



## 扁蓿豆 *MrLEA2* 基因的克隆和原核表达

马超<sup>1,2</sup>, 沈迎芳<sup>1,2</sup>, 吴小培<sup>1,2</sup>, 王海庆<sup>1\*</sup>

(1 中国科学院西北高原生物研究所高原适应与进化重点实验室, 西宁 810008; 2 中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要:** 从扁蓿豆 (*Medicago ruthenica* L.) 幼苗中克隆到一个编码晚期胚胎发生丰富蛋白的基因 *MrLEA2*, Pfam 数据库检索表明其编码产物属于 LEA<sub>2</sub> 蛋白家族。半定量 RT-PCR 分析发现 *MrLEA2* 在幼苗中表达水平不受非生物胁迫 (脱水、高盐和低温) 和脱落酸诱导。利用 *MrLEA2* 基因构建原核表达载体, 在大肠杆菌中实现了过量表达。通过斑点试验和菌落计数实验, 对过量表达 *MrLEA2* 蛋白的大肠杆菌细胞在高盐 (0.5 mol/L NaCl 和 0.5 mol/L KCl), 55 °C 高温和 -20 °C 冷冻胁迫处理下的生长存活情况检测发现, *MrLEA2* 蛋白过量表达能够明显提高大肠杆菌对上述胁迫的耐受性。研究表明, *MrLEA2* 蛋白对高盐和温度胁迫引起的细胞损伤具有保护作用。

**关键词:** 扁蓿豆; 晚期胚胎发生丰富蛋白; 大肠杆菌; 过量表达; 盐胁迫; 温度胁迫

中图分类号: Q785; Q786 文献标志码: A

## Cloning and Prokaryotic Expression of *MrLEA2* from *Medicago ruthenica*

MA Chao<sup>1,2</sup>, SHEN Yingfang<sup>1,2</sup>, WU Xiaopei<sup>1,2</sup>, WANG Haiqing<sup>1\*</sup>

(1 Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China; 2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** A gene encoding a late embryogenesis abundant (LEA) protein was isolated from seedling of *Medicago ruthenica* L.. Sequence analysis revealed that it belongs to LEA<sub>2</sub> family according to the Pfam classification of LEA proteins, here named as *MrLEA2* (*Medicago ruthenica* late embryogenesis abundant protein 2). Semi-quantitative RT-PCR analysis showed that the expression level of *MrLEA2* did not response to dehydration, high salinity, cold stress treatments and ABA application. A prokaryotic expression vector was constructed and *MrLEA2* was successfully overexpressed in *E. coli*. In order to get the clues of the function that *MrLEA2* plays in protecting cells against abiotic stresses, growth and survival of *E. coli* cells overexpressing *MrLEA2* protein under abiotic stresses, including high salinity, heating and freezing, was appraised. Spot assays and colony counting investigation showed that overexpression of *MrLEA2* increased the tolerance of *E. coli* to high salinity (0.5 mol/L NaCl or 0.5 mol/L KCl), heating (55 °C) and freezing (-20 °C) stresses. The results suggest that *MrLEA2* plays a role in protection of cell against damage caused by salinity and temperature stress.

**Key words:** *Medicago ruthenica* L.; late embryogenesis abundant protein; *E. coli*; overexpression; salinity stress; temperature stress

晚期胚胎发生丰富蛋白 (late embryogenesis abundant protein, LEA protein) 因其在植物胚胎形成晚期大量积累而被最先报道<sup>[1]</sup>, 之后在植物其它组织和器官中发现非生物胁迫和脱落酸 (ABA) 能

够诱导 LEA 蛋白的合成, 甚至在一些生物胁迫下也有 LEA 蛋白基因表达<sup>[2-3]</sup>。后续研究表明细菌、昆虫、线虫等有机体内也存在 LEA 蛋白<sup>[4-6]</sup>。

LEA 蛋白富含甘氨酸等亲水性氨基酸, 疏水性

收稿日期: 2014-05-05; 修改稿收到日期: 2014-08-09

基金项目: 中国科学院“西部之光”联合学者项目和青海省应用基础研究计划 (2014-ZJ-764)

作者简介: 马超 (1988-), 男, 在读硕士研究生, 主要从事植物抗逆生物学研究。E-mail: chinamachao@gmail.com

\* 通信作者: 王海庆, 博士, 副研究员, 主要从事植物抗逆分子生物学和牧草抗逆改良研究。E-mail: wanghq@nwipb.cas.cn

氨基酸含量很少,具有高度的亲水性和热稳定性<sup>[7]</sup>。在拟南芥中,Hundertmark 等根据 LEA 蛋白的氨基酸序列信息在 Pfam 数据库中将其划分为 6 个家族,大多数 LEA 蛋白基因的非编码区存在脱落酸、低温以及脱水胁迫应答元件,能够被低温、干旱等非生物胁迫因素以及脱落酸诱导表达<sup>[8]</sup>。在逆境胁迫情况下,LEA 蛋白具有保护细胞内酶等生物大分子的活性,维持细胞膜的稳定性等作用<sup>[8-10]</sup>。大麦中编码 LEA 蛋白的 *HVA1* 基因过量表达能够明显提高转基因水稻的抗旱和抗盐能力<sup>[11]</sup>。Gilmour 发现拟南芥 LEA 蛋白基因 *cor47* 和 *cor6.6* 在低温胁迫保护调节中起关键作用<sup>[12]</sup>。此外,在细菌和酵母中 LEA 蛋白过量表达能够明显增强宿主细胞对低温、高渗和高盐胁迫的耐受性<sup>[13-17]</sup>,因此在非生物胁迫下 LEA 蛋白对细胞具有重要的保护作用。

扁蓿豆(*Medicago ruthenica* L.)具有广适性和极强的抵抗干旱、低温、盐碱胁迫的能力,是唯一能够在青藏高原高寒地区生长的苜蓿属多年生豆科植物<sup>[18]</sup>。同时,扁蓿豆存在丰富的遗传多样性,是极具驯化利用潜力的高寒地区豆科牧草资源<sup>[19]</sup>,也是研究植物适应环境机制的理想材料之一。

本实验根据低温胁迫转录组测序信息,从扁蓿豆幼苗中克隆了编码晚期胚胎发生丰富蛋白 LEA\_2 家族成员的 *MrLEA2* 基因,半定量 RT-PCR 分析发现,*MrLEA2* 在扁蓿豆幼苗中的表达水平不受非生物胁迫和脱落酸诱导。利用原核表达系统对其在非生物胁迫下细胞的保护效果分析表明,*MrLEA2* 能够增强大肠杆菌对盐和温度胁迫的耐受性。根据上述结果推测 *MrLEA2* 基因在植物中除了逆境胁迫保护作用之外,还可能发挥其他功能。

## 1 材料和方法

### 1.1 植物材料和处理

扁蓿豆种子由中国农业科学院草原研究所孙启忠研究员提供。将种子用浓硫酸处理 10 min,用流水冲洗 5 次后置于铺有 2 层湿滤纸的培养皿中发芽,3 d 后挑选发芽种子转移蛭石和黑土(3:1)混合基质中,于 22 °C、16 h/8 h 光照条件下生长 3 周后对幼苗进行胁迫和脱落酸处理。将幼苗转移到 4 °C 光照培养箱进行低温处理;采用 150 mmol/L NaCl 水溶液浇灌进行高盐处理;脱落酸处理为将幼苗洗净转移至培养皿中,整株用含有 0.05% Tween 20(V/V)的 100 μmol/L 脱落酸溶液(ABA)喷雾后,在培养皿中放置多层吸足水的吸水纸,封盖以防

止植株脱水;脱水处理将幼苗洗净后于室温进行自然脱水。以上处理于不同时间点取样,液氮速冻后,-80 °C 冰箱保存。

### 1.2 *MrLEA2* 的克隆和半定量 RT-PCR 分析

总 RNA 提取使用 TRIzol 试剂(Invitrogen, USA),按照说明书进行。提取的 RNA 调整浓度至 200 ng/μL,用 PrimeScript™ RT reagent Kit(Perfect Real Time)(Takara,大连)按操作说明合成 cDNA 第一链。

根据本实验室获得的转录组测序结果设计正向引物 LEA2F(5'-CTCTCTCTCTCTCTCATCATCTG-3')和反向引物 LEA2R(5'-CTGACTGAACG-GACATACTCACT-3'),以低温处理 24 h 幼苗 cDNA 为模板,用 Pyrobest DNA 聚合酶(Takara,大连)进行 PCR 扩增。PCR 扩增产物经胶回收,*rTaq* DNA 聚合酶(Takara,大连)加尾处理后,克隆到 pGEM-T Easy 载体(Promega,USA)进行测序。

*MrLEA2* 表达水平半定量 RT-PCR 检测,以上述不同处理的扁蓿豆幼苗中提取 RNA 合成 cDNA 为模板,用 *rTaq* 聚合酶(Takara,大连)进行 28 次循环扩增。内标基因为 *Actin*(MrActF:5'-TGCT-TCTAACTGAGGCTCCACT-3',MrActR:5'-AA-AGGACTTCTGGGCAACG-3')。

### 1.3 *MrLEA2* 原核表达载体构建

利用引物 LEA2F1(5'-GCGGATCCATGTTCG-ACATCGGAGGATAAG-3')和 LEA2R1(5'-GCGA-GCTCTTAACAGCTGTAATGAGTTGCTACAG-3')扩增 *MrLEA2* 基因翻译区,连接到 pGEM-T Easy 载体测序确认后,*Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切获得目的基因片段,连接到原核表达载体 pET-30a(+)(Novagen, USA),转化 DH5a 大肠杆菌菌株,挑选阳性克隆提取质粒,进行酶切鉴定后,获得原核表达载体 pET-MrLEA2。

### 1.4 *MrLEA2* 融合蛋白的表达

将 pET-MrLEA2 质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3)表达菌株,在含有 50 mg/L 卡那霉素的 LB 平板培养基上挑取阳性克隆,接种到含有 50 mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中,于 37 °C 振荡培养。过夜培养物以 1:100(V/V)转接到新鲜 LB 液体培养基中培养 2~3 h 至 OD<sub>600</sub> 达到 0.6~0.8,加入异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度为 0.5 mmol/L 诱导 3 h 后,取 1 mL 菌液离心收集菌体,用 100 μL 2×SDS-PAGE 电泳上样缓冲液重悬菌体,煮沸 10 min,室温 12 000 g 离心 10 min,取 10 μL 上清液进

行 SDS-PAGE 电泳。

1.5 大肠杆菌转化子抗逆性实验

(1)定性分析 大肠杆菌培养和 IPTG 诱导条件如前所述。分别将含有 pET-MrLEA2 载体和空载体 pET-30a(+)

(2)定量分析(菌落计数) 大肠杆菌培养、IPTG 诱导,以及胁迫处理条件与定性分析过程相同,不同之处为将 IPTG 诱导的大肠杆菌培养物

进行菌落计数,用如下公式计算菌落形成率:

菌落形成率(%) = 胁迫处理平板菌落数 / 非胁迫处理平板菌落数 × 100%

2 结果与分析

2.1 MrLEA2 基因克隆和序列分析

本研究根据转录组测序结果设计引物,通过 RT-PCR 从 4 °C 处理 24 h 的扁蓿豆幼苗中扩增得到长度约为 1.2 kb 的特异性扩增条带

对由 cDNA 序列推导的氨基酸序列在 Pfam 数据库查询表明该基因编码产物属于晚期胚胎发生丰富蛋白 LEA\_2 蛋白家族,其氨基酸序列中含有 2 个和 LEA\_2 蛋白成员显著匹配的区段

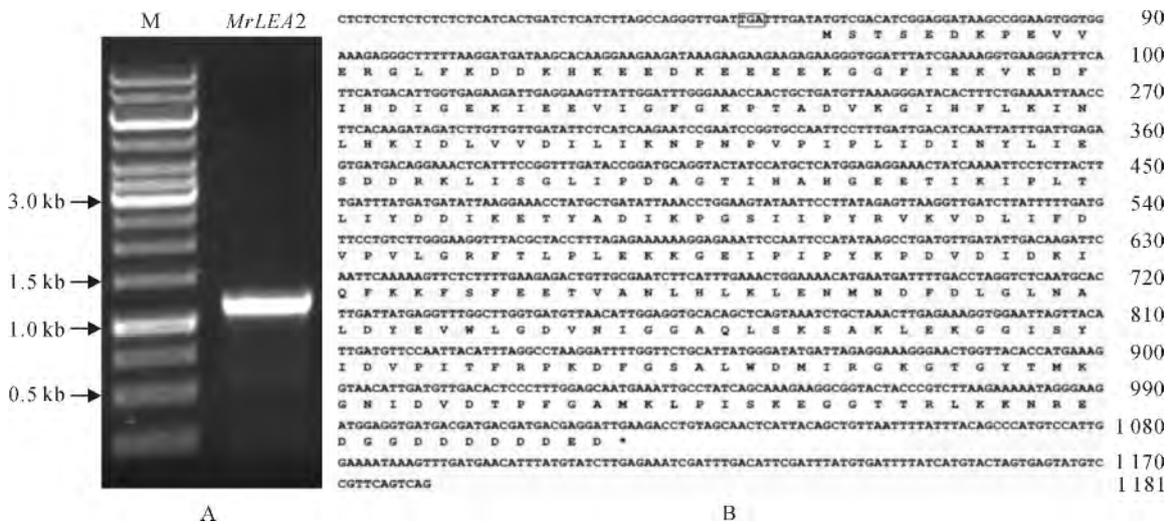


图 1 扁蓿豆 MrLEA2 基因的克隆及其序列分析

A. 扁蓿豆 MrLEA2 基因 RT-PCR 产物电泳结果;B. 扁蓿豆 MrLEA2 的 cDNA 序列及其编码的氨基酸序列; M. 1 kb DNA ladder;方框标示 MrLEA2 起始密码子上游的终止密码子

Fig. 1 Cloning and sequence analysis of MrLEA2 gene from M. ruthenica

A. Agrose gel electrophoresis of RT-PCR products of MrLEA2 from M. ruthenica;B. cDNA sequence and deduced amino acid sequence of MrLEA2;M. 1 kb DNA ladder;A stop codon at upstream of the start codon of MrLEA2 is boxed

MtLEA14 的一致性最高(图 2)。为此,将该基因命名为 *MrLEA2* (*Medicago ruthenica* late embryogenesis abundant protein 2)。其所编码产物长度为 322 个氨基酸(图 1,B;图 2),预测分子量为 36.1 kD,理论等电点为 4.55。平均疏水性系数(Grand average hydropathy index, GRAVY index)预测为 -0.427 6,表明具有较高的亲水性。

2.2 *MrLEA2* 在逆境胁迫下的表达特性

利用半定量 RT-PCR,以组成型表达的肌动蛋白基因(*Actin*)为内标,对 *MrLEA2* 基因在室温脱水(图 3,A)、150 mmol/L NaCl(图 3,B)、ABA 诱导(图 3,C)和 4 °C 低温处理(图 3,D)条件下的表达水平进行了检测。结果显示,在上述逆境胁迫和 ABA 处理过程中,*MrLEA2* 基因表达水平没有明显的变化,在扁蓊豆幼苗中为组成型表达(图 3)。

2.3 *MrLEA2* 原核表达载体构建及其表达

为了实现 *MrLEA2* 蛋白在大肠杆菌中的表达,将 *MrLEA2* 基因翻译区片段(969 bp)连接到 pET-30a(+ )载体,构建了原核表达载体。构建的载体经酶切鉴定后(图 4,a),转化大肠杆菌表达菌株 BL21 (DE3),将含有 pET-30a(+ )和 pET-*MrLEA2* 质粒的表达菌株培养物经终浓度为 0.5 mmol/L IPTG 诱导 3 h 后,对诱导前后的菌体总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳检测。含有 pET-*MrLEA2* 表达载体的菌株经 IPTG 诱导,在菌体总蛋白中出现了 1 条约 45 kD 的条带(图 4,b)。 *MrLEA2* 蛋白原核表达产物在 N-末端融合了 50 个氨基酸残基组成的 His-tag 和 S-tag 标签片段,融合蛋白的理论分子量为 41.5 kD,而 SDS-PAGE 电泳表观分子量略大于理论分子量。上述电泳表观分子量和预测分子量之间

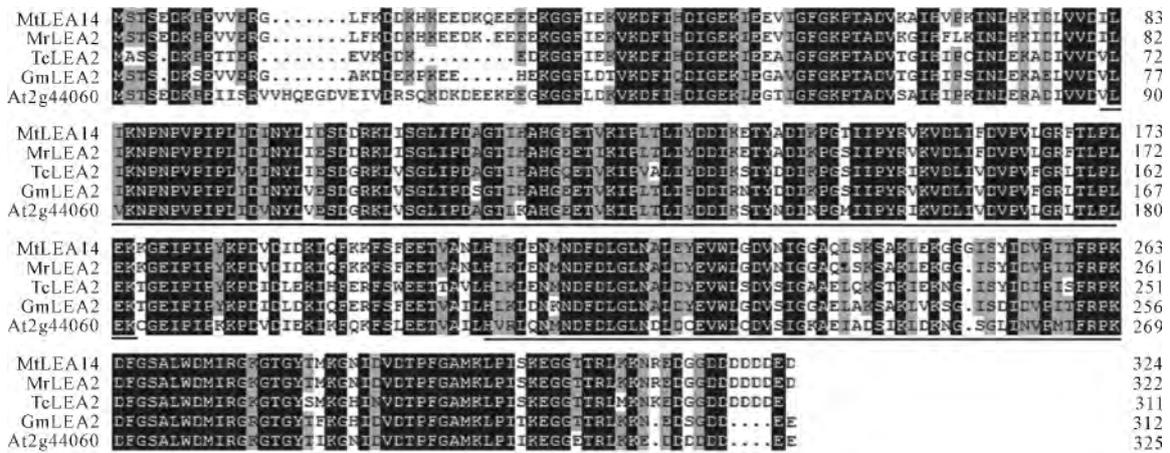


图 2 扁蓊豆 *MrLEA2* 与其它植物中 *LEA\_2* 蛋白的氨基酸序列比对

下划线示 2 个 *LEA\_2* 蛋白保守区段;MtLEA14. 截型首蓊(XP\_003617191. 1);TcLEA2. 可可(EOY06968. 1); GmLEA2. 大豆(NP\_001241079. 1);At2g44060. 拟南芥

Fig. 2 Alignment of amino acid sequences of *MrLEA2* and *LEA\_2* proteins from other plant species  
Two conserved regions are underlined;MtLEA14. *Medicago truncatula* (XP\_003617191. 1);TcLEA2. *Theobroma cacao* (EOY06968. 1);GmLEA2. *Glycine max* (NP\_001241079. 1);At2g44060. *Arabidopsis thaliana*

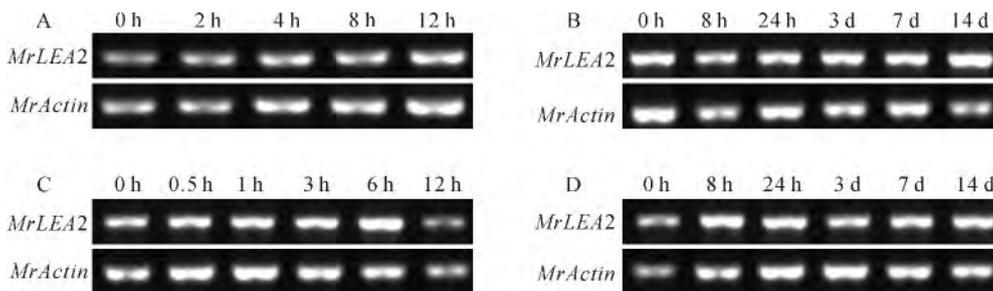


图 3 不同非生物胁迫和 ABA 诱导下 *MrLEA2* 基因表达水平半定量 RT-PCR 分析

A. 室温脱水;B. 150 mmol/L NaCl;C. 100 μmol/L 脱落酸;D. 4 °C 低温

Fig. 3 Semi-quantitative RT-PCR analysis of *MrLEA2* expression under abiotic stresses and ABA treatment  
A. Dehydration under room temperature;B. 150 mmol/L NaCl;C. 100 μmol/L ABA;D. 4 °C cold

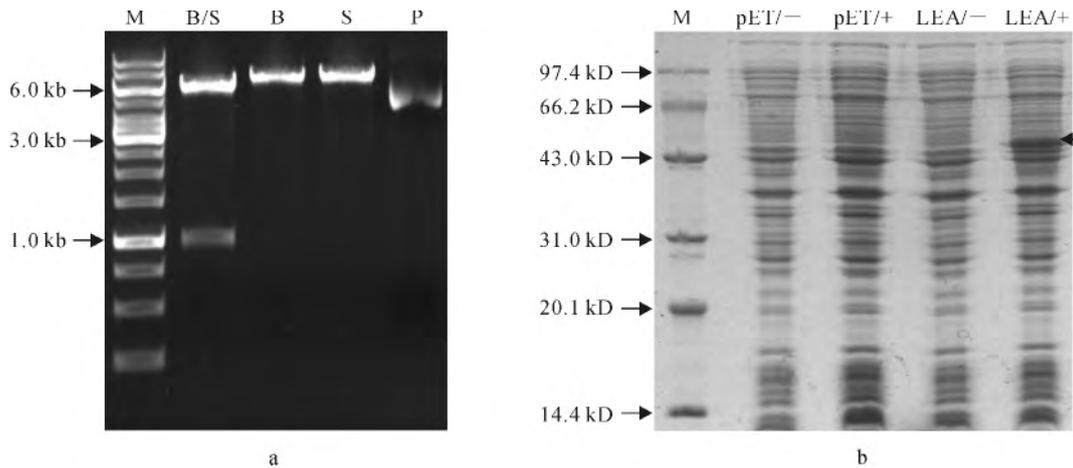


图 4 MrLEA2 原核表达载体酶切鉴定(a)及其原核表达产物电泳分析(b)

M. 1 kb DNA ladder 和低分子量蛋白标准;B/S. *Bam*H I /*Sac* I 双酶切;B. *Bam*H I 单酶切;S. *Sac* I 单酶切;P. pET-MrLEA2 质粒; pET/- . IPTG 诱导前含有 pET-30a(+ )载体的 BL21(DE3)总蛋白;pET/+ . IPTG 诱导后含有 pET-30a(+ )载体的 BL21(DE3)总蛋白; LEA/- . IPTG 诱导前含有 pET-MrLEA2 载体的 BL21(DE3)总蛋白;LEA/+ . IPTG 诱导后含有 pET-MrLEA2 载体的 BL21(DE3)总蛋白

Fig. 4 Restriction enzymatic verification of MrLEA2 prokaryotic expression vector(a) and SDS-PAGE identification of prokaryotic expressed MrLEA2 protein(b)

M. 1 kb DNA ladder and low-molecular-weight protein standard, respectively;B/S. *Bam*H I and *Sac* I double digested pET-MrLEA2 plasmid;B. *Bam*H I digested pET-MrLEA2 plasmid;S. *Sac* I digested pET-MrLEA2 plasmid;P. Undigested pET-MrLEA2 plasmid; pET/- . Crude protein extract of BL21(DE3) harboring pET-30a(+ ) before IPTG induction;pET/+ . Crude protein extract of BL21(DE3) harboring pET-30a(+ ) after IPTG induction;LEA/- . Crude protein extract of BL21(DE3) harboring pET-MrLEA2 before IPTG induction;LEA/+ . Crude protein extract of BL21(DE3) harboring pET-MrLEA2 after IPTG induction

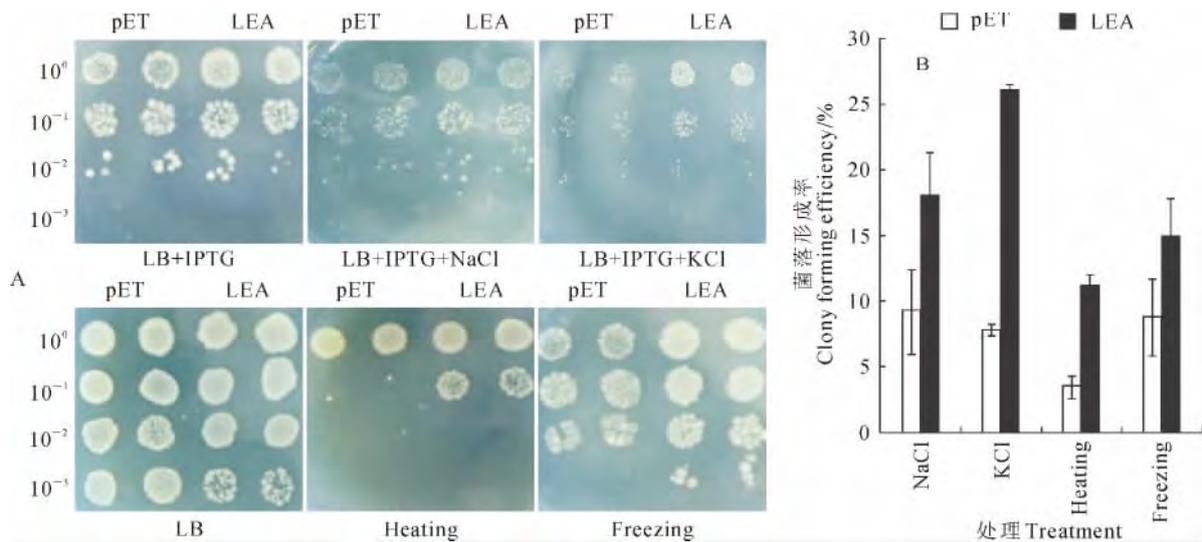


图 5 MrLEA2 蛋白过量表达对大肠杆菌逆境胁迫的保护效果

A. 菌液滴板试验;B. 菌落形成率测定;pET. 含有 pET-30a(+ )质粒的 BL21(DE3)大肠杆菌菌株;LEA. 含有 pET-MrLEA2 质粒的 BL21(DE3)大肠杆菌菌株;LB. Luria-Bertani 固体培养基;LB+IPTG. LB 固体培养基添加 0.5 mmol/L IPTG; LB+IPTG+NaCl. LB 固体培养基添加 0.5 mmol/L IPTG 和 0.5 mol/L NaCl;LB+IPTG+KCl. LB 固体培养基添加 0.5 mmol/L IPTG 和 0.5 mol/L KCl;Heating. 55 °C 高温处理;Freezing. -20 °C 冷冻处理

Fig. 5 Effects of MrLEA2 overexpression on protection of *E. coli* against injury under abiotic stresses

A. Spotting assays;B. Colony forming efficiency assays;pET. pET-30a(+ ) plasmid harboring BL21(DE3) strain;LEA. pET-MrLEA2 plasmid harboring BL21(DE3) strain;LB. Luria-Bertani(LB) solid medium;LB+IPTG. LB solid medium with 0.5 mmol/L IPTG; LB+IPTG+NaCl. LB solid medium with 0.5 mmol/L IPTG and 0.5 mol/L NaCl;LB+IPTG+KCl. LB solid medium with 0.5 mmol/L IPTG and 0.5 mol/L KCl;Heating. Heating treatment under 55 °C ;Freezing. Freezing treatment under -20 °C

的差异可能与目的蛋白氨基酸组成上的高度偏向性以及 SDS 溶液中仍然存在部分结构有关。

#### 2.4 MrLEA2 过量表达对大肠杆菌的逆境胁迫保护

为了鉴定 MrLEA2 蛋白对大肠杆菌在逆境胁迫下的保护效果,将经过 IPTG 诱导的大肠杆菌,分别给予 0.5 mol/L NaCl 和 0.5 mol/L 的 KCl 高盐胁迫,以及 55 °C 高温和 -20 °C 冷冻处理后,观察测定宿主菌的生长和存活情况,发现 MrLEA2 过表达能够明显提高大肠杆菌在上述胁迫条件下的生长和存活能力(图 5, A、B)。菌落计数结果(图 5, B)表明,在 0.5 mol/L NaCl 和 KCl 高盐胁迫下,MrLEA2 过表达菌株的菌落形成率分别为 18.13% 和 26.04%,而含有 pET-30a(+) 载体的菌落形成率分别为 9.22% 和 7.85%;55 °C 高温处理后,MrLEA2 过表达菌株的菌落形成率为 11.22%,含有载体 pET-30a(+) 菌株菌落形成率仅为 3.56%;-20 °C 冷冻处理后,MrLEA2 过表达菌株的菌落形成率为 14.93%,对照菌株菌落形成率为 8.81%。

### 3 讨 论

LEA 蛋白普遍存在于植物中,在调节种子发育以及非生物胁迫保护中起重要作用<sup>[20]</sup>。它们普遍具有高亲水性及热稳定性,在防止细胞失水、保护膜结构的稳定性、酶活性、离子平衡调节以及抗氧化过程中扮演重要角色<sup>[21]</sup>。本实验从扁蓊豆幼苗中克隆得到编码 LEA<sub>2</sub> 蛋白的 *MrLEA2* 基因,其所编码的蛋白质的氨基酸序列与来自截型苜蓿、大豆、可可和拟南芥等物种的 LEA<sub>2</sub> 蛋白具有高度一致性。平均疏水性系数预测显示 MrLEA2 蛋白具有高亲水性。拟南芥中由 At1g01470 位点编码的 LEA<sub>2</sub> 蛋白结构中存在和动物细胞表面的纤连蛋白(fibronectin) III 型结构域相似的结构区段<sup>[22]</sup>。动物纤连蛋白参与细胞形状维持、细胞粘附以及运动和创伤修复等功能<sup>[22]</sup>。由于植物 LEA<sub>2</sub> 蛋白一般存在于胞质中,而且其基因表达受与细胞失水相关的非生物胁迫、机械损伤以及昆虫咬噬所诱导,因此

推测其功能和细胞脱水保护有关<sup>[22]</sup>。最近对甘薯 *IbLEA14* 基因功能分析发现,IbLEA14 可以通过正向调节木质素合成,增强植物对干旱和盐胁迫的耐受性<sup>[21]</sup>。除此之外,还没有其它有关 LEA<sub>2</sub> 蛋白功能的试验证据。本研究通过大肠杆菌表达系统,分析了扁蓊豆 MrLEA2 蛋白对细胞在非生物逆境胁迫下的保护效果,发现 MrLEA2 蛋白在大肠杆菌中过表达后,能够明显提高细菌对高盐和温度胁迫的耐受性。但是 MrLEA2 过表达对高浓度山梨醇和甘露醇模拟脱水胁迫下的大肠杆菌没有观察到明显的保护效果。其原因可能与原核胞与真核细胞在细胞结构上存在差异,或 MrLEA2 对不同胁迫保护具有机制上的特异性有关。

基因表达特性发现植物 LEA<sub>2</sub> 蛋白基因通常在干旱、高盐、温度胁迫以及 ABA 诱导下呈上调趋势,此外还发现乙烯诱导、损伤情况下上调表达<sup>[21,23-25]</sup>,上述结果与该蛋白在细胞内的功能推测相符合。本研究表明 MrLEA2 蛋白对大肠杆菌具有显著的逆境胁迫保护作用,但非生物胁迫和 ABA 处理对扁蓊豆幼苗中 *MrLEA2* 基因的表达水平没有发现明显的差异,属于组成型表达。此前对菜豆中编码 LEA 蛋白家族中的 1 个脱水蛋白(dehydrin)基因及其所编码蛋白质的分析发现,尽管其基因在转录水平受到逆境胁迫诱导,但由于尚未知的特异性蛋白水解酶的降解作用,该脱水蛋白在不同器官之间的稳定性存在明显差异<sup>[26]</sup>。此外,也有研究表明,LEA 蛋白在植物中除了逆境胁迫保护功能外,还对植物的发育,如根和气孔发育<sup>[27-28]</sup>,以及木质素合成具有调控作用<sup>[21]</sup>。因此,在扁蓊豆中 *MrLEA2* 基因表达是否存在转录之后调控机制(如翻译水平、蛋白质水平等),以及该组成型表达基因是否在维持植物基本水平的胁迫保护中发挥功能,甚至还存在尚未发现的功能,是今后需要回答的问题。对于上述问题的解答和推测的验证,将会进一步深化对 LEA 蛋白在植物胁迫以及生长发育中的功能认识,也将为植物抗逆改良提供重要的参考信息。

#### 参考文献:

- [1] DURE III L, GREENWAY S C, GALAU G A. 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): 4 162-4 168.
- [2] INGRAM J, BARTELS D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 1996, **47**(1): 377-403.
- [3] THOMASHOW M F. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 1999, **50**(1): 571-599.
- [4] BATTISTA J R, PARK M J, MCLEMORE A E. Inactivation of two homologues of proteins presumed to be involved in the desiccation tol-

- erance of plants sensitizes *Deinococcus radiodurans* R1 to desiccation[J]. *Cryobiology*, 2001, **43**(2): 133–139.
- [5] BROWNE J, TUNNACLIFFE A, BURNELL A. Anhydrobiosis: plant desiccation gene found in a nematode[J]. *Nature*, 2002, **416**(6 876): 38–38.
- [6] WISE M J, TUNNACLIFFE A, POPP the question: what do LEA proteins do [J]. *Trends in Plant Science*, 2004, **9**(1): 13–17.
- [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): 1 346–1 353.
- [8] HUNDERTMARK M, HINCHA D K. LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana* [J]. *BMC Genomics*, 2008, **9**(1): 118.
- [9] GRELET J, BENAMAR A, TEYSSIER E, et al. Identification in pea seed mitochondria of a late-embryogenesis abundant protein able to protect enzymes from drying[J]. *Plant Physiology*, 2005, **137**(1): 157–167.
- [10] REYES J L, RODRIGO M J, COLMENERO-FLORES J M, et al. Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects *in vitro* [J]. *Plant, Cell & Environment*, 2005, **28**(6): 709–718.
- [11] XU D, DUAN X, WANG B, et al. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice[J]. *Plant Physiology*, 1996, **110**(1): 249–257.
- [12] GILMOUR S J, ARTUS N N, THOMASHOW M F. cDNA sequence analysis and expression of two cold-regulated genes of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Molecular Biology*, 1992, **18**(1): 13–21.
- [13] DALAL M, TAYAL 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.
- [14] LIU R, LIU M, LIU J, et al. Heterologous expression of a *Ammopiptanthus mongolicus* late embryogenesis abundant protein gene (*Am-LEA*) enhances *Escherichia coli* viability under cold and heat stress[J]. *Plant Growth Regulation*, 2010, **60**(2): 163–168.
- [15] SWIRE-CLARK G A, MARCOTTE JR W R. The wheat LEA protein Em functions as an osmoprotective molecule in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Plant Molecular Biology*, 1999, **39**(1): 117–128.
- [16] WANG W G, LI R, LIU B, et al. Alternatively spliced transcripts of group 3 late embryogenesis abundant protein from *Pogonatherum panicum* confer different abiotic stress tolerance in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2012, **169**(15): 1 559–1 564.
- [17] ZHANG L, OHTA A, TAKAGI M, et al. Expression of plant group 2 and group 3 lea genes in *Saccharomyces cerevisiae* revealed functional divergence among LEA proteins[J]. *Journal of Biochemistry*, 2000, **127**(4): 611–616.
- [18] JIN D, MA J, MA W, et al. Legumes in Chinese natural grasslands: species, biomass, and distribution[J]. *Rangeland Ecology and Management*, 2013, **66**(6): 648–656.
- [19] HUANG Y X (黄迎新), ZHOU D W (周道玮), YUE Q (岳秀泉), et al. . Research progress of *Medicago ruthenica* [J]. *Pratacultural Science* (草业科学), 2008, **24**(12): 34–39 (in Chinese).
- [20] LIU Y, ZHENG Y, ZHANG Y, et al. Soybean PM2 protein (LEA3) confers the tolerance of *Escherichia coli* and stabilization of enzyme activity under diverse stresses[J]. *Current Microbiology*, 2010, **60**(5): 373–378.
- [21] PARK S C, IM Y H, JEONG J C, 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.
- [22] SINGH S, CORNILESCU C C, TYLER R C, et al. Solution structure of a late embryogenesis abundant protein (LEA14) from *Arabidopsis thaliana*, a cellular stress-related protein[J]. *Protein Science*, 2005, **14**(10): 2 601–2 609.
- [23] ZEGZOUTI H, JONES B, MARTY C, et al. *ER5*, a tomato cDNA encoding an ethylene-responsive LEA-like protein: characterization and expression in response to drought, ABA and wounding[J]. *Plant Molecular Biology*, 1997, **35**(6): 847–854.
- [24] KIMURA M, YAMAMOTO Y Y, SEKI M, et al. Identification of *Arabidopsis* genes regulated by high light-stress using cDNA microarray[J]. *Photochemistry and Photobiology*, 2003, **77**(2): 226–233.
- [25] SEKI M, NARUSAKA M, ABE H, et al. Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray[J]. *The Plant Cell*, 2001, **13**(1): p. 61–72.
- [26] LIN C H, PENG P H, KO C Y, et al. Characterization of a novel Y2K-type dehydrin *VrDhn1* from *Vigna radiata* [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2012, **53**(5): 930–942.
- [27] SALLEH F M, 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.
- [28] XIE C, ZHANG R, QU Y, et al. Overexpression of *MtCAS31* enhances drought tolerance in transgenic *Arabidopsis* by reducing stomatal density[J]. *New Phytologist*, 2012, **195**(1): 124–135.