

## 研究报告 Original Papers

## 不同烤烟品种衰老叶片的无机氮积累及其生理调控

段旺军<sup>1,2</sup>, 李东亮<sup>1</sup>, 戴亚<sup>1\*</sup>, 杨铁钊<sup>2\*</sup>, 李宁<sup>1</sup>, 汪长国<sup>1</sup><sup>1</sup>川渝中烟工业有限责任公司技术研发中心, 成都610066; <sup>2</sup>河南农业大学烟草学院, 郑州450002

**摘要:** 以不同烤烟品种‘红花大金元’和‘中烟100’为试验对象, 研究同一生育期不同部位叶片的无机氮积累及其与氮素代谢和氨挥发的关系。结果表明, 烟草植株下部衰老叶片(第5片叶)  $\text{NO}_3^-$ 和 $\text{NH}_4^+$ 的含量要高于中部叶(第10和第15片叶)和上部叶(第20片叶), 并且‘红花大金元’下部叶 $\text{NO}_3^-$ 和 $\text{NH}_4^+$ 的含量比‘中烟100’显著偏高; ‘中烟100’植株各部位叶片的氨气补偿点比‘红花大金元’高。两个品种在第5到第20叶位间的谷氨酰胺合成酶(GS)、硝酸还原酶(NR)和谷氨酸脱氢酶(GDH)活性大小及其变化不一致, 是叶片无机氮积累存在品种间差异的生理基础。

**关键词:** 烟草; 无机氮; 氨气补偿点; 氮素代谢

## Inorganic N Accumulation and Its Physiological Regulation in Senescing Leaves of Flue-Cured Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Cultivars

DUAN Wang-Jun<sup>1,2</sup>, LI Dong-Liang<sup>1</sup>, DAI Ya<sup>1\*</sup>, YANG Tie-Zhao<sup>2\*</sup>, LI Ning<sup>1</sup>, WANG Chang-Guo<sup>1</sup><sup>1</sup>Research and Development Center, China Tobacco Chuanyu Industrial CO. Ltd., Chengdu 610066, China; <sup>2</sup>College of Tobacco Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

**Abstract:** Accumulation of inorganic nitrogen and its relationship with nitrogen metabolism and ammonia volatilization of different positions of leaves were investigated with different flue-cured tobacco cultivars as experimental subjects. The results indicated that the contents of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  in bottom senescent leaves (leaf 5) were higher than those in middle (leaf 10 and 15) and top leaves (leaf 20) of tobacco, and the contents of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  of ‘Honghuadajinyuan’ were significantly higher than those of ‘Zhongyan100’. And ‘Zhongyan 100’ exhibited higher apoplastic  $\text{NH}_3$  compensation points than ‘Honghuadajinyuan’. The glutamine synthetase (GS), nitrate reductase (NR) and glutamate dehydrogenase (GDH) activities and their changes in leaves of two cultivars were different. These results were physiological basis of the accumulation of inorganic nitrogen differences between cultivars.

**Key words:** *Nicotiana tabacum*; inorganic N;  $\text{NH}_3$  compensation point; nitrogen metabolism

作为一种收获叶片的特殊作物, 氮素是影响烟叶产量和品质最为重要的营养元素。不同的烟草品种具有不同的氮素代谢和肥料利用特性(刘卫群等1998; 杨铁钊等2001)。烟叶衰老期的氮素代谢是烟草生长发育最基本的代谢过程, 氮素代谢的调控方式、强度、协调性对氮素从衰老叶片的再转移利用、通过氨的挥发损失、甚至碳素代谢具有直接的影响, 最终决定烟叶内含物的种类和数量, 对烟叶品质的形成至关重要。据报道, 衰老烟叶能够积累 $\text{NO}_3^-$ 和 $\text{NH}_4^+$  (Masclaux等2000), 但不同基因型烟草的无机氮积累是否存在差异及其生理调控因素未见文献报道。因此, 开展相关研究对深入了解品种的氮素利用特性, 从而指导烟草栽培具有重要意义。

## 材料与方法

### 1 试验材料

烤烟(*Nicotiana tabacum* L.)品种‘红花大金元’和‘中烟100’均为当前我国主栽品种。种子由河南农业大学烟草学院提供。

试验于2011年在河南省平顶山市郟县进行。前茬作物为烟草, 土壤质地为砂壤土, 耕层含17.50  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 有机质、0.79  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 全氮、5.42  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 速效

收稿 2011-12-25 修订 2012-04-17

资助 川渝中烟工业有限责任公司博士后项目(川渝烟工技研[2010]347号-20)。

\* 共同通讯作者(E-mail: dycy@263.net, yangtiezhao@126.com; Tel: 028-86005765)。

氮、4.24 mg·kg<sup>-1</sup>速效磷、88.03 mg·kg<sup>-1</sup>速效钾, pH 7.29。行距110 cm, 株距55 cm。施120 kg·hm<sup>-1</sup>纯氮, N:P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:K<sub>2</sub>O为1:2:3。于5月10日移栽, 7月20日打顶, 留21片叶。采用单因子完全随机区组设计, 重复3次。在8月25日取第5、10、15、20片功能叶(从植株下部往上数)用于试验, 重复3株。

## 2 试验方法

### 2.1 常规化学成分的测定

叶绿素和类胡萝卜素含量采用φ=96%乙醇浸提, 用分光光度法测定(邹琦1995); 叶片硝酸根、可溶性蛋白和铵离子的测定分别采用水杨酸硝化法(邹琦1995)、考马斯亮蓝G-250法(上海市植物生理学会1999)和靛酚蓝比色法(Masclaux等2000)。

### 2.2 质外体提取和测定

叶片的质外体提取参考Husted和Schjoerring (1995)以及Loubet等(2002)的方法。用连续流动分析仪测定质外体铵离子(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)浓度。质外体pH用微电极直接在微型离心管内测定。

### 2.3 氨气补偿点的计算

参考Husted和Schjoerring (1996)、Massad等(2008)以及Herrmann等(2009)的方法, 在质外体pH范围内当K<sub>d</sub><<[H<sup>+</sup>]<sub>apo</sub>时, 根据方程计算氨气补偿点(χ<sub>s</sub>): χ<sub>s</sub> (nmol·mol<sup>-1</sup>)=Γ×K<sub>H</sub>×K<sub>d</sub>。

其中, Γ是质外体铵离子和氢离子浓度之比, 代表不依赖于温度的氨气交换潜力。K<sub>H</sub>和K<sub>d</sub>是热力学常数, 分别为10<sup>-1.76</sup> L·mol<sup>-1</sup>和10<sup>-9.25</sup> mol·L<sup>-1</sup> (25 °C)。但由于质外体中离子生理强度通常在14~28 mmol·L<sup>-1</sup>之间(Cosgrove和Cleland 1983; Speer和Kaiser 1991), 取20 mmol·L<sup>-1</sup>, 依照Debye-Hückel方程(Atkins 1990) K<sub>d</sub>值调整为K<sub>d</sub>'=10<sup>-9.32</sup> mol·L<sup>-1</sup> (25 °C)。

### 2.4 氮素代谢酶活性的测定

采用活体法测定硝酸还原酶(nitrate reductase, NR)活性(邹琦1995), 按照文献的方法测定谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS) (上海市植物生理学会1999)和谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase, GDH) (Turano等1996)活性。

### 2.5 数据处理

采用Excel 2003和SPSS 17.0软件对数据进行处理。

## 结果与讨论

### 1 不同品种烟草叶片色素和可溶性蛋白含量的比较

叶片衰老最显著的特征是叶绿素含量下降, 叶绿素是用于监测衰老进程的主要生物标记之一(Masclaux等2000)。从表1看出, 不同品种叶绿素含量的变化趋势基本一致, 从第20到第5片叶, 叶绿素含量逐步下降, ‘中烟100’比‘红花大金元’下降速度更快。‘中烟100’同一叶位的叶绿素含量显著低于‘红花大金元’。类胡萝卜素对叶绿素分子具有保护作用, 少量类胡萝卜素的存在就能保证叶绿素的正常代谢, 当类胡萝卜素的合成量不足以保护形成的叶绿素分子时, 也会导致叶绿素代谢发生异常, 造成黄化。表1表明, ‘红花大金元’各叶位类胡萝卜素含量变化不大, 而‘中烟100’的第15到第10片叶类胡萝卜素含量大幅下降, 与叶绿素含量的变化趋势一致, 并且‘红花大金元’的类胡萝卜素含量显著高于‘中烟100’。

与叶绿素一样, 可溶性蛋白的变化也可以作为一个衰老标记(Diaz等2008)。从表1可以看出, 可溶性蛋白含量随着叶片衰老而逐步下降, 同一

表1 不同品种烟草叶片色素和可溶性蛋白含量的比较

Table 1 Comparison of foliar pigment and soluble protein contents of leaves between different tobacco cultivars

品种	叶位	叶绿素含量/mg·g <sup>-1</sup> (FW)	类胡萝卜素含量/mg·g <sup>-1</sup> (FW)	可溶性蛋白含量/mg·g <sup>-1</sup> (FW)
‘红花大金元’	5	0.42±0.12*	0.10±0.02*	4.88±0.33*
	10	0.57±0.10*	0.10±0.02*	4.74±0.39*
	15	0.64±0.12*	0.11±0.02*	5.09±0.25*
	20	0.70±0.04*	0.11±0.01*	5.29±0.24*
‘中烟100’	5	0.07±0.05	0.02±0.00	3.63±0.42
	10	0.14±0.02	0.03±0.00	4.05±0.58
	15	0.33±0.06	0.08±0.01	4.61±0.30
	20	0.38±0.12	0.08±0.02	4.25±0.69

\*表示品种间在1%水平差异显著。下表同此。

叶位的‘红花大金元’可溶性蛋白含量显著高于‘中烟100’。

## 2 不同品种烟草叶片硝酸根和铵离子浓度的比较

叶片 $\text{NO}_3^-$ 浓度反映了植物吸收和贮存矿物态氮的能力。图1显示,从第20到第5片叶,‘红花大金元’ $\text{NO}_3^-$ 浓度逐步升高,‘中烟100’呈现先下降,后升高的趋势。两个品种在衰老叶片(第5片叶)中都有 $\text{NO}_3^-$ 的积累,‘红花大金元’达到 $179.41 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (FW),是第20片叶的3倍多;‘中烟100’则为 $77.27 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (FW)。除第20片叶外,‘红花大金元’其它部位叶片中的 $\text{NO}_3^-$ 浓度显著高于‘中烟100’。

叶片中的氮来自硝酸还原、光呼吸和蛋白质、氨基酸的水解(Joy 1993),在衰老叶片中会积累 $\text{NH}_4^+$  (Sutton等1993)。由图1看出,从第20到第5片叶,‘红花大金元’叶片组织 $\text{NH}_4^+$ 浓度呈现逐步升高的趋势,最高达到 $1.99 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  (FW);‘中烟100’只是在第10片叶稍微下降,第5片叶又大幅升高,最高达到 $0.82 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  (FW),‘红花大金元’同叶位

的 $\text{NH}_4^+$ 浓度显著高于‘中烟100’。叶片铵离子与可溶性蛋白的变化趋势基本相反,‘红花大金元’表现更加明显。

以上结果表明,在相同施肥量的条件下,两种基因型烤烟品种‘红花大金元’和‘中烟100’都会老叶中积累无机氮( $\text{NO}_3^-$ 和 $\text{NH}_4^+$ ),前者比后者更易积累无机氮,可能与不同品种植株的衰老特性有关。据报道,不同衰老型作物品种不仅衰老启动时间和衰老速度各异,而且对氮的吸收、贮存和转移利用等均存在差异(Diaz等2005; Martin等2005)。

## 3 不同品种烟草叶片质外体氨气挥发参数的比较

老叶中积累 $\text{NH}_4^+$ 除了与吸收有关外,主要与蛋白质的降解有关。在生育后期,蛋白质降解产生的大部分 $\text{NH}_4^+$ 被重新同化为氨基酸,运出衰老叶片,少部分则通过氨挥发从植物体流失(Schjoerring等1993)。在叶片质外体溶液中存在一定浓度的 $\text{NH}_4^+$ ,维持叶片气孔下腔一定浓度的气体 $\text{NH}_3$ ,这一浓度称为气孔氨气补偿点(stomatal ammonia compensation point,  $\chi_s$ ) (Farquhar等1980)。它是调控植物和大气氨气交流方向和强度的主要参数,由叶片温度、质外体 $\text{NH}_4^+$ 浓度和pH值的大小决定(Massad等2008)。

从表2可以看出,‘红花大金元’质外体 $\text{NH}_4^+$ 浓度最大值为 $0.16 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,出现在第15片叶,而‘中烟100’最大值为 $0.25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,出现在第20片叶,并随着叶位的下降而降低。与叶片组织相反,两个品种在老叶的质外体中都没有积累 $\text{NH}_4^+$ 的现象,可能与植株的 $\text{NH}_4^+$ 再转移和氨挥发这两个生理过程有关。同部位间比较,除了‘中烟100’第20片叶显著高于‘红花大金元’外,其它部位二者差异不显著。‘红花大金元’各叶位质外体pH显著低于‘中烟100’,两品种值最大值分别为6.99和7.12,均出现在第20片叶。品种间的氨气补偿点差异显著,‘中烟100’显著大于‘红花大金元’;‘中烟100’最大值为 $27.08 \text{ nmol}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,‘红花大金元’最大值为 $11.18 \text{ nmol}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,分别出现在第20和第15片叶。显然,‘红花大金元’氨气补偿点的峰值出现比‘中烟100’晚,而且氨气挥发潜力小。

## 4 不同品种烟草叶片氮素代谢关键酶活性的比较

NR是氮代谢过程中的关键酶,可以用其活性

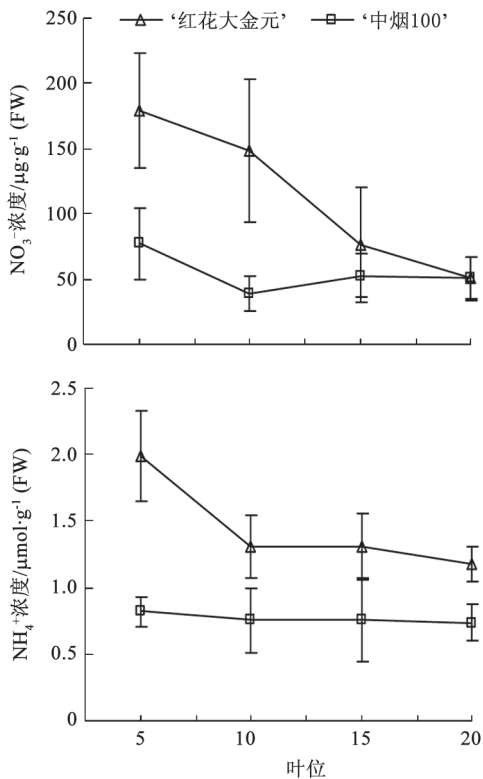


图1 不同品种烟草叶片硝酸根和铵离子浓度的比较  
Fig.1 Comparison of nitrate and ammonium ion concentrations of leaves between different tobacco cultivars

表2 不同品种烟草叶片质外体氨气挥发参数的比较

Table 2 Comparison of apoplastic parameters of ammonia emission of leaves between different tobacco cultivars

品种	叶位	质外体NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> 浓度/mmol·L <sup>-1</sup>	质外体pH	氨气补偿点/nmol·mol <sup>-1</sup>
‘红花大金元’	5	0.09±0.01	6.45±0.05*	2.20±0.27*
	10	0.14±0.06*	6.93±0.11*	9.39±2.76*
	15	0.16±0.03*	6.91±0.10*	11.18±4.30*
	20	0.09±0.03*	6.99±0.08*	7.35±3.73*
‘中烟100’	5	0.10±0.04	7.11±0.04	10.51±3.78
	10	0.19±0.03	7.02±0.09	16.85±5.71
	15	0.22±0.08	6.99±0.06	17.96±7.16
	20	0.25±0.07	7.12±0.04	27.08±5.43

作为衡量氮代谢强度的指标。由图2看出,从第20到第5叶片,两品种NR活性逐渐下降,‘中烟100’各叶位NR活性比‘红花大金元’高。从生理角度看,NO<sub>3</sub><sup>-</sup>的吸收和还原反应不平衡是造成NO<sub>3</sub><sup>-</sup>积累的根本原因。NR是一个诱导酶,其活性受光照、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>等的诱导,但本试验测得的NR活性与不同品种、不同叶位NO<sub>3</sub><sup>-</sup>浓度呈相反关系,表明衰老叶片中NR活性下降不是由NO<sub>3</sub><sup>-</sup>减少引起的,可能受某种代谢物的抑制,也可能与NO<sub>3</sub><sup>-</sup>在细胞内的代谢库和贮存库分布有关(董晓英等2003)。

烟叶中NH<sub>4</sub><sup>+</sup>的积累受到相关代谢酶活性的调控,其中GS是把无机氮同化为有机氮的关键酶。作物GS活性与衰老呈负相关关系,随着衰老受抑制(Masclaux-Daubresse等2005)。图2表明,两品种不同叶位GS活性的变化呈单峰曲线,但峰值出现时间有差异,‘红花大金元’在第10叶位达到高峰,然后下降,‘中烟100’在第15叶位达到高峰。从第20到第5片叶,‘红花大金元’GS活性稳步升高,‘中烟100’呈现“降-升-降-升”总体下降的趋势。与‘红花大金元’相比,‘中烟100’叶片GS活性不但升高得早,下降也早,表明二者衰老速度有差异。此外,GS也是调控植物和大气氨气交流的关键酶(Mattsson等1997),正是GS活性的下降导致了作物氨气补偿点的升高(Massad等2008)。

作为另外一个氮素代谢的关键酶,GDH具有同化NH<sub>4</sub><sup>+</sup>和分解氨基酸的双重功能,同时又是衰老和氮素再活化的标记,在叶片衰老过程中GDH的活性升高(Masclaux等2000)。图2表明,虽然‘红花大金元’老叶的GDH活性大于‘中烟100’,但是‘中烟100’GDH活性最大值在第20叶位,‘红花大金元’在第5叶位,两品种GDH活性最大值在叶位间

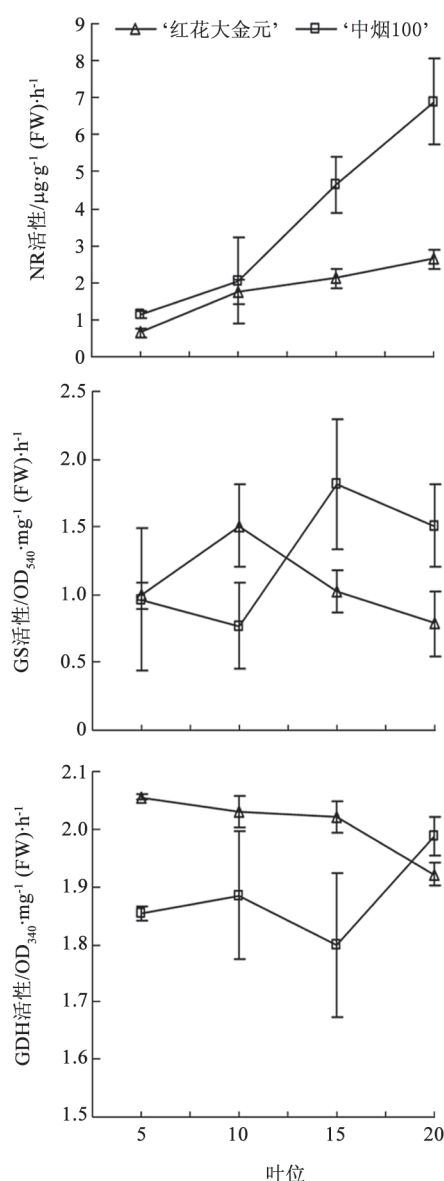


图2 不同品种烟草叶片氮素代谢关键酶活性的比较  
Fig.2 Comparison of the activities in key enzymes of N metabolism of leaves between different tobacco cultivars



存在差异。GDH活性升高与 $\text{NH}_4^+$ 积累(图1)关系密切, Tercé-Laforgue等(2004)的研究表明, 当烟草叶片氮素再转移效率最高时, GDH基因的转录和酶活性非常低, 而当氮素再转移受阻或叶片 $\text{NH}_4^+$ 积累时GDH活性受到高度诱导。

### 参考文献

- 董晓英, 李式军, 沈仁芳(2003). 白菜不同品种对硝酸盐吸收积累差异原因初探. 园艺学报, (4): 470~472
- 刘卫群, 韩锦峰, 史宏志, 王延亭, 李怀方(1998). 数种烤烟品种中碳氮代谢与酶活性的研究. 中国农业大学学报, 3 (1): 22~26
- 上海市植物生理学会(1999). 现代植物生理学实验指南. 北京: 科学出版社
- 杨铁钊, 林彩丽, 丁永乐, 许自成, 舒海燕(2001). 不同基因型烟草对氮素营养响应的差异研究. 烟草科技, 157 (6): 32~35
- 邹琦(2000). 植物生理学实验指导. 北京: 中国农业出版社
- Atkins PW (1990). Physical Chemistry. Oxford: Oxford University Press
- Cosgrove DJ, Cleland RE (1983). Solutes in the free space of growing tissues. Plant Physiol, 72: 326~331
- Diaz C, Lemaître T, Christ A, Azzopardi M, Kato Y, Sato F, Morot-Gaudry J-F, Dily FL, Masclaux-Daubresse C (2008). Nitrogen recycling and remobilization are differentially controlled by leaf senescence and development stage in *Arabidopsis* under low nitrogen nutrition. Plant Physiol, 147: 1437~1449
- Diaz C, Purdy S, Christ A, Morot-Gaudry J-F, Wingler A, Masclaux-Daubresse C (2005). Characterization of markers to determine the extent and variability of leaf senescence in *Arabidopsis*. A metabolic profiling approach. Plant Physiol, 138: 898~908
- Farquhar GD, Firth PM, Wetselaar R, Weir B (1980). On the gaseous exchange of ammonia between leaves and the environment. Determination of the ammonia compensation point. Plant Physiol, 66: 710~714
- Herrmann B, Mattsson M, Jones SK, Cellier P, Milford C, Sutton MA, Schjoerring JK, Neftel A (2009). Vertical structure and diurnal variability of ammonia exchange potential within an intensively managed grass canopy. Biogeosciences, 6: 15~23
- Husted S, Schjoerring JK (1995). Apoplastic pH and ammonium concentration in leaves of *Brassica napus* L.. Plant Physiol, 109: 1453~1460
- Husted S, Schjoerring JK (1996). Ammonia flux between oilseed rape plants and the atmosphere in response to changes in leaf temperature, light intensity and air humidity. Plant Physiol, 112: 67~74
- Joy KW (1988). Ammonia, glutamine and asparagine: a carbon-nitrogen interface. Can J Bot, 66: 2103~2109
- Loubet B, Milford C, Hill PW, Tang YS, Cellier P, Sutton MA (2002). Seasonal variability of apoplastic  $\text{NH}_4^+$  and pH in an intensively managed grassland. Plant Soil, 238: 97~110
- Martin A, Belastegui-Macadam X, Quilleré I, Floriot M, Valadier MH, Pommel B, Andrieu B, Donnison I, Hirel B (2005). Nitrogen management and senescence in two maize hybrids differing in the persistence of leaf greenness: agronomic, physiological and molecular aspects. New Phytol, 167 (2): 483~492
- Masclaux C, Valadier MH, Brugiere N, Morot-Gaudry JF, Hirel B (2000). Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. Planta, 211: 510~518
- Masclaux-Daubresse C, Carrayol E, Valadier M-H (2005). The two nitrogen mobilisation- and senescence-associated *GSI* and *GDH* genes are controlled by C and N metabolites. Planta, 221: 580~588
- Massad RS, Loubet B, Tuzet A, Cellier P (2008). Relationship between ammonia stomatal compensation point and nitrogen metabolism in arable crops: Current status of knowledge and potential modelling approaches. Environ Pollut, 154: 390~403
- Mattsson M, Hausler RE, Leegood RC, Lea PJ, Schjoerring JK (1997). Leaf atmosphere  $\text{NH}_3$  exchange in barley mutants with reduced activities of glutamine synthetase. Plant Physiol, 114 (4): 1307~1312
- Schjoerring J, Kyllingsbaek A, Mortensen J, Byskov-Nielsen S (1993). Field investigations of ammonia exchange between barley plants and the atmosphere. I: Concentration profiles and flux densities of ammonia. Plant Cell Environ, 16: 161~167
- Speer M, Kaiser WM (1991). Ion relations of symplastic and apoplastic space in leaves from *Spinacia oleracea* L. and *Pisum sativum* L. under salinity. Plant Physiol, 97: 990~997
- Sutton MA, Fowler D, Moncrieff JB, Storeton-West RL (1993). The exchange of atmospheric ammonia with vegetated surfaces II: fertilized vegetation. Q J Roy Meteor Soc, 119: 1047~1070
- Tercé-Laforgue T, Mack G, Hirel B (2004). New insights towards the function of glutamate dehydrogenase revealed during source-sink transition of tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants grown under different nitrogen regimes. Physiol Plant, 120: 220~228
- Turano FJ, Dashner R, Upadhyaya A, Caldwell CR (1996). Purification of mitochondrial glutamate dehydrogenase from dark-grown soybean seedlings. Plant Physiol, 112: 1357~1364