

DOI:10.11686/cyxb2025207

http://cyxb.magtech.com.cn

魏明, 吴欣蕊, 吴璇, 等. 甜菜碱醛脱氢酶基因 *BvBADH2* 的克隆及在植物盐胁迫中的作用. 草业学报, 2026, 35(5): 185—195.

WEI Ming, WU Xin-rui, WU Xuan, *et al.* Cloning of the betaine aldehyde dehydrogenase family *BvBADH2* gene and its role in plant salt tolerance. Acta Prataculturae Sinica, 2026, 35(5): 185—195.

## 甜菜碱醛脱氢酶基因 *BvBADH2* 的克隆 及在植物盐胁迫中的作用

魏明\*, 吴欣蕊, 吴璇, 李昊, 伍国强, 张伟杰, 程子义

(兰州理工大学生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730050)

**摘要:**甜菜作为我国北方盐碱地改良的先锋作物,其关键耐盐基因的挖掘对作物遗传改良具有重要理论价值。研究显示,甜菜碱醛脱氢酶基因家族 *BvBADHs* 通过生物合成甘氨酸甜菜碱可能在甜菜盐胁迫中发挥作用。本研究以耐盐甜菜品种‘甘糖7号’为材料,克隆该家族 *BvBADH2* 基因,利用农杆菌介导法构建过表达拟南芥株系,系统验证和解析其耐盐调控机制。基因克隆及生物信息学分析显示:*BvBADH2* 编码序列(CDS)全长 1512 bp,编码 503 个氨基酸;预测蛋白相对分子量为 54.78 kDa,等电点(pI)为 5.37,不稳定指数为 31.62;含有保守的乙醛脱氢酶结构域(Aldedh, PF00171),且启动子区域具有多种非生物胁迫响应的顺式作用元件。转基因拟南芥盐胁迫表型鉴定发现,150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 胁迫下,过量表达株系 OE<sub>1</sub> 与 OE<sub>3</sub> 的根长、鲜重和叶绿素含量较野生型分别显著增加 129.1%、125.0%、104.8% 和 137.5%、126.3%、107.2% ( $P < 0.01$ )。进一步研究揭示,OE<sub>1</sub>/OE<sub>3</sub> 通过特异性积累甘氨酸甜菜碱、脯氨酸和可溶性糖等渗透相容性物质,有效维持细胞渗透势稳态;同时动态激活超氧化物歧化酶、过氧化物酶和过氧化氢酶活性,显著抑制活性氧积累和缓解膜脂过氧化损伤。上述结果表明,*BvBADH2* 通过“渗透—抗氧化协同调控网络”赋予植物耐盐性,首次在模式植物中验证其功能保守性,为作物耐盐分子设计育种提供了关键酶基因资源。

**关键词:**甜菜碱醛脱氢酶;盐胁迫;渗透调节;氧化损伤;抗氧化系统

## Cloning of the betaine aldehyde dehydrogenase family *BvBADH2* gene and its role in plant salt tolerance

WEI Ming\*, WU Xin-rui, WU Xuan, LI Hao, WU Guo-qiang, ZHANG Wei-jie, CHENG Zi-yi

School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China

**Abstract:** Sugar beet (*Beta vulgaris*) is used as a pioneer crop for saline-alkali soil remediation in northern China. In this context, there is significant theoretical value in investigating crop genetic improvement through the identification of key salt-tolerance genes. Studies have shown that the betaine aldehyde dehydrogenase gene family *BvBADHs* may play a role in beet salt stress through facilitating glycine betaine biosynthesis. In this study, *BvBADH2* was cloned from the salt-tolerant sugar beet cultivar ‘Gantang 7’ and *BvBADH2*-overexpressing *Arabidopsis thaliana* lines were generated by *Agrobacterium*-mediated transformation to systematically analyze and confirm its salt-tolerance mechanisms. Gene cloning and bioinformatics analysis showed that the full length of the *BvBADH2* coding sequence

收稿日期:2025-05-26;改回日期:2025-07-18

基金项目:国家自然科学基金项目(32360253,32160353),甘肃省科技专员专项(25CXGA066)和甘肃省高校产业支撑计划项目(2025CYZC-032)资助。

作者简介:魏明(1987—),男,甘肃兰州人,副教授,博士。E-mail: weim12@126.com

\* 通信作者 Corresponding author. E-mail: weim12@126.com

(CDS) is 1512 bp, encoding 503 amino acids. The relative molecular weight of the predicted protein is 54.78 kDa, the isoelectric point is 5.37, and the instability index is 31.62. It contains a conserved aldehyde dehydrogenase domain (Aldedh, PF00171), and the promoter region has a variety of abiotic stress-responsive *cis*-acting elements. In the salt-stress tolerant phenotype of transgenic *A. thaliana* under 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl stress, the root length, fresh weight and chlorophyll content of the higher expression transgenic lines OE<sub>1</sub> and OE<sub>3</sub> were significantly increased by 129.1%, 125.0%, 104.8% and 137.5%, 126.3%, 107.2%, respectively, compared with the wild type ( $P < 0.01$ ). Further studies revealed that *BvBADHs* overexpression of transgenic plants effectively maintained cell osmotic potential homeostasis by specifically accumulating osmotic protective substances such as glycine betaine, proline, and soluble sugar. Concurrently, dynamic activation of antioxidant enzyme systems—superoxide dismutase, peroxidase, and catalase—significantly reduced reactive oxygen species accumulation and alleviated membrane lipid peroxidation. These findings indicate that *BvBADH2* confers salt tolerance through an “osmotic-antioxidant synergistic regulatory network”, marking the first functional validation of this gene’s conservation in model plants. This study provides critical insight for the development of enzymatic gene resources aimed at enhancing crop salt tolerance through molecular design breeding.

**Key words:** betaine aldehyde dehydrogenase; salt stress; osmotic adjustment; oxidative damage; antioxidant system

盐胁迫是制约作物生长和产量形成的主要环境因子。据统计,全球超过13.81亿hm<sup>2</sup>土地受到盐渍化影响,占土地面积的10.7%,其中我国受影响面积近1亿hm<sup>2</sup>,是世界上土壤盐渍化最为严重的国家之一<sup>[1]</sup>。土壤中高浓度的Na<sup>+</sup>和Cl<sup>-</sup>降低了土壤渗透势,致使植物根系吸水困难;此外,盐胁迫引发植物离子毒害、氧化损伤,导致细胞合成与代谢紊乱、光合速率下降等,致使作物减产,甚至死亡<sup>[2]</sup>。为应对盐胁迫,植物进化出一系列的耐逆机制,包括离子转运系统、渗透调节、抗氧化系统和激素信号转导等<sup>[3]</sup>。其中,渗透调节通过积累渗透相容性溶质以维持细胞膨压与代谢稳态,是植物适应盐胁迫的关键策略<sup>[4-5]</sup>。

盐等非生物胁迫诱导植物合成的有机渗透相容物质主要有脯氨酸(proline, Pro)、甘氨酸甜菜碱(glycine betaine, GB)、可溶性糖(soluble sugar, SS)、可溶性蛋白(soluble protein, SP)和多元醇(polyhydric alcohols, Polyol)等<sup>[6]</sup>。GB是一种季胺型水溶性生物碱,因首先在甜菜(*Beta vulgaris*)糖蜜中被分离而得名<sup>[7-8]</sup>。研究表明,GB通过调节渗透压、保护酶活性、维持离子平衡及介导胁迫信号转导等功能机制增强植物耐盐性<sup>[9]</sup>。植物中的GB先由胆碱单加氧酶(choline monooxygenases, CMOs)将胆碱(choline)催化为甜菜碱醛(betaine aldehyde),再经甜菜碱醛脱氢酶(betaine aldehyde dehydrogenases, BADHs)氧化生成,其中BADHs是主要的限速酶,决定GB在细胞内的积累水平<sup>[8,10]</sup>。高等植物首先在菠菜(*Spinacia oleracea*)<sup>[11]</sup>中克隆到BADHs基因,随后在甜菜<sup>[12]</sup>、大麦(*Hordeum vulgare*)<sup>[13]</sup>、水稻(*Oryza sativa*)<sup>[14]</sup>、辽宁碱蓬(*Suaeda liaotungensis*)<sup>[15]</sup>等植物中鉴定或克隆到该基因家族。研究显示,BADHs具有潜在调控植物耐盐性的功能。例如,在马铃薯(*Solanum tuberosum*)中过表达四翅滨藜(*Atriplex canescens*) *AcBADH*后,转基因植株H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量降低、Pro增多,使氧化损伤减轻和促进了植物的耐盐性<sup>[16]</sup>。将嗜盐植物山菠菜(*Atriplex hortensis*)的*AhBADH*转入大豆(*Glycine max*)后可耐受300 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl胁迫<sup>[17]</sup>。值得注意的是,甜菜作为典型的嗜盐作物,其*BvBADHs*基因家族鉴定及在盐胁迫下的表达模式已被初步解析,但在盐胁迫中的功能验证及调控机制仍未探究<sup>[18-19]</sup>。相关研究,如盐胁迫下*BvWD40*的过表达揭示了其在离子平衡和脱落酸(abscisic acid, ABA)信号中的潜在作用,这为*BvBADHs*的功能解析提供了借鉴<sup>[20]</sup>。

甜菜是藜科(Chenopodiaceae)二年生草本植物,广泛栽培于我国北方干旱半干旱地区。作为我国第二大糖料作物,甜菜不仅是我国北方盐碱地改良的先锋作物,还在畜牧、化工、医药、食品加工等领域具有一定的经济价值<sup>[21-23]</sup>。甜菜强耐盐性源于复杂的遗传调控网络,而*BvBADHs*可能是该网络的重要组分。全基因组鉴定与盐胁迫表达模式分析揭示,*BvBADHs*基因家族包含9个成员,其中*BvBADH2*启动子区富集ABRE、TCA等胁迫响

应元件,并随盐处理浓度的升高转录水平显著增加<sup>[18]</sup>。基于此,本研究以耐盐甜菜品种“甘糖 7 号”为材料,克隆 *BvBADH2* 基因,通过农杆菌介导的异源过表达系统,在模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中系统验证其盐胁迫耐受性及调控机制,为作物耐盐分子育种提供关键酶基因资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本研究于 2025 年 5 月在兰州理工大学植物与微生物互作实验室完成。耐盐甜菜品种‘甘糖 7 号’由甘肃省武威三农种业有限公司惠赠。拟南芥野生型种子(Col-0)及所用质粒载体(pEarleyGate100, pEG100)均由本实验室保藏。基因组 DNA 纯化试剂盒(Takara, 9768)、RNA 提取试剂盒(Takara, 9769)、反转录试剂盒(Takara, RR055A)、PrimeSTAR<sup>®</sup>预混型高保真 DNA 聚合酶(Takara, R055A)、In-Fusion 同源重组酶(Takara, 638920)及 TB Green<sup>®</sup>荧光定量试剂盒(Takara, RR420A)等购于宝生物(TaKaRa)工程(大连)有限公司。在上海生工生物工程股份有限公司(<https://www.sangon.com/>)合成引物序列。GB、Pro、SS、MDA 含量及过氧化氢酶(catalase, CAT)、过氧化物酶(peroxidase, POD)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD) 3 个抗氧化酶的活性检测试剂盒购自上海酶联生物(mlbio)科技有限公司(<https://www.mlbio.cn/>)。植物过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)和超氧阴离子(O<sub>2</sub><sup>·-</sup>)组织染色检测试剂盒购自北京索莱宝(Solarbio)科技有限公司(<https://www.solarbio.cn/>)。

### 1.2 方法

**1.2.1 植物种植与培养** 2023 年 8 月,挑选籽粒饱满、形状大小一致的“甘糖 7 号”种子播种于用霍格兰营养液(成分:硝酸钾 2 mmol·L<sup>-1</sup>、硝酸钙 0.1 mmol·L<sup>-1</sup>、硫酸镁 0.25 mmol·L<sup>-1</sup>、磷酸二氢铵 0.5 mmol·L<sup>-1</sup>、乙二胺四乙酸二钠铁 0.5 mmol·L<sup>-1</sup>、硼酸 92 mmol·L<sup>-1</sup>、氯化锰 18 mmol·L<sup>-1</sup>、硫酸锌 1.6 mmol·L<sup>-1</sup>、硫酸铜 0.6 mmol·L<sup>-1</sup>和钼酸铵 0.7 mmol·L<sup>-1</sup>)湿润的蛭石中,生长环境为昼温 25 °C、夜温 20 °C,光/暗周期 16 h/8 h,相对湿度 65%,光强 200 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>。拟南芥种子用 70% 乙醇浸泡 5 min,5% 次氯酸钠(0.1% Triton X-100)振荡 5 min,无菌水冲洗 4~5 次。经消毒后的种子播种于 1/2 MS 固体培养基(成分:MS 基础盐 2.15 g·L<sup>-1</sup>、蔗糖 10 g·L<sup>-1</sup>和琼脂 10 g·L<sup>-1</sup>),置于 4 °C 冰箱暗处理 3 d,然后移至恒温培养箱光照培养,待长至 2~3 片真叶后移栽至土壤继续培养。拟南芥培养条件为昼温 22 °C、夜温 18 °C,光/暗周期 16 h/8 h,相对湿度 70%,光强 200 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>。

**1.2.2 *BvBADH2* 的克隆及过量表达载体构建** 基于李昊等<sup>[18]</sup>利用生信分析对甜菜 *BvBADHs* 家族成员的鉴定,并结合甜菜基因组数据库(<http://bvseq.boku.ac.at/index.shtml>)中的 *BvBADH2* (LOC104894203)模型,获取并下载其基因编码序列(coding sequences, CDS)。以该 CDS 全长为模板利用 Primer 5 软件设计并合成基因特异性引物 *BvBADH2* F<sub>1</sub>/R<sub>1</sub>(表 1)。使用植物 RNA 提取试剂盒提取 3 周龄大小甜菜幼苗总 RNA,采用 PrimeScript<sup>™</sup> 反转录试剂盒合成 cDNA。以 cDNA 为模板,利用适合重组反应的 *BvBADH2* F<sub>2</sub>/R<sub>2</sub>引物扩增目的基因。PCR 体系(20 μL): 2×PrimeSTAR LongSeq Premix 10 μL,引物各 1 μL(10 μmol·L<sup>-1</sup>),cDNA 模板 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 7 μL。PCR 反应程序:94 °C 1 min;98 °C 20 s,68 °C 30 s(35 个循环)。经 1% 琼脂糖凝胶电泳验证后,通过同源重组将目的片段克隆至 pEG100 载体(CaMV 35S 启动子驱动),转化 DH5α 后测序验证。

**1.2.3 拟南芥的遗传转化及转基因株系鉴定** 将测序鉴定正确的阳性克隆通过冻融法<sup>[24]</sup>转入根癌农杆菌 GV3101,经卡那霉素(Kan<sup>+</sup>)/利福平(Rif<sup>+</sup>)/庆大霉素(Gen<sup>+</sup>)抗性筛选后,挑选阳性克隆进行菌落 PCR 鉴定。选取鉴定正确的农杆菌扩繁至 OD<sub>600</sub> 为 0.8,采用花序浸泡法侵染 Col-0 背景的野生型拟南芥,具体参照 Zhang 等<sup>[25]</sup>的方法配制菌液、侵染花序、转化等,收获 T<sub>0</sub> 代植株种子。T<sub>1</sub> 代种子经消毒后点播到含 40 mg·L<sup>-1</sup> Basta 的 1/2 MS 固体培养基,经抗性筛选后将阳性幼苗移栽至营养土中继续生长。提取过量表达株系的莲座叶 DNA,使用定向特异性引物(35SPro F/*BvBADH2* R<sub>3</sub>)进行 PCR 鉴定。鉴定为阳性的 T<sub>1</sub> 代转基因植株连续培养获得纯合株系(T<sub>3</sub>)。

**1.2.4 *BvBADH2* 的定量表达分析** 利用 Primer 5 软件设计 *BvBADH2* 特异的 qRT-PCR 引物(*BvBADH2* qRT F/R)。采用 Trizol 法<sup>[26]</sup>提取转基因和野生型拟南芥的莲座叶总 RNA,反转录合成 cDNA。以拟南芥 *AtActin* 为内参基因,使用 TB Green<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> 试剂盒在 QuantStudio<sup>®</sup> 3 型实时荧光定量 PCR 系统

表1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Name of primer	序列 Sequence (5'-3')	用途 Purpose
<i>BvBADH2</i> F <sub>1</sub>	ATGGCGATCCCAATACCT	基因克隆
<i>BvBADH2</i> R <sub>1</sub>	CAGTTTTGAGGGAGACTTGTAC	Gene cloning
<i>BvBADH2</i> F <sub>2</sub>	gaggacacgctcgagATGGCGATCCCAATACCT	载体构建
<i>BvBADH2</i> R <sub>2</sub>	tttgaatccccgggCAGTTTTGAGGGAGACTTGTAC	Vector construction
<i>BvBADH2</i> qRT F	GTCTGTGTGTCAGCAAGGGA	实时定量 PCR
<i>BvBADH2</i> qRT R	GCATGGACGTGGAGACATCA	Quantitative real time PCR
<i>AtACTIN</i> qRT F	AGATCCAGGACAAGGAAGGTATTC	
<i>AtACTIN</i> qRT R	CGCAGGACCAAGTGAAGAGTAG	
35S Pro F	GACGCACAATCCCACTATCC	转基因植株鉴定
<i>BvBADH2</i> R <sub>3</sub>	CTCGTCATCGGAAGTAAATG	Identification of the transgene plants

表中小写字母序列为同源臂,专用于“一步克隆法”载体构建。The lowercase sequences in the Table are homology arms specifically designed for “one-step” cloning vector construction.

(Thermo Fisher, 美国)上检测 *BvBADH2* 在不同植株中的表达量。PCR 反应程序: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 10 s (40 个循环)。熔解曲线分析为: 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 95 °C 15 s。基因相对表达量的计算采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法<sup>[27]</sup>, 每个样本设置 3 次技术重复。

**1.2.5 盐胁迫与表型分析** 将大小、长势一致的 5 日龄过表达 (overexpression, OE) 和野生型 (wild type, WT) 株系无菌苗转移至含 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 的 1/2 MS 培养基平板, 胁迫处理约 10 d, 期间观察并比较各株型生长差异。土壤盐胁迫中, 取长势大小一致的 3 周龄土培植株进行盐梯度处理 (100~200 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, 每 48 h 递增 50 mmol·L<sup>-1</sup>), 200 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 维持约 7 d 后拍照、取样。每个处理设置 ≥20 株苗, 重复 3 次。

**1.2.6 形态指标测定** 1/2 MS 培养基平板盐胁迫处理表型较为明显时 (10 d), 随机选取 5 株幼苗, 用直尺和电子秤分别测量各株系的根长、鲜重。每个处理设置 3 次重复。

**1.2.7 生理指标测定** 挑选长势一致、7 d 大小的无菌幼苗约 10 株, 将其小心移至含 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 的 1/2 MS 培养基, 胁迫处理 4 d 后取各株型样本材料用于叶绿素、GB、Pro、SS 和 MDA 等生理指标的测定。采用乙醇浸提法测定叶绿素 (mlbio, ml095018)<sup>[28]</sup> 含量; 雷氏盐显色法<sup>[29]</sup> 测定 GB (mlbio, ml076973) 含量; 茚三酮法<sup>[30]</sup> 测定 Pro (mlbio, ml094958) 含量; 蒽酮-硫酸法<sup>[31]</sup> 测定 SS (mlbio, ml095107) 含量和硫代巴比妥酸法<sup>[32]</sup> 测定 MDA (mlbio, ml094962) 含量。具体操作和计算按照说明书要求进行, 每个处理设置 3 次重复。

**1.2.8 抗氧化酶活性测定** 样本处理同 1.2.7。采用相应的酶联免疫吸附法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 定量检测 CAT、POD、SOD 的活性<sup>[33]</sup>。步骤概括如下: 取约 0.05 g 幼苗样品, 加入 3 mL 冰预冷的提取缓冲液 (含 1% 聚乙烯吡咯烷酮的 100 mmol·L<sup>-1</sup> 磷酸钾缓冲液, pH 值 7.8), 充分匀浆后于 4 °C、8000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 收集上清液。使用酶联生物公司生产的 ELISA 检测试剂盒对上清液中的 CAT (mlbio, ml022785)、POD (mlbio, ml095259) 和 SOD (mlbio, ml503401) 活性进行定量分析, 每个处理设置 3 次重复。

**1.2.9 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 组织化学检测** 挑选长势大小一致、3 周龄的 OE 与 WT 土培植株各 10 株, 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 处理 4 d 后采集各株型大小一致的叶片用于 ROS 组织染色。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 O<sub>2</sub><sup>·-</sup> 分别通过二氨基联苯胺 (diaminobenzidine, DAB) 和硝基蓝四氮唑 (nitroblue tetrazolium, NBT) 法进行组织化学染色和可视化分析<sup>[34]</sup>。选取大小、形状近似的植物叶片, 常温浸泡于 1 g·L<sup>-1</sup> DAB 或 NBT 缓冲液 (solarbio, G4815 和 G4816) 12 h。通过煮沸的乙醇 (95%) 对叶片进行脱色处理 10~15 min, 随后将叶片保存在该溶液中直至绿色完全褪去<sup>[35-36]</sup>。利用 ImageJ 软件 (<https://imagej.net/ij/>) 对着色密度进行定量分析<sup>[37]</sup>。

### 1.3 数据分析

采用 Microsoft-excel 2019、Graphpad Prism 8、A Plasmid Editor v 2.0.61 软件整理试验数据和绘制图表。采

用 SPSS 26.0 进行单因素方差分析 (ANOVA), 运用邓肯多重范围检验 (Duncan's multiple range test) 分析平均值的差异性 ( $P < 0.05$ ), 数据均为平均值 ± 标准误 ( $n = 3$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 *BvBADH2* 克隆及编码序列特性分析

以“甘糖 7 号”cDNA 为模板, 通过 PCR 成功扩增出约 1.5 kb 的特异性条带 (图 1A)。经 Sanger 测序及 NCBI BLAST 比对验证, 该序列与预期 *BvBADH2* cDNA 完全一致。利用 ProtParam 在线工具分析表明, 其编码蛋白的开放阅读框全长 1512 bp, 编码 503 个氨基酸, 预测分子量为 54.78 kDa, 理论等电点为 5.37, 不稳定指数为 31.62, 属于酸性稳定蛋白; 总平均疏水性指数为 -0.062, 提示其具备亲水性。进一步基于 SMART 数据库的保守结构域分析显示, 该蛋白含有一个典型的乙醛脱氢酶功能域 (Aldedh, PF00171), 暗示其在 GB 合成中可能催化甜菜碱醛向 GB 的转化 (图 1B)。

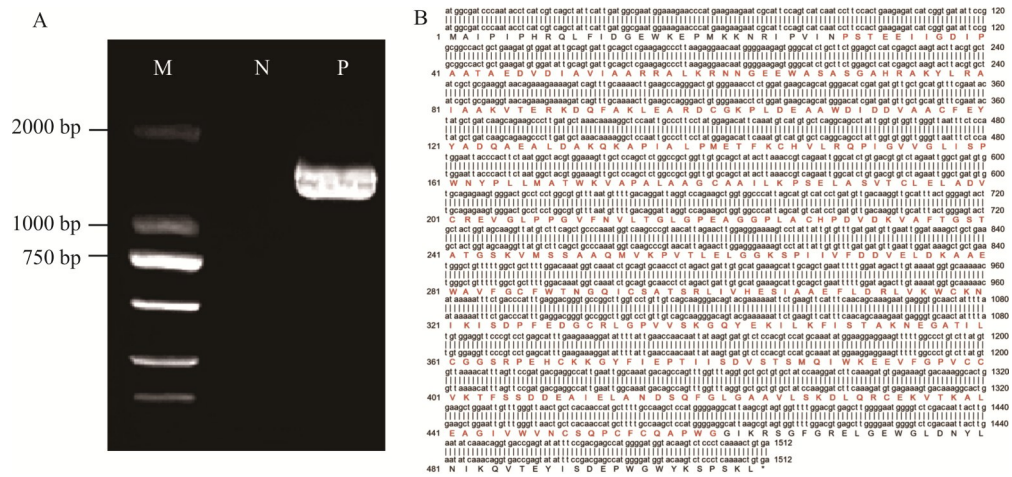


图 1 *BvBADH2* 分子克隆及编码蛋白序列分析

Fig. 1 Molecular cloning and protein sequence analysis of *BvBADH2*

A: *BvBADH2* 基因扩增产物, 大小 1512 bp; B: *BvBADH2* 全长编码序列分析。M: DL2000 DNA 分子量标准; N: 阴性对照; P: PCR 产物; 红色加粗氨基酸序列为乙醛脱氢酶保守结构域。下同。A: *BvBADH2* gene amplification product, size 1512 bp. B: Analysis of the full-length coding sequence of *BvBADH2*. M: DNA marker DL2000; N: Negative control; P: PCR product. Red crude amino acid sequence is aldehyde dehydrogenases conserved domain. The same below.

### 2.2 *BvBADH2* 过表达株系的鉴定

通过同源重组法将克隆获得的 *BvBADH2* 完整编码序列插入植物双元表达载体 pEG100 (CaMV 35S 组成型启动子驱动); 经质粒转化、筛选、PCR 和测序验证获得预期正确的重组质粒 (图 2A)。通过农杆菌介导的花序浸染法转化野生型拟南芥 (WT),  $T_1$  代拟南芥经 Basta 抗性筛选与 PCR 验证, 共鉴定出 5 个阳性转化株系 ( $OE_1 \sim OE_5$ ) (图 2B)。qRT-PCR 分析显示, 所有过表达株系 *BvBADH2* 的相对表达量均显著高于 WT, 并发现  $OE_1$  和  $OE_3$  较高, 分别较 WT 上调 611 和 683 倍 ( $P < 0.05$ ), 故选定这两个株系进行后续表型和功能验证 (图 2C)。

### 2.3 *BvBADH2* 增强植物耐盐性的功能验证

将 5 d 大小的纯合过表达株系  $OE_1$ 、 $OE_3$  和 WT 幼苗移至含  $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$  的 1/2 MS 平板, 盐胁迫处理 10 d 后, 尽管各株型的生长均受到抑制, 但  $OE_1$ 、 $OE_3$  的表现明显优于 WT, WT 呈现出严重的萎蔫、黄化和短小主根 (图 3A)。土培苗盐胁迫试验证实, WT 较转基因株系同样表现出矮小、黄化的盐敏感表型 (图 3B)。表型关联数据分析显示, 盐胁迫下  $OE_1$ 、 $OE_3$  较 WT 根长分别增加 129.1%、137.5%, 鲜重增多 125.0%、126.3%, 叶绿素含量提升 104.8%、107.2%, 均显著优于野生型植株 (图 3C~E,  $P < 0.05$ )。这些结果表明, *BvBADH2* 正调控植物的耐盐性。

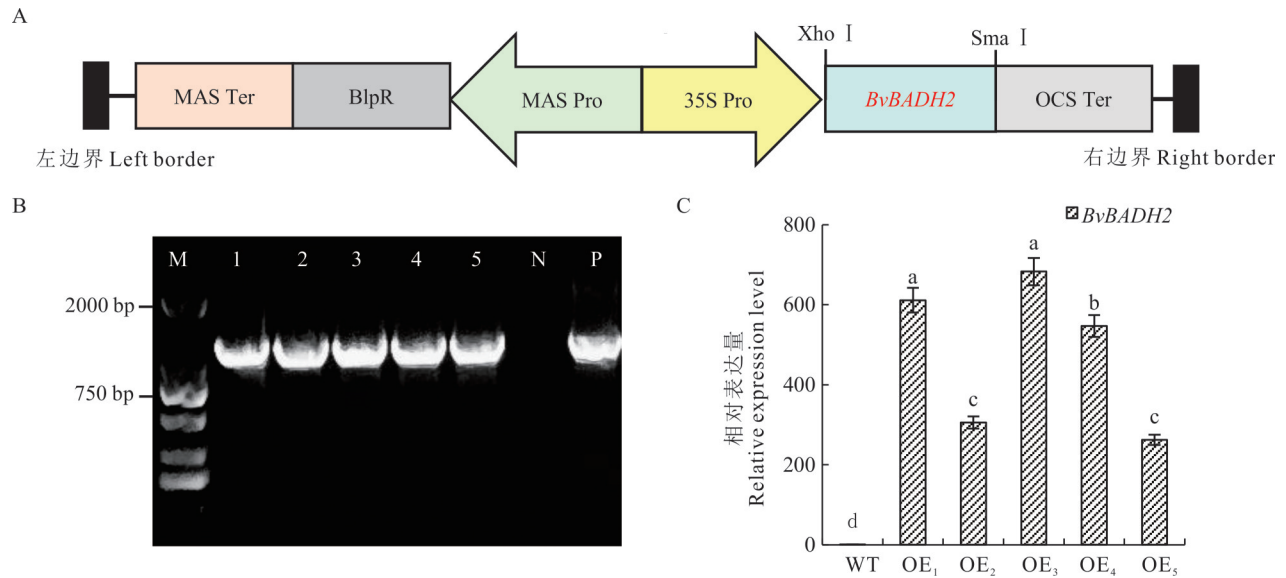


图2 *BvBADH2* 过表达载体构建与转基因植株鉴定

Fig. 2 Construction of the *BvBADH2* overexpression vector and identification of transgenic plants

A: 二元载体 T-DNA 区域示意图 Schematic diagram of the T-DNA region of the binary vector; MAS Ter: 甘露碱合成酶终止子 Mannopine synthase terminator; BlpR: 类细菌素肽调控蛋白 Bacteriocin-like peptide regulatory protein; MAS Pro: 甘露碱合成酶启动子 Mannopine synthase promoter; 35S Pro: 花椰菜花叶病毒 35S 启动子 Cauliflower mosaic virus 35S promoter; OCS Ter: 章鱼碱合成酶终止子 Octopine synthase terminator. B: 转基因株系 PCR 鉴定 PCR identification of transgenic lines; 1~5: 5 个独立的过表达株系  $OE_{1-5}$ ; N: 阴性对照 (野生型植株 DNA) Negative control (wild-type plant DNA); P: 阳性对照 (质粒 DNA) Positive control (plasmid DNA); C: 转基因株系 *BvBADH2* 表达量的 qRT-PCR 检测 qRT-PCR analysis of *BvBADH2* relative expression levels in different transgenic lines; WT: 野生型 Wild type. 不同小写字母代表不同株系间差异达到显著水平 ( $P < 0.05$ )。Different lowercase letters indicate significant differences among the lines ( $P < 0.05$ )。)

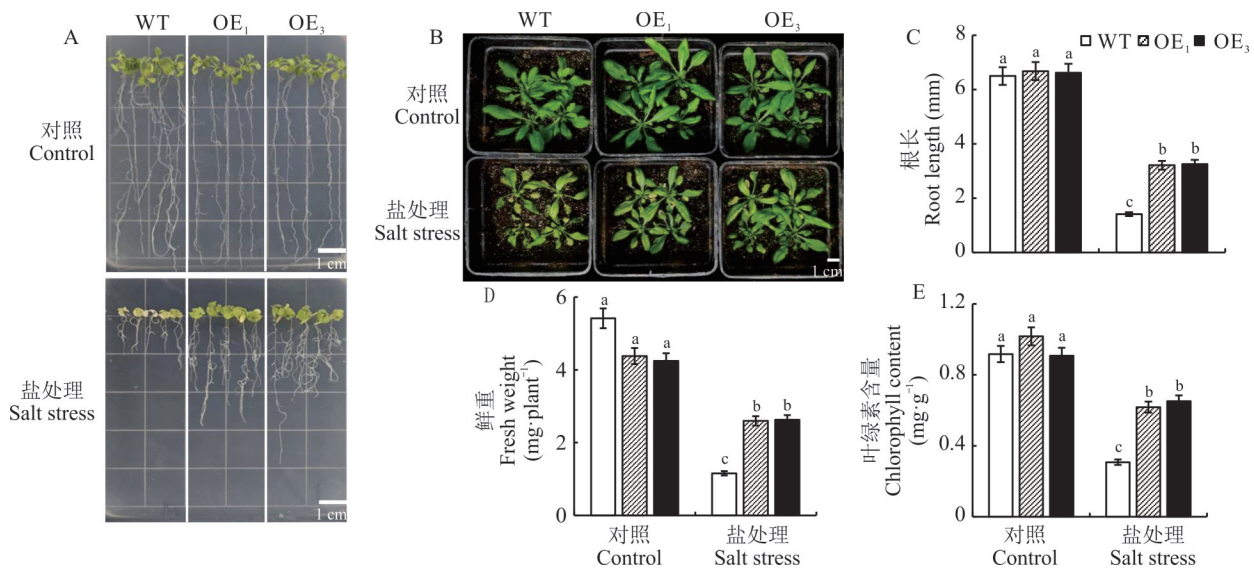


图3 过表达植株的盐胁迫表型分析

Fig. 3 Phenotypic analysis of overexpression plants under salt stress

不同小写字母表示对照与处理组不同株系间差异达到显著水平 ( $P < 0.05$ )，下同。Different lowercase letters indicate significant differences among controls and treatments within different lines ( $P < 0.05$ ), the same below.

#### 2.4 *BvBADH2* 调控渗透调节物质的合成

*BADHs* 的生物学功能是合成 GB, 且其大量积累往往受到盐、干旱等非生物胁迫的诱导。盐胁迫处理 4 d 后, 尽管各株型的 GB 含量较对照处理均显著增加, 但两个 OE 植株的增加更为明显, 均超过 WT 的 2 倍, 这说明

*BvBADH2* 介导盐胁迫诱导下 GB 的生物合成(图 4A)。除 GB 外,同步检测证实 Pro 与 SS 在 OE<sub>1</sub>、OE<sub>3</sub> 株系中较 WT 分别增加 2.1、1.5 与 2.03、1.34 倍(图 4B、C)。因此,*BvBADH2* 通过协同上调 GB、Pro 和 SS 等渗透相容性物质的合成,维持植物细胞的渗透平衡以应对盐胁迫。

### 2.5 *BvBADH2* 激活盐胁迫诱导的抗氧化酶系统

GB 具有调节细胞渗透压、增加根系吸水、保护大分子蛋白与酶活性及稳定细胞形态结构等作用。通过对抗氧化酶系统活性分析发现,正常培养条件下各植株的 CAT、POD、SOD 维持较低活性,盐胁迫处理后显著增强了 OE 植株的 3 种抗氧化酶活性,其中 OE<sub>1</sub> 分别较 WT 提高 1.6、1.3 和 1.3 倍,OE<sub>3</sub> 分别提高 1.4、1.4 和 1.3 倍(图 5A~C)。这表明,盐胁迫下 *BvBADH2* 介导 GB 等渗透相容性物质积累后激活了抗氧化酶系统的活性。

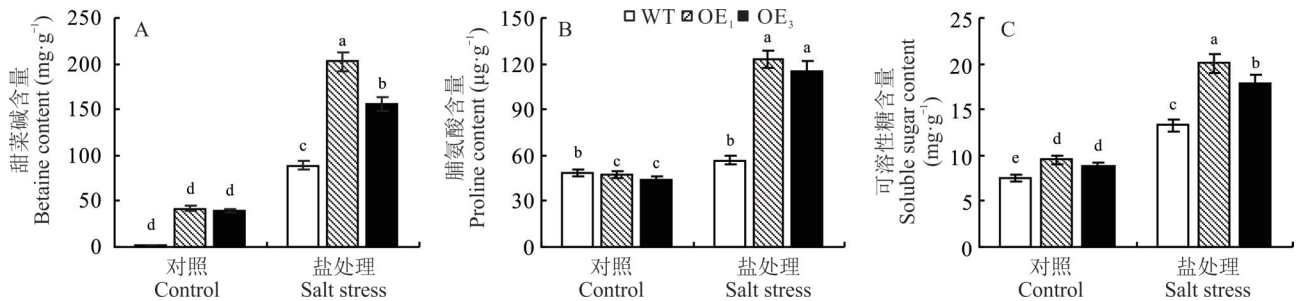


图 4 过表达植株盐胁迫生理生化分析

Fig. 4 Physiological and biochemical analysis of overexpression plants under salt stress

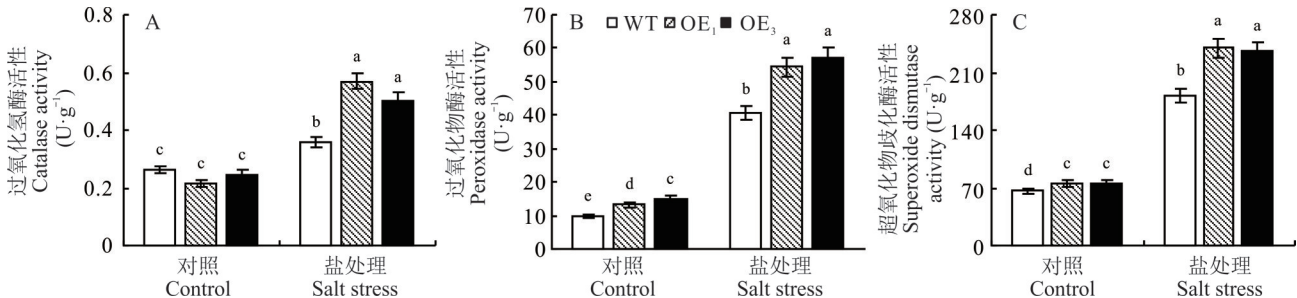


图 5 过表达植株盐胁迫诱导的抗氧化酶活性分析

Fig. 5 Analysis of salt stress-induced antioxidant enzyme activities in overexpression plants

### 2.6 *BvBADH2* 缓解盐胁迫诱导的氧化损伤

盐等非生物胁迫导致植物发生氧化应激反应,产生高水平的 ROS,破坏植物氧化还原稳态,并对细胞造成氧化损伤。DAB/NBT 组织化学染色结果显示,盐胁迫下 OE 叶片的 DAB(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)和 NBT(O<sub>2</sub><sup>·-</sup>)着色较浅,定量分析确认两者的积累量较 WT 分别下降 24.4% 和 29.9%,这说明盐胁迫下 OE 植株产生了较少的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 O<sub>2</sub><sup>·-</sup>,受到的氧化损伤较轻(图 6A~C)。进一步对膜系统脂质过氧化产物 MDA 检测发现,盐胁迫下两个过表达植株的 MDA 含量较 WT 平均降低 20%( $P < 0.05$ ,图 6D)。以上数据共同证明,*BvBADH2* 的过表达通过增强抗氧化防御系统,显著降低盐胁迫诱导的氧化损伤。

## 3 讨论

土壤盐渍化是全球主要的非生物胁迫之一,土壤高浓度的 Na<sup>+</sup> 和 Cl<sup>-</sup> 对植物造成渗透胁迫、离子毒害和氧化损伤,严重抑制农作物的生长和发育,并降低产量<sup>[38]</sup>。与甜土作物相比,嗜盐作物如甜菜进化出更为有效的机制来适应土壤的盐渍化环境<sup>[39-40]</sup>。研究表明,盐等非生物胁迫诱导植物合成 GB、Pro 和 SS 等渗透相容物质,这些物质的大量积累具有提高细胞液浓度、降低水势、维持细胞膨压和防止细胞脱水等作用,进而有效提高植物的耐盐性<sup>[4-5]</sup>。GB 等渗透相容物质在非生物胁迫中具有以下作用:1)调节渗透压稳态平衡;2)维持逆境胁迫下酶等

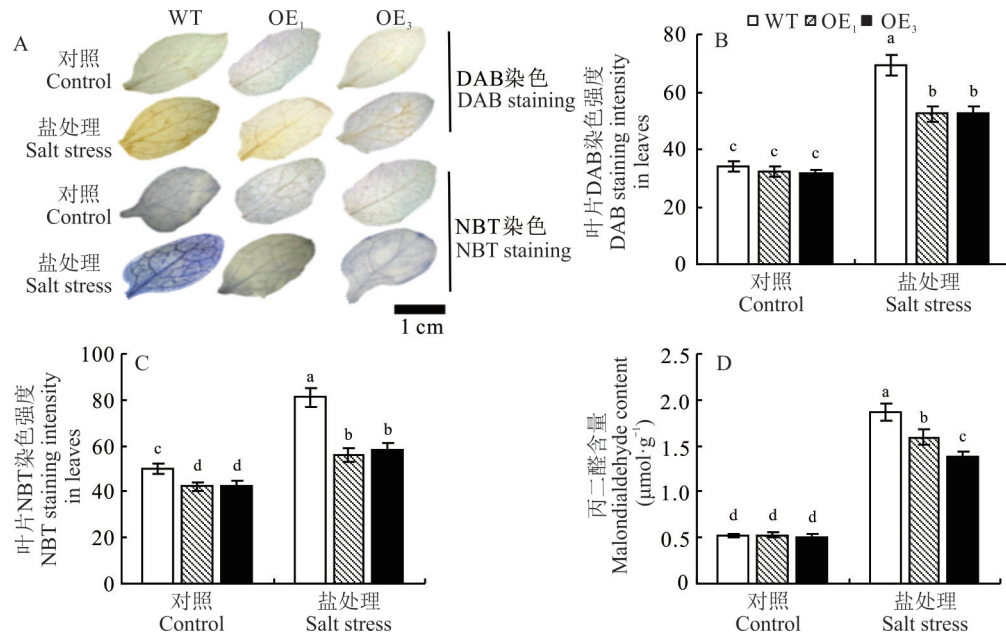


图6 过表达植株中盐胁迫诱导的活性氧积累分析

Fig. 6 Analysis of salt stress-induced reactive oxygen species accumulation in overexpression plants

生物大分子的空间结构;3)保护光合作用系统;4)维持生物膜系统的稳定性;5)清除活性氧和自由基;6)调控抗逆基因的表达<sup>[7,41-42]</sup>。因此,在传统农作物中提高GB等渗透相容性物质的合成是增强其耐盐性的重要途径。

高浓度的 $\text{Na}^+$ 和 $\text{Cl}^-$ 不仅破坏细胞离子稳态,还诱导ROS爆发引发膜脂过氧化、蛋白质变性及DNA损伤<sup>[43]</sup>。与甜土作物不同,盐生植物通过高效的渗透调节系统适应土壤的盐渍化环境,其核心包括合成并大量积累GB、Pro、SS等渗透相容性溶质<sup>[4,39]</sup>。这些物质通过降低细胞水势、稳定酶结构及保护光合系统等途径增强植物的耐盐性<sup>[6-7,39]</sup>。其中,GB因其无毒和具有渗透调节、ROS清除及信号转导等功能而成为关键的代谢标志物<sup>[40]</sup>。

研究揭示,*BADHs*是GB从头合成的关键性酶<sup>[8,10]</sup>。高等植物的*BADH*先后在菠菜<sup>[11]</sup>、甜菜<sup>[12]</sup>、大麦<sup>[13]</sup>、水稻<sup>[14]</sup>、辽宁碱蓬<sup>[15]</sup>等植物中被分离或克隆。通过对甜菜*BvBADH2*结构域分析,获得该基因编码蛋白含保守的乙醛脱氢酶功能域(Aldedh, PF00171),这暗示其在GB合成中可能催化甜菜碱醛向GB的转化(图1B)。本研究前期通过生物信息学方法在已公布的甜菜基因组中共鉴定到9个*BvBADHs*家族成员,其中*BvBADH2*启动子区域存在ABRE、TCA等胁迫或激素响应元件;且通过qRT-PCR方法分析发现随盐胁迫浓度的升高基因转录水平显著增加,这提示*BvBADH2*可能调控植物盐胁迫的响应过程<sup>[18-19]</sup>。

本研究通过克隆*BvBADH2*并将其在拟南芥中进行异源表达,证实*BvBADH2*具有潜在调控植物耐盐性的功能。与OE植株相比,WT在盐胁迫下呈现出严重的萎蔫、黄化和根系短小,且鲜重和叶绿素含量明显下降,表明*BvBADH2*正向调控植物的耐盐性(图3)。这一功能与其他研究结果吻合,如四翅滨藜*AcBADH*在马铃薯<sup>[16]</sup>、山菠菜*AhBADH*在大豆<sup>[17]</sup>、菠菜*SoBADH*在甘薯(*Dioscorea esculenta*)<sup>[44]</sup>、小麦(*Triticum aestivum*)*TaBADH*<sup>[45]</sup>在拟南芥中进行过量表达,均显著提高了这些植物的耐盐性。

过量表达*BvBADH2*不仅介导GB的合成,还激活盐胁迫诱导的Pro和SS的合成与积累(图4)。盐胁迫下,*AcBADH*、*TaBADH*在相关植物中异源表达也能增加Pro等渗透相容性物质的含量<sup>[16,46]</sup>。出现这一现象推测可能与代谢网络级联、转录调控协同或氧化还原稳态改变相关<sup>[47-49]</sup>。如植物合成GB后通过清除过量ROS的同时,间接保护Pro和糖代谢相关酶(如P5CS1、SPS1)活性,避免使其氧化而失活,从而促进了Pro和可溶性糖的合成<sup>[50]</sup>。上述发现突破了传统认知中*BADH*仅调控GB合成的局限性,揭示了其在整合渗透保护系统中的重要功能,为作物耐盐性多靶点协同改良提供了理论依据。

盐胁迫下ROS主要来源于光合电子传递链泄漏(叶绿体)、线粒体呼吸异常及烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸

(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)氧化酶激活<sup>[51-52]</sup>。植物细胞积累过量的 ROS 会引起生物膜系统损伤、光合和呼吸作用受阻、代谢紊乱、蛋白质氧化、DNA 损伤及相关信号通路受阻等<sup>[53-54]</sup>。研究发现,转基因株系的 MDA 含量及 ROS 积累量减少,表明过量表达 *BvBADH2* 具有减轻盐胁迫下植物氧化损伤的功能(图 5 和图 6)。其可能途径是:1) GB 通过稳定光系统 II (PS II) 及核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(ribulose-1,5-bisphosphatecarboxylase/oxygenase, rubisco)的结构,维持光合电子传递链的效率,减少叶绿体中超氧阴离子的泄漏<sup>[38]</sup>。2) GB 可能作为分子伴侣增强抗氧化酶 POD、SOD、CAT 的稳定性和活性,减少了 ROS 的积累<sup>[9]</sup>。3) GB 直接清除 ROS,减少了  $H_2O_2$  和  $O_2\cdot^-$  的生成量(图 4 和图 5),其功能机制可能与 GB 抑制 NADPH 氧化酶的活性有关<sup>[9]</sup>。值得注意的是,本研究中 Pro 和 SS 的同步积累可能进一步强化了抗氧化防御,例如 Pro 可作为羟基自由基清除剂,而糖类通过渗透保护维持细胞膜的完整性<sup>[4]</sup>,凸显了多渗透物质的功能互补性。上述多层次防御体系证实了转基因植株在盐胁迫下维持较好生长的表型特征。

#### 4 结论

本研究成功从甜菜基因组克隆了乙醛脱氢酶基因 *BvBADH2*, 并构建其过表达转基因拟南芥体系。盐胁迫表型分析发现,过表达株系相较于野生型表现出显著增强的耐盐性,包括无明显萎蔫、根系伸长、鲜重及叶绿素含量增加。生理生化分析揭示:1) *BvBADH2* 过表达促进了 GB 合成及协同激活 Pro 与 SS 的合成通路;2) 增强 POD、SOD、CAT 等抗氧化酶的活性,降低了 ROS 的积累量及膜脂过氧化反应。因此,*BvBADH2* 通过渗透调节物质合成与抗氧化防御系统激活的双重调控机制,有效缓解盐胁迫引起的渗透失衡与氧化损伤。本研究在模式植物中初步验证了耐盐性相关基因 *BvBADH2* 的功能保守性,为作物耐盐遗传改良提供了关键酶基因资源。

#### 参考文献 References:

- [1] Guang Z W, Gang N, Gu F, *et al.* Saline-alkali soil reclamation and utilization in China: progress and prospects. *Frontiers of Agricultural Science and Engineering*, 2024, 11(2): 216–228.
- [2] Zhang H M, Zhu J H, Gong Z Z, *et al.* Abiotic stress responses in plants. *Nature Reviews Genetics*, 2022, 23(2): 104–119.
- [3] Van Zelm E, Zhang Y, Testerink C. Salt tolerance mechanisms of plants. *Annual Review of Plant Biology*, 2020, 71(1): 403–433.
- [4] Munns R, Passioura J B, Colmer T D, *et al.* Osmotic adjustment and energy limitations to plant growth in saline soil. *New Phytologist*, 2020, 225(3): 1091–1096.
- [5] Yang Y Q, Guo Y. Elucidating the molecular mechanisms mediating plant salt-stress responses. *New Phytologist*, 2018, 217(2): 523–539.
- [6] Yu B, Chao D Y, Zhao Y. How plants sense and respond to osmotic stress. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2024, 66(3): 394–423.
- [7] Chen T H, Murata N. Glycinebetaine: an effective protectant against abiotic stress in plants. *Trends in Plant Science*, 2008, 13(9): 499–505.
- [8] Fitzgerald T L, Waters D L, Henry R J. Betaine aldehyde dehydrogenase in plants. *Plant Biology*, 2009, 11(2): 119–130.
- [9] Chen T H, Murata N. Glycinebetaine protects plants against abiotic stress: mechanisms and biotechnological applications. *Plant, Cell and Environment*, 2011, 34(1): 1–20.
- [10] Xu Z J, Sun M L, Jiang X F, *et al.* Glycinebetaine biosynthesis in response to osmotic stress depends on jasmonate signaling in watermelon suspension cells. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 1469.
- [11] Weretilnyk E A, Hanson A D. Betaine aldehyde dehydrogenase from spinach leaves: purification, *in vitro* translation of the mRNA, and regulation by salinity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1989, 271(1): 56–63.
- [12] Mccue K F, Hanson A D. Salt-inducible betaine aldehyde dehydrogenase from sugar beet: cDNA cloning and expression. *Plant Molecular Biology*, 1992, 18(1): 1–11.
- [13] Ishitani M, Nakamura T, Han S Y, *et al.* Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress and abscisic acid. *Plant Molecular Biology*, 1995, 27(2): 307–315.
- [14] Toshihide N, Sadaki Y, Yasunori M, *et al.* Expression of a betaine aldehyde dehydrogenase gene in rice, a glycinebetaine nonaccumulator, and possible localization of its protein in peroxisomes. *The Plant Journal*, 1997, 11(5): 1115–1120.

- [15] Li Q L, Gao X R, Yu X H, *et al.* Molecular cloning and characterization of betaine aldehyde dehydrogenase gene from *Suaeda liaotungensis* and its use in improved tolerance to salinity in transgenic tobacco. *Biotechnology Letters*, 2003, 25(17): 1431–1436.
- [16] Ali A, Ali Q, Iqbal M S, *et al.* Salt tolerance of potato genetically engineered with the *Atriplex canescens* BADH gene. *Biologia Plantarum*, 2020, 64: 271–279.
- [17] Yu Z J, Niu L, Cai Q A, *et al.* Improved salt-tolerance of transgenic soybean by stable over-expression of *AhBADH* gene from *Atriplex hortensis*. *Plant Cell Reports*, 2023, 42(8): 1291–1310.
- [18] Li H, Wu G Q, Wei M, *et al.* Genome-wide identification of the *BvBADH* gene family in sugar beet (*Beta vulgaris*) and their expression analysis under high salt stress. *Biotechnology Bulletin*, 2024, 40(2): 233–244.  
李昊, 伍国强, 魏明, 等. 甜菜 *BvBADH* 基因家族全基因组鉴定及其高盐胁迫下的表达分析. *生物技术通报*, 2024, 40(2): 233–244.
- [19] Han Y X, Wu G Q, Wei M, *et al.* The role of *BADH* in the response to abiotic stress in plants. *Plant Physiology Journal*, 2022, 58(2): 254–264.  
韩悦欣, 伍国强, 魏明, 等. *BADH* 在植物响应非生物胁迫中的作用. *植物生理学报*, 2022, 58(2): 254–264.
- [20] Wu Z R, Zhang T Y, Li J N, *et al.* Genome-wide analysis of WD40 protein family and functional characterization of *BvWD40-82* in sugar beet. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14: 1185440.
- [21] Bian C, Ji L Y, Xu W, *et al.* Research progress on bioactive substances of beets and their functions. *Molecules*, 2024, 29(19): 4756.
- [22] Wakeel A, Asif A R, Pitann B, *et al.* Proteome analysis of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) elucidates constitutive adaptation during the first phase of salt stress. *Journal of Plant Physiology*, 2011, 168(6): 519–526.
- [23] Wang Y T, Liu H J, Wang M Q, *et al.* Salt tolerance in sugar beet: from impact analysis to adaptive mechanisms and future research. *Plants*, 2024, 13(21): 3018.
- [24] Höfgen R, Willmitzer L. Improved method for transformation of *Agrobacterium tumefaciens* with binary vector plasmids. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1988, 6(2): 165–167.
- [25] Zhang X, Henriques R, Lin S S, *et al.* *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature Protocols*, 2006, 1(2): 641–646.
- [26] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 1987, 162(1): 156–159.
- [27] Ng H F, Ngeow Y F. A simple spreadsheet-based method for relative quantification using quantitative real-time PCR. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 2022, 50(1): 99–103.
- [28] Wellburn A R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 1994, 144(3): 307–313.
- [29] Grieve C M, Grattan S R. Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. *Plant and Soil*, 1983, 70(1): 303–307.
- [30] Bates L S, Waldren R P, Teare I D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 1973, 39(1): 205–207.
- [31] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 1956, 28(3): 350–356.
- [32] Hodges D M, Delong J M, Forney C F, *et al.* Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 1999, 207(4): 604–611.
- [33] Gill S S, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2010, 48(12): 909–930.
- [34] Chandran P R R, Sreedevi G S, Edwin B T, *et al.* Unveiling the key toxicity indicators and mechanisms on phytotoxicity of cerium dioxide nanoparticles in rice (*Oryza sativa*). *Chemosphere*, 2025, 376: 144270.
- [35] Thordal-Christensen H, Zhang Z G, Wei Y D, *et al.* Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *The Plant Journal*, 1997, 11(6): 1187–1194.
- [36] Thorsten J, Markus T, Christiane C, *et al.* Elicitor-stimulated ion fluxes and O<sub>2</sub><sup>-</sup> from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(2): 207–220.

- [37] Schneider C A, Rasband W S, Eliceiri K W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 2012, 9(7): 671–675.
- [38] Hasanuzzaman M, Fujita M. Plant responses and tolerance to salt stress: physiological and molecular interventions 2.0. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(21): 15740.
- [39] Chen J H, Wang Y. Understanding the salinity resilience and productivity of halophytes in saline environments. *Plant Science*, 2024, 346: 112171.
- [40] Omari A F. Metabolic engineering of osmoprotectants to elucidate the mechanism(s) of salt stress tolerance in crop plants. *Planta*, 2021, 253(1): 24.
- [41] Ashraf M, Foolad M R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 2007, 59(2): 206–216.
- [42] Islam S, Mohammad F, Shakeel A, *et al.* Glycine betaine: a multifaceted protectant against salt stress in Indian mustard through ionic homeostasis, ROS scavenging and osmotic regulation. *Physiologia Plantarum*, 2024, 176(5): e14530.
- [43] Niazian M, Sadat-Noori S A, Tohidfar M, *et al.* Betaine aldehyde dehydrogenase (*BADH*) vs. flavodoxin (*Fld*): two important genes for enhancing plants stress tolerance and productivity. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 650215.
- [44] Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 2002, 7(9): 405–410.
- [45] Fan W J, Zhang M, Zhang H X, *et al.* Improved tolerance to various abiotic stresses in transgenic sweet potato (*Ipomoea batatas*) expressing spinach betaine aldehyde dehydrogenase. *PLoS One*, 2012, 7(5): e37344.
- [46] Sun Y L, Liu X, Fu L S, *et al.* Overexpression of *TaBADH* increases salt tolerance in *Arabidopsis*. *Canadian Journal of Plant Science*, 2019, 99(4): 546–555.
- [47] Nathalie V, Christian H. Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids*, 2008, 35(4): 753–759.
- [48] De L T A, Montesinos-pereira D, Blasco B, *et al.* Influence of the proline metabolism and glycine betaine on tolerance to salt stress in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) commercial genotypes. *Journal of Plant Physiology*, 2018, 231: 329–336.
- [49] Zhao P P, Zhao M, Gao X Y, *et al.* *GhWRKY1bD* improves drought tolerance by co-regulation of ABA, ROS, and proline homeostasis in cotton (*Gossypium hirsutum*). *Industrial Crops and Products*, 2024, 220: 14.
- [50] Miyashita Y, Good A G. NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase is essential for the survival of *Arabidopsis thaliana* during dark-induced carbon starvation. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59(3): 667–680.
- [51] Mittler R, Zandalinas S I, Fichman Y, *et al.* Reactive oxygen species signaling in plant stress responses. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2022, 23(10): 663–679.
- [52] Zhuang Y, Wei M, Ling C C, *et al.* EGY3 mediates chloroplastic ROS homeostasis and promotes retrograde signaling in response to salt stress in *Arabidopsis*. *Cell Reports*, 2021, 36(2): 109384.
- [53] Wang P, Liu W C, Han C, *et al.* Reactive oxygen species: multidimensional regulators of plant adaptation to abiotic stress and development. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2024, 66(3): 330–367.
- [54] Kerchev P I, Van B F. Improving oxidative stress resilience in plants. *The Plant Journal*, 2022, 109(2): 359–372.