

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202007044

张强, 黄卓然, 胡康龙, 等. 过表达大豆类受体蛋白激酶基因 *RLPK2* 促进转基因拟南芥叶片的衰老 [J]. 广西植物, 2022, 42(5): 729-737.

ZHANG Q, HUANG ZR, HU KL, et al. Over expression of soybean receptor-like protein kinase *RLPK2* gene from *Glycine max* promotes transgenic *Arabidopsis thaliana* leaf senescence [J]. *Guihaia*, 2022, 42(5): 729-737.



过表达大豆类受体蛋白激酶基因 *RLPK2* 促进转基因拟南芥叶片的衰老

张强, 黄卓然, 胡康龙, 许超, 杨青青, 薛涛*

(淮北师范大学 生命科学学院, 污染物敏感材料与环境修复安徽省重点实验室, 安徽 淮北 235000)

摘要: 大豆 *RLPK2* 基因 (GenBank 登录号: AY687391) 是一个编码 N-末端富含亮氨酸重复序列的类受体蛋白激酶基因。为分析大豆 *RLPK2* 基因的功能, 该研究以野生型拟南芥和大豆 *RLPK2* 基因过表达拟南芥植株为材料, 通过农杆菌介导法转化野生型拟南芥, 构建了大豆 *RLPK2* 基因过表达载体, 分析了叶片衰老过程中叶绿素荧光参数、抗氧化酶活性及衰老相关基因表达量的变化。结果表明: (1) 无论是野生型还是转基因拟南芥, 随着叶片衰老进程的进行, 光系统 II (PS II) 的最大光化学效率 (F_v/F_m)、PS II 实际光化学效率 (Φ_{PSII})、光化学淬灭系数 (qP) 和光合电子传递速率 (ETR) 均呈下降趋势, 但后者下降趋势更明显; (2) 激发压 ($1-qP$) 在叶片衰老前期的变化较为平稳, 后期则急剧增加, 且转基因型比野生型拟南芥增加更明显; (3) 在叶片衰老的各个时期, 转基因拟南芥叶片丙二醛 (MDA) 含量均显著高于野生型, 而超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD) 和过氧化氢酶 (CAT) 活性均显著低于野生型; (4) 实时荧光定量 PCR 检测结果表明, *RLPK2* 转基因拟南芥中衰老标志基因 *ATSAG12*, 衰老关键转录因子 *ATNAP*、*ATWRKY6* 和叶绿素降解关键酶编码基因 *ATACD1* 表达量显著上调。综上所述, 大豆类受体蛋白激酶基因 *RLPK2* 参与调控植物叶片衰老进程, 其表达对叶片衰老具有促进作用。

关键词: 大豆 *RLPK2* 基因, 叶片衰老, 激发压, 抗氧化酶, 丙二醛

中图分类号: Q943; S565.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2022)05-0729-09

Over expression of soybean receptor-like protein kinase *RLPK2* gene from *Glycine max* promotes transgenic *Arabidopsis thaliana* leaf senescence

ZHANG Qiang, HUANG Zhuoran, HU Kanglong, XU Chao, YANG Qingqing, XUE Tao*

(College of Life Sciences, Huaibei Normal University, Anhui Province Key Laboratory of Pollutant Sensitive Materials and Environmental Remediation, Huaibei 235000, Anhui, China)

Abstract: Soybean *RLPK2* gene (GenBank accession No. AY687391) is a receptor-like protein kinase gene that encodes a leucine-rich repeat (LRR) receptor kinase-type protein encoded with a N-terminal. In order to further analyze

收稿日期: 2020-10-11

基金项目: 安徽省自然科学基金 (1608085MC49); 安徽省高校自然科学基金 (KJ2018A0403); 资源植物生物学安徽省重点实验室项目 (ZYZWSW2014004) [Supported by Anhui Provincial Natural Science Foundation (1608085MC49); Natural Science Foundation of Anhui University (KJ2018A0403); Key Laboratory Project of Resource Plant Biology of Anhui Province (ZYZWSW2014004)]。

第一作者: 张强 (1976-), 博士, 副教授, 研究方向为逆境植物生理生态学, (E-mail) zhangq@foxmail.com。

* 通信作者: 薛涛, 博士, 副教授, 主要从事生物化学与分子生物学研究, (E-mail) xuetao_26@163.com。

the function of the soybean *RLPK2* gene, the overexpression vector of the *RLPK2* gene was constructed via agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. In this study, wild-type (WT) and transgenic *A. thaliana* plants were used as materials, and the variations in chlorophyll fluorescence parameters and the activities of antioxidant enzymes as well as the expression levels of senescence-associated genes in the aging process of leaves were investigated. The results were as follows: (1) Both WT and transgenic plants tended to decrease the efficiency of primary conversion of light energy of photosystem II (PS II) (F_v/F_m), actual photochemical efficiency of PS II (Φ_{PSII}), photochemical quenching coefficient (qP) and electron transport rate (ETR) while the latter showed a more obvious decreasing pattern as aging progressed. (2) The PS II excitation pressure (estimated as $1-qP$) was relatively stable in the early stage of leaf senescence, and increased sharply in the later stage of leaf senescence, while the transgenic plants showed a more obvious increasing trend. (3) At different leaf senescence stages, the malondialdehyde (MDA) content was significantly higher in transgenic plants than that in WT, while the activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT) were significantly lower in transgenic plants than those in WT. (4) Additionally, the real-time quantitative RT-PCR showed that the expression levels of aging marker gene *ATSAG12*, critical senescence-associated transcription factors *ATNAP*, *ATWRKY6* and chlorophyll degradation key enzyme-encoding gene *ATACD1* increased in transgenic plants. In summary, transgenic *A. thaliana* exhibited faster leaf senescence compared with WT, and the expression of the soybean receptor-like protein kinase *RLPK2* gene played an important role in promoting leaf senescence.

Key words: soybean *RLPK2* gene, leaf senescence, excitation pressure, antioxidant enzyme, malondialdehyde (MDA)

作为进行光合作用的主要器官,叶片的生长发育优劣直接影响作物的生长、产量及品质。叶片衰老是叶片生长发育进程中的最终阶段,它不是叶片细胞的简单死亡过程,而是一种主动的、受细胞内部遗传程序控制的、器官水平上动态的细胞程序性死亡过程,并且受到外部多种环境因素(光照、水分、温度、矿质元素和微生物)及内部发育信号(激素、遗传和基因调控)的协调控制(初梦圆和于延冲,2019)。此外,叶片衰老还与 Ca^{2+} 、糖、活性氧(relative oxygen species, ROS)水平和内源激素的变化等因素密切相关(张艺函等,2019)。叶片衰老主要表现为光合同化能力下降,细胞结构的退化,光合色素包括叶绿素和类胡萝卜素的降解,蛋白质和核酸降解,ROS与丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量增加,水解酶及生长抑制因子持续增长等,这些特征在多种植物中已有描述(Woo et al., 2013; Wang et al., 2016)。叶片衰老能够增强植物对生存环境的适应性,从而有利于其生存和延续。但对农作物的生长而言,植物过早衰老引起的叶片同化功能的减退也极大地影响和限制了农作物产量潜力的发挥,导致作物品质及产量的损失。因此,对叶片衰老机理的研究不仅在揭示植物的生态适应等方面具有一定意义,还在粮食生产上抑制早衰具有重要意义。大豆在我国播种面积仅次于玉米、水稻、小麦和马铃薯,

是第五大粮食作物,其含有丰富的植物蛋白质,同时又可用来榨油,因此是我国重要的油料作物。相关研究表明,叶片早衰严重影响着大豆正常的生长发育,并会引起产量及品质的下降(吕林涛,2018)。鉴定大豆叶片衰老相关基因及其功能对于提高大豆的优质高产和育种改良具有重要的科学意义和深远的应用价值。

植物类受体蛋白激酶(receptor-like protein kinase, RLKs)具有特殊的蛋白质结构,在植物中普遍存在,占植物蛋白激酶总量的60%,是植物中较大的基因家族之一,参与细胞信号转导途径过程,并在植物的生长发育和环境的适应过程中具有重要作用(Shiu & Bleeker, 2001)。其中,富含亮氨酸重复序列(leucine-rich repeat, LRRs)型类受体蛋白激酶是RLKs中最大的一个亚家族(Colette et al., 2011)。迄今为止,LRRs-RLKs蛋白的结构特点和表达模式在拟南芥(阿依江·哈拜克等,2014)、烟草(曾建斌,2011)、花生(庄瑞蓉等,2018)、马铃薯(谢洁等,2019)等植物中均有研究。相关研究表明,LRR-RLKs在植物整个生长发育过程中具有重要作用(Diévert & Clark, 2004)。谢洁等(2019)发现马铃薯LRR类受体蛋白激酶SCLRRK1在低温条件下表达受到抑制,证实其参与低温胁迫响应过程。Zhou等(2016)发现LRR-RLKs型基因调节拟南芥花药的发育过程。

作为 LRR-RLKs 家族中被研究较为广泛的一员, BAK1 在油菜素内酯 (BR) 信号转导途径 (He et al., 2007)、植物先天免疫反应 (韦莉等, 2019)、细胞死亡调控 (Zhou et al., 2019) 等方面发挥作用。大豆 *RLPK2* 基因 (GenBank 登录号: AY687391) 是植物分子遗传学组李小平副教授前期以大豆科丰 34 为材料筛选到的一个编码 N-末端富含亮氨酸重复序列的类受体蛋白激酶基因, 前期研究结果发现人工诱导衰老处理显著提高了该基因在大豆初生叶片中的转录水平, 初步分析显示该基因可能参与大豆叶片衰老的调控过程。本研究在此基础上构建了大豆 *RLPK2* 基因过表达载体并转化野生型拟南芥, 对转基因拟南芥叶片衰老进程进行分析, 进一步揭示该基因在植物叶片衰老中的功能, 以期延缓叶片衰老从而提高大豆作物产量和改善作物品质提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料及培养方法

本试验所使用的拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 为哥伦比亚野生型 (WT) 拟南芥 (Columbia-0)。培养环境条件如下: 温度为 20~25 °C, 光暗周期为 16 h 光照/8 h 黑暗, 光照强度为 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 相对湿度为 80%。

1.2 总 RNA 的提取和反转录

采用 QIAGEN 的植物 RNA 提取试剂盒 RNeasy Plant Mini Kit 按照操作说明提取大豆品种科丰 34 叶片总 RNA, 经微量紫外分光光度计 (Merinton, 美国) 检测其纯度和浓度, 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性后, 利用 Thermo 公司提供的 cDNA 试剂盒按照反转录说明书合成 cDNA 第一条链。

1.3 *RLPK2* 全长 cDNA 引物设计及 RT-PCR 基因扩增

利用 Primer Premier 5.0 软件设计 *RLPK2* 基因的特异性引物, 根据 Gateway 技术构建表达载体的要求, 在引物 5' 端加上 AAAAAGCAGGCTCG, 引物序列如下:

RLPK2-OX-F: 5' AAAAAGCAGGCTCGATGAGATCAGTAAGTTCCCCTG3';

RLPK2-OX-R: 5' AGAAAGCTGGGTTTAACTCTCTTCTCCAAGTAAGAAG3'。

采用高保真 Phusion DNA 聚合酶进行 PCR 扩

增。反应程序: 94 °C 预变性 30 s, 35 个循环 (94 °C 30 s, 62 °C 30 s, 72 °C 30 s), 循环结束后 72 °C 10 min 延伸反应, 4 °C 保温。1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 回收特异性目标条带, 送样测序, 选取测序正确的克隆进行后期载体的构建。

1.4 *RLPK2* 过表达载体构建、拟南芥遗传转化及纯合体筛选

通过农杆菌介导法将重组植物过表达载体 pB2GW7 转入野生型拟南芥, 并将收取的种子种在含有 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Basta 的 1/2 MS 培养基上筛选阳性植株, 提取 T3 代转基因植株总 RNA, 反转录成 cDNA, 利用特异性引物对转基因植株进行 RT-qPCR 鉴定, 选取其进行后续表型实验。

1.5 叶绿素荧光参数测定

使用便携式叶绿素荧光测定仪 (PAM-2500, 德国) 测定 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 光强下植株叶片的稳态荧光 F_s 、最大荧光 F_m' 和最小荧光 F_o' 后, 将叶片暗适应 30 min 后, 测定初始荧光 F_o 和暗下最大荧光 F_m 。根据测定的荧光参数计算出光系统 II (PS II) 最大光化学效率 $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$, 实际光化学量子效率 $\Phi_{\text{PSII}} = (F_m' - F_s)/F_m'$, 光化学淬灭系数 $qP = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_o')$, 光合电子传递速率 $\text{ETR} = \Phi_{\text{PSII}} \times \text{PPFD} \times A \times 0.5$, 式中: *PPFD* 是光辐射通量; *A* 是叶片吸收光能系数。

1.6 MDA 含量和抗氧化酶活性测定

取样叶 0.1 g 在液氮中充分研磨后立即转入含有 1 mL 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲溶液 (pH 7.8, 含 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA 和 1% PVP) 的离心管中, 在 4 °C 下 15 000 *g* 离心 15 min, 取上清液弃沉淀, 再 15 000 *g* 离心 5 min, 回收上清液用于 MDA 含量和抗氧化酶活性的测定。抗氧化酶活性的测定参照文献 (陈斌等, 2015)。超氧化物歧化酶 (SOD) 活性检测采用氮蓝四唑 (NBT) 光化还原法; 过氧化物酶 (POD) 活性检测采用愈创木酚法; 过氧化氢酶 (CAT) 活性检测活性采用 H_2O_2 分解法测定。MDA 含量的测定参考中国科学院上海植物生理研究所 (1999) 的方法。

1.7 转 *RLPK2* 基因拟南芥中衰老相关基因表达

RNA 提取步骤同上, 其反转录及定量 PCR 体系的配制均依据 Quant RT-PCR kit (SYBR Green) 的说明书操作, 具体数据分析参照 Xue 等 (2017) 步骤进行。

1.8 数据分析

所得试验数据采用 Microsoft Excel 2019 软件和 IBM SPSS 22.0 软件进行处理,采用 student-*t* 检验方法检验不同处理之间的差异显著性 ($P < 0.05$, 差异显著)。采用 SigmaPlot 14.5 软件完成作图。

2 结果与分析

2.1 超表达 *RLPK2* 基因促进转基因拟南芥衰老

选取筛选得到的 2 个 T3 代纯系进行表型分析,首先通过 RT-PCR 比较分析野生型及两个转基因系 OX-1 和 OX-2 中的 *RLPK2* 的基因表达量。结果显示野生型中未检测到该基因,而两个转基因株系中均有显著的扩增条带,表明两个转基因纯系确为 *RLPK2* 的超表达株系(图 1)。比较生长 4 周时的野生型及转基因株系的拟南芥表型,可见两转基因株系拟南芥的抽苔和开花时间较野生型明显提前(图 1),表明 *RLPK2* 促进拟南芥衰老进程。

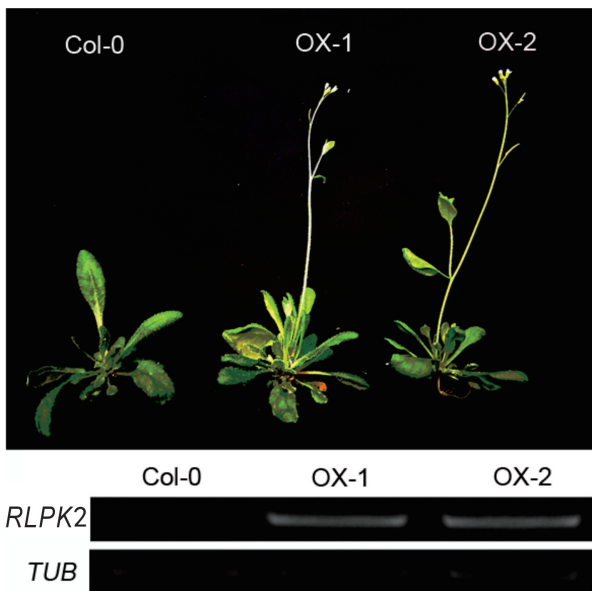
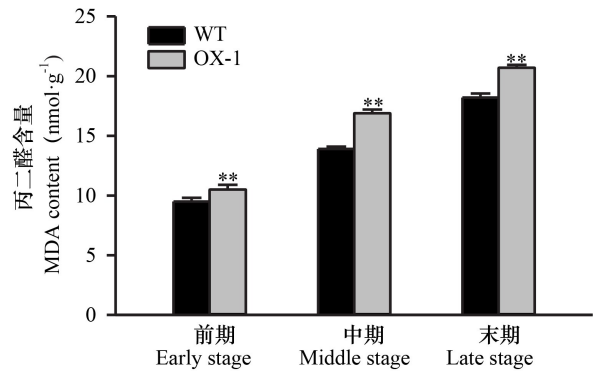


图 1 *RLPK2* 转基因拟南芥的表型及其表达检测
Fig. 1 Phenotype and gene expression detection of *RLPK2* transgenic *Arabidopsis thaliana*

2.2 MDA 含量

在三个不同发育时期,转 *RLPK2* 基因拟南芥植株叶片的 MDA 含量显著高于 WT 拟南芥(图 2)。MDA 是自由基作用于细胞膜脂发生过氧化反应的最终产物之一,能在一定程度上反映氧化

胁迫是否发生以及发生的程度。结果表明,超表达 *RLPK2* 基因可以引起拟南芥发生氧化胁迫。



* 表示 $P < 0.05$; ** 表示 $P < 0.01$ 。下同。

* means $P < 0.05$; ** means $P < 0.01$. The same below.

图 2 野生型(WT)和 OX-1 转基因拟南芥在自然衰老过程中丙二醛(MDA)含量的变化

Fig. 2 Changes of malondialdehyde (MDA) contents in the wild-type (WT) and transgenic *Arabidopsis thaliana* (OX-1) during the natural aging process

2.3 抗氧化酶系

为深入分析 *RLPK2* 基因过表达对植株细胞抗氧化性状的影响,分别检测了三个不同发育时期 WT 和 *RLPK2* 转基因拟南芥植株叶片的 SOD、POD 和 CAT 酶活性,结果如图 3 所示。由图 3 可知,在同一生长发育时期转基因拟南芥植株叶片的 SOD、POD 和 CAT 酶活性显著低于 WT。试验结果表明,超表达 *RLPK2* 基因使胞内 ROS 清除系统的功能降低,从而导致膜系统受到伤害,并进一步造成膜结构和功能的破坏。

2.4 叶绿素荧光

如图 4 所示,无论是 WT 还是 *RLPK2* 转基因拟南芥植株在衰老的前期和中期叶片 F_v/F_m 几乎未变,然而在衰老末期,衰老导致了拟南芥叶片 F_v/F_m 明显降低,且转基因拟南芥下降的更加明显。在拟南芥叶片衰老过程中还有一个明显的 PS II 激发压上升阶段,且转基因拟南芥比 WT 拟南芥上升更明显,表明前者比后者电子流受阻严重。此外,PS II 光合电子传递量子效率 Φ_{PSII} 、光化学淬灭系数 qP 和光合电子传递速率 ETR 在拟南芥叶片衰老过程中均呈降低趋势,且转基因拟南芥下降更明显,表明在生育后期衰老过程中,转基因型比野生型叶片的 PS II 功能下降更快,并且具有较低的光能利用效率。

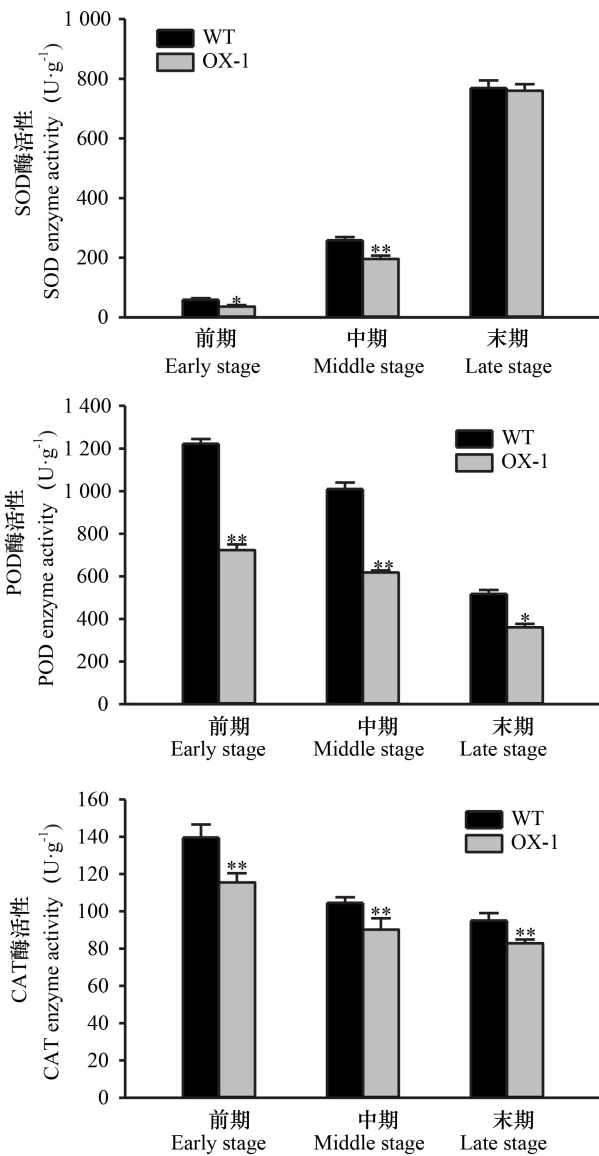


图 3 野生型 (WT) 和 OX-1 转基因拟南芥在自然衰老过程中抗氧化酶活性的变化

Fig. 3 Changes of antioxidant enzyme activities in the wild-type (WT) and transgenic *Arabidopsis thaliana* (OX-1) during the natural aging process

2.5 超表达 *RLPK2* 基因对拟南芥衰老相关基因表达的影响

为进一步研究 *RLPK2* 基因异源过表达对转基因拟南芥中各衰老相关基因和衰老转录因子表达量的影响,本研究利用 RT-PCR 检测衰老标志基因 *ATSAG12*, 衰老关键转录因子 *ATNAP*、*ATWRKY6* 和叶绿素降解关键基因 *ATACD1* 的表达变化情况。与 WT 拟南芥相比, *RLPK2* 基因异源过表达显著促进了上述衰老相关基因的表达 (图 5)。

3 讨论

除了作为信号分子介导植物对各种外界刺激响应之外, ROS 还在植物的正常生长发育与分化以及细胞程序性死亡 (programmed cell death, PCD) 等方面具有重要作用 (Mittler et al., 2011; Perez & Brown., 2014; Wang et al., 2020)。O₂⁻ 和 H₂O₂ 是植物体内主要的活性氧自由基, 作为强氧化剂攻击细胞膜中的不饱和脂肪酸或生物大分子物质导致其透性增加, 而 MDA 是细胞膜脂过氧化的最终产物, 其积累会对细胞造成一定的伤害, 其含量的变化是细胞质膜损伤程度的重要标志之一, 同时也是衡量植物器官衰老时或在逆境条件下细胞膜结构完整性的较好指标 (Slama et al., 2015; 夏冬冬等, 2018)。本研究发现, 随着叶片衰老进程的进行, 野生型和转基因拟南芥叶片 MDA 含量呈增加的趋势, 表明两者细胞膜脂过氧化程度逐渐增加, 细胞由完整变得破裂, 造成细胞衰老和死亡。MDA 含量增加可能与活性氧清除系统能力下降有关。在本研究中, 尽管 SOD 酶活性在拟南芥叶片衰老过程中有所提高, 但是由于 POD 酶和 CAT 酶活性降低, 导致了其体内活性氧清除系统能力下降, 从而引起 ROS 大量累积, 导致 MDA 含量增加; 在拟南芥衰老的各个时期, 在转基因株系叶片中 SOD、POD 和 CAT 酶活性均显著低于野生型, 因而导致转基因株系叶片 MDA 含量均相应地显著高于野生型。在植物叶片衰老过程中伴随着与光合作用光反应有关组分的降解 (如叶绿素、类胡萝卜素、叶黄素及 Cyt f 等) (Hikosaka et al., 1996; Murchie et al., 1999), 同时也伴随着与光合作用暗反应有关过程的衰退 (如 Rubisco 活性下降、Rubisco 降解及气孔导度下降等) (Ono et al., 2013; Majeran et al., 2019) 以及光合速率的下降。相关研究发现, 衰老引起叶绿体的结构、大小以及类囊体膜的完整性发生变化 (Hashimoto et al., 1989), 正是这种变化最终导致叶片衰老过程中 PS I 和 PS II 的活性都下降。然而相对而言, PS II 对衰老更为敏感 (Grover & Mohanty, 1993)。PS II 的叶绿素荧光动力学参数可直观反映植物叶片光合作用过程中光系统对光能的吸收、转化、耗散及分配等。作为其中一个比较重要的叶绿素荧光参数, F_v/F_m 是暗适应下 PS II 反应中心完全开放时

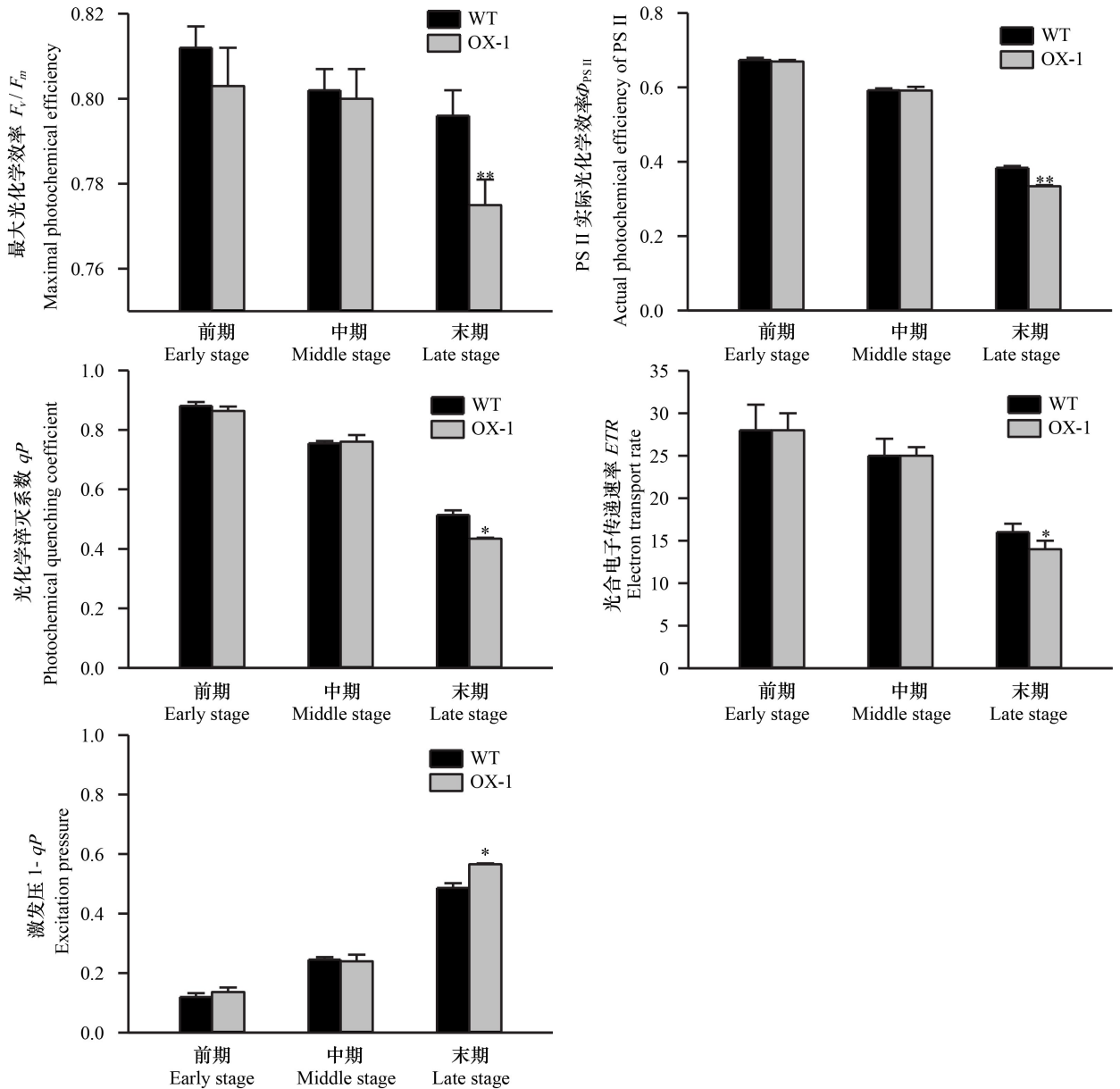


图 4 野生型 (WT) 和 OX-1 转基因拟南芥在自然衰老过程中叶绿素荧光参数的变化

Fig. 4 Changes of chlorophyll fluorescence parameters in the wild-type (WT) and transgenic *Arabidopsis thaliana* (OX-1) during the natural aging process

的最大光化学效率,代表了植物潜在的最大光合能力,正常生理状态下其数值通常介于 0.80~0.85 之间,并且基本上不受物种的影响。在植物体遭受到光抑制、逆境胁迫或者发生某些与光合相关的基因突变时, F_v/F_m 会发生显著性变化(肖华贵等,2013)。前人在研究不同种类作物衰老进程时均发现,尽管作物叶片衰老过程中光合作用能力下降,但是衰老并未引起 PS II F_v/F_m 明显下降(高

海涛等,2010;武永胜等,2010)。因此,有学者根据这一数据认为植物叶片衰老过程中 PS II 活性并未发生相应变化。本研究结果表明,在衰老的前期和中期,衰老确实未导致拟南芥叶片 F_v/F_m 明显下降;然而在衰老的末期,衰老导致了拟南芥叶片 F_v/F_m 明显降低,且转基因拟南芥下降得更加明显。PS II 激发压($1-qP$)是对 PS II 的电子接受体 Q_A 的氧化还原状态的估计值,其反映了 PS II 的氧

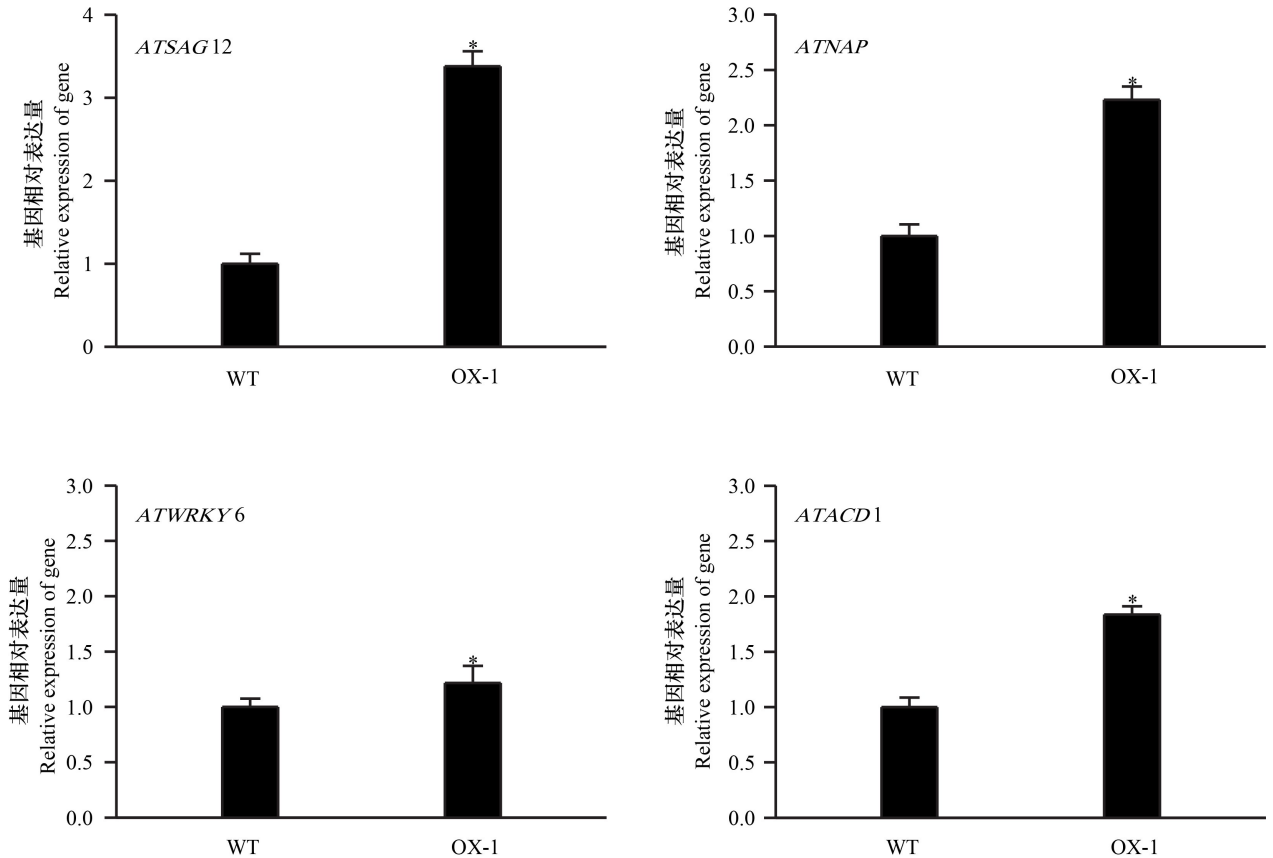


图 5 超表达 *RLPK2* 基因对拟南芥叶片衰老相关基因表达量的影响
 Fig. 5 Effects of *RLPK2* gene overexpression on the expression levels of several senescence-associated genes in *Arabidopsis thaliana* leaves

化还原状况以及能量供应和利用之间的平衡,能量平衡是通过光合电子传递链组分的氧化还原状态所介导的(Huner et al., 1998)。前人研究发现 PS II 激发压(1-*qP*)可能分别介导了自然衰老和缺氮引起的早衰(Tang et al., 2015; Wang et al., 2015)。Misra 等(2011)认为 PS II 激发压可以用作监测衰老开始的传感器。Ou 等(2003)研究发现超高产水稻剑叶衰老的过程中有一个明显的 PS II 激发压上升的阶段,显示光合电子流传递受阻。本研究同样也发现在拟南芥叶片衰老过程中有一个明显的 PS II 激发压上升的阶段,且转基因型比野生型拟南芥上升更加明显,表明转基因型比野生型拟南芥电子流受阻程度更严重。此外,本研究还发现在拟南芥叶片衰老过程中,PS II 光合电子传递量子效率 Φ_{PSII} 、光化学淬灭系数 *qP* 和光合电子传递速率 ETR 均降低,且转基因拟南芥下降更加明显,这一结果表明在生育后期衰老的过程

中,转基因株系较野生型叶片的 PS II 功能下降更快,并且具有较低的光能利用效率。

本研究通过实时定量 RT-PCR 检测,结果发现 *RLPK2* 基因超表达导致叶绿素降解关键酶编码基因 *ACD1* 表达量增加,这暗示了超表达 *RLPK2* 基因导致转基因拟南芥叶绿素降解速率加快,光合作用能力下降。现有研究表明,拟南芥中衰老标志基因 *ATSAG12* 编码半胱氨酸蛋白酶仅在只依赖于叶龄发育信号而导致的衰老过程中表达,且表达量不受其他胁迫信号的影响(张艺函等,2019)。本研究结果发现,在衰老中期才能在野生型和转基因拟南芥株系中检测到该基因的表达,且超表达 *RLPK2* 基因显著促进其表达量,揭示 *RLPK2* 基因在叶片衰老过程中响应叶龄发育信号。在叶片衰老过程中,*WRKY* 和 *NAC* 等转录因子家族成员中大部分成员表达量上调,参与调控叶片衰老过程,在叶片衰老过程中具有关键作用(Shah et al.,

2014)。在本研究中,超表达 *RLPK2* 基因显著促进 *ATWRKY6* 和 *ATNAP* 表达量的提升,表明 *RLPK2* 基因可能通过调节这些叶片衰老的关键转录因子而参与到叶片衰老的调控。

4 结论

大豆 *RLPK2* 受体蛋白激酶基因可参与植物叶片衰老调控过程,其过表达株系可通过调控衰老进程中抗氧化酶活性的变化,增加过氧化物的积累,导致 PS II 功能衰退较快,以及调控衰老相关基因如衰老标志基因 *ATSAG12*、衰老关键转录因子 *ATNAP*、*ATWRKY6* 和叶绿素降解关键酶编码基因 *ATACD1* 的表达,从而促进受体植株的早衰,但其调控衰老的机制尚有待于进一步研究。

参考文献:

ABROL YP, MOHANTY P, GOVINDJEE A, 1993. Photosynthesis: photoreactions to plant productivity [M]// GROVER A, MOHANTY P. Leaf senescence-induced alterations in structure and function of higher plant chloroplasts. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 225-255.

AYIJIANG H, YANG M, HAN YZ, 2014. Subcellular localization of RLK6, a protein of LRR-RLK subfamily and tissue expression pattern of the RLK6 in *Arabidopsis* [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 34(1): 1-6. [阿依江·哈拜克, 杨敏, 韩玉珍, 2014. 拟南芥 LRR-RLKs 亚家族蛋白 RLK6 的亚细胞定位及 RLK6 的组织表达 [J]. 西北植物学报, 34(1): 1-6.]

CHEN B, WANG YN, MA DW, et al., 2015. The antioxidant enzyme activities and their gene expression in maizeradicle under the allelochemical stress from *Chenopodium ambrosioides* L. [J]. Ecol Environ Sci, 24(10): 1640-1646. [陈斌, 王亚男, 马丹炜, 等, 2015. 土荆芥化感胁迫对玉米幼根抗氧化酶活性和基因表达的影响 [J]. 生态环境学报, 24(10): 1640-1646.]

Chinese Academy of Sciences, Shanghai Institute of Plant Physiology, 1999. Modern plant physiology experiment instruction [M]. Beijing: Science Press. [中国科学院上海植物生理研究所, 1999. 现代植物生理学实验指导 [M]. 北京: 科学出版社.]

CHU MY, YU YC, 2019. The research progress of factors affecting plant leaf senescence [J]. Chin Bull Life Sci, 31(2): 178-184. [初梦圆, 于延冲, 2019. 影响植物叶片衰老因素的研究进展 [J]. 生命科学, 31(2): 178-184.]

COLETTE A, BOCHDANOVITS Z, JANSWEIJER VMA, et

al., 2011. Probing the roles of LRR RLK genes in *Arabidopsis thaliana* roots using a custom T-DNA insertion set [J]. Plant Mol Biol, 76(1): 69-83.

DIÉVART A, CLARK SE, 2004. LRR-containing receptors regulating plant development and defense [J]. Development, 131(2): 251-261.

GAO HT, WANG YH, MENG ZY, et al., 2010. Study on grain yield and physiological characteristics of flag leaves in super high yield winter wheat [J]. J Triticeae Crops, 30(6): 1080-1084. [高海涛, 王育红, 孟战赢, 等, 2010. 超高产小麦产量及旗叶生理特性的研究 [J]. 麦类作物学报, 30(6): 1080-1084.]

HASHIMOTO H, KURA-HOTTA M, KATOH S, 1989. Changes in protein content and in the structure and number of chloroplasts during leaf senescence in rice seedling [J]. Plant Cell Physiol, 30(5): 707-715.

HE K, GOU XP, YUAN T, et al., 2007. BAK1 and BKK1 regulate brassinosteroid-dependent growth and brassinosteroid-independent cell death pathways [J]. Curr Biol, 17(13): 1109-1115.

HUNER NPA, AQUIST G, SARHAN F, 1998. Energy balance and acclimation to light and cold [J]. Trends Plant Sci, 3(6): 224-230.

HUNER NPA, MAXWELL DP, GRAY GR, et al., 1996. Sensing environmental temperature change through imbalances between energy supply and energy consumption: Redox state of photosystem II [J]. Physiol Plant, 98(2): 358-364.

LÜ LT, 2018. Causes and measures of summer soybean premature senescence [J]. Mod Agric Sci Technol, (4): 60. [吕林涛, 2018. 夏大豆早衰的原因及防治对策 [J]. 现代农业科技, (4): 60.]

MAJERAN W, WOSTRIKOFF K, WOLLMAN FA, et al., 2019. Role of ClpP in the biogenesis and degradation of rubisco and ATP synthase in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Plants (Basel), 8(7): 191.

MISRA AN, LATOWSKI D, STRZALKA K, 2011. Photosynthetic excitation pressure causes violaxanthin de-epoxidation in aging cabbage (*Brassica oleracea* L.) leaves [J]. J Life-Sci, 5: 182-191.

MITTLER R, VANDERAUWERA S, SUZUKI N, et al., 2011. ROS signaling: the new wave? [J] Trends Plant Sci, 16(6): 300-309.

MURCHIE EH, CHEN YZ, HUBBART S, et al., 1999. Interactions between senescence and leaf orientation determine in situ patterns of photosynthesis and photoinhibition in field-grown rice [J]. Plant Physiol, 119(2): 553-564.

ONO Y, WADA S, IZUMI M, et al., 2013. Evidence for contribution of autophagy to rubisco degradation during leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Cell Environ, 36(6): 1147-59.

OU ZY, PENG CL, LIN GZ, et al., 2003. Relationship

- between PS II excitation pressure and content of rubisco large subunit or small subunit in flag leaf of super high-yielding hybrid rice [J]. *Acta Bot Sin*, 45(8): 929-935.
- PEREZ IB, BROWN PJ, 2014. The role of ROS signaling in cross-tolerance: from model to crop [J]. *Front Plant Sci*, 5: 754.
- SHAH ST, PANG C, HUSSAIN A, et al., 2014. Molecular cloning and functional analysis of NAC family genes associated with leaf senescence and stresses in *Gossypium hirsutum* L. [J]. *Plant Cell Tiss Org*, 117(2): 167-186.
- SHIU SH, BLEECKER AB, 2003. Expansion of the receptor-like kinase/Pelle gene family and receptor-like proteins in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 132(2): 530-543.
- SLAMA I, ABDELLELY C, BOUCHEREAU A, et al., 2015. Diversity, distribution and roles of osmoprotective compounds accumulated in halophytes under abiotic stress [J]. *Ann Bot*, 115(3): 433-447.
- TANG G, LI X, LIN L, et al., 2015. Combined effects of girdling and leaf removal on fluorescence characteristic of *Alhagi sparsifolia* leaf senescence [J]. *Plant Biol*, 17(5): 980-989.
- WANG FB, LIU JC, CHEN MX, et al., 2016. Involvement of abscisic acid in PSII photodamage and D1 protein turnover for light-induced premature senescence of rice flag leaves [J]. *PLoS ONE*, 11(8): e0161203
- WANG J, LEISTER D, BOLLE C, 2015. Photosynthetic lesions can trigger accelerated senescence in *Arabidopsis thaliana* [J]. *J Exp Bot*, 66(21): 6891-6903.
- WANG YQ, CUI X, YANG B, et al., 2020. WRKY55 transcription factor positively regulates leaf senescence and the defense response by modulating the transcription of genes implicated in the biosynthesis of reactive oxygen species and salicylic acid in *Arabidopsis* [J]. *Development*, 147(16): dev189647.
- WEI L, LI X, HUANG ST, et al., 2019. Cloning and prokaryotic expression of receptor-like protein kinase gene *AhBAK1* in *Arachis hypogaea* [J]. *Guihaia*, 41(4): 573-588. [韦莉, 李霞, 黄舒婷, 等, 2019. 花生类受体蛋白激酶 *AhBAK1* 的克隆及原核表达 [J]. *广西植物*, 41(4): 573-588.]
- WOO HR, KIM HJ, NAM HG, et al., 2013. Plant leaf senescence and death-regulation by multiple layers of control and implications for aging in general [J]. *J Cell Sci*, 126(21): 4823-4833.
- WU YS, XUE H, LIU Y, et al., 2010. The study of senescence and fluorescence characteristic in leaves of stay-green wheat [J]. *Agric Res Arid Areas*, 28(4): 117-122. [武永胜, 薛晖, 刘洋, 等, 2010. 持绿型小麦叶片衰老和叶绿素荧光特征的研究 [J]. *干旱地区农业研究*, 28(4): 117-122.]
- XIA DD, BAI ZY, LIU B, et al., 2018. Changes of protective enzyme activities in leaves senescence of soybean cultivars bred at different ages in Jilin Province [J]. *Mol Plant Breed*, 16(1): 228-233. [夏冬冬, 白子裕, 刘冰, 等, 2018. 吉林省不同时期育成大豆品种叶片衰老中保护酶活性的变化 [J]. *分子植物育种*, 16(1): 228-233.]
- XIAO HG, YANG HW, RAO Y, et al., 2013. Photosynthetic characteristics and chlorophyll fluorescence kinetic parameters analyses of chlorophyll-reduced mutant in *Brassica napus* L. [J]. *Acta Agron Sin*, 39(3): 520-529. [肖华贵, 杨焕文, 饶勇, 等, 2013. 甘蓝型油菜黄化突变体的光合特性及叶绿素荧光参数分析 [J]. *作物学报*, 39(3): 520-529.]
- XIE J, WANG M, DING HY, et al., 2019. Expression and structural analysis of *ScmiR390-5p* and its target genes in potato response to low temperature [J]. *Sci Agric Sin*, 52(13): 2295-2308. [谢洁, 王明, 丁红映, 等, 2019. 马铃薯低温响应的 *ScmiR390-5p* 及其靶基因表达与结构分析 [J]. *中国农业科学*, 52(13): 2295-2308.]
- XUE T, LIU ZH, DAI XH, et al., 2017. Primary root growth in *Arabidopsis thaliana* is inhibited by the miR159 mediated repression of MYB33, MYB65 and MYB101 [J]. *Plant Sci*, 262: 182-189.
- ZENG JB, 2011. Construction of full-length cDNA library of *Nicotiana tabacum* and cloning and characterization of LRR receptor like protein kinase gene [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University. [曾建斌, 2011. 烟草全长 cDNA 文库的构建和 LRR 类受体蛋白激酶基因的克隆及表达分析 [D]. 福州: 福建农林大学.]
- ZHANG YH, XU F, JIANG TY, et al., 2019. Overexpression of rice *OsSAPP2* gene promotes leaf senescence in the transgenic *Arabidopsis* [J]. *J Shenyang Agric Univ*, 50(2): 129-137. [张艺函, 徐凡, 蒋太英, 等, 2019. 过表达水稻 *OsSAPP2* 基因促进转基因拟南芥叶片衰老 [J]. *沈阳农业大学学报*, 50(2): 129-137.]
- ZHOU F, GUO Y, QIU LJ, 2016. Genome-wide identification and evolutionary analysis of leucine-rich repeat receptor-like protein kinase genes in soybean [J]. *BMC Plant Biol*, 16(1): 58.
- ZHOU J, WANG P, CLAUS LAN, et al., 2019. Proteolytic processing of SERK3/BAK1 regulates plant immunity, development, and cell death [J]. *Plant Physiol*, 180(1): 543-558.
- ZHUANG RR, CHU WT, ZHAO SS, et al., 2018. Cloning and bioinformatics analysis of *AhLRPK1* gene in peanut [J]. *Mol Plant Breed*, 16(11): 3458-3467. [庄瑞蓉, 储文婷, 赵闪闪, 等, 2018. 花生 *AhLRPK1* 基因的克隆及生物信息学分析 [J]. *分子植物育种*, 16(11): 3458-3467.]