

毛薯硒代半胱氨酸甲基转移酶 *SMT* 基因的克隆与表达分析

杨亚飞, 黎丹, 黄东益, 符晓, 夏薇, 吴文婧

(海南大学热带农林学院, 海口 570228)

摘要: 硒代半胱氨酸甲基转移酶 (SMT, Selenocysteine methyltransferase) 是植物硒代谢的关键酶, 在植物硒积累的过程中发挥着重要作用。为了探究毛薯中 *SMT* 基因的功能, 本研究以优质富硒毛薯 Ds148 为研究对象, 利用 RT-PCR 技术从中克隆到了毛薯 *SMT* 基因, 命名为 *DsSMT*。 *DsSMT* (登录号: MH046782) 包含 1038 bp 完整开放阅读框 (ORF), 预测编码 345 个氨基酸, 理论分子量 (Mw) 为 37.24 kD, 等电点 (pI) 为 5.01, 编码的蛋白与其他植物的 *SMT* 蛋白同源性较高, 具有较高的保守性。系统进化树分析显示, 毛薯与海枣和菠萝的 *SMT* 蛋白的亲缘关系较近, 聚为同一类。利用 PSORT II 在线软件对 *DsSMT* 蛋白进行预测, 结果表明其可能定位于细胞质中。实时荧光定量 PCR 分析显示, *DsSMT* 基因在毛薯生长发育的各个时期的根、茎、叶、块茎以及块茎的皮组织中均有所表达, 其中在毛薯的根和成熟期表达量最高。本研究从毛薯中克隆出了硒代谢相关酶 *DsSMT* 基因的 cDNA 序列, 并对其进行了生物信息学分析; 同时又对 *DsSMT* 基因在毛薯块茎形成的不同时期、不同组织中的表达情况进行相对定量的研究和分析, 为深入研究 *DsSMT* 基因的调控机理提供分子依据, 同时也为毛薯硒吸收、同化的分子机理研究奠定基础。

关键词: 毛薯; 硒代半胱氨酸甲基转移酶; 基因克隆; 生物信息学; 表达分析

Cloning and Expression Analysis of a *Selenocysteine Methyltransferase SMT* Gene from *Dioscorea esculenta* (Lour.) Brukill

YANG Ya-fei, LI Dan, HUANG Dong-yi, FU Xiao, XIA Wei, WU Wen-qiang

(Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou 570228)

Abstract: Selenocysteine methyltransferase (SMT) is a key enzyme of selenium metabolism pathway in plants and plays important roles in accumulating for selenium in plants. To investigate the function of *SMT* in *Dioscorea esculenta* (Lour.) Brukill, the full-length cDNA was cloned from *D. esculenta* (Lour.) Brukill Ds148 using reverse transcription-PCR (RT-PCR) technique. This gene was named *DsSMT* with a GeneBank accession number MH046782. The full-length open reading frame (ORF) of *DsSMT* was 1038 bp that encoded 345 amino acids. The predicted molecular weight is 37.24 kD with the hypothetical isoelectric point of 5.01. *DsSMT* was highly conserved and grouped with the homologous proteins from *Phoenix dactylifera* L. and *Ananas comosus* (L.) Merr. Wolf Psort protection indicated that *DsSMT* protein was located in cytoplasm. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) analysis revealed the transcripts of *DsSMT* in different tissues of *D. esculenta* (Lour.) Brukill, including roots, stems, leaves, tubers and the peel of tubers. The levels of *DsSMT* were different among different tissues, and the level was the highest in roots and mature period during the process of *D. esculenta* (Lour.) Brukill development, respectively. Furthermore, the expression level of *DsSMT* was

收稿日期: 2018-10-27 修回日期: 2018-12-27 网络出版日期: 2019-01-17

URL: <http://www.doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20181027002>

第一作者研究方向为植物生物技术与育种, E-mail: yangyf93@foxmail.com

通信作者: 吴文婧, 研究方向为植物生物技术与育种, E-mail: 80582103@qq.com

黄东益, 研究方向为植物生物技术与育种, E-mail: hdongyi@126.com

基金项目: 农业部热带作物种质资源保护 (zzzz002007168)

Foundation project: Conservation of Tropical Crops Germplasm Resources, Ministry of Agriculture (zzzz002007168)

obviously down-regulated during the enlargemental period, and then increased during the mature period. These results isolated the coding sequence of *DsSMT* gene and unlocked its expressional profiles, which provided a base in future study of molecular regulation mechanism on selenium metabolism in *D. esculenta* (Lour.) Brukill.

Key words: *Dioscorea esculenta* (Lour.) Brukill; selenocysteine methyltransferase; gene cloning; bioinformatics; expression analysis

硒代半胱氨酸甲基转移酶 (SMT, Selenocysteine Methyltransferase) 最早是从 *A. bisulcatus* 中被分离出来的^[1], 是植物硒代谢途径的一个关键酶^[2]。在植物硒代谢过程中, 硒代半胱氨酸甲基转移酶 SMT 能催化硒代半胱氨酸 (SeCys) 甲基化形成甲基硒代半胱氨酸 (MeSeCys, 非蛋白质氨基酸), 从而使细胞内 SeCys 的浓度减少, 减少有毒物质被错误地插入耐硒植物蛋白质中并解除硒对植物的毒害^[1, 3-4]。转基因技术是提高植物硒代谢的一种有效途径。通过对超表达 SMT 的拟南芥转基因植物的研究发现, SMT 参与了 MeSeCys 和 MeCys 的合成, 猜测 SMT 可能对 SeCys 和 Cys 的甲基化有催化作用^[5-6]; Van Hoewyk 等^[7] 使 *ATCpNifS* 基因在拟南芥中超表达来研究其对植物硒代谢的影响发现: *ATCpNifS* 基因的超表达能显著提高拟南芥的耐硒能力和硒的积累量, 具体表现为根生长比对照提高了 1.9 倍, 硒在地上部的积累量提高了 2~3 倍; LeDuc 等^[8] 从硒富集植物印度芥菜和双槽紫云英中克隆了硒代半胱氨酸甲基转移酶 SMT 基因, 导入到印度芥菜, 转基因植株成功提高了对亚硒酸盐的耐受性和积累量; Brummell 等^[9] 将一种硒超积累植物的 SMT 基因导入番茄中进行表达, 并在转基因番茄果实发育期的培养基中提供硒酸盐或亚硒酸盐, 结果使果实中 MeSeCys 的含量提高到总 Se 量的 16%; 姚新等^[10] 将硒代半胱氨酸甲基转移酶基因转化进烟草, 显著提高了烟草对硒酸盐的耐受性。这都暗示了 SMT 对调控植物的耐硒和富硒能力具有巨大的潜在应用价值^[11]。

毛薯 (*Dioscorea esculenta* (Lour.) Brukill) 属于薯蓣科薯蓣属藤本植物, 在我国主要分布在海南、广东、广西、福建等地区, 其块茎为白色。因其肉质细嫩, 营养丰富, 药食同源, 深受老百姓的喜爱, 在海南更是作为一种传统作物存在^[2]。由于其具有抗旱耐肥、病虫害少等特性, 毛薯作为一种适应性好的耐

旱作物, 在各种旱地土壤中均可种植^[12]。此外, 毛薯还具有很好的药用价值, 除了可以益肺滋肾、健脾止泻和解毒敛疮^[13]之外, 近几年研究发现, 毛薯还可以诱导肌肉类固醇激素增加, 这有助于降低 2 型糖尿病患者对胰岛素的抗性^[14]。在富硒能力方面, 有关研究报道表明, 薯蓣植物具有明显的富集硒的作用^[15], 且与其他薯类作物相比, 毛薯的硒含量最为丰富^[16]。因此, 开展毛薯硒代谢相关酶基因的研究, 对其进一步往功能型食品的方向开发具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

毛薯 Ds148 种植在海南大学薯蓣种质资源圃。克隆载体 PMD-18T Vector 购于 TaKaRa 公司; 大肠杆菌感受态 DH5 α 购于上海唯地生物技术有限公司。RNA 提取试剂盒购于北京百泰克生物技术有限公司; 反转录试剂盒购于 TaKaRa 公司; HiFi 酶购于北京全式金生物技术有限公司; 胶回收试剂盒购于 Omega 公司; 引物合成及测序由天一辉远基因科技有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 毛薯总 RNA 提取和 cDNA 合成 毛薯生长发育不同时期、不同组织的总 RNA 提取按照 BioTeke 的通用植物总 RNA 提取试剂盒 (离心柱型) 的说明操作。cDNA 合成根据 TaKaRa Primescript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 的说明操作。

1.2.2 *DsSMT* 基因的克隆 基于毛薯 Ds148 转录组数据库, 利用 Primer 5.0 软件设计 *DsSMT* 基因的上下游引物 (表 1)。以毛薯块茎 cDNA 为模板进行扩增。PCR 条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 57~59 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 31 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。将 PCR 产物回收、克隆、转化、鉴定重组子, 并将阳性克隆测序验证。

表 1 基因克隆引物的名称和序列

Table 1 Primer name and sequences used for gene cloning

引物名称	引物序列	引物名称	引物序列
SMT-F	ATGGGGTTTGGGACCGGAGA	SMT-R	GCAGTTAAGCTATAGATGTTTCGGGAG
Q-Actin-F	GGTTACTCATTACCACCACAG	Q-Actin-R	GGTAACTCATAACTCTTCTCAACAGCA
Q-SMT-F	GCTTTGTTGCGTAGAAGTGTGA	Q-SMT-R	CCATCTGCTAAAAATGCTCCGTA

1.3 *DsSMT* 基因的生物信息学分析

利用 NCBI 网站 BLAST 程序进行基因和蛋白质预测,利用 DNAMAN 7.0 软件进行基因和氨基酸序列的分析与比对,利用 MEGA 5.0 软件进行进化树分析,采用邻接算法构建进化树。氨基酸和蛋白质的基本性质分析利用网站 <http://web.expasy.org> 相关软件完成。

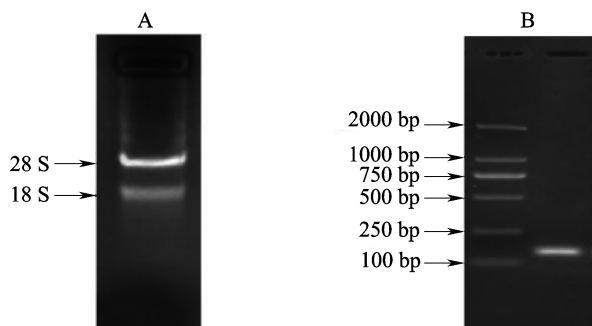
1.4 *DsSMT* 基因的实时荧光定量分析

利用实时荧光定量 PCR 分析 *DsSMT* 基因在毛薯生长发育不同时期、不同组织的表达情况。根据所得 cDNA 序列设计荧光定量 PCR 引物,以 *Actin* 作为内参基因,引物序列见表 1。荧光定量 PCR 扩增程序为:94 °C 3 min;94 °C 30 s;60 °C 30 s、72 °C 30 s,40 个循环;反应时每个样品设置 3 次重复。所得数据采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 的方法计算相对表达量。

2 结果与分析

2.1 毛薯总 RNA 的提取

将毛薯总 RNA 进行电泳检测(图 1),结果显示 28S rRNA 和 18S rRNA 条带清晰,且 28S rRNA 亮度约为 2 倍的 18S rRNA,说明提取的毛薯 RNA 较完整。RNA 的浓度在 200~500 ng/ μ L, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在 1.8~2.0 之间,表明 RNA 的浓度和质量都比较好,可用于进行反转录合成 cDNA。采用 β -*Actin* 作为内参基因对反转录的 cDNA 进行检测,其目的片段的大小为 130 bp,结果表明反转录效果良好。



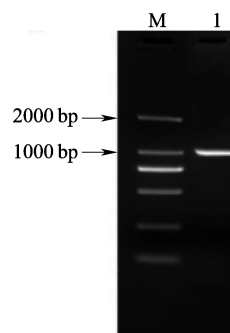
A: 总 RNA; B: cDNA 第一链

A: total RNA, B: first strand of cDNA

图 1 毛薯块茎总 RNA 和 cDNA 第一链琼脂糖凝胶电泳图
Fig.1 Agarose gel electrophoresis of total RNA and cDNA from the tuber of *D. esculenta* (Lour.) Brukkil

2.2 *DsSMT* 基因的克隆

使用设计的引物对毛薯硒代半胱氨酸甲基转移酶基因进行克隆(图 2),对得到的片段进行回收、连接转化、测序,最后进行比对,获得毛薯 *DsSMT* 基因的 cDNA 全长序列。

M: DNA 分子量标准; 1: *DsSMT* 全长扩增产物M: DNA marker, 1: PCR product of *DsSMT*图 2 *DsSMT* 全长 cDNA 的电泳图片Fig.2 The PCR product of *DsSMT* cDNA

2.3 *DsSMT* 基因的生物信息学分析

利用 NCBI 里的 ORF Finder 将所得基因的 cDNA 序列录入,查找 ORF 序列,结果表明 *DsSMT* 基因具有一个 1038 bp 的完整 ORF,预测编码 345 个氨基酸,理论分子量(Mw)为 37.24 kD,等电点(pI)为 5.01,即生理条件下该蛋白偏酸性。带负电荷残基(Asp+Glu)数 45,带正电荷残基(Arg+Lys)数 30,分子式为 $C_{1645}H_{2583}N_{445}O_{516}$ 。整个蛋白的总平均亲水性为 -0.070,表明该蛋白是亲水性蛋白。跨膜区段预测结果显示,毛薯 *DsSMT* 蛋白质没有跨膜结构,是非跨膜蛋白。系统进化分析结果表明,*DsSMT* 与海枣、菠萝等植物的 *SMT* 同源蛋白亲缘关系较近,具有较好的同源性,并且在进化树上与海枣和菠萝聚为一组(图 3)。

2.4 *DsSMT* 基因的表达分析

将毛薯 *DsSMT* 基因在萌发期的表达量设为 1,采用 $\Delta\Delta CT$ 法进行相对荧光定量,对毛薯 *DsSMT* 基因在其块茎生长发育不同时期(萌发期、形成期、膨大期、成熟期)、不同组织(叶、茎、根、皮(块茎)、块茎)中的表达情况进行分析(图 4)。

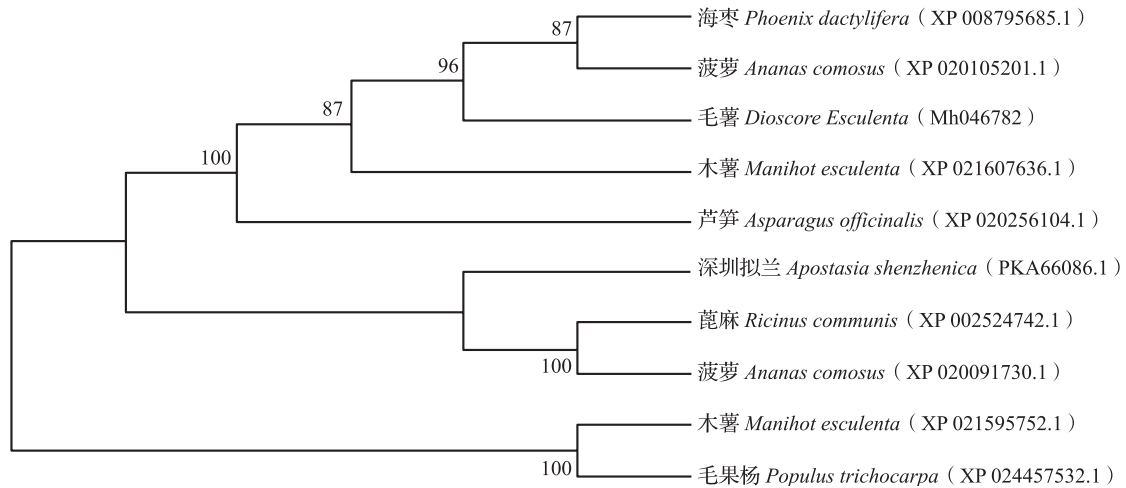


图3 DsSMT与其他植物SMTs的聚类分析

Fig.3 Phylogenetic analysis of DsSMT and other plant SMTs

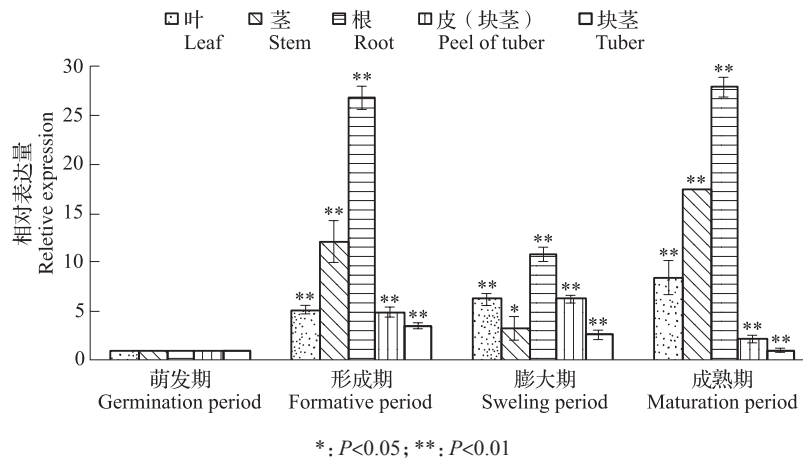


图4 DsSMT基因在不同时期不同组织中的表达

Fig.4 Expression of DsSMT in different stages and tissues

DsSMT 基因在毛薯生长发育的特定时期不同组织中的表达结果表明：*DsSMT* 基因在根、茎、叶、块茎和皮（块茎）等器官中均有所表达，其中在根中的表达量最高，其次为茎、叶和皮（块茎），块茎的表达量最低；*DsSMT* 基因在毛薯特定组织不同时期中的表达结果表明：*DsSMT* 基因的表达量在根和叶片中有明显的变化，其他组织中变化不大，其中在根中变化最为明显，形成期约是膨大期的 2 倍，且在成熟期表达量又会明显地提高。特别需要指出的是，在块茎发育的过程中 *DsSMT* 基因的表达量先迅速升高，后逐渐降低，成熟期达到最低。

3 讨论

目前对植物不同部位硒分布特征的研究报道较多^[17-20]，而对不同部位硒代谢相关酶基因表达水平的研究却很少。本研究以优质富硒毛薯 Ds148 为研究对象，利用 RT-PCR 技术从中克隆到了毛薯

SMT 基因，并对克隆到的 *DsSMT* 基因进行了生物信息学分析。初步认为 *DsSMT* 基因编码产物结构稳定，为亲水蛋白，无跨膜结构，定位于细胞基质，这方面与 Sors 等^[6]、杜玉潇等^[21]、刘声传等^[22] 的研究结果相一致。

此外，本试验还利用荧光定量 PCR 技术对硒代半胱氨酸甲基转移酶（*SMT*）基因在毛薯生长发育的不同时期、不同组织中的表达特点进行了分析。研究表明：*DsSMT* 在毛薯 Ds148 不同时期、不同组织中均有所表达；同一时期不同组织中的表达量为根 > 茎 > 叶 > 块茎，且不同组织中表达量的差异在形成期和成熟期较大，在膨大期不明显；同一组织（块茎和块茎皮除外）不同时期的表达量为成熟期 > 形成期，整体来看，形成期和成熟期表达量普遍较高，膨大期则明显偏低。*SMT* 基因在毛薯不同组织中，特别是叶片中的表达情况与在茶树和盾叶薯蓣中的表达情况类似^[23-24]。针对 *DsSMT* 基因

在不同组织中的表达量以及不同组织之间表达量的差异在膨大期出现明显下降这种情况,由于块茎的主要成分是淀粉^[25],故笔者认为这可能是由于该时期植物将大部分的能量用于块茎中淀粉等其他营养物质的合成,从而使 *DsSMT* 基因的表达受到了影响。此外针对在植物嫩叶中 *SMT* 基因的表达水平低于老叶的这种情况,谭振^[23] 根据前人关于 *SMT* 基因在黄芪中表达情况的研究结果进行了推测,认为 *SMT* 催化的反应可能会涉及到硒在新叶与老叶之间的重新定位,当叶片逐渐老化时,合成的 SeMeSeCys 就会被再次氧化成硒酸盐;另一方面,随着叶片的老化,SeMeSeCys 可能以 DMDSe 为主要形式逐渐挥发^[26-27]。而 *SMT* 在硒代谢中与 SeMeSeCys 的合成以及 DMDSe 的挥发有着非常密切的关系^[3,21]。由于植物体内有机硒的含量在不同部位、不同时期均不相同^[17-20],通过分析 *SMT* 基因在毛薯不同部位、不同时期表达水平上的差异以及在特定部位有机硒含量与该部位 *SMT* 基因表达和转录水平的关系有利于阐明产生上述结果的原因。同时该研究还为进一步深入了解毛薯硒代半胱氨酸甲基转移酶基因以及其他硒代谢相关酶基因的调控机制奠定基础,为创制高硒含量新种质资源、开展硒品质育种提供参考。

参考文献

- [1] Neuhierl B, Böck A. On the mechanism of selenium tolerance in selenium-accumulating plants. *Febs Journal*, 2010, 239(1): 235-238
- [2] 何娇. 利用海南毛薯制备燃料酒精. 海口: 海南大学, 2013
He J. Fuel ethanol production by using *Dioscorea esculenta* (Lour.) Eurkill. Haikou: Hainan University, 2013
- [3] Ellis D R, Salt D E. Plants, selenium and human health. *Current Opinion in Plant Biology*, 2003, 6(3): 273-279
- [4] Neuhierl B, Thanbichler M, Lottspeich F, Böck A. A family of S-methylmethionine-dependent thiol/selenol methyltransferases. Role in selenium tolerance and evolutionary relation. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(9): 5407
- [5] Sors T G, Ellis D R, Na G N, Lahner B, Lee S, Leustek T, Pickering I J, Salt D E. Analysis of sulfur and selenium assimilation in *Astragalus* plants with varying capacities to accumulate selenium. *Plant Journal*, 2010, 42(6): 785-797
- [6] Sors T G, Ellis D R, Salt D E. Selenium uptake, translocation, assimilation and metabolic fate in plants. *Photosynthesis Research*, 2005, 86(3): 373-389
- [7] Van Hoewyk D, Garifullina G F, Ackley A R, Abdel-Ghany S E, Marcus M A, Fakra S, Ishiyama K, Inoue E, Pilon M, Takahashi H, Pilon-Smits E A. Overexpression of *AtCpNifS* enhances selenium tolerance and accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2005, 139(3): 1518-1528
- [8] LeDuc D L, AbdelSamie M, Montes-Bayon M, Wu C P, Reisinger S J, Terry N. Overexpressing both ATP sulfurylase and selenocysteine methyltransferase enhances selenium phytoremediation traits in Indian mustard. *Environmental Pollution*, 2006, 144(1): 70-76
- [9] Brummell D A, Watson L M, Pathirana R, Joyce N I, West P J, Hunter D A, McKenzie M J. Biofortification of tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit with the anticancer compound methylselenocysteine using a selenocysteine methyltransferase from a selenium hyperaccumulator. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 2011, 59(20): 10987-10994
- [10] 姚新, 陈大清, 肖春, 李亚男. 超表达硒代半胱氨酸甲基转移酶基因对烟草硒酸盐胁迫的生理效应. *湖北农业科学*, 2009, 48(7): 1551-1553
Yao X, Chen D Q, Xiao C, Li Y N. Overexpression of selenocysteine methyltransferase gene on physiological effect of selenate stress in Tobacco. *Hubei Agricultural Sciences*, 2009, 48(7): 1551-1553
- [11] Nikiforova V, Freitag J, Kempa S, Adamik M, Hesse H, Hoefgen R. Transcriptome analysis of sulfur depletion in *Arabidopsis thaliana*: interlacing of biosynthetic pathways provides response specificity. *The Plant Journal*, 2003, 33(4): 633-650
- [12] 王弗能, 汪飞杰, 王天云. 海南岛大薯毛薯等资源考察初报. *作物品种资源*, 1991(2): 8
Wang F N, Wang F J, Wang T Y. A survey report of *Dioscorea alata* L. and *Dioscorea esculenta* (Lour.) Brukill resources in Hainan island. *China Seed Industry*, 1991(2): 8
- [13] 何娇, 黄广民. 毛薯粉浆酶法水解的响应面法优化及其动力学研究. *食品科学*, 2012, 33(16): 77-83
He J, Huang G M. Optimization and kinetics of enzymatic hydrolysis of *Dioscorea esculenta* (Lour.) Burkill tubers. *Food Science*, 2012, 33(16): 77-83
- [14] Sato K, Fujita S, Iemitsu M. *Dioscorea esculenta*-induced increase in muscle sex steroid hormones is associated with enhanced insulin sensitivity in a type 2 diabetes rat model. *Faseb Journal*, 2016, 31(2): 793-801
- [15] 林似兰, 赵陆华. 六味地黄汤中抗癌元素的研究. *中国中药杂志*, 1991, 16(1): 31-33
Lin S L, Zhao L H. Study of anti-cancer elements in Liuwei Dihuang decoction. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 1991, 16(1): 31-33
- [16] 傅杨荣. 海南岛土壤地球化学与优质农业研究. 北京: 中国地质大学, 2014
Fu Y R. Studies on soil geochemistry and high-quality agriculture in Hainan Island. Beijing: China University of Geosciences, 2014
- [17] 李亚敏, 姬海宁. 猕猴桃对硒的吸收、分布、积累特性的研究. *河北林果研究*, 2011, 26(4): 385-388
LI Y M, Ji H N. Selenium absorption, distribution and accumulation in *Actinidia chinensis*. *Hebei Journal of Forestry and Orchard Research*, 2011, 26(4): 385-388
- [18] 吴丽军, 孙小凤, 张荣, 张洋, 高旭升. 春油菜干物质积累与硒的吸收、累积及分配特性研究. *中国农学通报*, 2013(33): 141-145
Wu L J, Sun X F, Zhang R, Zhang Y, Gao X S. Study on dry matter accumulation and selenium's uptake, distribution, accumulation of *Brassica napus*. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2013(33): 141-145
- [19] 杜前进, 张永发, 唐树梅, 龙开意, 曾宾, 李国强. 水稻不同品

- 种在海南富硒土壤中硒的吸收和分配机理. 中国土壤与肥料, 2009(6): 37-40
- Du Q J, Zhang Y F, Tang S M, Long K Y, Zeng B, Li G Q. The absorption and distribution mechanisms of selenium from Hainan selenium-rich soil by different rice varieties. *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 2009(6): 37-40
- [20] 吴建国. 冬小麦地上器官对硒元素吸收累积与分配的研究. 华北农学报, 1989, 4(4): 39-43
- Wu J G. Studies on characteristic of Se element absorption, accumulation and distribution in winter wheat. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 1989, 4(4): 39-43
- [21] 杜玉潇, 李亚男, 陈大清. 植物硒代谢积累及相关酶的研究进展. 热带亚热带植物学报, 2007, 15(3): 269-276
- Du Y X, Li Y N, Chen D Q. Progress in selenium metabolism and accumulation and key enzymes in plants. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2007, 15(3): 269-276
- [22] 刘声传, 鄢东海, 魏杰. 茶树硒代半胱氨酸甲基转移酶基因生物信息学分析. 西南农业学报, 2013, 26(6): 2221-2226
- Liu S C, Yan D H, Wei J. Bioinformatics analysis of selenocysteine methyltransferase gene involved in selenium enrichment in tea plant. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2013, 26(6): 2221-2226
- [23] 谭振. 茶树叶片中硒代半胱氨酸甲基转移酶转录与表达水平的研究. 合肥: 安徽农业大学, 2009
- Tan Z. Studies on the transcription and expression levels of selenocysteine methyltransferase in the leaves of *Camellia sinensis*. Hefei: Anhui Agricultural University, 2009
- [24] 金亮. 盾叶薯蓣 SMT 基因克隆、表达及其低表达转基因植株的培育. 武汉: 湖北大学, 2012
- Jin L. Molecular cloning and expression of SMT genes in *Dioscorea zingiberensis* and producing SMT low-expression transgenic plants. Wuhan: Hubei University, 2012
- [25] 黎丹, 吴文婧, 黄东益, 谢俊, 赵景梅, 黄小龙, 许云. 毛薯的营养成分分析和聚类分析. 热带作物学报, 2018(3): 575-580
- Li D, Wu W Q, Huang D Y, Xie J, Zhao J M, Huang X L, Xu Y. Nutrition composition and clustering analysis of *Dioscorea esculenta* (Lour.) brukskill. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2018(3): 575-580
- [26] Pickering I J, Wright C, Bubner B, Ellis D, Persans M W, Yu E Y, George G N, Prince R C, Salt D E. Chemical form and distribution of selenium and sulfur in the selenium hyperaccumulator *Astragalus bisulcatus*. *Plant Physiology*, 2003, 131(3): 1460-1467
- [27] Evans C S, Asher C J, Johnson C M. Isolation of dimethyl diselenide and other volatile selenium compounds from *Astragalus racemosus* (Pursh). *Australian Journal of Biological Sciences*, 1968, 21(1): 13-20