

草莓钼转运蛋白基因*MOT1*的克隆与表达以及对氮代谢的影响

刘利, 孙明岳, 张蕊, 杨超, 李玲, 高东升, 付喜玲*

作物生物学国家重点实验室, 山东果蔬优质高效生产协同创新中心, 山东农业大学园艺科学与工程学院, 山东泰安271018

摘要: 从‘章姬’草莓中克隆了一个*MOT1*家族成员的全长, 测序发现其CDS序列与公布的森林草莓基因组序列一致, 将其命名为*FaMOT1*。进化树分析表明*FaMOT1*所编码的氨基酸与苹果和桃亲缘关系最近。荧光定量PCR结果表明, *FaMOT1*基因在草莓的根、茎、叶、花和10 d幼果中有不同程度的表达。对草莓幼苗喷施不同浓度的钼酸钠, 结果发现, 各处理叶片的钼浓度随着施钼量的增加而显著提高。2.4 mmol·L⁻¹ Na₂MoO₄处理显著诱导根部和叶片的*FaMOT1*的表达, 处理2和4 h时4.8 mmol·L⁻¹ Na₂MoO₄处理的茎部*FaMOT1*表达水平最高, 处理6和12 h时2.4 mmol·L⁻¹ Na₂MoO₄处理的茎部*FaMOT1*表达水平最高。2.4 mmol·L⁻¹ Na₂MoO₄处理叶片的确态氮浓度显著低于其它处理, 氨态氮浓度显著高于其它处理; 4.8 mmol·L⁻¹ Na₂MoO₄处理根部和叶片的氨态氮浓度最低。以上结果表明*FaMOT1*基因的表达受到钼的诱导和调节, 合适浓度的钼处理有利于硝态氮的吸收和向氨态氮的转化以及氨态氮向有机氮的转化。

关键词: 草莓; 钼; *MOT1*; 基因克隆; 表达分析

钼是原核生物和真核生物不可缺少的一种微量元素(Arnon和Stout 1939; 孙学成和胡承孝2005; Mendel和Bittner 2006)。钼是化学元素周期表中的一种过渡性金属元素, 化合价从+1到+6价都有, 以钼酶的形式参与体内的氧化还原反应中, 起着传递电子的作用(Kaiser等2005)。目前已证明存在于高等植物体内的钼酶有硝酸盐还原酶(nitrate reductase, NR)、黄嘌呤脱氢酶(xanthine dehydrogenase, XDH)、醛氧化酶(aldehyde oxidase, AO)、亚硫酸盐氧化酶(sulfite oxidase, SO)和线粒体氨肟还原蛋白(mitochondrial amidoxime reducing component, mARC)(Hille等2014; Leimkühler和Iobbi-Nivol 2015; Atwal和Scaglia 2016)。钼缺乏的现象在多种农作物中已有报道, 尤其是酸性土壤上更加严重(巫飞飞等2015)。植物生长在缺钼的土壤上容易出现叶片失绿、叶缘卷曲、叶枯斑病、种子发育不良和坐果率降低等症状(Tejada-Jiménez等2013)。钼酸根离子(MoO₄²⁻)是植物根系吸收的最为常见的一种钼元素形式(Kaiser等2005), 是植株体内钼元素转运的主要形式之一, 相对稳定的钼离子库在维持植株体内的钼元素动态平衡中具有重要作用(Tejada-Jiménez等2009; Merchant 2010)。因此, 深入研究钼的吸收转运的生物学过程, 克隆调控这一过程的关键基因, 并对其表达产物进行分析就显得尤为必要。

植物必须从土壤中吸收适量的MoO₄²⁻, 才能满足正常的生长发育。植物中存在两种类型的钼转运蛋白, 一种是专一性转运蛋白, 另一种是共转

运蛋白(Tejada-Jiménez等2013; 刘利和高东升2016)。近年来, 随着植物种属基因组和分子生物学的快速发展, 编码植物钼转运蛋白的基因得到鉴定。目前在莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中克隆了*MOT1*基因, 它们在钼元素的吸收转运过程中起着关键作用。研究发现CrMOT1和AtMOT1;1是一类高亲和的MoO₄²⁻转运蛋白, 能够从低钼水平的土壤环境中吸收、转运并介导MoO₄²⁻在细胞间的分配; AtMOT1;2是细胞内重要的MoO₄²⁻储存蛋白并参与器官间的钼酸盐的转移(Tejada-Jiménez等2007; Tomatsu等2007; Gasber等2011)。

氮素是植物生长发育所必需的大量矿质元素之一, 参与作物体内氨基酸、蛋白质、激素、核酸、叶绿素、酶、维生素和生物碱等关键有机化合物的组成(Novoa和Loomis 1981; Krapp 2015; 张合琼等2016)。植物能够吸收利用生长介质中的无机氮(硝酸盐和铵盐等)和有机氮(尿素和氨基酸等)(Qian等2015)。硝态氮是高等植物可直接利用且最易被植物吸收的氮素营养形态, 直接影响光合电子传递、糖类运输、蛋白质表达及二级代谢物等合成(Crawford和Glass 1998; Stitt 1999)。钼是NR的活性成分, 在硝酸盐还原为亚硝酸盐的过程中起着传递电子的作用。外界的钼如何转运到植

收稿 2016-10-17 修定 2017-03-15

资助 国家自然科学基金(31672137)和山东省现代农业产业技术体系果品创新团队-栽培与土肥岗(SDAIT-06-01)。

* 通讯作者(E-mail: xilingfu@sdau.edu.cn)。

物体内,转运到植物体内的钼是如何影响植物体内NR的活性,钼在硝态氮转化为氨态氮的过程中如何发挥作用,有待深入研究。生产上农民常常大量使用氮肥来达到提产增效的目的,这增加了成本,使得土壤氮素过剩,污染地下水,影响生态环境安全和农业可持续发展(Qian等2015)。钼肥的施用能否在一定程度上提高草莓对氮素的吸收利用有待系统研究。

目前国内外学者在衣藻和拟南芥等模式生物上对*MOT1*已有相对深入的研究,但是在果树上相关的研究报道还比较少。本试验选用栽培草莓克隆了*MOT1*基因,并对其生物信息学进行了分析,应用荧光定量技术检测了供钼和缺钼条件下该基因的表达水平,并利用电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)测定了植物体钼含量,利用试剂盒法测定植物体内硝态氮、亚硝态氮和氨态氮含量,为进一步阐明草莓*MOT1*基因的功能及作用机理提供基本依据。

材料与方法

1 试验材料与试验设计

试验于2015年在山东农业大学试验站进行。试验所用材料为栽培草莓‘章姬’(*Fragaria × ananassa* Duch. cv. ‘Akihime’),采用匍匐茎繁殖育苗技术,待幼苗长到5~6片真叶时移至栽培槽中进行无土栽培培养。每个槽内定植2行,株距15 cm左右,定植8棵,选用14个栽培槽,共定植112棵。一部分幼苗(16棵)先用1/4霍格兰营养液预培养7 d,再用1/2霍格兰营养液培养7 d,然后用霍格兰营养液培养。分别取生根期幼苗的生长根、幼茎、叶、开花期的初生花和花后10 d的幼果作为样品,液氮冷冻,−80°C保存,用于RNA提取。

另外一部分幼苗(96棵)先用1/4不含钼霍格兰营养液预培养7 d,再用1/2不含钼霍格兰营养液预培养7 d,然后用不含钼的全硝态氮霍格兰营养液培养。待幼苗长到10~15片真叶时,选取生长一致的幼苗用蒸馏水进行饥饿处理7 d,然后分别用不含钼的全硝态氮霍格兰营养液培养7 d后进行正式试验。试验设4个处理,即叶面喷施清水为对照(CK),叶面喷施1.2 (T1)、2.4 (T2) 和4.8 (T3) mmol·L⁻¹的钼酸钠(Na₂MoO₄),每个处理喷施60 mL,每7 d喷一次,共喷3次。每个处理24棵,3个重

复。取处理0、2、4、6和12 h后的样品液氮冷冻,用于RNA的提取。并于处理第25天取样测定植株体内钼含量、硝态氮、亚硝态氮和氨态氮含量,各处理的幼苗经清水→洗涤剂→清水→0.1%盐酸→3次去离子水冲洗干净后,分为根、茎和叶片三部分,于80°C下烘干,粉碎后过0.25 mm筛以备用(刘利等2016)。

2 总RNA的提取和反转录

将冻存的样品在液氮中迅速研磨成粉,取100 mg组织样,用TIANGEN生产的RNAprep Pure多糖多酚植物总RNA提取试剂盒法提取样品的总RNA。从各器官提取的RNA各取2 μL进行1.0%琼脂糖凝胶电泳检测,使用大连宝生物公司DL 2000 DNA Marker估测目的条带大小。cDNA第一链的合成参照试剂盒Primer Script™ RT Reagent Kit With gDNA Eraser (Takara)说明书。

3 *MOT1*基因的获取与克隆

根据拟南芥*MOT1*家族成员登陆的基因号,在拟南芥基因组数据(<https://www.arabidopsis.org/>)中查得*MOT1*家族成员的蛋白序列,然后比对草莓基因组数据库(<https://www.rosaceae.org/species/Fragaria/Fragaria x ananassa>)获得草莓中*MOT1*类似基因序列,最后再从GDR (<http://www.rosaceae.org/>)数据库下载最新草莓全基因组数据,从Pfam数据库(<http://pfam.xfam.org/>)下载MFS-family MOT1 (PF16983)。利用HMMER 3.0执行搜索,进一步验证上述得到草莓的*MOT1*类似基因,最终在草莓中确定1个*MOT1*家族成员,将其命名为*FaMOT1*。

利用Primer 5.0设计引物*MOT1*-F和*MOT1*-R(表1),分别以草莓的cDNA为模板,使用Thermo Scientific公司的Phusion High-Fidelity DNA Polymerase高保真酶进行草莓*MOT1*基因的CDS扩增。利用TIANquick Midi Purification Kit普通DNA产物

表1 本文所用的引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

引物名称	引物序列(5'→3')
<i>FaMOT1</i> -F	GTCGACATGGAGTCCCAAAACCC
<i>FaMOT1</i> -R	GGATCCTCATGCATTCAAATCGTTAGAAT
<i>FaActin</i> -F	TGGGTTTGCTGGAGATGAT
<i>FaActin</i> -R	CAGTTAGGAGAACTGGGTGC
<i>FaMOT1</i> -sybrF	CAACTCGCACAGGGATTGTCAATT
<i>FaMOT1</i> -sybrR	TCCTCAACTCCACCTTCACTCAC

纯化试剂盒对PCR产物进行胶回收后, 连入pEASY-Blunt Zero Cloning Kit载体, 转化大肠杆菌DH5 α , 挑取阳性克隆送去上海生工公司测序。

4 实时荧光定量PCR分析(qRT-PCR)

根据*MOT1*的cDNA序列设计荧光定量特异引物(表1), 同时选用草莓*Actin*基因为内参基因, 并设计定量PCR引物*FaMOT1*-sybrF和*FaMOT1*-sybrR(表1)。使用大连宝生物公司SYBR Premix ExTaq (TaKaRa Biotechnology)试剂盒进行实时荧光定量, qRT-PCR反应体系为25 μ L: SYBR Premix Ex Taq 12.5 μ L, 上、下游引物各1.0 μ L, 模板2.0 μ L, 加去离子水至25 μ L。每次试验设置3次技术重复。荧光定量PCR反应程序为: 95 $^{\circ}$ C预变性30 s; 95 $^{\circ}$ C变性5 s, 60 $^{\circ}$ C退火30 s, 40次循环, 所有PCR反应都设3次生物学重复和3次技术重复。使用SYBR Green法在Bio-RAD CFX connect实时荧光定量PCR仪上进行RT-qPCR实验, 试验结果用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法对数据进行定量分析。

5 系统进化树的构建与生物信息学分析

从拟南芥资源数据库TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>)和NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载*MOT1*蛋白序列, 与预测的草莓*MOT1*使用Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)进行多重序列比对后导入MEGA 6.0 (<http://www.megasoftware.net/history.php>) (Tamura等2013), 根据NJ方法(执行参数: Bootstrap method 1 000; Poissonmodel; Pairwise deletion)分析。利用TMHMM (<http://genome.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)对蛋白质进行跨膜分析; 蛋白质分析专家系统的在线工具ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)分析其蛋白组分; 利用ProtScale (<http://ca.expasy.org/tools/protscale.html>)分析氨基酸序列的亲/疏水性; 利用SWISS-MODEL (<http://swiss-model.expasy.org/>)进行蛋白质三维结构的空间预测。根据http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html在线软件对*FaMOT1*编码的氨基酸分子量和等电点进行分析。

6 草莓中铝含量、硝态氮、亚硝态氮和氨态氮含量测定

植物体内铝含量的测定参照刘利等(2016)方法进行。硝态氮、亚硝态氮和氨态氮含量利用试

剂盒(苏州科铭生物有限公司, 苏州)进行测定, 3次重复试验。

7 数据分析

数据方差和差异显著性分析利用SPSS ver. 19.0软件, 显著性分析利用Duncan's新复极差法。应用GraphPad Prism 6.0绘制图表。

实验结果

1 草莓*FaMOT1*的克隆和生物信息学分析

根据森林草莓(Shulaev等2011)和栽培草莓(Hirakawa等2014)基因组公布的*MOT1*家族CDS序列, 设计特异性引物, 以‘章姬’草莓cDNA为模板, 获得1条与目的基因相吻合的条带(图1), 送去上海

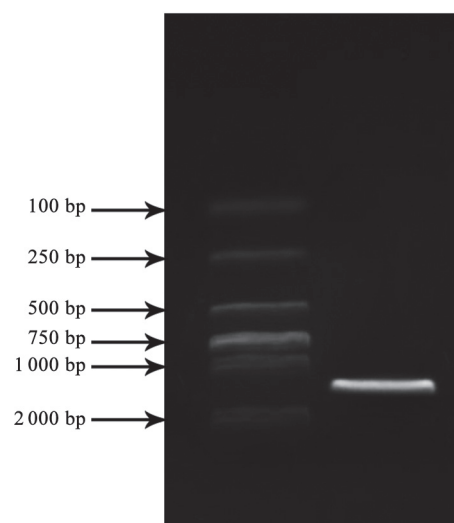


图1 草莓*FaMOT1*的PCR产物

Fig.1 PCR amplification result of *FaMOT1*

生工公司测序, 然后将测回的基因序列分别与基因组公布的CDS序列比对, 发现克隆得到的*MOT1*家族成员的CDS序列与公布的森林草莓基因组基因CDS序列一致。根据草莓基因组公布的基因序列分析表明, *FaMOT1*含有长度为1 365 bp的CDS序列, 编码454个氨基酸, 其中疏水性氨基酸219个, 占总氨基酸个数的48.24%, 亲水性氨基酸235个, 占总氨基酸个数的51.76%。预测其蛋白分子量为48 222.2 Da, 理论等电点为9.14。

利用在线软件SoftBerry ProtComp 9.0 (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>)进行亚细胞定位

预测, 结果显示, 该基因(液泡10.0, 数值为可信度系数, 满分为10.0)定位于液泡。

利用SOPM (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopm.html)测定*FaMOT1*基因的二级结构, α 螺旋(alpha helix)占37.89%, 延伸链(extended strand)占22.47%, 无规则

卷曲(random coil)占29.74%, β 转角(beta turn)占9.91%。由此可见, α 螺旋和无规则卷曲结构交错构成了草莓的MOT1蛋白质二级结构。利用SWISS-MODEL预测该蛋白质三级结构(图2-A), 也可以看出*FaMOT1*三维结构包含 α 螺旋和无规则卷曲等二级结构单元。

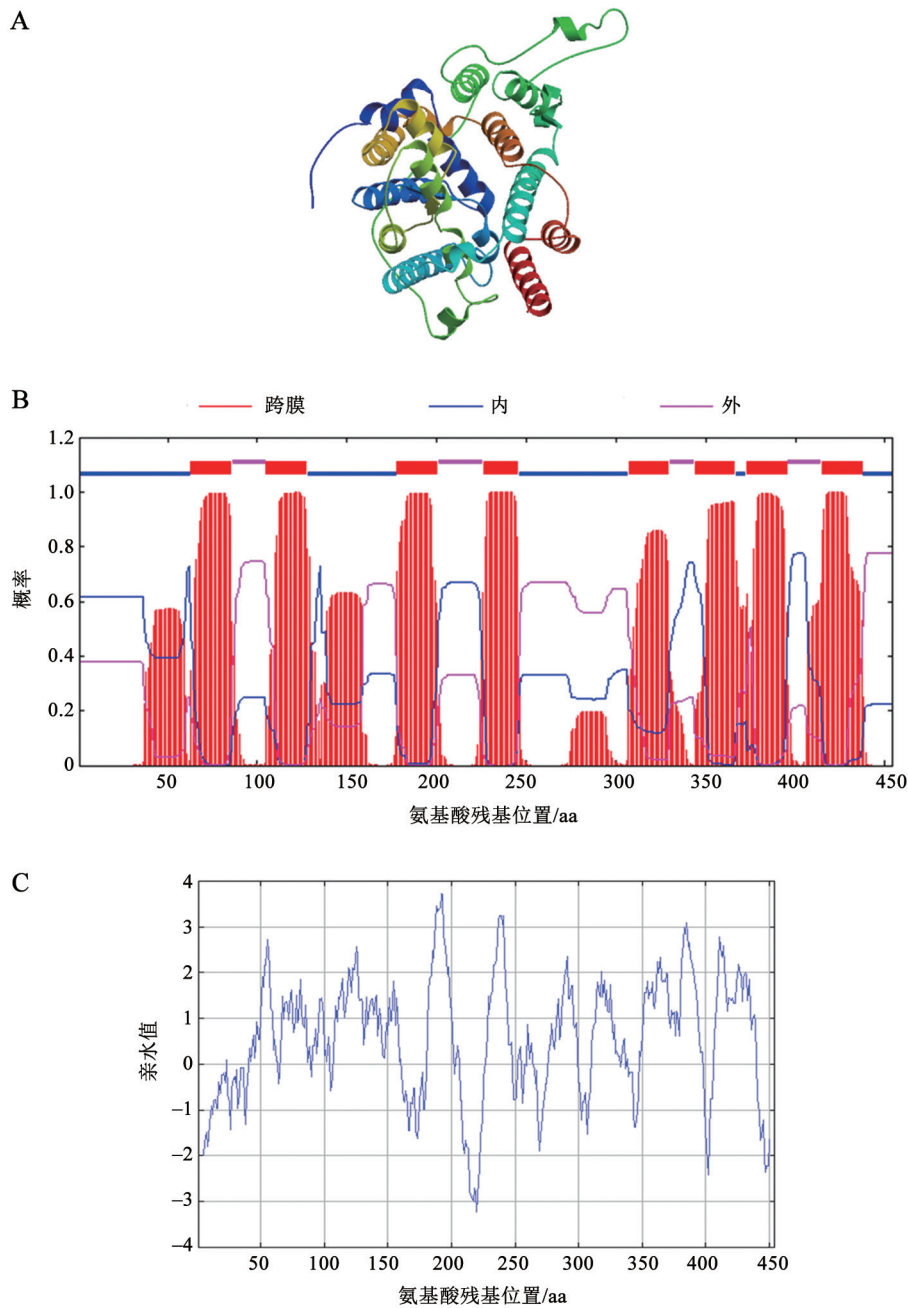


图2 *FaMOT1*蛋白的三级结构分析(A)、跨膜分析(B)和亲/疏水性分布曲线(C)

Fig.2 Analysis of tertiary structure (A), transmembrane domain (B) and distributing curve of hydropathy (C) of *FaMOT1*

TMHMM跨膜预测分析(图2-B)表明FaMOT1蛋白由8个疏水跨膜区域组成。其跨膜区域分别为63~85位、105~127位、178~200位、226~245位、307~329位、344~366位、373~395位和415~437位的区段。FaMOT1蛋白含有8个高疏水性区,其中178~200位的区段具有明显的疏水性(图2-C),与TMHMM预测结果(图2-B)相吻合。

2 同源比对和系统进化树分析

利用DNAMAN软件对FaMOT1的氨基酸序列与其它物种的*MOT1*同源基因所编码的氨基酸序列进行多序列比对分析表明,草莓的FaMOT1与其它植物的*MOT1*同源基因所编码的氨基酸同源性

都在50%以上,特别是苹果、桃、葡萄和三叶杨的同源性最高(图3-A),其相似性分别为80.48%、79.33%、66.81%和71.37%。

为了进一步分析FaMOT1与其它植物*MOT1*的亲缘关系,利用MEGA 6.06软件对植物的*MOT1*编码的氨基酸进行系统进化树分析。结果(图3-B)表明:FaMOT1与苹果属的苹果MdMOT1 (MDP0000732061)和桃属的桃PpMOT1 (Prupe.1G465500.1)亲缘关系最近。这与同源性比对结果一致。

3 草莓FaMOT1基因的组织特异性分析

实时定量RT-PCR检测结果表明(图4),FaMOT1在草莓的根、茎、叶、初生花和幼果中均有表达,

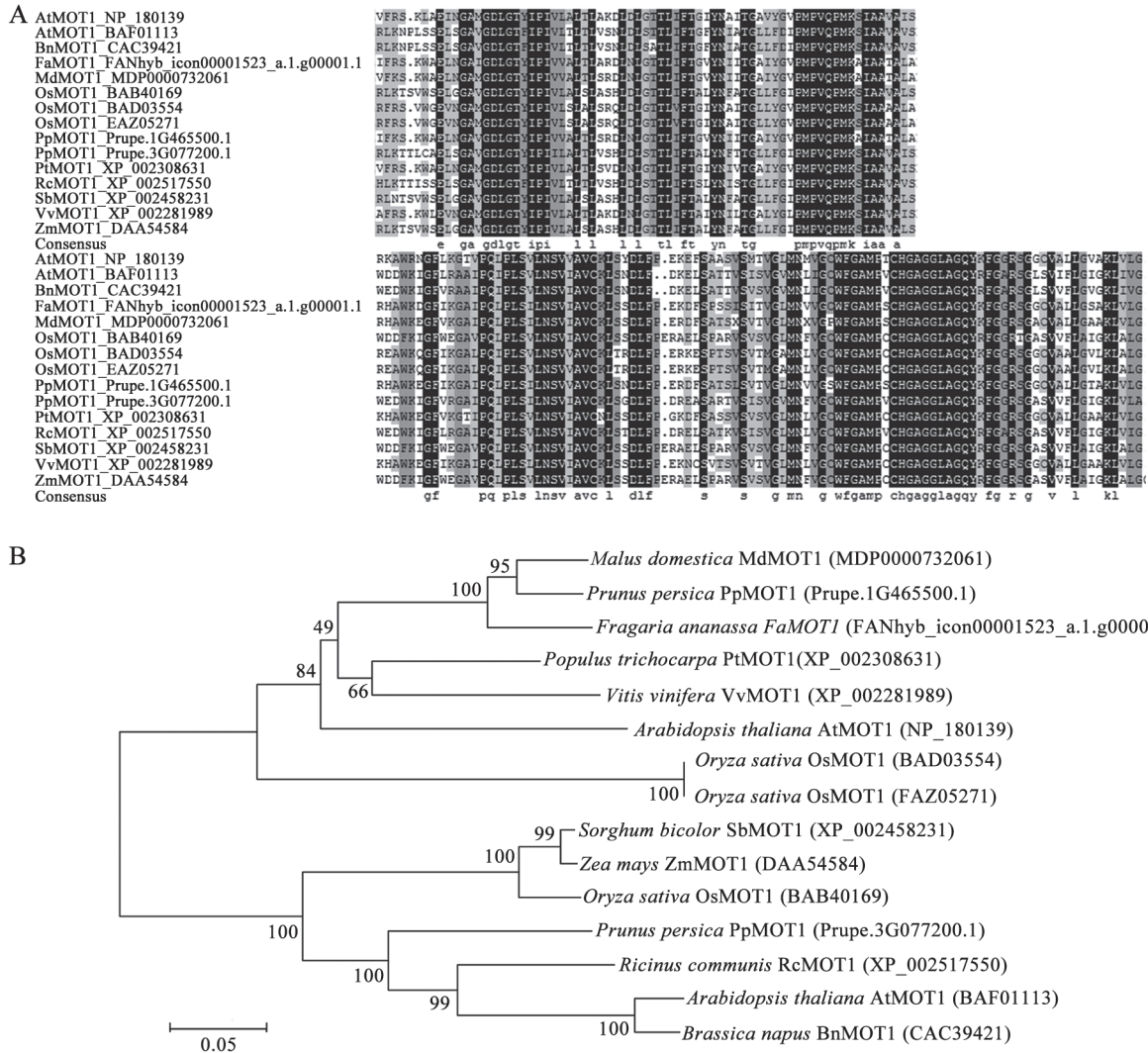


图3 草莓*MOT1*基因家族蛋白与其他物种的氨基酸序列同源比对(A)和系统进化树分析(B)
 Fig.3 Amino acid sequence alignment (A) and phylogenetic tree analysis (B) of *MOT1* gene family proteins in strawberry and other plants

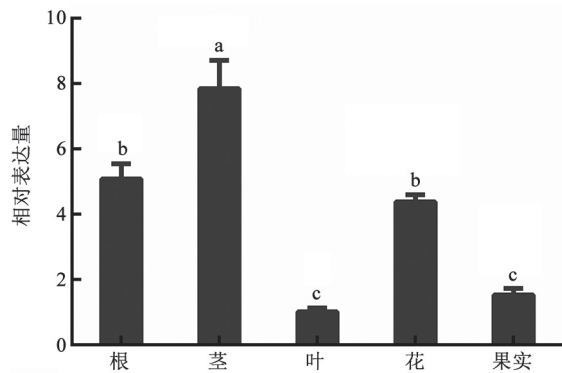


图4 *FaMOT1*基因在不同组织的表达分析
Fig.4 Expression analysis of *FaMOT1* gene
in different tissues

各柱形上不同小写字母表示显著差异($P < 0.05$)。下同此。

在茎中表达量最高, 其次是根和花器官中, 而在幼果和叶中表达量较低。

4 叶面喷施钼酸钠(Na_2MoO_4)对草莓钼浓度的影响

由图5可知, 各处理根部的钼浓度顺序为 $\text{T3} >$

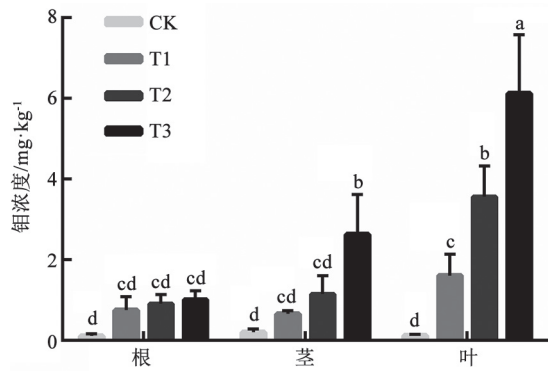


图5 不同 Na_2MoO_4 处理下草莓幼苗不同部位的钼浓度
Fig.5 The Mo concentration of different parts in strawberry
under different Na_2MoO_4 treatments

$\text{T2} > \text{T1} > \text{CK}$, 但是各处理差异不显著。T3处理的茎部钼浓度最高, 与其它处理差异显著。各处理叶片的钼浓度顺序为 $\text{T3} > \text{T2} > \text{T1} > \text{CK}$, 且各处理差异显著。

5 叶面喷施钼酸钠(Na_2MoO_4)对草莓*FaMOT1*表达的影响

由图6可以看出, 适量浓度的 Na_2MoO_4 处理可以诱导草莓根部、茎部和叶片*FaMOT1*的表达。 Na_2MoO_4 处理2 h, T3处理根部、茎部和叶片的*FaMOT1*全部显著上调表达, 而T2处理的根部和叶片中*FaMOT1*表达显著上调。处理4 h, 根中的*FaMOT1*

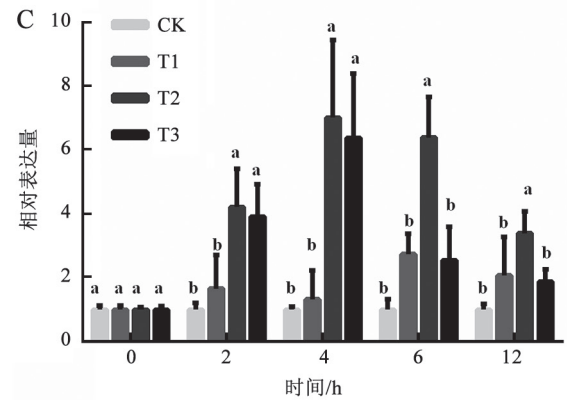
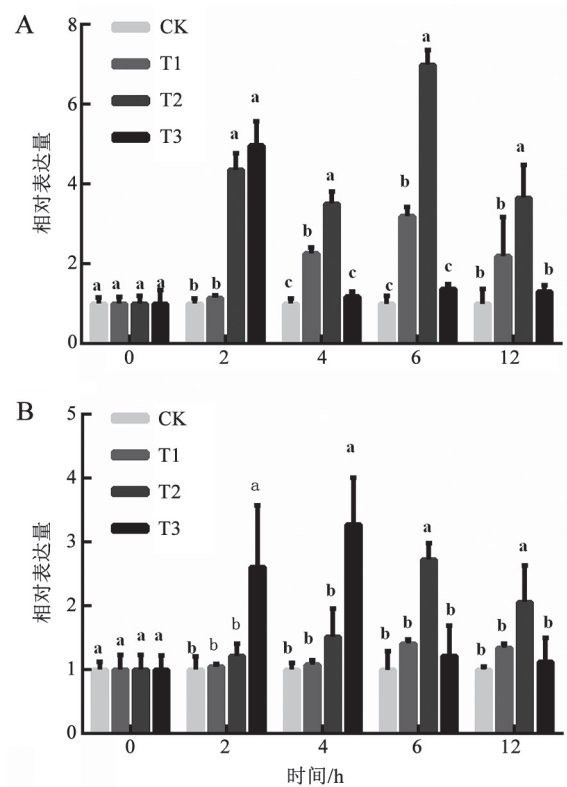


图6 不同 Na_2MoO_4 处理下草莓根系(A)、茎部(B)
和叶片(C)中*FaMOT1*的表达

Fig.6 Gene expression of *FaMOT1* in roots (A), stems (B)
and leaves (C) in strawberry under different
 Na_2MoO_4 treatments

表达量随着 Na_2MoO_4 浓度的增加呈现先上升后下降的趋势。其中T2处理的表达水平最高; 在茎中, T3处理的*FaMOT1*表达水平最高, 其它几个处理差异不大; 在叶中, T2和T3处理对*FaMOT1*诱导最显著, T1处理和对照差别不显著。处理6和12 h, 根部、茎部和叶片*FaMOT1*的表达趋势大体一致, 均以T2处理表达量最高。

6 叶面喷施钼酸钠(Na_2MoO_4)对草莓硝态氮、亚硝态氮和氨态氮含量的影响

由图7可知, 根部硝态氮的浓度高于叶片。各处理根部和茎部硝态氮的浓度差异不显著, 叶片各处理硝态氮的浓度大小为 $\text{CK} > \text{T1} > \text{T3} > \text{T2}$, 且T2处理显著低于其它处理。

各处理根部和茎部亚硝态氮的浓度差异不显著。T1和T2处理的叶片亚硝态氮浓度显著高于其它处理。

根部氨态氮的浓度都高于叶片和茎部。T2处理根部和叶片的氨态氮的浓度最高, 且显著高于其它处理。T3处理根部和叶片的氨态氮的浓度最低。茎部中不同处理的氨态氮浓度差异不显著。

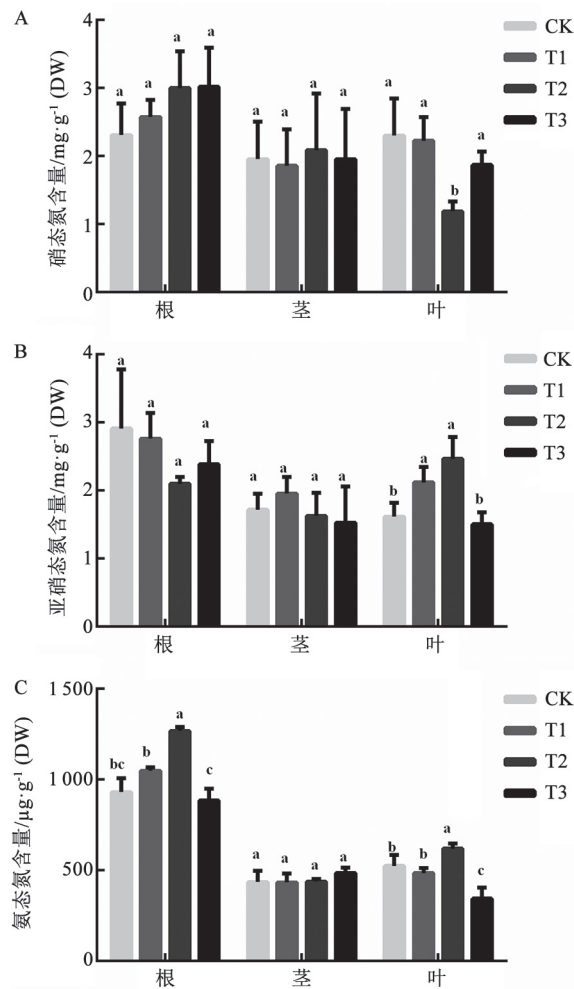


图7 不同 Na_2MoO_4 处理下草莓幼苗根部、茎部和叶片的硝态氮(A)、亚硝态氮(B)和氨态氮(C)含量

Fig. 7 The contents of NO_3^- (A), NO_2^- (B) and NH_4^+ (C) in roots, stems and leaves of strawberry seedlings under different Na_2MoO_4 treatments

讨 论

微量元素的稳态平衡是一个相当复杂的机制, 需要协调众多细胞生物学过程来满足细胞对其需求(Lahner等2003; Chen等2010; Zhang和Enns 2009)。钼虽然是植物所需微量元素中需求量较少的一种, 但是钼是多种钼酶的氧化还原中心不可或缺的金属元素, 钼需要特定的吸收转运蛋白来实现其在细胞内的稳态平衡。钼转运蛋白可以控制细胞内的钼浓度, 调控植物的生长发育过程。*MOT1*在植物吸收转运钼酸盐的生命过程中扮演着重要的角色, 对于生长在钼酸盐缺乏条件下植物的正常生长必不可少(Tomatsu等2007)。目前已成功克隆出衣藻和拟南芥的*MOT1*基因, Tejada-Jiménez等(2007)和Tomatsu等(2007)研究发现*MOT1*可以吸收转运钼, *MOT1*的表达下调减少了 MoO_4^{2-} 的转运。从拟南芥、水稻、玉米等模式植物和果树(苹果、葡萄、桃等)等高等植物中分离得到的*MOT1*编码的氨基酸均有共同的保守结构, 本研究中, 已克隆的1个‘章姬’草莓候选钼转运蛋白均具有*MOT1*家族的保守特征序列(图 3-A), 属于植物*MOT1*家族。系统发育进化树分析表明*FaMOT1*与苹果*MdMOT1* (MDP0000732061)和桃*PpMOT1* (Prupe.1G465500.1)亲缘关系较近。

拟南芥(NP-180139)、苹果、三叶杨和玉米的*MOT1*蛋白含有8个疏水跨膜区域, 衣藻、拟南芥(BAF01113)、水稻和蓖麻的*MOT1*蛋白含有9个疏水跨膜区域, 桃(Prupe.1G465500.1)和葡萄的*MOT1*蛋白含有10个疏水跨膜区域, 桃(Prupe.3G077-200.1)和高粱的*MOT1*蛋白含有11个疏水跨膜区域, 本试验发现草莓的*MOT1*蛋白含有8个疏水跨膜区域。这说明不同植物或同一植物的不同*MOT1*蛋白跨膜区域的数量可能不一样。

Tomatsu等(2007)研究发现拟南芥根部、子叶柄、叶肉、叶柄、雄蕊、花萼和长角果均能监测到*AtMOT1;1*活性。本试验研究发现*MOT1*在草莓的根、茎、叶、初生花和幼果中均有表达。以上结果表明*MOT1*几乎在拟南芥和草莓的整个植株中表达, 可能对于地上部和地下部细胞的钼元素的吸收转运起着至关重要的作用。

在衣藻株系21gr中研究发现硝酸盐能诱导*MOT1*的表达, 而钼不能够显著诱导*MOT1*的表达;

生长在钼缺乏培养基上的拟南芥地上部*MOT1*的表达量比生长在钼充足的培养基上的表达量下降50%，根部*MOT1*的表达量在缺钼的培养基上显著下降(Tejada-Jiménez等2007; Tomatsu等2007)。为验证钼对*MOT1*的诱导性，本试验对草莓幼苗喷施了不同浓度的 Na_2MoO_4 进行了研究，结果发现，适量浓度的 Na_2MoO_4 处理可以显著诱导草莓根茎叶*FaMOT1*的表达，处理2 h时，2.4和4.8 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2MoO_4 对根部和叶片的*FaMOT1*诱导比较显著。之后随着钼元素在*MOT1*的作用下进入植株体内以及叶片向地下部转运的增加，*FaMOT1*在植株各部位的表达发生了一些变化。2.4 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2MoO_4 处理的根部和叶片*FaMOT1*表达量相对来说最高，而4.8 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2MoO_4 处理根部和叶片*FaMOT1*表达量则表现出相对下降，这可能是由于叶片和根部钼含量的大量增加对*FaMOT1*的表达起着反向调节作用，此时即使*FaMOT1*的表达量不高也能满足植株参与生命各项生命活动的需求。4.8 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2MoO_4 处理4 h的茎*FaMOT1*表达量依然最高，这可能是由于相对于其它部位来说，茎对钼的需求量不高，这个时间段尚未出现钼含量的大量增加对*FaMOT1*的表达有一定程度的抑制这种情况，而处理6 h以后茎部和根部、叶片的趋势大体一致。Nie等(2014)研究发现低钼(0~0.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)浓度下，钼高效品种‘97003’和钼低效品种‘97014’根系*TaMOT1;1*和*TaMOT1;2*基因表达显著高于高钼(0.4~40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)浓度。在本试验中，2.4 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2MoO_4 处理4 h的根部和叶片的*FaMOT1*表达量最高，而高浓度的4.8 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理*FaMOT1*的表达量相对来说较低，这说明适宜钼处理显著诱导*MOT1*基因表达可能是对该条件下各种生命活动的响应。

叶面喷施 Na_2MoO_4 后草莓幼苗各部位的钼浓度有所提升，叶片的钼浓度高于根部，这可能与叶面施肥有关，喷施在叶片上的钼元素在*FaMOT1*的作用下往地下部转运，钼是一种移动性中等的元素，所以草莓幼苗叶片的钼浓度高于根部的钼浓度。Kovács等(2015)研究发现水培的玉米幼苗的钼浓度随着营养液中钼浓度的增加而提高，根部从营养液吸收的钼元素在*ZmMOT1*的作用下由根部转运到地上部，根部的钼浓度高于地上部，与本试验的结果正好相反，但作用机理一致。

本试验研究发现叶片的钼浓度高于根部，钼是NR的活性成分，参与到硝态氮的还原过程中，且本课题组前期的研究结果(刘利等2016)表明相同时期各个处理叶片的NR活性高于根部的NR活性， ^{15}N 同位素示踪结果显示各个处理的 ^{15}N 主要分配在叶片中，所以叶片可能是氮素同化利用的主要部位。各个处理根部和茎部的硝态氮和亚硝态氮浓度差异不显著，但是2.4 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2MoO_4 处理的叶片的硝态氮浓度显著低于其它处理，亚硝态氮和氨态氮浓度显著高于其它处理，这表明钼的稳态平衡有利于硝酸盐的吸收还原，促进氮素的同化。各个处理茎部的硝态氮、亚硝态氮和氨态氮浓度较低且差异不显著，这可能是与茎部不是硝酸盐的代谢还原和氮同化的主要部位有关。植物吸收的硝态氮还原成氨后，氨立即被同化，过量的氨会对植株造成毒害。前期的研究结果表明叶片的GS和GOGAT高于根系(刘利等2016)，本试验结果显示根部的氨态氮浓度高于叶片，这表明叶片氮的同化作用可能更加显著，叶片中的氨态氮很快被利用形成氨基酸或者酰胺。以上研究结果表明叶面喷施的钼元素在*FaMOT1*的作用下转运到植株各个部位，继而各个部位的钼浓度有一定程度的提高，只有合适的钼浓度才能最大程度的激发氮代谢有关的酶活性，从而有利于硝态氮的吸收和向氨态氮的转化以及氨态氮向有机氮的转化，由此能够提高氮素利用率，减少氮肥利用量，对农业的可持续发展具有重要作用。

据了解，在我国有4 400多万 hm^2 耕地缺钼(Nie等2014)，淋溶作用、传统的农业措施以及长期大量施用化肥使得一些农田果园土壤出现了酸化现象，进而降低了土壤有效钼含量，不利于植物对有限的 MoO_4^{2-} 的吸收利用，也不利于植株对氮肥的吸收利用，生长在有效钼含量低的酸性黄棕壤上的冬小麦等作物出现了严重的缺钼症状(Yu等2010)。因此，找到植物中与 MoO_4^{2-} 吸收相关的转运蛋白具有重要意义。鉴于此，本研究从草莓中克隆了*FaMOT1*基因，同时分析了不同浓度 Na_2MoO_4 处理对各组织的*FaMOT1*基因表达变化规律和硝态氮、亚硝态氮和氨态氮的影响，为下一步研究*FaMOT1*基因的功能和调控机理奠定了坚实的基础，同时为草莓遗传性状改良提供候选基因资源。

参考文献

- Arnon DI, Stout PR (1939). Molybdenum as an essential element for higher plants. *Plant Physiol*, 14 (3): 599–602
- Atwal PS, Scaglia F (2016). Molybdenum cofactor deficiency. *Mol genet metab*, 117 (1): 1–4
- Chen P, Andoy NM, Benitez JJ, Keller AM, Panda D, Feng G (2010). Cheminform abstract: tackling metal regulation and transport at the single-molecule level. *Nat Prod Rep*, 41 (31): 757–767
- Crawford NM, Glass AD (1998). Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends Plant Sci*, 3 (10): 389–395
- Gasber A, Klammann S, Trentmann O, Tranmpczynska A, Clemens S, Schneider S, Sauer N, Feifer I, Bittner F Mendel R (2011). Identification of an *Arabidopsis* solute carrier critical for intracellular transport and inter-organ allocation of molybdate. *Plant Biol*, 13: 710–718
- Hille R, Hall J, Basu P (2014). The mononuclear molybdenum enzymes. *Chem Rev*, 114 (7): 3963–4038
- Hirakawa H, Shirasawa K, Kosugi S, Tashiro K, Nakayama S, Yamada M, Kohara M, Watanabe A, Kishida Y, Fujishiro T, et al (2014). Dissection of the octoploid strawberry genome by deep sequencing of the genomes of *Fragaria* species. *DNA Res*, 21 (2): 169–181
- Kaiser BN, Gridley KL, Brady JN, Phillips T, Tyerman SD (2005). The role of molybdenum in agricultural plant production. *Ann Bot*, 96 (5): 745–754
- Kovács B, Puskás-Preszner A, Huzsvai L, Lévaib L, Bódi É (2015). Effect of molybdenum treatment on molybdenum concentration and nitrate reduction in maize seedlings. *Plant Physiol Bioch*, 96: 38–44
- Krapp A (2015). Plant nitrogen assimilation and its regulation: a complex puzzle with missing pieces. *Curr Opin Plant Biol*, 25: 115–122
- Lahner B, Gong J, Mahmoudian M, Smith EL, Abid KB, Rogers EE, Guerinet ML, Harper JF, Ward JM, McIntyre L (2003). Genomic scale profiling of nutrient and trace elements in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Biotechnol*, 21 (10): 1215–1221
- Leimkühler S, Iobbi-Nivol C (2015). Bacterial molybdoenzymes: old enzymes for new purposes. *FEMS Microbiol Rev*, 40 (1): 1–18
- Liu L, Gao DS (2016). Advances in molybdenum uptake and translocation, molybdenum cofactors and molybdenum enzymes in plants. *Plant Physiol J*, 52 (4): 381–393 (in Chinese with English abstract) [刘利, 高东升(2016). 植物中钼的吸收转运及钼辅因子与钼酶的研究进展. *植物生理学报*, 52 (4): 381–393]
- Liu L, Zhang R, Yang C, Li L, Gao DS (2016). Effect of sodium molybdate foliar sprays on key enzymes activities of nitrogen metabolism and ¹⁵N absorption, distribution and utilization of strawberry seedlings. *Plant Physiol J*, 52 (7): 1035–1044 (in Chinese with English abstract) [刘利, 张蕊, 杨超, 李玲, 高东升(2016). 叶面喷施钼肥对草莓幼苗氮代谢关键酶活性与¹⁵N吸收、分配及利用的影响. *植物生理学报*, 52 (7): 1035–1044]
- Mendel RR, Bittner F (2006). Cell biology of molybdenum. *Biochim Biophys Acta*, 1763: 621–635
- Merchant SS (2010). The elements of plant micronutrients. *Plant Physiol*, 154: 512–515
- Nie Z, Hu C, Liu H, Tan Q, Sun X (2014). Differential expression of molybdenum transport and assimilation genes between two winter wheat cultivars (*Triticum aestivum*). *Plant Physiol Bioch*, 82: 27–33
- Novoa R, Loomis RS (1981). Nitrogen and plant production. *Plant Soil*, 58 (1): 177–204
- Qian L, Chen X, Wu K, Fu X (2015). Nitrogen signaling and use efficiency in plants: what's new? *Curr Opin Plant Biol*, 27: 192–198
- Shulaev V, Sargent DJ, Crowhurst RN, Mockler TC, Folkerts O, Delcher AR, Jaiswal P, Mockaitis K, Liston A, Mane SP, et al (2011). The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). *Nat Genet*, 43: 109–116
- Sun X, Hu C (2005). Molybdoenzymes and molybdenum nutrition in higher plants. *Plant Physiol Comm*, 41 (3): 395–399 (in Chinese with English abstract) [孙学成, 胡承孝(2005). 高等植物含钼酶与钼营养. *植物生理通讯*, 41 (3): 395–399]
- Stitt M (1999). Nitrate regulation of metabolism and growth. *Curr Opin Plant Biol*, 2 (3): 178–186
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013). Mega6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*, 30 (4): 2725–2729
- Tejada-Jiménez M, Chamizo-Ampudia A, Galván A, Fernández E, Llamas Á (2013). Molybdenum metabolism in plants. *Metallomics*, 5 (9): 1191–1203
- Tejada-Jiménez M, Galván A, Fernández E, Llamas A (2009). Homeostasis of the micronutrients Ni, Mo and Cl with specific biochemical functions. *Curr Opin Plant Biol*, 12: 358–363
- Tejada-Jiménez M, Llamas Á, Sanz-Luque E, Galván A, Fernández E (2007). A high-affinity molybdate transporter in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104 (50): 20126–20130
- Tomatsu H, Takano J, Takahashi H, Watanabe-Takahashi A, Shibagaki N, Fujiwara T (2007). An *Arabidopsis thaliana* high-affinity molybdate transporter required for efficient uptake of molybdate from soil. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104 (47): 18807–18812
- Wu F, Shen Z, Cai Y, Lin Y, Gao J (2015). Screening and phenotypic analysis of Mo-sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol J*, 51 (2): 171–177 (in Chinese with English abstract) [巫飞飞, 沈知临, 蔡永萍, 林毅, 高俊山(2015). 拟南芥Mo敏感突变株的筛选和表型分析. *植物生理学报*, 51 (2): 171–177]
- Yu M, Hu CX, Sun XC, Wang YH (2010). Influences of Mo on nitrate reductase, glutamine synthetase and nitrogen accumulation and utilization in Mo-efficient and Mo-inefficient winter wheat cultivars. *Sci Agric Sin*, 9 (3): 355–361
- Zhang AS, Enns CA (2009). Molecular mechanisms of normal iron homeostasis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Prog*, 2: 207–214
- Zhang HQ, Zhang HM, Liang YS, Nan WB (2016). Research progress of nitrate in plant transport mechanism. *Plant Physiol J*, (2): 141–149 (in Chinese with English abstract) [张合琼, 张汉马, 梁永书, 南文斌(2016). 植物硝酸盐转运蛋白研究进展. *植物生理学报*, (2): 141–149]

Molecular cloning, expression analysis and its effect on nitrogen metabolism of molybdenum transporter gene *MOT1* in strawberry (*Fragaria × ananassa*)

LIU Li, SUN Ming-Yue, ZHANG Rui, YANG Chao, LI Ling, GAO Dong-Sheng, FU Xi-Ling*

State Key Laboratory of Crop Biology, Shandong Collaborative Innovation Center for Fruit and Vegetable Production with High Quality and Efficiency, College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China

Abstract: The *MOT1* homologue named *FaMOT1* was isolated from strawberry (*Fragaria × ananassa*). The obtained CDS was consistent with the ones released from *F. vesca* genome. Phylogenetic tree analysis showed that its encoded amino acids sequence had a relatively close evolutionary relationship with *Malus domestica* and *Prunus persica*. Quantitative real-time PCR analysis showed that *FaMOT1* had different levels of expression in strawberry roots, stems, leaves, flowers and young fruits of 10 d. The effects of different concentrations of Na_2MoO_4 foliar spraying on seedlings and *FaMOT1* expression were examined in this experiment. The molybdenum content of leaves increased with the increase of molybdenum sprays. *FaMOT1* gene was significantly induced in roots and leaves by $2.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{MoO}_4$. *FaMOT1* was higher expressed in stems after treatment of $4.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{MoO}_4$ for 2 and 4 h, and higher expressed in stems after treatment of $2.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{MoO}_4$ for 6 and 12 h. The treatment of $2.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{MoO}_4$ showed lowest leaf nitrate content and highest leaf ammonia nitrogen content. The lowest ammonia nitrogen contents of leaf and root were got in the seedlings sprayed with $4.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{MoO}_4$. All these results indicated that the expression of *FaMOT1* was induced and regulated by molybdenum, and appropriate molybdenum spraying could not only enhance nitrate uptake and transformation into ammonia nitrogen, but also be in favor of the transformation of ammonia nitrogen into organic nitrogen.

Key words: strawberry (*Fragaria × ananassa*); molybdenum; *MOT1*; molecular cloning; expression analysis

Received 2016-10-17 Accepted 2017-03-15

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31672137), and the Shandong Province Modern Agricultural Industry Technology System Innovation Team- Cultivation, Soil and Fertilizer (SDAIT-06-01).

*Corresponding author (E-mail: xilingfu@sdau.edu.cn).