

水稻*OsYDA*基因调控气孔发育的功能分析

郑国栋, 杨洪全*

上海交通大学农业与生物学院, 上海200240

摘要: 气孔是植物特化的表皮结构, 在植物蒸腾过程和与外界气体交换过程中起到重要作用。拟南芥YDA (AtYDA)是MAPK级联信号途径中的一种激酶(MAPKKK4), 它在叶片气孔的发育过程中起着负调控的作用。AtYDA功能缺失导致叶片气孔显著增加, 而表达组成型激活形式的AtYDA (ΔN -YDA)则会导致表皮产生无气孔表型。本研究克隆了水稻中与AtYDA同源的2个基因*OsYDA1*和*OsYDA2*。在拟南芥中过量表达这2个基因都导致了叶片气孔密度的减少和叶片失水速率的降低。而表达 ΔN -*OsYDA1*和 ΔN -*OsYDA2*的转基因植株则呈气孔系数下降的表型。这表明*OsYDA*与AtYDA在调控气孔发育的功能上具有保守性。

关键词: 水稻; 拟南芥; 气孔; YDA

Characterization of Rice *OsYDA* Gene in Regulating Stomatal Development

ZHENG Guo-Dong, YANG Hong-Quan*

School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China

Abstract: Stomata, the specialized structure in plant epidermis, play an important role in transpiration and gas exchange between plants and the environment. *Arabidopsis* YDA (AtYDA), a kinase (MAPKKK4) in MAPK cascade, negatively regulates stomatal development. The loss-of-function mutation of AtYDA leads to significant increase in the production of leaf stomata, whereas the expression of constitutively active form of AtYDA (ΔN -YDA) results in repressed stomatal formation in leaf epidermis. In this study, we cloned two orthologs of AtYDA in rice, namely *OsYDA1* and *OsYDA2*. Overexpression of either of these genes in *Arabidopsis* resulted in a significant decrease in stomatal density and water-loss rate. Likewise, the transgenic *Arabidopsis* plants expressing ΔN -*OsYDA1* and ΔN -*OsYDA2* displayed a dramatically reduced stomatal index phenotype. Taken together, these results demonstrate a conserved role for *OsYDA* and AtYDA in regulating stomatal development.

Key words: rice; *Arabidopsis thaliana*; stomata; YDA

气孔是植物特化的表皮结构, 在植物蒸腾过程和与外界气体交换过程中起到重要作用。光合作用是作物产量形成的基础生理过程, 气孔在其中起着至关重要的作用(王贺正等2005)。因此有关气孔发育和开度的调控是植物生物学研究的重要问题之一。

气孔是由2个特化的表皮细胞即保卫细胞组成的结构, 一般位于植物茎叶等器官的表皮, 植物通过气孔吸收CO₂进行光合作用并有效的防止了水分的过蒸发(Hetherington和Woodward 2003; Pillitteri和Torii 2007)。就气孔分布模式来看, 单子叶植物如水稻、玉米的气孔成线状与叶脉平行排列, 双子叶植物如拟南芥的气孔排列没有明显规律(赵益超等2008)。

在拟南芥中, 一类称为拟分生组织母细胞(meristemoid mother cell, MMC)的表皮原细胞(proto-

dermal cell)经过一次非对称分裂或进入分裂(entry division)产生一个小的近似三角形的拟分生组织细胞(meristemoid)和一个称为气孔家系细胞(stomatal lineage ground cell, SLGC)的大的子细胞, 这个过程需要SPCH (SPEECHLESS) (MacAlister等2007)。拟分生组织细胞具有分裂能力, 在进一步分化前仍可进行一两轮额外的非对称分裂或扩增分裂, 同样产生拟分生组织细胞和更多的SLGC, 拟分生组织细胞最终失去分裂能力, 在MUTE的作用下分化为保卫母细胞(guard mother cell, GMC) (Pillitteri等2007), GMC通常为椭圆形或圆形。最后GMC在FAMA、FLP和MYB88的共同作用下进

收稿 2010-12-25 修定 2011-01-12

资助 国家转基因专项(2009ZX08009-081B)。

* 通讯作者(E-mail: hqyang@sjtu.edu.cn; Tel: 021-34206005)。

行一次对称分裂后产生2个高度特化的保卫细胞(guard cell, GC) (Lai等2005; Ohashi-Ito和Bergmann 2006)。

综上所述, MUTE、SPCH、FAMA等作为转录因子在气孔的发育中起着重要的正调节作用。在植物气孔发育过程中也同样存在负调控机制, 如丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)级联反应途径, 该反应途径在整个真核生物界是非常保守的, MAPKs在植物中调控了抗病反应、抗非生物胁迫、激素的信号传导和生长发育等许多生理过程(Colcombet和Hirt 2008)。YDA是首先被发现在气孔发育模式形成中发挥作用的MAPKKK (MAP kinase kinase kinase), 位于MAPK途径的上游, 是气孔发育中重要的负调控因子。在拟南芥*yda*突变体中, 因YDA功能缺失会产生过多的气孔; 组成型表达YDA植株的气孔数量减少甚至没有气孔产生, 因为缺失N端的YDA (Δ N-YDA)具有组成型激酶活性, 在转基因拟南芥植株中的表达可以完全阻断气孔的产生(Bergmann等2004)。本研究克隆了水稻的2个与*AtYDA*同源的基因, *OsYDA1*和*OsYDA2*。通过在拟南芥中过量表达这2个基因来研究了它们的功能, 结果表明过量表达*OsYDA1*和*OsYDA2*的转基因拟南芥子叶和叶片的气孔密度减少, 这说明在单子叶植物水稻和双子叶植物拟南芥的YDA在调控气孔发育的功能上具有保守性。

材料与amp;方法

1 实验材料

水稻采用粳稻品种‘日本晴’(*Oryza sativa* ssp. *japonica* cv. Nipponbare)。拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)采用Col-0生态型。

2 水稻基因*OsYDA*的克隆及转基因质粒构建

将拟南芥*AtYDA*的氨基酸序列在水稻基因组数据库(TIGR)中进行比对, 发现*Os04g47240*和*Os02g44642*所编码的蛋白与*AtYDA*的一致性(identity)都在60%以上。我们将*Os04g47240*命名为*OsYDA1*, *Os02g44642*命名为*OsYDA2*。根据这2个基因的序列分别设计了扩增全长cDNA的引物, *OsYDA1*的上下游引物为*OsYDA1PstI5'* (5' AAACTG-CAGATGCCACCATGGTGGTGGGGGAAGTCTT

3')和 *OsYDA1SpeI3'* (5' AAAACTAGTTGGTTAC-CATGCCTGAGTCCAAG 3'), *OsYDA2*的上下游引物为*OsYDA2PstI5'* (5' AGCCTGCAGATGCCAC-CATGGTGGGGGAAGTCTT 3')和*OsYDA2SpeI3'* (5' GCTACTAGTGGACCATGGTTGCACCCA-AGGTG 3'), 其中下划线表示相应的限制性内切酶位点, 下同。用上述引物以‘日本晴’14 d幼苗的基因组DNA为模板, 通过聚合酶KOD plus (TOYOBO)进行PCR扩增, 获得了*OsYDA1*和*OsYDA2*的全长cDNA。将此片断用限制性内切酶*PstI*和*SpeI*双酶切后插入带编码萤火虫荧光素酶(firefly luciferase, 简称LUC)标签的超表达载体pHB-35S::LUC上(Liu等2008), 获得了重组表达载体pHB-35S::*OsYDA1-LUC*和pHB-35S::*OsYDA2-LUC*。用扩增 Δ N-*OsYDA1*片段的引物*OsYDA1XhoI5'* (5' GCCTCGAGATGTTACCATGCTTGAGTCCA-AGGTGT 3')、*OsYDA1PacI3'* (5' ATTAAT-TAAAAGTTACCATGCCTGAGTCCAAG 3')和扩增 Δ N-*OsYDA2*片段的引物*OsYDA2XhoI5'* (5' CGCTCGAGATGCCACCATGGTGGGG-GAAGTCTT 3')、*OsYDA2PacI3'* (5' GTTAAT-TAATGACCATGGTTGCACCCAAGGTGT 3'), 以‘日本晴’基因组DNA为模板通过PCR扩增后得到目的片段, 用*XhoI/PacI*双酶切后连入含有雌激素(β -estradiol)诱导启动子*XVE*与编码黄色荧光蛋白(YFP)基因的植物表达载体*XVE::YFP*上(Kang等2009), 获得了重组表达载体*XVE:: Δ N-*OsYDA1-YFP**和*XVE:: Δ N-*OsYDA2-YFP**。用于质粒转化和扩增的大肠杆菌菌株为DH5 α , 用于拟南芥转化的根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株为GV3101。

3 植株转化及转基因植株检测

3.1 植株转化

利用浸花法(Clough和Bent 1998)将含有pHB-35S::*OsYDA1-LUC*、pHB-35S::*OsYDA2-LUC*、*XVE:: Δ N-*OsYDA1-YFP**和*XVE:: Δ N-*OsYDA2-YFP**载体的GV3101菌液分别转化拟南芥Col-0生态型。分别利用除草剂和潮霉素对35S::*OsYDA1-LUC*、35S::*OsYDA2-LUC*、*XVE:: Δ N-*OsYDA1-YFP**和*XVE:: Δ N-*OsYDA2-YFP**转基因植株进行筛选。获得的单拷贝插入的纯合T₃代材料用于表型分析。

野生型及转基因植株均在全日照下培养(光照强度约为160 μmol·m⁻²·s⁻¹, 温度约为24 °C)。

3.2 LUC活性的测定

分别取全日照条件下栽种后10 d的幼苗新鲜叶片, 称重约0.2 g后速冻, 再将叶片磨碎后用 Luciferase Assay System (E1500, Promega)定量测定 LUC活性(Liu等2008)。

3.3 拟南芥子叶气孔系数测定

微分干涉显微技术(differential interference contrast microscope, DIC)用来进行气孔系数定性和定量分析。光照培养10 d, 此时第2对莲座叶在叶尖开始变黄后开始取样。子叶放进95%酒精中脱色, 脱色完全后梯度酒精复水(90%, 75%, 50%, 15%), 吸去酒精加入透明液(甘油:水合氯醛:水=1:8:1)透明过夜。制片时用透明液作为介质, 使用

Leica DM2500 显微镜观察叶片远轴面。气孔系数(SI)=气孔数/(气孔数+垫基细胞数)×100% (气孔和垫基细胞计数来源于Leica DM2500拍摄的照片)。

3.4 失水实验

做失水实验时, 用剪刀从叶柄处取下正常生长3周拟南芥的第1、2对真叶, 用分析天平称重(精确到0.1 mg), 并每隔30 min进行一次称重。失水率=(叶片初始重量-处理后的叶片重量)/叶片初始重量×100%。

实验结果

1 OsYDA与AtYDA同源性分析

用拟南芥AtYDA的氨基酸序列与水稻基因组数据库(TIGR)进行比对(图1), 发现OsYDA1和OsYDA2所编码的蛋白与AtYDA的一致性分别为71%

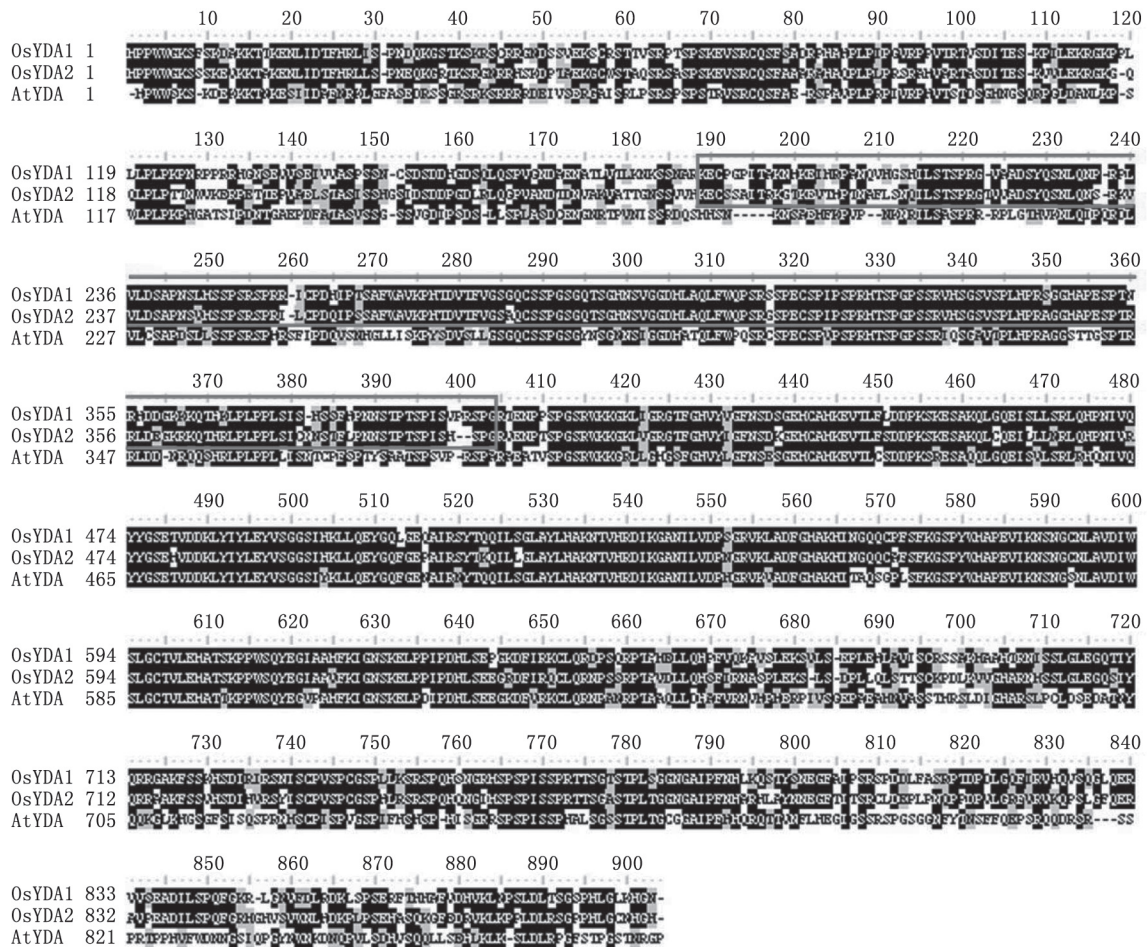


图1 OsYDA1、OsYDA2与AtYDA的氨基酸序列同源性比较
Fig.1 Amino acid sequence alignment among OsYDA1, OsYDA2 and AtYDA
图中线框内的序列为构建*XVE::AN-OsYDA-YFP*时缺失的N端序列。

和67%。其中OsYDA1和OsYDA2之间的一致性为82%。这表明OsYDA1和OsYDA2与拟南芥AtYDA之间存在较高同源性。

2 OsYDA1、OsYDA2、 ΔN -OsYDA1和 ΔN -OsYDA2过量表达载体的构建与拟南芥转基因植株的鉴定

AtYDA是气孔发育途径的负调控因子, 位于MAPK级联途径的上游, AtYDA组成型表达会导致气孔减少(Bergmann等2004)。为了研究OsYDA1和OsYDA2是否具有与AtYDA类似的功能, 我们构建了由35S启动子驱动的、分别与荧光素酶编码基因(LUC)连接的融合基因35S::OsYDA1-LUC和35S::OsYDA2-LUC, 并通过根癌农杆菌分别转化了拟南芥野生型Col-0。经筛选分别获得了3个独立的纯合单拷贝插入的株系(35S::OsYDA1-LUC-3、

11、12和35S::OsYDA2-LUC-3、5、6)(图2-A和B)。用上述转基因纯合株系T₃代小苗叶片进行LUC活性测定, 发现转基因植株样品中具有显著的LUC活性, 而在野生型中没有检测到LUC活性(图2-C和D), 说明OsYDA1-LUC和OsYDA2-LUC融合蛋白在转基因植株中过量表达。初步的表型观察发现这些35S::OsYDA1-LUC转基因植株呈现不同程度的分枝数量增加和植株矮化的表型(图2-A和B)。进一步对转基因植株的分枝数量进行了统计分析, 发现35S::OsYDA1-LUC和35S::OsYDA2-LUC各转基因株系植株的莲座叶分枝数和茎生叶分枝数都明显多于野生型Col-0(图2-E和F)。

YDA的N端负调控YDA的活性, 去除N端会使AtYDA被组成型激活(Lukowitz等2004; Kovtun等

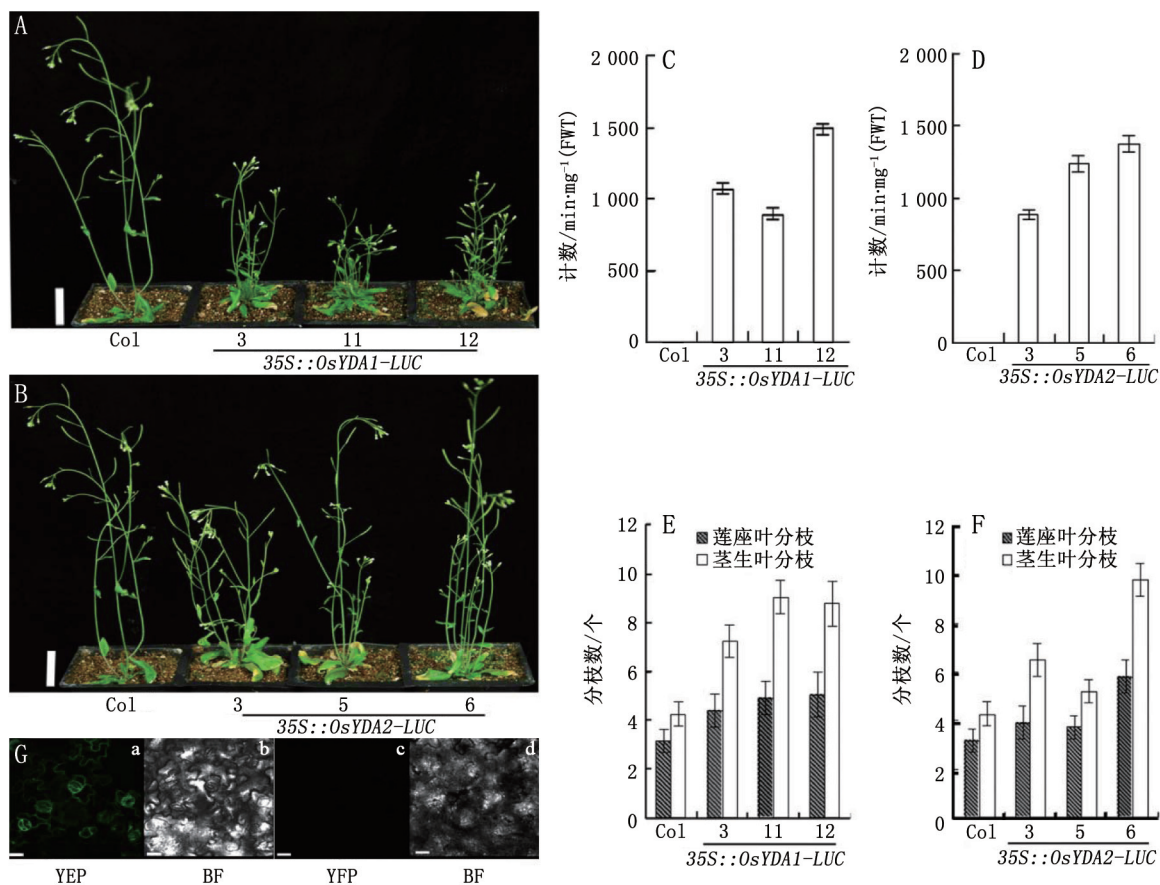


图2 35S::OsYDA1-LUC和35S::OsYDA2-LUC转基因植株的鉴定与表型分析

Fig.2 Identification and phenotypic analyses of 35S::OsYDA1-LUC and 35S::OsYDA2-LUC transgenic plants

A、B: 分别为生长20 d的35S::OsYDA1-LUC和35S::OsYDA2-LUC转基因植株, 比例尺为3 cm; C、D: 2种转基因植株生长10 d幼苗叶片LUC的检测, 数据为平均数±标准差($n=12$); E、F: 2种转基因成熟植株的莲座叶分枝和茎生叶分枝统计, 数据为平均数±标准差($n=20$); G: XVE:: ΔN -OsYDA1-YFP转基因植株经雌激素($20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ β -estradiol)诱导10 d后YFP观察, 其中a、b分别是转基因植株在黄色荧光(YFP)和白光通道(BF)下的观察, c、d是经相同诱导处理后Col-0的观察结果, 比例尺为20 μm 。

2000)。我们构建了受雌激素诱导的诱导型启动子 *XVE* 驱动的缺失N端的 *OsYDA* (ΔN -*OsYDA*) (图1) 与 *YFP* 基因的融合基因(*XVE:: ΔN -OsYDA-YFP*), 并通过根癌农杆菌转化拟南芥野生型 Col-0。经筛选分别获得了3个独立的纯合单拷贝插入的株系 (*XVE:: ΔN -OsYDA1-YFP*-1、2、7和*XVE:: ΔN -OsYDA2-YFP*-1、4、7)。将转基因纯合株系的幼苗经过20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 雌激素(β -estradiol)诱导处理后, 通过激光共聚焦显微镜可观察到其叶片表皮细胞的YFP荧光[图2-G (a)], 同一株系幼苗用20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DMSO进行处理则观察不到YFP荧光(结果未显示), 而野生型 Col-0 的幼苗无论是经雌激素处理[图2-G (c)]还是DMSO处理都观察不到YFP荧光, 表明 ΔN -*OsYDA1-YFP*以及 ΔN -*OsYDA2-YFP*融合蛋白在转基因幼苗中能被雌激素诱导表达。

3 *OsYDA1*、*OsYDA2*、 ΔN -*OsYDA1*和 ΔN -*OsYDA2*在拟南芥中的过量表达导致气孔系数的降低

通过对在光照条件下生长10 d的幼苗子叶下表皮气孔的显微观察, 发现35S::*OsYDA1-LUC*和35S::*OsYDA2-LUC*转基因植株幼苗子叶的成熟气孔比例较Col-0明显降低(图3-A); 经雌激素诱导的*XVE:: ΔN -OsYDA1-YFP*的转基因植株幼苗子叶的成熟气孔明显少于Col-0 (图3-B)。进一步通过气孔系数(SI)的统计分析, 证明了这些转基因植株的子叶SI明显低于Col-0 (图3-C~F)。

4 *OsYDA*在拟南芥中的过量表达导致植株离体叶片失水率的降低

气孔在植物蒸腾过程和与外界气体交换过程中起重要作用, 气孔系数的减少可能会减慢植物

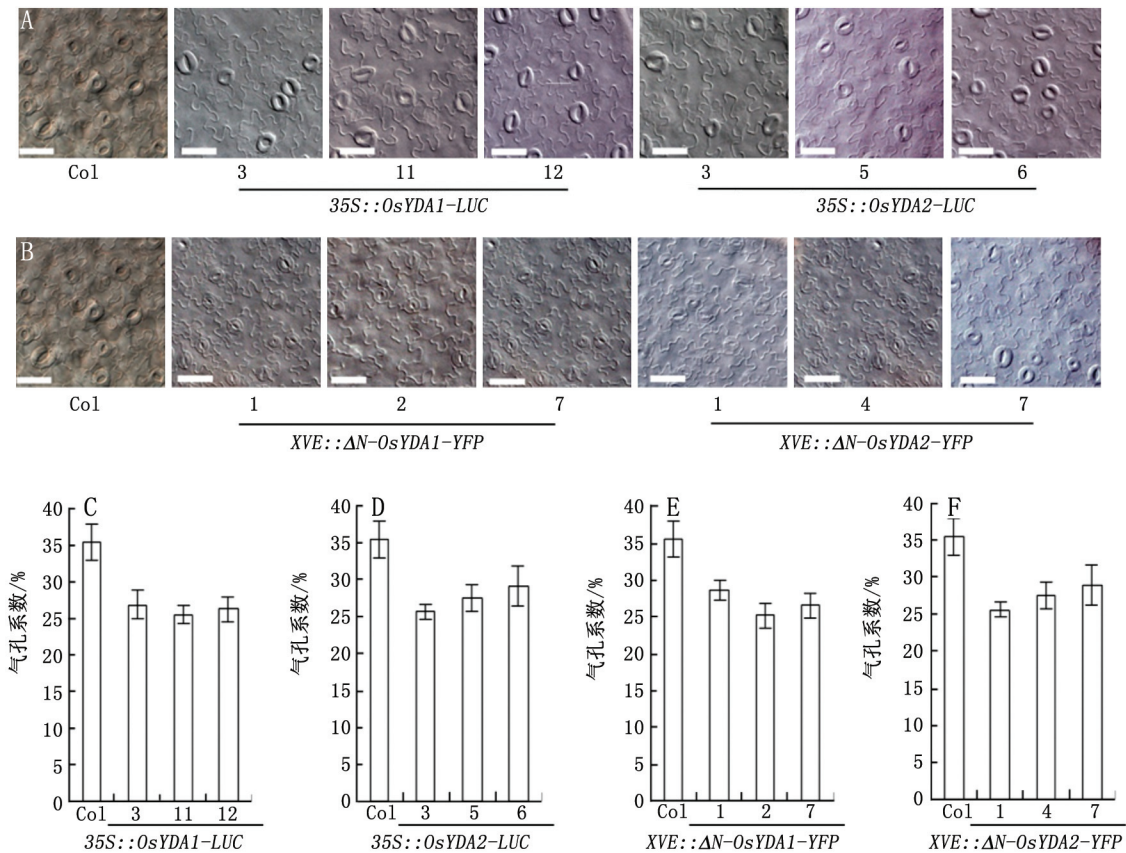


图3 35S::*OsYDA-LUC*和*XVE:: ΔN -OsYDA-YFP*转基因植株气孔表型分析

Fig.3 Stomatal phenotypes of 35S::*OsYDA-LUC* and *XVE:: ΔN -OsYDA-YFP* transgenic plants

A: 全日照条件下35S::*OsYDA-LUC*转基因植株正常生长10 d幼苗子叶气孔观察; B: 全日照条件下*XVE:: ΔN -OsYDA-YFP*转基因植株经雌激素(20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ β -estradiol)诱导后10 d幼苗子叶气孔观察; C~F:分别为转基因植株气孔系数SI的统计, 数据为平均数 \pm 标准差($n=12$)。比例尺为20 μm 。

的蒸腾过程。我们分析了35S::*OsYDA1-LUC*株系离体叶片的失水情况, 结果表明相对于Col-0失水率, 35S::*OsYDA1-LUC*转基因植株的失水率显著降低(图4), 这一结果与气孔系数的统计结果一致, 表明过量表达*OsYDA*能增强转基因植株叶片的保水能力。

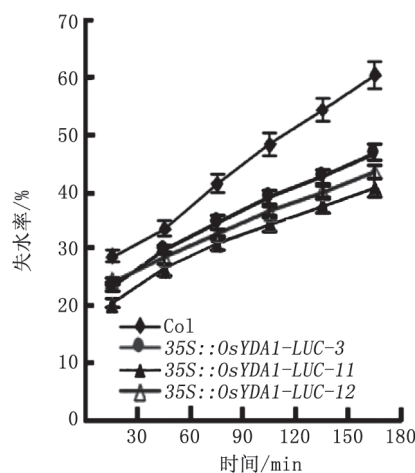


图4 35S::*OsYDA1-LUC*转基因植株离体叶片的失水率分析
Fig.4 Water-loss rate of explant leaves of 35S::*OsYDA1-LUC* transgenic plants

叶片从植株上取下开始计时, 每隔30 min将叶片称重, 同种基因型的植物以5~8片叶片为一组进行称量, 一共称量3组, 以这3组数据求平均值和标准差。本图为3次重复实验其中一次实验的数据。

讨 论

禾本科植物与双子叶植物的气孔发育存在明显差异。在单、双子叶植物气孔发育通路的关键因子FAMA、MUTE和SPCH中, 只有FAMA的功能相对比较保守, 而MUTE和SPCH在功能方面则存在一些差异(Liu等2009)。水稻中*OsFAMA*功能缺失后, 叶片不会出现成熟的保卫细胞, 并且其气孔的线性分布和气孔形态与野生型出现很大的不同, 气孔的形态也不是野生型的哑铃型而是长盒型(Liu等2009)。这意味着水稻的*OsFAMA*是其气孔发育分化所必需的, 并且*AtFAMA*的启动子驱动的*OsFAMA*能部分恢复*fama*突变体的表型。这些都表明, FAMA促进分化形成GC的功能在单、双子叶植物中都是保守的。前人研究发现(Liu等2009), *OsMUTE*和*OsSPCH* (*OsSPCH1*和*OsSPCH2*)表达的时空性与*AtMUTE*和*AtSPCH*都有着明显的差

异。在表型回复实验中, *AtMUTE*的启动子驱动的*OsMUTE*可部分回复拟南芥*mute*突变体的表型, 而*AtSPCH*的启动子驱动的*OsSPCH*不能回复*spch*的表型。功能分析发现*OsSPCH*在水稻气孔发育的早期发挥的功能与*AtSPCH*不完全一样。在拟南芥中过量表达*AtSPCH*能导致大量的异位不对称分裂, 而在拟南芥中过量表达*OsSPCH2*具有该作用, *OsSPCH1*却没有这个功能。本研究表明, 水稻中存在2个与*AtYDA*同源的基因*OsYDA1*和*OsYDA2*, 它们在气孔发育方面存在着与*AtYDA*相类似的功能, 即负调节气孔的发育。这说明YDA的功能在单、双子叶植物中具有保守性。过量表达*OsYDA1*和*OsYDA2*会导致拟南芥的分枝数量的增加, 有关*OsYDA*在水稻中的作用机制分析正在进行之中。

参考文献

- 王贺正, 马均, 刘慧远(2005). 水稻抗旱性研究现状与展望. 中国农学通报, 19: 110~113
- 赵益超, 公华林, 宋开侠(2008). 气孔发育的研究进展. 现代农业科技, 11: 361~366
- Bergmann DC, Lukowitz W, Somerville CR (2004). Stomatal development and pattern controlled by a MAPKK kinase. *Science*, 304: 1494~1497
- Clough SJ, Bent AF (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 16: 735~743
- Colcombet J, Hirt H (2008). *Arabidopsis* MAPKs: a complex signaling network involved in multiple biological processes. *Biochem J*, 413: 217~226
- Hetherington AM, Woodward FI (2003). The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature*, 24: 901~908
- Kang CY, Lian HL, Wang FF, Huang JR, Yang HQ (2009). Cryptochromes, phytochromes, and COP1 regulate light-controlled stomatal development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 21: 2624~2641
- Kovtun Y, Chiu WL, Tena G (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 2940~2945
- Lai LB, Nadeau JA, Lucas J, Lee EK, Nakagawa T (2005). The *Arabidopsis* R2R3 MYB proteins FOUR LIPS and MYB88 restrict divisions late in the stomatal cell lineage. *Plant Cell*, 17: 2754~2767
- Liu LJ, Zhang YC, Li QH, Sang Y, Mao J, Lian HL, Wang L, and Yang HQ (2008). COP1-mediated ubiquitination of CONSTANS is implicated in cryptochrome regulation of flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 20: 292~306
- Liu T, Ohashi-Ito K, Bergmann DC (2009). Orthologs of *Arabidopsis thaliana* stomatal bHLH genes and regulation of stomatal development in grasses. *Development*, 136: 2265~2276
- Lukowitz W, Roeder A, Parmenter D, Somerville C (2004). A MAP-

- KK kinase gene regulates extraembryonic cell fate in *Arabidopsis*. *Cell*, 16: 109~119
- MacAlister CA, Ohashi-Ito K, Bergmann DC (2007). Transcription factor control of asymmetric divisions that establish the stomatal lineage. *Nature*, 45: 537~540
- Ohashi-Ito K, Bergmann DC (2006). *Arabidopsis* FAMA controls the final proliferation/differentiation switch during stomatal development. *Plant Cell*, 18: 2493~2505
- Pillitteri LJ, Sloan DB, Bogenschutz N, Torii KU (2007). Termination of asymmetric cell division and differentiation of stomata. *Nature*, 445: 501~505
- Pillitteri LJ, Torii KU (2007). Breaking the silence: three bHLH proteins direct cell-fate decisions during stomatal development. *BioEssays*, 29: 861~870