

NaCl 胁迫下鲜烟叶中多酚物质含量及 PAL 和 PPO 活性变化

胡庆辉^{1,2}, 王程栋¹, 王树声^{1*}, 李湘伟^{1,2}, 侯娜^{1,2}, 王浩浩^{1,2}, 李斌^{1,2}

(1. 农业部烟草类作物质量控制重点开放实验室, 中国农业科学院烟草研究所, 青岛 266101; 2. 中国农业科学院研究生院, 北京 100081)

摘要: 为探讨 NaCl 胁迫对烤烟多酚物质含量的影响, 以烤烟 NC89 为供试品种, 在营养液砂培盆栽种植条件下经含 350、700 mmol/L NaCl 的 1/3 浓度 Hoagland 营养液根部胁迫处理, 检测分析了植株叶片中多酚物质含量和苯丙氨酸解氨酶(PAL)、多酚氧化酶(PPO)活性的变化。结果表明, NaCl 胁迫处理 2 d 时叶片类黄酮含量明显增加, 处理 6 d 时绿原酸含量开始增加, 处理 8 d 时芸香苷含量明显增加; 花青苷含量随处理时间延长呈先升高后降低的趋势; 不同胁迫浓度处理中, 绿原酸、类黄酮、芸香苷和花青苷含量以 350 mmol/L NaCl 处理较高。350 mmol/L NaCl 胁迫处理下, PAL 活性逐渐升高, 并分别与绿原酸、芸香苷含量呈极显著、显著正相关。胁迫处理后 PPO 活性逐渐升高, 且与绿原酸含量有一定相关性。总之, 适度 NaCl 胁迫处理下鲜烟叶多酚物质含量增加, 且与 PAL 活性变化密切相关。

关键词: 盐胁迫; 烤烟; 多酚; 多酚氧化酶; 苯丙氨酸解氨酶

中图分类号: S572.01

文章编号: 1007-5119 (2013) 01-0051-05

DOI: 10.3969/j.issn.1007-5119.2013.01.010

Changes of Polyphenols Contents, PPO and PAL Activities of Fresh Tobacco Leaves under NaCl Stress

HU Qinghui^{1,2}, WANG Chengdong¹, WANG Shusheng^{1*}, LI Xiangwei^{1,2},
HOU Na^{1,2}, WANG Haohao^{1,2}, LI Bin^{1,2}

(1. Key Laboratory of Tobacco Quality Control, Ministry of Agriculture, Tobacco Research Institute of CAAS, Qingdao 266101, China; 2. Graduate School of CAAS, Beijing 100081, China)

Abstract: A pot experiment with flue-cured tobacco NC89 planted in sand and three treatments (0, 350, 700 mmol/L NaCl with 1/3 Hoagland nutrient solution) was carried out to study the effect of NaCl stress on polyphenols of tobacco leaves and changes of polyphenols contents. The results showed that the flavonoid content increased significantly after 2 days of NaCl stress and the chlorogenic acid content began to increase after 6 days of NaCl stress. The rutin content increased significantly after 8 days of NaCl stress. The anthocyanin content first increased and then decreased. In different stress concentrations, the contents of chlorogenic acid, flavonoid, rutin, and anthocyanin were the highest in 350 mmol/L NaCl solution. PAL activity gradually increased, and had high significantly positive correlation with chlorogenic acid content and had positive correlation with rutin content at 350 mmol/L NaCl solution stress. PPO activity gradually increased and had correlation with chlorogenic acid. In general, the content of polyphenols increased and was closely related to change of PAL activity under the moderate NaCl stress treatment.

Keywords: salt stress; flue-cured tobacco; polyphenols; PPO; PAL

多酚物质是烤烟中重要的香气前体物, 烟叶中某些酚类物质的含量与烟叶品质及其芬香吸味成正相关, 与烟叶等级密切联系, 常被作为优质烟化学成分考核指标之一^[1]。烟叶中的酚类化合物主要包括单宁类、香豆素类、黄酮类、花色素类、简单

酚衍生物等, 其中绿原酸、芸香苷和茛菪亭是烟草中最主要的酚类物质^[2]。有关研究表明, 烟叶中多酚类物质的含量受众多栽培环境条件的影响, 如季学军等^[3]报道, 皖南地区粉砂土、河滩地砂壤土和冲积砂壤土植烟中部叶多酚含量高于水稻黏土; 赵

基金项目: 农业部烟草类作物质量控制重点开放实验室基金项目 (2009001)

作者简介: 胡庆辉, 男, 在读硕士研究生, 研究方向为烟草生理生化。E-mail: 206huhui@163.com。*通信作者, E-mail: wangshusheng886@sohu.com

收稿日期: 2012-02-20

修回日期: 2012-08-01

铭钦等^[4]认为,培土成垄和分次施钾可以明显增加烟叶中总酚、绿原酸、芸香苷、石油醚提取物含量;王毅等^[5]研究发现,在一定范围内增加 UV-B 辐射强度,烟草总多酚含量变化不大,但辐射强度高可提高烟叶总多酚含量。盐胁迫是目前对农业生产影响较大的非生物胁迫因子之一,目前有关 NaCl 胁迫对烤烟栽培品种多酚物质含量影响的报道较少。本研究试图探讨分析 NaCl 胁迫下烟草多酚物质及相关酶活性的变化规律,为研究逆境胁迫下的多酚物质的调控机制提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试烤烟品种为 NC89。温室播种育苗,幼苗 3 片真叶假植,五叶一心时进行砂培盆栽,每盆装填石英砂 15 kg,定期浇 Hoagland 营养液,植株生长至中心花开放期打顶,打顶后 8 d,进行 NaCl 胁迫处理。

胁迫处理在 1/3 Hoagland 营养液中设 350、700 和 0 mmol/L (CK) 3 个 NaCl 处理浓度,3 次重复。

胁迫处理后 0、2、4、6、8 d,分别取植株下部叶片(从下至上第 4 片),剪取叶片中部不含明显叶脉的叶肉样品,置于 CHRIST 冷冻干燥机干燥。

1.2 测定方法

多酚氧化酶(PPO)活性测定参照文献^[6]的方法,测定波长为 525 nm;苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性测定参照陈毓荃方法^[7];绿原酸、芸香苷含量测定参照文献^[8];类黄酮和花青苷含量测定采用 Pirie^[9]和王惠聪^[10]的方法,以 $U=OD_{600nm}-OD_{553nm}$ 表示花青苷含量。

1.3 数据分析

采用 DPS 7.05 软件进行相关性分析。

2 结果

2.1 NaCl 胁迫下烤烟叶片绿原酸含量变化

由图 1 看出,NaCl 胁迫处理前 4 d,绿原酸含量与对照差异不明显,处理 4 d 后,含量开始增加,

处理 8 d 时,达到最大值,平均比对照高 25.60%。不同 NaCl 浓度胁迫下,随处理时间的延长,叶片绿原酸含量变化趋势相似,其中胁迫处理 6 d 时含量接近,胁迫 8 d 时 350 mmol/L 处理烟叶绿原酸含量明显高于 700 mmol/L。由此表明,烤烟新鲜叶片中绿原酸含量随 NaCl 胁迫时间的延长,在胁迫后期逐渐增加,以 350 mmol/L 处理增幅较大。

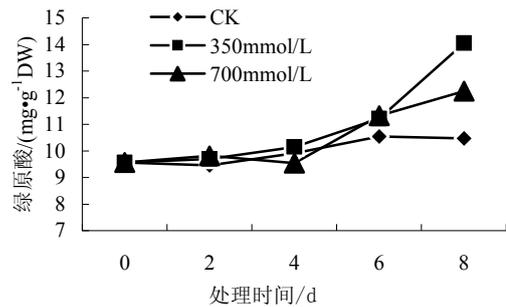


图 1 NaCl 胁迫下鲜烟叶绿原酸含量变化

Fig. 1 Changes of chlorogenic acid contents of fresh tobacco leaves under NaCl stress

2.2 NaCl 胁迫下烤烟叶片芸香苷含量变化

由图 2 看出,350 mmol/L NaCl 处理下,叶片芸香苷含量在胁迫后 2 d 略增加,处理 4、6 d 含量与对照接近,胁迫 8 d 时含量明显上升,比对照增加 12.02%。与对照相比,700 mmol/L 处理下芸香苷含量在胁迫前期略低,后期略高,但差异都不明显。可以看出,不同 NaCl 浓度胁迫下,叶片芸香苷含量变化趋势有较大差异,350 mmol/L 处理芸香苷含量在胁迫后期增加,而 700 mmol/L 处理芸香苷变化不大。

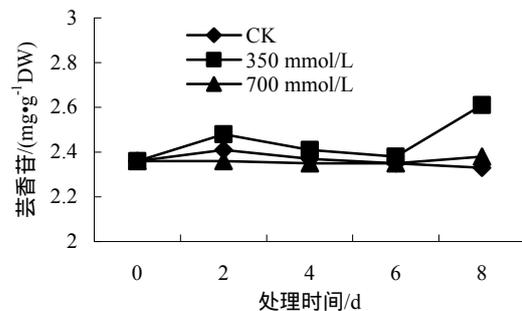


图 2 NaCl 胁迫下新鲜烟叶芸香苷含量的变化

Fig. 2 Changes of rutin contents of fresh tobacco leaves under NaCl stress

2.3 NaCl 胁迫下烤烟叶片类黄酮含量变化

由图 3 看出, 350 mmol/L 胁迫处理 2 d 时类黄酮含量迅速上升, 比对照增加 16.67%, 4、6 d 时含量回落, 与对照差异不显著, 处理 8 d 含量快速上升, 比对照高 33.54%。700 mmol/L 胁迫处理类黄酮含量呈先略降低再平缓增加。不同 NaCl 浓度胁迫下, 叶片类黄酮含量变化差异较大, 胁迫 2、8 d 时, 350 mmol/L 处理类黄酮含量均明显高于 700 mmol/L。NaCl 胁迫的浓度及时间都对类黄酮含量变化有明显影响, 其中 350 mmol/L 胁迫处理类黄酮含量随处理时间延长呈“增加-降低-增加”的变化趋势。

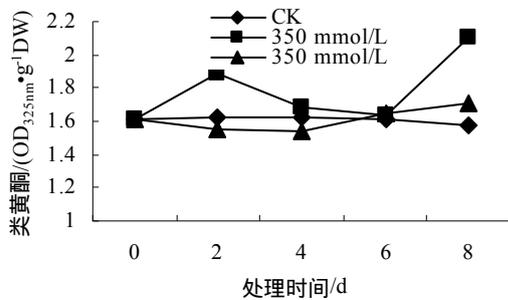


图 3 NaCl 胁迫下新鲜烟叶类黄酮含量变化

Fig. 3 Changes of flavonoid contents of fresh tobacco leaves under NaCl stress

2.4 NaCl 胁迫下烤烟叶片花青苷含量变化

由图 4 看出, 对照条件下, 叶片花青苷含量缓慢增加。处理 2 d 时, 350 mmol/L NaCl 处理花青苷含量明显增加, 高于对照 28.95%, 700 mmol/L 处理花青苷含量下降。随后 350、700 mmol/L 胁迫处理含量变化趋势相似, 均随处理时间延长, 先缓慢降低, 再迅速下降, 700 mmol/L 处理 6 d 时比对照降低 80.83%, 350 mmol/L 处理 8 d 时花青苷含量也大幅下降。不同 NaCl 浓度胁迫下, 350 mmol/L 胁迫花青苷含量均明显高于 700 mmol/L 处理。

2.5 NaCl 胁迫下烤烟叶片 PAL 活性变化

由图 5 可知, 350 mmol/L NaCl 胁迫下叶片 PAL 活性随处理时间的延长而逐渐增加, 其中处理 8 d 时增幅最大, 活性是对照的 2.44 倍, 处理 2 d 时增

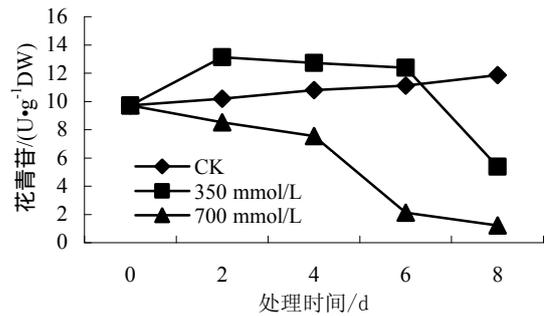


图 4 NaCl 胁迫下新鲜烟叶花青苷含量变化

Fig. 4 Change of anthocyanin contents of fresh tobacco leaves under NaCl stress

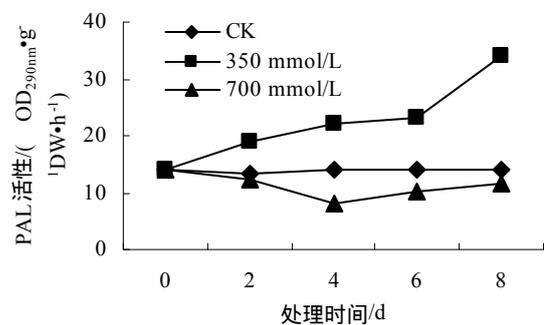


图 5 NaCl 胁迫下新鲜烟叶苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 活性变化

Fig. 5 Changes of phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity of fresh tobacco leaves under NaCl stress

幅次之。700 mmol/L 胁迫下 PAL 活性先降低, 胁迫 4 d 时活性降幅最大, 比对照下降 42.95%, 随后逐渐上升, 但均低于对照。可见, NaCl 胁迫浓度对 PAL 活性变化有明显影响, 350 mmol/L NaCl 胁迫后 PAL 活性明显高于 700 mmol/L NaCl 胁迫, 其中处理 8 d 时两者活性差异最大。

2.6 NaCl 胁迫下烤烟叶片 PPO 活性变化

NaCl 胁迫下新鲜烟叶多酚氧化酶 (PPO) 活性变化如图 6。在对照条件下, PPO 活性先一定幅度下降, 再平稳增加, 最后与处理前接近。350、700 mmol/L NaCl 胁迫下 PPO 活性变化趋势一致, 分别随胁迫时间的延长而增加, 胁迫 2 d 时增幅最大, 随后增幅逐渐减小。350 mmol/L NaCl 胁迫在处理前 4 d 活性略高于 700 mmol/L, 4 d 后两者接近。

2.7 NaCl 胁迫下多酚物质与 PAL、PPO 相关性分析

从表 1 可知, 350 mmol/L NaCl 胁迫处理后,

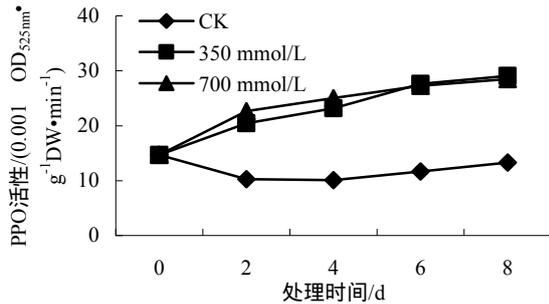


图6 NaCl胁迫下新鲜烟叶多酚氧化酶(PPO)活性变化
Fig. 6 Changes of polyphenol oxidase (PPO) activity of fresh tobacco leaves under NaCl stress

PAL活性与绿原酸在0.01水平上极显著正相关,相关系数0.95,与芸香苷在0.05水平上显著正相关,相关系数0.82,700 mmol/L NaCl胁迫处理下,PAL活性与绿原酸、芸香苷相关系数减小。PPO活性与绿原酸在350、700 mmol/L NaCl胁迫下呈正相关关系,接近显著水平,与类黄酮、芸香苷含量的关系不明确,与花青苷在700 mmol/L NaCl胁迫处理下显著负相关,相关系数-0.84。

表1 多酚物质含量与PAL、PPO活性相关系数

Table 1 Correlations between polyphenols contents and PAL, PPO activities

处理	酶	绿原酸	类黄酮	芸香苷	花青苷
350 mmol/L NaCl	PAL	0.95**	0.76	0.82*	-0.63
	PPO	0.8	0.5	0.56	-0.29
700 mmol/L NaCl	PAL	0.15	0.54	0.3	0
	PPO	0.73	0.38	0.18	-0.84*

注: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 。

3 讨论

多酚是一类广泛存在于植物体内的次生代谢物,被认为是植物抵抗不良环境因素的物质之一。Kasai等^[11]研究了多种植物的抗氧化机理,认为绿原酸可抑制DNA受到活性氧攻击时8-OH-dG的形成。Koepe等^[12]发现低温可促进绿原酸含量的增加。本研究发现,NaCl胁迫后期绿原酸含量增加,以700 mmol/L NaCl胁迫增幅较小,可能因为严重的胁迫会将绿原酸氧化形成其他物质^[13]。

芸香苷是烤烟类黄酮中含量较大的物质之一,NaCl胁迫处理下芸香苷、类黄酮含量变化趋势相似。蔡娜等^[14]认为,干旱胁迫可以增加荞麦总黄酮

和芦丁含量。类黄酮含量受胁迫程度的明显影响,350 mmol/L NaCl胁迫2 d时,含量增加,之后含量下降,NaCl处理浓度增大时,类黄酮含量则明显降低,与前人研究NaCl胁迫紫叶李叶片的研究结果一致^[15]。董新纯等^[16]也报道,增强UV-B处理后苦荞叶片类黄酮含量与逆境伤害程度相关。350 mmol/L NaCl胁迫8 d时,芸香苷、类黄酮含量明显增加,可能与其合成过程中的关键酶PAL活性大幅提高有关。

盐胁迫可诱导拟南芥突变体花青苷积累,提高植株清除活性氧及抵御逆境的能力^[17],同时紫外光辐射、低温和干旱胁迫也可增加花青苷含量,抵御环境胁迫^[18]。本研究中350 mmol/L NaCl胁迫前2 d,花青苷快速增加,之后积累量不断下降,700 mmol/L NaCl处理时花青苷含量持续降低。花青苷是由花青素和糖组成的糖苷,胡晓丽^[15]认为,花青苷含量的下降是受到可溶性糖降低的影响。

PAL作为苯丙烷类代谢途径的关键酶和限速酶,在土壤干旱胁迫下与紫叶矮樱叶片类黄酮正相关极显著,PAL活性提高能促进类黄酮的合成^[19]。350 mmol/L NaCl胁迫条件下,PAL活性上升,与绿原酸、芸香苷的相关性分别达到极显著、显著,但700 mmol/L NaCl胁迫下,这种相关关系明显减弱。这说明该NaCl胁迫下PAL活性的增加促进绿原酸、芸香苷的合成,但过高浓度NaCl胁迫时绿原酸、芸香苷的积累主要受其他酶或氧化伤害的影响。

PPO可在烘烤过程中氧化多酚物质形成醌,但在非生物胁迫中与多酚的关系报道较少。NaCl胁迫下,PPO活性逐渐上升,与绿原酸呈一定的正相关,但与类黄酮、芸香苷关系不明确,说明NaCl胁迫条件下绿原酸的积累除了受其合成机制的影响,还与PPO活性有关。

4 结论

350 mmol/L NaCl胁迫处理可明显的增加烤烟叶片中多酚物质(类黄酮、芸香苷、花青苷、绿原

酸)含量及 PAL 活性,但 700 mmol/L NaCl 胁迫时除绿原酸在处理 6 d 开始小幅增加外,类黄酮、花青苷含量及 PAL 活性均明显下降,可见多酚物质含量及 PAL 活性的变化在不同浓度 NaCl 胁迫下有较大差异。PAL 活性与多酚物质含量的相关性也受胁迫浓度的影响,350 mmol/L 处理时 PAL 活性分别与绿原酸、芸香苷含量呈极显著、显著正相关,这说明其与多酚物质含量变化有密切联系,但此相关性在 700 mmol/L 胁迫时明显减弱。NaCl 胁迫处理下,PPO 活性逐渐升高,对绿原酸含量变化有一定影响。从以上结果来看,探讨 NaCl 胁迫下多酚物质含量及相关酶活性的变化,也可作为一种研究酚类物质调控的方法。

参考文献

- [1] 曹建敏,邱军,杨德廉,等.不同等级烤烟多酚含量及其规律性分析[J].中国烟草科学,2009,30(6):21-24.
- [2] 中国农业科学院烟草研究所.中国烟草栽培学[M].上海:上海科学技术出版社,2005:73-74.
- [3] 季学军,张国,王道支,等.皖南不同土壤类型烤烟抗氧化能力差异分析[J].中国烟草科学,2011,32(6):26-31.
- [4] 赵铭钦,刘金霞,黄永成,等.不同成垄方式和分次施钾对烤烟多酚类和石油醚提取物含量的影响[J].江西农业大学学报,2007,29(5):720-722.
- [5] 王毅,钟楚,陈宗瑜,等.UV-B 辐射对烟草(*Nicotiana tobacum*)叶片总多酚含量和 PPO 活性的影响[J].中国烟草学报,2010,16(1):49-52.
- [6] Pizzocaro F, Torreggiani D, Gilardi G. Inhibition of apple polyphenol oxidase (PPO) by ascorbic acid, citric acid and sodium chloride[J]. Food Proc and Pres, 1993 (17): 21-30.
- [7] 陈毓荃.生物化学实验方法和技术[M].北京:科学出版社,2002:156-161.
- [8] 国家烟草质量监督检验中心.YC/T 202—2006 烟草及烟草制品 多酚类化合物绿原酸、茛菪亭和芸香苷的测定[S].北京:中国标准出版社,2006.
- [9] Pirie A, Mullins M G. Changes in anthocyanin and phenolics content of grapevine leaf and fruit tissues treated with sucrose, nitrate abscisic acid[J]. Plant Physiol, 1976, 58(4): 468-472.
- [10] 王惠聪,黄旭明,胡桂兵,等.荔枝果皮花青苷合成与相关酶的关系研究[J].中国农业科学,2004,37(12):2028-2032.
- [11] Kasai H, Fukada S, Yamaizumib Z, et al. Action of chlorogenic acid in vegetables and fruits as an inhibitor of 8-hydroxydeoxyguanosine formation in vitro and in a rat carcinogenesis model[J]. Food and Chemical Toxicology, 2000, 38 (5): 467-471.
- [12] Koepe D E, Rohrbaugh L M, Rice E L, et al. The effects of age and chilling temperature on the concentration of scopolin and caffeoylquinic acids in tobacco[J]. Physiol Plant, 1970, 23(2): 258-266.
- [13] Pasqualini S, Piccioni C, Reale L, et al. Ozone-induced cell death in tobacco cultivar Bel W3 plants. The role of programmed cell death in lesion formation[J]. Plant physiology, 2003, 133: 1122-1134.
- [14] 蔡娜,淡荣,陈鹏.水分胁迫对苦荞幼苗黄酮类物质含量的影响[J].西北农业学报,2008,17(4):91-93.
- [15] 胡晓立,杨建民,陈东亮,等.NaCl 胁迫对紫叶李叶片色泽的影响[J].林业科学,2010,46(12):64-69.
- [16] 董新纯,赵世杰,郭珊珊,等.增强 UV-B 条件下类黄酮与苦荞逆境伤害和抗氧化酶的关系[J].山东农业大学学报,2006,37(2):157-162.
- [17] Jee E O, Young H K, Jun H K, et al. Enhanced level of anthocyanin leads to increased salt tolerance in arabidopsis PAPI-D plants upon sucrose treatment[J]. Korean Soc, 2011, 54 (1): 79-88.
- [18] Chalker S L. Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses[J]. Photochemistry and Photobiology, 1999, 70(1): 1-9.
- [19] 李云飞,李彦慧,王中华.土壤干旱胁迫对紫叶矮樱叶片呈色的影响[J].生态学报,2009,29(7):3678-3684.