

甘菊 *BADH* 基因 cDNA 的克隆及在盐胁迫下的表达

刘振林^{1,3}, 曹华雯¹, 夏新莉², 尹伟伦², 戴思兰^{1*}

(1. 北京林业大学园林学院, 北京 100083; 2. 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083;

3. 河北科技师范学院园艺园林系, 河北昌黎 066600)

摘要: 利用 PCR、RT-PCR 和 PCR-RACE 技术,从菊科植物甘菊(*Dendranthema lavandulifolium*)中克隆到 2 个甜菜碱醛脱氢酶(betaine aldehyde dehydrogenase, BADH)基因的同源基因,分别命名为 *DIBADH1* 和 *DIBADH2*, GenBank 登录号分别为 DQ011151 和 DQ011152。*DIBADH1* 的 cDNA 全长 1821 bp,其开放阅读框编码 503 个氨基酸的蛋白质;*DIBADH2* 全长 1918 bp,编码 506 个氨基酸的蛋白质。两个基因核苷酸序列的同源性为 97%,推导的氨基酸序列的同源性为 98%。与已发表的其它植物 *BADH* 基因氨基酸序列的同源性在 64% 以上。在推导的氨基酸序列中,均含有醛脱氢酶所具有的高度保守的十肽(VTLELGKSP)以及与酶功能有关的半胱氨酸残基(C)。在推导的氨基酸序列的系统关系中,甘菊位于其它双子叶植物和单子叶植物之间,与其植物分类的系统关系相吻合。RT-PCR-Southern 半定量表达分析表明,甘菊 *BADH* 基因家族中存在表达受盐诱导的成员。

关键词: 甜菜碱醛脱氢酶基因; 甘菊; cDNA 克隆; 盐胁迫表达

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2009)01-0001-07

Cloning and Expression Analysis of Betaine Aldehyde Dehydrogenase Gene from *Dendranthema lavandulifolium* on Salinity

LIU Zhen-Lin^{1,3}, CAO Hua-Wen¹, XIA Xin-Li², YIN Wei-Lun², DAI Si-Lan^{1*}

(1. College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;

2. College of Biology Science and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;

3. Department of Horticulture and Landscape Architecture, Hebei Normal University of Science and Technology, Changli, Hebei 066600, China)

Abstract: By PCR, RT-PCR and PCR-RACE technique, two novel homologue genes of *BADH* gene were cloned from *Dendranthema lavandulifolium*, GenBank accession numbers are DQ011151 and DQ011152. The full length cDNA of *DIBADH1* is 1821 bp, encoding 503 amino acids (aa), and the full length of *DIBADH2* is 1918 bp, encoding 506 amino acids (aa). The similarity between the two sequences is 97%, and the similarity of the deduced amino acids is 98%. Encoded protein by the two sequences and other published *BADH* sequences also shared above 64% identity at the amino acid level. The result showed *BADH* gene was conserved. Both the deduced amino acid sequences contain the conserved decapptide (VTLELGKSP) and cysteine residue (C) in aldehyde dehydrogenase (ALDHs). According to the phylogenetic tree of the deduced amino acid sequences, *D. lavandulifolium* located between other dicotyledon plants and monocotyledon plants, which was identical with the plant taxonomy relationship. Semi-quantitative gene expression analysis by RT-PCR-Southern showed that there was at least a member induced by salt in the family of *BADH* from *D. lavandulifolium*.

Key words: Betaine aldehyde dehydrogenase gene; *Dendranthema lavandulifolium*; Cloning of cDNA; Expression on salinity

甘菊(*Dendranthema lavandulifolium*)为菊科菊属植物,分布于我国大部分地区,自然生长于山坡、岩石、河谷、荒地、丘陵、海滨等处,具有较强的耐旱、

耐盐碱能力。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,催化第二步反应

收稿日期:2008-03-24,修回日期:2008-06-09。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30471419);北京市自然科学基金项目(502205);国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2007AA021403)。

作者简介:刘振林(1970-),男,副教授,博士,从事园林植物遗传育种研究;戴思兰(1962-),女,教授,博士,博士生导师,从事园林植物遗传育种和花卉分子生物学研究。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail:silandai@gmail.com)。

的是甜菜碱醛脱氢酶(betaine aldehyde dehydrogenase, BADH)^[1]。目前,BADH 基因已从藜科植物菠菜(*Spinacia oleracea*)、甜菜(*Beta vulgaris*)、山菠菜(*Atriplex hortensis*)、辽宁碱蓬(*Suaeda liaotungensis*)、中亚滨藜(*Atriplex centralasiatica*)、三角叶滨藜(*Atriplex triangularis*)、苋科植物千穗谷(*Amaranthus hypochondriacus*)、马鞭草科植物海榄雌(*Avicennia marina*)、以及禾本科植物大麦(*Hordeum vulgare*)、高粱(*Sorghum bicolor*)、水稻(*Oryza sativa*)、小麦(*Triticum aestivum*)、玉米(*Zea mays*)^[2-15]等植物中得到分离和鉴定。菊科是被子植物中最大的科,也是双子叶植物中进化程度最高的科,但迄今为止,尚未有关于菊科植物甜菜碱生物合成途径及相关酶基因的报道。本研究分离了甘菊的 BADH 基因(已在文献^[16]中进行了登记),并对其在盐胁迫下的表达变化作了初步的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 甘菊采于北京林业大学校园内,并于北京林业大学花圃进行盆栽种植。选择长势相同的盆栽甘菊,分别采用终浓度为 0、200、400 mmol/L 的 NaCl 溶液处理。处理方法为:每隔 2 d 浇 1 次清水或 NaCl 溶液,NaCl 溶液的浓度每次以 100 mmol/L 的浓度递增,直至终浓度为 400 mmol/L 停止,2 d 后同时摘取各处理的幼嫩叶片,经液氮冷冻后置于 -70℃ 冰箱保存备用。

1.1.2 载体与试剂 T 载体(pMD18-T vector)、RT-PCR 试剂盒(mRNA selective PCR Ver. 1.1)为 Takara 公司产品;5' RACE 试剂盒(5' RACE system for rapid amplification of cDNA ends, Version 2.0)为 Invitrogen 公司产品;Southern 杂交采用 Roche 公司生产的高效 DNA 地高辛标记和检测试剂盒 I (DIG-high prime DNA labeling and detection starter kit I, 目录号为 1745832);Taqplus DNA 聚合酶购自上海生工;离心柱型琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、感受态细胞 TOP10 购自北京天为时代科技有限公司;引物由上海生工合成。

1.2 方法

1.2.1 总 DNA 和 RNA 的提取 甘菊总 DNA 的提取采用 CTAB 法,具体参见文献^[17]。RNA 的提取采用改进的异硫氰酸胍法,具体方法如下:在 2 mL 的离心管中加入 750 μL 的变性液[4 mol/L 异硫氰酸胍、25 mmol/L 柠檬酸钠、0.5% (W/V) 十二

烷基肌氨酸钠、0.1 mol/L β-巯基乙醇]置于冰上预冷。取 0.15 g 幼嫩叶片,于研钵中加液氮研磨成细粉,迅速转入离心管中,室温下震荡混匀后,加入 1/10 体积 2 mol/L 的醋酸钠(pH = 4.0),充分混匀,加入 2/3 体积的水饱和酚,震荡 15 s,冰浴 5 min。加入 1/3 体积的氯仿,剧烈震荡 10 s,冰浴 30 min,其间震荡数次。4℃、12 000 r/min 离心 20 min。转移上清,加入 1/2 体积水饱和酚,1/2 体积氯仿,震荡 10 s,冰浴 5 min。转移上清,加 2 倍体积无水乙醇,-70℃ 放置 30 min。4℃、12 000 r/min 离心 20 min。2 mol/L 氯化锂悬浮沉淀 1 次。4℃、12 000 r/min 离心 20 min。加入适量体积的 DEPC 处理的水溶解沉淀,并缓慢加入 1/2 体积的无水乙醇,混匀,-20℃ 放置 1 h。4℃、12 000 r/min 离心 20 min。将上清转入 1.5 mL 离心管中,加入 1/10 体积 3 mol/L 醋酸钠(pH = 5.2),3/2 体积的无水乙醇,-70℃ 放置 30 min。4℃、13 000 r/min 离心 20 min。沉淀用 70% 乙醇洗涤 2~3 次,晾干 15 min,10 μL DEPC 处理的水溶解沉淀,备用。

1.2.2 DIBADHI 核心片段的 PCR 扩增 根据 GenBank 上已发表的 BADH 基因序列(GenBank 登录号分别为 M31480、X58462、X69770、AF017150、AB043539、AB043540、D26448、U12196)设计一对兼并引物,从甘菊总 DNA 扩增该基因的核心片段。上游引物为 P1:5'-ATGGC(A,T)AC(A,T)TGGA(A,G)GTTG-3';下游引物为 P2:5'-GT(A,T)GCACT(G,A)CA(A,T)AT(T,C)TG ACC-3'。PCR 反应体系为:10 × buffer 2 μL, dNTP(2.5 mmol/L) 1.6 μL, Mg²⁺(25 mmol/L) 1.6 μL, 引物(20 μmol/L) 各 0.5 μL, DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.2 μL, 总 DNA(1 μg/μL) 1 μL, ddH₂O 12.6 μL。反应程序为:94℃ 预变性 5 min、94℃ 变性 1 min、52℃ 退火 40 s、72℃ 延伸 50 s,30 个循环后,72℃ 延伸 10 min。

1.2.3 DIBADHI 近 3'端 RT-PCR 扩增 根据上述核心片段的外显子序列设计上游引物 P3:5'-GC-CTGTTACCCTTGAGCTTG-3',根据已发表 BADH 基因序列(同 1.2.2)设计下游引物 P4:5'-TGTGAG-CAGTTGACCCAGAC-3',利用 RT-PCR 扩增 DIBADHI 近 3'端。RT-PCR 方法参照 mRNA Selective PCR Ver. 1.1 试剂盒说明书 2 Step RT-PCR 法。

1.2.4 DIBADHI 的 3' RACE 扩增 方法参照 mRNA Selective PCR Ver. 1.1 试剂盒说明书 2 Step RT-PCR 法,逆转录引物 P15:5'-GGCCACGCGTC-GACTAGTACT(dT)₁₆-3'。根据 DIBADHI 近 3'端设

计引物 P5:5'-GACCGGTGTGATCGTGTGAC-3',并与引物 P16:5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'配对,扩增 *DIBADH1* 的 3'末端。

1.2.5 *DIBADH1* 和 *DIBADH2* 的 5'RACE 扩增 根据上述 *DIBADH1* 的核心片段的外显子序列设计 3 个特异性引物 P6:5'-CTTATCAACATCAGGGTGAG-3'; P7:5'-CACCTGCATCTGGACCTAAAC-3'; P8:5'-CACCTCCTTGCACTTACC-3',利用 5'-RACE 技术一次同时扩增出 *DIBADH1* 和 *DIBADH2* 的 cDNA 5'末端。5'-RACE 采用 Invitrogen 公司的 5'RACE system for rapid amplification of cDNA ends, Version 2.0 试剂盒,并按其说明书进行。

1.2.6 *DIBADH2* 5'端的延伸 根据 5'RACE 结果设计上游引物 P9:5'-AGAAGATGACAACGACAATCC-3',根据已发表序列(同 1.2.2)设计下游引物 P10:5'-CTTGACAGAAGCATGGCTG-3',利用 RT-PCR 对 *DIBADH2* 的 5'端序列进行延伸。方法同 1.2.3。

1.2.7 *DIBADH2* 的 3'RACE 扩增 根据 *DIBADH2* 5'端的延伸序列设计引物 P11:5'-CATCCATGCAAGTATGCAGAGAG-3',扩增 *DIBADH2* 的 3'末端,方法同 1.2.4。

1.2.8 *DIBADH1* 和 *DIBADH2* 的完整开放阅读框的扩增 根据 5'RACE 结果设计上游引物 P12:5'-CAATCCATCTGCCATTAACCTCTC-3';根据 *DIBADH1* 的 3'RACE 结果设计下游引物 P13:5'-CTGGACTTCTGCCCTCTTAAAG-3',扩增 *DIBADH1* 的完整开放阅读框。以 P9 为上游引物,根据 *DIBADH2* 的 3'RACE 结果设计下游引物 P14:5'-CACATACCAGCTTCCAACAC-3',扩增 *DIBADH2* 的完整开放阅读框。方法同 1.2.3。

1.2.9 克隆与测序 PCR 产物采用离心柱型琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行回收,并将目的片段插入 pMD18-T 载体,并转化大肠杆菌 TOP10。根据 α 互补原理及 PCR 法筛选重组子。DNA 序列由上海博亚生物技术公司测定。

1.2.10 序列分析 采用 DNAMAN 软件进行序列分析,并与 GenBank 数据库资料(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)作 cDNA 核酸序列以及氨基酸序列的同源性和系统关系分析。

1.2.11 半定量 RT-PCR-Southern 半定量分析采用肌动蛋白基因 *ACT2* 的 RT-PCR 产物作为定量的内标,其引物根据 GenBank 上已发表的序列(登录号分别为:NM180280、U68462、AF246715)设计,上游引物 P17:5'-AGGCTGGATTTGCTGGAGATG-3';

下游引物 P18:5'-CGACCTTGATCTTCATGCTGC-3'。甘菊 *BADH* 基因片段的扩增引物根据已克隆的全长 cDNA 序列设计,上游引物 P19:5'-TATGACAACGA-TACCATCACC-3';下游引物 P20:5'-TTATCAACAT-CAGGGTGAGC-3'。反转录反应参照 1.2.3,模板 RNA 量严格控制为 1 μ g。PCR 扩增的反应体系(20 μ L)为:10 $\times$ PCR buffer 2 μ L,2.5 mmol/L dNTP 1.6 μ L, *ACT2* 和 *BADH* 基因特异性引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ L, Taqplus DNA 聚合酶(5 U/ μ L)0.2 μ L,反转录产物 4 μ L, ddH₂O 10.2 μ L。除反转录产物外,其余各组均混匀后分装以确保反应体系的一致性,反转录产物严格定量。采用“热启动 PCR”。反应程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,58 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,15 个循环后,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。Southern 杂交参照高效 DNA 地高辛标记和检测试剂盒 I 说明书进行。琼脂糖凝胶电泳时上样量严格控制为每样品扩增产物 10 μ L,电泳后不需 EB 染色而直接进行转膜和固定。杂交所用探针为 *BADH* 基因和 *ACT2* 扩增产物所标记的混合探针。

2 研究结果

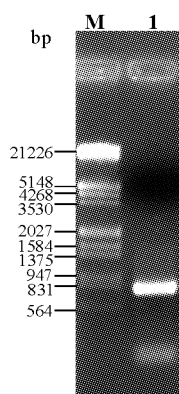
2.1 甘菊 *DIBADH1* 基因核心片段的克隆

用引物 P1 和 P2 对甘菊总 DNA 进行 PCR 扩增,获得了长为 801 bp 的基因组 DNA 片段,其中外显子部分长为 392 bp,与已发表的菠菜 *BADH* 基因的 cDNA 序列(GenBank 登录号为 M31480)进行比较,其同源性为 78%,且由其推测的氨基酸序列中,含有醛脱氢酶高度保守的十肽 VTLELGKSP 和半胱氨酸残基 C^[2],表明所扩增序列为甘菊 *BADH* 基因的核心片段。

2.2 *DIBADH1* 基因 3'端的克隆 由于预计上述所克隆的核心片段与该基因的 3'末端距离较远,直接采用 3'RACE 技术扩增较为困难,用引物 P3 和 P4 通过 RT-PCR 扩增了近 3'端,其长度为 588 bp。再用引物 P15、P5 和 P16,采用 3'RACE 技术获得了该基因的 3'端,长度为 422 bp。

2.3 *DIBADH1* 和 *DIBADH2* 基因 5'端的克隆

利用引物 P6、P7、P8 和 5'RACE 技术克隆了甘菊 *BADH* 基因的 5'末端(图 1),转化后,对其 6 个克隆进行了测序,其中 R3、R5、R8、R9 序列一致,长度为 721 bp,R1、R10 序列一致,长 744 bp。两者的同源性为 97%,在外显子区域,前者较后者少 9 bp,表明在甘菊中存在一个至少含有 2 个成员的 *BADH* 基因家族。前者命名为 *DIBADH1*,后者命名为 *DIBADH2*。

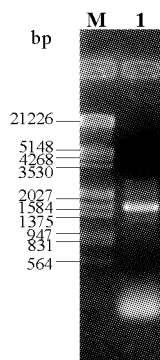


M 为分子质量标准; 1 为扩增条带
M is marker; 1 is the band of 5'RACE

图 1 5'RACE 扩增结果
Fig. 1 Band of 5'RACE

2.4 *DIBADH1* 完整开放阅读框的克隆

用引物 P12 和 P13 扩增该基因的完整开放阅读框, 序列长为 1599 bp (图 2), 该序列与长为 721 bp 的 5'端序列相一致, 证明该阅读框属于 *DIBADH1*。



M 为分子质量标准; 1 为扩增条带
M is marker; 1 is the band

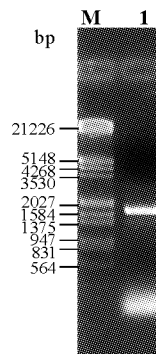
图 2 *DIBADH1* cDNA 完整开放阅读框扩增结果
Fig. 2 Band of the full length ORF of *DIBADH1* cDNA

2.5 *DIBADH2* 的克隆

利用引物 P9、P10 扩增与长为 744 bp 的 5'端序列相一致的更长的片段, 以便设计引物扩增与之相应的 3'末端序列, 所扩增序列的长度为 1380 bp。用根据该序列及 *DIBADH1* 开放阅读框序列的差异设计的特异性引物 P11, 与引物 P15 和 P16 配合, 利用 RACE 技术扩增 3'末端序列, 所扩增序列长为 633 bp。利用引物 P9 和 P14 扩增 *DIBADH2* 完整的开放阅读框, 扩增序列长 1732 bp (图 3)。

2.6 甘菊 *BADH* 基因全序列的拼接与分析

将以上所克隆两个基因的各序列利用 DNA-MAN 软件进行拼接, 得到两基因的全长 cDNA 序列, 其中 *DIBADH1* 长 1821 bp (GenBank 登录号为



M 为分子质量标准; 1 为扩增条带
M is marker; 1 is the band

图 3 *DIBADH2* cDNA 完整开放阅读框扩增结果
Fig. 3 Band of the full length ORF of *DIBADH2* cDNA

DQ011151), *DIBADH2* 长 1918 bp (GenBank 登录号为 DQ011152)。*DIBADH1* 的开放阅读框位于 113 ~ 1621 bp 处, 编码 503 个氨基酸的蛋白质; *DIBADH2* 的开放阅读框位于 127 ~ 1644 bp 处, 编码 506 个氨基酸的蛋白质。*DIBADH1* 的多聚腺苷酸信号位于 poly(A⁺) 尾上游 21 bp 处, *DIBADH2* 的该信号则位于 poly(A⁺) 尾上游 94 bp 处。

甘菊中两个 *BADH* 基因核苷酸序列的同源性为 97%, 推导的氨基酸序列的同源性为 98%。在推导的氨基酸序列中, 均含有醛脱氢酶所具有的高度保守的十肽 (VTLELGKSP) 以及与酶功能有关的半胱氨酸残基 (C) (图 4)。这些残基可能包含 NAD⁺ 结合位点和酶催化位点^[18]。在 5'端均含有不典型的信号肽 QLFIDGE, 表明该酶可能定位于叶绿体中^[2]。两基因序列在编码区的最大差异是在近 5'端, *DIBADH2* 比 *DIBADH1* 多 9 个核苷酸, 即编码 3 个氨基酸 (TIP) 的核苷酸。在非编码区的最大差异是在 3'端, 即多聚腺苷酸信号和多聚腺苷酸之间, *DIBADH2* 比 *DIBADH1* 长 73 个核苷酸。

由甘菊两个 *BADH* 基因的核苷酸序列推导的氨基酸序列与已发表的该基因的氨基酸序列的同源性在 64% 以上。在氨基酸序列的系统关系中 (图 5), 甘菊恰好处于其它双子叶植物和单子叶植物之间, 这与菊科在植物系统分类中的位置是相吻合的。

2.7 甘菊 *BADH* 基因半定量表达分析

RT-PCR-Southern 的结果见图 6。从图 6 中可以看出, 经 NaCl 处理之后, 甘菊 *BADH* 基因的表达量发生了较为明显的变化, 尤其是用 400 mmol/L NaCl 处理的样品, 其表达量远远高于对照。表明甘菊 *BADH* 基因的表达是受盐诱导的, 至少是存在盐诱导表达的基因家族成员。

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

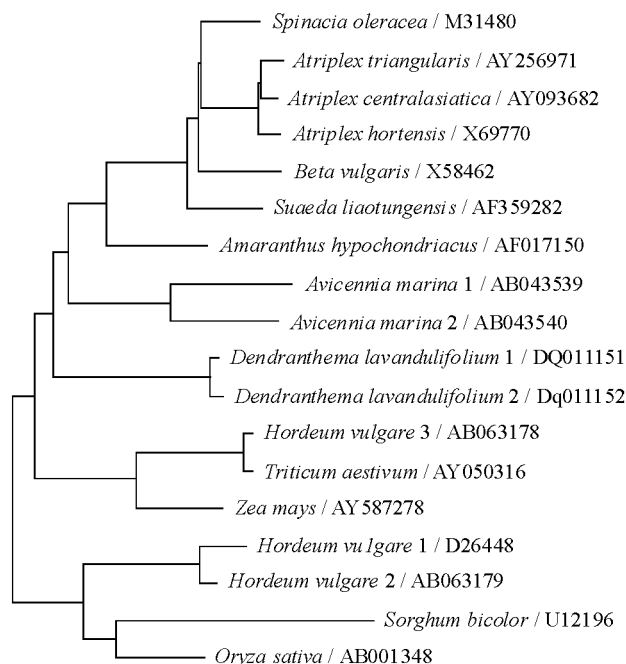
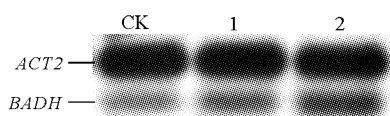


图 5 甘菊与其它物种间 BADH 氨基酸推导序列的系统关系

Fig. 5 Phylogenetic relationship among the deduced amino acid sequences of BADH in *Dendranthema lavandulifolium* and other species



CK 为清水对照; 1, 2 分别为用 200、400 mmol/L NaCl 处理的样品

CK is H₂O control; 1, 2 are the samples treated with 200, 400 mmol/L NaCl

图 6 RT-PCR-Southern 结果

Fig. 6 Result of RT-PCR-Southern

3 讨论

目前的研究表明:在植物中 *BADH* 基因是以小的多基因家族的形式存在。在甜菜 *BADH* 基因的研究中,发现在单倍体基因组中至少有两个相关序列^[3]。大麦中含有一个 2~3 个成员的小的多基因家族^[10];高粱、海榄雌、三角叶滨藜、菠菜中均克隆到该基因的两个成员^[7,9,12,19]。在本实验中克隆到的两个 *BADH* 基因序列的同源性很高,在 97% 以上,这存在两序列是由转录过程中的可变剪切现象形成的可能性。但由于在本研究的后续工作即该基因的启动子序列的克隆中,从基因组 DNA 上克隆了与这两个序列相对应的启动子序列 *DBP12* 和 *DBP21* (GenBank 登录号分别为 DQ497621 和 DQ497622),每个 cDNA 序列和相对应的启动子序列的重叠部位,不论在非编码区还是在编码区,核苷

酸序列均完全一致,因此排除了由同一基因组 DNA 序列因可变剪切现象而产生两个 cDNA 序列的可能性,证明在甘菊的 *BADH* 基因家族中确实存在两个同源性很高的家族成员。

BADH 基因家族中不同成员之间的表达类型也有所不同。在海榄雌的两个不同 *BADH* 基因成员中,克隆 2 mRNA 的表达是受盐诱导的,而克隆 13 mRNA 的水平则几乎与盐诱导无关^[9]。大麦的两个 *BADH* 基因中,*BBD1* 在叶片中持续以低水平表达,不具有诱导性,而在根系中则受渗透胁迫诱导,*BBD2* 在根和叶中均受渗透胁迫诱导^[11]。因此,本研究所克隆的两个甘菊 *BADH* 基因成员也有可能存在表达类型方面的不同。但由于这两个成员的同源性很高,无论是通过测定甜菜碱含量的方法,还是通过 Northern 杂交或半定量 RT-PCR 的方法,都难以区分不同成员之间的表达类型,而分别克隆两个基因的启动子序列,连接报告基因并转入适宜的植物中,通过永久表达可以使这个问题得到解决,这项工作本实验室正在进行当中。

参考文献:

- [1] 梁峥,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.
- [2] Weretilnyk E A, Hanson A D. Molecular cloning of a plant betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation

- to salinity and drought [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 2745 – 2749.
- [3] 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 – 11.
- [4] 肖岗, 张耕耘, 刘凤华, 王军, 陈受宜. 山菠菜甜菜碱醛脱氢酶基因研究 [J]. 科学通报, 1995, 40(8): 741 – 745.
- [5] Li Q L, Gao X R, Yu X H, Wang X Z, An L J. Molecular cloning and characterization of betaine aldehyde dehydrogenase gene from *Suaeda liaotungensis* and its use in improved tolerance to salinity in transgenic tobacco [J]. *Biotechnology Letters*, 2003, 25(17): 1431 – 1436.
- [6] Yin X J, Zhao Y X, Luo D, Zhang H. Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase (AcBADH) gene and isolation of its promoter from the halophyte *Atriplex centralasiatica* Iljin [J]. *J Plant Physiol Mol Bio*, 2002, 28(6): 479 – 484.
- [7] 何晓兰, 侯喜林, 吴纪中, 刘桂华, 钦佩, 朱卫民. 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.
- [8] Legaria J, Rajsbaum R, Muñoz-Clares R A, Villegas-Sepúlveda N, Simpson J, Iturriaga G. Molecular characterization of two genes encoding betaine aldehyde dehydrogenase from amaranth. Expression in leaves under short-term exposure to osmotic stress or abscisic acid [J]. *Gene*, 1998, 218: 69 – 76.
- [9] Hibino T, Meng Y, Kawamitsu Y, Uehara N, Matsuda N, Tanaka Y, Ishikawa H, Baba S, Takabe T, Wada K, Ishii T, Takabe T. Molecular cloning and function characterization of two kinds of betaine-accumulating mangrove *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh [J]. *Plant Molecular Biology*, 2001, 45: 353 – 363.
- [10] Ishitani M, Nakamura T, Han S Y, Takabe T. Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress and abscisic acid [J]. *Plant Molecular Biology*, 1995, 27: 307 – 315.
- [11] Nakamura T, Nomura M, Mori H, Jagedorf A T, Ueda A, Takabe T. An isozyme of betaine aldehyde dehydrogenase in barley [J]. *Plant Cell Physiol*, 2001, 42(10): 1088 – 1092.
- [12] Wood A J, Saneoka H, Rhodes D, Joly R J, Goldsbrough P B. Betaine aldehyde dehydrogenase in sorghum [J]. *Plant Physiol*, 1996, 110: 1301 – 1308.
- [13] Nakamura T, Yokota S, Muramoto Y, Tsutsui K, Fukui K, Takabe T. Expression of a betaine aldehyde dehydrogenase gene in rice, a glycine betaine nonaccumulator, and possible localization of its protein in peroxisomes [J]. *Plant J*, 1997, 11(5): 1115 – 1120.
- [14] 李永华, 邹琦. 小麦甜菜碱醛脱氢酶基因 *WBADH* 序列 [J]. 植物生理与分子生物学学报, 2002, 28(6): 495 – 496.
- [15] 余爱丽, 徐景生, 周会, 张木清, 陈如凯. 玉米 *BADH* 基因的克隆与序列分析 [J]. 分子植物育种, 2004, 2(3): 365 – 368.
- [16] 刘振林, 尹伟伦, 戴思兰. 新的 *BADH* 同源基因: 甘菊 *BADH* 基因 [J]. 分子植物育种, 2005, 3(4): 591 – 593.
- [17] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程 [M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 2002: 854.
- [18] Weretilnky E A, Hanson A D. Betaine aldehyde dehydrogenase from spinach leaves: purification, *in vitro* translation of the mRNA and regulation by salinity [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1989, 271: 55 – 63.
- [19] 刘振林, 尹伟伦, 戴思兰. 菠菜甜菜碱醛脱氢酶基因同源片段的克隆与序列分析 [J]. 分子植物育种, 2006, 4(1): 35 – 40.