

马 娜,王金彦,阚家亮,等. 一个响应盐胁迫的梨凝集素受体蛋白激酶 *PcLRLK066* 的功能分析[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(2): 404-411.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.02.026

## 一个响应盐胁迫的梨凝集素受体蛋白激酶 *PcLRLK066* 的功能分析

马 娜<sup>1,2</sup>, 王金彦<sup>3</sup>, 阚家亮<sup>2</sup>, 蔺 经<sup>2</sup>, 常有宏<sup>1,2</sup>

(1.南京农业大学园艺学院,江苏 南京 210095; 2.江苏省农业科学院园艺研究所,江苏 南京 210014; 3.江苏省农业科学院农业生物技术研究所,江苏 南京 210014)

**摘要:** 为了探讨梨凝集素受体蛋白激酶(*LecRLK*)对非生物胁迫(盐、渗透胁迫)的响应情况,以梨 *PcLRLK066* 基因为研究对象,研究 *LRK066* 在梨和其他物种间的进化关系及其在豆梨不同组织中的表达情况,并观察了其在细胞中的定位情况,此外还研究了转 *PcLRLK066* 拟南芥在不同盐浓度和甘露醇浓度处理下的发芽情况。结果显示,豆梨中 *PcLRLK066* 与苹果进化距离最近,与野生番茄最远;*PcLRLK066* 在不同组织器官中表达差异显著;通过亚细胞定位发现 *PcLRLK066* 可能定位在细胞膜上;转入 *PcLRLK066* 基因后的拟南芥在盐和渗透胁迫处理下发芽率均低于野生型拟南芥,表明转基因拟南芥对盐和干旱更加敏感,*PcLRLK066* 可能参与了盐胁迫和渗透胁迫。

**关键词:** 凝集素受体蛋白激酶;膜定位蛋白;非生物胁迫

**中图分类号:** S661.2;Q783

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-4440(2017)02-0404-08

## Functional analysis of a salt-induced lectin receptor-like kinase *PcLRLK066* of pear

MA Na<sup>1,2</sup>, WANG Jin-yan<sup>3</sup>, KAN Jia-liang<sup>2</sup>, LIN Jing<sup>2</sup>, CHANG You-hong<sup>1,2</sup>

(1.College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2.Institute of Horticulture, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 3.Provincial Key Laboratory of Agrobiotechnology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** To explore the role of pear *LecRLK* in response to abiotic stress such as salt and osmotic stress, the evolutionary relationship of *PcLRLK066* in pear and other species were studied. The phylogenetic tree showed that *PcLRLK066* in pear and apple had the nearest evolutionary distance to apple but the farthest to while wild tomato. PT-PCR revealed that *PcLRLK066* were differentially expressed in different organs of pear. *PcLRLK066* was subcellularly localized on plasma membrane. The germination rates of transgenic *Arabidopsis* plants under salt and osmotic stress were lower than those in wild type *Arabidopsis* plants, indicating that *PcLRLK066*-transgenic *Arabidopsis* is more sensitive to abiotic stress and *PcLRLK066* might be involved in the responses.

**Key words:** *LecRLK*; membrane protein; abiotic stress

收稿日期:2016-07-11

基金项目:国家自然科学基金项目(31372051);江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(14)5018]

作者简介:马 娜(1989-),河北唐山人,硕士研究生,主要从事果树逆境生理和分子生物学研究。(E-mail) mn506381141@163.com

通讯作者:常有宏,(E-mail) cyh@jaas.ac.cn

凝集素(Lectin)是一种普遍存在于动物、植物和微生物中的次生代谢产物,它能与糖结合成糖蛋白,在植物生长发育过程中发挥重要作用<sup>[1]</sup>。受体

蛋白激酶(*RLK*)是通过感知外部信号,调控基因表达发挥基础性作用的一类蛋白<sup>[2]</sup>。植物凝集素受体蛋白激酶(*LecRLKs*)的结构包括胞外凝集素域、横跨膜域和细胞质激酶域<sup>[3]</sup>。根据N端凝集素域的多样性,可以分为3个子类,L,G和C型<sup>[4]</sup>。L型*LecRLKs*的命名是由于它的激酶域类似于豆类植物(Leguminous plants)的可溶性凝集素蛋白<sup>[5]</sup>。在所有的植物凝集素蛋白中,豆类凝集素家族是最大的。G型*LecRLKs*有一个 $\beta$ 状凝集素域,它除了对 $\alpha$ -D甘露醇有亲和性,在非凝集素域还有一个参与花粉自我识别以防止近亲繁殖的S位点糖蛋白域<sup>[6]</sup>。C型*LecRLKs*存在于哺乳类动物中,是先天性免疫响应的中介,通常参与自我和非自我识别,发挥重要的作用,然而在植物中却是数量最小的一类*LecRLKs*,在水稻和拟南芥中都仅有一个代表<sup>[6-8]</sup>。

梨(*Pyrus*)是多年生落叶果树,在全球都有广泛分布,中国是梨的起源地之一<sup>[9]</sup>。目前,梨产量和品质的提高是影响梨产业发展的重要因素。然而,随着全球气候变化问题日益突出,土壤盐渍化,干旱等问题已经成为全球性生态问题<sup>[10]</sup>。土壤盐渍化可导致植物光合作用降低、生长受到抑制,生理代谢紊乱、衰老加速,最终导致植物死亡<sup>[11-13]</sup>。而水分胁迫是限制植物生长发育最重要的因素之一<sup>[14]</sup>,全世界每年由于缺水导致的减产大于其他影响因素造成的减产的总和<sup>[15]</sup>。因此,对梨抗逆品种的改良十分重要。

近年来有研究结果<sup>[6]</sup>表明,*LecRLK*在感知外部环境信号变化和胁迫变化等过程中发挥了重要作用。它参与植物的生长发育、激素调控,不仅对真菌、细菌和食草性昆虫均有抵御作用,还参与植物的非生物胁迫。如豌豆基因*PsLecRLK*以及拟南芥基因*AtLPK1*和*LecRK-b2*均被报道参与了植物的盐胁迫反应<sup>[16-18]</sup>。然而,自梨基因组测序完成后,*LecRLKs*在梨中的研究,尤其是在非生物胁迫方面的研究仍比较少见,因此本研究通过研究梨*LecRLK*的功能及应用以期提高梨的抗逆性。

### 1.1 试验材料

植物材料有豆梨(*Pyrus calleryana*),本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)。大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$ 菌株,根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)GV3101菌株,pBinGFP4载体由江苏省农业生物学重点实验室保

存。高保真DNA聚合酶,限制性内切酶,T4DNA连接酶均购于TaKaRa公司;DNA凝胶回收试剂盒、DNA marker、琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒购于TIANGEN公司。卡那霉素(Kan)、氨苄青霉素(Amp)、利福平(Rif)等抗生素购自Sigma公司。基因测序与引物合成均由南京金斯瑞生物科技有限公司完成。

### 1.2 试验方法

1.2.1 *PcLRLK066*的获得和生物信息学分析 以拟南芥胁迫相关*LecRLK*基因AT5G60280.1的序列在矽山梨蛋白数据库中进行BLAST比对<sup>[19]</sup>,找到1个同源性较高的梨基因*Pbr013498.1*,根据该基因序列设计克隆引物,在豆梨中克隆该基因,命名为*PcLRLK066*,再以豆梨*PcLRLK066*蛋白序列在NCBI数据库(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)中应用Blastp进行搜索,下载与*PcLRLK066*序列最相近的其他植物蛋白序列,利用MEAGA6构建进化树。等电点以及蛋白分子量计算分别利用在线软件ExPasy([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/))分析预测。

1.2.2 *PcLRLK066*的表达分析 根据*PcLRLK066*序列设计定量PCR引物(正向引物:5'-GTCTGTTT-GTGTGGAAGTGG-3',反向引物:5'-GCCCATC-CTCTTATCCACTAC-3'),豆梨定量内参引物*TUB-b2*(AB239681.1)<sup>[20]</sup>。分别取豆梨的根、茎、叶、花、果于液氮中保存,提取总RNA进行组织表达分析。RNA提取采用TIANGEN试剂盒;用Prime Script 1st Strand cDNA Synthesis Kit(TaKaRa)将RNA反转录为cDNA第1链。定量PCR反应体系为1.0  $\mu$ l cDNA,0.5  $\mu$ l引物(10  $\mu$ mol/L),6.0  $\mu$ l无菌水和7.5  $\mu$ l(2 $\times$ )SYBR染料。反应程序为95  $^{\circ}$ C预变性5 min;95  $^{\circ}$ C 10 s,60  $^{\circ}$ C 20 s,72  $^{\circ}$ C 10 s,40个循环。定量试剂盒为Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II Kit(Vazyme),定量PCR仪为Qtower 2.0/2.2 (Analytik Jena)。采用方法 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算基因的相对表达量<sup>[21]</sup>,每种处理包含3个生物学重复,每个样品分别进行3次技术重复。

1.2.3 盐胁迫处理豆梨幼苗中*PcLRLK066*的表达 将豆梨8叶龄幼苗分别移至含有0 mmol/L NaCl和100 mmol/L NaCl的1/4 MS营养液<sup>[22]</sup>中,处理8 h后,分别采集2种营养液中的豆梨叶片,每种处理3个生物学重复,于液氮中迅速冷却,提取总RNA和合成cDNA第1链,进行荧光定量PCR,以梨*TUB-b2*基因为内参<sup>[20]</sup>,比较分析*PcLRLK066*在有

无盐胁迫下的表达情况。

**1.2.4 *PcLRLK066* 的亚细胞定位载体构建** 提取豆梨总 RNA 后反转录为 cDNA,用 Primer5 设计带有 *Kpn* I 和 *Bam* H I 酶切位点的特异性引物进行 PCR 扩增。回收目的片段后,使用 *Kpn* I 和 *Bam* H I 双酶切 PCR 产物以及 pBinGFP4 空载体,清洁回收酶切产物,用 T4 连接酶过夜连接并转化后培养到含有卡那霉素抗性的固体 LB 培养基上,挑选阳性克隆,并测序验证,构建成功的载体命名为 GFP-*PcLRLK066*。

**1.2.5 农杆菌介导的本氏烟瞬时侵染** 将构建好的 GFP-*PcLRLK066* 质粒采用电击法转入根癌农杆菌 GV3101 中,培养在含有卡那霉素(50 mg/L)和利福平(25 mg/L)的固体 LB 培养基中。2 d 后挑取平板上长出的单克隆放入含有同样浓度的卡那霉素和利福平的液体 LB 培养基中,在 28 ℃ 摇床中以 180 r/min 振荡培养 16 h,悬浮菌液至  $OD_{600}$  值为 1.0。选取长势健壮的烟草叶片为试验材料,将重悬菌液注射入烟草叶片中,避开叶脉位置,GFP 空载体和 GFP-*PcLRLK066* 处理均注射 3 次作为生物学重复。28 ℃ 黑暗培养 12 h 后转移至光照下培养,取注射后 48 h 叶片为样品,在荧光显微镜下观察定位并拍照保存。

**1.2.6 转基因拟南芥的获得** 挑取阳性 GFP-*PcLRLK066* 农杆菌转化子,接种到含有利福平和卡那霉素的固体 LB 培养基上,28 ℃、220 r/min 振荡培养 12~16 h 至  $OD_{600} = 1.2 \sim 2.0$ 。按 1:100 比例接入到新的液体培养基中,振荡培养至  $OD_{600} = 1.5$ 。离心收集菌体,将菌体悬浮于软化缓冲液中(0.5×MS 盐,1×B5 维生素,5% 蔗糖)。调节 pH = 5.7 后加入 0.02% Silwet L-77。菌体充分悬浮后,将准备好的拟南芥植株剪去已经开放的花,将植株倒置浸入到软化缓冲液中 1 min,取出后放在湿润周转箱中暗培养 24 h 后,按正常条件培养至种子成熟,收集种子为  $T_0$  代,将种子播撒在含有卡那霉素的选择培养基上进行筛选,筛选至  $T_3$  代纯合系。拟南芥的生长条件为 22 ℃,每天 8 h 光照,光照度为 2 000 lx,空气相对湿度为 80%。

**1.2.7 转基因植株的检测** 提取筛选过的转基因拟南芥  $T_3$  代纯合体 DNA,以其为模板,用片段的正向引物和的反向引物扩增,以质粒 GFP-*PcLRLK066* 为阳性对照,以野生型拟南芥基因组 DNA 为阴性对

照,PCR 检测并进行琼脂糖凝胶电泳,拍照保存。

**1.2.8 转基因拟南芥种子在干旱胁迫下发芽率的测定** 选定 3 种转基因拟南芥株系 L1、L4、L5 与野生型 WT 种子经消毒后分区域播种在含有不同浓度甘露醇(0 mmol/L、350 mmol/L、400 mmol/L、450 mmol/L 和 500 mmol/L)的 1/2 MS 培养基上,在 4 ℃ 春化处理 1 d 后正常培养,观察种子萌发情况,统计发芽率,并于第 6 d 拍照记录,进行 3 次重复试验。

**1.2.9 转基因拟南芥种子在盐胁迫下的发芽率测定** 选定 3 种转基因拟南芥株系 L1、L4、L5 与野生型 WT 种子经消毒后分区域播种在含有不同浓度的 NaCl (0 mmol/L、100 mmol/L、150 mmol/L、200 mmol/L)的 1/2 MS 培养基上,在 4 ℃ 春化处理 1 d 后正常培养,观察种子萌发情况,统计发芽率,并于 15 d 拍照记录,进行 3 次重复试验。

## 2 结果

### 2.1 *PcLRLK066* 的克隆和生物信息学分析

以豆梨 cDNA 为模板扩增目的片段 *PcLRLK066*,获得大小为 2 046 bp 的 PCR 产物,该基因编码 682 个氨基酸,推测编码的蛋白质分子量为 76 110,等电点为 7.25。*PcLRLK066* 的核苷酸序列与已知测序的梨基因组 *Pbr013498.1* 相似性约为 98%(图 1)。在进化上 *PcLRLK066* 与苹果的 *LecRLK* 基因最相近,与野生番茄的进化距离最远(图 2)。

### 2.2 *PcLRLK066* 的组织特异性表达

提取豆梨的根、茎、叶、花以及果实的总 RNA,检测 *PcLRLK066* 的表达量。试验结果(图 3)表明,*PcLRLK066* 在叶、根、花中的表达量显著高于茎和果,其中叶中的相对表达量最高,达到了果实中的 2.6 倍左右。*PcLRLK066* 在豆梨的不同组织器官中的差异表达,表明其不同组织器官中可能发挥了不同作用。

### 2.3 豆梨幼苗中 *PcLRLK066* 对盐胁迫处理的响应

将长势一致的 8 叶龄幼苗分别用含有 0 mmol/L 和 100 mmol/L NaCl 的 1/4 MS 溶液处理检测 *PcLRLK066* 在盐处理和非盐处理下的表达量。试验结果(图 4)显示,*PcLRLK066* 的表达量在 100 mmol/L NaCl 处理下比在对照中显著升高,升高了 16 倍左右,表明盐处理诱导了 *PcLRLK066* 的表达。



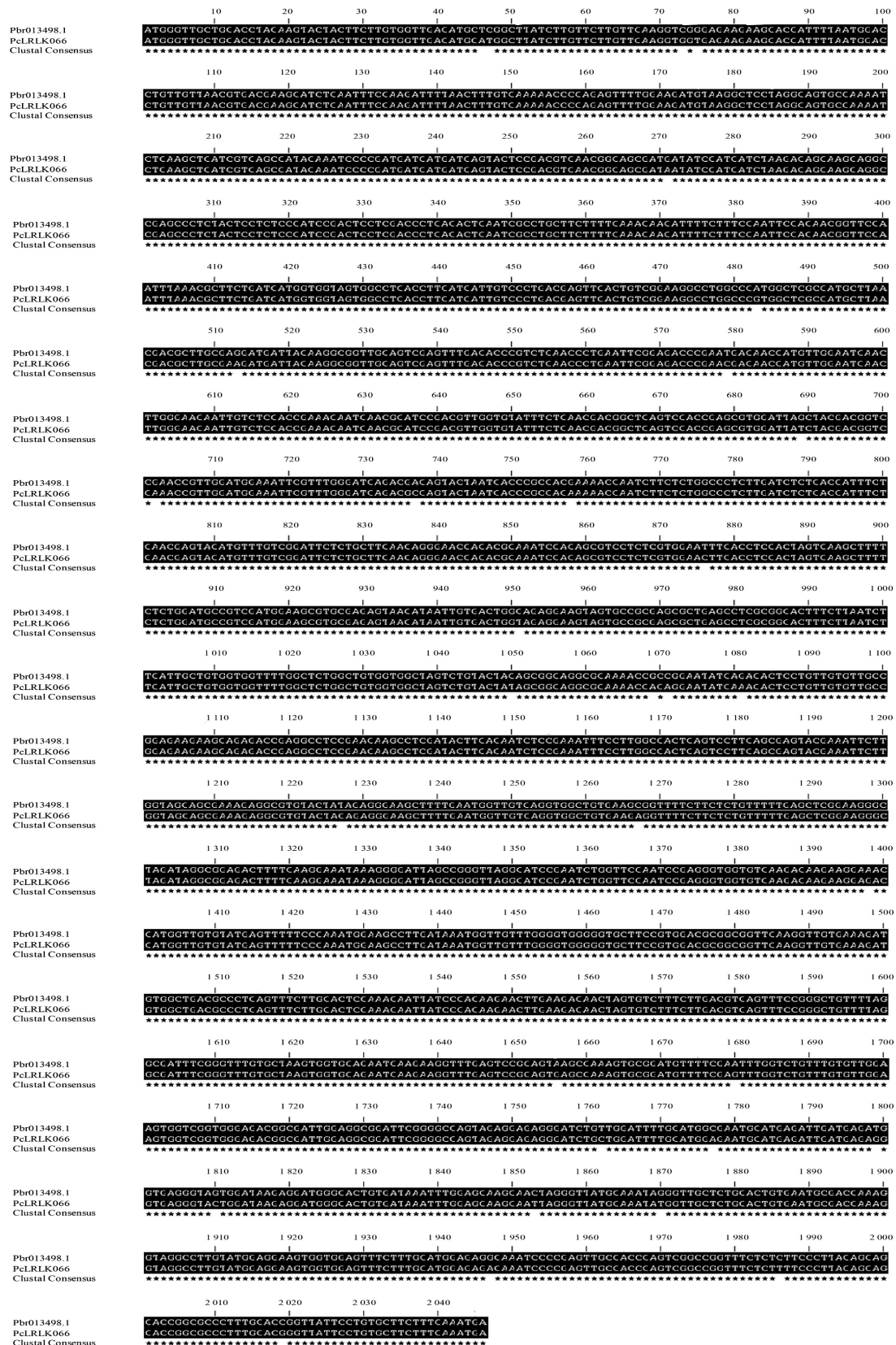
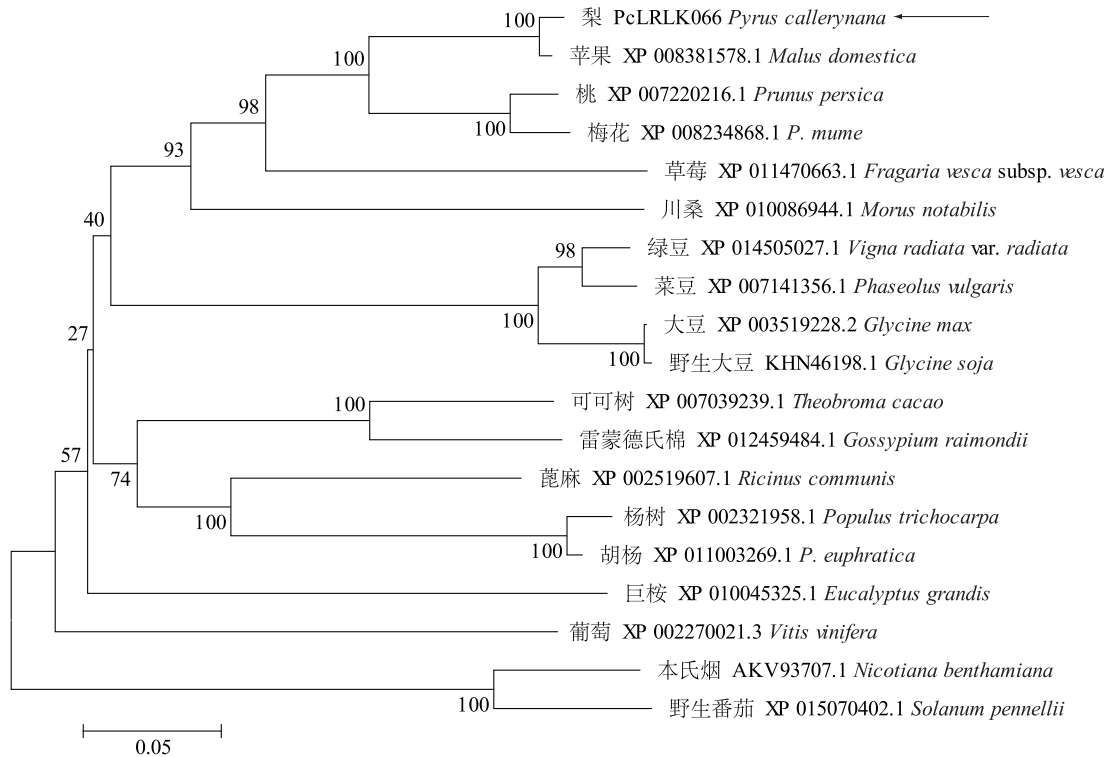


图1 PcLRLK066 与数据库公布序列 Pbr013498.1 比对

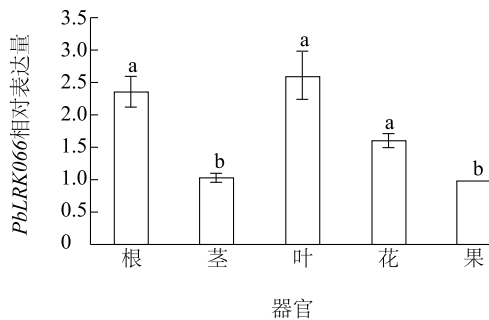
Fig.1 Multiple sequence alignment of PcLRLK066 and Pbr013498.1



箭头所指为 PcLRLK066。

图 2 梨 PcLRLK066 与已知的其他物种 LecRKs 蛋白聚类分析

Fig.2 The phylogenetic tree based on the amino acid sequences of PcLRLK066 in pear and LecRKs in other species



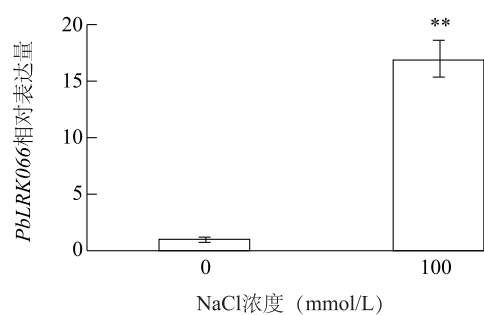
不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

图 3 梨 PcLRLK066 与已知的其他物种 LecRKs 蛋白聚类分析

Fig.3 The expression patterns of PcLRLK066 in different organs

## 2.4 PcLRLK066 的亚细胞定位分析

将构建好的 GFP-PcLRLK066 亚细胞定位载体通过农杆菌注射法瞬时侵染本氏烟后,于 48 h 在荧光显微镜下观察定位情况,结果(图 5)显示,GFP 空载对照为核膜共定位,而 GFP-PcLRLK066 只定位在细胞膜上。mCherry 是一种膜定位标记,在融合光下可看出,GFP-PcLRLK066 与膜定位信号 PIP2A 的融合光共定位在细胞膜上,说明 GFP-PcLRLK066 可



\*\* 表示差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

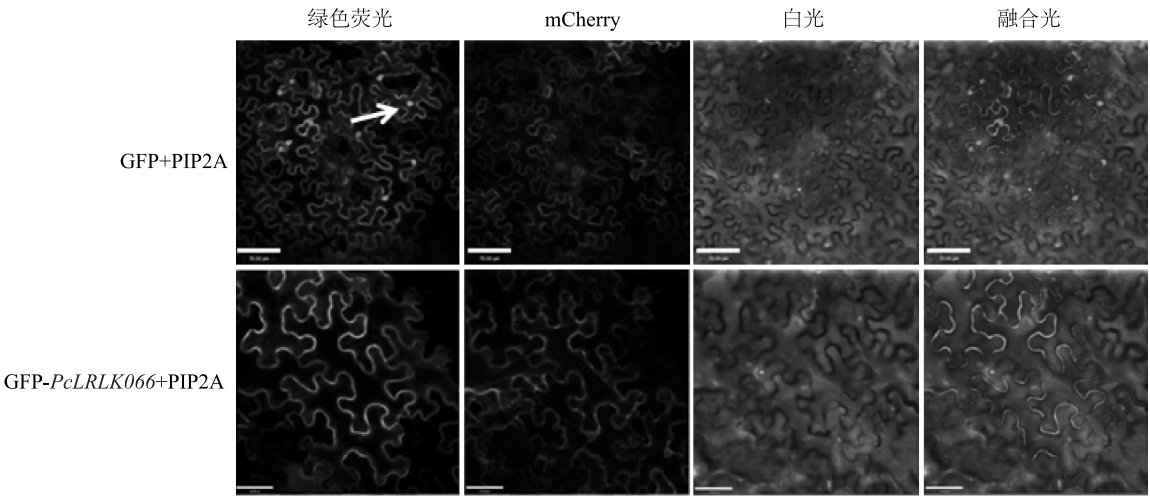
图 4 盐胁迫处理后 PcLRLK066 在豆梨幼苗叶中的表达情况

Fig.4 The expression patterns of PcLRLK066 between 0mM and 100mM NaCl treatment

能是膜定位蛋白。

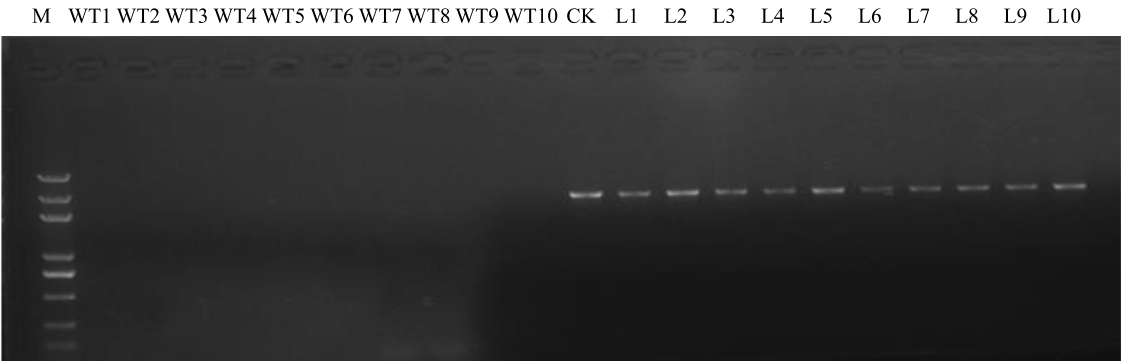
## 2.5 转基因拟南芥的获得和鉴定

利用拟南芥蘸花侵染法将 GFP-PcLRLK066 转入野生型拟南芥中,正常培养并获得  $T_3$  代转基因拟南芥,经卡那筛选出 25 株阳性拟南芥植株,提取这 25 株拟南芥叶片基因组 DNA 进行 PCR 鉴定筛选获得 21 株阳性株系,图 6 所示为 L1~L10 PCR 阳性检测结果。



上方图为注射 24 h 后 GFP 分别在绿色荧光信号下、mCherry 信号下、白光下和绿色荧光与 mCherry 融合光下所拍;下方图为 GFP-*PcLRLK066* 在上述信号通路下所拍。PIP2A 为膜定位标记,箭头所指为细胞核。

图 5 GFP-*PcLRLK066* 在本氏烟中的亚细胞定位  
Fig.5 Subcellular localization of GFP-*PcLRLK066* in *Nicotiana benthamiana*



M: DNA marker; WT1~WT10:野生型拟南芥;L1~L10:转 GFP-*PcLRLK066* 基因拟南芥;CK: GFP-*PcLRLK066* 质粒,为阳性对照。

图 6 T<sub>3</sub> 代转基因拟南芥 PCR 检测结果  
Fig.6 Identification of T<sub>3</sub> transgenic *Arabidopsis thaliana* by PCR

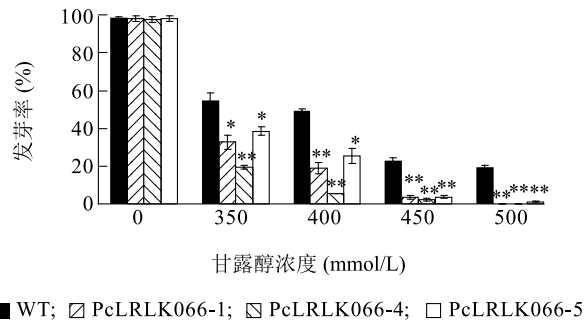
2.6 转基因拟南芥在渗透胁迫下发芽率的测定

将野生型拟南芥与转基因的 3 个株系 *PcLRLK066*-1、*PcLRLK066*-4、*PcLRLK066*-5 同时播种在含有 0 mmol/L、350 mmol/L、400 mmol/L、450 mmol/L 和 500 mmol/L 甘露醇的 1/2 MS 培养基上,结果(图 7)显示:野生型拟南芥与转基因拟南芥 3 个株系 *PcLRLK066*-1、*PcLRLK066*-4、*PcLRLK066*-5 在无甘露醇处理的 1/2 MS 培养基上发芽率无明显差异;在 350~500 mmol/L 甘露醇处理下,随着甘露醇浓度的提高,野生型与转基因拟南芥 3 个株系 *PcLRLK066*-1、*PcLRLK066*-4、*PcLRLK066*-5 发芽率均逐渐降低。转

基因拟南芥的 3 个株系的发芽率在甘露醇处理下均显著低于野生型拟南芥,其中 *PcLRLK066*-4 发芽率最低,差异达到极显著水平。说明转基因拟南芥对甘露醇处理比野生型拟南芥更加敏感。

2.7 转基因拟南芥在盐胁迫下发芽率的测定

为了研究野生型拟南芥与转基因拟南芥在盐处理下的发芽及生长情况,将野生型拟南芥和转基因 3 个株系 *PcLRLK066*-1、*PcLRLK066*-4、*PcLRLK066*-5 播种在含有 0 mmol/L、100 mmol/L、150 mmol/L 和 200 mmol/L NaCl 的 1/2 MS 培养基上,于第 15 d 观察发芽率。结果表明,野生型拟南芥和转基因的 3 个株系在不含



■ WT; ▨ PcLRLK066-1; ▩ PcLRLK066-4; □ PcLRLK066-5

\* 表示差异显著 ( $P < 0.05$ ); \*\* 差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

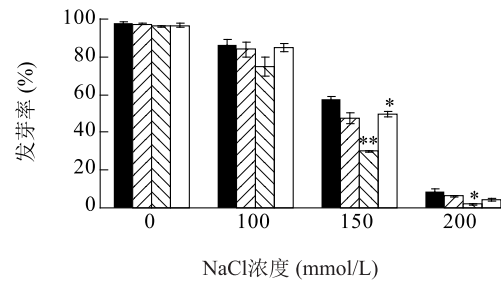
图7 WT及转基因拟南芥3个株系PcLRLK066-1、PcLRLK066-4、PcLRLK066-5在渗透胁迫处理下的发芽情况

Fig.7 The germination rate of WT and transgenic *Arabidopsis* (PcLRLK066-1, PcLRLK066-4 and PcLRLK066-5) under osmotic stress

NaCl的1/2 MS培养基上生长无明显差异;随着盐浓度的提高,野生型拟南芥和转基因拟南芥的3个株系发芽率及根长均呈降低趋势。在100 mmol/L NaCl处理下,PcLRLK066-1、PcLRLK066-4、PcLRLK066-5株系发芽率虽略低于野生型拟南芥但并未达到显著水平;在150 mmol/L NaCl处理下,PcLRLK066-1、PcLRLK066-5的发芽率分别为47.20%和49.65%,显著低于野生型拟南芥的发芽率(57.65%),而PcLRLK066-4发芽率为30.10%,极显著低于野生型拟南芥。在200 mmol/L NaCl处理下,野生型拟南芥和转基因3个株系受到抑制程度都较高,其中PcLRLK066-4株系的发芽率显著低于野生型拟南芥(图8)。说明,转入PcLRLK066基因后的拟南芥受到盐的抑制程度大于野生型拟南芥,对盐处理变得更加敏感。

### 3 讨论

植物在进化过程中对外界刺激形成了多种防御策略,其中包括物理和化学防御。当植物体感受到外界刺激后,产生并大量积累次生代谢产物,以增强自身的免疫和抵抗能力<sup>[23]</sup>。凝集素受体蛋白激酶(*LecRLK*)通过感知外界信号调节下游基因表达等在植物生长发育中发挥重要作用。在不同的植物中,已经发现了许多凝集素受体蛋白激酶(*LecRLK*),其中拟南芥中有75个,水稻中有173个<sup>[6]</sup>。本研究PcLRLK066属于L型,具有凝集素受体蛋白的基本结构特征,包含凝集素域、跨膜域和C端激酶域,通过亚细胞定位发现其可能定位在细胞膜上,这与拟南芥中*Lec*



■ WT; ▨ PcLRLK066-1; ▩ PcLRLK066-4; □ PcLRLK066-5

\* 表示差异显著 ( $P < 0.05$ ); \*\* 差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

图8 WT及转基因拟南芥3个株系PcLRLK066-1、PcLRLK066-4、PcLRLK066-5在不同浓度NaCl处理下的发芽情况

Fig.8 The growth of WT and transgenic *Arabidopsis* (PcLRLK066-1, PcLRLK066-4 and PcLRLK066-5) under salt stress

*RK-b2*定位在细胞膜上一致<sup>[24]</sup>。此外,PcLRLK066在叶和根中的表达量高于其他器官。由于叶片是植物感受外界刺激如病原菌等最直接的器官,而根是感受土壤条件(水分,盐)等最直接的器官,PcLRLK066在叶和根中较高的表达量表明它可能在植物对外界环境信号的感知方面发挥了作用。

目前对*LecRLK*的研究主要集中在感知外部环境信号、激素信号变化和胁迫压变化等领域。近年来,*LecRLK*在非生物胁迫的研究成为一个热点。有研究表明,在烟草中过表达豌豆基因*PsLecRLK*可以提高烟草对盐的耐受性<sup>[15]</sup>。过表达*GsSRK*的拟南芥,在同等盐胁迫下发芽率、根的生长情况均强于野生型拟南芥<sup>[25]</sup>。此外,水稻*LecRLK*基因*SIT1*在NaCl处理下迅速升高,然而过量表达*SIT1*可导致盐敏感,削弱植物的生长势,敲除该基因可减少对盐的敏感程度<sup>[26]</sup>。在本研究中,豆梨幼苗在盐胁迫处理下PcLRLK066基因显著上调表达,表明PcLRLK066响应了盐处理,然而将PcLRLK066转入到拟南芥中,在盐和甘露醇胁迫下,转基因株系的发芽受到盐和甘露醇胁迫的抑制程度均大于野生型拟南芥。这与水稻*LecRLK*基因*SIT1*的研究结果一致。这可能是由于PcLRLK066是1个负调控因子,过表达PcLRLK066的拟南芥对盐和渗透胁迫的敏感程度增加。然而,PcLRLK066在盐胁迫和渗透胁迫下的调控机制尚未明确。此外,转基因的3个株系L1、L4和L5在甘露醇处理下表现一致,发芽相对于



野生型拟南芥均受到显著抑制。在盐胁迫处理下也有相同的趋势,在 150 mmol/L 的高盐胁迫下,转基因 3 个株系发芽率均显著低于野生型拟南芥。尤其是转基因拟南芥 L4 株系,无论在甘露醇处理还是盐处理下,发芽受到抑制程度均大于 L1 和 L5,这可能是由于转基因拟南芥插入位点不同导致。

土壤盐渍化和水分缺失是植物生产和产量提高的重要限制因子,我们通过研究发现过量表达 *PcLRLK066* 是导致盐敏感和干旱敏感的一个因素,因此在生产上可以通过敲除 *PcLRLK066* 或抑制 *PcLRLK066* 的表达来改良梨品种,增强耐盐抗旱能力。

### 参考文献:

- [1] SHARON N, LIS H. Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins[J]. Science, 1972, 177(4053): 949-959.
- [2] MORILLO S A, TAX F E. Functional analysis of receptor-like kinases in monocots and dicots[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2006, 9(5): 460-469.
- [3] VAID N, MACOVEI A, TUTEJA N. Knights in action: lectin receptor-like kinases in plant development and stress responses[J]. Molecular Plant, 2013, 6(5): 1405-1418.
- [4] SHIU S H, BLEECKER A B. Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(19): 10763-10768.
- [5] HERVÉ C, SERRES J, DABOS P, et al. Characterization of the *Arabidopsis* *lecRK-a* genes: members of a superfamily encoding putative receptors with an extracellular domain homologous to legume lectins[J]. Plant Molecular Biology, 1999, 39(4): 671-682.
- [6] VAID N, PANDEY PK, TUTEJA N. Genome-wide analysis of lectin receptor-like kinase family from *Arabidopsis* and rice[J]. Plant Molecular Biology, 2012, 80(4/5): 365-388.
- [7] EPSTEIN J, EICHBAUM Q, SHERIFF S, et al. The collectins in innate immunity[J]. Current Opinion in Immunology, 1996, 8(1): 29-35.
- [8] HAWGOOD S, AKIYAMA J, BROWN C, et al. GM-CSF mediates alveolar macrophage proliferation and type II cell hypertrophy in SP-D gene-targeted mice[J]. AJP Lung Cellular & Molecular Physiology, 2001, 280(6): 1148-1156.
- [9] 王贵元,崔文宁. 梨黑斑病的生物学特性及其致病性研究进展[J]. 现代农业, 2011(10): 16-18.
- [10] 李建国,濮励杰,朱明,等. 土壤盐渍化研究现状及未来研究热点[J]. 地理学报, 2012, 67(9): 1233-1245.
- [11] 陈菊培. 盐胁迫下植物细胞吸收  $\text{Na}^+$  的可能途径[J]. 海南大学学报, 2005, 23(4): 383-390.
- [12] 翟亚明,魏丽萍,杨倩. 不同调控方式对设施盐渍化土壤特性和番茄产量及品质的影响[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(4): 871-876.
- [13] 孙凯文,施凯峰,时佩佩,等. 碳调节剂对次生盐渍化土壤理化性质及白菜幼苗生长的影响[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(2): 206-208.
- [14] 徐晓莹,齐洪鑫. 水分胁迫对大葱生长及品质的影响[J]. 山东农业科学, 2016, 48(10): 48-50.
- [15] 汤章城. 植物对水分胁迫的反应和适应性——I. 抗逆性的一般概念和植物的抗涝性[J]. 植物生理学报, 1983(3): 21-29.
- [16] VAID N, PANDEY P, SRIVASTAVA V K, et al. Pea lectin receptor-like kinase functions in salinity adaptation without yield penalty, by alleviating osmotic and ionic stresses and upregulating stress-responsive genes[J]. Plant Molecular Biology, 2015, 88(1/2): 1-14.
- [17] DENG K, WANG Q, ZENG J, et al. A lectin receptor kinase positively regulates ABA response during seed germination and is involved in salt and osmotic stress response[J]. Journal of Plant Biology, 2009, 52(6): 493-500.
- [18] HUANG P, JU H W, MIN J H, et al. Overexpression of L-type lectin-like protein kinase 1 confers pathogen resistance and regulates salinity response in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Science An International Journal of Experimental Plant Biology, 2013, 203-204(2): 98-106.
- [19] LITTLE D, GOUHIER-DARIMONT C, BRUESSOW F, et al. Oviposition by pierid butterflies triggers defense responses in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2007, 143(2): 784-800.
- [20] WU T, ZHANG R, GU C, et al. Evaluation of candidate reference genes for real time quantitative PCR normalization in pear fruit[J]. African Journal of Agriculture Research, 2012, 7(25): 3701-3704.
- [21] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [22] 韩金龙,李慧,丛郁,等. 杜梨 *CBL1* 和 *CBL7* 基因对非生物逆境的响应[J]. 果树学报, 2014, 31(4): 529-535.
- [23] RAUSHER M D. Co-evolution and plant resistance to natural enemies[J]. Nature, 2001, 411(6839): 857-864.
- [24] DENG K, LI X, WANG Q, et al. Lectin receptor kinase LecRK-b2 localizes to plasma membrane and functions as a homodimer[J]. African Journal of Biotechnology, 2009, 8(14): 3208-3214.
- [25] SUN X L, YU Q Y, TANG L L, et al. GsSRK, a G-type lectin S-receptor-like serine/threonine protein kinase, is a positive regulator of plant tolerance to salt stress[J]. Journal of Plant Physiology, 2013, 170(5): 505-515.
- [26] LI C H, WANG G, ZHAO J L, et al. The receptor-like kinase SIT1 mediates salt sensitivity by activating MAPK3/6 and regulating ethylene homeostasis in rice[J]. The Plant Cell, 2014, 26(6): 2538-2553.

(责任编辑:陈海霞)