

施氮量对烤烟糖代谢关键酶活性及其基因表达的影响

鲁黎明¹, 曾孝敏¹, 张永辉², 李立芹^{1*}

(1.四川农业大学农学院, 成都 611130; 2.四川省烟草公司泸州市公司, 四川 泸州 646000)

摘要: 为明确供氮水平对烤烟糖代谢关键酶活性、基因表达量以及糖含量的影响, 开展了供氮水平及品种的两因素试验, 结果显示, 蔗糖合成酶活性随施氮量增加而增强, 且处理间差异显著; 蔗糖磷酸合成酶、转化酶及淀粉酶的活性, 在栽后 45 d 与 60 d 随施氮量增加而增强; 在栽后 80 d, 高施氮量转化酶及淀粉酶的活性低于低施氮量。同一施氮量, 品种间的酶活性没有显著的差异。施氮量对糖代谢关键酶基因的表达量有显著影响, 同一施氮量不同品种之间基因表达量存在一定的差异。烟叶总糖和还原糖含量受施氮量的影响较小, 但淀粉的含量却随着施氮量的增加而增加。同一施氮量处理不同品种之间, 糖含量差异不明显。相关分析结果显示, 测定的 4 个糖代谢关键酶的活性, 与各生育时期淀粉含量呈著或极显著相关; 栽后 45 d, 蔗糖磷酸合成酶基因表达量与烟叶淀粉含量显著负相关, 栽后 60 d 及 80 d 蔗糖合成酶基因的表达量, 分别与还原糖及总糖呈显著正相关。本研究的结果表明, 施氮水平对烤烟糖代谢关键酶活性及其基因表达有着显著的影响, 烟叶中的糖含量受蔗糖合成酶及蔗糖磷酸合成酶活性及基因表达量的制约。

关键词: 施氮量; 烤烟; 糖代谢; 酶活; 基因表达

中图分类号: S572.01

文章编号: 1007-5119 (2017) 06-0084-07

DOI: 10.13496/j.issn.1007-5119.2017.06.013

Effects of Nitrogen Application on Activities of Key Enzymes and Their Gene Expression in Sugar Metabolism in Flue-cured Tobacco

LU Liming¹, ZHENG Xiaomin¹, ZHANG Yonghui², LI Liqin^{1*}

(1. Agricultural College, Sichuan Agriculture University, Chengdu 611130, China; 2. Sichuan Tobacco Company Luzhou Division, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: In order to explore the effects of nitrogen supply levels on the activities and gene expression of key enzymes of sugar metabolism, and the content of carbohydrate, and the relationship among these three elements in flue cured tobacco, a two factor experiment with nitrogen levels and varieties was carried out. The results showed that the activity of sucrose synthase increased with the increase of nitrogen application, and the difference was significant among treatments. The activities of sucrose phosphate synthase, invertase and amylase increased with the increase of nitrogen application on the 45th and 60th day after planting. In contrast, on the 80th day after planting, the activities of invertase and amylase were higher in low amount of nitrogen supply treatment than those of higher amount of nitrogen supply treatment, while there were no significant difference in enzyme activities among the variety treatments. The amount of nitrogen supply also had significant effects on the expression levels of sucrose synthase, sucrose phosphate synthase and invertase genes. There were some difference in the gene expression levels between varieties under the same nitrogen supply treatment. The contents of total sugar and reducing sugar in tobacco leaves were less affected by the amount of nitrogen applied. However, the contents of starch increased with the increase of nitrogen application. There was no obvious difference in the contents of carbohydrate of varieties tested under the same amount of nitrogen treatment. The results of correlation analysis showed that the activities of these enzymes were extremely significantly or significantly correlated with the starch content in tobacco leaves at each growth stage. The expression of sucrose phosphate synthase gene was negatively correlated with the starch contents of tobacco leaves on the 45th day after planting, while the expression of sucrose synthase gene was significantly positively correlated with reducing sugar and total sugar on the 60th and 80th day after planting respectively. Our results suggest that the amount of N application has a significant effect on activity and gene expression of key enzymes in tobacco sugar metabolism. Sugar content was determined by the activity and gene expression of sucrose synthase and sucrose phosphate synthase.

Keywords: nitrogen application; flue-cured tobacco; sugar metabolism; enzyme activity; gene expression

基金项目: 四川省烟草公司科技项目“四川烟叶特色风格主要物质代谢网络解析”(201302006); 泸州市烟草公司科技项目“泸州烟叶特色定位与品牌创建”(LY-FG-2015-87)

作者简介: 鲁黎明(1965-), 博士, 从事烟叶品质研究。E-mail: luliming@sicau.edu.cn。*通信作者, E-mail: lilq88@126.com

收稿日期: 2017-05-30

修回日期: 2017-08-05

烟草碳氮代谢强度和两者之间的协调程度及动态变化模式,对烟叶产量与品质有重大影响^[1-2]。烟草的糖代谢是碳代谢的重要组成部分,贯穿了脂类、蛋白质、次生物质及核酸等代谢过程^[3-4]。烟草糖代谢关键酶的活性,除与品种^[5-8]、生态因素^[9-11]以及生育时期^[12]等密切相关外,还受施氮量的制约。许晨曦等^[13]报道,随施氮量增加,烟草蔗糖转化酶、淀粉酶活性均提高;但成熟期淀粉酶活性反而降低。史宏志等^[14]认为,烟草生长前期,淀粉酶活性与施氮量呈正相关,在烟叶成熟阶段,则呈负相关;而烟叶各生育时期转化酶的活性,则随着施氮水平的提高而增高。刘卫群等^[15]研究表明,烟草转化酶的活性有随施氮量增加而升高的趋势。岳红宾^[16]及李洪臣等^[17]均发现,随着氮素水平的提高,淀粉酶及转化酶的活性均有升高趋势。肖丽娜等^[18]研究认为,施用无机氮烤烟的淀粉酶活性,要高于无机有机复混氮肥处理。葛国锋等^[19]报道,施氮能够提高烤烟前期蔗糖磷酸合成酶(SPS)及后期蔗糖合成酶(SS)的活性;同时,同一施氮水平下,红花大金元与 K326 的 SPS 及 SS 活性有所不同。在烟草糖代谢关键酶基因表达量研究方面,王红丽等^[20]研究发现,蔗糖转化酶(Inv)和 SS 基因随着烟叶的成熟表达量升高,不同氮水平处理间无显著差异,而 SPS 基因表达量在烟叶成熟前期随施氮量的降低而降低;淀粉合成酶(AM)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。

虽然供氮量影响烟草糖代谢关键酶活性的研究较多,但对其基因表达影响的研究较少,同时,还缺乏施氮水平、关键酶活性、基因表达及糖类代谢物质的关系分析。因此,本研究分析了施氮量对烟草糖代谢关键酶活性、基因表达及糖类物质含量的影响,以期为烟草糖代谢的理论研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

烤烟品种云烟 87 和 K326。

1.2 试验设计

试验于 2015 年在泸州市古蔺县箭竹乡自强村

进行,土壤为黏土。试验采用两因素裂区设计,氮肥施用量为主区因素,品种为副区因素,共有 6 个处理,设 3 次重复。氮肥因素有 3 个水平:每 667 m² 施纯氮 6 kg (A1)、7 kg (A2) 和 8 kg (A3); 品种因素有两个:云烟 87 (B1) 和 K326 (B2)。每个小区栽烟 60 株,行距 1.1 m,株距 0.5 m。试验地磷钾肥每 667 m² 的施用量为 10.5 kg (P₂O₅)、14 kg (K₂O)。

1.3 试验方法

2015 年 1 月按常规漂浮育苗法进行育苗,4 月 27 日进行移栽。70% 的氮肥在移栽时施入,其余在 5 月 13 日作为追肥施入。田间管理采用当地优质烟叶管理规程进行。于移栽后 45、60 及 80 d 分小区进行鲜烟叶样品采集。

每小区选择 30 株长势基本一致烟株并挂牌,每次采摘 3 片中部叶(第 10 叶位)。采后迅速沿主脉分开,一半立即用液氮冷冻,保存于 -80 °C 冰箱,用于测定酶活和基因表达量;另一半带回实验室,105 °C 杀青,80 °C 烘干,粉碎保存,用于测定烟叶中的总糖、还原糖及淀粉含量。

1.4 碳代谢关键酶活性测定

蔗糖磷酸合成酶(SPS)、蔗糖合成酶(SS)、转化酶(Inv)及淀粉酶(AM)的测定方法参照岳红宾^[16]及樊武广等^[21]的方法进行。

1.5 基因表达量分析

样品总 RNA 的提取通过 Trizol 法进行^[22]。cDNA 第一条链的合成,按照 Fermentas 公司的 RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis 试剂盒的操作说明进行。

引物设计:参考 NCBI 的 GenBank 数据库中 SPS、SS、Inv 的基因 cds 序列进行(表 1)。

表 1 qRT-PCR 所用引物序列

Table 1 Primers for qRT-PCR

引物名称	引物序列(5' to 3')
EF-1a(tobacco)-F	TGAGATGCACCACGAAGCTC
EF-1a(tobacco)-R	CCAACATTGTACCCAGGAAGTG
SS-F	GCCGATACTAGGGGAGCTTT
SS-R	CCTCAACCACAGTCAAACCA
SPS-F	ATCCTGGCCTCATCTTCAATA
SPS-R	GCATCAAAATCAGTAGGCTTCA
Inv-F	TAAGGGTTCAACAGTCCAAGGT
Inv-R	GAGGCATCAGAGCACATAAGAA

qPCR 扩增：以反转录合成的 cDNA 为模板，加入表 1 中的相应引物及其他反应试剂，进行 qPCR 扩增。反应体系为：2×Perime SAYB Max 5 μL、上游引物(10 μmol/L)0.5 μL、下游引物(10 μmol/L)0.5 μL、cDNA 2 μL、ddH₂O 2 μL，总体积 10 μL。反应条件为：50 °C 孵育 2 min，95 °C 预变性 10 min、95 °C 变性 15 s；60 °C，1 min，40 个循环。

1.6 数据分析

试验所得数据采用 Excel 2010 和 SPSS 2.0 软件，进行统计分析并作图。

2 结果

2.1 氮素供应水平对糖代谢关键酶活性的影响

2.1.1 蔗糖磷酸合成酶 从表 2 可以看出，随着生育时期的推进，SPS 酶的活性逐渐升高。同一生育时期，SPS 活性总体呈现高施氮量处理高于低施氮量处理的趋势，且在移栽后 45 d 和移栽后 60 d 处理间差异显著，而在移栽后 80 d 没有显著差异。同一施氮量，不同品种之间 SPS 酶活性表现不一。除 A3 处理在栽后 60 及 80 d 外，其余处理均表现为 K326 的 SPS 高于云烟 87。

表 2 各处理不同时期蔗糖磷酸合成酶活性

处理	移栽后 45 d	移栽后 60 d	移栽后 80 d
A1B1	6.82±0.54b	8.62±0.76b	9.09±0.06a
A1B2	8.41±0.32ab	8.91±0.25b	9.94±0.55a
A2B1	8.17±0.25ab	9.63±0.76ab	10.25±0.39a
A2B2	9.40±0.53a	9.84±0.92ab	10.36±0.57a
A3B1	8.65±0.79a	10.77±0.17a	10.37±0.32a
A3B2	9.07±0.63a	9.82±0.40ab	10.14±0.42a

注：m_F，代表烟叶鲜质量。同列中小写字母不同代表处理间在 0.05 水平上差异显著。下同。

2.1.2 蔗糖合成酶 蔗糖合成酶的活性在处理间及不同生育时期的变化趋势，与 SPS 较为类似(表 3)。随着烟株的生长，各个处理的 SS 酶活性均呈现出上升的趋势。同一个时期，不处理的 SS 酶活性存在显著差异，一般表现为随着施氮量的增加，酶活性增大。同一时期、同一施氮量的 2 个品种的酶活性差异不显著。这种现象说明，不同遗传背景的烟草，其 SS 酶活性对氮素的响应并无显著差异。

2.1.3 转化酶 随着生育时期的推进，处理 A1B1、A1B2 和 A2B1 的转化酶的活性逐渐上升(表 4)；处理 A2B2、A3B1 和 A3B2 的酶活性则呈现先升高再降低的趋势，栽后 80 d 的酶活性仍明显高于栽后 45 d。同一生育时期内，各处理的转化酶活性在栽后 45 d 无显著差异，在栽后 60 d，高施氮量的酶活性要高于低施氮量；而在栽后 80 d，则表现出相反的趋势。对于同一施氮量、同一时期来说，除栽后 60 d A2 处理外，其余处理的品种间转化酶活性均无差异。

2.1.4 淀粉酶 淀粉酶可将叶绿体中的淀粉水解为单糖，直接影响到烟叶中淀粉的积累。各处理不同时期淀粉酶的活性见表 5。淀粉酶活性随生育期的变化呈现两种趋势，处理 A1B1 和 A1B2 为一直上升，其余处理则为先升高而后降低。同一生育时期不同施氮量间差异显著。在栽后 45 及 60 d，随着施氮量的增加，淀粉酶的活性也随之增加；而在栽后 80 d，则表现为低施氮量的酶活高于中、高施

表 3 各处理不同时期蔗糖合成酶活性

处理	移栽后 45 d	移栽后 60 d	移栽后 80 d
A1B1	4.58±0.41b	5.69±0.43c	9.06±0.62c
A1B2	4.70±0.45b	5.68±0.41c	9.08±0.51c
A2B1	5.72±0.03a	6.33±0.34b	10.15±0.84b
A2B2	5.40±0.08a	6.29±0.19b	10.72±0.13b
A3B1	5.78±0.39a	7.16±0.17a	11.89±0.33a
A3B2	5.80±0.58a	7.49±0.37a	11.74±0.43a

表 4 各处理不同时期转化酶活性

处理	移栽后 45 d	移栽后 60 d	移栽后 80 d
A1B1	0.71±0.04a	1.41±0.09b	2.05±0.16a
A1B2	0.67±0.01a	1.71±0.17ab	1.90±0.18ab
A2B1	0.63±0.01a	1.41±0.17b	1.76±0.06ab
A2B2	0.63±0.03a	1.91±0.09a	1.58±0.04b
A3B1	0.65±0.04a	1.71±0.16ab	1.68±0.11b
A3B2	0.69±0.01a	1.76±0.08ab	1.55±0.13b

表 5 各处理不同时期淀粉酶活性

处理	移栽后 45 d	移栽后 60 d	移栽后 80 d
A1B1	1.61±0.12b	2.96±0.20c	3.46±0.25a
A1B2	1.64±0.16b	3.07±0.23c	3.21±0.20a
A2B1	1.64±0.11b	3.99±0.16b	2.58±0.12b
A2B2	2.01±0.16ab	3.98±0.40b	2.68±0.14b
A3B1	2.12±0.12a	4.49±0.23a	2.71±0.06b
A3B2	2.05±0.12ab	4.51±0.20a	2.62±0.08b

氮量。同一施氮量不同品种间，其淀粉酶的活性没有显著差异。

2.2 氮素供应水平对糖代谢关键酶基因相对表达量的影响

2.2.1 蔗糖磷酸合成酶基因相对表达量 蔗糖磷酸合成酶，能够催化蔗糖的合成以及控制碳素的分配及流向，在植物的碳代谢中起着关键的作用。从整个大田生育期来看（图 1），蔗糖磷酸合成酶基因的相对表达量，总体呈现出先下降后上升的情况，并在栽后 60 d 达到最低。同一生育时期不同处理之间，基因的表达量存在差异，其中 A1B1 栽后 45 d、A3B2 栽后 60 d 及 A1B2 栽后 80 d 表达量较高。此外，同一时期同一施氮量不同品种间，基因表达量并不一致，但没有一定的规律性。

2.2.2 蔗糖合成酶基因相对表达量 蔗糖合成酶在移栽后 45 d 的相对表达量最高，然后下降，虽然有所波动，但总体上维持一个较低的表达水平（图 2）。3 个时期蔗糖合成酶基因相对表达量较高的处理分别是 A2B1、A1B2 及 A2B1。

2.2.3 转化酶基因相对表达量 蔗糖转化酶是衡量植物碳代谢强度的一个标志性的酶，在调控植物衰老及果实发育中起重要作用。从移栽后 45 d 到移栽后 80 d，各个处理的转化酶基因的相对表达量基本上是上升的趋势，并在栽后 60 d 达到高峰，然后有所下降，但仍然高于栽后 45 d（图 3）。就同一时期不同处理的基因表达量来看，栽后 45 d 的 A3B1、栽后 60 d 的 A3B2 以及栽后 80 d 的 A1B1 较高。

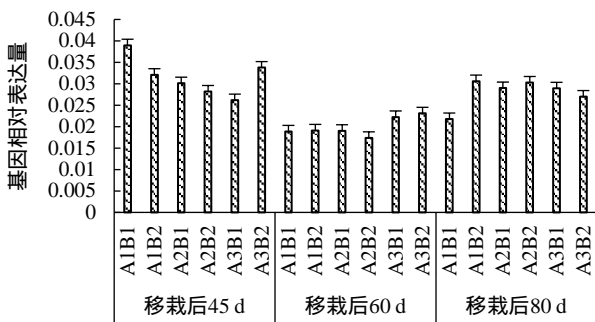


图 1 各处理不同时期蔗糖磷酸合成酶基因相对表达量
Fig. 1 Comparison of relative expression levels of sucrose phosphate synthase gene among different treatments at different stages

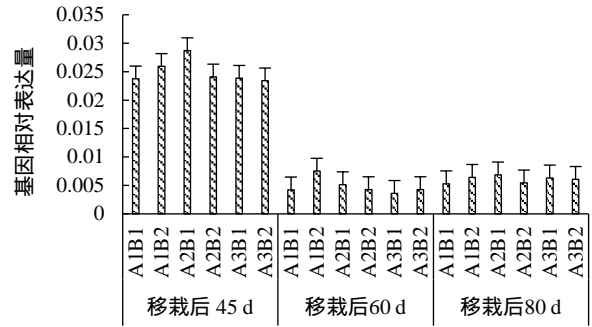


图 2 各处理不同时期蔗糖合成酶基因相对表达量
Fig. 2 Comparison of relative expression levels of sucrose synthase gene among different treatments at different stages

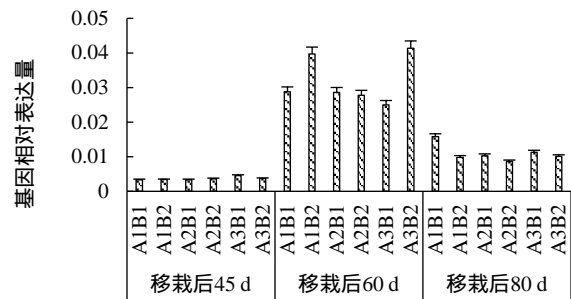


图 3 各处理不同时期转化酶基因相对表达量
Fig. 3 Comparison of relative expression levels of the invertase gene among different treatments at different stages

2.3 氮素供应水平对鲜烟叶糖类物质含量的影响

2.3.1 总糖与还原糖 各处理鲜烟叶总糖含量，表现为随着生育进程的推进而逐渐降低的趋势（表 6），在栽后 80 d 达到最低。同时，除栽后 60 d 外，在另外两个生育时期，各处理之间的总糖含量均无显著差异。在栽后 60 d，A1 与 A3 处理，两个品种之间的总糖含量均存在显著差异，但规律性不强。

总体来看，各处理鲜烟叶中的还原糖含量均呈现下降的趋势（表 7）。此外，在栽后 45 d，各处理之间鲜烟叶还原糖含量并无显著差异。然而，在栽后 60 及 80 d，处理之间就存在显著差异，但无明显的规律性；同时，栽后 60 d 的 A1 施氮量与栽后 80 d 的 A2 施氮量，存在品种间的显著差异。

表 6 各处理不同时期鲜烟叶总糖含量

Table 6 Total sugar content of tobacco leaves among different treatments at different stages %			
处理	移栽后 45 d	移栽后 60 d	移栽后 80 d
A1B1	9.43±0.33a	8.65±0.67a	6.16±0.19a
A1B2	9.54±0.25a	6.74±0.47b	6.38±0.62a
A2B1	9.16±0.66a	6.26±0.48b	6.57±0.41a
A2B2	9.60±0.75a	6.42±0.16b	6.07±0.61a
A3B1	9.12±0.48a	6.31±0.56b	6.50±0.38a
A3B2	9.70±0.71a	8.25±0.38a	6.45±0.03a

表7 各处理不同时期鲜烟叶还原糖含量

Table 7 Reduced sugar content of tobacco leaves among different treatments at different stages %

处理	移栽后 45 d	移栽后 60 d	移栽后 80 d
A1B1	2.85±0.12a	1.10±0.02b	1.12±0.70b
A1B2	2.78±0.14a	1.78±0.03a	1.30±0.71ab
A2B1	2.43±0.13a	1.24±0.07ab	1.88±0.18a
A2B2	2.86±0.08a	1.32±0.10ab	1.19±0.06b
A3B1	2.48±0.19a	1.13±0.05ab	1.47±0.03ab
A3B2	2.86±0.15a	1.39±0.09a	1.08±0.03b

2.3.2 淀粉 在大田生育期内,各处理鲜烟叶的淀粉的含量均表现出上升的趋势,并在栽后 80 d 达到最高(表 8)。在各个生育时期,处理间的淀粉含量存在显著差异,主要表现在 7 和 8 kg/667m² 施氮量处理显著高于 6 kg/667 m² 处理。此外,除 A2 处理外,同一施氮量内,两个品种之间的淀粉含量没有显著的差异。

表 8 各处理不同时期鲜烟叶淀粉含量

Table 8 Total starch content of tobacco leaves among different treatments at different stages %

处理	移栽后 45 d	移栽后 60 d	移栽后 80 d
A1B1	9.04±8.54b	19.29±7.25c	22.57±19.69b
A1B2	9.52±3.12b	19.28±14.35c	24.08±11.95b
A2B1	10.60±2.06a	20.87±10.21b	28.58±7.68a
A2B2	10.27±4.85a	22.16±17.52a	28.33±8.62a
A3B1	10.83±6.12a	22.97±16.99a	27.61±5.66a
A3B2	10.37±6.14a	23.09±13.33a	27.59±15.12a

2.4 糖代谢关键酶活性与糖类物质的相关分析

由表 9 可见,SS 酶活性与鲜烟叶淀粉含量,在栽后 45 d 及 60 d 呈极显著正相关,SPS 酶活性在栽后 60 d 及 80 d,呈现显著的正相关;Inv 酶活性在栽后 80 d,呈现显著的负相关;AM 酶活性在栽后 60 d 及 80 d,分别呈现极显著的正相关与负相关。

2.5 糖代谢关键酶基因表达量与糖类物质的相关分析

由表 10 可见,蔗糖合成酶基因与栽后 60 d 的还原糖含量,及栽后 80 d 的总糖含量呈现显著正相关;而蔗糖磷酸合成酶基因则与栽后 45 d 的淀粉含量呈现显著的负相关。

3 讨论

烟叶的蔗糖转化酶和淀粉酶活性,与碳代谢强度密切相关,是衡量同化产物的转化和利用、植物细胞代谢及生长强度的指标^[23-25]。本研究进行了烤

表 9 糖代谢关键酶活性与糖类物质的相关性

Table 9 Correlation of enzyme activity in sugar metabolism with sugar content in tobacco leaves

移栽后时间/d	酶活性	糖类物质		
		Y ₁	Y ₂	Y ₃
45	x ₁	0.106	0.011	0.671
	x ₂	-0.265	-0.505	0.960**
	x ₃	0.314	0.040	0.679
	x ₄	0.468	0.622	-0.699
60	x ₁	-0.287	-0.305	0.968**
	x ₂	-0.016	-0.256	0.932**
	x ₃	-0.524	-0.331	0.893*
	x ₄	-0.269	0.378	0.569
80	x ₁	-0.451	-0.414	-0.988**
	x ₂	0.347	0.007	0.751
	x ₃	0.402	0.408	0.901*
	x ₄	-0.170	0.009	-0.878*

注: x₁、x₂、x₃、x₄ 分别指 AM、SS、SPS 及 Inv 活性; Y₁、Y₂、Y₃ 分别指总糖、还原糖及淀粉含量; *代表在 0.05 水平(双侧)上显著相关, **代表在 0.01 水平(双侧)上显著相关,下同。

表 10 糖代谢关键酶基因表达量与糖类物质的相关性

Table 10 Correlation of genes expression level in sugar metabolism with sugar content in tobacco leaves

移栽后时间/d	基因表达量	糖类物质		
		Y ₁	Y ₂	Y ₃
45	x ₅	-0.466	-0.616	0.173
	x ₆	0.397	0.560	-0.826*
	x ₇	-0.416	-0.400	0.621
60	x ₅	-0.197	0.885*	-0.648
	x ₆	0.253	-0.106	0.598
	x ₇	0.390	0.766	-0.101
80	x ₅	0.915*	0.786	0.388
	x ₆	0.272	0.374	0.592
	x ₇	-0.197	-0.201	-0.718

注: x₅、x₆、x₇ 分别指 SS、SPS 及 Inv 基因。

烟全生育期糖代谢关键酶活性及糖含量的分析,结果显示,蔗糖磷酸合成酶、蔗糖合成酶的活性,均随着烟株的生长发育而逐步增加,并且随着施氮量的增加而增加,同时伴随着总糖与还原糖的含量的下降,说明本研究的施氮量下,烟株均能够适时地由氮代谢逐渐向碳代谢转变。同时,在整个生育期内,转化酶及淀粉酶的活性表现为先升高而后下降的趋势,烟叶中的淀粉含量急剧上升。这种总糖与还原糖的含量的下降与淀粉含量的上升,同样说明在烟叶生长后期,烟株以碳代谢为主,淀粉为叶片中碳水化合物的主要积累形式,从而为烟叶调制期间淀粉降解为可溶性糖奠定了物质基础。糖代谢关键酶的活性与糖类物质的相关性分析,也说明了关键酶的活性与烟叶中总糖、还原糖及淀粉的含量密切相关。此外, K326 与云烟 87 为本研究的两个参

试品种。由于两者的亲缘关系较近、遗传背景相似程度较高，其糖代谢特征特性也基本类似，因此，导致了在同一生育期同一施氮量处理下，两者的关键酶活差异不显著。

糖代谢途径中关键酶基因的表达，与烟叶中糖类物质的含量息息相关。王红丽等^[20]的研究表明，SPS 基因表达量，尽管在中期有一个低谷，但就整个生育期而言基本变化不大；Inv 基因表达量，随着烟叶的成熟而升高，这与本研究的结果相一致。同时，SPS、SS 及 Inv 基因的表达量与烟叶中总糖、还原糖及淀粉含量的相关性分析结果显示，在烤烟大田生长期，SPS 基因与 SS 基因分别与烟叶中总糖、还原糖及淀粉含量呈现显著的相关关系。说明，烟叶糖代谢中的基因表达量、酶活及糖类物质含量之间的存在着密切的关系，通过相关基因的表达量，可以在一定程度上预测糖类物质的含量。

氮素对烟叶的产量与品质影响巨大^[26]。而氮素通过影响糖代谢而影响其品质与产量，则是一个非常复杂的生化过程。深入分析其中的分子机制，对于提高烟叶的品质，具有十分重要的意义。

4 结 论

供氮水平对烟草糖代谢关键酶活性及基因的表达量有着显著的影响。鲜烟叶中的总糖和还原糖含量，受施氮量的影响较小；但淀粉的含量却随着施氮量的增加而显著增加。糖代谢关键酶的活性，直接影响着烟叶中的淀粉含量；糖代谢关键酶基因的表达量，与鲜烟叶糖类物质的含量关系密切。因此，施氮量的高低，对烟叶中糖类物质的含量有重要影响。

参考文献

[1] 黄树永, 陈良存. 烟草碳氮代谢研究进展[J]. 河南农业科学, 2005, 34(4): 8-11.

[2] 张森, 许自成, 李京京, 等. 烟草碳氮代谢及其调控技术研究进展[J]. 生物技术进展, 2016, 6(5): 312-318.

[3] 刘维智. 烤烟碳氮代谢对氮素形态的响应及 NRT2.2 的克隆[D]. 郑州, 河南农业大学, 2014.

[4] 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.

[5] 刘卫群, 韩锦峰, 史宏志, 等. 数种烤烟品种中碳氮代谢与酶活性的研究[J]. 中国农业大学学报, 1998(1): 22-26.

[6] 张晓燕, 俞杏珍, 符云鹏, 等. 不同基因型香料烟叶片发育过程中碳氮代谢关键酶活性及代谢产物变化[J]. 中国农学通报, 2009, 25(12): 112-116.

[7] 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.

[8] 杨志晓, 史跃伟, 林世峰, 等. 烤烟碳氮代谢关键酶动态及其与类胡萝卜素关系研究[J]. 中国烟草科学, 2014, 35(2): 59-63.

[9] 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, (3): 508-516.

[10] 史宏志, 李志, 刘国顺, 等. 皖南焦甜香烤烟碳氮代谢差异分析及糖分积累变化动态[J]. 华北农学报, 2009, 24(3): 144-148.

[11] 李雪利, 叶协锋, 顾建国, 等. 土壤 C/N 比对烤烟碳氮代谢关键酶活性和烟叶品质影响的研究[J]. 中国烟草学报, 2011, 17(3): 32-36.

[12] 张生杰, 黄元炯, 任庆成, 等. 不同基因型烤烟烟叶碳氮代谢差异研究[J]. 华北农学报, 2010, 25(3): 217-220.

[13] 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.

[14] 史宏志, 韩锦峰, 赵鹏, 等. 不同氮量与氮源下烤烟淀粉酶和转化酶活性动态变化[J]. 中国烟草科学, 1998, 19(3): 5-8.

[15] 刘卫群, 陈良存, 甄焕菊, 等. 烟叶成熟过程中碳氮代谢关键酶对追施氮肥的响应[J]. 华北农学报, 2005, 20(3): 74-78.

[16] 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.

[17] 李洪臣, 杨志晓, 武云杰, 等. 氮肥用量和施用方式对烟草中部叶碳氮代谢的影响[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(3): 65-68.

[18] 肖丽娜, 孟源, 刁朝强, 等. 不同施氮方式下烤烟大田期碳氮代谢研究[J]. 浙江农业科学, 2014(1): 27-31.

[19] 葛国锋, 王树会, 刘卫群. 氮肥对不同烤烟品种碳氮代谢关键酶活性的影响[J]. 中国农业科技导报, 2014, 16(1): 59-64.

- [20] 王红丽,杨惠娟,苏菲,等. 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[J]. 中国烟草学报, 2014, 20(5): 116-120.
- [21] 樊武广,王振海,牛书金,等. 不同氮源对烤烟碳氮代谢关键酶和化学成分的影响[J]. 江西农业学报, 2012, 24(10): 50-52, 58.
- [22] 鲁黎明,杨铁钊. 烟草钾转运体基 *NtHAK1* 的克隆及表达模式分析[J]. 核农学报, 2011, 25(3): 469-476.
- [23] 李玉潜,谢九生,谭中文. 甘蔗叶片碳、氮代谢与产量、品质关系研究初探[J]. 中国农业科学, 1995, 28(4): 46-53.
- [24] 熊福生,高煜珠,詹勇昌,等. 植物叶片蔗糖、淀粉积累与其降解酶活性关系研究[J]. 作物学报, 1994, 20(1): 52-58.
- [25] 章启发,陈刚,刘光亮,等. 施肥技术对上部烟叶使用价值的影响[J]. 中国烟草科学, 1999, 20(4): 16-18.
- [26] 李春俭,张福锁,李文卿,等. 我国烤烟生产中的氮素管理及其与烟叶品质的关系[J]. 植物营养与肥料学报, 2007, 13(2): 331-337.

(上接第83页)

- [22] 李姣,刘国顺,高琴,等. 不同生物有机肥与烟草专用复合肥配施对烤烟根际土壤微生物及土壤酶活性的影响[J]. 河南农业大学学报, 2013, 47(2): 132-137.
- [23] 蒋岁寒,刘艳霞,孟琳,等. 生物有机肥对烟草青枯病的田间防效及根际土壤微生物的影响[J]. 南京农业大学学报, 2016, 9(5): 784-790.
- [24] 王丽丽,石俊雄,袁赛飞,等. 微生物有机肥结合土壤改良剂防治烟草青枯病[J]. 土壤学报, 2013, 50(1): 150-156.
- [25] 王宝申,刘秀春,高树青,等. 生物有机肥对果园土壤养分挥发与淋溶损失的作用效果[J]. 园艺博览, 2008(10): 18-23.