

刘丽丽,陈银霞,聂蔚丹,等. LRR-RLKs 参与番茄抗根结线虫病途径中的功能分析与验证[J]. 江苏农业科学,2024,52(4):63-71.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2024.04.009

LRR-RLKs 参与番茄抗根结线虫病途径中的功能分析与验证

刘丽丽,陈银霞,聂蔚丹,冯成嵩,王超楠,杨中敏,杜 崇

(新疆农业大学园艺学院,新疆乌鲁木齐 830052)

摘要:前期以对南方根结线虫(*Meloidogyne incognita*)具有热稳定抗性的野生秘鲁番茄 LA3858(*Mi-3/Mi-3*)为试材,采用不同土壤温度处理形成抗感态,进行转录组测序(RNA-seq)。本研究以该测序数据为依托,筛选出 8 个编码 LRR-RLKs 的差异表达基因(DEGs)并进行相关分析与功能验证。结果表明,目标 LRR-RLKs 基因分布在番茄的 1 号、2 号、3 号、5 号、7 号和 8 号染色体上,编码蛋白均被定位于细胞膜上;在目标 LRR-RLKs 中,只有编码 *Solyc07g055810.3* 的氨基酸是碱性氨基酸;组织特异性表达分析发现,*Solyc05g056370.3* 在栽培番茄 Heinz1706 根部较其他基因高水平表达,并且接种线虫后,该基因在 LA3858 抗病材料根部响应迅速,24 h 内积累水平明显高于其他基因;同时,系统进化树分析发现,*Solyc05g056370.3* 所在分组大部分蛋白与油菜素类信号传导、细胞死亡控制、发病机制等免疫防卫进程相关;进一步 VIGS 功能验证揭示,*Solyc05g056370.3* 正向调控番茄对根结线虫的抗性。综上,*Solyc05g056370.3* 参与番茄介导抗病并正反馈响应防卫进程,是很有价值的抗性改良资源,因此,该基因的深入挖掘对后续番茄抗根结线虫病新材料的选育具有理论指导意义。

关键词:LRR-RLK;番茄;抗病;根结线虫;VIGS

中图分类号:S436.412 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2024)04-0063-08

富亮氨酸重复类受体蛋白激酶(LRR-RLK)是植物中最大的一类跨膜类受体蛋白^[1],通过胞外信号分子与胞外区结构域特异结合,激活胞内激酶域完成跨膜信号的转导^[2-3]。LRR-RLKs 胞外区的显著特点是含有串联排列的 LRR 结构,参与蛋白质间的相互作用^[4]。随着研究的深入,LRR-RLKs 在作物抗病途径中的功能也被相继挖掘。

在番茄中单独或共同沉默 2 个 LRR-RLKs,基因 *SISERK3A* 和 *SISERK3B*,导致植株对致病菌株 *Pst* DC3000 的敏感性增强^[5];在马铃薯中沉默 *NbSerK3* 后植株表现出对晚疫病更强的敏感性,说明马铃薯对晚疫病的基础抗性依赖该 LRR-RLK 的调控^[6];在水稻中超表达 *OsSERK1* 提高了对稻瘟病菌的抗

性,该基因编码的 LRR-RLK 可由水杨酸、茉莉酸和脱落酸诱导,从而正向调控水稻对真菌感染的防御反应^[7];在小麦中沉默 *TaSERK1*,发现该基因能正向调控对条纹锈病的抗性,同时该基因编码的 LRR-RLK 蛋白可与 TaDJA7 相互作用并磷酸化,而沉默 *TaDJA7* 再次增强了小麦对条纹锈病的敏感性,表明 TaSERK1-TaDJA7 复合体共同正反馈调节小麦植株对条纹锈病的抗性水平^[8]。

根结线虫病是作物重大土传病害之一^[9],其侵染通常导致植株根部出现根瘤^[10],降低植株对水分和养分的吸收,该病害一般可导致作物减产 20%~30%,严重时可减产 50%~70%,甚至绝收^[11]。笔者前期选用抗根结线虫病秘鲁番茄材料 LA3858(*Mi-3/Mi-3*),通过设置不同土温(25℃和 34℃)形成抗感态,利用 RNA-seq 筛选差异表达基因,最终发现 8 个 LRR-RLKs 基因在植株根部差异表达显著。本研究在此基础上,对目标 LRR-RLKs 进行生物信息学分析,通过基因克隆结合功能验证,鉴定出有价值的目标基因,旨在后期对其分子机制进行解析,以期为番茄优质种质资源的抗性改良提供夯实的理论依据。

收稿日期:2023-05-28

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金青年基金(编号:2022D01B95);2020 年新疆维吾尔自治区“天池博士计划”项目(编号:390000017);新疆维吾尔自治区重点研发计划子课题(编号:2022B02032-2)。

作者简介:刘丽丽(1998—),女,河南周口人,硕士研究生,研究方向为番茄分子遗传育种。E-mail:206346559@qq.com。

通信作者:杜 崇,博士,硕士生导师,主要从事番茄分子遗传育种研究。E-mail:godv2018@163.com。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验于 2023 年 3 月在新疆农业大学园艺学院蔬菜生物技术实验室开展。供试材料是对根结线虫表现出高抗的番茄材料 LA3858 ($Mi-3/Mi-3$) 和 Motelle ($Mi-1/Mi-1$), 由番茄遗传资源中心 (TGRC) 惠赠; 南方根结线虫由笔者所在团队多年纯化积累所得; $pTRV1$ 、 $pTRV2$ 克隆质粒由笔者所在实验室自行克隆保存。

1.2 试验方法

1.2.1 根结线虫的培养 将带有根结的番茄病根用 1% ~ 3% NaClO 洗涤 2 ~ 3 min, 随后用蒸馏水流动洗涤 15 min。从清洗后的根结表面挑取成熟的卵块并置于含有适量蒸馏水的无菌培养皿中; 每个培养皿中的卵块数为 100 ~ 150 个。最后将卵块密封于 28 °C 培养箱中避光培养。3 d 后, 提取线虫悬液, 计算浓度并接种^[12]。

1.2.2 $LRR-RLKs$ 的无缝克隆 利用 Trizol 法提取材料根部 RNA, 反转录合成 cDNA, 以 $BamH I$ 为酶切位点设计各带有 15 bp 重组同源臂的特异性上下游引物, 对以上基因 CDS 区进行 PCR 扩增, 运用无缝克隆构建 $pTRV2-LRR-RLKs$ 重组载体。质粒构建后, 进行感受态大肠杆菌 DH5 α 转化, 挑取单克隆菌落在含有卡那霉素 (Kan) 的 LB 固体培养基上划线并进行菌落 PCR 鉴定, 筛选阳性克隆送到华大基因进行测序, 随后在 NCBI 中 BLAST 鉴定。

1.2.3 $LRR-RLKs$ 染色体定位及蛋白结构分析 用软件 MapChart 进行 $LRR-RLKs$ 染色体定位并可视化; 运用在线网站 CELLO (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>) 进行亚细胞定位预测; 利用在线分析软件 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 对编码 $LRR-RLKs$ 的氨基酸进行理化性质分析; 利用 Sopma (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 和数据库 Swiss-Model 进行蛋白质的二级结构和三级结构预测。

1.2.4 $LRR-RLKs$ 系统进化树分析 从 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 得到与 $LRR-RLKs$ 同源的拟南芥和水稻氨基酸序列, 运用 MEGA 11 软件构建系统发育树。系统发育树采用邻接法 (NJ) 构建, 参数设置: 自展值 (bootstrap) 设为 500, 遗传距离计算模型选择 P-distance, partition deletion =

50%, 其余参数默认。

1.2.5 $LRR-RLKs$ 组织特异性表达分析及根部表达模式验证 利用在线网站 BAR (<http://bar.utoronto.ca/>) 收录的番茄基因表达数据库, 对目标基因在番茄 Heinz1706 根、叶组织中的表达水平进行分析; 选取 4 叶 1 心时期的 LA3858 番茄植株, 室温下接种南方根结线虫, 采集未接种和接种后 12、24 h 阶段的根部, 提取总 RNA, 反转录 cDNA, 对目标 $LRR-RLKs$ 设计 RT-qPCR 引物, 采用 $\Delta\Delta C_T$ 法进行根部表达模式鉴定^[13]。

1.2.6 病毒诱导的基因沉默 (virus induced gene silencing, VIGS) 植株的获取与初步功能验证 对质粒 $pTRV2$ 进行 $BamH I$ 位点单酶切, 对目标 $LRR-RLKs$ 的 CDS 编码区设计带有 20 bp 同源臂的特异性引物, 进行 PCR 扩增, 运用“1.2.1”节中的方法构建沉默表达载体。将制备好的农杆菌侵染液 ($pTRV1$ 、 $pTRV2$ - 目标基因) 进行叶片侵染, 每个处理 25 株, 待接种 15 ~ 20 d, 对目标基因表达量进行检测, 选取沉默效率在 50% 以上的番茄植株与 CK ($pTRV2$ 空载) 各 10 株进行根结线虫接种, 标准为 1 500 头 2 龄幼虫 (J2)/株, 并进行抗病性鉴定。

病情指数 (DI) = Σ (各病级 \times 各级株数) / (最高病级 \times 总调查株数) $\times 100$ 。对接种线虫的番茄材料进行抗性级别的划分, 即免疫 (I): $DI = 0$; 高抗 (HR): $0 < DI \leq 20$; 中抗 (MR): $20 < DI \leq 40$; 抗病 (R): $40 < DI \leq 60$; 感病 (S): $60 < DI \leq 80$; 高感 (HS): $DI > 80$ ^[14]。

2 结果与分析

2.1 $LRR-RLKs$ 基因的无缝克隆鉴定

依据前期 RNA-seq 数据基因表达水平差异 ($|\log_2 FC| \geq 1$)^[15], *Solyc03g005960.3*、*Solyc02g072480.3*、*Solyc08g061560.3*、*Solyc01g107650.3*、*Solyc07g055810.3*、*Solyc05g056370.3*、*Solyc02g071800.3* 和 *Solyc05g014240.3* 共 8 个编码 $LRR-RLKs$ 的 DEGs 被筛选出来, 成功无缝克隆后 (图 1), 进行测序比对。利用 NCBI 和 SGN 数据库对序列进行注释, 明确了 8 个目标基因分别编码 At1g53420、At3g47570、ERECTA、At4g37250、At1g07650、At5g63710、At1g53430 以及 At1g67720。

2.2 $LRR-RLKs$ 基因的染色体定位

利用 MapChart 进行 $LRR-RLKs$ 染色体定位分析, 结果 (图 2) 表明, 8 个 $LRR-RLKs$ 分别分布在番茄的 6 条染色体上, 其中 *Solyc02g071800.3* 和

Solyc02g072480.3 定位在 2 号染色体上;
Solyc05g014240.3 和 *Solyc05g056370.3* 定位在 5 号
染色体上; *Solyc01g107650.3*、*Solyc03g005960.3*、
Solyc07g055810.3 以及 *Solyc08g061560.3* 分别定位
在 1 号、3 号、7 号和 8 号染色体上;其余染色体未有

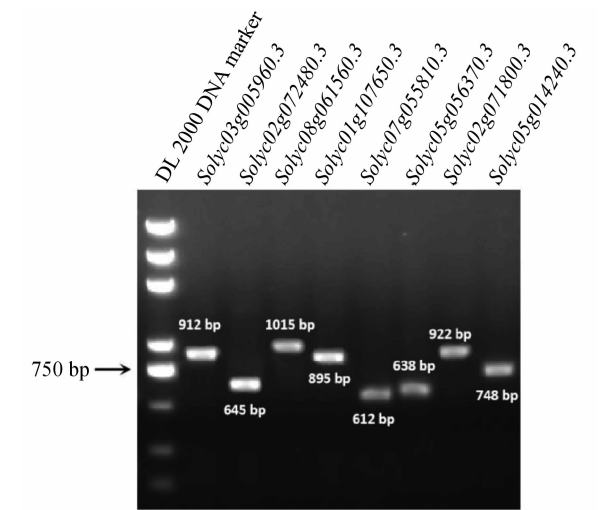


图1 目标*LRR-RLKs* 菌液 PCR 鉴定结果

目标基因分布。

2.3 LRR – RLKs 蛋白结构分析

LRR – RLKs 编码氨基酸理化性质分析结果(表 1)表明,8 个 LRR – RLKs 均定位于细胞膜,理论等电点显示只有编码 *Solyc07g055810.3* 的氨基酸是碱性氨基酸,其余 7 个 LRR – RLKs 均为酸性氨基酸;除了编码 *Solyc05g056370.3* 的氨基酸为不稳定氨基酸,其余 LRR – RLKs 稳定性均 < 40%,为稳定氨基酸;脂溶指数在 80 ~ 110 之间,除了编码 *Solyc02g072480.3* 的氨基酸为疏水氨基酸,其余 LRR – RLKs 亲水性指数均 < 0,属于亲水氨基酸。蛋白质二级结构预测显示,目标 LRR – RLKs 由 α 螺旋、 β 转角、延伸主链和无规则卷曲 4 个部分组成,无其他亚结构,且比例各不相同,目标 LRR – RLKs 中 α 螺旋和无规则卷曲所占组分最多,分别在 27.65% ~ 41.40% 和 39.12% ~ 48.38% 之间(图 3 – A),侧面说明 α 螺旋和无规则卷曲是目标 LRR – RLKs 二级结构组成的主要形式,而 β 转角和延伸主链可能起到修饰和辅助作用,从而共同参与

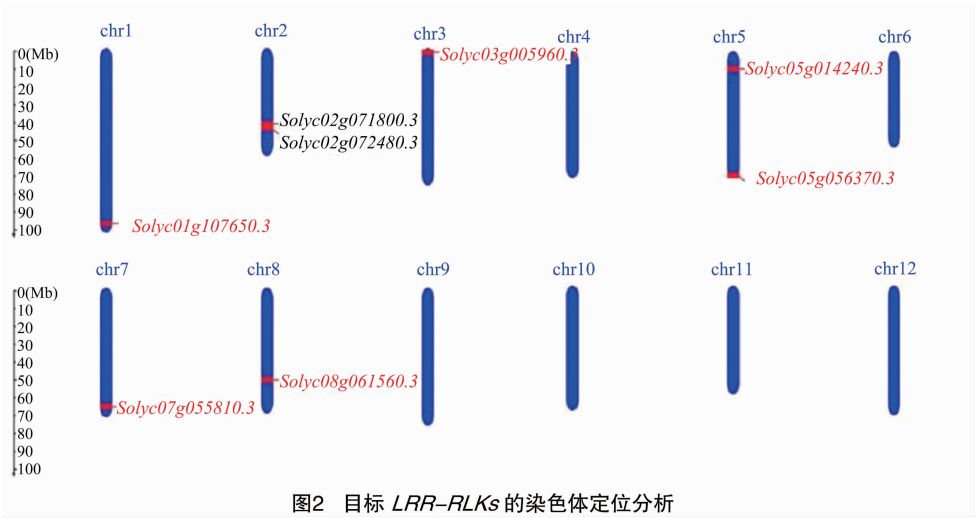


图2 目标 *LRR-RLKs* 的染色体定位分析

表 1 目标 *LRR – RLKs* 编码氨基酸的重要理化性质分析

基因	氨基酸长度	分子质量 (ku)	理论等电点 (pI)	稳定性 (%)	脂溶指数	亲水性指数	亚细胞定位
<i>Solyc03g005960.3</i>	997	112 183.15	6.02	37.97	93.07	–0.231	细胞膜
<i>Solyc02g072480.3</i>	1 186	130 737.53	6.64	37.58	105.38	0.041	细胞膜
<i>Solyc08g061560.3</i>	990	108 901.41	5.80	34.93	106.05	–0.014	细胞膜
<i>Solyc01g107650.3</i>	771	84 526.99	5.83	34.00	91.52	–0.213	细胞膜
<i>Solyc07g055810.3</i>	1 027	113 310.08	8.47	31.88	94.93	–0.090	细胞膜
<i>Solyc05g056370.3</i>	616	68 939.87	6.64	40.69	96.88	–0.176	细胞膜
<i>Solyc02g071800.3</i>	880	97 660.96	5.98	35.67	89.84	–0.279	细胞膜
<i>Solyc05g014240.3</i>	926	103 366.23	5.88	38.57	85.59	–0.267	细胞膜



A. 蛋白质二级结构组分分析

名称	模型	模型质量	全局得分	多聚体	配体	蛋白注释
Solyc03g005960.3		0.16	0.40 ± 0.05	单体	无配体	体积调节阴离子通道亚基 LRRCS8
Solyc02g072480.3		0.38	0.62± 0.05	单体	无配体	富含亮氨酸重复受体样蛋白激酶 PEPRI
Solyc08g061560.3		0.46	0.79± 0.05	单体	无配体	LRR受体样丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 ERL2
Solyc01g107650.3		0.21	0.57± 0.05	单体	无配体	白细胞介素-1受体相关激酶
Solyc07g055810.3		0.20	0.65± 0.05	单体	无配体	LRR受体样丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 FLS2
Solyc05g056370.3		0.43	0.78± 0.05	单体	无配体	油菜素类固醇不敏感1相关受体激酶1
Solyc02g071800.3		0.22	0.66± 0.05	单体	1 × MG-螯离子	刀豆蛋白a样凝集素蛋白激酶家族蛋白
Solyc05g014240.3		0.21	0.69± 0.05	单体	无配体	共生受体激酶 SymRK

B. 蛋白质三级结构预测

图3 目标 LRR-RLKs 蛋白质高级结构预测

后期蛋白复杂构象的形成,发挥特异性功能^[16]。蛋白质三级结构建模结果(图 3 - B)表明,目标 LRR - RLKs 与模板的比对质量均在 0 ~ 4 之间,全局得分的绝对值均在 0 ~ 4 之间,说明比对模板可信^[17];目标 LRR - RLKs 均不能形成同源二聚体,其中 Solyc02g071800.3 含有镁离子配体,其余 7 个均没有配体结合域;功能注释表明,Solyc05g056370.3 属于油菜素类固醇相关受体激酶,广泛参与植物抗病等各种生理过程^[18]。

2.4 LRR - RLKs 系统进化树分析

利用 NCBI 数据库进行 BLAST 鉴定,筛选并获得与目标 LRR - RLKs 同源性较强的 26 个拟南芥 LRR - RLKs,17 个水稻 LRR - RLKs,以及本研究中的 8 个 LRR - RLKs,共 51 个 LRR - RLKs 蛋白序列

构建系统发育树。结果(图 4)显示,这些 LRR - RLKs 被分为 5 组(I ~ V),其中 V 组成员最多,有 17 个,Solyc02g072480.3 和 Solyc08g061560.3 被分到该组;I 和 IV 组成员最少,均有 6 个成员,其中 I 组成员主要来自于拟南芥,而 Solyc05g014240.3 和 Solyc01g107650.3 分别分布在 I 和 IV 组;III 组成员数量有 13 个,Solyc07g055810.3、Solyc03g005960.3 和 Solyc02g071800.3 被分在该组,其中 Solyc03g005960.3 和 Solyc02g071800.3 同源性最高,推测它们的功能相近;Solyc05g056370.3 被单独分在 II 组,与拟南芥中的 Solyc05g056370.3 的同源性最高,前期报道该蛋白可能参与油菜素类信号传导、细胞死亡控制、发病机制等多种生理过程^[19]。

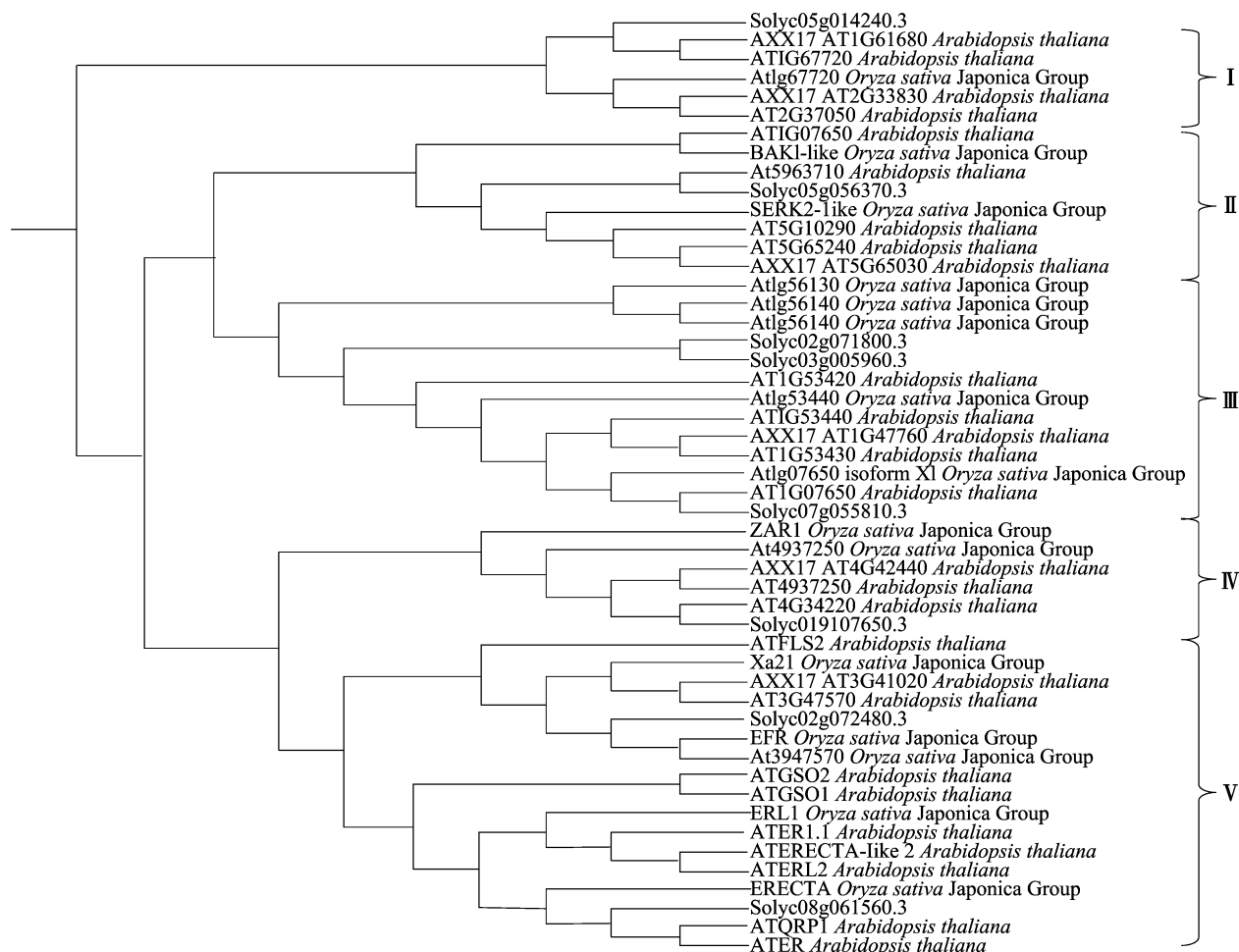


图4 目标 LRR-RLKs 与拟南芥、水稻中同源 LRR-RLKs 的系统发育树分析

2.5 LRR - RLKs 组织特异性表达分析和根部响应模式验证

利用在线网站 BAR 收录的番茄基因表达数据库,对目标 LRR - RLKs 在番茄 Heinz1706 根、叶组织

中的表达水平进行分析。结果(图 5 - A)表明,Solyc03g005960.3 和 Solyc02g072480.3 在根、叶组织的表达水平都很低甚至不表达;Solyc08g061560.3 在叶片部位表现出特异性表达特征;除此之外,

Solyc07g055810.3、*Solyc05g056370.3*、*Solyc02g071800.3* 以及 *Solyc05g014240.3* 在根、叶均呈现较高的表达水平,尤其以 *Solyc05g056370.3* 在根中的表达水平最高,侧面反映其很有可能在番茄植株的根部发挥功能^[20],这在线虫侵染后根部表达模式上得到了证明。利用 RT-qPCR 对各 *LRR-RLKs* 在线虫接种

后不同阶段进行表达水平测定。结果(图 5-B)发现,*Solyc05g056370.3* 在接种线虫后 6 h 迅速响应,表达量上调至 2.4 倍,较大多数基因在 12 h 的积累水平要高,而待接种时间达到 24 h,*Solyc05g056370.3* 的表达差异达到了最高的 3.67 倍。

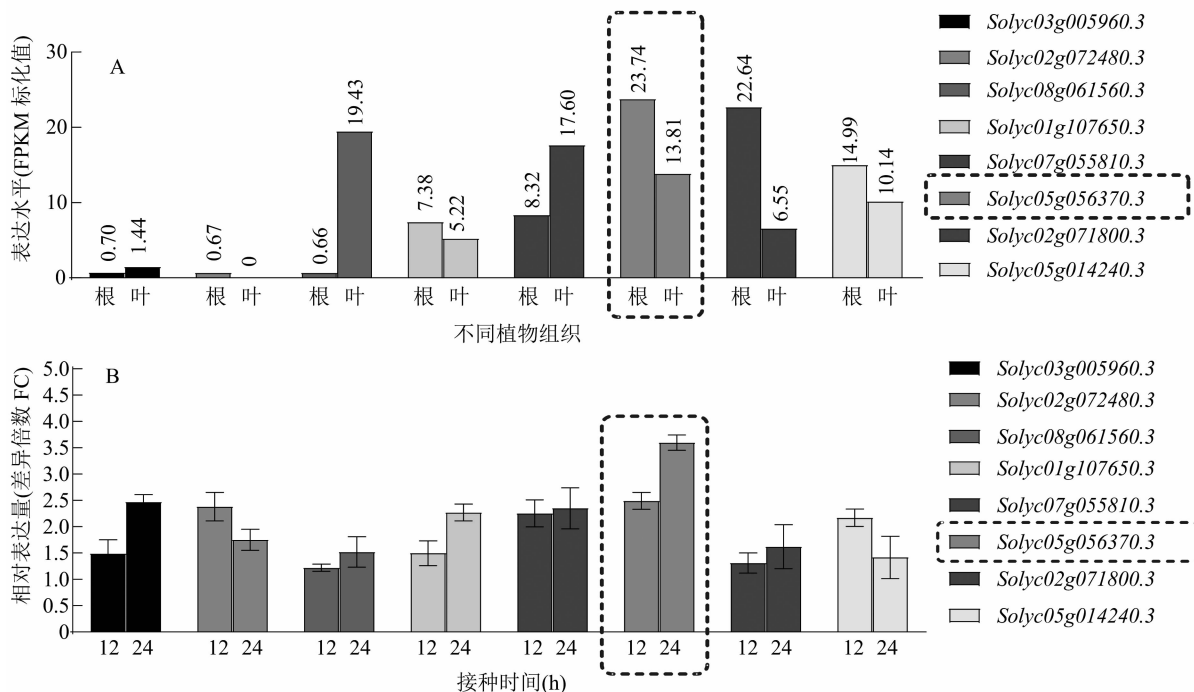


图5 目标 *LRR-RLKs* 组织特异性表达(A)和根部响应模式验证(B)

2.6 *Solyc05g056370.3* 在番茄防卫根结线虫病中的初步功能验证

通过无缝克隆构建 *pTRV2-Solyc05g056370.3* 重组载体,PCR 鉴定阳性克隆(图 6-A),通过农杆菌转染 *Motelle(Mi-1/Mi-1)* 番茄抗病材料,获取 *Solyc05g056370.3* 表达量下降 50% 以上的沉默植株(图 6-B),室温下接种南方根结线虫,鉴定其抗病性。结果(图 7)表明,*Solyc05g056370.3* 沉默后,*Mi-1* 番茄根部的根结数量相对于对照显著增多,病情指数(DI)由 3.4 上升至 46.3,最终植株抗性等级(RL)由高抗态(HR)转变为抗病态(R),反映了沉默株系的易感能力增强,说明 *Solyc05g056370.3* 在番茄抗根结线虫病过程中起到积极的正反馈调节作用。

3 讨论与结论

LRR-RLKs 在植物中的作用丰富多样,本研究通过前期 RNA-seq 分析数据,获得差异表达的目标 *LRR-RLKs* 基因,随后进行生物信息学分析、基因表达模式验证及 VIGS 鉴定,从而初步了解其生

物学功能。

对 8 个 *LRR-RLKs* 编码氨基酸进行理化性质分析发现,编码 *Solyc02g072480.3* 的氨基酸为疏水氨基酸,编码 *Solyc07g055810.3* 的是碱性氨基酸,而编码 *Solyc05g056370.3* 的为不稳定氨基酸,其余目标氨基酸均为亲水性稳定酸性氨基酸。*RLKs* 是许多信号识别传递途径中的关键组分^[21],作为识别信号的质膜受体能够感受外界刺激,通过磷酸化作用参与胞内信号传递^[22],本研究中的 *LRR-RLKs* 均被定位在细胞膜上,作为膜受体蛋白发挥功能。二级结构预测分析发现,目标 *LRR-RLKs* 的组分差异不明显;三级结构预测发现,*Solyc05g056370.3* 蛋白属于油菜素类固醇相关受体激酶,而这类激酶广泛参与植物抗逆、抗病等进程^[18]。

组织表达模式分析发现,目标 *LRR-RLKs* 基因在栽培番茄植株的根、叶中均有不同程度的表达,其中 *Solyc05g056370.3* 在根和叶中呈现较高的表达水平,尤其在根中较其他基因表达量高,表明该基因很可能在上述组织中行使重要的生物学功能^[11]。

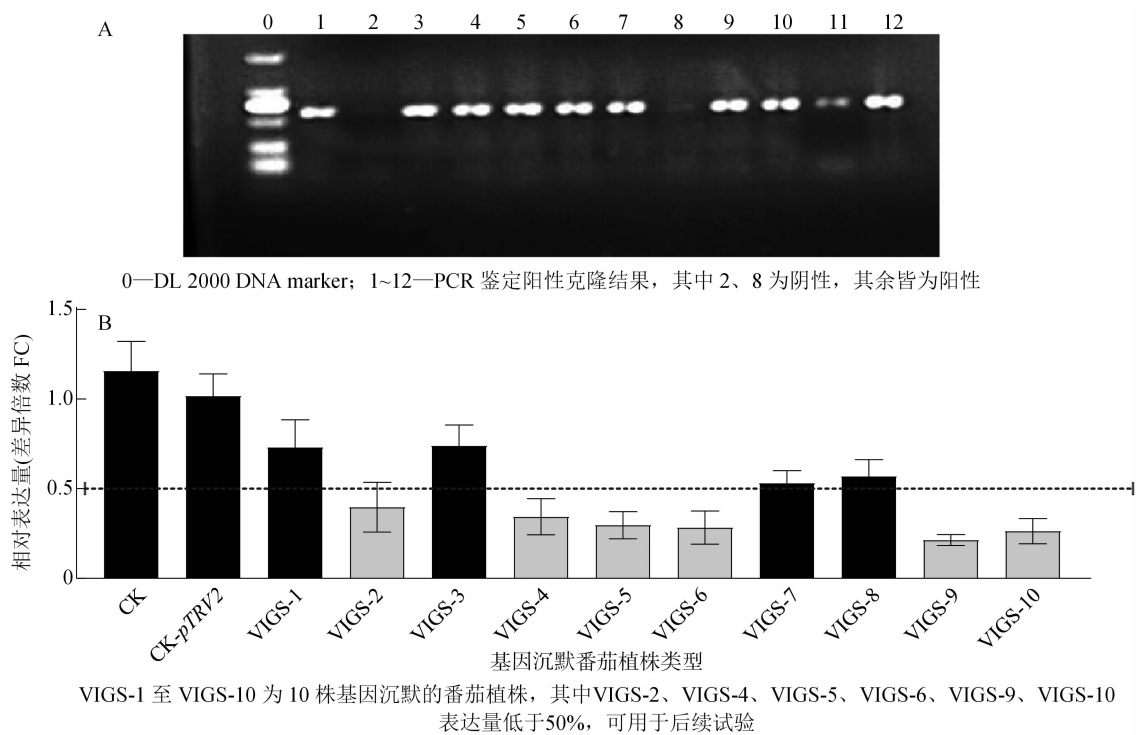


图6 部分 *Solyc05g056370.3* 重组载体 PCR 鉴定(A)及 VIGS 沉默效率鉴定(B)

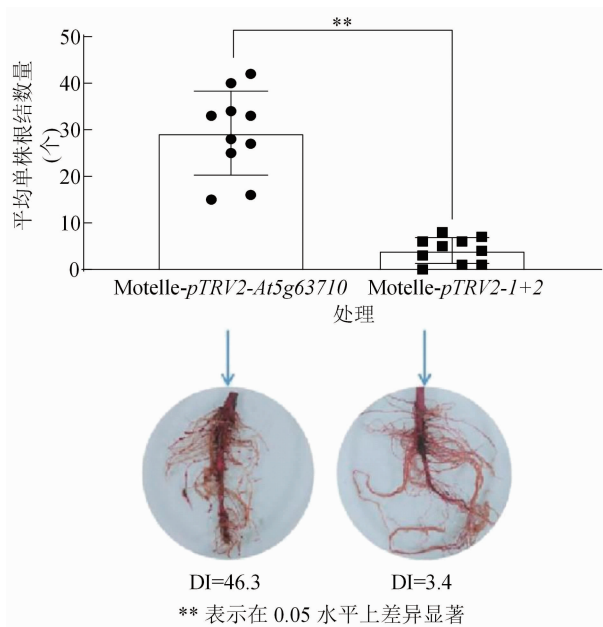


图7 *Solyc05g056370.3* 沉默后植株根结数量统计

接种线虫后，根部表达模式验证进一步说明，*Solyc05g056370.3* 在线虫入侵时响应迅速，在 24 h 的积累水平高于其他基因，说明 *Solyc05g056370.3* 可能积极参与番茄对根结线虫的防卫；进化树分类把 *Solyc05g056370.3* 分在第Ⅱ组，该组成员大多参与植物的抗病调节过程。其中目标 *Solyc05g056370.3* 与拟南芥中的 *Solyc05g056370.3* 同源性最高，除此之外，拟南芥中的 *At5g10290*、

At5g65240、水稻中的 *SERK2-like* 和 *BAK1* 也和目标 *Solyc05g056370.3* 具有较好的同源关系。前人研究表明，拟南芥 *Solyc05g056370.3*、*At5g10290* 和 *At5g65240* 分别编码 *SARK*、*SERK1-5* 和 *NIK1-2* 蛋白^[23]，其中，*SARK* 在控制细胞死亡、发病机制和花粉发育等多种生理过程中发挥相关功能^[24]，而 *SERK1-5* 在拟南芥中参与油菜素类信号传导^[25]；*NIK1* 在拟南芥抵抗病毒和细菌病原体方面发挥作用^[19]；*SERK2-like* 沉默的水稻植株表现出形态改变以及对油菜素内酯的敏感性降低，进一步发现 *SERK2* 通过 *XA21*、*XA3* 和 *FLS2*（免疫受体）的介导，正向调控水稻免疫反应^[26]；而水稻 *BAK1* 蛋白可通过与 *NADPH* 氧化酶 *RbohD* 直接互作促进活性氧（*ROS*）的产生^[27]，同时 *BAK1* 也可被 *flg22* 激活后磷酸化，并激活 2 个 Ca_2^+ 通道蛋白进而促进 *ROS* 的积累^[28]，*ROS* 是植物最早的免疫反应标志之一，适量的 *ROS* 水平有助于植物产生超敏反应（*HR*）抵御病原菌的侵染^[29-30]。因此，笔者推测番茄中的 *Solyc05g056370.3* 基因所编码的 *LRR-RLK* 可能在抵御生物胁迫方面同样发挥作用，可能介导多样的信号传导途径参与番茄防卫根结线虫的入侵。为了确定其反馈调节方式，利用 VIGS 发现 *Solyc05g056370.3* 沉默的植株根部对线虫的敏感性增强，根结数量增加，植株整体抗病水平由高抗态

(HR)转变为抗病态(R),证明了 *Solyc05g056370.3* 正向参与番茄对于根结线虫病的抵抗。

本研究通过对筛选出的 8 个 LRR-RLKs 进行生物信息学分析,并结合组织特异性表达分析和根部响应模式验证发现, *Solyc05g056370.3* 很可能参与番茄抗根结线虫病的进程;VIGS 功能验证进一步说明,该基因编码的 LRR-RLK 蛋白正反馈调节植株的抗性。因此, *Solyc05g056370.3* 功能的深入挖掘及分子机制的探究为番茄抗病种质的创制具有较好的应用价值。

参考文献:

- [1] Zhu Q F, Feng Y Z, Xue J, et al. Advances in receptor-like protein kinases in balancing plant growth and stress responses[J]. *Plants*, 2023, 12(3): 427.
- [2] Man J, Harrington T, Lally K, et al. Asymmetric evolution of protein domains in the leucine-rich repeat receptor-like kinase (LRR-RLK) family of plant developmental coordinators[J/OL]. *bioRxiv*, 2023(2023-03-13)[2023-05-28]. <https://doi.org/10.1101/2023.03.13.532436>.
- [3] Chen T S. Identification and characterization of the LRR repeats in plant LRR-RLKs[J]. *BMC Molecular and Cell Biology*, 2021, 22(1): 9.
- [4] Walker J C. Structure and function of the receptor-like protein kinases of higher plants[J]. *Plant Molecular Biology*, 1994, 26(5): 1599-1609.
- [5] Peng H C, Kaloshian I. The tomato leucine-rich repeat receptor-like kinases SlSERK3A and SlSERK3B have overlapping functions in bacterial and nematode innate immunity[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e93302.
- [6] Chaparro-Garcia A, Wilkinson R C, Gimenez-Ibanez S, et al. The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is required for basal resistance against the late blight pathogen *Phytophthora infestans* in *Nicotiana benthamiana*[J]. *PLoS One*, 2011, 6(1): e16608.
- [7] Hu H, Xiong L, Yang Y. Rice *SERK1* gene positively regulates somatic embryogenesis of cultured cell and host defense response against fungal infection[J]. *Planta*, 2005, 222(1): 107-117.
- [8] Shi Y F, Bao X Y, Song X P, et al. The leucine-rich repeat receptor-like kinase protein TaSERK1 positively regulates high-temperature seedling plant resistance to *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* by interacting with TaDJA7[J]. *Phytopathology*, 2023, 113(7): 1325-1334.
- [9] Karssen G, Van Aelst A. Root-knot nematode perineal pattern development: a reconsideration[J]. *Nematology*, 2001, 3(2): 95-111.
- [10] Aydınlı G, Kurtar E S, Mennan S. Screening of *Cucurbita maxima* and *Cucurbita moschata* genotypes for resistance against *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita*, *M. javanica*, and *M. luci*[J]. *Journal of Nematology*, 2019, 51(1): 1-10.

- [11] 马少军, 刘佳伟, 金玉华, 等. 兵团第十四师四十七团设施蔬菜根结线虫种类鉴定[J]. *新疆农垦科技*, 2022, 45(4): 37-39.
- [12] Du C, Jiang J B, Zhang H, et al. Transcriptomic profiling of *Solanum peruvianum* LA3858 revealed a *Mi-3*-mediated hypersensitive response to *Meloidogyne incognita*[J]. *BMC Genomics*, 2020, 21(1): 250.
- [13] Koppel R, Bucher T B. Duplex real-time PCR for the determination of wasabi (*Eutrema wasabi*) contents in horseradish (*Armoracia rusticana*) products applying the $\Delta\Delta C_T$ -method[J]. *European Food Research and Technology*, 2016, 242(7): 1111-1115.
- [14] Taylor A L, Sasser J N. Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.)[J/OL]. [2023-05-28]. https://www.researchgate.net/publication/303264394_Biology_Identification_and_control_of_Root-knot_Nematodes_Meloidogyne_spp.
- [15] Mutz K O, Heilkenbrinker A, Lönne M, et al. Transcriptome analysis using next-generation sequencing[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2013, 24(1): 22-30.
- [16] Banach M, Konieczny L, Roterman I. Secondary and supersecondary structure of proteins in light of the structure of hydrophobic cores[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2019, 1958: 347-378.
- [17] Schwede T, Kopp J, Guex N, et al. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server[J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(13): 3381-3385.
- [18] Clouse S D. Molecular genetic studies confirm the role of brassinosteroids in plant growth and development[J]. *Plant Journal*, 2010, 10: 1-8.
- [19] Li B, Ferreira M A, Huang M L, et al. The receptor-like kinase NIK1 targets FLS2/BAK1 immune complex and inversely modulates antiviral and antibacterial immunity[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 4996.
- [20] Takeuchi H, Higashiyama T. Tip-localized receptors control pollen tube growth and LURE sensing in *Arabidopsis*[J]. *Nature*, 2016, 531(7593): 245-248.
- [21] Sakamoto T, Deguchi M, Brustolini O J B, et al. The tomato RLK superfamily: phylogeny and functional predictions about the role of the LRR-II-RLK subfamily in antiviral defense[J]. *BMC Plant Biology*, 2012, 12: 229.
- [22] Brustolini O J B, Silva J C F, Sakamoto T, et al. Bioinformatics analysis of the receptor-like kinase (RLK) superfamily[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2017, 1578: 123-132.
- [23] 魏志蓉. 番茄(亨氏 1706)富含亮氨酸重复序列类受体蛋白激酶基因家族生物信息学与表达分析[D]. 天津: 天津大学, 2016: 56-78.
- [24] 王亚南, 孟涛, 徐凡, 等. GmSARK^{LRR}过表达拟南芥衰老相关的表型分析与分子鉴定[J]. *南开大学学报(自然科学版)*, 2021, 54(5): 82-87.
- [25] Wu W Z, Wu Y J, Gao Y, et al. Somatic embryogenesis receptor-like kinase 5 in the ecotype *Landsberg erecta* of *Arabidopsis* is a functional RD LRR-RLK in regulating brassinosteroid signaling and cell death control[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 852.

徐 娅,黄佑岗,李树杏. 水稻核糖体失活蛋白家族基因 *OsRIP8* 的生物信息学与功能分析[J]. 江苏农业科学,2024,52(4):71-79.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2024.04.010

水稻核糖体失活蛋白家族基因 *OsRIP8* 的生物信息学与功能分析

徐 娅,黄佑岗,李树杏

(贵州省农业科学院水稻研究所,贵州贵阳 550006)

摘要:核糖体失活蛋白(RIPs)是一种能使真核细胞核糖体功能被抑制的毒蛋白。*OsRIP8* 是属于该家族的一个功能未知基因。为研究该基因生物学功能,通过数据库对其进行生物信息学分析,利用 qRT-PCR 验证其表达模式,同时构建 *OsRIP8*-RNAi 干涉载体并利用农杆菌转化水稻,采用 PCR 技术鉴定出转基因阳性植株,分析阳性植株的表达和农艺性状,初步揭示该基因的功能。结果表明,水稻 *OsRIP8* 蛋白为不稳定亲水蛋白,不含信号肽及完整的跨膜结构域,蛋白结构以 α 螺旋为主;在 *OsRIP8* 基因启动子区域存在着与植物生长发育、生物与非生物胁迫以及植物激素响应有关的元件;*OsRIP8* 基因的共表达基因富集到多种大分子的生物合成与蛋白代谢等途径;qRT-PCR 分析结果表明,*OsRIP8* 基因在发育的小穗及抽穗前 1 d 的花药中优先表达;RNAi 干涉后 *OsRIP8* 基因的表达下调造成植株花粉育性和结实率显著降低。暗示该基因对水稻小穗的发育具有重要作用,可能参与调控花粉发育过程。

关键词:水稻;核糖体失活蛋白;生物信息学分析;功能分析;基因表达

中图分类号:S511.01 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2024)04-0071-09

核糖体失活蛋白(RIPs)是一类通过去除核糖体 RNA 的腺嘌呤残基从而使核糖体结构被破坏无法正常结合蛋白质合成时的延伸因子,进而导致蛋白质生物合成受抑制的一类毒蛋白,大部分存在于植物体中^[1]。根据核糖体失活蛋白的大小、结构及组成,一般将 RIPs 分为 3 个类型^[2]。第 I 类分子量

约为 30 ku,为单肽链,具有 RNA *N*-糖苷酶活性,该类型分布最为广泛,但由于缺少与细胞结合的配体 B 链而不能进入细胞内,对无细胞结构系统的蛋白合成有抑制作用,对完整细胞的毒性很小^[3]。第 II 类分子量约为 60 ku,由 A 链和 B 链组成,其中 A 链与 I 型 RIPs 的多肽链相似,B 链具有凝集素(lectin)活性,能识别并结合细胞膜上的特异受体^[4]。第 III 类 RIPs 是先合成无活性前体,经酶解加工后产生 2 个大小分别为 16.5、8.5 ku 的亚基,该类型 RIPs 较为少见,仅在玉米和大麦中被鉴定出来^[5-6]。诸多研究发现,RIPs 对病毒、真菌和昆虫均能产生抗性^[7-10],这为作物病虫害防治提供了新的解决思路,故而 RIPs 的功能研究受到植物抗病虫害领域研究者的普遍关注。

早期已报道的 RIPs 多以烟草为受体植物进行

收稿日期:2023-04-12

基金项目:贵州省科学技术基金(编号:黔科合基础[2020]1Z020);
贵州省农业科学院青年科技基金(编号:黔农科院青年基金[2019]01号);贵州省科技计划(编号:黔科合支撑[2022]重点028号);贵州省水稻研究所青年基金(编号:黔水稻所青年基金[2021]018号)。

作者简介:徐 娅(1991—),女,贵州贵阳人,硕士,助理研究员,研究方向为水稻生殖发育生物学。E-mail:xu_ya_1991@163.com。

通信作者:李树杏,硕士,正高级农艺师,研究方向为水稻栽培生理学。E-mail:24406882@qq.com。

[26] Alvy R I, Mubassir M H M. Effect of D128N mutation on OsSERK2 in Xa21 mediated immune complex; an in-silico study[J/OL]. bioRxiv, 2022(2022-11-30)[2023-05-28]. <https://doi.org/10.1101/2022.11.30.518629>.

[27] Upadhyay S K. Calcium channels, OST1 and stomatal defence; current status and beyond[J]. Cells, 2022, 12(1):127.

[28] Tian W, Hou C C, Ren Z J, et al. A calmodulin-gated calcium channel links pathogen patterns to plant immunity[J]. Nature, 2019, 572(7767):131-135.

[29] Zafari S, Vanlerberghe G C, Igamberdiev A U. The role of alternative oxidase in the interplay between nitric oxide, reactive oxygen species, and ethylene in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants incubated under normoxic and hypoxic conditions[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(13):7153.

[30] Wang J, Nan N, Shi L L, et al. *Arabidopsis* BRCA1 represses RRTF1-mediated ROS production and ROS-responsive gene expression under dehydration stress[J]. New Phytologist, 2020, 228(5):1591-1610.