

文章编号: 1001-411X(2002)03-0087-04

# 植物叶片衰老的特性、基因表达及调控

王亚琴<sup>1</sup>, 梁承邳<sup>1</sup>, 黄江康<sup>2</sup>

(1 中国科学院华南植物研究所, 广东 广州 510650; 2 广东省科技厅, 广东 广州 510070)

摘要: 综述了植物叶片衰老的特性、机理及分子调控方面的研究进展, 介绍了异戊烯基转移酶基因(*ipt*)作为外源基因转入各种农作物在很大程度上延缓了衰老进程, 并展望了目前植物衰老研究的热点及方向。

关键词: 叶片衰老; 衰老相关基因; 细胞分裂素; *ipt*

中图分类号: Q945.48

文献标识码: A

植物叶片衰老是一种程序性的细胞死亡, 是叶片发育的最终阶段。它除了代表生命周期的终结之外, 在发育生物学上也有着重要的意义。在这段时期内, 植物在成熟叶片中积累的物质, 将被分解并运送至植物其他生长旺盛的部位; 对于产生种子的作物, 包括绝大多数农作物, 衰老引起的叶片同化功能的减退极大地限制了作物产量潜力的发挥; 对蔬菜作物亦会造成采后损失。因此, 研究叶片衰老, 不仅有助于认识该发育过程, 而且更重要的是利用研究结果来建立操纵叶片衰老的方法, 从而造福于人类。

## 1 叶片衰老的特征与机理

叶片衰老是一种器官水平上的程序化死亡过程(Programmed cell death, PCD), 并非只是一种退化过程<sup>[1]</sup>。最明显的外观标志是叶色由绿变黄、脱落, 而在细胞水平上表现为叶绿素含量下降, 蛋白质含量下降, 光合磷酸化能力降低, 膜脂过氧化加剧, 游离氨基酸积累, 腐胺含量上升而精胺含量下降, CTK(细胞分裂素)含量下降, ABA(脱落酸)含量上升, 多种酶活性改变等等。许多大分子物质如蛋白质、膜脂、RNA 等降解形成的 N 素等营养物质被转运至幼嫩的叶片、发育中的种子, 加以重新利用和储存<sup>[2]</sup>。

许多实验证据表明: 植物在衰老时体内似乎存在一种能够保护自身不受外界因子损伤、维持自身活力、以确保衰老细胞能较长时间高效利用自己组分的机制<sup>[3]</sup>。在已鉴定的 SAGs(衰老上调基因)中, 功能上有一类与衰老细胞的保护机制有关, 如清除 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的过氧化氢酶(CAT)SAGs, 防止病原菌侵染的 PR1a(病程相关蛋白)SAGs, 重金属结合蛋白 SAGs 在叶片衰老过程中除具有贮存、运输金属离子的功能外, 很可能还具有保护核基因不受活性氧损伤、使 SAGs 准确表达的功能。ATP 硫酸化酶在 ATP 作用下

催化硫酸根转变成半胱氨酸和蛋氨酸, 半胱氨酸可进一步变为谷胱甘肽。谷胱甘肽既是硫的一种贮藏分子, 又是叶片衰老过程中大分子降解所释放的硫的运输分子, 同时它还是一种清除活性氧的小分子<sup>[4]</sup>。

## 2 一些与叶片衰老相关的基因

近几年, 随着植物分子生物学技术, 尤其是 mRNA 检测技术如 Northern blot、差示筛选(differential screening)、减式杂交(subtractive hybridization)等的迅速发展和渗透, 科学家们已成功分离、克隆出 40 多个与叶片衰老相关的基因, 并对其表达、调控进行了初步的研究, 运用遗传手段来延缓植物叶片的衰老。研究发现, 在叶片衰老过程中, 其总 DNA 水平变化较小, 而总 RNA 水平尤其是 rRNA 水平则剧烈下降<sup>[5]</sup>, 以小麦、牛尾草、大豆、萝卜和番茄的绿叶及衰老叶片中的 mRNA 进行体外翻译的结果表明, 随着叶片衰老, 一部分 mRNA 数量减少或消失, 而另外一部分 mRNA 则出现或数量增加。这说明叶片衰老过程中可能有一些基因受到抑制而低水平表达, 甚至完全不表达, 而另一些基因则在衰老期间被激活, 其表达增强。前一类基因被称为衰老下调基因(Senescence down-regulated genes, SDGs), 如编码与光合作用有关的蛋白质[叶绿素 a、b 集光复合体、rbcL、rbcS (2, 5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶大亚基、小亚基)、电子传递体(petB)、光合系统 II(psbA)]的转录本丰度随叶片衰老急剧下降<sup>[6, 7]</sup>; 后一类被称为衰老相关基因(Senescence-associated genes, SAGs)即衰老上调基因, 其中一类仅在衰老特定发育阶段表达的基因称为衰老特定基因(Senescence-specific genes, SSGs), 它的 mRNA 只有在叶片衰老时才能检测到, 如 SAG12、SAG13<sup>[8]</sup>、LSC54<sup>[9]</sup>, 其中 LSC54 虽然

收稿日期: 2001-07-12

作者简介: 王亚琴(1972-), 女, 中国科学院华南植物研究所在读博士生。

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(990770)

1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

是衰老特异的,但并不是叶片特异的,它们不仅在衰老的叶片中表达,也在衰老的茎、花瓣、萼片、心皮等器官中表达<sup>[10]</sup>. 另一类 SAGs 在叶片生长初期就可检测到有低水平表达,衰老开始后表达量迅速上升.

2.1 衰老下调基因

就衰老叶片的总体而言,大多数基因的表达是下调的, Bate 等<sup>[9]</sup> 研究发现菜豆初生叶在衰老期间与光合作用有关的部分蛋白质含量下降,其中有 PS II 的 D1 蛋白, 2, 5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(Rubisco)大亚基、小亚基及  $M_r$  为 26 000 的捕光复合蛋白(IHCP)等. Jiang 等<sup>[7]</sup> 的研究结果表明,大豆不同节位上的叶在衰老期间, Rubisco 全酶含量及活力的降低与 Rubisco 大/小亚基水平的下降相一致. Mitsuhashi 等<sup>[11]</sup> 以豌豆的离体完整叶绿体进行的试验证明,叶绿体中含有蛋白降解酶; Shankin 等<sup>[12]</sup> 在拟南芥的叶绿体中检测到蛋白质降解酶亚基(ClpP 和 ClpC)的存在. 因为液泡中含有较高浓度的蛋白降解酶,因此至今用一般生物化学方法仍检测不到与叶绿体结构紊乱和功能丧失有关的衰老特异蛋白降解酶活性极其变化. 但是已从玉米、拟南芥和油菜的衰老叶片中分离克隆出 3 种促进衰老的蛋白降解酶基因: SAG2、See1、LSC7<sup>[3 13]</sup>.

2.2 衰老相关基因

一些衰老相关基因的水平在衰老期间不同程度地上升, Lohman 等<sup>[8]</sup> 于 1994 年从拟南芥中获得了 6 个衰老相关基因的 cDNA (SAG12~17) 克隆. 其中 SAG12 在叶片衰老后才出现相应转录本,且随衰老加剧而加速表达. Buchanan-Wollaston 等<sup>[9]</sup> 从油菜叶中获得了几个与叶片衰老进程密切相关的 cDNA 克隆. 其中 LSC54 基因在叶片衰老期间高水平表达,并随衰老加剧而增强. 现已从 8 种农作物中克隆出了相应的衰老相关基因: 水稻(GS1 基因、GS2 基因)、拟南芥(RNS2 基因、SAG12-17 克隆)、小麦(RNase 基因)、萝卜(din1 基因)、番茄(pTOM13、pTOM36、pTOM66、pTOM75、pTOM96、pTOM129、pTOM137)、黄瓜(MS 基因)、南瓜(异柠檬酸裂解酶基因、苹果酸合成酶基因)、油菜(LSC54、LSC94、LSC7、LSC99、LSC8、LSC28).

3 影响叶片衰老的因子

叶片衰老是一种受遗传和外界因子(如日照、病害、遮荫、高温、干旱和水涝等逆境)影响的高度程序化过程<sup>[14, 15]</sup>. 在遗传学方面, Yoshida 等<sup>[16]</sup> 的研究表明:叶绿体的衰老是由核决定的. 通过抑制植物的 RNA 和蛋白质合成可延迟叶片的衰老<sup>[19]</sup>. 在研究一年生植物的开花和种子发育时发现,假如除去大豆的花或物理限制豆荚生长则延迟叶片衰老,这种现

象很可能是繁殖器官产生的一种“衰老激素”转运到叶片中,从而启动衰老程序<sup>[17]</sup>. 叶片衰老的启动和进程主要由自身遗传物质控制,但环境条件也有一定的调节作用. 例如遮荫也可诱导某些植物的下部叶片衰老,植物对遮荫的反应是通过增加茎伸长以达到光辐照度较高的位置(遮阴反应, shade-avoidance response). 这种胁迫条件下叶片虽被诱导衰老,但其养分水分会再分配至繁殖器官,从而使植物即使在逆境也能完成生活周期<sup>[19]</sup>.

4 叶片衰老的调控研究

4.1 水解酶在衰老中的作用

在叶片衰老过程中水解酶的异常表达会加速细胞内生物大分子的降解<sup>[18]</sup>, 用 PCR 方法从番茄中分离到两个衰老诱导的 RNase 基因的 cDNA 克隆,将它们同衰老诱变的转录产物杂交,发现这两个克隆分别对应番茄中的 LX-RNase 与 LE-RNase. 在衰老程度较高的时期, LX 的诱导表达量比 LE 更高. 在衰老的花和离体叶片中, RNase 基因表达较低,而在茎、根及不同成熟阶段的果实中没有表达. 幼年离体叶片中, LX 基因的表达可被乙烯活化,而 LE 则被脱落酸活化. 另外,外部伤害也可导致 LE 的暂时表达. 因此 LX 可能在衰老时叶的 RNA 代谢中起作用,而 LE 则可能与植物受伤时的主动防御有关<sup>[19]</sup>.

植物衰老中,质膜崩解是一个至关重要的过程. 磷脂酶(PLD)在其中起着关键作用. 磷脂酶  $\alpha$  是拟南芥中最为普遍的一种磷脂酶,它的表达能被反义 cDNA 片段抑制. 缺乏 PLD 的转基因植物的离体叶片在脱落酸和乙烯中培养其衰老过程比野生型慢. 衰老水平的衡量指标是叶片黄化程度、离子渗透量、光合作用活性、叶绿素与磷脂含量. 脱落酸与乙烯的处理能使 PLD 的 mRNA、蛋白质水平及其活性上升. 在没有上述两种处理的情况下,转基因植株与野生型在衰老速度上是相似的. 另外, PLD 的抑制并未改变植物的自然生长与发育. 因此,磷脂酶被认为是在离体叶片中由植物激素启动的触发衰老的重要媒介,而并非自然衰老中直接启动因子<sup>[20]</sup>.

4.2 细胞分裂素在叶片衰老过程中的作用

目前叶片衰老的调控主要从 3 个途径(激素、生殖库、代谢产物)来实现,其中激素生理学方面的调控是研究的重点. 一般运用转基因手段增强细胞分裂素在植物体内的表达来延缓衰老,但在基因水平上阐明叶片衰老的分子机制,进而调控叶片衰老相关基因的表达,达到延缓衰老进程或推迟衰老起始的目的仍是目前有待解决的问题.

自从 1957 年 Richmond 和 Lang<sup>[21]</sup> 发现激动素可延缓苍耳离体叶片衰老之后,人们已发现凡具有细胞分

裂素活性的物质, 均可作为叶片衰老延缓剂. 它具有促进细胞分裂和扩大、诱导芽分化、延缓叶片衰老、消除顶端优势、促进芽生长等功能. 之所以能延缓衰老主要是因为细胞分裂素能抑制核糖核酸酶、脱氧核糖核酸酶、蛋白酶等的活性, 从而延缓了核酸、蛋白质、叶绿体等的降解. 1979 年 Hen 等<sup>[22]</sup> 从烟草的非肿瘤细胞中克隆出具有异戊烯基转移酶活性的酶片段, 随后 Akiyoshi 等<sup>[23]</sup> 从根癌农杆菌中将编码此酶的基因 (*ipt*) 分离了出来, 并阐明了异戊烯基转移酶是细胞分裂素生物合成步骤中的一个关键限速酶, 它促使 5'-AMP 和异戊烯基焦磷酸合成异戊烯基-5'-腺苷磷酸, 并最终形成玉米素核苷酸和玉米素. *ipt* 的分离使得科研人员开始运用转基因技术将延缓衰老的解决方法提高到了分子水平. 最初人们以原始(未更换启动子的 *ipt*) 为外源基因转化植株, 发现不仅植株叶片衰老有所缓解, 而且植株形态发生了变化<sup>[24, 25]</sup>. 为了解决植物组织中细胞分裂素过量表达的问题, 科研人员试用了许多组织特异性启动子和可诱导启动子来表达外源 *ipt*, 例如热激启动子、铜诱导启动子、四环素诱导启动子、光诱导启动子、果实特异性启动子、伤害诱导启动子等等, 均获得了相应的抗衰老植株, 而且大部分的转基因植株的形态不发生变异. 但这些研究仅仅局限于实验室内, 大大限制了抗衰老遗传转化工程在农业生产上的应用. 直到 1994 年, Lohman 等人<sup>[8]</sup> 从拟南芥中克隆出一组 SAGs, 并证明其中 SAG12 是高度衰老特异的, 次年 Gan 等人<sup>[26]</sup> 把 SAG12 特异启动子与 *ipt* 构建成 *PSAG12-ipt* 嵌合基因, 通过根癌农杆菌介导转化烟草获得转基因植株. 这种转基因植株与野生型相比, 叶片衰老大大延迟, 并由此而导致花数和生物量增加等; 但形态方面无明显差别, 根系发育完全, 顶端优势得到保持, 在生理方面表现出光合能力延长.

目前有很多专家学者将 *ipt* 转入不同农作物(水稻、小麦、烟草等)中延缓叶片衰老, 以求提高作物产量, 1995 年 Gan 等人<sup>[26]</sup> 用农杆菌介导转化法将 *ipt* 转入烟草, 获得了 8 个独立的转基因植株. 1998 年付永彩等<sup>[27]</sup> 利用基因枪法将抑制衰老的嵌合基因 *PSAG12-ipt* 转入水稻, 观察并分析了 T<sub>1</sub> 代转基因植株成熟期的形态, 证明了抑制衰老的自我调节系统在部分转基因水稻中表达, 叶片衰老受到明显的抑制. 曹孟良<sup>[28]</sup> 通过根癌农杆菌法转化了水稻, 并取得了阳性植株.

5 展望

近几年, 分子生物学、细胞生物学以及生物技术的迅猛发展, 使得叶片衰老的分子机制研究有了一定的进展, 但仍有许多问题不清楚, 有待深入研究.

虽说 SAGs 基因的克隆、鉴定、应用延缓了不同植物叶片衰老进程, 但叶片 SAGs 的调控机制、衰老突变体的筛选、控制 SAGs 表达的启动子的分析、分离、鉴定仍需进一步的研究.

随着植物中大量钙调素结合蛋白的分离与鉴定, 目前科学家们将研究植物衰老机制的重点转向了钙调素结合蛋白(CaM-binding protein),  $Ca^{2+}/CaM$  不仅通过结合 SAUR(Small auxin up RNA) 参与生长素作用, 而且参与乙烯作用的机制. NtER1, 一个与衰老相关的乙烯上调基因, 编码一个  $Ca^{2+}/CaM$  结合蛋白, 其表达作用在叶或花瓣开始衰老时大幅度增强, 这进一步表明  $Ca^{2+}/CaM$  在植物衰老与死亡进程中起着很重要的作用<sup>[29]</sup>. 不仅钙调素结合蛋白在植物衰老中起一定作用, 多胺(PAs) 近来亦被认为可作为植物衰老调节剂. 足够的证据证明, 多胺与乙烯一同参与植物的衰老进程, 且以 SAM(S-adenosylmethionine) 作为一个共同的前体, 它们的生理功能具有拮抗作用, 在叶花衰老及果实成熟期, 它们有效的通过调整各自的生物合成而调控着衰老进程<sup>39</sup>.

参考文献:

[1] NOODEN L D, LEOPOLD A C. Phytohormones and the endogenous regulation of senescence and abscission[ A ]. Letham D, Goodwin P, Higgins T. Phytohormones and Related Compounds: A Comprehensive Treatise[ C ]. New York: Elsevier, 1978. 329—369.

[2] CLAUSEN S, APEL K. Seasonal changes in the concentration of the major storage proteins and its mRNA in xylem ray cells of poplar trees[ J ]. Plant Mol Biol, 1991, 17: 669—678.

[3] BUCHANAN—WOLLASTON V. The molecular of leaf senescence[ J ]. J Exp Bot, 1997, 48: 181—199.

[4] DAVIES K M, GRIERSON D. Identification of cDNA clones for tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. ) mRNAs that accumulate during fruit ripening and leaf senescence in response to ethylene[ J ]. Planta, 1989, 179: 73—87.

[5] BATE N J, ROTHSTEIN S J, THOMGSON J E. Expression of nuclear and chloroplast photosynthesis—specific genes during leave senescence[ J ]. J Exp Bot, 1991, 42: 801—811.

[6] CLOUSE S D. Molecular genetic studies confirm the role of brassinosteroids in plant growth and development[ J ]. Plant J, 1996, 10: 1—8.

[7] JIANG C Z, RODERMEL S R, SHIBLES R M. Photosynthesis rubisco activity and amount and their regulation by transcription in senescencing soybean leaves[ J ]. Plant Physiol, 1993, 101: 105—112.

[8] LOHMAN K N, GAN S, JOHN M C, et al. Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*[ J ]. Physiol Plant, 1994, 92: 322—328.

[9] BUCHANAN—WOLLASTON V. Isolation of cDNA clones for genes that are expressed during leaf senescence in *Brassica*

- napus*: Identification of a gene encoding a senescence-specific metallothionein-like protein[J]. *Plant Physiol*, 1994, 105: 839–846.
- [10] GAN S, AMASINO R M. Making sense of senescence[J]. *Plant Physiol*, 1997, 113: 313–319.
- [11] MITSUHASHI W, FELL U. Effects of light and external solutes on the catabolism of nuclear-encoded stromal proteins intact chloroplasts isolated from pea leaves[J]. *Plant Physiol*, 1992, 100: 2 100–2 105.
- [12] SHANKLIN J, de WITT N D, FLANAGAN J M. The stroma of higher plant plastids contain ClpP and ClpC: functional homologs of *Escherichia coli* ClpP and ClpA: an archetypal two-component ATP-dependent protease[J]. *Plant Cell*, 1995, 7: 1 713–1 722.
- [13] GUT H, MATILE P. Apparent induction of key enzymes of the glyoxylic acid in senescent barley leaves[J]. *Planta*, 1998, 176: 548–550.
- [14] NOODEN L D. Senescence and aging in plants[M]. New York: Academic Press, 1988, 1–50.
- [15] THOMAS H, STODDART J L. Leaf senescence[J]. *Annual Rev Plant Physiol*, 1982, 31: 83–111.
- [16] YOSHIDA Y. Nuclear control of chloroplast activity in *Elodea* leaf cells[J]. *Protoplasma*, 1961, 54: 476–492.
- [17] HAYATI R, EGLI D B, CRAFTS-BRANDNER S J. Carbon and nitrogen supply during seed filling and leaf senescence in soybean[J]. *Crop Sci*, 1995, 35: 1 063–1 069.
- [18] LIDGETT A J, MORAN M, WONG K A L, et al. Isolation and expression pattern of a cDNA encoding a cathepsin B-like protease from *Nicotiana rustica*[J]. *Plant Mol Biol*, 1995, 29(2): 379–384.
- [19] LERS A, ANDREI KHALCHITSKI, ELLA LOMANIEC, et al. Senescence-induced RNases in tomato[J]. *Plant Mol Biol*, 1998, 36(3): 439–449.
- [20] FAN L, ZHENG S, WANG X. Antisense suppression of phospholipase D alpha retards abscisic acid and ethylene-Promoted Senescence of postharvest *Arabidopsis* leaves[J]. *Plant Cell*, 1997, 9(12): 2 183–2 196.
- [21] RICHMOND A E, LANG A. Effect of kinetin on protein content and survival of detached *Xanthium* leaves[J]. *Science*, 1957, 125: 650–651.
- [22] HEN C M, MELTZ D K. Cytokinin biosynthesis in a cell free system from cytokinin autotrophic tobacco tissue culture[J]. *FEBS Lett*, 1979, 107: 15–20.
- [23] AKIYOSHI D E, KLEE H, AMASINO R M, et al. T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81: 5 994–5 998.
- [24] SMIGOCKI A C, OWENS L D. Cytokinin gene fused with a strong promoter enhances shoot organogenesis and zeatin levels in transformed plant cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85: 5 131–5 135.
- [25] BEINSBERGER S E I, VALCKE R L M, DEBLAERE R Y, et al. Effects of the introduction of *Agrobacterium tumefaciens* t-DNA *ipt* gene in *Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SRI plant cells[J]. *Plant Cell Physiol*, 1991, 32: 489–496.
- [26] GAN S, AMASINO R M. Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin[J]. *Science*, 1995, 270: 1 986–1 988.
- [27] 付永彩, 丁月云, 刘新仿. 抑制衰老的嵌合基因在水稻中的转化[J]. *科学通报*, 1998, 43: 1 963–1 967.
- [28] 曹孟良. 农杆菌介导的水稻高效遗传转化体系的建立[J]. *湖南农业大学学报*, 1999, 5: 349–356.
- [29] YANG T, POOVAIAH B W. An early ethylene up-regulated gene encoding a calmodulin-binding protein involved in plant senescence and death[J]. *J Biological Chemistry*, 2000, 275(49): 38 467–38 473.
- [30] PANDEY S, NAGAR P K, KUMAR N, et al. Role of polyamines and ethylene as modulators of plant senescence[J]. *J Biosciences*, 2000, 25(3): 291–299.

## Characteristics, Gene Expression and Regulation of Plant Leaf Senescence

WANG Ya-qin<sup>1</sup>, LIANG Cheng-ye<sup>1</sup>, HUANG Jiang-kang<sup>2</sup>

(1 South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650, China;

2 Science and Technology Department, Guangdong Province, Guangzhou 510070, China)

**Abstract:** The characteristics, mechanism and molecular regulation of plant leaf senescence were reviewed. It introduced *ipt* as an exogenous gene which can delay crop senescence, and gave a prospect for plant senescence's highlight and direction.

**Key words:** leaf senescence; senescence-associated genes; cytokinin; *ipt*

【责任编辑 柴 焰】