

烤烟根系激素水平、GS、PMT 对氮素形态的响应

郭红祥, 刘卫群, 岳俊勤, 石永春

(河南农业大学农学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 通过水培试验, 探讨了不同氮素形态对烤烟苗期根系激素水平与氮代谢酶的影响。研究结果表明, 外源铵态氮对烤烟根系及叶片的谷氨酰胺合成酶(GS)具有一定的诱导作用, 饼肥浸提液对烤烟叶片 GS 有激活作用、对根系 GS 有抑制作用; 外源铵态氮对根系烟碱合成关键酶 N-甲基腐胺转移酶(PMT)活性有激活作用; 不同氮素形态对根系激素的影响不同, 纯铵态氮处理的 IAA 含量最高, 纯硝态氮处理的 ABA 含量最高, 铵态氮与硝态氮 1:1 处理的 ZR 含量最高, 浸提液对 IAA, ABA, ZR, IAA/ABA, ZR/ABA 有明显的激活作用。

关键词: 烤烟; 根系; 氮素形态; 谷氨酰胺合成酶; N-甲基腐胺转移酶; 激素

中图分类号: S512.01 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2006)01-0072-04

The Effects of Different Nitrogen Forms on Hormones in Root, Activity of GS and PMT During the Period of the Tobacco

GUO Hong-xiang, LIU Wei-qun, YUE Jun-qin, SHI Yong-chun

(Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: A pot experiment was conducted to study the effects of different nitrogen forms on hormones in root and enzymes catalyzing nitrogen metabolism. The quantity of hormones in roots was mensurated with the method of ELISA, and the activity of PMT and GS were mensurated with the method of isotopes and spectrophotometer. The results show that the activity of GS in the leaves and roots can be improved to the extent by NH_4^+ . The activity of GS in the leaves can be improved and that in the roots can be reduced by the extract from sesame seed cake. The activity of PMT, a key enzyme that is in the synthesis of nicotine in root, can be activated by NH_4^+ . It is also found that the quantity of hormones in roots and balance among them are effected by different nitrogen forms and the extract from sesame seed cake, especially the quantity of IAA, ABA, ZR, IAA/ABA and ZR/ABA can be improved by the extract from sesame seed cake.

Key words: Tobacco; Roots; Nitrogen forms; GS; PMT; Hormone

烟碱是使烟草具有商品价值的主要成分, 但其含量过高会损害人体健康, 所以烟叶的品质和安全性已成为烟草行业最关心的问题。近年来, 国内外烟草市场都力求生产出适量烟碱、高香气的优质烟, 这就对种植业提出了新的要求。氮素是影响烤烟烟碱积累的最重要的营养元素。已有研究表明, 氮素肥料与烟草烟碱的积累呈正相关, 当氮肥施用量增加时, 烟碱的含量也随之增加。氮素对烟碱含量的影响不仅体现在氮素用量的多少, 而且氮素形态和

施用时期对烟碱合成和积累也有较大的影响^[1]。目前, 国内关于降烟碱的研究大多集中在通过改进农艺栽培措施来实现这一目的, 关于氮素形态影响烟碱水平的机理及激素含量与烟碱合成之间的关系少有报道。本研究探讨了烤烟根系激素、谷氨酰胺合成酶(GS)和 N-甲基腐胺转移酶(PMT)对不同形态氮素的响应, 试图从生理生化代谢机理方面阐述氮素对烟碱合成与积累的影响, 进而为我国优质烟生产提供代谢调控方面的理论依据。

收稿日期: 2005-03-15

基金项目: 国家烟草专卖局重点资助项目(110200001011A)

作者简介: 郭红祥(1974-), 男, 河南获嘉人, 讲师, 在职博士, 主要从事植物生理生化研究; 刘卫群为通讯作者。

1 材料和方法

1.1 试验设计

供试烤烟 (*Nicotiana tabacum*) 品种为 K326。选取 8 片叶龄、长势一致的烟苗，水培于 2L 黑色塑料桶中，每 24h 充气一次。培养液营养成分^[2]：N 40 mg/L, P 20mg/L, K 和 Ca 各 80 mg/L, Mg 10 mg/L, Fe 1 mg/L, Zn 和 Mn 各 0.1 mg/L, Be 0.05 mg/L, Cu 和 Mo 各 0.01 mg/L。培养液 pH 为 5.32，每 2 d 调整一次培养液 pH，每周换一次营养液。设置 6 个处理（表 1）。

表 1 试验设计

Tab 1 The design of experiment

| 处理 Treatment | 培养液总氮中饼肥浸提液氮的含量(mg/L) The content of the nitrogen from extracts from sesame seed cake in the total nitrogen | NO ₃ -N :NH ₄ -N |
|-----------------|---|--|
| T1 | 0 | 1:0 |
| T2 | 0 | 0:1 |
| T3 | 0 | 1:1 |
| T'1 | 8 | 1:0 |
| T'2 | 8 | 0:1 |
| T'3 | 8 | 1:1 |

注：饼肥浸提液制备：将腐熟芝麻饼肥粉碎，浸泡于蒸馏水中，24 h 后弃去残渣，测定浸提液中全氮含量为 0.22%，其中，铵态氮为 0.097%，硝态氮为 0.102%

1.2 试验方法

1.2.1 激素测定 水培后 28 d，每处理取 6 棵烟株，剪取根尖，用 ELISA 法检测激素含量，每处理重复 3 次。

1.2.2 GS 测定 水培后 28 d，自上而下选取第 3 片叶，称取相同部位烟叶 0.2 g (或根样 0.2 g)，用 4 mL 5 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.5±2，内含 0.5 mmol/L EDTA, 50 mmol/L K₂SO₄) 冷浴研磨成浆，在 0~4 ℃ 下 6 000 r/min 离心 10 min，取上清液，用分光光度法测定酶活性^[3]，以 15 min 内生成的产物 L-谷氨酰基氧肟酸在 540 nm 处的吸光值表示酶活性。每处理 3 次重复。

1.2.3 PMT 活性测定 水培后 28 d，取 4 g 根，由清华大学采用同位素法^[2]检测 PMT 酶活性，酶活性以在 30 min 内催化生成产物的放射性表示。

2 结果与分析

2.1 不同形态氮素对烤烟苗期根系 IAA, ABA, ZR 的影响

图 1 显示出氮素形态对烤烟苗期根系激素

IAA, ABA, ZR 的影响。T2, T'2 的 IAA 含量最高, T1, T'1 的 ABA 含量最高, T3, T'3 的 ZR 含量最高, 配用浸提液各处理的 IAA, ABA, ZR 含量明显高于纯无机肥的处理。从图 2 可以看出, T2, T'2 的 IAA/ABA 最大, T3, T'3 处理最小; 配用浸提液的各处理 IAA/ABA 明显大于纯无机肥各处理。图 3 中各处理 ZR/ABA 的大小依次为 T'3(T3)> T'1 (T1)> T'2 (T2), 配用浸提液处理的 ZR/ABA 大于纯无机肥处理。从图 4 可以看出, T'2 (T2) 的 IAA/ZR 明显大于其他处理; 除 T'1 (T1) 外, 配用饼肥浸提液处理的 IAA/ZR 大于纯无机肥的处理。

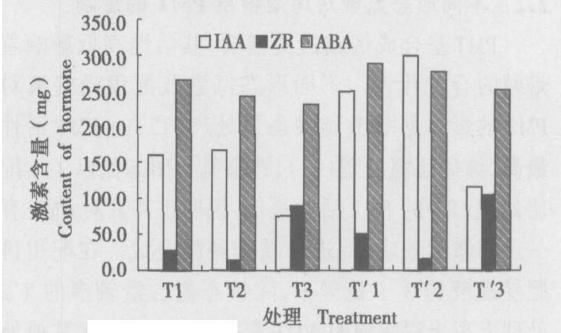


图 1 不同形态氮素与饼肥浸提液对根系激素含量的影响

Fig 1 The effects of different nitrogen forms and extract from sesame seed cake on the content of hormone

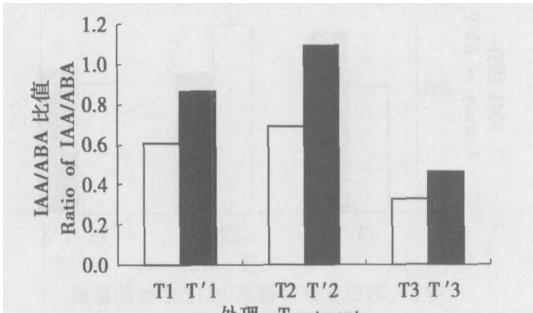


图 2 不同形态氮素与饼肥浸提液对 IAA/ ABA 的影响

Fig 2 The effects of different nitrogen forms and extract from sesame seed cake on ratio of IAA/ ABA

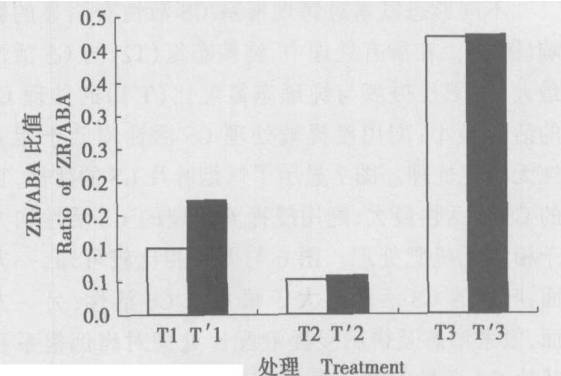


图 3 不同形态氮素与饼肥浸提液对 ZR/ ABA 的影响

Fig 3 The effects of different nitrogen forms and extract from sesame seed cake on ratio of ZR/ ABA

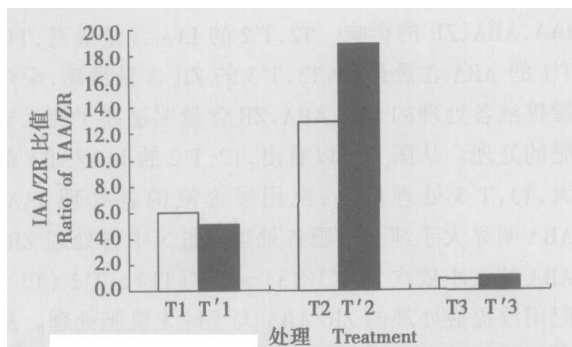


图4 不同形态氮素与饼肥浸提液对 IAA/ZR 的影响

Fig 4 The effects of different nitrogen forms and extract from sesame seed cake on ratio of IAA/ZR.

2.2 不同形态氮素对烤烟根系 PMT 的影响

PMT 是合成烟碱的关键酶,其活性高低影响着烟碱的合成代谢。不同形态氮素及配用浸提液对 PMT 的影响见图 5,纯铵态氮处理(T2)的 PMT 活性最高,纯硝态氮处理(T1)、铵态氮与硝态氮以 1:1 配比处理(T3)的 PMT 活性最低,说明铵态氮对 PMT 有一定的激活效应,促进根系烟碱的合成。在配用饼肥浸提液的 3 个处理中,除铵态氮含量较多的 T'2 处理表现出浸提液对 PMT 有抑制作用外,在其他处理中,浸提液不同程度地刺激了 PMT 的活性。

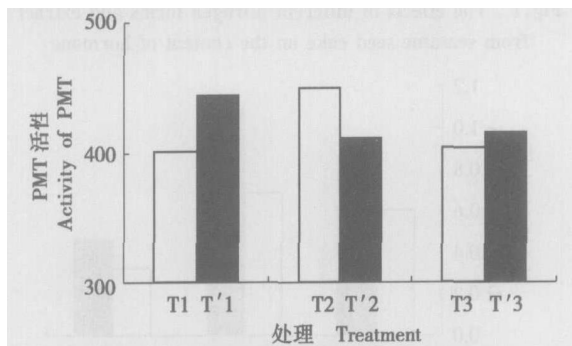


图5 不同氮素对根系 PMT 活性的影响

Fig 5 The effects of different nitrogen forms on activity of PMT

2.3 不同形态氮素对烤烟 GS 的影响

不同形态氮素对烤烟根系 GS 活性有明显的影响(图 6)。在所有处理中,纯铵态氮(T2)的 GS 活性最大,饼肥浸提液与纯硝态氮配比(T'1)的处理 GS 的活性最小;配用浸提液处理 GS 活性均低于相应纯无机肥处理。图 7 显示了烤烟叶片 GS 的活性,T2 的 GS 的活性最大;配用浸提液处理的 GS 活性均大于相应无机肥处理。图 6 与图 7 相比较可知,一方面,叶片的 GS 活性远大于根系的 GS 活性;另一方面,氮素形态及饼肥浸提液配比处理对烤烟根系和叶片 GS 活性有着不同的影响,饼肥浸提液对叶片 GS 活性有一定的刺激性,而对根系 GS 活性有一定的抑制性

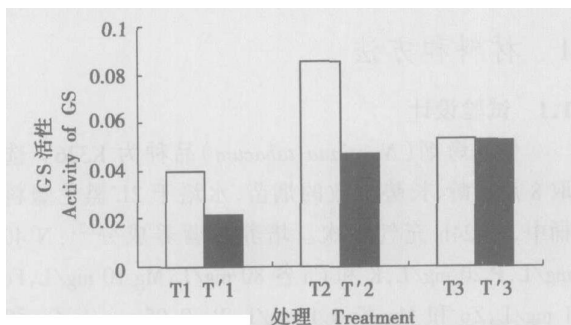


图6 不同形态氮素与饼肥浸提液对根系 GS 的影响

Fig 6 The effects of different nitrogen forms and extract from sesame seed cake on activity of GS

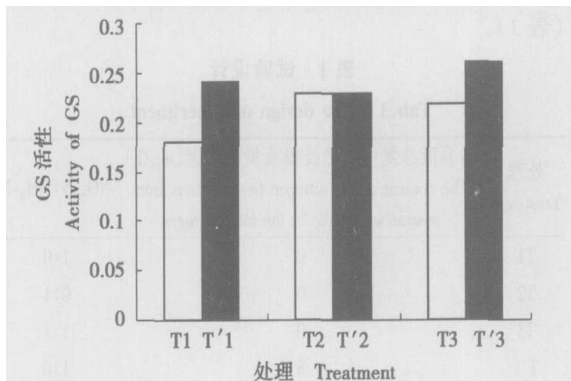


图7 不同形态氮素与饼肥浸提液对叶片 GS 的影响

Fig 7 The effects of different nitrogen forms and extract from sesame seed cake on activity of GS

3 讨论

氮素是烤烟生长发育以及影响产量和品质的重要营养元素。谷氨酰胺合成酶(GS)的活性大小可以反映氮素在植物体内被利用的状况^[4]。已有许多研究证明,外源铵态氮或硝态氮具有诱导部分植物中 GS 基因表达的作用,外源铵态氮能诱导大豆和小麦根系中 GS 基因的表达^[5]。张楚富等人(1992 年)还发现,外源铵态氮能诱导水稻根系产生一种 GS 同工酶(GSb)^[4]。李常健等人(2001 年)报道,硝态氮能诱导豌豆、玉米根系 GS 基因的表达。本试验结果也表明,外源铵态氮能提高烟草根系、叶片的 GS 的活性。这可能是由于外源铵态氮对烟草中 GS 的基因表达有一定的诱导作用,促进了烟草中 GS-mRNA 的合成,或是诱导产生一种 GS 同工酶,使 GS 的总活性提高,但有待于进一步研究。另外,饼肥浸提液对叶片 GS 活性有一定的刺激性,而对根系 GS 活性有一定的抑制性,可能是由于饼肥浸提液促进了根中的 $\text{NH}_4\text{-N}$ 向上运输,使得根中 $\text{NH}_4\text{-N}$ 浓度较低,导致酶活较低。

PMT (Putrescine N-methyltransferase) 是烟草根系烟碱合成途径中的一个关键酶,其活性大小直接影

响到烟叶中烟碱的含量^[2,7,8]。在纯无机肥处理中, 铵态氮对 PMT 活性有一定的激活效应, 主要原因在于铵态氮促进了烟株体内 PMT 底物(S-腺嘌呤蛋氨酸、腐胺)的生成。在配用饼肥浸提液后, 浸提液能抑制纯铵态氮对 PMT 的激活效应, 而与其他氮素形态配比时对 PMT 都有不同程度的激活作用。

生物体内源激素之间的平衡是调控植物生长发育的重要因素。本试验中氮素形态及饼肥浸提液对烤烟根系的激素水平(IAA/ABA, ZR/ABA, IAA/ZR)有明显的影响。在不配用浸提液的情况下, 铵态氮处理(T2)处理的 IAA/ABA 和 IAA/ZR 最大, ZR/ABA 比值最小, 而此时根系的 PMT, GS 活性以及叶片 GS 活性都最高; 在配用浸提液后, 各处理激素含量, IAA/ABA, ZR/ABA 均升高, 根系的 PMT 及叶片 GS 活性也有相同的变化规律。综合这些现象可以说明, 氮素形态及饼肥浸提液对烤烟体内酶活性的影响, 是通过先诱导内源激素水平及平衡的变化, 然后调控代谢酶基因的表达, 实现体内酶活性的变化。

参考文献

[1] 左天觉. 烟草的生产、生理和生物化学[M]. 上海: 远

东出版社, 1993. 60—64

- [2] Yoshida D, Mitake T. Agmatine and N-carbamylputrescine as intermediates in the formation of nicotine by tobacco plants [J]. *Plant and Cell Physiol*, 1966, 7: 301—305.
- [3] 汤章城. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 157—158
- [4] Mifflin B J, Lea P J. Ammonia assimilation[A]. In: *The Biochemistry of Plants* [M]. New York: Academic Press, 1980. 169—202
- [5] 李常健, 林清华, 张楚富. 高等植物中谷氨酰胺合成酶研究进展[J]. *生物学杂志*, 2001, 18(4): 1—3
- [6] Zhang C F, Peng S B, Bennett J, *et al.* Glutamine synthetase ferredoxin dependent glutamate synthase in maize[J]. *Plant Cell Physiology*, 1992, 33: 1193—1198
- [7] Mizusaki S, Tanabe Y, Noguchi M, *et al.* Changes in the activities of ornithine decarboxylase, putrescine N-methylputrescine oxidase in tobacco roots in relation to nicotine biosynthesis[J]. *Plant and Cell Physiol*, 1973, 14: 103—110
- [8] Saunders J W, Bush L P. Nicotine biosynthetic enzyme activities in *Nicotiana tabacum* L. genotypes with different alkaloid levels[J]. *Plant Physiol*, 1979, 64: 236—240