

茶树胞质型谷氨酰胺合成酶基因CsGS1s的克隆及表达分析

汤丹丹^{1,2}, 刘美雅^{2*}, 张群峰², 范凯², 石元值², 马立峰², 伊晓云², 倪康², 阮建云^{2*}

¹中国农业科学院研究生院, 北京100081

²中国农业科学院茶叶研究所, 农业部茶树生物学与资源利用重点实验室, 杭州310008

摘要: 谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)是植物氮素同化过程中的限速酶。本试验选取茶树(*Camellia sinensis*) ‘龙井43’为材料, 利用RACE法克隆得到3个茶树CsGS1s基因成员。序列分析显示CsGS1.1、CsGS1.2和CsGS1.3基因全长分别为1 634、1 482和1 398 bp, 其开放阅读框长度均为1 071 bp, 编码356个氨基酸; CsGS1s蛋白均为亲水性、非分泌蛋白, 定位在细胞质中且无跨膜结构。序列比对显示CsGS1.1s具有GS1基因家族的特征区域。系统进化树分析表明, CsGS1.1s与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、油菜(*Brassica napus*)、大麦(*Hordeum vulgare*)、水稻(*Oryza sativa*)以及玉米(*Zea mays*)的GS1表现出较近的亲缘关系。CsGS1s组织特异性表明, CsGS1.1和CsGS1.3在根部表达量最高, CsGS1.2主要在叶中表达, 但总体来看CsGS1.2在上述器官的表达丰度极低。利用实时荧光定量PCR对茶树在不同氮源处理下的表达进行检测, 结果表明, 在茶树叶中, CsGS1.1的表达量主要在NO₃⁻处理后期才显著提高, 而CsGS1.2和CsGS1.3的表达量则主要受NH₄⁺处理的影响; 在茶树根中, CsGS1s的表达水平受铵态氮的诱导显著高于硝态氮, 尤其是CsGS1.1和CsGS1.2。

关键词: 茶树; CsGS1s; NH₄⁺; NO₃⁻; 表达模式

氮素是植物生长发育必需的营养元素, 也是植物体内蛋白质、核苷酸和某些生长激素的重要组分, 直接影响着植物光合作用以及根系、成熟叶和新梢的生长发育过程(Arnold 2015)。茶树是我国多年生木本植物, 也是重要的叶用经济作物, 相比其它植物, 它对氮素营养的需求量更大。氮素营养与茶树生长发育、茶叶产量及茶叶品质成分氨基酸、茶多酚、咖啡碱等关系密切, 会在很大程度上影响茶叶滋味、香气(Ruan等2007b; 杜旭华2009; 苏有健等2011)。一般每年需300~450 kg·hm⁻²纯氮, 才能保证茶树对氮素的正常需求(马立峰等2013)。植物从土壤中吸收的无机态氮素主要是铵态氮和硝态氮(Krapp等2014), 而茶树是典型的“喜铵植物”, 对铵态氮的吸收利用效率显著高于硝态氮(Ishigaki 1974; Ruan等2007a, 2007b, 2016; 杨亚军2005; Yang等2013), 造成这种差异的原因, 可能是由于茶树对不同氮源的吸收利用机制存在差异。但是, 目前木本植物对不同氮素形态的响应及偏性利用机制尚未有全面的报道(杜旭2011), 茶树亦是如此。在茶树氮素偏性吸收研究中, 研究者尝试从茶树对铵态氮和硝态氮的吸收动力学角度来解析其氮素利用差异, 发现茶树对铵态氮的吸收效率高于硝态氮(Ruan等2007a, 2016; Yang等2013), 但是上述研究不能很好地解释造成茶树对铵态氮和硝态氮同化机制差异的原因。

众所周知, 植物将无机态氮转化形成氨基酸须经过谷氨酰胺合成酶/谷酰胺- α -酮戊二酸氨基转移酶(GS/GOGAT)循环, 此循环是植物氮素利用的关键环节, 在此过程中谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)是限速酶(Lea和Mifflin 1974; Bernard和Habash 2009)。高等植物GS主要有两种, 即定位在细胞质的胞质型GS (GS1)和定位在叶绿体的质体型GS (GS2) (Mifflin和Habash 2002; Weber和Flugge 2002)。GS1由多基因编码, 主要负责同化从土壤吸收的初级铵态氮及再同化植物氮循环途径中释放的铵, 在根、茎、叶等组织中都广泛存在, 生物学功能广泛(Ishiyama等2004a, b; Yamaya和Kusano 2014); 而GS2由单基因编码, 主要将叶绿体和光呼吸再合成的NH₄⁺转化成谷氨酰胺, 其功能相对保守(Bernard和Habash 2009)。GS1一直是植物生理学和营养学方面的研究热点, 目前拟南芥(Ishiyama等2004a; Guan等2015)、水稻(Yamaya和Kusano 2014)等很多物种中均有GS1家族成员的

收稿 2017-06-27 修订 2017-12-04

资助 国家自然科学基金(31700614)、浙江省自然科学基金(LQ15C150004)、国家重点研发计划项目(2016YFD-0200901)和中国农业科学院科技创新工程(CAAS-ASTIP-2017-TRICAAS)。

* 共同通讯作者: 阮建云(jruan@mail.tricaas.com)、刘美雅(liumeiya@tricaas.com)。

相关研究报道。研究表明在拟南芥、水稻等植物中 NO_3^- 、 NH_4^+ 等氮素形态都会不同程度地影响GSIs基因的表达(Ishiyama等2004a, 2004b; Goodall等2013; Yamaya和Kusano 2014)。

目前在茶树的相关水培和盆栽试验均显示, 氮素处理能提高茶树根系和叶片GS酶活性, 不同氮素形态影响情况不同(Ruan等2007a; Du等2015)。基于前期报道的茶树氮素吸收利用的生理生化基础, 我们推测GS编码基因成员与茶树氮素偏性吸收具有高度相关性。但是茶树中有关GS基因的研究报道相对较少。目前Rana等(2008a, 2008b, 2010)对CsGS1进行了简单的报道, 仅限于其在ABA、SA、盐胁迫和不同发育期的表达模式。日本学者Tanaka和Taniguchi仅仅克隆了CsGS1;1 (AB115183.1)、CsGS1;2 (AB115184.1)和CsGS1;3 (AB117934)基因, 但并没有相关研究被报道。史成颖等通过构建茶树幼根cDNA文库获得2条EST序列GS1-1和GS1-2, 同时克隆了GS1-2的全长并进行分析(史成颖2011; Shi等2011; 史成颖等2017)。迄今为止, 茶树GS1家族成员相关研究并不深入, 茶树中是否还有其它GS1基因成员, GS1基因家族成员功能以及它们对不同氮素响应情况均不明了。

本试验以茶树‘龙井43’为材料, 通过RACE法克隆得到3个CsGS1家族成员, 并进行了生物信息学分析, 同时分析了其在茶树‘龙井43’不同组织和不同氮源处理下的表达模式。本研究为进一步阐述茶树氮素偏性吸收及提高氮素利用效率提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与处理

供试材料为茶树栽培种‘龙井43’ [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. cv. Longjing43]一年生扦插苗。选取生长状况相似的一年生扦插苗, 根部土壤清洗干净后将其放置在中国农业科学院茶叶研究所人工气候室中于纯净水中通水培7 d, 随后移至营养液(Ruan等2007a)中通水培。营养液每周更换1次。人工气候室条件: 光照14 h/黑暗10 h、温度25°C、湿度70%; 营养液pH约为0.5, 用小型通气泵全天24 h通气, 保证根部氧气量。

培养6周后, 待茶苗长势良好时分成2组, 分别转入含1.5 mmol·L⁻¹ (NH₄)₂SO₄ (以铵态氮NH₄⁺为唯

一氮源)或3 mmol·L⁻¹ KNO₃ (以硝态氮NO₃⁻为唯一氮源)的营养液中, 其它营养液成分按完全营养液浓度加入, 其它条件不变。分别在处理0、2、4、6、8、10、12、24和48 h后取样, 每个时间点取4株茶苗, 分别取地上部(叶片)和地下部(嫩根), 于清水中洗净, 擦干后转入液氮中, 然后保存于-80°C冰箱备用。

1.2 茶树总RNA提取与cDNA合成

取0.1 g茶树‘龙井43’叶片, 采用RNAprep pure多糖多酚植物总RNA提取试剂盒(Tiangen, 北京)进行总RNA的提取; 茶树根部总RNA采用改进后的CTAB法提取(Chang等1993; Muoki等2012)。NanoDrop 2000微量核酸蛋白测定仪测定所提取RNA质量及浓度, 同时用1.2%琼脂糖凝胶电泳检测总RNA完整性。采用Prime Script RT reagent Kit (TaKaRa, 大连)将每个时间点根叶的总RNA反转录成cDNA, 用于基因表达分析。

1.3 CsGS1家族成员的克隆与序列分析

根据SMARTer RACE cDNA Amplification Kit (Clontech)使用手册进行CsGS1家族成员的克隆。RACE引物设计根据课题组前期获得的GS1 unigenes序列, 采用Primer Premier 5.0软件进行, 引物序列详见表1。用KOD Fx Neo体系进行PCR扩增, PCR产物经1.2%琼脂糖凝胶电泳检测后, 用Mini-BEST Agarose Gel DNA Extraction Kit进行纯化回收, 回收产物连接至pMD18-T载体(TaKaRa, 大连), 经热激转化法转入大肠杆菌DH5α (Tiangen, 北京), 菌液PCR验证, 挑选4个以上阳性克隆的菌液送上海铂尚生物技术有限公司测序。

1.4 生物信息学分析

经测序所得的核苷酸序列, 通过NCBI blast比对确定测序结果的准确性, 利用DNAMAN软件对所得CsGS1s cDNA全长进行ORF查询并推导其所编码的氨基酸序列。利用ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)在线软件推导蛋白质相对分子质量、理论等电点等基本理化性质, 使用NCBI中Blastp工具对推导获得的蛋白质序列进行同源性搜索。跨膜结构域通过MHMM服务器分析。蛋白亲/疏水性、信号肽、亚细胞定位等通过ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>)、SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)、ProtCompVersion 9.0 (<http://linux1.softberry.com/berry>).

表1 CsGSIs基因家族克隆RACE引物序列

Table 1 Sequences of RACE primers to isolate the cytosolic glutamine synthetase gene family

基因	5' RACE (5'→3')	3' RACE (5'→3')
<i>CsGS1.1</i>	CTAGATCCGTCATAATTCCACTTTGGAA	GGACGACATGAGACCGCCGACATCAA
<i>CsGS1.2</i>	GCAGGGCACAATCTCAAAGAGTGTA	GGTGAAGGCAACGAGCGTCGTCTCACT
<i>CsGS1.3</i>	CTTTGAAGGATCAGAGACTGGTGCATT	GGCAATGAGCGTCGGCTTACAGGAAAGCAC
<i>UPML</i>	TAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	

phtml)进行。序列比对使用Clustalx 2.0软件进行; 利用MEGA 7.0软件, 采用邻位法构建系统进化树, bootstrap值设置为1 000。

1.5 CsGS1家族成员在不同组织中的表达特性分析

以‘龙井43’的叶、茎、根为材料, 用定量PCR和半定量PCR对不同组织CsGSIs成员进行表达分析。荧光定量qRT-PCR特异引物见表2, 内参基因为*GAPDH*。按照SYBR Premix Ex Taq试剂盒(TaKaRa, 大连)的操作说明来进行实时荧光定量PCR (quantitative real time RT-PCR), 反应体系为: SYBR Premix Ex Taq 10 μL, 上、下游引物(10 μmol·L⁻¹)各0.8 μL, ROX Dye II 0.4 μL, cDNA 2 μL, 加ddH₂O至终体积20 μL。ABI7500实时荧光定量PCR仪作为qRT-PCR的平台, 反应程序: 95°C预变性30 s; 95°C变性5 s, 60°C退火延伸34 s, 40个循环; 每个样品生物学重复3次, 结果采用2^{-ΔΔCt}算法(Schäffer等2001)来计算。

1.6 CsGSIs成员对不同氮源的响应

以试验处理每个样品RNA反转录成的cDNA为模板, 采用qRT-PCR对不同氮源处理下茶树CsGSIs表达进行分析。qRT-PCR所用引物、反应体系等同上述1.4节。以未做处理的茶树叶、根中CsGSIs相对表达量为参照。

1.7 数据分析

对照组为未做处理的茶苗叶、根; 实验组为不同氮源下的茶苗叶、根。每个样本设置3组重复试

验。显著性分析使用SPSS 18.0 one-way ANOVA ($P \leq 0.05$), 利用SigmaPlot 12.5作图。

2 实验结果

2.1 CsGSIs基因cDNA全长的获得

基于课题组前期获得的茶树‘龙井43’转录组数据(Liu等2017), 结合NCBI数据库序列比对发现, 3个*CSGS1* unigenes序列与其他物种的*GS1*具有高度同源性, 根据此三条序列设计特异引物进行RACE克隆。结果显示: 茶树*CsGS1.1*、*CsGS1.2*和*CsGS1.3*基因全长分别为1 634、1 482和1 398 bp, 其中开放阅读框长度均为1 071 bp, 共编码356个氨基酸。值得注意的是, 本研究中获得3条CsGSIs序列, 分别为*CsGS1.1* (KY649469)、*CsGS1.2* (KY649470)、*CsGS1.3* (KY649471)。我们将其核苷酸序列与在NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上已登录的其他茶树栽培种的核苷酸序列*CsGS1;1* (AB115183.1)、*CsGS1;2* (AB115184.1)、*CsGS1;3* (AB117934)、*GS1-2* (JQ925873.1)以及*CsGS* (EF055882.1)进行比对, 发现它们的核苷酸序列存在很大不同, 特别是对基因表达起重要调控作用的非翻译区3'/5' UTR区域序列存在差异较大。

2.2 CsGSIs基因生物信息学分析

2.2.1 CsGSIs编码蛋白理化性质分析

CsGSIs编码蛋白基本理化性质见表3。ProtScale Sever对3个蛋白进行亲/疏水性预测, 根据正值

表2 CsGSIs基因的荧光定量引物序列

Table 2 Primer sequences used for qRT-PCR of cytosolic glutamine synthetase isogenes

基因	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
<i>qRTCsGS1.1</i>	GGTGGTGAGCCAATTCCAACAAAC	GTCCCTGAGGTCCTGGAAAACCT
<i>qRTCsGS1.2</i>	CTACCACCATCCTGTGGAAACCAT	GGGAGGAGGTCACCTTACTACTTGAA
<i>qRTCsGS1.3</i>	CACTATGTCTCTTCTTTCCGATCTTTG	CCATCGTAGTTCATTGTGGTAA
<i>qRTGAPDH</i>	TTGGCATCGTTGAGGGTCT	CAGTGGGAACACGGAAAGC

表3 *CsGSIs*编码的氨基酸序列的理化特性Table 3 Physicochemical characterization of amino acid sequences of *CsGSIs*

茶树GS1蛋白	氨基酸数/个	相对分子量/kDa	理论等电点	带负电荷的氨基酸(Asp+Glu)	带正电荷的氨基酸(Arg+Lys)	不稳定指数	平均疏水性值
CSGS1.1	356	39.250	5.79	44	39	42.63 (不稳定)	-0.414
CSGS1.2	356	39.240	6.13	44	41	37.25 (稳定)	-0.464
CSGS1.3	356	39.204	5.52	44	37	45.85 (不稳定)	-0.414

越大,疏水性越高;负值越小,亲水性越高判断,结果显示*CsGSIs*基因编码的蛋白均为亲水性蛋白。SignalP预测显示*CsGSIs*基因编码的蛋白均无信号肽输出位点,属于非分泌蛋白。WoLF PSORT预测*CsGSIs*基因编码的蛋白主要定位在细胞质内;跨膜螺旋结构域预测显示*CsGSIs*基因编码的蛋白均无跨膜区(TMs),这一预测结果与其定位在细胞质内相符。

2.2.2 *CsGSIs*序列比对和进化树分析

将*CsGSIs*编码的氨基酸序列与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻(*Oryza Sativa*)、大麦(*Hordeum vulgare*)、小麦(*Triticum aestivum*)、油菜(*Brassica napus*)和玉米(*Zea mays*) 6个代表性物种中的*GSIs*编码氨基酸进行序列多重比对。结果(图1)显示,序列之间具有较高同源性;保守区域分析发现这三个基因所编码的蛋白属于GS1蛋白家族。

为了进一步了解*CsGSIs*与其它物种之间基因的进化关系,进行了进化树的构建。结果(图2)显示,*CsGS1.1*、*CsGS1.2*、*CsGS1.3*与拟南芥*AtGln1;5*、油菜*BnGln1;5*、大麦*HvGS1;3*、水稻*OsGS1;3*以及玉米*ZmGS1;3*处于同一大分支,说明它们之间亲缘关系较近。

2.3 茶树*CsGSIs*成员的组织特异性

在水培条件下,‘龙井43’*CsGSIs*家族成员在根茎叶中表达情况如图3所示。3个成员之间表达丰度相比,*CsGS1.2*在根、茎及叶中相对表达量都很低,显著低于*CsGS1.1*和*CsGS1.3*。从组织部位来看,*CsGS1.1*在新根中表达量显著高于叶片,在茎中表达量最低,且差异显著;*CsGS1.2*在叶中表达量显著高于根、茎;*CsGS1.3*在根中表达量显著高于叶和茎。

2.4 不同氮源处理下茶树*CsGSIs*的表达模式

*CsGSIs*家族成员在含单一氮源 NH_4^+ 或 NO_3^- 处理下的表达情况如图4所示,将未做处理(0 h)的茶苗新根、地上部叶片相对表达量设为1。

在茶树叶片中,只在 NO_3^- 处理48 h时,*CsGS1.1*的相对表达量显著提高了2.21倍,且并不受 NH_4^+ 的诱导;相反地,在根中*CsGS1.1*的表达只在 NH_4^+ 处理48 h时达到最高,而不受 NO_3^- 的影响。有意思的是,无论是在叶片还是根中,*CsGS1.2*的表达只受 NH_4^+ 的影响,在 NO_3^- 处理时其表达变化并不显著。 NH_4^+ 对叶片中*CsGS1.2*的诱导表达在处理早期就达到极显著,处理8 h的表达量最高,比未处理时提高了7.87倍;而其对根中*CsGS1.2*的诱导表达则处于后期,处理48 h的表达量极显著增强。另外,*CsGS1.3*的表达只有在叶片中才受 NH_4^+ 的影响,在根中其表达量在两种氮源处理下均低于未处理时的表达量。

3 讨论

本研究通过对茶树*GS1*基因家族成员的克隆,得到3个编码356个氨基酸的*CsGSIs*基因,这三者核苷酸序列与其编码氨基酸序列不完全相同,它们是*CsGSIs*的3个成员,且与已登录的茶树其他栽培种的核苷酸序列不同,特别是对基因表达起重要调控作用的非翻译区3'/5' UTR区域序列差异较大。不同物种GS1编码基因一般有3~5个成员(Swarbreck等2011),拟南芥有5个*GS1*基因成员(Ishiyama等2004a),水稻有3个*GS1*基因成员(Yamaya和Kusano 2014),木本植物欧洲大叶杨有3个*GS1*基因成员(Castro-Rodriguez等2011)。*CsGSIs*编码氨基酸序列与其他植物中*GSIs*编码氨基酸序列具有较高的同源性,属于胞质型谷氨酰胺合成酶家族。生物学信息显示:*CsGSIs*编码蛋白为亲水性蛋白,均无跨膜区(TMs),无信号肽输出位点,是非分泌蛋白,预测其主要定位在细胞质内,与实际研究报道一致(Cren等1999)。

组织表达特性研究显示,茶树*CsGS1.1*在‘龙井43’叶、茎、根中均有表达,而且在根中表达量

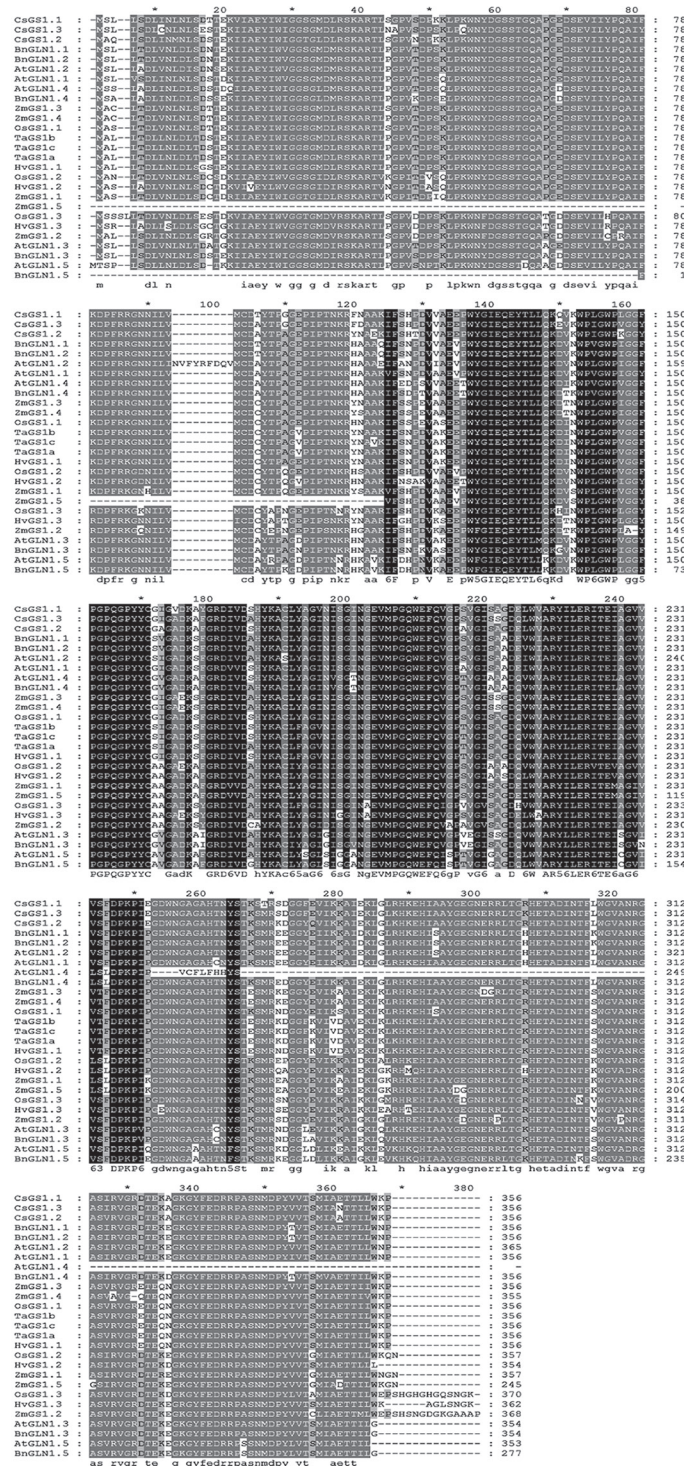


图1 CsGS1s编码的氨基酸序列与其他物种GS1s的多重比对

Fig.1 Multiple alignment of the amino acid sequences of CsGS1s with other species

上述蛋白的登录号为BnGLN1.1 (CAA54151.1), BnGLN1.2 (CAA73063.1), BnGLN1.3 (AGC24236.1), BnGLN1.4 (AGC24239.1), BnGLN1.5 (A0A078IIA5), AtGLN1.1 (AT5G37600), AtGLN1.2 (AT1G66200), AtGLN1.3 (AT3G17820), AtGLN1.4 (AT5G16570), AtGLN1.5 (AT1G48470), ZmGS1.1 (NP_001105538.1), ZmGS1.2 (NP_001105443.2), ZmGS1.3 (NP_001105296.1), ZmGS1.4 (NP_001105444.2), ZmGS1.5 (NP_001105297.2), OsGS1.1 (XP_015626102.1), OsGS1.2 (XP_015631679.1), OsGS1.3 (XP_015628694.1), TaGS1a (AAZ30057.1), TaGS1b (AAZ30058.1), TaGS1c (AAZ30059.1), HvGS1.1 (AFX60875.1), HvGS1.1 (AFX60876.1), HvGS1.1 (AFX60877.1)。

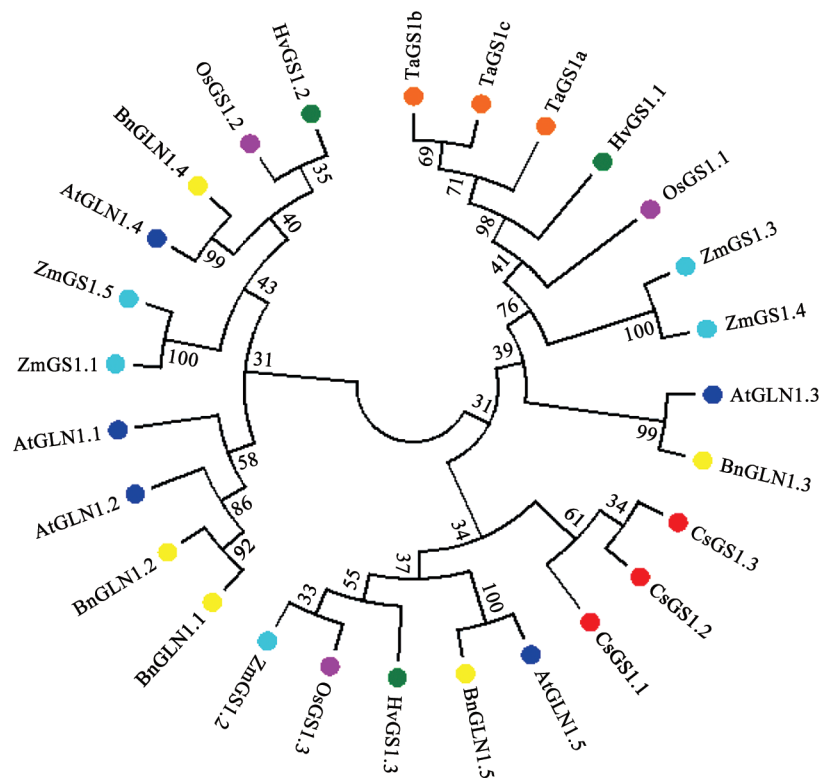


图2 *CsGSIs*编码氨基酸和其他植物GSI蛋白氨基酸序列的进化树

Fig.2 Phylogenetic analysis of *CsGSIs* and *GSIs* from other plant species

Cs: 茶树; Os: 水稻; At: 拟南芥; Ta: 小麦; Hv: 大麦; Zm: 玉米; Bn: 油菜。

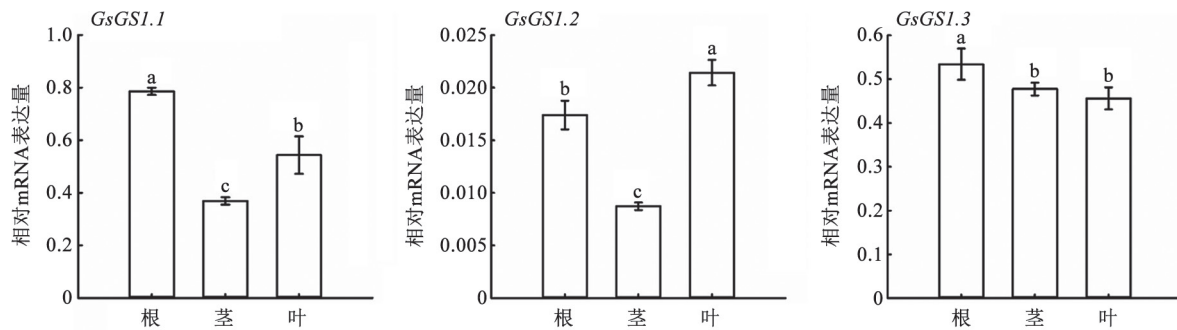


图3 茶树*CsGSIs*的组织特异性

Fig.3 Tissue specificity of *CsGSIs* in tea plant

不同小写字母表示差异达显著水平($P \leq 0.05$)。

显著高于叶、茎,在茎中表达量最低,这一结果与其他物种中报道的一致。欧洲大叶杨*PtGS1.1*在成熟叶、茎、新根中均有表达,而且在成熟叶片和新根中表达量较高,在茎中表达量最低(Castro-Rodríguez等2011)。Tabuchi等(2005)在水稻中发现*OsGS1.1*主要定位在根部和成熟叶片的维管束中。此外,拟南芥中*GLN1.1*主要定位在根伸长区表皮

细胞中(Guan等2015)。*CsGS1.2*在叶中表达量最高,其次是根,茎中表达量最低,但是它在各组织中表达量均很低。研究显示拟南芥*GLN1.2*定位在成熟叶片中,主要负责同化地上部由 NO_3^- 还原产生的 NH_4^+ (Lothier等2011; Guan等2016),而水稻中*OsGS1.2*则主要在根中发挥作用(Funayama等2013)。杨树*PtGS1.2*在次生根中表达量最高,成熟叶(叶柄

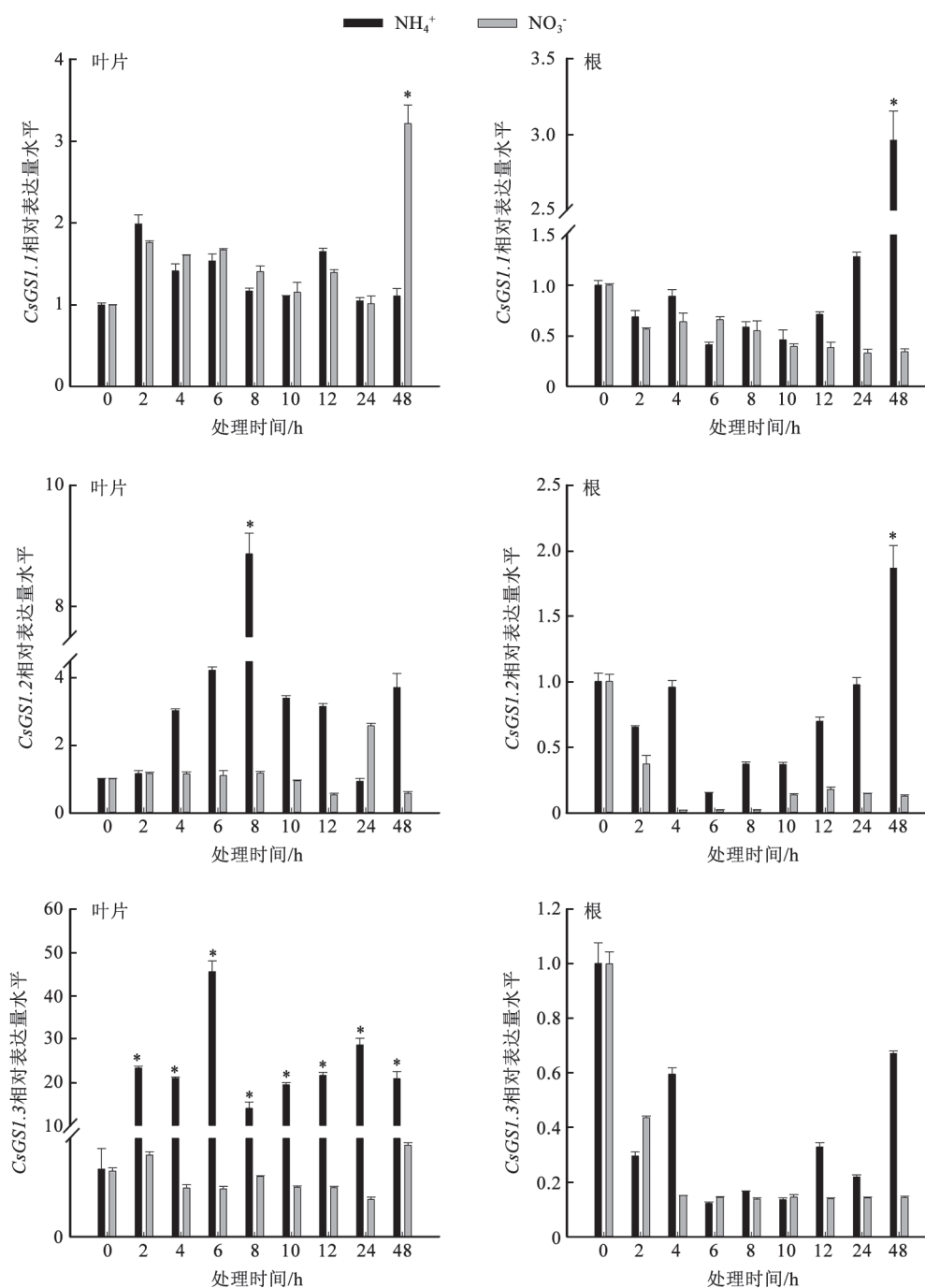


图4 不同氮素处理下茶树叶和根中*CsGSIs*表达情况

Fig.4 The expression levels of *CsGSIs* under different nitrogen treatments

*表示不同处理间差异达显著水平($P \leq 0.05$)。

和茎)中表达量是根中的一半左右(Castro-Rodríguez等2011)。Rana等(2008a, 2010)克隆了一条*CsGS*, 其氨基酸序列与我们*CsGS1.2*仅存在2个氨基酸的差异(第2、3位), 而且它在顶芽中表达量最高。最后, *CsGS1.3*在根茎叶各组织中表达量均较高, 主

要在根中表达。相关研究表明杨树*PtGS1.3*在地上部分和根部均有较高表达量(Castro-Rodríguez等2011); 拟南芥*GLN1.3*主要在根部维管组织中表达, 在水稻根和叶中均能检测到*OsGln1.3*表达(Zhao和Shi 2003)。由于生长环境(旱地/水田)等、对无机

态氮的偏性吸收不同以及适应机制不同等因素, 所以不同物种中*GSI*s成员在不同组织中表达情况也不尽相同。

氮素是植物生长最重要的营养元素之一, 也是调控*GSI*s基因表达的重要因子之一(于瑶等2012), 其中不同氮素形态对茶树氮素利用有很大的影响。本试验中, 叶片中*CsGSI.1*受 NO_3^- 的诱导, 在供应 NO_3^- 48 h后表达量显著提高, 其表达时间比较延后, 可能是因为 NO_3^- 需要经过维管束的运输从根部到达叶部, 所以才产生这种差异。叶片中*CsGSI.2*被 NH_4^+ 处理诱导表达主要是在早期(处理4~12 h), 而根中*CsGSI.2*则在 NH_4^+ 处理48 h后才被诱导表达, 由此可知*CsGSI.2*在叶片和根中氮同化中均起到一定作用, 但是发挥的功能可能不相同。本试验在早上9:00取样, 光照周期为14 h/10 h, 因此12~24 h期间茶苗整体上处于黑暗状态, 24 h后*CsGSI.2*的受 NH_4^+ 诱导下调, 而在 NO_3^- 处理下上调, 结果显示*CsGSI.2*表达可能受到光照的影响; 因此我们推测*CsGSI.2*可能参与茶树氮素再利用和转运, 可能参与地上部光呼吸产生的 NH_4^+ 同化, 而此外, 它在黑暗中参与同化地上部 NO_3^- 还原产生的 NH_4^+ 。Rana等(2010)人也发现茶树离体顶芽*CsGS*基因受到氮素和光照调节。定位在拟南芥叶片中*AtGLN1;2*也参与同化地上部 NO_3^- 还原产生的 NH_4^+ (Ishiyama等2004a; Lothier等2011)。叶部*CsGSI.3*受 NH_4^+ 诱导短时间内表达量迅速提高, 但是根部*CsGSI.3*却始终受到抑制, 推测它可能主要参与茶树地上部叶片 NH_4^+ 同化利用, 在缓解叶片氨毒中起着重要作用。茶树根中*CsGSI.1/CsGSI.2*均在 NH_4^+ 处理较短时间内受到抑制, 到了后期才被诱导表达, 而且相关研究显示, 水稻根中*OsGSI;1*在 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 处理2 h表达也受抑制(Zhao和Shi 2003), 而且当水稻根中 NH_4^+ 含量升高时, *OsGSI;2*表达量显著提高(Ishiyama等2004b)。Ishiyama等(2004a)研究表明拟南芥根部的*AtGLN1;2*在高 NH_4^+ 处理24 h后被诱导表达量显著提高, 由此推测*CsGSI.1*和*CsGSI.2*在根部 NH_4^+ 的同化中起重要作用, 但是只有当根部先吸收 NH_4^+ 一段时间后, 根部细胞中 NH_4^+ 得到累积, 达到一定含量后, *CsGSI.1*和*CsGSI.2*才能被诱导表达, 然后开始根部氮素同化。在 NO_3^- 处理下, 根部*GSI*成员表达均受抑制,

可能由此造成茶树根系不能很好地利用硝态氮(Ruan等2007a)。茶树不同组织部位的*GSI*s成员在不同氮源下表达模式不同, 从而造成它们在茶树氮素吸收利用中所起的具体作用及功能的差异, 而且很多研究也表明它们各自的功能是特异的且不能被替代(Funayama等2013; Guan等2016)。

本研究通过RACE克隆了胞质型谷氨酰胺合成酶基因*CsGSI*s三个成员的cDNA全长, 对其进行生物信息学分析, 同时采用qRT-PCR技术对其在不同组织中及不同氮素形态下的表达模式进行了分析, 了解了它们在不同组织、不同氮源下的作用差异, 为茶树偏性吸收提供了一定的研究基础。然而有关茶树*GSI*成员的具体功能, 以及深入分析还需通过细胞学定位、愈伤组织技术、转基因技术等试验进行进一步的研究和证实。

参考文献(References)

- Arnold JB (2015). The increasing importance of distinguishing among plant nitrogen sources. *Plant Biol*, 25: 10–16
- Bernard SM, Habash DZ (2009). The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. *New Phytol*, 182 (3): 608–620
- Castro-Rodríguez V, García-Gutiérrez A, Canales J, et al (2011). The glutamine synthetase gene family in populus. *BMC Plant Biol*, 11: 119
- Chang SJ, Jeff P, John C (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol Biol Rep*, 11 (2): 113–116
- Cren M, Hirel B (1999). Glutamine synthetase in higher plants regulation of gene and protein expression from the organ to the cell. *Plant Cell Physiol*, 40 (12): 1187–1193
- Du XH (2009). Research on the effect of nitrogen form on growth physiology and nitrogen absorption-utilization in four tea varieties (*Camellia sinensis* L.) (dissertation). Nanjing: Nanjing Forestry University (in Chinese with English abstract) [杜旭华(2009). 氮素形态对茶树生长及氮素吸收利用的影响(学位论文). 南京: 南京林业大学]
- Du XH, Peng FR, Jiang J, et al (2015). Inorganic nitrogen fertilizers induce changes in ammonium assimilation and gas exchange in *Camellia sinensis* L. *Turk J Agric For*, 39 (1): 28–38
- Funayama K, Kojima S, Tabuchi-Kobayashi M, et al (2013). Cytosolic glutamine synthetase1;2 is responsible for the primary assimilation of ammonium in rice roots. *Plant Cell Physiol*, 54: 934–943
- Goodall AJ, Kumar P, Tobin AK (2013). Identification and expression analyses of cytosolic glutamine synthetase genes in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Cell Physiol*, 54:

- 492–505
- Guan M, Møller IS, Schjørring JK (2015). Two cytosolic glutamine synthetase isoforms play specific roles for seed germination and seed yield structure in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, 66 (1): 203–212
- Guan M, de Bang TC, Pedersen C, et al (2016). Cytosolic glutamine synthetase Gln1;2 is the main isozyme contributing to GS1 activity and can be up-regulated to relieve ammonium toxicity. *Plant Physiol*, 171 (3): 1921–1933
- Ishigaki K (1974). Comparison between ammonium-nitrogen and nitrate-nitrogen on the effect of tea plant growth. *Jarq-Jpn Arg Res Q*, 8: 101–105
- Ishiyama K, Inoue E, Watanabe-Takahashi A (2004a). Kinetic properties and ammonium-dependent regulation of cytosolic isoenzymes of glutamine synthetase in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 279 (16): 16598–16605
- Ishiyama K, Inoue E, Tabuchi M (2004b). Biochemical background and compartmentalized functions of cytosolic glutamine synthetase for active ammonium assimilation in rice roots. *Plant Cell Physiol*, 45: 1640–1647
- Krapp A, David LC, Chardin C, et al (2014). Nitrate transport and signalling in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, 65: 789–798
- Lea P, Mifflin B (1974). Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. *Nature*, 251: 614–616
- Liu MY, Burgos A, Zhang QF, et al (2017). Analyses of transcriptome profiles and selected metabolites unravel the metabolic response to NH_4^+ and NO_3^- as signaling molecules in tea plant (*Camellia sinensis* L.). *Sci Hortic*, 218: 293–303
- Lothier J, Gaufichon L, Sormani R, et al (2011). The cytosolic glutamine synthetase GLN1;2 plays a role in the control of plant growth and ammonium homeostasis in *Arabidopsis* rosettes when nitrate supply is not limiting. *J Exp Bot*, 62: 1375–1390
- Ma LF, Chen HJ, Shan YJ, et al (2013). Status and suggestions of tea garden fertilization on main green tea-producing counties in Zhejiang province. *J Tea Sci*, 33 (1): 74–84 (in Chinese with English abstract) [马立锋, 陈红金, 单英杰等(2013). 浙江省绿茶主产区茶园施肥现状及建议. *茶叶科学*, 33 (1): 74–84]
- Mifflin BJ, Habash DZ (2002). The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. *J Exp Bot*, 53: 979–987
- Muoki RC, Paul A, Kumari A, et al (2011). An improved protocol for the isolation of RNA from roots of tea (*Camellia sinensis* L.) O. Kuntze. *Mol Biotechnol*, 52: 82–88
- Rana NK, Mohanpuria P, Yadav SK (2008a). Cloning and characterization of a cytosolic glutamine synthetase from *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze that is upregulated by ABA, SA and H_2O_2 . *Mol Biotechnol*, 39 (1): 49–56
- Rana NK, Mohanpuria P, Yadav SK (2008b). Expression of tea cytosolic glutamine synthetase is tissue specific and induced by cadmium and salt stress. *Biol Plantarum*, 52 (2): 361–364
- Rana NK, Mohanpuria P, Kumar V, et al (2010). A CsGS is regulated at transcriptional level during developmental stages and nitrogen utilization in *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. *Mol Biol Rep*, 37 (2): 703–710
- Ruan L, Wei K, Wang LY, et al (2016). Characteristics of NH_4^+ and NO_3^- fluxes in tea (*Camellia sinensis*) roots measured by scanning ion-selective electrode technique. *Sci Rep*, 6: 38370
- Ruan JY, Gerendas J, Hardter R, et al (2007a). Effect of nitrogen form and root-zone pH on growth and nitrogen uptake of tea (*Camellia sinensis*) plants. *Ann Bot*, 99 (2): 301–310
- Ruan JY, Gerendas J, Hardter R, et al (2007b). Effect of root zone pH and form and concentration of nitrogen on accumulation of quality-related components in green tea. *J Sci Food Agric*, 87: 1507–1516
- Schäffer AA, Aravind L, Madden TL, et al (2001). Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements. *Nucleic Acids Res*, 29 (14): 2994–3005
- Shi CY (2011). Construction of an EST library of young roots of the tea plant (*Camellia sinensis*), and expression analysis of genes related to theanine synthesis (dissertation). Hefei: Anhui Agricultural University (in Chinese with English abstract) [史成颖(2011). 茶树幼根EST文库构建及茶氨酸代谢相关基因表达分析(学位论文). 合肥: 安徽农业大学]
- Shi CY, Li ZG, Xu Q, et al (2017). Clone and expression of GS homologue of tea plant (*Camellia sinensis*). *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 37 (1): 40–47 (in Chinese with English abstract) [史成颖, 李正国, 徐乾等(2017). 茶树谷氨酰胺合成酶同源基因的克隆及表达分析. *西北植物学报*, 37 (1): 40–47]
- Shi CY, Yang H, Wei CL (2011). Deep sequencing of the *Camellia sinensis* transcriptome revealed candidate genes for major metabolic pathways of tea-specific compounds. *BMC Genomics*, 12: 131
- Su YJ, Liao WY, Ding Y, et al (2011). Effects of nitrogen fertilization on yield and quality of tea. *Plant Nutri Fert Sci*, 17 (6): 1430–1436 (in Chinese with English abstract) [苏有健, 廖万有, 丁勇等(2011). 不同氮营养水平对茶叶产量和品质的影响. *植物营养与肥料学报*, 17 (6): 1430–1436]
- Swarbreck SM, Defoin-Platel M, Hindle M, et al (2011). New perspectives on glutamine synthetase in grasses. *J Exp Bot*, 62 (4): 1511–1522
- Tabuchi M, Sugiyama K, Ishiyama K, et al (2005). Severe reduction in growth rate and grain filling of rice mutants lacking OsGS1;1, a cytosolic glutamine synthetase1;1. *Plant J*, 42: 641–651

- Weber A, Flugge UI (2002). Interaction of cytosolic and plastidic nitrogen metabolism in plants. *J Exp Bot*, 53: 865–874
- Yamaya T, Kusano M (2014). Evidence supporting distinct functions of three cytosolic glutamine synthetases and two NADH-glutamate synthases in rice. *J Exp Bot*, 65 (19): 5519–5525
- Yang YJ (2005). *Tea Cultivation*. Shanghai: Science and Technology Press (in Chinese) [杨亚军(2005). 中国茶树栽培学. 上海: 科技出版社]
- Yang YY, Li XH, Ratcliffe RG, et al (2013). Characterization of ammonium and nitrate uptake and assimilation in roots of tea plants. *Russ J Plant Physiol*, 60 (1): 91–99
- Yu Y, Zhang HY, Du JW (2012). Research progress of glutamine synthetase gene in higher plants. *Shandong Agric Sci*, 44 (4): 15–19 (in Chinese with English abstract) [于瑶, 张汉尧, 杜建伟(2012). 高等植物谷氨酰胺合成酶基因的研究进展. 山东农业科学, 44 (4): 15–19]
- Zhao XQ, Shi WM (2003). Expression analysis of the glutamine synthetase and glutamate synthase gene families in young rice (*Oryza sativa*) seedlings. *Plant Sci*, 170: 748–754

Isolation and expression profiles of cytosolic glutamine synthetase genes *CsGSIs* in tea plant (*Camellia sinensis*)

TANG Dan-Dan^{1,2}, LIU Mei-Ya^{2,*}, ZHANG Qun-Feng², FAN Kai², SHI Yuan-Zhi², MA Li-Feng², YI Xiao-Yun², NI Kang², RUAN Jian-Yun^{2,*}

¹Graduate School, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

²Key Laboratory of Tea Plant Biology and Resources Utilization (Ministry of Agriculture), Tea Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310008, China

Abstract: Glutamine synthetase (GS) is the key enzyme which determines the process of nitrogen assimilation in plants. In this study, three cytosolic glutamine synthetase encoding genes (*GSI*) were isolated from *Camellia sinensis* cv. Longjing43 using RACE. The full cDNA length of *CsGSI.1*, *CsGSI.2* and *CsGSI.3* were 1 634, 1 482 and 1 398 bp, respectively and each had a 1 071 bp length open reading frame encoding a 356-amino acid protein. All these three genes *CsGSIs* encoded hydrophilic and non-secreted proteins which localized in the cytoplasm without transmembrane structure. Sequence alignment showed that the *CsGSI.1s* contained characteristic feature domains of *GSI*s family. The phylogenetic relationship indicated that *CsGSIs* and *GSI*s of *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*, *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa* and *Zea mays* were grouped into one clade. Analysis of *CsGSIs* tissue specificity in tea plant showed that *CsGSIs* were expressed in root, stem and leaf, interestingly, the transcription level of *CsGSI.2* was rather low. The expression level of *CsGSI.1/CsGSI.3* was highest in root while *CsGSI.2* was mainly expressed in the leaf. Furthermore, the expression patterns of *CsGSIs* in response to different nitrogen forms in tea plant were detected using quantitative real-time PCR analysis. In leaves, the transcription of *CsGSI.1* was just induced by nitrate until the 48 h treatment time point during the whole nitrogen treatment time course. Contrary, the expression of *CsGSI.2/CsGSI.3* was highly induced by ammonium and with a slight induction by nitrate. In roots, the response of *CsGSIs* to ammonium was rather higher than that of nitrate, especially for *CsGSI.1/CsGSI.2*.

Key words: tea plant (*Camellia sinensis*); *CsGSIs*; ammonium; nitrate; expression pattern

Received 2017-06-27 Accepted 2017-12-04

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31700614), the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (LQ15C150004), the National Key Research and Development Program of China (2016YFD0200901) and the Chinese Academy of Agricultural Sciences through Agricultural Sciences Innovation Project (CAAS-ASTIP-2017-TRICAAS).

*Co-corresponding authors: Ruan JY (jruan@mail.tricaas.com), Liu MY (liumeiya@tricaas.com).