

茶树鸟苷酸交换因子 *CsRopGEF1* 和 *CsRopGEF3* 基因的克隆及表达特性

赵悦¹, 申加枝¹, 马媛春¹, 文博¹, 周琳^{1,2}, 朱旭君¹, 王玉花¹, 房婉萍^{1,①}

(1. 南京农业大学茶叶科学研究所, 江苏南京 210095; 2. 上海市农业科学院林木果树研究所, 上海 201106)

摘要: 从茶树(*Camellia sinensis* (Linn.) O. Ktze.) 品种‘龙井长叶’(‘Longjingchangye’) 叶片中克隆获得鸟苷酸交换因子 RopGEF 的编码基因 *CsRopGEF1* 和 *CsRopGEF3*; 用生物信息学方法分析了这 2 个基因编码的氨基酸序列的同源性及其理化性质; 并用 qRT-PCR 研究了 *CsRopGEF1* 和 *CsRopGEF3* 基因在茶树不同组织中的表达模式及其对外源 ABA 处理的响应模式。结果显示: 茶树 *CsRopGEF1* 和 *CsRopGEF3* 基因全长分别为 1 844 和 1 509 bp, 分别包含长度 1 731 和 1 434 bp 的开放阅读框, 各编码 576 和 477 个氨基酸。茶树 *CsRopGEF1* 和 *CsRopGEF3* 基因编码的氨基酸序列均含有保守的 PRONE 结构域, 其中均包含保守基序 Motif 1 至 Motif 7; 分子式分别为 $C_{2797}H_{4402}N_{762}O_{856}S_{32}$ 和 $C_{2356}H_{3696}N_{648}O_{752}S_{29}$, 理论相对分子质量分别为 63 420 和 54 060, 理论等电点分别为 pI 6.69 和 pI 5.10, 不稳定系数均大于 40, 亲水性平均系数分别为 -0.368 和 -0.552, 并存在多个磷酸化位点, 以丝氨酸磷酸化位点最多, 表明这 2 个基因编码的氨基酸序列均属于不稳定的酸性、亲水性蛋白, 且其功能可能受磷酸化调控。茶树 *CsRopGEF1* 和 *CsRopGEF3* 基因编码的氨基酸序列与水稻(*Oryza sativa* Linn.) 等植物的 RopGEF1 和 RopGEF3 氨基酸序列的相似度均在 75% 以上, 且与双子叶植物同类氨基酸序列的同源性较高, 而与单子叶植物同类氨基酸序列的同源性较低。qRT-PCR 分析结果显示: 茶树 *CsRopGEF1* 基因的相对表达量在茎中最高、叶片中最低, 且差异显著 ($P < 0.05$); 而 *CsRopGEF3* 基因的相对表达量在根和茎中均较高, 且均显著高于叶片, 表明 *CsRopGEF1* 和 *CsRopGEF3* 基因表达存在组织特异性。经 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 外源 ABA 处理后, 茶树 *CsRopGEF1* 基因的相对表达量整体显著下调, 而 *CsRopGEF3* 基因的相对表达量则整体上调, 说明这 2 个基因对外源 ABA 的响应模式存在差异。根据研究结果, 推测茶树 *CsRopGEF1* 和 *CsRopGEF3* 基因在 ABA 信号转导途径中受不同的调控作用, 且可能在茶树根和茎的生长发育中发挥重要作用。

关键词: 茶树; *RopGEF* 基因; 理化特性; 同源性; 表达特性

中图分类号: Q786; S571.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2018)04-0001-10

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2018.04.01

Cloning and expression properties of *CsRopGEF1* and *CsRopGEF3* genes of guanine nucleotide exchange factor in *Camellia sinensis* ZHAO Yue¹, SHEN Jiazhi¹, MA Yuanchun¹, WEN Bo¹, ZHOU Lin^{1,2}, ZHU Xujun¹, WANG Yuhua¹, FANG Wanping^{1,①} (1. Tea Research Institute, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Forest & Fruit Tree Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2018, 27(4): 1-10

Abstract: The coding gene *CsRopGEF1* and *CsRopGEF3* of guanine nucleotide exchange factor RopGEF were cloned from leaves of cultivar ‘Longjingchangye’ of *Camellia sinensis* (Linn.) O. Ktze.; the homology and physicochemical properties of amino acid sequences encoded by these two genes were analyzed by bioinformatics method; the expression patterns of *CsRopGEF1* and *CsRopGEF3* genes in

收稿日期: 2018-05-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31370688; 31770733); 江苏省科技品种后补助项目(BE2016417); 国家茶叶产业技术体系农业部财政专项(CARS-19); 江苏省现代农业(茶叶)产业技术体系良种繁育(SXGC[2017]279)

作者简介: 赵悦(1994—), 女, 江苏盐城人, 硕士研究生, 主要从事茶树育种研究。

①通信作者 E-mail: fangwp@njau.edu.cn

different tissues of *C. sinensis* and their response patterns to exogenous ABA treatment were studied by qRT-PCR. The results show that the full lengths of *CsRopGEF1* and *CsRopGEF3* genes from *C. sinensis* are 1 844 and 1 509 bp, which contain open reading frames with length of 1 731 and 1 434 bp, and encode 576 and 477 amino acids, respectively. Both amino acid sequences encoded by *CsRopGEF1* and *CsRopGEF3* genes from *C. sinensis* contain conserved PRONE domain with conserved motif Motif 1 to Motif 7; the molecular formulas are $C_{2797}H_{4402}N_{762}O_{856}S_{32}$ and $C_{2356}H_{3696}N_{648}O_{752}S_{29}$, the theoretical relative molecular masses are 63 420 and 54 060, and the theoretical isoelectric points are pI 6.69 and pI 5.10, the instability coefficients are all greater than 40, the average hydrophilicity coefficient are -0.368 and -0.552, respectively, and there are multiple phosphorylation sites, and phosphorylation sites of serine are the most, it is indicating that the amino acid sequences encoded by these two genes belong to unstable acidic and hydrophilic proteins, and their functions may be regulated by phosphorylation. The similarity degree between amino acid sequences encoded by *CsRopGEF1* and *CsRopGEF3* genes from *C. sinensis* and those of RopGEF1 and RopGEF3 from *Oryza sativa* Linn., etc. is higher than 75%, and the homology with the same kind of amino acid sequence from dicotyledons is higher, but that with the same kind of amino acid sequence from monocotyledons is lower. The result of qRT-PCR analysis shows that the relative expression level of *CsRopGEF1* gene from *C. sinensis* is the highest in stem and the lowest in leaf, and the difference is significant ($P < 0.05$); the relative expression level of *CsRopGEF3* gene is higher both in root and stem, and significantly higher than that in leaf, it is indicating that the expressions of *CsRopGEF1* and *CsRopGEF3* genes show tissue specificity. After $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ exogenous ABA treatment, the relative expression level of *CsRopGEF1* gene from *C. sinensis* is generally significantly down-regulated, while that of *CsRopGEF3* gene is generally up-regulated, it is indicating that these two genes have different response patterns to exogenous ABA. According to the results, it is speculated that *CsRopGEF1* and *CsRopGEF3* genes from *C. sinensis* are regulated differently in ABA signal transduction pathway, and may play important roles in growth and development of root and stem of *C. sinensis*.

Key words: *Camellia sinensis* (Linn.) O. Ktze.; *RopGEF* gene; physicochemical property; homology; expression property

茶树 [*Camellia sinensis* (Linn.) O. Ktze.] 是重要的叶用经济作物, 在农业经济中有重要地位。在自然的生态系统中, 茶树常受到气象灾害和病虫害的威胁, 导致其产量严重损失。相对于其他园艺作物, 从茶树中发掘的基因多涉及次生代谢^[1-2] 和茶叶品质^[3] 等方面, 而对生长发育调控基因以及生物或非生物抗性基因方面的研究^[4-6] 还处于基础研究阶段。研究茶树的抗逆机制、鉴定抗性基因, 进而通过分子育种技术培育优良的茶树抗逆品种具有重要意义。

Rop 蛋白是植物特有的一类小 G 蛋白, 在植物的生长发育和信号传导过程中起重要作用^[7-12]。其中, 鸟苷酸交换因子 RopGEF 能够催化 Rop 蛋白由 GDP 结合形式转化为 GTP 结合形式, 从而活化 Rop 蛋白使之发挥相关功能^[13-15]。相关研究结果表明: 拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.] Rop 蛋白是对脱落酸 (ABA) 特异的负调控因子, 并且通过 *RopGEF* 基因参与 ABA 信号转导^[16-17]; 此外, 外源 ABA 可抑制拟南芥 *AtRopGEF* 基因的表达, 进而调控 Rop 蛋白活性^[18]; 拟南芥 *RopGEF* 基因家族还参与了干旱、盐和低温等非生物胁迫应答, 且呈现出不同的表达模式^[19]。

目前, 对于 *RopGEF* 基因功能的研究仅限于拟南芥和水稻 (*Oryza sativa* Linn.) 等模式植物^[20-22]。

作者以茶树品种 ‘龙井长叶’ (‘Longjingchangye’) 为实验材料, 克隆 *CsRopGEF1* 和 *CsRopGEF3* 基因全长序列, 并利用生物信息学手段对 2 个基因编码的氨基酸序列的结构和功能进行分析; 在此基础上, 利用 qRT-PCR 分析了 *CsRopGEF1* 和 *CsRopGEF3* 基因在茶树不同组织中的表达模式及外源 ABA 处理对 *CsRopGEF1* 和 *CsRopGEF3* 基因表达的影响, 以期为进一步研究 *CsRopGEFs* 基因在茶树生长发育中的作用及其对逆境的响应机制提供基础研究数据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料为 2 年生茶树品种 ‘龙井长叶’ 的扦插幼苗, 由江苏省南京市高淳区南京雅润茶业有限公司提供, 于昼/夜温度 $28 \text{ }^{\circ}\text{C}/22 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、光照时间 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 、光照强度 $240 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、空气相对湿度 75% ~ 80% 的人工气候箱预培养 1 周。

于2017年7月2日选取长势基本一致、生长良好的幼苗,用手持喷雾器向叶面喷施 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA^[23],充分喷湿整株植株;共设置3组生物学重复,每重复35株幼苗。分别在处理0(CK)、1、2、4、8、12和24 h采集顶端第1枚芽叶,用精度1 mg的电子天平分别称取约0.1 g;另采集未经ABA处理的幼苗根(吸收根)、茎(顶端的新生茎)和叶片(顶端第1枚芽叶)各约0.1 g。所有样品均使用液氮速冻,于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存,用于qRT-PCR分析。

1.2 方法

1.2.1 基因克隆

用EASYspin Plus Complex Plant RNA Kit试剂盒[艾德莱生物科技(北京)有限公司]提取叶片总RNA;用Thermo NanoDrop 2000c微量紫外分光光度计(美国Thermo Scientific公司)和质量体积分数1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA的浓度和完整性。用PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)反转录试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司]合成cDNA,操作详见试剂盒说明书。

由茶树基因组数据库中获得茶树 *CsRopGEF1* 和 *CsRopGEF3* 基因序列,用IDT(<http://sg.idtdna.com/calc/analyzer>)软件设计各自的上游引物和下游引物。*CsRopGEF1*-F: 5'-CATTGACGACGAGATGTGCATC-3'; *CsRopGEF1*-R: 5'-CCTGATTAATGTCATATGGTGG-3'。*CsRopGEF3*-F: 5'-ATGGACAAC TGTCTAATTCGGATG-3'; *CsRopGEF3*-R: 5'-GCAAGAGAGGAAGCTCATTATATGGAG-3'。以叶片cDNA为模板进行PCR扩增,扩增体系包含2×Hiief CanaceTM PCR Master Mix 25.0 μL , cDNA 5.0 μL , 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 上游特异性引物和下游特异性引物各2.5 μL ,用双蒸水补足至50.0 μL 。扩增程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸2 min,35个循环;最后于72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min。PCR产物经质量体积分数1.2%琼脂糖凝胶电泳检测,并用Gel Extraction Kit试剂盒(美国OMEGA Bio-tek公司)进行回收;回收产物连接至pMD19-T Vector[宝生物工程(大连)有限公司]并转入DH5 α 感受态细胞,由南京金斯瑞生物科技有限公司测序。

1.2.2 生物信息学分析

用BioXM 2.6软件分析获得的2个基因序列的开放阅读框(ORF),并在NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库中查找同源序列,用BLASTp软件分析保守结构域。

用ExPASy ProtParam tool(<http://web.expasy.org/protparam>)

预测2个基因编码的氨基酸序列的理论相对分子量、理论等电点、亲水性平均系数和不稳定系数。用DNAMAN 6.0软件对茶树 *CsRopGEF1* 和 *CsRopGEF3* 基因编码的氨基酸序列与其他植物 *RopGEF1* 和 *RopGEF3* 基因编码的氨基酸序列进行多重比对;并用MEGA 7.0软件,采用邻接法(neighbor-joining)构建茶树 *CsRopGEF1* 和 *CsRopGEF3* 基因与其他植物 *RopGEF* 基因编码的氨基酸序列的系统进化树,bootstrap设置为1 000。用ProtScale(<http://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/protscale.pl>)软件分析各氨基酸序列的亲水性和疏水性,并以0为分界值判断亲水性和疏水性,得分大于0的为疏水性区域,得分小于0的为亲水性区域;用NetPhos 3.1 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)软件预测各氨基酸序列的磷酸化位点,并用MEME(<http://meme-suite.org/>)软件分析其保守基序。

1.2.3 基因表达分析

根据茶树 *CsRopGEF1* 和 *CsRopGEF3* 基因的cDNA序列和定量PCR引物设计原则,使用IDT软件设计各自的正向定量引物和反向定量引物。*CsRopGEF1*-qF: 5'-GTGTTTCGTCTGAA GATGGCT-3'; *CsRopGEF1*-qR: 5'-GACATCGAAC TCGAAGCTCCAT-3'。*CsRopGEF3*-qF: 5'-GGATG AGAATTATGATCTGGGT-3'; *CsRopGEF3*-qR: 5'-AGCCTGACATCTCAGAGTTTG-3'。以茶树 β -action基因为内参设计正向引物和反向引物(β -action-F: 5'-GCCATCTTTGATTGGAATGG-3'; β -action-R: 5'-GGTGCCACAACCTTGATCTT-3')。引物合成由南京金斯瑞生物科技有限公司完成。

用LightCycler[®] 480 II荧光定量PCR仪(瑞士Roche公司),并按照SYBR[®] Premix Ex TaqTM II试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司]使用说明书进行qRT-PCR反应,反应体系包括SYBR[®] Premix Ex TaqTM II 10.0 μL , cDNA 2.0 μL , 100.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 上游引物和下游引物各0.8 μL ,用DEPC水补足至20.0 μL 。扩增程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性3 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s,40个循环;最后于72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸7 min。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法^[24]计算茶树 *CsRopGEF1* 和 *CsRopGEF3* 基因的相对表达量。

1.3 数据统计和分析

采用EXCEL 2003软件对数据进行统计,用SPSS 22.0软件对qRT-PCR数据进行统计学分析,并采用Duncan's新复极差法进行多重比较。

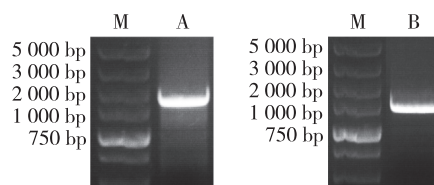
2 结果和分析

2.1 茶树 *CsRopGEF1* 和 *CsRopGEF3* 基因的全长序列分析

以茶树品种‘龙井长叶’的叶片 cDNA 为模板, 通过 PCR 扩增, 获得的条带见图 1。测序结果显示: 茶树 *CsRopGEF1* 基因全长 1 844 bp, 包含长度 1 731 bp 的开放阅读框, 编码 576 个氨基酸, GenBank 登录号为 MH160832; 茶树 *CsRopGEF3* 基因全长 1 509 bp, 包含长度 1 434 bp 的开放阅读框, 编码 477 个氨基酸, GenBank 登录号为 MH160833。

2.2 茶树 *CsRopGEF1* 和 *CsRopGEF3* 基因编码的氨基酸序列信息分析

2.2.1 结构域预测和保守基序分析 分析结果表明: 在茶树 *CsRopGEF1* 和 *CsRopGEF3* 基因编码的氨基酸序列中均存在保守的 PRONE 结构域(图 2)。且



M: DNA marker; A: *CsRopGEF1* 基因 *CsRopGEF1* gene; B: *CsRopGEF3* 基因 *CsRopGEF3* gene.

图 1 茶树 *CsRopGEF1* 和 *CsRopGEF3* 基因的 PCR 扩增结果
Fig. 1 PCR amplification result of *CsRopGEF1* and *CsRopGEF3* genes from *Camellia sinensis* (Linn.) O. Ktze.

与茶树、拟南芥、水稻、可可 (*Theobroma cacao* Linn.) 和大豆 [*Glycine max* (Linn.) Merr.] 的 RopGEF1 和 RopGEF3 氨基酸序列的 PRONE 结构域(图 3) 比, 均含有保守基序 Motif 1 至 Motif 7, 且除拟南芥外, 其他植物的 RopGEF1 氨基酸序列的 C 端还具有保守基序 Motif 8, 而所有植物的 RopGEF3 氨基酸序列均不含保守基序 Motif 8。

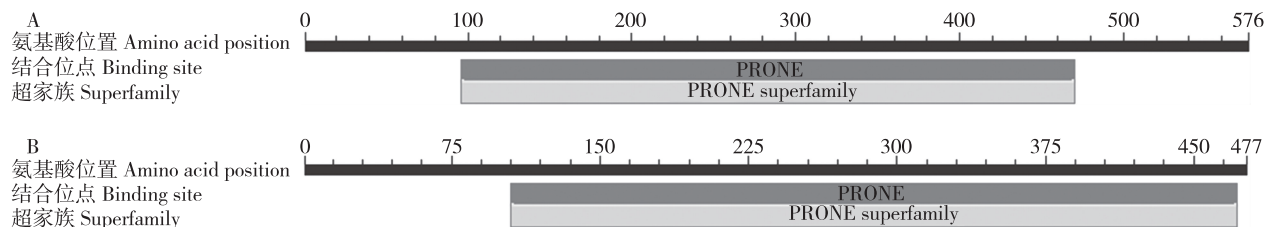
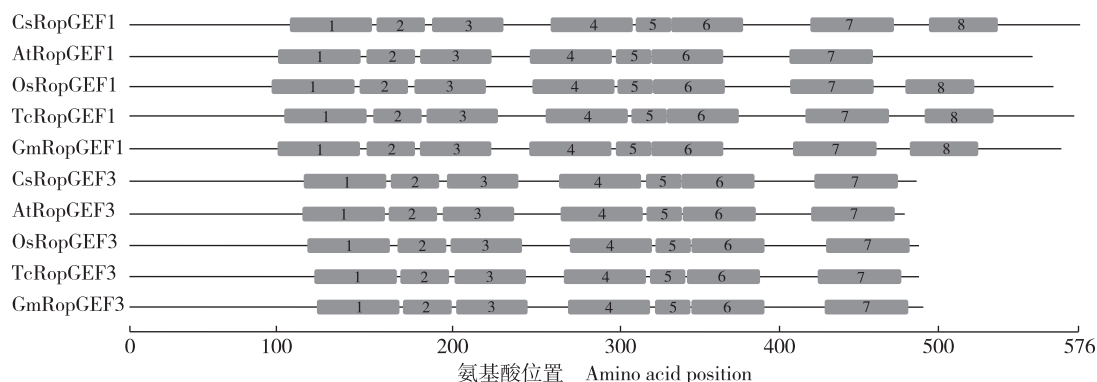


图 2 茶树 *CsRopGEF1* (A) 和 *CsRopGEF3* (B) 基因编码的氨基酸序列中保守结构域预测
Fig. 2 Prediction of conserved domain in amino acid sequences encoded by *CsRopGEF1* (A) and *CsRopGEF3* (B) genes from *Camellia sinensis* (Linn.) O. Ktze.

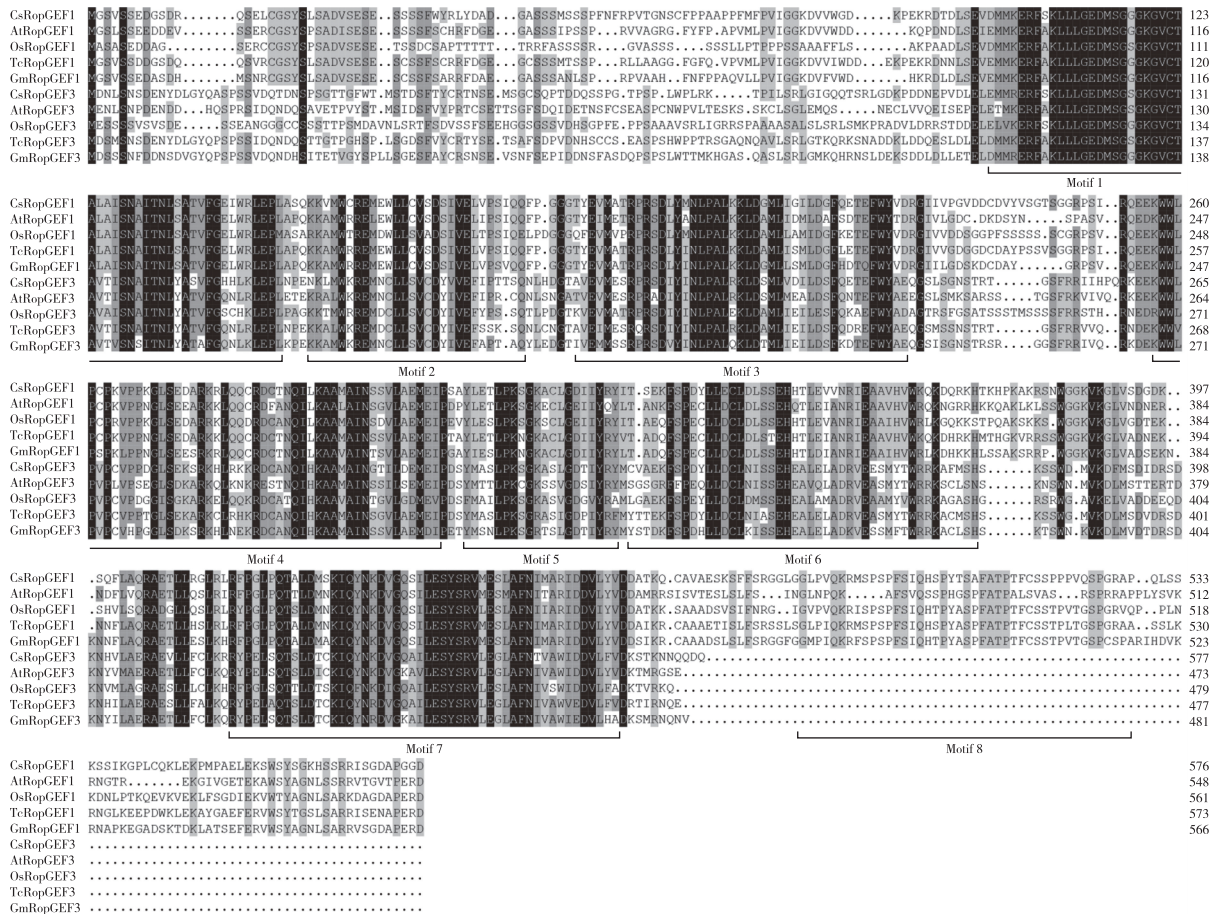


Cs: 茶树 *Camellia sinensis* (Linn.) O. Ktze.; At: 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.; Os: 水稻 *Oryza sativa* Linn.; Tc: 可可 *Theobroma cacao* Linn.; Gm: 大豆 *Glycine max* (Linn.) Merr. 1-8: 表示 Motif 1 至 Motif 8 Representing Motif 1 to Motif 8.

图 3 茶树 *CsRopGEF1* 和 *CsRopGEF3* 基因与其他植物 *RopGEF1* 和 *RopGEF3* 基因编码的氨基酸序列中保守基序分析
Fig. 3 Analysis on conserved motifs in amino acid sequences encoded by *CsRopGEF1* and *CsRopGEF3* genes from *Camellia sinensis* (Linn.) O. Ktze. and *RopGEF1* and *RopGEF3* genes from other plants

2.2.2 多重比对分析 多重比对分析结果(图 4)显示:茶树 *CsRopGEF1* 和 *CsRopGEF3* 基因编码的氨基酸序列分别与拟南芥 *AtRopGEF1* (NP_195556.1) 和 *AtRopGEF3* (NP_001118903.1)、水稻 *OsRopGEF1* (XP_015651165.1) 和 *OsRopGEF3* (XP_

015636129.1)、可可 *TcRopGEF1* (XP_007041712.2) 和 *TcRopGEF3* (XP_007051804.2) 以及大豆 *GmRopGEF1* (XP_003537755.3) 和 *GmRopGEF3* (XP_003521141.1) 的氨基酸序列具有较高的同源性,相似程度均在 75% 以上。



Cs: 茶树 *Camellia sinensis* (Linn.) O. Ktze.; At: 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.; Os: 水稻 *Oryza sativa* Linn.; Tc: 可可 *Theobroma cacao* Linn.; Gm: 大豆 *Glycine max* (Linn.) Merr.

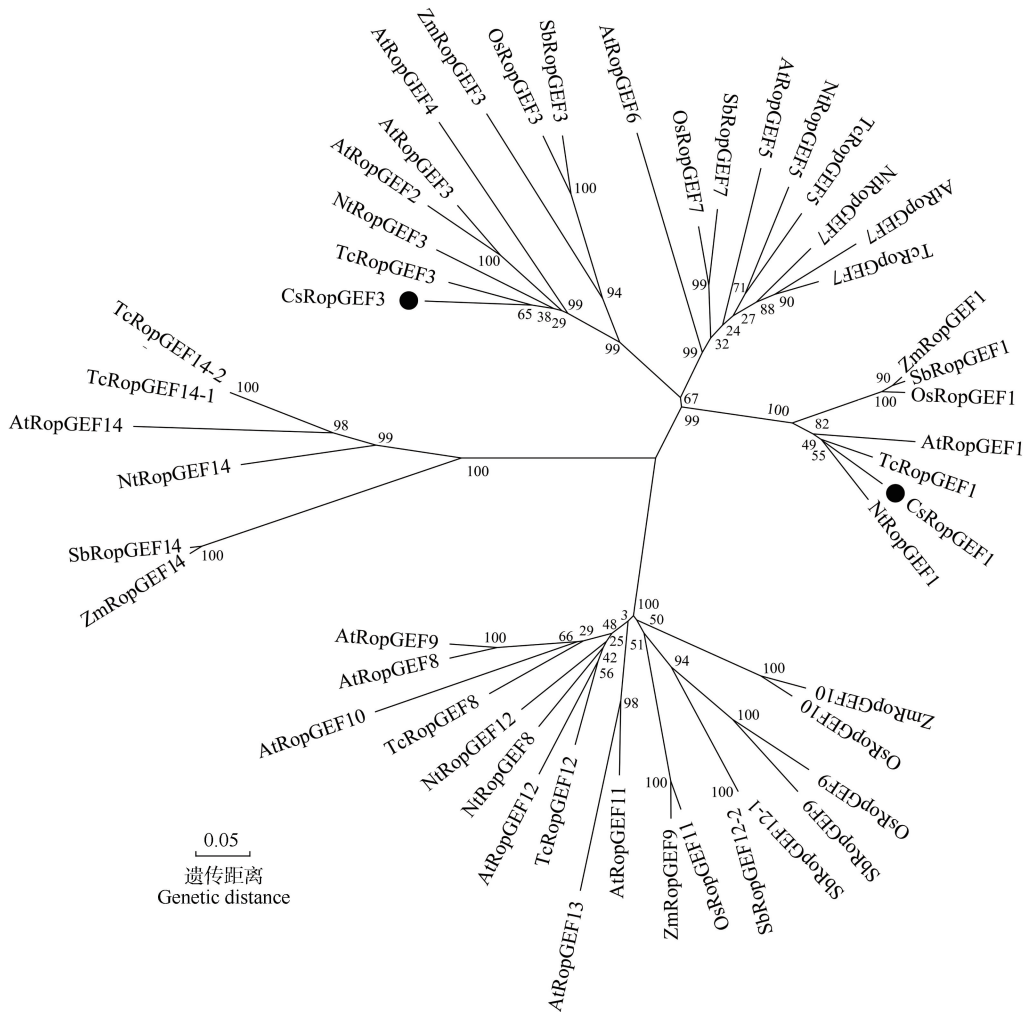
图 4 茶树 *CsRopGEF1* 和 *CsRopGEF3* 基因与其他植物 *RopGEF1* 和 *RopGEF3* 基因编码的氨基酸序列的多重比对分析
 Fig. 4 Multiple alignment analysis on amino acid sequences encoded by *CsRopGEF1* and *CsRopGEF3* genes from *Camellia sinensis* (Linn.) O. Ktze. with *RopGEF1* and *RopGEF3* genes from other plants

2.2.3 系统进化分析 为更加明确茶树 *CsRopGEF1* 和 *CsRopGEF3* 基因编码的氨基酸序列与其他植物 RopGEF 氨基酸序列的进化关系, 选用拟南芥 *AtRopGEF1*、*AtRopGEF2* (NP_171676.1)、*AtRopGEF3*、*AtRopGEF4* (NP_182113.2)、*AtRopGEF5* (NP_196213.2)、*AtRopGEF6* (NP_191125.1)、*AtRopGEF7* (NP_195821.1)、*AtRopGEF8* (NP_189105.1)、*AtRopGEF9* (NP_193060.1)、*AtRopGEF10* (NP_

197457.1)、*AtRopGEF11* (NP_175634.6)、*AtRopGEF12* (NP_178104.1)、*AtRopGEF13* (NP_001319564.1) 和 *AtRopGEF14* (NP_174446.2) 的氨基酸序列, 水稻 *OsRopGEF1*、*OsRopGEF3*、*OsRopGEF7* (XP_015622383.1)、*OsRopGEF9* (XP_015640605.1)、*OsRopGEF10* (XP_015622938.1) 和 *OsRopGEF11* (XP_015628594.1) 的氨基酸序列, 玉米 (*Zea mays* Linn.) *ZmRopGEF1* (NP_001132788.1)、

ZmRopGEF3 (XP_008653079.1)、ZmRopGEF9 (XP_008675023.1)、ZmRopGEF10 (XP_008645515.1) 和 ZmRopGEF14 (NP_001130409.1) 的氨基酸序列, 可可 TcRopGEF1、TcRopGEF3、TcRopGEF5 (XP_017984042.1)、TcRopGEF7 (XP_017977890.1)、TcRopGEF8 (XP_007013139.2)、TcRopGEF12 (XP_017978795.1)、TcRopGEF14-1 (XP_007040892.2) 和 TcRopGEF14-2 (XP_017973488.1) 的氨基酸序列, 烟草 (*Nicotiana tabacum* Linn.) NtRopGEF1 (XP_016445632.1)、NtRopGEF3 (XP_016491474.1)、NtRopGEF5 (XP_016439450.1)、NtRopGEF7 (XP_

016465518.1)、NtRopGEF8 (XP_016484735.1)、NtRopGEF12 (XP_016460052.1) 和 NtRopGEF14 (XP_016504442.1) 的氨基酸序列, 高粱 [*Sorghum bicolor* (Linn.) Moench] SbRopGEF1 (XP_002462770.1)、SbRopGEF3 (XP_002464972.1)、SbRopGEF7 (XP_002439905.1)、SbRopGEF9 (XP_002441507.1)、SbRopGEF12-1 (XP_021312196.1)、SbRopGEF12-2 (XP_002456125.2) 和 SbRopGEF14 (XP_002452689.1) 的氨基酸序列, 与上述 2 个茶树基因编码的氨基酸序列共同构建系统进化树, 结果见图 5。结果显示: 茶树 *CsRopGEF1* 和 *CsRopGEF3* 基因编码



Cs: 茶树 *Camellia sinensis* (Linn.) O. Ktze.; At: 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.; Os: 水稻 *Oryza sativa* Linn.; Zm: 玉米 *Zea mays* Linn.; Tc: 可可 *Theobroma cacao* Linn.; Nt: 烟草 *Nicotiana tabacum* Linn.; Sb: 高粱 *Sorghum bicolor* (Linn.) Moench. 分支上的数值表示 bootstrap 百分数 Data above the branches indicate percentages of bootstrap.

图5 茶树 *CsRopGEF1* 和 *CsRopGEF3* 基因与其他植物 *RopGEF* 基因编码的氨基酸序列的系统进化树
Fig. 5 Phylogenetic tree of amino acid sequences encoded by *CsRopGEF1* and *CsRopGEF3* genes from *Camellia sinensis* (Linn.) O. Ktze. with *RopGEF* genes from other plants

的氨基酸序列分别与双子叶植物拟南芥、可可和烟草的 RopGEF1 和 RopGEF3 的氨基酸序列同源性较高,而与单子叶植物水稻、玉米和高粱的 RopGEF1 和 RopGEF3 的氨基酸序列同源性较低。

2.2.4 理化性质预测 ExPASy ProtParam tool 预测结果显示:茶树 *CsRopGEF1* 和 *CsRopGEF3* 基因编码的氨基酸序列的分子式分别为 $C_{2797}H_{4402}N_{762}O_{856}S_{32}$ 和 $C_{2356}H_{3696}N_{648}O_{752}S_{29}$, 理论相对分子质量分别为 63 420 和 54 060, 理论等电点分别为 pI 6.69 和 pI 5.10; 分别有 69 和 70 个带负电荷的氨基酸残基(天冬氨酸和谷氨酸)及 65 和 33 个带正电荷的氨基酸残基(精氨酸和赖氨酸); 蛋白质三维结构不稳定系数分别为 57.57 和 49.88, 不稳定系数均大于 40, 呈不稳定状态。推测茶树 *CsRopGEF1* 和 *CsRopGEF3* 基因编码的氨基酸序列均属于不稳定的酸性蛋白质。

亲水性和疏水性预测结果(图 6)显示:在茶树 *CsRopGEF1* 基因编码的氨基酸序列中,疏水性最强的位点是第 211 位的亮氨酸,亲水性最强的位点是第 369 位的天冬酰胺;在茶树 *CsRopGEF3* 基因编码的氨基酸序列中,疏水性最强的位点是第 175 位的半胱氨酸,亲水性最强的位点是第 259 位的赖氨酸。总体上看,茶树 *CsRopGEF1* 和 *CsRopGEF3* 基因编码的氨基酸序列的亲水性区域均大于疏水性区域,且亲水性平均系数分别为 -0.368 和 -0.552, 表明二者都属于亲水性蛋白。

磷酸化位点预测结果(图 7)显示:在茶树 *CsRopGEF1* 和 *CsRopGEF3* 基因编码的氨基酸序列中存在多个磷酸化位点,其中丝氨酸磷酸化位点最多,表明这 2 个基因编码的氨基酸序列在发挥生物学功能时可能受到磷酸化的调控。

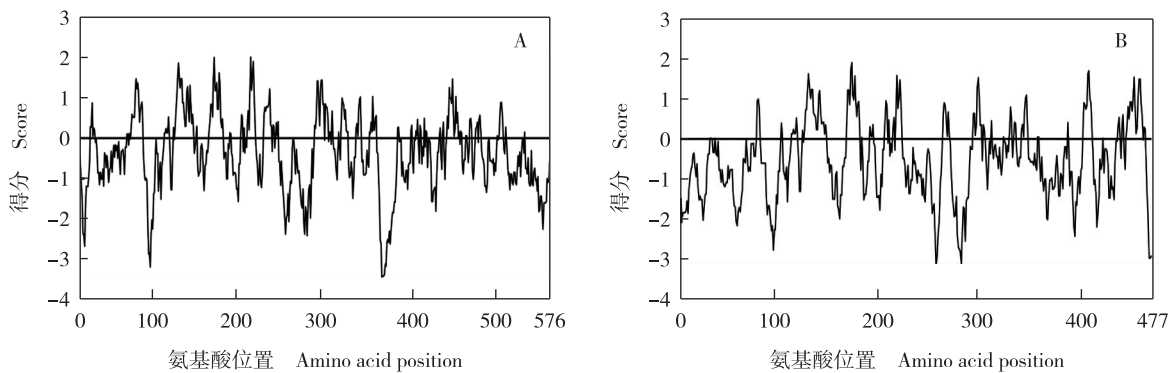
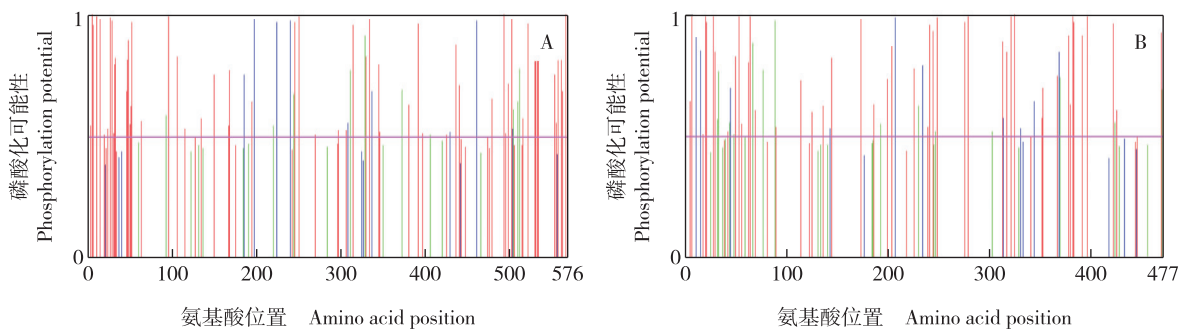


图 6 茶树 *CsRopGEF1* (A) 和 *CsRopGEF3* (B) 基因编码的氨基酸序列的亲水性和疏水性分析
Fig. 6 Analysis on hydrophilicity and hydrophobicity of amino acid sequences encoded by *CsRopGEF1* (A) and *CsRopGEF3* (B) genes from *Camellia sinensis* (Linn.) O. Ktze.



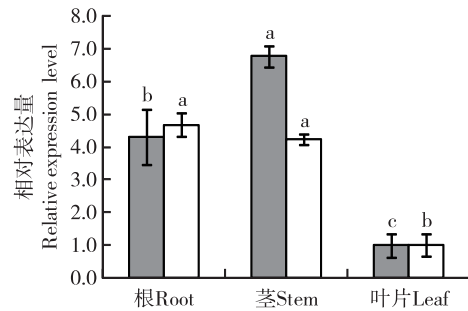
—: 丝氨酸 Serine; —: 苏氨酸 Threonine; —: 酪氨酸 Tyrosine; —: 阈值 Threshold.

图 7 茶树 *CsRopGEF1* (A) 和 *CsRopGEF3* (B) 基因编码的氨基酸序列中磷酸化位点预测
Fig. 7 Prediction on phosphorylation site in amino acid sequences encoded by *CsRopGEF1* (A) and *CsRopGEF3* (B) genes from *Camellia sinensis* (Linn.) O. Ktze.

2.3 茶树 *CsRopGEF1* 和 *CsRopGEF3* 基因的表达分析

2.3.1 组织特异性分析 茶树 *CsRopGEF1* 和 *CsRopGEF3* 基因在不同组织中相对表达量的差异见图 8。结果显示:茶树 *CsRopGEF1* 和 *CsRopGEF3* 基因表达存在组织特异性。其中,*CsRopGEF1* 基因的相对表达量在不同组织间差异显著 ($P < 0.05$),以茎中最高、叶片中最低;*CsRopGEF3* 基因的相对表达量则在根中最高,在叶片中最低,但根与茎中 *CsRopGEF3* 基因的相对表达量无显著 ($P > 0.05$) 差异,而叶片中 *CsRopGEF3* 基因的相对表达量与根和茎差异显著。整体上看, *CsRopGEF1* 基因的相对表达量高于 *CsRopGEF3* 基因。

2.3.2 对外源 ABA 处理的响应 经 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 外源 ABA 处理后茶树 *CsRopGEF1* 和 *CsRopGEF3* 基因表现出不同的表达模式(图 9)。其中, *CsRopGEF1* 基因的相对表达量在 24 h 内整体显著下调;而

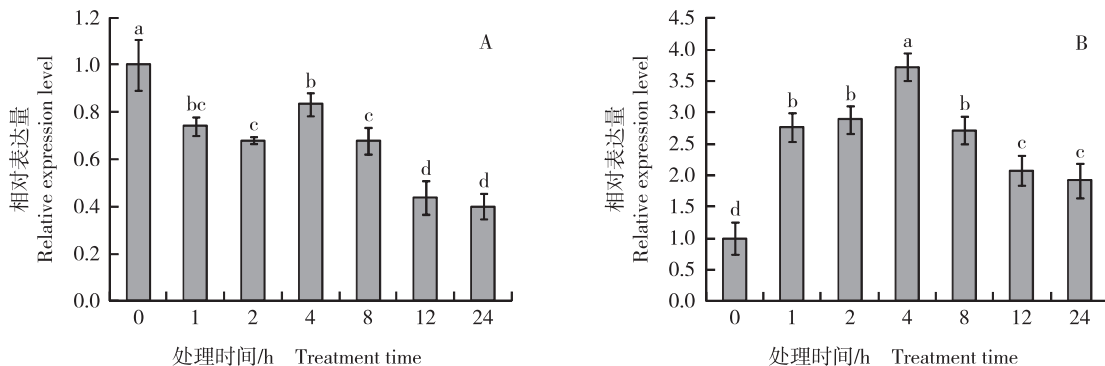


■: *CsRopGEF1* 基因 *CsRopGEF1* gene; □: *CsRopGEF3* 基因 *CsRopGEF3* gene.

不同的小写字母表示同一个基因的相对表达量在不同组织间差异显著 ($P < 0.05$) Different lowercases indicate the significant ($P < 0.05$) difference in relative expression level of the same gene among different tissues.

图 8 茶树不同组织中 *CsRopGEF1* 和 *CsRopGEF3* 基因的相对表达水平比较

Fig. 8 Comparison on relative expression level of *CsRopGEF1* and *CsRopGEF3* genes in different tissues of *Camellia sinensis* (Linn.) O. Ktze.



不同的小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$) Different lowercases indicate the significant ($P < 0.05$) difference.

图 9 经 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 外源 ABA 处理后茶树 *CsRopGEF1* (A) 和 *CsRopGEF3* (B) 基因相对表达量的比较

Fig. 9 Comparison on relative expression level of *CsRopGEF1* (A) and *CsRopGEF3* (B) genes from *Camellia sinensis* (Linn.) O. Ktze. after $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ exogenous ABA treatment

CsRopGEF3 基因的相对表达量则在处理前期显著上调,在处理 4 h 时达到峰值,随后逐渐下降,但仍显著高于对照 ($0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA),整体仍为上调。

3 讨论和结论

在植物的生长发育以及信号传导过程中 RopGEF 蛋白起了至关重要的作用,其生物学功能及分子调控机制越来越受到关注^[25-27]。RopGEF 蛋白的 PRONE 结构域的 C 端和 N 端对中间的结构域有

调节功能,具有自主抑制作用;当 RopGEF 蛋白的 C 端丝氨酸 (Ser) 残基被受体激酶 (receptor-like kinases) 磷酸化后,PRONE 结构域的自主抑制作用被释放,结合并激活 Rop 蛋白活性,从而调节花粉管极性与根系的生长发育^[13,28]。而在本研究中,茶树 *CsRopGEF1* 和 *CsRopGEF3* 基因编码的氨基酸序列均含有 PRONE 结构域,并包含数个 Ser 磷酸化位点,推测茶树 *CsRopGEF1* 和 *CsRopGEF3* 基因编码的氨基酸序列也具有类似功能。本研究结果还表明:RopGEF 氨基酸序列的 PRONE 结构域均含有保守基序 Motif 1

至 Motif 7,其中,除拟南芥外,茶树、水稻、可可和大豆的 RopGEF1 氨基酸序列的 C 端都含有保守基序 Motif 8,而茶树、拟南芥、水稻、可可和大豆的 RopGEF3 氨基酸序列均不含有保守基序 Motif 8,说明不同植物种类的 RopGEF1 蛋白总体上较 RopGEF3 蛋白具有更高的保守性。从系统进化树看,茶树 *CsRopGEF1* 和 *CsRopGEF3* 基因编码的氨基酸序列分别与双子叶植物拟南芥、可可和烟草的 RopGEF1 和 RopGEF3 氨基酸序列划分为一支,而单子叶植物水稻、玉米和高粱的 RopGEF1 和 RopGEF3 氨基酸序列分别单独为一支,推测在进化过程中 *RopGEF1* 和 *RopGEF3* 基因的分化在双子叶植物和单子叶植物之间具有不同的进化起源。

相关的研究表明:拟南芥 *AtRopGEF* 基因具有显著的组织特异性, *AtRopGEF7*、*AtRopGEF8*、*AtRopGEF9* 和 *AtRopGEF13* 基因在花中具有较高的表达量^[18],而 *AtRopGEF4* 和 *AtRopGEF10* 基因则在根毛中具有较高的表达量^[29]; *AtRopGEF1*、*AtRopGEF2*、*AtRopGEF13* 和 *AtRopGEF14* 基因在根中的表达量低于叶片,而 *AtRopGEF3*、*AtRopGEF4*、*AtRopGEF8* 和 *AtRopGEF10* 基因在根中的表达量则显著高于叶片^[30]。此外,拟南芥 *AtRopGEF1*、*AtRopGEF4* 和 *AtRopGEF10* 蛋白还被证实参与拟南芥根部的生长发育和形态建成^[21,31]。本研究中,茶树 *CsRopGEF1* 基因主要在茎中表达, *CsRopGEF3* 基因则在根和茎中具有较高的表达量,推测茶树 *CsRopGEF1* 和 *CsRopGEF3* 基因在根和茎的生长发育过程中可能具有重要作用。此外,经 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 外源 ABA 处理后,茶树 *CsRopGEF1* 基因的相对表达量整体显著下调,而 *CsRopGEF3* 基因则整体上调;拟南芥 *RopGEFs* 基因对外源 ABA 处理的响应也存在类似的规律^[16],提示茶树 *CsRopGEF1* 和 *CsRopGEF3* 基因在 ABA 信号转导途径中受不同的调控作用。另外,大量研究已经证实,逆境胁迫(如干旱、盐和低温)能够促进植物体内 ABA 的合成^[32-33]。Li 等^[34]的研究结果表明:在存在 ABA 的条件下,拟南芥的蛋白磷酸酶 2C (PP2C)失去活性, *AtRopGEF1* 蛋白逐渐水解,使得下游 SNF1 相关蛋白激酶 2 (SnRK2) 去磷酸化,进一步触发 ABA 信号转导;而在缺乏 ABA 的条件下, *AtRopGEF1* 蛋白激活 Rop 蛋白,使 PP2C 保持活性,且具有活性的 PP2C 能够维持 *AtRopGEF1* 蛋白活性,并继续下游 SnRK2 的磷酸化,终止 ABA 信号传导。

然而,在逆境条件下茶树 *CsRopGEF1* 蛋白是否也具有类似的转导机制,则有待更深入的研究。

本研究中,茶树 *CsRopGEF1* 和 *CsRopGEF3* 基因分别受到外源 ABA 的负调控和正调控,推测外源 ABA 对茶树 *CsRopGEF1* 和 *CsRopGEF3* 基因具有不同的调控方式,从而参与茶树的生长发育和对胁迫应答的信号转导,但具体的调控机制有待后期进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 纪志芳,甘玉迪,陈常颂,等. 茶树磷酸烯醇式丙酮酸转运子 *CsPPT2* 基因的克隆和分析[J]. 茶叶科学, 2017, 37(2): 149-159.
- [2] 王文丽,吴致君,刘志薇,等. 茶树类黄酮 3'-羟化酶基因的克隆与表达特性分析[J]. 茶叶科学, 2017, 37(1): 108-118.
- [3] 肖瑶,周天山,李佼,等. 茶树 GDP-D-甘露糖焦磷酸化酶基因 cDNA 全长的克隆与表达分析[J]. 茶叶科学, 2015, 35(1): 55-63.
- [4] 王文丽,吴致君,刘志薇,等. 茶树发育相关基因 *CsARGOS* 的克隆与表达特性分析[J]. 植物生理学报, 2017, 53(1): 38-44.
- [5] 朱晨,张舒婷,常笑君,等. 茶树几丁质酶基因的克隆及其在干旱胁迫下的表达分析[J]. 热带作物学报, 2017, 38(5): 894-902.
- [6] 刘志薇,吴致君,黎星辉,等. 茶树 *CsDREB-A1* 转录因子基因的克隆及其特性分析[J]. 植物资源与环境学报, 2014, 23(4): 8-16.
- [7] TAO L, CHEUNG A Y, WU H, et al. Plant Rac-like GTPases are activated by auxin and mediate auxin-responsive gene expression [J]. The Plant Cell, 2002, 14(11): 2745-2760.
- [8] XIN Z, ZHAO Y, ZHENG Z L, et al. Transcriptome analysis reveals specific modulation of abscisic acid signaling by ROP10 small GTPase in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2005, 139(3): 1350-1365.
- [9] HUANG J, 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.
- [10] LIN D, REN H, FU Y, et al. ROP GTPase-mediated auxin signaling regulates pavement cell interdigitation in *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2015, 57(1): 31-39.
- [11] HONG D, JEON B W, KIM S Y, et al. The ROP2-RIC7 pathway negatively regulates light-induced stomatal opening by inhibiting exocyst subunit Exo70B1 in *Arabidopsis* [J]. New Phytologist, 2016, 209(2): 624-635.
- [12] YANG Z. Cell polarity signaling in *Arabidopsis* [J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2008, 24: 551-575.
- [13] DUAN Q, KITA D, LI C, et al. FERONIA receptor-like kinase

- regulates RHO GTPase signaling of root hair development [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(41): 17821–17826.
- [14] FU Y, WU G, YANG Z. ROP GTPase-dependent dynamics of tip-localized F-actin controls tip growth in pollen tubes [J]. The Journal of Cell Biology, 2001, 152(5): 1019–1032.
- [15] LI Z, LI Z, GAO X, et al. ROP11 GTPase negatively regulates ABA signaling by protecting ABI1 phosphatase activity from inhibition by the ABA receptor RCAR1/PYL9 in *Arabidopsis* [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2012, 54(3): 180–188.
- [16] 王会, 金字骅, 卢曼曼, 等. 拟南芥 *RopGEFs* 家族基因在外界脱落酸处理下的表达分析 [J]. 植物生理学通讯, 2010, 46(8): 817–823.
- [17] BERKEN A, THOMAS C, WITTINGHOFER A. A new family of RhoGEFs activates the Rop molecular switch in plants [J]. Nature, 2005, 436(7054): 1176–1180.
- [18] 葛光君. 拟南芥 ROP10 负调控 ABA 信号途径中 RopGEFs 功能的初步分析 [D]. 长沙: 湖南大学生物学院, 2011: 1–43.
- [19] SHIN D H, KIM T-L, KWON Y-K, et al. Characterization of *Arabidopsis* RopGEF family genes in response to abiotic stresses [J]. Plant Biotechnology Reports, 2009, 3(3): 183–190.
- [20] 宋红弟. 拟南芥鸟苷酸交换因子 *RopGEF4/8* 基因表达及其响应 ABA 信号的初步分析 [D]. 南京: 南京农业大学生命科学学院, 2012: 1–69.
- [21] HUANG G Q, LI E, GE F R, et al. *Arabidopsis* RopGEF4 and RopGEF10 are important for FERONIA-mediated developmental but not environmental regulation of root hair growth [J]. New Phytologist, 2013, 200(4): 1089–1101.
- [22] YOO J-H, PARK J-H, CHO S-H, et al. The rice *bright green leaf (bgl)* locus encodes OsRopGEF10, which activates the development of small cuticular papillae on leaf surfaces [J]. Plant Molecular Biology, 2011, 77(6): 631–641.
- [23] 郭俊红, 王伟东, 谷星, 等. 茶树 WRKY 转录因子基因 *CsWRKY57* 的克隆及表达分析 [J]. 茶叶科学, 2017, 37(4): 411–419.
- [24] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402–408.
- [25] LANGEMEYER L, PERZ A, KÜMMEL D, et al. A guanine nucleotide exchanger factor (GEF) limits Rab GTPase driven membrane fusion [J]. Journal of biological chemistry, 2018, 293(2): 731–739.
- [26] THOMAS C, FRICKE I, WEYAND M, et al. 3D structure of a binary ROP-PRONE complex: the final intermediate for a complete set of molecular snapshots of the RopGEF reaction [J]. Biological Chemistry, 2009, 390: 427–435.
- [27] CHANG F, GU Y, MA H, et al. AtPRK2 promotes ROP1 activation via RopGEFs in the control of polarized pollen tube growth [J]. Molecular Plant, 2013, 6(4): 1187–1201.
- [28] LIU Y, DONG Q, KITA D, et al. RopGEF1 plays a critical role in polar auxin transport in early development [J]. Plant Physiology, 2017, 175(1): 157–171.
- [29] 黄国强. 拟南芥 RopGEF4 和 RopGEF10 介导的根毛的生长 [D]. 青岛: 山东农业大学生命科学学院, 2013: 1–45.
- [30] 黄蓉美. 拟南芥 GEF 家族在各组织中的表达及其对非生物胁迫的反应研究 [D]. 南京: 南京农业大学生命科学学院, 2011: 1–45.
- [31] 吴晓伟. 拟南芥 Rac/RopGEF1 在细胞极性与侧根发育中的作用 [D]. 广州: 华南农业大学生命科学学院, 2010: 1–29.
- [32] 吴耀荣, 谢旗. ABA 与植物胁迫抗性 [J]. 植物学通报, 2006, 23(5): 511–518.
- [33] 郭文雅, 赵京献, 郭伟珍. 脱落酸 (ABA) 生物学作用研究进展 [J]. 中国农学通报, 2014, 30(21): 205–210.
- [34] LI Z, WAADT R, SCHROEDER J I. Release of GTP exchange factor mediated down-regulation of abscisic acid signal transduction through ABA-induced rapid degradation of RopGEFs [J]. PLoS Biology, 2016, 14(5): e1002461.

(责任编辑: 郭严冬)