学校编码：10384　　　　　　　　　　　　　　　　分类号______密级______

学号：21620100153913　　　　　　　　　　　　　　　　　　UDC______

厦门大学

博 士 学 位 论 文

双孢蘑菇对氨基苯甲酸合酶基因在拟南芥中的功能分析

Functional analysis of *Agaricus bisporus* *para*-Aminobenzoic acid synthase gene in *Arabidopsis thaliana*

胡鑫

指导教师姓名：沈 月 毛 教授

宋 思 扬 教授

专 业 名 称：微生物学

论文提交日期：2016 年 11 月

论文答辩时间：2017 年 05 月

学位授予日期：　　年　　月

答辩委员会主席：__________

评　　阅　　人：__________

2017 年 05 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（　　　　　　　　　　　　　　）课题（组）的研究成果，获得（　　　　　　　　）课题（组）经费或实验室的资助，在（　　　　　　　）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年　　月　　日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（　　）1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于　　年　月　日解密，解密后适用上述授权。

（　　）2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打"√"或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年　　月

目录

Contents

摘要

双孢蘑菇（*Agaricus bisporus*）是一种产量高、消费量大、栽培广泛的食用菌。不耐高温是限制其人工栽培的主要因素。因此，深入了解双孢蘑菇的耐温机制和培养新型种质优良的耐高温菌株，具有十分重要的生产价值和理论意义。本实验室通过比较耐温型双孢蘑菇*02*菌株和常规双孢蘑菇*8213*菌株之间的转录组表达差异，筛选出一个与耐温相关的基因，对氨基苯甲酸（PABA）合酶基因（*Pabs*）。该基因编码的 PABA 合酶（PABS）参与双孢蘑菇中 PABA 的生物合成。PABA 是合成叶酸的一个重要前体，而叶酸是生物体内一碳单位的重要受体和供体，在一碳单位（C1 代谢）转运过程中起辅酶作用；PABA 还可以显著提高双孢蘑菇的耐温特性，然而其作用机制还不清楚。

我们通过转基因技术获得 *Pabs* 基因过表达的转基因拟南芥，主要研究了过表达 *Pabs* 基因对拟南芥生理形态的影响，以及探讨 *Pabs* 基因在拟南芥防御逆境胁迫的信号通路中所起的作用。

通过根癌农杆菌将双孢蘑菇 *Pabs* 基因导入拟南芥植株，该基因整合到拟南芥基因组 DNA 中并稳定遗传至后代，表达出具有生物活性的 PABS 蛋白，促进植物中 PABA 的合成。我们的实验结果表明 *Pabs* 转基因拟南芥中总 PABA 浓度可达到野生型拟南芥中总 PABA 浓度的 3 倍。在拟南芥中对 *Pabs* 基因进行生物学功能分析具有一定的理论依据。

PABA 可以调节拟南芥的生长发育。拟南芥氨基脱氧分支酸合酶基因（*adcs*）是 PABA 合成关键基因，该基因突变会导致胚乳败育。过表达 *Pabs* 基因对成熟拟南芥植株的表型没有明显的改变，但是会轻微抑制拟南芥幼苗主根的生长，表明了 PABA 参与了拟南芥根的生长调控。与之相应，外源 100 μmol/L PABA 能显著抑制拟南芥根的生长，同时促进根毛的发育。另外，PABA 会导致根尖生长素的积累。进一步研究表明，过表达 *Pabs* 基因导致根尖 ROS 水平上升，特别是在侧根冠（lateral root cap）和淀粉粒细胞（COL）中积累了大量的 ROS。我们推测 *Pabs* 基因可能通过促进 ROS 的产生来调节植物根的生长发育。

ROS 处于各种信号转导网络的中枢位置，ROS 动态平衡的改变不仅可以调节生物体的生长和发育，还可以提高植物体抵御生物胁迫和非生物胁的能力。在

拟南芥中，我们发现过表达 *Pabs* 基因会诱导 *PR-1* 的表达，但是在 *Pabs* 转基因植株中水杨酸的含量没有增加。

我们实验室之前的研究发现，在双孢蘑菇中过表达 *Pabs* 基因或者添加 PABA 可以增强双孢蘑菇对高温的抵抗能力。因此我们进一步研究了 *Pabs* 基因对拟南芥耐热特性的影响。在热激条件下，*Pabs* 转基因拟南芥下胚轴和根的生理形态和野生型相比没有明显的差异。但是在正常条件下，过表达 *Pabs* 基因会轻微诱导 HSP101 和 HSP70 的表达；而且在高温胁迫下，过表达植株中 HSP70 表达提高幅度要明显大于野生型。我们的结果表明过表达 *Pabs* 基因所导致的 HSPs 变化似乎不会引起拟南芥产生耐热的表型。

我们还发现 *Pabs* 转基因拟南芥对 UV-C 的敏感性减弱。在 UV-C 处理后 *Pabs* 转基因植株系表现出较高的相对根长和较少的白化子叶。UV-C 辐射会导致 PABA 的积累，表明 PABA 参与到植物响应 UV-C 胁迫的信号通路。过表达 *Pabs* 基因可以保护植物的 DNA，增强植株对 UV-C 的防御能力。我们认为 PABA 是从多个方面来提高植物对 UV-C 抗性。PABA 可以直接吸收 UV-C，减少 UV-C 对细胞的伤害；也可以介导 ROS 生成从而提高植物抗氧化酶 SOD 和 APX 的活性，最终减少 UV-C 诱导的 ROS 积累；最后 PABA 还诱导 *DDM1* 基因的表达，维持拟南芥 DNA 的稳定。

综上所述，本学位论文研究发现，双孢蘑菇 PABA 合酶基因 *Pabs* 能够在拟南芥中稳定遗传、表达，提高拟南芥的 PABA 水平；植物中 PABA 除了作为叶酸合成中的重要前体，还可能作为一种新型的次级代谢产物通过调节 ROS 的平衡来参与植株生长、发育和抗逆等过程，对农作物品种改良具有一定的参考意义。

关键词：对氨基苯甲酸；活性氧；紫外线

Abstract

Agaricus bisporus is a kind of edible mushroom. It is widely cultivated as it has high yield property and is consumed largely. Temperature is the main restricted factor for its growth. It thus has great economic and ecological values to study its thermotolerance mechanism and to breed a novel thermotolerant strain. Comparing the differentially expressed genes between thermal-insensitive *A.bisporus 02* and conventional *A.bisporus 8213* by integrative transcriptomic, *para*-aminobenzoic acid synthase gene (*Pabs*) was screened in our laboratory. It encodes a protein regulating the biosynthesis of *para*-aminobenzoic acid (PABA) in mushroom. PABA is a precursor of folate synthesis to maintain the fungi growth. Significantly, it also can enhance heat tolerance of mushroom. PABA as a mediator of environmental stress is rarely reported.

We obtained *Pabs* transgenic *Arabidopsis* by floral dip protocols. We further investigated the morphology changes and the tolerance-improving mechanisms of mushroom-derived *Pabs* on the perfect platform of *Arabidopsis*.

After being introduced into Col-1 mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, *Pabs* can be integrated into the *Arabidopsis* genome DNA and stably inherited to the offspring. It can express the correspondingly active protein (PABS) which promotes the synthesis of PABA in plants. *Pabs* overexpressing plants displayed at best 3 times PABA increase compared to wild type.

PABA can regulate the growth and development of *Arabidopsis thaliana*. Aminodeoxychorismate synthase gene (*Adcs*) is a key gene of PABA biosynthesis in *Arabidopsis*. Homozygous *Adcs* mutants lead to defective embryos. In this study, overexpression of *Pabs* did not result in any obvious phenotypic alteration in mature *Arabidopsis*, except its slight inhibition on primary root growth. It suggested that PABA may affect the growth of *Arabidopsis* roots. Exogenous PABA (100 μmol/L PABA) significantly decreases the length of *Arabidopsis* roots, and promotes the development of root hairs. In addition, PABA can lead to an accumulation of auxin in

root apical. Our further research found that overexpression of *Pabs* induced ROS generation in root apical, especially in lateral root cap and columella (COL). We proposed that *Pabs* might act as a novel regulater of the *Arabidopsis* roots growth and development via ROS.

ROS is a central messenger in a variety of signal transduction networks. The alteration of ROS homeostasis not only regulated the growth and development of organisms, but also improved the plants tolerance to biotic stress and abiotic stress. In *Arabidopsis*, we found that over expression of *Pabs* can induce the expression of Pathogenesis-related-1 gene (*PR-1*), while SA content was not changed.

Both overexpression of *Pabs* and exogenous PABA reinforced the thermotolerance of mushroom. However, there was no significant morphologic difference between *Pabs* overexpressing lines and wild type in heat stress. Interestingly, under normal conditions, overexpression of *Pabs* slightly induced the expression of HSP101 and HSP70. After heat shock, the relative increase of HSP70 expression in *Pabs* plants was significantly higher than that in wild type. Our experiments indicated that the improvement of HSPs expression induced by *Pabs* did not likely alter the phenotype of *Arabidopsis* in heat stress.

Interestingly, we also found that *Pabs* transgenic *Arabidopsis* was hyposensitive to UV-C irradiation. *Pabs* overexpression lines exhibited reduced root growth inhibition and cotyledon bleach upon UV-C stress. UV-C radiation could lead to the accumulation of PABA, which indicated that PABA was involved in response of UV-C stress. Reduced UV-C-induced DNA damage was observed in *Pabs* lines suggesting overexpression of *Pabs* may protect DNA against UV-C exposure. We assumed that PABA could enhanced plants resistance to UV-C in more than one aspect. PABA can directly absorb UV-C reducing the damage of UV-C radiation on cell. It also promotes ROS generation which in turn acts a signal to increase antioxidant enzymes SOD and APX activity in plants. Higher activity of SOD and APX prevented the accumulation of ROS induced by UV-C. Finally, PABA induced the *DDM1* expression, maintaining the stability of the genomic DNA.

In summary, this thesis showed that the PABA synthase gene of Agaricus

bisporus could be stably and inherited expressed in *Arabidopsis thaliana*, increasing the PABA level of *Arabidopsis*. Besides its role in folate synthesis, PABA may act as an active plant hormone to participate in the growth, development and environmental resistance of *Arabidopsis* by regulating the balance of ROS. Details of the underlying molecular mechanisms are needed to facilitate genetic improvements of crops.

Key words: *para*-amino benzoic acid, Reactive oxygen species, UV-C