

大豆脯氨酸积累相关基因家族鉴定及干旱胁迫表达分析

商成慧, 周泽宇, 崔文雪, 郭卫冷, 杨敬华, 白 琰, 郭长虹

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

摘要: 脯氨酸是一种广泛存在的渗透调节物质, 在植物生长发育以及响应干旱胁迫的信号途径中具有重要作用。吡咯啉-5-羧酸合成酶 (P5CS)、鸟氨酸转氨酶 (δ -OAT)、吡咯啉-5-羧酸还原酶 (P5CR)、脯氨酸脱氢酶 (ProDH)、吡咯啉-5-羧酸脱氢酶 (P5CDH)、脯氨酸转运体 (ProT) 是影响植物体内脯氨酸积累的关键酶。但关于大豆脯氨酸积累相关基因家族成员的研究尚未见报道。本研究在大豆基因组中鉴定出 7 个 *GmP5CS*、2 个 *GmOAT*、2 个 *GmP5CR*、5 个 *GmProDH*、3 个 *GmP5CDH* 及 6 个 *GmProT* 基因, 不均匀地分布在大豆 20 条染色体中的 12 条上, 发生 16 对片段复制事件。系统进化树分析发现, 大豆脯氨酸积累相关基因家族分为不同的进化分支, 同一亚族间的基因结构和保守基序相似。顺式作用元件分析结果显示, 脯氨酸积累相关基因家族含响应逆境胁迫及植物激素的顺式作用元件。干旱胁迫下的表达模式分析结果显示, 脯氨酸合成代谢相关基因家族成员 (*GmP5CS*、*GmOAT*、*GmP5CR*) 响应干旱胁迫, 在干旱胁迫 24 h 时显著上调表达; 大多脯氨酸分解代谢相关基因家族成员 (*GmProDH*、*GmP5CDH*) 下调表达, 脯氨酸转运相关基因家族成员 (*GmProT*) 在干旱胁迫 24 h 显著上调表达, 其中 *GmP5CS5*、*GmOAT1*、*GmProT2*、*GmProT4* 及 *GmProDH3~5* 基因在干旱胁迫下的脯氨酸积累中可能起到关键作用。大豆幼苗 P5CS、OAT 活性随干旱胁迫时间的延长呈显著上升的趋势, 与脯氨酸的积累呈正相关; ProDH 活性随干旱胁迫时间的增长呈显著下降的趋势, 与脯氨酸的积累呈负相关。本研究为进一步解析大豆脯氨酸积累相关家族基因响应干旱胁迫的功能提供了参考。

关键词: 大豆; 脯氨酸积累相关基因家族; 干旱胁迫; 基因表达

Identification and Expression Analysis of Proline Accumulation Related Gene Families in Soybean under Drought Stress

SHANG Cheng-hui, ZHOU Ze-yu, CUI Wen-xue, GUO Wei-leng,
YANG Jing-hua, BAI Yan, GUO Chang-hong

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

Abstract: Proline is a ubiquitous osmotic regulator that plays an important role in plant growth and development as well as signaling pathways in response to drought stress. P5CS, δ -OAT, P5CR, ProDH, P5CDH and ProT are the key enzymes that affect proline accumulation in plants. However, the members of the gene families related to proline accumulation in soybean remained to be systemically investigated. In this study, seven *GmP5CS*, two *GmOAT*, two *GmP5CR*, five *GmProDH*, three *GmP5CDH* and six *GmProT* genes were identified and found to be unevenly distributed on 12 of 20 soybean chromosomes, showing 16 pairs of fragment duplication events. The phylogenetic analysis showed that the soybean proline accumulation-related gene families were classified into different evolutionary branches, while within each branch a conservation on functional structure and motifs was observed. Analysis of *cis*-acting elements in these gene families revealed contained *cis*-acting

收稿日期: 2022-03-28 修回日期: 2022-07-01 网络出版日期: 2022-07-29

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20220328003>

第一作者研究方向为分子遗传学, E-mail: shangchenghui1998@163.com

通信作者: 白琰, 研究方向为植物多倍体进化, E-mail: baiyan789@163.com

郭长虹, 研究方向为植物遗传学, E-mail: kaku3008@126.com

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2021YFD1201103); 国家自然科学基金 (31972507); 哈尔滨师范大学研究生创新基金 (HSDSSCX2021-104)

Foundation projects: National Key Research and Development Program of China (2021YFD1201103); National Natural Science Foundation of China (31972507); Graduate Innovation Fund of Harbin Normal University (HSDSSCX2021-104)

elements that were reported associating with response to stress and plant hormones. Analysis of transcriptional profiles under drought stress treatment showed that the proline anabolism-related gene family members (*GmP5CS*, *GmOAT*, *GmP5CR*) were significantly up-regulated 24 hours post treatment, the most proline catabolism-related gene family members (*GmProDH*, *GmP5CDH*) were down-regulated, and the expression levels of proline transport-related gene family members (*GmProT*) were significantly up-regulated. Especially, *GmP5CS5*, *GmOAT1*, *GmProT2*, *GmProT4* and *GmProDH3-5* genes may play key roles in proline accumulation under drought stress. Moreover, the P5CS and OAT activity of soybean seedlings, which was significantly increased along with the increase of drought stress time, positively correlated with proline accumulation. The ProDH activity was significantly decreased along with the increase of drought stress time, and was negatively correlated with the accumulation of proline. Collectively, this study provided information for further analyzing the functions of soybean proline accumulation-related family genes in response to drought stress.

Key words: *Glycine max*; proline accumulation related gene families; drought stress; gene expression

植物在生长发育过程中经常遭受各种环境胁迫,包括生物胁迫和非生物胁迫,其中干旱胁迫是对植物生长和产量产生负面影响的重要非生物胁迫之一^[14]。在长期的进化过程中,植物形成了许多机制以抵抗或部分抵抗外界的逆境条件。在干旱胁迫下,植物通过积累渗透调节物质保护细胞结构。脯氨酸作为一种信号化合物在干旱胁迫应答中发挥重要作用。

已有研究表明,植物内源脯氨酸的积累受到合成、降解及细胞内、细胞间转运的共同调节^[5]。植物中脯氨酸合成主要分为谷氨酸途径和鸟氨酸途径^[6-7]。谷氨酸在吡咯琳-5-羧酸合成酶(P5CS, delta-pyrroline-5-carboxylate synthetase)及吡咯琳-5-羧酸还原酶(P5CR, delta-pyrroline-5-carboxylate reductase)作用下生成脯氨酸^[8],鸟氨酸在鸟氨酸转氨酶(δ -OAT, ornithine- δ -aminotransferase)及P5CR作用下生成脯氨酸^[9]。脯氨酸的降解代谢基本是合成代谢的逆过程,脯氨酸被脯氨酸脱氢酶(ProDH, proline dehydrogenase)和吡咯琳-5-羧酸脱氢酶(P5CDH, delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase)催化降解^[10]。在干旱胁迫下,植物可以通过对脯氨酸高度选择运输的脯氨酸转运体(ProT, proline transporter)运输脯氨酸^[11]。以上研究表明,P5CS、 δ -OAT、P5CR、ProDH、P5CDH、ProT 6类酶是影响植物体内脯氨酸积累的关键酶。

目前,已在拟南芥、烟草、水稻、玉米等多种植物中研究脯氨酸积累相关基因^[12-15]。P5CS是脯氨酸谷氨酸合成途径的关键限速酶,在拟南芥中,*AtP5CS*可以被多种非生物胁迫诱导表达,如干旱、盐和ABA等^[16]。拟南芥敲除突变体*atp5cs1*中脯氨酸含量显著降低,植株对盐胁迫的敏感性增加,过表达*P5CS1*植株促进脯氨酸的积累,提高转基因植株的渗透调

节能力^[17-18]。植物脯氨酸合成代谢的另一个关键酶是 δ -OAT, δ -OAT基因可被干旱、低温、ABA胁迫诱导表达,并且不受脯氨酸的反馈抑制作用^[19]。过表达 δ -OAT植株脯氨酸大量累积,从而增强转基因烟草对盐胁迫的耐受性^[20]。干旱胁迫下,P5CR催化的反应位于植物脯氨酸合成代谢两条途径的交界位置,在脯氨酸代谢调节中起重要作用。植物在干旱、低温、盐胁迫或ABA处理的情况下诱导P5CR基因表达^[21-23]。ProDH是脯氨酸分解途径的关键限速酶,ProDH在植物中参与脯氨酸氧化降解反应来改变脯氨酸积累水平,进而改变植物对生物和非生物胁迫的耐受性。在拟南芥中,反义抑制*ProDH*基因会导致ProDH活性降低及脯氨酸含量升高,转基因植株后代与对照植株相比更具有盐、干旱、低温胁迫的抗性^[24]。P5CDH催化植物脯氨酸降解途径的最后一步。在拟南芥中过表达*GmP5CDH*降低植物对盐和ABA胁迫的耐受性,根长和鲜重以及植株体内脯氨酸合成显著降低^[25]。逆境胁迫诱导的脯氨酸积累会受到转运的影响。*HvProT*过表达导致转基因植株地上部分的生物量和脯氨酸水平下降,而PDH的mRNA含量和活性均增加,表明ProT可能诱导脯氨酸降解,致使脯氨酸含量降低^[26]。

大豆(*Glycine max*(L.)Merr.)是我国乃至世界上最重要的油料作物和粮食作物之一,是全球优质蛋白质和食用植物油的优良来源^[27]。随着极端天气频发、全球气候变暖加剧及人口增长,水资源短缺的形势愈发严峻,干旱已成为大豆高产可持续的主要限制因素,因此挖掘大豆抵御干旱胁迫相关基因资源刻不容缓。迄今为止,关于脯氨酸合成、降解及转运的家族基因功能在拟南芥等植物中已被挖掘和鉴定^[12-15],尚未见脯氨酸积累相关

基因家族在大豆中的研究报道。本研究拟从大豆中鉴定出 *GmP5CS*、*GmOAT*、*GmP5CR*、*GmProDH*、*GmP5CDH*、*GmProT* 基因家族成员,并对这些成员的分子特性、基因结构、顺式作用元件、染色体定位、进化关系、干旱胁迫下的表达模式进行系统分析,并检测脯氨酸含量、P5CS、OAT 和 ProDH 酶活,以期为进一步解析大豆脯氨酸积累相关家族基因响应干旱胁迫的功能提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆品种:黑河 43(黑审豆 2007011)。RNA prep Pure Plant Kit(TIANGEN,北京,中国);反转录试剂盒(全式金,北京,中国);THUNDERBIRD SYBR® qPCR Mix(TOYOBO,上海,中国)。

1.2 方法

1.2.1 大豆脯氨酸积累相关基因家族成员鉴定 大豆基因组数据、CDS 序列、蛋白质序列以及注释文件,均来自 Phytozome(https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!infoalias=Org_Gmax)数据库,拟南芥基因序列和蛋白序列下载自拟南芥信息资源(TAIR10, <https://www.arabidopsis.org/>),野生大豆(*Glycine soja* Siebold & Zucc.)、鹰嘴豆(*Cicer arietinum* L.)、木豆(*Cajanus cajan* L.)、花生(*Arachis hypogaea* L.)、蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula* L.)和烟草(*Nicotiana tabacum* L.)脯氨酸积累相关基因家族蛋白序列下载自 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。以已知的拟南芥 6 个基因家族蛋白序列为参考对大豆的蛋白序列进行本地 Blast,设置 E-value 参数为 0.001,筛选得到候选同源基因。将搜索得到的序列提交到 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)进行蛋白结构预测,以确定其含有特定保守结构域。最终筛选出大豆中的 *GmP5CS*、*GmOAT*、*GmP5CR*、*GmProDH*、*GmP5CDH*、*GmProT* 基因家族全部成员。

1.2.2 大豆脯氨酸积累相关基因家族蛋白理化性质以及亚细胞定位分析 使用在线分析软件 ExPasy(<http://www.expasy.org/tools/>)对大豆家族所有成员基本理化性质进行预测;使用 Plant-mPLoc server(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>)进行亚细胞定位预测。

1.2.3 大豆脯氨酸积累相关基因家族的序列分析与系统发育树构建 利用 ClustalX 软件(<http://www.clustal.org/clustal2/>)将大豆、野生大豆、鹰嘴豆、木豆、

拟南芥、花生、蒺藜苜蓿和烟草 *P5CS*、*OAT*、*P5CR*、*ProDH*、*P5CDH*、*ProT* 蛋白序列进行比对,并使用 MEGA7^[28]中的 Neighbour-Joining(NJ)系统发育方法构建系统发育树。Bootstrap 重复值 1000 次,使用 ITOL(<https://itol.embl.de/>)网站美化系统发育树。参考拟南芥 *P5CS*、*OAT*、*P5CR*、*ProDH*、*P5CDH*、*ProT* 基因家族分类结果对大豆脯氨酸积累相关基因家族进行分类。

1.2.4 大豆脯氨酸积累相关基因家族的基因结构和 motif 分析 利用在线网站 GSDS2.0(<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)分析上述基因家族所有成员基因结构;并通过在线网站 MEME(<http://meme-suite.org/GSDS>)预测脯氨酸积累相关基因家族保守基序,参数设定保守基序数量为 10。基因结构及保守结构域信息使用 TBtools 软件^[29]进行可视化展示。

1.2.5 启动子顺式作用元件预测 利用 TBtools 软件从大豆 GFF3 文件中提取脯氨酸积累相关家族基因上游 2000 bp 的 DNA 序列,提交到 Plantcare(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html>)网站进行顺式元件预测,预测结果使用 TBtools 软件进行可视化展示。

1.2.6 染色体定位和基因复制关系分析 从大豆 GFF3 文件中提取脯氨酸积累相关基因家族成员的染色体位置信息和染色体长度信息,利用 TBtools 软件的 Gene Location Visualize 功能绘制基因的染色体定位图。利用 MCScanX 工具提取重复基因对,并使用 TBtools Circos 工具进行重复基因对关系可视化。

1.2.7 大豆幼苗干旱胁迫处理 大豆种子种植于装有土壤基质的营养钵中,置于温室(24℃,光照 16 h/黑暗 8 h)中培养,3 周后,选取长势一致的幼苗,用 5% PEG6000 溶液进行干旱胁迫处理,对照组用水浇灌。分别于胁迫处理 0 h、3 h、6 h、12 h、24 h 取材,液氮速冻后用于总 RNA 的分离。

1.2.8 总 RNA 提取和实时荧光定量 PCR 分析 提取植物总 RNA 采用 RNA prep Pure Plant Kit 试剂盒。以提取出的总 RNA 为模板,使用反转录试剂盒合成 cDNA。利用软件 Primer5^[30]设计引物,以大豆 *Actin* 为内参基因。使用 TOYOBO 公司 qRT-PCR 试剂盒进行定量 PCR 实验,具体程序设置参考说明书进行,并使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算基因的相对表达量。SPSS 软件进行差异显著性分析。

1.2.9 干旱胁迫下脯氨酸及脯氨酸积累相关的酶活性测定 采用茚三酮显色法,测定在 PEG 胁迫不同时间点的游离脯氨酸含量^[31]。参照韩晓玲^[32]的方法,采用盐酸羟胺比色法,测定在 PEG 胁迫不同

时间点的 P5CS 酶活性。参照赵贵林^[33]的方法,测定在 PEG 胁迫不同时间点的 OAT 酶活性。参照赵福庚等^[34]的方法,测定在 PEG 胁迫不同时间点的 ProDH 酶活性。

2 结果与分析

2.1 大豆脯氨酸积累相关基因家族鉴定

利用生物信息学手段和相关网站进行筛选验证,在大豆全基因组中共鉴定获得 7 个大豆 P5CS 基因(*GmP5CS*)、2 个大豆 OAT 基因(*GmOAT*)、2 个大豆 P5CR 基因(*GmP5CR*)、5 个大豆 ProDH 基因(*GmProDH*)、3 个大豆 P5CDH 基因(*GmP5CDH*)、6 个大豆 ProT 基因(*GmProT*)。根据它们在染色体上的相对位置分别将其命名为 *GmP5CS1*~*GmP5CS7*、*GmOAT1*~*GmOAT2*、*GmP5CR1*~*GmP5CR2*、*GmProDH1*~*GmProDH5*、*GmP5CDH1*~*GmP5CDH3*、

GmProT1~*GmProT6*。

由表 1 可知,*GmP5CS* 家族编码蛋白的长度为 713~763 个氨基酸,其他家族蛋白均表现出相似的氨基酸残基数目。大多数脯氨酸积累相关基因家族编码蛋白的等电点都大于 7,只有 *GmP5CDH1*、*GmP5CDH3* 及 *GmP5CS* 在 7 以下,结果显示,*GmP5CS* 可能是一类酸性蛋白。*GmP5CS* 分子量介于 77.42 kDa(*GmP5CS5*)和 83.13 kDa(*GmP5CS4*)之间,*GmProT* 分子量介于 47.28 kDa(*GmProT1*)和 51.10 kDa(*GmProT2*)之间,其余家族蛋白具有相近的分子量。亚细胞定位预测发现,*GmP5CS* 及 *GmP5CR* 蛋白定位于细胞质、*GmOAT* 蛋白定位于叶绿体、*GmProDH* 及 *GmP5CDH* 蛋白定位于线粒体、大多数 *GmProT* 蛋白定位于细胞膜上,但 *GmProT4* 和 *GmProT6* 蛋白定位于细胞膜或高尔基体中,结果显示同一家族基因编码的大多数蛋白质具有相似的定位。

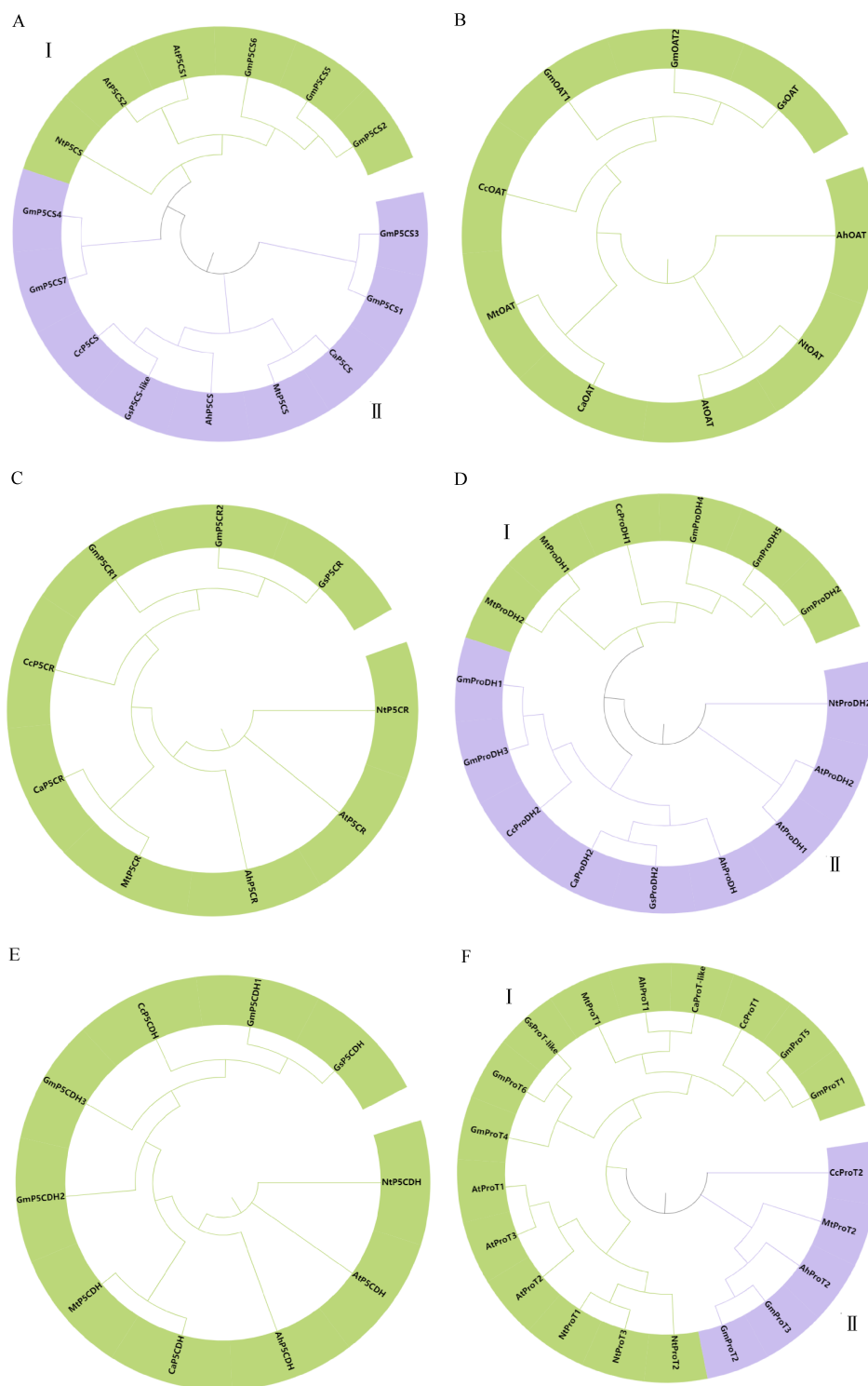
表 1 大豆脯氨酸积累相关基因家族基本信息
Table 1 Basic information of proline accumulation related gene families in soybean

基因名称 Gene name	基因 ID Gene ID	染色体 Chr.	氨基酸数量 No.of amino acids	外显子数量 No. of exons	等电点 (pI) Isoelectric point	分子量 (kDa) Molecular weight	亚细胞定位 Subcellular location
<i>GmP5CS1</i>	Glyma.01G099800	1	755	20	6.32	82.14	细胞质
<i>GmP5CS2</i>	Glyma.02G251100	2	713	17	6.37	77.53	细胞质
<i>GmP5CS3</i>	Glyma.03G069400	3	756	20	6.10	82.18	细胞质
<i>GmP5CS4</i>	Glyma.07G137300	7	763	20	6.42	83.13	细胞质
<i>GmP5CS5</i>	Glyma.14G065600	14	713	17	6.18	77.42	细胞质
<i>GmP5CS6</i>	Glyma.18G034300	18	715	20	6.57	78.01	细胞质
<i>GmP5CS7</i>	Glyma.18G188000	18	720	20	6.70	78.38	细胞质
<i>GmOAT1</i>	Glyma.05G141900	5	469	11	8.10	51.43	叶绿体
<i>GmOAT2</i>	Glyma.08G097800	8	467	10	7.08	51.18	叶绿体
<i>GmP5CR1</i>	Glyma.03G129100	3	274	7	7.91	28.64	细胞质
<i>GmP5CR2</i>	Glyma.19G131500	19	274	7	7.92	28.56	细胞质
<i>GmProDH1</i>	Glyma.08G255900	8	494	4	7.67	54.54	线粒体
<i>GmProDH2</i>	Glyma.13G049700	13	495	4	7.63	54.31	线粒体
<i>GmProDH3</i>	Glyma.18G278900	18	489	4	7.26	54.00	线粒体
<i>GmProDH4</i>	Glyma.19G042900	19	500	4	8.06	55.05	线粒体
<i>GmProDH5</i>	Glyma.19G043000	19	498	4	7.19	54.75	线粒体
<i>GmP5CDH1</i>	Glyma.05G029100	5	542	15	6.08	60.10	线粒体
<i>GmP5CDH2</i>	Glyma.05G029200	5	554	16	7.23	61.44	线粒体
<i>GmP5CDH3</i>	Glyma.17G097800	17	553	16	6.50	61.23	线粒体
<i>GmProT1</i>	Glyma.02G253200	2	433	7	8.18	47.28	细胞膜
<i>GmProT2</i>	Glyma.05G043000	5	450	8	9.36	51.10	细胞膜
<i>GmProT3</i>	Glyma.05G043100	5	450	8	9.34	50.94	细胞膜
<i>GmProT4</i>	Glyma.11G226000	11	444	7	9.12	49.10	细胞膜、高尔基体
<i>GmProT5</i>	Glyma.14G063200	14	435	7	8.99	47.64	细胞膜
<i>GmProT6</i>	Glyma.18G031300	18	443	7	8.95	48.81	细胞膜、高尔基体

2.2 系统发育分析

为了进一步研究不同物种脯氨酸积累家族基因的进化模式以及系统发育特征,利用MEGA7软件对大豆、野生大豆、鹰嘴豆、木豆、花生、蒺藜苜蓿和

烟草脯氨酸积累相关基因家族蛋白序列共同构建系统发育树(图1)。*P5CS*和*ProDH*基因家族均分为2个亚族,亚族1、亚族2分别含有3、4个*GmP5CS*基因,3、2个*GmProDH*基因,同一亚族内成员亲缘



A: *GmP5CS* 基因家族; B: *GmOAT* 基因家族; C: *GmP5CR* 基因家族; D: *GmProDH* 基因家族; E: *GmP5CDH* 基因家族; F: *GmProT* 基因家族
A: *GmP5CS* gene family; B: *GmOAT* gene family; C: *GmP5CR* gene family; D: *GmProDH* gene family; E: *GmP5CDH* gene family; F: *GmProT* gene family

图1 大豆和其他物种脯氨酸积累相关基因家族系统进化树

Fig.1 Phylogenetic tree of proline accumulation related gene families in soybean and other species

关系较近。*GmOAT*、*GmP5CR*、*GmP5CDH* 仅有 1 个进化分支,且在进化分支中与野生大豆距离最近。*GmProT* 基因家族同样分为 2 个亚族。

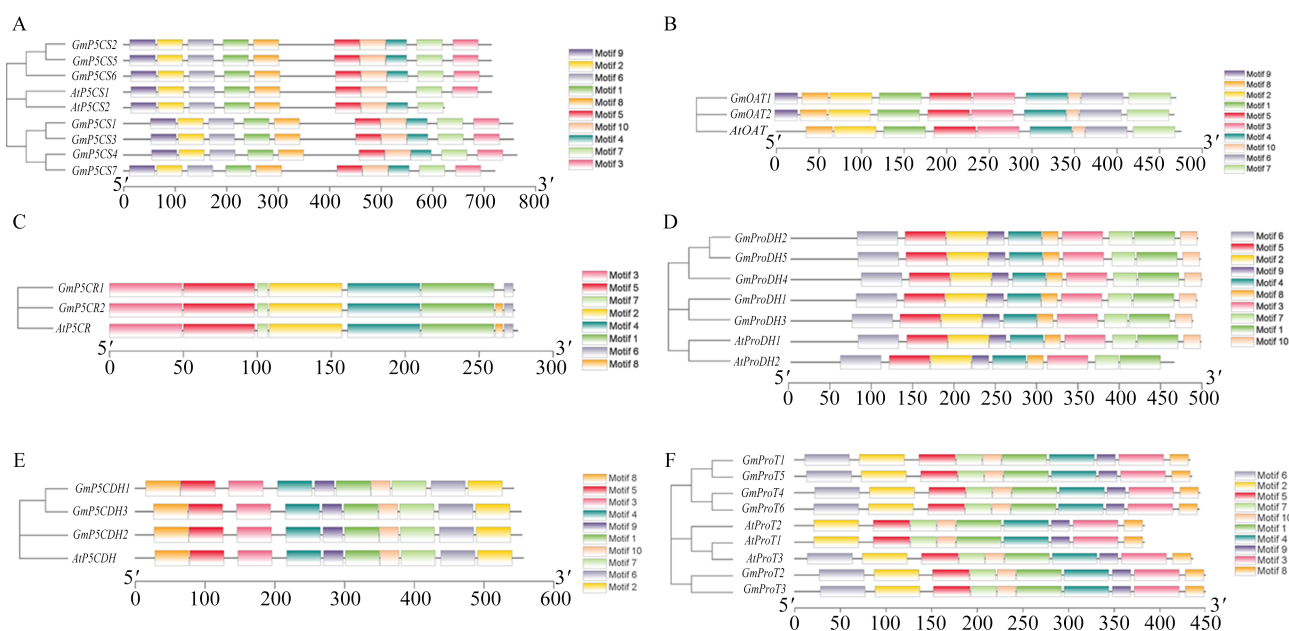
2.3 基因结构与 Motif 预测

基因内含子和外显子的组成是决定基因功能的重要依据^[35-36]。*GmP5CS* 基因家族外显子数目为 17~20 个; *GmOAT*、*GmProT* 基因家族分别具有 10~11、7~8 个外显子; *GmP5CDH* 中除 *GmP5CDH1* 外均含有 16 个外显子; 外显子数量的差别可能导致家族成员基因功能差异(表 1、图 2)。*GmP5CR*、*GmProDH* 家族成员内部外显子数目一致,结果显示, *GmP5CR*、*GmProDH* 基因家族进化较保守,推测可能具有类似的基因功能。

通过在线网站 MEME 预测 *GmP5CS*、*GmOAT*、*GmP5CR*、*GmProDH*、*GmP5CDH*、*GmProT* 基因家族保守基序,对大豆脯氨酸积累相关基因家族蛋白保守结构域进行分析,并按照其进化树顺序展示(图 3)。Motif 预测结果显示 *GmOAT* 家族成员仅比拟南芥 *AtOAT* 多 1 个 Motif9 保守基序,整体差异不大; *P5CRs* 均具有 7 个保守基序(Motif1~7),推断可能为 *P5CR* 家族蛋白共性的保守基序;其他家族成员保守基序组成模式完全相同,并且与拟南芥保守基序组成模式基本一致。脯氨酸积累相关基因在家族中都有极其相似的保守基序组成和排列顺序,结果显示它们在进化过程中高度保守。



图 2 大豆脯氨酸积累相关基因家族成员的基因结构
Fig.2 Gene structure of proline accumulation related gene family members in soybean



A: *GmP5CS* 基因家族; B: *GmOAT* 基因家族; C: *GmP5CR* 基因家族;
D: *GmProDH* 基因家族; E: *GmP5CDH* 基因家族; F: *GmProT* 基因家族
A: *GmP5CS* gene family; B: *GmOAT* gene family; C: *GmP5CR* gene family;
D: *GmProDH* gene family; E: *GmP5CDH* gene family; F: *GmProT* gene family

图 3 大豆脯氨酸积累相关基因家族保守结构域

Fig.3 Conserved domain of soybean proline accumulation related gene families

2.4 启动子顺式作用元件分析

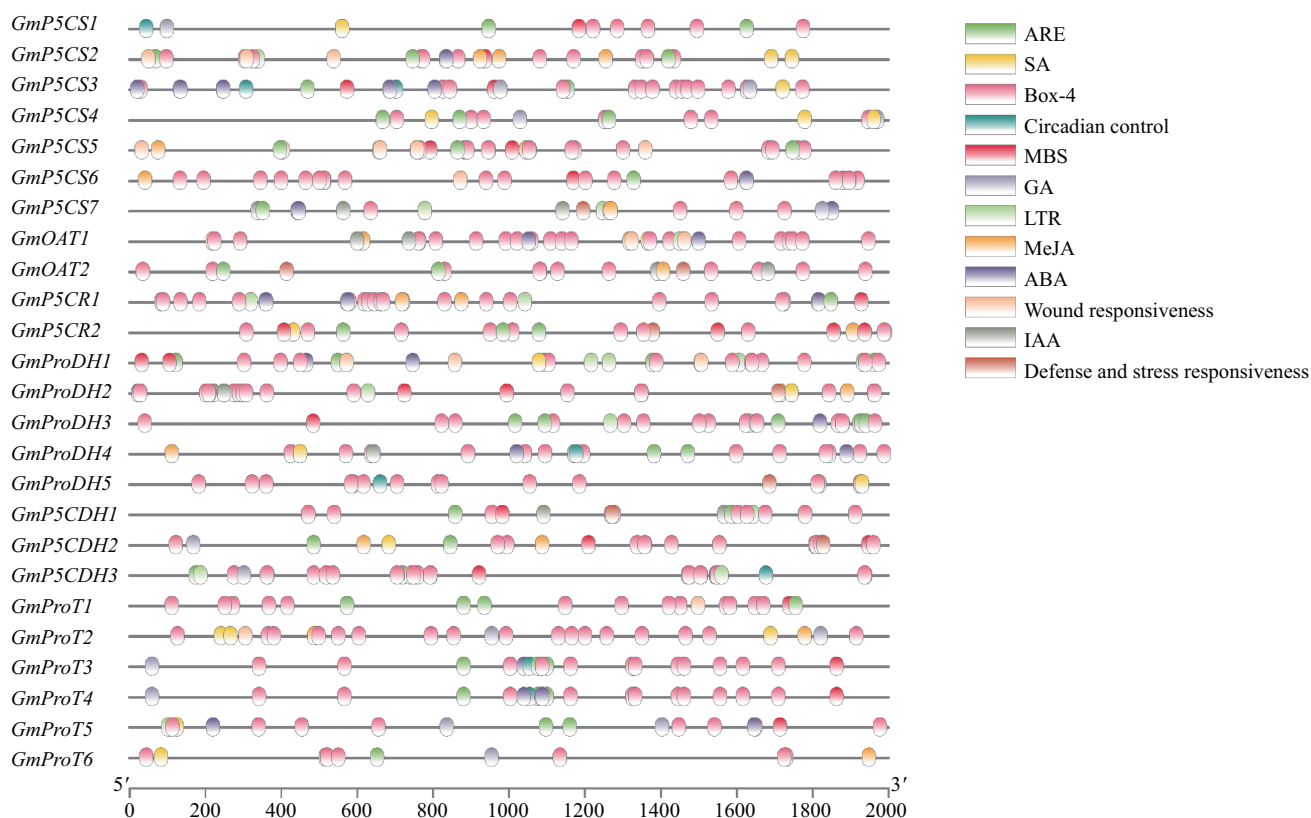
启动子中的顺式作用元件通过与转录因子特异性结合,在基因转录起始调控中起重要作用。顺式作用元件分布的规律可能揭示了功能和调控水平的差异^[37]。启动子区的顺式作用元件分析结果显示,脯氨酸积累相关基因家族启动子区均检测到大量逆境胁迫、植物激素响应相关的顺式作用元件(图4)。其中,响应逆境胁迫的顺式作用元件主要包括参与厌氧诱导元件 ARE(AAACCA)、光响应元件 Box-4(ATTAAT)、低温响应元件 LTR(CCGAAA)、干旱响应元件 MBS(CAACTG)、防御和应激响应元件 TC-rich repeats(CACGTT)及 WUN-motif(AAATTACT)等,结果显示脯氨酸积累相关基因家族在响应逆境胁迫方面存在广泛的潜在机制。植物激素响应元件主要包括赤霉素响应元件(GA)、水杨酸响应元件(SA)、茉莉酸甲酯响应元件(MeJA)、脱落酸响应元件(ABA)和生长素响应元件(IAA)。其中,*GmP5CS*中发现了较多的水杨酸响应元件及茉莉酸甲酯响应元件;在*GmProDH*、*GmP5CDH*中发现了较多水杨酸响应元件,其他植物激素响应元件基本存在于脯氨酸积

累相关基因家族中。说明脯氨酸积累相关基因家族在激素调节方面可能起到重要作用。*GmP5CS*、*GmProDH*、*GmP5CDH*、*GmProT*中还存在昼夜节律调控元件(Circadian control)。

2.5 染色体定位和基因复制关系分析

从大豆 GFF3 文件中提取脯氨酸积累相关家族成员的染色体位置信息和染色体长度信息,结果发现,*GmP5CS*、*GmOAT*、*GmP5CR*、*GmProDH*、*GmP5CDH*、*GmProT*分别定位在大豆 20 条染色体中的 12 条上,在 5 号染色体上分布的基因最多,共含有 5 个基因;其次是 18 号染色体上含有 4 个基因;其余染色体上均含有 1~3 个脯氨酸积累相关基因(图5)。说明,大豆脯氨酸积累相关基因在染色体上的分布是不均匀的。

复制事件对植物进化过程中基因家族成员的扩增至关重要^[38]。若 2 个同源基因的间隔少于 5 个基因,则判定其为串联重复,被 5 个以上基因分开则判定其为片段重复^[39]。通过对大豆脯氨酸积累相关基因家族成员扩增分析,共发现 16 个重复基因对,均为片段重复,无串联重复(图6)。结果显示片段复制在脯氨酸积累相关基因进化中发挥了主要功能。



ARE: 厌氧诱导元件; Box-4: 光响应元件; LTR: 低温响应元件; MBS: 干旱响应元件; TC-rich repeats、WUN-motif: 防御和应激响应元件; GA: 赤霉素响应元件; SA: 水杨酸响应元件; MeJA: 茉莉酸甲酯响应元件; ABA: 脱落酸响应元件; IAA: 生长素响应元件; Circadian control: 昼夜节律调控元件

ARE: Anaerobic responsiveness element; Box-4: Light responsiveness element; LTR: Low-temperature responsiveness element; MBS: Drought responsiveness element; TC-rich repeats、WUN-motif: Defense and stress responsiveness element; GA: Gibberellin responsiveness element; SA: Salicylic acid responsiveness element; MeJA: MeJA responsiveness element; ABA: Abscicic acid responsiveness element; IAA: Auxin responsiveness element; Circadian control: Circadian control element

图 4 大豆脯氨酸积累相关基因家族启动子中顺式作用元件

Fig.4 Cis-acting elements in promoters of soybean proline accumulation related gene families

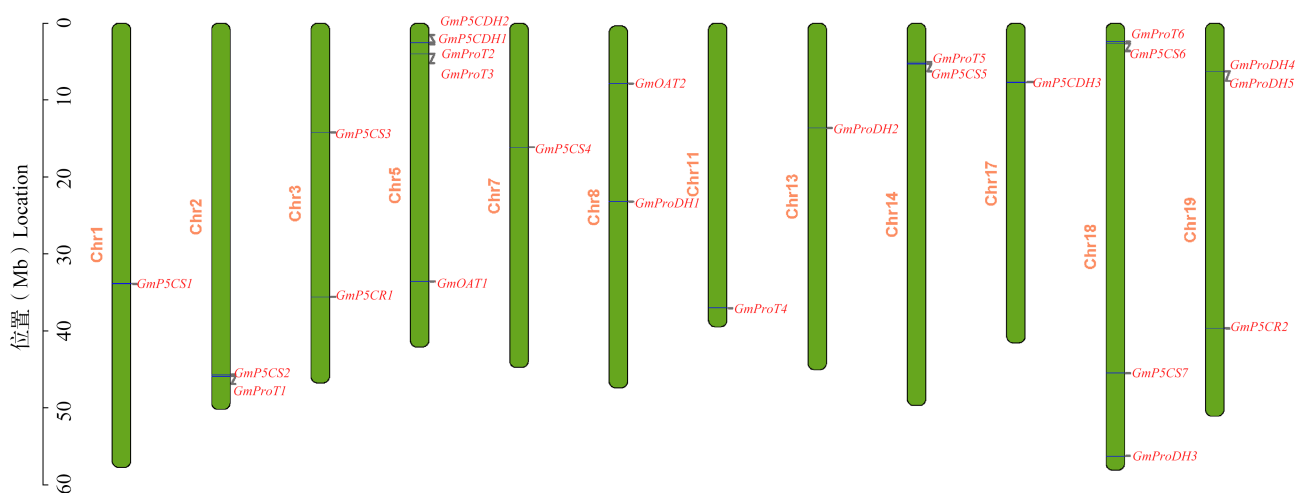
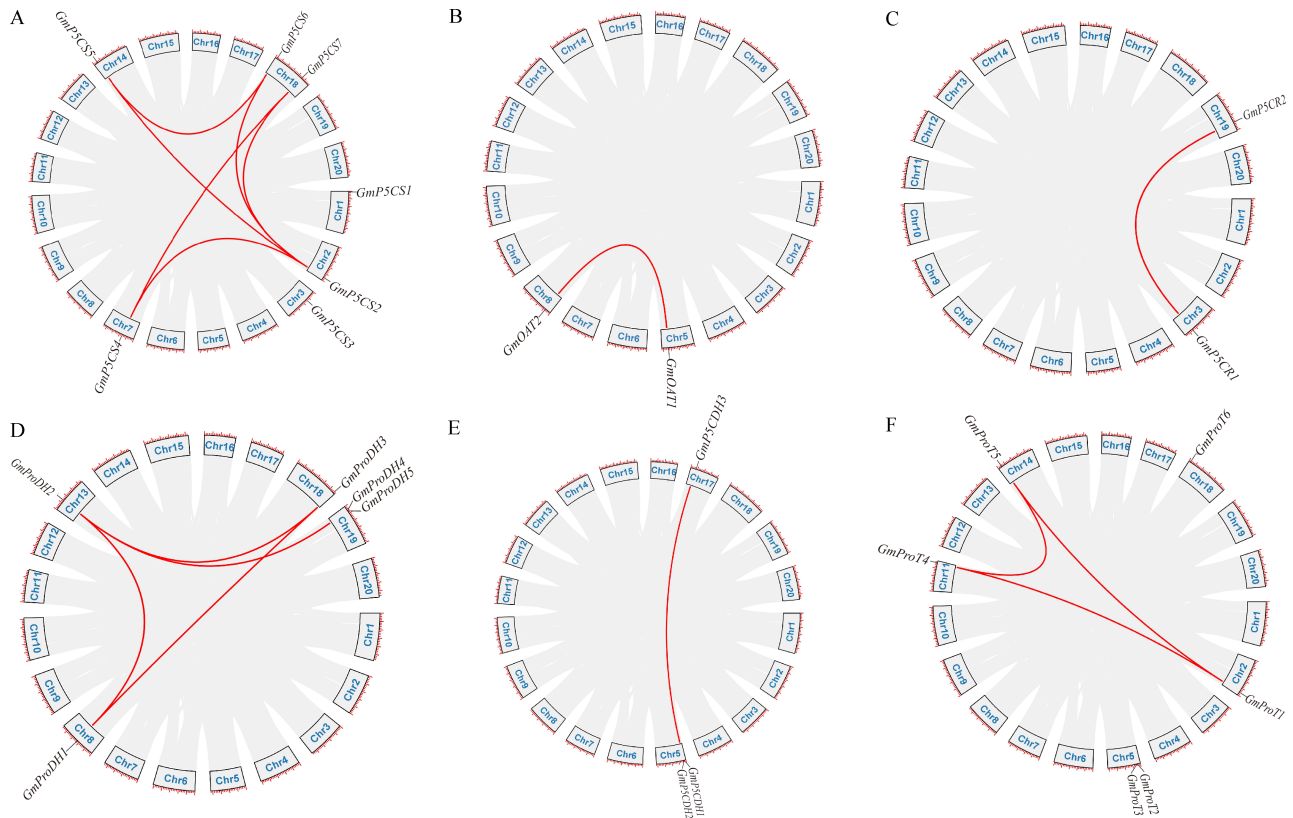


图 5 大豆脯氨酸积累相关基因家族成员在染色体上的位置

Fig.5 Chromosome positions of proline accumulation related gene family members in soybean



A: *GmP5CS* 基因家族; B: *GmOAT* 基因家族; C: *GmP5CR* 基因家族;
D: *GmProDH* 基因家族; E: *GmP5CDH* 基因家族; F: *GmProT* 基因家族
A: *GmP5CS* gene family; B: *GmOAT* gene family; C: *GmP5CR* gene family;
D: *GmProDH* gene family; E: *GmP5CDH* gene family; F: *GmProT* gene family

图 6 大豆脯氨酸积累相关基因家族基因复制关系

Fig.6 Gene replication relationship of soybean proline accumulation related gene families

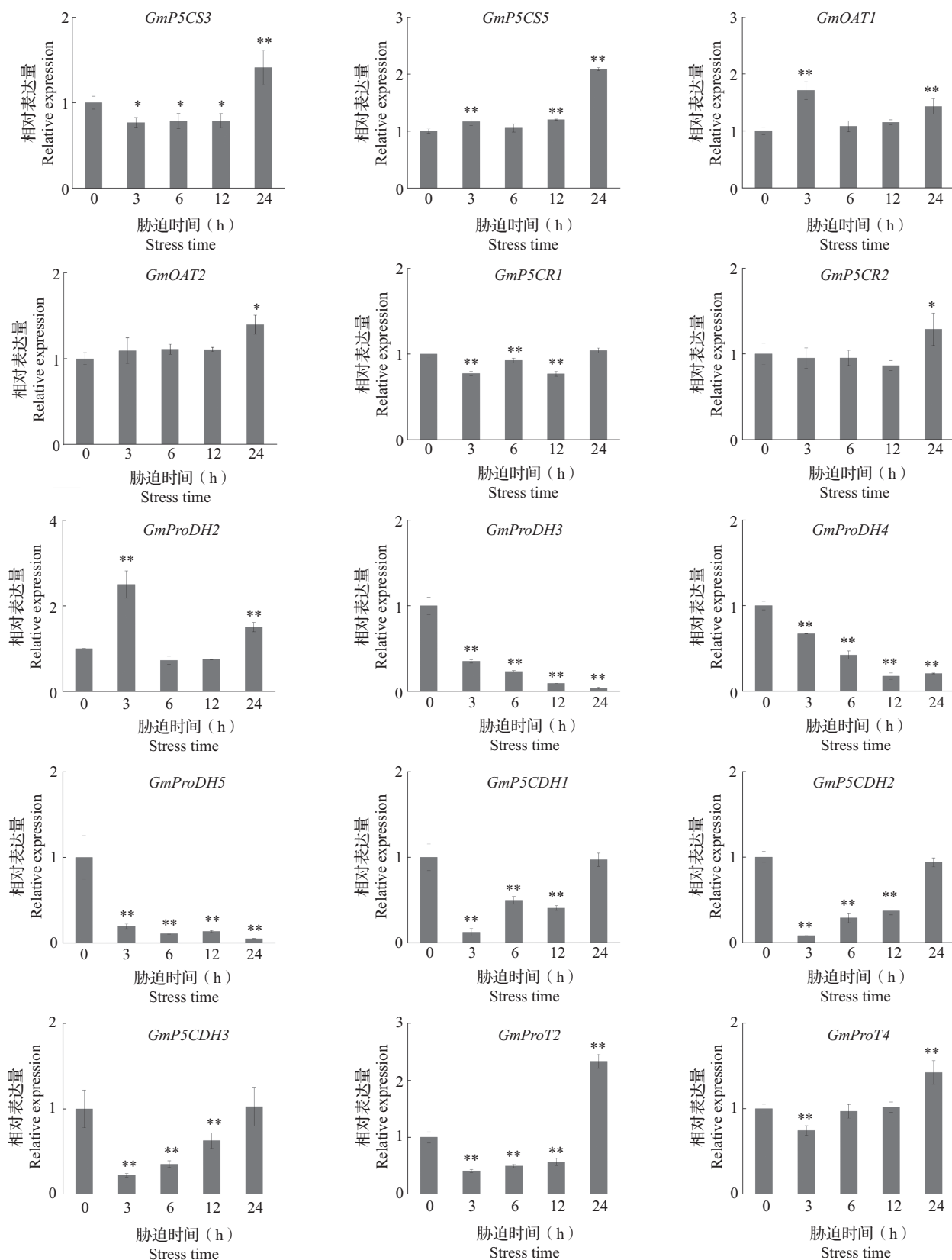
2.6 干旱胁迫下大豆脯氨酸积累相关基因家族表达模式分析

通过 qRT-PCR 方法对 15 个大豆脯氨酸积累相关家族基因干旱胁迫下表达模式进行分析。结果显示,大豆脯氨酸积累相关基因家族各个亚族间的表达趋势各不相同(图 7)。*GmP5CS*、*GmOAT*、*GmP5CR* 为脯氨酸合成相关基因家族。*GmP5CS3* (*GmP5CS* 亚族 II 基因)在干旱胁迫 3 h 表达量降到最低,随后在 6~12 h 表达量有所上升,在干旱胁迫 24 h 显著上调表达,*GmP5CS5* (*GmP5CS* 亚族 I 基因)在 3、12、24 h 显著上调表达,在 24 h 达到峰值。*GmOAT* 家族基因呈现上调表达趋势,*GmOAT1* 在干旱胁迫 3 h 达到峰值。在干旱胁迫处理 24 h 时,*GmP5CR1* 微弱上调表达,*GmP5CR2* 显著上调表达。*GmProDH*、*GmP5CDH* 为脯氨酸分解相关基因家族。除 *GmProDH2* 外,*GmProDH* 家族基因表达量均在 3~24 h 呈现下调表达趋势。*GmP5CDH* 在干旱胁迫 3~24 h 呈现下调表达趋势。*GmProT*

为脯氨酸转运相关基因家族。*GmProT* 基因在干旱胁迫 3 h 的表达量降到最低,随后在干旱胁迫 6 h 时表达量开始上升,直至 24 h 达到峰值。结果显示,脯氨酸合成代谢及转运相关基因家族成员在干旱胁迫 24 h 上调表达;脯氨酸分解代谢相关基因家族成员在干旱胁迫下大多下调表达。脯氨酸积累相关基因家族成员响应干旱胁迫,其中积极响应干旱胁迫的基因有 *GmP5CS5*、*GmOAT1*、*GmProDH3~5*、*GmProT2*、*GmProT4* 基因。

2.7 干旱胁迫下脯氨酸及脯氨酸积累相关酶活性分析

对干旱胁迫下大豆体内脯氨酸含量和相关酶活性进行了分析。结果显示,随着干旱胁迫时间的延长,大豆体内脯氨酸含量显著上升(图 8)。P5CS、OAT、ProDH 是脯氨酸积累过程中的关键酶,随着干旱胁迫时间延长,合成途径的关键限速酶 P5CS、OAT 活性显著增强,而分解途径的关键限速酶 ProDH 活性显著降低。植物体内脯氨酸含量上升,可能与 P5CS、OAT 及 ProDH 作用有关。



* 和 ** 分别表示在 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 水平上差异显著,下同

* and ** indicate significant difference at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ levels, respectively; The same as below

图 7 干旱胁迫处理下脯氨酸积累相关基因家族表达模式的 qRT-PCR 分析

Fig.7 qRT-PCR analysis of gene families expression patterns related to proline accumulation under drought stress

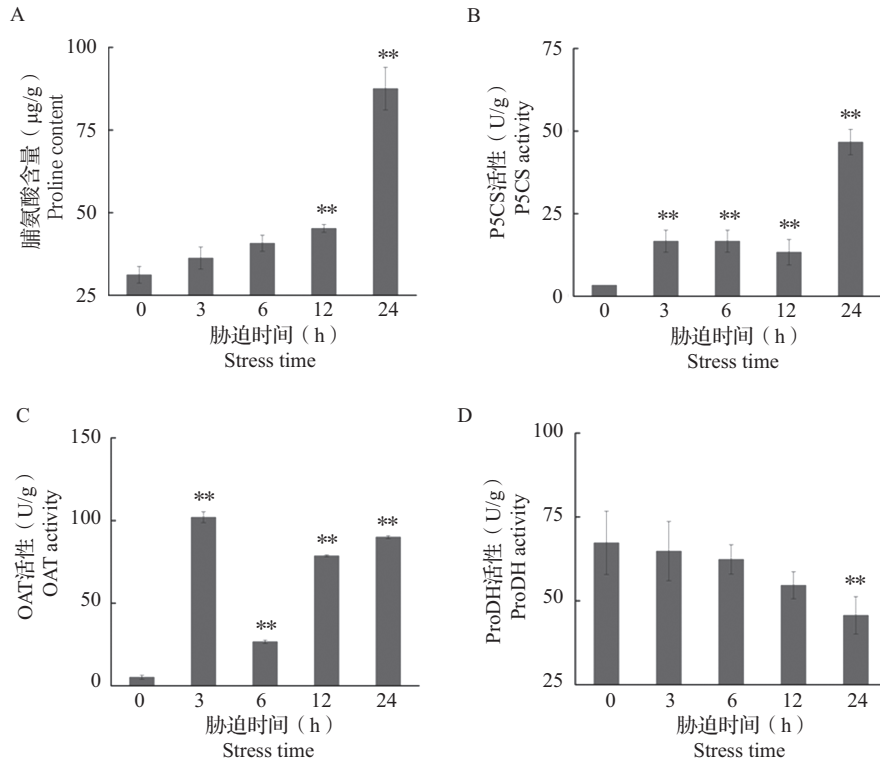


图8 干旱胁迫时间对大豆游离脯氨酸含量、P5CS、OAT、ProDH 活性的影响

Fig.8 Effects of drought stress time on activities of free proline content, P5CS, OAT and ProDH in soybean

3 讨论

脯氨酸是一种广泛存在的渗透调节物质,动物、植物、真菌、藻类中都有脯氨酸的累积^[40]。脯氨酸具有调节渗透平衡、提供能量来源、储藏氮素物质、清除活性氧、保护酶的活性以及降低胞内酸度和调节氧化还原电势等作用^[41-44]。在干旱胁迫条件下,脯氨酸合成增加、降解减少及运输会导致植物体内脯氨酸大量累积,从而提高植物对干旱的适应性。脯氨酸积累相关家族成员已在多个物种中被鉴定出来,比如在模式植物拟南芥中分别鉴定出 *AtP5CS* (2个)、*AtOAT* (1个)、*AtP5CR* (1个)、*AtProDH* (2个)、*AtP5CDH* (1个)、*AtProT* (3个) 家族成员^[45-48]。本研究对大豆脯氨酸积累相关家族进行了全基因组鉴定,共鉴定到 7个 *GmP5CS*、2个 *GmOAT*、2个 *GmP5CR*、5个 *GmProDH*、3个 *GmP5CDH* 及 6个 *GmProT* 基因,高于拟南芥中鉴定出的成员数,这反映出大豆作为古四倍体的特征。系统进化树分析发现,大豆脯氨酸积累相关基因家族分为不同的进化分支。基因结构差异对基因功能有巨大的影响^[49]。有研究发现,油菜 *BnaP5CS*、*BnaP5CR*、*BnaPDH*、*BnaP5CDH* 分别含有 17~20、5~10、3~4、10、15 个外显子^[50];而本研究基因结构分析结果显

示,大豆 *GmP5CS*、*GmOAT*、*GmP5CR*、*GmProDH*、*GmP5CDH*、*GmProT* 分别含有 17~20、10~11、7、4、15~16、7~8 个外显子,亲缘关系近的基因间,外显子相似,表明大豆脯氨酸积累相关基因家族结构较为保守。Motif 预测结果显示大豆与拟南芥脯氨酸积累相关家族成员保守结构域种类和数量基本保持一致,进一步表明脯氨酸积累相关基因家族在进化和功能上的保守性。

基因复制在生物体进化中起着关键作用^[51]。基因复制主要有两种途径:串联复制和片段复制^[52-53]。本研究在大豆脯氨酸积累相关基因家族共发现了 16 个重复基因对,且均为片段重复,结果显示片段复制对大豆脯氨酸积累相关基因家族成员扩增更为重要,可能是大豆脯氨酸积累相关基因家族成员扩增的主要原因,相似的扩增方式也出现在油菜等物种中^[48]。基因复制增加了脯氨酸积累相关基因家族成员数目,使脯氨酸积累相关基因家族成员具有特异和多样功能。基因的表达受启动子中顺式作用元件的调控。启动子区顺式作用元件分析结果显示,脯氨酸积累相关基因家族均含有多种与激素及逆境胁迫响应相关的顺式作用元件。脯氨酸积累相关基因家族成员除含有干旱响应元件外,还存在多种植物激素响应元件,而植物激素信号是植物响应

干旱应答的关键,结果显示脯氨酸积累相关基因家族在干旱响应中发挥至关重要的作用。

脯氨酸参与植物体内渗透调节,启动植物对干旱的保护性反应^[54]。随着干旱胁迫时间延长,大豆体内脯氨酸含量显著上升(图8)。P5CS、OAT、ProDH是脯氨酸积累过程中的关键酶。邓凤飞^[55]研究发现,10%PEG 6000处理后,小桐子幼苗脯氨酸含量显著提高了212.1%,P5CS和OAT的活性分别提高了114.3%和77.0%,ProDH活性下降了60.6%。本研究中随着干旱胁迫时间延长,P5CS、OAT活性显著增强,与脯氨酸积累正相关;而ProDH活性显著降低,与脯氨酸积累呈负相关。植物体内脯氨酸含量上升,可能与P5CS、OAT及ProDH作用有关。基于干旱胁迫下大豆幼苗的基因表达模式分析发现,脯氨酸积累相关基因家族成员不同程度地响应干旱胁迫。其中,*GmP5CS*亚族I基因*GmP5CS5*及*GmOAT1*在干旱胁迫下明显上调表达,表明*GmP5CS*亚族I基因*GmP5CS5*及*GmOAT1*在脯氨酸合成代谢中起到关键作用。姜南^[56]研究表明,过表达*P5CS*基因提高了玉米植株抵抗干旱胁迫的能力,减轻了植株发黄和萎蔫程度。吴亮其等^[57]研究发现,过表达*AtOAT*水稻植株在干旱胁迫下大量积累脯氨酸,提高了水稻的产量。*GmProDH3~5*基因在干旱胁迫下显著下调表达,表明其在脯氨酸分解代谢中起到重要的作用。在拟南芥中,反义抑制*ProDH*基因明显增强转基因植株对干旱胁迫的耐受性^[24]。*GmProT*基因在植物体内脯氨酸远距离运输及从土壤中吸收外源脯氨酸以抵抗干旱胁迫伤害过程中起作用^[58],*GmProT2*、*GmProT4*基因在干旱胁迫24 h显著上调表达,推测其可能在这一过程中起主要作用。Guo等^[59]研究发现,过表达*GmProT*基因拟南芥中脯氨酸大量积累,增强了拟南芥对盐胁迫和渗透胁迫的耐受性。综上,*GmP5CS5*、*GmOAT1*、*GmProDH3~5*及*GmProT2*、*GmProT4*基因在干旱胁迫下的脯氨酸积累中可能起到关键作用(图7)。

脯氨酸积累相关家族基因参与植物体内脯氨酸调控,在抵抗非生物胁迫中起到至关重要的作用。但仅在拟南芥、油菜等植物中研究较为深入,目前对大豆脯氨酸积累相关基因家族在响应干旱胁迫过程中的功能了解有限。本研究提供了完整的大豆脯氨酸积累相关基因家族成员的序列结构特性、顺式作用元件、染色体定位、进化关系,以及在干旱胁迫下的表达模式,研究结果将为将来从大豆基因组中选

择优质抗旱基因、解析大豆脯氨酸积累相关基因家族的生物学功能以及为创制抗旱大豆新种质提供依据。

参考文献

- [1] Yang C, Huang Y, Lv W, Zhang Y, Bhat J A, Kong J, Zhao T. *GmNAC8* acts as a positive regulator in soybean drought stress. *Plant Science*, 2020, 293: 110442
- [2] Oladosu Y, Rafii M Y, Samuel C, Fatai A, Magaji U, Kareem I, Kolapo K. Drought resistance in rice from conventional to molecular breeding: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(14): 3519
- [3] 王霞,侯平,尹林克.植物对干旱胁迫的适应机理.干旱区研究,2001,18(2): 42-46
Wang X, Hou P, Yi L K. Plant adaptation on physiology under drought stress. *Journal of Arid Land*, 2001, 18(2): 42-46
- [4] 周智彬,李培军.我国旱生植物的形态解剖学研究.干旱区研究,2002,19(2): 35-40
Zhou Z B, Li P J. A Review on the phytotomy research of xerophytes in China. *Journal of Arid Land*, 2002, 19(2): 35-40
- [5] Lehmann S, Gumy C, Blatter E, Boeffel S, Fricke W, Rentsch D. In planta function of compatible solute transporters of the *AtProT* family. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(2): 787-796
- [6] Yang C W, Kao C H. Importance of ornithine- δ -aminotransferase to proline accumulation caused by water stress in detached rice leaves. *Plant Growth Regulation*, 1999, 27(3): 191-194
- [7] Anwar A, Wang K, Wang J, Shi L, Du L, Ye X. Expression of Arabidopsis Ornithine Aminotransferase (*AtOAT*) encoded gene enhances multiple abiotic stress tolerances in wheat. *Plant Cell Reports*, 2021, 40: 1155-1170
- [8] Dominic V J, Jithin T. Effect of NaCl and Boron toxicity on proline biosynthesis of *Oryza sativa* (Pokkali VTL-4). *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research*, 2012, 1(3): 73-83
- [9] 邓凤飞,杨双龙,龚明.细胞信号分子对非生物胁迫下植物脯氨酸代谢的调控.植物生理学报,2015,51(10): 1573-1582
Deng F F, Yang S L, Gong M. Regulation of cell signaling molecules on proline metabolism in plants under abiotic stress. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2015, 51(10): 1573-1582
- [10] Ren Y, Miao M, Meng Y, Cao J, Fan T, Yue J, Cao S. DFR1-mediated inhibition of proline degradation pathway regulates drought and freezing tolerance in Arabidopsis. *Cell Reports*, 2018, 23(13): 3960-3974
- [11] Yamada N, Sakakibara S, Tsutsumi K, Waditee R, Tanaka Y, Takabe T. Expression and substrate specificity of betaine/proline transporters suggest a novel choline transport mechanism in sugar beet. *Journal of Plant Physiology*, 2011, 168(14): 1609-1616
- [12] Nakashima K, Satoh R, Kiyosue T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. A gene encoding proline dehydrogenase is not only induced by proline and hypoosmolarity, but is also developmentally regulated in the reproductive organs of Arabidopsis. *Plant Physiology*, 1999, 118(4): 1233-1241
- [13] Dobrá J, Vanková R, Havlová M, Burman A J, Libus J, Storchová H. Tobacco leaves and roots differ in the expression

- of proline metabolism-related genes in the course of drought stress and subsequent recovery. *Journal of Plant Physiology*, 2011, 168 (13): 1588-1597
- [14] Guo M, Zhang X, Liu J, Hou L, Liu H, Zhao X. *OsProDH* negatively regulates thermotolerance in rice by modulating proline metabolism and reactive oxygen species scavenging. *Rice*, 2020, 13 (1): 1-5
- [15] Moiseeva E M, Agafonov D A, Velikov V A, Volokhina I V, Chumakov M I. Elevated proline content in maize plants expressing a fragment of the proline dehydrogenase gene in antisense orientation. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2012, 59 (3): 419-422
- [16] Fabro G, Kovács I, Pavet V, Szabados L, Alvarez M E. Proline accumulation and *AtP5CS2* gene activation are induced by plant-pathogen incompatible interactions in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 2004, 17 (4): 343-350
- [17] Kishor P, Hong Z, Miao G H, Hu C, Verma D. Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiology*, 1995, 108: 1387-1394
- [18] Hu C A, Delauney A J, Verma D P. A bifunctional enzyme (Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992, 89: 9354-9358
- [19] 赵瑞雪, 朱慧森, 程钰宏, 董宽虎. 植物脯氨酸及其合成酶系研究进展. *草业科学*, 2008, 25 (2): 90-97
- Zhao R X, Zhu H C, Cheng Y H, Dong K H. Research progress on proline and its biosynthesis enzymes in plant. *Practaculture Science*, 2008, 25 (2): 90-97
- [20] Hong Z, Lakkineni K, Zhang Z, Verma D P S. Removal of feedback inhibition of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiology*, 2000, 122 (4): 1129-1136
- [21] Xue Y, Peng R, Xiong A, Li X, Zha D, Yao Q. Yeast heat-shock protein gene *HSP26* enhances freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Physiology*, 2009, 166 (8): 844-850
- [22] Yoshida Y, Kiyosue T, Katagiri T, Ueda H, Mizoguchi T, Yamaguchi - Shinozaki K, Shinozaki K. Correlation between the induction of a gene for Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. *The Plant Journal*, 1995, 7 (5): 751-760
- [23] Li C, Wei S, Lei H, Qian Y, Zhang H, Xin H, Sun Z. Gene cloning and expression of the pyrroline-5-carboxylate reductase gene of perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Horticultural Plant Journal*, 2015, 1 (2): 113-120
- [24] Ibragimova S S, Kolodyazhnaya Y S, Gerasimova S V, Kochetov A V. Partial suppression of gene encoding proline dehydrogenase enhances plant tolerance to various abiotic stresses. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2012, 59 (1): 88-96
- [25] 黄方, 王慧, 毛卓卓, 阙贵珍, 程浩, 喻德跃. 大豆 *GmP5CDH* 基因的应用. 中国, CN202010382641.3, 2020
- Huang F, Wang H, Mao Z Z, Kan G Z, Cheng H, Yu D Y. Application of *GmP5CDH* gene in soybean. China, CN202010382641.3, 2020
- [26] Ueda A, Shi W, Shimada T, Miyake H, Takabe T. Altered expression of barley proline transporter causes different growth responses in *Arabidopsis*. *Planta*, 2008, 227 (2): 277-286
- [27] Zhang T, Wu T, Wang L, Jiang B, Zhen C, Yuan S, Sun S. A combined linkage and GWAS analysis identifies QTLs linked to soybean seed protein and oil content. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20 (23): 5915
- [28] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33 (7): 1870-1874
- [29] Chen C, Chen H, Zhang Y, Thomas H R, Frank M H, He Y, Xia R. TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Molecular Plant*, 2020, 13 (8): 1194-1202
- [30] Lalitha S. Primer premier 5. Biotech Software & Internet Report, 2000, 1 (6): 270-272
- [31] 张宪政. 作物生理研究法. 北京: 农业出版社, 1992: 21-28
- Zhang X Z. Methods of crop physiology. Beijing: Agriculture Press, 1992: 21-28
- [32] 韩晓玲. 小冠花抗 L- 羟基脯氨酸 (Hyp) 变异系离体筛选及其耐盐性研究. 西安: 西北大学, 2006
- Han X L. Studies on in vitro screening and salt tolerance of L-hydroxy proline (Hyp) resistant mutant lines of corolla chinensis. Xian: Northwest University, 2006
- [33] 赵贵林. PEG, SA 预处理对水分胁迫下水稻脯氨酸含量及其代谢酶的影响. 沈阳: 沈阳师范大学, 2011
- Zhao G L. Effects of PEG and SA pretreatment on proline content and the proline metabolic enzymes of rice seedlings under water Stress. Shenyang: Shenyang Normal University, 2011
- [34] 赵福庚, 孙诚, 刘友良, 章文华, 刘兆普. ABA 和 NaCl 对碱蓬多胺和脯氨酸代谢的影响. *植物生理与分子生物学报*, 2002, 28 (2): 117-120
- Zhang F G, Sun C, Liu Y L, Zhang W H, Liu Z P. Effects of ABA and NaCl on metabolism of polyamines and proline in *Suaeda glauca* Bunge. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2002, 28 (2): 117-120
- [35] 李鹏, 刘彻, 宋皓, 姚盼盼, 苏沛霖, 魏跃伟, 杨永霞, 李青常. 烟草非特异性脂质转移蛋白基因家族的鉴定与分析. *作物学报*, 2021, 47 (11): 2184-2198
- Li P, Liu C, Song H, Yao P P, Su P L, Wei Y W, Yang Y X, Li Q C. Identification and analysis of non-specific lipid transfer protein family in tobacco. *Acta Agronomica Sinica*, 2021, 47 (11): 2184-2198
- [36] Magadum S, Banerjee U, Murugan P, Gangapur D, Ravikesavan R. Gene duplication as a major force in evolution. *Journal of Genetics*, 2013, 92: 155-161
- [37] 李濯雪, 陈信波. 植物诱导型启动子及相关顺式作用元件研究进展. *生物技术通报*, 2015, 31 (10): 8-15
- Li Y X, Chen X B. Research advances on plant inducible promoters and related Cis-acting elements. *Biotechnology Bulletin*, 2015, 31 (10): 8-15
- [38] Cannon S B, Mitra A, Baumgarten A, Young N D, May G. The roles of segmental and tandem gene duplication in the evolution of large gene families in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, 2004, 4 (1): 10
- [39] Wang L, Guo K, Li Y, Tu Y, Hu H, Wang B, Cui X, Peng L. Expression profiling and integrative analysis of the CESA/CSL

- superfamily in rice. *BMC Plant Biology*, 2010, 10: 282
- [40] 全先庆, 张渝洁, 单雷, 毕玉平. 脯氨酸在植物生长和非生物胁迫耐受中的作用. *生物技术通讯*, 2007, 18(1): 159-162
Quan X Q, Zhang Y J, Shan L, Bi Y P. The role of proline in plant growth and the tolerance to abiotic stresses. *Letters in Biotechnology*, 2007(1): 159-162
- [41] Hayat S, Hayat Q, Alyemeni M N, Wani A S, Pichtel J, Ahmad A. Role of proline under changing environments: A review. *Plant Signaling & Behavior*, 2012, 7(11): 1456-1466
- [42] Lehmann S, Funck D, Szabados L, Rentsch D. Proline metabolism and transport in plant development. *Amino Acids*, 2010, 39(4): 949-962
- [43] Mattioli R, Costantino P, Trovato M. Proline accumulation in plants: Not only stress. *Plant Signaling & Behavior*, 2009, 4(11): 1016-1018
- [44] 王小华, 庄南生. 脯氨酸与植物抗寒性的研究进展. *中国农学通报*, 2008, 24(11): 398-402
Wang X H, Zhuang N S. Advances in research on proline and cold resistance of plant. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2008, 24(11): 398-402
- [45] Rentsch D, Hirner B, Schmelzer E, Frommer W B. Salt stress-induced proline transporters and salt stress-repressed broad specificity amino acid permeases identified by suppression of a yeast amino acid permease-targeting mutant. *The Plant Cell*, 1996, 8(8): 1437-1446
- [46] Grallath S, Weimar T, Meyer A, Gumy C, Suter-Grotemeyer M, Neuhaus J M, Rentsch D. The *AtProT* family. Compatible solute transporters with similar substrate specificity but differential expression patterns. *Plant Physiology*, 2005, 137(1): 117-126
- [47] 丁泽红, 付莉莉, 颜彦, 铁韦韦, 胡伟. *P5CR* 基因的进化及其在木薯中的表达分析. *生物技术通报*, 2018, 34(3): 105-112
Ding Z H, Fu L L, Yan Y, Tie W W, Hu W. Evolution analysis of *P5CR* and expression analysis of *P5CR* gene in cassava. *Biotechnology Bulletin*, 2018, 34(3): 105-112
- [48] Funck D, Eckard S, Gudrun Müller. Non-redundant functions of two proline dehydrogenase isoforms in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology*, 2010, 10(1): 70
- [49] 马倩, 闫启, 张正社, 吴凡, 张吉宇. 紫花苜蓿 *CCoAOMT* 基因家族的鉴定, 进化及表达分析. *草业学报*, 2021, 30(11): 144
Ma Q, Yan Q, Zhang Z S, Wu F, Zhang J Y. Identification, evolution and expression analysis of the *CCoAOMT* family genes in *Medicago sativa*. *Acta Prataculturae Sinica*, 2021, 30(11): 144
- [50] 张天宇, 王越, 刘影, 周婷, 岳彩鹏, 黄进勇, 华营鹏. 油菜脯氨酸代谢基因家族的生物信息学分析与核心成员鉴定. *作物学报*, 2022, 48(8): 1977-1995
Zhang T Y, Wang Y, Liu Y, Zhou T, Yue C P, Huang J Y, Hua Y P. Bioinformatics analysis and core member identification of proline metabolism gene family in *Brassica napus* L. *Acta Agronomica Sinica*, 2022, 48(8): 1977-1995
- [51] Xu G, Guo C, Shan H, Kong H. Divergence of duplicate genes in exon-intron structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(4): 1187-1192
- [52] Cannon S B, Mitra A, Baumgarten A, Young N D, May G. The roles of segmental and tandem gene duplication in the evolution of large gene families in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, 2004, 4(1): 1-21
- [53] Moore R C, Purugganan M D. The early stages of duplicate gene evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, 100(26): 15682-15687
- [54] 汪桂凤. PEG 模拟耐干旱大豆种质资源的筛选及苗期生理生化特性研究. 杭州: 浙江大学, 2019
Wang G F. Screening for drought-tolerance soybean germplasm using PEG simulated stress and the physiological chemical characteristics in seedling stage of drought tolerance soybean. Hangzhou: Zhejiang University, 2019
- [55] 邓凤飞. ABA 对逆境胁迫下小桐子脯氨酸和甜菜碱代谢的影响及抗逆相关基因的克隆与功能分析. 昆明: 云南师范大学, 2016
Deng F F. Effects of ABA on metabolism of proline and betaine in *Jatropha japonica* under stress and cloning and functional analysis of stress-resistant genes. Kunming: Yunnan Normal University, 2016
- [56] 姜南. 脯氨酸合成酶基因在玉米中的遗传转化与功能验证. 长春: 吉林农业大学, 2020
Jiang N. Genetic transformation and functional verification of proline synthase gene in maize. Changchun: Jilin Agricultural University, 2020
- [57] 吴亮其, 范战民, 郭蕾, 李勇青, 张文静, 瞿礼嘉, 陈章良. 通过转 δ -OAT 基因获得抗盐抗旱水稻. *科学通报*, 2003, 48(19): 2050-2056
Wu L Q, Fan Z M, Guo L, Li Y Q, Zhang W J, Qu L J, Chen Z L. Salt and drought resistant rice was obtained by transferring δ -OAT gene. *Science Bulletin*, 2003, 48(19): 2050-2056
- [58] 张薇. 大豆脯氨酸转运体基因 *GmProT1* 和 *GmProT2* 的克隆及功能分析. 南京: 南京农业大学, 2012
Zhang W. Cloning and functional analysis on proline transporter genes *GmProT1* and *GmProT2* from soybean. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012
- [59] Guo N, Xue D, Zhang W, Zhao J M, Xue C C, Yan Q, Xue J Y, Wang H T, Zhang Y M, Xing H. Overexpression of *GmProT1* and *GmProT2* increases tolerance to drought and salt stresses in transgenic *Arabidopsis*. *Journal of Integrative Agriculture*, 2016, 15(8): 1727-1743