

蜡梅小 GTP 结合蛋白基因 *CpRAC1* 的克隆及表达分析

马 婧, 门维婷, 陈信立, 眭顺照, 李名扬*

(西南大学园艺园林学院, 重庆市花卉工程技术研究中心, 南方山地园艺学教育部重点实验室, 重庆 400715)

摘 要: 从蜡梅 (*Chimonanthus praecox*) 花 cDNA 文库中克隆获得了 1 个植物特有的小 GTP 结合蛋白基因 *CpRAC1* (GenBank accession: KR071131.1), 该基因 cDNA 全长 1 089 bp, 包含 1 个 597 bp 的 ORF 框。生物信息学分析表明该基因编码的蛋白无信号肽和跨膜结构域, 同源比对和进化树分析表明 *CpRAC1* 含有 Rho 超家族的保守结构域, 与其他物种的 Rac 蛋白同源性高, 属于第一类植物 Rac 蛋白。实时荧光定量 PCR 分析表明, 该基因在蜡梅各组织中均有表达, 但在雄蕊中的表达量最高; 在蜡梅花发育的早期阶段未检测到 *CpRAC1* 的表达, 随着蜡梅花发育, 该基因表达量逐渐升高, 在蜡梅花衰老期表达量达到最高; *CpRAC1* 对多种非生物胁迫产生响应, 在高温、低温、高盐、重金属和脱落酸处理后表达下调, 而在 H₂O₂ 处理后表达上调。推测蜡梅 *CpRAC1* 可能在蜡梅花发育和抵御非生物胁迫过程中扮演多种角色。

关键词: 蜡梅; 小 GTP 结合蛋白; 基因表达; 花发育; 非生物胁迫

中图分类号: S 685.17

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2018) 11-2177-11

Cloning and Expression Analysis of a Small GTP-binding Protein Gene (*CpRAC1*) in *Chimonanthus praecox*

MA Jing, MEN Weiting, CHEN Xinli, SUI Shunzhao, and LI Mingyang*

(College of Horticulture and Landscape, Southwest University, Chongqing Engineering Research Center for Floriculture, Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions, Ministry of Education, Chongqing 400715, China)

Abstract: In this study, we cloned a small GTP binding protein gene (*CpRAC1*) by randomly sequencing from cDNA library of *Chimonanthus praecox* flowers. The cDNA full length of *CpRAC1* gene was 1 089 bp, which contained an opening reading frame of 597 bp and encoded a protein of 198 amino acids residues. Bioinformatic analysis showed that there was no signal peptide or trans-membrane domain existed in *CpRAC1* protein. Sequence alignment and phylogenetic analysis indicated that *CpRAC1* protein, belonged to the type I plant Rac protein, which contained the Rho superfamily conserved domain and had the high identity with other Rac proteins in different plants. The qRT-PCR demonstrated that *CpRAC1* expressed in different tissues (root, stem, leaf, petal, stamen and pistil) and had the highest

收稿日期: 2018-08-24; 修回日期: 2018-10-11

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31500573)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: limy@swu.edu.cn)

expression level in stamen. However, no transcripts of *CpRAC1* were detected in the early stage of flower development, and then the expression level increased gradually along with the flower development. And the expression level reached its peak at the wither period. The expression of *CpRAC1* was down-regulated under cold, hot, salt, CuSO₄, drought and ABA stresses but up-regulated by H₂O₂ treatment. We speculated *CpRAC1* may play important roles in flower development and abiotic stress response.

Keywords: *Chimonanthus praecox*; small GTP binding protein; gene expression; flower development; abiotic stress

小 GTP 结合蛋白是 GTP 结合蛋白 (Guanine nucleotide-binding regulatory protein) 家族的一种单体小分子量蛋白,它通过在结合 GTP 的激活状态和结合 GDP 的失活状态之间的循环转化来行使“分子开关”的主要功能,从而参与真核细胞信号传导途径(王昕和种康,2005)。目前在真核生物中发现 100 多个小 GTP 结合蛋白,构成了一个庞大的超家族,这个超家族根据结构和功能又分为 Rab、Ras、Ran、Arf 和 Rho 等 5 个亚家族(Kahn et al., 1992; Christensen et al., 2003)。Rho 是亚家族中成员较多的一个。通过对拟南芥进行全基因组测序,分离获得了一类与 Rho 亚家族相关的小 GTP 结合蛋白,这些蛋白质在进化上独立成支,并且是植物中所特有,由于其与动物中的 Rac 蛋白相似度最高,因此命名为 Rac (Rho-related GTPase from plant) 或 Rop 蛋白家族(Winge et al., 2000)。

目前已有大量研究表明,Rac/Rop 蛋白家族在植物生长发育和抵御非生物胁迫方面发挥多种功能(Zheng & Yang, 2000; 罗敏和吴乃虎,2003)。Yang 和 Watson (1993) 在豌豆中首次克隆了 *Rac1*,发现其与豌豆花粉管生长有关。随后,在烟草(Kost et al., 1999)、水稻(Ye et al., 2003)、拟南芥(Lee & Yang, 2008; Hwang et al., 2010)的研究也证实了 Rac 蛋白参与植物花粉管、根毛等细胞的极性生长;Rac/Rop 蛋白还参与植物激素信号传导,如在超表达 *NtRac1* 的烟草和相应活性突变体中,生长素相关基因也被诱导表达(Morel et al., 2004);外源 ABA 可以抑制拟南芥 *AtRop10* 的表达,而该基因的缺失突变体则对 ABA 的敏感度增加(Zheng et al., 2002);Rac/Rop 蛋白还可以通过促进 H₂O₂ 的生成来参与植物抗病反应,例如在蚕豆悬浮细胞系中过量表达人类组成型的 *Rac1*,活性氧产量提高(Park et al., 2000);棉花 *GhRac13* 在拟南芥中的表达影响了活性氧的生产,该基因与棉花纤维细胞次生细胞壁的形成密切相关(Potikha et al., 1999);此外,Rac/Rop 蛋白还参与植物抵御非生物胁迫响应,超表达烟草 *NtRop1* 的拟南芥植株抗盐性提高(Cao et al., 2008);拟南芥 *AtRop6* 和 *AtRop11* 可以通过参与 ABA 调控的气孔关闭,增强植物的抗旱性(Lemichez et al., 2001; Zheng et al., 2002)。

本研究中从蜡梅花 cDNA 文库中分离克隆了 1 个小 GTP 结合蛋白家族成员基因 *CpRAC1*,利用生物信息学技术对该基因的分子序列特征进行了分析,并进一步利用实时荧光定量 PCR 技术,明确了该基因在蜡梅不同组织器官、花发育不同时期、不同非生物胁迫处理下的表达模式,为进一步分析 Rac/Rop 蛋白家族成员在蜡梅冬季开花分子调控途径中的功能提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料及处理

磬口蜡梅 (*Chimonanthus praecox* var. *grandiflora*) 种子及成年大树均由重庆市花卉工程技术研究中心苗圃保存和养护管理。用于 *CpRAC1* 基因克隆的蜡梅花 cDNA 文库由本实验室 Sui 等 (2012)

构建并保存。在同一蜡梅幼苗植株上采集根、茎、叶等组织, 在成年大树不同花期采集花蕾或全花, 用于不同组织和花期中的基因表达分析。将蜡梅种子播种在营养土中, 于 25 ℃, 相对湿度 85%, 16 h 光照/8 h 黑暗, 光照强度 2 000 lx 的条件下进行培养, 至四叶期时, 选取长势一致的幼苗分别放置于人工气候箱中进行各处理: (1) 过氧化物处理: 用浓度 30% 的 H_2O_2 浇灌; (2) 高盐处理: 用 $1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 溶液浇灌; (3) ABA 胁迫处理: 用 $50\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 脱落酸 (ABA) 溶液浇灌; (4) 模拟干旱处理: 用 30% 的 PEG6000 溶液浇灌; (5) 重金属胁迫处理: 用 $1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CuSO_4 溶液浇灌; (6) 低温胁迫处理: 放在 4 ℃ 人工气候箱中; (7) 高温胁迫处理: 放在 42 ℃ 人工气候箱中。在处理 0、0.25、1、6 和 12 h 时采集相同部位的叶片, 用于非生物胁迫下的基因表达分析。

以上植物材料均采用天根 (北京) 公司生产的 Plant RNA prep pure 试剂盒提取总 RNA 后, 再用 TaKaRa (大连) 公司生产的 One Step PrimeScriptTM RT-PCR Kit (Perfect Real Time) 试剂盒合成 cDNA 第 1 链, 用于下一步的 qPCR 检测。

1.2 蜡梅 *CpRAC1* 的克隆及其分子特征分析

蜡梅 *CpRAC1* 的克隆通过对蜡梅花 cDNA 文库进行随机测序获得。首先用 5'pTripl Ex-Sequence 引物随机挑选文库克隆子测序获得 EST 序列, 然后用 tBLASTn 和 BLASTX 在线软件对获得的 EST 进行聚类拼接, 序列分析比对后获得目标克隆子。用 SP5 和 T7 引物对, 对克隆子进行正反向测序, 获得蜡梅 *CpRAC1* 的 cDNA 全长序列。根据全长序列, 设计 1 对跨最大开放阅读框 (Opening Read Frame, ORF) 的特异引物 CpRAC1-F: 5'-AATTGGAAGAGGAGGATCGGCGGAG-3'; CpRAC1-R: 5'-AGAGTCACTACAAGGATGGCTGGT-3'。利用该引物分别以文库质粒和蜡梅花 cDNA 第 1 链为模板进行 PCR 扩增, 对 PCR 产物进行 TA 克隆后测序, 确认获得的目的片段包含蜡梅 *CpRAC1* 的 ORF 全长。

利用 DNASTAR 软件包和 NCBI 在线 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 对蜡梅 *CpRAC1* 进行分子结构和编码蛋白基本性质分析、保守结构域预测、同源比对和进化树分析; 用 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 进行信号肽预测; 用 PSORT (<https://psort.hgc.jp/>) 软件进行亚细胞定位预测。

1.3 蜡梅 *CpRAC1* 的表达分析

利用实时荧光定量 PCR 技术分析蜡梅 *CpRAC1* 在不同组织、花发育时期及不同胁迫处理下的表达特性。以蜡梅 *CpRAC1* 为基础, 用 Primer Premier 5.0 软件设计 1 对扩增片段长度为 158 bp 的 PCR 引物 qCpRAC1-F: 5'-TAAAGTGTGTTACAGTGGGAGATGG-3'; qCpRAC1-R: 5'-AATCTTCCTGACCTGCTGTAT-3'。以蜡梅 *Actin* 和 *Tublin* 为双内参基因, 引物序列参照 Ma 等 (2012) 的文献。在 BioRad (美国) CFX96 荧光定量 PCR 仪上利用该公司生产的 SsoFastTM EvaGreen Supermix 试剂盒进行反应。反应总体积为 20 μL : SsoFastTM EvaGreen Supermix (2 \times) 10 μL , 正、反向引物 ($10\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 1 μL , cDNA 模板 1 μL , RNase Free ddH₂O 8 μL 。反应程序为: 98 ℃ 30 s, 95 ℃ 5 s, 59 ℃ 5 s, 40 个循环。每个循环结束后采集荧光信号, 反应结束后从 65 ~ 95 ℃ 做熔解曲线, 分析扩增的特异性。

根据 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法 (Livak & Schmittgen, 2001) 用 Bio-Rad ManagerTM Software (Version 1.1) 软件对获得的数据进行 *CpRAC1* 相对表达量分析。

2 结果与分析

2.1 蜡梅 *CpRAC1* 的克隆及序列特征

通过对随机测序获得的 EST 序列的分析, 筛选出文库编号为 CH2097 的克隆子对应的可能是蜡梅小 GTP 结合蛋白基因。对该克隆子进行正反向测序和 BLAST 比对后, 确认获得的序列为蜡梅小 GTP 结合蛋白基因的 cDNA 全长。分别以 CH2097 质粒和蜡梅花 cDNA 第 1 链为模板, 用基因特异引物进行 PCR 扩增均获得了与预期大小一致的约为 600 bp 左右的片段 (图 1)。

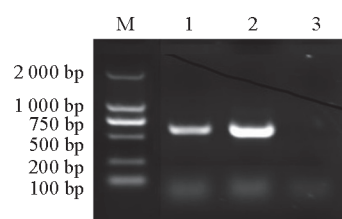


图 1 蜡梅 *CpRAC1* 基因的克隆

1: 蜡梅花 cDNA 模板; 2: 文库质粒 CH2097 模板 (阳性对照); 3: ddH₂O (阴性对照)。M: Marker。

Fig. 1 Cloning of *CpRAC1* gene in *Chimonanthus praecox*

1: cDNA from *Chimonanthus praecox* flower; 2: No. CH2097 plasmid from library (positive control);

3: ddH₂O (Negative control). M: Marker.

对该片段的测序结果表明获得的目的片段为蜡梅小 GTP 结合蛋白基因的 ORF 全长。这是首次从蜡梅中克隆获得的 Rac 基因家族成员, 因此命名为 *CpRAC1* (GenBank 登录号: KR071131.1)。其 cDNA 全长为 1 089 bp, 包含 1 个 597 bp 的 ORF, 编码 1 个长度为 198 个氨基酸的蛋白质, 预测分子量为 21.78 kD。该蛋白序列中无信号肽结构和跨膜结构域, 亚细胞定位预测结果显示该蛋白定位在细胞核中的可能性最高。

2.2 蜡梅 *CpRAC1* 蛋白的同源比对及进化树分析

利用 BLASTP 对蜡梅 *CpRAC1* 基因编码蛋白和其他物种中的 Rac/Rop 蛋白进行同源比对 (图 2), 结果显示该蛋白家族高度保守, *CpRAC1* 蛋白与其他物种的 Rac/Rop 蛋白相似度高, 其中与葡萄 (*Vitis vinifera*, XP_002278633.1) 和麻风树 (*Jatropha curcas*, XP012081772.1) 的同源性最高, 达到 98%。与其他物种中的 Rac/Rop 蛋白一样, *CpRAC1* 蛋白也含有 Rho 超家族的保守结构域, 包括 GTP 酶活性位点, GTP/GDP 结合位点, 丝氨酸/苏氨酸磷酸化位点, 异戊烯基化位点等保守结构。

作为模式植物, 拟南芥被最早开展植物 Rac/Rop 蛋白家族研究, 目前对其 Rac 蛋白家族的 11 个成员 AtRAC1 ~ AtRAC11 的功能研究较为深入和系统 (Winge et al., 2000; Berken & Wittinghofer, 2008), 因此将蜡梅 *CpRAC1* 蛋白与拟南芥的 11 个 RAC 蛋白进行聚类分析。

结果 (图 3) 显示, 蜡梅 *CpRAC1* 编码蛋白和拟南芥 AtRAC1、AtRAC2、AtRAC3、AtRAC4、AtRAC5、AtRAC6 及 AtRAC11 聚为一枝, 同属于植物中分布较为广泛的第 I 类 Rac 蛋白。拟南芥 AtRAC7、AtRAC8、AtRAC10 属于第 II 类植物 Rac 蛋白。与蜡梅亲缘关系最近的是拟南芥 AtRAC3。前人的研究表明, 该蛋白的编码基因 *AtRAC3* 在拟南芥中可能参与根的发育和花粉管伸长 (Hwang et al., 2010), 这为进一步研究蜡梅 *CpRAC1* 基因功能提供了一定方向。

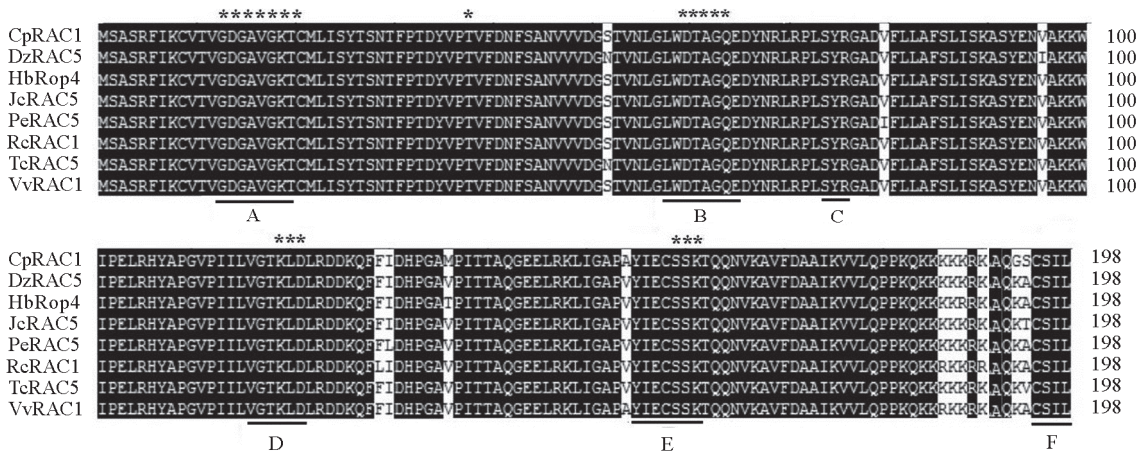


图 2 蜡梅 *CpRAC1* 与不同物种中同源蛋白的多序列比对

DzRAC5: 榴莲 *Durio zibethinus* (XP_022748258.1); HbRop4: 巴西橡胶树 *Hevea brasiliensis* (XP_021687666.1); JeRAC5: 麻风树 *Jatropha curcas* (XP_012081772.1); PeRAC5: 胡杨 *Populus euphratica* (XP_011046692.1); RcRAC1: 蓖麻 *Ricinus communis* (XP_002530817.1); TcRAC5: 可可 *Theobroma cacao* (XP_007041844.1); VvRAC1: 葡萄 *Vitis vinifera* (XP002278595.1).

A、B: GTP 酶活性位点; C: 丝氨酸/苏氨酸磷酸化位点; D、E: GTP/GDP 结合位点;
F: 异戊烯基化位点; 星号为 Rac/Rop 蛋白的主要结构 G 区。

Fig. 2 Amino acid alignment of *CpRAC1* with homologous proteins from different species
A and B are GTPase activating site; C is the Serine/threonine phosphorylation site; D and E are GTP/GDP binding sites;
F is the isopentenylation site. Stars represent the main structure G region.

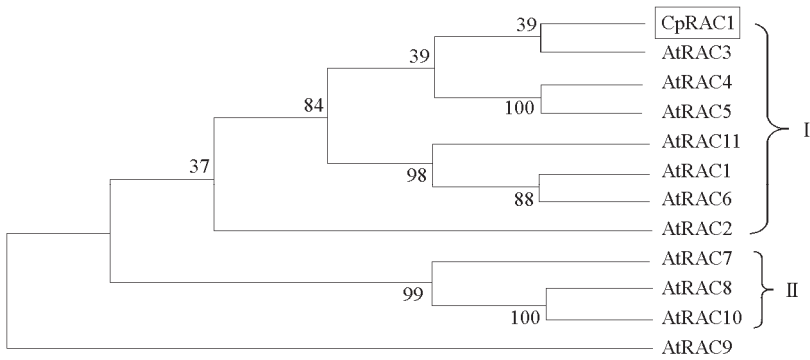


图 3 蜡梅 *CpRAC1* 与拟南芥 *Rac* 家族成员的聚类分析

Fig. 3 The phylogenetic tree analysis between *CpRAC1* and *AtRAC1* - 11

2.3 蜡梅 *CpRAC1* 的表达分析

2.3.1 在不同组织中的表达特性

利用实时荧光定量 PCR 技术检测蜡梅 *CpRAC1* 在各个组织中的表达特性, 结果 (图 4) 表明 *CpRAC1* 在蜡梅的营养器官和生殖器官中均有表达, 其中在盛开花朵的雄蕊中表达量最高, 茎中其次, 在根中的表达量最低。

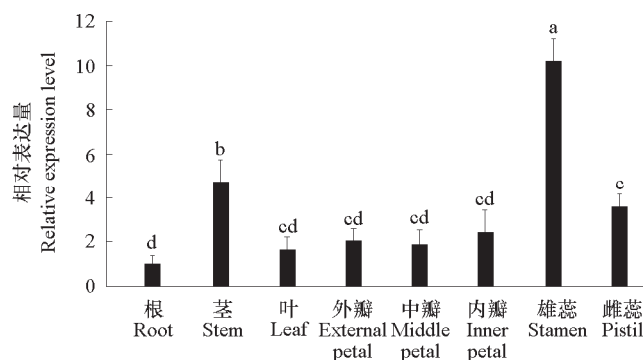


图 4 *CpRAC1* 在蜡梅不同组织中的表达分析

Fig. 4 The relative expression of *CpRAC1* gene in different tissues of *Chimonanthus praecox*

2.3.2 在花发育时期的表达

根据 Sui 等 (2012) 对蜡梅花朵开放时期的划分, 检测蜡梅 *CpRAC1* 在蜡梅花发育过程中在花中的表达模式。结果 (图 5, A) 显示该基因的相对表达量伴随着花发育呈现出规律性变化, 在蜡梅花发育早期 (萌动期和花蕾期) 检测不到该基因的表达; 之后表达量上升, 在花朵衰败期骤增, 达到露瓣期的 4.1 倍。这表明该基因可能参与蜡梅花器官衰老的过程。结合前期分析 *CpRAC1* 在雄蕊中表达量最高这一结果, 进一步检测该基因在蜡梅花雄蕊发育不同阶段中的表达。结果 (图 5, B) 显示 *CpRAC1* 在蜡梅花雄蕊中的表达模式和在全花中基本一致, 伴随着雄蕊的发育和衰败表达量逐渐增高, 在衰败后期达到最高。由此推测, 该基因可能通过调控雄蕊发育来参与蜡梅花器官衰老。

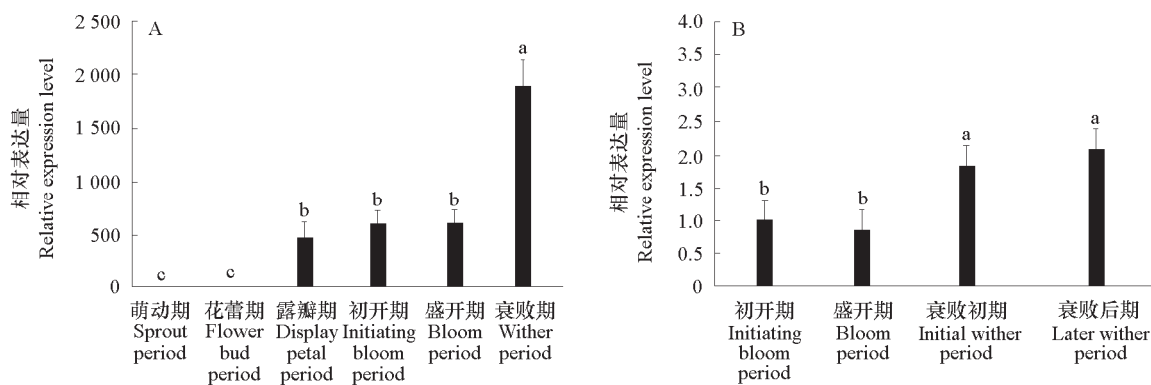


图 5 *CpRAC1* 在蜡梅不同发育阶段的花中 (A) 和雄蕊中 (B) 的表达分析

Fig. 5 The expression of *CpRAC1* gene during different flower development stages in *Chimonanthus praecox*

2.3.3 在不同胁迫处理下的表达

如图 6 所示, 蜡梅叶片中 *CpRAC1* 在低温和高温胁迫处理下具有相似的表达模式, 对外界低温胁迫在 0.25 h 内快速产生响应, 表达量分别降低至 0 h 时的 31% 和 27%, 随后趋于稳定。在高盐胁迫处理后, *CpRAC1* 表达量在 0.25 h 下降至 0 h 时的 35%, 随后小幅上升后, 12 h 时开始下降。重

金属 CuSO_4 处理后, *CpRAC1* 表达量在 0.25 h 降低, 随后基本保持稳定。ABA 处理后, *CpRAC1* 在 0.25 h 下降至 0 h 时的 70%, 随后 1 h 和 6 h 继续下降, 12 h 时回升到 0 h 时 80%, 与 0 h 相比, 表达量总体呈下降趋势。在 PEG6000 模拟干旱处理后, *CpRAC1* 的表达量下降, 12 h 时降至 0 h 时的 14%。 H_2O_2 处理后 *CpRAC1* 表达量升高, 12 h 时为 0 h 时的 2 倍, 这表明 *CpRAC1* 可能通过不同的方式参与植物抵御外界非生物胁迫分子调控途径。

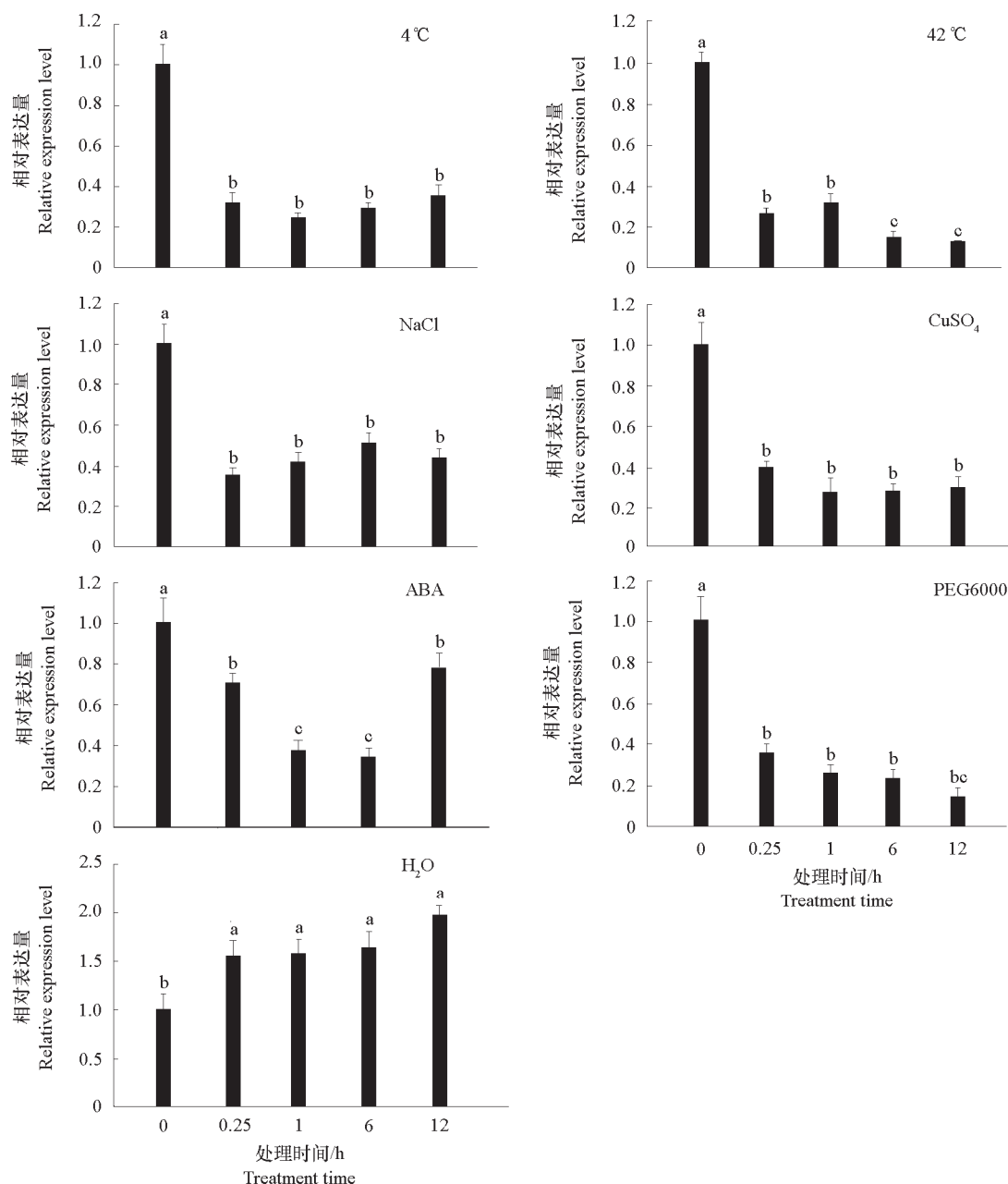


图 6 蜡梅叶片 *CpRAC1* 基因在不同胁迫处理下的表达分析

Fig. 6 The expression analysis of *CpRAC1* gene in leaves under different stress treatments

3 讨论

植物 Rac/Rop 蛋白主要通过调控细胞骨架肌动蛋白组装、活性氧产生和细胞内 Ca^{2+} 浓度变化来参与植物体内一系列重要的生物学过程, 如植物极性生长、激素信号传导、植物抗病反应和抵御非生物胁迫等多个方面 (Zheng & Yang, 2000; Li et al., 2001)。植物 Rac/Rop 蛋白在不同物种中具有高度保守的结构域。本试验中克隆获得的蜡梅 *CpRAC1* 编码蛋白包含了 Rac/Rop 蛋白家族共有的主要结构 G-box 基序, 该区域的主要功能是参与蛋白质与 Mg^{2+} 和核苷酸的结合以及失活时 GTP 的水解过程。根据氨基酸序列 C 末端是否具有 CAAL 基序, 该蛋白可分为两类。通过进一步与其他物种 Rac/Rop 蛋白的聚类分析发现, 蜡梅 *CpRAC1* 蛋白由于 C 末端具有 CAAL 基序列而被归为第 1 类植物 Rac/Rop 蛋白。在与拟南芥 11 种 Rac/Rop 蛋白的比对中, 蜡梅 *CpRAC1* 蛋白与拟南芥的 *AtRAC3* 聚为一枝, 同时该枝与 *AtRAC4* 和 *AtRAC5* 形成的分枝亲缘关系最近。前人研究表明, 拟南芥中的这 3 个 RAC 基因家族成员主要是参与植物极性生长和花粉发育 (Fu et al., 2005; Lee & Yang, 2008; Hwang et al., 2010)。

利用实时荧光定量 PCR 技术检测 *CpRAC1* 在蜡梅不同组织和花发育不同阶段的表达情况, 结果显示该基因在蜡梅各个器官均有不同丰度的表达, 有一定的组织特异性, 在雄蕊中的表达量最高, 茎次之。植物 Rac/Rop 家族成员众多, 不同成员表达模式各异, 功能也不尽相同。如水稻 RAC 家族的 7 个成员均在种子、叶鞘、茎和根中表达, 而 *OsRac2*、*OsRac6*, *OsRac7* 在叶片中的表达量极低, 同时 *OsRac7* 在花序、未成熟种子和培养细胞系中的表达量也很低, 这种表达差异说明不同的 Rac/Rop 小 GTP 结合蛋白成员在水稻的不同信号途径中扮演不同角色 (Chen et al., 2010)。棉花的两个 Rac 蛋白基因 *GhRacA* 和 *GhRacB* 在棉花各个组织中均有表达, 但在棉花纤维起始和伸长时期的表达量高, 推测这两个基因可能与棉花纤维的早期发育有关 (李先碧 等, 2005)。百脉根 *LjRac1* 在根和根瘤中的表达水平较其他组织更高, 推测该基因可能通过调控早期结瘤信号传导参与根瘤发育 (柯丹霞 等, 2015)。虽然 *CpRAC1* 在蜡梅各个组织器官均有表达, 但在雄蕊中的表达量最高, 推测该基因可能参与蜡梅雄蕊发育。对植物 Rac/Rop 蛋白功能研究最为清楚的也是它参与植物花粉发育的信号途径。在拟南芥中, 至少有 3 个 Rop 基因参与花粉形成, 其中 *Rop1* 是花粉特异表达基因, *Rop3* 和 *Rop5* 也在营养器官中表达 (Lin et al., 1996; Li et al., 1999; Fu et al., 2005), 这与蜡梅 *CpRAC1* 基因的表达模式一致。在拟南芥的小 GTP 结合蛋白基因 *AtRabD2b* 的研究中也发现了相同的表达特性, 该基因在拟南芥的雄蕊花药和雌蕊柱头具有较高表达 (王芳, 2011)。将水稻的 1 个小 GTP 结合蛋白基因 *OsRACD* 的反义链转入拟南芥中, 转基因植株的花粉管伸长受阻, 从而导致败育, 推测 *OsRACD* 可能参与花粉管延伸 (Ye et al., 2003)。蜡梅中 *CpRAC1* 在雄蕊中的高表达, 也暗示该基因可能与蜡梅花粉发育有关, 该基因与拟南芥 RAC 基因家族中的 *AtRac3* 亲缘关系较近, 结合前人对 *AtRac3* 功能的研究 (Hwang et al., 2010), 推测 *CpRAC1* 可能通过控制花粉管发育过程中细胞的极性生长, 影响花粉管的萌发和延伸, 从而参与蜡梅花育性调节。除此之外, *CpRAC1* 在茎中也有较高表达, 通过与下游的效应因子作用影响细胞骨架结构发生重组, 进而影响植物的形态建成, 特别是影响茎的生长 (Hall, 1998)。霍冲等 (2013) 研究发现小麦 (*Triticum aestivum*) 中的 *TaRop3* 也表现出在幼苗及成年植株茎部高丰度表达的特点。罗敏等 (2003) 发现水稻 *OsRACB* 在茎段中表达量最高。在蜡梅花发育早期, 未检测到 *CpRAC1* 表达, 随着花朵开放基因表达逐渐提高, 到花朵衰老期达到峰值, 特别是在衰老后期的雄蕊中表达量最高, 这表明 *CpRAC1* 可能参与蜡梅花器官衰老。研究表明植物 Rac/Rop 蛋白可能通过诱导活性氧的产生来参与细胞程序性死亡。对水稻

OsRac1 的研究表明该基因可能通过调控植物细胞内过氧化物的产生, 引起转基因水稻中由细胞程序性死亡诱导的叶片衰老 (Kawasaki et al., 1999); 王芳 (2011) 对拟南芥 *RabD2b* 的研究表明该基因在衰老叶片中表达量较高, 超表达该基因的拟南芥植株表现出衰老延迟, 而 T-DNA 插入突变体植株则表现为提前衰老。植物器官的衰老是细胞程序性死亡的结果, 这一过程受胞内 Ca^{2+} 浓度、自由基浓度、植物激素调节、内外环境等多种因素的共同影响 (黄冬梅 等, 2014), 而植物 Rac/Rop 蛋白所涉及到的信号调控途径也与上述因子, 如 Ca^{2+} 浓度、植物激素等密切相关 (Zheng & Yang, 2000)。植物中 Rac/Rop 蛋白家族成员众多, 涉及的调控网络互相交叉, 也增加了对其功能研究的复杂性, 对于蜡梅中 *CpRAC1* 参与蜡梅花器官衰老的具体机制有待进一步研究。

植物 Rac/Rop 蛋白基因参与多种植物抗逆反应。如小麦 *TaRop2* 和 *TaRop3* 基因在干旱、高温、低温和 ABA 处理后表达量均下调, 而 *TaRop2* 在高盐处理后表达量上升 (霍冲 等, 2013; 李媛媛 等, 2015)。甘薯 (*Ipomoea batata*) *IbRho* 基因在高盐、PEG、低温处理后的 6 h 内均有所下降, 而在 ABA 处理后表达量升高 (朱璐华 等, 2015)。这说明不同物种中的不同 Rac/Rop 蛋白家族成员可能通过多种模式响应外界胁迫。在本研究中, 蜡梅在高温、低温、干旱、重金属、高盐和脱落酸处理后, 表达量均在短时间内迅速下降, 然后趋于稳定, 说明蜡梅 *CpRAC1* 可以对外界不良环境产生快速响应, 从而调控下游分子信号途径, 引起植物抗逆反应, 这一结果与拟南芥中 *AtRop10* 在胁迫条件下的表达模式基本一致。*AtRop10* 能够抑制 ABA 诱导的反应, 如种子萌发、根伸长、气孔关闭等, 同时 ABA 也可以对 *AtRop10* 的表达起到负调控作用 (Zheng et al., 2002)。ABA 信号途径与植物抗逆反应密切相关, 在本研究中外源 ABA 抑制 *CpRAC1* 的表达, 推测 *CpRAC1* 基因在受到外界环境胁迫时, 可能通过表达量的降低, 解除或降低对 ABA 途径气孔关闭的抑制作用, 从而提高植物抗性。蜡梅 *CpRAC1* 在过氧化氢处理下表现出与前面几种胁迫处理完全相反的表达模式, 表现为表达量随着处理时间的推移而逐渐升高。目前对高等植物 RAC 基因家族功能的研究表明, 该家族成员可以通过调节 NADPH 氧化酶的活性来控制 H_2O_2 等活性氧的生产, 一方面 H_2O_2 可以直接杀死病原物, 引起植物过敏反应; 另一方面 H_2O_2 还可以作为第二信使诱导植物抗逆相关基因的表达, 参与植物抗逆反应 (罗敏和吴乃虎, 2003)。但过高的 H_2O_2 浓度对细胞有毒害作用, 因此维持这一过程中胞内 H_2O_2 浓度的平衡至关重要。推测在本研究中, 当外源高浓度 H_2O_2 对蜡梅幼苗的生长造成胁迫时, *CpRAC1* 基因表达量持续上升, 通过抑制 NADPH 氧化酶的活性对内源 H_2O_2 的产量起到负调控作用, 从而减少过量 H_2O_2 在植物体内积累所造成的损伤。

本研究中克隆了 1 个蜡梅小 GTP 结合蛋白家族成员 *CpRAC1*, 通过对该基因的分子结构特征、组织和花发育表达特异性和非生物胁迫下的表达分析, 推测该基因可能参与蜡梅花器官发育, 特别是花器官衰老及多种非生物胁迫的响应过程, 为进一步深入研究不同小 GTP 结合蛋白家族成员在植物中扮演的角色提供了理论依据。

References

- Berken A, Wittinghofer A. 2008. Structure and function of Rho-type molecular switches in plants. *Plant Physiol Bioch*, 46: 380 ~ 393.
- Cao Y R, Li Z G, Chen T, Zhang Z G, Zhang J S, Chen S Y. 2008. Overexpression of a tobacco small G protein gene *NtRop1* causes salt sensitivity and hydrogen peroxide production in transgenic plants. *Science in China (Series C: Life Sciences)*, 51 (5): 383 ~ 390.
- Chen L, Shiotani K, Togashi T, Miki D, Aoyama M, Wong H L, Kawasaki T, Shimamoto K. 2010. Analysis of the Rac/Rop small GTPase family in rice: expression, subcellular localization and role in disease resistance, 51 (4): 585 ~ 595.
- Christensen T M, Vejrupkova Z, Sharma Y K, Arthur K M, Spatafora J W, Albright C A, Meeley R B, Duvick J P, Quatrano R S, Fowler J E. 2003. Conserved subgroups and developmental regulation in the monocot rop gene family. *Plant Physiol*, 133: 1791 ~ 1808.

- Fu Y, Gu Y, Zheng Z, Wasteneys G, Yang Z. 2005. *Arabidopsis* interdigitating cell growth requires two antagonistic pathways with opposing action on cell morphogenesis. *Cell*, 120: 687 – 700.
- Hall A. 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, 279: 509 – 514.
- Huang Dong-mei, Ren Yu-jun, Miao Ying. 2014. Epigenetic regulation in plant senescence. *Plant Physiology Journal*, 50 (9): 1293 – 1304. (in Chinese)
- 黄冬梅, 任育军, 缪颖. 2014. 植物衰老过程中的表观遗传学调控. *植物生理学报*, 50 (9): 1293 – 1304.
- Huo Chong, An Yan-qiu, Wang Feng-tao, Feng Jing, Ling Rui-ming, Xu Shi-chang. 2013. Cloning and expression analyses of the wheat gene *TaRop3* encoding a small GTP-binding protein. *Acta Phytomorphologica Sinica*, 40 (6): 488 – 494. (in Chinese)
- 霍冲, 安艳秋, 王凤涛, 冯晶, 蔺瑞明, 徐世昌. 2013. 小麦小 GTP 结合蛋白基因 *TaRop3* 克隆及其表达分析. *植物保护学报*, 40 (6): 488 – 494.
- Hwang J U, Wu G, Yan A, Lee Y J, Grierson C S, Yang Z. 2010. Pollen-tube tip growth requires a balance of lateral propagation and global inhibition of Rho-family GTPase activity. *Journal of Cell Science*, 123: 340 – 350.
- Kahn R A, Der C J, Bokoch G M. 1992. The ras superfamily of GTP-binding proteins: guide lines on nomenclature. *FASEB J*, 6: 2512 – 2513.
- Kawasaki T, Henmi K, Ono E, Hatakeyama S, Iwano M, Saton H, Shimamoto K. 1999. The small GTP-binding protein RAC is a regulator of cell death in plants. *Plant Biology*, 23: 10922 – 10926.
- Ke Dan-xia, Li Xiang-yong, Wang Jing-jing, Jiao Ke. 2015. Functions of small GTPase Rac1 in nodulation process in *Lotus japonicus*. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 35 (12): 2365 – 2372. (in Chinese)
- 柯丹霞, 李祥永, 王静静, 焦珂. 2015. 百脉根小 G 蛋白 Rac1 基因的克隆与功能分析. *西北植物学报*, 35 (12): 2365 – 2372.
- Kost B, Lemiehe E, Spielhofer P, Hong Y, Tolias K, Carpenter C, Chua N H. 1999. Rac Homologues and compartmentalized phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate act in a common pathway to regulate polar pollen tube growth. *Journal of Cell Biol*, 145: 317 – 330.
- Lee Y J, Yang Z. 2008. Tip growth: signaling in the apical dome. *Current Opinion in Plant Biology*, 11: 662 – 671.
- Lemiehe E, Wu Y, Sanchez J P, Mettouchi A, Mathur J, Chua N H. 2001. Inactivation of *AtRac1* by abscisic acid is essential for stomatal closure. *Genes and Development*, 15: 1808 – 1816.
- Li H, Lin Y, Heath R M, Zhu M X, Yang Z. 1999. Control of pollen tube tip growth by a Rop GTPase-dependent pathway that leads to the tip-localized calcium influx. *The Plant Cell*, 11: 1731 – 1742.
- Li H, Shen J J, Zheng Z L, Lin Y, Yang Z. 2001. The Rop GTPase switch controls multiple developmental processes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 126: 670 – 684.
- Li Xian-bi, Xiao Yue-hua, Luo Ming, Hou Lei, Li Deng-mou, Luo Xiao-ying, Pei Yan. 2005. Cloning and expression analysis of two Rac genes from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Acta Genetica Sinica*, 32 (1): 72 – 78. (in Chinese)
- 李先碧, 肖月华, 罗明, 侯磊, 李德谋, 罗小英, 裴炎. 2005. 两个棉花 Rac 蛋白基因的克隆与表达分析. *遗传学报*, 32 (1): 72 – 78.
- Li Yuan-yuan, An Yan-qiu, Wang Feng-tao, Feng Jing, Ling Rui-ming, Chen Wan-quan, Xu Shi-chang. 2015. Cloning and expression analysis of *TaRop2* gene. *Journal of Plant Genetic Resources*, 16 (2): 315 – 322. (in Chinese)
- 李媛媛, 安艳秋, 王凤涛, 冯晶, 蔺瑞明, 陈万权, 徐世昌. 2015. 小麦中小 GTP 结合蛋白基因 *TaRop2* 克隆及其表达分析. *植物遗传资源学报*, 16 (2): 315 – 322.
- Lin Y, Wang Y, Zhu J, Yang Z. 1996. Localization of a Rho GTPase implies a role in tip growth and movement of the generative cell in pollen tubes. *The Plant Cell*, 8: 293 – 303.
- Livak K J, Schmittgen T D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25 (4): 402 – 408.
- Luo Min, Mi Zhi-yong, Qu Hong, Tang Zhao-rong, Liang Wei-hong, Wu Nai-hu. 2003. Cloning and structure analysis of a new Rac gene family member *osRACB* from *Oryza sativa*. *Science in China (Series C)*, 3: 202 – 214, 289. (in Chinese)
- 罗敏, 米志勇, 曲红, 唐朝荣, 梁卫红, 吴乃虎. 2003. 水稻 Rac 家族新成员 *osRACB* 基因的克隆及结构分析. *中国科学 (C 辑: 生命科学)*, 3: 202 – 214, 289.

- Luo Min, Wu Nai-hu. 2003. The structure and function of Rac family in high plant. Progress in Natural Science, 13 (9): 901 - 909. (in Chinese)
- 罗 敏, 吴乃虎. 2003. 高等植物 Rac 家族的结构与功能. 自然科学进展, 13 (9): 901 - 909.
- Ma Jing, Li Zheng, Wang B, Sui Shun-zhao, Li Ming-yang. 2012. Cloning of an expansin gene from *Chimonanthus praecox* flowers and its expression in flowers treated with ethephon or methylcyclopropene. Hortscience, 47 (10): 1472 - 1477.
- Morel J, Fromentin J, Blein J P, Simon-Plas F, Elmayan T. 2004. Rac regulation of NtrbohD, the oxidase responsible for the oxidative burst in elicited tobacco cell. Plant Journal, 37: 282 - 293 .
- Park J, Choi H J, Lee S, Lee T, Yang Z, Lee Y. 2000. Rac-related GTP-binding protein in elicitorinduced reactive oxygen generation by suspension-cultured soybean cells. Plant Physiology, 124: 725 - 732.
- Potikha T S, Collins C C, Johnson D I, Delmer D P, Levine A. 1999. The involvement of hydrogen peroxide in the differentiation of secondary walls in cotton fibers. Plant Physiol, 119: 849 - 858.
- Sui Shun-zhao, Luo Jing-hui, Ma Jing, Zhu Qin-long, Lei Xing-hua, Li Ming-yang. 2012. Generation and analysis of expressed sequence tags from *Chimonanthus praecox* (Wintersweet) flowers for discovering stress-responsive and floral development-related genes. Comparative and Functional Genomics, doi: 10.1155/2012/134596.
- Wang Fang. 2011. Expression, subcellular localization and functional study of *Arabidopsis* RabD2b GTPase [Ph. D. Dissertation]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. (in Chinese)
- 王 芳. 2011. 拟南芥小 G 蛋白 RabD2b 的表达、定位及功能研究 [博士论文]. 武汉: 华中农业大学.
- Wang Xin, Zhong Kang. 2005. Current progress on the small GTPase gene superfamily in plants. Chinese Bulletin of Botany, 22 (1): 1 - 10. (in Chinese)
- 王 昕, 钟 康. 2005. 植物小 G 蛋白功能的研究进展. 植物学通报, 22 (1): 1 - 10.
- Winge P, Brembu T, Kristensen R, Bones A M. 2000. Genetic structure and evolution of RAC-GTPases in *Arabidopsis thaliana*. Genetics, 156: 1959 - 1971.
- Yang Z B, Watson J C. 1993. Molecular cloning and characterization of rho, a ras-related small GTP-binding protein from the garden pea. Proc Natl Acad Sci, 90: 8732 - 8736.
- Ye J R, Huang M J, Wu N H. 2003. Fertility analysis of the *Arabidopsis* transformed with antisense rice osRACD gene. Progress in Natural Science, 424 - 428.
- Zheng Z L, Yang Z. 2000. The Rop GTPase: an emerging signaling switch in plants. Plant Mol Biol, 44: 1 - 9.
- Zheng Z L, Nafisi M, Tam A, Li H, Crowell D N, Chary S N, Schroeder J I, Shen J, Yang Z. 2002. Plasma membrane-associated *ROP10* small GTPase is a specific negative regulator of abscisic acid responses in *Arabidopsis*. Plant Cell, 14: 2787 - 2797.
- Zhu Lu-hua, Wang Ya, Sun Shi-meng, Wang Jing-shan, Sui Jiong-ming. 2015. Cloning and expression analysis of stress-resistant related *Rho* gene in sweet potato. Journal of Qingdao Agricultural University (Natural Science), 32 (2): 131 - 136. (in Chinese)
- 朱璐华, 王 亚, 孙世孟, 王晶珊, 隋炯明. 2015. 甘薯抗逆相关基因 *Rho* 的克隆和表达分析. 青岛农业大学学报 (自然科学版), 32 (2): 131 - 136.