

水稻永绿色基因突变和超表达对 其叶片类囊体蛋白降解的影响

戎红^{1,2}, 李美茹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:应用蛋白质免疫杂交技术分析了永绿色基因(Stay-green Rice, SGR)突变和超表达对水稻(*Oryza sativa*)叶片类囊体蛋白质降解的影响。结果表明, 在正常生长条件下, SGR 超表达降低了光系统 II (PS II)、光系统 I (PS I) 和电子传递链等的蛋白质含量。暗诱导衰老处理时, SGR 突变延缓了 PSI 和 PSII 的蛋白降解, 对电子传递链相关蛋白的降解无影响。缺氮胁迫下, SGR 超表达加快了 PSII 和 PSI 的蛋白降解, SGR 突变延缓了类囊体蛋白的降解。因此, SGR 超表达能促进类囊体 PSI、PSII 和光合电子传递链蛋白质的降解。

关键词: 永绿色基因; 水稻; 类囊体蛋白; 降解

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2011)04-0377-04

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2011.04.017

Effects of Stay-green Rice Gene (SGR) Mutation and Overexpression on the Protein Degradation in Thylakoid of Rice Leaves

RONG Hong^{1,2}, LI Mei-ru¹, 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) mutation and overexpression on thylakoid protein degradation in rice leaves were studied by using protein immunoblot method. The results showed that the overexpression of SGR reduced the contents of protein in photosystem II (PSII), as well as PSI and electron transport chain under normal growth condition. During the dark-induced senescence, SGR mutation delayed the degradation of PSII and PSI proteins, but proteins in the electron transport chain had no changes. Under nitrogen deficiency stress, the overexpression of SGR promoted the thylakoid protein degradation, whereas SGR mutation delayed the thylakoid protein degradation. Therefore, the overexpression of SGR could promote the degradation of thylakoid protein in photosystem I and II, and electron transport chain.

Key words: Stay-green rice gene (SGR); Rice; Thylakoid proteins; Degradation

氮素循环再利用是植物氮代谢的重要特性。在植物衰老或氮素缺乏时, 氮素能从老叶等衰老组织转移到生长中心^[1-3]。叶肉细胞中, 叶绿体是植物叶片蛋白质聚集的主要区域^[4], 大约 75% 的氮素存在于叶绿体中^[5], 因此叶绿体中蛋白质的降解与氮素的输出对于植物的氮素再利用具有重要意义。

水稻(*Oryza sativa* L.)在生育后期, 随着叶片的

衰老, 叶片逐渐变黄, 而水稻的永绿色基因(Stay-green rice gene, SGR)突变能够在叶片衰老过程中阻滞叶绿体内类囊体解体、叶绿素降解和部分蛋白质的降解, 产生永绿色表型^[6]。永绿色水稻突变体是日本花之舞品种的干种子经过 γ 射线处理后, 在 M2 代群体中选育出来的^[6]。通过对永绿色基因进行定位并克隆, 将该基因导入其它作物中, 这对

收稿日期: 2010-11-30

接受日期: 2011-03-16

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@scbg.ac.cn

于培育永绿色新作物品种具有重要的应用价值。我们的研究表明, *SGR* 在叶片中的表达随衰老进程而增加, 受乙烯和脱落酸促进, 但被细胞分裂素抑制; 超表达 *SGR* 会导致水稻叶绿体基质类囊体片层减少; 蛋白质结合实验表明, *SGR* 只能与捕光色素复合体 II (LHCII) 蛋白结合^[6]。因此, 推测 *SGR* 可能是与 LHCII 结合形成 *SGR*-LHCII 复合体, 促进叶绿素和色素结合蛋白的降解, 导致 PSII 的解离^[8]。

但是, 关于 *SGR* 超表达是否影响 PSI 及其捕光色素复合体 I (LHCI) 和光合电子传递体等还不清楚。本研究利用蛋白印迹杂交技术, 探讨永绿色基因 *SGR* 突变和超表达对水稻叶片叶绿体类囊体蛋白质降解的影响, 为研究叶片衰老过程中叶绿体降解机理及氮素的再利用等提供科学参考。

1 材料和方法

1.1 材料和处理

以水稻 (*Oryza sativa* L.) 品种花之舞的野生型 (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*-overexpression, *SGR*-OE) 为供试材料^[6]。种子经过消毒、浸种和催芽后, 用水稻完全营养液进行培育^[7], 每隔 7 d 换 1 次营养液, 种植于中国科学院华南植物园温室中, 室内昼夜温度约为 32℃/25℃。

叶片的离体暗处理 水稻幼苗在完全营养液中生长到五叶期时, 剪取第四位叶片, 长度 3 ~ 4 cm。将其悬浮在装有少量自来水的培养皿中放置在暗培养箱中, 温度控制在 30℃, 分别于培养的 0、5 和 7 d 取样^[6,8]。

缺氮培养 水稻幼苗在完全营养液中生长到五叶期时, 换成缺氮培养基进行培养。分别于培养的 0、14 和 28 d 取样。取样时迅速剪下第 4 片叶子, 置于液氮中, 存放在 -80℃ 的冰箱中备用^[9]。

1.2 抗体

一抗包括: 抗捕光色素复合体 I 蛋白亚基 (Lhca1、Lhca2、Lhca3 和 Lhca4)、PSI 核心复合体亚基 (PsaB、PsaD、PsaE 和 PsaH); 捕光色素复合体 II 蛋白亚基 (Lhcb1、Lhcb2、Lhcb4、Lhcb5 和 Lhcb6)、PSII 核心复合体亚基 (PsbA-C、PsbA-N、PsbO 和 PsbW); 光合电子传递相关蛋白质细胞色素复合体亚基 (Cyt f 和 Cyt b6)、质体蓝素 (PC); 类囊体膜脂贮藏与组装相关蛋白有 VIPP1 (抗类囊体合成相关蛋白 vesicle-inducing protein in plastids 1 抗体)^[11]

和 AtPGL35 [Anti-Plastoglobules 35 (a member of lipoprotein particles in chloroplasts)]^[12]。以上抗体购买于 Agrisera 公司。

1.3 SDS-PAGE 与蛋白质免疫杂交

蛋白质提取 称取 0.2 g 水稻叶片置研钵中, 加液氮研磨成粉末, 加 1.4 mL 蛋白提取液 [含 0.1 mol/L Tris-HCl pH 8.0, 10% (V/V) 甘油, 0.05% (V/V) β-巯基乙醇和 3% (W/V) 十二烷基硫酸钠 (SDS)]。匀浆后于 95℃ 加热 7 min, 冷却后在 120000 × g 下离心 10 min, 取上清液分装于离心管中, 在 -20℃ 下保存备用。

蛋白质免疫杂交 等体积的叶片总蛋白经 12% SDS-PAGE 分离后, 将蛋白转移至固相载体 PVDF 膜上, 按照《分子克隆》方法进行蛋白质免疫杂交, 以氮蓝四唑-5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸盐 (NBT-5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, BCIP) 显色^[13]。

2 结果和分析

2.1 *SGR* 对水稻叶片类囊体蛋白水平的影响

实验开始时, 野生型 (WT) 和 *sgr* 突变体水稻叶片的类囊体蛋白水平无明显差异 (图 1), 但 *SGR*-OE 水稻叶片中光合系统 I (PSI)、光合系统 II (PSII) 和电子传递体的蛋白水平明显低于 WT, 类囊体膜脂转运蛋白 AtPGL35 和 VIPP1 含量变化不显著。说明超表达 *SGR* 促进了类囊体蛋白的降解。

暗培养 5 d 后, WT 和 *SGR*-OE 的叶片中 PSI、PSII、电子传递体及其它叶绿体蛋白 (AtPGL35 和 VIPP1) 发生了明显降解, 并且 *SGR*-OE 中的降解最为严重 (图 1)。暗处理 7 d 后, 在 WT 中只检测到几条微弱的蛋白条带, 而 *SGR*-OE 中的类囊体蛋白完全降解, 这表明在暗诱导的衰老过程中超表达 *SGR* 加速了类囊体蛋白的降解。

sgr 叶片随着暗处理时间的延长, 类囊体蛋白也发生了部分降解, 但是其降解速度明显低于 WT 的。暗处理 7 d 后, PSI 中的 Lhca1、Lhca3、PsaD、PsaE 和 PsaH, PSII 中的 Lhcb2、Lhcb5、PsbA-N、PsbO 和 PsbW 等蛋白的含量明显降低; 而 PSI 中的 Lhca2、Lhca4 和 PsaB, PSII 中的 Lhcb1、Lhcb4、Lhcb6 和 PsbA-C 等蛋白含量较高。电子传递体蛋白 Cyt f、Cyt b6 和 PC 以及其它类囊体膜脂转运蛋白等的降解与 WT 叶片中的一致。

2.2 缺氮处理过程中叶片类囊体蛋白的降解

从图 2 可见, 随着缺氮培养时间的延长, WT

和 SGR-OE 水稻叶片中的 PSI、PSII (PsbA 除外)、电子传递体的 PC 以及类囊体膜脂转运蛋白 AtPGL35 和 VIPP1 蛋白含量均显著下降,而 PSII 反应中心蛋白 PsbA 和电子传递体蛋白 Cyt f 和 Cyt b6 的含量在开始时维持稳定或增加,但随后下降。SGR-OE 叶片在缺氮培养 28 d 后,PSI 和 PSII 的色素结合蛋白的含量显著下降,但 PSII 反应中心的蛋白含量较高。在 *sgr* 水稻叶片中,随着缺氮培养时间的延长,类囊体蛋白也发生了降解,但是降解速度明显低于 WT 的。

3 讨论

早期研究表明,SGR 突变的水稻叶片在衰老后仍然滞留很多类囊体结构,并且叶绿素和色素结合蛋白以及光系统中心的部分蛋白的降解发生延缓^[6,8,10]。根据 SGR 能够与 LHC 蛋白结合的特性,推测 SGR 可能是通过结合 LHCII 形成 SGR-LHCII 复合体,促进叶绿素和色素结合蛋白的降解^[8]。

本研究结果表明,水稻 *sgr* 突变体叶片在暗诱导的衰老过程中,PSII 与 PSI 的捕光色素蛋白和反

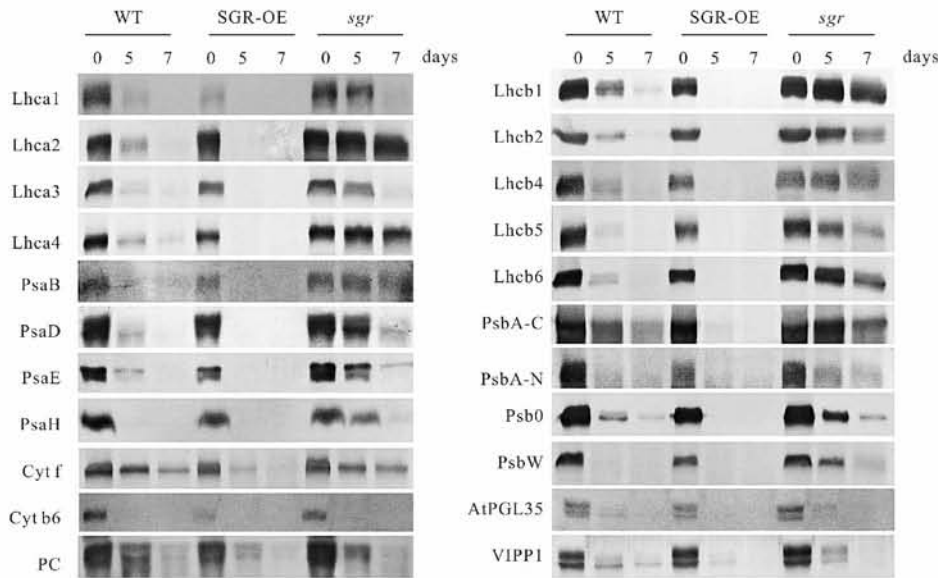


图 1 暗培养过程中 SGR 对水稻叶片类囊体蛋白降解的影响

Fig. 1 Effects of SGR on the degradation of thylakoid proteins in rice leaves under dark culture

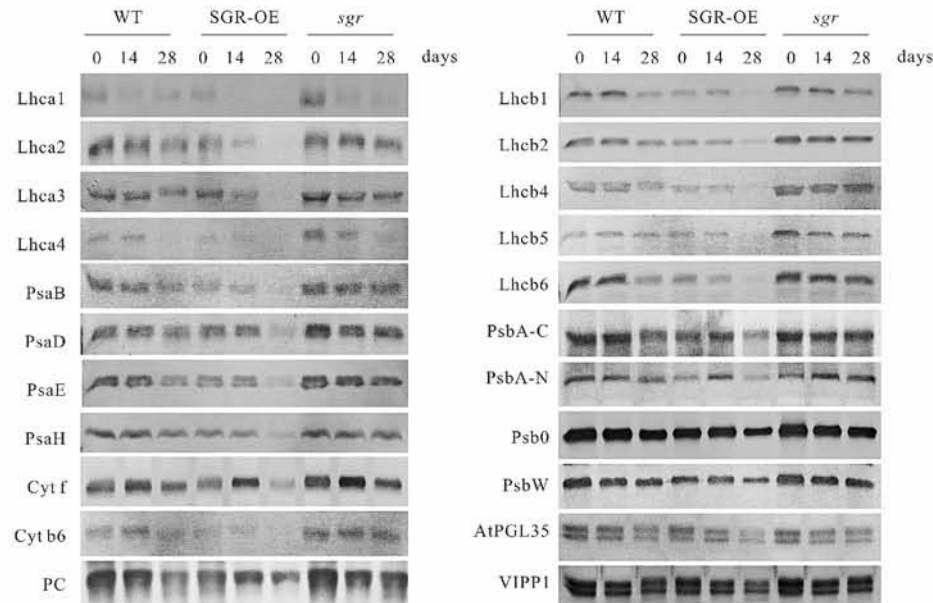


图 2 缺氮培养过程中 SGR 对水稻叶片类囊体蛋白降解的影响

Fig. 2 Effects of SGR on the degradation of thylakoid proteins in rice leaves during N-deficiency culture

应中心复合体部分蛋白的降解明显延缓;但电子传递相关蛋白的降解与野生型一致,而 PSII 和 PSI 的反应中心复合体外围的蛋白(如 PsaD 和 PsaH 等)容易发生降解。蛋白降解不一致可能与它们在复合体中所处的位置有关,即位置效应,位于复合体外围的蛋白没有被膜脂覆盖,容易被蛋白酶降解^[14]。但是 PSI 的捕光色素蛋白 Lhca1 和 Lhca3 在叶片衰老后期几乎完全降解,而非聚合体的 Lhca2 和 Lhca4 能够进入 PSI 中心,这可能与其在衰老时不易被降解有关^[15]。

在缺氮条件下,叶片类囊体蛋白水平的变化趋势在 *sgr* 突变体和野生型水稻中基本一致,即大部分类囊体蛋白水平随着氮饥饿时间的延长而下降,而 Cyt b6 蛋白和 f 蛋白等先增加后降低,与暗诱导衰老的结果不一致。这可能与缺氮处理的是植物活体叶片而暗诱导的是离体叶片有关,植物活体叶片的蛋白表达量受调节的机理可能更为复杂些。Cyt b6/f 复合体存在于叶绿体内囊体膜上,具有调节 PSII 和 PSI 间能量分配的作用^[16],其蛋白量先增加后降低可能有利于随时保持 PSII 和 PSI 之间能量的平衡,其作用机理尚需进一步研究。但是在缺氮后期,PSII 与 PSI 的捕光色素蛋白和反应中心复合体部分蛋白的降解在 *sgr* 突变体中也明显被延缓,进一步说明 *SGR* 能够促进类囊体蛋白的降解。

本研究结果表明,在 *SGR* 超表达的水稻叶片中,PSII 与 PSI 的捕光色素蛋白和反应中心复合体蛋白以及电子传递相关蛋白的水平都明显低于野生型水稻叶片。在暗诱导衰老叶片以及缺氮条件下,类囊体蛋白的降解速度也明显比野生型的快,这说明 *SGR* 超表达后不仅降低了 PSII 与 PSI 的捕光色素蛋白和反应中心复合体的蛋白含量,同时也降低了光合电子传递链的相关蛋白含量。在植物体中,植物吸收的光能在 PSII 和 PSI 间的平衡分配,才能保证光合作用的高效进行和对环境变化的适应^[17]。因此,这种同步降解有利于衰老过程在光系统之间的平衡,并维持一定的光合作用能力。这说明水稻叶片衰老过程中,*SGR* 蛋白能够驱动整个类囊体降解,也进一步证明 *SGR* 蛋白在水稻叶片衰老过程中氮素的再利用方面具有重要作用。

参考文献

- [1] Bakken A K, Macduff J, Humphreys M, et al. A stay-green mutation of *Lolium perenne* affects NO₃⁻ uptake and trans-

- location of N during prolonged N starvation [J]. *New Phytol*, 1997, 135: 41–50.
- [2] Himelblau E, Amasino R M. Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during senescence [J]. *Plant Physiol*, 2001, 158: 1317–1323.
- [3] Masclaux-Daubresse C, Reisdorf-Cren M, Orsel M. Leaf nitrogen remobilization for plant development and grain filling [J]. *Plant Biol*, 2008, 10: 23–36.
- [4] Fu J D, Yan Y F, Lee B W. Physiological characteristics of a functional stay-green rice “SNU-SG1” during grain-filling period [J]. *J Crop Sci Biotechn*, 2009, 12: 47–52.
- [5] Peoples M B, Dalling M J. The interplay between proteolysis and amino acid metabolism during senescence and nitrogen reallocation [M]// Noodén L D, Leopold A C. *Senescence and Aging in Plants*. San Diego: Academic Press, 1988: 181–217.
- [6] 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: 197–209.
- [7] 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.
- [8] Park S Y, Yu J W, Park J S, et al. The Senescence-induced staygreen protein regulates chlorophyll degradation [J]. *Plant Cell*, 2007, 19: 1649–1664.
- [9] 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: 411–417.
- [10] Kusaba M, Ito H, Morita R, et al. Rice non-yellow coloring1 is involved in light-harvesting complex II and grana degradation during leaf senescence [J]. *Plant Cell*, 2007, 19: 1362–1375.
- [11] Aseeva E, Ossenbühl F, Sippel C, et al. Vipp1 is required for basic thylakoid membrane formation but not for the assembly of thylakoid protein complexes [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2007, 45: 119–128.
- [12] Vidi P A, Kanwischer M, Baginsky S, et al. Tocopherol cyclase (VET1) localization and vitamin E accumulation in chloroplast plastoglobule lipoprotein particles [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281: 11225–11234.
- [13] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning* [M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 1996: 888–897.
- [14] Thomas H, Howarth C J. Five ways to stay green [J]. *J Exp Bot*, 2000, 51: 329–337.
- [15] Wientjes E, Oostergetel G T, Jansson S, et al. The role of Lhca complexes in the supramolecular organization of higher plant photosystem I [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284: 7803–7810.
- [16] Jan M. Anderson. Cytochrome b6 f complex: Dynamic molecular organization, function and acclimation [J]. *Photosynth Res*, 1992, 34: 341–357.
- [17] Wu W H(武维华). *Plant Physiology* [M]. Beijing: Science Press, 2003: 143–146.(in Chinese)