

陆地棉小 GTP 结合蛋白基因 *GhRop4* 的克隆及其表达分析李月<sup>1</sup>, 吾尔力汗·阿不都维力<sup>1</sup>, 周焱均<sup>1</sup>, 刘超<sup>1</sup>, 任艳萍<sup>1</sup>, 郭旺珍<sup>2</sup>, 刘晓东<sup>1\*</sup>

(1. 新疆农业大学 / 农业生物技术重点实验室, 乌鲁木齐 830052;

2. 南京农业大学 / 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095)

**摘要:**【目的】对陆地棉小 GTP 结合蛋白基因 (Small GTP-binding protein) *GhRop4* (AY965614.1) 在多种逆境胁迫下的应答表达模式进行研究分析, 为棉花抗逆相关基因克隆及棉花抗逆分子机制研究奠定基础。【方法】利用生物信息学方法分析了 *GhRop4* 基因的结构特征和进化树关系, 并通过荧光定量 PCR (Real-time quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR) 的方法分析 *GhRop4* 基因的组织表达特异性和不同逆境诱导条件下的表达模式。【结果】以陆地棉 cDNA 为模板克隆得到 *GhRop4* 基因, 其开放阅读框为 588 bp, 编码包含 195 个氨基酸残基的 I 型 Rop 蛋白。氨基酸多重序列比对表明, *GhRop4* 与其它植物 Rop 蛋白高度同源, 符合 Rop 蛋白结构特点。qRT-PCR 分析表明, *GhRop4* 基因在棉花幼苗根、茎、叶、子叶和下胚轴中均有表达, 且在子叶和茎中表达水平较高。*GhRop4* 基因对高盐、干旱、低温和棉花黄萎病菌处理都有一定程度的响应。【结论】*GhRop4* 基因在陆地棉的逆境胁迫适应过程中可能具有重要的作用。

**关键词:** 棉花; 小 GTP 结合蛋白; *GhRop4*; 克隆; 逆境胁迫

Molecular Cloning and Expression Analysis of a small GTP-binding Protein Gene *GhRop4* in *Gossypium hirsutum* L.Li Yue<sup>1</sup>, Wugalihan Abuduweili<sup>1</sup>, Zhou Yaojun<sup>1</sup>, Liu Chao<sup>1</sup>, Ren Yanpin<sup>1</sup>, Guo Wangzhen<sup>2</sup>, Liu Xiaodong<sup>1\*</sup>

(1. Key Lab of Agricultural Biological Technology/Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China; 2. State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement/Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** [Objective] This study is to dissect upland cotton small GTP-binding protein gene *GhRop4* (AY965614.1) expression alteration responsive to different abiotic stresses, and provide a foundation for stress-related genes clone, and elucidate the molecular mechanism of cotton stress-resistance. [Method] In this study, the protein structural characteristics and phylogenetic analysis of *GhRop4* gene were analyzed by bioinformatics methods. Tissue-specific expression of *GhRop4* under various induction conditions were conducted using quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). [Result] The *GhRop4* gene was cloned from the upland cotton cDNA, sequence analysis showed that it contained a 588 bp open reading frame, putatively encoding a type I Rop protein with 195 amino acid residues. Multiple sequence alignment showed that *GhRop4* shared high similarity with Rop proteins of other plants and was in accordance with the structural characteristics of Rop proteins. qRT-PCR analysis showed that *GhRop4* gene expressed in roots, stems, leaves, cotyledons, and hypocotyl of cotton seedlings, and especially expressed at a relatively higher level in cotyledons and stems. *GhRop4* gene expression was regulated with dehydration, high salinity, low temperature and Verticillium wilt treatments. [Conclusion] The results suggested that *GhRop4* gene may play important roles in the adaptation of upland cotton to adversity stress.

**Keywords:** cotton; small GTP-binding protein; *GhRop4*; cloning; adversity stress

作为 1 类分子量为 20~30 kD 的结合蛋白,  
小 GTP (Guanosine triphosphate, 三磷酸鸟苷) 结

合蛋白是许多信号转导过程的中心调节器, 广泛  
存在于真核生物中<sup>[1-2]</sup>。根据小 GTP 结合蛋白的

收稿日期: 2019-08-10 第一作者简介: 李月 (1984—), 女, 副教授, liyue6905@126.com。通信作者: xiaodongliu75@aliyun.com

基金项目: 南京农业大学 - 新疆农业大学联合基金 (KYYJ201701); 国家自然科学基金 (31660433)

结构和功能分为 Ras、Ran、Rab、Rho 和 Arf 5 个超家族<sup>[1-3]</sup>。在真核生物中,Ras 和 Rho 家族蛋白是信号转导开关,而其它 3 个家族蛋白的功能主要参与囊泡和大分子运动的调节<sup>[1-2]</sup>。然而,高等植物有 1 个独特的 Rho 亚家族的小 GTP 结合蛋白称为 Rop 蛋白<sup>[4-5]</sup>。Rop 蛋白具有 GTP 酶活性,与 GTP 结合可以催化 GTP 水解,而与 GDP (Guanosine diphosphate,二磷酸鸟苷)结合无催化活性,通过与 GTP/GDP 循环结合,在植物信号传导中作为分子开关调控相关代谢活动<sup>[6]</sup>。它由 N 末端催化结构域 G 结构域 (Catalytic G-domain) 和 C 末端高变区 (Hyper-variable domain, HVR) 组成,其中 G 结构域负责与核苷酸及效应子结合,HVR 负责亚细胞靶向。G 结构域含有 5 个保守序列基序称为 G-box 基序 (I-V),这 5 个基序是核苷酸结合、GTP 水解和  $Mg^{2+}$  结合的功能区域。I、III 是 GTP 酶结构域,II 和 III 基序也被称为开关 I (Switch I) 和开关 II (Switch II),III~V 是 GTP 或 GDP 的结合区域这些区域在与 GDP 和 GTP 结合状态下具有不同的构象,对与效应蛋白和调节蛋白的短暂相互作用至关重要。G 结构域内还包含 1 个 Rho 族独有的螺旋域,称为插入域<sup>[5]</sup>。Winge 等<sup>[7]</sup>根据 Rop 蛋白 C 端氨基酸序列差异,将 Rop 家族蛋白分为 2 种类型,即 I 型和 II 型。I 型 Rop 蛋白 C 端以典型的 CaaL 盒基序终止,其中 C 为半胱氨酸(Cys),a 为脂肪族氨基酸残基,L 为亮氨酸 (Leu),Cys 残基被 C20 异戊二烯基脂香叶基香叶基修饰。II 型 Rop 以 GC-CG 盒终止 (其中 G 为甘氨酸 Gly,C 是 Cys),其中 2 个 Cys 残基是由 5 或 6 个脂肪族残基隔开并经 C16 棕榈酸酯或 C18 硬脂酸酯脂肪酸 S 酰化<sup>[5]</sup>。

自从第 1 个 Rop 基因在豌豆中被鉴定出来,目前已经在多种植物中鉴定出 Rop 基因,其中拟南芥中有 11 个、玉米 9 个、油菜 11 个、葡萄 7 个、水稻 7 个、苜蓿 7 个、烟草 6 个、巴西橡胶树 5 个、番茄 9 个<sup>[8-9]</sup>。根据对 Rop 基因的功能研究,Rop 家族蛋白具有多种功能,包括调控花粉管尖生长、植物细胞生长、信号传导、核迁移和细胞骨架形成等<sup>[10-12]</sup>。除此之外,还广泛参与环境应激反应和宿主-病原体相互作用等过程<sup>[13]</sup>。在寒冷条

件下,苹果的 Rop 基因转录表达增加,导致果实中乙烯和活性氧含量降低<sup>[14]</sup>。拟南芥 AtRop11 的表达影响种子萌发、幼苗生长、气孔关闭、脱落酸介导响应和干旱胁迫响应<sup>[15]</sup>。在烟草中过量表达 NtRop1 基因,转基因植株产生较多的  $H_2O_2$ ,对盐胁迫的耐受能力降低<sup>[16]</sup>。将苜蓿 Rop 基因 MfARL1 转入拟南芥,转基因植株的  $Na^+/K^+$  比低于对照株,并增强了盐胁迫的耐受性<sup>[17]</sup>。拟南芥 Rop 效应蛋白 (RIC1) 敲除植株在盐胁迫下的存活率增加<sup>[18]</sup>。在水稻中发现 7 个功能各异的 Rop 基因,OsRac1 通过调控活性氧爆发和细胞死亡,正调控水稻对稻瘟病的抗性;OsRac4 和 OsRac5 负调控水稻稻瘟病抗性,其它基因可能与水稻稻瘟病无关<sup>[19]</sup>。烟草 NtRac5 通过调控烟草细胞氧化酶参与烟草抗病反应中的活性氧爆发<sup>[20]</sup>。MtRop9 参与植物受病原菌侵染的早期抗性反应<sup>[21]</sup>。HvRacB 参与大麦对白粉病菌的基础防卫反应<sup>[22]</sup>。棉花中 Rop 家族基因的研究报道主要和棉花纤维发育和陆地棉黄萎病菌侵染反应有关。李先碧等<sup>[23]</sup>从陆地棉克隆了 2 个棉花纤维起始和伸长时期优势表达的 GhRacA 和 GhRacB,推测可能调控棉花纤维早期发育。Deborah 等<sup>[24]</sup>克隆的 GhRac9、GhRac13 基因,在棉纤维发育过程中初生和次生壁合成的过渡时期的优势表达,推测它们可能是通过产生  $H_2O_2$  介导棉花次生壁的合成。GhRac1 调控细胞骨架的构建是纤维伸长的潜在调节因子<sup>[25]</sup>。王钰静<sup>[26]</sup>利用病毒诱导基因沉默 (Virus-induced gene silencing, VIGS) 技术抑制棉花 GhRop6 基因的表达,沉默植株的木质素含量较对照组低,并产生较多的  $H_2O_2$ ,推测 GhRop6 基因正调控棉花对黄萎病的抗性。而关于棉花中 Rop 基因在高盐、干旱、低温等逆境条件下的表达谱鲜有报道。

棉花是重要的纤维和油料作物,具有重要的经济作用,因此被广泛种植。但是棉花在生长过程中往往受到各种生物胁迫和环境因素如害虫、病原体、盐、冷和干旱等的影响。这些不利因素对棉花的生长、产量以及纤维品质影响很大,造成巨大的经济损失。植物特有的 Rop 家族蛋白作为上游信号传递的分子开关,参与植物抗逆反应和对病原菌的基础防卫调控。本文利用生物信息学

的方法,从陆地棉中克隆 1 个 *Rop* 基因 *GhRop4*, 对其蛋白序列特征、逆境和组织表达特性进行研究,为进一步揭示棉花 *GhRop4* 基因的生物学功能提供重要信息。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

陆地棉抗旱材料 KK1543 和黄萎病菌菌株 V991 均由新疆农业大学农学院农业生物技术重点实验室提供。

### 1.2 方法

**1.2.1 播种、生长条件和胁迫处理。**将 KK1543 种子均匀播种于黑土和蛭石 2:1 混合的营养土中,在温度(28±2)℃、湿度 65%、光照/黑暗周期为 16 h/8 h 条件下连续培养 15 d。选取生长一致的棉花,置于吸水纸上吸干水,分别进行高盐(200 mol·L<sup>-1</sup> NaCl)、干旱、4℃低温处理,具体处理参照李月等<sup>[27]</sup>已报道的方法进行。分别于处理后 0 h、1 h、3 h、6 h 和 12 h 采集叶片,同时采集未处理材料的根、真叶、子叶、下胚轴和茎用于组织特异性表达检测。将以上各时间点采集的不同组织的材料迅速置于液氮速冻,用于总 RNA 提取,进行目的基因表达分析。

将 KK1543 种子在 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液中浸泡 2 h,无菌水冲洗 3 次,最后在无菌水中避光浸泡 12 h,将露白的棉种平铺在发芽纸上发芽 2 d,选取萌发一致的种子播种于黑土和蛭石 2:1 混合的营养土中,生长条件同 1.2.1。待 2 片真叶展平时,采取伤根蘸菌法<sup>[26]</sup>,进行黄萎病菌 V991 侵染。在接菌 0 h、4 h、8 h、12 h、24 h 和 48 h 后取棉苗的幼根,迅速置于液氮冷冻,用于总 RNA 提取及基因的表达分析。

**1.2.2 总 RNA 的提取和 cDNA 的制备。**采用杭州博日科技公司的 BSC65S1 Biospin 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒提取棉花 RNA,赛默飞(Thermo fisher Scientific)DNase I 去除 RNA 中残存的 DNA,利用 Thermo Scientific (NanoDrop 1000)核酸分析仪和 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量和完整性,质量检测合格的 RNA 按照北京全式金生物技术有限公司 TransScript®II First-Strand cDNA Synthesis SuperMix 反转录试

剂盒说明书合成 cDNA,用于基因表达分析。

**1.2.3 棉花 *GhRop4* 基因的克隆。**以拟南芥 TAIR (<http://www.arabidopsis.org/index.jsp>) 的 *AtRac1* 基因(AT2G17800)的序列作为 BlastP 查询序列,在棉花 EST 数据库(<http://www.leonxie.com>),棉花基因组数据库(<http://www.phytozome.net/>)中比对,获得了 1 个 cDNA 序列,然后根据此序列的 ORF(Open reading frame)序列设计引物 *GhRop4*F:5'-ATGAGCGCCTCGAGATTCATA-3' 和 *GhRop4*R:5'-TCATAATATTGAGCAACCA-CC-3'。以陆地棉 KK1543 的 cDNA 为模板,以高保真聚合酶 TransStar KD Plus(北京全式金)进行 PCR 扩增。将扩增产物经 1%琼脂糖电泳检测,回收目的片段连接至 peasy-Blunt Zero 克隆载体,进行质粒酶切鉴定,将阳性克隆质粒送昆泰锐生物技术有限公司测序验证。参照李月等<sup>[27]</sup>方法进行试验所用的 PCR 程序、扩增产物检测及目的片段的纯化回收。

**1.2.4 序列分析和聚类分析。**利用 NCBI 在线服务工具中 BlastP 和 DNAMAN 软件对 *GhRop4* 蛋白序列进行氨基酸同源序列分析和多重序列比对。同时在 NCBI 上查找水稻 *Oryza sativa* OsRac1 (XP\_015621645.1)、OsRac3 (XP\_015625155.1)、OsRac4 (XP\_015641323.1) 和 OsRac5 (XP\_015627011.1); 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* AtRop1 (NP\_190698.1)、AtRop2 (NP\_173437.1)、AtRop4 (NP\_177712.1)、AtRop5 (NP\_195320.1)、AtRop6 (NP\_001190917.1) 和 AtRop11 (NP\_201093.1); 小麦 *Triticum aestivum* TaRop3 (ADD23345); 烟草 *Nicotiana tabacum* NtRac1 (XP\_016513031.1)、NtRac5 (XP\_016512162.1); 玉米 *Zea mays* ZmRop1 (XP\_008644256.1); 大麦 *Hordeum vulgare* HvRac1 (CAD57743.1)、HvRac3 (CAD57742.1)、HvRacB (CAC83043.2) 和 HvRop4 (CAD27896.1) 6 个物种功能已知的 Rop 蛋白序列。利用 Clustal X 和 MEGA 5 软件采用邻接法方法对棉花 *GhRop4* 和上述物种的 Rop 蛋白序列构建系统发生树,分支的可靠性评价采用靴带分析。

**1.2.5 棉花 *GhRop4* 基因的表达分析。**利用多糖多酚植物总 RNA 试剂盒提取棉花不同处理、不

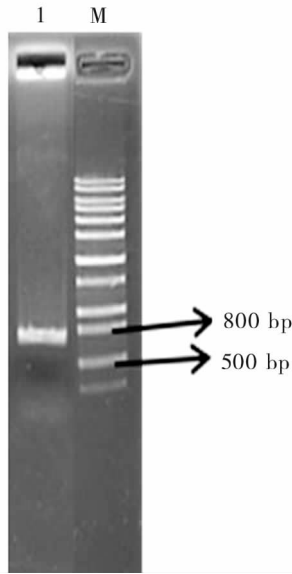


同时时间点棉花 RNA 和棉花不同组织的 RNA,质量检测合格反转录获得 cDNA 第一条链,以此链为模板进行荧光定量 PCR 扩增,扩增体系和反应条件参照李月等<sup>[28]</sup>的方法。内参 *Ubiquitin7* 基因引物序列为 UBQ7F:5'-CCAGAAGGAATCC-ACTTTGC-3';UBQ7R:5'-CCAGCTCACATCA-GCATACG-3' 和 *GhRop4* 基因的引物序列 qGhRop4F:5'-GGTCTTCTGCCTACATCGAGT-3';qGhRop4R:5'-GAAATGGGCACTGCGTTAG-G-3'。采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法分析数据,确定基因的相对表达量。并利用 DPS 7.05 软件对定量数据进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 *GhRop4* 基因的克隆与序列分析

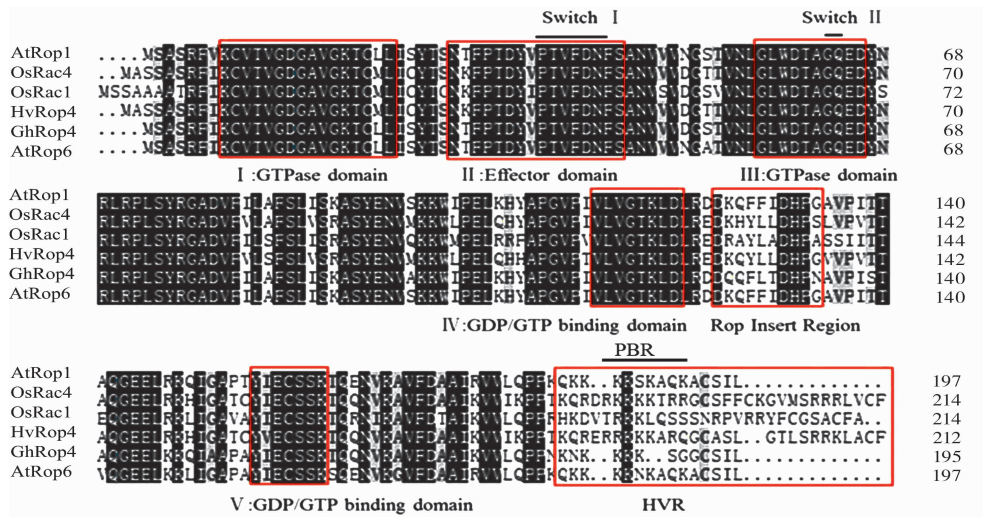
以 KK1543 叶片 cDNA 为模板进行 PCR 扩增结果(图 1)表明,从陆地棉中克隆 1 个 *Rop* 基因 cDNA 序列,命名为 *GhRop4*, 基因登陆号 AY965614.1。*GhRop4* 基因的 ORF 为 588 bp,编码 195 个氨基酸,分子量为 21.229 kD,理论等电点为 8.81,为碱性蛋白。利用 DNAMAN 软件与拟南芥、水稻、大麦 3 个物种中 5 个 ROP 蛋白序列比对发现,*GhRop4* 蛋白符合植物 Rop 蛋白的特征,含有 5 个(I-V)效应结构区 I、III 是 GTP



M:Trans 5k DNA 分子量标准;1:*GhRop4* 基因的 PCR 扩增片段。  
M: Trans 5k DNA Marker; 1: PCR amplification fragment of *GhRop4* gene.

图 1 *GhRop4* 基因的克隆  
Fig. 1 Cloning of *GhRop4* gene

酶结构域,II 是效应因子结构域,IV、V 是 GTP 或 GDP 的结合区域,2 个开关区域(开关 I 和开关 II),1 个 Rop 插入序列及 C 末端高度变异区(HVR)(图 2)。*Rop* 插入序列包含 10 个氨基酸残



框内序列为 Rop 家族蛋白效应结构区 I-V、Rop 插入序列及 C 末端高度变异区(HVR),黑色划线部分指开关 I、开关 II、多碱性区(polybasic region, PBR)位点。

I-V domains, Rop insert region, and hypervariable region (HVR) are boxed, respectively, The Switch I, switch II, and polybasic region (PBR) sites are black underlined.

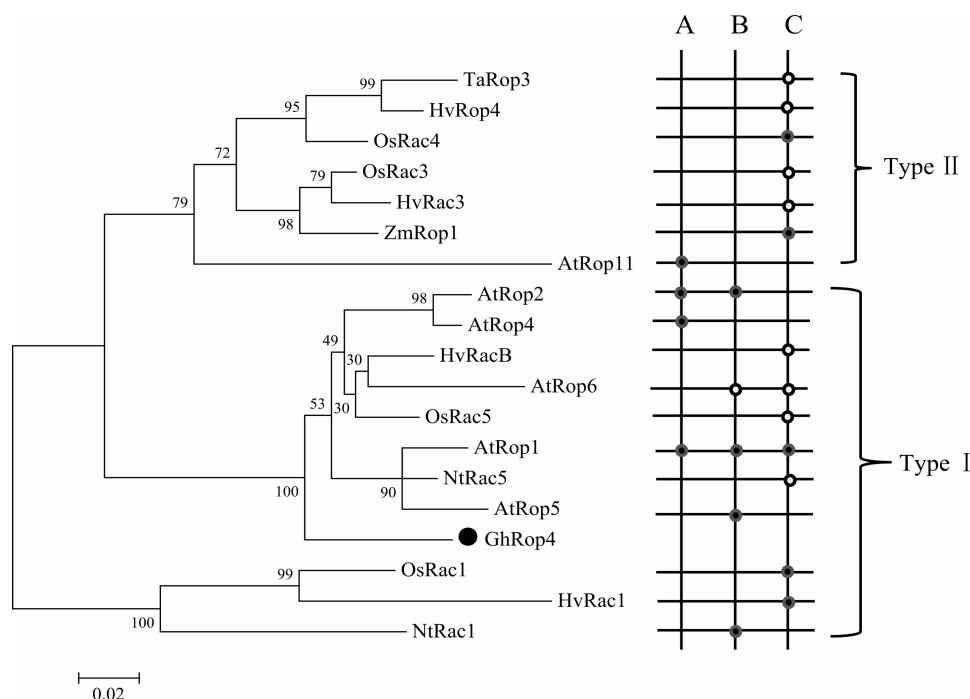
图 2 *GhRop4* 功能结构域分析  
Fig. 2 Analysis of the functional domains in *GhRop4* protein

基(DQQFLTDHFN)。GhRop4 蛋白 HVR 区的氨基酸序列 C 末端为 CSIL。

## 2.2 棉花 GhRop4 蛋白系统进化树分析

Winge 等<sup>[7]</sup>根据 Rop 蛋白 C 端氨基酸序列差异,将 Rop 家族蛋白分为 2 种类型,即 I 型和 II 型。从 GenBank 中下载水稻、拟南芥、小麦、烟草、玉米、大麦中共 19 个功能已知 Rop 蛋白序列,构建系统进化树。分析表明(图 3),19 个 Rop 蛋白分为 2 类,12 个 Rop 蛋白聚为 I 型 Rop 蛋白,7 个 Rop 蛋白聚为 II 型 Rop 蛋白,GhRop4 蛋白属

于 I 型 Rop 蛋白。研究表明,I 型 Rop 蛋白主要参与调控植物生长发育、植物抗逆和抗病性反应,推测属于 I 型 Rop 蛋白的棉花 GhRop4 蛋白在植物功能反应中扮演多样角色。利用 DNAMAN 软件对这 6 个已克隆的 *GhRop* 基因(*GhRacA*、*GhRacB*、*GhRac9*、*GhRac13*、*GhRac1*、*GhRop6*)与本研究克隆的 GhRop4 基因进一步比对分析,*GhRop4* 基因与 GhRac1 基因的序列相似性达到 88%,与其它 5 个 *GhRop* 基因的相似性均大于 75%。



左图为 Rop 蛋白聚类分析,右图为 Rop 蛋白的生物学功能统计结果。A:参与调控植物生长发育;B:参与调控植物抗逆反应;C: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。图中标尺代表遗传距离,进化树分枝上的数字代表进化度的可靠性。

Left part is the cluster analysis of Rop proteins, and the right part shows the statistic results of the function-known Rop proteins listed in the figure. The Rop proteins involved in plant development, stress response and/or disease resistance are marked with A, B and C, respectively. The filled and empty circle indicate the gene's positive and negative regulation functions, respectively. The scale bar represents genetic distance. The number on the branch of evolutionary tree represents the reliability of evolutionary degree.

图 3 Rop 蛋白聚类分析及生物学功能分析

Fig. 3 Cluster analysis and function analysis of Rop proteins

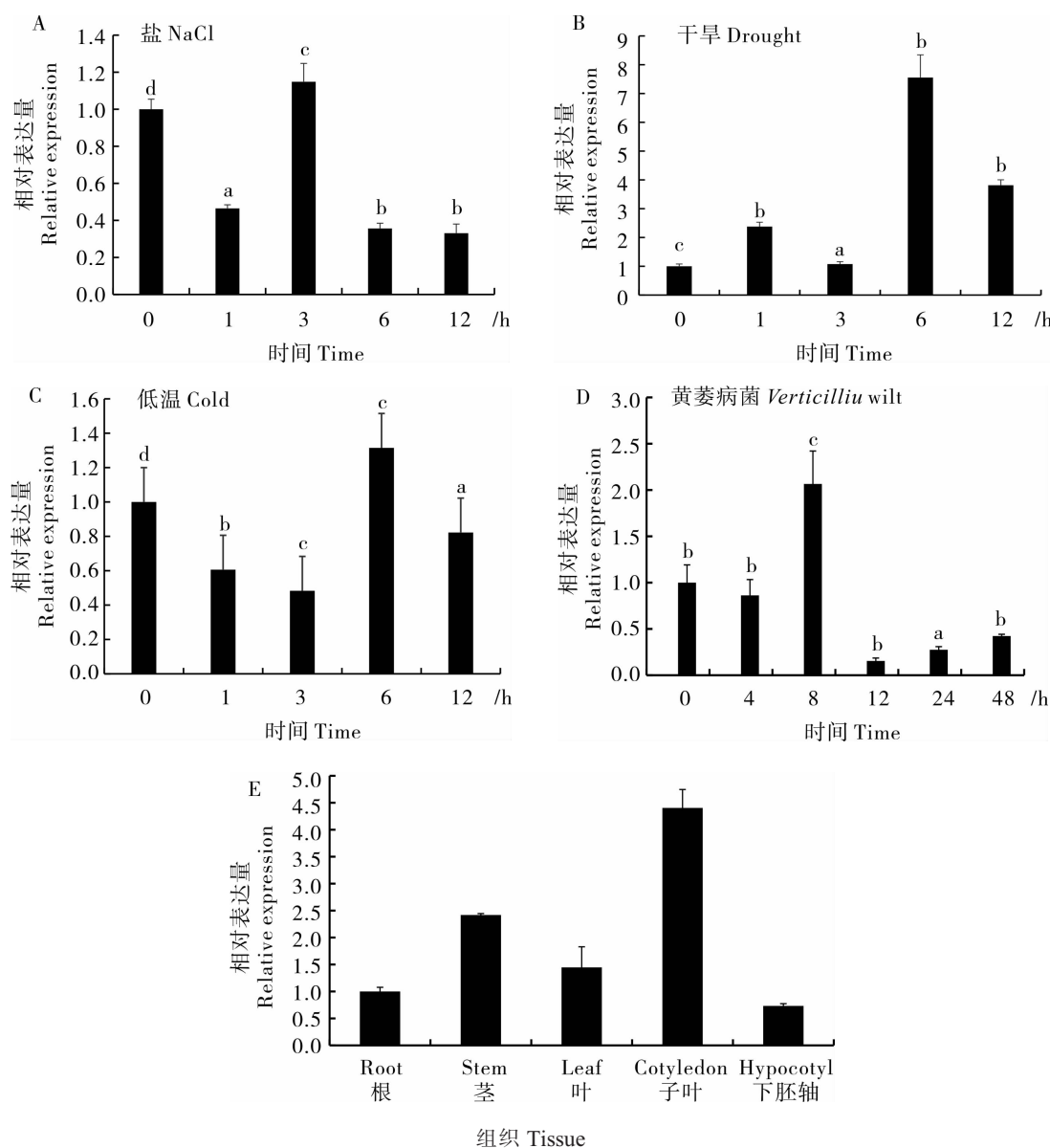
## 2.3 *GhRop4* 基因表达特征分析

高盐(200 mol·L<sup>-1</sup> NaCl)、干旱、低温和黄萎病菌逆境胁迫处理均影响 *GhRop4* 基因的表达,但是不同胁迫处理下基因表达模式不同。在高盐处理下,*GhRop4* 基因在处理 3 h 的表达量最大,处理后 1 h、6 h 和 12 h 的表达量均低于 0 h,

其中在 6 h 和 12 h 的表达量较低(图 4A)。干旱处理下,*GhRop4* 基因的表达量呈字母 M 型趋势,在 1 h 表达量升高,3 h 表达量降低,在 6 h 表达量急剧升高达到最大,随后又降低(图 4B)。低温处理后,随着胁迫处理时间的延长,*GhRop4* 基因表达量呈现逐渐下降趋势,在 3 h 时表达量最

低,在 6 h 表达量又急剧增加,12 h 表达量又有所下降(图 4C)。黄萎病菌侵染棉花后 4 h *GhRop4* 基因的表达量与 0 h 表达量基本一致,无显著差异;在侵染后 8 h *GhRop4* 基因的表达量显著增加,达到最大;处理后 12 h 表达急剧降到最低;在 24 h、48 h 基因表达量略微增加,但仍明显低于

0 h(图 4D)。*GhRop4* 基因在不同组织中的表达分析结果表明,*GhRop4* 基因在检测的根、茎、叶、子叶和下胚轴中均有表达,在子叶中表达最高,其次是茎、叶、根,在下胚轴中的表达量最低(图 4E),说明该基因的表达存在一定的组织特异性。



A: 盐处理下 *GhRop4* 基因的表达分析。B: 干旱处理下 *GhRop4* 基因的表达分析。C: 低温处理下 *GhRop4* 基因的表达分析。D: 棉花黄萎病菌处理下 *GhRop4* 基因的表达分析。E: *GhRop4* 基因在不同组织中的表达分析。以未处理(0 h)的表达量为参照,不同胁迫处理时间相同小写字母表示差异不显著( $P \geq 0.05$ ),不同小写字母之间表示差异显著( $P < 0.05$ )。

A: Expression analysis of *GhRop4* gene under salt stress. B: Expression analysis of *GhRop4* gene under drought stress. C: Expression analysis of *GhRop4* gene under cold stress. D: Expression analysis of *GhRop4* gene under Verticillium wilt. E: Expression of *GhRop4* in different tissues of cotton. The same lowercase letters showed no significant difference in different sample time, and the difference between the lowercase letters showed significant difference in different sample time at the 0.05 probability level.

图 4 *GhRop4* 基因表达谱分析

Fig. 4 Expression pattern analysis of *GhRop4*

### 3 讨论

棉花具有重要的经济和社会意义,对棉花的研究报道相对较多,特别是在逆境胁迫反应方面。如棉花 *GhWRKY91* 基因介导转基因拟南芥叶片衰老及对干旱胁迫的响应<sup>[29]</sup>。脱水素基因 *Gh\_A05G1554* (*GhDHN\_03*) 和 *Gh\_D05G1729* (*GhDHN\_04*) 介导植物耐受渗透胁迫和盐胁迫影响的能力<sup>[30]</sup>。棉花 *GhHB12*<sup>[31]</sup>、*GhLAC15*<sup>[32]</sup>、*GbaNA1*<sup>[33]</sup> 基因参与棉花抗黄萎病调控目前克隆到参与棉花抗逆的相关基因及信号传递途径主要涉及类受体蛋白、蛋白激酶、激素信号途径、转录因子调控、生化代谢酶、防卫基因合成等。信号转导在植物生长发育和环境适应过程中扮演关键的调控作用。在已报道的真核生物中,GTP 结合蛋白家族的 Rho 家族蛋白是 1 类信号转导的开关<sup>[34]</sup>。目前棉花有 6 个 *Rop* 基因的功能被报道,其中 5 个基因 *GhRacA*、*GhRacB*、*GhRac9*、*GhRac13*、*GhRac1* 功能研究集中在棉花纤维发育上<sup>[23-25]</sup>,1 个 *GhRop6* 基因参与了棉花对黄萎病抗性的调控<sup>[26]</sup>。本研究利用生物信息学、PCR 技术从陆地棉中克隆到 1 个 *Rop* 基因,命名为 *GhRop4*。本研究克隆的 *GhRop4* 基因与上述 6 个进行序列比对发现,相似性 70%~88%,表明 *GhRop4* 基因是新的未报道的 *Rop* 基因。DNA-MAN 多重序列比对结果表明,和已报道的 *Rop* 蛋白一样,含有 5 个(I-V)效应结构区,2 个开关区域,1 个 *Rop* 插入序列及 C 末端高度变异区(HVR),符合植物 *Rop* 蛋白的特征。

聚类分析中的 7 个 II 型 *Rop* 蛋白除了 *AtRop11* 参与生长发育调控,其余 6 个 *Rop* 蛋白正调控或负调控植物抗病反应。I 型 *Rop* 蛋白参与调控植物生长发育、抗逆反应和抗病性;聚类分析结果表明,*GhRop4* 蛋白属于 I 型 *Rop* 蛋白。与棉花 *GhRop4* 蛋白聚类在同一亚组的 *AtRop1* 和 *AtRop5* 正调控植物的抗逆性<sup>[35]</sup>,*AtRop6* 在这一过程发挥负调控作用<sup>[12]</sup>。*HvRacB*、*OsRac1*、*OsRac5* 和 *NtRac5* 参与植物对病原菌的入侵响应过程<sup>[19-20, 22]</sup>。一般认为蛋白质具有相似的结构域可能具有相似的生物学功能,*GhRop4* 蛋白与上述蛋白聚为一类,与它们的相似性均在 80%以上,

与 *OsRac5* 和 *NtRac5* 蛋白的相似性高达 88%和 90%,推测 *GhRop4* 蛋白可能在棉花抗逆性和抗病性反应中具有相似的功能。因此本研究分析了 *GhRop4* 基因在高盐、干旱、低温处理和黄萎病菌侵染后基因的表达情况,结果表明 *GhRop4* 基因在盐和低温处理下,基因整体上呈现先下调再上调后有下调的趋势,干旱和黄萎病菌处理后,基因呈现先升高后下降的表达趋势。在这 4 种逆境胁迫处理中 *GhRop4* 基因的表达受干旱调控的程度最强,其次是黄萎病菌。推测 *GhRop4* 基因更多地参与了棉花对干旱的适应反应过程,对黄萎病菌的响应也显示出该基因在棉花抗黄萎病反应中也发挥作用。上述结果暗示在后续的研究中应该更多地关注 *GhRop4* 基因在棉花抗旱和抗黄萎病中的功能。组织特异性分析表明, *GhRop4* 基因在棉花幼苗根、茎、叶、子叶和下胚轴中均有表达,与 *GhRac13*<sup>[24]</sup>、*GhRac1*<sup>[25]</sup>、*GhRop6*<sup>[26]</sup> 基因在检测的所有组织中均有表达的结果一致,但是存在一定的组织特异性,*GhRop4* 在子叶中的表达量较高,其余 3 个已报道的 *Rop* 基因主要在棉花纤维中表达,以上结果表明棉花 *GhRop* 基因在不同的组织中广泛地发挥着重要的调控功能。本研究为进一步深入研究 *GhRop4* 基因提供了重要的功能线索,也首次揭示 *GhRop* 基因在抗旱中的功能。

### 4 结论

本文以陆地棉 cDNA 为模板克隆到 1 个小 GTP 结合蛋白,其开放阅读框为 588 bp,编码 195 个氨基酸,包含 5 个效应结构区、2 个开关域、1 个 *Rop* 插入序列及 C 末端高度变异区,属于 I 型 *Rop* 蛋白,命名为 *GhRop4*。组织表达分析表明,*GhRop4* 基因在棉花幼苗根、茎、叶、子叶和下胚轴中均有表达,且在子叶中表达水平较高。同时,*GhRop4* 基因响应高盐、干旱、低温和棉花黄萎病菌等逆境胁迫。本试验结果对开展棉花耐逆机制研究有重要意义。

#### 参考文献:

- [1] Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins[J].



- Physiological Reviews, 2001, 81(1), 153-208. <http://doi.org/10.1002/orch.10075>
- [2] Ono E, Wong H L, Kawasaki T, et al. Essential role of the small GTPase Rac in disease resistance of rice[J]. Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America, 2001, 98(2): 759-764. <http://doi.org/10.1073/pnas.021273498>
- [3] Rocha N, Payne F, Huang-Doran I, et al. The metabolic syndrome-associated small G protein ARL15 plays a role in adipocyte differentiation and adiponectin secretion[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 17593. <http://doi.org/10.1038/s41598-017-17746-8>
- [4] Eliáš M, Klimeš V. Rho GTPases: Deciphering the evolutionary history of a complex protein family[J]. Methods in Molecular Biology, 2012, 827: 13-34. [http://doi.org/10.1007/978-1-61779-442-1\\_2](http://doi.org/10.1007/978-1-61779-442-1_2)
- [5] Feiquelman G, Fu Y, Yalovsky S. Rop GTPases structure-function and signaling pathways[J]. Plant Physiology, 2018, 176(1): 57-79. <http://doi.org/10.1104/pp.17.01415>
- [6] Yan J J, Xie B, Zhang L, et al. Small GTPases and stress responses of vvrn1 in the straw mushroom *Volvariella volvacea*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(9). pii: E1527. <http://doi.org/10.3390/ijms17091527>
- [7] 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
- [8] Miao H, Sun P, Liu J, et al. Overexpression of a novel ROP gene from the banana (*MaROP5g*) confers increased salt stress tolerance[J]. International Journal of Molecular Science, 2018, 19(10). pii: E3108. <http://doi.org/10.3390/ijms19103108>
- [9] Abbal P, Pradal M, Sauvage F X, et al. Molecular characterization and expression analysis of the Rop GTPase family in *Vitis vinifera*[J]. Journal of Experimental Botany, 2007, 58(10): 2641-2652. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm113>
- [10] Liu W, Chen A M, Luo L, et al. Characterization and expression analysis of *Medicago truncatula* ROP GTPase family during the early stage of symbiosis[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2010, 52(7): 639-652. <http://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00944.x>
- [11] Huang J B, Liu H, Chen M, et al. Rop3 GTPase contributes to polar auxin transport and auxin responses and is important for embryogenesis and seedling growth in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2014, 26(9): 3501-3518. <http://doi.org/10.1105/tpc.114.127902>
- [12] 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 Physiology, 2013, 161(3): 1172-1188. <http://doi.org/10.1104/pp.112.213165>
- [13] Ma Q H, Zhu H H, Han J Q. Wheat ROP proteins modulate defense response through lignin metabolism[J]. Plant Science 2017, 262: 32-38. <http://doi.org/10.1016/j.plantsci>
- [14] Zermiani M, Zonin E, Nonis A, et al. Ethylene negatively regulates transcript abundance of ROP-GAP rheostat-encoding genes and affects apoplastic reactive oxygen species homeostasis in epicarps of cold stored apple fruits[J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 66 (22): 7255-7270. <http://doi.org/10.1093/jxb/erv422>
- [15] Li Z, Kang J, Sui N, et al. ROP11 GTPase is a negative regulator of multiple ABA responses in *Arabidopsis*[J]. Journal Integrative Plant Biology, 2012, 54(3): 169-179. <http://doi.org/10.1111/j.1744-7909>
- [16] Cao Y, Li Z, Chen T, et al. Overexpression of a tobacco small G protein gene *NtRop1* causes salt sensitivity and hydrogen peroxide production in transgenic plants [J]. Science in China Series C-Life sciences, 2008, 51(5): 383-390. <http://doi.org/10.1007/s11427-008-0060-6>
- [17] Wang T Z, Xia X Z, Zhao M G, et al. Expression of a *Medicago falcata* small GTPase gene, *MfARL1* enhanced tolerance to salt stress in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2013, 63:227-235. <http://doi.org/10.1016/j.plaphy>
- [18] Li C, Lu H, Li W, et al. A ROP2-RIC1 pathway fine-tunes microtubule reorganization for salt tolerance in *Arabidopsis*[J]. Plant, Cell & Environment, 2017, 40(7): 1127-1142. <http://doi.org/10.1111/pce.12905>
- [19] Chen L, Shiotani K, Togashi T. Analysis of the Rac/Rop small GTPase family in rice: Expression, subcellular localization and role in disease resistance[J]. Plant Cell Physiology, 2010, 51(4): 585-595. <http://doi.org/10.1093/pcp/pcq024>
- [20] Morel J, Fromentin J, Blein J P, et al. Rac regulation of NtrbohD, the oxidase responsible for the oxidative burst in elicited tobacco cell[J]. The Plant Journal, 2004, 37(2): 282-293. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01957.x>
- [21] Kiirika L M, Bergmann H F, Schikowsky C, et al. Silencing of the Rac1 GTPase MtROP9 in *Medicago truncatula* stimulates early mycorrhizal and oomycete root colonizations but negatively affects rhizobial infection[J]. Plant Physiology, 2012, 159(1): 501-516. <http://doi.org/10.1104/pp.112.193706>
- [22] Reiner T, Hoefle C, Hü ckelhoven R. A barley SKP1-like protein controls abundance of the susceptibility factor RACB and influences the interaction of barley with the barley powdery mildew fungus[J]. Molecular Plant Pathology, 2015, 17(2): 184-195. <http://doi.org/10.1111/mpp.12271>
- [23] 李先碧, 肖月华, 罗明, 等. 两个棉花 Rac 蛋白基因的克隆与表达分析[J]. 遗传学报, 2005, 32(1): 72-78
- Li X B, Xiao Y H, Luo M, et al. Cloning and expression analysis of two Rac genes from cotton (*Gossypium hirsutum* L.)[J]. Acta Genetica Sinica, 2005, 32(1): 72-78.



- [24] Delmer D P, Pear J R, Andrawis A, et al. Genes encoding small GTP-binding proteins analogous to mammalian rac are preferentially expressed in developing cotton fibers[J]. Molecular and General Genetics (MGG), 1995, 248(1): 43-51. <https://doi.org/10.1007/bf02456612>
- [25] Kim H J, Triplett B A. Characterization of GhRac1 GTPase expressed in developing cotton (*Gossypium hirsutum* L.) fibers[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2004, 1679(3): 214-221. <https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2004.06.008>
- [26] 王钰静. *GhROP6* 在棉花抗黄萎病中的功能研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2017.
- Wang Yujin. Functional analysis of *GhROP6* in cotton responsive to *verticillium dahliae* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2017.
- [27] 李月, 代培红, 刘超. 海岛棉 5 个 *CBF/DREB* 基因的克隆与表达分析[J]. 棉花学报, 2016, 28(1): 42-51. <https://doi.org/10.11963/issn.1002-7807.201601006>
- Li Y, Dai P H, Liu C. Characterization and expression analysis of five *CBF/DREB* genes from *Gossypium barbadense* L [J]. Cotton Science, 2016, 28(1): 42-51.
- [28] 李月, 孙杰, 陈受宜, 等. 棉花转录因子 *GhGT30* 基因的克隆及转录功能分析[J]. 作物学报, 2013, 39(4): 1-10. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1006.2013.00806>
- Li Y, Sun J, Chen S Y, et al. Cloning and transcription function analysis of cotton transcription factor *GhGT30* gene[J]. Acta Agronomica Sinica, 2013, 39(4): 1-10.
- [29] Gu L, Ma Q, Zhang C, et al. The Cotton GhWRKY91 transcription factor mediates leaf senescence and responses to drought stress in transgenic *Arabidopsis thaliana*[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 1352. <http://doi.org/10.3389/fpls.2019.01352>
- [30] Kirungu J N, Magwanga R O, Pu L, et al. Knockdown of *Gh\_A05G1554 (GhDHN\_03)* and *Gh\_D05G1729 (GhDHN\_04)* Dehydrin genes, reveals their potential role in enhancing osmotic and salt tolerance in cotton[J]. Genomics, 2019 (in press). <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.11.003>
- [31] He X, Wang T, Zhu W, et al. GhHB12, a HD-ZIP I transcription factor, negatively regulates the cotton resistance to *Verticillium dahliae*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(12): 3997. <http://doi.org/10.3390/ijms19123997>
- [32] Zhang Y, Wu L, Wang X, et al. The cotton laccase gene *Gh-LAC15* enhances *Verticillium* wilt resistance via an increase in defence-induced lignification and lignin components in the cell walls of plants[J]. Molecular Plant Pathology, 2019, 20(3): 309-322. <http://doi.org/10.1111/mpp.12755>
- [33] Li N Y, Zhou L, Zhang D D, et al. Heterologous expression of the cotton NBS-LRR gene *GbaNA1* enhances *Verticillium* wilt resistance in *Arabidopsis*[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 119. <http://doi.org/10.3389/fpls.2018.00119>
- [34] Berken A, Wittinghofer A. Structure and function of Rho-type molecular switches in plants[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2008, 46(3): 380-393. <http://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.12.008>
- [35] Vernoud V, Horton A C, Yang Z, et al. Analysis of the small GTPase gene superfamily of *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2003, 131(3): 1191-1208. <https://doi.org/10.1104/pp.013052>