

## 烤烟施钼对含钼酶和碳氮代谢相关酶基因表达的影响

许嘉阳, 胡承孝\*, 孙学成

华中农业大学资源与环境学院/微量元素研究中心, 武汉430070

**摘要:** 为研究钼营养对烤烟生理代谢相关酶的影响, 利用荧光定量PCR技术检测了不同施钼处理下烤烟含钼酶和碳氮代谢相关酶基因的表达量。结果表明: 在4个取样时期, 硝酸还原酶(NR)和颗粒结合型淀粉合成酶(GBSSI)基因以施钼处理表达较强; 蔗糖磷酸合成酶(SPS)和蔗糖磷酸化酶(SPP)基因在移栽50 d后以Mo0处理表达较强, 移栽60和70 d后以Mo1和Mo2处理表达较强; 液泡转化酶(VIN)基因在移栽60、70和80 d后以施钼处理表达较强, 且基因表达强度随施钼浓度的提高而逐渐增强; 淀粉分支酶(SBE)基因表达量在处理间没有表现出明显的变化规律, 在移栽50和60 d后以Mo1表达最强, 移栽80 d后以Mo0表达最强; 谷氨酰胺合成酶GS1-3和GS1-5基因在4个取样时期均表现为Mo1和Mo2处理明显强于Mo0处理。

**关键词:** 烤烟; 钼; 碳氮代谢; 基因表达

钼是植物必需的微量元素之一, 生物体内的钼主要通过组成含钼酶而具有生物学功能。含钼酶通过影响酶的活性进而调控植株的碳代谢和氮代谢(Wang等2013)。碳氮代谢是烤烟生长发育过程中最基本的物质代谢, 碳氮代谢的强弱、协调程度及动态变化直接或间接影响碳水化合物和含氮化合物等物质的合成与积累, 对烤烟产量和品质的形成产生重要影响(史宏志等2009; 拓阳阳等2011; 刘炳清等2015)。近年来, 关于烤烟碳氮代谢的研究多集中在氮、磷、光照等因素对关键酶活性和相关代谢产物上, 认为施用氮和磷肥可以提高硝酸还原酶(nitrate reductase, NR)和淀粉酶的活性, 光强减弱会减少碳水化合物的含量(王红丽等2007; 岳红宾2007; 刘国顺等2009; 云菲等2010), 而关于土壤施钼对烤烟含钼酶和碳氮代谢相关酶基因表达特性的研究还未见报道。

烟草(*Nicotiana tabacum*)是一种重要的叶用经济作物, 其碳氮代谢过程受外界环境因素影响很大, NR、蔗糖磷酸化酶(sucrose-6-phosphate phosphatase, SPP)、蔗糖磷酸合成酶(sucrose-phosphate synthase, SPS)、液泡转化酶(vacuolar invertase, VIN)、谷氨酰胺合成酶(glutamine synthase, GS)等酶在烤烟的碳氮代谢过程中起着至关重要的作用(许自成等2007; 王树会等2012)。目前, 一般把土壤有效钼含量在0.15~0.20 mg·kg<sup>-1</sup>作为土壤钼供应的临界值(张纪利等2009)。烤烟缺钼会导致烟叶叶绿体细胞超微结构发生改变, 叶绿素含量降低, 光合作用能力减弱(武丽等2014), 进而影响烤烟的碳氮代谢过程。本研究以‘豫烟6号’烤烟品种为材料, 研究烤烟在施钼条件下含钼

酶和碳氮代谢相关酶基因表达差异, 旨在为烤烟产区合理施用钼肥和改善烟叶品质提供相关参考依据。

### 材料与方法

#### 1 实验设计

实验于2015年5月在华中农业大学盆栽场进行。供试烤烟(*Nicotiana tabacum* L.)品种为‘豫烟6号’。供试土壤为湖北省武汉市新洲区缺钼酸性黄棕壤, 其基本理化性质为: 有机质19.24 g·kg<sup>-1</sup>、碱解氮126.48 mg·kg<sup>-1</sup>、速效钾158.62 mg·kg<sup>-1</sup>、速效磷6.88 mg·kg<sup>-1</sup>、有效钼0.077 mg·kg<sup>-1</sup>, pH 4.98。

实验采用聚乙烯塑料桶, 每桶装土10 kg。设置Mo0 [0 mg (Mo)·kg<sup>-1</sup>]、Mo1 [0.2 mg (Mo)·kg<sup>-1</sup>]、Mo2 [0.4 mg (Mo)·kg<sup>-1</sup>]等3个钼浓度处理, 每个处理栽16盆。在烟苗移栽前按照N:P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:K<sub>2</sub>O=1:1.5:3 (m/m/m, 下同)施用肥料, 施用烟草专用复合肥(N:P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:K<sub>2</sub>O=10:12:18) 2.5g·kg<sup>-1</sup> (土), 施用过磷酸钙(含P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 12%) 0.75g·kg<sup>-1</sup> (土), 施用硫酸钾(含K<sub>2</sub>O 50%) 3.0g·kg<sup>-1</sup> (土)作为肥底, 使肥料与土壤充分混合均匀。所用肥料过磷酸钙、硫酸钾及钼酸铵均为分析纯(AR), 在烟草生育期内以去离子水浇灌, 以避免微量元素污染。盆栽场设有玻璃瓦防雨棚防止雨水淋洗, 及时松土、除草和喷施农药, 其他农艺措施与大田生产保持一致。

烤烟于2015年5月12日移栽。移栽50、60、

收稿 2016-04-08 修定 2016-06-16  
资助 中国烟草总公司河南省公司重点科技攻关项目(HYKJ-201405)。

\* 通讯作者(E-mail: hucx@mail.hzau.edu.cn)。

70和80 d后分别选取长势均匀一致的3株烤烟同一部位烟叶(第11片叶)进行采样, 并迅速置于液氮中低温保存备用。采用实时荧光定量PCR技术检测含钼酶及碳氮代谢关键酶基因的表达情况, 包括NR、SPS、SPP、VIN、颗粒结合型淀粉合成酶(*granule-bound starch synthase, GBSS*)、淀粉分支酶(*starch branching enzyme, SBE*)和GS基因。

## 2 实验方法

### 2.1 RNA提取

首先提取烟叶中总RNA, 提取方法参考丁福章等(2007)。利用NanoDrop 2000分光光度计测定RNA浓度及OD<sub>260</sub>、OD<sub>280</sub>值, 用琼脂糖凝胶电泳法检测RNA的完整性。

### 2.2 逆转录

利用PrimerScript RT reagent Kit (TaKaRa, Japan)将待测RNA逆转录成cDNA。配制逆转录反应体系: 0.5 μg总RNA、0.5 μL 50 μmol·L<sup>-1</sup> oligo(dT)、0.5 μL 100 μmol·L<sup>-1</sup> random 6mers、2 μL 5×PrimerScript Buffer、0.5 μL PrimerScript RT Enzyme Mix I, 加无核酸酶H<sub>2</sub>O至10 μL。使用ABI 9700型PCR仪在37°C保温15 min, 在85°C 5 s后终止反应。逆转录完毕后加入90 μL无核酸酶H<sub>2</sub>O稀释至100 μL, 储存在-20°C冰箱保存备用。

### 2.3 引物设计

引物采用Roche LCPDS2软件设计并由上海捷瑞生物工程有限公司合成, 引物序列见表1, 其中L25是烟草核糖体蛋白, 在本研究中作为内参基因。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因名称	GenBank登记号	引物序列(5'→3')	
		正向	反向
SPS	DQ213015.1	AGGGAGTCTTCATAAATCCAG	GGACCACCATTCTTAGTAGC
SPP	AAW32903	TTGTTCCCGCCTATGAAG	CAGATGGTCTACACACTGC
VIN	AF376773.1	TAAAGGAATCACAGCGTCCG	TGCATAAAGATCAGCCCAACTA
GBSSI	DQ069270.1	AACAGCTCGAAGTGTGTGA	ATCTGCTTGGAAACCAACATAA
SBE	AB028067.1	CCGAAGATGTTTCGGGTAT	TATCCACTTATCTGGGACTGC
NR	X14058.1	CTTAGCTTCTAGTCTCTGGTGA	CGTCTGCATAATGATATTCGT
GS1-3	X95933.1	GTGATGAAGTGTGGGTAGC	GTTCCAATCGCCCGGAATA
GS1-5	X95932.1	GCTGACATCAACACATTCAAA	GCCTCCTATCCTCGAAGTA
L25	L18908	AGTTACATTCCACCGACC	TCCTCAATCTTCTTCATTGCAG

### 2.4 荧光定量PCR

利用LightCycler<sup>®</sup> 480 SYBR Green I Master试剂盒(Roche, Switzerland)在LightCycler<sup>®</sup> 480 II型荧光定量PCR仪(Roche, Switzerland)上进行反应。PCR体系: 5 μL 2×LightCycler<sup>®</sup> 480 SYBR Green I Master、0.2 μL 10 μmol·L<sup>-1</sup>正向引物、0.2 μL 10 μmol·L<sup>-1</sup>反向引物、1 μL cDNA、3.6 μL无核酸酶H<sub>2</sub>O。PCR程序: 95°C 10 min; 95°C 10 s, 60°C 30 s, 40个循环。循环结束后利用熔解曲线检测产物特异性: 从60°C缓慢升温至97°C, 每升1°C采集5次荧光信号。

### 3 数据处理

实验数据采用2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>算法进行计算, 相对表达量=2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>=2<sup>-(ΔC<sub>t,实验组样品</sub>-ΔC<sub>t,对照样品</sub>)</sup>, 其中ΔC<sub>t</sub>=C<sub>t,目的基因</sub>-C<sub>t,内参基因</sub>, 实验数据处理和图形分析采用SPSS 19.0

和Excel 2007统计软件完成。

## 实验结果

### 1 施钼对烟叶中含钼酶基因表达的影响

NR是硝酸盐还原过程中的主要限制因子, 是一种含钼酶, 能够把植物体中的NO<sub>3</sub>还原成NO<sub>2</sub>(杜永成等2012)。如图1所示, 在同一取样时期, 施钼处理NR基因表达量显著高于不施钼处理。在烤烟移栽50和60 d后, Mo1水平NR基因表达量最强, 基因表达量分别比Mo0提高了78.76%和69.24%。在移栽70和80 d后, Mo2水平NR基因表达量最强, 分别比Mo0提高了51.26%和39.40%。

### 2 施钼对烟叶中碳代谢酶基因表达的影响

SPS是调控蔗糖合成途径的关键酶, 它以尿苷二磷酸葡萄糖(uridine diphosphate glucose, UDPG)

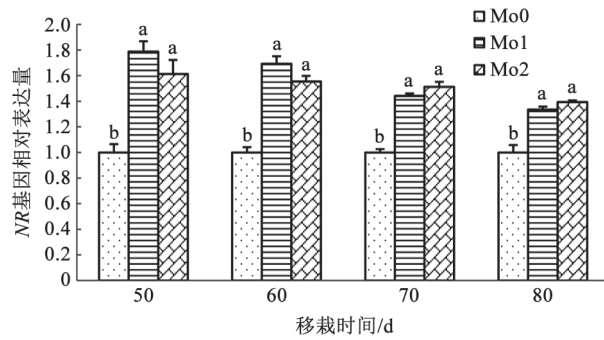


图1 施钼对烟叶NR基因表达量的影响

Fig.1 Effect of Mo application on NR gene expression

同一移栽时间的各柱形上用不同小写字母标识表示差异显著 ( $P<0.05$ ), 下同。

为供体, 调控烟叶中光合产物向库端的供应能力(王义伟等2009)。如图2所示, 烤烟移栽50 d后, SPS基因以Mo0表达最强; 移栽60和70 d后, 以Mo2表达最强; 移栽80 d后, 以Mo1处理最强, Mo2次之, Mo0为最弱。

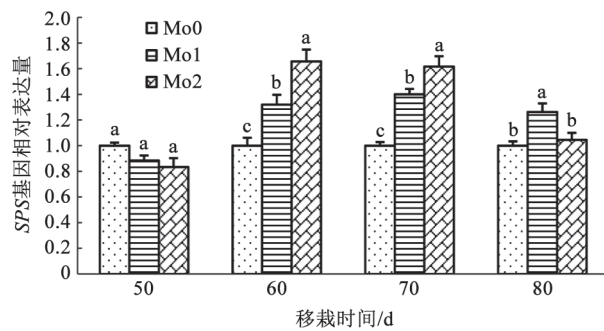


图2 施钼对烟叶SPS基因表达量的影响

Fig.2 Effect of Mo application on SPS gene expression

植物体内的SPP以复合体的形式存在, 是参与蔗糖合成最后步骤的关键酶(唐朝荣等2013)。如图3所示, 烤烟移栽50 d后, SPP基因表达以Mo0最强; 在移栽60和70 d后, 以Mo1表达最强, Mo2次之, Mo0最弱; 移栽80 d后, SPP基因表达量则表现为Mo1>Mo0>Mo2。

VIN能够催化蔗糖转化为葡萄糖, 协调果实器官中糖分含量变化的动态平衡(Woodson和Wang 1987)。如图4所示, 烤烟移栽50 d后, 各处理之间VIN基因表达量没有显著差别; 在移栽60、70和80 d后三个取样时期, VIN基因均以Mo2表达最强, Mo1次之, Mo0表达最弱。

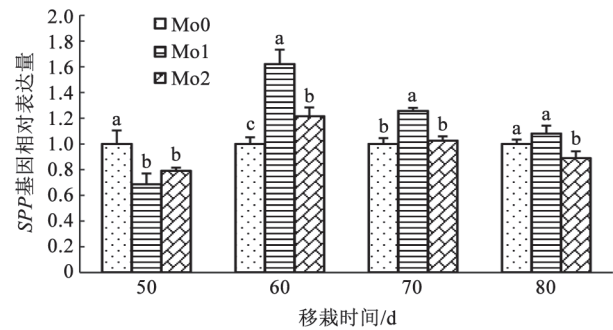


图3 施钼对烟叶SPP基因表达量的影响

Fig.3 Effect of Mo application on SPP gene expression

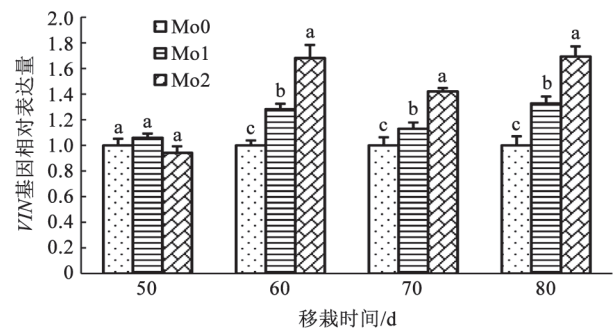


图4 施钼对烟叶VIN基因表达量的影响

Fig.4 Effect of Mo application on VIN gene expression

GBSS包括GBSSI和GBSSII, 是植物体内直链淀粉合成的关键酶(匡云波和赖钟雄2012)。如图5所示, 在同一取样时期, GBSSI基因表达量以施钼处理表达较强。在移栽70 d后, GBSSI基因以Mo1表达最强, 在移栽50、60和80 d后, GBSSI基因表达量呈现出Mo2>Mo1>Mo0的情况。

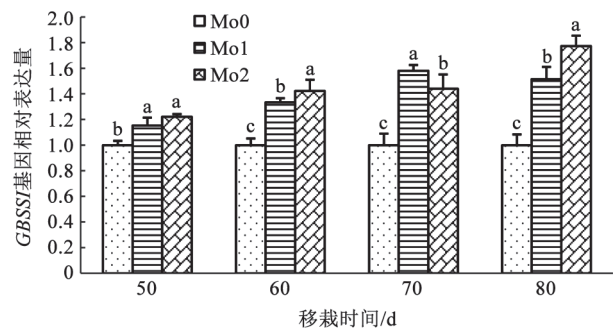


图5 施钼对烟叶GBSSI基因表达量的影响

Fig.5 Effect of Mo application on GBSSI gene expression

SBE能够催化 $\alpha$ -1,6糖苷键形成支链淀粉, 是直接参与支链淀粉生物合成的关键酶(刘玉汇等



2010)。如图6所示, 在移栽50和60 d后, *SBE*基因表达量以Mo1表达最强, Mo2次之, Mo0最弱; 在移栽70 d后, 以Mo1最强, Mo0次之, Mo2最弱; 在移栽80 d后, *SBE*基因表达量呈现出Mo0>Mo1>Mo2。

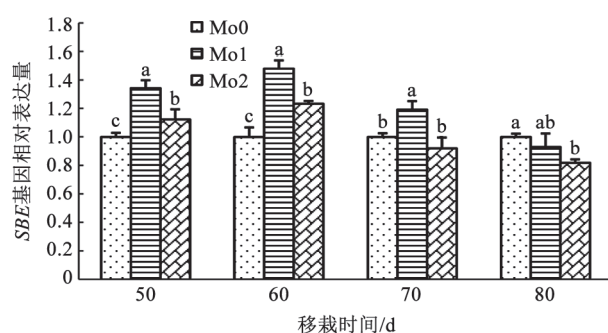


图6 施钼对烟叶*SBE*基因表达量的影响

Fig.6 Effect of Mo application on *SBE* gene expression

### 3 施钼对烟叶氮代谢酶基因表达的影响

GS能够将植物吸收的和从硝酸盐还原得到的铵经由GS/GOGAT循环同化为氨基酸(冯卓等2012)。如图7所示, 烤烟移栽50、60和70 d后, *GSI-3*基因表达量以Mo1表达最强, 基因表达量分别比Mo0增加了25.39%、50.23%和63.37%; 移栽80 d后, *GSI-3*基因表达量以Mo2表达最强, 比Mo0增加了49.69%。

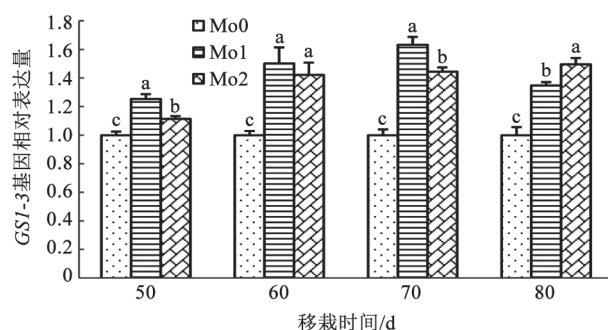


图7 施钼对烟叶*GSI-3*基因表达量的影响

Fig.7 Effect of Mo application on *GSI-3* gene expression

*GSI-5*基因表达量如图8所示, 在各取样时期基因表达量均以Mo1表达最强, Mo2次之, Mo0表达最弱。在4个取样时期, Mo1处理基因表达量分别比Mo0增加了31.45%、55.21%、58.70%和69.57%; Mo2比Mo0分别增加了24.39%、37.65%、45.34%和49.68%。

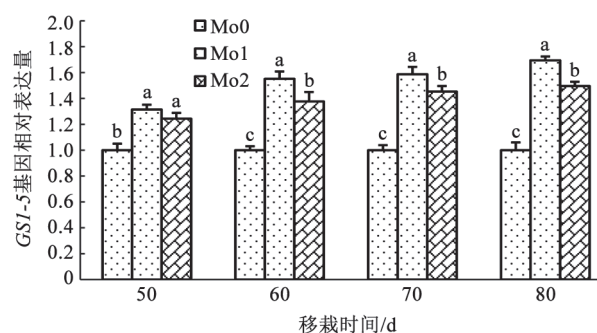


图8 施钼对烟叶*GSI-5*基因表达量的影响

Fig.8 Effect of Mo application on *GSI-5* gene expression

## 讨 论

烟苗移栽后50~80 d是烟草由旺长期向成熟期转变的关键时期, 也是烟草由营养生长到生殖生长的过渡时期。钼作为多种酶的组成成分, 通过影响酶的活性进而影响植物碳氮代谢等生理过程(Nautiyal和Chatterjee2004)。NR是一种含钼酶, 其活性大小能够反映植物进行氮代谢的水平(熊瑶等2012)。刘鹏和杨玉爱(2000)的研究指出, 大豆在低钼胁迫下会导致NR活性降低, 体内硝态氮积累, 抑制根系对氮的吸收, 对大豆氮代谢的产生消极影响。比较3个处理在不同取样时期NR基因表达量可以看出, Mo1和Mo2处理NR基因表达明显强于Mo0处理, 说明施钼促进了NR基因的表达, 烤烟体内的氮代谢强度明显增强, 促进了含氮物质的合成和积累, 这可能与钼直接参与NR的生物合成, 提高了NR的酶学活性有关。

烟叶的碳代谢主要包括无机碳的固定以及碳水化合物运输、转化、积累与分解过程, 这些生理过程需要多种相关酶的协同调控(史宏志等1999)。武丽等(2015)的研究指出, 烤烟在缺钼条件下培养30 d后, *SPP*、*VIN*等酶活性明显下降, 而施钼条件下培养的烟草相关酶活性有所提高。比较不同钼浓度水平各取样时期*SPS*、*SPP*和*VIN*的基因表达量可以得出, *VIN*基因表达以施钼处理表达较强, 且施钼浓度越高, 基因表达越强; *SPS*和*SPP*基因的表达规律则有所不同, 在烤烟生育初期(移栽50 d后), Mo0处理表达较强; 到了烤烟生育后期(移栽60、70和80 d后), Mo1和Mo2处理表达较强, 说明施钼促进了*VIN*、*SPS*和*SPP*基因的表达, 提高了烤烟对碳的固定能力, 这可能与烤烟生长

后期碳代谢强度增强有关,而施钼可以提高相关酶的活性,增强烤烟的光合作用。淀粉是烤烟在大田生育期间积累的重要碳水化合物,烟叶中的淀粉含量对烤后烟叶化学成分协调性和香气、芳香性有重要影响(宫长荣等2009)。GBSS和SBE是淀粉合成过程中的关键酶,其中GBSS主要影响直链淀粉的合成,可以分为GBSSI和GBSSII(时岩玲和田纪春2003)。本研究结果表明,施钼处理下GBSSI基因表达量明显增强,以Mo<sub>2</sub>水平提升效果更为明显;SBE基因表达量在各处理之间并未表现出明显的变化规律,说明施钼能够促进GBSS基因的表达,有利于直链淀粉的生物合成,有助于提高烟叶中的香气成分,这与黄泰松等(2012)研究中施钼对烟叶香气成分的影响结果一致。

氮代谢是烟草生长发育过程中最基本的代谢,烟叶中含氮化合物的多少对烟叶的品质形成起着至关重要的作用。GS可以分为细胞质型GS(GS1)和叶绿体型GS(GS2),能够将植物吸收的和从硝酸盐还原得到的铵经由GS/GOGAT循环同化为氨基酸(蔡红梅等2010)。比较各处理GS1-3和GS1-5基因表达量可以看出,施钼处理下酶基因表达较强,以Mo<sub>1</sub>水平提升效果更为明显,这可能与烤烟打顶以后烟碱等含氮物质向中部叶转移有关。施钼可以增强GS对氮的利用和转化,促进蛋白质的生物合成,从而有利于烤烟品质的形成。

本研究从分子生物学角度分析比较了不同施钼浓度下,烤烟含钼酶和碳氮代谢相关酶基因的表达差异,指出施钼使烤烟含钼酶和碳氮代谢相关酶基因表达上更强,有利于碳水化合物和含氮物质的合成与积累,但在最适宜施钼浓度以及钼对碳氮代谢相关酶基因增强作用的内在机理上仍需进一步研究。

### 参考文献

- Cai HM, Xiao JH, Zhang QF, Lian XM (2010). Co-suppressed *glutamine synthetase2* gene modifies nitrogen metabolism and plant growth in rice. *Chin Sci Bull*, 55 (10): 875–886 (in Chinese) [蔡红梅, 肖景华, 张启发, 练兴明(2010). 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. *科学通报*, 55 (10): 875–886]
- Ding F, Li J, Yuan Y, Lei B (2007). Effective isolation of total RNA from tobacco tissues. *Chin Agric Sci Bull*, 23 (12): 98–101 (in Chinese with English abstract) [丁福章, 李继新, 袁有波, 雷波(2007). 烟草不同组织总RNA的提取方法初探. *中国农学通报*, 23 (12): 98–101]
- Du YC, Wang YB, Fan WT, Gai ZJ, Yu DS, Gu W, Zhang LL, Ma FM (2012). Effect of nitrogen fertilization on nitrate reductase and nitrite reductase activities of sugar beet. *Plant Nutr Fert Sci*, 18 (3): 717–723 (in Chinese with English abstract) [杜永成, 王玉波, 范文婷, 盖志佳, 于敦爽, 谷维, 张俐俐, 马凤鸣(2012). 不同氮素水平对甜菜硝酸还原酶和亚硝酸还原酶活性的影响. *植物营养与肥料学报*, 18 (3): 717–723]
- Feng Z, Qin ZW, Wu T, He HM (2012). Cloning and expression of cytosolic glutamine synthetase (*GS1*) in *Cucumis sativus* L. under low nitrogen conditions. *Sci Agric Sin*, 45 (15): 3100–3107 (in Chinese with English abstract) [冯卓, 秦智伟, 武涛, 何红梅(2012). 黄瓜细胞质型谷氨酰胺合成酶基因(*GS1*)的克隆及其在低氮条件下的表达. *中国农业科学*, 45 (15): 3100–3107]
- Gong CR, Wu LL, Yuan HT, Wang GL, Yu JH, Chen CQ (2009). Effect of yellowing conditions on starch metabolism during curing process of tobacco leaf. *J Northwest A&F Univ-Nat Sci*, 37 (1): 117–121 (in Chinese with English abstract) [宫长荣, 毋丽丽, 袁红涛, 王国良, 余金恒, 陈长清(2009). 烘烤过程中变黄条件对烤烟淀粉代谢的影响. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 37 (1): 117–121]
- Hang T, Zhang J, Jin Y, Wei J, Bai S, Li Z, Xu Z (2012). Effect of molybdenum on aroma components of tobacco leaf. *Jiangsu Agric Sci*, 40 (6): 94–95 (in Chinese) [黄泰松, 张纪利, 金亚波, 韦建玉, 白森, 李章海, 徐增汉(2012). 施钼对烟草香气成分含量的影响. *江苏农业科学*, 40 (6): 94–95]
- Kuang Y, Lai Z (2012). Cloning and sequence analysis of *GBSSI* and *SSIII* from the leaves in *Musa* spp. *Chin J Trop Crops*, 33 (1): 70–78 (in Chinese with English abstract) [匡云波, 赖钟雄(2012). 香蕉叶片颗粒结合性淀粉合成酶I和可溶性淀粉合成酶III基因的克隆与序列分析. *热带作物学报*, 33 (1): 70–78]
- Liu BQ, Xu JY, Huang HG, Yang YX, Yang SJ, Lian PK, Xu ZC (2015). Analysis of differential gene expression of the related enzymes in carbon and nitrogen metabolism of flue-cured tobacco at different altitudes. *Plant Physiol J*, 51 (2): 183–188 (in Chinese with English abstract) [刘炳清, 许嘉阳, 黄化刚, 杨永霞, 杨双剑, 连培康, 许自成(2015). 不同海拔下烤烟碳氮代谢相关酶基因的表达差异分析. *植物生理学报*, 51 (2): 183–188]
- Liu GX, Peng ZL, Huang YJ, Li LD (2009). Effects of nitrogen and phosphorus interaction on enzyme activity in carbon and nitrogen metabolism. *Acta Tab Sin*, 15 (5): 33–37 (in Chinese with English abstract) [刘国顺, 彭智良, 黄元炯, 李立丹(2009). N、P互作对烤烟碳氮代谢关键酶活性的影响. *中国烟草学报*, 15 (5): 33–37]
- Liu P, Yang YA (2000). The effect of the stress of boron and molybdenum on NR activity and contents of nitrate-N in leaves of soybean. *J Zhejiang Univ-Agric Life Sci*, 26 (2): 36–39 (in Chinese with English abstract) [刘鹏, 杨玉爱(2000). 硼钼胁迫对大豆叶片硝酸还原酶与硝态氮的影响. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 26 (2): 151–154]
- Liu YH, Wang L, Yang HY, Zhang JL, Wang D (2010). Advances of research on plant starch branching enzyme gene. *J Triticeae Crops*, 30 (3): 581–586 (in Chinese with English abstract) [刘玉汇, 王丽, 杨宏羽, 张俊莲, 王蒂(2010). 植物淀粉分支酶基因

- 的研究进展. 麦类作物学报, 30 (3): 581-586]
- Nautiyal N, Chatterjee C (2004). Molybdenum stress-induced changes in growth and yield of chickpea. *J Plant Nutr*, 27 (1): 173-181
- Shi H, Han J, Zhao P, Yang C (1999). Studies on the dynamic changes in amylase and invertase activity in flue-cured tobacco as affected by nitrogen level and source. *Chin Tob Sci*, (3): 5-8 (in Chinese with English abstract) [史宏志, 韩锦峰, 赵鹏, 杨春英 (1999). 不同氮量和氮源下烤烟淀粉酶和转化酶活性动态变化. 中国烟草科学, (3): 5-8]
- Shi HZ, Li Z, Liu GS, Wang DZ, Zu CL, Yang YF (2009). Dynamic changes of carbon-nitrogen metabolism and sugar accumulation in South Anhui flue-cured tobacco with sweet aroma. *Acta Agric Boreal Sin*, 24 (3): 144-148 (in Chinese with English abstract) [史宏志, 李志, 刘国顺, 王道支, 祖朝龙, 杨永锋 (2009). 皖南焦甜香烤烟碳氮代谢差异分析及糖分积累变化动态. 华北农学报, 24 (3): 144-149]
- Shi YL, Tian JC (2003). Progress in research of granule-bound starch synthase (2003). *J Triticeae Crops*, 23 (3): 119-122 (in Chinese with English abstract) [时岩玲, 田纪春 (2003). 颗粒结合型淀粉合成酶研究进展. 麦类作物学报, 23 (3): 119-122]
- Tang C, Xiao X, Fang Y, Long X (2013). Cloning and expression of a sucrose phosphatase gene from *Hevea brasiliensis*. *Chin J Trop Crops*, 34 (5): 855-859 (in Chinese with English abstract) [唐朝荣, 肖小虎, 方永军, 龙翔宇 (2013). 巴西橡胶树磷酸蔗糖磷酸化酶基因的克隆和表达模式分析. 热带作物学报, 34 (5): 855-859]
- Tuo Y, Zhao M, Zhang G, Liu H (2011). Differences of foliar carbon and nitrogen metabolism and related products among cultivars of flue-cured tobacco. *Acta Agric Boreal-Occident Sin*, 20 (4): 82-86 (in Chinese with English abstract) [拓阳阳, 赵铭钦, 张广富, 刘洪华 (2011). 不同烤烟品种叶片碳氮代谢及相关产物差异性. 西北农业学报, 20 (4): 82-86]
- Wang D, Pang YX, Wang WQ, Wan CY, Hou JL, Yu FL, Wang QL, Liu FB, Zhang XD (2013). Effect of molybdenum on secondary metabolic process of glycyrrhizic acid in *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. *Biochem Syst Ecol*, 50 (7): 93-100
- Wang H, Yang H, Su F, Li H, Zhang Y, Yang J, Shi H (2014). Effects of nitrogen on expression of key genes related to carbon/nitrogen metabolism and terpenoid metabolism in maturing flue-cured tobacco leaves. *Acta Tab Sin*, 20 (5): 116-120 (in Chinese with English abstract) [王红丽, 杨惠娟, 苏菲, 李海江, 张要旭, 杨军杰, 史宏志 (2014). 氮用量对烤烟成熟期叶片碳氮代谢及萜类代谢相关基因表达的影响. 中国烟草学报, 20 (5): 116-120]
- Wang SH, Zhao XF, Liu WJ (2012). Effects of different soil types on carbon-nitrogen metabolism and metabolites changes of flue-cured tobacco in Mid-Yunnan. *J Southwest China Norm Univ-Nat Sci*, 37 (12): 62-66 (in Chinese with English abstract) [王树会, 赵宪凤, 刘卫群 (2012). 植烟土壤对云南滇中烤烟碳氮代谢及其代谢产物动态变化的影响. 西南师范大学学报(自然科学版), 37 (12): 62-66]
- Wang Y, He X, Fu Y, Li Z, Song Y (2009). Effect of different transplanting periods on the activity of sucrose metabolizing enzymes and chemical composition. *Chin Agric Sci Bull*, 25 (12): 107-111 (in Chinese with English abstract) [王义伟, 贺晓辉, 符云鹏, 李志伟, 宋玉川 (2009). 不同移栽期对保山香料烟叶片碳氮代谢关键酶活性和化学成分的影响. 中国农学通报, 25 (12): 107-111]
- Woodson WR, Wang H (1987). Invertases of carnation petals. Partial purification, characterization and changes in activity during petal growth. *Physiol Plantarum*, 71 (2): 224-228
- Wu L, Luo Q, Tang X, Li Z, Huang Y (2014). Effect of photosynthetic pigment, diurnal changes of fluorescence and ultrastructure in fast growing period of flue-cured tobacco to molybdenum deficiency. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 34 (9): 1801-1807 (in Chinese with English abstract) [武丽, 罗倩茜, 唐兴贵, 李章海, 黄义德 (2014). 缺钼对旺长期烤烟光合色素和荧光日变化及亚显微结构的影响. 西北植物学报, 34 (9): 1801-1807]
- Wu L, Zhang X, Tang X, Luo Q, Li Y, Zuo Y, Ye W (2015). Effects on molybdenum enzymes and carbon/nitrogen metabolism enzymes of tobacco under molybdenum stress. *J Nucl Agric Sin*, 29 (12): 2385-2393 (in Chinese with English abstract) [武丽, 张西仲, 唐兴贵, 罗倩茜, 李余湘, 左业华, 叶文玲 (2015). 钼胁迫对烟草含钼酶和碳氮代谢关键酶的影响. 核农学报, 29 (12): 2385-2393]
- Xiong Y, Chen J, Wang W, Deng S, Peng C, Lin Y, Wang X (2012). Effects of straw-returning on root activity and physiological characteristics of carbon-nitrogen metabolism of flue-cured tobacco. *Chin Agric Sci Bull*, 28 (30): 65-70 (in Chinese with English abstract) [熊瑶, 陈建军, 王维, 邓世媛, 彭琛, 林锐锋, 王晓剑 (2012). 秸秆还田对烤烟根系活力和碳氮代谢生理特性的影响. 中国农学通报, 28 (30): 65-70]
- Xu ZC, Zhang T, Lu XP, Zhang YJ (2007). Effects of applying indole-3-acetic acid (IAA) and potassium on carbon and nitrogen metabolism of flue-cured tobacco after topping. *Chin J Ecol*, 26 (4): 461-465 (in Chinese with English abstract) [许自成, 张婷, 卢秀萍, 张延军 (2007). 打顶后施用生长素(IAA)和钾肥对烤烟碳氮代谢的影响. 生态学杂志, 26 (4): 461-465]
- Yu F, Liu GS, Shi HZ (2010). Interaction effects of light intensity and nitrogen supply on gas exchange, some enzyme activities in carbon-nitrogen metabolism and quality in flue-cured tobacco. *Acta Agron Sin*, 36 (3): 508-516 (in Chinese with English abstract) [云菲, 刘国顺, 史宏志 (2010). 光氮互作对烟草气体交换和部分碳氮代谢酶活性及品质的影响. 作物学报, 36 (3): 508-516]
- Yu H (2007). Effects of various nitrogen levels on key enzymes activeness of flue-cured tobacco leaves in carbon and nitrogen metabolism. *Chin Tob Sci*, 28 (1): 18-20, 24 (in Chinese with English abstract) [岳红宾 (2007). 不同氮素水平对烟草碳氮代谢关键酶活性的影响. 中国烟草科学, 28 (1): 18-20, 24]
- Zhang JL, Yang ML, Luo HX, Lu XL, Huang YD, Li ZH (2009). Research progress on soil molybdenum nutrition and application of molybdenum nutrition in tobacco. *Guizhou Agric Sci*, 37 (4): 96-100 (in Chinese with English abstract) [张纪利, 杨梅林, 罗红香, 陆新莉, 黄义德, 李章海 (2009). 土壤钼素营养状况及钼在烟草上的应用研究进展. 贵州农业科学, 37 (4): 96-100]

## Effect of molybdenum application on the gene expression of molybdenum enzymes and related enzymes in carbon/nitrogen metabolism of *Nicotiana tabacum* L.

XU Jia-Yang, HU Cheng-Xiao\*, SUN Xue-Cheng

College of Resources and Environment / Microelement Research Center, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

**Abstract:** In order to study the effect of molybdenum nutrition on the related enzymes in physiological metabolism of *Nicotiana tabacum* L., the real-time quantitative PCR was used to detect gene expression of molybdenum enzymes and related enzymes in carbon/nitrogen metabolism among different molybdenum applications. The results indicate that, during the four sampling periods, *nitrate reductase (NR)* and *granule bound starch synthase (GBSSI)* genes were expressed more strongly in the treatment of molybdenum. *Sucrose phosphate synthase (SPS)* and *sucrose phosphorylase (SPP)* genes were expressed more strongly in the treatment of Mo0 at the fiftieth days after transplanting, and the treatment of Mo1 and Mo2 were expressed more strongly at the sixtieth and seventieth days after transplanting. The *vacuole invertase (VIN)* gene was expressed strongly at the sixtieth, seventieth and eightieth days after transplanting; the higher were the application of molybdenum, the more strongly *VIN* gene expressed. *Starch branching enzyme (SBE)* gene expression did not show a significant change in the study, *SBE* gene was expressed most strongly at the fiftieth and sixtieth days after transplanting in Mo1 treatment, and was expressed most strongly at the eightieth days after transplanting in Mo0 treatment. During the four sampling periods, *GSI-3* and *GSI-5* genes were expressed more strongly in Mo1 and Mo2 treatments than in the treatment of Mo0.

**Key words:** *Nicotiana tabacum*; molybdenum; carbon/nitrogen metabolism; gene expression

---

Received 2016-04-08 Accepted 2016-06-16

This work was supported by the Key Programs for Science and Technology Development of Henan Tobacco Corporation, China (Grant No. HYKJ201405).

\*Corresponding author (E-mail: hucx@mail.hzau.edu.cn).