

于永昂,张夏冰,张 蕾,等. 小麦 *TaAlaAT* 基因的克隆及镉胁迫下表达分析[J]. 江苏农业科学,2022,50(18):48-53.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.18.007

小麦 *TaAlaAT* 基因的克隆及镉胁迫下表达分析

于永昂^{1,2}, 张夏冰¹, 张 蕾^{1,2}, 睢晓洁¹

(1. 河南科技学院生命科技学院,河南新乡 453003; 2. 河南科技学院现代生物育种河南省协同创新中心,河南新乡 453003)

摘要: 为了研究 *AlaAT* 基因在小麦应对镉胁迫中的功能,以镉处理小麦为试验材料,利用 mRNA 差异显示技术 DDRT-PCR、RT-PCR 从小麦 cDNA 中克隆得到 *AlaAT* 基因全长,将其命名为 *TaAlaAT*。用生物信息学方法对 *TaAlaAT* 的基因序列和蛋白质氨基酸序列进行分析,进一步用 MEGA 6.0 软件构建进化树;用 qRT-PCR 研究 *TaAlaAT* 基因在小麦不同组织中以及镉胁迫后的相对表达水平。序列分析结果表明,该基因全长为 1 628 bp,包含 1 个长度为 1 440 bp 的完整开放阅读框(open reading frame, ORF),其编码 479 个氨基酸,蛋白质分子量约为 53.41 ku,等电点为 6.97,该蛋白质属于天冬氨转氨酶家族,与水稻(*Oryza sativa* L.) *AlaAT* 蛋白的相似性较高。qRT-PCR 结果表明, *TaAlaAT* 在小麦中具有组织特异性,在根部的表达水平最高,在镉胁迫处理后, *TaAlaAT* 基因表达量呈现先升高后降低的趋势。由研究结果可以看出, *TaAlaAT* 基因能够响应镉胁迫。

关键词: 小麦; *TaAlaAT* 基因; 镉胁迫; 表达分析

中图分类号: S512.103 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2022)18-0048-06

近年来,我国农业产业结构发生了重大调整,为了进一步提高我国粮食作物的产量,在田间生产过程中化肥和农药的使用越来越多,导致我国自然环境中重金属污染越来越严重^[1]。最新的研究结果表明,在众多重金属污染中,镉(Cd)污染占首位,并且其已经被世界卫生组织确定为食物污染物^[2-4]。Cd 是生命非必需元素,容易被植物吸收和积累后通过食物链最终进入人体,诱发神经痛、内分泌失调等多种病征,对人的身体健康造成极大危害^[5]。因此, Cd 污染问题已经成为我国土壤生态安全和制约农业健康可持续发展的重要因素。降低土壤 Cd 污染含量和缓解 Cd 对植物的毒害作用,已经成为当前研究的一个热点问题。目前,许多研究者已经在玉米^[6-8]、大豆^[9-11]、水稻^[12-15]、烟草^[16-17]、花生^[18-20]等多种粮食作物和经济作物中开展了 Cd 对农作物质量影响的相关研究,并取得了一定成果。然而,与水稻等植物相比,小麦 Cd 污染相关研究还较少,尤其是关于其对 Cd 的吸收、转运和积累的机制还不十分清楚。因此,深入研究小

麦的耐镉机制,进一步创制耐 Cd 或籽粒低 Cd 积累小麦新种质用于改良我国小麦的抗镉水平及粮食安全都有着非常重要的现实意义。

丙氨酸氨基转移酶(AlaAT)别称谷丙转氨酶,是植物碳氮代谢过程中的重要酶类,能够催化丙氨酸、 α -酮戊二酸形成丙酮酸、谷氨酸^[21]。*AlaAT* 基因在植物中能够参与光呼吸等生理代谢途径及抗逆性反应等^[22]。Son 等在研究黍稷叶肉细胞、维管束鞘细胞时发现,其细胞的细胞质中能够检测到 AlaAT 活性,因此他们认为 AlaAT 在黍稷细胞中可能具有丙酮酸转运的功能^[23]。在小麦中的相关研究发现,从小麦黄化苗中能够检测到 AlaAT,将黄化苗恢复在光照条件下培养后发现其酶活性显著增加,表明恢复光照后,在小麦植株转绿过程中该酶发挥了重要作用^[24]。在低氧环境下,拟南芥 *AtAlaAT* 基因的表达量显著增高^[25],而水稻中的 *OsAlaAT* 基因也能够响应低氧胁迫^[26]。茶树 *CsAlaAT* 基因能够响应高温、低温、脱落酸(ABA)和赤霉素(GA)等胁迫^[27]。以上研究结果表明, *AlaAT* 基因能够在植物应对非生物胁迫过程中发挥重要的作用,深入研究该基因功能对于培育抗逆作物品种具有非常重要的意义。

本研究采用 mRNA 差异显示技术(differential display reverse transcription PCR, DDRT-PCR)和 RT-PCR 技术对小麦的 *TaAlaAT* 基因进行克隆,利

收稿日期:2021-09-22

基金项目:河南省科技攻关项目(编号:222102110461, 212102110067)。

作者简介:于永昂(1986—),男,河南新乡人,博士,讲师,主要从事小麦分子育种研究。E-mail: xkyya@163.com。

通信作者:张 蕾,硕士,实验师,主要从事植物分子育种研究。

E-mail: zhanglei07025@163.com。

用 qRT-PCR 技术分析该基因在不同组织中及镉胁迫处理后的表达水平, 以期全面解析 *TaAlaAT* 基因在小麦中的功能提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料处理

本试验于 2020 年 1—10 月在河南省粮食作物基因组编辑工程技术中心开展, 供试小麦品种为百农矮抗 58。将小麦种子用无菌水冲洗 3~5 次后铺于培养皿中, 于温度 25 ℃、光—暗周期 16 h—8 h 的条件下培养 14 d。选取生长一致的小麦幼苗, 用 1.0 mmol/L CdCl₂ 处理 2、4、6、8、12 h 后取样, 以用纯净水处理的小麦作为对照, 用液氮速冻后于 -80 ℃ 冰箱中备用, 以上每个处理均设 3 个生物学重复。

1.2 试验方法

1.2.1 DDRT-PCR 分析和差异片段回收 以锚定引物 H-T11A 作为反转录引物, 将镉胁迫组和对照组的小麦叶片用南京诺唯赞生物科技股份有限公司的试剂盒提取总 RNA, 参照 PrimeScript Reverse Transcriptase (TaKaRa) 使用说明书合成第 1 链 cDNA, 以第 1 链 cDNA 为模板, 用 H-T11A 锚定引物与 8 个随机引物 (SP1~SP8, 序列见表 1) 组合的 8 对引物进行 RT-PCR 扩增。通过电泳检测挑选差异性条带后, 经 DNA 纯化回收试剂盒回收后送至金斯瑞生物科技股份有限公司测序。

表 1 用于小麦 DDRT-PCR 的引物序列

引物编号	引物序列(5'→3')
H-T11A	AAGCTTTTTTTTTTTA
SP1	TACAACGAGG
SP2	GTTTTTCGAC
SP3	TACAACGAGG
SP4	TCGATACAGG
SP5	TGGTAAAGGG
SP6	GATCAATCGC
SP7	CTGCTTGATG
SP8	GATCTAACCG

1.2.2 差异基因序列扩增与生物信息学分析 将获得的测序结果在美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 数据库中进行比对, 发现 1 个与差异基因序列高度同源的基因序列 (GenBank 登录号: AK455865), 对该序列进行分析后发现其含有 1 个完整的开放阅读框 (ORF), 编码谷丙氨酸转移酶蛋白, 因此将该基因命名为 *TaAlaAT*。根据所获得的

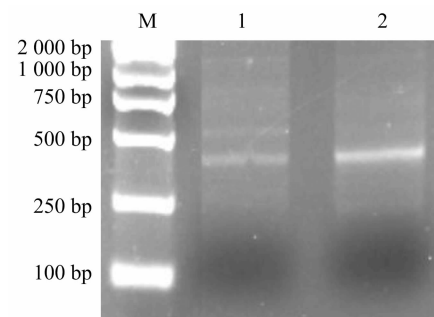
基因序列设计特异性引物: *TaAlaAT*-F, 5'-ACACC CACCTTTCCCCTC-3'; *TaAlaAT*-R, 5'-TATCAAG CATAGCAACCA-3'。以小麦叶片 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 用 NCBI 网站的相关程序 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 对获得的核苷酸、蛋白质序列进行 BLAST 比对搜索; 用 MEGA 6.0 构建进化树。

1.2.3 Cd 胁迫下 *TaAlaAT* 基因的表达分析 根据测序所得序列设计特异性定量引物: qRT-*TaAlaAT*-F, 5'-GAGAGGGACGGGATTTTG-3'; qRT-*TaAlaAT*-R, 5'-GCTTCACTCAGGCATTGG-3'。以小麦的 *Actin* 基因作为内参基因 (*TaActin*-F, 5'-CTTGTAT GCCAGCGGTCTGAACA-3'; *TaActin*-R, 5'-CTCAT AATCAAGGGCCACGTA-3')。qRT-PCR 反应所用仪器为 Roche 的 LightCycler 480, PCR 反应所用酶为 TaKaRa 公司的 SYBR Green Master Mix。用 2^{-ΔΔC_T} 法^[28] 分析试验数据。同一处理所用的样品数为 3 个, 每次对同一样品进行 3 次重复试验。

2 结果与分析

2.1 小麦差异片段的分离与回收

采用 1 个锚定引物和 8 个随机引物, 共 8 对引物进行 DDRT-PCR 反应。电泳结果表明, 与对照相比, 经 Cd 处理后获得 1 个表达量增强的条带 (图 1), 推测该 PCR 产物可能响应了小麦的 Cd 胁迫处理, 因此将该条带进行切胶回收纯化。



M—DL2000 marker; 1—对照; 2—镉胁迫处理
图 1 镉胁迫下小麦部分 DDRT-PCR 的扩增结果

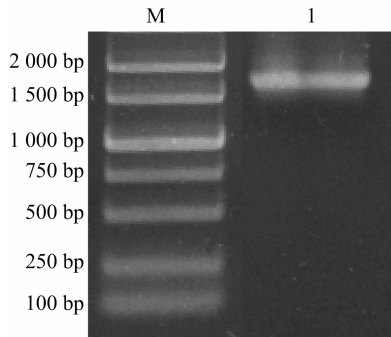
2.2 *TaAlaAT* 基因全长的获得及序列分析

差异表达片段测序结果表明, 该片段大小为 274 bp, 在 GenBank 数据库中进行 BLASTx 对比发现, 该片段与 *AlaAT* 基因的相似性很高, 根据筛选获得基因序列设计特异性引物, 以小麦叶片 cDNA 为模板, 采用 RT-PCR 技术扩展得到 1 个 1 500 bp 左右的条带 (图 2)。测序结果表明, 该片段全长

1 628 bp, 包含 1 个长度为 1 440 bp 的完整 ORF, 编码 479 个氨基酸(图 3)。蛋白质分析结果表明, 该蛋白质的相对分子量为 53. 41 ku, 理论等电点为 6. 97, 化学方程式为 $C_{2\ 386}H_{3\ 748}N_{646}O_{699}S_{23}$ 。不稳定指数为 41. 84, 属于不稳定蛋白; 脂肪指数为 85. 91, 总平均疏水性 (GRAVY) 为 -0. 220, 为亲水性蛋白。用在线工具 SignalP 3. 0、TMHMM 分析发现, 该蛋白的 N 端不含信号序列, 有跨膜结构域(位置为 109 ~ 131 bp)。用在线工具 SOPMA 对其进行二级结构预测发现, 该蛋白的二级结构由 36. 12% α -螺旋 (alpha helix)、31. 32% 无规则卷曲 (random coil)、21. 50% 延伸链 (extended strand) 和 11. 06% β -转角 (beta turn) 组成(图 4)。对小麦 *TaAlaAT* 基因保守域的预测结果显示, 第 83 ~ 464 位含有 1 个典型的 AAT-like 保守结构域(图 5-A), 表明 *TaAlaAT* 属于天冬氨酸转氨酶家族。

此外, 多重序列比对结果表明, 小麦 *TaAlaAT* 与拟南芥 (NP_173173)、油菜 (XP_013641560)、烟草

(XP_016466182)、水稻 (AA084040) 和玉米 (AAC62456) 的一致性为 70. 23% (图 5-B)。用 MEGA 6. 0 构建进化树的结果显示, *TaAlaAT* 与水稻 *OsAlaAT* 的亲缘关系最近(图 6)。



M—DL2000 marker; 1—*TaAlaAT*
图2 小麦 *TaAlaAT* 基因扩增结果

2.3 *TaAlaAT* 基因表达模式分析

为了进一步研究 *TaAlaAT* 基因的时空表达模式、同组织部位的表达模式, 采用 qRT-PCR 方法分析 *TaAlaAT* 基因在小麦根、茎、叶、雄蕊和雌蕊中的

```
1      ATGATGGGGAGGAAGGCCCTGGACTACGAGGAGCTCAACGAGAACGTCGAAGAAGGTGCAGTACGCCGTGCGCGGG
1      M M G R K A L D Y E E L N E N V K K V Q Y A V R G
76     GAGCTCTACCTCCGCGCCTCCGAGCTCCAGAAGGAGGGCAAGAGGATCATCTTACCAACGTCGGCAACCCGCAC
26     E L Y L R A S E L Q K E G K R I I F T N V G N P H
151    GCCCTCGGCCAGAAGCCACTCACCTTCCCCGCCAGGTGGTGGCGCTCTGCCAGGCTCCATTTCTGCTCGATGAT
51     A L G Q K P L T F P R Q V A L A L C Q A P F L L D D
226    CCCAACGTCGGCCTCATCTTCCCCGCCGATGCCATCGCGAGGGCCAAGCACTACCTCTCCCTCGCACCCGCGCGGT
76     P N V G L I F F P A D A I A R A K H Y L S L A P G G
301    TTAGGTGCTTACAGTGCATCTCCGAGGTATCCCTGGGGTTAGGCAGGAAGTTGCCGAGTTTCATTCAGAGCGTGAT
101    L G A Y S D S R G I P G V R Q E V A E F I Q R R D
376    GGGTATCCAAGTGATCCAGAGCTTATCTACCTCACTGATGGTGCCAGCAAAGGTGTGATGCAAATGCTCAACGCC
126    G Y P S D P E L I Y L T D G A S K G V M Q M L N A
451    ATTATCAGAAACGAGAGGGACGGGATTTTGGTCCCTGTTCCACAATACCCGCTTTATCTGCTGCTATTTCCCTC
151    I I R N E R D G I L V P V P Q Y P L Y S A A I S L
526    TTTGGTGGTTCTTGTCCGTATTATTGGAAGAAGAGGCTAACTGGGGACTGATCTTGTCACTACCCGGCA
176    F G G S L V P Y Y L E E E A N W G L D L V S T R Q
601    TCAGTTGCAGAAACGAGTCAAAGGGAATCTGTTCCAGCAATGGTGATAATAAACCCAGGAAACCCCTACTGGT
201    S V A E A S K G I T V R A M V I I N P G N P T G
676    CAATGCCTAAGTGAAGCAAATATTAGGGAACCTTTGAACTTCTGCTATCAGGAAAACTTGGTTCTGCTTGCAGAT
226    Q C L S E A N I R E L L N F C Y Q E N L V L L A D
751    GAAGTTTATCAACAGAATGTTTATCAAGATGAGCGTCCGTTTATAAGTGCAAGAAAGTTATGTTTGACATGGGT
251    E V Y Q N N V Y Q D E R P F I S A R K V M F D M G
826    CCTCCAGTAAGCAGGGAAGTTCAGCTGATTTCTTCCACTGTGTCCAAAGGATATTGGGGAGAGTGTGGACAG
276    P P V S R R E V Q L I S F H T V S K G Y W G E C G G
901    CGTGGTGGGTACTTGAATGCAAAATATTCCTCCCAAGACTGTGACGAGATTTATAAGGTTGCATCAATCGCG
301    R G G Y F E M T N I P P K T V D E I Y K V A S I A
976    CTGAGTCCAATGTTCTCTGGGCAGATCTTTATGGGGCTTATGGTGAACCCCTCTAAACCTGGAGACATCTCGTAC
326    L S P N V P G Q I F M V L M V N P K P G D I S Y
1051   CTGAAGTATTCTGCTGAAAGTAAGTCTATCCTTGAATCTTTGAGGAGGAGGGCACAATAATGACAGACGGTTTC
351   L K Y S A A E S K S I L E S L R R R A Q Q I M T D G F
1126   AATAGTTGCCAAGATGTTGTCTGCAATTTACAGAGAAGGAGCTATGTATTCTTCCCGCAAATACGCTGCGCGAA
376   N S C R N V V C N F T E G A M Y S F P Q I R L P Q
1201   AGAGCTATGGATGTAGCCAAAGCGCTGGCAAAGCGCCTGATGTTTACTACTGCCTCAAGCTTCTGGAAGCCACT
401   R A M D V A K S A G K A P D V Y Y C L K L L E A T
1276   GGAATTTCCACTGTTCCAGGCTCAGGTTTGGTTCAGAAAGAAAGGGTGTTCATCTGAGGACGACGATCCTGCCC
426   G I S T V P G S G F G Q K E R V F H L R T T I L P
1351   GCGGAGGAGGACATGCCGCGGATCATGTGAGCTTCAAGAAGTTCAACGACTCATTCATGGAGCAATACCAGAAC
451   A E E D M P A I M S S F K K F N D S F M E Q Y Q N
1426   CACTCGAGGCTGTGA
476   H S R L *
```

M—甲硫氨酸; G—甘氨酸; R—精氨酸; K—赖氨酸; A—丙氨酸; L—亮氨酸; D—天冬氨酸; Y—酪氨酸;
E—谷氨酸; N—天冬酰胺; V—缬氨酸; Q—谷氨酰胺; S—丝氨酸; F—苯丙氨酸; C—半胱氨酸; W—色氨酸;
P—脯氨酸; H—组氨酸; I—异亮氨酸; T—苏氨酸; *—终止密码子

图3 *TaAlaAT* 基因的编码序列(CDS)及其氨基酸序列

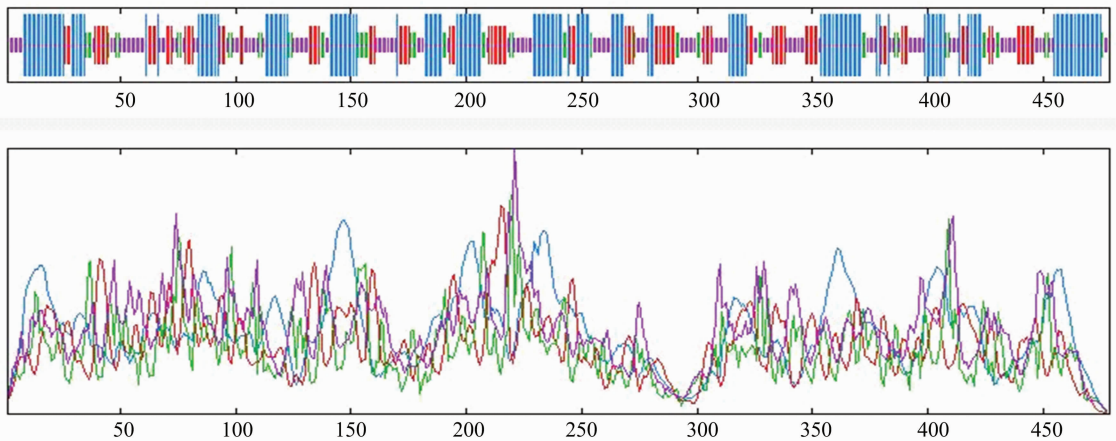
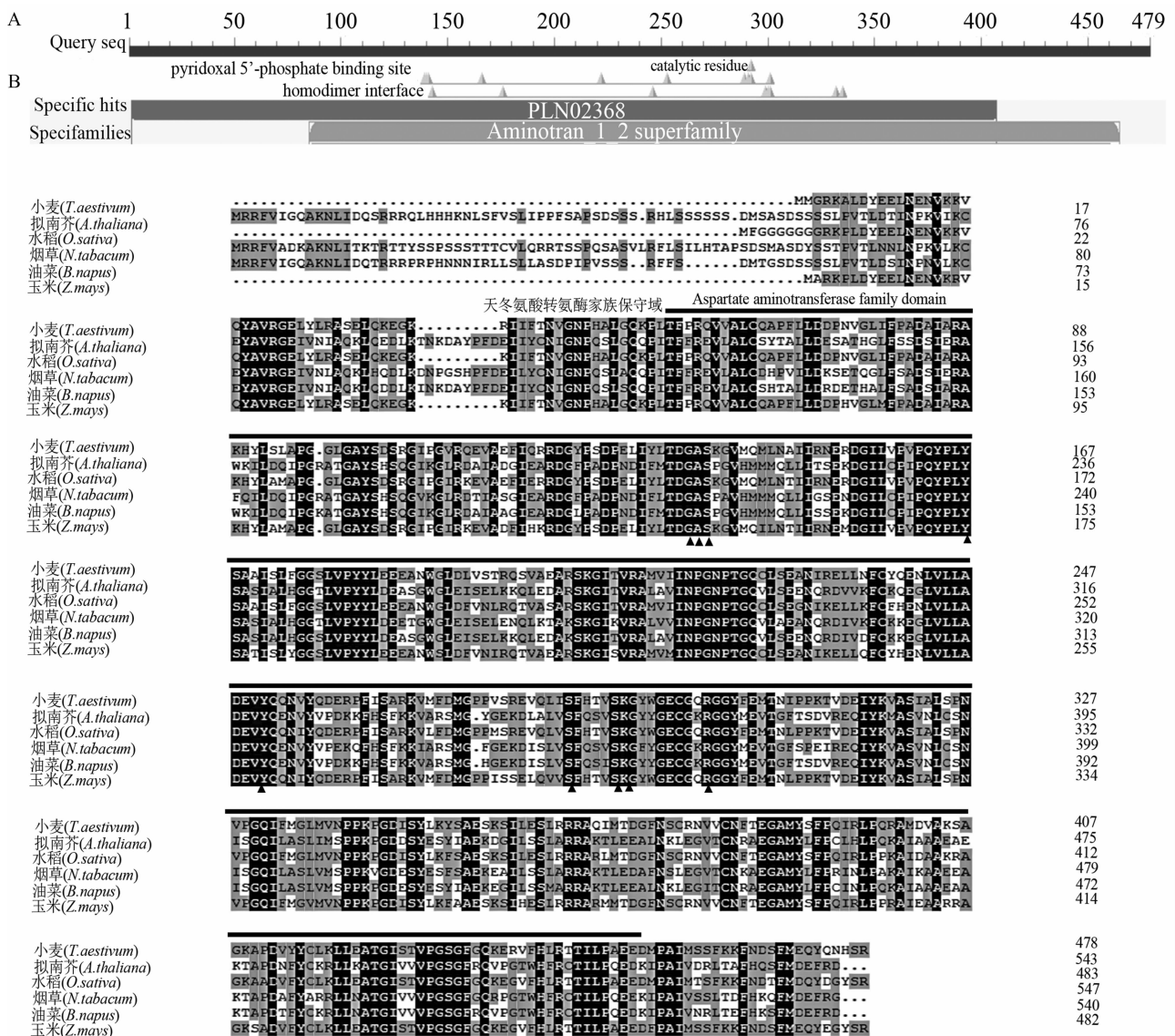


图4 小麦 TaAlaAT 蛋白的二级结构预测结果



上划线部分为天冬氨酸转氨酶家族保守结构域, 下标三角形为 PLP 结合位点, 下标矩形为催化位点。

A—保守域; B—多重比对

图5 小麦 TaAltAT 保守域及与其他物种氨基酸序列的多重对比结果

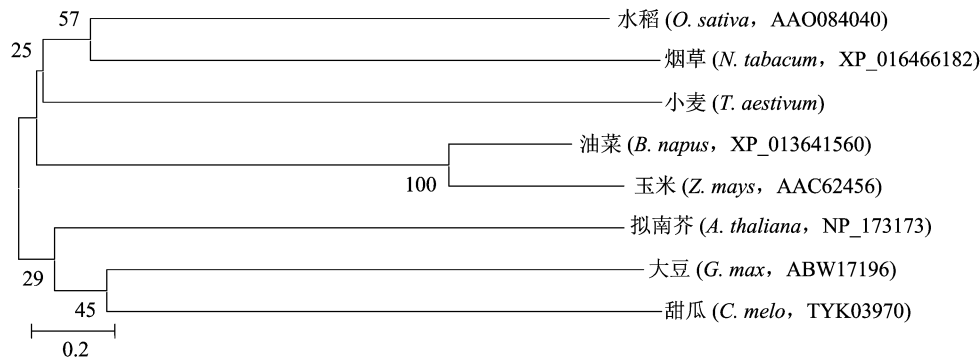
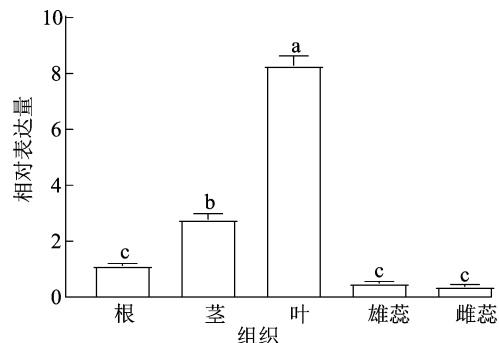


图6 TaAlaAT 蛋白与其他植物 AlaAT 蛋白的系统进化树分析结果

表达模式。由图 7 可以看出,该基因在小麦不同组织中都有一定程度的表达,但表达量不同,表达量由高到低排序为叶>茎>根>雄蕊>雌蕊。在镉胁迫下对 *TaAlaAT* 基因进行分析发现,随着胁迫时间的延长,*TaAlaAT* 基因的表达量呈现先增高后降低的趋势,在处理 4 h 时基因的表达量最高,随后逐渐降低,在处理 12 h 时恢复至对照水平(图 8)。由此推测,*TaAlaAT* 基因在小麦响应镉胁迫中起着一定作用。



不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。图 8 同
图7 *TaAlaAT* 基因在小麦各组织中的表达

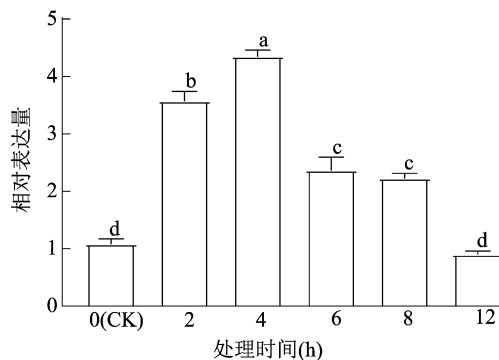


图8 Cd 胁迫后 *TaAlaAT* 基因的相对表达量

3 结论与讨论

丙氨酸转氨酶是一种以磷酸吡哆醛为辅酶的转氨酶,其催化的可逆反应中可用的底物包括在碳代谢中起关键作用的戊二酸、丙酮酸以及参与氮同

化和信号转导的谷氨酸,丙氨酸转氨酶在碳氮代谢过程中起着关键作用,能够帮助植物抵御外界胁迫^[26]。本研究采用 DDRT-PCR 技术和 RT-PCR 技术成功获得了小麦 *TaAlaAT* 基因,对由该基因推导的蛋白保守结构域进行分析发现,该蛋白属于天冬氨酸转氨酶超家族。多重序列比对结果表明,*TaAlaAT* 基因编码的氨基酸序列与其他植物 AlaAT 蛋白质的氨基酸序列具有很高的相似度,包含磷酸吡哆醛倚赖转移酶 I、II 和氨基酸转移酶 I、II 等结构及 C-末端过氧化物酶体靶标信号位点 PTS。组织表达模式分析发现,小麦 *TaAlaAT* 基因的表达具有组织特异性,在小麦叶片中的表达量最高,其次是在小麦茎、根中,在雌蕊、雄蕊中的表达量最低。qRT-PCR 结果表明,*TaAlaAT* 基因表达量在镉胁迫后呈现先增加后降低的趋势,说明 *TaAlaAT* 基因能够响应镉胁迫处理,推测其能够参与植物镉胁迫过程。非生物胁迫会导致植物在氮化物合成过程中积累过多的氨,而氨含量的过多积累会造成细胞膜损伤,进而影响到植物的生长发育^[27]。研究发现,高温胁迫后,水稻叶片中游离氨基酸的含量会增加,而游离氨基酸在一定条件下可以维持植物细胞的正常水势,并在一定程度上降低细胞的毒性效应^[29]。另外,茶叶 *CsAlaAT* 基因能够响应高温胁迫^[27]。在小黑杨中过表达 *AlaAT* 基因能够提高转基因株系谷丙转氨酶酶活性,1 mmol/L 硝态氮能够促进转基因植株根、叶片中 *AlaAT* 基因的表达。同时,与氮代谢相关的 *AspAT*、*NR*、*NADPH-GOGAT*、*NIR* 和 *NRT1.1* 等基因的表达量增加^[30]。在甘蔗中过表达大麦 *HvAlaAT* 基因能够提高转基因植株在低氮条件下的氮素利用率^[31]。在缺氧、低氮和弱光条件下,小麦幼苗地上部分的丙氨酸及其同系物谷氨酸的含量高于地下部分,表现出较高的耐性^[31]。因此,研究氮素含量与植物耐逆性之间的关系对于研

究植物抗逆性机制具有重要意义。

目前,对小麦氮代谢的研究主要集中在不同氮代谢关键酶活性与氮吸收、积累等方面,对小麦谷丙氨酸转移酶基因的研究还较少。因此,深入研究小麦 *TaAlaAT* 基因的分子作用机制,对于揭示其在小麦碳氮代谢及抵御胁迫中的作用和机制有重要的理论意义。

参考文献:

- [1]符云聪,朱晓龙,袁 鑫,等. 小麦对镉的吸收、富集及其镉污染预测研究进展[J]. 中国农学通报,2020,36(6):37-41.
- [2]陈 华,陈永快,王 涛,等. 水杨酸对镉胁迫下不结球白菜幼苗生长及生理的响应[J]. 福建农业学报,2020,35(12):1324-1329.
- [3]孙丽娟,秦 秦,宋 科. 镉污染农田土壤修复技术及安全利用方法研究进展[J]. 生态环境学报,2018,27(7):1377-1386.
- [4]蒋欣梅,薛冬冬,于锡宏,等. 玉米秸秆生物炭对镉污染土壤中小白菜生长的影响[J]. 江苏农业学报,2020,36(4):1000-1006.
- [5]Nakadaira H, Nishi S. Effects of low-dose cadmium exposure on biological examinations[J]. Science of the Total Environment, 2003, 308(1/2/3):46-62.
- [6]Fässler E, Robinson B H, Gupta S K, et al. Uptake and allocation of plant nutrients and Cd in maize, sunflower and tobacco growing on contaminated soil and the effect of soil conditioners under field conditions[J]. Nutrient Cycling in Agroecosystems, 2010, 87(3):339-352.
- [7]李中阳,齐学斌,樊向阳. 不同钝化材料对污灌农田镉污染土壤修复效果研究[J]. 灌溉排水学报,2016,35(3):42-44.
- [8]辛艳卫,梁成华,杜立宇,等. 不同玉米品种对镉的富集和转运特性[J]. 农业环境科学学报,2017,36(5):839-846.
- [9]何勇强,陶勤南,小畑仁,等. 镉胁迫下大豆中镉的分布状况及其籽粒品质[J]. 环境科学学报,2000,20(4):510-512.
- [10]赵云云,钟彩霞,方小龙,等. 华南地区夏播大豆品种镉耐性及籽粒镉积累的差异[J]. 大豆科学,2013,32(3):336-340.
- [11]阳小凤,马淑梅,黄 山,等. 农田镉污染对大豆镉吸收特性及其产量的影响[J]. 作物研究,2017,31(6):668-672.
- [12]Arao T, Ae N. Genotypic variations in cadmium levels of rice grain[J]. Soil Science & Plant Nutrition, 2003, 49(4):473-479.
- [13]Li J, Xu Y. Immobilization of Cd in a paddy soil using moisture management and amendment[J]. Environmental Science & Pollution Research International, 2015, 122(7):131-136.
- [14]龙思斯,宋正国,雷 鸣,等. 不同外源镉对水稻生长和富集镉的影响研究[J]. 农业环境科学学报,2016,35(3):419-424.
- [15]蔡秋玲,林大松,王 果,等. 不同类型水稻镉富集与转运能力的差异分析[J]. 农业环境科学学报,2016,35(6):1028-1033.
- [16]吴玉萍,杨虹琦,徐照丽,等. 重金属镉在烤烟中的累积分配[J]. 中国烟草科学,2008,29(5):37-39.
- [17]晏 哲,高志强,罗真华,等. 不同钾肥对几种烟草吸收累积土壤镉的影响[J]. 环境化学,2016,35(9):1913-1920.
- [18]Liu H Y, Prpbst A, Liao B H. Metal contamination of soils and crops affected by the Chenzhou lead/zinc mine spill (Hunan, China)[J]. Science of the Total Environment, 2005, 339(1):153-166.
- [19]王才斌,成 波,郑亚萍,等. 山东省花生田和花生籽仁镉含量及其与施肥关系研究[J]. 土壤通报,2008,39(6):1410-1413.
- [20]董淑玉,秦俊豪,王 迟,等. 不同生物质炭对酸雨及氧化性沉降下花生生长及累积镉的影响[J]. 环境科学学报,2017,37(11):4296-4304.
- [21]Kendziorek M, Paszkowska A, Zagdańska B. Biochemical characterization and kinetic properties of alanine aminotransferase homologues partially purified from wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. Phytochemistry, 2012, 82(10):7-14.
- [22]McAllister C H, Facette M, Holt A, et al. Analysis of the enzymatic properties of a broad family of alanine aminotransferases[J]. PLoS One, 2013, 8(2):e55032.
- [23]Son D, Sugiyama T. Molecular cloning of an alanine aminotransferase from NAD-malic enzyme type C₄ plant *Panicum miliaceum*[J]. Plant Molecular Biology, 1992, 20(4):705-713.
- [24]白培贤. 茶树丙氨酸脱羧酶和丙氨酸氨基转移酶基因的分离鉴定[D]. 北京:中国农业科学院,2017.
- [25]Miyashitay Y, Dolferus R, Ismond K P, et al. Alanine aminotransferase catalyses the breakdown of alanine after hypoxia in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Journal, 2007, 49(6):1108-1121.
- [26]Beatty P H, Shrawat A K, Carroll R T, et al. Transcriptome analysis of nitrogen-efficient rice over-expressing alanine aminotransferase[J]. Plant Biotechnology Journal, 2009, 7(6):562-576.
- [27]崔 新,刘志薇,吴致君,等. 茶树谷丙转氨酶基因的克隆及其表达分析[J]. 西北植物学报,2016,32(12):2361-2369.
- [28]Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_t} method[J]. Methods, 2001, 25(4):402-408.
- [29]张桂莲,陈立云,张顺堂. 高温胁迫对水稻剑叶氮代谢的影响[J]. 杂交水稻,2007,22(4):57-61.
- [30]张国壁. 转 *AlaAT* 基因小黑杨对氮素的响应[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2018.
- [31]Snyman S J, Hajari E, Watt M P, et al. Improved nitrogen use efficiency in transgenic sugarcane: phenotypic assessment in a pot trial under low nitrogen conditions[J]. Plant Cell Report, 2015, 34(5):667-669.