

doi:10.11937/bfyy.20170510

梨 *PbChi* II 基因的克隆及荧光定量表达分析

李朋朋, 叶 嘉, 付 伟, 乔莉娟, 李丹花

(邯郸学院 生命科学与工程学院, 河北 邯郸 056005)

摘 要:以鸭梨为试材,采用 qRT-PCR 技术克隆鸭梨果实几丁质酶基因 *PbChi* II,并对几丁质酶氨基酸序列进行聚类分析;同时采用荧光定量 PCR 的方法对鸭梨植株不同器官及水杨酸(salicylic acid, SA)和梨轮纹病菌(*Botryosphaeria berengeriana* de. Not. f. sp. *piricola* (Nose) Koganecawa et. Sokwwa)处理后几丁质酶基因的表达量进行了分析,以期为该基因的进一步研究与利用提供参考依据。结果表明:*PbChi* II 基因长度为 969 bp,核苷酸序列及推导的氨基酸序列与沙梨的同源性均达到 100%,该基因属于第 II 类几丁质酶基因;*PbChi* II 在根和果实中表达量较大。在鸭梨果实中,SA 和病原菌可诱导该基因表达,且表达量在 48 h 达到最高,初步推测 *PbChi* II 可能参与 SA 介导的植物抗病防卫反应的信号通路及轮纹病菌引起的防卫反应。

关键词:鸭梨;几丁质酶基因;基因克隆;荧光定量表达分析

中图分类号:S 661.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)17-0052-09

植物在生长发育过程中,会遇到各种不利因素影响,包括病原真菌、细菌、病毒等生物胁迫和盐害、冷害、涝害等非生物逆境^[1]。植物通过诱导防御反应合成活性氧、病程相关蛋白质等来抵抗这些逆境胁迫。几丁质酶是植物遭受病原真菌、细菌、病毒以及水杨酸、乙烯、茉莉酸和一些逆境后诱导并积累产生,可以降解病原物真菌细胞壁组分,表现出重要抗病作用的一类病程相关蛋白质^[2-4]。

迄今为止,已在烟草、拟南芥、水稻、黄冠梨等多种植物上克隆到了几丁质酶基因,并对其功能进行了初步研究^[5-7]。刘栋峰^[7]对黄冠梨几丁质酶基因家族不同成员之间在基因序列和肽链结构上存在的差异及不同基因之间的系统进化关系做了详细分析。BROGLIE 等^[8]通过构建 cDNA 文

库和原位差异杂交获得了菜豆几丁质酶基因。植物在非诱导状况下,细胞内几丁质酶基因的表达量很低,有的甚至低于可检测水平。如果被诱导,则基因的表达量会成倍升高。几丁质酶可以分为六大类,分别为 I、II、III、IV、V、VI 型,不同的几丁质酶基因在核酸和氨基酸序列及功能方面都存在显著差异,主要表现在肽链结构和基因结构等方面,几丁质酶的结构通常包括 N-端信号区、C-端延伸区和延伸区,部分几丁质酶还包括几丁质结合域^[9]。

该研究以鸭梨为试材,分离其第 II 类几丁质酶基因 *PbChi* II 的全编码区序列,利用 MEGA 6.0 软件将 *PbChi* II 编码的氨基酸序列与其它植物几丁质酶基因氨基酸序列进行聚类分析,同时采用荧光定量 PCR 方法对鸭梨植株不同器官及水杨酸和病原菌处理后 *PbChi* II 的表达量进行分析研究,以期为该基因的进一步研究和利用提供基础资料,为今后选育抗逆梨新种质提供参考依据。

第一作者简介:李朋朋(1987-),女,博士,讲师,研究方向为分子植物病理学。E-mail:lipengpeng0810@126.com.

基金项目:邯郸学院自然科学研究课题重点资助项目(16101);邯郸市科技局资助项目(1627201054-2)。

收稿日期:2017-03-31

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试鸭梨果实于 2014 年采自河北省肃宁县鸭梨果园。

1.2 试验方法

1.2.1 鸭梨果实处理

试验共设 3 个处理。A: 水杨酸处理。用 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 水杨酸(SA)喷洒于落花后 7、14、21 d 的鸭梨幼果果实及收获前成熟期果实表面, 每个处理 3 个果实, 重复 3 次, 分别在喷施后 0、3、6、12、24、48、72、96 h 取样, 并迅速置于液氮中冷冻, -80°C 保存备用。不经任何处理的对照果实取样时间及保存方法同上。B: 梨轮纹病菌处理。将梨轮纹病菌接种于 PDA 培养基, 培养 1 周后, 用黑光灯照射培养, 诱导轮纹病菌孢子产生。取轮纹病菌分生孢子, 制成约 1×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 孢子悬浮液, 喷洒于落花后 7、14、21 d 的鸭梨幼果及成熟期果实表面, 分别于喷施后 0、3、6、12、24、48、72、96 h 取样, 并迅速置于液氮中冷冻, -80°C 保存备用。不经任何处理的对照果实取样时间及保存方法同上。C: 水杨酸+梨轮纹病菌处理。 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SA 喷洒于落花后 7、14、21 d 的鸭梨幼果果实及收获前成熟期果实表面后 24 h 再喷施轮纹病菌孢子悬浮液, 并于喷施后 0、24、48、72、96 h 取样, 并迅速置于液氮中冷冻, -80°C 保存备用。不经任何处理的对照果实取样时间及保存方法同上。

1.2.2 *PbChi* II 的 cDNA 克隆

采用改良的 CTAB 法^[10]提取未处理鸭梨果实的总 RNA, 总 RNA 中 DNA 的消化根据说明书(TaKaRa 公司)的方法进行。取 $2 \mu\text{L}$ 消化后的总 RNA, 参考反转录说明书(TaKaRa)进行 cDNA 第 1 链的合成, 用于 *PbChi* II 的 cDNA 克隆。根据 GenBank 登录的 II 型黄冠梨几丁质酶基因序列设计特异引物。上游引物 F1: $5'-\text{ATG}-\text{GAGAAAAAATGGCTTCTG}-3'$, 下游引物 R1: $5'-\text{TCAAGAAGACGAAGACGAAGAA}-3'$ 。25 μL 的反应体系包括 Mix(TaKaRa 公司) 12.5 μL 、cDNA 2 μL ($30 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)、上下游引物各 1 μL ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、ddH₂O 8.5 μL 。PCR 反应程

序为 95°C 预变性 10 min; 94°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min。将 PCR 产物于 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 并将目的片段进行回收、克隆、测序。

1.2.3 序列分析

将测序得到的核苷酸序列和推导的氨基酸序列分别在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 上用 BLASTP 进行序列相似性分析, 利用 BiotEdit 软件对其氨基酸序列进行比对; 利用 MEGA 6.0 软件构建系统发育树。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 分析(qRT-PCR)

采用改良的 CTAB 法^[10]提取 1.2.1 中处理后鸭梨果实的总 RNA, 总 RNA 中 DNA 的消化根据说明书(TaKaRa 公司)的方法进行。取 $2 \mu\text{L}$ 消化后的总 RNA, 参考反转录说明书(TaKaRa)进行 cDNA 第 1 链的合成。将得到的 cDNA 于 -20°C 保存, 用于荧光定量 PCR 分析。采用实时荧光定量分析仪(Mastercycler ep realplex 4; Eppendorf AG, Hamburg, Germany)进行 qRT-PCR 分析。以鸭梨 *β actin* 为内参基因, 特异引物分别为上游引物 $5'-\text{TTGGGATGGGT}-\text{CAGAAGG}-3'$, 下游引物 $5'-\text{CTGTGAG}-\text{CAGAACTGGGTG}-3'$ 。根据克隆得到的 *PbChi* II 序列设计引物, 上游引物: $5'-\text{ACTACAAC}-\text{TATGGAGAAACGGGTG}-3'$ 和下游引物: $5'-\text{CAAAGACATCGTGGGCTGAAG}-3'$ 。反应体系为 cDNA 1 μL ($30 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)、上下游引物各 1 μL ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、SYBR Master Mix(TaKaRa) 12.5 μL , ddH₂O 补至 25 μL 。反应程序为 95°C 预变性 1 min; 95°C 变性 15 s, 57°C 退火 15 s, 72°C 延伸 45 s, 40 个循环。每处理重复 3 次, 数据采用相对定量方法进行分析, 即 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[11]。

1.3 数据分析

采用 SPSS 软件对试验数据进行方差分析, 采用邓肯氏新复极差测验法进行平均数的比较, 采用 Excel 软件进行制图。

2 结果与分析

2.1 鸭梨 *PbChi* II 基因的克隆及序列分析

由图 1 可知, 从鸭梨果实的 cDNA 模板上扩增出单一条带, 大小约 900 bp。经进一步克隆测

将 PbChi II 蛋白与 NCBI 检索的其它物种中 Chi II 蛋白进行多序列比对后构建系统发育树,由图 3 可知,鸭梨 PbChi II 蛋白与沙梨蛋白 (ACM45714.1) 的亲缘关系最近,其次是白梨

(XP_009348883.1, XP_009369953.1)、苹果 (XP_008361932.1, XP_008340624.1)。与陆地棉 (AAQ56599.1)、海岛棉 (ABL86686.1) 和亚洲棉 (KHG06992.1) 的亲缘关系较远。

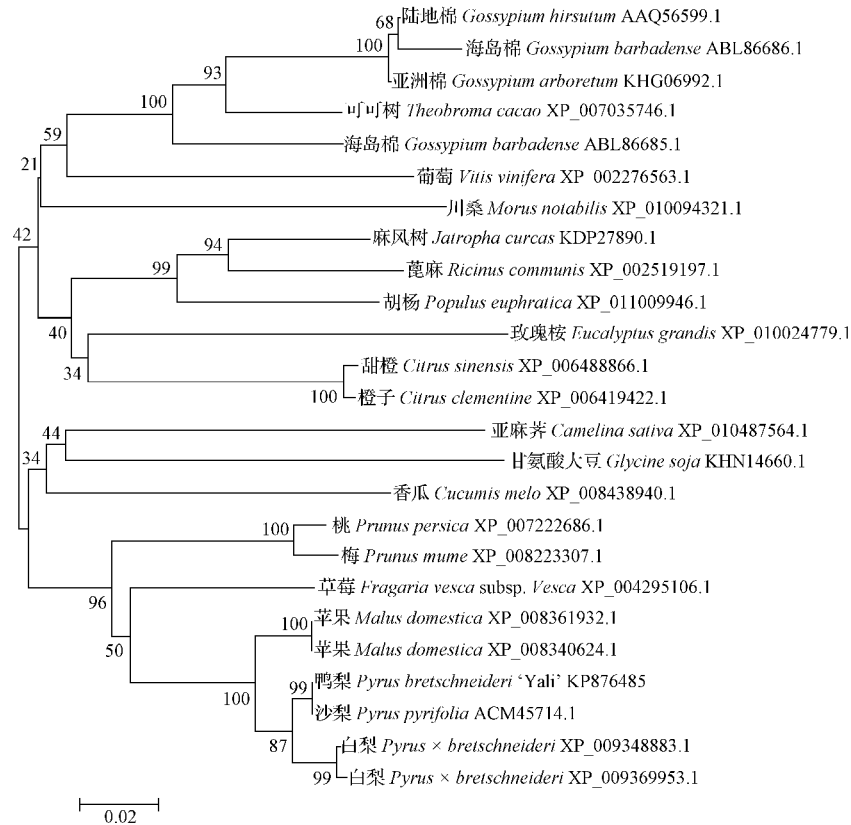


图 3 PbChi II 氨基酸序列聚类分析

Fig. 3 Phylogenetic relationship based on amino acid sequence of PbChi II

2.3 PbChi II 荧光定量表达分析

2.3.1 PbChi II 基因在鸭梨各器官中的表达特性

通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析 PbChi II 基因在鸭梨各组织中 (根、茎、叶、果实) 的表达特性,发现 PbChi II 基因在根中的表达量最高,分别是茎和叶的 2.72 倍和 1.86 倍,其次是在果实中的表达量,分别是茎和叶的 2.58 倍和 1.77 倍,在茎中的表达量最低。结果表明, PbChi II 基因在鸭梨各组织中存在基础性表达,但是表达量存在差异 (图 4)。

2.3.2 SA、病原菌诱导 7 d 鸭梨果实中 PbChi II 的表达

对开花后 7 d 的鸭梨果实进行 SA、病原菌、

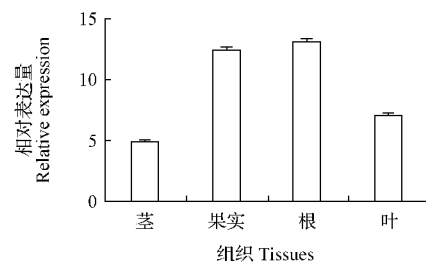


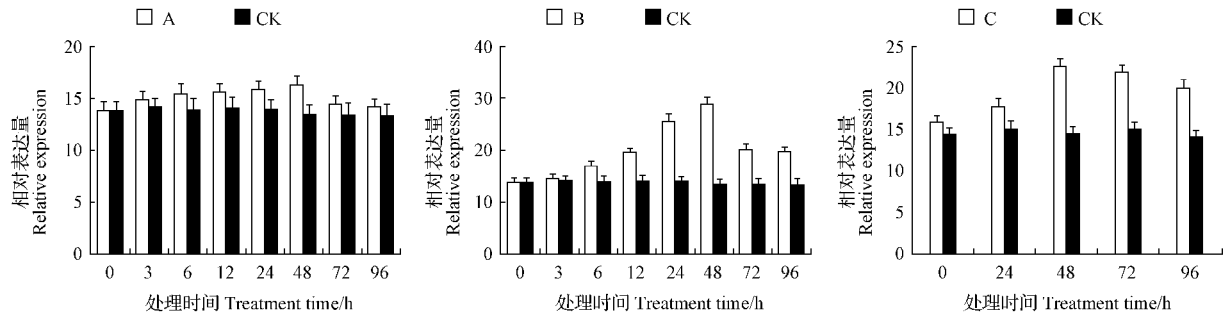
图 4 鸭梨 PbChi II 基因在各组织中的表达分析

Fig. 4 Expression analysis of PbChi II in different 'Yali' tissues

SA 和病原菌处理,分析 PbChi II 的表达特性。由图 5 可知,SA 处理后 96 h 内, PbChi II 的表达量均高于处理前,从处理后 3 h 开始, PbChi II 基因的表达量开始升高;轮纹病菌处理后 96 h 内, PbChi II 的表达量均高于处理前的,从处理后 3 h 开

始,*PbChi* II 基因的表达量开始升高,在处理后的 48 h,*PbChi* II 基因的表达量达到最大值。通过对 SA 处理后 24 h 再喷施梨轮纹病菌孢子悬浮液 *PbChi* II 的表达量分析,发现在喷施孢子悬浮

液后 24、48、72、96 h,*PbChi* II 的表达量均高于喷施孢子悬浮液 0 h(SA 处理 24 h)对照,在处理后的 48 h,*PbChi* II 的表达量达到最高。



注:A. SA 处理;B. 病原菌处理;C. SA 和病原菌处理。下同。

Note: A. SA treatment; B. Pathogen treatment; C. SA and pathogen treatment. The same below.

图 5 SA 和轮纹病菌处理 7 d 幼果后 *PbChi* II 的 qRT-PCR 分析

Fig. 5 Expression of *PbChi* II gene after treatment with SA and *B. berengeriana*. f. sp. *piricola* using qRT-PCR of 7-day-old young fruit

2.3.3 SA、病原菌诱导 14 d 鸭梨果实中 *PbChi* II 的表达

对开花后 14 d 的鸭梨果实进行 SA、梨轮纹病菌处理,分析 *PbChi* II 的表达特性。由图 6 可知,SA 处理后 96 h 内,*PbChi* II 的表达量均高于处理前的,从处理后 3 h 开始,*PbChi* II 基因的表达量开始升高;在处理后的 48 h,*PbChi* II 基因的表达量达到最大值。14 d 幼果经轮纹病菌处理后 48 h,*PbChi* II 的表达量分别是处理后 3、6、12、

24、72、96 h 的 1.72、1.31、1.05、1.04、1.23、1.57 倍。通过对 SA 处理后 24 h 再喷施梨轮纹病菌孢子悬浮液 *PbChi* II 的表达量分析,发现在喷施孢子悬浮液后 24、48、72、96 h,*PbChi* II 的表达量均高于喷施孢子悬浮液 0 h(SA 处理 24 h)对照,在处理后的 48 h,*PbChi* II 的表达量达到最高,14 d 幼果经生物胁迫处理后 48 h,*PbChi* II 的表达量分别是处理后 24、72、96 h 的 1.30、1.20、1.30 倍。

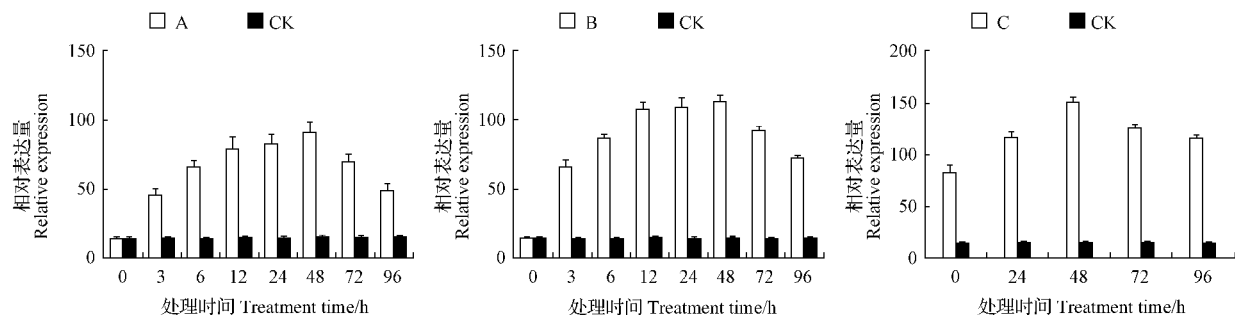


图 6 SA 和轮纹病菌处理 14 d 幼果后 *PbChi* II 的 qRT-PCR 分析

Fig. 6 Expression of *PbChi* II gene after treatment with SA and *B. berengeriana*. f. sp. *piricola* using qRT-PCR of 14-day-old young fruit

2.3.4 SA、病原菌诱导 21 d 鸭梨果实中 *PbChi* II 的表达

对开花后 21 d 的鸭梨果实进行 SA、梨轮纹

病菌处理,分析 *PbChi* II 的表达特性。由表 7 可知,21 d 幼果经 SA 处理后 48 h,*PbChi* II 的表达量分别是处理后 3、6、12、24、72、96 h 的 2.04、

1.74、1.27、1.14、1.17、1.16倍;21 d 幼果经轮纹病菌处理后 48 h, *PbChi II* 的表达量分别是处理后 3、6、12、24、72、96 h 的 2.51、1.70、1.17、1.07、1.16、1.31 倍;通过对 SA 处理后 24 h 再喷施梨轮纹病菌孢子悬浮液 *PbChi II* 的表达量分析,发

现在喷施孢子悬浮液后 24、48、72、96 h, *PbChi II* 的表达量均高于喷施孢子悬浮液 0 h(SA 处理 24 h)对照,21 d 幼果经生物胁迫处理后 48 h, *PbChi II* 的表达量分别是处理后 24、72、96 h 的 1.51、1.21、1.35 倍。

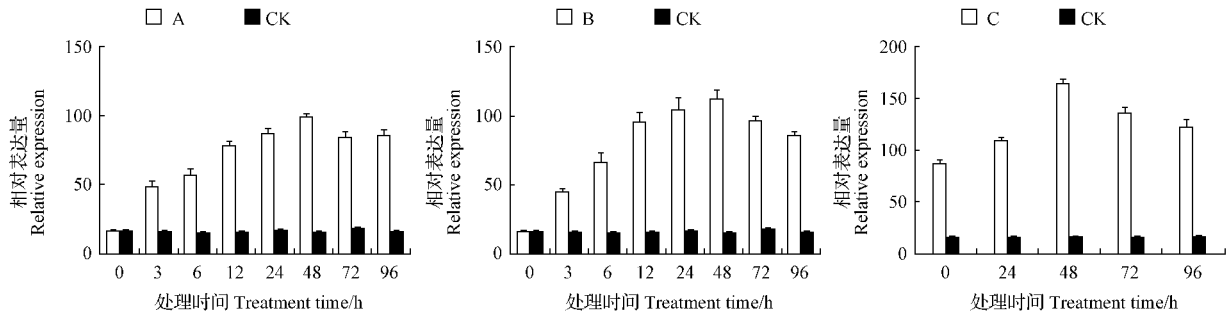


图7 SA和轮纹病菌处理21 d 幼果后 *PbChi II* 的 qRT-PCR 分析

Fig. 7 Expression of *PbChi II* gene after treatment with SA and *B. berengeriana*. f. sp. *piricola* using qRT-PCR of 21-day-old young fruit

2.3.5 SA、病原菌诱导成熟期鸭梨果实中 *PbChi II* 的表达

对成熟期鸭梨果实进行 SA、梨轮纹病菌处理,分析 *PbChi II* 的表达特性。由图 8 可知,成熟期果实经 SA 处理后 48 h, *PbChi II* 的表达量分别是处理后 3、6、12、24、72、96 h 的 1.96、1.38、1.05、1.04、1.24、1.63 倍。对照组果实 *PbChi II* 基因的表达量在供试的 96 h 无显著差异。成熟期果实经轮纹病菌处理后 48 h, *PbChi II* 的表达量分别是处理后 3、6、12、24、72、96 h 的 2.08、1.49、1.36、1.02、1.21、1.56 倍。通过对 SA 处

理后 24 h 再喷施梨轮纹病菌孢子悬浮液 *PbChi II* 的表达量分析,发现在喷施孢子悬浮液后 24、48、72、96 h, *PbChi II* 的表达量均高于喷施孢子悬浮液 0 h(SA 处理 24 h)对照,成熟期果实经生物胁迫处理后 48 h, *PbChi II* 的表达量分别是处理后 24、72、96 h 的 1.13、1.19、1.19 倍。SA 处理后再经病原菌处理, *PbChi II* 表达量升高的倍数大于只用病原菌处理,表明接菌前喷施 SA 对基因表达量的升高有一定的促进作用,可能会激发植物的防卫反应。未经任何处理的对照果实基因的表达量在供试的 96 h 无明显差异。

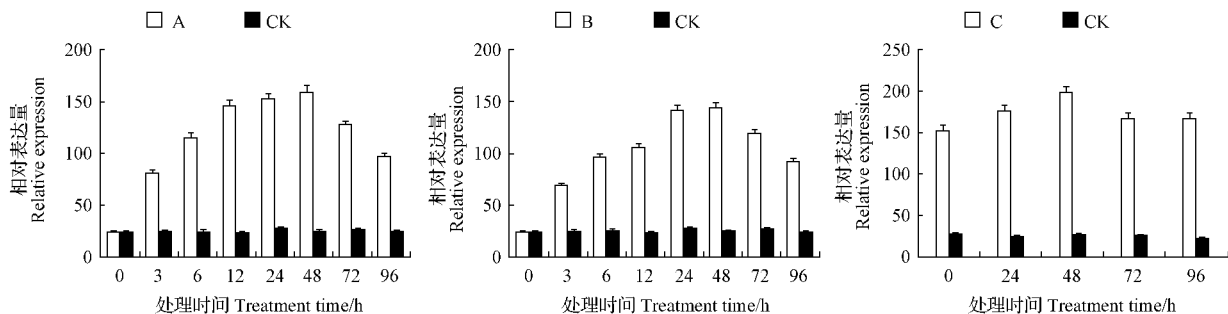


图8 SA和轮纹病菌处理成熟期果实后 *PbChi II* 的 qRT-PCR 分析

Fig. 8 Expression of *PbChi II* gene after treatment with SA and *B. berengeriana*. f. sp. *piricola* using qRT-PCR of mature fruit

3 讨论

几丁质酶基因在植物抗逆过程中发挥着重要

作用。迄今为止,已在多种植物中克隆到了几丁质酶基因,并对其进行了功能研究^[5]。为了解鸭梨 *PbChi II* 基因的功能,该研究对鸭梨 *PbChi II*

基因进行了克隆,并利用生物信息学手段对其结构和功能进行了预测。发现该基因具有 969 个核苷酸,编码 322 个氨基酸,属于第 II 类几丁质基因。系统进化树分析发现,PbChi II 氨基酸序列与沙梨 Chi II 氨基酸的进化关系最近。

荧光定量 PCR 技术是目前检测基因表达水平的重要技术,检测结果灵敏可靠,该研究利用实时荧光定量 PCR 分析 *PbChi II* 的组织特异性表达发现,该基因为组成型表达,即在鸭梨根、茎、叶和果实中均有表达,说明植物几丁质酶的活性与植物生长发育关系密切,几丁质酶在植物根部、基部老叶片和正在发育的花序中表达量较高^[12-14]。该研究中,*PbChi II* 在鸭梨的根中表达量最高,其次是果实和叶,茎中表达量最低,表明 *PbChi II* 参与了植物的生长发育过程,且其表达具有组织特异性。

SA 既是调节植物响应逆境环境的重要激素,又是植物抵御病菌侵染的重要因子,在植物适应逆境中起着重要作用。几丁质基因参与 SA 介导的植物抗病防卫反应,在抗病信号途径中扮演重要角色^[15-18]。该研究中,SA 可明显诱导鸭梨 *PbChi II* 的表达,但 *PbChi II* 是否参与 SA 信号途径还需进一步研究。

有研究表明,在病菌侵染寄主初期,植物就产生了防卫反应^[19]。该研究发现,梨轮纹病菌侵染鸭梨果实 3~96 h 后,*PbChi II* 的表达量均高于处理前,初步表明鸭梨 *PbChi II* 在梨轮纹病菌侵染的初期可能就开始发挥作用。在果实成熟期喷施 SA 使 *PbChi II* 的表达量上升,可能对病原菌在果实内的扩展起到一定积极作用。

梨轮纹病属于潜伏侵染病害,落花后的幼果即可受到病菌的侵染,因此,防治病害的适宜时期是落花后的幼果。该研究中,对落花后 7 d 的幼果喷施 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SA,之后 24 h 再喷洒梨轮纹病菌孢子悬浮液,结果表明,在喷施孢子悬浮液后的 24、48、72、96 h,*PbChi II* 基因的表达量均高于处理前,且在 48 h 达到最高峰,随后开始下降,但仍高于处理之前。喷施 SA 后如果再遇病菌侵染,*PbChi II* 的表达量继续升高,但 SA 是否激发植物的防卫反应还需进一步研究。

参考文献

- [1] LEON-REYES A, SPOEL S H, de LANGE E S, et al. Ethylene modulates the role of nonexpression pathogenesis-related genes 1 in cross talk between salicylate and jasmonate signaling[J]. *Plant Physiology*, 2009, 149: 1797-1809.
- [2] 蒋选利,李振岐,康振生,等. 几丁质酶与植物的抗病性[J]. *西北农业学报*, 2002, 11(3): 71-75.
- [3] 刘栋峰,张朝红,王跃进. 黄冠梨几丁质酶基因家族 cDNA 全长序列的克隆与分析[J]. *农业生物技术学报*, 2009, 17(6): 1042-1049.
- [4] GUAN Y, RAMALINGAM S, NAGEGOWDA D, et al. *Brassica juncea* chitinase BjCHI1 inhibits growth of fungal phytopathogens and agglutinates gram-negative bacteria[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59(12): 3475-3484.
- [5] 张志忠,吴菁华,吕柳新,等. 植物几丁质酶及其应用研究进展[J]. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2005, 34(4): 494-499.
- [6] XIAO Y H, LI X B, YANG X Y, et al. Cloning and characterization of a balsam pear class I chitinase gene (*Mcchit1*) and its ectopic expression enhances fungal resistance in transgenic plants[J]. *Biotechnology & Biochemistry*, 2007, 71(5): 1211-1219.
- [7] 刘栋峰. 梨抗病相关基因的克隆及表达检测[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2009: 10-11.
- [8] BROGLIE K E, BIDDLE P, CRESSMAN R, et al. Functional analysis of DNA sequences responsible for ethylene regulation of a bean chitinase gene in transgenic tobacco[J]. *The Plant Cell*, 1989(1): 599-607.
- [9] 蔡斌华,张计育,高志红,等. 一种改良的提取草莓属叶片总 RNA 的方法[J]. *江苏农业学报*, 2008, 24(6): 875-877.
- [10] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. *Methods*, 2001(25): 402-408.
- [11] SAMAC D A, HIRONAKA C M, YALLAY P E, et al. Isolation and characterization of genes encoding basic and acidic chitinase in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Physiology*, 1990, 93: 907-914.
- [12] LOTAN T, ORI N, FLUHR R. Pathogenesis-related proteins are developmentally regulated in tobacco flowers[J]. *The Plant Cell*, 1989(1): 881-887.
- [13] MEMELINK J, LINTHORST H J M, SCHILPEROOT R A, et al. Tobacco genes encoding acidic and basic isoforms of pathogenesis-related proteins display different expression patterns[J]. *Plant Molecular Biology*, 1990(14): 119-126.
- [14] NEALE A D, WAHLEITHNER J A, LUND M, et al. Chitinase, β -1, 3-glucanase, osmotin, and extensin are expressed in tobacco explants during flower formation[J]. *The Plant Cell*, 1990(2): 673-684.
- [15] GLAZEBROOK J. Genes controlling expression of defense

responses in *Arabidopsis*-2001 status[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2001(4): 301-308.

[16] LAMB C J, LAWTON M A, DIXON R A. Signal and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack[J]. Cell, 1989, 56: 215-224.

[17] van LOON L C, REP M, PIETERSE C M J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants[J]. Annual

Review of Phytopathology, 2006, 44: 135-162.

[18] VON D C C, BALDWIN I T. Deciphering the role of ethylene in plant herbivore interactions[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2007(26): 201-209.

[19] DODDS P N, RATHJEN J P. Plant immunity: Towards an integrated view of plant-pathogen interactions[J]. Nature Review Genetics, 2010, 11(8): 539-548.

Cloning and Quantitative Expression Analysis of *PbChi II* Gene in *Pyrus bretschneideri* ‘Yali’

LI Peingpeng, YE Jia, FU Wei, QIAO Lijuan, LI Danhua

(College of Life Science and Engineering, Handan College, Handan, Hebei 056005)

Abstract: The CDS of *PbChi II* was cloned from ‘Yali’ using qRT-PCR method, phylogenetic tree was clustered by MEGA 6.0 based on amino acid of *PbChi II* and known chitinase gene of other plants. At the same time, gene expression levels were analyzed by real-time quantitative PCR method for ‘Yali’ in different organs and the expression after treatment with SA (salicylic acid) and *Botryosphaeria berengeriana* de. Not. f. sp. *piricola* (Nose) Koganecawa et. Sokwwa. The results showed that cDNA lengths of *PbChi II* gene was 969 bp, the nucleotide sequence and the induced amino acids had 100% homology with *Pyrus pyrifolia*, this gene belonged to II chitinase gene. The expression of *PbChi II* in roots and fruits were higher, the expression of the gene could be induced by SA and pathogen. In addition, the expression was enhanced and up to the peak at 48 hours after treatment with SA and pathogen. It was speculated that *PbChi II* might be involved in SA-mediated basic signaling pathway of plant defense responses and the defense responses mediated by *B. berengeriana*, f. sp. *Piricola*.

Keywords: *Pyrus bretschneideri* ‘Yali’; chitinase gene; gene cloning; quantitative expression

我国首次发现线形双链 RNA 病毒

信息广角

华中农业大学果树病理研究团队首次发现线形双链 RNA 病毒,这是迄今国际上已知的最长病毒。在长期的进化历程中,病毒的形态特征受环境和寄主影响而呈现各种形态,包括球形、杆形、线形等,有些病毒为裸露状态。其中,正单链 RNA 病毒多呈线形,而双链 RNA 病毒大部分呈球形。大量报道表明,双链 RNA 病毒从正单链 RNA 病毒进化而来,但至今尚未发现线形双链 RNA 病毒,这在病毒进化上一直是未解之谜。

刺盘孢是侵染果树、茶树等园艺作物的重要病原菌。华农研究人员从刺盘孢内发现了新的双链 RNA 病毒,命名为山茶刺盘孢线形病毒(CcFV-1)。该病毒形成极长的丝状病毒颗粒,长度最长达 4 661.6 nm,比此前已报道的最长线形病毒(3 500 nm)更长。

此次发现的 CcFV-1 处于正单链 RNA 病毒和双链 RNA 病毒的过渡位置,有助于研究病毒进化的未解之谜;它还与缺失病毒外壳的“裸露”病毒聚为一簇,帮助人们研究“裸露”病毒怎样进化过渡到外壳包被病毒。此外,该病毒具有很小的基因组,却包被在超长的病毒颗粒里面,预示着一一种新的病毒“装配”。“该病毒的发现,揭示了双链 RNA 病毒新的分子、形态、包装、进化及生物学特性。”这对促进人们深入认识病毒有重要的科学意义。

(来源:网易)