

水稻 β -石竹烯合成酶基因 *OsCAS* 的克隆鉴定、 原核表达及其遗传转化

戈林泉^{1,2}, 周国鑫¹, 王祺¹, 祝树德², 娄永根¹

(1. 浙江大学 农业与生物技术学院 昆虫科学研究所, 浙江 杭州 310029; 2. 扬州大学 园艺与植物保护学院, 江苏 扬州 225009)

摘要:为阐明水稻 β -石竹烯在调节水稻、害虫及其天敌相互关系中的作用,克隆鉴定了一个水稻 β -石竹烯合成酶基因 *OsCAS*,并对其原核表达与遗传转化进行研究.该基因的 cDNA 全长 1731 bp,包含一个 1728 bp 的开放阅读框,编码一个由 576 个氨基酸组成的蛋白,预测分子量 66.5 kDa.系统进化树分析表明,水稻 *OsCAS* 基因编码蛋白的氨基酸序列与同为单子叶植物玉米的 β -石竹烯合成酶氨基酸序列同源性达 99%,而与其他植物(拟南芥、青蒿、黄瓜)的同源性仅 51%.褐飞虱为害和茉莉酸处理能明显上调 *OsCAS* 基因的表达水平.同时原核表达了 *OsCAS* 基因,并利用农杆菌转化系统获得 *OsCAS* 基因过量表达和 RNAi 的水稻品系,为分析 *OsCAS* 基因的生化与生物学功能奠定了基础.

关键词:水稻; β -石竹烯合成酶; 褐飞虱; *OsCAS*; 原核表达; 遗传转化

中图分类号: Q962 **文献标识码:** A

GE Lin-quan^{1,2}, ZHOU Guo-xin¹, WANG Qi¹, ZHU Shu-de², LOU Yong-gen¹ (1. Institute of Insect Sciences, College of Agriculture & Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; 2. School of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

Cloning and prokaryotic expression of rice gene encoding β -caryophyllene synthase and its genetic transformation. Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci.), 2009, 35(4): 365-371

Abstract: To elucidate the role of β -caryophyllene emitted from rice plants in mediating interactions among rice, herbivores and their natural enemies, a rice β -caryophyllene synthase gene *OsCAS* was cloned, expressed in *E. coli* and over-expressed or silenced in rice plants using an *Agrobacterium*-based transformation system. The gene *OsCAS*, a 1731 bp cDNA, contains an open reading frame of 1728 bp, which encodes a protein of 576 amino acids with a calculated molecular weight of 66.5 kDa. Phylogenetic tree analysis showed that the putative rice *OsCAS* had a high amino acid identity (99%) to maize (*Zea mays*) β -caryophyllene synthase, whereas a low amino acid identity (51%) to those in other plants including *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), *Artemisia* (*Artemisia annua*) and cucumber (*Cucumis sativus*). Infestation by rice brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stål) or jasmonic acid treatment enhanced significantly the expression levels of *OsCAS* gene. The recombinant *OsCAS* protein was expressed in *E. coli* and rice lines with over-expression or RNAi

收稿日期: 2008-06-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30671376); 教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目(NCET-04-0534); 浙江省科技厅资助项目(2006C22003; 2006C30040).

作者简介: 戈林泉(1981—), 男, 江西抚州人, 硕士研究生, 主要从事昆虫化学生态学研究. E-mail: lqge1027@163.com.

通讯作者: 娄永根, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事昆虫与植物互作的化学与分子生态学研究. Tel: 0571-86971622; E-mail: yglou@zju.edu.cn.

silencing of *OsCAS* gene were obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation, which laid a foundation for elucidating the biochemical and ecological functions of *OsCAS*.

Key words: *Oryza sativa* L.; β -caryophyllene synthase; *Nilaparvata lugens* (Stål); *OsCAS*; prokaryotic expression; genetic transformation

萜类化合物是植物体内的一类重要代谢产物,包括单萜、倍半萜、二萜、三萜、多萜等。除了在植物生长、发育中起着重要作用外,萜类化合物还在植物的抗逆反应中发挥着重要作用。如植物在受植食性昆虫攻击时,可产生更多的挥发性或非挥发性萜类化合物,这些化合物一方面可影响植食性昆虫及其天敌的寄主寻找行为,另一方面则可能直接影响植食性昆虫的生长发育与繁殖^[1-3]。

β -石竹烯是一类倍半萜,已有研究表明, β -石竹烯在植物的诱导防御反应中起着重要作用。如水稻在受茉莉酸或茉莉酸甲酯处理后能增加 β -石竹烯的释放量,并且该萜类化合物能对稻飞虱卵期的重要寄生蜂稻虱缨小蜂(*Anagrus nilaparvatae* Pang et Wang)产生明显的引诱作用^[4-5]。玉米在受到叶片害虫棉贪夜蛾(*Spodoptera littoralis*)或根部害虫玉米根萤叶甲(*Diabrotica virgifera virgifera*)为害时,能分别从叶片和根部释放 β -石竹烯,并引诱两种害虫各自的寄生蜂(*Cotesia marginiventris*)和寄生线虫(*Heterorhabditis megidis*)^[6-7]。然而, β -石竹烯在水稻整体的直接和间接防御反应中究竟起着什么作用,如 β -石竹烯除了能对稻虱缨小蜂产生引诱作用外,对其他天敌与害虫是否也会产生影响,至今尚不清楚。本文报道水稻 β -石竹烯合成酶基因*OsCAS*的克隆鉴定、原核表达、诱导表达特征及其RNAi与过量表达转基因品系的建立,为阐明水稻 β -石竹烯在调节水稻、害虫及其天敌相互关系中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 水稻品种

试验用水稻品种为秀水 11。水稻种子于温控培养箱催芽 2~3 d 后,均匀播种于塑料盆

(长 40.0 cm×宽 28.0 cm×高 6.5 cm)内,置于温室[(28±2) °C]中培养 2~3 周后移栽到塑料盆(直径 17 cm,高 9 cm)中,每盆移栽 2 株。水稻苗在(28±2) °C、光周期 12 L:12 D 温室中生长,每隔 2 d 浇一次水,每周施浓度为 1 g·L⁻¹的尿素水溶液 10 mL。秧龄为 40 d 左右的秧苗供实验用。

1.2 褐飞虱

褐飞虱[*Nilaparvata lugens* (Stål)]虫源采自浙江大学实验农场稻田,在人工气候室内[温度(28±2) °C,相对湿度 80%,光周期 12 L:12 D]以汕优 63 稻苗进行群体繁殖。1~2 代后的褐飞虱供实验用。

1.3 水稻处理

取上述盆栽水稻,去掉黄叶和小分蘖,3 d 后对水稻进行 2 种处理:1) 褐飞虱为害(BPH)。在每根稻苗茎秆上、下 2 个部位固定 2 个 parafilm 做成的小袋(长 6 cm×宽 5 cm),每个小袋上用解剖针刺 60 个小孔,在每根稻苗茎秆上各接 15 头短翅褐飞虱雌成虫(7~8 头·小袋⁻¹)。以在相同部位固定 2 个空的 parafilm 袋作为对照稻苗。2) 茉莉酸处理(JA)。用浓度为 100 μ g·mL⁻¹的茉莉酸溶液对水稻进行喷雾,每株 2 mL。茉莉酸溶液的配制是先用少量乙醇溶解,然后用 50 mmol·L⁻¹的 Na₂HPO₄ 缓冲液(用 1 mol·L⁻¹的柠檬酸滴定至 pH 8.0)配成相应的浓度。以喷雾相同体积 50 mmol·L⁻¹ Na₂HPO₄ (pH 8.0) 缓冲液的水稻苗作为对照。处理后水稻置于人工气候室内[(28±2) °C,相对湿度 80%,光周期 12 L:12 D],分别于不同时间取样。

1.4 水稻 *OsCAS* 基因的克隆与序列分析

RNA 提取采用北京鼎国化学试剂公司的试剂盒,具体步骤按试剂盒的使用说明进行。以水稻总 RNA 为模板,按照 Promega 公司 cDNA 合成试剂盒提供的方法合成 cDNA 第

一链.根据已知的水稻 β -石竹烯合成酶基因(AK241679)序列,在开放阅读框两端设计1对特异性引物,AKF1:5'-AT GGTACC ATG GCA ACC TCT GTT CCG AGT-3和AKR1:5'-GC GGATCC TT AAA CAG AGA GGA TGT AGA-3(下划线分别为 *KpnI* 和 *BamHI* 酶切位点).PCR总体积为20 μ L,其中cDNA 1 μ L,正反向引物各2 μ L,10 \times Buffer 2 μ L,dNTPs(2 mmol \cdot L⁻¹) 2 μ L,Taq DNA聚合酶(5 U \cdot μ L⁻¹) 0.2 μ L,ddH₂O 10.8 μ L.PCR反应条件为:95 $^{\circ}$ C变性2 min,然后94 $^{\circ}$ C 40 s,68 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 2 min,循环16次(退火温度每一个循环后降1 $^{\circ}$ C);再94 $^{\circ}$ C 40 s,50 $^{\circ}$ C 40 s,72 $^{\circ}$ C 2 min,循环20次,最后72 $^{\circ}$ C延伸10 min.PCR产物用琼脂糖凝胶回收试剂盒(购自上海申能博彩公司)纯化后,克隆进pMD19-T Easy载体(大连TaKaRa公司),命名为pMD19-T^{OsCAS}.对目的片段进行测序(上海申能博彩公司).应用Mega 3.1软件,对已报道的植物 β -石竹烯合成酶基因构建系统进化树.

1.5 水稻 *OsCAS* 基因的诱导表达特征分析

分别对褐飞虱为害稻株及其对照稻株在处理0、1和12 h取样,所取样品为2个parafilm小袋包裹处的水稻叶鞘,各取0.5 g.对茉莉酸处理及其对照稻株分别在处理后0、1和24 h取样,所取样品为水稻植株第3叶(由心叶开始计,完全展开叶片为第一叶,其余叶片以此类推),各取0.3 g.样品由液氮迅速冷冻后,-80 $^{\circ}$ C保存.分别提取各样品的总RNA,然后以Northern杂交分析 β -石竹烯合成酶基因的表达水平.

Northern分析以pMD19-T^{OsCAS}质粒为模板,以正向引物5'-ATG GCA ACC TCT GTT CCG AGT-3和反向引物5'-TTA AAC AGA GAG GAT GTA GA-3扩增的水稻 β -石竹烯合成酶基因序列(1731 bp)作为探针,按照Rushton等^[8]的方法进行.

1.6 水稻 *OsCAS* 基因的原核表达

以pMD19-T^{OsCAS}为模板,以AKF2:5'-AT GAATTC ATG GCA ACC TCT GTT CCG AGT-3和AKR2:5'-GC GGATCC TTC AAA CAG AGA GGA TGT AGA-3(下划线分别为

*EcoRI*和*BamHI*酶切位点)为引物扩增*OsCAS*基因ORF序列.PCR产物经1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测,用DNA凝胶纯化回收试剂盒(上海申能博彩公司)回收目的片段.目的片段经*EcoRI*/*BamHI*在37 $^{\circ}$ C双酶切4 h,酶切产物经凝胶纯化回收后,克隆进经*EcoRI*/*BamHI*酶切的原核表达载体pET32a(+)(美国Novagen公司).阳性克隆经酶切和测序验证目的片段插入方向及序列正确性,并命名为pET32a(+)-*OsCAS*.将pET32a(+)-*OsCAS*转化原核表达宿主大肠杆菌BL21(DE3)(大连TaKaRa公司).再将含有pET32a(+)-*OsCAS*的BL21(DE3)细菌接种于5 mL LB培养液(含50 μ g \cdot mL⁻¹卡那霉素)中,37 $^{\circ}$ C摇床(180 r \cdot min⁻¹)培养过夜.取2 mL过夜菌液接种到50 mL LB培养液中,37 $^{\circ}$ C振荡培养3~4 h至OD₆₀₀为0.6左右,加入终浓度为1 mmol \cdot L⁻¹的IPTG(isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside,异丙基- β -D-硫代半乳糖苷)进行诱导表达,对照不用IPTG诱导.37 $^{\circ}$ C继续振荡培养,分别在3、4和5 h后取样,将诱导和对照培养液于4 $^{\circ}$ C下离心(10000 g)收集菌体,加入适量的1 \times binding Buffer(5 mmol \cdot L⁻¹ imidazole,0.5 mol \cdot L⁻¹ NaCl,20 mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl,pH 7.9)悬浮后,置于冰浴中超声波破碎(超声波仪,SANYO Soniprep 150).破碎条件为:处理20次,每次15 s,间隔50 s.破碎后的样品在4 $^{\circ}$ C条件下12000 g离心15 min,上清液留用,再经变性处理后在12% SDS-PAGE胶上电泳.

1.7 水稻 *OsCAS* 基因的遗传转化

1.7.1 过量表达和RNAi载体的构建 过量表达载体的构建.以pMD19-T^{OsCAS}为模板,以AKF1和AKR1为引物扩增*OsCAS*基因ORF序列1731 bp,与1.6相同的方法回收目的片段,并将目的片段克隆进pCAMBIA1301质粒.阳性克隆经酶切分析验证目的片段插入方向及序列正确性,命名为pCAMBIA1301-*OsCAS*.采用热击法,将pCAMBIA1301-*OsCAS*转入农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)EHA105菌株(美国Novagen公司)经菌落PCR鉴定后获得阳性克隆,备用.

RNAi载体的构建.以pMD19-T^{OsCAS}为模

板,以 AKF3:5'-TC GTCGAC ATT TTA GAA CGT CTT TGC AT-3'和 AKR3:5'-AT GGTACC ATG CTT GTT CCC TTG GAG TT-3'(下划线分别为 *SalI* 和 *KpnI* 酶切位点)为引物,扩增出 *OsCAS* 基因 800 bp 的片段.与 1.6 相似的方法回收目的片段,经 *SalI/KpnI* 双酶切 4 h,克隆进经 *SalI/KpnI* 双酶切的 pMECE 载体中.阳性克隆经质粒酶切分析验证目的片段插入方向及序列正确性,命名为 pMECE-*OsCASR*.以 pMD19-T^{*OsCAS*} 为模板,以 AKF4:5'-AT CCCGGG ATT TTA GAA CGT CTT TGC AT-3'和 AKR4:5'-GC TCTAGA ATG CTT GTT CCC TTG GAG TT-3'(下划线分别为 *SmaI* 和 *XbaI* 酶切位点)为引物,扩增出 800 bp 的片段.回收目的片段,以 *SmaI/XbaI* 双酶切 4 h,克隆进经 *SmaI/XbaI* 双酶切的 pMECE-*OsCASR* 载体中,阳性克隆经酶切分析验证目的片段插入方向及序列正确性,命名为 pMECE-CASRL.采用热击法,将 pMECE-CASRL 转入农杆菌 EHA105 菌株,经菌落 PCR 鉴定后获得阳性克隆,备用.

1.7.2 农杆菌介导的遗传转化 农杆菌介导的遗传转化参考 Hier 等^[9]的方法进行.简单地说,挑取 1.7.1 中的重组农杆菌接种到 LB 液体培养基中,于 28 °C、250 r·min⁻¹ 条件下培养至 OD₆₀₀ 值为 0.4~0.7 左右(一般需要 2~3 d).然后将水稻愈伤组织置于菌液中,浸染 30 min.用灭菌滤纸吸干水稻愈伤组织表面菌液,于 25 °C 条件下暗培养 3 d,然后进行抗性愈伤筛选.对抗性愈伤组织预分化培养与分化培养,最后对转基因苗进行生根培养与炼苗.

2 结 果

2.1 水稻 *OsCAS* 基因的克隆与序列分析

以 AKF1 和 AKR1 为引物,扩增出水稻 *OsCAS* 基因的 cDNA 序列.该 cDNA 全长 1731 bp,编码 1 个由 576 个氨基酸组成的蛋白.推测分子量为 66.5 kDa,等电点为 5.27.序列比对结果表明,其核苷酸序列与 GenBank 中水稻 β-石竹烯合成酶基因(AK241679)同源性

达到 99.9%,氨基酸序列同源性为 99.8%.确定克隆的 cDNA 序列为 β-石竹烯合成酶基因序列(图 1).

构建水稻 *OsCAS* 编码蛋白氨基酸序列与其他植物中的 β-石竹烯合成酶氨基酸序列的系统进化树(图 2).从进化树可以看出,水稻 *OsCAS* 编码蛋白与拟南芥、青蒿、黄瓜等植物中的 β-石竹烯合成酶的氨基酸序列同源性为 51%,而与同为单子叶植物玉米的 3 个 β-石竹烯合成酶 ZmCAS23、ZmCAS10 和 ZmCAS4 的同源性达到 99%.

2.2 水稻 *OsCAS* 基因的诱导表达特征

Northern 分析结果表明,水稻 *OsCAS* 基因的表达水平在褐飞虱取食为害后 1 和 12 h 明显上调,茉莉酸处理后 1 和 24 h 亦明显提高(图 3).

2.3 水稻 *OsCAS* 基因的原核表达

通过 12% SDS-PAGE 电泳及考马斯亮蓝染色,发现在 IPTG 诱导表达 3、4 和 5 h 后,携带重组质粒 pET32a(+)-*OsCAS* 的 *E. coli* 菌株中存在 87.5 kDa 大小的一明显蛋白条带,而携带空质粒 pET32a(+)-的细菌中无相应蛋白条带(图 4).由于融合蛋白中 His 标签及质粒序列带来的氨基酸约为 21.0 kDa,因此所表达的蛋白条带大小与 *OsCAS* 预测的 66.5 kDa 基本一致.

2.4 水稻 *OsCAS* 基因的遗传转化

利用转基因方法获得 *OsCAS* 抑制或过量表达的水稻品系,对于阐明该基因主要产物 β-石竹烯在水稻抗虫反应中的作用具有重要意义.为此,构建了 *OsCAS* 基因过量表达与 RNAi 载体.获得的过量表达载体 pCAMBIA1301-*OsCAS* 经 *KpnI* 和 *BamHI* 双酶切(图 5A)及测序验证为正确插入;获得的 RNAi 载体 pMECE-*OsCASRL*,经 *SalI* 和 *SmaI* 双酶切(图 5B)及测序验证为正确插入;两者均置于 CaMV 35S 启动子下并由其驱动表达.将过量表达载体 pCAMBIA1301-*OsCAS* 和 RNAi 载体 pMECE-*OsCASRL* 分别转入农杆菌 EHA105 菌株,阳性克隆经菌落 PCR 验证后,分别进行水稻遗传转化,获得 *OsCAS* 基因过量表达或 RNAi 水稻品系(图 6).

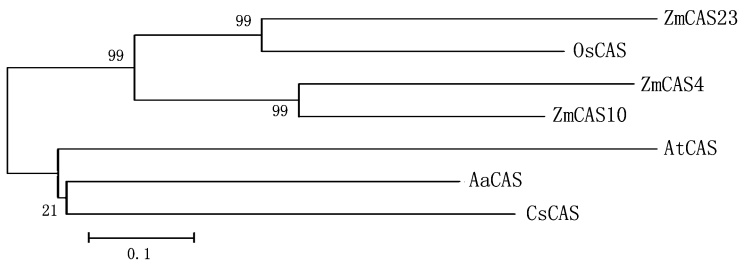
```

1  ATGGCAACCTCTGTT  CCGAGTGTACTACTA  CTACCTGTGCCTACC  TGCACCGATATGCTA  GTCTACCAGTAGAA  GGAGGAGATCTGCTG
   M A T S V P S V L L L P V P T C T D M L V S P V E G G D L L 30
91  CACTGTAACCCCACT  TTIGATCACCATCCT  AATGTCTGGGGCGAT  TACTTTCTTACCTTC  TCACCCCTGACTCCA  TCAATGCTTCTGAAT
   H C K P H F D H H P N V W G D Y F L T F S P C T P S M L L N 60
181 ATGAAGAGAAAAGCT  CATGTTCCGAGGAA  CAAGTGAAGAAGATG  ATACTTGAGTGTCT  TCTGGCCCAATTG  CACGTA AAACTTGAG
   M K R K A H V S E E Q V R R M I L E C S S G P N L H V K L E 90
271 CTCGTCGACACCTTA  GAACGCTTTGCATT  GACTACCACTACGAG  AAGGAGATTGAAAAT  GTGTTGCCCGGGTT  CATGAGGAAGAAGAC
   L V D T L E R L C I D Y H Y E K E I E N V L R R V H E E E D 120
361 GATACCGACAATCAC  TATGACCTCCACACT  ACAGCTCTCCGGTTC  TAICTGCTCAGGAAG  CATGGATACTATGCC  TCTCCAGATGTGTT
   D T D N H Y D L H T T A L R F Y L L R K H G Y Y A S P D V F 150
451 CAGAGTTCAGGGAC  GAGGAAGGAAATTC  ACACCGATGATAAC  AATAACGGCACAAGA  AGCATGCTGAGCTTG  TACAATGCTGCCCAT
   Q R F R D E E G N F T R D D N N N G T R S M L S L Y N A A H 180
541 CTCAGGATTCATGGG  GAGGAGATACTCGAC  GATGCTATCGTCTTC  ACTAGGAACTATTTG  CAGCTGTGGTAAAA  CATCTGCAGTCGCCA
   L R I H G E E I L D D A I V F T R N Y L Q S V V K H L Q S P 210
631 ATGGCGGACGAGGTG  TGCAGTGCACCTTAG  ACCCTCTTTTCAGG  AGGCCAAGAAGAGTT  GAAGCAAGGCCTACT  ATCTCAGTTTACGAC
   M A D E V C S A L R T P L F R R P R R V E A R H Y I S V Y D 240
721 AAGTTGCCACACGA  AATGAGACCATTTTG  GAGTTCGCCAAGCTC  GACTTTGGGATTTTG  CAATCTCTGTATTGC  GAGGAGCTCAATATC
   K L P T R N E T I L E F A K L D F G I L Q S L Y C E E L N I 270
811 CTCACCATGTGGTGG  AAAGAGCTCCAACCT  CAGGATCATCTAAGC  TTTGCGGAGATAGG  ATGGTGGAGATGCAC  TTTTGGATGCTTGG
   L T M W W K E L Q L Q D H L S F A R D R M V E M H F W M L G 300
901 GTTCTCTTCGAGCCT  CAGTACTCATATGGG  AGAACCATGCTCACT  AAATTGTTTCACTTT  GTCTCGATTTTCGAT  GACATCTACGACAAC
   V L F E P Q Y S Y G R T M L T K L F I F V S I F D D I Y D N 330
991 TACAGCACCTTGAAA  GAAAGCAAGCTGTT  ACAGAAGCAATTGAA  AGATGGGATGAGGAA  GCCGCTGAAGAAGCT  CCAGGCTACATGAAG
   Y S T L E E S K L F T E A I E R W D E E A A E E L P G Y M K 360
1081 TTCTTCTACAAGAAA  GTACTGACCACCATG  AAATCCATAGAAACT  GATCTTAACTCCAA  GGAACAAGCATGTC  GACTATGTCAAAAAC
   F F Y K K V L T T M K S I E T D L K L Q G N K H V D Y V K N 390
1171 CTATTAATCGACGCT  ACGAGATGCTTTTAC  AACGAGGTGAAATGG  CGCTCTGAAGGTGCA  GATCAGGTAGCTGCT  ACGGTGGAGGAGCAC
   L L I D A T R C F Y N E V K W R S E G A D Q V A A T V E E H 420
1261 CTCAAGATTTCAGTG  CCAAGCAGCTGCTGC  ATGCACGTCCTGTC  TACGCCTTCGTCGCC  ATGGGAAACGATGTC  ACAACCGATGATGCT
   L K I S V P S S C C M H V P V Y A F V A M G N D V T T D D A 450
1351 ATCAACTGGGGCATG  GCCTACCCCAAGATC  ATCACAATCTTCTGC  ATCGTTGGCCGATTA  CTCATGACATAGCT  TCACATGAGAGAGAG
   I N W G M A Y P K I I T S S C I V G R L L N D I A S H E R E 480
1441 CAAGGGTCTTCGTCG  TCGTCTGCTGTCGAC  GTGGAAGCCTGCATG  AGGGAGCACGGCGGC  ATCACGAAGGAGGAA  GCCTACGCGAAGCTG
   Q G S S S S S S S T V E A C M R E H G G I T K E E A Y A K L 510
1531 AGGGAGCTCGTGAG  GAGTCATGGATGGAC  ATCGCCGGGAGTGT  CTCGGCCGGCGGGC  GCTCAGCCGGCGCG  CTGCTGGAGGCGGTC
   R E L V E E S W M D I A G E C L R P A A A Q P P P L L E A V 540
1621 GTCAACGCCACACGC  GTGCTGGATTTGCTC  TACAAGCAGACCAA  GATGCATACACTCAT  CCAAGTTCGCTCAAG  GATACAATACACTCC
   V N A T R V L D F V Y K D D Q D A Y T H P S S L K D T I H S 570
1711 ATCTACATCTCTCT  GTTTAA
      I Y I L S V *

```

图 1 水稻 *OsCAS* 基因的全长 cDNA 和推测的氨基酸序列

Fig. 1 Rice *OsCAS* full-length cDNA and its deduced amino acid sequence



供分析的植物 β -石竹烯合成酶基因包括玉米 *ZmCAS23* (EU259641)、玉米 *ZmCAS10* (EU259639)、玉米 *ZmCAS4* (EU259642)、水稻 *OsCAS* (AK241679)、青蒿 *AaCAS* (AF472163)、拟南芥 *AtCAS* (AF472361)、黄瓜 *CsCAS* (AY640155)。

图 2 水稻 *OsCAS* 蛋白与其他植物已知的 β -石竹烯合成酶的系统进化树分析

Fig. 2 Phylogenetic tree analysis of rice *OsCAS* protein with other characterized plant β -caryophyllene synthases

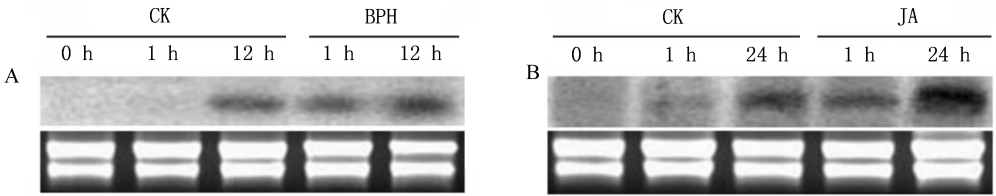


图 3 褐飞虱为害(A)或茉莉酸处理(B)后不同时间水稻 *OsCAS* 基因表达水平的 Northern 分析

Fig. 3 Northern analysis of expression levels of rice gene *OsCAS* at different time after plants were infested by rice brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stål) (BPH) (A) or treated by jasmonic acid (JA) (B)

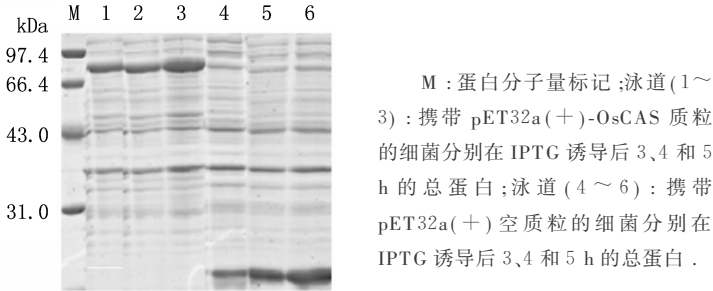
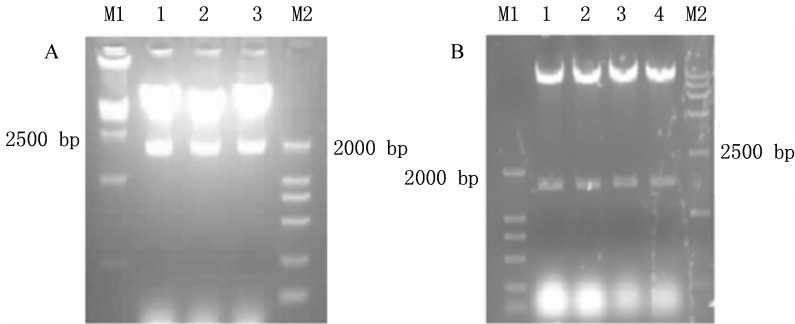


图 4 水稻 *OsCAS* 基因原核表达的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig. 4 Electrophoresis analysis of prokaryotic expression of rice gene *OsCAS*



M1, M2: DNA 分子标记; A: 泳道(1~3): *Kpn*I, *Bam*HI 酶切 pCAMBIA1301-*OsCAS* 质粒; B: 泳道(1~4): *Sal*I, *Sma*I 酶切 pMECE-*OsCASRL* 质粒.

图 5 pCAMBIA1301-*OsCAS*(A)和 pMECE-*OsCASRL* (B)质粒的酶切鉴定

Fig. 5 Enzyme digestion of recombinant plasmid pCAMBIA1301-*OsCAS* (A) and pMECE-*OsCASRL* (B)

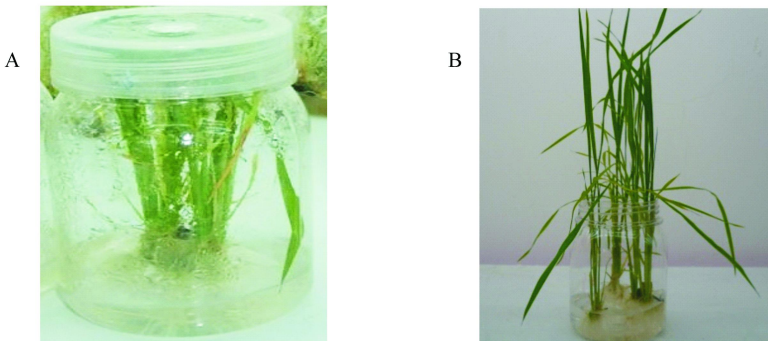


图 6 水稻 *OsCAS* 基因过量表达(A)与 RNAi(B)的水稻品系

Fig. 6 Rice lines with over-expression (A) or RNAi silencing (B) of rice gene *OsCAS*

3 讨论

植物的诱导防御反应是一个植物识别植食性昆虫特异性激发子,从而激活相关信号转导途径、转录因子,提高防御基因表达水平,并合成防御化合物的过程^[10-13]。在这一过程中,涉及到植物体内众多基因的表达与众多化合物的合成。要明确植物诱导防御反应产生的机理及其在调节昆虫与植物互作关系中的作用,则有必要对这一过程中重要基因及其相关产物的功能进行解析。

本研究结果表明,水稻的 β -石竹烯合成酶基因 *OsCAS* 与同为单子叶植物玉米中的3个 β -石竹烯合成酶基因有很高的同源性(99%),而与其他植物如拟南芥、青蒿、黄瓜等的 β -石竹烯合成酶基因同源性较低(51%)(图2)。同时,水稻 *OsCAS* 基因受褐飞虱为害与茉莉酸处理而诱导表达(图3)这与已报道的水稻^[5]和玉米的 β -石竹烯^[6-7]参与植物间接防御反应的结果一致。一个有趣的现象是,在对照植物的不同时间点,也发现了 *OsCAS* 表达水平的明显变化(图3)这说明包裹的 parafilm 小袋、 Na_2HPO_4 缓冲液等也可能诱导 *OsCAS* 转录水平的提高。另外,也可能与 *OsCAS* 表达水平自身的时间节律有关。具体的原因有待进一步深入研究。

本研究原核表达了 *OsCAS* 基因,并利用农杆菌转化系统获得了 *OsCAS* 基因过量表达或 RNAi 的 T0 代水稻品系,为阐明水稻 *OsCAS* 基因的生化功能及其主要产物 β -石竹烯在调节水稻、害虫及其天敌相互关系中的作用打下了基础。

References :

[1] Kappers I F, Aharoni A, van Herpen T W J M, et al. Genetic engineering of terpenoid metabolism attracts bodyguards to *Arabidopsis* [J]. **Science**, 2005, 309 : 2070-2072 .

[2] Karban R, Maron J, Felton G W, et al. Herbivore damage to sagebrush induces resistance in wild tobacco : evidence for eavesdropping between plants [J]. **Oikos**, 2003, 100 : 325-329 .

[3] Kessler A, Baldwin I T. Defensive function of

herbivore-induced plant volatile emission in nature [J]. **Science**, 2001, 391 : 2141-2144 .

[4] Lou Y G, Du M H, Turlings T C J, et al. Exogenous application of jasmonic acid induces volatile emissions in rice and enhances parasitism of *Nilaparvata lugens* eggs by the parasitoid *Anagrus nilaparvatae* [J]. **Journal of Chemistry Ecology**, 2005, 31 : 1985-2002 .

[5] Cheng A X, Xiang C Y, Chen X Y, et al. The rice (E)- β -caryophyllene synthase (*OsTPS3*) accounts for the major inducible volatile sesquiterpenes [J]. **Phytochemistry**, 2007, 68 : 1632-1641 .

[6] Rasmann S, Köllner T G, Degenhardt J, et al. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots [J]. **Nature**, 2005, 434 : 732-737 .

[7] Tobias G, Köllner T, Turling T C J, et al. A maize (E)- β -caryophyllene synthase implicated in indirect defense responses against herbivores is not expressed in most American maize varieties [J]. **Plant Cell**, 2008, 20(2) : 482-494 .

[8] Rushton P J, Torres J, Parniske M. Interaction of elicitor induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes [J]. **The EMBO Journal**, 1996, 5 (20) : 5690-5700 .

[9] Hier Y, Ohta S, Komari T, et al. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA [J]. **The Plant Journal**, 1994, 6 (2) : 271-282 .

[10] Arimura G, Kost C, Boland W. Herbivore-induced indirect plant defences [J]. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2005, 1734 : 91-111 .

[11] Bostock R M. Signal crosstalk and induced resistance : straddling the line between cost and benefit [J]. **Annual Review of Phytopathology**, 2005, 43 : 545-580 .

[12] Halitschke R, Gase K, Hui D, et al. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (lepidoptera, sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. VI. Microarray analysis reveals that most herbivore-specific transcriptional changes are mediated by fatty acid-amino acid conjugates [J]. **Plant Physiology**, 2003, 131 : 1894-1902 .

[13] Hui D, Iqbal J, Lehmann K, et al. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (lepidoptera, sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata* : V. microarray analysis and further characterization of large-scale changes in herbivore-induced mRNAs [J]. **Plant Physiology**, 2003, 131 : 1877-1893 .