

文章编号: 1674-7054(2015)02-0141-06

水稻 *OsCERK2* 转基因后代的鉴定与分析肖晓蓉^{1,2}, 苏桐慧^{1,2}, 廖华兰^{1,2}, 黎秀琼^{1,2},
汪德锋^{1,2}, 符秀梅^{1,2}, 陈银华^{1,2}, 牛晓磊^{1,2}

(1. 海南大学 海南省热带生物资源可持续利用重点实验室 海南 海口 570228;

2. 海南大学 农学院 海南 海口 570228)

摘 要: 为了研究水稻 *OsCERK2* 基因的功能, 构建了 *OsCERK2* 基因过表达和 RNAi 载体, 利用农杆菌介导的遗传转化获得转基因植株, 经多代筛选和分子检测, 获得了 4 个超量表达的过表达纯系和 2 个转录水平下降的 RNAi 纯系。转基因植株经病原微生物细胞壁成分喷雾处理, 采用半定量 RT-PCR 方法分析转基因植株中病程相关 (*PR*) 基因的表达情况, 结果发现, 诱导后过表达植株中 *PR* 基因表达增强, 而 RNAi 植株中表达下降; 抗病性鉴定结果表明, 过表达转基因植株对白叶枯菌致病小种 PXO99 的抗性增强, 而 RNAi 植株与野生型差异不显著。结果表明, 过量表达 *OsCERK2* 基因可能是水稻抗病的有效途径。

关键词: *OsCERK2*; 转基因; 几丁质; *PR* 基因; 植物抗病反应

中图分类号: Q 943.2; S 511

文献标志码: A

植物长期暴露在外界环境中, 受到各种潜在微生物的侵袭, 虽然不能像动物一样通过移动来主动趋避有害环境, 但是植物在与病原物共同进化中逐渐形成了一套先天免疫系统。这套免疫系统的第 1 层次便是植物可以通过其细胞表面的模式识别受体 (Pattern recognition receptors, PRRs) 识别病原微生物的表面物质从而触发基础免疫, 这类物质统称为病原微生物的病原相关分子模式 (Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)。已知的 PAMPs 包括细菌的脂多糖、肽聚糖 (PGN)、鞭毛蛋白与延伸因子 Tu、真菌的细胞壁组分几丁质和细胞膜组分麦角甾醇等^[1-3]。文献 [4-6] 的研究发现, 几丁质诱导物还可以被植物的 PRRs 识别。现已证明, 拟南芥几丁质诱导物受体激酶 1 (LysM RLK1/CERK1) 和水稻几丁质诱导物结合蛋白 (*OsCEBiP*) 参与植物对真菌细胞壁成分几丁质的识别和抗病反应^[5-6]。CERK1 不仅参与激活真菌几丁质酶过表达诱导的防御反应, 同时也调控非生物胁迫反应^[7]。*cerk1* 突变体植株易感丁香假单胞菌, 表明 *CERK1* 在细菌 PAMP 感知中也发挥着重要功能^[8], *CERK1* 也参与植物对细菌肽聚糖 PGN 的识别及防御反应^[9]。Eiichi 等^[10] 第 1 次证明了 *CERK1* 与几丁质直接结合。在水稻几丁质信号中, 除了 *OsCEBiP* 外, *OsCERK1* 同样重要, Shimizu 等^[11] 经免疫共沉淀分析发现, 几丁质处理后, *OsCEBiP* 与 *OsCERK1* 以受体复合物的形式存在, 直接证明了 *OsCEBiP* 蛋白与 *OsCERK1* 蛋白的互作。除拟南芥和水稻外, 其他作物中含 LysM 功能域的 RLP/RLK 也被大量克隆鉴定。Zeng 等^[12] 研究发现, 番茄 LysM 类受体激酶能促进免疫, 这种激酶活性同时也能被效应蛋白 *AvrPtoB* 抑制。百脉根、苜蓿和大麦中也存在类似的抗病反应^[12-14]。这些结果表明, *CERK* 在植物先天免疫中发挥重要作用。植物病程相关蛋白 (pathogenesis related proteins, PRPs) 是植物在应答后 (如病原菌、昆虫、物理伤害、化学伤害及恶劣的环境等胁迫) 诱导产生的, 是植物抗病性的一个重要标志^[15]。PR1 蛋白首先在烟草中发现, 其编码基因受到烟草花叶病毒 (tobacco mosaic virus, TMV) 诱导而表达; 随后, 在大麦、番茄、玉米、水稻等多种植物中都发现其同源蛋白的存在, 调控这些基因的表达均能改变其对真菌病害的抗性^[16]。GLU 是 PR2 类中的一种, 编码 β -1, 3

收稿日期: 2015-04-12

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项 (2009ZX08009-41B); 国家自然科学基金项目 (31260345)

作者简介: 肖晓蓉 (1990-), 女, 海南大学农学院 2012 级硕士研究生。E-mail: xiaorong1990829@163.com

通信作者: 牛晓磊, 男, 讲师, 研究方向: 植物与病原微生物的互作。E-mail: ninterxl@hainu.edu.cn

—葡聚糖酶,具有抗真菌活性^[17]。PR10 具有核糖核酸酶活性^[18],不仅受真菌诱导表达,同时也受细菌和病毒等的诱导而大量表达^[19-22],PR 蛋白是植物先天免疫反应中的重要组分。在获得转 *OsCERK2* 基因 T_0 代植株的基础上,笔者选择分离比为 3 : 1 的株系继续繁殖,通过多代选择,获得了转基因纯系。经 PCR 和 RT-PCR 验证、转基因植株中病程相关基因的表达检测和转基因株系抗病性鉴定等对转基因纯系进行了分析,旨在为进一步探索 *OsCERK2* 抗病分子机理提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 材料 粳稻品种日本晴(*Oryza sativa* L. spp. *Japonica* var. *Nippobare*) 由中国科学院微生物所提供;以野生型 NB 为背景的 T_0 代 *OsCERK2* 过表达植株和 RNAi 植株种子由本实验室保存。

1.1.2 病原菌 黄单胞杆菌水稻致病变种(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) 生理小种 PXO99(Xoo-R6) ,在 PSA 培养基上划线培养后挑单菌落摇菌培养过夜,吸取过夜培养的菌液在 PSA 培养基上划粗线培养 24 h 后,用无菌水稀释至 OD_{600} 值为 0.4 ~ 0.6。

细菌细胞壁肽聚糖的制备:取离心洗涤得到的嗜酸乳杆菌湿菌 20 g,悬浮于 200 mL 的 10% 三氯乙酸(TCA) 溶液中,沸水浴 20 min 以裂解菌体;冷却后,12 000 r · min⁻¹ 离心 15 min,收集不含磷壁酸的细胞壁沉淀,蒸馏水洗涤沉淀 3 次;沉淀溶于胰蛋白酶磷酸缓冲液(3 mg · mL⁻¹ 胰蛋白酶 0.1 mol · L⁻¹ 磷酸缓冲液 pH 8.0) 中,37 °C 水浴振荡 3 h,以 3 000 r · min⁻¹ 转速离心 5 min,弃去未溶解的胰蛋白酶沉淀。上清液 12 000 r · min⁻¹ 离心 15 min,沉淀用蒸馏水洗 2 次,加入乙醚(除脂类物质),12 000 r · min⁻¹ 离心 15 min,70 °C 干燥脱水后,即得淡褐色胶质肽聚糖提取物。

稻瘟病菌细胞壁物质的制备:用液体培养基(胰化蛋白胨 6 g · L⁻¹ 酵母提取物 6 g · L⁻¹ 蔗糖 10 g · L⁻¹) ,于 28 °C 温度下培养稻瘟病菌,7 d 后收集真菌菌丝,用 20 mmol · L⁻¹ 的磷酸钾缓冲液(含有 0.1% Tween 20) 重悬。悬浮的菌丝用超声波处理后,经 120 °C 高压蒸汽处理 20 min,13 000 r · min⁻¹ 离心 1 h,取上清,将其冻干,溶于水并调至合适的浓度即为激发子。

1.2 引物序列 本实验所用的引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

基因 Gene	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
<i>PBZ1/PR-10</i>	5'-ATGAAGCTTAACCCTGCCGC-3'	5'-GTCTCCGTCGAGTGTGACTTG-3'
<i>OsPR-1</i>	5'-GGAAGTACGGCGAGAATC-3'	5'-GGCGAGTAGTTGCAGGTG-3'
<i>GLU</i>	5'-CAGCGTTGTCAGCAGTAG-3'	5'-GCCGAATACAGAGCATCC-3'
<i>HPT</i>	5'-CTGCTCCATACAAGCCAACC-3'	5'-TGCCTGAAACCGAACTGC-3'
<i>OsCERK2</i>	5'-TCAGGTATGGAGATGTATCAG-3'	5'-AGGAGAGCAATAGCAATCA-3'
<i>GAPDH</i>	5'-ACAGGGGAGTTGTGTTTTGC-3'	5'-CCCAACCAACCACCATGATA-3'

1.3 转基因植株纯合后代的筛选与鉴定 将 T_0 代阳性植株收种后继续种植,待到 4 叶 1 心期后,用 SDS 法提取野生型和转基因水稻的基因组总 DNA,根据标志基因潮霉素序列设计引物对 hpt-F/R,PCR 扩增鉴定 T_1 代转基因植株,选择阳性且分离比为 3 : 1 的植株单株收种,继续种植和 PCR 鉴定,经过多代筛选和鉴定后,得到性状不发生分离的稳定纯合株系。

1.4 过表达纯合系和 RNAi 纯系的表达分析 种植野生型和筛选得到的转基因纯合株系,待其长至 4 叶 1 心期,用 Trizol 试剂提取水稻叶片中的 RNA,经 DNase I 消耗基因组 DNA,参照 RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit 使用说明书,将 RNA 反转录为 cDNA,将 cDNA 稀释至合适浓度后作模板,经水稻甘油醛-3-磷酸脱氢酶(*OsGAPDH*) 基因均一化处理,通过 RT-PCR 法检测转基因纯合株系中 *OsCERK2* 基因的转录水平。

1.5 病原物细胞壁物质处理后转基因植株中相关 *PR* 基因的表达检测 转基因纯系和野生型统一催芽播种, 种植 10 d 后, 选取生长良好且一致的植株, 用 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的细菌性白叶枯菌菌株 PXO99 和细菌性条斑病菌菌株 JB01-25 的细胞壁肽聚糖以及稻瘟病菌细胞壁物质对其进行喷雾处理, 以清水为对照, 2 h 后收集水稻叶片(相同处理取 3~5 片叶), 提取总 RNA, 经 RT-PCR 分析病程相关基因(*PR1*, *PR10* 和 *GLU*) 的表达。

1.6 白叶枯病接种与调查 转基因纯系和野生型统一催芽播种, 待其长至苗期, 采用剪叶接种法接种白叶枯菌菌株 PXO99, 12~14 d 后, 调查病斑长度, 数据经 *t* 测验分析显著性 ($P < 0.05$)。每个品种接种 20~30 株苗, 每株 3 片叶, 以无菌水为空白对照。

2 结果与分析

2.1 转基因植株纯合后代的筛选与鉴定 杂合转基因植株通过自交可以得到纯合基因型后代, 利用这一基因分离定律, 选择分离比为 3:1 的 T_1 单株进行加代繁殖, 每代都进行 PCR 检测, 直到 PCR 检测均为阳性, 再繁殖 2 代, 鉴定同样为阳性, 说明不再发生分离, 则这一株系即为纯系。从图 1 可知: 经过 4~5 代的筛选和检测, 获得的 4 个过表达纯系和 2 个 RNAi 纯系都能扩增出与阳性对照(用于转化的表达载体质粒 pCambia1301) 大小一致的目的条带, 说明获得了纯合转基因植株, 其中 4 个过表达纯系分别为 OE30, OE42, OE56, OE57, 2 个 RNAi 纯系为 RNAi-54, RNAi-57。

2.2 过表达纯合系和 RNAi 纯系的表达分析 提取野生型和经上述 PCR 鉴定获得转基因纯系植株的总 RNA, 消耗基因组 DNA, 将其分别反转录成 cDNA, 通过 RT-PCR 鉴定转基因植株中 *OsCERK2* 基因的转录水平。从图 2 可知, 转基因纯系中潮霉素标志基因 *HPT* 都表达, 而野生型中不表达, 与预期结果一致。经 *OsGAPDH* 均一化处理后, 过表达纯系中 *OsCERK2* 基因转录水平明显增加, RNAi 的纯系植株中 *OsCERK2* 的转录水平明显下降。

2.3 病原物细胞壁物质处理后转基因植株中相关 *PR* 基因的表达检测 利用半定量 RT-PCR 技术检测了转基因植株中 3 个水稻 *PR* 基因的表达水平。从图 3 可以看出, 水处理后, 转基因植株中 3 个诱导相关基因(*PR1*, *PR10* 和 *GLU*) 的表达基本一致; PGN_{Xoo} , PGN_{Xoc} 和 Chitin_{Mo} 处理后, 日本晴 NB 和转基因纯系植株中 3 个诱导相关基因的表达存在一定的差异, 与野生型相比, 过表达株系中 *PR1*, *PR10* 和 *GLU* 的表达增加, 而在反义抑制表达转基因植株中则降低。

2.4 *OsCERK2* 参与白叶枯病原菌 PXO99 介导的抗病反应 将获得的转基因纯系和野生型种植于同一环境, 待其长至苗期, 剪叶接种 PXO99, 14 d 后调查病斑长度。结果发现(图 4) 4 个纯合过表达株系病斑长度在 3.4~4.6 cm 之间, 2 个 RNAi 干扰纯系病斑长度为 7 cm, 而野生型 NB 病斑长度为 6 cm, 过表达株系病斑长度显著小于 NB, 表明该基因的过表达能提高转基因植株的抗病性。RNAi 干扰植株比野生型更感病, 但两者间差异不显著。从图 5 可知, 过表达植株病健交界较明显, 病原菌的侵染受到抑制, 野生型和 RNAi 发病情况接近。

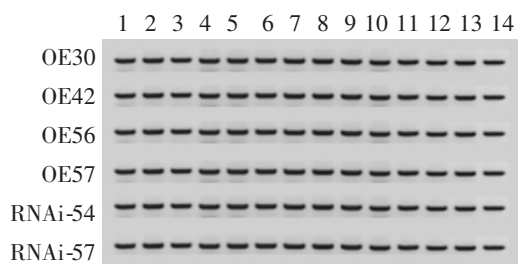


图 1 T_4 代转基因植株的 PCR 鉴定

1: 阳性对照; 2-14: 同一株系的不同单株;
OE: 过表达纯系; RNAi-54 及 RNAi-57: 2 个 RNAi 纯系
Fig. 1 PCR detection of T_4 transgenic plants
1: positive control; 2-14: different plants of the same lines;
OE: four independent overexpressing homozygotes;
RNAi-54 and RNAi-57: two independent RNAi homozygotes

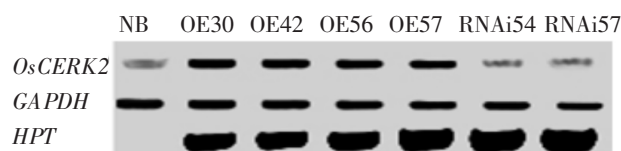


图 2 转基因植株中 *OsCERK2* 的表达

NB: 野生型日本晴; OE 为过表达纯系;

RNAi-54, RNAi-57 为 RNAi 的转基因纯系

Fig. 2 *OsCERK2* expression in transgenic plants

NB: wild-type Nipponbare;

OE: four independent overexpressing homozygotes;

RNAi-54 and RNAi-57: two independent RNAi homozygotes

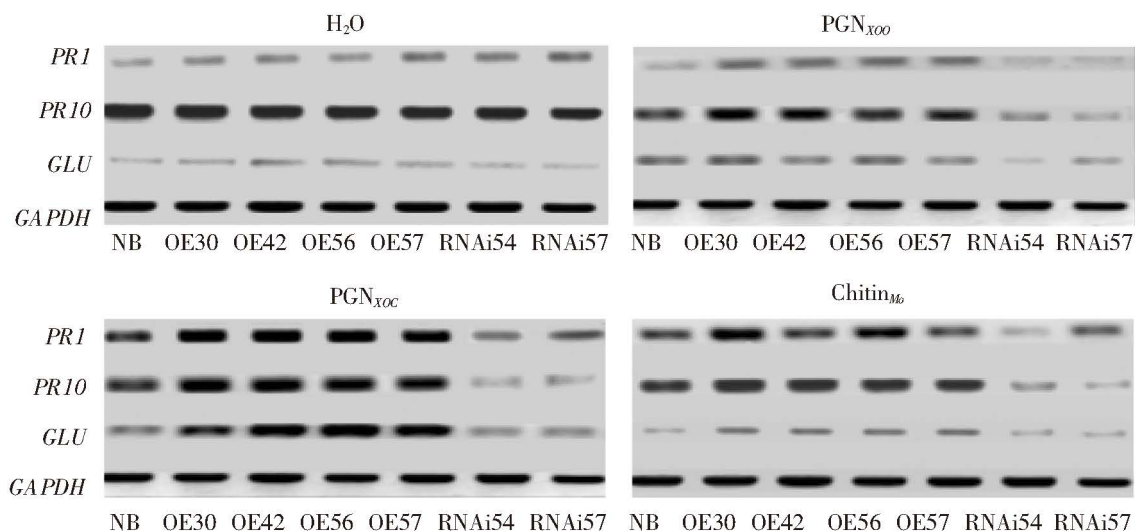


图3 转基因株系中病程相关蛋白基因的表达

NB: 野生型日本晴; OE 为过表达转基因纯系; RNAi 为 RNAi 的转基因纯系; *GAPDH* 为内参引物; H_2O 处理作为对照; PGN_{Xoo} , PGN_{Xoc} 和 $Chitin_{Mo}$ 分别来源于 *Xoo* 菌株 PXO99, *Xoc* 菌株 JB01-25 和 *Magnaporthe oryzae* 菌株 Y34 的细胞壁

Fig. 3 Expression of pathogenesis-related protein genes in transgenic plants

NB: wild-type Nipponbare; OE: overexpressing homozygotes; RNAi: RNAi homozygotes; *GAPDH*: internal control; H_2O treatment as a control; PGN_{Xoo} , PGN_{Xoc} and $Chitin_{Mo}$ coming from the cell wall of *Xoo* PXO99, *Xoc* JB01-25 and *Magnaporthe oryzae* Y34, respectively

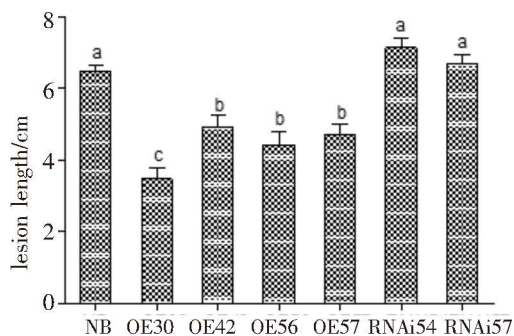


图4 转基因植株活体接种 PXO99 的病斑长度测定

NB: 野生型; OE: 过表达植株;
RNAi54 及 RNAi57: RNAi 植株

Fig. 4 Lesion length of transgenic plants inoculated with PXO99 in vivo

NB: Wild-type; OE: overexpression lines of *OsCERK2*; RNAi 54 and RNAi 57: RNAi lines



图5 转基因植株活体接种 PXO99 的表型图

NB: 野生型; OE: 过表达植株;
RNAi 54 及 RNAi 57: RNAi 植株

Fig. 5 Phenotype of transgenic plants inoculated with PXO99 in vivo

NB: Wild-type; OE: overexpression lines of *OsCERK2*; RNAi 54 and RNAi 57: RNAi lines

3 讨论

植物类受体激酶(receptor-like kinases, RLKs)是目前在高等植物中发现数目巨大的一类受体基因,参与许多生物过程如生长发育、先天免疫和花粉自交不亲和等^[23-25]。几丁质诱导物受体激酶是一类含有 LysM 胞外结构域类受体激酶, LysM RLKs 在拟南芥、大麦、百脉根和苜蓿中都有研究^[26-27]。水稻中的同源基因研究较多的是 *OsCEBiP* 和 *OsCERK1*, 本课题组分离得到了另一个同源基因 *OsCERK2*, 为了进一步明确 *OsCERK2* 基因的功能, 在已经获得 T_0 代过量表达和 RNAi 植株的基础上, 通过多代筛选及鉴定, 笔者获得了 *OsCERK2* 过量表达的过表达纯系和转录水平明显下降的 RNAi 纯系。

PR 基因编码的 PR 蛋白参与植物的抗病反应, 是植物抗病性的一个标志^[17]。几丁质寡糖刺激物处理水稻悬浮培养细胞和拟南芥幼苗时, 各种 *PR* 基因被诱导表达, *AtCERK1* 是植物识别细菌的细胞壁肽聚

糖(PGN)所必需的,且受几丁质寡糖刺激物的诱导表达,是一个正调控基因^[5]。笔者用病原物细胞壁物质处理转基因植株,随后通过 semiRT-PCR 技术检测了转基因株系中 *PR1*、*GLU*、*PR10* 等病程相关基因的表达情况。结果发现,用细菌性白叶枯病原菌 *Xoo* 和细菌性条斑病原菌 *Xoc* 的细胞壁物质 PGN、真菌性稻瘟病菌的细胞壁物质 Chitin 诱导处理后,过表达植株中 *PR* 基因表达量明显增加,而 RNAi 植株中表达量比野生型中低,说明 *OsCERK2* 可能与 *AtCERK1* 功能类似,都能参与植物的抗真菌反应和抗细菌反应,且起正调控作用。更重要的是,转基因水稻接种白叶枯病原菌 PXO99 后的病斑调查进一步验证了 *OsCERK2* 正调控植物抗病反应,过表达植株病斑长度明显小于野生型,表现出一定的抗病性, RNAi 植株病斑长度虽然比野生型长,但差异不显著。这是因为防卫反应是由多层次的防御机制包括各种 PAMP 分子的识别等组成的^[28-29],因此,这个多层防御体系的单一成分被干扰后抗病性可能不会发生很大变化。根据本实验研究结果,笔者发现 *OsCERK2* 能正调控植株抗病反应,但是其具体作用机理尚不清楚。*OsCERK1* 和 *OsCEBiP* 能形成一种质膜异寡聚化受体复合物协同调控几丁质寡糖的反应^[11]。*OsCERK2* 是否和 *OsCERK1* 一样能与另一物质形成受体复合物而发挥作用,还是和拟南芥中一样可以直接与几丁质结合,这些问题还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] ZIPFEL C. Early molecular events in PAMP-triggered immunity [J]. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2009, 12(4): 414–420.
- [2] GUST A A, BISWAS R, LENZ H D, et al. Bacteria-derived peptidoglycans constitute pathogen-associated molecular patterns triggering innate immunity in *Arabidopsis* [J]. *J. Biol. Chem.* 2007, 282(44): 32338–32348.
- [3] GRANADO J, FELIX G, BOLLER T. Perception of Fungal Sterols in Plants (Subnanomolar Concentrations of Ergosterol Elicit Extracellular Alkalinization in Tomato Cells) [J]. *Plant Physiol.* 1995, 107(2): 485–490.
- [4] KAKU H, NISHIZAWA Y, ISHII-MINAMI N, et al. Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, 103(29): 11086–11091.
- [5] MIYA A, ALBERT P, SHINYA T, et al. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis* [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, 104(49): 19613–19618.
- [6] WAN J, ZHANG X C, NEECE D, et al. A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2008, 20(2): 471–481.
- [7] BROTHA Y, LANDAU U, PINI S, et al. The LysM receptor-like kinase LysM RLK1 is required to activate defense and abiotic-stress responses induced by overexpression of fungal chitinases in *Arabidopsis* plants [J]. *Molecular Plant* 2012, 5(5): 1113–1124.
- [8] GIMENEZ-ABANEZ S, HANN D R, NTOUKAKIS V, et al. AvrPtoB targets the LysM receptor kinase CERK1 to promote bacterial virulence on plants [J]. *Curr. Biol.*, 2009, 19(5): 423–429.
- [9] WILLMANN R, LAJUNEN H M, ERBS G, et al. Arabidopsis lysin-motif proteins LYM1 LYM3 CERK1 mediate bacterial peptidoglycan sensing and immunity to bacterial infection [J]. *PNAS*, 2011, 108(49): 19824–19829.
- [10] IIZASA E, MITSUTOMI M, NAGANO Y. Direct binding of a plant LysM receptor-like kinase, LysM RLK1/CERK1, to chitin *in Vitro* [J]. *J. Biol. Chem.*, 2010, 285(5): 2996–3004.
- [11] SHIMIZU T, NAKANO T, TAKAMIZAWA D, et al. Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice [J]. *Plant J.*, 2010, 64(2): 204–214.
- [12] ZENG L, VELASQUEZ A C, MUNKVOLD K R, et al. A tomato LysM receptor-like kinase promotes immunity and its kinase activity is inhibited by AvrPtoB [J]. *Plant J.*, 2012, 69(1): 92–103.
- [13] TANAKA S, ICHIKAWA A, YAMADA K, et al. *HvCEBiP*, a gene homologous to rice chitin receptor CEBiP, contributes to basal resistance of barley to *Magnaporthe oryzae* [J]. *BMC Plant Biol.* 2010(10): 288.
- [14] FLIEGMANN J, UHLENBROICH S, SHINYA T, et al. Biochemical and phylogenetic analysis of CEBiP-like LysM domain-containing extracellular proteins in higher plants [J]. *Plant Physiol. Biochem.*, 2011, 49(7): 709–720.
- [15] VAN LOON L C, REP M, PIETERSE C M. Significance of inducible defense-related proteins in infected plant [J]. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 2006, 44: 135–162.
- [16] CORNELISSEN B J, HOOFT VAN HUIJSDUIJNEN R A, VAN LOON L C, et al. Molecular characterization of messenger RNAs for “pathogenesis related” proteins 1a, 1b and 1c, induced by TMV infection of tobacco [J]. *EMBO J.*, 1986, 5(1): 37–40.
- [17] SINHA M, SINGH R P, KUSHWAHA G S, et al. Current overview of allergens of plant pathogenesis related protein families [J]. *Scientific World Journal*, 2014(10): 543195.

- [18] LEGRAND M ,KAUFFMANN S ,GEOFFROY P , et al. Biological function of pathogenesis-related proteins: Four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA ,1987 ,84(19) : 6750 –4.
- [19] PARK C J , KIM K J , SHIN R , et al. Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway[J]. Plant J. ,2004 37(2) : 186 –198.
- [20] BORSICS T , LADOS M. Dodder infection induces the expression of a pathogenesis-related gene of the family *PR-10* in alfalfa [J]. J. Exp. Bot. 2002 ,53(375) : 1831 –1832.
- [21] LO S C , HIPSKIND J D , NICHOLSON R L. cDNA cloning of a sorghum pathogenesis – related protein (*PR-10*) and differential expression of defense-related genes following inoculation with *Cochliobolus heterostrophus* or *Colletotrichum sublineolum* [J]. Mol. Plant Microbe Interact. ,1999 ,12(6) : 479 –489.
- [22] MCGEE J D , HAMER J E , HODGES T K. Characterization of a *PR-10* pathogenesis-related gene family induced in rice during infection with *Magnaporthe grisea* [J]. Mol. Plant Microbe Interact. ,2001 ,14: 877 –886.
- [23] STEIN J C , HOWLETT B , BOYES D C , et al. Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea* [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA ,1991 88(19) : 8816 –8820.
- [24] STONE J M , WALKER J C. Plant Protein Kinase Families and Signal Transduction[J]. Plant Physiol. ,1995 ,108(2) : 451 –457.
- [25] LI J , CHORY J. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction [J]. Cell ,1997 90(5) : 929 –938.
- [26] LIU B , LI J F , AO Y , et al. Lysin motif-containing proteins LYP4 and LYP6 play dual roles in peptidoglycan and chitin perception in rice innate immunity [J]. Plant Cell ,2012 ,24(8) : 3406 –3419.
- [27] RADUTOIU S , MADSEN L H , MADSEN E B , et al. LysM domains mediate lipochitin-oligosaccharide recognition and Nfr genes extend the symbiotic host range [J]. EMBO J. ,2007 26(17) : 3923 –3935.
- [28] HEATH M C. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses [J]. Curr. Opin. Plant Biol. ,2000 3(4) : 315 –319.
- [29] NUMBERGER T , BRUNNER F , KEMMERLING B , et al. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences [J]. Immunol. Rev. 2004 ,198: 249 –266.

Identification and Analysis of *OsCERK2* Transgenic Progeny of Rice

XIAO Xiaorong^{1 2} , SU Tonghui^{1 2} , LIAO Hualan^{1 2} , LI Xiuqiong^{1 2} ,
WANG Defeng^{1 2} , FU Xiumei^{1 2} , CHEN Yinhua^{1 2} , NIU Xiaolei^{1 2}

(1. Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bioresources , Hainan University , Haikou 570228 , China;

2. College of Agronomy , Hainan University , Haikou 570228 , China)

Abstract: To study the biological function of *OsCERK2* gene , we constructed the *OsCERK2* gene overexpression and RNA interference vectors by modifying pCambia1300 and pTCK303 as framework plasmid , and then transferred the vectors respectively into the rice through *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. Molecular detection produced four overexpressing homozygous lines and two RNAi homozygous lines with reduced transcriptional level. The transgenic plants of the OE lines and RNAi lines were sprayed with peptidoglycan prepared from the cell wall of both race PXO99 (*Xoo*-R6) of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (PGNXoo) and the strain JB01-25 of *X. oryzae* pv. *oryzicola* (PGNXoc) and ChitinMo from the cell wall of *Magnaporthe oryzae* , with water as control. The expression of pathogenesis related (*PR*) genes were determined by using the semi-quantitative RT-PCR. The results showed that the plants of overexpressing lines improved the expression of their *PR* genes while the plants of RNAi expressing line reduced the expression of the *PR* genes , as compared with the nontransgenic rice. Furthermore , the plants of overexpressing transgenic lines exhibited high tolerance to PXO99 , but there were not significantly different between the RNAi plants and the wild type. These results indicated that *OsCERK2* overexpressing gene may be an effective way to disease tolerance of rice.

Key words: *OsCERK2*; transgenic; chitin; *PR* gene; plant disease tolerance