

两个大豆品种转 *hrpZ_{psta}* 基因后代对大豆灰斑病的抗性分析

尹俊琦,王楠,周莹,卢实,吴楠,曲静,张卓,王丕武

(吉林农业大学 农学院,吉林 长春 130118)

摘要:大豆灰斑病是由真菌类病原菌引发的,能导致大豆植物体整株死亡的恶性植物病害。*hrpZ_{psta}* 基因所编码的激发子 harpin 蛋白,已被证实能够通过引起植物过敏反应来提高植株机体对多种病原菌的抗性。将含有 *hrpZ_{psta}* 基因的植物表达载体转化到大豆品种吉农 17 和吉农 29 中,以所得的 T₄ 代株系为试验材料,通过分子生物学方法与人工接菌方式对其进行检测。Southern blot 和 RT-PCR 鉴定结果表明 *hrpZ_{psta}* 基因能够在吉农 17 和吉农 29 的 T₄ 代转化株系中稳定的遗传和表达,并且转化植物后代对灰斑病病原菌的抗性较受体品种明显提高。此外,不同大豆受体品种对灰斑病的抗性存在差异。

关键词:大豆灰斑病;*hrpZ_{psta}* 基因;抗病性鉴定;抗性评价

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2013)01-0238-04

Analysis on Resistance to Frogeye Leaf Spot between Two Species of Transgenic Soybean Progenies with *HrpZ_{psta}* Gene

YIN Jun-qi, WANG Nan, ZHOU Ying, LU Shi, WU Nan, QU Jing, ZHANG Zhuo, WANG Pi-wu

(College of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: Soybean *Cercospora sojina* is caused by fungal pathogens, which lead to plant death. Protein harpin which coded by gene *hrpZ_{psta}* has been proved to elevate resistance for plants against several kinds of fungal pathogen by hypersensitive reaction. The recombinant expressed vector which contained *hrpZ_{psta}* gene had been transformed into two soybean cultivars, Jinong 17 and Jinong 29, and T₄ transgenic plants were identified both in molecular way and artificial inoculations. Southern blot and RT-PCR test showed that *hrpZ_{psta}* gene could inherit in T₄ transgenic plants steadily on the molecular level, and artificial inoculation test revealed the resistant ability to *Cercospora sojina* had been improved obviously. In addition, the resistance to frogeye leaf spot varied with soybean cultivars.

Key words: Soybean *Cercospora sojina*; *hrpZ_{psta}* gene; Screening for disease resistance; Evaluation of resistance

大豆灰斑病的病原菌为半知菌亚门中短胖孢属的大豆褐斑短胖孢菌 (*Cercospora sojina* Hara)^[1], 同疫霉根腐病一样是世界范围的大豆病害^[2]。该病害在中国的主要危害区域为东北三省^[3]。灰斑病对大豆植株地上各部位均能造成危害,以叶片和籽实最为严重,灰斑病爆发严重时可减产 50% 以上,而近年来我国大豆生产因灰斑病的发生而导致品质和产量的损失均在上亿元。

利用传统育种手段选育出的抗病品种,虽然在农艺性状表现上较为突出,但同时存在选育周期长、效率低、抗性退化快等缺陷。近年来,生物技术的发展以及转基因技术的普及,为抗病新品种的培育与种质资源的丰富提供了可能。将生物技术与传统育种方法相结合,不仅可以快速稳定地提高植物抗性,同时也能保证品种农艺性状的优良特性。因此,对抗病基因的发现与研究,便成了抗性育种的基础保证。

研究发现,源自于丁香假单胞菌的 *hrpZ* 基因可以编码产生 harpin 蛋白,该蛋白作用机理并不是直接针对于目标病原菌,而是刺激植物自身产生过敏反应(HR)^[4-7],从而达到抵御不利微生物侵害的目的。该反应效果已被证实能够激发并提高植物体对多种微生物病原菌的抗性,而这种自然的免疫机制可以促进植物抵抗一系列的细菌、真菌和病毒病害,赋予植物广谱抗病性。至 21 世纪初编码 harpin 蛋白的 *hrp* 基因家族陆续被分离和鉴定,主要包括 *hrpN*, *hrpM*, *hrpZ* 和 *popA* 等^[8-10],已在多种植物中进行了应用研究并取得了良好的抗病效果。

本试验选择 *hrp* 基因家族中的 *hrpZ_{psta}* 基因。通过花粉管通道法将该基因转化到吉农 17 和吉农 29 两个受体大豆中,对所得到的 T₄ 代植株运用 Southern blot 和 RT-PCR 方法检测 *hrpZ_{psta}* 基因的遗传稳定性,同时进行病原菌接菌试验,检测转基因大豆

收稿日期:2013-01-13
基金项目:转基因生物新品种培育重大专项(2011ZX08004-004)。
第一作者简介:尹俊琦(1987-),女,在读硕士,主要从事生物技术与作物遗传育种的研究。E-mail: yin_junqi@163.com。
通讯作者:王丕武(1958-),男,博士,教授,主要从事生物技术与作物遗传育种的研究。E-mail: peiwuw@yahoo.com.cn。

的抗病能力,为培育具有强抗灰斑病能力的新大豆种质奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 以大豆品种吉农 17 和吉农 29 为受体,利用重组表达载体 pCAMBIA1301-*hrpZ_{psta}* 进行转化,所得到的 T₄代株系,由本实验室培育。

1.1.2 菌种 大豆灰斑病菌株 CsJ-1,由吉林农业大学农学院病理教研室提供。

1.1.3 试剂 植物基因组提取试剂盒、PCR 分子检测所用试剂、Roche 公司的地高辛和检测试剂盒 (DIG DNA Labeling and Detectin Kit)、TaKaRa 公司的 RNAiso Plus 试剂盒、Fermentas 公司的 Revert Aid Frist Strand cDNA Cynthesis Kit 试剂盒。

1.2 方法

1.2.1 转化植株的分子生物学鉴定

(1)PCR 检测:利用 CWBIO 公司的植物基因组提取试剂盒提取吉农 17 和吉农 29T₄代转化植株的基因组 DNA,并对其进行 PCR 检测。扩增条件:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 40 s;54℃ 退火 40 s;72℃ 延伸 40 s,30 个循环;72℃ 延伸 10 min。然后用 1% 琼脂糖凝胶电泳对扩增结果进行检测。

(2)Southern blot 鉴定:提取 T₄代转化植株的 DNA 基因组,按照 Roche 公司的 DIG DNA Labeling and Detection Kit 操作步骤对基因组进行操作,验证 *hrpZ_{psta}* 基因在 T₄代植物基因组中的整合情况。

(3)RT-PCR 鉴定:提取 T₄代转化植株花前期至初花期的叶片部位总 RNA,按照 Fermentas 公司的 Revert Aid Frist Strand cDNA Cynthesis Kit 试剂盒的要求,合成相对应的 cDNA,以大豆 cDNA 为模板对外源基因进行体外扩增,总反应体系为 50 μL,反应条件 94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 40 s;49℃ 退火 40 s;72℃ 延伸 40 s,40 个循环;72℃ 延伸 10 min。利用 1% 的琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行分离验证,根据电泳结果来鉴定整合在 T₄代植物基因组中的 *hrpZ_{psta}* 基因在转录水平的表达情况。

1.2.2 大豆灰斑病的抗病性鉴定

(1)菌种的培养与保存:用高粱培养基对大豆灰斑病菌 CsJ-1 进行扩大培养。首先对高粱粒进行灭菌处理,然后接入试管斜面扩繁的病菌,置于 25~28℃ 恒温箱中培养,待病菌在高粱粒表面分布均匀,继续培养 15 d 后洗去菌丝晾干并准备接种。

(2)接种方法:选择花前期至初花期的大豆植株,采用叶面喷施法接种。接种前 3 d,保湿诱发产生新鲜孢子,用无菌水洗下孢子,加入 3% 的蔗糖,制成孢子悬浮液。当显微镜下 10×10 视野孢子数为 15 个时,便可进行全田全株喷雾接种。

接种后将植株置于鉴定设施内保湿 (RH 为 90%~100%)72 h,以后每天白天光照 14 h,正常管理,晚上继续保湿 (RH 为 80%~90%)。接种期间温度控制在 25℃ 左右。所有处理 5 次重复。

(3)病情调查:于接种后 15 d 左右进行病情调查。

根据《大豆灰斑病鉴定技术规范》调查每份鉴定材料全部株数的全株发病情况,根据病害症状描述,逐份材料进行调查,记载病情级别,计算病情指数 (DI)和平均严重度。并依据鉴定材料的病情指数确定其对灰斑病的抗性水平,划分标准见表 1。

表 1 大豆对灰斑病抗性评价标准
Table 1 Standard of soybean resistant evaluation for Frogeye leaf spot

病情指数 Disease index	抗性评价 Resistance evaluation
0	免疫 (IM)
≤2.0	高抗 (HR)
2.1~15.0	抗 (R)
15.1~40.0	中抗 (MR)
40.1~60.0	中感 (MS)
60.1~80.0	感 (S)
≥80.1	高感 (HS)

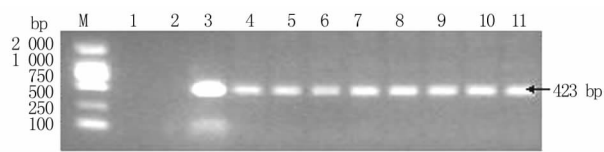
2 结果与分析

2.1 转化植株的分子生物学鉴定

2.1.1 PCR 检测 小量提取受体品种吉农 17 和吉农 29 及其 T₄代转化株系的基因组 DNA,选用 1301-*hrpZ_{psta}* 重组质粒为阳性对照,未转化的吉农 17 及吉农 29 为阴性对照,然后用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

由图 1 可知,吉农 17 和吉农 29 的 T₄代转化植株均出现与阳性对照位置相同的特异性条带。初步证明 *hrpZ_{psta}* 基因已稳定地遗传到转化植株 T₄代株系中。

2.1.2 Southern blot 鉴定 提取高纯度 PCR 检测呈阳性的 T₄代转化植株基因组 DNA,同时分别选用 1301-*hrpZ_{psta}* 重组质粒作阳性对照,未转化的吉农 17 及吉农 29 为阴性对照,利用限制性内切酶 *Hind* III 对 DNA 进行酶切,并通过 Southern blot 方法检测 *hrpZ_{psta}* 在植物基因组中的整合情况 (图 2,图 3)。

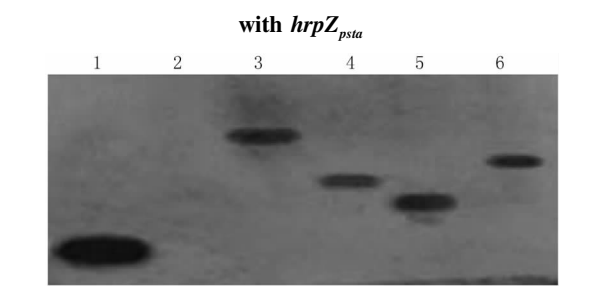


M:DL-2000;1:吉农 17;2:吉农 29;3:阳性对照;4~7:吉农 17 T₄代转化植株;8~11:吉农 29 T₄代转化植株

M:Marker DL-2000;1:Jinong 17;2:Jinong 29;3:Positive control;4-7:T₄ transgenic plants of Jinong 17;8-11:T₄ transgenic plants of Jinong 29

图 1 T₄代转基因大豆 PCR 检测

Fig. 1 PCR detection of T₄ transgenic plants

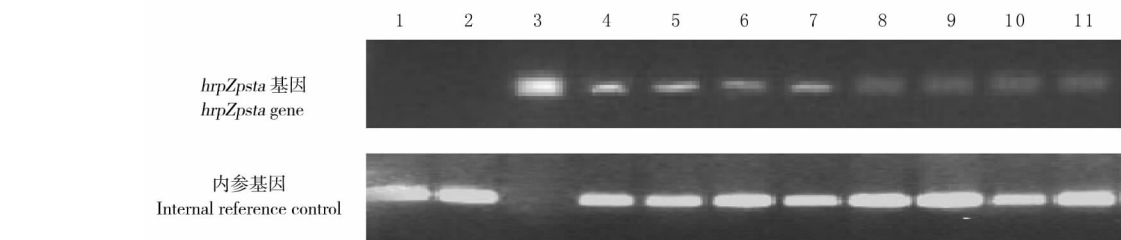


1:阳性对照;2:吉农 17;3~6:吉农 17T₄ 代植株

1: Positive control; 2:Jinong 17; 3~6:T₄ transgenic plants of Jinong 17

图 2 吉农 17 T₄ 代转化植株 Southern blot 检测

Fig. 2 Southern blot analysis of Jinong 17 T₄ transgenic plants with *hrpZ_{psta}*



1:吉农 17;2:吉农 29;3:阳性对照;4~7:吉农 17T₄代转化植株;8~11:吉农 29T₄代转化植株

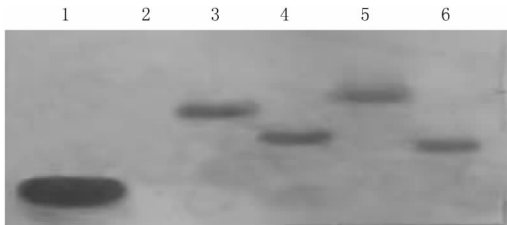
1:Jinong 17;2:Jinong 29;3:Positive control;4-7:T₄ transgenic plants of Jinong 17;8-11:T₄ transgenic plants of Jinong 29

图 4 T₄代转化植株 RT-PCR 检测

Fig. 4 RT-PCR analysis of T₄ transgenic plants with *hrpZ_{psta}*

2.2 抗病性鉴定

按照《大豆灰斑病鉴定技术规范》中的接菌方法完成抗病性鉴定试验,对试验所得数据进行统计。从表 2 可知,与原受体品种相比较,吉农 17 和吉农 29 T₄代转化植株病情指数明显降低,分别下降了 33.33% 和 15.42%。在对灰斑病抗病能力等级方面,吉农 17 从中感上升为中抗,吉农 29 从感病提



1:阳性对照;2:吉农 29;3-6:吉农 29T₄ 代植株

1: Positive control; 2:Jinong 29; 3~6:T₄ transgenic plants of Jinong 29

图 3 吉农 29 T₄ 代转化植株 Southern blot 检测

Fig. 3 Southern blot analysis of Jinong 29 T₄ transgenic plants with *hrpZ_{psta}*

杂交结果表明,T₄代转化植株基因组均有杂交条带形成,而阴性对照则无杂交信号产生。证明目的基因 *hrpZ_{psta}* 在大豆基因组中能够稳定遗传并整合在 T₄ 代转化植株基因组中,由于杂交信号位置的不同,可知外源基因与大豆基因组整合的位点不尽相同。

2.1.3 RT-PCR 鉴定 提取并分离吉农 17 和吉农 29T₄代转化植株的叶片总 RNA,并通过反转录酶合成对应的 cDNA,利用 RT-PCR 方法对 2 个品种 T₄ 代转化植株进行检测。

由图 4 可知,吉农 17 和吉农 29 T₄代转化植株的 RNA 中,含有目的基因 *hrpZ_{psta}* 对应的 mRNA,证明了目的基因 *hrpZ_{psta}* 可正常转录和表达,而 PCR 反应条带深浅不同,说明同为 35S 启动子调控下,目的基因 *hrpZ_{psta}* 在不同植株中的表达量是不相同的。

升到中感水平。总体来说,2 个品种的转化植株后代对灰斑病的抵抗能力均有大幅度的增强,但吉农 17 病情指数降低的程度要优于吉农 29。品种本身对外源基因接受能力不同,以及外源基因在不同品种中抗性的表达程度存在差异,都是造成这一现象的主要原因。

表 2 2012 年抗大豆灰斑病鉴定结果

Table 2 Results of disease resistance screening among frogeye leaf spot in 2012

组别 Group	品种名称 Cultivar	调查总数 Number of screening	病情级别 Disease rating scale						病情指数 Disease index/%	抗性评价 Resistance evaluation
			0	1	3	5	7	9		
对照组 Control	吉农 17 Jinong 17	50	17	8	25	0	0	0	55.33	MS
	吉农 29 Jinong 29	50	0	2	3	6	38	1	70.22	S
转化组 Transgenic plants	吉农 17 Jinong 17	50	39	11	0	0	0	0	22.00	MR
	吉农 29 Jinong 29	50	3	11	27	9	0	0	54.80	MS

3 讨 论

目前在大豆生产过程中,病害防治的成功与否已经成为影响大豆产量与质量提高的关键因素。传统的防治方法有许多弊端,浪费人力物力的同时,还会对农田和水源造成严重的农药污染,作物本身的农药残留也随之而来。将生物技术与传统育种方法相结合,利用转基因技术将外源抗性基因导入大豆基因组中,通过指导植物体合成抗性蛋白,赋予植物广谱的抗病性,可以安全无污染的缓解大豆生产过程中各类病原菌对大豆产量及品质造成的威胁。本试验着重大豆抗病分子育种过程中实际效果的检测,利用分子生物学方法确定外源基因是否稳定遗传,在此基础上通过抗病性鉴定验证转化植株的抗性提高程度。

根据 Southern blot 结果可知,在转化植株的 T₄ 代个体中,目的基因 *hrpZ_{psta}* 能够高效地与植物基因组进行整合并获得稳定遗传;而 RT-PCR 结果表明,外源基因在转录水平同样得到了表达,扩增条带亮度的不同,说明种属差异和个体差异都对外源基因的转录效果有所影响。

抗病性鉴定结果表明基因 *hrpZ_{psta}* 编码的 harpin 蛋白可以改良大豆的抗病能力,使大豆植株对真菌类病害的抵抗能力有较显著的增强。转 *hrpZ_{psta}* 基因的大豆 T₄ 代植株对灰斑病的抗病能力较对应受体植株明显提高。同时 *hrpZ_{psta}* 基因并没有对转基因植株的农艺性状和产量产生负面影响。因此,整个转化体系的后代已经成为兼具农艺性状优良、抗病能力较高的改良新种质。

参考文献

[1] 任友科,于保全. 大豆灰斑病研究进展[J]. 现代农业科技,

2010(3):164-169. (Ren Y K, Yu B Q. Advances of Researches on *Cercospora sojina* [J]. Morden Agricultural Science and Technology, 2010(3):164-169.)

[2] 廖林. 大豆灰斑病研究概况及展望[J]. 中国农学通报, 1992, 8(1):6-9. (Liao L. Research Progress and Preview of *Cercospora sojina* [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 1992, 8(1):6-9.)

[3] 顾鑫,丁俊杰. 大豆灰斑病的研究现状[J]. 中国农学通报, 2010, 26(9):303-306. (Gu X, Ding J J. The research status of *Cercospora sojina* [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2010, 26(9):303-306.)

[4] He S Y, Huang C H, Collmer A. *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* harpin_{psa}: protein that is secreted via the hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plant [J]. Cell, 1993, 73:1255-1266.

[5] Lin H J, Cheng H Y, Chen C H. Plant amphipathic proteins delay the hypersensitive response caused by harpin_{psa} and *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1997, 51:367-375.

[6] Taguchi F, Tanaka R, Kinoshita S, et al. Harpin_{psta} from *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* is defective and deficient in its expression and HR-inducing activity[J]. Journal of General Plant Pathology, 2001, 67:116-123.

[7] Strobel N E, Ji C, Goplan S, et al. Induction of systemic acquired resistance in cucumber by *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* 61 *hrpZ_{psa}* protein[J]. The Plant Journal, 1996, 9:431-439.

[8] Cooper B. A defective movement protein of TMV in transgenic plants confers resistance to multiple viruses whereas the functional analog increases susceptibility[J]. Virology, 1995, 206:307-313.

[9] Lindgren P B, Peet R C, Panopoulos N J. Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity on nonhost plants[J]. Journal of Bacteriology, 1986, 168:512-522.

[10] 杨军,尹启生,宋纪真,等. 植物病原菌的 hrp 基因[J]. 遗传, 2005, 27(5):852-858. (Yang J, Yin Q S, Song J Z, et al. Review on *hrp* genes of plant pathogenic bacteria [J]. Hereditas, 2005, 27(5):852-858.)