

学校编码: 10384
学号: 21720081152569

分类号 _____ 密级 _____
UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

拟南芥 *FT* mRNA 通过内质网系统进行
长距离运输的研究

Research on The Long-distance Trafficking of *FT* mRNA
Through The Endoplasmic Reticulum System in *Arabidopsis*

王维娜

指导教师姓名: 黄涛教授
朱学艺副教授
专 业 名 称: 发育生物学
论文提交日期: 年 月
论文答辩时间: 年 月
学位授予日期: 年 月

答辩委员会主席: _____
评 阅 人: _____

年 月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

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

厦门大学博硕士学位论文摘要库

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 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录

摘 要.....	1
ABSTRACT.....	2
第一章 前 言	3
1 高等植物的开花调控.....	3
1.1 模式植物拟南芥.....	3
1.2 拟南芥开花调控的分子机理.....	4
2 蛋白质转运途径.....	9
2.1 蛋白质分选信号.....	9
2.2 内质网（endoplasmic reticulum, ER）的结构.....	10
2.3 内质网与高尔基体.....	10
2.4 内质网与胞间连丝.....	10
3 立题依据与研究意义.....	12
3.1 开花信号的研究进展.....	12
3.2 研究目的和意义.....	13
第二章 材料与方 法	14
1 实验材料.....	14
1.1 植物材料及菌株.....	14
1.2 培养基及抗生素.....	14
1.3 常用溶液.....	15
1.4 主要试剂.....	16
1.5 引物序列.....	17
1.6 实验仪器.....	19
2 实验方法.....	20
2.1 生理实验操作.....	20
2.2 分子克隆实验操作.....	23

2.3 蛋白实验操作.....	30
2.4 根尖的 GFP 荧光检测	33
第三章 结果与分析	34
1 定位到内质网的 FT 蛋白协同 <i>FT</i> mRNA 长距离运输.....	34
2 叶绿体和线粒体不参与 <i>FT</i> 信号转运.....	41
3 FT 蛋白与 <i>FT</i> mRNA 的转运不经过高尔基体.....	42
3.1 高尔基体不参与 FT 的转运	42
3.2 FT 蛋白与 <i>FT</i> mRNA 的运输不依赖运输小泡.....	45
4 FT 蛋白与 <i>FT</i> mRNA 通过胞间连丝运输.....	48
5 FT 蛋白与 <i>FT</i> mRNA 定位在内质网上.....	51
第四章 讨论	54
1 内质网中 FT 蛋白与 <i>FT</i> mRNA 协同转运	54
2 高尔基体不参与 FT 蛋白和 <i>FT</i> mRNA 的转运.....	55
3 FT 蛋白与 <i>FT</i> mRNA 的转运通过胞间连丝	56
4 与已发表文章的探讨.....	56
第五章 展望	59
参考文献	60
致谢.....	66

CONTENTS

Abstract (in Chinese)	1
Abstract (in English)	2
Chapter 1 Introduction	3
1 Flowering regulation of higher plants	3
1.1 Model plant <i>Arabidopsis</i>	3
1.2 Molecular mechanism of <i>Arabidopsis</i> flowering regulation	4
2 Protein transport pathway	9
2.1 Protein sorting signals	9
2.2 Structure of endoplasmic reticulum(ER)	10
2.3 ER and the golgi apparatus.....	10
2.4 ER and plasmodesma	10
3 Aims and meanings of the research	12
3.1 Researches of florigen	12
3.2 Aims and meanings of the research	13
Chaper 2 Materials and methods	14
1 Materials	14
1.1 Plants materials and plasmids	14
1.2 Medium and antibiotics	14
1.3 Common solutions.....	15
1.4 Main reagents	16
1.5 Primer sequences.....	17
1.6 Main instruments.....	19
2 Methods	20
2.1 Physiological experiment	20
2.2 Molecular cloning.....	23
2.3 Protein experiments.....	30

2.4 GFP scanning	33
Chaper 3 Results and analysis.....	34
1 ER FT protein and <i>FT</i> mRNA transport together	34
2 Chloroplast and Mitochondria aren't involved in <i>FT</i> transport	41
3 Transport of FT protein and <i>FT</i> mRNA bypass Golgi apparatus	42
3.1 Golgi apparatus isn't involved in <i>FT</i> transport	42
3.2 Transport of FT protein and <i>FT</i> mRNA doesn't rely on transport vesicle	45
4 FT protein and <i>FT</i> mRNA transport through plasmodesmata	48
5 FT protein and <i>FT</i> mRNA localized on ER.....	51
Chaper 4 Discussion.....	54
1 ER FT protein transport with <i>FT</i> mRNA	54
2 Transport of FT protein and <i>FT</i> mRNA bypass Golgi apparatus	55
3 FT protein and <i>FT</i> mRNA transport through plasmodesmata	56
4 Discussion with the published articles	56
Chaper 5 Summary and Outlook.....	59
References	60
Acknowledgement.....	66

摘要

拟南芥开花调控分为四条途径：光周期途径、春化途径、赤霉素途径和自主途径，其中 *FLOWER LOCUST* (*FT*) 是光周期途径中重要的调控基因，也是四条开花调控途径关键的整合因子，其表达产物具有长距离运输的功能。实验室已有研究证明 FT 蛋白和 *FT* mRNA 共同参与了长距离运输，本研究主要针对 FT 蛋白与 *FT* mRNA 的转运模式展开研究，得到了以下结果：（1）通过将 FT 蛋白与不同定位信号肽的融合将 FT 蛋白分别定位到内质网、线粒体和叶绿体中，发现内质网中的 FT 蛋白参与协同 *FT* mRNA 的长距离运输。（2）证明了 FT 蛋白与 *FT* mRNA 的转运不通过高尔基体。该研究利用超表达 *Sec12p* 和蛋白转运抑制剂 BFA/Monensin 将“内质网→高尔基体”途径阻断，结果并没有影响植株开花，表明高尔基体不参与 FT 的转运。（3）根据实验结果推测 FT 蛋白和 *FT* mRNA 的转运可能通过胞间连丝。

根据研究结果，我们推测出 FT 蛋白和 *FT* mRNA 转运的基本模型：伴胞中的 FT 蛋白与 *FT* mRNA 定位到内质网，然后共同通过胞间连丝到达筛管，运输到茎尖。

关键词：拟南芥；*FT* mRNA；内质网

Abstract

There are four signaling pathways that regulate the flowering time in *Arabidopsis*: photoperiod pathway, vernalization pathway, gibberellin pathway and autonomous pathway. *FLOWER LOCUS T* (*FT*) is an important regulatory gene in photoperiod pathway, which also plays a critical role in floral integrated networks. It has been proved in our lab that both FT protein and *FT* mRNA take part in the long-distance trafficking from leaf to shoot apex. It remains to be elucidated the mechanism of the trafficking of FT protein and *FT* mRNA. The main results are as following: (1) FT protein localized within the endoplasmic reticulum(ER) is involved in the long-distance trafficking of *FT* mRNA from leaf to shoot apex. (2) The long-distance trafficking of FT protein and *FT* mRNA bypasses the golgi apparatus. When the pathway of "ER → Golgi apparatus" is blocked by *Sec12p* overexpression and BFA/Monensin treatment, the flowering time is not influenced. So it can be regarded that the golgi apparatus is not in the pathway of *FT* signalling. (3) FT protein and *FT* mRNA might traffic from the companion cell to the sieve tube through the plasmodesmata.

The model of the long-distance floral signalling is proposed in this study: FT protein and *FT* mRNA are localized to the ER, then they pass through the plasmodesmata and traffic via the sieve tube to the shoot apex .

Key Words: *Arabidopsis*; *FT* mRNA; Endoplasmic reticulum(ER)

第一章 前言

植物开花是从营养生长向生殖生长转变的标志,是高等植物整个生命周期中的重要转折点。研究植物开花的控制机理,对于通过基因工程技术精确地调控景观植物开花时间和农作物改良增产具有重要的指导意义和广泛的应用前景。

开花调控是一个精确而复杂的过程,受外界环境因子和内部遗传因子的共同调控,环境因子主要有光周期、温度、矿质营养、水分等,内部因子包括一系列与开花相关的基因,其中*FLOWER LOCUS T (FT)*是光周期途径中重要的调控基因,与*SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1(SOCl)*、*LEAFY(LFY)*等被称为开花调控途径关键的整合因子,其表达产物具有长距离运输的功能。实验室已有研究发现细胞质中的FT蛋白参与协同FT mRNA转运,为进一步确定不同亚细胞结构中FT蛋白的功能,本研究通过将定位信号与FT蛋白融合,从而将其定位到不同的细胞器中,因此本研究中除涉及到植物开花调控外,还涉及到蛋白信号分选的内容。下面以拟南芥为例对植物开花调控的分子机理及蛋白转运途径做简要介绍。

1 高等植物的开花调控

1.1 模式植物拟南芥

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*),十字花科,主要分布于温带,一般生长在干燥的环境中。拟南芥本身并无经济价值,但作为一种模式植物被广泛的应用于遗传学和分子生物学研究,主要因为其具有以下特点:基因组小(只有5对染色体,1.15亿个碱基对);基因功能完善(2.5万多个基因在功能上和其它高等植物大致相同);生长周期短(仅需6-8周时间);个体较小宜培养;自交亲和且杂交可育,易转化等。2000年,拟南芥的全基因组测序工作已经完成^[1],成为植物界第一个被完整测序的物种。

1.2 拟南芥开花调控的分子机理

花作为植物生殖生长的主要器官,其形成的调控机理一直是植物学研究的重点。

植物的成花过程可分为成花诱导、花芽发育、花原基形成和花器官的成熟四个阶段^[2],其中成花诱导最为关键,它直接控制了开花的时间。成花诱导过程受日照长度、温度、赤霉素(GA)和自主途径因子等因素的调控,由此可将开花调控途径分为四条:光周期途径(photoperiod pathway),春化途径(vernalization pathway),赤霉素途径(gibberllin pathway)和自主途径(autonomous pathway)

1.2.1 光周期途径

光周期途径是开花调控中最主要的途径。根据植物开花对日照长度的要求,将它们分为长日植物(LDPs)、短日植物(SDPs)和日中性植物(DNPs)^[3-5]。拟南芥是长日植物,因此其光周期途径也被称为长日照途径。

在拟南芥的光周期途径中,植物通过叶片的光受体(photoreceptor)感受光信号,将其传递给昼夜节律钟(circadian clock),节律钟将检测的日照长度信号传输给主要信号分子CO,进而诱导其靶位基因FT、SOC1的表达,从而实现了日照长度对开花时间的调控。

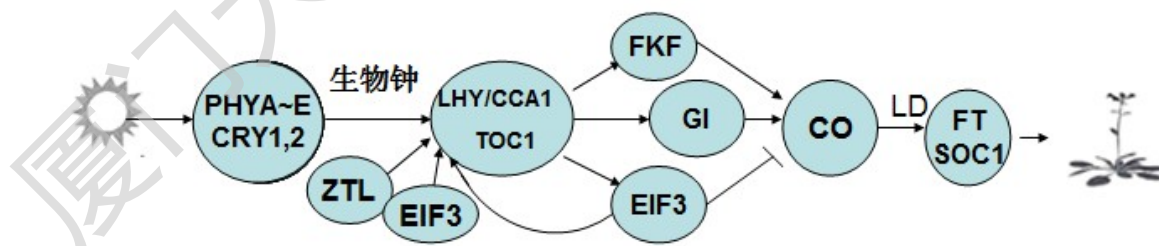


图1 拟南芥光周期诱导模式

Fig.1 The model of photoperiod pathway in *Arabidopsis*

目前已知的有三类接收光信号的受体,即红光和远红光的受体—光敏色素(phytochrome),蓝光和紫外线A的受体—隐花色素(cryptochrome)和紫外线B受

体 (UV-receptor) [6,7]。

光敏色素是一种蛋白和生色团的复合体, 后者由4个吡咯分子组成。拟南芥中至少存在5种光敏色素: PHYTOCHROME(PHY) A~E; 以及2种隐花色素: CRYPTOCHROME 1 (CRY1)和CRY2^[6]。光敏色素蛋白主要吸收红光和远红光, 红光抑制拟南芥开花, 而远红光促进开花。隐花色素CRY2 由*FHA* 基因编码, 它在长日条件下促进开花^[8]。一旦叶片中的CRY2和光敏色素感受到光信号, 它就会与定位在细胞核内的转录因子PIF3结合形成复合体^[9,10]。这种复合体可以结合到基因启动子上游的G-box元件上。靶基因包括*CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)* 和*LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)*, 它们是拟南芥感受昼夜节律的主要基因。昼夜节律钟以一种负反馈调节的方式循环运行, 在黎明时分, *CCA1*和*LHY*的表达水平达到高峰, 以转录因子的形式结合在*TOC1*、*ELF4*和*LUX*启动子上来抑制它们的表达^[11-18], 但它们的表达水平在白天逐渐降低, 黄昏时降低到初始水平, 从而解除了对*TOC1*、*ELF4*和*LUX* 的抑制, 使它们的表达又逐渐增强, 重新促进了*CCA1*和*LHY*的表达^[14,19,20]。另外, *CCA1*蛋白和*TOC1*蛋白还可以通过*ZEITLUPE (ZTL)* 进行调控^[21-25]。

昼夜节律钟信号主要通过*FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, AND F-BOX 1 (FKF1)*、*GIGANTEA (GI)* 和*EARLY FLOWERING 3 (ELF3)* 这几个基因输出, 其中*FKF1*和*GI*激活*CO*的转录^[30-33], *ELF3*、*CDF1*和*RFI2*抑制*CO*的转录^[30,34,35]。*ELF3*蛋白水平受昼夜节律钟调节, 在夜间水平达到最高, 使昼夜节律钟在夜间对光照不敏感^[26-28]。*ELF3*同时参与了*TOC1*对*CCA1*和*LHY*的调控^[12,29]。*CO* 编码一个MADS 转录因子, 它直接作用于*FT*。*FT*是一个Raf-like 激酶抑制蛋白^[65], 主要在叶片表达, 其表达产物从叶片运输到茎尖, 与转录因子FD (- 种bZIP 转录因子)形成复合体, 共同在茎尖分生组织中激活下游的*SOC1*, *APETALA1 (API)*, *LEAFY (LFY)* 等开花基因的表达, 促进植物开花^[93]。*FT*的表达产物被认为是“开花素 (florigen)”^[85]的成分之一, 但*FT*产物是以蛋白、mRNA还是二者复合物的形式进行长距离的, 这个问题有待进一步证实。

1.2.2 春化途径

低温对植物开花的促进作用称为春化 (vernalization) ^[38,39], 拟南芥经4℃处

理2天可提前4-8周开花。目前,与春化相关的基因研究较多的植物是十字花科的拟南芥和禾本科的小麦、大麦等。*FLOWERING LOCUS C* (*FLC*) 和 *FRIGIDA*(*FRI*) 基因在春化过程中起主要作用。研究表明,拟南芥由单基因*FRI* 控制^[40],其编码的蛋白具有卷曲螺旋结构,若该区域发生突变则可导致拟南芥过早开花。*FLC* 属于MADS-box基因^[41],它编码的蛋白转录因子是一个强的开花抑制因子,其抑制程度与其剂量成正比,春化后*FLC* mRNA丰度降低,从而使开花提前。*FRI* 可使*FLC* mRNA丰度增加,使开花推迟。低温春化通过*FRI* 转录及蛋白表达水平的负调控,抑制*FLC* 的表达,促进植物开花^[42]。

在拟南芥中*VERNALIZATION 1* (*VRN1*)、*VRN 2* 和*VERBALIZATION-INSENSITIVE 3* (*VIN 3*) 也参与拟南芥的春化作用^[43]。*VRN 1*位于细胞核内,编码一种具有两个植物特异的与DNA结合的有关的B3结构域^[44],参与染色质结构的改变;*VRN 2* 编码核定位锌指结构蛋白,是一种转录因子^[45],*VRN 1* 和*VRN 2*都是组成型表达,在不同组织和不同发育阶段均有表达。*VIN 3* 编码的蛋白属于PHD finger蛋白,该类型蛋白质与染色质空间结构的变化有关^[46],许多染色质重建复合体的组分中含有PHD finger。*VIN 3*具有感受低温时程的特性。其作用是响应春化低温起始抑制*FLC* mRNA的表达。只有冬性1年生拟南芥经过足以产生春化反应的一段时期的低温处理,*VIN 3* 才会诱导表达,当*VIN 3*被诱导表达后,*FLC*的表达随即被抑制。

1.2.3 赤霉素途径

赤霉素(gibberlin, GA)是广泛存在的一类植物激素。其化学结构属于二萜类酸,由四环骨架衍生而得,可刺激叶与芽的生长,调控种子的萌发、茎秆的伸长、花和果实的发育,防止器官脱落和打破休眠等^[47-50]。目前已知的赤霉素类至少有38种,其中生理活性最强、研究最多的是GA3,它能显著地促进植物茎、叶生长,特别是对遗传型和生理型的矮生植物有明显的促进作用。在拟南芥中,GA是非诱导性条件下开花所必需的,施加外源GA能促进拟南芥开花。GA合成突变体和GA信号途径突变体一般延迟开花。

开花诱导的GA途径中,调节活性GA生物合成的最关键限速酶—GA20氧化酶(GA20ox)在GA合成代谢的前馈和反馈中作用显著,其活性高低是决定GA

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库