

学校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学号: 21720091152191

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

**AtST39 在逆境响应和 AtMPA 在花粉发育中的  
功能分析**

**Functional Characterization of AtST39 in Stress Response and  
AtMPA Mediating Pollen Development**

肖世民

指导教师姓名: 陈亮教授

专 业 名 称: 细胞生物学

论文提交日期: 2012 年 5 月

论文答辩时间: 2012 年 6 月

学位授予日期: 2012 年 7 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2012 年 6 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 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 摘要

基因芯片显示番茄细菌性叶斑病原菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000), 干旱、冷和盐等逆境处理及在开花关键基因 *lfy* 突变体中都能够上调 *AtST39* (*At3g46110*) 基因表达; *AtMPA* (*At1g05577*) 在拟南芥单核花粉粒向三核花粉发育的过程中特异性表达。但是 *AtST39* 参与胁迫和 *AtMPA* 在介导花粉发育的分子机制知之甚少。我们主要对 *AtST39* 进行了探索研究, 结果如下:

(1) NCBI 数据库显示 YWC 基因家族共有 185 个蛋白家族成员。经蛋白多序列比对, 发现 YWC 蛋白家族含有三个高度保守的模式。生物信息学预测 YWC 蛋白家族成员可能受到 Auxin 调节, 具有半胱氨酸内切酶水解活性, 能与 APG6 结构域相互作用。*AtST39* 和 *AtMPA* 蛋白都含有两个未知功能的 YWC 结构域。

(2) 转  $P_{AtST39}::GUS$  基因植株 GUS 染色结果显示, *AtST39* 在维管束组织、花粉、子叶和成熟叶中表皮毛表达, 同时在侧根起始区域特异性表达。荧光显微镜下观察  $35S::AtST39-GFP$  转基因植株幼苗根部发现该蛋白定位在细胞质和细胞膜, 同时在烟草中的瞬时表达进一步确认了 *AtST39* 蛋白定位在细胞质和细胞膜。从 N 端截短的 *AtST39* 蛋白  $35S::AtST39 N_1T-GFP$  和  $35S::AtST39 N_2T-GFP$  在成熟的根中发现都定位在细胞核, 说明 *AtST39* 蛋白 N 端不影响其入核。生物信息学预测 *AtST39* 存在两个已知的剪切变异体, 通过设计特异性引物, 半定量 PCR 发现 *AtST39* 还存在一个新的剪切体。通过测序发现, *AtST39* 新的剪切体第一个内含子没有发生选择性剪切。进一步研究表明盐和冷胁迫能提高新的选择性剪切体基因表达丰度, 提示新的选择性剪切体参与了盐和冷胁迫应答。

(3) 利用三引物法和双引物法在基因组水平对 *Atst39*, *Atst39h*, *Atmpa* 和 *ufc* 的 T-DNA 插入突变体进行鉴定, 通过 RT-PCR 鉴定并获得了 *AtST39* 基因 T-DNA 插入突变体纯合体, 而 *Atst39h*, *Atmpa* 插入突变体鉴定结果显示没有敲除 *AtST39H* 和 *AtMPA*。

(4) *AtST39* 过量表达株系, T-DNA 插入突变体纯合株系与野生型相比, 在盐和干旱胁迫中表现萌发率下降。突变体对干旱胁迫的敏感性可以被内源 ABA 合成抑制剂氟啶酮恢复。实时荧光定量 PCR 发现突变体与野生型相比, 能够激活更多的 ABA 响应基因 *RD29B* 和 *RD29A* 转录表达, 同时反馈抑制 ABA 合成关键基因 *NCED3* 转录。首先, 荧光定量 PCR 结果显示 ABA 可以诱导 *AtST39* 基因的表达。其次, ABA 处理 *Atst39* 突变体, 过量表达株系和野生型时, 发现突变体中的 ABA 响应基因如 *RD29B* 和 *NCED3* 基因表达下调, 而过量表达株系能够迅速上调 *RD29B* 基因表达。再次, 突变体与野生型相比, 在不同浓度的 ABA 处理下, 种子萌发率下降, 并且 ABA 能够强烈地抑制突变体的主根伸长, 下胚轴的伸长和子叶的生长, 这种表型可以通过加入细胞分裂素和转移到不含 ABA 的 1/2 MS 培养基中部分恢复。以上结果表明 *AtST39* 在盐和干旱胁迫条件下依赖于 ABA 调控种子萌发和非依赖于 ABA 的信号途径来调控幼苗对逆境的响应。最后, 用  $200\mu M H_2O_2$  处理野生型拟南芥, 能够在 1h 内迅速诱导 *AtST39* 基因表达并达到最大值, 因此, 我们推测 *AtST39* 作为 ROS 信号分子, 负向调控脱落酸与细胞分裂素抑制主

根、下胚轴的伸长和子叶变绿过程。

(5) 在 *pad3*, *wrky11*, 和 *coil-1* 突变体中的 *AtST39* 基因表达下调, 相反 *npr1* 中 *AtST39* 基因表达上调。用 *P.syringae pv.tomato* DC3000 处理植株后发现, 突变体的病斑与野生型和 *AtST39* 过量植株相比, *Atst39* T-DNA 纯合突变体的病斑明显缩小且突变体接菌后能够显著激活病程相关基因的表达, 同时也能增强 *PAD3* 和 *WRKY11* 基因表达, 表明 *AtST39* 在拟南芥响应 *P.syringae pv.tomato* DC3000 病原菌的过程中起负向调控作用。

(6) 我们构建了原核 His-*AtST39* 融合表达载体 pET28a-*AtST39*, 并对 *AtST39* 蛋白进行了 BL21(DE3) 菌株原核表达, 通过优化表达条件, 发现该蛋白主要以包涵体形式存在, 少量存在上清中。

(7) 另外, 我们对 *AtMPA* 基因表达模式有初步的探索: 生物信息学预测拟南芥成熟花粉中大量表达基因 *AtMPA* (*At1g05577*) 在花粉中特异表达, 并且 Genevestigator V4 提示 *AtMPA* 在 JA 生物合成途径 *opr3* 突变体中基因表达量显著下调。共表达数据库分析显示 *AtMPA* 与脂肪酶和果胶酶基因共表达。PLACE 启动子预测结果表明 *AtMPA* 启动子存在花粉特异性表达元件 CARGCW8GA、POLLEN1LELAT52、根器官特异元件 OSE2ROOTNODULE 和多个生长素响应元件, 转  $P_{AtMPA}::GUS$  植株组织化学染色进一步证实了 *AtMPA* 在成熟花粉粒中大量表达, 同时在子叶叶尖和侧根的起始区域与伸长区特异性表达, 这些结果提示 *AtMPA* 可能具有水解活性, 并参与 JA 介导的花粉发育和 Auxin 介导的侧根发育。

关键词: 花粉; 细胞分裂素; 根长; 脱落酸

## Abstract

Microarray data reveals expression level of *AtST39* (*At3g46110*) is up-regulated by pathogens such as *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*DC3000), cold, drought and salt treatment and in key regulators *lfy* which controls flowering; while *AtMPA* (*At1g05577*) is specifically expressed in the process of uninucleate microspore switching to tricellular. However, the molecular mechanism of two members of YWC gene family (*AtST39* and *AtMPA*) mediating flower development and stress response remains elusive. Here we report mainly characterization of *AtST39* gene function to unravel its function, results are shown below:

(1) Members of YWC protein family are estimated to be over 185 members shown in NCBI along with three highly conserved motifs. YWC protein family is putatively regulated by auxin, potentially has cysteine-type endopeptidase activity and interacts with APG6 domain from bioinformatic analysis. Both *AtST39* and *AtMPA* share two YWC domains whose function is unknown.

(2) Analysis of transgenic plants expressing  $P_{AtST39}::GUS$  shows that *AtST39* is highly expressed in vascular tissue, pollen, trichomes site as well as slightly in lateral roots initiation. The *AtST39* protein is localized in the cytoplasm and cell membrane in the seedling root of transgenic plants, which is confirmed by transient expression of *AtST39*-GFP fusion gene in *Nicotiana tabacum* epidermis cells. According to conserved domains, 35S::*AtST39* N<sub>1</sub>T-GFP and 35S::*AtST39* N<sub>2</sub>T-GFP truncated derived from *AtST39* protein from N terminus were observed to locate in nucleus in mature roots. TAIR database predicts that *AtST39* has two splicing variants. However, a novel alternative splicing transcript of *AtST39* was identified by RT-PCR and verified by sequencing besides predicted variants above. We found that the first intron in novel transcript was not spliced and this novel variant expression level was up-regulated under salt and cold stresses, implying the novel variant might be involved in salt and cold stresses.

(3) The T-DNA insertion mutants including *Atst39*, *Atst39h*, *Atmpa* and *ufc* were identified by PCR at genome level and RT-PCR at mRNA level. Homozygous mutant *Atst39* was obtained while *ATST39H* and *ATMPA* gene were not knocked out in corresponding mutant lines.

(4) The seeds germination of overexpression of *AtST39* lines and *AtST39* T-DNA insertion homozygous mutants decreased under salt and drought stresses compared with wild-type. The phenotype of homozygous mutants that is more sensitive in seed germination can be restored by ABA inhibitor fluridone, indicating that mutants may accumulate more ABA under NaCl and PEG treatment. Quantitative PCR confirmed that the transcriptional levels of ABA responsive gene *RD29B* and *RD29A* were up-regulated while the transcriptional levels of ABA biosynthesis gene *NCED3* down-regulated due to possible feedback. Moreover, Quantitative PCR demonstrated *AtST39* gene expression was induced by ABA. The transcriptional levels of

ABA responsive gene *RD29B* and *NCED3* decreased in mutants while *RD29B* gene expression can be quickly activated in overexpression lines compared with wild-type under ABA treatment. Germination defects were not observed in mutants compared with wild-type under various concentration of ABA treatment. However, the morphology of inhibiting main root length, hypocotyl elongation and cotyledon turning green was observed after *Atst39* being subjected to ABA. These phenotypes can be partly reversed by cytokinin or transferring to 1/2 MS medium without ABA after two days, demonstrating that AtST39 maybe modulate seed germination in ABA-dependent manner under osmotic stress whereas respond to stress in ABA-dependent signaling passway during seeding stage. AtST39 expression reached maximum in Wild-type subjected to 200μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> after 1 hour treatment. So, We propose that AtST39 as ROS signal transducer negatively regulates the process of ABA and cytokinin inhibiting root length, hypocotyl length and cotyledon turning green.

(5) *AtST39* gene expression level is down-regulated in *pad3*, *wrky11*, and *coil-1* while upregulated in *npr1*. *Atst39* T-DNA mutant plants displayed notably smaller lesion than wild-type plants after inoculation with *P.syringae pv.tomato* DC3000. PR gene transcriptional levels was significantly activated and *PAD3* and *WRKY11* gene expression was enhanced compared with wild-type after inoculation, suggesting AtST39 negatively modulates plants response to *Pst* DC3000.

(6) We constructed prokaryotic expression vector pET28a-AtST39 containing his-tag. The results showed AtST39 protein was mainly expressed in inclusion bodies after transforming in *E.coli* BL21(DE3) stain and optimizing the expression condition.

(7) Moreover, we also probed into *AtMPA* (*At1g05577*) gene expression pattern: *AtMPA* (Mature Pollen Abundance expressed in *Arabidopsis thaliana*) was predicted to specifically express in stamen and Genevestigator V4 indicated *AtMPA* expression decreased remarkably in *opr3* linked to JA biosynthesis. Co-expression database showed *AtMPA* exhibited strong co-expression with genes which encoding lipase and pectinase. PLACE promoter prediction manifested *AtMPA* promoter contained pollen-specific cis-elements: CARGCW8GAT, POLLEN1LELAT52, root-specific OSE2ROOTNODULE and auxin response factors binding site, which were related with pollen development. The expression of *AtMPA* increased sharply shown in transgenic plants expressing P<sub>*AtMPA*</sub>::GUS during pollen development. Interestingly, we also found *AtMPA* expressed in specific location such as lateral root initiation site and root elongation zone. These results showed that the *AtMPA* may have hydrolase activity, maybe involved in the process of the mature pollen development JA mediated and root development auxin regulated.

**Key words: pollen; root length; cytokinin; ABA**



## 缩略词

RNA 干扰	RNAi(RNA interference)
3-吲哚乙酸	IAA (3-Indoleacetic Acid)
脱落酸	ABA (abscisic acid)
6-苄基氨基嘌呤	6-BA (6-benzylaminopurine)
潮霉素 B	Hyg (hygromycin B)
十六烷基三甲基溴化铵	CTAB (cetyltriethylammonium bromide)
聚合酶链式反应	PCR (polymerase chain reaction)
反转录聚合酶链式反应	RT-PCR (reverse transcriptase-PCR)
绿色荧光蛋白	GFP (green fluorescent protein)
假单胞杆菌番茄致病菌	Pst DC3000 ( <i>Pseudomonas syringae pv. tomato</i> )
延伸因子	Tu EF-Tu (elongation factor Tu)
聚乙二醇	PEG (Polyethylglycol)
甘露醇	Mannitol
ABA 响应元件	ABRE (ABA responsive element)
拟南芥响应因子	ARR (Arabidopsis response regulators)
DRE 结合因子	DREB (DRE binding factor)
乙烯响应因子	ERF (Ethylene-responsive factor)
$\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶	GUS ( $\beta$ -Glucuronidase)
CBF 诱导子 1	ICE1 (Inducer of CBF expression 1)
异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷	IPTG (Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside)
冷诱导	KIN (Cold-induced)
胚胎发育晚期丰富	LEA (Late embryogenesis-abundant)
核定位信号	NLS (Nuclear localization signal)
干旱响应	RD (Responsive to dehydration)
5-溴-4-氯-3-吲哚-D-葡萄糖醛酸	X-gluc(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-glucuronide)
1-氨基环丙烷-1-羧酸	ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid)
油菜素内酯受体相关受体激酶	BAK1 (BRI1-associated receptor kinase 1)
鞭毛蛋白敏感型受体	FLS2 (Flagellin sensitive2)
赤霉素	GA (gibberellins)
细胞分裂素	CK (Cytokinins)
超敏反应与致病性	Hrp (Hypersensitive reaction and pathogenicity)
水杨酸羟化酶	NahG (salicylate hydroxylase gene)
水杨酸诱导缺陷性突变体	SID2 (Salicylic-acid-Induction Deficient 2)
芸苔素内酯	BL (brassinolide)

# 目录

摘要	I
Abstract	III
缩略词	V
目录	VI
Table of Content	VIII
1 绪论	1
1.1 植物与病原菌互作研究的必要性	1
1.2 植物主要抗病信号转导网络	1
1.2.1 植物先天性免疫系统	1
1.2.2 植物适应性免疫系统	3
1.3 非生物胁迫研究的必要性	7
1.4 非生物胁迫与 ABA 信号通路	8
1.4.1 ABA 受体的发现	8
1.4.2 ABA 参与逆境中的种子休眠与萌发	8
1.4.3 ABA 介导渗透胁迫中保卫细胞气孔关闭	9
1.4.4 ABA 在转录水平调控基因表达	9
1.4.5 ABA 与其他重要激素调控主根发育的机制	11
1.4.6 非生物胁迫研究的应用与局限	11
1.5 YWC 基因家族研究现状	12
1.6 研究目标及主要思路	13
2 实验材料与方法	14
2.1 实验材料	14
2.1.1 植物材料	14
2.1.2 菌株与质粒载体	14
2.1.3 实验药品	14
2.1.4 实验溶液配置	14
2.1.5 主要培养基	15
2.1.6 主要仪器设备	16
2.2 实验方法	17
2.2.1 拟南芥种植与收种方法	17
2.2.2 目的基因克隆与克隆鉴定	17
2.2.3 目标表达载体的构建	23
2.2.4 拟南芥的转化与筛选	24
2.2.5 <i>AtST39</i> 原核表达	26
2.2.6 组织染色与亚细胞定位观察	27
2.2.7 拟南芥突变体杂交实验	28
2.2.8 种子萌发与根长实验	28
2.2.9 <i>Psyringae</i> pv. <i>tomato</i> 菌胁迫实验	28
3 实验结果	30
3.1 基因家族进化与结构域分析	30
3.1.1 基因家族进化与功能注释	30
3.1.2 YWC 蛋白家族互作预测	30
3.1.3 目标蛋白结构分析	30
3.2 载体构建与鉴定	33
3.2.1 pENTRY 载体的构建与鉴定	33
3.2.2 LR 反应构建目标表达载体	33

3.2.3	表达载体转化农杆菌的鉴定.....	35
3.2.4	转基因植株鉴定.....	35
3.3	AtST39 原核表达载体构建与蛋白表达.....	38
3.4	PCR 鉴定突变体.....	38
3.5	基因表达谱分析.....	41
3.5.1	基因表达谱显示 AtMPA 参与花粉形成.....	41
3.5.2	基因表达谱显示 AtST39 参与抗逆与发育.....	42
3.6	AtST39 蛋白亚细胞定位.....	45
3.7	AtST39 存在新的选择性剪切体.....	46
3.8	AtST39 依赖于 ABA 调控种子萌发.....	47
3.9	ABA 抑制 T-DNA 突变体的主根伸长.....	48
3.10	突变体中 ABA 响应基因表达情况.....	50
3.11	ABA 与其他激素协同调控突变体主根的伸长.....	51
3.12	Atst39 参与 Psyringae pv.tomato 响应.....	55
4	讨论.....	57
4.1	AtMPA 基因功能与 Auxin、JA 和水解有关.....	57
4.2	AtST39 参与叶与根长发育的机制.....	57
4.3	AtST39 基因表达受到严格的调控.....	59
5	结论与展望.....	61
5.1	结论.....	61
5.2	研究展望.....	61
5.3	研究不足.....	62
	参考文献.....	63
	致谢.....	73

## Table of Content

<b>Abstract (In Chinese)</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract (In English)</b> .....	<b>III</b>
<b>Abbreviations</b> .....	<b>V</b>
<b>Content</b> .....	<b>VI</b>
<b>1 Preface</b> .....	<b>1</b>
1.1 The necessity of studying interactions between plants and microbes.....	1
1.2 Major signal passways in plants immunity .....	1
1.2.1 Plant innate immunity .....	1
1.2.2 Plant adaptive immunity .....	3
1.3 The necessity of studying abiotic stresses Abiotic stresses and ABA.....	7
1.4 Abiotic stresses and ABA .....	8
1.4.1 the discovery of ABA receptor.....	8
1.4.2 ABA involved in seed germination and dormancy in stress .....	8
1.4.3 ABA mediating stomatal closure in guard cell under Osmotic stress.....	9
1.4.4 ABA regulated gene expression at transcription level .....	9
1.4.5 The mechanism of ABA and other phytohormone modulated root length .....	7
1.4.6 Applications and limitations of studying abiotic stresses .....	11
1.4 Current research in YWC gene family .....	11
1.5 Research objectives and strategies .....	12
<b>2 Materials and methods</b> .....	<b>14</b>
2.1 Materials.....	14
2.1.1 Plant materials.....	14
2.1.2 Bacterial strains and plasmid .....	14
2.1.3 Main reagents .....	14
2.1.4 Solution preparation .....	14
2.1.5 Main medium .....	15
2.1.6 Major Apparatus and equipments .....	16
2.2 Methods.....	17
2.2.1 The cultivation and seeds storge of Arabidopsis.....	17
2.2.2 Cloning and identification of target gene.....	17
2.2.3 Construction of target vectors .....	23
2.2.4 Transformation and selection of Arabidopsis .....	24
2.2.5 Prokaryotic expression of AtST39 .....	26
2.2.6 Tissue staining and subcelluar localization observation .....	27
2.2.7 Hybridization of Arabidopsis mutants .....	28
2.2.8 Seed germination and root length measurement .....	28
2.2.9 <i>Psyringae</i> pv. <i>tomato</i> strain inoculation.....	28
<b>3 Results</b> .....	<b>30</b>
3.1 Gene family evolution and domain analysis .....	30
3.1.1 Gene family evolution and Gene Ontology .....	30
3.1.2 Prediction of YWC domain interaction.....	30
3.1.3 Structure analysis of target protein .....	30
3.2 Vector construction and confirmation .....	32
3.2.1 Construction and confirmation of pENTRY vectors.....	32
3.2.2 LR Destination expression vector indentification.....	33
3.2.3 Agrobacterium-mediated vectors transformation and confirmation.....	35

3.2.4	Screening transgenic plants.....	35
3.3	Construction and expression AtST39 prokaryotic vectors.....	38
3.4	Screening transgenic plants by PCR.....	38
3.5	Gene expression profile analysis.....	41
3.5.1	Pollen development meditates by AtMPA.....	41
3.5.2	AtST39 involved in stress response and development.....	42
3.6	Subcelluar localization of AtST39.....	45
3.7	Novel splicing variant of AtST39.....	46
3.8	AtST39 regulate germination dependent on ABA.....	47
3.9	Main root elongation of T-DNA mutants of <i>Atst39</i> inhibited by ABA.....	48
3.10	ABA responsive gene expression in mutant.....	50
3.11	ABA and other hormone regulate main root elongation of mutant.....	51
3.12	<i>Atst39</i> resistant to <i>Psyringae</i> pv. <i>tomato</i> .....	55
<b>4</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>58</b>
4.1	AtMPA gene function conferring to Auxin & JA and hydrolysis.....	58
4.2	Mechanism of AtST39 modulating root length.....	58
4.3	AtST39 expression is tight controlled.....	60
<b>5</b>	<b>Conclusions and perspectives.....</b>	<b>62</b>
5.1	Conclusions.....	62
5.2	Perspective.....	62
5.3	Defects.....	63
	<b>References.....</b>	<b>63</b>
	<b>Acknowledgments.....</b>	<b>74</b>

厦门大学博硕士学位论文摘要库

# 1 绪论

逆境是指植物生长和生存不利的各种环境因素,包括非生物胁迫因子(如干旱、水灾、高温、低温、冷冻、紫外线、盐碱、杀虫剂、除草剂、重金属胁迫、营养匮乏和大气污染等)和生物胁迫因子(如真菌、细菌、病毒、线虫、植食性昆虫以及寄生性植物)。非生物胁迫因素对全世界的农业造成了重大的影响,使绝大多数的农作物平均产量减少50%<sup>[4]</sup>。另一方面,植物还必须防御一系列的害虫和病原菌。植物面对每一种胁迫将产生复杂的细胞层面和分子层面反应,以阻止毒害入侵植物,确保植物能生存下来,但这经常会对植物的生长和产量带来不利<sup>[5]</sup>。

## 1.1 植物与病原菌互作研究的必要性

农作物构成了几乎全世界基本食物的供给。据FAO估计,当前全世界近100万人口由于各种原因得不到足够的食物供给(<http://www.fao.org/isfp/isfp-home/en/>)。而这个问题的部分原因,就是相当一部分的农作物被非人类和非贮藏的害虫所致(估计全球每年损失10%,在病原菌流行期间比例更大)<sup>[6]</sup>。大量的植物病原(小至几百个核苷酸的类病毒大至高等植物)都可以导致不同的作物感病。病原微生物引起病害,有的可以对人类生存、社会安定、国家政治、食品价格、人口数量和政策都产生重大影响,最典型的是马铃薯晚疫病和小麦茎秆黑锈病<sup>[7]</sup>;有的植物病害对农业生产、生物多样性和生态环境造成了巨大的影响,比如威胁植物物种的生存(如荷兰榆树疫病),降低作物的质量和产量,导致植物产生对消费者有毒的物质(如麦角病)<sup>[8]</sup>。植物病原菌难以控制的原因在于,植物病原菌的群体随着时间、空间以及基因型而发生改变。更可怕的是,它们也在进化,经常会克服植物育种工作者花费大量心血挖掘出来的某种抗病性<sup>[8]</sup>。虽然化学农药的使用提高了对植物病害的控制作用,但是这些有毒的化合物在保护植物的同时,也沉积到土壤中导致环境污染,甚至使原有耕地丧失了可耕种性。为了应对病原菌对农作物造成的损失,我们有必要去深入了解病原菌与植物之间的互作,并找到相应的解决方案。降低病原菌的入侵,抑制病原菌的致毒机制和推动农作物遗传多样化手段可以减少病害<sup>[8]</sup>。但是,这些手段的基础在于,揭示植物与病原菌互作的分子遗传规律。它也是认识植物抗病和病原物致病机理,培育持久、广谱抗病作物品种的理论基础<sup>[9]</sup>。

## 1.2 植物主要抗病信号转导网络

### 1.2.1 植物先天性免疫系统

病原菌的生活方式和策略是多样的<sup>[6]</sup>,包括分泌毒素、生长调节素以及其它可以干扰植物细胞代谢或者干涉植物防卫的物质<sup>[10]</sup>,从而完成它们的目标:利用植物做为营养来源去完成生命的循环。但是,由于植物具有坚实的细胞结构,以及植物具有的先天性识别潜在的侵入病原物并激发有效的防卫反应的能力<sup>[11]</sup>,因而能阻止大部分的病原微生物的入侵。植物采取两种途径的先天性免疫系统来应对植物感染病原菌:第一种途径是植物识别和响应大多数微生物共有的分子,包括非寄主病原菌<sup>[12]</sup>,微生物共有的分子包括细菌的脂多糖(lipopolysaccharides, LPS),细菌的冷休克蛋白(cold-shock protein, CSP),鞭毛蛋白(flagellin)和延长因子(elongation factor Tu, EF-Tu)等<sup>[13]</sup>;第二种途径则是

响应病原菌对植物产生直接或间接效应的毒力因子 (pathogen virulence factors) [12]。

### 1.2.1.1 基于细胞表面的模式识别信号途径

植物进化出基于细胞表面的模式识别受体(Pattern recognition receptors, PRRs)识别其中绝大多数病原微生物的病原物相关分子模式(Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), 从而产生病原物相关分子模式触发的免疫(PAMP-Triggered Immunity, PTI)。一些病原微生物则通过分泌效应子来干扰 PTI, 使病原菌获得营养和扩散, 导致植物产生了效应子激活的易感性 (effector-triggered susceptibility, ETS)。之后, 植物进化出能够特异性识别相应效应子且具有 NB-LRR 结构的抗病 R (Resistance) 蛋白, 触发效应子触发的免疫(Effector- Triggered Immunity, ETI), 使植物体再次表现出更强的抗性, 通常在侵染位点产生过敏性细胞死亡反应(Hypersensitive cell death response, HR), 从而阻止病原微生物的进一步侵染。在自然选择的作用下, 病原微生物可能通过丧失原有的效应子并产生新的效应子帮助病原菌抑制 ETI, 进而植物又共进化出新的 NB-LRR 等位基因来再次触发 ETI [12]。

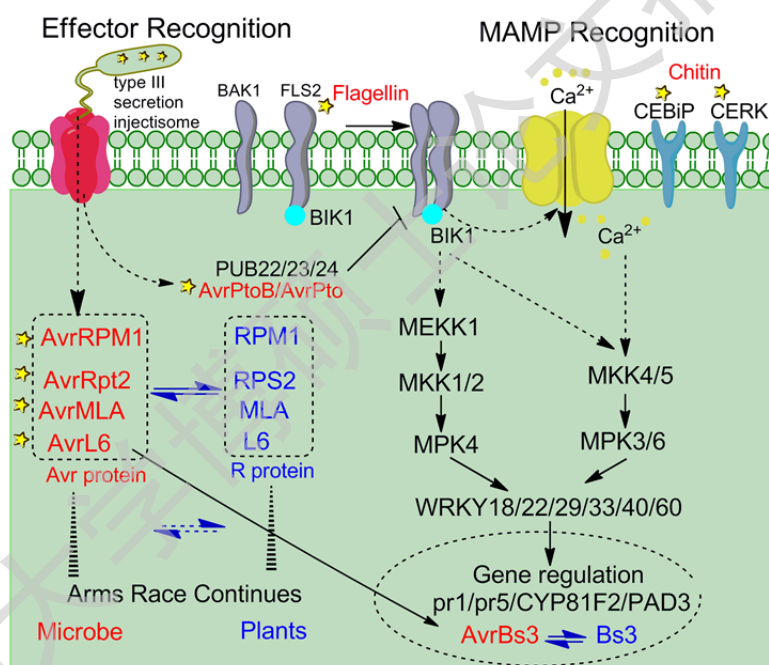


图 1.1 植物先天性免疫系统信号

Figure 1.1 plant innate immunity signaling modified from [1, 2]

Solid lines indicate established interactions, dashed lines represent hypothesized or less well characterized interactions. Red: effector from bacteria or fungi.

### 1.2.1.2 MAPK 及 ROS 信号通路

PRRs 识别保守的 PAMPs 后, 通过保守的 MAPK (mitogen-activated protein kinase) 信号通路 (MAPKKK, MAPKK, MAPK) 产生细胞内的信号转导, 最终通过植物特有转录因子包括 WRKY 超家族, 转录激活防御相关基因 [11]。MAPK 信号通路在所有的真核生物中呈高度保守, 它参与调节发育、生长、细胞程序性死亡和应对各种外界刺激包括冷、热、活性氧爆发、紫外辐射、干旱和病原菌袭击 [14]。细菌鞭毛蛋白衍生物 Flg22 能触发 MPK3, MPK4 和 MPK6 迅速且强有力的激活 [15], 很多病原菌的 *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity) 编码的 harpin 蛋白也能被激活 MPK4 和 MPK6 [16]。在拟南芥中, MPK4 与其上游的 MKK1/2 及 MEKK1 (MEK kinase 1) 形成一条防御反应的信号通路, 这条通



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts 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](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.