

杨树 (*Populus* spp.) 与茶蔗子葡萄座腔菌 (*Botryosphaeria dothidea*) 互作中 SA 和 H_2O_2 的信号转导特征

马健, 刘振宇, 严东辉, 吕全, 梁军, 张星耀

(1 国家林业局森林保护学重点实验室, 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 北京 100091;

2 山东农业大学植保学院, 山东 泰安 271000)

摘要: 本研究以毛白杨(*Populus tomentosa*)和北京杨(*Populus × beijingensis*)为试验材料, 探讨了杨树与溃疡病菌(*Botryosphaeria dothidea*) 互作过程中的信号转导, 重点分析了水杨酸 (SA)、水杨酸甲酯 (MeSA) 和过氧化氢 (H_2O_2) 作为信号分子的作用及其信号转导特征, 主要研究结果如下: 1. 接种 *B. dothidea* 后, 毛白杨中游离态SA含量显著升高, 接种后6h开始增加, 72h时达到最高值, 随后又下降, 而对照中游离态SA的含量变化不明显; 相对于结合态SA而言, 游离态SA含量的变化总是相对敏感且显著; 不同抗性杨树接种 *B. dothidea* 后 SA 含量变化具有显著差异, 毛白杨呈现出上述SA作为信号分子的典型功能特征, 而北京杨接种 *B. dothidea* 后内源SA含量变化不显著, 没有出现SA的迅速积累现象。证实SA参与了毛白杨与 *B. dothidea* 的互作过程, SA主要以游离态形式参与杨树抗病防卫反应, 同时显示了杨树对溃疡病的抗性 with 杨树体内游离态SA的积累密切相关。2. 针对杨树与 *B. dothidea* 互作中 SA 的合成途径进行研究, 发现 *B. dothidea* 接种毛白杨后6-12h苯甲酸 (BA) 的含量呈下降趋势, 同时苯甲酸2-羟化酶 (BA2H) 活性显著升高, 随着接种时间的延长, BA含量增加, 而苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 活性显著升高, 说明 *B. dothidea* 侵染毛白杨后, BA由BA2H催化形成SA, 但接种后期BA2H酶活性受到抑制导致BA含量的增加; 与毛白杨相比较, 北京杨接种后植物体内BA含量变化表现为缓慢上升趋势, 整个接种期间没有出现BA含量下降现象; 同时研究结果还显示, 毛白杨在接种后48-72h, 游离态SA与结合态 SA 的含量变化呈相反趋势, 推测存在结合态SA向游离态SA转化的现象。3. 检测了 *B. dothidea* 与杨树互作中水杨酸 (SA) 与水杨酸甲酯 (MeSA) 的相互转化特征。在不同抗性杨树中SA 和 MeSA含量水平不同, SA 和 MeSA的变化具有一定的关系; 接种 *B. dothidea* 后, 毛白杨被诱导导致MeSA含量水平变化显著, 并在接种后48h时出现峰值, 而北京杨MeSA含量没有显著变化; MeSA和SA含量变化特征揭示, 接种后48h MeSA含量达到最大值, 伴随着SA含量达到峰值, MeSA含量随之急剧下降, 而SA含量却急剧上升, 表现出一个在量上的可能转化特征; 经对杨树

*SABP2*与*SAMT*两个基因的克隆及其RT-PCR分析发现,毛白杨接种*B. dothidea*后,*SAMT*在12h时表达量达到最大值,*SABP2*则在接种后48h时表达量达到最大值,但接种前期其表达受到抑制,这与SA和MeSA含量变化相一致,进一步表明在接种点存在MeSA与SA相互转化的现象;同一植株接种后,在未被感染部位,毛白杨中MeSA与SA含量均呈现上升趋势,与接种部位相比较,未感染组织MeSA的含量水平开始上升时间晚,且最高值小,未感染组织中SA的含量比接种点SA的含量低,而北京杨中这两种信号分子并没有显著变化;毛白杨未受感染组织中*SABP2*基因相对表达量在整个接种期间均处于上调状态,且比接种部位*SABP2*的表达更活跃,而*SAMT*的表达量变化不显著,上调幅度不大,这些现象表明,在杨树与溃疡病菌互作体系中接种部位与未受感染部位均存在SA与MeSA通过*SABP2*与*SAMT*进行相互转化的现象。4. 测定了过氧化氢 (H_2O_2) 作为第二信使在*B. dothidea* 与杨树互作中的作用。

毛白杨在接种*B. dothidea*后 H_2O_2 的含量显著高于北京杨,毛白杨 H_2O_2 含量于48-72h内迅速积累,较北京杨上升快且含量高,毛白杨接种后72h时, H_2O_2 含量达到最大值,且对照中 H_2O_2 含量没有显著变化,表明毛白杨对*B. dothidea*的抗性可能与植株体内 H_2O_2 的快速积累有关;毛白杨在接种6h时即有沉淀积累,72h出现一个 H_2O_2 迸发高峰,大量电子沉积物累积并密集分布于细胞壁;同样,在未受感染部位中 H_2O_2 变化趋势与接种部位相似,但 $CeCl_3$ 沉淀积累相对较少,推测杨树中*B. dothidea*可以诱导 H_2O_2 在整株植株中系统性产生;与抗病毛白杨相比,感病北京杨中 H_2O_2 - $CeCl_3$ 沉淀颗粒很少,与利用生理学方法检测 H_2O_2 含量的结果相一致。

5. 对毛白杨外施SA的实验表明,SA处理与SA处理后接菌的植株中 H_2O_2 含量具有相似的变化趋势,外源SA处理使杨树体内 H_2O_2 含量迅速升高,48h时出现一峰值,SA处理后接菌的杨树体内 H_2O_2 含量变化趋势与SA单独处理相一致,但含量水平比SA单独处理要高,且SA处理后接菌的植株在接种前期 H_2O_2 含量明显高于接菌植株,表明在毛白杨与*B. dothidea*的互作过程中,外源SA可明显促进杨树体内 H_2O_2 的积累;通过对CAT及APX的活性进行测定表明,外源SA可明显抑制CAT活性,而APX活性没有明显变化,可见,在杨树与*B. dothidea*互作体系中SA可能主要通过对CAT的调节作用,积累 H_2O_2 产生抗病性;克隆获得编码毛白杨水杨酸结合蛋白PtSABP和北京杨PbSABP蛋白的两个基因,RT-PCR分析表明,接种后毛

白杨SABP基因的表达在6-24h时受到抑制,结合前期对SA的研究,推测此时SA与SABP结合,抑制其CAT活性,从而促使24h后 H_2O_2 含量的显著升高;因此本实验证明 H_2O_2 的变化差异是由于*B. dothidea* 侵染杨树后引起的,SABP参与了杨树的抗病过程,表明杨树对溃疡病的抗性与 H_2O_2 的积累情况有关,在杨树的防卫反应中, H_2O_2 位于SA下游起作用。

关键词: 杨树; 茶蔗子葡萄座腔菌; 交互; 水杨酸; 水杨酸甲酯; 过氧化氢