

小麦中小 GTP 结合蛋白基因 *TaRop2* 克隆及其表达分析

李媛媛, 安艳秋, 王凤涛, 冯 晶, 蔺瑞明, 陈万权, 徐世昌

(中国农业科学院植物保护研究所/植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193)

摘要: 小 GTP 结合蛋白属于 Rho 家族, 是植物特有的一类蛋白, 在调控植物生长发育、抗逆和抗病过程中发挥着重要的作用。本研究通过筛选非亲和条锈菌小种 CYR32 侵染诱导的抗条锈病基因 *Yr5* 近等基因系 (Taichung29 * 6/*Yr5*) cDNA 文库, 分离获得 1 个 Rop 家族基因的全长 cDNA 序列, 命名为 *TaRop2* (*Triticum aestivum Rop2*)。 *TaRop2* 包含 1 个 591 bp 的开放阅读框, 预测编码含 197 个氨基酸残基的蛋白质, 分子量为 21.52 kD, 理论等电点为 9.49。通过在烟草表皮细胞瞬时表达, 发现 *TaRop2* 分布于细胞核内和细胞膜上。RT-PCR 分析结果表明, 在高盐处理、非亲和条锈菌小种 CYR32 和亲和混合白粉菌菌株侵染时, *TaRop2* 基因的表达水平升高, 但被干旱、高温、低温和 ABA 处理抑制。说明 *TaRop2* 可能参与小麦防卫和抗逆反应过程。

关键词: 小麦; 条锈菌; 小 GTP 结合蛋白; 防卫反应; 胁迫反应

Cloning and Expression Analysis of *TaRop2* Gene Encoding a Small GTP-binding Protein in Common Wheat

LI Yuan-yuan, AN Yan-qiu, WANG Feng-tao, FENG Jing, LIN Rui-ming, CHEN Wan-quan, XU Shi-chang

(State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests/ Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193)

Abstract: The small GTP-binding proteins belonging to the Rho (Rho-related proteins of plant) family are plant-specific and play important roles in regulating plant development, stress tolerance, and defense responses. In this study, a full-length cDNA sequence encoding a Rop protein was isolated by screening the cDNA library of the wheat stripe rust resistance gene *Yr5* near-isogenic line (Taichung29 * 6/*Yr5*) infected by an incompatible race CYR32 of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, and was designated *TaRop2* (*Triticum aestivum Rop2*). It contained a 591 bp open reading frame and was predicted to encode a 197 amino acids, which molecular weight was about 21.52 kD with theoretical isoelectric point (pI) was 9.49. It was found that *TaRop2* were mainly distributed in nucleus and membrane of the transformed tobacco epidermal cell through transient expression experiment. By RT-PCR expression analysis, *TaRop2* expression level was increased after salt treatment or inoculation with incompatible race of stripe rust pathogen and compatible mixed powdery mildew strains, but suppressed by drought, heat, cold, and ABA. Based on these results, we proposed that *TaRop2* might be involved in the wheat defence and stress responses.

Key words: wheat; *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*; small GTP-binding protein; defence responses; stress response

GTP 结合蛋白 (GTP-binding proteins) 是能结合并水解鸟嘌呤核苷三磷酸 (GTP) 的一类蛋白总称,

包括小 GTP 结合蛋白、异三聚体 GTP 结合蛋白和一些其他特殊的 GTP 结合蛋白^[1]。小 GTP 结合蛋白

收稿日期: 2014-04-18 修回日期: 2014-05-06 网络出版日期: 2015-02-06

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20150206.1643.015.html>

基金项目: 国家“973”项目 (2013CB127700); 国家自然科学基金项目 (31171838, 31261140370, 31272033)

第一作者研究方向为分子植物病理学。E-mail: liyuanyuan_0212@126.com

通信作者: 蔺瑞明, 研究方向为分子植物病理学。E-mail: rmlin@ippcaas.cn

不同于异三聚体 G 蛋白,是一类相对分子量为 20 ~ 40 kD 的单体 GTP 结合蛋白,简称小 G 蛋白,具有 ATPase 活性^[1]。小 GTP 结合蛋白由 Ras、Rab、Arf、Ran 和 Rho^[2] 5 个家族组成,该类蛋白能被 GTP 激活而被 GDP 抑制,与异三聚体 G 蛋白的 G α 亚基类似,是真核细胞信号传导过程中的分子开关^[3],参与了多种生命活动过程,如细胞增殖、细胞骨架的形成和组装、膜系统运输、基因表达调控等^[4-5]。目前,已经在真核生物中发现了数百个小 GTP 结合蛋白^[6-7]。Rho 蛋白由 RHO、Rac 和 Cdc42 亚家族组成,是植物细胞信号传导过程的重要组成部分。从植物中分离获得的 Rho 家族相关的小 GTP 结合蛋白组成了一个植物中特有的小 GTP 结合蛋白家族,即 Rop 蛋白(Rho-related proteins of plant)家族^[8-9]。

从豌豆中分离获得了第一个 Rop 基因 *RhoIPs*^[10],之后从拟南芥^[11]、玉米^[12]、水稻^[13]、大麦^[14]、大豆^[15]和苜蓿^[16]等植物中均分离得到了 Rop 家族基因。Rop 家族蛋白在植物生长发育、外源激素胁迫和逆境胁迫等几个方面具有调控功能,如超量表达 *AtRac2* 和 *AtRop1* 能促进转基因拟南芥的花粉管伸长生长^[17],IAA 胁迫处理提高了烟草和拟南芥幼苗中 Rop 基因表达水平^[18-19],超量表达水稻 Rop 家族基因 *OsRacB* 能提高转基因植株的耐盐能力^[20]。此外,Rop 蛋白在各种植物中通过不同途径参与调控植物对病原物的抗性。*OsRac1* 基因在水稻抗稻瘟病过程中起正调控作用,而 *OsRac4* 与 *OsRac5* 基因却对稻瘟病菌的抗病性起负调控作用^[21]。在大麦中,HvRACB、HvRAC1 和 HvRAC3 蛋白参与了生长发育和病原菌反应的调控过程^[22-24]。另外,非活化形式的 *AtRop6* 突变体能提高拟南芥对白粉病菌的抗性水平,而这种抗性的产生与水杨酸(SA)信号途径有关^[25]。因此,Rop 蛋白在植物抗病反应过程中发挥着重要调控作用。

小麦是一种主要的粮食作物,条锈病和白粉病是小麦上具有破坏性的真菌病害,特别是小麦条锈病在我国频繁发生,造成了严重的产量损失^[26]。包括高温、干旱和盐等环境胁迫对小麦产量也造成了影响。培育抗性品种是提高小麦产量切实可行的途径之一。小麦基因组中抗性相关基因研究将对培育小麦抗病品种具有一定理论参考价值。Rop 家族蛋白是植物抗性防御过程中非常重要的一类调节因子。在本研究中,从小麦抗条锈病基因 *Yr5* 近等基因系分离获得编码 Rop 蛋白的 *TaRop2* 基因全长 cDNA 序列,分析了该基因编

码的蛋白结构、亚细胞定位以及小麦与条锈菌互作过程和非生物胁迫反应中的表达特征,为进一步研究其功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

以抗条锈病基因 *Yr5* 的小麦近等基因系 Taichung29 * 6/*Yr5* 为供试材料,构建了非亲和条锈菌小种 CYR32 侵染诱导的 cDNA 文库,以上材料均为中国农业科学院植物保护研究所麦类病害组创制、收集和保存。试验中所需引物由北京三博远志生物技术公司合成,所用的 Easy Taq 酶、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、pEASY-T3 载体、大肠杆菌(*E. coli*) Trans1-T1 感受态细胞、质粒提取试剂盒和 RNA 反转录试剂盒均购自北京全式金生物技术公司,DNA 测序工作由北京博尚生物技术公司完成。构建 cDNA 文库试剂盒(ZAP Express cDNA Synthesis Kit)为美国 Stratagene 公司产品。

取温室(15 ~ 18 $^{\circ}$ C)培养 7 d 的 Taichung 29 * 6/*Yr5* 幼苗,并做如下处理:(1)将小麦幼苗根系置于 100 mmol/L NaCl 溶液中,胁迫处理 2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、24 h 和 48 h 后取样;(2)将小麦幼苗的根部土壤冲洗干净并用吸水纸吸去多余水分后,置于滤纸上,干旱胁迫处理 2 h、4 h、6 h、8 h 和 12 h 后取样;(3)将小麦幼苗置于 38 $^{\circ}$ C 光照培养箱中培养,分别于 1 h、4 h、6 h、8 h、16 h、24 h 和 36 h 后取样;(4)将小麦幼苗置于 4 $^{\circ}$ C 条件培养,分别于 1 h、3 h、6 h、12 h 和 24 h 后取样;(5)将小麦幼苗用 100 μ mol/L 脱落酸(ABA)溶液进行喷雾处理,1 h、3 h、6 h、12 h 和 24 h 后取样;(6)采用扫抹法接种非亲和条锈菌小种 CYR32,在 10 ~ 12 $^{\circ}$ C 条件下保湿 24 h,然后放置于日光温室(15 ~ 18 $^{\circ}$ C)^[27],在接种 4 h、8 h、12 h、16 h、24 h、36 h、48 h 和 72 h 后取样,取样后液氮速冻,-80 $^{\circ}$ C 保存备用;(7)采用扫抹法接种小麦白粉菌亲和混合菌系,在 18 ~ 20 $^{\circ}$ C 条件下保湿 24 h^[28],然后放置于日光温室(18 ~ 25 $^{\circ}$ C),于接种 4 h、7 h、10 h、16 h、24 h、32 h、40 h、48 h、72 h、96 h 和 120 h 后取样,以 0.025% (v/v) Tween20 处理的样品为叶面喷雾处理或接种条锈菌、白粉菌对照。用于目的基因表达分析。

1.2 方法

1.2.1 *TaRop2* 基因的 cDNA 序列克隆 以 *Yr5* 近等基因系的 cDNA 文库 λ DNA 为模板,利用 GenBank 数据库不同物种 Rop 基因编码的保守结构域

序列设计简并引物 Rop6R (5'-WCCACGGTAGCT-CAGAGGTC-3'),与 cDNA 文库载体左臂 T3 引物进行 PCR 扩增,获得 *TaRop2* 基因的 5'端部分 cDNA 片段,根据这段序列设计引物 TaRop2F (5'-GAGGGTCCAG-GTTCATAAAGT-3')与文库载体右臂 T7 引物进行 PCR 扩增,获得完整的 cDNA 序列。

1.2.2 *TaRop2* 基因的生物信息学分析 利用 DNAMAN 软件、SMART 在线工具 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 和 NCBI 在线工具推测 *TaRop2* 基因所编码的氨基酸序列,分析蛋白质基本性质和预测功能结构域;通过 HMM-TM (<http://www.bs.tu.k/services/TMHMMT-2.0/>) 和 PSORT (<http://wolfsort.org>) 在线工具分别预测分析 Rop 蛋白的跨膜结构和定位的亚细胞器;利用 GrainGenes 2.0 在线软件 (<http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml>) 分析该基因可能所在的染色体同源群。利用 ClustalX 和 Mega 4.0 软件采用 NJ 法对 Rop 蛋白家族亲缘关系进行分析,并预测本研究 Rop 家族蛋白可能具有的功能。聚类分析中所用 Rop 蛋白序列分别来自小麦 (*Triticum aestivum*) *TaRop2*; 大麦 (*Hordeum vulgare*) *HvRacB* (CAC83043)、*HvRac1* (CAD57743)、*HvRac3* (CAD57742) 和 *HvRop6* (CAD27894); 水稻 (*Oryza sativa*) *OsRacB* (AAF91343)、*OsRacD* (AAK27450)、*OsRac1* (BAA84492)、*OsRac4* (BAG87727)、*OsRac5* (BAG90452)、*OsRac6* (BAG94793) 和 *OsRac7* (Q6Z7L8); 玉米 (*Zea mays*) *ZmRacB* (AAD34356)、*ZmRop1* (AAD34355)、*ZmRop4* (AAD34358) 和 *ZmRop9* (AAO41290); 高粱 (*Sorghum bicolor*) XP_002453210; 大豆 (*Glycine max*) CBD27754 和 CBD27833; 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) *AtRac1* (AAB38780)、*AtRac2* (AAF40241)、*AtRac8* (AAF40247)、*AtRop1* (NP_190698) 和 *AtRop2* (AAC78391); 烟草 (*Nicotiana tabacum*) *NtRac1* (AAK31299)、*NtRac5* (CAB57818) 和 *NtRop1* (CAA10815); 野甘草 (*Scoparia dulcis*) *SdRac2* (ACM07419); 苜蓿 (*Medicago sativa*) *MsRac1* (CAB62075)、*MsRop5* (CAI84890) 和 CBD27833; 陆地棉 (*Gossypium hirsutum*) *GhRac1* (AAD47828)、*GhRac13* (AAB35093) 和 *GhRacA* (ABG66964)。

1.2.3 *TaRop2* 基因的亚细胞定位分析 设计带有 *SacI/KpnI* 酶切位点的引物,其序列分别为 *TaRop2SF*: 5'-AGAGCTCATGAGCGCGTCCAGGTTCA-3', *TaRop2SR*: 5'-AAGGTACCCAAGATGGAGCAAGCCCC-3', 下划线部分分别是 *SacI* 和 *KpnI* 酶切位点。以 pEASY-T3-*TaRop2* 质粒为模板进行 PCR 扩增获得 *TaRop2* 基因

编码区。将 PCR 产物用 *SacI/KpnI* 进行双酶切并连接至已进行相应酶切的载体 pCam35S:GFP 上,获得亚细胞定位重组表达载体 pCam35S:*TaRop2*-GFP,转入农杆菌感受态 EHA105 中,利用渗透法将含有表达载体 pCam35S:GFP 和 pCam35S:*TaRop2*-GFP 农杆菌悬浮液注入三生烟草叶表皮,在激光共聚焦显微镜下观察。

1.2.4 *TaRop2* 基因表达谱分析 利用 TRIZOL 法提取接种条锈菌和不同处理的小麦幼苗叶片总 RNA,并反转录成 cDNA。以小麦 Actin 为内参,利用 *TaRop2* 基因特异引物对不同处理的样品进行半定量 RT-PCR 扩增,分析该基因在不同胁迫条件下的表达情况。引物序列为 *Actin1*: 5'-GTTCCAATC-TATGAGGGATACACG C-3' 和 *Actin2*: 5'-GAACCTC-CACTGAGAACAACATTACC-3'; *TaRop2RTF*: 5'-TGTGGACCATCCTGGTGCT G-3' 和 *TaRop2RTR*: 5'-TAGGGTGGG GTAGGCTGAGG-3'。

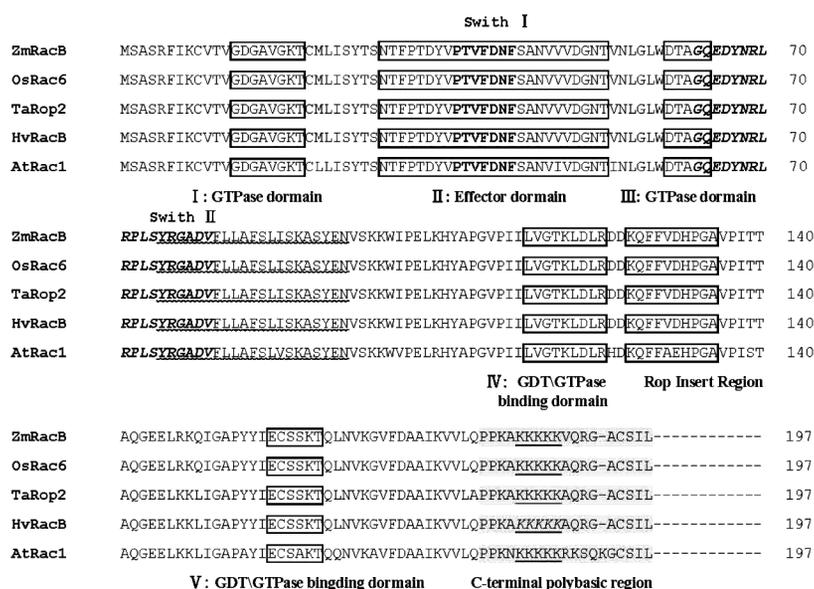
2 结果与分析

2.1 *TaRop2* 基因全长 cDNA 序列克隆

利用 Rop6R/T3 引物扩增获得 300 bp 大小的 cDNA 片段,与预期的目的条带大小相符,测序分析发现具有起始密码子,NCBI 数据库序列同源性比对分析发现,基因片段均与小 GTP 结合蛋白超家族中 Rop 蛋白家族的基因序列具有高度同源性,因此推测属于小麦 Rop 蛋白家族基因,并命名 *TaRop2* (*Triticum aestivum Rop2*)。在该 cDNA 片段基础上设计正向特异性引物 *TaRop2F*,与文库载体多克隆位点下游通用引物 T7 组合,进行目的基因全长 cDNA 序列扩增,获得特异 cDNA 片段。

2.2 *TaRop2* 基因生物信息学分析

2.2.1 序列分析 测序分析 *TaRop2* 基因的 cDNA 序列全长为 1015 bp,包含 1 个 591 bp 的开放阅读框,推测其编码含有 197 个氨基酸残基的蛋白质,分子量约为 21.52 kD,理论等电点为 9.49,为碱性蛋白。经与 *ZmRacB*、*OsRac6*、*HvRacB* 和 *AtRac1* 多重比对分析,发现 *TaRop2* 含有 5 个效应结构区 (GI ~ GV)、1 个 C 端多变区 (C-terminal polybasic region)、1 个核定位信号 (NLS) 基序 (KKKKK)、1 个 Rop 家族特有的 Rop 插入位点 (Rop Insert) 和 2 个能在 Rop 蛋白形成三维构象时使 4 个 DNA 结合位点结合在一起的开关 (Switch I、Switch II) (图 1)。利用 PSORT (<http://wolfsort.org>) 在线工具进行亚



框内序列为 Rop 家族蛋白效应结构区 G I ~ G V 和 Rop 插入位点, SwiCh I 为黑体部分表示, SwiCh II 为黑体并斜体部分表示, 跨膜基序为下划线曲线部分表示, 阴影部分表示 C 末端多变区, 阴影并下划线部分为核定位信号区

Domains I - V and Rop insert region are boxed respectively, SwiCh I is shown in bold and swiCh II in bold and italic.

Transmembrane motif is underlined with a curved line, and C-terminal polybasic region is highlighted in gray,

which contained a conserved NLS(KKKKK) underlined

图 1 TaRop2 与 ZmRacB, OsRac6, HVRacB 和 AtRac1 氨基酸序列多重比对分析

Fig. 1 Multiple amino acid sequence alignment of TaRop2 with ZmRacB, OsRac6, HVRacB, and AtRac1

细胞定位预测分析, 结果显示, TaRop2 蛋白分布于细胞核的可能性最大, 其概率为 0.895。将 TaRop2 序列与小麦基因组序列进行比对, 发现 TaRop2 序列与 GrainGenes 2.0 数据库中编号为 BE500768 的 EST 序列具有高度的同源性, 同时已确定 BE500768 序列位于 6AS、6BS 和 6DS 染色体上, 由此推断 TaRop2 基因可能位于小麦基因组的第 6 染色体组短臂同源群上。

2.2.2 TaRop2 蛋白的聚类分析 将小麦 TaRop2 蛋白与单子叶植物水稻、玉米、大麦、高粱以及双子叶植物拟南芥、烟草、苜蓿、大豆、野甘草和陆地棉中已克隆的 Rop 家族蛋白进行聚类分析, 并对该蛋白家族进行初步分类。聚类分析结果发现, 可将植物 Rop 家族成员分为 2 个亚家族, 即组 I 和组 II (图 2)。TaRop2 蛋白属于组 I, 分析聚类图谱右侧标注的已知蛋白功能发现, 组 I 成员参与植物抗逆、抗病和植物发育过程, 而组 II 蛋白成员只参与植物发育和抗病防卫反应过程。由此可推测, TaRop2 蛋白可能在小麦发育和抗病过程中发挥重要作用。此外, TaRop2 蛋白可能还具有调控小麦抗逆反应的功能。

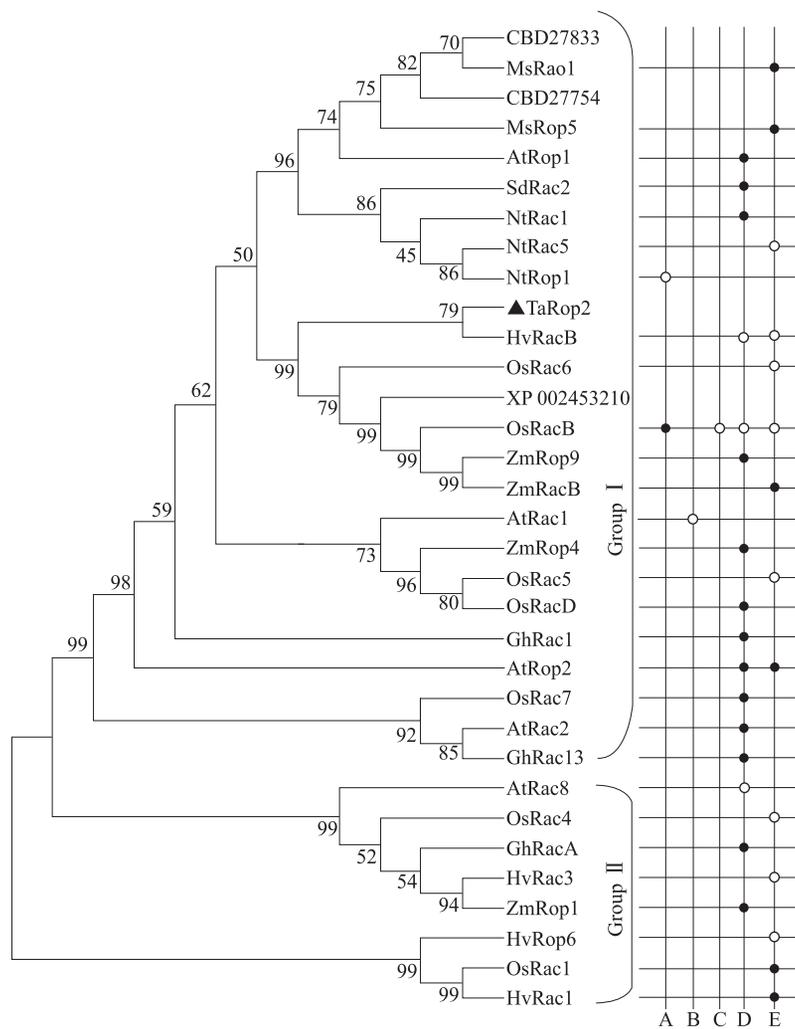
2.3 TaRop2 蛋白亚细胞定位分析

为了研究 TaRop2 蛋白在亚细胞器中的分布情

况, 分别将含有表达载体 pCam35S:GFP 和 pCam35S:TaRop2-GFP 农杆菌悬浮液注入三生烟草叶片, GFP 和融合蛋白 TaRop2-GFP 在烟草表皮细胞中瞬时表达, 并在激光共聚焦显微镜下观察绿色荧光在细胞中的分布情况。结果表明, 转入空载体对照 pCam35S:GFP 的烟草叶表皮细胞内各部分均充满绿色荧光, 而在转入表达融合蛋白载体 pCam35S:TaRop2-GFP 的烟草叶表皮细胞内绿色荧光只出现于细胞膜和细胞核, 在细胞质中分布量很少 (图 3)。由此可以确定 TaRop2 是位于细胞膜和细胞核的蛋白。

2.4 TaRop2 基因的表达谱分析

利用 RT-PCR 分析了在不同环境胁迫和病原菌侵染条件下 TaRop2 基因的表达动态。TaRop2 基因在 NaCl 胁迫后表达上调, 0 h 时的表达水平最低, 随后其表达量开始上升, 6 h 时表达量约为对照 (0 h) 的 10 倍左右, 随后开始出现短暂下降现象, 处理 24 h 时达到最大峰值, 约为对照的 15 ~ 20 倍, 直到处理 48 h 后仍保持较高的表达水平 (图 4A)。当小麦幼苗在干旱、高温 (38℃) 和脱落酸 ABA (100 μmol/L) 处理后, TaRop2 基因的表达水平比对照明显下降 (图 4B、C、E)。在



图左侧部分为 Rop 蛋白聚类分析,图右侧部分为 Rop 蛋白的生物学功能统计结果。Rop 蛋白被分为组 I 和组 II。A:参与盐胁迫反应; B:参与干旱胁迫反应;C:参与伤害胁迫反应;D:参与调控植物生长发育;E:参与调控植物抗病性反应。

实心圆表示基因正向调控功能,空心圆表示基因负调控功能

The cluster analysis results of Rop proteins was shown on the left, and the statistic results of the function-known Rop proteins were listed on the right. Rop proteins were divided into group I and group II according to the previous results.

The function - known Rop genes listed were involved in stress responses to salt (A),

drought (B) and wounding (C), or play roles in plant development (D) or defense response (E).

The filled and empty circle represent the gene's positive and negative regulation functions, respectively

图 2 *TaRop2* 蛋白的聚类分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of *TaRop2* protein

低温处理条件下, *TaRop2* 基因的表达也呈现了一个下降的趋势(图 4D)。接种非亲和条锈菌小种 CYR32, *TaRop2* 基因在处理 8 h 后表达水平最高, 然后表达量逐渐下降, 72 h 时检测不到该基因的表达(图 4F)。在接种亲和白粉菌混合菌株 24 h 后其表达水平到达最大峰值, 而后出现下降趋势, 但在接种 40 h 和 48 h 后基因的表达水平又有所增加, 之后 *TaRop2* 基因的表达明显下降(图 4G)。表达谱分析表明, *TaRop2* 基因参与了小麦抗逆和抗病反应过程。

3 讨论

Rop 蛋白组成了一个植物特有的小 GTP 结合蛋白家族, 具有调控植物发育、信号传导以及生物和非生物胁迫反应等过程。本研究克隆并分析了 *TaRop2* 基因的表达特征及其编码的蛋白结构。同源比对分析发现, *TaRop2* 与大麦 *HvRacB* 相似性最高, 并与来自水稻和玉米的 Rop 蛋白具有较高的相似性。*TaRop2* 蛋白所在的组 I 成员中包括来自单子叶和双子叶植物的 Rop 蛋白, 包含 4 个具有 GTP 酶活性和用

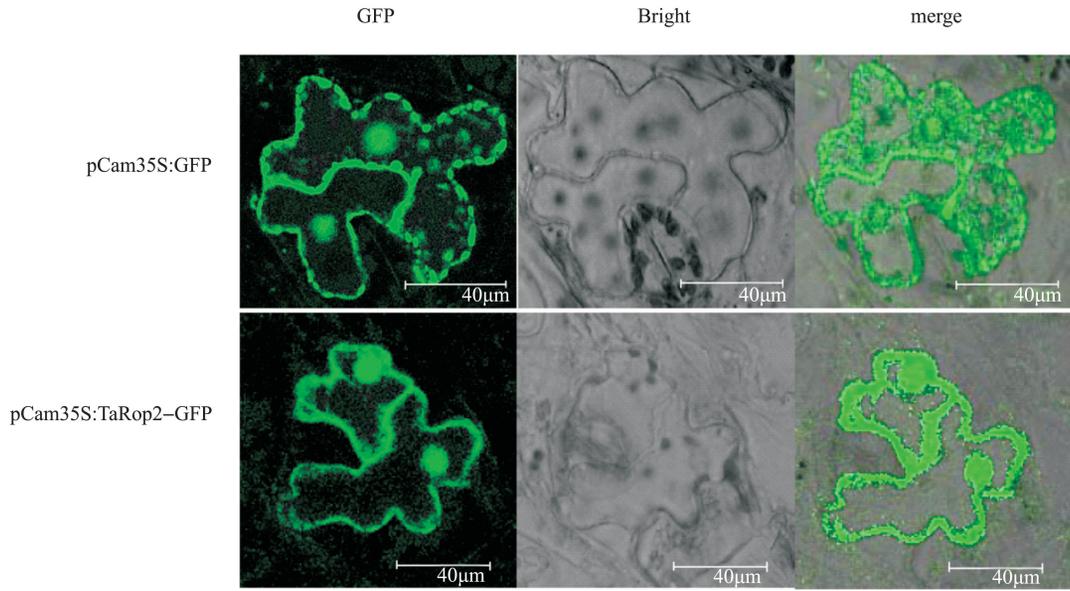
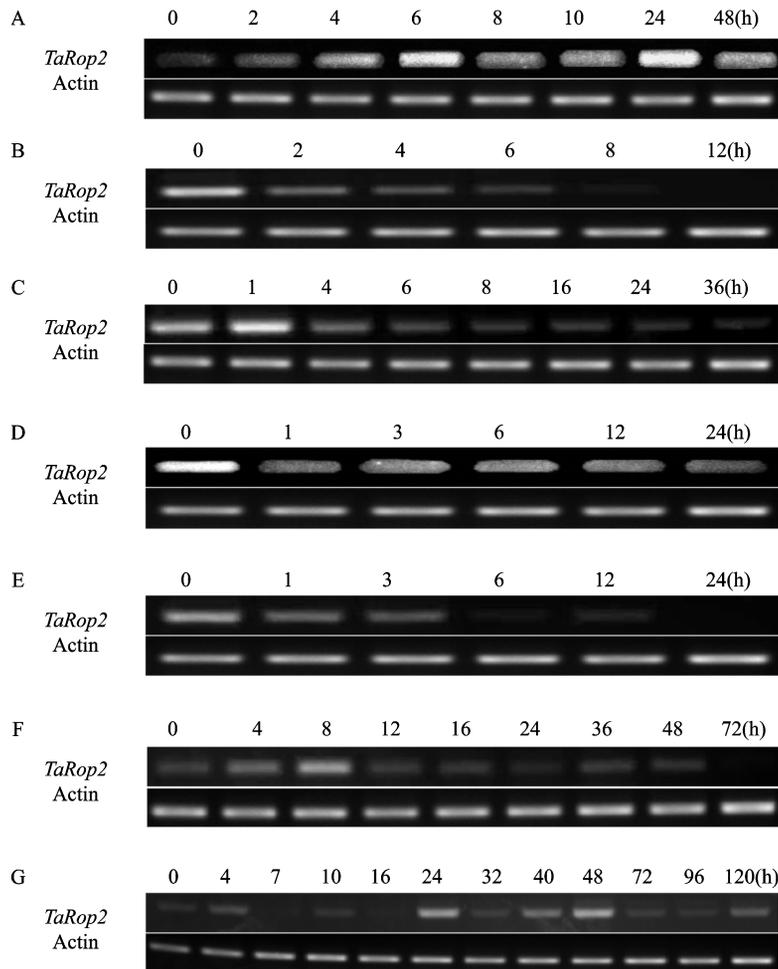


图3 TaRop2 蛋白在烟草表皮细胞中的亚细胞定位分析

Fig. 3 Subcellular localization of TaRop2 protein in the transformed epidermal cells of tobacco leaves



A: 盐胁迫处理; B: 干旱处理; C: 高温处理; D: 低温处理; E: 脱落酸(ABA)处理; F: 条锈菌小种 CYR32 侵染处理; G: 白粉菌混合菌种侵染处理
 A: Salt stress, B: Drought stress, C: High temperature stress, D: Cold stress, E: Abscisic acid stress, F: Inoculated with incompatible race CYR32 of *P. Striiformis* f. sp. *tritici*, G: Mixed compatible isolates of *E. graminis* f. sp. *tritici*

图4 环境胁迫和病原菌侵染条件下 TaRop2 基因表达水平

Fig. 4 Expression levels of TaRop2 gene under environmental stresses and pathogens infection

于鸟苷酸结合的 DNA 结合位点效应结构区(G I ~ G V)、1 个效应分子结合点、1 个 C 端多变区、1 个 Rop 家族特有的 Rop 插入位点和 2 个能在 Rop 蛋白形成三维构象时使 4 个 DNA 结合位点结合在一起的开关。说明 *TaRop2* 是典型的 Rop 蛋白,该家族成员在蛋白结构和遗传进化中具有高度保守性。

本研究根据植物 Rop 家族蛋白功能的不同将其分为 2 个亚家族(组 I 和组 II),其中组 I 蛋白成员主要参与植物发育、抗逆和抗病过程,如玉米 *Zm-Rop9*^[29] 和烟草 *NtRac1*^[30] 基因等均与植物的发育有关;苜蓿 *MsRac1* 超量表达转基因烟草在病菌侵染时形成过敏性坏死斑,这说明 *MsRac1* 基因参与了苜蓿的抗病防卫反应过程^[16]。由此可见,属于组 I 的 *TaRop2* 基因也可能是小麦发育、抗逆和抗病过程的调控因子,研究其功能具有重要意义。

由于蛋白质是细胞生命活动的最终执行者,在细胞中的定位与该蛋白的功能和调控途径紧密相连。因此,对蛋白质进行亚细胞定位分析已成为研究基因功能必不可缺的试验环节^[31]。I 型蛋白 *OsRac5*、*OsRac6* 和 *OsRac7* 亚细胞定位分析发现,3 个蛋白均定位在细胞核和细胞膜上^[21]。本研究中 *TaRop2* 属于 I 型蛋白,具有核定位信号(KKKKK)和跨膜基序,亚细胞定位结果表明 *TaRop2* 主要分布于细胞核和细胞膜上。

高盐、干旱、高温和低温等环境胁迫因子和病原菌影响作物的生长,造成了严重的产量损失。研究表明,Rop 蛋白具有调控植物抗逆和防卫反应的功能。水稻 *OsRacB* 的超量表达增加了转基因烟草的耐盐性,而该基因的反义表达减弱了转基因烟草对盐的抵抗能力^[20],但烟草 *NtRop1* 的超量表达则增加了转基因烟草对盐的敏感性^[32]。本研究中,当发生高盐胁迫时,*TaRop2* 基因被诱导表达,与水稻 *OsRacB* 基因在高盐胁迫过程中的作用相似,而与烟草 *NtRop1* 的作用相反。利用 DNAMAN 软件对 *TaRop2* 蛋白氨基酸序列与 *OsRacB*、*NtRop1* 的相似度进行分析,结果发现与 *OsRacB* 之间的相似度高于与 *NtRop1* 之间的相似度,这也解释了在高盐胁迫时 *TaRop2* 与 *OsRacB* 均是植物正调控因子的原因。干旱胁迫是限制世界粮食作物生产的主要环境因子之一,在本研究中,*TaRop2* 基因的表达受干旱抑制。高温胁迫主要通过影响植物的光合作用和呼吸作用对植物造成损伤,是限制植物生长和地域分布的重要影响因子之一。本研究在 38℃ 高温环境对小麦幼苗进行胁迫处理,结果发现高温对 *TaRop2* 基因的

表达具有抑制作用。低温是限制植物生长发育和分布的重要环境胁迫因子,严重时可导致植株死亡。低温条件能改变植物细胞的膜脂相,影响植物的光合作用,减弱部分酶的活性和扰乱细胞中渗透物质的调节功能^[33]。当发生低温胁迫时,*TaRop2* 基因被抑制表达,即负调控植株对低温的反应过程。因而抑制 *TaRop2* 基因表达可能增强小麦对低温的抗性。脱落酸(ABA)具有影响植物气孔关闭的作用,从而增加植物的抗旱、抗盐和抗寒能力^[34]。*AtRop10* 基因持续性激活(CA-*AtRop10*)减弱了 ABA 对种子萌发的抑制,而 *DN-AtRop10* 突变体则增强了 ABA 的应答反应,即 *AtRop10* 是 ABA 反应过程的抑制因子^[35]。本研究中经过外源激素 ABA 处理后,*TaRop2* 基因的表达水平下降,即 ABA 能抑制该基因的表达。

另一方面,Rop 家族蛋白在植物对病菌的防卫反应中发挥重要作用。超量表达 *OsRacB* 增强了转基因株系对稻瘟菌的敏感性,在水稻与稻瘟菌互动中起负调控作用^[36]。另外也发现大麦 *HvRacB* 基因在植物防卫过程中起负调控作用^[37-38]。本试验中在接种条锈菌小种 CYR32 和白粉菌混合菌系后,*TaRop2* 基因的表达水平均上升,能被病原菌侵染后诱导表达。在小麦 *TaRop2* 与其他植物 Rop 蛋白的聚类分析时,与 *OsRacB* 和 *HvRacB* 具有很高的结构相似性,所以可推测 *TaRop2* 与小麦对病原菌的防卫反应有关,可能参与了小麦的抗病过程。

参考文献

- [1] 张之为,赵君,樊明寿,等.植物小 G 蛋白的研究进展[J].西北植物学报,2009,29(3):622-628
- [2] Vetter I R, Wittinghofer A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions[J]. Science, 2001, 294(5545):1299-1304
- [3] Vernoud V, Horton A C, Yang Z, et al. Analysis of the small GTPase gene superfamily of Arabidopsis[J]. Plant Physiol, 2003, 131(3):1191-1208
- [4] Boguski M S, McCormick F. Proteins regulating Ras and its relatives[J]. Nature, 1993, 366(6456):643-654
- [5] Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins[J]. Physiol Rev, 2001, 81(1):153-208
- [6] Bourne H R, Sanders D A, McCormick F. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions[J]. Nature, 1990, 348(6297):125-132
- [7] Jiang S Y, Ramachandran S. Comparative and evolutionary analysis of genes encoding small GTPases and their activating proteins in eukaryotic genomes[J]. Physiol Genom, 2006, 24(3):235-251
- [8] Zheng Z L, Yang Z. The Rop GTPase: an emerging signaling switch in plants[J]. Plant Mol Biol, 2000, 44(1):1-9
- [9] Winge P, Brembu T, Kristensen R, et al. Genetic structure and evolution of RAC-GTPases in Arabidopsis thaliana[J]. Genetics, 2000, 156(4):1959-1971
- [10] Yang Z, Watson J C. Molecular cloning and characterization of rho,

- a ras-related small GTP-binding protein from the garden pea[J]. Proc Natl Acad Sci UAS,1993,90(18):8732-8736
- [11] Jaffe A B, Hall A. Rho GTPases; biochemistry and biology[J]. Annu Rev Cell Dev Biol,2005,21:247-269
- [12] Hassanain H H, Sharma Y K, Moldovan L, et al. Plant rac proteins induce superoxide production in mammalian cells[J]. Biochem Biophys Res Commun,2000,272(3):783-788
- [13] Kawasaki T, Henmi K, Ono E, et al. The small GTP-binding protein Rac is a regulator of cell death in plants[J]. Proc Natl Acad Sci UAS,1999,96(19):10922-10926
- [14] Schultheiss H, Dechert C, Kogel K H, et al. Functional analysis of barley RAC/ROP G-protein family members in susceptibility to the powdery mildew fungus[J]. Plant J,2003,36(5):589-601
- [15] Park J, Choi H J, Lee S, et al. Rac-related GTP-binding protein in elicitor-induced reactive oxygen generation by suspension-cultured soybean cells[J]. Plant Physiol,2000,124(2):725-732
- [16] Schiene K, Puhler A, Niehaus K. Transgenic tobacco plants that express an antisense construct derived from a *Medicago sativa* cDNA encoding a Rac-related small GTP-binding protein fail to develop necrotic lesions upon elicitor infiltration[J]. Mol Genet Genomics,2002,263(5):761-770
- [17] Gu Y, Vernoud V, Fu Y, et al. ROP GTPase regulation of pollen tube growth through the dynamics of tip-localized F-actin[J]. J Exp Bot,2003,54(380):93-101
- [18] Tao L, Cheung A Y, Wu H. Plant Rac-like GTPases are activated by auxin and mediate auxin-responsive gene expression[J]. The Plant Cell Online,2002,14(11):2745-2760
- [19] Christensen T M, Vejlpkova Z, Sharma Y K, et al. Conserved subgroups and developmental regulation in the monocot rop gene family[J]. Plant Physiol,2003,133(4):1791-1808
- [20] Luo M, Gu S H, Zhao S H, et al. Rice GTPase *OsRacB*: potential accessory factor in plant salt-stress signaling[J]. Acta Biochim Biophys Sin,2006,38(6):393-402
- [21] Chen L, Shiotani K, Togashi T, et al. Analysis of the Rac/Rop small GTPase family in rice: expression, subcellular localization and role in disease resistance[J]. Plant Cell Physiol,2010,51(4):585-595
- [22] Hoeffle C, Huesmann C, Schultheiss H, et al. A barley ROP GTPase ACTIVATING PROTEIN associates with microtubules and regulates entry of the barley powdery mildew fungus into leaf epidermal cells[J]. The Plant Cell Online,2011,23(6):2422-2439
- [23] Pathuri I P, Zellerhoff N, Schaffrath U, et al. Constitutively activated barley ROPs modulate epidermal cell size, defense reactions and interactions with fungal leaf pathogens[J]. Plant Cell Rep,2008,27(12):1877-1887
- [24] Schultheiss H, Hensel G, Imani J, et al. Ectopic expression of constitutively activated RACB in barley enhances susceptibility to powdery mildew and abiotic stress[J]. Plant Physiol,2005,139(1):353-362
- [25] Poraty-Gavra L, Zimmermann P, Haigis S, et al. The *Arabidopsis* Rho of plants GTPase *AtROP6* functions in developmental and pathogen response pathways[J]. Plant Physiol,2013,161(3):1172-1188
- [26] Chen W Q, Wu L R, Liu T G, et al. Race dynamics, diversity, and virulence evolution in *Puccinia striiformis* f. sp. tritici, the causal agent of wheat stripe rust in China from 2003 to 2007[J]. Plant Dis,2009,93(11):1093-1101
- [27] 康振生,李振岐. 条锈菌诱导的小麦 MBF1 转录辅激活因子基因的克隆及其特征分析[J]. 作物学报,1984(12):18-28
- [28] 武英鹏,原宗英,李艳芳. 山西省不同生态区小麦白粉病菌毒性监测研究[J]. 中国生态农业学报,2005,13(2):62-64
- [29] Christensen T M, Vejlpkova Z, Sharma Y K, et al. Conserved subgroups and developmental regulation in the monocot rop gene family[J]. Plant Physiol,2003,133(4):1791-1808
- [30] Chen C Y, Cheung A Y, Wu H. Actin-depolymerizing factor mediates Rac/Rop GTPase-regulated pollen tube growth[J]. The Plant Cell Online,2003,15(1):237-249
- [31] 邹华文,肖雪,李翠花. 玉米 *ZmPti1* 在转基因拟南芥中的亚细胞定位[J]. 中国农学通报,2010,26(14):74-77
- [32] Cao Y R, Li Z G, Chen T, et al. Overexpression of a tobacco small G protein gene *NtRop1* causes salt sensitivity and hydrogen peroxide production in transgenic plants[J]. Sci China Ser C,2008,51(5):383-390
- [33] 吴广霞,唐献龙,杨德光,等. 植物低温胁迫生理研究进展[J]. 作物杂志,2008(3):17-19
- [34] 孙大业,郭艳林,马力耕. 细胞信号转导[M]. 北京:科技出版社,2000:225-230
- [35] Zheng Z L, Nafisi M, Tam A, et al. Plasma membrane-associated ROP10 small GTPase is a special negative regulator of abscisic acid responses in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2002, 14: 2787-2797
- [36] Jung Y H, Agrawal G K, Rakwal R, et al. Functional characterization of *OsRacB* GTPase—a potentially negative regulator of basal disease resistance in rice [J]. Plant Physiol Biochem, 2006,4:68-77
- [37] Schultheiss H, Dechert C, Kogel K H, et al. A small GTP-binding host protein is required for entry of powdery mildew fungus into epidermal cells of barley [J]. Plant Physiol, 2002, 128: 1447-1454
- [38] Plutner H, Cox A D, Pind S, et al. Rab1b regulates vesicular transport between the endoplasmic reticulum and successive Golgi compartments[J]. J Cell Biol,1991,115:31-43