

研究报告

Research Report

过量表达拟南芥 *NPR1* 基因提高小麦纹枯病的抗性

周淼平[✉], 杨学明[✉], 姚金保[✉], 张鹏[✉], 余桂红[✉], 马鸿翔[✉]

江苏省农业科学院生物技术所, 江苏省农业生物学重点实验室, 南京, 210014

✉ 通讯作者: mpzhou@hotmail.com ✉ 作者

分子植物育种, 2012年, 第10卷, 第62篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0062

收稿日期: 2012年08月01日

接受日期: 2012年08月15日

发表日期: 2012年12月16日

本文首次发表在《分子植物育种》(2012年第10卷第6期655-661页)上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 协议对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

周淼平等, 2012, 过量表达拟南芥 *NPR1* 基因提高小麦纹枯病的抗性, 分子植物育种(online) Vol.10 No.62 pp.1458-1463 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0062)

引用格式(英文):

Zhou et al., 2012, Over-expression of *AtNPR1* Enhances Resistance to Wheat Sharp Eyespot in Transgenic Wheat, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.10 No.62 pp.1458-1463 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0062)

摘要 拟南芥 *NPR1* 基因是植物重要的抗病调控因子, 转基因过表达该基因可以赋予植物广谱抗性。为明确该基因在小麦抗纹枯病基因工程中的应用潜力, 本研究构建了由玉米 ubiquitin 启动子驱动的拟南芥 *NPR1* 表达载体, 采用基因枪介导导入到小麦品种扬麦 12 号中, 获得 20 株转基因植株。对 14 个外源基因纯合株系的半定量 RT-PCR 和测序分析结果显示, 外源拟南芥 *NPR1* 基因已经导入转基因小麦并有不同水平的表达, 部分转基因株系拟南芥 *NPR1* 基因发生重排; 纹枯病抗性鉴定结果表明, 转基因株系中拟南芥 *NPR1* 基因的正确表达可以减轻纹枯病菌引起的病症发展, 提高转基因小麦的纹枯病抗性。
关键词 小麦; *AtNPR1*; 遗传转化; 纹枯病

Over-expression of *AtNPR1* Enhances Resistance to Wheat Sharp Eyespot in Transgenic Wheat

Zhou Miaoping[✉], Yang Xueming[✉], Yao Jinbao[✉], Zhang Peng[✉], Yu Guihong[✉], Ma Hongxiang[✉]

Institute of Biotechnology, Provincial Key Laboratory of Agrobiolgy, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing, 210014, P.R., China

✉ Corresponding author, mpzhou@hotmail.com; ✉ Authors

Abstract The Arabidopsis *NPR1* gene is the important antiviral regulatory factor in plant, transgenic overexpression of the gene can be imparted to the plant broad resistance. In order to evaluate the potential application of *AtNPR1* gene in the genetic engineering for the resistance to wheat sharp eyespot, the expression vector of *AtNPR1* driven by maize ubiquitin promoter was constructed and introduced into wheat Yangmai12 via particle bombardment in this study. Twenty transgenic plants were obtained by L-PPT screening and PCR analysis. The result of semi-quantitative RT-PCR and DNA sequencing of 14 transgenic homozygous lines showed that the alien *AtNPR1* genes were integrated into wheat genome and expressed at different levels. Rearrangement of *AtNPR1* gene was observed in some transgenic lines. The assessment of resistance to *Rhizoctonia cerealis* indicated that the correct expression of *AtNPR1* in transgenic lines could reduce the severity of wheat sharp eyespot.

Keywords Wheat; *AtNPR1*; Genetic transformation; Sharp eyespot

番植物在长期进化过程中, 形成了复杂的抵御病原菌侵染的抗病机制。抗病机制具有多种表现形式, 包括基础抗病性、病原菌诱导的抗性以及抗病基因(R gene)主导的抗性等。不同形式的抗病信号传导途径既有区别, 也有重叠和交叉。其中的交叉点是植物整体抗病的重要调节因子。*NPR1* (nonexpressor of pathogenesis related genes 1)就是抗病重要调节基因之一, 它既是 SAR (systemic acquired resistance)和 ISR (induced systemic resistance)诱导抗性信

号传导的交叉点, 也是基础抗性以及部分抗病基因所决定抗性的重要调节基因。

NPR1 基因最早从拟南芥中克隆(Cao et al., 1997), 该基因位于 1 号染色体, 含有 4 个外显子和 3 个内含子, 编码的蛋白包含 593 个氨基酸, 分子量约 66 kD。*NPR1* 在植株体内组成性表达。通常情况下, *NPR1* 单体在细胞质中通过分子间二硫键形成寡聚体而存在。在 SAR 反应中, 水杨酸的累积增加了细胞内的还原势, 从而破坏了 *NPR1* 寡聚体中的二硫

键,寡聚体解离为单体,单体在 C 末端的核定位序列引导下,在细胞核内积累,与 TGA 等转录因子发生互作,激活下游防卫基因表达而产生抗性(张红志和蔡新忠, 2005)。

目前,烟草(Liu et al., 2002)、水稻(Chern et al., 2005)、棉花(王旭静等, 2006)、中间偃麦草(唐益苗等, 2007)、苹果(Malnoy et al., 2007)、梨(Che et al., 2008)、香蕉(Endah et al., 2008)、大豆(Sandhu et al., 2009)、甘薯(陈观水等, 2009)、葡萄(Henanff et al., 2009)、可可树(Shi et al., 2010)等植物中的 *NPR1* 基因已经被克隆,表明 *NPR1* 介导的抗性途径可能是多种植物共同保守的途径。研究发现,作物中过量表达 *NPR1* 基因可以提高其对病害的抗性。例如过量表达 *NPR1* 的拟南芥对细菌 *Pseudomonas syringae*、真菌 *Peronospora parasitica* 和 *Erysiphe cichoracearum* 的抗性增加(Cao et al., 1998; Friedrich et al., 2001); 转基因番茄中过量表达拟南芥 *AtNPR1* 表现出对病原菌的广谱抗性(Lin et al., 2004); 转基因苹果过量表达苹果 *MpNPR1* 对病原菌 *Erwinia amylovora*、*Venturia inaequalis* 和 *Gymnosporangium juniperi-virginianae* 的抗性增加; 单子叶植物中过量表达 *AtNPR1*, 同样也会提高植物抵御病原菌的能力, 在水稻中过量表达 *AtNPR1* 和水稻 *OsNPR1* 基因都增加了对白叶枯病菌 *Xanthomonas oryzae* 的抗性(Chern et al., 2001; 2005; Yuan et al., 2007); 在小麦中过量表达 *AtNPR1* 增加了对小麦赤霉病菌 *Fusarium graminearum* 的抵御能力(Makandar et al., 2006); 表明单子叶植物与双子叶植物可能拥有相同的 *NPR1* 抗病调控途径。

小麦纹枯病(Wheat sharp eyespot)是中国长江流域中下游麦区和黄淮麦区的主要病害,禾谷丝核菌(*Rhizoctonia cerealis* Vander hoeven)和立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani* Kuhn)是其主要病原菌,每年造成严重的产量损失,选育和使用抗纹枯病小麦新品种是防治该病害最经济和有效的途径。迄今为止,尚未发现对该病害免疫的小麦品种(系),高抗的材料也较匮乏。研究发现,小麦纹枯病抗性是数量性状,主基因效应不大,并且存在基因互作,给常规育种带来诸多困难(蔡士宾等, 2006)。转基因技术由于周期短、针对性强等优点,已经成为小麦抗纹枯病育种的新手段(Chen et al., 2008)。

本研究构建了拟南芥 *AtNPR1* 基因的单子叶作物组成型高表达载体,并通过基因枪介导将其导入小麦扬麦 12 号,进一步分析了 *AtNPR1* 基因在转基因

小麦后代中的表达以及对小麦纹枯病的抗性,以评估转基因小麦中 *AtNPR1* 基因能否正常表达以及该基因在基因工程培育抗纹枯病小麦中的应用潜力。

1 结果与分析

1.1 *AtNPR1* 基因的克隆和载体构建

根据 *AtNPR1* 基因 DNA 序列设计引物,采用 PCR 方法从拟南芥基因组扩增出 2 125 bp 的 DNA 片段,连接到 pGEM-T 载体,经测序和 Blast 验证,扩增片段确实含有 *AtNPR1* 基因,该基因全长 2 079 bp,包含 4 个外显子和 3 个内含子,内含子的大小分别为 79 bp (位于 562-640)、108 bp (位于 1 377-1 484)和 110 bp (位于 1 689-1 798)。采用 *Sma* I 和 *Sac* I 双酶切获得 *AtNPR1* 基因,替代 pACH25 载体(Christensen and Quail, 1996)中的 *gus* 基因,即获得 Ubiquitin 启动子驱动的 *AtNPR1* 基因表达载体 pAC-NPR1 (图 1)。

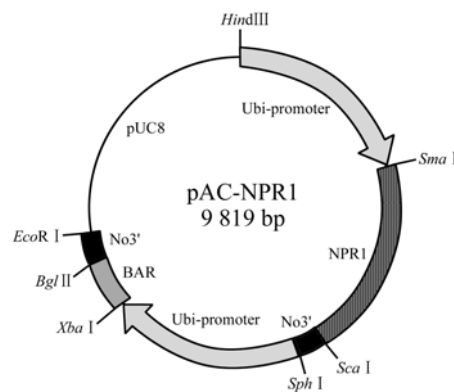


图 1 质粒 pAC-NPR1 构造
Figure 1 Construct of plasmid pAC-NPR1

1.2 小麦的遗传转化与分子检测

共转化 6 300 枚小麦幼胚,通过愈伤诱导、分化以及 L-PPT 筛选,获得抗 L-PPT 再生植株 126 株,对其 T_1 后代喷施 Basta 除草剂,发现 27 株的后代出现抗感分离,初步定为阳性植株。对这 27 株进行 PCR 检测发现,20 株含有 *AtNPR1* 基因(图 2),其余 7 株未能扩增出相应片段,可能转基因植株只插入了 *bar* 基因片段或 *AtNPR1* 基因的片段。

1.3 转基因阳性植株的表达分析

采用 Basta 除草剂喷涂和 PCR 检测相结合的方法筛选 *AtNPR1* 基因纯合的转基因株系,并对这些转基因株系的农艺性状同时进行鉴定筛选。从转基因后代株系中选取与受体亲本扬麦 12 号农艺性相近的 14 个转基因株系分析 *AtNPR1* 基因的表达以及对小

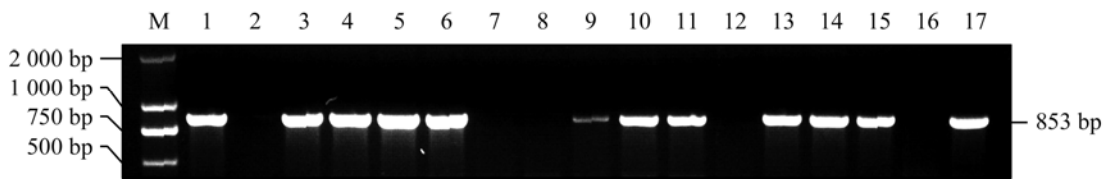


图2 部分 T₀ 代转基因植株 *AtNPR1* 基因的 PCR 检测
注: M: DL2000 marker; 1: pAC-NPR1; 2: 扬麦 12 号; 3~17: 转基因植株

Figure 2 PCR analysis of *AtNPR1* gene in part of T₀ transgenic plant
Note: M: DL2000 marker; 1: pAC-NPR1; 2: Yangmai12; 3~17: Transgenic plants

麦纹枯病的抗性。

采用 18S rRNA 作为内参基因, 对转基因对照扬麦 12 和 14 个转基因株系 *AtNPR1* 基因的半定量 RT-PCR 分析结果发现, R3、R4、R7、R8、R9、R10 和 R13 等 7 个株系扩增出 635 bp 的亮带; R2、R14 和 R15 等 3 个株系扩增出 853 bp 和 1165 bp 两条带; R6 和 R11 等 2 个株系只有微量表达, R5 和 R12 等 2 个株系没有扩增条带(图 3)。将扩增的各个 DNA

条带回收、测序和 Blast 分析结果显示, 635 bpDNA 条带为内含子正常剪切和表达的 *AtNPR1* 基因片段; 853 bp 条带为 108 bp 和 110 bp 的 2 个内含子未剪切的表达片段; 1165 bp 条带为如图 4 所示插入基因发生复杂片段重排的表达片段。

正常表达(切除内含子)的 7 个株系中, R9 的表达最强, 其次为 R3、R4 和 R13, R7、R8 和 R10 的表达相对较弱。

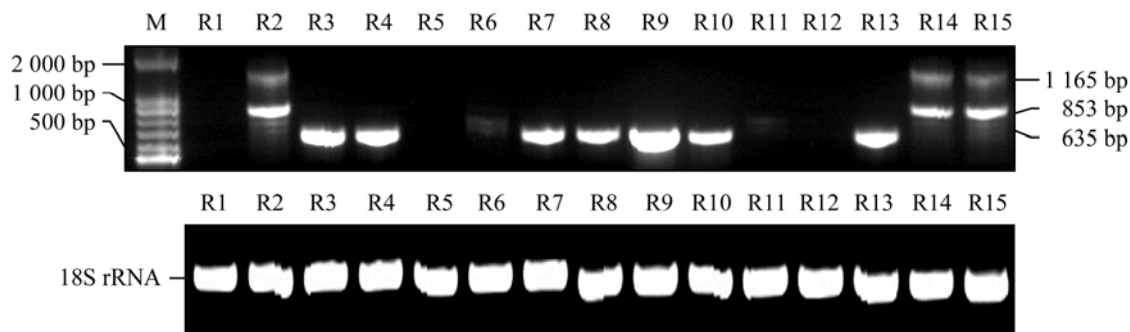


图3 转基因株系 *AtNPR1* 基因的半定量 RT-PCR 分析

注: M: 100 bp DNA ladder marker; R1: 扬麦 12 号; R2-R15 转基因株系; R2, R14 和 R15: 来自 S1-1; R3 和 R4 来自 S44-1; R6 和 R11 来自 S89-1; 其余来之不同转基因植株

Figure 3 Semi-quantitative RT-PCR analysis of *AtNPR1* gene in transgenic lines

Note: M: 100 bp DNA ladder marker; R1: Yangmai12; R2-R15: Transgenic lines; R2, R14 and R15 from S1-1; R3 and R4 from S44-1; R6 and R11 from S89-1; The other transgenic lines derived from different transgenic plant

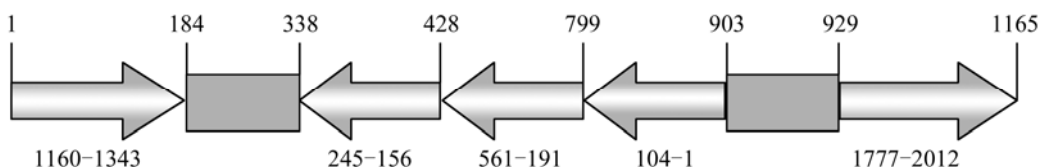


图4 转基因植株 S1-1 中的 *AtNPR1* 基因片段重排

注: 箭头表示片段方向; 方框表示未知序列; 上排数字表示重排基因片段的位置; 下排数字为原基因中片段位置

Figure 4 The rearrangement of *AtNPR1* fragments in transgenic plant S1-1

Note: The arrows indicate the direction of fragments; The boxes indicate unknown DNA sequences; The number of up line indicates the location of fragments in the rearranged gene; The number of lower line indicates the location of fragments in the original gene

1.4 转基因株系的纹枯病抗性鉴定

纹枯病抗性鉴定结果表明, R5 和 R12 等 2 个 *AtNPR1* 基因未表达的转基因株系以及 R6 和 R11 微量表达的转基因株系的纹枯病抗性与未转基因受体对照扬麦 12 号差异不显著; R2、R14 和 R15 等 3 个 *AtNPR1* 基因内含子未切除的转基因株系的纹枯病抗性较对照也未有显著提高; 正常表达的 R3、R4、R7、R8、R9、R10 和 R13 等 7 个株系的纹枯病抗性较扬麦 12 号提高明显, 平均病级和平均病情指数均显著低于未转基因受体对照, 纹枯病病级和病情指数比对照平均分别降低 24.2% 和 25.0%, *zAtNPR1* 基因正常表达转基因株系的病级和病情指数的降低程度与该基因的表达强度没有明显的相关性(表 1)。

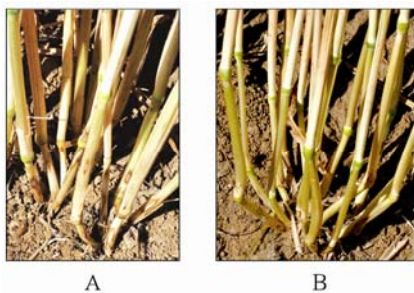


图 5 转基因小麦 R8 株系的纹枯病抗性
注: A: 扬麦 12 号品种; B: R8 转基因株系
Figure 5 Resistance of transgenic line R8 to Sharp eyespot
Note: A: Yangmai12; B: R8 transgenic line

2 讨论

AtNPR1 基因是重要的抗病调节基因, 不仅在拟南芥, 在其他植物中过量表达都可以提高植物对多种病害包括真菌病害侵袭的抵抗能力。本研究将玉米高表达 *ubiquitin* 启动子驱动的 *AtNPR1* 基因导入普通小麦, 并获得纹枯病抗性显著提高的转基因小麦株系, 进一步验证了 *AtNPR1* 基因在植物抗病反应中的重要作用。研究也发现, 在 *AtNPR1* 基因正常表达的株系中, 其纹枯病抗性与植株中 *AtNPR1* 基因表达强度相关不明显, 这与以转 *Rs-AFP2* 等抗病下游基因以及抗真菌蛋白基因为目的基因的转基因作用方式不同, *Rs-AFP2* 这类基因的表达产物直接作用于病原真菌, 因而浓度越高, 作用越强(路妍等, 2009), 而 *AtNPR1* 基因为调节基因, 下游抗病基因的表达只需一定量的 *AtNPR1* 基因表达即可激活, *AtNPR1* 基因过量超表达, 对提高下游防卫基因的表达帮助不大, Friedrich 等(2001)在拟南芥中过表达

表 1 转 *AtNPR1* 基因株系的纹枯病抗性

Table 1 The resistance of *AtNPR1* transgenic lines to wheat sharp eyespot

株系	平均病级	平均病情指数
Lines	Average disease grade	Average disease index
R12	2.4a	48.7a
R2	2.4ab	48.0ab
R5	2.4ab	47.3ab
扬麦 12 号	2.3ab	46.0ab
Yangmai12		
R11	2.3ab	46.0ab
R6	2.3ab	45.3ab
R15	2.1b	42.7bc
R14	2.1b	42.7bc
R10	1.9c	37.4cd
R4	1.8c	35.4d
R7	1.8c	35.3d
R3	1.7c	34.0d
R13	1.7c	34.0d
R9	1.7c	33.4d
R8	1.6c	32.0d

注: 数据后不同字母表示相同受体品种的不同株系间平均病级或病情指数有显著差异(P<0.05)

Note: Different letters after average disease grade or disease index indicate significant differences among transgenic lines derived from the same recipient parent (P<0.05)

AtNPR1 基因也发现类似的研究结果。

目的基因沉默现象是转基因研究中常见的现象, 主要为同源依赖性沉默(Homology-dependent gene silencing)和位置依赖性基因沉默(Position-dependent gene silencing), 前者由同源或互补核苷酸序列间相互作用产生, 多为转基因出现多拷贝或与内源基因相互作用而诱发的基因沉默; 后者则反映转基因宿主的后成状态或染色体特异区段对外源 DNA 入侵忍耐性的强弱(Stam et al., 1997)。本研究也发现 2 个转基因株系虽然可以检测到 *AtNPR1* 基因的存在, 但未检测到该基因的表达, 由于尚未有 Southern 杂交的结果, 目前还很难判定基因沉默是由多拷贝插入引起还是由于插入了小麦异染色质等部位引起。

真核生物的基因大多含有内含子, 基因表达时首先形成前体 RNA, 再经内含子的剪切形成成熟的 mRNA, 以进行下一步的翻译和调控。内含子剪切识别位点的强弱、内含子的长度、相邻外显子的序列以及前体 RNA 的二级结构等都会影响内含子的正

确剪切,特别是识别位点的突变极易造成内含子的剪切错误(陈县明,2010)。本研究由转基因植株 S1-1 形成的纯合后代株系中 *AtNPR1* 基因所含内含子均不能切除,测序结果发现,RT-PCR 扩增的 853 bp 片段中,两个内含子的识别位点都没有发生突变,表明内含子未剪切不是由识别位点突变引起,RT-PCR 除扩增出 853 bp 片段,还有表达量稍低 1 165 bp 片段出现,测序结果显示该片段是基因重排的结果,在重排的基因中,位于 *AtNPR1* 基因的 562~640 bp 和 1 377~1 484 bp 间的内含子均未出现在表达序列中,原位于 1 689~1 798 bp 的内含子只有 1 777~1 789 bp 出现在重排基因中,失去了内含子识别的 5'ss (splice site) 序列,推测可能是该重排基因的表达干扰了 *AtNPR1* 基因的正常剪切,未能形成有功能的表达产物,转基因株系的表型—纹枯病抗性未有显著提高。

3 材料与方 法

3.1 植物材料

拟南芥为哥伦比亚生态型,为本实验室保存。江苏里下河地区农科所小麦室提供扬麦 12 号转基因受体品种,开花后 12~14 d 的小麦幼胚用于转化研究。

3.2 *AtNPR1* 基因的克隆及载体构建

采用 CTAB 法提取拟南芥叶片 DNA。根据 *AtNPR1* 基因 DNA 序列(GenBank accession no. EF470-723)设计 PCR 扩增引物对 *AtNPR1*-F: 5'-accgggC-TGTTGATGGACACCACATTGATGG-3' (下画线为引入的 *Sma* I 酶切位点)和 *AtNPR1*-R: 5'-agagctcGC-AAAAATTACTACTAAGAGGCAAG-3' (下画线为引入的 *Sac* I 酶切位点),以提取的叶片 DNA 为模板,采用 TaKaRa LA *Taq* 酶扩增 *AtNPR1* 基因,回收 2125 bp 的扩增片段,连接到 pGEM-T 载体 (Promega),产生 pGEM-T-NPR1 质粒,生工生物工程(上海)有限公司测序,测序结果进行 Blast 验证。

采用限制性内切酶 *Sma* I 和 *Sac* I 双酶切质粒 pGEM-T-NPR1,获得 *AtNPR1* 基因,将该基因替换质粒 pACH25 (Christensen and Quail, 1996)中的 *Sma* I 和 *Sac* I 位点间的 *gus* 基因即获得表达载体 pACN-PR1,其中玉米 Ubiquitin 组成型高表达启动子控制 *AtNPR1* 基因的表达,*bar* 基因为筛选标记基因,该基因抗除草剂 L-PPT (L-phosphinothricin) (图 1)。

3.3 小麦转基因植株的获得

小麦转化过程中,质粒提取和包裹金粉以及基因枪轰击的参数按周森平等(2008)文献略作修改。

基因枪轰击前后用 0.4 mol/L 山梨醇高渗处理幼胚 16 h,轰击后,在未加选择压的愈伤诱导培养基(MS 基本培养基添加 2 mg/L 2,4-D)暗培 4 d 后,转入添加 3 mg/L L-PPT 愈伤诱导培养基诱导培养 21 d,抗性愈伤然后转入分化培养基(MS 基本培养基添加 1 mg/L KT 和 1 mg/L NAA 以及 3 mg/L L-PPT)分化 42 d,再生抗 L-PPT 幼苗转入生根培养基(1/2MS 添加 3 mg/L L-PPT),待幼苗长至 6~8 cm 长时转移至钵,取叶片样品提取 DNA 用于分子检测,套袋自交结实收获 T_0 代种子。

T_0 代种子播于 72 孔塑料穴盆中,萌发产生 T_1 代植株,于 2~3 叶时喷施含 100 mg/L L-PPT 有效成分的 Basta 除草剂溶液继续筛选,根据 T_1 代植株抗 Basta 的分离结果推断 T_0 代植株是否为转基因阳性植株。

3.4 转基因小麦 *AtNPR1* 基因的分子检测

采用 CTAB 法抽提抗 Basta 植株的叶片 DNA,进行 *AtNPR1* 基因 PCR 检测,上游引物(*NPR1*-F1): 5'-GAAGGTAGAACC GCACTC-3';下游引物(*NPR1*-R1): 5'-GTCGAATCTGTCAGGGAC-3',预期扩增片段为 853 bp,含 108 bp 和 110 bp 的 2 个内含子。PCR 的总体积为 20 μ L,含 1 \times Buffer、1.5 mmol/L MgCl₂、0.2 mmol/L dNTPs、0.5 μ mol/L 引物、50 ng 模板 DNA、1 U *Taq* 酶(TaKaRa)。PCR 条件为 95 $^{\circ}$ C 先预变性 3 min;然后 94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 45 s,扩增 35 个循环;然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测分析扩增片段。

3.5 转基因小麦 *AtNPR1* 基因的表达分析

用 SV Total RNA Isolation System 试剂盒(Promega)提取 T_5 代转基因植株叶片总 RNA,按照 Prime-Script RT-PCR 试剂盒(TaKaRa)说明书合成 cDNA 并进行半定量 RT-PCR 分析,*AtNPR1* 基因扩增引物与分子检测相同,正常表达(切除内含子)的预期扩增片段为 635 bp。采用 18S rRNA 基因作为内参基因(18S-QF: 5'-GTGACGGGTGACGGAGAAT-3';18S-QR:5'-GACACTAATGCGCCCGGTAT-3')。PCR 的总体积为 25 μ L,含 1 \times Buffer II、0.4 mmol/L dNTPs、0.6 μ mol/L 引物、2 μ L cDNA 模板、1.25 U Ex *Taq* HS 酶(TaKaRa)。PCR 程序为 95 $^{\circ}$ C 先预变性 3 min;然后 94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 45 s,扩增 30 个循环;然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。1.2%琼脂糖凝胶电泳检测分析扩增片段。部分扩增产物的测序和验证同 3.2。

3.6 转基因小麦的纹枯病抗性鉴定

采用病麦粒接种法鉴定转基因小麦的纹枯病抗性。拔节期时将带有禾谷丝核菌 *R. cerealis* R0301 菌丝的病麦粒均匀播于转基因小麦植株基部, 弥雾保湿 7 d。小麦乳熟期时调查纹枯病发病情况, 每个转基因株系随机调查 15 个发病茎秆, 重复 2 次, 病级调查按 1~5 级标准, 1 级: 叶鞘有典型病斑, 病菌不侵入茎秆; 2 级: 病菌侵入茎秆, 但病斑宽度不超过茎秆周长的 1/2; 3 级: 病斑宽度在 1/2~3/4 茎秆周长之间; 4 级: 病斑宽度占茎秆周长的 3/4 以上; 5 级: 枯孕穗或枯白穗。分别计算各转基因株系平均病级和平均病情指数。平均病情指数 = $\frac{(1 \times \chi^1 + 2 \times \chi^2 + 3 \times \chi^3 + 4 \times \chi^4 + 5 \times \chi^5) / [(1 \times \chi^1 + \chi^2 + \chi^3 + \chi^4 + \chi^5) \times 5]}{\times 100}$, 式中: $\chi^1, \chi^2, \dots, \chi^5$ 分别代表 1, 2, \dots, 5 级的茎秆数。采用 SAS 9.0 软件进行方差分析。

作者贡献

周淼平、杨学明、张鹏和余桂红是本研究的实验设计和实验研究的执行人; 周淼平是项目的构思者及负责人, 完成数据分析和论文初稿的写作; 姚金保和马鸿翔指导实验设计和论文修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家转基因生物新品种培育重大专项(2011-ZX08002001)、江苏省产学研联合创新基金(BY2012208)、江苏省科技支撑计划项目(BE2011306)、国家科技支撑项目(2011BAD35B03)和江苏省农业科技自主创新资金(CX11-1025)共同资助。感谢江苏省里下河农科所小麦室提供扬麦 12 号小麦种子、江苏省农科院植保所陈怀谷研究员提供禾谷丝核菌 R0301。

参考文献

Cai S.B., Ren L.J., Yan W., Wu J.Z., Chen H.G., Wu X.Y., and Zhang X.Y., 2006, Germplasm development and mapping of resistance to sharp eyespot (*Rhizoctonia cerealis*) in Wheat, *Zhongguo Nongye Kexue* (Scientia Agricultura Sinica), 39(5): 928-934 (蔡士宾, 任丽娟, 颜伟, 吴纪中, 陈怀谷, 吴小有, 张仙义, 2006, 小麦抗纹枯病种质创新及 QTL 定位的初步研究, *中国农业科学*, 39(5): 928-934)

Cao H., Glazebrook J., Clarke J.D., Volko S., and Dong X., 1997, The Arabidopsis *NPR1* gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats, *Cell*, 88(1): 57-63 [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81858-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81858-9)

Cao H., Li X., and Dong X.N., 1998, Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essen-

tial regulatory gene in systemic acquired resistance, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 95(11): 6531-6536 <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.95.11.6531> PMID:9601001 PMCid:34-547

Che D.D., Fan J.P., Wang J.G., Xu P., Yang T., and Liu S.K., 2008, Cloning and analysis of full-length cDNA of *PumNPR1* gene from *Pyrus ussuriensis* Maxim, *Journal of Northeast Agricultural University*, 15(2): 12-17

Chen G.S., Zhang Z., Zhou Y.F., Lin S., Guo Y.G., and Pan D.R., 2009, Construction of plant expression vector of *IbNPR1* gene and transformation in tobacco, *Redai Zuowu Xuebao* (Chinese Journal of Tropical Crops), 30(10): 1484-1487 (陈观水, 张铮, 周以飞, 林生, 郭友国, 潘大仁, 2009, 甘薯 *IbNPR1* 基因表达载体的构建及转化烟草, *热带作物学报*, 30(10): 1484-1487) <http://dx.doi.org/10.1117/2.1200909.17-39> <http://dx.doi.org/10.1117/2.1200909.1719> <http://dx.doi.org/10.1117/2.1200911.1849> <http://dx.doi.org/10.1117/2.1200905.1467> <http://dx.doi.org/10.1117/2.1200901.1482> <http://dx.doi.org/10.1117/2.1200908.1757>

Chen L., Zhang Z.Y., Liang H.X., Liu H.X., Du L.P., Xu H.J., and Xin Z.Y., 2008, Overexpression of TiERF1 enhances resistance to sharp eyespot in transgenic wheat, *J. Exp. Bot.*, 59(15): 4195-4204 <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/ern259> PMID:18 953072 PMCid:2639029

Chen X.M., 2010, Summary on recognition and alternative splicing of intron, *Anhui Nongxue Tongbao* (Anhui Agricultural Science Bulletin), 16(10)29-30 (陈县明, 2010, 内含子的识别和选择性剪切, *安徽农学通报*, 16(10): 29-30)

Chern M.S., Fitzgerald H.A., Yadav R.C., Canlas P.E., Dong X., and Ronald P.C., 2001, Evidence for a disease-resistance pathway in rice similar to the NPR1-mediated signaling pathway in Arabidopsis, *Plant J.*, 27(2): 101-113 <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.01070.x> PMID:11489 188

Chern M.S., Fitzgerald H.A., Canlas P.E., Navarre D.A., and Ronald P.C., 2005, Overexpression of a rice NPR1 homolog leads to constitutive activation of defense response and hypersensitivity to light, *Mol. Plant Microbe Interact.*, 18 (6): 511-520 <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-18-0511> PMID:159-8-6920

Christensen A.H., and Quail P.H., 1996, Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants, *Transgenic Res.*, 5(3): 213-218 <http://dx.doi.org/10.1007/BF019697-12> PMID:8673150

Endah R., Beyene G., Kiggundu A., van den Berg N., Schluter U., Kunert K., and Chikwamba R., 2008, Elicitor and Fusarium-induced expression of *NPR1*-like genes in banana, *Plant Physiol. Biochem.*, 46(11): 1007-1014 <http://dx.doi.org/10.1007/2.1200909.1719>

- 1016/j.plaphy.2008.06.007 PMID:18657982
- Friedrich L., Lawton K., Dietrich R., Willits M., Cade R., and Ryals J., 2001, NIM1 overexpression in Arabidopsis potentiates plant disease resistance and results in enhanced effectiveness of fungicides, *Mol. Plant Microbe Interact.*, 14: 111-4-1124 <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.9.1114> PMID:11551076
- Henanff G.L., Heitz T., Mestre P., Mutterer J., Walter B., and Chong J., 2009, Characterization of *Vitis vinifera* NPR1 homologs involved in the regulation of *Pathogenesis-Related* gene expression, *BMC Plant Biol.*, 9: 54 <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2229-9-54> PMID:19432948 PMCid:268-6700
- Lin W.C., Lu C.F., Wu J.W., Cheng M.L., Lin Y.M., Yang N.S., Black L., Green S.K., Wang J.F., and Cheng C.P., 2004, Transgenic tomato plants expressing the *Arabidopsis* NPR1 gene display enhanced resistance to a spectrum of fungal and bacterial diseases, *Transgenic Res.*, 13(6): 567-581 <http://dx.doi.org/10.1007/s11248-004-2375-9> PMID:15672838
- Liu Y., Schiff M., Marathe R., and Dinesh-Kumar S.P., 2002, Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus, *Plant J.*, 30(4): 415-429 <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-13X.2002.01297.x> PMID:12028572
- Lu Y., Zhang Z.Y., Ren L.J., Liu B.Y., Liao Y., Xu H.J., Du L.P., Ma H.X., Ren Z.L., Jing J.X., and Xin Z.Y., 2009, Molecular analyses on *Rs-AFP2* transgenic wheat plants and their resistance to *Rhizoctonia cerealis*, *Zuowu Xuebao (Acta Agronomica Sinica)*, 35(4): 640-646 (路妍, 张增艳, 任丽娟, 刘宝业, 廖勇, 徐惠君, 杜丽璞, 马鸿翔, 任正隆, 井金学, 辛志勇, 2009, 转*Rs-AFP2*基因小麦的分子分析及其纹枯病抗性, *作物学报*, 35(4): 640-646)
- Makandar R., Essig J.S., Schapaugh M.A., Trick H.N., and Shah J., 2006, Genetically engineered resistance to Fusarium head blight in wheat by expression of Arabidopsis NPR1, *Mol. Plant Microbe Interact.*, 19(2): 123-129 <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-19-0123> PMID:16529374
- Malnoy M., Jin Q., Borejsza-Wysocka E.E., He S.Y., and Aldwinckle H.S., 2007, Overexpression of the apple *Mp-NPR1* gene confers increased disease resistance in *Malus × domestica*, *Mol. Plant Microbe Interact.*, 20(12): 1568-1580 <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-20-12-1568> PMID:17990964
- Sandhu D., Tasma I.M., Frasc R., and Bhattacharyya M.K., 2009, Systemic acquired resistance in soybean is regulated by two proteins, Orthologous to Arabidopsis NPR1, *BMC Plant Biol.*, 9: 105 <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2229-9-105> PMID:19656407 PMCid:2738679
- Shi Z., Maximova S.N., Liu Y., Verica J., and Guiltinan M.J., 2010, Functional analysis of the theobroma cacao NPR1 gene in Arabidopsis, *BMC Plant Biol.*, 10: 248 <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2229-10-248> PMID:21078185 PMCid:3095330
- Stam M., Mol J.M., and Kooter J.M., 1997, The silence of genes in transgenic plants, *Annals of Botany*, 79: 3-12 <http://dx.doi.org/10.1006/anbo.1996.0295>
- Tang Y.M., Zhang Z.Y., and Xin Z.Y., 2007, Isolation and characterization of NPR1 homolog gene *TiNHI* in *Thinopyrum intermedium*, *Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica)*, 40(6): 1101-1107 (唐益苗, 张增艳, 辛志勇, 2007, 中间偃麦草NPR1同源基因*TiNHI*的分离和特性分析, *中国农业科学*, 40(6): 1101-1107)
- Wang X.J., Dou D.L., Wang Z.X., and Jia S.R., 2006, Cloning full-length cDNA of *GbNPR1* gene from *Gossypium barbadense* and its expression in transgenic tobacco, *Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica)*, 39(5): 886-894 (王旭静, 窦道龙, 王志兴, 贾士荣, 2006, 海岛棉*GbNPR1*基因全长cDNA的克隆及其在烟草中的表达, *中国农业科学*, 39(5): 886-894)
- Yuan Y., Zhong S., Li Q., Zhu Z., Lou Y., Wang L., Wang J., Wang M., Li Q., Yang D., and He Z., 2007, Functional analysis of rice *NPR1*-like genes reveals that *OsNPR1/NHI* is the rice orthologue conferring disease resistance with enhanced herbivore susceptibility, *Plant Biotechnol. J.*, 5(2): 313-324 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1467-7652.2007.00243.x> PMID:17309686
- Zhang H.Z., and Cai X.Z., 2005, Nonexpressor of pathogenesis-related genes 1 (NPR1): a key node of plant Disease resistance signaling network, *Shengwu Gongcheng Xuebao (Chinese Journal of Biotechnology)*, 21(4): 511-515 (张红志, 蔡新忠, 2005, 病程相关基因非表达子1 (NPR1): 植物抗病信号网络中的关键节点, *生物工程学报*, 21(4): 511-515)
- Zhou M.P., Yu G.H., Ren L.J., Zhu W.F., and Ma H.X., 2008, Screening of transgenic wheat plants resistant to herbicide, *Mailei Zuowu Xuebao (Journal of Triticeae Crops)*, 28(6): 935-940 (周淼平, 余桂红, 任丽娟, 朱伟芳, 马鸿翔, 2008, 转抗除草剂基因小麦植株的筛选方法研究, *麦类作物学报*, 28(6): 935-940)