

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2020.92060

## *OsRPK1* 基因过表达和 RNA 干涉对水稻苗期耐盐性的影响

李晶岚\*\* 陈鑫欣\*\* 石翠翠 刘方惠 孙 静 葛荣朝\*

河北师范大学生命科学学院, 河北石家庄 050024

**摘 要:** 水稻 *OsRPK1* 基因属于富含亮氨酸重复序列的类受体蛋白激酶, 在盐胁迫下其表达量暂时升高后出现明显下降。前期研究表明, *OsRPK1* 基因过表达会造成拟南芥非生物胁迫耐受性明显降低。本研究对 *OsRPK1* 基因在水稻中实现过表达和 RNA 干涉, 进而对 *OsRPK1* 的抗逆性功能加以探究。结果表明, *OsRPK1* 基因表达量增加时, 水稻幼苗表现为耐盐性下降; RNA 干涉则使水稻幼苗表现为耐盐性增加。盐胁迫后 *OsRPK1* 过表达植株脯氨酸含量低于野生型、MDA 含量和相对电导率显著高于野生型, 而 *OsRPK1*-RNAi 水稻植株的脯氨酸含量显著高于野生型、MDA 含量和相对电导率显著低于野生型。因此, *OsRPK1* 基因的表达量对水稻耐盐性具有明显影响, 脯氨酸含量及细胞质膜受损程度的改变可能是造成转基因水稻耐盐性变化的内在原因。本研究为进一步阐明 *OsRPK1* 基因的抗逆作用机制奠定了基础, 对于通过调整该基因表达改良水稻的耐盐性具有重要意义。

**关键词:** 水稻; *OsRPK1* 基因; 过表达; RNA 干涉; 生理指标

## Effects of *OsRPK1* gene overexpression and RNAi on the salt-tolerance at seedling stage in rice

LI Jing-Lan\*\*, CHEN Xin-Xin\*\*, SHI Cui-Cui, LIU Fang-Hui, SUN Jing, and GE Rong-Chao\*

College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050024, Hebei, China

**Abstract:** *OsRPK1* is a leucine-rich repeat receptor-like protein kinase (LRR-RLK) gene in rice, and its expression level decreases evidently after temporarily increasing under salt stress. Previous studies have shown that the overexpression of *OsRPK1* can significantly reduce the abiotic stress tolerance of *Arabidopsis*. In this study, *OsRPK1* gene was overexpressed and RNA interfered in rice. The salt tolerance of the 35S:*OsRPK1* rice seedlings was significantly lower than that of the control plants. The *OsRPK1*-RNAi rice seedlings exhibited higher salt tolerance than the wild-type plants. The proline content of *OsRPK1* overexpressed plants was lower than that of the wild type, MDA content and relative conductivity were significantly higher than those of the wild type, while the proline content of *OsRPK1*-RNAi rice plants was significantly higher than those of wild type, MDA content and relative conductivity were significantly lower than those of wild type. The results of this study indicate that *OsRPK1* plays an important role in salt tolerance of rice. The changes of proline content and the damage degree of cytoplasmic membrane may be the internal reasons for the salt-tolerance variations of the transgenic rice lines. This study lays a foundation for further elucidating the resistance mechanism of *OsRPK1* gene, which is very important for cultivating salt-tolerance rice by adjusting the expression of *OsRPK1* gene.

**Keywords:** rice; *OsRPK1* genes; overexpressed; RNA interference; physiological indexes

目前土壤盐渍化在全世界范围严重影响着农业生产<sup>[1]</sup>。我国在东北、西北、华北及滨海地区也分布着大面积的盐碱地, 盐碱化耕地面积达 $6.7 \times 10^6$  hm<sup>2</sup>,

占全国耕地总面积的25%左右<sup>[2-3]</sup>。因此, 在我国农作物育种工作中选育耐盐碱的优良品种显得尤为重要。其中探究耐盐相关基因、研究其耐盐内在生理

本研究由国家自然科学基金项目(30900104)和河北省自然科学基金项目(C2016205158)资助。

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (30900104) and the Hebei Provincial Natural Science Foundation (C2016205158).

\* 通信作者(Corresponding author): 葛荣朝, E-mail: grcgp@sina.com

\*\* 同等贡献(Contributed equally to this work)

第一作者联系方式: 李晶岚, E-mail: 83494429@qq.com; 陈鑫欣, E-mail: 1046433763@qq.com

Received (收稿日期): 2019-11-25; Accepted (接受日期): 2020-03-24; Published online (网络出版日期): 2020-04-21.

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.s.20200421.1254.004.html>

机制,成为耐盐碱农作物选育的重要研究方向之一。植物对逆境胁迫应答反应是一个涉及多基因、多信号传导途径及多基因表达产物的复杂过程,这一过程中蛋白激酶是植物体内一类重要的调节因子,通过膜受体蛋白激酶感知外界环境胁迫信号,导致细胞内 $Ca^{2+}$ 、 $Na^+/K^+$ 、ABA(脱落酸)等离子和分子浓度改变,进而激活不同蛋白磷酸化途径,调控下游抗逆基因的转录表达,启动相应的生理生化等适应性反应来降低或消除危害<sup>[4-6]</sup>。

类受体蛋白激酶(receptor-like kinase, RLK)属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,通过Ser/Thr残基的磷酸化和脱磷酸化,控制下游靶蛋白的开启和关闭,将胞外信号转换为胞质信号进而诱导特定功能基因的表达<sup>[7-8]</sup>。目前,人们已经从玉米、拟南芥、水稻、小麦等多种高等植物基因组中克隆出大量的RLK基因。类受体蛋白激酶参与了植物体一系列的发育过程,如调节原韧皮部和分生组织的生长<sup>[9]</sup>、影响茎和导管的生长发育<sup>[10]</sup>、抑制器官脱落<sup>[11]</sup>、调控花药的生长发育<sup>[12]</sup>以及维持植物细胞壁的完整性<sup>[13]</sup>。大量的RLK家族成员也被证实参与了植物对病原体入侵<sup>[14-16]</sup>、非生物胁迫的防御反应<sup>[17-23]</sup>。富含亮氨酸重复序列的类受体蛋白激酶(leucine-rich repeat receptor-like kinase, LRR-RLK)是在植物中广泛存在的、与抗逆性密切相关的类受体激酶,其LRR单元的氨基酸序列一般为LXXLXXLXXLXXNXLXGXIPXX(X为任意氨基酸)<sup>[24]</sup>。AtRPK1具有2个胞外LRR结构,在ABA、脱水、高盐和低温等胁迫下,AtRPK1基因转录水平明显增加<sup>[25]</sup>。AtRPK1在拟南芥对ABA的早期识别中发挥重要作用,在发芽、生长和气孔关闭期间,AtRPK1基因的抑制表达将降低植物对脱落酸识别的敏感性<sup>[26]</sup>。在野生型拟南芥中过表达AtRPK1增加了植株对ABA的敏感性<sup>[19]</sup>。水稻抗白叶枯病基因Xa21、番茄的抗病基因Cf9和Cf2在结构上均具有胞外LRR区,Cf9蛋白有28个LRR单元,Cf2蛋白有38个LRR单元<sup>[22-23]</sup>。

水稻基因Os07g0602700(OsRPK1)与拟南芥基因AtRPK1序列具有高度的同源性。OsRPK1蛋白质长度为1084个氨基酸,约为AtRPK1蛋白质(540个氨基酸)的2倍,其胞外部分明显具有2个LRR单元的聚集区域,1~355位氨基酸区域具有7个LRR单元,355~685位氨基酸区域具有6个LRR单元,其后685~801位氨基酸区域为跨膜区(MSD)。前期实验表明,AtRPK1、OsRPK1基因过表达拟南芥与对照植株相比表现出对NaCl和ABA的耐受性明显降低。

AtRPK1-RNAi拟南芥与野生型拟南芥相比,对NaCl和ABA的耐受性得到明显提高<sup>[27]</sup>。本文拟通过对基因OsRPK1在水稻中实现过量表达及RNA干涉,进一步研究OsRPK1的抗逆性功能。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

供试水稻品种为日本晴(*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare)、水稻RNAi载体pTCK303由本室保存;RNA提取试剂、DNA限制性内切酶、PrimerSTAR DNA聚合酶、T<sub>4</sub>-DNA连接酶、qRT-PCR荧光酶、反转录试剂盒均购自TaKaRa公司;PCR引物均由生物工程(上海)股份有限公司合成。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 OsRPK1基因在盐胁迫下的表达模式分析

将10日龄水稻幼苗移栽到140 mmol L<sup>-1</sup> NaCl溶液中处理0、1、6、24 h后,剪取幼苗叶片,提取总RNA,反转录获得cDNA,利用Actin基因调整cDNA浓度使其一致,然后利用LP-q: 5'-GCTATGGTGTGTACTGATGGAGT-3'、RP-q: 5'-GTGCACATCACTGCTAAATGCAATG-3'对不同处理的cDNA进行qRT-PCR检测,重复检测3次确定OsRPK1基因在盐胁迫后的表达模式。

#### 1.2.2 OsRPK1基因过量表达与RNAi表达载体的构建

提取水稻总RNA,反转录获得cDNA,利用引物PU: 5'-GCTCTAGACTAGCTAGCTCCCACC-3' (酶切位点Xba I)和PD: 5'-GCTCTAGAGTTGAA TGTGTAATCATCGGT-3' (酶切位点Xba I)扩增获得基因OsRPK1,构建到表达载体pCambia1300上,获得过量表达载体p1300:35S:OsRPK1。

选取OsRPK1基因距转录起始点69~419 bp区域和2043~2371 bp区域作为RNAi的干涉序列,分别命名为OsRPK1-RNAi-1和OsRPK1-RNAi-2。以p1300:35S:OsRPK1质粒为模板,用引物LP-1: 5'-GACTAGTGGTACCATCACTCTCTCCTCCTCCTG-3' (酶切位点Spe I、Kpn I)和RP-1: 5'-GGAGCTCGGATCCCGGCGGAGCGACCAGAT-3' (酶切位点Sac I、BamH I),采用PrimerSTAR DNA聚合酶进行PCR扩增,得到350 bp目的片段,回收、连接到pMD18-T载体pMD18-OsRPK1-RNAi-1,转化到DH5 $\alpha$ 进行测序。提取pTCK303和pMD18-T-OsRPK1-RNAi-1的质粒,首先采用内侧酶Kpn I/BamH I进行双酶切,电泳、回收、连接、转化到大肠杆菌,酶切鉴定获得正连载体pTCK303-OsRPK1-

RNAi-antisense-1; 提取 pTCK303-*OsRPK1*-RNAi-antisense-1 和 pMD18-T-*OsRPK1*-RNAi-1 质粒, 采用外侧酶 *Spe* I/*Sac* I 进行双酶切, 回收、连接、构建获得 RNAi 表达载体 pTCK303-*OsRPK1*-RNAi-sense-1, 即 pTCK303-*OsRPK1*-RNAi-1 载体。

利用引物 LP-2: 5'-GACTAGTGGTACCGTTCCGTGTGATAGCGTTATTGG-3' (酶切位点 *Spe* I、*Kpn* I) 和 RP-2: 5'-GGAGCTCGGATCCTGATTGGCACTCCGATGTCTTG-3' (酶切位点 *Sac* I、*Bam*H I), 用相同的方法构建获得 RNAi 表达载体 pTCK303-*OsRPK1*-RNAi-sense-2, 即 pTCK303-*OsRPK1*-RNAi-2 载体。

1.2.3 水稻愈伤组织的遗传转化及鉴定 对日本晴水稻种子消毒后, 均匀铺于诱导培养基(NB 培养基+2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D)诱导愈伤组织, 28 ℃ 暗培养 25~28 d。挑选光滑、淡黄色、较硬的胚性愈伤组织, 均匀铺放在新鲜 NB 培养基上继代培养 3~4 d。然后将胚性愈伤组织转移到无菌培养皿中, 倒入适量的农杆菌悬浮液, 室温放置 10~20 min, 并不时晃动。取出愈伤组织用无菌滤纸吸去多余的菌液, 接种到固体共培养培养基(NB 培养基+100 μmol L<sup>-1</sup> 乙酰丁香酮, pH 5.5), 28 ℃ 暗培养 2~3 d。随后, 将经过共培养的愈伤组织转移到无菌培养皿, 用无菌水冲洗 2~3 次。将愈伤组织转入含潮霉素的选择性培养基(NB 培养基+羧苄青霉素 500 mg L<sup>-1</sup>+潮霉素 50 mg L<sup>-1</sup>), 28 ℃ 避光培养 7 d。第 2 轮筛选培养基为 NB 培养基+羧苄青霉素 250 mg L<sup>-1</sup>+潮霉素 50 mg L<sup>-1</sup>, 在 28 ℃ 培养箱避光继续培养 2 周。然后, 选择生长旺盛的抗性愈伤组织转移到分化培养基(NB 培养基+2.5 mg L<sup>-1</sup> KT+0.5 mg L<sup>-1</sup> NAA+羧苄青霉素 250 mg L<sup>-1</sup>+潮霉素 50 mg L<sup>-1</sup>), 于 28 ℃、12 h 光照/12 h 黑暗条件下培养。分化的幼苗长到 2 cm 左右时, 将其移到壮苗培养基(1/2 MS +1/2 B5 维生素+10 g L<sup>-1</sup> 蔗糖+50 mg L<sup>-1</sup> 潮霉素)。继续培养幼苗长到瓶口时, 打开瓶盖、加入少量水, 将其于自然状态下炼苗 1 周左右。然后将幼苗移入营养土中, 将成活的幼苗移栽至大田, 培养、收取种子。

利用上述方法, 将已构建好的过量表达载体 p1300:35S:*OsRPK1*、RNAi 表达载体 pTCK303-*OsRPK1*-RNAi-1 和 pTCK303-*OsRPK1*-RNAi-2 转入农杆菌 EHA105 后, 对水稻愈伤组织进行遗传转化, 最终得到 35S:*OsRPK1*、*OsRPK1*-RNAi-1 和 *OsRPK1*-RNAi-2 水稻种子。用 RT-PCR 检测 35S:*OsRPK1* 和

RNAi 水稻的基因表达。

质粒 pTCK303 携带 GUS 报告基因, 因此在转化水稻愈伤组织过程中, 可以对愈伤组织及分化幼苗进行 GUS 基因表达的组织化学染色进行转基因初步鉴定。具体方法是将准备好的愈伤组织、幼苗用蒸馏水冲洗干净后放入 EP 管中, 加入染色液(50 μL X-Gluc 母液 + 950 μL 基液)浸没样品, 封好盖子。37 ℃ 培养箱中避光温育 1~12 h。将浸染过的样品转入 95%乙醇中脱色 2~3 次, 至阴性对照材料呈白色为止, 在体视显微镜下观察拍照。

1.2.4 转基因水稻的耐盐性检测 选取 p1300:35S:*OsRPK1*、pTCK303-*OsRPK1*-RNAi-1 和 pTCK303-*OsRPK1*-RNAi-2 转基因水稻 T<sub>1</sub> 代株系, 在潮霉素水(50 mg L<sup>-1</sup>)中浸泡, 筛选出生根长芽的阳性苗, 挑选生长状态基本一致的转基因水稻移栽入微孔板中, 用含有 0 mmol L<sup>-1</sup>、140 mmol L<sup>-1</sup> NaCl 水稻营养液培养 7~10 d, 并以生长状态一致的野生型水稻作为对照进行耐盐性分析。

1.2.5 转基因水稻的生理指标检测 对正常培养 7 d 的野生型和转基因水稻幼苗分别用清水和 140 mmol L<sup>-1</sup> NaCl 溶液浇灌 6~10 d, 测定其脯氨酸含量、MDA 含量。

选取叶龄相似的对照日本晴水稻与转基因水稻的叶片, 剪成小块, 称取 0.2 g, 将叶片压入 10 mL 蒸馏水中, 真空抽气 1 h 后重新充入空气。将样品于室温搅动浸提 1 h 后, 用电导仪测定样品电导率。再将同样的叶片样品放入 100 ℃ 沸水浴 15 min, 转入清水中冷却 10 min, 测定其煮沸电导率。相对电导率(%) = (处理电导率 - 空白电导率) / (煮沸电导率 - 空白电导率) × 100%。

## 2 结果与分析

### 2.1 盐胁迫后 *OsRPK1* 基因在水稻中的表达模式

对 10 日龄水稻幼苗用 140 mmol L<sup>-1</sup> NaCl 溶液处理 0、1、6、24 h, 分别取叶片提取总 RNA, 反转录获得 cDNA。qRT-PCR 检测表明, 水稻中 *OsRPK1* 基因在盐胁迫后 1 h 出现暂时的应激性增加, 在胁迫 6 h 时表达量出现持续下降, 胁迫 24 h 时, 表达量比对照显著下降(图 1)。

### 2.2 *OsRPK1* 过表达和 RNAi 转基因水稻的获得

2.2.1 *OsRPK1* 过表达载体的构建 以水稻日本晴基因组 cDNA 为模板, 扩增得到 *OsRPK1* 基因 3317 bp 的目的条带。测序正确后, 对 pMD18-T-

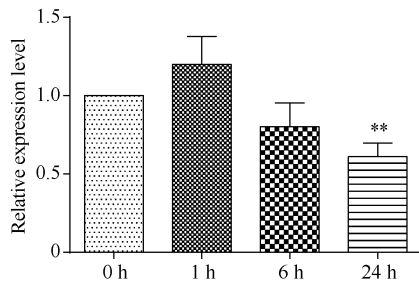


图 1 *OsRPK1* 基因在 140 mmol L<sup>-1</sup> NaCl 胁迫的水稻中表达量的变化

Fig. 1 Changes of the expression of *OsRPK1* gene in rice under 140 mmol L<sup>-1</sup> NaCl stress

差异显著性分析采用 *t*-test 方法, \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001。

The significant difference was evaluated by the Student's *t*-test. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001.

*OsRPK1* 质粒进行 *Xba* I 单酶切, 电泳后回收、纯化 3317 bp 目的 DNA 条带。将该基因与 p1300 表达载体重组融合, 对阳性克隆进行酶切鉴定后, 测序判断插入方向正确, 获得过量表达载体 p1300:35S:*OsRPK1*。

2.2.2 *OsRPK1*-RNAi 表达载体的构建 利用设计的 LP-1、RP-1 和 LP-2、RP-2 两对引物, PCR 扩增得到两段长度分别为 350 bp、328 bp 的 *OsRPK1* 特异性序列, 对 PCR 产物电泳、回收、连接到 pMD18-T 载体上, 进行双酶切鉴定、测序。测序正确的质粒分别命名为 pMD18-T-*OsRPK1*-RNAi-1、pMD18-T-*OsRPK1*-RNAi-2。用内侧酶 *Kpn* I/*Bam*HI 分别酶切两种 RNAi T 载体和 pTCK303 载体, 回收目标片段进行连接、转化、酶切鉴定, 分别命名为新构建的载体 pTCK303-*OsRPK1*-RNAi-antisense-1、pTCK303-*OsRPK1*-RNAi-antisense-2。然后用外侧酶 *Sac* I/*Spe* I 双酶切两种 RNAi T 载体质粒和两种 pTCK303-*OsRPK1*-RNAi-antisense 质粒, 回收目的片段进行连接转化, 用 *Bam*HI 单酶切鉴定分别得到 1199 bp、1155 bp 的 DNA 片段, 鉴定表明连接正确, 分别命名质粒为 pTCK303-*OsRPK1*-RNAi-sense-1、pTCK303-*OsRPK1*-RNAi-sense-2, 成功构建获得水稻 pTCK303-*OsRPK1*-RNAi-1、pTCK303-*OsRPK1*-RNAi-2 载体。

2.2.3 水稻愈伤组织的培养与转化 将消毒好的水稻种子在诱导培养基培养得到愈伤组织, 选择光滑、淡黄色、较硬、大小为 2~3 mm 的胚性愈伤组织, 转移到继代培养基上继续培养 3~4 d; 利用含有 p1300:35S:*OsRPK1*、pTCK303-*OsRPK1*-RNAi-1 和 pTCK303-*OsRPK1*-RNAi-2 的农杆菌 EHA105 转化

水稻愈伤组织, 平铺于带有滤纸的固体共培养培养基上暗培养 3 d; 然后将愈伤组织转移至含有潮霉素的第 1 次选择培养基上, 7 d 后将淡黄色、生长状态良好的愈伤组织转移到第 2 次选择培养基上进行筛选; 培养 2 周后, 将黄色、生长活性良好的愈伤组织转移至分化培养基上; 分化培养至发绿、生长出幼苗; 最后将生长出的幼苗进行壮苗、炼苗; 然后移栽到营养土中, 等其适应外部环境后再栽种到大田, 培养、收获种子。将 RNAi 转基因后的水稻愈伤组织和幼苗在 GUS 染液中染色, 初步确定 RNAi 质粒对水稻的成功转化。

## 2.3 水稻 *OsRPK1* 转基因植株的鉴定和耐盐性检测

2.3.1 水稻 *OsRPK1* 转基因植株的鉴定 分别选取 T<sub>1</sub> 代 p1300:35S:*OsRPK1*、pTCK303-*OsRPK1*-RNAi-1 和 pTCK303-*OsRPK1*-RNAi-2 转基因水稻的 OX1、OX2、OX3 三个株系和对照日本晴水稻, 提取总 RNA, 反转录获得 cDNA, 根据 *OsRPK1* 序列 3' 端设计的引物 LP-q 和 RP-q, 进行 qRT-PCR 扩增检测表明, 在模板量相同的条件下, 35S:*OsRPK1* 水稻相对于对照水稻日本晴表达量显著上升; *OsRPK1*-RNAi 转基因水稻相对于对照水稻日本晴表达量则显著减弱, 其中利用基因编码区 5' 区域作为 RNAi 干扰序列的 *OsRPK1*-RNAi-1 表达量下降更为显著(图 2)。

### 2.3.2 水稻 *OsRPK1* 转基因植株的耐盐性检测

分别选取 p1300:35S:*OsRPK1*、pTCK303-*OsRPK1*-RNAi-1 和 pTCK303-*OsRPK1*-RNAi-2 T<sub>1</sub> 代转基因水稻的不同株系, 以水稻日本晴作为对照

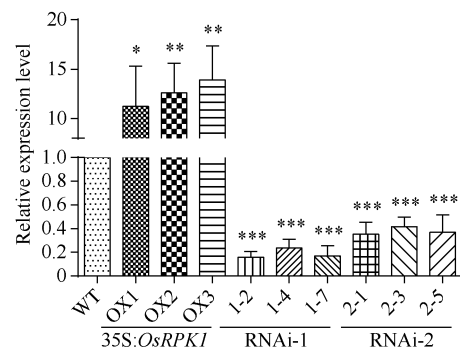


图 2 35S:*OsRPK1* 植株与 *OsRPK1*-RNAi 植株的 qRT-PCR 检测  
Fig. 2 qRT-PCR identify of the 35S:*OsRPK1* plants and *OsRPK1*-RNAi plants

差异显著性分析采用 *t*-test 方法, \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001。

The significant difference was evaluated by the Student's *t*-test. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001.

进行幼苗耐盐性分析。

正常水培条件下, *OsRPK1* 过表达水稻与对照日本晴的长势无明显差异(图 3-A)。140 mmol L<sup>-1</sup> NaCl 胁迫处理 6 d 后, *OsRPK1* 过表达水稻幼苗叶片出现明显干枯萎蔫现象, 而对照日本晴水稻受盐胁迫损伤较轻, 依旧有很多绿色叶片(图 3-B), 恢复培养 9 d 后, 过表达植株绝大多数都干枯萎蔫, 出现失绿现象, 而对照水稻依旧有部分植株存活(图 3-C)。存活率统计表明, 野生型水稻约为 61%, 而 *OsRPK1* 过表达水稻 OX1、OX2、OX3 株系则分别仅有 5.57%、6.67%、4.43%, 耐盐性明显下降(图 3-D)。

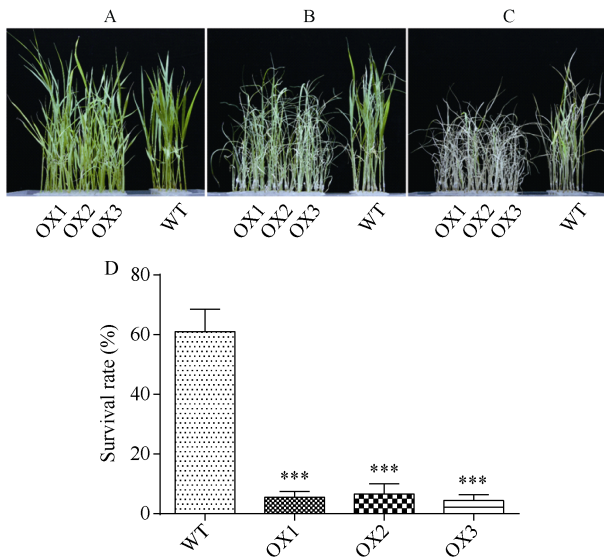


图 3 *OsRPK1* 过表达水稻在盐胁迫下的生长情况

Fig. 3 Salt tolerance of the *OsRPK1* overexpressing plants

A: NaCl 胁迫前; B: 140 mmol L<sup>-1</sup> NaCl 胁迫 6 d; C: 140 mmol L<sup>-1</sup> NaCl 胁迫后恢复 9 d; D: 盐胁迫恢复培养后存活率统计。差异显著性分析采用 *t*-test 方法, \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001。A: rice seedling without NaCl stress; B: treated with 140 mmol L<sup>-1</sup> NaCl for 6 days; C: recovery for nine days after 140 mmol L<sup>-1</sup> NaCl stress; D: survival rate after renewing culture under salt stress. The significant difference was evaluated by the Student's *t*-test. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001.

在正常水培条件下, *OsRPK1*-RNAi-1 水稻与对照日本晴的长势均无明显差异(图 4-A)。在 140 mmol L<sup>-1</sup> NaCl 胁迫 10 d 后, *OsRPK1*-RNAi-1 转基因水稻与对照水稻相比存活绿叶更多, 生长状态较好; *OsRPK1*-RNAi-2 转基因水稻在盐胁迫后也具有比对照野生型水稻更多的绿叶(图 4-B)。恢复培养 7 d 后, *OsRPK1*-RNAi-1 转基因水稻表现仍较葱绿, 但是对照日本晴已经全部干枯, 无法存活; 其中 *OsRPK1*-RNAi-2 转基因水稻在盐胁迫后的抗逆性与

对照植株差异并不显著, 幼苗也基本枯萎(图 4-C)。最终野生型水稻存活率为 1%左右, 而 *OsRPK1*-RNAi 水稻株系存活率均明显较高, 其中表达量抑制效果更好的 *OsRPK1*-RNAi-1 株系 1-2、1-4、1-7 存活率更高, 达到 50%~77%; 而 RNA 干涉区域设计在开放阅读框 3'下游区域的 *OsRPK1*-RNAi-2 株系 2-1、2-3、2-5 存活率约为 27%~32% (图 4-D, E)。

*OsRPK1* 在水稻中的过量表达降低了植株对盐胁迫的耐受性; 而 *OsRPK1* 的表达被干涉后, *OsRPK1*-RNAi 水稻对盐的耐受性有所提高, 与过表达植株的表型正好相反。

## 2.4 水稻 *OsRPK1* 转基因植株的生理指标检测

2.4.1 脯氨酸含量的检测 选取 p1300:35S:*OsRPK1*、两种 *OsRPK1*-RNAi 转基因水稻和对照水稻日本晴植株, 分别用清水和 140 mmol L<sup>-1</sup> NaCl 溶液浇灌, 然后测定其脯氨酸含量表明, 盐胁迫前, *OsRPK1* 过表达水稻、两种 *OsRPK1*-RNAi 水稻和野生型水稻植株的脯氨酸含量均无明显差异; 盐胁迫后, *OsRPK1* 过表达植株脯氨酸含量显著低于对照水稻, 而 *OsRPK1*-RNAi 水稻的脯氨酸含量显著高于对照植株(图 5)。

*OsRPK1* 过表达植株体内脯氨酸合成不足可能是造成植株盐敏感的原因之一, 而 *OsRPK1*-RNAi 植株体内有更多的脯氨酸从而提高了水稻植株对盐的耐受性。

2.4.2 MDA 含量的检测 对 p1300:35S:*OsRPK1*、两种 *OsRPK1*-RNAi 转基因水稻和对照水稻植株, 分别用清水和 140 mmol L<sup>-1</sup> NaCl 溶液浇灌培养, 然后测定其 MDA 含量。表明, 胁迫前 *OsRPK1* 过表达水稻、*OsRPK1*-RNAi 水稻和野生型日本晴水稻的 MDA 含量无明显差异; 胁迫后所有水稻植株的 MDA 含量均显著升高, 其中 *OsRPK1* 过表达水稻 MDA 含量显著高于野生型日本晴水稻, *OsRPK1*-RNAi 水稻的 MDA 含量均显著低于野生型日本晴水稻植株(图 6)。

在盐胁迫条件下, *OsRPK1* 过表达水稻植株细胞受损程度比野生型日本晴更高, *OsRPK1*-RNAi 水稻植株细胞受损程度比野生型日本晴低。

2.4.3 相对电导率的检测 *OsRPK1* 过表达水稻的相对电导率显著高于野生型日本晴水稻; 而 *OsRPK1*-RNAi 水稻植株的相对电导率则均显著低于野生型日本晴水稻(图 7)。



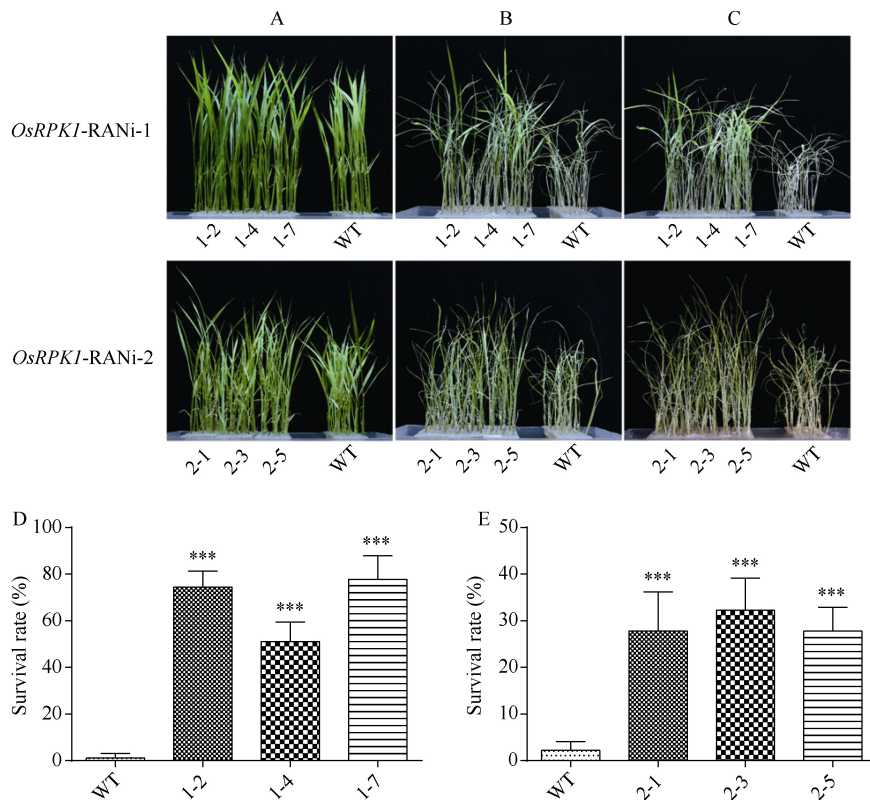


图 4 *OsRPKI*-RNAi 水稻在胁迫下生长情况

Fig. 4 Salt stress tolerance of the *OsRPKI*-RNAi rice plants

A: NaCl 胁迫前; B: 140 mmol L<sup>-1</sup> NaCl 胁迫 10 d; C: 140 mmol L<sup>-1</sup> NaCl 胁迫后恢复 7 d; D, E: 盐胁迫恢复培养后存活率统计。差异显著性分析采用 *t*-test 方法, \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001。

A: rice seedling without NaCl stress; B: treated with 140 mmol L<sup>-1</sup> NaCl for 10 days; C: recovery for seven days after 140 mmol L<sup>-1</sup> NaCl stress; D, E: survival rate after renewing culture under salt stress. The significant difference was evaluated by the Student's *t*-test. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001.

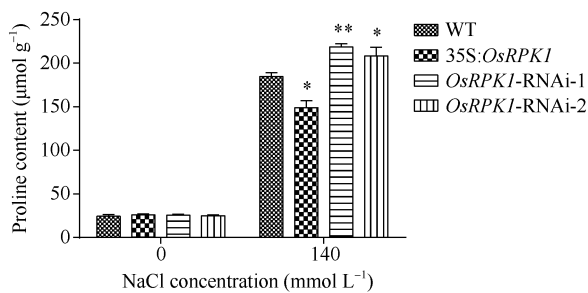


图 5 140 mmol L<sup>-1</sup> NaCl 盐胁迫后转基因水稻脯氨酸含量

Fig. 5 Proline content of transgenic rice plants after 140 mmol L<sup>-1</sup> NaCl treatment

差异显著性分析采用 *t*-test 方法, \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001。

The significant difference was evaluated by the Student's *t*-test. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001.

*OsRPKI* 基因过表达水稻在受到盐胁迫时, 可能会有更多的 Na<sup>+</sup>离子进入细胞之中, 从而表现出盐敏感表型; 而 *OsRPKI*-RNAi 水稻植株则由于较低的质膜透性, 盐胁迫时, 进入细胞的 Na<sup>+</sup>离子较少, 从而植株表现出对盐胁迫的耐受性。

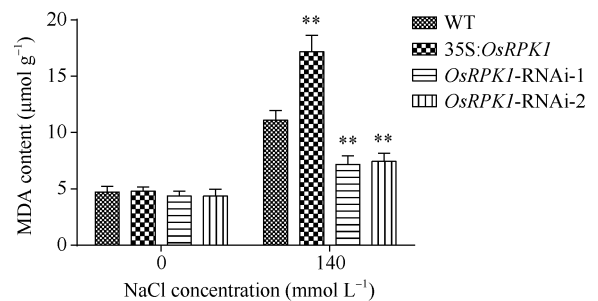


图 6 140 mmol L<sup>-1</sup> NaCl 盐胁迫后转基因水稻株系中 MDA 含量  
Fig. 6 MDA content of transgenic rice plants after 140 mmol L<sup>-1</sup> NaCl treatment

差异显著性分析采用 *t*-test 方法, \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001。

The significant difference was evaluated by the Student's *t*-test. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001.

### 3 讨论

类受体蛋白激酶在植物体内能够参与信号转导、抗逆反应和病原反应等途径, 对植物的抗逆信号传导具有重要意义。类受体激酶的表达量上升往

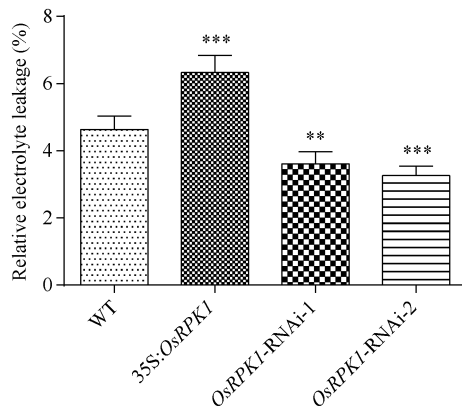


图 7 转基因水稻的相对电导率

Fig. 7 Relative electrical conductivity of transgenic rice plants. 差异显著性分析采用 *t*-test 方法, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

The significant difference was evaluated by the Student's *t*-test. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

往会提高植物体的抗逆性, 如 PnLRR-RLK27 的过量表达提高了拟南芥对盐、干旱、 $H_2O_2$  和 ABA 的耐受性<sup>[28]</sup>; 在拟南芥中类受体丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶基因 *GsRLCK* 的过量表达同样提高了转基因植株对盐、干旱和 ABA 的耐受性<sup>[29]</sup>; An 等<sup>[30]</sup>从辣椒中分离获得的 *CAMRP* 基因的表达使拟南芥提高了耐盐性和抗病性。同时, 一些类受体激酶的表达量上升也会造成植物抗逆性的下降, 如水稻类受体激酶 SIT1 可以被 NaCl 诱导表达量明显上升, 进而 SIT1 磷酸化 MAPK3/6, 介导细胞中的乙烯传导信号通路, 导致植物活性氧的产生和积累, 造成细胞生长受抑和死亡<sup>[31]</sup>。在苔藓中, 凝集素受体样激酶 PnLecRLK1 在低温、盐胁迫、干旱胁迫、外源 ABA 和茉莉酸甲酯胁迫下表达量迅速上升。过表达 PnLecRLK1 的转基因拟南芥对低温胁迫的耐受性增强, 而对 ABA 的耐受性明显减弱<sup>[32]</sup>。

*AtRPK1* 是 Hong 等在 1997 年从拟南芥中克隆到的受干旱、高盐及低温诱导的受体蛋白激酶基因。*AtRPK1* 在脱落酸诱导、脱水、高盐和低温等胁迫环境下转录水平明显增加<sup>[11]</sup>。*AtRPK1* 基因的过量表达造成了拟南芥的耐盐性明显下降, 而 *AtRPK1* 基因的表达受到抑制时, 拟南芥植株的耐盐性则明显得到提高。*OsRPK1* 与 *AtRPK1* 基因具有高度同源性, 前期研究表明, *OsRPK1* 基因过表达拟南芥与对照拟南芥相比, 其种子萌发、幼苗生长阶段对 NaCl 和 ABA 的耐性明显降低<sup>[27]</sup>。

本实验对 *OsRPK1* 基因在盐胁迫下的表达模式检测表明, 水稻受到盐胁迫时, *OsRPK1* 的表达量暂

时升高后, 明显下降。在水稻中实现 *OsRPK1* 的过量表达和 RNA 干扰, 结果表明 *OsRPK1* 基因表达量增加时, 水稻植株对盐胁迫表现为抗逆性明显降低; 在 RNA 干扰使其表达量下调后, 水稻植株则表现为耐盐性明显增加。通过生理检测发现, *OsRPK1* 过表达造成拟南芥质膜透性增加, 在受到盐胁迫时对细胞造成更大的损伤。前期亚细胞定位检测实验表明, *OsRPK1* 蛋白分布于细胞膜上, 且明显呈簇状分布, 这可能是过表达植株细胞膜通透性增加的原因之一。同时 *OsRPK1* 过表达拟南芥细胞内脯氨酸含量的减少, 使其在遭受盐胁迫时受到了更严重的渗透胁迫。无论在抗逆表型还是在生理指标的变化趋势方面, *OsRPK1* 基因在水稻中的表现与在转基因拟南芥中的表现一致<sup>[27]</sup>。

总之, 通过本实验证实, 在水稻中 *OsRPK1* 基因的过表达会明显降低植株的耐盐性, 而对 *OsRPK1* 基因表达抑制后, 减弱了盐胁迫对早期细胞质膜的损伤, 提高了水稻植株的耐盐性。在农作物育种方面, 对相应的 *RPK1* 基因敲除, 可能会获得耐盐性提高的品系, 为培育优良耐盐作物品种奠定了基础。

## 4 结论

水稻类受体蛋白激酶基因 *OsRPK1* 在盐胁迫下其表达量暂时升高后出现明显下降。*OsRPK1* 基因的表达量对水稻耐盐性具有明显影响, 其表达量增加时, 水稻幼苗耐盐性下降; *OsRPK1* 基因的 RNA 干扰则使水稻幼苗耐盐性增加。生理指标检测结果表明, 脯氨酸含量及细胞质膜受损程度的改变可能是造成转基因水稻耐盐性变化的内在原因。

## References

- [1] Liang W J, Ma X L, Wan P, Liu L Y. Plant salt-tolerance mechanism: a review. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 495: 286–291.
- [2] 李彬, 王志春, 孙志高, 陈渊, 杨福. 中国盐碱地资源与可持续利用研究. *干旱地区农业研究*, 2005, 23(3): 154–158.  
Li B, Wang Z C, Sun Z G, Chen Y, Yang F. Resources and sustainable resource exploitation of salinized land in China. *Agric Res Arid Areas*, 2005, 23(3): 154–158 (in Chinese with English abstract).
- [3] 张建峰, 张旭东, 周金星, 刘国华, 李冬雪. 世界盐碱地资源及其改良利用的基本措施. *水土保持研究*, 2005, 12(6): 28–30.  
Zhang J F, Zhang X D, Zhou J X, Liu G H, Li D X. World resources of saline soil and main amelioration measures. *Res Soil Water Conserv*, 2005, 12(6): 28–30 (in Chinese with English abstract).

- [4] Lee S K, Kim B G, Kwon T R, Jeong M J, Park S R, Lee J W, Byun M O, Kwon H B, Matthews B F, Hong C B, Park S C. Overexpression of the mitogen-activated protein kinase gene *OsMAPK33* enhances sensitivity to salt stress in rice (*Oryza sativa* L.). *J Biosci*, 2011, 36: 139–151.
- [5] Xing H T, Guo P, Xia X L, Yin W L. PdERECTA, a leucine-rich repeat receptor-like kinase of poplar, confers enhanced water use efficiency in *Arabidopsis*. *Planta*, 2011, 234: 229–241.
- [6] Mondal T K, Rawal H C, Chowrasia S, Varshney D, Panda A K, Mazumdar A, Kaur H, Gaikwad K, Sharma T R, Singh N K. Draft genome sequence of first monocot-halophytic species *Oryza coarctata* reveals stress-specific genes. *Sci Rep*, 2018, 8: 13698–13708.
- [7] 牛吉山. 植物和小麦蛋白激酶的研究现状. 西北植物学报, 2003, 23: 143–150.  
Niu J S. Studies on plant and wheat protein kinases. *Acta Bot Boreali-Occident Sin*, 2003, 23: 143–150 (in Chinese with English abstract).
- [8] Julie M S, John C W. Plant protein kinase families and signal transduction. *Plant Physiol*, 1995, 108: 451–457.
- [9] Depuydt S, Rodriguez-Villalon A, Santuari L, Wyser-Rmili C, Ragni L, Hardtke C S. Suppression of *Arabidopsis* protophloem differentiation and root meristem growth by CLE45 requires the receptor-like kinase BAM3. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 7074–7079.
- [10] Bryan A C, Obaidi A, Wierzbza M, Tax F E. XYLEM INTERMIXED WITH PHLOEM1, a leucine-rich repeat receptor-like kinase required for stem growth and vascular development in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 2012, 235: 111–122.
- [11] Burr C A, Leslie M E, Orlowski S K, Chen I, Wright C E, Daniels M J, Liljegren S J. CAST AWAY, a membrane-associated receptor-like kinase, inhibits organ abscission in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2011, 156: 1837–1850.
- [12] Mizuno S, Osakabe Y, Maruyama K, Ito T, Osakabe K, Sato T, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Receptor-like protein kinase 2 (RPK2) is a novel factor controlling anther development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2007, 50: 751–766.
- [13] Engelsdorf T, Hamann T. An update on receptor-like kinase involvement in the maintenance of plant cell wall integrity. *Ann Bot*, 2014, 114: 1339–1347.
- [14] Wu Y, Zhou J M. Receptor-like kinases in plant innate immunity. *J Integr Plant Biol*, 2013, 55: 1271–1286.
- [15] Phillips S M, Dubery I A, Heerden H. Identification and molecular characterisation of a lectin receptor-like kinase (GHLECRK-2) from cotton. *Plant Mol Biol Rep*, 2013, 31: 9–20.
- [16] Singh P, Kuo Y C, Mishra S, Tsai C H, Chien C C, Chen C W, Desclos-Theveniau M, Chu P W, Schulze B, Chinchilla D, Boller T, Zimmerli L. The lectin receptor kinase-VI.2 is required for priming and positively regulates *Arabidopsis* pattern-triggered immunity. *Plant Cell*, 2012, 24: 1256–1270.
- [17] Tanaka H, Osakabe Y, Katsura S, Mizuno S, Maruyama K, Kusakabe K, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Abiotic stress-inducible receptor-like kinases negatively control ABA signaling in *Arabidopsis*. *Plant J: Cell Mol Biol*, 2012, 70: 599–613.
- [18] Hua D, Wang C, He J, Liao H, Duan Y, Zhu Z, Guo Y, Chen Z, Gong Z. A plasma membrane receptor kinase, GHR1, mediates abscisic acid- and hydrogen peroxide-regulated stomatal movement in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2012, 24: 2546–2561.
- [19] Yuriko O, Shinji M, Hidenori T, Maruyama K, Osakabe K, Todaka D, Fujita Y, Kobayashi M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Overproduction of the membrane-bound receptor-like protein kinase1, RPK1, enhances abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 2010, 285: 9190–9201.
- [20] Yang T, Chaudhuri S, Yang L, Du L, Poovaiah B W. A calcium/calmodulin-regulated member of the receptor-like kinase family confers cold tolerance in plants. *J Biol Chem*, 2010, 285: 7119–7126.
- [21] Sicilia A, Testa G, Santoro D F, Cosentino S L, Lo Piero A R. RNASeq analysis of giant cane reveals the leaf transcriptome dynamics under long-term salt stress. *BMC Plant Biol*, 2019, 19: 355–379.
- [22] Song W Y, Wang G L, Chen L L, Kim H S, Pi L Y, Holsten T, Gardner J, Wang B, Zhai W X, Zhu L H, Fauquet C, Ronald P. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene *Xa21*. *Science*, 1995, 270: 1804–1806.
- [23] Kobe B, Deisenhofer J. The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem Sci*, 1994, 19: 415–421.
- [24] Jones D A, Jones J D G. The role of leucine-rich repeat proteins in plant defences. *Adv Bot Res*, 1997, 24: 89–167.
- [25] Hong S W, Jon J H, Kwak J M, Nam H G. Identification of a receptor-like protein kinase gene rapidly induced by abscisic acid, dehydration, high salt, and cold treatments in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 1997, 113: 1203–1212.
- [26] Osakabe Y, Maruyama K, Seki M, Satou M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Leucine-rich repeat receptor-like kinase1 is a key membrane-bound regulator of abscisic acid early signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2005, 17: 1105–1119.
- [27] Shi C C, Feng C C, Yang M M, Li J L, Li X X, Zhao B C, Huang Z J, Ge R C. Overexpression of the receptor-like protein kinase genes *AtRPK1* and *OsRPK1* reduces the salt tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci*, 2014, 217–218: 63–70.
- [28] Wang J, Li C, Yao X, Liu S H, Zhang P Y, Chen K S. The Antarctic moss leucine-rich repeat receptor-like kinase (PnLRR-RLK2) functions in salinity and drought stress adaptation. *Polar Biol*, 2018, 41: 353–364.
- [29] Sun X, Sun M, Luo X, Ding X, Cai H, Bai X, Liu X, Zhu Y. A *Glycine soja*, ABA-responsive receptor-like cytoplasmic kinase, GsRLCK, positively controls plant tolerance to salt and drought stresses. *Planta*, 2013, 237: 1527–1545.
- [30] An S H, Choi H W, Hwang I S, Hong J K, Hwang B K. A novel pepper membrane-located receptor-like protein gene *CaMRP1* is required for disease susceptibility, methyl jasmonate insensitivity and salt tolerance. *Plant Mol Biol*, 2008, 67: 519–533.
- [31] Li C H, Wang G, Zhao J L, Zhang L Q, Ai L F, Han Y F, Sun D Y, Zhang S W, Sun Y. The receptor-like kinase SIT1 mediates salt sensitivity by activating MAPK3/6 and regulating ethylene homeostasis in rice. *Plant Cell*, 2014, 26: 2538–2553.
- [32] Liu S H, Wang J, Chen K S, Zhang Z H, Zhang P Y. The L-type lectin receptor-like kinase (*PnLecRLK1*) from the Antarctic moss *Pohlia nutans* enhances chilling-stress tolerance and abscisic acid sensitivity in *Arabidopsis*. *Plant Growth Regul*, 81: 409–418.