

柠条锦鸡儿 *CkLEA4* 基因克隆及表达分析

张燕娜,于秀敏,杨杞,岳文冉,王瑞刚,李国婧*

(内蒙古农业大学 生命科学学院,呼和浩特 010018)

摘要:LEA 蛋白是一种与植物抗逆相关的胚胎发育晚期丰富蛋白。该研究从已构建的柠条锦鸡儿干旱胁迫抑制削减杂交文库中筛选到 1 条 LEA 蛋白编码基因的部分序列,用 RACE 技术扩增得到该基因 cDNA 全长并对其进行克隆。测序表明该基因 cDNA 长 870 bp,其中开放阅读框长 510 bp,编码 169 个氨基酸,推算蛋白分子量为 17.03 kD,等电点为 9.3,是一种亲水蛋白。序列比对和系统进化分析表明,该基因属于 *LEA4* 基因家族成员,命名为 *CkLEA4*。实时荧光定量 PCR 检测发现, *CkLEA4* 基因在干旱、ABA 和 NaCl 处理下均受到不同程度的诱导,说明 *CkLEA4* 基因可能与柠条锦鸡儿响应逆境胁迫有关。

关键词:LEA;基因克隆;表达分析;柠条锦鸡儿

中图分类号:Q785;Q789 文献标志码:A

Clone and Expression Analysis of *CkLEA4* from *Caragana korshinskii* Kom.

ZHANG Yanna, YU Xumin, YANG Qi, YUE Wenran, WANG Ruigang, LI Guojing*

(College of Life Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract: Late embryogenesis abundant (LEA) proteins could be induced in plants under stress conditions. In this study, an LEA encoding gene fragment was isolated from the suppression subtractive hybridization library of *Caragana korshinskii* Kom., and the full length cDNA was cloned by rapid amplification of cDNA ends technique. Sequencing results showed that the full length cDNA was 870 bp, with an open reading frame of 510 bp. It encodes a protein composed of 169 amino acids with a calculated molecular mass of 17.03 kD, and a theoretical pI of 9.3. The deduced protein is strongly hydrophilic. Sequence and phylogenetic analysis indicated that the protein belongs to the LEA4 subfamily, therefore it was designated as *CkLEA4*. Real-time quantitative PCR analysis showed that the transcript of *CkLEA4* was induced strongly under different treatments, including ABA, salt and drought. These results indicated that *CkLEA4* might be involved in stress responses of *C. korshinskii* Kom.

Key words: LEA; gene cloning; expression analysis; *Caragana korshinskii* Kom.

植物赖以生存的环境总是会出现干旱、低温、高温、土壤盐碱化等诸多不利于植物正常生长的因素,造成农作物减产,使生态环境日益恶化^[1]。所以植物在长期的进化过程中发展了各种不同的生理生化

机制来适应环境胁迫。其中胚胎发育晚期丰富蛋白 LEA(late-embryogenesis-abundant protein)就是由各种胁迫诱导产生的一类蛋白质。LEA 蛋白最早发现于棉花胚胎发育后期的子叶中,后来在拟南芥、

收稿日期:2013-10-09;修改稿收到日期:2013-11-14

基金项目:国家自然科学基金(31360169);教育部新世纪优秀人才支持计划(ECNT-11-1020);教育部博士学科点基金(20111515110001)

作者简介:张燕娜(1989—),女,在读硕士研究生,主要从事植物分子生物学研究。E-mail:zhangyanna1989@163.com

*通信作者:李国婧,博士,教授,博士研究生导师,主要从事植物分子生物学研究。E-mail:liguojing@imau.edu.cn

水稻、玉米、苔藓、松柏、大麦、小麦、葡萄、向日葵、胡萝卜和大豆等植物中也有发现,而且也普遍存在于极端耐辐射异常球菌、线虫、枯草芽孢杆菌等生物中^[2],目前已经有研究人员从拟南芥^[3]、大豆^[4]、水稻^[5]、烟草^[6]、棉花^[7]、苜蓿^[8]、沙冬青^[9]、菘蓝^[10]、小黑杨^[11]、柠条锦鸡儿^[12]、天山雪莲^[13]等植物中克隆到LEA基因并对其进行表达分析,发现LEA蛋白参与植物的多种抗逆途径,与植物对逆境的抵抗密切相关^[14]。

大部分LEA蛋白的分子量约为10~30 kD,少部分在30 kD以上,富含甘氨酸和其他亲水氨基酸,疏水氨基酸含量很少,因此具有高亲水性和热稳定性^[15]。高亲水性可以使LEA蛋白在植物受到干旱失水时替代水分子。越来越多的研究表明,干旱^[16~17]、ABA^[18]、高pH、高盐、高温、低温^[19~20]等条件均会诱导LEA蛋白编码基因的大量表达,从而提高植物的抗逆性^[21]。

由于LEA蛋白是一个很大的家族,所以可以依据不同的标准对其进行分类。研究者最开始依据被分类的LEA蛋白与棉花LEA蛋白氨基酸序列同源性的比较将其分为3类^[22]。后来,又依据LEA蛋白氨基酸序列和mRNA的同源性将其分为6个家族^[23]。同时,研究人员还对不同植物中的LEA蛋白也进行了分类,其中模式植物拟南芥中共有50个LEA基因,被分为9组^[24];大豆基因组共有36个LEA基因,被分为8个亚族^[4],其中的LEA4家族有2个成员。

柠条锦鸡儿属豆科锦鸡儿属植物,为欧亚大陆特产,在中国分布于内蒙古西部、西北部以及宁夏等地区^[25]。柠条锦鸡儿的枝叶繁茂、产草量高、营养丰富、适口性强,是家畜的优良饲用灌木以及造林和工业方面的重要材料^[26],对环境具有广泛的适应性和抗逆性。但是目前国内大部分学者都是对柠条锦鸡儿的抗逆生理机制进行研究,而很少有人研究其分子机理。因此,研究柠条锦鸡儿抗逆分子机制并进行其相关基因的克隆及表达分析越来越成为人们研究该物种的重点^[27]。本研究克隆了1个LEA基因,初步研究发现该基因受干旱、盐和ABA强烈诱导。

1 材料和方法

1.1 植物材料及处理方法

柠条锦鸡儿种子采自于内蒙古赤峰市,挑选饱满无虫蛀的种子播种在装有蛭石和营养土(1:1)的

培养钵中,置于温室中进行培养,培养条件分别是:温度25℃,16 h光照/8 h黑暗,光照强度7 000~8 000 lx。

选取1个月苗龄并且长势一致的柠条锦鸡儿小苗用于实验,分别进行干旱、ABA和NaCl 3种处理。处理方法分别是:(1)小心从蛭石中取出柠条锦鸡儿小苗,清水冲洗掉小苗上的蛭石(尽量避免损伤小苗)后摆放于滤纸上,进行干旱脱水处理;(2)将柠条锦鸡儿小苗根部浸泡于100 μmol/L的ABA水溶液中进行处理;(3)将柠条锦鸡儿小苗浸泡于300 mmol/L的NaCl溶液进行盐胁迫处理。以上3种处理的取样时间为0、0.5、1、3、6、9、12和24 h,每个时间点取3株柠条锦鸡儿幼苗,每种处理重复3次。采集到的小苗地上部分样品于液氮中速冻,−80℃冰箱保存用于RNA提取。

1.2 柠条锦鸡儿总RNA提取及反转录

采集柠条锦鸡儿小苗样品,用TRIzol试剂(Invitrogen公司)进行总RNA提取,按说明书操作进行。用超微量紫外分光光度计Q5000检测RNA浓度,1%浓度的琼脂糖凝胶电泳检测RNA质量。选电泳条带清晰完整并且OD_{260/230}值为1.9~2.0的RNA,采用RNA PCR kit(TaKaRa公司)进行cDNA第一链的合成,以上操作按试剂盒说明书进行。

1.3 CkLEA4基因全长cDNA的克隆

在已构建好的柠条锦鸡儿干旱胁迫抑制削减杂交文库(SSH)^[27]中发现了1条LEA基因片段,通过NCBI Blast比对,发现该基因片段的5'和3'端均不完整,所以利用RACE技术扩增得到该基因的cDNA全长。5'-RACE和3'-RACE引物(表1)的设计以及具体实验操作流程完全按照试剂盒(TaKaRa

表1 实验中采用的引物及序列

Table 1 Primers used in this study

引物类型 Primer type	引物名称 Primer name	序列 Sequence(5'-3')
全长引物 Full-length primers	F-CkLEA4 R-CkLEA4	GCgtcgacATGCAGGGAGCAAAGAAAGC GCgagtcCTTAACGTAAAGTACCGCCAGTCC
RT-PCR 引物 RT-PCR primers	CkLEA4F CkLEA4R	ACCCTGCTGAGGCATTGGA CCTATTGGGACGAATAGAGGCAC
内参引物 Internal control primers	EF1αF EF1αR	TGGGTGGACATTCTCTGATT GCACGGTTCACTTCTCTTAGC
	3' inner	ACCACTCCATCGGTGACAT
RACE 引物 RACE primers	3' outer 5' inner 5' outer	CATCCGTGCCTCTATTGCG ATTGGGACGAATAGAGGCAC ATGCCTGGTCATGGAAGTC

公司)说明书进行。将扩增产物连入 pMD[®] 19-T Vector(TaKaRa 公司),转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,进行菌落 PCR 确认重组成功后,菌液送测序,测序结果用核酸和蛋白分析软件 Vector NTI 10 拼接得到全长 cDNA 序列。

依据全长 cDNA 序列设计扩增该基因全长的特异引物,正向和反向引物分别加有 *Sal* I 和 *Sac* I 酶切位点,为进一步构建带有 HA 标签的表达载体做准备。

以柠条锦鸡儿 cDNA 为模板,F-CkLEA4 和 R-CkLEA4 为引物(表 1),利用高保真酶 PrimeSTAR (TaKaRa 公司)进行 PCR 扩增。扩增条件为:98 °C 预变性 3 min,98 °C 变性 10 s,60 °C 退火 10 s,72 °C 延伸 1 min,72 °C 补充延伸 5 min,30 个循环。1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,切胶后用胶回收试剂盒(DP209,天根公司)进行回收。将胶回收产物连入平末端载体 pEASY-Blunt-Sample(全式金公司),转化大肠杆菌 trans1 感受态细胞,进行菌落 PCR 验证后,菌液送测序。本实验所用引物(表 1)和菌液测序均由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

1.4 *CkLEA4* 基因生物信息学分析

CkLEA4 基因核苷酸序列翻译以及亲水性分析采用 DNAMAN 软件。利用 ExPASy(<http://www.expasy.org/proteomics>)数据库中的 ProtParam 软件推导氨基酸序列的分子量、理论等电点以及对氨基酸残基数等理化性质进行分析。用 SOPMA 软件预测 *CkLEA4* 基因所编码的蛋白的二级结构。与其他植物的 LEA4 蛋白家族成员的一致性分析利用 NCBI 网站 GenBank 数据库的 BLAST 程序,并用 Mega5 进行系统进化分析。

1.5 不同胁迫处理下 *CkLEA4* 基因表达分析

使用 LightCycler480 实时荧光定量 PCR 仪,用

SYBR[®] Green I 荧光染料法检测柠条锦鸡儿幼苗在不同胁迫处理下基因的转录表达水平,反应体系根据 SYBR[®] Premix Ex *Taq*TM TaKaRa 试剂盒说明书进行配制,每个反应 3 次重复。反应体系中含有 10 μ L SYBR[®] Premix Ex *Taq*TM, 引物各 0.4 μ L (10 μ mol/L),稀释的 cDNA 模板 5 μ L,灭菌水 4.2 μ L, 总体系 20 μ L。反应程序为 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 5 s,60 °C 退火 15 s,72 °C 延伸 30 s,40 个循环。反应结束后做熔解曲线以及利用 $\triangle\triangle Ct$ 法分析数据。

2 结果与分析

2.1 *CkLEA4* 基因克隆

从 SSH 文库中得到 *CkLEA4* 基因片段,通过 NCBI Blast 进行比对,发现该基因序列为非全长 cDNA 序列,故参照 RACE 试剂盒(TaKaRa 公司)说明书扩增该基因的 5' 和 3' 端,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,经 NCBI Blast 验证,得到的序列是完整的 5'(图 1,A)和 3'(图 1,B)端序列。将测序结果与该基因的中间序列进行拼接,得到 1 条 870 bp 的全长 cDNA 序列,其中开放阅读框(ORF)长 510 bp。

以柠条锦鸡儿 cDNA 为模板,依据拼接得到的全长 cDNA 序列设计基因特异引物 F-CkLEA4 和 R-CkLEA4,利用高保真酶 Prime STAR 进行 PCR 扩增,得到了 *CkLEA4* 基因的全长 cDNA(图 1,C)。回收目的片段并进行连接转化后,将阳性克隆测序表明,该序列与拼接的序列完全相同并包含完整的 ORF。

2.2 *CkLEA4* 基因序列分析

测序表明克隆得到的 *CkLEA4* 基因的 cDNA 全长为 870 bp,其中开放阅读框长 510 bp,5'-UTR 长 90 bp,3'-UTR 长 270 bp。起始密码子为 ATG,

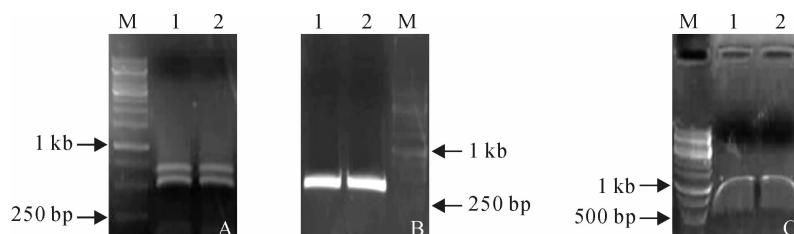


图 1 *CkLEA4* 基因(1,2)5'-RACE,3'-RACE 和 cDNA 全长扩增结果

A. 5'-RACE 扩增片段;B. 3'-RACE 扩增片段;C. cDNA 全长扩增片段

Fig. 1 PCR products of 5'-RACE,3'-RACE and the full-length cDNA of *CkLEA4*(1,2)

A. 5'-RACE amplified fragment;B. 3'-RACE amplified fragment;C. The amplified full-length cDNA;M. 1 kb DNA ladder

图 2 *CkLEA4* 基因的 cDNA 序列及推导的氨基酸序列

下划线部分表示非编码区域,大写字母表示所编码的氨基酸序列

Fig. 2 The cDNA sequence of *CkLEA4* and its deduced amino acid sequence

The underlined letters indicated the non-coding regions, and the capital letters showed the deduced amino acid sequence

终止密码子为 TAA, 共编码 169 个氨基酸, 其中包括一段 12 个腺苷酸组成的 polyA 尾(图 2)。

2.3 CkLEA4 蛋白的生物信息学分析

将该核酸序列翻译的氨基酸序列在 NCBI 上进行 Blast 比对,结果显示该蛋白的结构域与 LEA4 蛋白家族成员如拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的 LEA4-5 蛋白、大豆 (*Glycine tomentella*) 的 LEA4 蛋白和烟豆 (*Glycine tabacina*) 的 LEA4 蛋白的结构域有相同的部分。

用 ExPASy 数据库中的 ProtParam 程序进行预测,结果显示 CkLEA4 编码的蛋白分子量为 17.03 kD,等电点为 9.3。蛋白质富含丙氨酸 (Ala 16.0%)、甘氨酸 (Gly 14.8%)、苏氨酸 (Thr 14.8%),含有少量的亮氨酸 (Leu 1.2%) 和精氨酸 (Arg 1.8%),不含有半胱氨酸 (Cys)、苯丙氨酸 (Phe)、色氨酸 (Trp)。用 DNAMAN 软件对 CK-LEA4 的多肽链进行亲水性分析,发现整个多肽链中亲水性氨基酸为 116 个,疏水性氨基酸为 53 个,表明该蛋白整体上是亲水的(图 3)。同时,ProtParam 程序预测该蛋白的平均疏水指数(GRAVY)为 -0.786,以上结果都说明 CkLEA4 为亲水蛋白。

用 SOPMA 软件预测 CkLEA4 蛋白的二级结构,发现该蛋白和其他大多数第 4 族 LEA 蛋白一样,二级结构主要有 α -螺旋和无规卷曲。其中 75 个氨基酸残基形成 α -螺旋结构,含量为 44.38%,主要集中在 N 端;93 个氨基酸残基形成无规则卷曲结构,主要分布在 C 端,占总数的 55.03%;而延伸链只占总数的 0.59%,没有 β -转角结构(图 4)。

2.4 CkLEA4 蛋白的系统进化树分析

为了解 CkLEA4 蛋白与其他物种中第 4 族 LEA 蛋白的亲缘关系,对 CkLEA4 与其他物种已知的 LEA4 蛋白家族成员进行了系统进化分析。用 Blast 分析并用 MEGA 5 软件构建系统进化树发现,CkLEA4 与豆科模式植物蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*) 的 MtLEA(XP_003625258.1) 聚类在一起,二者一致性高达 85%,亲缘关系最近;与其他植物中的 LEA 蛋白,如短绒野大豆 (*Glycine tomentella*) 的 GtLEA4 (AAG37451.1)、烟豆的 Glytalea4 (AAG37441.1) 和大豆的 GmLEA (NP_001236128.1) 一致性分别是 81%、82% 和 76%,与模式植物拟南芥的 AtLEA4-5 (NP_196294.1) 的一致性是 60%(图 5)。序列比对分析显示该蛋白的第 8~80 位氨基酸残基形成 LEA-1 结构域,与其他植

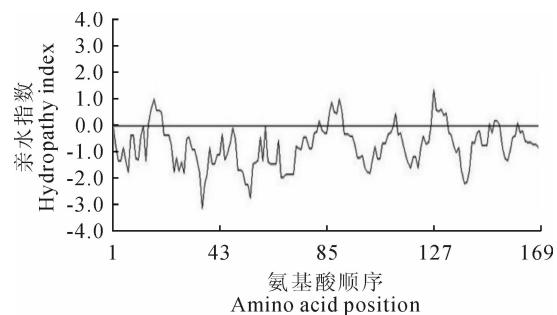


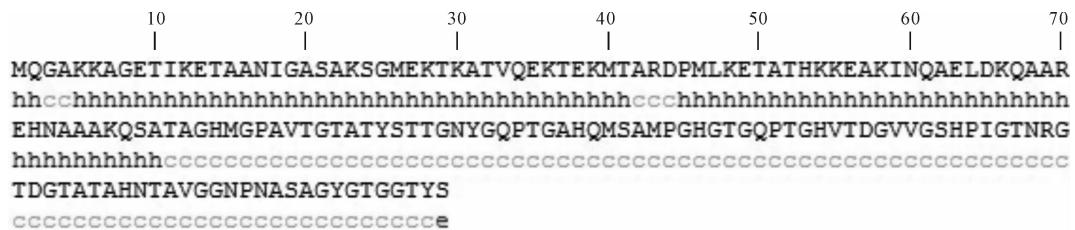
图 3 CkLEA4 蛋白的疏水/亲水性分析

0 值以上的部分表示疏水区域,0 值以下的部分表示亲水区域

Fig. 3 Hydrophobicity/hydrophilicity profile of CkLEA4

Regions above a hydropathy score of zero are hydrophobic.

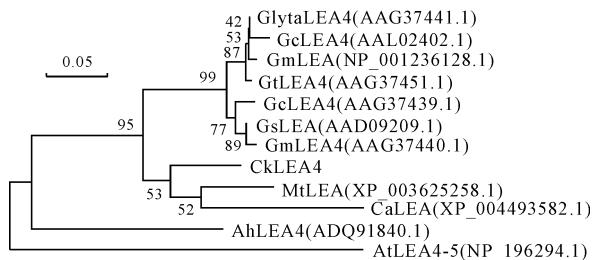
Regions below a hydropathy score of zero are hydrophilic

图 4 *CkLEA4* 蛋白的二级结构

大写字母为 *CkLEA4* 的氨基酸序列; h. α -螺旋; c. 无规则卷曲; e. 延伸链

Fig. 4 The secondary structure of the *CkLEA4* protein

Capital letters represent the amino acid sequence of *CkLEA4*; h. Alpha helix; c. Random coil; e. Extended strand

图 5 *CkLEA4* 与其他植物 LEA 蛋白的系统进化分析

分支上的数字表示 Bootstrap 验证中基于 500 次重复该节点的可信度;标尺表示演化距离;GlytaLEA4(烟豆);GcLEA4(灰毛大豆);

GmLEA(大豆);GtLEA4(短绒野大豆);GsLEA(野大豆);

GmLEA(大豆);MtLEA(蒺藜苜蓿);CaLEA(鹰嘴豆);

AhLEA4(落花生);AtLEA4-5(拟南芥);CkLEA4(柠条锦鸡儿)

Fig. 5 Phylogenetic analysis of *CkLEA4* and

members of LEA proteins from other plants

The numbers on the branches represent the reliability percent of bootstraps values based on 500 replications;

Scaleplate represents the evolution distance of these plants';

GlytaLEA4(*Glycine tomentella*);GcLEA4(*Glycine canescens*);

GmLEA(*Glycine max*);GtLEA4(*Glycine tomentella*);GsLEA

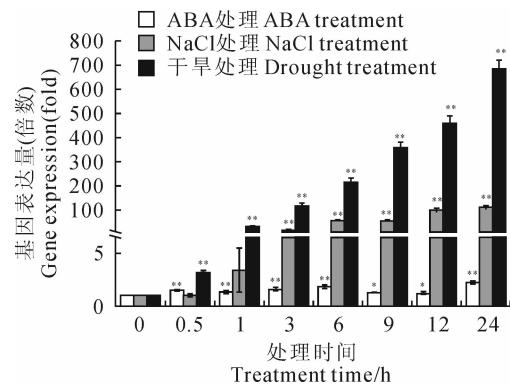
(*Glycine soja*);GmLEA4(*Glycine max*);MtLEA(*Medicago truncatula*);CaLEA(*Cicer arietinum*);AhLEA4(*Arachis hypogaea*);AtLEA4-5(*Arabidopsis thaliana*);

CkLEA4. (*Caragana korshinskii* Kom.)

物的 LEA4 蛋白家族成员具有一致性。基于以上分析和系统进化关系确定 *CkLEA4* 为第 4 族 LEA 蛋白。

2.5 *CkLEA4* 基因的表达分析

目前,已有研究者陆续从不同的植物中克隆到 LEA 基因并利用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)技术检测 LEA 基因在不同处理条件下的表达情况来验证其基因功能。杨杞等^[12]从柠条锦鸡儿中克隆了基因 *CkLEA1*,并利用 qRT-PCR 技术对该基因在干旱、ABA、冷、热、盐和碱等不同处理下的表达情况进行了分析,推测该基因与柠条锦鸡儿响应逆境胁迫的机制有关。沙伟等^[16]克隆了 1 个与毛尖

图 6 qRT-PCR 检测不同处理条件下 *CkLEA4* 基因的表达

*. 表示 $P < 0.05$; **. 表示 $P < 0.01$

Fig. 6 The expression of *CkLEA4* under different treatments detected by qRT-PCR

* indicates significant difference among samples at 0.05 level;

** indicates significant difference among samples at 0.01 level

紫萼藓抗旱相关的基因 *Gp-LEA*,利用 qRT-PCR 技术对不同复水时间和快速干旱时间下 *Gp-LEA* 基因表达情况进行分析显示,它在复水和快速干旱两种模式下均能表达,由此推测该基因在毛尖紫萼藓的复水和干旱过程中起着重要作用。本研究利用 qRT-PCR 技术检测了 *CkLEA4* 基因在不同处理条件下的表达情况。结果显示:经过 ABA、NaCl 和干旱胁迫 3 种处理后, *CkLEA4* 基因的表达量均有不同程度的提高,其表达量均在 24 h 达到最高(图 6)。但是该基因对 ABA 的响应并不明显,只达到未处理时的 2 倍左右,而对 NaCl 和干旱的响应则非常迅速而且强烈,分别是未处理时的 110 倍和 700 倍左右,暗示 *CkLEA4* 基因可能在柠条锦鸡儿抵抗非生物胁迫的分子机制中发挥作用。

3 讨 论

柠条锦鸡儿分布在干旱、寒冷、瘠薄的地区,在

生长发育过程会受到各种理化和生物因素的影响,研究其抗逆相关基因并进行功能分析,可以帮助我们从分子机制上进一步了解它适应逆境的机理^[28]。本研究从杨杞博士构建的 SSH 文库中筛选到 1 个 *CkLEA4* 基因^[27],并通过 RACE 技术扩增得到该基因的全长 cDNA 序列。NCBI Blast 比对结果显示,该基因具有 LEA_1 结构域,但是与其他植物 LEA4 蛋白家族成员具有较高的同源性,分析其二级结构,发现该蛋白和其他大多数 LEA4 蛋白家族成员一样,N 端氨基酸残基主要形成 α -螺旋,C 端氨基酸残基主要形成无规则卷曲^[29],表明该蛋白属于 LEA4 家族。

LEA 蛋白有较高亲水性,在水分缺乏时,它在细胞中的作用像可溶性糖一样,有增强束缚水的作用^[30],所以 LEA 蛋白在植物抵抗逆境的过程中发挥着重要的作用。张林华等^[13]从天山雪莲中克隆得到 1 个属于 LEA2 家族的基因 *SiLEA14*,利用农杆菌介导法将该基因转入烟草,并对转基因植株在冷冻和盐胁迫处理下的生理指标进行了测定及分析。结果表明, *SiLEA14* 基因在烟草中的过量表达提高了烟草的抗冻和耐盐能力。路莎莎等^[10]从菘蓝中克隆了 1 个基因 *IiLEA* 并对其进行胁迫表达分析显示,在正常生长条件下, *IiLEA* 基因在菘蓝幼苗内没有表达,而随着胁迫时间的延长其表达量逐渐增加,9 h 表达量达到峰值,表明该基因可能受

逆境胁迫诱导表达。Duan 等^[31]从水稻中克隆了基因 *OsLEA3-2* 并将其转入水稻和拟南芥中,发现该基因能够使植物抵抗非生物胁迫。此外,胡廷章等^[32]还通过将水稻 *OsLEA19a* 基因转化到大肠杆菌 BL21 菌株中进行抗逆分析来验证 LEA 蛋白功能,结果表明 *OsLEA19a* 的表达能增强大肠杆菌对高盐、高渗透压、高温和低温等非生物胁迫的抗性。本研究从柠条锦鸡儿中克隆到 1 个基因 *CkLEA4* 并利用 qRT-PCR 技术检测该基因在不同逆境胁迫下的表达情况,结果表明该基因在 ABA 处理、NaCl、干旱等非生物胁迫条件下的表达量确实有不同程度的提高,其中干旱对该基因的诱导程度最为显著,暗示 *CkLEA4* 在植物对干旱的抵抗过程中该基因可能发挥着重要的作用。

CkLEA4 只是 LEA 基因家族的一个基因,其具体的生物学功能还有待进一步验证。为了进一步揭示该基因在柠条锦鸡儿抵抗非生物胁迫中的功能,我们已经构建了该基因的双元表达载体并转化了拟南芥野生型,为后续通过转基因植物验证该基因的功能做准备。同时,为了全面理解 LEA 基因家族成员在柠条锦鸡儿生长发育中的作用,本实验室除了已经发表的关于 *CkLEA1* 的研究结果^[12] 和本研究外,对其他 LEA 基因家族成员的研究工作也正在进行中,期望这些研究结果能够为未来作物的抗性改良提供理论基础。

参考文献:

- CHEN L(陈雷), LI L(李磊), LI J H(李金花), et al. Plant LEA proteins and their functions[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*(中国农学通报), 2009, **25**(24): 143—146(in Chinese).
- ZOU Y D(邹永东), SHI L SH(施丽沙), LIU G B(刘国宝), et al. Structure and function of group 1 late embryogenesis abundant proteins[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*(生命科学), 2008, **20**(3): 489—494(in Chinese).
- YADIRA O C, FRANCISCO C, JOSE L R, et al. Functional analysis of the group 4 late embryogenesis abundant proteins reveals their relevance in the adaptive response during water deficit in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2010, **154**: 373—390.
- LI L(李乐), XU H L(许红亮), YANG X L(杨兴露), et al. Genome-wide identification, classification and expression analysis of LEA gene family in soybean[J]. *Scientia Agricultura Sinica*(中国农业科学), 2011, **44**(19): 3 945—3 954(in Chinese).
- HU T ZH(胡廷章), WU Y M(吴应梅), YANG J N(杨俊年), et al. Molecular cloning, expression and sequence analysis of *OsLEA2* gene from rice[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*(西南农业学报), 2012, **25**(3): 743—749(in Chinese).
- JIANG J(姜静), YU Y(于影), ZHAO X(赵鑫), et al. Analysis of salt tolerance in transgenic tobacco with LEA gene[J]. *Biotechnology*(生物技术), 2006, **16**(1): 16—20(in Chinese).
- LUO K M(罗克明), GUO Y L(郭余龙), XIAO Y H(肖月华), et al. Cloning and characterization of *D-113* gene promoter from cotton[J]. *Journal of Genetics and Genomics*(遗传学报), 2002, **29**(2): 161—165(in Chinese).
- LIU Y L(刘亚玲), WANG J J(王俊杰), YUN J F(云锦凤), et al. Cloning and bioinformatics analysis of LEA3 gene from wild *Medicago falcata*[J]. *Biotechnology Bulletin*(生物技术通报), 2011, **7**: 82—87(in Chinese).
- SHI J(师静), LIU M Q(刘美芹), SHI J N(史军娜), et al. Sequence analysis and expression pattern of *AmLEA14* encoding a late embryogenesis abundant protein in *Ammopiptanthus mongolicus*[J]. *Journal of Beijing Forestry University*(北京林业大学学报), 2012, **34**

- (4):114—119(in Chinese).
- [10] LU SH SH(路莎莎),JIA R R(贾荣荣),DUAN F(段 飞),*et al*. Cloning and expression analysis under stress of *IiLEA* gene in *Isatis indigotica*[J]. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.*(西北植物学报),2011,31(3):511—516(in Chinese).
- [11] WANG S(王 遂),LIU M R(刘梦然),HUANG H J(黄海娇),*et al*. Selection of cold resistant strains from *TaLEA* gene transferred *Populus simonii* *P. nigra*[J]. *Journal of Northeast of Forestry University*(东北林业大学学报),2011,39(9):5—8(in Chinese).
- [12] YANG Q(杨 杞),YIN J J(尹佳佳),WANG Y(王 颖),*et al*. Cloning and expression analysis of *CkLEA1* gene in *Caragana korshinskii* Kom[J]. *China Biotechnology*(中国生物工程杂志),2013,33(5):93—99(in Chinese).
- [13] ZHANG L H(张林华),LIU CH(刘 超),QIU H L(邱红林),*et al*. Cloning and function analysis of *SiLEA14* from *Saussurea involucrata* Kar. et Kir[J]. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.*(西北植物学报),2013,33(6):1 071—1 078(in Chinese).
- [14] LU S(鲁 松),YANG N(杨 楠),XIONG T Y(熊铁一). Advance in researches on LEA proteins and *Lea* genes[J]. *Journal of Sichuan Forestry Science and Technology*(四川林业科技),2013,34(3):26—29(in Chinese).
- [15] RIED J L,WALKER-SIMMONS M K. Group 3 late embryogenesis abundant proteins in desiccation-tolerant seedlings of wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. *Plant Physiology*,1993,102(1):125—131.
- [16] SHA W(沙 伟),ZHANG M J(张梅娟),LIU B(刘 博),*et al*. Cloning and expression analysis of drought-tolerance related gene *Gp-LEA* in *Grimmia pilifera*[J]. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.*(西北植物学报),2013,33(9):1 724—1 730(in Chinese).
- [17] XIAO B Z,HUANG Y M,TANG N,*et al*. Over-expression of a LEA gene in rice improves drought resistance under the field conditions [J]. *Theoretical and Applied Genetics*,2007,115(1):35—46.
- [18] DALALA M,TAYALD D,CHINNUSAMY V,*et al*. Abiotic stress and ABA-inducible group 4 LEA from *Brassica napus* plays a key role in salt and drought tolerance[J]. *Journal of Biotechnology*,2009,139(2):137—145.
- [19] ZHOU L(周 丽),JI X N(姬向楠),HE F(何 非),*et al*. Structure and function of late embryogenesis abundant proteins in plant[J]. *Journal of Tropical Organisms*(热带生物学报),2012,3(2):191—196(in Chinese).
- [20] ZHAO X,ZHAN L P,ZOU X ZH. Improvement of cold tolerance of the half-high bush Northland blueberry by transformation with the LEA gene from *Tamarix androssowii*[J]. *Plant Growth Regulation*,2011,63(1):13—22.
- [21] LI J(李 剑),ZHAO CH Y(赵常玉),ZHANG F SH(张富生),*et al*. LEA protein and plant stress tolerance[J]. *Plant Physiology Communications*(植物生理学通讯),2010,46(11):1 101—1 108(in Chinese).
- [22] DURE L,CROUCH M,HARAD J,*et al*. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants[J]. *Plant Molecular Biology*,1989,12:475—486.
- [23] INGRAM J,BARTELS D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants[J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*,1996,47(1):377—403.
- [24] BIES-ETHEVE N,GAUBIER-COMELLA P,DEBURES A,*et al*. Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Molecular Biology*,2008,67(1—2):107—124.
- [25] LI G(李 高),YANG Q(杨 杞),ZHANG Y(张 烨),*et al*. Cloning and sequence analysis of the *CkC3H* gene from *Caragana korshinskii* Kom. and preliminary studies of its function[J]. *China Biotechnology*(中国生物工程杂志),2013,33(4):61—67(in Chinese).
- [26] LIU L H(刘龙会),GU S(古 松),GUO Y J(郭亚娇),*et al*. Microsporogenesis and male gametophyte development of *Caragana korshinskii* Kom[J]. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.*(西北植物学报),2012,32(1):81—84(in Chinese).
- [27] YANG Q(杨 杞),ZHANG T(张 涛),WANG Y(王 颖),*et al*. Construction of a suppression subtractive hybridization library of *Caragana korshinskii* under drought stress and cloning of *CkWRKY1* gene[J]. *Scientia Silvae Sinicae*(林业科学),2013,49(7):62—68 (in Chinese).
- [28] ZHOU ZH L(周正立),WANG L(王 琳),YU J(于 军),*et al*. Seed germination physiology of two species of *Caragana* Fabr[J]. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.*(西北植物学报),2011,31(12):2 509—2 515(in Chinese).
- [29] SUN L P(孙立平),LI D Q(李德全). Progress in molecular biology of LEA protein[J]. *Biotechnology Bulletin*(生物技术通报),2006,6:5—9(in Chinese).
- [30] ZHANG L SH(张林生),ZHAO W M(赵文明). LEA protein functions to tolerance drought of the plant[J]. *Plant Physiology Communications*(植物生理学通讯),2003,39(1):61—66(in Chinese).
- [31] DUAN J L,CAI W M. *OsLEA3-2*,an abiotic stress induced gene of rice plays a key role in salt and drought tolerance[J]. *PLoS ONE*,2012,7(9):1—11.
- [32] HU T ZH(胡廷章),YANG J N(杨俊年),WU Y M(吴应梅),*et al*. Expression of *OsLEA19a* gene in *Escherichia coli* and its resistance analysis[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*(华北农学报),2012,27(6):1—4(in Chinese).