

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 21720061152185

UDC _____

廈門大學

硕士学位论文

水稻 *OsL-RLK1* 和 *OspPIR2* 基因的克隆
及功能研究初探

Cloning and Preliminary Functional Analysis of
OsL-RLK1 and *OspPIR2* of Rice

毛倩

指导教师姓名: 陈亮 教授

专业名称: 细胞生物学

论文提交日期: 2010 年 4 月

论文答辩时间: 2010 年 6 月

学位授予日期: 2010 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2010 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

摘 要	1
Abstract	2
略 缩 词	4
第一章 前 言	5
1 水稻细菌性条斑病概况及研究进展	5
1.1 水稻细菌性条斑病概况	5
1.1.1 水稻细条病病原的分类与分化	5
1.1.2 水稻细菌性条斑病的侵染及流行规律	5
1.1.3 水稻细菌性条斑病的危害	6
1.2 水稻细菌性条斑病的研究进展	7
1.2.1 水稻细条病的抗性生理研究	7
1.2.2 水稻细条病抗性遗传研究	7
1.2.3 水稻细条病抗性的分子生物学研究	8
2 植物抗病基因工程研究概况	9
2.1 植物抗病基因及其种类	9
2.2 植物抗病基因的作用机制	10
2.3 病程相关蛋白	12
2.3.1 PR 蛋白的特性及分类	12
2.3.2 PR-5 蛋白	13
2.4 植物受体类蛋白激酶	13
2.4.1 植物受体类蛋白激酶的结构和种类	14
2.4.2 植物受体类蛋白激酶在抗病防御反应中的作用	16
3 基于 Gateway 克隆技术的载体构建	18
3.1 Gateway 克隆技术简介	18
3.2 Gateway 克隆技术在基因沉默中的应用	19
4 本课题研究的内容和意义	20
第二章 <i>OsL-RLKI</i> 基因植物表达载体的构建及遗传转化	22
1 前 言	22

2 材料与方法	22
2.1 材料.....	22
2.1.1 植物材料.....	22
2.1.2 质粒与菌种.....	23
2.1.3 主要化学试剂及仪器.....	23
2.1.4 培养基.....	24
2.2 方法.....	25
2.2.1 水稻 <i>OsL-RLK1</i> 蛋白序列分析.....	25
2.2.2 RT-PCR.....	25
2.2.3 <i>OsL-RLK1</i> 过量表达载体的构建.....	28
2.2.4 <i>OsL-RLK1</i> RNAi 表达载体的构建.....	33
2.2.5 载体的农杆菌转化.....	35
2.2.6 农杆菌介导的水稻遗传转化.....	36
2.2.7 转基因植株的鉴定.....	38
3 结果与分析	39
3.1 <i>OsL-RLK1</i> 蛋白序列及家族分析.....	39
3.2 基因表达量的检测.....	42
3.3 植物过量表达载体的构建和鉴定.....	42
3.3.1 PCR 扩增获得目的基因片段.....	42
3.3.2 TOPO 反应获得含有目的片段的中间载体.....	42
3.3.3 LR 反应获得过量表达载体.....	43
3.4 <i>OsL-RLK1</i> RNAi 载体的构建和鉴定.....	44
3.5 表达载体转化农杆菌的鉴定.....	45
3.6 水稻愈伤组织的遗传转化.....	46
3.7 转基因水稻检测.....	47
3.7.1 组织化学染色检测.....	47
3.7.2 转基因植株的检测.....	49
第三章 <i>OsPir2</i> 基因植物表达载体的构建及遗传转化	52
1 前言	52

2 材料与方法	53
2.1 材料.....	53
2.2 方法.....	53
2.2.1 水稻 <i>OspPIR2</i> 蛋白序列分析.....	53
2.2.2 <i>OspPIR2</i> 基因植物过量和 RNAi 表达载体的构建.....	53
2.2.3 载体的农杆菌转化及鉴定.....	55
2.2.4 农杆菌介导的水稻遗传转化.....	55
2.2.5 转基因植株的检测.....	55
3 结果与分析	56
3.1 水稻 <i>OspPIR2</i> 蛋白序列分析.....	56
3.2 植物表达载体的构建和鉴定.....	59
3.2.1 RT-PCR 扩增获得目的基因片段.....	59
3.2.2 TOPO 反应获得含有目的片段的中间载体.....	59
3.2.3 LR 反应获得过量表达载体.....	59
3.3 RNAi 载体的构建和鉴定.....	60
3.4 表达载体转化农杆菌的鉴定.....	61
3.5 根癌农杆菌介导的水稻遗传转化.....	62
3.6 转基因水稻检测.....	63
第四章 讨论	64
1 <i>OsL-RLK1</i>,<i>OspPIR2</i> 结构域和功能的研究	64
1.1 <i>OsL-RLK1</i> 结构域和功能的研究.....	64
1.2 <i>OspPIR2</i> 结构域和功能的研究.....	64
2 RNAi 植物表达载体的构建	65
3 水稻愈伤组织的诱导及转化	66
4 转基因植株的检测	68
第五章 结论与展望	69
参考文献	70
致谢	77

Content

Abstract in Chinese	1
Abstract in English	2
Abbreviation	4
Chapter 1 Preface	5
1 Research Overview of Rice Bacterial Leaf Streak	5
1.1 Summary of the Study on Rice Bacterial Leaf Streak	5
1.1.1 Classification and Differentiation of Pathogens	5
1.1.2 Infection and Prevalence Trend of Rice Bacterial Leaf Streak	5
1.1.3 Harm Caused by Rice Bacterial Leaf Streak	6
1.2 Research Progress on Rice Bacterial Leaf Streak	7
1.2.1 Physiological Research of Bacterial Leaf Streak	7
1.2.2 Genetic Research of Bacterial Leaf Streak	7
1.2.3 Molecular Biology Research of Bacterial Leaf Streak	8
2 Research Overview of Plant Disease Resistance Genes	9
2.1 Plant Disease Resistance Genes and Species	9
2.2 Mechanism of Plant Disease Resistance Genes	10
2.3 Pathogenesis-related Proteins	12
2.3.1 Characteristics and Classification of Pathogenesis-related Proteins	12
2.3.2 Pathogenesis-related Protein 5	13
2.4 Plant Receptor-like Protein Kinases	13
2.4.1 Structure and Types of Receptor-like Protein Kinases	14
2.4.2 The Role of RLKs in the Defense Response of Resistant	16
3 Vector Construction Based on Gateway Cloning Technology	18
3.1 Introduction of Gateway Cloning Technology	18
3.2 Applications of Gateway Cloning Technology in Gene Silencing	19
4 The Contents and Significance of the Research	20
Chapter 2 Construction of Expression Vectors and Genetic Transformation of <i>OsL-RLK1</i>	22
1 Preface	22

2 Materials and Methods	22
2.1 Materials.....	22
2.1.1 Plant Materials.....	22
2.1.2 Plasmid and Bacterium.....	23
2.1.3 The Main Reagents and Apparatuses.....	23
2.1.4 Medium.....	24
2.2 Methods.....	25
2.2.1 Sequence Analysis of <i>OsL-RLK1</i> Protein.....	25
2.2.2 RT-PCR.....	25
2.2.3 Construction of Over Expression Vector of <i>OsL-RLK1</i>	28
2.2.4 Construction of RNAi Expression Vector of <i>OsL-RLK1</i>	33
2.2.5 Vectors Transferred into Agrobacterium.....	35
2.2.6 Agrobacterium-mediated Genetic Transformation.....	36
2.2.7 Identification of Transgenic Rice.....	38
3 Results and Analysis	39
3.1 Sequence and Family Analysis of <i>OsL-RLK1</i>	39
3.2 Detection of Gene Expression.....	42
3.3 Construction and Identification of Over Expression Vector of <i>OsL-RLK1</i>	42
3.3.1 Gene Fragment Amplified by PCR.....	42
3.3.2 Obtained the Intermediate Vector with Fragments.....	42
3.3.3 Obtained the Over Expression Vector.....	43
3.4 Construction and Identification of RNAi Expression Vector of <i>OsL-RLK1</i>	44
3.5 Identification of Expression Vector Transformed into Agrobacterium.....	45
3.6 Genetic Transformation of Rice Callus.....	46
3.7 Identification of Transgenic Rice.....	47
3.7.1 Identification by Histochemical staining.....	47
3.7.2 Detection of Transgenic Rice.....	49
Chapter 3 Construction of Expression Vectors and Genetic Transformation of <i>OspPIR2</i>	52
1 Preface	52

2 Materials and Methods	53
2.1 Materials.....	53
2.2 Methods.....	53
2.2.1 Sequence Analysis of <i>OspPIR2</i> Protein.....	53
2.2.2 Construction of Over and RNAi Expression Vector of <i>OspPIR2</i>	53
2.2.3 Vectors Transferred into Agrobacterium.....	55
2.2.4 Agrobacterium-mediated Genetic Transformation.....	55
2.2.5 Identification of Transgenic Plants.....	55
3 Results and Analysis	56
3.1 Sequence and Family Analysis of <i>OspPIR2</i>	56
3.2 Construction and Identification of Over Expression Vector of <i>OspPIR2</i>	59
3.2.1 RT-PCR.....	59
3.2.2 Obtained the Intermediate Vector with Fragments.....	59
3.2.3 Obtained the Over Expression Vector.....	59
3.3 Construction and Identification of RNAi Expression Vector of <i>OspPIR2</i>	60
3.4 Identification of Expression Vector Transformed into Agrobacterium.....	61
3.5 Agrobacterium-mediated Genetic Transformation.....	62
3.6 Identification of Transgenic Rice.....	63
Chapter 4 Discussion	64
1 Research on Domains and Function of <i>OsL-RLK1</i> and <i>OspPIR2</i>	64
1.1 Research on Domains and Function of <i>OsL-RLK1</i>	64
1.2 Research on Domains and Function of <i>OspPIR2</i>	64
2 Construction of RNAi Expression Vectors	65
3 Induction and Transformation of Rice callus	66
4 Identification of Transgenic Rice	68
Chapter 5 Conclusion and Outlook	69
References	70
Acknowledgements	77

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

水稻细菌性条斑病是由 *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola* 侵染引起的细菌性病害，简称细条病，现已成为威胁我国南方稻区水稻生产的重要病害，也是我国重要的检疫性水稻病害。由水稻细菌性条斑病所引起的产量损失通常为 15—25%，严重时可达 40—60%。

OsL-RLK1 是在水稻细菌性条斑病侵染应答的差异蛋白质组学研究中发现的一个水稻中编码植物受体类蛋白激酶的基因，*OspPIR2* 为病程相关蛋白基因。本实验对 *OsL-RLK1* 和 *OspPIR2* 基因进行了生物信息学的分析，并根据蛋白序列分析结果，设计 PCR 引物，得到了目的克隆，为了更好地研究它们的功能，及其在水稻抗病反应中的作用，构建了相应的植物过量表达载体 pH7WG2-*OsL-RLK1*、pH7WG2-*OspPIR2* 以及 RNAi 表达载体 pDS1301-*OsL-RLK1*、pH7GWIWG2 (II) -*OspPIR2*，用含有目的基因的根癌农杆菌直接侵染诱导的愈伤组织，用新生的愈伤组织进行再分化，获得了再生植株。对得到的新生抗性愈伤、再生水稻植株通过组织化学 *GUS* 染色、PCR 检测验证后确认，目的基因已经成功整合到水稻基因组中，并得到了表达。在通过半定量 RT-PCR 对转基因株系 RNA 转录水平的检测中发现，*OsL-RLK1* 基因过量表达的转基因植株中该基因转录水平明显高于野生型，这说明在过量表达植株中 *OsL-RLK1* 基因能够稳定表达并达到较高的水平。对 6 株 RNAi 转基因植株的检测显示，其中 5 株并不表达 *OsL-RLK1* 基因，这说明在这些 RNAi 植株中 *OsL-RLK1* 基因成功地被敲除，但也并不是所有的 RNAi 植株中该基因都得到干扰。这为后续转基因水稻植株的分析，*OsL-RLK1* 和 *OspPIR2* 基因功能的研究奠定了基础。

关键词：*OsL-RLK1*；*OspPIR2*；水稻

Abstract

Bacterial Leaf Streak (BLS) caused by the pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola* (Xooc.) is one of the major rice diseases in South China. It leads to decreased rice production usually by 15-25%; 40-60% can be serious in prevailing years.

OsL-RLK1 is a hypothetical resistant-related gene that has been detected from rice genome based on the study of differential proteomics from rice leaves in response to bacterial leaf streak. It encodes a protein belonging to the large family of Receptor-like protein kinases. *OspPIR2* encodes a protein belonging to the large family of Pathogenesis-related proteins.

In this article, we studied the characteristics of *OsL-RLK1*, *OspPIR2* by bioinformatic analysis. We got destination genes through PCR. In order to further clarify the mechanisms, the functions and the effects of these genes in plant-resist-disease reaction, we constructed the plant over expression vector and RNAi expression vector of *OsL-RLK1* and *OspPIR2* respectively. In this paper, we got the over expression vector pH7WG2-*OsL-RLK1*, pH7WG2-*OspPIR2*, and RNAi expression vector pDS1301-*OsL-RLK1*, pH7GWIWG2(II)-*OspPIR2*. Then, the recombinant plasmids were integrated into the genome of rice via *Agrobacterium tumefaciens* *EHA105* mediation respectively. The transgenic plants were detected, and the results indicated that the recombinant plasmids had been transferred and expressed in the rice cultivars with PCR analysis and *GUS* gene expression detection. The mRNA expressional level of *OsL-RLK1* in regenerated plants were detected by semiquantitative RT-PCR, the results shows that the expressional level of *OsL-RLK1* in over expression transgenic plants were higher than in wild type plants, this indicates that *OsL-RLK1* can be expressed stably. Furthermore, the detection of six RNAi transgenic plants shows *OsL-RLK1* gene did not express in five of them. It implies that *OsL-RLK1* was total knocked out successfully. But we also found that gene silence not happen in all of the RNAi transgenic plants.

We got the preliminary results by the physiological and biochemical analysis of the transformant. The potential roles of *OsL-RLK1* and *OspPIR2* as resistant-related genes in the processes of defense are discussed.

Key words: *OsL-RLK1*; *OspPIR2*; Rice

厦门大学博硕士学位论文摘要库

缩 略 词

BLS(Bacterial Leaf Streak)	水稻细菌性条斑病
RLK(Receptor-like protein kinase)	受体类蛋白激酶
LRR(Leucine-rich repeat)	富亮氨酸
PR-5 (pathogenesis-related protein 5)	病程相关蛋白 5
RNAi(RNA interference)	RNA 干扰
LB	Luria-Bertani 培养基
2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid)	2,4-二氯苯氧乙酸
NAA (naphthalene acetic acid)	萘乙酸
6-BA (6-benzylaminopurine)	6-苄基氨基嘌呤
KT(Kinetin)	激动素
AS (3,5-dimethoxy-4-hydroxy acetophenone)	乙酰丁香酮
Hyg (hygromycin B)	潮霉素 B
Cef (Cefotaxime Sodium)	头孢霉素
Carb (Carbenicillin)	羧苄青霉素钠
<i>GUS</i> (β -glucuronidase)	β -葡糖醛酸糖苷酶
CTAB (cetyltriethylammonium bromide)	十六烷基三甲基溴化铵
X-gluc	5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-葡糖苷酸
PCR (polymerase chain reaction)	聚合酶链式反应
RT-PCR (reverse transcriptase-PCR)	反转录聚合酶链式反应

第一章 前言

1 水稻细菌性条斑病概况及研究进展

1.1 水稻细菌性条斑病概况

水稻细菌性条斑病 (Rice Bacterial Leaf Streak), 简称细条病, 是由 *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola* 侵染引起的细菌性病害。最早发现危害的是在菲律宾, 该病主要分布在亚洲的热带、亚热带地区。1955 年广东首先发现水稻细条病危害, 尔后随着引种调种、南繁加代以及材料交换逐步传播蔓延, 现已成为我国南方稻区的主要病害之一^[1], 也是我国、美国和澳大利亚等国重要的检疫性水稻病害^[2]。目前生产上还没有防治水稻细条病危害的有效方法。福建省部分地区为害已超过水稻白叶枯病。当气候条件适宜时, 水稻细条病能在感病品种上引起很大的产量损失, 该病引起的损失通常为15~25%, 严重时可达40~60%。

1.1.1 水稻细条病病原的分类与分化

1958年Pordesimo研究了菲律宾水稻条斑病的病原, 命名为 *Xanthomonas translucens* f. sp. *oryzae*, 误将其作为白叶枯病菌。1990年Swing等根据病原的表型、基因型、化学分类资料重新承认水稻黄单胞菌这个种 (*X. oryzae*), 该种包括了分别引起水稻白叶枯病和细菌性条斑病的黄单胞杆菌白叶枯致病型 (*X. oryzae* pv. *Oryzae*) 和细菌性条斑病致病型 (*X. oryzae* pv. *Oryzicola*) 2个变种。研究发现, 病斑长度及数量因品种、菌株不同而异^[3-5]。根据在BP176品种上的严重度将菲律宾和日本的菌株分为4群^[6]。尽管有报道认为水稻细菌性条斑病菌不存在生理小种^[7], 但在此之后, 进一步的研究表明, 水稻细菌性条斑病菌确实存在致病性分化^[8]。但也有报道认为水稻细条病菌菌株的遗传谱系与其致病性之间并无明显的相关性^[9]。

1.1.2 水稻细菌性条斑病的侵染及流行规律

水稻细菌性条斑病菌通过稻叶气孔及伤口侵入, 经雨水、灌溉水、昆虫及农

事操作等作近距离的传播蔓延，也可通过叶片之间接触传播；而病原菌的远距离传播则靠种子调运。对水稻细菌性条斑病种子侵染和传播方式研究结果发现，在小花和种子的不同发育阶段接种，会导致子房、雄蕊及胚乳变成褐色或黑色而坏死，颖片也变褐，病菌存在于成熟种子的颖壳下，在发芽过程中侵染胚芽，然后穿过胚芽鞘的气孔，侵染叶鞘的第一真叶，感病真叶上的病菌再侵染其它叶片，最后剑叶上的菌脓引起种子感染^[8]。Reddy 等报道野生稻可能在水稻细菌性条斑病流行中起了交互寄主的作用^[10]。

研究表明，水稻不同品种感病程度不同。一般粳稻较籼稻抗病，常规稻较杂交稻抗病^[6]。品种间对水稻细菌性条斑病的抗性差异明显，但许多报道结果很不一致，这是由于各地供试菌株致病力不同，还是接种方法与条件等存在差异所致，有待进一步澄清。在各地调查中，发现分蘖期至孕穗期间的植株往往发病较重，嫩叶比老叶易感病；在幼苗期，病叶率虽然很高，但严重度较轻。

水稻细条病发病适温为25~30℃，必须有2~3天的高湿或早晨有露方可引致侵染；不论相对湿度多大，在气温低于22℃时，病斑即停止扩展，低于16℃时，无新病斑出现^[11]。在适温条件下，雨量越多田间湿度越大，发病就早而且重。可见水稻细菌性条斑病发生与温度、雨量、湿度关系较密切。

1.1.3 水稻细菌性条斑病的危害

有关产量损失方面，各研究者报道很不一致。吴培机^[12]测定的结果是早稻因病害造成的损失为1%~15%，晚稻则为1%~37%。李建仁等报道该病对产量影响较大，一般减产10%~20%^[13]。1990年，陈玉其对产量损失估计进行了专门的研究，结果表明，水稻受水稻细菌性条斑病为害，随着被害叶片面积的增加，其空秕率也随之增加，千粒重相应降低，将病叶分成1、2、3、4、5级，其损失率分别为5.61%、16.48%、27.37%、39.84%、40.16%。Chand等报道因水稻细菌性条斑病而造成的产量损失率为0.5%~35%，而 Opina 和 Exconde^[14]报道在菲律宾旱季水稻因水稻细菌性条斑病而造成的产量损失比雨季要小。

从近几年水稻细条病的病害管理实践表明，要有效控制水稻细条病的发展和危害，种植抗病品种是防治水稻细条病经济有效的措施。因此，水稻细条病抗源的筛选和抗病品种的选育已是水稻抗病育种的研究热点之一，明确水稻细条病病

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库