



转 *CiNPR4* 基因柑橘抗溃疡病的机制解析

张婧芸, 刘语诺, 王兆昊, 彭爱红[✉], 陈善春, 何永睿[✉]

西南大学柑桔研究所, 重庆 400712

摘要:【目的】病程相关基因非表达子1(non-expressor of pathogenesis-related gene 1, NPR1)是水杨酸(salicylic acid, SA)介导的系统获得性抗性信号转导途径中一个重要的转录因子,在调节植物的抗病方面发挥着关键性的作用。研究耐黄龙病的‘Jackson’葡萄柚(*Citrus paradisi*)中的NPR1-like基因*CiNPR4*对柑橘溃疡病的抗性,解析过表达*CiNPR4*的转基因晚锦橙(*C. sinensis*)抗柑橘溃疡病的机理。【方法】选取黄龙病抗性增强的*CiNPR4*转基因柑橘,采取完全成熟的叶片利用针刺法进行柑橘溃疡病的离体抗性评价分析;在此基础上,对溃疡病抗性增强的*CiNPR4*转基因植株利用针刺法离体接种溃疡病菌(*Xanthomonas citri* subsp. *citri*, *Xcc*),统计接种*Xcc*后0、1、3、5、7和9 d的细菌数量;利用注射法对溃疡病抗性增强的*CiNPR4*转基因植株叶片接种*Xcc*,接种后0、3和5 d收集接种部位的叶片,测定叶片中SA和茉莉酸(jasmonic acid, JA)含量;同时,收集接种*Xcc*后0、3和5 d接种部位的叶片,利用实时荧光定量PCR分析SA和JA分别介导的防御反应相关基因*CsPR1*和*CsPDF1.2*在*Xcc*诱导下表达水平的变化;根据*CiNPR4*蛋白与TGA转录因子相互作用网络预测*CiNPR4*互作蛋白为Ciclev10005080m和Ciclev10001081m,以甜橙为参考基因组,将这两个基因在<https://www.citrusgenomedb.org/>网站上进行blastx分析,预测*CiNPR4*在甜橙基因组中互作的候选蛋白,克隆*CiNPR4*和候选蛋白基因的cDNA,利用同源重组法分别构建诱饵载体和猎物载体,并将诱饵质粒和猎物质粒共转入酵母菌株Y2HGold中,进行点对点酵母双杂交分析。【结果】*CiNPR4*的超量表达减轻了转基因柑橘叶片上溃疡病的症状,柑橘溃疡病抗性增强的*CiNPR4*转基因植株叶片上*Xcc*的生长比较缓慢,在接种*Xcc*后9 d,转基因植株*Xcc*数量显著低于野生型(wild type, WT)晚锦橙;*Xcc*诱导0 d,溃疡病抗性增强的*CiNPR4*转基因植株含有与WT植株无差异的SA含量,随着*Xcc*诱导时间的延长,*CiNPR4*转基因植株中SA的含量显著增加;而*Xcc*处理0 d时,WT植株含有显著高于*CiNPR4*转基因植株的JA含量,随后,JA含量在*CiNPR4*转基因植株中逐步上升,*Xcc*处理5 d时,达到显著高于WT植株的水平;而WT植株在整个处理期间SA和JA的含量基本保持不变;溃疡病抗性增强的转基因植株受*Xcc*诱导3 d时*CsPR1*的表达水平迅速上升,达到与WT植株差异显著的水平,而*CsPDF1.2*的表达水平在*Xcc*诱导5 d时上升;WT植株受*Xcc*诱导后*CsPR1*的表达水平没有发生显著变化,而*CsPDF1.2*的表达水平在*Xcc*诱导5 d时上升,且显著高于*CiNPR4*转基因植株中*CsPDF1.2*的表达水平;酵母双杂交分析证实,*CiNPR4*与甜橙基因组中的CsTGA2转录因子互作。【结论】*CiNPR4*与CsTGA2转录因子互作,通过促进SA而抑制JA介导的防御反应,调控转基因柑橘对溃疡病的抗性。

关键词: *CiNPR4*; 柑橘溃疡病; 水杨酸; 茉莉酸; TGA转录因子

Analysis of Resistance Mechanism of *CiNPR4* Transgenic Plants to Citrus Canker

ZHANG JingYun, LIU YuNuo, WANG ZhaoHao, PENG AiHong[✉], CHEN ShanChun, HE YongRui[✉]

Citrus Research Institute, Southwest University, Chongqing 400712

收稿日期: 2021-02-07; 接受日期: 2021-04-25

基金项目: 广东省重点领域研发计划(2018B020202009)、国家现代农业产业技术体系建设资金(CARS-26)

联系方式: 张婧芸, E-mail: xixianzhangjingyun@163.com. 通信作者彭爱红, E-mail: pengaihong@cric.cn. 通信作者何永睿, E-mail: heyongrui@cric.cn

Abstract: 【Objective】 Non-expressor of pathogenesis-related genes 1 (NPR1) is an important transcription factor in salicylic acid (SA)-mediated signal transduction of systemic acquired resistance and plays a key role in regulating plant disease resistance. The objective of this study is to evaluate the resistance of *CiNPR4*, a *NPR1*-like gene from Huanglongbing-tolerant ‘Jackson’ grapefruit (*Citrus paradisi*), to citrus canker and preliminarily explore the resistance mechanism of *CiNPR4* transgenic plants to citrus canker.

【Method】 The fully mature leaves from Huanglongbing-resistant *CiNPR4* transgenic citrus plants were selected to challenge the *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*) pathogen via *in vitro* pin-prick inoculation. Then, the *CiNPR4* transgenic plants with enhanced resistance to citrus canker were inoculated with *Xcc in vitro* by the pin-prick method and then counted the number of *Xcc* at 0, 1, 3, 5, 7 and 9 d after inoculation. The leaves of *CiNPR4* transgenic plants with enhanced resistance to citrus canker were inoculated with *Xcc* by injection and collected at 0, 3 and 5 d after inoculation. The contents of SA and jasmonic acid (JA) in the leaves were measured. Meanwhile, the expression level of defense-related genes *CsPR1* and *CsPDF1.2* mediated by SA and JA, respectively, was analyzed by quantitative real-time PCR. According to the interaction network of *CiNPR4* protein and TGA transcription factor, it is predicted that Ciclev10005080m and Ciclev10001081m can interact with *CiNPR4*, respectively, these two genes were analyzed by blastx on the website <https://www.citrusgenomedb.org/> to predict the candidate proteins that interact with *CiNPR4* in the sweet orange genome. Then, the cDNA sequences of *CiNPR4* and candidate protein genes were cloned, and inserted into the pGBKT7 and pGADT7 plasmid to construct the bait and prey vectors by homologous recombination method, respectively. After that, the bait and prey plasmids were co-transformed into yeast strain Y2HGold for point-to-point yeast two-hybridization analysis. 【Result】 The disease resistance evaluation *in vitro* showed that overexpression of *CiNPR4* alleviated the symptoms of citrus canker on transgenic citrus plants. *Xcc* grew slowly in the leaves of *CiNPR4* transgenic plants with enhanced resistance to citrus canker during the entire observation period, and the number of *Xcc* in the transgenic plants was significantly lower than that of wild-type (WT) plants at 9 d after inoculation. The SA contents among the transgenic citrus lines and WT plants were not significantly different at 0 d. However, with the prolongation of *Xcc* induction time, the SA content in *CiNPR4* transgenic plants significantly increased. The JA content in WT plants was significantly higher than that in *CiNPR4* transgenic plants at 0 d after inoculation, after that, the JA content in *CiNPR4* transgenic plants gradually increased and was significantly higher than that in WT plants at 5 d after *Xcc* induction. However, the SA and JA contents in WT plants were not significantly changed during the entire induction period. The expression level of *CsPR1* was significantly increased in the transgenic plants with increased canker resistance than that in WT plants after *Xcc* induction for 3 d, and the expression level of *CsPDF1.2* in the above-mentioned transgenic plants increased at 5 d after inoculation. However, WT plants exhibited no significantly different expression of *CsPR1* after *Xcc* induction, but had an increased expression level of *CsPDF1.2* at 5 d after inoculation, which was significantly higher in WT plants than that in the *CiNPR4* plants. The interaction between *CiNPR4* and *CsTGA2* was confirmed by the yeast two-hybrid analysis. 【Conclusion】 These results indicated that *CiNPR4* interacts with *CsTGA2* to regulate the resistance of transgenic plants to citrus canker by promoting SA- and inhibiting JA-mediated defense response.

Key words: *CiNPR4*; citrus canker; salicylic acid; jasmonic acid; TGA transcription factor

0 引言

【研究意义】柑橘溃疡病是由柑橘黄单胞菌柑橘致病亚种 (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*, *Xcc*) 引起的细菌性病害, 流行于世界主要柑橘产区, 每年给柑橘产业造成高达数亿美元的经济损失。柑橘溃疡病由于危害大、传播快、难防治, 是国内外重要的检疫性病害^[1-3]。培育并推广抗溃疡病的优良柑橘新品种是防治柑橘溃疡病最根本和最有效的途径, 对柑橘产业的健康稳定发展具有十分重要的意义。【前人研究进展】利用抗溃疡病的柑橘品种与易感品种进行有性杂交, 从杂交后代中筛选出抗溃疡病的后代, 是培育抗溃疡病柑橘品种的途径之一^[4]。但由于柑橘类果树的遗传

背景高度杂合, 基因间紧密连锁、珠心胚干扰等原因, 使得杂交育种的效率较低, 难以培养出抗溃疡病的优良柑橘新品种。近年来, 植物基因工程的迅速发展为柑橘品种改良开辟了一条新途径, 使短期内进行柑橘品种的定向改良成为可能^[5-6]。植物受到病原物侵染后体内的水杨酸 (salicylic acid, SA) 水平上升, 并由病原物侵入点向周围进行扩散, 诱导植物产生系统获得性抗性 (systemic acquired resistance, SAR)^[7-8]。在 SA 介导的 SAR 途径中, 病程相关基因非表达子 1 (non-expressor of pathogenesis-related genes 1, NPR1) 以及两个 NPR1 同源物 NPR3 和 NPR4 参与了植物对病原物的防御反应^[9-11]。植物细胞感知 SA 信号后, 细胞内的氧化还原势发生变化, NPR1 在细胞质中

由寡聚体变成单体,并在其 C-末端核定位信号的介导向下向细胞核中进行移动。在细胞核中, NPR1 与 TGA 转录因子结合,促进病程相关基因 (pathogenesis-related gene, PR) 的表达,增强植物对病原物的抗性^[12-13]。通过导入拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的 *NPR1* (*AtNPR1*) 已获得了抗溃疡病和黄龙病的转基因柑橘^[14-15]。*AtNPR1* 与甜橙基因组中的 *CtNHI* 具有较高的同源性,通过超表达 *CtNHI* 提高了柑橘对溃疡病的抗性^[16]。进一步的研究表明,超量表达 *AtNPR1* 或 *CtNHI* 组成型均提高了与防御反应相关的基因如 *CsPR1*、*CsPR2* 或 *Chi1* 的表达。不同于 *AtNPR1*, *AtNPR4* 调控植株防御反应的方式具有争议性, LIU 等^[17]利用反向遗传学,在研究 *AtNPR4* 的功能时发现, *AtNPR4* 突变体 *npr4-1* 对丁香假单胞菌 DC3000 (*Pseudomonas syringe* pv. *tomato* DC3000) 敏感;且 *NPR4* 正向调控 SA 和茉莉酸 (jasmonic acid, JA) 分别诱导的防御反应相关基因 *PR1* 和 *PDF1.2* 的表达。这些结果表明, *AtNPR4* 正向调控了拟南芥对丁香假单胞菌 DC3000 的抗性。而另一个 *AtNPR4* 突变体 *npr4-3* 受丁香假单胞菌 ES4326 (*Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* ES4326) 和卵菌 (*Hyaloperonospora parasitica* Noco2) 诱导后,其抗性或敏感性水平并没有发生变化;但 *AtNPR3/4* 双突变体 *npr3-1/npr4-3* 却表现出比 *AtNPR3* 单突变体 *npr3-1* 更高的 *PR1* 表达水平和更强的抗丁香假单胞菌 ES4326 和卵菌特性,因而推测 *AtNPR4* 负向调控了植株的防御反应^[18]。DING 等^[11]在拟南芥原生质体中超量表达 *AtNPR4*, 防御反应相关基因 *SARD1* 和 *WRKY70* 的表达水平受到了抑制,进一步证明了 *AtNPR4* 对植株防御反应的负向调控。耐黄龙病的 ‘Jackson’ 葡萄柚受到柑橘黄龙病菌侵染后,其体内的一个 *CiNPR4* (Ciclev10031749m) 上调表达^[19]。研究表明,在甜橙中导入 *CiNPR4* 增加了转基因植株对柑橘黄龙病的抗性。转录组分析证实,黄龙病抗性增强的 *CiNPR4* 转基因植株中与防御反应相关的基因上调表达。这些结果表明超量表达 *CiNPR4* 提高了柑橘的内在免疫力^[20]。【本研究切入点】异源表达拟南芥 *AtNPR1* 能够同时提高转基因柑橘对溃疡病和黄龙病的抗性。但 *AtNPR4* 正向还是负向调控植物防御仍具有争议性,柑橘 *CiNPR4* 与柑橘溃疡病抗性相关性鲜有研究。【拟解决的关键问题】以过表达抗黄龙病基因 *CiNPR4* 转基因晚锦橙 (*Citrus sinensis* Osbeck) 为材料进行溃疡病抗性评价,探讨 *CiNPR4* 在柑橘溃疡病菌生物胁迫信号途径中相关激素应答和

抗性诱导的相关性,明确 *CiNPR4* 对柑橘溃疡病的抗性机理。

1 材料与方法

1.1 植物材料

供试 7 个 *CiNPR4* 转基因株系 (N1、N2、N8、N12、N20、N21 和 N28)^[20]以及野生型 (WT) 晚锦橙均来自于西南大学柑桔研究所国家柑桔品种改良中心。试验于 2020 年 4 月开始,在西南大学柑桔研究所国家柑桔品种改良中心完成。

1.2 *CiNPR4* 转基因植株的溃疡病抗性评价

在进行溃疡病抗性评价前 3 d,将 *Xcc* 菌株 YN1 (本实验室保存) 在 LB 固体培养基上活化^[21]。接种前 1 d,挑选活化的 *Xcc* 置于 LB 液体培养基中,在 220 r/min、28℃ 的摇床上振荡培养过夜。用紫外分光光度计测量菌液的 OD₆₀₀ 值。用 LB 液体培养基稀释菌液,使其 OD₆₀₀ 值为 0.1,继续在上述培养条件下振荡培养至 OD₆₀₀ 值为 0.5。菌液置离心管中,在离心机上以 5 000 r/min 离心 10 min,弃上清,收集菌体。加入与上清液等体积的无菌水重悬。将菌液进行连续梯度稀释 1 000 倍 (5×10^5 cfu/mL) 备用。选取完全展开的 6 个月叶龄 *CiNPR4* 转基因株系和 WT 植株的叶片,无菌水洗净,平铺至 150 mm 的培养皿中,并在叶柄处放置一块充分吸水的脱脂棉。用针头 (0.5 mm) 在叶脉分左右两边针刺叶片,每边针刺相同孔数,每个针孔接种 1 μ L 上述 *Xcc* 稀释菌液。培养皿用 Parafilm 膜封口,于 28℃、光照 16 h·d⁻¹ 的培养箱中培养。每天观察一次发病情况,接种后 10 d 观察病情并拍照。用 ImageJ 软件统计叶片接种点处溃疡病斑的面积。相对抗病率=转基因植株的病斑面积/WT 植株的病斑面积^[22]。试验 3 次重复。

Xcc 生长曲线的分析参照 PENG 等^[22]的方法进行。分别于接种后 0、1、3、5、7 和 9 d 用直径为 0.5 cm 的打孔器取下转基因植株和 WT 植株接种区域的叶圆片,3 个叶圆片为一组,放入 1.5 mL 的离心管中,加入 200 μ L 的无菌水,捣碎,定容至 1 000 μ L,连续梯度稀释,取 50 μ L 的菌液涂布 LB 平板,28℃ 培养 2 d,统计菌斑个数。每平方厘米叶片组织中的 *Xcc* 细胞= (菌斑个数 \times 稀释倍数 \times 1000) / [$50 \times \pi$ (直径/2)² \times 3]。试验 3 次重复。

1.3 内源 SA 和 JA 含量的测定

按上述 1.2 中的方法准备 OD₆₀₀ 值为 0.5 的 *Xcc* 菌液。采取健康的转基因植株和 WT 植株充分展开的叶

片, 参照 DUAN 等^[23]的方法将 OD₆₀₀ 为 0.5 的 *Xcc* 菌液用 1 mL 去针头的注射器接种转基因植株和 WT 植株叶片, 于 28℃、光照 16 h·d⁻¹、相对湿度 85% 的培养箱中培养。接种后 0、3 和 5 d 分别采集 0.5 g 的叶片。叶片收集后迅速用液氮速冻, 用植物激素 SA 和 JA 酶联免疫试剂盒 (Sinobestbio, 上海, 中国) 分别测定 SA 和 JA 的含量。SA 和 JA 含量测定由赛诺生物科技有限公司 (上海, 中国) 完成。试验 3 次重复。

1.4 RNA 的提取和表达分析

按照上述 1.3 中的方法对 *CiNPR4* 转基因植株和 WT 植株的叶片进行 *Xcc* 接种。分别收集未处理和接种 *Xcc* 后 0、3 和 5 d 的叶片 50 mg, 叶片收集后迅速投入液氮中, 利用 RNA 快速提取试剂盒 (RN09, Aidlab, 北京, 中国) 提取总 RNA, 方法参照说明书。对 RNA 样品浓度和质量测定后, 将 500 ng 的 RNA 用 iScriptTM cDNA Synthesis Kit 试剂盒反转录成 cDNA。使用 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 进行 *CsPR1* 和 *CsPDF1.2* 的表达分析。*CsPR1*、*CsPDF1.2* 和内参基因 *Actin* 的表达分析引物见表 1。反应体系 (12 μL): 6 μL 荧光染料试剂 iTaqTM Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), 上、下游引物各 0.3 μL, cDNA 模板 1 μL, 加 ddH₂O 至 12 μL。采用 2^{-ΔΔCt} 法^[24], 以各自健康的植株为参照, *Actin* 为内参基因, 分别计算相应的转基因植株和 WT 植株感病后的 *CsPR1* 和 *CsPDF1.2* 表达水平。试验 3 次重复。

1.5 酵母双杂交分析

根据 *CiNPR4* 蛋白与 TGA 转录因子相互作用网络, 预测 *CiNPR4* 分别与 *Ciclev10005080m* 和 *Ciclev10001081m* 基因编码的蛋白互作^[19]。以甜橙为参考基因组, 将这两个基因在 <https://www.citrusgenomedb.org/> 网站上进行 blastx 分析^[25], 找到与 *Ciclev10005080m* 和 *Ciclev10001081m* 基因编码的氨基酸序列相同或者相似性较高的基因, 这些基因所编码的蛋白为候选蛋白。

以 *CiNPR4* 的 cDNA 序列设计引物对 *CiNPR4*-f/*CiNPR4*-r (表 1), 以 pUC57:*CiNPR4* 质粒 (本实验室保存, 此质粒含有 *CiNPR4* 的 cDNA 序列) 为模板, 扩增获得 *CiNPR4* 的 cDNA 序列。对酵母载体 pGBKT7 进行 *EcoR* I 单酶切, 回收产物与 *CiNPR4* 的 cDNA 序列通过同源重组试剂盒 (Cat639648, TaRaKa, 大连, 中国) 进行同源重组并进行测序验证, cDNA 序列正确的质粒确认为诱饵质粒 pGBKT7:*CiNPR4*。

根据与 *CiNPR4* 互作的候选蛋白的 cDNA 序列以及 pGADT7 质粒序列, 以 *EcoR* I 和 *BamH* I 为酶切位点, 按上述方法设计同源重组引物 (表 1)。按照上述 1.4 中的方法提取 WT 植株的 RNA, 并反转录成 cDNA。以晚锦橙的 cDNA 序列为模板, 利用同源重组引物对分别进行扩增。参照上述诱饵质粒的构建方法将候选蛋白的 cDNA 序列插入 pGADT7 中, 获得猎物质粒 pGADT7:候选蛋白。

表 1 本研究所用引物
Table 1 Primers used in this study

| 引物名称 Primer name | 引物序列 Primer sequence (5'→3') | 用途 Usage |
|------------------|--|---|
| CsPR1-f | AAATGTGGGTGAATGAGAAAGC | <i>CsPR1</i> 的表达分析 Expression analysis of <i>CsPR1</i> |
| CsPR1-r | ATTATTGTTGCACGTCACCTTG | |
| CsPDF1.2-f | CAGTGGCAGAAGCAAAACAA | <i>CsPDF1.2</i> 的表达分析 Expression analysis of <i>CsPDF1.2</i> |
| CsPDF1.2-r | CCGGGGAAGTCGTAGTGGC | |
| Actin-f | CATCCTCAGCACCTTCC | 柑橘 <i>actin</i> 的表达分析 Expression analysis of citrus <i>actin</i> |
| Actin-r | CCAACCTTAGCACTTCTCC | |
| CiNPR4-f | CATGGAGGCCGAATTATGGTTGAGAAGGCTCTCGTGG | <i>CiNPR4</i> 的 cDNA 扩增 Amplification of cDNA from <i>CiNPR4</i> |
| CiNPR4-r | GGATCCCCGGGAATTTTAATTGCTCGTGCCGAGG | |
| CsTGA2-f | GCCATGGAGGCCAGTGAATTCATGGAGAATGCTGTTGACCT | <i>CsTGA2</i> 的 cDNA 扩增 Amplification of cDNA from <i>CsTGA2</i> |
| CsTGA2-r | GCAGCTCGAGCTCGATGGATCCTCACTCCCGTGGCCGGGCCA | |
| CsTGA6-f | GCCATGGAGGCCAGTGAATTCATGCCGAGCTTTGATTCTC | <i>CsTGA6</i> 的 cDNA 扩增 Amplification of cDNA from <i>CsTGA6</i> |
| CsTGA6-r | GCAGCTCGAGCTCGATGGATCCTCACTCTCTTGGCGGGC | |

诱饵质粒和猎物质粒在酵母菌株 Y2HGold 中的共转化以及共转化子的筛选参照 Matchmaker® Gold Yeast Two-Hybrid System (TaKaRa) 试剂盒的操作方法进行。此试剂盒中包含载体 pGBKT7 和 pGADT7、酵母菌株 Y2HGold、标准的阳性对照(pGBKT7-53 和 pGADT7-T) 和阴性对照 (pGBKT7-Lam 和 pGADT7-T)。

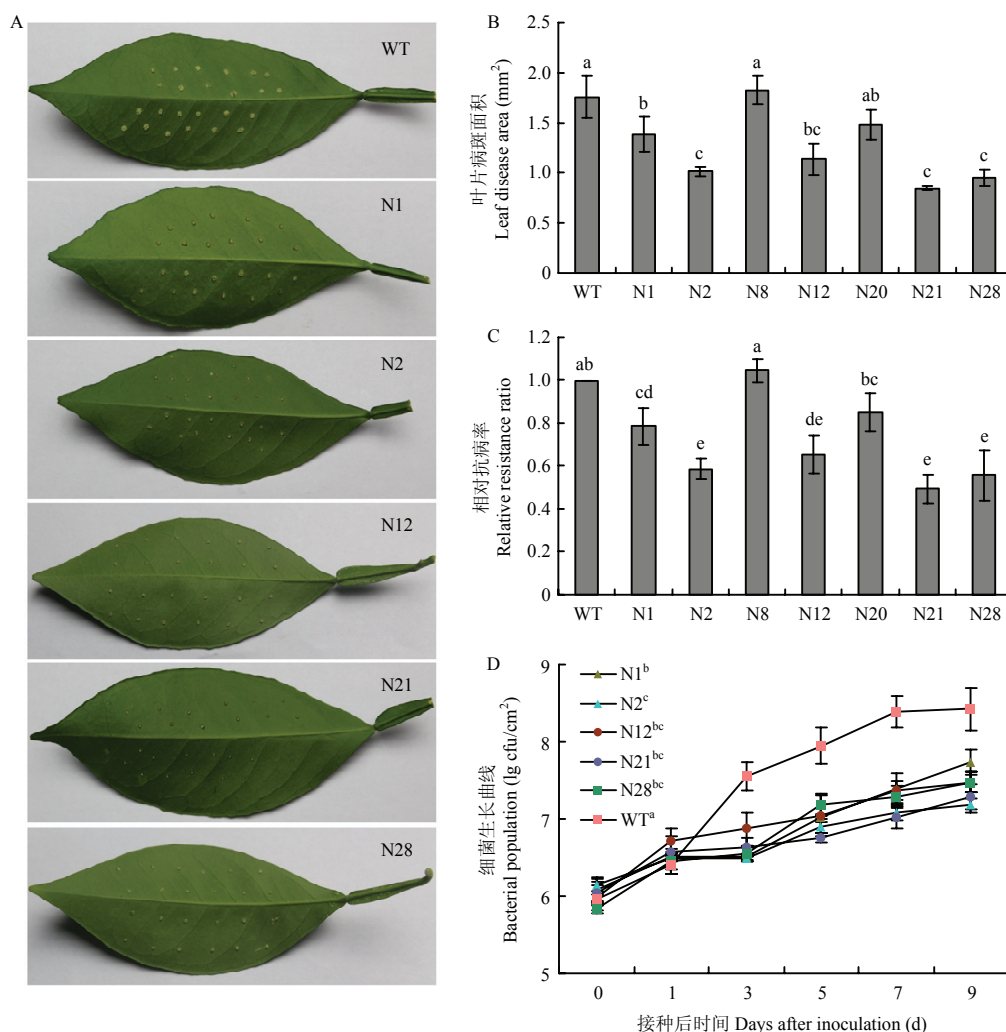
1.6 数据处理

数据使用 IBM SPSS 19 统计学软件 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 进行邓肯方差分析, 结果以平均值 \pm 标准差显示, $P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 *CiNPR4* 转基因植株的溃疡病抗性分析

对 7 个转基因株系 (N1、N2、N8、N12、N20、N21 和 N28) 进行溃疡病的离体抗性分析。针刺法离体接种 *Xcc*, 以 WT 植株为对照, 3 d 后转基因植株和 WT 植株叶片针刺点有轻微的损伤, 针刺孔中有白色且形似愈伤样的组织。随着感染时间的延长, 白色愈伤样的组织突出针刺孔, 但不同的转基因株系白色愈伤样组织团的大小存在差异 (图 1-A)。接种 *Xcc* 10 d



A: *Xcc* 接种 10 d 后, *CiNPR4* 植株叶片上柑橘溃疡病的症状 Citrus canker symptoms on leaves of *CiNPR4* transgenic plants at the 10 d after inoculation; B: *Xcc* 接种 10 d 后, *CiNPR4* 植株叶片上溃疡病斑的面积 The disease area on leaves of *CiNPR4* transgenic plants at the 10 d after inoculation; C: *Xcc* 接种 10 d 后, *CiNPR4* 植株对柑橘溃疡病的相对抗病率 Relative resistance ratio of *CiNPR4* transgenic plants to citrus canker at the 10 d after inoculation; D: *CiNPR4* 植株叶片上的 *Xcc* 生长 Growth of *Xcc* in leaves of *CiNPR4* transgenic plants
WT: 野生型植株 Wild-type plants; N1—N28: *CiNPR4* 转基因株系 *CiNPR4* transgenic lines; 不同字母表示不同 *CiNPR4* 转基因和 WT 植株两两比较差异显著 ($P<0.05$) Different letters represented significant differences from *CiNPR4* transgenic and WT plants in pairwise comparison at $P<0.05$ according to Duncan's test. 图 2 同 The same as Fig. 2

图 1 *CiNPR4* 转基因植株的溃疡病抗性评价

Fig. 1 Evaluation of the resistance of *CiNPR4* transgenic plants to citrus canker

后,统计植株叶片针刺点的病斑面积,转基因株系 N1、N2、N12、N21 和 N28 的叶片溃疡病病斑面积显著低于对照(图 1-B)。根据病斑面积计算相对抗病率后显示,转基因株系 N8 和 N20 与 WT 的相对抗病率无显著性差异,但 N1、N2、N12、N21 和 N28 转基因株系的相对抗病率显著低于 WT 植株,分别为 WT 植株的 79.3%、58.5%、65.4%、49.3%和 55.6%(图 1-C),表明过表达 *CiNPR4* 能够显著提高晚锦橙对柑橘溃疡病的抗性。

分析溃疡病菌接种后 0、1、3、5、7 和 9 d, 5 个转基因株系(N1、N2、N12、N21 和 N28)晚锦橙叶片内细菌的生长。结果显示,WT 植株接种 *Xcc* 后至第 7 天,接种部位 *Xcc* 细菌总量急剧上升,而 N1、N2、N12、N21 和 N28 转基因株系接种部位 *Xcc* 细菌总量在整个观察期的增长较为缓慢。*Xcc* 接种 9 d 后,对 5 个转基因株系和 WT 植株叶片接种部位的 *Xcc* 细菌总量进行方差分析,结果显示,5 个转基因株系叶片内 *Xcc* 细菌总量显著低于 WT 植株;N2 转基因株系中 *Xcc* 细菌总量显著低于 N1 株系。这些结果表明

CiNPR4 的过表达降低了 *Xcc* 在寄主上的生长能力,与表型一致(图 1-D)。

2.2 *CiNPR4* 转基因植株中 SA 和 JA 含量的变化

接种 *Xcc* 0、3 和 5 d 后,测定植株叶片内 SA 和 JA 含量。处理 0 d 时,转基因株系 N1、N2、N12、N21 和 N28 体内的 SA 含量与野生型无显著差异。处理 3 d 时,N1、N12、N21 和 N28 转基因植株叶片中 SA 含量急剧上升,与 WT 植株相比达到显著的差异水平,随着诱导时间的延长,SA 水平进一步增加;N2 转基因植株在处理 3 d 时 SA 含量达到最高,在处理 5 d 时 SA 含量有所下降但仍保持较高水平;而 WT 植株在整个观察期间 SA 的水平基本保持不变(图 2-A)。

对于转基因植株体内的 JA 含量来说,*Xcc* 诱导 0 d 时,所有检测的转基因植株体内含量显著低于 WT 植株的 JA 含量;*Xcc* 诱导 3 d 时,JA 含量在转基因植株体内稍微上升,达到与 WT 植株无显著差异的水平;*Xcc* 诱导 5 d 时,JA 含量在转基因植株体内急剧上升,达到比 WT 植株显著高的水平;而 WT 植株在整个

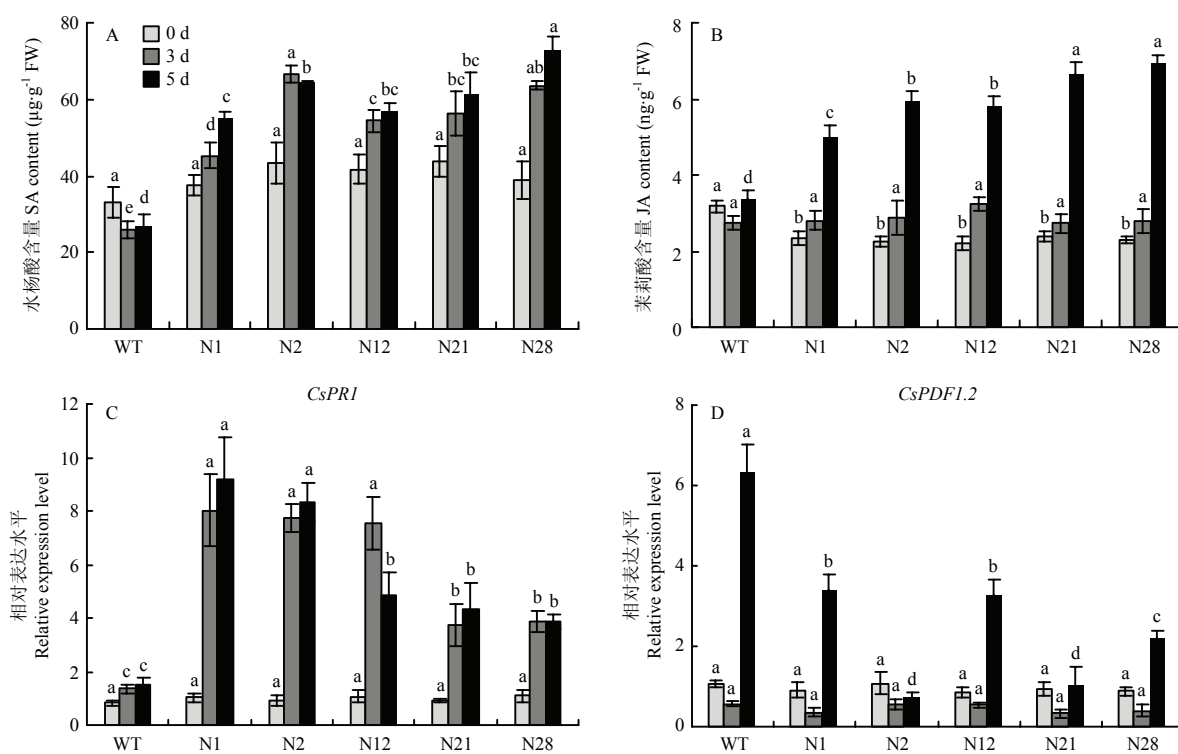


图 2 SA 和 JA 含量及其信号转导途径中防御反应相关基因在 *CiNPR4* 转基因植株中的表达分析

Fig. 2 Analyses of SA and JA content and expression of defense response related genes in their signal transduction pathways in *CiNPR4* transgenic plants

观察期间 JA 含量无显著差异 (图 2-B)。结果表明, 受 *Xcc* 诱导后, *CiNPR4* 的过表达显著上调晚锦橙叶片内 SA 和 JA 含量, 对 SA 和 JA 在体内的积累有着正向调控作用。

2.3 *CsPR1* 和 *CsPDF1.2* 的表达分析

CsPR1 和 *CsPDF1.2* 分别是 SA 和 JA 介导的植物防御反应途径中的标志性基因。为了进一步分析 *CiNPR4* 在 *Xcc* 生物胁迫信号途径相关激素应答和抗性诱导过程中的作用, 对 *Xcc* 诱导后 5 个转基因株系和 WT 植株叶片中 *CsPR1* 和 *CsPDF1.2* 的表达情况进行分析。以各自健康的植株为参照, *Xcc* 处理 0 d 时, 所有检测的转基因株系和 WT 植株中 *CsPR1* 的表达水平无明显变化; *Xcc* 处理 3 d 时, 转基因株系 N1、N2、N12、N21 和 N28 中 *CsPR1* 的表达水平迅速上升, 与 WT 植株相比存在显著差异; *Xcc* 诱导 5 d 时, *CsPR1* 的表达水平在转基因株系 N1、N2 和 N21 中继续上升, 而在 N12 转基因株系中有所下降, 在 N28 转基因株系中基本保持不变, 但所有检测的转基因株系中 *CsPR1* 的表达水平仍然显著高于 WT 植株; 而 WT 植株中的 *CsPR1* 的表达在 *Xcc* 诱导后无显著性变化 (图 2-C), 上述结果表明 *CiNPR4* 正向调控转基因植株体内 *CsPR1* 的表达。

同样, 以各自健康的植株为参照, *Xcc* 处理 0 d 时, 所有检测的转基因株系和 WT 植株中 *CsPDF1.2* 的表达水平无明显变化; *Xcc* 处理 3 d 时, *CiNPR4* 过表达株系和 WT 植株中 *CsPDF1.2* 下调表达, 且转基因株系与对照之间无显著差异; *Xcc* 诱导 5 d, *CsPDF1.2* 在所有的 *CiNPR4* 转基因株系和 WT 植株中的表达水平均上升, 但 WT 植株的 *CsPDF1.2* 表达水平显著高于 *CiNPR4* 转基因株系 (图 2-D), 上述结果表明 *CiNPR4* 抑制了转基因植株体内 *CsPDF1.2* 的表达。

2.4 酵母双杂交分析

通过 *CiNPR4* 蛋白与 TGA 转录因子相互作用网络分析, *CiNPR4* 可能的诱饵蛋白是 Ciclev10005080m 和 Ciclev10001081m, 以甜橙基因组为参考, 通过氨基酸序列比对, Cs5g11160 和 Cs1g16230 为甜橙中的同源基因, 编码的氨基酸序列具有 100% 和 98.9% 的相似性。Cs1g16230 和 Cs5g11160 蛋白分别属于 TGA6 和 TGA2 蛋白, 因而在本研究中, 分别将 Cs1g16230 和 Cs5g11160 命名为 CsTGA6 和 CsTGA2。

诱饵质粒 pGBKT7-*CiNPR4* 分别与猎物质粒 pGADT7-CsTGA2 和 pGADT7-CsTGA6 共转入 Y2HGold, 并将共转化子分别涂布在 DDO 和 QDO/X/ABA 培养

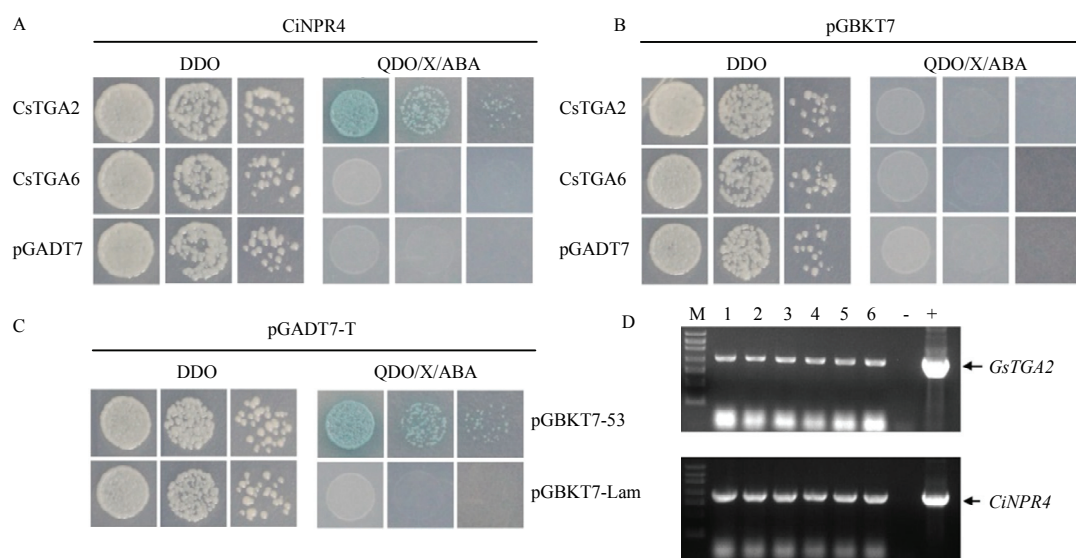
基上。结果表明, 所有的共转化子在 DDO 培养基上都生长白色菌斑, 而只有 *CiNPR4* 与 CsTGA2 组合在 QDO/X/ABA 培养基上长出蓝色菌斑 (图 3-A)。猎物质粒 pGADT7-CsTGA6 和 pGADT7-CsTGA2 分别与 pGBKT7 空载杂交后在 QDO/X/ABA 培养基上没有出现蓝色菌斑, 表明猎物蛋白本身并不能自激活 (图 3-B)。阳性对照 pGBKT7-53 与 pGADT7-Rec 存在互作, 共转化后在 QDO/X/ABA 培养基上长出蓝色菌斑, 而阴性对照 pGBKT7-Lam 与 pGADT7-Rec 不存在互作, 共转化后在 QDO/X/ABA 培养基上不能生长 (图 3-C)。结果表明, *CiNPR4* 与 CsTGA2 蛋白存在互作。

为了进一步证实互作的真实性, 对 *CiNPR4* 与 CsTGA2 共转化子在 QDO/X/ABA 培养基上长出的蓝色菌落进行 PCR 分析, 分别扩增 *CiNPR4* 与 *CsTGA2* 的基因片段。结果显示, 在 *CiNPR4* 与 CsTGA2 共转化的酵母菌落中分别能扩增出 *CiNPR4* 和 *CsTGA2* 基因片段 (图 3-D), 表明 *CiNPR4* 与 CsTGA2 确实存在互作。

3 讨论

在 *NPR* 基因家族中, *NPR4* 调控了植物对病原物的防御反应。研究表明, *NPR4* 调控植株的防御反应与其氨基酸序列 C-末端的 VDLNETP 基序有关^[11]。分别来源于甜橙和草莓的 *NPR4* 蛋白 CsNPR4 和 FvNPR1-1 氨基酸序列的 C-末端分别含有 IDLNETP 和 VDLNETP 基序^[20], 这两种蛋白负向调控植物对病原物的防御反应^[26-27]。将 *NPR4* 的 VDLNETP 基序中 ‘DLN’ 3 个氨基酸突变成与 *NPR1* 相同的 ‘GVK’ 后, 会导致 *NPR4* 的抑制功能丧失^[11]。与 AtNPR1 类似, *CiNPR4* 蛋白氨基酸序列的 C-末端完全缺失 VDLNETP 基序^[20,28]。在柑橘黄龙病易感品种晚锦橙中导入 *CiNPR4* 增加了转基因植株对柑橘黄龙病的抗性, 表明不含 VDLNETP 基序的 *CiNPR4* 正向调控了植株的防御反应^[20]。在本研究中, 过表达 *CiNPR4* 抗黄龙病的转基因晚锦橙, 同时也获得了溃疡病抗性, 进一步证明了 *CiNPR4* 能够正向调控植物防御反应。

柑橘溃疡病与细菌性白叶枯病的病原菌同属于黄单胞菌, 研究表明, JA 信号转导增加了玉米对细菌性白叶枯病的抗性^[29]。相似地, 在本研究中, 野生型晚锦橙受 *Xcc* 感染后, 尽管其体内的 JA 含量并没有发生显著变化, 但 JA 信号转导途径中防御反应相关基因 *CsPDF1.2* 在感染 *Xcc* 5 d 后显著上调表达, 而 SA 信号转导途径中的防御反应基因 *CsPR1* 的表达水平在



A: CiNPR4 与 CsTGA2 和 CsTGA6 的酵母双杂交分析 Yeast-two-hybrid assay of CiNPR4 with CsTGA2 and CsTGA6, respectively; B: CsTGA2 和 CsTGA6 与空载 pGBKT7 的酵母双杂交分析 Yeast-two-hybrid assay of CsTGA2 and CsTGA6p with the empty pGBKT7 vector, respectively; C: 阳性对照 (pGBKT7-53 和 pGADT7-Rec) 和阴性对照 (pGBKT7-Lam 和 pGADT7-Rec) 的酵母双杂交分析 Yeast-two-hybrid assay of positive (pGBKT7-53 and pGADT7-Rec) and negative (pGBKT7-Lam and pGADT7-Rec) controls; D: 酵母双杂交阳性克隆的 PCR 验证 Confirmation of the positive clones of CiNPR4 and CsTGA2 by PCR

DDO: 缺少色氨酸和亮氨酸的 SD 培养基 SD/-Trp and -Leu; QDO/X/ABA: 缺少腺嘌呤和组氨酸, 添加 α -半乳糖苷酶和金担子素的 DDO 培养基 DDO/-Ade/-His + X- α -Gal and aureobasidin A; M: DNA Ladder; 1—6: 阳性克隆 Positive clone; -: 水对照 H₂O control; +: CsTGA2 (上) 和 CiNPR4 (下) 质粒 CsTGA2 (upper) and CiNPR4 (below) plasmids

图 3 酵母双杂交分析

Fig. 3 Yeast-two-hybrid interaction assays

Xcc 诱导期间无显著变化, 表明野生型晚锦橙启动 JA 信号转导途径抵抗 *Xcc* 的入侵。这种现象发生的原因可能是野生型晚锦橙受 *Xcc* 诱导后调控了 JA 信号而非 JA 水平, 与 *OsNPR1* 调控 SA 和 JA 介导的信号而不是它们的水平提高水稻中防御反应相关基因的表达水平结果一致^[30]。但是, 在晚锦橙中导入 *CiNPR4* 后, 在 *Xcc* 的诱导下, SA 和 JA 的水平都显著提高, 相应地, SA 介导的防御反应相关基因 *CsPRI* 的表达水平显著上升, 而 *CiNPR4* 转基因植株体内高水平的 JA 并未强烈地诱导 *CsPDF1.2* 的表达, 在 *Xcc* 诱导 5 d 时, *CiNPR4* 转基因植株拥有显著低于 WT 植株的 *CsPDF1.2* 表达水平, 这些结果表明 *CiNPR4* 促进了 SA 介导的 *CsPRI* 表达, 而抑制了 JA 介导的 *CsPDF1.2* 表达, 此研究结果不同于 *AtNPR4* 正向地调控 SA 和 JA 信号转导途径中的防御反应相关基因 *PR-1* 和 *PDF1.2* 的表达^[17], 而与 *AtNPR1* 正向地调控 SA 信号而抑制 JA 信号途径中相关基因的表达结果相同^[31]。这种现象的出现可能是因为 *CiNPR4* 的 C-末端不含有 *AtNPR4* 氨基酸序列 C-末端的 VDLNETP 基序, 而与 *AtNPR1* 的 C-末端具有某些相似性。

研究表明, NPR 类蛋白不能直接结合 DNA, 需要通过与 TGA 转录因子互作, 调控 SA 下游基因的表达^[11,32]。本研究表明, 柑橘 *CiNPR4* 通过与 *CsTGA2* 转录因子互作, 对 SA 和 JA 分别介导的防御反应相关基因的表达水平进行调控, 从而增强转基因植株对柑橘溃疡病的抗性。但 *CiNPR4* 与 *CsTGA2* 形成的复合物是否结合在 *CsPRI* 和 *CsPDF1.2* 的启动子上还需进一步的研究。

4 结论

黄龙病抗性增强的 *CiNPR4* 转基因植株获得了增强的柑橘溃疡病抗性。*CiNPR4* 与 *CsTGA2* 转录因子互作, 在 *Xcc* 的诱导下, 通过正向调控 SA 而抑制 JA 信号转导途径中防御反应相关基因的表达水平, 从而提高 *CiNPR4* 转基因植株对柑橘溃疡病的抗性。

参考文献 References

- [1] PITINO M, ARMSTRONG C M, DUAN Y. Rapid screening for citrus canker resistance employing pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity responses. *Horticulture Research*, 2015, 2: 15042.

- [2] 杨枫, 陈传武, 范七君, 石春梅, 谢宗周, 郭大勇, 刘继红. 温度和
多胺对柑橘溃疡病发生的影响及作用机制. 中国农业科学, 2018,
51(10): 1899-1907.
YANG F, CHEN C W, FAN Q J, SHI C M, XIE Z Z, GUO D Y, LIU J
H. Influence of temperature and polyamines on occurrence of citrus
canker disease and underlying mechanisms. Scientia Agricultura
Sinica, 2018, 51(10): 1899-1907. (in Chinese)
- [3] 姚廷山, 胡军华, 唐科志, 冉春, 李中安, 周常勇. 利用 rep-PCR 技
术研究我国 9 省柑橘溃疡病菌遗传多样性. 果树学报, 2010, 27(5):
819-822.
YAO T S, HU J H, TANG K Z, RAN C, LI Z A, ZHOU C Y. Primary
analysis on genomic diversities of *Xanthomonas axnopodis* pv. *citri* in
nine provinces of China. Journal of Fruit Science, 2010, 27(5):
819-822. (in Chinese)
- [4] 向旭. 柑桔抗病分子育种研究进展. 分子植物育种, 2006, 4(2):
262-268.
XIANG X. Progresses on molecular breeding for citrus disease
resistance. Molecular Plant Breeding, 2006, 4(2): 262-268. (in Chinese)
- [5] 彭爱红. 根癌农杆菌介导甲型肝炎病毒(HAV)衣壳蛋白融合基因
转化柑桔的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2006.
PENG A H. *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus with
hepatitis A virus capsid protein fusion gene[D]. Chongqing: Southwest
University, 2006. (in Chinese)
- [6] 李鼎立. 柑橘遗传转化受体系统优化与抗溃疡病转基因植株培育
[D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
LI D L. Optimization of transformation system and production of
transgenic plants with *Xa21* gene in citrus[D]. Wuhan: Huazhong
Agricultural University, 2008. (in Chinese)
- [7] STICHER L, MAUCH-MANI B, METRAUX J P. Systemic acquired
resistance. Annual Review of Phytopathology, 1997, 35: 235-270.
- [8] AN C, MOU Z. Salicylic acid and its function in plant immunity.
Journal of Integrative Plant Biology, 2011, 53(6): 412-428.
- [9] FU Z Q, YAN S, SALEH A, WANG W, RUBLE J, OKA N, MOHAN
R, SPOEL S H, TADA Y, ZHENG N, DONG X. NPR3 and NPR4 are
receptors for the immune signal salicylic acid in plants. Nature, 2012,
486(7402): 228-232.
- [10] WU Y, ZHANG D, CHU J Y, BOYLE P, WANG Y, BRINDLE I D,
DE LUCA V, DESPRÉS C. The *Arabidopsis* NPR1 protein is a
receptor for the plant defense hormone salicylic acid. Cell Reports,
2012, 1(6): 639-647.
- [11] DING Y, SUN T, AO K, PENG Y, ZHANG Y, LI X, ZHANG Y.
Opposite roles of salicylic acid receptors NPR1 and NPR3/NPR4 in
transcriptional regulation of plant immunity. Cell, 2018, 173(6):
1454-1467.
- [12] MOU Z, FAN W, DONG X. Inducers of plant systemic acquired
resistance regulate NPR1 function through redox changes. Cell, 2003,
113(7): 935-944.
- [13] DESPRES C, DELONG C, GLAZE S, LIU E, FOBERT P R. The
Arabidopsis NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity
of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. The
Plant Cell, 2000, 12(2): 279-290.
- [14] ZHANG X, FRANCIS M I, DAWSON W O, GRAHAM J H,
ORBOVIĆ V, TRIPLETT E W, MOU Z. Over-expression of the
Arabidopsis *NPR1* gene in citrus increases resistance to citrus canker.
European Journal of Plant Pathology, 2010, 128: 91-100.
- [15] DUTT M, BARTHE G, IREY M, GROSSER J. Transgenic citrus
expressing an *Arabidopsis* *NPR1* gene exhibit enhanced resistance
against Huanglongbing (HLB; citrus greening). PLoS ONE, 2015,
10(9): e0137134.
- [16] CHEN X, BARNABY J Y, SREEDHARAN A, HUANG X,
ORBOVIĆ V, GROSSER J W, WANG N, DONG X, SONG W Y.
Over-expression of the citrus gene *CiNHI* confers resistance to
bacterial canker disease. Physiological and Molecular Plant Pathology,
2013, 84: 115-122.
- [17] LIU G, HOLUB E B, ALONSO J M, ECKER J R, FOBERT P R. An
Arabidopsis *NPR1*-like gene, *NPR4*, is required for disease resistance.
The Plant Journal, 2005, 41(2): 304-318.
- [18] ZHANG Y, CHENG Y T, QU N, ZHAO Q, BI D, LI X. Negative
regulation of defense responses in *Arabidopsis* by two NPR1 paralogs.
The Plant Journal, 2006, 48(5): 647-656.
- [19] WANG Y, ZHOU L, YU X, STOVER E, LUO F, DUAN Y.
Transcriptome profiling of Huanglongbing (HLB) tolerant and
susceptible citrus plants reveals the role of basal resistance in HLB
tolerance. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 933.
- [20] PENG A, ZOU X, HE Y, CHEN S, LIU X, ZHANG J, ZHANG Q,
XIE Z, LONG J, ZHAO X. Overexpressing a *NPR1*-like gene from
Citrus paradisi enhanced Huanglongbing resistance in *C. sinensis*.
Plant Cell Reports, 2021, 40(3): 529-541.
- [21] DAS A K. Citrus canker-A review. Journal of Applied Horticulture,
2003, 5(1): 52-60.
- [22] PENG A, XU L, HE Y, LEI T, YAO L, CHEN S, ZOU X. Efficient
production of marker-free transgenic 'Tarocco' blood orange (*Citrus
sinensis* Osbeck) with enhanced resistance to citrus canker using a
Cre/loxP site-recombination system. Plant Cell, Tissue and Organ
Culture, 2015, 123: 1-13.
- [23] DUAN S, JIA H, PANG Z, TEPER D, WHITE F, JONES J, ZHOU C,

- WANG N. Functional characterization of the citrus canker susceptibility gene *CsLOB1*. *Molecular Plant Pathology*, 2018, 19(8): 1908-1916.
- [24] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [25] XU Q, CHEN L L, RUAN X A, CHEN D J, ZHU A D, CHEN C L, BERTRAND D, JIAO W B, HAO B H, LYON M P, *et al.* The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). *Nature Genetics*, 2013, 45(1): 59-66.
- [26] GÓMEZ-MUÑOZ N, VELÁZQUEZ K, VIVES M C, RUIZ-RUIZ S, PINA J A, FLORES R, MORENO P, GUERRI J. The resistance of sour orange to citrus tristeza virus is mediated by both the salicylic acid and RNA silencing defence pathways. *Molecular Plant Pathology*, 2017, 18(9): 1253-1266.
- [27] SHU L J, LIAO J Y, LIN N C, CHUNG C L. Identification of a strawberry *NPR*-like gene involved in negative regulation of the salicylic acid-mediated defense pathway. *PLoS ONE*, 2018, 13(10): e0205790.
- [28] LIU X, LIU Z, NIU X, XU Q, YANG L. Genome-wide identification and analysis of the *NPRI*-like gene family in bread wheat and its relatives. *International Journal of Molecular Science*, 2019, 20(23): 5974.
- [29] YAMADA S, KANO A, TAMAOKI D, MIYAMOTO A, SHISHIDO H, MIYOSHI S, TANIGUCHI S, AKIMITSU K, GOMI K. Involvement of OsJAZ8 in jasmonate-induced resistance to bacterial blight in rice. *Plant and Cell Physiology*, 2012, 53(12): 2060-2072.
- [30] YUAN Y, ZHONG S, LI Q, ZHU Z, LOU Y, WANG L, WANG J, WANG M, LI Q, YANG D, HE Z. Functional analysis of rice *NPRI*-like genes reveals that *OsNPRI/NHI* is the rice orthologue conferring disease resistance with enhanced herbivore susceptibility. *Plant Biotechnology Journal*, 2007, 5(2): 313-324.
- [31] SPOEL S H, KOORNNEEF A, CLAESSENS S M C, KORZELIUS J P, VAN PELT J A, MUELLER M J, BUCHALA A J, MÉTRAUX J P, BROWN R, KAZAN K, VAN LOON L C, DONG X, PIETERSE C M J. NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *The Plant Cell*, 2003, 15(3): 760-770.
- [32] ZHANG Y, FAN W, KINKEMA M, LI X, DONG X. Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the *PRI* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(11): 6523-6528.

(责任编辑 岳梅)