

学校编码: 10384

分类号 密级

学号: 21620070153798

UDC

厦门大学

博士 学位 论 文

一个 NBS-LRR 基因 *DEPG1* 和两个胞质类受体激酶基因 *NRRB* 和 *XCRK* 在水稻与细菌性条斑病菌互作中的作用

Role of the NBS-LRR Gene *DEPG1*, and the Two Receptor-Like Cytoplasmic Kinase Genes *NRRB* and *XCRK* in Rice - Bacterial Leaf Streak Pathogen Interactions

郭立佳

指导教师姓名: 陈亮

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2011 年 5 月

论文答辩时间: 2011 年 6 月

学位授予日期: 2011 年 月

答辩委员会主席:

评 阅 人:

2011 年 6 月

厦门大学博硕士论文摘要库

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

厦门大学博硕士论文摘要库

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

厦门大学博硕士论文摘要库

目录

| | |
|--|-----------|
| 中文摘要 | 1 |
| ABSTRACT | 5 |
| 缩写词(ABBREVIATIONS) | 9 |
| 1. 前言 | 11 |
| 1.1. 水稻细菌性条斑病及其病原菌 | 11 |
| 1.1.1. 水稻细菌性条斑病的发生与影响..... | 11 |
| 1.1.2. 水稻细菌性条斑病病原菌的形态与生理特性..... | 11 |
| 1.1.3. 病原菌的侵染模式和引起病害的症状..... | 12 |
| 1.1.4. 病原菌的传播和越冬..... | 12 |
| 1.1.5. 细菌性条斑病的防治策略..... | 13 |
| 1.1.6. 水稻细菌性条斑病菌的致病性分化和遗传多样性..... | 13 |
| 1.2. 水稻细菌性条斑病抗性研究进展 | 14 |
| 1.2.1. 水稻品种对细菌性条斑病的抗性..... | 14 |
| 1.2.2. 水稻细菌性条斑病的抗性遗传研究..... | 15 |
| 1.2.3. 水稻细菌性条斑病抗性相关基因..... | 16 |
| 1.2.4. 水稻细菌性条斑病菌 <i>Xoc</i> 的无毒基因与非宿主抗病基因 | 18 |
| 1.3. <i>Xoc</i> 致病机理研究进展 | 19 |
| 1.3.1. <i>Xoc</i> 的 III 型分泌系统 | 19 |
| 1.3.2. <i>Xoc</i> 的 AvrBs3 效应子及其靶标 | 20 |
| 1.3.3. TAL 效应子和 <i>Xoc</i> 抑制的水稻防御反应 | 22 |
| 1.4. 植物激素与植物的防御反应 | 23 |
| 1.4.1. 水杨酸在植物病原菌防御中的作用 | 23 |
| 1.4.2. 茉莉酸类物质在植物病害防御中的作用 | 25 |
| 1.4.3. 乙烯在植物病害防御中的作用 | 27 |
| 1.4.4. 其它植物激素与防御反应 | 31 |
| 1.5. 植物数量抗病性状的利用 | 31 |
| 1.6. 研究的目的和意义 | 32 |
| 2. <i>DEPG1</i> 基因在水稻与细条菌 <i>XOC</i> 互作中的作用 | 33 |
| 2.1. 实验材料 | 33 |
| 2.2. 实验方法 | 34 |
| 2.2.1. <i>DEPG1</i> 基因生物信息分析 | 34 |
| 2.2.2. 水稻材料培养及处理 | 35 |
| 2.2.3. 总 RNA 提取、反转录与定量 PCR | 36 |
| 2.2.4. <i>DEPG1</i> 基因各种表达载体的构建 | 36 |
| 2.2.5. 农杆菌介导的水稻遗传转化 | 43 |
| 2.2.6. PCR 鉴定转基因植株 | 43 |
| 2.3. 结果与分析 | 44 |
| 2.3.1. <i>DEPG1</i> 基因的生物信息学分析 | 44 |
| 2.3.2. <i>DEPG1</i> 基因在水稻各组织器官中的表达 | 50 |

| | |
|--|------------|
| 2.3.3. <i>Xoc</i> 侵染对 <i>DEPG1</i> 和病程相关基因表达的影响..... | 52 |
| 2.3.4. 各种防御信号化合物及胁迫处理对 <i>DEPG1</i> 基因表达的影响..... | 55 |
| 2.3.5. <i>DEPG1</i> 基因各种表达载体的获得..... | 57 |
| 2.3.6. 各种转基因水稻植株的 PCR 鉴定..... | 61 |
| 2.3.7. <i>DEPG1-GFP</i> 融合蛋白在洋葱表皮细胞中的定位 | 63 |
| 2.3.8. <i>DEPG1</i> 基因在 T ₀ 代超量表达转基因植株中的表达水平 | 64 |
| 2.3.9. <i>DEPG1</i> 基因在 T ₀ 代抑制表达转基因植株中的表达 | 65 |
| 2.3.10. <i>DEPG1</i> 超量表达和抑制表达转基因植株对 <i>Xoc</i> 的抗性 | 66 |
| 2.3.11. 防御相关基因在 T ₁ 代 <i>DEPG1</i> 超量表达转基因植株的表达 | 69 |
| 2.3.12. 防御相关基因在 T ₁ 代 <i>DEPG1</i> 抑制表达转基因植株的表达 | 70 |
| 2.4. 讨论 | 71 |
| 2.4.1. <i>DEPG1</i> 基因的生物信息学分析..... | 71 |
| 2.4.2. <i>DEPG1</i> 基因与水稻的防御反应..... | 72 |
| 2.4.3. <i>DEPG1</i> 的组织表达特性与水稻和 <i>Xoc</i> 互作的关系..... | 73 |
| 2.4.4. <i>DEPG1</i> 基因在水稻细菌性条斑病抗性中的作用 | 73 |
| 2.4.5. 转基因水稻对 <i>Xoc</i> 抗性变化所涉及的可能分子机制分析 | 74 |
| 2.4.6. <i>DEPG1</i> 基因其它可能功能 | 75 |
| 2.5. 小结 | 76 |
| 3. <i>NRRB</i> 基因在水稻与 <i>XOC</i> 互作中的作用 | 77 |
| 3.1. 实验材料 | 77 |
| 3.2. 实验方法 | 78 |
| 3.2.1. <i>NRRB</i> 基因生物信息学分析..... | 78 |
| 3.2.2. 水稻材料培养与处理..... | 78 |
| 3.2.3. 总 RNA 提取、反转录与定量 PCR..... | 78 |
| 3.2.4. <i>NRRB</i> 基因各种表达载体的构建..... | 79 |
| 3.2.5. 农杆菌介导的水稻遗传转化..... | 84 |
| 3.2.6. 转基因植株的 PCR 鉴定 | 84 |
| 3.3. 结果与分析 | 85 |
| 3.3.1. <i>NRRB</i> 基因的生物信息学分析..... | 85 |
| 3.3.2. <i>NRRB</i> 基因在粳稻各组织器官中的表达..... | 91 |
| 3.3.3. 不同防御信号化合物处理和非生物胁迫下 <i>NRRB</i> 基因的表达分析 | 93 |
| 3.3.4. <i>Xoc</i> 对 <i>NRRB</i> 基因表达的影响 | 95 |
| 3.3.5. <i>NRRB</i> 基因各种表达载体的获得 | 96 |
| 3.3.6. <i>NRRB</i> 基因各种转基因植株的 PCR 鉴定 | 100 |
| 3.3.7. 截短 <i>NRRB</i> 蛋白的亚细胞定位 | 102 |
| 3.3.8. 删减 <i>NRRB</i> 基因在 T ₀ 代超量表达转基因植株中的表达分析 | 103 |
| 3.3.9. 删减 <i>NRRB</i> 基因超量表达和抑制表达转基因植株对 <i>Xoc</i> 的抗性 | 104 |
| 3.3.10. 防御相关基因在 T ₁ 代 <i>NRRB</i> 超量表达转基因植株中的表达 | 107 |
| 3.3.11. 防御相关基因在 T ₁ 代 <i>NRRB</i> 抑制表达转基因植株中的表达 | 108 |
| 3.4. 讨论 | 110 |
| 3.4.1. <i>NRRB</i> 基因与其它已知类受体激酶基因的比较 | 110 |
| 3.4.2. 不同水稻遗传背景下 <i>Xoc</i> 对 <i>NRRB</i> 基因表达的影响 | 111 |

| | |
|---|------------|
| 3.4.3. <i>NRRB</i> 基因组织表达特性和水稻与 <i>Xoc</i> 互作的关系 | 111 |
| 3.4.4. <i>NRRB</i> 基因在调控水稻对 <i>Xoc</i> 抗性中的作用 | 112 |
| 3.4.5. 超量表达删减 <i>NRRB</i> 基因增强水稻对 <i>Xoc</i> 敏感性的分子机制 | 112 |
| 3.4.6. <i>NRRB</i> 基因抑制表达的转基因水稻对 <i>Xoc</i> 抗性增强的分子机制 ... | 113 |
| 3.4.7. <i>NRRB</i> 基因与生物胁迫和非生物胁迫..... | 113 |
| 3.5. 小结 | 116 |
| 4. <i>XCRK</i> 基因在水稻与 <i>XOC</i> 互作中的作用 | 117 |
| 4.1. 实验材料 | 117 |
| 4.2. 实验方法 | 117 |
| 4.2.1. <i>XCRK</i> 基因生物信息学分析 | 117 |
| 4.2.2. 水稻材料的培养及处理..... | 118 |
| 4.2.3. 总 RNA 提取与反转录及荧光定量 PCR..... | 118 |
| 4.2.4. <i>XCRK</i> 基因各种表达载体的构建 | 118 |
| 4.2.6. 转基因植株的 PCR 鉴定 | 126 |
| 4.3. 结果与分析 | 127 |
| 4.3.1. <i>XCRK</i> 基因的生物信息学分析 | 127 |
| 4.3.2. <i>XCRK</i> 基因在粳稻各组织器官中的表达 | 133 |
| 4.3.3. <i>Xoc</i> 侵染对 <i>XCRK</i> 基因表达的影响 | 136 |
| 4.3.4. 各种防御信号化合物和非生物胁迫处理对 <i>XCRK</i> 基因表达的影响 | 136 |
| 4.3.5. <i>XCRK</i> 基因各种表达载体的获得 | 138 |
| 4.3.6. <i>XCRK</i> 基因各种转基因植株的 PCR 鉴定..... | 141 |
| 4.3.7. <i>XCRK-GFP</i> 融合蛋白的亚细胞定位..... | 143 |
| 4.3.8. <i>XCRK</i> 基因超量表达和抑制表达转基因植株对 <i>Xoc</i> 的抗性 | 143 |
| 4.3.9. 防御相关基因在 T ₁ 抑制表达转基因植株中的表达 | 147 |
| 4.4. 讨论 | 149 |
| 4.4.1. <i>XCRK</i> 基因与其它已知类受体激酶基因的比较 | 149 |
| 4.4.2. <i>XCRK</i> 的组织表达特性和水稻与 <i>Xoc</i> 互作的关系 | 149 |
| 4.4.3. <i>XCRK</i> 与水稻的防御反应 | 149 |
| 4.4.4. <i>XCRK</i> 在调控水稻细菌性条斑病抗性中的作用 | 151 |
| 4.4.5. <i>XCRK</i> 抑制表达转基因植株对 <i>Xoc</i> 敏感性增强的可能分子机制... | 151 |
| 4.4.6. <i>XCRK</i> 基因其它可能功能 | 152 |
| 4.5. 小结 | 153 |
| 论文主要创新点 | 154 |
| 参考文献 | 155 |
| 附录 | 177 |
| 附录 1. 用于载体构建的 PCR 引物 | 177 |
| 附录 2. 用于检测转基因植株的 PCR 引物 | 179 |
| 附录 3. 半定量 RT-PCR 引物 | 179 |
| 附录 4. qRT-PCR 引物 | 180 |
| 附录 5. 大肠杆菌感受态的制备和转化..... | 181 |
| 附录 6. 质粒 DNA 的提取 | 182 |
| 附录 7. 农杆菌 EHA105 感受态细胞制备和质粒转化 | 183 |

| | |
|------------------------------|------------|
| 附录 8. 农杆菌介导的水稻遗传转化程序..... | 184 |
| 附录 9. 小样提取水稻基因组 DNA 的方法..... | 189 |
| 附录 10. 组织化学染色..... | 190 |
| 致谢 | 191 |

厦门大学博硕士论文摘要库

Contents

| | |
|--|-----------|
| ABSTRACT (IN CHINESE) | 1 |
| ABSTRACT (IN ENGLISH)..... | 5 |
| ABBREVIATIONS..... | 9 |
| INTRODUCTION | 11 |
| 1.1. BATERIAL LEAF STREAK DISEASE AND ITS PATHOGEN..... | 11 |
| 1.1.1. Occurrence and impact of rice bacterial leaf streak (BLS)..... | 11 |
| 1.1.2. Physiological and morphological characters of <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i> (<i>Xoc</i>)..... | 11 |
| 1.1.3. Infection mode of the pathogen and disease symptoms..... | 12 |
| 1.1.4. Spread and survival of the pathogen <i>Xoc</i> | 12 |
| 1.1.5. Management principles of BLS | 13 |
| 1.1.6. Genetical diversity and virulence differentiation of <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i> | 13 |
| 1.2. PROGRESSES IN STUDIES OF RESISTANCE TO BLS | 14 |
| 1.2.1. Resistance of rice varieties to BLS | 14 |
| 1.2.2. BLS-resistance inheritance of rice | 15 |
| 1.2.3. Resistance-related genes conferring resistance to <i>Xoc</i> | 16 |
| 1.2.4. Avirulence gene of <i>Xoc</i> and non-host resistance gene..... | 18 |
| 1.3. PROGRESS IN PATHOGENESIS OF <i>Xoc</i>..... | 19 |
| 1.3.1. Type III secretion system of <i>Xoc</i> | 19 |
| 1.3.2. The transcription activator-like (TAL) effectors of <i>Xoc</i> and their targets | 20 |
| 1.3.3. The TAL effectors and its inhibitory effect on defense response..... | 22 |
| 1.4. PHYTOHORMONE AND DEFENSE RESPONSES..... | 23 |
| 1.4.1. The role of salicylic acid in plant-pathogen interactions | 23 |
| 1.4.2. The role of jasmonates in plant defense responses | 25 |
| 1.4.3. The role of ethylene in plant defense responses | 27 |
| 1.4.4. Other phytohormones and plant defense responses | 31 |
| 1.5. USE OF QUANTITATIVE DISEASE RESISTANCE GENES | 31 |
| 1.6. AIM OF THIS WORK | 32 |
| 2. THE ROLE OF DEPG1 IN RICE-XOC INTERATIONS | 33 |
| 2.1. MATERIALS..... | 33 |
| 2.2. METHODS..... | 34 |
| 2.2.1. Bioinformatics analysis of <i>DEPG1</i> gene | 34 |
| 2.2.2. Rice culture and treatments..... | 35 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 2.2.3. | Total RNA isolation, reverse transcription and quantitative PCR | 35 |
| 2.2.4. | Construction of expression vectors of <i>DEPG1</i> gene | 35 |
| 2.2.5. | <i>Agrobacterium</i> -mediated transformation of rice..... | 43 |
| 2.2.6. | Identification of transgenic plants by primer-specific PCR..... | 43 |
| 2.3. | RESULTS..... | 44 |
| 2.3.1. | Bioinformatics analysis of <i>DEPG1</i> gene | 44 |
| 2.3.2. | The tissue expression pattern of <i>DEPG1</i> gene | 50 |
| 2.3.3. | Effect of <i>Xoc</i> -infection on <i>DEPG1</i> expression..... | 52 |
| 2.3.4. | Effect of defense-signal compounds and abiotic stresses on <i>DEPG1</i> expression | 55 |
| 2.3.5. | Obtainment of the expression vectors of <i>DEPG1</i> gene | 57 |
| 2.3.6. | Identification of the transgenic plants by primer-specific PCR..... | 61 |
| 2.3.7. | Localization of <i>DEPG1</i> -GFP fusion protein in onion epidermis cells.... | 63 |
| 2.3.8. | Analysis of <i>DEPG1</i> expression in <i>DEPG1</i> -overexpressing T ₀ transgenic plants | 64 |
| 2.3.9. | Analysis of <i>DEPG1</i> expression in <i>DEPG1</i> -suppressing T ₀ transgenic plants | 65 |
| 2.3.10. | Evaluation of resistance of the <i>DEPG1</i> -overexpressing or suppressing transgenic plants to <i>Xoc</i> | 66 |
| 2.3.11. | Analysis of the expression of defense-related genes in <i>DEPG1</i> -overexpressing T ₁ transgenic plants..... | 69 |
| 2.3.12. | Analysis of the expression of defense-related genes in <i>DEPG1</i> -suppressing T ₁ transgenic plants | 70 |
| 2.4. | DISCUSSION..... | 71 |
| 2.4.1. | Bioinformatics analysis of <i>DEPG1</i> | 71 |
| 2.4.2. | <i>DEPG1</i> and defense responses in rice | 72 |
| 2.4.3. | Relationship of the tissue expression character of <i>DEPG1</i> and the interaction between rice and <i>Xoc</i> | 73 |
| 2.4.4. | The role of <i>DEPG1</i> in regulation of rice resistance to BLS | 73 |
| 2.4.5. | Mechanism of enhanced resistance or susceptibility to <i>Xoc</i> in the transgenic plants..... | 74 |
| 2.4.6. | Other possible functions of <i>DEPG1</i> gene | 75 |
| 2.5. | SUMMARY | 76 |
| 3. | THE ROLE OF <i>NRRB</i> GENE IN RICE-<i>XOC</i> INTERACTIONS..... | 77 |
| 3.1. | MATERIALS..... | 77 |
| 3.2. | METHODS | 78 |
| 3.2.1. | Bioinformatics analysis of <i>NRRB</i> gene | 78 |
| 3.2.2. | Method of rice culture and treatments | 78 |
| 3.2.3. | Total RNA isolation, reverse transcription and quantitative PCR | 78 |
| 3.2.4. | Construction of expression vectors of <i>NRRB</i> gene | 79 |
| 3.2.5. | <i>Agrobacterium</i> -mediated transformation of rice | 84 |

| | |
|--|------------|
| 3.2.6. Identification of the transgenic rice plants by primer-specific PCR | 84 |
| 3.3. RESULTS..... | 85 |
| 3.3.1. Bioinformatics analysis of <i>NRRB</i> gene | 85 |
| 3.3.2. The tissue expression pattern of <i>NRRB</i> gene in japonica rice | 91 |
| 3.3.3. Analysis of <i>NRRB</i> expression under the treatments of defense-signal compounds and abiotic stresses | 93 |
| 3.3.4. Effect of <i>Xoc</i> -infection on <i>NRRB</i> expression..... | 95 |
| 3.3.5. Obtainment of the expression vectors of <i>NRRB</i> gene | 96 |
| 3.3.6. Identification of the transgenic plants by primer-specific PCR | 100 |
| 3.3.7. Localization of the truncated <i>NRRB</i> -GFP fusion protein in onion epidermis cells | 102 |
| 3.3.8. Analysis of expression of the deleted <i>NRRB</i> in T_0 transgenic plants overexpressing the deleted <i>NRRB</i> gene | 103 |
| 3.3.9. Evaluation of BLS-resistance of the T_1 transgenic plants overexpressing the deleted <i>NRRB</i> or suppressing <i>NRRB</i> | 104 |
| 3.3.10. Analysis of the expression of defense-related genes in <i>NRRB</i> -overexpressing T_1 transgenic plants | 107 |
| 3.3.11. Analysis of the expression of defense-related genes in <i>NRRB</i> -suppressing T_1 transgenic plants..... | 108 |
| 3.4. DISCUSSION..... | 110 |
| 3.4.1. Comparison of <i>NRRB</i> gene and other known receptor-like cytoplamic kinase genes | 110 |
| 3.4.2. Effect of <i>Xoc</i> infection on <i>NRRB</i> expression under the different genetic backgrounds | 111 |
| 3.4.3. Relationship of the tissue expression character of <i>NRRB</i> and the interactions between rice and <i>Xoc</i> | 111 |
| 3.4.4. The role of <i>NRRB</i> in regulation of resistance to <i>Xoc</i> in rice | 112 |
| 3.4.5. Potential mechanism of enhanced susceptibility to <i>Xoc</i> in the deleted <i>NRRB</i> -overexpressing transgenic plant..... | 112 |
| 3.4.6. Potential mechanism of enhanced resistance to <i>Xoc</i> in the <i>NRRB</i> -suppressing transgenic plants | 113 |
| 3.4.7. <i>NRRB</i> gene and biotic and abiotic stresses | 113 |
| 3.5. Summary..... | 116 |
| 4. THE ROLE OF <i>XCRK</i> IN RICE–<i>XOC</i> INTERACTIONS | 117 |
| 4.1. MATERIALS..... | 117 |
| 4.2. METHODS..... | 117 |
| 4.2.1. Bioinformatics analysis of <i>XCRK</i> gene..... | 117 |
| 4.2.2. Rice culture and treatments..... | 118 |
| 4.2.3. Total RNA isolation, reverse transcription and quantitative PCR | 118 |
| 4.2.4. Construction of expression vectors of <i>XCRK</i> gene..... | 118 |
| 4.2.5. <i>Agrobacterium</i> -mediated transformation of rice | 118 |
| 4.2.6. Identification of transgenic plants by primer-specific PCR..... | 126 |
| 4.3. RESULTS..... | 127 |

| | | |
|--|--|------------|
| 4.3.1. | Bioinformatics analysis of <i>XCRK</i> gene..... | 127 |
| 4.3.2. | The tissue expression pattern of <i>XCRK</i> gene | 133 |
| 4.3.3. | Effect of <i>Xoc</i> -infection on <i>XCRK</i> expression | 136 |
| 4.3.4. | Effect of defense-signal compounds and abiotic stresses on <i>XCRK</i> expression | 136 |
| 4.3.5. | Obtainment of the expression vectors of <i>XCRK</i> gene..... | 138 |
| 4.3.6. | Identification of the transgenic plants by primer-specific PCR | 141 |
| 4.3.7. | Localization of <i>XCRK</i> -GFP fusion protein in epidermis cells of onion..... | 143 |
| 4.3.8. | Evaluation of resistance of the <i>XCRK</i> -suppressing T ₀ transgenic plants to <i>Xoc</i> | 143 |
| 4.3.9. | Analysis of the expression of defense-related genes in <i>XCRK</i> -suppressing T ₁ transgenic plants | 147 |
| 4.4. | DISCUSSION..... | 149 |
| 4.4.1. | Comparison of <i>XCRK</i> and the known receptor like cytoplasmic kinase genes | 149 |
| 4.4.2. | <i>XCRK</i> and defense responses in rice..... | 149 |
| 4.4.3. | Relationship of the tissue expression character of <i>XCRK</i> and the interaction between rice and <i>Xoc</i> | 149 |
| 4.4.4. | The role of <i>XCRK</i> in regulation of resistance to BLS..... | 151 |
| 4.4.5. | Potential mechanism of enhanced susceptibility to <i>Xoc</i> in the <i>XCRK</i> -suppressing transgenic plants | 151 |
| 4.4.6. | Other possible fuctions of <i>XCRK</i> gene | 152 |
| 4.5. | SUMMARY | 153 |
| THE MAIN INNOVATIONS OF THIS THESIS | | 154 |
| REFERENCES..... | | 155 |
| APPENDIX | | 176 |
| Appendix 1. | Primers used for construction of expression vectors | 176 |
| Appendix 2. | Primers used for identification of transgenic plants | 178 |
| Appendix 3. | Primers used in semi-quantitative RT-PCR..... | 178 |
| Appendix 4. | Primers used in quantitative real time PCR | 179 |
| Appendix 5. | Preparation of competent cells of <i>E.coli</i> for plasmid DNA transformation | 180 |
| Appendix 6. | Preparation of plasmid DNA protocol..... | 181 |
| Appendix 7. | Preparation of competent cells of <i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain EHA105 for plasmid DNA transformation | 182 |
| Appendix 8. | <i>Agrobacterium</i> -mediated rice transformation protocol..... | 183 |
| Appendix 9. | Protocol for mini-prep DNA extraction from rice leaves..... | 188 |
| Appendix 10. | Histochemical Staining with X-Gluc | 189 |
| ACKNOWLEDGEMENTS | 错误！未定义书签。 | |

中文摘要

在世界一些地区尤其是亚洲热带和亚热带地区，细菌条斑病（Bacterial Leaf Streak, BLS）是水稻生产的一个重要限制因素。抗病育种是防治 BLS 的首选方法。用蛋白质组学的方法分析细菌条斑病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, *Xoc*) 侵染的水稻叶片蛋白组表达的差异，从中鉴定差异表达的蛋白基因，是一种研究水稻与细菌性条斑病菌 *Xoc* 互作分子机制的重要方法，有望从中鉴定出参与水稻和 *Xoc* 互作的重要蛋白，包括参与水稻防御反应的重要蛋白，进而获得相应编码基因。本论文是在获得上述差异表达蛋白基因的基础上，对其中 1 个 NBS-LRR 类基因 *DEPG1* 和 2 个类受体激酶基因 *NRRB* 和 *XCRK* 进行功能分析和验证，以期了解它们在水稻与 *Xoc* 互作中的作用，同时期望从中获得可用于水稻改良的 BLS 抗性相关基因。此外，水稻与 *Xoc* 互作研究可为其它单子叶植物与非维管束病害病原细菌互作研究提供参考，因而也具有重要的理论意义。

DEPG1 编码一个推定的具有核苷酸结合位点 (nucleotide binding site) 结构域和富亮氨酸重复结构域 (leucine-rich repeat) 的蛋白，与稻瘟病抗性基因 *Pi37* 编码蛋白具有大约 64% 序列相似性。PSORT 分析 *DEPG1* 蛋白定位于细胞质，观察 *DEPG1* 与 GFP 融合蛋白在洋葱表皮细胞中的瞬时表达证实了 *DEPG1* 蛋白的细胞质定位。在 *Xoc* 侵染诱发的水稻防御反应中，*DEPG1* 基因的表达受抑制；防御信号化合物水杨酸 (SA)、茉莉酸甲酯 (MeJA) 和 1-氨基环丙烷-1-羧酸 (ACC) 也可抑制 *DEPG1* 基因的表达，因此，推断 *DEPG1* 参与多种不同的水稻防御反应。*DEPG1* 基因在叶片、叶鞘和茎秆中比在其它组织中的表达水平高，且在叶肉软细胞组织中的表达水平也较高，而这些组织也是 *Xoc* 定殖的主要部位，这暗示 *DEPG1* 基因参与水稻与 *Xoc* 的互作。超量表达 *DEPG1* 基因提高了水稻对 *Xoc* 的感病性，而抑制 *DEPG1* 基因表达增强了水稻对 *Xoc* 的抗性，这些结果表明 *DEPG1* 基因负调水稻对 *Xoc* 的抗性。在超量表达 *DEPG1* 的转基因植株中，参与 SA 合成的基因 *ICS* 及病程相关基因 *PRI#12* 的表达被抑制，推测 SA 的合成和 *PRI#12* 等其它防御相关基因表达被下调，可能是感病性增强的原因。在 *DEPG1* 抑制表达转基因植株中，一些参与 SA 合成的基因和 *PR* 基因的

表达也被抑制，推测抗性增强可能是由其它防御信号途径介导的。此外，赤霉素 GA、脱落酸 ABA、过氧化氢和盐胁迫等处理也会导致 *DEPG1* 的表达变化；该基因上游的 1 kbp 启动子区包含一些碳代谢相关元件、光响应元件和组织特异表达元件，这些暗示 *DEPG1* 基因可能还参与非生物胁迫、生长和发育等生物学过程。

NRRB 基因编码一个胞质类受体激酶，包含一个胞内蛋白激酶结构域和 U-box 结构域，是 RLCK-IXb 亚家族基因成员之一。PSORT 预测分析 *NRRB* 蛋白定位在细胞质，截短的 *NRRB* 蛋白定位在洋葱表皮细胞的细胞质中。*NRRB* 基因在 *Xoc* 侵染激发的防御反应中的表达方式因水稻遗传背景的不同而有差异；防御信号化合物 SA 和 ACC 抑制 *NRRB* 基因表达，而 MeJA 可诱导其表达。可见 *NRRB* 基因以不同方式参与不同的防御反应。*NRRB* 基因的组织偏好表达特性与 *Xoc* 组织侵染特性相吻合，暗示 *NRRB* 基因参与水稻和 *Xoc* 的互作。抑制 *NRRB* 基因表达，增强了转基因水稻对 *Xoc* 的抗性，表明 *NRRB* 负调控水稻对 *Xoc* 的抗性，超量表达截短的 *NRRB* 基因，对应的转基因水稻对 *Xoc* 的敏感性增强，这也一定程度上支持 *NRRB* 负调控水稻对 *Xoc* 的抗性。在抑制表达转基因植株中，一些参与 SA 合成的关键基因和病程相关（*PR*）基因的表达显著上调。因此，抑制 *NRRB* 表达的转基因植株抗性的增强可能通过 SA 介导的防御信号途径调控的。此外，*NRRB* 受脱落酸 ABA 和过氧化氢的诱导，其编码区上游 1 kbp 启动子区包含许多非生物胁迫响应元件包括 ABA、干旱和冷胁迫等响应元件，表明 *NRRB* 可能参与非生物胁迫。一些碳代谢相关元件、光响应元件和组织特异表达元件及其它一些元件的存在，暗示 *NRRB* 基因也可能参与水稻其它生物学过程。

XCRK 基因编码一个推定的胞质类受体激酶，是 LRK10L-2 亚家族基因成员之一。观察 *XCRK-GFP* 蛋白在洋葱表皮细胞中的瞬时表达，发现 *XCRK* 蛋白定位于细胞质。在 *Xoc* 侵染诱导的水稻防御反应中，*XCRK* 表达被激活，而防御信号化合物 SA、MeJA 和 ACC 在不同处理时间点调控 *XCRK* 的不同表达，表明 *XCRK* 基因可能受不同调控因子的调控。*XCRK* 基因的组织表达特性与 *Xoc* 的组织侵染特性相吻合，暗示 *XCRK* 参与水稻和 *Xoc* 的互作。抑制 *XCRK* 基因的表达，对应转基因水稻对 *Xoc* 的敏感性增强，表明 *XCRK* 是水稻对 *Xoc* 抗性

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