

· 研究报告 ·

## 异源过表达*OsATG8b*基因提高转基因拟南芥的氮/碳胁迫耐受性和产量

甄晓溪, 刘浩然, 李鑫, 徐凡\*, 张文忠\*

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

**摘要** 氮素是参与植物生长发育的一种重要元素, 对植物的产量和品质具有重要作用。自噬是真核生物中一种保守的细胞组分降解-循环再利用途径, 在植物生长发育和籽粒形成期间的氮素再动员过程中发挥作用。我们鉴定到水稻(*Oryza sativa*)自噬核心基因*OsATG8b*, 并获得2个独立的35S-*OsATG8b*转基因拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)纯合株系。研究表明*OsATG8b*基因响应低氮胁迫处理, 过表达*OsATG8b*基因促进转基因拟南芥的生长发育, 使莲座叶增大, 单株产量显著提高(15.16%)。进一步研究表明, 过表达*OsATG8b*能够显著增强缺氮胁迫下转基因拟南芥叶片中的自噬活性, 从而有效缓解氮胁迫和碳胁迫对转基因拟南芥造成的生长抑制。因此, *OsATG8b*是提高氮素利用效率和产量的候选基因。

**关键词** 自噬, *OsATG8b*, 氮素再利用, 产量

甄晓溪, 刘浩然, 李鑫, 徐凡, 张文忠 (2019). 异源过表达*OsATG8b*基因提高转基因拟南芥的氮/碳胁迫耐受性和产量. 植物学报 54, 23–36.

氮素是植物体内最重要的营养元素, 是植物生长发育过程中必需的大量元素之一, 是氨基酸、蛋白质、核酸、叶绿素和激素等的重要组分(Kraiser et al., 2011)。氮素对植物(尤其是谷类作物)的产量和品质具有重要作用, 籽粒产量不仅取决于植株在开花前对氮素的吸收, 还取决于种子成熟期间氮素的动员再利用(Kichey et al., 2007), 因此对氮素循环再利用进行研究具有重要意义(Chardon et al., 2012)。

植物无法选择自身所需的营养环境, 只能依靠根际吸收有限的矿质营养维持生长发育, 因此植物必须有效代谢并循环利用体内的营养物质(Avila-Ospina et al., 2014; Krapp, 2015)。植物中大部分营养物质被分配到叶绿体中, C<sub>3</sub>植物中叶绿体蛋白质占叶片总氮的75%–80%, 因此叶绿体是植物中碳、氮循环再利用的主要来源(Makino and Osmond, 1991)。光合作用CO<sub>2</sub>固定酶Rubisco占叶片中可溶性蛋白质的50%以上, 是氮素动员再利用的主要来源(Masclaux-Daubresse et al., 2010)。

在植物发育的后期阶段, 叶片蛋白(尤其是叶绿体蛋白)被迅速降解, 从而输出大量可再利用的氮,

其释放的游离氨基酸及其它化合物被转运至新生的生殖器官和储存器官中(如新生的叶片或种子) (Masclaux-Daubresse et al., 2008), 这部分被重新再动员的氮也是种子中氮素的重要来源(Patrick and Offler, 2001)。植物中有机氮从衰老器官组织向籽粒中转移的循环过程(尤其是在氮胁迫条件下)是植物生产力和产量的重要决定因素(Masclaux-Daubresse et al., 2010)。虽然衰老叶片的蛋白质降解途径还没有被完全解析清楚, 但目前公认的代谢机制主要包括3种: 细胞质蛋白酶、衰老相关小泡(SAVs)和巨自噬(autophagy, 以下简称自噬) (Otegui et al., 2005; Ishida et al., 2008; Wada et al., 2009; Roberts et al., 2012)。

自噬是真核生物中一种保守的基本生物学过程, 正常情况下用于维持细胞稳态。当植物生长发育受到胁迫或营养饥饿时, 细胞通过自噬途径降解一些不必要的大分子物质或受损的细胞器来循环再利用自身养分以维持正常生命活动(Liu and Bassham, 2012; Yoshimoto, 2012; Avila-Ospina et al., 2014; Yang and Bassham, 2015)。在植物细胞受到胁迫时, 自噬

收稿日期: 2018-03-12; 接受日期: 2018-07-16

基金项目: 国家重点研发计划(No.2018YFD0200200)

\* 通讯作者。E-mail: celiafanfan@163.com; zwzhong@126.com

通过大规模的胞质降解路径降解单个长寿蛋白、蛋白质复合体及细胞器等来响应和适应胁迫条件(景红娟等, 2012)。Tsukada和Ohsumi (1993)首先在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中发现了自噬相关基因。目前已发现40多个自噬相关基因(ATGs), 它们大多编码参与自噬发生与调控的核心蛋白(Ohsumi, 2001; Feng et al., 2014; Yao et al., 2015), 且大多数高等植物中都存在自噬相关同源基因。已在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻(*Oryza sativa*)和玉米(*Zea mays*)等植物中证实了自噬对氮素再利用的重要作用。Guiboileau等(2012)利用 $^{15}\text{N}$ 同位素标记实验首次在拟南芥中证明了氮素从叶片到种子的再动员受自噬控制, 拟南芥自噬缺失导致突变体种子中氮素再利用效率显著降低至50%左右。水稻自噬缺失突变体*Osatg7-1*在营养生长阶段的生物量和氮素利用效率明显低于对照, 叶片早衰且衰老的叶片中氮含量较高, 说明*Osatg7-1*无法动员再利用衰老叶片中的氮素(Wada et al., 2015)。通过 $^{15}\text{N}$ 同位素标记发现, 玉米自噬缺失突变体*atg12*籽粒中再利用的氮素减少50%, 新生上部叶中的 $^{15}\text{N}$ 主要位于玉米棒上方, 说明玉米自噬突变体*atg12*中氮素从衰老叶向籽粒中再动员受到抑制(Li et al., 2015a)。在众多ATG蛋白中, ATG8蛋白在细胞水平的丰度可以调节自噬体的大小。在多种植物中过表达ATG8基因都表现出有利于整体植株生长发育的表型。例如, 过表达*AtATG8f*转基因拟南芥莲座叶显著增大, 生长发育速度加快, 且能有效抵抗碳氮胁迫(Slavikova et al., 2008); 过表达谷子(*Setaria italica*)自噬相关基因*SiATG8a*能够增强转基因拟南芥对氮胁迫和干旱胁迫的耐受性, 使氮胁迫下转基因拟南芥生物量与氮素含量增加, 而干旱胁迫下转基因拟南芥存活率较高(Li et al., 2015b); 异源表达谷子自噬相关基因*SiATG8a*还能够提高水稻对氮胁迫的耐受性(Li et al., 2016)。此外, 异源表达苹果(*Malus domestica*)自噬相关基因*MdATG8i*能够促进转基因拟南芥的营养生长, 增强转基因拟南芥和苹果愈伤组织对氮胁迫的耐受性(Wang et al., 2016); 过表达大豆(*Glycine max*)自噬相关基因*Gm-ATG8c*能够促进转基因大豆愈伤组织与转基因拟南芥抵抗氮胁迫及拟南芥的生长发育和产量提高(Xia et al., 2012)。Xia等(2011)通过对水稻全基因组数据分析, 鉴定了7个OsATG8的编码基因(*OsATG8a*、

*OsATG8b*、*OsATG8c*、*OsATG8d*、*OsATG8e*、*OsATG8f*和*OsATG8i*)。Izumi等(2015)对OsATG8s的氨基酸序列进行比对分析, 发现*OsATG8a*-c氨基酸序列高度一致, 而*OsATG8d*与*AtATG8i*较为相似, 他们通过将荧光蛋白(FP)与*OsATG8a*和*OsATG8d*融合, 成功建立了FPs-*OsATG8*水稻自噬监测系统, 并用该系统证明能量缺乏能够诱导水稻叶绿体和根质体发生自噬, 使叶绿体蛋白得到循环再利用, 同时也表明OsATG8s在作物自噬研究中具有至关重要的作用。

为了筛选水稻的可能氮高效利用候选基因, 我们前期克隆到1个新的水稻自噬核心基因(*LOC\_Os04g53240*; *Os04g0624000*) *OsATG8b* (*Oryza sativa* *Autophagy Related 8 gene*)。该基因位于第4号染色体, 全长2 754 bp, CDS全长360 bp, 编码120个氨基酸残基。我们克隆了*OsATG8b*基因ATG上游1 988 bp的启动子序列, 并使用PlantCare对该启动子序列进行顺式作用元件分析, 结果显示该序列包含启动子基本转录元件TATA-box和CAAT-box, 同时还含有光响应元件(Box I、CATT-motif和G-Box)、与水杨酸的响应相关元件(TCA-element)、生长发育相关元件(Skn-1 motif)和参与逆境胁迫相关的作用元件(TCT-motif、CCAAT-box和MBS)等顺式调控元件。

在本研究中, 我们发现*OsATG8b*基因响应低氮胁迫诱导。与野生型相比, 过表达*OsATG8b*转基因拟南芥表现出明显的生长优势, 莲座叶大小和株高显著增加、抽薹开花提前、植株生物量和产量也显著增加。同时, 缺氮胁迫下过表达*OsATG8b*转基因拟南芥叶片中的自噬活性显著增强, 且能够有效缓解碳、氮胁迫造成的生长抑制。因此, 我们认为*OsATG8b*基因可能是1个协同提高氮素利用效率和生产潜力的关键基因。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料及培养条件

实验所用水稻品种为粳稻(*Oryza sativa* L. subsp. *japonica*)沈农9816。培养条件: 光周期为14小时光照/10小时黑暗, 温度28°C/25°C, 光照强度为90  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。

拟南芥生态型为Columbia-0。培养条件: 光周期

为16小时光照/8小时黑暗, 温度( $22\pm 1$ ) $^{\circ}\text{C}$ , 光照强度为 $80\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。

## 1.2 水稻幼苗中*OsATG8b*基因对氮胁迫的响应

挑选籽粒饱满且大小一致的水稻种子, 经表面消毒后于 $28^{\circ}\text{C}$ 催芽2天。选取发芽状态一致的水稻种子置于1/2Hoagland营养液中培养14天, 然后将生长状态一致的水稻幼苗以全氮(NS)、低氮(NL)和缺氮(ND) 1/2 Hoagland营养液继续培养。全氮1/2Hoagland营养液中氮的浓度为 $3\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 用 $\text{KNO}_3$ 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 来改变营养液中氮的浓度; 低氮条件下二者的浓度分别为 $0.6$ 和 $0.1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 缺氮条件下二者浓度均为 $0\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 缺少的 $\text{K}^{+}$ 用 $\text{KCl}$ 来补足。培养1和3天时分别取水稻幼苗的叶片和根, 液氮速冻后保存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 用于总RNA提取和基因表达分析。

## 1.3 植物表达载体构建及拟南芥遗传转化

以水稻cDNA为模板, 利用常规PCR方法扩增*Os-ATG8b*基因的CDS序列(360 bp), 分别在上、下游引物中引入*Nco* I和*Bst* E II的酶切位点, 通过*Nco* I/*Bst* E II双酶切插入到双元表达载体pCambia1301, 完成携带35S-*OsATG8b*的植物表达载体构建。以水稻基因组DNA为模板, 扩增*OsATG8b*基因启动子序列(1988 bp), 分别在上、下游引物中引入*Eco*R I和*Nco* I的酶切位点, 通过*Eco*R I/*Nco* I双酶切插入到双元表达载体pCambia1301, 完成*Pro<sub>OsATG8b</sub>-GUS*双元表达载体的构建。使用农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101介导的花序浸泡法(Clough and Bent, 1998)转化野生型拟南芥。将35S-*OsATG8b*转基因拟南芥T<sub>0</sub>代种子在含有 $30\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 潮霉素的筛选培养基上经过3代筛选获得5个纯合株系, 选取2个代表株系用于后续实验。通过GUS组织化学染色鉴定选取的启动子区域具有活性的*Pro<sub>OsATG8b</sub>-GUS*转基因拟南芥。所有构建均经测序验证正确, 构建引物信息见表1。

## 1.4 转基因拟南芥的表型分析

使用10%安替福民对纯合的35S-*OsATG8b*转基因和野生型(WT)拟南芥种子表面消毒5分钟后, 用无菌蒸馏水冲洗4次, 置于 $4^{\circ}\text{C}$ 春化处理2天。将种子均匀平

铺于1/2MS培养基, 苗龄8天时(萌发后天数)将幼苗转土培养, 用于全氮条件下的基本表型分析。用相机(Nikon D3200)对相应时间点表型进行拍照记录。为了分析转基因拟南芥对氮胁迫的耐受性, 将苗龄7天的转基因拟南芥和野生型(WT)移至1/2MS (NS)及不含氮素的1/2MS (ND)培养基上进行水平和垂直培养, 观察其地上和地下部分的生长变化。使用扫描仪(EPSON Perfection v33)对水平培养和垂直培养9天后的植株进行表型记录, 并利用Image J软件对垂直培养的根长进行比较分析。

## 1.5 叶绿素和可溶性蛋白含量测定

总叶绿素含量测定参照Arnon (1949)的方法。可溶性蛋白含量测定参照Bradford法(Bradford, 1976)。

## 1.6 氮代谢相关基因相对表达量分析

分别取全氮和缺氮处理14天的35S*OsATG8b*转基因及野生型拟南芥的叶片和根系, 液氮速冻后存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 提取总RNA并反转录得到cDNA。以*TIP41*为内参基因对所有样品进行归一化处理, 利用荧光定量RT-PCR检测氮代谢相关基因的相对表达水平变化。总RNA提取、cDNA合成和荧光定量RT-PCR分析参照文献所述(Liu et al., 2010)。荧光定量RT-PCR检测所用的基因特异性引物和内参引物见表1。

## 1.7 外源植物激素/缺氮胁迫处理和GUS组织化学染色

将*Pro<sub>OsATG8b</sub>-GUS*转基因拟南芥种子消毒后, 均匀平铺在含有 $30\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 潮霉素的筛选培养基上, 用于*OsATG8b*基因启动子的时空表达模式和对植物激素/缺氮胁迫的响应分析。植物激素水杨酸(SA) (SIGMA)浓度为 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 培养条件同1.1节所述, 处理时间24小时。GUS组织化学染色分析参照Liu等(2010)的文献。

## 1.8 MDC染色检测自噬体活性

将苗龄7天的转基因和野生型拟南芥幼苗置于含有 $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 刀豆素(ConA) (SIGMA)的缺氮培养液中处理12小时, 将叶片取下立即浸没于单丹磺酰戊二胺

表1 引物信息

Table 1 The information of primers

Primer name	Sequence (5'-3')	Function
cOsATG8b-F	CCATTCAAGTGGATGGCCAAGAGCTCGTTCAAGC	Gene cloning
cOsATG8b-R	GGTGACCTAGAGCAGCCCAAAGGTGTTCTCG	Gene cloning
cpOsATG8b-F	AAGCTTAAAATTAAATAAGACGAACAGTCAAACG	Gene cloning
cpOsATG8b-R	CCATGGCGCTCCTTCCTGCACACAAT	Gene cloning
rtOsATG8b-F	GCTGATCTTACCGTTGGGCA	Real-time RT-PCR
rtOsATG8b-R	ATCAGAGCAGCTGTTGGTGG	Real-time RT-PCR
rtAtAMT1-F	GCCTCTGCTGACTACTCCAACCTT	Real-time RT-PCR
rtAtAMT1-R	GACCAGAACCAGTGAGAGACGA	Real-time RT-PCR
rtAtNR1-F	AGGATGGGCTAGTAAGCATAAGG	Real-time RT-PCR
rtAtNR1-R	GCAAACCTGAATCATAGCGGTG	Real-time RT-PCR
rtAtGS2-F	CACCAAACCTTACTCTCTGACA	Real-time RT-PCR
rtAtGS2-R	CACTATCTTCACCAGGTGCTTG	Real-time RT-PCR
rtAtGDH1-F	GCTTTAGCAGCAACAAACAGAA	Real-time RT-PCR
rtAtGDH1-R	TGAGCCAATGCGTTCACCTC	Real-time RT-PCR
rtACTIN1-F	ACCATTGGTGCTGAGCGTTT	Real-time RT-PCR
rtACTIN1-R	CGCAGCTTCCATTCTATGAA	Real-time RT-PCR
rtTIP41-F	GTATGAAGATGAACTGGCTGACAAT	Real-time RT-PCR
rtTIP41-R	ATCAACTCTCAGCCAAAATCGCAAG	Real-time RT-PCR

(monodansylcadaverine, MDC)染液(SIGMA)中进行染色,通过激光共聚焦显微镜(Zeiss LSM 710)观察自噬体荧光信号, MDC染色方法参照Wang等(2013)的文献。

2 结果与讨论

2.1 OsATG8b基因响应氮胁迫

在对沈农9816水稻幼苗进行低氮和缺氮处理1和3天时,分别利用荧光定量RT-PCR检测了叶片及根系中OsATG8b基因的表达量(图1)。结果显示低氮处理1天,水稻幼苗叶片中OsATG8b基因的表达量比对照略有上升,缺氮处理1天则急剧上升(图1A);水稻幼苗根系在低氮和缺氮处理1天时,OsATG8b基因的表达量随氮胁迫程度加深而上升(图1B);OsATG8b在低氮处理3天的水稻幼苗叶片中表达量增加(图1A),在缺氮处理3天的叶片和根系中表达量均显著升高(图1)。上述结果表明,水稻幼苗中OsATG8b基因的表达受氮胁迫诱导。

2.2 过表达OsATG8b基因促进转基因拟南芥生长发育并提高产量

为了研究OsATG8b基因的功能,我们构建了35S-OsATG8b双元表达载体,获得了多个独立的转基因拟南芥株系。我们选取其中2个纯合株系作为代表株系进行持续的表型观察。首先,利用荧光定量RT-PCR确定了OsATG8b在转基因拟南芥中的表达水平(图2A);进一步通过表型观察,我们发现在整个生长发育过程中,转基因拟南芥的莲座叶均显著大于野生型(WT) (图2B, D),且过表达OsATG8b加快了转基因拟南芥的发育进程,使其抽薹开花明显提前约6天(表2)。此外,我们统计了转基因拟南芥的株高,发现转基因拟南芥的株高显著高于野生型(10.42%) (图2C, E);我们还发现随着苗龄增加,转基因拟南芥的叶绿素含量始终高于对照(图2F)。8天苗龄的转基因拟南芥莲座叶中的可溶性蛋白含量与对照几乎没有差异;但从苗龄18天开始一直到植株成熟,转基因拟南芥莲座叶中的可溶性蛋白含量始终高于对照(图



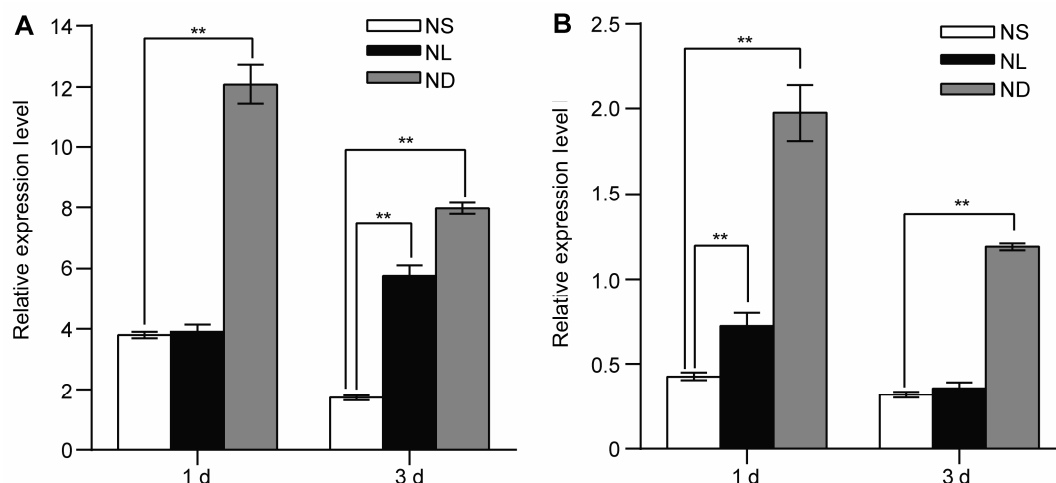


图1 氮胁迫处理诱导水稻幼苗叶片及根中*OsATG8b*基因的表达

(A) 全氮条件下生长14天的水稻幼苗转移至全氮(NS)、低氮(NL)和缺氮(ND)条件下生长1和3天时叶片中*OsATG8b*基因的表达量;(B) 全氮、低氮和缺氮条件下生长1和3天的水稻根系中*OsATG8b*基因的表达量。图中数据为平均值±标准差,  $n=16$ , 实验经3次生物学重复。\*\*表示全氮条件与低氮和缺氮条件相比差异显著( $P<0.01$ ) (Student's *t*-test)。

Figure 1 Identification of *OsATG8b* as a nitrogen deficiency inducible/responsive gene in leaves and roots of rice seedlings

(A) The rice seedlings cultured with N-sufficient (NS) solution for 14 days and transferred to the same NS solution, low N (NL) solution and the N-deficient (ND) solution, the expression of *OsATG8b* gene in leaves after 1 day and 3 days treatment; (B) The expression of *OsATG8b* gene in roots after 1 day and 3 days treatment. Values are means±SD,  $n=16$ , three biological replicates were performed. \*\* indicate significant differences in NS solution compared with NL and ND solution ( $P<0.01$ ) (Student's *t*-test).

表2 野生型和35S-*OsATG8b*转基因拟南芥的抽薹及开花时间

Table 2 Bolting and flowering times of the wild-type and 35S-*OsATG8b* transgenic Arabidopsis

	WT	L-13	L-14
Blotting time (d)	36.56±1.58	30.78±2.07**	31.39±1.91**
Flowering time (d)	42.67±1.75	35.94±1.98**	36.61±1.94**

数据为平均值±标准差,  $n=24$ , \*\*表示各转基因株系与野生型(WT)之间差异显著( $P<0.01$ ) (Student's *t*-test), 实验经3次生物学重复, 统计天数为播种后天数。

Values are means±SD,  $n=24$ , \*\* indicate significant difference between transgenic lines and wild type (WT) ( $P<0.01$ ) (Student's *t*-test), three biological replicates were performed; the two traits were scored as days after sowing.

2G)。经统计分析表明, 转基因拟南芥的总果荚数、千粒重和单株总种子重量显著增加(表3)。上述结果表明, 过表达*OsATG8b*基因能够促进转基因拟南芥的生长发育并提高其产量。

### 2.3 过表达*OsATG8b*基因可提高转基因拟南芥对缺氮胁迫的耐受性

为研究过表达*OsATG8b*转基因拟南芥对氮胁迫的响

应, 将在1/2MS培养基上生长7天的转基因及其野生型拟南芥幼苗移至1/2MS全氮(NS)和1/2MS缺氮(ND)培养基上处理9天, 采取水平和垂直2种培养方式进行地上部和地下部观察。我们发现无论在全氮还是缺氮条件下, 转基因拟南芥的生长情况都优于对照, 其地上部莲座叶和主根长均显著大于野生型(图3A, B, E, F), 地上部和地下部生物量也显著增加(图3G, H); 说明35S*OsATG8b*转基因拟南芥与野生型相比能够更好地抵抗缺氮胁迫。此外, 我们还测定了全氮/缺氮条件下转基因拟南芥和野生型的叶绿素和可溶性蛋白含量(图3C, D), 结果表明转基因拟南芥叶绿素和可溶性蛋白含量均高于WT。分别对苗龄为10天的*ProOsATG8b*-*GUS*转基因拟南芥进行缺氮处理和10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 水杨酸处理, 24小时后对其进行GUS组织化学染色, 发现*OsATG8b*启动子活性显著增强(图3I, J)。

### 2.4 过表达*OsATG8b*促进转基因拟南芥抵抗黑暗诱导的碳胁迫

为进一步探究*OsATG8b*基因对碳饥饿的响应, 我们

表3 野生型和35S-OsATG8b转基因拟南芥的产量性状

Table 3 Yield related characteristics of the wild-type and 35S-OsATG8b transgenic Arabidopsis

	Total number of siliques	Yield per plant (mg)	Thousand grain weight (mg)
WT	35.74±3.86	85.34±7.89	14.87±0.23
L-13	46.26±3.13**	100.13±6.02**	16.36±0.21**
L-14	48.22±3.62**	99.77±5.76**	17.54±0.41**

所有株系均经单株收获统计, 数据为平均值±标准差,  $n=10$ 。\*\*表示各转基因株系与野生型(WT)之间差异显著( $P<0.01$ ) (Student's  $t$ -test), 实验经3次生物学重复。

Seeds of all lines were harvested and weighted individually, values are means±SD,  $n=10$ . \*\* indicate significant difference between transgenic lines and wild type (WT) ( $P<0.01$ ) (Student's  $t$ -test), three biological replicates were performed.

将苗龄7天的转基因和野生型拟南芥幼苗同时进行黑暗处理。结果表明, 黑暗处理10天后, 与野生型相比, 转基因拟南芥生长速度加快, 莲座叶数目增多, 且叶片黄化的程度较轻, 叶绿素含量显著增加, 说明OsATG8b能够使植物更好地抵抗碳胁迫, 从而促进转基因拟南芥在碳胁迫条件下的生长发育(图4A, B)。

2.5 过表达OsATG8b能够增强氮胁迫条件下转基因拟南芥叶片中的自噬活性

为了验证过表达OsATG8b转基因拟南芥中的自噬活性是否增强, 我们对苗龄7天的转基因和野生型拟南芥进行缺氮处理, 并通过MDC染色检测其叶片中的自噬活性。由于 $H^+$ -ATPase抑制剂ConA能够增加植物细胞液泡腔内pH, 通过抑制液泡水解酶活性来促进自噬体在液泡中积累, 使细胞内自噬体便于观察, 我们在缺氮处理液中添加了 $H^+$ -ATPase抑制剂ConA。在激光共聚焦显微镜下观察, 转基因拟南芥叶肉细胞中的自噬体荧光信号显著多于野生型, 且信号强度较大(图5)。以上结果表明, 过表达OsATG8b能够显著增加转基因拟南芥自噬体的数量、增强自噬活性, 从而有效促进转基因拟南芥抵抗缺氮胁迫。

2.6 过表达OsATG8b转基因拟南芥中氮代谢关键基因的表达变化

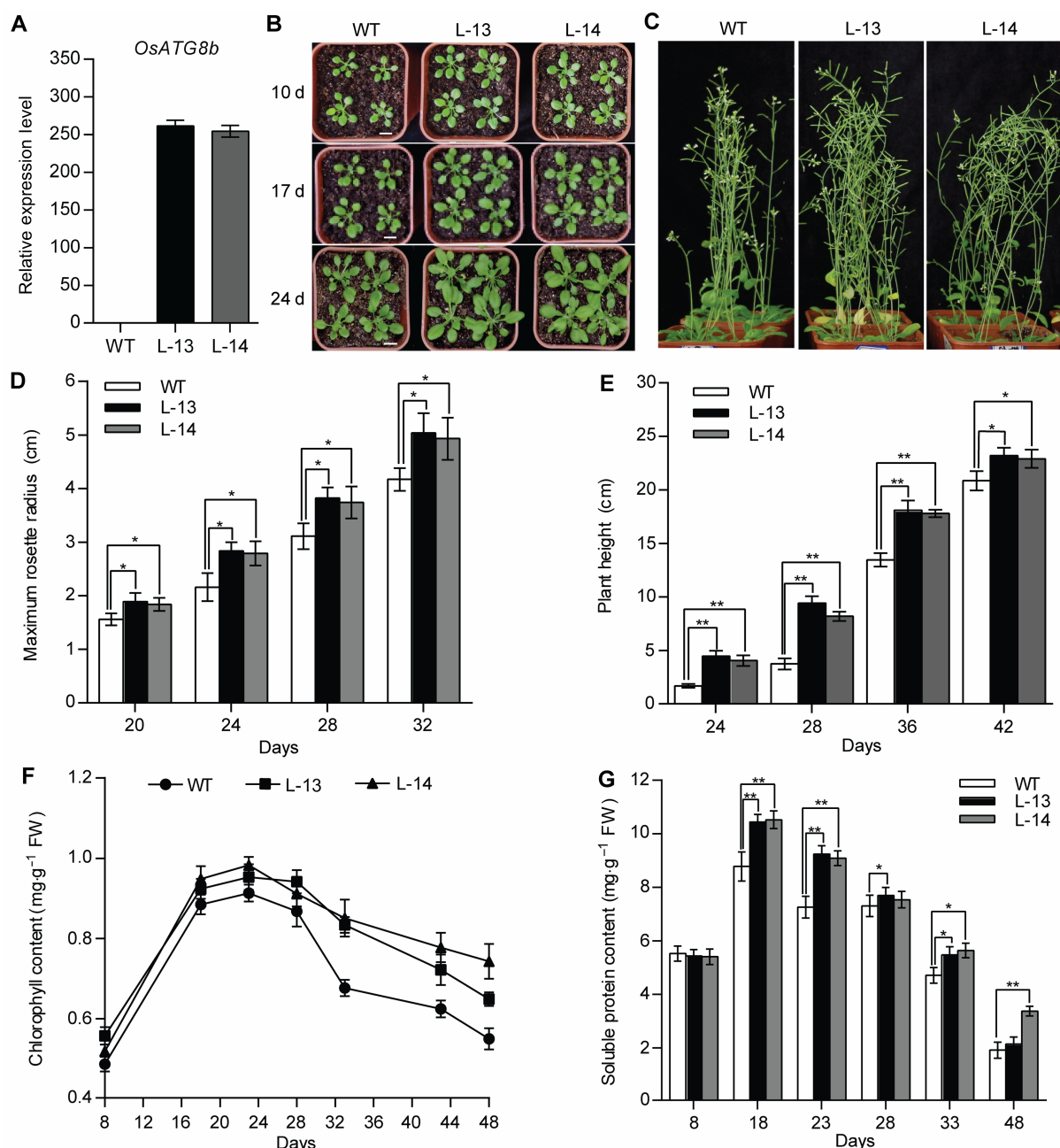
为进一步探究过表达OsATG8b转基因拟南芥对氮素代谢的响应, 我们检测了转基因和野生型拟南芥中一些氮代谢相关基因的相对表达水平。在全氮条件下, 过表达OsATG8b促进了转基因拟南芥叶片中铵转运蛋白基因(*AtAMT1*)、硝酸还原酶基因(*AtNR1*)及谷氨酰胺合成酶基因(*AtGS2*)的表达, 谷氨酸脱氢酶合成基因(*AtGDH1*)的表达量较低, 但仍显著高于野生型

(图6A); 转基因拟南芥地下部硝酸盐转运蛋白基因(*AtNRT1.1*)和谷氨酸脱氢酶基因(*AtGDH1*)的表达量显著高于野生型, 亚硝酸还原酶基因(*AtNIR1*)的表达水平也略有升高(图6B)。在缺氮条件下, 转基因拟南芥地上部*AtNR1*、*AtGDH1*和*AtGS2*的表达水平显著高于野生型, *AtAMT1*的表达水平也略高于野生型(图6A); 过表达OsATG8b显著促进拟南芥根中*AtNRT-1.1*、*AtNIR1*和*AtGDH1*的表达, *AtAMT1*的表达也有所升高(图6B)。上述结果表明, 无论在全氮还是缺氮条件下, 过表达OsATG8b均促进了转基因拟南芥中氮转运蛋白基因和氮代谢关键酶合成基因的表达。

2.7 讨论

前人研究表明, 营养饥饿能够诱导植物自噬发生(Moriyasu and Ohsumi, 1996; Thompson, 2005)。碳、氮胁迫下, 许多自噬相关基因的转录水平显著上调(Breeze et al., 2011; Xia et al., 2011)。本研究中, 水稻自噬相关基因OsATG8b在氮胁迫诱导下表达水平显著升高, 同时在缺氮条件下还可以直接观察到过表达OsATG8b基因的转基因拟南芥叶片中自噬体活性增加(图5), 说明OsATG8b可能是参与抵抗氮胁迫的自噬基因(图1)。在其它植物中已有关于ATG8s基因功能的研究。例如, 过表达GmATG8c能够提高转基因拟南芥对氮胁迫的耐受性并使其产量增加(Xia et al., 2012); 异源表达SiATG8a能够促进转基因水稻抵抗氮饥饿(Li et al., 2016)。本研究中, 我们验证了OsATG8b在植株生长发育、产量形成和氮素利用中的作用。

在适宜的生长条件下, 35S-OsATG8b转基因拟南芥表现出极强的生长优势, 过表达OsATG8b促进转基因拟南芥的营养生长, 使植株生物量显著增加

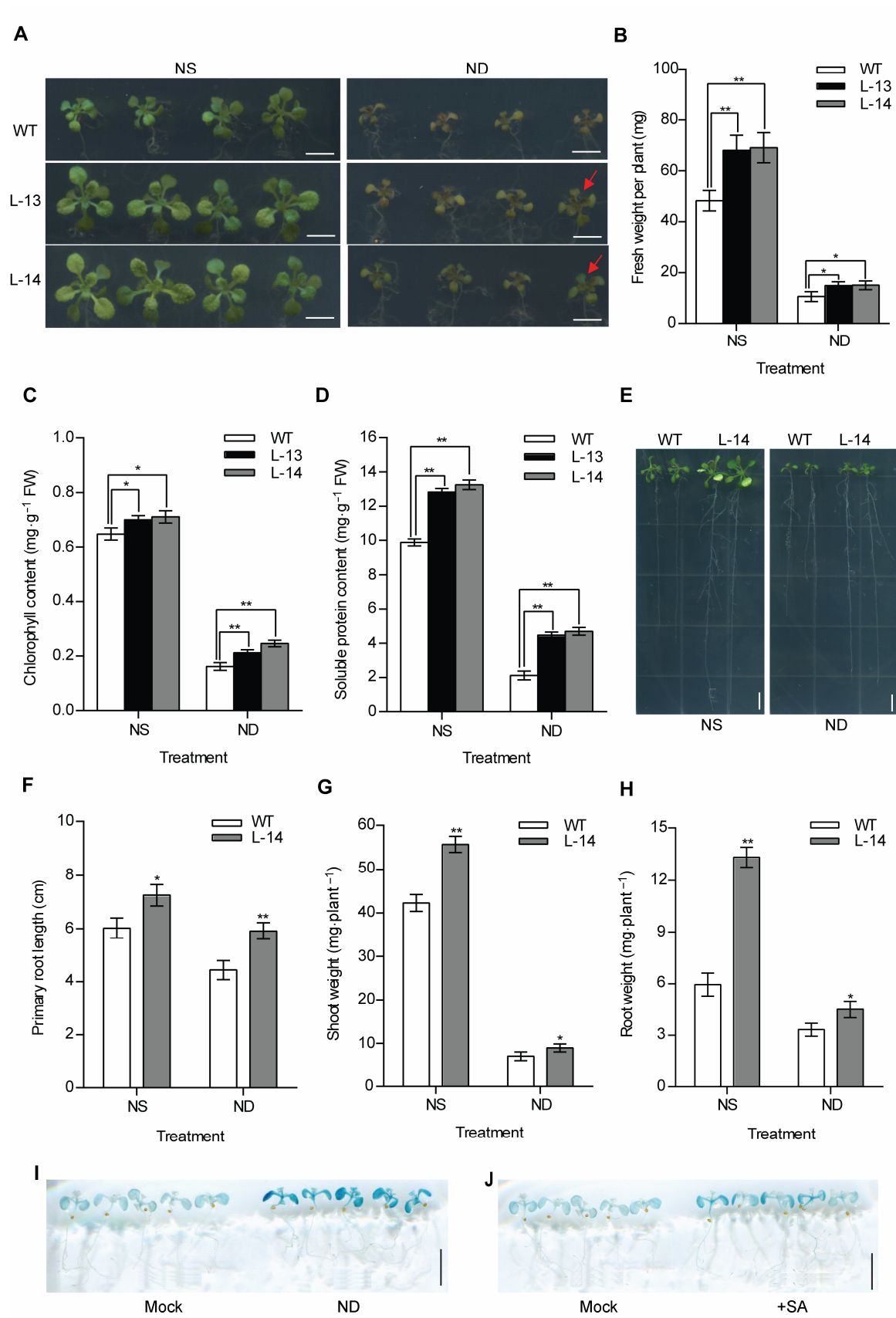


**图2** 过表达*OsATG8b*促进转基因拟南芥生长发育

将苗龄8天的野生型(WT)和35S-*OsATG8b*转基因拟南芥幼苗移入蛭石-营养土(1:3, v/v)中。(A) 苗龄14天的35S-*OsATG8b*转基因拟南芥和WT幼苗中*OsATG8b*的表达水平;(B) 由上至下依次为移苗后10、17和24天的拟南芥表型;(C) 移苗后42天的表型;(D) 不同苗龄的35S-*OsATG8b*转基因拟南芥和WT的最大莲座叶半径;(E) 株高;(F) 总叶绿素含量;(G) 可溶性蛋白含量。Days: 萌发后天数。图中数据为平均值±标准差,  $n=24$ , \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$  (Student's *t*-test), 实验经3次生物学重复。Bars=1 cm

**Figure 2** Over-expression of *OsATG8b* promotes growth and development of transgenic Arabidopsis

8-day-old seedlings were transferred to vermiculite-nutritional soil (1:3, v/v). (A) Expression level of *OsATG8b* in 14-day-old seedlings of 35S-*OsATG8b* transgenic lines and wild type (WT); (B) Panels from top to bottom show phenotypic observations of transgenic lines and WT of Arabidopsis at 10, 17 and 24 days after transfer to soil, respectively; (C) Phenotype of transgenic lines and WT at 42 days after transfer to soil; (D) The maximum rosette radius of 35S-*OsATG8b* transgenic lines and WT at different seedling age; (E) The plant height; (F) The total chlorophyll content; (G) The soluble protein content. Days: Days after germination. Values are means±SD,  $n=24$ , \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$  (Student's *t*-test), three biological replicates were performed. Bars=1 cm



**图3** 过表达*OsATG8b*促进转基因拟南芥抵抗缺氮胁迫

(A) 将苗龄7天的35S-*OsATG8b*转基因和野生型(WT)拟南芥幼苗分别移入全氮(NS)和缺氮(ND)1/2MS培养基中培养9天后的表型; (B)–(D) 分别为全氮(NS)和缺氮(ND)处理9天的35S-*OsATG8b*转基因和WT拟南芥幼苗的鲜重, 叶绿素和可溶性蛋白含量; (E) 苗龄7天的35S-*OsATG8b*转基因和WT拟南芥幼苗全氮(NS)和缺氮(ND)垂直培养9天后的表型; (F)–(H) 分别为全氮(NS)和缺氮(ND)处理9天的35S-*OsATG8b*转基因和WT拟南芥幼苗的主根长、地上部和地下部鲜重; (I), (J) 分别为苗龄10天的*Pro<sub>OsATG8b</sub>-GUS*转基因拟南芥经缺氮处理和10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 水杨酸(SA)处理24小时后的GUS组织化学染色结果。Mock代表未经处理的拟南芥。数据为平均值 $\pm$ 标准差,  $n=16$ , \*和\*\*分别表示各转基因株系与WT之间差异显著( $P<0.05$ )和极显著( $P<0.01$ ) (Student's *t*-test), 实验经3次生物学重复。Bars=5 mm

**Figure 3** Overexpression of *OsATG8b* enhances tolerance to N deficiency in transgenic Arabidopsis

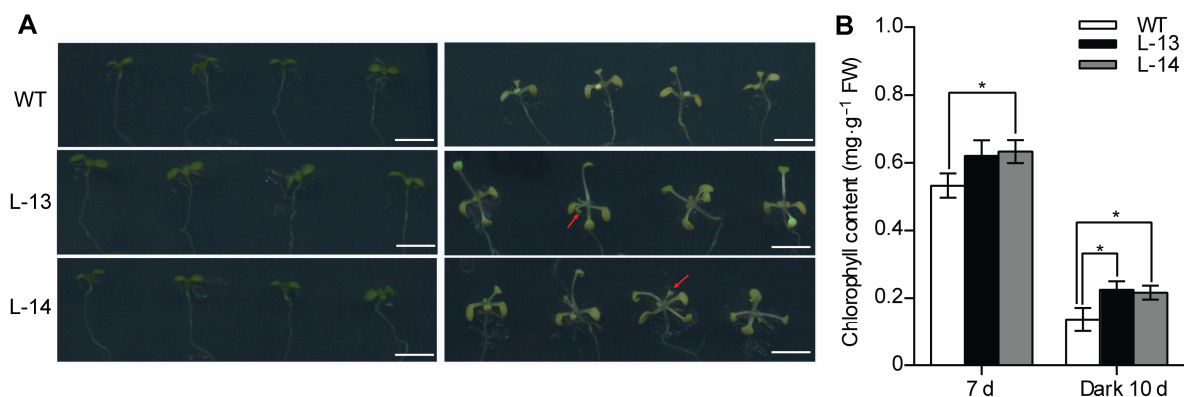
(A) 7-day-old seedlings of 35S-*OsATG8b* transgenic lines and wild type (WT) were transferred to 1/2MS medium for horizontal culture with sufficient (NS) or deficient (ND) N for 9 days. (B)–(D) The fresh weight, chlorophyll content and soluble protein content in rosette leaves of WT and 35S-*OsATG8b* transgenic Arabidopsis under NS or ND for 9 days, respectively; (E) The phenotype of 7-day-old seedlings of 35S-*OsATG8b* transgenic lines and WT were transferred to vertical plates with NS or ND for 9 days; (F)–(H) The primary root length, the shoot weight and the root weight of WT and transgenic Arabidopsis lines under NS or ND for 9 days, respectively; (I), (J) 10-day-old seedlings of *Pro<sub>OsATG8b</sub>-GUS* transgenic Arabidopsis were transferred to ND and 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  SA for 24 h, respectively. Mock represented that the seedlings without treated. Values are means $\pm$ SD,  $n=16$ , \* and \*\* indicate significant ( $P<0.05$ ) and extremely significant ( $P<0.01$ ) differences between transgenic lines and WT (Student's *t*-test), three biological replicates were performed. Bars=5 mm

(图2B, C, 图3A, E); 35S-*OsATG8b*转基因拟南芥莲座叶中叶绿素和可溶性蛋白含量增加(图2F, G), 反映出转基因拟南芥源器官中氮素含量较高, 表明过表达*OsATG8b*转基因拟南芥可能通过增加营养生长阶段氮素的吸收和积累, 为生殖生长和产量形成提供了充足的养分。过表达*OsATG8b*加速了转基因拟南芥营养生长向生殖生长的转变(表2), 延长了转基因拟南芥的生殖生长阶段, 从而使其果荚数量、单株产量和种子千粒重显著增加(图2C; 表3)。

细胞自噬是植物中参与营养物质的重新分配、清除受损的蛋白和细胞器及响应生物和非生物胁迫等过程的一种重要的降解途径(黄晓和李发强, 2016)。在所有真核生物的养分循环过程中, 自噬都发挥重要作用, 尤其是对于氮素的再动员并向籽粒中转移至关重要。对拟南芥和玉米自噬相关基因缺失突变体的研究表明, 自噬缺失导致叶片中氮素向籽粒中再动员过程受阻(Guiboileau et al., 2012, 2013; Wada et al., 2015; Li et al., 2015a)。自噬相关基因缺失突变体在营养饥饿时表现出明显的生长发育迟缓、加速衰老及存活率下降等表型(Guiboileau et al., 2012; Wada et al., 2015; Li et al., 2015a; 刘洋等, 2018), 表明植物中自噬相关基因在抵抗营养胁迫过程中发挥重要作用。

由于自噬缺陷导致细胞中的含氮资源无法被有效回收和利用, 因此产生的营养物质及废物堆积会促进细胞早衰死亡, 同时影响其它途径的氨基酸产生, 从而抑制植物生长, 并进一步降低氮素利用效率(任晨霞和龚清秋, 2014)。过表达*OsATG8b*不仅能在全氮条件下显著增加转基因拟南芥的全株生物量, 而且能有效缓解缺氮胁迫对莲座叶和根系造成的生长抑制(图3A, E)。转基因拟南芥莲座叶中叶绿素和可溶性蛋白含量有所增加(图3C, D), 说明过表达*OsATG8b*能促进转基因拟南芥在全氮条件下积累更多可利用的氮。MDC是一种广泛应用于哺乳动物和植物研究的嗜酸性染料, 它可以作为识别自噬体的探针来检测自噬结构(Biederbick et al., 1995; Contento et al., 2005)。ConA可以通过增大液泡腔内的内部pH值, 使细胞中的水解酶处于最适环境有利于自噬体的观察(Yoshimoto et al., 2004; Ishida et al., 2008)。在缺氮条件下, 通过MDC染色结合激光共聚焦观察, 我们还发现过表达*OsATG8b*基因能够显著增加转基因拟南芥叶片中的自噬体活性(图5), 表明转基因拟南芥可以在缺氮条件下通过增加自噬活性更好地利用前期积累的氮素; 缺氮处理24小时的*Pro<sub>OsATG8b</sub>-GUS*转基因拟南芥中*OsATG8b*启动子活性增强(图3I), 进



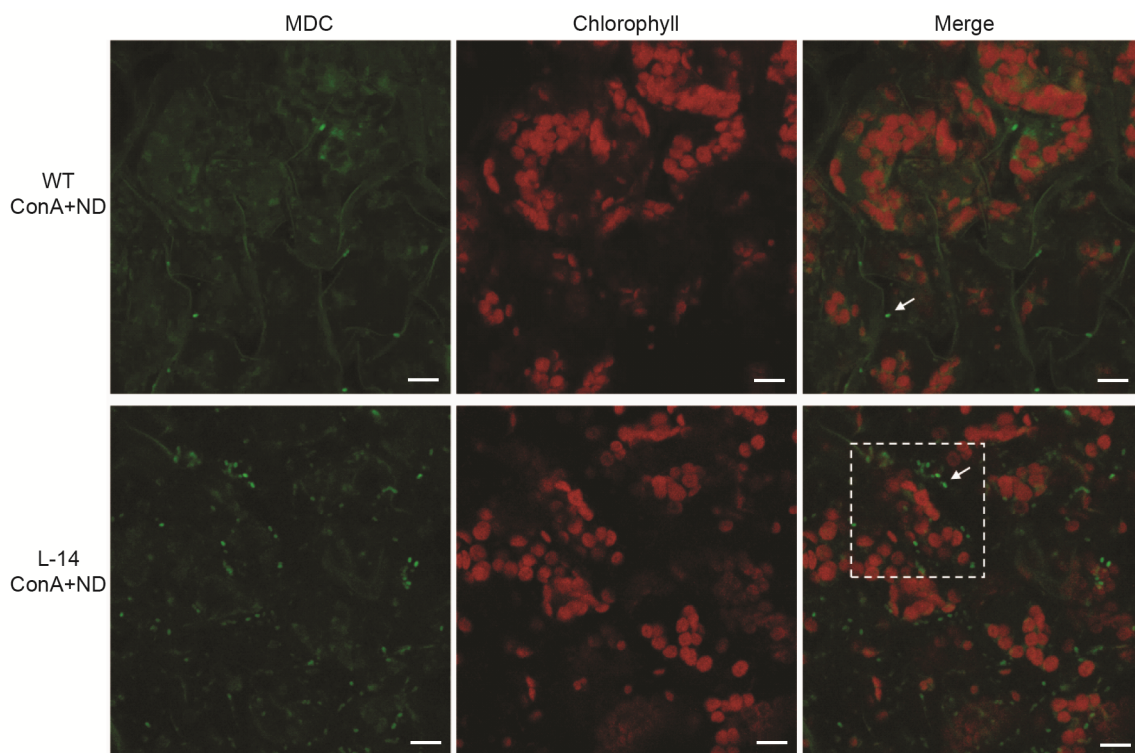


**图4** 过表达*OsATG8b*促进转基因拟南芥抵抗黑暗诱导的碳胁迫

(A) 对苗龄7天的35S-*OsATG8b*转基因拟南芥和野生型(WT)黑暗处理10天后记录表型(左为处理前, 右为处理后); (B) 叶绿素含量测定。数据为平均值±标准差,  $n=10$ , \*表示各转基因株系与WT之间差异显著( $P<0.05$ ) (Student's *t*-test), 实验经3次生物学重复。Bars=5 mm

**Figure 4** Overexpression of *OsATG8b* in Arabidopsis enhanced tolerance to carbon starvation induced by dark treatment

(A) 7-day-old seedlings of 35S-*OsATG8b* transgenic lines and wild type (WT) were transferred to darkness for 10 days (The left is before treatment, and the right is after treatment); (B) The chlorophyll content determination. Values are means±SD,  $n=10$ , \* indicate significant difference between transgenic lines and WT ( $P<0.05$ ) (Student's *t*-test), three biological replicates were performed. Bars=5 mm

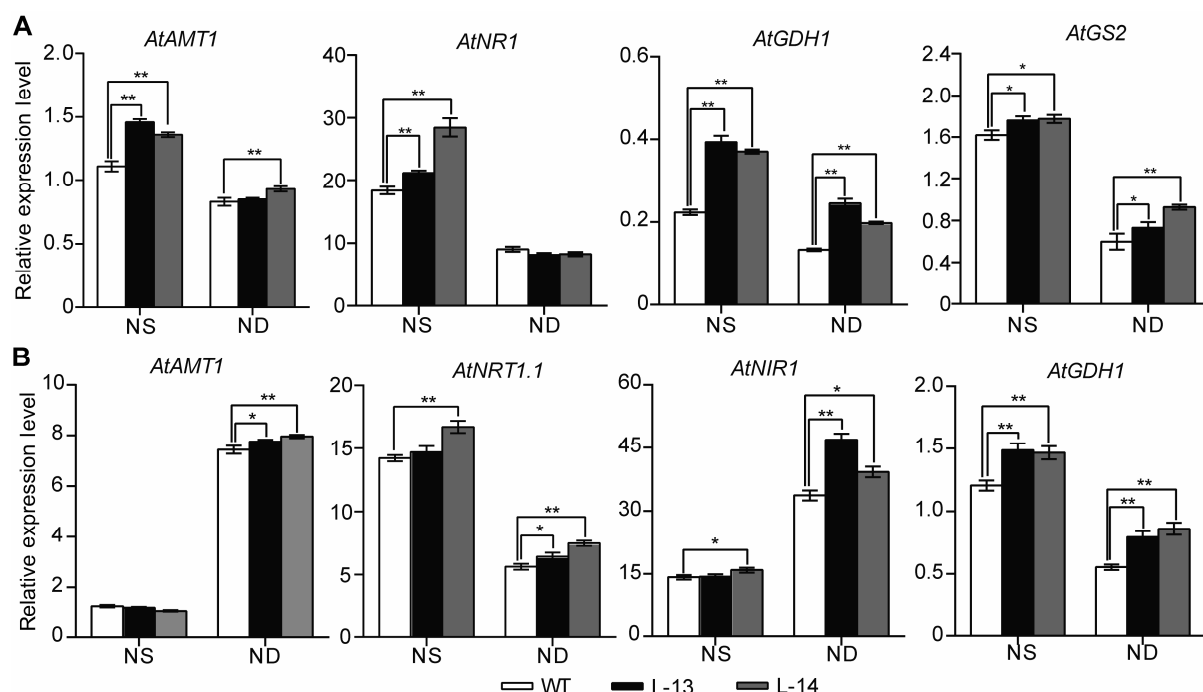


**图5** 缺氮条件下过表达*OsATG8b*转基因拟南芥中的自噬活性增加

将苗龄7天的35S-*OsATG8b*转基因(L-14)和野生型(WT)拟南芥幼苗转移至含有 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ConA的缺氮培养液中处理12小时后进行MDC染色, 于激光共聚焦显微镜下观察自噬体荧光。Bars=10  $\mu\text{m}$

**Figure 5** Overexpression of *OsATG8b* in Arabidopsis enhanced the autophagic activity under N deficient condition

7-day-old seedlings of transgenic line (L-14) and wild type (WT) were transferred to in N-deficient (ND) liquid medium with  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ConA for 12 h, MDC-stained autophagosomes in leaves were observed by confocal microscopy. Bars=10  $\mu\text{m}$



**图6** 过表达*OsATG8b*转基因拟南芥中氮代谢关键基因的表达变化

将7天苗龄的35S-*OsATG8b*转基因和野生型(WT)拟南芥移至全氮(NS)和缺氮(ND) 1/2MS培养基处理14天。(A) 35S-*OsATG8b*转基因和WT拟南芥中地上部氮代谢相关基因相对表达水平; (B) 地下部氮代谢相关基因相对表达水平。数据为平均值±标准差,  $n=10$ , \*和\*\*分别表示各转基因株系与WT之间差异显著( $P<0.05$ )和极显著( $P<0.01$ ) (Student's *t*-test), 实验经3次生物学重复。

**Figure 6** Overexpression of *OsATG8b* in *Arabidopsis* changes the expression of genes in nitrogen metabolic

7-day-old seedlings of transgenic lines and wild type (WT) were transferred to 1/2MS medium with sufficient (NS) or deficient (ND) nitrogen for 14 days. (A) The expression of genes related to nitrogen metabolic in rosette leaves of 35S-*OsATG8b* transgenic lines and WT; (B) The expression of genes related to nitrogen metabolic in roots of 35S-*OsATG8b* transgenic lines and WT. Values are means±SD,  $n=10$ , \* and \*\* indicate significant ( $P<0.05$ ) and extremely significant ( $P<0.01$ ) differences between transgenic lines and WT (Student's *t*-test), respectively, three biological replicates were performed.

一步证明氮胁迫能够诱导*OsATG8b*表达, 使自噬作用增强, 从而提高转基因拟南芥对氮胁迫的耐受性。根系是植物感知生长环境中氮素供应情况的重要器官, 其形态结构对于氮素的吸收利用非常关键(Walch-Liu et al., 2005), 过表达*OsATG8b*转基因拟南芥的根系有助于增加其对氮素的吸收。

Yoshimoto等(2009)研究表明, 拟南芥自噬缺失突变体*atg5*的早衰表型是由水杨酸过量积累造成的, 在拟南芥自噬突变体*atg5-2*中过表达细菌的水杨酸羟化酶*NahG*基因, 或者在双突变体*atg5-2/sid2* (*sid2*为水杨酸合成缺陷突变体)中, *atg5-2*的叶片早衰表型均得到抑制。我们发现*OsATG8b*启动子响应水杨酸处理, 其活性明显增强(图3J), 表明自噬可能在植物抵抗衰老过程中发挥一定作用。前人研究表明, 自噬

可以通过提供游离氨基酸等能源来保证夜间能量供应(Izumi et al., 2013), 且自噬在叶片淀粉降解过程中也起到一定作用(Wang et al., 2013)。本研究表明, 过表达*OsATG8b*能够有效缓解碳胁迫(黑暗处理10天)造成的转基因拟南芥生长受抑制和叶绿素含量下降(图4); 此外, 将成熟幼苗经黑暗处理后我们发现过表达*OsATG8b*基因可以显著抑制由于黑暗处理导致的叶片叶绿素含量下降(结果未显示), 表明过表达*OsATG8b*可能通过增强自噬作用, 为碳饥饿条件下的转基因拟南芥的代谢活动提供能量。

植物通过硝酸盐转运因子(*AtNRT*)和铵盐转运因子(*AtAMTs*)转运根系吸收的硝态氮与铵态氮(Good et al., 2004; Rentsch et al., 2007)。硝酸盐在硝酸盐还原酶(NR)和亚硝酸盐还原酶(NiR)的作用下形成铵

盐, 铵盐通过谷氨酰胺合成酶-谷氨酸合酶(GS2/GOGAT)途径生成谷氨酸盐, 谷氨酸盐再通过膜系统转运到木质部并运输到其它库器官中(Meyer and Stitt, 2001)。本研究中, 无论是全氮还是缺氮条件下, 35S-OsATG8b转基因拟南芥莲座叶和根系中氮素吸收与同化相关基因AtAMT1、AtNRT1.1、AtNR1、AtNIR1和AtGS2的表达量均高于野生型(图6), 表明过表达OsATG8b可能促进转基因拟南芥对氮的吸收, 同时也促进硝态氮的还原和氮的同化与利用。谷氨酸脱氢酶(GDH)的某些亚型在氮素再动员过程中被激活(Masclaux-Daubresse et al., 2010); 过表达Os-ATG8b转基因拟南芥中AtGDH1表达量显著增加, 暗示OsATG8b可能促进转基因拟南芥的氮素动员再利用。

综上所述, 水稻自噬相关基因OsATG8b是一个能够促进植物生长发育、增加产量并提高氮素利用率的重要候选基因。本研究进一步证实了自噬在植物生长发育和氮素利用方面发挥一定作用, 为提高作物氮素利用率和产量指明了一个新的方向。OsATG8b促进氮素的吸收利用并提高产量的具体机制还有待深入研究。

## 参考文献

- 黄晓, 李发强 (2016). 细胞自噬在植物细胞程序性死亡中的作用. 植物学报 **51**, 859–862.
- 景红娟, 周广舟, 谭晓荣, 平康康, 任雪建 (2012). 活性氧对植物自噬调控的研究进展. 植物学报 **47**, 534–542.
- 刘洋, 张静, 王秋玲, 侯岁稳 (2018). 植物细胞自噬研究进展. 植物学报 **53**, 5–16.
- 任晨霞, 龚清秋 (2014). 细胞自噬在植物碳氮营养中作用的研究进展. 中国细胞生物学学报 **36**, 407–414.
- Arnon DI (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* **24**, 1–15.
- Avila-Ospina L, Moison M, Yoshimoto K, Masclaux-Daubresse C (2014). Autophagy, plant senescence, and nutrient recycling. *J Exp Bot* **65**, 3799–3811.
- Biederbick A, Kern HF, Elsässer HP (1995). Monodansylcadaverine (MDC) is a specific *in vivo* marker for autophagic vacuoles. *Eur J Cell Biol* **66**, 3–14.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254.
- Breeze E, Harrison E, McHattie S, Hughes L, Hickman R, Hill C, Kiddle S, Kim YS, Penfold CA, Jenkins D, Zhang CJ, Morris K, Jenner C, Jackson S, Thomas B, Tabrett A, Legaie R, Moore JD, Wild DL, Ott S, Rand D, Beynon J, Denby K, Mead A, Buchanan-Wollaston V (2011). High-resolution temporal profiling of transcripts during Arabidopsis leaf senescence reveals a distinct chronology of processes and regulation. *Plant Cell* **23**, 873–894.
- Chardon F, Noël V, Masclaux-Daubresse C (2012). Exploring NUE in crops and in Arabidopsis ideotypes to improve yield and seed quality. *J Exp Bot* **63**, 3401–3412.
- Clough SJ, Bent AF (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**, 735–743.
- Contento AL, Xiong Y, Bassham DC (2005). Visualization of autophagy in Arabidopsis using the fluorescent dye monodansylcadaverine and a GFP-AtATG8e fusion protein. *Plant J* **42**, 598–608.
- Feng YC, He D, Yao ZY, Klionsky DJ (2014). The machinery of macroautophagy. *Cell Res* **24**, 24–41.
- Good AG, Shrawat AK, Muench DG (2004). Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? *Trends Plant Sci* **9**, 597–605.
- Guiboileau A, Avila-Ospina L, Yoshimoto K, Soulay F, Azzopardi M, Marmagne A, Lothier J, Masclaux-Daubresse C (2013). Physiological and metabolic consequences of autophagy deficiency for the management of nitrogen and protein resources in Arabidopsis leaves depending on nitrate availability. *New Phytol* **199**, 683–694.
- Guiboileau A, Yoshimoto K, Soulay F, Bataillé MP, Avice JC, Masclaux-Daubresse C (2012). Autophagy machinery controls nitrogen remobilization at the whole-plant level under both limiting and ample nitrate conditions in Arabidopsis. *New Phytol* **194**, 732–740.
- Ishida H, Yoshimoto K, Izumi M, Reisen D, Yano Y, Makino A, Ohsumi Y, Hanson MR, Mae T (2008). Mobilization of rubisco and stroma-localized fluorescent proteins of chloroplasts to the vacuole by an ATG gene-dependent autophagic process. *Plant Physiol* **148**, 142–155.
- Izumi M, Hidema J, Makino A, Ishida H (2013). Autophagy contributes to nighttime energy availability for growth in Arabidopsis. *Plant Physiol* **161**, 1682–1693.
- Izumi M, Hidema J, Wada S, Kondo E, Kurusu T, Kuchitsu K, Makino A, Ishida H (2015). Establishment of monito-



- ring methods for autophagy in rice reveals autophagic recycling of chloroplasts and root plastids during energy limitation. *Plant Physiol* **167**, 1307–1320.
- Kichey T, Hirel B, Heumez E, Dubois F, Le Gouis J** (2007). In winter wheat (*Triticum aestivum* L.), post-anthesis nitrogen uptake and remobilisation to the grain correlates with agronomic traits and nitrogen physiological markers. *Field Crops Res* **102**, 22–32.
- Kraiser T, Gras DE, Gutiérrez AG, González B, Gutiérrez RA** (2011). A holistic view of nitrogen acquisition in plants. *J Exp Bot* **62**, 1455–1466.
- Krapp A** (2015). Plant nitrogen assimilation and its regulation: a complex puzzle with missing pieces. *Curr Opin Plant Biol* **25**, 115–122.
- Li FQ, Chung T, Pennington JG, Federico ML, Kaeppler HF, Kaeppler SM, Otegui MS, Vierstra RD** (2015a). Autophagic recycling plays a central role in maize nitrogen remobilization. *Plant Cell* **27**, 1389–1408.
- Li WW, Chen M, Wang EH, Hu LQ, Hawkesford MJ, Zhong L, Chen Z, Xu ZS, Li LC, Zhou YB, Guo CH, Ma YZ** (2016). Genome-wide analysis of autophagy-associated genes in foxtail millet (*Setaria italica* L.) and characterization of the function of *SiATG8a* in conferring tolerance to nitrogen starvation in rice. *BMC Genomics* **17**, 797.
- Li WW, Chen M, Zhong L, Liu JM, Xu ZS, Li LC, Zhou YB, Guo CH, Ma YZ** (2015b). Overexpression of the autophagy-related gene *SiATG8a* from foxtail millet (*Setaria italica* L.) confers tolerance to both nitrogen starvation and drought stress in Arabidopsis. *Biochem Biophys Res Commun* **468**, 800–806.
- 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 YM, Bassham DC** (2012). Autophagy: pathways for self-eating in plant cells. *Annu Rev Plant Biol* **63**, 215–237.
- Makino A, Osmond B** (1991). Effects of nitrogen nutrition on nitrogen partitioning between chloroplasts and mitochondria in pea and wheat. *Plant Physiol* **96**, 355–362.
- Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Dechorgnat J, Chardon F, Gaufichon L, Suzuki A** (2010). Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Ann Bot* **105**, 1141–1157.
- Masclaux-Daubresse C, Reisdorf-Cren M, Orsel M** (2008). Leaf nitrogen remobilisation for plant development and grain filling. *Plant Biol* **10**, 23–36.
- Meyer C, Stitt M** (2001). Nitrate reduction and signaling. In: Lea PJ, Morot-Gaudry JF, eds. *Plant Nitrogen*. Berlin, Heidelberg: Springer. pp. 37–59.
- Moriyasu Y, Ohsumi Y** (1996). Autophagy in tobacco suspension-cultured cells in response to sucrose starvation. *Plant Physiol* **111**, 1233–1241.
- Ohsumi Y** (2001). Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 211–216.
- Otegui MS, Noh YS, Martínez DE, Vila Petroff MG, Staehelin LA, Amasino RM, Guisard JJ** (2005). Senescence-associated vacuoles with intense proteolytic activity develop in leaves of Arabidopsis and soybean. *Plant J* **41**, 831–844.
- Patrick JW, Offler CE** (2001). Compartmentation of transport and transfer events in developing seeds. *J Exp Bot* **52**, 551–564.
- Rentsch D, Schmidt S, Tegeder M** (2007). Transporters for uptake and allocation of organic nitrogen compounds in plants. *FEBS Lett* **581**, 2281–2289.
- Roberts IN, Caputo C, Criado MV, Funk C** (2012). Senescence-associated proteases in plants. *Physiol Plant* **145**, 130–139.
- Slavikova S, Ufaz S, Avin-Wittenberg T, Levanony H, Galili G** (2008). An autophagy-associated Atg8 protein is involved in the responses of Arabidopsis seedlings to hormonal controls and abiotic stresses. *J Exp Bot* **59**, 4029–4043.
- Thompson AR, Doelling JH, Suttangkakul A, Vierstra RD** (2005). Autophagic nutrient recycling in Arabidopsis directed by the *ATG8* and *ATG12* conjugation pathways. *Plant Physiol* **138**, 2097–2110.
- Tsukada M, Ohsumi Y** (1993). Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **333**, 169–174.
- Wada S, Hayashida Y, Izumi M, Kurusu T, Hanamata S, Kanno K, Kojima S, Yamaya T, Kuchitsu K, Makino A, Ishida H** (2015). Autophagy supports biomass production and nitrogen use efficiency at the vegetative stage in rice. *Plant Physiol* **168**, 60–73.
- Wada S, Ishida H, Izumi M, Yoshimoto K, Ohsumi Y, Mae T, Makino A** (2009). Autophagy plays a role in chloroplast degradation during senescence in individually darkened leaves. *Plant Physiol* **149**, 885–893.
- Walch-Liu P, Filleur S, Gan YB, Forde BG** (2005). Signaling mechanisms integrating root and shoot responses to changes in the nitrogen supply. *Photosynth Res* **83**, 239–250.

- Wang P, Sun X, Jia X, Wang N, Gong XQ, Ma FW** (2016). Characterization of an autophagy-related gene *MdATG8i* from apple. *Front Plant Sci* **7**, 720.
- Wang Y, Yu BJ, Zhao JP, Guo JB, Li Y, Han SJ, Huang L, Du YM, Hong YG, Tang DZ, Liu YL** (2013). Autophagy contributes to leaf starch degradation. *Plant Cell* **25**, 1383–1399.
- Xia KF, Liu T, Ouyang J, Wang R, Fan T, Zhang MY** (2011). Genome-wide identification, classification, and expression analysis of autophagy-associated gene homologues in rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Res* **18**, 363–377.
- Xia TM, Xiao D, Liu D, Chai WT, Gong QQ, Wang NN** (2012). Heterologous expression of *ATG8c* from soybean confers tolerance to nitrogen deficiency and increases yield in Arabidopsis. *PLoS One* **7**, e37217.
- Yang XC, Bassham DC** (2015). New insight into the mechanism and function of autophagy in plant cells. *Int Rev Cell Mol Biol* **320**, 1–40.
- Yao ZY, Delorme-Axford E, Backues SK, Klionsky DJ** (2015). Atg41/Icy2 regulates autophagosome formation. *Autophagy* **11**, 2288–2299.
- Yoshimoto K** (2012). Beginning to understand autophagy, an intracellular self-degradation system in plants. *Plant Cell Physiol* **53**, 1355–1365.
- Yoshimoto K, Hanaoka H, Sato S, Kato T, Tabata S, Noda T, Ohsumi Y** (2004). Processing of ATG8s, ubiquitin-like proteins, and their deconjugation by ATG4s are essential for plant autophagy. *Plant Cell* **16**, 2967–2983.
- Yoshimoto K, Jikumaru Y, Kamiya Y, Kusano M, Consonni C, Panstruga R, Ohsumi Y, Shirasu K** (2009). Autophagy negatively regulates cell death by controlling NPR1-dependent salicylic acid signaling during senescence and the innate immune response in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**, 2914–2927.

## Heterologous Overexpression of Autophagy-related Gene *OsATG8b* from Rice Confers Tolerance to Nitrogen/Carbon Starvation and Increases Yield in Arabidopsis

Xiaoxi Zhen, Haoran Liu, Xin Li, Fan Xu\*, Wenzhong Zhang\*

Key Laboratory of Northern Japonica Rice Genetics and Breeding, Ministry of Education, Key Laboratory of Northeast Rice Biology and Breeding, Ministry of Agriculture, Rice Research Institute, Shenyang Agriculture University, Shenyang 110866, China

**Abstract** Nitrogen is an essential element for plant growth and development and plays an important role in plant yield and quality. Autophagy is a conserved degradation-recycle pathway of cellular components in eukaryotes that plays an important role in nitrogen remobilization during plant growth and grain formation. We identified an autophagy core gene *OsATG8b* in rice and obtained 2 independent 35S-*OsATG8b* transgenic Arabidopsis homozygous lines. The expression of *OsATG8b* responded to nitrogen starvation in rice. Overexpression of *OsATG8b* promoted the growth and development of transgenic Arabidopsis, with rosette leaves larger than wild-type leaves. In addition, the yield increased significantly, by 15.16%. In addition, overexpression of *OsATG8b* could significantly enhance autophagic activity in leaves of transgenic Arabidopsis under nitrogen deficiency and effectively alleviate the growth inhibition of transgenic Arabidopsis caused by nitrogen and carbon stress. *OsATG8b* may be a good candidate gene for increasing nitrogen use efficiency and yield.

**Key words** autophagy, *OsATG8b*, nitrogen remobilization, yield

**Zhen XX, Liu HR, Li X, Xu F, Zhang WZ** (2019). Heterologous overexpression of autophagy-related gene *OsATG8b* from rice confers tolerance to nitrogen/carbon starvation and increases yield in Arabidopsis. *Chin Bull Bot* **54**, 23–36.

\* Authors for correspondence. E-mail: celiafanfan@163.com; zwzhong@126.com

(责任编辑: 朱亚娜)