

陆地棉小 GTP 结合蛋白基因 *GhROP4* 在棉花抗旱中的功能分析

胡子曜¹, 张琅让², 黄惠莹¹, 雷建峰², 玛迪娜·木拉提², 邓嘉辉¹,
孙玲², 刘敏¹, 徐诗佳², 李月¹

(¹新疆农业大学生命科学学院, 乌鲁木齐 830052; ²新疆农业大学农学院, 乌鲁木齐 830052)

摘要: 干旱是影响新疆棉花产量及品质的首要非生物因素, ROP (Rho-related GTPases from plants) 蛋白是一类植物特有的 Rho 类小 G 蛋白, 在植物体内起着调控生长发育及多种抗逆反应的作用。本研究利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR, real-time quantitative polymerase chain reaction) 技术分析了 *GhROP4* 基因在干旱胁迫下及外源脱落酸 (ABA, abscisic acid) 处理下的表达模式, 通过病毒诱导的基因沉默 (VIGS, virus induced gene silencing) 技术分析了 *GhROP4* 基因对干旱的调控方式及可能参与的调控通路。干旱及脱落酸处理使 *GhROP4* 基因的转录水平整体均呈上调趋势, 沉默 *GhROP4* 基因后增强了棉花的抗旱性; 沉默植株的离体叶片失水率及干旱胁迫处理后叶片的相对含水量、脯氨酸 (Pro, proline) 含量及 3 种抗氧化物酶: 过氧化氢酶 (CAT, catalase)、超氧化物歧化酶 (SOD, superoxide dismutase)、过氧化物酶 (POD, peroxidase) 活性均显著高于阴性对照, 而过氧化氢 (H₂O₂, hydrogen peroxide) 及丙二醛 (MDA, malonaldehyde) 含量显著低于阴性对照; 与阴性对照相比, 沉默植株叶片中 ABA 合成及通路基因表达量均显著上调。*GhROP4* 基因可能通过负调控 ABA 通路, 在棉花抗旱中发挥负调控的作用。

关键词: 棉花; 干旱; *GhROP4*; 病毒诱导的基因沉默; 脱落酸

Functional Analysis of a small GTP-binding Protein Gene *GhROP4* in Drought Resistance of Cotton (*Gossypium hirsutum* L.)

HU Zi-yao¹, ZHANG Lang-rang², HUANG Hui-ying¹, LEI Jian-feng², MADINA Mulati², DENG Jia-hui¹,
SUN Ling², LIU Min¹, XU Shi-jia², LI Yue¹

(¹College of Life Sciences, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052;

²College of Agronomy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052)

Abstract: Drought is the primary abiotic factor that affects the yield and quality of cotton fiber. ROP (Rho-related GTPases from plants) protein is a type of plant-specific Rho small G proteins, and in plants this protein plays a role in responses to the development and various stresses. In this study, real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to analyze the expression pattern of the *GhROP4* gene under drought stress and exogenous abscisic acid (ABA) treatment conditions. Virus-induced gene silencing (VIGS) technology was used to analyze the regulation mode of the *GhROP4* gene on drought and the possible regulatory pathways involved. Drought and abscisic acid treatment increased the transcription level of *GhROP4* gene as a whole, and silencing *GhROP4* gene enhanced the drought resistance of cotton. The water loss rate and relative water content, proline (Pro, Proline) content, and activities of three antioxidant enzymes: catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and peroxidase (POD) of the detached leaves of the silent plants after drought

收稿日期: 2021-10-31 修回日期: 2021-11-23 网络出版日期: 2021-12-08

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20211031001>

第一作者研究方向为作物逆境分子生物学, E-mail: 1916938224@qq.com; 张琅让为共同第一作者

通信作者: 李月, 研究方向为作物逆境分子生物学, E-mail: liyue6905@126.com

基金项目: 国家自然科学基金 (31560534)

Foundation project: National Natural Science Foundation of China (31560534)

stress were significantly higher than those of the negative control. The contents of hydrogen peroxide (H_2O_2) and malondialdehyde (MDA) were significantly lower than those of the negative control; compared with the negative control, ABA synthesis and pathway gene expression in the leaves of silent plants were significantly up-regulated. Altogether, our results supported that the *GhROP4* gene was a negative regulator in drought resistance of cotton through negatively regulating the ABA metabolic pathway.

Key words: cotton; drought; *GhROP4*; virus-induced gene silencing (VIGS); abscisic acid

棉花是我国重要的经济作物之一,在国民经济中占有重要地位,而陆地棉是目前主要的种植品种^[1-2]。作为最常见的非生物胁迫之一,干旱胁迫严重制约着棉花的产量和纤维品质,是我国农业生产面临的首要威胁^[3]。传统的杂交育种方法由于难度大、周期长,已无法满足现实的生产发展需要。因此发掘、鉴定棉花相关抗旱基因并研究其抗旱分子机制,对培育棉花抗逆种质材料具有重要意义。

小 GTP 结合蛋白简称小 G 蛋白,与异源三聚体蛋白及其他几种特殊蛋白同属 G 蛋白家族^[4]。根据其功能不同及结构的差异又可分为 5 个亚家族: Rho、Ras、Ran、Rab 及 Arf。ROP (Rho-related GTPases from plants) 蛋白又称 Rac 蛋白,是高等植物所特有的一类小 G 蛋白,属于 Rho 亚家族^[5]。ROP 蛋白通过在两种状态(与 GTP 结合时的激活状态及与 GDP 结合时的非激活状态)之间不断地变化,以“分子开关”的形式调节细胞内的各项生命活动^[6]。通过对 ROP 蛋白的功能研究发现,该类蛋白具有调节植物细胞的形态结构、细胞生长、亚细胞定位、信号转导、细胞骨架形成及核迁移等多种生物学功能^[7]。目前关于棉花 ROP 基因在抗逆中的研究报道主要集中在病菌及虫害等生物胁迫,例如:王钰静^[8]利用病毒诱导的基因沉默(VIGS, virus induced gene silencing)技术抑制了棉花 *GhROP6* 基因的表达,显著降低了棉花对黄萎病的抗性,推测 *GhROP6* 基因可能正向调节棉花的黄萎病抗性;Yang 等^[9]过表达 *GhRac6* 基因后,转基因植株对蚜虫的抗性及相关抗蚜指标均显著提高,推测该基因是棉花对蚜虫防御反应的一个正向调控因子;而对其在干旱等非生物胁迫下的功能探究也有初步报道,胡子曜等^[10]从陆地棉中克隆出了 *GhROP3* 基因并利用 qRT-PCR 技术分析了该基因在不同逆境胁迫下的表达模式,表明棉花 ROP 基因响应于干旱等非生物胁迫。但由于 qRT-PCR 技术的局限性,对于棉花 ROP 基因是否在棉

花抗旱反应中起作用及对干旱胁迫的调控方式目前尚无相关报道,其抗旱分子机制也需要进一步探究。

实验室前期李月等^[11]利用同源克隆的方法从陆地棉中克隆出一个小 GTP 结合蛋白基因 *GhROP4*。为进一步探究该基因的功能,本研究利用 VIGS 技术对 *GhROP4* 基因的功能及可能参与的调控通路进行了初步探究,为解析棉花对干旱胁迫的反应机制及棉花抗逆育种提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

陆地棉新陆早 22 的种子、VIGS 病毒载体及农杆菌菌株 GV3101 均由本课题组保存。

所用试剂包括: Trans-T1 感受态细胞、pEASY Blunt-Zero 克隆载体、FastPfu Fly DNA 聚合酶、T4 DNA Ligase、RNase A、Taq DNA 聚合酶、琼脂糖凝胶回收试剂盒、DNA 分子量 Marker(全式金,北京,中国);植物总 RNA 提取试剂盒(博日,杭州,中国);反转录试剂盒及荧光定量试剂盒(abm,加拿大);卡那霉素、庆大霉素、脱落酸(ABA)、乙酰丁香酮(AS)及生化指标测定试剂盒等(索莱宝,北京,中国);*Xba* I 和 *Kpn* I 限制性内切酶(Thermo,美国);PCR 所用引物的合成及 DNA 的测序均由上海杰李生物技术有限公司完成。

1.2 试验方法

1.2.1 播种及胁迫处理 参照周垚均等^[12]的方法种植新陆早 22,待植株第二片真叶完全展开时,挑选生长状况一致的棉苗,将待处理棉苗根部土壤用清水洗净后,浸泡在质量浓度为 15% 的 PEG 6000 中,对照组用水处理,分别在 0 h、1 h、3 h、6 h、12 h、24 h 取植株真叶组织。参照 Ni 等^[13]的方法选取生长状况一致的棉株,将其根部洗净后浸泡在 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 ABA 溶液中,对照组用水(含少量无水乙醇)处理,分别在 0 h、3 h、6 h、9 h、12 h 取植株

真叶组织。每个时间点均取 3~4 个生物学重复,取样后迅速冻于液氮中并转移至 -80 °C 冰箱保存,用于后续试验。

1.2.2 棉花 RNA 的提取与 cDNA 的合成 将 -80 °C 冰箱保存的样品用液氮研磨成白色粉末状,采用 Biospin Plant Total RNA Extraction Kit 试剂盒(博日,杭州,中国)提取棉花叶片样品总 RNA。用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,后参照反转录试剂盒(abm,加拿大)说明书合成 cDNA。

1.2.3 GhROP4 基因在 PEG 6000 和外源 ABA 诱导下的表达模式分析 利用 qRT-PCR 技术探究 GhROP4 基因在 PEG 6000 模拟干旱及外源 ABA 诱导下的表达模式,内参基因为棉花管家基因 GhUBQ7^[14]。参照 abm 荧光定量试剂盒说明书,以反转录得到的 cDNA 为模板进行 qRT-PCR。反应体系及反应条件参照胡子曜等^[10]的方法;qRT-PCR 反应所用引物见表 1;目的基因相对表达量的计算方法及数据分析参照李月等^[11]的方法。

表 1 引物及用途

Table 1 Primer and application

引物名称 Primer name	序列 Primer sequence (5' -3')	用途 Application
CM-GhROP4-F	<u>TCTAGAGTCGTCGATGGCAGCACT</u>	载体构建
CM-GhROP4-R	<u>GGTACCAGGAGCCGAATCTGTTTCTT</u>	
q-GhROP4-F	ACCAGCAACACTTTCCTAC	qRT-PCR
q-GhROP4-R	TGACCAGCAGTGTCCATAAA	
q-GhUBQ7-F	GAAGGCATTCCACCTGACCAAC	
q-GhUBQ7-R	CTTGACCTTCTTCTTCTGTGCTTG	
q-GhCLA1-F	GCCCTTTGTGCATCTTC	
q-GhCLA1-R	CTCTAGGGGCATTGAAG	
GhNCED2-F	GACTCGCCGTGCCATTATTT	
GhNCED2-R	CGACTTTGGCGAATCCTGAC	
GhNCED3-F	TGGGTTGAATCCCCTGATACTT	
GhNCED3-R	GCGACGTGTGGACTTACCTGT	
GhNCED9-F	CCCAGTAGACGGTCCGATAA	
GhNCED9-R	ATCCCAAACCTTGACATCTTG	
GhABF2-F	CCAATTGCTGGGAAGGATAA	
GhABF2-R	GGTAACTGGTGCTGGTTTGATT	
GhABF3-F	GAATAGTTGGTTTACCATCTCCTGC	
GhABF3-R	AACTACTTTCTCCAATGCTGCACTG	
GhABI2-F	AGTCAAATCCTCAAAGCCGAAAGTG	
GhABI2-R	ACAATAGTTCGCAACCTGACACCCT	
GhABI5-F	GTGGGTCCGAGTTTTGTCC	
GhABI5-R	AGCTGCACCTACTTTCCGT	

下划线为 *Xba* I 和 *Kpn* I 酶切位点

Xba I and *Kpn* I sites are underlined

1.2.4 陆地棉 GhROP4 基因 VIGS 片段克隆与 VIGS 载体构建 根据陆地棉 GhROP4 基因(Gh_D05G185300.1)的 CDS 序列(588 bp),利用在线软件 SGN-VIGS(<https://vigs.solgenomics.net/>)设计抑制目的基因表达的靶序列(334 bp),手动设计特

异性引物并在其上、下游引物 5' 端分别加入 *Xba* I 和 *Kpn* I 酶切位点(表 1)。以陆地棉 cDNA 为模板,PCR 扩增目标片段。从 DNA 凝胶中回收 PCR 产物并与 pEASY Blunt-Zero 平端克隆载体连接,挑取阳性克隆测序,用 *Xba* I 和 *Kpn* I 双酶切测序正确

的 pEASY-GhROP4 质粒及 TRV2 载体, 分别回收目标片段, 用 T4 DNA Ligase 连接 4~5 h 后, 将连接产物转化 Trans-T1 感受态细胞, 对候选的阳性克隆用 *Xba* I 和 *Kpn* I 进行酶切鉴定, 酶切正确的 TRV::GhROP4 质粒取 8~15 μ L 使用冻融法转化农杆菌 GV3101 感受态细胞, 28 $^{\circ}$ C 倒置培养 36~48 h, 用于后续试验。

1.2.5 农杆菌介导的 VIGS 侵染棉花及沉默效率检测 选取叶绿素合成相关基因 GhCLA1^[15] 作为阳性对照用于 VIGS 技术体系的检验, 将实验室前期构建好的载体 TRV::RNA1、TRV::RNA2、TRV::GhCLA1 和 TRV::GhROP4 转化农杆菌后, 参照李秀青等^[16]的方法, 进行菌体的活化、重悬及侵染。待棉花幼苗生长至两片子叶完全展开且真叶刚露尖时, 选取生长较为一致的幼苗, 利用注射法进行 VIGS 侵染。将包含 TRV::GhROP4 和 TRV::RNA1、TRV::GhCLA1 和 TRV::RNA1、TRV::RNA2 和 TRV::RNA1 的重悬菌液侵染的棉花植株分别作为实验组 TRV::GhROP4 及阳性对照 TRV::GhCLA1、阴性对照 TRV::00。侵染大约 14 d 左右, 当阳性对照 TRV::GhCLA1 出现叶绿素缺失的白化表型时, 拍照记录。同时对阴性对照、阳性对照和实验组植株第二片真叶及根部进行取样, 每个样本取 3~4 个技术重复。将所取样本进行 RNA 提取并合成 cDNA, 利用 qRT-PCR 技术检测基因沉默效率。阳性对照 *GhCLA1* 基因的荧光定量引物见表 1。

1.2.6 *GhROP4* 沉默植株的干旱胁迫处理及离体叶片失水率测定 选取生长状况一致的 *GhROP4* 沉默植株即包含 TRV::GhROP4 和 TRV::RNA1 的重悬菌液侵染的棉花植株及阴性对照植株置于相同湿度环境中停止浇水, 进行自然干旱处理。分别于胁迫处理前及干旱处理 10 d 后拍照, 记录干旱胁迫处理前后的表型差异。剪取植株第二片真叶, 采用称重法^[17]比较 *GhROP4* 沉默植株和阴性对照植株离体叶片失水率的差异, 每隔 1 h 称量其鲜重, 共自然失水 7 h, 每个处理均设置 3 个重复。

1.2.7 干旱胁迫处理后生化指标的测定 选取干旱处理前和干旱处理 10 d 后的 *GhROP4* 沉默植株及阴性对照植株的第二片真叶, 参照生化指标活性检测试剂盒(索莱宝, 北京, 中国)的说明书, 利用紫外分光光度法测定过氧化氢酶(CAT, catalase)

活性, 利用可见分光光度法测定超氧化物歧化酶(SOD, superoxide dismutase)、过氧化物酶(POD, peroxidase)活性及过氧化氢(H_2O_2 , hydrogen peroxide)、丙二醛(MDA, malonaldehyde)、脯氨酸(Pro, proline)含量^[18]; 参照张净等^[19]利用烘干法测定叶片相对含水量。每个处理均设置 3 个重复。

1.2.8 VIGS 处理后 ABA 信号传导途径相关 Marker 基因表达分析 选取 ABA 合成基因 *GhNCED2*、*GhNCED3*、*GhNCED9*^[20] 和 ABA 信号通路基因 *GhABF2*、*GhABF3*、*GhABI2*、*GhABI5*^[21-22], 利用 qRT-PCR 技术分析上述基因在 *GhROP4* 基因沉默植株及阴性对照植株第二片真叶中的表达量差异。ABA 信号传导途径相关 Marker 基因所用引物见表 1。

2 结果与分析

2.1 PEG 6000 及外源脱落酸处理下 *GhROP4* 基因的表达模式分析

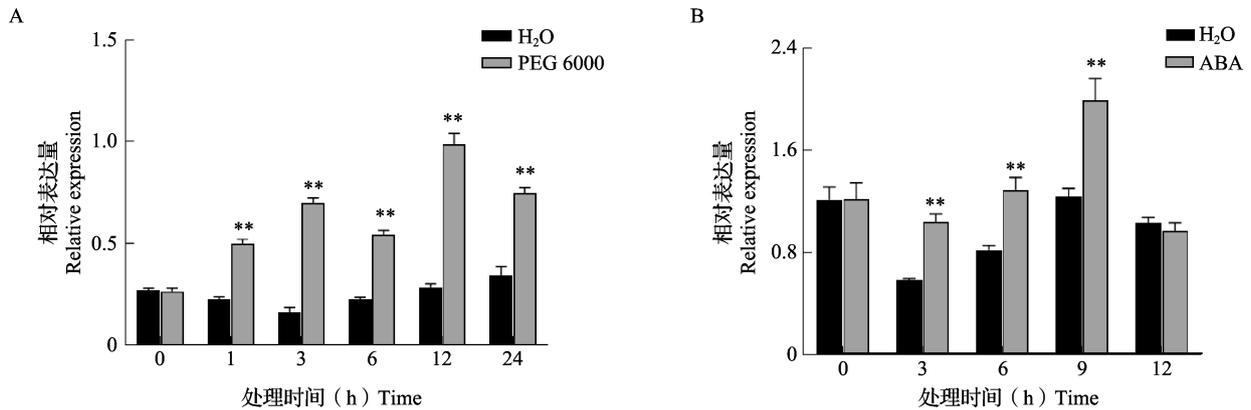
PEG 6000 处理后, *GhROP4* 基因表达量呈上升趋势, 在诱导后 1 h、3 h、6 h、12 h 及 24 h 的表达量均显著高于对照组(图 1A), 这表明 *GhROP4* 基因能够响应干旱胁迫诱导。在外源 ABA 处理后, 与对照相比, *GhROP4* 基因表达量在 3 h、6 h 和 9 h 均显著上调, 在 12 h 表达量与对照相比无明显差异(图 1B), 表明 *GhROP4* 基因能够响应 ABA 激素诱导处理。

2.2 *GhROP4* 的 VIGS 载体构建

利用 PCR 技术扩增 *GhROP4* 的 VIGS 沉默片段 CM-GhROP4, 所得产物长度符合预期(图 2A)。将产物回收进行克隆并测序, 所得结果与目标片段序列一致。将测序正确的 pEASY-GhROP4 阳性质粒经 *Xba* I 和 *Kpn* I 酶切后与 VIGS 沉默载体 TRV2 连接, 双酶切鉴定后结果呈现一条大于 8000 bp 的沉默载体 TRV2 条带和一条大小在 250~500 bp 之间的沉默片段 CM-GhROP4 条带, 其大小均符合预期(图 2B), 表明 *GhROP4* 的 VIGS 沉默载体 TRV::GhROP4 构建成功。

2.3 *GhROP4* 基因沉默效率检验

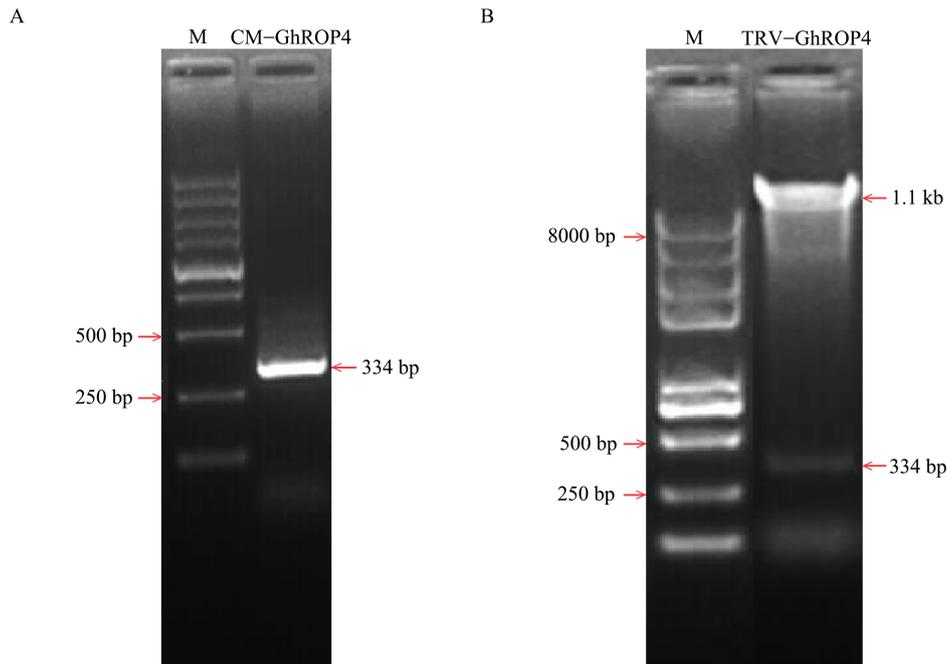
将 3 个转化体 TRV::GhCLA1、TRV::GhROP4 和 TRV::RNA2 分别与 TRV::RNA1 混合后分别侵染棉花子叶作为阳性对照 TRV::GhCLA1、实验组 TRV::GhROP4、阴性对照 TRV::00。约 14 d 后, 阳性对照 TRV::GhCLA1 的叶片出现白化现象(图 3A); 且利用 qRT-PCR 技术检测阳性对照



A: PEG 6000 处理; B: ABA 处理。*: 在 0.05 水平上存在显著差异; **: 在 0.01 水平上存在显著差异, 下同
A: The inoculation of PEG 6000, B: The inoculation of ABA. *: Significant difference at the 0.05 probability, **: Significant difference at the 0.01 probability, the same as below

图 1 PEG 6000 和 ABA 处理后 *GhROP4* 基因的表达模式

Fig.1 Expression pattern of *GhROP4* gene after PEG 6000 and ABA treatment



A: *GhROP4* 目标片段的 PCR 扩增; B: TRV::GhROP4 VIGS 载体的酶切鉴定。M: Trans 2K Plus II DNA Marker
A: PCR amplification of target fragment of *GhROP4*, B: Identification of TRV::GhROP4 vectors by restriction enzyme digestion.
M: Trans 2K Plus II DNA Marker

图 2 *GhROP4* 的 VIGS 载体的构建

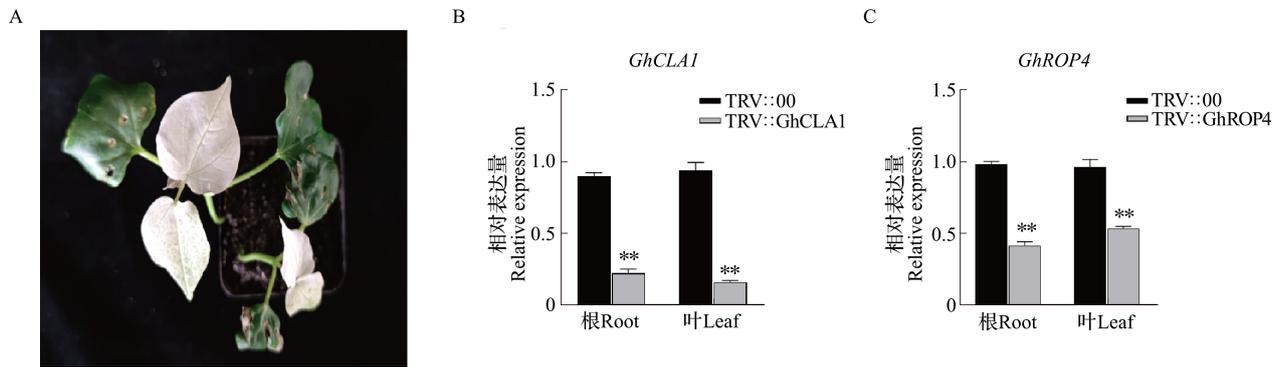
Fig.2 Construction of VIGS vector of *GhROP4*

GhCLA1 及目的基因 *GhROP4* 在根和真叶中的表达量, 结果显示, *GhCLA1* 和 *GhROP4* 基因的表达量均显著低于阴性对照 TRV::00 (图 3B、C), 证明 VIGS 沉默载体在植株体内能够正常工作, 同时成功获得 *GhROP4* 基因的沉默植株。

2.4 *GhROP4* 基因沉默植株的表型分析

选取长势良好且生长状态一致的 *GhROP4* 基因沉默植株和 TRV::00 阴性对照植株进行自然干

旱处理, 10 d 后拍照记录。胁迫处理前, *GhROP4* 基因沉默植株在表型上与 TRV::00 阴性对照植株相比无差异。胁迫处理后 *GhROP4* 基因沉默植株和 TRV::00 阴性对照植株都发生了一定程度的萎蔫, 但对照组萎蔫严重, 甚至已经枯死; 而 *GhROP4* 基因沉默植株叶片的萎蔫程度较轻, 植株的整体健康状况明显优于对照植株 (图 4), 表明沉默 *GhROP4* 基因可以显著提高棉花的抗旱性。



A: 在棉花中沉默 *GhCLA1* 表型; B: *GhCLA1* 的沉默效率检测结果; C: *GhROP4* 的沉默效率检测结果

A: The phenotype of silenced *GhCLA1* in cotton, B: Silencing efficiency test result of *GhCLA1*, C: Silencing efficiency test result of *GhROP4*

图3 *GhROP4* 基因的沉默效率检测结果

Fig.3 Silencing efficiency test result of *GhROP4* gene



图4 *GhROP4* 基因沉默后的植株表型

Fig.4 Phenotype of plants after *GhROP4* gene silencing

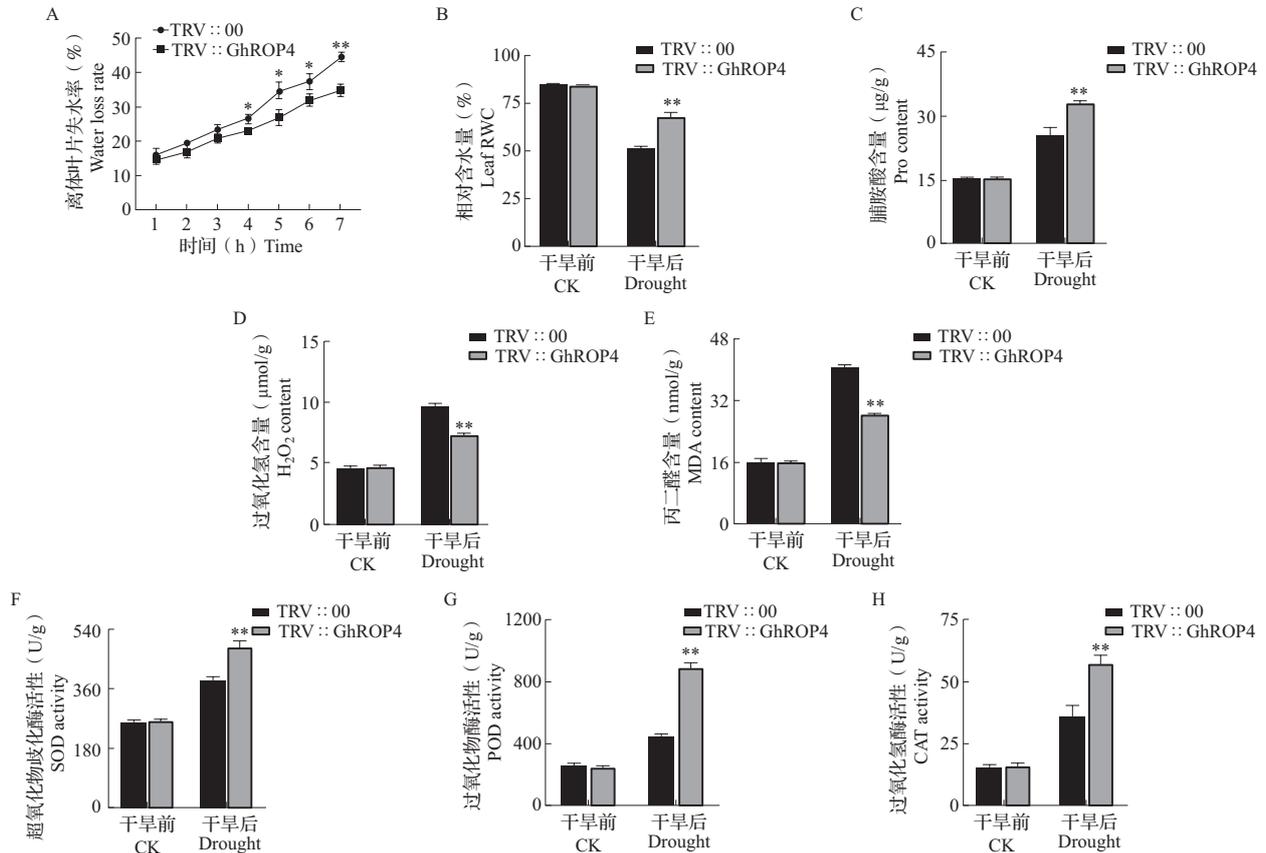
2.5 *GhROP4* 基因沉默植株与抗旱有关的生化指标变化

测定 *GhROP4* 基因沉默植株和阴性对照植株离体叶片失水率,结果显示,与阴性对照相比,沉默植株在 4 h、5 h、6 h 和 7 h 均显著低于对照组(图 5A);胁迫处理前两者的相对含水量无明显差异,在胁迫处理后则均有所下降,但沉默植株的叶片相对含水量显著高于对照(图 5B),表明沉默植株的保水能力强于对照。正常处理下两组植株体内的脯氨酸含量基本一致,干旱胁迫后两组均显著增加,但沉默植株的脯氨酸含量显著高于对照(图 5C),表明沉默植株的渗透调节能力显著强于对照植株。在正常环境中, *GhROP4* 基因沉默植株和阴性对照植株的过氧化氢及丙二醛含量均无差别,干旱处理后,两者的含量均显著增加,但沉默植株两者的含量均显著低于对照植株(图 5D、E),表明沉默植株所受氧化伤害程度显著低于对照植株。胁迫处理前,沉默植株及对照植株的超氧化物歧化酶、过氧化物酶及过氧化氢酶活性无明显差别,胁迫处理后 3 种酶活性均

显著提高,但沉默植株的 3 种酶活性均显著高于对照(图 5F~H);表明沉默植株的抗氧化能力显著强于对照。以上结果表明, *GhROP4* 基因是一个棉花抗旱的负调控因子,在棉花中抑制该基因的表达可以显著增强植株的抗旱性。

2.6 VIGS 处理后 ABA 信号通路相关基因的表达分析

在所有已鉴定的植物激素中,脱落酸(ABA)是介导植物干旱反应最重要的激素。植物在受到干旱、高盐、低温、高温及渗透等非生物胁迫时,体内会迅速积累脱落酸,从而激活多种抗逆反应。为进一步探究沉默植株对干旱抗性增强的可能性,利用 qRT-PCR 技术检测了 *GhROP4* 基因沉默植株及阴性对照植株真叶中 ABA 信号通路相关基因表达量变化情况,结果显示, *GhROP4* 基因沉默植株中 ABA 合成基因 *GhNCED2*、*GhNCED3*、*GhNCED9* 和通路基因 *GhABF2*、*GhABF3*、*GhABI2*、*GhABI5* 与阴性对照植株相比,其表达量均显著上调(图 6)。表明 *GhROP4* 基因可能通过负调控 ABA 信号通路,在棉花抗旱中扮演负调控的角色。



RWC: Relative water content, Pro: Proline, H₂O₂: Hydrogen peroxide, MDA: Malondialdehyde, SOD: Superoxide dismutase, POD: Peroxidase, CAT: Catalase

图5 干旱相关生化指标测定

Fig.5 Determination of drought-related biochemical indexes

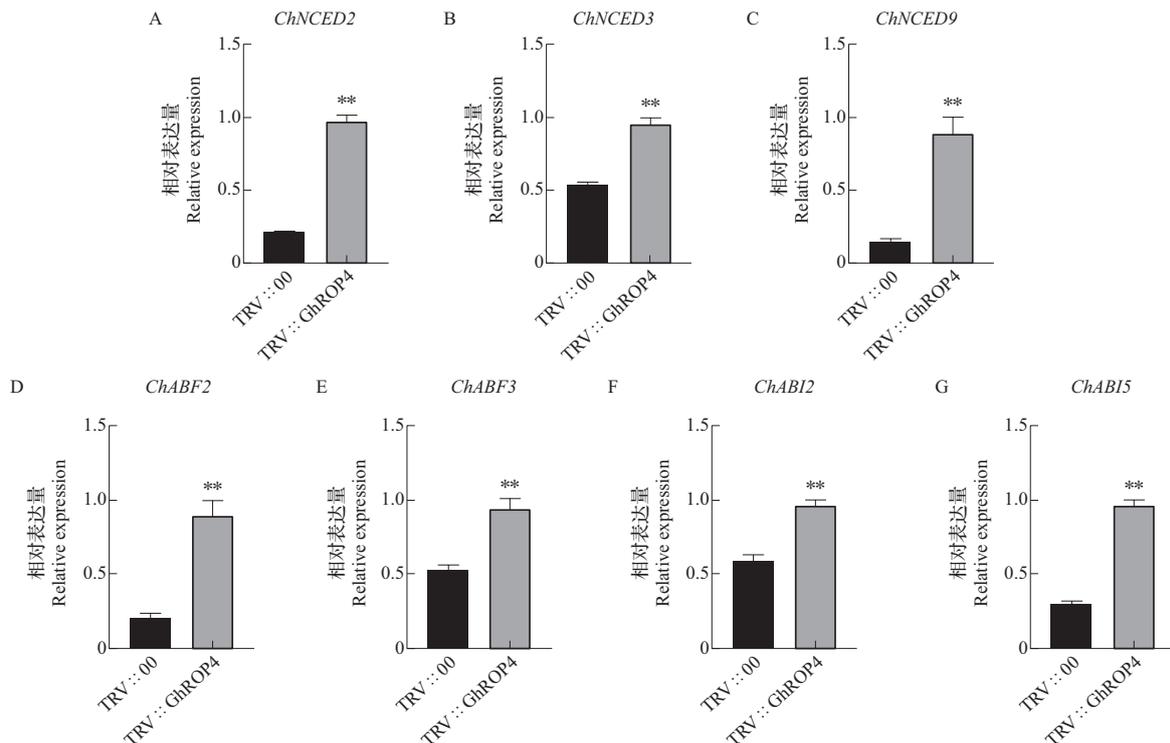


图6 GhROP4 沉默植株和对照植株的真叶中 ABA 信号通路基因表达分析

Fig.6 Expression analysis of genes involved in ABA signaling pathway in leaves from GhROP4 silenced plants and control

3 讨论

ROP 蛋白是植物所特有的一种 Rho 类小 G 蛋白, 又称 Rac 蛋白^[23]。近年来对 ROP 基因在植物抗逆中的功能研究已逐渐成为植物基因功能鉴定方面的热点, 已有研究表明, ROP 基因参与干旱、高盐、高温、低温及病害等多种逆境胁迫的调控^[24]。Miao 等^[25]在拟南芥中过表达香蕉 *MaROP5g* 基因后显著提高了转基因植株的耐盐性; Shi 等^[26]研究发现, 小麦 *TaROP10* 基因通过与 *TaTrxh9* 基因互作, 在小麦抗条锈病反应中扮演一个负调控因子; Lee 等^[27]发现抑制拟南芥 ROP 基因表达后, *had15* 突变体表现出对干旱胁迫更强的敏感性, 表明拟南芥 ROP 蛋白参与了植物的抗旱反应; Cao 等^[28]研究发现过表达烟草 *NtROP1* 基因后增强了转基因株系对盐胁迫的敏感性, 而沉默该基因后减弱了植株对盐胁迫的敏感性, 表明烟草 *NtROP1* 基因负调控植物的耐盐性; Ma 等^[29]抑制大麦 *RacB* 基因表达后显著增强了沉默植株对白粉病的抗性, 表明该基因负调控大麦的抗病性; Qiu 等^[30]研究表明辣椒 *CaROP1* 基因通过参与茉莉酸 / 乙烯的信号通路调控继而参与辣椒对青枯病的抗病反应。目前关于棉花 ROP 基因在抗逆方面的功能研究主要集中在抗病虫害等生物胁迫反应^[8-9], 而该类基因在棉花中对非生物胁迫的调控方式及抗逆分子机制的相关研究目前鲜有。本研究利用实验室前期通过同源克隆获得的一个小 GTP 结合蛋白基因 *GhROP4*, qRT-PCR 技术分析发现该基因响应干旱胁迫诱导, 推测其可能在棉花抵御干旱胁迫过程中发挥一定的作用; 利用 VIGS 技术干涉该基因表达后显著降低了棉花对干旱的敏感性; 干旱相关生化指标测定结果显示: *GhROP4* 基因沉默植株的离体叶片失水率及干旱胁迫后沉默植株的相对含水量、脯氨酸含量和 3 种抗氧化酶 (CAT、POD、SOD) 活性均显著高于对照组, 丙二醛及过氧化氢含量均显著低于对照组。以上结果初步表明 *GhROP4* 基因是棉花抗旱反应的一个负调控因子。

脱落酸 (ABA) 是植物体内重要激素之一, 具有调控气孔关闭, 促进种子休眠、器官脱落及果实成熟等多种生理功能, 同时在植物响应不同逆境胁迫中发挥着重要作用^[31]; 此外, ABA 还是一种干旱信号物质, 调控着植物的抗旱生理过程。当植物处于干旱逆境中时, 体内积累的 ABA 可以诱导气孔关闭从而减弱植物的蒸腾作用, 还可以特异性诱

导合成抗旱蛋白, 继而增强植株的抗旱能力^[32]。对拟南芥 ROP 基因的信号转导研究发现, *AtROP* 基因作为负调控因子参与 ABA 信号转导^[33]; *AtROP1* 基因在调控气孔开闭中发挥着重要作用, ABA 则通过灭活 *AtROP1* 蛋白从而诱导气孔关闭^[34]; Li 等^[35]研究发现, *AtROP2* 的组成型活化突变体 *CA-ROP2* 对 ABA 调控种子萌发具有抑制作用, 而其功能缺失突变体 *DN-ROP2* 则可以加强 ABA 对种子萌发的调控; 类似的是, *CA-ROP6* 与 *DN-ROP6* 对 ABA 调控种子萌发同样有减弱或加强作用^[34]; 此外, *AtROP10* 和 *AtROP11* 基因对 ABA 引起的气孔关闭、种子萌发、根的伸长、保卫细胞肌动蛋白重组及相关基因的表达等过程均具有抑制作用^[36-37]。为探究棉花 ROP 基因是否同样参与 ABA 信号通路的调控, 本研究利用 qRT-PCR 技术分析了 *GhROP4* 基因在外源 ABA 处理下的表达模式, 结果表明, *GhROP4* 基因响应外源 ABA 激素诱导, ABA 处理后其表达量呈上调趋势; 为进一步探究棉花 ROP 基因对 ABA 信号通路的调控方式及沉默植株对干旱胁迫抗性增强的可能性, 通过 qRT-PCR 检测了沉默植株及阴性对照真叶中 ABA 合成及通路基因 *GhNCED2*、*GhNCED3*、*GhNCED9*、*GhABF2*、*GhABF3*、*GhABI2*、*GhABI5*, 结果显示, TRV:: *GhROP4* 植株中 ABA 信号通路相关基因的表达量与阴性对照植株相比均显著上调。以上结果表明 *GhROP4* 基因可能是 ABA 信号通路的一个负调控因子, 通过负调控 ABA 信号通路, 继而参与棉花对干旱反应的负调控; 然而 *GhROP4* 基因是通过何种方式和途径参与 ABA 信号通路的调控及具体的调控机制还有待进一步探究。

本研究利用反向遗传学的方法, 初步证明了棉花 *GhROP4* 基因是一个理想的抗旱负调控基因, 为后续利用基因组编辑技术创制该基因的突变体材料提供了新的靶向基因, 同时也为培育棉花抗旱新种质提供了理论基础。

参考文献

- [1] 喻树迅, 范术丽, 王寒涛, 魏恒玲, 庞朝友. 中国棉花高产育种研究进展. 中国农业科学, 2016, 49(18): 3465-3476
Yu S X, Fan S L, Wang H T, Wei H L, Pang Z Y. Progresses in research on cotton high yield breeding in China. Scientia Agricultura Sinica, 2016, 49(18): 3465-3476
- [2] 乔铁军, 董俊哲, 郑丽莎, 王铭, 魏玲玲, 耿向阳, 曲京武, 孙宁. USDA 关于 2015-2024 年世界棉花行情的长期展望. 国际纺织导报, 2016, 44(1): 13-17
Qiao T J, Dong J Z, Zheng L S, Wang M, Wei L L, Geng X Y,

- Qu J W, Sun N. USDA long-term outlook for world co USDA long-term outlook for world cotton market from 2015 to 2024. *Melliand China*, 2016, 44 (1): 13-17
- [3] Abdelraheem A, Nardana E, Mary O C, Zhang J F. Progress and perspective on drought and salt stress tolerance in cotton. *Industrial Crops & Products*, 2019, 130: 118-129
- [4] Assmann S M. Heterotrimeric and unconventional GTP binding proteins in plant cell signaling. *The Plant Cell*, 2002, S14: 355-373
- [5] Eliáš M, Klimeš V. Rho GTPases: deciphering the evolutionary history of a complex protein family. *Methods in Molecular Biology*, 2012, 827: 13-34
- [6] Berken A, Wittinghofer A. Structure and function of Rho-type molecular switches in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2008, 46 (3): 380-393
- [7] Rivero C, Traubenik S, Zanetti M E, Blanco F A. Small GTPases in plant biotic interactions. *Small GTPases*, 2019, 10 (5): 350-360
- [8] 王钰静. *GhROP6* 在棉花抗黄萎病中的功能研究. 武汉: 华中农业大学, 2017
Wang Y J. Functional analysis of *GhROP6* in cotton responsive to *Verticillium dahliae*. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2017
- [9] Yang Z, Liu J J, Luo L, Ye S, Yang Y Z, Zhang G H, Wang X P, Zhang J M. The cotton *GhRac6* gene encoding a plant ROP/RAC protein improves the plant defense response to aphid feeding. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2018, 36 (5): 888-896
- [10] 胡子曜, 代培红, 刘超, 玛迪娜·木拉提, 王倩, 吾尔力汗·阿不都维力, 赵焱, 孙玲, 徐诗佳, 李月. 陆地棉小 GTP 结合蛋白基因 *GhROP3* 的克隆、表达及 VIGS 载体的构建. *生物技术通报*, 2021, 37 (9): 106-113
Hu Z Y, Dai P H, Liu C, Madina M, Wang Q, Wugalihan A, Zhao Y, Sun L, Xu S J, Li Y. Molecular cloning, expression and VIGS construction of a small GTP-binding protein gene *GhROP3* in *Gossypium hirsutum*. *Biotechnology Bulletin*, 2021, 37 (9): 106-113
- [11] 李月, 吾尔力汗·阿不都维力, 周垚均, 刘超, 任艳萍, 郭旺珍, 刘晓东. 陆地棉小 GTP 结合蛋白基因 *GhRop4* 的克隆及其表达分析. *棉花学报*, 2020, 32 (1): 21-29
Li Y, Wugalihan A, Zhou Y J, Liu C, Ren Y P, Guo W Z, Liu X D. Molecular cloning and expression analysis of a small GTP-binding protein gene *GhRop4* in *Gossypium hirsutum* L.. *Cotton Science*, 2020, 32 (1): 21-29
- [12] 周垚均, 任艳萍, 代培红, 刘超, 刘晓东, 李月. 棉花四个 C2H2 锌指蛋白基因的克隆与表达分析. *分子植物育种*, 2021, 19 (13): 4216-4223
Zhou Y J, Ren Y P, Dai P H, Liu C, Liu X D, Li Y. Cloning and expression analysis of four C2H2 zinc protein gene in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Molecular Plant Breeding*, 2021, 19 (13): 4216-4223
- [13] Ni Z Y, Liu N, Yu Y H, Bi C X, Chen Q J, Qu Y Y. The cotton 70-kDa heat shock protein *GhHSP70-26* plays a positive role in the drought stress response. *Environmental and Experimental Botany*, 2021, 191: 104628
- [14] 袁伟, 万红建, 杨悦俭. 植物实时荧光定量 PCR 内参基因的特点及选择. *植物学报*, 2012, 47 (4): 427-436
- Yuan W, Wang H J, Yang Y J. Characterization and selection of reference genes for real-time quantitative RT-PCR of plants. *Chinese Bulletin of Botany*, 2012, 47 (4): 427-436
- [15] Mandel M A, Feldmann K A, Herrera-Estrella L, Rocha-Sosa M, León P. *CLA1*, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution. *Plant Journal*, 2010, 9 (5): 649-658
- [16] 李秀青, 李月, 刘超, 代培红, 刘晓东. 棉花黄萎病相关基因 *GhAAT* 的克隆与功能鉴定. *分子植物育种*, 2020, 18 (4): 1048-1053
Li X Q, Li Y, Liu C, Dai P H, Liu X D. Cloning and functional identification of cotton *Verticillium wilt* related gene *GhAAT*. *Molecular Plant Breeding*, 2020, 18 (4): 1048-1053
- [17] Wei T L, Wang Y, Xie Z Z, Guo D Y, Chen C W, Fan Q J, Li X D, Liu J H. Enhanced ROS scavenging and sugar accumulation contribute to drought tolerance of naturally occurring autotetraploids in *Poncirus trifoliata*. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17 (7): 1394-1407
- [18] 吉春容, 白书军, 胡启瑞, 王森, 江远安. 棉田干旱指标研究进展. *沙漠与绿洲气象*, 2019, 13 (1): 136-143
Ji C R, Bai S J, Hu Q R, Wang S, Jiang Y A. Advance of the drought index of cotton field. *Desert and Oasis Meteorology*, 2019, 13 (1): 136-143
- [19] 张净, 王锦霞, 郭萌萌, 马龙彪, 兴旺, 王茂芊, 刘大丽. 甜菜幼苗对干旱胁迫的适应机制. *中国农学通报*, 2020, 36 (32): 1-7
Zhang J, Wang J X, Guo M M, Ma L B, Xing W, Wang M Q, Liu D L. *Beta vulgaris* Seedlings: Adaptive mechanism to drought stress. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2020, 36 (32): 1-7
- [20] Li C Y, Kong X Q, Luo Z, Li W J, Tang W, Zhang D M, Ma C L, Dong H Z. Exogenous application of acetic acid improves the survival rate of cotton by increasing abscisic acid and jasmonic acid contents under drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2021, 43 (2): 1-10
- [21] Liang C Z, Meng Z H, Meng Z G, Malik W, Yan R, Lwin K M, Lin F Z, Wang Y, Sun G Q, Zhou T, Zhu T, Li J Y, Jin S X, Guo S D, Zhang R. *GhABF2*, a bZIP transcription factor, confers drought and salinity tolerance in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Scientific Reports*, 2016, 6 (1): 247-273
- [22] Wang X Y, Chen B Z, Ma C K, Qiao K K, Li Z S, Wang J S, Peng R H, Fan S L, Ma Q F. Systematical characterization of *YUCCA* gene family in five cotton species, and potential functions of *YUCCA22* gene in drought resistance of cotton. *Industrial Crops & Products*, 2021, 162: 113290
- [23] Engelhardt S, Trutzenberg A, Hüchelhoven R. Regulation and functions of ROP GTPases in plant-microbe interactions. *Cells*, 2020, 9 (9): 2016
- [24] Jin W W, Xu C J, Li X, Zhang B, Wang P, Allan A C, Chen K S. Expression of ROP/RAC GTPase genes in postharvest loquat in association with senescence and cold regulated lignification. *Postharvest Biology and Technology*, 2009, 54 (1): 9-14
- [25] Miao H X, Sun P G, Liu J J, Wang J Y, Xu B Y, Jin Z Q. Overexpression of a novel ROP gene from the banana (*MaROP5g*) confers increased salt stress tolerance. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19 (10): 3108

- [26] Shi B B, Wang J, Gao H F, Yang Q C, Wang Y, Day B, Ma Q. The small GTP-binding protein TaRop10 interacts with TaTrxh9 and functions as a negative regulator of wheat resistance against the *Stripe rust*. *Plant Science*, 2021, 309: 110937
- [27] Lee H G, Seo P J. MYB96 recruits the HDA15 protein to suppress negative regulators of ABA signaling in *Arabidopsis*. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 1713
- [28] Cao Y R, Li Z G, Chen T, Zhang Z G, Zhang J S, Chen S Y. Overexpression of a tobacco small G protein gene NtRop1 causes salt sensitivity and hydrogen peroxide production in transgenic plants. *Science China Life Sciences*, 2008, 51(5): 383-390
- [29] Ma Q H, Zhu H H, Han J Q. Wheat ROP proteins modulate defense response through lignin metabolism. *Plant Science*, 2017, 262: 32-38
- [30] Qiu A L, Liu Z Q, Li J Z, Chen Y S, Guan D Y, He S L. The ectopic expression of CaRop1 modulates the response of tobacco plants to *ralstonia solanacearum* and aphids. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1177
- [31] 胡鹏伟, 黄桃鹏, 李媚娟, 王睿, 李玲. 脱落酸的生物合成和信号调控进展. *生命科学*, 2015, 27(9): 1193-1196
- [32] Hu P W, Huang T P, Li M J, Wang R, Li L. Research progress on abscisic acid biosynthesis and signaling regulation. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2015, 27(9): 1193-1196
- [33] Chen K, Li G J, Bressan R A, Song C P, Zhu J K, Zhao Y. Abscisic acid dynamics, signaling, and functions in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2020, 62(1): 25-54
- [34] Lee H G, Seo P J. MYB96 recruits the HDA15 protein to suppress negative regulators of ABA signaling in *Arabidopsis*. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 161-679
- [35] Lemichez E, Wu Y, Sanchez J P, Mettouchi A, Mathur J, Chua N H. Inactivation of AtRac1 by abscisic acid is essential for stomatal closure. *Genes Development*, 2001, 15(14): 1808-1816
- [36] Li H, Shen J J, Zheng Z L, Lin Y K, Yang Z B. The Rop GTPase switch controls multiple developmental processes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2001, 126(2): 670-684
- [37] Zheng L Z, Yang Z B. The Rop GTPase: An emerging signaling switch in plants. *Plant Molecular Biology*, 2000, 44(1): 1-9
- [38] Li Z X, Kang J, Sui N, Liu D. ROP11 GTPase is a negative regulator of multiple ABA responses in *Arabidopsis*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2012, 54(3): 169-179