

抑制表达谷氨酰胺合成酶基因对水稻氮代谢和生长发育的影响

蔡红梅, 肖景华, 张启发, 练兴明*

华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室和植物基因研究中心, 武汉 430070

* 联系人, E-mail: xmlian@mail.hzau.edu.cn

2009-06-11 收稿, 2009-10-10 接受

国家重点基础研究发展计划(编号: 2005CB120905)资助项目

摘要 从明恢 63 平衡化 cDNA 文库中获得水稻 *GS2* 基因的 cDNA 克隆, 通过基因克隆和农杆菌介导的水稻遗传转化方法将 *GS2* 基因导入中花 11 进行超量表达. 对获得的转基因植株进行生长表型和基因表达、生理生化指标测定与分析. 结果显示, T_1 代转基因植株由于 *GS2* 的抑制表达出现黄化现象, 生长受到限制; 叶片叶绿素含量与 *GS2* 基因的表达量紧密相关; 植株中大多数氮代谢、叶绿素合成和光呼吸途径中相关基因表达量上升; 而植株的氮代谢水平下降, 包括 *GS* 活性、水溶性蛋白和氨基酸含量.

关键词

谷氨酰胺合成酶
抑制表达
黄化
氮代谢
水稻

高等植物氮代谢的最初同化是无机态铵离子 (NH_4^+) 经过谷氨酰胺合成酶 (*GS*; EC 6.3.1.2) 和谷氨酸合酶 (*GOGAT*; EC 1.4.1.14, EC 1.4.7.1) 循环 (*GS/GOGAT*) 转化为有机态氮谷氨酰胺 (*Gln*), 之后形成各种氨基酸参与蛋白质的生物合成^[1-3]. 研究认为, *GS* 一般以胞质型 *GS1* 和叶绿体型 *GS2* 两种同工酶形式存在; *GS1* 由多个基因编码, 而 *GS2* 则由单基因编码^[4]; 但也有例外, 在大豆和紫花苜蓿中克隆到多个基因编码 *GS2* 蛋白^[5]. *GS2* 蛋白是由核基因编码, 由信号肽引导进入叶绿体, 然后行使功能, 主要在叶绿体中进行 NH_4^+ 的初级同化和光呼吸途径中释放 NH_3 的再利用^[6-10]. 随着 *GS2* 基因在植物氮代谢途径中的重要功能以及近年来分子生物学技术的飞速发展, *GS2* 的转基因研究成为国内外科研小组的重点研究对象. 高等植物中关于 *GS2* 的转基因研究已有一些相关报道, 如超量表达 *GS2* 的转基因烟草和水稻增加了光呼吸能力和对强光的抵抗能力, 但没有生长表型的差异^[11,12]; *GS2* 基因反义抑制的转基因油菜则表现为蛋白质含量的下降, 而其生物产量、叶形、叶

色等均没有显著差异^[13].

水稻是我国种植面积最为广泛的粮食作物之一, 在农业生产和发展过程中具有十分重要的地位; 它又是单子叶植物和农作物的模式植物, 对其进行深入而系统的功能基因组学研究将会为作物遗传改良和新品种培育奠定良好的分子理论基础. 然而, 对水稻 *GS2* 基因的转基因研究仍然停留在一个表观的初级阶段, 所以有必要对 *GS2* 转基因水稻在功能基因组学、蛋白质组学和代谢组学平台上进行更加系统、更加详细的生理生化和分子生物学研究, 以揭示 *GS2* 基因的重要功能. 本研究以水稻为研究对象, 通过转基因和多种生化与分子生物学手段对水稻 *GS2* 基因的功能进行详细地研究; 以 *GS2* 转基因植株为研究对象, 对其进行了生长表型、基因表达量和各种生理生化指标的测定, 揭示了 *GS2* 基因在水稻氮代谢途径甚至整个生长发育进程中的重要功能, 同时也为进一步研究 *GS2* 基因的功能甚至是植物整个氮代谢途径、氨基酸的生物合成途径和光呼吸途径提供了一个良好的研究材料.

1 材料与方法

(i) 载体的构建与基因转化. 在 NCBI 网站上 (<http://ncbi.nih.nlm.gov>) 输入关键词“glutamine synthetase AND rice”搜索序列获得水稻叶绿体型谷氨酰胺合成酶 *GS2* 基因的序列 (GenBank 登录号: X14246). 通过生物信息学同源序列分析 (Blastn), 在水稻籼稻品种明恢 63 平衡化 cDNA 文库 (redb.ncpgr.cn)^[14] 中获得与之对应的 cDNA 克隆 EI[#]90M06. 通过限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Kpn* I 将 *GS2* cDNA 克隆到带有 *CaMV* 35S 启动子的转化载体 pCAMBIA1301S 上 (基因克隆及 DNA 操作的具体方法参照标准的分子生物学技术^[15,16]); 之后, 通过农杆菌介导的水稻遗传转化方法将 *GS2* 基因导入水稻粳稻品种中花 11 进行超量表达^[17]. *GS2* 基因在全生育期不同组织器官中的表达谱是根据 CREP 数据库 (<http://crep.ncpgr.cn>) 中水稻明恢 63 全基因组 DNA 芯片的差异表达信息而获得的.

(ii) Southern 和 Northern 杂交分析. 通过 CTAB 法抽提水稻叶片基因组总 DNA 进行 Southern 杂交检测转化基因的拷贝数: 将 4 μg 基因组总 DNA, 利用限制性内切酶 *Hind* III 完全消化酶切, 然后进行电泳、转膜; 通过潮霉素 *HPT* 基因特异性引物 HPT-F (5'-A GAAGAAGATGTTGGCGACCT-3') 和 HPT-R (5'-GT CCTGCGGGTAAATAGCTG-3'), 以转化载体为模板扩增获得相应的探针 (此探针片段中不含有 *Hind* III 酶切位点), 与膜上的 DNA 进行杂交; 探针的标记、杂交、洗膜及显影等操作按照标准程序进行^[16]. 采用 TRIzol 试剂 (Invitrogen, Germany) 抽提水稻叶片总 RNA 进行 Northern 杂交检测基因表达量: 将 15 μg 总 RNA 在 1.2% 琼脂糖变性凝胶中电泳分离, 转至尼龙膜, 通过紫外交联固定, 与 ³²P 标记的 *GS2* 基因探针杂交, 洗膜及显影等操作按照标准程序进行^[16].

(iii) Real-time PCR 分析. 通过 Superscript II reverse transcriptase (SS II, Invitrogen) 将待测水稻叶片中的 RNA 进行反转录获得 cDNA, 以此为模板在 ABI PRISM 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 上进行 real-time PCR 检测相关基因的表达量, 具体的 PCR 试剂及程序参见 SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa) 相关的操作手册. 待测基因的引物均以表达序列通过 Primer Express Software (Foster City, CA, USA) 软件设计, 以 *actin* 基因 (NM_197297) 为内参照, 并通过 BLAST 和溶解曲

线检测引物的特异性, 引物序列详见表 1~3.

(iv) 转基因植株的种植. 将待测水稻种子沙培至 2~3 叶期后转移至水培面包盒中在正常水培营养液中生长 1 个星期, 之后分别进行低氮胁迫处理和继续正常培养. 将上述植株以列为单位 (即一列 6 棵植株为一个单位) 进行随机种植 3 个重复, 生长约 4 个星期后, 对其进行表型观察、生物产量以及各种生理生化指标的测定. 其中, 正常水培营养液的配方为: 1.44 mmol/L NH₄NO₃, 0.3 mmol/L NaH₂PO₄, 0.5 mmol/L K₂SO₄, 1.0 mmol/L CaCl₂, 1.6 mmol/L MgSO₄, 0.17 mmol/L NaSiO₃, 50 μmol/L Fe-EDTA, 0.06 μmol/L (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 15 μmol/L H₃BO₃, 8 μmol/L MnCl₂, 0.12 μmol/L CuSO₄, 0.12 μmol/L ZnSO₄, 29 μmol/L FeCl₃, 40.5 μmol/L citric acid, 用浓硫酸调节 pH 为 5.5^[18]; 低氮水培营养液的配方除了 NH₄NO₃ 含量减为 1/15 外, 其余成分与含量均与正常水培营养液相同. 在水培过程中每隔 3 天更换一次营养液.

(v) 叶片叶绿素含量的测定. 将待测新鲜叶片剪碎浸泡于 80% (体积比) 的丙酮溶液中, 置于 37℃ 浸提直至叶片变白; 将浸提液分别在 663 和 646 nm 测定吸光值, 根据 Arnon 方法^[19] 计算叶片叶绿素的含量.

(vi) 水溶性蛋白含量的测定. 将待测新鲜叶片在冰上用提取缓冲液 (10 mmol/L Trizma (pH 7.5), 5 mmol/L sodium glutamate, 10 mmol/L MgSO₄, 1 mmol/L dithiothreitol, 10% (体积比) glycerol, 0.05% (体积比) Triton X-100) 充分研磨后于 4℃, 12000×g 离心 20 min, 上清液即为粗蛋白液^[20]. 粗蛋白液中的水溶性蛋白含量根据 Bradford 蛋白检测方法^[21] 通过考马斯亮蓝染液测定, 其中以牛血清蛋白溶液为参照做标准曲线.

(vii) 谷氨酰胺合成酶活性的测定. 将待测新鲜叶片在冰上用提取缓冲液 (70 mmol/L MOPS (pH 6.8), 10 mmol/L MgSO₄, 2 mmol/L dithiothreitol, 5 mmol/L glutamate, 0.1% (体积比) Triton X-100, 10% (体积比) ethanediol) 充分研磨后于 4℃, 12000×g 离心 20 min, 上清液即为粗酶液^[22]. 将粗酶液与反应液 (70 mmol/L MOPS (pH 6.8), 100 mmol/L glutamate, 50 mmol/L MgSO₄, 15 mmol/L NH₂OH, 15 mmol/L ATP) 混匀于 37℃ 反应 30 min 之后, 用终止液 (88 mmol/L FeCl₃, 670 mmol/L HCl, 200 mmol/L trichloroacetic acid) 终止反应; 10 min 后将之于室温、4000×g 离心 10 min, 将上清液于 540 nm 测定吸光值, 样品中谷氨酰胺合成酶活性计算参照文献 [13].

表 1 Real-time PCR 检测氮代谢途径相关基因表达的引物序列

基因名称	序列号	引物名称	引物序列(5'→3')
硝酸根还原酶基因	AK102178	NRF NRR	ACTACCATTACCGCGACAACC CTCGTTTATCATGTACTCCGGC
亚硝酸根还原酶基因	AK103604	NiRF NiRR	CATCGACGAACCTGGAATGGA CTCTGCCATTTCTGTGCGATGA
谷氨酰胺合成酶基因 1;1	X14245	GS1;1F GS1;1R	GAGTCGTCGTCTCATTTGACCC GTAGCCACCATCGTTCCTCATC
谷氨酰胺合成酶基因 1;2	X14244	GS1;2F GS1;2R	TTTTCAAGGACCCGTTTCAGGA CGGCACTGTGCCTCTGTGTTAGT
谷氨酰胺合成酶基因 1;3	AB180689	GS1;3F GS1;3R	TCAAGCCATCTTCAGAGACCCA TACCGTTGTTTCGTCGGAATC
谷氨酰胺合成酶基因 2	X14246	GS2F GS2R	TCACTTCGCCATGACTTGCA CCCCATGAGAAATTGTCAATGC
Fd-谷氨酸合酶基因	AB024716	Fd-GOGATF Fd-GOGATR	AAACAGGCAGCGAGAAAGGTG AAACTCGGCACAAGCTTCAGG
NADH-谷氨酸合酶基因	AB008845	NADH-GOGATF NADH-GOGATR	GAGCGGAGCAAAGCTGAGTTT TCTGGAGCGCAGATTCACCTA
天冬酰胺合成酶基因	U55873	ASF ASR	CAAGGCACCAAACAAGAAGGAA CACCCCATGCAGAAGTTGATTT
天冬氨酸转氨酶基因 1	AB110193	AAT1F AAT1R	GAGGCAACAGCTTTTTGATGCT TGTGAGCCAGTGAAAGTGAA
天冬氨酸转氨酶基因 2	AY157306	AAT2F AAT2R	ATTGGCACGGCCCATGTAT CCATCTCCTGTTTCCATTCACC
天冬氨酸转氨酶基因 3	D67042	AAT3F AAT3R	GAACAGGTGGTTTCGTTAACCA GCCAAATACGCCACATTTCTT
天冬氨酸转氨酶基因 4	D67043	AAT4F AAT4R	CAGGCTCTTTCAGGAAGTGGTG ATGTTGGCCCATGTAGGTGT
谷氨酸脱氢酶基因 1	AB024962	GDH1F GDH1R	GCTGTGGTGACTGGAAAACCTG ATGCTCTGAAGCAAGGCTTTC
谷氨酸脱氢酶基因 2	AB189166	GDH2F GDH2R	ACGCTACTGAGGCTCTTTTGGC TGATTCGTGCAGCCCATGA
谷氨酸脱氢酶基因 3	AB035927	GDH3F GDH3R	TCATCCATCAGAAAGGTGGCA CCTGTGCTTCAAGAGAGCAGGT
肌动蛋白基因	NM_197297	ACTINF ACTINR	TTATGGTTGGGATGGGACA AGCACGGCTTGAATA

表 2 Real-time PCR 检测叶绿素合成途径中基因表达的引物序列

基因名称	序列号	引物名称	引物序列(5'→3')
谷氨酰-tRNA 还原酶基因	NM_001071526	HEMAF HEMAR	ATGGAGGCCCAAACAATCATC GCGTAGGACCTCAGTTCCTTGA
胆色素原合酶基因	NM_001065045	HEMBF HEMBR	CACGTGCTGGTGCTGATGTAGT GGAGACATCATGGAACCCTCA
羟甲基后胆色素原合酶基因	NM_001052552	HEMCF HEMCR	TTGCCTTGTAATCTCCCACGG GCACTCCAACAACACTGCCA
尿卟啉原 III 合酶基因	NM_001055736	HEMDF HEMDR	CCGAGCTTGGCTAAATCTTGC TCAGGCCAAATTTCTTAGCTGC
尿卟啉原脱羧酶基因 1	NM_001056584	HEME1F HEME1R	GATCCCTTGAGAACAGCAGCTG CATTGTTAACCTCTTCCCGBAA
尿卟啉原脱羧酶基因 2	NM_001050145	HEME2F HEME2R	GCTGCTTTGCTAGGATTTGTGG GCTGTGTGGCACATGCTCTTFA
谷氨酸-1-半醛转氨酶基因	NM_001068872	GSAF GSAR	GCTCTCCGTGACTTGACGAAAC CCGAAGTATTCTTGAGCCCCA
叶绿素合酶基因	NM_001061807	CHLGF CHLGR	TCCACCTCTGAAGCTCAAGCAG TTCCAAATAATGCCTGGCCAG
镁螯合酶 D 亚基基因	NM_001058203	CHLDF CHLDR	CGCATGCAGAATGCGAAAG CCTCAGCAAAAATCTCCACGAAA
镁螯合酶 I 亚基基因	EF 065607	CHLIF CHLIR	GCGACCCTTCAATTCCGA TGATCTTGGCCGTGACAACA
NADPH:原叶绿素酸酯氧化还原酶 A 基因	NM_001060809	PORAF PORAR	TCGGCCTCGTCTGAGTTTATT CATCACTTGACAGGCTTCTCTC
NADPH:原叶绿素酸酯氧化还原酶 B 基因	NM_001071490	PORBF PORBR	CGTTGCAAAATGGTTATGCCT AGCCCTTGACATTGTCATAGC

表3 Real-time PCR 检测光呼吸途径中基因表达的引物序列

基因名称	序列号	引物名称	引物序列(5'→3')
乙醇酸氧化酶基因	AF022740	GOXF GOXR	AATGTCATGGAGTACCAGGCCA GCCTCCCTGTTTTCTTGAGAG
2-磷酸乙醇酸磷酸酶基因	NM_001069243	PGPF PGPR	GTCTTTTCATTGCGACCAACC CACAGAGCAACTAACAGCAGCA
核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶加氧酶基因	U74321	RBCOF RBCOR	GACAAGCTCGTCGTCCACATCT AGGATTTTCCCTGACCCTTGC
谷胱甘肽合成酶基因 1	NM_001074888	GTS1F GTS1R	CCTTCTGAAGCGGAATGGAGA GCTGGATCTTTTTCGTTCCCA
谷胱甘肽合成酶基因 2	AY453405	GTS2F GTS2R	GAGGATCTTTCCACCAGCATCA GCAGGTAGGCTCCAAAAATTCC
甘氨酸脱羧酶复合蛋白 H 基因 1	NM_001064850	GDCH1F GDCH1R	AGACCATGCTCAGGACCATTGT GCTTTCACACTTTCAACCGCA
甘氨酸脱羧酶复合蛋白 H 基因 2	NM_001071595	GDCH2F GDCH2R	CCAATGCCCTCAAGATCTCAT GGAGCTGTACTTCAACCCATCA
丙糖磷酸异构酶基因	NM_001070312	TPIF TPIR	TGGATTGAAAAGGAGGAGCA TGTCTACGCTCTGAATGCCCA

(viii) 游离氨基酸含量的测定. 将待测新鲜叶片剪碎于 80% (体积比)的乙醇里, 80℃水浴提取 20 min, 重复 3 次; 将收集到的提取液在 80℃干浴去除乙醇并定容, 并用乙醚提取后转移水相于一新管中, 真空干燥; 用 0.02 mol/L HCl 充分溶解, 14000 r/min 离心 15 min, 并取上清液用 0.2 μmol/L 的滤膜过滤. 吸取滤液于自动进样瓶中, 在氨基酸测定仪(L-8800 HI-TACHI)上机测定, 具体的上机操作步骤及结果分析软件参照氨基酸测定仪的标准实验手册(Hitachi Instruments Engineering, Japan).

(ix) 游离 NH₄⁺含量的测定. 将待测新鲜叶片在冰上用提取缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0), 10 mmol/L imidazole, 0.5% (质量体积比) β-mercaptoethanol)充分研磨后于 4℃, 12000×g 离心 20 min, 上清液即为待测样品提取液. 提取液中的游离 NH₄⁺含量根据 Berthelot color reaction^[23]方法在 480 nm 测定吸光值, 其中以 NH₄NO₃ 溶液为参照做标准曲线.

2 结果分析

2.1 GS2 基因的表达谱分析和 T₀ 代转基因植株的分子鉴定

研究认为, 水稻中存在 3 个 GS1 基因(GS1;1, GS1;2, GS1;3)编码胞质型谷氨酰胺合成酶和一个 GS2 基因(GS2)编码叶绿体型谷氨酰胺合成酶. 通过 CREP 数据库中水稻明恢 63 全基因组 DNA 芯片的差

异表达获得了 GS2 基因在全生育期不同组织器官中的表达信息; 表达谱显示, GS2 基因主要在营养生长时期的叶片和叶鞘中大量表达, 而在根、生殖器官和种子萌发时期几乎没有表达(图 1).

根据“材料与方法”中所述, 将 GS2 基因的全长 cDNA 片段通过相应的限制性内切酶接头连接到超量表达转化载体 pCAMBIA1301S 上, 由 35S 启动子启动该基因在水稻转化受体中花 11 中的超量表达(图 2(a)). 通过农杆菌介导的水稻遗传转化方法获得了 GS2 的 T₀ 代转基因植株, 并对它们进行相关的分子生物学鉴定, 包括: 阳性检测、转基因拷贝数和表达量的检测. 使用 HPT 基因特异性引物通过 PCR 进行转基因植株的阳性检测, 结果显示阳性率为 88%; 转基因阳性植株的 Northern 杂交结果显示, 47, 50, 51, 65, 67, 86, 87 和 88 共 8 个转基因植株显示为 GS2 基因的超量表达(图 2(b)); 超量表达 GS2 的 Southern 杂交结果显示, 其转基因的拷贝数为 1~2 个(图 2(c)).

2.2 转基因植株的表型与生物产量的分析

为了检测 GS2 基因超量表达对水稻植株的影响以及转基因植株的生长表型, 将转基因植株 T₁ 代进行正常营养和低氮胁迫(1/15 N)水培种植并观察生长表型, 检测生物产量. 结果显示, 超量表达 GS2 的转基因植株在苗期与野生型中花 11 并没有任何差异, 而在营养生长后期渐渐分离出黄化植株(图 3(a); 4~7), 此黄化植株生长受到抑制, 生物产量低, 其干重显著

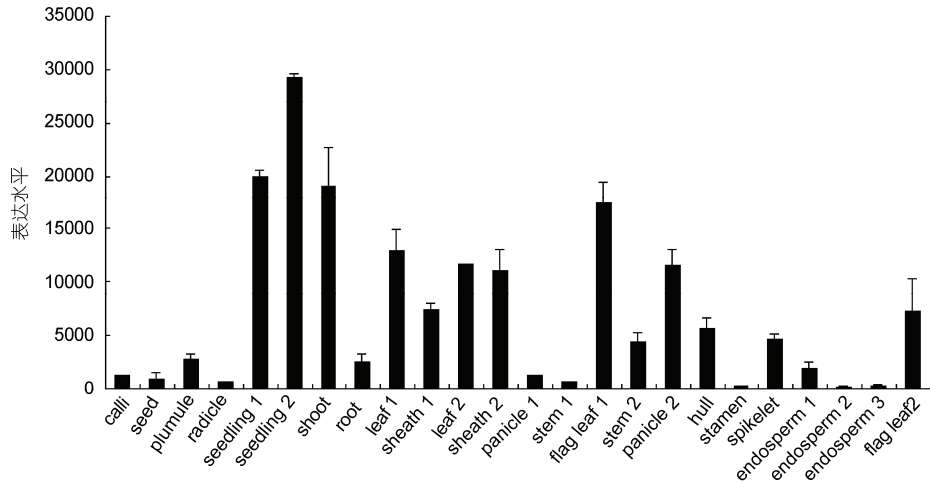


图1 水稻 *GS2* 基因在 24 个不同组织中的表达谱

Calli, 继代 15 d 后的愈伤; seed, 吸水 72 h 后的种子; plumule, 种子萌发 48 h 后的幼芽; radicle, 种子萌发 48 h 后的胚根; seedling 1, 播种 3 d 后的根和叶片; seedling 2 和 3, 叶期的根和叶片; shoot, 2 个分蘖时期的地上部; root, 2 个分蘖时期的根部; leaf 1, 幼穗二次科原分化期的叶片; sheath 1, 幼穗二次科原分化期的叶鞘; leaf 2, 4~5 cm 幼穗期的叶片; sheath 2, 4~5 cm 幼穗期的叶鞘; panicle 1, 4~5 cm 幼穗期的幼穗; stem 1, 抽穗期 5 d 前的茎秆; flag leaf 1, 抽穗期 5 d 前的剑叶; stem 2, 抽穗期的茎秆; panicle 2, 抽穗期的幼穗; hull, 开花期 1 d 前的颖壳; stamen, 开花期 1 d 前的雄蕊; spikelet, 授粉后 3 d 的小穗; endosperm 1, 授粉后 7 d 的胚乳; endosperm 2, 授粉后 14 d 的胚乳; endosperm 3, 授粉后 21 d 的胚乳; flag leaf 2, 抽穗后 14 d 的剑叶

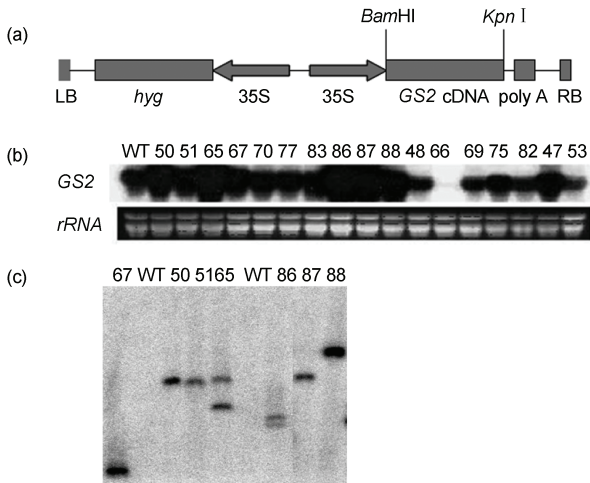


图2 超量表达 *GS2* 的转基因植株的获得与鉴定

(a) 使用 *CaMV* 35S 启动子对 *GS2* 基因超量表达的载体构建, 潮霉素基因(*hyg*)为抗性筛选标记基因. (b) 通过 Northern 杂交对 T_0 代 *GS2* 转基因植株以及野生型中花 11 (WT) 中相应基因的表达量进行检测. (c) 以潮霉素基因片段为探针, 通过 Southern 杂交对 T_0 代超量表达 *GS2* 的转基因植株以及野生型中花 11 (WT) 进行拷贝数检测

低于正常生长的绿色植株(图 3(b)), 可以完成整个生育期, 但是结实很少. 通过对各个单株的 PCR 检测发现, 黄化植株为转基因阳性, 而绿色植株中一部分为转基因阳性(图 3(a); 1, 2, 9, 10 和 14), 另一部分为转基因

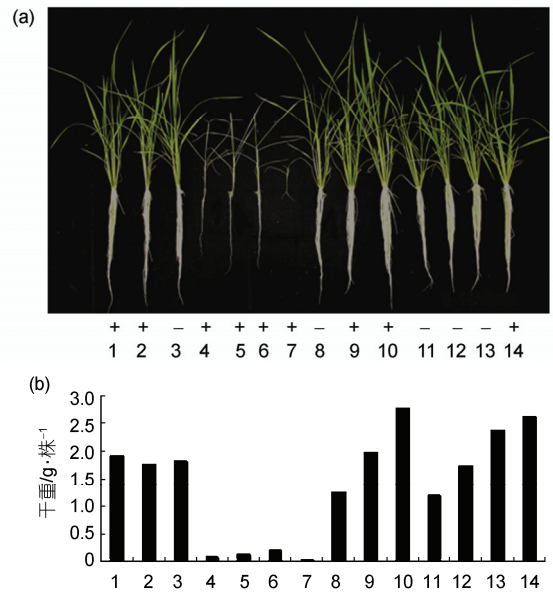


图3 *GS2* 转基因植株在 T_1 代的生长表型和生物产量的分析

(a) *GS2* 转基因家系 87 在 T_1 代分离出生长弱小的黄化植株(4~7), 以及相应植株的 PCR 检测结果. (b) *GS2* 转基因家系 87 中相应单株的干重产量. 实验中所用植株在正常水培条件下生长 4 个星期后收获

因阴性(图 3(a); 3, 8, 11~13). 对其叶片的 Northern 杂交显示, 各个家系中绿色阳性转基因植株与野生型

中花 11 的 *GS2* 表达量相似, 甚至相对高一点, 而黄化植株中的 *GS2* 表达量则明显降低. 很明显, 转基因植株是由于受到体内 *GS2* 基因表达量的抑制而引起叶片黄化现象的产生. 有趣的是, 这种黄化现象并不受到基因遗传的调控, 在各个家系中, 只要是阳性转基因植株, 无论是绿色阳性转基因植株的后代还是黄化植株的后代中仍然能够出现这种黄化分离的现象.

2.3 转基因黄化植株叶绿素含量的测定

GS2 转基因植株的叶片黄化现象并不是一开始就出现的, 在 2~3 叶期之前, 与野生型中花 11 并没有明显的差异; 而在 3 叶期后转基因植株开始长出黄化叶片, 于是将转基因植株和野生型中花 11 进行了不同生育期叶片中 *GS2* 表达量的检测和叶绿素含量的测定. 结果显示, 转基因植株在早期(图 4(a)和(b); I 和 II 期) *GS2* 的表达量较高, 相对于野生型中花 11 来说是超量表达的, 同时叶片呈现绿色, 其叶绿素含量也较高; 而在后期(图 4(a)和(b); III~V 期) *GS2* 的表

达量就突然下降, 同时叶片黄化, 其叶绿素含量也随之下降; 与此同时, 野生型中花 11 *GS2* 的表达量没有明显的变化, 叶片的叶绿素含量则有小幅度的上升(图 4(a)和(b)). 可见, 转基因植株叶片的黄化现象是与 *GS2* 基因的表达量紧密相连的.

同时, 在黄化植株的营养生长成熟期, 植株上的叶片并不是全部是黄化的, 只有相对比较幼嫩的叶片(顶端 3~4 片叶)是黄化的, 而比较老的叶片(末端 2 片叶)则保持绿色直至自然死亡(图 4(c)). 于是, 我们对转基因黄化植株、转基因绿色阳性植株和野生型中花 11 进行了不同叶龄阶段叶片中 *GS2* 表达量的检测和叶绿素含量的测定. 结果显示, 黄化植株顶端幼嫩叶片(图 4(d)和(e); 2~4 号叶片)中 *GS2* 的表达量较低, 相对于野生型中花 11 来说是抑制表达的, 其叶绿素含量也较低; 而在末端老叶(图 4(d)和(e); 5 和 6 号叶片)中 *GS2* 的表达量突然上升, 呈现超量表达, 同时叶绿素含量也随之升高; 与此同时, 转基因绿色阳性植株和野生型中花 11 中 *GS2* 的表达则是在幼嫩叶片

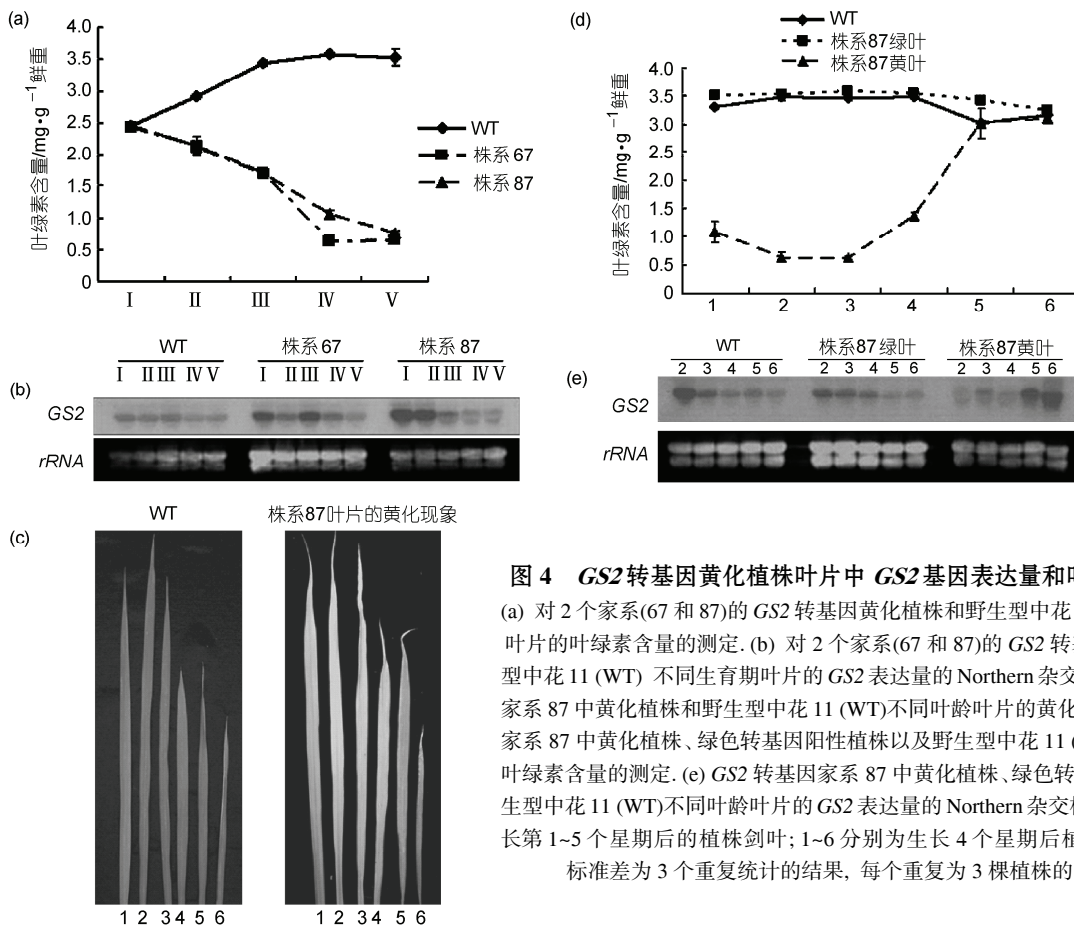


图 4 *GS2* 转基因黄化植株叶片中 *GS2* 基因表达量和叶绿素含量的测定

(a) 对 2 个家系(67 和 87)的 *GS2* 转基因黄化植株和野生型中花 11 (WT) 不同生育期叶片的叶绿素含量的测定. (b) 对 2 个家系(67 和 87)的 *GS2* 转基因黄化植株和野生型中花 11 (WT) 不同生育期叶片的 *GS2* 表达量的 Northern 杂交检测. (c) *GS2* 转基因家系 87 中黄化植株和野生型中花 11 (WT) 不同叶龄叶片的黄化表型. (d) *GS2* 转基因家系 87 中黄化植株、绿色转基因阳性植株以及野生型中花 11 (WT) 不同叶龄叶片的叶绿素含量的测定. (e) *GS2* 转基因家系 87 中黄化植株、绿色转基因阳性植株以及野生型中花 11 (WT) 不同叶龄叶片的 *GS2* 表达量的 Northern 杂交检测. I~V 分别为为生长第 1~5 个星期后的植株剑叶; 1~6 分别为为生长 4 个星期后植株顶端第 1~6 片叶, 标准差为 3 个重复统计的结果, 每个重复为 3 棵植株的叶片混合样品

(图 4(d)和(e); 2~4 号叶片)中高表达而在老叶(图 4(d)和(e); 5 和 6 号叶片)中表达量较低, 叶绿素含量没有明显的变化(图 4(d)和(e)).

2.4 转基因黄化植株氮代谢途径、叶绿素合成途径及光呼吸途径相关基因的表达分析

很显然, 转基因黄化植株的叶绿素含量是显著降低的, 而 *GS2* 又在氮代谢途径和光呼吸途径中扮演一个十分重要的角色, 因此通过 *real-time PCR* 对 *GS2* 转基因黄化植株和野生型中花 11 叶片中氮代谢途径、叶绿素合成途径及光呼吸途径的相关基因进行了表达分析. 其中涉及到的基因以及相关引物序列详见表 1~3. 结果显示, 与野生型中花 11 相比, *GS2* 转基因黄化植株叶片氮代谢途径相关基因中, 除了硝酸还原酶基因(*NR*)的表达水平显著下降($P<0.01$)以外, 其他基因包括亚硝酸还原酶(*NiR*)、谷氨酰胺合成酶(*GS1;1*, *GS1;2*, *GS1;3*, *GS2*)、谷氨酸合酶(*Fd-GOGAT*, *NADH-GOGAT*)、天冬酰胺合酶(*AS*)、天冬酰胺转氨酶(*AAT1*, *AAT2*, *AAT3*, *AAT4*)和谷氨酸脱氢酶 (*GDH1*, *GDH2*, *GDH3*)基因的表达水平均显著上升($P<0.01$; 图 5(a)); 在叶绿素合成途径相关基因中, 除了谷氨酰-tRNA-还原酶(*HEMA*)、原叶绿素酸酯氧化还原酶 A (*PORA*)和叶绿素合酶(*CHLG*)基因的表达水平没有显著变化($P<0.01$)以外, 其他基因包括胆色素原合酶(*HEMB*)、羟甲基后胆色素原合酶(*HEMC*)、尿卟啉原 III 合酶(*HEMD*)、尿卟啉原脱羧酶(*HEME1*, *HEME2*)、原叶绿素酸酯氧化还原酶 B (*PORB*)、镁螯合酶 D 亚基(*CHLD*)、镁螯合酶 I 亚基(*CHLI*)和谷氨酸-1-半醛转氨酶(*GSA*) 基因的表达水平均显著上升($P<0.01$; 图 5(a)); 在光呼吸途径相关基因中, 除了甘氨酸脱羧酶 2 (*GDCH2*)基因的表达水平没有显著变化($P<0.01$)以外, 其他基因包括甘氨酸脱羧酶 1 (*GDCH1*)、谷胱甘肽合成酶(*GTS1*, *GTS2*)、乙醇酸氧化酶(*GOX*)、二磷酸乙醇酸磷酸酶(*PGP*)、核酮糖-1,5-二磷酸加氧酶(*RBCO*)和丙糖磷酸异构酶(*TPI*)基因的表达水平均显著上升($P<0.01$; 图 5(a)). 可见, 黄化植株中 *GS2* 基因的抑制表达引起了氮代谢途径、叶绿素合成途径及光呼吸途径中相关基因的大量上升表达.

2.5 转基因黄化植株的生理生化指标的测定

为了检测 *GS2* 基因的抑制表达对植株氮代谢水

平的影响, 对转基因黄化植株、转基因绿色阳性植株和野生型中花 11 进行了叶片谷氨酰胺合成酶活性、水溶性蛋白、游离 NH_4^+ 和氨基酸含量的测定. 结果显示, 黄化植株中的 *GS* 活性比转基因绿色阳性植株和野生型中花 11 显著降低 28%~46%, 而转基因绿色阳性植株和野生型中花 11 则没有显著差异(图 6(b); $P<0.05$); 黄化植株中的水溶性蛋白含量比转基因绿色阳性植株和野生型中花 11 显著降低 30%~44%, 而转基因绿色阳性植株和野生型中花 11 则没有显著差异(图 6(c); $P<0.05$); 黄化植株中的游离 NH_4^+ 含量比转基因绿色阳性植株和野生型中花 11 显著降低 36%~72%, 而转基因绿色阳性植株和野生型中花 11 则没有显著差异(图 6(d); $P<0.05$). 对游离氨基酸含量的测定结果中发现, 黄化植株中的游离氨基酸的总含量与野生型中花 11 相比没有显著差异, 而单个氨基酸含量, 除了 Val 和 Ile 含量没有明显差异以外, 均存在显著差异; 尤其是与氮代谢直接相关的 Glu 和 Asp 以及相应的酰胺 Gln 和 Asn, 其中, Glx (Glu+Gln) 的含量降低了 20%, Asx (Asp+Asn) 的含量则上升了约 60%(图 6(e); $P<0.05$). 图 6(f)显示的是将除了 His 以外的各种氨基酸以不同类型的碳骨架进行归类分析, 结果显示, *GS2* 转基因黄化植株中以 α -酮戊二酸(2-OG)、草酰乙酸(OAA)和丙酮酸(Pyr)为碳骨架的氨基酸含量要比野生型中花 11 中显著降低, 而以磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)和磷酸甘油酸(PGA)为碳骨架的氨基酸含量则要比野生型中花 11 中显著升高(图 6(f); $P<0.01$).

2.6 转基因黄化植株体外添加 Gln 的实验

由于转基因黄化植株中 *GS2* 的表达量受到明显的抑制, 谷氨酰胺合成酶的活性显著降低, 植株体内谷氨酰胺(Gln)的合成就会受到阻碍, 于是将 2~3 叶期的转基因黄化植株进行了体外添加 0.5 g/L Gln 的水培实验. 生长两个星期后发现, *GS2* 转基因植株在添加 Gln 的水培营养液中生长具有明显的优势, 叶片恢复绿色, 生物产量明显升高; 而在不含有 Gln 的普通水培营养液中生长的转基因植株大部分都出现了黄化的生长表型, 株型瘦小(图 7).

3 讨论

3.1 *GS2* 基因的表达与功能

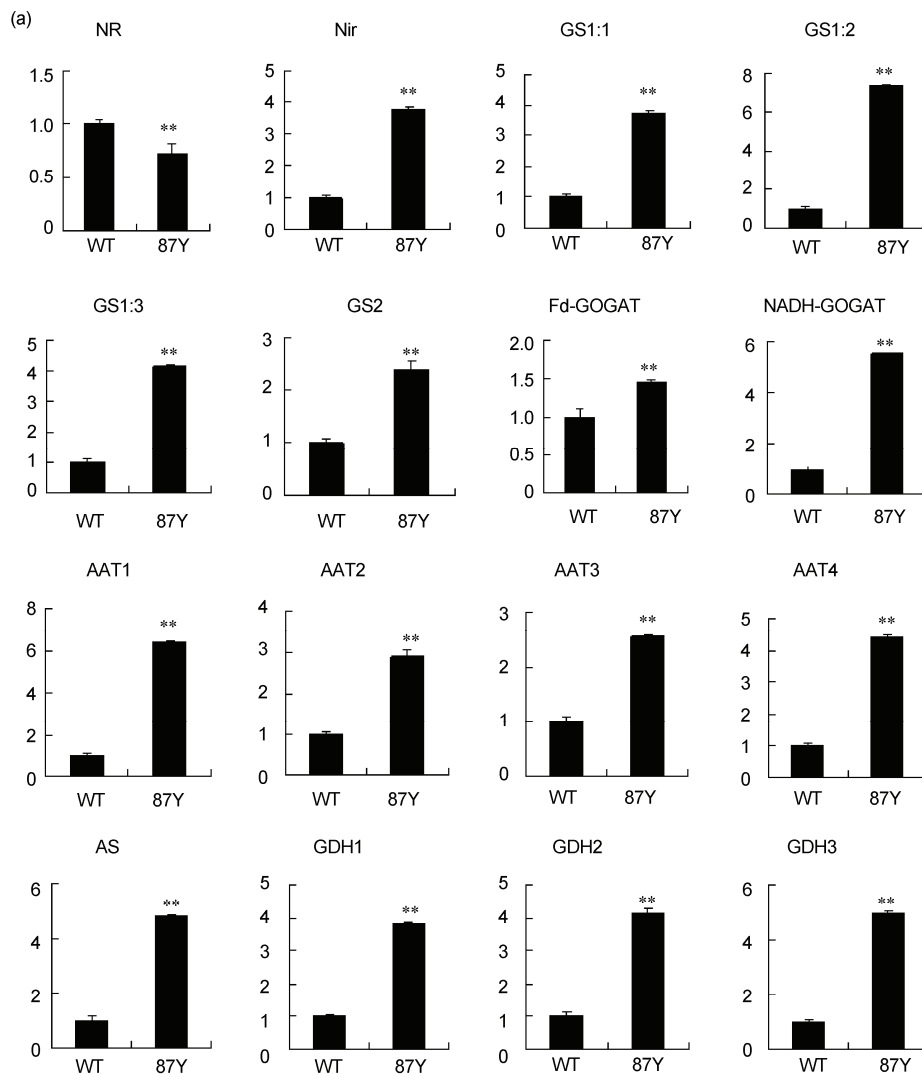
氮代谢在植物的生长发育过程中扮演着极为重

要的角色,其过程主要产生各种氨基酸参与蛋白质的生物合成;而其中的第一步反应就是 GS/GOGAT 循环,可见 GS 基因的重要性.高等植物中 GS 有两种同工酶形式,存在胞质中的 GS1 和叶绿体中的 GS2,它们行使不同的功能^[3,24];GS1 主要参与氮的初级同化,而 GS2 在叶片中既参与初级同化,同时也参与光呼吸途径中释放 NH₃ 的再利用^[25];GS1 基因主要在根中表达,而 GS2 则主要在叶肉细胞中表达^[26,27].同样,本文从 CREP 数据库中获得 GS2 基因表达谱也显示其在叶片中大量表达,可见,GS2 主要在绿色组织中起功能.

3.2 转基因植株的生长表型

本文中过量表达 GS2 的转基因植株在后代中分

离出现了一种叶片黄化、生长弱势、分蘖少、结实少的植株表型,伴随着 GS2 表达量的降低,推测这是由于基因共抑制而引起的转基因沉默现象.转基因植株的这种叶片黄化的现象与大麦的 GS2 缺失突变体和拟南芥的 Fd-GOGAT 缺失突变体的生长表型很相似^[25,28-30];但是,这种缺失突变体会产生致死效应而不能完成整个生育期,这样就为后续的研究工作带来了困难.而本文中产生的转基因黄化植株中 GS2 基因的表达量、酶活的下降程度比缺失突变体低,能使植株完成整个生育期并能够收获种子,无疑这为进一步研究 GS2 的基因功能提供了一个良好的材料.有趣的是,此转基因植株的叶片黄化现象并不是出现在全生育期或是所有叶片中,它只有在特定期和特定的叶片中才会表现为失绿;而且此现象并不



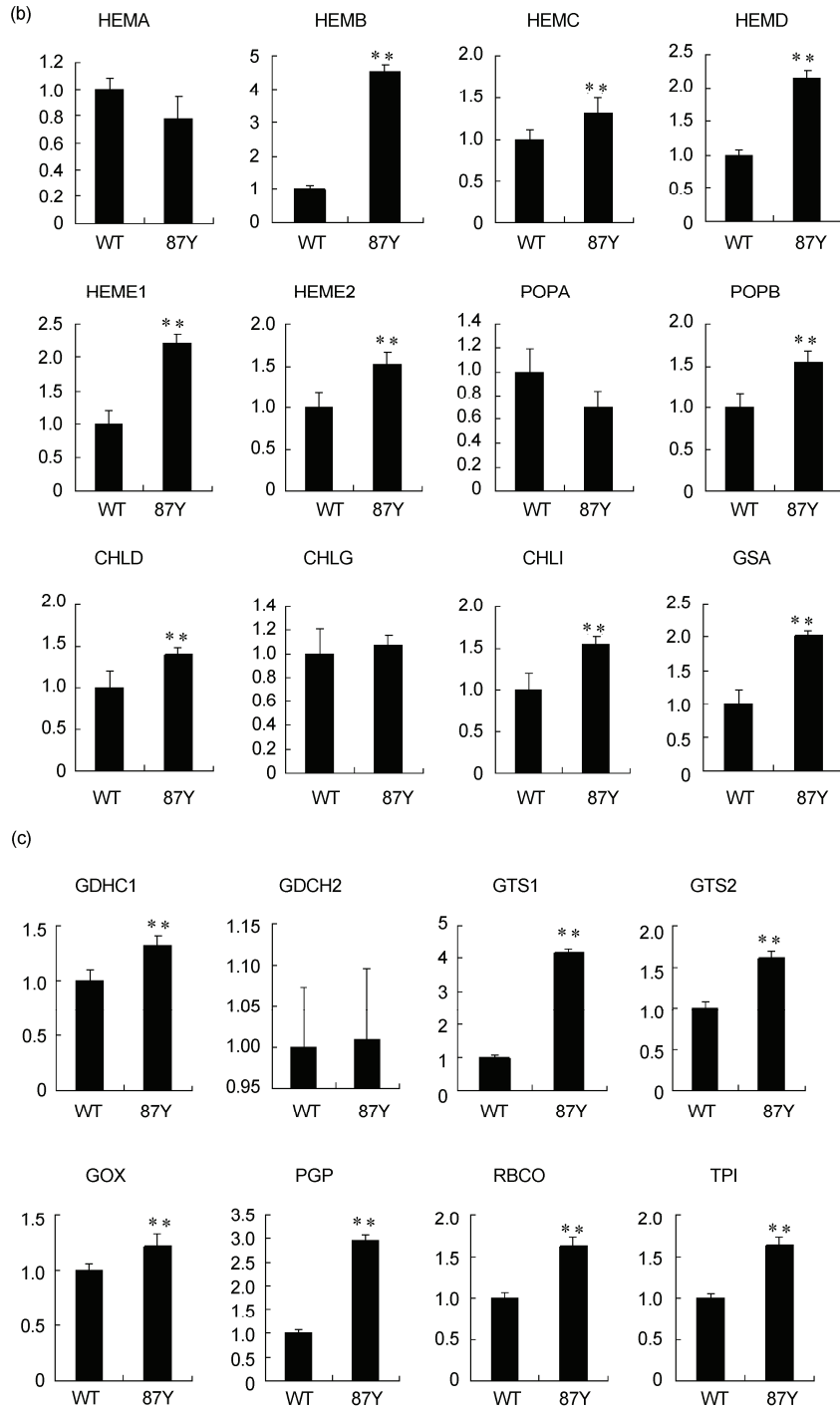


图5 *GS2*转基因黄化植株叶片相关基因表达量的检测

通过 real-time PCR 对 *GS2* 转基因黄化植株(87Y)和野生型中花 11 植株(WT)剑叶中(a)氮代谢途径;(b)叶绿素合成途径和(c)光呼吸途径中相关基因进行表达量检测

伴随基因型在后代中遗传. 转基因植株在 2 叶期之前保持正常的绿色, 而之后叶片则开始失绿; 成熟植株顶端幼嫩叶片黄化, 而底部老叶片保持绿色; 并且,

这种现象与 *GS2* 的表达水平紧密相关, 黄化叶片中 *GS2* 表达水平很低, 而绿色叶片中 *GS2* 表达水平较高. 这也验证了转基因植株中叶片的黄化现象正是由于

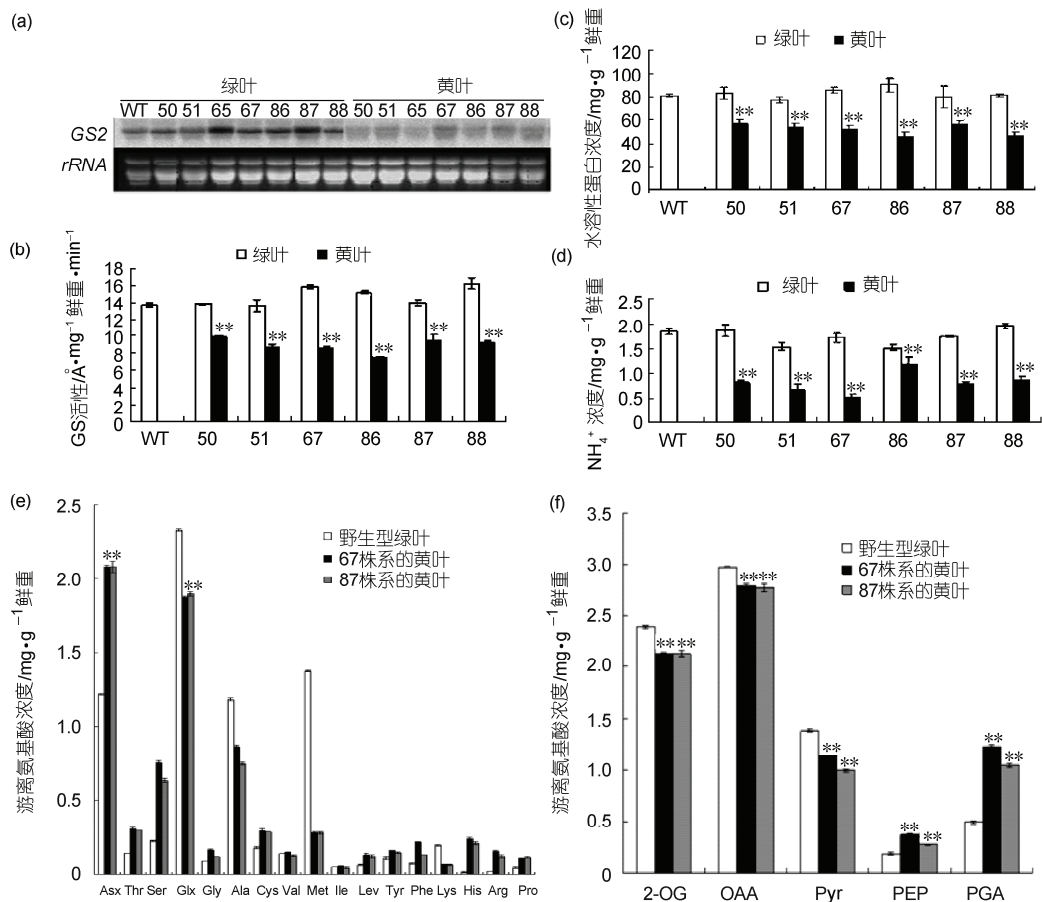


图6 GS2转基因黄化植株叶片中相关代谢水平的测定

(a) 对7个家系(50, 51, 65, 67, 86, 87和88)的T₁代GS2转基因植株中黄化植株和绿色阳性转基因植株以及野生型中花11(WT)的GS2表达量检测。(b)对6个家系(50, 51, 67, 86, 87和88)的T₁代GS2转基因植株中黄化植株和绿色阳性转基因植株以及野生型中花11(WT)谷氨酰胺合成酶活性的测定。(c)对6个家系(50, 51, 67, 86, 87和88)的T₁代GS2转基因植株中黄化植株和绿色阳性转基因植株以及野生型中花11(WT)水溶性蛋白含量的测定。(d)对6个家系(50, 51, 67, 86, 87和88)的T₁代GS2转基因植株中黄化植株和绿色阳性转基因植株以及野生型中花11(WT)游离NH₄⁺含量的测定。(e)对2个家系(67和87)的T₁代GS2转基因植株中黄化植株和野生型中花11游离氨基酸含量的测定。(f)对2个家系(67和87)的T₁代GS2转基因黄化植株和野生型中花11中各种氨基酸以不同类型的碳骨架进行归类的结果分析,共分为5大类:以α-酮戊二酸(2-OG)为碳骨架的氨基酸包括: Arg, Glu和Pro;以草酰乙酸(OAA)为碳骨架的氨基酸包括: Asp, Ile, Lys, Met和Thr;以丙酮酸(pyr)为碳骨架的氨基酸包括: Ala, Leu和Val;以磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)为碳骨架的氨基酸包括: Phe和Tyr;以及以磷酸甘油酸(PGA)为碳骨架的氨基酸包括: Cys, Gly和Ser。标准差为2个(e, f)或3个(b, c, d)重复统计的结果,每个重复为一行中间6棵植株的剑叶混合样品;实验中所用植株在正常水培条件下生长4个星期后收获。**,黄化植株与绿色转基因阳性植株,野生型中花11在P=0.01水平上的差异极显著

GS2基因表达的共抑制而引起的。在正常植株中,幼嫩叶片中相对高水平的GS2表达量和老叶中相对低水平的GS2表达量的分配方式可以使从GS/GOGAT循环合成的氮化合物满足幼嫩组织的生长和形成。然而,在GS2转基因黄化植株中却恰恰相反,在幼嫩的叶片中由于低水平的GS2表达量,从GS/GOGAT循环合成的氮化合物就不能满足幼嫩叶片的正常生长发育,而导致叶片失绿;而底部的老叶则是从苗期

的两片叶而来的,由于其一直保持相对高水平的GS2表达量,从GS/GOGAT循环合成的氮化合物可以满足它的生长发育而维持绿色。同样,2叶期之前的植株生长发育所需要的营养可以种子萌发过程中供给而没有受到影响;但是,之后的叶片生长发育所需的氮化合物就必须从GS/GOGAT循环而来,转基因植株不能供给足够的营养,叶片就无法正常生长,出现营养不良的黄化现象。



图7 *GS2*转基因植株在体外添加Gln条件下和正常水培条件下的生长表型

3.3 转基因植株的代谢水平

与野生型中花 11 相比, *GS2* 转基因黄化植株的 *GS2* 基因表达水平很低, 同时叶片中的 *GS* 活性和水溶性蛋白含量只有野生型植株叶片的 54%~72%之间。类似的结果在拟南芥的 *Fd-GOGAT* 缺失突变体 *gls113* 中也有所报道, *gls113* 植株中仅含有野生型 2%~4%的 *Fd-GOGAT* 活性^[29]; 在 *Fd-GOGAT* 基因反义链的转基因烟草中, 其 *Fd-GOGAT* 活性在叶片中降低了 10%~81%, 在根中降低了 17%~65%^[31]。相比而言, 本文中的转基因植株由于 *GS2* 基因表达水平降低而引起的 *GS* 活性的下降幅度是很低的, 这也是转基因沉默与突变体之间的差异所在; 缺失突变体往往会引起致死现象, 而此转基因植株仅仅在生长表型上出现营养不良的现象, 但是仍然可以完成整个生育期的生长, 甚至可以结实。据报道, 在大麦的 *GS2* 缺失突变体叶片中, 其 NH_4^+ 含量显著升高^[25,32]; 而在 *GS2* 沉默的转基因油菜中, 虽然其 *GS2* 活性下降了 83%, 但 NH_4^+ 含量则没有显著变化^[13]。这与本实验所得的结果不同, *GS2* 转基因黄化植株叶片中 NH_4^+ 含量降低了 36%~72%之多。

同样, 在大麦的 *GS2* 缺失突变体^[33]和拟南芥的 *Fd-GOGAT* 缺失突变体^[30]叶片中游离氨基酸含量存在显著的降低, 而本文的 *GS2* 转基因黄化叶片中总氨基酸含量却没有显著变化, 这又与 *GS2* 沉默的转

基因油菜相似^[18]。但是, *GS2* 转基因黄化叶片中单个游离氨基酸的含量与野生型植株叶片却是存在差异的, 尤其是 *Asx* (*Asp* + *Asn*)的大量累积和 *Glx* (*Glu* + *Gln*)的大幅度下降。其原因正是由于低水平的 *GS2* 基因的表达量导致 *GS* 活性的下降, 使得 *GS/GOGAT* 循环中 NH_4^+ 和 2-OG 转化为 *Glu* 和 *Gln* 这一步骤受到限制, 最后导致 *Glx* (*Glu*+*Gln*)含量的大幅降低。据报道, 谷氨酰胺合成酶(*GS*)与天冬酰胺合成酶(*AS*)之间存在一个很明显的负调控作用, 使用 *GS* 特异性抑制剂 *PPT* 对细胞中 *GS* 活性进行抑制的时候, 观察到 *AS* 的高水平表达^[34]; 并且, 低水平的 *GS* 活性能够引起 *Asn* 含量的增加, 也就是说, 在 *GS* 活性受到抑制的条件下, 氮能够被 *AS* 直接同化合成 *Asn*^[35]。在 *GS2*转基因黄化叶片中也正是由于 *GS* 活性的降低导致了氮通过 *AS* 直接同化合成 *Asn*, 最终导致 *Asx* (*Asp*+*Asn*)含量的升高, 这或许是植物在逆境条件下体内一种互补平衡的代谢途径。

高等植物叶片中的水溶性蛋白绝大部分是与代谢相关的一些酶类, 比如说 *RUBISCO*; *GS2*转基因黄化叶片中水溶性蛋白含量的降低必然会导致光合作用和三羧酸循环代谢能力的下降。所以说, 从三羧酸循环而来的碳水化合物也会随之减少, 导致了 *GS2*转基因黄化叶片中以 α -酮戊二酸(2-OG)、草酰乙酸(*OAA*)和丙酮酸(*Pyr*)为碳骨架合成的氨基酸含量的显著降低; 而植株为了维持平衡, 以磷酸烯醇式丙酮酸(*PEP*)和磷酸甘油酸(*PGA*)为碳骨架的的氨基酸含量就相应升高。虽然 *GS2* 转基因黄化叶片中总的氨基酸含量没有显著变化, 其单个氨基酸特别是相同类型的氨基酸的变化却体现了 *GS2* 基因在氮同化和氨基酸合成途径中扮演的不容忽视的重要作用。可见, *GS2* 基因在植株氮代谢途径中甚至是整个生长发育过程中发挥着重要的作用。

参考文献

- 1 Hirel B, Lea P J. Ammonium Assimilation. In: Lea P J, Morof Gaudry J F, eds. Plant nitrogen. Berlin: Springer-Verlag, 2001. 79—99
- 2 Temple S J, Vance C P, Gantt J S. Glutamate synthase and nitrogen assimilation. Trends Plant Sci, 1998, 3: 51—56
- 3 Ireland R J, Lea P J. The enzymes of glutamine, glutamate, asparagines and aspartate metabolism. In: Singh B K, ed. Plant Amino Acids: Biochemistry And Biotechnology. New York: Marcel Dekker, 1999. 49—109
- 4 Stewart G R, Mann A F, Fentem P A. Enzymes of glutamate formation: Glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase and glutamate synthase. In: Mifflin B J, ed. The Biochemistry Of Plants: Amino Acids And Derivatives. New York: Academic Press, 1980. 271—327
- 5 Zozaya-Garza M, Sengupta-Gopalan C. Glutamine synthetase gene isolation from an alfalfa leaf cDNA library. Plant Physiol, 1999, 119: 1568
- 6 Lightfoot D A, Green N K, Cullimore J V. The chloroplast-located glutamine synthetase of *Phaseolus vulgaris* L.: Nucleotide sequence, expression in different organs and uptake into isolated chloroplast. Plant Mol Biol, 1988, 11: 191—202

- 7 Tingey S V, Tsai F-Y, Edwards J W, et al. Chloroplast and cytosolic glutamine synthetase are encoded by homologous nuclear genes which are differentially expressed *in vivo*. *J Biol Chem*, 1988, 163: 9651—9657
- 8 Keegstra K, Cline K. Protein import and routing system of chloroplasts. *Plant Cell*, 1999, 11: 557—570
- 9 May T, Soll J. Chloroplast precursor protein translocon. *FEBS Lett*, 1999, 452: 53—56
- 10 Lam H-M, Coschigano K, Shultz C, et al. Use of *Arabidopsis* mutants and genes to study amide amino acid biosynthesis. *Plant Cell*, 1995, 7: 887—898
- 11 Kozaki A, Tabeka G. Photorespiration protects C₃ plants from photooxidation. *Nature*, 1996, 384: 557—560
- 12 Hoshida H, Tanaka Y, Hibino T, et al. Enhanced tolerance to salt stress in transgenic rice that overexpresses chloroplast glutamine synthetase. *Plant Mol Biol*, 2000, 43: 103—111
- 13 Husted S, Mattsson M, Mollers C, et al. Photorespiratory NH₄⁺ production in leaves of wild-type and glutamine synthetase 2 antisense oilseed rape. *Plant Physiol*, 2002, 130: 989—998
- 14 储昭晖, 彭开蔓, 张利达, 等. 水稻全生育期均一化 cDNA 文库的构建和鉴定. *科学通报*, 2002, 47: 1656—1662
- 15 Maniatis T A, Fritsch E F, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992
- 16 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 17 Hiei Y, Ohta S, Komari T, et al. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J*, 1994, 6: 271—282
- 18 Yoshida S, Forno D A, Cook J H, et al. *Laboratory manual for physiological studies of rice*. 3rd ed. Manila: International Rice Research Institute, 1976
- 19 Arnon D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol*, 1949, 24: 1—15
- 20 Melo P M, Lima L M, Santos I M, et al. Expression of the plastid-located glutamine synthetase of *Medicago truncatula*. Accumulation of the precursor in root nodules reveals an *in vivo* control at the level of protein import into plastids. *Plant Physiol*, 2003, 132: 390—399
- 21 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248—254
- 22 O'Neal D, Joy K W. Glutamine synthetase of pea leaves: purification, stabilization and pH optima. *Arch Biochem Biophys*, 1973, 159: 113—122
- 23 Gordon S A, Fleck A, Bell J. Optimal conditions for the estimation of ammonium by the Berthelot reaction. *Ann Clin Biochem*, 1978, 15: 270—275
- 24 Lancien M, Gadal P, Hodges M. Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in higher plant ammonium assimilation. *Plant Physiol*, 2000, 123: 817—824
- 25 Wallsgrove R M, Turner J C, Hall N P, et al. Barley mutants lacking chloroplast glutamine synthetase—biochemical and genetic analysis. *Plant Physiol*, 1987, 83: 155—158
- 26 Edwards J W, Walker E L, Coruzzi G M. Cell specific expression in transgenic plants reveals nonoverlapping roles for chloroplast and cytosolic glutamine synthetase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 3459—3463
- 27 Zhao X Q, Shi W M. Expression analysis of the glutamine synthetase and glutamate synthase gene families in young rice (*Oryza sativa*) seedlings. *Plant Sci*, 2006, 170: 748—754
- 28 Blackwell R D, Murray A J S, Lea P J, et al. Photorespiratory amino donors, sucrose synthesis and the induction of CO₂ fixation in barley deficient in glutamine synthetase and/or glutamate synthase. *J Exp Bot*, 1988, 39: 845—858
- 29 Somerville S R, Ogren W L. Inhibition of photosynthesis in *Arabidopsis* mutants lacking leaf glutamate synthase activity. *Nature*, 1980, 286: 257—259
- 30 Coschigano K T, Melo-Oliveira R, Lim J, et al. *Arabidopsis gls* mutants and distinct *Fd-GOGAT* genes: Implications for photorespiration and primary nitrogen metabolism. *Plant Cell*, 1998, 10: 741—752
- 31 Ferrario-Mery S, Suzuki A, Kunz C, et al. Modulation of amino acid metabolism in transformed tobacco plants deficient in *Fd-GOGAT*. *Plant Soil*, 2000, 221: 67—79
- 32 Hausler R E, Blackwell R D, Lea P J, et al. Control of photosynthesis in barley leaves with reduced activities of glutamine synthetase and glutamate synthase: Plant characteristics and changes in nitrate, ammonium and amino acids. *Planta*, 1994, 194: 406—417
- 33 Blackwell R D, Murray A J S, Lea P J. Inhibition of photosynthesis in barley with decreased levels of chloroplastic glutamine synthetase activity. *J Exp Bot*, 1987, 38: 1799—1809
- 34 Carvalho H G, Lopes-Cardoso I A, Lima L M, et al. Nodule-specific modulation of glutamine synthetase in transgenic *Medicago truncatula* leads to inverse alterations in asparagine synthetase expression. *Plant Physiol*, 2003, 133: 243—252
- 35 Harrison J, Pou M A, Sene O, Hirel B. Does lowering glutamine synthetase activity in nodules modifying nitrogen metabolism and growth of *Lotus japonicus*? *Plant Physiol*, 2003, 133: 253—262