

烤烟碳氮代谢关键酶活性动态及其与类胡萝卜素关系研究

杨志晓¹, 史跃伟¹, 林世峰¹, 王志红¹, 谢升东¹, 任学良^{1*}

(贵州省烟草科学研究所, 贵阳 550081)

摘要: 以红花大金元、K326 为试验材料, 采用大田种植方式, 研究了不同基因型烤烟叶片碳氮代谢关键酶的活性动态及其与类胡萝卜素的相关性。结果表明, 在烟草生长发育过程中, 硝酸还原酶、谷氨酰胺合成酶、蔗糖转化酶和淀粉酶活性均呈现先上升后降低的变化规律, 硝酸还原酶、谷氨酰胺合成酶和淀粉酶在移栽后 60 d 达到最大值, 而蔗糖转化酶活性最大值出现在移栽后 75 d。类胡萝卜素各组分 (β -类胡萝卜素、叶黄素、新黄质和紫黄质) 含量随着生育进程的推移, 呈下降趋势。在整个生育期内, 红花大金元叶片硝酸还原酶、谷氨酰胺合成酶、蔗糖转化酶和淀粉酶活性以及类胡萝卜素各组分含量均高于 K326。相关分析结果表明, 蔗糖转化酶活性与类胡萝卜素各组分含量呈显著负相关。

关键词: 烤烟; 碳氮代谢; 酶; 类胡萝卜素; 相关分析

中图分类号: S572.01

文章编号: 1007-5119 (2014) 02-0059-05

DOI: 10.13496/j.issn.1007-5119.2014.02.011

Dynamic of Key Enzymes Activity Involved in Carbon and Nitrogen Metabolism in Flue-cured Tobacco and their Correlation with Carotenoids

YANG Zhixiao¹, SHI Yuewei¹, LIN Shifeng¹, WANG Zhihong¹, XIE Shengdong¹, REN Xueliang^{1*}

(Guizhou Academy of Tobacco Science, Guiyang 550081, China)

Abstract: The dynamic of key enzyme activities involved in carbon and nitrogen metabolism in different flue-cured tobacco cultivars were studied with K326 and Honghuadajinyuan in field condition, and their correlations with carotenoids was also investigated. The results showed that the activities of nitrate reductase, glutamine synthetase, invertase and amylase all increased at the earlier stage and decreased at later stage in the growth and development period of tobacco. The activities of nitrate reductase, glutamine synthetase, and amylase reached maximum at 60 d after transplanting, but the peak activity value of invertase was at 75 d after transplanting. The contents of carotenoids components (β -carotene, lutein, neoxanthin, violaxthin) decreased gradually with the proceeding of tobacco growth and development process. In the whole growth period, Honghuadajinyuan had higher enzyme activity and carotenoids content than K326. There was significant negative correlation between the activity of invertase and the contents of carotenoids components.

Keywords: flue-cured tobacco; carbon and nitrogen metabolism; enzyme; carotenoids; correlation

近年来, 我国烟叶生产水平大幅提升, 烟叶生长的整齐度和烤后烟叶质量的均衡性大大提高^[1]; 但与国外优质烤烟相比, 香气质差、香气量不足、化学成分不够协调仍是影响我国烟叶质量提高的制约性因素^[2]。相关研究指出, 碳氮代谢是烤烟体内最基本的代谢过程, 碳氮代谢活动的强度、协调程度及其在烟叶生长和成熟过程中的动态变化模式直接或间接影响烟叶中各类化学成分的含量和

组成比例, 对烟叶品质产生重大影响; 烟叶碳氮代谢失调, 烟叶香气质差、香气量不足, 烟叶质量难以提高^[3-4]。类胡萝卜素是烟叶中重要的致香前体物质, 烤后烟叶类胡萝卜素及其降解产物含量和协调性, 直接影响烤烟的香气风格、香气质和香气量^[5-6]。目前, 关于烤烟碳氮代谢与类胡萝卜素之间关系的研究报道还较少, 而在烟叶碳氮代谢过程中, 各种酶的活性变化起着决定性的调节作用^[7]。因此, 本

基金项目: 国家烟草专卖局重点项目“烤烟育种新技术与新一代烤烟新品种选育研究”[中烟办(2010)221号]; 国家烟草专卖局重大专项“烟草主要栽培品种、核心种质资源和野生种基因差异分析”[中烟办(2012)146号]; 贵州省科技厅农业攻关项目[黔科合(2011)3047号]

作者简介: 杨志晓, 男, 在读博士, 主要从事烟草遗传育种研究。E-mail: linyingxian2006@126.com。*通信作者, E-mail: renxuel@126.com

收稿日期: 2012-06-30

修回日期: 2012-11-28

研究以不同基因型烤烟品种 K326、红花大金元为材料,研究了碳氮代谢关键酶的动态变化及其与类胡萝卜素之间的相关关系,以期为特色优质烟叶开发和高香气、低危害烤烟品种选育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于 2010 年在贵州省贵定县进行。以我国主栽烤烟品种红花大金元、K326 为试验材料,供试土壤类型为黄壤土,肥力中等,地面平坦向阳,排水良好。

1.2 试验设计

试验采用大区种植,每个品种各种植 0.33 hm²。于 2010 年 4 月 28 日移栽,行距 110 cm 株距 50 cm。施氮量为 90 kg/hm², $m(N):m(P_2O_5):m(K_2O)=1:0.8:2.5$ 。移栽后 55 d 时现蕾初花打顶,每株留叶数为 18 片,其他田间管理按照当地优质烟叶生产技术方法进行。选取每个品种的中部叶(从下向上数第 10~12 片叶)作为待测样品,取样时间分别为移栽后 30、45、60、75、90 d。鲜样取下后立即用液氮冷冻带回,存于-80℃冰箱待用。

1.3 测定内容与方法

1.3.1 碳氮代谢关键酶活性测定 硝酸还原酶活性测定按照活体法进行^[8],谷氨酰胺合成酶活性测定按照分光光度法进行^[9],淀粉酶活性测定按照 3,5-二硝基水杨酸比色法进行^[10],蔗糖转化酶活性测定按照 3,5-二硝基水杨酸比色法进行^[11],每项测定指标重复 3 次。

1.3.2 类胡萝卜素含量测定 采用反相高效液相色谱法测定^[12]。准确称取 0.200 g 样品,放入 25 mL 试管中,加入 25 mL 90% (体积分数)的丙酮,室温下超声萃取 20 min。取约 1 mL 萃取液,用 0.45 μm 微膜过滤器过滤,滤液装入棕色色谱瓶中进行 HPLC 分析,分析条件为:色谱柱 Waters Nova-Pak-C18(3.9 mm×150 mm 4 μm)柱温 30℃;检测波长 450 nm。流动相 A,异丙醇 B,乙腈+水

(体积比 80:20);梯度洗脱:100%B(0 min)→100%A(40 min);柱流速 0.5 mL/min;平衡时间 6 min;进样量 10 μL。采用比较标样保留时间法定性,外标法定量。

1.3.3 统计分析 采用 SPSS 17.0 进行统计分析。

2 结果

2.1 不同基因型烤烟氮代谢关键酶活性变化

2.1.1 硝酸还原酶 从图 1 可以看出,不同基因型烤烟品种 K326、红花大金元叶片硝酸还原酶活性变化趋势基本一致:在移栽后随着生育进程的推移,硝酸还原酶活性呈增加趋势,在移栽后 60 d 时达到最大值,此后迅速下降。这表明生长前期烟株氮代谢旺盛,对氮素的吸收、同化利用能力较强,有利于满足烟株的生长发育,进入成熟期后硝酸还原酶活性下降,能够促进烟叶正常落黄成熟和内在品质的形成。同时,结果表明,在生长发育过程中,不同基因型烤烟品种叶片硝酸还原酶活性存在差异,在各个生育期均表现为红花大金元>K326,表明红花大金元的氮代谢能力较强。

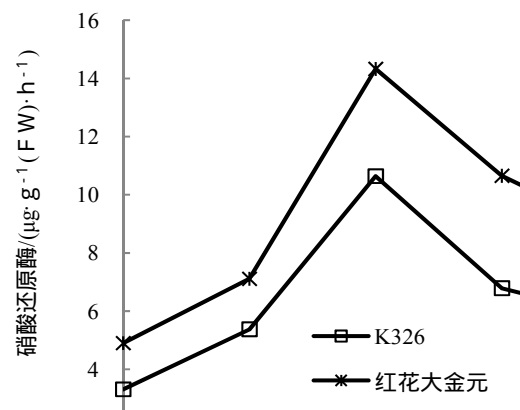


图 1 不同基因型烤烟硝酸还原酶活性变化

Fig. 1 Activity change of nitrate reductase in different flue-cured tobacco cultivars

2.1.2 谷氨酰胺合成酶 图 2 表明,整体上两个不同基因型烤烟品种叶片谷氨酰胺合成酶活性在生育期内的变化趋势相同,即呈单峰曲线变化,在移栽后 60 d 时活性达到最大值,之后下降。在烟叶成熟期,谷氨酰胺合成酶活性较低,表明这个时期烟叶中氮同化代谢活动已非常微弱。就不同烤烟品种

而言，在整个生育期内，红花大金元谷氨酰胺合成酶活性均高于 K326，表明红花大金元氮同化能力优于 K326。

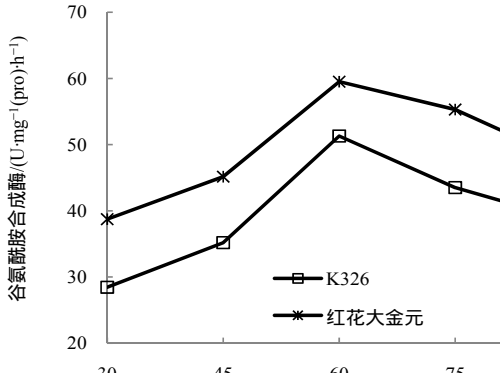


图 2 不同基因型烤烟谷氨酰胺合成酶活性变化
Fig. 2 Activity change of glutamine synthetase in different flue-cured tobacco cultivars

2.2 不同基因型烤烟碳代谢关键酶活性变化

2.2.1 蔗糖转化酶 图 3 为不同基因型烤烟叶片蔗糖转化酶活性变化，结果显示，整个生育期内，不同基因型烤烟品种蔗糖转化酶活性变化趋势一致，移栽后 30~60 d 时，蔗糖转化酶活性较低，呈缓慢增加趋势；此后，迅速上升，在 75 d 时达到最大值，然后活性下降。这表明在叶片功能盛期，碳代谢活性较弱，主要以氮代谢为主；进入叶片功能盛期，氮代谢减弱，以碳代谢为主。蔗糖转化酶活性较高，能够促进光合产物的合理分配，有利于形成优质烟叶。不同基因型间比较结果表明，红花大金元叶片蔗糖转化酶活性高于 K326，表明红花大金元对有机碳的固定能力较强。

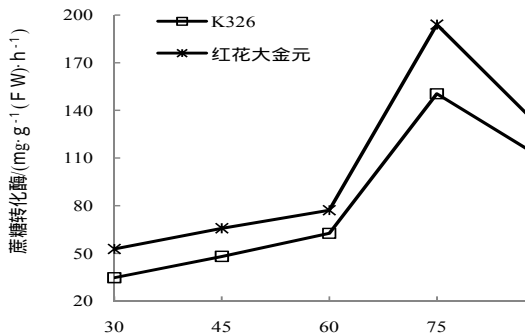


图 3 不同基因型烤烟蔗糖转化酶活性变化
Fig. 3 Activity change of invertase in different flue-cured tobacco cultivars

2.2.2 淀粉酶 从图 4 可看出，在移栽后 30~45 d，烟叶淀粉酶活性处于较低的水平，随着叶片的生长发育和进入现蕾期，淀粉酶活性迅速升高，在移栽后 60 d 时达到最大值，之后淀粉酶活性逐渐降低。表明在生长前期淀粉在逐渐积累，但积累量较小；现蕾期淀粉积累迅速增多，进入成熟期后淀粉由积累向分解转化。就不同基因型而言，红花大金元叶片淀粉酶活性在整个生育期内均高于 K326，说明红花大金元叶片积累淀粉的能力较强，叶片淀粉含量较高。

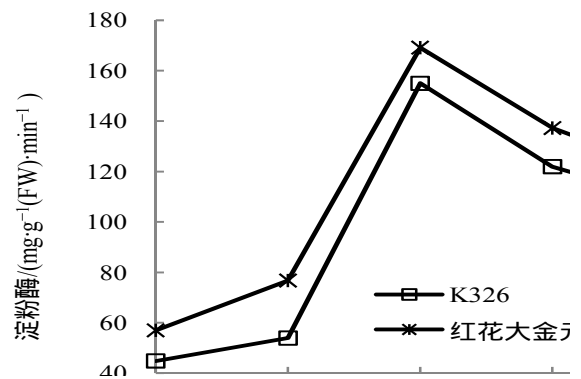


图 4 不同基因型烤烟淀粉酶活性变化
Fig. 4 Activity change of amylase in different flue-cured tobacco cultivars

2.3 不同基因型烤烟类胡萝卜素含量变化

烟叶类胡萝卜素主要由 β-类胡萝卜素、叶黄素、新黄质和紫黄质组成，对烟叶香气贡献率大^[13]。从表 1 可以看出，随着生育进程的推移，类胡萝卜素各组分含量均呈下降趋势。β-类胡萝卜素含量在前期降解速度较慢，在移栽 60 d 后下降明显。新黄质在 30~45 d 时迅速下降，而后，降解速度较慢，进入成熟期，又呈明显下降趋势。紫黄质含量在前期下降明显，中后期呈缓慢下降趋势。叶黄素在前期降幅较小，进入成熟期后快速下降。类胡萝卜素各组分中以 β-类胡萝卜素含量最高，其次为叶黄素，新黄质含量较低，而紫黄质含量最少。同时，结果表明，在整个生育期内，不同基因型烤烟品种类胡萝卜素含量存在差异，β-类胡萝卜素、叶黄素、新黄质和紫黄质均以红花大金元含量较高。红花大金元烟叶中类胡萝卜素含量较高，表明烟叶类胡萝卜素含量与基因型表现有关。

表1 不同基因型烤烟类胡萝卜素含量变化 $\mu\text{g/g}$
Table 1 Content change of carotenoids in different flue-cured tobacco cultivars

类胡萝卜素	品种	移栽后时间/d				
		30	45	60	75	90
β -类胡萝卜素	K326	752.77	659.48	526.36	302.18	140.34
	红花大金元	810.42	773.34	691.78	340.72	170.57
新黄质	K326	145.39	80.215	65.13	40.415	15.06
	红花大金元	160.21	130.77	91.78	45.62	25.27
紫黄质	K326	64.26	32.30	24.45	18.78	12.05
	红花大金元	69.25	48.14	37.69	21.22	16.57
叶黄素	K326	481.98	342.22	193.39	140.82	90.36
	红花大金元	519.39	461.02	302.69	159.15	124.29

2.4 类胡萝卜素含量与碳氮代谢关键酶活性的相关分析

相关分析结果表明(表2),类胡萝卜素各组分间均呈极显著($P<0.01$)正相关关系。 β -类胡萝卜素、新黄质、叶黄素和紫黄质与硝酸还原酶、谷氨

酰胺合成酶、淀粉酶活性均呈负相关关系,但相关关系不显著($P>0.05$),但 β -类胡萝卜素、新黄质、叶黄素和紫黄质均与蔗糖转化酶活性呈显著负相关关系($P<0.05$),表明蔗糖转化酶活性较高不利于烟叶生长发育过程中类胡萝卜素的合成、积累。

表2 烤烟类胡萝卜素含量与碳氮代谢关键酶活性的简单相关系数
Table 2 Pearson correlation coefficients between carotenoids contents and key enzyme activities involved in carbon and nitrogen metabolism

类胡萝卜素	β -类胡萝卜素	新黄质	叶黄素	紫黄质	硝酸还原酶	谷氨酰胺合成酶	蔗糖转化酶	淀粉酶
β -类胡萝卜素	1.000	0.942**	0.884**	0.938**	-0.132	-0.198	-0.753*	-0.254
新黄质		1.000	0.984**	0.985**	-0.320	-0.343	-0.708*	-0.425
叶黄素			1.000	0.968**	-0.389	-0.415	-0.683*	-0.490
紫黄质				1.000	-0.390	-0.418	-0.736*	-0.526

注: *表示 0.05 显著水平, **表示 0.01 极显著水平。

3 讨论

试验结果表明,在烟草生长发育过程中,氮代谢关键酶硝酸还原酶、谷氨酰胺合成酶和碳代谢关键酶蔗糖转化酶、淀粉酶变化规律基本一致,即4种酶活性在叶片功能盛期均呈增加趋势,进入成熟期,硝酸还原酶、谷氨酰胺合成酶活性迅速下降,而蔗糖转化酶、淀粉酶在达到峰值后也呈下降趋势,但降幅较小,叶片以碳代谢活动为主。这与以往的研究结论基本一致^[14]。同时,研究表明,不同基因型烤烟品种间叶片碳氮代谢关键酶活性也存在明显差异,红花大金元叶片硝酸还原酶、谷氨酰胺合成酶、蔗糖转化酶以及淀粉酶活性全生育期均高于K326,说明红花大金元碳氮代谢活动旺盛,这可能是红花大金元内在品质良好的重要原因。

类胡萝卜素是烟草香气的重要前体物,与香气

量、香气质成正相关关系^[15]。本文研究发现,在生长发育过程中,红花大金元叶片中类胡萝卜素各组分 β -类胡萝卜素、新黄质、叶黄素和紫黄质含量均高于K326,这与杨红旗等^[16]、张树堂等^[17]的研究结果相一致。在同一生态条件和种植管理方式下,红花大金元叶片中类胡萝卜素含量较高,这可能是红花大金元烟叶香气质好的原因之一。过伟民等^[18]研究了我国6个主栽品种的类胡萝卜素含量,发现不同品种叶片类胡萝卜素含量存在明显差异,中烟100中部叶片中紫黄质、叶黄素、 β -类胡萝卜素和总类胡萝卜素含量均显著高于其他品种。这与本文结果相似,表明烟叶中类胡萝卜素含量存在基因型差异;基因型不同,烟株对类胡萝卜素的合成和降解能力不同,导致叶片内类胡萝卜素各组分含量存在差异。品种是决定烤烟中类胡萝卜素合成、积累

的首要因素，因此，可以通过育种途径选育类胡萝卜素含量适宜的烤烟品种，从而提高烟叶品质。

由类胡萝卜素各组分含量与碳氮代谢关键酶相关分析结果可知，类胡萝卜素各组分与硝酸还原酶、谷氨酰胺合成酶和淀粉酶呈负相关关系，但相关性未达到显著水平，表明硝酸还原酶、谷氨酰胺合成酶和淀粉酶对烟叶类胡萝卜素含量影响不大。而 β -类胡萝卜素、新黄质、叶黄素和紫黄质均与蔗糖转化酶活性呈显著负相关关系，说明类胡萝卜素在生长发育过程中的变化与碳氮代谢关键酶有一定的关联性。蔗糖转化酶对烟叶类胡萝卜素合成、积累影响较大，可以通过调控蔗糖转化酶活性改善烟叶类胡萝卜素含量，从而达到提高烟叶品质的目的。

参考文献

- [1] 刘国顺. 国内外烟叶质量差距分析和提高烟叶质量技术途径探讨[J]. 中国烟草学报, 2003(增刊): 54-58.
- [2] 史宏志, 刘国顺. 烟草香味学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [3] 刘国顺, 彭智良, 黄元炯, 等. N、P 互作对烤烟碳氮代谢关键酶活性的影响[J]. 中国烟草学报, 2009, 15(5): 33-37.
- [4] 史宏志, 韩锦峰. 烤烟碳氮代谢几个问题的探讨[J]. 烟草科技, 1998(2): 34-36.
- [5] 周冀衡, 王勇, 邵岩, 等. 产烟国部分烟区烤烟质体色素及主要挥发性香气物质的含量比较[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2005, 31(2): 128-132.
- [6] 韦凤杰, 刘国顺, 杨永锋, 等. 烤烟成熟过程中类胡萝卜素变化与其降解香气物质关系[J]. 中国农业科学, 2005, 8(9): 1882-1889.
- [7] 岳红宾. 不同氮素水平对烟草碳氮代谢关键酶活性的影响[J]. 中国烟草科学, 2007, 28(1): 18-20, 24.
- [8] 萧浪涛, 王三根. 植物生理学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005.
- [9] 汤章城. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [10] 邹琦. 植物生理生化实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995.
- [11] 何钟佩. 农作物化学控制实验指导[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1992.
- [12] 田海英, 韦凤杰, 张东豫, 等. RP-HPLC 法测定烟草中的质体色素[J]. 烟草科技, 2009(4): 32-36.
- [13] 周冀衡, 杨虹琦, 林桂华, 等. 不同烤烟产区烟叶中主要挥发性香气物质的研究[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2004, 30(1): 20-23.
- [14] 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]. 西南农业学报, 2011, 20(4): 82-86.
- [15] 景延秋, 宫长荣, 张月华, 等. 烟草香味物质分析研究进展[J]. 中国烟草科学, 2005, 26(2): 44-48.
- [16] 杨红旗. 中国烤烟主要香气前体物的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2006.
- [17] 张树堂, 杨雪彪. 烤烟两品种采收成熟度对色素和多酚化合物的影响[J]. 云南农业大学学报, 2006, 21(6): 757-760.
- [18] 过伟民, 尹启生, 宋纪真, 等. 烤烟质体色素含量的品种间差异及其与感官质量的关系[J]. 烟草科技, 2009(8): 50-55.