

李丽华, 杨铁钊, 张小全, 等. 不同基因型烟草叶片成熟过程中质体色素降解及相关酶活性变化[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(3): 65–68.

不同基因型烟草叶片成熟过程中质体色素降解及相关酶活性变化

李丽华¹, 杨铁钊¹, 张小全¹, 李 飞¹, 康雪莉¹, 王 东¹, 武云杰¹, 符新妍¹, 岳修强²

(1. 河南农业大学烟草学院, 河南郑州 450002; 2. 湖南省安仁县烟草公司, 湖南安仁 423600)

摘要:以不同烟草品种(系)云烟 87、中烟 100、豫烟 10 号、豫烟 11 号和 8306 中部叶片为材料, 分析了烟叶成熟过程中质体色素降解和相关酶活性变化及其与烤后烟叶中性致香物质含量的关系。结果表明, 在成熟过程中烟叶的质体色素含量呈下降趋势, 叶绿素的降解量总体大于类胡萝卜素, 且叶绿素 a 的降解量显著高于叶绿素 b。中烟 100 前期叶绿素合成较多, 降解也较为迅速, 但成熟后期降解缓慢; 豫烟 11 号成熟期质体色素降解量较大, 质体色素降解产物较高。脂氧合酶活性在烟叶成熟过程中呈现先升后降的趋势, 且与类胡萝卜素的降解量呈极显著正相关。在不同烟草品种(系)间质体色素降解量及中性致香物质总量均表现为豫烟 11 号 > 豫烟 10 号 > 8306 > 中烟 100 > 云烟 87, 品种间中性致香物质形成与质体色素的最大积累量无关, 与质体色素的降解量有关, 脂氧合酶活性较高、质体色素降解量大的品种(系)中性致香物质含量较高。

关键词:烟草; 基因型; 质体色素; 中性致香物质

中图分类号:S572.01 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)03-0065-04

烟草质体色素主要包括叶绿素(chlorophyll, Chl)和类胡萝卜素(carotenoid, Car)^[1], 主要存在于烟叶细胞的细胞器质体中, 是烟草生长过程中光合作用的重要物质, 对改善烟叶品质和提高烟叶工业可用性具有重要意义^[2-3]。质体色素是烟叶重要的香气前体物, 其本身不具有香味特征, 但通过分解、转化可形成对烟叶香气品质有重要贡献的香气成分^[4]; 烟叶质体色素的降解产物是所测定的中性致香物质中含量最高的, 占中性致香物质总量的 85%~96%^[5], 其中类胡萝卜素

降解产物的含量占 8%~12%, 对烟叶香气质量的影响较大^[6]。不同基因型烟草质体色素的合成与降解量存在较大差异^[7]。

前人研究认为, 脂氧合酶(lipoxygenase, LOX)既是烟叶类胡萝卜素降解的关键酶^[8], 又与烟叶叶绿素降解有关^[9]。烟叶类胡萝卜素在 LOX 作用下氧化降解产生 β -二氢大马酮、巨豆三烯酮、 β -紫罗兰酮等致香物质^[8], LOX 及其过氧化产物的氧化漂白作用使烟草叶绿素降解成新植二烯等致香物质^[10], 但烟叶成熟过程中质体色素的降解及脂氧合酶的调控作用和与烤后烟叶中性致香物质含量的关系尚不明了。因此, 本研究选取 5 个不同基因型烟草品种对烟叶成熟过程中质体色素含量、脂氧合酶活性变化及烤后烟叶中性致香物质含量进行分析, 以揭示色素降解与烟叶香气物质含量的关系, 并探讨烟叶成熟过程中脂氧合酶与质体色素降解的关系, 为揭示浓香型特色优质烟叶形成机理和提高烟叶香气物质含量提供理论支撑。

收稿日期: 2013-07-11

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

作者简介: 李丽华(1987—), 女, 河南濮阳人, 硕士研究生, 主要从事烟草品质遗传改良研究。E-mail: lilihua11yan@163.com。

通信作者: 杨铁钊, 教授, 博士生导师, 主要从事烟草品质遗传改良研究。E-mail: yangtiezhao@126.com。

[11] 介晓磊, 杜 君, 刘世亮, 等. 不同有机酸营养对不同成熟度烤烟内在品质的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2008, 14(4): 734–741.

[12] 冉定邦, 李天福, 陈 萍, 等. 成熟度, 施肥量, 留叶数与烟叶组织结构和比叶重的关系[J]. 中国烟草, 1993(2): 2–6.

[13] 石 磊, 查宏波. 烤烟施氮量、采摘成熟度关系的试验研究[J]. 云南烟草, 1998(2): 54–62.

[14] 李宏光, 钟 权, 谷文南, 等. 提高烤烟上部烟叶质量的几项关键栽培技术研究[J]. 湖南农业科学, 2012, 1(8): 15–18.

[15] 查宏波, 石 磊, 卯志勇, 等. 株行距、施氮量及打顶留叶长度对云烟 97 农艺性状和化学成分的影响[J]. 烟草科技, 2012(12): 39–43.

[16] 张学杰. 不同氮源和打顶方式对烟叶生长发育和质量品质的影响[D]. 郑州: 河南农业大学, 2011.

[17] 国家烟草专卖局. YC/T 159—2002 烟草及烟草制品 连续流动法测定常规化学成分测量不确定评定指南 第 1 部分: 水溶性糖[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.

[18] 国家烟草专卖局. YC/T 160—2002 烟草及烟草制品 连续流动法测定常规化学成分测量不确定评定指南 第 2 部分: 总植物碱[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.

[19] 国家烟草专卖局. YC/T 161—2002 烟草及烟草制品 连续流动法测定常规化学成分测量不确定评定指南 第 3 部分: 总氮[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.

[20] 国家烟草专卖局. YC/T 217—2007 烟草及烟草制品 连续流动法测定常规化学成分测量不确定评定指南 第 5 部分: 钾[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.

[21] 曹务栋, 潘文杰, 薛小平, 等. 不同留叶数对烤烟新品系兴烟 1 号生长及产值的影响[J]. 耕作与栽培, 2009, 5(5): 13–14, 43.

1 材料与方法

1.1 试验设计

试验于 2012—2013 年在河南省许昌市进行,以云烟 87、中烟 100、豫烟 10 号、豫烟 11 号和 8306(遗传上稳定的品系) 5 个烟草品种作为参试材料。试验采用单因子完全随机区组设计,3 次重复,每个小区种植面积 330 m²,行株距为 120 cm × 50 cm。5 月 2 日移栽,按照大田优质烟叶生产管理方法管理。每个品种各选取整齐一致的单株,以第 11 张叶(自下向上数)为试验对象,在叶龄 40、50、60、70、80 d(以幼叶长 1 cm、宽 0.5 cm 时作为叶龄 1 d)取样测定质体色素(叶绿素 a、叶绿素 b、类胡萝卜素)含量和脂氧合酶活性,各项指标测定重复 3 次。

采用三段式烘烤工艺进行调制,各基因型烟叶在统一的烘烤环境中烘烤,按 GB 2635—1992《烤烟》进行分级,初烤烟样用于中性致香物质含量测定。

1.2 测定项目与方法

采用分光光度计法测定质体色素的含量^[11];脂氧合酶(LOX)活性参照文献[12]的方法测定。

采用内标法测定烟叶中性致香物质香气成分。中性致香物质提取及定性定量分析采用 HP5890-5972 气质联用仪。GC/MS 分析条件如下:HP-5 色谱柱(60 m × 0.25 mm × 0.25 μm);载气 He,流速 0.8 mL/min;进样口温度 250 ℃;传输线温度 280 ℃;离子源温度 177 ℃;升温程序:50 ℃保持 2 min 后,以 2 ℃/min 的速度升至 120 ℃,5 min 后再以 2 ℃/min 的速度升至 240 ℃,保持 30 min;分流比 1:15,进样量 2 μL;电离能 70 eV;质量数范围 50~500 amu;MS 谱库为 NIST02;采用内标法定量。

1.3 数据处理

采用 SPSS 17.0 数据处理系统和 Microsoft Excel 2003 软件对数据进行分析。

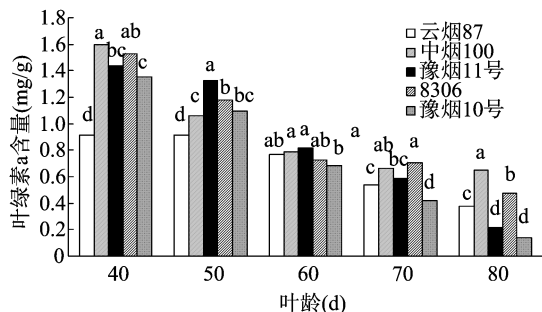
2 结果与分析

2.1 不同基因型烟草叶片叶绿素含量的动态变化

由图 1、图 2 可知,不同基因型烟草叶片中叶绿素的含量动态变化趋势类似。叶绿素含量随成熟期的推进而逐渐下降,但品种(系)间含量存在差异,云烟 87 叶绿素 a 含量在叶龄 40~60 d 变化平稳,叶龄 60~80 d 呈直线下降趋势;豫烟 11 号、8306 和豫烟 10 号较大幅度下降出现在叶龄 50~60 d;叶绿素 b 在整个成熟过程中下降幅度小于叶绿素 a,变化比较平缓。因此,在烟叶成熟期,叶绿素 a 和叶绿素 b 的比值虽大于 1,但逐渐减小;同一叶龄不同基因型烟草叶片的叶绿素含量存在明显差异,中烟 100 叶龄 40 d 时含量最大,而在叶龄 50 d 时含量偏低,叶龄 80 d 时含量仍然最高,表明中烟 100 前期叶绿素合成较多,其降解也较为迅速,但成熟后期降解缓慢;叶龄 80 d 时豫烟 10 号叶绿素含量最少,仅为 0.172 mg/g;豫烟 10 号叶绿素降解量最大,为 1.904 mg/g,云烟 87 降解量最小,为 0.989 mg/g。

2.2 不同基因型烟草叶片类胡萝卜素含量的动态变化

由图 3 可知,不同基因型烟草叶片在叶龄 40 d 时类胡萝卜素含量均已达到最大值,随着成熟期叶龄增加,类胡萝卜素



不同小写字母表示相同叶龄、不同品种间差异显著($P < 0.05$);下同

图1 不同基因型烟草叶片成熟过程中叶绿素a含量动态变化

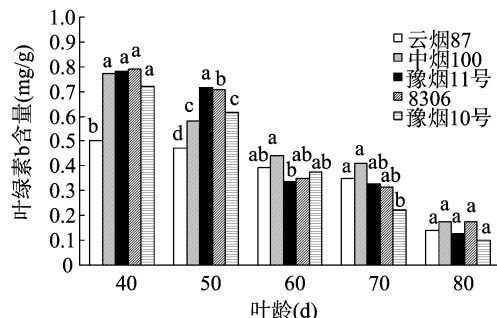


图2 不同基因型烟草叶片成熟过程中叶绿素b含量动态变化

含量呈现逐渐下降的趋势。不同基因型烟草叶片类胡萝卜素含量和变化动态有很大差异,中烟 100 在整个成熟过程中类胡萝卜素含量均最高,说明中烟 100 在成熟过程中类胡萝卜素降解较缓慢;除叶龄 70~80 d 时豫烟 11 号类胡萝卜素含量最少外,云烟 87 在整个成熟过程中含量最低;豫烟 11 号在叶龄 40~50 d 降幅平稳,叶龄 50~60 d 处于大量降解时期;8306 在叶龄 60~70 d 降幅最大。不同品种(系)生长成熟期间类胡萝卜素降解量表现为豫烟 11 号 > 8306 > 豫烟 10 号 > 中烟 100 > 云烟 87,且豫烟 11 号烟叶叶龄 80 d 时类胡萝卜素含量最低,降解最为充分。

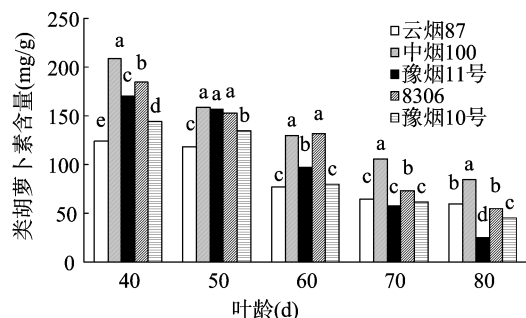


图3 不同基因型烟草叶片成熟过程中类胡萝卜素含量动态变化

2.3 不同基因型烟草叶片脂氧合酶活性的动态变化

LOX 是一种含非血红素铁的蛋白质,它专一催化含有顺,顺-1,4-戊二烯结构的多元不饱和脂肪酸加氧反应,生成具有共轭双键的过氧化物^[13]。本试验结果(图 4)表明,烟叶成熟过程中,脂氧合酶的活性呈现明显的倒“V”形特征;不同基因型烟草叶片脂氧合酶活性和变化动态有很大差异,在叶龄 40~50 d 时酶活性变化较平稳,叶龄 50~60 d 时酶活

性迅速攀升且 60 d 出现最大峰值,之后迅速下降,8306 脂氧合酶在叶龄 70 d 时仍保持较高活性;豫烟 11 号叶龄 40 d 时脂氧合酶活性最低,为 2.76 $D_{234\text{ nm}}/(g \cdot \text{min})$,叶龄 60 d 时达到各品种最大值 15.4 $D_{234\text{ nm}}/(g \cdot \text{min})$,说明该时期豫烟 11 号烟叶代谢比较旺盛,8306 在整个成熟过程中脂氧合酶活性均较高。

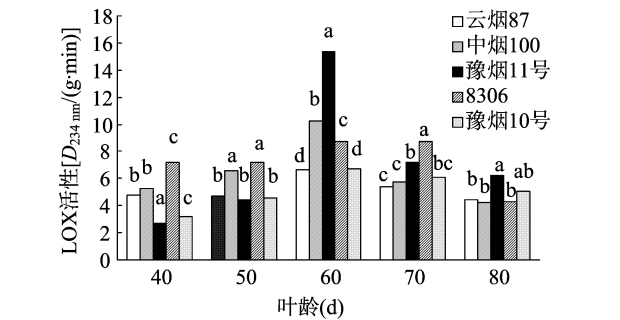


图4 不同基因型烟草叶片成熟过程中脂氧合酶活性动态变化

2.4 不同基因型烟草叶片成熟过程中质体色素与酶活性的相关分析

不同品种(系)烟草叶片在成熟过程中叶龄间质体色素降解量与相同叶龄内脂氧合酶活性的相关分析结果表明,在整个生育期内脂氧合酶活性与类胡萝卜素降解量和总质体色素降解量均呈极显著 ($P < 0.01$) 正相关,相关系数分别为 0.661 **, 0.663 **, LOX 对类胡萝卜素的降解起着至关重要

的作用;脂氧合酶活性与叶绿素 a 和叶绿素 b 的降解量呈正相关,但未达显著水平(相关系数 0.404, 0.203)(表 1),因此 LOX 的作用对不同品种(系)烟草叶片成熟过程中叶绿素的降解很重要,但 LOX 可能不是叶绿素降解唯一的关键酶。

表 1 烟叶成熟过程中质体色素降解量与酶活性的相关性分析	
项目	LOX 活性 [$D_{234\text{ nm}}/(g \cdot \text{min})$]
叶绿素 a	0.404
叶绿素 b	0.203
叶绿素	0.298
类胡萝卜素	0.661 **
总质体色素	0.663 **

注:“ ** ”表示在 0.01 水平显著相关。

2.5 不同基因型烟草叶片质体色素降解产物含量的分析

新植二烯是烟叶中叶绿素降解的重要香气成分之一,也是烟叶中性挥发性香气成分中含量最高的成分。新植二烯本身不仅具有一定的香气,而且可分解转化形成低分子香味成分^[4]。由于其可直接转移到烟气中,并具有减轻刺激和柔和烟气的作用,因而与烟气的品质密切相关^[14]。由表 2 可知,不同基因型烟之间新植二烯含量存在较大的差异,豫烟 11 号的新植二烯含量最高,豫烟 10 号和 8306 含量居中,中烟 100 和云烟 87 含量最低。不同基因型烤烟烟叶新植二烯含量占中性致香物质总量的比例界于 85.91% ~ 92.57%,可见新植二烯对中性致香物质总量的多少起决定性作用。

表 2 不同基因型烟草叶片烤后烟叶质体色素降解产物含量的分析

质体色素降解产物	质体色素降解产物含量(μg/g)				
	云烟 87	豫烟 11 号	中烟 100	8306	豫烟 10 号
6-甲基-5庚烯-2酮	1.106 8	1.077 5	1.334 4	0.685 6	0.786 4
6-甲基-5庚烯-2醇	1.030 4	1.064 0	0.675 5	0.822 5	0.895 2
法尼基丙酮	11.121 6	11.327 3	9.261 0	12.544 2	13.609 1
β-二氢大马酮	12.888 4	15.169 3	10.933 1	8.176 6	13.503 8
β-大马酮	16.704 2	17.506 8	15.806 5	16.045 3	21.102 3
香叶基丙酮	2.737 1	3.324 3	2.475 8	3.240 8	1.782 6
二氢猕猴桃内酯	3.435 4	2.730 5	1.662 4	2.671 0	2.172 1
巨豆三烯酮 1	1.921 0	1.832 4	1.595 3	1.652 0	2.038 3
巨豆三烯酮 2	6.8655	6.584 3	6.024 4	7.602 5	8.484 1
巨豆三烯酮 3	2.781 2	2.682 3	0.979 2	1.326 8	1.866 5
3-羟基-β-二氢大马酮	0.855 9	0.366 2	0.276 6	0.346 6	0.989 9
巨豆三烯酮 4	11.269 3	10.497 4	6.620 0	6.962 3	11.962 0
螺岩兰草酮	6.088 6	7.248 3	0.960 4	1.1519	1.220 7
芳樟醇	0.749 1	0.633 6	0.566 6	0.523 9	0.562 1
氧化异佛尔酮	0.106 9	0.126 8	0.087 9	0.093 6	0.100 5
类胡萝卜素降解产物总量	79.661 4	82.171 0	59.259 1	63.845 6	81.075 6
新植二烯	764.65	1 586.70	844.15	945.08	1 077.00
挥发性香气物质总量	993.361 3	1 714.034 3	890.077 8	1 038.690 0	1 228.086 0

利用 GS/MS 方法从烤后烟叶中分离鉴定出 15 种类胡萝卜素降解产物,主要有 β-大马酮、香叶基丙酮、二氢猕猴桃内酯、巨豆三烯酮等,在 15 种类胡萝卜素降解产物中,以 β-大马酮的含量最高。不同基因型烟草叶片中所含类胡萝卜素降解产物的种类相同,但各品种(系)类胡萝卜素降解产物含量却有所差异,各处理类胡萝卜素降解产物的总量大小顺序为豫烟 11 号 > 豫烟 10 号 > 云烟 87 > 8306 > 中烟 100,

且 豫烟 11 号是中烟 100 的 1.40 倍。香气物质总量与新植二烯含量顺序相同,为豫烟 11 号 > 豫烟 10 号 > 8306 > 中烟 100 > 云烟 87。

3 结论与讨论

质体色素(叶绿素和类胡萝卜素)是影响烟叶品质和可用性的主要成分之一,它不仅决定了调制后烟叶的色泽,而且

其相关降解产物与烟叶的香气质和香气量密切相关。因此,烟草生长成熟期和调制后质体色素的含量变化,将直接影响到烟叶制品的香气风格和工业可用性;深入研究不同基因型烟叶中质体色素的形成、转化和降解规律,阐明其降解产物与烤烟香气风格的形成关系,对提高烟叶香气质和香气量的烟草品种筛选与评价具有重要意义。

类胡萝卜素降解产物是构成烟叶香气质量的重要组分。许多类胡萝卜素降解产物已是烤烟中确定的重要香气成分,它们产生香味的阈值相对较低,刺激性较小,香气质较好,对烟叶香气贡献率大^[15],是形成烤烟细腻、高雅、清新香气的主要成分。韦凤杰等研究表明不同基因型烟叶质体色素含量随成熟进程的推进而逐渐下降^[16]。本试验结果不同质体色素变化规律与其基本相同,但降解量有明显差异,叶绿素 a 的降解量大于叶绿素 b,类胡萝卜素降低幅度总体小于叶绿素;不同基因型烟叶质体色素及其降解产物含量有一定的差异,豫烟 11 号成熟期质体色素降解量较大,质体色素降解产物较多,中烟 100 生长过程中质体色素合成虽然最多,但成熟和调制过程中没有充分降解,其质体色素降解产物最少,因为栽培措施和生长条件一致,所以质体色素的差异是由基因型决定的;不同基因型烟叶质体色素及其降解产物含量的差异也可能是导致不同烟草品种表现出不同的香味质量和风格的重要原因。

在烟叶烘烤中,LOX 既是类胡萝卜素降解的关键酶^[17-18],又和叶绿素降解密切相关^[19],对烤烟的香气质和量有重要影响^[10]。对于不同品种(系)烟草,LOX 活性在烟叶生长成熟过程中均呈现先升后降的趋势,LOX 活性与类胡萝卜素的降解量呈极显著正相关,这与文献[20-21]报道的类胡萝卜素降解与 LOX 活性呈显著正相关的结论完全一致,也与文献[17]等报道的 LOX 与烤烟类胡萝卜素降解呈高度正相关的结论相符;脂氧合酶活性与叶绿素 a 和叶绿素 b 的降解量的相关性没有达到显著水平($P > 0.05$),这与文献[22]报道烟叶烘烤中 LOX 活性与叶绿素降解速率均呈显著正相关的结论不完全一致,但与文献[23]结论一致,可能是 LOX 活性与叶绿素降解的相关特征与烟草品种、温度、成熟度^[14]等多种因素有关,需要作进一步研究。因此,在烟叶成熟过程中,LOX 对类胡萝卜素的降解起着至关重要的作用,但可能不是叶绿素降解的关键酶。对于不同基因型烟草叶片在成熟过程中的质体色素降解,LOX 可能主要作用于类胡萝卜素而不是叶绿素。

品种间中性致香物质形成与质体色素的最大积累量无关,而与其质体色素的降解量有关,质体色素降解量大的品种(系)中性致香物质含量较高。在烟叶生长过程中,促进质体色素的积累,而在成熟和调制过程中促进烟叶质体色素的充分降解,提高色素降解量,将有利于促进烟叶香气物质的形成,提高烟叶的香气品质。

参考文献:

[1] Tso T C. Production, physiology and biochemistry of tobacco plant [M]. Maryland, USA: IDEALS Inc, 1990.

- [2] 王瑞新. 烟草化学[M]. 北京:中国农业出版社,2003:84-85.
- [3] 金闻博,戴 亚,横田拓. 烟草化学[M]. 北京:清华大学出版社,2000:45-46.
- [4] 史宏志,刘国顺,杨惠娟,等. 烟草香味学[M]. 北京:中国农业出版社,2011.
- [5] Week W W. Chemistry of tobacco constituents influencing flavor and aroma[J]. Recent Advance in Tobacco Science, 1985 (11): 175-200.
- [6] 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.
- [7] 宋朝鹏,高 远,武圣江,等. 密集烘烤定色期烟叶类胡萝卜素降解及相关酶活性变化[J]. 中国农业科学,2009,42(8):2875-2881.
- [8] 苏 行,林植芳,孙谷畴. 脂氧合酶对黄瓜叶片光合电子传递活性的影响[J]. 植物学报,1996,38(4):287-294.
- [9] 左天觉,朱尊权. 烟草的生产、生理和生物化学[M]. 上海:上海远东出版社,1993:385-396.
- [10] 赵世杰,刘华山,董新纯. 植物生理学实验指导[M]. 北京:中国农业科技出版社,1998:68-72.
- [11] Sekwa J, Kamiuchi H, Hatannaka A. Lipoxxygenase, hydroperoxide-lyase and volatile C6 - aldehyde formation from C18 - fatty acids during development of *Phaseolus vulgaris* L. [J]. Plant Cell Physiol, 1982, 23(4): 631-638.
- [12] Köckritz A, Schewe T, Hieke B, et al. The effects of soybean lipoxxygenase - 1 on chloroplasts from wheat [J]. Phytochemistry, 1985, 24(3): 381-384.
- [13] 杨立均,宫长荣,马京民. 烘烤过程中烟叶色素的降解及与化学成分的相关分析[J]. 中国烟草科学,2002(2):5-7.
- [14] Roberts D L, Rode W A. Isolation and identification of flavor components of burley tobacco[J]. Tobacco Science, 1972, 16: 107-112.
- [15] Lloyd R A, Miller C W, Robert D L. Flue - cured tobacco flavor I. Essence and essential oil components [J]. Tobacco Science, 1976, 20: 40-48.
- [16] 韦凤杰,王 芳,刘国顺,等. 烤烟叶片发育过程中类胡萝卜素的组分含量变化研究[J]. 河南农业大学学报,2006,40(6):588-591.
- [17] 李艳梅,宫长荣,陈江华,等. 烟叶在烘烤过程中脂氧合酶、脱落酸与色素降解的关系[J]. 中国烟草学报,2001,9(3):46-48.
- [18] 张荣平. 脂氧合酶在植物体内的生理功能[J]. 莱阳农学院学报,1993,10(1):47-51.
- [19] Goodwin T W, Mercer E I. Introduction to plant biochemistry [M]. 2nd ed. Oxford: Pergamon Press, 1983: 304-306.
- [20] 宫长荣,林学梧,李艳梅. 烟叶在烘烤过程中脂氧合酶活性及其作用的研究[J]. 西北农业学报,1999,8(4):63-66.
- [21] 宋朝鹏,武圣江,高 远,等. 烤烟密集烘烤变黄期类胡萝卜素及其降解香气成分的变化[J]. 中国农业科学,2010,43(20):4246-4254.
- [22] 赵昶灵,杨焕文,邓建华,等. 云南玉溪烟区 KRK26 在烘烤中的脂氧合酶比活力及其与质体色素降解的相关性[J]. 西南农业学报,2011,24(5):1708-1713.
- [23] 李爱军,代惠娟,娄 本,等. 烟草类胡萝卜素研究进展[J]. 安徽农业科学,2008,36(6):2364-2366.