

拟南芥 *RopGEFs* 家族基因在外源脱落酸处理下的表达分析

王会, 金宇骅, 卢曼曼, 葛光君, 向芬, 李杜, 朱咏华*, 郑巧林*

湖南大学生物学院生物技术系, 长沙 410082

摘要: ABA不同浓度和不同时间处理拟南芥野生型7天龄幼苗, 采用实时荧光定量PCR方法, 分析小G蛋白ROP10和ROP鸟苷酸交换因子RopGEFs基因的表达水平差异。结果表明, *RopGEF7-10, 12*及*13*没有检测到表达, 而*RopGEF1-6, 11, 14*及*ROP10*在ABA处理下表现出不同的应答趋势, 其中*RopGEF5*基因的表达变化与*ROP10*的变化相似。推测RopGEF5有可能在ROP10介导的ABA信号转导途径中起调控作用。

关键词: 拟南芥; 脱落酸; *ROP10*; *RopGEFs*

Expression Analysis of *RopGEFs* Genes in *Arabidopsis thaliana* Treated with ABA

WANG Hui, JIN Yu-Fei, LU Man-Man, GE Guang-Jun, XIANG Fen, LI Du, ZHU Yong-Hua*, ZHENG Qiao-Lin*

Department of Biotechnology, College of Biology, Hunan University, Changsha 410082, China

Abstract: The real-time fluorescence quantitative PCR was carried out to analyze the expression profiles of ROP10 (Rho-related GTPase from plants) and RopGEFs (guanine nucleotide exchange factor) genes in 7-d seedlings of *Arabidopsis thaliana* in response to ABA with different concentrations or periods. The results showed that the expression of *RopGEF7-10, 12* and *13* could not be detected in wild type (Col-4) seedlings. *RopGEF1-6, 11, 14* and *ROP10* indicated different expression patterns in response to ABA treatment, while *RopGEF5* showed similar expression profile to *ROP10*. These results suggested that RopGEF5 might act as a regulate factor in ROP10-dependent ABA signaling pathway.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; ABA; *ROP10*; *RopGEFs*

植物激素脱落酸(abscisic acid, ABA)可调节农艺上许多重要的植物生长和发育过程, 同时, 还介导了植物对诸如干旱、高盐、低温等环境胁迫的生理反应。目前, 对ABA信号转导机制的了解较少。在已知的与ABA信号转导有关的成分中, 小G蛋白(单体鸟苷酸结合蛋白)引人注目, 植物拥有其独特的ROP (Rho-related GTPase from plants)亚家族(Vernoud等2003)。ROPs作为植物生长发育过程中重要的“分子开关”, 参与调控多种信号转导过程(Berken 2006)。拟南芥有11个ROPs成员, 其中ROP10蛋白是ABA应答的特异性负调控因子(Zheng等2002), 其介导的ABA信号转导机制还不明确。

为了阐明与ROP10有关的ABA信号转导机制, 首先需要揭示该信号转导通路的组成结构和功能。鸟苷酸交换因子 RopGEFs (guanine nucleotide ex-

change factor)为ROPs的上游调控子, 能使细胞表面的受体样激酶受胞外信号激活后, 促进非活性ROPs转变为活性形式, 介导产生胞内信息(Zhang和McCormick 2007)。已知拟南芥基因组编码了14个植物特有的*RopGEFs* (Berken等2005), 为确定是否有RopGEFs作用于ROP10上游以调控ABA应答, 我们比较分析了*RopGEFs*及*ROP10*基因在外源ABA处理后的表达情况。初步筛选出可能为ROP10上游调控子的RopGEF, 为更详尽认识ROP10介导的ABA信号转导通路及作用机制建立基础。

收稿 2010-04-07 修定 2010-07-16

资助 湖南省科技计划项目(2009FJ3198)。

* 通讯作者(E-mail: zyh20@hotmail.com, qiaolzheng@hotmail.com; Tel: 0731-88821565, 0731-88664028)。

材料与方法

1 材料

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)哥伦比亚生态型野生型(wide type, WT) Col-4 为本实验室保存。种子分别用 70% 乙醇消毒 30 s 和 10% NaClO 消毒 7 min, 无菌水清洗, 于黑暗下 4 °C 春化 4 d。用 0.1% 琼脂悬液悬浮种子后均匀点播在含 0.8% 琼脂的 MS 固体培养基表面, 置于 22 °C 全日照培养箱中生长。移栽的植株则放在培养室中于长日照(光照 16 h·d⁻¹, 光照强度为 100 μmol·m⁻²·s⁻¹)条件下生长。

2 方法

2.1 ABA 处理 取拟南芥生长 7 天龄幼苗, 根部分别置于含不同浓度(3、10、10²、10³、10⁴、5×10⁴、10⁵ nmol·L⁻¹) ABA 的 MS 液体培养基中, 处理 4 h; 或置于含 10 nmol·L⁻¹ ABA 的液体培养基中, 分别处理不同时间(0.5、1、2、4、6、8 h)。以不含 ABA 的 MS 液体培养基处理的材料为对照。选取 40 天龄拟南芥, 将含不同浓度 ABA 溶液喷洒在花上, 处理 4 h, 用透气性较好的纸袋罩住植株, 防止溶液挥发。以不含 ABA 的蒸馏水喷洒的材料为对照。上述处理后的幼苗或花以液氮速冻, 保存于 -80 °C 冰箱中用于目标基因的表达分析。

2.2 总RNA的提取 按RNAeasy Mini Kit (Ambiogen 生物技术有限公司)说明书, 分别提取拟南芥幼苗和花的总 RNA。除去基因组 DNA, 按照 Invitrogen M-MLV Reverse Transcriptase Instruction 说明书进行反转录, 合成 cDNA 的第一链, 该合成链作为实时荧光定量 PCR 的模板, 用于检测 *ROP10* 和 *RopGEFs* 基因的表达水平。

2.3 引物的设计合成 根据拟南芥基因组数据库 (TAIR-Home Page) 中 *ROP10*、*RopGEFs* 以及 *ACT7* 的 cDNA 序列, 设计 PCR 引物, 序列见表 1。

2.4 实时荧光定量PCR反应体系和条件 以幼苗或花的各 cDNA 样品为模板, 分别用上述各组特异性引物进行定量 PCR 反应。反应体系为 10 μL: DEPC 水 5.4 μL、10× 缓冲液 1 μL、10 mmol·L⁻¹ dNTPs 0.2 μL、MgCl₂ 0.8 μL、引物各 0.05 μL、SYBR Green I 0.25 μL、ROX 0.05 μL、2.5 U·μL⁻¹ JumpStart Taq 聚合酶 0.2 μL、cDNA 模板 2 μL。其中, ROX 为被动参考染料。反应程序为: 95 °C 10 min, 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40 个循环。*ACT7* 的表达水平被用作均一化的内参。未经 ABA 处理的材料作为参比样本, 所有检测样品均设置 3 个重复。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名称	引物序列(5' → 3')	引物名称	引物序列(5' → 3')
RopGEF1F	CGAGAGTTCAGCAGCTTCTC	RopGEF1R	AGTAAAATCCTCTACCAGCGACAAC
RopGEF2F	CCTAGTGATTGGCCTGTCTTAACC	RopGEF2R	CAAGGTGCTCATCAGTCTCAATCT
RopGEF3F	TTCAATTCATCGTCTGGATCGT	RopGEF3R	GGTTGAATCGAAATCGTCTTTAAG
RopGEF4F	CTTCGAATTCGACCAAATG	RopGEF4R	AACGTGCAACCGGTGAGATAAT
RopGEF5F	GAAAATATGCGTTAATCCGTCAGA	RopGEF5R	CCTTTGATGGACTGATGTTGAGT
RopGEF6F	TCTCTATGATCTCTGCTTCCTTTTTC	RopGEF6R	CCCTCAAACCCGATACAGCTAT
RopGEF7F	CACAGACCCACTCACTGCATTT	RopGEF7R	GAGAACCCTTATTGTTTCGATCTGATT
RopGEF8F	ATTGTCGTGGAGAACGGAGATT	RopGEF8R	AATCATTGGAAGGCTGCTCTCT
RopGEF9F	CAAAAGACATGTGAACAACTAAAATGA	RopGEF9R	GAAACAAAACCTGGAAGGAAGATAATAGTTA
RopGEF10F	AGAAGAAGAAAAACACAAAGAGA	RopGEF10R	ATCCTAAAACCAATGCCTGCAT
RopGEF11F	TGGATGGTTCTGACAATTTGGA	RopGEF11R	AGGCAAAGAAGGTCCGGTCAA
RopGEF12F	AGCGTCGAGACCGGTTTAGA	RopGEF12R	CCGACGCCGATCTTGAAA
RopGEF13F	CCTCCAGCATCCAGCCAAT	RopGEF13R	TTTCTCTTTGCCTGAATCTTTCTG
RopGEF14F	GATGGGACAGAGACTGGTTGATTT	RopGEF14R	TTACTCAAACACCACAGTCTACTGCTT
ROP10F	GGCCAGTTTGTGATTCTGATAAGTC	ROP10R	AAACATCAGGGTCCATATACAAACAG
ACT7F	ATCCCTCAGVACCTTCCAAC	ACT7R	ACAACTCACCACCACGAAC

实验结果

1 不同浓度ABA处理对拟南芥*RopGEFs*和*ROP10*表达水平的影响

Shin等(2009)报道*RopGEF7~9*和*13*只在花中表达, *RopGEF10*和*12*主要在花和根中表达。我们在拟南芥花中能检测到所有14个*RopGEFs*的表达(图1), 而在幼苗中只检测到8个*RopGEFs* (*RopGEF1~6, 11, 14*)的表达(图2)。这与Shin等的报道基本一致, 显示了*RopGEFs*表达的组织特异性。

选取3个浓度(10 、 10^2 、 10^3 nmol·L⁻¹)的ABA直接喷施拟南芥4 h后, 花中14个*RopGEFs*基因及*ROP10*表达量显著降低, 浓度趋势基本一致(图1), 而*ACT7*在花中的表达未受ABA的影响(结果未显示)。可见, 花中*RopGEFs*和*ROP10*的转录水平受ABA调控, 其作用机制有待进一步研究。由于花中没有找到各*RopGEFs*的ABA应答差异, 且Zheng等(2002)报道*ROP10*转录水平在根尖部位受ABA特异性抑制, 所以我们选择采用幼苗为研究材料进行详尽分析。

在*ROP10*介导ABA信号转导途径的研究中, 不同报道采取了不同的ABA处理浓度($0.3\sim 50$ μmol·L⁻¹) (Xin等2005; Zheng等2002)。为选择最适宜的ABA处理浓度, 我们分别以从低到高的ABA浓度(3 、 10 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 5×10^4 、 10^5 nmol·L⁻¹)处理7天龄幼苗4 h, 实时荧光定量PCR检测结果显示, *RopGEF4*和*6*表达几乎没有变化, 而其他*RopGEFs*的表达随ABA浓度变化显示出不同的变化趋势(图2)。ABA基本抑制*RopGEF1*表达, 诱导*RopGEF2*和*11*表达。*RopGEF3*的表达在低浓度ABA处理时受到抑制, 而ABA浓度达到 100 nmol·L⁻¹时却开始增加。在ABA浓度低于 10 nmol·L⁻¹的范围内, 随着浓度的升高, *RopGEF5*和*ROP10*基因的表达量增加; 当ABA浓度高于 10 nmol·L⁻¹时, 随着浓度的升高, 两个基因的表达量逐渐减少。这一结果表明 10 nmol·L⁻¹是*ROP10*基因ABA处理的适宜浓度。

2 ABA处理不同时间对拟南芥*RopGEFs*和*ROP10*表达水平的影响

拟南芥7天龄幼苗用ABA浓度 10 nmol·L⁻¹分别处理0.5、1、2、4、6和8 h后, 各*RopGEFs*的表达趋势不同(图3)。*RopGEF4*和*6*的表达不受ABA影响, *RopGEF1*、*3*和*14*的表达受ABA抑制, 而*RopGEF2*、*5*和*11*的表达却基本受ABA诱导。*RopGEF5*随ABA处理时间的表达模式与*ROP10*仍表现出一致性, 即在ABA处理4 h时, 两个基因的mRNA表达量达到最大值, 之后开始下降。

讨 论

目前已有研究证明, *ROP10*蛋白在一共有的ABA信号转导通路中, 特异性负调控ABA的应答反应。*ROP10*的质膜定位是其发挥功能的前提(Zheng等2002)。拟南芥基因组编码的14个*RopGEFs*也定位在质膜上, 而且*RopGEFs*与质膜定位的受体样蛋白激酶(receptor-like kinases, RLKs)活性复合物有直接互作(Gu等2006; Zhang和McCormick2007)。Trotochaud等(1999)报道, *ROPs*蛋白似乎也与RLKs活性复合物相关。Osakabe等(2010)已证明, 一个受体蛋白激酶RPK1参与了ABA信号转导过程。所以, 我们推测RLK有可能作为一个质膜定位的受体, 通过*RopGEFs*来调控*ROP10*。

本文以不同浓度ABA处理拟南芥野生型7天龄幼苗4 h, 对其*RopGEFs*和*ROP10*的mRNA水平进行分析。*RopGEF7~10, 12*和*13*主要在花中表达, 因此从可检测到的*RopGEF1~6, 11*和*14*的mRNA水平看, *RopGEF5*的表达值得关注, 不同ABA浓度下*RopGEF5*的表达变化体现出和*ROP10*类似的模式。同样, 当我们用 10 nmol·L⁻¹ ABA处理幼苗以不同时间, 它们也表现出相似的表达趋势。这暗示*RopGEF5*有可能在*ROP10*介导的ABA信号转导途径中起调控作用。可通过蛋白质-蛋白质相互作用研究及*RopGEF5*和*ROP10*突变体表型、相关基因的表达水平分析等研究进一步验证此推论。

Xin等(2005)指出, *ROP10*在渗透胁迫和盐胁迫

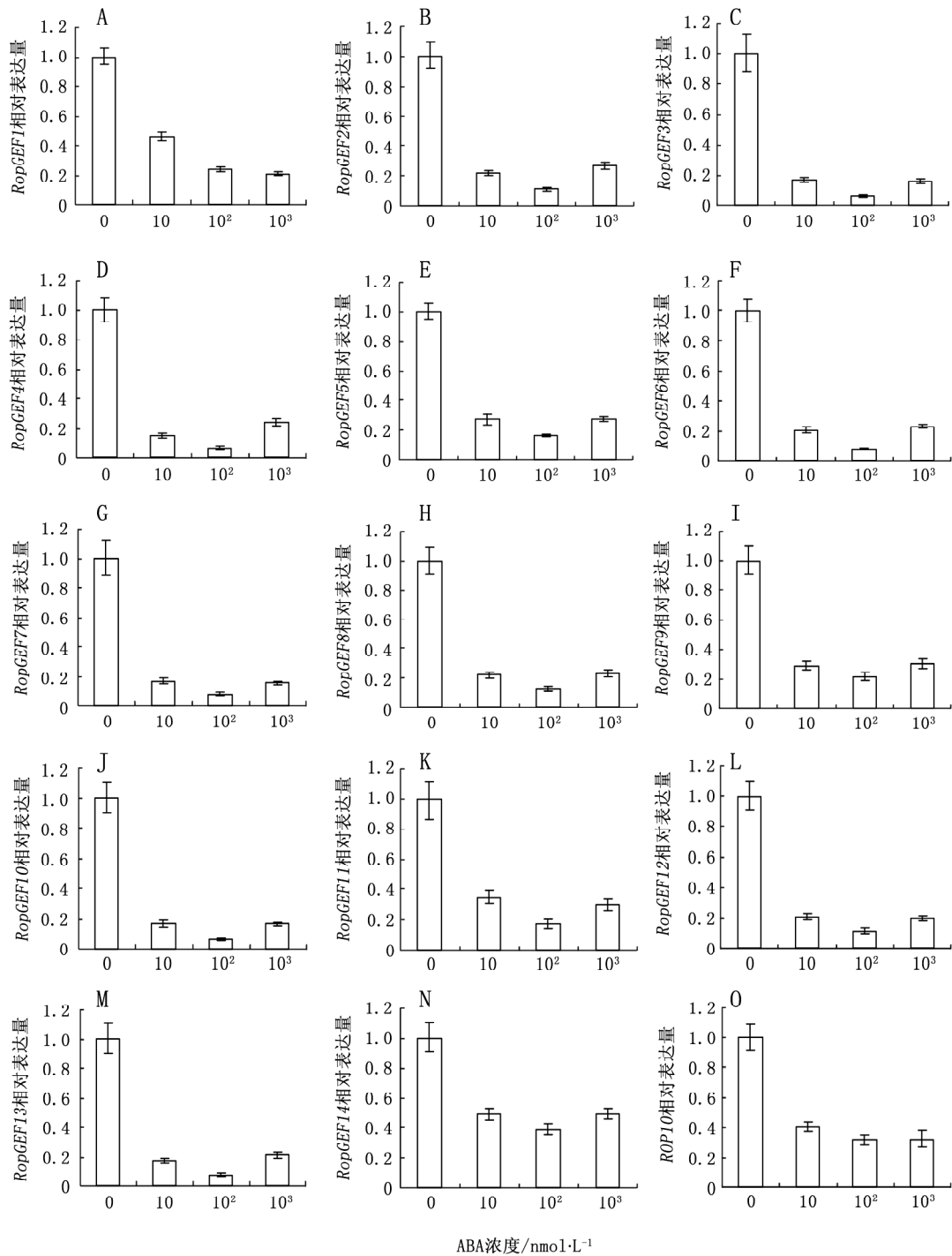


图1 不同浓度ABA处理拟南芥花后的 $ROP10$ 和 $RopGEFs$ 基因表达

Fig.1 Different expression profiles of $ROP10$ and $RopGEFs$ genes in *A. thaliana* flowers in response to different concentrations of ABA

迫应答中起负调控作用。最近, Shin等(2009)发现 $RopGEF5$ 的表达量在盐和干旱胁迫下显著增加, 热胁迫时降低。有些非生物胁迫的信号转导过程由

ABA介导或关联(Chinnusamy等2004)。这些研究结果也暗示 $RopGEF5$ 与 $ROP10$ 作用, 参与ABA应答。对其作用机制的阐述还有待进一步研究。

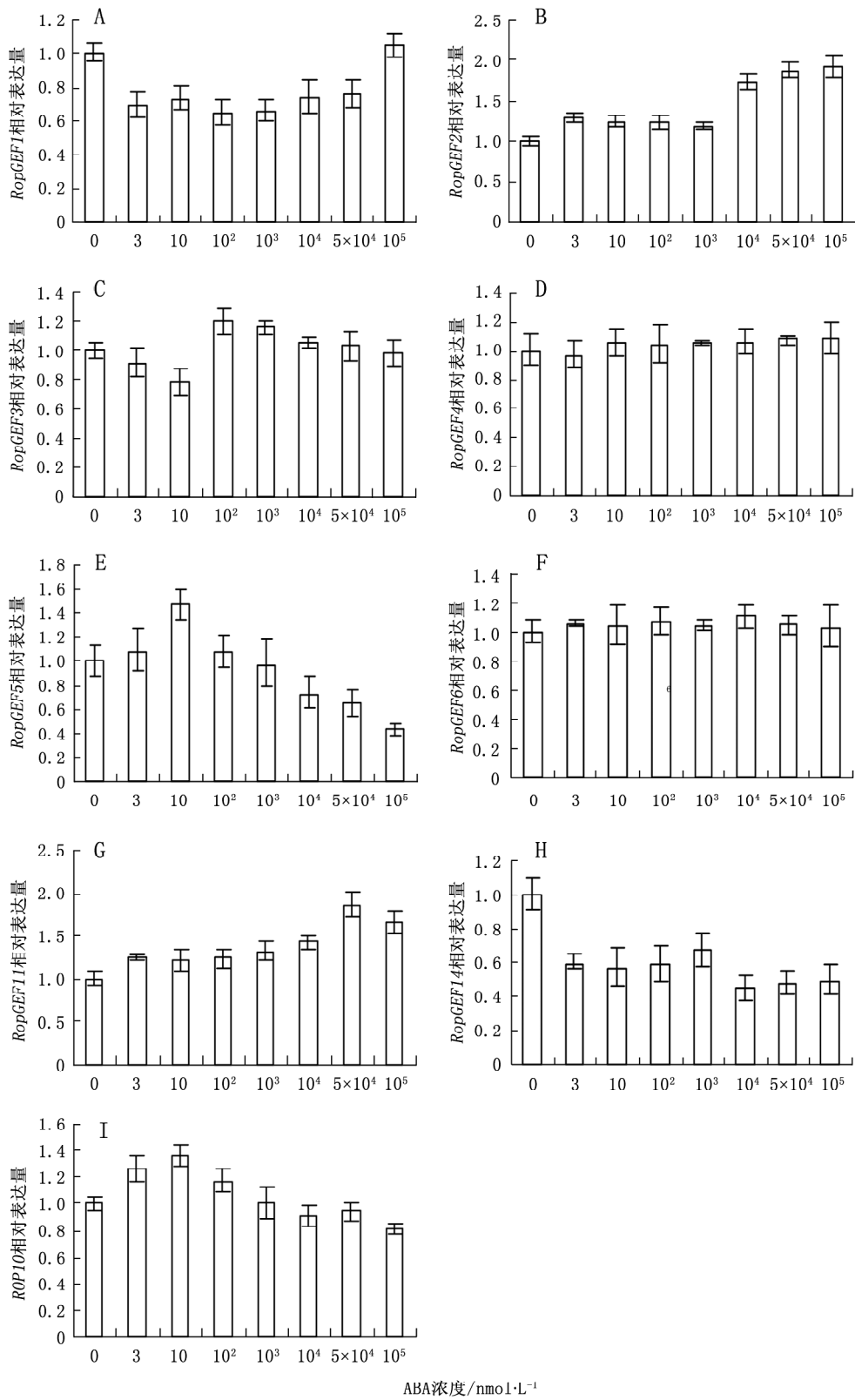


图2 不同浓度 ABA 处理拟南芥幼苗后的 *ROP10* 和 *RopGEFs* 基因表达
 Fig.2 Different expression profiles of *ROP10* and *RopGEFs* genes in *A. thaliana* seedlings in response to different concentrations of ABA

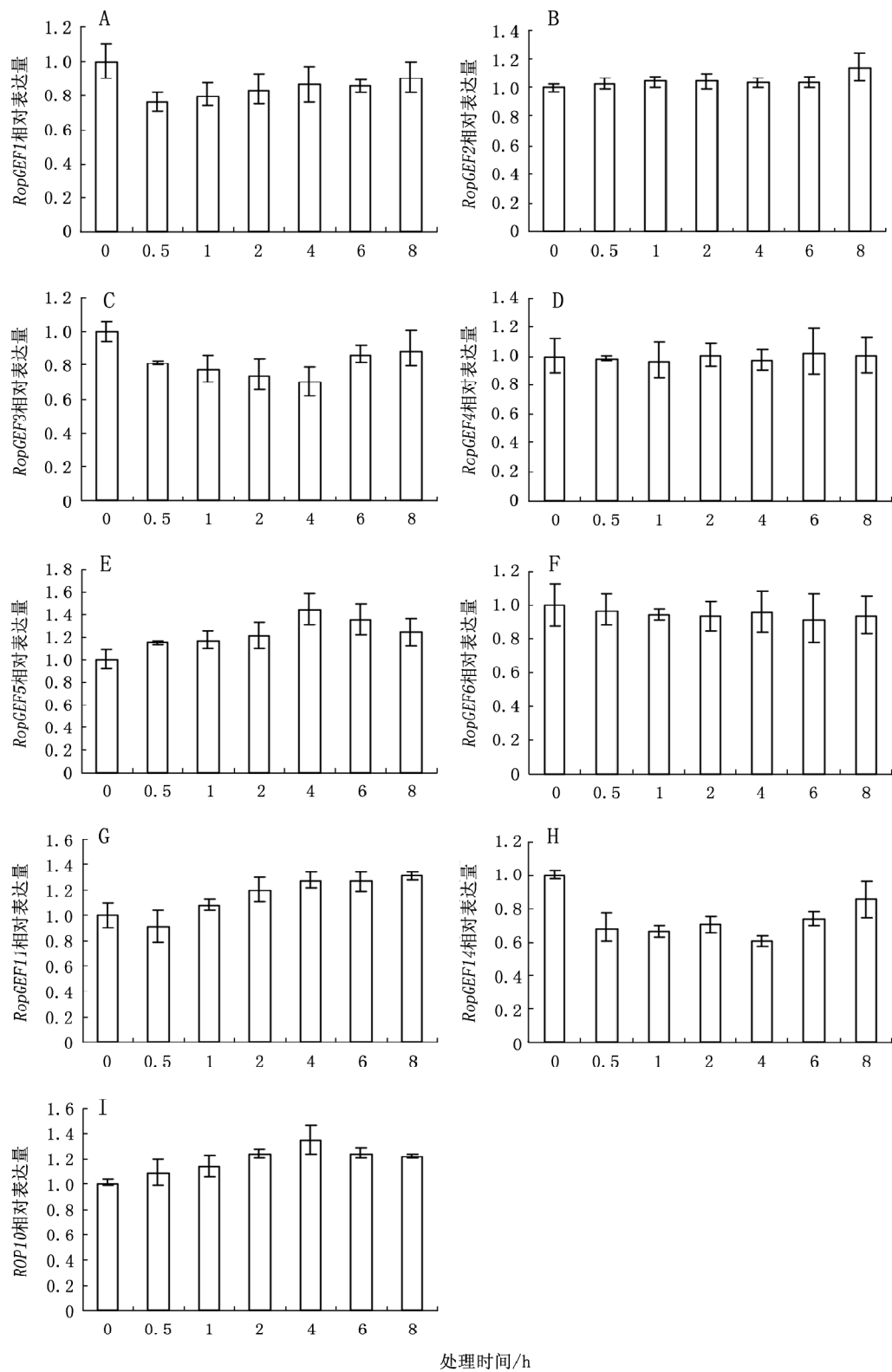


图3 ABA (10 nmol·L⁻¹)处理拟南芥幼苗不同时间后的 *ROP10* 和 *RopGEFs* 基因表达
 Fig.3 Different expression profiles of *ROP10* and *RopGEFs* genes in *A. thaliana* seedling in response to 10 nmol·L⁻¹ ABA treatment with different periods

参考文献

- Berken A (2006). ROPs in the spotlight of plant signal transduction. *Cell Mol Life Sci*, 63: 2446~2459
- Berken A, Thomas C, Wittinghofer A (2005). A new family of RhoGEFs activates the Rop molecular switch in plants. *Nature*, 436: 1176~1180
- Chinnusamy V, Schumaker K, Zhu JK (2004). Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *J Exp Bot*, 55: 225~236
- Gu Y, Li S, Lord EM, Yang Z (2006). Members of a novel class of *Arabidopsis* Rho guanine nucleotide exchange factors control Rho GTPase-dependent polar growth. *Plant Cell*, 18: 366~381
- Osakabe Y, Mizuno S, Tanaka H, Maruyama K, Osakabe K, Todaka D, Fujita Y, Kobayashi M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2010). Overproduction of the membrane-bound receptor-like protein kinase 1, RPK1, enhances abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 285: 9190~9201
- Shin DH, Kim TL, Kwon YK, Cho MH, Yoo J, Jeon JS, Hahn TR, Bhoo SH (2009). Characterization of *Arabidopsis* RopGEF family genes in response to abiotic stresses. *Plant Biotechnol Rep*, 3: 183~190
- Trotochaud AE, Hao T, Wu G, Yang Z, Clark SE (1999). The CLAVATA1 receptor-like kinase requires CLAVATA3 for its assembly into a signaling complex that includes KAPP and a Rho-related protein. *Plant Cell*, 11: 393~406
- Vernoud V, Horton AC, Yang Z, Nielsen E (2003). Analysis of the small GTPase gene superfamily of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 131: 1191~1208
- Xin Z, Zhao Y, Zheng ZL (2005). Transcriptome analysis reveals specific modulation of abscisic acid signaling by ROP10 small GTPase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 139: 1350~1365
- Zhang Y, McCormick S (2007). A distinct mechanism regulating a pollen-specific guanine nucleotide exchange factor for the small GTPase Rop in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 18830~18835
- Zheng ZL, Nafisi M, Tam A, Li H, Crowell DN, Chary SN, Schroeder JI, 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