

缺氮及氮素形态对烟草幼苗 糖代谢的影响机理初探

刘维智, 贾宏昉, 尹贵宁, 时向东, 刘国顺*

(河南农业大学 烟草学院, 烟草行业烟草栽培重点实验室, 郑州 450002)

摘要: 为了探明缺氮及不同氮素形态对烟草幼苗糖代谢的影响机理。该试验以‘中烟 100’为试材, 设置正常供氮为对照(CK, $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+ = 1 : 1$)、缺氮(T_1)、单一铵态氮(T_2)和单一硝态氮(T_3) 4 个处理的沙培试验, 检测烟株功能叶片的全氮、还原糖、总糖、蔗糖淀粉的含量及糖代谢相关酶的活性, 并分析根、茎、叶等 3 个部位糖代谢关键基因(*SUT1*、*INV*、*GBSSI*、*AGPase*)的表达差异。结果显示: (1) 烟株功能叶片的全氮含量表现为 $T_3 > \text{CK} > T_2 > T_1$ 。(2) 与 CK 前期相比, T_1 处理显著增加了烟株叶片的还原糖、总糖、蔗糖及淀粉含量, 降低了淀粉酶的活性, 但对转化酶活性影响不显著; 其中烟株叶片淀粉积累表现为 $T_1 > T_2 > \text{CK} > T_3$ 。(3) 缺氮及氮素形态对糖转运蛋白基因(*SUT1*)、焦磷酸化酶基因(*AGPase*)和颗粒淀粉合成酶基因(*GBSSI*)等关键基因的表达影响显著。研究认为, 缺氮及不同氮素形态下烟草幼苗氮素利用率与淀粉积累成反比, 其中蔗糖转运蛋白基因(*SUT1*)在氮素形态影响烟叶糖代谢过程中起关键作用。

关键词: 烟草; 氮素形态; 糖代谢; 基因表达

中图分类号: Q945.78

文献标志码: A

Preliminary Study on Influence of Nitrogen Nutrition Stress and Nitrogen Forms on Glucose Metabolism in Tobacco Seedlings

LIU Weizhi, JIA Hongfang, YIN Guining, SHI Xiangdong, LIU Guoshun*

(College of Tobacco Science, Henan Agricultural University; Industry Key Lab. for Tobacco Cultivation, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In order to demonstrate the mechanism of nitrogen stress and different nitrogen forms on glucose metabolism of tobacco seedlings, we used ‘Zhongyan 100’ as the material. Sand culture were adopted in the normal supply of nitrogen (CK, $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+ = 1 : 1$), nitrogen deficiency (T_1), single ammonium (T_2) and single nitrate (T_3) of the four treatments. The contents of reducing sugar, total sugars, sucrose, starch and the activities of glucose metabolism-related enzymes in functional leaves of tobacco plants were detected. Meanwhile, we analyzed the differences of key glucose metabolism genes (*SUT1*, *INV*, *GBSSI*, *AGPase*) in roots, stems, leaves. The results showed that: (1) The total N in four treatments are $T_3 > \text{CK} > T_2 > T_1$. (2) The contents of sugar, total sugar, sucrose and starch in tobacco leaves of T_1 were increased significantly ($P < 0.05$) compared with CK during early plant development; The amylase activity was significantly reduced, however the invertase activity was different ($P > 0.05$). The accumulation of starch in four treatments are $T_1 > T_2 > \text{CK} > T_3$. (3) The glucose metabolism gene expression showed that *SUT1*, *INV*, *AGPase*, *GBSSI* were expressed significantly in T_1 , T_2 and T_3 , indicating that biosynthesis of grain starch in T_1 , T_2 and T_3 were more active. Altogether, our data suggest that the accumulation of starch and nitrogen utilization rate are inversely proportional, and the *SUT1* gene may be very important in starch biosyn-

收稿日期: 2013-11-24; 修改稿收到日期: 2014-01-23

基金项目: 中国烟草总公司特色优质烟叶开发重大专项浓香型项目(Ts-01)

作者简介: 刘维智(1987—), 男, 在读硕士研究生, 主要从事烟草营养分子遗传的研究。E-mail: tcldemon@163.com

* 通信作者: 刘国顺, 教授, 博士生导师, 主要从事烟草生理生化研究。E-mail: liugsh1851@163.com

thesis under different nitrogen forms.

Key words: tobacco; nitrogen forms; glucose metabolism; gene expression

氮素是植物生长发育所必需的三大营养元素之一,广泛参与植物体内的生化合成、能量转移、信号转导等代谢过程,对促进烟草生长发育和新陈代谢起着重要作用^[1-2]。土壤中的氮素主要以无机硝态氮(NO_3^-)和铵态氮(NH_4^+)的形态被植物根系细胞膜上的氮转运蛋白吸收和运输到体内,不同形态的氮素与烤烟产量和品质的形成密切关系^[1]。烤烟叶片中的糖代谢产物主要有总糖、还原糖和淀粉,这3种物质的含量对烤烟的品质影响显著。与糖代谢密切相关的基因有蔗糖转运蛋白基因(*SUT*)、蔗糖转化酶基因(*INV*)、焦磷酸化酶基因(*AGPase*)和颗粒淀粉合成酶基因(*GBSSI*)等^[3]。前人在拟南芥、大豆和玉米上的研究表明氮肥可以调控糖代谢途径^[4],因此探讨缺氮及氮素形态对烤烟糖代谢途径的影响机理,对改善烤烟品质及提高烤烟的氮素利用率具有重要价值^[5]。目前关于烟草氮素营养方面的研究主要集中在产量和品质上,而对烟草氮素营养影响糖代谢机理方面的研究还鲜有报道^[6]。本试验主要研究氮素对烟叶糖代谢产物积累及相关基因表达的影响,旨在探索氮素对烟叶糖代谢产物积累的响应机理,为进一步调控氮肥施用、提高烟叶品质提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 供试材料

供试烤烟品种为‘中烟100’,种子由北方烟草育种中心提供。

1.2 试验设计与处理

沙培试验于2012年在河南农业大学科教园区进行,人工气候室内生长,基本条件:光强 $300\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,光周期16h,温度 $25\ ^\circ\text{C}$ 。烟草种子消毒后在无菌水中黑暗催芽,露白后供给1/4营养液至4片真叶完全展开,然后进行营养处理^[7]。试验设置正常供氮处理(CK)、缺氮处理(T_1)、单一铵态氮

NH_4^+ (T_2)和单一硝态氮 NO_3^- (T_3)共4个处理(表1),处理时间为3周,每个处理设置10次重复。

1.3 样品采集

每个处理均选择5株长势一致的烟株,分别采集根、茎和叶等3个部位样品,其中叶片采集完全展开的功能叶片(从上往下数第4片叶)。迅速置于液氮中,于 $-80\ ^\circ\text{C}$ 冰箱冻存,用于基因表达分析。其余试验所涉及到的叶片生理指标测定均为采集的烟株功能叶片(从上往下数第4片叶)。

1.4 单株生物量统计及功能叶片表型观察

每个处理均选择5株长势一致的烟株,清洗干净根部,在分析天平上整株称重,做好记录。同时,采集完全展开的功能叶片(从上往下数第4片叶),用尼康D7000进行拍照。

1.5 测定指标与方法

1.5.1 还原糖、总糖、淀粉及全氮含量^[8] 取0.5 g新鲜烟叶,去主脉,采用德国Seal AA流动分析仪测定含量。

1.5.2 蔗糖含量^[9] 取0.5 g叶片加入5 mL蒸馏水研磨为匀浆,4 000 r/min离心10 min;取上清液采用蒽酮法测定蔗糖含量。

1.5.3 酶活性 将0.2 g叶片放入8 mL 1% NaCl中研磨为匀浆后3 000 r/min,离心10 min;参照Xue等^[10]的方法测定转化酶活性,参照Doehlert等^[11]的方法测定淀粉酶活性。

1.5.4 基因表达分析 采用Trizol法提取烟草根、茎和叶3个部位的总RNA,样品通过随机引物法反转录合成cDNA。根据GenBank发布的蔗糖转运蛋白基因(*SUT1*)、蔗糖转化酶基因(*INV*)、焦磷酸化酶基因(*AGPase*)和颗粒淀粉合成酶基因(*GBSSI*)的序列设计各基因扩增引物(表2),进行荧光实时定量PCR分析。按照Invitrogen公司的Real-MasterMix (SYBR Green)试剂盒说明书进行实时定量RT-PCR,每个样品3次重复。实时定量的实

表1 试验处理方案
Table 1 Test treatment program (mmol/L)

处理 Treatment	NH_4NO_3	KH_2PO_4	K_2SO_4	$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	NH_4Cl	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$
CK	1.25	1	1	0.75	1	0	0	0	0
T_1	0	1	1	0.75	1	0	0	0	0
T_2	0	1	1	0.75	1	0.5	1	0	0
T_3	0	1	1	0.25	0.25	0	0	0.75	0.5

表 2 烟草糖代谢途径及营养元素转运蛋白
基因荧光定量 PCR 引物序列

Table 2 Tobacco glucose metabolic pathways quantitative
PCR primer sequence of nutrients transporter gene

名称 Name	序列号 Series number	引物序列(5'→3') Primer sequences(5'→3')
<i>SUT1</i>	FM164640	F:CATCAAACGCCTTCTTCT; R:ACCGTACACTTCCTTAGC
<i>INV</i>	AJ305044.2	F:CTCCACGACCCATTACAC; R:GGAAACTCCCTGAGATACA
<i>AGPase</i>	DQ399915	F:CGTGATAAGTTCCCTTGTGG; R:TCACATTGTCCCTATACGG
<i>GBSSI</i>	DQ069270.1	F:GGTAGGAAAAATCAACTGGTGC; R:TATCCATGCCATTACAATCC
<i>L25</i>	L18902	F:GCTTCTTCGTCCCATCA; R:CCCCAAGTACCCTCGTAT

验数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 算法^[12] 进行分析,假设目的基因在胁迫处理下的表达量是对照(正常培养)的 N 倍, $N=2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\Delta\Delta Ct=$ 处理(Ct 样品 $- Ct$ L25) $- CK$ (Ct 样品 $- Ct$ L25)。

1.6 数据处理

采用 Sigmpilot 10.0 和 SPSS 12.0 进行数据处理和统计分析。

2 结果与分析

2.1 缺氮及不同氮素形态下烟草幼苗功能叶片表型、单株生物量及全氮含量分析

在烟株经过缺氮及不同氮素形态处理 3 周后,对烟株功能叶片表型观察(图 1, A)发现,缺氮(T_1)阻碍了烟株的正常生长,烟叶表现出发黄等缺氮症状,铵态氮处理(T_2)叶片表型和正常供氮处理(CK)表型基本一致,而硝态氮处理(T_3)叶片明显大于其余 3 个处理,叶片颜色也比较深。单株生物量统计(图 1, B)表明, T_1 、 T_2 和 T_3 处理 3 周后生物量分别是对照 CK 的 95.15%、100.25%和 104.12%,且均与对照差异显著($P<0.05$)。4 个处理植株之间的叶片全氮含量均达到了显著差异水平($P<0.05$),并表现为 $T_3>CK>T_2>T_1$ (图 1, C),这与上述 4 个处理叶片表型表现相一致。以上结果说明缺氮及不同氮素形态下烟株的氮素利用率不同,从而影响了烟草幼苗的正常生长发育。

2.2 缺氮及不同氮素形态对烟草幼苗叶片还原糖、总糖、蔗糖及淀粉含量的影响

在烟株经过缺氮及不同氮素形态处理 3 周后,对烟草幼苗叶片还原糖、总糖、蔗糖及淀粉含量进行检测。图 2, A~D 结果显示,与 CK 相比, $T_1\sim T_3$ 处理烟株叶片还原糖含量分别显著提高了 158.51%、

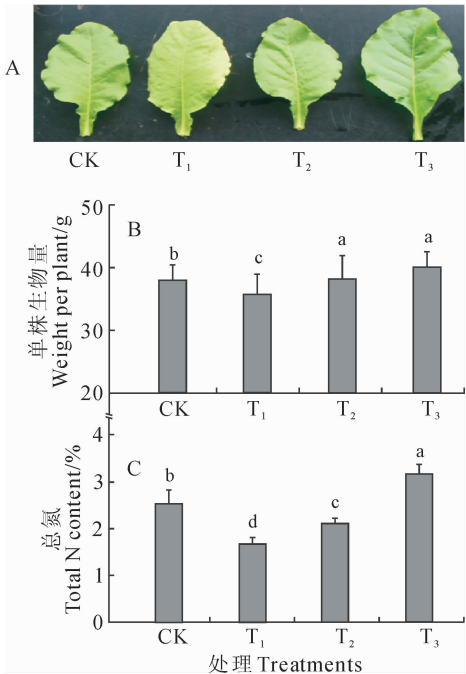


图 1 缺氮及不同氮素形态下烟草幼苗功能
叶片表型、单株生物量及全氮含量分析
CK、 T_1 、 T_2 、 T_3 分别表示正常供氮、缺氮、铵态氮和硝态氮处理;
不同小写字母表示处理间存在显著差异($P<0.05$);下同
Fig. 1 Phenotype and total N content of tobacco under low
nitrogen and different forms of nitrogen forms and biomass
CK, T_1 , T_2 , T_3 stand for the normal supply of nitrogen
($NO_3^- : NH_4^+ = 1 : 1$), nitrogen deficiency, single ammonium
and single nitrate treatments, respectively; The normal letters
indicate significant difference among treatments
at 0.05 level; The same as below

90.48%和 27.89%,总糖含量分别显著提高了 251.61%、125.65%和 68.59%,蔗糖含量则分别显著提高了 39.49%、46.91%和 16.37% ($P<0.05$);它们的淀粉含量在 T_1 处理下比 CK 显著提高 43.31%,在 T_2 处理下与 CK 相近,在 T_3 处理下反比 CK 显著降低 22.87%。整体来看,4 个处理中缺氮处理叶片中糖物质含量最高,铵态氮和硝态氮次之,正常供氮处理最低,这说明缺氮及不同氮素形态显著影响着烟株幼苗的糖代谢物质积累。尤其是缺氮处理淀粉含量最高,而硝态氮处理淀粉含量最低,推测是由于烟草喜硝态氮,在利用硝态氮的同时需要相应地消耗糖类(酮酸、烯酸),使叶鞘内贮藏的淀粉减少,这符合烟株幼苗期“得氮耗糖”的规律。

2.3 缺氮及不同氮素形态对烟草幼苗叶片糖代谢途径关键基因表达的影响

大量的研究表明,蔗糖和淀粉的合成与蔗糖转运蛋白(SUT1)、转化酶(INV)、颗粒淀粉合成酶

(GBSSI)和 ADPG 焦磷酸化酶(AGPase)的活性或基因表达量密切相关^[10]。利用荧光定量 PCR 技术对不同氮素形态烟草糖代谢相关基因进行转录水平的表达分析结果(图 3)显示,蔗糖转运蛋白基因(*SUT1*)在幼苗根、茎、叶等 3 个部位表达量均以铵态氮处理(T_2)最高,并均显著高于其他 3 个处理(P

<0.05),如 T_2 处理根部、茎部和叶部表达量分别是对照(CK)的 3.51 倍、7.58 倍和 1.36 倍,而各部位 T_1 和 T_3 处理表达量均低于相应对照,其中 T_3 处理根部和叶片基因表达量仅有对照的40.16%和 36.17% (图 3,A);蔗糖转化酶基因(*INV*)于幼苗根、茎、叶中表达量在CK和 T_1 处理中均无显著差

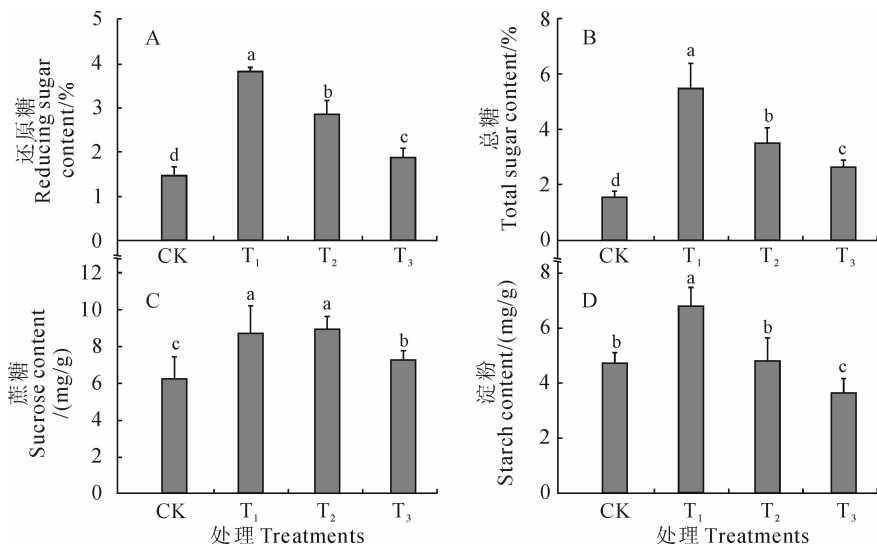


图 2 缺氮及不同氮素形态下烟草还原糖、总糖、蔗糖及淀粉含量分析
Fig. 2 Analysis of tobacco under low nitrogen and different forms of nitrogen reducing sugar, total sugar, sucrose and starch contents

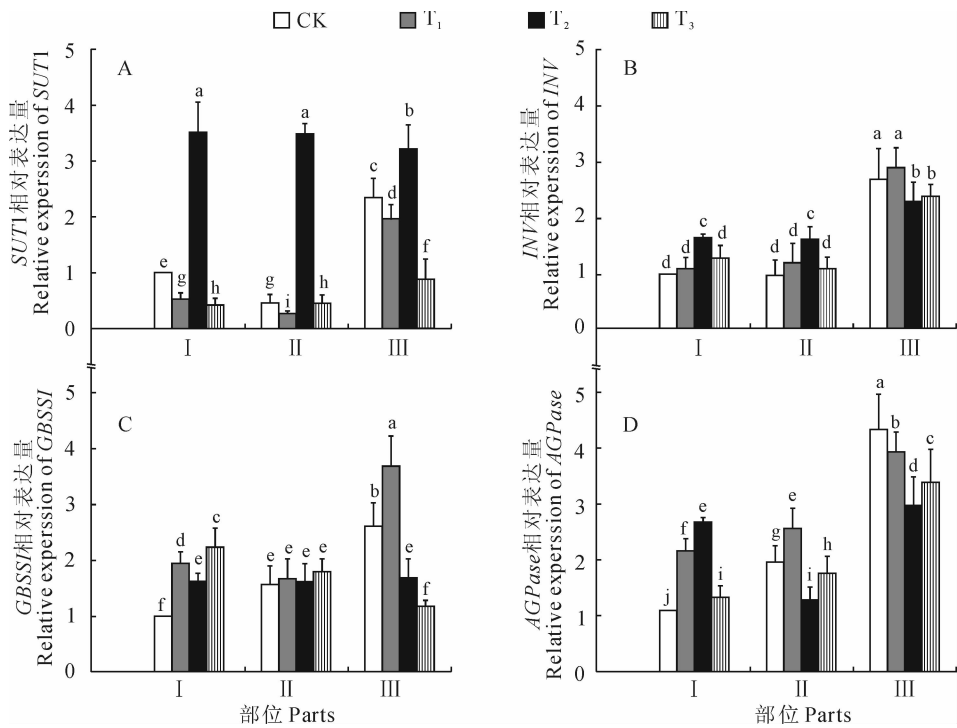


图 3 缺氮及不同氮素形态下烟株不同部位糖代谢关键基因的 Q-PCR 分析
I. 根; II. 茎; III. 叶
Fig. 3 Analysis of tobacco under low nitrogen and different forms of nitrogen in different parts of glucose metabolism key gene expression
I. Root; II. Stem; III. Leaf

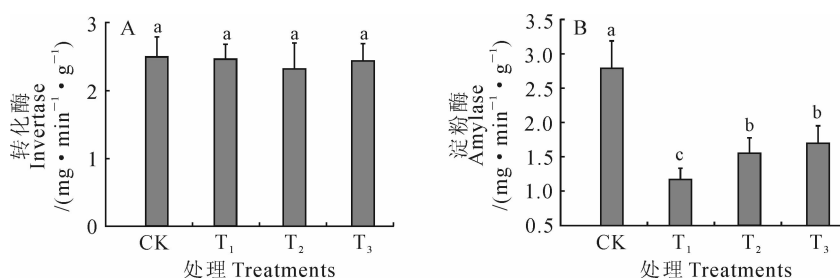


图4 缺氮及不同氮素形态下烟株叶片糖代谢途径关键酶活性的分析

Fig. 4 Analysis of leaf sugar metabolic key pathways of tobacco plant under different nitrogen forms

异,在单一氮素形态(T_2 和 T_3 处理)下根部和茎中转化酶基因表达量略有提高,而叶片中转化酶基因表达量却略有降低(图 3,B);颗粒淀粉合成酶关键基因 *GBSSI* 表达量在烟草幼苗根部表现为缺氮处理(T_1)、铵态氮处理(T_2)和硝态氮处理(T_3)下显著高于正常供氮烟株(CK),在茎中差异不显著,而在叶片中以缺氮处理(T_1)最高,比对照提高了42.71%,硝态氮处理(T_3)最低,仅有对照的46.11%(图 3,C);*AG-Pase* 基因表达量在幼苗根部以铵态氮处理(T_2)最高,正常供氮处理(CK)最低,其在茎中的表达量仍以铵态氮处理(T_2)最高,而在叶片中的表达水平表现为正常供氮处理(CK)显著高于($P < 0.05$)其他 3 个处理(图 3,D)。结果说明不同氮素形态从糖代谢关键基因转录水平上影响着烟株幼苗的糖代谢过程,其中蔗糖转运蛋白基因(*SUT1*)在铵态氮素影响烟草糖代谢途径中起关键作用。

2.4 缺氮及不同氮素形态对烟草幼苗叶片糖代谢途径关键酶活的影响

在烟株经过低氮及不同氮素形态处理 3 周后,对糖代谢关键酶转化酶和淀粉酶活性进行检测,结果如图 4 所示。由图 4,A 可以看出,4 个处理中烟草幼苗叶片转化酶活性差异不显著,这与上述检测的转化酶基因(*INV*)表达结果相一致(图 3,B);由图 4,B 可以看出,幼苗叶片淀粉酶活性在缺氮处理(T_1)、铵态氮处理(T_2)和硝态氮处理(T_3)中均显著低于正常供氮(CK)($P < 0.05$),分别只达到正常供氮处理(CK)的41.96%、55.59%和 60.96%。以上结果说明淀粉酶活性在缺氮及不同氮素影响烟草幼苗糖代谢过程中起更重要作用。

3 讨论

大量的研究表明烟草叶片中碳水化合物的含量受到光照、干旱、海拔高度等生态环境因素的影响^[13-15]。土壤供氮量及氮素形态对烟叶品质影响较大,但是目前关于氮素用量及不同氮素形态对烟草

碳水化合物的影响机制还未有报道。本试验对缺氮及不同氮素形态下烟草植株功能叶片蔗糖与淀粉合成相关基因的表达水平、酶活性、总糖含量、还原糖及淀粉含量进行研究分析,发现缺氮及不同氮素形态对烟叶糖代谢途径影响显著,淀粉积累量表现为缺氮(T_1)>铵态氮(T_2)>正常供氮(CK)>硝态氮(T_3),进一步从分子水平分析糖代谢途径关键基因的表达情况表明,蔗糖转运蛋白基因(*SUT1*)各部位表达量在铵态氮处理中显著高于其他处理。

蔗糖是高等植物光合产物运输的主要形式,研究表明,*SUT* 家族成员在蔗糖长距离运输中的重要作用^[16],Bürkle 等^[17]通过抑制烟草的 *SUT* 表达而导致维管束中蔗糖含量降低,开花延迟。本研究表明,给烟草幼苗供应单一铵态氮(T_2)显著增加了根、茎、叶等 3 个部位蔗糖转运蛋白基因的表达,这预示着铵态氮可能通过改变蔗糖转运蛋白的活性来影响糖代谢物质的流向,这与试验中检测到铵态氮处理叶片中蔗糖含量最高的结果相一致。本研究表明,单一铵态氮(T_2)对烟草叶片糖代谢途径的影响可能主要依赖于蔗糖转运蛋白(*SUT1*)。另外,本研究还发现缺氮处理烟草幼苗叶片中蔗糖含量也很高,这可能是由于该处理处于缺氮胁迫下,氮素吸收量少,因此糖消耗量较少,造成了蔗糖的积累,这和人前报道的“得氮耗糖”规律相一致^[18]。

对植物体内淀粉合成代谢的研究表明,转化酶基因(*INV*)和焦磷酸化酶基因(*AGPase*)2 个基因的表达及酶活性大小意味着功能叶片中内含物积累的状况^[19-20]。本研究发现,缺氮处理和 2 个单一氮素形态处理(T_2 、 T_3)烟草幼苗叶片焦磷酸化酶基因(*AGPase*)的表达量均显著低于正常供氮处理,而转化酶基因(*INV*)表达量在 4 个处理中差异不显著,表明 *AGPase* 基因在糖代谢淀粉合成中起关键作用。推测在缺氮条件下,虽然烟草叶片 *AGPase* 基因的表达量低于正常供氮,但是由于该处理处于氮素营养胁迫状态,耗糖量少,淀粉分解较少,这与本

试验中得到的缺氮处理下淀粉酶活性最低的结果相一致,所以缺氮条件下叶片中淀粉含量仍显著高于正常供氮;根据 *AGPase* 基因在幼苗组织中的表达情况,推测硝态氮处理幼苗淀粉合成能力大于铵态氮处理,但是由于烟草对不同形态氮素的利用率不同,导致消耗的淀粉也不相同,表现在淀粉酶活性上是硝态氮处理大于铵态氮处理。因此,最终 4 个处理中幼苗叶片淀粉积累量表现为缺氮(T_1)>铵态氮(T_2)>正常供氮(CK)>硝态氮(T_3)。同时,4 个处理幼苗叶片的全氮含量也表现为硝态氮(T_3)>正常供氮(CK)>铵态氮(T_2)>缺氮(T_1),符合植物的碳氮平衡规律。

颗粒淀粉合成酶(GBSSI)紧密结合在淀粉粒上,能通过 α -1,4-D-糖苷键将 ADPG 中的葡萄糖残

基加到引物的非还原端,形成线性大分子^[21]。本试验对颗粒淀粉合成酶基因(*GBSSI*)的表达检测结果表明,缺氮处理叶片的 *GBSSI* 基因表达量显著高于其他处理,即 *GBSSI* 基因在 T_1 处理烟叶中活跃表达,说明氮营养胁迫处理烟叶中直链淀粉含量可能较高,当然这还需要进一步的验证。

综上所述,本研究结果表明,烟草幼苗对不同氮素形态的利用率与淀粉积累呈反比,与前人“得氮耗糖”结论相一致,且烟草幼苗对硝态氮的利用率最高;糖代谢途径基因表达分析表明,蔗糖转运蛋白基因(*SUT1*)可能在铵态氮素影响烟草糖代谢途径中起关键作用,这为调控不同氮素形态配比提高烟草氮素利用率及改善烟叶品质奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] WANG SH X(王少先),PENG K Q(彭克勤),XIA SH T(夏石头). Influence of carbon and nitrogenous fertilizers application on yield and quality of tobacco[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin* (中国农学通报),2004,20(2):135—138(in Chinese).
- [2] GENG S X(耿素祥),WANG SH H(王树会),LIU W Q(刘卫群). Effects of nitrogen on metabolism and dry matter accumulation of flue-cured tobacco before and after topping[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture* (中国生态农业学报),2011,19(6):1 250—1 254(in Chinese).
- [3] 宫长荣. 烟草调制学[M]. 北京:中国农业出版社,2003:149—175.
- [4] XIE ZH J(谢祝捷),JIANG D C(姜 东),DAI T B(戴廷波). Sugar signal and its regulation on C/N metabolism gene in plant[J]. *Plant Physiology Communications* (植物生理学通讯),2002,(4):399—405(in Chinese).
- [5] ZHANG T CH(张廷春),CHEN ZH F(陈治峰),et al. Effect of different nitrogen forms and their ratio on agronomical character, economic and quality of flue-cured tobacco[J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science* (植物营养与肥料学报),2005,11(6):787—792(in Chinese).
- [6] GE T D(葛体达),HUANG D F(黄丹枫),SONG SH W(宋世威),et al. Effects of nitrogen forms on carbon and nitrogen accumulation in tomato seedling[J]. *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学),2008,41(10):3 168—3 176(in Chinese).
- [7] CHEN A Q, HU J, SUN S B, et al. Conservation and divergence of both phosphate- and mycorrhiza-regulated physiological responses and expression patterns of phosphate transporters in solanaceous species[J]. *New Phytologist*,2007,173(4):817—831.
- [8] ZHANG S T(张松涛),YANG Y X(杨永霞),HUA X H(滑夏华),et al. Comparison of dynamic metabolism of starch biosynthesis in tobacco leaves from different ecological zones[J]. *Acta Tabacaria Sinica* (中国烟草学报),2012,18(4):31—34(in Chinese).
- [9] SHOU H, BORDALLO P, FAN J, et al. Expression of an active tobacco mitogen-activated protein kinase enhances freezing tolerance in transgenic maize[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*,2004,101(9):3 298—3 303.
- [10] XUE G P, MCINTYRE C L, JENKINS C L D, et al. Molecular dissection of variation in carbohydrate metabolism related to water-soluble carbohydrate accumulation in stems of wheat[J]. *Plant Physiology*,2008,146(2):441—454.
- [11] DOEHLERT D C, DUKE S H. Specific determination of α -amylase activity in crude plant extracts containing β -amylase[J]. *Plant Physiology*,1983,71(2):229—234.
- [12] 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.
- [13] SHI H ZH(史宏志),HAN J F(韩锦峰),YUAN T(远 彤). Effects of red and blue light proportional leaf growth, carbon-nitrogen metabolism and quality in tobacco[J]. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报),1999,25(2):215—220(in Chinese).
- [14] HUANG G W(黄国文),CHEN L B(陈良碧). Influence of drought on cell structure and chemical ingredients of tobacco upper leaves[J]. *Life Science Research* (生命科学研究),2004,4(2):183—187(in Chinese).
- [15] YANG Y X(杨永霞),SHI B J(石冰瑾),WANG X L(王霄龙),et al. Dynamic metabolic analysis of tobacco starch biosynthesis at different altitudes[J]. *Journal of Hunan Agricultural University* (Nat. Sci. Ed.) (湖南农业大学学报·自然科学版),2012,38(1):22—26(in Chinese).
- [16] HAYASHI H, CHINO M. Chemical composition of phloem sap from the uppermost internode of the rice plant[J]. *Plant Cell Physiol.*,1990,31(2):247—251.
- [17] BÜRKLE L, HIBBERD J M, QUICK W P, et al. The H^+ -sucrose cotransporter NtSUT1 is essential for sugar export from tobacco leaves[J]. *Plant Physiology*,1998,118(1):59—68.
- [18] 张福锁,李春俭,米国华. 植物营养生理进展[M]//洪德元. 21 世纪的生命科学展望,济南:山东教育出版社,2003:206—235.
- [19] TAN C X(谭彩霞),FENG CH N(封超年),CHEN J(陈 静). Progress on key enzymes involved in crop starch synthesis and their gene expression[J]. *Journal of Triticeae Crops* (麦类作物学报),2008,28(5):912—919(in Chinese).
- [20] GU C Q(顾采琴),LAI Y P(赖雅平),ZHU D X(朱冬雪),et al. Changes of the metabolism of starch and sucrose content in chestnuts at different degrees of calcification[J]. *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学),2013,46(8):1 676—1 681(in Chinese).
- [21] WANG Y F(王月福),MA D H(马东辉),et al. Effects of nitrogen fertilizer rate and post-anthesis soil moisture content on starch synthesis and quality of grains in strong gluten wheat[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报),2008,28(9):1 803—1 810(in Chinese).