

邹禹, 刘园园, 钱宝云, 等. 水稻高盐胁迫下的酵母双杂交文库构建及 *OsRPK1* 胞内互作蛋白质的筛选[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(4): 753-763.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2019.04.001

水稻高盐胁迫下的酵母双杂交文库构建及 *OsRPK1* 胞内互作蛋白质的筛选

邹禹¹, 刘园园², 钱宝云¹, 占新春¹, 郑乐娅¹, 张炜², 张培江¹

(1. 安徽省农业科学院水稻研究所, 安徽 合肥 210031; 2. 南京农业大学生命科学学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 为了挖掘水稻 *OsRPK1* 胞内互作蛋白质, 阐明 *OsRPK1* 参与高盐胁迫的分子机制, 本研究利用 SMART 技术, 构建水稻高盐胁迫下根尖的酵母双杂交文库。PCR 扩增获得 *OsRPK1* 基因编码胞内区域的碱基序列, 构建诱饵表达载体 (pGBKT7-*OsRPK1*-CD), 检测诱饵表达载体在酵母中的毒性和自激活活性, 筛选 *OsRPK1* 胞内互作蛋白, 进一步分析高盐胁迫下候选基因的表达模式。结果表明, 构建的 cDNA 文库库容量为 1.11×10^7 CFU, 文库重组率为 96%, 文库插入片段多态性较好。成功构建了诱饵表达载体 (pGBKT7-*OsRPK1*-CD), 经检测诱饵表达载体无毒性, 无自激活活性。诱饵表达载体与 cDNA 文库进行双杂交筛选, 经测序和比对分析获得了 11 个重要的候选基因, 检测候选基因在高盐处理下的表达情况, 其中 8 个候选基因受高盐诱导表达, 2 个候选基因受高盐胁迫抑制表达, 1 个候选基因受高盐胁迫瞬时诱导表达后表达量又受到显著抑制。

关键词: 水稻; *OsRPK1*; 高盐胁迫; 酵母双杂交 cDNA 文库

中图分类号: Q943.2; S511 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2019)04-0753-11

Construction of yeast two-hybrid cDNA library of rice under high salinity stress and screening of intracellular interacting protein of *OsRPK1*

ZOU Yu¹, LIU Yuan-yuan², QIAN Bao-yun¹, ZHAN Xin-chun¹, ZHENG Le-ya¹, ZHANG Wei², ZHANG Pei-jiang¹

(1. Rice Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 210031, China; 2. College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: In order to explore the intracellular interacting protein of *OsRPK1* in rice, and describe the molecular mechanism of *OsRPK1* involved in high-salinity stress, a yeast two-hybrid cDNA library of rice root tip under high-salinity stress was constructed by switching mechanism at 5' end of the RNA transcript (SMART) technique. The base sequence of

OsRPK1 gene encoding intracellular region was obtained by PCR amplification, and the bait expression vector (pGBKT7-*OsRPK1*-CD) was constructed. Then the toxicity and self-activation activity of pGBKT7-*OsRPK1*-CD in yeast were detected. The intracellular interacting proteins of *OsRPK1* were screened and the expression patterns of candidate genes were analyzed under high-salinity stress. The results showed that the capacity of the cDNA library was 1.11×10^7 CFU, the recombinant rate was 96%, and the polymorphism of the cDNA fragments was good. The bait vector pGBKT7-*OsRPK1*-CD was constructed suc-

收稿日期: 2018-10-29

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31701409); 安徽省重点研究和开发计划项目 (1804a07020111、1804h07020156); 安徽省自然科学基金项目 (1408085MKL63); 安徽省农业科学院院长青年创新基金 (17B0101)

作者简介: 邹禹 (1986-), 男, 安徽安庆人, 博士, 助理研究员, 主要从事水稻基因功能解析及分子设计育种研究。 (Tel) 0551-62160151; (E-mail) zouyu0308@126.com。刘园园为共同第一作者。

通讯作者: 张培江, (E-mail) peijiangzhang@126.com; 张炜, (E-mail) wzhang@njau.edu.cn

cessfully and tested to be no toxicity and no self-activation. The cDNA library was screened by bait vector, and 11 important candidate genes were found by sequencing and alignment analysis. Under high-salinity stress, eight candidate genes were up-regulated. Inversely, two candidate genes were down-regulated. Besides, one candidate gene was up-regulated transiently, and then the expression was inhibited significantly.

Key words: rice; OsRPK1; high salinity stress; yeast two hybrid cDNA library

土壤盐碱化是限制农作物产量的重要逆境因子。据联合国粮食及农业组织统计,目前世界上约 $9.56 \times 10^8 \text{ hm}^2$ 陆地受到盐渍化的影响,占陆地总面积的 6.0% 以上,其中 58.0% 发生在灌溉农业区,19.5% 的灌溉土壤受到盐渍化威胁,而且这个比例还在增加^[1]。中国约有 $3.00 \times 10^7 \text{ hm}^2$ 以上的土地属于盐碱地,其中 $8.00 \times 10^6 \text{ hm}^2$ 是农田,占全国耕地面积的 7.0%。高盐主要通过引发离子胁迫、渗透胁迫和氧化胁迫对植物的生长发育造成损伤,而植物在长期的进化过程中为了适应盐胁迫,建立了耐盐或将盐分排出细胞外的特殊分子机制^[2-5]。随着分子生物学、分子遗传学及各种相关研究技术的发展,高等植物的耐盐机制和信号转导途径已成为研究的热点,进一步深入研究植物关于盐胁迫响应的信号传递分子机制,对揭示植物耐盐机理,提高植物耐盐性,科学合理运用闲置盐碱地具有重要意义。

高盐造成的细胞离子胁迫主要通过盐超敏感 (SOS) 信号途径进行调节, SOS 信号传导途径由 SOS1、SOS2 (CIPK24)、SOS3 (CBL4) 以及 SOS2/SOS3 复合体组成,植物细胞通过此传导途径将细胞质中的 Na^+ 排出胞外或区隔化至液泡中,减轻高盐毒害^[6-8]。进一步研究发现, SOS1 在高盐胁迫下也参与磷脂酶 (PLD) 信号传导途径^[9],高盐胁迫下拟南芥磷脂酶 $\alpha 1$ (PLD $\alpha 1$) 的活性增强,引起脂质第二信使磷脂酸 (PA) 的瞬时积累。PA 激活丝裂原活化蛋白激酶 (MPK6), MPK6 直接磷酸化 SOS1。虽然磷脂酶信号传导途径通过 SOS1 调节离子外排,却与 SOS2/SOS3 复合体平行介导盐胁迫途径。因此,维持体内离子平衡的机制很复杂, SOS3/SCaBP8-SOS2-SOS1 信号传导途径也不是调控胞内 Na^+ 外排的唯一途径。

植物富含亮氨酸重复序列型类受体蛋白激酶 (LRR-RLKs) 是一类胞外富含亮氨酸重复片断 (LRRs) 的受体蛋白激酶^[10],在植物非生物胁迫中发挥重要作用。如,水稻受体类蛋白激酶 OsSIK1 的表达量受干旱、盐、 H_2O_2 诱导,水稻过表达 OsSIK1

能够明显增强其对干旱和高盐的耐受性^[11]。拟南芥的受体类蛋白激酶 RPK1 能够被干旱、盐胁迫诱导表达^[12],拟南芥过表达 RPK1 后,根部对脱落酸 (ABA) 敏感,气孔关闭,水分流失减少,而突变体 *rpkl-1* 对 ABA 不敏感,导致水分流失增加^[13]。拟南芥受体激酶通过与蛋白磷酸酶间的相互作用,参与 ABA 信号途径,正向调控高盐和渗透胁迫^[14]。水稻类受体蛋白激酶 LRK2 表达受干旱胁迫诱导, LRK2 过表达则水稻侧根发达,耐旱性增强^[15]。水稻叶穗特异表达的类受体蛋白激酶 LP2,其表达受干旱和 ABA 抑制,锌指转录因子 C_2H_2 与其启动子特异序列结合,锌指转录因子 DST-LP2 途径能促进叶片气孔张开,并减少 H_2O_2 的积累^[16]。南极苔癣 PNLRR-RLK2 能够被非生物胁迫诱导表达,在拟南芥中过表达 PNLRR-RLK2 能提高拟南芥对高盐、干旱、 H_2O_2 以及 ABA 的耐受性^[17]。以水稻为模式作物,通过插入突变获得 128 个 LRR-RLKs 水稻突变体,并在水稻不同发育阶段观察不同非生物胁迫下的生长表型,筛选出 37 个具有改善水稻耐受非生物胁迫潜力的 LRR-RLKs^[10]。目前为止, LRR-RLKs 参与非生物胁迫响应的抗性机制和调控途径仍未被揭示。

本课题组前期开展了盐胁迫下水稻质膜蛋白质组分析,鉴定出一个 LRR 型类受体蛋白激酶 OsRPK1,其表达量受高盐诱导表达^[19]。体外磷酸化试验结果表明,原核表达 OsRPK1 蛋白胞内激酶区依赖于 Mn^{2+} 或 Mg^{2+} ,而且在高盐处理的根部总蛋白质孵育前提下, OsRPK1 蛋白才能发生磷酸化^[20]。本研究拟通过构建水稻根尖盐胁迫 cDNA 文库,采用酵母双杂交技术筛选出与 OsRPK1 胞内互作的蛋白质,为从分子水平上揭示 OsRPK1 参与高盐胁迫的分子机制及开展其生物学功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

日本晴水稻于实验室光照培养箱中培养 14 d 后

作为试验材料,其中光照度为 $600 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,白天 14 h,黑夜 10 h,相对湿度为 75%。

RNA 提取试剂 TRIzol 和 FastTrack MAG mRNA isolation Kit 购自 Invitrogen 公司,Library Construction & Screening Kits 购自 Clontech 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 高盐处理后水稻根尖 RNA 的提取及 mRNA 的分离与纯化 用 150 mmol/L NaCl 处理生长 14 d 的日本晴水稻 12 h,收集水稻根尖,用液氮研磨 1 g 根尖样品,利用 Trizol 提取总 RNA,紫外分光光度计检测 OD_{260} 值及 OD_{260}/OD_{280} 值,分析总 RNA 的纯度和质量浓度,并用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整度。采用 FastTrack MAG mRNA isolation Kit 分离获得 mRNA,利用紫外分光光度计和 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测分离纯化后 mRNA 的质量浓度和质量。

1.2.2 双链 cDNA 的合成及其纯化 PCR 管中分别加入 $2 \mu\text{g}$ mRNA 和 $1 \mu\text{mol/L}$ CDS III 引物,用 RNase-free H_2O 补至总体积为 $4 \mu\text{L}$ 。混匀后 72°C 水浴变性 3 min,冰上冷却 5 min,瞬时离心,加入 $2 \mu\text{L}$ 5×First-Strand buffer、 $1 \mu\text{L}$ 20 mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT)、 $1 \mu\text{L}$ 10 mmol/L 脱氧核糖核苷三磷酸 (dNTP) 和 $1 \mu\text{L}$ PowerScript™ RT 反转录酶,混匀, 42°C 水浴 10 min,加入 $1 \mu\text{L}$ SMART III-modified Oligonucleotide,混匀后 42°C 水浴 1 h,然后 72°C 水浴 10 min,终止 cDNA 第一链的合成。室温冷却后,加入 $1 \mu\text{L}$ 核糖核酸酶 H, 37°C 水浴 20 min。以反转录合成的第一链 cDNA 为模板进行长距离 PCR (LD-PCR) 扩增,循环数为 25, 68°C 延伸 5 min,合成双链 cDNA,使用 CHROMA SPIN™ TE-400 Column 纯化双链 cDNA。

1.2.3 文库的构建 纯化后的双链 cDNA 和线性化的 pGADT7-Rec 载体同时转化酵母感受态细胞 Y187,利用 SD/-Leu (亮氨酸) 缺失培养基进行筛选,每个平板加入 $100 \mu\text{L}$ 悬浮酵母细胞,用涂布棒涂开至无液体流动, 30°C 倒置培养 3 d 后收集菌落,将长出菌落的琼脂板置于 4°C 条件下冻存 3 h。每个琼脂板加入 5 ml 冻存液以及 15 个 5 mm 的玻璃珠,玻璃珠轻轻在琼脂板上滚动分离菌落溶于冻存液中。收集所有的菌落冻存液于烧瓶中,利用细胞计数器估计细胞密度。

1.2.4 文库的鉴定 取 $50 \mu\text{L}$ 菌落冻存液,分别稀

释 10 倍、100 倍后涂于 SD/-Leu 平板上,共转化 pGADT7-Rec 和 SV40 大 T PCR 片段作为阳性对照,转化空载体 pGADT7-Rec 作为阴性对照。 30°C 倒置培养 3 d,出现单菌落后统计琼脂板上的菌落数量,计算文库容量和重组率(文库容量=每皿平均克隆数/涂布体积×稀释倍数×转化体积;文库重组率=空载体转化的克隆数/共转化检测的克隆总数×100%)。随机挑取 24 个单菌落进行培养,使用酵母质粒提取试剂盒提取质粒,用插入片段检测引物 (T7-Primer: $5'-\text{TAATACGACTCACTATAGGGC}-3'$; 3' AD Primer: $5'-\text{CTGAAGTTCGGGGGTTTTTC}-3'$) 进行 PCR 扩增,检测插入片段的大小。

1.2.5 诱饵表达载体 pGBKT7-*OsRPK1-CD* 的构建

利用在线软件 SMART 分析水稻类受体蛋白激酶 *OsRPK1* (NCBI 登录号: XP_015640180) 的蛋白质结构域,确定胞内区域为第 631 氨基酸至第 969 氨基酸,设计 2 条引物用于扩增该区域碱基序列:上游引物 *OsRPK1-CD-F*: $5'-\text{GCCGAATTCATGTTCTCTGACCAACCACGAG}-3'$,下游引物 *OsRPK1-CD-R*: $5'-\text{CAGGTCGACCTACTTGGGCTTGACCTCAAAAT}-3'$,分别在上、下游引物中插入 *Eco* RI 和 *Sal* I 酶切位点(划线部分),引物由安徽生物通用生物有限公司合成。利用高保真 PrimeSTAR DNA 聚合酶以水稻根尖 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。纯化的 PCR 产物与诱饵载体 pGBKT7 同时用 *Eco* RI 和 *Sal* I 双酶切,酶切产物回收后用 T4 DNA 连接酶于 16°C 连接 4 h,连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 37°C 培养过夜后挑取单菌落进行 PCR 扩增、酶切和测序验证。

1.2.6 pGBKT7-*OsRPK1-CD* 毒性 诱饵表达载体 pGBKT7-*OsRPK1-CD* 和空载体 pGBKT7-Rec 分别转化进入酵母感受态 AH109 中,挑取单菌落至 50 ml SD/-Trp (色氨酸) 液体培养基中, 30°C 摇床中 250 r/min 振荡培养 24 h; 600 g 室温离心 5 min,弃上清液;用 5 ml SD/-Trp 液体培养基重悬菌体,用细胞计数器计算细胞密度。

1.2.7 pGBKT7-*OsRPK1-CD* 自激活检测 诱饵载体 pGBKT7-*OsRPK1-CD* 转入 AH109 (MAT α) 菌株,以转入 Y187 (MAT α) 菌株的 pGADT7-Rec 作为空载体对照,分别以转入 Y2HGold 菌株的 pGBKT7-53 载体和 pGBKT7-Lam 载体作为阳性对照和阴性对照。挑取 SD-1 平板上生长较好的单菌落,分别挑到 1 ml

2×YPDA 液体培养基中,摇至对数生长期,1 000 g 离心收集菌体,移入 100 ml 三角瓶,加入 2 ml 2×YPDA 液体培养基中,30 ℃,30 r/min,接合 18 h 后收集菌体,将收集的菌体分别涂布于 SD/-Leu/-Trp 和 SD/-Ade(腺嘌呤)/-His(组氨酸)/-Leu/-Trp 营养缺陷型平板上,30 ℃培养箱中培养 2 d,观察结果。

1.2.8 酵母双杂交筛选与 pGBKT7-*OsRPK1-CD* 互作的下游蛋白质 在 2 L 三角瓶中分别加入 5 ml 含有诱饵表达载体 pGBKT7-*OsRPK1-CD* 的 AH109 菌液、冻融的 1 ml 酵母文库和 45 ml 2×YPDA/Kan (50 μg/ml),于 30 ℃、30 r/min 条件下配对 20~24 h。配对菌液 1 000 r/min 室温离心 10 min,弃上清液。然后再加入 YPDA(2×)清洗酵母细胞,1 000 g 室温离心 10 min,弃上清液。用灭菌水清洗酵母细胞,1 000 r/min 室温离心 10 min,弃上清液。加入约 10 ml 灭菌水重悬酵母细胞,SD/-His/-Leu/-Trp/-Ade 4 缺培养基平板涂布 150 μl 悬浮酵母细胞,30 ℃培养 4~6 d,挑取阳性单菌落。选取单菌落至 YPDA 液体培养基中,菌液摇匀后插入片段进行 PCR 扩增检测(T7-primer-F: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGC-3'; ADR-primer-R: 5'-GTGAACCTGCGGGGTTTTTC-3')。插入片段大于 500 bp 的酵母单克隆质粒送至安徽通用生物公司测序,测序结果利用 NCBI 在线网站比对,并用 Uniprot 网站预测基因功能。

1.2.9 荧光定量 PCR 分析盐胁迫下 *OsRPK1* 和候选基因的表达模式 野生型水稻在培养液中生长 14 d,用 150 mmol/L NaCl 处理 0 h、0.5 h、3.0 h、12.0 h、24.0 h、48.0 h 后收集根尖组织样品,液氮研磨利用 Invitrogen 公司的 Trizol 试剂提取 RNA,采用 TaKaRa 公司反转录试剂盒合成 cDNA,采用 SYBR Green PCR 试剂盒,以 cDNA 为模板进行 PCR 反应。PCR 反应程序:95 ℃ 10 min;95 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,循环扩增 40 次结束扩增。利用荧光定量 PCR 在线设计引物网站 QuantPrime 设计特异性引物(表 1),选用 *actin* 作为内参基因^[21],采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对表达量的计算方法^[22],比较不同时间下 150 mmol/L NaCl 处理的基因表达量。

2 结果与分析

2.1 高盐处理后水稻根尖总 RNA 提取及 mRNA 的分离

水稻幼苗生长 14 d 后,150 mmol/L NaCl 处理

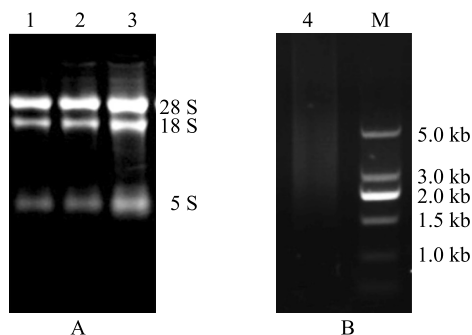
表 1 荧光定量 PCR 引物

Table 1 Fluorescence quantitative PCR primers

引物名称	引物序列(5'→3')
Q- <i>OsRPK1</i> -F	AAACGCAGCACTTCCATTTC AAC
Q- <i>OsRPK1</i> -R	TTCCTATCCAATCGGAGAACTTCG
Q-2943-4-F	TGGCATCTTGTAGCACCAGTGAAC
Q-2943-4-R	TGCTTGTCCACCACCAACCATC
Q-2943-5-F	GCTAAGGCCAAGGCGATCTA
Q-2943-5-R	ACATGGATTTCACGCCACGAT
Q-2943-6-F	ATGATGAGTTGGCCAGCAAGGG
Q-2943-6-R	TGATAGAGTTCTGGCTGGCTCCTC
Q-2943-7-F	ACATGTCACGCTCTGTGTGTGTG
Q-2943-7-R	ACAGCAGCTTGTATGCAATGTACC
Q-2943-11-F	CTGGGGCAGATCAAGAAG
Q-2943-11-R	ATGGACCACGTAGGAGAA
Q-2943-12-F	GATGCCAACATCGCCCAAACTG
Q-2943-12-R	GCTACTCGCGTATCTGTGTGTG
Q-2943-14-F	ACTGGAATGGTACTGCCAGC
Q-2943-14-R	ACCAAGGTTTCAGTGCCACA
Q-2943-27-F	TCATCCTACCTGAAGAAG
Q-2943-27-R	CCTCTCAATCATGTGTCTC
Q-2943-30-F	TAAGTCTGGCGACGAGAGGAAG
Q-2943-30-R	TCTGCGAGAGCAATGTCTCTGAC
Q-2943-32-F	TGCTGACACTACACAGCGTT
Q-2943-32-R	TGGCATCGACACAGTTCCAA
Q-2943-36-F	TGGATGCAGATGCAAGATGTTCCC
Q-2943-36-R	ATTCTCTCCAGAGCTCGCCTTGTTG
Q-Actin-F	GACTCTGGTGTGTTGTCTCAGC
Q-Actin-R	GGCTGGAAGAGGACCTCAGG

根尖 12 h,使用 Trizol 试剂提取总 RNA,总 RNA 稀释 25 倍后用紫外分光光度计检测 OD_{260}/OD_{280} 值为 1.92,说明提取的 RNA 既没有降解,也没有被其他物质(蛋白质、糖类等)污染,并且根据所测的 OD_{260} 值换算得到实际提取的总 RNA 质量浓度为 556 ng/μl。1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 结果(图 1A)显示,28S 和 18S 条带清晰明亮,无拖尾,总 RNA 完整性较好,28S 条带的亮度约为 18S 的 2 倍,5S 条带的亮度较低,表明总 RNA 降解较少。利用试剂盒 FastTrack MAG mRNA isolation Kit 分离纯化获得 mRNA,1.5%的琼脂糖凝胶电泳结果(图 1B)

显示,mRNA 条带呈弥散状,条带最亮部分在 2.0 kb 附近,说明 mRNA 未发生降解,可以进行后续试验。



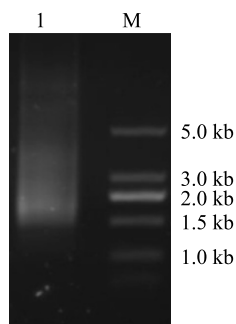
M: DNA marker; 1~3: 总 RNA; 4: 纯化后的 mRNA。

图1 盐胁迫后的水稻根尖总 RNA (A) 及纯化后的 mRNA (B)

Fig.1 Electrophoresis of total RNA (A) isolated from rice root tip after salt stress, and purified mRNA (B)

2.2 双链 cDNA 的合成与纯化

以 mRNA 为模板反转录合成第一链 cDNA, 通过长距离 PCR (LD-PCR) 扩增获得双链 cDNA, 双链 cDNA 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析。结果 (图 2) 显示, 条带呈弥散状, 条带大小主要分布在 1.5~5.0 kb, 表明不同大小和不同丰度的 RNA 被反转录。使用 CHROMA SPIN™ TE-400 Column 纯化双链 cDNA, 此纯化产物可用于酵母体内重组。



M: DNA marker; 1: LD-PCR 扩增获得的双链 cDNA。

图2 LD-PCR 扩增获得的双链 cDNA

Fig.2 Synthesized dscDNA by long distance PCR (LD-PCR)

2.3 酵母双杂交文库的构建及鉴定

利用 SMART 同源重组技术将纯化后的双链 cDNA 片段与载体 pGADT7-Rec 共转化酵母 Y187 感受态细胞, 经过 SD/-Leu 缺失培养基筛选, 3 d 左右长出菌落。利用冻存液及玻璃珠分离并收集菌落于 400 ml 大烧瓶中, 吸取 100 μ l 菌液, 稀释至 1 ml, 吸取至 16 格 \times 25 格的细胞计数板, 计算酵母菌的密

度, 100 小格共计数 212 个酵母菌, 细胞密度为 $1 \text{ ml } 8.48 \times 10^7$ 个细胞, 符合文库构建要求。同时共转化 pGADT7-Rec 和 SV40 大 T PCR 片段作为阳性对照, 转化空载体 pGADT7-Rec 作为阴性对照, 培养 3 d 后收集菌落, 配制悬浮酵母细胞, 按 1:100 进行稀释, 再涂到 SD-Leu 培养基平板上。图 3 显示, ds cDNA 片段与载体 pGADT7-Rec 共转化后长出的克隆数为 370 个, 折算后文库容量为 1.11×10^7 CFU。其中, SV40 大 T PCR 和 pGADT7-Rec 共转化后的克隆数为 148 个, 空载体 pGADT7-Rec 转化后的克隆数为 11 个, 97% 克隆都包含同源重组后的 pGADT7 质粒。为进一步分析文库重组子情况, 从文库中随机挑选 24 个克隆, 提取酵母质粒, 用 pGADT7 载体的通用引物 T7 和 3'AD 进行 PCR 扩增。结果 (图 4) 显示, 23 个克隆检测到片段, 且片段大小差异明显, 分布在 0.75~2.00 kb, 主要集中在 1.00 kb 左右, 说明文库插入片段多态性较好, 信息丰富。文库重组率为 96%, 满足文库重组率要高于 80% 的质量要求。说明构建的水稻盐胁迫根尖 cDNA 酵母文库的库容、重组率和插入片段大小达到标准 cDNA 文库要求, 可用于筛选高盐胁迫下的 *OsRPK1* 胞内互作蛋白质。

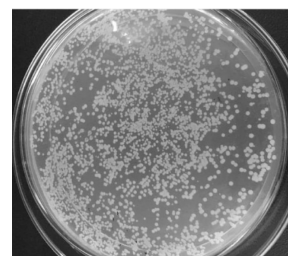


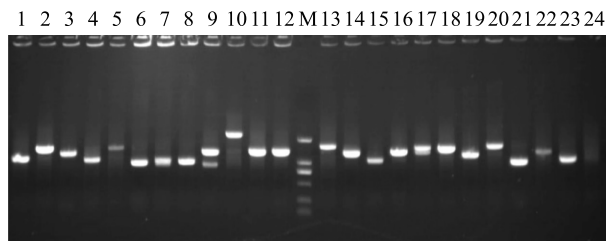
图3 酵母双杂交文库库容鉴定

Fig.3 Identification of the capacity of yeast two hybrid library

2.4 诱饵载体 pGBKT7-*OsRPK1*-CD 的构建和鉴定

基于在线网站 SMART 分析水稻类受体蛋白激酶 *OsRPK1* (NCBI 登录号: XP_015640180) 的蛋白质结构域, 确定胞内区域 (CD) 为第 631 氨基酸到 969 氨基酸位置, 设计特异性引物扩增 *OsRPK1*-CD 序列, 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后显示大小为 1 000 bp 左右, 与预期值 1 020 bp 相符 (图 5)。

PCR 扩增 *OsRPK1*-CD, 同时将诱饵表达载体 pGBKT7 进行双酶切, T4 连接酶连接后构建重组质粒 pGBKT7-*OsRPK1*-CD, 重组质粒转化 DH5 α 菌株, 挑取阳性单克隆质粒进行 *Eco* R I 和 *Sal* I 双酶切,

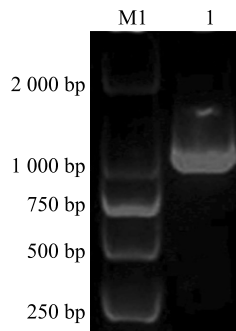


M: 100 bp DNA ladder marker; 1~24: 插入片段的 PCR 产物。

图 4 文库插入片段 PCR 检测

Fig.4 Detection of the cDNA library insert fragments by PCR amplification

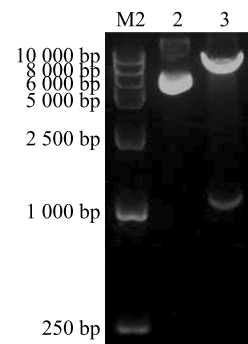
结果(图 6)显示,酶切产物大小与预期值相符。选取阳性克隆进行 DNA 测序,结果与 NCBI 数据库中的序列一致,说明 pGBKT7-*OsRPK1-CD* 诱饵表达载体构建成功。



M1: DNA marker; 1: PCR 扩增 *OsRPK1-CD*。

图 5 PCR 扩增 *OsRPK1-CD*

Fig.5 PCR amplification production of *OsRPK1-CD*



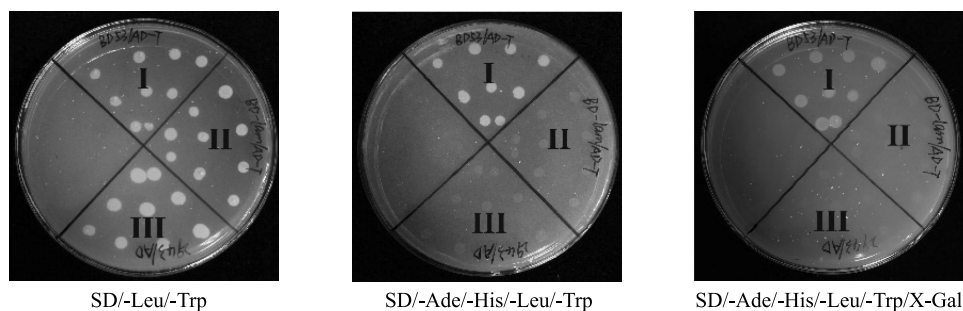
M2: DNA marker; 2: 质粒 pGBKT7-*OsRPK1-CD*; 3: *Eco* R I 和 *Sal* I 双酶切质粒 pGBKT7-*OsRPK1-CD*。

图 6 pGBKT7-*OsRPK1-CD* 重组质粒双酶切鉴定

Fig.6 Identification of pGBKT7-*OsRPK1-CD* by enzyme digestion

2.5 诱饵表达载体 pGBKT7-*OsRPK1-CD* 的自激活活性和毒性检测

将诱饵表达载体 pGBKT7-*OsRPK1-CD* 转入 AH109 (MAT α) 菌株中, pGADT7-Rec 空载体转入 Y187 (MAT α) 菌株中, 阳性对照载体 (pGBKT7-53) 和阴性对照载体 (pGBKT7-Lam) 转入 Y2HGOLD 菌株中。结果(图 7)显示, 阳性对照 pGBKT7-53/pGADT7-T 在 SD/-Leu/-Trp 和 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 营养缺陷型平板上均能长出白色菌落, 并且在 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X-Gal 营养缺陷型平板上长出蓝色菌落。阴性对照 pGBKT7-Lam/pGADT7-T 只能在 SD/-Leu/-Trp 营养缺陷型平板上生长, pGBKT7-*OsRPK1-CD*/pGADT7-T 的结果与阴性对照相同, 说明 pGBKT7-*OsRPK1-CD* 诱饵载体无自激活活性。



I: pGBKT7-53/pGADT7-T; II: pGBKT7-Lam/pGADT7-T; III: pGBKT7-*OsRPK1-CD*/pGADT7-T。

图 7 pGBKT7-*OsRPK1-CD* 的自激活验证

Fig.7 Identification of pGBKT7-*OsRPK1-CD* for auto-activation

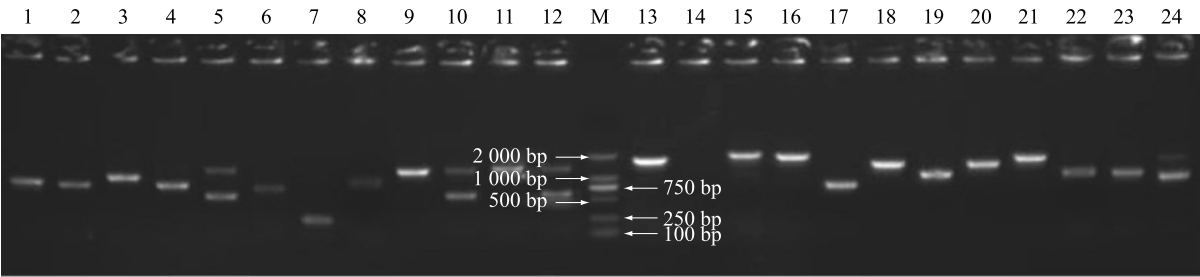
挑取含有 pGBKT7-*OsRPK1-CD* 诱饵表达载体的 AH109 菌株, 单克隆至 SD/-Trp 液体培养基中, 30 °C 培养 24 h。用 1/10 体积的 SD/-Trp 液体培养基重悬菌体, 采用细胞计数板计算细胞密

度, 1 ml 的细胞数不低于 1×10^9 个, 说明 pGBKT7-*OsRPK1-CD* 无毒性。pGBKT7-*OsRPK1-CD* 诱饵表达载体可用于后续 *OsRPK1* 胞内互作蛋白质的筛选工作。

2.6 筛选水稻盐胁迫根尖 cDNA 文库中的 *OsRPK1* 胞内互作蛋白质

含有诱饵表达载体 pGBKT7-*OsRPK1-CD* 的酵母菌液与含有 pGADT7 质粒的文库菌液结合后,将产物涂布于 SD/-Trp/-His/-Leu/-Ade 培养基平板上,30 ℃ 培养 4 d 左右,挑取直径 1~2 mm 的菌落,扩增后提取质粒进行 PCR 检测。结果(图 8)显示,

扩增获得的条带大小主要集中在 750~2 000 bp,从 PCR 扩增到条带的 68 个单克隆中提取质粒,转化大肠杆菌 DH5a 并测序,在 NCBI 数据库中对测序得到的 DNA 碱基序列进行比对分析,共获得 37 个基因碱基序列。利用 Uniprot 在线分析网站,对 37 个基因碱基序列进行功能分析,部分重要的候选蛋白质如表 2 显示。



M;100 bp DNA ladder marker;1~24;插入片段的 PCR 产物。

图 8 部分 cDNA 文库插入片段的 PCR 检测结果

Fig.8 PCR identification of insert fragments in the cDNA library

表 2 以 *OsRPK1-CD* 为诱饵筛选到的部分候选蛋白质信息

Table 2 The information of partial candidate proteins interacting with *OsRPK1-CD* by yeast two-hybrid screening

克隆的基因编号	蛋白质注释	GenBank 登录号	功能
2943-4	类受体蛋白激酶	XM_015778795	在植物生长发育、激素信号转导和逆境胁迫过程中发挥重要作用
2943-5	金属硫转运蛋白 OsMT4c	AK105219	作为活性氧(ROS)清除剂,具有超氧阴离子自由基和羟自由基清除活性
2943-6	腺苷激酶蛋白	AK059771	催化腺苷生成腺苷-磷酸(AMP)
2943-7	胁迫响应蛋白	AK060132	参与植物胁迫反应
2943-11	脂肪酸去饱和酶 <i>FAD2</i>	AK103618	具有氧化还原酶活性,能够影响植物的耐盐性 ^[23-24]
2943-12	纤维素酶	AK065000	将纤维素降解为葡萄糖
2943-14	ABC 转运蛋白 C2	XM_015779966	参与植物胁迫反应
2943-27	延伸因子	AF030517	mRNA 翻译时促进多肽链的延伸
2943-30	14-3-3 蛋白 GF14-d	XM_015761572	植物中的顺式 DNA 调控元件
2943-32	葡萄糖苷酶	XM_015791884	水解酶活性,水解 O-糖基化合物
2943-36	金属硫转运蛋白 OsMT2b	AK070937	具有超氧阴离子和羟自由基清除活性,可通过细胞分裂素途径调节根的发生、侧根发生和种子胚萌发 ^[25-26]

2.7 水稻盐胁迫下 *OsRPK1* 与部分候选基因的表

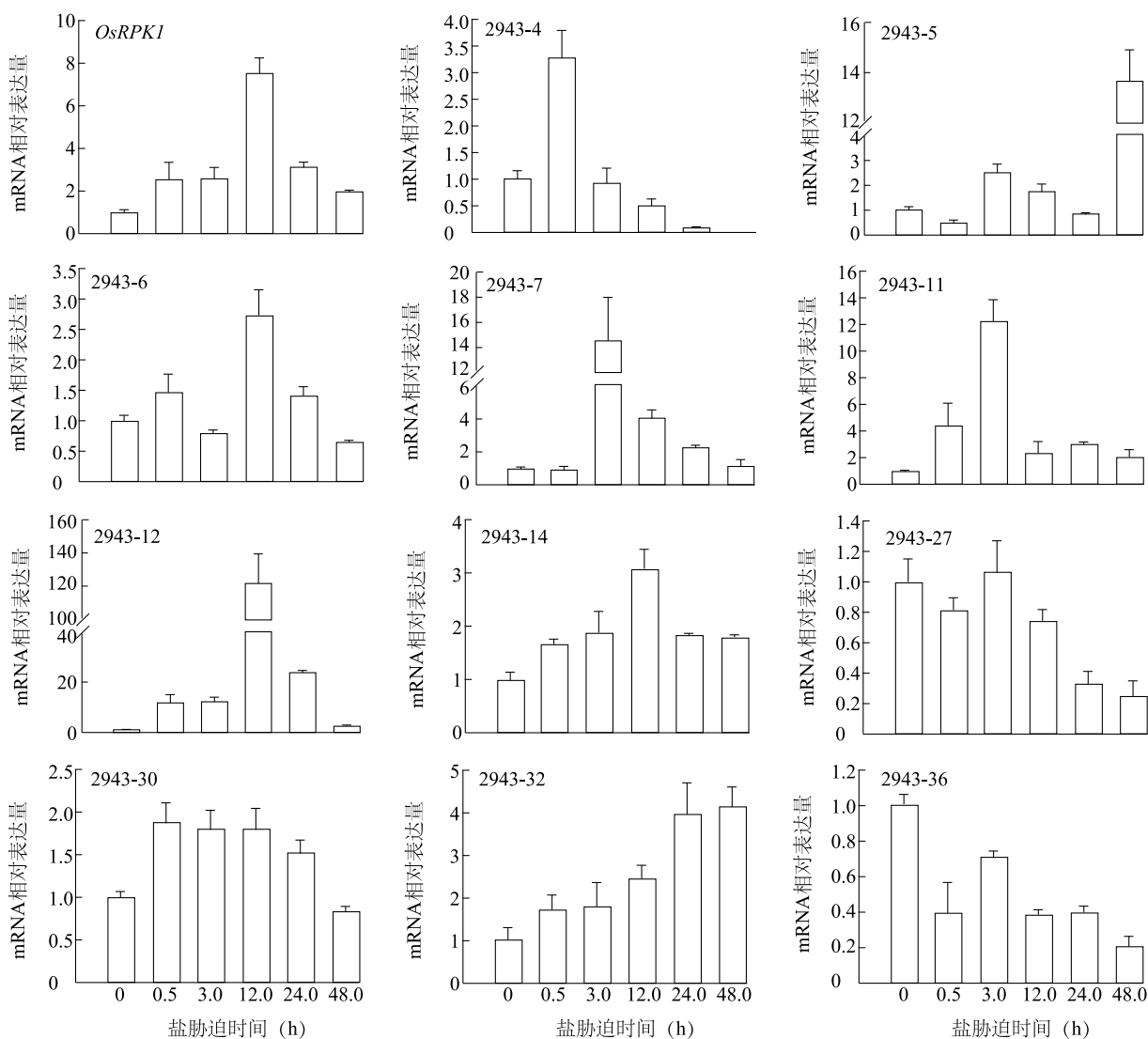
达模式分析

图 9 显示,采用生长 14 d 的野生型水稻日本晴,用 150 mmol/L 的 NaCl 处理 0~48.0 h, *OsRPK1* 受高盐胁迫诱导表达,处理 12.0 h 时表达量最高,然后表达量又缓慢下降。2943-5(金属硫转运蛋白 OsMT4c)、2943-6(腺苷激酶蛋白)、2943-7(胁迫响应蛋白)、2943-11(脂肪酸去饱和酶 *FAD2*)、2943-12

(纤维素酶)、2943-14(ABC 转运蛋白 C2)、2943-30(14-3-3 蛋白 GF14-d)和 2943-32(葡萄糖苷酶)8 个候选基因受高盐胁迫诱导表达。2943-5 在 3.0 h 时开始诱导表达,其表达量在 48.0 h 达到最大;2943-6、2943-12 和 2943-14 3 个候选基因表达模式与 *OsRPK1* 基本一致;2943-7、2943-11 和 2943-30 3 个候选基因的表达量分别在 3.0 h、3.0 h 和 0.5 h 时达到最大;2943-32 受盐胁迫持续诱导表达,48.0 h

时表达量达到最大。2943-27(延伸因子)、2943-36(金属硫转运蛋白 *OsMT2b*) 2 个候选基因受高盐胁迫抑制表达,2943-27 的表达量抑制需要高盐胁迫

12.0 h 才发生。2943-4(类受体蛋白激酶)受盐胁迫瞬时(0.5 h)诱导表达,然后表达量迅速下降,48.0 h 时 2943-4 的表达量受到显著抑制。



2943-4、2943-5、2943-6、2943-6、2943-7、2943-11、2943-12、2943-14、2943-27、2943-30、2943-32、2943-36 为克隆的基因编号。

图 9 盐胁迫下 *OsRPK1* 和部分候选基因的表达模式

Fig.9 Expression pattern of *OsRPK1* and partial candidate genes under salt stress

3 讨论

土壤盐渍化是目前影响农作物产量和质量的主要环境因子之一^[27],而植物本身为了适应环境,在漫长的进化过程中建立了耐受高盐或将盐分排出细胞外的特殊分子机制^[28-30]。胞外富含亮氨酸重复片段的植物类受体蛋白激酶 *LRR-RLKs*,在植物盐胁迫过程中发挥重要作用,但其参与的抗性机制和调

控途径仍未被揭示。*LRR-RLKs* 的胞外 LRR 基序首先识别外界刺激,在跨膜区将信号传递给胞内的激酶结构域,激酶结构域通过磷酸化作用将胞外信号传入胞内,从而调节植物响应胁迫。对于 *LRR-RLKs* 作用的下游信号分子所知甚少,比较明确的下游靶分子包括激酶结合蛋白磷酸酶(*KAPP*)和丝裂原活化蛋白激酶(*MAPK*)。*KAPP* 与 *LRR-RLKs* 的结合有赖于后者的磷酸化,*KAPP* 能识别 *LRR-RLKs* 磷酸化

的丝氨酸和苏氨酸,并与之结合^[31]。目前比较清楚的信号途径包括受体蛋白激酶(*CLV1*)、油菜素内酯受体(*BRI1*)和鞭毛蛋白受体(*FLS2*),其基本方式都是 *LRR-RLKs* 结合各自的配基后形成同源(*FLS2*)或异源(*CLV1/CLV2*; *BRI1/BAK1*)二聚体。二聚体导致 *LRR-RLKs* 的自磷酸化,通过 *KAPP*、*MAPK* 或油菜素内酯信号通路激酶(*BSK*)等胞内信号分子诱导相关转录因子表达,并在核内启动响应基因^[31]。

前期开展盐胁迫下水稻质膜蛋白质组分析,鉴定出一个受盐胁迫诱导表达的 LRR 型类受体蛋白激酶(*OsRPK1*)。体外磷酸化试验结果表明,*OsRPK1* 依赖于 Mn^{2+} 或 Mg^{2+} , 并且需要在高盐处理的根部总蛋白质孵育前提下,才能发生磷酸化^[20]。*OsRPK1* 的组织定位及其在盐胁迫条件下的原位表达分析结果显示,*OsRPK1* 定位于细胞膜,蛋白质表达受盐胁迫显著诱导^[19]。同源比对和进化树分析结果表明,*OsRPK1* 蛋白没有与其同源性很高的蛋白质,而且同源蛋白质均未见其功能报道^[20]。因此,*OsRPK1* 是一个功能不冗余,有激酶活性,具有盐响应的典型 LRR 型类受体蛋白激酶。为了进一步揭示 *OsRPK1* 参与盐胁迫的分子机制,采用 150 mmol/L NaCl 处理水稻日本晴 12 h,构建了根尖 cDNA 酵母文库,文库容量为 1.11×10^7 CFU,重组率和插入片段大小达到标准 cDNA 文库要求。利用 *OsRPK1* 胞内激酶区构建诱饵表达载体 pGBKT7-*OsRPK1-CD*, pGBKT7-*OsRPK1-CD* 诱饵表达载体无自激活活性,无毒性。通过构建的文库,筛选到了 37 个候选基因,对其基因碱基序列进行功能分析,从中选择了 11 个重要的候选蛋白质分析其在高盐处理下的表达模式,为进一步研究 *OsRPK1* 的分子机制及下游作用因子奠定了基础。

植物 LRR 型受体蛋白激酶不仅在识别信号的过程中发挥重要作用,也可以作为信号传导途径下游重要的调节因子。在油菜素内酯(BR)信号传导的过程中,油菜素内酯受体 *BRI1* 能够识别 BR, *BRI1* 磷酸化激活,而负调控因子 *BKI1* 与 *BRI1* 相互作用并被解离,然后 *BRI1* 与共受体 *BAK1* 相互作用,将 BR 信号传递给下游作用蛋白质^[32-33]。本研究中,*OsRPK1* 受高盐诱导表达,而高盐处理 0.5 h 时类受体蛋白激酶表达量瞬时上升,这可能是受到高盐胁迫后的一种应激反应,处理 12.0 h 时表达量最高,然后表达量又缓慢下降。*OsRPK1* 和类受体

蛋白激酶的表达模式与 BR 信号传导途径中的 *BRI1* 和 *BKI1* 相似,故推测类受体蛋白激酶可能是 *OsRPK1* 参与高盐信号传导过程中的负调控因子。

本试验筛选到 2 个金属硫转运蛋白 *OsMT2b* 和 *OsMT4c*,金属硫转运蛋白能提高植物对不同重金属的耐受性,具有自由基清除活性,可提高植物对生物胁迫和非生物胁迫的抗逆性^[34]。刘佳等^[35]通过分析金属硫转运蛋白家族基因 *OsMTs* 的组织表达以及胁迫下的表达情况,发现 *OsMT2b* 在各个组织中的表达丰度明显高于其他家族成员,而 *OsMT4* 在各个组织中的表达量均最低,*OsMT2b* 受干旱胁迫抑制表达,高盐(200 mmol/L NaCl)处理 3 h 表达量变化不大。本研究用 150 mmol/L NaCl 处理,发现 *OsMT2b* 的表达量是缓慢受到抑制,3 h 时的表达量与 0 h 差异不显著,但到 48 h 时表达量已受到显著抑制,所以认为 *OsMT2b* 同样也受到高盐抑制表达。*OsMT2b* 具有超氧阴离子和羟自由基清除活性,通过影响细胞分裂素在植物体内的含量来调节根的发育,侧根的发生以及种子胚的萌发^[25-26]。在盐胁迫过程中,植物体内将有大量自由基产生,并且诱导脱落酸和细胞分裂素含量的增加,所以推测 *OsMT2b* 可能在盐胁迫过程中与 *OsRPK1* 相互作用,进而影响水稻体内的活性氧含量和细胞分裂素含量,调控水稻耐盐性。*OsMT4c* 在高盐胁迫中的表达模式与 *OsMT2b* 不同,可能暗示 *OsMT2b* 和 *OsMT4c* 在盐胁迫过程中行使的功能不同。

在盐胁迫过程中,植物细胞壁最先感知胁迫信号,继而是细胞膜,因而在盐胁迫过程中控制细胞壁和细胞膜的合成蛋白质非常重要。本试验筛选到了脂肪酸去饱和酶、纤维素酶和葡萄糖苷酶,盐胁迫后这 3 种酶编码的基因表达量都受诱导表达。脂肪酸去饱和酶控制细胞膜中不饱和脂肪酸的合成,已有研究结果^[24]表明,水稻 *OsFAD2* 不受低温诱导表达,而受黑暗诱导表达。在拟南芥中,*AtFAD2* 受高盐诱导表达,高盐胁迫后 *FAD2* 突变体的萌发率和存活率都明显下降, Na^+/K^+ 值升高,超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性降低,*FAD2* 在液泡和质膜中维持 Na^+ 外排,从而调节拟南芥耐盐性^[23]。这 3 个酶是否通过 *OsRPK1* 来感知高盐胁迫信号途径值得深入研究。

14-3-3 蛋白 GF14 可通过识别特异的磷酸化序列与激酶、跨膜蛋白等信号蛋白质结合,从而发挥作

用^[36]。GF14参与盐胁迫,如水稻盐胁迫后GF14表达量上调^[37],OsGF14e与OsCPK21相互作用并被其磷酸化,参与ABA信号传导途径,增强水稻的耐盐性^[38]。拟南芥GF14λ、GF14κ与盐超敏感SOS信号途径中的钙依赖蛋白激酶SOS2(CIPK24)结合,并抑制SOS2(CIPK24)激酶活性,负调控拟南芥的耐盐性^[39]。由此可见,GF14通过多种信号途径调控植物的耐盐性,本研究筛选到的14-3-3蛋白GF14-d和OsRPK1是否通过新的信号途径参与盐胁迫,也是值得研究的。ABC转运蛋白几乎参与植物所有的生命活动,C亚族ABCC蛋白是人类多种药物抗性相关蛋白质,所以又称为MRP蛋白,该类蛋白质参与植物非生物胁迫的报道较少。在拟南芥中,AtMRP4和AtMRP5主要在气孔保卫细胞中表达,能够通过影响气孔关闭来调控水利用效率和作物耐旱性^[40-41]。AtMRP4和AtMRP5也能够被盐胁迫诱导表达,而且盐胁迫后AtMRP4、AtMRP5突变体的气孔不能关闭,认为AtMRP4和AtMRP5可能是通过调节气孔的开关来参与盐胁迫过程,但具体的分子机制现在还不清楚^[42]。进一步研究ABC转运蛋白C亚族2及其与OsRPK1的相互作用,对于改良植物耐盐性意义重大。本研究得到的3个蛋白质(腺苷激酶蛋白、胁迫响应蛋白和延伸因子)与OsR-*PK1*在盐胁迫过程中的作用需要进一步研究。

参考文献:

- [1] 赵可夫,李法曾,张福锁.中国盐生植物[M].2版.北京:科学出版社,2013.
- [2] 宁丽华,何晓兰,张大勇.大豆耐盐相关基因GmNcl1功能标记的开发及验证[J].江苏农业学报,2017,33(6):1227-1234.
- [3] 夏秀忠,张宗琼,杨行海,等.广西地方稻种资源核心种质的耐盐性鉴定评价[J].南方农业学报,2017,48(6):979-984.
- [4] 蔡继鸿,徐鹏,张香桂,等.盐胁迫下陆地棉耐盐相关WRKY基因的表达分析[J].江苏农业科学,2018,46(18):28-32.
- [5] ZHU J K. Salt and drought stress signal transduction in plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2002, 53(1): 247-273.
- [6] HANIN M, EBEL C, NGOM M, et al. New insights on plant salt tolerance mechanisms and their potential use for breeding[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 1787.
- [7] QUAN R, LIN H, MENDOZA I, et al. SCABP8/CBL10, a putative calcium sensor, interacts with the protein kinase SOS2 to protect Arabidopsis shoots from salt stress[J]. The Plant Cell, 2007, 19(4): 1415-1431.
- [8] QUINTERO F J, MARTINEZ-ATIENZA J, VILLALTA I, et al. Activation of the plasma membrane Na/H antiporter Salt-Overly-Sensitive 1 (SOS1) by phosphorylation of an auto-inhibitory C-terminal domain[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011, 108(6): 2611-2616.
- [9] YU L, NIE J, CAO C, et al. Phosphatidic acid mediates salt stress response by regulation of MPK6 in Arabidopsis thaliana[J]. New Phytologist, 2010, 188(3): 762-773.
- [10] 查笑君,马伯军,潘建伟,等.植物富亮氨酸重复类受体蛋白激酶的研究进展[J].浙江师范大学学报(自然科学版),2010,33(1):7-12.
- [11] OUYANG S Q, LIU Y F, LIU P, et al. Receptor-like kinase Os-SIK1 improves drought and salt stress tolerance in rice (Oryza sativa) plants[J]. The Plant Journal, 2010, 62(2): 316-329.
- [12] OSAKABE Y, MARUYAMA K, SEKI M, et al. Leucine-rich repeat receptor-like kinase1 is a key membrane-bound regulator of abscisic acid early signaling in Arabidopsis[J]. The Plant Cell, 2005, 17(4): 1105-1119.
- [13] OSAKABE Y, MIZUNO S, TANAKA H, et al. Overproduction of the membrane-bound receptor-like protein kinase 1, RPK1, enhances abiotic stress tolerance in Arabidopsis[J]. Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(12): 9190-9201.
- [14] KUMAR D, KUMAR R, BAEK D, et al. Arabidopsis thaliana RECEPTOR DEAD KINASE1 functions as a positive regulator in plant responses to ABA[J]. Molecular Plant, 2017, 10(2): 223-243.
- [15] KANG J, LI J, GAO S, et al. Overexpression of the leucine-rich receptor-like kinase gene LRK2 increases drought tolerance and tiller number in rice[J]. Plant Biotechnology Journal, 2017, 15(9): 1175-1185.
- [16] WU F, SHENG P, TAN J, et al. Plasma membrane receptor-like kinase leaf panicle 2 acts downstream of the drought and salt tolerance transcription factor to regulate drought sensitivity in rice[J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 66(1): 271-281.
- [17] WANG J, LI C, YAO X, et al. The Antarctic moss leucine-rich repeat receptor-like kinase (PnLRR-RLK2) functions in salinity and drought stress adaptation[J]. Polar Biology, 2018, 41(2): 353-364.
- [18] DIEVART A, PERIN C, HIRSCH J, et al. The phenome analysis of mutant alleles in leucine-rich repeat receptor-like kinase genes in rice reveals new potential targets for stress tolerant cereals[J]. Plant Science, 2016, 242: 240-249.
- [19] CHENG Y, QI Y, ZHU Q, et al. New changes in the plasma-membrane-associated proteome of rice roots under salt stress[J]. Proteomics, 2009, 9(11): 3100-3114.
- [20] ZOU Y, LIU X, WANG Q, et al. OsRPK1, a novel leucine-rich repeat receptor-like kinase, negatively regulates polar auxin transport and root development in rice[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2014, 1840(6): 1676-1685.
- [21] JAIN M, NIJHAWAN A, TYAGI A K, et al. Validation of house-keeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR[J]. Biochemical and

- Biophysical Research Communications, 2006, 345(2): 646-651.
- [22] SCHMITTGEN T D, LIVAK K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method[J]. Nature Protocols, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [23] ZHANG J, LIU H, SUN J, et al. Arabidopsis fatty acid desaturase FAD2 is required for salt tolerance during seed germination and early seedling growth[J]. PLoS ONE, 2012, 7(1): e30355.
- [24] 曹英萍, 石金磊, 李 钟, 等. 水稻 *OsFAD2*、*OsFAD6* 的克隆及其家族成员对非生物胁迫的响应[J]. 遗传, 2010, 32(8): 839-847.
- [25] WONG H L, SAKAMOTO T, KAWASAKI T, et al. Down-regulation of metallothionein, a reactive oxygen scavenger, by the small GTPase OsRac1 in rice[J]. Plant Physiology, 2004, 135(3): 1447-1456.
- [26] YUAN J, CHEN D, REN Y, et al. Characteristic and expression analysis of a metallothionein gene, *OsMT2b*, down-regulated by cytokinin suggests functions in root development and seed embryo germination of rice [J]. Plant Physiology, 2008, 146(4): 1637-1650.
- [27] 鄂玉联, 谭兰兰, 安梦洁, 等. 高分子化合物对盐渍化棉田土壤团聚体组成及棉花产量的影响[J]. 南方农业学报, 2017, 48(11): 1989-1993
- [28] 申玉香, 李洪山, 封功能, 等. 油菜苗期耐盐性差异与耐盐指标选择[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(24): 85-87.
- [29] 黄 芳, 徐珍珍, 孟 珊, 等. 盐胁迫下棉花 LTR-反转座子的转录激活及在耐盐相关基因发掘中的应用[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(6): 1220-1226
- [30] 黄相玲, 林妃妃, 张明月, 等. 盐胁迫对小叶榄仁幼苗生长和渗透调节物质含量的影响[J]. 南方农业学报, 2018, 49(7): 1364-1369.
- [31] TORII K. Receptor kinase activation and signal transduction in plants: an emerging picture [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2000, 3(5): 361-367.
- [32] WANG X, CHORY J. Brassinosteroids regulate dissociation of BKI1, a negative regulator of BRI1 signaling, from the plasma membrane[J]. Science, 2006, 313(5790): 1118-1122.
- [33] JAILLAIS Y, HOTHORN M, BELKHADIR Y, et al. Tyrosine phosphorylation controls brassinosteroid receptor activation by triggering membrane release of its kinase inhibitor[J]. Genes & Development, 2011, 25(3): 232-237.
- [34] 代 勋, 龚 明. 植物金属硫蛋白在植物抗逆性中的作用[J]. 宁夏师范学院学报, 2011, 32(3): 47-51.
- [35] 刘 佳. 水稻铜诱导金属硫蛋白 OsMT2c 的功能研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
- [36] 李 芳, 滕建晒, 陈宣钦. 14-3-3 蛋白参与植物应答非生物胁迫的研究进展[J]. 植物科学学报, 2018, 36(3): 459-469.
- [37] CHEN F, LI Q, SUN L, et al. The rice 14-3-3 gene family and its involvement in responses to biotic and abiotic stress[J]. DNA Research, 2006, 13(2): 53-63.
- [38] CHEN Y, ZHOU X, CHANG S, et al. Calcium-dependent protein kinase 21 phosphorylates 14-3-3 proteins in response to ABA signaling and salt stress in rice[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2017, 493(4): 1450-1456.
- [39] ZHOU H, LIN H, CHEN S, et al. Inhibition of the *Arabidopsis* salt overly sensitive pathway by 14-3-3 proteins[J]. The Plant Cell, 2014, 26(3): 1166-1182.
- [40] KLEIN M, PERFUS-BARBECH L, FRELET A, et al. The plant multidrug resistance ABC transporter AtMRP5 is involved in guard cell hormonal signalling and water use[J]. The Plant Journal, 2003, 33(1): 119-129.
- [41] KLEIN M, GEISLER M, SUH S J, et al. Disruption of AtMRP4, a guard cell plasma membrane ABCC-type ABC transporter, leads to deregulation of stomatal opening and increased drought susceptibility[J]. The Plant Journal, 2004, 39(2): 219-236.
- [42] 吴延朋, 李洪旺, 侯丽霞, 等. ABC 转运体位于 H_2S 上游参与盐胁迫诱导的拟南芥气孔关闭[J]. 植物生理学报, 2014, 50(4): 401-406.

(责任编辑: 王 妮)