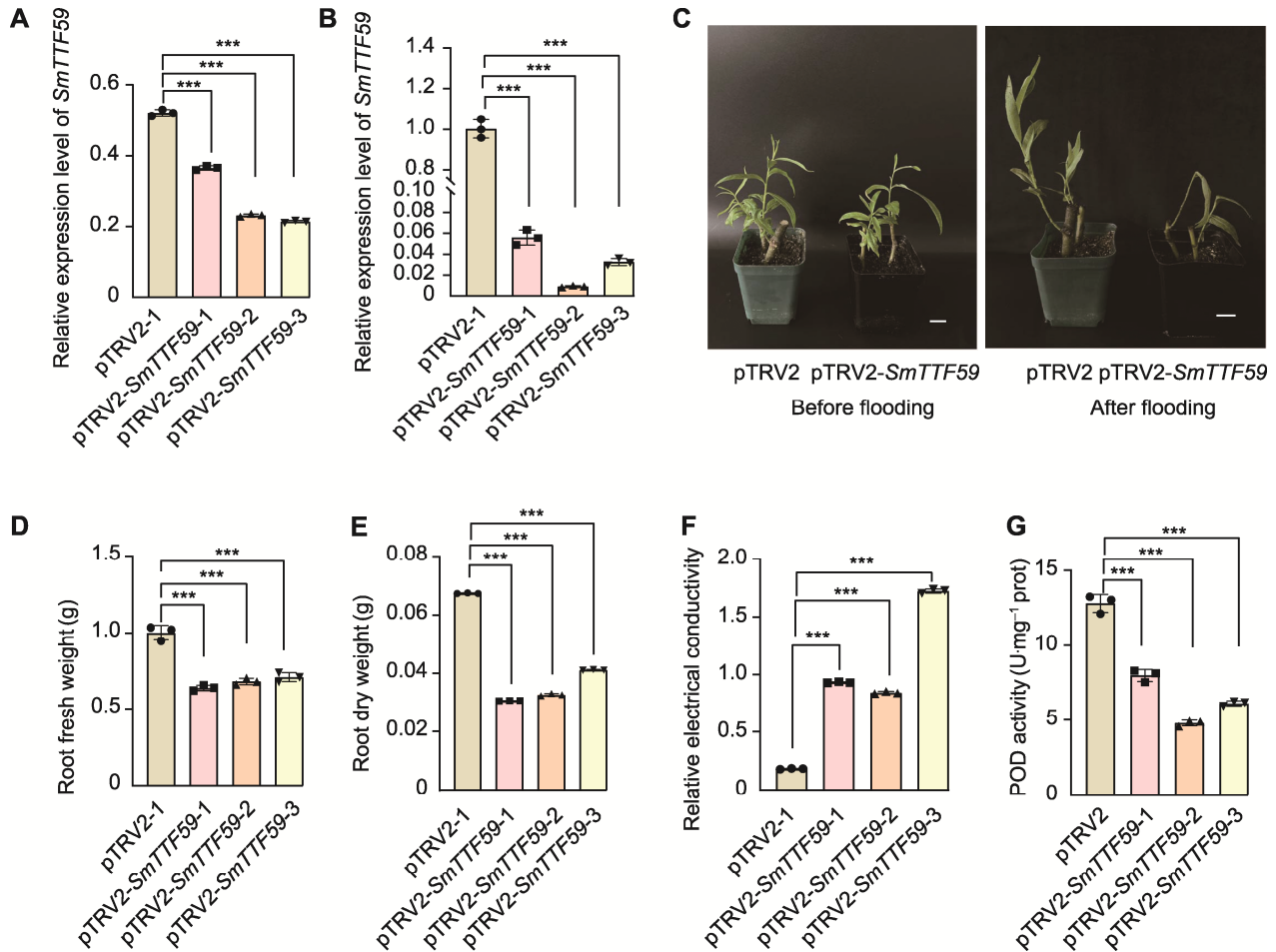


图4 *SmTTF59*沉默效率检测以及实验组和对照组淹水前后的表型/生理指标比较 (A) *SmTTF59*敲降后淹水0小时的相对表达量; (B) *SmTTF59*敲降后淹水24小时的相对表达量; (C) 淹水前后表型差异(bars=1 cm); (D) 淹水处理后根鲜重; (E) 淹水处理后根干重; (F) 淹水处理后相对电导率; (G) 淹水处理后过氧化物酶(POD)活性。差异显著性分析使用Student's *t*-test (***) $P < 0.001$ 。

Figure 4 Silencing efficiency analysis of *SmTTF59* and phenotypic/physiological comparisons between experimental and control groups pre- and post-flooding treatments

(A) Relative expression level of *SmTTF59* knockdown at 0 h post-flooding; (B) Relative expression level of *SmTTF59* knockdown at 24 h post-flooding; (C) Phenotypic differences between pre- and post-flooding (bars=1 cm); (D) Root fresh weight after flooding treatment; (E) Root dry weight after flooding treatment; (F) Relative electrical conductivity after flooding treatment; (G) Peroxidase (POD) activity after flooding treatment. Significant difference analysis using Student's *t*-test (***) $P < 0.001$.

升高845%, 表明受到严重的膜脂过氧化损伤(图4F); 沉默组过氧化物酶(POD)活性较对照组下降60.0%, 表明ROS清除能力受损(图4G)。上述结果表明, *SmTTF59*基因在柳树响应淹水胁迫中发挥重要作用。

3 讨论

*Trihelix*家族基因在植物生长发育的不同阶段, 以及在应对各种非生物胁迫(如盐、干旱、高温和冷胁迫)中扮演重要角色。在拟南芥中, *Trihelix*家族基因有30个成员, 在响应非生物胁迫中具有重要作用(周宏等, 2017)。目前, 已经在烟草(*Nicotiana tabacum*)中鉴定出多个*Trihelix*转录因子, *GT1*家族的*NtBF2*基因在光反应中发挥调控作用, 在ABA、高盐、低温及PEG处理下, 烟草*Trihelix*转录因子*GT-2*家族基因*NtGT-2*均有不同程度的响应(赵利杰等, 2020; 李栋成等, 2022)。从小麦(*Triticum aestivum*)基因组中鉴定出94个*Trihelix*家族基因, 分为*GT-1*、*GT-2*、*SIP1*、*SH4*和*GTy*共5个亚家族, 其中*TaGT-42*等10个*Trihelix*基因普遍在响应非生物胁迫中发挥作用(肖杰, 2020)。在玉米(*Zea mays*)中鉴定出46个*Trihelix*家族成员, 大多数*ZmTHXs*基因在干旱处理下表达水平发生显著变化, 表明它们参与干旱胁迫响应(Cao et al., 2024)。

毛白杨*Trihelix*家族基因*PtoGT55*被鉴定为抗盐基因, 研究显示该基因通过MAPK信号通路介导, 在盐胁迫响应中发挥重要作用, 且*PtoGT55*可能通过正向调控早期盐胁迫信号转导基因的转录来增强植物的盐胁迫抗性(李孝红, 2021)。在毛竹中鉴定到2个响应非生物胁迫的*Trihelix*家族转录因子基因*PheGT8*和*PheGT16*, 分析上游启动子序列, 发现二者均含有多个非生物胁迫响应元件(如干旱响应元件和高温诱导元件), 还包括一些激素相关元件(高红艳, 2019)。此外, 在菘蓝(*Isatis tinctoria*) *Trihelix*家族基因启动子区域发现了许多与干旱、低温和激素胁迫有关的其它顺式作用元件(王震和马伟, 2023)。我们在*SmTTF59*基因的启动子序列中发现了与缺氧响应相关的元件(ARE), 这表明*SmTTF59*基因可能参与调控柳树淹水胁迫响应。

我们发现的*Trihelix*家族基因*SmTTF59*在响应淹水胁迫中也是一个正调控因子, 但是其调控机制仍不

清楚。我们通过对柳树耐淹品种和淹水敏感品种转录组中*Trihelix*家族转录因子的表达量进行分析, 发现*SmTTF59*基因在淹水胁迫后表达变化较为明显, 与未淹水相比, 淹水4小时其表达量显著提高(Yang et al., 2023), 这与蒙古栎(*Quercus mongolica*)中的研究结果相一致。在光胁迫以及淹水胁迫条件下, 有多个*Trihelix*家族基因的表达量发生显著变化, 表明其发挥重要调控作用(孟鑫等, 2023)。通过对不同物种*TTF59*同源蛋白的多重序列比对, 我们发现*SmTTF59*蛋白与其它6个物种的*TTF59*蛋白具有显著的序列相似性, 证实*TTF59*是一个较为保守的基因, 同时推测*SmTTF59*在非生物胁迫响应中发挥作用。淹水胁迫与缺氧胁迫之间存在密切联系, 淹水胁迫导致土壤中的含氧量急剧降低, 从而造成植株缺氧。在拟南芥中进行缺氧胁迫处理, 可以精准验证*SmTTF59*基因在缺氧环境中的功能, 但通过基因敲降后柳树的淹水处理, 更接近于自然环境, 可以观察*SmTTF59*基因敲降植株在复杂环境中的具体表现。

*SmTTF59*转基因拟南芥的缺氧胁迫实验结果进一步验证了我们的推测。在正常条件下, 转基因拟南芥与野生型表型无明显差异。低氧胁迫处理后, *SmTTF59*过表达拟南芥相较于野生型表现出显著的对低氧胁迫的耐受性, 表明*SmTTF59*可能通过增强活性氧清除能力调控植物低氧适应性。基于此, 本研究进一步通过VIGS技术构建*SmTTF59*敲降旱柳植株, 深入探究其耐淹机制。结果表明, *SmTTF59*通过正向调控活性氧代谢与细胞膜完整性维持, 在柳树淹水胁迫应答中发挥核心作用, 其功能缺失将直接导致耐淹能力衰退。

挖掘柳树耐淹关键基因并解析其功能机制, 是创制抗逆种质、修复湿地生态系统的基础。本研究通过*SmTTF59*转基因拟南芥的缺氧胁迫实验, 证实了*SmTTF59*转基因拟南芥在缺氧条件下比野生型(WT)具有更强的适应性, 表明*SmTTF59*基因在淹水缺氧环境中发挥重要作用。本研究以淹水胁迫为切入点, 对*Trihelix*家族基因功能进行验证。随后, 我们通过VIGS实验在柳树中沉默该基因, 发现柳树的耐淹能力明显降低, 进一步证实*SmTTF59*在柳树淹水胁迫应答中行使重要功能。因此表明*TTF59*基因是参与柳树响应淹水胁迫的调控基因, 验证了本课题组前期关

于柳树Trihelix家族基因功能的推测(Yang et al., 2023)。然而,关于TTF59基因在柳树响应淹水胁迫中的具体作用机制及相关调控网络仍有待深入研究。

4 结论

SmTTF59为旱柳Trihelix转录因子家族成员,其编码基因启动子区含有缺氧响应相关元件。SmTTF59为旱柳响应淹水和缺氧胁迫调控网络中的正调控基因,通过减缓氧化胁迫损伤等机制增强植物对淹水和缺氧胁迫的抵抗力。

作者贡献声明

邓明超:构思设计实验,完成实验,分析数据,撰写论文初稿,修改论文;钱超楠、李梦茹和徐孙然:管理材料,协助分析数据;陈艳红和张健:提供实验设备和技术支持。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突

Conflict of Interests: The authors declare that there is no conflict of interests

©The author(s) 2026. This is an open access article under the CC BY-NC-ND 4.0 license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

参考文献

- Bu HF, Gu ZH, Zhang WD, Liu HR (2024). Genome-wide identification and expression analysis of FT gene family in floral transition regulation of peach. *Agric Technol* **44**, 35–39. (in Chinese)
- 步洪凤, 顾振华, 张文斗, 刘皓然 (2024). 桃花花期调控FT基因家族分析研究. *农业与技术* **44**, 35–39.
- Cao YY, Cheng ZQ, Sun XY, Zhu MC, Yue L, Liu H, Wu XL, Zhang JH, Duan CX (2024). Genome-wide identification of the Trihelix transcription factor family and functional analysis of *ZmTHX15* in maize. *Int J Mol Sci* **25**, 13257.
- Chen YH, Deng MC, Huang QH, Liu GY, Zhang J (2025). SmDREB A1-10 is required for SmTTF30-mediated hypoxia stress tolerance in *Salix matsudana*. *Plant Cell Environ* **48**, 4415–4429.
- Cheng XR, Xiong R, Yan HW, Gao YM, Liu HL, Wu M, Xiang Y (2019). The Trihelix family of transcription factors: functional and evolutionary analysis in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*). *BMC Plant Biol* **19**, 154.
- Du MY, Ma JZ, Duo JC, Luo TR, Xiong HY, Chen YT, Duan RJ (2024). Identification of GPAT gene family members in *Salsola abrotanoides* and their expression analysis under drought stress. *J Plant Genet Resour* **25**, 1781–1792. (in Chinese)
- 杜明阳, 马健芝, 多杰措, 罗天蓉, 熊辉岩, 陈亦婷, 段瑞君 (2024). 蒿叶猪毛菜GPAT基因家族成员鉴定及其在干旱胁迫下的表达模式分析. *植物遗传资源学报* **25**, 1781–1792.
- Du ZY, Li MY, Chen J, Huang J (2024). Research advances in plant stress associated protein functions. *Chin Bull Bot* **59**, 110–121. (in Chinese with English abstract)
- 杜志焯, 李明玉, 陈稷, 黄进 (2024). 植物胁迫相关蛋白功能研究进展. *植物学报* **59**, 110–121.
- Gao HY (2019). Genome-wide Analysis of Trihelix Family in *Phyllostachys edulis* and Functional Identification of *PheGT8* and *PheGT16*. Master's thesis. Beijing: Chinese Academy of Forestry. pp. 20. (in Chinese)
- 高红艳 (2019). 毛竹三螺旋家族全基因组分析及*PheGT8*和*PheGT16*的功能研究. 硕士学位论文. 北京: 中国林业科学研究院. pp. 20.
- Huang QH, Tian BW, Hua X, Zhou XT, Jiang ZH, Chen YH, Zhang J (2025). Research progress of AP2/ERF transcription factor family in response to abiotic stress in woody plants. *J Nantong Univ (Nat Sci Ed)* **24**, 74–84. (in Chinese)
- 黄倩慧, 田博雯, 华炫, 周欣彤, 江梓涵, 陈艳红, 张健 (2025). AP2/ERF转录因子家族响应木本植物非生物胁迫的研究进展. *南通大学学报(自然科学版)* **24**, 74–84.
- Li DC, Li KY, Wei XQ, Duan LL, Mo ZJ, Liu RX (2022). Identification and expression analysis of Trihelix transcription factor family in tobacco. *Subtrop Plant Sci* **51**, 1–12. (in Chinese)
- 李栋成, 李魁印, 韦兴启, 段丽丽, 莫泽君, 刘仁祥 (2022). 烟草Trihelix转录因子家族鉴定及表达分析. *亚热带植物科学* **51**, 1–12.
- Li H (2014). Review on effects of waterlogging stress on plant physiological properties. *J Anhui Agric Sci* **42**, 3802–3804. (in Chinese)
- 李航 (2014). 植物淹水胁迫对各生理特性的影响概述. *安徽农业科学* **42**, 3802–3804.
- Li QY, Liu C, He L, Peng S, Ma JY, Hu ZY, Liu HB (2025). Cloning and functional analysis of the *BnaA02.CPSF6*

- gene from *Brassica napus*. *Chin Bull Bot* **60**, 62–73. (in Chinese with English abstract)
- 李青洋, 刘翠, 何李, 彭姗, 马嘉吟, 胡子祎, 刘宏波 (2025). 甘蓝型油菜 *BnaA02.CPSF6* 基因的克隆及功能分析. *植物学报* **60**, 62–73.
- Li XH (2021). Functional Characterization of *PtoGT55* in Regulating Salt Tolerance of *Populus tomentosa*. Master's thesis. Chongqing: Southwest University. pp. 16–17. (in Chinese)
- 李孝红 (2021). *PtoGT55* 在毛白杨盐胁迫响应中的功能分析. 硕士学位论文. 重庆: 西南大学. pp. 16–17.
- Liu W, Zhang YW, Li W, Lin YH, Wang CJ, Xu R, Zhang LF (2020). Genome-wide characterization and expression analysis of soybean Trihelix gene family. *PeerJ* **8**, e8753.
- Lu SX, Wang P, He HH, Liang GP, Ma ZH, Qiao YL, Wu YX, Chen BH, Mao J (2019). Bioinformatics identification and expression analysis of grape Trihelix transcription factor family. *Acta Horti Sin* **46**, 1257–1269. (in Chinese)
- 卢世雄, 王萍, 何红红, 梁国平, 马宗桓, 乔亚丽, 吴玉霞, 陈佰鸿, 毛娟 (2019). 葡萄Trihelix转录因子家族生物信息及其基因表达分析. *园艺学报* **46**, 1257–1269.
- Mathew IE, Rhein HS, Green AJ, Hirschi KD (2023). Generating reproducing anoxia conditions for plant phenotyping. *Bio Protocol* **13**, e4603.
- Meng X, Wang SJ, Jiang M, Li HY, Wang JM, Yang MS (2023). Identification and expression analysis of Trihelix transcription factor family in *Quercus mongolica*. *J Plant Genet Resour* **24**, 1448–1460. (in Chinese)
- 孟鑫, 王世杰, 江敏, 李红燕, 王进茂, 杨敏生 (2023). 蒙古栎Trihelix转录因子家族鉴定与表达分析. *植物遗传资源学报* **24**, 1448–1460.
- Mozo I, Rodríguez ME, Monteoliva S, Luquez VMC (2021). Floodwater depth causes different physiological responses during post-flooding in willows. *Front Plant Sci* **12**, 575090.
- Ning XM, Sun JJ, Feng SY, Li TJ, Ren ZC, Li RH (2022). Genome identification and disease-resistant expression pattern analysis of Trihelix family of *Betula platyphylla*. *Acta Bot Boreal-Occident Sin* **42**, 920–929. (in Chinese)
- 宁小萌, 孙晶晶, 冯思雨, 李天骄, 任占辰, 李然红 (2022). 白桦Trihelix家族全基因组鉴定及抗病表达模式分析. *西北植物学报* **42**, 920–929.
- Qiu LP, Chao RQ, Liang JJ, Wen PF, Zhang PF (2024). Expression and vector construction of *ZjPG* gene in *Ziziphus jujuba* Mill. *J South Agric J* **55**, 1682–1691. (in Chinese)
- 仇力平, 晁瑞强, 梁晋军, 温鹏飞, 张鹏飞 (2024). 枣 *ZjPG* 基因表达分析及载体构建. *南方农业学报* **55**, 1682–1691.
- Wang XH, Li QT, Chen HW, Zhang WK, Ma B, Chen SY, Zhang JS (2014). Trihelix transcription factor GT-4 mediates salt tolerance via interaction with TEM2 in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol* **14**, 339.
- Wang XY, Wei LJ, Wang XM, Tang L, Qiao ZQ, Pan ZX (2024). Effects of flooding stress on growth and physiology characteristics of *Lagerstroemia indica* L. seedlings. *North Hortic* (15), 60–66. (in Chinese)
- 王湘莹, 魏溧姣, 王晓明, 唐丽, 乔中全, 潘子曦 (2024). 淹水胁迫对紫薇苗生长及生理特性的影响. *北方园艺* (15), 60–66.
- Wang Z, Ma W (2023). Genome-wide identification of the Trihelix gene family and abiotic expression pattern analysis in *Isatis indigotica* Fort. of traditional Chinese medicine satidis radix and isatidis folium. *China J Tradit Chin Med Pharm* **38**, 2109–2115. (in Chinese)
- 王震, 马伟 (2023). 中药大青叶、板蓝根基原植物菘蓝 Trihelix 基因家族鉴定及非生物胁迫下表达模式分析. *中华中医药杂志* **38**, 2109–2115.
- Wang ZC, Liu QG, Wang HZ, Zhang HZ, Xu XM, Li CH, Yang CP (2016). Comprehensive analysis of Trihelix genes and their expression under biotic and abiotic stresses in *Populus trichocarpa*. *Sci Rep* **6**, 36274.
- Wu YN, Hu HJ, E Y (2015). Research progress on water-logging resistance in crop. *Guizhou Agric Sci* **43**, 68–71, 82. (in Chinese)
- 吴亚男, 胡海军, 鄂洋 (2015). 作物耐涝机理的研究进展. *贵州农业科学* **43**, 68–71, 82.
- Xiang JH, Song TT, Yuan YY, Sun X, Yu JQ, Li JW, Cui GW (2020). Bioinformatics and expression analysis of *MsGT6* in *Medicago sativa* L. under stress. *Mol Plant Breed* **18**, 7742–7750. (in Chinese)
- 项继红, 宋婷婷, 袁玉莹, 孙雪, 喻金秋, 李佳玮, 崔国文 (2020). 紫花苜蓿 *MsGT6* 的生物信息学及其逆境胁迫下表达分析. *分子植物育种* **18**, 7742–7750.
- Xiao J (2020). Genome-wide Identification and Expression Profiling of Wheat *Trihelix* Gene Family and Functional Analysis of *TaGT-75*. PhD dissertation. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology. pp. 53. (in Chinese)
- 肖杰 (2020). 小麦 *Trihelix* 基因家族鉴定、表达分析及 *TaGT-75* 基因的功能研究. 博士学位论文. 武汉: 华中科技大学. pp. 53.

- Yang J, Du YW, Li YX, Dai YH, Liu GY, Chen YH, Zhang J** (2022). Effects of submergence stress on the phenotype and physiological indexes of the cuttings from 13 arbor willow varieties. *J Northwest For Univ* **37**, 95–104. (in Chinese)
- 杨杰, 杜雅雯, 李懿鑫, 戴远浩, 刘国元, 陈艳红, 张健 (2022). 淹水对13种乔木柳插条表型和生理指标的影响. 西北林学院学报 **37**, 95–104.
- Yang J, Tang ZX, Yang WY, Huang QH, Wang YQ, Huang MF, Wei H, Liu GY, Lian BL, Chen YH, Zhang J** (2023). Genome-wide characterization and identification of Trihelix transcription factors and expression profiling in response to abiotic stresses in Chinese Willow (*Salix matsudana* Koidz). *Front Plant Sci* **14**, 1125519.
- Yang ZM, Peng XY, Huang X, Jiao RY, Li W, Guan CN, Zhou ML, Yan ML, Xiao L** (2025). Cloning of the *FtAPDSLX1* gene in Tartary buckwheat and analysis of its anti-*Rhizoctonia solani* function. *J Plant Genet Resour* **26**, 342–355. (in Chinese)
- 杨智敏, 彭晓杨, 黄旭, 焦茹玉, 李伟, 关超男, 周美亮, 严明理, 肖璐 (2025). 苦荞基因 *FtAPDSLX1* 的克隆及其抗立枯病功能分析. 植物遗传资源学报 **26**, 342–355.
- Yu B, Chen MD, Wang YG** (2019). Advances of plant Trihelix transcription factor family interacting with environmental factors. *J Plant Genet Resour* **20**, 1134–1140. (in Chinese)
- 于冰, 陈孟迪, 王宇光 (2019). 植物三螺旋Trihelix转录因子家族与环境相互作用的研究进展. 植物遗传资源学报 **20**, 1134–1140.
- Yu T, Zhang WM** (2020). Effects of 6-benzylaminopurine (6-BA) on endogenous hormone balance in Xiangyun seedlings under waterlogging stress. *South China Agric* **14**, 124–125. (in Chinese)
- 余婷, 张望梅 (2020). 6-苄基腺嘌呤对香云幼苗淹水胁迫下内源激素平衡的影响. 南方农业 **14**, 124–125.
- Yuan F, Liao ZR, Zhang L, Chen YX** (2015). Bioinformatic analysis of the structure and function of FadD3 from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Pathog Biol* **10**, 406–409, 413. (in Chinese)
- 袁方, 廖泽容, 张璐, 陈元晓 (2015). 结核分枝杆菌 FadD3结构与功能的生物信息学分析. 中国病原生物学杂志 **10**, 406–409, 413.
- Zhang RM, Wu FZ** (2024). Cloning and functional analysis of bog bilberry E3 ligase *VuARI2* gene in cold resistance. *Acta Bot Boreal-Occident Sin* **44**, 1420–1432. (in Chinese)
- 张润梅, 乌凤章 (2024). 笃斯越橘E3连接酶基因 *VuARI2* 的克隆及其抗寒功能分析. 西北植物学报 **44**, 1420–1432.
- Zhang YJ, Sang HT, Wang HQ, Shi ZZ, Li L, Wang X, Sun K, Zhang J, Feng HQ** (2024). Research progress of plant signaling in systemic responses to abiotic stresses. *Chin Bull Bot* **59**, 122–133. (in Chinese with English abstract)
- 张悦婧, 桑鹤天, 王涵琦, 石珍珍, 李丽, 王馨, 孙坤, 张继, 冯汉青 (2024). 植物对非生物胁迫系统性反应中信号传递的研究进展. 植物学报 **59**, 122–133.
- Zhao LJ, Zheng M, Wang Z, Xie XD, Luo CP, Li HG, Wu MZ** (2020). Cloning and expression of *NtGT-2* gene from *Nicotiana tabacum*. *Tob Sci Technol* **53**, 1–8. (in Chinese)
- 赵利杰, 郑美, 王中, 谢小东, 罗朝鹏, 李宏光, 武明珠 (2020). 烟草 *NtGT-2* 基因的克隆及表达分析. 烟草科技 **53**, 1–8.
- Zhao YL, Wang Q, Peng WY, He XT, Wang Y, Wang YP, Lei XJ** (2024). Identification and expression pattern analysis of Trihelix transcription factor family genes of ginseng. *Chin J Chin Mater Med* **49**, 3758–3768. (in Chinese)
- 赵昱琳, 王琪, 彭文月, 何旭彤, 王源, 王英平, 雷秀娟 (2024). 人参Trihelix转录因子家族基因鉴定与表达模式分析. 中国中药杂志 **49**, 3758–3768.
- Zheng LZ** (2023). Research progress on drought resistance mechanisms and drought-tolerant varieties of willow. *Anhui Agric Sci Bull* **29**, 79–81, 118. (in Chinese)
- 郑凌泽 (2023). 柳树耐旱机制及耐旱品种研究进展. 安徽农学通报 **29**, 79–81, 118.
- Zhou H, Qian J, Li RF, Chen DD, Fang RJ, Zhao WG** (2017). Research of the *Arabidopsis* Trihelix transcription factor gene family. *J Jiangsu Univ Sci Technol (Nat Sci Edn)* **31**, 231–236, 258. (in Chinese)
- 周宏, 钱娇, 李荣芳, 陈丹丹, 方荣俊, 赵卫国 (2017). 拟南芥Trihelix转录因子基因家族研究. 江苏科技大学学报(自然科学版) **31**, 231–236, 258.

Functional Study of the *SmTTF59* Gene in *Salix matsudana* in Response to Flooding Stress

Mingchao Deng^{1,2}, Chaonan Qian^{1,2}, Mengru Li^{1,2}, Sunran Xu^{1,2}, Yanhong Chen^{1,2*}, Jian Zhang^{1,2*}

¹School of Life Sciences, Nantong University, Nantong 226019, China

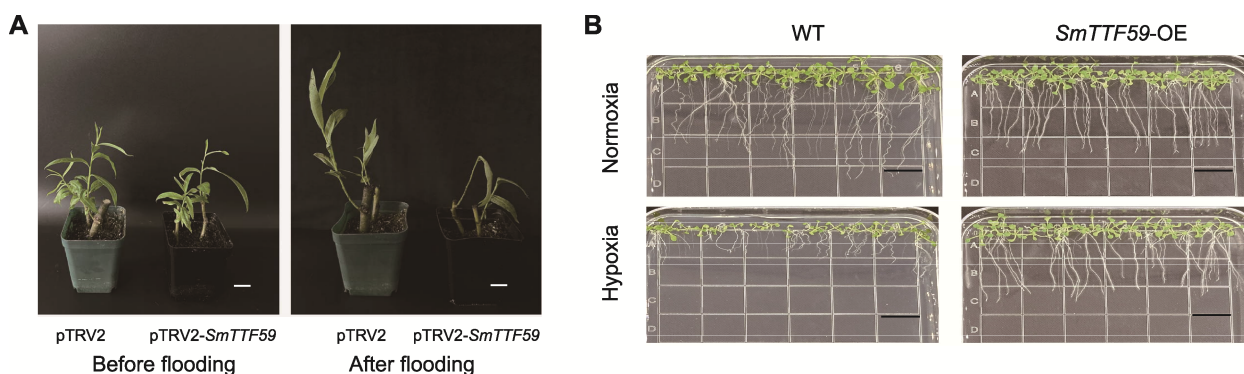
²Nantong Key Laboratory of Ornamental Plant Genetics and Breeding, Nantong 226019, China

INTRODUCTION: Submergence tolerance is one of the most crucial stress resistances among garden plants. Willow is a model plant that has strong tolerance to submergence. The objective of this study is to clone the TTF family gene *SmTTF59* of willow and construct overexpression and silencing vectors in order to explore its role in responding to submergence stress in willow.

RATIONALE: Studies demonstrated that TTF family transcription factors play critical regulatory roles in plant responses to abiotic stresses. *Salix matsudana*, a species with strong submergence tolerance, serves as an ideal model for investigating submergence stress adaptation mechanisms. By silencing *SmTTF59* in *S. matsudana* and conducting hypoxia stress experiments on *SmTTF59*-transgenic *Arabidopsis*, this study provides theoretical foundations for understanding the complex regulatory mechanisms of Trihelix transcription factors and lays a groundwork for genetic breeding of submergence-tolerant *S. matsudana*.

RESULTS: The results showed that the coding sequence (CDS) of the *SmTTF59* gene in *S. matsudana* is 834 bp in length, encoding 277 amino acid residues with a predicted protein molecular weight of 33 kDa. Through PCR experiments, the 834 bp CDS of *SmTTF59* was successfully amplified and used to construct recombinant vectors pWM101 and pYL156. Hypoxic stress experiments on transgenic *Arabidopsis* plants demonstrated that *SmTTF59*-overexpressing lines exhibited enhanced hypoxia tolerance compared to wild-type plants, characterized by longer root lengths and higher fresh weights. Physiological analyses revealed higher levels of antioxidant enzymes, such as peroxidase (POD) and catalase (CAT), in transgenic lines. Virus-induced gene silencing (VIGS) experiments in willow plants further showed that *SmTTF59* knockdown lines displayed poorer growth under submergence stress compared to controls, including severe leaf decay and abscission. Quantitative measurements showed that silenced plants had lower root fresh weight, root dry weight, and POD activity, along with higher relative electrical conductivity, compared to control plants. These results collectively demonstrated that *SmTTF59* knockdown significantly reduces willow tolerance to submergence stress.

CONCLUSION: The better anoxic tolerance of *SmTTF59* transgenic *Arabidopsis* plants proved that this gene might be related to the response of willow to submergence stress. Through the VIGS experiment on willow, we verified that this gene plays a positive regulatory role in submergence. This study is of great significance for the subsequent breeding work of submergence-tolerant willow varieties.



Phenotypic differences between pre- and post-flooding (A) and phenotypic comparison between wild type (WT) and *SmTTF59* transgenic *Arabidopsis thaliana* (B) under normoxic and hypoxic conditions. Elucidated the function of the *SmTTF59* gene in response to submergence stress. Bars=1 cm

Key words *Salix matsudana*, *SmTTF59*, flooding stress, hypoxia stress, VIGS

Deng MC, Qian CN, Li MR, Xu SR, Chen YH, Zhang J (2026). Functional study of the *SmTTF59* gene in *Salix matsudana* in response to flooding stress. *Chin Bull Bot* **61**, 264–276.

* Authors for correspondence. E-mail: chenyh@ntu.edu.cn; yjnky@ntu.edu.cn

(责任编辑: 朱亚娜)

附图1 *SmTTF59*基因的PCR扩增结果

M: DL2000 DNA marker; 1, 2: PCR扩增产物

Appendix figure 1 PCR amplification results of *SmTTF59* gene

M: DL2000 DNA marker; 1, 2: PCR amplification products

附图2 *SmTTF59*过表达载体和沉默载体构建

(A) pWM101-*SmTTF59*菌落PCR (1–4: 菌落PCR产物); (B) pYL156-*SmTTF59*菌落PCR (1–4: 菌落PCR产物). M: DL2000 DNA marker

Appendix figure 2 *SmTTF59* overexpression vector and silencing vector construction

(A) pWM101-*SmTTF59* colony PCR (1–4: Colony PCR products); (B) pYL156-*SmTTF59* colony PCR (1–4: Colony PCR products). M: DL2000 DNA marker

附图3 *SmPDS*基因的白化表型

Appendix figure 3 Albino phenotype of the *SmPDS* gene

附表1 实验所用引物

Appendix table 1 Primers used in the study

<https://www.sciengine.com/CBB/doi/10.11983/CBB25042>



扫码看附录

通讯作者简介

陈艳红, 博士, 南通大学生命科学学院教授, 硕士生导师。主要从事园林植物抗逆分子调控机制与育种研究。以第一作者或通讯作者发表SCI收录期刊论文10余篇。

张健, 博士, 南通大学生命科学学院教授, 研究员, 硕士生导师。主要从事园林植物抗逆分子调控机制与育种研究。主持国家级自然科学研究项目2项, 江苏省自然科学研究项目3项。以第一作者或通讯作者发表SCI收录期刊论文40余篇。