

· 研究报告 ·

异源过表达水稻OsSAPP3基因促进拟南芥叶片衰老

崔胜男^{1,2}, 张艺函¹, 徐凡^{1*}

¹沈阳农业大学水稻研究所, 农业部东北水稻生物学与遗传育种重点实验室, 北方超级粳稻育种
教育部重点实验室, 沈阳 110866; ²抚顺四方高级中学, 抚顺 113122

摘要 蛋白磷酸酶催化的蛋白质可逆磷酸化反应是叶片衰老的关键环节。该研究筛选并克隆了1个新的参与水稻(*Oryza sativa*)叶片衰老调控的PP2C基因OsSAPP3。研究表明, OsSAPP3的启动子在*Pro*_{OsSAPP3}-GUS转基因拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的莲座叶中有活性, 并且活性以依赖叶龄方式增加。利用CaMV 35S启动子驱动组成型异源过表达OsSAPP3导致转基因拟南芥无法正常生长。用可诱导型启动子GVG系统驱动OsSAPP3异源过表达导致转基因拟南芥出现莲座叶变小、数量增加、叶片早衰及抽薹开花提前等早衰表型。外源诱导OsSAPP3基因异源过表达后, 利用实时荧光定量PCR检测到SAG12、WRKY6和NAC2等衰老标志基因显著上调表达。研究结果表明, OsSAPP3是参与水稻叶片衰老的正向调控因子。

关键词 拟南芥, 叶片衰老, OsSAPP3, 2C型蛋白磷酸酶

崔胜男, 张艺函, 徐凡 (2019). 异源过表达水稻OsSAPP3基因促进拟南芥叶片衰老. 植物学报 54, 46–57.

生理和遗传学研究表明, 植物叶片衰老是一个受调控的细胞程序性死亡过程(PCD), 包含诸多有序事件的发生(肖冬等, 2014)。植物进入衰老阶段后, 自动激活自毁程序, 将组织细胞的结构退化, 在衰老叶中储存的营养物质会被重新利用, 从而为植株做最后的贡献(Quirino et al., 2000; 杨同文和李成伟, 2014); 其主要特征为叶片泛黄、叶绿素含量显著减少、叶片光合作用潜力下降、叶绿体结构被破坏以及营养物质转移到植物其它组织, 从而最终导致叶片衰老死亡(徐凡等, 2010; Wang et al., 2016)。叶片衰老受众多内外因素协同调控, 其中叶龄是最主要的调控因子, 同时叶片衰老的起始和进展受到各种环境与内源因素的调节(Lim et al., 2003; Buchananwollaston et al., 2005; Lim and Hong, 2007; Zhao et al., 2015)。

水稻(*Oryza sativa*)叶片衰老相关研究显示, 水稻衰老过程中会产生大量的水解酶类(郑建敏等, 2009)。蛋白激酶(protein kinase, PK)和蛋白磷酸酶(protein phosphatase, PP)所催化的蛋白质可逆磷酸化反应是细胞信号识别与转导的重要环节(Xu et al., 2011)。Menges等(2002)研究表明, 蛋白磷酸酶通过去磷酸化调控蛋白激酶活性来参与细胞周期的调节。

PP2C磷酸酶是高等植物中存在的最大蛋白磷酸酶家族, 它是1种丝氨酸/苏氨酸残基蛋白磷酸酶(翁华等, 2003)。目前已经在多种植物中鉴定到PP2C的编码基因, 它们大多参与植物对非生物胁迫的响应。例如, 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) AtbZIP19/23 (Castro et al., 2017)、玉米(*Zea mays*) ABP9 (Wang et al., 2017)和水稻 OsPP2C51 (Bhatnagar et al., 2017)作为ABA信号转导的辅助受体, 在干旱、寒冷和盐胁迫的ABA依赖性应激反应中起重要作用; 大豆(*Glycine max*)中GsAPD的表达水平明显受盐碱胁迫的影响(Chen et al., 2018); PP2C型蛋白磷酸酶编码基因AP2C1在植物组织发生创伤或病原体胁迫时, 与MPK4或者MPK6协同抑制MAPK的活性(Schweighofer et al., 2007); PacPP2C1协同SnRK2蛋白激酶在甜樱桃(*Prunus avium*)果实成熟和改善植物对干旱胁迫的耐受性中起关键作用(Shen et al., 2017); 拟南芥中的SAG113与AtNAP协同调控ABA诱导的叶片衰老进程(Zhang and Gan, 2012); 拟南芥PP2C中的SSPP通过直接去磷酸化AtSARK来抑制SARK介导的衰老信号转导, 从而负向调节拟南芥叶片的衰老进程(Xiao et al., 2015)。

收稿日期: 2018-02-12; 接受日期: 2018-05-21

基金项目: 国家自然科学基金(No.31401298)

* 通讯作者。E-mail: celiafanfan@163.com

本研究中, 我们克隆并鉴定了1个水稻的PP2C型蛋白磷酸酶编码基因(*LOC_10g39780; Os10g-0544900*), 将该基因命名为*OsSAPP3 (Oryza sativa Senescence-Associated Protein Phosphatase, OsSAPP3)*。根据Xue等(2008)对水稻中PP2Cs的聚类分析, 水稻中PP2Cs共有11个亚家族, *OsSAPP3*基因是水稻PP2C亚家族D的成员。*OsSAPP3*基因CDS全长1 182 bp, 编码394个氨基酸残基, 经SMART、NCBI和Pfam等生物信息学软件预测, 该蛋白具有明显的PP2C结构域, 位于第53–329位氨基酸之间, 预测为丝/苏氨酸蛋白磷酸酶。我们还克隆了*OsSAPP3*基因ATG上游2 063 bp的启动子序列, 利用PlantCare网站进行在线分析, 预测*OsSAPP3*启动子区域不仅含有核心元件TATA-box, 还具有脱落酸响应元件(ABRE)、光响应元件(AE-box和G-box)及MBS结合位点等其它调控元件; 构建了*Pro_{OsSAPP3}-GUS*双元表达载体, 并获得相应的转基因拟南芥株系。研究发现组成型异源过表达*OsSAPP3*基因导致转基因拟南芥发育严重受阻, 因此后续实验中使用可诱导型启动子驱动*OsSAPP3*基因异源过表达。在转基因拟南芥中外源诱导*OsSAPP3*基因异源过表达会导致转基因拟南芥叶片黄化、叶绿素含量降低及植株提前进入衰老程序。各衰老标志基因的表达水平也随着外源诱导*OsSAPP3*的上调表达而上调。以上结果表明, *OsSAPP3*基因参与叶片衰老进程的调控, 是水稻叶片衰老的正调控因子。

1 材料与方法

1.1 基因克隆、双元表达载体构建与植物材料培养

设计引物(表1)扩增*OsSAPP3*的CDS序列, 分别在上游引物CDS_{*OsSAPP3*}-F和cGVG-SAPP3-F中引入*Sma* I和*Sal* I的酶切位点; 分别在下游引物CDS_{*OsSAPP3*}-R和cGVG-SAPP3-R中引入*Sac* I和*Cla* I的酶切位点。以水稻(*Oryza sativa* L.) (沈农9816) cDNA为模板, 用高保真聚合酶进行PCR反应, 克隆产物长度为1 182 bp, 然后将PCR产物分别连入T载体(pGEM-T Easy Vector), 完成TA克隆; 将所获得的TA克隆分别与pBI121基本载体以及pTA7002载体用*Sma* I/*Sac*

I以及*Xho* I/*Cla* I进行双酶切, 分别回收小片段和载体片段, 连接后完成35S-*OsSAPP3*双元表达载体以及GVG-*OsSAPP3*双元表达载体的构建。

设计引物(表1)扩增*OsSAPP3*基因初始密码子ATG上游2 063 bp的序列, 并在上游引物Pro_{*OsSAPP3*}-F中引入*EcoR* I酶切位点、在下游引物Pro_{*OsSAPP3*}-R中引入*Nco* I酶切位点。以水稻(沈农9816)基因组DNA为模板, 用高保真聚合酶进行PCR反应, 然后将PCR产物连入T载体(pGEM-T Easy Vector), 完成启动子的TA克隆; 将所获得的TA克隆和pCAMBIA1301基本载体用*EcoR* I/*Nco* I双酶切, 分别回收小片段和载体片段, 连接完成Pro_{*OsSAPP3*}-*GUS*双元表达载体的构建。

Pro_{*OsSAPP3*}-*GUS*转基因拟南芥、35S-*OsSAPP3*转基因拟南芥、GVG-*OsSAPP3*转基因拟南芥和对照转基因拟南芥(转化空载体, 以下简称CK)均为Col₀生态型背景, 且均在沈阳农业大学水稻研究所拟南芥培养室中进行培养。培养条件: 光周期为16小时光照/8小时黑暗, 温度为(21±1)°C, 光照强度为90 μmol·m⁻²·s⁻¹。在拟南芥不同生育时期(stage)对其进行表型观察, 各生育时期的表示方法参照已发表文献(Boyes et al., 2001), 并使用相机(Nikon D3200)和扫描仪(EPSON Perfection v33)记录表型。

1.2 生物试剂

实验中所使用的*Sma* I等所有快切酶均购自NEB公司。pBI121载体、pCAMBIA1301载体和pTA7002载体均购自质粒载体菌种细胞基因保藏中心(Bio-vector)。T载体(pGEM-T Easy Vector)和反转录试剂盒(PrimeScriptTM RT Master Mix)购自Promega公司。荧光定量试剂盒(SYBR[®] Premix Ex TaqTM)购自大连宝生物公司(TaKaRa)。抗性筛选剂潮霉素(Hyg)购自Roche公司。GUS组织化学染色所用GUS荧光染料(X-GLUC, sodium salt)购自上海生工生物工程公司。地塞米松诱导剂(Dexamethasone, DEX)和各植物激素购自Sigma公司。荧光实时定量RT-PCR引物和克隆引物在Invitrogen公司合成。转基因植物检测引物在苏州金唯智生物科技有限公司合成。

1.3 RT-PCR分析

采用Easestep Super总RNA提取试剂盒(Promega, Cat

表1 引物序列

Table 1 Sequences of primers

Primer name	Primer sequence (5'–3')	Annotation
CDS _{OsSAPP3} -F	CCCGGGATGCTATCTGCTGCGATGGAATACTT	PCR
CDS _{OsSAPP3} -R	GAAGTCTATGTAGGAACTGAGAATGGAGCAAGG	PCR
cGVG-SAPP3-F	GTCGACATGCTATCTGCTGCGATGGAATAC	PCR
cGVG-SAPP3-R	ATCGATCTATGTAGGAACTGAGAATGGAGCAA	PCR
Pro _{OsSAPP3} -F	AAGCTTTCATATCCGTTGTTCCGTAGCG	PCR
Pro _{OsSAPP3} -R	TCTAGACCTTCATCTCCGACACCTCCC	PCR

No.LS1040)提取不同叶龄(从移苗第2天开始计算)的GVG-OsSAPP3转基因拟南芥和CK第5和6片莲座叶总RNA。采用PrimeScript™ RT Master Mix试剂盒(TaKaRa, Cat No.RR036A)将总RNA反转录成cDNA。以TIP41-like作为内参基因,采用SYBR® Premix Ex Taq™试剂盒(TaKaRa, Cat No.RR420A)进行实时定量RT-PCR分析。

1.4 叶绿素含量检测

将经过DEX诱导处理后正常生长的GVG-OsSAPP3转基因拟南芥和CK第5和6片叶子剪下,立即称取0.5–1 g,迅速剪碎置于2.0 mL EP管中,随后快速向EP管中加入2 mL 95%无水乙醇。用锡箔纸包裹好,遮光条件下放置1–2天,浸泡至叶片绿色褪去,使用多功能酶标仪(购自基因有限公司)测量叶绿素含量。数据分析参照李合生(2000)的方法。

1.5 植物激素/地塞米松诱导处理

将苗龄Stage 1.04 (Boyes et al., 2001)的Pro_{OsSAPP3}-GUS转基因拟南芥幼苗从基本培养基上转移至含有不同植物激素的1/2MS培养液中处理24小时,同时转移至只含有10 μmol·L⁻¹无水乙醇(植物激素溶剂)的1/2MS培养液中处理24小时作为MOCK对照。培养条件同1.1节所述,所用激素处理浓度为10 μmol·L⁻¹ ABA和6-BA。

将0.781 6 g地塞米松粉末溶于2 mL无水乙醇溶剂中。将GVG-OsSAPP3转基因拟南芥和转基因拟南芥对照的种子铺于含有10 μmol·L⁻¹地塞米松的诱导培养基上水平培养4天,使用扫描仪对各相应时间点的表型进行记录。连续3天每天对GVG-OsSAPP3转基因拟南芥和CK的成熟苗喷施含有30 μmol·L⁻¹ DEX/MOCK诱导剂和0.01%吐温-20的溶液,使用相机记

录转基因成熟苗的表型变化(Aoyama and Chua, 1997)。

1.6 GUS组织化学染色

将在1/2MS潮霉素抗性培养基上培养48小时的Pro_{OsSAPP3}-GUS转基因拟南芥种子、培养7天的Pro_{OsSAPP3}-GUS转基因拟南芥幼苗(Stage 1.0)和培养14天的Pro_{OsSAPP3}-GUS转基因拟南芥幼苗(Stage 1.04)完整取出,用扫描仪记录染色前形态,将整株苗浸入GUS染色液中避光染色,然后对其进行脱色,用扫描仪记录染色结果。在营养土中培养14天的Pro_{OsSAPP3}-GUS转基因拟南芥(Stage 1.10)、培养45天的Pro_{OsSAPP3}-GUS转基因拟南芥花序和Pro_{OsSAPP3}-GUS转基因拟南芥的成熟果荚染色步骤同上。染色和脱色方法均参考已发表文献(Liu et al., 2010; 徐凡, 2012)。

2 结果与讨论

2.1 Pro_{OsSAPP3}-GUS转基因拟南芥时空表达模式分析

通过GUS组织化学染色对Pro_{OsSAPP3}-GUS转基因拟南芥植株中OsSAPP3启动子的活性进行分析(图1A–E)。我们分别在Stage 1.0和Stage 1.04的Pro_{OsSAPP3}-GUS转基因拟南芥幼苗的子叶、真叶和下胚轴及Stage 1.10的转基因拟南芥莲座叶中检测到Pro_{OsSAPP3}-GUS的表达活性(图1B),并且其表达水平随叶龄的增加而逐渐升高,说明OsSAPP3启动子的活性具有随衰老程度加剧上调的特点。外源施加10 μmol·L⁻¹ ABA和10 μmol·L⁻¹ 6-BA处理结果显示,10 μmol·L⁻¹ ABA处理显著增加Pro_{OsSAPP3}-GUS转基因拟南芥幼苗中的GUS活性,尤其子叶中的GUS活性

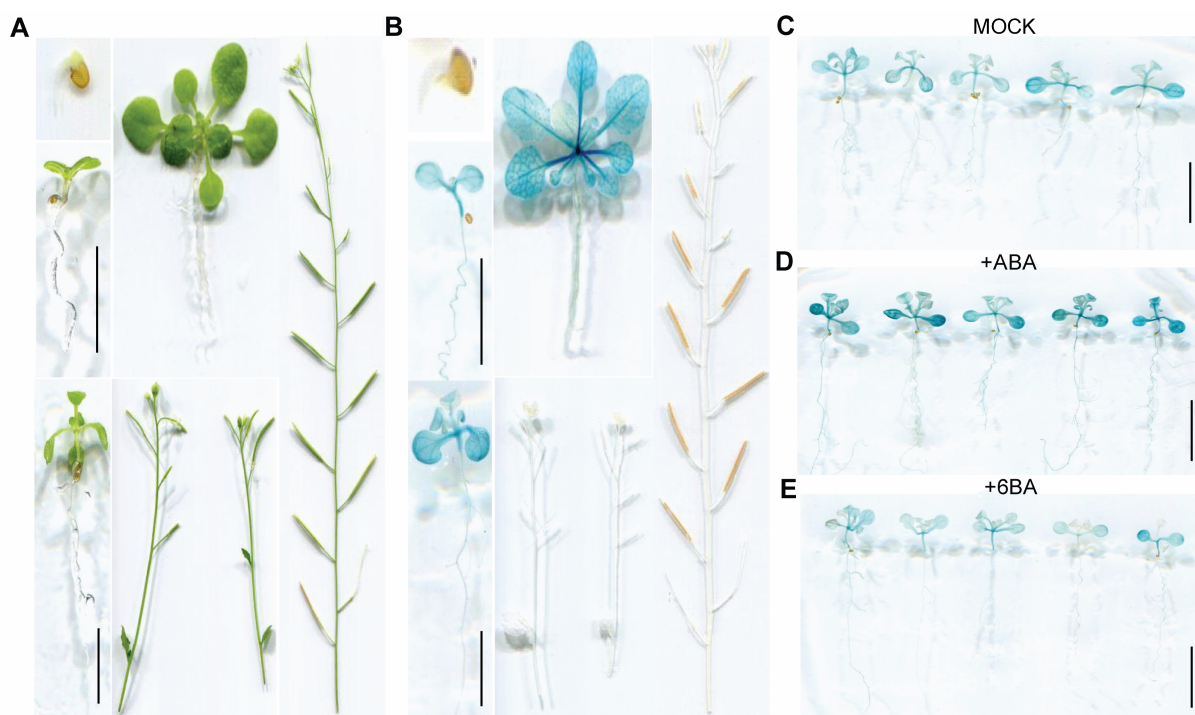


图1 *ProOsSAPP3-GUS*转基因拟南芥不同发育时期GUS组织化学染色

(A) 染色前的转基因拟南芥, 从上到下, 从左到右, 依次为Stage 0.5、Stage 1.02、Stage 1.04、Stage 1.10、Stage 6.0、Stage 6.9; (B) 染色后的转基因拟南芥, 从上到下, 从左到右年龄同染色前; (C) 经MOCK溶液(激素溶剂)处理的转基因拟南芥; (D) 经 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA溶液处理的转基因拟南芥; (E) 经 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA溶液处理的转基因拟南芥。Bars=5 mm

Figure 1 GUS histochemical staining of *ProOsSAPP3-GUS* transgenic *Arabidopsis thaliana* at different developmental stages

(A) From top to bottom, from left to right, the transgenic *Arabidopsis thaliana* before stain: Stage 0.5, Stage 1.02, Stage 1.04, Stage 1.10, Stage 6.0, Stage 6.9; (B) From top to bottom, from left to right, the transgenic *Arabidopsis thaliana* was stained in turn, and the seedling age was identical to that before staining; (C) Transgenic *Arabidopsis thaliana* treated with MOCK solution (hormone solvent); (D) Transgenic *Arabidopsis thaliana* treated with $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA solution; (E) Transgenic *Arabidopsis thaliana* treated with $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA solution. Bars=5 mm

增加更为明显(图1D); $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA处理显著抑制*ProOsSAPP3-GUS*转基因拟南芥幼苗中的GUS活性(图1E)。

2.2 组成型异源过表达*OsSAPP3*对转基因拟南芥生长发育的影响

在35S-*OsSAPP3*转基因拟南芥培养过程中, 发现组成型异源过表达*OsSAPP3*基因(图2A)导致转基因拟南芥植株生长受到严重抑制, 叶片极小且逐渐出现坏死斑症状, 虽有果荚出现但是无法正常结种(图2B)。研究表明, 超量组成型异源过表达*OsSAPP3*会

导致拟南芥植株生长严重受阻, 不能正常发育。

2.3 可诱导型启动子GVG系统驱动*OsSAPP3*在拟南芥中异源过表达

为进一步研究*OsSAPP3*的基因功能, 我们采用可诱导型启动子GVG系统驱动*OsSAPP3*基因异源过表达, 并获得相应的转基因拟南芥株系。外源DEX诱导后检测*OsSAPP3*基因的表达情况, 最终获得6个纯合株系(图3L)。在后续实验中选择line2、line14和line20为典型代表株系。我们将3个纯合株系(line2、line14和line20)和CK的种子铺于含有 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

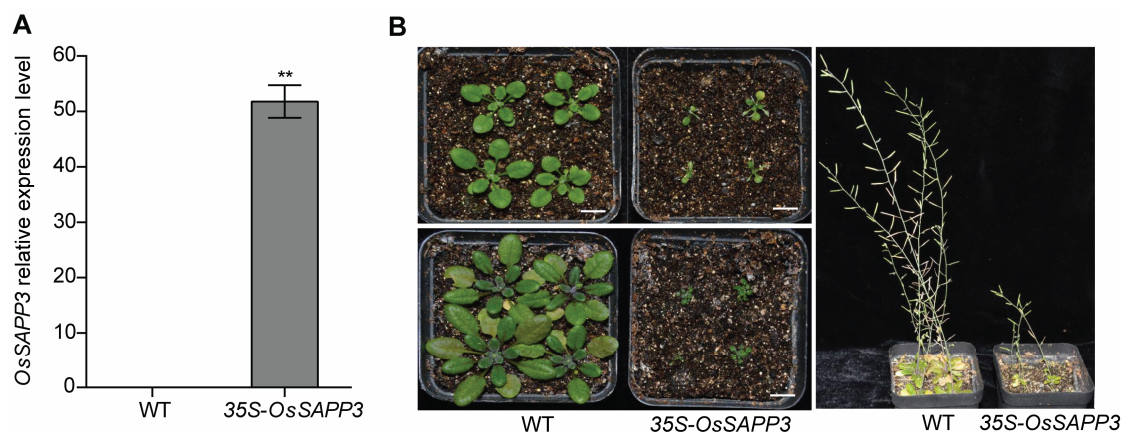


图2 组成型异源过表达*OsSAPP3*基因导致转基因拟南芥生长发育异常

(A) 35S-*OsSAPP3*转基因与野生型拟南芥的基因表达水平; **(B)** WT为野生型拟南芥植株; 35S-*OsSAPP3*为35S-*OsSAPP3*转基因拟南芥株系; 图左上为营养土中生长14天的幼苗, 图左下为营养土中生长21天的植株, 图右为营养土中培养75天的植株。图中数据为平均值 \pm 标准差, $n=10$, 实验经3次生物学重复。** $P<0.01$ 。Bars=1 cm

Figure 2 Heterologous expression of *OsSAPP3* gene lead to abnormal growth and development of transgenic *Arabidopsis*

(A) 35S-*OsSAPP3* transgenic *Arabidopsis* and wild-type *Arabidopsis* gene expression levels; **(B)** Wild-type *Arabidopsis* plant (WT) and 35S-*OsSAPP3* transgenic *Arabidopsis* line (35S-*OsSAPP3*). The top left panel was the 14-day-old seedling growing in the nutrient soil, the bottom left is the 21-day-old plant growing in the nutrient soil, and the right panel was the plants cultured in nutrient soil for 25 days. Values are means \pm SD of one representative biological replicate ($n=10$) out of three, ** $P<0.01$. Bars=1 cm

DEX和MOCK溶液的1/2MS固体培养基上进行培养。发现CK的种子正常萌发且幼苗生长正常, 但line2、line14和line20株系的种子萌发率低且缓慢, 已经萌发的幼苗子叶无法张开, 下胚轴无法伸长到正常程度。培养96小时line14株系的幼苗开始死亡; 而line2和line20株系幼苗, 畸形生长, 移入土中后无法存活并最终致死(图3A-I)。

将正常生长5天的line14幼苗转入到含10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DEX的1/2MS固体培养基上进行诱导处理, 利用荧光定量RT-PCR方法分别检测处理12、24、36、48和72小时的幼苗中目的基因*OsSAPP3*和衰老标志基因*WRKY6*的表达量。我们发现诱导处理24小时左右, *OsSAPP3*的表达水平最高, 之后随着诱导时间的延长缓慢下降(图3J); *WRKY6*的表达量随着诱导时间的延长而上升(图3K)。

2.4 外源诱导*OsSAPP3*基因异源过表达促进转基因拟南芥早衰

为研究异源过表达*OsSAPP3*基因对转基因拟南芥生长发育的影响, 我们对正常培养15天的转基因拟南芥喷施30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DEX溶液, 连续喷施3天后, 对其

进行表型观察。结果显示, *GVG-OsSAPP3*转基因植株比对照植株莲座叶数目多、叶片小, 且差异显著或极显著(图4A; 表2); 比对照植株提前抽薹、提早开花2-4天(图4B-E)。

诱导处理21天后, *GVG-OsSAPP3*转基因拟南芥出现明显的衰老表型(图4F), 转基因植株叶片边缘变黄, 且由边缘向中心蔓延, 由老叶向新叶蔓延; 部分老叶已完全衰老黄化, 并且衰老程度与DEX诱导后*OsSAPP3*表达程度相对应, 即line14株系的衰老程度最高。叶绿素含量测定结果表明, line14、line20与line2的叶绿素含量分别比CK降低50%、47.27%和36.36% (图4G)。

2.5 外源诱导*OsSAPP3*基因异源过表达影响衰老相关标志基因表达

为进一步研究外源诱导*OsSAPP3*基因异源过表达对转基因拟南芥中各衰老相关基因和衰老转录因子表达量的影响, 我们利用荧光定量PCR检测外源诱导*OsSAPP3*基因异源过表达后, 衰老标志基因*SAG12*, 衰老关键转录因子基因*NAC2*、*NAP*和*WRKY6*, 光合作用相关基因*RbcL*和*RbcS*, 以及叶绿素降解相关基

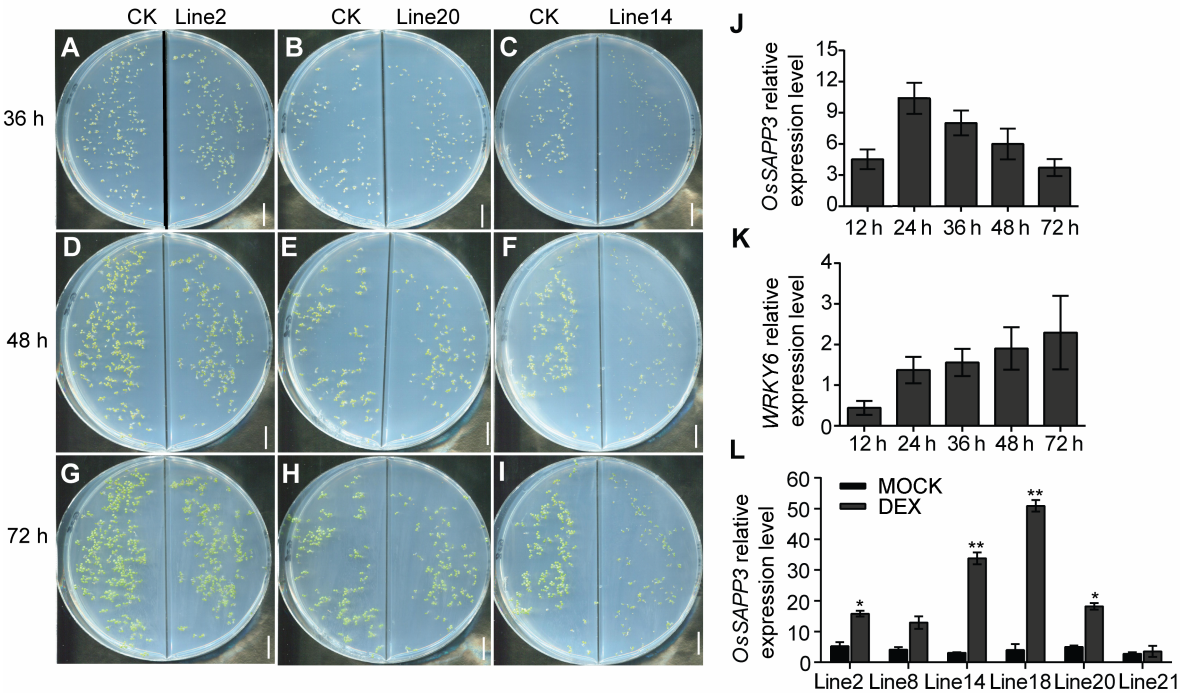


图3 外源诱导*OsSAPP3*异源过表达导致转基因拟南芥无法正常萌发 (A)–(C) DEX诱导36小时, 各转基因种子与对照种子萌发情况; (D)–(F) DEX诱导48小时, 各转基因种子与对照种子萌发情况; (G)–(I) DEX诱导72小时, 各转基因种子与对照种子萌发情况; (J) 外源诱导不同时长, *OsSAPP3*基因的表达变化情况; (K) 外源诱导不同时长, *WRKY6*基因的表达变化情况; (L) *GVG-OsSAPP3*转基因拟南芥纯合株系的基因表达水平。数据为平均值±标准差, $n=10$, 实验经3次生物学重复。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。Bars=1 cm

Figure 3 Exogenously induced *OsSAPP3* heterologous over expression resulted in the inability of germination of transgenic Arabidopsis (A)–(C) DEX induced 36 h, the germination of transgenic and control seeds; (D)–(F) DEX induced 48 h, the germination of transgenic and control seeds; (G)–(I) DEX induced 72 h, the germination of transgenic and control seeds; (J) The expression of *OsSAPP3* induced by exogenous factors at different times; (K) Exogenous induction of *WRKY6* expression changes at different times; (L) Gene expression levels of *GVG-OsSAPP3* transgenic Arabidopsis homozygous lines. Values are means±SD of one representative biological replicate ($n=10$) out of three. * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Bars=1 cm

表2 拟南芥*GVG-OsSAPP3*转基因株系与转化对照(CK)的表型数据

Table 2 Phenotypic data of Arabidopsis *GVG-OsSAPP3* transgenic lines and control (CK)

	Number of rosette leaves ^a	5% significant level	1% very significant level	Rosette leaf size ^b	5% significant level	1% very significant level
CK	9.4	c	A	2.84	d	C
Line2	10.2	bc	A	2.3	ab	BC
Line20	11.8	abc	A	1.9	bc	AB
Line14	12.6	ab	A	1.5	cd	A

^a: 苗龄23天植株的莲座叶数目统计($n=36$); ^b: 苗龄28天植株最大莲座叶长度(单位: 毫米, $n=18$)。

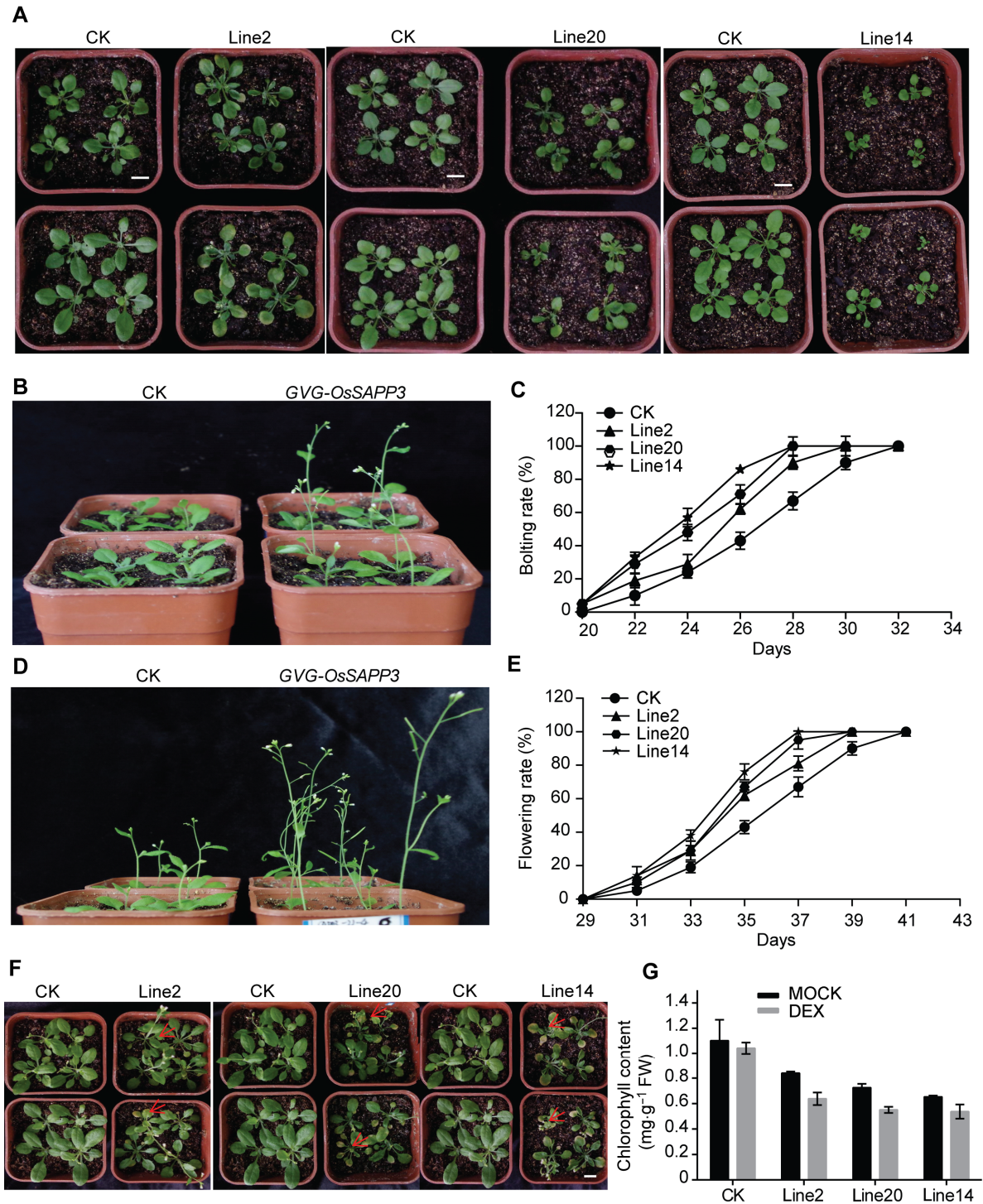
^a: Number of rosette leaves of 23-d-old plant ($n=36$); ^b: Maximum rosette leaf length of 28-d-old plant (Unit: mm, $n=18$).

因*ACD1*的表达变化情况(图5A–G)。与对照相比, 异源表达*OsSAPP3*导致*SAG12*、*NAC2*、*NAP*、*WRKY6*和*ACD1*的表达量上升; 而*RbcL*和*RbcS*的表达量下降。

2.6 讨论

牟少亮等(2011)分离出水稻PP2C家族中*ABI2*的启动子, 并发现*OsABI2*启动子驱动的*GUS*报告基因在水稻根、茎和叶中均有表达, 且在根中表达量高、叶中表达量低。本研究中, 我们分离了*OsSAPP3*的启动

子, 发现*Pro_{OsSAPP3}-GUS*在转基因拟南芥不同时期的叶中均有活性, 且活性依赖叶龄方式增加(图1B), 表明*OsSAPP3*基因参与调控植物叶片的自然衰老过程。虽然PP2C在植物多个生物学过程中起调节作用, 但主要参与ABA信号通路的调节过程。本研究显示, 外源ABA可以显著促进*Pro_{OsSAPP3}-GUS*的表达, 外源



6-BA则显著抑制 $Pro_{OsSAPP3}$ -*GUS*的表达(图1D, E), 表明ABA是*OsSAPP3*基因表达的一个正调控因子, *OsSAPP3*可能在ABA信号通路的下游发挥作用。由此我们推测, ABA与6-BA都可以通过对*OsSAPP3*表达的协同调控来参与水稻自然衰老和外源激素应答反应的过程。这为深入研究不同激素对增强作物叶片功能和延缓叶片衰老的协同调控作用提供了线索。

叶片由绿变黄是叶片衰老终末阶段最显著的形态特征之一, 其根本原因是叶绿素的降解。有研究表明, 玉米叶片中叶绿素降解导致功能叶的叶面积减小, 光合效率和光合能力降低, 从而使玉米的生育周期提前, 并最终影响产量(孙高阳等, 2017)。在拟南芥中, *SGR1*通过与叶绿体降解酶(CCEs)以及捕光色素复合体结合调控叶片衰老过程(Sakuraba et al., 2012)。本研究表明, 外源诱导*OsSAPP3*异源过表达导致*GVG-OsSAPP3*转基因拟南芥成熟苗莲座叶面积积极小且数量增多(图4A; 表1); 莲座叶提前黄化(图4F), 叶绿素含量下降(图4G); 抽薹开花均提前2–4天(图4B–E)。我们发现转基因株系叶片形态发育畸形、变黄以及抽薹开花提前等现象的严重程度均与其*OsSAPP3*基因表达量相对应。以上结果表明, *GVG-OsSAPP3*转基因拟南芥提前进入衰老程序的终末阶段, 正常的营养生长被破坏, 转基因植株提前从营养生长进入生殖生长阶段。叶片作为水稻重要的源器官, 具有为作物提供各种营养物质的功能; 叶片早衰造成源器官功能期缩短, 导致营养物质缺乏并严重影响籽粒发育和水稻产量(徐娜等, 2017)。本研究

显示, *OsSAPP3*表达量升高使叶片形态发育畸形、萎蔫黄化、叶绿素含量下降显著, 出现叶片早衰表型, 这些功能叶片光合作用能力的丧失将会对产量和品质产生影响。对于叶片衰老进程及调控机制的研究不仅可以使我们了解其生物学过程, 也可以服务于农业生产, 用于改良作物品质和提高作物产量等。例如, 在明恢63水稻品系的剑叶衰老过程中, W-box和G-box顺式作用元件是早期叶片衰老调控的重要正向因子(Liu et al., 2016)。在后续的水稻育种中, 可以通过精确调控*OsSAPP3*的表达量来提高水稻叶片的光合能力, 减少叶片中叶绿素的降解, 从而提高水稻产量和籽粒品质。

在植物叶片衰老过程中, NAC和WRKY家族中的一些转录因子不可或缺。WRKY转录因子家族中的*AtWRKY4*、6、11和57是一类重要的SAGs, 也受衰老诱导表达(Jiang et al., 2014)。Robatzek和Somssich (2002)研究发现, 钙调素相关基因和各种激酶(如SIRK)与拟南芥*AtWRKY6*相互作用从而调节植物的衰老进程。NAC家族中*AtNAP*的转录水平随着拟南芥叶片衰老而逐渐升高。本研究中, 利用实时荧光定量PCR检测到, *GVG-OsSAPP3*转基因拟南芥幼苗与成熟苗经地塞米松外源诱导*OsSAPP3*异源过表达后, *SAG12*、*WRKY6*、*NAP*和*NAC2*等衰老标志基因均上调表达(图3J, K; 图5)。以上结果表明, 异源过表达*OsSAPP3*影响其它衰老相关基因的表达, 从而协同调控衰老进程。我们可以通过调控*OsSAPP3*编码的PP2C蛋白磷酸酶来调节作物的适时衰老, 从而

图4 外源诱导*OsSAPP3*基因异源过表达促进转基因拟南芥成熟苗提前衰老

(A) 喷施处理5天后的转化对照(CK)和*GVG-OsSAPP3*转基因拟南芥; (B) 苗龄24天的CK和*GVG-OsSAPP3*转基因拟南芥的代表植株; (C) CK和*GVG-OsSAPP3*转基因拟南芥的抽薹进程; (D) 苗龄34天的CK和*GVG-OsSAPP3*转基因拟南芥植株; (E) CK和*GVG-OsSAPP3*转基因拟南芥的开花进程; (F) 喷施处理后21天的CK和*GVG-OsSAPP3*转基因拟南芥; (G) 苗龄26天的CK和*GVG-OsSAPP3*转基因拟南芥第4、5和6片叶的叶绿素含量。数据为平均值±标准差, $n=10$, 实验经3次生物学重复。Bars=1 cm

Figure 4 Exogenous-induced *OsSAPP3* heterologous over expression promotes premature aging of transgenic Arabidopsis mature seedlings

(A) Arabidopsis control (CK) and *GVG-OsSAPP3* transgenic Arabidopsis after spray treatment for 5 days; (B) 24-day-old CK and *GVG-OsSAPP3* transgenic Arabidopsis plants; (C) The CK and *GVG-OsSAPP3* transgenic Arabidopsis bolting process; (D) 34-day-old CK and *GVG-OsSAPP3* transgenic Arabidopsis plants; (E) The CK and *GVG-OsSAPP3* transgenic Arabidopsis flowering process; (F) CK and *GVG-OsSAPP3* transgenic Arabidopsis after spray treatment for 21 days; (G) The chlorophyll contents of the fourth, fifth and sixth leaf of 26-day-old CK and *GVG-OsSAPP3* transgenic Arabidopsis. Values are means±SD of one representative biological replicate ($n=10$) out of three. Bars=1 cm

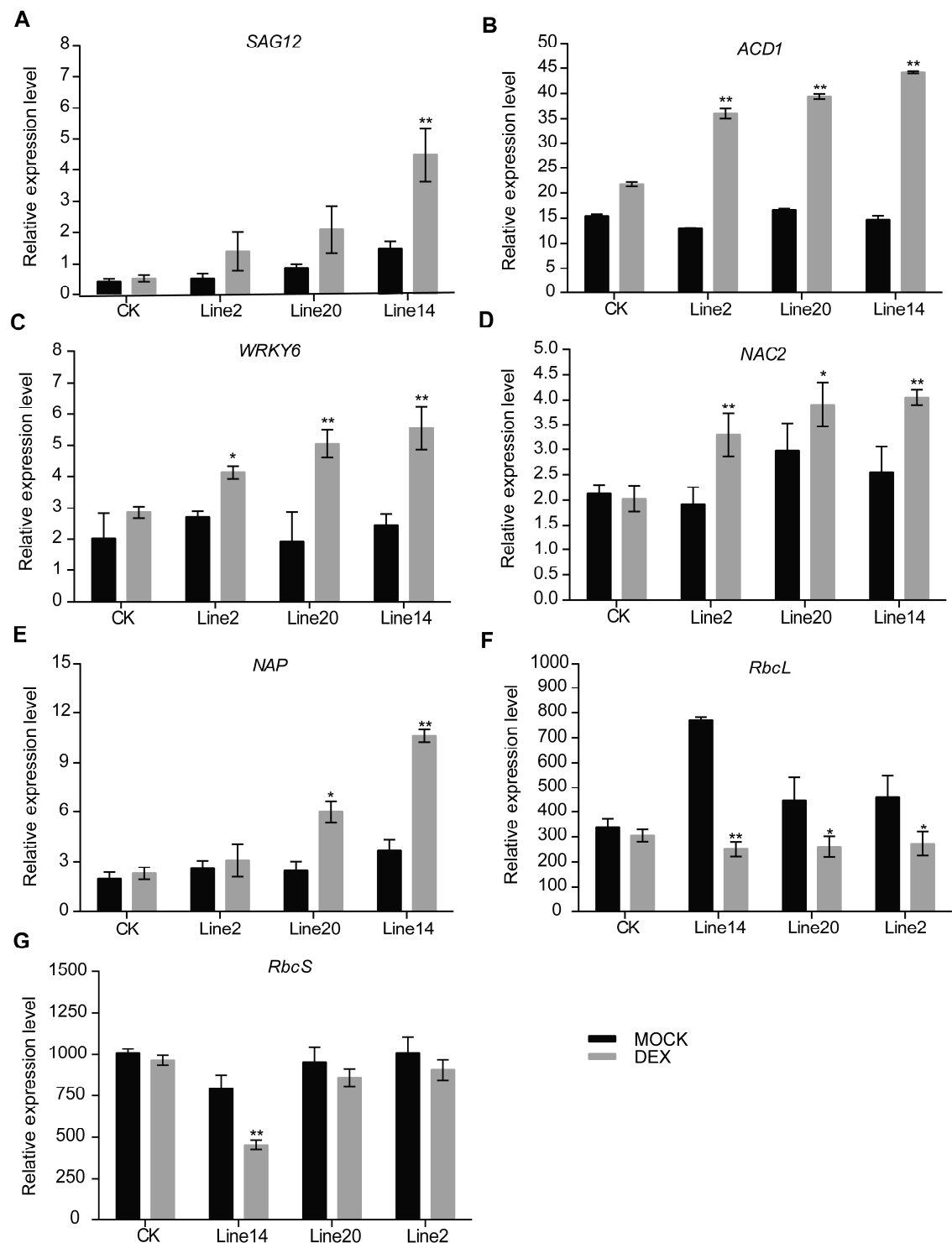


图5 $30\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DEX与MOCK溶液处理24小时后, 转化对照(CK)和GVG-OsSAPP3转基因拟南芥第5和6片叶的衰老标志基因表达变化
数据为平均值 \pm 标准差, $n=10$, 实验经3次生物学重复。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

Figure 5 Changes of senescence marker gene expression in the fifth and sixth leaves of control (CK) and GVG-OsSAPP3 transgenic Arabidopsis after $30\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DEX and MOCK solution treatment for 24 hours
Values are means \pm SD of one representative biological replicate ($n=10$) out of three. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

深入研究植物衰老调控过程。同时, *GVG-OsSAPP3* 转基因成熟苗的光合作用相关基因 *RbcL* 和 *RbcS* 表达下调、叶绿素降解相关基因 *ACD1* 表达上调。我们推测异源过表达 *OsSAPP3* 影响叶绿体的结构和功能, 导致植物叶片进入衰老阶段, 使转基因植物叶片光合作用减弱, 叶绿素降解加快, 最终表现出叶片提前变黄等早衰表型。以上结果也证实, *OsSAPP3* 编码的 PP2C 蛋白磷酸酶在植物衰老的生物学过程中起重要调节作用。因此, 我们认为 *OsSAPP3* 是植物叶片衰老的正向调控因子, 可促进植物衰老。

参考文献

- 李合生 (2000). 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社. pp. 134–137.
- 牟少亮, 李秀娟, 官德义, 赖燕, 何水林 (2011). 水稻蛋白磷酸酶 *ABI2* 基因启动子的克隆和功能分析. 热带作物学报 **32**, 2293–2297.
- 孙高阳, 吴向远, 叶琳琳, 孟淑君, 阎鹏帅, 汤继华, 郭战勇 (2017). 玉米衰老相关基因在2个杂交种及其亲本中的表达分析. 河南农业大学学报 **2**, 140–148.
- 翁华, 冉亮, 魏群 (2003). 植物蛋白磷酸酶及其在植物抗逆中的作用. 植物学报 **20**, 609–615.
- 肖冬, 崔燕娇, 王宁宁 (2014). 叶片衰老过程中的蛋白激酶和蛋白磷酸酶. 植物生理学报 **50**, 1267–1273.
- 徐凡 (2012). *GmSARK* 和 *AtSARK* 基因调控叶片衰老分子机制的研究. 博士论文. 天津: 南开大学. pp. 1–12.
- 徐凡, 李鹏丽, 安宝燕, 苑玲玲, 孟涛, 岳慧琴, 王宁宁 (2010). 大豆诱导型启动子驱动类受体蛋白激酶 *GmSARK* 转基因植物分析. 植物学报 **45**, 149–156.
- 徐娜, 徐江民, 蒋玲欢, 饶玉春 (2017). 水稻叶片早衰成因及分子机理研究进展. 植物学报 **52**, 102–112.
- 杨同文, 李成伟 (2014). 植物叶片衰老的表观遗传调控. 植物学报 **49**, 729–737.
- 郑建敏, 张涛, 郑家奎 (2009). 水稻叶片衰老相关基因的研究进展. 基因组学与应用生物学 **28**, 1010–1019.
- Aoyama T, Chua NH (1997). A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant J* **11**, 605–612.
- Bhatnagar N, Min MK, Choi EH, Kim N, Moon SJ, Yoon I, Kwon T, Junq KH, Kim BG (2017). The protein phosphatase 2C clade a protein *OsPP2C51* positively regulates seed germination by directly inactivating *OsbZIP10*. *Plant Mol Biol* **93**, 389–401.
- Boyce DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davis KR, Görlach J (2001). Growth stage-based phenotypic analysis of Arabidopsis: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell* **13**, 1499–1510.
- Buchanan-Wollaston V, Page T, Harrison E, Breeze E, Lim PO, Nam HG, Lin JF, Wu SH, Swidzinski J, Ishizaki K, Leaver CJ (2005). Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signaling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in Arabidopsis. *Plant J* **42**, 567–585.
- Castro PH, Lilay GH, Muñoz-Mérida A, Schjoerring JK, Azevedo H, Assunção AGL (2017). Phylogenetic analysis of F-bZIP transcription factors indicates conservation of the zinc deficiency response across land plants. *Sci Rep* **7**, 3806.
- Chen C, Yu Y, Ding XD, Liu BD, Duanmu H, Zhu D, Sun XL, Cao L, Zaib-Un-Nisa, Li Q, Zhu YM (2018). Genome-wide analysis and expression profiling of PP2C clade D under saline and alkali stresses in wild soybean and Arabidopsis. *Protoplasma* **255**, 643–654.
- Jiang YJ, Liang G, Yang SZ, Yu DQ (2014). Arabidopsis WRKY57 functions as a node of convergence for jasmonic acid- and auxin-mediated signaling in jasmonic acid-induced leaf senescence. *Plant Cell* **26**, 230–245.
- Lim PO, Hong GN (2007). Aging and senescence of the leaf organ. *J Plant Biol* **50**, 291–300.
- Lim PO, Woo HR, Hong GN (2003). Molecular genetics of leaf senescence in Arabidopsis. *Trends Plant Sci* **8**, 272–278.
- Liu D, Gong QQ, Ma YY, Li PL, Li JP, Yang SH, Yuan LL, Yu YQ, Pan DD, Xu F, Wang NN (2010). cpSecA, a thylakoid protein translocase subunit, is essential for photosynthetic development in Arabidopsis. *J Exp Bot* **61**, 1655–1669.
- Liu L, Xu W, Hu XS, Liu HJ, Lin YJ (2016). W-box and G-box elements play important roles in early senescence of rice flag leaf. *Sci Rep* **6**, 20881.
- Menges M, Hennig L, Grisse W, Murray JAH (2002). Cell cycle-regulated gene expression in Arabidopsis. *J Biol Chem* **277**, 41987–42002.
- Quirino BF, Noh YS, Himelblau E, Amasino RM (2000). Molecular aspects of leaf senescence. *Trends Plant Sci* **5**, 278–282.
- Robatzek S, Somssich IE (2002). Targets of *AtWRKY6* regulation during plant senescence and pathogen defense.

- Genes Dev* **16**, 1139–1149.
- Sakuraba Y, Schelbert S, Park SY, Han SH, Lee BD, Andr s CB, Kessler F, H rtensteiner S, Paek NC** (2012). STAY-GREEN and chlorophyll catabolic enzymes interact at light-harvesting complex ii for chlorophyll detoxification during leaf senescence in Arabidopsis. *Plant Cell* **24**, 507–518.
- Schweighofer A, Kazanaviciute V, Scheikl E, Teige M, Doczi R, Hirt H, Schwanninger M, Kant M, Schuurink R, Mauch F, Buchala A, Cardinale F, Meskiene I** (2007). The PP2C-type phosphatase AP2C1, which negatively regulates MPK4 and MPK6, modulates innate immunity, jasmonic acid, and ethylene levels in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**, 2213–2224.
- Shen XJ, Guo X, Zhao D, Zhang Q, Jiang YZ, Wang YT, Peng X, Wei Y, Zhai ZF, Zhao W, Li TH** (2017). Cloning and expression profiling of the *PacSnRK2* and *PacPP2C* gene families during fruit development, ABA treatment, and dehydration stress in sweet cherry. *Plant Physiol Biochem* **119**, 275–285.
- Wang CL, Lu GQ, Hao YQ, Guo HM, Guo Y, Zhao J, Cheng HM** (2017). ABP9, a maize bZIP transcription factor, enhances tolerance to salt and drought in transgenic cotton. *Planta* **246**, 453–469.
- Wang FB, Liu JC, Chen MX, Zhou LJ, Li ZW, Zhao Q, Pan G, Zaidi SHR, Cheng FM** (2016). Involvement of abscisic acid in PSII photodamage and D1 protein turnover for light-induced premature senescence of rice flag leaves. *PLoS One* **11**, e0161203.
- Xiao D, Cui YJ, Xu F, Xu XX, Gao GX, Wang YX, Guo ZX, Wang D, Wang NN** (2015). Senescence-suppressed protein phosphatase directly interacts with the cytoplasmic domain of senescence-associated receptor-like kinase and negatively regulates leaf senescence in Arabidopsis. *Plant Physiol* **169**, 1275–1291.
- Xu F, Meng T, Li PL, Yu YQ, Cui YJ, Wang YX, Gong QQ, Wang NN** (2011). A soybean dual-specificity kinase, GmSARK, and its Arabidopsis homolog, AtSARK, regulate leaf senescence through synergistic actions of auxin and ethylene. *Plant Physiol* **157**, 2131–2153.
- Xue TT, Wang D, Zhang SZ, Ehrling J, Ni F, Jakab S, Zheng CC, Zhong Y** (2008). Genome-wide and expression analysis of protein phosphatase 2C in rice and Arabidopsis. *BMC Genomics* **9**, 550.
- Zhang KW, Gan SS** (2012). An abscisic acid-AtNAP transcription factor-SAG113 protein phosphatase 2C regulatory chain for controlling dehydration in senescing Arabidopsis leaves. *Plant Physiol* **158**, 961–969.
- Zhao Y, Chan ZL, Gao JH, Xing L, Cao MJ, Yu CM, Hu YL, You J, Shi HT, Zhu YF, Gong YH, Mu ZX, Wang HQ, Deng X, Wang PC, Bressan RA, Zhu JK** (2016). ABA receptor PYL9 promotes drought resistance and leaf senescence. *Proc Natl Acad Sci USA* **113**, 1949–1954.

Heterologous Overexpression of Rice *OsSAPP3* Gene Promotes Leaf Senescence in Transgenic Arabidopsis

Shengnan Cui^{1,2}, Yihan Zhang¹, Fan Xu^{1*}

¹Key Laboratory of Northeast Rice Biology and Breeding, Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Northern Japonica Rice Genetics and Breeding, Ministry of Education, Rice Research Institute, Shenyang Agriculture University, Shenyang 110866, China; ²Fushun Sifang Senior High School, Fushun 113122, China

Abstract Protein phosphatase-catalyzed reversible phosphorylation of proteins is a key aspect of leaf senescence. We screened and cloned a new PP2C gene, *OsSAPP3*, involved in leaf senescence regulation in rice. The promoter of *OsSAPP3* was active in rosette leaves of *ProOsSAPP3-GUS* transgenic Arabidopsis and its activity increased with leaf age. With heterologous overexpression of *OsSAPP3* driven by a CaMV 35S promoter, transgenic Arabidopsis could not grow normally. Therefore, *OsSAPP3* heterologous overexpression was induced by the inducible promoter GVG system. Exogenous inducible heterologous overexpression of *OsSAPP3* led to a precocious leaf senescence phenotype in transgenic Arabidopsis including smaller rosette leaves and increased number, premature leaf senescence, and advanced bolting and flowering. Additionally, quantitative RT-PCR showed that exogenous inducible heterologous overexpression of *OsSAPP3* upregulated the expression of critical senescence-related transcription factor genes, including *SAG12*, *WRKY6*, and *NAC2*. In summary, *OsSAPP3* is a positive factor involved in regulating leaf senescence in rice.

Key words Arabidopsis, leaf senescence, *OsSAPP3*, 2C type protein phosphatase

Cui SN, Zhang YH, Xu F (2019). Heterologous overexpression of rice *OsSAPP3* gene promotes leaf senescence in transgenic Arabidopsis. *Chin Bull Bot* **54**, 46–57.

* Author for correspondence. E-mail: celiafanfan@163.com

(责任编辑: 朱亚娜)