

## 植物扩展蛋白基因的研究进展

徐 筏 徐 倩 张 镛 徐吉臣

(北京林业大学林木育种国家工程实验室 林木花卉遗传育种教育部重点实验室,  
国家林业局树木花卉育种与生物工程重点开放实验室)

**摘要:**扩展蛋白基因(expansin genes)是一个相对保守的基因家族,由 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 和 $\delta$ 4个亚家族组成。作为植物细胞壁的重要组成部分,扩展蛋白以酶催化的作用方式,使细胞壁组分间疏松,细胞伸展,细胞的柔韧性增强,以此缓解各种环境因子对细胞的压力。目前研究发现:扩展蛋白参与了植物生长发育过程中的许多环节,如种子萌发、根毛的起始和延长、叶子生长发育、叶柄脱落、花粉管延长、果实成熟等。同时,扩展蛋白还参与了抗旱、抗病、耐高温等众多抗逆性反应。扩展蛋白基因多属于诱导表达,易受激素、温度、干旱、病原菌、机械损伤等各种内外界环境因素的影响。

**关键词:**扩展蛋白;细胞壁;发育;抗逆;调控

中图分类号:S718.3 文献标志码:A 文章编号:1000-1522(2010)05-0154-09

XU Xiao; XU Qian; ZHANG Kai; XU Ji-chen. **Advancements in expansin genes of plants.** *Journal of Beijing Forestry University* (2010) 32(5) 154-162 [Ch, 50 ref.] National Engineering Laboratory for Tree Breeding, Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants of Ministry of Education, Tree and Ornamental Plant Breeding and Biotechnology Laboratory of State Forestry Administration, Beijing Forestry University, 100083, P. R. China.

Expansin gene is a kind of conserved multigene family with four sub-families  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  and  $\delta$ . As an important component in plant cell wall, expansin refers to a nonenzymatic protein with unique "loosening" effects on plant cell walls to accelerate the cell extension, increase its flexibility, and release the pressure by environment factors. The advancements of expansins support that expansins are involved in most of the physiological process in plants, such as seed germination, root hair promotion and extension, leaf formation, petiole off, pollen tube growth, fruit ripening, and other developmental process where cell wall loosening occurs. It is also involved in the process of drought, heat or disease resistance in plants. Mostly, expansin genes express inducible by the environmental factors, such as hormone, temperature, drought, pathogen and injuring.

**Key words** expansin; cell wall; development; tolerance; regulation

扩展蛋白(expansins)是植物细胞壁的重要组成部分,广泛存在于各种植物细胞组织中。植物在正常生长条件下,细胞壁中扩展蛋白的含量较低,但在植株特定的发育阶段,或者植株遭受外界环境因子刺激时,扩展蛋白的含量可迅速提高几倍甚至上百倍。有关扩展蛋白的结构、作用机制、生理功能以及

基因克隆等的研究是在美国 Pennsylvania 州立大学生物学系 Cosgrove 先生的实验室开始的<sup>[1]</sup>,近几年来,随着分子生物学技术的发展以及多个植物品种基因组测序的完成,有关扩展蛋白基因的研究进展很快。本文就目前的研究状况,对扩展蛋白基因的结构、功能、表达调控等方面的研究进展进行综述。

收稿日期:2010-03-24

基金项目:国家自然科学基金项目(30771516)、教育部留学回国人员基金项目。

第一作者:徐筱。主要研究方向:草坪草抗逆分子生物学。电话:010-62336628 Email:xuxiao1945@163.com 地址:100083 北京市清华东路 35 号北京林业大学 118 信箱。

责任作者:徐吉臣 教授。主要研究方向:草坪草抗逆分子生物学。电话:010-62336628 Email:jcxu282@sina.com 地址:100083 北京市清华东路 35 号北京林业大学生物科学与技术学院。

本刊网址: <http://www.bjfujournal.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

## 1 扩展蛋白基因结构

### 1.1 扩展蛋白基因家族

扩展蛋白基因隶属于一个相对保守的基因家族,在不同植物中都有广泛的分布。依据基因序列构成的不同,扩展蛋白可被分为 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 和 $\delta$ 4个亚家族<sup>[2]</sup>,从功能及数量上来看, $\alpha$ 、 $\beta$ 亚型是植物中存

在的主要扩展蛋白。其中, $\alpha$ -扩展蛋白主要存在于双子叶和非禾本科(Gramineae)单子叶植物中, $\beta$ -扩展蛋白多存在于禾本科单子叶植物中<sup>[3]</sup>, $\gamma$ 和 $\delta$ 扩展蛋白在水稻(*Oryza sativa*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)等个别物种中有发现报道。表1示例了目前为止几种重要植物品种中扩展蛋白的种类和数量分布。

表1 植物中的扩展蛋白基因  
Tab. 1 Expansin genes in plants

植物种类	$\alpha$ -expansin	$\beta$ -expansin	$\gamma$ -expansin	$\delta$ -expansin	来源
拟南芥	26	10	3	1	http://www.bio.psu.edu/expansins
水稻	32	24	6	18	文献[4]
白杨( <i>Populus tomentosa</i> )	27	2			文献[5]
玉米( <i>Zea mays</i> )	5	8			文献[6]
番茄( <i>Lycopersicon esculentum</i> )	18				文献[6]
烟草( <i>Nicotiana tabacum</i> )	6				文献[6]
小麦( <i>Triticum aestivum</i> )	1				文献[6]
棉花( <i>Gossypium</i> spp.)	2				文献[6]

系统发生分析表明,扩展蛋白基因家族起源于一个共同的祖先基因<sup>[7]</sup>, $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 和 $\delta$ 扩展蛋白亚家族的趋异随之发生。同源性比对推测, $\gamma$ 亚家族首先从系统树主干分离,紧接着是 $\alpha$ 与 $\beta$ 的分离, $\delta$ 亚家族最后从 $\beta$ 的一个亚组起源产生<sup>[2]</sup>。

孙涌栋等<sup>[8]</sup>以黄瓜(*Cucumis sativus*)*CsEXP10*蛋白序列为基础上,对扩展蛋白家族氨基酸序列进行了多重序列比较和进化树分析,发现扩展蛋白家族成员间总体的同源性较高,进化上趋于保守。比较而言,扩展蛋白亚型间的同源性较低,如 $\alpha$ -扩展蛋白和 $\beta$ -扩展蛋白之间的同源性大约为20%~25%<sup>[7]</sup>,而亚型内的同源性则要高的多,如拟南芥中 $\alpha$ -扩展蛋白之间的序列同源性介于55%~99%之间<sup>[9]</sup>。不同扩展蛋白功能的改变主要源于一些特定部位氨基酸的差异。对扩展蛋白基因家族的研究有助于了解其演变历史,并为深入探讨扩展蛋白的氨基酸构成和空间结构与功能的关联奠定基础。

### 1.2 扩展蛋白基因结构

比较不同扩展蛋白基因的序列构成,发现扩展蛋白基因具有相对保守的内含子模式。综合而言,扩展蛋白基因具有4种不同的内含子序列,分别为

内含子1、2、3和4,不同扩展蛋白基因中内含子的种类、数量及长度有所不同,显示扩展蛋白基因组内含子在进化过程中发生了添加或丢失<sup>[7]</sup>。其中,多数 $\alpha$ -扩展蛋白基因含有2个内含子,分别属于内含子1和3,少数 $\alpha$ -扩展蛋白基因也会丢失其中的1个,如*OsaEXP1*、*OsaEXP8*只含内含子3,而*OsaEXP7*、*OsaEXP13*只含内含子1; $\beta$ -扩展蛋白基因一般含有3个内含子,根据所含内含子的不同,可以分为3个亚类,即 $\beta1$ 、 $\beta2$ 和 $\beta3$ 。在拟南芥中, $\beta1$ 丢失内含子1或者4, $\beta2$ 无内含子, $\beta3$ 丢失了内含子3; $\gamma$ -扩展蛋白基因一般只具有内含子1和3,但其内含子3序列后随即出现基因的终止密码信号<sup>[9]</sup>。

外显子序列比对显示,不同亚型扩展蛋白之间存在特殊的结构序列,即基因的中间部位存在一段插入序列(一般位于内含子2和3之间)。Li等<sup>[9]</sup>分析了拟南芥中的38个扩展蛋白,分别隶属于 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 3种扩展蛋白亚型。其中, $\alpha$ -扩展蛋白的插入序列位于一段保守区域的前端,长度14 bp左右,其3'端具有保守的氨基酸序列“GWCN”;而 $\beta$ -扩展蛋白的插入序列在这段保守区域的后部,长度7 bp左右,序列变异较大;而 $\gamma$ -扩展蛋白中缺失这种插入序列(图1)。

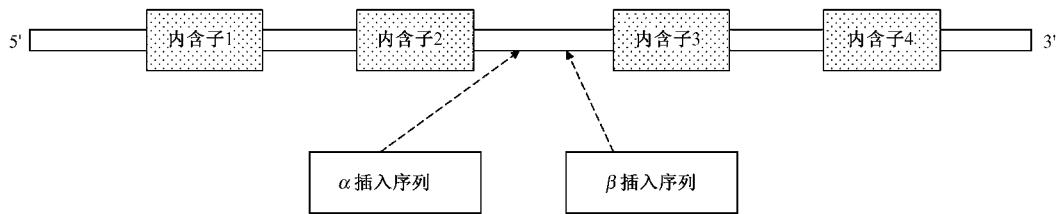


图1 扩展蛋白基因结构  
Fig. 1 Structure of expansin genes

### 1.3 扩展蛋白结构

扩展蛋白的前体包含 1 段信号肽<sup>[10]</sup> ,大约有 22 ~ 25 个氨基酸 ,引导初生的多肽透过内质网 ,信号肽被切除后 ,进一步加工、修饰成为成熟蛋白 ,由高尔基体转运分泌到细胞壁(图 2)。典型的扩展蛋白分子量约为 25 ~ 27 kD ,含有 2 个结构域 ,第 1 个是位于序列中段的催化区 ( catalysis domain , catdom ) ,大小约 15 kD ,其核心序列与内切葡聚糖酶 EG 45 有较高的同源性 ( 内切葡聚糖酶是纤维素酶系中的 1 个主要成分 ,它可在葡聚糖链的随机位点降解底物产生寡糖 )。这段区域半胱氨酸 (C) 含量丰富 ,推测可能与二硫键的形成有关 ; 第 2 个结构域是位于羧基端的与纤维素酶类似的纤维素吸附区 ( cellulose-binding domain , CBD ) ,这段序列较为保守 ,主要由最后一个外显子编码 ,大小约 10 kD ,拥有丰富的色氨酸 (W) ,色氨酸微环境对 pH 变化非常敏感 ,有实验表明 ,降低 pH 可以导致酶分子构象发生较大变化 ,从而影响扩展蛋白的功能<sup>[11]</sup>。

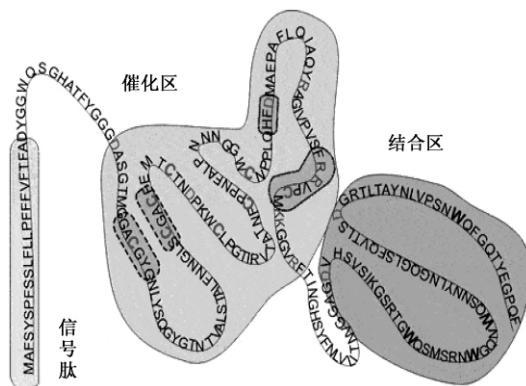


图 2 扩展蛋白结构<sup>[12]</sup>

Fig. 2 Structure of expansions

## 1.4 扩展蛋白的作用机制

关于扩展蛋白的作用机制,目前还没有确切的定论,比较流行的假说有两种:

第1种假说认为扩展蛋白有酶学效应,其结合区“CBD”负责把扩展蛋白锚定在纤维素表面,催化区“catdom”能够打断细胞壁纤维素与半纤维素间的非共价键连接。而且这种非共价键连接是可逆的,可导致半纤维素像尺蠖一样向前运动,使得细胞壁疏松,柔韧性增强,进而诱导细胞壁伸展<sup>[13]</sup>。图3模拟了扩展蛋白的作用机制,箭头指示的是扩展蛋白的运动方向,它通过细胞壁多聚物释放的机械张力能驱动。

第2种假说由McQueen<sup>[12]</sup>于1994年提出。在酸性环境下,扩展蛋白和一些酸依赖型酶被激活,扩展蛋白结合于纤维素微纤丝和缠绕其表面上的基质多聚糖之间,导致两者之间相互滑动。一些细胞壁

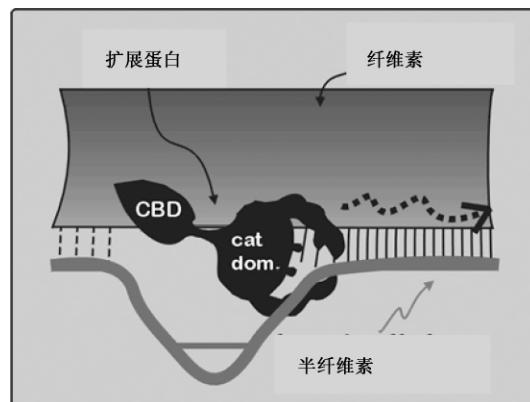


图 3 扩展蛋白作用机制假说之一<sup>[12]</sup>

Fig. 3 The first presumption of expansins' mechanism

水解酶(如内切葡聚糖酶)随之把基质多聚糖切成很多较小的片段,导致细胞壁的软化。进一步,糖基转移酶(如内切木葡聚糖基转移酶)将短的糖基片段连接,重新组合形成长短不一的多糖片段,导致细胞壁的扩展。图4显示了这种假说的作用模式。

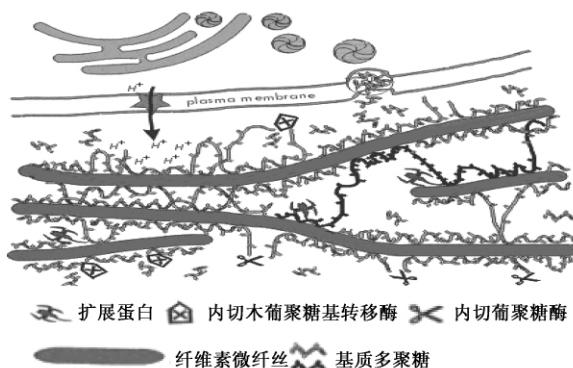


图4 扩展蛋白作用机制假说之一<sup>[12]</sup>

Fig. 4 The second presumption of expansins' mechanism

## 2 扩展蛋白的功能

扩展蛋白基因已在多种植物中被鉴定存在,如表1所示。而越来越多基因的克隆和相关功能的研究分析表明,扩展蛋白(特别是 $\alpha$ -扩展蛋白)几乎参与了植物的整个生长发育进程,包括种子的萌发、根毛的起始和延长、茎和叶的生长发育、叶柄的脱落、花粉管的延长、果实的成熟等,近几年来在植物抗逆性过程中,也陆续发现了一些扩展蛋白基因的参与。 $\beta$ -扩展蛋白的功能主要集中于花粉管的延长等领域,而 $\gamma$ -扩展蛋白和 $\delta$ -扩展蛋白数量分布较少,有关功能的研究鲜有报道。

## 2.1 扩展蛋白与种子的萌发

许多研究证实,扩展蛋白基因的表达能促进植物种子的萌动和发育过程。Chen 等<sup>[14-15]</sup>在萌发的

番茄种子中鉴定了3个扩展蛋白基因,并分析了基因表达的时空效应。其中,基因 $LeEXP4$ 在胚乳冠区域特异性表达,其表达水平与胚乳冠的软化程度相吻合,推测 $LeEXP4$ 使得胚乳冠层细胞的细胞壁组分解聚,导致细胞壁软化从而促进了胚的生长和种子萌发。另外2个基因 $LeEXP8$ 、 $LeEXP10$ 在胚中特异表达,其中基因 $LeEXP8$ 在干种子和其他成熟组织材料如根、茎、叶和花中不表达,在种子浸泡12 h后开始表达;基因 $LeEXP10$ 在种子发育的早期阶段表达丰富,随着种子的成熟,表达量逐渐减弱。2003年,Choi等<sup>[16]</sup>利用转基因技术,使 $OsEXP4$ 基因在水稻中进行正义和反义表达,发现正义表达植株的胚芽鞘和中胚轴的长度分别比对照增加了31%和97%,而反义植株则分别降低了28%和43%,并且在转基因植株中, $OsEXP4$ 基因的诱导表达水平与水稻秧苗的生长呈正相关关系。

## 2.2 扩展蛋白与植物的营养生长

### 2.2.1 与根毛起始、根系生长相关

有实验表明,扩展蛋白基因的表达与根的形成及其生长发育过程紧密相关。2002年,Cho等<sup>[17]</sup>以拟南芥的各种突变体为材料,利用乙烯合成的前体1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid(ACC)和乙烯合成的抑制剂1-methylcyclopropene(MCP)进行处理,分析在根毛区特异表达的扩展蛋白基因 $AtEXP7$ 和 $AtEXP18$ 的表达情况,发现突变体株系 $rhd6$ 经过促进乙烯合成的ACC处理后, $AtEXP7$ 基因的转录水平提高了近8倍,而根毛生长区表皮细胞数占总表皮细胞数的比例增加了约38%;进一步对ACC处理过的突变体株系 $rhd6$ 用MCP进行对比处理,发现ACC处理过的突变体 $rhd6$ 根毛生长密集,再用MCP处理后根毛消失,而 $AtEXP7$ 和 $AtEXP18$ 基因的表达量在MCP处理后,均降低到了零点。结果表明,乙烯能显著诱导根毛区扩展蛋白基因的特异性表达,进而促进根毛的生长。

2003年,Lee等<sup>[18]</sup>鉴定了第1个根特异性表达的大豆(*Glycine max*)扩展蛋白基因 $GmEXP1$ ,研究了它对大豆根生长的影响。实验结果显示,在根发育的不同时期,其初生根和次生根的生长速度与 $GmEXP1$ 基因的表达量呈正相关关系,亦即在大豆根快速生长时期, $GmEXP1$ 基因的表达量也较高,反之在大豆根生长缓慢阶段, $GmEXP1$ 基因的表达量也随之较低。进一步分析生长5 d后大豆初生根不同区段 $GmEXP1$ 基因的表达情况,发现在初生根根尖0.5 cm以内的区域基因表达量最高,0.5~4 cm处无次生根的区域基因几乎不表达,而4~7 cm间有次生根生长的区域,随着次生根数目的增加,

$GmEXP1$ 基因的表达量又随之增加。将 $GmEXP1$ 基因导入烟草中进行过量表达,发现转基因烟草的根对于接触胁迫的抗性增高,平均根长比对照组长2.4 cm。

### 2.2.2 对茎生长的作用

2008年,王桂凤等<sup>[19]</sup>在研究杉木(*Cunninghamia Lanceolata*)木材形成过程中,鉴定了2个组织特异性表达的扩展蛋白基因 $CLEXP1$ 和 $CLEXP2$ 。分别转入烟草中进行过量表达,发现转基因烟草的高生长和粗生长均显著增加。其中,转入 $CLEXP1$ 和 $CLEXP2$ 基因的烟草植株的高度比野生型烟草分别增加了8%和5%,茎干直径的增加量分别为10%和5%。电镜扫描显示,转基因烟草的髓薄壁细胞显著增大,推断过量表达的扩展蛋白使得细胞壁松弛从而促进了细胞的伸展,并进一步促使植物的茎延长。王桂凤进一步测定了转基因植株茎干基部细胞壁的纤维素含量,发现转入 $CLEXP1$ 和 $CLEXP2$ 基因的烟草植株分别增加了约50%和30%,初步推测 $CLEXP1$ 和 $CLEXP2$ 通过细胞壁局部加厚的方式,直接或间接参与了纤维素的合成或沉积。

### 2.2.3 对叶子生长发育的作用

研究表明,扩展蛋白基因的表达对叶子生长的启动和形成过程都具有非常重要的作用。2000年,Cho等<sup>[20]</sup>将 $AthEXP10$ 基因转移到拟南芥中,利用35SCaMV强启动子启动该基因的表达,发现在5 d大小的转基因苗中,基因的表达部位位于第一片真叶的基部而非子叶;在29 d的转基因苗中,基因表达的部位位于叶柄和中脉处,在叶子表皮毛基部、叶梗脱落区也有大量表达,但在叶子中没有表达。此外,比较正义和反义表达的转基因植株发现,正义表达植株扩展蛋白基因的转录增加,叶片长度、宽度和叶柄长度都有所增加,显示扩展蛋白通过胞壁流力学作用控制叶片形状,在细胞壁松弛的基础上调控叶细胞的生长,而反义表达的转基因植株,叶片明显缩小,叶片长度、宽度和叶柄长度减小,并沿中脉旋转呈现畸形,可能是由于叶片和中脉生长的不协调所致。Stephane于2001年研究发现<sup>[21]</sup>,扩展蛋白基因 $CsEXP1$ 在黄瓜幼苗顶端分生组织表达可导致叶片组织异常,叶片脉络呈卵形,甚至叶序方向也发生变异,植株形成起始时叶序呈反时针方向,随后才形成正常的顺时针方向的叶序。

Cosgrove等<sup>[22]</sup>发现,外源扩展蛋白可诱导非分化细胞转化成为叶片细胞,生成类似叶子的结构,新“叶”模仿正常叶片生长的模式,有规律的生于茎上并行使叶片功能。Fleming等<sup>[23]</sup>研究发现,局部应

用扩展蛋白可诱导番茄分生组织产生不正常的叶原基,但这些叶原基不能进一步发育成正常的叶片。2001年,Stephane等<sup>[21]</sup>发展了一种新的检测技术,以研究扩展蛋白在叶子生长发育中的作用。该技术通过对转基因植株的短暂局部微诱导,使扩展蛋白基因在转基因植物中的特定位点得到瞬时表达。结果发现,扩展蛋白基因在叶原基部位的特定表达能够诱导一个信号程序或传导途径,并因此启动叶子的形成。对正在发育的叶原基侧面的微诱导显示,扩展蛋白基因的表达能够导致叶片形状的改变。

#### 2.2.4 促进叶柄脱落

2000年,Cho等<sup>[20]</sup>利用特异启动子,使 $AtEXP10$ 基因在生长发育的拟南芥叶子和叶柄基部得到正义和反义的表达,对比发现,正义植株叶柄的脱落明显多于反义植株。分析原因,扩展蛋白通过诱导最接近分离区的细胞膨胀,使其产生机械压力而使叶柄脱离。

### 2.3 扩展蛋白与植物生殖生长

#### 2.3.1 对花粉管的作用

$\beta$ -扩展蛋白对花粉管生长的影响源于花粉过敏原的研究。Cosgrove等<sup>[22]</sup>研究发现,草本植物中鉴定的第一类花粉过敏原与 $\beta$ -扩展蛋白的序列同源性较高,蛋白的二级结构类似,作用方式上也具有类似扩展蛋白的松弛细胞壁的作用。由此推论,这类花粉过敏原是 $\beta$ -扩展蛋白亚家族的成员之一。换言之, $\beta$ -扩展蛋白在花粉管及花粉中的表达是花粉过敏原形成的主因。

2001年,Downes等<sup>[24]</sup>在大豆中鉴定了一个激素调控的 $\beta$ -扩展蛋白基因 $CIM1$ ,研究分析表明,该基因具有软化柱头与花柱细胞的细胞壁、协助花粉管伸长生长的作用,有助于花粉管通过花柱进入子房<sup>[22]</sup>。2002年,Pezzotti等<sup>[25]</sup>在烟草中鉴定了一个雌蕊特异表达的 $\beta$ -扩展蛋白基因 $PPAL$ ,该基因在柱头分泌区和胎座表皮层表达,蛋白分泌于柱头渗出液中。分析发现,该基因的表达水平与烟草花粉的受精过程相互关联,在未授粉的雌蕊中 $PPAL$ 基因的表达量较低,而授粉后的雌蕊中 $PPAL$ 基因的表达量急剧上升,并在12~24 h内一直处于较高水平,随后表达水平降低,至48 h后表达停止。由此推测, $PPAL$ 能促进花粉粘附于柱头上,并协助花粉管穿过雌蕊,以完成受精过程,原位杂交的实验结果也证明了这一点。

2006年,金慧清等<sup>[4]</sup>从小麦中分离克隆了1个小孢子中特异性表达的 $\beta$ -扩展蛋白基因(GenBank accession No: AY451239),该基因只在花粉发育早期小孢子阶段特异表达,在成熟花粉、未成熟种子、

子房以及其他营养器官中未见表达,推测其与小孢子的发育有关。

#### 2.3.2 扩展蛋白与果实的成熟

扩展蛋白(主要是 $\alpha$ -扩展蛋白)普遍存在于各种果实中,如杏(*Prunus armeniaca*)<sup>[26]</sup>、草莓(*Fragaria ananassa*)<sup>[27]</sup>、樱桃(*Cerasus pseudocerasus*)<sup>[28]</sup>和桃子(*Prunus persica*)<sup>[29]</sup>等。根据表达时期的不同将其分为2类:一类与果实的生长膨大有关,如番茄 $LeEXP3$ 、 $LeEXP4$ 、 $LeEXP5$ 、 $LeEXP6$ 、 $LeEXP7$ 及草莓 $FaEXP3$ 、 $FaEXP4$ 、 $FaEXP6$ 、 $FaEXP7$ 等,主要存在于生长中的果实;另一类与果实的完熟有关,如番茄 $LeEXP1$ 、草莓 $FaEXP2$ 和 $FaEXP5$ 、桃子 $PchEXP1$ 等在完熟的果实中特异性表达。这两类蛋白质的一级结构具有很高的相似性,但它们在序列亲缘关系树状图中的位置及其免疫交叉反应上存在明显的不同,表明它们在蛋白质的高级结构和功能上存在差异<sup>[30]</sup>。

在低温冷藏时,桃子果肉组织容易发生脱水和絮败,当自由水含量下降到一定量以下时,果肉质地开始变得粗糙。研究发现,在果肉质地变化之前,扩展蛋白的含量也开始下降。并且,同一果实不同部位的果肉组织脱水程度存在着差异,而含水量低的部位扩展蛋白含量也相应降低。Obenland等<sup>[31]</sup>认为,扩展蛋白可能通过改变果胶酶与底物的相互接触,使细胞壁内的化学反应减缓、细胞壁柔韧性降低,从而导致桃子果实粗糙。

Brummell等<sup>[32]</sup>利用转基因技术,将 $LeEXP1$ 基因转移至番茄中,使其过量表达或抑制表达,发现过量表达至野生型3倍的转基因植株中,果实的基质多糖在绿熟期开始发生降解,在绿果期果实硬度即明显降低;相反,抑制表达的转基因株系,其 $LeEXP1$ 的表达量只有野生型的3%,其果实在完熟期间的软化程度比对照降低了15%~20%。另外,Civello等<sup>[33]</sup>研究草莓时发现,扩展蛋白基因 $FaEXP2$ 的mRNA在绿色果实中含量很低,伴随果实的成熟,丰度增加,成熟后开始降低,进一步表明扩展蛋白是果实成熟过程中不可或缺的组成成分。

激素乙烯可以诱导果实成熟,Theologis<sup>[34]</sup>利用反义RNA技术调控番茄果实ACC合成酶的表达,在抑制乙烯生物合成的同时,也抑制了扩展蛋白基因 $LeEXP1$ 的表达,如果不进行外源乙烯处理,这些转基因番茄很难成熟。

#### 2.4 扩展蛋白的抗逆性功能

在植物的生长发育过程中,经常遭受干旱、高温、病虫害等各种生物和非生物因子的胁迫和影响。与之响应过程中,植物细胞的形态结构、生理生化、

代谢、基因表达等许多方面都产生一系列变化<sup>[35]</sup>,以最大限度地减轻逆境造成的伤害。近年来的研究表明,某些扩展蛋白基因的表达,与许多抗性反应有很大的关联,可有效增加植物对逆境的耐受性。

#### 2.4.1 扩展蛋白与植物干旱的胁迫反应

许多研究表明,植物受到干旱胁迫时,其根/冠比增加,因此植物根系更多的参与了对干旱胁迫的反应。Wu等<sup>[36]</sup>检测了高(-0.03 MPa)、低(-1.6 MPa)水势下离体玉米根尖不同区域5个扩展蛋白基因 $EXP1$ 、 $EXP5$ 、 $EXB2$ 、 $EXB6$ 、 $EXB8$ 的表达情况。实验将根尖分成3个区域,顶端区(0~5 mm)、伸长区(5~10 mm)和成熟区(10~20 mm)。Northern杂交实验显示,高、低水势处理10 h后,低水势下根尖不同区域的5种扩展蛋白的表达量分别都显著高于高水势,如低水势下顶端区 $EXP5$ 的相对表达水平为4.6,高水势为0.34;在伸长区,该基因的相对表达水平也由低水势下的0.4降到至高水势下的0.03。另外,随着处理时间的延长,高、低水势对扩展蛋白基因表达的影响程度也有所改变。比较而言,低水势处理48 h后的扩展蛋白表达水平与高水势处理20 h的扩展蛋白表达水平相当,根部的生长也达到同样的高度50 mm。上述结果表明,植物根系中存在特定的应对水势胁迫机制,即通过提高扩展蛋白的表达水平,增加细胞壁的韧性,以舒缓水势胁迫对细胞造成压力。

#### 2.4.2 扩展蛋白与水稻的抗病性研究

生长素是植物体内重要的生长调节因子,也参与了植物的抗病性过程。在研究其调控机理时发现,扩展蛋白是其中的重要链条之一。水稻白叶枯病菌是水稻的头号杀手,曾令全球水稻减产70%。Wang等<sup>[37]</sup>研究水稻白叶枯病抗性时,发现了一种生长素响应基因 $GH3-8$ ,它编码一种吲哚乙酸(IAA)氨基合成酶,可防止自由型IAA的积累。转基因结果显示, $GH3-8$ 过表达的植株对水稻白叶枯病菌的抗性显著增强,并伴随着植物形态的异常、生长和发育迟缓等特征。基因表达分析显示,过表达植株中,扩展蛋白基因 $EXPA1$ 、 $EXPA5$ 、 $EXPA10$ 、 $EXPB7$ 相对表达水平比野生型植株分别降低了6.2、2.1、2.4、4.0倍,利用IAA处理后,基因的表达有一定程度的恢复。进一步研究发现,这几个扩展蛋白基因在携带抗病基因的野生株系中的表达量更低。分析原因认为,白叶枯病病菌侵染水稻时,引起水稻体内大量生长素(如IAA)的积累,IAA进一步诱导扩展蛋白基因的表达,使细胞壁疏松,为病菌的顺利入侵提供了有利的条件。相反,抑制生长素的合成和积累,阻滞扩展蛋白基因的表达,可增强细胞

壁的堡垒作用,也因此增加了植物的抗病能力。这一通过调控扩展蛋白基因的表达进行抗病的过程,是不依赖传统的水杨酸和茉莉酸的信号传导途径而起作用的,从而为植物抗病性的研究提供了新的思路。

#### 2.4.3 扩展蛋白抗高温方面的研究

随着全球温室效应的加剧,植物耐热性的研究日益受到重视。目前为止,有关植物耐热的分子调控过程有很多的报道。2007年,Xu等<sup>[38]</sup>分析草坪草耐热基因表达谱时发现,扩展蛋白也介入了植物抗高温的过程。分析结果表明,扩展蛋白基因 $AsEXP1$ 存在于所有检测的草坪草品种中,在正常生长条件下不表达,而当经受高温胁迫时, $AsEXP1$ 基因在耐高温品种中有强势表达,在温度敏感品种中不表达或有微弱表达, $AsEXP1$ 基因的表达水平与草坪草品种的耐热性呈显著正相关。分析原因,高温胁迫使得植物细胞经受高温膨胀的压力,易造成细胞的物理损伤。扩展蛋白的适时表达增加了细胞壁的柔韧性,在一定程度上舒缓了高温对植物细胞的张力威胁,增加了植物品种对高温的耐受能力。

### 3 扩展蛋白基因的表达调控

#### 3.1 扩展蛋白基因的时空特异性表达

许多研究表明,扩展蛋白基因的表达有明显的时空效应,即在植物的不同生长发育阶段、不同组织器官,不同的扩展蛋白基因表达活性不同。Harrison等<sup>[27]</sup>分析了6个扩展蛋白基因在草莓果实发育过程中的表达情况,发现 $FaEXP3$ 和 $FaEXP4$ 随着果实的成熟呈现高-低-高的表达模式, $FaEXP6$ 和 $FaEXP7$ 呈现低-高-低的表达模式, $FaEXP2$ 和 $FaEXP5$ 随着果实的变黄成熟呈逐渐增加的表达模式。Lee等<sup>[18]</sup>通过Northern杂交方法,检测了第1、2、3、4、5、7、9、13 d大豆根特异性表达的扩展蛋白基因 $GmEXP1$ 的mRNA转录水平,发现该基因在根发育的不同阶段表达量不同:在种子萌发第1 d的根中有很高的表达水平,在5 d苗的根中表达量达到最大,随后逐渐降低。荆赞革等<sup>[39]</sup>对萝卜(*Raphanus sativus*)扩展蛋白基因 $RsEXPB1$ 进行了克隆和半定量RT-PCR时空表达分析,发现在萝卜的5个发育时期中,幼叶细胞生长分裂旺盛,其 $RsEXPB1$ 表达水平比功能叶高;在破肚期、叶片生长盛期和膨大期,肉质根生长旺盛,其木质部和韧皮部 $RsEXPB1$ 基因表达水平较高;膨大后期因肉质根已基本完成发育,细胞分裂缓慢,木质部和韧皮部 $RsEXPB1$ 表达丰度极低或不表达。

Cosgrove<sup>[40]</sup>在拟南芥中检测了6个扩展蛋白基

因的表达,发现这6个基因均是在特定的细胞类型表达,其中1个基因在气孔保卫细胞表达,1个在根毛出现时期表达,2个局限在微管束中表达,1个在中脉皮质细胞中表达,1个在根冠和根中其他特定的位点表达。Cho等<sup>[41]</sup>利用mRNA原位杂交及免疫组织化学方法对扩展蛋白基因的表达部位进行研究,发现扩展蛋白在水稻生长发育的节间表皮、正在分化的节间维管束中有很高的表达水平,在初生根的根顶端区域,特别是在初生根表皮、正在分化的维管束以及围绕中柱鞘的细胞中、正在生长发育的不定根及侧根原基以及茎顶端正在形成的叶原基部位也有大量的表达,暗示扩展蛋白在植物组织和器官的伸展、分化过程起着很重要的作用。1996年,Wu等<sup>[36]</sup>分析了玉米根尖在高、低水势下扩展蛋白基因的表达情况,发现不同生长部位具有不同种类的扩展蛋白表达类型。在根尖顶端区部位检测的扩展蛋白基因 $EXP1$ 、 $EXP5$ 、 $EXPB2$ 和 $EXPB8$ 的相对表达水平比在伸长区中检测的相对表达水平分别高2~7倍不等,而 $EXPB6$ 的相对表达水平却下降了近2倍。总之,扩展蛋白基因是在高度特定的位点和高度特定的细胞类型中表达,按照一定的发育阶段程序化地进行。

### 3.2 激素、环境因子与扩展蛋白基因的表达

Hutchison等<sup>[42]</sup>研究表明,用外源生长素处理松树(*Pinus*)材料24~48 h后,1种扩展蛋白基因(accession no. AF085330)的表达可提高50~100倍。Vriezen等<sup>[43]</sup>研究发现,乙烯能够诱导扩展蛋白基因 $Rp-EXP1$ 在耐涝品种*Rumex palustris*叶子中的表达,当淹水处理2 h后表达量开始提高,5~6 h后达到最大,并且至少24 h内仍保持较高的表达水平。高英等<sup>[44]</sup>将旱稻 $IRAT109$ 生长8 d苗的根用50  $\mu$ mol/L的ABA溶液处理3 h后, $OsEXP3$ 和 $OsEXP5$ 基因mRNA表达量较对照都有所增加;将3 d苗的幼根干旱胁迫1 h后, $OsEXP3$ 基因的mRNA表达量也明显增加,干旱胁迫后再复水,其表达量又基本回复到对照水平,且4种稻种呈现出相同的规律;进一步对 $OsEXP3$ 基因的表达分析发现,抗旱性强的品种根中基因的表达量多,抗旱性差的品种根中基因的表达较弱。Cho等<sup>[45]</sup>研究表明,水淹信号以及能直接促进植物生长的赤霉素都能诱导深水稻结节的快速生长,叶片中 $OsEXP2$ 和 $OsEXP4$ 的转录水平同时显著增加。Xue等<sup>[46]</sup>用乙烯(100  $\mu$ L/L)处理成熟的绿色番茄果实,0.5 h后 $LeEXP1$ 的表达水平增加,2~10 h内保持稳定,12 h后 $LeEXP1$ 表达量趋于加强,显示乙烯对 $LeEXP1$ 基因的表达有明显的调控作用。Rose等<sup>[47]</sup>用乙烯作用抑制剂冰

片二烯(Norbornadiene, NBD)处理番茄果实, $LeEXP1$ 基因mRNA的转录及近停止,利用乙烯处理可以恢复基因的表达。对此可能的解释是乙烯通过乙烯受体进行信号传导,调控 $LeEXP1$ 基因的表达,而NBD可与乙烯受体作用,抑制了这一信号传导的途径,使 $LeEXP1$ 基因的表达受阻。

损伤对扩展蛋白的基因表达具有调节作用在很多研究中得到证实。Joseph等<sup>[48]</sup>发现,机械损伤1.5 h内,胡萝卜(*Daucus carota*)根扩展蛋白转录本含量增加了10倍。Corbin等<sup>[49]</sup>研究发现,机械损伤后1.5 h内,一个4.4 kb扩展蛋白基因的转录本急剧增加,在12~18 h内保持其最高水平,而24 h后这种转录本含量降低到未损伤下胚轴中的水平;另外2个3.3 kb和2.2 kb的转录本在损伤4 h后才开始积累,在12 h内达最高水平。这些事实表明,损伤虽然是扩展蛋白基因表达在转录水平上的一种调节信号,但是各种扩展蛋白基因表达时对损伤调节的反应并不完全相同,或者是其他因素也同时参与了基因表达的调节。

植物遭受病原菌侵染时,其细胞壁结构发生变化以阻止或限制病原侵染及传播。把菜豆(*Phaseolus vulgaris*)的炭疽刺盘孢菌接种到豌豆(*Pisum sativum*)下胚轴后,具抗性的豌豆产生过敏反应。经过接种后约50 h的延滞期,2.7 kb和1.6 kb两种扩展蛋白mRNA转录本迅速增加10倍,即使是离接种部位有一定距离的细胞,这种转录本也能增加5倍,说明某种物理的或化学的信号从被侵染的部位产生并传输至其相邻细胞<sup>[50]</sup>。Wu等<sup>[36]</sup>研究发现,玉米根在干旱条件下能够继续维持生长,与生长区域扩展蛋白活性增加有关,暗示扩展蛋白基因表达能加强作物的抗旱性。

## 4 展望

扩展蛋白作为植物细胞壁的重要组成成分,其主要作用方式是疏松植物细胞壁的组分,增加细胞壁的柔韧性,这一特征决定它参与了植物细胞生命活动的许多过程,如根、茎、叶、花、果实、种子的生长发育等。近些年来,随着抗逆性分子生物学研究的深入,陆续发现其在耐热、抗旱、抗病等抵御逆境方面也起着非常重要的作用。当植物处于逆境胁迫时,通过细胞壁中扩展蛋白的积累,疏松细胞壁的组分,增加细胞壁的柔韧性,可以舒缓逆境造成的压力,维持细胞的基本形态。植物这种被动式的抵御逆境胁迫的现象不仅为扩展蛋白的功能赋予了更多的新含义,也为抗逆的分子生物学研究开辟了新思路,受到了学术界广泛的关注。随着越来越多扩展

蛋白基因的鉴定、克隆和功能分析,扩展蛋白在植物生命活动过程中的重要性将得以进一步的解析。

扩展蛋白是一个庞大的基因家族,每一个植物品种中都包含有几个到几十个家族成员不等。近几年来,随着越来越多植物基因组测序的完成,人们对扩展蛋白基因家族的认识越来越深入,伴随着更多的科学问题随之而来,如扩展蛋白基因家族如何演变而来?不同家族成员的功能如何?家族成员相互之间的关联和协调怎样?扩展蛋白基因表达调控的机制是什么?扩展蛋白基因的应用潜力怎样?所有这些问题的解释,还需要学术界更多的努力进行更深入的挖掘。

### 参 考 文 献

- [1] MCQUEEN-MASON S J, DURACHKO D M, COSGROVE D J. Two endogenous proteins that induce cell-wall extension in plants [J]. *The Plant Cell*, 1992, 4: 1425-1433.
- [2] LI Y, JONES L, MCQUEEN-MASON S J. Expansins and cell growth [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2003, 6(6): 603-610.
- [3] MA J L, ZHANG Z D, ANN L T, et al. The role of expansin in the fruit growth and development [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2003, 30(4): 492-495.
- [4] 金慧清, 陈英豪, 金勇丰. Expansin(细胞壁松弛蛋白)的发展 [J]. 生命科学, 2006, 18(2): 168-174.
- [5] 牛艳梅, 沈文涛, 周鹏, 等. Expansin 超级家族的进化与命名 [J]. 广东农业科学, 2007(8): 133-135.
- [6] 王玮, 赵新西, 马千全, 等. 扩展蛋白生理与分子生物学 [J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(1): 1-6.
- [7] LEE Y, CHOI D, KENDE H. Expansins: Ever-expanding numbers and functions [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2001, 4(6): 527-532.
- [8] 孙涌栋, 罗未蓉, 张传来. 扩展蛋白家族蛋白序列分析 [J]. 生物信息学, 2009, 7(3): 193-195.
- [9] LI Y, DARLEY C P, ONGARO V, et al. Plant expansins are a complex multigene family with an ancient evolutionary origin [J]. *Plant Physiology*, 2002, 128(3): 854-864.
- [10] COSGROVE D J. Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility [J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1999, 50: 391-417.
- [11] 阎伯旭, 曲音波, 高培基. 色氨酸残基在内切葡聚糖酶分子中的作用 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 1998, 14(2): 181-185.
- [12] 高英, 王学臣. 扩展蛋白(Expansin)研究进展 [J]. 中国农学通报, 2005, 21(7): 82-86.
- [13] COSGROVE D J. Loosening of plant cell walls by expansins [J]. *Nature*, 2000, 407: 321-326.
- [14] CHEN F, KENT J B. Expression of an expansin is associated with endosperm weakening during tomato seed germination [J]. *Plant Physiology*, 2000, 124: 1265-1274.
- [15] CHEN F, DAHAL P, BRADFORD K J. Two tomato expansin genes show divergent expression and localization in embryos during seed development and germination [J]. *Plant Physiology*, 2001, 127: 928-936.
- [16] CHOI D, LEE Y, CHO H, et al. Regulation of expansin gene expression affects growth and development in transgenic rice plants [J]. *The Plant Cell*, 2003, 15: 1386-1398.
- [17] CHO H T, COSGROVE D J. Regulation of root hair initiation and expansin gene [J]. *The Plant Cell*, 2002, 14: 3237-3253.
- [18] LEE D K, AHN J H, SONG S K, et al. Expression of an expansin gene is correlated with root elongation in soybean [J]. *Plant Physiology*, 2003, 131: 985-997.
- [19] 王桂凤, 施季森. 杉木木材形成过程中差异表达基因的鉴定与功能分析 [D]. 南京: 南京林业大学, 2008.
- [20] CHO H T, COSGROVE D J. Altered expression of expansin modulates leaf growth and pedicel abscission in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(17): 9783-9788.
- [21] STEPHANE P S, WYRZYKOWSKA J, MCQUEEN-MASON S J, et al. Local expression of expansin induces the entire process of leaf development and modifies leaf shape [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(20): 11812-11817.
- [22] COSGROVE D J, BEDINGER P, DURACHKO D M. Group I allergens of grass pollen as cell wall-loosening agents [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(2): 6559-6564.
- [23] FLEMING A J, MCQUEEN-MASON S J, MANDEL T, et al. Induction of leaf primordial by the cell wall protein expansin [J]. *Science*, 1997, 276(5317): 1415-1418.
- [24] DOWNES B P, STEINBAKER C R, CROWELL D N. Expression and processing of a hormonally regulated  $\beta$ -expansin from soybean [J]. *Plant Physiology*, 2001, 126: 244-252.
- [25] PEZZOTTI M, FERON R, MARIANI C. Pollination modulates expression of the *PPAL* gene, a pistil-specific  $\beta$ -expansin [J]. *Plant Mol Biol*, 2002, 49(20): 187-197.
- [26] MBEGUIE A M, GOUBLE B, GOMEZ R M, et al. Two expansin cDNAs from *Prunus armeniaca* expressed during fruit ripening are differently regulated by ethylene [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2002, 40: 445-452.
- [27] HARRISON E P, MCQUEEN-MASON S J, MANNING K. Expression of six expansin genes in relation to extension activity in developing strawberry fruit [J]. *J Exp Bot*, 2001, 52(360): 1437-1446.
- [28] YOO S D, GAO Z F, CANTINI C, et al. Fruit ripening in sour cherry: Changes in expression of genes encoding expansins and other cell-wall-modifying enzymes [J]. *J Am Soc Hortic Sci*, 2003, 128: 16-22.
- [29] OBENLAND D M, CRISOSTO C H, ROSE J K C. Expansin protein levels decline with the development of mealiness in peaches [J]. *Postharvest Biol Technol*, 2003, 29: 1-18.
- [30] SE J K C, BENNETZEN A B. Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell wall: Parallels between cell expansion and fruit ripening [J]. *Trends Plant Sci*, 1999, 4: 176-183.
- [31] OBENLAND D M, CRISOSTO C H, ROSE J K C. Expansin protein levels decline with the development of mealiness in peaches [J]. *Postharvest biology and technology*, 2003, 29: 11-18.

- [32] BRUMMELL D A, HARPSTER M H, DUNSMUIR P. Differential expression of expansin gene family members during growth and ripening of tomato fruit [J]. *Plant Mol Biol*, 1999, 39(1): 161-169.
- [33] CIVELLO P M, POWELL A L T, SABEHAT A, et al. An expansin gene expressed in ripening strawberry fruit [J]. *Plant Physiology*, 1999, 121(4): 1273-1279.
- [34] THEOLOGIS A, OELLER PW, WONG L, et al. Use of a tomato mutant constructed with reverse genetics to study fruit ripening, a complex developmental process [J]. *Dev Genet*, 1993, 14(4): 282-295.
- [35] 胡守景, 张治礼, 黄荣峰. 植物应答干旱胁迫的基因表达调控 [J]. 中国农业科技导报, 2008, 10(4): 1-6.
- [36] WU Y, SHARP R E, DURACHKO D M, et al. Growth maintenance of the maize primary root at low water potentials involves increases in cell wall extensibility, expansins activity and wall susceptibility to expansins [J]. *Plant Physiology*, 1996, 111: 765-772.
- [37] WANG S P, LI X H, XU C G, et al. Activation of the indole-3-acetic acid-amido synthetase *GH3-8* suppresses expansin expression and promotes salicylate- and jasmonate-independent basal immunity in rice [J]. *The Plant Cell*, 2008, 20(1): 228-240.
- [38] XU J C, TIAN J, BELANGER F C, et al. Identification and characterization of an expansin gene *AsEXP1* associated with heat tolerance in *C<sub>3</sub>* *Agrostis* grass species [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2007, 58(13): 3789-3796.
- [39] 荆赞革, 柳李旺, 龚义勤, 等. 萝卜扩展蛋白基因 *RsEXPB1* 克隆与表达特征分析 [J]. 分子植物育种, 2009, 7(4): 801-805.
- [40] COSGROVE D J. New genes and new biological roles for expansins [J]. *Curr Opin Plant Biology* 2000, 3(1): 73-78.
- [41] CHO H T, KENDE H T. Tissue localization of expansins in deepwater rice [J]. *Plant Journal*, 1998, 15: 805-812.
- [42] HUTCHISON K W, SINGER P B, MCINNIS S, et al. Expansins are conserved in conifers and expressed in hypocotyls in response to exogenous auxin [J]. *Plant Physiology*, 1999, 120(3): 827-831.
- [43] VRIEZEN W H, MARIANI C, VOESENEK L J, et al. Submergence induces expansin gene expression in flooding-tolerant *Rumex palustris* and not in flooding-intolerant *R. acetosa* [J]. *Planta*, 2000, 210: 956-963.
- [44] 高英, 王学臣. 扩张蛋白与旱稻抗旱性关系的研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2003.
- [45] CHO H T, KENDE H. Expression of expansin genes is correlated with growth in deepwater rice [J]. *The Plant Cell*, 1997, 9: 1661-1671.
- [46] XUE Z H, KOU X H, LUO Y B, et al. Effect of ethylene on polygalacturonase, lipoxygenase and expansin in ripening of tomato fruits [J]. *Transactions of Tianjin University*, 2009, 15: 173-177.
- [47] ROSE J K C, LEE H H, BENNETT A B. Expression of a divergent gene is fruit-specific and ripening-regulated [J]. *Proc Nail Acad Sci USA*, 1997, 94(11): 5955-5960.
- [48] JOSEPH R E, RONALD W D. Plant defense genes are regulated by ethylene [J]. *Proc Nail Acad Sci USA*, 1987, 84: 5202-5206.
- [49] CORBIN D R, SAUER N, LAMB C J. Differential regulation of a hydroxyproline-rich glycoprotein gene family in wounded and infected plants [J]. *Mol Cell Biol*, 1987, 7(12): 4337-4344.
- [50] AVERYHART-FULLARD V, DATTA K, MARCUS A. A hydroxyproline-rich protein in the soybean cell wall [J]. *Proc Nail Acad Sci USA*, 1988, 85: 1082-1085.

(责任编辑 李 娟)