

互花米草 *BADH* 基因的克隆与定量表达分析

刘 振,张 侠,尹海波*,陈世华,郭善利
(烟台大学 生命科学学院,山东 烟台 264005)

摘要: 为研究甜菜碱醛脱氢酶(Bataine aldehyde dehydrogenase, *BADH*)基因的耐逆功能及分子机制,以盐生植物互花米草(*Spartina alterniflora*)为试验材料,利用 RACE 技术克隆了 cDNA 全长序列。生物信息学分析发现,该核苷酸序列全长 1 983 bp,开放阅读框 1 515 bp,编码 504 个氨基酸残基。Blast 比对发现,该氨基酸与细叶结缕草、二穗短柄草、高粱氨基酸的相似性分别达到 96%、87%、86%,且氨基酸数量基本相同。将该基因命名为 *SaBADH*。以 *tub* 为内参,对 *SaBADH* 基因在 600 mmol/L 的 NaCl、20% 的 PEG 处理下表达的定量分析表明,*SaBADH* 受 NaCl、PEG 诱导表达,随着处理时间的延长,*SaBADH* 基因的表达呈现先上升后下降的趋势,分别在处理 24、12 h 时达到最大值,分别约为对照的 7.4 倍,差异达到极显著水平,表明 *SaBADH* 基因可能在抵御盐和干旱对互花米草的胁迫中发挥重要作用。

关键词: 互花米草;甜菜碱;*BADH* 基因;基因克隆;抗旱耐盐性

中图分类号: S45;S153 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2018)11-0045-05

Cloning and Quantitative Expression Analysis of *BADH* Gene from *Spartina alterniflora*

LIU Zhen, ZHANG Xia, YIN Haibo*, CHEN Shihua, GUO Shanli
(College of Life sciences, Yantai University, Yantai 264005, China)

Abstract: In order to study the inverse resistance function and molecular mechanism of *BADH* gene, the full-length cDNA of *BADH* gene was cloned from *Spartina alterniflora* by RACE strategy. Bioinformatic analysis showed that the full-length cDNA of *BADH* gene was 1 983 bp and the open reading frame was 1 515 bp which encoding 504 amino acids. Blast alignment found that amino acid sequence from *Spartina alterniflora* was similar to that of *Zoysia tenuifolia*, *Brachypodium distachyon* and *Sorghum bicolor* and shared 96%, 87% and 86% identity, respectively. The number of amino acids were basically the same. So the gene was named *SaBADH*. Using *tub* as internal reference, the expression pattern of *Spartina alterniflora* under 600 mmol/L NaCl and 20% PEG treatments was studied. The results showed that *SaBADH* gene was induced by NaCl and PEG, suggesting that it may play an important role in salt and drought tolerance of *Spartina alterniflora*. With the prolongation of treatment time, the expression of *SaBADH* gene showed a trend of increasing first and then decreasing, reaching the maximum at 24 h, 12 h, respectively, about 7 times and 4 times of the control, respectively, and the difference reached a very significant level.

Key words: *Spartina alterniflora*; Glycine betaine; *BADH* gene; Gene cloning; Drought and salt tolerance

长期以来,对土地不合理的利用(不合理轮作、过度施用化肥、不合理浇灌、过度放牧等)及对植被资源的过度开采,导致土地受到不同程度的盐渍化

威胁,荒漠戈壁滩的面积也不断扩大,同时,盐渍化和干旱也成为制约农业发展的重要非生物胁迫因素。因此,如何有效地开发利用盐碱地、干旱地成为

收稿日期:2018-06-30

基金项目:国家自然科学基金面上项目(31370296);烟台大学博士启动基金项目(TM09B25, HX10B23)

作者简介:刘 振(1992-),女,山东临沂人,在读硕士研究生,研究方向:植物抗逆生理。E-mail:liulizhen92@163.com

* 通讯作者:尹海波(1976-),男,山东青岛人,副教授,博士,从事植物抗逆生理研究。E-mail:Yinhaibo76@163.com

社会关注的重点。

互花米草 (*Spartina alterniflora*) 是一种禾本科草属的多年生草本植物,适宜生长在潮间带,起源于美国大西洋沿岸和墨西哥湾,引进中国后主要分布在沿海滩涂地带。互花米草叶互生、具盐腺,是挖掘耐盐基因良好的生物材料。1996年 Wood 等^[1]研究发现,禾本科植物含有甜菜碱醛脱氢酶基因。甘氨酸甜菜碱 (Glycine betain, 以下简称甜菜碱) 是以胆碱为底物,丝氨酸为原料,在胆碱单加氧酶的催化下先生成甜菜碱醛,再通过甜菜碱醛脱氢酶 (BADH) 的氧化作用生成的^[2-3]。甜菜碱作为植物中重要的渗透调节剂,在植物遭受盐碱、干旱等逆境胁迫时,帮助植物维持细胞渗透平衡,并可保护蛋白酶活性,激活抗逆基因表达,显著提高植物的抗逆能力。目前已从菠菜^[4]、辽宁碱蓬^[5]、异苞滨藜^[6]、大麦^[7]、结缕草^[8]、盐节木^[9]、柳树^[10]等植物中克隆出 BADH 基因。将 BADH 基因转入小麦^[11]、水稻^[12]、大豆^[13]、玉米^[14]、棉花^[15]、羽衣甘蓝^[16]等植物使其耐盐性或耐旱性得到不同程度的提高。本研究拟从盐生植物互花米草中克隆 BADH 基因,对其进行生物信息学及表达分析,为进一步研究其耐逆功能和分子机制提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

互花米草种子采集于山东莱州海滨,浸泡处理后 4 ℃ 保存。将保存的种子种植于基质中 (1/2 椰土 + 1/2 黑土),在 25 ℃、光照/黑暗为 16 h/8 h 的环境下培养 2 周。取长势一致的植株移到小方盆中,继续培养至 4 ~ 5 叶龄^[17]。用 600 mmol/L 的 NaCl 溶液浇灌 4 ~ 5 叶龄幼苗 48 h,剪取幼嫩叶片,液氮速冻后 -80 ℃ 保存,用于 BADH 基因的克隆。用 600 mmol/L 的 NaCl 溶液、20% 的 PEG 溶液分别对幼苗进行浇灌和喷洒处理,分别胁迫 0、3、6、12、24、48 h,每个处理重复 3 次。洗样,剪取幼嫩叶片,液氮速冻后 -80 ℃ 保存,用于 BADH 基因的表达分析。

大肠杆菌 DH_{5α} 为烟台大学植物发育分子生物学实验室保存;PCR 相关试剂、pMD18 - T Vector、T₄ DNA 连接酶、限制性内切酶、DNA 凝胶回收试剂盒均购自 TaKaRa;BIOZOL RNA Kit 购自 BIOFLUX 公司;Reverse Transcriptase 试剂盒购自 Promega 公司;氨基青霉素购自 Sigma 公司;其他试剂多为国产分析纯;引物由北京华大六合基因公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 互花米草 BADH 基因的克隆 取冻存的用

于基因克隆的互花米草叶片,液氮研磨,利用 BIOZOL RNA Kit 提取 RNA,使用超微量紫外分光光度仪检测其纯度和浓度,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。利用 Reverse Transcriptase 试剂盒体外反转录合成 cDNA。根据烟台大学植物发育分子生物学实验室转录组测序结果,获得 BADH 基因的中间片段,在此基础上设计 RACE 引物 (S31 - BADH:5' - CCAAGATTACTGAGAGGAAGCCTG - 3'; S32 - BADH:5' - CCACCTTCAGAGAGACCCTATTGG - 3'; S51 - BADH:5' - CCAATAGGGTCTCTCTGAAGGTGG - 3'; S52 - BADH:5' - CAGGCTTCCTCTCAGTAATCTTGG - 3'),以 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增。反应条件:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,68 ℃ 延伸 90 s,30 个循环;68 ℃ 充分延伸 10 min。DNA 凝胶回收试剂盒回收目的片段,加尾,与 pMD18 - T Vector 连接,转化 DH5α 感受态细胞,酶切,挑选阳性克隆送华大基因公司测序。比对分析测序结果,拼接获得互花米草 BADH 全长 cDNA 序列,登陆 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 进行 Blast 比对,确认其为互花米草 BADH 基因,将其命名为 SaBADH 基因。根据拼接获得的全长 cDNA 序列,设计引物 (SaBADH1 - oxF:5' - CTCTAGACACCCAAAGCCCAAGCTCAGTG - 3'; SaBADH1 - oxR:5' - GGTACCCACACGACTTCAGCACATGGTAC - 3'),以 cDNA 为模板,扩增 SaBADH 基因。反应条件为:94 ℃ 预变性 7 min;94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,68 ℃ 延伸 120 s,35 个循环;68 ℃ 充分延伸 10 min。将扩增产物回收,加尾,连接,转化,酶切,挑选阳性克隆送测序,确认获得正确的 SaBADH 基因的 pMD18 - T 克隆载体。

1.2.2 互花米草 BADH 基因的生物信息学分析 利用 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 进行 Blast 比对分析,取部分高度相似 (相似度 > 70%) 的同源序列,利用 MEGA 6 进行同源序列比对,构建 N - J 进化树,分析 SaBADH 与其他植物 BADH 的进化关系。利用 Ex-pasy 软件 (<https://web.expasy.org/protparam>) 分析 SaBADH 蛋白的基本理化性质。利用 PredictProtein 软件 (<https://www.predictprotein.org/>) 预测 SaBADH 的二级结构和亚细胞定位。利用 InterProScan 软件 (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>) 分析蛋白质的结构域。利用 SWISS - MODEL 软件 (<https://swissmodel.expasy.org/>) 进行三维建模,预测其三级结构。

1.2.3 互花米草 BADH 基因的表达分析 取冻存的用于表达分析的互花米草叶片,用 BIOZOL RNA

Kit 提取 RNA,用 Reverse Transcriptase 试剂盒合成 cDNA,稀释 20 倍作为 qRT-PCR 的模板。根据 *SaBADH* 基因的 cDNA 全长序列,设计定量引物 (*SaBADH* - RTF: 5' - TAAGTGGTCACAGCACAGGGAAC - 3', *SaBADH* - oxR: 5' - GGTACCCACACGACTTCAGCACATGGTAC - 3')。以 *tub* 为内参,进行 PCR 反应得到扩增曲线。反应条件为:95 °C 预变性 10 min;95 °C 变性 10 s,57 °C 退火 15 s,72 °C 延伸 20 s,40 个循环)。循环结束后,从 72 °C 缓慢升温至 95 °C 获得溶解曲线。

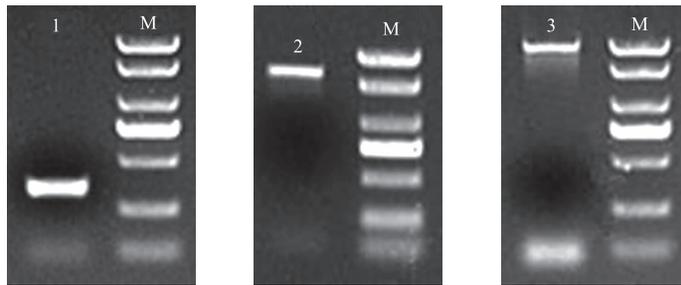
1.3 数据分析

采用 Excel 2003 软件绘图,利用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。本研究采用单因素方差分析,进行方差齐性检验和 *LSD* 分析。

2 结果与分析

2.1 互花米草 *BADH* 基因的克隆

采用 RACE 技术获得的 *SaBADH* 基因的两端序列见图 1,将其与本课题组实验室通过转录组测序得到的中间片段进行拼接,得到 *SaBADH* 基因 cDNA 的全长序列,在 NCBI 网站进行 Blast 比对,发现 *SaBADH* 与细叶结缕草、二穗短柄草、高粱氨基酸的 *BADH* 相似性分别达到 96%、87%、86%,且氨基酸数量基本相同,确认拼接得到了 *SaBADH* 基因。根据 *SaBADH* 基因 cDNA 的全长序列设计引物,以 cDNA 为模板,扩增 *SaBADH* 基因(图 1),获得 *SaBADH* 的克隆载体 pMD18-T::SaBADH。



M: Marker 2000 plus;1: 互花米草 *SaBADH* 基因 5'RACE 产物;2: 互花米草 *SaBADH* 基因 3'RACE 产物;3: 互花米草 *SaBADH* 基因全长产物

图 1 互花米草 *SaBADH* 基因电泳结果

2.2 互花米草 *BADH* 基因的生物信息学分析

SaBADH 基因的 cDNA 全长 1 983 bp,开放阅读框 1 515 bp,编码 504 个氨基酸(图 2)。Expasy 软

件预测 *SaBADH* 蛋白分子质量为 54.388 ku,理论等电点为 5.45,不稳定系数为 33.37,脂肪系数为 88.89,平均亲水系数为 -0.080,为稳定的亲水性蛋

```

1      GAGCGTCACTCCCTGTGCGCA GCGGCGTGC GGA TCCCCAC ACCCA AAGCCCA AGGCTC AGTGC CCGCCAC CCACTC CGCTCCG
85     ATGGCCTC GCCGCG CGCGCT CC3CAG CGGCG AGCTCTT CATCGGCG GCGAGT GCGCG CGCCCG CGCTCG GTCGCCG CATCC CGTGTCAA CCCTCC CAAC GAGGCC CACATC GGGCGAC
1      M A S P A A V P Q R Q L F I G G E W R A P A L G R R I P V V N P S N E A H I G D
205    GTCCCGCC GGGCAC GGTGGAG GACATC GACGCC GCGGTG AAGGCC GCGCGCG CGGCGCT CAAAG AGAACC GCGGCC GCGACT GGGCCCG CGCCCG GGGGGC CGTCCGG GCCAAG TACCTC
41     V P A G T V E D I D A A V K A A R A I L K R N R G R D W A R A P G A V R A K Y L
325    CGCGCCAT CGCCCG CAAGATT ACTGAGGAA GCGT GAGCTG GCTAAGCTAGAGG CACTTGATT CTGGCAA GCCTATATGATGA AGCAATATGGGA CATGGAT GATGTT GCTGGTGCCTTC
81     R A I A A K I T E R K P E L A K L E I L D S G K P Y D E A I W D M D D V A G C F
445    GAGTCTT CGCCGG TCTGGCA GAGGCT TGGCA AAAAG CAAAAT TCCCCCG TTGCTC TTCCAG AAAATT TCAAGT GCCACTT CAGAGA GACCCT ATTGGT GTAGTTG GGTAA TCACA
121    E F F A G L A E A L D K K Q N S P V A L P E N F K C H L Q R D P I G V V G L I T
565    CCTTGGAA CTATCTCTCTG TGGCCACATGGAAGTA GCTCCC GCTCTGG CTGCTGTTGTA CAGCTG CTCTAAAGCCATC TGAATTGGCTTC GGTGACTTGC TTA GAGTGC GCGAGT
161    P W N Y P L L M A T W K V A P A L A A G C T A V L K P S E L A S V T C L E L A D
685    GCTCTCA AAGAGT TGGTCTT CCTTCA GGTGTT TTAACATCGT GACTGGAT TAGCCG CTGATG CTGGTG CTCTCT TGGCAGC ACACCCAGATGT TGAAGA GGTCTCT TTTACT GGGAGT
201    V C Q E V G L P S G V L N I V T G L S P D A G A P L A A H P D V D K V S F T G S
805    TCAGCACT TGGTCA AAAAGTT ATACT GCTGCA GCTACA ATGGTC AAGCCTG TTTCACTGGAAC TTGGTG AAAAAA GTCCAT TGTAAATATTTGA TGAATG TGAACAT GACAAA GCTGTT
241    S A T G Q K V M T A A A T M V K P V S L E L G G K S P I V I F D D V D I D K A V
925    GAATGGT TCTTT TGGTGC TTTTGGACCAAT GGCCAGATTTC AGCGCAA CATCTC GTCTTC TTTATCCATA CAAA AAATTC TAAAGATTCAT TGAAGATGGT GCATGG ACCAAA
281    E W V L F G F W T N G Q I S A T J R L L I H T K I A K E F I E R M V A W T R
1045   AACATCAA GGTGTCAGATC CACTGAA GAGGGT TGCAGG CTTGGG CCTGTTG TTAGTGAAGGACAGTATGAGAAGA TTAAGAAG GTTGTGACAAA TGCTAA AGCGAA GGTGCT ACTATT
1285   N I K V S D P L E E G C R L G P V V S E G Q Y E K I K F V A N A K G E G A T I
1165   CTGACTGG GGTGT TAGACG GAGCAT CTTGAG AAGGA TACTAC ATTTGAA CCGGCA TCGTTA CTGACA TCAGCA CATCAAT GGAATA TGGAG GAGGA GGTCTT TGTGCCA GTCTTC
361    L T G V R P R H L E K G Y Y I E P T I V T D I S T S M E I W R E E V F G P V L
1285   TGTVTAAGGAGTT TAGTAC CGMAGT GAAGCT ATTGAA CTAGCT AACGAT ACTCHT ATGGTT TGGCTG GTGCTG TGAATTC TGTCTGA CCGTGG GCGATG TCAGAG AGTAGCT GAGGAG
401    C V K E F S T E D E A I E L A N D T I Y G L A G A V I S A D R G R C P A E E
1405   ATCGACCGAGGACTATT TGGGTAAC TGCTCG CAACCC TGCTTC TGCCAA GCTCCTT GGGCGG GGAACA AGCGCA GTGGATT CGGCCG TGAAGT TGGAGA TGGGGG ACTGGAC ATCTAC
441    I D A G A I W V N C S Q P C F C Q A ? W G G N K R S G F G R E L G D G G L D I Y
1525   CTTAATGT CAAGCA GATCAC GAGTCACTTCA GACGAG CCTTGG GCGTGG TACAGCG CGCCCT CCAAGA TTTAA
481    I N V R K E I T E V T S D E D P W C W Y Z P D S K I *
1600   GTACCGGCGGTGA GAAGAA TTTATCT CGGTT CCATTA GAATAA GTGGTC ACAGCACACGGAA CCGCCCAAGATT TAAGTAC GCGGGC GTGAGA AGAATT TCATCT CGGTTCC GTTAGA
1720   ATAAGTGG TCACAC CACACG GAACCGA CATTGT TATTA CATTTA GACAGG AAAATTGGAGCG GAGTAT ATGTGG TGAATGAT GACATT TTGATG TGAATT GCTGGA CGTGCGA ATAAAA
1840   GGTCAAGT TGAAT GGTGCT GTATGCT AGCTTT GTACCA TGTGCT GAATGC GTGTGCA ATGACA TTTGTA TTAACA TTTACTC CCCCCT ATTCCTAAATAT TGTAT TATTGACT TTTTAA
1960   AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

单下划线为叶绿体定位序列;双下划线为十缩肽;阴影为酶功能相关残基;*为终止密码子

图 2 互花米草 *BADH* 的核苷酸序列及其所编码的氨基酸序列

白^[18]。PredictProtein 软件预测 SaBADH 蛋白的二级结构由 43.65% 的 H、17.06% 的 E、39.29% 的 L 组成, SaBADH 蛋白定位于叶绿体。InterProScan 分析 SaBADH 具有碱醛脱氢酶结构域。SaBADH 的三级结构预测显示其为椭球形。SaBADH 的 Blast 比对发现, 互花米草与细叶结缕草、二穗短柄草、高粱

的相似性达到 86% 以上。从 N - J 进化树(图 3)中可知, 互花米草 BADH 与结缕草属细叶结缕草 BADH 亲缘关系最近, 其次是短柄草属二穗短柄草、高粱属高粱、蜀黍属谷子等禾本科单子叶植物的 BADH, 与棉花、山萮菜等双子叶植物的 BADH 亲缘关系较远。

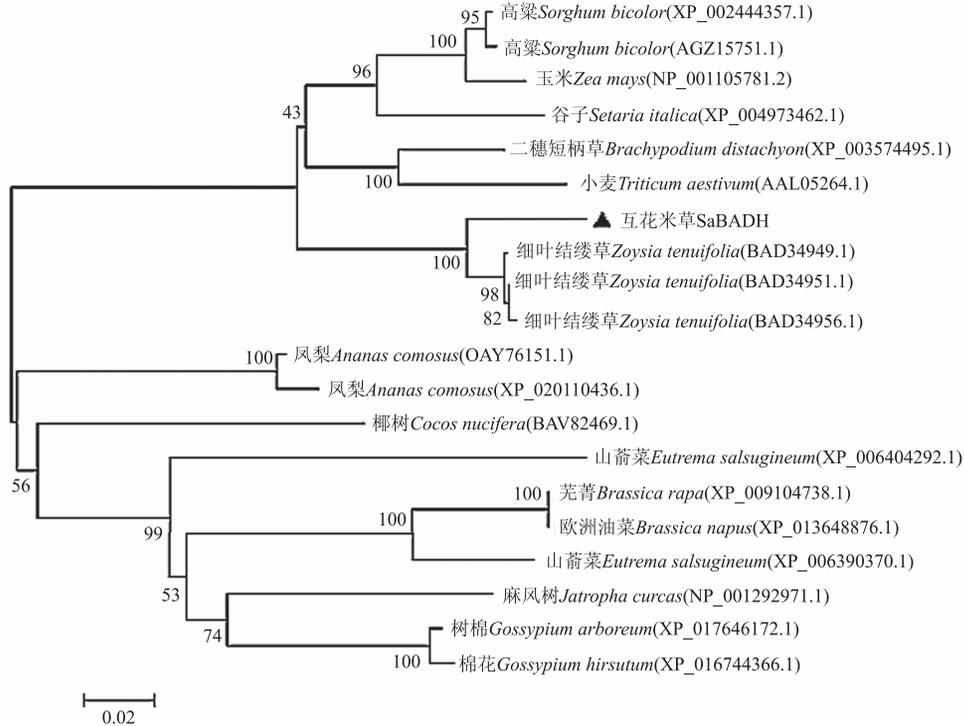
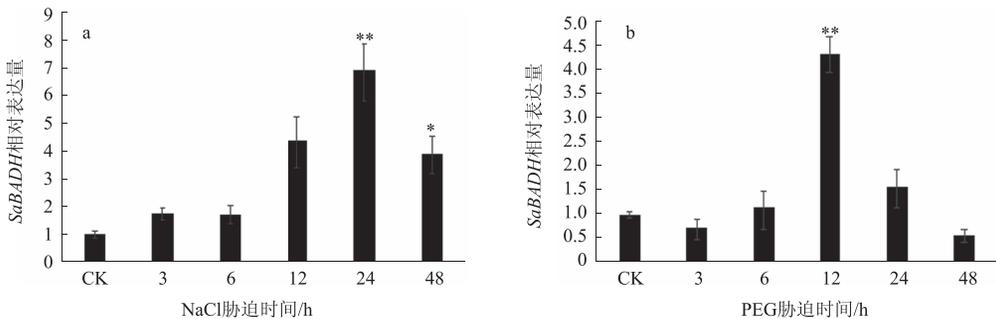


图 3 互花米草和其他植物的 BADH 系统进化树

2.3 互花米草 BADH 基因的表达分析

对在 600 mmol/L NaCl 和 20% 的 PEG 不同胁迫时间处理下的互花米草的 qRT - PCR 分析结果表明(图 4), 随着处理时间的延长, SaBADH 基因的表

达呈现先上升后下降的趋势, 分别在处理 24、12 h 时达到最大值, 分别为对照的 7、4 倍, 且与对照相比差异达到极显著水平, 表明 SaBADH 受 NaCl、PEG 诱导表达, 这与互花米草的耐盐耐旱有密切关系。



*、** 分别表示在 0.05、0.01 水平差异显著

图 4 互花米草 BADH 在 NaCl、PEG 胁迫下的定量表达分析

3 结论与讨论

BADH 是甜菜碱合成过程中的关键酶, 在植物耐逆过程中起重要作用^[18-20], 随着全球土地盐渍化和干旱等非生物胁迫因素的加剧, 研究植物的耐逆

基因意义愈发重大。目前, 已经克隆出多种植物耐逆相关基因, 主要有渗透物质合成酶基因、功能蛋白基因、信号转导相关基因等^[21]。本研究通过 RACE 技术, 从互花米草中克隆出 BADH 基因的全长 cDNA 序列。生物信息学分析预测 SaBADH 为稳定的

具有椭球形三级结构的亲水性蛋白,定位于叶绿体。已有报道指出,*BADH* 定位于叶绿体的序列为 QLFIDGE^[22],推测 *SaBADH* 蛋白的氨基酸序列中的 QLFIDGE 指导其定位到叶绿体。InterProScan 分析 *SaBADH* 具有碱醛脱氢酶结构域。有报道指出,碱醛脱氢酶结构域有保守的 VTLELGKSP 十缩肽^[23],推测 *SaBADH* 蛋白的氨基酸序列中 VSLELGKSP 是该酶的保守十缩肽。系统进化分析显示,*SaBADH* 是序列保守的蛋白质,单子叶与双子叶 *BADH*、禾本科与非禾本科 *BADH* 在进化上有一定的差异,这与植物分类学上的亲缘关系一致。为进一步探讨 *SaBADH* 的耐盐机制,本研究利用 qRT-PCR 仪对 *SaBADH* 在 600 mmol/L NaCl、20% 的 PEG 胁迫处理下的表达量进行了相对定量表达研究。结果发现,*SaBADH* 的相对表达量发生了很大变化,这说明 *SaBADH* 受 NaCl、PEG 诱导表达。在 NaCl 胁迫处理时,随着处理时间的延长 *SaBADH* 的相对表达量逐渐增加,处理 24 h 时达到最大,约为对照的 7 倍,且差异达到极显著水平,之后 *SaBADH* 的相对表达量下降;在 PEG 胁迫处理时,随着处理时间的延长 *SaBADH* 的相对表达量逐渐增加,在处理 12 h 时达到最大,约为对照的 4 倍,且差异达到极显著水平,之后 *SaBADH* 的相对表达量下降。由此可见,*SaBADH* 在盐胁迫和干旱胁迫下基因表达上调,通过增加 *SaBADH* 的表达量来抵御盐和干旱胁迫对自身的毒害,这与互花米草在植物耐逆机制方面有较保守的功能密切相关。

随着土壤盐渍化和干旱问题的日益严重,利用基因工程技术培育耐盐耐旱新品种对于开发利用盐碱、干旱土地有重要意义。本实验室下一步将构建 *SaBADH* 的过量表达载体,转模式植物拟南芥,进一步研究 *SaBADH* 的耐逆功能与分子机制。

参考文献:

- [1] Wood A J, Saneoka H, Rhodes D, *et al.* Betaine aldehyde dehydrogenase in *Sorghum* [J]. *Plantphysiol*, 1996, 110: 1301-1308.
- [2] Jeyanthi R L, Toshiya M, Izumi Y, *et al.* Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Avena sativa* [J]. *Journal of Plant Research*, 2003, 116: 133-140.
- [3] Hideki O, Masumi E. Isolation of cDNA and enzymatic properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Zoysia tenuifolia* [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2005, 162: 1077-1086.
- [4] Weretilnyk E A, Hanson A D. Molecular cloning of a plant betaine aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation to salinity and drought [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1990, 87(7): 2745-2749.
- [5] 李秋莉,张毅,尹辉,等. 辽宁碱蓬甜菜碱醛脱氢酶基因(*BADH*)启动子分离及序列分析[J]. *生物工程学报*, 2006, 22(1): 77-81.
- [6] 何宇锋. 麦冬(*Ophiopogon japonicus*)甜菜碱合成酶基因的克隆与表达研究[D]. 北京:北京林业大学, 2006.
- [7] Fujiwara T, Hori K, Ozaki K, *et al.* Enzymatic characterization of peroxisomal and cytosolic betaine aldehyde dehydrogenases in barley [J]. *Physiologia Plantarum*, 2008, 134(1): 22-30.
- [8] Hideki O, Masumi E. Isolation of cDNA and enzymatic properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Zoysia tenuifolia* [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2005, 162: 1077-1086.
- [9] 高天鹏,王春艳,徐红伟,等. 盐生植物盐节木甜菜碱醛脱氢酶基因的克隆与表达[J]. *植物研究*, 2013, 33(3): 317-324.
- [10] 李敏,张健,王奎山,等. 耐盐柳树 *BADH* 基因克隆及表达分析[J]. *江苏农业学报*, 2013, 29(3): 485-489.
- [11] 郭北海,张艳敏,李洪杰,等. 甜菜碱醛脱氢酶(*BADH*)基因转化小麦及其表达[J]. *植物学报*, 2000, 42(3): 279-283.
- [12] 杨晓玲,东方阳,孙耀中,等. 转 *BADH* 基因水稻幼苗抗盐性研究[J]. *西北植物*, 2006, 26(8): 1627-1632.
- [13] 秦迪,赵翠兰,郑成忠,等. 转 *BADH* 基因大豆耐旱性分析[J]. *中国油料作物学报*, 2015, 37(6): 752-758.
- [14] 郑成忠,王丕武,吴楠,等. 转 *BADH* 基因玉米自交系的抗旱耐盐性分析[J]. *吉林农业大学学报*, 2016, 38(3): 266-273.
- [15] 蒋玉蓉,袁俊杰,陈国林,等. 转甜菜碱醛脱氢酶(*BADH*)基因的棉花的获得及其耐盐性鉴定[J]. *分子植物育种*, 2015, 13(1): 125-131.
- [16] 李春枝,潘彩霞,刘宏伟,等. 转甜菜碱醛脱氢酶基因增强羽衣甘蓝的耐盐性研究[J]. *北方园艺*, 2018(5): 33-38.
- [17] 徐璐,尹海波,张侠,等. 互花米草 *NHX1* 基因的 cDNA 的全长克隆、序列分析及定量表达分析[J]. *江苏农业科学*, 2016, 44(8): 34-38.
- [18] 金杭霞,董德坤,杨清华,等. 碱蓬 *SgBADH* 的克隆与分析及植物表达载体的构建[J]. *核农学报*, 2016, 30(2): 246-251.
- [19] 母连胜,何勇,罗岸,等. 质体基因工程在植物育种中的应用研究进展[J]. *河南农业科学*, 2017, 46(6): 1-12.
- [20] 韩芸,孙守钧,裴忠有,等. 高粱耐盐性研究进展[J]. *河南农业科学*, 2012, 41(6): 1-8.
- [21] 化焯,才华,柏锡,等. 植物耐盐基因工程研究进展[J]. *东北农业大学学报*, 2010, 41(10): 150-156.
- [22] Nakamura T, Nomura M, Mori H, *et al.* An isozyme of betaine aldehyde dehydrogenase in barley [J]. *Plant Cell Physiol*, 2001, 42(10): 1088-1092.
- [23] 曹红利,郝心愿,月川,等. 茶树碱醛脱氢酶基因(*CsBADH1*)的全长 cDNA 克隆与表达分析[J]. *茶叶科学*, 2013, 33(2): 99-108.