

甜瓜抗旱性相关基因 *MeP5CS* 的克隆、序列分析及表达

黄 志^{1,2}, 邹志荣¹, 黄焕焕², 贺超兴^{2,*}, 张志斌², 王怀松², 李建明¹

(¹西北农林科技大学园艺学院, 陕西杨凌 712100; ²中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘 要: 用 GenBank 登录的抗旱相关基因序列进行比对, 在保守区域设计一对引物, 利用 RT-PCR 获得了一个甜瓜抗旱相关基因, 命名为 *MeP5CS*。生物信息学分析表明, 该基因全长 1 000 bp, 开放阅读框 (ORF) 753 bp, 编码 250 个氨基酸; *MeP5CS* 蛋白大小约 82.18 kD, 理论 pI 值为 4.90; *MeP5CS* 编码蛋白与桐花树、猕猴桃和葡萄同源性较高, 分别为 94%、81% 和 73%。该蛋白含约 40.2% 的 α -螺旋, 25.2% 的 β -转角, 34.6% 的不规则卷曲, 在第 19~20 氨基酸之间存在信号肽的剪切位点; *MeP5CS* 编码蛋白是疏水性蛋白, 有 2 个跨膜螺旋结构和 13 个磷酸化位点。半定量 RT-PCR 表明, *MeP5CS* 在甜瓜根系中表达最高, 茎中次之, 叶片中表达较低。*MeP5CS* 基因在甜瓜组织中的表达受丛枝菌根真菌 (AMF) 和水分胁迫双重诱导, 与甜瓜的组织特异性和水分胁迫处理时间有关。水分胁迫条件下, 接种 AMF 可以显著增加甜瓜幼苗脯氨酸的积累量, 菌根甜瓜幼苗的脯氨酸积累与 *MeP5CS* 基因的表达呈正相关。

关键词: 甜瓜; *MeP5CS*; 序列分析; 表达; 丛枝菌根真菌; 水分胁迫

中图分类号: S 652

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2010) 08-1279-08

Cloning, Analysis and Expression of a Drought-related Gene *MeP5CS* from Melon

HUANG Zhi^{1,2}, ZOU Zhi-rong¹, HUANG Huan-huan², HE Chao-xing^{2,*}, ZHANG Zhi-bin², WANG Huai-song², and LI Jian-ming¹

(¹College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; ²Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Using designed primers based on the conserved amino acid sequences of known drought-related genes to amplify cDNA fragments from melon (*Cucumis melo* L.) by RT-PCR, a drought-related gene named *MeP5CS* was obtained. Bioinformatics analysis indicated that the full-length of cDNA sequence was 1 000 bp, which contained an open reading frame of 753 bp and encoded a protein of 250 amino acid residues with a calculated molecular weight of 82.18 kD and isoelectric point of 4.90. The *MeP5CS* protein showed 94%, 81% and 73% similarity to the P5CS from *Aegiceras corniculatum*, *Actinidia deliciosa* and *Vitis vinifera*. The protein include α -helix (40.2%), β -turn (25.2%), random coil (34.6%) and a cleavage site between nineteen and twenty amino acid residues. The protein is a hydrophobic protein and there is two transmembrane helix and thirteen phosphorylation sites. The result of

收稿日期: 2010-05-13; 修回日期: 2010-07-19

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2007BAD79B04, 2006BAD07B01, 2009BADA4B04)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: hechaoxing@126.com)

RT-PCR analysis indicated that *MeP5CS* expression levels were different in roots ,stems and leaves ,and it was the highest in roots and middle in stems ,lower in leaves. The results showed that the AMF can induce expression of *MeP5CS* gene in melon under water stress , and enhance the drought resistance of melon ; Expression differences in tissues were related to different tissues and the duration of water stress. Under water deficit , AMF could increase Pro accumulation in melon leaves , gene expression and proline accumulation were positively correlated.

Key words : melon ; *MeP5CS* ; sequence analysis ; expression ; AMF ; water stress

干旱胁迫被认为是影响作物生长及产量的最重要的非生物因素之一 (Kramer & Boyer , 1995) , 特别是在许多干旱和半干旱地区 , 水分亏缺严重影响了植物的正常生理代谢 , 由水分亏缺造成的植物生长减少和作物减产超过了其他逆境影响的总和 (Maggio et al. , 2000) 。丛枝菌根真菌 (Arbuscular Mycorrhizal Fungi , 简称 AMF) 是分布最广泛的一类内生真菌 , 能够改善宿主植物的水分代谢 , 增强宿主的抗旱性 (Muthukumar & Udaiyan , 2002) 。众多研究表明 AMF 可以影响植物对干旱的响应 , 通过调节植物体内渗透物质含量 , 改善植物的矿质营养 , 提高气孔导度和净光合速率方法来增加植株的生物量 , 提高植物的抗旱性 (Azcón et al. , 1996 ; Auge , 2001 ; 贺忠群 等 , 2008) 。在诸多调节物质中分布最广的是脯氨酸 (Proline , Pro) (Delauney & Verma , 2002) 。大多数研究表明 , 吡咯啉 - 5 - 羧酸合成酶 (P5CS) 是渗透胁迫时植株体内合成脯氨酸 (Pro) 的关键酶 (Szoke et al. , 1992 ; Verbruggen et al. , 1993 ; Yoshida et al. , 2002) 。

本试验中采用半定量 RT-PCR 法对甜瓜接种 AMF 后在水分胁迫下的甜瓜 *P5CS* 基因进行了克隆 , 并对其序列进行生物信息学分析和诱导表达 , 为 AMF 增强甜瓜抗逆性的应用提供理论依据 , 并为进一步研究该基因的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试验设计

甜瓜材料为 ‘中蜜 3 号’ , 由中国农业科学院蔬菜花卉研究所选育并提供。供试丛枝菌根真菌 (AMF) 菌剂为匈牙利科学院土壤科学与农业化学研究所 Tunde Takacs 博士提供的摩西球囊霉菌 *Glomus mosseae* 2 (GM) 。

甜瓜于 2009 年 10 月 15 日播种于育苗钵后在光照培养箱中培养 , 光照培养箱的光周期为 12 h , 光照强度约为 $400 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 昼温 30°C , 夜温 22°C 。试验采用 2×2 设计 , 根据 Hsiao 的方法选择两个水分处理级别 , 一是水分适合 (Well-watered , 记为 WW) , 即控制基质含水量在田间持水量的 80% ~ 90% , 作为对照 ; 二是水分亏缺 (Water deficit , 记为 WD) , 即控制基质含水量在田间持水量的 35% ~ 45% 。每个基质含水量设接种 GM (G) 和不接种 (N) 两水平 , 共 4 个处理。每个处理 8 株重复 , 共 32 钵。接种处理的每钵接入 10 g 菌剂 (约含 720 个孢子) 。孢子的接种采用 “ 二层接种法 ” , 即首先在试验盆中装入 1/3 的灭菌基质 , 然后均匀地撒上一层接种体 , 用量大约是每钵接入量的 3/5 , 之后又撒上一层基质至盆高的 3/4 处 , 将剩余的菌根接种体全部施入 , 覆上一层基质。将甜瓜种子播于其上 , 再覆上一层细的基质。盆的规格是 : 上口内径 10 cm , 盆底内径 7 cm , 盆高 8.5 cm 。采用蛭石作为试验基质 , 每盆装试验基质约 100 g , 基质预先经过 0.11 MPa , 121 $^{\circ}\text{C}$ 高压蒸气灭菌 2 h 。

整个试验过程使用 1/2 浓度的 Hoagland 营养液浇灌 , 经过 30 d 的侵染后幼苗达到两叶一心时

开始水分处理, 5 d 和 10 d 后取各处理甜瓜幼苗的根系、茎和叶片, 液氮冷却后, -80°C 保存。

1.2 RNA 的提取和 cDNA 第一链合成

所有甜瓜组织材料采用异硫氰酸胍法(程华等, 2005)提取 RNA。参照 TIANScript^{RT} Kit 说明书合成 cDNA 第一链。

1.3 目的基因的克隆和测序

参照 GenBank 登录的水稻、小麦、拟南芥等物种中已发表的抗旱相关基因序列进行比对, 在保守区域设计一对引物 P1 和 P2 (P1: 5'-TTGTAAATCTCCGCATCG-3'; P2: 5'-TCAGCACCCAGACCAAAT-3')。分别以水分处理 5 d 后各甜瓜幼苗根系反转录产物为模板进行 PCR 扩增: 94 $^{\circ}\text{C}$ 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s; 50 $^{\circ}\text{C}$ 或 54 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。反应产物用 2% 的琼脂糖凝胶检测, 差异片段用天根生化科技(北京)有限公司的琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收, 回收纯化产物克隆至 pMD-18T (TaKaRa) 载体, 转化 *E. coli* TOP10 (TaKaRa), 菌液 PCR 鉴定后由北京三博远志生物有限公司测序。

1.4 生物信息学分析

用 BLAST 对克隆序列进行同源检索后, 确认为抗旱相关基因的同源序列; 用 DNASTar 分析克隆基因序列; 在 NCBI 网站上用 ORFfinder 寻找最大开放阅读框, 用 BioXM 对克隆序列进行氨基酸组成、等电点分析; 用 SOPMA 在线软件工具, 预测编码蛋白质的二级结构, 用 CBS 服务器上的 SingalP 程序和 NetPhos 程序对编码蛋白质序列的信号肽和磷酸化位点进行预测分析; 氨基酸序列的疏水性和跨膜区分别用 protscale 程序和 TMpred 软件进行预测。

1.5 甜瓜 *MeP5CS* 基因的组织表达分析

提取不同组织来源的 RNA, 以甜瓜看家基因 (GenBank 登录号: AY292386) 设计内参引物, 作为内参。PCR 反应的扩增条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。通过 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.6 甜瓜叶片脯氨酸含量的测定

脯氨酸含量的测定采用酸性茚三酮染色法。取 0.3 g 甜瓜叶片鲜样测定, 重复 3 次, 数据采用 DPS 软件 (7.05 版本) 进行单因素方差分析处理间差异显著性, 用 Duncan's 新复极差法进行平均数间的多重比较。

2 结果与分析

2.1 目的基因的扩增与克隆

所有甜瓜材料 RNA 经电泳均检测到 3 条清晰可区分的条带, 表明 RNA 未降解。经紫外分光光度计检测, RNA 样品 A260/A280 的比值介于 1.8~2.0 之间, 说明抽提的 RNA 质量和纯度符合反转录和 PCR 的要求。

以引物 P1 和 P2 对水分处理 5 d 后各甜瓜幼苗根系反转录产物进行 PCR 扩增。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 表明只有在水分胁迫下的接菌甜瓜根系具有 1 000 bp 的特异性片段 (图 1), 说明 AMF 在水分胁迫下可以诱导甜瓜抗旱基因的特异表达。回收此条带, 经克隆测序后将序列用

BLAST 检索,发现此片段与多种植物的 *P5CS* 基因同源性较高,因此推断为甜瓜 *P5CS* 基因,并命名为 *MeP5CS*。

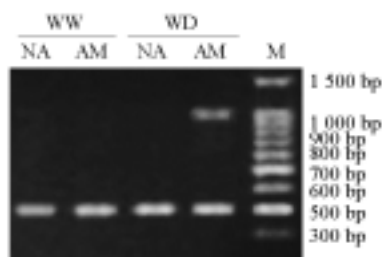


图 1 甜瓜幼苗根系抗旱基因的 PCR 扩增

NA: 未接菌株; AM: 接菌株; WW: 正常水分; WD: 水分亏缺; M: Marker。

Fig. 1 Amplified products with primers P1 and P2 in melon seedling roots

NA: Non-AM plant; AM: Mycorrhizal plant; WW: Well-watered; WD: Water deficit; M: Marker.

2.2 *MeP5CS* 基因的生物信息学分析

MeP5CS 的 cDNA 序列及其推导氨基酸组成如图 2 所示,利用 DNASTar、ORFfinder 和 BioXM 软件分析, *MeP5CS* 基因全长 1 000 bp,包含 73 bp 的 5'非编码序列、174 bp 的 3'非编码序列和 753 bp 的开放阅读框,编码 250 个氨基酸,起始密码子为 ATG,终止密码子为 TGA (图 2)。 *MeP5CS* 编码的蛋白质分子量为 82.18 kD,理论等电点为 4.90。

```

1 - TTGTAATCTCCGATCGGAGGACTCTTCTGGTATATTTGGGATACTGACAGTTTAGCG
61 - GCTTTACTAGCTTATGGAGCTTAAGGCTGACCTCCTTATCCTTTTAAGTGATGTGGAGGG
1 - M E L K A D L L I L L S D V E G
121 - TCTTTTGTAGTGGCCCTCCAGTGATCCACAGTCAAAGCTCATACATACCTACATTAAGGA
17 - L F S G P P S D P Q S K L I H T Y I K E
181 - AAAGTACGAAGGACTGATTACATTGGAGATAAATCCCGGTGGGCGTGGGCGTATGAC
37 - K Y E G L I T F G D K S R V G R G G M T
241 - CGCTAAAGTAAAGCTGCTGTTTACTCAGCCCAAGCAACTACAGGCTTGTATTACCAG
57 - A K V K A A V Y S A Q A T T G F V I T S
301 - TGGTTGTGCTCCGATAATATCATAAAAGTACAGAATGCAGAGCGTATTGTTACTCTATT
77 - G C A P D N I I K V Q N G E R I G T L F
361 - TCATCGAGATGCAAATACATGGGGTCCATCTGGAGCAGTTGGTGTCTCGGACATGGCTGT
97 - H R D A N T W G P S G A V G A R D M A V
421 - TGCAGCAAGAGAGAGTTCAAGGCTGGAATCCCTGATGTCTCCAGGAGCTAGGAGTAAGAT
117 - A A R E S S R L E S L M S P G A R S K I
481 - ATTACTGGATATAGGAGTCTCTGGAAGCGAATGAACAGAATATTACTGTAGACATCGA
137 - L L D I A S A L E A N E Q N I T V D I E
541 - AGCTGATGTGCTGCTGCACAACAGGCTGTTATGAGAAATCATTGATATCCCGCTTGC
157 - A D V A A A Q Q A G Y E K S L I S R L A
601 - TCTTAAGCCTGAAAAGATTCAAGTCTTGCAAACTCCATTCTGTACTTGCAAACATGGA
177 - L K P G K I S S L A N S I R V L A N M E
661 - AGAGCCAATTGGTCATGTTCTAAATAGAACTGAGATTGCCAGTGGCTCTGTTTATAGAGAA
197 - E P I G H V L N R T E I A S G S V L E K
721 - GAAATCATCTTCATTGGGGTTCCTGTTGGTGATTTTTCAGTCTCGTCTGACGCTCTGGT
217 - K S S S L G V L L V I F E S R P D A L V
781 - TCAGATAGCTTCTTGGCAATCAGATCTGGAATGGCTTACTGTTGAAAGGGGAAAGGAC
237 - Q I A S L A I R S G M A Y C *
841 - GCCAGAAGATCCAACGAGCCTTGCAAGGTTATTACTTCTGCTATCTTAACCGCTCAG
901 - GAAGGAAAGCTTATTGGGCTAGTAACTTCAAGAGATGAGATTCCCGATTGCTGAAGCTT
961 - GATGATGTGATCGATCTTGTAATTGGTCTGGGTGCTGA

```

图 2 *MeP5CS* 基因的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

起始密码子为 ATG,终止密码子 (TGA) 用星号表示。

Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of the *MeP5CS* cDNA

The start codon is ATG and the stop codon (TGA) is marked with asterisk.

高等植物 P5CS 蛋白质具有 6 个主要功能域：ATP 结合位点，两个亮氨酸结构域，NADPH 结合位点，谷氨酰激酶（GK）结构域和谷氨酸半醛（GSA）结构域（Zhu et al., 1998）。通过序列比对，*MeP5CS* 编码氨基酸序列与已知植物桐花树（ABG74923）、猕猴桃（AAC14481）和葡萄（CBI31612）的 P5CS 基因同源性较高，分别为 94%、81% 和 73%（图 3），表明 *MeP5CS* 具有高等植物 P5CS 蛋白质的两个功能域：亮氨酸结构域（1~20 氨基酸）和谷氨酰激酶（GK）结构域（46~70 氨基酸）。由于本试验只是获得甜瓜 P5CS 基因的部分 cDNA 序列，尚未克隆到全长，所以 P5CS 的其他功能域在 *MeP5CS* 中未找到。

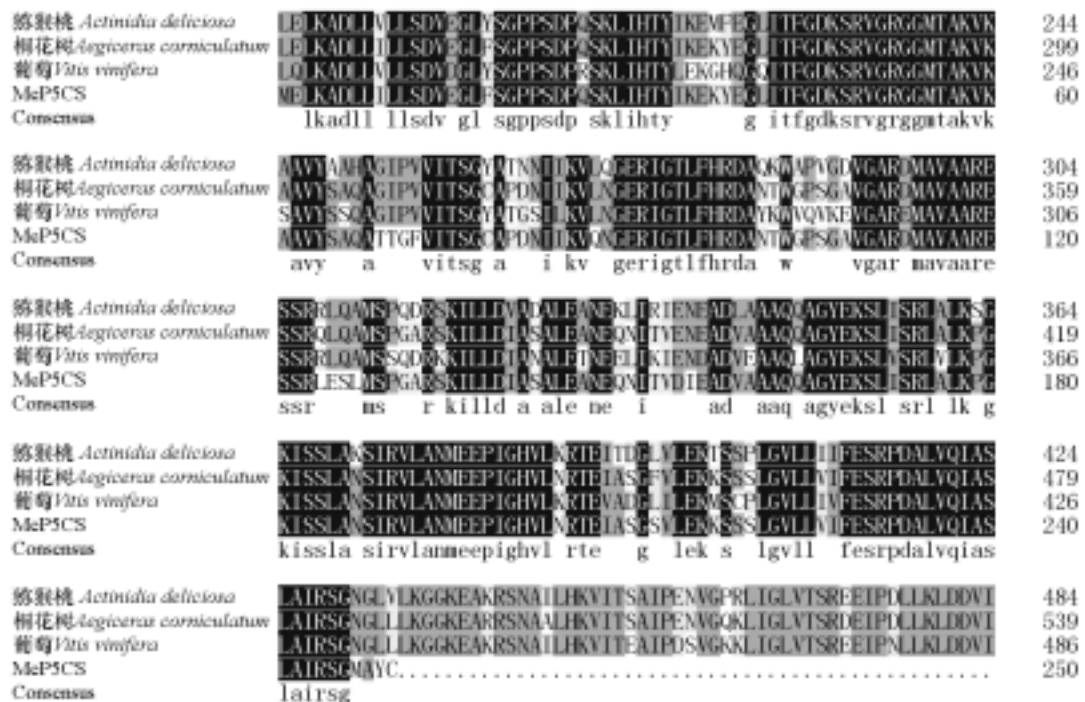


图 3 *MeP5CS* 与其他植物的同源性比对

图中的蛋白质序列在 GenBank 中的登录号：猕猴桃（AAC14481），桐花树（ABG74923），葡萄（CBI31612）。

Fig. 3 Alignment of the deduced *MeP5CS* protein and P5CS from other plants

The protein sequences shown in these diagrams are listed in the GenBank database under the following accession numbers:

Actinidia deliciosa (AAC14481), *Aegicerax corniculatur* (ABG74923), *Vitis vinifera* (CBI31612).

依据 SOPMA 在线软件工具预测甜瓜 *MeP5CS* 基因编码蛋白质的二级结构，表明该蛋白约含 40.2% 的 α -螺旋，25.2% 的 β -转角和 34.6% 的不规则卷曲。

在 CBS 服务器上利用 SignalP 程序的神经网络模型（NN）和隐马尔克夫模型（HMM）进行预测，在 N 端含有 19 个由氨基酸残基组成的信号肽，信号肽酶剪切位点介于 S¹⁹ ~ G²⁰ 之间，表明 *MeP5CS* 编码的蛋白质是分泌蛋白质；利用 NetPhos 程序预测得出该蛋白有 10 个丝氨酸（Ser）、两个苏氨酸（Thr）和 1 个酪氨酸（Tyr）可能成为蛋白激酶磷酸化的位点，表明在 P5CS 的生物合成过程中需要翻译后加工修饰才能成为特定功能的成熟多肽，同时磷酸化和去磷酸也是细胞内信号传导的重要方式。

用 protscale 程序预测编码蛋白质序列亲水/疏水性，结果表明多肽链的第 224 位的亮氨酸（Leu）具有最高的分值 2.878，第 24 位的精氨酸（Asp）具有最低的分值 -1.967，第 224 位的 Leu 疏水性最强，第 24 位的 Asp 亲水性最强，就多肽链整体来看，疏水性氨基酸占多肽链大部分，整体偏于

正值以上,表明 *MeP5CS* 编码蛋白是疏水性蛋白。此外用 TMpred 软件预测,该基因编码蛋白有 2 个跨膜螺旋结构(63~83,234~250),表明该蛋白属于膜结合蛋白。

2.3 甜瓜 *MeP5CS* 基因的组织表达分析

以半定量 RT-PCR 法分析 *MeP5CS* 基因在菌根甜瓜不同组织部位的表达,当正常水分处理时,在接种 AMF 和未接种 AMF 的甜瓜组织中 *MeP5CS* 基因都没有表达;当在水分胁迫处理时,只有在接种 AMF 的甜瓜组织中 *MeP5CS* 基因才表达,而且在根系中表达最强,其次是茎部,叶片中表达最弱(图 4);水分胁迫处理 5 d 和 10 d 时相比较,同一甜瓜组织的 *MeP5CS* 基因在 10 d 后的表达明显比 5 d 后的高。表明 *MeP5CS* 基因在甜瓜组织中的表达受 AMF 和水分胁迫的影响,并且与甜瓜的组织特异性和水分胁迫处理的时间有关。

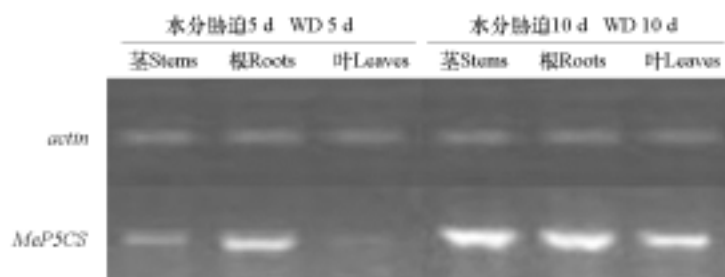


图 4 接种 AMF 的甜瓜组织中 *MeP5CS* 基因的表达分析

Fig. 4 Expression and analysis of *MeP5CS* in melon by AMF under water stress

2.4 甜瓜幼苗处理后脯氨酸积累与 *MeP5CS* 基因表达的相关分析

如图 5 所示,在正常水分条件下,两个处理甜瓜幼苗的脯氨酸含量在整个试验处理中相对稳定,接菌处理(WWG)和未接菌处理(WWN)的脯氨酸含量无显著差异;在水分胁迫下,接菌处理(WDG)的脯氨酸含量在第 5 天和第 10 天分别是未接菌处理(WDN)的 172.5%和 139.6%,接菌处理(WDG)的脯氨酸含量均显著高于未接菌处理(WDN),表明在水分胁迫下,接种 AMF 可以显著增加甜瓜幼苗脯氨酸的积累量,且积累量随胁迫时间的延长而增加,且与 *MeP5CS* 基因在甜瓜幼苗中的表达呈正相关。

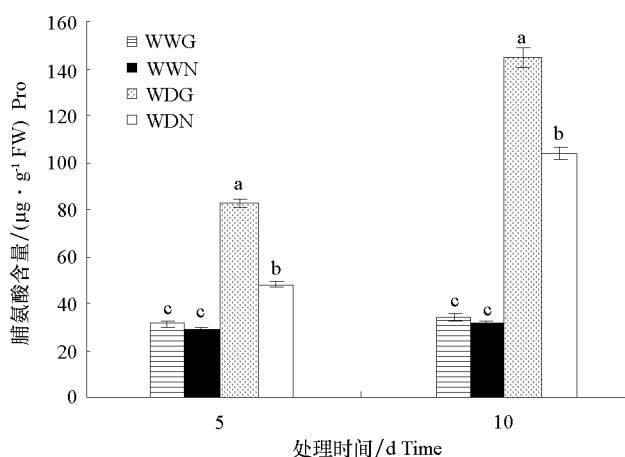


图 5 丛枝菌根真菌对不同水分处理下甜瓜幼苗脯氨酸含量的影响

WWG: 正常水分接菌; WWN: 正常水分未接菌; WDG: 水分亏缺接菌; WDN: 水分亏缺未接菌。

Fig. 5 Effects of Arbuscular mycorrhizal fungi on changes of proline content under different water treatments

WWG: AMF + well-watered; WWN: Well-watered; WDG: AMF + water deficit; WDN: Water deficit.

3 讨论

本研究中对水分胁迫下接菌和未接菌甜瓜 *MeP5CS* 基因表达的结果表明,该基因的表达受 AMF 和水分胁迫的双重诱导,是菌根在逆境下增强抗性的重要分子基础。正常水分处理时,AMF 不能诱导甜瓜 *MeP5CS* 基因的表达,水分胁迫下,*MeP5CS* 基因只有在接种 AMF 甜瓜中被诱导表达,并且在根系中表达最强,其次是在茎部,叶片中表达最弱,结果还显示水分胁迫处理 10 d 后,各个组织中的表达分别较 5 d 后的要强,这说明本试验中只有当水分胁迫时 AMF 才能诱导 *MeP5CS* 基因在甜瓜材料中进行表达,并且 AMF 的诱导作用因部位而不同,同时与水分胁迫时间也有关。关于在接种 AMF 与水分胁迫双重因素下 *P5CS* 基因的表达研究尚无文献报道。本试验通过半定量 RT-PCR 对甜瓜组织表达的差异分析证明了菌根增强植物抗逆性有特异表达,为进一步通过实时定量 PCR 深入开展研究打下了基础。

脯氨酸合成酶 *P5CS* 是脯氨酸合成代谢中的关键酶,决定着脯氨酸合成的速度。目前,编码该酶的基因已经从很多植物中克隆出来。第一个编码 *P5CS* 基因是从豇豆 cDNA 文库中分离得到 (Hu et al., 1992), 基因序列全长为 2 417 bp, 含有一个开放阅读框, 编码蛋白质约 73.2 kD, 其中含有一个亮氨酸结构域, 而亮氨酸结构域有利于蛋白分子之间或分子内的相互作用, 维持蛋白质结构的稳定, 也可能与同型二聚体和异型二聚体的形成有关; 另外该编码蛋白质序列还具有磷酸化位点, 并证明在脯氨酸合成水平上具有反馈调节作用。在苜蓿中发现两个 *P5CS* 基因 (Ginzberg et al., 1998; Armengaud et al., 2004), 试验表明 *P5CS* 基因的表达水平受不同发育时期与环境特异的影响。拟南芥中也克隆出两个 *P5CS* 基因 (Savouré et al., 1995; Strizhov et al., 1997), 在干旱胁迫下, *P5CS* 基因的诱导表达和脯氨酸的积累之间存在着明显的相关性 (Savouré et al., 1995), 本试验结果与其一致。

采用生物信息学方法对本试验获得的 *MeP5CS* 基因进行序列分析, 其 cDNA 全长 1 000 bp, ORF 为 753 bp, 编码 250 个氨基酸。同源序列比对发现, 甜瓜的 *MeP5CS* 基因的序列与猕猴桃、桐花树和葡萄的 *P5CS* 基因的序列同源性较高, 因此推断获得的 cDNA 序列是甜瓜的 *P5CS* 基因。*MeP5CS* 编码蛋白是一种疏水跨膜蛋白, 并且存在磷酸化位点, 与已报道的桐花树 *P5CS* 编码蛋白疏水区域十分相似, 因此推测他们之间的关系有可能是同一种功能蛋白的不同变构体; 此外在 1~20 和 46~70 氨基酸之间分别具有亮氨酸结构域和谷氨酰激酶 (GK) 结构域, 但是并未找到 *P5CS* 的其他功能域, 可能是由于本试验仅获得甜瓜 *P5CS* 基因的部分 cDNA 序列, 尚未克隆到 *P5CS* 基因的全长。

通过对不同处理下与 *MeP5CS* 密切相关的植株脯氨酸积累分析, 表明在水分胁迫下, 接种 AMF 可以显著增加甜瓜幼苗脯氨酸的积累量, 且积累量随胁迫时间的延长而增加, 这些均与 *MeP5CS* 基因在甜瓜幼苗中的表达呈正相关, 从而进一步验证了菌根增抗对植物体内渗透物含量的调节是通过诱导基因表达的变化完成的, 下一步拟通过 RACE 技术获得 *MeP5CS* 基因的全长, 对其功能作进一步的深入分析。

References

- Armengaud P, Thierry L, Buhot N, Grenier-de March G, Savouré A. 2004. Transcriptional regulation of proline biosynthesis in *Medicago truncatula* reveals developmental and environmental specific features. *Physiologia Plantarum*, 120: 442–450.
- Auge R M. 2001. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza*, 11: 3–42.
- Azcón R, Gomez M, Tobar R. 1996. Physiological and nutritional responses by *Lactuca sativa* L. to nitrogen sources and mycorrhizal fungi under drought conditions. *Biology and Fertility of Soils*, 22: 156–161.
- Cheng Hua, Yu Long-jiang, Hu Qiong-yue, Sun You-ping, Chen Shan-cai. 2005. Extraction of total RNA from leaves of sterile Maca plantlet.

- Biotechnology, 15 : 45 – 47. (in Chinese)
- 程 华, 余龙江, 胡琼月, 孙友平, 陈善才. 2005. 改良异硫氰酸胍法提取玛咖 (Maca) 叶片中总 RNA 研究. 生物技术, 15 : 45 – 47.
- Delauney A, Verma D. 2002. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. The Plant Journal, 4 : 215 – 223.
- Ginzberg I, Stein H, Kapulnik Y, Szabados L, Strizhov N, Schell J, Koncz C, Zilberstein A. 1998. Isolation and characterization of two different cDNAs of 1-pyrroline-5-carboxylate synthase in alfalfa, transcriptionally induced upon salt stress. Plant Molecular Biology, 38 : 755 – 764.
- He Zhong-qun, He Chao-xing, Zhang Zhi-bin, Zou Zhi-rong, Wang Huai-song, Tunde Takacs. 2007. Study on osmotic adjustment mechanism of tomato salt tolerance enhanced by arbuscular mycorrhizal fungi. Acta Horticulturae Sinica, 34 (1) : 147 – 152. (in Chinese)
- 贺忠群, 贺超兴, 张志斌, 邹志荣, 王怀松, Tunde Takacs. 2007. 丛枝菌根真菌对番茄渗透调节物质含量的影响. 园艺学报, 34 (1) : 147 – 152.
- Hu C, Delauney A, Verma D. 1992. 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 of the United States of America, 89 : 9354.
- Kramer P J, Boyer J S. 1995. Water relations of plants and soils. San Diego, CA, USA : Academic Press Inc.
- Maggio A, Reddy M P, Joly R J. 2000. Leaf gas exchange and solute accumulation in the halophyte *Salvadora persica* grown at moderate salinity. Environmental and Experimental Botany, 44 : 31 – 38.
- Muthukumar T, Udaiyan K. 2002. Growth and yield of cowpea as influenced by changes in arbuscular mycorrhiza in response to organic manuring. Journal of Agronomy and Crop Science, 188 : 123 – 132.
- Savou   A, Jaoua S, Hua X, Ardiles W, Van Montagu M, Verbruggen N. 1995. Isolation, characterization, and chromosomal location of a gene encoding the Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase in *Arabidopsis thaliana*. FEBS Letters, 372 : 13 – 19.
- Strizhov N, Abraham E, Okresz L, Blickling S, Zilberstein A, Schell J, Koncz C, Szabados L. 1997. Differential expression of two *P5CS* genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by ABA1, ABI1 and AXR2 in *Arabidopsis*. The Plant Journal, 12 : 557 – 569.
- Szoke A, Miao G-H, Hong Z, Verma D P S. 1992. Subcellular location of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase in root/nodule and leaf of soybean. Plant Physiology, 99 : 1642 – 1649.
- Verbruggen N, Villarroel R, Van Montagu M. 1993. Osmoregulation of a pyrroline-5-carboxylate reductase gene in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology, 103 : 771 – 781.
- Yoshiba Y, Kiyosue T, Katagiri T, Ueda H, Mizoguchi T, Yamaguchi-Shinozaki K, Wada K, Harada Y, Shinozaki K. 2002. 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, 7 : 751 – 760.
- Zhu B, Su J, Chang M, Verma D, Fan Y, Wu R. 1998. Overexpression of a Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water-and salt-stress in transgenic rice. Plant Science, 139 : 41 – 48.