

# 蒺藜苜蓿 *MtLEA5B* 的克隆和功能分析

张业猛<sup>1, 2</sup> 沈迎芳<sup>2</sup> 王英芳<sup>1, 2</sup> 姚品雅<sup>1, 2</sup> 王海庆<sup>1</sup>

(1. 中国科学院大学西北高原生物研究所 高原适应与进化重点实验室, 西宁 810002; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要:** 胚胎发育晚期丰富蛋白 (Late embryogenesis abundant protein, LEA protein) 是一类参与植物抗逆性应答的亲水蛋白。旨在揭示异源表达 LEA 蛋白在非生物胁迫条件下对宿主的保护作用。从蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*) 幼苗中克隆到一个编码 LEA<sub>5</sub> 蛋白的基因, 命名为 *MtLEA5B*, 通过半定量 RT-PCR 分析 *MtLEA5B* 的表达模式。利用 SDS-PAGE 蛋白电泳检测重组蛋白的耐热性和可溶性。构建原核表达载体, 转化大肠杆菌过表达, 检测大肠杆菌的生长存活情况。*MtLEA5B* 的表达模式受到低温 (4℃)、脱水、150 mmol/L NaCl 胁迫和 ABA 处理的调控。SDS-PAGE 蛋白电泳出现一条相比理论预测值较大, 且沸水条件下可溶性未降低的条带。在大肠杆菌中过表达 *MtLEA5B* 蛋白能明显提升宿主菌在高温 (55℃) 和冷冻 (-20℃) 条件下的生存率。*MtLEA5B* 是诱导性表达基因; *MtLEA5B* 蛋白具有较高的亲水性和耐热性。在大肠杆菌中过表达可以明显提升其对温度胁迫的耐受性。

**关键词:** 蒺藜苜蓿; 胚胎发育晚期丰富蛋白; *MtLEA*

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2018-0095

## Cloning and Functional Analysis of the *MtLEA5B* Gene from *Medicago truncatula*

ZHANG Ye-meng<sup>1, 2</sup> SHEN Ying-fang<sup>2</sup> WANG Ying-fang<sup>1, 2</sup> YAO Pin-ya<sup>1, 2</sup> WANG Hai-qing<sup>1</sup>

(1. Northwest Institute of Plateau Biology, Academy of Sciences/Key laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota, xining 810008; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

**Abstract:** Late embryogenesis abundant protein (LEA protein) is hydrophilic one that is involved in the responses to stress in plants. This work is aimed to unravel the protective effect of heterologous expressed LEA protein on host under abiotic stress. A novel gene encoding LEA<sub>5</sub> protein was cloned from *Medicago truncatula* seedlings, and designated as *MtLEA5B*, and its expression patterns were analyzed by semi-quantitative RT-PCR. Then the heat resistance and solubility of recombinant protein were detected by SDS-PAGE protein electrophoresis. Further, the prokaryotic expression vector was constructed and transferred to *Escherichia coli* so as to induce *MtLEA5B* over expression in *E. coli*. The expression patterns of *MtLEA5B* gene was regulated by dehydration, low temperature, high salt stress, and ABA induction. There was a band by SDS-PAGE protein electrophoresis, which was larger than the theoretical prediction value and did not decrease in solubility under boiling water condition. The overexpression of *MtLEA5B* protein in *E. coli* obviously increased the survival rate of hosts at heat (55℃) and freeze (-20℃). Moreover, *MtLEA5B* was an inducible expressed gene, *MtLEA5B* protein had high hydrophilicity and heat resistance, overexpression in *E. coli* may significantly enhance its tolerance to temperature stress.

**Key words:** *Medicago truncatula*; late embryogenesis abundant protein; *MtLEA*

胚胎发育晚期丰富蛋白在种子发育后期阶段不断积累而得名<sup>[1]</sup>。LEA 蛋白分布极为广泛, 植物的其他组织和器官经非生物胁迫和 ABA 能诱导 LEA

蛋白的合成<sup>[2, 3]</sup>, 此外在蛭形轮虫、细菌、昆虫、线虫中都有发现 LEA 蛋白的存在<sup>[4-6]</sup>。LEA 蛋白不仅能提升生命体对逆境胁迫的耐受性<sup>[7-9]</sup>, 而且

收稿日期: 2018-01-26

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31770365), 青海省应用基础研究项目 (2017-ZJ-784), 中科院科技服务网络计划 (KFJ-SW-STS-177)

作者简介: 张业猛, 男, 硕士研究生, 研究方向: 高原生物适应进化; E-mail: 854545286@qq.com

通讯作者: 王海庆, 男, 博士, 研究方向: 牧草抗逆改良; E-mail: wanghq@nwipb.cas.cn

LEA 蛋白的异源表达也能提升转化子对逆境胁迫的耐受性。Wang 等<sup>[10]</sup>将小麦 *TaLEA3* 导入羊草 (*Leymus chinensis plants*) 后, 发现转基因羊草对干旱的耐受性明显提升。所以, LEA 蛋白不仅是非生物胁迫环境因素选择的靶位点, 也是局部研究植物适应机制的目标基因之一, 克隆 *LEA* 明确其作用机制, 对于转基因技术改良植物的抗逆性具有重要意义。

LEA 蛋白根据不同的分类方法有不同的命名<sup>[11-13]</sup>, Battaglia 等<sup>[14]</sup>根据氨基酸同源性和保守基序将 LEA 蛋白分为 7 组。LEA\_1、LEA\_2、LEA\_3、LEA\_4、LEA\_6 和 LEA\_7 组都有特定的保守基序, 被视为典型 LEA 蛋白; 而 LEA\_5 组因为没有明显的保守基序或相似序列, 被认为是非典型 LEA 蛋白。不同的 LEA 蛋白家族在功能和作用机制上并不具有明显的相似性, 小麦中 Em 蛋白 (LEA\_1) 体外可以防止柠檬酸合成酶的凝聚和失活<sup>[15]</sup>; 拟南芥中 AtEm6 (LEA\_1) 蛋白不仅是种子发育所必需, 也能响应高盐胁迫<sup>[16-17]</sup>。LEA\_2 蛋白内在的无序结构, 主要作为分子伴侣来发挥冷冻保护<sup>[18]</sup>。LEA\_3 可以响应多种胁迫, 例如, 水稻中 OSLEA3 (LEA\_3) 可以响应 ABA 诱导和高盐胁迫<sup>[19]</sup>, 玉米中的 ZmLEA3 (LEA\_3) 可以响应于高盐、低温、ABA 诱导等多种途径<sup>[20-21]</sup>。LEA\_5B 家族的 SAG21 可以提升拟南芥对细菌病原体的耐受性和抗氧化能力, LEA\_5A 家族的 Rab8 可以提升玉米对干旱的耐受性<sup>[22]</sup>。

目前, LEA\_5 蛋白作为一类非同源蛋白, 其功能机制尚且十分模糊。本研究从蒺藜苜蓿 A17 幼苗中克隆到一个编码胚胎发育晚期丰富蛋白的基因 *MtLEA5B*。并通过生物信息学方法对其进行分析, 运用 RT-PCR 和原核表达对其表达模式和对宿主菌在温度胁迫条件下的保护进行验证, 为转基因技术改良植物的抗逆性提供参考奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

将蒺藜苜蓿 A17 种子用浓硫酸处理 5-10 min, 用双蒸水洗涤多次除去残余硫酸。处理后的种子置于含有 1/2 MS 固体培养基中, 4℃春化 2 d 移至 21℃、16 h/8 h 光照条件下萌发。3 d 后将已发芽的

幼苗移栽到蛭石: 营养土 (3:1) 的混合基质中, 在 21℃、16 h/8 h 光照条件下生长, 每 7 d 用复合肥溶液浇灌 1 次。所用引物的合成由上海生物生工合成 (上海)。

表 1 试验所用引物

引物	序列 (5'-3')	酶切位点
MtLEA5B-BF	TGGGGATCCATGGCTCGCAAC	BamH I
MtLEA5B-SR	TGGCAGCTCTTACTGCTCTGTG	
MtActin-F	TGCTTCTAACTGAGGCTCCACT	Sac I
MtActin-R	AAAGGACTTCTGGGCAACG	

注: 下划线处是酶切位点

### 1.2 方法

1.2.1 胁迫处理 将生长 3 周的幼苗进行非生物胁迫和 ABA 处理。NaCl 胁迫处理: 用 150 mmol/L NaCl 水溶液浇灌培养基质, 分别于 0 和 8 h 及 1 和 3 d 取样; ABA 胁迫处理: 将整株幼苗取出洗净砂石后, 转移至铺有多层吸水纸的培养皿中, 用 0.05% Tween 20 (V/V) 的 100 μmol/L 脱落酸溶液喷洒, 封盖防止植物脱水, 分别于 0、1、3 和 6 h 取样; 脱水胁迫处理: 将幼苗取出洗净砂石, 温室自然脱水, 分别于 0、4、8 和 12 h 取样; 低温胁迫处理: 将幼苗转移至 4℃、16 h/8 h 光照培养箱中进行培养, 分别于 0 和 8 h 及 1 和 3 d, 取样。取样后迅速液氮冷冻, -80℃冰箱保存, 每组处理设 3 次生物学重复。

1.2.2 *MtLEA5B* 的克隆和序列分析 胁迫处理样本总 RNA 提取使用 TRIzol® 试剂 (Invitrogen, USA), 参照说明书使用 Recombinant DNase I (RNase-free, TaKaRa, 大连) 去除基因组 DNA。cDNA 第一条链按 PrimeScript® RT reagent Kit (Perfect Real Time, TaKaRa, 大连) 的操作说明合成。以蒺藜苜蓿转录组 cDNA 为模板, MtLEA5BF/R 为引物, 用 Pyrobest™ DNA 聚合酶 (TaKaRa, 大连) 进行 30 次 PCR 扩增。使用 PCR 纯化试剂盒 (上海生工生物, 上海) 纯化回收。

采用 DNAMAN 软件分析核酸序列; 用 ExPASy 网站 (<http://web.expasy.org/translate/>) 分析开放阅读框 OPF; 用 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行核苷酸和蛋白质相似性检索; 用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 和 Pfam (<http://pfam.org/>)

xfam.org/) 进行蛋白质序列分析<sup>[23]</sup>。

**1.2.3 *MtLEA5B* 原核表达载体构建** 将上述 PCR 纯化产物经 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切连接到 pET30a 载体中。重组质粒转化至大肠杆菌菌株 (DH5 $\alpha$ ), 筛选阳性克隆提取质粒, 进行酶切鉴定, 获得原核表达载体 pET30a-*MtLEA5B*。

**1.2.4 *MtLEA5B* 蛋白的异源表达和热稳定性分析** 将质粒 pET30a 和 pET30a-*MtLEA5B* 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株内。在含有 50 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基中筛选阳性克隆, 接种于 10 mL 含有 50 mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 180 r/min 震荡培养。12 h 后, 按照 1:100 (V:V) 转接到 5 mL LB 培养基中培养 OD<sub>600</sub>=0.6–0.8。菌液中加入异丙基硫代半乳糖苷 (Isopropyl-D-thiogalactopyranoside, IPTG) 至最终浓度 1.0 mmol/L。诱导 3 h, 取 1 mL pET30a 和 pET30a-*MtLEA5B* 菌液作为第一组, 另取 1 mL pET30a 和 pET30a-*MtLEA5B* 菌液作为第二组。

将 2 组诱导样品 8 000 r/min 离心 2 min, 弃上清, 用 80 mL 的灭菌双蒸水重悬, 第一组直接 100 $^{\circ}$ C 金属浴 10 min; 第二组加入 20  $\mu$ L 5 $\times$  SDS, 100 $^{\circ}$ C 金属浴 10 min。15 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 第一组加入 20  $\mu$ L 5 $\times$  SDS。各取 6  $\mu$ L 进行 SDS-PAGE 进行电泳。

**1.2.5 异源表达大肠杆菌转化子抗逆性试验**

**1.2.5.1 定性试验** 将含有 pET30a-*MtLEA5B* 和 pET30a 载体的大肠杆菌进行液体培养和诱导, 培养和诱导条件如 1.2.4 所述。培养诱导后的菌液 OD<sub>600</sub>=0.9, 用含有 50 mg/L 卡那霉素和 1.0 mmol/L IPTG 的 LB 液体培养基将诱导菌液分别稀释 10、100 和 1 000 倍, 取原诱导菌液和稀释菌液进行胁迫处理试验。温度胁迫试验中分别用 60 $^{\circ}$ C 金属浴温育 30 min 和 -20 $^{\circ}$ C 冰箱冷冻 24 h。将上述胁迫菌液和对照组菌液取 10  $\mu$ L 滴加到含有 1.0 mmol/L IPTG 和 50 mg/L 卡那霉素的固体 LB 培养基中。37 $^{\circ}$ C 倒置培养 24 h 后进行观察。

**1.2.5.2 定量分析** 大肠杆菌转化子的培养、IPTG 诱导、胁迫条件以及 LB 固体培养基与 1.2.5.1 相同, 当 IPTG 诱导菌液培养 OD<sub>600</sub>=0.9, 用含有 50 mg/L 卡那霉素和 1.0 mmol/L IPTG 的 LB 液体培养基稀释 10

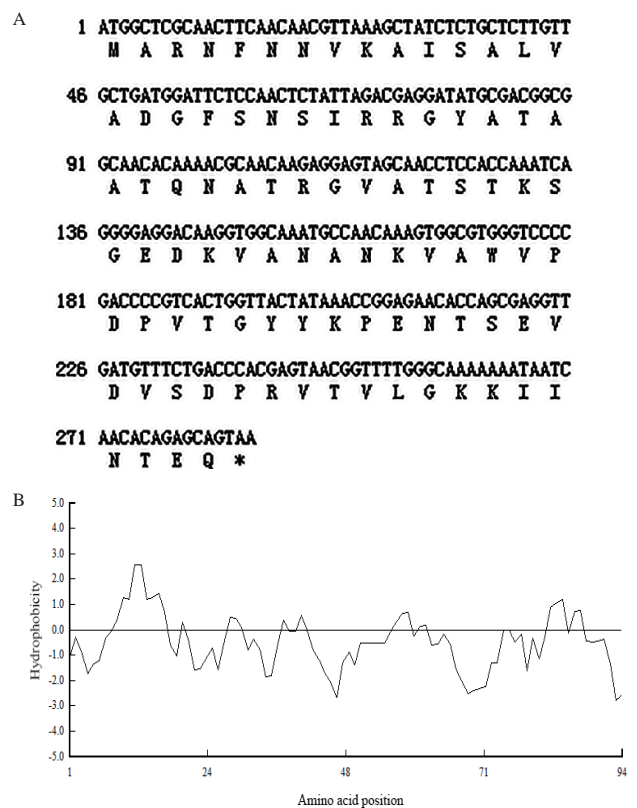
倍, 取 100  $\mu$ L 均匀涂于固体 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 倒置培养 24 h 进行菌落计数, 公式如下:

$$\text{菌落形成率} = \frac{\text{胁迫处理平板菌落数}}{\text{非胁迫处理平板菌落数}}$$

## 2 结果

### 2.1 *MtLEA5B* 的克隆和序列分析

以蒺藜苜蓿幼苗样品 cDNA 为模板进行扩增, 获得 *MtLEA5B* 的 cDNA 序列, 长度为 285 bp; 编码 94 个氨基酸 (图 1-A), 预测分子量为 10.05 kD, 理论等电点 (pI) 为 9.40 (<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>)。基因序列在 JCVI 数据库 (<http://www.jcvi.org/>) 中显示 *MtLEA5B* 是位于第 1 染色体编码胚胎发育晚期丰富蛋白的基因; *MtLEA5B* 蛋白富含丙氨酸 (12.72%) 和缬氨酸 (11.70%), 而半胱氨酸和组氨酸含量为 0; DNAMAN 软件显示平均亲水系数为 -0.472 (图 1-B)。



A: 蒺藜苜蓿 *LEA5B* 编码区序列和氨基酸序列; B: *MtLEA5B* 蛋白质的疏水性预测

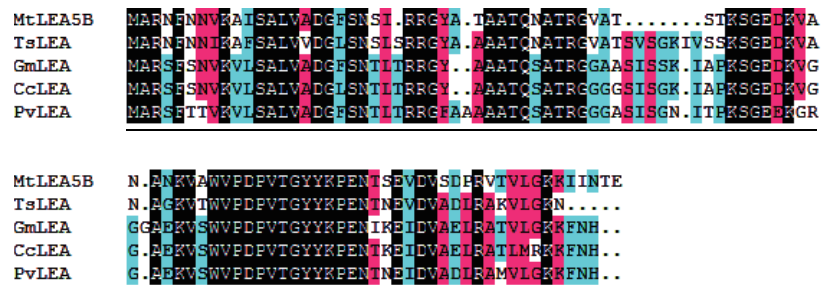
图 1 蒺藜苜蓿 *MtLEA5B* 的序列分析

通过进行 BlastP 分析, MtLEA5B 蛋白包含 Pfam LEA\_3 结构域, 并且与地三叶 (*Trifolium subterraneum*)、大豆 (*Glycine max*)、木豆 (*Cajanus cajan*) 和菜豆 (*Phaseolus vulgaris*) 豆科植物的 LEA

蛋白具有较高的相似性 (图 2)。

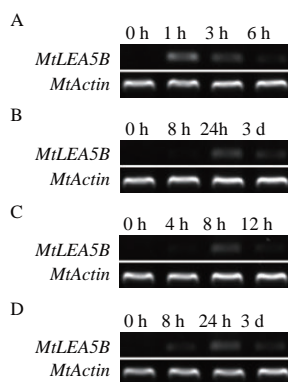
## 2.2 MtLEA5B 在非生物胁迫条件下表达特性分析

通过对不同胁迫下 MtLEA5B 的半定量 RT-PCR 分析 (图 3), 发现 MtLEA5B 表达量上调, 在蒺藜苜



TsLEA : *Trifolium subterraneum* (GAU43746.1); GmLEA : *Glycine max* (NP\_001237596.1); CcLEA : *Cajanus cajan* (XP\_020204737.1); PvLEA : *Phaseolus vulgaris* (XP\_007145200.1)

图 2 蒺藜苜蓿 MtLEA5B 与其他植物 LEA 蛋白氨基酸序列比对分析



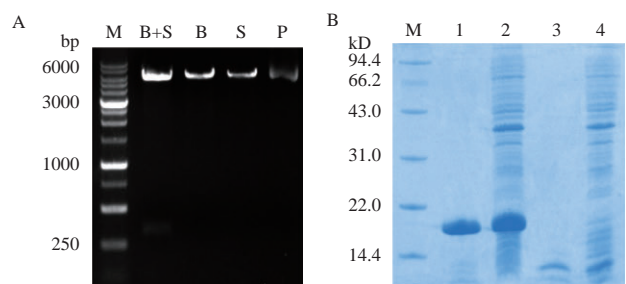
A : 100 μmol/L ABA ; B : 150 mmol/L NaCl ; C : 温室脱水 ; D : 4℃低温

图 3 ABA 诱导和非生物胁迫条件下 MtLEA5B 的 RT-PCR 分析

苜蓿幼苗中为诱导型表达。

## 2.3 pET30a-MtLEA5B 载体的构建和 MtLEA5B 蛋白表达特性的分析

重组质粒 pET30a-MtLEA5B 经酶切鉴定 (图 4-A), 转化至大肠杆菌表达菌株 BL21 (DE3), 进行 SDS-PAGE 电泳检测。结果 (图 4-B) 显示, MtLEA5B 蛋白原核表达理论值是 10.05 kD, 但是发现表达重组蛋白相比于蛋白理论分子量略大, 并且诱导菌液直接在无菌水中煮沸, 大部分蛋白都已变性, 但目的蛋白含量未发生太大变化, 表明 MtLEA5B 蛋白的高度偏向性导致其具有较高的抗



M : 1.0 kb-plus DNA Marker 和低分子量蛋白质 Marker ; B+S : BamH I + Sac I 双酶切 ; B : BamH I 单酶切 ; S : Sac I 单酶切 ; P : pET30a-LEA5B 质粒 ; 1 : 含 pET30a-LEA5B 载体的 BL21 经 IPTG 诱导后沉淀中的总蛋白 ; 2 : 含 pET30a-LEA5B 载体的 BL21 经 IPTG 诱导后上清液中的总蛋白 ; 3 : 含 pET30a 载体的 BL21 经 IPTG 诱导后沉淀中的总蛋白 ; 4 : 含 pET30a 载体的 BL21 经 IPTG 诱导后上清液中的总蛋白

图 4 pET30a-LEA5B 表达载体酶切鉴定 (A) 和 SDS-PAGE 电泳检测 (B)

性, 在 SDS 变性溶剂和高温煮沸条件下仍然存在部分结构。

## 2.4 MtLEA5B 异源过表达对大肠杆菌的胁迫保护

为鉴定大肠杆菌中过表达 MtLEA5B 是否对宿主菌具有保护作用。将含有 pET30a-MtLEA5B 和 pET30a 载体的大肠杆菌 BL21 (DE3) 分别培养至 OD<sub>600</sub>=0.9, 经 60℃ 高温和 -20℃ 冷冻胁迫处理, 发现含有 pET30a-MtLEA5B 载体的大肠杆菌生存状态明显增多 (图 5-A)。

菌落计数结果（图 5-B）显示，在 60℃ 高温胁迫处理后，含有 BLpET30a 载体的菌株菌落形成率仅有 4.29%，含有 pET30a-MtLEA5B 载体的菌株菌落形成率为 13.88%；在 -20℃ 冷冻胁迫处理后，含有 pET30a 载体的菌株菌落形成率仅有 9.39%，含有 pET30a-MtLEA5B 载体的菌株菌落形成率为 18.16%。

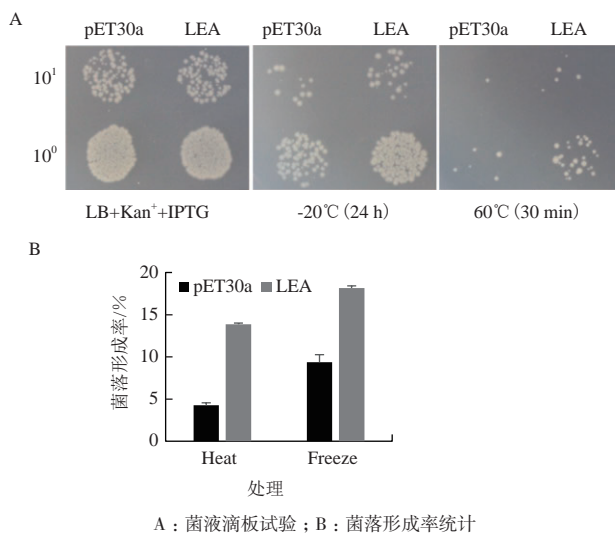


图 5 *LEA5B* 蛋白过表达对大肠杆菌温度胁迫的保护

### 3 讨论

*LEA* 蛋白与植物逆境胁迫耐受性密切相关，可以维持植物在极端环境条件下的正常生命代谢活动<sup>[24-27]</sup>。本研究在蒺藜苜蓿幼苗中克隆到定位于第 1 染色体上的 *MtLEA5B*，编码 *LEA\_5B* 类蛋白，经疏水氨基酸残基预测 *MtLEA5B* 蛋白具有较高的亲水性。*MtLEA5B* 蛋白的氨基酸序列与地三叶、大豆、木豆等豆科植物具有高度一致性，表明 *LEA\_5B* 蛋白具有种属特异性。其表达模式响应于高盐、脱水、温度胁迫和 ABA 处理，但 *MtLEA5B* 在不同胁迫条件下响应不尽相同，表明 *MtLEA5B* 参与蒺藜苜蓿对非生物胁迫抗性反应过程是复杂的，可能通过多种信号通路交叉进行。

虽然有实验结果对特定 *LEA* 蛋白功能和机制进行阐述，但 *LEA\_5* 蛋白是一类疏水残基高于典型 *LEA* 蛋白的非同源蛋白，这些结果并不具有普适性。Baker 和 Galau 等<sup>[28-29]</sup> 发现 *LEA\_5* 蛋白沸水孵

化可能形成一种不溶的球形构象。本研究中，经沸水孵化后，大部分大肠杆菌细胞的内生蛋白质消失在上层清液与总蛋白提取的 SDS 样品缓冲中，但是 *MtLEA5B* 重组蛋白数量上并没有造成明显减少，推测原因是 *MtLEA5B* 重组蛋白中富含的极性丙氨酸残基使具有较高热稳定性和亲水性，以及较短的氨基酸序列赋予它灵活的结构。此外，重组 *MtLEA5B* 蛋白的表观分子质量明显高于估计的分子质量，其原因可能是 *LEA* 蛋白分子的高亲水性或无序结构导致其在沸水和 SDS 中仍存在部分结构。

众多研究表明，异源表达 *LEA* 蛋白能够提升植物和细菌对非生物胁迫的耐受性<sup>[30-34]</sup>。Rodriguez-Salazar 等<sup>[35]</sup> 研究发现 *LEA1* 蛋白响应于囊肿干燥且能提升维氏固氮菌高温耐受性。Wu 等<sup>[36]</sup> 发现过表达 *SmLEA* 可以增强大肠杆菌和丹参对干旱和高盐胁迫的耐受性。本研究在大肠杆菌中过表达 *MtLEA5B* 蛋白，明显增强了大肠杆菌对温度胁迫的耐受性。但是，*MtLEA5B* 蛋白过表达在高盐和脱水条件下未发现明显的保护作用，推测 *MtLEA5B* 对不同的胁迫有不同的响应机制<sup>[37-38]</sup>。此外有研究表明，*LEA* 蛋白对植物的发育过程也具有调控作用<sup>[39-40]</sup>。因此 *MtLEA5B* 是否存在其他的调控机制尚且不明，需要进一步科研进行证实。

### 4 结论

从蒺藜苜蓿中克隆获得 *MtLEA5B*，其受外源激素 ABA 和高盐、脱水和温度胁迫的调控；其编码的蛋白质属于 *LEA\_5B* 蛋白家族，在 SDS 变性剂和高温煮沸条件下仍能保持一定的结构。*MtLEA5B* 在大肠杆菌转化子中超表达可以增强大肠杆菌对温度胁迫的耐受性。

#### 参考文献

- [1] Dure I, Greevay SC, Galau GA. Developmental biochemistry of cotton seed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by *in vitro* and *in vivo* protein synthesis [J]. *Biochemistry*, 1981, 20 (14): 4162-4168.
- [2] Gram J, Bartels D. The molecular basis of dehydration tolerance in plant [J]. *Annual Review of plant biology*, 1999, 50 (1): 571-599.

- [ 3 ] Battista JR, Park MJ, Mclemore AE. Inactivation of two homologues of proteins presumed to be involved in the desiccation tolerance of plant sensitizes *Deinococcus radiodurans* R1 to desiccation [ J ] . *Cryobiology*, 2001, 43 ( 2 ) : 133-139.
- [ 4 ] Campos FC, Cuevas-Velazquez C, et al. Group 1 LEA proteins, an ancestral plant protein group, are also present in other eukaryotes, and in the archaea and bacteria domains [ J ] . *Molecular Genetic Genomics*, 2013, 288 : 503-517.
- [ 5 ] Wise MJ, Tunnacliffe A. POPP the question : what do LEA proteins do ? [ J ] . *Trends in Plant Science*, 2004, 9 ( 1 ) : 13-17.
- [ 6 ] Browne J, Tunnacliffe A, Burnell A. Anhydrobiosis : plant desiccation gene found in a nematode [ J ] . *Nature*, 2002, 416 ( 6876 ) : 38.
- [ 7 ] Bartels D, Salamini F. Desiccation tolerance in the resurrection plant *Craterostigma Plantagineum*. A contribution to the study of drought tolerance at the molecular level [ J ] . *Plant Physiology*, 2001, 127 ( 4 ) : 1346-1353.
- [ 8 ] 李剑, 赵常玉, 张富生, 等. LEA 蛋白与植物抗逆性 [ J ] . *植物生理学通讯*, 2010, 46 ( 11 ) : 1101-1108.
- [ 9 ] zhao Y, wang Y, liu Q, et al. Cloning of a new LEA1 gene promoter from soybean and functional analysis in transgenic tobacco [ J ] . *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2017, 130 : 379-391.
- [ 10 ] Wang L, Li X, Chen S, et al. Enhanced drought tolerance in transgenic *Leymus chinensis* *TaLEA3* [ J ] . *Biotechnology Letter*, 2009, 31 ( 2 ) : 313-319.
- [ 11 ] Baker J, Van Dennsteele C, Dure L. Sequence and characterization of 6 lea proteins and their genes from cotton [ J ] . *Plant Mol Biol*, 1989, 12 ( 5 ) : 475-486.
- [ 12 ] Bray EA. Molecular responses to water deficit [ J ] . *Plant Physiology*, 1993, 103 ( 4 ) : 1035-1040.
- [ 13 ] Tunnacliffe A, Wise MJ. The continuing conundrum of the LEA proteins [ J ] . *Naturwissenschaften*, 2007, 94 : 791-812.
- [ 14 ] Battaglia M, Olvera-Carrillo Y, Garciarribo A, et al. The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins [ J ] . *Plant Physiology*, 2008, 148 : 6-24.
- [ 15 ] Goyal K, Walton LJ, Tunnacliffe A. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress [ J ] . *Biochemistry Journal*, 2005, 388 ( 1 ) : 151-157.
- [ 16 ] Manfre AJ, Lanni LM, Marcotte WR. The *Arabidopsis* group 1 late embryogenesis abundant protein AtEM6 is required for normal seed development [ J ] . *Plant Physiology*, 2006, 140 : 140-149.
- [ 17 ] Tang W, Page M. Overexpression of the *Arabidopsis* AtEm6 gene enhances salt tolerance in transgenic rice cell lines [ J ] . *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2013, 114 : 339-350.
- [ 18 ] Hand SC, Menzea MA, Tonerb M, et al. LEA proteins during water stress : not just for plants anymore [ J ] . *Annual Review of Physiology*, 73 : 115-134.
- [ 19 ] Moons A, De Keyser A, Van Montagu M. A group 3 LEA cDNA of rice, responsive to abscisic acid, but not to jasmonic acid, shows variety-specific differences in salt stress response [ J ] . *Gene*, 1997, 1119 ( 97 ) : 197-204.
- [ 20 ] Liu Y, Wang L, Cai GH, et al. Response of tobacco to the *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 is mainly dependent on salicylic acid signaling pathway [ J ] . *FEMS Microbiology Letter*, 2013, 344 ( 1 ) : 77-85
- [ 21 ] Liu Y, Wang L, Xing X, et al. ZmLEA3, a multifunctional group 3 LEA protein from maize ( *Zea mays* L. ), is involved in biotic and abiotic stresses [ J ] . *Plant Cell Physiology*, 2013, 54 ( 6 ) : 944-959.
- [ 22 ] Amara L, Capellades M, Ludevid MD. Enhance water stress tolerance of transgenic maize plants over-expressing LEA Rab28 gene [ J ] . *Plant Physiology*, 2013, 170 ( 9 ) : 864-873.
- [ 23 ] Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, et al. Clustal W and Clustal X version 2. 0 [ J ] . *Bioinformatics Applications Note*, 2001, 23 ( 21 ) : 2947-2948.
- [ 24 ] Liu ZY, Li XL, Qi X, et al. Alfalfa science research by Chinese scholars science 1950 : history and main topics [ J ] . *Acta Prataculturas Sinica*, 2015, 24 ( 10 ) : 58-69.
- [ 25 ] Battaglia M, Covarrubias AA. Late Embryogenesis Abundant ( LEA ) proteins in Legumes [ J ] . *Front Plant Sci*, 2013, 4 : 190.
- [ 26 ] Kalemba EM, Bagniewska-Zadworna A, Ratajczak E. Multiple subcellular localizations of teins in the embryonic axes of common beech ( *Fagus sylvatica* L. ) seeds during maturation and dry storage [ J ] . *Journal of Plant Growth Regulation*, 2015, 34 ( 1 ) : 137-149.
- [ 27 ] Grahman LN, Chen L, Nazim S, et al. Interactions of intrinsically disordered *Thellungiella salsuginea* dehydrins TsDHN-1 and TsDHN-2 with membranes-synergistic effects of lipid composition and temperature on secondary structure [ J ] . *Biochemistry and Cell biology*, 2010, 88 ( 5 ) : 791-807.
- [ 28 ] Baker I, Steele C, Dure L. Sequence and characterization of 6 LEA

- proteins and their genes from cotton [J]. *Plant Mol Biol*, 1988, 11 : 277-291.
- [ 29 ] Galau GA, Wang HY, Hughes, et al. Cotton *Lea5* and *Lea74* encode atypical late embryogenesis-abundant proteins [J]. *Plant Physiology*, 1993, 101 : 695-696.
- [ 30 ] Liu R, Liu M, Liu J, et al. Heterologous expression of a *Ammopiptanthus mongolicus* late embryogenesis abundant protein gene (*Am-LEA*) enhance *Escherichia coli* viability under cold and heat stress [J]. *Plant Growth Regulation*, 2010, 60 ( 2 ) : 163-168.
- [ 31 ] Wang WG, Li R, Liu B, et al. Alternatively spliced transcripts of group 3 late embryogenesis abundant protein from *Pogonatherum paniceum* confer different abiotic stress tolerance in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2012, 169 ( 15 ) : 1559-1564.
- [ 32 ] Ochoa-Alfaro AE, Rodríguez-Kessler M, Pérez-Morales MB, et al. Functional characterization of an acidic SK3 dehydrin isolated from an *Opuntia streptacantha* cDNA library [J]. *Planta*, 2012, 235( 3 ) : 565-578.
- [ 33 ] Lakshmi TV, Varalaxmi Y, et al. Metabolic engineering of SK2-type of dehydrin I (*DHNI*) gene isolated from *Sorghum bicolor* enhances tolerance to water-deficit and NaCl stresses in transgenic tobacco [J]. *Plant Omics*, 2015, 8 ( 6 ) : 556.
- [ 34 ] Shi J, Liu M, Chen Y, et al. Heterologous expression of the dehydrin-like protein gene *AmCIP* from *Ammopiptanthus mongolicus* enhance viability of *Escherichia coli* and tobacco under cold stress [J]. *Plant Growth Regulation*, 2015, 79 ( 1 ) : 1-10.
- [ 35 ] Rodriguez-Salazar J, Moreno S, Espín g. LEA proteins are involved in cyst desiccation resistance and other abiotic stresses in *Azotobacter vinelandii* [J]. *Cell Stress and Chaperones*, 2017, 22 : 397-408.
- [ 36 ] Wu Y, Liu C, Kuang J, et al. Overexpression of *SmLEA* enhance salt and drought tolerance in *Escherichia coli* and *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Protoplasma*, 2011 : 1-9.
- [ 37 ] Zhang L, Oht A, Takagi M, et al. Expression of plant group 2 and group 3 lea gene in *Saccharomyces cerevisiae* revealed functional divergence among LEA proteins [J]. *Journal of Biochemistry*, 2000, 127 ( 4 ) : 611-616.
- [ 38 ] Lan T, Cai D, Zhang YZ. Expression of three different group soybean lea genes enhance stress tolerance in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2005, 42 ( 5 ) : 613-621.
- [ 39 ] Park SC, Im YH, Jeong JC, et al. Sweetpotato late embryogenesis abundant 14 (*IbLEA14*) gene influences lignification and increases osmotic-and salt stress-tolerance of transgenic calli [J]. *Planta*, 2011, 233 ( 3 ) : 621-634.
- [ 40 ] Salleh FM, Evans K, Goodall B, et al. A novel function for a redox-related LEA protein (*SAG21/AtLEA5*) in root development and biotic stress responses [J]. *Plant, Cell & Environment*, 2012, 35 ( 2 ) : 418-429.

(责任编辑 李楠)