

野生大豆 *P5CS* 基因的克隆及对盐胁迫反应

张兆元¹, 陈吉宝¹, 宋佳璘², 曹苑楠¹, 冉小芹¹, 党虹¹

(¹南阳师范学院, 河南南阳 473061; ²河南省环境监控中心, 郑州 450004)

摘要:逆境下植物大量积累脯氨酸是减轻胁迫伤害的一种自我保护机制。本研究应用同源克隆方法从 NaCl 处理的野生大豆中克隆获得一个脯氨酸合成酶(*P5CS*)基因, 命名为 *GsP5CS*。该基因核苷酸序列全长 2.232 kb, 含一个 2148bp 开放阅读框, 编码 715 个氨基酸, 包含有高等植物 *P5CS* 蛋白质的 5 个主要功能域, 与菜豆 *PvP5CS1* 基因核苷酸序列相似性高达 98.79%。Real Time PCR 分析显示该基因受轻度盐胁迫诱导上调表达, 根中表达高峰出现在 200 mmol/L NaCl 处理下, 相对表达量为对照的 5.83 倍; 叶片中表达高峰出现在 300 mmol/L NaCl 处理条件下, 相对表达量为对照的 12.78 倍。并且该基因在根和叶片中的表达模式和脯氨酸含量的变化模式相同。上述结果说明, *GsP5CS* 可能参与野生大豆脯氨酸合成。

关键词:野生大豆; *P5CS* 基因; 盐胁迫; 表达模式; Real Time PCR

Cloning and Expression Analysis of *P5CS* Gene from Wild Soybean (*Glycine soja*) Seedling under Salt Stress

ZHANG Zhao-Yuan¹, CHEN Ji-Bao¹, SONG Jia-Lin², CAO Yuan-Nan¹, RAN Xiao-Qin¹, DANG Hong¹

(¹Nanyang Normal University, Nanyang Henan 473061; ²Environmental Monitoring Center in Henan Province, Zhengzhou 450004)

Abstract: Proline accumulation in plant tissues is a self-protection mechanism reducing stress injuries. In the study, a *P5CS* gene was isolated by homologous clone strategy from wild soybean seedling under NaCl treatment, named *GsP5CS*. Sequence analysis showed that the full-length cDNA was 2.232 kb, containing an open reading frame of 2148 bp, and encoding 715 amino acids with 5 typical function domains of plant *P5CS* protein. The cDNA sequence shared 98.79% similarity with *PvP5CS1* from common bean. Real time PCR analysis showed that the gene expression level was significantly up-regulated under salt stress. The relative expression of the gene reached to the maximum under 200 mmol/L NaCl treatment in roots and 300 mmol/L NaCl treatment in leaves and were respectively 5.83 and 12.78 times of the control. And the expression models of *GsP5CS* gene were similar with the proline accumulation models in leave and root of wild soybean treated with different NaCl concentration. The above results showed that *GsP5CS* enzyme might participate in the proline synthetase in wild soybean (*Glycine soja*).

Key words: wild soybean; *P5CS* gene; salt stress; express pattern; real time PCR

野生大豆是栽培大豆的近缘野生种, 是大豆育种极为重要的种质资源。野生大豆的研究利用, 对拓宽栽培大豆的遗传基础, 提高大豆育种水平有重要价值^[1]。前人的研究证明野生大豆和大豆都具有很强的抗盐能力^[2-4], 但是野生大豆耐盐性相关的理论研究至今尚未有突破性进展。非生物逆境胁迫是作物产量降低的主要原因之一, 脯氨酸是植物

细胞中的渗透调节物质, 在渗透胁迫条件下脯氨酸的积累不仅有助于提高植物细胞的渗透势, 提高植物抗胁迫能力, 而且还是植物从胁迫条件恢复正常过程中迅速有效的氮源、碳源和还原剂^[5-6], 因此提高植物逆境下脯氨酸的积累速度对于提高植物抗渗透胁迫能力具有重要的意义。脯氨酸合成酶 Δ -吡咯啉-5-羧酸合成酶 (*P5CS*, pyrroline-5-carboxylate

收稿日期: 2013-10-21 修回日期: 2013-11-14 网络出版日期: 2014-06-09

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20140609.1405.002.html>

基金项目: 南阳师范学院专项项目 (ZX2010008); 河南省教育厅自然科学研究项目 (2010A180016)

第一作者主要从事植物基因工程研究。E-mail: ying0482@qq.com

通信作者: 陈吉宝, 主要从事植物生物化学与分子生物学研究。E-mail: chenjibao2012@163.com

synthetase)是植物脯氨酸生物合成中的限速酶,决定着植物体内脯氨酸的积累速度^[7]。目前很多植物 *P5CS* 基因已获得较深入的研究^[8-12],但对野生大豆脯氨酸合成酶基因仍然没有很好的研究,本研究通过克隆野生大豆脯氨酸合成酶基因并分析其对盐胁迫的反应,旨在从分子生物学角度解释野生大豆抗盐机理。

1 材料与方法

1.1 野生大豆幼苗培养

野生大豆种子用 98% 硫酸处理 10 min,无菌水清洗数遍至 pH 值接近中性后用无菌水室温培养至发芽。将发芽的种子单粒点播于营养钵内,营养土用花土:细砂:壤土按照 1:1:1 混合配制,每钵使用 50 g 营养土。营养钵置于室温光照 16 h/d 培养至第 1 对真叶完全展开,培养期间每隔 3 d 用自来水浇灌营养土。

在第 1 对真叶完全展开第 2 对真叶刚刚露出时对所有幼苗进行一次充分灌溉,然后自然干旱控水,5 d 后选择大小一致、健康无损的幼苗进行盐胁迫处理。每钵分别用 100 mL 浓度为 100 mmol/L、200 mmol/L、300 mmol/L、400 mmol/L、500 mmol/L NaCl 溶液均匀浇灌营养土 5 h 模拟盐胁迫处理。每个处理重复 6 次,以自来水浇灌营养土为对照。

1.2 总 RNA 提取及 cDNA 第 1 链合成

分别取盐处理野生大豆幼苗叶片、茎和根,液氮速冻后用 Trizol 试剂提取总 RNA。按照 TaKaRa 公司的 PrimeScript 2 试剂盒说明,用 Oligo(dT)₁₅ 作为引物合成 cDNA 第 1 链。反转录产物稀释 10 倍备用。

1.3 目的基因的扩增

参考普通菜豆 *P5CS* 基因序列 (GeneBank: EU407263),利用 DNASTar 软件包中的 PrimerSelect 软件设计引物对 G1:5'-ATGGAGAACACAGATCCT-TG-3', G2:5' CTAGAGGAAATAAAACACAGGCT-3',由上海生工生物工程技术有限公司合成。PCR 反应体系总体积 20 μL,包括反转录产物 4 μL 作模板,目标基因上下游引物(引物浓度 2 μmol/L)各 3 μL、2 × *Taq* PCR MasterMix 10 μL。PCR 扩增程序为 95 °C 预变性 3 min;95 °C 变性 30 s,50 °C 退火 40 s,72 °C 延伸 1 min 30 s,33 个循环,72 °C 延伸 10 min。

1.4 目标基因表达量实时荧光定量 PCR 检测

按照 RealMasterMix (SYBR Green) PCR 试剂盒 (TIANGEN Corporation)操作,以大豆 *β-Actin* 基因作

为内参,采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR, real-time quantitative PCR) 检测基因相对表达量。目标基因引物对为 F:5'-GGCCCTCCGAGTGACCAA-3' 和 R:5'-CTCGCGGGCGTTAACCTCTTTT-3'。RT-qPCR 反应程序为:94 °C 预变性 2 min;94 °C 变性 20 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 40 s,40 个循环,72 °C 延伸 10 min。基因的表达量采用 K. J. Livak 等^[13]的 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 公式计算,其中 $\Delta\Delta C_T = C_{T,Target} - C_{T,Actin} \circ C_{T,Target}$ 和 $C_{T,Actin}$ 分别是目标基因和内参基因在不同处理点的 C_T 值,每个样品 3 次重复。

1.5 序列分析

目标扩增产物由上海英骏生物技术有限公司进行测序,采用 DNASTar 软件系统的 Editsep、MegAlign 软件包以及 DNAMAN 软件分析基因序列。

1.6 脯氨酸含量检测

取盐胁迫处理幼苗真叶和根在液氮中充分研磨后,参照陈红敏等^[14]的方法分别测定脯氨酸含量。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 扩增目的基因

用目标基因特异引物对 G1/G2,以野生大豆幼苗叶片反转录产物为模板进行 PCR 扩增,扩增产物电泳检测结果显示获得一条约 2.2 kb 左右的扩增片段,大小与目标片段一致(图 1)。测序结果表明,该片段全长 2.232 kb,有完整的开放阅读框,无 5' UTR 序列,3'UTR 序列长 84 bp,编码 715 个氨基酸,蛋白质的大小约 77.42 kD (图 2),将其命名为 *GsP5CS*。

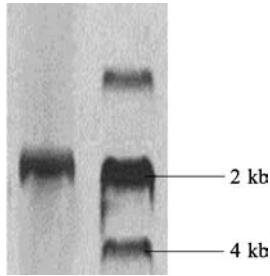


图 1 *GsP5CS* 基因 RT-PCR 扩增结果
Fig. 1 RT-PCR product of *GsP5CS* gene

2.2 野生大豆 *P5CS* 基因序列分析

张春宝等^[19]2007 年曾报道 2 个 *P5CS* 基因,分别为 *GsP5CS1* 和 *GsP5CS2*,其序列全长分别为 1568bp 和 560bp。序列比对表明,*GsP5CS1* 与 *GsP5CS2* 的核苷酸相似性为 72.7%,本研究获得 *GsP5CS* 和 *GsP5CS1*、*GsP5CS2* 的核苷酸相似性分别

1 ATGGAAGAACAGATCCCTTGTAGACATTTTCTCAAAGATGTTAAGCGCATGGTTATCAAGGTGGGACTGCTGTGGTTACTCGC
1 M E N T D P C R H F L K D V K R I V I K V G T A V V T R
85 CAAGATGGAAGGGTGGCGGTGTGGAATAATAGGGGCACTATGTAGCAGATTAAGGAGCTGAACCTCTTGGTTATGAGATTATT
29 Q D Q R V A V G K L G A L C E Q I K E L N S L G Y E I I
169 TTGGTGTATCAGGTTGCTGTGGGCTTGGTGGCAAGGCTTAGATACAGAAAATTAATCAACAGCAGCTTGTGTCAGCTTTCAG
57 L V S S G A V G L G R Q R L R Y R K L I N S S F A D L Q
253 AAGCCGCAAGTTGAACCTTGATGGCAAGGCTTGTCTGCTGTAGGACAGAGCAGTCTTATGGCTCTTTATGATGCTTTGTTTAGT
85 K P F V E L D K A C A A V G Q S S L M A C A P Y E D
337 CAGCTAGATGTGACATCTGCTCAGCTTCTGTGACAGACAATGATTTTCAGACAAGATTTTCAGAAAAGCACTCAGGAAAAC
113 Q L D V T S A Q L L V T D N D F R D K D F R K Q L S E T
421 GTGAAATCACTGTTAGGATTAAAAGTTATCCCATATTCACAGAGAAAGATGCACTTACTAGGAAAAGCTCCATATGAGGAT
141 V K S L L G L K V I P I F N E N D A V S T R K A P Y E D
505 TCTTCTGGCATATTTTGGGATAATGACAGTTTATCAGCTTTATTTGGCTTGGGATTAAGGCTGATCTTCTTATTTTGTGAGT
169 S S G I F W D N D S L S A L L A L G L K A D L L I L L S
589 GAOGTAGAGGGTCTTTATAGTGGGCTCCGAGTGACCAAGGTTCAAAGCTTATTCATACATACATTAAGAAAATACATCAAAA
197 D V E G L Y S G P P S D Q G S K L I H T Y I K E I Q N
673 GAAATTACTTTTGGAGCAAGTCTAGAGTGGGAAGAGGTGGTATGACTGCCAAGTAAAGGCTTCTATTTCATGCAAGCTGATGCT
225 E I T F G D K S R V G R G G M T A K V K A S I H A A D A
757 GGCATTCTCTTTATCATTACCAGTGTGTTAGTCAGCAGAAAATATCTTAATGTTCTTCAAGGACAAAGTATTGGAACCTCTCTC
253 G I P V I T S G Y A A E N I L N V L H G Q R I G T K I F
841 CATAAAGATGCCTATAAATGGGCCCAATAAAGAGGTTAAAGCCGAGATGGCAGTTGCACTAGGACTGTTCAGGAAGG
281 H K D A Y K W A P I K E V N A R E M A V A A R D C S R R
925 CTCAGGCCATGTCTTCAGAAAGGAAGCAAAATTTTACTAAAAATAGCTGATGCTTTGGAATCAGATCAAGAGAGATCAGG
309 L Q A M S S E E R K Q I L L K I A D A L E S H Q E I R
1009 ATTGAAAATGAAGCTGATGTGCCACTGTCACAAAGGAAGGATGTGAAAATCCTTGGTGGCTAGGCTGTTTTTAAAGAGGAGG
337 I E N E A D V A T A Q E E G C E K S L V A R L F L K E E
1093 AAGCTTGCAGGCTTGCACAAACATTCGAATTAATGCAACATGGAAATCCAAATGGTGGAGTGCATAAAGCAACTGAGCTC
365 K L A S L A N N I R I I A N M E D P I G R V L K R T E L
1177 GCAGAAAGGGCTGATTTTGGAGAAAACATCATCTCTTTAGGTGTTCTCTTAATGTTTTTGAAGTCTGGGCTAGGCACTAGTG
393 A E G L I L E K T S S P L G V L L I V F E S R P E A L V
1261 CAGATAGCTTCTTTAGCAATCCGAAGTGGGAATGGGCTTCTTGAAGGAGGCAAGGAGCTAAGAGATCAATGCAATTTTGG
421 Q I A S L A I R S G N G L L L K G G K E A K R S N A I L
1345 CACAAGTTATTACTGAAGCCATACCCAGATTCTGTGGTGAAGAACTTATTGGACTTGTGACATCAAGAGCAGAAATTCCTGAG
449 H K V I T E A I P D S V G E K L I G L V T S R A E I P E
1429 TTACTCAAGTTGGATGATGTAATGTATCTGGTGATTCACAGAGGCGAGCAACAACTTGTCTCTCAGATCAAGATCTGACTAAA
477 L L K L D V I D L V I P R G S N K L V S Q I K S T K
1513 ATTCTGTTATGGGTCATGCTGATGGAATTTGTCATGTCTATGTTGATAAATCTGCTGATTGAGATGGCAAGAAAGATTGTA
505 I P V M G H A D G I C H V Y V D K S A D L E M A K K I V
1597 CTAGATGCAAAAGTAGATTATCCAGCAGGTGCAATGCCATGGAAACACTTCTTGTTCACAGGACTTAGTAGAGAAAGTTGG
533 L D A K V D Y P A G C N A M E T L L V H K D L V E K G W
1681 CTCATAATATTAAGTTGAOCTACGGACAGAAAGTGTTCATTTGTGGAGGACCGAAGTCCGTTGTATAATATTCAC
561 L N N I T V D L R T E G V T L F G G P K A S P L L N I P
1765 CTGGCTGCGACATTATCATCTGAGTACAAATTCATGACATGACAGTTGAAATGTGGATGATGTTATGCACTATGATCAT
589 L A R T L H L E Y N S L T C T V E I V D V Y A I D H
1849 ATAAATCTTTATGGAGTTACATACATGATTCCATTGTTACAGAAATCATGAAGTAGCTGATTTTCTAGCTCAGTTGAC
617 I N L Y G S S H T D S I V T E D H E V A D V F L R Q V D
1933 AGTGCTGCTGTTTTTCACAAATGCTAGTACAAGATTCAGTGATGGGGCAGGATTGGTCTAGGGGCAAGGTTGGAAATAGTACA
645 S A A V F H N A S T R F S D G A R F G L G A E V G I S T
2017 AGCAGGATTCATGCTCGGGTCCAGTAGGAGTTGATGGATTGTTAACCAACAGATGGATTCTCAAAGGAAGTGGACAGATAGTG
673 S R I H A R G P V G V D G L L T T R W I L K G S G Q I V
2101 GATGGTGACAAAGCAGTTAACTACATCAGAGAACCTTTCATATGATTCATGATGTTGCAAGTAAAAATTCATGATGGA
701 D G D K A V N Y I H R D L S I *
2185 GGGATGGGAGAAAAGGAGGGTTGCTAGCCTGTTTATTTATTTCTCTAG

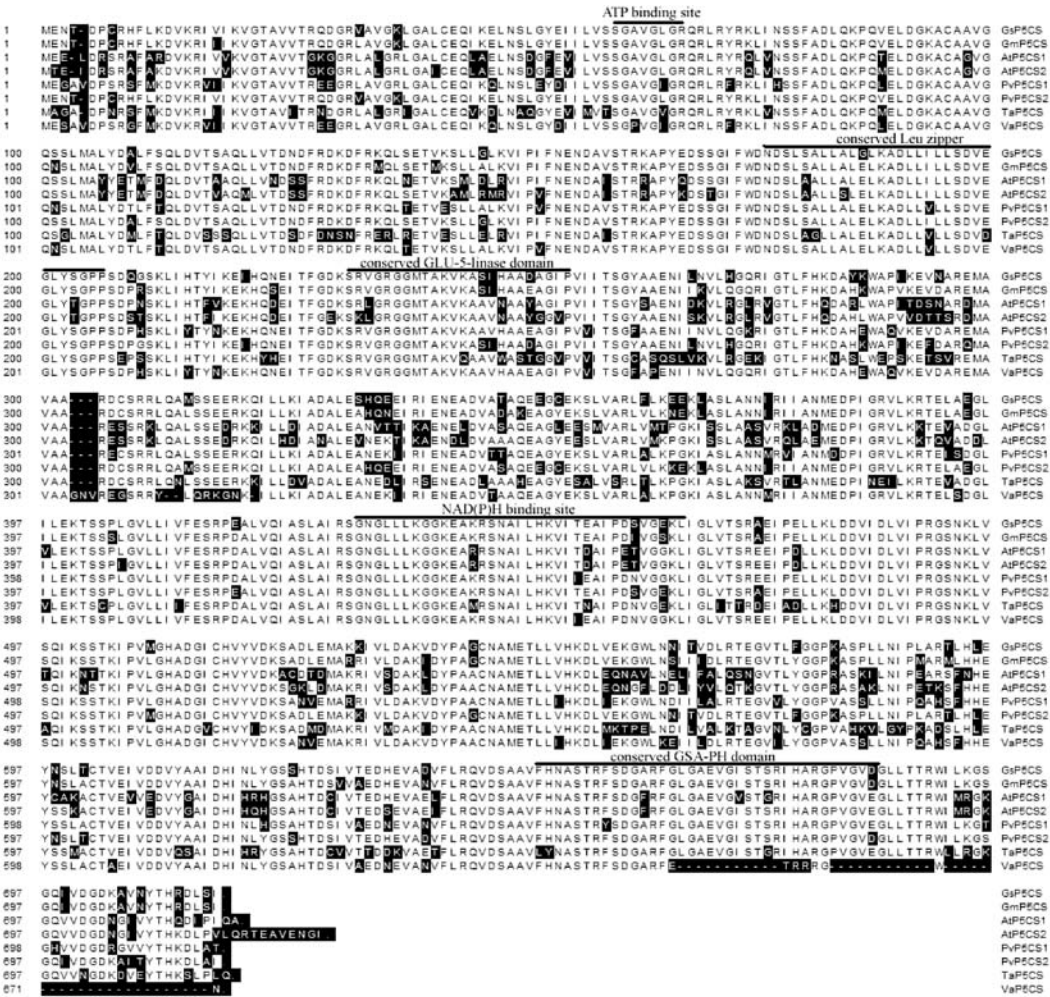
图2 野生大豆 *P5CS* 基因序列及蛋白质序列

Fig. 2 Nucleotide sequences and putative amino acids sequences of *GsP5CS* gene

为 89.3% 和 74.1%，说明 *GsP5CS* 可能和 *GsP5CS1* 是同一个基因。*GsP5CS1* 第 1 个核苷酸起始于 *GsP5CS* 的第 580 bp 处，其末端序列结束于 *GsP5CS* 的第 2148 bp。从 *GsP5CS* 蛋白的氨基酸序列比对结果可以看出，*GsP5CS* 的起始氨基酸和大豆、豇豆、普通菜豆、拟南芥以及小麦 *P5CS* 蛋白的起始氨基酸完全相同(图 3)，因此认为 *GsP5CS* 具有完整的开放阅读框，而 *GsP5CS1* 不具有完整的开放阅读框。

利用 DNASTar 软件系统中的 MegAlign 软件包，分析野生大豆 *P5CS* 基因与其他植物 *P5CS* 基因序列的多态性，结果表明 *GsP5CS* 与大豆 *GmP5CS*

(AY492005)、菜豆 *PvP5CS1* (EU340347) 和 *PvP5CS2* (EU407263)、豇豆 *VaP5CS* (M92276)、拟南芥 *AtP5CS1* (X86777) 和 *AtP5CS2* (Y09355)、小麦 *TaP5CS* (AY888045) 基因的核酸序列相似性分别为 93.6%、83.3%、98.79%、83.2%、73.1%、73.3%、69.4%，氨基酸序列的相似性分别为 93.2%、84.4%、97.9%、82.1%、75.6%、74.7%、73.9%。采用 ClustalW 程序分析了 *GsP5CS* 与其他 *P5CS* 基因的进化关系，结果显示野生大豆与菜豆 *PvP5CS2* 亲缘关系最近，其次是大豆 *GmP5CS*，亲缘关系最远的是单子叶植物小麦(图 4)。



下划线部分表示 5 个主要功能域的序列

Sequences underlined represent the conserved function domains

图 3 *GsP5CS* 基因与几种植物 *P5CS* 基因的氨基酸序列比对

Fig. 3 Amino acid sequence alignment of *GsP5CS1* with *P5CS* homologs in plants

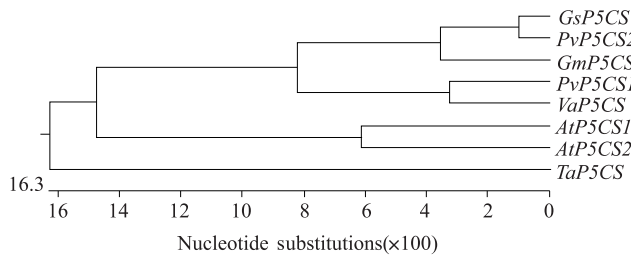


图 4 *P5CS* 基因的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of *P5CS* gene

2.3 盐胁迫下野生大豆幼苗脯氨酸含量的变化

在整个处理期间,叶片和根中脯氨酸水平呈现先升后降的变化趋势(图 5)。叶片中脯氨酸从 21.57 $\mu\text{g/g} \cdot \text{FW}$ (对照) 逐渐上升到最大值 64.59 $\mu\text{g/g} \cdot \text{FW}$ (300 mmol/L),为对照的 2.9 倍,然后又逐渐下降到 44.96 $\mu\text{g/g} \cdot \text{FW}$ (500 mmol/L)。

方差分析显示,叶片中脯氨酸含量在不同胁迫点之间差异极显著 ($P < 0.01$)。根中脯氨酸从 18.12 $\mu\text{g/g} \cdot \text{FW}$ (对照) 逐渐上升到最大值 39.12 $\mu\text{g/g} \cdot \text{FW}$ (200 mmol/L),为对照的 2.1 倍,然后又逐渐下降到 24.45 $\mu\text{g/g} \cdot \text{FW}$ (500 mmol/L)。方差分析显示,根中脯氨酸含量在 200 mmol/L 和 300 mmol/L 之间差异不显著,对照和其他各胁迫点之间差异极显著 ($P < 0.01$)。盐胁迫下叶中脯氨酸积累量都极显著高于根部 ($P < 0.01$),最高可达根部的 2.0 倍 (400 mmol/L)。

2.4 野生大豆 *P5CS* 基因对盐胁迫的反应

应用实时定量 PCR 的方法分析了盐胁迫处理下 *GsP5CS* 基因的相对表达量,结果显示,在整个处理期间,叶片和根中 *GsP5CS* 基因的相对表达量也呈现先升后降的变化趋势(图 6)。无盐胁迫(对照)

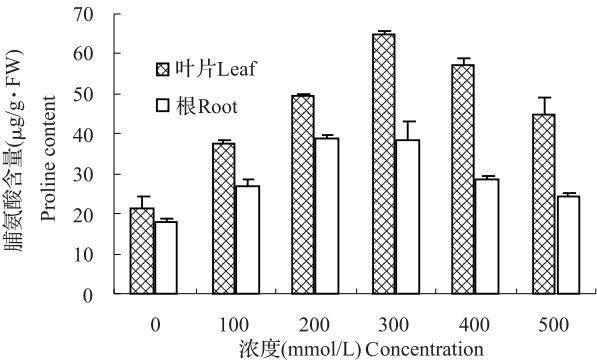


图5 NaCl胁迫下野生大豆幼苗叶片和根中脯氨酸含量
Fig. 5 Proline content in leaves and roots of wild soybean seedlings treated with NaCl stress

情况下, *GsP5CS* 基因在根中和叶片中的相对表达量无显著差异。轻微的盐胁迫 (100 mmol/L NaCl) 即可诱导叶片和根中 *GsP5CS* 基因的上调表达, 其相对表达量分别是对照的 1.78 倍和 4.63 倍。在 200 mmol/L NaCl 处理下根中 *GsP5CS* 基因相对表达量就达到最大值, 为对照的 5.83 倍; 叶片中 *GsP5CS* 基因最大相对表达量出现在 300 mmol/L NaCl 处理条件下, 为对照的 12.78 倍。在 500 mmol/L NaCl 处理下叶片中 *GsP5CS* 基因相对表达量极显著小于对照 ($P < 0.01$), 为对照的 0.28 倍, 虽然根中基因的相对表达量也有所下降, 但比对照还略高, 为对照的 1.28 倍。

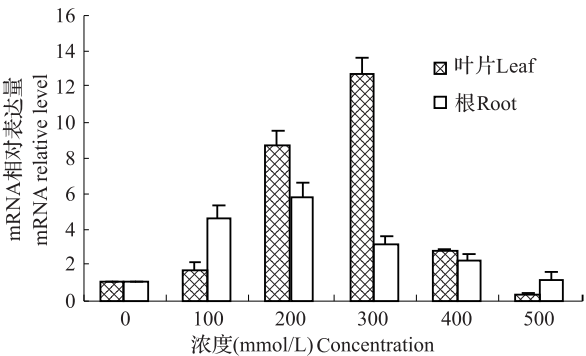


图6 NaCl胁迫下野生大豆幼苗叶片和根中 *GsP5CS* 基因 mRNA 的相对表达量

Fig. 6 *GsP5CS* gene mRNA relative levels in leaves and roots of wild soybean seedlings treated with NaCl stress

3 讨论

植物体内脯氨酸的合成有 2 条途径, 即谷氨酸途径和鸟氨酸途径, 其中谷氨酸途径被认为是植物逆境胁迫相关途径。在谷氨酸途径中, 脯氨酸的合

成起始于谷氨酸, 在 Δ -吡咯啉-5-羧酸合成酶 (*P5CS*) 的催化下转化成谷氨酸半醛, 该物质自动转化成吡咯啉-5-羧酸 (*P5C*, pyrroline-5-carboxylate), *P5C* 再由吡咯啉-5-羧酸还原酶 (*P5CR*, pyrroline-5-carboxylate reductase) 催化生成脯氨酸^[8,15]。*P5CS* 是植物细胞内脯氨酸合成途径的关键酶, 目前已从许多植物中分离到 *P5CS* 基因, 并从分子遗传角度证明该基因是一个有益的植物抗逆境胁迫基因^[16-17]。本研究表明, *GsP5CS* 具有 1 个 2148 bp 的完整开放阅读框, 推定其编码 715 个氨基酸, 与其他物种已证明的 *P5CS* 蛋白质相似。序列分析结果表明, *GsP5CS* 与同为豆科的 *PvP5CS2* 及大豆的 *GmP5CS* 同源性最高, 与拟南芥、小麦的 *P5CS* 基因同源性也较高, 这与植物分类学上的亲缘关系一致。A. C. Turchetto-Zolet 等^[18] 通过对 48 种植物和微生物 *P5CS* 基因序列比对分析表明, 植物 *P5CS* 基因在进化过程发生过基因拷贝数复制现象, 即 *P5CS* 在植物体内都存在双拷贝。张春宝等^[19] 曾报道了一个野生大豆 *P5CS* 基因, 本研究又从野生大豆中克隆获得一个 *P5CS* 基因, 说明野生大豆 *P5CS* 基因在进化过程中也出现过基因复制现象。

本研究结果表明, 盐胁迫能够强烈诱导 *GsP5CS* 基因的表达, 并且脯氨酸含量的变化与 *GsP5CS* 的表达量平行, 进一步证明 *GsP5CS* 基因与野生大豆体内脯氨酸的合成具有高度相关性。前人的研究结果证明 *P5CS* 基因在干旱、高盐等逆境胁迫下大量表达, 并调控内源脯氨酸的合成^[7,20-21], 本研究结果与前人的结果类似, 说明 *GsP5CS* 基因是一个盐胁迫诱导上调表达基因。本研究首次发现野生大豆 *P5CS* 基因在根和叶片中具有不同的表达规律, 在相同胁迫条件下根和叶中该基因的表达有明显的不同, 在 100 mmol/L NaCl 处理下, 根中 *GsP5CS* 基因的表达是叶中的 2.6 倍, 然后随着胁迫程度的加强该基因在叶中的表达量明显高于根部, 最高可达根部表达量的 4 倍 (300 mmol/L NaCl), 同时该基因在根部表达峰值的出现早于叶部。以上结果说明该基因在根部对盐胁迫的反应速度快于叶部, 但反应强度小于叶部。胁迫条件下基因在叶部总相对表达量明显高于根部 5 倍, 这刚好与脯氨酸在根和叶中的积累量不同相吻合, 这些结果暗示叶部 *GsP5CS* 基因的诱导上调表达速度对提高野生大豆抗盐能力具有积极的意义。本研究克隆了一个新的 *GsP5CS* 基因, 为进一步研究 *GsP5CS* 基因表达的调控和野生大豆抗逆分子机理及创造耐盐新品种奠定了基础。

致谢:本研究所用野生大豆种子由中国农业科学院作物科学研究所野生大豆课题组王克晶老师提供,特此致谢!

参考文献

[1] 王克晶,李向华. 国家基因库野生大豆 (*Glycine soja*) 资源最近十年考察与研究 [J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13 (4): 507-514

[2] 孙微,张辉. 河南和山西野生大豆耐盐鉴定及耐盐相关基因分析 [D]. 北京:中国农业科学院,2007

[3] 肖鑫辉,李向华,刘洋,等. 野生大豆 (*Glycine soja*) 耐高盐碱土壤种质的鉴定与评价 [J]. 植物遗传资源学报, 2009, 10 (3): 392-398

[4] 姜静涵,郭勇,常汝镇,等. 大豆苗期耐盐性的简便鉴定方法 [J]. 作物学报, 2013, 39 (7): 1248-1256

[5] AkpJnar B A, Lucas S J, Budak H. Genomics approaches for crop improvement against abiotic stress [J]. Scientific World Journal, 2013, doi. /10. 1155/2013/361921

[6] Isabel P A, Francisco C A, Ana I M, et al. Pyrroline-5-carboxylate synthase and proline biosynthesis: from osmotolerance to rare metabolic disease [J]. Protein Sci, 2010, 19: 372-382

[7] Lehmann S, Funck D, Szabados L, et al. Proline metabolism and transport in plant development [J]. Amino Acids, 2010, 39: 949-962

[8] 陈吉宝,景蕊莲,毛新国,等. 转 *PvP5CS2* 基因烟草对干旱胁迫的反应 [J]. 植物遗传资源学报, 2008, 9 (2): 186-189

[9] 周精华,邢虎成,揭雨成,等. 苕麻 Δ^1 -吡咯啉-5-羧酸合成酶 (*P5CS*) 基因的克隆和表达分析 [J]. 作物学报, 2012, 38 (3): 549-555

[10] Chen J B, Zhang X Y, Jing R L, et al. Cloning and genetic diversity analysis of a new *P5CS* gene from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) [J]. Theor Appl Genet, 2010, 120: 1393-1404

[11] Karthikeyan A, Pandian S K, Ramesh M. Transgenic *indica* rice cv. ADT 43 expressing a pyrroline-5-carboxylate synthetase (*P5CS*) gene from *Vigna aconitifolia* demonstrates salt tolerance [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2011, 107: 383-395

[12] 曹丽,义鸣放,孙振元,等. 多年生黑麦草 *P5CS* 基因的定点突变及其在拟南芥中的转化 [J]. 草业学报, 2011 (1): 143-152

[13] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method [J]. Methods, 2001, 25: 402-408

[14] 陈红敏,陈明,魏安智,等. 抗逆相关基因 *GmAREB* 转基因小麦的获得与鉴定 [J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11 (6): 749-754

[15] Chakraborty K, Sairam R K, Bhattacharya R C. Salinity-induced expression of pyrroline-5-carboxylate synthetase determine salinity tolerance in *Brassica* spp [J]. Acta Physiol Plant, 2012, doi: 10. 1007/s11738-012-0994-y

[16] Kiran Kumar G S, Sujata K G, Vijay Kumar B M R, et al. Heterologous expression of *P5CS* gene in chickpea enhances salt tolerance without affecting yield [J]. Biol Plantarum, 2011, 55 (4): 634-640

[17] Bagdi D L, Shaw B P. Analysis of proline metabolic enzymes in *Oryza sativa* under NaCl stress [J]. J Environ Biol, 2013, 34: 677-681

[18] Turchetto-Zolet A C, Margis-Pinheiro M, Margis M. The evolution of pyrroline-5-carboxylate synthase in plants: a key enzyme in proline synthesis [J]. Mol Genet Genomics, 2009, 281: 87-97

[19] 张春宝,赵洪锬,李启云,等. 野生大豆 Δ -吡咯啉-5-羧酸合成酶 (*P5CS*) 基因的克隆与序列分析 [J]. 大豆科学, 2008, 6 (27): 915-920

[20] Jaarsma R, Rozemarijn S M V, Albertus H B. Effect of salt stress on growth, Na^+ accumulation and proline metabolism in potato (*Solanum tuberosum*) cultivars [J]. PLoS ONE, 2013, 8 (3): 1-10

[21] Huang Z, Zhao L, Chen D, et al. Salt stress encourages proline accumulation by regulating proline biosynthesis and degradation in Jerusalem Artichoke plantlets [J]. PLoS ONE, 2013, 8 (4): 1-10