

# 水稻 *Xa21* 基因启动子序列分析及其在不同条件下的表达特征

牟少亮<sup>a,b</sup>, 刘志钦<sup>a,b</sup>, 赖燕<sup>a,b</sup>, 蔡汉阳<sup>a,b</sup>, 何水林<sup>b,c,①</sup>

(福建农林大学: a. 生命科学学院, b. 作物遗传改良与综合利用教育部重点实验室, c. 作物科学学院, 福建 福州 350002)

**摘要:** 以水稻品种‘日本晴’(*Oryza sativa* ‘Nipponbare’)为实验材料,根据 GenBank 上公布的同品种水稻的基因组 DNA 序列设计 1 对引物,对水稻 *Xa21* 基因启动子进行克隆并测序,通过 PCR 扩增获得的 *Xa21* 基因启动子序列长 1 982 bp,其中除包含启动子基本元件外,还包含一些与逆境信号相关的元件(GCC-box、A-box、TC-rich repeats、MBS、LTR 和 W-box 等)。利用 GUS 组织化学染色和定量分析方法,研究了转基因水稻 T1 代株系不同器官和发育阶段 *Xa21* 基因启动子的表达特异性及其在不同逆境和激素处理条件下的表达特征,结果显示:在转基因水稻的叶、茎和根部均能检测到 GUS 活性,但根部 GUS 活性最高,特别是在根尖的中柱区活性最强;随苗龄增长(3 叶期、5 叶期和 8 至 9 叶期)叶片中 GUS 活性逐渐增加,8 至 9 叶期 GUS 活性最高;机械损伤和 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  茉莉酸甲酯(MeJA)处理可使叶片中 GUS 活性显著或极显著提高,而干旱、500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  水杨酸(SA)和 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  脱落酸(ABA)处理则对叶片中 GUS 活性无明显影响。研究结果表明:外界逆境胁迫对水稻 *Xa21* 基因启动子的表达有诱导作用;该启动子的表达受水稻发育阶段的调控并具有一定的器官组织特异性,在根中的表达量最高;其介导的抗病反应依赖于茉莉酸(JA)信号通路。

**关键词:** 水稻; *Xa21* 基因启动子; 序列分析; GUS 活性; 表达特性; 茉莉酸甲酯(MeJA)

中图分类号: Q78; Q511.034 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2012)04-0010-06

**Sequence analysis of *Xa21* gene promoter in rice (*Oryza sativa* ‘Nipponbare’) and its expression characteristics under different conditions** MOU Shao-liang<sup>a,b</sup>, LIU Zhi-qin<sup>a,b</sup>, LAI Yan<sup>a,b</sup>, CAI Han-yang<sup>a,b</sup>, HE Shui-lin<sup>b,c,①</sup> (Fujian Agriculture and Forestry University: a. College of Life Science, b. Crop Genetic Improvement and Utilization Key Laboratory of Ministry of Education, c. College of Crop Science, Fuzhou 350002, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2012, 21(4): 10-15

**Abstract:** Taking cultivar ‘Nipponbare’ of rice (*Oryza sativa* L.) as the experimental materials, *Xa21* gene promoter was cloned and sequenced by a pair of primers designed on the basis of genomic DNA sequence of same cultivar published on GenBank. *Xa21* gene promoter with sequence length of 1 982 bp is obtained by PCR amplification, in which, except with promoter basic elements, it also contains some elements related to stress signals, such as GCC-box, A-box, TC-rich repeats, MBS, LTR and W-box, etc. By means of GUS histochemical staining and quantitative assay methods, expression specificity of *Xa21* gene promoter in different organs and developmental stages of T1 strain of transgenic rice and its expression characteristics under different conditions with stress and hormone treatments were researched. The results indicate that GUS activity in leaf, stem and root of transgenic rice can be detected but that is the highest in root, especially in stele of root tip. With increasing of seedling age (3-, 5- and 8- to 9-leaf stages), GUS activity in leaf increases gradually and reaches the highest at 8- to 9-leaf stage. Treatments with mechanical damage or 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  methyl jasmonate (MeJA) can lead GUS activity to increase significantly or extremely significantly, respectively, but treatments with drought, 500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  salicylic acid (SA) or 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  abscisic acid (ABA) have no obvious effect on GUS activity.

收稿日期: 2011-12-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30971718); 国家转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX08001-015B)

作者简介: 牟少亮(1979—),男,山东烟台人,博士研究生,讲师,主要研究方向为植物抗逆基因工程。

①通信作者 E-mail: hsl324@yahoo.com.cn

It is suggested that external stress has an induction to expression of *Xa21* gene promoter in rice, and the expression of promoter is controlled by developmental stages and possesses the specificity in organ or tissue with the highest expression in root. Disease resistance response mediated by *Xa21* gene promoter depends on the jasmonate acid (JA) signal pathway.

**Key words:** rice (*Oryza sativa* L.); *Xa21* gene promoter; sequence analysis; GUS activity; expression characteristics; methyl jasmonate (MeJA)

在自然生态环境中植物遭受各种病害的危害,并在长期进化过程中形成复杂的抗病机制,包括 PTI (PAMP triggered immunity) 和 ETI (effector triggered immunity) 2 种彼此相互关联的抗病反应<sup>[1-2]</sup>。其中 ETI 是由抗性基因 R (resistance gene) 介导的专化性抗病反应,与 PTI 相比,其强度大而持久。目前已经克隆获得多种植物的 R 基因并对其抗病功能进行了分析,结构分析结果表明:这些 R 基因可分成 NBS-LRR、eLRR-TM、eLRR-TM-pkinase、STK (serine-threonine kinase) 和其他 5 大类型<sup>[3]</sup>。它们的作用符合“基因对基因”学说,在植物抗病基因工程中具有重要的应用价值,但迄今为止对这些抗病基因表达及调控机制的研究报道还很少<sup>[4]</sup>。

水稻 (*Oryza sativa* L.) 是重要的粮食作物之一,白叶枯病 [*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* (Ishiyama) Dye] 是水稻生产上仅次于稻瘟病 [*Magnaporthe oryzae* (Hebert) Barr.] 的主要病害,不仅可导致水稻大幅度减产,而且还影响稻米品质<sup>[5]</sup>。由于其危害严重,化学防治难以奏效,因此,培育抗病品种是有效防治水稻白叶枯病的重要手段之一<sup>[6]</sup>。目前,已报道的水稻白叶枯病抗性基因有 30 多个<sup>[7]</sup>,其中, *Xa21* 基因是最早克隆的水稻白叶枯病广谱抗性基因,属于 STK-LRR 类抗性基因,定位于水稻第 11 号染色体。 *Xa21* 基因编码的蛋白可以通过胞外 LRR (leucine-rich repeat) 域识别病原物的无毒基因编码产物,然后将信号传导到细胞内活化 STK 的表达,进而激活细胞内的防御反应<sup>[7-8]</sup>。研究表明: *Xa21* 基因可下调其信号通路上游调节蛋白的编码基因,激活 PR (pathogenesis-related) 基因表达<sup>[9]</sup>; *Xa21* 基因介导的抗病反应受发育时期的调控,植株在 2 叶期感病、5 叶期有 75% 抗病、9 叶期之后完全抗病<sup>[10]</sup>。虽然关于 *Xa21* 基因的表达已有报道<sup>[10-11]</sup>,但这些研究结果存在争议。

为了进一步阐明水稻 *Xa21* 基因的表达及其调控机制,作者以水稻品种‘日本晴’(‘Nipponbare’)为实验材料,对 *Xa21* 基因 5' 端的上游启动子进行克隆及

序列分析,并获得了其与 GUS ( $\beta$ -葡萄糖苷酸酶) 报告基因的转基因水稻 T1 代株系,通过分析转基因水稻中 GUS 基因表达的组织器官特异性及其对不同逆境和逆境相关激素信号分子的应答情况,确定水稻 *Xa21* 基因 5' 端上游启动子的表达特性,以期为抗白叶枯病水稻品种的育种研究奠定实验基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

实验用水稻品种‘日本晴’、大肠杆菌 (*Escherichia coli* (Migula) Castellani et Chalmers) 菌株 DH10B 和根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Towns.) Conn.) 菌株 EHA105 均为本实验室保存的实验材料; pMD18-T 质粒和 DL2000 均购自宝生物工程(大连)有限公司; pDNOR-207 和 pMDC163 质粒由瑞士苏黎世大学 Curtis 教授惠赠。

### 1.2 方法

1.2.1 启动子克隆和测序 参照 GenBank 上公布的水稻品种‘日本晴’基因组 DNA 序列进行上、下游引物的设计,其中,上游引物 *Xa21*-F 序列为 5'-AGA GTTGCTGCCCCTTGAT-3',下游引物 *Xa21*-R 序列为 5'-GTGCAAGCTAAGACAGCAAGA-3'。

参照文献[12]采用 CTAB 法提取基因组总 DNA,并以其为模板进行 PCR 扩增。扩增反应在 Tgradient 型 PCR 仪(德国 Biometra 公司)上进行。反应体系总体积为 50  $\mu$ L,包括 0.2  $\mu$ g 模板 DNA、10 $\times$ PCR buffer 5  $\mu$ L、2.5 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> dNTPs 2  $\mu$ L、10  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 上下游引物各 2  $\mu$ L 和 5 U  $\cdot$   $\mu$ L<sup>-1</sup> Ex Taq DNA 聚合酶 0.4  $\mu$ L,用灭菌双蒸水补足至 50  $\mu$ L。扩增程序为:95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,54  $^{\circ}$ C 退火 40 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 2 min,共计 35 个循环;最后于 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

扩增反应结束后将获得的 PCR 产物用质量体积分数 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测,以 DL2000 为 Marker;采用天根生化科技(北京)有限公司生产的

DNA 纯化回收试剂盒进行产物回收,并将回收产物连接到 pMD-18T 载体上,交送北京三博远志生物技术有限公司测序。

**1.2.2 GUS 融合表达载体的构建** 利用 Gateway 技术<sup>[13]</sup>,分别以 pDNOR-207 和 pMDC163 为入门载体和目的载体,构建 *Xa2l* 基因启动子的 GUS 融合表达载体。PCR 验证采用 *Xa2l* 基因启动子的特异扩增引物,验证正确后转化到根癌农杆菌 EHA105 菌株中用于水稻遗传转化。

**1.2.3 水稻遗传转化及转基因植株的获得** 以水稻品种‘日本晴’的成熟胚为受体材料,参照 Toki 等<sup>[14]</sup>的方法进行愈伤组织的诱导和转化。从获得的转基因水稻植株中提取 DNA,利用潮霉素基因特异引物 HypF 和 HypR 进行 PCR 验证,其中,上游引物 HypF 序列为 5'-ACACAGCCATCGTCCAGAC-3',下游引物 HypR 序列为 5'-ATCTTAGCCAGACGAGCGGG-3'。

**1.2.4 GUS 检测与定量分析** 根据潮霉素基因特异引物对转基因水稻的 PCR 验证结果,收集阳性植株的 T1 代种子;选择 T1 代种子分离比接近 3:1 的株系进行 *Xa2l* 基因启动子驱动的 GUS 活性的组织染色和定量分析。参照 Jefferson<sup>[15]</sup>的方法,对 T1 代转基因水稻的根、茎和叶分别进行 GUS 组织化学染色分析,GUS 染色液包含 0.2 mol · L<sup>-1</sup> 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0)、0.1 mol · L<sup>-1</sup> 铁氰化钾、0.1 mol · L<sup>-1</sup> 亚铁氰化钾、1.0 mol · L<sup>-1</sup> 乙二胺四乙酸二钠和质量体积分数 0.1% X-Gluc。取 T1 代转基因水稻的根、茎和叶,并在不同发育时期(水稻 3 叶期、5 叶期和 8 至 9 叶期)采集叶片,参照曾凡锁等<sup>[16]</sup>的分光光度法测定 GUS 活性,以 1 min 内使 PNPG(4-硝基苯基-β-D-吡喃半乳糖苷)水解生成 1 nmol · L<sup>-1</sup> 对硝基苯酚的酶量为 1 个酶活力单位。

**1.2.5 对转基因植株的处理方法** 收获的 T1 代转基因种子经潮霉素抗性筛选后进行培养,7~8 d 后将正常萌发的绿色幼苗移栽至装有土壤的塑料花盆中,待幼苗长到 4 至 5 叶期时分别进行各种处理,对照组植株不进行任何处理,然后取样按照上述方法进行 GUS 定量分析。机械损伤处理方法:用解剖刀在幼苗叶片上切割数处 2~3 cm 伤口,12 h 后取叶片进行 GUS 活性测定。干旱处理方法:停止浇水,48 h 后待幼苗叶片出现微蔫状态时取叶片进行 GUS 活性测定。激素处理方法:分别用 500 μmol · L<sup>-1</sup> 水杨酸

(SA)、100 μmol · L<sup>-1</sup> 脱落酸 (ABA) 和 100 μmol · L<sup>-1</sup> 茉莉酸甲酯 (MeJA) 进行叶面喷洒,每株 10 mL,12 h 后取叶片进行 GUS 活性测定。

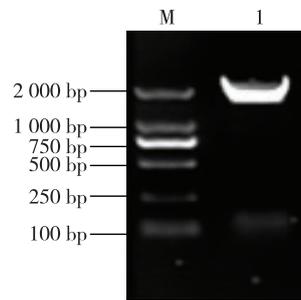
### 1.3 数据处理

采用 Excel 2003 和 SPSS 10.0 软件对实验数据进行统计和处理;GUS 活性为 10 个单株的平均值。

## 2 结果和分析

### 2.1 水稻 *Xa2l* 基因启动子的克隆和序列分析

以水稻品种‘日本晴’为实验材料,通过 PCR 扩增得到 1 条长 1 982 bp 的片段(图 1),将该片段的测序结果(图 2)与 GenBank 上报道的水稻品种‘日本晴’的序列进行比对,显示二者的序列同源性百分率为 99.7%。将获得的此片段序列登录至启动子顺式元件预测网站 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 进行分析<sup>[17]</sup>,结果表明:除了启动子的基本元件 (TATA-box 和 CAAT-box) 外,在该片段上还预测到一些逆境信号相关元件,如:GCC-box(乙烯应答元件)、A-box(顺式调控元件)、TC-rich repeats(逆境应答元件)、MBS(MYB 结合位点)、LTR(低温应答元件)和 W-box(病原菌应答元件),表明扩增获得的水稻 *Xa2l* 基因启动子可能在外界逆境胁迫时具有诱导能力。



M: Marker; 1: *Xa2l* gene promoter.

图 1 水稻品种‘日本晴’*Xa2l* 基因启动子的 PCR 扩增结果  
Fig. 1 PCR amplification result of *Xa2l* gene promoter of cultivar ‘Nipponbare’ of *Oryza sativa* L.

### 2.2 在转基因水稻中 *Xa2l* 基因启动子的表达特征

**2.2.1 在不同器官中的表达特征** GUS 组织化学染色结果表明(图 3):在 T1 代转基因水稻的根、茎和叶中都能检测到 GUS 活性,特别是在根尖的中柱组织中 GUS 活性明显高于其他组织(图 3-D),具有

-1 982 AGAGTTGCTGCCCTTGATCG A GCCGCCCTTCCCGTTCCCGTGCTGCGACAGACTCGCCGCTGGCTCGCCGCTGCCTGCTCGAGT  
GCC-box

-1 892 GCTGCACGGGGGATCTATAGTACGTACTAGGACCGGTGTCAGGCGACACCGACGACTCTCGGTAAAAAGGTATAGCAAAAAGCTTATT

-1 802 CATATGTTATAACATCATGATCTAAGCATAATTA GTATACTATGACACC GTTAGACACGTTATGACACCAA CGAATCGATTTTCTGGATC

-1 712 CGCCACAGTGCACGGGATTGGGATGGGAACGGCCGACGACGCTGTGTGTTGGGCTAGCTAGTGGGGTTGGGAGTTGGGACTAGGTAGG

-1 622 TTA TTTTTC CCA GGGG TAC AATAG TTCTTTTG CATTTT GTA AACT CTCTTT CTTTTT CTFTC GAG ATAAT CCATT ATATG CCATT AACTTT

-1 532 ATCGC ACGT CTACGA TTTGCCA CTG ACTTTGTCA CGTTCTA CAATATGCCAT CGACTTTT GCTTAACTT CTACGATTTACCAT CGCCGTC

-1 442 CGGTTAACCACTTTAGTACTGTACAAAATTTGTTGAAATGACAAAATACCCCTATGACAAAATATCCAAAATT TGGATAAAAATTATCA  
TC-rich repeats

-1 352 AAATATTATATTATAAACATAAGATTGTAAACATCCAAAAT T TGACCAAAAACTTGAAATATGATATTTTCATAATTTTTATCCAAAATTTT  
W-box

-1 262 GAAACCTTTTCTCCAGGGGTATTTTGGTCATTTTCGATAAAATTTGTACAGTACTAACGGAGACTAAC G GACGGCGATGGTAAATTGTAG  
A-box

-1 172 AAGTTAAGCAAAAGTCGATGACATATCGTAGAACATGGTAAAGTCAGTGGCAAATCATAGACGCTGTGACAAAGTCAGTGGTATATAATGG

-1 082 TTTCT CTC TTTT CT TTTT CT TTTT CTCTCA GAAATTT GGG CCCA GCTAATTTT GCCAATGTT GTTGCAA GAACACAA CAA GTGTATC

-992 AACCTCT CTCTGTATTCCATCT GCCTTCTAT GGGTG ATTATTTACACATTTATATACA GGGATATAACAAGA GG AAAATGCTT CGGTGCC

-902 CCTATCCTTACGAT GTGCCATATCGGACT GGCCGGTGGGCCAGCCTT GCTCTAGTGGTAACTTGATGGAGGACAGGAGAGCT GCGCCCGG

-812 CATGGGGCATCGCT GTTCCGGGGGACCTTGCTACTA CCCGGGTAAAGGCATCCCGGGTAATAGC ATGCTCCGTCT AGCTGCCATCAA

-722 TAGTGCAATGTTAG TTGGGGCGCTAGTGCGC ATTTATTCGCGCCGCTAGCGCCTT GTTCTTGACTTGGCTTGC CGC AGCACATCGAG

-632 GCATAATTCCTCCGGCT AGCACATCGGGCTTT AGGGCCCCCTCGGAGCTCCGAAGCCCTT AGGTAGCCTCCGGA GCTCCCTTCCGGAC

-542 TCCGGGTACCC TT TCGGCTTCGGAGCT CG GTCACTAGGTGTGTCACCGGAGCCCATGGCGCTGGACCTCCCGGAGCTCTTCCGGAGCC  
LTR MBS

-452 GGTCGG CCGCCATCCG AAGCCTGCTT AGGTCTTGTT CCTCTCGCCCT CAATGAGATCCGTTTCTCT CGGATCCCC GGGGG CCTCCGG AGC

-362 AGGGGGCCAGCCGCGGACCGACATGGCCTTGATTCA CG GTCATCTCTGGGGAGGATGTTTCTCGGAGCCGCTGCAGCCCTTCGGAGGCT  
MBS

-272 AGCGTCCCTTGATCCGGAGATACTCCCTAACACCTTCTTATTCAACCAAGCTAGGACCAATGACCATGACCCTTTTGGATATCAAGATG

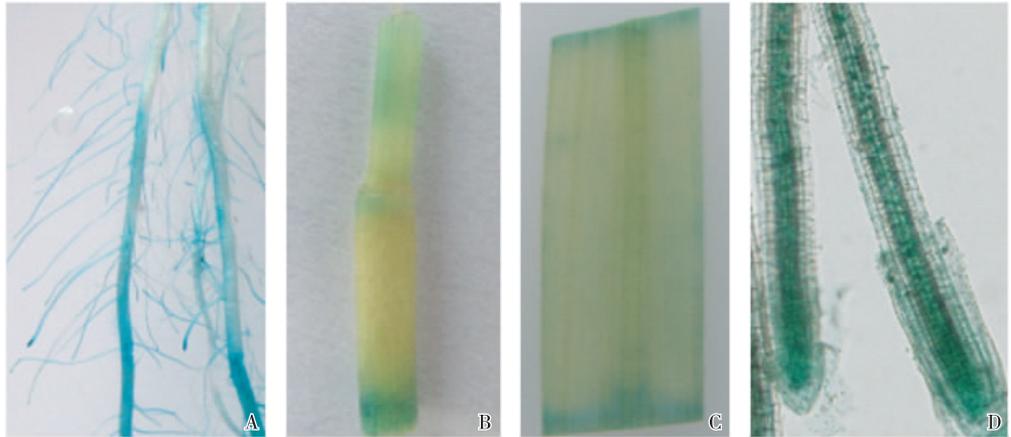
-182 ACCACAGGTTTAGATATCCTCTTAATCAGCCAACCGTTTTTCCACTCTGAAAATCAAGTG TGCCAACAAGTTGCGGACCAAGAATGTTGGT  
CAAT-box

-92 GGTTGGTCAGG CTACATCAC TTTTCT TATATCTGTCT AAGTCCATGA GCTAAACC AAAAACA TCTCTCGCTCTT GCTGTCTT AGCTTGC  
TATA-box

-2 AC

GCC-box: 乙烯应答元件 Ethylene responsive element; TC-rich repeats: 逆境应答元件 Stress responsive element; W-box: 病原菌应答元件 Pathogen responsive element; A-box: 顺式调控元件 *Cis*-acting regulatory element; LTR: 低温应答元件 Low temperature responsive element; MBS: MYB 结合位点 MYB binding site; TATA-box, CAAT-box: 启动子基本元件 Basic elements of promoter.

图 2 水稻品种‘日本晴’*Xa21* 基因启动子序列及其相关元件  
**Fig. 2 Sequence of *Xa21* gene promoter of cultivar ‘Nipponbare’ of *Oryza sativa* L. and its related elements**



A: 根 Root; B: 茎 Stem; C: 叶 Leaf; D: 根尖 Root tip.

图 3 T1 代转基因水稻不同器官 GUS 活性的组织化学染色结果  
**Fig. 3 Histochemical staining result of GUS activity in different organs of T1 strain of transgenic rice (*Oryza sativa* L.)**

一定的组织表达特异性。而 GUS 活性定量检测结果显示(表 1):转基因水稻幼苗根的 GUS 活性是叶片的 2.31 倍,且二者间的差异达到极显著水平( $P<0.01$ );茎的 GUS 活性是叶片的 1.93 倍,二者间的差异达到显著水平( $P<0.05$ );根的 GUS 活性略高于茎,但二者间的差异不显著( $P>0.05$ )。

表 1 T1 代转基因水稻不同器官中 GUS 活性比较( $\bar{X}\pm SD$ )<sup>1)</sup>  
Table 1 Comparison of GUS activity in different organs of T1 strain of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) ( $\bar{X}\pm SD$ )<sup>1)</sup>

| 器官<br>Organ | GUS 活性/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$<br>GUS activity |
|-------------|--|
| 根 Root      | 3.74±0.60aA  |
| 茎 Stem      | 3.12±0.42aAB   |
| 叶 Leaf      | 1.62±0.27bB  |

<sup>1)</sup> 同列中不同的小写和大写字母分别表示在 0.05 和 0.01 水平上差异显著 Different small letters and capitals in the same column indicate the significant difference at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

2.2.2 在不同发育时期的表达特征 T1 代转基因水稻 3 叶期、5 叶期和 8 至 9 叶期叶片的 GUS 活性见表 2。由表 2 可见:由 *Xa21* 基因启动子驱动的 GUS 活性受到水稻发育时期的影响;在 8 至 9 叶期叶片的 GUS 活性极显著高于 3 叶期( $P<0.01$ ),是 3 叶期的 2.68 倍;8 至 9 叶期叶片的 GUS 活性也显著高于 5 叶期( $P<0.05$ ),是 5 叶期的 2.00 倍;而 5 叶期叶片的 GUS 活性略高于 3 叶期,但差异不显著( $P>0.05$ )。表明随转基因水稻苗龄的增长,*Xa21* 基因启动子驱动的 GUS 活性逐渐增加。

表 2 不同发育期 T1 代转基因水稻叶片中 GUS 活性比较( $\bar{X}\pm SD$ )<sup>1)</sup>  
Table 2 Comparison of GUS activity in leaf of T1 strain of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) at different developmental stages ( $\bar{X}\pm SD$ )<sup>1)</sup>

| 发育时期<br>Developmental stage | GUS 活性/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$<br>GUS activity |
|-----------------------------|--|
| 3 叶期 3-leaf stage           | 0.77±0.16bB  |
| 5 叶期 5-leaf stage           | 1.03±0.15bAB   |
| 8 至 9 叶期 8- to 9-leaf stage | 2.06±0.40aA  |

<sup>1)</sup> 同列中不同的小写和大写字母分别表示在 0.05 和 0.01 水平上差异显著 Different small letters and capitals in the same column indicate the significant difference at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

2.2.3 在不同逆境及激素处理条件下的表达特征通过 GUS 活性定量分析,在干旱、机械损伤以及不同激素处理条件下 T1 代转基因水稻叶片中 GUS 的活性见表 3。由表 3 可见:机械损伤 12 h 后,转基因水稻叶片中的 GUS 活性显著高于对照( $P<0.05$ ),为对照的 1.24 倍;干旱处理 48 h 后,转基因水稻叶片中的

GUS 活性变化并不明显;用  $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  茉莉酸甲酯处理 12 h 后,转基因水稻叶片中的 GUS 活性极显著高于对照( $P<0.01$ ),为对照的 1.39 倍;经  $500\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  水杨酸和  $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  脱落酸处理 12 h 后,转基因水稻叶片中的 GUS 活性与对照差异不显著。

表 3 在不同处理条件下 T1 代转基因水稻叶片中 GUS 活性比较( $\bar{X}\pm SD$ )  
Table 3 Comparison of GUS activity in leaf of T1 strain of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) under different treatments ( $\bar{X}\pm SD$ )

| 处理<br>Treatment        | GUS 活性/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$<br>GUS activity |
|------------------------|--|
| 对照 CK                  | 0.88±0.08  |
| 机械损伤 Mechanical damage | 1.09±0.09 * <sup>1)</sup>  |
| 干旱 Drought             | 0.79±0.15  |
| 水杨酸 Salicylic acid     | 0.90±0.07  |
| 茉莉酸甲酯 Methyl jasmonate | 1.22±0.05 ** <sup>1)</sup>   |
| 脱落酸 Abscisic acid      | 0.83±0.23  |

<sup>1)</sup> \*\*: 对照与处理组间差异极显著( $P<0.01$ ) The extremely significant difference between the control and treatment group ( $P<0.01$ ); \*: 对照与处理组间差异显著( $P<0.05$ ) The significant difference between the control and treatment group ( $P<0.05$ ).

### 3 讨论和结论

研究表明:从水稻品种‘日本晴’中扩增得到 1 条长度为 1 982 bp 的片段,该片段与 GeneBank 中登录的水稻品种‘日本晴’*Xa21* 基因启动子序列的同源性高达 99.7%,据此推断该序列为 *Xa21* 基因启动子。通过顺式作用元件预测该序列包含有 GCC-box、A-box、TC-rich repeats、MBS、LTR 和 W-box 等逆境信号相关元件。GUS 活性分析结果显示:该启动子在水稻的根、茎和叶中均能表达,其中在根中的表达量最高,特别是在根尖的中柱组织中集中表达;在不同发育时期以及在不同的逆境和外源激素处理条件下,该启动子均能表达,但表达量有明显差异,其中,8 至 9 叶期表达量最高,机械损伤以及  $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  茉莉酸甲酯处理均能促进该启动子的表达。

基因的结构、表达与其功能之间相互适应,这是生物在长期进化过程中形成的一种重要的适应机制。Century 等<sup>[10]</sup>的研究结果表明:水稻不同发育时期 *Xa21* 基因的表达变化不显著,而且转基因植株对白叶枯病和创伤处理不敏感,说明 *Xa21* 基因很可能是在转录后水平进行调控;而 Park 等<sup>[11]</sup>的研究结果则表明:白叶枯病可以诱导水稻 *Xa21* 基因的表达,在幼苗期和成苗期过量表达 *Xa21* 基因都可以增加水稻的

抗病性。造成上述研究结果不一致的原因可能是不同研究者采用的 PCR 反应引物不同所致。由于水稻基因组中抗病基因家族很大,不同成员之间存在着序列同源性,研究人员在设计引物时模板区域的选择有一定差异,因此难以获得基因家族特定成员特异性表达的数据。启动子是基因表达调控的重要元件,启动子的活性在很大程度上可以反映基因的表达情况,因此通过分析基因启动子的表达特征推测基因的表达,可以弥补上述研究的不足之处。根据本研究结果,推测水稻 *Xa21* 基因的表达明显受水稻发育时期的影响,随着水稻苗龄的增长,*Xa21* 基因的表达水平逐渐升高,说明在水稻不同发育期的抗性差异与 *Xa21* 的表达密切相关。

水稻白叶枯病是一种细菌性病害,自然条件下从寄主的伤口或自然开放的孔口(如水孔)侵入,进入木质部后繁殖并转移到植株的全身,其危害主要发生在叶片及叶鞘部位<sup>[5]</sup>。Chen 等<sup>[18]</sup>的研究结果表明:在水稻根系中,*Xa21* 基因也能对白叶枯病病原菌产生抗性。本研究结果表明:*Xa21* 基因启动子驱动的 GUS 活性在水稻根尖的中柱区域表达量明显较高,这与 *Xa21* 介导的白叶枯病抗性特征相吻合<sup>[18]</sup>。茉莉酸(JA)是植物体内重要的内源性信号分子,茉莉酸信号途径参与了水稻对白叶枯病的抗病反应<sup>[19-20]</sup>。在本研究中,外源茉莉酸甲酯可以显著增强水稻中 *Xa21* 基因启动子驱动的 GUS 活性,也说明 *Xa21* 介导的白叶枯病抗性依赖于茉莉酸信号通路。

#### 参考文献:

- [1] JOENS J D G, DANGL J L. The plant immune system[J]. *Nature*, 2006, 444: 323-329.
- [2] 赵开军,李岩强,王春连,等. 植物天然免疫性研究进展及其对作物抗病育种的可能影响[J]. *作物学报*, 2011, 37(6): 935-942.
- [3] 王友红,张鹏飞,陈建群. 植物抗病基因及其作用机理[J]. *植物学通报*, 2005, 22(1): 92-99.
- [4] MOHR T J, MAMMARELLA N D, HOFF T, et al. The *Arabidopsis* downy mildew resistance gene *RPP8* is induced by pathogens and salicylic acid and is regulated by W-box cis elements[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2010, 23(10): 1303-1315.
- [5] 王运丰. 水稻白叶枯病的综合防治措施[J]. *农村实用科技信息*, 2011(8): 38.
- [6] 毛凌华,聂元元,李 瑶,等. 水稻白叶枯病抗性基因及其分子标记辅助选择育种研究进展[J]. *江西农业学报*, 2011, 23(8): 115-117.
- [7] 鄂志国,王 磊. 水稻抗病性基因的克隆和功能研究进展[J]. *遗传*, 2009, 31(10): 999-1005.
- [8] SONG W Y, WANG G L, CHEN L L, et al. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21* [J]. *Science*, 1995, 270: 1804-1806.
- [9] GAN Q, BAI H, ZHAO X F, et al. Transcriptional characteristics of *Xa21*-mediated defense responses in rice[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2011, 53(4): 300-311.
- [10] CENTURY K S, LAGMAN R A, ADKISSON M, et al. Developmental control of *Xa21*-mediated disease resistance in rice[J]. *The Plant Cell*, 1999, 20(2): 231-236.
- [11] PARK C J, LEE S W, CHERN M, et al. Ectopic expression of rice *Xa21* overcomes developmentally controlled resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* [J]. *Plant Science*, 2010, 179(5): 466-471.
- [12] 张 睿,陶建敏,蔡斌华,等. 藤稔葡萄花发育相关基因启动子的克隆及功能分析[J]. *植物资源与环境学报*, 2011, 20(4): 17-23.
- [13] CURTIS M D, GROSSNIKLAS U. A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta[J]. *Plant Physiology*, 2003, 133(2): 462-469.
- [14] TOKI S, HARA N, ONO K, et al. Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice [J]. *The Plant Journal*, 2006, 47(6): 969-976.
- [15] JEFFERSON R A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1987, 5(1): 387-405.
- [16] 曾凡锁,钱晶晶,康 君,等. 转基因白桦中 GUS 基因表达的定量分析[J]. *植物学报*, 2009, 44(4): 484-490.
- [17] LESCOT M, DÉHAIS P, THIJS G, et al. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences[J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(1): 325-327.
- [18] CHEN F, GAO X J, MIAO Y S, et al. Plasma membrane localization and potential endocytosis of constitutively expressed *Xa21* proteins in transgenic rice[J]. *Molecular Plant*, 2010, 3(5): 917-926.
- [19] MAHMOOD T, JAN A, KAKISHIMA M, et al. Proteomic analysis of bacterial-blight defense-responsive proteins in rice leaf blades [J]. *Proteomics*, 2006, 6(22): 6053-6065.
- [20] SHEN X L, YUAN B, LIU H B, et al. Opposite functions of a rice mitogen-activated protein kinase during the process of resistance against *Xanthomonas oryzae* [J]. *The Plant Journal*, 2010, 64(1): 86-99.

(责任编辑:佟金凤)