

宁夏枸杞甜菜碱乙醛脱氢酶(*LbBADH2*)的克隆与序列分析樊云芳¹, 陈晓军², 曹有龙^{1*}

(1. 国家枸杞工程技术研究中心, 宁夏银川 750002; 2. 宁夏农业生物技术重点实验室, 宁夏银川 750002)

摘要 以宁夏枸杞为试验材料, 利用同源克隆技术, 设计简并引物, 克隆得到一个新的甜菜碱醛脱氢酶基因。该基因全长 cDNA 为 1 527 个碱基, 编码 508 个氨基酸, 编码区两侧翼分别具有 5'UTR (47 bp) 和 3'UTR (129 bp)。在推导的氨基酸序列中, 含有醛脱氢酶所具有的高度保守的十肽(VTLEIGGKSP)以及与酶功能有关的半胱氨酸残基(C)。进化分析表明, 它与番茄甜菜碱醛脱氢酶亲缘关系最近, 与其他藜科植物亲缘关系较远。该基因的获得有助于理解枸杞这一盐生植物耐盐机理, 为培育新的耐盐枸杞奠定理论基础。

关键词 宁夏枸杞; 同源克隆; *BADH2*

中图分类号 S567.1⁺9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)35-12798-05

Cloning and Sequence Analysis of *LbBADH2* in *Lycium barbarum*

FAN Yun-fang¹, CHEN Xiao-jun², CAO You-long^{1*} (1. National Engineering Research Center for Wolfberry, Yinchuan, Ningxia 750002; 2. Key Lab of Agricultural Biotechnology of Ningxia, Yinchuan, Ningxia 750002)

Abstract A new gene of Betaine Aldehyde Dehydrogenase (BADH), named *LbBADH2*, was obtained by RACE technology in *Lycium barbarum*. The full cDNA of *LbBADH2* is consist of 1 527 base pairs and encode 508 aa., 5'UTR (47 bp) and 3'UTR (129 bp) locating both side of it. A high conserved decapeptide sequence 'VTLEIGGKSP' and Cys, which are related to the activity of enzyme, are found in putative amino acid among all BADH. The evolutionary analysis showed that *LbBADH2* is closer with *Solanum lycopersicum* than others plant in genetic relationship. The obtaining of *LbBADH2* will help understanding the mechanism of salt tolerance and lay theoretical foundation for developing new salt-tolerance variety in *Lycium barbarum*.

Key words *Lycium barbarum*; Homo-cloning; *BADH2*

枸杞(*Lycium barbarum* L.)属于茄科枸杞属落叶灌木,也是其中唯一一属盐生植物,其根系发达,具有抗旱、耐盐碱、耐寒、耐瘠薄的特点,主要种植于轻度盐渍化地区,是盐渍化土地改良的先锋植物。在当前西部生态建设和中药材基地建设,枸杞具有很高的生态、经济和社会价值^[1-2]。

甘氨酸甜菜碱(简称甜菜碱)是甘氨酸的衍生物,被认为是最好的渗透调节剂。在植物体内,甜菜碱由胆碱经两步氧化生成,催化第2步反应的是甜菜碱醛脱氢酶(betaine aldehyde dehydrogenase, *BADH*)^[3]。目前 *BAHD* 已经从盐节木(*Halocnemum strobilaceum*)^[4]、盐穗木(*Halostachys caspica*)^[5]、碱蓬(*Suaeda liaotungensis*)^[6-7]、梭梭(*Haloxylon ammodendron*)^[8]、菠菜(*Spinacia oleracea*)^[9]、滨藜(*Atriplex centralasiatica*)^[10]、山菠菜(*Atriplex hortensis*)^[11]、甜菜(*Beta vulgaris*)^[12]、盐爪爪(*Kalidium foliatum*)^[13]等藜科植物,小麦(*Triticum aestivum*)^[14]、水稻(*Oryza sativa*)、短芒大麦草(*Hordeum brevisubulatum*)等禾本科植物以及油菜(*Brassica napus*)^[15]等其他植物中分离克隆。在盐生植物宁夏枸杞中虽然已经克隆了 *BADH1*^[16],但在枸杞复杂的耐盐生理过程中是否存在除 *BAHD1* 外的甜菜碱醛脱氢酶尚未见报道。笔者以宁夏枸杞叶片为试验材料,利用同源克隆技术分离克隆到 *BADH2*,从进化角度分析其在耐盐生理过程中的保守性。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 植物材料。2013年5月,在宁夏枸杞种质资源圃中,

基金项目 国家863计划(2013AA102606-04);国家自然科学基金项目(31260351)。

作者简介 樊云芳(1981-),女,甘肃天水人,助理研究员,硕士,从事枸杞细胞与分子生物学研究。*通讯作者,研究员,博士,硕士生导师,从事枸杞研究。

收稿日期 2014-10-31

取枸杞1号幼嫩枸杞根、茎、叶片、花等植物材料,低温冰盒保藏后带回实验室,然后置于-70℃冰箱中备用,随后提取总RNA。

1.1.2 载体与试剂。RNA提取试剂盒为SV Total RNA Isolation System(Promega);RNA反转录试剂盒为mProm-II Reverse Transcriptase(Promega)、离心柱型琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒为Wizard SV Gel and PCR Clean-up System(Promega);T连接载体试剂盒为pGEM-T easy II Vector(Promega),5'-RACE和3'-RACE试剂盒均为Takara公司产品,Taq DNA聚合酶与DNA分子量marker为Tiangen公司产品;引物由北京奥科公司合成;其余试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 总RNA的提取。按Promega公司SV Total RNA Isolation System试剂盒操作指南进行。

1.2.2 总cDNA的反转录。按Promega公司mProm-II Reverse Transcriptase试剂盒进行。取2μg枸杞叶片总RNA,以Oligo dT为引物,进行总cDNA反转录。反应体系为20μl,MMIV RT buffer 4μl,总RNA 2μl,dNTP 2μl,反转录酶MMIV 1μl,Oligo(dT)16 1μl,RNA酶抑制剂RNasesin 0.5μl,加DEPC处理的H₂O至20μl。反转录反应为42℃ 60min,95℃ 5min,3℃ 3min。反转录产物置于-20℃备用。

1.2.3 *BADH*基因核心序列的PCR扩增。根据GenBank上已发表的*BADH*基因序列(GenBank登录号分别为FJ228482、BT013588、FJ514799、DQ497233、DQ923617)设计一对简并引物,从枸杞叶片cDNA扩增该基因的核心片段。上游引物为P1(CGNCARYVTTCATYGAYGG),下游引物为P2(TTCYCCDAGYTCDCGCCAAA NCCRCTRCG),预期扩增片段大小为1392bp。PCR反应体系为25μl,包含10×buffer

2.5 μl , dNTP (2.5 mmol/ μl) 1.5 μl , 上、下游引物 (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$) 各 1 μl , *Taq* 聚合酶 (5 U/ μl) 1 μl , 总 cDNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 1 μl , 加 ddH₂O 至 25 μl 。反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 50 s, 30 个循环后, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

1.2.4 *BADH* 基因 3'-RACE 扩增。根据其他已发表物种的 *BADH2* 基因 cDNA 序列设计 *BADH2* 基因的 3'-RACE 的引物 P3 (CTGAAGAGG AAGCCATTGAG) 和 P4 (TTCTCAGT-CAGGGTGTGTC), 按照 Takara 3'-Full RACE Core Set Ver. 2.0 说明书进行 3'-RACE 扩增, 预期扩增片段大小为 362 bp。

1.2.5 *BADH* 基因 5'-RACE 扩增。根据其他已发表物种的 *BADH2* 基因 cDNA 序列设计 5'-RACE 引物 P5 (TCAG-GATGTGAAACCAAAGGAGAACCAG) 和 P6 (GAGGTAAT-AGATGCCATTTTCAGACGGCT), 按照 Takara 5'-Full RACE Kit 说明书进行 5'-RACE 扩增, 预期扩增片段大小为 628 bp。

1.3 克隆与测序

1.3.1 *BADH2* 基因完整序列的测序与拼接。所有基因片段送北京天根生物公司测序。将核心序列、3'-RACE 测序结果与 5'-RACE 测序结果进行拼接, 所得即为 *BADH2* 基因 cDNA 的完整序列。

1.3.2 *BADH2* 基因 cDNA 完整 ORF 的 PCR 扩增。根据测序结果, 设计 *BADH2* 基因完整 ORF 序列的上游引物 P7 (GAAAACTCATATCAGTAGCATTTAGC) 和下游引物 P8 (GCTCTTAAAGATGAAATAAACAGAAGAGG), 以枸杞叶片反转录产物为模板, 进行 PCR 扩增, 测序确认, 预期扩增片段大小为 1 527 bp。

1.4 *BADH2* 基因的进化分析 采用 www.ncbi.nlm.nih.gov 中的 BLAST 软件、DNAMAN 7.0, 对编码 *BADH2* 蛋白基因序列进行生物信息学分析; 采用 MEGA 5.05 软件绘制进化树, 计算方法采用 Neighbor-joining 方法, Bootstrap 设置为 1 000^[9]。

2 结果与分析

2.1 *LbBADH2* cDNA 序列的获得 以枸杞叶片 cDNA 为模板, 设计简并引物扩增 *LbBADH2* 保守核心序列, 扩增片段大小为 1 392 bp (图 1), 与预期大小一致, 测序获得 *LbBADH2* 保守核心序列; 3'-RACE 扩增片段大小为 362 bp (图 2), 与设计一致, 测序后获得 *LbBADH2* 3' 序列; 5'-RACE 结果扩增片段大小为 628 bp (图 4), 与设计一致, 测序后获得 *LbBADH2* 5' 序列; 将 *LbBADH2* 保守核心片段、3' 片段、5' 片段用 DNAMAN (V7.0) 生物软件进行拼接, 重新设计引物, 扩增该基因全长序列, 扩增大小为 1 527 bp (图 4), 与预计大小一致, 测序验证获得 *LbBADH2* 全长 cDNA 序列。

2.3 *LbBADH2* cDNA 序列分析 *LbBADH2* 全长 cDNA 序列 (GenBank 登录号: KM036501), 推导氨基酸序列 (图 5), 可见 *LbBADH2* 的编码区为 1 527 bp, 编码区两侧翼分别具有 5'UTR (47 bp) 和 3'UTR (129 bp); 用软件 polyadq 预测到在 poly(A) 尾前 46 位出现终止信号 AATAAA, 代表多聚核苷酸

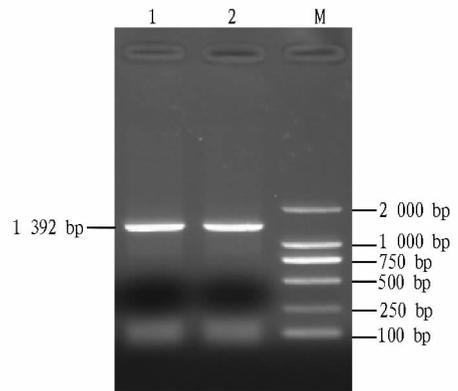


图1 *LbBADH2* 保守区域扩增

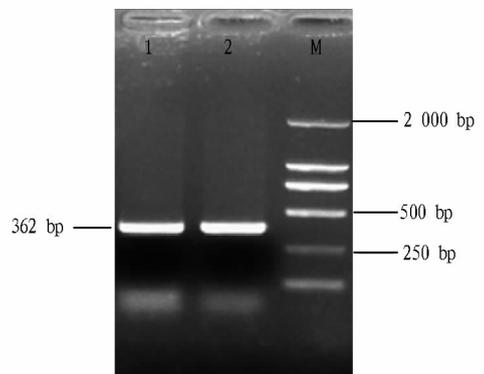


图2 *LbBADH2* 3'-RACE 片段扩增

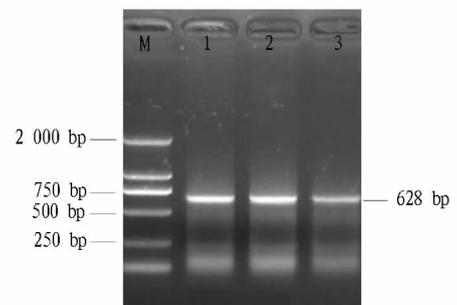


图3 *LbBADH2* 5'-RACE 片段扩增

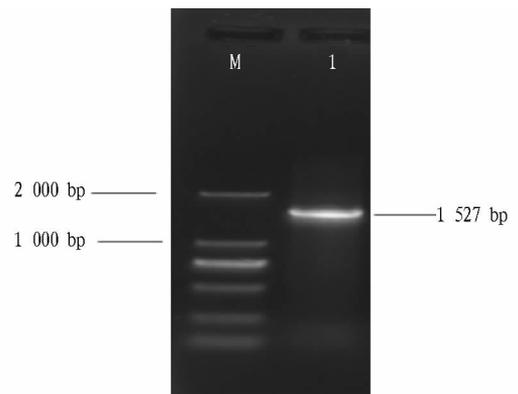


图4 *LbBADH2* 全长 cDNA 扩增

A 合成信号。推测该开放阅读框编码 508 个氨基酸的 BADH 蛋白, 分子量为 56 147.5, 理论等电点为 5.30。编码蛋白质中碱性氨基酸为 lys 和 Arg, 占氨基酸总数的 11.2%; 酸性氨

基酸为 Asp、Glu、Asn 和 Gln,占氨基酸总数的 18.5%;疏水氨基酸为 Ala、Ile、Leu、Phe、Trp、Val、Tyr 和 Pro,占氨基酸总数的 45.87%;极性氨基酸为 Gly、Asn、Cys、Gln、Ser、Thr 和 Tyr,占氨基酸总数的 35.3%。在推导的氨基酸序列中,含有醛脱氢酶

所具有的高度保守的十肽(VTIEIGGKSP)以及与酶功能有关的半胱氨酸残基(C)(图5阴影部分)。这些残基可能包含 NAD⁺结合位点和酶催化位点^[17]。在5'端含有不典型的信号肽 QIFIDGE,表明该酶可能定位于叶绿体中^[18]。

```

1      GAAAAGTGTAGCCACACACATAAAGTAGTAAGTGCAGTGATCAAGCATGGCAATTCTCTA
1      M A I P
61     1  ATATACGGATCCCTTGTAGGCAGTTGTTTCATCGACGGTGAATGGAGAGAACCCGTTAAGA
5      N I R I P C R Q L F I D G E W R E P V K
121    5  AGAATCGGCTACCTATCATCAATCCCTCCACTGAAGAACTATCGGGGATATCCGGCAG
25     K N R L P I I N P S T E E T I G D I P A
181    25 CTACATCGGAGGATGTAGATATCGCCGTCAGAGCAGCAAGGAATGCGCTACGTCGAGATG
45     A T S E D V D I A V R A A R N A L R R D
241    45 ACTGGGGTTCTACAACCTGGAGCACAGCGCGCTAAATATCTTCGTATTGCTGCTAAGG
65     D W G S T T G A Q R A K Y L R A I A A K
301    65 TACTGGAGAAAAAGCCTGAAGTACTGACTGAGACGATTGATAGTGGAAAACCCCTGGT
85     V L E K K P E L A T L E T I D S G K P W
361    85 TTGAGGCTGCTGCTGATATGGATGATGTCGTAGCGTGTTFAGTACTATGCAGATCTCG
105    F E A A A D M D D V V A C F E Y A D L
421    105 CAGAAGCTTTGGATTCCAAAAAGAAGACTGAAGTTAAACTTCATTTGGATGCATTCAAGA
125    A E A L D S K K K T E V K L H L D A F K
481    125 CCCATGTTTATAGAGAGCCTCTTGGTGTGTGGGGTTGATTACTCCATGGAATTATCCGC
145    T H V Y R E P L G V V G L I T P W N Y P
541    145 TATTGATGAGCACATGGAAAGTTGCTCCTGCGCCTAGCTGCTGGTGTGACGACGACTTA
165    L L M S T W K V A P A L A A G C A A V L
601    165 AGCCGCTGAAAATGGCATCTATTACCTCTTTGGAGTTGGGTGAAGTCTGTAGAGAGGTGG
185    K P S E M A S I T S L E L G E V C R E V
661    185 GTCTTCTCTCGGGCCCTTAACATACTAACTGGATTGGGACATGAAGCTGGTTCTCCTT
205    G L P P G A L N I L T G L G H E A C A S P
721    205 TGGTTGCACATCCTGATGTTGATAAGATTTTCATTTACTGGAAGTGGCCTCAGAGGGTCA
225    L V S H P D V D K I S F T G S G L T G V
781    225 AGATCATGACCGCTGCAGCTCAACTTGTTAAACCAGTTACTCTTGAGCTTGGTGGAAAAA
245    K I M T A A A Q L V K P V T L E L G G K
841    245 GTCCAATAGTCGTGTTTGTGACATTCACCTTGATATAGCTGTTGAGTGGACTCTTT
265    S P I V V F D D I H D L D I A V W T L
901    265 TTGGCTGCTTTTGGACAAAACGGTCAAATTTGCAGTGCAACATCACGCTCTTATATTGCAGG
285    F G C F W T N G Q I C S A T S R L I L Q
961    285 AAACAATTGCTTCAAAAATTTTGGACAGACTTCTGGAGTGGACGAAAAACATCAAAAATCT
305    E T I A S K F L D R L L E W T K N I K I
1 021 305 CAGATCCCTGGGAAGAAGACTGCAAGCTTGGTCTGTGATTGCTGGACAGTATGAGA
325    S D P L E E D C K L G P V I S R G Q Y E
1 081 325 AGATCATGAAGTTTATATCAACAGCCAAAAATGAAGGTGCAACCATCTTTATGGTGGCG
345    K I M K F I S T A K N E G A T I L Y G G
1 141 345 AACGGCTCCGCACTTAAAGAAAGGATATTATATTCAACCAACATCATTACTGATGTTG
365    E R P P H L K K G Y Y I Q P T I T D V
1 201 365 ATACGTCCATGGAAATCTGGAAGAGGAGGTATTTGGACCTGTTCTTTTCTCAAAAACAT
385    D T S M E I W K E E V F G P V L C L K T
1 261 385 TTA AAACTGAAGAGGAAGCCATTGAGCTAGCAAATGATACCAGGTATGGTTGGCTTCTG
405    F K T E E E A I E L A N D T R Y G L A S
1 321 405 CTATTTTGTCAAAAGACCTTGATAGGTGTGAACGTTTCGAAAAGGCTTCTCAGTCAGGGT
425    A I L S K D L D R C E R F A K A S Q S G
1 381 425 GTGCTGGATCAACTGCTCGCAGCCATGCTTTTGGCAACCTCCATGGGGCGGTAAAAAGC
445    C V W I N C S Q P C F W Q P P W G G K K
1 441 445 GTAGTGGATTGGACGCGAACTTGGGGAATGGGGTCTTGAGAAGTACCTAAACATTAAGC
465    R S G F G R E L G E W G L E N Y L N I K
1 501 465 AGGTGACTCAGTATGCATCTCCAACGAACCATGGGGTTTTTACAAGTCTCTTCAAATC
485    Q V T Q Y A S P N E P W G F Y K S P S N
1 561 485 TGCTAAACTGTAAAGTGGTCAAGGAACCTGTGAATGATGAAGTAGAGATGAAACTTGATC
505    L L N C *
1 621 505 TAGTGTAGAAGTGTGTTTGTGTTATCATCAAGTCTAATAAACTGTTTGGACGGGACAA
1 681 565 AATATGGATTGCATTTTCTTTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

注:—3'UTR;=5'UTR;ATG 起始密码;TAA 终止密码;加粗阴影部分为保守的十肽基序'VTIEIGGKSP'和半胱氨酸残基;AATAAA 为 ploy A 合成信号。

图5 LbBADH2 阅读框和推测氨基酸

2.3 LbBADH 进化分析 用 DNAMAN7.0 分析克隆 LbA-DH2 基因与登录 LbBADH1 (基因登录号:ACQ99195) 基因氨

(AIDH) 基因家族^[20], 大麦中含有一个 2~3 个成员小的多基因家族^[21]; 胡杨^[22]、甘菊^[23]、三角叶滨藜^[24] 均克隆到该基因的 2 个成员。这种多个转录产物有可能是一个转录本不同剪切方式造成, 甘菊 2 个基因可能是由于此方式造成。但从枸杞 2 个基因比对和进化分析看出, 推测它们是由不同基因所编码。这 2 个基因在应答盐胁迫时, 不同的响应方式及表达模式还需进一步研究。

在已报道的 BADH 氨基酸序列中, 存在 2 种有关该酶蛋白定位的信号肽。一种是 N-端信号肽, 其氨基酸序列为 QIFIDGE, 被认为是定位于叶绿体的信号, 但该信号肽缺乏典型性; 另一种是 C-端信号肽, 氨基酸序列为 SKI, 是定位于过氧化物酶体中的信号。从目前研究结果看, 将具有 C-端信号肽 SKI 的 BADH 定位于过氧化物酶体已无争议, 但对具有不典型 N-端信号肽的 BADH 定位问题尚有争论。在 *LbBADH2* 推导的氨基酸序列中, 含有醛脱氢酶所具有的高度保守的十肽 (VTIEIGGKSP) 以及与酶功能有关的半胱氨酸残基 (C)。这些残基可能包含 NAD⁺ 结合位点和酶催化位点^[17]。在 5' 端含有不典型的信号肽 QIFIDGE, 表明该酶可能定位于叶绿体中^[18]。

提高农作物 (大豆^[25]、玉米^[26])、牧草 (苜蓿^[27]) 耐盐性的 BADH 基因转化已有报道, 该研究所克隆的宁夏枸杞 *BADH2* 基因为耐盐植物定向培育提供了选择空间。

参考文献

- [1] 毛桂莲, 许兴. 枸杞耐盐突变体的筛选及生理生化分析 [J]. 西北植物学报, 2005, 25(2): 275-280.
- [2] 孟凤, 郁松林, 郑强卿, 等. 甜菜碱与植物抗性关系之研究进展 [J]. 中国农学通报, 2008, 24(4): 225-228.
- [3] 梁峰, 骆爱玲. 甜菜碱和甜菜碱合成酶 [J]. 植物生理学通讯, 1995, 31(1): 1-8.
- [4] 高天鹏, 王春燕, 徐红伟, 等. 盐生植物盐芥木甜菜碱醛脱氢酶基因的克隆及表达 [J]. 植物研究, 2013, 33(3): 317-324.
- [5] 关波, 胡有贞, 张富春, 等. 盐穗木甜菜碱醛脱氢酶基因 (BADH) 的克隆及其在盐胁迫下的表达分析 [J]. 植物生理学通讯, 2010(1): 47-50.
- [6] 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.
- [7] 王三红, 陶建敏, 张红梅, 等. 盐地碱蓬甜菜碱合成酶基因的克隆及植物共表达载体的构建 (英文) [J]. 西北植物学报, 2007(2): 215-222.
- [8] 石磊, 甘晓燕, 陈虞超, 等. 梭梭甜菜碱醛脱氢酶基因克隆及序列分析 [J]. 西北植物学报, 2010, 30(2): 223-228.
- [9] 舒卫国, 艾万东, 陈受宜, 等. 菠菜甜菜碱醛脱氢酶基因全序列分析

- [J]. 科学通报, 1997, 42(22): 2441-2445.
- [10] 陈秀娟, 王峻岭, 赵彦修, 等. 中亚滨藜甜菜碱醛脱氢酶基因的表达特性 [J]. 植物生理学报, 2001, 27(4): 309-312.
- [11] 肖岗, 张耕耘, 刘凤华, 等. 山菠菜甜菜碱醛脱氢酶基因研究 [J]. 科学通报, 1995, 40(8): 741-745.
- [12] TABUCHI T, OKADA T, TAKASHIMA Y, et al. Transcriptional response of glycinebetaine-related genes to salt stress and light in leaf beet [J]. Plant Biotechnol, 2006, 23: 317-320.
- [13] 曾幼玲, 幸婷, 蔡忠贞, 等. 盐生植物盐爪爪甜菜碱醛脱氢酶基因的克隆及在盐胁迫下的 BADH 基因的表达 [J]. 云南植物研究, 2007, 29(1): 79-84.
- [14] 李永华, 尚玉萍, 杨芳绒, 等. 小麦甜菜碱醛脱氢酶基因在烟草中的转化及表达 [J]. 河南农业大学学报, 2007, 41(1): 12-14, 20.
- [15] 柴靛, 李浩杰, 蒲晓斌, 等. 甘蓝型油菜甜菜碱醛脱氢酶基因 (BnBADH-1) 的克隆与真核表达载体的构建 [J]. 分子植物育种, 2013(1): 53-61.
- [16] 田跃胜, 许洁婷, 唐克轩, 等. 枸杞甜菜碱醛脱氢酶基因全长 cDNA 的克隆与表达分析 [J]. 扬州大学学报: 农业与生命科学版, 2010, 31(2): 48-52.
- [17] WERETILNYK E A, HANSON A D. Betaine aldehyde dehydrogenase from spinach leaves: purification, in vitro translation of the mRNA, and regulation by salinity [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1989, 271(1): 56-63.
- [18] 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 of the United States of America, 1990, 87(7): 2745-2749.
- [19] MCCUE K F, HANSON A D. Salt-inducible betaine aldehyde dehydrogenase from sugar beet: cDNA cloning and expression [J]. Plant Molecular Biology, 1992, 18(1): 1-11.
- [20] KOTCHONI S O, JIMENEZ-IOPEZ J C, GAO D. Modeling-dependent protein characterization of the rice aldehyde dehydrogenase (AIDH) superfamily reveals distinct functional and structural features [J]. PLoS One, 2010, 5(7): 11516.
- [21] MANABU ISHITANI, TOSHIHIDE NAKAMURA, SEUNG YOUN HAN et al. Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress and abscisic acid [J]. Plant Molecular Biology, 1995, 27(2): 307-315.
- [22] 刘佳琪, 杨雪, 李迪, 等. 胡杨甜菜碱醛脱氢酶基因的功能分化 [J]. 生物工程学报, 2012, 28(3): 329-339.
- [23] 刘振林, 曹华雯, 夏新莉, 等. 甘菊 BADH 基因 cDNA 的克隆及在盐胁迫下的表达 [J]. 武汉植物学研究, 2009, 27(1): 1-7.
- [24] 何晓兰, 侯喜林, 吴纪中, 等. 三角叶滨藜甜菜碱醛脱氢酶 (BADH) 基因的克隆及序列分析 [J]. 南京农业大学学报, 2004, 27(1): 15-19.
- [25] 刘志华, 姜振峰, 王宏燕, 等. 转 BADH 基因大豆对盐碱土壤根际微生物量碳氮的影响 [J]. 作物杂志, 2014(3): 50-53.
- [26] 邸宏, 周成生, 曾兴, 等. 转 BADH 基因耐盐碱玉米对根际土壤酶活性的影响 [J]. 东北农业大学学报, 2014(4): 25-29.
- [27] 张丽, 甘晓燕, 石磊, 等. 新疆大叶紫花苜蓿 BADH 基因转化体系的研究 [J]. 草地学报, 2014(2): 359-365.

(上接第 12797 页)

- [42] 宋学会, 黎云祥, 苏志先. 马尾松苗分枝率研究 [J]. 四川师范大学学报, 2001, 22(2): 158-160.
- [43] 祝宁, 陈力. 植物种群生态学研究现状与进展 [M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1994: 69-73.
- [44] 魏媛, 喻理飞. 构树枝构件种群生态特征研究 [J]. 浙江林业科技, 2009, 29(5): 34-37.
- [45] BORCHERT R, SLADE N A. Bifurcation ratios and the adaptive geometry of trees [J]. Bot Gaz, 1981, 142: 394-401.

- [46] 谢元贵, 杨泊, 陈洪, 等. 喀斯特适生植物小蓬竹不同龄级种群的构件特征 [J]. 贵州农业科学, 2011, 39(4): 167-169.
- [47] 张学勇, 杨允菲, 邵奎龙, 等. 辽东半岛不同生境结缕草无性系种群构件生物量结构 [J]. 草业科学, 2006, 23(4): 78-81.
- [48] CHEN W, COLEMAN D C, BOX J E. Root dynamics, production and distribution in agr-ecosystems on the Georgia Piedmont using minirhizotrons [J]. J Appl Ecol, 1990, 27: 592-604.
- [49] 范广芝, 李海燕, 杨允菲. 割草场不同演替系列羊草和光稃茅香种群构件结构的研究 [J]. 草业科学, 2006, 23(2): 34-36.