

大豆 Δ^1 - 吡咯啉 - 5 - 羧酸合成酶基因 *GmP5CS1* 和 *GmP5CS2* 的克隆与过表达载体构建

高明潇, 郭娜, 薛晨晨, 王海棠, 赵晋铭, 邢邯

(南京农业大学 大豆研究所/国家大豆改良中心/农业部大豆生物学与遗传育种重点实验室/作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏 南京 210095)

摘要: 利用同源克隆方法从强耐旱栽培大豆 (*Glycine max*) 品种齐黄 22 中克隆得到 2 个编码大豆 Δ^1 - 吡咯啉 - 5 - 羧酸合成酶 (P5CS) 的基因, 分别命名为 *GmP5CS1* 和 *GmP5CS2*。氨基酸序列分析发现, *GmP5CS1* 包含 1 个长度为 2 163 bp 的 ORF, 编码 720 个氨基酸, 等电点 pI 为 6.70, 分子量大小为 78.38 kDa; *GmP5CS2* 包含 1 个长度为 2 271 bp 的 ORF, 编码 756 个氨基酸, 等电点 pI 为 6.10, 分子量大小为 82.18 kDa。与 NCBI 公布的部分物种蛋白质序列比对发现, *GmP5CS1* 与紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) 的亲缘关系最高, *GmP5CS2* 与豇豆 (*Vigna unguiculata*) 的亲缘关系最高。组织表达分析表明, *GmP5CS1* 与 *GmP5CS2* 基因在大豆的各个组织中均有表达, 其中叶和根中的表达量相对较高, 茎中表达量次之, 花和籽粒中的表达量相对较低。利用 Gateway 技术得到植物过表达载体 pEarleyGate103-*GmP5CS*, 再转入根癌农杆菌 EHA105 中, 为 *GmP5CS* 基因的转化及功能分析奠定了基础。

关键词: 大豆; *GmP5CS* 基因; Gateway 技术

中图分类号: S565.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.11861/j.issn.1000-9841.2016.01.0025

Cloning of the Soybean Δ^1 -Pyrroline-5-Carboxylate Genes *GmP5CS1* and *GmP5CS2* and Construction of Its Overexpression Vectors

GAO Ming-xiao, GUO Na, XUE Chen-chen, WANG Hai-tang, ZHAO Jin-ming, XING Han

(Soybean Research Institute of Nanjing Agricultural University/National Center for Soybean Improvement/Key Laboratory of Biology and Genetics and Breeding for Soybean, Ministry of Agriculture/State Key Laboratory for Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing 210095, China)

Abstract: In this study, we cloned two genes encoding soybean Δ^1 -pyrroline-5-carboxylic acid synthase (P5CS) by homology cloning method of cultivation from the strong drought tolerant soybean (*Glycine max*) variety Qihuang 22, named *GmP5CS1* and *GmP5CS2*. The amino acid sequence analysis found that *GmP5CS1* contained a length of 2 163 bp ORF, encoding 720 amino acids, isoelectric point (pI) was 6.70, protein was weak acid, molecular weight was 78.38 kDa; *GmP5CS2* contained a length of 2 271 bp ORF, encoding 756 amino acids, isoelectric point (pI) was 6.10, acidic protein, molecular weight was 82.18 kDa. Phylogenetic analysis showed that *GmP5CS1* affinity with *Medicago sativa* highest, *GmP5CS2* affinity with *Vigna unguiculata* highest. The organization expression analysis found that *GmP5CS1* and *GmP5CS2* genes expressed in all soybean organizations. Gene relative expression in leaf and root is higher, relative expression in the stem is middle, the relative expression of flowers and seed is relatively lower. A plant over-expression vector of pEarleyGate103-*GmP5CS* was constructed by Gateway technology, and was transferred into *Agrobacterium* EHA105, which would lay a foundation of its conversion into the plant and provide a foundation for further studying the function of *GmP5CS* gene in soybean.

Keywords: *Glycine max* L. Merr.; *GmP5CS* gene; Gateway technology

植物在生长发育过程中,经常会受到各种非生物胁迫的影响。非生物胁迫从模式上划分可以分为两种:一种是渗透胁迫,通常由干旱、盐渍和冷害所引起;另一种是氧化胁迫,通常由离子毒害引发^[1]。植物在受到盐或者干旱等非生物胁迫时,植物细胞内会迅速合成并积累大量的渗透物质如脯氨酸、甜菜碱、可溶性糖还有甘露醇等,由于它们分

子量小,易溶于水,生成迅速,能够降低细胞的渗透势,进而维持水分平衡,保护很多酶的活性^[2]。前人研究表明,植物的耐盐性与渗透物质脯氨酸的积累有关^[3]。

脯氨酸作为一个渗透调节剂,使细胞保持适当的渗透势,稳定和保护生物大分子结构以及功能,保持膜结构的完整性。支立峰等^[4]把豆科植物

收稿日期:2015-12-04
基金项目:国家转基因生物新品种培育科技重大专项(2014ZX08004);国家自然科学基金(31301340,31301343);国家现代农业产业技术体系(CARS-004-PS10);江苏省农业科技支撑计划(BE2013350);长江学者和创新团队发展计划(PCSIRT13073);江苏省现代作物生产协同创新中心(JCIC-MCP)。
第一作者简介:高明潇(1989-),男,硕士,主要从事大豆分子遗传育种研究。E-mail:gaomingxiao1989@163.com。
通讯作者:邢邯(1963-),男,教授,博导,主要从事大豆育种工作。E-mail:hanx@njau.edu.cn。

mothbean 的 *P5CS* 基因转化水稻,得到的转基因水稻的脯氨酸含量提高,并且耐盐性比非转基因的强。目前对于脯氨酸的积累与植物耐盐性的关系仍没有确定。有报道认为植物脯氨酸积累可能是受到盐害的结果^[5]。也有研究表明,植物为了对抗盐胁迫而积累脯氨酸,这是一种保护性措施^[6-9]。脯氨酸极易溶于水,具有较强的渗透性,pH 为中性的条件下不带电荷。同时在浓度较高的条件下,可溶性小分子和脯氨酸几乎没有不利的相互作用^[12]。以往的研究表明,可溶性溶质不仅能够保护亚细胞结构,还具有渗透平衡剂的作用^[13]。同时,可溶性溶质还可以为细胞膨胀提供膨压,提高维持细胞渗透压的浓度,使水分进入或流出细胞。吡咯啉-5-羧酸合成酶(*P5CS*)是脯氨酸合成和降解的关键酶和限速酶。正常条件下,脯氨酸反馈调节抑制了 *P5CS* 基因的表达。胁迫条件下,*P5CS* 基因的表达活性得到增强^[12-13]。

P5CS 酶具有吡咯啉-5-羧酸还原酶和羧酸合成酶的活性,在代谢反应过程中具有限速作用,同时具有双功能酶的特性^[4]。本研究通过克隆大豆 *GmP5CS* 基因,并构建其过表达载体,奠定了该基因的遗传转化及功能分析的基础。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

1.1.1 植物材料 本研究使用栽培大豆(*Glycine max*)品种齐黄 22(强耐旱型)。种植前将营养土和蛭石按 1:2 比例混合并移入花盆,随后每盆点播种子 9 粒,再将花盆放入人工气候箱培养,待幼苗长出(14 d)后取幼叶,用液氮速冻后放入超低温冰箱。

1.1.2 载体和菌株 大肠杆菌(*E. coli*)DH5 α 菌株购自北京天根公司,根癌农杆菌 EHA105 及表达载体 pEarlygate103 由本实验室保存。克隆载体 PMD19-T Vector 购自 TaKaRa 公司。

1.1.3 试剂 RNA 提取试剂盒购自北京天根公司;Ex *Taq* DNA 聚合酶、M-MLV 反转录酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、PrimeScriptTM 1st strand cDNA Synthesis Kit、pMD19-T Vector 及 DNA Maker 均购自 TaKaRa 公司;Kan、Amp 购自南京生兴公司;琼脂糖凝胶回收试剂盒购自上海赛百盛公司;质粒提取试剂盒购自丁贝生物科技有限公司,表面活性剂 silwet L-77 购于北京鼎国试剂公司,其它常用试剂多为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 *GmP5CS* 的克隆 对大豆叶片做处理,使用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA。随后使用试剂盒进

行 cDNA 反转录。根据拟南芥 *AtP5CS*(TAIR Accession No. 2063906)核苷酸序列作探针模板,在线同源搜索大豆基因组序列数据库(网址: www.phytozome.com/),发现了 2 条与之相似度很高的序列,分别位于 Gm18 和 Gm03 两条染色体上,将其命名为 *GmP5CS1* 和 *GmP5CS2*。利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物,序列如下:

GmP5CS1: (F) 5'-GTGCTGATAGGATAGTGTA-AAGTGT-3', (R) 5'-AGAATAGCAATTCCTTG-TATAAC-3';

GmP5CS2: (F) 5'-GCTATTGCTCGTATCAGT-GCTCAG-3', (R) 5'-CAAATGCCGTTCTCTACTGTG-3'。

PCR 反应条件:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s;56℃ 退火 30 s;72℃ 延伸 1 min 30 s(35 个循环);72℃ 延伸 10 min;4℃ 下保存。

PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶上电泳,用胶回收试剂盒对目的条带进行回收,与 pMD19-T vector 进行连接,随后转化大肠杆菌感受态细胞,将阳性单克隆送 Invitrogen 测序公司检测。

1.2.2 *GmP5CS* 的组织表达及生物学分析 使用 ExPasy 在线软件对两个 *GmP5CS* 基因编码的氨基酸序列进行理化性质的分析;使用 NCBI 网站上的 BLAST 工具 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)和 DNAMAN V 6、ClustalX 2.0 软件进行同源序列比对;使用 Mega 4.0 和 DNAMAN 软件进行系统发育树的构建及分析;登陆 Softberry 网站,使用 ProtComp 9.0 做在线亚细胞定位分析,比对 *GmP5CS1* 和 *GmP5CS2* 基因的氨基酸序列。

培养大豆至幼叶长出,随后取其根、茎、叶等组织;待盛花期取其根、茎、叶及花。对以上材料分别提取总 RNA,参考大豆内参基因 β -Tubulin。

β -Tubulin 基因上游引物:5'-GTTGAAAAGC-CAGGGGACA-3',下游引物:5'-TCCTACCCCTT-GAGCGTGG-3'。

目的基因引物:

GmP5CS1: (F) 5'-AGTGGTGTCTAGGAAGTG-TAAGTG-3', (R) 5'-GCAATAGCAATTCCTTG-TATAAC-3';

GmP5CS2: (F) 5'-TAGCTATTGCTCGTCACT-GCTCAG-3', (R) 5'-ACAGAATGCCGTTCTCTACTGTG-3'。

随后用实时荧光定量 PCR 对上述不同组织中的 *GmP5CS* 基因做表达分析。

1.2.3 构建过表达载体 引物设计参照 Gateway 技术进行,并将特异性重组序列 attB 加入引物

两端。

Gm5CS1-F: 5'-GGGGACATTTGTACAAGAAAG-CAGGACCTTCATGGCTGAATTTTCCA-3'

GmP5CS1-R: 5'-GGGCCACGATTTGTACAAAG-CTGAGGTCAATACGTTTTTGGTGTAC-3'

GmP5CS2-F: 5'-GGCAAGTTTGAGTACAAAAG-CAGTTACCATGGCTGCGATTCCGAT-3'

GmP5CS2-R: 5'-GACCACTTGGGTACAAGAA-GCGTGGTCTAAATCCGCAATGAACAC-3'

设置 BP 反应体系 (10 μL) 如下: pDONR221 vector 0.5 μL, attB-PCR product 2 μL, BP clonaseTMII enzyme mix 1 μL, TE Butter (pH8.0) 6.5 μL。经过短暂离心后放入 25℃ 温水浴培养 10 h, 取出后加入 1 μL 蛋白酶 K 溶液, 并在 37℃ 下继续温育 10 min, 随后终止反应。

随后使用热激法做 DH5α 感受态细胞的转化, 首先取 1 μL BP 反应液, 准备 LB 固体培养基 (含草甘膦 20 mg·L⁻¹), 将转化的细胞均匀涂抹在上面, 随后放到 37℃ 摇床上培养 12~16 h。摇床培养结束后挑取单克隆, 剩余菌液做 PCR 检测, 阳性克隆送往 Invitrogen 测序公司检测。测序结果正确的菌液做摇菌并提取质粒, 作为下一步实验的入门载体。

设置 LR 反应体系 (10 μL) 如下: Entry clone 2 μL, pEarleyGate103 vector 1.5 μL, TE-Buffer (pH8.0) 4.5 μL, LR clonaseTMII enzyme mix 2 μL。经过短暂离心后放入 25℃ 温水浴中培养 10 h, 取出后加入 1 μL 蛋白酶 K 溶液, 并在 37℃ 下继续温育 10 min, 随后终止反应。

接下来使用热激法做 DH5α 感受态细胞的转化, 取 1 μL LR 反应液, 实验步骤与 BP 反应相同。测序后提取质粒, 获得过表达载体。

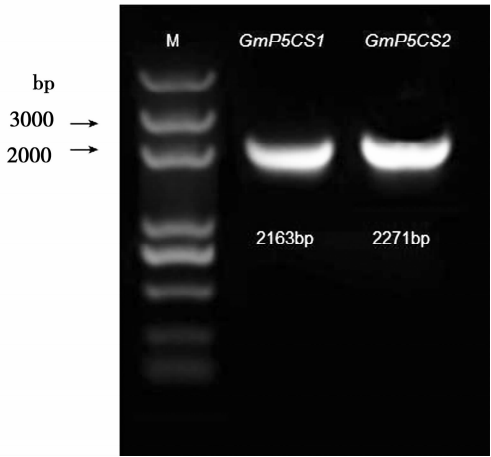
1.2.4 根癌农杆菌的转化 菌株选用根癌农杆菌 EHA105, 使用冻融法将构建好的过表达载体转入其中, 准备 YEB 固体培养基, 含 20 mg·L⁻¹ 草甘膦以及

50 mg·L⁻¹ 利福平, 将转化的细胞均匀涂抹在培养基表面, 随后放入 27℃ 摇床中培养 24 h, 取出后对单克隆做检测, 阳性克隆留部分在 -80℃ 冰箱中备用。

2 结果与分析

2.1 *GmP5CS1* 和 *GmP5CS2* 基因的克隆

提取大豆幼龄叶片 cDNA 做模板, 用特异性引物做 PCR 扩增, 产物放在 2% 琼脂糖凝胶上电泳检测, 得到 2 条特异性条带, 与预测条带大小相符, 随后与克隆载体 pMD19-T vector 进行连接, 测序结果表明克隆得到的目的基因和大豆基因组数据库中相应基因的碱基序列相似度超过 99%, 编码的氨基酸序列一致, 可以证实为同一基因 (图 1)。



M: Trans2K Plus DNA Maker.

图 1 *GmP5CS1* 和 *GmP5CS2* 基因 ORF 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification of *GmP5CS1* and *GmP5CS2* ORF

2.2 *GmP5CS* 基因的生物学分析与组织表达分析

使用 ExPASy 在线软件, 对大豆 *GmP5CS1* 和 *GmP5CS2* 基因的氨基酸序列进行理化性质分析, 结果详见表 1。

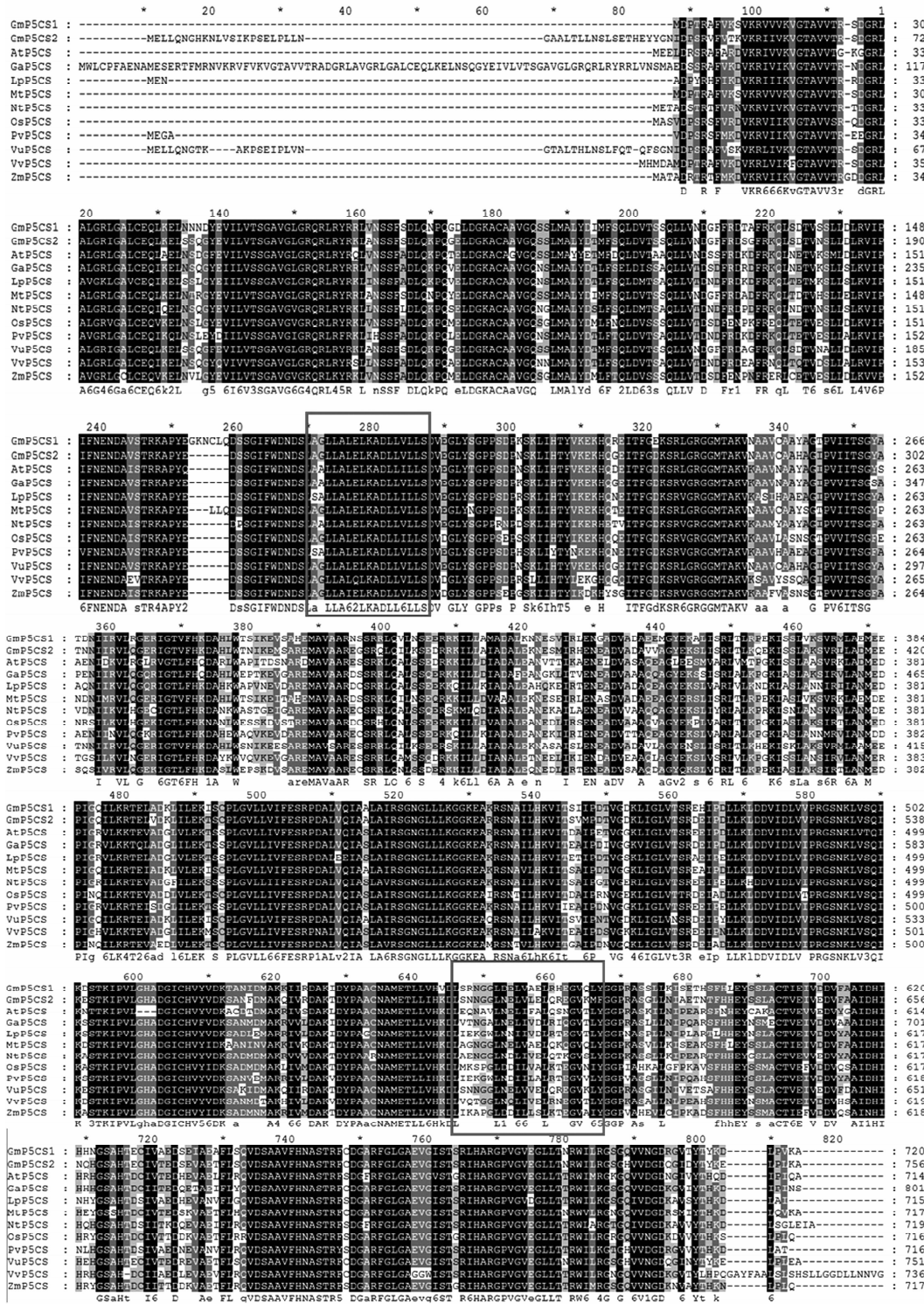
表 1 *GmP5CS1* 和 *GmP5CS2* 基因性质分析

Table 1 Prediction of the properties of *GmP5CS1* and *GmP5CS2*

基因 Gene	染色体位置 Chromosome	ORF 大小 ORF length/bp	氨基酸数目 Amino acid No.	等电点 pI	分子量大小 kDa
<i>GmP5CS1</i>	Gm18	2163	720	6.70	78.38
<i>GmP5CS2</i>	Gm03	2271	756	6.10	82.18

登陆 NCBI 官网, 查询并下载已被报道过的物种 *P5CS* 基因的氨基酸序列, 包括: 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、菜豆 (*Phaseolus vulgaris*)、紫花苜蓿 (*Medicago sativa*)、豇豆 (*Vigna unguiculata*)、水稻 (*Oryza sativa*)、烟草 (*Nicotiana tabacum*)、玉米 (*Zea mays*)、亚洲棉 (*Gossypium arboreum*)、葡萄 (*Vitis*

vinifera)、牛枝子 (*Lespedeza potaninii*)。使用 DNAMAN V 6.0 软件做比对分析得知, 本研究的 2 个 *GmP5CS* 氨基酸序列与其它物种具有相似的功能保守区域, 例如: 谷氨酸激酶保守位点 (271-288Aa)、谷酰磷酸还原酶保守位点 (646-667Aa), 见图 2。



方框分别表示谷氨酸激酶保守位点、谷胱甘肽还原酶保守位点。
Red boxes indicate the conserved sites of Glutamate kinase and GPR.

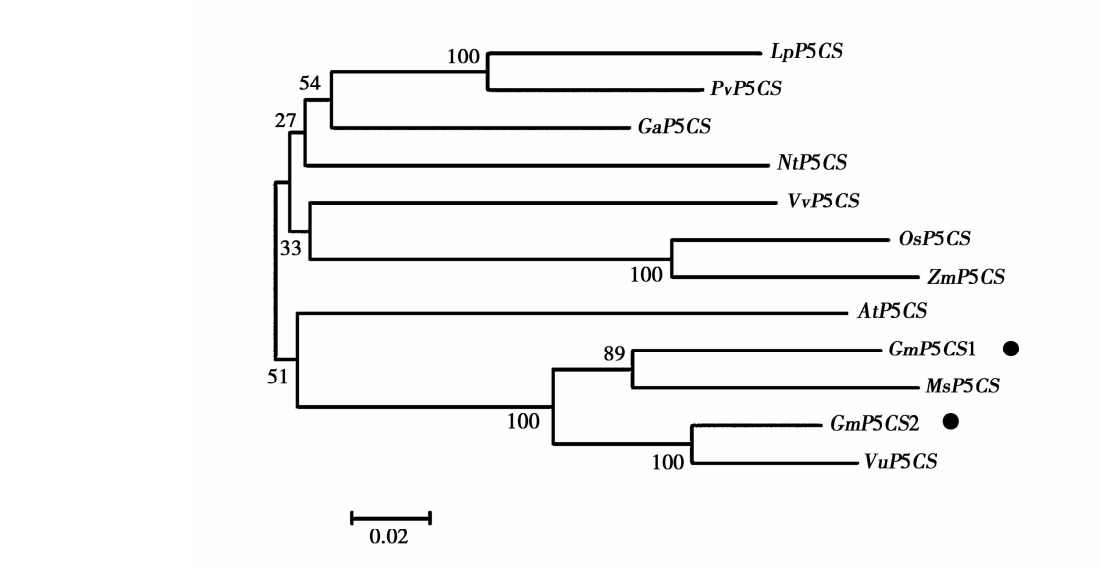
图2 大豆与其它物种 *P5CS* 基因编码氨基酸序列比对结果

Fig. 2 Sequence multialignment of the GmP5CS with P5CS proteins encoded by various *P5CS* genes of other species

使用 Mega V 4.0 和 DNAMAN V 6.0 软件对大豆 *GmP5CS1* 和 *GmP5CS2* 基因进行系统发育树分析 (图 3), 结果表明, 大豆 *GmP5CS1* 基因与紫花苜蓿的 *P5CS* 基因亲缘关系最高, 大豆 *GmP5CS2* 基因则与豇豆 *P5CS* 基因的亲缘关系最高, 而与牛枝子、菜

豆、亚洲棉的亲缘关系最远。利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术, 分析 *GmP5CS1* 和 *GmP5CS2* 在大豆不同组织中的表达模式 (图 4), 结果表明 2 个基因在大豆的根、茎、叶、花和籽粒中都有表达, 说明 *GmP5CS1* 和 *GmP5CS2* 在

大豆的器官中可能为组成型表达。但是其表达丰度具有明显差异,如在根和叶中表达量较高,约为籽粒中的 8 倍,而在茎、花和种子中表达量则相对较低,因而以籽粒的表达量作为参照。

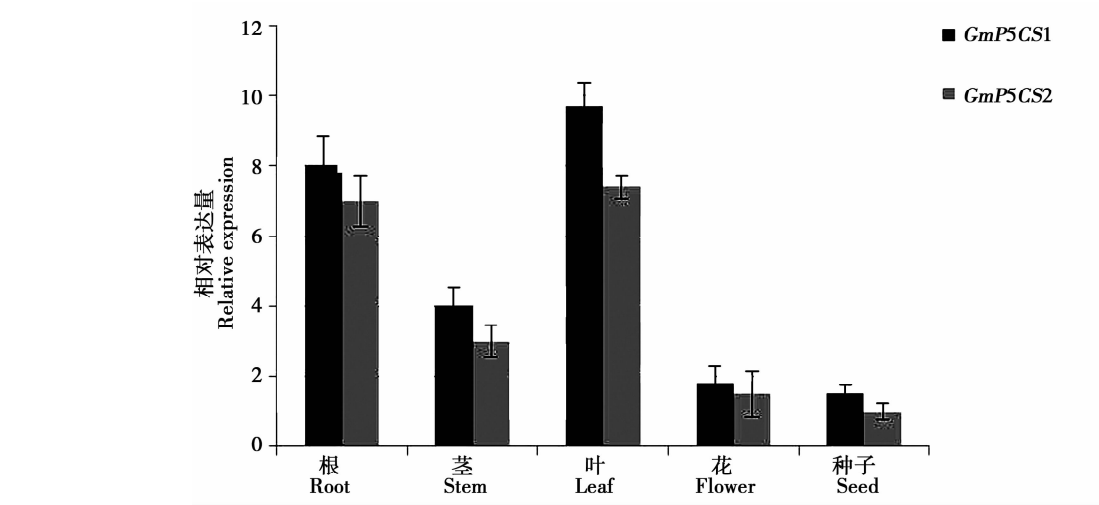


LpP5CS;牛枝子 *P5CS* 基因;*PvP5CS*;菜豆 *P5CS* 基因;*GaP5CS*;亚洲棉 *P5CS* 基因;*NtP5CS*;烟草 *P5CS* 基因;*VvP5CS*;葡萄 *P5CS* 基因;*OsP5CS*;水稻 *P5CS* 基因;*ZmP5CS*;玉米 *P5CS* 基因;*AtP5CS*;拟南芥 *P5CS* 基因;*MsP5CS*;紫花苜蓿 *P5CS* 基因;*VuP5CS*;豇豆 *P5CS* 基因。

LpP5CS; *Lespedeza potaninii* *P5CS*; *PvP5CS*; *Phaseolus vulgaris* *P5CS*; *GaP5CS*; *Gossypium arboreum* *P5CS*; *NtP5CS*; *Nicotiana tabacum* *P5CS*; *VvP5CS*; *Vitis vinifera* *P5CS*; *OsP5CS*; *Oryza sativa* *P5CS*; *ZmP5CS*; *Zea mays* *P5CS*; *AtP5CS*; *Arabidopsis thaliana* *P5CS*; *MsP5CS*; *Medicago sativa* *P5CS*; *VuP5CS*; *Vigna unguiculata* *P5CS*.

图 3 *GmP5CS1* 和 *GmP5CS2* 基因系统发育树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree analysis of *GmP5CS1* and *GmP5CS2*



数据均是 3 个重复的平均值。

Each data represents the mean of three replicates.

图 4 *GmP5CS1* 和 *GmP5CS2* 在大豆不同组织中的表达分析

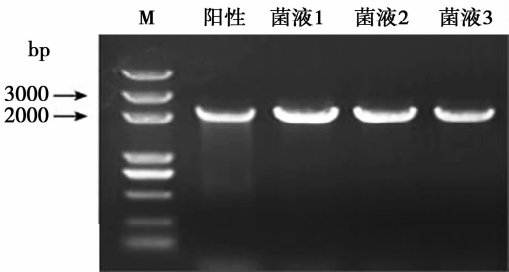
Fig. 4 Expression patterns of *GmP5CS1* and *GmP5CS2* in different tissues of soybean

2. 3 *GmP5CS* 植物过表达载体的构建

2. 3. 1 入门载体的构建 以质粒为模板,用带接头的引物进行 PCR 扩增,1% 琼脂糖凝胶电泳检测条带大小,结果显示扩增产物大小正确,进行割胶回收纯化目的基因,并检测产物浓度。将含有目的基因的片段通过 BP 反应,转移到入门载体 pDO-

NOR221 中,经过 LR、BP 反应交换重组,得到植物过表达载体 pEarleyGate103-*GmP5CS1* 及 pEarleyGate103-*GmP5CS2*,经过 PCR 进行初步检测,条带大小正确,再经测序验证,利用冻融法将构建好的植物表达载体质粒转化到农杆菌中,PCR 检测呈阳性后,进行后续工作。

2.3.2 表达载体的获得 使用入门载体对表达载体 pEarleyGate103 与目的片段进行连接,随后转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,并以菌液作为模板,用带接头的引物进行 PCR 检测,在 1% 琼脂糖凝胶上检测条带(图 5),将筛选的阳性克隆送去检测,测序结果与目的片段序列完全一致,说明目的片段已插入到表达载体中。对测序正确的提取质粒。



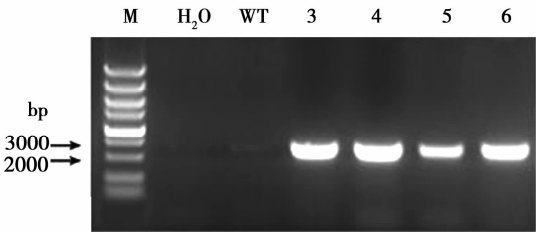
M: Trans2K Plus DNA Maker; 1, 2: *GmP5CS1*; 3: *GmP5CS2*.

图 5 菌液 PCR 检测

Fig. 5 Colibacillus PCR detection

2.4 过表达载体转化根癌农杆菌

采用冻融法做过表达载体的农杆菌转化,选用根癌农杆菌 EHA105,挑取单克隆做 PCR 检测,结果证明重组后的过表达载体已成功导入农杆菌中(图 6)。



M: Trans2K Plus DNA Maker; 3, 4: *GmP5CS1*; 5,6: *GmP5CS2*.

图 6 农杆菌转化阳性克隆 PCR 检测

Fig. 6 The PCR products of positive clones for *Agrobacterium* mediated transformation

3 讨论

高等植物体当中,编码吡咯啉-5-羧酸合成酶的基因(*P5CS*)最早是从豇豆中(*Vigna unguiculata*)克隆得到的^[15]。该基因在拟南芥、水稻中的研究表明,其在根、叶中的表达量相对其它组织器官要高,并且,受干旱、高盐、低温的胁迫诱导^[16]。

大豆 2 个 *GmP5CS* 基因在幼苗的根、茎、叶,成熟期的花及籽粒中都有表达。总的来看,这两个基因在籽粒中的表达量最低,在幼苗期的叶和根中表达量相对较高,与前人报道的 *PvP5CS* 基因在普通

菜豆中的表达情况一致^[17]。

在苗期生长过程中,大豆会受到各种各样的生物胁迫和非生物胁迫,尤其以干旱、高盐、冷环境胁迫这类非生物胁迫居多,因此,在幼苗生长阶段,其根、叶部位的 *GmP5CS* 基因的表达量会显著高于其它部位;而在成熟期当中,由于已经度过了前期的环境胁迫影响,因此花中的 *GmP5CS* 基因的表达量较苗期的都要低;到结荚期以后,由于营养成分已经积累完毕,从源到库的营养物质流动已趋于减缓,环境因素对植物体的影响较苗期更为趋小,因此,在籽粒中 *GmP5CS* 基因的表达量较苗期要低。该表达模式与拟南芥中 *AtP5CS* 基因的表达模式类似^[18-19]。

通过高效的 Gateway 技术定向地把 PCR 产物连接到指定的过表达载体上。从强耐旱栽培大豆品种齐黄 22 中克隆得到大豆 Δ^1 -吡咯啉-5-羧酸合成酶基因 *GmP5CS1* 和 *GmP5CS2*,并对其进行生物信息学分析发现, *GmP5CS1* 包含 1 个长度为 2 163 bp 的 ORF,编码 720 个氨基酸,等电点 pI 为 6.70,分子量大小为 78.38 kDa; *GmP5CS2* 包含 1 个长度为 2 271 bp 的 ORF,编码 756 个氨基酸,等电点 pI 为 6.10,分子量为 82.18 kDa。与 NCBI 公布的部分蛋白质序列比对发现, *GmP5CS1* 与紫花苜蓿的亲缘关系最高, *GmP5CS2* 与豇豆的亲缘关系最高。本研究构建得到了 2 个 *GmP5CS* 基因的过表达载体,并将其成功转化进了根癌农杆菌 EHA105 中,为今后将 *GmP5CS* 转入大豆或其它植物进行功能研究提供了宝贵的材料基础。

参考文献

[1] Vinocur B, Altman A. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: Achievements and limitations[J]. Curreng Opinion in Biotechnology, 2005, 16: 123-132.

[2] 陈淑芳,朱月林,刘友良,等. NaCl 胁迫对番茄嫁接苗保护酶活性、渗透调节物质含量和光特性的影响[J]. 园艺学报, 2005, 32(4): 609-613. (Chen S F, Zhu Y L, Liu Y L, et al. Effects of NaCl stress on activities of protective enzymes, contents of osmotic adjustment substances and photosynthetic characteristics in grafted tomato seedlings[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2005, 32(4): 609-613.)

[3] Elsamad H M A. Salt tolerance of soybean cultivars[J]. Biologia Plantarum, 1977, 39(2): 263-269.

[4] 支立峰,陈明清,余涛,等. P5CS 转化水稻细胞系的研究[J]. 湖北师范学院学报(自然科学版), 2005, 25(4): 39-43. (Zhi L F, Chen M Q, Yu T, et al. Study of the P5CS transform rice cell line[J]. Journal of Hubei Normal University (Natural Science), 2005, 25(4): 39-43.)

- sentative genes in a dicot (*Arabidopsis*) and a monocot (rice) during reproduction and abiotic stress[J]. *Plant Physiology*, 2011, 157(4): 1609-1627.
- [14] Bourbon H M. Comparative genomics supports a deep evolutionary origin for the large, four-module transcriptional mediator complex[J]. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36(12): 3993-4008.
- [15] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [16] Libault M, Farmer A, Joshi T, et al. An integrated transcriptome atlas of the crop model *Glycine max*, and its use in comparative analyses in plants[J]. *Plant Journal*, 2010, 63(1): 86-99.
- [17] Severin A J, Woody J L, Bolon Y T, et al. RNA-Seq Atlas of *Glycine max*: A guide to the soybean transcriptome[J]. *BMC Plant Biology*, 2010, 10(1): 160.
- [18] Belamkar V, Weeks N T, Bharti A K, et al. Comprehensive characterization and RNA-Seq profiling of the HD-Zip transcription factor family in soybean (*Glycine max*) during dehydration and salt stress[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 950.
- [19] Saeed A I, Sharov V, White J, et al. TM4: A free, open-source system for microarray data management and analysis[J]. *Biotechniques*, 2003, 34(2): 374-378.
- [20] Wang F, Wei H, Tong Z, et al. Knockdown of *NtMed8*, a *Med8*-like gene, causes abnormal development of vegetative and floral organs in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)[J]. *Plant Cell Reports*, 2011, 30(11): 2117-2129.
- [21] 王丰青, 田云鹤, 魏荷, 等. 植物中介体的组成及功能和表达特性研究进展[J]. *西北植物学报*, 2012, 32(10): 2124-2132. (Wang F Q, Tian Y H, Wei H, et al. Mediator complex in plant: Component, function and expression profile[J]. *Acta Botanica Boreali-Occident Sinica*, 2012, 32(10): 2124-2132.)
- [22] Pasrija R, Thakur J K. Tissue specific expression profile of Mediator genes in *Arabidopsis*[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2013, 8(5): e23983.
- [23] Guglielmi B, Van berkum N L, Klapholz B, et al. A high resolution protein interaction map of the yeast mediator complex[J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(18): 5379-5391.
- [24] Takagi Y, Calero G, Komori H, et al. Head module control of mediator interactions[J]. *Molecular Cell*, 2006, 23(3): 355-364.
- [25] Cai G, Imasaki T, Takagi Y, et al. Mediator structural conservation and implications for the regulation mechanism[J]. *Structure*, 2009, 17(4): 559-567.
- [26] 向鹏, 龙承波, 罗红丽. 水稻 *OsMED7* 基因的克隆及表达分析[J]. *作物杂志*, 2013(3): 21-24. (Xiang P, Long C B, Luo H L. Cloning and expression of *OsMED7* from rice[J]. *Crops*, 2013(3): 21-24.)

(上接第 30 页)

- [5] Ghonlam C, Foursy A, Fares K. Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2002, 47(1): 39-50.
- [6] Santa A, Acosta M, Rus A. Short term salt tolerance mechanisms in differentially salt tolerant tomato species[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 1999, 37(1): 65-71.
- [7] Aida H S, Radhia G B, Amira B. Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants[J]. *Plant Science*, 2005, 169(4): 746-752.
- [8] Bartels D, Phillips J. Drought stress tolerance[J]. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 2010, 64(2): 139-157.
- [9] Daniels M J. The plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* contains a mercury-insensitive aquaporin that is a homology of the tonoplast water channel protein TIP[J]. *Plant Physiol*, 1994, 106: 1325-1333.
- [10] Peng Z, Lu Q, Verma D P S. Reciprocal regulation of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes controls levels during and after osmotic stress in plants[J]. *Molecular and General Genetics*, 1996, 253: 334-341.
- [11] Hayashi F, Ichino T, Osanai M & Waa K. Oscillation and regulation of proline content by *P5CS* and *ProDH* gene expressions in the light/dark cycles in the *Arabidopsis thaliana* L[J]. *Plant Cell Physiology*, 2000, 41: 1096-1111.
- [12] Yoshihara Y, Kiyosue T, Katagiri T, et al. Correlation between the induction of a gene for pyrroline-5-carboxylate synthetase and accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress[J]. *Plant Journal*, 1995(7): 751-760.
- [13] Ahmad I, Hellebust J A. The relationship between inorganic nitrogen metabolism and proline accumulation in osmoregulatory responses of two euryhaline microalgae[J]. *Plant Physiology*, 1988, 88(2): 328.
- [14] Forlani G, Scainelli D, Nielsen E. Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase from cultured cells of potato[J]. *Plant Physiology*, 1997, 113: 1413-1418.
- [15] Hu C A, Delauney A J, Verma D P S. A bifunctional enzyme (Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 1992, 89: 9354-9358.
- [16] Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2000, 3: 217-223.
- [17] 陈吉宝, 赵丽英, 毛新国, 等. 转 *PvP5CS1* 基因拟南芥植株对干旱和盐胁迫的反应[J]. *作物学报*, 2010, 36(1): 147-153. (Chen J B, Zhao L Y, Mao X G, et al. Response of *PvP5CS1* transgenic *Arabidopsis* plants to drought and salt stress[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2010, 36(1): 147-153.)
- [18] Strizhov N, Abraham Z, Okrészl, et al. Differential expression of two *P5CS* genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by ABA1, ABI1 and AXR2 in *Arabidopsis*[J]. *Plant Journal*, 1997, 12(3): 557-569.
- [19] Szekely G, Abraham E, Cseplo A, et al. Duplicated *P5CS* genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis[J]. *Plant Journal*, 2008, 53(1): 11-28.