



GmRACK1 基因对大豆耐旱性调控作用研究

刘喜平, 王淑静, 张福强, 张 丹, 李大红

(黄淮学院 生物与食品工程学院, 河南 驻马店 463000)

摘要: 活化 C 激酶 1 受体 (RACK1) 属于含有色氨酸-天冬氨酸结构域 (WD) 重复结构的蛋白质亚家族。为研究 *GmRACK1* 在干旱胁迫中的调控作用, 本研究构建 *GmRACK1* 基因过表达与沉默两种二元表达载体并转化大豆, 对转基因和对照大豆株系进行干旱和复水处理, 测定株系的干重、存活率、叶绿素含量、过氧化氢含量和抗氧化酶活性等指标; 分析 *GmRACK1* 基因对大豆抗旱性的调控作用。结果显示: 在干旱胁迫下, 大豆 *GmRACK1* 基因沉默株系 (RNAi) 的存活率和干重明显高于野生型 (WT) 和过表达 (OE) 株系。干旱 10 d 后 RNAi 株系的叶绿素含量显著高于 WT 和 OE 株系, OE 株系的 DAB 和 NBT 染色颜色比 WT 和 RNAi 株系深。土壤干旱胁迫 10 d 后复水 4 d, RNAi 株系恢复好于 WT 和 OE 株系。在 15% PEG 4000 处理下, RNAi 株系抗氧化酶 SOD、POD 和 CAT 的活性和 ABA 含量显著高于 WT 和 OE 株系, 而 MDA 和电导率显著低于 WT 和 OE 株系。结果说明 RNAi 株系能清除过多活性氧, 导致植物的氧化伤害减弱。*GmRACK1* 基因对大豆耐旱性存在调控作用。

关键词: 大豆; RACK1; 转基因; 基因过表达; 基因沉默; 耐旱性

GmRACK1 Gene Negatively Regulates Drought-Tolerance in Soybean

LIU Xi-ping, WANG Shu-jing, ZHANG Fu-qiang, ZHANG Dan, LI Da-hong

(School of Biological and Food Processing Engineering, Huanghuai University, Zhumadian 463000, China)

Abstract: Receptor of activated protein kinase C1 (RACK1) belongs to a subfamily of proteins with a repeated structure of the tryptophan-aspartic acid domain (WD). In order to study the regulation of *GmRACK1* in drought stress, we constructed overexpression and silencing two binary expression vectors of *GmRACK1* gene and transformed into soybean. The control and transgenic lines were treated with drought and rewatering. The dry weight, survival rate, chlorophyll content, hydrogen peroxide content and antioxidant enzyme activity of the lines were measured. We analyzed the regulation of *GmRACK1* gene on drought resistance of soybean. The results showed that, under drought stress, the survival rate and dry weight of *GmRACK1* gene silenced lines (RNAi) were significantly higher than those of WT and OE lines. After 10 days drought, the chlorophyll content of RNAi lines was significantly higher than that of WT and OE lines. The color of the staining OE lines stained with DAB and NBT was deeper than that of WT and RNAi lines. After 10 days soil drought stress and then 4 days rewatering, RNAi lines recovered better than WT and OE lines. Under 15% PEG 4000 treatment, the activities of SOD, POD, CAT and ABA content of RNAi strains were significantly higher than those of WT and OE strains, while MDA and conductivity were significantly lower than those of WT and OE strains. These results indicated that RNAi strain could remove excessive reactive oxygen species, which will weaken the oxidative damage to plants, so the *GmRACK1* gene could regulate the drought tolerance of soybean.

Keywords: Soybean; RACK1; Transgenesis; Gene overexpression; Gene silencing; Drought resistance

在哺乳动物中, RACK1 (活化 C 激酶 1 受体) 是一种具有七 β 螺旋桨结构的多功能支架蛋白, 是真核生物中最重要的色氨酸-天冬氨酸 (WD) 重复蛋白家族的成员。植物中的第一个 RACK1 同源物在烟草 BY-2 悬浮细胞中被鉴定, 为生长素诱导基因 *ARCA*^[1]。随后, 在所有已检测的真核生物中都发现了 RACK1 的氨基酸序列同源物^[2]。尽管许多生物仅有单个 *RACK1* 基因, 但一些植物中却有多个基因编码, 如拟南芥基因组含有 3 个 *RACK1* 基因, 水稻基因组中存在至少 2 个 *RACK1* 同源物^[3]。

许多报道表明 RACK1 与非生物胁迫有关。

Chen 等^[3]利用拟南芥中的 RACK1 功能缺失突变体研究了 RACK1 对几种植物激素响应过程中的功能。他们发现 *rack1a* 突变体对几种植物激素的敏感性发生了改变, 包括种子萌发时对赤霉素和油菜素类酯的低敏感性; 不定根和侧根形成时对生长素的低敏感性, 以及种子萌发和早期幼苗发育中对 ABA 的超敏反应。ABA 响应基因 *RD29B* 和 *RAB18* 在 *rack1a* 突变体中上调, 并且 ABA 可下调 3 种 *RACK1* 基因的表达^[4]。Islas-Flores 等^[5]使用 RNAi 方法抑制 *P. vulgaris* (PvRACK1) 中 *RACK1* 基因的表达, 结果表明根中 PvRACK1 mRNA 的积累是由生长

收稿日期: 2021-04-19

基金项目: 河南省科技攻关项目 (182102110305)。

第一作者: 刘喜平 (1976—), 女, 硕士, 实验师, 主要从事植物逆境生理研究。E-mail: 401346101@qq.com。

通讯作者: 李大红 (1969—), 男, 博士, 教授, 主要从事植物分子育种及基因功能研究。E-mail: lidahong@huanghuai.edu.cn。

素、ABA、细胞分裂素和赤霉素诱导的。对转基因水稻植株和细胞培养物分析表明, RACK1A 在 ROS 的产生和对稻瘟病的抗性中起重要作用, *OsRACK1A* 的过表达增强了水稻幼苗中活性氧(ROS)的产生^[6]。Wang 等^[7]研究表明玉米中 *ZmRACK1* 的过表达能减轻玉米叶枯病引起的症状。Li 等^[8]研究表明, 水稻 RACK1 RNAi 株系抗旱性显著增强。

因此, RACK1 似乎在植物的多个发育过程中发挥重要作用。然而, RACK1 蛋白在拟南芥和水稻中显示出不同的功能, 所以需要在各种植物中表征 RACK1 同源物。大豆(*Glycine max* L.) 是世界上广泛种植的重要作物。它为人类生活、动物饲料和生物燃料提供有价值的蛋白质和油料来源。大豆还通过根的天然固氮在土壤改良中发挥重要作用^[9]。大豆的生长受到干旱、寒冷、炎热和高盐等环境胁迫的不利影响。其中干旱是影响大豆生长发育的重要因素, 严重影响了大豆的产量。因此, 研究与干旱胁迫相关的基因在大豆抗逆品种培育中具有重要意义。本研究从大豆编码蛋白质序列(Q39836)中分离与水稻 *RACK1A* 和拟南芥同源性较高的 *GmRACK1* 基因, 转基因获得 *GmRACK1* 基因过表达材料 OEs 和干扰表达材料 RNAis, 通过设置正常情况、干旱胁迫和 PEG 4000 胁迫等处理, 对其进行抗旱性鉴定, 探明不同干旱胁迫处理对转 *GmRACK1* 基因大豆苗期表型、叶绿素含量、SOD 和 POD 活性, MDA 含量等生理生化指标的影响, 旨在明确 *GmRACK1* 基因调控机理, 为培育高抗性大豆新品种奠定理论和材料基础。

1 材料和方法

1.1 材料

以大豆品种中黄 13 为转基因受体。

1.2 试验设计

为了研究 *GmRACK1* 基因在干旱胁迫中的作用, 分别构建 *GmRACK1* 基因沉默质粒和过表达质粒, 转化至中黄 13 中。用 0.1% 潮霉素溶液进一步筛选 T₁ 幼苗, 使用 *HPT* 基因探针, 对转基因株系 T₀ 植株进行 Southern 印迹, 获得纯合株系。采用 qRT-PCR 方法分析不同转基因植株的 *GmRACK1* 表达情况。

于黄淮学院温室进行盆栽试验。去杂, 选取整

齐一致、健康饱满的 *GmRACK1* 基因超表达大豆株系(OE)、中黄 13(WT) 和 RNAi 株系种子各 200 粒, 播种于塑料花盆内, 盆高 20 cm, 上口直径为 22 cm, 底部直径为 15 cm, 每桶装沙土 800 g, 沙土使用前清洗 3 遍, 在人工气候室培养。采用完全随机区组设计, 设置不同株系(品种)和干旱处理两个因素, 设两个水分处理, 分别为正常水分处理和干旱后复水处理, 3 次重复。在第一个三出复叶完全展开之前正常浇水, 使土壤基本保持湿润状态, 在大豆第一个三出复叶完全展开后进行干旱处理, 10 d 后进行复水处理, 观察不同大豆株系(品种)植株的恢复情况。复水处理之前测定叶绿素含量, 复水 4 d 后测定存活率。每个处理选择至少 30 株幼苗, 对比植株存活率、干重和叶绿素含量, 3 次重复。

采用 15% PEG 4000 对大豆 OE、WT 和 RNAi 株系模拟干旱试验。各株系分别选取 100 粒种子, 在水中萌发处理, 当第一个真叶展开时用 MS 培养基培养, 每 3 d 换 1 次营养液。第 30 天时, 各株系分别取长势相同植株 30 株, 用 15% PEG 4000 处理 12 h 时测定样品 ROS 积累和抗氧化酶活性、ABA 含量、MDA 含量和电导率。处理 3 d 后, 观察不同株系的生长情况。

1.3 方法

1.3.1 蛋白质序列分析 以 *GmRACK1* 为参考序列, 在 BLASTP 搜索大豆 *RACK1* 基因同源序列, 并使用 DNAMAN 6.0 比对蛋白质序列并分析 *GmRACK1* 蛋白质与其他植物蛋白质的相似性。在 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de>) 数据库获得 WD 重复域的位置。

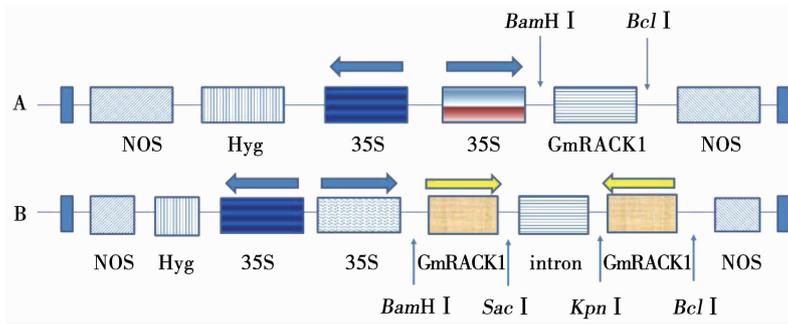
1.3.2 植物表达载体构建及转化 以 *GmRACK1* 的全长 CDS 为模板, 使用引物 P1 和 P2(表 1) PCR 扩增 *GmRACK1* RNAi 片段, 将 PCR 产物链接到双元载体 pCAMBIA1301 中的 *Bam*H I/*Sac* I 和 *Kpn* I/*Bcl* I 位点之间, 构建 *GmRACK1* RNAi 载体(图 1)。

以 pT-*GmRACK1* 质粒为模板, 使用 *Bam*H I 和 *Bcl* I 接头引物 P3 和 P4(表 1) PCR 扩增 *GmRACK1* 的全长 CDS, 构建 35S:*GmRACK1* 质粒, 将其克隆到双元载体 pCAMBIA1301 中, 构建 *GmRACK1* 基因超表达载体(图 1)。

表1 供试引物名称和序列

Table 1 The primers name and sequence used in the study

引物名称 Primer name	扩增方向 Amplification direction	引物序列 Primer sequence(5'-3')	用途 Usage
P1	F	eggtagcgagctccactcttcagccaaccatt	基因沉默
P2	R	ctgatacggatccatccgcactccagttcaa	基因沉默
P3	F	cggatccatattggcgaaggactcg	<i>GmRACK1</i> 克隆
P4	R	ctgatcagatcctaataacgtccaatage	<i>GmRACK1</i> 克隆
P5	F	cagagaaagtgcccaaatcatgt	qRT-PCR 内参 <i>Actin2</i>
P6	R	ttgcatacaaggagagaacagctt	qRT-PCR 内参 <i>Actin2</i>
P7	F	gacattctcacttcgtccagg	qRT-PCR 转基因检测
P8	R	cccattttgccaccact	qRT-PCR 转基因检测
P9	F	gctgttatggccattgtc	Southern 检测
P10	R	gacgtctgtcgagaagtttc	Southern 检测

图1 基于 pCAMBIA1301 载体的 *GmRACK1* 过表达载体 (A) 和抑制表达载体 (B) 结构图Fig. 1 The vector structural of overexpression (A) and suppression (B) of *GmRACK1* based on the gateway binary vector pCAMBIA1301

1.3.3 转基因植株筛选与鉴定 将得到的载体转化到根癌农杆菌 EHA105 中,并转化到大豆中黄 13 中^[10]。在含有 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 潮霉素的 $0.5 \times \text{MS}$ 琼脂平板上筛选 T₁转基因植株,分别收集其种子并繁殖 T₂植株。

通过 qRT-PCR 分析确认纯合的过表达株系和抑制表达株系。采用 TRIzol 试剂 (Invitrogen) 分离总 RNA,将 $2 \mu\text{g}$ RNA 样品 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 下用 33.34 kat DNase I 处理 1 h,使用 EasyScript First strand cDNA Synthesis SuperMix (TransGen) 合成第一链 cDNA,使用 P7 和 P8 引物(表 1),采用 SYBR Premix Ex Taq (TAKARA)体系($25 \mu\text{L}$)在 ABI 7500 序列检测系统 (Applied BioSystems, Foster City, USA) 进行 RT-qPCR。PCR 程序为: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s; $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, $53 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 s,40 个循环, $65 \sim 95 \text{ }^\circ\text{C}$ 熔融循环。使用大豆基因 *Actin 2* 作为内参基因,在对数期定量 *GmRACK1* 基因表达,3 次重复。

1.3.4 Southern 分析 使用 *HPT*(潮霉素)基因进行转基因大豆植物的 Southern 印迹分析,使用 P9 和

P10 引物(表 1)扩增 *HPT* 基因作为探针。使用 DIG High Prime DNA 标记和检测试剂盒 (Roche, Switzerland) 进行杂交。

1.3.5 干旱条件下大豆植株存活率分析 植物的存活率为具有绿叶的植物数与植物总数的比率。成活率(%) = 绿叶植株数量/总植株数量 $\times 100$ 。

1.3.6 干旱条件下大豆植株干重和叶绿素含量检测 在干旱 10 d 结束时,将整株大豆在 $70 \text{ }^\circ\text{C}$ 烘箱中干燥至少 3 d,记录整株干重。根据陈建勋等^[11]的方法测定叶绿素含量。

1.3.7 模拟干旱条件下大豆植株理化性质检测 参照 Wang 等^[12]的方法,取不同株系的叶片,用二氨基联苯胺 (DAB) 和硝基蓝四唑 (NBT) 染色并检测过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化物酶 (POD) 活性^[11]。

将 0.2 g 幼苗叶在 1 mL 蒸馏水中匀浆, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下振荡过夜,离心匀浆,取上清液,参照 Quarrie 等^[13]的方法测定脱落酸 (ABA) 含量,参照 Zhang 等^[14]的方法测定丙二醛 (MDA) 含量和电导率。

1.4 数据分析

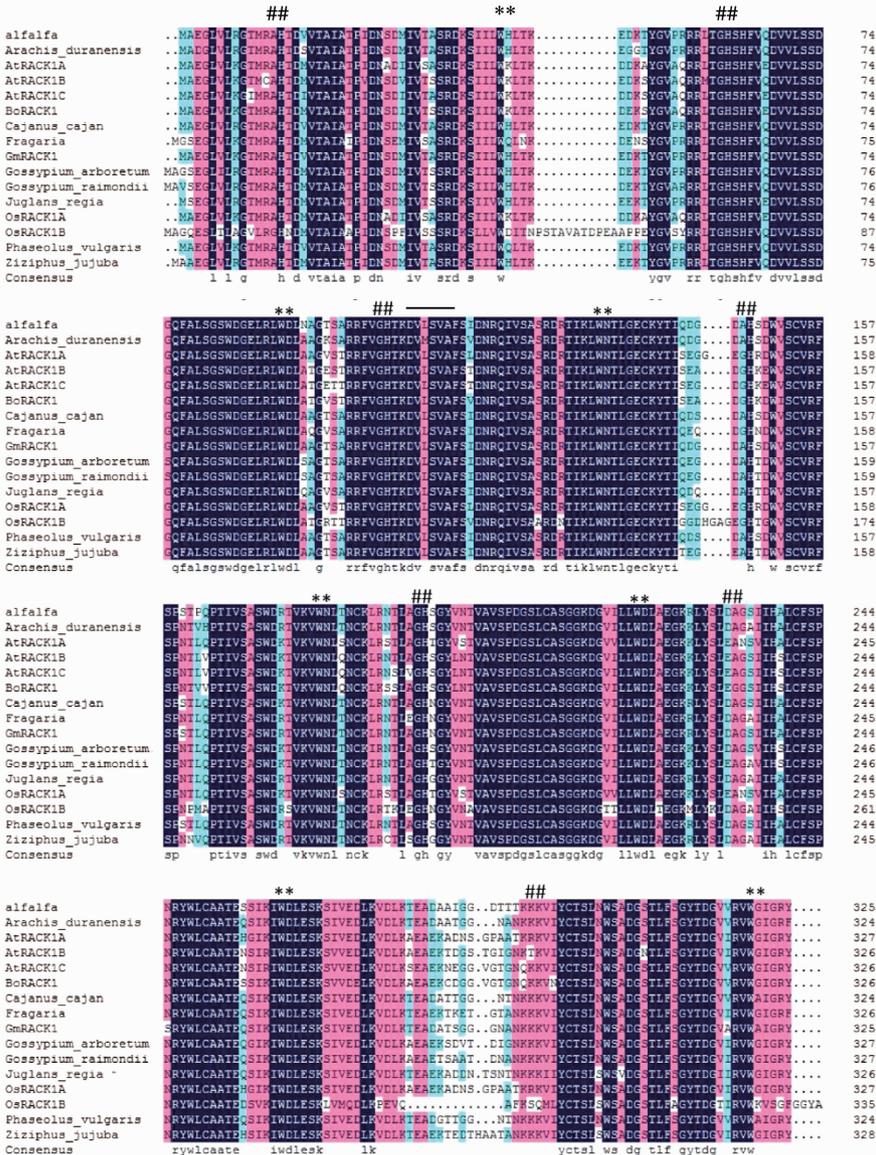
使用 Excel 2016 和 SPSS 17.0 软件进行方差分析和 Duncan 多重比较,使用 Sigmaplat 12.5 软件作图。

2 结果与分析

2.1 GmRACK1 蛋白序列分析

从大豆编码蛋白质序列(Q39836)中分离出 1 个 *GmRACK1* 基因,基因长度为 978 bp,由单个开

放阅读框(ORF)组成,编码 325 个氨基酸,分子量为 35.6 kDa, pI7.62。GmRACK1 的氨基酸序列具有 7 个 WD(色氨酸-天冬氨酸结构域)重复,存在典型的 GH(甘氨酸-组氨酸)和 WD(色氨酸-天门冬氨酸)二肽(图 2),为活化蛋白激酶 C(aPKC)保守结构域。*GmRACK1* 基因与水稻 *RACK1A* 同源性达 79.5%,与拟南芥 *RACK1A* 同源性达 92.2%。大豆和其他植物 RACK1 蛋白的 GH 和 WD 核心序列的数量和位置以及 PKC 结合位点基本保守。



Alfalfa: *Medicago sativa*, Q24076; *Arachis duranensis*: XP_015966958.1; AtRACK1A: *Arabidopsis*, NP_173248; AtRACK1B: *Arabidopsis*, NP_175296; AtRACK1C: *Arabidopsis*, NP_188441; BoRACK1: *Brassica oleracea*, XP_013610846; *Cajanus cajan*: KYP67473.1; *Fragaria*: XP_004299548.1; GmRACK1: *Glycine max*, Q39836; *Gossypium arboreum*: KHG29145.1; *Gossypium raimondii*: XP_012486409.1; *Juglans regia*: XP_018829694.1; OsRACK1A: *Oryza Sativa* L, NP_001043910.1; OsRACK1B: *Oryza Sativa* L, NP_001056254.1; *Phaseolus vulgaris*: ACJ24167.1; *Ziziphus jujuba*: XP_015882908.1; ##: GH; * * : WD.

图 2 GmRACK1 与其同源蛋白质序列比对

Fig. 2 The protein sequence alignment between GmRACK1 and other RACK1 orthologs

2.2 转基因植株分子检测

经 PCR 检测,共获得 10 个 RNAi 转基因 T_0 株系和 14 个过表达转基因 T_0 株系。用 0.1% 潮霉素溶液进一步筛选出 7 个分离比为 3:1 的 RNAi 转基因 T_1 品系和 5 个分离比为 3:1 的过表达品系(图 3)。Southern 印迹分析结果显示,7 个 RNAi 株系均和 5 个过表达株系均为单拷贝基因型。qRT-PCR 检测

结果表明, RNAi-3、RNAi-9 和 RNAi-16 株系的 *GmRACK1* 表达量显著低于野生型大豆,而过表达 OE-5、OE-8 和 OE-13 株系的 *GmRACK1* 表达量显著高于野生型大豆(图 4)。后续研究选择 RNAi-3、RNAi-9 和 RNAi-16 株系作为抑制表达株系,OE-5、OE-8 和 OE-13 株系作为过表达株系。

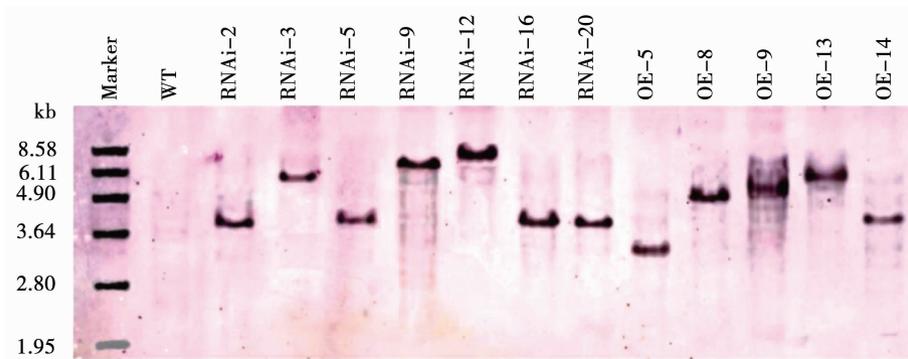
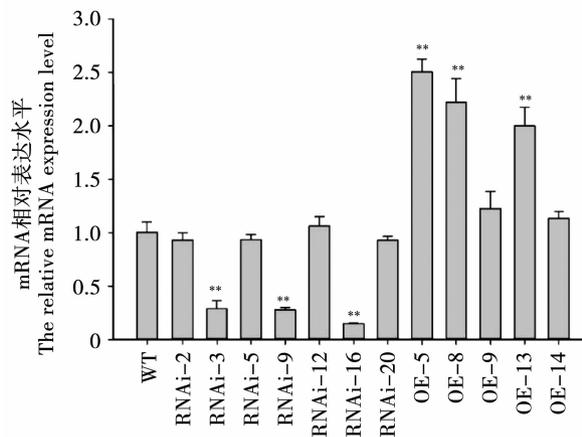


图 3 Southern 印迹分析

Fig. 3 The southern blot analysis



** 表示与对照有极显著差异 ($P < 0.01$)。

** indicate significant differences at $P < 0.01$ level compared with the control.

图 4 RNAi 和过表达株系中 *GmRACK1* 基因的相对表达分析

Fig. 4 The relative expressions of *GmRACK1* gene insuppression and overexpression lines

2.3 转基因大豆耐旱性检测

2.3.1 植株表型和干重分析 如图 5 所示,自然条件下土壤干旱胁迫 10 d 后,WT 植株叶片整体表现出严重的枯萎表型,而 RNAi 株系仅老叶或叶尖有枯萎现象;干旱 10 d 后复水,所有 RNAi 株系恢复较好,而 OE 株系仅有新叶能够恢复生长。如图 6 所示,复水处理后,WT 株系存活率约为 63.54%,RNAi 株系存活率达 90.2%,而 OE 株系存活率仅为 25%~35%。如图 7 所示,干旱处理

10 d 后, RNAi 株系植株干重显著高于 WT 株系, OE 株系植株干物质显著低于 WT 株系。研究结果表明,与 WT 株系相比,OE 株系对土壤干旱胁迫的敏感性更高,而 RNAi 株系对干旱胁迫的抗性显著提高。

2.3.2 植株叶绿素含量分析 如图 8 所示,干旱胁迫 10 d 后, RNAi 株系叶片的叶绿素含量显著高于野生型,而 OE 株系叶片的叶绿素含量显著低于野生型。

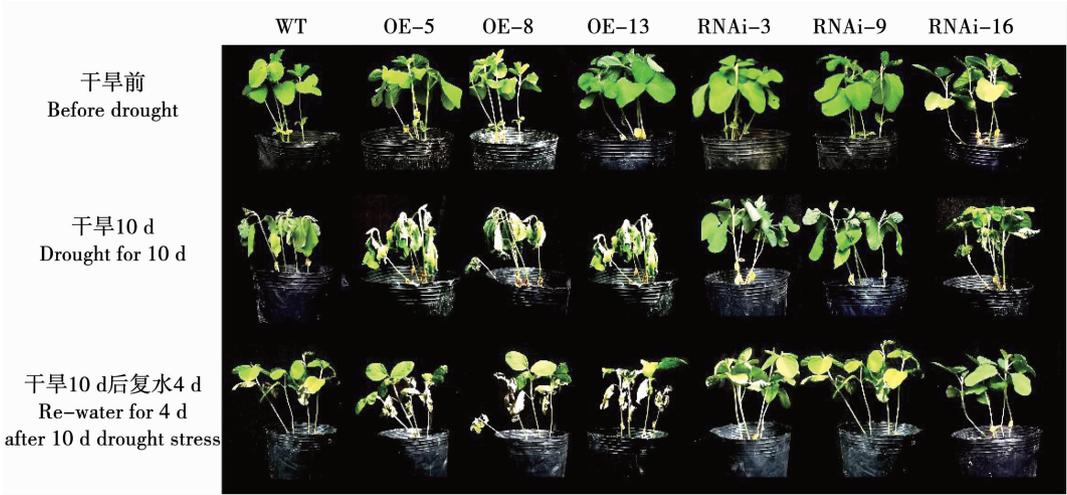
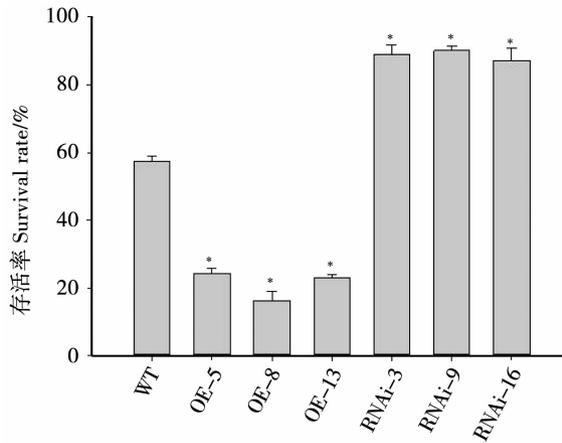


图 5 干旱和复水处理后转基因植株的耐旱性表现

Fig. 5 The drought tolerance of transgenic plants after drought and rehydration treatment



* 表示与对照有显著差异 ($P < 0.05$)。下同。

* indicate significant differences at $P < 0.05$ level compared with the control. The same below.

图 6 转基因大豆存活率

Fig. 6 The survival rate of the transgenic soybeans

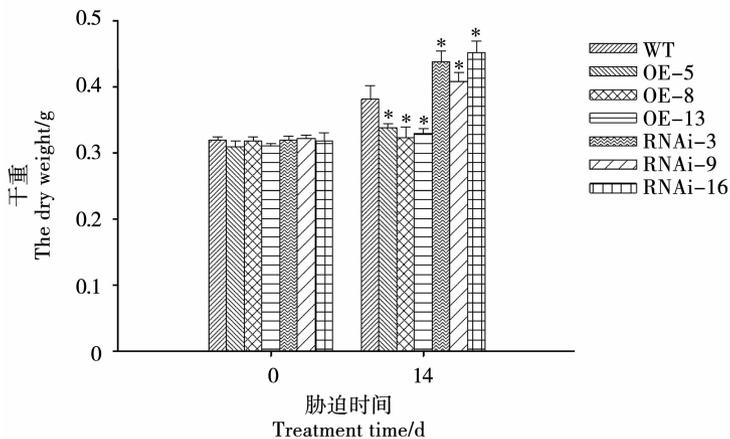


图 7 干旱胁迫后大豆植株干重

Fig. 7 The dry weight of soybean plant after drought stress

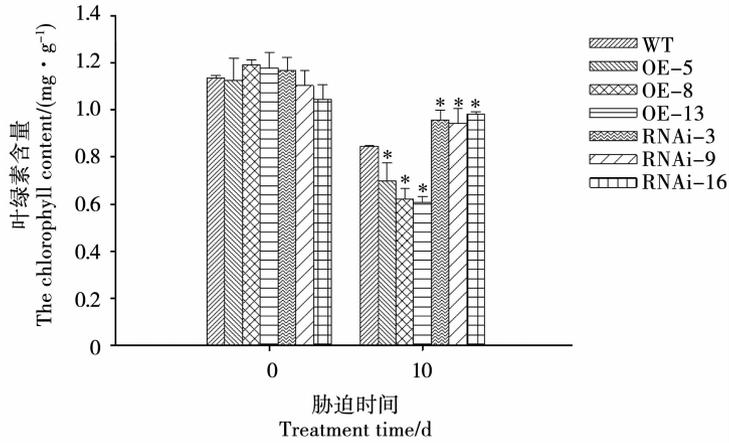


图8 干旱胁迫后转基因植株叶片叶绿素含量

Fig. 8 The chlorophyll content of transgenic plant leaves after drought treatment

2.4 模拟干旱胁迫下植株表型和理化指标分析

2.4.1 植株表型 使用 15% PEG 4000 处理 3 d 后,过表达植株明显失水萎蔫,而抑制表达植株

长势较好(图9)。结果与土壤干旱处理相似,表明 OE 株系对渗透胁迫的敏感性较 WT 高,而 RNAi 株系对渗透胁迫的抗性显著提高。

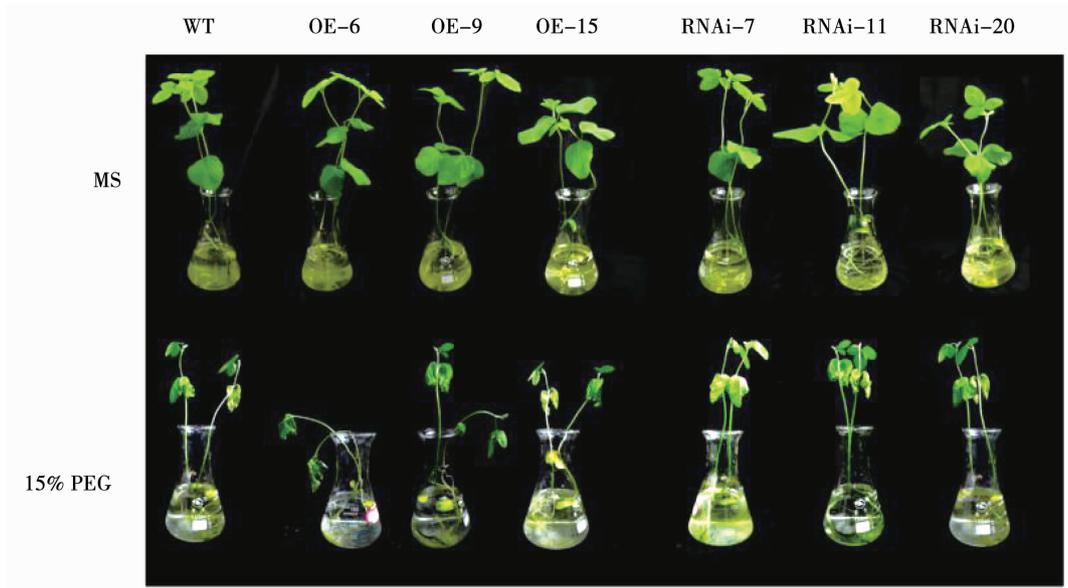


图9 模拟干旱胁迫处理 3 d 时转基因大豆表型

Fig. 9 The phenotypes of transgenic soybean under simulated drought stress for 3 d

2.4.2 抗氧化酶活性、ABA 和 MDA 含量及电导率

如图 10 所示,干旱胁迫下,OE 株系的 SOD、POD 和 CAT 活性均低于 WT 和 RNAi 株系降低;而正常水分条件和干旱胁迫下,RNAi 株系的 SOD、POD 和 CAT 活性均高于 WT 和 RNAi 株系,并且在干旱胁迫下的抗氧化酶活性的增加幅度大于正常水分条件。在干旱胁迫下,RNAi 株系的 ABA 含量高于

WT 株系;而 OE 株系的 ABA 含量低于 WT 株系;RNAi 株系的 MDA 含量和电导率低于 WT 株系。结果表明,RNAi 株系在渗透胁迫下有较强的抗氧化能力,同时 MDA 及电导率下降,对膜的保护能力显著增加;而 OEs 株系在渗透胁迫下抗氧化能力显著降低,DA 及电导率上升,对膜的保护能力显著下降。

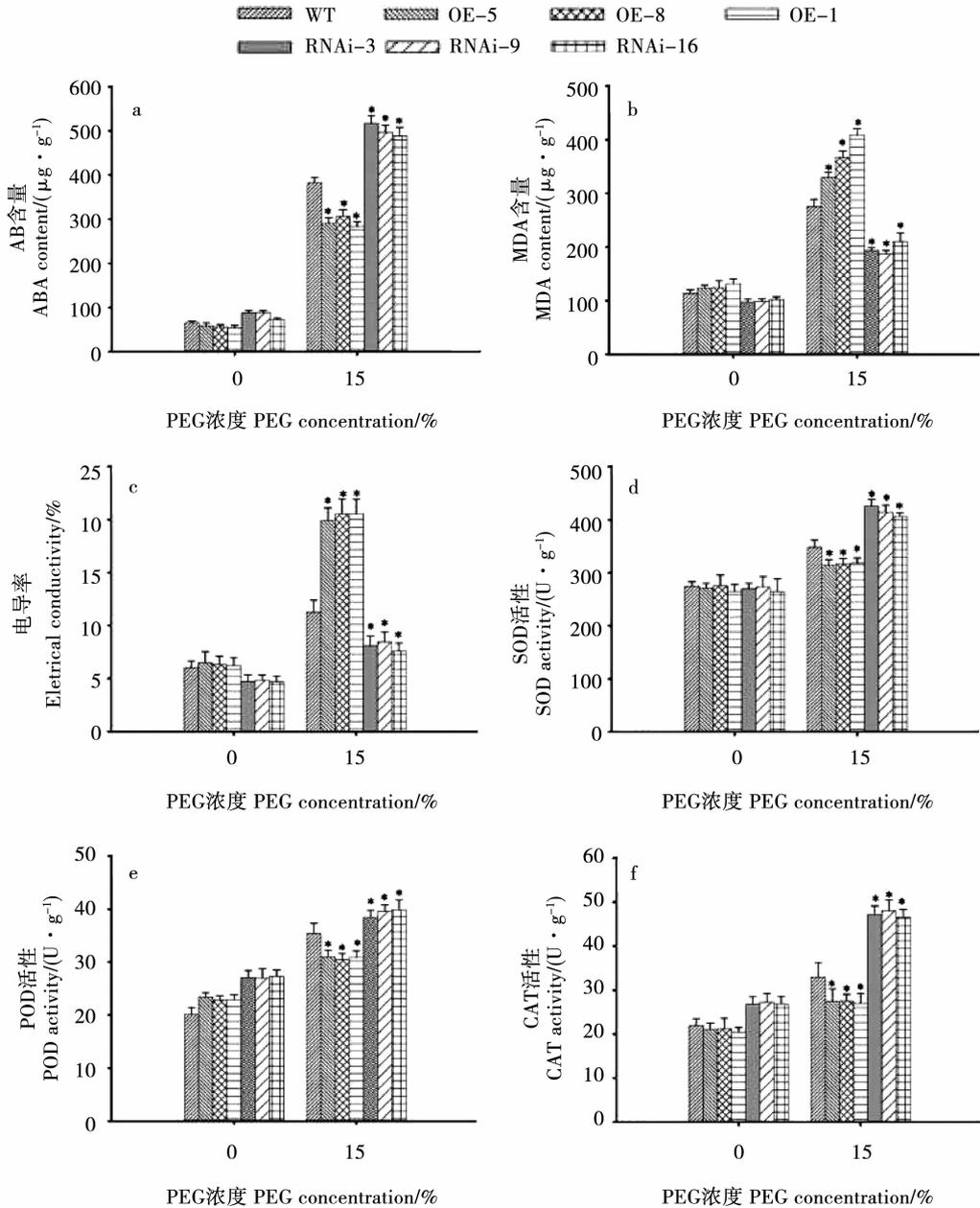


图 10 模拟干旱胁迫下转基因植物抗氧化酶活性、ABA 和 MDA 含量及电导率分析

Fig. 10 The antioxidant enzyme activity, ABA and MDA content, and electrical conductivity of transgenic plants under simulated drought stress

2.4.3 H_2O_2 和超氧阴离子含量 DAB 和 NBT 染色结果如图 11 所示,在干旱胁迫下,OE 株系比 WT 和 RNAi 株系染色更深,说明 RNAi 株系含有较少的 H_2O_2 和超氧阴离子。研究结果说明在干旱胁迫下,与 WT 株系相比, RNAi 株系中细胞受损程度较轻,细胞死亡量较少;过表达 OE 株系中细胞受损程度

较重,细胞死亡量较多。干旱胁迫下,抑制 *GmRACK1* 基因表达大豆可增强转基因细胞内清除活性氧能力,促使超氧阴离子和 H_2O_2 积累的减少,从而减少细胞受损或细胞死亡,增强植物的抗逆性,推测 *GmRACK1* 基因可能对干旱胁迫有负调控作用。

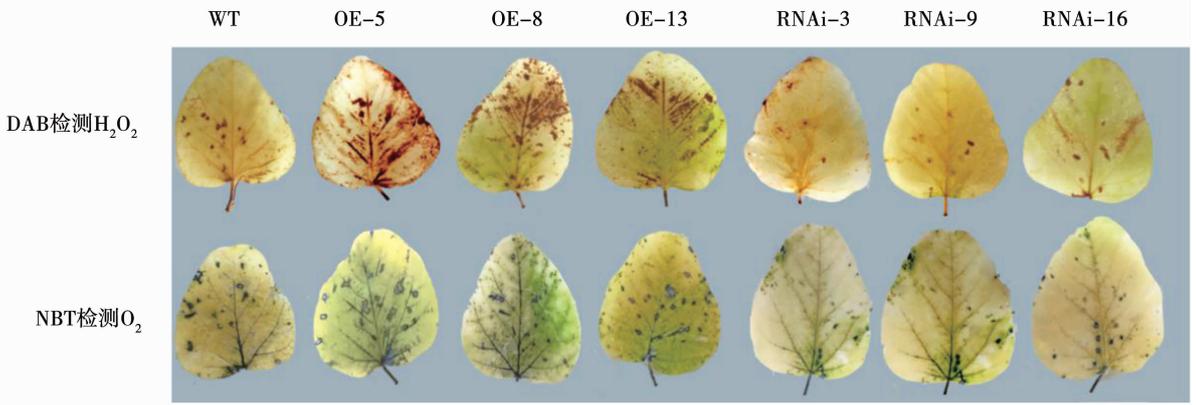


图 11 模拟干旱胁迫下转基因株系 H_2O_2 和超氧阴离子含量分析

Fig. 11 The analysis of H_2O_2 and superoxide anion content in transgenic plants under simulated drought stress

3 讨论

RACK1 是一种高度保守的支架蛋白,参与多种信号传导途径,包括生长和发育以及对胁迫信号的响应^[3,6]。植物 RACK1 蛋白由 7 个色氨酸-天冬氨酸结构域(WD40)重复组成。每个 WD 重复序列大约跨越 40~60 个氨基酸。WD 结构域以 N 端 11~24 个残基的甘氨酸-组氨酸(GH)二肽开始,C 端以色氨酸-天冬氨酸(WD)二肽结束,GH 和 WD 序列并不绝对保守^[15]。目前,发现 RACK1 参与调节细胞增殖和生长,也与植物激素调节及环境胁迫响应有关^[3,16-17]。本研究中,*GmRACK1* 抑制表达株系的干旱胁迫抗性增强,而 *GmRACK1* 过表达株系对干旱胁迫更加敏感。因此,*GmRACK1* 可能在大豆对干旱胁迫的反应中起重要作用。

在干旱胁迫下,植物激素对植物生长和发育有重要作用。它们不仅起到远距离传输信号的作用,而且还响应干旱胁迫中基因表达的复杂网络^[18]。ABA 在植物的生物和非生物胁迫中发挥内源信使的作用^[19]; H_2O_2 也已被证明是植物的胁迫信号^[20]。本研究发现 *GmRACK1* RNAi 株系在干旱胁迫下 ABA 含量显著高于 WT 和 OEs,而 H_2O_2 含量显著低于 WT 和 OEs。在羽衣甘蓝的研究中,*RACK1* 基因过表达 H_2O_2 含量显著增加,而 ABA 显著降低。其作用机理可能是 RACK1 与 Rboh 存在相互作用,而 ABA 对 RACK1 有抑制作用^[21]。另外 *RACK1* 共表达的基因中 80% 以上编码核糖体蛋白,这意味着 RACK1 的功能与核糖体复合体之间存在密切关系。这些结果表明 RACK1 在 ABA 反应中的调节作用可能部分归因于其在蛋白质翻译中的特定功能^[22]。

干旱导致 ROS 的形成,由于膜脂质过氧化,导致植物中 MDA 积累^[23]。由氧化胁迫诱导的膜损伤和细胞膜不稳定性常被用作评估植物抗旱性程度的指标^[24]。植物通过产生一系列抗氧化酶来清除这些有毒化合物,包括 SOD、POD 和 CAT。增强植物的抗氧化防御能力可以提高植物对不同胁迫因子的耐受性^[25]。本研究表明在干旱胁迫下, RNAi 株系中 MDA 含量和电导率低于 WT 株系。与 WT 株系相比, RNAi 株系具有更高的 SOD、POD 和 CAT 活性,而 OE 株系具有更低的 SOD、POD 和 CAT 活性。说明 RNAi 株系经历较少的膜损伤,并且干旱处理后细胞膜更稳定。RNAi 株系对干旱胁迫的耐受性增强,说明 *GmRACK1* 基因对大豆耐旱性具有负调控作用。

4 结论

GmRACK1 蛋白含有保守的 WD40 结构域。*GmRACK1* 抑制表达转基因材料 RNAi-3、RNAi-9 和 RNAi-16 在干旱胁迫条件下生长状态较好,保护酶 SOD、CAT 和 POD 的活性相对较高,过氧化物产物 MDA 含量和 H_2O_2 含量相对较低,增长较慢,叶绿素含量相对较高。结果说明 *GmRACK1* 基因的抑制表达能提高大豆株系的抗旱能力,*GmRACK1* 基因可能参与大豆的抗旱应答反应过程,但有关该基因的作用机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Ishida S, Takahashi Y, Nagata T. Isolation of cDNA of an auxin-regulated gene encoding a G protein subunit-like protein from tobacco BY-2 cells [J]. Proceedings of the National Academy of

- Sciences, 1994, 90(23): 11152-11156.
- [2] Zohar B S, Sylvie J, Talia N H, et al. A pomegranate (*Punica granatum* L.) WD40-repeat gene is a functional homologue of *Arabidopsis* TTG1 and is involved in the regulation of anthocyanin biosynthesis during pomegranate fruit development [J]. *Planta*, 2019, 234(5): 865-881.
- [3] Chen J G, Hemayet U, Brenda T, et al. RACK1 mediates multiple hormone responsiveness and developmental processes in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57(11): 2697-2708.
- [4] Jianjun G, Junbi W, Li X, et al. RACK1 is a negative regulator of ABA responses in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60(13): 3819-3833.
- [5] Islas-Flores T, Guillén G, Sánchez F, et al. Changes in RACK1 expression induce defects in nodulation and development in *Phaseolus vulgaris* [J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2014, 7(1): 1-3.
- [6] Nakashima A, Chen J, Thao N P, et al. RACK1 functions in rice innate immunity by interacting with the Rac1 immune complex [J]. *Plant Cell*, 2008, 20(8): 2265-2279.
- [7] Wang B, Yu J, Zhu D, et al. Maize ZmRACK1 is involved in the plant response to fungal phytopathogens [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(6): 9343-9359.
- [8] Li D H, Hu, L, Yang Y L, et al. Down-regulated expression of *RACK1* gene by RNA interference enhances drought tolerance in rice [J]. *Rice Science*, 2009, 16(1): 14-20.
- [9] Kidokoro S, Watanabe K, Ohori T, et al. Soybean DREB1/CBF-type transcription factors function in heat and drought as well as cold stress-responsive gene expression [J]. *Plant Journal*, 2014, 81(3): 505-518.
- [10] 李大红, 刘喜平, 甄萍萍. 大豆 *RACK1* 基因 RNAi 载体构建及植株转化 [J]. *南方农业学报*, 2014, 45(6): 944-949. (Li D H, Liu X P, Zhen P P. Construction of RNAi vector carrying *RACK1* gene and transformation in soybean [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2014, 45(6): 944-949.
- [11] 陈建勋, 王晓峰. 植物生理学实验指导 [M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2006. (Chen J X, Wang X F. *Plant physiology laboratory instruction* [M]. Guangzhou: South China University of Technology, 2006.)
- [12] Wang Y, Shen W, Chan Z, et al. Endogenous cytokinin overproduction modulates ROS homeostasis and decreases salt stress resistance in *Arabidopsis Thaliana* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6(8): 1-14.
- [13] Quarrie S A, Whitford P, Appleford N, et al. A monoclonal antibody to (S)-abscisic acid: Its characterisation and use in a radioimmunoassay for measuring abscisic acid in crude extracts of cereal and lupin leaves [J]. *Planta*, 1988, 173(3): 330-339.
- [14] Zhang D, Chen L, Li D, et al. OsRACK1 is involved in abscisic acid- and H₂O₂-mediated signaling to regulate seed germination in rice (*Oryza sativa*, L.) [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e97120.
- [15] Guo J, Liang J, Chen J. RACK1, A versatile scaffold protein in plants? [J]. *International Journal of Plant Developmental Biology*, 2007, 1(1): 105-114.
- [16] Guo J, Wang L, Valerius O, et al. Involvement of *Arabidopsis* RACK1 in protein translation and its regulation by abscisic acid [J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2011, 155(5): 370-383.
- [17] Kundu N, Dozier U, Deslandes L, et al. *Arabidopsis* scaffold protein RACK1A interacts with diverse environmental stress and photosynthesis related proteins [J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2013, 8(5): 1-12.
- [18] Fàbregas N, Yoshida T, Fernie A R. Role of Raf-like kinases in SnRK2 activation and osmotic stress response in plants [J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 6184.
- [19] Kang M, Lee S, Abdelmageed H, et al. *Arabidopsis* stress associated protein 9 mediates biotic and abiotic stress responsive ABA signaling via the proteasome pathway [J]. *Plant Cell and Environment*, 2017, 40(5): 702-716.
- [20] Devireddy A R, Zandalinas S I, Fichman Y, et al. Integration of reactive oxygen species and hormone signaling during abiotic stress [J]. *The Plant Journal*, 2020, 105(2): 459-476.
- [21] Li D H, Shen F J, Li H Y, et al. Kale BoRACK1 is involved in the plant response to salt stress and *Peronospora brassicae* Gaumann [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2017, 213: 188-198.
- [22] Guo J, Wang S, Valerius O, et al. Involvement of *Arabidopsis* RACK1 in protein translation and its regulation by abscisic acid [J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2011, 155(5): 370-383.
- [23] 贾斯淳, 王娜, 郝兴宇, 等. 不同干旱胁迫处理对大豆品种生长及逆境生理的影响 [J]. *华北农学报*, 2019, 34(5): 137-144. (Jia S C, Wang N, Hao X Y, et al. Effects of different stresses on growth and physiological properties of soybean [J]. *Acta Agrariae Boreali-Sinica*, 2019, 34(5): 137-144.)
- [24] Xu P, Li J, Lyu H Y, et al. Effects of drought stress on ultrastructure of chloroplast and mitochondria and membrane lipid peroxidation of *Ammodendron argenteum* [J]. *Arid Zone Research*, 2016, 1(1): 1-15.
- [25] Liu H, Wang Y, Zhou X, et al. Overexpression of a harpin-encoding gene *popW* from *Ralstonia solanacearum* primed antioxidant defenses with enhanced drought tolerance in tobacco plants [J]. *Plant Cell Reports*, 2016, 35(6): 1333-1344.