

夏侯龙, 马丹妮, 张乐慧, 等. 过表达茶树自噬相关基因 *CsATG3b* 对拟南芥氮利用效率的影响[J]. 华中农业大学学报, 2023, 42(6): 127-137.
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2023.06.016

过表达茶树自噬相关基因 *CsATG3b* 对拟南芥氮利用效率的影响

夏侯龙, 马丹妮, 张乐慧, 黄玮, 赵华, 倪德江

果蔬园艺作物种质创新与利用全国重点实验室/华中农业大学园艺林学学院, 武汉 430070

摘要 为探究茶树自噬相关基因 *CsATG3b* 在茶树氮利用中的潜在作用, 从茶树中克隆了 *CsATG3b* 基因, 在拟南芥中验证其参与氮利用的功能。结果显示, *CsATG3b* 的表达水平随着茶树叶片成熟度的增加呈上升的趋势; 与野生型拟南芥相比, 低氮条件下, *CsATG3b* 过表达株系 (*CsATG3b*-OE) 的根冠比和氮含量显著增加; 过表达 *CsATG3b* 改变氮在植株体内的分配, 正常氮条件下促进氮向茎生部位分配, 低氮条件下促进氮向根系分配; 过表达 *CsATG3b* 株系在低氮条件下显著上调根中氮吸收与转运相关基因 *AtNRT1.1*、*AtNRT2.1*、*AtNRT2.2* 和莲座叶中氨基酸转运基因 *AtAAP1*、*AtAAP4*、*AtAAP6* 及自噬相关基因 *AtATG3*、*AtATG5*、*AtATG8b* 的表达水平; 过表达 *CsATG3b* 株系在正常氮条件下氮的积累增加, 在低氮条件下的氮利用效率显著提高。结果表明, 过表达 *CsATG3b* 能够通过调控拟南芥氮的吸收转运基因和自噬相关基因表达, 从而提高植株氮利用效率及耐低氮胁迫的能力。

关键词 茶树; *CsATG3b* 基因; 养分再移动; 氮利用效率

中图分类号 S571.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2023)06-0127-11

氮是茶叶关键品质成分如游离氨基酸、咖啡碱和香气形成的物质基础, 约占茶树全株干质量的 4.5%^[1]。提高氮肥施用量被广泛用作茶叶增产的主要手段, 倪康等^[2]调查发现我国大约有 30% 的茶园存在氮肥过量施用的问题。氮肥的过量施用带来了一系列负面影响, 如土壤和地下水污染、土壤酸化加剧土壤微生物多样性减少、茶树抵抗病虫害和不良环境的能力降低等, 严重影响茶园的可持续发展^[3-5]。因此, 合理施肥并提高茶树氮利用率是茶叶生产提质增效、减少环境不良影响和茶园可持续发展的重要途径。茶树体内氮的动态循环受到茶树生育及栽培管理措施影响, 提高茶树冠层成熟叶中的氮向幼嫩芽叶的转移和再利用是提高茶树氮素再利用的关键, 对提高茶叶产量和品质具有重要意义。

细胞自噬是一种保守的细胞生物过程, 通过降解细胞器或细胞质成分, 使其中含有的矿质元素在植物体内循环, 促进植物营养元素从衰老的源器官到库器官实现养分循环再利用^[6]。细胞自噬广泛发

生于植物生长发育的各个阶段, 在正常生长条件下, 基础水平的自噬对维持细胞内稳态是必需的^[7]。而在养分缺乏、干旱、高盐等多种逆境胁迫下, 植物则会通过自噬机制来维持自身的生长、发育和生存^[8]。自噬相关基因 (ATGs) 负责调控和执行细胞的自噬过程, ATG8-PE 系统是自噬体运输以及选择特定的自噬目标所必需的, 而 ATG3 在催化 ATG8 向吞噬膜中的磷脂酰乙醇胺 (PE) 转移的过程中起关键作用^[9]。茶树对养分需求表现为需求量大、持续性、阶段性等特点, 且易受茶园养分状况影响, 茶树体内的养分循环再利用有利于茶树高产稳产及适应逆境胁迫, 而细胞自噬在这一过程中发挥重要作用。目前, 细胞自噬在茶树氮胁迫条件下的生物学功能研究报道较少, Huang 等^[10]从茶树基因组中鉴定了 2 个 *CsATG3* 亚家族基因 *CsATG3a* 和 *CsATG3b*, 并在拟南芥中对 *CsATG3a* 参与氮利用的功能进行了鉴定。

在此基础上, 本研究克隆了茶树 *CsATG3b* 基因, 探讨了过表达 *CsATG3b* 对拟南芥在低氮和正常

收稿日期: 2023-10-08

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFD1000600); 国家自然科学基金项目 (32070376)

夏侯龙, E-mail: XiaHoul@webmail.hzau.edu.cn

通信作者: 赵华, E-mail: zhaohua@mail.hzau.edu.cn

氮条件下氮利用的影响,揭示茶树 *CsATG3b* 基因在提高茶树氮利用效率和增产中的潜在应用价值。

1 材料与方法

1.1 植物材料

茶苗:福鼎大白茶、黄旦、鄂茶 10 号、铁观音、利川红 1 号 5 个品种无性系茶树,均栽植于湖北省武汉市华中农业大学南湖茶园。

1.2 *CsATG3b* 基因的克隆及转化拟南芥植株

从茶树基因组数据库(TPIA)搜索 *CsATG3b* 基因编码序列,利用 primer5 设计 *CsATG3b* 基因特异性引物 *CsATG3b*-F 和 *CsATG3b*-R(表 1),以‘福鼎大

白茶’叶片的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,对目的条带进行胶回收纯化、连接 pTOPO 载体,转化大肠杆菌 DH5 α ,挑选单个阳性菌落送至武汉擎科创新生物科技有限公司完成测序,获得 *CsATG3b* 序列。

将扩增得到的 *CsATG3b* 全长序列用 *Xba* I 和 *Xho* I 双酶切后与 pBin35sRed 载体连接(引物见表 1),转化 GV3101 农杆菌。以农杆菌介导的方法通过蘸花浸染拟南芥^[11],转化的拟南芥种子通过红色荧光标记进行鉴定^[12],获得 T0 代拟南芥转化植株。继续培养拟南芥阳性植株,收取种子,直至获得 T3 代纯合株系。

表 1 所用的引物序列

Table 1 Primers used in this study

用途 Function	引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
基因克隆 Gene cloning	<i>CsATG3b</i>	F: ATGGTTCTGTCTCAGAAAG; R: GGCAGCTCCAGCACATAA
过表达载体构建 Overexpression vector construction	<i>CsATG3b</i> -OE	F: GCTCTAGAATGGTTCTGTCTCAG; R: TTCTCGAGTTATGTGCTGGAGCT
	<i>AtNRT1.1</i>	F: AAATCGTGCGAATGTTAC; R: ATAGACGGCGGTGGTTAG
	<i>AtNRT2.1</i>	F: CCATCTCTCGTGGATCTCTTTC; R: GTTGAGATTCTCCGGATGATAG
	<i>AtNRT2.2</i>	F: TCGTCACTGCCGTTGTA; R: CACGTTAGCCCTTCTTCA
	<i>AtAAP1</i>	F: GCATCGCTGTCCACCTTATTG; R: CTTGTTGTCTGGATAGTTTCTGTTGC
	<i>AtAAP4</i>	F: CGTACAAAGTCAACGTTTTTCAGAGC; R: ACTCCATCTCTCAACCTTCTCTGTG
实时荧光定量引物 qRT-PCR primer	<i>AtAAP6</i>	F: ACCAATTTTTTCAGTTCGTAGAGAGCC; R: ACCAATCTGAGGAAGTTGATACTAAAATC
	<i>AtATG3</i>	F: TCATCCACACTTGCTGGTA; R: CCGAGATCAAAGTCCATTGTG
	<i>AtATG5</i>	F: TAATCGCCCTGTTGAGTTCC; R: TCGACCATCTGCTTCTTCT:
	<i>AtATG8b</i>	F: TTGGCCAATTTGTGTACGTT; R: TCCACCAAATGTGTTCTCTCC
	<i>CsATG3b</i>	F: GCTGCTGGATGCGAAGT; R: CCTCCTCACCACCAAAG
	<i>AtGAPDH</i>	F: TTGGTGACAACAGGTCAAGCA; R: AAAGTTGTGCTCAATGCAATC
	<i>CsGAPDH</i>	F: TTGGCATCGTTGAGGGTCT; R: CAGTGGGAACACGGAAAAGC

1.3 植株生长条件与氮处理

取福鼎大白茶、黄旦、鄂茶 10 号、铁观音、利川红 1 号 5 个品种无性系茶树的第 1 叶(展叶 10 d, L1)、第 5 叶(展叶 30 d, L2)、成熟叶(展叶 180 d 以上, L3),所有样品经液氮速冻,保存于-80 °C,用于 RNA 提取和实时荧光定量 PCR。

将野生型和 *CsATG3b* 转基因拟南芥种子浸没在 1.5% 的次氯酸钠溶液中消毒 5 min 后,用蒸馏水冲洗 3 次,播种于 1/2 MS 固体培养基上,4 °C 春化 2 d 后置于生长室中培养,培养条件为 22 °C,14 h/10 h 光暗培养。14 d 后选择生长一致的幼苗转移至 1/2 Hoagland 营养液(pH=5.7)中培养 20 d,随后转移至正常氮(NN,5.0 mmol/L)和低氮(LN,0.25 mmol/L)

营养液中培养。不同氮处理 14 d 后取根、莲座叶和茎生部位(aerial part excluding rosette, APER)测定干物质质量和氮含量;同时,取以上不同氮水平处理植株的根尖和莲座叶,液氮冷冻后-80 °C 保存,用于 RNA 提取和实时荧光定量 PCR。

将野生型和 *CsATG3b* 转基因拟南芥种子用适量蒸馏水处理后 4 °C 条件下春化 2 d,然后播种至装有泥炭土的营养钵中,保证营养钵中土量基本一致。设置 2 个氮素水平,分别是正常氮(TNN,2 g/kg)和低氮(TLN,0.1 g/kg)。

1.4 RNA 提取和实时荧光定量 PCR 分析

使用多糖多酚植物通用总 RNA 快速提取试剂盒(ZH120,北京华越洋生物科技有限公司)提取茶树

RNA,使用PLANTpure通用植物总RNA快速提取试剂盒(RN3302,北京艾德莱生物公司)提取拟南芥总RNA,具体操作步骤见试剂盒说明书。采用反转录试剂盒(PC65,北京艾德莱生物公司)合成cDNA。以茶树 *CsGAPDH* 和拟南芥 *AtGAPDH* 作为内参基因,使用SYBR Green qPCR Mix试剂盒(PC33,北京艾德莱生物公司)在ABI荧光定量PCR仪上进行qRT-PCR分析。利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[13]计算各基因的相对表达量。基因特异性引物序列见表1。

1.5 拟南芥生物量、氮含量的测定及氮利用率

营养液培养的拟南芥,取样时分成根、莲座叶和茎生部位3部分。所有样品120℃杀青30min后80℃烘干至恒质量,称量各部分的干物质质量。样品研磨成粉后称取0.05g装入20mL消化管底部,用硫酸和过氧化氢消煮样品,使用流动注射分析仪(FIAstar 5000 analyzer,FOSS)测定消煮液的氮含量(以干物质质量计,mg/100mg),每个样品3次生物学重复。

基质土培养的拟南芥,在营养生长期对莲座叶(20d)进行取样,生殖生长结束后将植株分为种子和残茬2部分取样。干物质质量和氮含量的测定方法与营养液培养的拟南芥相同。

结合各部位干物质质量,计算各部位实际氮素积累量,并根据公式计算出相应的氮素利用效率。收获指数(harvest index, HI)=种子干质量/植株总干质量;氮收获指数(N harvest index, NHI)=种子氮含量/植株总氮含量;氮利用率(nitrogen utilization efficiency, NUtE)=种子干质量/植株总氮含量;氮利用效率(nitrogen use efficiency, NUE)=NHI/HI。

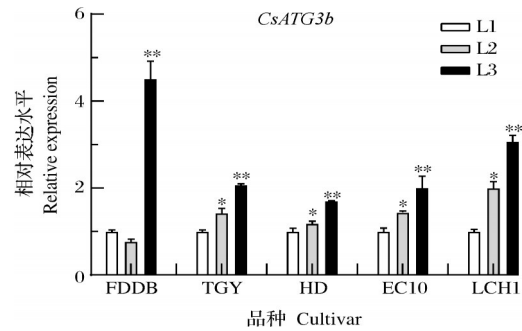
1.6 数据分析

使用Excel处理数据,Graphpad prism 8.0.2绘制图表,应用IBM SPSS Statistics 26对数据进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 茶树自噬相关基因 *CsATG3b* 在茶树不同成熟度叶片中的表达情况

茶树 *CsATG3b* 在不同成熟度的茶树叶片L1、L2和L3的表达水平检测结果显示(图1),除福鼎大白外的其余4个茶树品种中 *CsATG3b* 的表达量均随着叶片成熟度的增加而增加, *CsATG3b* 在成熟叶片中的表达量均显著高于其他叶片。



L1:正在展开的幼嫩叶;L2:展开30d的叶片;L3:展叶180d以上的叶片。茶树品种:福鼎大白(FDDDB)、铁观音(TGY)、黄旦(HD)、鄂茶10号(EC10)和利川红1号(LCHI)。*:差异显著($P<0.05$), **:差异极显著($P<0.01$),下同。L1:Developing leaves;L2:Newly developed leaves;L3:Mature leaves. Tea cultivars: Fudingdabaicha (FDDDB), Tieganyin (TGY), Huangdan (HD), Echa 10 (EC10) and Lichuanhong 1 (LCHI). * indicates a significant difference at 0.05 level; ** indicates significant difference at 0.01 level. The same as follows.

图1 *CsATG3b*基因在5个茶树品种不同成熟度叶片中的表达模式

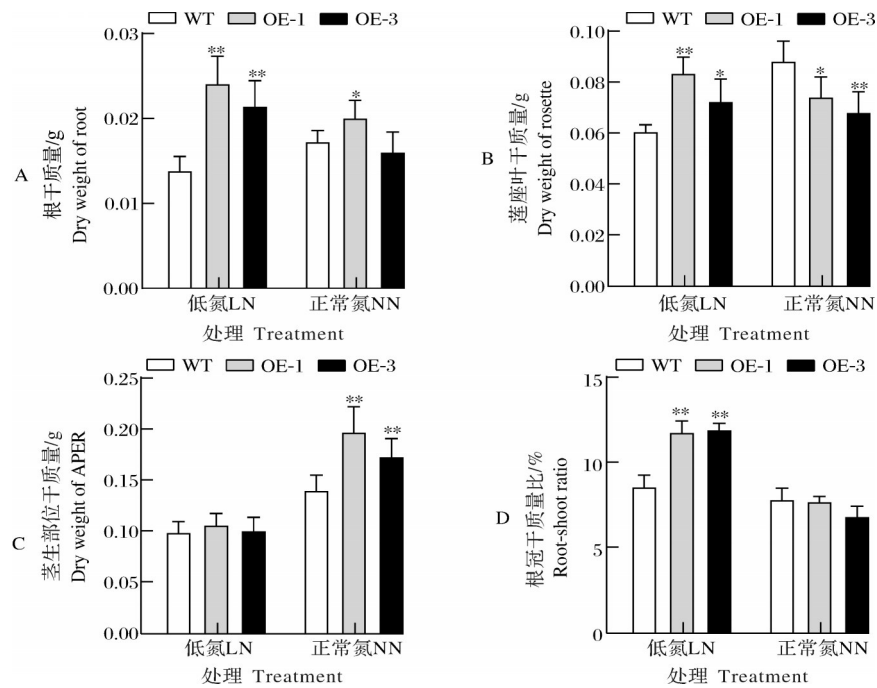
Fig.1 Expression patterns of *CsATG3b* in the leaves at gradient mature leaves of five tea plant cultivars

2.2 过表达 *CsATG3b* 对拟南芥株系各部位生物量的影响

利用转化获得的2个纯合的过表达株系 *CsATG3b*-OE-1(OE-1)和 *CsATG3b*-OE-3(OE-3)进行后续试验。在低氮(LN, 0.25 mmol/L)培养条件下, *CsATG3b*-OE株系根和莲座叶的干质量显著高于野生型(WT)植株(图2A、B),茎生部位的干质量与WT没有显著差异(图2C)。在正常氮(NN, 5.0 mmol/L)培养条件下, *CsATG3b*-OE-1株系根的干质量显著高于WT(图2A), *CsATG3b*-OE-3株系差异不显著; *CsATG3b*-OE株系的莲座叶干质量显著低于WT(图2B),茎生部位干质量显著高于WT(图2C)。进一步分析发现, LN条件下 *CsATG3b*-OE株系的根冠比较WT显著增加(图2D),表明在拟南芥中过表达 *CsATG3b* 可能通过促进根系生长提高植株对低氮胁迫的耐受性。

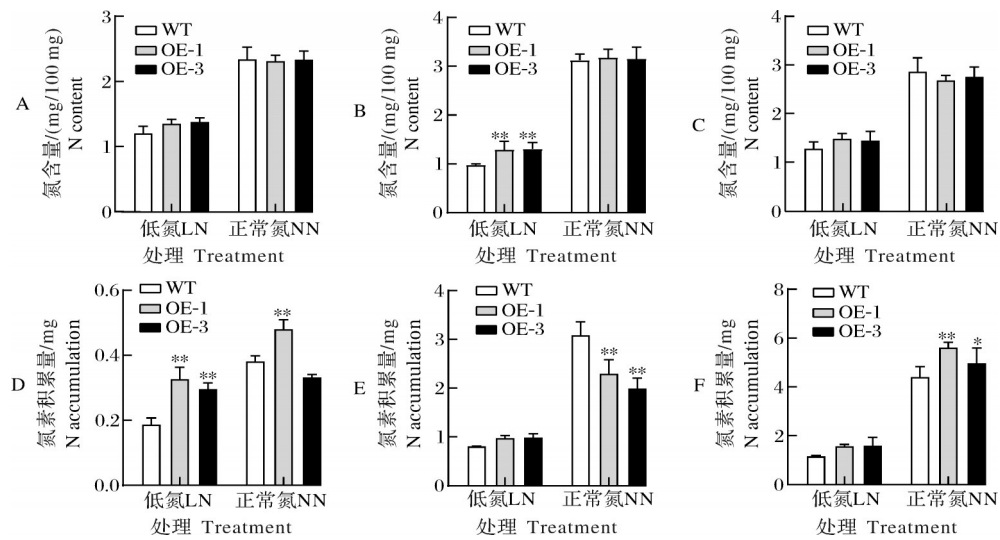
2.3 过表达 *CsATG3b* 对拟南芥各部位氮含量、氮素积累量和氮分配的影响

对根、莲座叶和茎生部位氮含量和氮素积累量的测定结果显示,根和茎生部位的氮含量在 *CsATG3b*-OE株系和WT之间无显著差异(图3A、C),莲座叶氮含量在LN条件下的显著高于WT,在



A: 根干质量 Dry weight of root; B: 莲座叶干质量 Dry weight of rosette; C: 茎生部位干质量 Dry weight of APER; D: 根冠干质量比 Root-shoot ratio.

图2 营养液培养条件下 *CsATG3b* 过表达株系与野生型拟南芥根、莲座叶及茎生部位干物质质量的比较
Fig.2 Comparisons of dry weight of root, rosette leaves or APER between *CsATG3b*-overexpressing lines and wild type *Arabidopsis* plants cultured in hydroponic nutrient solution



A: 根中氮含量; B: 莲座叶氮含量; C: 茎生部位氮含量; D: 根中氮素积累量; E: 莲座叶氮素积累量; F: 茎生部位氮素积累量。A: N content of root; B: N content of rosette; C: N content of APER; D: N accumulation of root; E: N accumulation of rosette; F: N accumulation of APER.

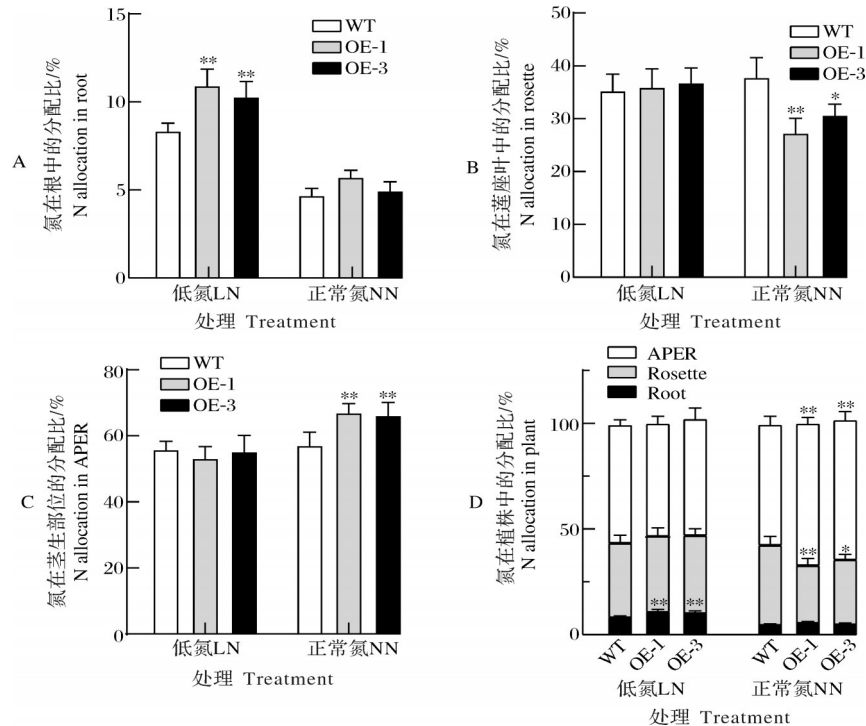
图3 营养液培养条件下 *CsATG3b* 过表达株系与野生型拟南芥氮含量及氮素积累量的比较
Fig.3 Comparison of N content and N accumulation between *CsATG3b*-overexpressing lines and wild type *Arabidopsis* plants cultured in hydroponic nutrient solution

NN条件下差异不显著(图3B)。分析各部位氮素积累量发现, *CsATG3b*-OE株系根部氮素积累量在LN条件下显著高于WT, 在NN条件下则只有 *CsATG3b*-OE-1显著高于WT(图3D); 莲座叶的氮

素积累量在LN条件下差异不显著, 在NN条件下则显著低于野生型(图3E); 茎生部分的氮素积累量则只在NN条件下显著高于WT, LN条件下无显著差异(图3F)。为明确 *CsATG3b* 对氮在植株内分配的

影响,进一步分析各部位氮的分配情况,结果显示,*CsATG3b*-OE株系根部的氮分配在LN条件下较WT显著增加,NN条件下差异不显著(图4A);莲座叶氮分配在NN条件下显著低于WT,LN条件下无显著差异(图4B),而茎生部位的氮分配在NN条件

下较WT显著增加(图4C)。结果表明,过表达*CsATG3b*改变了拟南芥植株氮向各部位的分配,且这一改变受到氮水平的调节,即LN条件下促进氮向根系分配,NN条件下促进氮向茎生部位分配(图4D)。



A: 氮在根中的分配比; B: 氮在莲座叶中的分配比; C: 氮在茎生部位中的分配比; D: 氮在植株中的分配比。A: N allocation in root; B: N allocation in rosette; C: N allocation in APER; D: N allocation in plant.

图4 营养液培养条件下 *CsATG3b* 过表达株系与野生型拟南芥氮分配的比较

Fig.4 Comparison of N allocation between *CsATG3b*-overexpressing and wild type

Arabidopsis plants cultured in hydroponic nutrient solution

2.4 过表达 *CsATG3b* 对拟南芥氮吸收转运基因和 *AtATGs* 表达水平的影响

进一步检测根中氮素吸收转运相关基因的表达水平,结果如图5A、B、C所示,在LN条件下,3个硝酸盐吸收相关基因 (*AtNRT1.1*、*AtNRT2.1*、*AtNRT2.2*) 在 *CsATG3b*-OE株系根中的表达量均显著高于野生型。在NN条件下, *CsATG3b*-OE-3株系3个硝酸盐吸收相关基因的表达量都显著高于野生型, *CsATG3b*-OE-1株系只有 *AtNRT2.1*、*AtNRT2.2* 的表达量显著高于野生型,而 *AtNRT1.1* 的表达量显著低于野生型。氨基酸是氮在植株体内运输的主要形态,因此本研究还检测了氨基酸转运基因在莲座叶中的表达水平,结果如图5D、E、F所示,在LN和NN条件下,过表达株系中参与氨基酸转运基因 *AtAAP1*、*AtAAP4* 和 *AtAAP6* 的表达量均显著高于野生型。以上结果表明,过表达 *CsATG3b* 可以上调

拟南芥根部氮吸收转运相关基因的表达,并且可以增强多个氨基酸转运基因在拟南芥莲座叶中的表达(尤其是在低氮条件下),推测过表达 *CsATG3b* 可能通过提高植株对氮的吸收转运能力而增加植株对氮的利用。此外,为了研究不同氮营养条件下野生型和过表达株系的自噬发生情况,对莲座叶中自噬相关基因的表达进行了检测,结果如图5G、H、I所示,在拟南芥中过表达 *CsATG3b* 上调了 *AtATG3*、*AtATG5* 和 *AtATG8b* 等自噬相关基因的转录。

2.5 过表达 *CsATG3b* 对拟南芥氮营养诊断指标及氮效率参数的影响

基质土培养20d后(营养生长阶段),TLN条件下 *CsATG3b*-OE株系叶片的紫化程度明显低于野生型(图6A)。植株莲座叶干质量、氮含量和氮素积累量检测结果如图6B、C、D所示,TLN条件下, *CsATG3b*-OE株系莲座叶干质量显著低于WT,而

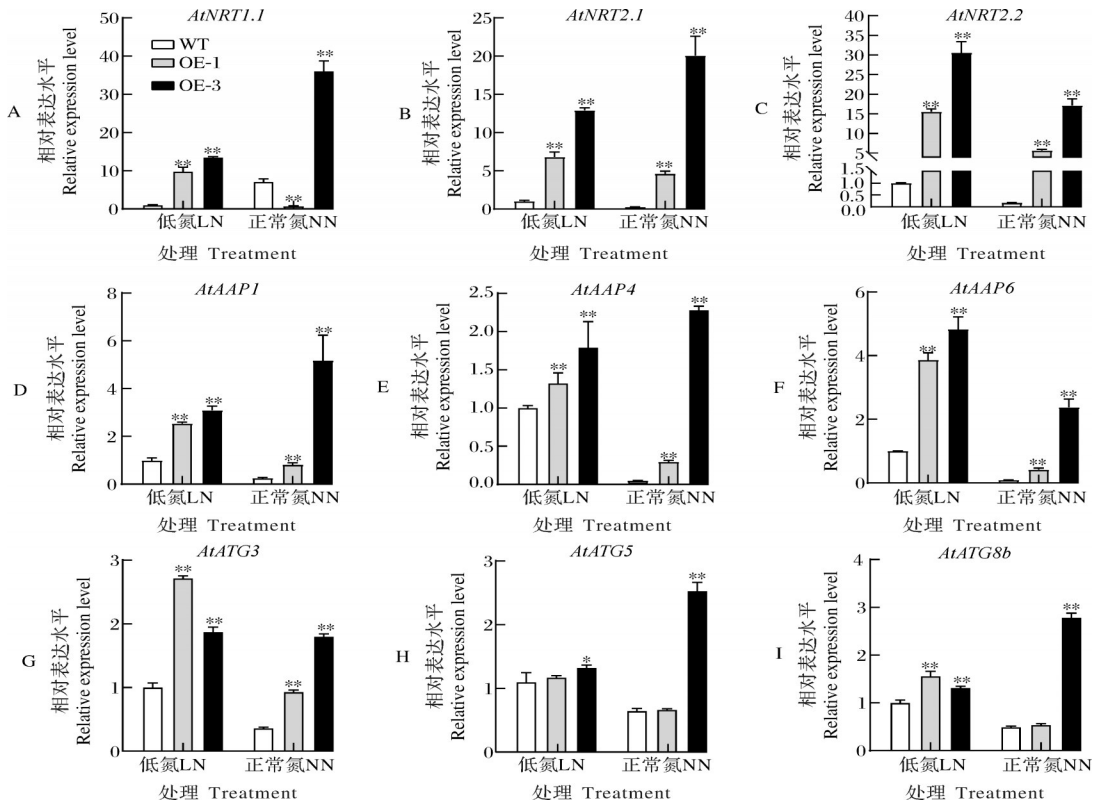
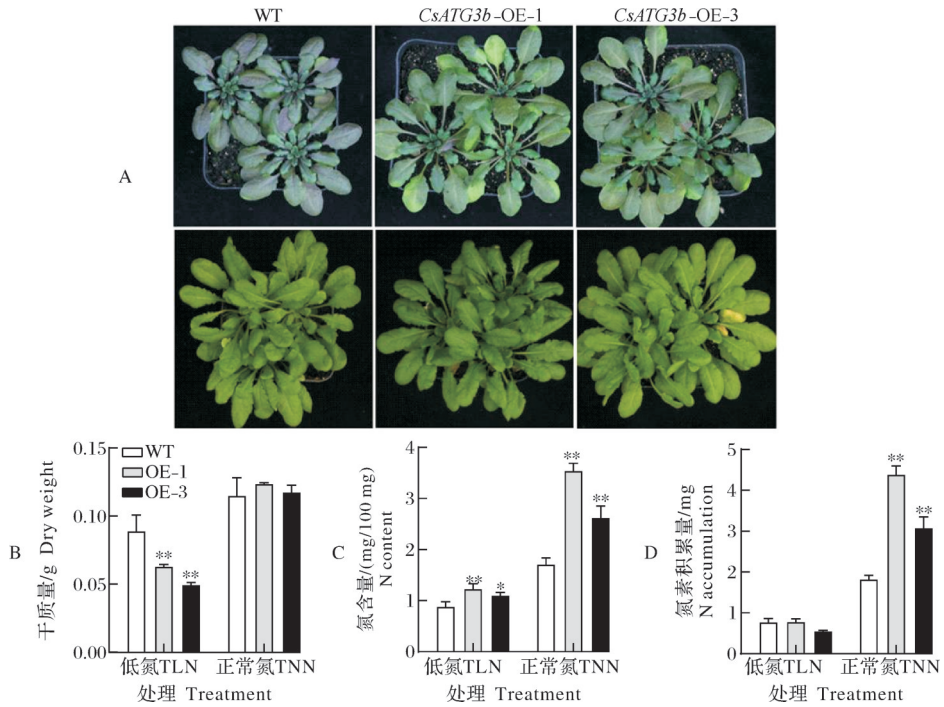


图5 营养液培养条件下 *CsATG3b* 过表达株系与野生型拟南芥氮吸收转运和自噬相关基因转录水平的比较
Fig.5 Comparisons of relative expression levels of the genes related with nitrogen uptake, transport and autophagy between *CsATG3b*-overexpressing lines and wild type *Arabidopsis* plants cultured in hydroponic nutrient solution



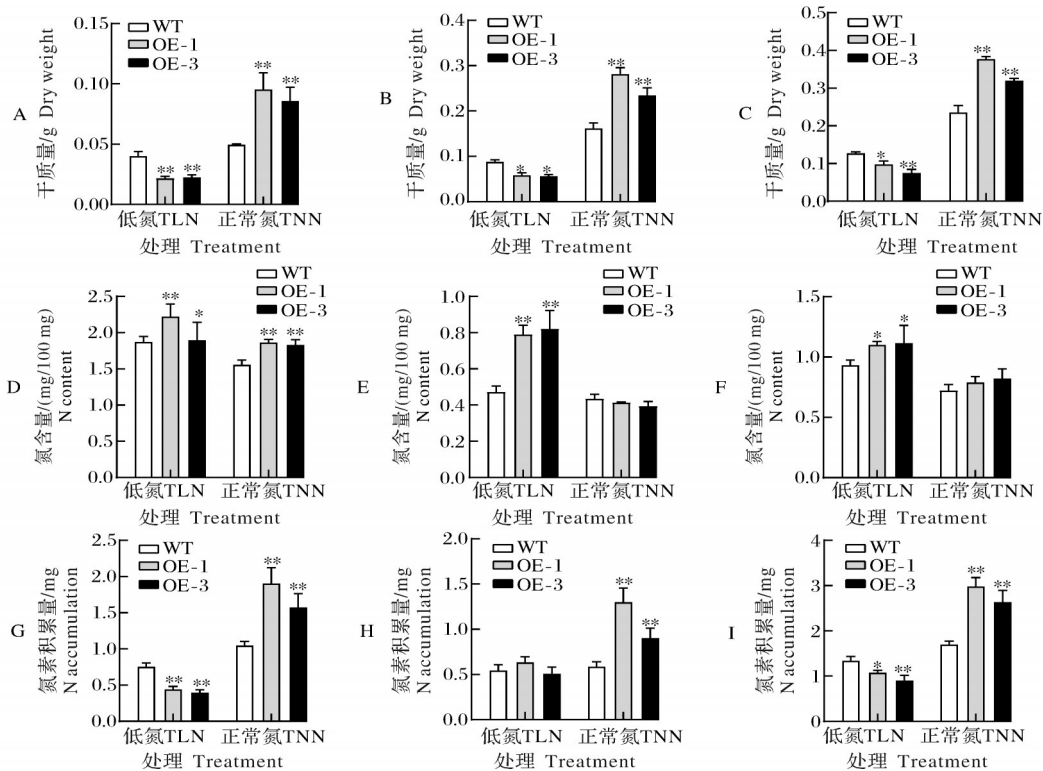
A: 营养生长 Vegetative growth of *CsATG3b*-overexpressing (OE) lines and WT *Arabidopsis* plants; B: 莲座叶干质量 Dry weight of rosette; C: 莲座叶氮含量 N content of rosette; D: 莲座叶氮素积累量 N accumulation of rosette.

图6 基质土培养条件下 *CsATG3b* 过表达株系和野生型拟南芥营养生长期莲座叶的干质量、氮含量和氮素积累量
Fig.6 Dry weight, N content and accumulation in rosette of *CsATG3b*-overexpressing lines and wild type *Arabidopsis* plants during vegetative growth under soil culture

氮含量显著高于WT,氮素积累量则无显著差异。在TNN条件下, *CsATG3b*-OE株系莲座干质量与WT相比无显著差异,但氮含量显著高于WT, *CsATG3b*-OE株系氮素积累量也显著高于WT。生殖生长结束后, TLN条件下 *CsATG3b*-OE株系的种子和残茬生物量均显著低于WT,但TNN条件下均显著高于野生型(图7A、B、C)。以上结果表明,在TNN条件下,过表达 *CsATG3b* 促进了转基因拟南芥的生长。

为研究 *CsATG3b* 是否在氮素从营养部位向种子转移中起作用,测定了植株残茬和种子中的氮含

量,结果显示,在TLN条件下, *CsATG3b*-OE株系种子和残茬中的氮含量显著高于野生型;TNN条件下,只有残茬中的氮含量显著高于野生型(图7D、E、F)。考虑到转基因株系种子干质量的增加,进一步比较了植株的氮素积累量,结果显示,在TLN条件下 *CsATG3b*-OE株系种子和整株的氮素积累量较WT显著降低;在TNN条件下, *CsATG3b*-OE株系种子和残茬的氮素积累量均显著升高(图7G、H),其整株的氮素积累量也显著高于WT(图7I),这表明在TNN条件下过表达 *CsATG3b* 可促进植株对氮的积累。

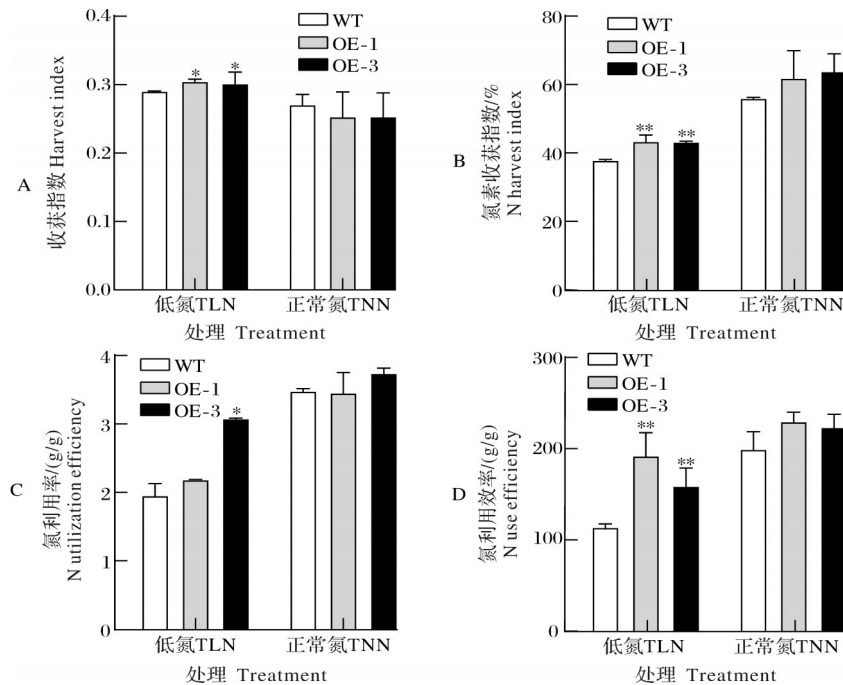


A: 种子干质量 Dry weight of seed; B: 残茬干质量 Dry weight of stubble; C: 总植株干质量 Dry weight of whole plant; D: 种子氮含量 N content of seed; E: 残茬氮含量 N content of stubble; F: 总植株氮含量 N content of whole plant; G: 种子氮素积累量 N accumulation of seed; H: 残茬氮素积累量 N accumulation of stubble; I: 总植株氮素积累量 N accumulation of whole plant.

图7 基质土培养条件下 *CsATG3b* 过表达株系和野生型拟南芥在生殖生长结束后的干物质质量、氮含量和氮素积累量
Fig.7 Dry weight, N content and accumulation of *CsATG3b*-overexpressing lines and wild type *Arabidopsis* plants after reproductive growth under soil culture

收获指数(HI)是一个重要的生产力指标,在TLN条件下, *CsATG3b*-OE株系的HI显著高于野生型,在TNN条件下则无显著差异(图8A)。氮素收获指数(NHI)是反映分配到籽粒氮的重要生产指标,TLN条件下 *CsATG3b*-OE株系的NHI也显著高于野生型株系, TNN条件下则无显著差异(图8B)。氮利用率(NUtE)表示单位氮素生产的籽粒产量, TLN条件下 *CsATG3b*-OE-1株系的NUtE较野生型具有

增加的趋势,但未达显著水平, *CsATG3b*-OE-3株系达到了显著水平(图8C)。以NHI/HI比值作为衡量野生型和过表达株系氮利用效率(NUE)差异的指标, TLN条件下 *CsATG3b*-OE株系的NUE显著高于野生型株系,在TNN条件下则无显著差异(图8D)。以上结果表明, *CsATG3b* 对植株的经济产量和氮素利用效率提高具有潜在应用价值,过表达 *CsATG3b* 能够提高拟南芥植株在低氮条件下的氮素利用效率。



A: 收获指数 Harvest index (HI); B: 氮素收获指数 N harvest index (NHI); C: 氮利用率 N utilization efficiency (NUE); D: 氮利用效率 N use efficiency (NUE).

图8 过表达 *CsATG3b* 拟南芥植株的收获指数和氮效率参数

Fig.8 Harvest index and nitrogen indices in *CsATG3b*-overexpressing *Arabidopsis* plants

3 讨论

氮是茶树生长及茶叶品质形成的物质基础。茶叶每年多轮次的萌发与采摘消耗较多的氮,因此在茶树年生长周期中对氮的需求存在节律性^[14]。然而,茶园土壤氮含量并不能满足茶树对氮的动态需求,因此,茶树体内氮的循环利用对茶树的生长发育及茶叶品质起着重要作用^[1]。细胞自噬是真核细胞中的自噬小体在各种胁迫下如营养缺乏、干旱、高盐或过氧化,降解和清除细胞器或细胞质组分,使营养物质被回收的一个重要生物学过程^[15]。前人研究表明,自噬在植物抵抗一些逆境胁迫中发挥着重要作用,植株通过增强自噬活性,使营养物质被转运到最需要的部位得以再利用,提高植株抵抗胁迫的能力^[16-18],而自噬突变体 *atg5*、*atg9* 在逆境条件下会表现出更不耐受的表型^[19]。但自噬在茶树中的具体作用仍不清楚, Huang 等^[10] 基于特征序列从茶树基因组中鉴定出 2 个 *CsATG3* 同源基因,并在拟南芥中对 *CsATG3a* 参与氮利用的功能进行了鉴定。本研究通过对 *CsATG3b*-OE 株系及野生型拟南芥进行不同氮处理后的表型进行分析研究发现,低氮胁迫条件下, *CsATG3b*-OE 植株根和莲座叶干质量显著增加,根系更为发达,对低氮胁迫表现出更适应性的表型,推

测这可能是自噬基因 *CsATG3b* 响应低氮胁迫的重要机制。

氮的利用包括吸收、同化、运输和再利用,与植物的生命周期密切相关^[20]。本研究重点关注了氮在拟南芥不同部位的分配情况,与 WT 相比, *CsATG3b*-OE 株系在 LN 条件下,氮向根部的分配显著增加,在 NN 条件下向茎生部位分配显著增加。这表明 *CsATG3b* 改变拟南芥植株内氮的分配受氮水平的调节,且在低氮胁迫下过表达 *CsATG3b* 能够促进根系氮素供应,这可能有助于提高植株抵抗低氮胁迫的能力。NRT 家族成员在硝酸盐吸收和转运中发挥重要作用, NRT1.1 是一种双亲和硝酸盐转运蛋白和硝酸盐信号蛋白,且参与植物中的氮信号转导^[21];低氮条件下 NRT2 主要负责拟南芥对硝酸盐的吸收^[22]。本研究发现, *CsATG3b* 过表达株系的 *AtNRT1.1*、*AtNRT2.1* 和 *AtNRT2.2* 在低氮条件下的表达水平显著高于野生型。这些结果表明, LN 条件下过表达 *CsATG3b* 可能通过提高硝酸盐转运相关基因的表达水平,从而促进拟南芥对硝酸盐的吸收。当细胞经历衰老或逆境时,自噬过程被激活,蛋白被大量降解^[23],在该生物学过程中, *AAP1*、*AAP4* 和 *AAP6* 被证实在氨基酸的转运中起关键作用^[24]。在

本研究中,这些基因在CsATG3b过表达植株莲座叶中的表达显著高于野生型,说明过表达植株自噬活性增强,反馈调节氨基酸转运基因表达,促进氨基酸的转运。

前期研究发现养分胁迫条件下不同物种ATG基因的转录水平显著上调,自噬活性也协同提高,并且自噬发生水平也增强^[25-28]。在本研究中,过表达CsATG3b拟南芥中AtATG3、AtATG5和AtATG8b的表达水平显著升高,特别是在氮缺乏的情况下,推测过表达CsATG3b拟南芥的自噬活性受到强烈诱导。CsATG3b显著促进了自噬相关基因AtATG3、AtATG5和AtATG8b在低氮胁迫下的表达,潜在提高了自噬活性。同时,也为自噬在植物应对低氮胁迫中发挥重要作用提供了佐证。自噬参与了整个植物水平上的营养物质的再循环和再利用,并在氮从源器官向种子等库器官转移的再利用过程中发挥重要作用^[29-30],过表达ATG8a、ATG8b、ATG8c或ATG8e不仅能显著增加自噬体数量,还能提高种子中的氮含量^[31-33]。Chen等^[33]研究发现,低氮条件下过表达ATGs的拟南芥株系NUE较野生型显著增加,但过表达株系的种子产量和干物质质量没有受到影响。本研究也得出了相似的结论,在低氮胁迫下,CsATG3b过表达拟南芥种子干质量没有显著提高,但HI、NHI、NUE较野生型显著增加。另一方面,Chardon等^[34]采用NHI/HI比值作为氮营养效率NUE,本研究发现CsATG3b过表达拟南芥株系的NHI/HI显著高于野生型,表明CsATG3b能提高氮利用效率,增加向种子的氮素分配。在正常氮条件下,CsATG3b过表达拟南芥株系的种子干物质和氮含量均显著高于野生型,表明在正常氮条件下CsATG3b在提高产量方面具有潜在的作用。

对于茶树来说,每一轮次新萌发的幼嫩叶是茶树的库器官,本研究推测CsATG3b扮演着促进氮在植物体内氮循环的角色,促进氮从衰老叶片向幼嫩叶片循环再利用从而提高茶树氮素利用率。过表达CsATG3b增加了细胞的自噬活性,促进营养物质在植株体内的再利用,从源器官向库器官的转移。此外,过表达CsATG3b能够增加拟南芥植株产量,提高植株的氮素利用效率,增强植株对低氮胁迫的耐受性,在茶树中可能具有促进幼嫩芽叶生长和增产的作用,对选育氮高效利用茶树品种具有一定的理论价值。

参考文献 References

- [1] ZHANG Y, YE X, ZHANG X, et al. Natural variations and dynamic changes of nitrogen indices throughout growing seasons for twenty tea plant (*Camellia sinensis*) varieties [J/OL]. *Plants*, 2020, 9 (10) : 1333 [2023-10-08]. <https://doi.org/10.3390/plants9101333>.
- [2] 倪康, 廖万有, 伊晓云, 等. 我国茶园施肥现状与减施潜力分析[J]. *植物营养与肥料学报*, 2019, 25(3): 421-432. NI K, LIAO W Y, YI X Y, et al. Fertilization status and reduction potential in tea gardens of China [J]. *Journal of plant nutrition and fertilizers*, 2019, 25(3) : 421-432 (in Chinese with English abstract).
- [3] MA L F, YANG X D, SHI Y Z, et al. Response of tea yield, quality and soil bacterial characteristics to long-term nitrogen fertilization in an eleven-year field experiment [J/OL]. *Applied soil ecology*, 2021, 166: 103976 [2023-10-08]. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.103976>.
- [4] YANG X D, NI K, SHI Y Z, et al. Heavy nitrogen application increases soil nitrification through ammonia-oxidizing bacteria rather than archaea in acidic tea (*Camellia sinensis* L.) plantation soil [J/OL]. *The science of the total environment*, 2020, 717: 137248 [2023-10-08]. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137248>.
- [5] 蒋志敏, 王威, 储成才. 植物氮高效利用研究进展和展望[J]. *生命科学*, 2018, 30(10): 1060-1071. JIANG Z M, WANG W, CHU C C. Towards understanding of nitrogen use efficiency in plants [J]. *Chinese bulletin of life sciences*, 2018, 30(10): 1060-1071 (in Chinese with English abstract).
- [6] AVILA-OSPINA L, MOISON M, YOSHIMOTO K, et al. Autophagy, plant senescence, and nutrient recycling [J]. *Journal of experimental botany*, 2014, 65(14): 3799-3811.
- [7] 杨玲钰, 张蕾. 植物自噬的研究进展[J]. *生命科学研究*, 2022, 26(4): 309-315. YANG L Y, ZHANG L. Progress in plant autophagy [J]. *Life science research*, 2022, 26(4): 309-315 (in Chinese with English abstract).
- [8] KROEMER G, MARIÑO G, LEVINE B. Autophagy and the integrated stress response [J]. *Molecular cell*, 2010, 40(2): 280-293.
- [9] ICHIMURA Y, KIRISAKO T, TAKAO T, et al. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation [J]. *Nature*, 2000, 408(6811): 488-492.
- [10] HUANG W, MA D N, XIA L, et al. Overexpression of CsATG3a improves tolerance to nitrogen deficiency and increases nitrogen use efficiency in *Arabidopsis* [J]. *Plant physiology and biochemistry*, 2023, 196: 328-338.
- [11] CLOUGH S, BENT A. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. *The plant journal*, 1998, 16(6): 735-743.
- [12] ZHANG C Y, ZHANG W, REN G D, et al. Chlorophyll syn-

- these under epigenetic surveillance is critical for vitamin E synthesis, and altered expression affects tocopherol levels in *Arabidopsis* [J]. *Plant physiology*, 2015, 168(4):1503-1511.
- [13] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408.
- [14] 李维, 向芬, 周凌云, 等. 氮素减施对茶树光合作用和氮肥利用率的影响 [J]. *生态学杂志*, 2020, 39(1):93-98. LI W, ZHANG F, ZHOU L Y, et al. Effects of nitrogen fertilizer reduction on photosynthesis and nitrogen use efficiency in tea plant [J]. *Chinese journal of ecology*, 2020, 39(1):93-98 (in Chinese with English abstract).
- [15] HAN S J, YU B J, WANG Y, et al. Role of plant autophagy in stress response [J]. *Protein & cell*, 2011, 2(10):784-791.
- [16] XIONG Y, CONTENTO A L, BASSHAM D C. *AtATG18a* is required for the formation of autophagosomes during nutrient stress and senescence in *Arabidopsis thaliana* [J]. *The plant journal*, 2005, 42(4):535-546.
- [17] XIONG Y, CONTENTO A L, NGUYEN P Q, et al. Degradation of oxidized proteins by autophagy during oxidative stress in *Arabidopsis* [J]. *Plant physiology*, 2007, 143(1):291-299.
- [18] ZHOU J, WANG J, CHENG Y, et al. NBR1-mediated selective autophagy targets insoluble ubiquitinated protein aggregates in plant stress responses [J/OL]. *PLoS genetics*, 2013, 9(1):e1003196 [2023-10-08]. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003196>.
- [19] GUIBOILEAU A, YOSHIMOTO K, SOULAY F, et al. Autophagy machinery controls nitrogen remobilization at the whole-plant level under both limiting and ample nitrate conditions in *Arabidopsis* [J]. *New phytologist*, 2012, 194(3):732-740.
- [20] XU G H, FAN X R, MILLER A J. Plant nitrogen assimilation and use efficiency [J]. *Annual review of plant biology*, 2012, 63:153-182.
- [21] TEGEDER M, MASCLAUX-DAUBRESSE C. Source and sink mechanisms of nitrogen transport and use [J]. *New phytologist*, 2018, 217(1):35-53.
- [22] LÉRAN S, VARALA K, BOYER J C, et al. A unified nomenclature of nitrate transporter 1/peptide transporter family members in plants [J]. *Trends in plant science*, 2014, 19(1):5-9.
- [23] MASCLAUX-DAUBRESSE C, CHEN Q W, HAVÉ M. Regulation of nutrient recycling via autophagy [J]. *Current opinion in plant biology*, 2017, 39:8-17.
- [24] YOUNÈS D. Manipulating amino acid metabolism to improve crop nitrogen use efficiency for a sustainable agriculture [J/OL]. *Frontiers in plant science*, 2020, 11:602548 [2023-10-08]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.602548>.
- [25] BEDU M, MARMAGNE A, MASCLAUX-DAUBRESSE C, et al. Transcriptional plasticity of autophagy-related genes correlates with the genetic response to nitrate starvation in *Arabidopsis thaliana* [J/OL]. *Cells*, 2020, 9(4):1021 [2023-10-08]. <https://doi.org/10.3390/cells9041021>.
- [26] SUN X, JIA X, HUO L Q, et al. *MdATG18a* overexpression improves tolerance to nitrogen deficiency and regulates anthocyanin accumulation through increased autophagy in transgenic apple [J]. *Plant, cell & environment*, 2018, 41(2):469-480.
- [27] LI W W, CHEN M, WANG E H, et al. 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 [J/OL]. *BMC Genomics*, 2016, 17(1):797 [2023-10-08]. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3113-4>.
- [28] XIA K F, LIU T, OUYANG J, et al. Genome-wide identification, classification, and expression analysis of autophagy-associated gene homologues in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *DNA research*, 2011, 18(5):363-377.
- [29] CHEN Q, LUO J, HAVE M, et al. Autophagy and nutrients management in plants [J/OL]. *Cells*, 2019, 8(11):1426 [2023-10-08]. <https://doi.org/10.3390/cells8111426>.
- [30] FAN T, YANG W, ZENG X, et al. A rice autophagy gene *OsATG8b* is involved in nitrogen remobilization and control of grain quality [J/OL]. *Frontiers in plant science*, 2020, 11:588 [2023-10-08]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00588>.
- [31] LI W W, CHEN M, ZHONG L, et al. Overexpression of the autophagy-related gene *SiATG8a* from foxtail millet (*Setaria italica* L.) confers tolerance to both nitrogen starvation and drought stress in *Arabidopsis* [J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 2015, 468(4):800-806.
- [32] ZHEN X X, LI X, YU J L, et al. *OsATG8c*-mediated increased autophagy regulates the yield and nitrogen use efficiency in rice [J/OL]. *International journal of molecular sciences*, 2019, 20(19):4956 [2023-10-08]. <https://doi.org/10.3390/ijms20194956>.
- [33] CHEN Q W, SOULAY F, SAUDEMONT B, et al. Overexpression of ATG8 in *Arabidopsis* stimulates autophagic activity and increases nitrogen remobilization efficiency and grain filling [J]. *Plant and cell physiology*, 2019, 60(2):343-352.
- [34] CHARDON F, NOËL V, MASCLAUX-DAUBRESSE C. Exploring NUE in crops and in *Arabidopsis* ideotypes to improve yield and seed quality [J]. *Journal of experimental botany*, 2012, 63(9):3401-3412.

Effects of overexpression of tea autophagy-related gene *CsATG3b* on nitrogen utilization efficiency in *Arabidopsis thaliana*

XIAHOU Long, MA Danni, ZHANG Lehui, HUANG Wei, ZHAO Hua, NI Dejiang

*National Key Laboratory for Germplasm Innovation and Utilization of Horticultural Crops/
College of Horticulture and Forestry, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*

Abstract The autophagy-related gene *CsATG3b* was cloned from tea trees and its function in nitrogen utilization was verified in *Arabidopsis thaliana* to explore the potential role of *CsATG3b* in nitrogen utilization in tea trees. The results showed that the expression level of *CsATG3b* in tea leaves increased with the increase of tea leaves maturity. Compared with wild-type *Arabidopsis* (WT), the root to shoot ratio and content of nitrogen in *CsATG3b* overexpressing (*CsATG3b*-OE) lines under low nitrogen were significantly increased. Overexpression of *CsATG3b* changed the distribution of nitrogen within the plant. It promoted the distribution of nitrogen to stems under normal nitrogen, while it promoted the distribution of nitrogen to roots under low nitrogen. The *CsATG3b* overexpressing (*CsATG3b*-OE) lines significantly upregulated the expression levels of nitrogen absorption and transport related genes *AtNRT1.1*, *AtNRT2.1*, *AtNRT2.2* in roots, amino acid transport genes *AtAAP1*, *AtAAP4*, *AtAAP6* and autophagy related genes *AtATG3*, *AtATG5*, and *AtATG8b* in rosette-leaves under low nitrogen. The *CsATG3b* overexpressing (*CsATG3b*-OE) lines increased nitrogen accumulation under normal nitrogen and significantly improved nitrogen utilization efficiency under low nitrogen. It is indicated that the overexpression of *CsATG3b* can improve nitrogen utilization efficiency and tolerance to low nitrogen in *Arabidopsis* by regulating the expression of nitrogen absorption and transport genes and autophagy related genes.

Keywords tea tree; *CsATG3b*; nutrient remobilization; nitrogen utilization efficiency

(责任编辑:葛晓霞)