

类受体蛋白激酶PBL28参与N-癸酰基高丝氨酸内酯对拟南芥根生长的调控

孙雅娜^{1,2,#}, 何子玮^{1,2,#}, 曹向宇^{2,3}, 赵芊^{2,3}, 刘方^{2,3}, 贾振华^{2,3}, 宋水山^{2,3,*}, 张利平^{1,*}

¹河北大学生命科学学院, 生命科学与绿色发展研究院, 河北保定071002

²河北省科学院生物研究所, 石家庄050051

³河北省主要农作物微生物病害控制工程技术研究中心, 石家庄050051

#并列第一作者

*共同通信作者: 宋水山(shuishans620@163.com)、张利平(zhlping201@163.com)

摘要: N-酰基高丝氨酸内酯(N-acyl-homoserine lactones, AHLs)是一种细菌群体感应信号分子, 由其介导的群体感应(quorum sensing, QS)参与革兰氏阴性菌多种生物学功能的调控。N-癸酰基高丝氨酸内酯(N-decanoyl-homoserine lactone, C10-HSL)是一种中长链的AHLs。前期研究表明, C10-HSL处理可以显著改变植物的根系结构, 并且NO和H₂O₂参与C10-HSL影响植物根系结构的过程。但对于植物如何感知C10-HSL知之甚少。植物中存在大量类受体蛋白激酶, 在植物感应外界环境信息调节其自身生长发育过程中发挥重要作用。但植物类受体蛋白激酶是否参与植物感应细菌QS信号分子, 进而调控植物生理过程尚不清楚。该研究筛选出了对C10-HSL处理抑制根长表型不敏感的拟南芥类受体蛋白激酶缺失突变体, 发现C10-HSL对突变体主根生长的抑制、侧根形成的促进效应与野生型拟南芥Col-0相比明显减弱。进一步分析表明, 突变体中C10-HSL诱导产生的NO和H₂O₂的浓度显著低于Col-0。研究结果初步表明, 植物类受体蛋白激酶PBL28可能参与植物对C10-HSL的感知, 并且通过调控NO和H₂O₂的产生影响C10-HSL对拟南芥根系结构的调控。

关键词: N-癸酰基高丝氨酸内酯; 拟南芥; *pbl28*; 类受体蛋白激酶

Involvement of receptor-like protein kinase PBL28 in the regulation of root growth by N-decanoyl-homoserine lactone in *Arabidopsis*

SUN Yana^{1,2,#}, HE Ziwei^{1,2,#}, CAO Xiangyu^{2,3}, ZHAO Qian^{2,3}, LIU Fang^{2,3}, JIA Zhenhua^{2,3}, SONG Shuishan^{2,3,*}, ZHANG Liping^{1,*}

¹College of Life Sciences, Hebei University, Institute of Life Science and Green Development, Baoding, Hebei 071002, China

²Biology Institute, Hebei Academy of Sciences, Shijiazhuang 050051, China

³Hebei Engineering and Technology Center of Microbiological Control on Main Crop Disease, Shijiazhuang 050051, China

Co-corresponding authors: Song SS (shuishans620@163.com), Zhang LP (zhlping201@163.com)

Abstract: N-acyl homoserine lactones (AHLs) is a quorum-sensing signal molecule in bacteria. Quorum sensing (QS) mediated by AHLs participates in the regulation of various biological processes of Gram-neg-

收稿 2020-12-25 修定 2021-04-07

致谢 河北师范大学生命科学学院汤文强教授惠赠类受体蛋白激酶缺失突变体的种子。

资助 国家重点基础研究计划项目(2015CB150600)和国家自然科学基金(31601144)。

ative bacteria. *N*-decanoyl-homoserine lactone (C10-HSL) is one type of AHL with a medium-length chain. Previous studies have shown that C10-HSL treatment can significantly change the root structure of plants while NO and H₂O₂ participate in the process of C10-HSL affecting plant root structure. However, little is known about how plants perceive C10-HSL. There exist a large number of receptor-like protein kinases in plants, which play an important role in sensing the outside world to facilitate the regulation of plant development. However, it is unclear whether plant receptor-like protein kinases are involved in plant sensing bacterial QS signal molecules and regulating plant physiological processes. The current study isolated a mutant of *Arabidopsis* receptor-like protein kinase PBL28 showing the rather low sensitivity to C10-HSL with respect to root growth compared to wild-type *Arabidopsis* Col-0. It was found that the inhibitory effect on primary root growth and the stimulatory effect on formation of lateral roots of C10-HSL in wild type *Arabidopsis* were significantly alleviated in the mutant *pbl28*. Furthermore, the data showed that the C10-HSL-induced increase in production of NO and H₂O₂ in mutant *pbl28* was remarkably lower than those in wild type *Arabidopsis* Col-0. The preliminary results indicate that the plant receptor-like protein kinase PBL28 might be involved in the perception of plant to C10-HSL and participate in the regulation of *Arabidopsis* root structure by C10-HSL via mediating the production of NO and H₂O₂.

Key words: *N*-decanoyl-homoserine lactone; *Arabidopsis*; *pbl28*; receptor-like protein kinase

许多革兰氏阴性菌利用*N*-酰基高丝氨酸内酯(*N*-acyl-homoserine lactones, AHLs)作为细胞间通讯的信号分子,由其介导的细胞间通讯称为细菌群体感应(quorum sensing, QS) (Holm和Vikstrom 2014)。AHLs均由一个高丝氨酸内酯环和一个酰基侧链组成,其特异性由酰基链的长度(4~18个碳原子)、C3位的取代基(羰基和羟基)和酰基链的饱和水平来决定。AHLs介导的QS在毒力因子产生、共生、抗生素合成、生物膜形成及运动等多种细菌的生理过程中起着至关重要的作用。近年的研究表明,真核宿主可以感知和响应这些细菌群体感应信号(宋水山2010)。3-羰基十二酰基高丝氨酸内酯(3OC12-HSL)是由铜绿假单胞菌(一种囊性纤维化患者的机会致病菌)产生的,可刺激动物细胞内多种宿主信号通路和激活免疫反应(Wagner 2006)。近年来, Moura-Alves等(2019)研究发现,细菌QS分子可以与宿主芳烃受体(AhR)结合,并能显著调节其活性。另一方面,植物生活在复杂的环境中,不断暴露在根际微生物中,包括产生和释放AHLs的致病和有益细菌。大量证据表明,植物进化的手段是感知AHLs,并对其作出生理或分子变化的反应(宋水山2010)。Mathesius等(2003)采用蛋白质组学的方法研究发现,3-羰基十二酰基高丝氨酸

内酯(3OC12-HSL)和3-羰基十六酰基高丝氨酸内酯(3OC16-HSL)两种信号分子处理苜蓿(*Medicago truncatula* A17)导致150多种蛋白质的积累发生了显著变化(Mathesius等2003)。微阵列实验表明,*N*-己酰基高丝氨酸内酯(C6-HSL)可以诱导水杨酸(salicylic acid, SA)和乙烯依赖的防御基因的积累(Schuhegger等2006)。3-羰基十四酰基高丝氨酸内酯(3OC14-HSL)可以通过水杨酸(SA)、氧脂素(Oxylipin)以及蛋白激酶MPK6 (Mitogen-activated protein kinase 6)等途径诱导拟南芥产生抗病性(Schenk等2014)。长链的AHLs (C12-C14-HSLs)可以诱导植物抗病,而短链的AHLs (少于8个碳)可以促进植物主根的伸长。Zhao等研究发现, G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor, GPCR) GCR1和转录因子MYB44参与了3-羰基辛酰基高丝氨酸内酯(3OC8-HSL)对拟南芥主根生长的调控(Zhao等2016)。含有10个碳原子的中长链AHLs,能够显著调节植物的根系形态建成、影响植物的衰老以及防御反应(Ortiz-Castro等2011)。Hu等研究发现, *N*-癸酰基高丝氨酸内酯(*N*-decanoyl-homoserine lactone, C10-HSL)可以通过茉莉酸(Jasmonic acid, JA)信号转导途径激活番茄对灰霉病的系统抗性(Hu等2018)。Ortiz-Castro等研究了七种不同的AHLs

(C4-HSL、C6-HSL、3OC6-HSL、C8-HSL、C10-HSL、C12-HSL、C14-HSL)对拟南芥根系结构的影响,发现C10-HSL可以显著抑制主根伸长,促进侧根和根毛的形成。此外,他们指出C10-HSL介导的根系结构的改变独立于生长素信号转导途径(Ortiz-Castro等2008)。Bai等研究发现3-羧基癸酰基高丝氨酸内酯(3OC10-HSL)通过H₂O₂和NO依赖的cGMP (cyclic Guanosine monophosphate)信号途径促进绿豆不定根的形成(Bai等2012)。

研究表明,植物细胞表面受体在感知胞外环境信号进而调节自身生长发育以适应环境的过程中发挥重要作用。动物细胞膜上存在一种具有激酶活性的跨膜受体蛋白,这种受体蛋白通过胞外结构域与配体的结合利用其胞内激酶结构域催化底物蛋白磷酸化,从而完成对细胞生理反应的调控。植物中存在多个与动物受体蛋白激酶同源的基因,由于大多数受体蛋白的配体还未找到,故称之为类受体蛋白激酶(receptor like-kinases, RLKs) (Walker和Zhang 1990)。植物类受体蛋白激酶根据其结构主要分为两类,分别为具有胞外结构域、跨膜结构域和胞内激酶结构域的跨膜受体蛋白激酶RLKs和缺少胞外结构域或跨膜结构域的胞质受体蛋白激酶(Receptor-like cytoplasmic kinases, RLCKs) (Shiu等2001)。

植物类受体蛋白激酶最早发现于玉米(Walker 1990),进而在马铃薯(Montesano等2001),大豆(Liu等2009)中相继发现植物类受体蛋白激酶。目前为止,在拟南芥中已发现约600多种RLKs,其中RLCKs约160多种,总的RLKs占拟南芥基因组的2.5% (Shiu等2001)。大量植物RLKs的发现,暗示着植物能够感应大量信号,同时表明了其在植物生长发育过程中的重要作用。Hazako等(2017)发现,拟南芥中不同的CLE (CLAVATA3/embryo surrounding region-related)肽配体及其同源的CLAVATA (CLV)均可与类受体激酶BAM (barely any meristem)发生相互作用,从而完成信号转导,调控根的生长发育。类受体蛋白激酶RGFR (root meristem growth factor receptor)可以感应RGF (root meristem growth factor)肽,参与其调控拟南芥根的分生组织的大小(Ou等2017)。油菜素内酯信号激酶(brassinosteroid-

signalling kinase, BSK)是RLCK-XII亚家族的一员,参与BR (brassinosteroid)信号途径的信号转导。Tang等研究表明,AtBSK3可以通过BR信号途径调控拟南芥根和胚轴的生长发育(Tang等2008)。类受体蛋白激酶不仅影响植物的生长发育,而且能够调控植物应对多种胁迫。拟南芥RLCK-VII家族的PBS1 (AvrPphB susceptible 1)、BIK1 (Botrytis-induced kinase 1)、PBL1 (PBS1-like kinase 1)、PBL2、PBL27等均可以参与植物免疫信号的传递。BIK1和PBL参与激活由elf18、AtPep1以及几丁质诱导产生的免疫反应。PBL2是AvrPphB蛋白酶的底物,在没有flg22的情况下,它与FLS2 (flagellin-sensing 2)相互作用(Zhang等2010)。BSK1与FLS2结合可以参与调控ROS (reactive oxygen species)的生成,当BSK1缺失时,flg22诱导的ROS大量减少,病原菌诱导的SA的积累受到阻碍,并且对白粉菌、丁香假单胞菌和卵菌易感(Shi等2013)。在无病原菌感染时,PBL13可以结合RBOHD (respiratory burst oxidase homolog protein D)负调控植物先天免疫途径(Lin等2015)。

活性氧(ROS)和NO (nitric oxide)是参与调控植物系统获得性抗性(systemic acquired resistance, SAR)、超敏反应(hypersensitive response, HR)、气孔关闭以及根系生长等(Schuhegger等2006; Ortiz-Castro等2008; Zhao等2019)各种生理反应过程的重要信号分子。Zhang等发现,ROS和NO参与外源H₂S抑制拟南芥主根生长的过程(Zhang等2017)。C6-HSL、C8-HSL和C12-HSL处理诱导NO在大麦根冠和伸长区积累,并且改变根系形态(Rankl等2016)。可见NO和H₂O₂在植物感应信号刺激的过程中发挥着重要作用。

不同的AHLs在影响植物生长发育方面被研究的较为深入,但对于植物如何感知C10-HSL知之甚少。本实验室前期研究发现,C10-HSL处理可以显著改变植物的根系结构,并且NO和H₂O₂参与C10-HSL影响植物根系结构的过程(另文发表)。类受体蛋白激酶在植物感知外界进而调节植物生长发育过程中发挥重要作用,但植物类受体蛋白激酶是否参与植物感应细菌QS信号分子,进而调控植物生理过程尚不清楚。

该研究首先筛选对C10-HSL处理抑制根长表型不敏感的拟南芥类受体蛋白激酶缺失突变体,进而分析C10-HSL处理对拟南芥类受体蛋白激酶缺失突变体*pbl28*主根生长和侧根形成的影响,并研究PBL28缺失突变对C10-HSL诱导细胞内NO和H₂O₂产生水平的影响,以探究PBL28是否参与植物对C10-HSL的感知以及调控植物根生长的作用机制。

1 材料和方法

1.1 拟南芥的培养

拟南芥野生型(*Arabidopsis thaliana* L. Columbia, Col-0)由本实验室保存,161种拟南芥类受体蛋白激酶缺失突变体由河北师范大学生命科学学院汤文强教授惠赠。将拟南芥种子用75%的乙醇表面消毒1 min, 25%的次氯酸钠消毒5 min,再用无菌水清洗5次,散点于MS固体培养基(pH 5.8)。将培养基放置在4°C条件下,春化2 d后转移至光照培养箱中培养(培养条件:温度22°C,光照周期12 h光照/12 h黑暗,光照强度100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)。种子在MS培养基中生长10 d左右,将幼苗移入浸透营养液的蛭石中继续培养,取生长1个月左右的拟南芥叶片,提取基因组DNA和RNA,用于突变体鉴定。在MS培养基中竖直生长3 d,选取根长一致的幼苗转移到含有或未含有C10-HSL的1/2MS固体培养基中竖直培养7 d,用于根长、侧根以及分生组织的统计分析。在MS固体培养基中竖直培养至根长为1.5~2 cm,采用激光扫描共聚焦显微镜的荧光强度检测系统检测根中H₂O₂和NO的产生情况。

1.2 实验试剂

C10-HSL、5,6-Diaminofluorescein diacetat (DAF-2DA)、2,7-Dichlorodihydr-ofluorescein diacetate (DCFH-DA)以及碘化丙啶(propidium iodide, PI)均购自Sigma公司。用无水乙醇溶解C10-HSL,制备浓度为30 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的C10-HSL母液,使用前加入固体或液体培养基中稀释至终浓度为30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。DAF-2DA和DCFH-DA母液浓度均为10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,PI母液浓度为1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。TaqTM DNA聚合酶和TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0试剂盒均购自TaKaRa公司。

1.3 突变体鉴定

突变体的鉴定从两个方面进行:DNA水平和RNA水平的检测。DNA水平上的检测:取在浸透营养液的蛭石中生长1个月左右的拟南芥幼苗的叶片,提取基因组DNA,该DNA作为模板,采用三引物PCR法,进行PCR扩增。植物类受体蛋白激酶PBL28基因的特异引物为LP: 5'-TAGGTGCAATG-CAATAAAGCC-3'; RP: 5'-CTGCTGTTCTGTAG-ACCCCTG-3'。T-DNA上的引物为LB: 5'-GCGTG-GACCGCTTGCTGCAACT-3'。RNA水平上的检测:采用TRIzol法提取拟南芥叶片的总RNA,进行RT-PCR转录水平的分析。以反转录获得的cDNA作为模板,用植物类受体蛋白激酶PBL28基因的特异引物为LP和RP进行PCR扩增,并用*actin*基因表达作为对照,*actin*引物为F: 5'-CCAGAAGGATGCATAT-GTTGGTGA-3'; R: 5'-GAGGAGCCTCGGTA-AGAAGA-3'。用于PCR扩增的引物由上海生工合成,PCR扩增产物均用1%的琼脂糖凝胶电泳进行检测分析。

1.4 拟南芥主根和侧根的测定

拟南芥野生型Col-0和类受体蛋白激酶缺失突变体*pbl28*的种子在MS培养基中生长3 d后,转移至含有30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ C10-HSL的1/2MS培养基中,竖直培养7 d,测量主根长度。在显微镜下测量侧根的数目,平均每毫米根长的侧根数量即为侧根密度。实验重复4次,每次不少于30根幼苗。

1.5 PI染色分析拟南芥主根分生组织的变化

拟南芥的培养条件与主根测定一致,取在含有1/2MS培养基中生长7 d的幼苗,用10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PI染色2 min,无菌水清洗3次,将幼苗压片进行激光扫描共聚焦显微镜分析(激发波长为536 nm,PI的最大发射波长为617 nm)分生组织的变化。

1.6 拟南芥中NO和H₂O₂的分析

用DAF-2DA和DCFH-DA染色分析拟南芥中NO和H₂O₂的分布。拟南芥幼苗在MS培养基上竖直培养至主根长度为2 cm左右,移至含有30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ C10-HSL的1/2MS培养基中,分别竖直培养至48 h和24 h,将幼苗用10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DAF-2DA和DCFH-DA染液染色30 min,用蒸馏水洗3次后压片,采用激光扫描共聚焦显微镜的荧光强度检测系统检测

NO和H₂O₂的荧光强度(激发波长488 nm; 发射波长500~550 nm)。

1.7 统计分析

实验数据均通过DPS v7.05统计软件, 采用邓肯新复级差法进行显著性分析。

2 实验结果

2.1 拟南芥类受体蛋白激酶缺失突变体*pbl28*的筛选和鉴定

Ortiz-Castro等(2008)比较了七种不同的AHLs (C4-HSL、C6-HSL、3OC6-HSL、C8-HSL、C10-HSL、C12-HSL、C14-HSL)对拟南芥根系建成的影响, 发现C10-HSL显著抑制主根伸长、促进侧根和根毛的形成。本实验室在前期研究中也发现在所检测的10种AHLs中, C10-HSL对拟南芥主根生长的抑制效应和对侧根形成的促进效应最明显(结果另文发表)。为探究类受体蛋白激酶在细菌AHLs调控拟南芥根系生长过程中的作用, 我们对

获得的161种拟南芥类受体蛋白激酶缺失突变体对C10-HSL处理的敏感性进行了检测。结果发现, 5株突变体对C10-HSL处理表现出不同程度的不敏感表型, 其中突变株*pbl28*对C10-HSL处理的不敏感性最显著(结果未显示)。因此, 我们选择突变株*pbl28*为材料做进一步研究。

利用Tair网站(<https://www.arabidopsis.org/>)查询到PBL28基因CDS为1 128 bp, 编码375个氨基酸, 分子质量约为43 kDa。该基因的T-DNA插入缺失突变体*pbl28*的突变体号为salk_103160。经<https://www.signal.salk.edu/>分析, salk_103160 T-DNA插入到PBL28基因的第七个外显子上(图1-A)。用该基因的特异引物LP和RP对*pbl28*进行DNA水平鉴定。PCR扩增结果显示, 野生型中有大小为1 128 bp的条带, *pbl28*中无该条带; 用RP和LB同时进行PCR扩增, *pbl28*中有条带, 而野生型中无该条带(图1-B)。用PBL28基因的特异引物对突变体进行RNA水平上的鉴定。结果显示, 野生型上可以扩增出对应的

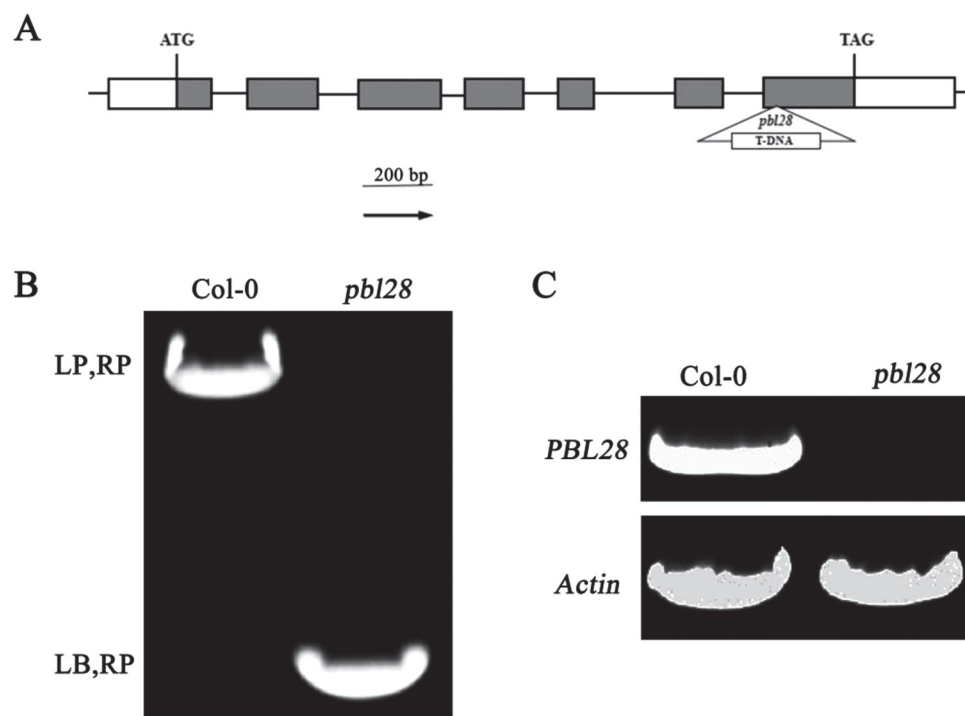


图1 拟南芥PBL28基因T-DNA插入位点及突变体鉴定

Fig. 1 T-DNA insertion site of PBL28 gene in *Arabidopsis thaliana* and the identification of mutants

A: PBL28基因T-DNA插入位点(灰色方框代表外显子); B: 突变体DNA水平上的鉴定; C: 突变体RNA水平上的鉴定。

条带,但在突变体中未扩增出(图1-C),该结果表明T-DNA的插入使得突变体中*PBL28*基因完全被敲除,即突变体*pbl28*为纯合子。

2.2 C10-HSL对拟南芥Col-0和*pbl28*主根生长和侧根形成的影响

本实验室前期采用不同浓度(0~75 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的C10-HSL处理拟南芥幼苗,发现30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ C10-HSL对拟南芥根系结构的影响最大(另文发表),故后续试验采用30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ C10-HSL。选取在MS培养基中竖直生长3 d、根长一致的Col-0和*pbl28*幼苗转移到含有30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ C10-HSL的固体培养基中,继续竖直培养7 d。未加入C10-HSL的培养基为对照(CK)。如图2-A和B所示,30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ C10-HSL处理显著抑制拟南芥Col-0的主根生长,抑制率达41.02%;但同样浓度的C10-HSL处理对*pbl28*主根长度的抑制效应显著减弱,抑制率仅为14.91%。

另一方面,30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ C10-HSL处理显著增加Col-0的侧根密度,与未处理对照相比侧根密度增加了3倍,而在*pbl28*中C10-HSL处理后侧根密度比对照增加了2倍(图2-A和C)。结果表明,类受体蛋白激酶基因*PBL28*的缺失减弱了C10-HSL处理拟南芥主根生长的抑制效应和侧根形成的促进效应。

2.3 C10-HSL对拟南芥Col-0和*pbl28*主根分生区的影响

分生组织细胞的分裂影响着主根的生长。为探究C10-HSL对拟南芥Col-0和*pbl28*主根分生组织细胞分裂的影响,我们用PI染液处理拟南芥幼根,之后对主根根尖进行共聚焦分析。结果发现,30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ C10-HSL处理导致Col-0的分生区长度缩短了39.24%,皮层细胞数目减少了37%;而*pbl28*的分生区长度变化明显小于野生型,只缩短了15.13%,皮层细胞数目仅仅减少了7% (图3-A~C)。

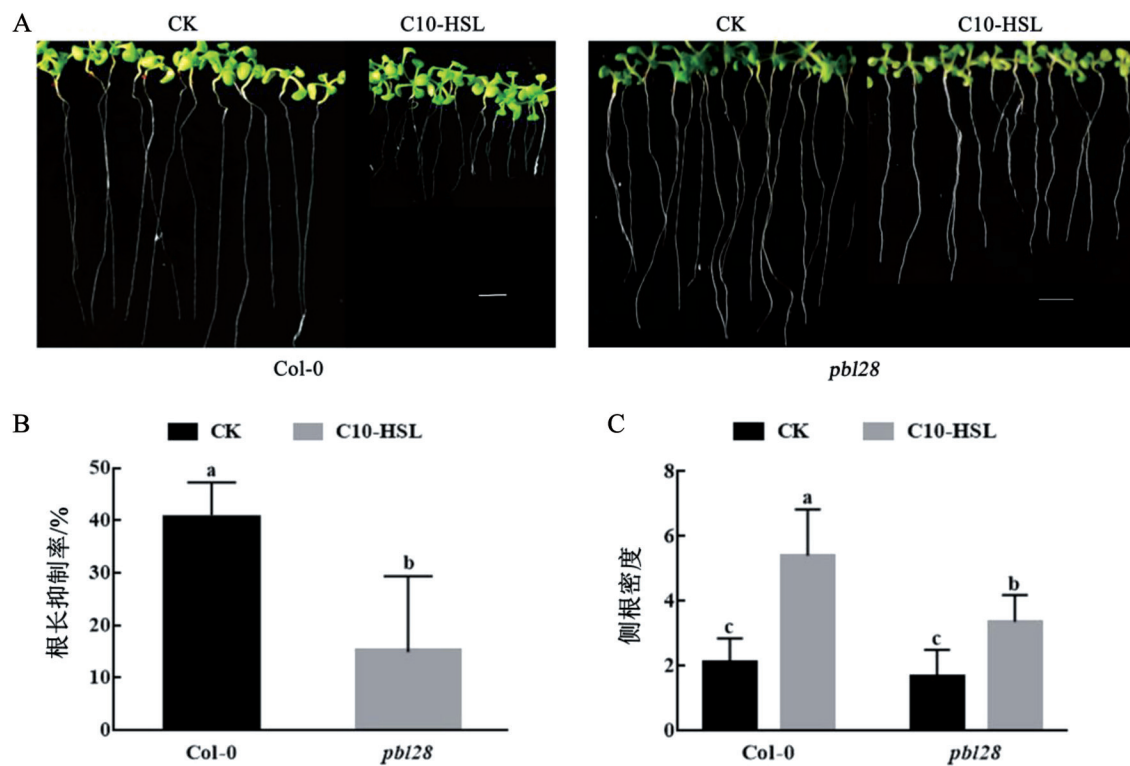


图2 C10-HSL对Col-0和*pbl28*主根和侧根生长的影响

Fig. 2 Effect of C10-HSL on growth of primary root growth and lateral root development of Col-0 and *pbl28*

A: Col-0和*pbl28*根长表型图(图片中的标尺均为1 cm); B: Col-0和*pbl28*根长的统计分析; C: Col-0和*pbl28*侧根数量的统计分析。

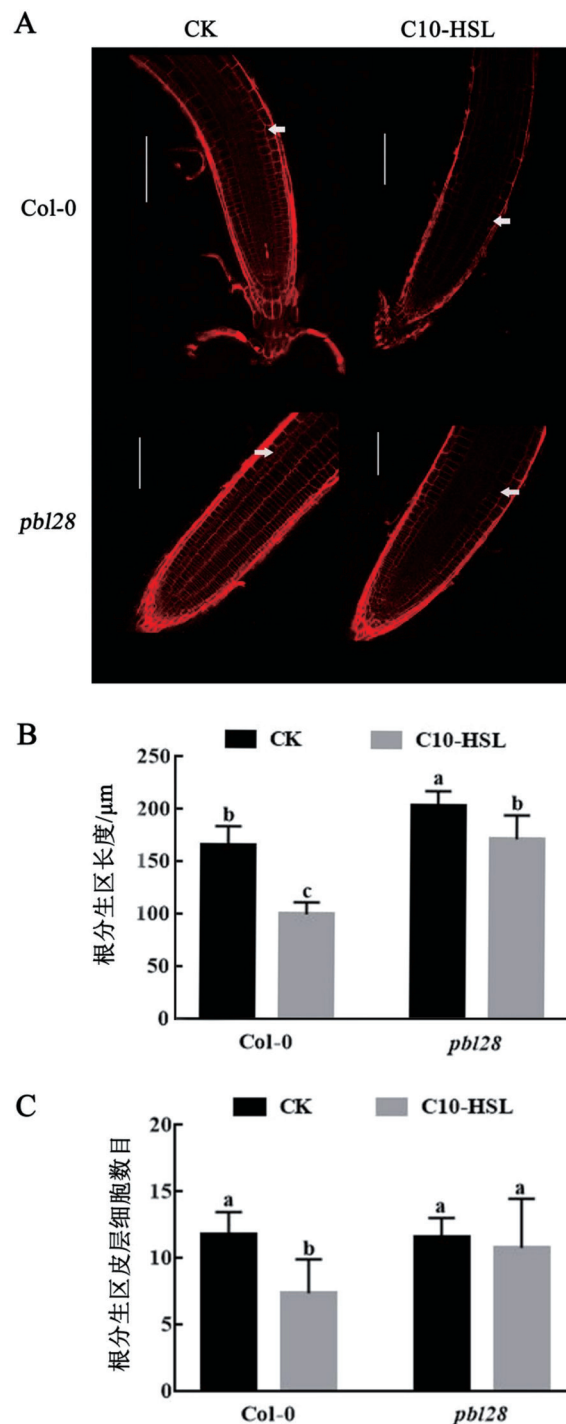


图3 C10-HSL对Col-0和Fig. 3 Effect of C10-HSL on meristem of Col-0 and *pbl28*

A: Col-0和

数据表明, C10-HSL可能通过调节主根分生组织细胞生长和分裂抑制拟南芥主根生长, PBL28蛋白参与这一过程。

2.4 C10-HSL对拟南芥Col-0和

NO是重要的气体信号分子, 在调节植物根系发育中发挥着重要作用(Zhang等2017)。有报道表明, C6-HSL、C8-HSL和C12-HSL处理诱导NO在大麦根冠和伸长区积累, 并且改变根系形态(Rankl等2016)。本实验室前期研究发现, NO参与C10-HSL介导的对植物主根的抑制过程(另文发表)。为研究类受体蛋白激酶PBL28是否通过调控C10-HSL诱导产生的NO而影响拟南芥根系生长, 我们采用NO特异性荧光探针4,5-二氨基荧光素二乙酸酯(DAF-2DA)的染料分析PBL28的缺失对C10-HSL处理导致NO合成的影响。荧光检测发现C10-HSL可使Col-0根中的NO含量大幅度增加, 是对照组的2倍。但在突变体

2.5 C10-HSL对拟南芥Col-0和2O₂水平的影响

H₂O₂是一种重要的信号分子, 参与调节植物的生长发育(Zhao等2019)。Bai等(2012)研究发现, 3OC10-HSL通过H₂O₂和NO依赖的cGMP信号途径促进绿豆不定根的形成。本实验室研究表明, H₂O₂参与C10-HSL介导的对植物主根的抑制过程(另文发表)。为研究类受体蛋白激酶PBL28是否通过调控C10-HSL诱导产生的H₂O₂而影响拟南芥根系生长, 采用活性氧特异性荧光探针5-(和-6)-氯甲基-29, 79-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)的染料分别对Col-0和2O₂显著增加, 加C10-HSL的处理组与未加任何处理的对照组相比, H₂O₂的含量是对照组的7倍。但在突变体2O₂大幅度减少, 与对照组相比没有显著性差异(图5-A和B)。结果表明, 类受体蛋白激酶PBL28正调控C10-HSL诱导产生的H₂O₂。

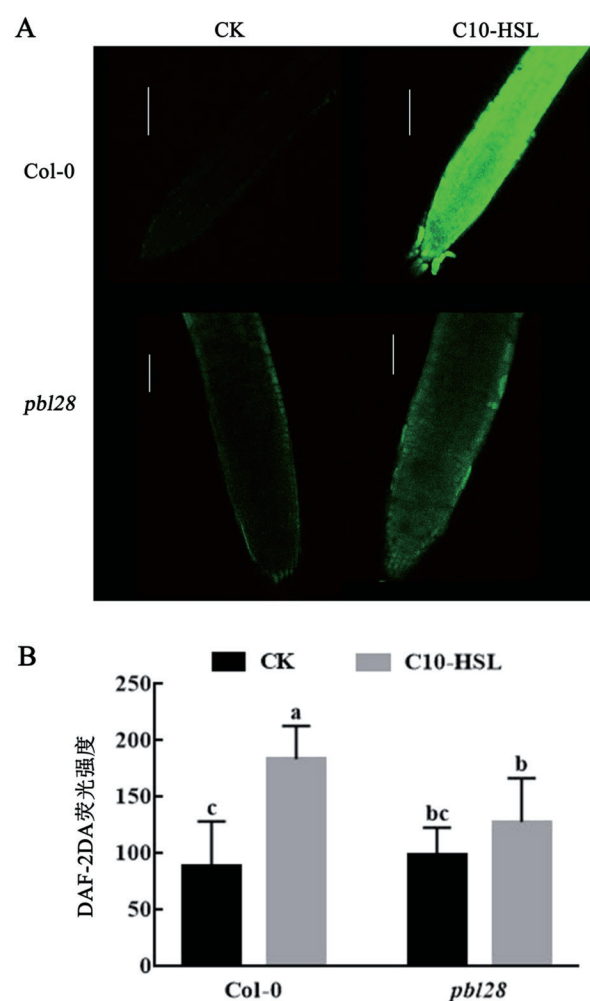


图4 C10-HSL对Col-0和*pbl28*中NO水平的影响
Fig. 4 Effect of C10-HSL on NO production of Col-0 and *pbl28*

A: Col-0和*pbl28*主根DAF-2DA染色, 分析荧光强度的扫描图像(图片中的标尺均为100 μm); B: Col-0和*pbl28*根中DAF-2DA荧光强度的统计分析。

3 讨论

植物和土壤环境中的微生物长期共生共存、共同进化, 形成多种感知对方、适应对方的跨界信息交流机制。AHLs是革兰氏阴性菌感应种群密度调节其群体行为的细胞间通讯信号分子(Holm和Vikstrom 2014)。越来越多的证据表明, AHLs不仅能够细菌的多种生理过程中发挥重要作用, 还能够被植物感知, 进而调控植物的生长发育以及防御反应等(Ortiz-Castro等2008)。C10-HSL是

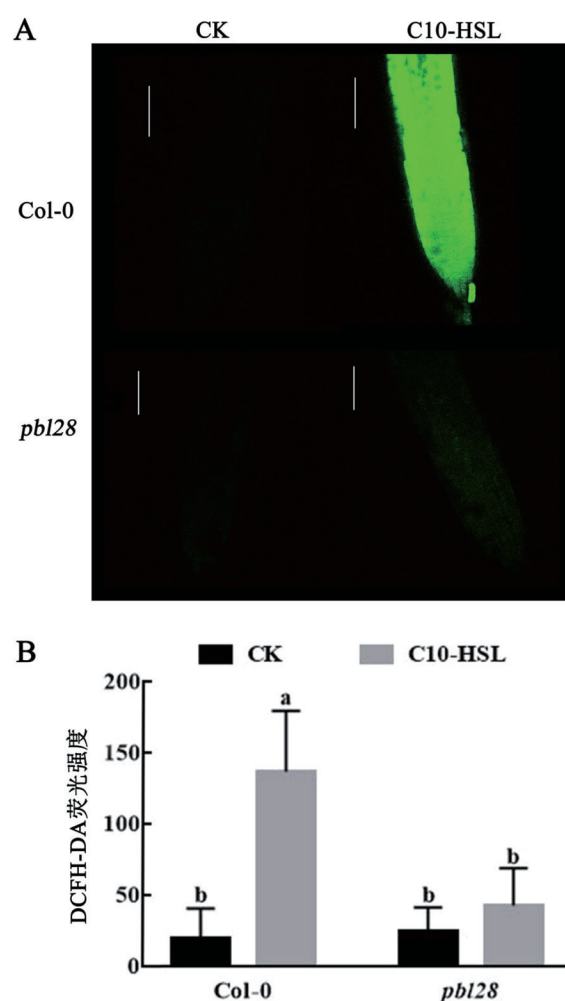


图5 C10-HSL对Col-0和*pbl28*中 H_2O_2 水平的影响
Fig. 5 Effect of C10-HSL on H_2O_2 production of Col-0 and *pbl28*

A: Col-0和*pbl28*主根DCFH-DA染色, 分析荧光强度的扫描图像(图片中的标尺均为100 μm); B: Col-0和*pbl28*根中DCFH-DA荧光强度的统计分析。

一种中链AHLs, 由一些有益的根际细菌产生, 如荧光假单胞菌F113 (Laue等2000)和苜蓿中华根瘤菌(Marketon 2002)。C10-HSL能够抑制拟南芥主根的伸长, 促进侧根和根毛的发生, 从而影响根系结构(Ortiz-Castro等2008)。Bai等(2012)研究表明, C10-HSL的衍生物3OC10-HSL能够促进绿豆不定根的形成。本实验室也进一步证实了C10-HSL对拟南芥根系建成的影响(结果另文发表)。但对植物感知C10-HSL的分子机制知之甚少。本研究从拟南

芥类受体蛋白激酶突变体库中筛选到一株突变体 *pbl28*。研究表明, 突变体 *pbl28* 中 C10-HSL 对主根生长的抑制效应和对侧根形成的促进效应显著减弱(图2)。进一步分析发现, *pbl28* 根中分生区细胞的分裂受 C10-HSL 的抑制程度明显小于 Col-0 (图3)。这些结果预示着类受体蛋白激酶 PBL28 参与 C10-HSL 对拟南芥根系生长结构的调节, 尽管当前数据有待通过基因回复突变和基因超表达分析进一步验证。

类受体蛋白激酶通常定位在细胞膜, 一般是由胞外结构域、跨膜结构域和胞内激酶结构域三部分组成, 称之为跨膜受体; 但有一部分类受体蛋白激酶不存在胞外结构域或跨膜结构域, 而是整体都在细胞质中, 即胞质类受体蛋白激酶(RLCKs)。据报道, 拟南芥中有 160 多种 RLCK。研究表明, RLCKs 在植物感应病原体的侵入、激素刺激、光温度变化等信号刺激并做出应答的过程中发挥着重要的作用(Yang等2004)。根部特异性表达的 ARSK1 (*Arabidopsis* root-specific kinase 1) 参与拟南芥渗透胁迫信号的转导(Hwang等2002)。钙结合类受体胞质蛋白激酶 AtCRCK1 的表达受 H_2O_2 、盐、ABA 及低温等的调控, 在非生物胁迫应答中发挥作用(Yang等2004)。PBL28 是胞质类受体蛋白激酶亚家族 VII 中的一员, PBS1、PBL1、PBL2 等均属于这一亚家族。不同的 PBL 可能参与不同的信号传递途径, 即使同一 PBL 在感应不同信号的过程中也可能发挥不同的作用。PBS1、PBL2 参与植物免疫信号的传递(Zhang等2010)。在无病原菌侵染时, PBL13 可以结合 RBOHD (Respiratory burst oxidase homolog protein D) 负调控植物先天免疫反应(Lin等2015)。PBL27 参与几丁质诱导的植物免疫反应(Shinya等2014)。PCRK1 和 PCRK2 通过激活 SA 合成参与植物免疫(Kong等2016)。BSK1 参与 flg22 诱导的防卫反应, 但不参与 elf18 诱导的免疫(Shi等2013), 而 PBL13 负调控 flg22 和 elf18 诱导的免疫反应(Lin等2015)。本研究发现, PBL28 参与细菌 AHL 调控拟南芥根生长过程, 丰富了 PBL28 的生物学功能。尽管 PBL28 与 PBS1、PBL1、PBL27、PBL13 以及 PBL2 同属一亚家族, 但其蛋白序列与其他 PBL 的同源性很低, 可能具有特有的生物学功

能, 这也可能解释本研究中 PBL28 单突变导致的强表型。同样, Wei 等研究发现, 在 *pbl1*、*pbl5*、*pbl7*、*pbl27*、*pbl31*、*pbl32* 等单突变体中 nlp20 处理 ROS 水平无显著影响, 但显著升高突变体 *pbl28* 中的 ROS 水平, 说明 PBL28 与其他 PBL 基因的功能互补性较差(Wei 2017)。

H_2O_2 和 NO 是重要的气体类信号分子, 在调控植物生长发育、抗病反应和抵御逆境胁迫中发挥着重要作用。据报道 H_2O_2 、NO 和 cGMP 参与了 3OC10-HSL 诱导的绿豆不定根的发育(Bai等2012)。本实验室前期研究发现, C10-HSL 调控拟南芥根系结构依赖于 NO 和 H_2O_2 信号途径(结果另文发表)。本研究发现, 拟南芥中受体激酶 PBL28 的缺失降低了 C10-HSL 诱导的 NO 和 H_2O_2 的水平(图4和5), 表明 PBL28 有可能通过调节 NO 和 H_2O_2 的水平参与 C10-HSL 对植物根生长发育的调控。

植物根系的建成是维系植物生长发育的重要系统, 根系结构的变化有助于提升植物吸收水分和摄取养分的能力, 也增加了植物抵御环境胁迫的能力。本研究初步分析了细菌群体感应信号分子调控植物根系生长的分子机制, 初步明确了 PBL28 可能在植物-微生物互作中发挥重要作用, 为研究植物与细菌跨界交流的信号转导机制提供一定的参考依据, 也为研究 AHLs 对植物生长发育的影响以及进一步的应用开辟新的途径。

参考文献(References)

- Bai X, Todd CD, Desikan R, et al (2012). *N*-3-oxo-decanoyl-L-homoserine-lactone activates auxin-induced adventitious root formation via hydrogen peroxide and nitric oxide-dependent cyclic GMP signaling in mung bean. *Plant Physiol*, 158: 725–736
- Hazak O, Brandt B, Cattaneo P (2017). Perception of root-active CLE peptides requires COR YNE function in the phloem vasculature. *EMBO Rep*, 18: 1367
- Holm A, Vikstrom E (2014). Quorum sensing communication between bacteria and human cells: signals, targets, and functions. *Front Plant Sci*, 5: 309
- Hu Z, Shao S, Zheng C, et al (2018). Induction of systemic resistance in tomato against *Botrytis cinerea* by *N*-decanoyl-homoserine lactone via jasmonic acid signaling. *Planta*, 247: 1217–1227
- Hwang I, Goodman HM (2002). An *Arabidopsis thaliana*

- root-specific kinase homolog is induced by dehydration, ABA, and NaCl. *Plant J*, 8: 37–43
- Kong Q, Sun T, Qu N, et al (2016). Two redundant receptor-like cytoplasmic kinases function downstream of pattern recognition receptors to regulate activation of SA aiosynthesis. *Plant Physiol*, 171: 1344–1354
- Laue BE, Jiang Y, Chlabra SR, et al (2000). The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the rhizobium small bacteriocin, *N*-(3-hydroxy-7-*cis*-tetradecenoyl) homoserine lactone, via HdtS, a putative novel *N*-acylhomoserine lactone synthase. *Microbiology*, 146: 2469–2480
- Lin ZJD, Liebrand TWH, Yadeta KA, et al (2015). PBL13 is a serine/threonine protein kinase that negatively regulates *Arabidopsis* immune responses. *Plant Physiol*, 169: 2950–2962
- Liu P, Wei W, Ouyang S, et al (2009). Analysis of expressed receptor-like kinases (RLKs) in soybean. *J Genet Genomics*, 36: 611–619
- Marketon MM, Eberhard A, González JE (2002). Characterization of the *Sinorhizobium meliloti* sinR/sinI locus and the production of novel *N*-acyl homoserine lactones. *J Bacteriol*, 184: 5686–5695
- Mathesius U, Mulders S, Gao M, et al (2003). Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 1444–1449
- Montesano M, Kiv V, Me A, et al (2001). Novel receptor like protein kinases induced by *Erwinia carotovora* and short oligogalacturonides in potato. *Mol Plant Pathol*, 2: 339–346
- Moura-Alves P, Puyskens A, Stinn A, et al (2019). Host monitoring of quorum sensing during *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Science*, 366
- Ortiz-Castro R, Diaz-Perez C, Martinez-Trujillo M, et al (2011). Transkingdom signaling based on bacterial cyclodipeptides with auxin activity in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108: 7253–7258
- Ortiz-Castro R, Martínez-Trujillo M, López-Bucio J (2008). *N*-acyl-L-homoserine lactones: a class of bacterial quorum-sensing signals alter post-embryonic root development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ*, 31: 1497–1509
- Ou Y, Li J (2017). Three divergent approaches identified the same RGF1 receptors in *Arabidopsis thaliana*. *Sci China Life Sci*, 60: 1040–1043
- Rankl S, Gunse B, Sieper T, et al (2016). Microbial homoserine lactones (AHLs) are effectors of root morphological changes in barley. *Plant Sci*, 253: 130–140
- Schenk ST, Hernández-Reyes C, Samans B, et al (2014). *N*-acyl-homoserine lactone primes plants for cell wall reinforcement and induces resistance to bacterial pathogens via the salicylic acid/oxylin pathway. *Plant Cell*, 26: 2708–2723
- Schuhegger R, Ihring A, Gantner S, et al (2006). Induction of systemic resistance in tomato by *N*-acyl-L-homoserine lactone-producing rhizosphere bacteria. *Plant Cell Environ*, 29: 909–918
- Shi H, Shen QJ, Qi YP, et al (2013). BRSIG-NALING KINASE 1 physically associates with FLAGELLIN SENSING 2 and regulates plant innate immunity in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 25: 1143–1157
- Shinya T, Yamaguchi K, Desaki Y, et al (2014). Selective regulation of the chitin-induced defense response by the *Arabidopsis* receptor-like cytoplasmic kinase PBL27. *Plant J*, 79: 56–66
- Shiu SH, Bleecker AB (2001). Receptor-like kinases from *Arabidopsis* from a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 10763–10768
- Song S (2010). Communication between bacteria and their eukaryotic host mediated by *N*-acyl homoserine lactones. *Chin J Cell Biol*, 32: 331–335 (in Chinese with English abstract) [宋水山(2010). *N*-酰基高丝氨酸内酯介导的细菌与真核寄主之间的信息交流. 中国细胞生物学学报, 32: 331–335]
- Tang W, Kim TW, Osés-Prieto JA, et al (2008). BSKs Mediate signal transduction from the receptor kinase BRI1 in *Arabidopsis*. *Science*, 321: 557–560
- Wagner VE, Barth RK, Iglewski BH (2006). Quorum sensing: dynamic response of *Pseudomonas aeruginosa* to external signals. *Trends Microbiol*, 14: 55–58
- Walker JC, Zhang R (1990). Relationship of a putative receptor protein kinase from maize to the S-locus glycoproteins of Brassica. *Nature*, 345: 743–746
- Wei LW (2017). Comparative analysis of signaling pathways triggered by different pattern-recognition receptor-types (dissertation). Baden: Eberhard Karls Universität Tübingen
- Yang T, Chaudhuri S, Yang L, et al (2004). Calcium/Calmmodulin upregulates a cytoplasmic receptor-like kinase in plants. *J Biol Chem*, 279: 42552–42559
- Zhang P, Luo Q, Wang R, et al (2017). Hydrogen sulfide toxicity inhibits primary root growth through the ROS-NO pathway. *Sci Rep*, 7: 868
- Zhao Q, Li M, Jia Z, et al (2016). AtMYB44 positively regulates the enhanced elongation of primary roots induced by *N*-3-oxo-hexanoyl-homoserine lactone in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact*, 29: 774–785
- Zhao Y, Zhang Y, Liu F, et al (2019). Hydrogen peroxide is involved in methane-induced tomato lateral root formation. *Plant Cell Rep*, 38: 377–389