

网络出版时间:2014-06-21 18:02

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.07.004

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.07.004.html>

杨树 *PsChi* I 基因全长的克隆与表达分析

王 琼, 曹支敏

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 **【目的】**克隆川杨几丁质酶基因 cDNA 全长序列, 分析其在病原菌侵染过程中不同时间段的表达特征。**【方法】**以受落叶松-杨栅锈菌 (*Melampsora larici-populina*) 单孢子堆菌系 Sb052 侵染后的川杨叶片为试材, 采用 RACE 法克隆川杨几丁质酶基因 cDNA 序列, 对其进行生物信息学和实时荧光定量表达分析。**【结果】**克隆到 1 条川杨几丁质酶基因序列, 将其命名为 *PsChi* I (GenBank 登录号: KC416180)。该序列全长 1 145 bp, 包含 1 段 960 bp 的开放阅读框(ORF), 38 bp 的 5' 非编码区和 147 bp 的 3' 非编码区。其编码蛋白含有 319 个氨基酸, 具有 2 条糖苷水解酶 19 家族特征序列, 理论等电点为 5.03, 为 Class I b 型酸性几丁质酶, 属于几丁质酶第 19 家族。序列比对和系统进化树结果表明, *PsChi* I 与毛果杨 (*Populus trichocarpa*) 几丁质酶基因相似性最高, 且亲缘关系最近。实时荧光定量 PCR 结果表明, 菌系 Sb052 侵染杨树叶片后 *PsChi* I 基因在各个时段都有表达, 但以侵染后 12 和 48 h 时的表达量相对较高。**【结论】**获得了几丁质酶基因全长序列, 推测其参与了寄主川杨抵抗真菌的防御机制。

【关键词】 杨树; 几丁质酶基因; RACE 技术; 实时荧光定量 PCR

【中图分类号】 S792.11; S763.1

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2014)07-0083-06

Cloning and expression of *PsChi* I gene from poplar

WANG Qiong, CAO Zhi-min

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

Abstract: **【Objective】** This research aimed to clone the full length cDNA of chitinase gene from *Populus szechuanica* and analyze its expression characteristics during pathogenesis process. **【Method】** The cDNA of chitinase gene (GenBank accession: KC416180) from *P. szechuanica* leaves infected by *Melampsora larici-populina* Sb052 was cloned using RACE technology, and analyzed by bioinformatics method and real-time quantitative PCR. **【Result】** Full length of *PsChi* I gene (GenBank accession number: KC416180) with 1 145 bp in length was obtained. It contained a 38 bp 5'-untranslated region (5'-UTR), a 147 bp 3'-UTR, and a 960 bp open reading frame (ORF). The predicted protein encoded 319 amino acid residues and contained two sequences belonging to the 19th family signature sequences of chitinases. Its theoretical isoelectric point was 5.03. The gene obtained from *P. szechuanica* belonged to Class I b acidic chitinase, a member of the 19th chitinase family. Sequence alignment and phylogenetic tree revealed that the deduced amino acid sequence of *PsChi* I had the highest similarity and closest phylogenetic relationship with *P. trichocarpa*. QRT-PCR analysis showed that *PsChi* I gene expressed in all pathogenesis processes and the highest relative expression levels occurred at 12 hpi and 48 hpi. **【Conclusion】** A full length of chitinase gene was obtained, and its role in poplar against fungal infection was analyzed.

Key words: poplar; chitinase gene; RACE technology; real-time PCR

〔收稿日期〕 2013-05-10

〔基金项目〕 国家自然科学基金项目(30872027)

〔作者简介〕 王 琼(1989—), 女, 河南西平人, 在读硕士, 主要从事森林病理学研究。E-mail: wq1989@hotmail.com

〔通信作者〕 曹支敏(1954—), 男, 陕西富平人, 教授, 博士生导师, 主要从事森林病理与菌物学研究。E-mail: zmcao@nwsuaf.edu.cn

植物受到病原物侵染后,会迅速表达多种病程相关蛋白(Pathogenesis-related protein, PR protein),以参与其抗病防卫反应。在这些病程相关蛋白中,几丁质酶(Chitinase)是最主要的蛋白之一^[1],许多微生物、植物和动物都可产生几丁质酶。植物体几丁质酶的底物 N-乙酰葡萄糖胺以糖酯键形式存在,为非线性同聚物,可见植物体内缺少几丁质酶的有效底物^[2]。几丁质酶可以降解病原真菌细胞壁中的几丁质,破坏细胞新物质的沉积致使病原菌死亡,因此,其作为一种抗菌物质,可减少病原菌侵染造成的植物生长损失,是寄主植物防御系统的一部分^[3]。许多植物通过诱导都能产生几丁质酶,几乎在植物所有的器官中均可发现几丁质酶^[4]。在正常情况下,植物中几丁质酶水平很低,但经诱导因子的诱导,其表达量可迅速增加。病原真菌、细菌、病毒的侵染、激发子(多糖、真菌的细胞壁)和一些逆境等均可能诱导植物几丁质酶的表达^[5]。病原真菌侵染可诱导植物几丁质酶在抗病性不同的品种或基因系中差别表达,抗病性强的品种几丁质酶的活性显著高于抗病性弱或感病的品种^[6-8]。近年来,有关对植物几丁质酶的特性、基因结构、分类、分子进化、生物学作用及转几丁质酶基因的研究越来越深入,已成为植物抗真菌病害的研究热点之一^[9-10]。本研究以受落叶松-杨栅锈菌单孢子堆菌系 Sb052 侵染的川杨叶片为材料,采用 RACE 技术克隆川杨几丁质酶基因 DNA 全长,并对其进行了实时荧光定量表达分析,以期进一步明确几丁质酶基因的抗病机制。

1 材料与方法

1.1 材料

寄主植物:1~2 年生川杨(*Populus szechuanica*)盆栽苗。

供试菌种:中国落叶松-杨栅锈菌(*Melampsora larici-populina* Kleb.) 生理小种四川宝兴单孢子堆菌系 Sb052,由西北农林科技大学林学院森林病理学实验室提供。

供试杨树苗的栽植及锈菌菌种的繁殖、采集和保存等参照曹支敏等^[11]的方法进行。于 3 月初,将盆栽杨树苗放置于 18~25 °C 温室内培养。4 月中旬,选取菌系 Sb052 夏孢子,保湿活化 6 h 后,用洁净自来水配成悬浮液(质量浓度为 0.01 g/mL),均匀涂抹于杨树叶片背面,接种后于保湿桶中保湿 36 h,然后取出放置于温室内培养。采集接菌后 0,12,24,48,72,96 和 168 h 的叶片各 1~2 g,用无菌锡纸

包好,迅速投入液氮中速冻后于-80 °C 贮存,备用。

1.2 受侵染川杨叶片总 RNA 的提取和第 1 链 cDNA 的合成

取液氮中保存的叶片约 100 mg,按照 RNAiso Plus (TaKaRa 公司)说明书提取总 RNA。参照 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa)逆转录酶的说明书,以提取的总 RNA 为模板反转录合成 cDNA 的第 1 链,将制备好的 cDNA 于-20 °C 保存。

1.3 几丁质酶基因中间部分片段的克隆

根据 GenBank 收录的毛果杨(*Populus trichocarpa*) win8 基因全长序列(GenBank 登录号: M25337.1),利用 Primer 5.0 软件设计特异性引物 WqF 和 WqR (序列见表 1),引物由上海生工生物工程公司合成。以反转录合成的 cDNA 第 1 链为模板,扩增获得几丁质酶基因中间片段。PCR 扩增体系为 25 μ L: Mix 12.5 μ L, cDNA 1 μ L, 上、下游引物各 1 μ L, ddH₂O 9.5 μ L。反应程序:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s, 54 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 38 个循环;72 °C 保持 10 min。用 15 g/L 的琼脂糖凝胶电泳(100 V 电泳 50 min)检测 PCR 扩增产物。参照 MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit (TaKaRa 公司)说明书,将 PCR 扩增产物回收纯化后连接至 pMD18-T Vector (TaKaRa 公司),并转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。转化子经蓝白斑筛选后将阳性克隆送上海生工生物工程公司测序部测序,并在 NCBI 数据库中比对分析测序结果。

1.4 几丁质酶基因的 3'RACE 和 5'RACE

根据获得的几丁质酶基因中间片段序列,设计 3'RACE 和 5'RACE 基因特异性引物(表 1)。按照 Clontech 公司的 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒的说明,分别将提取的总 RNA 反转录合成 3'和 5'cDNA 第 1 链,进行 3'RACE 和 5'RACE。分别以 3'和 5'端的 Outer Primer 与试剂盒提供的 UPM (通用引物混合物)为引物进行巢式第 1 轮 PCR 扩增,获得的产物稀释 50 倍后,再次分别以 Inner Primer 与试剂盒提供的 UPM 为引物进行巢式第 2 轮 PCR。PCR 扩增的退火温度为 60 °C,其他条件及反应体系同中间片段(1.3 节)的扩增。3'RACE 和 5'RACE 扩增产物经回收、连接转化后测序(方法同 1.3 节),得到川杨几丁质酶基因片段 3'端和 5'端序列。

1.5 几丁质酶基因 cDNA 全长序列的获得及生物信息学分析

通过 SeqMan 软件将 5′端、3′端序列以及中间 cDNA 片段序列拼接,获得川杨几丁质酶基因全长 cDNA 序列信息,以此为基础设计全长序列上、下游引物 F 和 R(表 1),以反转录合成的 5′第 1 链 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增(条件和体系同 1.3 节),以验证检测几丁质酶基因 cDNA 的全长。

几丁质酶基因及编码氨基酸序列的组成分析、开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)的查找和翻译、编码蛋白的理化性质分析分别采用 DNASTAR 软件及 ORF Finder、Prot-Param、pI/Mw 等在线工具完成;信号肽预测采用 SignalP 4.1 Server 软件完成;亲水性/疏水性分析利用在线工具 ProtScale 完成;编码蛋白的亚细胞定位通过软件 Psort 预测;蛋白质保守区域预测利用 SOPMA 在线工具和 Scan-Prosites 软件以及 NCBI 的 CDD 数据库完成;核酸

和氨基酸序列的同源性比对及多序列比对,借助于 Blast 在线工具和 MEGA 5.0 软件完成。

1.6 几丁质酶基因的实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)分析

分别提取-80℃保存的 7 个时间段的杨树叶片的总 RNA,反转录得到 cDNAs,作为实时荧光定量 PCR 的模板。参照 TaKaRa 公司的 SYBR Premix Ex Taq™ II 试剂盒说明书,以杨树泛素蛋白基因(*Ubiquitin*)作为内参基因,对杨树几丁质酶基因进行 qRT-PCR,反应体系为 12.5 μL:6.25 μL 的 *Taq* II,1 μL 的 cDNA,目的基因和内参基因上、下游引物(表 1)各 0.5 μL,补充 ddH₂O 到 12.5 μL。反应程序为:95℃预变性 30 s;95℃变性 5 s,60℃退火 30 s,共 40 个循环;65℃延伸 30 s 做熔解曲线。每个样品设 3 个重复,并用 2^{-ΔΔC_t} 方法^[12] 分析结果。

表 1 试验所用的引物序列
Table 1 Sequences of primers used in this study

引物名称 Name of the primers	引物名称及序列(5′→3′) Sequence of primers(5′→3′)
中间片段引物 Primers for partial fragment	WqF: TGTAAGCCAATGCCGTAA WqR: CCAAAGCCTGGTTTCCTG
3′RACE 引物 Primers for 3′RACE	3′Outer Primer: TGTAAGCCAATGCCGTAAGTGC 3′Inner Primer: AACGAGGCGAACCCTAAATC
5′RACE 引物 Primers for 5′RACE	5′Outer Primer: ATCCAGAACCAGAGTGCTGCCTTG 5′Inner Primer: CCTTCCAGGACAGCGGTCATCGT
全长验证引物 Primers for full length	F: AGCAGTGGTATCAACGCAGAG R: RYTAACAAACACAAGCCAAATG
内参基因 <i>Ubiquitin</i> 引物 Primers of <i>Ubiquitin</i>	UbiF: GCAGGGAAACAGTGAGGAAGG UbiR: TGGACTCACGAGGACAG
荧光定量 <i>PsChi I</i> 引物 Primers for qRT-PCR	ChiF: CGGCAGGAAACCAGGCTATG ChiR: CAGGGTCAACCTCTAACAACTCG

2 结果与分析

2.1 *PsChi I* 基因全长的克隆及序列分析

以川杨叶片 RNA 反转录得到的第 1 链 cDNA 为模板,根据同属于青杨派的毛果杨 *win8* 基因序列设计引物 WqF 和 WqR,扩增获得了 594 bp 的 cDNA 中间片段序列,经 Blast 分析,该片段与多数几丁质酶基因一致。以此中间片段序列为基础,设计 3′和 5′末端基因特异性引物进行 RACE 扩增,扩增产物经克隆和测序后,分别得到 663 和 300 bp 的 3′和 5′端扩增产物。根据测序结果,用 SeqMan 软件将 3′端序列和 5′端序列以及中间 cDNA 片段序列进行拼接,除掉重叠序列后得到 1 条长度为 1 145 bp 的 cDNA 序列。此后,设计全长序列引物,通过 PCR 扩增获得 1 条约 1 200 bp 的片段,经克隆测序发现该片段序列与推导的序列一致,将其命名为

PsChi I。利用 ORF Finder 软件对 *PsChi I* 进行预测,结果(图 1)显示,该序列具有起始密码子 ATG 和终止密码子 TAG,包含 960 bp 的开放阅读框(ORF);3′-UTR 长 147 bp,含有添加 PolyA 尾的信号“AATAAA”序列和 1 段 27 bp 的 PolyA;5′-UTR 长 38 bp,共编码 319 个氨基酸,因此 *PsChi I* 应该是 1 条完整的 cDNA 全长序列。将该序列在 GenBank 中注册,获得的登录号为 KC416180。

2.2 *PsChi I* 基因的生物信息学分析

通过在线软件分析,*PsChi I* 编码蛋白的分子式为 C₁₅₇₂ H₂₃₆₀ N₄₂₀ O₄₈₇ S₂₅,分子质量约为 35.7 ku,理论等电点 pI 为 5.03,是酸性蛋白。SignalP 4.1 Server 软件预测结果表明,在该蛋白 N-末端有 1 段 21 个氨基酸的信号肽结构,其中第 21 和 22 个氨基酸之间为信号肽切割位点。对该蛋白进行跨膜预测和亚细胞定位分析,结果表明其不含跨膜结构,是胞

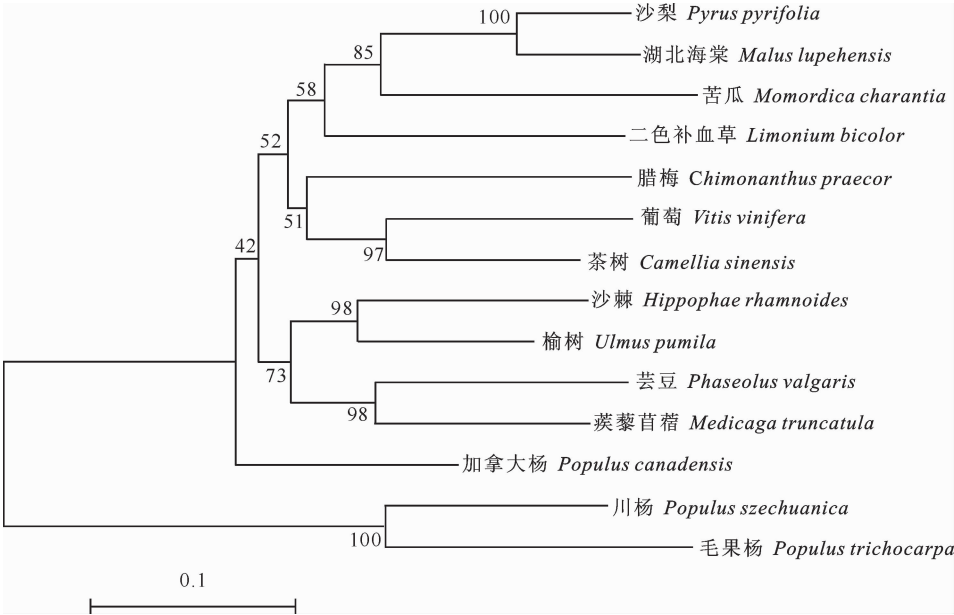


图 2 川杨与其他植物几丁质酶的系统进化关系

Fig. 2 Phylogenetic relationships between chitinase *PsChi I* of poplar and other plants

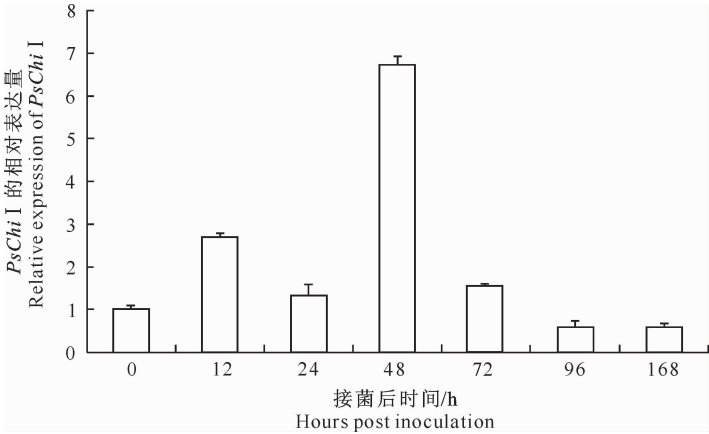


图 3 接种锈菌 Sb052 后川杨叶片中 *PsChi I* 相对表达量随时间的变化

Fig. 3 Changes in the relative expression of poplar chitinase *PsChi I* after inoculation of Sb052

3 讨 论

按蛋白质结构特征,几丁质酶可划分为 6 类^[13],即 Class I ~ Class VI,其中根据 C-末端延伸区的有无,Class I 又包括 Class I a 和 Class I b。对本研究中得到的 *PsChi I* 基因序列进行核苷酸及编码氨基酸分析,发现该几丁质酶 N-端有一段 21 个氨基酸的信号肽序列,一个富含半胱氨酸和亲水性氨基酸的几丁质结合区域,可以结合底物及多糖^[14]。此外,几丁质酶结合区后面有一段完整保守的催化区,无可变交联区,无 C-端延伸区。通过软件预测得到 *PsChi I* 基因编码氨基酸序列的 pI 为 5.03,亚细胞定位显示其应该位于胞外。通过上述特征可推测 *PsChi I* 应为 Class I b 类酸性几丁质

酶。Kasprzewska^[15]根据氨基酸序列的同源性将几丁质酶 Class I 归于糖苷水解酶第 19 家族。保守结构分析显示,*PsChi I* 序列包含了几丁质酶基因第 19 家族的 2 个标签序列,同时还有糖苷水解酶区以及溶菌酶相似超家族区域,因此推测川杨几丁质酶属于第 19 家族,同时其可能具有几丁质酶活性和溶菌酶活性。通过 ScanProsite 软件分析时,发现该氨基酸序列有一段氨甲酰磷酸合成酶 II 特征序列,这在其他植物序列中极少发现。氨甲酰磷酸合成酶 II 与嘧啶代谢有关,其存在是否有助于 *PsChi I* 基因的防御功能,还需进一步深入研究。

序列比对和系统进化分析结果表明,几丁质酶基因的进化有明显的种属特征,川杨 *PsChi I* 与同为青杨派的毛果杨亲缘关系最近,其相似性达到

78%,与黑杨派的加拿大杨(*Populus canadensis*)及其他科属的亲缘关系较远。一般情况下,糖苷水解酶 19 家族的几丁质酶结构包括信号肽、几丁质酶基因结构特征结合区、催化区以及二者之间的可变交联区^[16],同时含有 2 个特征保守区域。本研究通过比对后发现,只有 PsChi I 和 win8 无交联区,并且进化中二者单独聚为一支,PsChi I 和 win8 在抗病反应中的防御机制与其他几丁质酶基因是否相似,还需进一步研究。

为进一步明确锈菌 Sb052 是否能够诱导川杨表达几丁质酶,本研究采用实时荧光定量 PCR 方法分析了接菌后不同时间段川杨叶片 *PsChi I* 基因的表达变化,结果表明,杨树叶片几丁质酶基因在 Sb052 侵染后 12 和 48 h 有较高水平的表达,48 h 之后迅速下降并保持低于侵染 0 h 时的表达水平。国内外已有研究表明,受锈菌侵染后,在非亲和组合中的寄主川杨体内,侵染后 48 h 诱导产生的几丁质酶活性达到最高峰,较大幅度地抑制了锈菌的生长^[17-18],这与本研究结果相吻合。Jiang 等^[7]同样发现,受 *Marssonina brunnea* 侵染后,加拿大杨叶片几丁质酶基因表达量迅速上升。Collinge 等^[2]和 Kasprzewska^[15]研究表明,几丁质酶参与了病原菌感染诱导信号的产生与传达。病原菌侵染可诱导植物体合成并分泌大量的胞外几丁质酶,这些胞外几丁质酶通过水解病原菌菌丝细胞壁的几丁质产生信号因子,引发植物体的主动防御机制,产生抗病性物质。当菌丝穿透植物细胞后,液泡几丁质酶发挥作用,降解真菌新合成的几丁质,抑制其生长。这一机理与细胞壁和液泡酶类结合底物的特异性有关。胞外几丁质酶可以较好地水解水溶性几丁质,液泡几丁质酶可高效水解结晶几丁质。根据实时荧光定量 PCR 结果,*PsChi I* 基因最高相对表达量出现在接菌后 48 h,此时正是锈菌附着胞的形成和侵入期,可进一步确认其应为胞外蛋白,主要作用是传输病原菌感染信号,调控川杨的防御机制。而在川杨叶片细胞内极有可能存在液泡几丁质酶,在接菌后 48 h 活性增强,以抑制 Sb052 菌系的生长,但本次试验尚未得到液泡几丁质酶基因,应进一步研究。

4 结 论

本研究采用 RACE 技术成功克隆到 1 条川杨几丁质酶基因 *PsChi I* 的全长序列,分析了该基因编码蛋白的序列特征和保守区域。通过实时荧光定量表达分析,推测 *PsChi I* 基因参与了寄主川杨抵

抗真菌的防御机制。

[参考文献]

- [1] 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 Sciences, 2009, 28(5): 309-334.
- [2] Collinge D B, Kragh K M, Mikkelsen J D, et al. Plant chitinases [J]. The Plant Journal, 1993, 3(1): 31-40.
- [3] Jia Z, Sun Y, Yuan L, et al. The chitinase gene (*Bbchit1*) from *Beauveria bassiana* enhances resistance to *Cytospora chrysosperma* in *Populus tomentosa* carr [J]. Biotechnology Letters, 2010, 32(9): 1325-1332.
- [4] Hamid R, Khan M A, Ahmad M, et al. Chitinases: An update [EB/OL]. (2013-01-28) [2013-05-01]. <http://www.jpbonline.org/text.asp?2013/5/1/21/106559>.
- [5] Davis J M, Wu H G, Cook J E, et al. Pathogen challenge, allicylic acid, and jasmonic acid regulate expression of chitinase gene homologs in pine [J]. Mol Plant Microbe Interact, 2002, 15: 380-387.
- [6] 刘德兵, 范崇辉, 魏军亚, 等. 栗疫病菌对板栗几丁质酶活性的诱导 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2002, 30(3): 63-65.
Liu D B, Fan C H, Wei J Y, et al. The induction and purification of *Cryphonectria parasitica* to chitinase of chestnut [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2002, 30(3): 63-65. (in Chinese)
- [7] Jiang C, Song J, Huang R, et al. Cloning and expression analysis of chitinase genes from *Populus Canadensis* [J]. Fiziologiya Rastenii, 2013, 60(3): 408-415.
- [8] Hacquard S, Veneault-Fourrey C, Delaruelle C, et al. Validation of *Melampsora larici-populina* reference genes for in planta RT-quantitative PCR expression profiling during time-course infection of poplar leaves [J]. Physiological and Molecular, Plant Pathology, 2011, 75(3): 106-112.
- [9] Mathivanan N, Kabilan V, Murugesan K. Purification, characterization and antifungal activity of chitinase from *Fusarium chlamydosporum*, a mycoparasite to groundnut rust, *Puccinia arachidis* [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1998, 44(7): 646-651.
- [10] Sharma N, Sharma K P, Gaur R K, et al. Role of chitinases in plant defense [J]. Asian Journal of Biochemistry, 2011, 6(1): 29-37.
- [11] 曹支敏, 余仲东, 潘彦平, 等. 中国落叶松-杨栅锈菌 (*Melampsora larici-populina* Kleb.) 生理小种分化 [J]. 植物病理学报, 2005, 35(2): 184-186.
Cao Z M, Yu Z D, Pan Y P, et al. Differentiation of physiological races in *Melampsora larici-populina* Kleb in China [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2005, 35(2): 184-186. (in Chinese)

Moench, *Persica davidiana* Carr, *Syringa oblata* Lindl leaves purification potential of heavy metal pollutants in the atmosphere of Cu, Cr, Pb, Zn [J]. Environmental Protection Science, 1991(3): 71-75, 57. (in Chinese)

[19] 庄树宏, 王克明. 城市大气重金属(Pb、Cd、Cu、Zn)污染及其在植物中的富积 [J]. 烟台大学学报: 自然科学与工程版, 2000, 13(1): 31-37.

Zhuang S H, Wang K M. Study on the relationship between atmospheric heavy metal pollution (Pb, Cd, Cu, Zn) and its accumulations in leaves of urban trees [J]. Journal of Yantai University: Natural Science and Engineering Edition, 2000, 13(1): 31-37. (in Chinese)

[20] 许宗仁. 水质评价标准 [M]. 北京: 中国建筑工业出版社, 1981: 31-109.

Xu Z R. Evaluation of water quality standards [M]. Beijing: China Architecture & Buildin Press, 1981: 31-109. (in Chinese)

[21] 黄益宗, 朱永官. 森林生态系统镉污染研究进展 [J]. 生态学报, 2004, 24(1): 101-107.

Huang Y Z, Zhu Y G. A review on cadmium contamination in forest ecosystem [J]. Acta Ecologica Sinica, 2004, 24(1): 101-107. (in Chinese)

[22] 梁翠萍, 张胜利. 秦岭锐齿栎林和油松林林冠层对大气降水雨质的影响 [J]. 东北林业大学学报, 2011, 39(2): 54-56.

Liang C P, Zhang S L. Effects of forest canopies of *Quercus aliena* var. *acuteserrata* and *Pinus tabulaeformis* stands on rain water quality in Qinling Mountain range [J]. Journal of Northeast Forestry University, 2011, 39(2): 54-56. (in Chinese)

(上接第 88 页)

[12] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta C (T)) method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.

[13] Meins F J, Fritig B, Linthorst H J M, et al. Plant chitinase genes [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1994, 12(2): S22-S28.

[14] Beintema J J. Structural features of plant chitinases and chitin-binding proteins [J]. FEBS Letters, 1994, 350(2): 159-163.

[15] Kasprzewska A. Plant chitinases-regulation and function [J]. Cellular and Molecular Biology Letters, 2003, 8(3): 809-824.

[16] 欧阳石文, 赵开军, 冯兰香. 植物几丁质酶的结构与功能、分类及进化 [J]. 植物学通报, 2001, 18(4): 418-426.

Ouyang S W, Zhao K J, Feng L X. The structure and function, classification and evolution of plant chitinases [J]. Chinese Bulletin of Botany, 2001, 18(4): 418-426. (in Chinese)

[17] Rinaldi C, Kohler A, Seo M S, et al. Transcript profiling of poplar leaves upon infection with compatible and incompatible strains of the foliar rust *Melampsora larici-populina* [J]. Plant Physiology, 2007, 144(1): 347-366.

[18] 陈祖静, 曹支敏, 苟兴庆, 等. 杨树与杨棚锈菌互作中寄主活性氧及抗性相关酶变化 [J]. 林业科学, 2010, 46(8): 101-106.

Chen Z J, Cao Z M, Gou X Q, et al. Dynamic changes of active oxygen and related enzymes of the host in interaction between the poplar and *Melampora larici-populina* [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2010, 46(8): 101-106. (in Chinese)