

• 农业生物技术 •

水稻 Rho GDP 解离抑制因子 *OsRhoGDI1* 基因的特征分析

戚旺[#], 王俊杰[#], 轩强兵, 毕一凡, 朱明兰, 张艳娇, 姚莎莎, 王晶晶, 张禹舜, 梁卫红^{*}

河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007

戚旺, 王俊杰, 轩强兵, 毕一凡, 朱明兰, 张艳娇, 姚莎莎, 王晶晶, 张禹舜, 梁卫红. 水稻 Rho GDP 解离抑制因子 *OsRhoGDI1* 基因的特征分析[J]. 生物工程学报, 2024, 40(10): 3515-3529.

QI Wang, WANG Junjie, XUAN Qiangbing, BI Yifan, ZHU Minglan, ZHANG Yanjiao, YAO Shasha, WANG Jingjing, ZHANG Yushun, LIANG Weihong. Characterization of a Rho GDP dissociation inhibitor gene *OsRhoGDI1* from rice[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(10): 3515-3529.

摘要: 水稻 Rho GDP 解离抑制因子 1 (Rho GDP dissociation inhibitor 1, RhoGDI1)是本课题组前期通过酵母双杂交筛选从幼穗中分离的一个与小 G 蛋白 Rho/Rop 家族成员 OsRac5 相互作用蛋白的编码基因, 对该基因特征及其功能的研究报道较少。本研究在对 *OsRhoGDI1* 开展生物信息学分析的基础上, 利用表达谱芯片挖掘和实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real time polymerase chain reaction, RT-qPCR)对 *OsRhoGDI1* 基因的表达模式进行分析, 发现该基因在水稻多种组织中广泛表达, 尤其在幼穗发育过程中高表达, 且该基因的表达受脱落酸(abscisic acid, ABA)、油菜素内酯(brassinolide, BL)、水杨酸(salicylic acid, SA)、吲哚-3-乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)、赤霉素(gibberellin, GA)及盐胁迫的调控。亚细胞定位鉴定显示, *OsRhoGDI1* 分布在细胞膜、细胞质以及细胞核中。双分子荧光互补(bimolecular fluorescence complementation, BiFC)技术检测发现 *OsRhoGDI1* 与 *OsRac5* 在细胞膜、细胞质和细胞核均能发生互作, *OsRhoGDI1* 还可与 *OsRac1* 在细胞膜上相互作用。本研究表明, *OsRhoGDI1* 与水稻穗发育等过程密切相关, 并且 *OsRhoGDI1* 可能通过与不同 Rho/Rop 蛋白结合并调节其活性, 参与调控水稻生长发育、激素应答以及非生物胁迫等多种生物学过程。

关键词: 水稻; Rho GDP 解离抑制因子 1 (RhoGDI1); 基因表达; 亚细胞定位; 蛋白质相互作用

资助项目: 国家自然科学基金(32201248); 河南省科技研发计划联合基金(222301420106); 河南省自然科学基金青年基金(222300420202); 河南省高等学校重点科研项目(23A180020)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32201248), the Henan Provincial Science & Technology Research and Development Plan Joint Fund (222301420106), the Henan Provincial Natural Science Foundation Youth Fund (222300420202), and the Key Scientific Research Project of Colleges and Universities in Henan Province (23A180020).

[#]These authors contributed equally to this study.

^{*}Corresponding author. E-mail: liangwh@htu.cn

Received: 2023-12-04; Accepted: 2024-05-27; Published online: 2024-06-06

Characterization of a Rho GDP dissociation inhibitor gene *OsRhoGDI1* from rice

QI Wang[#], WANG Junjie[#], XUAN Qiangbing, BI Yifan, ZHU Minglan, ZHANG Yanjiao, YAO Shasha, WANG Jingjing, ZHANG Yushun, LIANG Weihong^{*}

College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, Henan, China

Abstract: The Rho GDP dissociation inhibitor gene *OsRhoGDI1* was isolated as the putative partner of OsRac5 from rice young panicles by the yeast two-hybrid screening, but the characterization and functions of the gene remains unknown. In this study, on the basis of the bioinformatics analysis, expression profile chip mining and RT-qPCR were employed to analyze the expression pattern of *OsRhoGDI1*, and it was found that the gene was widely expressed in various tissues of rice, especially with high abundance during the development of young panicles, and its expression was regulated by abscisic acid (ABA), brassinolide (BL), salicylic acid (SA), indole-3-acetic acid (IAA), gibberellin (GA) and high salinity. Subcellular localization identification showed that OsRhoGDI1 was distributed in the cytomembrane, cytoplasm, and nucleus. Bimolecular fluorescence completion (BiFC) was further performed to identify the *in vivo* interaction between OsRhoGDI1 and OsRac5, the results suggested that the interaction occurred in the nucleus, cytomembrane, and cytoplasm. In addition, OsRhoGDI1 interacted with OsRac1 in the cytomembrane. Our results indicated that OsRhoGDI1 may be involved in rice panicle development, and participate in regulating various biological processes such as rice growth and development, hormone response, and abiotic stress by regulating the activities of different Rho/Rop proteins *via* interactions.

Keywords: rice; Rho GDP dissociation inhibitor 1 (RhoGDI1); gene expression; subcellular localization; protein-protein interaction

小 G 蛋白 (small G proteins) 也称为单体 G 蛋白, 广泛存在于从单细胞酵母到多细胞动、植物等真核生物中。植物 Rho 蛋白, 也称为 Rop (Rho of plant), 是植物唯一有信号传递功能的小 G 蛋白^[1], 结构上高度保守^[2]。作为“分子开关”, Rop 蛋白在 GTP 结合的激活型和 GDP 结合的失活型之间切换^[3], 调控植物生长发育、激素应答等多种生理过程, 涉及细胞骨架动态变化、囊泡运输和细胞极性生长等^[4-5]。在水稻中, Rop 蛋白也曾被命名为 Rac, 对水稻 Rho/Rop 家族成员的研究发现, OsRac1 能够促进水稻幼穗的细胞分裂,

提高籽粒灌浆速率, 从而增大籽粒、提高产量^[6]; OsRac3 可能在细胞分裂素信号途径上, 调控籽粒大小和冠根的发育^[7]; OsRac5 与叶角变化相关^[8]; OsRac6 可能与花粉和花药的发育有关, 该基因的功能缺失导致完全雄性不育^[9]。

RhoGDI/RopGDI 是 Rho/Rop 活性的负调控因子, 通过与 Rho/Rop 的结合, 抑制其所结合的 GDP 解离, 从而抑制 Rho/Rop 的活化^[10]。*OsRhoGDI1* 是本课题组前期利用酵母双杂交技术, 从水稻幼穗中分离到的与 Rho/Rop 家族 OsRac5 相互作用蛋白的编码基因^[11]。原位杂交

检测结果显示, 该基因在幼穗中高表达^[12]。对启动子顺式作用元件的分析提示, 该基因的表达可能受激素、胁迫等因素的调控^[13]。为系统研究该基因的特征, 本研究拟挖掘表达谱芯片信息, 结合 RT-qPCR 检测 *OsRhoGDI1* 基因的表达模式; 构建该基因与 GFP 融合的瞬时表达载体, 检测融合蛋白的亚细胞定位, 了解该基因编码蛋白的胞内分布特征; 并采用双分子荧光互补 (bimolecular fluorescence complementation, BiFC) 技术鉴定 *OsRhoGDI1* 与 *OsRac5*、*OsRac1* 在体内的相互作用, 以期为后续研究 *OsRhoGDI1* 基因与水稻 Rho/Rop 信号在调控生长发育中的功能联系奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 植物材料

所用材料为水稻粳稻品种日本晴 (*Oryza sativa* L. *Japonica* cv. Nipponbare) 和本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana*), 均由本实验室保存。

1.2 菌株与载体

所用菌株大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105, 以及所用 BiFC 载体 pXYn106、pXYc104 和 GFP 融合表达载体 pGIT163-GFP 均由本实验室保存。

1.3 主要试剂及试剂盒

限制性内切酶、无缝克隆酶和高保真酶均购自北京 TaKaRa 公司, 植物总 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、荧光定量试剂盒、胶回收试剂盒以及质粒提取试剂盒均购自南京诺唯赞公司, 氨基青霉素、壮观霉素均购自北京鼎国生物技术有限公司, 水稻原生质体制备试剂盒购自北京酷来搏科技有限公司, 内毒素清除试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.4 引物设计及合成

本研究所用引物由 Prime Prime 5.0 设计, 并委托天津金唯智生物科技有限公司合成。引物信息见表 1。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Purpose
P1	TCAAGGAGGGCTCCCTCTAC	RT-qPCR primers for expression analysis of <i>OsRhoGDI1</i>
P2	GAGCATCTCCTTGTGGCTGT	
P3	CATGCTATCCCTCGTCTCGACCT	RT-qPCR primers for expression analysis of <i>OsAct1</i>
P4	CGCACTTCATGATGGAGTTGTAT	
P5	TCATTTGGAGAGGACAGCCCAATGAGAGCGGACAGAGCCGAG	Primers for pGIT163GFP
P6	CAGCTCCTCGCCCTTGCTCACCATGCTCAACGCCGGCCACTCTCG	<i>OsRhoGDI1</i> vector construction
P7	ATCGAGGACGCCGGCGGATCCATGAGCGCGTCTCGGTTTCATC	Primers for pXYn106-
P8	ACGAAAGCTCTGCAGGTCGACTTACAAGATGGCACATCCTTTCTG	<i>OsRac5</i> vector construction
P9	ATCGAGGACGCCGGCGGATCCATGAGCTCGGCGGCGGCGGCG	Primers for pXYn106-
P10	ACGAAAGCTCTGCAGGTCGACCTACGCGAAACAAGCGCTTCCGC	<i>OsRac1</i> vector construction
P11	ATTACAGGTACCCGGGGATCCATGAGAGCGGACAGAGCCGAG	Primers for pXYc104-
P12	CACGCTGCCACCGCCGTCGACGCTCAACGCCGGCCACTCTCG	<i>OsRhoGDI1</i> vector construction
P13	ATCGAGGACGCCGGCGGATCCATGAGAGCGGACAGAGCCGAG	Primers for pXYn106-
P14	ACGAAAGCTCTGCAGGTCGACGCTCAACGCCGGCCACTCTCG	<i>OsRhoGDI1</i> vector construction

The bold sequences indicate primer sequences on the vector.

1.5 OsRhoGDI 蛋白的生物信息学分析

将 OsRhoGDI 蛋白序列提交至 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 预测 OsRhoGDI 蛋白保守结构域; 根据 Blast 同源性的提示, 选择 16 个不同植物中的同源蛋白, 利用 MEGA 6.0 软件构建系统发育树; 使用 DNAMAN 软件对 OsRhoGDI 蛋白及其同源性最高的 4 种植物中的同源蛋白进行多序列比对; 使用在线工具 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 和 ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) 分别对蛋白序列中氨基酸的理化性质和亲/疏水性进行分析; 使用在线工具 SignalP 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 和 TMHMM (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 分别预测信号肽和跨膜结构域。

1.6 OsRhoGDI 1 基因的表达模式分析

1.6.1 OsRhoGDI 1 基因的表达谱数据挖掘

通过 NCBI 数据库检索水稻 RhoGDI 家族 3 个成员 OsRhoGDI1–OsRhoGDI3 以及 Rho/Rop 家族 7 个成员 OsRac1–OsRac7 的蛋白序列信息, 利用 MEGA 6.0 分别构建这 2 个家族成员的系统进化树, 并将上述蛋白序列提交至 RiceXPro 数据库(<http://ricexpro.dna.affrc.go.jp/>), 绘制基因表达热图, 获取 2 个家族成员在不同组织和发育时期的表达特征。

1.6.2 OsRhoGDI 1 基因的时空表达模式

通过 RT-qPCR 检测 *OsRhoGDI 1* 基因在 1 月龄日本晴水稻的根、茎、叶片、叶枕、叶鞘, 以及幼穗发育的第二次枝梗及颖花原基分化期、花粉母细胞形成期和花粉内容物充实期的表达量。按照总 RNA 提取试剂盒的方法, 提取各材料的总 RNA, 采用超微量分光光度计检测其浓度与纯度后, 按照反转录试剂盒说明书的方法反转录制备 cDNA。以 cDNA 为模板, 使用引物 P1/P2 扩增 *OsRhoGDI 1* 基因, P3/P4 扩增水稻内参基因 *OsAct1*, RT-qPCR 反应体系(20 μ L):

2 \times ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μ L; 上、下游引物(10 μ mol/L)各 0.4 μ L; 模板 cDNA (50 ng/ μ L) 2 μ L; ddH₂O 7.2 μ L。采用三步法进行 RT-qPCR 扩增, 第一步预变性, 95 $^{\circ}$ C 30 s; 第二步 PCR 反应, 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环; 第三步生成熔解曲线, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 最后 95 $^{\circ}$ C 15 s。数据处理分析采用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t}法, 使用 Origin2017 软件作图。

1.6.3 激素及盐胁迫对 *OsRhoGDI 1* 基因表达的影响

将日本晴水稻种子黑暗萌发 2 d, 然后播种于水稻培养盘中, 用 Yoshida 水稻培养液培养, 以 28 $^{\circ}$ C、光照 8 h 条件培养 2 周后, 分别用含有 100 μ mol/L 的 ABA、SA、GA、BL 和 IAA 的 Yoshida 营养液处理; 模拟高盐采用含 200 mmol/L NaCl 的 Yoshida 营养液处理, 在以上各个处理的 0、4、8、12、24 h 分别取水稻地上部分提取总 RNA, 并反转录成 cDNA, 进行 RT-qPCR 检测, 方法同 1.6.2。

1.7 OsRhoGDI 1 蛋白亚细胞定位的鉴定

1.7.1 OsRhoGDI 1 蛋白亚细胞定位的预测

将 OsRhoGDI 1 序列提交至 PROST II 网站 (<http://www.genscript.com/tools/psort>) 预测蛋白的胞内分布情况, 为亚细胞定位实验提供参考。

1.7.2 OsRhoGDI 1-GFP 瞬时表达载体的构建

以日本晴水稻叶片的 cDNA 为模板, P5/P6 为引物, PCR 扩增获得 *OsRhoGDI 1* 基因的 cDNA 编码区。PCR 反应体系(50 μ L): 2 \times Taq Plus Master Mix 25 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 2.5 μ L, 模板 cDNA (50 ng/ μ L) 5 μ L, ddH₂O 15 μ L。PCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 70 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定并回收纯化, 通过同源重组的方法, 连入经 *Hind* III 和 *Nco* I 酶切的 pGIT163-GFP 载体, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 经筛

选和菌落 PCR 鉴定,从阳性转化子中提取质粒,经测序验证,将重组质粒命名为 pGIT163-*OsRhoGDI1*-GFP。

1.7.3 *OsRhoGDI1*-GFP 融合蛋白亚细胞定位的观察

使用内毒素清除剂清除 pGIT163-*OsRhoGDI1*-GFP 质粒中的内毒素,然后按照水稻原生质体制备试剂盒说明书,进行水稻原生质体的制备及转化。在 PEG 溶液的介导下将 pGIT163-*OsRhoGDI1*-GFP 质粒转入水稻原生质体,于 28 °C 恒温培养箱中孵育 16 h。设置对照组为空载体 pGIT163-GFP,通过激光扫描共聚焦显微镜观察转化后的原生质体,根据荧光分布判断 *OsRhoGDI1*-GFP 融合蛋白在细胞内的定位。

1.8 *OsRhoGDI1* 与两种 Rop 蛋白互作的鉴定

1.8.1 BiFC 重组载体的构建

以日本晴水稻叶片的 cDNA 为模板,以 P7/P8、P9/P10 为引物分别扩增 *OsRac5* 与 *OsRac1* 基因的 cDNA 编码区;以 P11/P12、P13/P14 为引物分别扩增 *OsRhoGDI1* 基因的 cDNA 编码区。PCR 体系及扩增条件同 1.7.2。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测后回收纯化,分别连入经 *Sal* I 与 *Bam* H I 酶切回收的 pXYc104 与 pXYn106 载体,其中 *OsRhoGDI1* 基因 cDNA 编码区分别连入 pXYc104 和 pXYn106 中,*OsRac1* 和 *OsRac5* 的 cDNA 编码区分别连入 pXYn106 中,连接产物的转化、筛选和鉴定同 1.7.2。测序验证后的重组质粒分别命名为 pXYc104-*OsRhoGDI1*、pXYn106-*OsRac1*、pXYn106-*OsRac5* 和 pXYn106-*OsRhoGDI1*。

1.8.2 烟草的转化及观察

将内毒素清除剂处理后的 pXYc104-*OsRhoGDI1*、pXYn106-*OsRac1*、pXYn106-*OsRac5* 和 pXYn106-*OsRhoGDI1* 重组质粒分别转化农杆菌 EHA105 感受态细胞,并通过菌落 PCR 鉴定阳性克隆。以农杆菌转化子菌液对培养 4–5 周

的烟草叶片表皮细胞进行转化,25 °C 继续培养 2 d 后,在激光扫描共聚焦显微镜下观察烟草叶片浸润区域的荧光信号。

2 结果与分析

2.1 *OsRhoGDI1* 基因及其编码蛋白的生物信息学分析

2.1.1 *OsRhoGDI1* 序列特征及理化特征分析

序列检索及分析显示,*OsRhoGDI1* 基因位于水稻 2 号染色体,基因编码区全长为 2 065 bp,包含 5 个外显子和 4 个内含子。cDNA 编码区长 765 bp,编码一个含有 254 个氨基酸的蛋白,第 72–249 位氨基酸编码 RhoGDI 蛋白保守结构域(图 1A)。Prot Param 分析提示,*OsRhoGDI1* 蛋白分子式为 $C_{1238}H_{1950}N_{334}O_{395}S_9$,相对分子量为 28.12 kDa,理论等电点(isoelectric point, pI)为 5.07,包含 42 个带负电荷的氨基酸残基和 33 个带正电荷的氨基酸残基,属于碱性蛋白。Prot Scale 分析提示,*OsRhoGDI1* 蛋白亲水性平均系数为 -0.60 (图 1B),属于亲水性蛋白。利用 SignalP 5.0 对 *OsRhoGDI1* 蛋白进行信号肽位置及切割位点分析,结果显示 *OsRhoGDI1* 蛋白存在信号肽的可能性为 0.000 7 (图 1C),提示 *OsRhoGDI1* 可能不是分泌蛋白、膜整合蛋白以及内膜系统滞留蛋白。使用 TMHMM 进一步对 *OsRhoGDI1* 蛋白跨膜区进行预测,结果显示蛋白跨膜螺旋的数量为 0 (图 1D),排除了膜蛋白的可能性。

2.1.2 *OsRhoGDI1* 基因的系统进化分析和同源序列比对

将 *OsRhoGDI1* 序列提交至 NCBI 数据库检索同源序列,发现 RhoGDI 蛋白在多种植物中存在。选择其中同源性较高的 16 个 RhoGDI,使用 MEGA 6.0 软件构建系统进化树(图 2)。结果显示,从进化的亲缘关系来讲,*OsRhoGDI1* 与同属于单子叶植物的短花药野生稻(*Oryza*

brachyantha)、二穗短柄草 (*Brachypodium distachyon*)、硬直黑麦草 (*Triticum dicoccoides*) (GenBank 登录号依次为: XP_015689031.1、XP_010235896.1、XP_037448053.1) 和野生二粒小麦 (XP_047082401.1, *Lolium rigidum*) 中的 RhoGDI 亲缘关系很近, 其中短花药野生稻的 RhoGDI

蛋白与水稻 OsRhoGDI1 蛋白在同一进化分支上, 可信度达到了 97%。相比之下, OsRhoGDI1 与双子叶植物胡桃 (*Juglans regia*)、美国山核桃 (*Carya illinoensis*) 的 RhoGDI 蛋白 (GenBank 登录号依次为: XP_018809557.1、XP_042940659.1) 在进化上关系则较远。

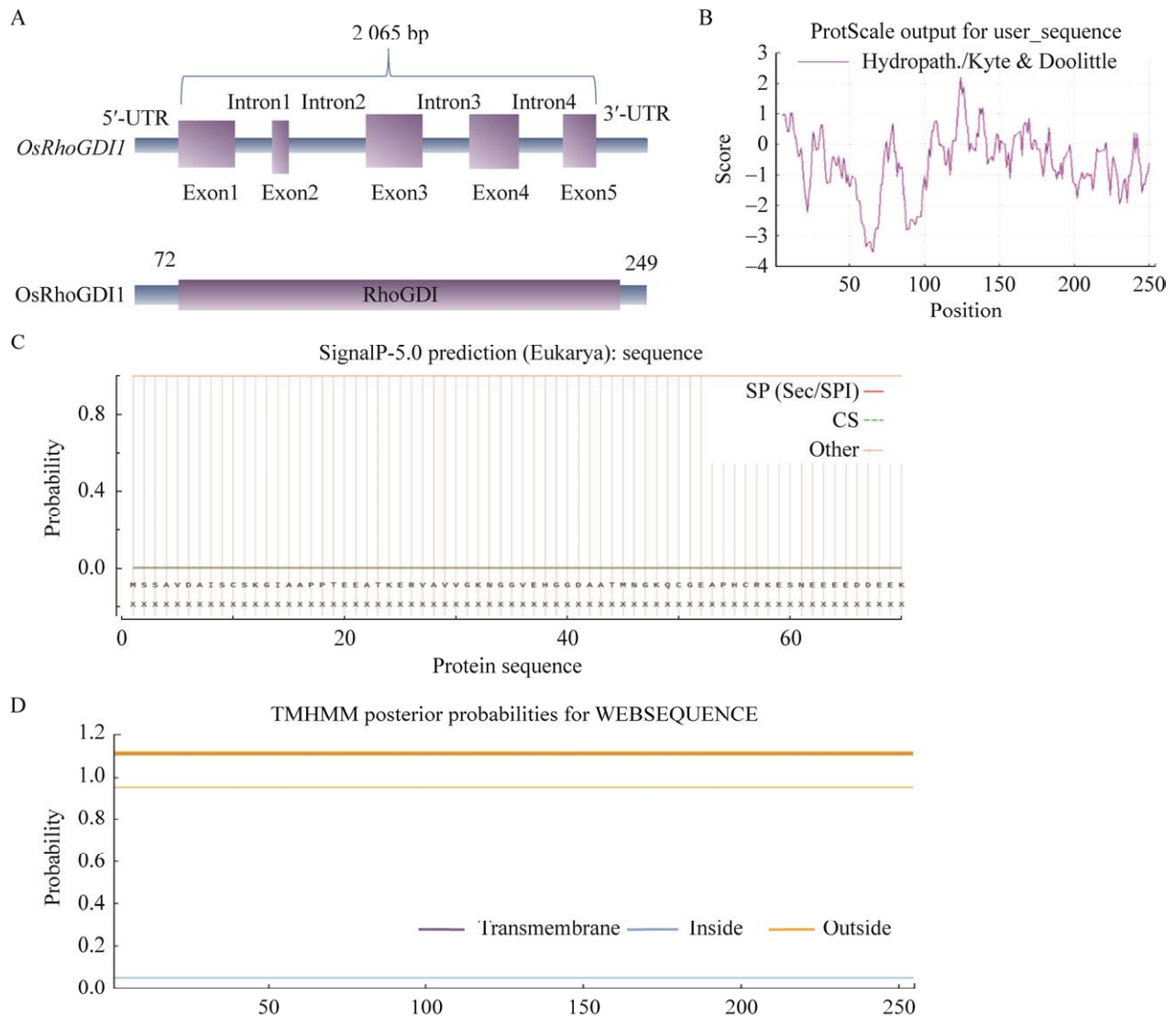


图 1 *OsRhoGDI1* 序列特征及编码蛋白的理化特征 A: 基因结构及编码蛋白的保守结构域位置. B: 亲/疏水性分析. C: 信号肽预测. D: 跨膜结构域分析

Figure 1 Sequence characteristics of *OsRhoGDI1* gene and physicochemical properties of its encoded protein. A: *OsRhoGDI1* gene structures and conserved domain analysis of its encoded protein. B: Hydrophilic/hydrophobic nature analysis. C: Signal peptide analysis. D: Transmembrane structure analysis.

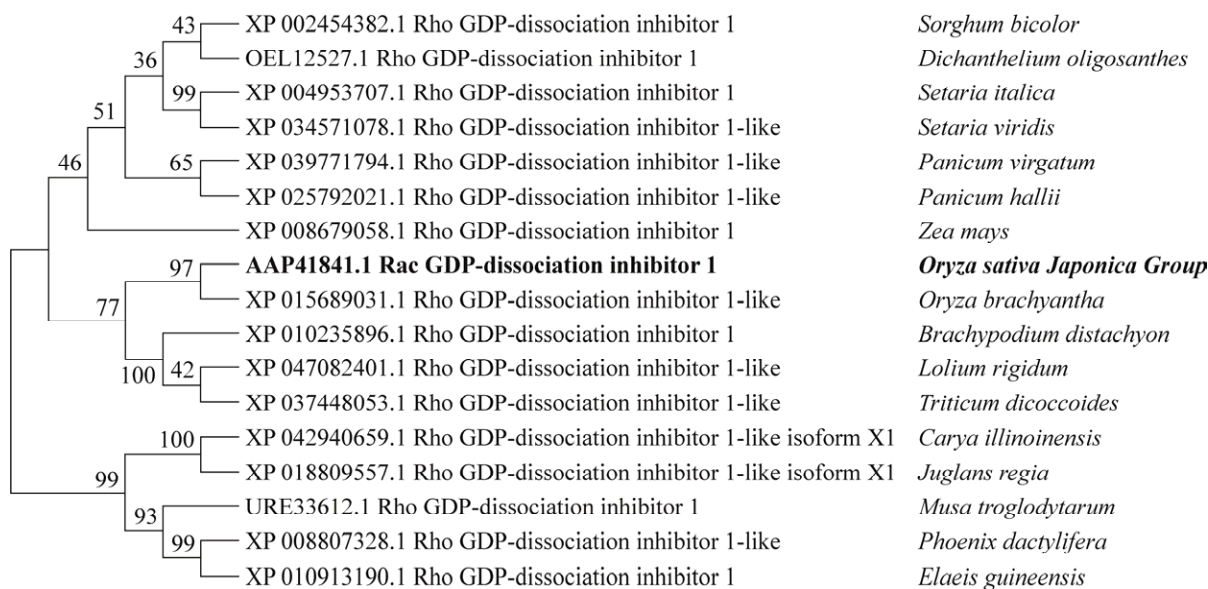


图 2 *OsRhoGDI1* 与不同植物 RhoGDI 蛋白的系统进化分析 使用邻接法并设置 1 000 次 bootstrap 值重复检验构建系统进化树, 加粗部分为水稻 *OsRhoGDI1* 蛋白

Figure 2 Phylogenetic analysis of *OsRhoGDI1* and RhoGDI proteins in different plants. The phylogenetic tree was constructed by neighbor-joining methods and 1 000 bootstrap replicates, the bold part shows *OsRhoGDI1* protein of *Oryza sativa*.

采用 DNAMAN 软件将图 2 中与 *OsRhoGDI1* 蛋白聚类关系最近的 4 个蛋白进行多序列比对, 结果如图 3 所示, 水稻 *OsRhoGDI1* 与来自短花药野生稻、二穗短柄草、硬直黑麦草和野生二粒小麦的 RhoGDI 蛋白序列一致性分别为 92.94%、77.82%、78.24%和 78.60%。从蛋白的多序列比对结果可以看到, 植物 RhoGDI 的相似性高的部分位于保守的 RhoGDI 结构域, 例如日本晴水稻和野生二粒小麦 RhoGDI 序列相比, 在 179 个氨基酸构成的保守结构域中, 仅有 14 个氨基酸不同, 而在 RhoGDI 结构域之外, RhoGDI 的序列差异性较大。

2.2 *OsRhoGDI1* 基因的表达模式分析

2.2.1 水稻 RhoGDI 家族和 Rho/Rop 家族的表达谱芯片数据分析

利用 NCBI 数据库的信息, 对水稻 RhoGDI 家族的 3 个成员以及 Rho/Rop 家族的 7 个成员进行系统进化分析, 结果显示, 水稻 RhoGDI

家族成员 *OsRhoGDI1* 蛋白与 *OsRhoGDI2* 蛋白位于同一进化分支上, *OsRhoGDI3* 则为单独一个分支; Rho/Rop 家族的 *OsRac1* 与 *OsRac2*、*OsRac3* 与 *OsRac4*、*OsRac5* 与 *OsRac7* 蛋白分别位于各自的进化分支上, 而 *OsRac6* 单独在一个进化分支上, 且与其他成员的进化关系较远(图 4)。

基于表达谱芯片数据, 对两个家族成员进行表达热图构建, 结果显示(图 4), RhoGDI 家族的 3 个成员在水稻不同组织的表达各具特点, 但在叶片中的表达水平都较低, *OsRhoGDI1* 基因在营养生长和生殖生长阶段的多种组织中表达量普遍较高, 而 *OsRhoGDI2* 与 *OsRhoGDI3* 基因在生殖生长阶段的表达量明显高于营养生长阶段, 但在生殖生长阶段的同一组织中, *OsRhoGDI1* 与 *OsRhoGDI3* 的表达水平普遍高于 *OsRhoGDI2* 基因, *OsRhoGDI2* 基因在发育中的胚乳中的表达量却显著高于 *OsRhoGDI1*

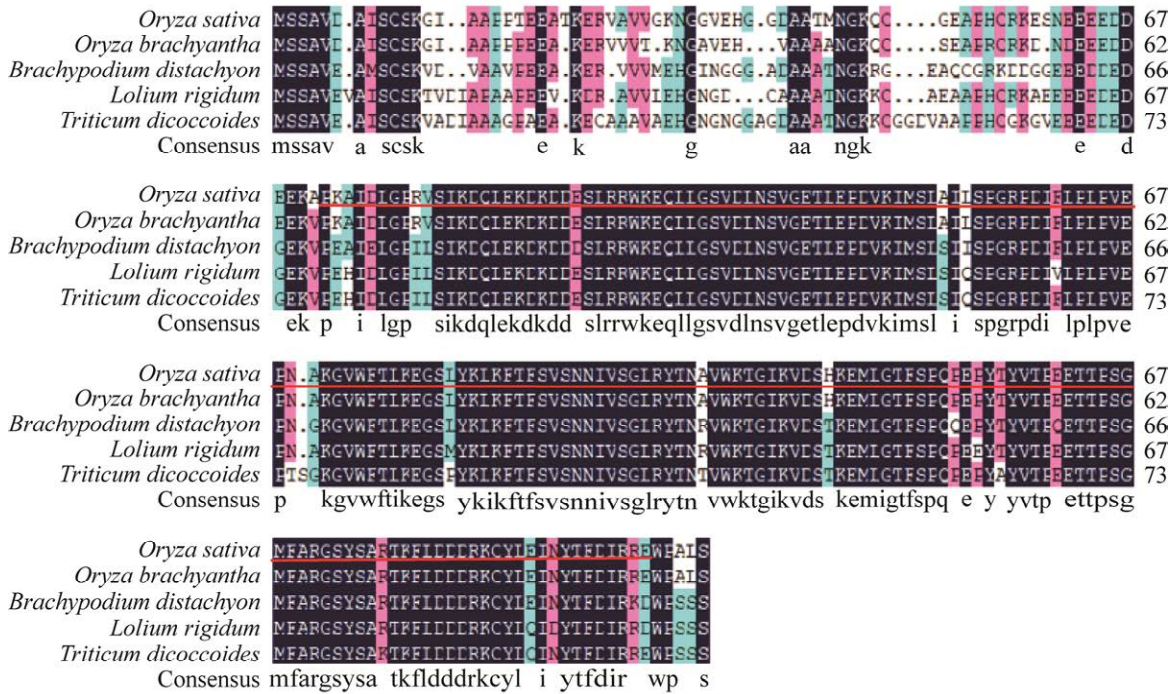


图3 OsRhoGDI1与同源蛋白的多序列比对分析 下划线表示RhoGDI蛋白保守结构域

Figure 3 Multi-sequence alignment analysis of OsRhoGDI1 and homologous proteins. Underline indicates the conserved RhoGDI domain.

与 *OsRhoGDI3*。对 Rho/Rop 家族的表达热图分析提示, 该家族成员在叶片中的表达水平同样普遍较低, 其中 *OsRac1* 与 *OsRac2* 基因的表达特征与 *OsRhoGDI1* 与 *OsRhoGDI3* 基因相似, 在水稻生殖生长阶段表达量要明显高于营养生长阶段; *OsRac3* 与 *OsRac5* 基因在水稻生殖生长阶段表达量要略微高于营养生长阶段; *OsRac4* 在营养生长阶段的茎和生殖生长阶段的内外稃中表达量明显高于其他阶段; *OsRac7* 在营养生长阶段的叶片和生殖生长阶段的子房、胚乳中表达量低于其他阶段; *OsRac6* 基因在营养生长阶段的叶片及叶鞘中表达量明显低于其他阶段。总之, 表达热图提示 Rho/Rop 家族与 RhoGDI 家族成员的表达具有一个共同特点, 即在叶片中的表达水平都较低, 同时多数成员在幼穗、雌雄蕊、内外稃以及胚的发育过程中的表达水平较高, 提示这两个家族成员与水稻生

殖生长阶段的器官发育可能存在重要联系。

2.2.2 *OsRhoGDI1* 基因在水稻发育过程中的时空表达模式

为进一步了解 *OsRhoGDI1* 基因在水稻发育过程中的表达特征, 采用 RT-qPCR 检测了该基因在幼苗期的根、茎、叶、叶枕及叶鞘, 以及幼穗发育的第二次枝梗及颖花原基分化期、花粉母细胞形成期及花粉内容物形成期的表达模式。结果如图 5 所示, *OsRhoGDI1* 基因在所检测组织中均有表达, 在营养生长阶段, 该基因在幼苗期的根、茎、叶、叶枕和叶鞘均有表达, 但表达水平均较低; 而在所检测的幼穗发育 3 个时期, 该基因的表达量显著高于其他组织, 尤其是在第二次枝梗及颖花原基分化期和花粉内容物充实期, 该基因的表达分别是在根中的 13 倍和 20 倍, 这也与本课题组前期利用原位杂交检测发现 *OsRhoGDI1* 基因在幼穗中高

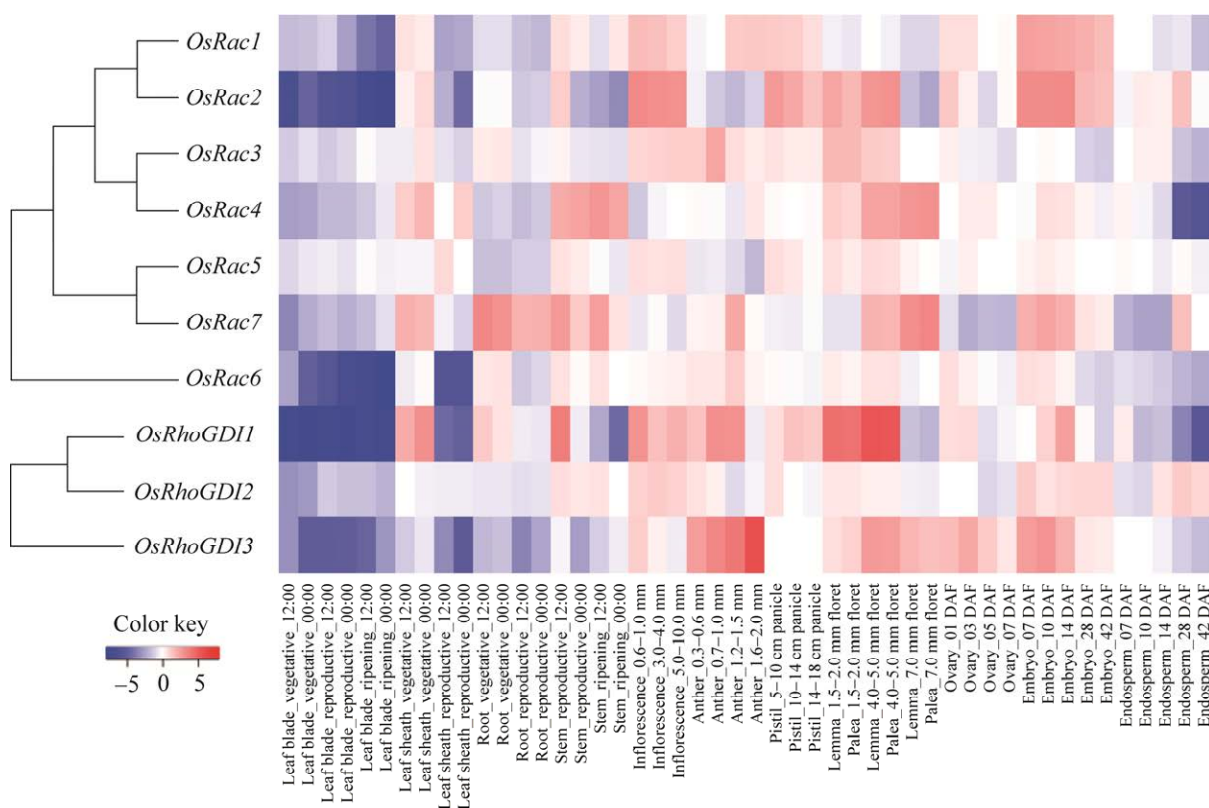


图 4 水稻 RhoGDI 家族与 Rho/Rop 家族成员的系统进化及表达芯片数据分析 使用邻接法并设置 1 000 次 bootstrap 值重复检验构建系统进化树. 热图中的红色部分表示高表达, 蓝色部分表示低表达. 数值表示表达芯片数据的 log₂ 归一化强度的平均值

Figure 4 Phylogeny and expression chip data analysis of RhoGDI family and Rho/Rop family members in rice. The phylogenetic tree was constructed by neighbor-joining methods and 1 000 bootstrap replicates. In the heatmap, the red color indicates a high expression, and the blue color indicates a low expression. Numeric values indicates an average of the normalized log₂ intensity of expression chip data.

表达保持一致^[12], 提示该基因可能在幼穗发育过程中具有重要作用。

2.2.3 *OsRhoGDI1* 基因对激素和盐胁迫的响应

采用 RT-qPCR 检测经 ABA、SA、GA、IAA 和 BL 这 5 种激素以及高盐胁迫处理后, *OsRhoGDI1* 基因在 24 h 内的表达变化。结果如图 6 所示, 在几种激素处理下, *OsRhoGDI1* 基因的表达变化各有特征, 经 ABA、BL、SA 处理后的不同时间, 除 BL 处理 4 h 以外, 该基因的表达量均显著或者极显著降低; 经 IAA 和 GA 处理后, 该基因的表达量大多呈现上升趋势, 除 GA 处理后 8 h 上调达到极显著水平, 其

他时间的表达量均未达到统计学上的显著水平, 提示 *OsRhoGDI1* 基因的表达受到多种激素的调控, 其中 ABA、BL 和 SA 是该基因表达的负调控信号, 而 IAA 和 GA 能在一定程度上促进该基因的表达。

模拟高盐胁迫处理水稻后的 24 h 内, *OsRhoGDI1* 基因仅在处理 2 h 时表达量相比于处理前略微上升, 在其他的检测时间点, 该基因的表达水平均下调, 其中在 4、12、24 h 的表达量在统计学上达到极显著差异水平(图 6)。该结果表明, 高盐胁迫抑制 *OsRhoGDI1* 基因的表达。

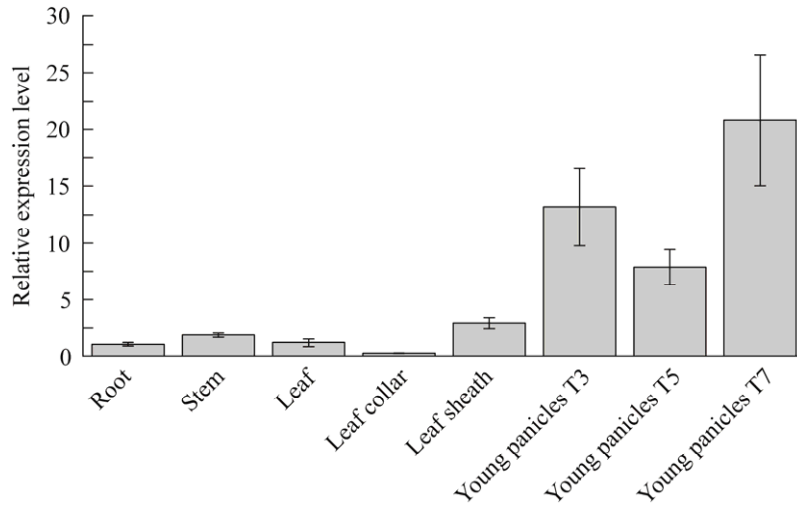


图5 *OsRhoGDII* 基因在水稻生长发育过程中的相对表达量 幼穗 T3: 第二次枝梗及颖花原基分化期; 幼穗 T5: 花粉母细胞形成期; 幼穗 T7: 花粉内容物形成期. 以 *OsAct1* 作为内参, 误差棒表示 3 次生物学重复的标准误差

Figure 5 The relative expression of *OsRhoGDII* gene during the growth and development of rice. Young Panicles T3: Second branch stem and primordium differentiation stage; Young Panicles T5: Pollen mother cell formation stage; Young Panicles T7: Pollen content enrichment stage. *OsAct1* was used as an internal control. The error bar indicates standard errors in three biological replicates.

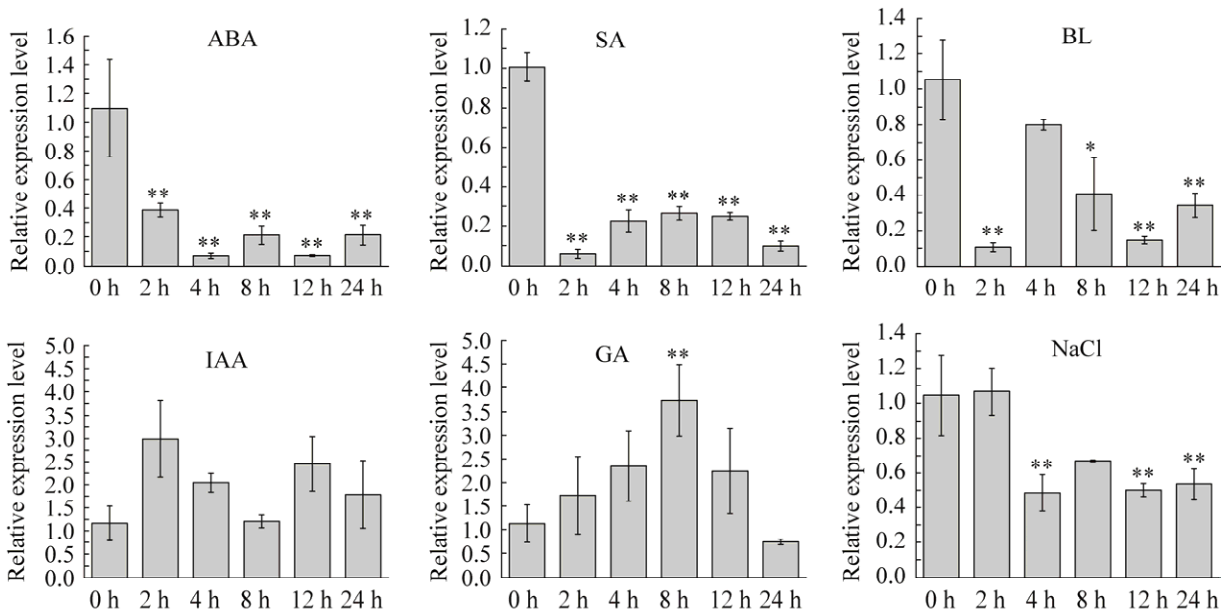


图6 激素和盐胁迫对 *OsRhoGDII* 基因表达的影响 以 *OsAct1* 作为内参. 误差棒表示 3 次生物学重复的标准误差. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

Figure 6 Effects of hormones and salt stress on *OsRhoGDII* gene expression. *OsAct1* was used as an internal control. The error bar indicates standard errors in three biological replicates. * indicates significant difference by *t* test at $P < 0.05$; ** indicates significant difference by *t* test at $P < 0.01$.

2.3 *OsRhoGDI1* 蛋白亚细胞定位的鉴定

2.3.1 *OsRhoGDI1* 蛋白胞内分布的生物信息学预测

采用 PROST II 对 *OsRhoGDI1* 蛋白的亚细胞定位进行预测, K-NN 算法预测显示, 该蛋白定位在细胞核、线粒体、细胞质和过氧化物酶体的概率分别为 43.50%、26.10%、17.40% 和 13.00%; 莱因哈特的方法预测显示, 该蛋白在细胞核中定位概率为 55.50%, 提示 *OsRhoGDI1* 蛋白在细胞中定位广泛, 并很可能入核。

2.3.2 *OsRhoGDI1* 蛋白亚细胞定位的观察

采用 DNA 重组技术, 将 *OsRhoGDI1* 基因的 cDNA 编码区与 GFP 融合, 构建了 pGIT163-*OsRhoGDI1*-GFP 瞬时表达载体, 并转入水稻原生质体中。以空载体 pGIT163-GFP 为对照, 在激光扫描共聚焦显微镜下观察 *OsRhoGDI1*-GFP 融合蛋白在细胞中的分布。结果如图 7 所示, 与对照组类似的是, *OsRhoGDI1*-GFP 融合蛋白

在细胞膜、细胞质及细胞核均有荧光信号, 表明 *OsRhoGDI1* 蛋白是一种在细胞中广泛分布的蛋白质。

2.4 *OsRhoGDI1* 与 *OsRac1* 及 *OsRac5* 体内相互作用的检测

为了鉴定 *OsRhoGDI1* 是否与 *OsRac1* 和 *OsRac5* 存在体内相互作用, 分别构建了与 YFP 的 N 端融合的 pXYn106-*OsRac5*、pXYn106-*OsRac1* 载体以及与 YFP 的 C 端融合的 pXYc104-*OsRhoGDI1* 载体, 将其成对分别转入到烟草表皮细胞中, 另外还构建了与 YFP 的 N 端融合的 pXYn106-*OsRhoGDI1* 载体, 并将其与 cYFP 空载体融合作为阴性对照。在激光扫描共聚焦显微镜下观察的结果如图 8 所示, 阴性对照组在细胞中无荧光出现, 而 pXYc104-*OsRhoGDI1* 与 pXYn106-*OsRac1* 共转化的细胞中, 细胞膜上可以明显观察到 YFP 黄色荧光, 表明 *OsRhoGDI1* 与 *OsRac1* 在细胞膜上发生了相互作用。与之不

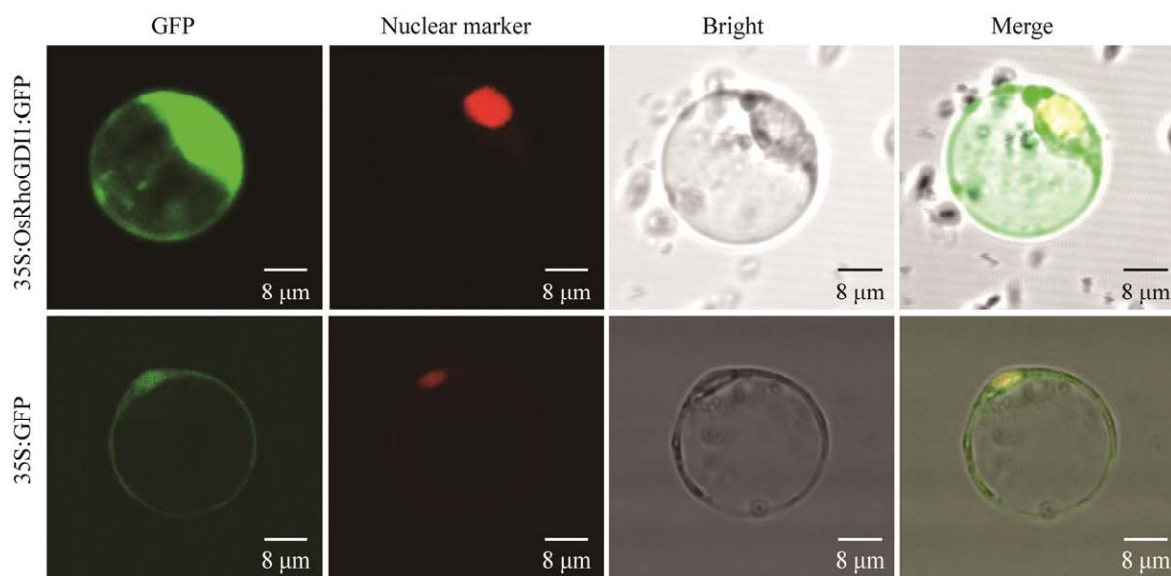


图 7 *OsRhoGDI1*-GFP 融合蛋白在水稻原生质体中的分布 GFP 连接到 *OsRhoGDI1* 的 C 端, 由 35S 启动子驱动. 以 35S:GFP 载体作为对照. 核定位标记采用 bZIP52-RFP

Figure 7 Distribution of *OsRhoGDI1*-GFP fusion protein in rice protoplasts. GFP was fused to the C-terminus of *OsRhoGDI1* and driven by the 35S promoter. The vector 35S:GFP was used as the control. Nuclear marker: bZIP52-RFP.

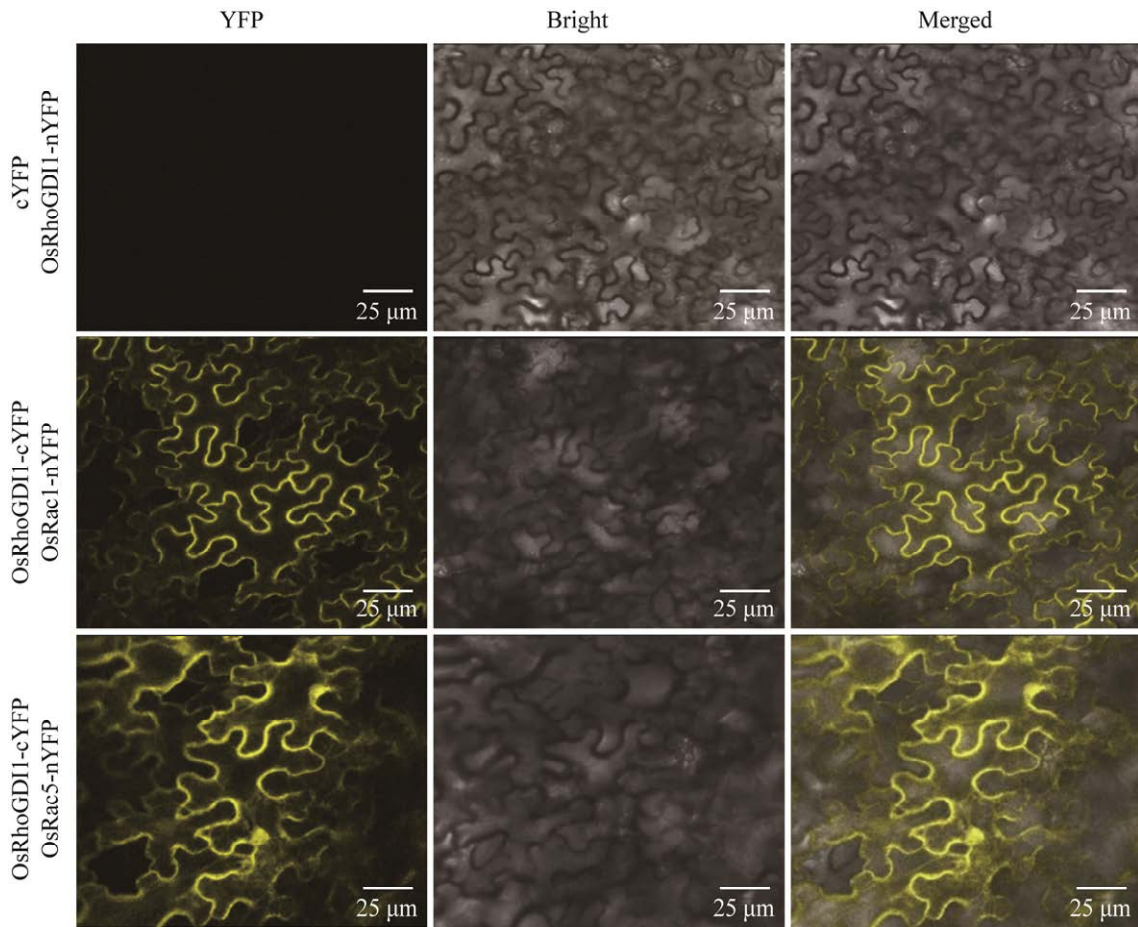


图8 BiFC技术检测OsRhoGDI1和OsRac1、OsRac5蛋白之间的相互作用 OsRhoGDI1与pXYc104的C端连接,OsRac1和OsRac5分别与pXYn106的N端连接.共转至烟草细胞中共表达.BiFC的检测信号为YFP信号

Figure 8 The interaction between OsRhoGDI1 and OsRac1, OsRac5 proteins detected by BiFC technology. OsRhoGDI1 was tagged with the C-terminus of pXYc104, OsRac1 and OsRac5 were tagged with the N-terminus of pXYn106. Both constructs were coexpressed in tobacco cells. BiFC signals were detected as YFP signals.

同的是,OsRhoGDI1与OsRac5在细胞膜、细胞核以及细胞质中均有结合,说明在植物细胞中,OsRhoGDI1蛋白不仅结合OsRac5,而且还能与OsRac1发生相互作用,但共定位特征有所不同。

3 讨论与结论

对植物RhoGDI的研究显示,矮牵牛PiRhoGDI1可以与花粉特异的钙依赖蛋白激酶

PiCDPK1相互作用,补偿因*PiCDPK1*过表达而导致的花粉管顶端生长极性表型的异常^[14];拟南芥AtRhoGDI1可与AtRop4或AtRop6相互作用,通过调节NADPH氧化酶RHD2/AtrohC的活性,显著影响拟南芥根毛的极性生长^[15];拟南芥*AtRhoGDI2a*基因表达下调,导致拟南芥的花粉管在伸长过程中末端膨大,极性生长异常^[16]。鉴于目前水稻*OsRhoGDI1*基因系统研究的报道较少,为此本文首先通过生物信息学分

析, 确认了 *OsRhoGDI1* 基因具有植物 RhoGDI 的典型特征以及编码蛋白的基本特性, 并利用 RiceXPro 数据库获取 *OsRhoGDI1* 基因的表达特征信息, 结合 RT-qPCR 检测的结果, 证实该基因广泛表达, 且在幼穗发育过程中高表达, 提示该基因可能在穗发育中起重要作用, 为后续开展该基因的功能鉴定提供了线索。考虑到 *OsRhoGDI1* 基因是作为 Rho/Rop 家族的 *OsRac5* 潜在相互作用蛋白编码基因分离获得, 将 *OsRhoGDI1* 基因和 *OsRac5* 基因表达特性进行比较, 发现二者均在水稻幼穗中高表达, 这与本课题组前期对 *OsRac5* 基因表达的研究相符^[17], 提示二者有可能共同参与对幼穗发育过程的调控。

研究发现植物 Rho/Rop 受多种激素的调控^[18-19]。在烟草和拟南芥中, IAA 能迅速激活 Rho/Rop, 活化的 Rho/Rop 蛋白进而促进依赖 26S 蛋白酶体的 AUX/IAA 蛋白的降解, 激活 IAA 相关基因的表达^[20]。Rho/Rop 也是 ABA 应答的负调控因子, 拟南芥 *AtRac1* 和 *AtRop10* 可以抑制 ABA 诱导的包括气孔关闭、种子萌发、根伸长等反应^[18,21]。棉花 *GhRop1*、*GhRop8* 和 *GhRop6* 基因的表达也响应 ABA 信号^[22-23]。然而, 对 RhoGDI 家族参与植物激素响应的相关报道较少, 本课题组前期对 *OsRhoGDI1* 基因启动子元件的分析发现, 该基因启动子上包含激素的应答元件^[13], 而本研究发现经 ABA、GA、BL、IAA 和 SA 激素处理, *OsRhoGDI1* 基因的表达水平都发生了变化, 这与 *OsRac5* 基因响应激素的表达特性存在一定的关联, 在 IAA 与 ABA 的处理下, 两种基因的表达呈现出相反趋势, 在 IAA 处理下, *OsRac5* 基因表达下调, 而 *OsRhoGDI1* 基因表达上调; ABA 处理下, 两种基因的表达也呈现相反的表达特征, 推测两种基因在转录水平上的表达受到 IAA、

ABA 等激素的共同调控, 可能在同一信号通路中发挥作用。本研究还发现高盐处理会下调该基因的表达水平, 与此对应的是, 本课题组前期对 *OsRac5* 基因表达的分析发现高盐也能诱导其表达水平下调^[17], 提示 *OsRac5* 基因与 *OsRhoGDI1* 基因也可能共同参与水稻盐胁迫信号应答。

对植物 RhoGDIs 在细胞中的定位研究发现, Nt-RhoGDI2 位于烟草花粉管的细胞质中, 并且通过与 Nt-Rac5 相互作用可以将 Nt-Rac5 从花粉管质膜转运到细胞质中^[24]; 水稻 *OsRhoGDI2* 蛋白可能在细胞质、细胞膜及细胞核中都有分布^[25]。为了解 *OsRhoGDI1* 基因编码蛋白在细胞中的分布特征, 本研究采用水稻原生质体瞬时表达技术, 发现 *OsRhoGDI1*-GFP 融合蛋白是一种在胞内分布广泛的蛋白, 这与植物 RhoGDI 调控 Rho/Rop 活性所要求的胞质与质膜之间定位的循环是相符的, 但是 *OsRhoGDI1* 蛋白的核定位意义仍需要深入研究。

鉴于本课题组前期已通过酵母双杂交以及 GST pull down 实验证实 *OsRhoGDI1* 与 *OsRac5* 存在相互作用^[11], 为此本研究进一步利用 BiFC 技术鉴定了 *OsRhoGDI1* 与 *OsRac5* 的体内相互作用, 发现 *OsRhoGDI1* 与 *OsRac5* 在细胞膜、细胞质及细胞核中都能发生相互作用, 由于 Rho/Rop 蛋白 GTP 结合的激活型定位于质膜上, 而 GDP 结合的失活型定位于胞质中^[26], 因此胞质荧光信号代表的是 *OsRhoGDI1* 与 GDP 结合的失活型 *OsRac5* 结合, 而质膜上的荧光信号代表的是 *OsRhoGDI1* 与 GTP 结合的激活型 *OsRac5* 结合, 但在细胞核出现的荧光信号, 是否说明二者还能够入核发生相互作用, 仍需要后续进一步的研究。*OsRac1* 是目前研究较为深入的水稻 Rho/Rop 家族成员, 已知功能不仅涉及稻瘟病抗性^[27-28], 而且涉及调控穗发育和粒

型^[6], 作为“分子开关”, *OsRac1* 的活性是否受 *OsRhoGDI1* 调控值得关注。为此本研究采用 BiFC 检测了二者的相互作用, 发现 *OsRhoGDI1* 与 *OsRac1* 蛋白在细胞膜上共定位, 不仅证实 *OsRac1* 和 *OsRhoGDI1* 存在体内相互作用, 而且说明受 *OsRhoGDI1* 调控的水稻 Rho/Rop 蛋白不止一种, 本研究的结果为后续深入研究 *OsRhoGDI1*-*OsRac1* 模块在穗发育及粒型控制、稻瘟菌的抗性等作用机制奠定了基础。

REFERENCES

- [1] MA QH, ZHU HH, HAN JQ. Wheat ROP proteins modulate defense response through lignin metabolism[J]. *Plant Science: an International Journal of Experimental Plant Biology*, 2017, 262: 32-38.
- [2] ELIÁŠ M, KLIMEŠ V. Rho GTPases: deciphering the evolutionary history of a complex protein family[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2012, 827: 13-34.
- [3] LIU HL, HUANG JQ, ZHANG XJ, LIU GL, LIANG W, ZHU GQ, DONG MG, LI M, ZHANG J, YANG WY, XIAO W, CHEUNG AY, TAO LZ. The RAC/ROP GTPase activator *OsRopGEF10* functions in crown root development by regulating cytokinin signaling in rice[J]. *The Plant Cell*, 2023, 35(1): 453-468.
- [4] WU HM, HAZAK O, CHEUNG AY, YALOVSKY S. RAC/ROP GTPases and auxin signaling[J]. *The Plant Cell*, 2011, 23(4): 1208-1218.
- [5] FEIGUELMAN G, FU Y, YALOVSKY S. ROP GTPases structure-function and signaling pathways[J]. *Plant Physiology*, 2018, 176(1): 57-79.
- [6] ZHANG Y, XIONG Y, LIU RY, XUE HW, YANG ZB. The Rho-family GTPase *OsRac1* controls rice grain size and yield by regulating cell division[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(32): 16121-16126.
- [7] 刘慧丽, 郭子鸣, 程泰然, 张志成. *OsRAC3* 调控水稻籽粒性状的功能分析[J]. *华南农业大学学报*, 2023, 44(5): 690-695.
LIU HL, GUO ZM, CHENG TR, ZHANG ZC. Functional analysis of *OsRAC3* regulating seed traits in rice[J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2023, 44(5): 690-695 (in Chinese).
- [8] 王美娜, 彭静静, 王凯婕, 安文静, 刘亚菲, 李珂嘉, 梁卫红. 利用 CRISPR/Cas9 技术编辑水稻 *ROP* 基因 *OsRac5*[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2018, 34(12): 1350-1357.
WANG MN, PENG JJ, WANG KJ, AN WJ, LIU YF, LI KJ, LIANG WH. Editing *ROP* gene *OsRac5* of rice by CRISPR/Cas9 technique[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2018, 34(12): 1350-1357 (in Chinese).
- [9] XU YF, CAI WG, CHEN XF, CHEN MJ, LIANG WQ. A small Rho GTPase *OsRacB* is required for pollen germination in rice[J]. *Development, Growth & Differentiation*, 2022, 64(2): 88-97.
- [10] FENG QN, KANG H, SONG SJ, GE FR, ZHANG YL, LI E, LI S, ZHANG Y. *Arabidopsis* RhoGDIs are critical for cellular homeostasis of pollen tubes[J]. *Plant Physiology*, 2016, 170(2): 841-856.
- [11] 梁卫红, 唐朝荣, 吴乃虎. 两种水稻 GDP 解离抑制蛋白基因的分离及特征分析[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2004, 20(6): 785-791.
LIANG WH, TANG CR, WU NH. Isolation and characterization of two GDP dissociation inhibitor genes from *Oryza sativa* L[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 20(6): 785-791 (in Chinese).
- [12] 刘洪梅, 梁卫红, 毕佳佳. 2 种水稻 *OsRhoGDIs* 基因在幼穗组织中的原位杂交分析[J]. *河南农业科学*, 2009, 38(12): 22-25.
LIU HM, LIANG WH, BI JJ. *In situ* hybridization analysis of two rice *OsRhoGDIs* genes in young panicle[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2009, 38(12): 22-25 (in Chinese).
- [13] 张利娟, 梁卫红, 刘悦霞, 刘肖飞, 侯成千, 毕佳佳. 两种水稻 *OsRhoGDIs* 基因启动子的克隆及分析[J]. *中国农业科学*, 2008, 41(10): 2916-2922.
ZHANG LJ, LIANG WH, LIU YX, LIU XF, HOU CQ, BI JJ. Cloning and analysis of the promoters of two *OsRhoGDIs* genes in rice[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, 41(10): 2916-2922 (in Chinese).
- [14] SCHEIBLE N, YOON GM, MCCUBBIN AG. Calmodulin domain protein kinase PiCDPK1 regulates pollen tube growth polarity through interaction with RhoGDI[J]. *Plants*, 2022, 11(3): 254.
- [15] CAROL RJ, TAKEDA S, LINSTED P, DURRANT MC, KAKESOVA H, DERBYSHIRE P, DREA S,

- ZARSKY V, DOLAN L. A RhoGDP dissociation inhibitor spatially regulates growth in root hair cells[J]. *Nature*, 2005, 438: 1013-1016.
- [16] HWANG JU, WU G, YAN A, LEE YJ, GRIERSON CS, YANG ZB. Pollen-tube tip growth requires a balance of lateral propagation and global inhibition of Rho-family GTPase activity[J]. *Journal of Cell Science*, 2010, 123(Pt 3): 340-350.
- [17] 林群婷, 梁卫红, 李辉, 张静. 水稻 *Rop* 基因 *OsRac5* 的表达特性[J]. *植物生理学报*, 2013, 49(12): 1400-1406.
- LIN QT, LIANG WH, LI H, ZHANG J. Expression characteristic of rice *Rop* gene *OsRac5*[J]. *Plant Physiology Journal*, 2013, 49(12): 1400-1406 (in Chinese).
- [18] ZHENG ZL, NAFISI M, TAM A, LI H, CROWELL DN, CHARY SN, SCHROEDER JI, SHEN JJ, YANG ZB. Plasma membrane-associated ROP10 small GTPase is a specific negative regulator of abscisic acid responses in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2002, 14(11): 2787-2797.
- [19] BLOCH D, LAVY M, EFRAT Y, EFRONI I, BRACHA-DRORI K, ABU-ABIED M, SADOT E, YALOVSKY S. Ectopic expression of an activated RAC in *Arabidopsis* disrupts membrane cycling[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2005, 16(4): 1913-1927.
- [20] TAO LZ, CHEUNG AY, NIBAU C, WU HM. RAC GTPases in tobacco and *Arabidopsis* mediate auxin-induced formation of proteolytically active nuclear protein bodies that contain AUX/IAA proteins[J]. *The Plant Cell*, 2005, 17(8): 2369-2383.
- [21] LEMICHEZ E, WU Y, SANCHEZ JP, METTOUCHI A, MATHUR J, CHUA NH. Inactivation of AtRac1 by abscisic acid is essential for stomatal closure[J]. *Genes & Development*, 2001, 15(14): 1808-1816.
- [22] 胡子曜, 武晓玉, 雷建峰, 程贯富, 刘超, 代培红, 梁春燕, 徐诗佳, 李月. 陆地棉小 GTP 结合蛋白基因 *GhROP1* 和 *GhROP8* 的克隆及表达分析[J]. *中国农业大学学报*, 2023, 28(4): 13-25.
- HU ZY, WU XY, LEI JF, CHENG GF, LIU C, DAI PH, LIANG CY, XU SJ, LI Y. Molecular cloning and expression analysis of small GTP-binding protein genes *GhROP1* and *GhROP8* in cotton (*Gossypium hirsutum* L.)[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2023, 28(4): 13-25 (in Chinese).
- [23] 胡子曜, 雷建峰, 程贯富, 刘超, 代培红, 孙博洋, 马海洋, 李月. 陆地棉小 GTP 结合蛋白基因 *GhROP6* 的克隆及表达初步分析[J]. *核农学报*, 2023, 37(3): 461-470.
- HU ZY, LEI JF, CHENG GF, LIU C, DAI PH, SUN BY, MA HY, LI Y. Molecular cloning and expression preliminary analysis of a small GTP-binding protein gene *GhROP6* in *Gossypium hirsutum* L.[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2023, 37(3): 461-470 (in Chinese).
- [24] KLAHRE U, BECKER C, SCHMITT AC, KOST B. Nt-RhoGDI2 regulates Rac/Rop signaling and polar cell growth in tobacco pollen tubes[J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2006, 46(6): 1018-1031.
- [25] 彭威风, 梁卫红. 水稻 *OsRhoGDI2* 蛋白生物信息学分析及亚细胞定位研究[J]. *生物技术通报*, 2010(5): 82-86, 92.
- PENG WF, LIANG WH. Bioinformatics analysis and subcellular localization study on rice *OsRhoGDI2* gene[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2010(5): 82-86, 92 (in Chinese).
- [26] YANG ZB. Small GTPases: versatile signaling switches in plants[J]. *The Plant Cell*, 2002, 14(Suppl): S375-S388.
- [27] KAWANO Y, AKAMATSU A, HAYASHI K, HOUSEN Y, OKUDA J, YAO A, NAKASHIMA A, TAKAHASHI H, YOSHIDA H, WONG HL, KAWASAKI T, SHIMAMOTO K. Activation of a Rac GTPase by the NLR family disease resistance protein Pit plays a critical role in rice innate immunity[J]. *Cell Host & Microbe*, 2010, 7(5): 362-375.
- [28] ONO E, WONG HL, KAWASAKI T, HASEGAWA M, KODAMA O, SHIMAMOTO K. Essential role of the small GTPase Rac in disease resistance of rice[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(2): 759-764.

(本文责编 陈宏宇)