



转 *NPR1* 和 *CHR3* 抗病基因提高大豆对疫霉根腐病抗性研究

朱婷婷, 王春生, 孙珊珊, 赵 贺, 曲 硕, 焦耀磊, 王丕武

(吉林农业大学 农学院, 吉林 长春 130118)

摘要: 为检测 *GmCHR3* 和广谱抗病基因 *NPR1* 双抗基因转化到大豆吉林 30 中的遗传稳定性和抗病能力, 从而为培育出抵抗疫霉根腐病大豆新品种提供有效参考, 以大豆品种吉林 30 转 *CHR3* 抗病基因转化品系 JL30 + *GmCHR3* 为目标受体材料, 以吉林 30 为对照受体材料, 利用农杆菌介导法将 *NPR1* 导入受体中。利用常规 PCR 检测基因转化情况, 利用 Southern 杂交和 qRT-PCR 技术分别鉴定 JL30 + *GmCHR3* 受体和双抗基因转化株系 T_1 和 T_2 代中两个基因的整合和表达情况, 采用下胚轴浸染法鉴定转基因大豆植株对疫霉根腐病的抗性。PCR 研究结果显示: 转化元件的启动子 *35s*、终止子 *Nos*、筛选标记基因 *Bar* 以及目的基因 *NPR1* 全部转入到受体基因组中; *NPR1* 基因以单拷贝的形式在转化植株中完成整合; *NPR1* 基因在大豆植株根、茎和叶中均有表达, 其中 T_1 代株系在 3 个部位的相对表达量分别是 2. 732、1. 614 和 3. 316, T_2 代株系的相对表达量分别是 2. 936、2. 084 和 3. 864; *NPR1* 基因在各组织中的相对表达量为茎 < 根 < 叶。*CHR3* 和 *NPR1* 双抗基因转化株系对疫霉根腐病表现为高抗, *NPR1* 单抗基因转化株系表现为中抗, 非转基因吉林 30 植株表现为感病。结果说明大豆吉林 30 转入双价抗病基因 *GmCHR3* 和 *NPR1* 可以增强其对疫霉根腐病的抗性。

关键词: 大豆; *NPR1*; JL30 + *GmCHR3*; 双价转基因; 疫霉根腐病; 抗病性

Improving the Resistance to *Phytophthora* Root Rot of Soybean by Transforming Broad-Spectrum Disease Resistance Gene *NPR1* and *CHR3*

ZHU Ting-ting, WANG Chun-sheng, SUN Shan-shan, ZHAO He, QU Shuo, JIAO Yao-lei, WANG Pi-wu

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

Abstract: In order to detect the integration and genetic stability of *NPR1* gene in soybean Jilin 30 transgenic *CHR3* line, to investigate the disease resistance of transgenic progeny with bivalent gene of *CHR3* and *NPR1*, and to provide an effective reference for breeding new soybean varieties resistant to *Phytophthora* root rot. In this paper, soybean varieties JL30 + *GmCHR3* were used as receptor materials, the broad-spectrum resistance gene *NPR1* was introduced into the receptor by agrobacteria-mediated. Conventional PCR were used to test the genetic transformation, southern blot hybridization and qRT-PCR were used to identify the integration and expression of the two genes in the T_1 and T_2 generations of JL30 + *GmCHR3* receptor and double-resistant transgenic lines respectively, and hypocotyl infection was used to identify the resistance of transgenic soybean plants to *Phytophthora* root rot. The results showed that promoter *35s*, terminator *Nos*, screening marker gene *Bar* and target gene *NPR1* were all expressed in receptor genome. Southern blotting showed that the target gene was integrated in soybean plants in a single copy manner. And the qRT-PCR detection results showed that the target gene was expressed in the root, stem and leaf of soybean plant, among them, the average relative expression of roots, stems and leaves of T_1 generation were 2. 732, 1. 614 and 3. 316, respectively, the mean relative expression of roots, stems and leaves of T_2 generation strains were 2. 936, 2. 084 and 3. 864, respectively. The results showed that the relative expression of the target gene in each tissue was as stem < root < leaf. Transformation lines with dual resistance genes of *CHR3* and *NPR1* showed high resistance to *Phytophthora* root rot disease, JL30 + *NPR1* showed moderate resistance, and non-transgenic plants showed susceptible. The results showed that the transformation of the bivalent resistance genes *GmCHR3* and *NPR1* into the soybean Jilin 30 could enhance the resistance to *Phytophthora* root rot.

Keywords: Soybean; *NPR1*; JL30 + *GmCHR3*; Bivalent gene; *Phytophthora* root rot disease; Disease resistance

收稿日期: 2020-11-03

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项(2016ZX08004-004)。

第一作者: 朱婷婷(1995—), 女, 在读硕士, 主要从事生物技术与作物遗传育种研究。E-mail: 1143515859@qq. 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研究。E-mail: peiwuw@yahoo. com. cn。

大豆病害是一直以来影响大豆产量和品质的重要因素之一,被证实的大豆病害越来越多^[1],其中疫霉根腐病(*Phytophthora Root Rot*, PRR)对大豆产量的影响尤为严重。大豆疫霉根腐病由土壤传播的大豆疫霉引起。大豆疫霉寄主范围狭窄,以大豆为主,传播能力强,传播速度快,传播不受生育期限制,可导致大豆植株萎蔫和溃烂^[2]。在饱和土壤条件下,大豆疫霉菌株可以在大豆植株的各个生长阶段侵染大豆,它以菌丝的形式存在于根和茎组织中,在其中能形成卵孢子,卵孢子随后发芽,释放出能动的、具有感染性的动物孢子,导致地上部分腐烂致植株死亡,使植株萎蔫最后死亡^[3-4]。大豆疫霉根腐病在有利条件下通常可造成 30% ~ 50% 产量损失,在严重爆发时会导致绝收,对大豆产量造成重创^[5]。传统的化学农药喷施防治不但污染环境、费时费力,且不能从根源解决问题^[6]。发现抗性资源和提高对相应防御机制的认识对培育抗性品种尤为重要。但是传统育种技术周期长、费时费力,因此一直以来并没有能够高效解决此问题的方法^[7]。而随着转基因技术的兴起,转基因抗病品种的利用成为对该病原体最经济、有效和环境友好的控制方法之一^[8]。利用转基因育种技术培育出抗性强并且持久稳定的抗疫霉根腐病大豆品种为防治疫霉根腐病提供了新的思路^[9-10]。一般来说,植物能够同时利用几种途径来防御病原体,李琦等^[11]将 *hrpZpsta* 和 *chi* 双价广谱抗病基因转入大豆后,研究大豆抗性的改变,分析得出双价抗病基因可以有效地提高大豆抗病能力,为大豆分子育种提供有力参考。

Cao 等^[12]最先研究发现 *NPR1* 基因位于拟南芥中 1 号染色体上,在它的启动子区域含有 1 个 *W-box* 序列,其结构可以被 WRKY 转录因子特异性识别,当植物受到各种病害侵染后,WRKY 转录因子会立刻表达,并且开始启动调节 *PR* 基因的表达来回应病原菌的诱导,受到正向调节的 *NPR1* 可以让植物表现出抗病性^[13]。WRKY 转录因子依赖 *NPR1* 蛋白并与其存在互作关系^[14-15]。坏死性病原体能够通过茉莉酸甲酯途径得到处理^[16],而生物性病原体需要通过水杨酸途径抵抗^[17],两种途径之间存在正向及负向的相互作用。*NPR1* 基因能够调控植物广谱抗性的发生。缺失 *NPR1* 基因的拟南芥突变植株不能应答 *SAR* 诱导物,表现为发病相关蛋白基因几乎不表达以及对病原微生物感染敏感性的提高^[18]。该基因的发现为后续学者对植株抗病性研究奠定

了基础。此后在多种植株中克隆出 *NPR1* 基因,证明了该基因能够调控植物广谱抗性的发生。宋阳^[19]利用 *NPR1* 和 *HrpZpsg12* 双价抗病基因在大豆中进行遗传转化,证实双价抗病基因除了能抵抗大豆疫霉根腐病外,对大豆灰斑病等多种病害也具有很强的抗性。Chern 等^[20]发现 *NPR1* 在水稻中表达可增强水稻对稻黄单孢菌引起的细菌性疫病的抗性,*AtNPR1* 基因可以处于稳态转录水平,并且水稻 *AtNPR1* 转基因株系的农艺性状未受影响,大部分植株可育^[21]。该结果有效地证实了 *NPR1* 基因在农作物中可以抵抗细菌病的感染,也为 *NPR1* 基因在农作物抗病方面的应用提供了重要参考。

大豆苷元又称大豆黄酮,是一种植物防御素,可以提高植物抗病性。查尔酮还原酶是异黄酮代谢途径中特有的一种酶,大豆查尔酮还原酶基因 *CHR3* 能催化合成大豆苷元生物合成的必需前体物质—异甘草素,从而提高植物中的大豆苷元含量,进而增加植物的抗病性^[22]。2014 年张超等^[23]利用 *RACE* 技术在大豆品种吉农 17 中克隆出 *CHR3* 序列。

本实验室前期将 *CHR3* 基因转化到大豆品种吉林 30 中,提高了大豆的抗病能力^[24]。本研究以吉林 30 转 *CHR3* 基因的稳定转化品系为受体材料,将抗病基因 *NPR1* 转入该大豆品系中,研究转化株系的抗病能力,探讨双价抗病基因提高大豆疫霉根腐病的可能性,为培育大豆抗病新株系提供可能的途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 以吉林 30 转 *CHR3* 基因的稳定转化品系 JL30 + *GmCHR3* 为目标受体材料,以栽培大豆品种吉林 30 为对照受体材料,均由吉林农业大学植物生物技术中心提供。

1.1.2 菌液 *pCAM3301-NPR1* 菌液,由吉林农业大学植物生物技术中心保存和提供。*NPR1* 序列来源于拟南芥,序列号为 NM-105102.2。

1.1.3 疫霉根腐病病原菌 大豆疫霉根腐病菌株 PmC-1,由吉林农业大学植物生物技术中心保存和提供。

1.1.4 主要仪器 台式高速离心机 (Eppendorf, 5810R)、PCR 仪 (东胜龙, ETC811)、电泳仪 (LIUYI, DYY-12C)、孵育器 (杭州米欧, DTC-100)、凝胶成像仪 (东胜龙, Bio-Imaging Systems910)、杂交炉

(Hybaid Limited, HBMOVCSY220)、天平 (TOMS)、pH 测定仪 (PHS-3C)、qRT-PCR 仪 (Thermofisher, QuantStudio 3 Real-Time PCR 96-well 0.2 mL)等。

1.1.5 主要药品与试剂 PCR 分子检测试剂 (Fermentas)、植物 DNA 基因提取试剂盒 (康为, CW0531M)、高纯质粒小量提取试剂盒 (威格拉斯)、Detection Starter Kit、DIG High Prime DNA Labeling (Roche)、凝胶回收试剂盒 (Axygen)、RNAiso Plus 试剂盒 (TaKaRa)、RNAlater[®] 试剂盒 (Thermo Fisher) 和 Prime-Script[™] RT Master Mix (Fermentas) 等。

1.2 方法

1.2.1 将 *NPR1* 基因转入受体植株 利用农杆菌介导法^[25]将外源基因 *NPR1* 导入目标受体 JL30 + *GmCHR3* 和对照受体吉林 30 中。选取大小均匀的种子在消毒柜中用 5 mL 浓盐酸(12.27 mol · L⁻¹)和 25 mL 次氯酸钠(25.54 mol · L⁻¹)消毒处理,经过萌发培养 3 d、预培养 3 d 后进行农杆菌侵染,15 d 后初筛,15 d 后使用 1 mg · mL⁻¹除草剂筛选,将筛

选得到的愈伤组织转入伸长培养基中培养 15 d,再转入生根培养基中培养至根系粗壮发达,幼苗发育状态良好,然后炼苗移栽。室内加代获得 T₁和 T₂代植株。

1.2.2 转 *CHR3* 基因株系 PCR 检测 利用植物 DNA 提取试剂盒(康为,CW0531M)提取转化植株嫩叶基因组 DNA。利用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物,用于检测受体 JL30 + *GmCHR3* 中启动子 35s、终止子 *Nos* 和筛选标记基因 *Bar*,检测转化 *NPR1* 植株的目的基因 *NPR1*、启动子 35s、终止子 *Nos* 和筛选标记基因 *Bar*。引物序列为: NPR1-s: 5'-ATAATGGGATACTTGTGC-3'; NPR1-as: 5'-CTAC-AGTTCGTAGGGACTT-3'。 Bar-s: 5'-AAGTCCAGCT-GCCAGAAACC-3'; Bar-as: 5'-CTGCACCATCGTCAACCACTACA-3'。 35s-s:5'-TTTCTTAAGATTGAATCC-TGTTGCC-3'; 35s-as: 5'-ACCGCGCGCGATAATTT-3'。 Nos-s: 5'-TAGAGGACCTAACAGAAC-3'; Nos-as: 5'-CCGTGTTCTCTCCAAATG-3'。筛选转基因植株的常规 PCR 检测程序如表 1 所示。

表 1 PCR 反应程序
Table 1 PCR procedure

基因	预变性	变性	退火	延伸	循环数	后延伸
Gene	Predenaturation	Denaturation	Annealig	Extend	Recurring number	Rear extension
35s	94 ℃ ,5 min	94 ℃ ,30 s	55 ℃ ,30 s	72 ℃ , 30 s	40	72 ℃ , 8 min
<i>Bar</i>	94 ℃ ,5 min	94 ℃ ,40 s	57 ℃ ,42 s	72 ℃ , 40 s	40	72 ℃ , 8 min
<i>Nos</i>	94 ℃ ,5 min	94 ℃ ,30 s	48 ℃ ,30 s	72 ℃ , 50 s	40	72 ℃ , 8 min
<i>NPR1</i>	94 ℃ ,3 min	94 ℃ ,30 s	54 ℃ ,48 s	72 ℃ , 50 s	40	72 ℃ , 8 min

1.2.3 Southern 杂交 用 CTAB 法^[26]提取 PCR 检测结果为阳性的 T₁、T₂ 代转化植株基因组 DNA,以 *NPR1* 基因 PCR 产物制取探针,选用 *Bst*E II 进行酶切,以 pCAMBIA3301-*NPR1* 质粒为阳性对照,无菌水为空白对照,未转化植株为阴性对照,使用 DIG DNA Labeling and Detection Kit 试剂盒(Roche)进行 Southern 杂交,验证目的基因 *NPR1* 在转化植株基因组中的整合情况。

1.2.4 qRT-PCR 检测 使用 RNAiso Plus 试剂盒 (TaKaRa)提取转基因植株根、茎和叶总 RNA,利用 RNAlater[®]试剂盒 (Thermo Fisher, AM7020) 转化为 cDNA,利用 Primer 5.0 设计目的基因 *NPR1*、*CHR3* 特异性荧光定量引物与内参基因引物。引物序列为:QNPR1-s;5'-GGTGAGTTCTCAATCACCAAGA-3'; QNPR1-as: 5'-TCAGTGCACAGTCACCTTTAC-3'。

QCHR3-s: 5'-TAATAGTGACTGCGTTCT-3'; QCHR3-as: 5'-CTTCAGCACATCATTCTC-3'。 QActin-s: 5'-CGGTGGTTCTATCTTGGCATC-3'; QActin-as: 5'-GTCTTTCGCTTCAATAACCCTA-3'。

使用 Prime-Script[™] RT Master Mix (Fermentas) 试剂进行 qRT-PCR 扩增,扩增条件为:94 ℃ 预变性 4 min;94 ℃ 变性 10 s;60 ℃ 退火和延伸 40 s;40 个循环。运用 2^{-ΔΔCT}计算方法分析目的基因的表达情况和相对表达量,2 次重复,取平均值。

1.2.5 双抗基因转化植株疫霉根腐病抗性鉴定 对转 *NPR1* 基因的受体植株和未转化植株吉林 30 进行疫霉根腐病抗病性鉴定,试验采用 Gordon 等^[27]的抗性评价标准,植株死亡率 ≤30% 为抗病,植株死亡率 30% ~70% 为中抗,植株死亡率 ≥70% 为感病,在温室接种大豆疫霉根腐病菌株 PmC-1

后,对比株系的抗病性。

2 结果与分析

2.1 除草剂筛选阳性植株

使用除草剂筛选出利用农杆菌介导法共转化获得的 JL30 + *GmCHR3* + *NPR1* 转基因大豆 T₀代植株 16 株,其中阳性 3 株;收获 T₀代种子 58 粒;进行室内加代得到 T₁代阳性植株 32 株、T₂代阳性植株 34 株。获得 JL30 + *NPR1* 转基因 T₀代植株 19 株,

其中阳性 5 株;收获 T₀代种子 76 粒;进行室内加代得到 T₁代阳性植株 35 株、T₂代阳性植株 38 株。

2.2 常规 PCR 检测

2.2.1 受体植株 JL30 + *GmCHR3* 中基因 *GmCHR3* 基因常规 PCR 检测 检测结果显示,受体基因组中整合有启动子 35*s*、终止子 *Nos*、筛选标记基因 *Bar*,证实 *GmCHR3* 基因存在于受体中。其中,启动子 35*s* 为 500 bp,终止子 *Nos* 为 192 bp,筛选标基因 *Bar* 为 552 bp(图 1)。

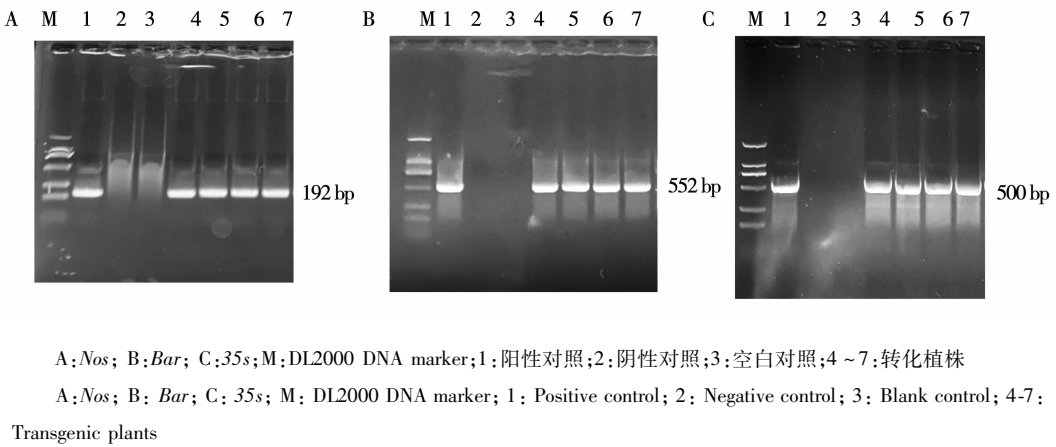
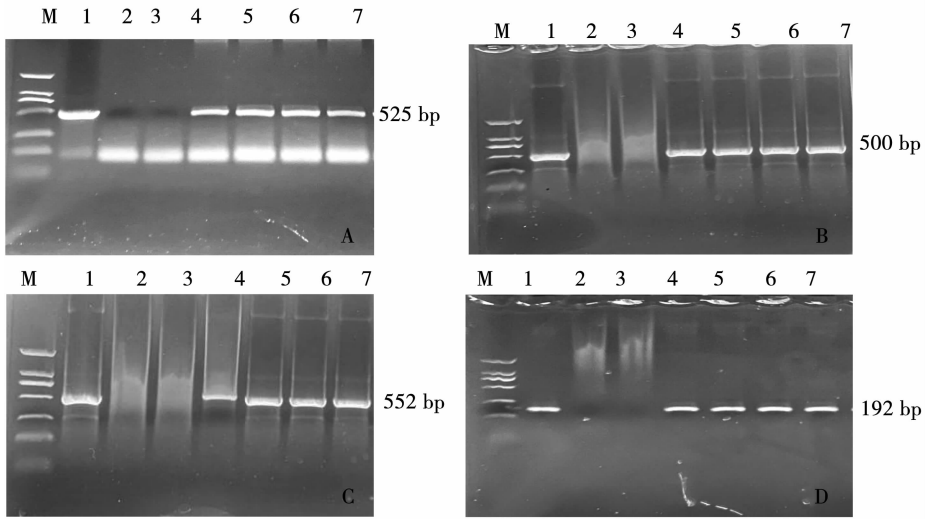


图 1 受体植株 *CHR3* 基因 PCR 检测

Fig. 1 PCR detection of *CHR3* gene in receptor plants

2.2.2 转基因后代 *NPR1* 基因常规 PCR 检测 检测结果表明, JL30 + *GmCHR3* + *NPR1* 转基因株系 T₁、T₂代中均出现了与阳性对照相同位置的 *NPR1* 基因扩增片段, *NPR1* 基因扩增目的片段为 525 bp,

空白对照和阴性对照均没有产生 *NPR1* 基因条带,而 *NPR1* 基因在 T₁、T₂代株系中有所表达,证明 *NPR1* 成功转入 JL30 + *GmCHR3* 目标受体中,并获得 T₁、T₂代转化植株(图 2 和图 3)。

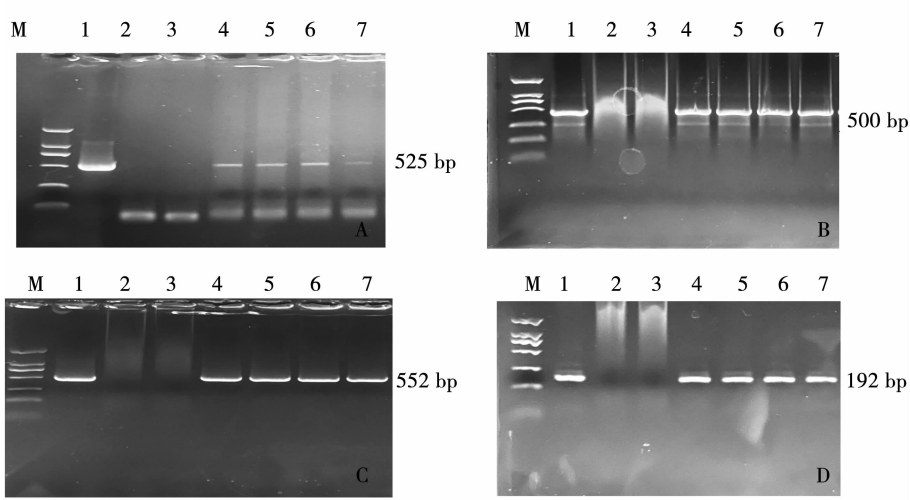


A: *NPR1*; B: 35*s*; C: *Bar*; D: *Nos*; M: DL2000 DNA marker; 1: 阳性对照; 2: 阴性对照; 3: 空白对照; 4~7: 转化植株

A: *NPR1*; B: 35*s*; C: *Bar*; D: *Nos*; M: DL2000 DNA marker; 1: Positive control; 2: Negative control; 3: Blank control; 4-7: Transgenic plants

图 2 JL30 + *GmCHR3* + *NPR1* 转基因株系 T₁代 *NPR1* 基因 PCR 检测

Fig. 2 PCR detection of *NPR1* gene in T₁ transgenic plants of JL30 + *GmCHR3* + *NPR1*



A: *NPR1*; B: *35s*; C: *Bar*; D: *Nos*; M: DL2000 DNA marker; 1: 阳性对照; 2: 阴性对照; 3: 空白对照; 4~7: 转化植株

A: *NPR1*; B: *35s*; C: *Bar*; D: *Nos*; M: DL2000 DNA marker; 1: Positive control; 2: Negative control; 3: Blank control; 4-7: Transgenic plants

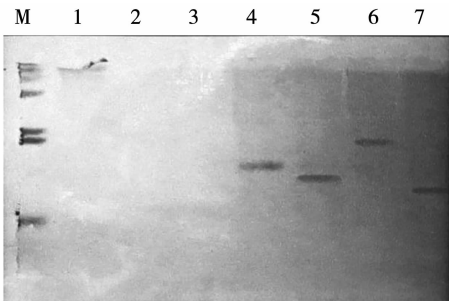
图3 JL30 + *GmCHR3* + *NPR1* 转基因株系 T₂代 *NPR1* 基因 PCR 检测

Fig. 3 PCR detection of *NPR1* gene in T₂ transgenic plants of JL30 + *GmCHR3* + *NPR1*

对照受体转基因植株 JL30 + *NPR1* 转基因株系 T₁和 T₂代的 PCR 结果也显示目的片段与预期条带位置一致(图略),证明 *NPR1* 基因成功转入吉林 30 对照受体植株中,并获得 T₁、T₂代转化植株。

2.3 Southern 印迹杂交检测 *NPR1* 基因整合情况

检测结果表明,在转化植株中检测到的杂交信号均是单一的目的条带,而且在非转化植株中并没有信号产生,表明 *NPR1* 基因在 T₁和 T₂代转基因大豆基因组中完成整合且以单拷贝形式存在(图 4 和图 5)。

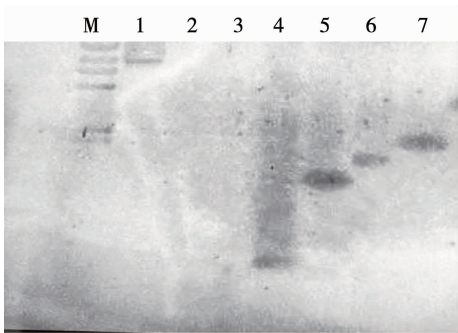


M: Southern DNA marker; 1: 阳性对照; 2: 阴性对照; 3: 空白对照; 4~7: 转化植株

M: Southern DNA marker; 1: Positive control; 2: Negative control; 3: Blank control; 4-7: Transgenic plants

图4 T₁代转基因植株 Southern 杂交检测

Fig. 4 Southern blot analysis of T₁ transgenic plants



M: Southern DNA marker; 1: 阳性对照; 2: 阴性对照; 3: 空白对照; 4~7: 转化植株

M: Southern DNA marker; 1: Positive control; 2: Negative control; 3: Blank control; 4-7: Transgenic plants

图5 T₂代转基因植株 Southern 杂交检测

Fig. 5 Southern blot analysis of T₂ transgenic plants

2.4 qRT-PCR 检测转基因植株不同部位 *CHR3* 和 *NPR1* 基因表达情况

2.4.1 *CHR3* 基因 结果表明, *CHR3* 基因在转基因株系 T₁和 T₂后代的茎、叶、根中均有表达。在 T₁代植株中,相对表达量最高的部位为叶,为 4.302 ~ 3.712,平均值为 4.012;其次为根,相对表达量为 3.016 ~ 2.680,平均值为 2.848;最低为茎,相对表达量为 1.903 ~ 1.412,平均值为 1.658。在 T₂代植株中,叶中的相对表达量为 4.654 ~ 3.912,平均值为 4.283;根中的相对表达量为 3.816 ~ 3.280,平均

值为 3.584;茎中的相对表达量为 2.303 ~ 1.612,平均值为 1.958。证明抗病基因 *CHR3* 存在于转基因植株 T_1 和 T_2 后代中,并且均为叶片中的表达量最高(图 6)。

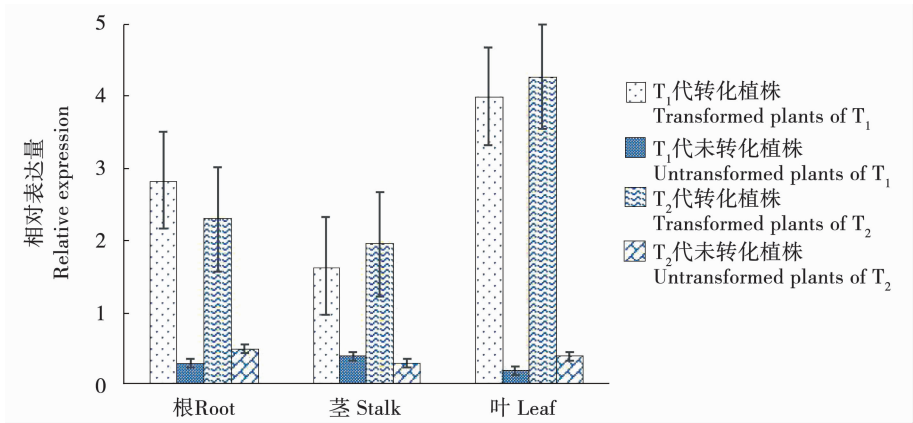


图 6 转基因后代植株不同部位 *CHR3* 基因表达分析

Fig. 6 Analysis of *CHR3* gene expression in different parts of transgenic plants

2.4.2 *NPR1* 基因 结果表明,*NPR1* 基因在转基因株系 T_1 和 T_2 后代的茎、叶、根中均有表达。其中相对表达量最高的部位为叶, T_1 代植株在叶中的相对表达量为 3.624 ~ 3.012,平均值为 3.316; T_2 代在叶中的相对表达量为 4.053 ~ 3.675,平均值为 3.864。其次为根,在 T_1 代中根的相对表达量为 2.976 ~ 2.488,平均值为 2.732;在 T_2 代中根的相对表达量为 2.983 ~ 2.485,平均值为 2.936。相对表达量最低的部位是茎, T_1 代植株在茎中的相对表达量为 1.718 ~ 1.513,平均值为 1.614;在 T_2 代中相对表达量为 1.964 ~ 1.783,平均值为 1.873。表明 *NPR1* 基因可在转基因大豆植株各部位表达,且可以稳定遗传(图 7)。

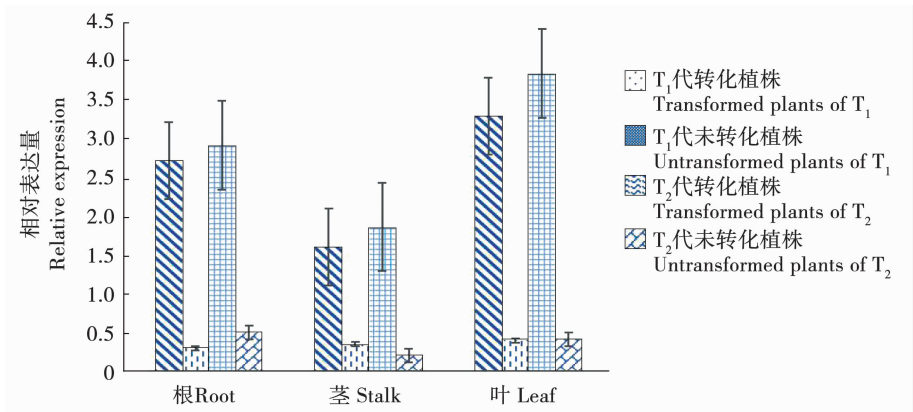


图 7 转基因后代植株不同部位 *NPR1* 基因表达分析

Fig. 7 Analysis of *NPR1* gene expression in different parts of transgenic plants

2.5 双抗基因转化植株疫霉根腐病抗性鉴定

结果表明,作为对照的非转化植株吉林 30 接种疫霉根腐病菌后,植株出现大面积萎蔫状况,部分叶片发黄,主茎从伤口处有折断情况发生;单抗病基因对照植株 JL30 + *NPR1* 表现为植株萎蔫,有部分死亡情况,*CHR3* 和 *NPR1* 双抗基因转化株系 JL30 + *GmCHR3* + *NPR1* 的 T_1 和 T_2 代植株没有明显发病状况。结果说明 *CHR3* 和 *NPR1* 双抗病基因聚合能有效提高大豆抵抗疫霉根腐病的能力(图 8 和图 9)。

对目标受体材料与对照受体材料接种疫霉根腐病后的死亡率的调查结果如表 2 所示。 T_1 代中,*CHR3* 和 *NPR1* 双抗基因转化株系的平均死亡率为 0,为抗病;*NPR1* 单抗病基因转化株系平均死亡率为 22.58%,为中抗;吉林 30 平均死亡率为 80.65%,为感病。在 T_2 代中,*CHR3* 和 *NPR1* 双抗基因转化株系平均死亡率为 0,为抗病;*NPR1* 单抗病基因转化株系的平均死亡率为 25.81%,为中抗;未转化体的平均死亡率为 70.97%,为感病。结果表明 *GmCHR3* 和 *NPR1* 双抗基因转化株系死亡率较未转化植株平均降低 75.81%,较抗病单基因 *NPR1* 转化株系平均降低 24.20%,双抗基因转化株系不同世代对疫霉根腐病均表现为高抗。



A:JL30 + *GmCHR3* + *NPR1* ;B:吉林 30 + *NPR1* ;C:吉林 30
A: JL30 + *GmCHR3* + *NPR1* ; B:JL30 + *NPR1* ;C: Jilin 30
图 8 T₁代转化植株疫霉根腐病抗性鉴定

Fig. 8 Identification of PRR resistance of T₁ generation transformed plants



A:JL30 + *GmCHR3* + *NPR1* ;B:JL30 + *NPR1* ;C:吉林 30
A: JL30 + *GmCHR3* + *NPR1* ; B:JL30 + *NPR1* ; C: Jilin 30
图 9 T₂代转化植株疫霉根腐病抗性鉴定

Fig. 9 Identification of PRR resistance of T₂ generation transformed plants

表 2 T₁和 T₂代 JL30 + *GmCHR3* + *NPR1*、JL30 + *NPR1* 株系死亡率鉴定

Table 2 Mortality identification of T₁ and T₂ generations of JL30 + *GmCHR3* + *NPR1* and JL30 + *NPR1*

世代 Generation	植株 Plant	株数 Plant number	死亡株数 No. of dead plants	死亡率 Mortality rate/%	抗性评价 Resistance evaluation
T1	JL30 + <i>GmCHR3</i> + <i>NPR1</i>	31	0	0	抗病
	JL30 + <i>NPR1</i>	31	7	22. 58	中抗
	吉林 30	31	25	80. 65	感病
T2	JL30 + <i>GmCHR3</i> - <i>NPR1</i>	31	0	0	抗病
	JL30 + <i>NPR1</i>	31	8	25. 81	中抗
	吉林 30	31	22	70. 97	感病

3 讨论

本研究中基因工程方案在减轻植物病害影响的方面是成功的,并且植物抗病基本机制的研究表明 *NPR1* 基因在抗病过程中有明确的作用,因此,无论是通过传统的 *NPR1* 转基因育种影响抗病表型或防御基因表达,还是通过转基因安装 *NPR1* 调节因子,该基因都处于增强植物对生物(有时是非生物)胁迫耐受性的研究设计的中心地位。可以通过识别不同物种中更活跃的 *NPR1* 特定等位基因,或者将 *NPR1* 相关基因置于共同的遗传背景中,这些方法可以加速植物抗病分子育种进程^[28-29]。*NPR1* 基

因的广谱抗病性在多种作物中都有所体现,庄华等^[30] *NPR1* 基因转化小麦,在接种条锈病夏孢子后 *NPR1* 表达量发生了显著变化,证实其对小麦条锈病抗性的诱导作用。结果表明在接种条锈菌夏孢子后 *NPR1* 表达量发生了显著变化,证实 *NPR1* 基因可以有效抵抗小麦条锈病。Quilis 等^[31] 研究表明 *NPR1* 介导水稻后,在水稻生长发育中的生物和非生物胁迫的防御反应中具有积极的调控作用,转 *NPR1* 基因的植株分别对引起稻瘟病和水稻恶苗病的真菌病原体产生抗性,并对引起脚腐病的细菌病原体产生抗性。该结果表明除了细菌病,转 *NPR1* 基因植株对真菌病也可以有效抵抗,*NPR1* 基因的

抗病功能进一步被扩展,但是植株仍具有一定的发病率。

更多证据也证明 *NPR1* 基因在多种农作物中都具有广谱抗病能力,但是单靠 *NPR1* 基因调控植株也具有一定的局限性,农作物抗病性提高的同时,需要追求的是更高更持久稳定的抗性和遗传表达能力,从而达到培育出高产抗病新品种的目的。卢实等^[32]将抗病基因 *chi* 和 *hrpZpsta* 双价表达载体和单价载体分别转入大豆中,结果表明单价基因导入受体大豆对抗性的提高具有局限性,而多价基因导入使转基因大豆品种具有更高更稳定的抗性。因此通过双基因的导入提高农作物的抗病害能力研究是十分有意义的。本研究利用 *NPR1* 基因的广谱抗病性优势并通过双价基因抗病聚合的方法使大豆抗病能力提升,植株发病率大幅降低。本研究通过转基因手段将抗病基因 *NPR1* 导入本身具有抗病基因 *CHR3* 的大豆受体植株和吉林 30 对照受体,以单抗病基因转化株系 JL30 + *GmCHR3* 和普通受体吉林 30 对比使结果更清晰明了,有效证实了 *NPR1* 和 *GmCHR3* 双抗病基因聚合能大幅提高大豆植株的抗病能力,且能够稳定遗传,为培育出高产抗病大豆品种提供新的参考。

4 结 论

本研究证实大豆吉林 30 品种中双聚合抗病基因能更好地抵抗病原菌感染。在吉林 30 和 JL30 + *GmCHR3* 受体中,导入广谱抗病基因 *NPR1*,对 T₁ 代、T₂ 代转基因株系后代进行常规 PCR 检测, Southern 印迹杂交检测, qRT-PCR 检测及疫霉根腐病抗性鉴定。检测结果证实转入基因 *NPR1* 以单拷贝形式克隆,并且可以稳定遗传和表达。通过对两种受体和未转化植株接入疫霉根腐病菌株鉴定,证实了双抗病基因聚合大豆品系较单抗病基因大豆品系抗病能力有所提升,且植株死亡率较未转化植株平均降低 75.81%,较抗病单基因 *NPR1* 转化株系平均降低 24.20%,而双抗病基因聚合大豆品系死亡率为 0,抗病能力更强,且可以多世代稳定遗传,研究结果为培育大豆抗病新种质提供良好的思路。

参考文献

[1] Schmitthenner A F, Dorrance A E. *Phytophthora* root and stem rot [M]//Hartman G L, Rupe J C, Sikora E J, et al. Compendium of soybean diseases and pests. USA: The American Phytopathological Society Press, 2015: 73-76.

[2] 代瑞平, 刘海. 大豆疫霉根腐病研究进展[J]. 大豆科技, 2011(1): 20-26. (Dai R P, Liu H. Research advance on soybean phytophthora root rot [J]. Soybean Science & Technology, 2011(1): 20-26.)

[3] 左豫虎. 大豆疫霉菌遗传特性及侵染过程研究[D]. 西北农林科技大学, 2004: 23-34. (Zuo Y H. Inheritance and infection process of *Phytophthora sojae* [D]. Northwest AF University, 2004: 23-34.)

[4] Grau C R, Dorrance A E, Bond J, et al. Fungal diseases[M]//Boerma H R, Specht J E. Soybeans: Improvement, production, and uses. USA: American Society of Agronomy, 2004.

[5] 王华, 李国英, 战勇, 等. 新疆大豆根腐疫病鉴定初报[J]. 新疆农业科学, 2006(2): 106-108. (Wang H, Li G Y, Zhan Y, et al. Identification of *Phytophthora* root rot of soybean in Xinjiang [J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2006(2): 106-108.)

[6] Sinclair J B, Dhingra O D. Basic plant pathology methods[M] 2nd ed. Boca Raton: Chemical Rubber Company Press 1985: 355.

[7] Zhao W, Wang T, Qi R. Ypti gene-based detection of *Phytophthora sojae* in a loop-mediated isothermal amplification assay[J]. Journal of Plant Diseases and Protection, 2015, 122: 66-73.

[8] 于洋, 侯文胜, 韩天富. 农杆菌介导大豆遗传转化技术的研究进展[J]. 大豆科学, 2010, 29(4): 696-701. (Yu Y, Hou W S, Han T F. Approaches to agrobacterium-mediated transformation in soybean[J]. Soybean Science, 2010, 29(4): 696-701.)

[9] 王振华, 杨德光, 张辉, 等. 大豆遗传转化技术在转基因大豆研究中的应用[J]. 生物技术通报, 2010(10): 60-66. (Wang Z H, Yang D G, Zhang H, et al. Research progress of transgene method in transgenic soybean[J]. Biotechnology Bulletin, 2010(10): 60-66.)

[10] Haudenshield J S, Song J Y, Hartman G L. A novel, multiplexed, probe-based quantitative PCR assay for the soybean root-and stem-rot pathogen, *Phytophthora sojae*, utilizes its transposable element[J]. PLoS One, 2017, 12(4): e0176567.

[11] 李琦, 宋阳, 于森, 等. 转 *hrpZ* (*psta*) 和 *chi* 双价广谱抗病基因大豆对疫霉根腐病的抗性分析[J]. 吉林农业大学学报, 2019, 41(1): 11-16. (Li Q, Song Y, Yu M, et al. Resistance of transgenic soybean with two broad spectrum disease-resistant genes(*hrpZpsta* and *chi*) to *Phytophthora* root rot[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2019, 41(1): 11-16.)

[12] Cao H, Bowling S A, Dong X. Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance[J]. Plant Cell, 1994, 6: 1583-1592.

[13] 王春玲, 徐祥彬, 潘园园, 等. WRKY 转录因子在防御反应中的信号转导网络及其功能研究概况[J]. 浙江农业科学, 2012(1): 123-126. (Wang C L, Xu X B, Pan Y Y, et al. Overview of signal transduction networks and their functions of WRKY transcription factors in defense response [J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 2012(1): 123-126.)

[14] Nobuaki I, Hirofumi Y. Post-translational regulation of WRKY transcription factors in plant immunity [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2012, 15: 431-437.

[15] 王磊,高晓清,朱苓华,等. 植物 WRKY 转录因子家族基因抗病相关功能的研究进展[J]. 植物遗传资源学报,2011, 2(1): 80-85. (Wang L, Gao X Q, Zhu L H, et al. Advances in research on function of WRKY transcription factor genes in plant resistance[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2011, 2(1): 80-85.)

[16] Goossens J, Fernandez-Calvo P, Schweizer F, et al. Jasmonates: Signal transduction components and their roles in environmental stress responses [J]. Plant Molecular Biology, 2016, 91(6): 673-689.

[17] Yan S, Dong X. Perception of the plant immune signal salicylic acid[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2014, 20: 64-68.

[18] 蔡鞞鞞,曾志芳,魏春,等. *NPR1* 同源基因全长 cDNA 的分离与表达分析[J]. 园艺学报,2019, 46(3): 567-576. (Cai W W, Zeng Z F, Wei C, et al. Isolation and expression analysis of full-length cDNAs of *NPR1* homologous genes in *Nai* (*Prunus salicina* var. *cordata*) [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2019, 46(3): 567-576.)

[19] 宋阳. *NPR1* 和 *HrpZpsg12* 双价抗病基因植物表达载体的构建及在大豆中的遗传转化[D]. 长春: 吉林农业大学, 2014. (Song Y. Construction of bivalent plant expressed vector of the *NPR1* and *HrpZpsg12* genes and its transformation in soybean [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2014.)

[20] Chern M S, Fitzgerald H A, Yadav R C, et al. Evidence for a disease-resistance pathway in rice similar to the *NPR1*-mediated signaling pathway in *Arabidopsis* [J]. The Plant Journal, 2001, 27(2): 101-113.

[21] Cao H, Li X, Dong X N. Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(11): 6531-6536.

[22] 叶和杨,邱峰,曾靖,等. 大豆苷元抗心律失常作用的研究[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(9): 853-855. (Ye H Y, Qiu F, Zeng J, et al. Effect of daidzein on antiarrhythmia[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2003, 28(9): 853-855.)

[23] 张超,王丕武,张卓. 大豆查尔酮还原酶 3 基因(*chr3*)的克隆及体外催化活性分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2015, 43(9): 89-96. (Zhang C, Wang P W, Zhang Z. Cloning of soybean chalcone reductase gene (*chr3*) and its expression in *Escherichia coli* [J]. Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition), 2015, 43(9): 89-96.)

[24] 张超. 大豆查尔酮还原酶基因 3 (*chr3*) 的克隆及在大肠杆菌中的表达[D]. 长春: 吉林农业大学, 2014. (Zhang C. Cloning and expression of soybean Chalcone reductase gene 3 (*CHR3*) in *E. coli* [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2014.)

[25] Chan M, Lee T, Chang H. Transformation of indica rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Plant Cell Physiology, 1992, 33(5): 577-583.

[26] 廖俊杰. 采用 CTAB 法快速提取植物 DNA [J]. 天津农业科学, 1993(3): 26. (Liao J J. Rapid extraction of plant DNA by CTAB method [J]. Tianjin Agricultural Science, 1993(3): 26.)

[27] Gordon S G, Martin S K, Dorrance A E. Rps8 maps to a resistance gene rich region on soybean molecular linkage group F [J]. Crop Science, 2006, 46:168-173.

[28] Silva K J P, Mahna N, Mou Z, et al. *NPR1* as a transgenic crop protection strategy in horticultural species [J]. Horticulture Research, 2018(5):15.

[29] Wang X R, Yan X L, Liao H. Genetic improvement for phosphorus efficiency in soybean: A radical approach [J]. Annual Botany, 2010, 106(1):215-222.

[30] 庄华,段婉露,杨婷,等. 小檗 *NPR1* 在小麦条锈菌侵染过程中的表达特征[J]. 植物病理学报, 2019, 49(6): 773-781. (Zhuang H, Duan W L, Yang T, et al. Expression pattern of barberry *NPR1* during the infection of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2019, 49(6): 773-781.)

[31] Quilis J, Peñas G, Messeguer J, et al. The *Arabidopsis AtNPR1* inversely modulates defense responses against fungal, bacterial, or viral pathogens while conferring hypersensitivity to abiotic stresses in transgenic rice [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2008, 21(9): 1215-1231.

[32] 卢实,王丕武,曲静,等. 广谱抗病基因 *chi* 和 *hrpZpsta* 双价表达载体的构建及其在大豆中的遗传转化[J]. 大豆科学, 2015, 34(1): 26-31. (Lu S, Wang P P, Qu J, et al. Construction of bivalent plant expression vector with two broad-spectrum disease resistance genes *chi* and *hrpZpsta* and transformation into soybean [J]. Soybean Science, 2015, 34(1): 26-31.)