文章编号: 1005-0906(2025)02-0009-12

DOI: 10.13597/j.cnki.maize.science.20250202

### 玉米P5CS基因家族全基因组 鉴定及生物信息学分析

刘俊宇<sup>1,2</sup>,张春宵<sup>2</sup>,孙 博<sup>1,2</sup>,董 菁<sup>2</sup>,石创业<sup>1,2</sup>,吴委林<sup>1</sup>,李晓辉<sup>2</sup> (1.延边大学农学院,吉林 延吉 133002; 2.吉林省农业科学院玉米研究所,吉林 公主岭 136100)

摘 要:基于14个物种的P5CS家族基因构建系统进化树,深入分析模式作物拟南芥及玉米、高粱、水稻3个亲缘关系较近的禾本科物种P5CS家族成员的基因结构、保守基序及其蛋白质理化性质等,对玉米P5CS基因家族进行全基因组鉴定和系统的生物信息学分析。分别用200 mmol/L NaCl和100 mmol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>对郑58(抗)和昌7-2(感)的玉米幼苗进行盐、碱胁迫处理,在胁迫0h、1d和3d时取叶部及根部样品进行转录水平分析。结果表明,14个物种的P5CS家族成员在系统进化树划分为两个支系,推测可能至少来自两个共同的祖先基因;P5CS家族具有相似的基因结构和特殊的基因特征,玉米P5CS基因家族包括*ZmP5CS1、ZmP5CS2*和*ZmP5CS3*。盐碱胁迫下,*ZmP5CS1*和*ZmP5CS3*上调表达而*ZmP5CS2*下调表达,表明这3个基因可能通过不同的机制来响应胁迫伤害和参与脯氨酸合成。

关键词: 玉米; P5CS基因家族; 生物信息学; 盐碱胁迫; 基因表达中图分类号: S513.035.3文献标识码: A

### Whole Genome Identification and Bioinformatics Analysis of Maize P5CS Gene Family

LIU Jun-yu<sup>1,2</sup>, ZHANG Chun-xiao<sup>2</sup>, SUN Bo<sup>1,2</sup>, DONG Jing<sup>2</sup>, SHI Chuang-ye<sup>1,2</sup>, WU Wei-lin<sup>1</sup>, LI Xiao-hui<sup>2</sup> (1. Agricultural College of Yanbian University, Yanji 133002;

2. Maize Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100, China)

Abstract: A phylogenetic tree was constructed based on the P5CS gene family of 14 species, and the gene structure, conserved motifs, and physicochemical properties of the P5CS family members of the model crop *Arabidopsis thaliana* and three closely related species of maize, sorghum, and rice were deeply analyzed. The alkali-tolerant inbred line Zheng58 and the alkali-sensitive inbred line Chang7-2 were used as experimental materials to transcription analysis data of the leaf and root for the seedlings under the stress of 200 mmol/L NaCl or 100 mmol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution at stress 0 h, 1 and 3 days. The results showed that the P5CS family members of 14 species were divided into two clades in the phylogenetic tree, which may be derived from at least two common ancestral genes. P5CS family had similar gene structure and special gene characteristics. There were 3 members of the maize P5CS3 ene family, which included *ZmP5CS1*, *ZmP5CS2* and *ZmP5CS3*. Under saline-alkali stress, *ZmP5CS1* and *ZmP5CS3* were up-regulated, but *ZmP5CS2* is down-regulated. They may respond to saline-alkali injury through different mechanisms and participate in proline synthesis.

Key words: Maize(Zea mays L.); P5CS gene family; Bioinformatic; Salt or alkali stress; Gene expression

- 基金项目: 吉林省科技厅自然科学基金项目(20220101309JC)、吉林 省农业科技创新工程人才基金项目(CXGC2022RCY017)
- 作者简介:刘俊宇(1998-),女,吉林敦化人,硕士,从事玉米抗逆研 究。E-mail:2021010598@ybu.edu.cn 张春宵为并列第一作者。 李晓辉和吴委林为本文通信作者。

世界许多地区,特别是干旱和半干旱地区,土 壤盐渍化的面积正在增加<sup>11</sup>。目前,在全世界 15亿hm<sup>2</sup>的耕地中,约有7700万hm<sup>2</sup>受到含盐量过 高的影响<sup>12</sup>,开发耐盐品种是世界范围内许多作物 育种计划的重中之重。盐胁迫通过对光合作用、抗 氧化代谢、矿质营养素稳态、渗透物质积累和激素信 号传导等一系列生化和生理过程的不利影响来破坏

录用日期: 2023-12-01

植物的发育<sup>[3-4]</sup>。相应的植物进化出复杂的生理和 分子机制,以抵御这些不利的环境<sup>[5]</sup>。

作为对非生物胁迫最常见的反应之一,细胞渗 透物质的积累已在许多植物中被广泛证实。在众多 的渗透产物中,因脯氨酸是植物在逆境条件下积累 最广泛的化合物而引起了人们的广泛关注。脯氨酸 作为渗透剂不仅可以稳定蛋白质结构,而且还作为 细胞氧化还原潜能的调节器[6-7]。在各种植物中,在 胁迫下积累脯氨酸的能力通常与胁迫耐受性有 关<sup>[8-9]</sup>。脯氨酸的生物合成有谷氨酸(Glu)和鸟氨酸 (Orn)途径两种途径<sup>[10-11]</sup>。在谷氨酸途径中,谷氨酸 被Δ1-pyrroline-5carboxylate合成酶(P5CS)还原为谷 氨酸半醛(GSA),并自发转化为P5CS,此过程通常位 于细胞质和叶绿体中四;在鸟氨酸途径中,脯氨酸由 鸟氨酸合成,此过程发生在线粒体中。P5CS是植物 脯氨酸生物合成的关键酶,它通过催化谷氨酸途径 中的限速步骤来调节脯氨酸含量<sup>[13]</sup>。增加P5CS酶 活性可以刺激脯氨酸的积累,从而提高植物在环境 胁迫下的渗透调节能力<sup>[14-15]</sup>。在拟南芥中P5CS酶由 两个高度同源的基因编码116,一个是持家基因,另一 个在胁迫条件下发挥重要作用<sup>117</sup>,即P5CS1和 P5CS2具有非冗余功能,存在一定程度的功能分 化<sup>[18]</sup>。P5CS可以通过转录调控来控制脯氨酸的生 物合成<sup>[19]</sup>。拟南芥中,与P5CS2相比,P5CS1在大多 数植物器官中的稳态转录水平显著高于P5CS2, P5CS2似乎在细胞分裂和对不相容的病原体相互作 用的反应中优先表达[20-21]。在盐和干旱胁迫下,过 表达P5CS提高了水稻、拟南芥、柳枝稷和紫花针茅 等一些植物的脯氨酸含量和氧化应激耐受性[22-24]。 此外,在东方杂交百合中,P5CS基因在甘露醇和脱 落酸处理下表达上调,脯氨酸积累增加[25]。

玉米是世界上种植面积最大的作物,在全球粮 食安全中发挥着不可替代的作用。作为一种对盐胁 迫敏感的作物<sup>[26]</sup>,非生物胁迫已经严重影响了玉米 的生产。在一些植物中发现了 P5CS基因,但玉米 P5CS基因家族尚未见全面研究报道。本研究共鉴 定出3个ZmP5CS基因家族成员,并对ZmP5CS基因 结构和系统发育关系进行了全面的分析。除系统地 分析ZmP5CS基因的假定功能外,结合盐碱胁迫下 转录组数据,分析其转录模式,有助于了解 P5CS基 因的作用,为研究 P5CS蛋白功能提供理论参考。

1 材料与方法

### 1.1 序列数据信息获取

本研究检索各作物基因的编码区(CDS, Coding

DNA Sequence)、蛋白序列和基因组注释信息来自以 下数据库:拟南芥(Arabidopsis thaliana L.)信息来自 TAIR10(https://www.arabidopsis.org/); 玉米(Zea mays L.)、水稻(Oryza sativa L.)、高粱(Sorghum bicolor L.)、 谷子(Setaria italica L.)、大麦(Hordeum vulgare L.)、小 麦(Triticum aestivum L.)、乌拉尔图小麦(Triticum urartu)、圆锥小麦(Triticum turgidum)、粗山羊草(Aegilops tauschii)、二穗短柄草(Brachypo diumdistachyon)、互花 米草(Spartina alternifloraLoise L.)、小花碱茅(Puccinellia tenuiflora)、藜麦(Chenopodium quinoa Willd.)、苜蓿 (Medicago truncatula)14种作物的信息来自 EnsemblPlants数据库(http://plants.ensembl.org/index.html)。

### 1.2 P5CS基因家族鉴定及命名

在拟南芥中,P5CS是催化脯氨酸生物合成的限 速酶,包括P5CS1和P5CS2两个成员,且二者之间存 在一定程度的功能分化,根据与拟南芥P5CS蛋白序 列同源性由高至低顺序,将玉米P5CS家族基因依次 命名为ZmP5CS1、ZmP5CS2、ZmP5CS3等。

以拟南芥全基因组数据库中两个P5CS蛋白序 列为探针,在玉米等14种作物的蛋白序列中设定 E<1e<sup>-5</sup>进行本地BLASTp比对,筛选出同源性较高的 序列;利用本地HMMSEARCH功能并再次设定E< 1e<sup>-5</sup>,从上述已筛选出的蛋白序列中剔除没有保守结 构域的蛋白序列;结合PFAM数据库(http://pfam. xfam.org/)中的结构域信息,确保剩余的蛋白序列包 含P5CS基因家族相关的保守结构域,最终鉴定玉米 等14个作物P5CS基因家族成员。

### 1.3 P5CS基因家族分子特征、亚细胞定位及互作 网络分析

使用 ExPASy(https://www.expasy.org/)在线平台, 对玉米 P5CS 基因家族的所有成员进行蛋白质分子 量(MW, Molecular weight)、理论等电点(pI, isoelectric point)以及不稳定性指数(II)的预测<sup>[27]</sup>。使用在线工 具 WoLFPSORT(https://www.genscript.com/wolf-psort. html)<sup>[28]</sup>和 CELLO(http://cello.life.nctu.edu.tw/)<sup>[29]</sup>,对基 因家族蛋白的亚细胞定位进行预测。同时,通过 SignalP(http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)<sup>[30]</sup>,对 玉米 P5CS 基因家族编码蛋白序列中信号肽切割位 点的存在及位置进行预测。最后,使用 STRING 在 线平台(https://string-db.org/)<sup>[31]</sup>,进行邻近基因的重 复实例搜索,展示编码蛋白的互作网络。

### 1.4 多序列比对和系统发育分析

利用 MEGA7(https://www.megasoftware.net/) 软件<sup>[32]</sup>进行多序列比对,使用邻接法(NJ, neighbor-join-ing)构建进化树<sup>[33]</sup>。其中,参数设置为泊松校正、成

对删除以及自举法检验(Bootstrap),设置1000次重 复<sup>[34]</sup>,进化树通过ITOL(https://itol.embl.de/)在线网站 进行美化调整<sup>[35]</sup>。

### 1.5 P5CS基因结构及染色体定位分析

TBtools(http://www.tbtools.com/)中输入gff3注释和P5CS家族成员ID文件,得到P5CS基因家族的基因结构图<sup>[36]</sup>。SOPMA(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\_automat.pl?page=npsa%20\_sopma.html)在线预测P5CS基因家族的二级结构。利用EnsemblPlants数据库中玉米、水稻、高粱和小麦基因组注释以及TAIR数据库中拟南芥基因组注释,使用TB-tools的内置程序Gene Location Visualize from GFF对基因家族在染色体上的定位进行可视化。

### 1.6 P5CS基因家族顺式作用元件分析

基于拟南芥、玉米等作物的P5CS基因家族的 gff注释文件和基因全长,使用TBtools提取启动子上 游2000 bp序列,利用启动子在线分析工具Plant-Care(http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plant care/html/预测顺式作用元件(CRE,cis-regulatory element)<sup>[37]</sup>。使用TBtools软件图表功能在基因组上展 示顺式作用元件的分布,以直观地了解他们在启动 子区域的分布特征。

### 1.7 P5CS基因家族保守基序预测和共线性分析

将蛋白质序列提交 MEME(http://meme-suite. org/tools/meme)网站得到保守基序,基序的最大数量 设置为10,其他为默认参数<sup>[38]</sup>。使用TBtools软件可 视化结果,设定E<1e<sup>-5</sup>,通过内置BLAST程序对玉米 物种内及其与拟南芥、水稻、高粱和小麦之间的共线 性关系进行比对筛选,获得基因在染色体上的位置、 基因对共线性以及染色体长度、密度等信息,通过 TBtools内置程序对物种间和物种内基因的共线性 关系进行可视化。

### 1.8 P5CS基因家族进化选择压力和功能分化分析

计算核苷酸同义(Ks)和非同义(Ka)替代频率以及Ka/Ks值,使用TBtools软件内置Ka/Ks\_Calculator并进行Ka/Ks分析。根据达尔文进化论,Ka/Ks>1.0表示正向选择,Ka/Ks<1.0表示发生纯化选择,Ka/Ks=1.0表示中性选择。此外,散度时间(T)采用公式T=Ks/2λ×10<sup>-6</sup>(λ=6.5×10<sup>-9</sup>,代表禾本科植物的变异率)百万年前(Mya)计算<sup>[39-40]</sup>。

### 1.9 盐碱胁迫条件下植物的培养

以优良玉米自交系郑58和昌7-2为试材,种子 由吉林省农业科学院玉米研究所提供。选择大小一 致、子粒饱满无破损的种子,用0.1%升汞溶液消毒 10 min。将种子播种在玉米幼苗鉴定仪<sup>[41]</sup>中,并置 于光照培养箱中。培养条件为16h光照/8h黑暗交 替,湿度为60%,温度为(25±2)  $C/(20\pm2) CE/夜交$ 替,光强为50~60  $\mu$ mol/(m<sup>2</sup>·s),浇注适量的Hoagland营养液。待幼苗长至3叶1心时,使用盐胁迫 液(200 mmol/L NaCl)或碱胁迫液(100 mmol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 对幼苗进行胁迫。分别于0h、1d和3d,称取叶片 和根各25 mg,每个样本包含3个独立的生物重复, 立即投入液氮中冷冻,制备盐胁迫下叶(Leaf under salt stress, LS)、盐胁迫下根(Root under salt stress, RS)、碱胁迫下叶(Leaf under alkali stress,LA)、碱胁迫 下根(Root under alkali stress,RA)等样品,放于-80 C下储存备用。

### 1.10 ZmP5CS基因家族转录分析

使用EZ-10总RNA小量提取试剂盒[生工生物 工程(上海)股份有限公司,B618583]提取郑58和 昌 7-2 叶和根中的 RNA, 通过 MightyScript 第一链 cDNA 合成 Master Mix(gDNA digester)反转录试剂盒 [生工生物工程(上海)股份有限公司, B639252]反转 录获得 cDNA, 作为 qRT-PCR 的模板, 以玉米 UBI 作为内参基因。所用引物由Primer5.0设计,生工生 物工程(上海)股份有限公司合成(表1)。实时荧光定 量PCR反应在ABI7500实时荧光定量PCR仪(Applied Biosystems)中进行,预混液为2X SG Fast qPCR Master Mix(Low Rox)[生工生物工程(上海)股份有限 公司, B639272]。qRT-PCR 总反应体系为 20 µL, 10 µL 2×SG Fast qPCR Master Mix(Low Rox) 0.4 µL 上/下游引物(10 µmol/L)、1 µL cDNA 模板和 8.2 µL 无菌水。反应程序:95 ℃预变性3 min;95 ℃变性 30 s, 60 ℃退火加延伸 30 s, 共进行 40 个循环, 收集 荧光信号。采用2-----分析方法计算基因表达量,基 因的相对表达量使用(平均值±标准差)表示。

表1 本研究使用的引物列表

Table 1	List of	the	primers	used	in	this	study
			r				

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
ZmUBI-2_F	TGGTTGTGGCTTCGTTGGTT
ZmUBI-2_R	GCTGCAGAAGAGTTTTGGGTACA
ZmP5CS1-RT-F	CCTCTACAGCGGTCCACCTA
ZmP5CS1-RT-R	CACTGTTTGAAGCCACGAGA
ZmP5CS2-RT-F	ACGAGGTGATCCTTGTGA
ZmP5CS2-RT-R	CATCCAGCTCCATCTGTG
ZmP5CS3-RT-F	CCAAGCGATCCTCAGTCA
ZmP5CS3-RT-R	TGCCACCTCTTCCAACAC

### 2 结果与分析

### 2.1 玉米P5CS基因家族成员的筛选鉴定

为鉴定不同作物中的P5CS基因家族成员,以拟 南芥2个P5CS基因家族成员的氨基酸序列作为筛 选参照,通过本地BLASTp及PFAM结构域在玉米蛋 白数据库中筛选出3个玉米P5CS同源基因,命名为 ZmP5CS1、ZmP5CS2和ZmP5CS3。以此方式筛选出 其余作物P5CS基因家族成员如下:藜麦1个,高粱、 粗山羊草、乌拉尔图小麦、二穗短柄草、小花碱茅、水 稻、谷子、大麦各2个,圆锥小麦和苜蓿各3个,小麦 4个(表2)。

	Table	2 Copy numb	er of P5CS gene f	amily in 14 crops	including Zea	mays L.	个
基因名称	玉 米	拟南芥	水 稻	高 粱	谷 子	大 麦	小 麦
Gene name	Zea mays L.	Arabidopsis	Oryza sativa L.	Sorghum	Setaria	Hordeum	Triticum
		thaliana L.		bicolor L.	italica L.	vulgare L.	aestivum L.
P5CS1	2	1	1	1	1	1	2
P5CS2	1	1	1	1	1	1	2
Total	3	2	2	2	2	2	4
基因名称	乌拉尔图小麦	圆锥小麦	粗山羊草	二穗短柄草	小花碱茅	藜 麦	苜 蓿
Gene name	Triticum	Triticum	Aegilops	Brachypo	Puccinellia	Chenopodium	Medicago
	urartu	turgidum	tauschii	dium distachy on	tenuiflora	quinoa Willd.	truncatula
P5CS1	1	1	1	1	1	1	3
P5CS2	1	2	1	1	1	0	0
Total	2	3	2	2	2	1	3

表2 P5CS基因家族在玉米等14种作物中的拷贝数目

## 2.2 P5CS基因家族分子特征、理化性质分析及亚 细胞定位预测

为探究 ZmP5CS 基因家族的分子特征以及他们 在细胞内的功能,采用 ExPASy 工具来计算拟南芥和 玉米中 P5CS 家族每个基因的生化性质参数。结果 表明,P5CS 家族基因编码的绝大多数蛋白质都表现 出相似的分子特性(表3)。在 ZmP5CS 家族中,CDS 序 列的长度相对于拟南芥同源基因更长,其中最长的 为2 307 bp(*Zm00001d010056*),最短的为2 190 bp (*Zm00001d038358*)。这些基因家族成员编码的氨基 酸数量在 717 ~ 769。进一步观察 ZmP5CS 蛋白质成 员,他们的分子量在 79.12 ~ 83.50 kD,差异微乎其 微。这些蛋白质的等电点值位于 6.02~8.41。此 外,根据亲水性指数(GRAVY),他们的总平均值<0, 说明 ZmP5CS家族蛋白质具有亲水性质。不稳定性 系数(II)均<34,表明 ZmP5CS家族蛋白质具有一定稳 定性。为更深入地了解这些基因家族在细胞内的位 置,采用在线 WoLF粒子群优化算法来预测 ZmP5CS 基因家族的亚细胞定位。结果显示,*AtP5CS*基因的 产物全部定位在叶绿体上(chloroplast, chlo), *ZmP5CS*基因的产物全部定位在细胞质(cytoplasm, cyto)上,表明他们在玉米的生长发育和逆境响应过 程中可能发挥相似的功能。

表3	P5CS基因家族在拟南芥和玉米中的分子特征

Table 3 Molecular characterization of P5CS gene families in Arabidopsis thaliana and maize

-												
	基因ID	基因名称	染色体	蛋白质长度	编码区长度	DNA全长	外显子/	分子量	等电点	不稳定	总平均	亚细胞定位
	Gene ID	Gene name	Chr.	(aa)	(bp)	(bp)	内含子	(kD)	pI	系数	亲水性	Subcellular
				Protein length	CDS length	DNA length	Exon/intron	MW		Π	GRAVY	localization
	AT2G39800	AtP5CS1	2	717	2 154	5 156	20/19	77.70	5.89	33.53	-0.072	chlo
	AT3G55610	AtP5CS2	3	726	2 181	5 276	20/19	78.87	6.35	33.85	-0.092	chlo
	Zm00001d038358	ZmP5CS1	6	730	2 190	8 158	19/18	79.12	6.02	31.67	-0.043	cyto
	Zm00001d010056	ZmP5CS2	8	769	2 307	10 884	19/20	83.50	6.23	29.12	-0.054	cyto
	Zm00001d012391	ZmP5CS3	8	756	2 268	7 973	21/20	82.45	8.41	32.65	-0.085	cyto
	Os05t0455500	OsP5CS1	5	717	2 151	7 011	19/19	77.75	6.37	33.02	-0.060	cyto
	Os01t0848200	OsP5CS2	1	736	2 208	9 866	20/20	79.51	6.10	23.35	-0.058	cyto

### 2.3 系统发育分析

为进一步阐明P5CS家族基因的分子进化和系统发育特征,利用禾本科植物和拟南芥的P5CS基因的氨基酸序列构建无根系统发育树,确定玉米与其他植物的P5CS基因的亲缘关系(图1)。结果显示,P5CS1和P5CS2两个较大的分支,P5CS1分支包括Zm00001d038358与Zm00001d010056;P5CS2分支

包括*Zm00001d012391*。此外,通过对禾本科物种和 拟南芥中*P5CS*基因的氨基酸序列进行比对和分析, 发现*P5CS*基因在不同植物种类中具有一定的保守 性和相似性。另外,结合表1可以看出,P5CS基因 家族在不同作物中的拷贝数目不尽相同,这表明 P5CS基因家族在不同作物中可能发生了基因复制 和扩增的事件,从而导致了拷贝数目的差异。



注:进化树中不同颜色区域代表不同分支:浅灰色、深灰色区域分别代表P5CS1、P5CS2分支。

Note: Different color regions represent different branches of the evolutionary tree: the light gray and dark gray regions represent *P5CS1* and *P5CS2* branches, respectively.

### 图1 拟南芥和玉米等14种作物P5CS基因家族的系统进化分析

Fig.1 Phylogenetic analysis of P5CS gene families in Arabidopsis and 14 crops including maize

### 2.4 基因结构及染色体定位



注:深色部分代表UTR 区域,浅色部分代表外显子,黑色线代表内含子。

Note: The dark color represents the UTR region, the light color represents the exon, and the black line represents the intron.

#### 图2 拟南芥、玉米、水稻和高粱 P5CS 的基因结构

Fig.2 Gene structures of P5CS of Arabidopsis, maize, rice and sorghum

由图2可以得出,玉米脯氨酸代谢家族基因在 基因结构上含有19~21个外显子,除了 Zm00001d012391(ZmP5CS3)含有21个外显子之外, 玉米脯氨酸代谢家族其他成员均有19个外显子,外 显子数量的差别可能导致家族成员基因功能差异。 外显子的长度和数量都比较相似,这表明这个基因 家族在进化中相对保守。为进一步了解这些基因在 基因组中的分布和排列情况,从玉米的GFF3文件 中提取了脯氨酸代谢家族成员染色体的位置和长度 信息,并进行了3个ZmP5CS基因的位置分析。结 果显示,Zm00001d010056(ZmP5CS2)和Zm00001d0-12391两个基因定位在8号染色体上。没有发现串 联重复的ZmP5CS基因,这为未来的功能研究提供 了重要线索。

### 2.5 顺式作用元件分析

转录因子可以与靶基因启动子区域的顺式作用 调控元件结合,进而调控靶基因的表达。为了预测 P5CS家族基因的转录因子以及家族基因可能参 与的响应途径,选取基因起始密码子(ATG)的上游 2000 bp区域序列用于预测富集的顺式作用元件 (CREs)。首先,除去常见的TATA-box、CAAT-box以 及那些未被定义的顺式元件。结果发现,启动子区 域包括3类应答元件:低温、干旱、脱水、创伤、防御 和应激、厌氧等非生物和生物胁迫应答元件;脱落 酸、水杨酸、茉莉酸甲酯、赤霉素、牛长素等植物激素 应答元件;分生组织表达调控、昼夜节律调控、大量 光响应等植物生长发育应答元件(图3)。ARE为厌 氧诱导元件;MYB为MYB结合位点;MYC为MYC结 合位点:STRE 为热休克蛋白相关元件:TC-rich repeats 为防御和应激响应元件; MBS 为干旱响应元 件:WUN-motif 为创伤响应元件:DRE core 为于旱和 高度盐胁迫响应元件;W box 为真菌诱导剂反应元 件,伤口反应元件:LTR 为低温响应元件:ABRE 为 脱落酸响应元件;MeJA(CGTCA-motif、TGACG-motif) 为茉莉酸甲酯响应元件;ERE 为乙烯反应元件; as-1为水杨酸响应的顺式作用元件;IAA(AuxRRcore) 为生长素响应元件;GA(GARE-motif、P-box) 为 赤霉素响应元件;SA(TCA-element) 为水杨酸响应元 件;TGA-element为叶黄素反应元件;Light responsiveness(AE-box, ATCT-motif, Box 4, G-box, I-box, MRE、Sp1、TCT-motif、GA-motif) 为光响应元件; CAT-box 为分生组织表达调控元件。





Fig.3 Analysis of cis-acting regulatory elements in the P5CS gene promoter region of Arabidopsis, maize, rice and sorghum

通过拟南芥、水稻、高粱和玉米 P5CS 基因家族 成员启动子区的顺式作用元件进行分析,结果显示, 在非生物和生物胁迫(Abiotic and biotic stresses)分类 中,含有大量参与细胞应激反应和免疫应答等生物 过程的 MYB 结合位点、促进 DNA 损伤修复的 MYC 结合位点、热休克蛋白相关元件(STRE),部分成员含 有厌氧诱导元件(ARE)、防御和应激响应(TC-rich repeats)、创伤响应(WUN-motif)、干旱和高盐度胁迫响 应(DRE core)、干旱响应(MBS)、伤口反应(W box)以及 低温响应(LTR)等元件,表明 P5CS 基因家族参与调 控植物的逆境胁迫反应。在植物激素应答(Phytohormone responsive)分类中,含有大量的脱落酸响应 (ABRE)、乙烯反应(ERE)、茉莉酸甲酯响应(CGTCAmotif、TGACG-motif)和氧化应激响应(as-1)等元件, 表明 P5CS 基因家族在激素调节方面起到一定作 用。在植物生长发育应答(Plant growth and development)分类中,含有大量的光响应元件(AE-box、 ATCT-motif、Box 4、G-box、I-box、MRE、Sp1、TCTmotif、GA-motif),含有少量的分生组织表达调控元 件(CAT-box)。

在玉米中, ZmP5CS1、ZmP5CS2、ZmP5CS3都含 有1个ARE, 无WUN-motif。ZmP5CS1具有较多的 MYC、STRE、MBS和LTR以及较少的MYB、TC-rich repeats和W box; *ZmP5CS2*具有较多MYC和STRE 以及较少MYB和LTR; *ZmP5CS3*具有大量MYB、MYC和STRE以及较少的MBS、DRE core、W box和LTR。综上, *ZmP5CS*基因在参与调控植物发育和非生物胁迫应答过程中存在潜在机制。

### 2.6 保守基序分析及共线性分析

为深入了解ZmP5CS基因家族的功能和结构, 利用MEME在线工具对ZmP5CS基因家族编码的氨 基酸序列进行深入的分析,进行保守结构域的预测 (图4)。通常情况下,如果氨基酸残基在进化过程中 是保守的,那么可以认为他们在功能或结构上具有 重要作用。本研究设置了预测基序的长度范围为 5~60个氨基酸。研究发现,图中所预测的10个保 守结构域都表现出高度的同一性。所有结构域在 *ZmP5CS*的3个成员中都得到了体现,这与拟南芥中 的结构域分布相似,证明了这些结构域在进化中相 对保守。这一结果强烈暗示这些结构域在基因的功 能或结构方面扮演着非常重要的角色。



Fig.4 Sequence analysis of conserved bases of proline metabolism gene family members of Arabidopsis, maize, rice and sorghum

为更深入地了解不同植物物种之间 P5CS 基因的演化和功能关系,利用 TBtools 软件分析玉米与拟南芥、水稻以及高粱基因组之间的共线性关系,结果显示,玉米 P5CS 家族成员之间存在两对共线性关系(图 5)。玉米中的两个 P5CS 基因与拟南芥中的1个 P5CS 基因构成了两对共线性关系,表明他们之间存

在一定的同源关系; 玉米中的3个P5CS 基因与水稻、高粱中的两个P5CS 基因构成了6对共线性关系, 这说明玉米与水稻、高粱在P5CS 基因上具有较为密切的同源关系(图6)。分析结果表明, 玉米与单子叶植物水稻和高粱的P5CS 基因之间亲缘关系更为接近。







### 2.7 进化选择压力分析

为评估在进化过程中对玉米的选择压力,使用 玉米种间P5CS家族的同源基因对来计算Ka(非同义 变异率)、Ks(同义变异率)以及Ka/Ks的值。结果表 明,玉米P5CS基因家族的所有基因的Ka/Ks值都远 小于1.00(表4),意味着ZmP5CS家族基因可能经历

了非常强的负向选择来维持他们的功能,表明这些 基因在进化过程中具有高度的保守性、结构稳定性 和功能一致性。此外,为了解玉米P5CS基因家族的 演化历史,还计算了散度时间(T)。玉米3个P5CS基 因之间的分离发生在22~88百万年前。

	Table 4 H	Evolutionary selection p	ressure of maize P5CS	gene family	
基因1	基因2	非同义变异率	同义变异率	V IV	散度时间
Gene1	Gene2	Ka	Ks	Ka/Ks	Т
ZmP5CS1	ZmP5CS2	0.05	0.29	0.17	22.60
ZmP5CS1	ZmP5CS3	0.19	1.00	0.19	77.14
ZmP5CS2	ZmP5CS3	0.17	1.15	0.15	88.24

表4 玉米P5CS基因家族进化选择压力

### 2.8 蛋白质互作网络分析及二级结构预测



为了进一步确定哪些蛋白质可能与玉米 P5CS 的3个基因家族成员相互作用,本研究基于已知的 实验或预测的相互作用,使用 STRING 数据库构建 了玉米中蛋白质相互作用网络。图中共有11个蛋 白以不同功能划分可分为3种,ZmP5CS1 (A0A1D6M5N6)、ZmP5CS2(A0A1D6FNZ7) 和 ZmP5CS3(A0A1D6G8E7)、肽酶 C45(A0A1D6MFD7)、 P5CR (Q4TZJ2)、A0A1D6ELM0与脯氨酸生物合成过 程有关;鸟氨酸氨基转移酶(A0A1D6KX35)和肽酶 C45(A0A1D6MFD7)参与了精氨酸分解为脯氨酸和 谷氨酸的过程;胸苷酸合酶(A0A1D6F5H8)和二氢叶 酸还原酶(A0A1D6KCE1)参与单磷酸核苷生物合成 过程,与GMP合酶(C0PH60)一起参与胸苷酸生物合 成过程。由图7可知,ZmP5CS家族3个蛋白与其余 8种蛋白都存在互作关系。

为更深入地了解基因家族的蛋白质结构特征, 对 ZmP5CS基因家族的所有成员进行了二级结构预 测,并发现了其二级结构的重要信息(表 5)。在 ZmP5CS基因家族中,蛋白质的二级结构主要由α-螺旋和无规则卷曲结构组成,而扩展链结构和β-转 角结构所占比例较小。具体来说,α-螺旋结构的比 例为41.41%~47.15%,β-转角的比例在9.40%~ 10.43%,无规则卷曲的比例为25.56%~26.89%。这 些结果表明,α-螺旋是ZmP5CS基因家族中二级结 构的主要组成部分,占据了主导地位。

表5	玉米P5CS蛋白的二级结构	

Table 5 The secondary structure of P5CS proteins in maize

%

蛋白质名称	α-螺旋	扩展链结构	β-转角	无规则卷曲
Protein name	Alpha helix	Extend strand	Beta turn	Random coil
ZmP5CS1	41.70	20.99	10.43	26.89
ZmP5CS2	41.41	22.66	9.77	26.17
ZmP5CS3	47.15	17.88	9.40	25.56

2.9 基因表达验证

通过qRT-PCR方法,分别对盐碱胁迫下郑58

(抗)和昌7-2(感)的ZmP5CS基因家族的3个基因表达进行分析。图8结果显示,①盐胁迫下,ZmP5CS1



### 图8 盐碱胁迫下玉米中P5CS基因家族基因的差异表达

Fig.8 Differential expression of P5CS gene family in maize under salt or alkali stress

33卷

基因表达(图8A、8C),郑58叶部0→1d上调、1→3d 几乎不变,根部0→1 d略微下调、1→3 d显著上调: 昌7-2叶部0→1d略微上调、1→3d显著下调至低 于0 d水平,根部0→1 d下调、1→3 d显著上调。碱 胁迫下 ZmP5CS1 基因表达(图 8B、8D), 郑 58 叶部和 根部0 d→3 d 持续上调:昌7-2 叶部0 d→3 d 持续上 调,根部0→1d下调、1→3d几乎不变。盐碱胁迫 下,郑58和昌7-2的ZmP5CS1基因表达整体呈上调 趋势,且与对照相比3d上调程度根部高于叶部,起 始表达量昌7-2均高于郑58。②盐胁迫下, ZmP5CS2基因表达(图8E、8G),郑58叶部0→1d几 平不变、1→3d显著下调,根部0→1d显著下调、1→ 3 d 略微下调;昌7-2 叶部0→1 d 下调、1→3 d 几乎不 变,根部0→1 d略微上调、1→3 d显著下调至低于0 d 水平。碱胁迫下ZmP5CS2基因表达(图8F、8H),郑58 叶部0→1 d下调、1→3 d略微上调至低于0 d水平, 根部0→3 d持续显著下调;昌7-2叶部0→3 d持续 显著上调、根部0→1d略微下调、1→3d下调。盐碱 胁迫下,郑58和昌7-2的ZmP5CS2基因表达整体呈 下调趋势,起始表达量郑58均高于昌7-2且根部差 异明显。③盐胁迫下, ZmP5CS3基因表达(图 8I、 8K), 郑58叶部0→1d略微下调, 1→3d略微上调至 低于0 d水平,根部0→3 d持续显著上调;昌7-2叶 部0→1 d略微上调,1→3 d略微下调至低于0 d水 平,根部0→1d显著上调,1→3d显著下调至高于0d 水平。碱胁迫下 ZmP5CS3 基因表达(图 8J、8L),郑58 叶部0→3 d持续显著上调,根部0→1 d显著上调, 1→3 d显著下调至高于0 d水平;昌7-2叶部0→3 d 持续显著上调,根部0→1d显著上调,1→3d显著下 调至高于0 d水平。盐碱胁迫下,郑58和昌7-2的 ZmP5CS3基因表达整体呈上调趋势,且与对照相比 胁迫后上调程度根部明显高于叶部,起始和胁迫后 表达量昌7-2均高于郑58且叶部差异明显。盐碱胁 迫下, ZmP5CS1和ZmP5CS3基因上调表达, 昌7-2 起始表达量均高于郑58,猜测是其盐碱敏感的根源 所在。尽管ZmP5CS2基因下调表达,鉴于材料间基 因表达差异不显著,判定该基因与材料耐性差异无 关。此外,与对照相比胁迫后根部以及碱比盐胁迫 表达强烈。

3 结论与讨论

## 3.1 生物信息学分析为P5CS基因家族提供了系统的解释

*P5CS*基因在植物响应各种胁迫的生物化学和 生理过程中起关键作用<sup>[42-43]</sup>。因此,研究 P5CS 基因 家族在不适生态环境中的功能,可以为植物适应机 制提供有价值的信息。为避免单个基因突变导致致 命缺陷的可能性,植物中许多关键酶具有重复的关 键基因。基因复制在避免致死突变的同时,通常伴 随着序列改变而导致转录调控的改变,促进功能分 化的进化<sup>[44]</sup>。本研究拟南芥两个P5CS基因家族成 员作为参照,鉴定出了3个玉米,1个藜麦,高粱、粗 山羊草、乌拉尔图小麦、二穗短柄草、小花碱茅、水 稻、谷子、大麦各2个,圆锥小麦和苜蓿各3个,4个 小麦P5CS基因家族成员,他们共同具备了氨基酸激 酶(AA kinase domain)和醛脱氢酶(Aldedh domain)结 构域。家族成员数量的变化是由于*P5CS*基因在不 同作物中发生了基因复制或扩增。基因复制是产生 新基因的重要机制,为物种产生新功能提供了演化 的动力<sup>[45]</sup>。

禾本科植物和拟南芥的 P5CS 基因的系统发育 分析表明,他们的基因结构和基序相对比较保守,在 不同的植物种类中,这些基因家族的功能存在一定 的相似性。此外,同一亚家族之中,拟南芥与藜麦和 苜蓿的同源基因聚在一起,这与双子叶植物的亲缘 关系一致,同时证明了三者基因家族功能的分化先 于物种的分化。玉米与其余植物蛋白聚集在一起, 这与禾本科单子叶植物的亲缘关系一致,其中玉米 与高粱、谷子和水稻的物种分化较晚。亚细胞定位 预测显示,ZmP5CS基因定位于细胞质上,这与脯氨 酸合成场所一致<sup>[46]</sup>。ZmP5CS基因在进化树中分布 不均匀,这可能是由于基因家族成员在演变过程中 发生了基因重排、基因复制和染色体重组等事件导 致了分散,但三者保守基序的高度同一性表示,他们 仍然保留了相似的序列特征和功能。结合进化选择 压力分析, ZmP5CS3与ZmP5CS2最早发生基因分 离,ZmP5CS1和ZmP5CS2之间基因分离滞后。由此 可见,玉米P5CS基因家族的演化最初是由ZmP5CS3 开始。内含子和外显子的变异对不同基因的进化至 关重要[47-48], ZmP5CS基因结构不同数量的外显子和 内含子,印证了ZmP5CS基因之间的进化关系。

顺式作用元件通过与转录因子结合,调控基因转录的精确起始和转录效率,在植物基因表达调控中扮演着重要的角色。ZmP5CS基因家族的启动子 区域含有响应干旱、低温、防御和应激、激素响应和 光响应相关的顺式作用元件,在高盐、干旱、低温、创 伤以及ABA等胁迫下,这些抗逆元件可能通过与特 定的转录因子结合,调控ZmP5CS基因的表达,从而 使玉米能够抵御各种非生物和生物胁迫。除此之 外,ZmP5CS3在参与环境适应性和响应应激的方面 比较突出,在响应干旱、低温和高度盐胁迫方面拥有 更复杂的机制。

# 3.2 转录水平分析揭示盐碱胁迫下 P5CS 家族基因差异变化

P5CS酶的活性代表了脯氨酸生物合成中的一 个限制速率的步骤,该步骤在P5CS转录水平上并通 过脯氨酸对P5CS基因的反馈抑制来控制。油菜中, BnP5CS1和BnP5CS2均会被盐和ABA诱导。水稻 中,OsP5CS1由盐、脱水和寒冷等胁迫诱导下基因表 达水平上升;OsP5CS2会受到盐胁迫和甘露醇处理 的影响。苜蓿中,MtP5CS2和MtP5CS3基因表达水 平被盐和干旱胁迫诱导增加,MtP5CS1基因是组成 型表达,不受外界环境影响。

对不同的植物、不同器官以及不同发育阶段研究发现,P5CS基因因生理条件及环境条件不同表达 有差异,他们可能在植物生长发育和应对胁迫时分 别起着不同的作用。在其他物种中,P5CS基因家族 的不同成员之间会存在器官差异性表达。拟南芥 中,AtP5CS1在大多数植物器官中表达,AtP5CS2主 要在活跃的细胞分裂区域表达;芦苇金丝雀草在盐 胁迫下,不同器官出现差异,在叶中P5CS的表达量 增加,而根中的表达水平降低;在高粱应对盐和干旱 时,SbP5CS1和SbP5CS2存在时空差异性表达, SbP5CS2为组成型表达基因,SbP5CS1基因在成熟 的营养和生殖器官中表达水平最高。

本研究通过对玉米脯氨酸合成代谢基因P5CS 在盐碱胁迫下的表达进行分析,得出P5CS基因在不 同品种、不同部位以及不同生长胁迫时间和不同胁 迫条件下的表达水平存在差异,他们可能在植物生 长发育过程中和应对环境胁迫时分别发挥着不同的 作用。结果表明,响应性ZmP5CS可能参与植物的 防御机制。ZmP5CS基因家族成员在盐碱胁迫下均 受到差异调控,表明ZmP5CS基因可能介导玉米的 植物防御机制,这与顺式作用元件分析结果一致。 目前,ZmP5CS基因在植物发育和防御过程中的生 物学功能尚不清楚,ZmP5CS基因家族的生物信息 学和表达分析为筛选候选基因提供了有价值的信 息,为进一步研究ZmP5CS基因家族的功能奠定了 基础,为通过调节P5CS基因家族的功能奠定了

#### 参考文献:

- ABDEL LATEF A A. Changes of antioxidative enzymes in salinity tolerance among different wheat cultivars[J]. Cereal Research Communications, 2010, 38: 43–55.
- [2] SHENG M, TANG M, CHEN H, et al. Influence of arbuscular mycor-

rhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress[J]. Mycorrhiza, 2008, 18: 287–296.

- [3] MISRA N, GUPTA A K. Effect of salt stress on proline metabolism in two high yielding genotypes of green gram[J]. Plant Sci., 2005, 2: 13.
- [4] KHAN M I R, IQBAL N, MASOOD A, et al. Variation in salt tolerance of wheat cultivars: role of glycinebetaine and ethylene[J]. Pedosphere, 2012, 22: 746–754.
- [5] YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOAKI K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses[J]. Annu. Rev. PlantBiol, 2006, 57: 781–803.
- [6] VERBRUGGEN N, HERMANS C. Proline accumulation in plants: a review[J]. Amino Acids, 2008, 35: 753–759.
- [7] SZABADOS L, SAVOURE A. Proline: a multifunctional amino acid[J]. Trends Plant Sci., 2010, 15: 89–97.
- [8] ANOOP N, GUPTA A K. Transgenic indica rice cv IR-50 overexpressing Vigna aconitifolia delta 1-pyrroline-5- carboxylate synthetase cDNA shows tolerance to high salt[J]. J. Plant Biochem. Biot, 2003, 12: 109-116.
- [9] HMIDA-SAYARI A, GARGOURI-BOUZID R, BIDANI A, et al. Overexpression of Δ1-pyrroline -5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants[J]. Plant Sci., 2005, 169: 746-752.
- [10] HU C A, DELAUNEY A, VERMA D S. A bifunctional enzyme(delta 1- pyrroline- 5- carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A, 1992, 89: 9354-9358.
- [11] ROOSENS N H, THU T T, ISKANDAR H M, et al. Isolation of ornithine-d-aminotransferas cDNA and effect of salt stress on its expression in Arabidopsis thaliana[J]. Plant Physiol, 1998, 117: 263– 271.
- [12] ARMENGAUD P, THIERY L, BUHOT N, et al. Transcriptional regulation of proline biosynthesis in Medicago truncatula reveals developmental and environmental specific features[J]. Physiol. Plant, 2004, 120: 442–450.
- [13] CHEN J B, YANG J W, ZHANG Z Y, et al. Two P5CS genes from common bean exhibiting different tolerance to salt stress in transgenic Arabidopsis[J]. J. Genet, 2013, 92(3): 461–469.
- [14] GUAN C, JI J, GUAN W, et al. A Lycium chinense-derived P5CSlike gene is regulated by water defcit-induced endogenous abscisic acid and overexpression of this gene enhances tolerance to water defcit stress in Arabidopsis[J]. Mol. Breed, 2014, 34: 1109–1124.
- [15] ANTON D B, GUZMAN F L, VETÖ N M, et al. Characterization and expression analysis of P5CS(D1-pyrroline-5-carboxylate synthase) gene in two distinct populations of the Atlantic forest native species Eugenia unifloral[J]. Mol. Biol. Rep, 2020, 47: 1033-1043.
- [16] FUJITA T, MAGGIO A, GARCIA-RIOS M, et al. Comparative analysis of the regulation of expression and structures of two evolutionarily divergent genes for D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase from tomato[J]. Plant Physiol, 1998, 118: 661-674.
- [17] YOSHIBA Y, KIYOSUE T, KATAGIRI T, et al. Correlation between the induction of a gene for delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in Arabidopsis thaliana

- [18] SZÉKELY G, ABRAHÁM E, CSÉPLO A, et al. Duplicated P5CS genes of Arabidopsis play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthe sis[J]. Plant J., 2008, 53: 11–28.
- [19] SZABADOS L, SAVOURÉ A. Proline: a multifunctional amino acid[J]. Trends Plant Sci., 2010, 15: 89–97.
- [20] FABRO G, KOVACS I, PAVET V, et al. Proline accumulation and AtP5CS2 gene activation are induced by plant – pathogen incompatible interactions in Arabidopsis[J]. Mol. Plant Microbe Interact, 2004, 17: 343–350.
- [21] STRIZHOV N, A' BRAHA'M E, O" KRE' SZ L, et al. Differential expression of two P5CS genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by ABA1, ABI1 and AXR2 in Arabidopsis[J]. Plant J., 1997, 12: 557–569.
- [22] KUMAR V, SHRIRAM V, KISHOR P, et al. Enhanced proline accumulation and salt stress tolerance of transgenic indica rice by over-expressing P5CSF129A gene[J]. Plant Biotechnol Rep, 2010, 4: 37-48.
- [23] GUAN C, CUI X, LIU H Y, et al. Proline biosynthesis enzyme genes confer salt tolerance to switchgrass(*Panicum virgatum* L.) in cooperation with polyamines metabolism[J]. Front. Plant Sci., 2020, 11: 46.
- [24] YANG D, NI R, YANG S, et al. Functional characterization of the Stipa purpurea P5CS gene under drought stress conditions[J]. Int. J. Mol. Sci., 2021, 22: 9599.
- [25] WANG L, GUO Z, ZHANG Y, et al. Characterization of Lh-SorP5CS, a gene catalyzing proline synthesis in oriental hybrid lily Sorbonne: molecular modelling and expression analysis[J]. Bot. Stud, 2017, 58(1): 10.
- [26] FAROOQ M, HUSSAIN M, WAKEEL A, et al. Salt stress in maize: effects, resistance mechanisms, and management[J]. A Review. Agronomy for Sustainable Development, 2015, 35(2): 461–481.
- [27] ARTIMO P, JONNALAGEDDA M, ARNOLD K, et al. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal[J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40: 597-603.
- [28] HORTON P, PARK K J, OBAYASHI T, et al. WoLF PSORT: protein localization predictor[J]. Nucleic Acids Research, 2007, 35: 585–587.
- [29] YU C S, LIN C S, HWANG J K. Predicting subcellular localization of proteins for Gram-negative bacteria by support vector machines based on n-peptide compositions[J]. Protein Science, 2004, 13: 1402–1406.
- [30] PETERSEN T, BRUNAK S, VON HEIJNE G, et al. SIGNALP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions[J]. Nat Methods, 2011, 8: 785–786.
- [31] SZKLARCZYK D, GABLE A L, LYON D, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47: 607–613.
- [32] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Molecu-

lar Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1870–1874.

- [33] DAVIDSON R, MARTÍN DEL CAMPO A. Combinatorial and computational investigations of Neighbor–Joining bias[J]. Frontiers in Genetics, 2020, 11: 584785.
- [34] KUMAR S, STECHER G, LI M, et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. Molecular Biology and Evolution, 2018, 35: 1547–1549.
- [35] LETUNIC I, BORK P. Interactive tree of life(iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation[J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49: 293–296.
- [36] CHEN C, CHEN H, ZHANG Y, et al. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. Molecular Plant, 2020, 13: 1194–1202.
- [37] LESCOT M, DÉHAIS P, THIJS G, et al. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences[J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30: 325–327.
- [38] BAILEY T L, BODEN M, BUSKE F A, et al. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching[J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37: 202–208.
- [39] MORTON B R, GAUT B S, CLEGG M T. Evolution of alcohol dehydrogenase genes in the palm and grass families[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996, USA 93: 11735–11739.
- [40] QURAISHI U M, ABROUK M, MURAT F, et al. Cross-genome map based dissection of a nitrogen use efficiency ortho-meta QTL in bread wheat unravels concerted cereal genome evolution[J]. Plant Journal, 2011, 65: 745-756.
- [41] 郭 虎.玉米幼苗鉴定仪[P].中国专利:ZL200920177285.0, 2010-04-11.
- [42] CHEN J B, YANG J W, ZHANG Z Y, et al. Two P5CS genes from common bean exhibiting different tolerance to salt stress in transgenic Arabidopsis[J]. J. Genet, 2013, 92(3): 461–469.
- [43] YANG D, NI R, YANG S, et al. Functional characterization of the Stipa purpurea P5CS gene under drought stress conditions[J]. Int. J. Mol. Sci., 2021, 22: 9599.
- [44] BRIGGS G C, OSMONT K S, SHINDO C, et al. Unequal genetic redundancies in Arabidopsis- aneglected phenomenon[J]. Trends Plant Sci., 2006, 11: 492–498.
- [45] MAGADUM S, BANERJEE U, MURUGAN P, et al. Gene duplication as a major force in evolution[J]. Journal of Genetics, 2013, 92: 155-161.
- [46] ELTHON T E, STEWART C R. Submitochondrial location and electron transport characteristics of enzymes involved in proline oxidation[J]. Plant Physiol, 1981, 67: 780–784.
- [47] MUSTAFIN R N, KHUSNUTDINOVA E K. The role of transposable elements in the ecological morphogenesis under the influence of stress[J]. Vavilov Journal of Genetics and Breeding, 2019, 23(4): 380–389.
- [48] ROGERS J H. The role of introns in evolution[J]. FEBS Lett, 1990, 268(2): 339–343.

(责任编辑:朴红梅)