

多年生黑麦草 *P5CS* 基因的 cDNA 克隆、表达及亚细胞定位

曹 丽^{1,2}, 孙振元^{2,*}, 义鸣放¹, 韩 蕾², 辛海波¹

(¹ 中国农业大学观赏园艺与园林系, 北京 100193; ² 中国林业科学研究院林业研究所/国家林业局林木培育重点实验室, 北京 100091)

摘 要: 以多年生黑麦草 (*Lolium perenne*) ‘Derby’ 为试材, 采用 RT-PCR 结合 RACE 技术, 克隆获得 1 个 Δ^1 -吡咯啉-5-羧酸合成酶基因 (*P5CS*) 的 cDNA 序列, 全长 2 528 bp, 推断其编码 716 个氨基酸, 命名为 *LpP5CS*。序列分析表明: *LpP5CS* 基因与小麦 *TaP5CS* 和水稻 *OsP5CS* 基因核苷酸序列的相似性分别为 92.05% 和 85.82%, 氨基酸序列的相似性分别为 93.99% 和 87.99%。半定量 PCR 结果表明, *LpP5CS* 基因在多年生黑麦草根、茎、叶均有表达。盐处理下, 表达量高于对照, 其中叶片中表达量最高, 根中最低。200 mmol · L⁻¹ NaCl 处理下, *LpP5CS* 基因表达量随处理时间延长, 有先升高后降低的趋势。洋葱鳞茎表皮细胞的瞬时表达显示, *LpP5CS* 蛋白定位于细胞膜和细胞核。

关键词: 多年生黑麦草; *P5CS*; 渗透胁迫; 克隆; 亚细胞定位内容

中图分类号: S 68

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2010) 09-1477-08

Cloning, Expression and Subcellular Localization of *P5CS* Gene from Perennial Ryegrass (*Lolium perenne* L.)

CAO Li^{1,2}, SUN Zhen-yuan^{2,*}, YI Ming-fang¹, HAN Lei², and XIN Hai-bo¹

(¹ Department of Ornamental Horticulture and Landscape Architecture, China Agricultural University, Beijing 100193, China; ² Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry/Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, State Forestry Administration, Beijing 100091, China)

Abstract: In this study, full length cDNA sequence of a putative Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthase gene (*LpP5CS*) was cloned from perennial ryegrass (*Lolium perenne* L. ‘Derby’) leaves using RT-PCR and rapid amplification of cDNA ends (RACE). Sequence analysis showed that the nucleotide sequence of this gene is 2 528 bp, containing a complete open reading frame and encoding 716 amino acids. Nucleotide and amino acid sequence analysis revealed that *LpP5CS* shares high identity with the orthologs from *Triticum aestivum* (92.05%, 93.99%) and *Oryza sativa* (85.82%, 87.99%), respectively. Semi-quantitative RT-PCR analysis showed that *LpP5CS* expressed in different tissues. Various elevated levels of *LpP5CS* expression have been detected when the seedling roots exposed to high salinity. Tested with salt solution, its expression was higher than control, and the highest in leaves, the lowest in roots. The contents of *LpP5CS* increased first then decreased with the processing time is extended after 200 mmol · L⁻¹ NaCl.

收稿日期: 2009-12-11; 修回日期: 2010-07-13

基金项目: 国家 ‘十一·五’ 科技支撑计划项目 (2006BAD01A19-2); 国家 ‘863’ 计划项目 (2006AA100109)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: sunzy@caf.ac.cn)

treatment. Finally, subcellular localization assays showed that the LpP5CS protein was present in the nucleus and at the plasmalemma.

Key words: perennial ryegrass; Δ^1 -Pyrroline-5-carboxylate synthetase; osmotic stress; cloning; subcellular localization

多年生黑麦草 (*Lolium perenne* L.) 建植速度快, 修剪后再生力强, 耐践踏性和耐牧性强, 是世界最重要的草坪草种和禾本科牧草之一, 世界各地的温带地区均有分布 (Jauhar, 1993; Xu et al., 2001; Ma et al., 2006), 适宜我国北方大部分地区种植。但绝大多数黑麦草品种耐盐抗旱性差, 提高其耐盐抗旱性对发展我国草坪业和畜牧业具有重要的意义。

吡咯啉-5-羧酸合成酶 (Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase, P5CS) 是植物通过谷氨酸途径合成脯氨酸的关键酶 (Hu et al., 1992), 是双功能酶 (Delauney & Verma, 1993), 也是限速酶 (Kavi Kishor et al., 2005)。逆境条件下该基因的诱导表达伴随着脯氨酸合成的增加 (Chen et al., 2008)。Su 和 Wu (2004) 将豇豆的 P5CS 基因转入水稻, 结果发现水分胁迫前, 用胁迫诱导型启动子启动的两个转基因株系的脯氨酸含量分别是对照的 138% 和 121%; 水分胁迫 8 d 后, 脯氨酸含量分别是对照的 182% 和 169%。大量资料表明, 脯氨酸积累与植物对干旱和盐胁迫适应性之间有显著的正相关 (Claussen, 2005)。

目前, 已经在豇豆 (Hu et al., 1992)、拟南芥 (Savoure et al., 1995)、蒺藜苜蓿 (Armengaud et al., 2004) 等植物中克隆到了 P5CS 基因。拟南芥中有两个 P5CS 同源基因: *AtP5CS1* 和 *AtP5CS2*。在渗透胁迫下, *AtP5CS1* 基因在各种器官和不同的组织中都表达, 并且在脱水, 高盐和 ABA 处理下主要是上调表达 (Yoshida et al., 1995; Szekely et al., 2008), 但是在非逆境条件下该基因在培养的分裂细胞中没有检测到它的表达。*AtP5CS2* 基因在培养的分裂细胞表达, 并且逆境下该基因的诱导依赖于蛋白质的合成 (Strizhov et al., 1997)。Fujita 等 (1998) 从番茄分离到两个 P5CS 基因序列, 在 NaCl 胁迫下, *tomPRO2* 的 mRNA 水平增加 3 倍多, 而 *tomPRO1* 的信息没有检测到。由此可见, 同一类植物 P5CS 基因可以对不同的逆境胁迫作出反应, 而不同的 P5CS 基因也可以受同一种胁迫诱导表达。

目前尚未有多年生黑麦草 P5CS 基因的相关报道。本研究中利用 RT-PCR 结合 RACE (rapid amplification of cDNA ends) 技术, 从 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 处理 3 h 的多年生黑麦草叶片中克隆到一个 P5CS 同源基因的全长 cDNA, 并对其盐胁迫下的表达规律进行了分析, 最后构建瞬时表达载体, 利用基因枪轰击洋葱鳞茎表皮细胞, 分析了 LpP5CS 蛋白的亚细胞定位情况, 为进一步研究脯氨酸在多年生黑麦草中的作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

试验于 2008—2009 年在北京进行。以多年生黑麦草 (*Lolium perenne* L.) ‘Derby’ 种子为材料, 用 15% 的次氯酸钠消毒 20 min, 然后用无菌水清洗 4~6 次, 在培养皿中用无菌水培养至种子萌发。将萌发的种子转移到装有基质 (基质组成为营养土: 蛭石: 珍珠岩 = 4: 1: 1) 的塑料盆内 (10 cm × 10 cm), 于 25/18 (昼/夜) 温室下正常生长, 光照 16 h, 每盆 10 株。幼苗 4 W 时进行 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 盐处理, 分别剪取对照 (未经盐处理) 和盐处理后 3、6、9、12 和 24 h 的根、茎和叶。液氮速冻后 -70 °C 保存, 用于提取总 RNA。

1.2 多年生黑麦草 *P5CS* 同源基因 cDNA 片段的克隆和分析

以经过盐处理 3 h 的多年生黑麦草叶片为材料，液氮中研磨，总 RNA 的提取采用 Trizol 法 (Invitrogen, CA, USA)。根据 GenBank 中已发表的小麦 (AAX35536)、斑茅 (ABV03819)、水稻 (BAA19916) *P5CS* 基因的 cDNA 序列，在同源区域设计 5'端引物：5'-GGATTCATCTGGTATA TT(T/C)TGGGAT-3'和 3'端引物：5'-ACCTTATGCAATA(C/T)(G/T/C)G(C/T)GTTTGAT-3'。以总 RNA 为模板，RT-PCR 反应参照 Promega 公司的 M-MLV Reverse Transcriptase 说明书进行。PCR 反应体系为 25 μ L，反应条件为 94 预变性 5 min；94 变性 30 s，50 复性 45 s，72 延伸 70 s，40 个循环；72 延伸 10 min。PCR 产物测序后用 DNAMAN 软件与其他植物 *P5CS* 基因的 cDNA 序列进行同源性比对。

PCR 产物的凝胶回收按照说明书进行。连接反应按 pMD19-T 载体试剂盒说明书进行。转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞，然后将转化的大肠杆菌用氨苄青霉素、X-gal 和 IPTG 平板筛选，挑取白色菌斑进行菌体 PCR 扩增与质粒双酶切鉴定。选取 PCR 及酶切检测均呈阳性的菌落测序。测序工作由北京六合华大基因科技股份有限公司完成。测序结果利用 DNAMAN 和 NCBI BLAST 进行序列分析。

1.3 多年生黑麦草 *P5CS* 同源基因全长 cDNA 序列的克隆和分析

根据上一步骤获得的 cDNA 片段序列，设计 5'端引物 (GSP1：5'-TCGAATGGCTAAAGAC GCAATCTGGA-3'；GSP2：5'-GCTGTATAGGCCATCCACATCAC-3') 和 3'端引物 (GSP3：5'-AGT GGTAATGGTCTTCTCTCTAAAGG-3')，5'RACE 反应条件按照 TaKaRa 公司 5'-Full RACE Kit 操作说明书进行，3'RACE 反应条件按照 Clontech 公司 BD SMARTTMRACE cDNA Amplification Kit 的说明书进行。PCR 产物测序后，用 Clustalx 软件对由其序列推导的氨基酸序列和 GenBank 中已发表的其他植物的 *P5CS* 氨基酸序列进行聚类分析。

1.4 *P5CS* 基因在多年生黑麦草不同组织和不同处理下的表达和分析

根据获得的全长序列，设计 5'端引物：5'-GCTGTTATCACCAGAAAT-3'和 3'端引物：5'-CCAGT AGACCTGCCAAAC-3'，以 eEF-1 α (James & Ruth, 2009) 为内标基因 (eEF-1 α For 5'-GAGAGGTCC ACCAACCTTG-3'；eEF-1 α Rev 5'-GGCTTGGTGGGAATCATC-3')，RT-PCR 法分析未经盐处理及盐处理后 *P5CS* 基因在多年生黑麦草各组织中的表达情况，反应条件为退火温度 55 $^{\circ}$ C，35 个循环。每组处理重复 3 次，用凝胶成像软件量化图片中 PCR 产物，反应完毕后取 10 μ L 于 1.5% 的琼脂糖凝胶上进行电泳分析。

1.5 瞬时表达载体构建

根据目的基因 *LpP5CS* 序列设计带有酶切位点 *Nco* /*Sac* 的引物对 GFP-1 For (5'-CGAACGAT AGCCATGGTCATGGCGCCCGCCGACCCCAAC-3') GFP-1 Rev (5'-AATTCGAAGCTTGAGCTCTTG CAAAGGAAGACTCTTATGG-3') 扩增 *LpP5CS* 基因完整开放阅读框 (不包含终止子)。扩增产物回收纯化后连接到克隆载体 pMD19-T 上，获得重组质粒，用 *Nco* /*Sac* 进行双酶切，回收目的片段后，与经用 *Nco* /*Sac* 双酶切的 pSAT6-GFP-N1 (原 RFP 改造为 GFP，启动子为 CaMV 35S，质粒由中国农业大学王涛教授课题组惠赠) 载体用 T4 连接酶进行连接，构建成瞬时表达载体 pSAT6-*LpP5CS*-GFP-N1。获得的连接产物转化到 *E. coli* DH5 α ，经酶切和测序鉴定正确后，筛选阳性克隆并提取质粒 pSAT6-*LpP5CS*-GFP-N1。

1.6 基因枪轰击洋葱表皮

1.6.1 微粒子弹的制备

1~2 μg 的 pSAT6-*LpP5CS*-GFP-N1 和 pSAT6-GFP 重组质粒 DNA 分别与 8 μL 60 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的金粉悬液 (直径为 1.0 μm)、4 μL 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 亚精胺 (抽滤灭菌)、8 μL 2.5 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 混合制作成金粉悬浮液,振荡器上震荡 3 min, 10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 s, 收集金粉沉淀, 20 μL 无水乙醇重悬金粉-DNA 混合物。

1.6.2 轰击受体材料

撕取幼嫩的洋葱表皮平放在 MS 固体培养基 (1.5%琼脂) 上, 25 $^{\circ}\text{C}$ 预培养 4 h。选用 1 100 psi 的压力膜, 将 10 μL 金粉-DNA 混合物点在轰击膜中央, 采用 PDS 1000/He 型基因枪 (Bio-Rad) 进行轰击, 轰击距离 6 cm, 真空度为 25 $\text{In} \cdot \text{Hg}^{-1}$ 。轰击后的洋葱表皮细胞 25 $^{\circ}\text{C}$ 暗培养 24 h 后在共聚焦显微镜 (C1 Nikon) 下后观察 GFP 的表达情况。

2 结果与分析

2.1 多年生黑麦草 *P5CS* 同源基因全长 cDNA 的克隆

以 *P5CS* 蛋白保守序列为基础, 设计简并引物, 通过 PCR 扩增, 从多年生黑麦草叶片中获得了 852 bp 的 cDNA 片段。测序后, 在 GenBank 中进行 Blast 分析发现, 该片段编码的氨基酸序列与 *P5CS* 类蛋白高度同源。以此片段为模板, 设计特异引物进行 3'RACE、5'RACE, 获得了长度为 1 139 bp 和 714 bp 的 cDNA 全长序列 (图 1), 经过 Blast 比对后, 与 *P5CS* 类基因同源, 将其定名为 *LpP5CS*。

LpP5CS 包含一个长度为 104 bp 的 5'非翻译区和 272 bp 的 3'非翻译区, 其开放阅读框架 (open reading frame, ORF) 编码一个含 716 个氨基酸的蛋白质, 推定的分子量为 77.537 kD, 推测的等电点为 5.80。

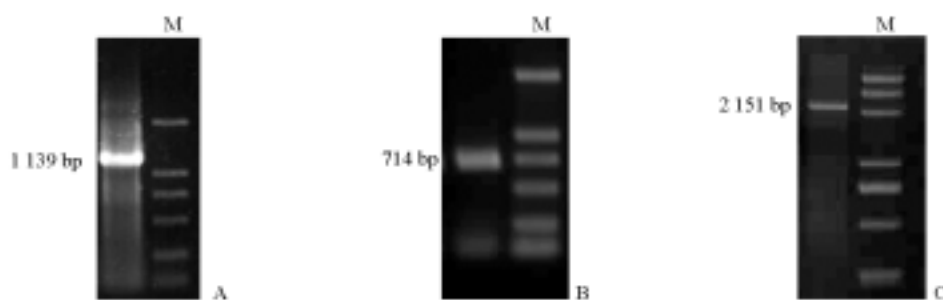


图 1 PCR 产物检测

A: 3'RACE 产物; B: 5'RACE 产物; C: CDS 产物; M: Marker。

Fig. 1 Agrose gel electrophoresis of PCR products

A, B and C show 3', 5' RACE and CDS product respectively; M: Marker.

2.2 多年生黑麦草 *P5CS* 同源基因的序列分析

将 *LpP5CS* 进行 Blast 同源性分析, 发现其与小麦 (AAX35536)、水稻 (BAA19916)、拟南芥 *P5CS1* (CAA60446)、豇豆 (M92276) *P5CS* cDNA 序列的同源性分别达 92.05%、85.82%、68.71% 和 70.33%, 氨基酸序列的同源性分别为 93.99%、87.99%、73.22%和 67.92%。

氨基酸序列比对显示, *LpP5CS* 都包含有高等植物 *P5CS* 蛋白质的 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 (图 2), 说明 *LpP5CS* 可能在多年生黑麦草脯氨酸合成中起作用。从图 2 可以看到, 除谷氨酰激酶 (GK) 结构域和 1 个亮氨酸结构域差异较大外, 其它 4 个功能域的差异都较小, 说明 *P5CS* 蛋白质的主要功能域相对保守。豇豆 *VaP5CS* 蛋白质序列 129 位的苯丙氨酸 (Phenylalanine, F) 是脯氨酸反馈抑制位点, 这个反馈抑制位点在原核生物和真核生物中是比较保守的, 该位点的突变能使 *VaP5CS* 酶的反馈抑制作用丧失 (Hong et al., 2000)。在 *LpP5CS* 的 128 位点发现苯丙氨酸 (图 2), 说明 *LpP5CS* 和 *VaP5CS* 酶一样, 其活性可能被高浓度脯氨酸抑制。

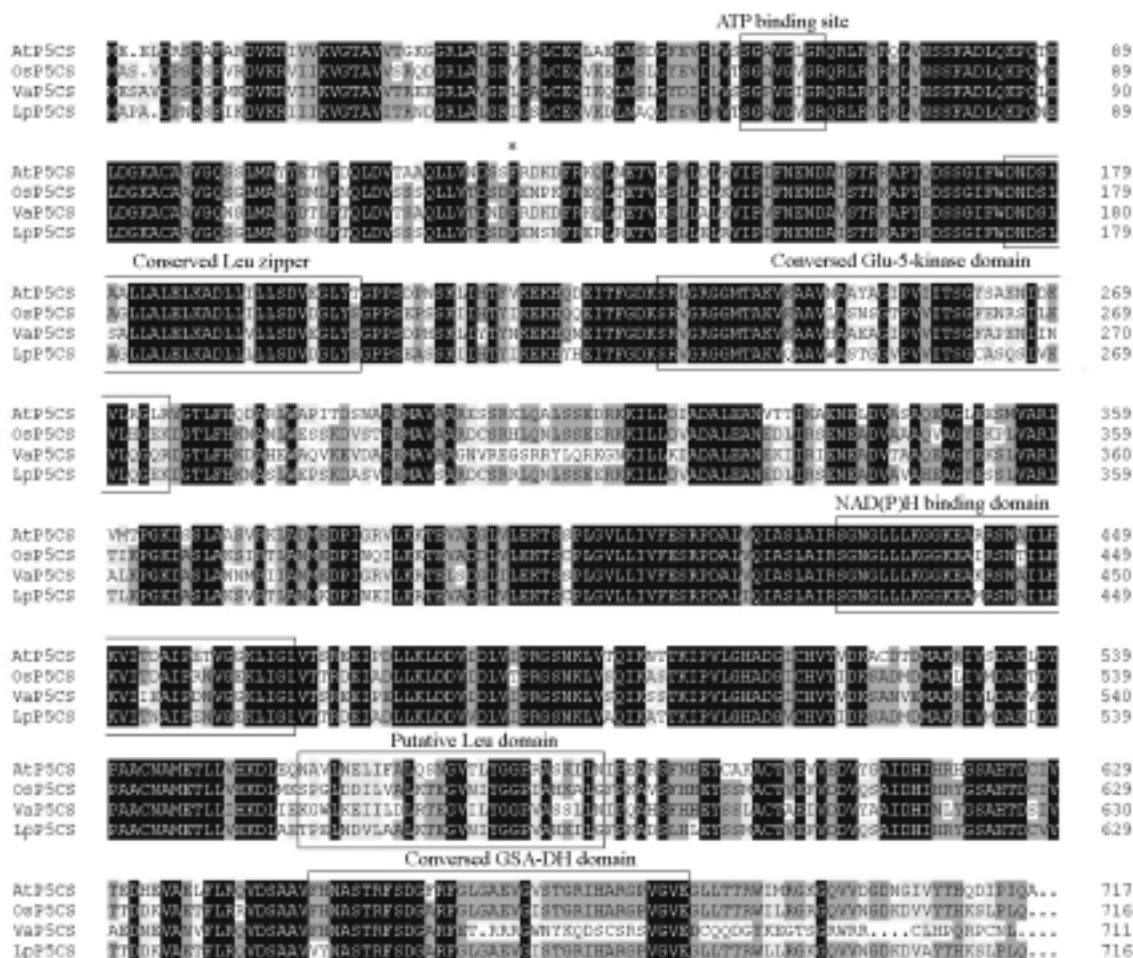


图 2 *LpP5CS* 氨基酸序列与其它植物 *P5CS* 氨基酸序列的比较分析

框内表示 5 个主要功能域的序列。*表示苯丙氨酸。

Fig. 2 Comparison of the deduced amino acid sequences of *LpP5CS* with other plants

Sequences under square show the conserved *P5CS* function domains. * indicate Phenylalanine.

采用 ClustalW 和 Phylip 程序分析了 *LpP5CS* 基因与其它 *P5CS* 基因的进化关系。结果 (图 3) 表明: 所选的 *P5CS* 聚成二组: 双子叶植物杨树, 葡萄, 大豆, 苜蓿等分在同一个组群 (I); *LpP5CS* 与其他单子叶植物小麦、玉米、斑茅、稻类 *P5CS* 蛋白 (*TaP5CS*, *GmP5CS*, *SaP5CS*, *OsP5CS*) 分在同一个组群 (II), 在这个组内 *TaP5CS* 和 *LpP5CS* 的距离最近, *LpP5CS2* 和 *OsP5CS* 的距离最远。

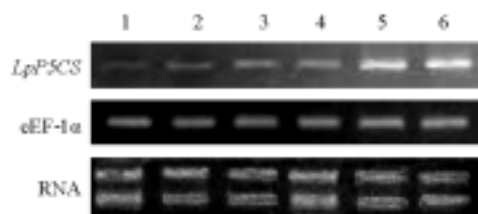
图 3 *LpP5CS* 基因与已知的 *P5CS* 基因序列聚类Fig. 3 Phylogenetic tree for *P5CS* from *Lolium perenne* and those from different species

2.3 盐胁迫下 *LpP5CS* 同源基因在多年生黑麦草各组织中的表达

分别提取根、茎、叶的 RNA 进行半定量 RT-PCR，分析 *LpP5CS* 在不同器官和不同盐处理下的表达模式。结果表明，*LpP5CS* 基因在多年生黑麦草各组织中均表达，未经盐处理的各组织 *LpP5CS* 基因表达量均较弱，盐处理后，组织中表达量急剧升高（图 4）。用凝胶成像软件量取 DNA 条带密度值，对根、茎和叶片表达量进行相对定量，结果表明，盐处理后，多年生黑麦草叶片和茎中 *P5CS* 基因表达量最高，差异不大，根中最低。本试验中克隆到的多年生黑麦草 *P5CS* 基因与水稻和小麦的 *P5CS* 基因表达特性相同。

用叶片分离的 mRNA 反转录成 cDNA 作为模板，对 *LpP5CS* 不同盐处理时间的表达情况进行了分析。图 5 结果显示，200 mmol·L⁻¹NaCl 处理下，*LpP5CS* 基因表达量随处理时间延长，有先升高后降低的趋势。盐处理后基因表达量逐渐增高，处理后 9 h 基因表达量最高，12 h 到 24 h 略降低。

以上结果表明，*LpP5CS* 基因受盐诱导而表达。

图 4 *LpP5CS* 在多年生黑麦草不同组织中的表达

1~3：未经 NaCl 处理的根、茎、叶；4~6：200 mmol·L⁻¹NaCl 处理的根、茎、叶。

Fig. 4 *LpP5CS* expression in various tissues

1-3: Root, stem and leaf without NaCl treatment; 4-6: Root, stem and leaf at 200 mmol·L⁻¹ NaCl.

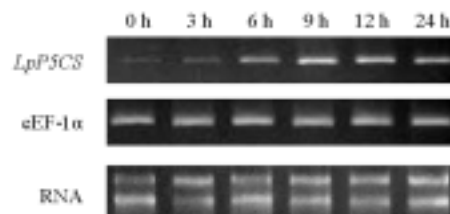
图 5 200 mmol·L⁻¹NaCl 处理后不同时间 *LpP5CS* 在叶片中的表达

Fig. 5 *LpP5CS* expression in leaves at different time after 200 mmol·L⁻¹ NaCl treatment

2.4 *LpP5CS* 蛋白亚细胞定位

为了探索 *LpP5CS* 蛋白在植物亚细胞结构中的分布情况，构建了 *LpP5CS* 基因的瞬时表达载体 pSAT-*LpP5CS*-GFP。将 *LpP5CS*-GFP 融合基因转化到洋葱表皮细胞，借助于绿色荧光蛋白信号确定目标蛋白在细胞内的分布。基因枪轰击洋葱表皮细胞 24 h 后，通过共聚焦激光扫描显微镜观察绿色荧光蛋白的信号。结果显示，转 pSAT-GFP 载体的洋葱细胞内绿色荧光分布在整个细胞膜、细胞核和细胞质中（图 6，B），转 pSAT-*LpP5CS*-GFP（图 6，C）载体的洋葱细胞内绿色荧光都分布在细胞膜和细胞核中，说明 *LpP5CS* 蛋白可能分布在细胞膜和细胞核上。

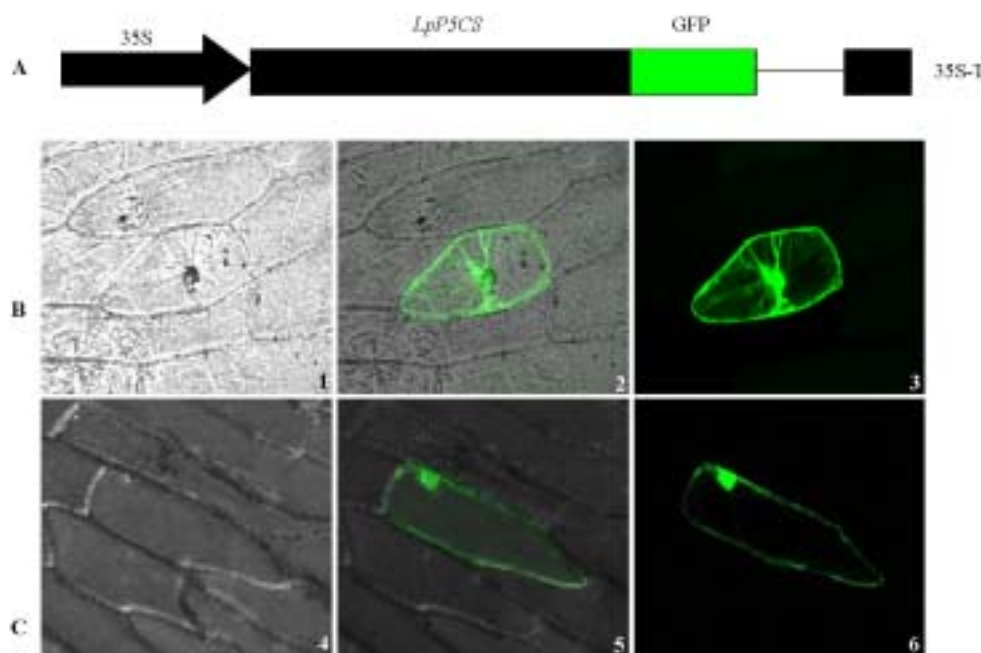


图 6 pSAT-*LpP5CS*-GFP 载体基本结构 (A)、GFP (B)、*LpP5CS* (C) 基因在洋葱内表皮细胞中的瞬时表达

1、4：洋葱内表皮细胞外观图；2：1 与 3 的重叠；3、6：共聚焦显微镜下

GFP 蛋白，*LpP5CS*-GFP 融合蛋白的绿色荧光信号。

Fig. 6 The construction of pSAT-*LpP5CS*-GFP (A), transient expression of GFP (B), *LpP5CS* (C) gene in onion cells

1, 4: Out-look of onion epidermal cells; 2: Overlaid of 1 and 3; 5: Overlaid of 4 and 6; 3, 6: Images of green fluorescence of GFP, *LpP5CS*-GFP protein in onion cells under the confocal microscope.

3 讨论

已有研究表明，植物中脯氨酸的合成有两条途径——谷氨酸途径和鸟氨酸途径，其中谷氨酸途径在渗透胁迫和氮素缺乏的情况下发挥了重要作用 (Delauney & Verma, 1993)。在植物中，谷氨酸经由 *P5C* 合成脯氨酸是由两个酶催化的，即 *P5CS* 和 *P5CR*。对基因在胁迫下表达的分析显示，脯氨酸含量的上升和下降与 *P5CS* 基因的 mRNA 水平的消长成比例。而 *P5CR* 受胁迫的影响不大。无论是干旱、盐胁迫或是 ABA，都不能明显提高 *P5CR* 的表达水平 (Yoshida et al., 1995)。

本试验中通过 RT-PCR 结合 RACE 技术从多年生黑麦草中克隆到 *P5CS* 基因，氨基酸序列比对显示，该基因推导的氨基酸序列与已知的其它植物该基因的氨基酸序列同源性都在 60% 以上，说明该基因在物种进化上具有高度的保守性。*LpP5CS* 包含有高等植物 *P5CS* 蛋白质的保守结构域，包括共同的 ATP 和 NADPH 结合位点，两个亮氨酸结构域，谷氨酰激酶 (GK) 结构域和谷氨酸半醛 (GSA) 结构域，且与水稻 *P5CS* 蛋白结构类似 (比较结果未列出)，都不具有跨膜结构及信号肽，进一步说明该基因在物种进化过程的保守性很高。

半定量 RT-PCR 结果表明，与报道的水稻 (Hur et al., 2004)、仙人掌 (Silva-Ortega et al., 2008) *P5CS* 基因表达特性相同，多年生黑麦草 *P5CS* 基因受盐诱导而表达，进一步证明多年生黑麦草体内存在着渗透胁迫后脯氨酸积累的适应机制 (Kemble & MacPherson, 1954)，这为进一步研究多年生黑麦草体内脯氨酸的生理功能及通过生物技术提高多年生黑麦草的抗逆性提供了线索。本文所获得的基因是否会被其他逆境胁迫诱导表达以及与脯氨酸积累的量化关系，值得进一步研究。

洋葱鳞茎表皮细胞的瞬时表达显示, LpP5CS 定位于细胞膜和细胞核, 与普通菜豆 P5CS 蛋白亚细胞定位结果一致 (Chen et al., 2008), 进一步说明脯氨酸合成的第一步反应可能发生在细胞膜和细胞核上。然而逆境胁迫下多年生黑麦草脯氨酸的合成是否如此, 值得进一步探讨。

References

- Armengaud P, Thierry L, Buhot N, March G G, Savoure A. 2004. Transcriptional regulation of proline biosynthesis in *Medicago truncatula* reveals developmental and environmental specific features. *Physiol Plant*, 120 : 442 – 450.
- Chen Ji-bao, Wang Shu-min, Jing Rui-lian, Mao Xin-guo. 2008. Cloning the *PvP5CS* gene from common bean (*Phaseolus vulgaris*) and its expression patterns under abiotic stresses. *J Plant Physiol*, 176 : 1 – 8.
- Claussen. 2005. Proline as a measure of stress in tomato plants. *Plant Science*, 168 : 241 – 248.
- Delauney A J, Verma D P S. 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The Plant Journal*, 4 (2) : 215 – 223.
- Fujita T, Maggio A, Garcia-Rios M, Bressan R A, Csonka L N. 1998. Comparative analysis of the regulation of expression and structures of two evolutionarily divergent genes for Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase from tomato. *Plant Physiol*, 118 : 661 – 674.
- Hu C A A, Delauney A J, Verma D P S. 1992. A bifunctional enzyme (Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89 : 9354 – 9358.
- Hur J, Jung K H, Lee C H, An G. 2004. Stress-inducible *OsP5CS2* gene is essential for salt and cold tolerance in rice. *Plant Sci*, 167 : 417 – 426.
- Hong Z, Lakkineni K, Zhang Z, Verma D P S. 2000. Removal of feedback inhibition of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiol*, 122 : 1129 – 1136.
- James E D, Ruth C M. 2009. Evaluation of reference genes for quantitative RT-PCR in *Lolium temulentum* under abiotic stress. *Plant Science*, 176 : 390 – 396.
- Jauhar P P. 1993. Cytogenetics of the Festuca-Lolium complex relevance to breeding. *Monogr Theor Appl Genet*, 18 – 23.
- Kavi Kishor P B, Sangam S, Amrutha R N, Laxmi P S, Naidu K R, Rao K R S S, Rao S, Reddy K J, Theriappan P, Sreenivasulu N. 2005. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Curr Sci*, 88 : 424 – 438.
- Kemble A R, MacPherson H T. 1954. Liberation of amino acids in perennial ryegrass during wilting. *Biochem J*, 58 : 46 – 59.
- Ma xinrong, Sun Zhenyuan, Jiang Changshun, Dong Zhaoyong, Zhang Yizheng. 2006. Transfer DREB into *Lolium perenne* L. to improve its drought tolerance. *High Technology Letters*, 41 : 427 – 432.
- Savoure A, Jaoua S, Hua X J, Ardiles W, Vanmontagu M, Verbruggen N. 1995. Isolation, characterization, and chromosomal location of a gene encoding the delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett*, 372 : 13 – 19.
- Silva-Ortega C O, Ochoa-Alfaro A E, Reyes-Aguero J A, Aguado-Santacruz G A, Jimenez-Bremont J F. 2008. Salt stress increases the expression of *P5CS* gene and induces proline accumulation in cactus pear. *Plant Physiol Biochem*, 46 : 82 – 92.
- 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*. *Plant J*, 12 : 557 – 569.
- Su J, Wu R. 2004. Stress-inducible synthesis of proline in transgenic rice confers faster growth under stress conditions than that with constitutive synthesis. *Plant Science*, 166 : 941 – 948.
- Szekely G, Abraham E, Csalo A, Rigo G, Zsigmond L, Csiszar J, Ayaydin F, Strizhov N, Jasik J, Schmelzer E, Koncz C, Szabados L. 2008. Duplicated *P5CS* genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. *Plant J*, 53 : 11 – 28.
- Xu J, Schubert J, Altpeter F. 2001. Dissection of RNA mediated virus resistance in fertile transgenic perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Plant J*, 26 : 265 – 274.
- Yoshida Y, Kiyosue T, Katagiri T, Ueda H, Mizoguchi T, Yamaguchi-Shinozaki K, Wada K, Harada Y, Shinozaki K. 1995. 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. *Plant J*, 7 : 751 – 760.