

学校编码: 10384

分类号 密级

学号: 200426059

UDC

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

水稻 *OsLecRK1* 基因功能研究初探

Study on Functional Characterization of a Rice Lectin-like
Receptor Kinase Gene (*OsLecRK1*)

杨 晓 坡

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: 2007年 7月 2日

论文答辩时间: 2007年 8月 4日

学位授予日期: 年 月 日

答辩委员会主席: 陶 涛 教授

评 阅 人:

2007 年 8 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，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的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1. 保密（ ），在 年解密后适用本授权书。
2. 不保密（ ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名： 日期： 年 月 日
导师签名： 日期： 年 月 日

目 录

目 录.....	I
摘 要.....	1
Abstract.....	3
略 缩 词.....	5
1 文献综述.....	6
1.1 水稻细菌性条斑病研究进展.....	6
1.1.1 水稻细菌性条斑病概况.....	6
1.1.2 水稻抗细菌性条斑病研究进展.....	7
1.2 水稻抗性基因工程研究进展.....	9
1.2.1 Bt 抗虫转基因水稻.....	11
1.2.2 转 <i>Xa21</i> 基因抗白叶枯病水稻.....	11
1.2.3 稻瘟病分子生物学研究进展.....	12
1.3 植物凝集素类受体蛋白激酶 (LecRK) 研究进展.....	12
1.4 本课题研究的内容和意义.....	13
2 材料与方法.....	14
2.1 实验材料.....	14
2.1.1 目的基因.....	14
2.1.2 病原菌.....	14
2.1.3 农杆菌菌种.....	14
2.1.4 受体植物材料.....	14
2.1.5 主要化学试剂及仪器.....	14
2.2 实验方法.....	16
2.2.1 水稻 <i>OslacRK1</i> 基因的生物信息学分析.....	16
2.2.2 RT-PCR 检测 <i>OslacRK1</i> 保守区片段.....	17

2.2.3 <i>OsLecRK1</i> 的 Northern 杂交分析	18
2.2.4 植物过量表达载体的构建	20
2.2.5 RNAi 载体的构建	21
2.2.6 水稻中花 11 的组织培养	22
2.2.7 农杆菌介导的水稻中花 11 遗传转化	23
2.2.8 水稻转化体的筛选鉴定	24
3 结果与分析	26
3.1 水稻 <i>OsLecRK1</i> 基因的生物信息学分析	26
3.1.1 确定了水稻中最少还有 188 个 LecRK 类基因	26
3.1.2 水稻 LecRK 类基因在染色体上的分布情况	36
3.1.3 水稻 LecRK 类基因的多序列联配和同源性分析	36
3.2 <i>OsLecRK1</i> 基因的 RT-PCR 检测和 Northern 验证	41
3.3 植物过量表达载体的构建及鉴定	43
3.3.1 克隆载体的构建及重组子的鉴定	43
3.3.2 中间载体 pBPF- <i>OsLecRK1</i> 的构建及重组子的鉴定	43
3.3.3 表达载体 p1301-35S- <i>OsLecRK1</i> -Tnos 的构建及重组子的鉴定	43
3.4 RNAi 载体的构建及重组子的鉴定	44
3.5 转基因水稻组织培养	45
3.6 GUS 基因表达检测	46
3.6.1 转化后愈伤组织 GUS 基因表达检测	46
3.6.2 再生植株叶片 GUS 基因表达检测	47
3.7 再生植株 PCR 检测	48
3.8 再生植株 <i>OsLecRK1</i> 转录水平的半定量 RT-PCR 检测	48
4 讨论	50
4.1 <i>OsLecRK1</i> 基因的结构特征	50
4.2 <i>OsLecRK1</i> 基因的定位	51
4.3 植物凝集素与植物防御反应	51
4.4 RNAi 技术及其在转基因水稻中的应用	52

4.5 水稻的成熟胚组织培养.....	53
5. 结论与展望.....	54
参考文献.....	55
致 谢.....	61
附录 1: 培养基及试剂的配制.....	62
附录 2: 重组载体 p1301-35S- <i>OsLecRK1</i> -Tnos 测序及比对结果.....	63
附录 3: RNAi 载体 pDS1301- <i>OsLecRK1</i> 测序及比对结果.....	67

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘 要

*OsLecRK1*基因是对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RLK蛋白的基因。该基因的cDNA全长为2361 bp, 其中2046 bp的开放阅读框编码681个氨基酸。*OsLecRK*类似于植物类受体蛋白激酶(receptor-like kinase, RLK), 此类蛋白通常由胞外信号序列、跨膜结构域和激酶结构域组成。在植物体对外界胁迫、激素、病原物的应答过程中, RLK起着关键作用。植物凝集素类受体蛋白激酶(lectin-like receptor kinases, LecRKs)是在拟南芥中首次发现并得以命名。LecRK与RLK有着类似的结构, 都包括N端靶序列、胞外结构域、跨膜结构和激酶结构域几个部分。植物凝集素是一类具有高度特异性糖结合活性的蛋白, 含有一个或多个可与单糖或寡聚糖特异可逆结合的非催化结构域。它的糖结合特异性主要针对外源寡糖, 主要生理功能是介导植物的防御反应。这说明LecRK有可能在植物发育、机械损伤和抵抗逆境等反应中发挥作用。但是, 目前还不明确这类蛋白到底在生物体相关应答途径中行使何种生物学功能。

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%。因此, 分离和克隆细条病相关抗性基因并进一步明确这些基因的抗病机制, 对于控制细条病的发生与发展, 减少经济损失具有重要的理论和现实意义。

本课题是基于水稻蛋白质组学的研究, 通过双向电泳联用质谱技术得到差异表达蛋白点, 并根据蛋白序列分析结果, 设计PCR引物, 经RT-PCR, 从水稻cDNA 中, 获得若干水稻激酶-RLK类基因片断, *OsLecRK1*正是其中之一。信息学分析表明该基因定位在水稻第七号染色体上, GenBank编号为XM_476511。Northern杂交证明接种水稻细菌性条斑病可以诱导*OsLecRK1*的表达。然后我们分别针对稻*OsLecRK1*基因构建了植物超量表达载体p1301-35S-*OsLecRK1*-Tnos和RNAi载体pDS1301-*OsLecRK1*, 目

的是分别增强和减弱*OsLecRK1*的表达量，对比给植物体带来生物学功能上的差异。我们以水稻作为受体植物进行基因转化，最后对转化体进行了鉴定并得到了初步结果。为水稻*OsLecRK1*基因功能的进一步研究奠定了基础。

关键词：植物凝集素类受体蛋白激酶；*OsLecRK1*；水稻细菌性条斑病

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Abstract

OsLecRK1 is a hypothetical resistant-related gene that has been detected from rice genome based on the study of differentially expressed proteins from rice leaves in response to bacterial leaf streak (BLS). The cDNA length is 2361 bp, of which 2046 bp form the open reading frame encoding 681 amino acids. Lectin-like receptor kinases (LecRKs) and plant receptor-like kinases (RLKs) are specific functional group in a similar way. They are proteins with a predicted signal sequence, single transmembrane region, and cytoplasmic kinase domain. RLKs play an important part in plant in response to stress, incrition and pathogeny. LecRKs are a class of proteins originally described from Arabidopsis. They have a structure similar to other plant RLKs with an N-terminal targeting signal, a presumably extracellular domain, a single transmembrane (TM)-spanning helix, and a cytosolic kinase domain. All of above have led to suggestions that LecRKs could be involved in plant development and also adaptive processes such as wounding, defense, and protein storage. It remains enigmatic whether they have a major biochemical function leading to these different physiological roles.

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 generally by 40-60% in prevailing years. And genes which are related closely to resistance may be play important roles in controlling BLS epidemics and reducing economic losses.

In this article, we describe our study of functional characterization of *OsLecRK1*. Bioinformatic analysis suggests that the gene locates in the 7 chromosome. The cDNA and genomic sequences have been submitted to GenBank database (Accession No.: XM_476511). Expression of the *OsLecRK1* mRNA was demonstrated with Northern hybridization to be enhanced under BLS conditions.

We specifically address the question of their potential role in relation to the resistance of plant study on the genetic transformation of *OsLecRK1* in rice. First, a plant over expression vector according the cDNA of *OsLecRK1* of rice and an RNAi expression vector of *OsLecRK1* was constructed. Then, the *OsLecRK1* gene and its RNAi

fragment was integrated into the genome of rice callus via *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 mediation respectively. The potential role of *OsLecRK1* as resistant-related gene in the processes of defense is discussed.

Key words: Lectin-like receptor kinase (LecRK); *OsLecRK1*; Bacterial leaf streak (BLS)

厦门大学博硕士学位论文摘要库

略 缩 词

receptor-like kinases (RLKs)	植物类受体蛋白激酶
Lectin-like receptor kinases (LecRKs)	植物凝集素类受体蛋白激酶
Bacterial leaf streak (BLS)	水稻细菌性条斑病
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>Oryzicola</i> (Xooc)	水稻细菌性条斑病病原菌
Cb(Carbenicillin Na ₂)	羧苄青霉素
Hyg (hygromycin B)	潮霉素 B
Kan (kanamycin)	卡那霉素
NAA (naphthalene acetic acid)	萘乙酸
2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid)	2,4-二氯苯氧乙酸
6-BA (6-benzylaminoppurine)	6-苄基氨基嘌呤
LB	Luria-Bertani 培养基
AS (3,5-dimethoxy-4-hydroxy acetophenone)	乙酰丁香酮
GUS (β-glucuronidase)	β-葡糖醛酸糖苷酶
CTAB (cetyltriethylammonium bromide)	十六烷基三甲基溴化铵
PCR (polymerase chain reaction)	聚合酶链式反应
X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide)	5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-葡萄糖苷酸
BSA (bovine serum albumin)	牛血清白蛋白
BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- Hosphate)	5-溴-4-氯-3-吲哚-磷酸二钠盐
NBT(nitro-blue tetrazolium)	氯化氮蓝四唑

1 文献综述

1.1 水稻细菌性条斑病研究进展

1.1.1 水稻细菌性条斑病概况

水稻细菌性条斑病(bacterial leaf streak, BLS, 简称细条病)是由 *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola* 侵染引起的细菌性病害。该病是目前威胁我国南方稻区水稻生产的重要病害^[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]。1918年菲律宾首次发现了细条病。目前, 该病主要分布在亚洲的亚热带区, 在澳大利亚及非洲的尼日利亚也发生了该病。解放初期, 我国仅在广东发现了细条病, 以后由于南繁及病区调种, 使得该病分布日趋扩大, 现分布于南方各省。福建省闽南地区受害严重, 现已漫延到全省, 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, 其损失通常为15~25%, 严重时可达40~60%, 但是目前生产上还没有防治水稻细条病的有效方法。分离和克隆细条病相关抗性基因并进一步明确这些基因的抗病机制, 对于控制细条病的发生与发展, 减少经济损失具有重要的理论和现实意义。

1.1.1.1 水稻细菌性条斑病的发现及菌系分化

1958年 Pordesimo 研究了菲律宾水稻条斑病的病原, 并将其命名为 *Xanthomonastranslucens* f. sp. *oryzae*, 但当时将该病菌误认为是白叶枯病菌。1957年方中达将该病与白叶枯病区分开来, 确认为一种新的细菌性病害, 属黄单胞杆菌。1990年 Swing 等根据病原的表型、基因型和化学分类资料最终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。尽管有报道认为水稻细菌性条斑病菌不存在生理小种^[3], 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。

1.1.1.2 水稻细菌性条斑病的侵染及流行规律

水稻细条病病菌的远距离传播通常靠种子异地调运来实现，而病原菌则通过气孔及伤口侵染稻叶，同时可以经过水源、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。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^[4]。研究表明，品种间对水稻细菌性条斑病的抗性差异明显。通过在不同生育期测定不同稻种的抗性反应发现分蘖期至孕穗期间的植株往往发病较重，嫩叶比老叶感病；在幼苗期，病叶率虽然很高，但严重度较轻。进一步可以将水稻品种对稻细条病的抗性类型分为全期抗病型、全期中抗型、苗期感病成株期抗病型、全期感病型 4 类。水稻细菌性条斑病发病适温为 25~30 °C，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 °C 时，病斑即停止扩展，低于 16 °C 时，无新病斑出现^[5]。研究发现，病斑长度及数量因品种、菌株不同而异^[6-8]。水稻细条病发生与温度、雨量、湿度关系较密切，在适温条件下，雨量越多、田间湿度越大，发病就早而且重。另外，小叶型品种较大叶型品种抗病，叶片窄而直立的品种较叶片宽而平展的品种抗病，叶片气孔密度较低及气孔开张度较小的品种抗病性较强。目前尚未发现对水稻细菌性条斑病免疫的水稻品种。但研究表明水稻品种间抗病性差异明显，一般粳稻较籼稻、糯稻抗病，常规稻较杂交稻抗病，但也有认为糯稻比籼稻和粳稻更易感病，而籼、粳稻品种中抗感比例差异不大^[9]。另外也应该注意到各地采用不同的鉴定方法、病菌不同的生态环境都会在一定程度上影响差异的形成。

1.1.2 水稻抗细菌性条斑病研究进展

病害是农业生产的主要限制因子之一，也是影响作物产量并危及粮食安全的重要原因。迄今为止，国内外学者对水稻细菌性条斑病的研究大多集中在病原菌鉴定、栽培防治管理、水稻抗源筛选、抗性鉴定、抗病生理和遗传等方面，但是对水稻抗性的分子遗传机理的研究仍然很少，特别是有关抗病基因的定位、克隆以及由病原

菌诱导的抗性基因表达与调控等分子基础研究尚不深入^[10]。

1.1.2.1 水稻细菌性条斑病的抗性遗传研究

植物抗病性可能由单基因抗性或多基因抗性控制。单基因抗性由于能提供明显的抗、感病界限，便于对后代进行选择，所以很容易进入育种程序。迄今已发现几百个单基因分别对真菌、细菌、病毒、线虫和其他昆虫提供抗性，包括从免疫到部分抗性的不同类型。这些抗病基因多数仅对一种病菌或一个小种起作用，但也发现一些与病毒侵染有关的抗病基因对其他病原物也有效。

由于对水稻细条病的遗传研究较少，对细条病的抗性遗传方式报道不多。Khush等初步认为细条病抗性属于数量性状。有研究表明Dular和IR36对细条病的抗性是由一对主效基因控制^[11]，但也有认为Dular和IR36对细菌性条斑病的抗性都是由两对隐性基因控制的^[12]。Nayak等试探性地分析了抗源BJ1的抗性，初步认为其抗性受3对独立隐性基因控制^[13]，而Khush认为细条病抗性属数量性状遗传。何月秋等分别对几个杂交水稻恢复系和不育系配组了不同的杂交组合及其各个世代抗细菌性条斑病的遗传规律进行了研究，结果认为杂交稻的抗性取决于恢复系，抗病恢复系对细菌性条斑病的抗性由1~2对主效基因控制，抗病对感病为显性^[14]。徐建龙等分析了Hashikalmi、Dular和90IRBBN44这3个抗源品种对细条病的抗性遗传，发现了3个水稻品种中对细条病S2103菌株存在4个不同的抗性基因，并暗示水稻细条病抗性基因存在多个基因位点。吴为人等采用t测验法、复合区间定位法及多性状复合区间定位法对细条病抗性基因进行了定位分析。共检测出11个细条病抗性基因QTL^[15]。也有不少学者认为水稻对细条病的抗性与细胞质无关，属多基因控制的数量性状，符合简单的加性模型，基因的效应为积加作用，具有较高的广义和狭义遗传力^[15]。这些差异可能是各实验室采用不同的菌株、接种方法、病情测定指标、抗性分级标准以及实验材料造成的结果。同一抗病品种及不同材料在不同的杂交组合中，对不同菌株的抗性基因的组成及遗传规律有待于深入研究。

1.1.2.2 水稻细菌性条斑病的抗性分子生物学研究

随着分子植物病理学的研究深入和现代分子生物学的不断发展，植物抗病基因

(R基因)已成为分子植物病理学和植物基因工程研究的热点之一, R基因的克隆及其在抗病反应中的功能研究为揭示植物抗病反应机制和有效控制植物病害提供了可能。1992年Johal和Briggs克隆了第一个R基因, 玉米抗圆斑病基因*Hm1*。迄今为止, 已有近三十多个R基因被克隆, 它们分别介导植物病原真菌、细菌、病毒和线虫的抗性。

目前, 国内外对水稻抗细菌性条斑病基因的克隆尚鲜见报道, 通过对过氧化物酶同工酶谱分析发现细菌性条斑病菌能诱导过氧化物酶的某些等位基因的达, 表现为多条同工酶带的变化^[16], 而酯酶同工酶在抗感病品种中的变化大。吴为人等以高感和高抗细条病的两个籼稻品种 H359 和 Acc8558 为亲本, 建立了一个重组自交系群体, 利用该群体构建了一张包含 225 个分子标记的连锁图。1996 和 1997 连续两年对该群体进行了细条病抗性鉴定。采用 t 测验法、复合区间定位法及多性状复合区间定位法对细条病抗性基因 (quantitative trait locus, QTL) 进行了定位分析。共检测出 11 个 QTL, 分别位于第 1、2、3、4、5、7、8 和 11 号染色体上, 效应大小彼此接近, 其中大多数抗病等位基因来自抗病亲本 Acc8558, 只有位于第 3 和第 4 号染色体上的 2 个 QTL 的抗病等位基因来源于感病亲本 H359^[17]。Tang 等对该群体进行了连续两年的抗性鉴定试验, 并将所得数据应用复合区间定位法 (CIM) 进行分析, 发现了 5 个表现出较大效应的 QTL, 对 F₂ 群体则采用分离体分组混合分析法 (BSA) 进行分析, 共检测到 3 个 QTL。方宣钧实验室利用 mRNA 差异显示技术克隆由水稻细条病菌诱导表达的相关基因, 已经获得一些 cDNA 序列。显然, 要鉴定和分离水稻细菌性条斑抗性基因, 尚需要进一步研究该病的分子遗传机理, 明确抗病基因的数量、在水稻基因组中的定位及抗性基因型与表型的相互关系。

1.2 水稻抗性基因工程研究进展

植物R基因的转基因工程较传统遗传育种方式有着较大的优势。一方面转基因途径可以大大缩短新品种的育成时间, 常规育种通常至少要7~10年, 而转基因则只需3~4年。另外转基因途径还可以进行跨种、属的基因转移, 这也是常规育种所无法办到的。但纵观目前所进行的转基因工程研究状况, 还存在着一些问题, 其中最关键的一点就是要加强对病原菌致病机制和植物抗病机制的深入研究。

针对水稻的抗性基因工程已经取得一定的成果,水稻遗传转化体系也相对成熟。80年代末期,国内外相继报道利用PEG法和电击法转化水稻原生质体,并且通过此法获得了水稻转基因植株。但是由于原生质体培养操作复杂,使得以原生质体作为转化受体的转化再生率非常低^[18]。李宝健等首先利用农杆菌转化水稻,通过在农杆菌菌液和感染培养基中添加AS(乙酰丁香酮)、香草醛、没食子酸等酚类化合物的方法,在愈伤组织水平上检测到了外源基因的表达,并在电子显微镜下观察到了农杆菌对水稻细胞的粘附和侵染^[19]。这一发现使得人们可以把双子叶植物常用的农杆菌转化技术应用到水稻转基因研究中。Chan等以水稻开花授粉后10~12天的幼胚为受体,经农杆菌感染后获得了转基因植株,但缺乏分子生物学证据^[20]。李瑶等用农杆菌转化水稻不定芽,获得了具有GUS表达的转化植株,仍然缺乏分子生物学证据^[21]。Hiei等以水稻成熟胚愈伤组织和未成熟幼胚为受体,获得了较多有严格分子生物学证据的转基因植株,并对农杆菌介导法转化水稻的影响因素进行了详细研究,建立了比较成熟的农杆菌转化水稻的技术体系,为农杆菌介导法转化单子叶植物开辟了先河^[22]。继而Rashid等利用农杆菌成功转化了籼稻^[23]。Ye等将 β -胡萝卜素合成途径的3个基因 psy 、 $crt I$ 、 $aph IV$ 导入了水稻,培育了富含维生素A的新品系^[24]。Eunpyo等、张宪银等、高越峰等分别将储藏蛋白基因Glutein、球蛋白基因、高赖氨酸基因导入了水稻,转基因水稻的品质有了不同程度改进^[25, 26]。何迎春等利用花粉管通道法将几丁质酶基因导入水稻,均获得了变异的子代,并提供了分子杂交证据^[27]。但这一方法的转化效率还比较低,在操作上还受到开花季节的限制,而且对后代的筛选工作量很大。许明辉等先后利用基因枪法将几丁质酶-葡聚糖酶双价基因转入了水稻,与受体品种相比,转基因水稻对稻瘟病的抗性显著增强^[28]。Gatehouse等报道了转雪花莲凝集素GNA基因水稻抗褐飞虱的研究结果^[29]。黄大年等利用基因枪法将抗菌肽基因导入了京引119水稻,转基因植株对白叶枯病具有一定抗性;将抗除草剂的 bar 基因导入了杂交水稻恢复系,由于保持系不含 bar 基因,所以杂交种苗期喷洒Basta除草剂,不但可以杀死杂草,而且可以去除假杂种,转基因抗除草剂水稻已进入田间试验^[30]。农杆菌介导的水稻遗传转化体系非常成熟,在国内外得到了广泛应用,同时基因枪介导的水稻遗传转化体系比较成熟,实际工作中的应用也比较广泛。

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