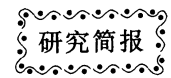


DOI: 10.3724/SP.J.1006.2009.01146



转甜菜碱醛脱氢酶基因马铃薯的抗旱耐盐性

张宁^{1,2} 司怀军^{1,2} 栗亮¹ 杨涛^{1,2} 张春风¹ 王蒂^{1,*}

¹ 甘肃省作物遗传改良与种质创新重点实验室, 甘肃兰州 730070; ² 甘肃农业大学生命科学技术学院, 甘肃兰州 730070

摘要: 通过根癌农杆菌介导法将甜菜碱醛脱氢酶(BADH)基因导入马铃薯栽培品种甘农薯 2 号, 经 PCR、Southern 和 Northern 杂交证明 *BADH* 基因已整合到马铃薯基因组中并在转基因植株中转录和表达。测定表明对照植株没有 BADH 酶活性, 各转化株系在胁迫前后 BADH 酶活性近似, 在 2.1~10.5 U 之间。BADH 酶活性与叶片的相对电导率呈一定的负相关($y = -3.774x + 57.083$, $r = 0.989^{**}$)。在 NaCl 和 PEG 胁迫下, 转基因植株生长正常, 株高比对照提高 0.41~1.00 cm, 单株重量比对照增加 10%~35%, 说明外源 *BADH* 基因的导入提高了马铃薯植株对于干旱和盐碱的抗性。

关键词: 马铃薯; 甜菜碱醛脱氢酶; 遗传转化; 抗旱; 耐盐

Drought and Salinity Tolerance in Transgenic Potato Expressing the Betaine Aldehyde Dehydrogenase Gene

ZHANG Ning^{1,2}, SI Huai-Jun^{1,2}, LI Liang¹, YANG Tao^{1,2}, ZHANG Chun-Feng¹, and WANG Di^{1,*}

¹ Gansu Key Laboratory of Crop Genetic & Germplasm Enhancement, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; ² College of Life Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

Abstract: Glycine betaine (GB) is a common compatible solute in many different organisms including higher plants. Many plant species can accumulate GB in response to drought and salinity. GB is synthesized by conversion of choline to GB through a two-step oxidation via the intermediate betaine aldehyde. In higher plants, the relevant enzymes are choline monoxygenase (CMO) and betaine aldehyde dehydrogenase (BADH). The fact that many important crops, such as rice, potato and tomato are betaine-deficient has inevitably led to the proposal that it might be possible to increase drought and salinity tolerances by genetic engineering of GB synthesis. In the present study, the transgenic plants of potato cultivar Gannongshu 2 were obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation of the expression vector pBIBB contained *BADH* gene under the control of the constitutive promoter CaMV 35S. PCR, Southern, and Northern blot analyses showed that the *BADH* gene was integrated into potato genome, transcribed and expressed in the transgenic plants. The analysis of BADH activity of transgenic plant leaves revealed that the BADH activity ranged from 2.1 to 10.5 U, while it was not detectable in the control plants. There was a negative relationship ($y = -3.774x + 57.083$, $r = 0.989^{**}$) between BADH activity and relative electric conductivity of the transgenic potato leaves. The transgenic potato plants grew normally under NaCl and polyethylene glycol (PEG) stresses with increase of 0.41–1.00 cm for plant height and 10–35% for fresh weight per plant compared with the control plants. This result demonstrated that the transgenic potato plants can improve tolerances to drought and salinity as a result of transformation and expression of *BADH* gene.

Keywords: Potato; Betaine aldehyde dehydrogenase; Genetic transformation; Drought resistance; Salt tolerance

马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)是世界第四大粮食作物, 又是重要的蔬菜作物和食品及工业加工原料。马铃薯是水分胁迫敏感型作物, 随着干旱和土壤盐渍化、次生盐渍化程度地日益加重, 其产量和品质深受影响^[1]。甜菜碱被认为是目前最有希望的抗渗透胁迫保护物质之一^[2]。已有许多研究证明将甜菜碱合成的关键酶 *BADH* 基因导入烟草^[3-4]、水稻^[5-6]、小麦^[7]、豆瓣菜^[8]、草莓^[9]、白三叶

草^[10]、棉花^[11]等作物中, 获得的转基因植株的抗旱耐盐性都得到一定程度的提高。我们从菠菜中克隆了 *BADH* 基因(GenBank 登录号为 AY156694)^[12], 构建了组成型启动子 CaMV 35S 启动的 *BADH* 基因表达载体 pBIBB, 并获得了抗旱和耐盐性提高的转基因烟草^[13]。本研究将该 *BADH* 基因导入马铃薯栽培品种, 以期提高转基因马铃薯的抗旱和耐盐性, 为创造马铃薯抗旱耐盐新种质和进一步培

本研究由国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2006AA100107), 高等学校博士学科点专项科研基金项目(20050733003), 甘肃省农业生物技术研究与开发项目(GNSW-2006-01)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 王蒂, E-mail: wangd@gsau.edu.cn

第一作者联系方式: E-mail: ningzh@gsau.edu.cn

Received(收稿日期): 2008-10-29; Accepted(接受日期): 2009-02-13.

育抗旱耐盐新品系提供基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料、菌株和质粒

采用马铃薯四倍体栽培品种甘农薯 2 号的无菌试管苗, 经单节切段扩大繁殖, 繁殖培养基由 MS 附加 3%蔗糖和 0.8%琼脂组成。按柳俊等^[14]的方法, 将马铃薯茎切段接种培养于光照强度 $70\sim 90\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 光周期 $8\ \text{h d}^{-1}$ 、温度 $(20\pm 1)^\circ\text{C}$ 的条件下诱导试管薯。大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株为 DH5 α , 根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株为 LBA4404, 抗性筛选剂为利福平(Rif), 植物表达载体为 pBIBB (CaMV 35S 启动子驱动的 *BADH* 基因)^[13], 抗性标记为卡那霉素(Kan)。

1.2 酶和试剂

限制性内切酶购自 TaKaRa 公司; *Taq* DNA 聚合酶、引物合成、DNA 凝胶回收试剂盒购自上海生物工程公司; DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 和 DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)杂交试剂盒购自 Roche 公司。其他生化试剂为 Sigma 公司产品或国产分析纯。

1.3 马铃薯的遗传转化

采用农杆菌介导的马铃薯试管薯薄片遗传转化方法^[15]。

1.4 转基因植株 PCR 和 Southern 杂交检测

按 Edwards 等^[16]的方法从马铃薯叶片中提取植物总 DNA。用未转化植株作阴性对照, 转化植株的总 DNA 为模板, 以 *BADH* 基因内部的两个引物 5'-GTTGACAAG ATTGCCTTTAC-3'和 5'-CTTAACAAAAACAACACCGT-3'进行 PCR 扩增。扩增程序为 $94^\circ\text{C}\ 3\ \text{min}$; $94^\circ\text{C}\ 45\ \text{s}$, $50^\circ\text{C}\ 45\ \text{s}$, 72°C , $1\ \text{min}$; 36 个循环, 72°C 延伸 $5\ \text{min}$ 。预期扩增片段为 853 bp。

PCR 检测为阳性的转基因植株, 用 CTAB 法提取其植株总 DNA 进行 Southern 杂交检测。按 Roche 公司生产的 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 试剂盒说明书, 标记 *BADH* 基因的 cDNA 探针。取 30~40 μg 纯化的马铃薯 DNA, *Sac* I 酶切 10 h, 用乙醇沉淀浓缩 DNA 并重新溶解于 60 μL TE (pH 8.0)中, 在 0.8%琼脂糖凝胶上电泳分离, 经变性、中和处理后, 用毛细管法将 DNA 转至尼龙膜上(Hybond-N⁺, Amersham, USA)。120 $^\circ\text{C}$ 烘膜 1 h, 交联后进行杂交。按 Roche 公司试剂盒说明书进行杂交, 采用 Anti-Dig-AP 与 NBT/BCIP 显色系统。

1.5 转基因植株 Northern 杂交检测

用异硫氰酸胍法^[17]抽提转基因马铃薯和对照的总 RNA。RNA 经 1%甲醛-MOPS 琼脂糖凝胶电泳后, 转至尼龙膜(Hybond-N⁺, Amersham, USA)。用 DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)标记 *BADH* 基因探针, 按 Roche 公司生产的试剂盒说明书进行 Northern 杂交及检测。

1.6 转基因植株 *BADH* 酶活性和电导率的测定

转基因马铃薯植株经胁迫处理后 3 d, 取其中上部充分展开的叶片 2 g, 在液氮中研磨后, 室温下加入 3 mL 蛋白提取液进行抽提, 提取液含 $50\ \text{mmol L}^{-1}$ Tris-HCl (pH

8.0), $1\ \text{mmol L}^{-1}$ EDTA, $5\ \text{mmol L}^{-1}$ DTT。4 $^\circ\text{C}$ 下 $12\ 000\times g$ 离心 10 min。以 BSA 为标准, 用 Bradford 法测定酶蛋白浓度^[18]。*BADH* 酶活性的测定方法见文献^[9]。取经过胁迫处理的转基因马铃薯及对照植株的中上部充分展开的叶片 2 g, 测定相对电导率, 方法见文献^[19]。用 DDS-11A 型电导仪测定转化植株叶片的电导率 L1(叶片杀死前外渗液的电导值)和 L2(叶片死后外渗液的电导值), 细胞相对电导率=(L1/L2) $\times 100\%$ 。

1.7 转基因植株抗旱和耐盐性分析

将转 *BADH* 基因的马铃薯试管苗移栽于花盆的蛭石中, 以未转化马铃薯为对照。每个转化株系设 3 个重复处理, 于温室 25 $^\circ\text{C}$ 自然光下浇灌营养液进行培养。当株高达 10 cm 时, 进行胁迫处理。第 1 组为 NaCl 胁迫, 用 NaCl 溶液浇灌植株, 浓度从 $50\ \text{mmol L}^{-1}$ 开始, 每天提高 $50\ \text{mmol L}^{-1}$, 至终浓度 $500\ \text{mmol L}^{-1}$ 。第 2 组为 PEG-6000 模拟的干旱胁迫, 连续 10 d 用 15% PEG 浇灌。胁迫处理后 3 d, 提取各组植株 RNA 进行 Northern 杂交检测、*BADH* 活性和电导率的测定, 并观察植株生长情况, 统计株高和单株鲜重。

2 结果与分析

2.1 转基因马铃薯植株再生和分子杂交鉴定

采用农杆菌介导法获得了转 *BADH* 基因的马铃薯栽培品种甘农薯 2 号的批量转化植株。提取转化植株总 DNA, 用 *BADH* 基因内部的两个特异引物进行 PCR 扩增, 将能够扩增出预期片段的植株进行 Southern 杂交检测。结果显示, 外源 *BADH* 基因已成功整合到转基因马铃薯的基因组中, 而在未转基因的对照植株中则检测不到 *BADH* 基因或其同源基因(图 1)。从 NaCl 和 PEG 胁迫处理后植株提取的 RNA 进行 Northern 杂交结果显示, 在未转基因的马铃薯对照中检测不到 *BADH* 基因的转录产物, 这与马铃薯不积累甜菜碱的报道^[20]相一致。在 NaCl 和 PEG 胁迫处理下, 转基因植株中 *BADH* 基因转录水平差异不大(图 2)。

2.2 转基因马铃薯 *BADH* 酶活性

转基因马铃薯的 *BADH* 活性测定结果表明, 在非转基因的马铃薯对照植株中检测不到 *BADH* 酶活性, 而在转 *BADH* 基因植株中, 导入的外源 *BADH* 基因均能表达

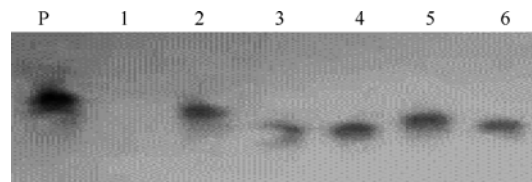


图 1 转基因马铃薯 Southern 杂交鉴定

Fig. 1 Identification of transgenic potato by Southern blot
P: 质粒 pBIBB(阳性对照); 1: 非转基因马铃薯(阴性对照);
2~6: 转化植株。

P: plasmid pBIBB (positive control); 1: non-transgenic potato (negative control); 2~6: transgenic potatoes.

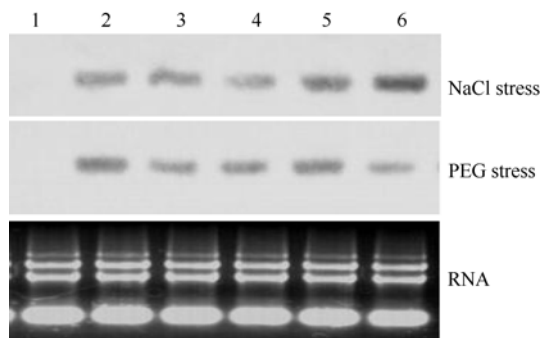


图 2 转基因马铃薯植株 Northern 杂交分析

Fig. 2 Northern blotting analysis of transgenic potato plants
1: 非转基因马铃薯(阴性对照); 2-6: 转化植株。每个泳道含 30 μg RNA 样品, 用溴化乙锭(EB)染色作为参照。

1: non-transgenic potato (negative control); 2-6: transgenic potatoes. Each lane in electrophoresis contained 30 μg RNA sample stained with ethidium bromide (EB).

BADH 酶活性, 说明在转基因马铃薯植株中, *BADH* 基因能够正确转录并翻译成甜菜碱醛脱氢酶蛋白。并且, 每个转化株系在 NaCl 和 PEG 胁迫前后 BADH 酶活性近似, 但在不同的转基因个体间 BADH 酶活性差异较大, 变化范围在 2.1~10.5 U 之间(表 1)。

表 1 转基因马铃薯植株在 NaCl 和 PEG 胁迫后 BADH 酶活性的测定结果

Table 1 BADH enzyme activity assay of transgenic potato plants stressed by NaCl and PEG

株系 Line	BADH 酶活性 BADH activity (U)		
	未胁迫 Untreated	NaCl 胁迫 Treated with NaCl	PEG 胁迫 Treated with PEG
1	0 a	0 a	0 a
2	5.2 a	5.1 a	5.6 a
3	2.1 a	2.6 a	2.4 a
4	8.9 a	9.0 a	9.1 a
5	10.2 a	10.5 a	10.5 a
6	6.7 a	6.5 a	6.8 a

1: 非转基因马铃薯; 2-6: 转基因马铃薯株系。数据后不同的小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。

1: non-transgenic potato; 2-6: transgenic potato plant lines. Values followed by a different small letter are significantly different at the 0.05 probability level.

2.3 转基因马铃薯植株电导率

细胞相对电导率反映细胞膜的相对透性, 可以表示胁迫细胞受损害的程度。以未转化植株为对照, 测定并计算了转基因植株叶片的相对电导率。结果表明, 转 *BADH* 基因植株叶片的细胞相对电导率在 16.3%~47.8% 之间, 株系间差异较大, 其中 4 个转基因株系的相对电导率低于非转基因株的相对电导率(45.6%)。说明外源 *BADH* 基因的导入提高了马铃薯植株的抗旱性, 表现细胞膜相对透性的降低。从图 3 可以看出, 转基因植株的 BADH 酶活性与叶片的相对电导率有一定的负相关, 其直线回归方程为 $y = -3.774x + 57.083$ ($r = 0.989^{**}$), 这一结果进一步说明

BADH 酶活性越强, 对植株细胞膜通透性的保护能力越强, 反映为相对电导率越低, 从而使转基因植株的抗逆性比对照显著增强。

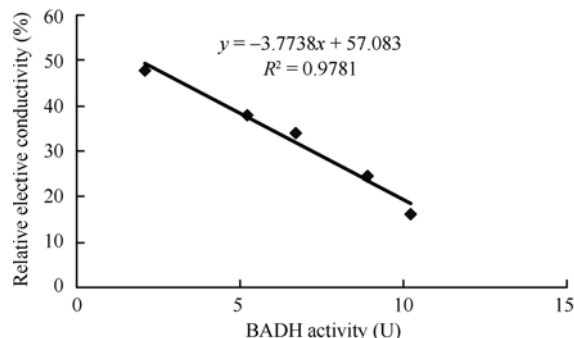


图 3 转基因马铃薯 BADH 酶活性与相对电导率的关系

Fig. 3 Relationship between BADH activity and relative electric conductivity in transgenic potatoes

2.4 转基因马铃薯抗旱耐盐性的观察与鉴定

在 NaCl 和 PEG 胁迫下, 转基因植株能生长正常, 生长势强于非转基因的对照, 株高比对照提高 0.41~1.00 cm, 单株重量比对照增加 10%~35%, 说明外源 *BADH* 基因的导入提高了马铃薯植株对干旱和盐碱的抗性; 两胁迫间差异不明显(图 4 和图 5)。

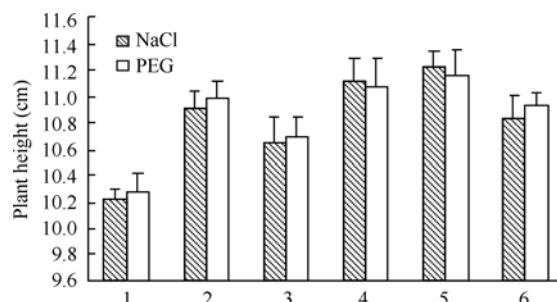


图 4 转基因马铃薯株高

Fig. 4 Plant height of transgenic potatoes

1: 非转基因马铃薯; 2-6: 转基因马铃薯株系。
1: non-transgenic potato; 2-6: transgenic potato plant lines.

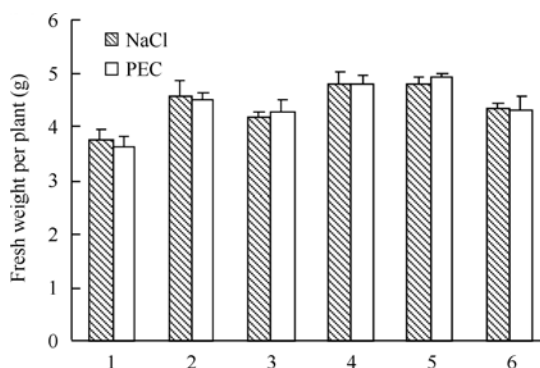


图 5 转基因马铃薯单株鲜重

Fig. 5 Fresh weight per plant of transgenic potatoes

1: 非转基因马铃薯; 2-6: 转基因马铃薯株系。
1: non-transgenic potato; 2-6: transgenic potato plant lines.

3 讨论

干旱和盐渍化对农业生产的影响极其严重,土壤干旱和盐渍化在一定意义上都属于渗透胁迫。高等植物对水分胁迫的应答反应是一系列复杂的调控机制协调作用的结果,包括对水分胁迫的感受、信号的传导、基因的激活及随后的一系列生理生化反应等。在长期的进化过程中,许多植物已演化出了一套抗水分胁迫的适应性机制。最为常见的是积累与代谢相容的渗透保护性物质,如多元醇类、脯氨酸和季铵类化合物等^[21]。甜菜碱是一类季铵化合物,植物体内的甜菜碱是在叶绿体内通过光或激素(如ABA)诱导合成的^[4,22]。许多高等植物,特别是藜科、禾本科和苋科植物,在受到水分和盐胁迫时,积累大量的甜菜碱。而自然界也有一些植物如水稻、马铃薯、番茄和烟草等不能或基本不能合成甜菜碱^[20],因此,将甜菜碱合成的相关基因导入这些植物以增强作物的抗旱、抗盐及抗逆境能力,已成为近年来植物基因工程研究的热点之一。

本研究把菠菜的 *BADH* 基因导入马铃薯并能表达,具有较高的酶活性,提高了马铃薯的抗旱性和耐盐性。转基因植株的 *BADH* 酶活性在 NaCl 和 PEG 胁迫前后变化不明显,这可能是因为 CaMV 35S 启动子是强组成型启动子,所驱动的外源基因的表达没有组织、器官、发育阶段、诱导条件等特异性。但在不同的转基因个体间 *BADH* 酶活性差异较大,说明外源基因插入马铃薯染色体组的不同位点对基因的表达具有重要的影响,导入的外源基因在转基因马铃薯中的表达可能在转录、翻译水平或者成熟酶蛋白加工过程中出现差异。许多作物在受到不利的环境条件胁迫时,细胞膜的结构和功能首先受到伤害,细胞膜的透性增大,组织受伤害越严重,细胞外渗液中电解质渗漏越严重,可以用外渗液电导率的变化,反映细胞的受胁迫损害程度。在本研究中,转 *BADH* 基因植株叶片细胞相对电导率与 *BADH* 酶活性值类似,都存在株系间较大差异。二者存在负相关($y = -3.774x + 57.083, r = 0.989^{**}$),这一结果充分显示 *BADH* 酶活性越强,对植株细胞膜通透性的保护能力越强,转基因植株抗性比对照植株显著增强。形态学观察和抗旱耐盐性鉴定表明,转基因植株在 NaCl 和 PEG 胁迫下,株型正常,生长势明显优于对照。从而说明, *BADH* 基因的表达能够提高转基因马铃薯对干旱和盐碱的抗性,获得的转基因植株可以作为马铃薯抗逆育种的种质材料而加以利用。

References

- [1] Deblonde P M K, Ledent J F. Effects of moderate drought condition on green leaf number, stem height, leaf length and tuber yield of potato cultivars. *Eur J Agron*, 2001, 14: 31–41
- [2] Chen T H H, Murata N. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Curr Opin Plant Biol*, 2002, 5: 250–257
- [3] Rathinasabapathi B, McCue K F, Gage D A, Hanson A D. Metabolic engineering of glycine betaine synthesis: Plant betaine aldehyde dehydrogenases lacking typical transit peptides are targeted to tobacco chloroplasts where they confer betaine aldehyde resistance. *Planta*, 1994, 193: 155–162
- [4] 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. *Plant Mol Biol*, 1995, 27: 307–315
- [5] Guo Y(郭岩), Zhang L(张莉), Xiao G(肖岗), Cao S-Y(曹守云), Gu D-M(谷冬梅), Tian W-Z(田文忠), Chen S-Y(陈受宜). Expression of betaine aldehyde dehydrogenase gene and salinity tolerance in rice transgenic plants. *Sci China (Ser C)* (中国科学·C 辑), 1997, 27(2): 151–155 (in Chinese)
- [6] Kishitani S, Takanami T, Suzuki M, Oikawa M, Yokoi S, Ishitani M, Alvarez-Nakase A M, Takabe T, Takabe T. Compatibility of glycinebetaine in rice plants: Evaluation using transgenic rice plants with a gene for peroxisomal betaine aldehyde dehydrogenase from barley. *Plant Cell Environ*, 2000, 23: 107–114
- [7] Guo B-H(郭北海), Zhang Y-M(张艳敏), Li H-J(李洪杰), Du L-C(杜立群), Li Y-X(李银心), Zhang J-S(张劲松), Chen S-Y(陈受宜), Zhu Z-Q(朱至清). Transformation of wheat with a gene encoding for the betaine aldehyde dehydrogenase (*BADH*). *Acta Bot Sin* (植物学报), 2000, 42(3): 279–283 (in Chinese with English abstract)
- [8] Li Y-X(李银心), Chang F-Q(常凤启), Du L-Q(杜立群), Guo B-H(郭北海), Li H-J(李洪杰), Zhang J-S(张劲松), Chen S-Y(陈受宜), Zhu Z-Q(朱至清). Genetic transformation of watercress with a gene encoding for betaine-aldehyde dehydrogenase (*BADH*). *Acta Bot Sin* (植物学报), 2000, 42(5): 480–484 (in Chinese with English abstract)
- [9] Liu F-H(刘凤华), Guo Y(郭岩), Gu D-M(谷冬梅), Xiao G(肖岗), Chen Z-H(陈正华), Chen S-Y(陈受宜). Salt tolerance of transgenic plants with *BADH* cDNA. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 1997, 24(1): 54–58 (in Chinese with English abstract)
- [10] Chen C-F(陈传芳), Li Y-W(李义文), Chen Y(陈豫), Bai J-R(白建荣), Li H(李辉), Zhu Y-F(朱银锋), Chen S-Y(陈受宜), Jia X(贾旭). Saline tolerance white clover transformed with the betaine aldehyde dehydrogenase gene by *Agrobacterium tumefaciens*. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 2004, 31(1): 97–101 (in Chinese with English abstract)
- [11] Luo X-L(罗晓丽), Xiao J-L(肖娟丽), Wang Z-A(王志安), Zhang A-H(张安红), Tian Y-C(田颖川), Wu J-H(吴家和). Overexpression of *Spinacia oleracea* betaine aldehyde dehydrogenase (*SoBADH*) gene confers the salt and cold tolerant in *Gossypium hirsutum* L. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报), 2008, 24(8): 1464–1469 (in Chinese with English abstract)
- [12] Zhang N(张宁), Wang D(王蒂), Si H-J(司怀军). Isolation and induced expression of betaine aldehyde dehydrogenase gene from spinach. *J Agric Biotechnol* (农业生物技术学报), 2004, 12(5): 612–613 (in Chinese)
- [13] Si H-J(司怀军), Zhang N(张宁), Wang D(王蒂). Enhancement of drought and salt resistances in tobacco by transformation of betaine aldehyde dehydrogenase gene. *Acta Agron Sin* (作物学报),

- 2007, 33(8): 1335–1339 (in Chinese with English abstract)
- [14] Liu J(柳俊), Xie C-H(谢从华), Huang D-E(黄大恩), Liao Y(廖勇), Wu C-J(吴承金). Research on forming mechanism of potato microtubers-effects of BA on the formation and growth of microtubers. *Chin Potato J* (马铃薯杂志), 1995, 9(1): 7–11(in Chinese with English abstract)
- [15] Si H-J(司怀军), Xie C-H(谢从华), Liu J(柳俊). An efficient protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation of microtuber and the introduction of an antisense class I patatin gene into potato. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2003, 29(6): 801–805(in English with Chinese abstract)
- [16] Edwards K, Johnstone C, Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucl Acids Res*, 1991, 19: 1349
- [17] Chomeczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, 162: 156–159
- [18] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248–254
- [19] Li H-S(李合生). Principles and Techniques of Plant Physiological and Biochemical Experiment (植物生理生化实验原理与技术). Beijing: Higher Education Press, 2000. pp 261–263 (in Chinese)
- [20] McCue K F, Hanson A D. Drought and salt tolerance: Towards understanding and application. *Trends Biotechnol*, 1990, 8: 358–362
- [21] Yancey P H, Clark M E, Hand S C, Bowlus R D, Somero G N. Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. *Science*, 1982, 217: 1214–1222
- [22] Weigle P, Weretilnyk E A, Hanson A D. Betaine aldehyde oxidation by spinach chloroplasts. *Plant Physiol*, 1986, 82: 753–759