

## 毛竹中NYE基因的分离及功能分析

陈云霞<sup>1,3</sup>, 魏强<sup>1</sup>, 蒯本科<sup>2</sup>, 丁雨龙<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>南京林业大学竹类研究所, 南京210037; <sup>2</sup>复旦大学生命科学学院, 上海200433; <sup>3</sup>南京森林警察学院鉴定中心, 南京210046

**摘要:** *AtNYE1*是拟南芥叶片衰老过程中叶绿素降解的重要调控基因, 本文用*AtNYE1*为诱饵基因, 通过NCBI tblastn在毛竹的cDNA文库中找到3个与其相似性较高的cDNA全长序列, 分别命名为*PeNYE1*、*PeNYE2*和*PeNYE3*。为了验证其是否具有*AtNYE1*相似的功能, 分别将它们的编码区构建到带有花椰菜花叶病毒35S强启动子的植物表达载体上, 并通过冻融法将这3个表达载体导入GV3101农杆菌。通过农杆菌介导法, 将这3个基因分别在烟草叶片中瞬时表达及在拟南芥植株中稳定表达, 结果显示, 瞬时过表达和组成型过表达*PeNYE1*均导致了叶片的黄化, 而瞬时或组成型过表达*PeNYE2*或*PeNYE3*均未观察到黄化表型。这些结果表明*PeNYE1*是毛竹中叶绿素降解的重要调控基因。

**关键词:** 叶片衰老; 叶绿素降解; 毛竹; 滞绿; NYE

## Isolation and Function Analysis of NYE Genes in Moso [*Phyllostachys edulis* (Carr.) Lehaie]

CHEN Yun-Xia<sup>1,3</sup>, WEI Qiang<sup>1</sup>, KUAI Ben-Ke<sup>2</sup>, DING Yu-Long<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Bamboo Research Institute, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; <sup>2</sup>School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China; <sup>3</sup>Identification Center, Nanjing Forest Police College, Nanjing 210046, China

**Abstract:** *AtNYE1* is an important chlorophyll degradation regulatory gene during leaf senescence of *Arabidopsis thaliana*. With *AtNYE1* as a bait gene, three sequences which have high similarity with *AtNYE1* were found in the moso (*Phyllostachys edulis*) EST database through NCBI tblastn, and were named *PeNYE1*, *PeNYE2* and *PeNYE3* respectively. To verify whether those genes have the similar function of *AtNYE1*, the coding regions of *PeNYE1*, *PeNYE2* and *PeNYE3* were constructed to the plant expression vector with CaMV 35S promoter. And the resulting constructs were introduced into *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 through the freeze-thaw method. By *Agrobacterium*-mediated method, the three genes were transiently expressed in tobacco leaves and constitutively expressed in *Arabidopsis* plants, respectively. The results showed that both transient-expression and constitutive-expression of *PeNYE1* could result in the leaf yellowing phenotype. But transient- or constitutive-overexpression of *PeNYE2* or *PeNYE3* couldn't induce the leaf de-greening phenotype. The results collectively indicate that *PeNYE1* is an important regulator gene of chlorophyll degradation in moso.

**Key words:** leaf senescence; chlorophyll degradation; moso; stay green; NYE

叶绿素降解是植物绿色器官衰老的一个显著特征, 通过近20年的研究, 植物叶绿素降解代谢途径已经基本明了, 但长期以来对于衰老进程中叶绿素降解的分子调控机制知之甚少。Ren等(2007)通过筛选滞绿(stay-green)突变体, 鉴定到一个与叶绿素降解代谢途径相关的关键调控基因NYE1 (*Non-yellowing*)。AtNYE1的过表达能引起拟南芥叶片黄化, 甚至出现白化苗。其无义突变体nye1-1在叶片衰老进程中叶绿素及光合作用相关蛋白的降解受到显著抑制。AtNYE1在植物中高度保守, 在其他植物物种中相继鉴定出AtNYE1的同源基因, 且这些基因的变异也能够导致植株的滞绿表

型(Barry等2008; Jiang等2007; Park等2007; Armstead等2006)。这些基因统称为衰老诱导的叶绿体滞绿相关蛋白(senescence-inducible chloroplast stay-green protein, SGR)基因(Hörtensteiner 2009)。在水稻上的研究发现, NYE1很可能是参与捕光色素蛋白复合物II (light-harvesting chlorophyll-protein complex II, LHCII)解构的蛋白因子(Park等

收稿 2011-09-09 修定 2011-11-07

资助 南京林业大学优秀博士学位论文创新基金项目和国家“十一五”科技支撑项目(2006BAD19B02)。

\* 通讯作者(E-mail: ylding@vip.163.com; Tel: 025-85428004)。

2007),但其具体的作用途径目前还一无所知。

竹类植物是禾本科(Gramineae)竹亚科(Bambusoideae)植物的总称。竹子生长快、成材早、产量高、用途广,如今在建筑、造纸、装饰材料、食品保健、园林绿化和生态防护等领域,均以其独有的特点表现出巨大的优势和潜力(Chen等2011)。竹林集经济效益、生态效益和社会效益于一身,已经成为我国最重要的森林类型之一。竹子属于常绿植物,但在生长过程中不断有衰老的叶片脱落,新的叶片产生。有些竹子在一年中叶片有长达6个月的半衰老状态,严重影响其光合作用。毛竹是我国分布面积最广、经济价值最大的一个竹种。近年来,毛竹已成为竹类植物中的模式竹种被大家广泛研究,但毛竹秆型高大,基因组数量庞大,变异不稳定,尚未有成熟的组培体系及经典分子生物学手段的局限性等客观原因限制了过去乃至将来一段时间人们对毛竹生长发育等分子机制的深入研究。

本文利用目前已有的毛竹cDNA序列(Peng等2010),克隆了3个与拟南芥*NYE1*相似性较高的cDNA全长序列,借助烟草和拟南芥植物系统,分析了这3个基因的功能,并初步明确了*PeNYE1*在毛竹叶绿素降解过程中的功能,为今后观赏类竹类植物绿期及色泽的改良提供了候选基因。

## 材料与方法

### 1 材料

野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)哥伦比亚生态型(Col-0)和烟草(*Nicotiana tabacum* L. cv. K326)均由复旦大学蒯本科教授实验室提供。毛竹[*Phyllostachys edulis* (Carr.) Lehaie]种子为南京林业大学竹类研究所保存。实生苗植株生长于装有黑土、蛭石、珍珠岩(体积比为3:9:0.5)的盆钵中,置于长日照光周期(16 h光照/8 h黑暗),光照强度为130  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,温度为(22±2) °C的人工培养室内培养。

植物表达载体pCHF3、大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株Top10和农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株GV3101均由复旦大学蒯本科教授实验室保存。克隆载体pMD19-T购自TaKaRa公司,PCR引物由上海赛百盛基因技术有限公司合成,DNA

序列测定由上海杰李生物技术有限公司完成。

### 2 方法

#### 2.1 植物叶片DNA和总RNA的抽提

采用十六烷基三乙基溴化铵(CTAB)法抽提DNA;使用Invitrogen公司的Trizol试剂抽提总RNA。

#### 2.2 cDNA第一链的合成及实时荧光定量PCR (real-time PCR)

使用Fermentas公司的RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis试剂盒合成cDNA第一链;荧光定量PCR使用TaKaRa公司的SYBR® Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time)试剂盒。相关引物如下:ACT2-F, 5'-CGCTCTTTCTTTCCAAGCTC-3'; ACT2-R, 5'-AACAGCCCTGGGAGCATC-3'; PeACT-F, 5'-GGTGTGAGCCATACTGTGCCCAT-3'; PeACT-R, 5'-TTTCCCGTTCAGCAGAGGTTGTG-3'; PeNYE1RT-F, 5'-GCCTCCGCTACTACATCTTTTCGC-3'; PeNYE1RT-R, 5'-GAAGCGGGGAGGTTGGAGT-3'; PeNYE2RT-F, 5'-CGGGCTCGGTGGTCGTGTT-3'; PeNYE2RT-R, 5'-CTTCTCCTCGTCCACCCCCAG-3'; PeNYE3RT-F, 5'-GACCTACCGTATTCCTCCCTGGC-3'; PeNYE3RT-R, 5'-GCGGTGAAGTCGCAGTGGGT-3'。

#### 2.3 毛竹*NYEs*基因cDNA及其基因组序列的克隆

利用拟南芥中*AtNYE1*为诱饵,通过NCBI的tblastn程序检索毛竹中与*AtNYE1*同源性较高的基因,根据找到的3个相似较高的cDNA序列,分别设计3对包含酶切位点的特异引物(带下划线序列为酶切位点)如下: PeNYE1-F, 5'-GGGTACCATGGC-GACTGCTACCAC-3' (*KpnI*); PeNYE1-R, 5'-GCTCTAGAACGAACCATGTAGCGGC-3' (*XbaI*); PeNYE2-F, 5'-GGGTACCATGGCTACTGC-CACCAT-3' (*KpnI*); PeNYE2-R, 5'-TGCTCTAGACACATTCTATTTAGTCAGTCCC-3' (*XbaI*); PeNYE3-F, 5'-GGGTACCTGCCAGAGTTCATC-AATG-3' (*KpnI*); PeNYE3-R, 5'-TGCTCTAGACTTATGGGCCTAGGTACGTA-3' (*XbaI*)。以毛竹衰老叶cDNA为模板,扩增其完整编码区序列;以毛竹叶DNA为模板,扩增其基因组序列。

PCR反应体系为: 5  $\mu\text{L}$  10 Plus缓冲液、5  $\mu\text{L}$  2

mmol·L<sup>-1</sup> dNTPs、2 μL 25 mmol·L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>、1 μL PeNYEs-F、1 μL PeNYEs-R、1 μL cDNA/DNA、1 μL KOD Plus、34 μL MiliQ H<sub>2</sub>O。PCR反应程序为: 首先94 °C预变性5 min; 然后94 °C变性30 s, 60 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 38个循环; 最后72 °C延伸10 min。

## 2.4 生物信息学分析

序列相似性用NCBI的BLAST程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)进行分析; 多序列比对应用GeneDoc软件; 系统进化树用MEGA软件进行构建, 采用NJ法, 重复1 000次; 基因结构分析在<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>网站完成。

## 2.5 表达载体构建

利用引物PeNYE1~3-F与PeNYE1~3-R扩增出PeNYE1、PeNYE2及PeNYE3的完整编码区, 测序无误之后, 用限制性内切酶KpnI与XbaI进行双酶切, 回收、纯化目的片段, 连接至用同样两个内切酶酶切并纯化的pCHF3载体上, 转化农杆菌GV3101。

## 2.6 烟草叶片瞬时表达

选择生长了3~4周烟草完全展开的嫩叶作为侵染材料, 先在烟草叶片下表皮的侧脉之间用注射器针头轻轻扎一个小孔, 用1 mL不带针头的注射器吸取含有目的基因*AtNYE1*、*PeNYEs*及pCHF3空载体的农杆菌GV3101重悬菌液, 从烟草下表皮经小孔将菌液缓缓注射进叶肉中, 烟草注

射菌液后继续在正常条件下生长, 2~3 d后开始观察叶片黄化表型。

## 2.7 转基因拟南芥的获得

将长势良好的拟南芥材料经2~3次打顶, 增加其花蕾数量, 采用花蕾侵染法转化。收集转化后的拟南芥种子, 用75%的酒精灭菌, 铺于含有50 mg·L<sup>-1</sup>卡那霉素的MS培养基上, 经抗性筛选获得转基因的拟南芥植株, 再抽提DNA, 用PCR鉴定。

## 实验结果

### 1 *PeNYEs*基因cDNA全长及其基因组序列的获得

利用NCBI的tblastn程序, 在毛竹中检索得到3个(FP099970、FP100808、FP094177)与*AtNYE1*相似性分别为62%、76%、53%的cDNA序列, 分别命名为*PeNYE1*、*PeNYE2*、*PeNYE3*。*PeNYE1*基因cDNA全长1 481 bp, 包含816 bp的开放阅读框, 编码271个氨基酸残基; *PeNYE2*基因cDNA全长975 bp, 包含564 bp的开放阅读框, 编码187个氨基酸残基; *PeNYE3*基因cDNA全长986 bp, 包含729 bp的开放阅读框, 编码242个氨基酸残基。利用特异引物PeNYE1~3-F/R, 扩增获得其基因组序列, 基因结构分析显示其基因结构差异较大(图1)。*PeNYE1*含有3个外显子和2个内含子, *PeNYE2*含有2个外显子和1个内含子, 而*PeNYE3*则含有4个外显子和3个内含子。

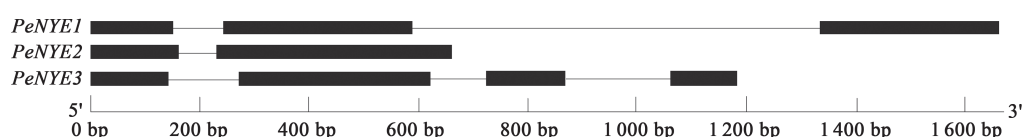


图1 *PeNYEs*的基因结构

Fig.1 The gene structure of *PeNYEs*

黑色条块: 外显子(exon); 黑色线条: 内含子(intron)。

## 2 *PeNYEs*的生物信息学分析

### 2.1 *PeNYEs*的多重序列比对

为了验证*PeNYEs*与其他物种来源的NYE的同源性, 使用GeneDoc软件分析它们蛋白的相似性。结果表明, *PeNYE1*与其他5个物种来源的NYE相似性最高; *PeNYE2*虽然相似性也很高, 但是只覆盖了其他物种的前2/3氨基酸序列; 而*PeNYE3*相对*PeNYE1*与*PeNYE2*, 相似性则较低(图2)。

### 2.2 *PeNYEs*的进化树分析

为了进一步探讨*PeNYEs*与不同物种中SGR/NYE的同源性, 构建了*PeNYEs*与其他9个物种SGR/NYE蛋白的进化树, 结果表明*PeNYE1*和*PeNYE2*与水稻的SGR蛋白在进化关系上最近, 而*PeNYE3*则不属于SGR/NYE蛋白类群(图3)。

### 3 *PeNYEs*在毛竹中的表达模式分析

取自自然生长状态下未衰(新叶完全展开后生

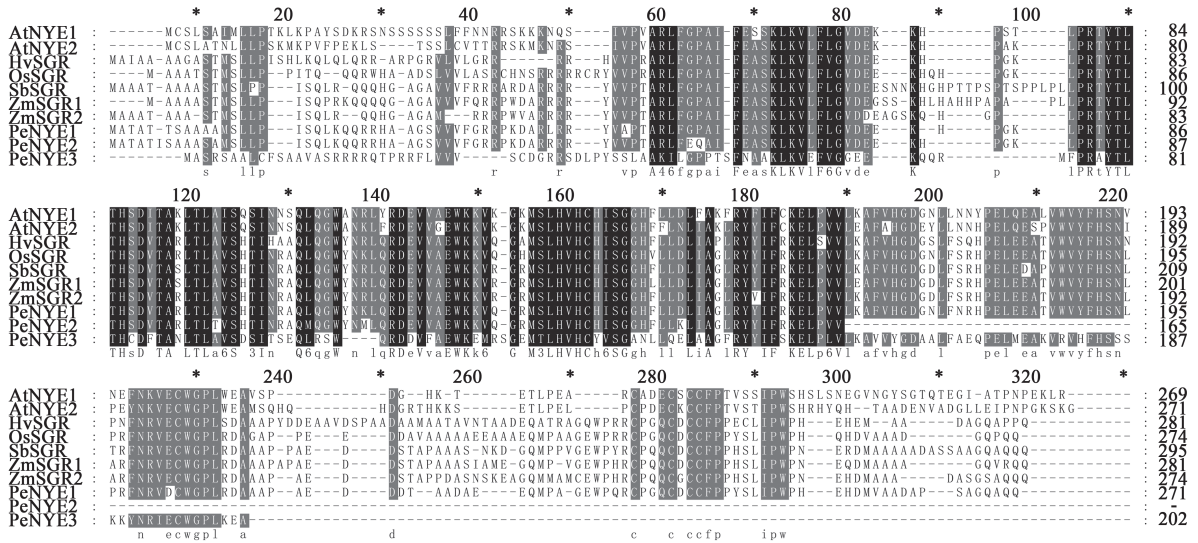


图2 PeNYEs与其他物种来源的NYE的多重序列比对

Fig.2 Multi-alignment of PeNYEs with NYE from other plants

黑色表示完全一致的氨基酸序列; 灰色表示50%以上一致的氨基酸序列; 序列下方是一致的氨基酸; 序列上方的数字代表包括空格在内的氨基酸数目; 序列右侧的数字代表实际的氨基酸数目。AtNYE1 (DQ437531)和AtNYE2 (NM\_117261.5): 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*); HvSGR (AY850135.1): 大麦(*Hordeum vulgare*); OsSGR (AY850134.1): 水稻(*Oryza sativa*); SbSGR (AY850140.1): 高粱(*Sorghum bicolor*); ZmSGR1 (AY850138.1)和ZmSGR2 (AY850139.1): 玉米(*Zea mays*)。

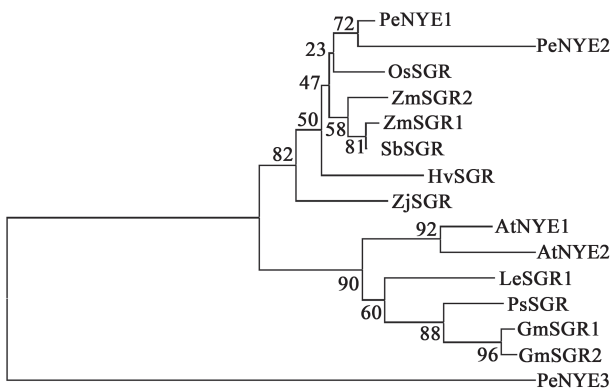


图3 PeNYEs与不同物种来源SGR/NYE的进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of PeNYEs with other SGR/NYE from different plants

AtNYE1 (DQ437531)和AtNYE2 (NM\_117261.5): 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*); GmSGR1 (AY850141)和GmSGR2 (AY850142): 大豆(*Glycine max*); PsSGR (AB303332): 豌豆(*Pisum sativum*); OsSGR (AY850134.1): 水稻(*Oryza sativa*); ZmSGR1 (AY850138.1)和ZmSGR2 (AY850139.1): 玉米(*Zea mays*); ZjSGR1 (AY850154.1): 结缕草(*Zoysia japonica*); SbSGR (AY850140.1): 高粱(*Sorghum bicolor*); HvSGR (AY850135.1): 大麦(*Hordeum vulgare*); LeSGR1/SISGR1 (AY850152): 番茄(*Lycopersicon esculentum*)/辣椒(*Solanum lycopersicum*)。

长1周无黄化的叶片)、初衰(新叶完全展开后生长2个月左右1/3面积黄化的叶片)和衰老(新叶完全展开后生长5个月左右完全黄化的叶片)的毛竹叶片(图4-A)。以毛竹中的ACTIN作为内参, *PeSAG12* (毛竹中拟南芥衰老相关基因SAG12的同源基因)作为衰老标记基因(图4-C), 实时荧光定量PCR分析*PeNYE1*、*PeNYE2*及*PeNYE3*在不同衰老阶段毛竹叶片中的表达水平, 结果显示, *PeNYE1*和*PeNYE2*的表达量均随着叶片衰老程度的增加而显著上调, 衰老叶片中这2个基因的表达量可达未衰叶片中的30多倍, 而*PeNYE3*在这3种不同衰老阶段叶片中的表达量没有显著变化(图4-B)。

#### 4 PeNYEs在烟草中的瞬时表达

为了验证*PeNYEs*的功能, 通过农杆菌介导法将*PeNYE1*、*PeNYE2*和*PeNYE3*分别在烟草叶片中瞬时超量表达。通过直接观察注射农杆菌液体的烟草叶片发现, 注射含*AtNYE1*及*PeNYE1*基因菌液的烟草叶片2~3 d后能观察到黄化的出现, 而注射含*PeNYE2*和*PeNYE3*基因菌液的烟草叶片均未观察到叶片黄化现象(图5)。

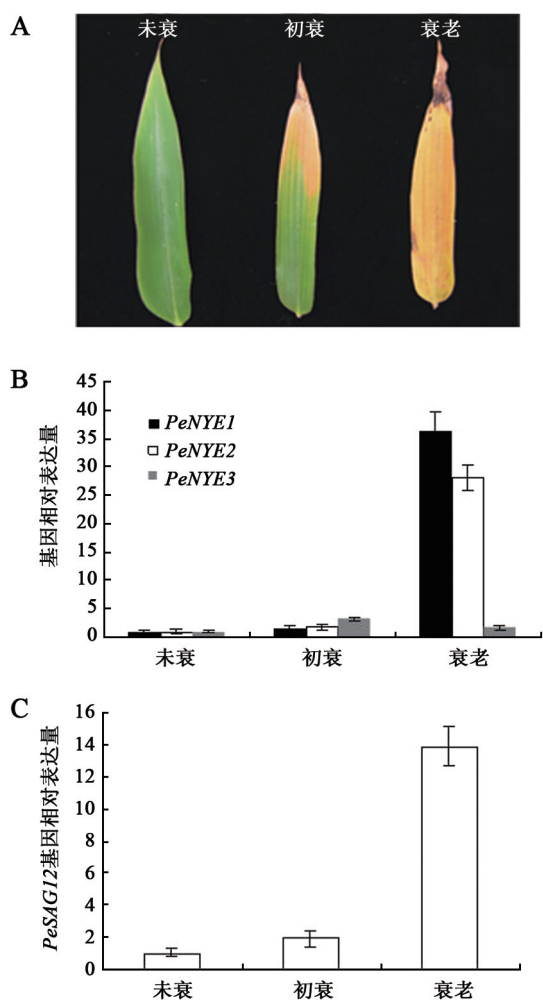


图4 3种不同衰老阶段叶片中*PeNYEs*的表达水平  
Fig.4 The transcript level of *PeNYEs* in moso leaves at three different senescence stages

A: 自然生长条件下不同衰老阶段的毛竹叶片; B: *PeNYE1*、*PeNYE2*、*PeNYE3*在A图叶片中的相对表达量; C: *PeSAG12*在A图叶片中的相对表达量。

### 5 *PeNYEs*在拟南芥中的组成型超量表达

为了进一步验证*PeNYEs*的功能, 将构建好的*PeNYEs*的过表达载体转化拟南芥野生型Col-0, 在拟南芥中稳定表达。自然生长到第20天, 观察T<sub>2</sub>代转基因植株与野生型植株的表型发现, 部分*PeNYE1*的过表达株系呈现黄化的表型(图6-A), 而*PeNYE2*和*PeNYE3*的转基因植株均不出现叶片黄化表型(资料未列出)。实时荧光定量PCR检测各株系中*PeNYE1*的表达水平, 结果显示其表达量与转基因植株的黄化程度呈正相关(图6-B), 与叶绿素含量呈负相关(图6-C)。

## 讨 论

研究表明, 叶绿素的降解不仅影响一些园艺植物的观赏性, 还会影响到绿叶蔬菜的货架期及农作物的产量(Lim等2003; Reyes-Arribas等2001)。 *AtNYE*类基因是调控植物叶绿素降解的关键基因(Ren等2007), 基于毛竹测序工作的完成, 我们利用生物信息学及分子生物学的方法, 初步阐明了毛竹中与*AtNYE*序列相似的3个同源基因在调控毛竹叶绿素降解过程中的作用。

在毛竹现有的测序数据库中, 检索到3个与*AtNYE1*相似性较高的序列。但通过生物信息学和分子生物学的分析发现, 在进化树中, *PeNYE3*不属于NYE/SGR蛋白这一类群, 表达量不随叶片衰老程度的增加而增加, 并且瞬时过表达和组成型过表达均不能引起叶片黄化。以上分析结果表明, *PeNYE3*应不参与植物叶片衰老过程中叶绿素降解过程。

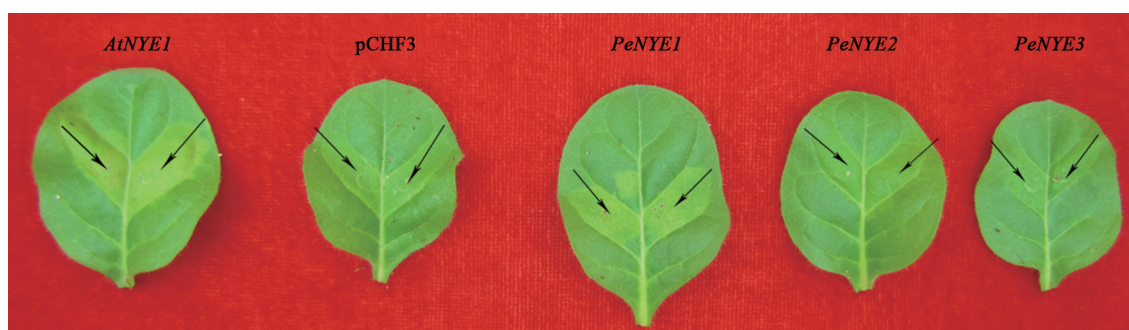


图5 *PeNYEs*在烟草叶片中的瞬时超量表达

Fig.5 Transient-overexpression of *PeNYEs* in tobacco leaves  
*AtNYE1*: 阳性对照; pCHF3: 空载体阴性对照。箭头所示为农杆菌注射区域。

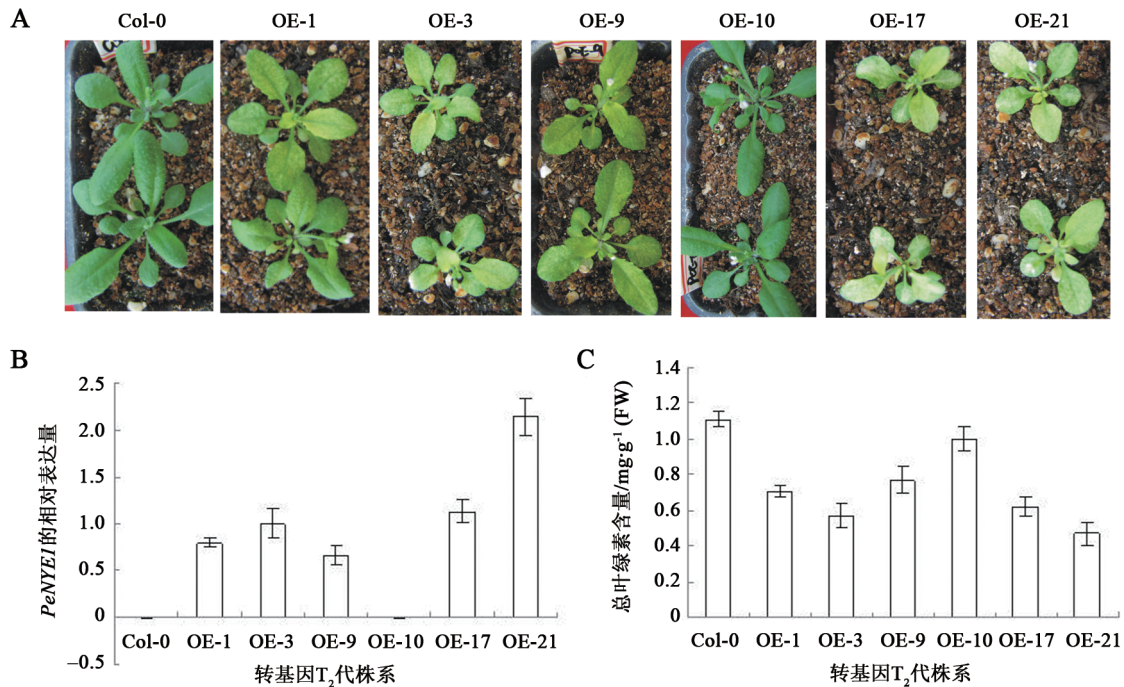


图6 *PeNYE1*在拟南芥中的超量表达能导致叶片黄化

Fig.6 The constitutive overexpression of *PeNYE1* could result in leaf yellowing in *Arabidopsis*

A: 野生型植株与随机挑选的6个转基因T<sub>2</sub>代株系(OE-1、OE-3、OE-9、OE-10、OE-17、OE-21)自然生长第20天时的表型; B: A图中各植株体内*PeNYE1*的相对表达量; C: A图中各对应植株全部莲座叶的总叶绿素含量。

*PeNYE2*与其他NYE/SGR蛋白相似性较高,且响应植物衰老信号,但是*PeNYE2*只编码187个氨基酸残基,与其他NYE/SGR蛋白相比少了将近1/3的氨基酸序列,且在植物中的功能分析发现,瞬时和组成型过表达*PeNYE2*也都不能引起叶片的黄化。这些结果表明,*PeNYE2*参与响应植物衰老信号,但不具备NYE/SGR的功能,同时也暗示NYE/SGR蛋白的后1/3氨基酸序列可能就是NYE蛋白行使功能的必需区域。

与*PeNYE2*和*PeNYE3*相比,*PeNYE1*与*AtNYE1*的相似性最高,并响应叶片衰老信号,而且不论是在烟草中的瞬时表达还是在拟南芥中的稳定超量表达,都能引起叶片的黄化。这些结果表明*PeNYE1*应参与了毛竹叶片中叶绿素的降解过程,具有与*AtNYE1*类似的功能,是毛竹叶片衰老过程中叶绿素降解的重要调控基因。

#### 参考文献

Armstead I, Donnison I, Aubry S, Harper J, Hörtensteiner S, James C, Mani J, Moffet M, Ougham H, Roberts L et al (2006). From crop to model to crop: identifying the genetic basis of the stay green mutation in the *Lolium/Festuca* forage and amenity grasses. *New Phytol*, 172 (4): 592~597

Barry CS, McQuinn RP, Chung MY, Besuden A, Giovannoni JJ (2008).

Amino acid substitutions in homologs of the STAY-GREEN protein are responsible for the *green-flesh* and *chlorophyll retainer* mutations of tomato and pepper. *Plant Physiol*, 147 (1): 179~187

Chen YX, Qiu K, Kuai BK, Ding YL (2011). Identification of an NAP-like transcription factor BeNAC1 regulating leaf senescence in bamboo (*Bambusa emeiensis* 'Viridiflavus'). *Physiol Plant*, 142 (4): 361~371

Hörtensteiner S (2009). Stay-green regulates chlorophyll and chlorophyll-binding protein degradation during senescence. *Trends Plant Sci*, 14 (3): 155~162

Jiang HW, Li MR, Liang NT, Yan HB, Wei YB, Xu XL, Liu J, Xu ZF, Chen F, Wu GJ (2007). Molecular cloning and function analysis of the *stay green* gene in rice. *Plant J*, 52 (2): 197~209

Lim PO, Woo HR, Nam HG (2003). Molecular genetics of leaf senescence in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci*, 8 (6): 272~278

Park SY, Yu JW, Park JS, Li J, Yoo SC, Lee NY, Lee SK, Jeong SW, Seo HS, Koh HG et al (2007). The senescence-induced stay green protein regulates chlorophyll degradation. *Plant Cell*, 19 (5): 1649~1664

Peng ZH, Lu TT, Li LB, Liu XH, Gao ZM, Hu T, Yang XW, Feng Q, Guan JP, Weng QJ et al (2010). Genome-wide characterization of the biggest grass, bamboo, based on 10 608 putative full-length cDNA sequences. *BMC Plant Biol*, 10: 116

Ren G, An K, Liao Y, Zhou X, Cao YJ, Zhao HF, Ge XC, Kuai BK (2007). Identification of a novel chloroplast protein *AtNYE1* regulating chlorophyll degradation during leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 44 (3): 1429~1441

Reyes-Arribas T, Barrett JE, Huber DJ, Nell TA, Clark DG (2001). Leaf senescence in a non-yellowing cultivar of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora*). *Physiol Plant*, 111 (4): 540~544