

水稻永绿色基因超表达和突变对其叶片氮碳代谢若干指标的影响

戎红^{1,2}, 李美茹¹, 陈雅平¹, 吴国江¹, 姜华武^{1*}

(1. 中国科学院华南植物园, 中国科学院植物资源保护与可持续利用重点实验室, 广州 510650; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要:通过水培实验,研究了水稻永绿色(Stay-green rice, SGR)基因超表达和突变对叶片氮碳代谢的影响。结果表明,在正常生长条件下,SGR 基因超表达降低了水稻叶片可溶性蛋白、叶绿素及淀粉的含量,但可溶性糖和游离氨基酸含量增加,并提高了谷氨酰胺合成酶(GS)活性和谷氨酸合成酶(GOGAT)活性;SGR 基因突变增加了水稻叶片淀粉和可溶性蛋白质含量,并提高了硝酸还原酶(NR)活性。在缺氮条件下,SGR 基因超表达与野生型叶片各生理指标的变化趋势一致,但是 SGR 基因突变体叶片中淀粉含量的变化趋势与野生型及 SGR 基因超表达的不一致。这说明 SGR 蛋白水平的变化在一定程度上影响了水稻叶片的氮碳代谢。

关键词:永绿色基因; 碳/氮代谢; 缺氮; 水稻

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2011)05-0407-05

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2011.05.003

Effects of Stay-green Rice Gene (SGR) Over-expression and Mutation on Some Indexes Related with Carbon and Nitrogen Metabolism in Rice Leaves

RONG Hong^{1,2}, LI Mei-ru¹, CHEN Ya-ping¹, WU Guo-jiang¹, JIANG Hua-wu^{1*}

(1. Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Sustainable Utilization, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: The effects of Stay-green rice gene (SGR) over-expression and mutation on carbon and nitrogen metabolism in rice (*Oryza sativa* L.) leaves were studied by using hydroponic culture. The results showed that SGR over-expression reduced contents of soluble protein, chlorophyll and starch, but the contents of soluble sugar and free amino acids increased, as well as the activities of glutamine synthetase (GS) and glutamate synthetase (GOGAT) in rice leaves under normal growth condition. Whereas, SGR mutation increased the contents of starch and soluble protein and improved nitrate reductase (NR) activity. Under nitrogen deficiency, the variation trend of physiological parameters was consistent among the three types of rice except the starch content in SGR mutant rice leaves. These suggested that the changes in SGR level could influence the carbon and nitrogen metabolism in rice leaves.

Key words: Stay-green rice gene (SGR); C/N metabolism; Nitrogen deficiency; Rice

水稻(*Oryza Sativa* L.)永绿色(Stay-green rice)基因(SGR)突变能够阻滞色素-蛋白复合体的解离,进

而导致叶片衰老过程中叶绿素降解和部分蛋白质的降解受到抑制,产生永绿色 (Stay-green)表型^[1]。

收稿日期: 2011-01-05

接受日期: 2011-04-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(30770174); 863 计划项目(2006AA10Z163)资助

* 通讯作者 Corresponding author, email: hwjiang@scib.ac.cn

永绿色突变体是日本水稻“花之舞”品种的干种子经过 γ 射线处理后,在 M2 代群体中选育出的^[1]。*SGR* 突变阻碍了叶绿素降解,使叶片呈现出永绿色表型,但在植物衰老过程中不能维持其光合效率。因此它属于非功能型突变体,并被归类为 C 型永绿色突变体^[1-2]。这一突变体对于研究叶绿素蛋白复合体的解离是一种很理想的材料^[2]。

氮素是植物生长必需的大量元素之一,它往往成为植物发育及其产量的限制因子^[3]。在氮素营养缺乏时,会引发一系列代谢途径的改变,并加速植株的衰老^[4-5]。在植物生长发育过程中,光合氮、碳代谢是植物体内的两大重要代谢过程^[6],直接影响植物光合产物的形成和物质的转化等。在氮代谢过程中,硝酸还原酶(NR)、谷氨酰胺合成酶(GS)和谷氨酸合成酶(GOGAT)是氮素同化的关键酶^[7],同时氮素也是碳代谢关键酶磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)、核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶(RuBPC)及叶绿素的重要组成成分^[8]。因此,供氮水平会直接影响植物的碳氮代谢。*SGR* 基因突变抑制了叶绿素降解,而超表达 *SGR* 基因将会促进叶绿素的降解^[1]。因此,*SGR* 表达水平的变化会引起叶绿素含量的变化,也可能对植物的碳/氮代谢产生影响。

在氮碳代谢过程中,各种酶活性的变化起着重要的调节作用,探讨氮碳代谢关键酶活性等相关指标的变化对研究 *SGR* 基因的作用机理有着重要的意义。但目前有关 *SGR* 基因表达水平对植物碳/氮代谢的影响尚不清楚。因此,本文利用水稻 *SGR* 基因突变体(*sgr*)和 *SGR* 基因超表达转基因材料,分析正常生长条件和缺氮条件下的叶片淀粉、可溶性总糖、可溶性蛋白和氨基酸等含量,以及氨基酸代谢相关的部分酶活性的变化,以探讨 *SGR* 基因表达水平在调节水稻叶片氮碳代谢方面的作用,为研究植物衰老过程中叶绿素蛋白复合体的解离机制提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料培养、采集及预处理

以水稻(*Oryza sativa* L.)“花之舞”野生型(Wild-type, WT)、永绿色(Stay-green rice)突变体(*sgr*)和永绿色基因超表达转基因水稻(SGR-OE)为供试材料^[1]。种子经过消毒、浸种和催芽后,将其置于尼龙网上,用水稻完全营养液进行培育^[9]。待水稻长至 3 叶期时进行移栽,泡沫板分隔、海绵固定,然后将

其置于容积 10 L、高 15 cm 的塑料盆中,用 10 L 完全营养液进行培育。水稻幼苗种植于中国科学院华南植物园温室中,每隔 7 d 换 1 次营养液,营养液 pH 值控制在 5.5 左右(用 NaOH 或 HCl 进行调节),温室白天温度为 32°C 左右,夜间为 25°C 左右。

当水稻幼苗生长至五叶期时,将完全营养液中的氮素去掉,换成缺氮营养液进行培育,每隔 7 d 换 1 次缺氮营养液,取样时间分别为 0、14 和 28 d 的上午 9 至 10 点钟。取样时迅速剪下第 4 片叶子,置于液氮中,存放在 -80°C 冰箱备用^[10]。

1.2 测定方法

叶绿素的提取和含量测定按照 Schelbert^[11] 的方法进行;可溶性蛋白含量测定采用考马斯亮蓝法^[12];淀粉及可溶性糖含量参照 Agüera 等^[13] 方法测定;游离氨基酸含量的测定采用茚三酮法^[14];硝酸还原酶(NR)活性的测定采用李合生^[15] 的方法;谷氨酰胺合成酶(GS)及谷氨酸合成酶(GOGAT)活性的测定参照 Wang^[16] 的方法。各生理指标的测定均设置 3 个重复。

用 SPSS statistics 软件对数据进行差异显著性检验。

2 结果和分析

2.1 对叶绿素和可溶性蛋白质含量的影响

在正常生长条件下,永绿色(Stay-green rice)突变体(*sgr*)叶片的可溶性蛋白含量最高,*SGR* 基因超表达体(SGR-overexpression, SGR-OE)最低。缺氮处理后,3 种水稻材料的可溶性蛋白含量整体上都呈现下降的趋势。野生型水稻(Wild-type, WT)和 *sgr* 的可溶性蛋白含量在缺氮处理 14 和 28 d 时无明显差异,但都明显高于 SGR-OE 的(图 1A)。正常生长的叶片中,*sgr* 的叶绿素含量最高,WT 次之,SGR-OE 最低。缺氮处理后,3 种水稻材料叶片的总叶绿素含量降低。缺氮处理 14 和 28 d 时,*sgr* 的叶绿素含量基本未发生变化,WT 略微降低,SGR-OE 降低最为明显。这些表明,SGR 蛋白的水平不仅影响水稻叶片叶绿素的含量,对可溶性蛋白含量也有一定影响(图 1B)。

2.2 对淀粉和总可溶性糖含量的影响

在正常生长条件下,*sgr* 叶片中淀粉含量最高,WT 次之,SGR-OE 最低。缺氮处理后,WT 和 SGR-OE 叶片淀粉含量随着缺氮程度的加深而增加,

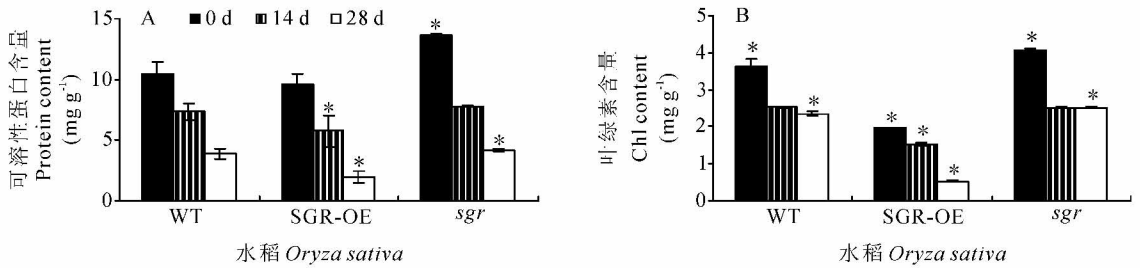


图1 缺氮条件下水稻叶片的可溶性蛋白含量(A)及叶绿素含量(B)的变化。* $P < 0.05$;下同。

Fig. 1 Changes of soluble protein (A) and Chl content (B) in rice leaves under nitrogen deficiency. * $P < 0.05$. The same as following Figures.

而 *sgr* 呈现先下降然后上升回复到原先水平(图2A)。缺氮处理拟南芥发现,随着缺氮时间的延长,叶片中淀粉含量也不断增加^[17]。正常条件下,SGR-OE 叶片中可溶性糖含量最高,WT 和 *sgr* 差异

不明显。缺氮处理后,3 种水稻材料的可溶性糖含量整体上呈现先下降后上升的趋势。缺氮后期(28 d),SGR-OE 叶片中可溶性糖含量最低,WT 和 *sgr* 中差异不明显(图2B)。

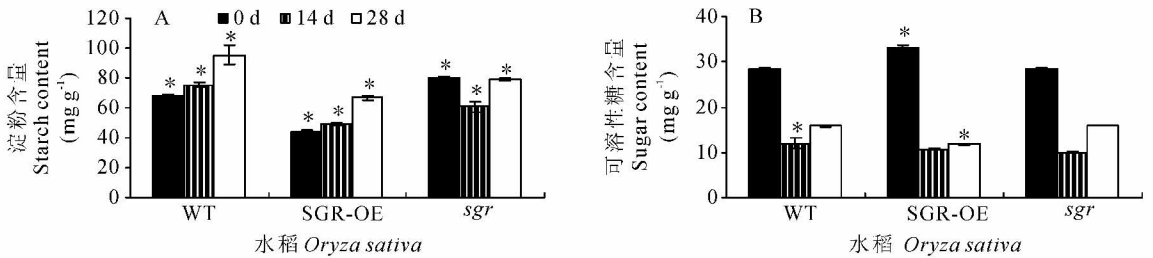


图2 缺氮条件下水稻叶片的淀粉(A)及可溶性糖(B)含量的变化

Fig. 2 Changes in starch (A) and soluble sugar (B) contents of rice leaves under nitrogen deficiency

2.3 对游离氨基酸含量和氨基酸代谢相关酶活性的影响

在正常生长条件下,SGR 超表达水稻叶片中的游离氨基酸含量最高。缺氮处理后,3 种水稻叶片内的游离氨基酸含量均随缺氮时间的延长而降低,但差异不显著(图3A)。不同氮素水平处理烟草的研究表明,游离氨基酸在老叶中明显积累^[18],这与本研究结果不一致,需要进一步证实。在正常生长条件下,*sgr* 叶片中的 NR 活性最高,SGR-OE 次之,WT 最低。缺氮处理后,3 者的 NR 活性均下降,但 3 者间的酶活性无明显差异(图3B)。从图3C 和3D 中可以看出,正常生长条件下,SGR-OE 水稻叶片的 GS 和 GOGAT 活性最高,WT 和 *sgr* 间的基本无差异。随着缺氮程度的加深,3 种水稻材料的 GS 和 GOGAT 活性均呈不断升高趋势。

3 讨论和结论

早期研究结果表明,暗诱导后的水稻 SGR 基因突变体(*sgr*)叶片中仍滞留很多类囊体结构,并且

在水稻衰老过程中,延缓了叶绿素和色素结合蛋白以及光系统中心部分蛋白的降解;而 SGR 基因超表达则降低基粒类囊体片层数量^[1,19]。这表明,衰老过程中 SGR 蛋白水平的变化影响了水稻叶片叶绿体结构,进而可能影响叶片的碳同化。植物体内的碳同化与氮同化又存在着紧密的联系:碳同化为氮同化提供碳源和同化力;氮同化通过影响碳同化过程中关键酶的活性而影响碳同化的速率^[20]。因此,SGR 蛋白水平的变化在一定程度上影响了植物的碳氮代谢。

本研究结果表明,在正常生长条件下,SGR 基因超表达明显降低了水稻叶片的可溶性蛋白及叶绿素含量,这表明 SGR 基因超表达能促进叶绿素的降解,而可溶性蛋白含量的降低可能是由于其类囊体片层的减少而导致了内含物包括蛋白质的减少^[1]。

淀粉的合成与降解受到植物体内碳/氮比的调节,提高糖含量或减少氮的供应都会促进叶片淀粉的合成与积累^[21]。在正常生长条件下,SGR-OE 水

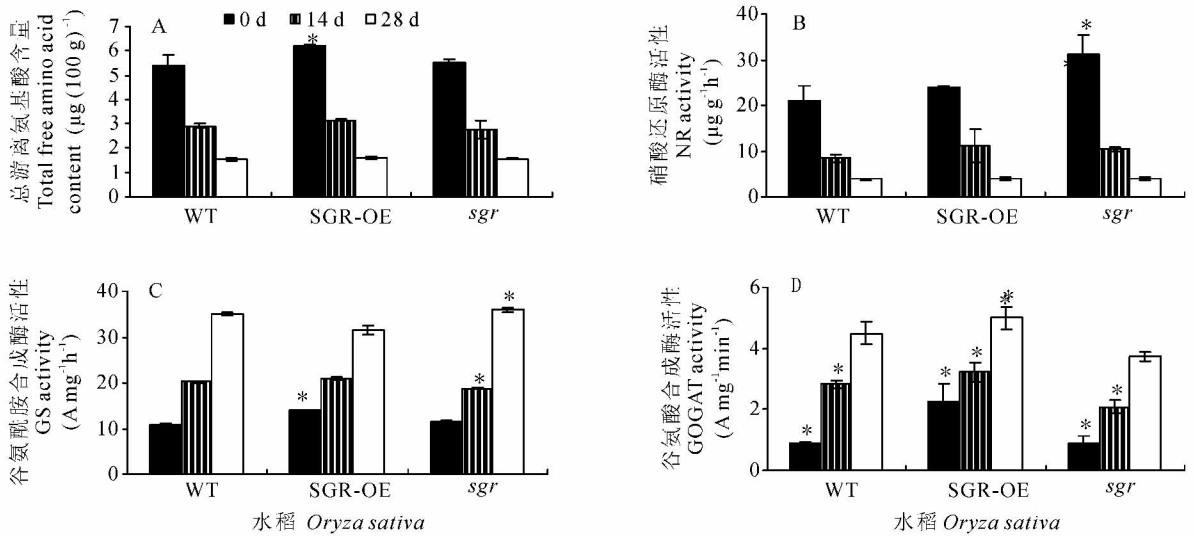


图 3 缺氮条件下水稻叶片游离氨基酸含量(A)、硝酸还原酶活性(NR, B)、谷氨酰胺合成酶(GS, C)及谷氨酸合成酶(GOGAT, D)活性的变化
Fig. 3 Changes in free amino acid content (A), activities of nitrate reductase (NR, B), glutamine synthetase (GS, C) and glutamate (GOGAT, D) in rice leaves under nitrogen deficiency

稻叶片中淀粉积累降低而可溶性糖含量增加,表明超表达 *SGR* 基因会影响光合产物的生产和积累,这可能与 *SGR* 基因超表达促进了叶绿素和色素结合蛋白的降解导致光合能力降低有关。但是, *sgr* 水稻在正常条件下,叶片中淀粉含量增加,而在缺氮条件下淀粉含量先降低,而缺氮后期也只有少量回升。这说明 *SGR* 蛋白水平对类囊体结构的调节部分影响了水稻叶片细胞内碳/氮比调节的信号。

硝酸还原酶(NR)是一种诱导酶^[22],其活性受硝酸盐的正调控^[23]。谷氨酰胺合成酶(GS)及谷氨酸合成酶(GOGAT)是氮素同化和氨基酸周转的关键酶^[24],其活性在低氮条件下会增加^[17]。缺氮处理后,3种水稻材料叶片中的硝酸还原酶活性均发生下降,而GS和GOGAT活性增加。正常供氮条件下,*SGR*基因超表达水稻叶片中游离氨基酸含量最高,而GS和GOGAT的活性又都有显著增加,说明高水平 *SGR* 蛋白影响了细胞内的氮水平信号并提高了氨基酸的代谢速度,促进了氮代谢。而 *sgr* 突变体叶片中的高NR活性说明 *sgr* 突变促进了氮的同化代谢。

本研究结果说明, *SGR* 蛋白水平对色素-蛋白复合体含量的调节影响了水稻叶片细胞内碳/氮比信号,改变了水稻叶片可溶性糖含量和淀粉积累特性,以及氨基酸代谢部分相关酶活性水平等。

参考文献

[1] Jiang H W, Li M R, Liang N T, et al. Molecular cloning and

function analysis of the stay green gene in rice [J]. *Plant J*, 2007, 52(2): 197-209.

- [2] Thomas H, Howarth C J. Five ways to stay green [J]. *J Exp Bot*, 2000, 51(1): 329-337.
- [3] Françoise D V, Anne K, Wenner M. Cellular biology of nitrogen metabolism and signaling [J]. *Plant Cell Monogr*, 2010, 17: 145-172.
- [4] Pourtau N, Mares M, Purdy S, et al. Interactions of abscisic acid and sugar signaling in the regulation of leaf senescence [J]. *Planta*, 2004, 219(5): 765-772.
- [5] Kato Y, Yamamoto Y, Murakami S, et al. Post-translational regulation of CND41 protease activity in senescent tobacco leaves [J]. *Planta*, 2005, 222(4): 643-651.
- [6] 戴忠民. 氮素代谢对小麦生理特性的影响研究进展 [J]. *河南农业科学*, 2008(7): 10-13.
- [7] Lam H M, Coschigano K T, Oliveira I C. The molecular genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1996, 47: 569-593.
- [8] Jin J Y(金继运), He P(何萍). Effect of N and K nutrition on post metabolism of carbon and nitrogen and grain weight formation in maize [J]. *Sci Agri Sin(中国农业科学)*, 1999, 32(4): 55-62.(in Chinese)
- [9] Yoshida S, Forno D A, Cock J H, et al. Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice [M]. 3rd ed. Manila, Philippines: International Rice Research Institute, 1976: 61-64.
- [10] Kamachi K, Yamaya T, Mae T, et al. A role for glutamine synthetase in the remobilization of leaf nitrogen during natural senescence in rice leaves [J]. *Plant Physiol*, 1991, 96(2): 411-417.
- [11] Schelbert S, Aubry S, Burla B, et al. Pheophytin pheophorbide hydrolase (Pheophytinase) is involved in chlorophyll

- breakdown during leaf senescence in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2009, 21(3): 767–785.
- [12] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72(1/2): 248–254.
- [13] Agüera E, Ruano D, Cabello P, et al. Impact of atmospheric CO₂ on growth, photosynthesis and nitrogen metabolism in cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants [J]. *Plant Physiol*, 2006, 163(8): 809–817.
- [14] Rosen H. A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1957, 67(1): 10–15.
- [15] Li H S(李合生). Principles and Techniques of Plant Physiological Biochemical Experiment [M]. Beijing: Higher Education Press, 2000: 125–127.(in Chinese)
- [16] Wang X C(王小纯), Xiong S P(熊淑萍), Ma X M(马新明), et al. Effect of different nitrogen forms on key enzyme activity involved in nitrogen metabolism and grain protein content in specialty wheat cultivars [J]. *Acta Ecol Sin(生态学报)*, 2005, 25(4): 802–807.(in Chinese)
- [17] Thomas L, Laure G, Stéphanie B M and et al. Enzymatic and metabolic diagnostic of nitrogen deficiency in *Arabidopsis thaliana* Wassileskija accession [J]. *Plant Cell Physiol*, 2008, 49(7): 1056–1065.
- [18] Tercé-Laforgue T, Mäck G, Hirel B. New insights towards the function of glutamate dehydrogenase revealed during source-sink transition of tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants grown under different nitrogen regimes [J]. *Physiol Plant*, 2004, 120(2): 220–228.
- [19] Park S Y, Yu J W, Park J S, et al. The senescence-induced staygreen protein regulates chlorophyll degradation [J]. *Plant Cell*, 2007, 19(5): 1649–1664.
- [20] Evans R J. Nitrogen and photosynthesis in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Plant Physiol*, 1983, 72(2): 297–302.
- [21] Dian W M, Jiang H W, Chen Q S, et al. Cloning and characterization of the granule-bound starch synthase II gene in rice: Gene expression is regulated by the nitrogen level, sugar and circadian rhythm [J]. *Planta*, 2003, 218(2): 261–268.
- [22] Wu W H(武维华). *Plant Physiology* [M]. Beijing: Science Press, 2003: 90–91.(in Chinese)
- [23] Vincentz M, Moureaux T, Leydecker M T, et al. Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves by nitrogen and carbon metabolites [J]. *Plant J*, 1993, 3(2): 315–324.
- [24] Paula M M, Ligia M L, Isabel M S, et al. Expression of the plastid located glutamine synthetase of *Medicago truncatula* [J]. *Plant Physiol*, 2003, 132(1): 390–399.