

# 过表达羊草 *VHA* 基因提高大豆耐碱性研究

任鹏飞<sup>1,2</sup>, 蔡勤安<sup>2</sup>, 尚丽霞<sup>2</sup>, 于志晶<sup>2\*</sup>, 马 瑞<sup>2\*</sup>

(1. 吉林农业大学农学院, 长春 130118; 2. 吉林省农业科学院生物技术研究所/吉林省农业生物技术重点实验室, 长春 130033)

**摘要:** 土壤盐碱化是影响植物生长和分布、限制粮食产量的主要非生物胁迫因素。本研究通过农杆菌介导的大豆子叶节遗传转化技术将羊草 *LcVHA* 基因转入栽培大豆品种 Bert 中, 以提高大豆耐碱性。共侵染外植体 4000 个, 转化植株经分子检测获得了阳性植株 108 株, 转化率为 2.7%。转基因植株中外源基因拷贝数为 1~5 个, 单拷贝率为 21%。耐碱试验结果表明, 转基因植株在碱胁迫 (300 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>) 下生长较好, 耐碱性和农艺性状显著高于非转基因对照植株。本研究共获得了 23 份耐碱转基因大豆, 为耐碱转基因大豆育种提供了新材料。

**关键词:** 大豆; 耐碱性; 遗传转化; 质子泵

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2022)03-0079-04

## Overexpression of *LcVHA* Gene Improve Alkali Tolerance in Transgenic Soybean

RENG Pengfei<sup>1,2</sup>, CAI Qin'an<sup>2</sup>, SHANG Lixia<sup>2</sup>, YU Zhijing<sup>2\*</sup>, MA Rui<sup>2\*</sup>

(1. College of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun 130118; 2. Agro-Biotechnology Research Institute/Jilin Provincial Key Laboratory of Agricultural Biotechnology, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China)

**Abstract:** Soil salinization is the main abiotic stress factor that affects plant growth and distribution and limits grain yield. In this study, *LcVHA* gene obtained from *Leymus chinensis* was transferred into cultivar Bert through *Agrobacterium*-mediated soybean cotyledon node transformation system to improve the alkali tolerance of soybean. Together with PPT resistance selection, the transgenic plants were confirmed by PCR detection, southern blot, RT-PCR analysis and Quick PAT/bar strip detection. A total of 4,000 explants were infected. 108 transgenic plants with *LcVHA* gene were obtained by molecular detection. The conversion rate was 2.7%. The copy number of foreign gene in transgenic plants varied from 1 to 5, and the single copy rate was 21%. The results for alkali tolerance test showed that the transgenic plants under alkali stress (300 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>) grew better than the non-transgenic control plants, and the alkali tolerance of transgenic soybean was increased. In this study, total 23 alkali resistant transgenic lines were obtained, which provided new materials for the soda alkali resistant transgenic soybean breeding.

**Key words:** Soybean; Alkali tolerance; Genetic transformation; Proton pump

土壤盐碱化是土地退化的主要原因, 它会威胁作物的正常生长, 阻碍土地资源的有效利用<sup>[1-2]</sup>。吉林省盐碱地面积 96.90 万公顷, 盐碱土类型主要为苏打型盐碱土, 盐分组成以 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、

NaHCO<sub>3</sub> 为主, 交换性钠占比较高, 土壤 pH 值通常高于 8.5, 在重盐碱地甚至达到 9.0~11.0<sup>[1,3-4]</sup>。研究表明, 土壤盐碱化导致土壤孔隙度降低、土壤更坚实、透水性减弱、土壤肥力下降, 进而使植被退化和植物生产力下降<sup>[5]</sup>。因此, 培育耐盐碱作物新品种对于粮食增产和环境改善具有重要意义。

大豆是东北地区重要的经济作物, 土壤盐碱化给大豆生产带来严重威胁<sup>[6-7]</sup>。通过基因工程技术将耐盐碱基因导入大豆材料是提高大豆耐盐碱性的一种有效途径。曹甜甜等<sup>[8]</sup>将 *TvNHX1* 基因导入大豆中使大豆耐盐碱能力提高, 林凡敏

收稿日期: 2019-12-31

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项 (2016ZX08004002)

作者简介: 任鹏飞 (1993-), 男, 在读硕士, 主要从事植物生物技术研究。

通讯作者: 于志晶, 女, 硕士, 副研究员, E-mail: yuzhijing0001@163.com

马 瑞, 男, 博士, 研究员, E-mail: ruimaa@126.com

等<sup>[9]</sup>对转耐盐碱基因 *GsGSTI4* 大豆株系进行调查发现转基因大豆株系在农艺性状上并未产生较大不良变异,应用前景良好。盐、碱对植株生长有不同程度的影响,目前关于植物耐碱性的研究相对较少<sup>[10]</sup>。V-ATPase (The vacuolar type H<sup>+</sup>-ATPase) 是一类重要的液泡膜质子泵,参与液泡中稳态的调节和多种代谢途径过程,甚至能影响植物细胞寿命<sup>[11-12]</sup>。研究表明,V-ATPase 在液泡膜上进行反应形成电化学梯度,增强了液泡对 Na<sup>+</sup> 等碱金属离子的吸附作用,从而减轻了植物体在盐碱条件下离子胁迫对植物细胞造成的伤害,在缺乏 V-ATPase 的植物突变体中,叶肉液泡内的质子浓度变低,生长发育迟缓现象明显<sup>[12]</sup>。

本研究通过农杆菌介导的大豆子叶节遗传转化技术将羊草 *VHA* 基因转入大豆栽培品种 Bert 中,为耐碱大豆新品种培育提供育种新材料。

## 1 材料与方 法

### 1.1 植物材料

本研究所用大豆材料 Bert、目的基因 *LcVHA* (羊草质子泵 H<sup>+</sup>-ATPase 基因) 和植物表达载体 pTF101 均由吉林省农业科学院农业生物技术研究所提供。植物表达载体 pTF101 以 *bar* 基因作为标记基因。*bar* 基因编码的草铵膦乙酰转移酶 (Phosphinothricin N-acetyltransferase, PAT) 可以使草铵膦乙酰化,从而使植株获得除草剂 PPT (Phosphinothricin monoammonium salt) 抗性。

### 1.2 大豆遗传转化和抗性植株筛选

大豆遗传转化过程:使用 *Xba* I 和 *Eco* RI 双酶切,将目的基因 *LcVHA* 连接在植物表达载体 pTF101 上,构建植物表达载体 pTF101-*LcVHA* (图 1),用冻融法<sup>[13]</sup>将此载体导入农杆菌 EHA101 中,进行大豆的遗传转化。大豆的遗传转化方法参照于志晶等<sup>[14]</sup>方法。待根系生长健全,炼苗后移栽至土壤中。幼苗长至第 3 对三出复叶完全展开后,喷洒除草剂 (PPT, 240 mg/L),筛选抗性植株。对 T<sub>0</sub> 代抗性植株分单株收获,播种。

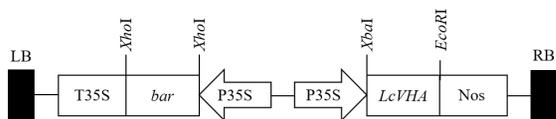


图 1 植物表达载体 pTF101-*LcVHA* 的 T-DNA 区示意图

### 1.3 转基因植株的分子检测

取 T<sub>3</sub> 代转化植株叶片,使用 *bar* 试纸条 (EnviroLogix) 检测阳性植株。用 CTAB 法提取阳性植株

叶片基因组 DNA 进行 PCR, *LcVHA* 基因正向引物 5'-ACCTCCTCGGATTCCATTGC-3' 和反向引物 5'-GCCATGATGAGGCCGTAGAT-3', 产物为 540 bp, *bar* 基因正向引物 5'-GCACCATCGTCAACCACTACATCGAG-3' 和反向引物 5'-TGAAGTCCAGCTGCCAGAAACCCAC-3', 产物 441 bp。引物由长春联博商贸有限公司合成。PCR 反应体系为 25 μL, 扩增反应程序: 94 °C, 5 min; 94 °C, 30 s; T<sub>m</sub>, 30 s, 72 °C, 30 s, 30 个循环; 72 °C, 5 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后用凝胶成像仪分析。对 PCR 阳性植株进行 Southern 杂交。Southern 杂交采用罗氏公司地高辛标记试剂盒 (I 型), 具体操作过程根据试剂盒说明书进行。所用 DNA marker 购自全式金公司。使用全式金公司 EasyPure® Plant RNA Kit 试剂盒进行大豆总 RNA 分离和纯化。用 TransScript® One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒合成 cDNA。进行 RT-PCR, *LcVHA* 基因正向引物 5'-TGTTTCAGCGGAGATGAGACG-3' 和反向引物 5'-TCCCACGATGAGACCGTAGA-3', 产物为 446 bp, *GmActin* 基因正向引物 5'-TTCCCAGCATTGTAGGT CG-3' 和反向引物 5'-ACACGAAGCTCATTATAGA AGGTAT-3', 产物 138 bp。用大豆内参基因 *GmActin* 作为对照。具体方法参照试剂盒说明书。

### 1.4 转基因植株耐碱性鉴定

选取经检测为单拷贝的 T<sub>3</sub> 代转基因大豆和非转基因大豆分别种到土壤中, 30 d 后, 挑选生长健壮一致的幼苗各 100 株用含有 300 mmol/L NaHCO<sub>3</sub> 营养液浇灌; 40 d 后观察, 单株受害叶面积达 50%

表 1 本试验大豆农艺性状测定标准

性状	测定标准及统计方法
株高	子叶痕至植株顶端生长点的高度, 单位: cm。分为五级, 高: 91 cm 以上, 较高: 81~90 cm, 中等: 61~80 cm, 较矮: 41~60 cm, 矮: 40 cm 以下
主根长	植株出土位置到主根最远点长度, 单位: cm
结荚高度	子叶痕到最低结荚部位的距离, 单位: cm
主茎节数	从子叶痕上一节到植株顶端的茎节数, 单位: 个
分枝数	主茎上的有效分节数, 有效分枝至少有 2 个及以上节数, 不计二次分支, 单位: 个
单株荚数	单株上的有效大豆荚个数, 单位: 个
3 粒荚数	单株上所结 3 粒荚的个数, 单位: 个
单株粒数	单株上所结全部籽粒个数, 单位: 个
单株生产力	单株上全部籽粒重量, 单位: g
百粒重	随机选取完整成熟豆粒 100 粒称重, 两个重复, 两次相差不超过 0.5 g, 单位: g

或有3片及以上绿叶枯萎即为碱害植株;150 d后,参考莫金钢<sup>[15]</sup>的农艺性状测定标准对大豆进行考种(表1)。

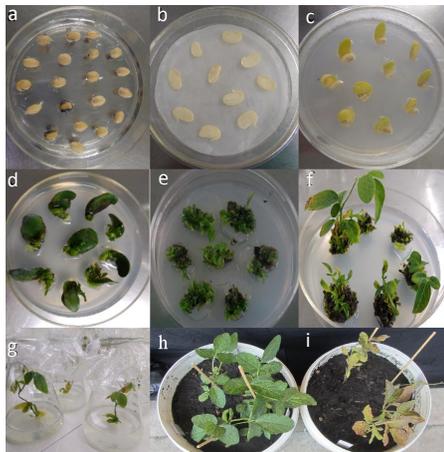
### 1.5 数据分析

使用SPSS 22进行数据统计和分析。在  $P < 0.05$  和  $P < 0.01$  水平上,采用  $t$  检验进行差异显著性分析。再生率=(阳性转化植株数/感染外植体总数) $\times 100\%$ ;转化效率=(阳性转基因植株数/感染外植体总数) $\times 100\%$ ;单拷贝率=(单拷贝转基因植株数/阳性转基因植株数) $\times 100\%$ ;碱害率=(碱害植株数/植株总数) $\times 100\%$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 大豆遗传转化和PPT抗性植株的筛选

通过农杆菌介导的大豆子叶节遗传转化技术(图2)共感染外植体4000个,获得转化幼苗156株,植株再生率为3.9%。



注:a.种豆;b.共培养;c.不定芽诱导;d.继代培养;  
e.芽伸长;f.转化幼苗;g.幼苗生根;  
h.左边为阳性转化植株,右边为阴性转化植株

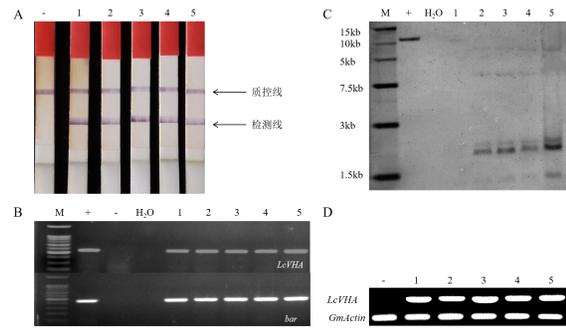
图2 大豆遗传转化过程示意图

### 2.2 转基因植株分子检测

*bar* 试纸条检测(图3A)表明 Bar 蛋白在转基因植株中表达。转基因植株 PCR(图3B)和 Southern 杂交(图3C)结果表明 *LcVHA* 基因已转化到大豆基因组中。Southern 杂交中,外源基因拷贝数为1~5个。RT-PCR 结果(图3D)显示 *LcVHA* 基因在转基因植株中有表达。本研究获得阳性转基因植株108株,转化率为2.7%,单拷贝阳性植株有23株,约占阳性转基因植株的21%。

### 2.3 耐碱试验

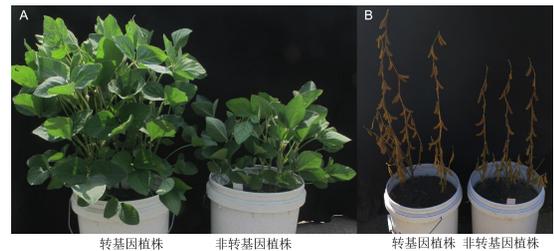
在300 mmol/L  $\text{NaHCO}_3$  胁迫下,转基因植株碱害率约为21%,非转基因植株碱害率约为53%,转



注:A. *bar* 试纸条检测;B. PCR 检测;C. Southern 杂交;D. 转基因植株和非转基因植株 RT-PCR 结果。*LcVHA*:目的基因;*bar*:*bar* 基因;*GmActin*:大豆内参基因;M:DNA marker;+:阳性质粒;-:非转基因植株; $\text{H}_2\text{O}$ :水;1~5:转基因植株

图3 转基因植株 *LcVHA* 基因和 *bar* 基因的分子检测

基因植株耐碱能力增强。碱胁迫后,非转基因植株生长受到明显抑制,植株高度比转基因植株矮(图4)。对转基因植株和非转基因植株考种结果如表2所示,与非转基因植株相比,转基因植株株高和结荚高度分别增加了30%和33%,达到显著水平( $P < 0.05$ ),这是由于苗期碱胁迫极大地抑制了非转基因植株的生长。表明转基因植株在碱胁迫中生



注:A. 苗期植株表型(70 d);B. 成熟期植株表型(150 d)

图4 转 *LcVHA* 基因大豆植株耐碱性鉴定(300 mmol/L  $\text{NaHCO}_3$ )

表2 转 *LcVHA* 基因大豆植株和非转基因植株农艺性状对比

项目	转基因植株	非转基因植株
株高(cm)	68.43 $\pm$ 3.26*	48.20 $\pm$ 2.46
主根长(cm)	32.57 $\pm$ 2.59	26.73 $\pm$ 1.42
结荚高度(cm)	4.40 $\pm$ 0.36**	2.93 $\pm$ 0.38
主茎节数(个)	16.33 $\pm$ 1.53**	12.67 $\pm$ 1.53
分枝数(个)	5.67 $\pm$ 1.15	3.33 $\pm$ 2.31
单株荚数(个)	20.33 $\pm$ 4.04	34.67 $\pm$ 5.03
3粒荚数(个)	5.00 $\pm$ 1.00	14.33 $\pm$ 4.04
单株粒数(个)	43.33 $\pm$ 7.23*	70.00 $\pm$ 2.00
单株生产力(g)	8.70 $\pm$ 1.32	10.86 $\pm$ 1.18
百粒重(g)	20.13 $\pm$ 0.35*	15.50 $\pm$ 1.45

注:表中数值为3个重复“平均数 $\pm$ 标准差”。“\*”表示差异显著( $P < 0.05$ ),“\*\*”表示差异极显著( $P < 0.01$ )

长更好。转基因植株分枝数较多,单株生产力较小。单株荚数、3粒荚数较少,单株粒数下降38%,但是百粒重增加了23%,达到显著水平( $P<0.05$ )。

### 3 讨 论

提高转化效率一直是基因工程中的一个难点<sup>[16-19]</sup>。本研究使用农杆菌介导的大豆子叶节遗传转化技术,转化率为2.7%,相对较低<sup>[14, 16]</sup>。转化植株经过PPT抗性筛选、bar试纸条检测、PCR和Southern杂交鉴定,结果表明*LcVHA*基因已转入大豆基因组中。转基因植株中外源基因拷贝数为1~5个,单拷贝率为21%。结荚高度是影响大豆产量的重要间接因素<sup>[20]</sup>。耐碱试验结果表明,转基因植株的耐碱性有了显著提高,转基因植株在碱胁迫下能保持较好生长。转基因植株的株高和结荚高度显著升高,百粒重显著增加( $P<0.05$ )。V-ATPase c亚基主要存在于液泡膜上,也可能出现在内质网和高尔基体膜上参与物质运输,是V-ATPase中V<sub>0</sub>结构不可缺少的重要组成部分<sup>[21-25]</sup>。研究表明,V-ATPase c亚基环与a亚基组成一个可供质子通过的质子选择性通道,直接负责质子的结合和跨膜结构转运,其相关基因的过表达可以增强转基因植株V-ATPase活性<sup>[26-27]</sup>。在已有研究中,V-ATPase c亚基的功能研究大多偏向于提高植物耐盐能力<sup>[28-30]</sup>。丁晗等<sup>[31]</sup>研究发现野生玫瑰*RrVHA-c*基因在盐胁迫下转录水平的变化对野生玫瑰的耐盐性有着重要作用。周爱民等<sup>[28]</sup>对拟南芥和星星草V-ATPase c亚基基因的研究中,*PutVHA-c*和*AtVHA-c*基因通过提高V-ATPase活性来加快胞内囊泡的运输,在盐胁迫中发挥作用。本研究首次将V-ATPase c亚基基因导入栽培大豆中,并获得耐碱大豆转基因新材料。

综上所述,本研究将羊草*VHA*基因通过农杆菌介导遗传转化法转入大豆栽培品种Bert中,共侵染外植体4000个,获得阳性转基因植株108株。经分子检测和耐碱试验分析,*LcVHA*基因成功导入大豆中并表达,转基因大豆的耐碱能力高于对照。本研究获得了23份耐碱效果较好的转*LcVHA*基因大豆新材料,为耐碱转基因大豆新品种培育奠定了较好的基础。

#### 参考文献:

[1] Li Y, Li Q, Liu H, et al. Ecological stoichiometry-based study of the influence of soil saline-alkali stress on nutrient homeostasis in *L. chinensis*[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety,

2018, 165: 243-249.

- [2] Liu X, Zhang H, Jin Y, et al. Abscisic acid primes rice seedlings for enhanced tolerance to alkaline stress by upregulating antioxidant defense and stress tolerance-related genes[J]. Plant and Soil, 2019, 438(1): 39-55.
- [3] 梁正伟,王志春,马红媛,等.利用耐逆植物改良松嫩平原高pH盐碱土研究进展(英文)[J].吉林农业大学学报,2008,30(4):517-528.
- [4] 孙 凯.吉林省西部盐碱土及植物改良的研究现状与展望[J].中国农业信息,2014(5):109-110.
- [5] Zhang Z, He K, Zhang T, et al. Physiological responses of Goji berry (*Lycium barbarum* L.) to saline-alkaline soil from Qinghai region, China[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 12057.
- [6] 邱译萱,马树庆,李秀芬.吉林春大豆生育期变化及其对气候变暖的响应[J].中国农业气象,2018,39(11):715-724.
- [7] 牛 陆.盐、碱胁迫对大豆属植物的结构演化及生理特性的影响[D].长春:东北师范大学,2013.
- [8] 曹甜甜.转*TvNHX1*基因大豆后代的检测及其耐盐碱性分析[D].哈尔滨:哈尔滨师范大学,2014.
- [9] 林凡敏,柏 锡,樊 超,等.转*GsGST14*耐盐碱基因大豆的农艺性状调查[J].大豆科学,2013,32(1):56-58.
- [10] 任鹏飞,尚丽霞,蔡勤安,等.植物耐碱性研究进展及其在大豆中的应用展望[J].大豆科学,2019,38(6):977-985.
- [11] Tan X, Li K, Wang Z, et al. A review of plant vacuoles: formation, located proteins, and functions[J]. Plants, 2019, 8: 327.
- [12] Kriegl A, Andrés Z, Medzilhradszky A, et al. Job sharing in the endomembrane system: vacuolar acidification requires the combined activity of V-ATPase and V-PPase[J]. The Plant Cell, 2015, 27: 3383-3396.
- [13] Wang X Q, Shen X, He Y M, et al. An optimized freeze-thaw method for transformation of *Agrobacterium Tumefaciens* EHA105 and LBA4404[J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2011, 18: 382-386.
- [14] 于志晶,蔡勤安,刘艳芝,等.拟南芥抗逆基因*DREB2A*转化大豆的研究[J].大豆科学,2013,32(5):606-608.
- [15] 莫金钢.大豆抗旱突变体耐旱机理研究[D].长春:吉林农业大学,2015.
- [16] 李艳超,赵青松,王凤敏,等.大豆遗传转化技术研究进展[J].大豆科学,2015,34(1):155-162.
- [17] 李冬梅,陈 薇,李永光,等.大豆子叶节遗传转化体系的优化研究[J].大豆科学,2018,37(4):531-538.
- [18] 姚丙晨,孙 玥,孙林静,等.农杆菌介导大豆遗传转化研究进展及其应用[J].中国农学通报,2016,32(6):24-33.
- [19] 杨 柳,于翠梅,刘 铭,等.农杆菌介导大豆遗传转化影响因素研究进展[J].大豆科学,2018,37(5):803-808.
- [20] 程春光.大豆结荚高度标记的开发及利用[D].哈尔滨:东北农业大学,2018.
- [21] Marshansky V, Futai M. The V-type H<sup>+</sup>-ATPase in vesicular trafficking: targeting, regulation and function[J]. Curr Opin Cell Biol, 2008, 20(4): 415-426.
- [22] Zhou A, Bu Y, Takano T, et al. Conserved V-ATPase c subunit plays a role in plant growth by influencing V-ATPase-dependent endosomal trafficking[J]. Plant (下转第98页)

6.40~7.96 kg/kg 的研究结果略高。缓释肥处理能显著提高氮肥偏生产力和氮肥农学效率,与普通化肥处理 CF 相比,SRF0.8、SRF0.9、SRF 氮肥偏生产力和农学效率分别提高 20.66%、15.35%、12.69%,氮肥农学效率分别提高 11.65%、24.19%、38.97%。

综上所述,相同施肥量条件下,缓释肥处理 SRF,花生叶片 NR 活性、根系活力均显著优于普通化肥处理 CF,荚果和籽仁产量、肥料利用效率均显著高于普通化肥处理 CF。缓释肥减量处理 SRF0.9,生长指标及产量表现都高于普通化肥处理 CF,但差异不显著。缓释肥减量处理 SRF0.8,各项生理生长指标及产量均低于普通化肥处理 CF,但差异不显著。因此,SRF0.9 处理的施肥量是该试验条件下的最佳缓释肥施用量,继续减量则影响麦茬花生的生长发育和产量提高。试验表明,缓释肥 SRF、SRF0.9 处理施用量可代替相同施用量的普通化肥。从夺取高产的角度考虑,可以优先选用缓释肥 SRF 的施肥量;从减肥增效的角度考虑,可以优先选用缓释肥 SRF0.9 的施肥量。

#### 参考文献:

- [1] 刘钦普. 中国化肥施用强度及环境安全阈值时空变化[J]. 农业工程学报, 2017, 33(6): 214-221.
- [2] 王才斌. 实施理性栽培, 推进山东花生生产可持续发展[J]. 花生学报, 2018, 47(1): 74-76.
- [3] 自由路. 高效施肥技术研究的现状与展望[J]. 中国农业科学, 2018, 51(11): 2116-2125.
- [4] 高璐阳, 王怀利, 王晓飞, 等. 我国发展缓控释肥的意义及前景[J]. 磷肥与复肥, 2015, 34(4): 14-17.
- [5] 揣峻峰, 肖艳, 杜迎辉, 等. 控释肥对夏玉米产量及土壤性状的影响[J]. 东北农业科学, 2020, 45(3): 41-44.
- [6] 柴鑫鑫. 控释氮肥的研制及应用研究[D]. 临汾: 山西师范大学, 2017.
- [7] 余露. 首部缓控释肥白皮书首发 力促化肥行业转型升级[J]. 农药市场信息, 2016(15): 40.
- [8] 成艳红, 武琳, 钟义军, 等. 控释肥对稻草覆盖红壤花生产量及土壤有效氮平衡的影响[J]. 土壤学报, 2014, 51(2): 306-313.
- [9] 王艳华, 董元杰, 邱现奎, 等. 控释肥对坡耕地花生生理特性、产量及品质的影响[J]. 作物学报, 2010, 36(11): 1974-1980.
- [10] 张玉树, 丁洪, 卢春生, 等. 控释肥料对花生产量、品质以及养分利用率的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2007, 13(4): 700-706.
- [11] 刘兆新, 刘妍, 刘婷如, 等. 控释复合肥对麦套花生光系统 II 性能及产量和品质的调控效应[J]. 作物学报, 2017, 43(11): 1667-1676.
- [12] 杨劲峰, 鲁豫, 刘小华, 等. 施用炭基缓释肥对花生光合功能的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2017, 23(2): 408-415.
- [13] 初长江, 吴正锋, 孙学武, 等. 控释肥对花生氮代谢相关酶活性的影响[J]. 花生学报, 2017, 46(2): 32-39.
- [14] 李拴柱, 郑青焕, 宋江春, 等. 夏花生土壤磷钾养分丰缺指标研究与应用[J]. 东北农业科学, 2021, 46(3): 34-36, 40.
- [15] 郭峰, 初长江, 王才斌, 等. 控释肥料对不同品种花生 (*Arachis hypogaea* L.) 叶片生理的影响[J]. 土壤通报, 2012, 43(5): 1127-1131.
- [16] 姜涛, 倪皖莉, 王嵩, 等. 炭基缓释花生专用肥对砂姜黑土夏花生干物质积累及产量的影响[J]. 花生学报, 2018, 47(3): 75-80.
- [17] 刘文龙, 陈宏, 王怀利, 等. 控释掺混肥对花生农艺性状及产量品质的影响[J]. 农业科技通讯, 2015(5): 115-117.
- [18] 张海焕, 王月福, 张晓军, 等. 控释肥用量对花生田土壤养分含量及产量品质的影响[J]. 花生学报, 2016, 45(2): 27-32.
- [19] 邱现奎, 董元杰, 史衍玺, 等. 控释肥对花生生理特性及产量、品质的影响[J]. 水土保持学报, 2010, 24(2): 223-226, 250.
- [20] 杨吉顺, 李尚霞, 吴菊香, 等. 控释肥对花生产量及干物质积累的影响[J]. 山东农业科学, 2013, 45(10): 98-100, 107.
- [21] 蔡永萍. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2014: 16-19.
- [22] 郭振升. 植物与植物生理[M]. 重庆: 重庆大学出版社, 2014: 313-315.
- [23] 陶妹宇. 缓控释氮肥调控对花生产量及氮素吸收利用的影响[J]. 农业科技与装备, 2016(10): 1-6.
- [24] 栾天浩, 翟季, 孙祎龙, 等. 密度与氮、磷、钾用量对花生吉花 1 号产量的影响[J]. 东北农业科学, 2017, 42(4): 23-26.
- [25] Rouquié D, Tournaire-Roux C, Szponarski W, et al. Cloning of the V-ATPase subunit G in plant: Functional expression and sub-cellular localization[J]. FEBS Letters, 1998, 437(3): 287-292.
- [26] Zhou L, Sazanov L A. Structure and conformational plasticity of the intact *Thermus thermophilus* V/A-type ATPase[J]. Science, 2019, 365(6455): w9144.
- [27] Zhou A, Takano T, Liu S. The role of endomembrane-localized VHA-c in plant growth[J]. Plant Signaling & Behavior, 2018, 13(1): e1382796.
- [28] 周爱民. V-H<sup>+</sup>-ATPase c 亚基对植物生长和耐盐性作用机制的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2014.
- [29] 肖忠意. 棉花液泡 H<sup>+</sup>-ATPase C 亚基基因 *GhDET3* 的克隆与功能分析[D]. 重庆: 西南大学, 2008.
- [30] 马辉. NaHCO<sub>3</sub> 胁迫下二色补血草基因的表达研究及 VHA-c 基因的功能验证[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2008.
- [31] 丁晗. 野生玫瑰耐盐相关基因 *RrNHX1* 和 *RrVHA-c* 的克隆与表达分析[D]. 扬州: 扬州大学, 2014.

(责任编辑:刘洪霞)

(责任编辑:王丝语)