

## 低聚壳聚糖诱导的毛白杨抗病反应 与 ABA 信号通路的关系

韩锋溪, 胡景江\*

(西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西杨陵 712100)

**摘要:**脱落酸(ABA)信号通路核心组分有 ABA 受体(PYR/PYL/RCARs)、2C 型蛋白磷酸酶家族中的 A 亚族成员(PP2Cs)以及蔗糖非酵解型蛋白激酶 2 家族成员(SnRK2s)。运用 BLASTP 序列比对方法,在毛果杨中获得 14 条 *PtPYR*、7 条 *PtPP2C* 和 4 条 *PtSnRK2* 基因,它们分别与拟南芥 *AtPYR*、*AtPP2C* 和 *AtSnRK2* 基因同源。根据系统进化树分析结果,选取基因 *PtPYRL7*、*PtPYRL9*、*PtHAB2*、*PtPP2CA*、*PtSnRK2.3* 和 *PtSnRK2.6*,设计合适的引物。以 85 号无性系毛白杨组培苗为材料,分别对其根部进行外源 ABA 和低聚壳聚糖处理,于处理 3 h、6 h、12 h 和 24 h 4 个时间点取样,提取样本叶片总 RNA,反转录成 cDNA,进行实时荧光定量 PCR 分析。结果显示:ABA 处理和低聚壳聚糖处理均能使 *PtPYRL7* 和 *PtPYRL9* 基因表达下调,使 *PtHAB2* 和 *PtPP2CA* 基因表达上调,使 *PtSnRK2.3* 和 *PtSnRK2.6* 基因表达先上调后下调。研究表明,ABA 处理和低聚壳聚糖处理诱导毛白杨叶片中与 ABA 信号通路相关的基因的表达变化趋势几乎一致,说明 ABA 信号通路是低聚壳聚糖诱导毛白杨抗病的信号传递途径之一。

**关键词:**低聚壳聚糖;毛白杨;诱导抗病;ABA 信号通路

中图分类号:Q789

文献标志码:A

## Relationship between Chito-oligosaccharide Induced Disease Resistance and ABA Signaling Pathway in *Populus tomentosa*

HAN Fengxi, HU Jingjiang\*

(College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** The core components of abscisic acid (ABA) signal transduction in plants include ABA receptors (PYR/PYL/RCARs), group A type 2C protein phosphatases (PP2Cs) and SNF1-related protein kinases 2 (SnRK2s). In this study, via BLASTP, 14 *PtPYR*, 7 *PtPP2C* and 4 *PtSnRK2* genes were obtained in *Populus trichocarpa*. They are homologous to *Arabidopsis AtPYR*, *AtPP2C* and *AtSnRK2* genes, respectively. Based on phylogenetic analysis, *PtPYRL7*, *PtPYRL9*, *PtHAB2*, *PtPP2CA*, *PtSnRK2.3* and *PtSnRK2.6* were chosen and their primers were designed. Total RNA in Number 85 clonal *Populus tomentosa* leaves were isolated after 3 hour, 6 hour, 12 hour and 24 hour exogenous ABA treatment and chito-oligosaccharide treatment of its roots. Real-Time quantitative PCR results have shown that: (1) The expression levels of *PtPYRL7* and *PtPYRL9* were down-regulated after ABA or chito-oligosaccharide treatment; (2) The expression levels of *PtHAB2* and *PtPP2CA* were up-regulated after ABA or chito-oligosaccharide treatment; (3) The expression levels of *PtSnRK2.3* and *PtSnRK2.6* were up-regulated first and then down-regulated

收稿日期: 2013-12-04; 修改稿收到日期: 2013-12-26

基金项目: 长江学者和创新团队发展计划(IRP0748)

作者简介: 韩锋溪(1987-), 女, 硕士研究生, 主要从事植物逆境分子生物学研究。E-mail: hanfengxi1@126.com

\* 通信作者: 胡景江, 教授, 主要从事植物逆境生理与分子生物学研究。E-mail: hujj@nwsuaf.edu.cn

after ABA or chito-oligosaccharide treatment. The study indicated that ABA signaling pathway was one of signal transduction ways of chito-oligosaccharide induced disease resistance in *Populus tomentosa*.

**Key words:** chito-oligosaccharides; *Populus tomentosa*; induced disease resistance; ABA signaling pathway

杨树是重要的造林绿化、农田防护和用材树种,但杨树病害种类很多,其叶部、枝干和根部均能遭受不同程度病害<sup>[1-2]</sup>。利用化学农药防治病害是一种有效方法,但也带来一系列环境污染问题<sup>[3]</sup>,因此,寻求高效、安全、无污染的绿色生物农药显得尤为重要<sup>[4-5]</sup>。近年来,植物诱导抗病性的研究为植物病害的防治开辟了一条新途径,并发现低聚糖是诱导植物抗病性的有效诱导物<sup>[6]</sup>。

已有的研究表明,壳聚糖和其降解产物低聚壳聚糖具有多种生物活性<sup>[7]</sup>,能调节植物生长发育、增强植物的抗逆性。低聚壳聚糖能增强多种植物的抗寒、抗病、抗旱和抗盐能力,使防御酶和病程相关蛋白如几丁质酶、 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶和 PAL 活性升高<sup>[6,8]</sup>。但目前研究多局限在与植物抗病相关的生理指标上,对于低聚壳聚糖诱导抗病性的分子机制,相关报道并不多。

ABA 调控着与种子萌发、植物发育以及生物和非生物胁迫应答相关的关键过程,而且,ABA 能够与植物防御机制相关的其他激素互作<sup>[9-15]</sup>。ABA 信号通路核心组分有 PYR/PYL/RCARs、PP2Cs 和 SnRK2s。默认情况下,PP2Cs 通过物理相互作用使 SnRK2 激酶去磷酸化处于失活状态。但是有外界刺激或发育信号时,PYR/PYL/RCARs 与 ABA 结合,形成的复合物可以与 PP2Cs 互作而抑制 PP2Cs 的活性,SnRK2s 从而可以摆脱 PP2Cs 的束缚,磷酸化而激活。许多 ABA 诱导的基因在它们的启动子区域包含一个保守的 ABA 应答元件 (ABA-responsive elements, ABRE),那些有能力结合 ABREs 的转录因子被命名为 ABFs/AREBs (碱性亮氨酸拉链类转录因子),磷酸化 SnRK2s 的积累可以引起 ABFs/AREBs 的磷酸化,然后磷酸化的 ABFs/AREBs 与 ABA 应答启动子元件结合,起始 ABA 应答基因的表达<sup>[9,16-17]</sup>。

模式植物拟南芥基因组编码 14 种 PYR/RCAR 蛋白,被命名为 PYR1 和 PYL1-13 或 RCAR1-RCAR14,这些蛋白在氨基酸序列水平高度保守<sup>[18-20]</sup>。拟南芥 PP2C A 亚族蛋白有 9 个成员,被表明参与 ABA 信号通路,分别是 ABI1、ABI2、HAB1、HAB2、PP2CA、AHG1、HAI1、HAI2 和 HAI3<sup>[18]</sup>,最近,其 PP2C B 亚族蛋白中的 PP2C5 和 AP2C1 也被

报道参与 ABA 信号通路<sup>[21]</sup>。拟南芥 SnRK2 蛋白家族有 10 名成员,被分为 3 组,其中 SnRK2 I 亚组激酶不被 ABA 激活,II 亚组和 III 亚组激酶能被 ABA 激活;III 亚组包括 SnRK2.2、SnRK2.3 和 SnRK2.6/OST1,它们被认为参与植物 ABA 应答<sup>[18,22]</sup>。

本研究运用生物信息学手段和实时荧光定量 PCR 方法,以 85 号毛白杨无性系组培苗为材料,研究了低聚壳聚糖诱导植物抗病性与内源信号分子 ABA 信号通路的关系,为进一步揭示低聚壳聚糖诱导植物抗病的分子机制和研究植物抗病性提供了新的思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料与处理方法

试验所用材料为 85 号毛白杨无性系组培苗,由西北农林科技大学林业科学研究所提供。25 °C 下 16 h 光照、8 h 黑暗交替培养,培养基为 1/2 MS + 0.01 mg/L NAA。当组培苗长至接近组培瓶瓶口且根已很健壮时,即可进行外源 ABA 和低聚壳聚糖处理。处理方法为:在超净工作台上,将整株组培苗转移至含有 5 mg/L 低聚壳聚糖或者 20  $\mu$ mol/L ABA 的 1/2MS 培养基上。每种处理分别在 3、6、12 和 24 h 4 个时间点剪取植物全部叶片,取样后液氮速冻,于 -80 °C 保存备用。实验重复 3 次,结果取平均值。

### 1.2 低聚壳聚糖的获得

参照张锦<sup>[8]</sup>的方法,称取 20 g 壳聚糖(脱乙酰度  $\geq 90.0\%$ ,粘度 50.0~800.0 mPa·s;国药集团,上海,中国),向其中加入 400 mL 2% 的醋酸溶液,磁力搅拌器上 60 °C 搅拌至分散均匀,然后再逐滴加入 10 mL 的 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,反应 6 h 左右。降解液用 10% NaOH 溶液调节 pH 至 8.5 左右,抽滤去残渣。向滤液中加入 3 倍体积预冷的无水乙醇,沉淀 12 h,抽滤,所得沉淀用 75% 乙醇洗 1 遍,3 500 r/min 离心 15 min,无水乙醇洗沉淀后 4 000 r/min 离心 15 min (重复此过程 3 遍以脱去产物中的水),弃上清后沉淀冷冻干燥得低聚糖样品。

### 1.3 序列比对、系统进化树的建立和引物设计

从 NCBI (the National Centre for Biotechnology Information) 或 Phytozome v9.1 (<http://www.>

phytozome.net)数据库下载拟南芥中的 14 条 ABA 受体(PYR/PYL/RCARs)蛋白、9 条 PP2C A 亚族蛋白、PP2C5 蛋白、AP2C1 蛋白以及 SnRK2 蛋白激酶的氨基酸序列。在 Phytozome v9.1 数据库中通过 BLASTP 进行拟南芥与毛果杨之间的同源序列比对。毛果杨中 ABA 受体同源基因的选取标准和命名参照 Hauser 等<sup>[18]</sup>的方法。根据 Romero 等<sup>[23]</sup>的方法,将同源 PP2C 编码基因和 SnRK2 编码基因的获得标准定为:选取分值最大的,当同时有几条氨基酸序列拥有相同的最大分值时,选取里面一致性最大的;一致性较大的毛果杨基因与其同源的拟南芥基因同名。

利用 MEGA 5.1 软件,通过矩阵法(neighbor-joining,NJ)构建系统进化树,bootstrap re-sampling 值是 1 000。引物由 Takara 公司设计。

#### 1.4 总 RNA 的提取和 cDNA 的制备

取毛白杨叶片,于研钵中加液氮研磨成干粉,迅速转入离心管中。用 RNAprep pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒(离心柱型;目录号:DP441;天根生化科技有限公司,北京,中国)提取总 RNA。具体操作步骤按试剂盒说明书进行。琼脂糖凝胶电泳(电泳条件:胶浓度 1.2%;0.5×TBE 电泳缓冲液;150 V,15 min)检测 RNA 完整性,当植物 RNA 样品中最大 rRNA 亮度为次大 rRNA 亮度的 1.5~2.0 倍时,表明 RNA 较完整。OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 读数在 1.8~2.1 之间、OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub> 读数接近 2.0 时,表明 RNA 质量较好。

用 PrimeScript RT reagent kit (Perfect Real Time)(编号:DRR037S;宝生物工程有限公司,大连,北京)将提取的完整性及质量较好的总 RNA 反转成 cDNA,-20 °C 保存备用。具体操作步骤按试剂盒说明书进行。

#### 1.5 实时荧光定量 PCR

参照 Secchi 等<sup>[24]</sup>的方法,将内参基因定为 *Ubiquitin*。用 SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II (Perfect Real Time)(编号:DRR081A;宝生物工程有限公司,大连,北京)荧光染料进行实时荧光定量 PCR。SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II (2×)10 μL,正向和反向引物各 0.8 μL,cDNA 0.5 μL,dH<sub>2</sub>O 7.9 μL,总反应体系 20 μL。反应程序为:95 °C 30 s 1 次,然后 95 °C 5 s,60 °C 30 s 循环 40 次。溶解曲线由 65 °C 开始,每次增加 0.5 °C,直至 95 °C。

## 2 结果与分析

### 2.1 序列比对、系统进化树建立和引物设计

在毛果杨中,共找到 14 种与拟南芥 ABA 受体蛋白氨基酸序列同源的蛋白质(表 1),分别命名为 PtPYRL1-PtPYRL14。这些蛋白作为毛果杨中的 ABA 受体,当有外界刺激或发育信号时,可与 ABA 结合以接受 ABA 信号,起始 ABA 信号通路。在这些蛋白质中,PtPYRL1 和 PtPYRL9 均与拟南芥 AtPYL9 同源,PtPYRL2 和 PtPYRL14 均与 AtPYL12 同源,PtPYRL5 和 PtPYRL7 均与 AtPYL13 同源,PtPYRL6 和 PtPYRL13 均与 AtPYL2

表 1 ABA 受体 PYR/PYL/RCARs 氨基酸序列比对结果

Table 1 The BLASTP result of ABA receptor PYR/PYL/RCARs

毛果杨基因 <i>Populus trichocarpa</i> gene	mRNA 的 NCBI 参考序列 NCBI reference sequence	氨基酸序列标识符 (源数据库:Phytozome) Sequence identifier (source database:Phytozome)	拟南芥同源基因 <i>Arabidopsis thaliana</i> homolog gene
<i>PtPYRL1</i>	XM_002326486.1	POPTR_0001s02490.1	<i>AtPYL9/AtRCAR1</i>
<i>PtPYRL2</i>	XM_002329527.1	POPTR_0003s09050.1	<i>AtPYL12/AtRCAR6</i>
<i>PtPYRL3</i>	XM_002324726.1	POPTR_0018s05090.1	<i>AtPYL10/AtRCAR4</i>
<i>PtPYRL4</i>	XM_002308532.1	POPTR_0006s24670.1	<i>AtPYL5/AtRCAR8</i>
<i>PtPYRL5</i>	XM_002315100.1	POPTR_0010s19120.1	<i>AtPYL13/AtRCAR7</i>
<i>PtPYRL6</i>	XM_002308200.1	POPTR_0006s10500.1	<i>AtPYL2/AtRCAR14</i>
<i>PtPYRL7</i>	XM_002312147.1	POPTR_0008s07340.1	<i>AtPYL13/AtRCAR7</i>
<i>PtPYRL8</i>	XM_002322988.1	POPTR_0016s13320.1	<i>AtPYL4/AtRCAR10</i>
<i>PtPYRL9</i>	XM_002302588.1	POPTR_0002s17070.1	<i>AtPYL9/AtRCAR1</i>
<i>PtPYRL10</i>	XM_002320821.1	POPTR_0014s09280.1	<i>AtPYL4/AtRCAR10</i>
<i>PtPYRL11</i>	XM_002321414.1	POPTR_0015s02210.1	<i>AtPYL6/AtRCAR9</i>
<i>PtPYRL12</i>	XM_002304517.1	POPTR_0003s13900.1	<i>AtPYL3/AtRCAR13</i>
<i>PtPYRL13</i>	XM_002318344.1	POPTR_0012s01550.1	<i>AtPYL2/AtRCAR14</i>
<i>PtPYRL14</i>	XM_002297944.1	POPTR_0001s10530.1	<i>AtPYL12/AtRCAR6</i>

同源,PtPYRL8 和 PtPYRL10 均与 AtPYL4 同源。进化树分析结果显示(图 1, a), PtPYRL9、PtPYRL10、PtPYRL11、PtPYRL12、PtPYRL13 和 PtPYRL14 属于 ABA 受体 I 亚家族,PtPYRL5、PtPYRL6、PtPYRL7 和 PtPYRL8 属于 ABA 受体 II 亚家族,PtPYRL1、PtPYRL2、PtPYRL3 和 PtPYRL4 属于 ABA 受体 III 亚家族。

根据较大一致性,将获得的毛果杨 PP2C 编码基因分别命名为 *PtABI1*、*PtAHG1*、*PtHAB2*、*PtHAI3*、*PtPP2CA*、*PtAP2C1*、*PtPP2C5*,将获得的毛果杨 SnRK2 编码基因分别命名为 *PtSnRK2.3*、*PtSnRK2.6*、*PtSnRK2.7* 和 *PtSnRK2.8*(表 2)。其中,蛋白 *PtABI1*、*PtAHG1*、*PtHAB2*、*PtHAI3* 和 *PtPP2CA* 属于 PP2C A 亚族蛋白,*PtAP2C1* 和 *PtPP2C5* 属于 PP2C B

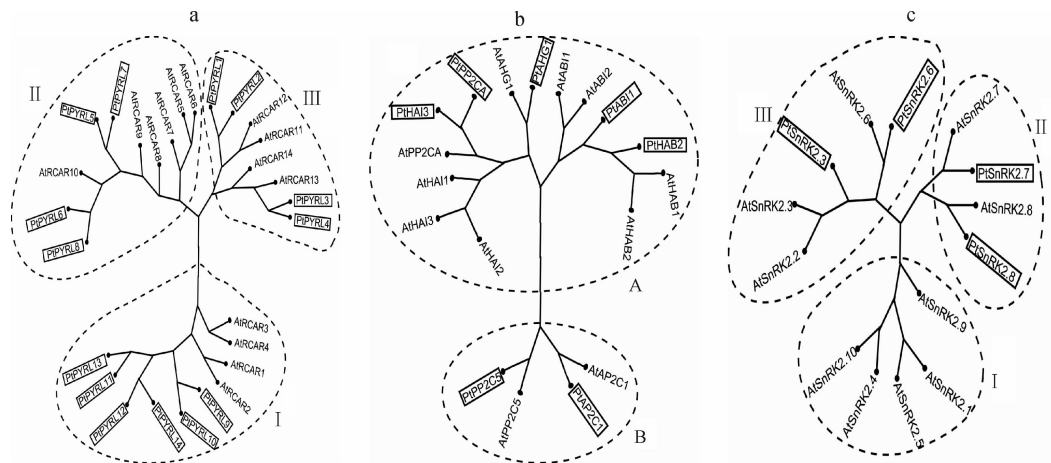


图 1 无根系统进化树

a. 毛果杨和拟南芥 ABA 受体 PYR/PYL/RCARs; b. 毛果杨和拟南芥 PP2Cs; c. 毛果杨和拟南芥 SnRK2s; 进化树利用 MEGA5.1 软件、基于氨基酸序列比对并通过矩阵法建立,每个蛋白的基因信息详见表 1 和表 2

Fig. 1 Unrooted phylogenetic trees containing

*Populus trichocarpa* and *Arabidopsis thaliana* ABA receptor PYR/PYL/RCARs (a), PP2Cs (b), and SnRK2 protein kinases (c) obtained by using the Neighbor-Joining method in the MEGA 5.1 software and based on the protein sequence alignments. The gene information for each protein is detailed in Table 1 and Table 2

表 2 PP2Cs 和 SnRK2s 氨基酸序列比对结果

Table 2 The BLASTP result of PP2Cs and SnRK2s

拟南芥中的同源基因 Homologous gene in <i>Arabidopsis thaliana</i>	毛果杨基因名称 <i>Populus trichocarpa</i> gene name	毛果杨基因位点名称 (源数据库:Phytozome) <i>Populus trichocarpa</i> gene locus name (source database:Phytozome)	分值 Score	E 值 E value	一致性 Identity	氨基酸序列 比对覆盖率 Query cover	转录本名称 Transcript name
<i>AtABI1</i>	<i>PtABI1</i>	Potri.006G224600	401.0	9e-134	65.5% (213/325)	65%	Potri.006G224600.1
<i>AtABI2</i>	<i>PtABI1</i>	Potri.006G224600	424.1	6.6e-143	60.6% (231/381)	70%	Potri.006G224600.1
<i>AtAHG1</i>	<i>PtAHG1</i>	Potri.012G131800	346.7	5.3e-115	60.3% (188/312)	79%	Potri.012G131800.1
<i>AtHAB1</i>	<i>PtHAB2</i>	Potri.003G044200	412.1	1.3e-138	53.7% (239/445)	79%	Potri.003G044200.1
<i>AtHAB2</i>	<i>PtHAB2</i>	Potri.003G044200	575.5	0	55.0% (303/551)	99%	Potri.003G044200.1
<i>AtHAI1</i>	<i>PtHAI3</i>	Potri.009G037300	376.7	4.2e-126	65.1% (196/301)	74%	Potri.009G037300.1
<i>AtHAI2</i>	<i>PtHAI3</i>	Potri.009G037300	402.1	1.2e-135	66.8% (221/331)	99%	Potri.009G037300.1
<i>AtHAI3</i>	<i>PtHAI3</i>	Potri.009G037300	396.7	1.2e-134	68.2% (212/311)	69%	Potri.009G037300.1
<i>AtPP2CA</i>	<i>PtPP2CA</i>	Potri.010G199600	373.6	9.3e-126	65.1% (231/355)	92%	Potri.010G199600.1
<i>AtAP2C1</i>	<i>PtAP2C1</i>	Potri.009G073000	460.7	1.3e-159	64.9% (259/399)	91%	Potri.009G073000.1
<i>AtPP2C5</i>	<i>PtPP2C5</i>	Potri.010G187000	357.1	2e-119	65.6% (204/311)	91%	Potri.010G187000.1
<i>AtSnRK2.2</i>	<i>PtSnRK2.3</i>	Potri.005G134400	594.0	0	83.1% (295/355)	96%	Potri.005G134400.1
<i>AtSnRK2.3</i>	<i>PtSnRK2.3</i>	Potri.005G134400	600.9	0	84.8% (280/330)	99%	Potri.005G134400.1
<i>AtSnRK2.6</i>	<i>PtSnRK2.6</i>	Potri.004G145500	532.3	0	90.2% (248/275)	83%	Potri.004G145500.1
<i>AtSnRK2.7</i>	<i>PtSnRK2.7</i>	Potri.007G096400	485.0	5.1e-171	85.9% (225/262)	99%	Potri.007G096400.1
<i>AtSnRK2.8</i>	<i>PtSnRK2.8</i>	Potri.002G099700	523.5	0	81.9% (249/304)	89%	Potri.002G099700.1

亚族蛋白, *PtSnRK2.3* 和 *PtSnRK2.6* 属于 SnRK2 III 亚组蛋白, *PtSnRK2.7* 和 *PtSnRK2.8* 属于 SnRK2 II 亚组蛋白。图 1, b 和图 1, c 可以进一步说明 BLASTP 序列比对结果的合理性。

基因 *AtABI1* 和 *AtABI2* 均与毛果杨基因位点 Potri.006G224600 同源, identity 分别为 65.5% 和 60.6%; 基因 *AtHAB1* 和 *AtHAB2* 均与毛果杨基因位点 Potri.003G044200 同源, identity 分别为 79% 和 99%; 基因 *AtHAI1*、*AtHAI2* 和 *AtHAI3* 均与毛果杨基因位点 Potri.009G037300 同源, identity 分别为 74%、99% 和 69%; 基因 *AtSnRK2.2* 和 *AtSnRK2.3* 均与毛果杨基因位点 Potri.005G134400 同源, identity 分别为 96% 和 99%。

根据建树结果, 从 ABA 受体 I 亚族中选取基因 *PtPYRL9*, 从 ABA 受体 II 亚族中选取基因 *PtPYRL7*, 从与 ABA 信号通路最相关的 PP2C A 亚族中选取基因 *PtHAB2* 和 *PtPP2CA*, 从与 ABA 信号通路最相关的 SnRK2 III 亚组中选取基因 *PtSnRK2.3* 和 *PtSnRK2.6*, 用于设计引物(表 3), 进行基因表达分析。

## 2.2 实时荧光定量 PCR 结果及分析

选取毛果杨 *Ubiquitin* 为内参基因, 进行实时荧光定量 PCR。从图 2 可以看出, ABA 处理和低聚壳聚糖处理均能使毛白杨叶片中 *PtPYRL7* 基因和 *PtPYRL9* 基因的表达水平下调。ABA 处理下, *PtPYRL7* 基因在 3~12 h 时间段内表达量变化不大, 24 h 时表达量进一步下调, 而低聚壳聚糖处理下 *PtPYRL7* 基因在 3~24 h 时间段内表达量处于波动变化状态; ABA 处理和低聚壳聚糖处理均能使 *PtPYRL9* 基因在 3~24 h 时间段内表达量先下降后上升。

ABA 处理和低聚壳聚糖处理均能使毛白杨叶片中 *PtHAB2* 基因和 *PtPP2CA* 基因表达水平上调(图 3)。其中, ABA 处理下, 基因 *PtHAB2* 在 3~24 h 时间段内表达量变化不大, 而低聚壳聚糖处理下基因 *PtHAB2* 在 3~24 h 时间段内表达量先下降后上升; ABA 处理下, 基因 *PtPP2CA* 在 3~24 h 时间段内表达量先上升后下降, 而低聚壳聚糖处理下基因 *PtPP2CA* 在 3~24 h 时间段内表达量处于波动变化状态。

表 3 PCR 引物序列

Table 3 PCR primer sequences

基因名称 Gene name	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer	产物大小 Product size/bp
<i>PtPYRL7</i>	5'-TCGTCGAATCATACGTTGTGG-3'	5'-TATCTGGTTATCCGTGCCTTCTT-3'	137
<i>PtPYRL9</i>	5'-CATCAAAGCTCCTGCTCACCT-3'	5'-AACATTCACCTCCCTAACACTTCC-3'	133
<i>PtHAB2</i>	5'-TGCCTTGGTCTGCTCATCC-3'	5'-TTCATCTCCCTGTTTGGTTTG-3'	121
<i>PtPP2CA</i>	5'-ACAAGATTAGAACTCCGACCACTCA-3'	5'-TTTCTACTGCGTTTCCACAATCAC-3'	145
<i>PtSnRK2.3</i>	5'-TGATAGTCTGCTCCTCGTTTG-3'	5'-CGACCACACATCTGCAACCT-3'	160
<i>PtSnRK2.6</i>	5'-CGTTATGTTGGTTGGGGCTTAC-3'	5'-GATTAGATGTTGGCATTCAAGAGA-3'	139
<i>Ubiquitin</i>	5'-CAGCTGAAGATGGGAGGAC-3'	5'-CAATGGTGTCTGAGCTCTCG-3'	154

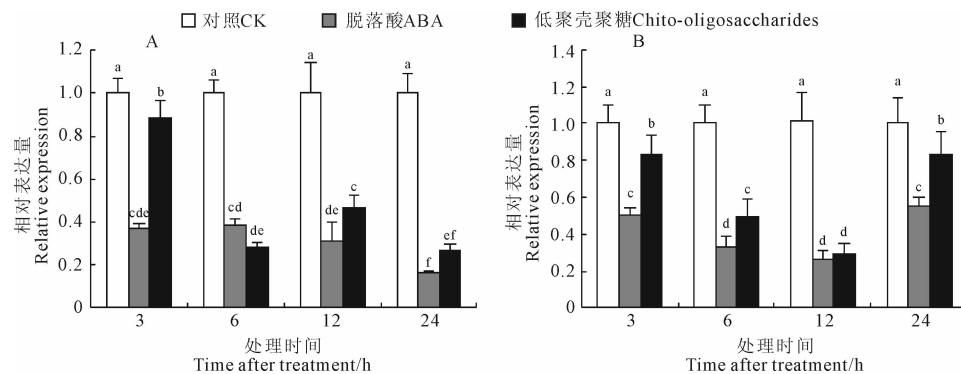


图 2 ABA 受体蛋白编码基因的表达变化

A. *PtPYRL7* 基因; B. *PtPYRL9* 基因; 不同字母表示处理间显著差异 ( $P < 0.05$ )

Fig. 2 The expression changes of ABA receptor encoding genes

A. *PtPYRL7*; B. *PtPYRL9*; Different letters represent significant difference among treatments ( $P < 0.05$ )

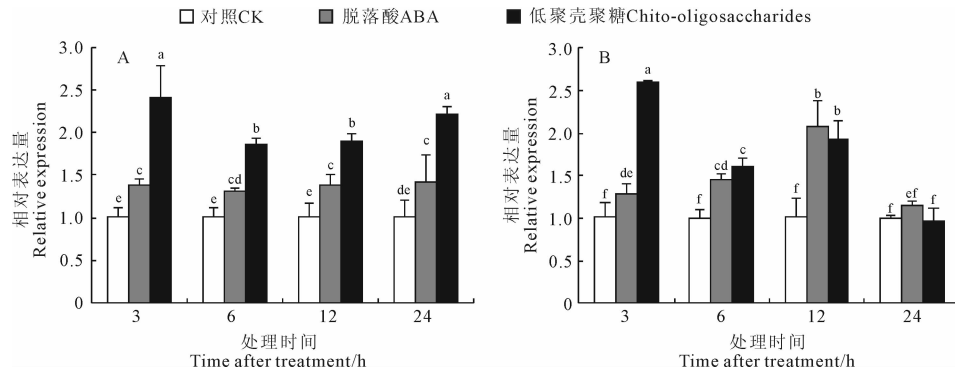


图3 PP2C 蛋白编码基因的表达变化

A. *PtHAB2* 基因; B. *PtPP2CA* 基因; 不同字母表示处理间显著差异 ( $P < 0.05$ )

Fig. 3 The expression changes of PP2C encoding genes

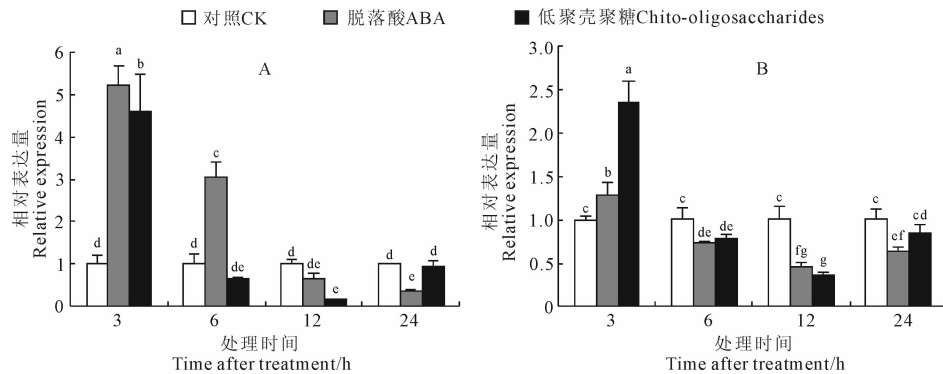
A. *PtHAB2*; B. *PtPP2CA*; Different letters represent significant difference among treatments ( $P < 0.05$ )

图4 SnRK2 蛋白编码基因的表达变化

A. *PtSnRK2.3* 基因; B. *PtSnRK2.6* 基因; 不同字母表示处理间显著差异 ( $P < 0.05$ )

Fig. 4 The expression changes of SnRK2 encoding genes

A. *PtSnRK2.3*; B. *PtSnRK2.6*; Different letters represent significant difference among treatments ( $P < 0.05$ )

ABA 处理和低聚壳聚糖处理均能使毛白杨叶片中 *PtSnRK2.3* 基因和 *PtSnRK2.6* 基因表达水平先上调后下调(图 4)。低聚壳聚糖处理下, 24 h 后 *PtSnRK2.3* 和 *PtSnRK2.6* 的表达水平基本恢复正常。

ABA 处理和低聚壳聚糖处理诱导毛白杨叶片中与 ABA 信号通路相关的基因的表达水平变化是一致的, 由此可得出结论, ABA 信号通路是低聚壳聚糖诱导毛白杨抗病的信号传递途径之一。

### 3 讨论

Chan<sup>[9]</sup> 对拟南芥进行外源 ABA 处理或非生物逆境处理后, 提取植物 RNA 并做实时定量 PCR, 发现选定的 PYR/PYLs 的基因表达水平均下调, PP2Cs 和 ABFs 的基因表达水平均上调, 由此表明, PP2Cs:PYR/PYLs 比例的增加可能是生物和非生物逆境下下游 ABA 信号通路激活所必需的。San-

tiago 等<sup>[25]</sup> 和 Szostkiewicz 等<sup>[26]</sup> 两个研究团队也发现了 ABA 处理和非生物胁迫条件能够改变 PYR/PYL/RCAR 和 PP2C 家族成员的相对表达水平并使 PP2Cs:PYL/PYRs 的比值升高。本试验中, ABA 处理和低聚壳聚糖处理均能使毛白杨叶片中 PYR 编码基因表达下调、PP2C 编码基因表达上调, 与对照组有显著差异, 这一实验结果与 Chan、Santiago 等和 Szostkiewicz 等的实验结果一致, 说明 PP2Cs:PYR/PYLs 比例的增加可能是低聚壳聚糖诱导毛白杨抗病过程中激活下游 ABA 信号通路所必需的。SnRK2 编码基因表达先上调, SnRK2 激酶蛋白积累且活性增加, 使其下游的 ABFs/AREBs 磷酸化, 然后磷酸化的 ABFs 结合 ABA 应答启动子元件, 诱导 ABA 应答基因的表达<sup>[9,16-17]</sup>; 一段时间后, SnRK2 编码基因表达下调, 使 ABA 应答基因的表达得到控制, 恢复到静息水平。

ABA 是一类重要的内源信号分子, 本试验通过

序列比对、进化树建立和实时荧光定量 PCR,初步确定了 ABA 信号通路与低聚壳聚糖诱导毛白杨抗病的关系。分析 ABA 处理和低聚壳聚糖处理对其余基因表达的影响,可以进一步确定两者的关系。

### 参考文献:

- [1] ZENG D P(曾大鹏). Review of current situation of research and control on poplar diseases in China[J]. *Forest Pest and Disease*(中国森林病虫),2002,**21**(1):20—26(in Chinese).
- [2] FENG N(冯 宁). The analysis on health situation surveys of clonal twenty-year-old *Populus tomentosa* from different provenances[J]. *Information of Agricultural Science and Technology*(农业科技与信息),2009,(18):24—26(in Chinese).
- [3] GAO R T(高瑞桐),WANG B D,MASTRO V C,*et al.* Efficacy of 4 insecticides used as cover spray for controlling adult *Anoplophora glabripennis* (Motsch.) and the levels of these insecticides detected in leaves and twigs[J]. *Scientia Silvae Sinicae*(林业科学),2005,**41**(3):202—205(in Chinese).
- [4] 计红芳. 防治杨树叶枯病的毒蘑菇菌株筛选及其生防机理研究[D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学,2007.
- [5] SU Y J(苏元吉),SUN D Y(孙德莹). The prevention effect of 3% hypertonic fenoxycarb on *Apocheima cinerarius*[J]. *Modernizing Agriculture*(现代化农业),2009,(8):14(in Chinese).
- [6] 周白云. 低聚糖激酶对毛白杨愈伤组织诱导抗病性的研究[D]. 陕西杨陵:西北农林科技大学,2004.
- [7] SHANG W J(商文静),WU Y F(吴云锋),ZHAO X M(赵小明),*et al.* Changes of defensive enzymes and PR-1a gene expression of tobacco induced by chito-oligosaccharides[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*(植物病理学报),2010,**40**(1):99—102(in Chinese).
- [8] 张 锦. 低聚壳聚糖诱导毛白杨抗病性的基因差异表达研究[D]. 陕西杨陵:西北农林科技大学,2011.
- [9] CHAN Z. Expression profiling of ABA pathway transcripts indicates crosstalk between abiotic and biotic stress responses in *Arabidopsis* [J]. *Genomics*,2012,**100**(2):110—115.
- [10] LEE S C,LUAN S. ABA signal transduction at the crossroad of biotic and abiotic stress responses[J]. *Plant, Cell and Environment*, 2012,**35**(1):53—60.
- [11] ANDERSON J P,BADRUZSAUFARI E,SCHENK P M,*et al.* Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*,2004,**16**(12):3 460—3 479.
- [12] ASSELBERGH B,VLEESSCHAUWER D D,HOFTE M. Global switches and fine-tuning-ABA modulates plant pathogen defense[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*,2008,**21**(6):709—719.
- [13] MELOTTO M,UNDERWOOD W,KOCZAN J,*et al.* Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion[J]. *Cell*, 2006,**126**(5):969—980.
- [14] MELOTTO M,UNDERWOOD W,HE S Y. Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases[J]. *Annual Review of Phytopathology*,2008,46:101—122.
- [15] MOSHER S,MOEDER W,NISHIMURA N,*et al.* The lesion-mimic mutant cpr22 shows alterations in abscisic acid signaling and abscisic acid insensitivity in a salicylic acid-dependent manner[J]. *Plant Physiology*,2010,**152**(4):1 901—1 913.
- [16] HAUSER F,WAADT R,SCHROEDER J I. Evolution of abscisic acid synthesis and signaling mechanisms[J]. *Current Biology*,2011,**21**(9):346—355.
- [17] UMEZAWA T,NAKASHIMA K,MIYAKAWA T,*et al.* Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: Sensing, signaling and transport[J]. *Plant Cell Physiology*,2010,**51**(11):1 821—1 839.
- [18] BEN-ARI G. The ABA signal transduction mechanism in commercial crops: learning from *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell Reports*,2012,**31**(8):1 357—1 369.
- [19] MA Y,SZOSTKIEWICZ I,KORTE A,*et al.* Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors[J]. *Science*,2009,**324**(5 930):1 064—1 068.
- [20] PARK S Y,FUNG P,NISHIMURA N,*et al.* Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins[J]. *Science*,2009,**324**(5 930):1 068—1 071.
- [21] BROCK A K,WILLMANN R,KOLB D,*et al.* The arabidopsis mitogenactivated protein kinase phosphatase PP2C5 affects seed germination, stomatal aperture, and abscisic acid-inducible gene expression[J]. *Plant Physiology*,2010,**153**(3):1 098—1 111.
- [22] HUBBARD K E,NISHIMURA N,HITOMI K,*et al.* Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions[J]. *Genes & Development*,2010,**24**(16):1 695—1 708.
- [23] ROMERO P,LAFUENTE M T,RODRIGO M J. The Citrus ABA signalosome: identification and transcriptional regulation during sweet orange fruit ripening and leaf dehydration[J]. *Journal of Experimental Botany*,2012,**63**(13):4 931—4 945.
- [24] SECCHI F,MACIVER B,ZEIDEL M L,*et al.* Functional analysis of putative genes encoding the PIP2 water channel subfamily in *Populus trichocarpa* [J]. *Tree Physiology*,2009,**29**(11):1 467—1 477.
- [25] SANTIAGO J,RODRIGUES A,SAEZ A,*et al.* Modulation of drought resistance by the abscisic acid-receptor PYL5 through inhibition of clade A PP2Cs[J]. *The Plant Journal*,2009,**60**(4):575—588.
- [26] SZOSTKIEWICZ I,RICHTER K,KEPKA M,*et al.* Closely related receptor complexes differ in their ABA selectivity and sensitivity[J]. *The Plant Journal*,2010,**61**(1):25—35.