

# 杨树 *PtROP* 家族基因的表达分析与功能预测

李煜<sup>1,2</sup>, 张进<sup>1,2</sup>, 王丽娟<sup>1,2</sup>, 卢孟柱<sup>1,2\*</sup>

(1. 林木遗传育种国家重点实验室, 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091;  
2. 国家林业局林木培育重点实验室, 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091)

**摘要:** [目的] 为探究 *ROP* 基因在林木中的功能。[方法] 本研究以杨树为模式, 在全基因组水平上对 *ROP* 基因家族成员、基因结构、保守结构域、氨基酸序列相似性及表达模式进行了分析。[结果] 显示, 杨树 *PtROP* 基因家族包含 13 个成员, 不同成员间在进化上相对保守, 均存在与 GTP 结合与水解相关的结构域。这些基因在不同组织、不同胁迫条件下的表达具有明显差异, 说明它们参与不同的生物学过程。通过构建功能基因网络 (functional gene network for poplar) 发现 *PtROP* 基因主要参与了信号转导过程。[结论] 杨树 *PtROP* 基因家族包含 13 个成员参与不同的生物学过程, 可能主要参与了信号转导过程。

**关键词:** 杨树; *ROP*; 基因家族; 基因表达模式

中图分类号: S792.11

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2017)01-0001-09

## Expression and Functional Analysis of *ROP* Gene Family in *Populus*

LI Yu<sup>1,2</sup>, ZHANG Jin<sup>1,2</sup>, WANG Li-juan<sup>1,2</sup>, LU Meng-zhu<sup>1,2</sup>

(1. State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China;  
2. Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, State Forestry Administration, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

**Abstract:** [Objective] To explore the putative function of *ROPs* in forest trees. [Method] A genome-wide analysis of *ROPs* was performed, including the phylogeny, gene structure, conserved motifs, *ROP* amino sequences similarity between *Populus* and *Arabidopsis* *ROP* proteins and the expression patterns using *Populus* as a model. [Result] The results showed that there were 13 members of *PtROP* genes in *Populus* and the *PtROP* genes were conserved during evolution of species, all of them containing GTP binding and hydrolysis-related domains. Furthermore, the expression profiles revealed that *Populus PtROP* had distinct expression pattern across different tissues and different stress conditions, suggesting that *PtROP* genes were involved in different biological processes. In addition, the analysis on *PtROP* gene functional network was conducted. It is predicted that *Populus PtROP* genes were mainly involved in signal transduction. [Conclude] In this study, systematically bioinformatics analysis on *PtROP* were conducted which laid the foundation for the further exploration of poplar *PtROP* functions.

**Keywords:** *Populus*; *ROP*; gene family; gene expression pattern

G 蛋白是一类 GTP 结合蛋白, 按照 G 蛋白分子量和亚基组成可分为异源三聚体 G 蛋白、小 G 蛋白和几种特殊的 GTP 结合蛋白<sup>[1]</sup>。小 G 蛋白家族又称为 Ras 超家族, 根据其成员之间结构和功能的相

似性, 将 Ras 超家族分为五个不同的家族, 分别是 Ras、Rab、Arf、Ran 和 Rho 家族<sup>[2]</sup>, 其中 Rho 家族又可被分为 CDC42、RAC 和 RHO 三个亚家族<sup>[3-4]</sup>。这五个家族成员在细胞中参与了不同的生物学过程,

收稿日期: 2016-02-01

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31270699)。

作者简介: 李煜, 男, 在读硕士。主要方向: 林木极性生长调控。E-mail: linxueliyu@163.com

\* 通讯作者: 研究员, 博士生导师, 从事分子生物学研究。E-mail: lumz@caf.ac.cn

例如 Ras 家族成员参与调控细胞增殖, Rab 家族和 Arf 家族成员在介导不同膜细胞器之间的囊泡运输中发挥重要作用, Ran 家族成员主要调控与细胞核相关的一些细胞活动, 而 Rho 家族成员在细胞骨架重组及信号转导中行使重要功能<sup>[5]</sup>。

与动物或真菌 Ras 超家族不同, 植物没有 Ras 家族, 而植物中 Rho 形成了独特的一类, 称为 ROP (Rho-related proteins from plants)<sup>[5]</sup>。自 1993 年首次从豌豆中发现 Rho 相似性 GTPase 以来, 已在拟南芥、水稻与玉米等多种植物中进行了鉴定<sup>[6]</sup>。ROP 主要在与 GTP 结合的活性形式和与 GDP 结合的非活性形式之间循环, 该循环过程需要多种蛋白的参与, 如鸟苷酸交换因子 (guanine nucleotide exchange factor, GEF)、GTPase 激活蛋白 (GTPase activating protein, GAP)、鸟苷酸解离抑制因子 (GDP dissociation inhibitor, GDI) 等。一旦受体感知到上游信号, 鸟苷酸交换因子就催化 ROP 从 GDP 结合的非活性形式转换为 GTP 结合的活性形式, 具有活性的 ROP 蛋白与下游效应蛋白结合发挥其生理功能<sup>[7]</sup>。ROP 蛋白的结构极为保守, 主要包含与鸟苷酸结合和水解有关的 5 个高度保守结构域、1 个效应因子结合区、1 个插入序列和 C 端高度可变区。GTP 结合结构域和效应因子结合区决定 ROP 蛋白的功能, 插入序列的功能目前尚不清楚, C 端高度可变区决定 ROP 蛋白的亚细胞定位<sup>[8]</sup>。

ROP 在植物发育与抗逆等生物学过程中具有重要的功能。在叶表皮铺板细胞中, 拟南芥 ROP2 调节 PIN1 的内吞过程<sup>[9]</sup>。在拟南芥胚胎发育阶段, ROP3 在维持 PIN1 和 PIN3 在细胞膜上的极性分布方面具有重要作用<sup>[10]</sup>。拟南芥中多种 ROP 基因在花粉管尖端表达, 其中 *ROP1* 对花粉管的极性生长起主要作用<sup>[11]</sup>。ROP 还参与根毛的发育, 超表达拟南芥 *ROP2*, 能增加根毛数量和密度, 而 *AtROP4* 控制根毛的发生和尖端的伸长<sup>[12]</sup>。此外, 拟南芥保卫细胞中的 *ROP2* 能够被光激活来抑制光诱导的气孔张开<sup>[13]</sup>。目前, 在拟南芥基因组中共发现了 10 个 ROP 基因成员, 水稻和玉米分别发现 7 个和 9 个<sup>[6]</sup>。虽然一些研究都表明 ROPs 广泛参与了植物对激素, 环境等信号的响应及植物生长发育过程, 但各个 ROP 成员的功能还有待进一步解析。杨树全基因组序列虽已公布, 但对 ROP 基因家族成员尚未进行系统分析<sup>[14]</sup>。

本研究利用拟南芥 ROP 氨基酸序列, 在杨树基因组数据库中进行同源比对, 共鉴定出 13 个 *PtROP* 基因序列。在此基础上, 对杨树 *PtROP* 基因进行了

系统进化、基因结构及保守结构域分析, 并对其在不同组织和不同胁迫条件下的表达情况进行了分析, 构建了其基因调控网络。研究结果为将来系统解析杨树 ROP 基因的功能奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验所用银腺杨 (*P. alba* × *P. glandulosa*) 无性系 84K, 由中国林业科学研究院林木遗传育种国家重点实验室保存。杨树幼苗培养于人工培养箱, 培养条件为 16 h 光照/8 h 黑暗, 昼夜温度为 23℃/20℃。分别取杨树幼株 (株高约 80 cm) 的顶端、幼叶、成熟叶、茎顶端、茎下部及根, 分别提取总 RNA。

### 1.2 总 RNA 的提取

总 RNA 提取参见 QIAGEN RNeasy Plant Kit RNA 描述的方法进行。

### 1.3 转录组测序

用带有 Oligo (dT) 的磁珠富集样品总 RNA 中的 mRNA, 将富集的 mRNA 片段化后用随机引物合成第一链 cDNA, 随后合成双链 cDNA, 再对双链 cDNA 进行纯化, 末端修复和添加测序接头, 最后进行 PCR 扩增, 建好的测序文库用 Illumina HiSeq™2000 测序平台进行 pair-end 100 bp 测序, 每个样品分别获得 2G clean data。测序原始数据去除接头及低质量 reads, 获得的 clean reads 利用 TopHat2 比对到毛果杨基因组上 ([http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org\\_Ptrichocarpa\\_release\\_3.0](http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org_Ptrichocarpa_release_3.0))。标准化的 FPKM 值反映基因的表达水平。

### 1.4 数据来源

拟南芥 ROP 基因及其编码的蛋白质序列来源于 TAIR (<http://www.arabidopsis.org/index.jsp>) 数据库。以拟南芥 ROP 蛋白序列为搜索对象, 通过 blastp 程序在毛果杨基因组数据库 ([http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org\\_Ptrichocarpa\\_release\\_3.0](http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org_Ptrichocarpa_release_3.0)) 中搜索相似的蛋白序列, 选取  $E \leq 10^{-10}$  的序列作为候选序列, 获得的毛果杨 ROP 基因命名为 *PtROP1-13*。

### 1.5 系统进化树分析

将拟南芥和杨树 *PtROP* 氨基酸序列保存为 FASTA 格式, 用 Clustal X<sup>[15]</sup> 对其氨基酸序列进行多序列比对, 分别利用 MEGA5.0<sup>[16]</sup> 中 Maximum-Likelihood (ML) 法和 Neighbor-Joining (NJ) 法构建系统进化树。

### 1.6 基因结构分析

运用在杨树基因组数据库中下载的基因组 DNA 序列及 CDS 序列使用 GSDS<sup>[17]</sup> 程序 (<http://gsd>

ds. cbi. pku. edu. cn/) 对杨树 *PtROP* 基因的外显子和内含子进行分析。杨树 *PtROP* 基因组 DNA 序列及 CDS 序列下载自 Phytozome 数据库 ([http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org\\_PtTrichocarpa](http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org_PtTrichocarpa), release 3.0)。

### 1.7 基因表达分析

分析杨树不同胁迫条件下的 *PtROP* 基因成员的表达模式所用的基因芯片数据来自 NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) [18] 数据库。

### 1.8 杨树 *PtROP* 基因功能网络分析

利用网站 (<http://10.13.200.25/PoplarGene/index.php>) 对杨树 *ROP* 基因进行功能网络分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 杨树 *PtROP* 基因鉴定及系统进化分析

利用拟南芥 *ROP* 氨基酸序列,在杨树全基因组数据库中搜索相似的氨基酸序列,以  $E \leq 10^{-10}$  作为候选标准,共得到 13 个 *PtROP* 基因家族成员(表

1)。13 个 *PtROP* 基因长度在 2 047 ~ 6 862 bp 之间,但其蛋白序列约为 200 个氨基酸左右,蛋白质分子量约 22 kDa,等电点约为 9,其中毛果杨基因组数据获取的 *PtROP10* 基因序列不完整。利用两种不同的算法,即最大似然法 (ML) 和邻接法 (NJ),对杨树和拟南芥 *ROP* 蛋白进行系统进化分析,发现用两种算法得到的杨树及拟南芥 *ROP* 蛋白进化关系相似(图 1)。根据 *ROP* 家族成员在杨树染色体上的分布顺序,将其命名为 *PtROP1-13*。Zheng 和 Yang 等根据氨基酸序列相似性及 C 端高度可变区结构,将拟南芥 *ROP* 蛋白分为四类,即 *AtROP8*、*AtROP9-11*、*AtROP7* 和 *AtROP1-6* [19]。对杨树及拟南芥 *ROP* 蛋白系统进化关系分析显示,同拟南芥 *ROP* 蛋白一样,这四类中均有相应的杨树 *ROP* 蛋白,分别对应为:第一类 (*PtROP10*)、第二类 (*PtROP8*、*PtROP11*、*PtROP12*)、第三类 (*PtROP7*、*PtROP9*、*PtROP13*) 及第四类 (*PtROP1-6*)。与拟南芥相比,杨树在第三类增加了两个 *ROP* 基因成员。

表 1 杨树 *PtROP* 基因家族成员基本信息  
Table 1 Basic information of *Populus PtROP* gene

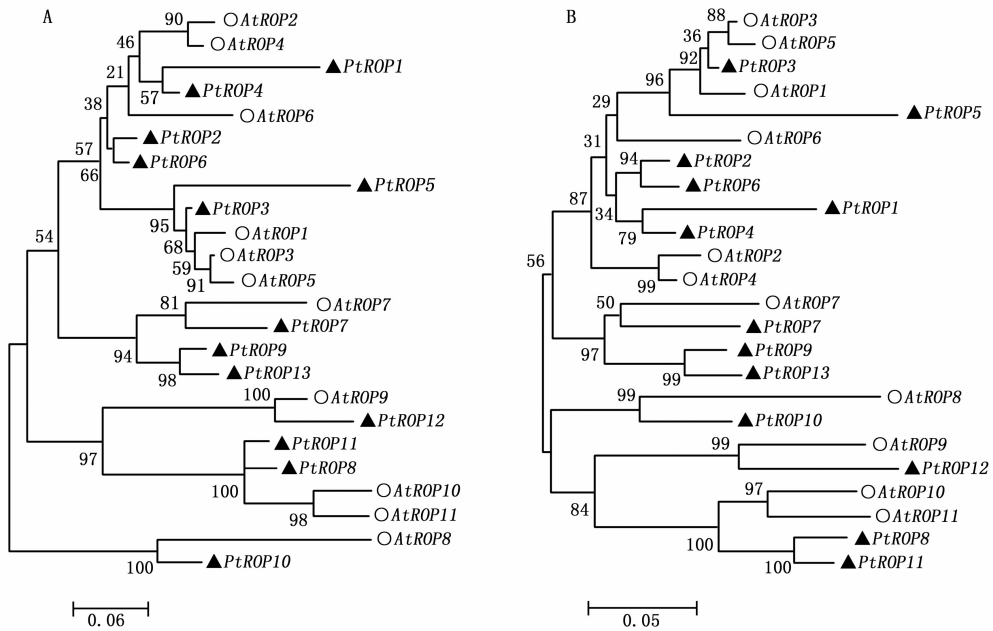
杨树基因 gene	基因号 gene number	基因在染色体上的位置 location	基因长度 length of gene/bp	蛋白质长度 length of protein/aa	等电点 pI/ (分子量/kDa)
<i>PtROP1</i>	Potri.002G019500	Chr02(-)1130440-1133737	3 298	202	9.49/22.305 64
<i>PtROP2</i>	Potri.004G174900	Chr04(+)19344459-19348452	3 994	198	9.33/21.859 42
<i>PtROP3</i>	Potri.005G110700	Chr05(-)8522678-8526079	3 402	197	9.32/21.570 95
<i>PtROP4</i>	Potri.005G242000	Chr05(+)24796222-24799414	3 193	197	9.28/21.692 14
<i>PtROP5</i>	Potri.007G061500	Chr07(+)6811340-6814779	3 440	228	8.18/25.038 61
<i>PtROP6</i>	Potri.009G134600	Chr09(+)10876427-10880720	4 294	210	9.50/23.298 15
<i>PtROP7</i>	Potri.011G061500	Chr11(-)5482983-5485029	2 047	196	9.30/21.845 30
<i>PtROP8</i>	Potri.012G077800	Chr12(-)10352323-10359184	6 862	211	9.35/23.448 24
<i>PtROP9</i>	Potri.013G123800	Chr13(-)13754749-13757500	2 752	197	9.45/21.861 31
<i>PtROP10</i>	Potri.014G051800	Chr14(-)4107009-4109732	2 724	191	9.07/21.389 68
<i>PtROP11</i>	Potri.015G073000	Chr15(-)9749868-9756148	6 281	211	9.21/23.465 25
<i>PtROP12</i>	Potri.018G083400	Chr18(-)11015972-11018214	2 243	226	9.37/25.242 44
<i>PtROP13</i>	Potri.019G092300	Chr19(+ )12299464-12301826	2 363	197	9.53/21.797 27

### 2.2 *PtROP* 基因结构及保守结构域分析

通过对杨树 *PtROP* 基因结构(外显子/内含子)分析显示,杨树 13 个 *PtROP* 基因成员结构相似性很高,外显子数目为 6 ~ 8 个。其中,9 个 *PtROP* 基因成员 (*PtROP2*、*PtROP3*、*PtROP4*、*PtROP5*、*PtROP7*、*PtROP9*、*PtROP10*、*PtROP12* 与 *PtROP13*) 存在 7 个外显子,3 个 *PtROP* 基因 (*PtROP6*、*PtROP8* 及 *PtROP11*) 有 8 个外显子,1 个 *PtROP* 基因 (*PtROP1*) 具有 6 个外显子(图 2)。对杨树及拟南芥 *ROP* 氨基酸序列相似性比较,发现杨树与拟南芥 *ROP* 氨基酸序列在相对应的分类中相似性很高(图 3),可能为直系同源关系。而杨树中有四对 *ROP* (*PtROP1*/

*PtROP4*、*PtROP2*/*PtROP6*、*PtROP8*/*PtROP11*、*PtROP9*/*PtROP13*) 氨基酸序列一致性很高(图 3),说明他们是旁系同源关系,可能来自染色体加倍或基因的复制。

利用 MEME 结构域搜索工具在杨树 *PtROP* 中检测到 15 个保守的结构域。结果表明,*PtROP10* 中不存在 motif 2,*PtROP5* 不具有 motif 5,而其它 *ROP* 均具有 motif 1-7。Motif 1、2、3 及 5 代表了 *ROP* 蛋白与 GTP 结合的结构域(图 4),这四个结构域中都存在与 GTP 结合的保守结合位点。*PtROP5* 虽然不具有 motif 5,但它具有其它与 GTP 结合的保守结合位点。对杨树 *PtROP* 蛋白 motif 2 中第 20 位的苏氨



A. 最大似然法 (ML) 构建的系统进化树; B. 邻接法 (NJ) 构建的系统进化树

etic tree was constructed by the Maximum Likelihood method; B. Phylogenetic tree was constructed by the neighbor-joining method

图1 杨树和拟南芥 ROP 基因家族系统进化分析

Fig. 1 Phylogenetic relationship between *Populus* and *Arabidopsis* ROP families

酸、motif 3 中第 10 位的天冬氨酸分别进行点突变,能够改变 ROP 蛋白与 GTP 的亲水性,使其成为显性失活形式。如果对杨树 PtROP 蛋白 motif 1 中将第 6

位的谷氨酰胺突变为亮氨酸,ROP 蛋白就成为了持续活性型形式(图 4)。

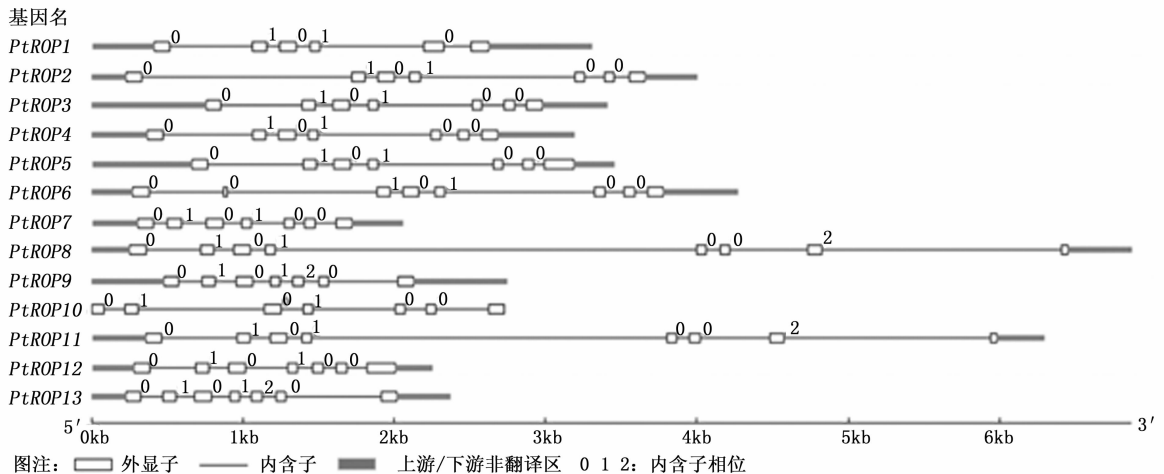


图2 杨树 PtROP 基因结构

Fig. 2 Gene structures of *PtROP* genes

### 2.3 *PtROP* 基因旁系同源基因对的复制

通过比较其系统进化关系、基因结构及氨基酸序列相似性,在杨树 *PtROP* 基因家族中共鉴定得到 4 对旁系同源基因对,分别是 *PtROP1/PtROP4*、*PtROP2/PtROP6*、*PtROP8/PtROP11* 及 *PtROP9/PtROP13*,这些

基因对之间在氨基酸序列、内含子的插入大小及插入位点都极为保守。*PtROP1/PtROP4*、*PtROP2/PtROP6*、*PtROP8/PtROP11*、*PtROP9/PtROP13* 所在染色体片段区域的大部分基因都是同源基因,因此这四个基因对可能是由于染色体复制产生的(图 5)。计算这

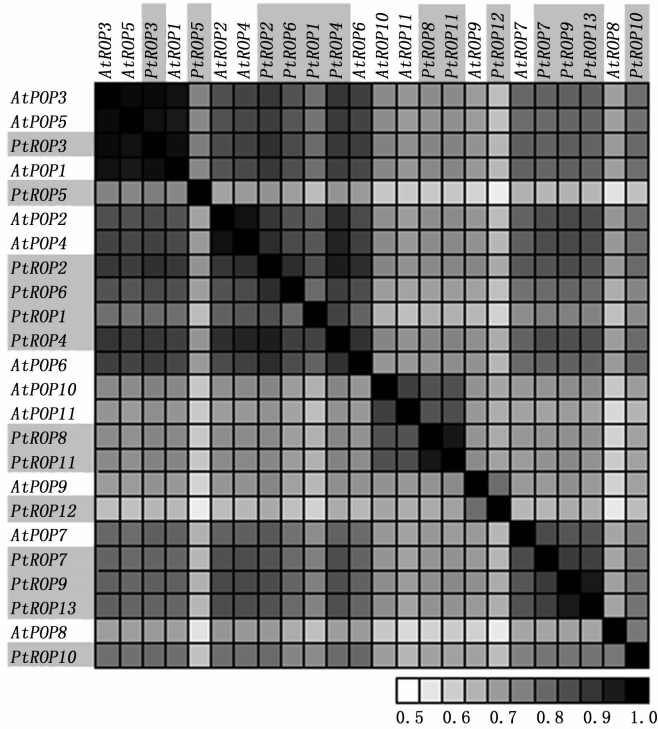


图 3 杨树与拟南芥 ROP 氨基酸序列相似性

Fig. 3 Sequence similarities between *Populus* and *Arabidopsis* ROP proteins

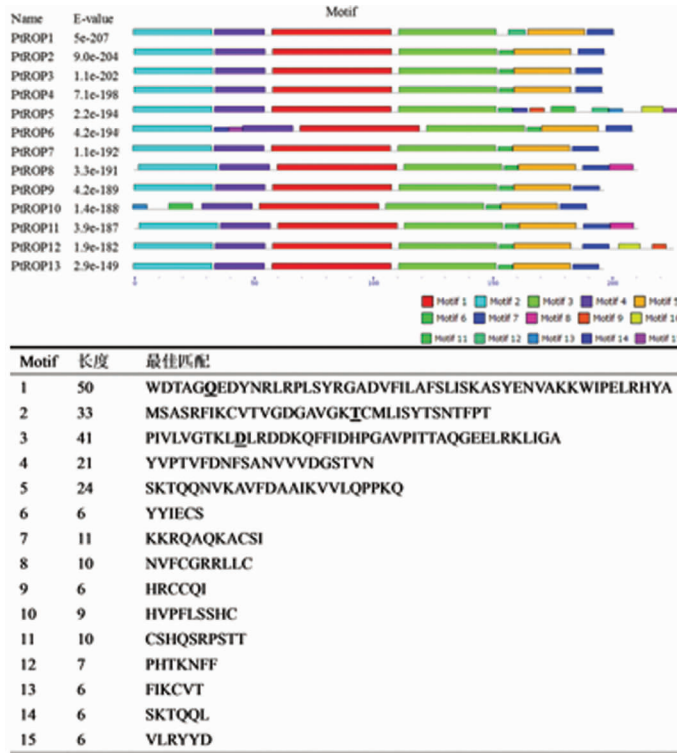


图 4 杨树 *PtROP* 蛋白保守结构域分布

Fig. 4 Distribution of conserved motifs in *PtROP* proteins

四个基因对非同义替换率和同义替换率的比值,发现它们都小于 0.4,因此基因对中的两个旁系同源基因复制后经历了纯化选择在功能上产生了一定程度的差异(表 2)。根据杨树扩张度  $\lambda = 9.1 \times 10^{-9}$ ,

估算出 *PtROP* 旁系同源基因对可能是在 8.74 到 17.30 百万年前产生的,其中 *PtROP1/PtROP4* 产生的最早,约在 17.30 百万年前;*PtROP8/PtROP11* 产生的最晚,约在 8.74 百万年前。而 *PtROP2/*

*PtROP6*、*PtROP9*/*PtROP13* 分别是在 13.98 百万年前和 11.77 百万年前产生的,这个时期与杨树最近

一次在 13 百万年前发生的大规模片段复制时间大致相符<sup>[14]</sup>。

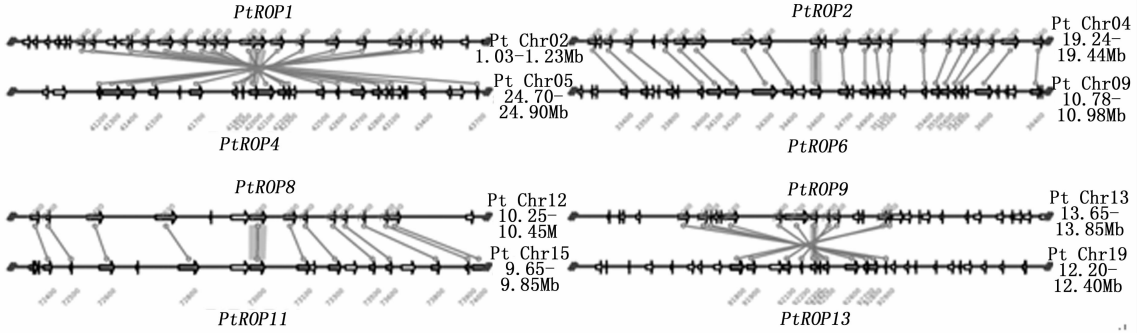


图5 杨树 *PtROP* 旁系同源基因对

Fig. 5 *PtROP* paralogous gene pairs in *P. trichocarpa* *ROP* gene family

表2 杨树 *PtROP* 基因对差异

Table 2 Divergence between paralogous *PtROP* gene pairs

基因 1	基因 2	非同义替换率	同义替换率	非同义替换率/同义替换率	时期 (百万年前)
<i>PtROP1</i>	<i>PtROP4</i>	0.074	0.315	0.236	17.30
<i>PtROP2</i>	<i>PtROP6</i>	0.013	0.255	0.052	13.98
<i>PtROP8</i>	<i>PtROP11</i>	0.020	0.159	0.125	8.74
<i>PtROP9</i>	<i>PtROP13</i>	0.020	0.214	0.094	11.77

基因芯片数据,分析了杨树 *PtROP* 基因在不同组织及不同胁迫条件下的表达模式。与幼叶、老叶、幼茎、木质化茎及根相比,杨树 *PtROP1*、*PtROP2*、*PtROP8*、*PtROP11* 及 *PtROP12* 在顶点的表达水平较高,表明它们可能参与了顶端发育过程。*PtROP7*、*PtROP9* 及 *ROP13* 特异性地在已木质化的茎中表达,说明这些基因可能参与杨树次生生长。*PtROP1*、*PtROP8*、*PtROP9* 及 *PtROP12* 在老叶中的表达量最低,表明它们可能不参与光合作用及次生物质的代谢过程(图6)。

## 2.4 在不同组织、不同胁迫条件下的表达

为了探究杨树 *PtROP* 基因可能参与的生物学过程,利用课题组的 RNA-seq 数据和已公布的杨树

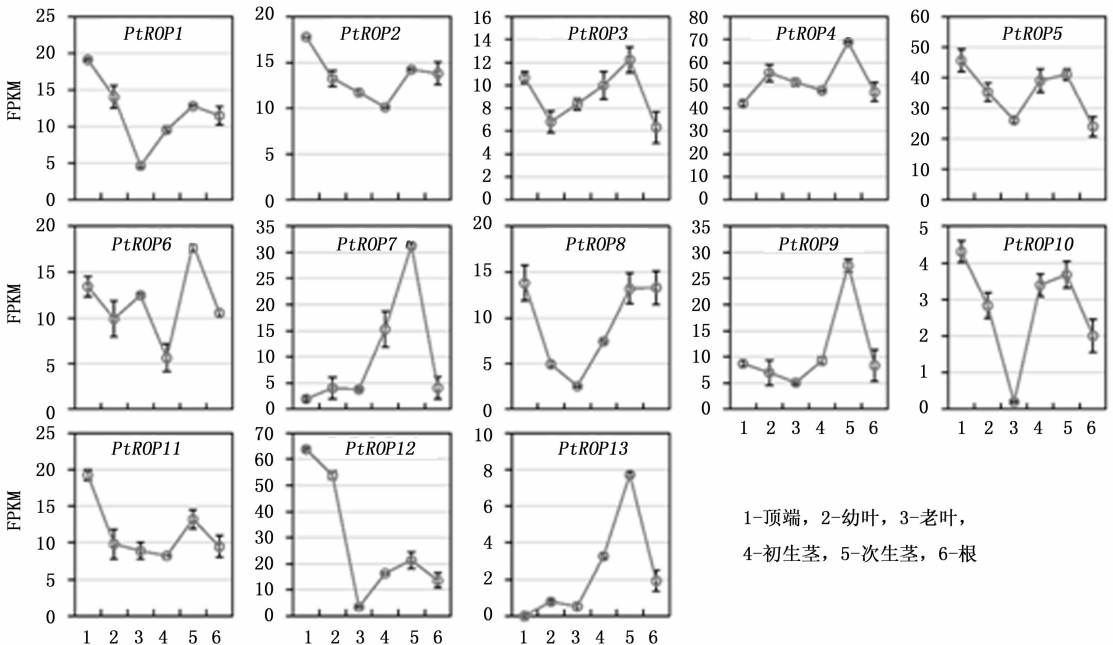


图6 杨树 *PtROP* 基因在不同组织中的表达模式

Fig. 6 Expression analyses of *PtROPs* in various tissues

在应拉木和应力木中 *PtROP7*、*PtROP9*、*PtROP10* 及 *PtROP13* 表达都显著下调,且 *PtROP7*、

*PtROP9* 及 *PtROP13* 在次生茎中特异性高表达,表明这三个基因的表达受外力的调控。对高温、低温、

干旱和盐胁迫条件下 *PtROP* 基因的表达分析发现, 13 个基因中仅有 *PtROP7* 在低温条件下下调表达, 表明大部分 *PtROP* 基因可能不直接对高、低温、干旱和盐等胁迫响应, 或者其在胁迫条件下的稳定表达对细胞功能的维持具有重要作用(图 7)。

### 2.5 杨树 *PtROP* 基因功能基因网络分析

为了进一步解析 *PtROP* 基因的生物学功能, 构建了 *PtROP* 的功能基因网络。发现与 *PtROP* 基因紧密联系的基因主要分为四类, 即 Rho GDP-解离抑制活性、信号转导、tRNA 修饰及 Actin 细胞骨架(表 3)。其中, 在整个网络中大约 50% 的基因与信号转导相关, 并且这些基因与杨树 *PtROP* 基因的相关性都比较大, 这与拟南芥中 ROP 参与了信号转导的结果相符合, 说明 *PtROP* 基因具有功能保守性。13 个基因中, 与 *PtROP2* 和 *PtROP3* 相关联的基因最多, 表明二者在整个调控网络中发挥主要作用。在网络中, 与 tRNA 修饰相关的基因占 50% 以上, 但仅

	应力木	应拉木	42°C 6 h	4°C 10 h	Drought 100 mmol·L <sup>-1</sup> 3 d	NaCl 24 h
<i>PtROP1</i>	-0.9	-1.0	-0.1	0.0	-0.2	0.0
<i>PtROP2</i>	-0.6	-0.5	0.1	-0.1	0.1	0.0
<i>PtROP3</i>	0.1	-0.1	-0.2	0.1	0.0	0.0
<i>PtROP4</i>	-1.1	-1.0	-0.6	-0.1	-0.2	0.0
<i>PtROP5</i>	-0.6	-0.9	-0.1	0.0	0.1	0.0
<i>PtROP6</i>	-1.0	-1.0	0.5	-0.1	0.1	0.1
<i>PtROP7</i>	-4.9	-4.5	-0.1	-1.4	-0.7	0.0
<i>PtROP8</i>	NA	NA	0.1	0.0	0.1	0.0
<i>PtROP9</i>	-2.7	-2.8	-0.3	-0.4	-0.1	0.0
<i>PtROP10</i>	-2.6	-2.4	NA	NA	NA	NA
<i>PtROP11</i>	-0.2	-0.3	-0.2	0.1	0.0	0.0
<i>PtROP12</i>	-1.3	-1.4	-0.2	-0.2	0.0	0.1
<i>PtROP13</i>	-2.9	-2.6	0.0	0.0	0.0	0.0

图 7 杨树 *PtROP* 基因不同胁迫下的表达  
(*PtROPs* 在不同胁迫下的变化倍数的 log<sub>2</sub> 转换值)

Fig. 7 Expression analyses of *PtROPs* under various stresses

有 *PtROP4* 与之相关联, 并且它们之间的相关性较小, 可能 *PtROP4* 广泛地参与到 tRNA 修饰中, 但在其中起主要作用, 另外, *PtROP4* 基因在 13 个 *PtROP* 基因中仅与 *PtROP1* 存在关联, 显示杨树 *PtROP4* 可能在进化过程中出现了功能分化(图 8)。

表 3 杨树 *PtROP* 功能基因网络中基因相关信息

Table 3 Genes information in the *PtROP* gene functional network

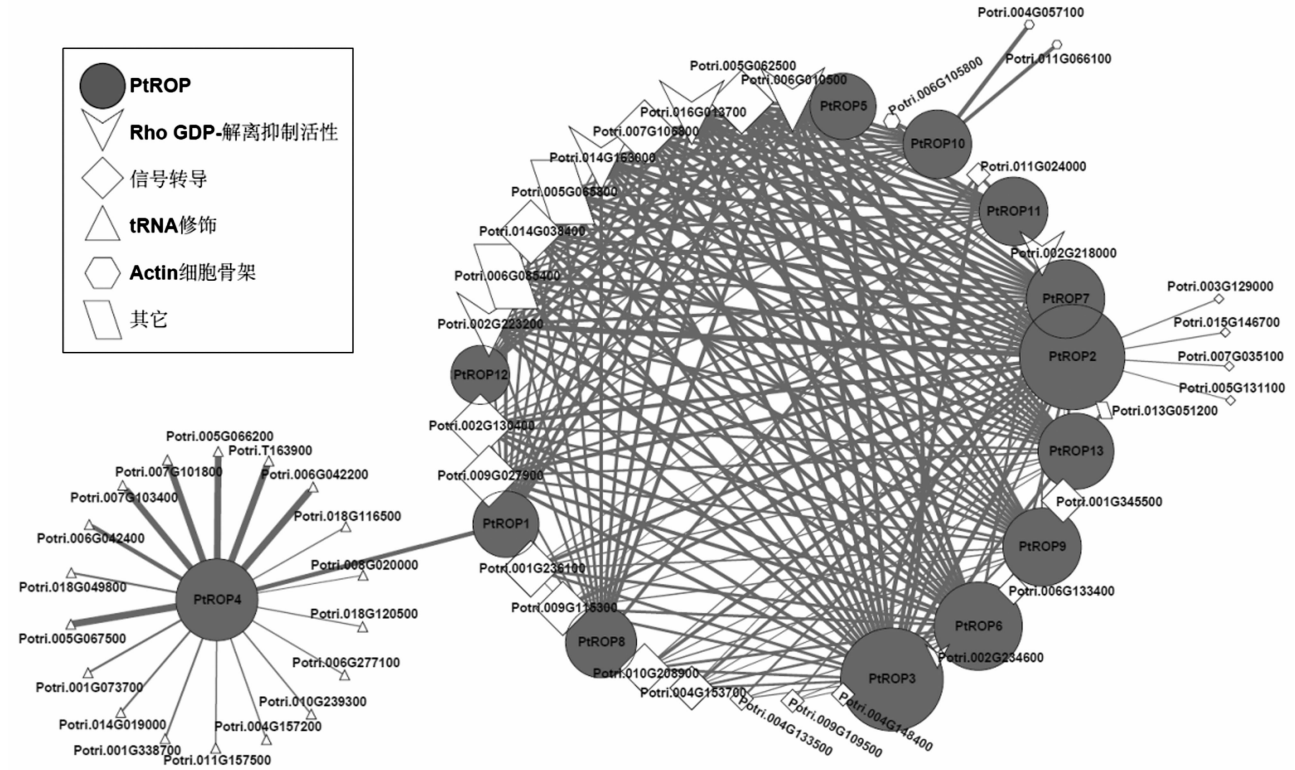
分类	基因号 gene number	功能注释 tunction	分类	基因号 gene number	功能注释 function
tRNA 修饰	Potri. 001G073700	S-腺苷-L-甲硫氨酸依赖性甲基转移酶	信号转导	Potri. 001G236100	Ras 相关小 G 蛋白
tRNA	Potri. 001G338700	S-腺苷-L-甲硫氨酸依赖性甲基转移酶	signal	Potri. 004G148400	WD40 重复蛋白
modification	Potri. 004G157200	核糖体蛋白 S25 家族蛋白	transduction	Potri. 004G153700	GTP 结合蛋白
	Potri. 005G066200	S-腺苷-L-甲硫氨酸依赖性甲基转移酶		Potri. 005G131100	WD40 重复蛋白
	Potri. 005G067500	S-腺苷-L-甲硫氨酸依赖性甲基转移酶		Potri. 006G123400	GTP 激活蛋白
	Potri. 006G042200	S-腺苷-L-甲硫氨酸依赖性甲基转移酶		Potri. 007G035100	WD40 重复蛋白
	Potri. 006G042400	S-腺苷-L-甲硫氨酸依赖性甲基转移酶		Potri. 009G027900	Ras 相关小 G 蛋白
	Potri. 006G277100	tRNA 甲基转移酶		Potri. 009G109500	WD40 重复蛋白
	Potri. 007G101800	S-腺苷-L-甲硫氨酸依赖性甲基转移酶		Potri. 009G115300	GTP 结合蛋白
	Potri. 007G103400	S-腺苷-L-甲硫氨酸依赖性甲基转移酶		Potri. 010G208900	RabA
	Potri. 008G020000	核糖体蛋白 S25 家族蛋白		Potri. 011G024000	鸟苷酸交换因子
	Potri. 010G239300	核糖体蛋白 S25 家族蛋白		Potri. 014G038400	WD40 重复蛋白
	Potri. 011G157500	甲基转移酶		Potri. 002G130400	WD40 重复蛋白
	Potri. 014G019000	锚蛋白重复序列蛋白家族	actin 细胞骨架	Potri. 004G057100	SCAR 蛋白
	Potri. 018G049800	S-腺苷-L-甲硫氨酸依赖性甲基转移酶	actin cytoskeleton	Potri. 006G105800	SCAR 蛋白
	Potri. 018G116500	S-腺苷-L-甲硫氨酸依赖性甲基转移酶		Potri. 011G066100	SCAR 蛋白
	Potri. 018G120500	S-腺苷-L-甲硫氨酸依赖性甲基转移酶	其他	Potri. 006G085400	生物素合成相关
	Potri. T163900	S-腺苷-L-甲硫氨酸依赖性甲基转移酶	others	Potri. 005G065800	DNA 结合相关
				Potri. 013G051200	转录激活因子

### 3 讨论

杨树是全球广泛分布的重要经济树种, 具有生长迅速, 生物量大、轮伐期短等特点, 随着杨树全基因组测序的完成, 杨树已成为研究多年生林木生长发育的模式树木。在不同物种中对 *ROP* 基因的研

究发现 *ROP* 基因广泛地参与了植物的生长发育和抗逆过程, 而且 *ROP* 基因在初生细胞壁和次生细胞壁的沉积过程中具有重要作用<sup>[20]</sup>。因此对于杨树 *ROP* 基因的研究, 不仅在揭示木本植物发育和抗逆机理上具有重要意义, 而且具有重要的应用价值。

本研究利用已知的拟南芥 ROP 氨基酸序列在

图8 杨树 *PtROP* 基因调控网络Fig. 8 *PtROP* gene functional network

杨树全基因组数据库中进行相似性序列搜索,共检测到13个 *PtROP* 基因成员,其中包含四个旁系同源基因对;进化分析表明,这些基因可能来自全基因组染色体复制。杨树 *PtROP* 基因结构分析、系统进化分析及氨基酸序列相似性分析表明,杨树 *PtROP* 基因家族成员在结构与氨基酸序列上极为保守。杨树 *PtROP* 基因与拟南芥相同,分为四类,它们相对应的类别,氨基酸序列相似度很高。对杨树 *PtROP* 的 motif 研究表明,杨树和拟南芥 *ROP* 一样,都具有相同的与 GTP 结合的保守结构域。这些研究结果预示着 *ROPs* 在杨树中具有类似的、保守的功能。

对杨树 *PtROP* 基因家族成员在不同组织、不同胁迫条件下的表达情况进行了分析,发现不同的 *PtROP* 基因在不同的组织中表达存在差异,表明它们可能参与了不同的生物学过程。研究发现拟南芥 *ROP11* 影响次生细胞壁的沉积,在超表达持续活性型 *ROP11* 拟南芥中,正在分化的木质部细胞次生壁上没有纹孔的形成,而 *ROP* 效应因子 *ROPGEF4* 的缺失导致次生壁上纹孔数量减少<sup>[21]</sup>。桉树 *ROPI* 也能够影响次生细胞壁的沉积,其在形成层和正在分化的木质部细胞中都有很高的表达水平,在拟南芥中超表达持续活性型的桉树 *ROPI* 基因抑制次生

木质部的木质化和木葡聚糖沉积<sup>[22]</sup>。本研究发现杨树 *PtROP7*、*PtROP9* 与 *PtROP13* 特异性地在茎的次生长中高丰度表达,表明这三个基因可能参与了杨树次生生长过程。*PtROP7*、*PtROP9* 与 *PtROP13* 同属于杨树 *PtROP* 基因家族的第三类,可能存在功能上的冗余,以保障在茎的次生维管发育中发挥重要作用。

已有研究表明,植物 *ROP* 蛋白参与了多种逆境胁迫。例如,油菜 *ROP5* 和 *ROP9* 在高温胁迫后表达发生明显变化<sup>[23]</sup>,玉露桃冷害胁迫后,果实中的 *ROP* 基因表达量显著降低<sup>[24]</sup>。本研究通过对高温、低温、干旱与盐等胁迫条件下杨树 *PtROP* 的表达分析发现,*PtROP* 基因对这些胁迫没有产生显著响应,可能是由于杨树 *PtROP* 基因功能的特化,趋于基本维持细胞正常的信息与物质的流动。通过杨树 *PtROP* 的功能基因网络分析,发现杨树 *PtROP* 基因主要参与了信号转导过程,这与上述推测是一致的<sup>[25]</sup>。

## 4 结论

本研究以杨树为模式,在全基因组水平上对 *ROP* 基因的家族成员、基因结构、保守结构域、氨基



酸序列相似性及表达模式进行了分析。发现杨树中共有 13 个 *PtROP* 基因,它们的基因结构相似,功能结构域是保守的。根据氨基酸序列相似性及 C 端高度可变区结构,杨树 *PtROP* 被分为四类:第一类 (*PtROP10*)、第二类 (*PtROP8*、*PtROP11* 和 *PtROP12*)、第三类 (*PtROP7*、*PtROP9* 和 *PtROP13*) 及第四类 (*PtROP1-6*)。对 *PtROP* 基因的复制情况进行分析,发现 *PtROP* 基因家族中存在四对旁系同源基因对 (*PtROP1/PtROP4*、*PtROP2/PtROP6*、*PtROP8/PtROP11* 及 *PtROP9/PtROP13*),它们都是通过全基因组复制产生的。四个基因对都经历了纯化选择。*PtROP* 旁系同源基因对可能是在 8.74 到 17.30 百万年前产生的。对 *PtROP* 基因家族成员在不同组织和不同胁迫响应进行分析,发现 *PtROP* 基因家族成员表达模式具有明显差异。通过构建 *PtROP* 功能基因网络,发现 *PtROP* 可能参与了信号转导、tRNA 修饰及细胞骨架形成等过程。

本研究系统分析了杨树 *PtROP* 家族的成员及其进化关系,研究 *PtROP* 基因在木本植物发育过程中的表达特性和可能的功能,为进一步研究其在木本植物特别是次生生长过程中的作用奠定了基础。

## 参考文献:

[1] Assmann S M. Heterotrimeric and unconventional GTP binding proteins in plant cell signaling[J]. *The Plant Cell*, 2002, 149(suppl 1): S355 - S373.

[2] Kahn R A, Der C J, Bokoch G M. The ras superfamily of GTP-binding proteins: guidelines on nomenclature[J]. *The FASEB Journal*, 1992, 6(8): 2512 - 2513.

[3] Chant J, Stowers L. GTPase cascades choreographing cellular behavior: movement, morphogenesis, and more[J]. *Cell*, 1995, 81(1): 1 - 4.

[4] Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton[J]. *Science*, 1998, 279(5350): 509 - 514.

[5] 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.

[6] Pandey G K, Sharma M, Pandey A, et al. GTPases: Versatile Regulators of Signal Transduction in Plants[M]. Springer, 2015.

[7] Ren H, Lin D. ROP GTPase Regulation of Auxin Transport in *Arabidopsis*[J]. *Molecular Plant*, 2015, 8(2): 193 - 195.

[8] Berken A, Wittinghofer A. Structure and function of Rho-type molecular switches in plants[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2008, 46(3): 380 - 393.

[9] Nagawa S, Xu T, Lin D, et al. ROP GTPase-dependent actin microfilaments promote PIN1 polarization by localized inhibition of clathrin-dependent endocytosis [J]. *PLoS Biol*, 2012, 10(4): e1001299.

[10] 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.

[11] Li H, Wu G, Ware D, et al. *Arabidopsis* Rho-related GTPases: differential gene expression in pollen and polar localization in fission yeast[J]. *Plant Physiology*, 1998, 118(2): 407 - 417.

[12] Molendijk A J, Bischoff F, Rajendrakumar C S V, et al. *Arabidopsis thaliana* Rop GTPases are localized to tips of root hairs and control polar growth[J]. *The EMBO Journal*, 2001, 20(11): 2779 - 2788.

[13] Jeon B W, Hwang J U, Hwang Y, et al. The *Arabidopsis* small G protein ROP2 is activated by light in guard cells and inhibits light-induced stomatal opening[J]. *The Plant Cell*, 2008, 20(1): 75 - 87.

[14] Tuskan G A, Difazio S, Jansson S, et al. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray)[J]. *Science*, 2006, 313(5793): 1596 - 1604.

[15] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(24): 4876 - 4882.

[16] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731 - 2739.

[17] Guo A Y, Zhu Q H, Chen X, et al. [GSDS: a gene structure display server[J]. *Yi Chuan = Hereditas/Zhongguo Yi Chuan Xue Hui Bian Ji*, 2007, 29(8): 1023 - 1026.

[18] Barrett T, Edgar R. [19] Gene Expression Omnibus: Microarray Data Storage, Submission, Retrieval, and Analysis[J]. *Methods in enzymology*, 2006, 411: 352 - 369.

[19] Zheng Z L, Yang Z. The Rop GTPase switch turns on polar growth in pollen[J]. *Trends in plant science*, 2000, 5(7): 298 - 303.

[20] Oda Y, Fukuda H. Emerging roles of small GTPases in secondary cell wall development[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5.

[21] Oda Y, Fukuda H. Initiation of cell wall pattern by a Rho-and microtubule-driven symmetry breaking [J]. *Science*, 2012, 337(6100): 1333 - 1336.

[22] Foucart C, Jauneau A, Gion J M, et al. Overexpression of *EgROPI*, a Eucalyptus vascular-expressed Rac-like small GTPase, affects secondary xylem formation in *Arabidopsis thaliana*[J]. *New Phytologist*, 2009, 183(4): 1014 - 1029.

[23] Chan J, Pauls K P. Brassica napus Rop GTPases and their expression in microspore cultures[J]. *Planta*, 2007, 225(2): 469 - 484.

[24] Jin W, Xu C, Li X, et al. Expression of *ROP/RAC GTPase* genes in postharvest loquat fruit in association with senescence and cold regulated lignification [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2009, 54(1): 9 - 14.

[25] Miyawaki K N, Yang Z. Extracellular signals and receptor-like kinases regulating ROP GTPases in plants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5.