

# 大豆 *GmALMT33* 基因在镉胁迫应答中的功能分析

翟佳悦, 宁 伊, 刘丽媛, 王全伟

(哈尔滨师范大学生命科学与技术学院/黑龙江省分子细胞遗传与遗传育种重点实验室, 哈尔滨 150025)

**摘要:** 由于工业发展以及生活废弃物污染的不断加剧, 作物中的重金属浓度超标, 严重威胁人体的健康。铝激活苹果酸转运体编码一类阴离子通道蛋白, 在植物有机酸的跨膜转运中发挥重要的作用。为研究 *GmALMT33* 基因在大豆应对镉胁迫中的功能, 本研究以大豆黑农48的叶片 cDNA 为模板, 利用 RT-PCR 克隆得到 *GmALMT33* 基因。该基因 CDS 区全长 1622 bp, 编码 553 个氨基酸, 含有 1 个 ALMT 结构域。qRT-PCR 结果表明, *GmALMT33* 在大豆根部的表达水平最高; 镉胁迫后, 该基因表达量呈现先升高后降低的趋势。构建植物表达载体 pCPB-*GmALMT33* 并对烟草、大豆毛状根进行遗传转化, 转基因植株抗逆表型与生理指标分析表明, 镉 (66  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CdCl}_2$ ) 胁迫下, 转基因烟草叶片黄化、褪绿, 边缘褐化程度明显低于野生型烟草。转基因大豆毛状根复合体植株茎秆和叶脉呈现的红褐色毒害症状程度明显弱于转空载体植株。在镉胁迫处理 7 d 后, 转基因烟草叶片的超氧化物歧化酶、抗坏血酸过氧化物酶活性及可溶性糖含量均高于野生型对照, 丙二醛含量均低于对照。在镉胁迫处理 0 d、1 d、3 d 后, 转基因大豆毛状根复合体根和叶的超氧化物歧化酶、抗坏血酸过氧化物酶活性、可溶性糖含量均高于转空载体对照, 丙二醛含量均低于对照, 表明 *GmALMT33* 基因提高了植株的耐镉能力。本研究为进一步探讨 *GmALMT33* 基因的作用机制提供了依据, 并为大豆抗逆育种提供了新的基因。

**关键词:** 苹果酸转运蛋白; 镉胁迫; 生物信息学分析; 功能分析

## Functional Analysis of Soybean *GmALMT33* Gene in Response to Cadmium Stress

ZHAI Jiayue, NING Yi, LIU Liyuan, WANG Quanwei

(College of Life Science and Technology, Harbin Normal University /Key Laboratory of Molecular Cytogenetics and Genetic Breeding of Heilongjiang Province, Harbin 150025)

**Abstract:** Due to industrial development and increasing pollution from domestic wastes, heavy metal concentrations in crops are exceeding standards, posing a serious threat to human health. Aluminum-activated malate transporters (ALMT) encode a class of anion channel proteins that play important roles in the transmembrane transport of plant organic acids. In order to investigate the function of *GmALMT33* gene in response to Cd stress in soybean, the *GmALMT33* gene was cloned from soybean using RT-PCR in this study. The CDS region of the gene is 1622 bp in length, encodes 553 amino acids, and contains the ALMT structural domain. qRT-PCR results showed that the expression level of *GmALMT33* was the highest in the roots of soybeans, and the expression of this gene showed a tendency of first increasing and then decreasing after cadmium stress. We constructed the plant expression vector pCPB-*GmALMT33* and genetically transformed tobacco and soybean hairy roots. Phenotypic analysis of the transgenic plants showed that under cadmium stress (66  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CdCl}_2$ ), the leaf blades of the transgenic tobacco were yellowed and greenish, and the degree of

收稿日期: 2023-12-18 网络出版日期: 2024-05-06

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20231218001>

第一作者研究方向为分子遗传学, E-mail: 1414868046@qq.com

通信作者: 王全伟, 研究方向为分子遗传学, E-mail: wqw125@126.com

**基金项目:** 哈尔滨市科技创新人才研究专项(RC2013, QN002103); 黑龙江省博士后资助项目(LBH-Z13185); 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12511154)

**Foundation projects:** Harbin Science and Technology Innovation Talent Research Special Project (RC2013, QN002103); Postdoctoral Funding Program of Heilongjiang Province (LBH-Z13185); Science and Technology Research Project of Heilongjiang Provincial Department of Education (12511154)

browning at the edges was significantly lower than that of wild-type tobacco. The transgenic soybean hairy root complex plants showed significantly weaker degree of reddish-brown toxicity symptoms in stalks and leaf veins than the trans-space vector plants, which indicated that the *GmALMT33* gene improved the toxicity symptoms of transgenic soybean hairy root complex. After 7 d of cadmium stress treatment, the SOD, APX activity and soluble sugar content of transgenic tobacco leaves were higher than those of the wild-type control, and the MDA content was lower than that of the control. After 0 d, 1 d and 3 d of cadmium stress treatment, the SOD, APX activity and soluble sugar content of roots and leaves of transgenic soybean hairy root complex were higher than those of the trans-space vector control, and the MDA content was lower than that of the control. *GmALMT33* gene improved the cadmium tolerance ability of plants. This study provides a basis for further exploring the mechanism of action of *GmALMT33* gene and provides a new gene for soybean stress tolerance breeding.

**Key words:** malate transporter protein; cadmium stress; bioinformatics analysis; functional analysis

大豆 (*Glycine max*) 是世界上优质蛋白质和油脂的重要来源,在食品、饲料和工业上有多种用途。然而在大豆生长过程中,会面临环境中各种生物和非生物胁迫的挑战。近年来,为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愈加严重<sup>[1]</sup>。重金属污染是影响植物生长发育的主要自然因素。有研究表明,在众多重金属污染中,镉(Cd)污染占首位<sup>[2-3]</sup>。镉容易被植物吸收和积累,对作物生长、产量和质量影响巨大。镉是环境中毒性较强的重金属元素之一,是植物生长和人体的非必要元素,具有高毒性、易积累、难降解等特点<sup>[4-5]</sup>,超过一定限度就会导致植物细胞损伤,正常生理代谢受阻,影响植物生长及作物的产量和品质<sup>[6-7]</sup>。因此缓解镉对植物的毒害作用,已经成为当前研究的热点问题,深入研究大豆耐镉机制,对创制大豆耐镉新种质及粮食安全都有着重要的现实意义。

苹果酸转运蛋白(ALMT, Aluminum-activated malate transporter)是植物所特有且广泛存在的一类膜蛋白家族<sup>[8]</sup>,属于阴离子通道蛋白,最初由 Sasaki 等<sup>[9]</sup>在小麦中发现。其主要功能是运输苹果酸,也可以运输阴离子和其他有机酸<sup>[10-11]</sup>。苹果酸可与  $Al^{3+}$  螯合,进而减少铝对细胞壁、细胞膜和其他细胞成分的损害,从而增强植株对铝的抗性。ALMT 蛋白还参与低磷胁迫、盐胁迫等多种非生物胁迫<sup>[12-13]</sup>,在植物气孔开放、矿质营养等基本生理过程中也发挥重要作用<sup>[14]</sup>。近年来,ALMT 基因家族在多个物种中被鉴定,如大豆、铁皮石斛、苹果基因组中分别有 15 个<sup>[15]</sup>、12 个<sup>[16]</sup>、25 个<sup>[17]</sup>ALMT 基因。虽然 ALMT 家族广泛存在于植物中,但只有少数被详细研究过。拟南芥中的 3 个 ALMT 成员 (*AtALMT6*、

*AtALMT9* 和 *AtALMT12*) 和大麦中的 1 个 ALMT 成员通过跨质膜或液泡膜运输有机和无机阴离子,以保护细胞功能<sup>[18-19]</sup>。葡萄 *VvALMT9* 除可以运输苹果酸外,还可以转运酒石酸<sup>[20]</sup>。Liang 等<sup>[21]</sup>证明大豆 *GmALMT1* 是一种质膜苹果酸外流转运体,在大豆耐铝性中起关键作用。蔡冰杰<sup>[22]</sup>研究指出,苜蓿并非特异响应铝胁迫,镉也会诱导 *MsALMT1* 表达上调,但其表达量的高低与胁迫中镉浓度的高低并不呈明显的正相关。另有研究发现,大豆 *GmALMT* 基因家族成员对磷(Pi)饥饿反应不同,*GmALMT* 的表达模式也有很大差异,*GmALMT5* 可通过提高低磷土壤中少量可溶性磷源的利用来提高大豆磷效率<sup>[23]</sup>。对转基因大豆毛状根中 *GmALMT5* 的亚细胞定位和苹果酸分泌的分析表明,*GmALMT5* 是介导苹果酸从根中流出的质膜蛋白。当以少量可溶性钙磷用作外部磷源时,过表达 *GmALMT5* 的转基因拟南芥的生长和磷含量都显著增加<sup>[24]</sup>。土壤盐分是最重要的非生物胁迫之一,可导致作物生产力下降。研究发现,在拟南芥中苹果酸可以作为信号物质在 Cl 通道中起作用,激活促进 Cl 向液泡内转运<sup>[10]</sup>。水稻 *OsALMT1* 参与盐胁迫和渗透胁迫的调节<sup>[25]</sup>。苹果 *MdALMT14* 通过促进苹果酸的积累提高植物耐盐能力<sup>[13]</sup>。*AtALMT9* 主要在保卫细胞中表达,该基因编码的离子通道定位于液泡膜,控制气孔张开,研究发现,*almt9* 突变体表现出明显的抗旱性<sup>[8]</sup>;在干旱胁迫下整株植物可以合成脱落酸来帮助气孔闭合,防止枯萎。*almt4* 突变体对脱落酸的响应可以导致气孔运动,从而使 *almt4* 突变体叶片失水率升高,表现出对干旱敏感的表型<sup>[26]</sup>。

本研究成功克隆了前期在镉胁迫大豆甲基化差异片段中筛选得到的 *GmALMT33* 基因,并利用 qRT-PCR 技术分析其在大豆不同组织及镉胁迫处

理后的表达水平,通过镉胁迫下转基因植株的表型分析和相关生理指标检测分析其在镉胁迫应答中的功能,以期全面解析 *GmALMT33* 基因的作用机制和大豆耐镉品种的培育奠定基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试验材料

试验所使用的大豆黑农48和烟草龙江981,均由黑龙江省农业科学院惠赠。大豆种植方法参考姜静涵等<sup>[27]</sup>。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 镉耐受性鉴定** 选取大小均匀、颗粒饱满的黑农48种子,在0.1%次氯酸钠溶液中消毒5 min后用去离子水反复冲洗,将CdCl<sub>2</sub>配制成质量分数分别为0 mg/L、6 mg/L、10 mg/L、20 mg/L、30 mg/L、50 mg/L的镉溶液,选取50粒黑农48种子,用不同浓度的镉溶液浸种24 h,取出浸泡过的种子,放入MS培养基中。每个处理重复3次,第3天统计发芽

势,第7天统计种子发芽率,计算平均值。

**1.2.2 基因表达模式分析** 选取长势一致的大豆幼苗移至1/2 Hoagland培养液中培养一周,之后在1/2 Hoagland培养液中加入66 μmol/L CdCl<sub>2</sub>进行溶液培养处理,分别在0 h、2 h、6 h、12 h和24 h取材大豆叶片。未经CdCl<sub>2</sub>处理的大豆根、茎、叶进行组织表达分析。每个样品取3株,用液氮速冻后于-80℃冰箱保存备用。利用RNA提取试剂盒(OMEGA)提取镉处理的大豆叶片总RNA并反转录成cDNA。利用大豆 *GmALMT33* 基因定量引物(见表1)进行qRT-PCR扩增,内参基因为 *GmActin11*。反应体系:2×SYBR Green qPCR Master Mix 10 μl; 10 μmol/L *GmALMT33*-F1 (*GmActin11*-F) 0.5 μl; 10 μmol/L *GmALMT33*-R1 (*GmActin11*-R) 0.5 μl; cDNA 1 μl; ddH<sub>2</sub>O 8 μl。反应条件:95℃ 10 min; 95℃ 30 s, 59.9℃ 10 s, 72℃ 4 min, 40个循环后结束反应。设置3次生物学重复,运用2<sup>-ΔΔCt</sup>公式对数据进行分析,确定基因的相对表达量。

表1 本研究所用引物序列

Table 1 Primers used in the study

名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	用途 Application
<i>GmALMT33</i> -F1	CGCTCTCTGATCGTGTCGTT	qRT-PCR
<i>GmALMT33</i> -R1	AGGGTAGCACCTATGCTGAA	
<i>GmActin11</i> -F	CGGTGGTTCTATCTTGGCATC	内参基因
<i>GmActin11</i> -R	GTCTTTCGCTTCAATAACCCTA	
<i>GmALMT33</i> -F2	<u>GATCTAGAAATGGCCGCGAGAGTGGGGT</u>	基因克隆
<i>GmALMT33</i> -R2	<u>CTCCCGGGCCTAGCTACTTGAGCAAAGGTTG</u>	
<i>bar</i> -F	AGTCGACCGTGTACGTCTCC	分子鉴定
<i>bar</i> -R	GAAGTCCAGCTGCCAGAAAC	

单下划线为 *Xba*I 内切酶识别位点,双下划线为 *Sma*I 内切酶识别位点

The single underlined portion is the *Xba*I endonuclease recognition site, the double underlined portion is the *Sma*I endonuclease recognition site

**1.2.3 大豆 *GmALMT33* 基因克隆与生物信息学分析** 根据前期在镉胁迫大豆甲基化差异片段中筛选出的 *GmALMT33* 基因片段,在NCBI数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中同源检索其基因全序列,用Premier 5.0设计引物(表1),以大豆叶片cDNA为模板进行PCR扩增。反应体系:10×Buffer 2.5 μL; 10 mmol/L dNTP 2 μL; 10 μmol/L *GmALMT33*-F2 1 μL; 10 μmol/L *GmALMT33*-R2 1 μL; cDNA 1 μL; *rTaq* 2.5 μL; ddH<sub>2</sub>O 17.25 μL。扩增程序为:94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 59.9℃ 30 s, 72℃ 1.5 min, 32个循

环; 72℃ 10 min。PCR产物纯化回收转化大肠杆菌参考彭亚男<sup>[28]</sup>方法,筛选的阳性克隆由上海生工生物工程股份有限公司完成测序。

使用NCBI的ORF finder查找开放阅读框并进行序列翻译。在NCBI上用CDD(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>)分析 *GmALMT33* 蛋白的保守结构域。利用PSORT工具对 *GmALMT33* 蛋白进行亚细胞定位分析。将 *GmALMT33* 蛋白序列在NCBI上进行BLAST比对,选取同源性较高的部分氨基酸序列,利用MEGA7.0软件构建进化树。

**1.2.4 *GmALMT33* 基因表达载体的构建** 提取测序正确的 pMD-*GmALMT33* 质粒,利用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Sma* I 对植物表达载体 pCPB 进行双酶切,酶切反应体系:10×K Buffer 5 μL;0.1%BSA 5 μL;pCPB 载体 25 μL;*Xba* I 1 μL;*Sma* I 1 μL;ddH<sub>2</sub>O 13 μL。酶切条件:37℃酶切 12 h。*GmALMT33* 基因片段与 pCPB 载体连接,连接体系:*GmALMT33* 3 μL;pCPB 载体片段 5 μL;T4 DNA 连接酶 1 μL;10×T4 Buffer 1 μL。连接条件:16℃过夜连接。采用菌液 PCR(反应体系同 1.2.3)和双酶切对重组载体进行验证。

**1.2.5 转 *GmALMT33* 基因烟草及大豆毛状根复合植株的获得及鉴定** 通过冻融法将 pCPB-*GmALMT33* 转入农杆菌 EHA105 感受态中,叶盘法<sup>[29]</sup>转化烟草叶片。共培养后在 MS 培养基上进行愈伤组织的诱导、芽的分化和生根,最终移入土壤中培养。

通过冻融法将重组植物表达载体 pCPB-*GmALMT33* 和 pCPB 空载体分别转化到发根农杆菌 9402 中。将发根农杆菌 9402 菌液震荡培养至 OD<sub>600</sub>=0.7。取 6~7 日龄大豆幼苗在子叶节近胚轴 1 cm 处斜切,在子叶节近胚轴 3 mm 处制造伤口。将处理好的大豆外植体在重悬菌液中浸泡 30 min 后放置于被 1/2 Hoagland 营养液浸湿的滤纸上,遮光培养 48 h 后移栽到蛭石中,7~8 天即可长出毛状根。待长出毛状根后,14 h(光照)/10 h(黑暗),光照 28℃/黑暗 20℃,温室培养 3 周。

采用 CTAB 法<sup>[30]</sup>提取转基因烟草叶片和大豆毛状根基因组 DNA,用载体上的 *bar* 基因引物对转基因植株基因组 DNA 进行 PCR 扩增,反应体系同 1.2.3。扩增程序为:94℃ 3 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 15 s,30 个循环;72℃ 5 min。产物经琼脂糖凝胶电泳检测。利用 RNA 提取试剂盒(OMEGA)提取大豆毛状根 RNA,反转录获得 cDNA,进行 qRT-PCR 鉴定,反应体系、反应条件同 1.2.2。

**1.2.6 转 *GmALMT33* 基因植株的功能分析** 转 *GmALMT33* 基因植株抗逆表型分析 各取 3 株生长状态较一致的野生型和转基因烟草叶片,用直径 7 mm 的打孔器打孔,分别置于含有 66 μmol/L CdCl<sub>2</sub> 的 MS 固体培养基上,于 25℃,16 h(光照)/8 h(黑暗)的条件下,胁迫处理 7 d,观察叶片的变化,并拍照记录,设置 3 次生物学重复和技术重复。选取 3 周龄,同一生长状态的转基因及转空

载体大豆毛状根复合体植株各 3 株,转移至 1/2 Hoagland 营养液中培养一周,然后用含 66 μmol/L CdCl<sub>2</sub> 的 1/2 Hoagland 营养液进行镉胁迫。胁迫处理 7 d,拍照记录植株表型,设置 3 次生物学及技术重复。

**转 *GmALMT33* 基因植株生理指标测定** 取经含 66 μmol/L CdCl<sub>2</sub> 的 1/2 Hoagland 溶液胁迫处理 0 d、1 d、3 d 的转基因及转空载体大豆毛状根复合体植株的根和叶片,进行生理指标检测。将生长一致的转基因和野生型烟草幼苗移植到土壤:蛭石=1:1 中,待缓苗后,进行镉胁迫处理。处理组浇灌 100 μmol/L CdCl<sub>2</sub>,对照组浇灌等量的水,处理 7 d。对处理 7 d 的野生型和转基因烟草各 3 株植物叶片进行超氧化物歧化酶(SOD, superoxide dismutase)活性、抗坏血酸过氧化物酶(APX, ascorbate peroxidase)活性、丙二醛(MDA, malondialdehyde)含量等测定,生理指标测定试验每组重复 3 次,用 SPSS 对数据进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 大豆黑农 48 镉耐受性鉴定分析

种子的发芽率是反映植物重金属胁迫的一个基本指标。不同浓度 CdCl<sub>2</sub> 对黑农 48 种子发芽率会产生一定的抑制作用,随着 CdCl<sub>2</sub> 浓度升高,抑制作用明显增强。当 Cd<sup>2+</sup> 浓度为 6 mg/L 时,对黑农 48 种子的萌发表现为刺激作用,Cd<sup>2+</sup> 浓度达到 10 mg/L、20 mg/L、30 mg/L、50 mg/L 时,对种子萌发表现为显著的抑制作用(表 2)。当种子发芽 3 d 时,测定发芽势,从测得的结果可以看出,黑农 48 种子的发芽势均随着 Cd<sup>2+</sup> 处理浓度的升高而降低(表 2)。通过测定黑农 48 种子在镉胁迫下的发芽率和发芽势,参考其他作物镉耐受等级表明黑农 48 表现出对镉耐受性较弱。

### 2.2 大豆不同组织和镉胁迫下 *GmALMT33* 基因的表达模式分析

qRT-PCR 结果显示,*GmALMT33* 基因在大豆根、茎、叶中均有表达,但表达模式有显著差异。*GmALMT33* 基因的表达量在根中最高,在茎和叶中显著降低。大豆植株经 66 μmol/L CdCl<sub>2</sub> 处理后,*GmALMT33* 的表达量显著升高,其中胁迫 6 h 时表达量最高,是对照(0 h)的 8.2 倍(图 2),表明 *GmALMT33* 基因在大豆响应重金属镉胁迫中可能发挥重要作用。

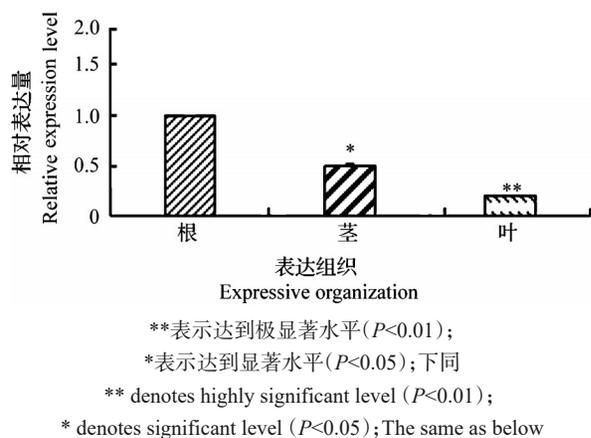
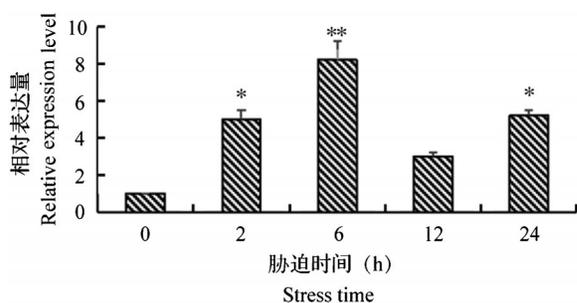
表2 黑农48发芽率与发芽势

Table 2 The germination rate and germination potential of Heinong 48

指标 Target	对照 Control	处理浓度 (mg/L) Treatment concentration				
		6	10	20	30	50
发芽率 (%) Germination rate	92.70±0.01 <sup>ab</sup>	94.67±0.01 <sup>ab</sup>	78.00±0.02 <sup>b</sup>	64.67±0.01 <sup>b</sup>	46.00±0.02 <sup>b</sup>	26.67±0.02 <sup>b</sup>
发芽势 (%) Germination force	96.67±0.01 <sup>b</sup>	75.33±0.03 <sup>b</sup>	54.67±0.02 <sup>b</sup>	46.67±0.02 <sup>b</sup>	35.33±0.03 <sup>b</sup>	21.33±0.03 <sup>b</sup>

数据后小写字母a代表无显著差异, b代表差异显著 ( $P < 0.05$ )

The lowercase letter a after the data represents no significant difference, while b represents significant difference ( $P < 0.05$ )

图1 *GmALMT33* 基因在不同组织中的表达模式Fig. 1 The expression patterns of *GmALMT33* gene in tissue图2 *GmALMT33* 基因在镉胁迫下的表达模式Fig. 2 The expression patterns of *GmALMT33* gene under different time of  $\text{CdCl}_2$  stress

### 2.3 *GmALMT33* 的克隆及生物信息学分析

利用 *GmALMT33* 特异引物从大豆叶片 cDNA 中扩增获得 1770 bp 的 DNA 片段 (图 3A), 编码 553 个氨基酸, 预测蛋白分子量为 137 kDa, 等电点 (PI) 4.99, 为酸性蛋白。亚细胞定位预测结果表明 (图

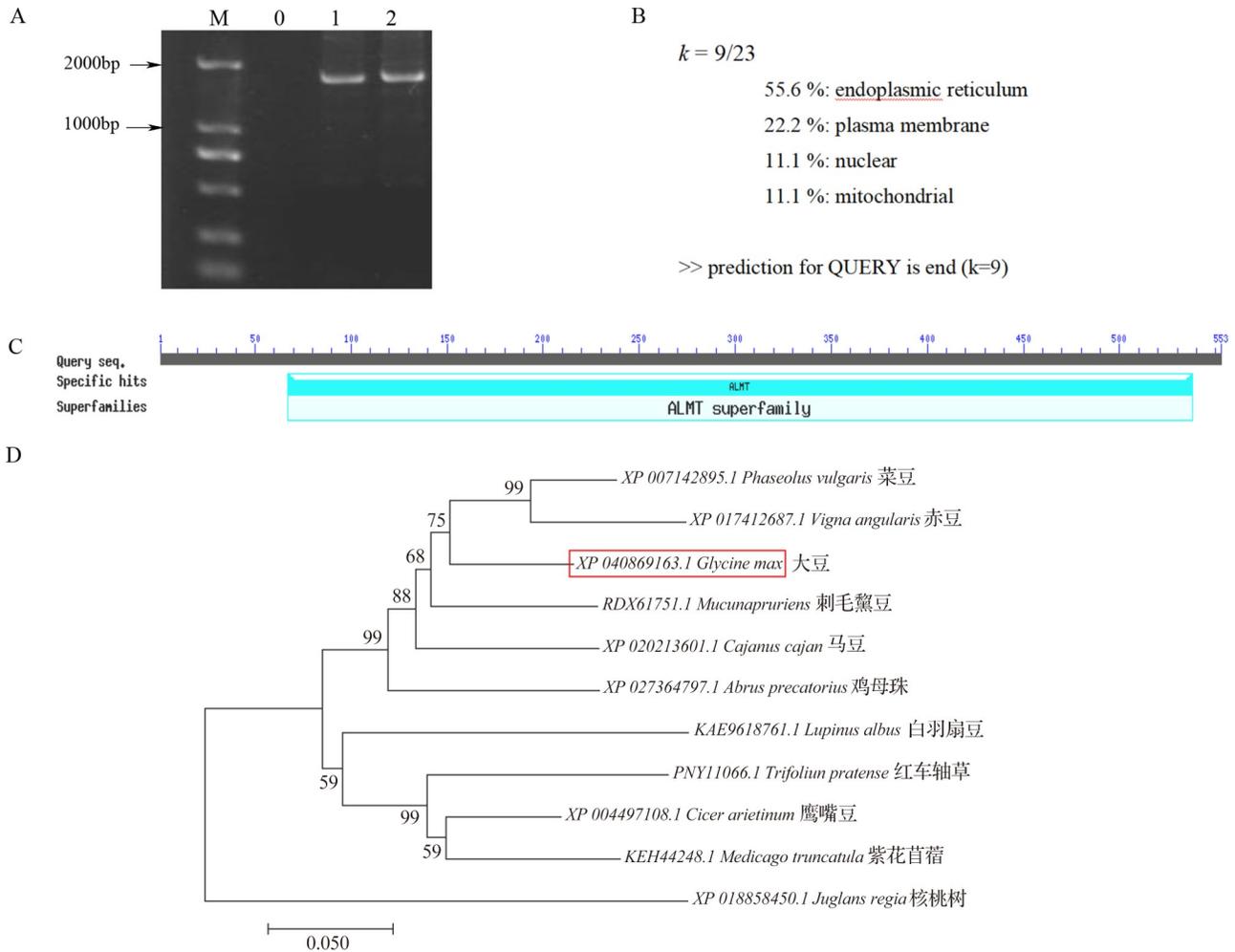
3B), *GmALMT33* 蛋白主要定位于内质网中, 说明该蛋白可能参与细胞质中消耗能量较多的细胞活动。 *GmALMT33* 蛋白在 67~538 位氨基酸之间含有 1 个 ALMT 结构域 (图 3C)。系统进化分析发现, *GmALMT33* 蛋白与豆科植物菜豆、木豆、豇豆、相思子、豇豆、鹰嘴豆中同源蛋白在进化上处于同一分支, 蛋白相似性达 80% 以上。其中 *GmALMT33* 与菜豆中同源蛋白亲缘关系最近 (图 3D), 蛋白相似性为 87.25%。 *GmALMT33* 蛋白同车轴草、紫花苜蓿、白羽扇豆、核桃中同源蛋白不处于同一进化分支, 表明亲缘关系较远。

### 2.4 pCPB-*GmALMT33* 植物表达载体构建及转基因植株的获得

借助 *Xba* I 和 *Sma* I 内切酶将 *GmALMT33* 与植物表达载体 pCPB 连接, 重组质粒双酶切后得到 1770 bp 的目的基因条带 (图 4A), 表明重组载体 pCPB-*GmALMT33* 构建成功。

农杆菌侵染烟草叶片后, 经共培养、愈伤组织的诱导、芽的分化、生根培养, 最终移栽入土壤中, 获得草胺磷抗性再生植株 (图 4B)。大豆种子经蛭石培养发芽, 发根农杆菌侵染子叶节后, 继续用蛭石培养诱导产生毛状根复合体植株, 最后用营养液水培得到毛状根复合体植株 (图 4C)。获得的转基因烟草及大豆毛状根复合体植株, 利用 *bar* 基因引物进行鉴定 (图 4D、4E), 结果表明获得了阳性植株。

对阳性转基因大豆毛状根与转空载体毛状根进行 qRT-PCR 鉴定 (图 4F), 转基因毛状根的 *GmALMT33* 基因相对表达量高于转空载体毛状根的表达量, 约为 2.5 倍。



A: *GmALMT33* 基因 PCR 扩增结果; M: DL 2000 DNA 标记; 0: 空白对照; 1~2: *GmALMT33* 基因; B: *GmALMT33* 蛋白亚细胞定位预测; C: *GmALMT33* 蛋白结构域预测; D: *GmALMT33* 蛋白系统进化树

A: PCR amplification results of *GmALMT33* gene; 0: Water control; 1-2: *GmALMT33* gene; B: Prediction of *GmALMT33* protein subcellular localization; C: Prediction of *GmALMT33* protein structural domains; D: Phylogenetic tree of *GmALMT33* protein

图 3 大豆 *GmALMT33* 基因的克隆与序列分析

Fig. 3 Cloning and sequence analysis of soybean *GmALMT33* gene

## 2.5 转 *GmALMT33* 基因植株的功能分析

### 2.5.1 镉胁迫下转基因植株表型分析

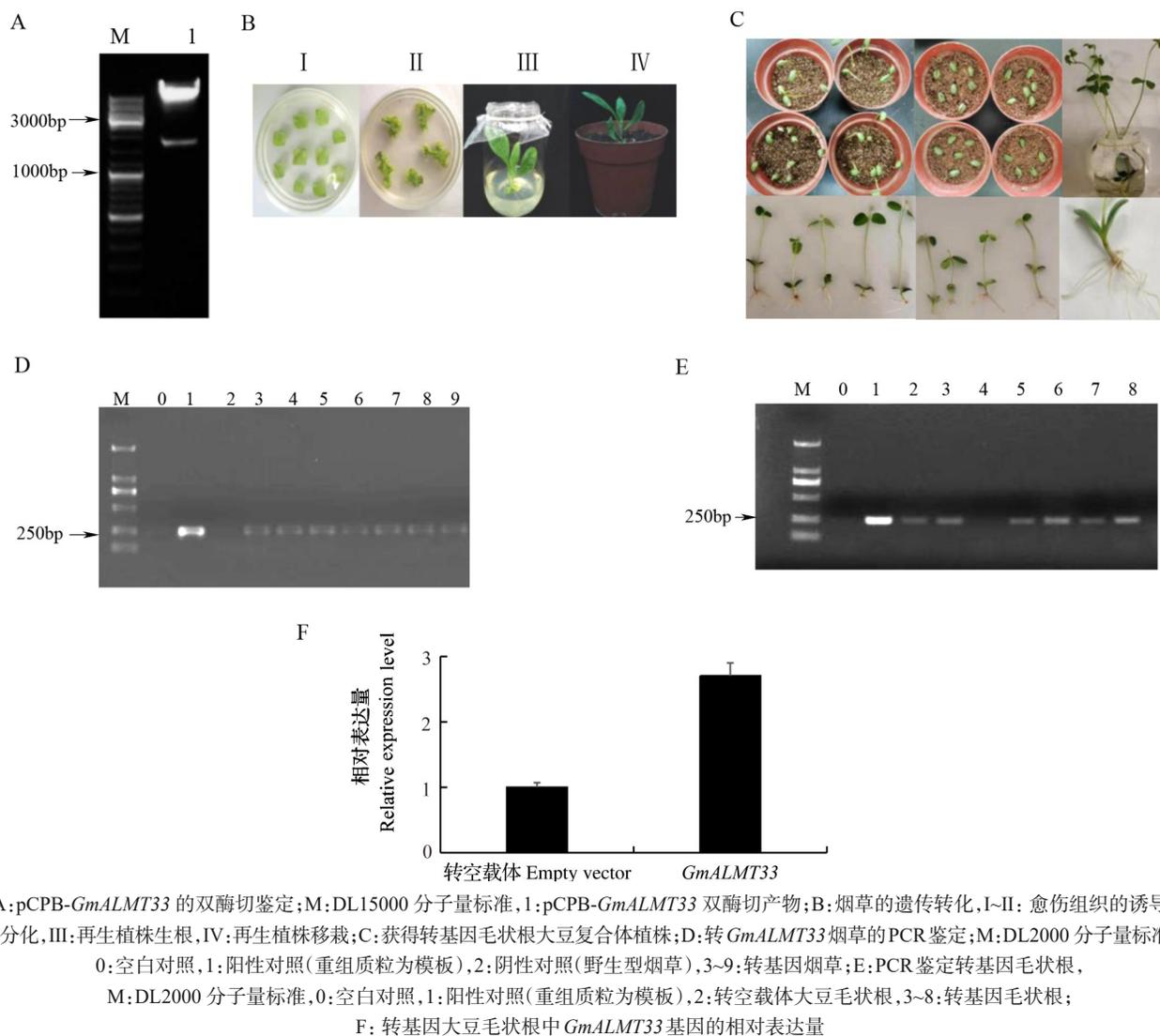
转基因烟草植株表型分析 CdCl<sub>2</sub> 胁迫处理结果显示(图 5A), 与胁迫前(0 d)相比, 胁迫 3 d 的野生型烟草叶片即已出现轻微褪绿、黄化现象; 随着胁迫时间的延长, 叶片黄化、褪绿逐渐加重, 至胁迫 7 d, 所有烟草叶片的整个叶面均明显黄化, 且少数叶片出现边缘褐化现象。而转基因烟草在胁迫 3 d 时叶色与胁迫前(0 d)相比无变化, 胁迫 5 d 时才出现轻度褪绿、黄化, 至胁迫 7 d 时黄化加剧, 但约一半的叶片叶面上仍保有一定的绿色。可见转基因烟草叶片黄化的时间晚于野生型, 黄化的程度也低于野生型, 表明 *GmALMT33* 基因能够提高转基因植株对镉胁迫的耐受性。

镉胁迫下转基因大豆毛状根复合体植株表型

分析 CdCl<sub>2</sub> 胁迫结果显示(图 5B), 胁迫 7 d 时, 转空载体和转基因大豆毛状根复合体植株与胁迫前(0 d)相比均出现镉毒害现象, 茎秆出现红褐色, 并且从植株的形态学下端向上蔓延, 但转空载体植株叶柄出现红褐色并蔓延至叶脉, 而转基因植株叶柄处只出现少许红褐色。说明 *GmALMT33* 基因能够在一定程度上增强植株对镉胁迫的耐受性。

### 2.5.2 镉胁迫下转基因植株生理指标分析

转基因烟草生理指标分析 由图 6A 可知, 在正常生长条件下, 野生型烟草与转基因烟草叶片 SOD、APX 活性、MDA、可溶性糖含量均无显著性差异。镉胁迫处理 7 d 后, 野生型烟草与转基因烟草植株的 4 种生理指标均升高, 其中转基因植株的 APX、SOD 活性、可溶性糖含量均极显著高于野生



A: pCPB-*GmALMT33* 的双酶切鉴定; M: DL15000 分子量标准, 1: pCPB-*GmALMT33* 双酶切产物; B: 烟草的遗传转化, I-II: 愈伤组织的诱导和分化, III: 再生植株生根, IV: 再生植株移栽; C: 获得转基因毛状根大豆复合体植株; D: 转 *GmALMT33* 烟草的 PCR 鉴定; M: DL2000 分子量标准; 0: 空白对照, 1: 阳性对照 (重组质粒为模板), 2: 阴性对照 (野生型烟草), 3~9: 转基因烟草; E: PCR 鉴定转基因毛状根, M: DL2000 分子量标准, 0: 空白对照, 1: 阳性对照 (重组质粒为模板), 2: 转空载体大豆毛状根, 3~8: 转基因毛状根; F: 转基因大豆毛状根中 *GmALMT33* 基因的相对表达量

A: Dual enzyme cleavage identification of pCPB-*GmALMT33*; 1: pCPB-*GmALMT33* dual enzyme cleavage product, B: Genetic transformation of tobacco, I-II: Healing tissue induction and differentiation, III: Rooting of regenerated plants, IV: Transplantation of regenerated plants; C: Cultivation process of soybean composite plants transgenic for hairy roots; D: PCR identification of trans-*GmALMT33* tobacco; 0: Blank control; 1: Positive control (recombinant plasmid as a template), 2: Negative control (wild type tobacco), 3-9: Transgenic tobacco; E: PCR identification of transgenic hairy root; 0: Blank control, 1: Positive control (recombinant plasmid as a template), 2: Soybean hairy roots transformed into empty carriers, 3-8: Transgenic hairy root; F: Relative expression of *GmALMT33* gene in hairy roots of soybean

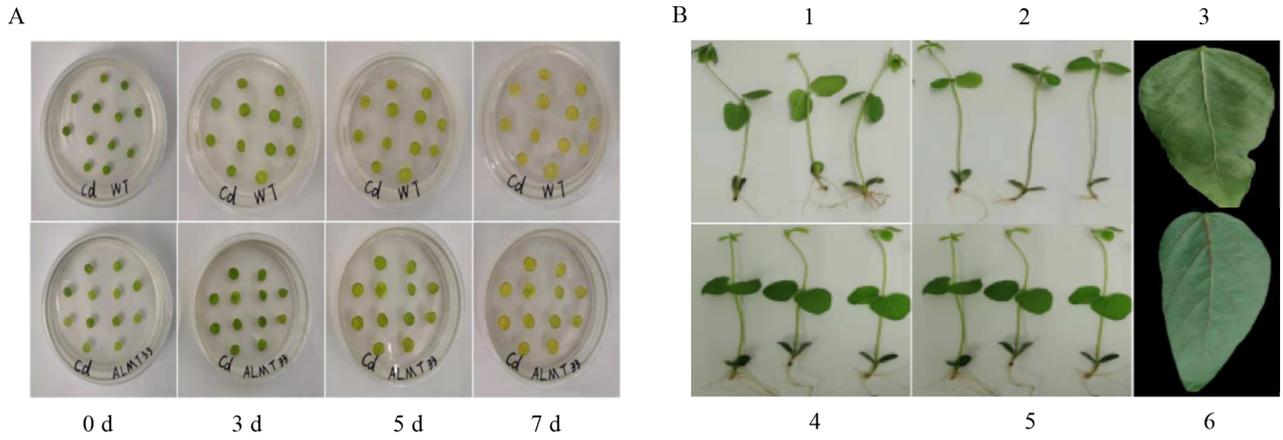
图4 植物表达载体的构建及转 *GmALMT33* 基因植株的获得及鉴定

Fig.4 Construction of plant expression vectors and acquisition and characterization of transgenic *GmALMT33* plants

型,较野生型植株分别升高 1.20%、1.05% 和 1.38%; MDA 含量极显著低于野生型,较野生型低 1.22%。

镉胁迫下转基因大豆毛状根复合体植株生理指标分析 由图 6B 可知,在正常生长条件下,转空载体与转基因毛状根复合体植株根和叶中 SOD、APX 活性、MDA、可溶性糖含量均无显著差异。镉胁迫处理后,二者的根和叶中 SOD、APX 活性均持续升高,但转基因植株应答更强烈,两种酶活性均高于对照,且 SOD 活性差异显著。MDA 含量在胁迫后均持续升高,但转基因植株根和叶中 MDA 含量极显著低于转空载体植株。转基因植株和对照

植株根和叶中可溶性糖含量在胁迫后均升高,且转基因植株可溶性糖含量始终高于对照,在根中达到了极显著水平。胁迫 1 d 时和 3 d 时,转基因植株毛状根 SOD 活性分别比对照升高 50.65%、7.50%; APX 活性分别比对照升高 14.18%、14.12%; MDA 含量分别比对照降低 32.53%、25.31%; 可溶性糖含量分别比对照升高 60.89%、30.00%。胁迫 1 d 时和 3 d 时,转基因植株叶片 SOD 活性分别比对照升高 54.96%、50.46%; APX 活性分别比对照升高 17.25%、16.44%; MDA 含量分别比对照降低 71.77%、49.25%; 可溶性糖含量分别比对照升高 13.28%、8.20%。

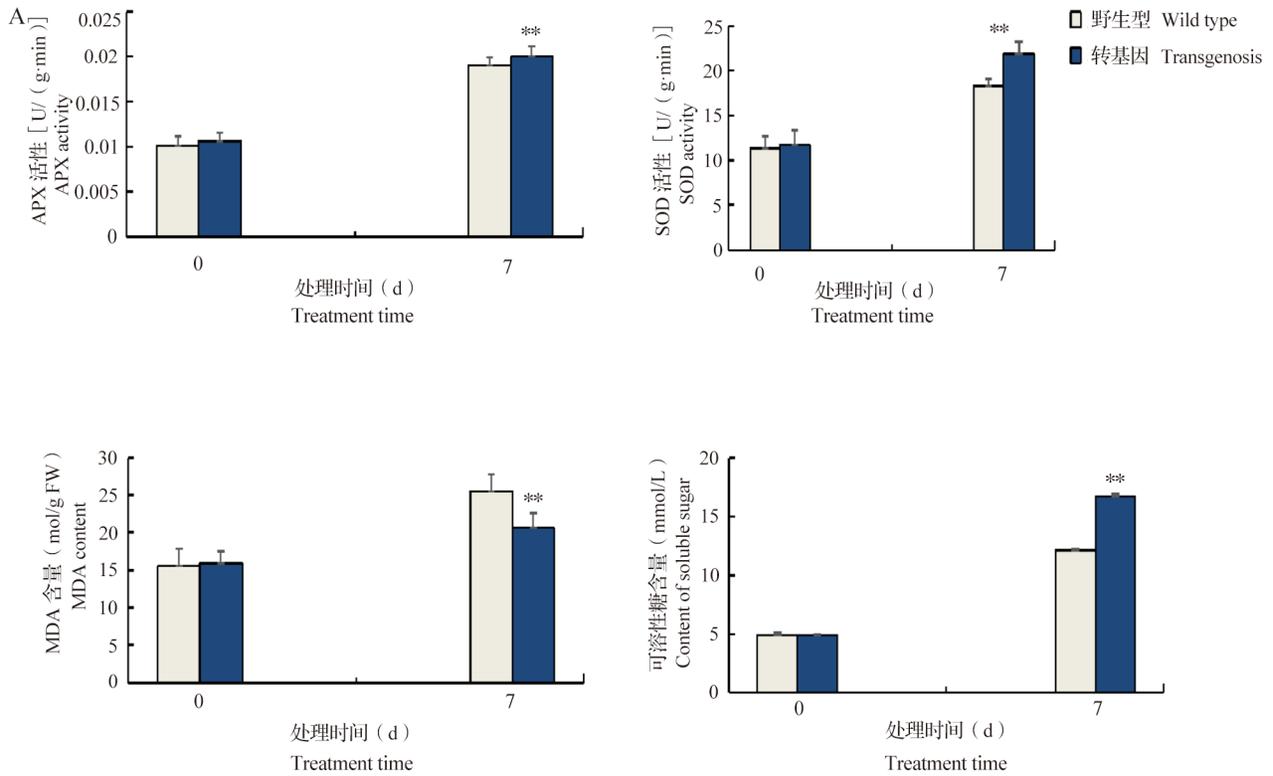


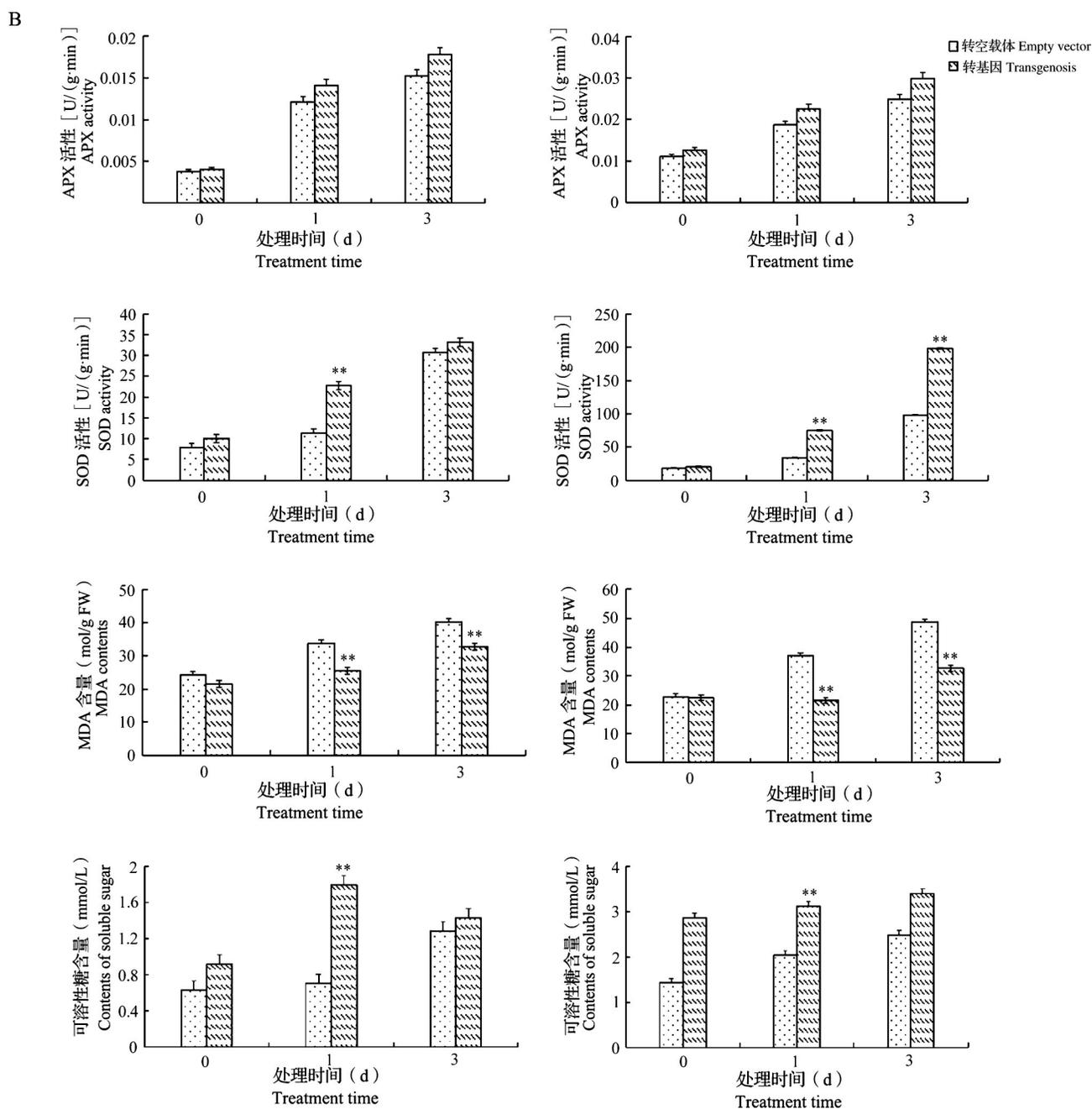
A: 66  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CdCl}_2$  胁迫处理烟草叶片表型; B: 66  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CdCl}_2$  胁迫处理转基因大豆毛状根复合体表型, 1~2: 转空载体大豆毛状根复合体植株分别胁迫 0 d、7 d, 3: 转空载体大豆毛状根复合体植株胁迫 7 d 的叶片, 4~5: 转基因大豆毛状根复合体植株分别胁迫 0 d、7 d, 6: 转基因大豆毛状根复合体植株胁迫 7 d 的叶片

A: 66  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CdCl}_2$  stress-treated tobacco leaf phenotype; B: 66  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CdCl}_2$  stress-treated transgenic soybean hairy root complex phenotype, 1-2: Trans-empty vector soybean hairy root complex plants stressed for 0 d and 7 d, respectively, 3: Trans-empty vector soybean hairy root complex plants stressed for 7 d, 4-5: Transgenic soybean hairy root complex plants stressed for 0 d and 7 d respectively, 6: Transgenic soybean hairy root complex plants stressed for 7 d in leaves

图5 转 *GmALMT33* 基因植株表型

Fig. 5 Phenotypic of transgenic *GmALMT33* plants





A: 镉胁迫处理下转基因烟草中的APX、SOD活性和MDA、可溶性糖含量; B: 镉胁迫处理下转基因大豆毛状根复合体植株根(左)和叶片(右)中的SOD、APX活性及MDA、可溶性糖含量

A: APX, SOD activity, MDA and soluble sugar content in transgenic tobacco under cadmium stress treatment; B: SOD, APX activity, MDA and soluble sugar content in roots (left) and leaves (right) of transgenic soybean hairy root complex plants under cadmium stress treatment

图6 转 *GmALMT33* 基因植株生理指标

Fig. 6 Physiological indexes of transgenic *GmALMT33* plants

### 3 讨论

铝激活苹果酸转运体基因家族广泛存在于陆生植物体内,在植物有机酸的跨膜转运中起着重要作用。目前对 *ALMT* 基因家族成员的功能研究涉及其增强植物对重金属镉胁迫的耐受性<sup>[31-32]</sup>、有机酸

的运输和气孔开闭<sup>[33]</sup>等。在众多植物中, *ALMT* 基因家族在拟南芥、紫花苜蓿和小麦等作物中有较为广泛深入的研究,但在大豆中研究相对较少。大豆是全球重要的农作物,是植物油和优质蛋白的重要来源。为探究豆科植物中 *ALMT* 基因家族的功能及其在重金属镉胁迫下的表达模式,本研究以 *GmALMT33* 基因为研究对象,对其在镉胁迫中的功

能进行了探讨。

蛋白的结构及其在细胞中的定位与其功能紧密相关。有研究表明 ALMT 作为一类相对保守的蛋白,其大多数家族成员都含有一个或多个 PF11744 结构域,二级结构预测结果也表明大多数 ALMT 蛋白在 N 端含有 5~7 个疏水跨膜结构域,在 C 端含有亲水区<sup>[34]</sup>。本研究成功克隆了 *GmALMT33* 基因,生物信息学分析表明,该基因编码的蛋白属于酸性、亲水性蛋白,无信号肽,亚细胞定位预测结果显示 ALMT33 主要定位于内质网和线粒体中,含有 ALMT 结构域,符合 ALMT 家族的结构特征。在其他作物中,也有相似的研究结果。拟南芥 *AtALMT9* 定位于液泡膜,参与细胞内苹果酸平衡的调节<sup>[35]</sup>;小麦 *TaALMT1* 含有 6 个跨膜结构域,定位于细胞膜,参与苹果酸的外排以增加植物铝耐受性<sup>[18]</sup>;苹果 *MdALMT13* 含有 5 个跨膜结构域,也定位于细胞膜<sup>[36]</sup>;番茄 *SIALMT5* 定位于内质网中<sup>[37]</sup>,而番茄 *SIALMT9* 定位于液泡膜中,*SIALMT5* 与种子中苹果酸含量有关,*SIALMT9* 具有果实苹果酸调控和根系耐铝毒的双重功能<sup>[38]</sup>。*GmALMT33* 基因编码蛋白预测其定位于内质网中,推测其通过参与细胞内苹果酸的外排来参与大豆镉响应以及一定程度上减轻镉离子对根系的毒害。

基因的时空表达特异性也与基因的功能直接相关。有研究证明 *ALMT* 基因多在根系或叶片中特异性表达<sup>[39]</sup>。本研究获得的 *GmALMT33* 基因在大豆根、茎、叶中均有表达,且在根中表达量显著高于茎和叶。镉胁迫后 *GmALMT33* 基因的表达水平显著上调,这与苜蓿 *MsALMT1* 基因受镉胁迫后的表现相似<sup>[40]</sup>,*MsALMT1* 在受到镉胁迫时基因表达量显著上调。推测 *GmALMT33* 基因在大豆抵御镉胁迫中发挥重要作用。

Taoufik 等<sup>[41]</sup>研究表明,镉会破坏光收集复合体 II 和光系统 I、II,阻碍光合作用的光化学反应和羧化反应,破坏叶绿体代谢。*GmALMT33* 基因转化烟草和大豆毛状根表型分析显示,当处于镉胁迫环境中,野生型和转基因烟草叶片受镉毒害出现褪绿、黄化等现象,说明镉胁迫能造成叶绿素合成的受阻,但转基因烟草叶片生长未受到抑制,而野生型烟草生长则相反;同样的,镉胁迫处理后,转空载体和转基因大豆复合体植株的茎秆和叶脉均呈现红褐色的镉毒害症状,但转基因植株叶柄的褐化症状没有和野生型一样向叶脉蔓延,受镉毒害程度弱于转空载体对照。

遗传转化的结果均证明 *GmALMT33* 基因能够在一定程度上稳定植株体内的稳态,降低镉对植株的损伤,提高植株对镉胁迫的耐受性。

在重金属胁迫下,植物已经发展出各种防御机制来减轻氧化应激的影响,包括活性氧解毒酶,如超氧化物歧化酶、抗坏血酸过氧化物酶、过氧化氢酶和谷胱甘肽还原酶,以及低分子量抗氧化剂,如抗坏血酸、谷胱甘肽、类胡萝卜素和金属硫蛋白<sup>[42]</sup>。为评价 *GmALMT33* 基因在植物镉胁迫应答中的生理机制,本研究对大豆毛状根复合体植株的根和叶片进行了 SOD、APX 活性及可溶性糖、MDA 含量的检测,重金属胁迫会导致植物生成大量的活性氧,使膜脂过氧化而产生 MDA,因此 MDA 含量的高低在一定程度上能反映脂膜过氧化程度<sup>[43]</sup>。而植物体内的抗氧化酶则会清除活性氧,减轻重金属对植物的毒害作用<sup>[44]</sup>。SOD、APX 是清除植物体内活性氧的重要防御酶,是植物活性氧清除机制的重要组成部分。有研究证明转 *MdALMT13* 的苹果植株经盐或碱处理后根中 SOD、POD 活性均显著高于野生型,可以通过提高抗氧化酶活性提高植物的耐盐和耐碱性。本研究中,当处于镉胁迫时,转基因烟草叶片及大豆毛状根复合体植株叶片和根的 SOD、APX 活性均高于对照,表明 *GmALMT33* 基因的表达可调节抗氧化酶活性,降低镉对植株的氧化毒害。渗透调节物质的积累也是植物抵御一些非生物胁迫的重要方式。可溶性糖广泛参与渗透调节,其含量越高,植物在逆境下细胞失水的可能性越小,对逆境的抵御能力越强。本研究发现 *GmALMT33* 基因的转入可以提高植株可溶性糖的积累,因而降低了镉毒造成的渗透损伤,这也是增强植株对镉耐受性的重要原因。

*GmALMT33* 基因在大豆应对镉胁迫中发挥了重要的调控作用,能够在一定程度上提高植株的耐镉能力,但其具体的作用机制还有待后续进一步研究。

## 4 结论

克隆获得 *GmALMT33* 基因,该基因在大豆根、茎、叶中均有表达,但在根中表达水平最高,同时该基因被镉胁迫诱导显著上调表达。镉胁迫下转基因烟草及转基因大豆毛状根复合体植株表型及生理分析结果进一步说明 *GmALMT33* 基因可以提高植株对镉的耐受性。

## 参考文献

- [1] 符云聪,朱晓龙,袁磊,解晓露,李鹏祥,朱维,黎红亮,刘代欢.小麦对镉的吸收、富集及其镉污染预测研究进展.中国农学通报,2020,36(6):37-41  
Fu Y C, Zhu X L, Yuan C, Xie X L, Li P X, Zhu W, Li H L, Liu D H. Cadmium absorption and enrichment in wheat and its cadmium pollution prediction: Research progress. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2020, 36(6): 37-41
- [2] 陈华,陈永快,王涛,黄语燕,廖水兰,兰婕,康育鑫.水杨酸对镉胁迫下不结球白菜幼苗生长及生理的响应.福建农业学报,2020,35(12):1321-1329  
Chen H, Chen Y K, Wang T, Huang Y Y, Liao S L, Lan J, Kang Y X. Effects of salicylic acid on growth and physiology of non-heading Chinese cabbage seedlings under cadmium stress. Fujian Journal of Agriculture Science, 2020, 35(12): 1321-1329
- [3] 蒋欣梅,薛冬冬,于锡宏,吴凤芝,许铎月,李钰锋,曲娟娟,闫雷.玉米秸秆生物炭对镉污染土壤中小白菜生长的影响.江苏农业学报,2020,36(4):1000-1006  
Jiang X M, Xue D D, Yu X H, Wu F Z, Xu H Y, Li Y F, Qu J J, Yan L. Effects of con-stalk biochar on the growth of Chinese cabbage in cadmium contaminated soil. Jiangsu Journal of Agriculture Science, 2020, 36(4):1000-1006
- [4] 李明月,张文婷,李阳,张保龙,杨立明,王金彦.小肽Ospep5对水稻耐镉性的影响.作物学报,2024,50(1):67-75  
Li M Y, Zhang W T, Li Y, Zhang B L, Yang L M, Wang J Y. Effects of small peptide Ospep5 on cadmium tolerance in rice. Acta Agronomica Sinica, 2024, 50(1): 67-75
- [5] 赵晓鑫,黄烁淇,谭文勃,兴旺,刘大丽.甜菜HPPs基因家族鉴定与镉胁迫下的表达分析.作物学报,2023,49(12):3302-3314  
Zhao X X, Huang S Q, Tan W B, Xing W, Liu D L. Identification and relative expression profile of HPPs gene family cadmium stress in sugar beet. Acta Agronomica Sinica, 2023, 49(12): 3302-3314
- [6] Length Y, Li Y, Wen Y, Zhao H, Wang Q, Li S W L. Transcriptome analysis provides molecular evidences for growth and adaptation of plant roots in cadmium-contaminated environments. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2020, 204: 111098-111098
- [7] 徐佳慧,王萌,张润,吴玲玲.土壤镉污染的生物毒性研究进展.生态毒理学报,2020,15(05):82-91  
Xu J H, Wang M, Zhang R, Wu L L. Toxicity of cadmium pollution in soil to organisms: A review. Asian Journal of Ecotoxicology, 2020, 15(05):82-91
- [8] 张慧,李泽锋,徐国云,金静静,王晨,翟妞,金立锋,郑庆霞,陈千思,刘萍萍,周会娜.普通烟草ALMT基因家族的鉴定与表达分析.烟草科技,2020,53(5):1-9  
Zhang H, Li Z F, Xu G Y, Jin J J, Wang C, Zhai N, Jin L F, Zheng Q X, Chen Q S, Liu P P, Zhou H N. Identification and expression analysis of ALMT gene family in *Nicotiana tobaccae*. Tobacco Science & Technology, 2020, 53(5):1-9
- [9] Sasaki T, Yoko Y, Bunichi E, Maki, K, Sung J, Ahn S J, Peter R R, Emmanuel D, Hideaki M. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology, 2004, 37(5):645-53
- [10] Barbier-Brygoo H, Angeli D A, Filleur S. Anion Channels/Transporters in plants: From molecular bases to regulatory networks. Annual Review of Plant Biology, 2011, 62(1): 25-51
- [11] Palmer-Antongy J, Baker A, Muench-Stephen P. The varied functions of aluminium-activated malate transporters-much more than aluminium resistance. Biochemical Society Transactions, 2016, 44(3):856-62
- [12] 李姣姣,梁翠月,廖红.低磷胁迫对大豆苹果酸转运子GmALMT家族的表达调控//中国作物学会,中国细胞生物学学会,中国遗传学会,中国植物生理与分子生物学学会,中国植物学会.2013全国植物生物学大会论文集.华南农业大学亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室,资源环境学院根系生物学研究中心,2013:176  
Li J J, Liang C Y, Liao H. Regulation of the expression of the GmALMT family of malate transporters in soybean by low phosphorus stress//The Crop Science Society of China, Chinese Society For Cell Biology, Genetics Society of China, Chinese Society for Plant Biology, Botanical Society of China. Proceedings of the 2013 National Congress of Plant Biology. State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, South China Agricultural University, Root Biology Center, College of Resources and Environment, 2013:176
- [13] 路静.苹果酸转运蛋白MdALMT14调控苹果耐盐的功能研究.泰安:山东农业大学,2019  
Lu J. Functional characterization in salt tolerance of a malate transporter MdALMT14 in apple. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2019
- [14] 魏志敏,李亚林,黄鑫,李学文,吴飞华,刘家友,喻敏.植物阴离子通道铝激活苹果酸转运体ALMTs在植物营养与生理中的作用.植物生理学报,2023,59(6):1072-1082  
Wei Z M, Li Y L, Huang X, Li X W, Wu F H, Liu J Y, Yu M. The role of plant anion channel aluminum-activated malate transporters (ALMTs) in plant nutrition and physiology. Plant Physiology Journal, 2023, 59(6):1072-1082
- [15] Peng W T, Wu W W, P J U, Li J J, Li Y. Characterization of the soybean GmALMT family genes and the function of GmALMT5 in response to phosphate starvation. Journal of integrative plant biology, 2018, 60(3): 216-231
- [16] 彭福程.铁皮石斛ALMT基因家族全基因组研究及昼夜表达模式的分析.北京:中国林业科学研究院,2020  
Peng F C. Genome-wide study of ALMT gene family in *Dendrobium catenatum* and analysis of expression profiles during day and night. Beijing: Chinese Academy of Forestry, 2020
- [17] Ma B Q, Yuan Y Y, Gao M, Qi T H, Li M J, Ma F W. Genome-wide identification, molecular evolution, and expression

- divergence of aluminum-activated malate transporters in Apples. *International Journal of Molecular Science*, 2018, 19(9):2807-2807
- [18] Xu M Y, Gruber B D, Delhaize E, White R G, James R A, You J F, Yang Z M, Ryan P R. The barley anion channel, *HvALMT1*, has multiple roles in guard cell physiology and grain metabolism. *Physiologia Plantarum*, 2015, 153:183-193
- [19] Miguel A Piñeros, Geraldo M A Cançado, Lyza G Maron, Sangbom M Lyi, Marcelo Menossi, Leon V Kochian. Not all ALMT1-Type transporter mediate aluminum-activated organic acid responses: The case of *ZmALMT1*-an anion-selective transporter. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 2008, 53(2):352-367
- [20] Alexis A D, Ulrike B, Rita F. The vacuolar channel *VvALMT9* mediates malate and tartrate accumulation in berries of *Vitis vinifera*. *Planta*, 2013, 238(2):283-291
- [21] Liang C, Pionros A M, Tian J, Yao Z F, Sun L L, Liu J P, Shaff Jon, Coluccio Alison, Leon V K, Hong L. Low pH, aluminum, and phosphorus coordinately regulate malate exudation through *GmALMT1* to improve soybean adaptation to acid soils. *Plant Physiology*, 2013, 161(3):1347-1361
- [22] 蔡冰杰. 紫花苜蓿苹果酸转运体基因的克隆和表达模式研究. 重庆: 重庆大学, 2014
- Cai B J. Study on clone and expression of *MsALMT1* gene in *Medicago Sativa* L. Chongqing: Chongqing University, 2014
- [23] 彭文婷, 彭俊楚, 李姣姣, 吴炜炜, 林雁, 孙丽莉, 梁翠月, 廖红. 大豆苹果酸转运子在大豆响应低磷胁迫中的功能//中国遗传学会, 中国细胞生物学学会, 中国植物学会, 中国植物生理与植物分子生物学学会, 中国作物学会. 2016年全国植物生物学大会摘要集. 华南农业大学根系生物学研究中心, 福建农林大学海峡联合研究院, 2016: 197
- Peng W T, Peng J C, Li J J, Wu W W, Ling Y, Sun L L, Liang C Y, Liao H. Function of soybean malic acid transporter in soybean response to low phosphorus stress//Genetics Society of China, Chinese Society For Cell Biology, Botanical Society of China, Chinese Society for Plant Biology, The Crop Science Society of China. Proceedings of the 2016 National Congress of Plant Biology. Root Biology Center, South China Agricultural University, Haixia Institute of Science and Technology, Fujian Agriculture and Forestry University, 2016: 197
- [24] Jun L, Gao X R, Dong Z M, Yi J, An L J. Improved phosphorus acquisition by tobacco through transgenic expression of mitochondrial malate dehydrogenase from *Penicillium oxalicum*. *Plant Cell Reports*, 2012, 31(1):49-56
- [25] Liu J. Biology and function of the *OsALMT1* gene in rice (*Oryza sativa* L.). Tasmania: University of Tasmania, 2016
- [26] Eisenach C, Baetz U, Huck NV, Zhang J, De Angeli A, Beckers G J M, Martinoia E. ABA-induced stomatal closure involves ALMT4, a phosphorylation dependent vacuolar anion channel of Arabidopsis. *Plant Cell*, 2017, 29(10):2552-2569
- [27] 姜静涵, 关荣霞, 郭勇, 常汝镇, 邱丽娟. 大豆苗期耐盐性的简便鉴定方法. *作物学报*, 2013, 39(7):1248-1256
- Jiang J H, Guang R X, Guo Y, Chang R Z, Qiu L J. Simple evaluation method of tolerance to salt at seeding stage in soybean. *Acat Agronomica Sinica*, 2013, 39(7) 1248-1256
- [28] 彭亚男. 大豆 *GmCBL7* 基因启动子的克隆与功能分析. 哈尔滨: 哈尔滨师范大学, 2021
- Peng Y N. Cloning and functional analysis of soybean *GmCBL7* gene promoter. Harbin: Harbin Normal University, 2021
- [29] 李舒文, 李殷睿智, 董笛, 王梦迪, 晁跃辉, 韩烈保. 藜苜蓿 *MtSAG113* 基因的转化及表达特征分析. *生物技术通报*, 2022, 38(1):108-114
- Li S W, Li Y R Z, Tong D, Wang M D, Chao Y H, Han L B. Transformation and expression pattern analysis of gene *MtSAG113* from *Medicago truncatula*. *Biotechnology Bulletin*, 2022, 38(1):108-114
- [30] 邵亚林, 司俊波, 常玮, 石家恋, 丁勇. 五种兜兰属植物基因组 DNA 提取方法比较. *分子植物育种*, 2020, 18(15):4965-4974
- Shao Y L, Si J B, Chang W, Shi J L, Ding Y. Comparison of genomic DNA extraction methods for five species of *Tulipa spp.* *Molecular Plant Breeding*, 2020, 18(15):4965-4974
- [31] Delhaize E, Ryan P R, Hebb D M. Engineering high-level aluminium tolerance in barley with the *ALMT1* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(42): 15249-15254
- [32] Hoekenga OA, Maron L G, Piñeros M A, Cançado G M, Shaff J, Kobayashi Y, Ryan P R, Dong B, Delhaize E, Sasaki T, Matsumoto H, Yamamoto Y, Koyama H, Kochian LV. *AtALMT1*, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(25): 9738-9743
- [33] Akira I, Kazutsuka S, Kenta W. Identification of genes encoding ALMT and MATE transporters as candidate aluminum tolerance genes from a typical acid soil plant, *Psychotria rubra* (Rubiaceae). *Peer J*, 2019, 7e7739
- [34] Delhaize E, Gruber D B, Ryan R P. The roles of organic anion permeases in aluminium resistance and mineral nutrition. *Febs Letters*, 2007, 581(12):2255-2262
- [35] Alexis A D, Jingbo Z, Stefan M. *AtALMT9* is a malate-activated vacuolar chloride channel required for stomatal opening in Arabidopsis. *Nature communications*, 2013, 4(1): 1804
- [36] 李云浩. *MdALMT13* 在苹果响应干旱和碱胁迫中的功能研究. 杨凌: 西北农林科技大学, 2022
- Li Y H. Study on the functional of *MdALMT13* in response to drought and alkali stress in apple. Yangling: Northwest A&F University, 2022
- [37] 巫伟峰, 陈明杰, 祁芳斌, 陈发兴. 李果实有机酸组成特征及其与苹果酸转运体基因 *PsALMT9* 和 *PstDT* 的相关性. *西北植物学报*, 2022, 40(8):1356-1363

- Wu W F, Chen M J, Qi F B, Chen F X. Organic acid composition characteristics and its correlation with malate transporter genes *PsALMT9* and *PstDT* in plum fruit. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2022, 40(8):1356-1363
- [38] 王冰. 番茄苹果酸调控基因 *SLALMT9* 互作蛋白 CESA2、TP、TEP 的鉴定及功能验证. 武汉: 华中农业大学, 2020
- Wang B. Identification and functional analysis of malate regulatory gene *SLALMT9* interaction proteins CESA2, TP and TEP in tomato. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2020
- [39] 赵红, 徐芬芬, 余淑铃, 郑怡婷, 符诗婷. 2,4-表油菜素内酯对镉胁迫下黄瓜幼苗的缓解效应. *北方园艺*, 2022(20):35-41
- Zhao H, Xu F F, Yu S L, Zheng Y T, Fu S T. Mitigation effect of 2, 4-Epibrassinolide on cucumber seedlings under cadmium stress. *Northern Horticulture*, 2022(20):35-41
- [40] Hegedüs A, Erdei S, Janda T, Toth E, Horvath G, Dudits D. Transgenic tobacco plants overproducing alfalfa aldose/aldehyde reductase show higher tolerance to low temperature and cadmium stress. *Plant Science*, 2004, 166(5):1329-1333
- [41] Taoufik R E, Abdallah O, Abdelmajid H, Hocheol S, Eilhann K, Nanthi B, Abin S, Prasad M. Cadmium stress in plants: A critical review of the effects, mechanisms, and tolerance strategies. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 2022, 52(5):675-726
- [42] 王芳洲, 王友绍.  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$  胁迫对秋茄幼苗可溶性蛋白和抗氧化酶活性的影响. *生态科学*, 2020, 39(4):10-18
- Wang F Z, Wang Y S. Effects of  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  stresses on soluble protein content and activities of antioxidant enzymes in *Kandelia obovata* seedlings. *Ecological Science*, 2020, 39(4):10-18
- [43] 闵强, 柯汉玲, 祖艳群, 秦丽. 连续2年土壤砷胁迫对三七 (*Panax notoginseng*) 细胞膜透性和抗氧化酶活性的影响. *云南农业大学学报: 自然科学版*, 2016, 31(4):767-771
- Min Q, Ke H L, Zu Y Q, Qin L. Effects of soil as on cellmembrane permeability and antioxidant enzymes activities of *Panax notoginseng*. *Journal of Yunnan Agricultural University: Natural Science Edition*, 2016, 31(4):767-771
- [44] 陈镔, 谭淑端, 董方旭, 杨雨婷. 重金属对植物的毒害及植物对其毒害的解毒机制. *江苏农业科学*, 2019, 47(4):34-38
- Chen B, Tan S D, Dong F X, Yang Y T. Toxicity effects of heavy metals on plants and detoxification mechanism of plants. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2019, 47(4):34-38