



大豆 *GmNCED5* 基因非生物胁迫响应及生物信息学分析

朱 琨¹, 翟 莹¹, 于海伟¹, 张 军², 邱 爽¹, 何佳琦¹, 李铭杨¹

(1. 齐齐哈尔大学 生命科学与农林学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006; 2. 黑龙江省农业科学院 畜牧兽医分院, 黑龙江 齐齐哈尔 161005)

摘 要:为探究大豆 9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧酶(NCED)基因 *GmNCED5* 对非生物胁迫的响应及原理,为植物基因工程及大豆抗逆育种提供理论基础,本研究检测 *GmNCED5* 在非生物胁迫下的表达量,并对该基因及其启动子序列进行生物信息学分析。实时荧光定量 PCR 结果显示,干旱、高盐、高温、低温及外源脱落酸(ABA)处理均可以不同程度地诱导 *GmNCED5* 在大豆幼苗中表达。*GmNCED5* 基因开放阅读框(ORF)全长1 686 bp,编码 561 个氨基酸。亚细胞定位预测结果显示,*GmNCED5* 蛋白主要定位于细胞质中。系统进化分析表明 *GmNCED5* 蛋白与豇豆 *VuNCED* 蛋白的亲缘关系最近。启动子预测分析结果显示,*GmNCED5* 启动子区域含有 5 种激素响应相关顺式作用元件和 3 种胁迫响应相关顺式作用元件。由此推测 *GmNCED5* 可能通过启动子区域的顺式作用元件响应非生物胁迫。

关键词:大豆; *GmNCED5*; 非生物胁迫; 表达分析; 生物信息学分析; 顺式作用元件

Response of Soybean *GmNCED5* Gene Under Abiotic Stress and Its Bioinformatics Analysis

ZHU Kun¹, ZHAI Ying¹, YU Hai-wei¹, ZHANG Jun², QIU Shuang¹, HE Jia-qi¹, LI Ming-yang¹

(1. College of Life Science and Agro-Forestry, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China; 2. Branch of Animal Husbandry and Veterinary, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Qiqihar 161005, China)

Abstract: In order to explore the role and mechanism of soybean 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) gene *GmNCED5* in abiotic stress and provide a theoretical basis for plant genetic engineering and soybean stress resistance breeding, we analyzed the gene and promoter sequence of *GmNCED5* with bioinformatics method, and detected its expression levels under abiotic stresses. The results of real-time quantitative PCR showed that drought, high salt, high temperature, low temperature and exogenous abscisic acid (ABA) treatments could induce the expression of *GmNCED5* in soybean seedlings to different degrees. The open reading frame (ORF) of *GmNCED5* gene was 1 686 bp, encoding 561 amino acids. The prediction results of subcellular localization showed that *GmNCED5* protein was mainly localized in the cytoplasm. Phylogenetic analysis showed that *GmNCED5* protein was closely related to *VuNCED* protein in cowpea. The results of promoter prediction analysis showed that the promoter region of *GmNCED5* contained five hormone-responsive *cis*-elements and three stress-responsive *cis*-elements. These results suggested that *GmNCED5* might respond to the abiotic stress *via* the *cis*-elements in the promoter region.

Keywords: Soybean; *GmNCED5*; Abiotic stress; Expression analysis; Bioinformatics analysis; *Cis*-element

脱落酸(ABA)是一种重要的植物激素,作为信号分子在调节植物生长发育和适应逆境胁迫过程中发挥着多方面的作用^[1-2]。在高等植物中,ABA的合成从玉米黄质环氧化为紫黄质开始,紫黄质的修饰产物再经 9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧酶(9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase, NCED)裂解形成 C₁₅黄质醛,最后在细胞质中转化成 ABA^[3]。其中, NCED 催化的反应是 ABA 生物合成途径中的关键限速步骤, NCED 表达水平与植物体内 ABA 含量呈正相关^[4-5]。因此, NCED 基因的克隆及功能鉴定对 ABA 合成调控分子机理及植物抗逆育种研究均具有重要意义。

NCED 基因在植物体内以多基因家族形式存

在,且多数能够响应非生物胁迫。葡萄基因组中存在 12 个 NCED 基因,它们在根和叶中均对干旱胁迫有不同程度的响应^[6]。在拟南芥基因组中发现了 9 个 NCED 基因,但只有 5 个 NCED 基因的功能得到确认^[5]。其中, *AtNCED3* 主要在应答环境胁迫方面发挥作用^[7-8]。苹果 *MpNCED2* 在干旱、高温和低温胁迫下表达量均显著增加,而 *MpNCED1* 则主要响应温度胁迫^[9]。应用 NCED 基因改良植物的抗逆性也成为可能。将番茄 *LeNCED1* 基因转入白三叶中能显著提高转基因植株 ABA 含量,降低蒸腾速率和气孔导度,从而提高其长期水分利用效率^[10]。将油菜 *BnNCED3* 转入拟南芥同样提高了转基因植株的 ABA 含量及抗逆性^[11]。

收稿日期:2021-02-02

基金项目:黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目(135409216);齐齐哈尔大学研究生创新科研项目(YJSCX2020041)。

第一作者:朱琨(1986—),女,硕士,讲师,主要从事植物资源和逆境研究。E-mail:zhukunyan@163.com。

通讯作者:翟莹(1982—),女,博士,教授,主要从事植物分子遗传育种研究。E-mail:fairy39809079@126.com。

到目前为止,大豆 NCED 基因中仅 *GmNCED1* 基因被鉴定,高盐、干旱、低温及外源 ABA 和萘乙酸 (NAA) 均可以诱导 *GmNCED1* 在大豆叶片和根中表达,在拟南芥中过表达 *GmNCED1* 可以提高转基因拟南芥的抗旱和抗盐能力^[12-13]。为了进一步研究大豆 NCED 家族基因,本研究从 NCBI 数据库中获取了大豆 *GmNCED5* 基因,对其进行生物信息学预测分析,为 *GmNCED5* 在植物基因工程及大豆抗逆育种中的应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

以齐齐哈尔地区广泛种植的优良抗逆大豆品种北豆 9 号为供试材料。

1.2 试验设计

将大豆种子播种于沙土和草炭土 1:1 混合土中。待根长大约 5 cm 时移入 Hoagland 营养液中,直至大豆幼苗的第一片三出复叶完全展开后进行非生物胁迫处理。参照 Zhai 等^[14]的方法进行干旱、高盐、低温和 ABA 处理;将大豆幼苗置于 42 ℃ 培养箱中进行高温胁迫处理。所有处理均持续 24 h,期间分别在 0,1,2,5,10 和 24 h 剪取 0.1 g 第一片三出复叶,重复 3 次。将所取样品作好标记后迅速置于液氮中,取出后保存在 -80 ℃ 超低温冰箱中。从 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 搜索并下载 *GmNCED5* 基因 (GenBank 登录号: NM001254687) 的 mRNA 序列。采用实时荧光定量 PCR 方法分析不同非生物胁迫下 *GmNCED5* 基因的表达情况。

同时,进行 *GmNCED5* 基因结构和理化性质分析、进化树分析和启动子顺式作用元件分析等生物信息学分析。

1.3 方法

1.3.1 RNA 提取及反转录 将非生物胁迫样品从 -80 ℃ 超低温冰箱取出后迅速在液氮中充分研磨,加入 1 mL RNAiso Plus 试剂 (Takara 公司),提取各样本的总 RNA。通过 1% 琼脂糖凝胶电泳和 OD_{260/280} 值检测 RNA 质量。使用 cDNA 反转录试剂盒 (Novoprotein 公司) 将 RNA 反转录成第一链 cDNA。

1.3.2 实时荧光定量 PCR (qPCR) 根据 *GmNCED5* 基因的开放阅读框 (ORF) 序列,使用 Primer Premier 5 软件设计其 qPCR 引物 (F: 5'-CCTACGAGCTCCGAATCACC-3'; R: 5'-ATGCCGGA-TCATGGAGGAAT-3')。以大豆 β -Tubulin 基因为内参基因 (F: 5'-GGAAGGCTTCTTGCATTGGTA-3'; R: 5'-

AGTGGCATCTCTGGTACTGC-3')^[14]。qPCR 总反应体系为 20 μ L:cDNA 模板 2 μ L、上下游引物各 0.8 μ L、2 \times TB Green Premix Ex Taq II (Takara 公司) 10 μ L、补 H₂O 至总体积。使用 CFX96 Real-Time PCR 仪 (BIO-RAD 公司),设置反应程序:95 ℃ 1 min;95 ℃ 20 s,58 ℃ 1 min,40 次循环。3 次重复,计算基因的相对表达量。

1.3.3 生物信息学分析 基因结构和理化性质分析:使用在线软件 SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1) 预测 *GmNCED5* 蛋白序列的保守结构域及位置。使用在线软件 ExPASy (https://web.expasy.org/compute_pi/) 预测 *GmNCED5* 蛋白分子量和等电点。使用在线软件 NetPhos 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 预测 *GmNCED5* 蛋白序列中可能存在的磷酸化位点;使用在线软件 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/>) 预测 *GmNCED5* 蛋白的信号肽序列;使用在线软件 WoLF PSORT (<https://wolfsort.hgc.jp/>) 和 TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP-1.1/index.php>) 预测 *GmNCED5* 蛋白的亚细胞定位。

进化树分析:从 NCBI 数据库中搜索并下载植物中的 NCED 蛋白氨基酸序列,利用 MEGA5 软件中的邻接法 (NJ) 构建蛋白系统进化树,Boot-strap 重复次数默认 1 000。

启动子顺式作用元件分析:从 PlantGDB 数据库 (<http://www.plantgdb.org/GmGDB/>) 搜索并下载 *GmNCED5* 基因起始密码子上游 2 000 bp 的启动子序列。使用在线软件 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 预测启动子中的顺式作用元件。

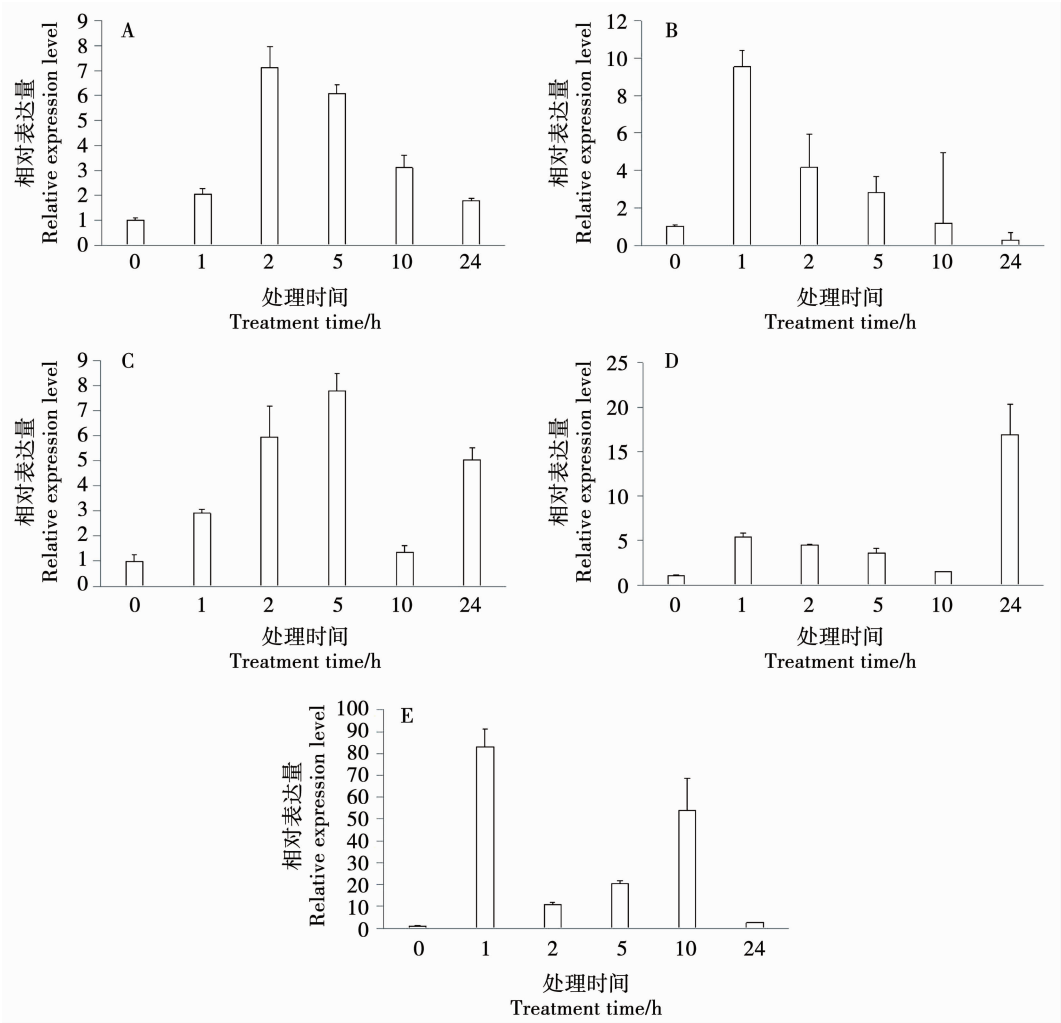
1.4 数据分析

使用 Excel 2010 绘制基因表达量柱状分析图。

2 结果与分析

2.1 非生物胁迫下基因表达分析

实时荧光定量 PCR 结果显示:5 种处理均可以不同程度地诱导 *GmNCED5* 的表达。高盐胁迫处理 2 h 时 *GmNCED5* 的表达量达到最高峰,是对照的 7 倍左右;高温胁迫 1 h 时表达量最高,是对照的 9.5 倍,干旱胁迫处理 5 h 时 *GmNCED5* 的表达量达到最高,是对照的 8 倍左右;低温处理后基因表达量的峰值出现在 24 h,是对照的 17 倍左右;而 ABA 处理后基因的表达量出现两次峰值,第一次峰值在处理 1 h,是对照的 83 倍,之后表达量有所下降,第二次峰值在处理 10 h,是对照的 54 倍 (图 1)。



A - 高盐; B - 高温; C - 干旱; D - 低温; E - ABA 处理。
A - High salt; B - High temperature; C - Drought; D - Low temperature; E - ABA treatment.

图 1 非生物胁迫处理下大豆幼苗 *GmNCED5* 的表达量

Fig. 1 The expression of *GmNCED5* in soybean seedlings under abiotic stress

2.2 基因和蛋白序列分析

序列分析表明, *GmNCED5* 位于大豆第 5 号染色体, ORF 全长1 686 bp, ORF 内部不含有内含子, 编码 1 个含有 561 个氨基酸的蛋白质, 蛋白分子量 62.71 kDa, pI5.95。

预测结果显示, *GmNCED5* 蛋白序列中无信号肽序列, 属于非分泌性蛋白, *GmNCED5* 蛋白氨基酸序列的第 4 位至 559 位是 NCED 家族保守结构域 PLN02258 (图 2)。

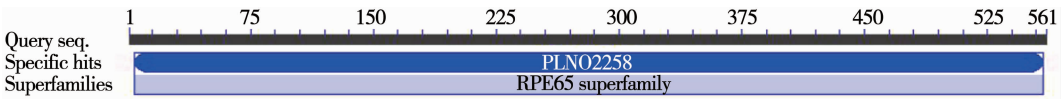


图 2 *GmNCED5* 蛋白质结构域
Fig. 2 The protein domain of *GmNCED5*

亚细胞预测结果表明, *GmNCED5* 蛋白最可能定位于细胞质中。

磷酸化位点预测分析显示, *GmNCED5* 氨基酸序列上共有 44 个磷酸化位点, 属于 RPE65 超家族,

且含有 NCED 家族所特有的 2 个保守结构域序列 (MIAHPKxDP 和 HDFAITE) 和 4 个活性保守组氨酸残基位点 (图 3)。

676 CTGCCATGTCGGAGGACGACCTCCCTACGAGCTCCGAATCACCGCCTCCGGCGACCTCGAAACAATCGGTCGC
226 L A M S E D D L P Y E L R I T A S G D L E T I G R
751 TACAGTTCCACGACCAGCTCAATTCTCCATGATCGCGCATCCGAAGGTGGATCCTATCTCCGGCGAGCTTTTC
251 Y S F H D Q L N S S M I A H P K V D P I S G E L F
826 ACTCTAAGCTACGACGTACGAGCAAGTACCTCAAATACTTCGGTTTCTCGCCGGAGGAGAGAAGAAGTCGCCG
276 T L S Y D V T S K Y L K Y F R F S P E E E K K S P
901 GACGTGGAATCCCCCTCGGCGCCGCGACGATGACGCACGACTTCGCGATCACGAGAATTCGTCGTGATCCCA
301 D V E I P L G A A T M T H D F A I T E N F V V I P
976 GACCAGAAGGTGGTGTTCAGCTCGGCGAAATGATAAAAGGAGGATCGCCGGTGATCTACGACGACGAGAAGAAA
326 D Q K V V F K L G E M I K G G S P V I Y D D E K K
1051 TCGCGTTCCGAATTCTTCCGAAGTACGCCTCCGACGCGTCGAGCATCGTGTGGGTGGAGTACCAGACACGTTTC
351 S R F G I L P K Y A S D A S S I V W V E S P D T F
1126 TTCTTCCACTTCTGGAACGCGTGGGAGGAACGCGAGACGGACGAAGTTGTAGTAATAGGTTCTGTCATGACGCCA
376 F F H F W N A W E E R E T D E V V V I G S C M T P
1201 CCGGATTCAATATTCAAAGACACCGAAGAGAGTCTGAAAAGTGTCTTAACAGAAATAAGGCTTAACATAAGAAGC
401 P D S I F K D T E E S L K S V L T E I R L N I R S
1276 GGGAAGTCGACGCGCGTGTGGTGGTAGAGAAATGAACCTGGAGGCGGGGATGGTGAACCGGAACAGGTGCGGG
426 G K S T R R V V V E E M N L E A G M V N R N R L G
1351 AGAAAAACCGGTTTCGCGTACTTGTGCATAGCGGAACCGTGGCCGAAGGTGTCGGGATTTCGCGAAGGTGGACCTG
451 R K T R F A Y L C I A E P W P K V S G F A K V D L
1426 GAGAGTGGGAAGTGAAGAGGCACGAGTACGGAGAGAGAAGGTTCTGGGGGAGAGCCATTCTTTTCCAAACACGT
476 E S G E V K R H E Y G E R R F G G E P F F L P T R
1501 GGAGAGAATGGGAATGAGGATGAAGGTACGTGATGGCTTTTGTGCATGACGAGGTGACGTGGCAGTCCGAGTTG
501 G E N G N E D E G Y V M A F V H D E V T W Q S E L
1576 CAGATTCTGAATGCACTTGATTGAAGTTGGAGGCCACCATCATGCTGCCTTCAGAGTGCCTATGGCTTTTCAT
526 Q I L N A L D L K L E A T I M L P S R V P Y G F H
1651 GGCACGTTTGTGGAGGCTATGGATTGCCCCAGTGA
551 G T F V E A M D L P Q *

下划线代表保守结构域序列;方框代表保守组氨酸残基位点;黑体代表磷酸化位点;星号代表终止密码子。
The conserved domain sequences were underlined; The active conserved sites were in the box; The phosphorylation sites were shown in black; The termination codon was indicated by asterisk.

图 3 *GmNCED5* 核酸序列及其编码氨基酸序列

Fig. 3 The nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *GmNCED5*

2.3 *GmNCED5* 蛋白系统进化分析

NCED 蛋白系统发育树如图 4 所示,NCED 蛋白分为两大组,第二大组含有大豆 *GmNCED5*、豇豆 *VuNCED*、拟南芥 *AtNCED2*、可可 *TcNCED5*、拟南芥 *AtNCED5*、四季豆 *PvNCED2*、大豆 *GmNCED1* 和番茄 *SINCED*,其中,*GmNCED5* 蛋白与豇豆 *VuNCED* 蛋白的亲缘关系最近。

2.4 *GmNCED5* 基因启动子元件预测分析

如表 1 所示,*GmNCED5* 启动子中除含有光响应相关元件外,还含有 5 种激素响应相关元件(ABRE、CGTCA-motif、GARE-motif、TCA-element 和 TGACG-motif)和 3 种胁迫响应相关元件(ARE、GC-motif 和 LTR)。这些顺式作用元件的存在可能导致 *GmNCED5* 基因参与大豆对胁迫和激素诱导的应答。

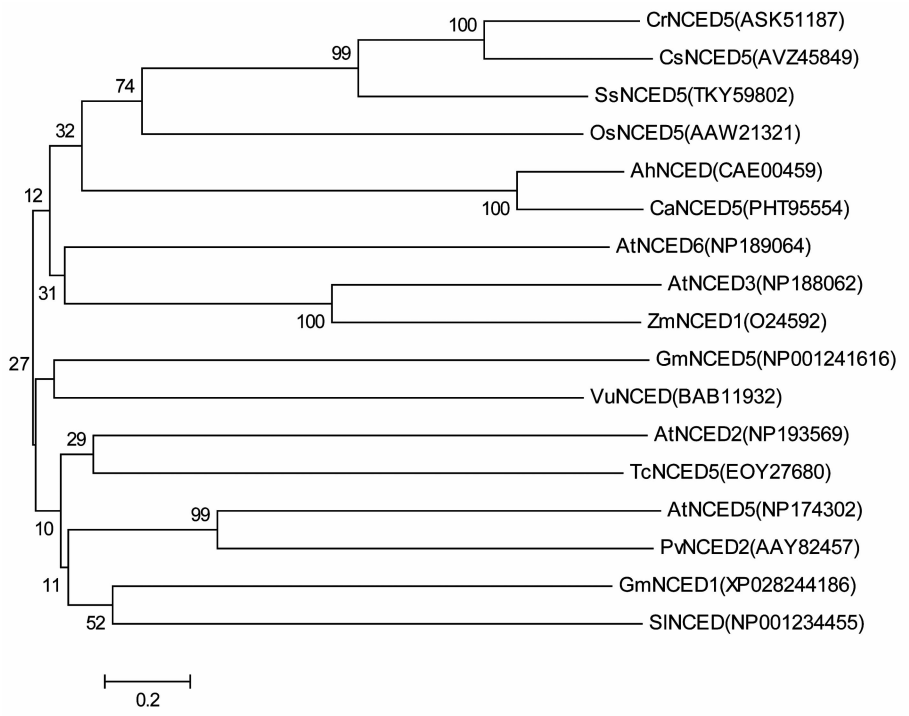


图 4 NCED 蛋白系统进化树

Fig. 4 The phylogenetic tree of NCED protein

表 1 *GmNCED5* 启动子顺式作用元件预测

Table 1 The prediction of *cis*-elements in *GmNCED5* promoter

基序 Motif	功能预测 Functional prediction	序列 Sequence	数目 Amount	位置 Location/bp
ABRE	脱落酸响应元件 ABA responsive element	ACGTG	3	+ 1291 、 - 1779 、 - 1746
ARE	厌氧诱导元件 Anaerobic induction element	AAACCA	1	+ 1858
Box 4	光响应元件 Light responsive element	ATTAAT	5	+ 295 、 + 335 、 + 549 、 - 1589 、 - 1012
CGTCA-motif	茉莉酸甲酯响应元件 MeJA responsive element	CGTCA	1	- 1289
G-Box	光响应元件 Light responsive element	ACGTG	3	- 1779 、 - 1746 、 - 1290
GARE-motif	赤霉素响应元件 Gibberellin responsive element	TCTGTTG	1	+ 59
GC-motif	缺氧特异性诱导元件 Anoxic specific inducibility element	CCCCCG	1	+ 661
GT1-motif	光响应元件 Light responsive element	GGTTAA	1	+ 418
LTR	低温响应元件 Low-temperature responsive element	CCGAAA	1	- 414
TCA-element	水杨酸响应元件 Salicylic acid responsive element	TCAGAAGAGG	1	- 769
TGACG-motif	茉莉酸甲酯响应元件 MeJA responsive element	TGACG	1	+ 1289

3 讨 论

非生物胁迫是影响大豆产量的主要环境因素。ABA 作为信号分子可以激活植物体内抗逆基因的表达,在植物应对非生物胁迫时发挥重要作用。研究表明,植物体内 ABA 的合成受 NCED 基因表达水平的调控^[15-16],在转基因植物中过表达 NCED 基因可以提高体内 ABA 的积累^[17-18],而抑制 NCED 基因的表达则使内源 ABA 含量下降^[19]。本研究的 *GmNCED5* 蛋白序列中含有 NCED 家族所特有的保守结构域及 4 个保守组氨酸残基位点,这些位点对类胡萝卜素裂解双加氧酶家族中铁辅因子的结合至关重要^[20-21],也表明了 *GmNCED5* 属于 NCED 基因家族。以往研究表明,大多数 NCED 基因编码的蛋白含有叶绿体转运肽,定位于叶绿体中^[22-23]。但也有例外,例如 *OsNCED4* 蛋白定位于细胞核中^[24],*GmNCED5* 蛋白的预测结果也显示其不含有叶绿体转运肽,最可能定位于细胞质中。

研究表明,NCED 基因主要通过促进气孔关闭减少水分蒸发及诱导 *rab18*、*kin1* 和 *rd29b* 等胁迫相关基因的表达来应答干旱胁迫^[19, 25],而其应答其他非生物胁迫的机制则比较复杂。豇豆 *VuNCED1* 的表达可以被干旱和高盐胁迫诱导,但却不被低温和高盐胁迫诱导^[26]。白蜡树 *FvNCED3* 的表达量在干旱和高盐胁迫下增加,在高温和低温胁迫下降低^[27]。本研究中 *GmNCED5* 的表达则可以被干旱、高盐、低温和高温 4 种非生物胁迫不同程度诱导表达。ABA 被认为可以负调控植物内源 ABA 的积累。拟南芥 *AtNCED3* 和枸杞 *LeNCED1* 可以被外源 ABA 诱导表达^[21, 28],而豇豆 *VuNCED1* 则不被外源 ABA 诱导表达^[26]。本研究中 *GmNCED5* 的表达在外源 ABA 的作用下也出现了显著上调,这表明 *GmNCED5* 的表达量可能受到 ABA 的反馈调控^[21]。*GmNCED5* 启动子中含有多个 ABA 响应元件,这可能是导致 *GmNCED5* 对 ABA 诱导响应最为明显的重要原因^[23]。

本研究初步证实 *GmNCED5* 基因参与了大豆对非生物胁迫的应答,后续将会将 *GmNCED5* 基因转入植物植株并对转基因植株进行抗逆性鉴定,进而为该基因在植物抗逆基因工程育种中的应用提供理论依据,并丰富植物抗逆候选基因资源。

4 结 论

干旱、高盐、高温、低温及外源 ABA 处理均可以不同程度地诱导 *GmNCED5* 在大豆幼苗中的表达。*GmNCED5* 基因编码 1 个含有 561 个氨基酸的蛋白,主要定位于细胞质中。*GmNCED5* 蛋白与豇豆 *VuNCED* 蛋白亲缘关系最近。*GmNCED5* 启动子区域含有 5 种激素响应相关顺式作用元件和 3 种胁迫

响应相关顺式作用元件。本研究为 *GmNCED5* 基因在植物抗逆基因工程育种中的应用提供理论依据。

参考文献

[1] Cutler S R, Rodriguez P L, Finkelstein R R, et al. Absciscic acid; Emergence of a core signaling network[J]. Annual Review of Plant Biology, 2010, 61(1): 651-679.

[2] Vishwakarma K, Upadhyay N, Kumar N, et al. Absciscic acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: A review on current knowledge and future prospects[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 161.

[3] Milborrow B V. The pathway of biosynthesis of absciscic acid in vascular plant: A review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis[J]. Journal of Experimental Botany, 2001, 52(359): 1145-1164.

[4] Qin X Q, Zeevaart J A D. The 9-*cis*-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of absciscic acid biosynthesis in water-stressed bean[J]. Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America, 1999, 96(26): 15354-15361.

[5] Schwartz S H, Qin X, Zeevaart J A. Elucidation of the indirect pathway of absciscic acid biosynthesis by mutants, genes, and enzymes[J]. Plant Physiology, 2003, 131(4): 1591-1601.

[6] 王小龙, 刘凤之, 史祥宾, 等. 葡萄 *NCED* 基因家族进化及表达分析[J]. 植物学报, 2019, 54(4): 474-485. (Wang X L, Liu F Z, Shi X B, et al. Evolution and expression analysis of *NCED* gene family in grapevine[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2019, 54(4): 474-485.)

[7] Endo A, Sawada Y, Takahashi H, et al. Drought induction of *Arabidopsis* 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase occurs in vascular parenchyma cells[J]. Plant Physiology, 2008, 147(4): 1984-1993.

[8] Frey A, Effroy D, Lefebvre V, et al. Epoxycarotenoid cleavage by NCED5 fine-tunes ABA accumulation and affects seed dormancy and drought tolerance with other NCED family members[J]. The Plant Journal, 2012, 70(3): 501-512.

[9] Xia H, Wu S, Ma F W. Cloning and expression of two 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase genes during fruit development and under stress conditions from *Malus* [J]. Molecular Biology Reports, 2014, 41(10): 6795-6802.

[10] 王昌耀, 闫尔俊, 常凯, 等. 转 *LeNCED1* 基因对白三叶 ABA 含量及水分利用效率的影响[J]. 云南农业大学学报, 2020, 35(6): 1029-1033. (Wang C Y, Yan E J, Chang K, et al. Effect of transfection of *LeNCED1* gene on ABA content and water use efficiency in white clover[J]. Journal of Yunnan Agricultural University, 2020, 35(6): 1029-1033.)

[11] Xu P, Cai W. Functional characterization of the *BnNCED3* gene in *Brassica napus*[J]. Plant Science, 2017, 256: 16-24.

[12] 张洁. 大豆 *GmNCED1* 基因的功能鉴定及其表达调控研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2014. (Zhang J. Functional identification and expression regulation of *GmNCED1* gene in soybean[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2014.)

[13] 李琼琼, 张洁, 邓宇, 等. 大豆 *GmNCED1* 基因的克隆及表达模式分析[J]. 中国油料作物学报, 2014, 36(4): 455-460. (Li Q Q, Zhang J, Deng Y, et al. Cloning and expression pattern analysis of soybean *GmNCED1* gene[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2014, 36(4): 455-460.)

(下转第 489 页)

physiological response mechanism of soybean (*Glycine max*) stem to shad stress at seedling stage[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2011, 33(2): 141-146.)

[31] 彭姜龙, 张永强, 唐江华, 等. 株行距配置对夏大豆光合特性及产量的影响[J]. 大豆科学, 2015, 34(5): 794-800. (Peng J L, Zhang Y Q, Tang J H, et al. Effect of plant-row spacing on photosynthetic characteristics and yield of summer soybean[J]. Soybean Science, 2015, 34(5): 794-800.)

[32] 高亚男, 曹庆军, 韩海飞, 等. 不同行距对春玉米产量和光合速率的影响[J]. 玉米科学, 2010(2): 73-76. (Gao Y N, Cao Q J, Han H F, et al. Effect of different row spacing on yield and photosynthetic rate of spring maize[J]. Journal of Maize Sciences, 2010(2): 73-76.)

[33] 周勋波, 孙淑娟, 陈雨海, 等. 株行距配置对夏大豆光利用特性、干物质积累和产量的影响[J]. 中国油料作物学报, 2008, 30(3): 322-326. (Zhou X B, Sun S J, Chen Y H, et al. Effect of plant row spacing on solar utilization, dry matter weight and yield in summer soybean [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2008, 30(3): 322-326.)

[34] 张敬涛, 王成, 王谦玉, 等. 不同栽培模式对大豆产量及生长发育的影响[J]. 中国农学通报, 2002, 18(5): 8-10. (Zhang J T, Wang C, Wang Q Y, et al. Effect of different cultivation on soybean yield and development[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2002, 18(5): 8-10.)

[35] Adams P D, Weaver D B. Stem trait row spacing and plant population effects on soybean yield[J]. Crop Science, 1998, 38(3): 750-755.

[36] 彭姜龙. 品种筛选和株行距配置方式对夏大豆产量形成的影响[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2015. (Peng J L. Effects of variety selection and spacing configurations on yield formation of summer soybean [D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2015.)

[37] 王维军. 大豆落花落荚原因及其解决途径的探讨[J]. 中国农业科学, 1962, 3(5): 21-24. (Wang W J. The reason of falling pods and flowers of soybean and the prevention solutions [J]. Scientia Agricultura Sinica, 1962, 3(5): 21-24.)

[38] 柴国华, 吕慧颖, 李辉亮, 等. 热胁迫对大豆花荚离层细胞 *HSP70* 基因表达、能量供应及花荚脱落率的影响[J]. 农业生物技术学报, 2006, 14(4): 574-577. (Chai G H, Lyu H Y, Li H L, et al. Effects of heat stress on *HSP70* gene expression and energy supply in abscission zone of flowers-pods, and abscission rate of flowers-pods in soybean cultivars [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2006, 14(4): 574-577.)

(上接第 481 页)

[14] Zhai Y, Wang Y, Li Y J, et al. Isolation and molecular characterization of *GmERF7*, a soybean ethylene-response factor that increases salt stress tolerance in tobacco[J]. Gene, 2013, 513(1): 174-183.

[15] Sun L, Sun Y, Zhang M, et al. Suppression of 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase, which encodes a key enzyme in abscisic acid biosynthesis, alters fruit texture in transgenic tomato [J]. Plant Physiology, 2012, 158(1): 283-298.

[16] Rodrigo M J, Alquezar B, Zacarias L. Cloning and characterization of two 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase genes, differentially regulated during fruit maturation and under stress conditions, from orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) [J]. Journal of Experimental Botany, 2006, 57(3): 633-643.

[17] Qin X, Zeevaart J A. Overexpression of a 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase gene in *Nicotiana plumbaginifolia* increases abscisic acid and phaseic acid levels and enhances drought tolerance[J]. Plant Physiology, 2002, 128(2): 544-551.

[18] Wan X R, Li L. Regulation of ABA level and water-stress tolerance of *Arabidopsis* by ectopic expression of a peanut 9-*cis*-epoxy-carotenoid dioxygenase gene [J]. Biochemical Biophysical Research Communications, 2006, 347(4): 1030-1038.

[19] Iuchi S, Kobayashi M, Taji T, et al. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. The Plant Journal, 2001, 27(4): 325-333.

[20] Schwartz S H, Tan B C, Gage D A, et al. Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize[J]. Science, 1997, 276(5320): 1872-1874.

[21] Tian X W, Ji J, Wang G, et al. Cloning and expression analysis of 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase gene 1 involved in fruit maturation and abiotic stress response in *Lycium chinense* [J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2015, 34(3): 465-474.

[22] 王赞, 陈丹, 岳川, 等. 茶树 *CsNCED2* 基因的克隆和表达分析[J]. 西北植物学报, 2018, 38(6): 994-1002. (Wang Z, Chen D, Yue C, et al. Cloning and expression analysis of *CsNCED2* gene in tea plant [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2018, 38(6): 994-1002.)

[23] Jia Y Y, Liu J L, Bai Z Q, et al. Cloning and functional characterization of the *SmNCED3* in *Salvia miltiorrhiza* [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2018, 40(7): 133.

[24] 周丽, 李梦婷, 朱莺, 等. 水稻 *OsNCED4* 基因的克隆及功能初探[J]. 分子植物育种, 2020, 18(7): 2087-2096. (Zhou L, Li M T, Zhu Q, et al. Cloning and functional analysis of *OsNCED4* gene in rice [J]. Molecular Plant Breeding, 2020, 18(7): 2087-2096.)

[25] Zeevaart J A, Creelman R A. Metabolism and physiology of abscisic acid[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1988, 39: 439-473.

[26] Iuchi S, Kobayashi M, Yamaguchi S K, et al. A stress-inducible gene for 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase involved in abscisic acid biosynthesis under water stress in drought-tolerant cowpea [J]. Plant Physiology, 2000, 123(2): 553-562.

[27] Li T, Sun J, Li C, et al. Cloning and expression analysis of the *FvNCED3* gene and its promoter from ash (*Fraxinus velutina*) [J]. Journal of Forestry Research, 2019, 30(2): 471-482.

[28] Xiong L, Lee H, Ishitani M. Regulation of osmotic stress-responsive gene expression by the LOS6/ABA1 locus in *Arabidopsis* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(10): 8588-8596.