

# 宁夏枸杞 *LbALDH3F1* 基因克隆及耐盐性分析

马小霞<sup>1</sup>, 胡进红<sup>1</sup>, 梁旺利<sup>1</sup>, 麻玉荣<sup>1</sup>, 孙雯<sup>1</sup>, 王玲霞<sup>1,2</sup>, 秦垦<sup>3</sup>, 梁文裕<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>宁夏大学生命科学学院, 银川 750021; <sup>2</sup>林木资源高效生产全国重点实验室, 银川 750021; <sup>3</sup>宁夏农林科学院, 银川 750002)

**摘要:** 宁夏枸杞为著名耐盐药用植物, 本研究以宁夏枸杞为材料, 采用 RACE 方法克隆 *LbALDH3F1* 基因并进行序列分析, PCR 法克隆 *LbALDH3F1* 基因启动子序列, 构建过表达载体 pCAMBIA 2300 EGFP-*LbALDH3F1* 进行拟南芥遗传转化和亚细胞定位, 并进行转 *LbALDH3F1* 拟南芥耐 NaCl 胁迫检验及 PCR 鉴定。结果表明, 宁夏枸杞 *LbALDH3F1* 基因全长 1700 bp, 编码序列为 1446 bp, 编码 481 个氨基酸残基; 上游启动子序列为 1850 bp; *LbALDH3F1* 二级结构以  $\alpha$  螺旋和无规则卷曲为主, 定位于细胞核和细胞膜中。随着 NaCl 胁迫程度加深, 宁夏枸杞的 *LbALDH3F1* 表达量呈先升后降的趋势, 且在 200 mmol/L NaCl 胁迫时表达量最高。对 *LbALDH3F1* 进行遗传转化, 发现转基因拟南芥对 NaCl 胁迫的耐受能力明显增强, 超氧化物歧化酶表现出更高的活性, 脯氨酸及叶绿素 a 含量在 300 mmol/L NaCl 胁迫下显著升高, 而过氧化氢及丙二醛等含量在高盐胁迫下显著低于野生型拟南芥, 表明 *LbALDH3F1* 具有提高植物抗氧化能力从而增强耐 NaCl 胁迫的能力。该研究结果为深入探讨宁夏枸杞 *LbALDH3F1* 基因功能及其在响应盐胁迫过程中的应答机制奠定了基础。

**关键词:** *LbALDH3F1*; 克隆; 遗传转化; 盐胁迫; 基因功能; 宁夏枸杞

## Cloning of *LbALDH3F1* Gene from *Lycium barbarum* and Analysis of Its Salt Tolerance

MA Xiaoxia<sup>1</sup>, HU Jinhong<sup>1</sup>, LIANG Wangli<sup>1</sup>, MA Yurong<sup>1</sup>, SUN Wen<sup>1</sup>, WANG Lingxia<sup>1,2</sup>,

QIN Ken<sup>3</sup>, LIANG Wenyu<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>School of Life Sciences, Ningxia University, Yinchuan 750021; <sup>2</sup>State Key Laboratory of Efficient Production of Forest Resources, Yinchuan 750021; <sup>3</sup>Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Yinchuan 750002)

**Abstract:** *Lycium barbarum* Linn. is a well-known salt-tolerant medicinal plant. In this study, the *LbALDH3F1* gene was cloned from *L. barbarum* by RACE, *LbALDH3F1* gene promoter sequence was also cloned by PCR. Overexpression vector pCAMBIA 2300 EGFP-*LbALDH3F1* was constructed for genetic transformation and subcellular localization in *Arabidopsis thaliana*, detection of NaCl stress tolerance in transgenic *A. thaliana* and PCR identification were carried out. The results showed that the *LbALDH3F1* was 1700 bp in length, with a CDS of 1446 bp, encoding 481 amino acids. The upstream promoter sequence of *LbALDH3F1* was 1850 bp. The secondary structure of *LbALDH3F1* was dominated by  $\alpha$ -helix and irregular coil. The *LbALDH3F1* localized in nucleus and cell membrane. With the severity of NaCl stress, the expression of *LbALDH3F1* in *L. barbarum* showed a tendency of increasing and then decreasing, and the highest expression was found at 200 mmol/L NaCl stress. Genetic transformation of *LbALDH3F1* revealed that transgenic *LbALDH3F1* *A. thaliana* was significantly more tolerant to NaCl stress, SOD showed higher activity, proline and chlorophyll a content were significantly increased under 300 mmol/L NaCl stress, whereas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MDA

收稿日期: 2024-05-17 网络出版日期: 2024-09-20

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20240517001>

第一作者研究方向为植物资源保护与利用, E-mail: 1052698543@qq.com

通信作者: 梁文裕, 研究方向为植物资源保护与开发利用, E-mail: liang\_wy@nxu.edu.cn

基金项目: 2022 年度宁夏留学回国人员创新创业项目; 国家自然科学基金项目 (32301632); 宁夏自然科学基金项目 (2023AAC05024)

**Foundation projects:** Innovation and Entrepreneurship Project for Returned from Overseas Study of Ningxia Hui Autonomous Region in 2022; National Natural Science Foundation of China (32301632); Natural Science Foundation of Ningxia Hui Autonomous Region (2023AAC05024)

content were significantly lower than wild type *A. thaliana* under high salt stress. These results lay a foundation for further studying the function of *LbALDH3F1* gene in *L. barbarum* and its response mechanism in response to salt stress.

**Key words:** *LbALDH3F1*; cloning; genetic transformation; salt stress; gene function; *Lycium barbarum*

盐碱胁迫等逆境胁迫因子会影响植物的生长发育,使细胞内产生大量的活性氧(ROS, reactive oxygen species)<sup>[1]</sup>,打破ROS稳态使膜脂过氧化,进而产生相应的醛类物质,醛的过度积累会破坏蛋白质和核酸的正常结构及功能<sup>[2-3]</sup>。为降低活性氧的毒害作用,植物体内会诱导醛脱氢酶(ALDHs, aldehyde dehydrogenases)基因的表达。ALDHs是一类NAD(P)<sup>+</sup>依赖型酶的基因超家族,能催化多种内源性及外源性芳香族与脂肪族醛的不可逆氧化<sup>[4]</sup>,参与脂质过氧化释放的醛产物的解毒,将醛类物质转化为无毒的羧酸,并降低脂质过氧化,提高植物对逆境的耐受性,从而调节植物体内醛类物质的动态平衡<sup>[5-6]</sup>。ALDHs在植物响应逆境胁迫中发挥重要作用<sup>[7-9]</sup>,棉花中大多数 *Ga-ALDHs* 和 *Gh-ALDHs* 在高盐和干旱等胁迫条件下上调表达<sup>[10]</sup>,油桐 (*Vernicia fordii* (Hemsl.) Airy Shaw) 中的 *ALDH2B4*、*ALDH3H1* 基因也受盐胁迫、干旱胁迫及 ABA 诱导表达<sup>[11]</sup>。研究发现,过表达 *At-ALDH3* 的转基因拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) 与野生型植株相比具有更强的耐盐性,其原因主要与脂质过氧化产生的反应性醛类物质的积累减少相关<sup>[12]</sup>。此外,对转 *ALDH3II* 基因的烟草植株进行盐胁迫,发现与野生型相比,转基因植株的 *ALDH3II* 转录水平升高,对盐和氧化胁迫等耐受性增强,可通过积累脯氨酸和叶绿素使植株具有非生物胁迫耐受性,以及降低 ROS 和丙二醛 (MDA, malondialdehyde) 水平来降低氧化胁迫,从而提高转基因植株的抗逆性<sup>[13]</sup>。因此,ALDHs 在参与植物逆境胁迫应答过程中具有非常重要的作用,其参与的生物学过程及其调控功能需进一步研究。

宁夏枸杞 (*Lycium barbarum*) 为茄科枸杞属的多年生落叶灌木,广泛分布于我国西北部地区,是典型的耐盐碱药用植物和园艺植物。长期的盐生环境使宁夏枸杞进化出了一系列适应盐胁迫的机制,包括离子选择性吸收<sup>[14]</sup>、渗透调节物质积累<sup>[15]</sup>、活性氧自由基清除等<sup>[16]</sup>。目前越来越多的研究表明宁夏枸杞可通过形态结构、生理生化及分子水平等方面的变化协同适应盐胁迫,如 NaCl 浓度大于 200 mmol/L 时,宁夏枸杞叶片和幼根细胞的显微及

超微结构发生明显变化,且叶肉细胞中线粒体的变化没有叶绿体的变化显著<sup>[17]</sup>。随着 NaCl 胁迫时间的延长和浓度的增加,编码质膜和液泡膜的 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 转运蛋白基因 *LbSOS1* 和 *LbNHX1*、液泡膜 H<sup>+</sup>-ATPase 基因 *LbVHA-C1* 和质膜 H<sup>+</sup>-ATPase 基因 *LbHAI* 的表达水平平均降低,而 Na<sup>+</sup> 积累量大幅增加,致使枸杞抗盐性降低<sup>[18]</sup>。本课题组前期研究发现宁夏枸杞 *ALDH3F1* 在不同浓度 NaCl 胁迫 (0、100、200、300 mmol/L) 下差异表达<sup>[19]</sup>,而宁夏枸杞 *ALDH3F1* 的分子信息及调控机制尚不明确。因此,本研究以宁夏枸杞为材料,利用 RACE 技术克隆 *LbALDH3F1* 基因,PCR 法克隆 *LbALDH3F1* 基因启动子序列,对 *LbALDH3F1* 进行遗传转化并进行功能分析,为明确宁夏枸杞 *LbALDH3F1* 基因功能及其在响应盐胁迫过程中的应答机制奠定基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试验材料

宁夏枸杞‘宁杞1号’种苗由宁夏农林科学院枸杞工程中心惠赠。将种苗种植于珍珠岩:蛭石:草木灰为 1:1:1 的培养基质中,人工培养室内培养 1 个月 (8~12 叶期),定期浇水,一周浇一次 Hoagland 营养液,培养条件为温度 25±2 °C、湿度 42%、光周期 16 h / 8 h、光照强度 60 μmol/m<sup>2</sup>·s。选择长势一致、健康的幼苗,分别进行 0、100、200、300 mmol/L NaCl 胁迫处理,各处理组 3 次生物学重复,每个重复 4 盆幼苗,每盆 20 盒,每盒 9 株。处理第 7 天取相同部位叶片,液氮冷冻,置于 -80 °C 冰箱中保存备用。

真核表达试验材料哥伦比亚野生型拟南芥 (Col-0)、植物双元表达载体 pCAMBIA 2300-EGFP 和农杆菌菌株 GV 3101 由本实验室保存。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 RNA 的提取及 *LbALDH3F1* 基因克隆** 采用多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (天根生化科技有限公司) 提取经 NaCl 胁迫处理的宁夏枸杞‘宁杞1号’叶片总 RNA,1% 琼脂糖凝胶电泳及 Nanodrop 2000 微量核酸测定仪 (赛默飞世尔科技公司) 测定其浓度及质量。样品总 RNA 质量检测合格后构建 cDNA 测序文库。cDNA 第一条链的合成参照

RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒 (Fermentas)说明书进行。

根据宁夏枸杞转录组序列结果<sup>[19]</sup>,利用Primer 5.0 软件设计*LbALDH3F1*中间片段克隆引物*LbALDH3F1*-F与*LbALDH3F1*-R(表1),PCR扩增体系为25 μL 2× PCR Buffer, 1 μL KOD FX Neo(1 U/μL), 10 μL dNTP (2 mmol/L), 2 μL *LbALDH3F1*-F (10 μmol/L), 2 μL

*LbALDH3F1*-R(10 μmol/L), 5 μL 模板 cDNA, 5 μL ddH<sub>2</sub>O。扩增程序为 98 °C 预变性 5 min; 98 °C 变性 10 s, 55 °C 退火 30 s, 68 °C 延伸 90 s, 35 个循环; 68 °C 终止延伸 10 min。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定, OMEGA 胶回收试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)回收目的片段, 与 pMD18-T 载体进行连接及转化, 阳性克隆进行测序分析, 获得中间片段序列。

表 1 引物名称及序列

Table 1 The name and sequence of primers

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	引物功能 Primer function
<i>Actin</i> -F	CCTAAGGCCAACAGAGAGAAA	<i>Actin</i> 内参引物
<i>Actin</i> -R	CGACCACTAGCATACAAGGAA	
3' GSP1	AAGCAGAACATCTTCAGGAAGTGTGGTATT	3' RACE 基因克隆引物
3' GSP2	TCCAATATGCAGCAGATACTCCATT	
5' GSP1	CTCTGGTTTTCCCTGA	5' RACE 基因克隆引物
5' GSP2	AAAAGTCTCTCTAAGAAC	
5' GSP3	TCCAAATCTTTCTCACACTCTG	
<i>LbALDH3F1</i> -F	ATGTCAGAGTGTGAGAAAAG	中间片段基因克隆引物
<i>LbALDH3F1</i> -R	TCAAGCCTTCTTGAGTCC	
AD1	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCVNVNNGGAA	<i>LbALDH3F1</i> 启动子克隆引物
AD2	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCBNNNGGTT	
AD3	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCVNVNNGCAA	
AD4	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCBDBNNNCGGT	
<i>LbALDH3F1</i> -R1	AGACCAAGAGGCTCAGGAACAAAC	
<i>LbALDH3F1</i> -R2	CTAATGTCCCAATCTCATCCCTGTAAGC	
<i>LbALDH3F1</i> -R3	GTGACCTCCTCCATGATTCTTCTCTG	
<i>LbALDH3F1</i> -F	GAGGCTTACAGGGATGAGATTG	枸杞 qRT-PCR 引物
<i>LbALDH3F1</i> -R	CCAAGAGGCTCAGGAACTAAC	
<i>LbALDH3F1</i> -2300-EGFP-F	<b>ACGGGGGACGAGCTCGGTACC</b> ATGTCAGAGTGTGAGAAAGATTG	过表达载体目的基因扩增引物
<i>LbALDH3F1</i> -2300-EGFP-R	<b>CACCATGGTGTCTGACTCTAGA</b> AGCCTTCTTGATCCTAGTG	
<i>LbALDH3F1</i> -T-F	GCAGCAGATACTCCCATTTG	转基因拟南芥 PCR 鉴定引物
<i>LbALDH3F1</i> -T-R	GCCGTCGTCCTGAAGAAGA	
<i>LbALDH3F1</i> -F-Y	GAGGCTTACAGGGATGAGATTG	转基因拟南芥 qRT-PCR 引物
<i>LbALDH3F1</i> -R-Y	ACTCTGCTGAAGAAGGGAATG	

加粗序列为与载体同源的序列

Sequences homologous to the vector are marked in bold

利用Primer 5.0设计3' RACE引物3' GSP1和3' GSP2与5' RACE引物5' GSP1、5' GSP2和5' GSP3(表1),参照3'-RACE试剂盒和5'-RACE试剂盒(生工生物工程股份有限公司)操作手册,以反转录后的cDNA第一链为模版,进行宁夏枸杞*LbALDH3F1*基因的3'末端扩增(3' RACE)和5'末

端扩增(5' RACE),将所获得的PCR产物进行凝胶电泳及目的条带回收,连接载体及转化,阳性克隆菌液测序,获得3'和5'端序列。最后将获得的宁夏枸杞*LbALDH3F1*基因中间片段、3'末端和5'末端片段进行拼接,得到完整的*LbALDH3F1*基因序列。

**1.2.2 *LbALDH3F1* 基因序列分析** 对克隆得到的宁夏枸杞 *LbALDH3F1* cDNA 序列进行生物信息学分析。使用 ProtParam ([https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/)) 在线工具分析蛋白理化性质; 使用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 对蛋白的保守结构域进行分析; 蛋白质的二级与三级结构则通过 SOPMA ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)) 与 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 分别完成。

**1.2.3 *LbALDH3F1* 基因启动子克隆** 启动子克隆参照史光珍等<sup>[20]</sup>方法, 以宁夏枸杞叶片 cDNA 为模板, 通过 TAIL-PCR 技术分 3 次扩增 *LbALDH3F1* 的上游序列, 用 Primer 5.0 设计随机简并引物 AD1~AD4 和特异性引物 *LbALDH3F1*-R1、*LbALDH3F1*-R2、*LbALDH3F1*-R3 (表 1), PCR 扩增反应程序、体系参考 Liu 等<sup>[21]</sup>。PCR 产物同中间片段克隆操作一致, 最终获得启动子序列。利用 DNAMAN 软件比对测序结果, 利用植物顺式元件数据库 PLACE ([www.dna.affrc.go.jp/PLACE/](http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/)) 和数据库 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 预测及分析顺式调控作用元件。

**1.2.4 *LbALDH3F1* 基因遗传转化、鉴定及转基因拟南芥 NaCl 胁迫** 利用 Primer 5.0 设计 *LbALDH3F1* 扩增引物 *LbALDH3F1*-2300-EGFP-F 和 *LbALDH3F1*-2300-EGFP-R (表 1), 将 *LbALDH3F1* CDS 序列 PCR 扩增连接至 2300EGFP 表达载体, 对应反应体系为 20  $\mu\text{L}$  2 $\times$ P515 酶, 1  $\mu\text{L}$  *LbALDH3F1*-2300-EGFP-F (10  $\mu\text{mol/L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  *LbALDH3F1*-2300-EGFP-R (10  $\mu\text{mol/L}$ ), 0.5  $\mu\text{L}$  cDNA 模板, 17.5  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O。扩增程序为 95 $^{\circ}\text{C}$  10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$  30s, 96 $^{\circ}\text{C}$  30s, 72 $^{\circ}\text{C}$  60s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$  10 min。扩增产物进行凝胶电泳后将目的条带用 Magen 胶回收试剂盒 (HiPure Gel Pure DNA Mini Kit) 切胶回收。pCAMBIA 2300-EGFP 真核表达载体通过 *Xba* I 和 *Kpn* I 进行双酶切, 将 PCR 扩增产物和载体用 NovoRec<sup>®</sup> PCR 一步定向克隆试剂盒 (赛默飞世尔科技公司) 进行连接, 转化至大肠杆菌 BL21 感受态细胞中, 用扩增引物进行 PCR 验证 (PCR 反应体系和程序同上) 及测序, 成功构建 pCAMBIA 2300-EGFP-*LbALDH3F1* 载体并转化农杆菌。将含有阳性重组质粒 pCAMBIA 2300-EGFP-*LbALDH3F1* 的农杆菌菌液配置成转化液, 参照朱熙<sup>[22]</sup>方法转化拟南芥并采集保存 T0 代种子, 将其培养并依次筛选得到 T1~T3 代。利用 CTAB 法提取野生型和转基因阳性

拟南芥叶片 DNA 并以此为模板进行 PCR 验证, 利用 Primer 5.0 设计引物 *LbALDH3F1*-T-F 和 *LbALDH3F1*-T-R (表 1), 反应按照 10  $\mu\text{L}$  2 $\times$ Taq mix, 正反向引物各 0.4  $\mu\text{L}$ , 2  $\mu\text{L}$  gDNA, 7.2  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O。扩增程序为 94 $^{\circ}\text{C}$  3min; 94 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  60 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$  5 min。

将转 *LbALDH3F1* 拟南芥 T3 代及野生型拟南芥种子表面消毒后, 播种于 MS 固体培养基上生长 7~10 d, 之后移栽至育苗基质, 人工气候培养箱中生长 15~20 d, 培养条件为 22 $^{\circ}\text{C}$  (光照 16 h)/20 $^{\circ}\text{C}$  (黑暗 8 h), 湿度 60%, 光照强度 700  $\mu\text{mol/m}^2\cdot\text{s}$ 。选择长势一致、健康的 T3 代进行 NaCl 胁迫处理。试验设置 0、100、200、300 mmol/L NaCl 浓度梯度。每组处理每天定期用对应浓度的 NaCl 溶液浇灌, 直至溶液从排水孔析出, 析出持续时间 10 min, 持续 7 d, 分别在处理后 0 d、4 d、7 d 时观察并记录叶片的表型变化, 并用 SPSS Statistics 26.0 软件进行存活数统计分析。NaCl 处理后 8 d 进行叶片取样。野生型和转基因各 4 个处理组, 各处理组重复 3 次, 每个重复 10 株, 每组 30 株。

**1.2.5 ALDH3F1 亚细胞定位** 将测序鉴定正确的重组质粒加入感受态农杆菌 GV 3101 菌液中进行转化, 28 $^{\circ}\text{C}$  培养 48 h 左右。将培养出来的单菌落提取质粒并进行 PCR 鉴定, 引物为 *LbALDH3F1*-T-F、*LbALDH3F1*-T-R, 扩增程序与体系参照 1.2.4 PCR 验证。检测为阳性的农杆菌用来侵染拟南芥叶片的原生质体。原生质体用 1.5 mL 预冷的 W5 buffer 轻柔悬浮, 冰上放置 30 min 后离心 1 min (23 $^{\circ}\text{C}$ , 100 g), 弃上清, 每管沉淀用 800  $\mu\text{L}$  MMG buffer 重悬。每个 2 mL 离心管中加入 20  $\mu\text{L}$  阳性质粒和 300  $\mu\text{L}$  MMG buffer 重悬的原生质体, 轻柔混匀, 再加入 250  $\mu\text{L}$  PEG/Ca<sup>2+</sup> buffer, 轻柔混匀后放置 30 min (23 $^{\circ}\text{C}$ )。接着加入 800  $\mu\text{L}$  W5 buffer, 轻柔混匀后, 100 g 离心 3 min, 弃上清, 加入 1 mL W5 buffer。轻柔混匀后, 置于 23 $^{\circ}\text{C}$ , 弱光孵育 12~18 h。采用 Olympus FV1000 viewer 型共聚焦激光扫描显微镜 (奥林巴斯) 观察。

**1.2.6 宁夏枸杞 *LbALDH3F1* 及转基因拟南芥 *LbALDH3F1* 响应 NaCl 胁迫的差异表达检测** 宁夏枸杞和 NaCl 胁迫的野生型拟南芥、T3 代转基因拟南芥叶片 RNA、cDNA 第一链的合成按照 1.2.1 方法执行。qRT-PCR 定量实验使用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒 (诺唯赞生物科技有限公司) 完成。用 Premier 5.0 分别设计宁夏枸杞的

内参基因 *Actin* 的扩增引物 *Actin-F* 和 *Actin-R*、qRT-PCR 扩增引物 *LbALDH3F1-F* 和 *LbALDH3F1-R*、转 *LbALDH3F1* 拟南芥的扩增引物 *LbALDH3F1-F-Y* 和 *LbALDH3F1-R-Y* (表 1), 用 Roche LightCycler480 型定量 PCR 仪 (北京华恩时代科技发展有限公司) 进行反应, qRT-PCR 反应体系为 10  $\mu$ L 2 $\times$ ChamQ Universal SYBR qPCR Master mix, 0.5  $\mu$ mol/L 正反向引物各 0.5  $\mu$ L, 1.0  $\mu$ L cDNA, 8  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O, 扩增条件为 95  $^{\circ}$ C 10 min; 95  $^{\circ}$ C 30 s, 60  $^{\circ}$ C 1 min, 共 41 个循环, 每个反应 3 次技术重复。采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 法<sup>[23]</sup> 对表达量进行分析。

**1.2.7 NaCl 胁迫下宁夏枸杞 ALDH 酶活及转基因拟南芥相关生理指标测定** 采用苏州梦犀生物医药科技有限公司的乙醛脱氢酶 (ALDH, aldehyde dehydrogenase) 酶活检测试剂盒, 对不同 NaCl 浓度处理的宁夏枸杞叶片 ALDH 的酶活进行测定。

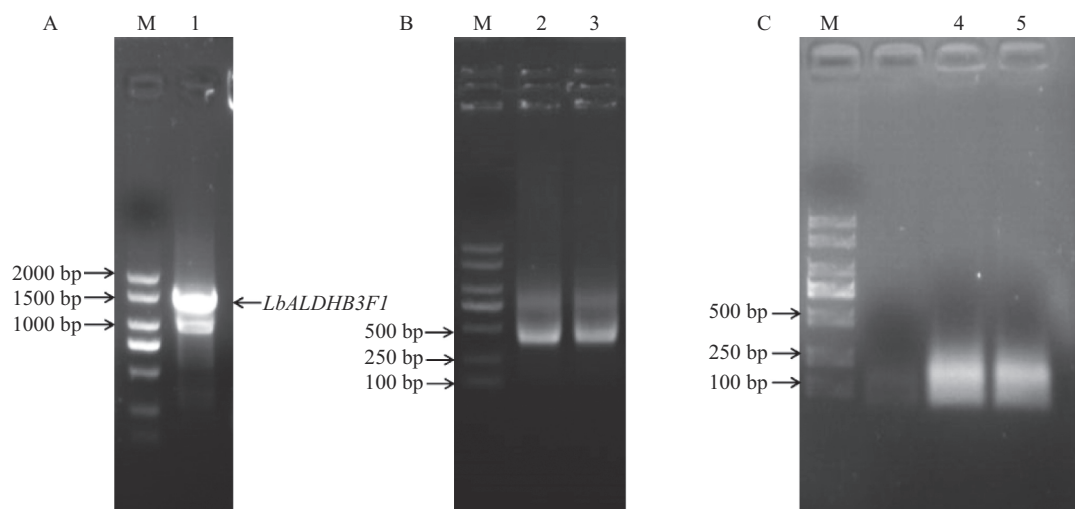
采用睿信生物科技有限公司的过氧化氢酶 (CAT, catalase) 试剂盒、过氧化物酶 (POD, peroxidase) 试剂盒、超氧化物歧化酶 (SOD, superoxide dismutase) -WST-8 法活性测定试剂盒分别测定野生型和转基因拟南芥 CAT、POD 和 SOD 活性。采用睿信生物科技有限公司的植物叶绿素 (Chlorophyll) 含量试剂

盒、脯氨酸 (Pro, proline) 含量测定试剂盒、脱落酸 (ABA, abscisic acid) 定量检测试剂盒 (ELISA)、丙二醛 (MDA, malondialdehyde) 含量检测试剂盒、过氧化氢 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hydrogen peroxide) 含量检测试剂盒及羟自由基清除率检测试剂盒分别测定野生型和转基因拟南芥叶绿素、Pro、ABA、MDA、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量及羟自由基清除率。

## 2 结果与分析

### 2.1 *LbALDH3F1* 基因克隆分析

经 PCR 扩增获得宁夏枸杞 *LbALDH3F1* 基因的中间片段 (图 1A), 目的片段切胶回收连接 T 载体并转化后测序分析, 获得长度为 1446 bp 的 *LbALDH3F1* 中间片段。使用巢式 PCR 和梯度 PCR 相结合克隆得到 *LbALDH3F1* 5' 和 3' 端序列 (图 1B、C), 对目的条带进行切胶回收, 连接载体进行转化后测序分析, 获得 3' 和 5' 端碱基序列, 分别为 401 bp 和 96 bp。将测序获得的基因中间片段序列和 3' 与 5' 端序列进行拼接, 得到 *LbALDH3F1* 基因的全长序列为 1700 bp, CDS 序列为 1446 bp (图 2)。上传 GenBank, 登录号为 OR365868。



A: *LbALDH3F1* 基因中间片段; M: DL2000, 下同; 1: *LbALDH3F1* 基因中间片段; B: *LbALDH3F1* 基因 3' 克隆片段; 2~3: 3' RACE 产物; C: *LbALDH3F1* 基因 5' 克隆片段; 4~5: 5' RACE PCR 产物

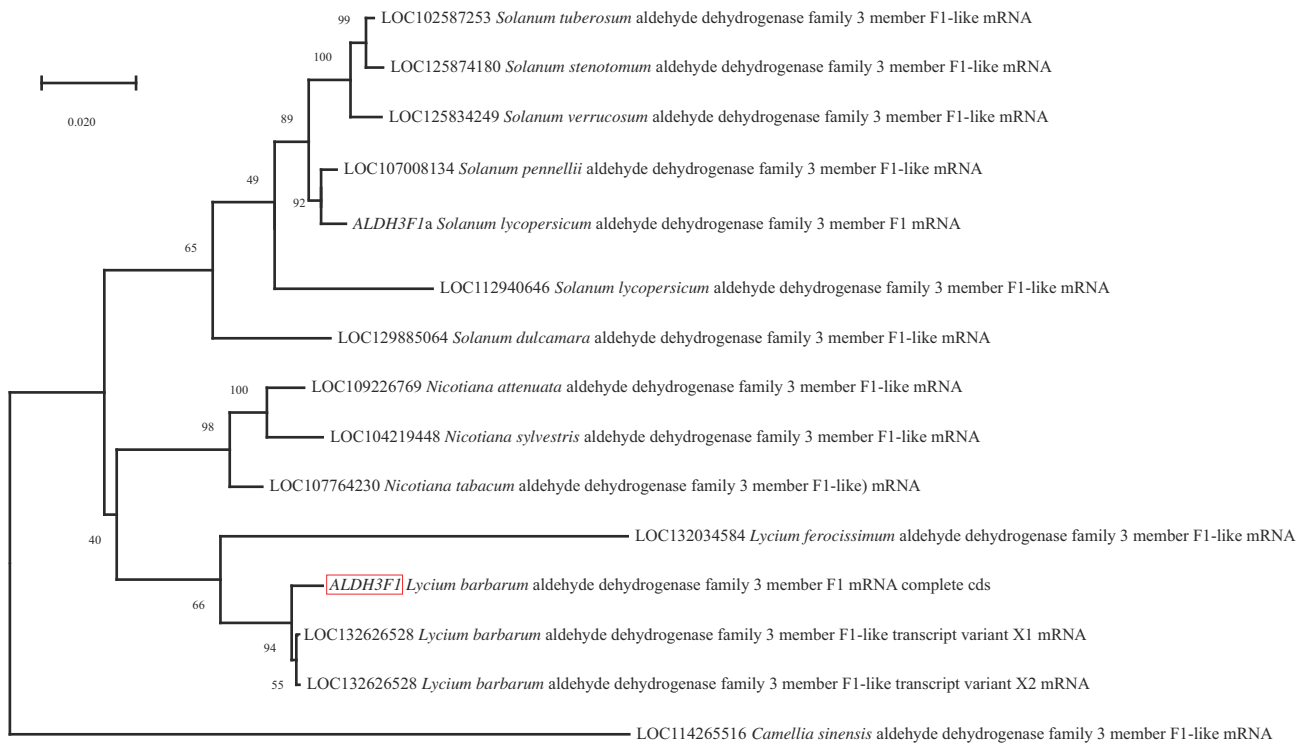
A: Amplification results of intermediate segments of *LbALDH3F1*; M: DL 2000; The same as below; 1: Intermediate segments of *LbALDH3F1*; B: Cloning of 3' fragments of *LbALDH3F1* genes; 2-3: 3' RACE products; C: Cloning of 5' fragments of *LbALDH3F1* genes; 4-5: 5' RACE products

图 1 宁夏枸杞 *LbALDH3F1* 基因克隆

Fig. 1 Cloning of *LbALDH3F1* gene from *L. barbarum*



C

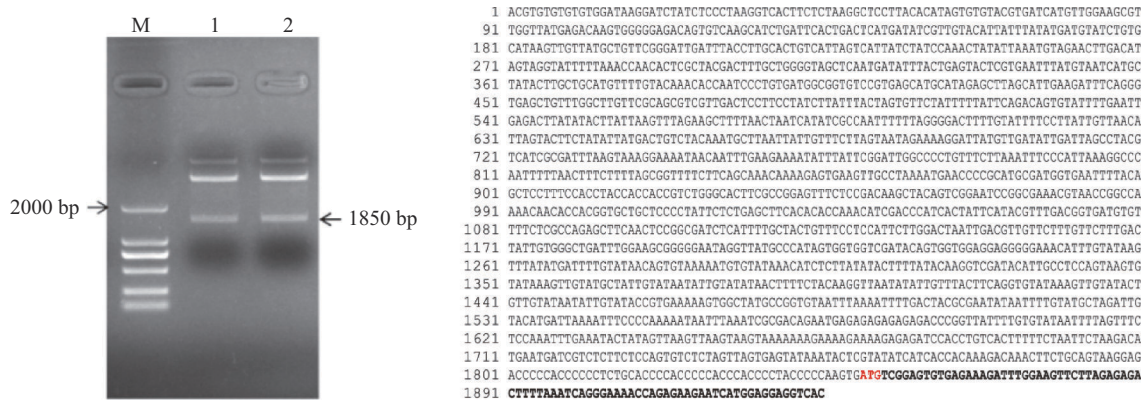


A: LbALDH3F1 蛋白的三级结构模型预测; B: LbALDH3F1 亚细胞定位, 比例尺均为 10 μm; C: *LbALDH3F1* 系统进化树, 红框表示宁夏枸杞基因名称, 条目格式为基因名称+物种+基因注释信息

A: Prediction of LbALDH3F1 protein tertiary structure model; B: Subcellular localization of LbALDH3F1, all scales are 10 μm; C: Phylogenetic tree of LbALDH3F1 gene; The red boxes indicate gene names; The format of term is gene name+species+gene annotation information of *L. barbarum*

图3 *LbALDH3F1* 基因序列三级结构预测、亚细胞定位及系统进化树分析

Fig. 3 Tertiary structure prediction, subcellular localization and phylogenetic tree analysis of the *LbALDH3F1* gene sequence



1~2: *LbALDH3F1* 启动子; 红色字体为起始密码子, 粗体部分为 CDS 序列

M: DL 2000; 1~2: The *LbALDH3F1* promoter; The red font is start codon, the bold part is CDS sequence

图4 *LbALDH3F1* 基因启动子片段

Fig. 4 *LbALDH3F1* gene promoter fragment

**2.3.2 启动子顺式作用元件预测** 利用 Plant CARE 和 PLACE 在线工具对启动子序列进行顺式作用元件预测分析。*LbALDH3F1* 启动子存在多个顺式作用元件响应 NaCl 胁迫, 其中 3-AF1 binding site、AE-box、G-box、GA-motif、GATA-motif、GT1-motif、LAMP-element、TCCC-motif 元件参与光响应信号, ABRE、ABRE3a、ABRE4、MYB、MYC 元件参

与脱落酸信号, CGTCA-motif、TGACG-motif 参与茉莉酸甲酯信号, TGA-element 元件参与生长素信号(表 2)。预测结果表明 *LbALDH3F1* 启动子可通过调控光反应和植物激素等途径来响应 NaCl 胁迫。此外, 还发现 *LbALDH3F1* 的启动子区域含有 3 处 TGA 转录因子的结合位点 as-1 顺式作用元件, 表明 *LbALDH3F1* 可能受到 TGA 转录因子的调控。

表 2 *LbALDH3F1* 基因启动子部分顺式作用元件Table 2 Cis-acting elements of *LbALDH3F1* gene promoter

顺式元件名称 Cis-acting elements name	特征序列 Characteristic sequence	功能 Function	位置(bp) Site
3-AF1 binding site	TAAGAGAGGAA	光反应响应元件	-486
ABRE	ACGTG	ABA、干旱、NaCl 响应元件	+69
ABRE3a	TACGTG	ABA 响应元件	+68
ABRE4	CACGTA	ABA 响应元件	-68
AE-box	AGAAACAA	光反应响应元件	-671
CGTCA-motif	CGTCA	MeJA 响应元件	+718、-1146、-1066
G-box	TACGTG	光反应响应元件	+68、+1679
GA-motif	ATAGATAA	光反应响应元件	-232
GATA-motif	GATAGGA	光反应响应元件	-487
GT1-motif	GTGTGTGAA	光反应响应元件	-1027、+1398
LAMP-element	CCTTATCCA	光反应响应元件	-11
MYB	TAACCA	MYB 结合位点; 干旱响应元件; ABA 响应元件	-90、-1438
MYC	CATTG	MYC 结合位点; 干旱响应元件; ABA 响应元件	-657、-1248
TCCC-motif	TCTCCCT	光反应响应元件	+25
TGA-element	AACGAC	生长素响应元件	-474
TGACG-motif	TGACG	MeJA 响应元件	-718、+1146、+1066
as-1	TGACG	TGA 转录因子的结合位点	-718、+1146、+1066

+表示上游,-表示下游

+ represents the upstream, and -represents the downstream

## 2.4 宁夏枸杞 *LbALDH3F1* 响应盐胁迫的差异表达分析及 ALDH 酶活变化

对不同浓度 NaCl 处理的枸杞叶片 *LbALDH3F1* 进行 qRT-PCR 分析。结果表明,随着 NaCl 胁迫程度增加, *LbALDH3F1* 相对表达量呈先升高后下降的趋势,在 200 mmol/L NaCl 胁迫时表达量最高(图 5A),说明 *LbALDH3F1* 参与了盐胁迫响应过程。

对不同 NaCl 浓度处理的宁夏枸杞叶片 ALDH 酶活进行测定,发现随着 NaCl 胁迫程度增加,ALDH 酶活性呈先升高后下降的趋势,100 mmol/L NaCl 处理显著高于其他处理(图 5B)。

## 2.5 *LbALDH3F1* 基因遗传转化及转基因植株耐盐性分析

### 2.5.1 转基因拟南芥 DNA 鉴定

转 *LbALDH3F1* 拟南芥目标片段大小在 640 bp 左右,测序序列与载体和部分目的基因片段序列相符,野生型拟南芥无条带,表明 *LbALDH3F1* 基因成功连接到 2300-EGFP 载体内,且成功转化到拟南芥基因组(图 6)。

### 2.5.2 转基因拟南芥 *LbALDH3F1* 响应盐胁迫的差

异表达分析 对盐胁迫下野生型及转基因拟南芥叶片进行 qRT-PCR 表达量分析,结果显示各浓度 NaCl 胁迫转基因拟南芥的表达量均显著高于野生型拟南芥,表明成功将宁夏枸杞 *LbALDH3F1* 基因转入拟南芥,而且转基因拟南芥 *LbALDH3F1* 基因在各浓度 NaCl 胁迫下差异表达显著(图 7)。

### 2.5.3 盐胁迫下转基因拟南芥的表型分析

不同 NaCl 浓度处理野生型及转 *LbALDH3F1* 拟南芥的表型变化如图 8 A 所示,野生型拟南芥在 300 mmol/L NaCl 处理的 4 d 已出现叶缘失绿现象,而转 *LbALDH3F1* 拟南芥未发现该现象,表明盐胁迫对过表达 *LbALDH3F1* 拟南芥的伤害较野生型小。此外,对 NaCl 胁迫处理 7 d 的拟南芥存活情况进行统计,发现经 100、200 mmol/L NaCl 处理的转基因与野生型拟南芥存活率均为 100%(图 8B),而 300 mmol/L NaCl 胁迫的转基因拟南芥存活率为 76.67%,野生型拟南芥是 60.00%,转基因拟南芥存活率较高于野生型拟南芥,表明过表达 *LbALDH3F1* 基因具有增强植株耐盐性的作用。



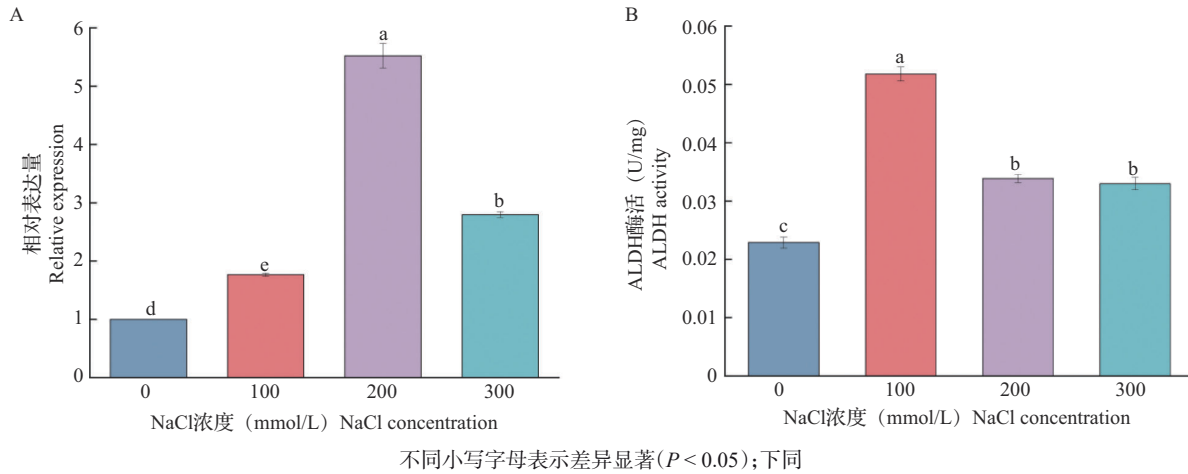
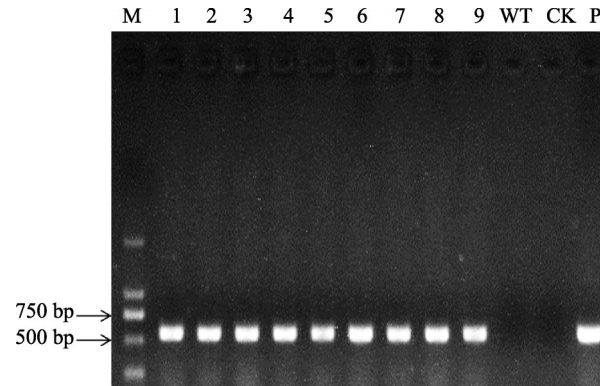


图5 宁夏枸杞不同浓度 NaCl 胁迫下 *LbALDH3F1* 相对表达量及 ALDH 酶活变化

Fig. 5 Relative expression of *LbALDH3F1* and active changes of ALDH enzyme under different concentrations of NaCl stress in *L. barbarum*



1~9: 转 *LbALDH3F1* 拟南芥 DNA; WT: 阴性对照 (野生型); CK: 空白对照 (水); P: 阳性对照 (农杆菌菌液); 下同  
1-9: *LbALDH3F1* transgenic *A. thaliana* DNA; WT: Negative control (wild type); CK: Blank control (water);  
P: Positive control (*Agrobacterium tumefaciens*); The same as below

图6 转 *LbALDH3F1* 拟南芥 T1 代 DNA 电泳检测

Fig. 6 *LbALDH3F1* transgenic *A. thaliana* T1 generation DNA electrophoresis detection

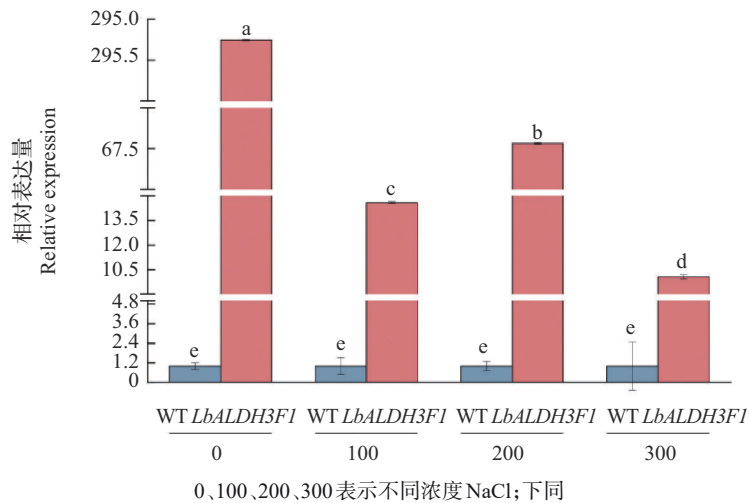


图7 转基因拟南芥不同浓度 NaCl 胁迫下 *LbALDH3F1* 相对表达量

Fig. 7 Relative expression of *LbALDH3F1* transgenic *A. thaliana* under different concentrations of NaCl stress

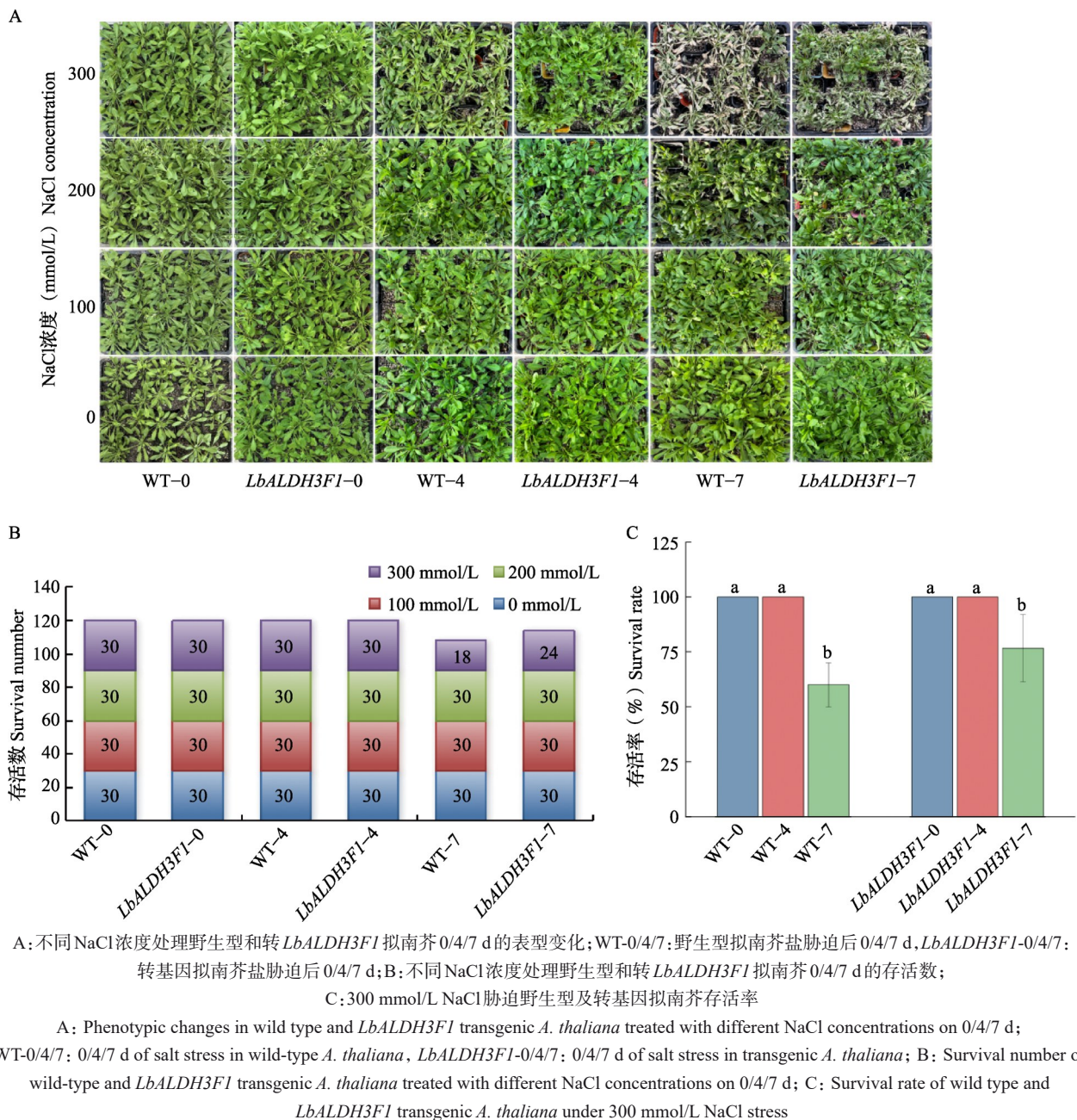


图8 不同浓度NaCl胁迫野生型和转 *LbALDH3F1* 拟南芥植株表型变化及存活情况

Fig. 8 Phenotypic change and survival data of different NaCl stressed wild type and *LbALDH3F1* transgenic *A. thaliana*

#### 2.5.4 盐胁迫下转基因拟南芥相关生理指标变化

对盐胁迫下野生型及过表达 *LbALDH3F1* 拟南芥相关抗氧化物质进行测定(图9),发现NaCl处理后,与野生型相比,过表达 *LbALDH3F1* 拟南芥的SOD活性显著升高,而盐浓度大于200 mmol/L处理后,CAT和POD活性并无显著性差异。在高盐(300 mmol/L NaCl)胁迫下  $H_2O_2$  及MDA含量显著低于野生型,羟自由基清除率显著高于野生型拟

南芥。

对盐胁迫下野生型及过表达 *LbALDH3F1* 拟南芥的Pro、ABA及叶绿素a的含量进行测定,盐胁迫的转基因拟南芥Pro及叶绿素a的含量均较高于野生型,且在高盐(300 mmol/L NaCl)胁迫下均达到显著性差异,而盐胁迫下野生型及过表达 *LbALDH3F1* 拟南芥的ABA含量没有显著性差异。

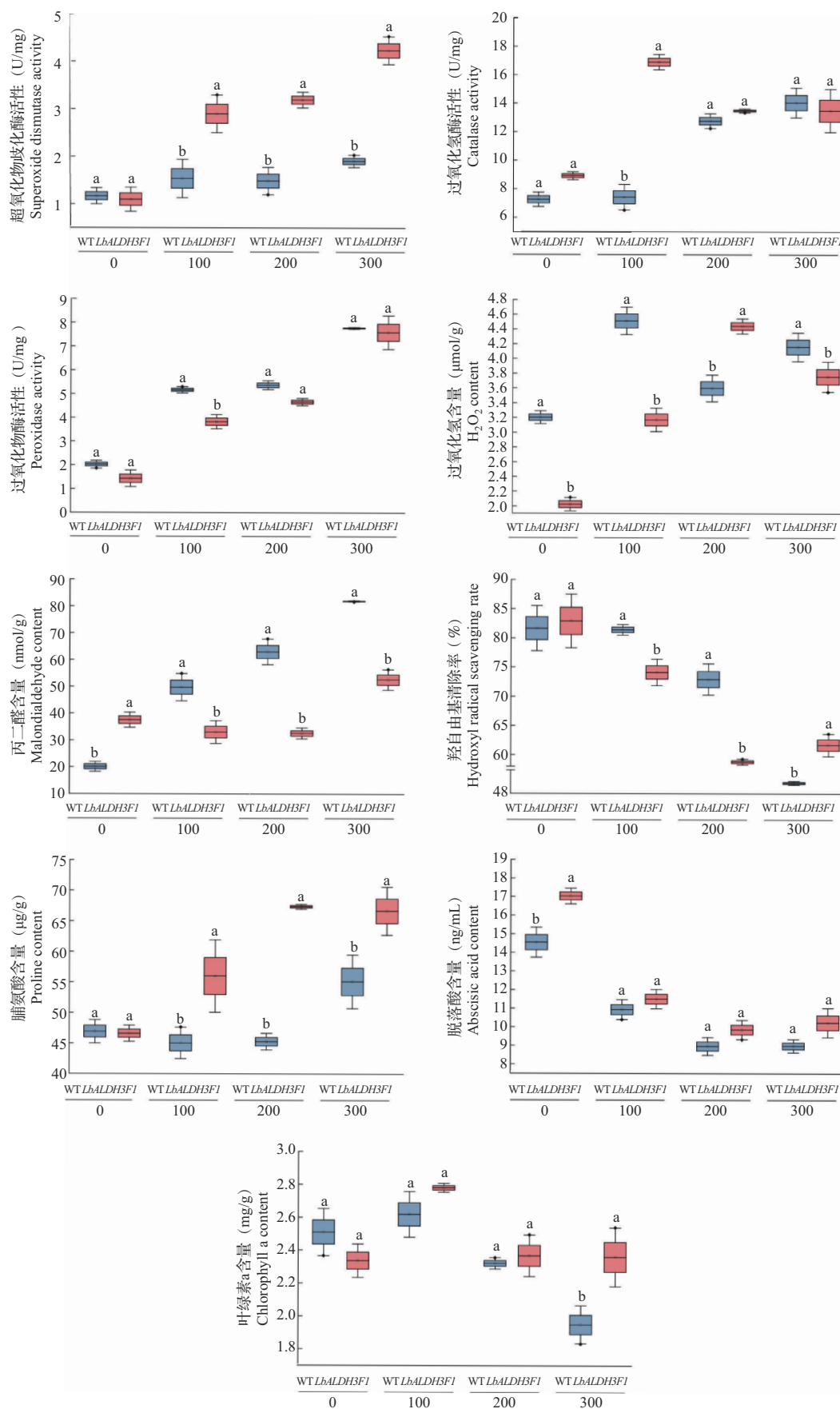


图9 转基因拟南芥相关生理指标

Fig. 9 Relevant physiological indicators of transgenic *A. thaliana* plants

### 3 讨论

宁夏枸杞作为重要的耐盐药用植物,耐盐基因功能分析对揭示其抗盐生理及分子机制至关重要。本研究通过 RACE 技术获得宁夏枸杞 *LbALDH3F1* 基因全长 1700 bp, 编码 481 个氨基酸残基, 蛋白质二级结构以  $\alpha$  螺旋和无规则卷曲为主, 与渐狭叶烟草 (*N. attenuata*) *ALDH3F1* 同源性较高。

蛋白质的亚细胞定位与其功能密切相关<sup>[24]</sup>。有研究认为 ALDH3 定位于线粒体、胞质和细胞核<sup>[25]</sup>, 也有认为 ALDH3I1 定位于叶绿体, 而 ALDH3H1 定位于细胞质中<sup>[26]</sup>。本研究发现 *ALDH3F1* 主要定位于细胞核和部分细胞膜中, 表明 ALDH 家族的不同蛋白存在定位差异, 体现了蛋白功能的多样化, 并表明不同的细胞区室可能存在特定功能的 ALDH 蛋白。此外, ALDH3 的亲水性平均值为负值, 有助于与 NAD(P)<sup>+</sup> 和醛类的醛基结合, 进而催化醛类物质起到解毒作用<sup>[27]</sup>。宁夏枸杞的 *ALDH3F1* 的亲水性平均值小于 0, 表明 *ALDH3F1* 蛋白为亲水性蛋白, 有利于与 NAD(P)<sup>+</sup> 和醛类的醛基结合, 进而催化醛类物质起到解毒作用。

不同基因的启动子区含有不同功能的顺式作用元件, 植物响应环境胁迫与这些顺式作用元件有关<sup>[28]</sup>。宁夏枸杞 *LbALDH3F1* 启动子区域含有多种胁迫相关的顺式作用元件, 包括光反应元件, ABA 响应元件、盐胁迫响应元件等。植物激素 ABA 介导多种生理过程, 包括对盐胁迫的响应。*LbALDH3F1* 启动子含有多个 ABA 响应元件, 如 ABRE 与 MYB/MYC 等, 这些顺式作用元件对应于盐胁迫响应启动子 (RD29B、RD22 等) 发挥作用<sup>[29]</sup>, 共同调节植物的胁迫响应。但本研究发现, 盐胁迫下野生型及过表达 *LbALDH3F1* 拟南芥的 ABA 含量没有显著性差异, 其响应机制还需要进一步研究。

*ALDHs* 基因家族与植物的抗逆性和生长发育密切相关, 如过表达 *Ath-ALDH3* 的拟南芥在遭遇干旱、NaCl 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 等胁迫时表现出更强的耐受性<sup>[30]</sup>, 过表达花生 *Ah-ALDH3H1* 的大豆可以通过增加 ALDH 活性从而提高对盐碱胁迫的耐受性<sup>[31]</sup>, 而过表达 *ALDH3F1* 可以提高转基因植株对菌核病和草铵膦的抗性<sup>[32]</sup>, 且有研究认为 *ALDH3F1* 还可以调控开花时间<sup>[33]</sup>。本研究将宁夏枸杞 *LbALDH3F1* 过表达转化拟南芥并进行盐胁迫, 发现经 NaCl 处理的转基因拟南芥所受盐胁迫的伤害较野生型小, 有更

高的存活率, 且在高盐 (300 mmol/L NaCl) 胁迫下有更高的叶绿素 a 含量, 这可能与 *LbALDH3F1* 启动子区域含有光反应元件和盐胁迫响应元件有关, 有利于细胞进行光合作用积累能量进而增强抗盐性。此外, 由于植物在逆境条件下通过一系列抗氧化防御系统减轻和修复由大量 ROS 产生所造成的伤害<sup>[30]</sup>, 高水平的 ALDH 可激活抗氧化剂的生成, 抑制活性氧物质在植株体内的累积, 增强植物的抗氧化能力<sup>[34-36]</sup>。本研究发现转基因拟南芥的 SOD 活性显著高于野生型, 且在高盐 (300 mmol/L NaCl) 胁迫下 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 及 MDA 含量显著低于野生型, Pro 含量和羟自由基清除率显著高于野生型拟南芥。表明在盐胁迫条件下转 *LbALDH3F1* 拟南芥具有更强的活性氧清除能力, 从而降低了体内活性氧的积累, 减弱了 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对抗氧化酶系统的损伤, 增强了植物抗氧化能力, 从而抵御盐胁迫带来的生理伤害。因此, 在 NaCl 胁迫下宁夏枸杞可能通过诱导 *LbALDH3F1* 上调表达调控 ALDH 参与 ROS 清除进而减弱膜脂过氧化程度, 维持细胞内 ROS 代谢平衡, 增强植株的抗盐胁迫能力。

#### 参考文献

- [1] Singh S, Brocker C, Koppaka V, Chen Y, Jackson B C, Matsumoto A, Thompson D C, Vasiliou V. Aldehyde dehydrogenases in cellular responses to oxidative/electrophilic stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 2013, 56:89-101
- [2] Perozich J, Nicholas H, Wang B C, Lindahl R, Hempel J. Relationships within the aldehyde dehydrogenase extended family. *Protein Science*, 1999, 8(1):137-146
- [3] Carmona-Molero R, Jimenez-Lopez J C, Caballo C, Gil J, Millan T, Die J V. Aldehyde dehydrogenase 3 is an expanded gene family with potential adaptive roles in chickpea. *Plants*, 2021, 10(11):2429
- [4] Islam M S, Ghosh A. Evolution, family expansion, and functional diversification of plant aldehyde dehydrogenases. *Gene*, 2022, 829:146522
- [5] Koppaka V, Thompson D C, Chen Y, Ellermann M, Nicolaou K C, Juvonen R O, Petersen D, Deitrich R A, Hurley T D, Vasiliou V. Aldehyde dehydrogenase inhibitors: A comprehensive review of the pharmacology, mechanism of action, substrate specificity, and clinical application. *Pharmacological Reviews*, 2012, 64(3):520-539
- [6] Hou Q, Bartels D. Comparative study of the aldehyde dehydrogenase (*ALDH*) gene superfamily in the glycophyte *Arabidopsis thaliana* and *Eutrema halophytes*. *Annals of Botany*, 2015, 115(3):465-479
- [7] Gao C, Han B. Evolutionary and expression study of the aldehyde dehydrogenase (*ALDH*) gene superfamily in rice

- (*Oryza sativa*). *Gene*, 2009, 431(1-2):86-94
- [8] Brocker C, Lassen N, Estey T, Pappa A, Cantore M, Orlova V V, Chavakis T, Kavanagh K L, Oppermann U, Vasilou V. Aldehyde dehydrogenase 7A1 (*ALDH7A1*) is a novel enzyme involved in cellular defense against hyperosmotic stress. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(24):18452-18463
- [9] Zhao J, Missihoun T D, Bartels D. The role of *Arabidopsis* aldehyde dehydrogenase genes in response to high temperature and stress combinations. *Journal of Experimental Botany*, 2017, 68(15):4295-4308
- [10] Guo X, Wang Y, Lu H, Cai X, Wang X, Zhou Z, Wang C, Wang Y, Zhang Z, Wang K, Liu F. Genome-wide characterization and expression analysis of the aldehyde dehydrogenase (*ALDH*) gene superfamily under abiotic stresses in cotton. *Gene*, 2017, 628:230-245
- [11] 华园榕. 油桐乙醛脱氢酶 *ALDH* 基因家族的克隆与功能表达研究. 长沙: 中南林业科技大学, 2017  
Hua Y R. Cloning and functional expression of *aldhs* gene of aldehydedehydrogenase in *Vernicia fordii*. Changsha: Central South University of Forestry and Technology, 2017
- [12] Sunkar R, Bartels D, Kirch H H. Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. *Plant Journal*, 2003, 35(4):452-464
- [13] Raza H, Khan M R, Zafar S A, Kirch H H, Bartels D. *Aldehyde dehydrogenase 3II* gene is recruited in conferring multiple abiotic stress tolerance in plants. *Plant Biology*, 2022, 24(1):85-94
- [14] 朱志明, 毛桂莲, 许兴, 王盛, 郑蕊, 杨淑娟. 盐胁迫下宁夏枸杞根系  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  平衡及抑制剂对其影响的研究. 干旱地区农业研究, 2017, 35(6):140-145  
Zhu Z M, Mao G L, Xu X, Wang S, Zheng R, Yang S J. Effect of salt stress and inhibitor on uptake and transportation of  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  in the root of Ningxia *Lycium barbarum* L.. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2017, 35(6):140-145
- [15] 梁敏. 盐胁迫下宁夏枸杞差异蛋白的筛选及离子转运相关基因的表达. 银川: 宁夏大学, 2019  
Liang M. Screening of differential proteins and expression of related iontransport genes in *Lycium barbarum* L. under salt stress. Yinchuan: Ningxia University, 2019
- [16] 陆瑛, 鲁延芳, 占玉芳, 杜国新, 滕玉凤. 盐胁迫对“宁杞1号”生长表现和生理指标的影响. 林业科技通讯, 2018(5):70-75  
Lu Y, Lu Y F, Zhan Y F, Du G X, Teng Y F. The influence of growth performance and physiological Index in salt stress for 3 kinds of tree species. *Forest Science and Technology*, 2018(5):70-75
- [17] 马晓蓉, 杨淑娟, 姚宁, 王玲霞, 马强, 梁文裕. NaCl胁迫对宁夏枸杞叶和幼根显微及超微结构的影响. 西北植物学报, 2021, 41(12):2087-2095  
Ma X R, Yang S J, Yao N, Wang L X, Ma Q, Liang W Y. Effect of NaCl stress on the microstructure and ultrastructure of leaves and young roots in *Lycium barbarum*. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2021, 41(12):2087-2095
- [18] 梁敏, 许兴, 丁向真, 李志英, 郑蕊, 杨淑娟, 毛桂莲. 盐胁迫下宁夏枸杞  $\text{Na}^+$  吸收及  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  转运蛋白与  $\text{H}^+$ -ATPase 基因表达的研究. 核农学报, 2020, 34(4):745-751  
Liang M, Xu X, Ding X Z, Li Z Y, Zheng R, Yang S J, Mao G L. Effects of salt stress on  $\text{Na}^+$  uptake and expression of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  transporter and  $\text{H}^+$ -atpase genes in *Lycium barbarum* L. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2020, 34(4):745-751
- [19] 胡进红. 宁夏枸杞响应 NaCl 胁迫的基因差异表达及 *TGA2* 和 *ALDH3F1* 的功能分析. 银川: 宁夏大学, 2023  
Hu J H. Analysis of gene differential expression of *Lycium barbarum* in response to NaCl stress and function of *TGA2* and *ALDH3I*. Yinchuan: Ningxia University, 2023
- [20] 史光珍, 王兆晔, 孙琦, 朱新霞. 雪莲 *SikCDPK1* 启动子的克隆和活性分析. 生物技术通报, 2022, 38(9):191-197  
Shi G Z, Wang Z Y, Sun Q, Zhu X X. Cloning and activity analysis of *SikCDPK1* promoter from *Saussurea involucrata*. *Biotechnology Bulletin*, 2022, 38(9):191-197
- [21] Liu Y G, Chen Y. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences. *Biotechniques*, 2007, 43(5):649-650, 652, 654
- [22] 朱熙. 马铃薯中与胁迫相关 *StMAPKs* 基因的分离及功能研究. 兰州: 甘肃农业大学, 2021  
Zhu X. Isolation and functional study of stress-related *StMAPKs* gene in potato. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2021
- [23] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001, 25(4):402-408
- [24] 张家瑞, 孙僖, 梁芳, 王菲, 张艳俊, 王海燕, 刘大群. 小麦病程相关蛋白1基因的亚细胞定位及信号肽鉴定. 河北农业大学学报, 2017, 40(4):1-7  
Zhang J R, Sun X, Liang F, Wang F, Zhang Y J, Wang H Y, Liu D Q. Identification of the signal peptide and subcellular localization of pathogenesis related protein 1 gene from wheat. *Journal of Hebei Agricultural University*, 2017, 40(4):1-7
- [25] 常凯, 童立冬, 江忠勇, 熊怡沁, 张睿, 熊杰. 醛脱氢酶 (ALDH) 蛋白家族的信息学比较分析与修饰预测. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(1):28-33  
Chang K, Tong L D, Jiang Z Y, Xiong Y S, Zhang R, Xiong J. Comparative analysis and mutation prediction of aldehyde dehydrogenase based on the bioinformatics methods. *Genomics and Applied Biology*, 2016, 35(1):28-33
- [26] 黄世平, 曾幼玲. 植物醛脱氢酶在逆境胁迫中的研究进展. 生物技术通报, 2015, 31(12):8-14  
Huang S P, Zeng Y L. Research progress on plant aldehyde dehydrogenase under adversity stresses. *Biotechnology Bulletin*, 2015, 31(12):8-14
- [27] Perozich J, Kuo I, Wang B C, Boesch J S, Lindahl R, Hempel J. Shifting the NAD/NADP preference in class 3

- aldehyde dehydrogenase. *European Journal of Biochemistry*, 2000, 267(20): 6197-6203
- [28] 宋志钢, 刘颖, 刘瑞, 卢少云. 海雀稗 *PvCIPK9* 基因克隆及耐盐功能鉴定. *草地学报*, 2023, 31(10): 2938-2948
- Song Z G, Liu Y, Liu R, Lu S Y. Cloning and identification of salt tolerance function of *Paspalum vaginatum PvCIPK9*. *Acta Agrestia Sinica*, 2023, 31(10): 2938-2948
- [29] 徐金龙, 张文静, 向凤宁. 植物盐胁迫诱导启动子及其顺式作用元件研究进展. *植物生理学报*, 2021, 57(4): 759-766
- Xu J L, Zhang W J, Xiang F N. Advances in stress inducible promoter and *cis*-acting elements in higher plants. *Plant Physiology Journal*, 2021, 57(4): 759-766
- [30] Sunkar R, Bartels D, Kirch H H. Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. *Plant Journal*, 2003, 35(4): 452-464
- [31] Cao Y, Wang J, Zhao S, Fang Q, Ruan J, Li S, Liu T, Qi Y, Zhang L, Zhang X, Meng F. Overexpression of the aldehyde dehydrogenase *AhALDH3H1* from *Arachis hypogaea* in soybean increases saline-alkali stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14: 1165384
- [32] Gan Q, Luan M, Hu M, Liu Z, Zhang Z. Functional study of *CYP90A1* and *ALDH3F1* gene obtained by transcriptome sequencing analysis of *Brassica napus* seedlings treated with brassinolide. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 1040511
- [33] Xu D, Liu Q, Chen G, Yan Z, Hu H. Aldehyde dehydrogenase *ALDH3F1* involvement in flowering time regulation through histone acetylation modulation on *FLOWERING LOCUS C*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2020, 62(8): 1080-1092
- [34] 刘聪, 董腊媛, 林建中, 刘选明. 逆境胁迫下植物体内活性氧代谢及调控机理研究进展. *生命科学研究*, 2019, 23(3): 253-258
- Liu C, Dong L Y, Lin J Z, Liu X M. Research advances on regulation mechanism of reactive oxygen species metabolism under stresses. *Life Sciences Research*, 2019, 23(3): 253-258
- [35] Zhao J, Missihoun T D, Bartels D. The role of *Arabidopsis* aldehyde dehydrogenase genes in response to high temperature and stress combinations. *Journal of Experimental Botany*, 2017, 68(15): 4295-4308
- [36] Stiti N, Missihoun T D, Kotchoni S O, Kirch H H, Bartels D. Aldehyde dehydrogenases in *Arabidopsis thaliana*: Biochemical requirements, metabolic pathways, and functional analysis. *Frontiers in Plant Science*, 2011, 2: 65