

潘宇琪,潘首慧,陈 东,等. 烤烟氮胁迫响应基因的筛选及氮胁迫分析[J]. 江苏农业科学,2025,53(4):111-119.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2025.04.013

# 烤烟氮胁迫响应基因的筛选及氮胁迫分析

潘宇琪<sup>1,2</sup>, 潘首慧<sup>3</sup>, 陈 东<sup>1,2</sup>, 张新旺<sup>1,2</sup>, 许恬菊<sup>1,2</sup>, 陈风雷<sup>4</sup>, 黄 莺<sup>1,2</sup>

(1. 贵州大学烟草学院, 贵州贵阳 550025; 2. 贵州省烟草品质研究重点实验室, 贵州贵阳 550025;

3. 贵州省烟草公司安顺市公司, 贵州安顺 561000; 4. 中国烟草总公司贵州省公司, 贵州贵阳 550000)

**摘要:**氮胁迫直接影响烤烟的生产与品质。为探究烤烟对于低氮、高氮胁迫作出的响应,利用 RNA-Seq 方法对打顶后的烤烟叶片进行分子机制研究。结果显示,在 375 个响应低氮胁迫的基因中,有 240 个基因表现出上调的特征,135 个基因则出现了下调的情况;另外,在 1 079 个响应高氮胁迫的基因中,有 691 个基因表现出上调的特征,388 个则出现了下调的情况。GO 注释和 KEGG 显著性富集分析发现,氮信号主要对烤烟碳氮代谢、烟碱合成产生影响,筛选出氮代谢关键基因 9 个,碳代谢关键基因 11 个。低氮胁迫差异基因主要富集在各种转移酶活性及转运相关的囊泡等条目中,在低氮胁迫下,多种转移蛋白活性被抑制,能量转运减少;葡萄糖-1-磷酸转化被抑制,促使更多蔗糖合成,优先补偿碳代谢;*L*-天冬酰胺酶上调,天冬氨酸被更多地转化为天冬酰胺而非  $\alpha$ -亚氨基琥珀酸,影响烟碱形成。高氮胁迫的差异基因主要富集到与光合作用相关的条目与通路,叶绿素 a/b 结合蛋白 7、叶绿素 a/b 结合蛋白 16 及叶绿素 a/b 结合蛋白 40 基因和天冬氨酸转氨酶基因上调,直接或间接地促进 CO<sub>2</sub> 固定,更多的碳代谢产物被用于氮代谢中,使烤后烟叶中氮含量过度积累,碳氮代谢失衡;谷氨酰胺合成酶下调,氮更多地流向了烟碱形成途径而非氨基酸合成途径;查尔酮合酶 1B 基因下调,优先保证 1-*N* 甲基吡咯咯啉的转化,促进烟碱形成。

**关键词:**烤烟;RNA-seq;氮胁迫;碳氮代谢

**中图分类号:**S572.01 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2025)04-0111-09

氮是影响烤烟品质及产量的重要营养物质,参与烤烟体内碳、氮代谢等重要生物过程<sup>[1]</sup>。N 的供应不足或过量都会对烤烟品质产生显著影响。植物在低氮胁迫下,叶片形态大小、干物质质量、硝酸还原酶(NR)、谷氨酸合成酶(GOGTA)以及亚硝酸还原酶(NiR)等氮代谢相关酶活性降低,全株氮积累量下降但利用效率提高<sup>[2-3]</sup>。低氮下光合作用基因受到显著抑制,特别是叶绿素 a/b 结合蛋白基因下调<sup>[4]</sup>。含氮化合物、烟碱含量与施氮量呈正相关,总糖、还原糖含量相反,各生育时期的淀粉酶活性都随施氮量增加而增加<sup>[5-9]</sup>。过量施用氮肥则会导致烤烟根系发育受到抑制,防御相关蛋白酶活性降低,且烤烟生长后期贪青晚熟,烤后烟叶品质不

佳等情况<sup>[10-11]</sup>。研究认为随着施氮量增加,导致烟草体内糖代谢减弱以及  $\alpha$ -酮戊二酸回补能力降低,是烟草体内碳氮代谢失衡的主要原因之一<sup>[12]</sup>。以上结论只针对氮代谢的单一指标进行研究,很难真实反映出植物体内错综复杂的含氮化合物的变化。组学技术为此提供了解决方法,利用组学技术对植物环境压力进行筛选并揭示其机制成为近年来的研究热点。张玉宁等利用蛋白组学、代谢组学等技术揭示了环境胁迫下氮代谢过程的复杂过程<sup>[13-15]</sup>。本研究用 RNA-Seq 的方法,分析氮胁迫下烤烟基因的变化,试图从转录组学的角度分析烤烟响应氮胁迫相关的基因差异表达以及差异代谢途径,为深入了解烤烟响应氮胁迫的耐性分子机制提供基础数据支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验地点和材料

试验于 2022 年在贵州省安顺市西秀区杨武乡(106°E、26°N)进行。供试土壤为黄壤,有机质含量 47.38 g/kg,全氮含量 2.25 g/kg,碱解氮含量 175.19 mg/kg,有效磷含量 16.31 mg/kg,速效钾含

收稿日期:2024-02-18

基金项目:中国烟草总公司贵州公司科技项目(编号:2023XM12)。

作者简介:潘宇琪(1999—),男,贵州六盘水人,硕士研究生,主要从事烟草营养与施肥研究。E-mail:1552031764@qq.com。

通信作者:陈风雷,硕士,高级农艺师,硕士生导师,主要从事优质烟叶栽培技术研究,E-mail:cfl-fenglei@163.com;黄 莺,硕士,副教授,硕士生导师,主要从事烟草营养与施肥及土壤环境化学研究,E-mail:316452492@qq.com。

量 84.38 mg/kg, pH 值 5.48。试验品种为我国主要种植品种烤烟云烟 87。

## 1.2 试验设计与方法

1.2.1 试验设计 设置 3 个 N 肥施用水平(以 N 计),分别为低氮处理(LN)60 kg/hm<sup>2</sup>、正常氮处理(CK)105 kg/hm<sup>2</sup>、高氮处理(HN)150 kg/hm<sup>2</sup>。打顶后 10 d,采集烤烟中部叶,混合后得到样品,称取 20 g(鲜重)左右在超低温冰箱( $T \leq -80\text{ }^{\circ}\text{C}$ )中保存,用于转录组测序。

1.2.2 化学成分含量测定 采用烟草行业的标准方法<sup>[16-18]</sup>,对烟叶烟碱、总氮、总糖以及还原糖的浓度进行测定。

1.2.3 经济性状 根据烤烟 42 级国家标准<sup>[19]</sup>,对所有原烟的等级进行划分,并以当地收购价格作为参考。此外,对每个等级的产量、平均价格、产值以及上等烟中上等烟的比重等进行精确的统计。

1.2.4 转录组学测定 RNA 提取:取 1 g 保存完好的鲜样,置于研钵中倒入液氮研磨,使其呈细微的颗粒后加入 1 mL RNA 提取试剂,在室温下静置 5 min;加入 1/5 体量的三氯甲烷,上下摇晃后再次在室温下静置 5 min;在 8 939 r/min、4  $^{\circ}\text{C}$  的条件下离心 15 min;将离心过后的上层清液取出倒入新的离心管中,加入与上清液等量的 2-丙醇上下摇晃至均匀状态,在室温下静置 5 min;在同样条件下离心 10 min;加入 1 mL 75% 乙醇对离心管中的沉淀进行清洗;再次以上述条件离心 5 min;保留沉淀并使其干燥;加 DEPC 水溶解沉淀。之后采用 Nano Drop 2000 分光光度计(Thermo Scientific, USA)和 Agilent 2100 Bioanalyze (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) 检查 RNA 的纯度和评估 RNA 完整性。

转录组文库构建:将 mRNA 分离与片段化。使用 VAHTS Universal V5 RNA-Seq Library Prep Kit 试剂盒构建文库。通过使用具有寡聚物(dT)的磁珠富集 mRNA,并利用片段化技术将其转录成单链

cDNA。接着,使用模板和随机引物,合成双链 cDNA,以实现更高效的 cDNA 转录。通过纯化、末端修复以及添加 polyA,双链 cDNA 被连接到接合器上,并且根据片段的大小进行 PCR 扩增。使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 评价构建好的 cDNA 文库质量。

转录组测序:采用 Illumina Nova Seq 6000 测序平台(USA)对文库进行测序,并生成 150 bp 生物功能双端读长。采用 Fastp 软件进行读长过滤后获得干净读长用于后续数据分析<sup>[20]</sup>。使用 HISAT2 软件将测序结果与烤烟的基因组比对,并进行基因表达量的计算,并通过 HTSeq-count 获得每个基因的读长计数<sup>[21]</sup>。每个样品 3 次生物学重复,使用 R (v3.2.0)对基因进行 PCA 分析以及绘图,以评估样本生物学重复。利用 DESeq2 软件进行差异表达基因分析,其中符合  $Q$  值  $< 0.05$  且 fold change  $> 2$  或 fold change  $< 0.5$  阈值的基因被定义为差异表达基因<sup>[22]</sup>。

差异表达基因功能分析:通过欧易生物分析云平台、茄科基因组数据库(Sol Genomics network, SGN)、基因本体数据库(Gene Ontology Resource, GO)及京都基因与基因组百科全书数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)深入探究差异表达基因的特殊功用,并将其特殊功用注解、富集,以期获得更加准确的研究结果。然后从中筛选出与碳氮代谢相关的差异表达基因。

## 2 结果与分析

### 2.1 转录组测序数据质量评估

对原始的测序结果进行过滤,得到的干净读长在 38.62 ~ 40.32 Mb 之间, Q30 均在 95.20% 以上。97.28% ~ 98.19% 测序序列能映射到已公布的烤烟基因组数据库(表 1),唯一映射率为 84.40% ~ 87.15%,各样本的测序质量较好,可以进行后续分析。

表 1 样品测序数据质量表

样品名称	原始读长 (Mb)	干净读长 (Mb)	总映射 (bp)	总映射率 (%)	唯一映射 (bp)	唯一映射率 (%)	Q30 (%)	GC (%)
CK	38.94	38.62	37 849 201	98.19	33 609 144	87.15	95.36	42.90
LN	40.71	40.32	38 975 398	97.28	38 975 398	84.40	95.20	43.36
HN	39.16	38.83	37 684 268	97.64	33 499 830	86.70	95.38	43.12

### 2.2 氮胁迫下的差异表达基因

由图 1 可以看出,低氮胁迫下共获得 375 个差异基因,其中 240 个差异基因上调,135 个差异基因

下调;高氮胁迫下共获得 1 079 个差异基因,其中 691 个差异基因上调,388 个差异基因下调。韦恩图显示响应低氮胁迫与高氮胁迫的相同基因有 67 个,

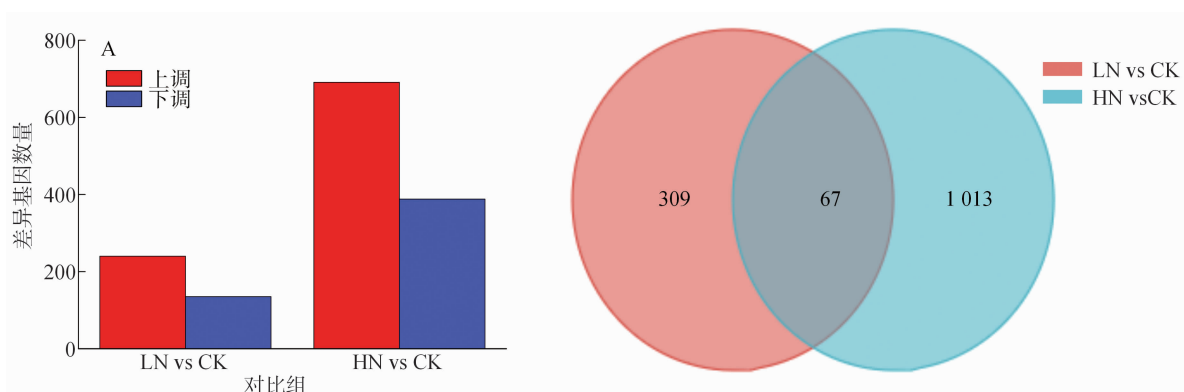


图1 不同氮胁迫下打顶 10 d 后烟叶差异表达基因数量与差异表达基因韦恩图

响应高氮胁迫的特有差异基因有 1 013 个,响应低氮胁迫的有 309 个,这说明高氮胁迫对烤烟生长代谢的影响更大。

GO 功能注释主要分为三大独立板块:生物过程、分子功能和细胞组分。将差异表达基因进行 GO 富集功能分类, LN 和 CK 之间共富集到 650 条条目, HN 和 CK 之间共富集到 1 181 条条目。在图 2 中显示出了 GO 富集最显著的前 30 条条目。

由图 2 可知, LN 和 CK 的差异基因参与的生物

过程除细胞过程外, 还有化合物代谢过程、生物过程的调节、对环境变化的反应、生物调节及发育过程等, 对免疫系统、生长过程等也有影响。低氮胁迫下差异基因描述的分子功能主要是结合, 其次是催化活动、转运体活动, 还有酶调节活性、抗氧化活性、结构分子活性和电子载流子活性等。差异基因所处的细胞组分主要是细胞、细胞组分, 其次是细胞器、膜、膜组分、细胞器组分等, 影响最小的主要是胞外区。

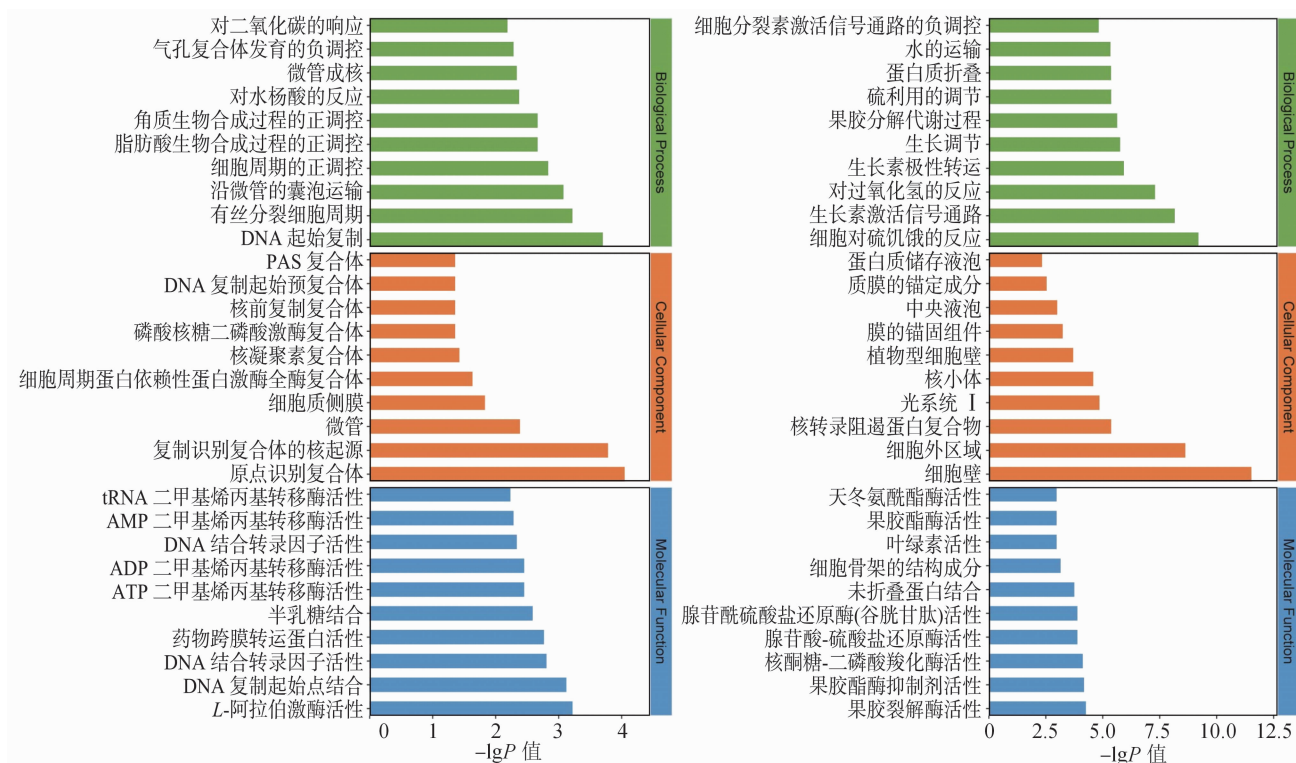


图2 LN 和 CK 组、HN 和 CK 组 GO 功能富集图

HN 和 CK 的差异基因参与的生物功能主要是细胞过程, 其次是各种化合物代谢过程、对外界刺激的响应、生物调节及生物过程的调节。高氮胁迫

下差异基因参与的分子功能主要是结合, 其次是催化活动以及转运体活动等, 对分子传感器活性、翻译调控活性等的影响较小。差异基因参与的细胞

组分主要是细胞,其次是细胞组分、细胞器、膜、膜组分以及细胞器等,影响最小主要是膜封闭、胞外区和拟核。

LN 胁迫下特有的条目有 217 条,包括生物功能中的 DNA 起始复制过程、沿微管的囊泡运输、对二氧化碳的响应等,分子功能中的 *L*-阿拉伯激酶活性、ATP-二甲基烯丙基转移酶活性、ADP-二甲基烯丙基转移酶活性、AMP-二甲基烯丙基转移酶活性、tRNA-二甲基烯丙基转移酶活性等,细胞组分中的原点识别复合体、复制识别复合物的核起源等。HN 胁迫下特有的条目有 748 条,生物功能中的光合作用、光收集过程、调控次生芽形成过程、苯丙烷代谢过程的调控等,分子功能中核酮糖-二磷酸羧化酶活性、硫代葡萄糖苷生物合成过程的调控等是 LN 胁迫下没有的。

通过 KEGG 通路数据库对基因注释进行解析。LN 和 CK 之间共富集到 50 条通路,HN 和 CK 之间共富集到 91 条。图 3 显示了富集最显著的前 20 条。

由图 3 可知, LN 和 CK 中差异基因主要富集在植物激素信号转导,各种生物碱的生物合成, C-支链二元酸代谢,硫代葡萄糖苷生物合成,赖氨酸生物合成,玉米素生物合成,硫磺酸和次硫磺酸代谢,色氨酸代谢,苯丙氨酸代谢,倍半萜类化合物和三萜类化合物生物合成,缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成,二萜类生物合成,异喹啉酸生物碱生物合成,硫胺素代谢,半乳糖代谢,赖氨酸降解,脂肪酸伸长率,泛酸和辅酶 A 的生物合成,苯丙烷生物合成,丙酮酸代谢,

色氨酸代谢,苯丙氨酸代谢,倍半萜类化合物和三萜类化合物生物合成,缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成,二萜类生物合成,异喹啉酸生物碱生物合成,硫胺素代谢,半乳糖代谢,赖氨酸降解,脂肪酸伸长率,泛酸和辅酶 A 的生物合成,苯丙烷生物合成,丙酮酸代谢等。

而在 HN 和 CK 中差异基因主要富集在植物激素信号转导, MAPK 信号通路-植物,鞘糖脂生物合成神经节系列,硫代谢,糖胺聚糖降解,黄酮类生物合成,氨基氨基酸代谢,二苯乙烯类二芳基庚烷类和姜辣素生物合成,光合作用-天线蛋白,各种植物次生代谢产物的生物合成,托烷、哌啶和吡啶生物碱的生物合成,氮代谢,泛酸和辅酶 A 的生物合成,戊糖和葡萄糖醛酸相互转化,淀粉和蔗糖代谢,精氨酸和脯氨酸代谢,半乳糖代谢,苯丙烷生物合成,谷胱甘肽代谢等。

仅在 LN 胁迫下富集的 KEGG 通路有 4 条,分别是萜类骨架生物合成通路、基础转录因子、二萜类生物合成以及 C-支链二元酸代谢。而 HN 中特有的通路有 46 条,其中有氮代谢、光合作用-天线蛋白、托烷、哌啶和吡啶生物碱的生物合成、精氨酸生物合成、组氨酸代谢以及苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成等。

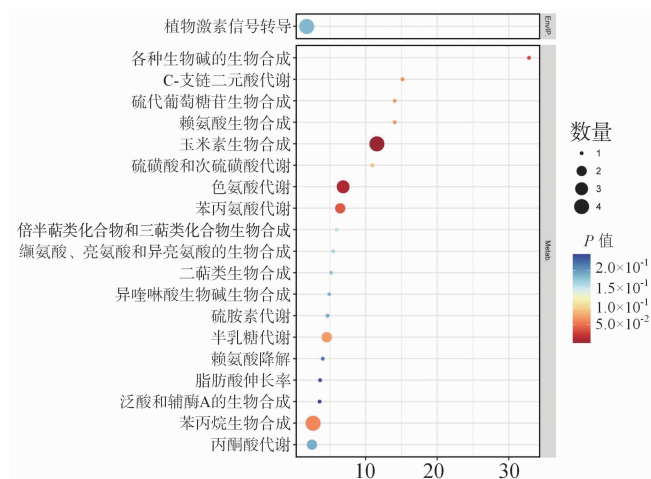


图3 LN 和 CK、HN 和 CK KEGG 气泡图

### 2.3 烤烟氮代谢对氮胁迫的响应

通过比对茄科数据库 ([https://solgenomics.sgn.cornell.edu/organism/Nicotiana\\_tabacum/edwards\\_et\\_al\\_2017](https://solgenomics.sgn.cornell.edu/organism/Nicotiana_tabacum/edwards_et_al_2017)) 对不同处理筛选到的基因进行基因注释。从 LN vs CK 的 KEGG 通路中共筛选到与氮代谢相关的基因 3 个(表 2),分别是编码多酚氧化酶 E 基因(*Nitab4.5\_0003171g0010*)、断马钱子

苷合成酶基因(*Nitab4.5\_0001073g0090*)和 *L*-天冬酰胺酶/ $\beta$ -天冬氨酸胺酶基因(*Nitab4.5\_0000412g0050*)。

从 HN vs CK 的 KEGG 通路中共筛选到相关基因 6 个(表 2),分别是编码高亲和力硝酸盐转运蛋白 2.5 基因(*Nitab4.5\_0002255g0010*、*Nitab4.5\_0007682g0010*)、谷氨酰胺合成酶基因(*Nitab4.5\_*

0000777g0010)、尼古丁 *N*-去甲基酶基因(*Nitab4. 5\_0009277g0010*)、查尔酮合酶 1B 基因(*Nitab4. 5\_0003904g0060*)和天冬氨酸氨基转移酶基因(*Nitab4. 5\_0000052g0220*)。

表 2 氮胁迫下氮代谢差异基因

对比组	基因 ID	基因名称	通路	调控	<i>P</i> 值	表达值 倍数变化
LN vs CK	<i>Nitab4. 5_0001073g0090</i>	断马钱子苷合成酶	各种生物碱的生物合成	上调	0.018 714 211	5.790 180 972
	<i>Nitab4. 5_0000412g0050</i>	<i>L</i> -天冬酰胺酶/ $\beta$ -天冬氨酸 肽酶	丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢, 氨基酸代谢	上调	0.025 896 139	2.146 165 240
	<i>Nitab4. 5_0003171g0010</i>	多酚氧化酶 <i>E</i>	酪氨酸代谢, 异喹啉生物碱生物合成	下调	0.201 322 187	0.029 545 66
HN vs CK	<i>Nitab4. 5_0002255g0010</i>	高亲和力硝酸转运蛋白 2.5	氮代谢	下调	0.023 499 833	0.459 384 827
	<i>Nitab4. 5_0007682g0010</i>	高亲和力硝酸转运蛋白 2.5	氮代谢	下调	0.001 530 928	0.405 473 285
	<i>Nitab4. 5_0000777g0010</i>	谷氨酰胺合成酶	精氨酸生物合成, 氮代谢, 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢, 乙醛酸和二羧酸代谢	下调	0.002 830 380	0.427 796 805
	<i>Nitab4. 5_0000052g0220</i>	天冬氨酸氨基转移酶	精氨酸生物合成, 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢, 半胱氨酸与蛋氨酸代谢, 精氨酸与脯氨酸代谢, 酪氨酸代谢, 异喹啉生物碱生物合成, 苯丙氨酸代谢, 苯丙氨酸、酪氨酸与色氨酸生物合成, 生物中的碳固定, 托烷、哌啶和吡啶生物碱的生物合成	上调	0.000 533 122	3.562 031 831
	<i>Nitab4. 5_0009277g0010</i>	尼古丁 <i>N</i> -去甲基酶	托烷、哌啶和吡啶生物碱生物合成	下调	0.035 511 916	0.232 531 746
	<i>Nitab4. 5_0003904g0060</i>	查尔酮合酶 1B	黄酮生物合成, 昼夜节律-植物, 托烷、哌啶和吡生物碱的生物合成	下调	0.013 436 842	0.490 227 814

2.4 烤烟碳代谢对氮胁迫的响应

由表 3 可知, 从 LNvsCK 的 KEGG 通路中共筛选到碳代谢相关的基因 2 个, 分别是编码丙酮酸激酶同工酶 A 基因(*Nitab4. 5\_0003815g0060*)和 UDP-糖焦磷酸化酶基因(*Nitab4. 5\_0002557g0050*)。

从 HNvsCK 的 KEGG 通路中共筛选到相关基因 9 个(表 3), 分别是叶绿素 *a/b* 结合蛋白 7 基因(*Nitab4. 5\_0004269g0080*)、叶绿素 *a/b* 结合蛋白 16 基因(*Nitab4. 5\_0000982g0200*)、叶绿素 *a/b* 结合蛋白 40 基因(*Nitab4. 5\_0001434g0050*)、天冬氨酸转氨酶基因(*Nitab4. 5\_0000052g0220*)、 $\beta$ -果糖呋喃糖苷酶基因(*Nitab4. 5\_0003404g0040*)、葡萄糖-1-磷酸腺苷酸转移酶基因(*Nitab4. 5\_0009972g0030*)、ATP 依赖性 6-磷酸果糖激酶 2 基因(*Nitab4. 5\_0000928g0020*)、蔗糖合成酶 6 基因(*Nitab4. 5\_0001180g0180*)、1,4- $\alpha$ -葡聚糖支链酶 2-2 基因(*Nitab4. 5\_0003541g0040*)。

2.5 氮胁迫对烤烟生长及烟叶品质的影响

从植物外观形态鉴定氮胁迫最为直观。图 4 是不同供氮水平下烤烟的田间表现。试验地力水平下, 团棵期 CK、HN 差异不显著, LN 处理叶色较浅, 略黄。采烤期, CK 正常落黄, LN 提前落黄且叶色浅淡、叶片窄小, HN 叶片宽大且落黄延迟, LN、HN 处

理从外观形态上表现出明显的缺素或过量胁迫症状。

由表 4 可知, 烤后烟叶氮的含量随着施氮量的增加而显著增加。LN 胁迫下, 还原糖、淀粉和烟碱含量与 CK 相比均未达到显著差异, 但总糖却显著高于 CK; HN 胁迫与 LN 胁迫相似, 水溶性总糖、还原糖、淀粉和烟碱含量与 CK 相比均未达到显著差异水平, 但是水溶性总糖、还原糖以及淀粉含量均低于对照处理, 且烟碱含量升高。糖氮比随着施氮量的增加而降低, 两糖比以 CK 协调性最佳。

由表 5 可知, HN 处理相较于 CK 生物产量提高, 但是经济产量及产值均显著降低。LN 条件下, 经济产量与 CK 无显著差异, 但是因为中上等烟率低, 导致产值降低。

综上, LN、HN 处理相较于 CK, 从外观、内在化学成分和经济性状上均表现出氮缺乏、氮过量的胁迫症状。

3 讨论与结论

3.1 烟株氮胁迫的界定

氮是影响烟叶产量和品质最为重要的营养元素, 轻微的氮胁迫会引起植株生理生化过程改变, 严重的甚至导致外观变化<sup>[23]</sup>。LN、HN 处理的烟株,



表 3 氮胁迫下的碳代谢差异基因

对比组	基因 ID	基因名称	通路	调控	P 值	表达值 倍数变化
LN vs CK	<i>Ntub4.5_0003815g0060</i>	丙酮酸激酶同工酶 A	糖酵解/糖异生, 丙酮酸代谢	上调	0.018 714 211	5.790 180 972
	<i>Ntub4.5_0002557g0050</i>	UDP-糖焦磷酸化酶	戊糖和葡萄糖醛酸相互转化, 半乳糖代谢, 氨基糖和核糖代谢, 抗坏血酸和醛酸代谢	下调	0.025 896 139	2.146 165 240
HN vs CK	<i>Ntub4.5_0004269g0080</i>	叶绿素 a/b 结合蛋白 7	光合作用-天线蛋白	上调	0.024 123 388	2.292 515 613
	<i>Ntub4.5_0000982g0200</i>	叶绿素 a/b 结合蛋白 16	光合作用-天线蛋白	上调	0.044 928 516	2.213 087 781
	<i>Ntub4.5_0001434g0050</i>	叶绿素 a/b 结合蛋白 40	光合作用-天线蛋白	上调	0.024 692 757	2.770 530 713
	<i>Ntub4.5_0000052g0220</i>	天冬氨酸氨基转移酶	精氨酸生物合成, 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢, 半胱氨酸与蛋氨酸代谢, 精氨酸与脯氨酸代谢, 酪氨酸代谢, 苯丙氨酸代谢, 苯丙氨酸, 酪氨酸与色氨酸生物合成, 光合生物中的碳固定, 异喹啉生物碱生物合成, 托烷、哌啶和吡啶生物碱生物合成	上调	0.000 533 122	3.562 031 831
	<i>Ntub4.5_0000928g0020</i>	ATP 依赖性 6-磷酸果糖激酶 2	糖酵解/糖异生, 磷酸戊糖途径, 果糖和甘露糖代谢, 半乳糖代谢, RNA 降解	下调	0.000 728 005	0.221 669 902
	<i>Ntub4.5_0003404g0040</i>	$\beta$ -果糖呋喃糖苷酶	半乳糖代谢, 淀粉和蔗糖代谢	上调	0.021 075 603	4.995 558 956
	<i>Ntub4.5_0001180g0180</i>	蔗糖合成酶 6	淀粉和蔗糖代谢	下调	0.039 514 918	0.436 092 962
	<i>Ntub4.5_0009972g0030</i>	葡萄糖-1-磷酸腺苷酸转移酶	淀粉与蔗糖代谢, 氨基糖与核苷酸糖代谢	下调	0.003 797 311	0.470 918 787
	<i>Ntub4.5_0003541g0040</i>	1,4- $\alpha$ -葡聚糖支链酶 2-2	淀粉和蔗糖代谢	上调	0.034 884 505	2.463 310 722



从左至右分别为 LN、CK、HN。上排为团棵期，下排为采收期

图4 不同氮水平下烤烟的外观形态

在打顶后 10 d 外观有明显变化, 烤后烟叶的化学品质和经济性状降低, 说明均已处于缺氮和氮过量的胁迫状态。

3.2 烤烟氮代谢及烟碱合成对氮胁迫的响应

氮是植物生长发育过程中必需的营养物质以

及信号分子, 铵态氮与硝态氮是植物吸收无机态氮的主要形态。本研究中, 高氮胁迫促使高亲和硝酸盐转运蛋白 2.5 (NRT 2.5) 基因显著下调, 这表示烤烟内的低亲和力转运系统可能替代高亲和力硝酸转运系统以此进行硝酸转运, 减少植物对氮的转

表 4 氮胁迫下烤后烟叶化学品质

处理	总糖含量 (%)	还原糖含量 (%)	淀粉含量 (%)	氮含量 (%)	烟碱含量 (%)	糖氮比	两糖比
LN	36.04a	25.49a	16.80a	1.41c	1.68a	25.56	0.71
CK	26.34b	20.16a	12.27a	1.73b	1.80a	15.23	0.77
HN	25.81b	17.25a	9.34a	2.01a	2.18a	12.84	0.67

注:同列数据后不同小写字母表示各施氮处理差异显著( $P<0.05$ )。下表同。

表 5 氮胁迫下烤烟经济性状表

处理	生物产量 (kg/667 m <sup>2</sup> )	经济产量 (kg/667 m <sup>2</sup> )	产值 (元/667 m <sup>2</sup> )	中上等烟率 (%)
LN	138.15a	111.98a	2 912.29a	84.84
CK	133.02a	120.96a	3 359.19a	86.96
HN	134.68a	40.14b	1 079.63b	28.92

运,主动避免过多硝态氮累积对植物的伤害<sup>[24-25]</sup>。当铵态氮充足时,谷氨酰胺合成酶活性升高,以存储更多的氮。研究中高氮条件下谷氨酰胺合成酶基因显著下调,可能是因为氮更多地流向了生物碱合成途径,而非氨基酸合成途径。

在烤烟氮代谢中,烟碱是极为重要的品质指标,是产生生理依赖的原因,还影响了烟草的香吃味<sup>[26]</sup>。天冬氨酸氨基转移酶在植物体内催化天冬氨酸和 2-氧代戊二酸由草酰乙酸和谷氨酸生成的途径,天冬氨酸作为烤烟烟碱合成的前体物质,其含量也影响着烟碱的合成<sup>[27]</sup>。LN 胁迫下,*L*-天冬酰胺酶基因显著上调意味着天冬氨酸被更多地转化为天冬酰胺而非  $\alpha$ -亚氨基琥珀酸,这可能是低氮下烟碱含量较低的原因。HN 处理则提高了天冬氨酸氨基转移酶活性,导致天冬氨酸含量升高进而使烟碱含量上升。

氮胁迫除了影响烟碱形成前体物外,对其形成和降解过程也产生了影响。在高氮胁迫下,查尔酮合酶 1B 基因下调,表明 1-*N* 甲基吡咯啉鎓的转化促进了烟碱的生物合成而非类黄酮类物质的生成(图 5)。另外,尼古丁 *N*-去甲基酶基因下调,表明去甲基尼古丁的生物合成在高氮下受到抑制,这一过程减少了去甲基烟碱的形成,也降低了烟碱的降解,可能是施氮水平高导致烟碱含量增加的又一途径<sup>[28]</sup>。而在 LN 处理下,多酚氧化酶 E 基因下调影响了异喹啉生物碱的合成;断马钱子苷合成酶基因的上调可能导致茄碱和番茄碱含量上升,但由于其占烤烟总生物碱的比例太小,烟草总生物碱含量较

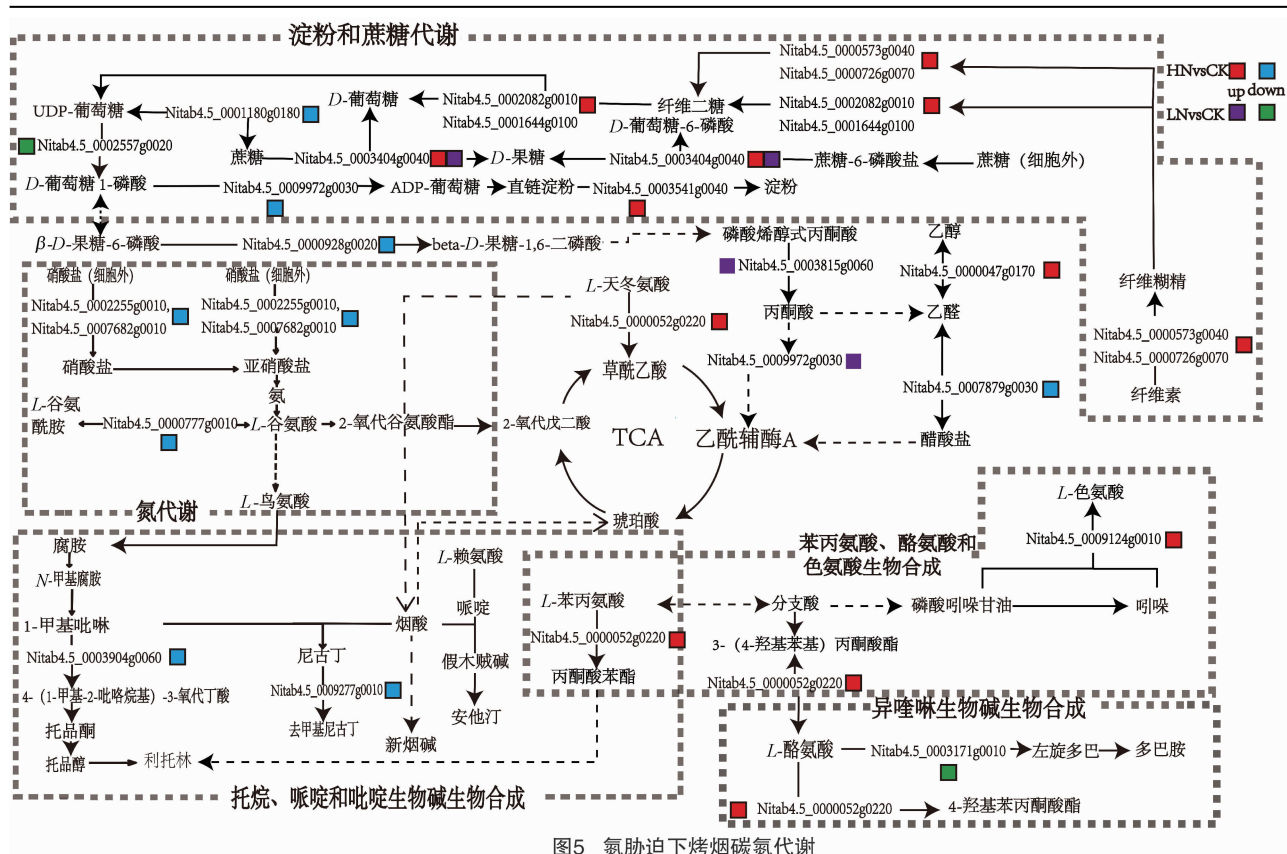
CK 依然降低。

### 3.3 烤烟碳代谢对氮胁迫的响应

碳代谢的中心是光合作用。烟草进行 HN 处理后,叶绿素 a/b 结合蛋白 7、叶绿素 a/b 结合蛋白 16 及叶绿素 a/b 结合蛋白 40 基因显著上调,合成更多的叶绿素以促进光合作用,进而促进 C 的固定<sup>[29-30]</sup>。与其他作物一样,HN 使烟叶天冬氨酸转氨酶基因上调,促进 CO<sub>2</sub> 的固定。

作为植物能量代谢的碳代谢、蔗糖代谢两大部分,蔗糖合酶(SS)和 UDP-葡萄糖焦磷酸化酶(UDPG)的催化作用使得蔗糖代谢发生了一种可逆的变化,即 SS 将果糖转化为蔗糖,从而维持植物体内蔗糖浓度的稳定性。HN 下 SS 显著下调,抑制了蔗糖合成,Yang 等在烤烟根系中也观察到了相同现象<sup>[31]</sup>。蔗糖的分解代谢中, $\beta$ -果糖呋喃糖苷酶上调,使蔗糖持续分解为果糖及葡萄糖,积累量下降。HN 处理可以显著降低葡萄糖-1-磷酸腺苷酸转移酶(GPAT)的活性,从而阻碍腺苷二磷酸葡萄糖(ADPG)的生成,这种情况下,淀粉的生产量可能会大幅度减少<sup>[32]</sup>。另外,HN 下的 1,4- $\alpha$ -葡聚糖支化酶 2-2 基因(*GBSS2-2*)的上调促进直链淀粉链合成支链淀粉,这表明了 HN 不仅抑制淀粉的合成,还会促使淀粉结构改变。在 LN 条件下,UDP-糖焦磷酸化酶表达量下调(图 5),葡萄糖-1-磷酸盐转化为 UDP-葡萄糖的过程受抑制,而葡萄糖-1-磷酸来源于葡萄糖,所以这可能是 LN 下烤烟糖含量较高的原因之一。

ATP-磷酸果糖激酶是控制糖酵解/糖异生途



径第一步的关键酶,催化果糖-6-磷酸形成果糖-1,6-二磷酸,这个反应阻碍了果糖-6-磷酸向蔗糖和淀粉转化,整个糖酵解/糖异生过程都受到该酶的控制。HN 诱导该酶的基因显著下调,抑制了糖酵解/糖异生途径,蔗糖合成受抑制。丙酮酸激酶作为糖酵解的终止步骤,它通过无法逆转的方式把磷酸烯醇式丙酮酸的高能磷酸基团从 ADP 转换到 ATP 和丙酮酸。在 LN 条件下,为了补偿碳代谢,烟叶中丙酮酸激酶同工酶 A 显著上调,促进丙酮酸的生成,以提高对碳的利用效率,这与 Ambasht 等的研究结果<sup>[33-34]</sup>一致。

### 3.4 氮代谢对烤烟碳氮平衡的影响

烤烟内部的碳氮代谢平衡对于烤烟的产量品质形成有着极为重要的影响,碳氮代谢是烤烟生长发育的基础,它们之间的联系非常密切,不仅存在着彼此的限制,也存在着协同的作用,即氮代谢的进行需要碳代谢提供碳源和能量,而碳代谢则需要氮代谢提供酶和光合色素,这种双向的交换使得烤烟的生长发育受到至高的保障,从而决定了其产量和品质的高低<sup>[35]</sup>。

对于差异基因的 GO 以及 KEGG 分析显示, LN 使各种转移酶活性及转运相关的囊泡等条目受到

十分显著的抑制,氮供应不足时碳代谢优先满足自身代谢所需能量,降低了转移蛋白酶活性,这一点也可以从丙酮酸激酶同工酶 A 基因的显著上调可以看出;此外, LN 下减少葡萄糖-1-磷酸的转化,促使更多蔗糖合成,优先补偿碳代谢,烟叶叶色较浅,这些都体现了低氮下氮代谢强度不高、碳代谢增强。通过 L-天冬酰胺酶上调,天冬氨酸被更多地转化为天冬酰胺而非  $\alpha$ -亚氨基琥珀酸,影响了烟碱形成。

HN 的差异基因主要富集到与光合作用相关的条目与通路,叶绿素 a/b 结合蛋白和天冬氨酸转氨酶基因的上调,直接或间接地促进了 C 固定,烟叶外观叶色也较为浓绿。结合对烤后烟叶含氮量增加看来,光合作用强度增大是为了提供更多的能量来进行氮代谢,符合大部分研究报道的耗“碳”得“氮”的规律,这应该是导致高氮下碳氮代谢失衡的原因。值得一提的是,打顶后 HN 处理下烟株获得的氮,因为谷氨酰胺合成酶的下调,更多地流向了烟碱形成途径而非氨基酸合成途径。此时,烟碱形成途径也发生着变化,查尔酮合酶 1B 基因下调,阻止了氮代谢产物向非黄酮类化合物的转移,保证了 1-N 甲基吡咯啉鎓的转化,以便合成更多的烟碱。



## 参考文献:

- [1] 韩锦峰, 刘国顺, 韩富根, 等. 氮素用量、形态和种类对烤烟生长发育及产量品质影响的研究[J]. 中国烟草学报, 1992, 1(1): 44–52.
- [2] 谷闻东, 刘春娟, 李 邦, 等. 外源色氨酸对低氮胁迫下高粱苗期叶片碳氮平衡和衰老特性的影响[J]. 中国农业科学, 2023, 56(7): 1295–1310.
- [3] Yang R Z, Yang J P, Yu J, et al. Effects of different nitrogen application rates on the quality and metabolomics of cigar tobacco[J]. Agronomy Journal, 2022, 114(2): 1155–1167.
- [4] 陈 莹, 王 茜, 杨春燕, 等. 高羊茅光合作用与激素信号对低氮胁迫的转录组响应[J]. 中国草地学报, 2023, 45(2): 26–34.
- [5] 习向银, 晁逢春, 陈 亚, 等. 不同施氮量对烤烟氮素和烟碱累积的影响[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2008, 30(5): 110–115.
- [6] 王 冠. N 素调控对烤烟碳氮代谢规律及产质量影响研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2013: 21–29.
- [7] 王广山, 陈卫华, 薛超群, 等. 烟碱形成的相关因素分析及降低烟碱技术措施[J]. 烟草科技, 2001(2): 38–42.
- [8] 黄 佳, 李 信, 王子一, 等. 种植密度和施氮量对烤烟碳氮代谢关键酶及品质的影响[J]. 江苏农业科学, 2023, 51(9): 82–88.
- [9] 邱宝平, 郭濛濛, 李德贤, 等. 氮用量及氮磷钾配比对晒红烟品质的影响[J]. 山东农业科学, 2016, 48(1): 83–86.
- [10] 熊承飞, 陈军桥, 杨 莉, 等. 不同施氮量对铜仁烟区烤烟生长发育及品质的影响[J]. 种子科技, 2021, 39(22): 21–24.
- [11] 杨永锋. 钼氮配施对烤烟发育及产质量形成的影响[D]. 郑州: 河南农业大学, 2021: 14–26.
- [12] Chen Y J, Ren K, He X, et al. The response of flue-cured tobacco cultivar K326 to nitrogen fertilizer rate in China[J]. The Journal of Agricultural Science, 2020, 158(5): 371–382.
- [13] 张玉宁, 史宏志, 王 景, 等. 高、低硝态氮营养条件下烟草根系基因表达谱及代谢途径的差异分析[J]. 烟草科技, 2019, 52(4): 1–8.
- [14] 冯新维. 不同施氮水平下烤烟氮代谢的蛋白组学应答研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2022: 9–41.
- [15] 党 伟, 姚怡帆, 黄海霞, 等. 不同氮素水平下烟草品种‘NC89’叶片代谢组变化[J]. 植物生理学报, 2022, 58(4): 687–698.
- [16] 国家烟草专卖局. 烟草及烟草制品 水溶性糖的测定 连续流动法: YC/T 159—2002[S]. 北京: 中国标准出版社, 2002: 399–401.
- [17] 国家烟草专卖局. 烟草及烟草制品 总植物碱的测定 连续流动法: YC/T 160—2002[S]. 北京: 中国标准出版社, 2002: 403–407.
- [18] 国家烟草专卖局. 烟草及烟草制品 总氮的测定连续流动法: YC/T 161—2002[S]. 北京: 中国标准出版社, 2002: 411–413.
- [19] 国家烟草专卖局. 烤烟: GB 2635—1992[S]. 北京: 中国标准出版社, 1992.
- [20] Chen S F, Zhou Y Q, Chen Y R, et al. Fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor[J]. Bioinformatics, 2018, 34(17): i884–i890.
- [21] Kim D, Langmead B, Salzberg S L. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements[J]. Nature Methods, 2015, 12: 357–360.
- [22] Love M I, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. Genome Biology, 2014, 15(12): 550.
- [23] 崔保伟, 陆引罡, 张振中, 等. 不同施氮量对烤烟生理特性及化学品质的影响[J]. 山地农业生物学报, 2008, 27(5): 377–381.
- [24] 王 娟, 陈皓宁, 石大川, 等. 花生高亲和硝酸盐转运蛋白基因 *AhNRT2.7a* 响应低氮胁迫的功能研究[J]. 中国农业科学, 2022, 55(22): 4356–4372.
- [25] 罗翔宇. 不同施氮水平对美人蕉生理指标的影响[J]. 山西林业科技, 2013, 42(3): 29–31.
- [26] 杨淳婷. 嫁接及低烟碱栽培模式对烟叶生物碱等化学成分及质量的影响[D]. 郑州: 河南农业大学, 2023: 9.
- [27] 王巧兰, 吴礼树, 赵竹青, 等. 氮、磷、钾配施对水稻植株氮损失的影响[J]. 湖北农业科学, 2010, 49(5): 1060–1064.
- [28] Pakdeechanuan P, Teoh S, Shoji T, et al. Non-functionalization of two CYP82E nicotine N-demethylase genes abolishes normicotine formation in *Nicotiana glauca* [J]. Plant & Cell Physiology, 2012, 53(12): 2038–2046.
- [29] 逯久幸, 苗润田, 王司琦, 等. 低温胁迫下秋菊叶片光系统特性分析[J]. 植物生理学报, 2022, 58(2): 425–434.
- [30] 钱雪松, 黄人杰, 周俊成, 等. 烟草碳代谢产物及关键酶基因对移栽期的响应[J]. 江苏农业科学, 2024, 52(6): 117–124.
- [31] Yang H J, Zhang Y N, Zhou Y, et al. Transcriptome analysis of tobacco root response to different concentrations of nitrate[J]. Agronomy Journal, 2020, 112(2): 1111–1125.
- [32] 鲁佳林, 陈 娇, 李瑞雪, 等. 玉米 ACPase 小亚基基因的扩张分析[J]. 玉米科学, 2023, 31(5): 25–33.
- [33] Ambasht P K, Kayastha A M. Plant pyruvate kinase[J]. Biologia Plantarum, 2002, 45(1): 1–10.
- [34] 郭红霞, 王创云, 邓 妍, 等. 藜麦对低氮胁迫的响应研究[J]. 作物杂志, 2023(3): 221–229.
- [35] 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.