

不同施氮量烤烟氮素代谢差异及其对香气前体物形成的影响

李 飞,杨铁钊,张小全,武云杰,李丽华,康雪莉,符新妍,宋洋洋

(河南农业大学 烟草学院,河南 郑州 450002)

摘要:为了探索烤烟品种氮素代谢差异对烟叶香气前体物形成的影响,运用大田施肥试验,测定了不同施氮水平下豫烟10号和中烟203成熟过程中的氮素代谢产物和相关酶活性的变化,同时测定了类胡萝卜素和多酚含量。结果表明,品种间GS、GDH等氮素代谢相关酶活性不同决定了氮素转化方式和转移规律,是导致基因型间氮素代谢差异的重要因素。类胡萝卜素和多酚含量与氮代谢产物和相关酶活性的相关性分析:在生长成熟前期类胡萝卜素含量与GS的相关系数达0.515*,在成熟后期与GS、GDH的相关系数分别达0.664**和0.645**;在整个成熟期多酚含量与NR的相关系数达到-0.524**。品种间比较说明烤烟成熟前期氮代谢旺盛有利于类胡萝卜素的形成,成熟后期氮代谢强度减弱有利于类胡萝卜素降解产物的形成;烤烟成熟期NR活性低,硝酸盐积累则多酚的形成受到抑制。

关键词:烤烟;氮代谢;类胡萝卜素;多酚

中图分类号:S572 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2014)01-0170-08

Flue-cured Tobacco Nitrogen Metabolism Differences and Its Influence on Aroma Precursors in Different Amount of Nitrogen

LI Fei, YANG Tie-zhao, ZHANG Xiao-quan, WU Yun-jie, LI Li-hua,
KANG Xue-li, FU Xin-yan, SONG Yang-yang

(College of Tobacco Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In order to explore the differences of nitrogen metabolism in varieties and its influence on tobacco aroma precursors formation. Under the condition of the field, measured nitrogen metabolites and related enzyme activity in different varieties under different nitrogen levels, at the same time determined carotenoids and polyphenols content. The results indicated that the difference of enzymes related to nitrogenous metabolism such as GS, GDH in varieties, determined the way of nitrogen transformation and the rule of the nitrogen transfer. It is an important factor that lead to nitrogen metabolism differences of genotype. Correlation analysis showed that grow mature early, correlation coefficient between carotenoid content and GS were 0.515*; grow mature late, correlation coefficient between carotenoid content and GS, GDH were 0.664** and 0.645**; In the mature polyphenol content and NR correlation coefficient reaches -0.524**. By maturity of flue-cured tobacco, the NR activity was low, nitrate accumulation, the formation of polyphenols is restrained.

Key words: Flue-cured tobacco; Nitrogen metabolism; Carotenoid; Polyphenols

氮素是影响烟叶产量和品质的重要营养元素^[1]。在烟叶栽培管理过程中,氮运筹是烟叶质量和产量调控的关键技术,尤其是在烟叶成熟期,烟叶的氮代谢特性始终是优质烟叶生产关注的焦点。合理的氮素供应是最终收获优质烟叶的前提,烤烟对氮素营养十分敏感,增施氮肥可以增加产量,但氮素

供应过量,氮代谢延长,烟株生长过旺,烟叶成熟期推迟,造成烟叶品质低劣^[1-4]。类胡萝卜素、多酚作为烟叶中重要的香气前体物,在烟草的生长发育、调制特性以及烟叶品质等方面起着重要的作用^[5],经合理调制,可以生成一系列降解产物,这些降解产物能赋予烟草制品优雅的香气,增加香气量,改善余

收稿日期:2013-11-20

基金项目:中国烟草总公司特色优质烟叶开发重大专项(Ts-01-2011003)

作者简介:李 飞(1988-),女,河南浚县人,在读硕士,主要从事烟草遗传育种研究。

通讯作者:杨铁钊(1956-),男,河南临颍人,教授,硕士,主要从事烟草遗传育种研究。

味^[6-7]。类胡萝卜素是影响烟叶品质的主要成分之一,不仅决定了调制后的颜色,其降解产物与烟叶的香气质和香气量也密切相关^[8],其降解产物丙酮、大马酮、紫罗兰酮、巨豆三烯酮、二氢猕猴桃内酯等在烟支燃吸过程中能够产生香气物质,影响烟叶的香吃味^[9]。多酚是烟叶中重要的香气物质和香气前体物。有研究^[10]显示,烟叶中多酚含量与烟叶品质相关,对烤烟品质、色泽和生理强度等均有重要影响^[11-13]。目前,有关香气前体物的研究^[14-16]多集中在不同氮用量或氮素形态对烤后烟类胡萝卜素和多酚含量的影响方面,而有关烟叶成熟期氮代谢与类胡萝卜素及多酚含量关系的研究报道较少,鉴于此,研究了不同氮用量对类胡萝卜素及多酚含量的影响,并测定了氮代谢相关指标,旨在明确烟叶氮代谢对香气前体物形成的影响及品种间差异,为特色优质烟叶生产提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 供试材料

试验于2012年在许昌禹州进行。试验地前茬作物一致,土壤肥力均匀,地面平整,排灌方便,供试土壤为褐土,基础土壤肥力为全氮1.07 g/kg,土壤碱解氮65.25 mg/kg,有效磷5.56 mg/kg,速效钾92.39 mg/kg,缓效钾791.00 mg/kg,有机质20.60 g/kg,pH值8.02。供试烤烟品种为豫烟10号和中烟203。

1.2 试验设计

试验采取裂区设计,氮素水平为主处理,烤烟品种为副处理。氮素用量设低氮N1(45 kg/hm²)、中氮N2(60 kg/hm²)、高氮N3(75 kg/hm²)3个处理。行距120 cm、株距55 cm,每个处理300株,于2012年5月4日移栽,其他管理措施按优质烟生产要求进行。

1.3 测定项目及方法

各品种(系)选取生长一致的烟株,第11叶(自下向上数,不计底脚叶)的叶芽长1 cm、宽0.5 cm时计为第1天,从第40天开始每隔10 d取样1次,至叶龄80 d为止(采样避开阴雨天气)。所有样品及时放入液氮罐和冰盒带回实验室,用蒸馏水洗净叶片表面的尘土和污物并用吸水纸小心擦干,去除叶脉,混匀,测定1.3.1~1.3.5中各项指标,重复3次。

1.3.1 硝酸还原酶(NR)活性 采用活体法^[17]在540 nm处测定,以1.0 g鲜样酶粗液在1 h内催化形成的1 μg亚硝态氮(NO₂⁻)为1个酶活性单位。

1.3.2 谷氨酰胺合成酶(GS)活性 将1.0 g鲜样

置于预冷的研钵中,加入少许无菌石英砂,加入2.5 mL的100 mmol/L Tris-HCl缓冲液(pH值7.6,含1 mmol/L MgCl₂,1 mmol/L EDTA和10 mmol/L β-巯基乙醇)冰浴研磨成糊状,匀浆液于12 000 r/min离心20 min,上清液即为粗酶液。按O'Neal等^[18]的方法测定粗酶提取液GS活性。1个GS活性单位定义为每分钟于37℃催化1 nmol的γ-谷氨酰异羟肟酸所需要的酶量。

1.3.3 谷氨酸脱氢酶(GDH)活性 将1.0 g鲜样加入3 mL Tris-HCl缓冲液中研磨匀浆,于15 000 r/min离心20 min,上清液即为酶液。按Turano等^[19]的方法在340 nm比色测定GDH活性。以每分钟反应混合液于30℃下减少1 nmol/L NADH定义为1个酶活性单位。

1.3.4 叶片铵、总氮和可溶性蛋白含量 分别采用改良的茚满三酮法、凯氏定氮法、考马斯亮蓝G-250法^[20]测定。

1.3.5 类胡萝卜素含量和多酚总量 参照参考文献[17]的改进方法,取0.2 g剪碎的鲜叶片放入25 mL的容量瓶中,用95%的乙醇定容,黑暗中浸提24 h,分别在665,649,470 nm波长下测OD值,通过公式计算出类胡萝卜素含量。多酚总量采用分光光度法^[21]在540 nm处进行测定。

1.3.6 烟叶香味物质 样品前处理:烟叶采摘后晾干,经去梗、干燥(40℃,4 h)、粉碎、过孔径为0.3 mm筛。用烘箱法测定烟样的含水率。精密称取20 g烟末进行同时蒸馏萃取,萃取剂使用二氯甲烷。同时蒸馏萃取3 h,得到二氯甲烷萃取物。加入15 g无水硫酸钠,放置过夜,过滤,浓缩至1 mL,所得样品进行气相色谱分析。

气相色谱条件:初始温度80℃,停留1 min,以2℃/min升温至210℃,保持20 min。进样口温度230℃,汽化室温度300℃;柱流量1.0 mL/min。EI能量70 eV。载气为高纯He;分流比10:1;离子源温度200℃,传输线温度260℃,扫描质量范围30~500 amu,溶剂延迟1.3 min。进样1 μL。采用NIST谱库检索定性。对于有标样的香味物质,结合加标定性,定性标样化合物包括吡啶、糠醛、6-甲基-5-庚烯-2-酮、苯甲醛、异佛尔酮、吡嗪、β-紫罗兰酮、β-大马酮、香叶基丙酮、二氢猕猴桃内酯、金合欢基丙酮(纯度均大于98%),采用内标法定量;无标样的香味物质,设其响应因子为1,然后进行定量分析。

1.4 统计分析

采用SPSS 19.0和Microsoft Excel 2003软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同氮素水平下氮代谢关键酶活性的变化动态

NR 是植物氮同化代谢关键步骤硝酸盐同化中的限速酶和调节酶^[22]。由图 1 可知,随生育进程的推进,NR 活性均表现为先升高后降低。不同品种 NR 活性均随施氮水平升高而提高,处理间差异显著,N1 和 N2 处理的 NR 活性高峰出现在叶龄 50 d, N3 处理则在叶龄 60 d 达到最高,N1 处理的 NR 活性在整个生育期内一直处于较低水平,氮代谢下降较早,促使叶片早衰;N3 处理则持续保持较高水平。叶片进入生长后期氮代谢运转速度减慢,NR 活性迅速降低。说明高施氮量在一定程度上延长了烤烟叶片的功能期,加强了氮代谢的强度,延缓了氮代谢转向碳代谢的时间。品种间 NR 活性变化规律一致,说明豫烟 10 号对氮素吸收的能力和中烟 203 相当。

GS 是催化无机氮转化为有机氮的关键酶^[23]。从图 1 可以看出,GS 活性在烟草叶龄 50 d 时达到高峰,而后随着自然衰老过程不断下降。不同施氮量处理对 GS 活性影响显著,增施氮肥有利于 GS 活

性的上升,对叶片 NH_4^+ 的再同化能力增强。随着施氮量的增加,GS 活性的下降速度逐渐增加。品种间 GS 活性在叶龄 50 d 和 60 d 之间存在显著差异,豫烟 10 号和中烟 203 的 GS 活性均在此期间下降,其中,从叶龄 50 d 到 60 d, N1、N2、N3 处理豫烟 10 号的 GS 活性分别下降了 47.88%, 49.57%, 50.23%, 而中烟 203 分别下降了 25.69%, 30.88%, 16.05%。与中烟 203 相比,豫烟 10 号即使在较高的氮素供应条件下也能保持稳定的衰老进程。

GDH 具有合成氨和脱氨功能,是氮代谢的调节酶^[24-25],由图 1 可以看出,GDH 活性随着烟叶的生长呈现先升后降的趋势,豫烟 10 号的 GDH 活性在不同施氮量下均在叶龄 50 d 达到峰值,中烟 203 在中等施氮水平下达到峰值的时间延后至叶龄 60 d。随着施氮水平的增加,GDH 活性上升,各处理间差异显著,说明施氮量对 GDH 活性的影响很大。品种间 GDH 活性始终表现为豫烟 10 号 > 中烟 203,说明豫烟 10 号在成熟期的脱氨作用大于中烟 203,有利于物质降解和叶片衰老。

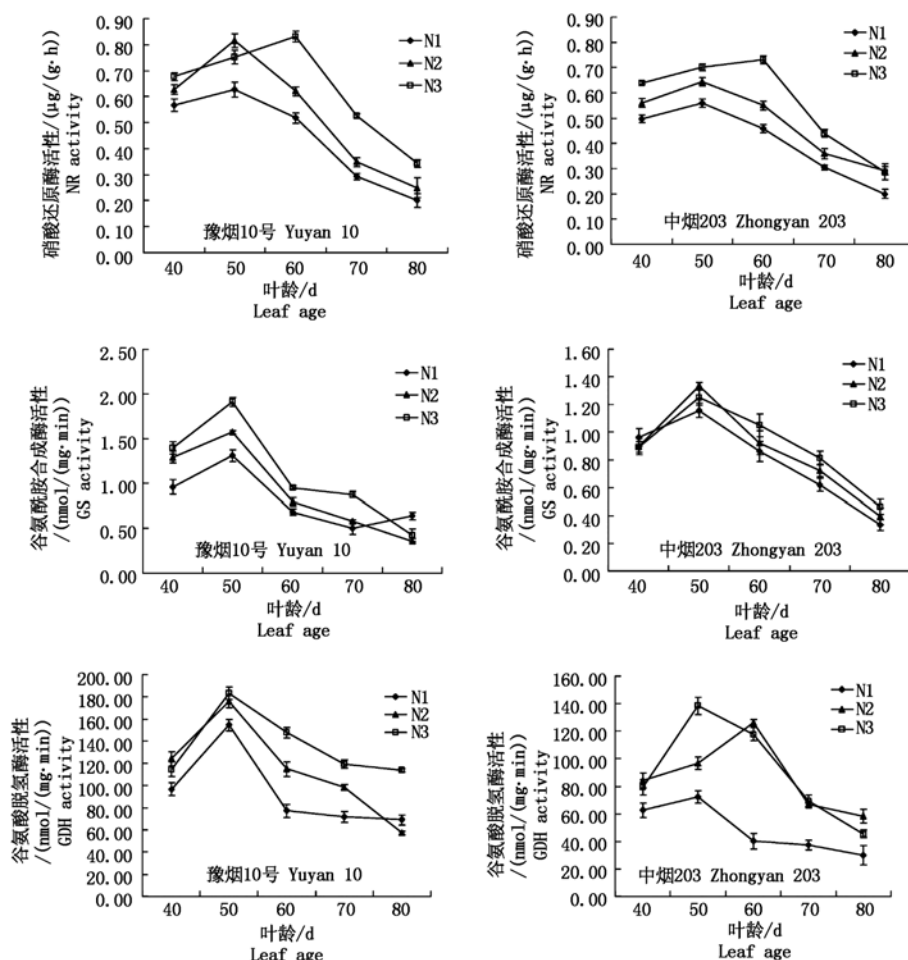


图 1 不同氮素水平下氮代谢关键酶活性的变化

Fig. 1 The change of key enzyme activity to nitrogen metabolism under different nitrogen levels

2.2 不同氮素水平下叶片铵浓度、可溶性蛋白和总氮含量的变化动态

由图 2 可以看出,除低氮水平下豫烟 10 号的叶片铵浓度是持续下降外,其他处理均表现为先升高后下降的趋势,且在叶龄 50 d 达到峰值。随着施氮量的增加,各品种叶片铵浓度均表现出先升高后下降的趋势。说明氮素用量对叶片 NH_4^+ 浓度有很大影响,但施氮量过大不利于烟叶衰老期氮素的再转移,豫烟 10 号氮素再转移量大于中烟 203,衰老过程中不同基因型烤烟对 NH_4^+ 的运输和再利用存在差异。

特定叶龄的可溶性蛋白和总氮含量可以很好地反映作物氮素营养状况。由图 2 可知,可溶性蛋白

均在叶龄 50 d 达到峰值,之后一直下降;总氮含量则处于不断下降的状态。 N_1 、 N_2 、 N_3 处理豫烟 10 号的总氮降解百分率为 60.63%、61.38%、58.75%,中烟 203 为 50.93%、58.69%、56.68%,整体趋势均为先升高后下降,豫烟 10 号降解百分率高于中烟 203。说明适当的施氮量可以促进烟叶氮代谢,而施氮过多则降低烟叶的代谢强度,豫烟 10 号的氮代谢强度和氮素营养物质积累量受施氮量影响较小。

尽管叶片衰老过程中, NH_4^+ 的积累是蛋白质降解的结果^[26-29],但可溶性蛋白与总氮与叶片 NH_4^+ 的变化并不完全一致,而且品种间的差异显著性在各个时期也不同。

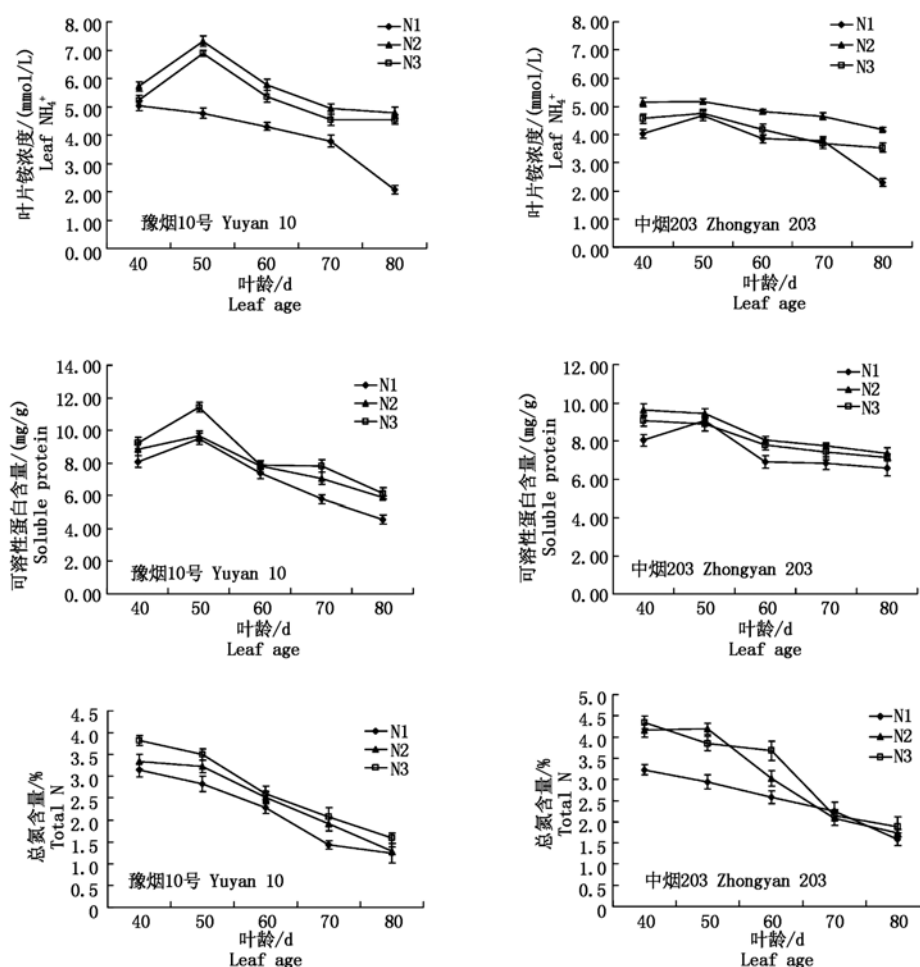


图 2 不同氮素水平下叶片铵浓度、可溶性蛋白、总氮含量的变化

Fig. 2 The change of leaf NH_4^+ , soluble protein, total N under different nitrogen levels

2.3 不同氮素水平下多酚和类胡萝卜素含量的变化动态

从图 3 中可以看出,类胡萝卜素含量总体变化趋势为成熟前期类胡萝卜素含量整体上升,然后随成熟时期的推进而下降。在达到峰值以前,类胡萝卜素含量处于积累期,即类胡萝卜素生成量大于降解量,各品种均呈上升趋势;在达到峰值以后,类胡

萝卜素含量开始下降,类胡萝卜素含量处于降解期,即类胡萝卜素降解量远大于生成量。叶龄 40 ~ 50 d, 3 个施氮处理的类胡萝卜素含量表现为 $\text{N}_3 > \text{N}_2 > \text{N}_1$, 之后高氮水平下类胡萝卜素含量有所降低,但仍极显著高于低氮水平。在 N_1 、 N_2 、 N_3 水平下,豫烟 10 号和中烟 203 的峰值分别为 0.50, 0.87, 0.90 mg/g 和 0.49, 0.83, 0.81 mg/g; 随后类胡萝卜

素开始降解,在 N1、N2、N3 水平下,豫烟 10 号的降解量分别为 0.12、0.61、0.56 mg/g,中烟 203 为 0.18、0.45、0.47 mg/g;豫烟 10 号类胡萝卜素的降解百分率为 24.00%、70.11%、62.22%,中烟 203 为 36.73%、54.21%、58.02%,在不同氮素水平下,类胡萝卜素的积累量和降解百分率均有差异,且豫烟 10 号的积累量和降解百分率明显地高于中烟 203。

随着施氮量的增加,2 个烤烟品种类胡萝卜素的积累与降解均显著增加。且类胡萝卜素在叶龄 50~60 d 的降解量最大,与此同时叶片 GS 活性出现最大幅下降。由表 1 可以看出,施氮量增加,烤后烟的类胡萝卜素降解产物含量增加,且豫烟 10 号的增加量明显高于中烟 203。

烟草中的多酚不仅对烟叶颜色有直接影响,而且对烟气质量和香气有间接影响^[30]。从图 3 中可以看出,随着叶片的衰老,多酚含量表现出先升高后降低的趋势,在叶龄 70 d 达到最大值,在接近烟叶成熟采收的 20 d 内下降。在叶龄 40 d 时,随着施氮量的增加,多酚含量先上升后略有下降,高氮和中氮处理间差异不显著;在叶龄 50~70 d 时,豫烟 10 号的多酚含量随着施氮量的增加而先上升后略有下降,低氮处理显著高于中氮处理,中烟 203 则随着施氮量的增加而上升;在叶龄 80 d 时,多酚含量随着施氮量的增加而增加。由此可见,多酚含量在不同时期对氮用量的响应不同,且品种间差异明显。

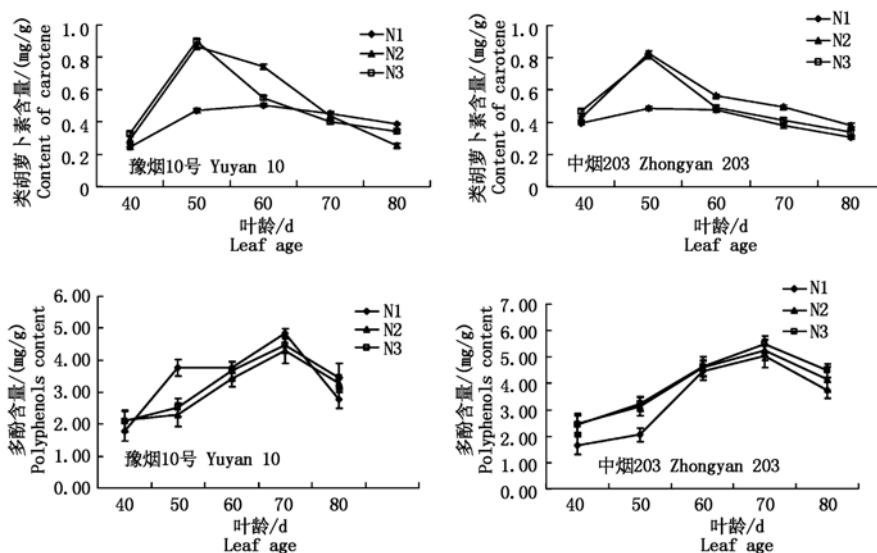


图 3 不同氮素水平下多酚和类胡萝卜素含量的变化

Fig. 3 The change of polyphenols and carotene content under different nitrogen levels

表 1 不同氮素水平下类胡萝卜素降解产物含量

Tab. 1 Content of carotene degradation under different nitrogen levels

μg/g

类胡萝卜素降解产物 Carotenoid degrading products	豫烟 10 号 Yuyan 10			中烟 203 Zhongyan 203		
	N1	N2	N3	N1	N2	N3
6-甲基-5 庚烯-2-酮 6-Me-5-heptene-2-dione	1.31	1.45	0.90	0.67	0.59	0.45
6-甲基-5 庚烯-2-醇 6-Me-5-heptene-2-ionol	1.03	1.31	1.00	1.05	0.89	1.77
芳樟醇 Linalool	0.60	0.82	0.63	0.58	0.54	0.57
β-大马酮 β-Damascenone	16.24	17.04	19.74	20.42	18.71	21.32
β-二氢大马酮 β-Damascone	15.81	18.88	18.01	14.60	16.20	16.20
香叶基丙酮 Neryl acetone	2.54	3.39	2.79	2.28	2.64	2.58
二氢猕猴桃内酯 Benzofuranone	3.41	4.42	4.20	2.97	2.77	2.86
巨豆三烯酮 1 Megastignone-1	2.16	2.06	1.92	1.58	1.87	1.81
巨豆三烯酮 2 Megastignone-2	7.51	6.16	7.33	6.80	7.81	6.94
巨豆三烯酮 3 Megastignone-3	1.70	1.52	1.85	1.54	1.66	1.59
巨豆三烯酮 4 Megastignone-4	11.53	12.44	12.47	10.50	11.63	10.87
3-羟基-β-二氢大马酮 3-Hydroxy1-β-damascenone	1.04	2.28	2.45	1.51	1.19	1.16
螺岩兰草酮 Solavetivone	2.08	2.25	3.75	1.32	1.43	1.44
法尼基丙酮 Farnesyl acetone	10.68	11.61	14.68	11.97	12.97	11.16
总量 Total	77.64	85.64	91.74	77.80	80.89	80.72

2.4 多酚和类胡萝卜素含量与氮代谢相关生理指标的相关分析

从表 2 可以看出,类胡萝卜素积累期,类胡萝卜素含量与 GS、NR 活性以及可溶性蛋白含量呈显著正相关;类胡萝卜素降解期,类胡萝卜素含量与 GS、GDH 活性以及叶片铵浓度呈极显著正相关,与 NR 活性呈显著正相关。烤烟成熟前期 NR、GS 活性高,氮素代谢旺盛,有利于类胡萝卜素含量的形成,后期

GS、GDH 活性大幅下降,叶片衰老速度加快,氮素再转移效率高,有利于类胡萝卜素的降解。

多酚含量在烤烟成熟期与 NR 活性、叶片铵浓度、可溶性蛋白含量呈极显著负相关,说明 NR、叶片铵、可溶性蛋白等氮代谢相关指标对多酚的形成有一定的影响。由此可见,烟草氮代谢的强弱对多酚和类胡萝卜素香气前体物的形成有显著影响。

表 2 多酚和类胡萝卜素含量与氮代谢相关生理指标的相关分析

Tab.2 The correlation analysis of polyphenol, carotenoid content and related physiological indexes of nitrogen metabolism

指标 Index	NR 活性 NR activity	GS 活性 GS activity	GDH 活性 GDH activity	叶片铵浓度 Leaf NH_4^+	可溶性蛋白含量 Soluble protein	总氮含量 Total N
类胡萝卜素积累量 Content of carotene accumulation	0.581 *	0.515 *	-0.459	0.543	0.631 *	0.188
类胡萝卜素降解量 Content of carotene degradation	0.739 *	0.664 **	0.645 **	0.618 **	0.561	0.527
多酚 Polyphenols content	-0.524 **	-0.436 *	-0.287	-0.489 **	-0.550 **	-0.508

注: ** 和 * 分别表示在 0.01 和 0.05 水平上显著相关。

Note: ** and * denote significance of correlation at 0.01 and 0.05 probability levels respectively.

3 结论与讨论

NR 作为 NO_3^- 同化过程中的第一个关键酶,对作物的光合、呼吸及氮代谢等有重要影响,其活性随着施氮量的增加而增加^[31],豫烟 10 号的 NR 活性在烟叶生长和成熟过程中,无论是低氮或高氮条件下,均与中烟 203 变化一致,说明豫烟 10 号对氮素吸收的能力和与中烟 203 相当。

GS 是氮素代谢中同化和转移 NH_4^+ 的关键酶,也是防止叶片 NH_4^+ 积累到有害浓度的关键酶,本试验结果表明,豫烟 10 号通过 GS 同化的氮素量显著低于中烟 203,使 NH_4^+ 再同化量减少。而在烟叶衰老期间 GDH 活性受到 GS 的影响,在前期受诱导上升表现出合成氨的作用,后期则转变为脱氨作用^[24-25,32]。试验结果显示,随着施氮量的增加,GS、GDH 活性增强,豫烟 10 号在叶龄 50 d 后 GS 活性下降速度较快,而且在叶龄 60 d 时低于中烟 203,各施肥量间表现一致。说明豫烟 10 号的氮代谢遗传特性受施氮量多少或土壤氮供应能力大小的影响较小,即使在较高的氮素供应能力下,也能保持稳定的衰老进程,烟叶落黄好。

衰老速度快的烤烟品种叶片中氮素在衰老过程中再利用时,总氮含量减少的百分率高,且在衰老前期氮素吸收能力和对 NH_4^+ 的再同化能力略强,对 NH_4^+ 的转移能力强,增加施肥量使品种间对 NH_4^+ 的转移特性表现得更加明显。本试验结果表明,GS 等相关酶活性不同决定了氮素转化方式和转移规律,是导致基因型间氮素代谢差异的重要因素。随着施氮量的增加,烤烟氮代谢增强,且品种间豫烟

10 号的氮代谢较中烟 203 明显旺盛。

作为烟草主要的香气前体物,类胡萝卜素和多酚在烟叶成熟过程中的积累、转化和降解,将直接影响烤烟的香气风格、香气质和香气量。烟草香气前体物多为烟草生长过程中由初生代谢派生的次生代谢产物^[33],相关研究表明,植物次生代谢产物受氮素营养水平的调控,如萜类代谢与植物氮素营养水平有关^[34]。烟叶类胡萝卜素及其降解物种类、含量直接决定着烟叶的品质,因此,对类胡萝卜素及相关因素的研究在国内外烟草行业一直是一个热点。类胡萝卜素通过类异戊二烯途径合成,该途径是一个十分庞大的次生代谢途径,从类胡萝卜素与氮代谢各指标的相关性分析可以看出,类胡萝卜素积累期,类胡萝卜素含量与 GS、NR 活性以及可溶性蛋白含量呈显著正相关;类胡萝卜素降解期,类胡萝卜素含量与 GS、GDH 活性以及叶片铵浓度呈极显著正相关,与 NR 活性显著正相关。其中,在成熟后期与 GS、GDH 活性的相关系数分别达 0.664 ** 和 0.645 **。可见,氮素代谢对类胡萝卜素的形成是有显著影响的,在成熟前期,豫烟 10 号的氮代谢较中烟 203 旺盛,豫烟 10 号的类胡萝卜素含量较高;在成熟后期,豫烟 10 号的氮代谢较中烟 203 减弱,氮素再转移量少,有利于烟叶成熟落黄,类胡萝卜素降解量较高。而品种间氮素代谢的差异主要表现在 GS 和 GDH 活性的不同。

不同烤烟产区烤烟独特香气风格的形成与其烟叶中各种质体色素降解产物的协调性有关^[31],而各种质体色素的形成究其根源也和氮素的同化吸收及次生代谢有关。在新叶中,谷氨酰胺的合成主要是

通过叶绿体中的 GS-GOGAT 循环。氮和碳的底物主要来自于硝酸的还原、光呼吸和 TCA 循环^[35-36]。随着叶片的衰老和叶绿体降解,叶绿体中的酶发生改变,GS2-GOGAT 循环的主导地位也被削弱。在老叶中,谷氨酰胺的合成主要来自新表达的 GS1 同工酶,同时 GDH 和蛋白酶也随之表达。GS2 基因的表达是随着叶绿体的成熟和光合作用过程中子叶的发育而开始的^[35-37]。有关 GS 和 GDH 如何作用在烟叶成熟后期,从而影响类胡萝卜素的形成与降解,这有可能来源于 GS 同工酶的特异性作用,需要测定 GS 同工酶的基因表达来做进一步研究。

从多酚与氮代谢各指标的相关性分析可以看出,多酚含量与氮代谢负相关,其中与 NR 活性的相关系数达到 -0.524^{**} 。NR 是植物氮同化代谢关键步骤硝酸盐同化中的限速酶和调节酶,随着 NR 活性的降低, NO_3^- 同化受到抑制,硝酸盐积累。有研究表明,氮素的变化对次生代谢产物的比例有很大影响,同时证明这种影响的原因是硝酸盐作用于苯丙烷代谢的转录调节^[38]。多酚作为次生代谢苯丙烷代谢的产物,受到氮素的调节,与氮代谢有显著的负相关性。

类胡萝卜素降解产物对烤烟香型和香气质量的影响很大,成熟期鲜烟叶类胡萝卜素含量与烤后烟类胡萝卜素降解产物呈极显著的正相关关系^[39]。席元肖等^[40]研究表明,多酚类物质含量越高,对烤烟感官质量越不利,类胡萝卜素含量过高或过低对烟叶的感官质量也不利。本研究结果表明,烤烟成熟前期氮代谢旺盛有利于类胡萝卜素的形成,成熟后期氮代谢强度减弱有利于类胡萝卜素降解产物的形成;烤烟成熟期氮代谢旺盛,则多酚的形成受到抑制,氮素代谢的强弱影响着类胡萝卜素和多酚香气前体物的形成,在生产实际中可以根据调节施氮量来调控氮素代谢从而影响香气前体物的形成,本研究获得类胡萝卜素与多酚含量的平衡点,适宜的供氮水平为 60 kg/hm^2 。

参考文献:

- [1] Sreeramamuthy C H, Arishukumar P H, Nageswararao C R. Change in concentration of nitrogenous constituents in flue-cured tobacco leaf as affected by nitrogen fertilization in vertisols[J]. Tobacco Research, 1996, 22(1): 22-25.
- [2] 史宏志, 韩锦峰. 烤烟碳氮代谢几个问题的探讨[J]. 烟草科技, 1988(2): 34-36.
- [3] 李文卿, 陈顺辉, 江荣风, 等. 不同施氮量对烤烟总氮和烟碱积累的影响[J]. 中国烟草学报, 2007, 13(4): 31-35.
- [4] 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.
- [5] 于存峰, 张峻松, 闫洪洋, 等. 烟草中多酚类化合物研究进展[J]. 河南农业科学, 2008(4): 10-13.
- [6] 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含量的比较[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2005, 31(2): 128-132.
- [7] 黄中艳, 王树会, 朱勇. 云南烤烟化学品质与气候关系的研究[J]. 烟草农业科学, 2006, 2(4): 351-358.
- [8] 姚益群, 谢金轮, 郭其菲, 等. 云南烟草香气研究[J]. 烟草科技, 1998(4): 24-27.
- [9] 李雪震, 张希杰, 李念胜, 等. 烤烟烟叶色素与烟叶品质的关系[J]. 中国烟草, 1988(2): 23-27.
- [10] Snook M E, Mason P F, Sisson V A. Polyphenols in the *Nicotiana Species*[J]. Tob Sci, 1986, 30(18): 43-51.
- [11] Tso T C. Physiology and biochemistry of tobacco plant[M]. Stroudsburg, Pa: Dowden, Hutchison and Ross, 1972: 259, 271.
- [12] 钟庆辉. 烟草芳香吃味化学指标的探索[J]. 烟草科技, 1981(4): 21-23.
- [13] 徐晓燕, 孙五三, 王能如. 烟草多酚类化合物的合成与烟叶品质的关系[J]. 中国烟草科学, 2003, 24(1): 3-5.
- [14] 秦卫普, 赵铭钦, 瞿永生, 等. 不同基因型烤烟烟叶质体色素及其降解产物含量的研究[J]. 江西农业报, 2009, 21(11): 17-19.
- [15] 刘阳, 尹启生, 宋纪真, 等. 不同品种烤烟多酚含量和组成的差异分析[J]. 烟草科技, 2007(8): 32-34.
- [16] 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): 51-55.
- [17] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [18] O'Neal D, Joy K W. Glutamine synthetase of pea leaves: Purification, stabilization, and pH optima[J]. Arch Biochem Biophys, 1973, 159(1): 113-122.
- [19] Turano F J, Dashner R, Upadhyaya A, et al. Purification of mitochondrial glutamate dehydrogenase from dark-grown soybean seedlings[J]. Plant Physiol, 1996, 112(3): 1357-1364.
- [20] 中国科学院上海植物生理研究所, 上海市植物生理学会. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [21] 李应金, 吴玉萍. 烟草中多酚总含量的检测[J]. 光谱实验室, 2006, 23(5): 1127-1129.
- [22] Foyer C H, Noctor G, Lelandais M. Short-term effects of nitrate, nitrite and ammonium assimilation on photosynthesis carbon partition and protein phosphorylation in

- maize[J]. *Planta*, 1994, 192(2): 211 – 220.
- [23] Mo L Y, Wu L H, Tao Q N. Research advances on GS/GOGAT cycle in higher plants[J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2001, 7(2): 223 – 231.
- [24] Masclaux-Daubresse C, Reisdorf-Cren M, Pageau K. Glutamine synthetase-glutamate synthase pathway and glutamate dehydrogenase play distinct roles in the sink-source nitrogen cycle in tobacco[J]. *Plant Physiology*, 2006, 140(2): 444 – 456.
- [25] Skopelitis D S, Paranychianakis N V, Kouvarakis A. The isoenzyme 7 of tobacco NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase exhibits high deaminating and low aminating activities *in vivo* [J]. *Plant Physiology*, 2007, 145(4): 1726 – 1734.
- [26] Masclaux C, Valadier M H, Brugiere N, *et al.* Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence [J]. *Planta*, 2000, 211(4): 510 – 518.
- [27] Masclaux-Daubresse C, Valadier M H, Carrayol E, *et al.* Diurnal changes in the expression of glutamate dehydrogenase and nitrate reductase are involved in the C/N balance of tobacco source leaves[J]. *Plant Cell Environ*, 2002, 25(11): 1451 – 1462.
- [28] Joy K W. Ammonia, glutamine and asparagine: a carbon-nitrogen interface[J]. *Can J Bot*, 1988, 66(10): 2103 – 2109.
- [29] Feller U, Fischer A. Nitrogen metabolism in senescing leaves[J]. *Crit Rev Plant Sci*, 1994, 13(3): 241 – 273.
- [30] 史宏志, 刘国顺. 烟草香味学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 68 – 70.
- [31] 杨虹琦, 周冀衡, 罗泽民, 等. 不同产区烤烟中质体色素及降解产物的研究[J]. *西南农业大学学报*, 2004, 26(5): 641 – 644.
- [32] Purnell M P, Botella J R. Tobacco isoenzyme 1 of NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase catabolizes glutamate *in vivo* [J]. *Plant Physiology*, 2007, 143(1): 530 – 539.
- [33] 王 莉, 史玲玲, 张艳霞, 等. 植物次生代谢物途径及其研究进展[J]. *武汉植物学研究*. 2007, 25(5): 500 – 508.
- [34] 徐 涛, 孔垂华, 胡 飞. 红藟化感作用研究Ⅲ. 挥发油对不同营养水平下植物的化感作用[J]. *应用生态学报*, 1999, 10(6): 748 – 750.
- [35] Dubois F, Brugiere N, Sangwan R S, *et al.* Localization of tobacco cytosolic glutamine synthetase enzymes and the corresponding transcripts shows organ and cell-specific patterns of protein synthesis and gene expression [J]. *Plant Mol Biol*, 1996, 31(4): 803 – 817.
- [36] Ochs G, Schock G, Trischler M, *et al.* Complexity and expression of the glutamine synthetase multigene family in the amphidiploid crop *Brassica napus* [J]. *Plant Mol Biol*, 1999, 39(3): 395 – 405.
- [37] 印莉萍, 柴晓清, 刘祥林, 等. 叶绿体发育和光对小麦叶谷氨酰胺合成酶基因表达的影响[J]. *植物学报*, 1994, 36(8): 597 – 602.
- [38] Christina F, Natalia P R, Regina F, *et al.* Regulation of secondary metabolism by the carbon-nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism[J]. *The Plant Journal*, 2006, 46(4): 533 – 548.
- [39] 王新发, 杨铁钊, 殷全玉, 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.
- [40] 席元肖, 宋纪真, 杨 军, 等. 不同烤烟品种的类胡萝卜素、多酚含量及感官品质的比较[J]. *烟草科技*, 2011(2): 70 – 73.