

## 过表达*OsATG8a*基因提高转基因拟南芥对低氮的耐受性和产量

李鑫, 甄晓溪, 于金磊, 徐凡\*

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:** 自噬(autophagy)是真核生物一种保守的物质降解途径, 通过物质的降解和循环实现其再利用。我们鉴定到了水稻(*Oryza sativa*)自噬核心基因*OsATG8a*并获得2个独立的过表达*OsATG8a*转基因拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)纯合株系。研究发现过表达*OsATG8a*增加了叶片细胞中自噬体的数量和活性, 且35S-*OsATG8a*转基因拟南芥相对于野生型拟南芥(WT)有更好的表型, 如氮代谢相关基因表达量增加, 正常生长条件下莲座叶增大、产量增多, 缺氮条件下转基因株系相对于WT具有更强的抵抗作用。因此, 我们认为*OsATG8a*是一个可以提高产量的优质候选基因。

**关键词:** 自噬; 氮胁迫; 产量; *OsATG8a*

自噬(autophagy)是真核生物细胞应对外界胁迫刺激的一种大分子降解机制, 将细胞质内的一些不再需要的、受损伤的蛋白质和细胞器等运送至液泡进行降解, 并对降解物质加以循环再利用。自噬在正常情况下以基础水平表达, 维持细胞稳态(Yoshimoto等2010)。1993年首先在酵母中发现了第一个自噬基因*APG1/ATG1* (Tsukada和Ohsumi 1993), 陆续通过对自噬相关突变体的研究发现和确定了一系列自噬相关蛋白(autophagy-related protein, ATG), 它们分别参与自噬的启动, 自噬体的成核、膜延展、成熟及与液泡膜的融合过程(Li和Vierstra 2012; Feng等2014)。自噬是在进化上相对保守的过程, 目前在大多数高等植物中都发现了ATG基因, 如在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻(*Oryza sativa*)、玉米(*Zea mays*)和烟草(*Nicotiana tabacum*)中发现了超过30个ATG基因, 在番茄(*Solanum lycopersicum*)和辣椒(*Capsicum annuum*)中也鉴定出近30个ATG基因(杨小龙等2017)。自噬不仅参与植物细胞生长发育的调节, 还在植物免疫、响应非生物胁迫(如高温、氧化、干旱和离子胁迫)过程中发挥作用, 同时对于衰老细胞内营养(尤其是碳、氮)的再利用具有不可低估的作用(Li和Vierstra 2012), 还参与植物籽粒氮素利用效率(nitrogen use efficiency, NUE)和氮素再利用效率(nitrogen remobilization efficiency, NRE)的调节过程, 如在拟南芥中自噬对氮素再利用的贡献大约为50% (Guiboileau等2012); 而拟南芥其他自噬突

变体(*atg*突变体, *atg18a RNAi*、*atg5*和*atg9*)还表现出对营养胁迫更敏感及产量下降的表型, 在低氮和足氮条件下这些突变体将氮再分配到种子中的能力也要低于对照组(Hanaoka等2002; Thompson等2005); 拟南芥*atg7*、*atg10*突变体和*atg13a atg13b*双突变体对缺氮的耐受力均明显低于野生型(wild-type, WT) (Phillips等2008; Suttangkakul等2011)。水稻自噬缺失突变体*osatg7-1*出现叶片早衰表型, 衰老叶片中的氮素重新再利用受到影响而使其保持较高的氮含量(Izumi等2015)。

在众多的自噬过程相关蛋白中, ATG8蛋白参与降解底物的捕获与自噬小体的形成, 在细胞水平的丰度可以决定自噬小体的大小, 是自噬过程核心组分之一(Masclaux-Daubresse等2017)。ATG8基因表达量的改变可以影响植物对低氮的响应能力, 如在拟南芥中分别异位过表达大豆(*Glycine max*)、谷子(*Setaria italica*)和苹果(*Malus pumila*)的ATG8基因, 都能够有效提高转基因拟南芥对低氮的耐受力, 使转基因拟南芥提前进入生殖生长, 种子产量也大幅度提高(Xia等2012; Li等2015; Wang等2016); 在拟南芥中过表达*AtATG8f*也观察到了促进莲座叶生长、对低氮和低碳耐受性增加的表型(Slávíková等2005)。Izumi等(2015)将荧光蛋白(fluorescent protein, FP)分别与*OsATG8a*和

收稿 2018-09-09 修定 2018-12-20

资助 十三五国家重点研发计划(2018YFD0200200)。

\* 通讯作者(celiqianfan@163.com)。

*OsATG8d*融合,建立了FPs-*OsATG8*水稻自噬监测系统,并用该系统观测到能量缺乏诱导水稻叶绿体自噬的发生,使叶绿体蛋白得到循环再利用,表明*OsATG8s*在作物自噬研究中具有至关重要的作用。

我们前期筛选到并克隆了一个水稻的*ATG8*基因——*OsATG8a* (LOC\_Os07g32800; Os07g-0512200),该基因位于第7号染色体上,全长2 769 bp,含有5个外显子,蛋白质编码区(coding sequence, CDS)全长360 bp,编码一个由119个氨基酸组成的蛋白产物,*OsATG8a*基因的表达量响应低氮胁迫诱导。我们克隆了*OsATG8a*基因ATG上游1 452 bp的启动子序列,并使用PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)对该启动子序列进行顺式作用元件分析,结果显示这段序列除了包含启动子区普遍存在的顺式调控元件CAAT-box和核心元件TATA-box外,还存在光响应元件Box 4、GATA-motif、I-box,生长发育相关元件Sknl\_1\_motif,赤霉素(gibberellic acid, GA)应答元件P-box,水杨酸(salicylic acid, SA)应答元件W box等。

在本研究中,我们首先获得了过表达*OsATG8a*基因的转基因拟南芥。与拟南芥对照组(WT)相比转基因拟南芥具有明显的生长优势,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;另外,在拟南芥中过表达*OsATG8a*基因还可以有效缓解氮胁迫造成的生长抑制,显著增加自噬体活性和自噬体数量。一些氮素代谢相关基因的表达量在过表达*OsATG8a*的转基因拟南芥中也具有上升趋势。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及培养条件

拟南芥[*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.]生态型为Columbia (Col-0),培养条件为:16 h光照/8 h黑暗,温度(22±1)°C,光照强度约140 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>。

实验所用水稻(*Oryza sativa* L.)品种为‘沈农9816’,培养条件为:14 h光照/10 h黑暗,昼/夜温度28°C/25°C,光照强度约360 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>。

### 1.2 植物表达载体构建及拟南芥遗传转化

*35S-OsATG8a*双源表达载体的构建及相应转基因拟南芥的获得:提取水稻‘沈农9816’RNA,通过

反转录获得水稻cDNA,具体方法参照Xu等(2011)。以此为模板,通过PCR扩增*OsATG8a*基因的CDS (360 bp),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双酶切插入到双源表达载体pCambia1301,获得*35S-OsATG8a*双源表达载体。利用根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens* Smith & Townsend)GV3101介导的花苞浸泡法(Clough和Bent 1998)转化WT。将*35S-OsATG8a*转基因拟南芥T<sub>0</sub>代种子在含有35 mg·L<sup>-1</sup>潮霉素的筛选培养基中筛选阳性植株,经过3代培养获得纯合株系。

*Pro<sub>OsATG8a</sub>-GUS*双源表达载体的构建及相应转基因拟南芥的获得:以‘沈农9816’的基因组DNA为模板,扩增*OsATG8a*基因启动子序列(1 452 bp),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,获得*Pro<sub>OsATG8a</sub>-GUS*双源表达载体。利用农杆菌GV3101介导的花苞浸泡法转化WT。通过β-葡萄糖醛酸酶(β-glucuronidase, GUS)组织化学染色鉴定选取的启动子区域具有活性的*Pro<sub>OsATG8a</sub>-GUS*转基因拟南芥。

以上所有构建DNA均测序正确,引物信息如表1所示。

### 1.3 表型观察分析

无菌条件下用有效成分为体积分数1%的次氯酸钠溶液将纯合的*35S-OsATG8a*转基因拟南芥种子和WT种子浸泡5 min,进行表面消毒,于4°C条件下春化2 d后,将种子在无菌条件下均匀平铺在1/2MS培养基上,铺种后第8天选取长势均匀一致幼苗移至土(营养土与蛭石按体积比3:1混和)中,进行持续的表型观察并使用相机(Nikon D3200)对相应时间点的表型进行记录。每3 d对最大莲座叶半径和叶片数进行一次记录,Stage 5.1开始统计抽薹时间,Stage 6.0开始统计开花时间,Stage 6.9 (Boyes等2001)统计总果荚数,Stage 9.7统计单株产量及千粒重。

### 1.4 叶绿素含量及可溶性蛋白含量的测定

参照Arnon (1949)法测定总叶绿素含量;参照Bradford (1976)法测定可溶性蛋白含量。

### 1.5 缺氮胁迫

按照上述消毒铺种方法获得正常生长的*35S-*

表1 引物信息

Table 1 The information of primers

名称	序列(5'→3')	用途
cOsATG8a-F	CCATGGATGGCCAGGACTTCCTTCAAGCT	基因克隆
cOsATG8a-R	GGTGACCTTACGAGAGCCGAATGTGTTCTC	基因克隆
cpOsATG8a-F	GAATTCCTCCAAACAATTCCTTATCTAAAAGAA	基因克隆
cpOsATG8a-R	CCATGGCTCCAACCTGCGAATCAAATCAT	基因克隆
rtOsATG8a-F	ACTGGAAAGGAGGCAAGCAG	实时荧光定量PCR
rtOsATG8a-R	CCTTCTCAACGATCACCGGA	实时荧光定量PCR
rtAtAMT1.1-F	GCCTCTGCTGACTACTCCAACCT	实时荧光定量PCR
rtAtAMT1.1-R	GACCAGAACCAGTGAGAGACGA	实时荧光定量PCR
rtAtNRT1.1-F	GCACATTGGCATTAGGCTTT	实时荧光定量PCR
rtAtNRT1.1-R	CTCAATCCCCACCTCAGCTA	实时荧光定量PCR
rtAtGDH1-F	GCTTTAGCAGCAACAAACAGAA	实时荧光定量PCR
rtAtGDH1-R	TGAGCCAATGCGTTCACCTC	实时荧光定量PCR
rtTIP41-F	GTATGAAGATGAACTGGCTGACAAT	实时荧光定量PCR
rtTIP41-R	ATCAACTCTCAGCCAAAATCGCAAG	实时荧光定量PCR
rtACTIN-F	GAAGATCACTGCCTTGCTCC	实时荧光定量PCR
rtACTIN-R	CGATAACAGCTCCTCTTGCC	实时荧光定量PCR

*OsATG8a*转基因拟南芥和WT无菌幼苗, 铺种后第8天选取长势均匀一致的幼苗移至1/2MS (NS)培养基和不含氮素的1/2MS (ND)培养基中, NS培养基中的氮源为 $\text{KNO}_3$ 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , ND培养基中缺少的 $\text{K}^+$ 用KCl补足。在上述拟南芥培养条件下培养相应的植物材料, 移苗10 d后进行表型记录和数据测定。使用扫描仪(EPSON Perfection v33, 下同)进行表型记录。

### 1.6 氮代谢相关基因表达量的鉴定

对35S-*OsATG8a*转基因拟南芥和WT植株进行总RNA的提取、cDNA的合成, 最后通过实时荧光定量PCR对氮代谢相关基因的表达量进行检测, 具体方法参照Xu等(2011)。实时荧光定量PCR所用的基因特异性引物和内参引物参见表1。

### 1.7 *OsATG8a*基因时空表达模式的分析

分别对*Pro<sub>OsATG8a</sub>-GUS*转基因拟南芥萌发的种子、1周和2周的幼苗、4周的成熟莲座叶、早期花序、成熟花序和果荚进行GUS染色, GUS组织化学染色分析参照Xu等(2011), 萌发的种子使用显微镜进行记录, 其余使用扫描仪进行表型记录。

### 1.8 外源植物激素/缺氮胁迫处理

选取长势均匀一致的无菌条件下正常生长的10 d苗龄的*Pro<sub>OsATG8a</sub>-GUS*转基因拟南芥, 分别移至

不含氮素的ND培养液和含 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 水杨酸(salicylic acid, SA; 购自Sigma-Aldrich公司)的NS培养液中, 以不加激素的NS培养液为对照, 处理12 h之后进行GUS染色, 使用扫描仪进行表型记录。

挑选籽粒饱满且大小均匀一致的水稻种子, 表面消毒后放到 $28^\circ\text{C}$ 培养箱中培养2 d进行催芽, 之后选取发芽程度一致的种子移至1/2Hoagland营养液中, 按上述水稻培养条件在培养箱中培养14 d, 选取长势一致的水稻幼苗分别用全氮(NS)、低氮(NL)和缺氮(ND)的1/2Hoagland营养液处理, 分别在处理1和3 d后取水稻的根和叶提取RNA, 检测*OsATG8a*基因的相对表达水平。全氮1/2Hoagland营养液中氮的浓度为 $3 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 通过改变 $\text{KNO}_3$ 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的用量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, 用KCl来补足缺少的 $\text{K}^+$ 。

取水稻成熟叶片, 分别放置在装有被蒸馏水浸湿的滤纸和被溶有 $0.2 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  SA的蒸馏水浸湿的滤纸的培养皿中(吴冰等2015), 按上述水稻培养条件在培养箱中处理24 h, 取样检测*OsATG8a*基因的相对表达水平。

实时荧光定量PCR所用的基因特异性引物和内参引物参见表1。



### 1.9 自噬体的观察

按照上述方法获得苗龄8 d的35S-*OsATG8a*转基因拟南芥和WT无菌幼苗, 选取长势均匀一致的幼苗分别移至NS培养液和ND培养液中, 并且各培养液中均含有1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 刀豆素(concanavalin A, ConA), 按上述拟南芥培养方法培养12 h后用单丹黄酰尸胺(monodansylcadaverine, MDC) 37°C避光染色10 min, 再用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)清洗3次, 在激光共聚焦显微镜(Zeiss LSM 710)下观察叶片中的自噬体荧光信号。

## 2 实验结果

### 2.1 *Pro<sub>OsATG8a</sub>-GUS*转基因拟南芥时空表达模式分析

为了研究*OsATG8a*基因的时空表达模式, 我们获得了*Pro<sub>OsATG8a</sub>-GUS*转基因拟南芥, 并通过GUS组织化学染色进行了*OsATG8a*基因的时空表达模式分析。发现在种子萌发时的胚根, 苗龄1周幼苗的子叶、下胚轴和根, 苗龄2周幼苗的子叶、真叶、下胚轴和根以及苗龄4周成熟苗的莲座叶和根, 成熟花絮的萼片和种荚中都能检测到*Pro<sub>OsATG8a</sub>-GUS*的活性(图1)。

在前期研究中, 我们对水稻植株进行了不同氮含量处理和0.2  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  SA外源处理。氮胁迫实验中, 随着氮含量的降低, *OsATG8a*基因的表达水平不断升高, 各处理间差异为极显著(图2-D和E); SA实验中, SA极显著地诱导了*OsATG8a*基因的表达(图2-F)。在拟南芥的实验中, 我们对苗龄10 d的*Pro<sub>OsATG8a</sub>-GUS*转基因拟南芥进行缺氮处理(ND处理), 12 h后染色, 发现*OsATG8a*的启动子活性显著上升(图2-B)。另外, 我们使用10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  SA对*Pro<sub>OsATG8a</sub>-GUS*转基因拟南芥进行外源处理, 结果表明*OsATG8a*的启动子活性上升明显(图2-C)。

### 2.2 过表达*OsATG8a*基因促进转基因拟南芥的生长发育并增加产量

为进一步分析*OsATG8a*基因的功能, 我们构建了35S-*OsATG8a*双元表达载体, 并获得了多个独立的转基因拟南芥株系, 我们选取了2个纯合株系line 10 (L-10)和line 12 (L-12)作为代表株系进行持续的表型观察。首先, 利用实时荧光定量PCR检测了L-10和L-12中*OsATG8a*基因的过表达情况, 如图3-C所示可以确定*OsATG8a*基因在L-10和L-12中过量表达。其次, 与对照组(WT)相比, 我们发现

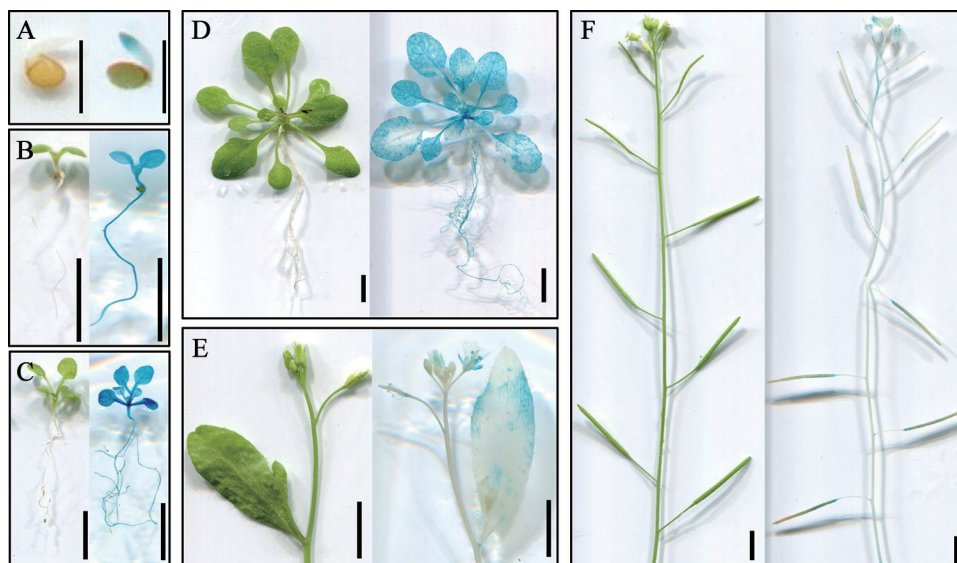
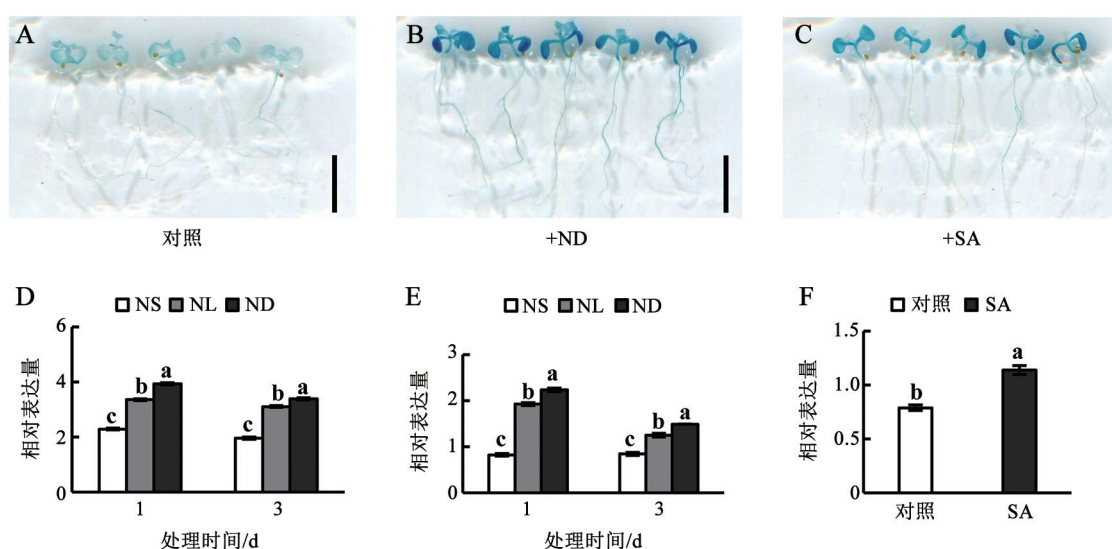


图1 *Pro<sub>OsATG8a</sub>-GUS*转基因拟南芥不同发育时期GUS组织化学染色

Fig. 1 GUS histochemical staining of *Pro<sub>OsATG8a</sub>-GUS* transgenic *A. thaliana* at different developmental stages

A: 萌发中的种子; B: 苗龄1周的幼苗; C: 苗龄2周的幼苗; D: 苗龄4周成熟苗莲座叶; E: 早期的花序; F: 成熟晚期的花序和果荚。各图中左为染色前, 右为染色后。A、B中比例尺为1 mm, C~F中比例尺为5 mm。

图2 缺氮处理或SA处理条件下*OsATG8a*的启动子活性Fig.2 Promoter activity of *OsATG8a* under the condition of nitrogen deficiency or SA

A: NS处理作为对照; B: ND处理; C: 含 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  SA处理; D: 不同氮素水平下水稻根系中*OsATG8a*的相对表达量; E: 不同氮素水平下水稻叶片中*OsATG8a*的相对表达量; F: 水稻叶片中*OsATG8a*对SA的响应。图中比例尺为5 mm。

35S-*OsATG8a*转基因拟南芥的莲座叶显著大于WT (图3-B), 且过表达*OsATG8a*加快了转基因拟南芥的发育进程, 使其抽薹时间提前3 d左右, 开花提前4 d左右(表2)。同时, 我们还对转基因拟南芥和WT中的叶绿素含量及蛋白质含量进行了检测, 发现与WT相比, 过表达*OsATG8a*基因可以显著提高转基因拟南芥中的叶绿素和可溶性蛋白含量(图3-D和E)。最后, 我们通过统计发现35S-*OsATG8a*转基因拟南芥的总果荚数、千粒重和单株总种子质量显著增加(表3)。综合上述结果, 在拟南芥中过表达*OsATG8a*基因能够促进转基因拟南芥的生长发育并增加其产量。

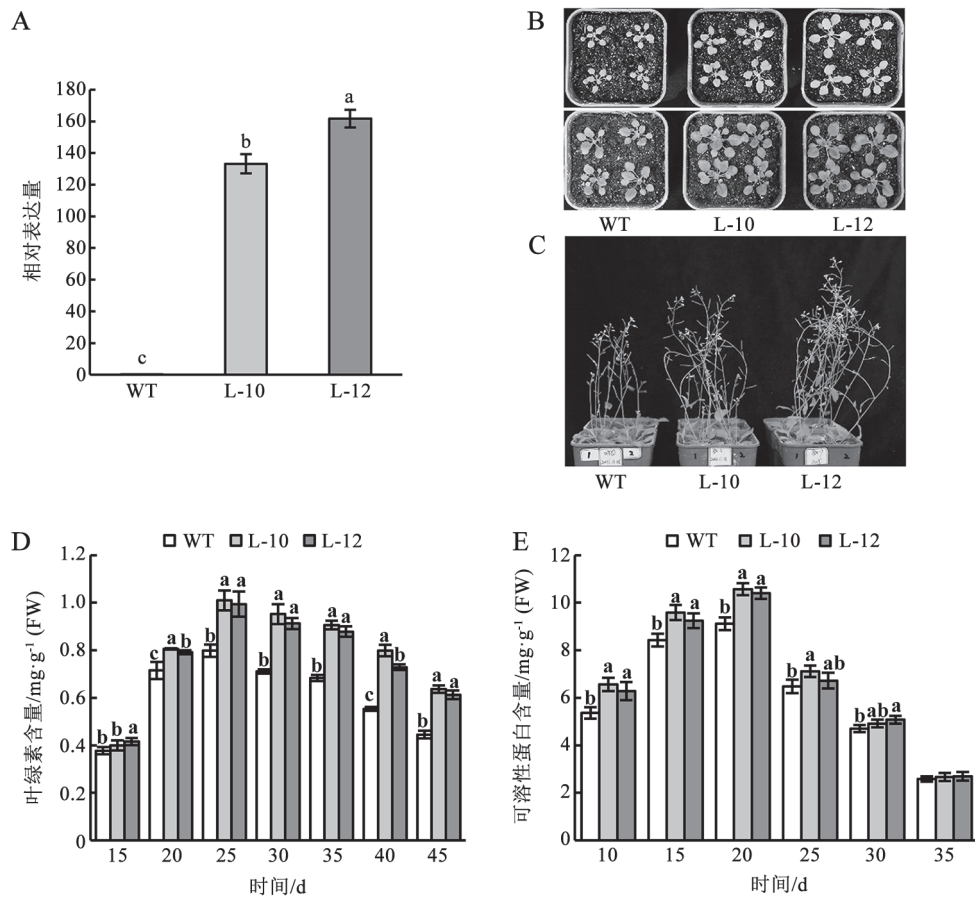
### 2.3 过表达*OsATG8a*基因显著增强转基因拟南芥叶片中的自噬体活性

为了检测35S-*OsATG8a*转基因拟南芥叶片中的自噬体活性, 我们对苗龄8 d的拟南芥进行正常(NS)处理和缺氮(ND)处理, 经过MDC染色, 通过激光共聚焦显微镜进行观察。为了便于自噬体的观察, 我们添加了 $\text{H}^+$ -ATPase抑制剂ConA, 结果发现不管是在正常条件还是缺氮条件下, 35S-*OsATG8a*转基因拟南芥叶肉细胞中的自噬体荧光信号数目

均多于WT, 且信号强度较大, 缺氮处理下这一现象更加明显(图4), 我们认为过表达*OsATG8a*能够显著增加转基因拟南芥中自噬体的数量和自噬活性, 有效促进转基因拟南芥抵抗缺氮胁迫。

### 2.4 过表达*OsATG8a*基因可以促进转基因拟南芥对缺氮胁迫的耐受性

为了研究*OsATG8a*基因对缺氮的响应情况, 我们将苗龄8 d正常生长发育的35S-*OsATG8a*转基因拟南芥和WT同时进行全氮(NS, 1/2MS培养基)和缺氮(ND, 缺少氮素培养基, 其他成分相同)处理10 d, 发现无论是在全氮还是缺氮条件下, 35S-*OsATG8a*转基因拟南芥的生长情况都优于WT, 其地上部莲座叶和生物量也显著大于WT (图5-A和B); 我们还测定了全氮/缺氮条件下35S-*OsATG8a*转基因拟南芥和WT处理前后的鲜重、叶绿素含量及可溶性蛋白含量的变化量, 正常条件下转基因株系鲜重、叶绿素含量和可溶性蛋白含量的增加量极显著高于WT; 在缺氮条件下, 转基因株系鲜重增加量极显著高于WT, 叶绿素含量减少量略低于WT, 其中L-12的减少量极显著低于WT, 可溶性蛋白含量的减少量低于WT, 未达到显著水平(图5-B~D)。

图3 过表达*OsATG8a*转基因拟南芥的生长发育状况Fig.3 Overexpression of *OsATG8a* promotes growth of transgenic *A. thaliana*

A: 14 d苗龄的WT和35S-*OsATG8a*转基因拟南芥中*OsATG8a*基因的表达水平; B: 上和下分别为21 d和28 d苗龄的表型; C: 48 d苗龄的表型; D: 不同时期WT和35S-*OsATG8a*转基因拟南芥总叶绿素含量; E: 不同时期WT和35S-*OsATG8a*转基因拟南芥可溶性蛋白含量。

表2 WT和35S-*OsATG8a*转基因拟南芥抽薹、开花时间Table 2 Bolting and flowering time of WT and 35S-*OsATG8a* transgenic *A. thaliana*

	WT	L-10	L-12
抽薹时间/d	32.65±1.14 <sup>b</sup>	29.48±1.41 <sup>a</sup>	29.32±1.30 <sup>a</sup>
开花时间/d	37.82±1.25 <sup>b</sup>	33.35±1.34 <sup>a</sup>	33.15±1.48 <sup>a</sup>

同一指标数据用不同小写字母标识表示差异显著( $P < 0.05$ ), 下同。

表3 WT和35S-*OsATG8a*转基因拟南芥的产量性状Table 3 Yield traits of WT and 35S-*OsATG8a* transgenic *A. thaliana*

	WT	L-10	L-12
总果荚数	50.31±4.90 <sup>b</sup>	62.69±4.99 <sup>a</sup>	65.38±4.47 <sup>a</sup>
单株总种子质量/mg	97.90±4.41 <sup>b</sup>	131.00±5.48 <sup>a</sup>	126.38±5.35 <sup>a</sup>
千粒重/mg	14.99±0.13 <sup>b</sup>	16.79±0.25 <sup>a</sup>	16.70±0.35 <sup>a</sup>

## 2.5 过表达*OsATG8a*基因的转基因拟南芥中氮素代谢关键基因表达情况

为了进一步探究过表达*OsATG8a*基因对植物体内氮素代谢相关基因表达的影响, 我们检测了一部分标志基因的表达水平。在全氮(NS)条件下, 转基因拟南芥中铵转运蛋白基因*AtAMT1.1*表达量略高于WT, 但未达到显著水平; 硝酸盐转运蛋白基因*AtNRT1.1*和谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase, GDH)合成基因*AtGDH1*的表达量高于WT, 且达到显著或极显著水平。在缺氮(ND)条件下, 氮代谢相关基因*AtAMT1.1*、*AtNRT1.1*和*AtGDH1*在转基因拟南芥中的表达水平均高于WT, 且差异明显, 除了*AtNRT1.1*的差异为显著外其余差异均达到极显著水平(图6)。从上述结果我们可以看出,



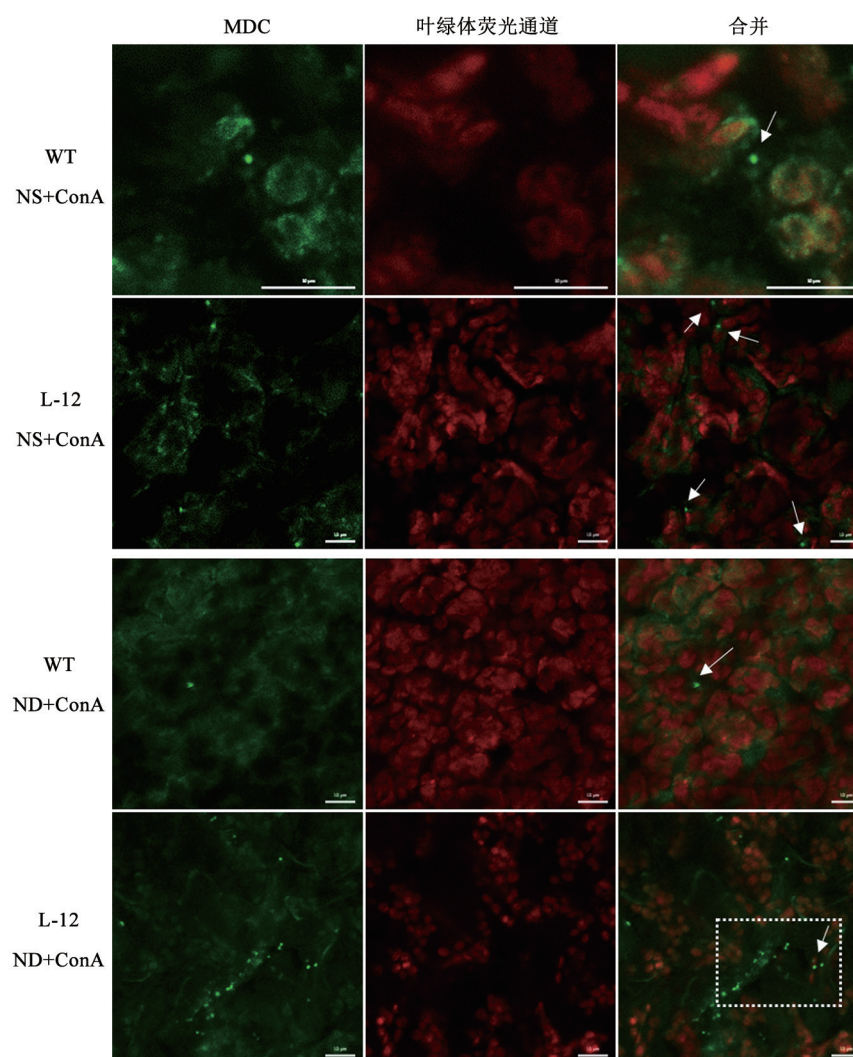


图4 正常和缺氮条件下过表达*OsATG8a*转基因拟南芥中的自噬活性增加

Fig.4 Overexpression of *OsATG8a* in *A. thaliana* enhanced the autophagic activity under normal and nitrogen-deficiency conditions  
MDC: MDC标记的自噬体荧光信号; ConA:  $H^+$ -ATPase抑制剂, 提高自噬体荧光信号的观察效果。图中比例尺为10  $\mu m$ 。

无论在全氮还是缺氮条件下, 过表达*OsATG8a*均对转基因拟南芥中这三个基因的表达有促进作用。

### 3 讨论

氮素是植物生长发育的必需元素之一, 植物对于氮素的利用主要包括氮素的吸收、转运、同化和再利用。氮素的再利用过程对于产量形成具有重要意义, 例如在谷类作物中, 籽粒产量不仅取决于植株对氮素的吸收, 还取决于种子成熟期间氮素的动员再利用, 种子中50%~90%的氮素来源于这种转移再利用过程(Kichey等2007; Xu等2012)。

叶片衰老过程中蛋白质(尤其是叶绿体蛋白)被迅速降解输出大量的可再利用的氮, 其释放的游离氨基酸和其他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等2008)。现阶段研究认为自噬过程参与衰老叶片中蛋白质降解的途径。

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)。研究发现碳、氮等营养物质缺乏可以诱导植物发生自噬过程, *ATG*基因表达量上调(Thompson

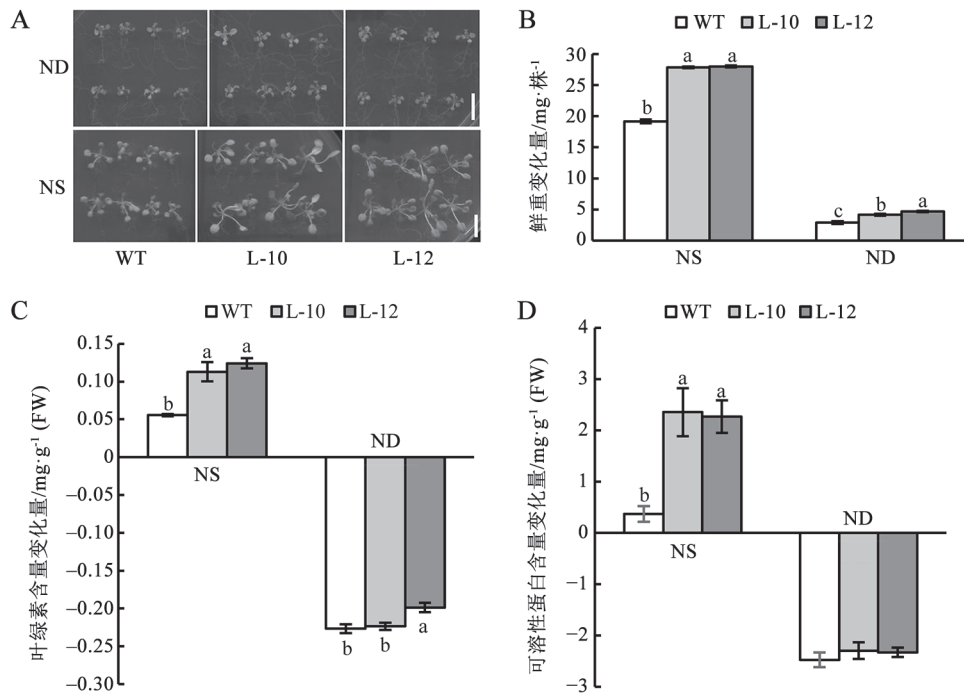


图5 过表达*OsATG8a*能够促进转基因拟南芥抵抗缺氮胁迫

Fig. 5 Overexpression of *OsATG8a* enhances tolerance to nitrogen deficiency in transgenic *A. thaliana*

A~D均为NS和ND条件下处理10 d后的WT和35S-*OsATG8a*转基因拟南芥表型。A: 莲座叶大小; B: 处理前后每株植株鲜重变化量; C: 处理前后总叶绿素含量变化量; D: 处理前后可溶性蛋白含量变化量。图中比例尺为5 mm。

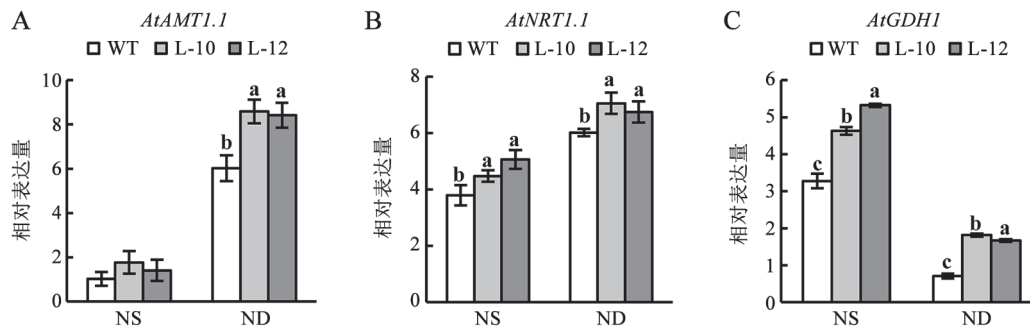


图6 过表达*OsATG8a*转基因拟南芥中氮代谢相关基因表达变化

Fig. 6 Overexpression of *OsATG8a* in *A. thaliana* changes the expression of genes in nitrogen metabolism

WT和35S-*OsATG8a*转基因拟南芥在全氮(NS)和缺氮(ND)条件下铵转运蛋白基因*AtAMT1.1* (A)、硝酸盐转运蛋白基因*AtNRT1.1* (B)、GDH合成基因*AtAGDH1* (C)表达情况。

2005)。自噬相关突变体在营养饥饿时表现出明显的生长发育抑制、衰老加速和存活率下降等表型 (Guiboileau等2012; Wada等2015; Li等2015)。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,产生的营养物质及废物堆积会促进细胞早衰死亡,同时影响其他途径的氨基酸产生,对植

物产生生长抑制,进一步降低氮素利用效率(任晨霞和龚清秋2014)。在前期研究中我们发现*OsATG8a*基因明显响应缺氮胁迫,在缺氮培养条件下其表达水平显著上升(图2-D和E);另外,在*Pro<sub>OsATG8a</sub>-GUS*转基因拟南芥中,我们也可以检测到*OsATG8a*基因的启动子响应低氮胁迫,其活性在低氮处理



下显著增强(图2-B), 这与我们前期的研究相呼应。对于其他物种的*ATG8*基因目前已有报道, 发现过表达这些基因都可以显著促进转基因植物的生长, 如过表达大豆*GmATG8c*基因可以提高大豆对氮胁迫的耐受性并使其产量增加(徐伟等2017), 在拟南芥中过表达苹果*MdATG8i*, 在拟南芥和水稻分别中分别过表达谷子*SiATG8a*基因能够促进转基因拟南芥和水稻抵抗氮饥饿(Li等2016)。

在本研究中, 我们同样验证了*OsATG8a*对转基因植物生长发育过程中的作用。与对照组(WT)相比, 过表达*OsATG8a*基因可以促进转基因拟南芥的营养生长, 莲座叶大小、株高(图3-B和C)、鲜重(图5-B)显著增加, 表现出极强的生长优势, 这与前人研究结果一致, 说明过表达不同物种的*ATG*基因都可以显著促进植物的生长发育。通过生理学分析发现过表达*OsATG8a*基因可以提高莲座叶中的叶绿素含量和可溶性蛋白含量(图3-D和E), 反映出35S-*OsATG8a*转基因拟南芥“源”器官中氮素含量较高, 为生殖生长提供了充足的养分, 在养分充足的时候可以积累更多的氮素, 而在养分缺乏条件下更好地利用前期积累的氮素。同时转基因拟南芥抽薹和开花时间提前, 加速了发育进程, 延长了转基因拟南芥的生殖生长期, 为产量提高打下了时间和养分基础。

MDC是一种广泛使用的嗜酸性染料, 它可以作为识别自噬体的探针来检测自噬结构(Contento等2005); ConA可以通过增加液泡腔的内部pH, 使细胞中的水解酶处于最适环境来促进自噬体的观察(Yoshimoto等2004)。在缺氮条件下, 我们发现过表达*OsATG8a*基因能够显著增加转基因拟南芥叶片中的自噬体活性(图4), 说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; 同时在缺氮处理12 h的*Pro<sub>OsATG8a</sub>-GUS*转基因拟南芥中GUS活性增强(图2-B), 进一步证明氮胁迫能够诱导*OsATG8a*表达, 导致转基因拟南芥体内自噬作用增强, 从而增加了转基因拟南芥对氮胁迫的耐受性。在拟南芥自噬缺失突变体*atg5*中可以观察到早衰表型, 研究者认为这种表型是由于SA的过量积累造成的, 如果在*atg5*突变体中降低水杨酸的含量则可以有效缓解早衰表型(Yoshimoto等

2009)。研究中我们也发现了*OsATG8a*启动子可以响应外源SA处理, 启动子活性显著增强(图2-C和F); 另外在*Pro<sub>OsATG8a</sub>-GUS*转基因拟南芥的衰老叶片中发现启动子活性增强(图1-D), 表明*OsATG8a*基因可能通过SA依赖途径参与叶片衰老过程中的大分子物质降解。

铵盐转运因子(AtAMTs)、硝酸盐转运因子(AtNRT)和GDH是植物体内三个氮代谢相关的转运因子及酶, 其中AtAMTs负责转运根系吸收的铵态氮(Rentsch等2007), AtNRT负责转运根系吸收的硝态氮(Good等2004), GDH的某些亚型与氮素的再利用有关(Masclaux-Daubresse等2010)。在拟南芥实验中我们对它们的编码基因进行了表达量检测, 发现不管是全氮还是缺氮条件下, 35S-*OsATG8a*转基因拟南芥中与吸收相关的*AtAMT1.1*和*AtNRT1.1*(图6-A和B)及与再利用相关的*AtGDH1*(图6-C)表达量均高于WT。我们可以推测过表达*OsATG8a*对氮素的吸收和再利用有促进作用。

综上所述, *OsATG8a*基因在促进植物生长发育、提高氮素吸收和再利用效率并增加产量方面有很大潜力。另外, 我们对于自噬在植物生长发育和氮素利用方面的研究, 可为通过自噬来提高作物产量和减少氮肥施用量提供进一步的证据。

### 参考文献(References)

- Arnon DI (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol*, 24 (1): 1–15
- Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, et al (2001). Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell*, 13 (7): 1499–1510
- 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 (S1–2): 248–254
- Clough SJ, Bent AF (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 16 (6): 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 (4): 598–608
- Feng Y, He D, Yao Z, et al (2014). The machinery of macroautophagy. *Cell Res*, 24 (1): 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 (12): 597–605
- Guiboileau A, Yoshimoto K, Soulay F, et al (2012). Autophagy machinery controls nitrogen remobilization at the whole-plant level under both limiting and ample nitrate conditions in *Arabidopsis*. *New Phytol*, 194 (3): 732–740
- Hanaoka H, Noda T, Shirano Y, et al (2002). Leaf senescence and starvation-induced chlorosis are accelerated by the disruption of an *Arabidopsis* autophagy gene. *Plant Physiol*, 129 (3): 1181–1193
- Huang X, Li F (2016). Roles of autophagy in plant programmed cell death. *Chin Bull Bot*, 51 (6): 859–862 (in Chinese with English abstract) [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 (6): 859–862]
- Izumi M, Hidema J, Wada S, et al (2015). Establishment of monitoring methods for autophagy in rice reveals autophagic recycling of chloroplasts and root plastids during energy limitation. *Plant Physiol*, 167 (4): 1307–1320
- Kichey T, Hirel B, Heumez E, et al (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 Crop Res*, 102 (1): 22–32
- Li F, Chung T, Pennington JG, et al (2015). Autophagic recycling plays a central role in maize nitrogen remobilization. *Plant Cell*, 27 (5): 1389–1408
- Li F, Vierstra RD (2012). Autophagy: a multifaceted intracellular system for bulk and selective recycling. *Trends Plant Sci*, 17 (9): 526–537
- Li W, Chen M, Wang E, et al (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 Genom*, 17: 797
- Masclaux-Daubresse C, Chen Q, Havé M (2017). Regulation of nutrient recycling *via* autophagy. *Curr Opin Plant Biol*, 39: 8–17
- Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Dechorgnat J, et al (2010). Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Ann Bot*, 105 (7): 1141–1157
- Masclaux-Daubresse C, Reisdorf-Cren M, Orsel M (2008). Leaf nitrogen remobilization for plant development and grain filling. *Plant Biol*, 10 (S1): 23–36
- Phillips AR, Suttangkakul A, Vierstra RD (2008). The ATG12-conjugating enzyme ATG10 is essential for autophagic vesicle formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 178 (3): 1339–1353
- Ren C, Gong Q (2014). Progress on the involvement of plant autophagy in carbon and nitrogen utilization. *Chin J Cell Biol*, 36 (4): 407–414 (in Chinese with English abstract) [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 (4): 407–414]
- Rentsch D, Schmidt S, Tegeder M (2007). Transporters for uptake and allocation of organic nitrogen compounds in plants. *FEBS Lett*, 581 (12): 2281–2289
- Sláviková S, Shy G, Yao Y, et al (2005). The autophagy-associated *Atg8* gene family operates both under favourable growth conditions and under starvation stresses in *Arabidopsis* plants. *J Exp Bot*, 56 (421): 2839–2849
- Suttangkakul A, Li F, Chung T, et al (2011). The ATG1/ATG13 protein kinase complex is both a regulator and a target of autophagic recycling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 23 (6): 3761–3779
- Thompson AR, Doelling JH, Suttangkakul A, et al (2005). Autophagic nutrient recycling in *Arabidopsis* directed by the ATG8 and ATG12 conjugation pathways. *Plant Physiol*, 138 (4): 2097–2110
- Tsukada M, Ohsumi Y (1993). Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 333 (1–2): 169–174
- Wada S, Hayashida Y, Izumi M, et al (2015). Autophagy supports biomass production and nitrogen use efficiency at the vegetative stage in rice. *Plant Physiol*, 168 (1): 60–73
- Wang P, Sun X, Jia X, et al (2016). Characterization of an autophagy-related gene *MdATG8i* from apple. *Front Plant Sci*, 7: 720
- Wu B, Cang J, Zhang D, et al (2015). Effects of SA treatment on winter wheat (*Triticum aestivum* L.) sucrose metabolism in low temperature. *Plant Physiol J*, 51 (4): 537–545 (in Chinese with English abstract) [吴冰, 苍晶, 张达等 (2015). SA处理对低温胁迫下冬小麦(*Triticum aestivum* L.)蔗糖代谢的影响. *植物生理学报*, 51 (4): 537–545]
- Xia T, Xiao D, Liu D, et al (2012). Heterologous expression of *ATG8c* from soybean confers tolerance to nitrogen deficiency and increases yield in *Arabidopsis*. *PLoS ONE*, 7 (5): e37217
- Xu F, Meng T, Li P, et al (2011). A soybean dual-specificity kinase, GmSARK, and its *Arabidopsis* homolog, AtSARK, regulate leaf senescence through synergistic actions of auxin and ethylene. *Plant Physiol*, 157 (4): 2131–2153
- Xu G, Fan X, Miller AJ (2012). Plant nitrogen assimilation and use efficiency. *Ann Rev Plant Biol*, 63 (1): 153–182
- Xu W, Liu S, You X, et al (2017). Overexpression of *GmATG8c* gene enhances tolerance to low nitrogen and increases yield in soybean. *Plant Physiol J*, 53 (2): 241–247 (in Chinese with English abstract) [徐伟, 刘生, 游翔等

- (2017). 过表达*GmATG8c*基因提高大豆的低氮耐受性和产量. 植物生理学报, 53 (2): 241–247]
- Yang X, Li Y, Liu Y, et al (2017). Review of selective autophagy in plant cell. Acta Horti Sin, 44 (10): 2015–2028 (in Chinese with English abstract) [杨小龙, 李漾漾, 刘玉凤等(2017). 植物细胞选择性自噬研究进展. 园艺学报, 44 (10): 2015–2028]
- Yoshimoto K, Hanaoka H, Sato S, et al (2004). Processing of ATG8s, ubiquitin-like proteins, and their deconjugation by ATG4s are essential for plant autophagy. Plant Cell, 16 (11): 2967–2983
- Yoshimoto K, Jikumaru Y, Kamiya Y, et al (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 (9): 2914–2927
- Yoshimoto K, Takano Y, Sakai Y (2010). Autophagy in plants and phytopathogens. FEBS Lett, 584 (7): 1350–1358

## Overexpression of *OsATG8a* gene confers tolerance to nitrogen starvation and increases yield in transgenic *Arabidopsis thaliana*

LI Xin, ZHEN Xiao-Xi, YU Jin-Lei, XU Fan\*

Rice Research Institute, Shenyang Agricultural University; Key Laboratory of Northeast Rice Biology and Breeding, Ministry of Agriculture; Key Laboratory of Northern Super Rice Breeding, Ministry of Education, Shenyang 110866, China

**Abstract:** Autophagy is a conserved degradation pathway of substance in eukaryotes, which degrades and recycles cellular components to reuse of substances. We identified an autophagy core gene *OsATG8a* in rice (*Oryza sativa*) and obtained two independent 35S-*OsATG8a* transgenic *Arabidopsis thaliana* homozygous lines. We found that overexpression of *OsATG8a* does increase the amount and activity of autophagy in leaf cells, especially under nitrogen-deficiency conditions. 35S-*OsATG8a* transgenic *A. thaliana* had a better phenotype than the wild type (WT), in which the rosette leaves were larger and the yield was higher under normal growth conditions. In addition, the transgenic *A. thaliana* showed stronger resistance to nitrogen starvation and the expression levels of genes related to nitrogen metabolism were higher than those of WT under both nitrogen-sufficient and -deficient conditions. Therefore, we believe that *OsATG8a* is a high-quality candidate gene for increasing yield.

**Key words:** autophagy; nitrogen stress; yield; *OsATG8a*

Received 2018-09-09 Accepted 2018-12-20

This work was supported by National Key Research and Development Program of China (2018YFD0200200).

\*Corresponding author (celiafanfan@163.com).