

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

王红丽¹, 杨惠娟¹, 苏菲^{1,3}, 李海江², 张要旭², 杨军杰¹, 史宏志¹

1 河南农业大学烟草学院, 河南 郑州 450002;

2 河南省烟草公司平顶山市公司, 河南 平顶山 467002;

3 云南省烟草公司, 昆明市公司东川分公司, 云南 昆明 654199

摘要: 为探索氮用量对烤烟碳氮代谢的影响, 在前期不同氮素营养水平上在成熟期统一调亏, 分析烤烟叶片糖代谢、氮代谢、淀粉代谢及萜类代谢相关关键基因的表达水平。结果显示: 糖代谢中3个关键基因, 胞外蔗糖转化酶(Inv)和蔗糖合成酶(SuS)基因随着烟叶的成熟表达量升高, 在不同氮水平处理间表达水平差异无统计学意义。蔗糖磷酸合成酶(SPS)基因表达量在烟叶成熟前期随着施氮量的降低而降低。淀粉代谢中颗粒结合型淀粉合成酶(GBSSI)基因表达量既不受烟叶成熟时期的影响也不受前期供氮水平的影响。氮代谢中硝酸还原酶(NR)基因在不同成熟时期及不同的供氮处理间表达量均无差异。谷氨酰胺合成酶(GS)基因的表达量在烟叶成熟后期呈降低趋势, 且受前期供氮水平的影响较大。萜类代谢途径中3-羟-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶(HMGR)基因表达量随着烟叶的成熟先升高再降低, 在成熟后期表达量随前期供氮水平的降低而降低。表明在前期供氮水平不一致的基础上于成熟期统一调亏, 对成熟后期烟叶氮素的同化吸收过程和萜类代谢影响较大。烟叶糖代谢和淀粉代谢受烟叶成熟时期的影响最大。

关键词: 烤烟; 氮素; 碳氮代谢; 基因表达

doi: 10.3969/j.issn.1004-5708.2014.05.019

中图分类号: S572.6; Q81

文献标志码: A

文章编号: 1004-5708 (2014) 05-0116-05

Effects of nitrogen on expression of key genes related to carbon/nitrogen metabolism and terpenoid metabolism in maturing flue-cured tobacco leaves

WANG Hongli¹, YANG Huijuan¹, SU Fei^{1,3}, LI Haijiang², ZHANG Yaoxu², YANG Junjie¹, SHI Hongzhi¹

1 College of Tobacco, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2 Henan Pingdingshan Tobacco Company, Pingdingshan 467002, Henan, China;

3 Kunming Dongchuan Tobacco Company, Yunnan Provincial Tobacco Company, Kunming 654199, China

Abstract: Expression of key genes involved in sugar, nitrogen, starch and terpenoid metabolism pathways were tested by regulated deficit nitrogen nutrition to study effects of different nitrogen applications on carbon and nitrogen metabolism in flue-cured tobacco. Results indicated that in sugar metabolism pathway Inv and SuS genes' expression increased when tobacco leaf became more mature while not affected by early nitrogen level. Expression of SPS gene decreased with decline of nitrogen supply at early maturing stage. GBSSI gene in starch metabolism pathway was not affected by either maturity or early nitrogen supply. GS gene expressed at lower level in maturing stage and affected by early nitrogen supply while NR gene expression was not affected. HMGR gene expression in terpenoid metabolism pathway decreased when leaf became more mature and decreased with decline of early nitrogen supply. The assimilation of nitrogen and terpenoid metabolism were significantly affected when regulated deficit of nitrogen was applied at early growing stage. Sugar and starch metabolism were affected mostly at leaf maturing stage.

Keywords: flue-cured tobacco; nitrogen; carbon and nitrogen metabolism; gene expression

基金项目: 河南省烟草公司科技项目 (HYKJ2012M06)

作者简介: 王红丽 (1989—), 在读硕士, 主要从事烟草栽培生理研究, Email: 379714360@qq.com

通讯作者: 史宏志 (1963—), 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事烟草栽培生理研, Email: shihongzhi88@163.com

收稿日期: 2013-10-14

氮素对植物生命活动有极其重要的作用。氮素是蛋白质、核酸、磷脂等的主要组成成分,氮在植物体内的主要存在形态是蛋白质^[1-2]。在烟叶各种代谢过程中,碳氮代谢是最基本和最重要的代谢,其代谢强度和协调程度对烟叶的生长发育和决定烟叶产量品质各类化学成分的形成转化有重要影响,直接或间接关系到烟叶产量和品质的形成和提高^[3]。拓阳阳^[4]研究表明硝酸还原酶和转化酶活性都存在显著性差异,随着烟叶的生长成熟,叶绿素、硝酸还原酶和转化酶活性均呈下降趋势,不同烤烟品种不同生长阶段的碳氮代谢强度具有显著性差异。许晨曦^[5]研究表明随氮素水平的提高同一品种烟草的硝酸还原酶、蔗糖转化酶、淀粉酶活性均提高;但在成熟期,增加施氮量后,烟草的淀粉酶活性反而降低。云菲^[6]等研究结果表明随着光强的降低转化酶(INV)活性逐渐降低,但充足的氮素营养能够促进碳代谢。随光强减弱和施氮量增加,烟碱、总氮含量上升,碳水化合物含量下降,总体上呈现氮代谢强于碳代谢的趋势。史宏志^[7]研究发现,在叶片功能盛期以前,随着施氮量的增加,淀粉酶活性增高,碳的固定和转化增强,但碳积累代谢减弱;烟叶成熟阶段,淀粉酶活性高时,碳的分解代谢旺盛,其活性与施氮量呈负相关。随着施氮水平的提高,烟叶各期的转化酶活性均升高,表明增施氮肥可以促进碳代谢的增强。岳俊芹^[8]对不同氮素形态影响的研究发现,纯施硝态氮有利于还原糖的积累;纯施铵态氮的烟叶中谷酰胺合成酶和蔗糖合成酶活性在成熟期一直保持在相对较高的水平上,烟碱含量最高;硝态氮与铵态氮各占50%的情况下,烟叶碳氮代谢协调。

目前,关于氮素营养对烟叶生长发育和品质影响的研究多集中在大田条件下控制氮素用量和氮素形态比例等方面^[9-11],但大田条件下很难实现氮素营养的动态精准调控。氮素供应不足将导致烟叶刺激性降低,劲头不足;氮素过多,则烟株氮代谢旺盛,烟叶难以正常生理成熟。合理的施氮量可以保证烟株正常的生长发育,达到体内碳氮代谢平衡,有利于优良品质的形成。鉴于此,本文采用盆栽试验,在育苗基质固持的条件下进行全营养液培养,使烟株前期生长在不同氮素营养条件下,后期则进行氮素调亏,减少其氮素供应,研究了不同生长时期氮素精准动态供应对烤烟碳氮代谢关键基因表达水平的影响,以期对烤烟的动态精准施肥提供依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

本研究在河南省郑县采用盆栽试验套盆设计,供试品种为烤烟 NC297。盆栽试验中种植盆钵高 30 cm,直径 35 cm,底盆直径 40 cm,所用填充固持材料为烤烟育苗基质。烟株生长营养全部由 Hoagland 营养液提供,营养液组成为 NH_4NO_3 、 KH_2PO_4 、 K_2SO_4 、 MnSO_4 、 H_3BO_3 、 CuSO_4 、 ZnSO_4 、EDTA-Fe、 MgSO_4 、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 H_2MoO_4 、 H_2O 。采用分析纯试剂配制 Hoagland 营养液,营养液中各种元素 N、P、K、Mg、Zn、Cu、Mn、B、Mo、Fe 的质量浓度分别为 140、40、300、40、0.05、0.02、0.50、0.50、0.05、5.60 mg/L。

1.2 试验设计

研究设计了前期不同氮素营养协同成熟期氮素调亏试验,共设 4 个处理,每个处理栽种 8 盆。烤烟于 2012 年 5 月 10 号移栽,团棵前每 5 d 添加 1 次营养液,之后每 3 d 添加 1 次营养液。移栽后 28 d 进入团棵期,移栽后 56 d 打顶,打顶后进行同量氮素调亏,即把氮素质量浓度降至 35 mg/L, Hoagland 营养液中其余元素浓度保持不变。团棵前 N1、N2、N3、N4 处理每次分别添加营养液的体积为: 2.250 L、1.875 L、1.500 L、1.125 L,其中 N2 处理为根据大田推荐施氮量确定的正常施氮量,添加后均按差量用清水补足到 2.5 L;团棵后 N1、N2、N3、N4 处理每次分别添加营养液的体积为: 2.725 L、2.213 L、1.700 L、1.188 L,添加后均按差量用清水补足到 3.0 L。打顶后各处理每次分别添加营养液的体积均为 1 L,按差量用清水补足到 2 L。

1.3 碳氮代谢基因和萜类代谢基因的 RT-PCR 检测

分别在移栽后 60 d, 70 d 和 80 d 选取生长发育良好的不同烟株的 3 片上二棚叶,于液氮中冷冻保存。采用 Trizol 法提取烟草总 RNA^[12],通过随机引物法反转录合成 cDNA。检测内参基因 L25^[13]及目的基因 *lnv*、*SuS*、*SPS*、*GBSS*、*NR1*、*GS* 和 *HMGR* 表达量用的引物如表 1。PCR 体系: cDNA 1 μL , dH_2O 为 11 μL ,上游引物和下游引物均为 1.5 μL ,含染料的 Taqmix 为 15 μL ,整个 PCR 体系共 30 μL 。反应程序: 94 $^\circ\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s; 退火温度依各引物 T_m 值变化而变化 (47 $^\circ\text{C}$ ~ 60 $^\circ\text{C}$); 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 1 min; 35 个循环; 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min,于 4 $^\circ\text{C}$ 保存。

表 1 扩增引物序列
Tab. 1 Amplification primer sequence

种类	基因名称	NCBI 登录号	引物序列 (5' - 3')
	L25	L18908	F: GCTTTCTTCGTCCCATCA R: CCCCAAGTACCCTCGTAT
糖代谢基因	胞外蔗糖转化酶 Inv	AB055500	F: CTIGCGAGGGATAGGGTG R: TGGTTGGAAGGGATTGAG
	蔗糖合成酶 SuS	AB055497.1	F:CCATTTCTCAGCCCAGTTTA R:CTCTGCCTGTTCTTCCAAGT
	蔗糖磷酸合成酶 SPS	AF194022	F:GGAATTACAGCCCATACGAG R:AAGTTCTGGGTGAGCAAA
淀粉代谢基因	颗粒结合型淀粉合成酶 GBSSI	DQ069270.1	F:GGTAGGAAAATCAACTGGATG R:TATCCATGCCATTCACAATCC
氮代谢基因	硝酸还原酶 NR1	X14058.1	F:ATCCAGTTATCAGCGGTA R: GGCAGTTCAGTCACATAGA
	谷氨酰胺合成酶 GS	X95933.1	F:CAGCAATCTCCGCAATCC R:CGAGCCTATCCCGACAAA
萜类代谢基因	3- 羟 -3 甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 HMGR	AF004232.1	F:AAATCTTACTGGCTCTGCG R:CTGTTGGCACCTTTCACTC

注: F 表示上游引物, R 表示下游引物。

1.4 数据处理分析

采用 LaunchVisionWorksLS 软件对 RT-PCR 检测所得半定量图片进行量化, 提取各个基因表达的亮度相对值进行对比, 每个基因均以移栽后 60 天 N2 处理为基准。

2 结果与分析

2.1 氮素营养协同成熟期同量调亏处理对糖代谢关键基因表达的影响

胞外蔗糖转化酶 (extracellular invertase, Inv), 在高等植物蔗糖代谢中起着关键的作用, 参与植物的生长、器官建成、糖分运输、韧皮部卸载及调节库组织糖分构成及水平, 其酶活性常作为衡量碳代谢强度的重要指标; 如图 1 表 2 所示, Inv 基因的表达强度随生育期的推进而逐渐增强, 移栽后 60 天表达量均较低, 在处理间表现为 N1<N2<N3<N4。而在移栽后

70 天、80 天表达量明显增加, 70 天时处理间没有明显差异, 80 天时表现为基因表达量随前期施氮量的增加而增加。蔗糖合成酶 (sucrose synthase, SuS) 主要是将运输入叶片中的蔗糖降解, 提供合成淀粉等多糖的葡萄糖供体, 承担着非光合组织中为其它合成反应提供核苷酸糖类的任务。SuS 基因在不同的生育期表达量不同, 随生育期的推进表达量有逐渐增加的趋势, 但不如 Inv 基因表达量增加明显。蔗糖磷酸合成酶 (sucrosephosphate synthase, SPS), 是催化蔗糖生成的关键酶, 也是控制碳素分配和流向的关键酶^[14]。SPS 基因在移栽后 60 天表达强度弱于其余两个时期, SPS 基因表达量在移栽后 60 天时四个处理间有差异, N3 处理亮度相对值为 59.3 明显低于其余各处理, 在 70 天与 80 天时表达量在发育时期与处理间均无明显差异 (图 1, 表 2)。

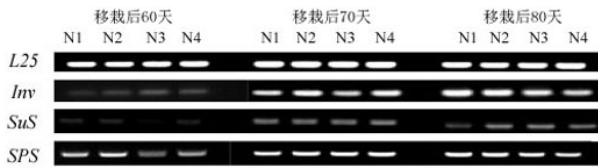


图1 不同发育时期烤烟 *Inv*, *SuS* 和 *SPS* 基因的检测结果

Fig.1 Results of *Inv*, *SuS*, *SPS* genes on different growing stages

表2 氮素营养协同成熟期同量调亏处理对糖代谢关键基因表达的影响

Tab. 2 Effects of regulated deficit of nitrogen nutrition during mature stage on expression of key genes in carbohydrate metabolism

基因	移栽后天数 /d	N1	N2	N3	N4
<i>Inv</i>	60	81.4	100.0	117.8	103.8
	70	206.7	271.5	198.7	275.1
	80	341.5	321.7	277.5	223.2
<i>SuS</i>	60	91.1	100.0	21.3	89.7
	70	402.9	405.2	409.5	435.0
	80	200.7	421.3	422.3	327.2
<i>SPS</i>	60	101.2	100.0	59.3	72.6
	70	89.0	99.0	100.4	107.9
	80	107.8	103.2	89.4	79.2

注：表中数据为亮度相对值，以移栽后 60 天 N2 处理为 100。

2.2 氮素营养协同成熟期同量调亏处理对淀粉代谢关键基因表达的影响

颗粒结合型淀粉合成酶 (GBSSI)，是控制直链淀粉合成的关键酶。如图 2 表 3 所示，GBSSI 基因在不同发育时期表达量变化不大，同一时期不同处理间差异不明显，在移栽后 70 天 N4 处理表达量相对值为 126.9 稍高于其余各处理，移栽后 80 天 N4 处理表达量相对值为 84.0 低于其余各处理 (图 2，表 3)。

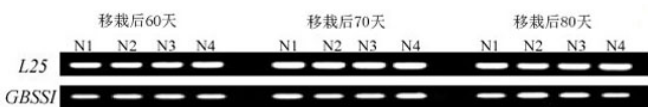


图2 不同发育时期烤烟 GBSSI 基金的检测结果

Fig. 2 Results of GBSSI gene on different growing stages

表3 氮素营养协同成熟期同量调亏处理对 GBSSI 基因表达的影响

Tab. 3 Effects of regulated deficit of nitrogen nutrition during mature stage on expression of GBSSI gene

移栽后天数 /d	处理			
	N1	N2	N3	N4
60	84.7	100.0	106.4	100.2
70	117.9	104.4	109.7	126.9
80	98.5	123.8	104.0	84.0

注：表中数据为亮度相对值，以移栽后 60 天 N2 处理为 100。

2.3 氮素营养协同成熟期同量调亏处理对氮代谢关键基因表达的影响

硝酸还原酶 (NR)，是氮代谢的第一个关键酶和限速酶，主要作用是把 NO₃⁻ 离子还原成 NO₂⁻ 离子。如图 3 表 4 所示，NR 的基因表达量随生育期的推进先升高再降低，在同一时期不同处理间无明显差异。谷氨酰胺合成酶 (glutamine synetase, GS, 又称为 N 素转移酶) 催化产生谷氨酰胺，GS 常与谷氨酸合酶 (glutamate synmase, GOGAT) 协同作用，组成 GS/GOGAT 循环，这是高等植物 NH₄⁺ 同化的主要途径。GS 基因的表达量在移栽后 70 天高于其余两个时期，在移栽后 60 天和 70 天时各处理间表达量没有明显差异，在 80 天时 N3、N4 处理的亮度相对值分别为 70.1, 54.1 明显低于 N1, N2 处理 (图 3，表 4)。

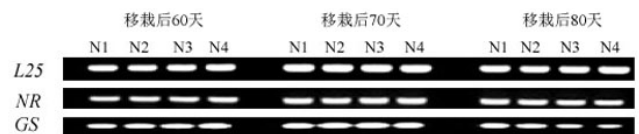


图3 不同发育时期烤烟 NR 和 GS 基因的检测结果

图3 不同发育时期烤烟 NR 和 GS 基因的检测结果

Fig. 3 Results of NR and GS genes on different growing stages

表4 氮素营养协同成熟期同量调亏处理对氮代谢关键基因表达的影响

Tab. 4 Effects of regulated deficit of nitrogen nutrition during mature stage on expression of key genes in nitrogen metabolism

基因	移栽后天数 /d	N1	N2	N3	N4
NR	60	89.9	100.0	99.3	105.5
	70	114.4	117.8	122.9	124.3
	80	112.9	111.4	104.7	97.8
GS	60	91.6	100	102.3	113.3
	70	116.5	122.5	127.3	114.3
	80	101.8	93.5	70.1	54.1

注：表中数据为亮度相对值，以移栽后 60 天 N2 处理为 100。

2.4 氮素营养协同成熟期同量调亏处理对萜类代谢关键基因表达的影响

3-羟-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶(HMGR),是植物甲羟戊酸途径调控的第一个限速酶,也是细胞质萜类代谢中的重要调控位点。如图4表5所示, HMGR 基因的表达量在移栽后70天时各处理的基因表达量均高于移栽后60天时的表达量,随之在移栽后80天时表达量又逐渐降低。四个处理间的表达量有明显差异,在移栽后60天 N3,N4 处理 HMGR 基因表达量亮度相对值分别为 204.5,183.0 明显高于 N1,N2 处理,移栽后70天 N1 处理亮度相对值为 387.9 明显低于其余各处理,移栽后80天表现为随前期施氮量的增加基因表达强度增强(图4,表5)。

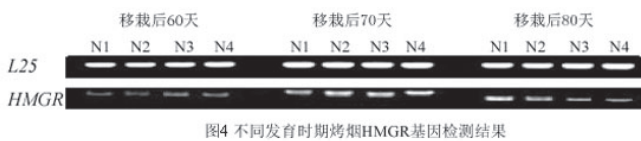


图4 不同发育时期烤烟 HMGR 基金检测结果

Fig. 4 Results of HMGR gene on different growing stages

表5 氮素营养协同成熟期同量调亏处理对 HMGR 基因表达的影响

Tab. 5 Effects of regulated deficit of nitrogen nutrition during mature stage on expression of HMGR gene

移栽后天数/d	N1	N2	N3	N4
60	103.5	100.0	204.5	183.0
70	387.9	584.5	518.0	546.4
80	504.5	339.4	228.9	202.2

注:表中数据为亮度相对值,以移栽后60天N2处理为100。

3 讨论

在烟叶生长和成熟过程中其碳氮代谢的动态变化对烟叶品质都会产生重大影响^[3]。本研究表明,糖代谢中3个关键基因,胞外蔗糖转化酶和蔗糖合成酶基因表达均受烟叶成熟时期的影响较大,烟叶越趋向成熟其基因表达量越高,而不受前期氮素施用量影响,在各个时期的4个处理间2个基因的表达量均无差异。但 SuS 基因的表达量整体低于 Inv 基因。SPS 基因的表达量在烟叶成熟前期随打顶前施氮量的降低而降低,随着烟叶成熟期的退后表达量在4个处理间趋于一致。糖代谢3个关键基因表达量的变化说明打顶后随着烟叶的成熟糖代谢关键基因表达量均趋向升高,表明糖代谢活动也越来越活跃,糖代谢过程受烟叶成熟时期影响较大而受前期氮素施用量影响较小。

淀粉代谢中颗粒结合型淀粉合成酶(GBSSI)基因表达既不受烟叶成熟时期的影响也不受前期供氮水平的影响,表明前期供氮对淀粉合成代谢影响不大。

氮代谢中硝酸还原酶(NR)基因在不同成熟时期和不同的前期供氮处理间表达量均无差异。N素转移酶GS基因的表达强度在成熟前期无差异,越到烟叶成熟后期表达量越低且随前期供氮水平的降低表达量也降低。结果说明氮代谢途径中烟叶固氮能力随着烟叶的成熟而降低,且前期供氮水平越低氮素吸收能力也将越低。

萜类代谢MVA途径中3-羟-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶HMGR是控制萜类代谢的限速酶,其表达量随着烟叶的成熟先升高再降低,在成熟前期表达量在四个处理间均较低,在成熟中期表达量都升高,而在成熟后期表达量随即又降低,但在这一时期表达量受前期供氮水平的影响,前期供氮越高,其表达量也越高。结果表明萜类代谢在烟叶成熟中期最活跃,前期供氮水平对烟叶成熟后的萜类代谢影响最大。

综上所述,在前期供氮水平不一致的基础上成熟期统一调亏,对烟叶糖代谢和淀粉代谢影响不大,而对成熟后期烟叶氮素的同化吸收过程和萜类代谢影响较大。

参考文献

- [1] 周昆,周清明,胡晓兰. 烤烟香气物质研究进展[J]. 中国烟草科学, 2008, 29(2): 58-61.
- [2] 史宏志,韩锦峰,官春云. 烟叶香气前体物在成熟和调制过程中的变化[J]. 作物研究, 1996, 10(2): 22-25.
- [3] 黄树永,陈良存. 烟草碳氮代谢研究进展[J]. 河南农业科学, 2005, (4): 8-11.
- [4] 拓阳阳,赵铭钦,张广富,等. 不同烤烟品种叶片碳氮代谢及相关产物差异性[J]. 西北农业学报, 2011, 20(4): 82-86.
- [5] 许晨曦,刘国顺,李向阳,等. 品种与施氮量互作对烟草碳氮代谢关键酶的影响[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(3): 83-85.
- [6] 云菲,刘国顺,史宏志. 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[J]. 作物学报, 2010, 36(3): 508-516.
- [7] 史宏志,韩锦峰,赵鹏. 不同氮量与氮源下烤烟淀粉酶和转化酶活性动态变化浓香型烟叶特色品种衰老期的氮素代谢特性[J]. 中国烟草科学, 1998, (3): 5-8.
- [8] 岳俊芹,刘健康,刘卫群. 不同氮素形态对烤烟叶片碳氮代谢关键酶活性及化学成分的影响[J]. 河南农业大学学报, 2004, 38(2): 154-158.
- [9] 王新发,杨铁钊,殷金玉,等. 氮用量对烟叶质体色素及中性香气基础物质的影响[J]. 华北农学报, 2010, 25(1): 185-189.
- [10] 赵进恒,赵铭钦,韩富根,等. 水肥耦合对烤烟质体色素及其降解产物的影响[J]. 华北农学报, 2010, 25(2): 216-220.
- [11] 韩富根,沈铮,李元实,等. 不同施肥和灌溉组合对烤烟化学成分和香气质量的影响[J]. 土壤, 2010, 42(1): 14-19.
- [12] 丁福章,李继新,袁有波,等. 烟草不同组织总RNA的提取方法初探[J]. 中国农学通报, 2007, 23(12): 98-101.
- [13] Schmidt G W, Delaney S K. Stable internal reference genes for normalization of real-time RT-PCR in tobacco (*Nicotiana tabacum*) during development and abiotic stress[J]. Mol Genet Genomics, 2010, 283(3): 233-41.
- [14] 张明方,李志凌. 高等植物中与蔗糖代谢相关的酶[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(3): 289-295.