

DOI: 10.13332/j.1000-1522.20150499

C14 族 *R2R3-MYB* 基因调控杨树抗锈菌过敏性反应

牛春阳 王 峰 李丹蕾 陈俏丽 张瑞芝
(东北林业大学林学院)

摘要:由落叶松-杨栅锈菌引起的杨树叶锈病分布广泛,危害严重。为探究杨树 C14 族 *R2R3-MYB* 基因在杨树抗锈菌过敏性反应中的调控作用,对接种了落叶松-杨栅锈菌 E4 强致病性生理小种的 2 种杨树叶片进行症状观察、感病指数判定并对 2 种杨树 C14 族共 6 条 *R2R3-MYB* 基因表达量变化情况进行分析。接种 7 dpi 后,弱感病性树种杂交杨叶片产生的夏孢子堆数量显著少于感病树种欧美杨。杂交杨叶片 4 dpi 开始出现过敏性反应症状,欧美杨未观察到类似症状。表明过敏性反应可有效阻止锈菌夏孢子堆形成,降低杨树感病性。杂交杨与欧美杨 *R2R3-MYB* 基因表达量变化趋势相反,预测杨树 C14 族 *R2R3-MYB* 基因为杨树与病原互作过程中调控过敏性反应的正向调控因子。本研究为进一步系统研究杨树 *R2R3-MYB* 基因与过敏性反应的调控机理及杨树抗病育种工作提供理论依据。

关键词:转录因子; 转录调控; 美洲黑杨×毛果杨; 欧美杨; 落叶松-杨栅锈菌

中图分类号:S763.15 **文献标志码:**A **文章编号:**1000-1522(2016)07-0025-08

NIU Chun-yang; WANG Feng; LI Dan-lei; CHEN Qiao-li; ZHANG Rui-zhi. **Impact of clade 14 *R2R3-MYB* genes on hypersensitive response of the poplar infected with *Melampsora larici-populina*.** *Journal of Beijing Forestry University* (2016)**38**(7) 25-32 [Ch, 29 ref.] School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang, 150040, P. R. China.

Leaf rust caused by *Melampsora larici-populina* is the main disease affecting poplar plantations, causing severe economic losses. To explore the regulatory effects of clade 14 *R2R3-MYB* genes on hypersensitive response of the poplar infected with *M. larici-populina*, leaves of two poplar species were inoculated by *M. larici-populina* E4 pathotypes to observe the symptom and score the infectious index. In addition, changes of the gene expression level of six clade 14 *R2R3-MYB* genes were analyzed. After seven days of inoculation, the number of uredinium on *Populus deltoides* × *P. trichocarpa* (less susceptible to *M. larici-populina* E4 pathotypes) leaves was significantly less than that on *P. × euramericana* (very susceptible to *M. larici-populina* E4 pathotypes). On the fourth day of inoculation, symptoms of hypersensitive reaction (HR) were observed on leaves of *P. deltoides* × *P. trichocarpa*, but not on *Populus × euramericana* leaves. It turns out that HR can prevent the formation of uredinium and reduce the susceptibility of poplar. The change trend of *R2R3-MYB* gene expression level of the two poplar species was contrary. It is estimated that poplar clade 14 *R2R3-MYB* genes may be positive regulators of the HR in host in response to rust attack. This study provides a theoretical foundation for further studying these transcriptional factors in the control of the HR and the possible usage of these genes for the production of rust-resistant poplar.

Key words transcription factor; transcriptional regulation; *Populus deltoides* × *P. trichocarpa*; *P. × euramericana*; *Melampsora larici-populina*

专性寄生真菌落叶松-杨栅锈菌 (*Melampsora larici-populina*) 主要侵染青杨派 (Section *Tacamahaca*)、黑杨派 (Section *Aigeiros*) 及其杂交种叶片,引起杨树叶锈病^[1]。落叶松-杨栅锈菌完整生活史共产生性孢子、锈孢子、夏孢子、冬孢子和担孢子 5 种孢子,其中无性阶段的夏孢子在生长季反复侵染杨树叶片。Van Vloten H (1949) 首次发现了落叶松-杨栅锈菌生理分化现象,并报道了 3 个生理小种和 1 个变种^[2]。随着致病性的不断加强,欧洲已经发现 E1、E2、E3、E4 和 E5 共 5 个落叶松-杨栅锈菌生理小种^[3]。不同品种的杨树对不同致病性落叶松-杨栅锈菌生理小种的感病性不同。虽然黑杨 (*Populus deltoides*) 的杂交后代普遍对 E1、E2 和 E3 生理小种存在抗性^[4],但尚未培育出对强致病(毒性)的 E4 和 E5 生理小种不感病的杨树品种。杨树和柳树的基因组分子标记研究表明,对锈菌感病性不同的寄主基因组 DNA 多态性不同^[5-6]。进一步研究表明,寄主通过一系列抗病基因 (Resistance genes, *R*) 及其相关的转录因子 (transcription factors, TFs) 调控植物先天免疫^[7],从而决定其感病性。

植物先天免疫系统 (innate immune system) 通过激活一系列防御机制对病原入侵做出反应,反应过程可分为 4 个阶段。首先,植物通过跨膜的模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs) 识别微生物或病原相关分子模式 (microbial-or pathogen-associated molecular patterns, MAMPs/PAMPs) 引起病原诱导的免疫反应 (PAMP-triggered immunity, PTI),阻止病原定殖;其次,成功定殖的病原分泌效应因子 (effector) 干扰 PTI,植物产生效应因子诱导的感病性 (effector-triggered susceptibility, ETS);继而,植物 NB-LRR 蛋白特定识别效应因子,植物通过效应因子诱导免疫反应 (effector-triggered immunity, ETI) 引起寄主抗病性,并在感染部位产生过敏反应 (hypersensitive response, HR) 阻止病原扩散;最后,病原通过脱落被识别的效应因子来逃避 ETI,或分泌新的效应因子引发新一轮 ETI^[8]。在整个植物先天免疫过程中,HR 作为细胞程序化死亡 (programmed cell death, PCD) 的一种形式,导致与病原接触或紧邻病原的寄主细胞死亡,进而阻止病原扩散,是决定寄主感病性的关键步骤^[9]。低感病杨树在与锈菌互作过程中发生 HR^[10-11],HR 由 MYB (*v-myb* avian myeloblastosis viral oncogene homolog) 及 WRKY 等多基因共同调控^[12-13]。

MYB 转录因子是一类在其 N 端含有长约 51 ~

52 个氨基酸的 MYB 结构域的蛋白质^[14]。根据 MYB 结构域的数量可将 MYB 转录因子分为 1R-、R2R3-、3R-和 4R-MYB 4 个类型。R2R3-MYB 转录因子在植物中分布最广,广泛参与植物生长发育、代谢及响应生物和非生物胁迫等过程^[15]。多种植物 R2R3-MYB 转录因子调控寄主抗锈菌等多种病原侵染的先天免疫过程,例如小麦 (*Triticum aestivum*) 的 TaMYB4 调控寄主对小麦条锈病 (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) 的抗病性^[16];大豆 (*Glycine max*) R2R3-MYB 转录因子调控寄主对大豆锈病 (*Phakopsora pachyrhizi*) 的抗病性^[17]。拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 基因组中含有 126 个基因编码 R2R3-MYB 转录因子^[18],其中 AtMYB44 在拟南芥对丁香假单胞杆菌番茄致病变种 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000) 的应答反应中起正向调节作用^[19]。

毛果杨 (*Populus trichocarpa*) R2R3-MYB 转录因子分为 49 族 (C1 ~ C49),其中 C14 族包括 3 条 R2R3-MYB 基因: *PtrMYB053*、*PtrMYB081* 和 *PtrMYB155*^[18]。本课题组前期转录组测序表明锈菌侵染后美洲黑杨 × 毛果杨杂交杨 (*Populus deltoides* × *P. trichocarpa*,下文简称杂交杨) 和欧美杨 (*Populus* × *euramericana*) C14 族的 R2R3-MYB 基因表达量存在差异。为深入探究两树种感病性的症状差异及分子机理,对两树种先天免疫过程中的 HR 差异及 C14 族 R2R3-MYB 基因对 HR 的调控作用进行研究。本研究结果表明两树种感病指数、叶片 HR 症状及 R2R3-MYB 基因表达量显著不同。预测杨树 C14 族 R2R3-MYB 基因参与调控杨树与病原互作产生的过敏性反应。深入探讨杨树 C14 族 R2R3-MYB 基因与杨树与病原互作过程中的过敏性反应的关系,可为进一步系统研究杨树感病性的调控机理及杨树抗病育种工作提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料与锈菌接种

本研究使用由东北林业大学森林病理学标本室保存的落叶松-杨栅锈菌 E4 强致病性生理小种。杨树叶片采自杂交杨及欧美杨 1 年生枝条。从活化培养的 1 年生休眠枝条上取分离叶间隔期指数为 5 ~ 9 的完全展开叶片,用含 0.004% Tween 20 去离子水对 CK 组叶片进行喷雾处理,含 0.004% Tween 20 去离子水孢子悬浮液对接种组叶片进行喷雾接种^[20-22]。接种处理后,将叶片放置在温度为 16 ℃ 的培养箱内持续培养 7 d。对应接种组和 CK 组分别进行 20 个生物重复,在时间点 2 hpi (hours post inoculation)、6 hpi、12 hpi、1 dpi (days post

inoculation)、2 dpi、4 dpi 及 7 dpi 收集样品,用数码相机(佳能 6D)对接种叶片拍照并提取 RNA 以备基因克隆和荧光定量 PCR 取用。

1.2 感病指数判定

水孢子悬浮液对准面积(S)水琼脂培养基喷雾,显微镜下计数 N ,计算接种密度 ρ 。依据平均夏孢子器面积($\bar{S}$)及接种密度(ρ)两个变量来计算感病斜率因子(slope factor, SF)^[23-24]。利用图像分析软件 SigmaScan Pro 5.0 (SPSS Inc)计算 $\bar{S}$ 。产生最大夏孢子器面积 $\max(S)$ 的叶片上所有夏孢子器面积平均值 $\overline{\max(S)}$ 用于计算最大感病斜率因子(maximum slope factor, MSF),进一步求出平均最大感病斜率因子(average maximum slope factor, AMSF)。感病程度根据 SF 值和 AMSF 值分为 5 个等级:0 级, SF = 0;1 级, $0 < SF \leq \text{AMSF} \times 2/7$;2 级, $\text{AMSF} \times 2/7 < SF \leq \text{AMSF} \times 4/7$;3 级, $\text{AMSF} \times 4/7 < SF \leq \text{AMSF} \times 6/7$;4 级, $SF > \text{AMSF} \times 6/7$ 。具体计算公式如下:

$$\begin{aligned} \rho &= \frac{S}{N} \\ SF &= \frac{\sqrt{S}}{\sqrt{\rho}} \\ MSF &= \frac{\sqrt{\max(S)}}{\sqrt{\rho}} \\ AMSF &= \overline{MSF} \end{aligned}$$

式中: N 为夏孢子个数。

1.3 基因完整蛋白编码区克隆

选取接种落叶松-杨栅锈菌 2 hpi ~ 7 dpi 处理组杨树叶片,CTAB 法提取总 RNA。DNase I (RNase-free) 去除基因组 DNA,酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提后应用 Promega AMV 反转录系统进行第一链 cDNA 反转录。根据本课题组转录组测序结果分别设计杂交杨及欧美杨(Coding sequence, CDS)引物(表 1)。以第一链 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增反应分别克隆 *PndMYB053*、*PndMYB081*、*PndMYB155*、*PdtMYB053*、*PdtMYB081* 和 *PdtMYB155* 共 6 条基因完整蛋白编码区。PCR 产物经纯化后送上海生物工程公司测序。

1.4 生物信息学分析

应用 ORF Finder(open reading frame finder)进行在线 ORF 分析并推导出 6 条基因氨基酸序列,NCBI 进行 BLASTP 多序列比对并下载同源序列。应用 ClustalW 进行多序列比对,并用 Mega 5.05 根据 BIC 值确定核酸进化最适模型,构建邻接树(neighbor joining tree, NJT)。应用自展检验(bootstrap test)估计所构建系统树的可靠性,重复次

数设定为 1 000^[25]。

应用 SWISSModel server, *PndMYB053*、*PdtMYB053*、*PndMYB081* 和 *PdtMYB081* 以 MYB 蛋白 1h88c (E-value = 3.1×10^{-30}) 为模板, *PndMYB155* 和 *PdtMYB155* 以 MYB 蛋白 3zqc (E-value = 9.9×10^{-34}) 为模板在线构建蛋白质三维结构,根据已有 X 射线衍射结构进行适当修正。应用 Hex 6.3^[26] 进行这 6 条蛋白和含有 MYB 结合元件核心序列“5'-CC-TAACTG-ACACACAT-3'”^[27] 的分子对接试验。

1.5 荧光定量 PCR

选取接种落叶松-杨栅锈菌 E4 生理小种 2 hpi、6 hpi、12 hpi、1 dpi、2 dpi、4 dpi 和 7 dpi 后处理组杨树叶片相应的第一链 cDNA 为模板,以 *PndMYB053*-Q-F 和 *PndMYB053*-Q-R、*PndMYB081*-Q-F 和 *PndMYB081*-Q-R、*PndMYB155*-Q-F 和 *PndMYB155*-Q-R、*PdtMYB053*-Q-F 和 *PdtMYB053*-Q-R、*PdtMYB081*-Q-F 和 *PdtMYB081*-Q-R、*PdtMYB155*-Q-F 和 *PdtMYB155*-Q-R 为引物,应用 Bio-Rad iCycler iQ^{TM5}, 应用 GoTaq 2-Step RT-qPCR System 试剂盒进行 Q-PCR 扩增。以杨树 18S rRNA 基因^[28-29] 作为内参基因(positive internal control)。使用 2 步法 PCR,反应程序:第 1 步预变性 95 ℃ 2 min;第 2 步 95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,进行 40 个循环。60 ~ 95 ℃ 测定融解曲线。采用相对定量法计算 3 次重复试验初始模板量比值,两独立样本 t 检验差异显著性。

2 结果与分析

2.1 锈菌接种及感病指数判定

E4 强致病性生理小种接种杂交杨及欧美杨两种杨树叶片试验结果明显不同,至 7 dpi 时欧美杨叶片未见叶组织坏死反应,无 HR 症状产生,且已产生大量夏孢子堆。而杂交杨叶片产生明显 HR 症状,几乎无夏孢子堆产生。观察发现,欧美杨叶片在 2 hpi ~ 1 dpi 未表现明显症状(图 1 pnd 2 hpi ~ 1 dpi),2 dpi 叶片局部出现细小褪绿斑点(图 1 pnd 2 dpi),4 dpi 叶片可见明显黄色斑点(图 1 pnd 4 dpi),7 dpi 病斑面积扩大(图 1 7 dpi),锈菌完成一个生长周期开始形成夏孢子堆;杂交杨叶片 2 hpi ~ 2 dpi 未表现明显症状(图 1 pdt 2 hpi ~ 2 dpi),4 dpi 在锈菌侵染点周围产生褪绿斑点(图 1 pdt 4 dpi 箭头所示),7 dpi 落叶松-杨栅锈菌完成一个生长周期开始形成夏孢子时叶组织产生坏死斑点,可见明显 HR 症状(图 1 pdt 7 dpi)。经计算本次试验 $\rho \approx 65$ 个孢子/cm²、AMSF = 1.076,欧美杨 = 1.766 mm²、

表 1 试验所用引物
Tab.1 Primers used in the study

试验 Experiment	杨树品种 Poplar varieties	基因 Gene	引物 Primer name	序列 Sequences
CDS 克隆 CDS clone	欧美杨 <i>Populus × euramericana</i>	<i>PndMYB053</i>	Pnd-MYB053-C-F	5'-TAA AGT GAT AAT GGG CAG ACC AC -3'
			Pnd-MYB053-C-R	5'-GAG CCC TCC CAC TAG AAG AG -3'
		<i>PndMYB081</i>	Pnd-MYB081-C-F	5'-CCT AAG CCA TGG GAA GAC C-3'
			Pnd-MYB081-C-R	5'-AAC GTG CTC AGA ATA TTG G -3'
		<i>PndMYB155</i>	Pnd-MYB155-C-F	5'-GGC CTT ACA TGC TTG TTC -3'
			Pnd-MYB155-C-R	5'-CAT CTG GTG TGA CTT CAC T -3'
	美洲黑杨 × 毛果杨杂交杨 <i>P. deltoides × P. trichocarpa</i>	<i>PdtMYB053</i>	Pdt-MYB053-C-F	5'-TAA TGG GCA GAC CAC CTT GC -3'
			Pdt-MYB053-C-R	5'-CAC TAG AAG AGA TTA TCT TC -3'
		<i>PdtMYB081</i>	Pdt-MYB081-C-F	5'-CCA TGG GAA GAC CTC CTT G -3'
			Pdt-MYB081-C-R	5'-CTC AGA ATA TTG GAG ACA G -3'
		<i>PdtMYB155</i>	Pdt-MYB155-C-F	5'-CAT GCT TGT TCT ATC TTT AG -3'
			Pdt-MYB155-C-R	5'-TCA TCT GGT GTG ACT TCA C -3'
荧光定量 PCR Q-PCR	欧美杨 <i>P. × euramericana</i>	<i>PndMYB053</i>	Pnd-MYB053-Q-F	5'-TCA TCA ACA GGT TCA CAG CAA -3'
			Pnd-MYB053-Q-R	5'-CAT ACC CAC AAG AGG GTT TCA A-3'
		<i>PndMYB081</i>	Pnd-MYB081-Q-F	5'-GCT TTG GAT CCT ATG GCA CA -3'
			Pnd-MYB081-Q-R	5'-CTT CAA GAA GGC GCG AAA TG-3'
		<i>PndMYB155</i>	Pnd-MYB155-Q-F	5'-GGC TGC CAT AGC TTC ATA CC -3'
			Pnd-MYB155-Q-R	5'-GCC TAG CCA TGT GGA TAT CAG -3'
	美洲黑杨 × 毛果杨杂交杨 <i>P. deltoides × P. trichocarpa</i>	<i>PdtMYB053</i>	Pdt-MYB053-Q-F	5'-TCC AGA TTG CTC AAA GGA TGG -3'
			Pdt-MYB053-Q-R	5'-CCT GTG ATA ATC CAG TGC CA -3'
		<i>PdtMYB081</i>	Pdt-MYB081-Q-F	5'-TCA TCT CCA AAG CCA AAC GG -3'
			Pdt-MYB081-Q-R	5'-ATC ACC ACT TTC TTC CTC GG -3'
		<i>PdtMYB155</i>	Pdt-MYB155-Q-F	5'-TAG GCA AGC TCT AAG CGA GG -3'
			Pdt-MYB155-Q-R	5'-TCA TCC AAC CTT TGA GCA ACT-3'
		18S rRNA	18S-F	5'-CGA AGA CGA TCA GAT ACC GTC CTA -3'
			18S-R	5'-TTT CTC ATA AGG TGC TGG CGG AGT -3'

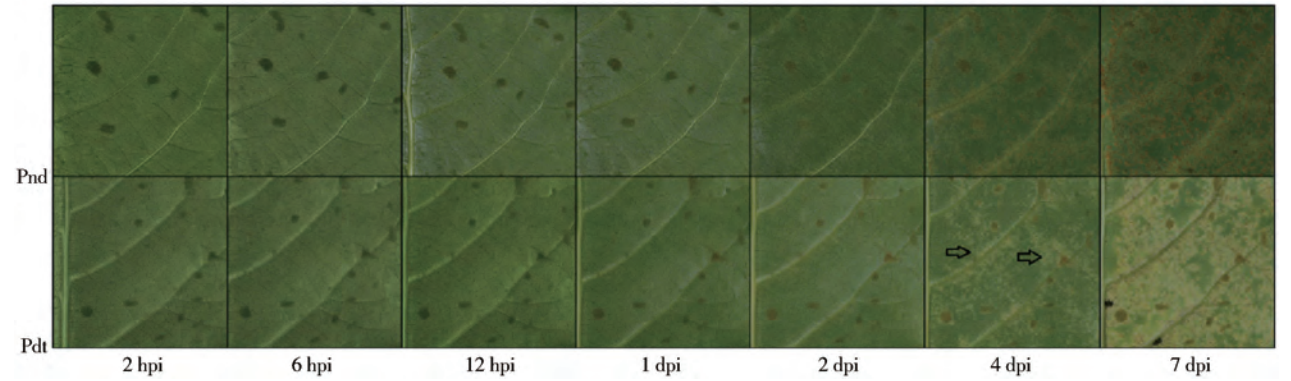


图 1 锈菌 E4 生理小种接种 2 种杨树 7 dpi 叶片

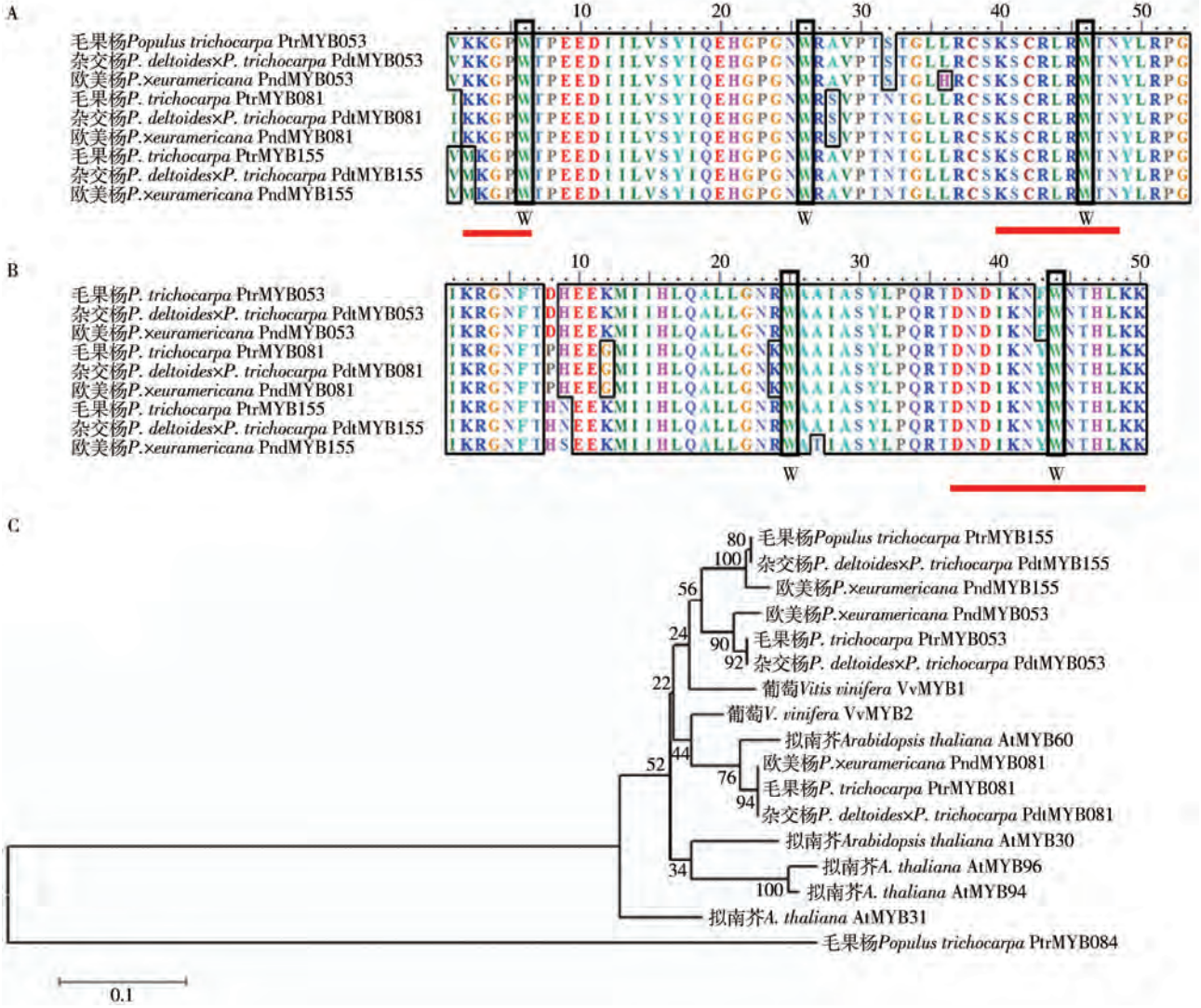
Fig. 1 E4 Rust infected two species of poplar leaves at 7 dpi

SF = 1.328,感病指数为 4 级,为高感病树种;杂交杨 = 0.332 mm²、SF = 0.575,感病指数为 2 级,中等感病,为低感病树种。

2.2 完整蛋白编码区克隆及生物信息学分析
完整蛋白编码区克隆测序结果翻译为氨基酸序列进行结构域分析表明,6 条蛋白氨基酸序列均具

有 2 个串联的 MYB 结构域 R2 (图 2A) 和 R3 (图 2B), 因此这 6 条蛋白属于 R2R3-MYB。NCBI 下载拟南芥 C14 族 R2R3-MYB 序列 5 条 (AtMYB30、AtMYB31、AtMYB60、AtMYB94 和 AtMYB96)、葡萄 (*Vitis vinifera*) C14 族 R2R3-MYB 序列 2 条 (VvMYB1 和 VvMYB2) 和毛果杨 C14 族 R2R3-MYB 序列 3 条 (PtrMYB053、PtrMYB081 和 PtrMYB155) 作

为内群 (ingroup), 毛果杨 C48 族 R2R3-MYB 蛋白 PtrMYB084 作为外群 (outgroup)。用 Mega 5.05 选择 JTT + G 模型 (BIC 值 = 2 596.185) 构建邻接树 (图 2C), 归根后 6 条 R2R3-MYB 与 C14 族 R2R3-MYB 聚在一起, 外群 PtrMYB084 独立成枝, 表明这 6 条蛋白属于 C14 族 R2R3-MYB。



A. 杨树 C14 族 R2-MYB 结构域序列比对; B. 杨树 C14 族 R3-MYB 结构域序列比对; C. 5 种植物 C14 族 R2R3-MYB 邻接树。A: alignment of R2 MYB repeats from poplar clade 14 R2R3-MYB; B: alignment of R3 MYB repeats from poplar clade 14 R2R3-MYB; C: the NJT of clade 14 R2R3-MYB from 5 kinds of plants.

图 2 杨树 C14 族 R2R3-MYB 蛋白系统进化分析

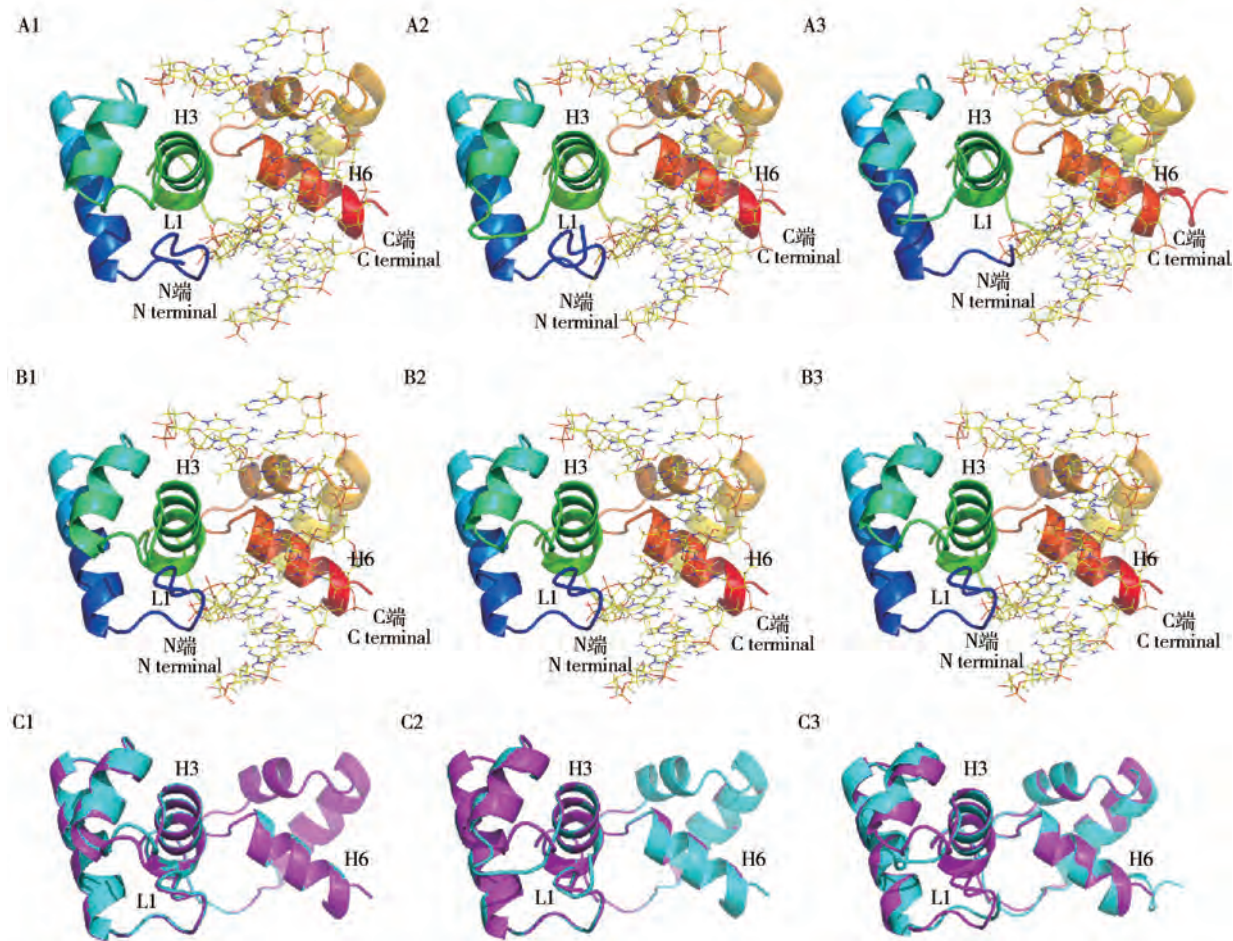
Fig. 2 Phylogenetic analysis of poplar clade 14 R2R3-MYB

杂交杨和欧美杨的 C14 族 R2R3-MYB 蛋白质由多个“α 螺旋-loop-α 螺旋”串联构成 (图 3), 该结构有利于嵌入 DNA 双螺旋的大沟 (major groove) 中, 便于和其调控靶基因的启动子结合。分子对接表明, 6 条杂交杨和欧美杨的 C14 族 R2R3-MYB 蛋白均可以与 MYB 结合元件核心序列结合 (图 3A、3B)。三维结构及序列比对表明, 杨树 C14 族 R2-

MYB 结构域序列含有 2 段 DNA 结合位点 (图 2A 红色短线), R3-MYB 结构域序列含有 1 段 DNA 结合位点 (图 2B 红色短线)。其中 R2-MYB 结构域 DNA 结合位点位于 N 端 loop 区 L1 和 α 螺旋 H3 区, R3-MYB 结构域 DNA 结合位点位于 C 端 α 螺旋 H6 区, 分子对接表明这 3 个结合位点与这含有 MYB 结合元件核心序列的 DNA 结合 (图 3A、3B)。杂交杨

和欧美杨的 C14 族 R2R3-MYB 序列保守,结构相近。PdtMYB053 与 PndMYB053、PdtMYB081 与 PndMYB081 三维结构比对(图 3C1、3C2)近 H3 前端 loop 区存在差异,DNA 结合位点结构完全一致。

PdtMYB155 与 PndMYB155 三维结构比对(图 3C3)除了近 H3 前端 loop 区存在差异外 N 端 loop 区 L1 DNA 结合位点也存在差异,其余 2 个 DNA 结合位点结构完全一致。



A1. PdtMYB053 与 DNA 分子对接;A2. PdtMYB081 与 DNA 分子对接;A3. PdtMYB155 与 DNA 分子对接;B1. PndMYB053 与 DNA 分子对接;B2. PndMYB081 与 DNA 分子对接;B3. PndMYB155 与 DNA 分子对接;C1. PdtMYB053 与 PndMYB053 三维结构比对;C2. PdtMYB081 与 PndMYB081 三维结构比对;C3. PdtMYB155 与 PndMYB155 三维结构比对。A1;docking of PdtMYB053 to DNA;A2; docking of PdtMYB081 to DNA;A3;docking of PdtMYB155 to DNA;B1;docking of PndMYB053 to DNA;B2;docking of PndMYB081 to DNA;B3; Docking of PndMYB155 to DNA; C1: 3D alignment of PdtMYB053 to PndMYB053; C2: 3D alignment of PdtMYB081 to PndMYB081;C3:3D alignment of PdtMYB155 to PndMYB155.

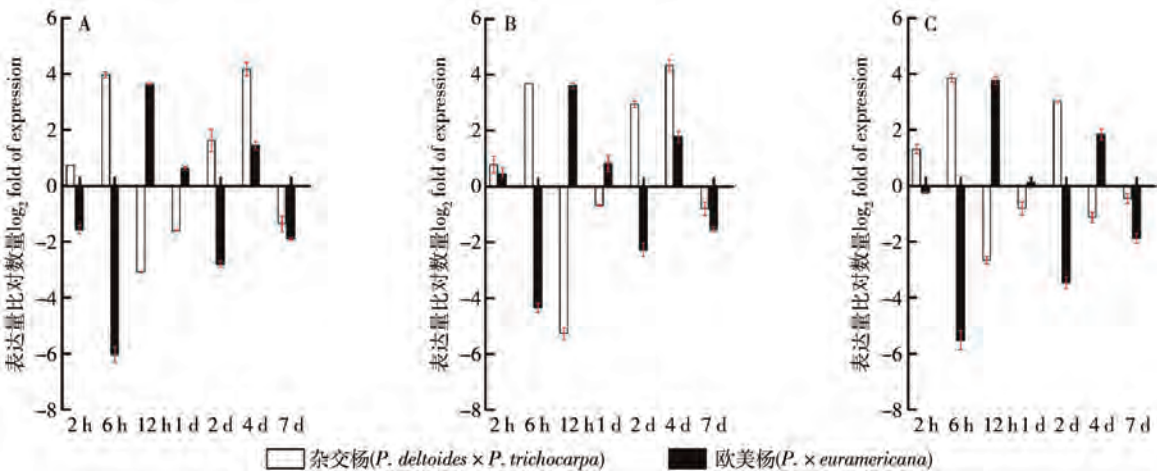
图 3 杨树 C14 族 R2R3-MYB 蛋白三维结构

Fig. 3 3D structure of poplar clade 14 R2R3-MYB

2.3 荧光定量 PCR

根据落叶松-杨栅锈菌无性繁殖的几个主要发育转换时期,选取接种落叶松-杨栅锈菌 E4 生理小种 2 hpi、6 hpi、12 hpi、1 dpi、2 dpi、4 dpi 和 7 dpi 后处理组两树种叶片,进行 Q-PCR 扩增检验 C14 族 R2R3-MYB 基因表达量变化,采用相对定量法计算 3 次重复试验两独立样本 t 检验 $P < 0.01$,差异显著。杂交杨 3 条 C14 族 R2R3-MYB 基因在落叶松-杨栅锈菌接种后在 6 hpi 和 4 dpi 两个时间点均为高峰表达时期(图 4),锈菌菌丝生长期(6 hpi) R2R3-MYB

基因表达量均上调增幅较高,随后略有下降,在锈菌生物量大量增长时期(4 dpi) PdtMYB053 和 PdtMYB081 基因又出现显著增幅,在形成夏孢子时(7 dpi)3 个基因表达均略有下降。对应杂交杨基因表达量情况,欧美杨 C14 族 R2R3-MYB 基因在 10 号树种第一个表达高峰表达时期(6 hpi)表达量均下调幅度较高,随后显著上升,在杂交杨第二个表达高峰表达时期(4 dpi)欧美杨 3 条 C14 族 R2R3-MYB 基因表达量均略有增幅,在锈菌形成夏孢子时(7 dpi)基因表达量均显著下降。



A. *PdtMYB053* 与 *PndMYB053* 表达;B. *PdtMYB081* 与 *PndMYB081* 表达;C. *PdtMYB155* 与 *PndMYB155* 表达。A:gene expression of *PdtMYB053* and *PndMYB053*; B: gene expression of *PdtMYB081*and *PndMYB081*; C: gene expression of *PdtMYB155* and *PndMYB155*.

图 4 杨树 C14 族 *R2R3-MYB* 基因抗 E4 落叶松-杨栅锈菌表达

Fig. 4 Gene expression of poplar clade 14 *R2R3-MYB* genes after the infection of E4 rust

3 讨论与结论

选育抗病性品种是控制杨树叶锈病的根本途径。对于抗病性杨树,病原菌入侵会导致组织发生 HR 等一系列抗病反应来抑制病原菌侵染,达到抗病的目的。欧美杨为落叶松-杨栅锈菌 E4 强致病性生理小种的高感病树种^[20],感病指数 4 级,接种锈菌 E4 生理小种 7 dpi 后未产生 HR 症状;杂交杨感病指数 2 级,中等感病,接种锈菌 7 dpi 后产生明显 HR 症状,为低感病树种。HR 可有效阻止锈菌夏孢子堆形成,欧美杨叶片夏孢子堆数量远多于杂交杨,其由 *MYB* 及 *WRKY* 等多基因共同调控。

经系统发育分析筛选出高度同源的 6 条杨树 *R2R3-MYB* 基因 (*PndMYB053*、 *PndMYB081*、 *PndMYB155*、 *PdtMYB053*、 *PdtMYB081* 和 *PdtMYB155*),该 6 条基因与拟南芥 *R2R3-MYB* 基因 *AtMYB30* 同属于 C14 进化枝。*AtMYB30* 是植物与病原互作过程中调控过敏性反应的正向调控因子,其在拟南芥和烟草植株中过表达均可促进过敏性反应并增强植株对多种细菌、真菌病原的抗性,其中包括强致病性活体营养型真菌病害烟草蛙眼病 (*Cercospora nicotianae*)^[12]。由于高度同源的基因通常具有相似的功能,因此预测这 6 条基因和杨树与锈菌互作产生的过敏性反应相关。为证明这一预测,我们分别对杂交杨和欧美杨 C14 族 *R2R3-MYB* 基因表达量变化进行了研究。荧光定量 PCR 结果表明同一树种 3 条基因表达量变化趋势基本一致,欧美杨 *R2R3-MYB* 基因表达量变化趋势较杂交杨滞后。杂交杨 C14 族 *R2R3-MYB* 基因在锈菌菌丝生长

期(6 hpi)基因表达量均上调增幅较高,该期发生寄主和病原识别,随后 *R2R3-MYB* 基因对下游 R 基因进行转录调控。在锈菌生物量大量增长时期(4 dpi) *PdtMYB053* 及 *PdtMYB081* 基因表达量又有一定增幅,表明该期间又开始了新一轮抗性基因转录调控。杨树叶片接种锈菌 2 h 后,夏孢子开始萌发,6 hpi 为锈菌菌丝生长期,此时杂交杨 C14 族 *R2R3-MYB* 基因大量表达促进叶肉细胞发生过敏性反应,欧美杨在 6 hpi 的基因表达量下调幅度较高,12 hpi 大量表达则错过了抑制锈菌萌发侵染叶肉细胞的最佳时间。本研究初步估计杨树 C14 族 *R2R3-MYB* 基因为杨树与病原互作过程中调控过敏性反应的正向调控因子。为进一步系统研究杨树 *R2R3-MYB* 基因与过敏性反应的调控机理及杨树抗病育种工作提供理论依据。

参 考 文 献

[1] 曹支敏,杜林,王秦虎,等. 中国落叶松-杨栅锈菌遗传多样性研究[J]. 菌物学报,2012(4):510-522.
CAO Z M, DU L, WANG Q H, et al. Genetic diversity of poplar rust fungus *Melampsora larici-populina* in China [J]. *Mycosystema*, 2012(4): 510-522.
[2] VAN VLOTEN H. Kruisingsproeven met rassen van *Melampsora larici-populina* Klebahn[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 1949, 55(3): 196-209.
[3] PEI M H, MCCracken A R. Rust diseases of willow and poplar [M]. Wallingford: CABI Publishing, 2005.
[4] DOWKIW A, JORGE V, VILLAR M, et al. Breeding poplars with durable resistance to *Melampsora larici-populina* leaf rust: a multidisciplinary approach to understand and delay pathogen adaptation[C] // *Proceedings of the fourth international workshop on the genetics of host-parasite interactions in forestry: disease and insect resistance in forest trees*, Gen. Tech. Rep. PSW-GTR-

240. Albany: Pacific Southwest Research Station, Forest Service, US Department of Agriculture, 2012: 31-38.
- [5] PEI M H, YUAN Z W, HUNTER T, et al. Heterogeneous nature of a 'new' pathotype of *Melampsora* rust on *Salix* revealed by AFLP[J]. European Journal of Plant Pathology, 2000, 106(8): 771-779.
- [6] PEI M H, BAYON C, RUIZ C, et al. Genetic variation in *Melampsoralarici-epitea* on biomass willows assessed using AFLP [J]. European Journal of Plant Pathology, 2002, 108(3): 229-236.
- [7] 程曦,田彩娟,李爱宁,等. 植物与病原微生物互作分子基础的研究进展[J]. 遗传,2012,34(2):134-144.
CHENG X, TIAN C J, LI A N, et al. Advances on molecular mechanisms of plant-pathogen interactions[J]. Hereditas, 2012, 34(2): 134-144.
- [8] JONES J D G, DANGL J L. The plant immune system [J]. Nature, 2006, 444: 323-329.
- [9] GREENBERG J T, YAO N. The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions[J]. Cellular Microbiology, 2004, 6(3): 201-211.
- [10] DUPLESSIS S, MAJOR I, MARTIN F, et al. Poplar and pathogen interactions: insights from *Populus* genome-wide analyses of resistance and defense gene families and gene expression profiling [J]. Critical Reviews in Plant Science, 2009, 28(5): 309-334.
- [11] 陈祖静,费昭雪,曹支敏,等. 杨树与叶锈菌互作中的细胞程序性死亡[J]. 西北林学院学报,2013,28(3):134-137,205.
CHEN Z J, FEI Z X, CAO Z M, et al. Programmed cell death in the interaction between poplar and leaf rust [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2013, 28(3): 134-137,205.
- [12] VAILLEAU F, DANIEL X, TRONCHET M, et al. A *R2R3-MYB* gene, *AtMYB30*, acts as a positive regulator of the hypersensitive cell death program in plants in response to pathogen attack [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002, 99(15): 10179-10184.
- [13] 王美芳. 转录因子 WRKY1 和 WRKY2 在激发子诱导的过敏反应和气孔关闭中的功能研究[D]. 南京:南京农业大学,2011.
WANG M F. The role of WRKY transcription factors in the elicitor-triggered hypersensitive response and stomatal closure in *Nicotiana benthamiana* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2011.
- [14] 刘蕾,杜海,唐晓凤,等. MYB 转录因子在植物抗逆胁迫中的作用及其分子机理[J]. 遗传,2008, 30(10): 1265-1271.
LIU L, DU H, TANG X F, et al. The roles of MYB transcription factors on plant defense responses and its molecular mechanism [J]. Hereditas, 2008, 30(10): 1265-1271.
- [15] AMBAWAT S, SHARMA P, YADAV N R, et al. MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: an overview[J]. Physiology and Molecular Biology of Plants, 2013, 19(3): 307-321.
- [16] AL-ATTALA M N, WANG X J, ABOU-ATTIA M A, et al. A novel TaMYB4 transcription factor involved in the defence response against *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* and abiotic stresses [J]. Plant Molecular Biology, 2014, 84(4): 589-603.
- [17] AOYAGI L N, LOPES-CAITAR V S, DE CARVALHO M C C G, et al. Genomic and transcriptomic characterization of the transcription factor family R2R3-MYB in soybean and its involvement in the resistance responses to *Phakopsora pachyrhizi* [J]. Plant Science, 2014, 229: 32-42.
- [18] WILKINS O, NAHAL H, FOONG J, et al. Expansion and diversification of the *Populus* R2R3-MYB family of transcription factors[J]. Plant Physiology, 2009, 149(2): 981-993.
- [19] ZOU B H, JIA Z H, TIAN S M, et al. AtMYB44 positively modulates disease resistance to *Pseudomonas syringae* through the salicylic acid signalling pathway in *Arabidopsis* [J]. Functional Plant Biology, 2013, 40(3): 304-313.
- [20] PEI M H, RUIZ C, BAYON C, et al. Pathogenic variation in poplar rust *Melampsora larici-populina* from England [J]. European Journal of Plant Pathology, 2005, 111(2): 147-155.
- [21] 牛春阳,李丹蕾,王峰,等. 基于转录组的欧美杨 *Pnd-WRKY3* 基因克隆及其抗锈菌表达[J]. 东北林业大学学报,2015,43(9):1-5.
NIU C Y, LI D L, WANG F, et al. Isolation and expression of *Pnd-WRKY3* transcription factor gene from poplar (*Populus nigra* × *P. deltoides*) [J]. Journal of Northeast Forestry University, 2015, 43(9): 1-5.
- [22] 陈俏丽,李丹蕾,王峰,等. 欧美杂交杨 *Pnd-LRR3* 基因克隆及其抗锈菌侵染表达[J]. 东北林业大学学报,2015,43(3):95-98,103.
CHEN Q L, LI D L, WANG F, et al. Genetic cloning and gene expression of *Pnd-LRR3* resistance gene from *Populus nigra* × *P. deltoides* [J]. Journal of Northeast Forestry University, 2015, 43(3): 95-98,103.
- [23] PEI M H, RUIZ C, BAYON C, et al. Rust resistance in *Salix* to *Melampsora larici-epitea* [J]. Plant Pathology, 2004, 53(6): 770-779.
- [24] PEI M H, LINDEGAARD K, RUIZ C, et al. Rust resistance of some varieties and recently bred genotypes of biomass willows[J]. Biomass and Bioenergy, 2008, 32(5): 453-459.
- [25] 王峰,王志英,李丹蕾. 小兴安岭代表性菌物系统进化初步研究[J]. 森林工程, 2012, 38(2):1-5.
WANG F, WANG Z Y, LI D L. Phylogenetic of representative fungi in Xiaoxing'an Mountains [J]. Forest Engineering, 2012, 28(2):1-5.
- [26] MACINDOE G, MAVRIDIS L, VENKATRAMAN V, et al. HexServer: an FFT-based protein docking server powered by graphics processors [J/OL]. Nucleic Acids Research, 2010, 38 [2015-11-14]. <http://www.research.gate.net/publication/44575459>. DOI:10.1093/nar/gkq311.
- [27] OGATA K, MORIKAWA S, NAKAMURA H, et al. Solution structure of a specific DNA complex of the Myb DNA-binding domain with cooperative recognition helices[J]. Cell, 1994, 79(4): 639-648.
- [28] LI Q, LIN Y C, SUN Y H, et al. Splice variant of the SND1 transcription factor is a dominant negative of SND1 members and their regulation in *Populus trichocarpa* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012, 109(36): 14699-14704.
- [29] DUAN Y, JIANG Y, YE S, et al. PtrWRKY73, a salicylic acid-inducible poplar WRKY transcription factor, is involved in disease resistance in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Cell Reports, 2015, 34(5): 831-841.

(责任编辑 李 雯 范 娟
责任编辑 康向阳)