

甘蔗细胞质型苹果酸脱氢酶基因的克隆及其表达分析

徐景升^a, 阙友雄^a, 颜克伟^b, 唐唯其^c, 许莉萍^a, 高三基^a, 郭晋隆^a, 董萌^a, 陈如凯^{a*}

(福建农林大学, a. 农业部甘蔗遗传改良重点开放实验室, 甘蔗综合研究所; b. 生命科学学院; c. 水稻遗传研究所, 福州 350002)

摘要: 对甘蔗(*Saccharum officinarum* L.)叶片全长 cDNA 文库进行测序, 获得了 1 个细胞质型苹果酸脱氢酶(cMDH)基因的全长 cDNA 序列, 命名为 *Sc-cMDH*。生物信息学分析表明, 该基因全长 1314 bp, 开放阅读框为 999 bp, 编码 332 个氨基酸。Sc-cMDH 与其他植物 cMDH 的氨基酸序列同源性高达 86.5%~97.0%。Sc-cMDH 包含典型的 NAD⁺ 结合基元 T¹¹GAAGQI¹⁷ 和催化基元 I¹⁸⁴WGNH¹⁸⁸, 还有相当保守的 6 个半胱氨酸残基, 因此推断该基因为细胞质型 NAD-MDH。定量 PCR 分析结果表明, 该基因在甘蔗叶片和根中的表达量高于茎。

关键词: 甘蔗; 细胞质型苹果酸脱氢酶基因; 实时定量 PCR

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2012.05.005

Cloning and Expression Analysis of Cytosolic Malate Dehydrogenase Gene from Sugarcane

XU Jing-sheng^a, QUE You-xiong^a, YAN Ke-wei^b, TANG Wei-qi^c, XU Li-ping^a, GAO San-ji^a, GUO Jin-long^a, DONG Meng^a, CHEN Ru-kai^{a*}

(a. Key Laboratory of Sugarcane Genetic Improvement, Ministry of Agriculture; Institute of Sugarcane; b. College of Life Science; c. Institute of Rice Genetics, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: A full-length cDNA sequence of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) cytosolic malate dehydrogenase (cMDH) gene, named as *Sc-cMDH*, was obtained from sugarcane full-length cDNA library by EST sequencing and bioinformatics analysis. The full-length of *Sc-cMDH* was 1314 bp with 999 bp open reading frame, encoding 332 amino acids. Sc-cMDH shared 86.5%~97.0% of amino acids with cMDH from other 9 species. Sc-cMDH contains typical NAD⁺ binding motif (T¹¹GAAGQI¹⁷) and catalytic motif (I¹⁸⁴WGNH¹⁸⁸). Real-time PCR analysis showed that the expression of *Sc-cMDH* was higher in leaves and roots than that in stems of sugarcane.

Key words: *Saccharum officinarum* L.; Cytosolic malate dehydrogenase gene; Real-time PCR

苹果酸脱氢酶(malate dehydrogenases, MDH)广泛存在于生物体内。根据辅酶专一性、亚细胞定位和生理功能, 植物 MDH 可分为 5 类: 线粒体 NAD-MDH (mMDH)、微体 NAD-MDH、叶绿体 NADP-MDH、叶绿体 NAD-MDH 和细胞质 NAD-

MDH (cytosolic malate dehydrogenase, cMDH)^[1]。MDH 主要催化草酰乙酸和苹果酸的相互转化, 参与众多重要的代谢过程, 如糖酵解、光合作用、木质素合成、氮固定、氨基酸合成、离子平衡、磷^[2]、铁的吸收^[3]和抗铝盐毒害等^[4-5]。植物 cMDH 是 NAD

收稿日期: 2011-11-14

接受日期: 2012-03-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(30700514); 农业部 2010 年引进国际先进农业科学技术“948”计划项目(2010-C21)资助

作者简介: 徐景升, 博士, 副研究员, 主要从事分子育种研究工作。E-mail: xujingsheng@126.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: fafu948@126.com

依赖酶,目前相关研究还比较少。cMDH 在植物的中枢代谢途径(糖柠檬酸循环)、线粒体能量代谢底物供应中均占有重要地位,参与柠檬酸循环的主要底物草酰乙酸必须在细胞质中经 cMDH 还原为苹果酸后,才可以直接进入线粒体,进入线粒体的苹果酸在 mMDH 作用下再生成草酰乙酸从而进入柠檬酸循环^[6-9]。

甘蔗(*Saccharum officinarum* L.)是重要的糖料作物,其成熟节间积累的蔗糖浓度可以达到 650 mmol L⁻¹^[10]。对甘蔗糖代谢过程进行研究,不但具有重要的生物学意义,而且可为甘蔗高糖育种提供科学依据。迄今,在禾谷类作物中,玉米(*Zea mays*)^[11]、水稻(*Oryza sativa*)^[12]、小麦(*Triticum aestivum*)^[1,13]、高粱(*Sorghum bicolor*)^[14]等作物的细胞质型苹果酸脱氢酶基因相继被克隆,但是有关甘蔗细胞质型苹果酸脱氢酶基因的研究尚未见报道。本研究在对甘蔗叶片全长 cDNA 文库测序^[15]的基础上,首次获得了编码甘蔗细胞质型苹果酸脱氢酶的基因,并利用生物信息学手段对该基因的结构特征和特性进行了分析。同时,利用 Real-time PCR 技术研究了该基因在甘蔗不同组织中的表达,探讨了该基因的潜在应用价值,为甘蔗高糖育种提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

甘蔗叶片全长 cDNA 文库和福农 95-1702 由本实验室提供。福农 95-1702 种植于试验田内。核酸分子量标准、SYBR[®]Premix Ex Taq[™] (Perfect Real Time)、Reverse Transcription System 试剂盒等购自 TaKaRa 公司(日本)、用于 RNA 分离的试剂 TriPure Isolation Reagent 购自 Roche 公司(美国)。所用定量 PCR 仪器为 ABI PRISM 7500 实时定量 PCR 仪。

1.2 *Sc-cMDH*基因的获得和生物信息学分析

将甘蔗叶片全长 cDNA 文库进行大规模测序和生物信息学分析。挑取含有目的基因的克隆进行测序,获得目的基因全长序列。

用 National Center of Biotechnology Information (NCBI, <http://ncbi.nlm.nih.gov/>)站点上的在线软件 ORF finder 和 BLAST,分别对该序列进行开放阅读框预测和同源性比较分析。使用 Clustal W 做

多序列比对;利用 ProtParam 分析翻译蛋白的分子量和等电点。利用 EBI/SAS (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/sas/>)和蛋白质数据库(Protein Data Bank, PDB, <http://www.rcsb.org/pdb/>)预测蛋白质结构并注释,使用 Sanger PFAM 预测结构域,使用 ProtParam (<http://expasy.org/tools/protparam.html>)预测该基因编码蛋白分子量、等电点和不稳定系数。使用 Phobius 预测信号肽和跨膜区域,利用 MEGA 4.0 构建进化树。检索 ExPasy 酶数据库 (<http://www.expasy.org/enzyme>),确认该基因编码的酶的 EC 号。

1.3 *Sc-cMDH*基因定量表达分析

RNA 分离 分别取甘蔗的心叶,正 1 叶,第 8 叶,第 1、2 节间,第 4 节间,第 7 节间,第 14 节间和根,在液氮中研磨成粉末,按照 TriPure Isolation Reagent 使用说明书分离提取 RNA。用 Nanodrop 核酸蛋白定量仪定量,取 1 μg RNA 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检查质量。RNA 样品储存于 -80℃ 冰箱中备用。

RNA 反转录 使用 Takara 公司的 PrimeScript[™] RT reagent Kit (perfect Real Time)反转录试剂盒,将 RNA 反转录成 cDNA。冰上配制反转录反应液,反转录体系为 20 μL,包含 4 μL 5×PrimerScript[™] buffer, 1.0 μL PrimerScript[™] RT Enzyme Mix I, 1.0 μL Oligo dT Primer (50 μmol L⁻¹), 1.0 μL Random 6 mers (100 μmol L⁻¹), RNA 样品 1 μg,用 RNase free H₂O 补足。反应条件为:37℃ 反应 15 min, 85℃ 5 s,储存于 -20℃ 冰箱中备用。

定量 PCR 引物测试 以反转录 PCR 产物为模板,对内参基因 25S RNA (PCR 产物长度为 110 bp)^[16]和目的基因 *Sc-cMDH* 进行扩增,测试引物和模板质量。两个基因的 PCR 反应体系和反应条件相同。使用 Vector NTI 9.0 设计 *Sc-cMDH* 基因的定量 PCR 引物。PCR 产物长度为 100 bp,正向引物 *Sc-cMDH*-F:5'-TTGACGGTTCTCAAGGA-AGAAGCT-3',反向引物 *Sc-cMDH*-R:5'-GGGTATGGTAGAATTTACTCGAGGCATG-3'。反应体系为 25 μL,包含 1×PCR 缓冲液, 2 mol L⁻¹ MgCl₂, 0.2 mol L⁻¹ dNTPs, 1 μL 反转录 PCR 产物, 2.5 U *Taq* 聚合酶,引物浓度为 0.25 μmol L⁻¹。PCR 反应程序为:95℃ 变性 5 min;94℃ 30 s, 60℃ 1 min, 72℃ 退火 1 min, 35 个循环;72℃ 延伸 10 min。反

包含1个催化基元“I¹⁸⁴WGNH¹⁸⁸”。这两个基元在植物cMDH中广泛存在且高度保守,由此断定该基因为cMDH。EBI/SAS分析表明,Sc-cMDH包含

13个 α 螺旋、13个 β 折叠、4个催化残基。PDB分析表明,除了结合基元的7个氨基酸残基外,还有22个氨基酸残基可能参与NAD结合(图2)。

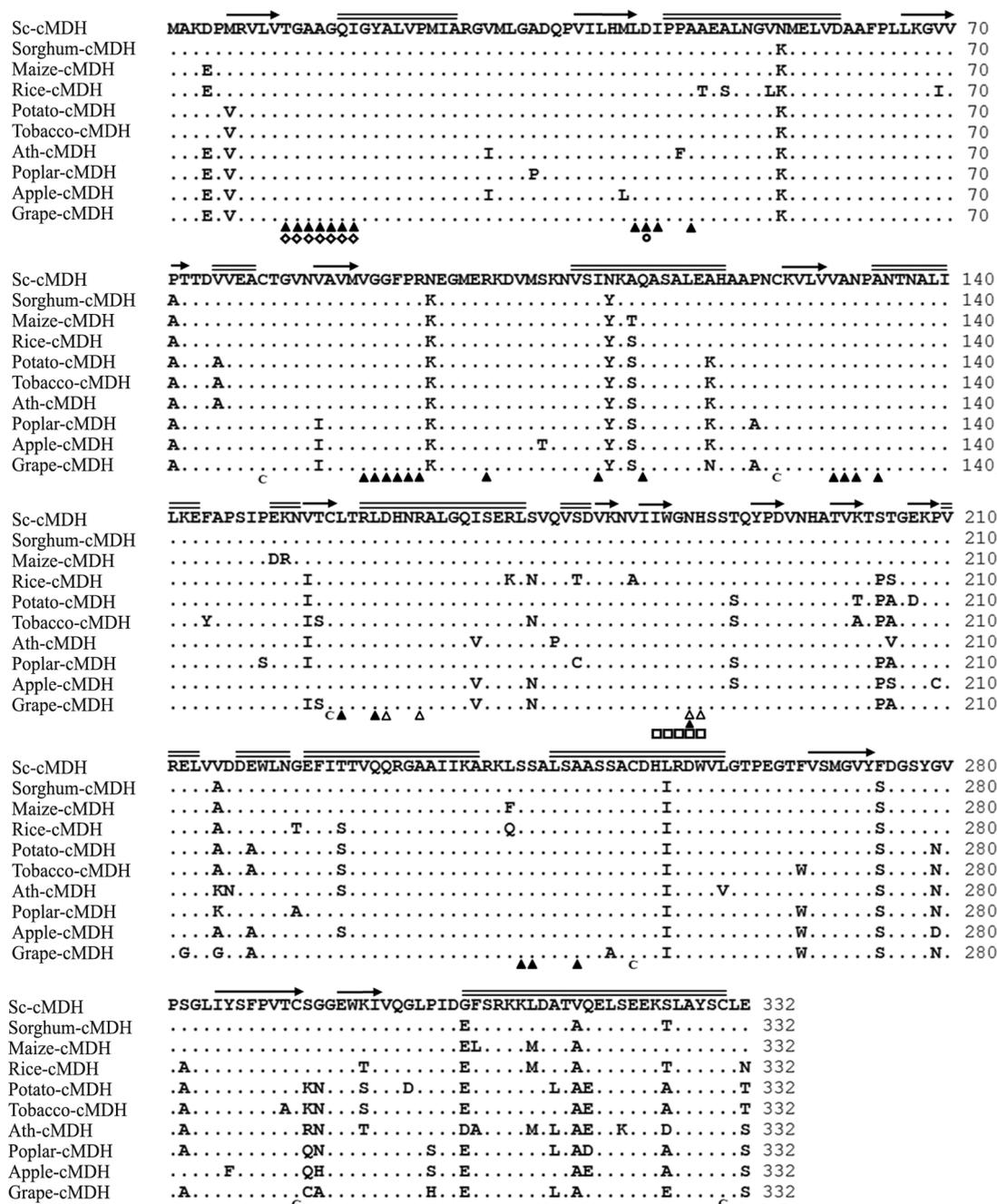


图2 Sc-cMDH与其他物种cMDHs的多序列比对。Sc-cMDH: 甘蔗; Sorghum-cMDH: 高粱(Uniprot登录号C5WYF2); Maize-cMDH: 玉米(B6SLL8); Rice-cMDH: 水稻(Q7XDC8); Potato-cMDH: 马铃薯(Q2PYY8); Tobacco-cMDH: 烟草(Q9FSF0); Ath-cMDH: 拟南芥(P57106); Poplar-cMDH: 杨树(A9P8R3); Apple-cMDH: 苹果(A3DSX0); Grape-cMDH: 葡萄(A7Q1T9); ◇: 催化基元; □: 结合基元; △: 催化残基; ▲: 配体NAD⁺结合位点; ○: 决定辅酶特异性的关键位点; =: α -螺旋; →: β -折叠; C: 半胱氨酸残基。

Fig. 2 Multiple sequence alignment between Sc-MDH and cMDHs from other 9 species. Sc-cMDH: *Saccharum officinarum*; Sorghum-cMDH: *Sorghum bicolor* (Uniprot accession number C5WYF2); Maize-cMDH: *Zea mays* (B6SLL8); Rice-cMDH: *Oryza sativa* (Q7XDC8); Potato-cMDH: *Solanum tuberosum* (Q2PYY8); Tobacco-cMDH: *Nicotiana tabacum* (Q9FSF0); Ath-cMDH: *Arabidopsis thaliana* (P57106); Poplar-cMDH: *Populus trichocarpa* (A9P8R3); Apple-cMDH: *Malus domestica* (A3DSX0); Grape-cMDH: *Vitis vinifera* (A7Q1T9); ◇: Rhombus motif; □: Binding motif; △: Catalytic residue; ▲: Binding site of ligand coenzyme NAD⁺; ○: Critical site of cofactor specificity; =: α -helix; →: β -sheet; C: Cysteine.

通过检索 ExPasy 酶数据库(<http://www.expasy.org/enzyme>), 确认该基因编码的蛋白酶的 EC 号为 1.1.1.37。ProtParam (<http://expasy.org/tools/protparam.html>)预测该基因编码的蛋白质分子量为 35443.7 D, 等电点为 5.60, 不稳定系数为 26.98, 属于稳定蛋白。用 Phobius 预测信号肽和跨膜区域, 前 20 个氨基酸有 70% 的可能是信号肽, 其跨膜可能性在 10% 以下, 因此认为没有跨膜结构。

通过进化树分析表明, Sc-cMDH 与高粱、玉米这 3 个 C₄ 植物聚在一起; 然后与 C₃ 植物水稻聚在同一类。而茄科的烟草(*Nicotiana tabacum*)和

马铃薯(*Solanum tuberosum*)聚在一起, 木本植物葡萄(*Vitis vinifera*)、杨树(*Populus trichocarpa*)和苹果(*Malus sieversii*)聚在一起, 然后再与十字花科的拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)聚在一起(图 3)。

2.2 Sc-cMDH 基因定量表达分析

定量 PCR 引物测试 电泳检测结果表明, 25S RNA 引物和 Sc-cMDH 基因的特异引物均能扩增出与预期一致的目标条带, 没有杂带和引物二聚体出现, 表明引物特异性强, 且模板质量良好(图 4)。

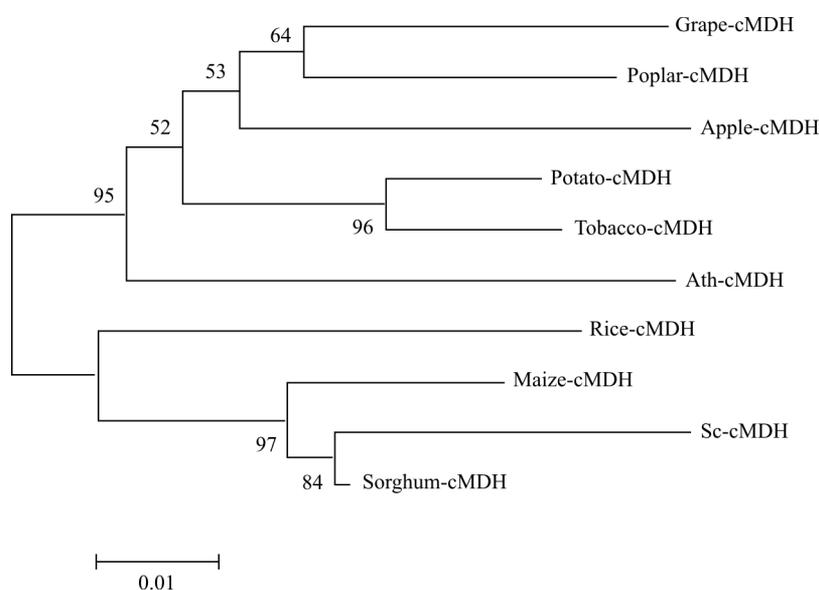


图3 甘蔗和其他物种cMDH的进化树分析。Sc-cMDH: 甘蔗; Sorghum-cMDH: 高粱(Uniprot登录号: C5WYF2); Maize-cMDH: 玉米(B6SLL8); Rice-cMDH: 水稻(Q7XDC8); Potato-cMDH: 马铃薯(Q2PYY8); Tobacco-cMDH: 烟草(Q9FSF0); Ath-cMDH: 拟南芥(P57106); Poplar-cMDH: 杨树(A9P8R3); Apple-cMDH: 苹果(A3DSX0); Grape-cMDH: 葡萄(A7Q1T9)。

Fig. 3 Phylogenetic analysis based on cMDH amino acid sequence of sugarcane and other species. Sc-cMDH: *Saccharum officinarum*; Sorghum-cMDH: *Sorghum bicolor* (Uniprot accession number: C5WYF2); Maize-cMDH: *Zea mays* (B6SLL8); Rice-cMDH: *Oryza sativa* (Q7XDC8); Potato-cMDH: *Solanum tuberosum* (Q2PYY8); Tobacco-cMDH: *Nicotiana tabacum* (Q9FSF0); Ath-cMDH: *Arabidopsis thaliana* (P57106); Poplar-cMDH: *Populus trichocarpa* (A9P8R3); Apple-cMDH: *Malus domestica* (A3DSX0); Grape-cMDH: *Vitis vinifera* (A7Q1T9)。

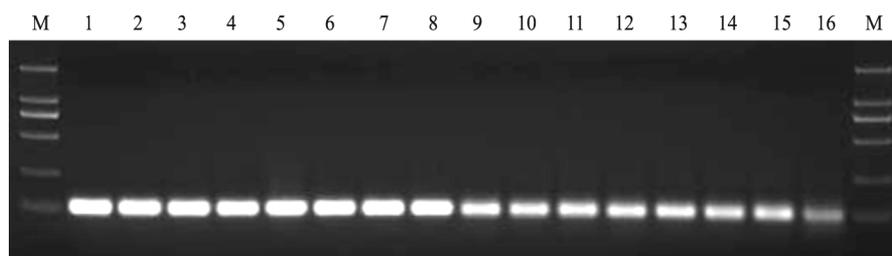


图4 引物及模板质量的PCR电泳图。M: 分子量标记; 1~8: 25S RNA; 9~16: Sc-cMDH基因; 1,9: 正1叶; 2,10: 心叶; 3,11: 第8叶; 4,12: 第1,2节间; 5,13: 第4节间; 6,14: 第7节间; 7,15: 第14节间; 8,16: 根。

Fig. 4 PCR of sugarcane with different primers and template. M: Molecular marker; 1~8: 25S RNA; 9~16: Sc-cMDH gene; 1,9: Leaf roll; 2,10: 1st leaf; 3,11: 8th leaf; 4,12: 1st and 2nd internode; 5,13: 4th internode; 6,14: 7th internode; 7,15: 14th internode; 8,16: Root.

Sc-cMDH 基因的组织表达特性 定量 PCR 分析结果表明, *Sc-cMDH* 基因在甘蔗不同组织中的表达有差异(图 5)。总的看来,在叶片和根中的表达量高于蔗茎。其中, *Sc-cMDH* 基因在正 1 叶中表达量最高,在第 4 节间表达量最低,而且在幼叶中的表达量高于老叶。但是在蔗茎中, *Sc-cMDH* 基因的表达没有明显差异。

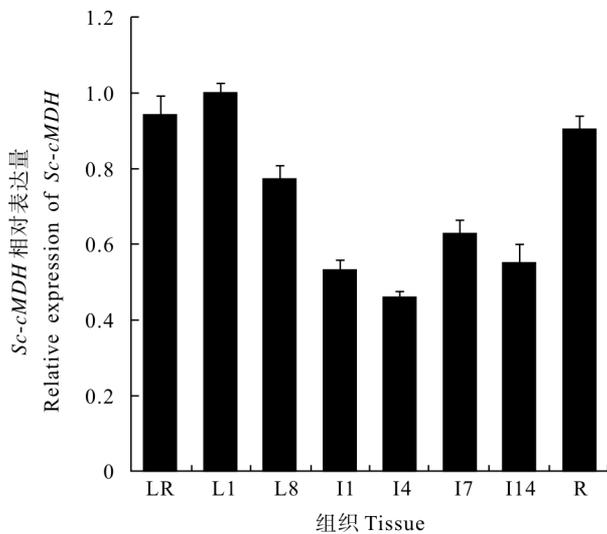


图5 *Sc-cMDH*基因在甘蔗组织中的定量表达。LR: 心叶; L1: 正1叶; L8: 第8叶; I1: 第1,2节间; I4: 第4节间; I7: 第7节间; I14: 第14节间; R: 根; $n=3$ 。

Fig. 5 Expression of *Sc-cMDH* gene in sugarcane tissues. LR: Leaf roll; L1: 1st leaf; L8: 8th leaf; I1: 1st and 2nd internode; I4: 4th internode; I7: 7th internode; I14: 14th internode; R: Root; $n=3$.

3 讨论

本研究从甘蔗中获得了细胞质型苹果酸脱氢酶基因序列,将其命名为 *Sc-cMDH*。*Sc-cMDH* 与其他物种的氨基酸序列相似性非常高,表明该基因选择压力大,具有重要的生物学功能。此外,定量 PCR 分析结果表明, *Sc-cMDH* 基因在甘蔗不同器官和组织中的表达存在差异,具有组织特异性。叶片是进行光合作用的场所,柠檬酸循环中产生的苹果酸有可能经葡萄糖异生作用生成葡萄糖。对于具有高光效高糖特性的 C_4 植物甘蔗而言,生成的葡萄糖能立即被合成蔗糖并运输到蔗茎中,反应有利于葡萄糖的生成。*Sc-cMDH* 基因在正 1 叶中的表达高于幼叶和老叶,可能是因为叶片以合成代谢为主,正 1 叶已完成形态建成,开始进行旺盛的光和作用,而心叶处于快速生长阶段,柠檬酸循环以

提供能量为主,老叶则趋于衰老,因而 *Sc-cMDH* 基因的表达有所下降。

蔗茎中进行的糖分代谢反应主要是蔗糖积累,蔗糖的长距离运输需要能量,在共质体途径中, *cMDH* 可能将草酰乙酸还原为苹果酸输入线粒体进入柠檬酸循环为蔗糖积累提供能量。蔗茎中 *Sc-cMDH* 基因的表达明显低于叶片,可能由于在蔗茎中的柠檬酸循环所需要的苹果酸比叶片中低。在不同成熟度的节间中, *Sc-cMDH* 基因的表达没有明显差异,但是不能确定 *Sc-cMDH* 基因的表达与蔗茎的发育程度无关。甘蔗第 1、2 节间处于旺盛的生长阶段,需要大量的碳源和能量,这两个节间的柠檬酸循环不单要提供能量,还要为其他生化反应提供底物,其中草酰乙酸可能通过转氨基作用生成氨基酸,用于蛋白质合成。第 4 节间基本完成形态建成,糖分累积开始,第 7 节间完全处于糖分累积阶段,第 14 节间则完成糖分累积,即达到所谓的成熟,蔗糖含量不再增加。从第 4 节间到第 14 节间,柠檬酸循环所产生的能量可能主要是用于运输光合作用产生的蔗糖和维持细胞的正常功能。

甘蔗根的主要功能是吸收于水分和矿质营养,柠檬酸循环需要苹果酸为大分子物质的吸收提供能量。但蔗根中 *Sc-cMDH* 基因的表达也明显高于蔗茎,可能还与土壤环境有关。本实验所用甘蔗材料种植的土壤呈酸性, pH 值为 4.0~4.5。在酸性土壤中, Al^{3+} 阻碍植物根系生长和发育,是植物生长主要的限制因子之一^[4]。同时, Al^{3+} 与可溶性磷结合,形成不易溶解的 $AlPO_4$, 导致土壤中可利用磷极度缺乏^[5]。在酸性土壤中,甘蔗根系发育不良^[17]。近年来的研究表明,植物通过向根际分泌有机酸如柠檬酸、草酸和苹果酸等,与 Al^{3+} 形成复合物,阻止 Al^{3+} 进入根内,保护根系免受铝盐毒害。有研究表明,耐铝盐毒害的小麦根系能分泌苹果酸,玉米和大豆(*Glycine max*)分泌柠檬酸,荞麦(*Fagopyrum esculentum*)和芋头(*Colocasia esculenta*)分泌草酸;而有的耐铝盐植物同时分泌两种有机酸,如葡萄、燕麦(*Avena sativa*)和黑麦(*Secale cereale*)分泌苹果酸和柠檬酸^[4-5]。

通过转苹果酸脱氢酶基因培育耐铝盐毒害品系已经在苜蓿(*Medicago sativa*)^[18]和烟草^[19]等植物获得成功。本研究中甘蔗根中 *Sc-cMDH* 基因表达量很高,推测植物 *cMDH* 表达量增加,能合成大量苹果酸,分泌于根际用于螯合 Al^{3+} 。通过转基因手

段,提高根系苹果酸的分泌,则有望培育耐铝盐毒害的甘蔗品种。在酸性土壤中甘蔗根系分泌何种有机酸,对 *Sc-cMDH* 进行基因功能鉴定,在铝盐胁迫下的 *Sc-cMDH* 基因表达及 cMDH 活性变化等还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Ding Y, Ma Q H. Characterization of a cytosolic malate dehydrogenase cDNA which encodes an isozyme toward oxaloacetate reduction in wheat [J]. *Biochimie*, 2004, 86(8): 509–518.
- [2] López-Bucio J, de la Vega O M, Guevara-García A, et al. Enhanced phosphorus uptake in transgenic tobacco plants that overproduce citrate [J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(4): 450–453.
- [3] Schulze J, Tesfaye M, Litjens R H M G, et al. Malate plays a central role in plant nutrition [J]. *Plant Soil*, 2002, 247(1): 133–139.
- [4] Kochian L V, Piñeros M A, Hoekenga O A. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity [J]. *Plant Soil*, 2005, 274(1/2): 175–195.
- [5] Ma J F, Ryan P R, Delhaize E. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids [J]. *Trends Plant Sci*, 2001, 6(6): 273–278.
- [6] Scheibe R. NADP-malate dehydrogenase in C₃-plants: Regulation and role of a light-activated enzyme [J]. *Physiol Plant*, 1987, 71(3): 393–400.
- [7] Gietl C. Malate dehydrogenase isoenzymes: Cellular locations and role in the flow of metabolites between the cytoplasm and cell organelles [J]. *Biochem Biophys Acta*, 1992, 1100(3): 217–234.
- [8] Miller S S, Driscoll B T, Gregerson R G, et al. Alfalfa malate dehydrogenase (MDH): Molecular cloning and characterization of five different forms reveals a unique nodule-enhanced MDH [J]. *Plant J*, 1998, 15(2): 173–184.
- [9] Kim D J, Smith S M. Expression of a single gene encoding microbody NAD-malate dehydrogenase during glyoxysome and peroxisome development in cucumber [J]. *Plant Mol Biol*, 1994, 26(6): 1833–1841.
- [10] Welbaum G E, Meinzer F C. Compartmentation of solutes and water in developing sugarcane stalk tissue [J]. *Plant Physiol*, 1990, 93(3): 1147–1153.
- [11] Hu J G, Zhao X S, Liu J, et al. Isolation and characterization of a cDNA encoding maize cytosolic malate dehydrogenase [J]. *Acta Bot Sin*, 1999, 41(1): 40–44.
- [12] 胡建广, 赵相山, 刘军, 等. 玉米苹果酸脱氢酶基因的分离与结构分析 [J]. *植物学报*, 1999, 41(1): 40–44.
- [12] Jiang R H, Lin C F, Shen G A, et al. Cloning of the rice cytoplasmic malic dehydrogenase gene (*RcMDH*) and its expression in *E. coli* [J]. *J Fudan Univ (Nat Sci)*, 2002, 41(1): 67–69.
- [12] 姜瑞华, 林长发, 申国安, 等. 水稻苹果酸脱氢酶基因的克隆及其在 *E. coli* 中的表达 [J]. *复旦学报: 自然科学版*, 2002, 41(1): 67–69.
- [13] Zhang L Y, Li H X, Zhang G S, et al. Cloning and expression analysis of *cMDH* gene related to cytoplasmic male sterile wheat with *Aegilops kotschy* cytoplasm [J]. *Acta Agron Sin*, 2009, 35(9): 1620–1627.
- [13] 张龙雨, 李红霞, 张改生, 等. 黏类小麦细胞质雄性不育相关基因 *cMDH* 的克隆与表达分析 [J]. *作物学报*, 2009, 35(9): 1620–1627.
- [14] Paterson A H, Bowers J E, Bruggmann R, et al. The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses [J]. *Nature*, 2009, 457(7229): 551–556.
- [15] Xu L P, Que Y X, Liu J X, et al. Construction of full-length cDNA library from sugarcane leaves and the corresponding EST analysis [J]. *J Agri Biotechnol*, 2009, 17(5): 843–850.
- [15] 许莉萍, 阙友雄, 刘金仙, 等. 甘蔗叶片全长 cDNA 文库构建及 EST 序列分析 [J]. *农业生物技术学报*, 2009, 17(5): 843–850.
- [16] Iskandar H M, Simpson R S, Casu R E, et al. Comparison of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression in sugarcane [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2004, 22(4): 325–337.
- [17] Tan G L, Gu M H, Yang B, et al. A study of aluminum stress on the growth and enzyme activity of primary roots of sugarcane [J]. *J Guangxi Agri Biol Sci*, 2003, 22(4): 271–274.
- [17] 谭贵良, 顾明华, 杨博, 等. 铝胁迫对甘蔗初生根生长及酶活性的效应 [J]. *广西农业生物科学*, 2003, 22(4): 271–274.
- [18] Luo X Y, Cui Y B, Deng W, et al. Transgenic alfalfa plants overexpressing nodule-enhanced malate dehydrogenase enhances tolerance to aluminum toxicity [J]. *Mol Plant Breed*, 2004, 2(5): 621–626.
- [18] 罗小英, 崔衍波, 邓伟, 等. 超量表达苹果酸脱氢酶基因提高苜蓿对铝毒的耐受性 [J]. *分子植物育种*, 2004, 2(5): 621–626.
- [19] Wang Q F, Zhao Y, Yi Q, et al. Overexpression of malate dehydrogenase in transgenic tobacco leaves: Enhanced malate synthesis and augmented Al-resistance [J]. *Acta Physiol Plant*, 2010, 32(6): 1209–1220.