

## 外源植物生长调节物质对烟草根中烟碱含量和烟碱合成酶活性变化的生理效应

刘华山<sup>1</sup> 朱大恒<sup>2</sup> 韩锦峰<sup>1,\*</sup> 毕庆文<sup>3</sup> 曾涛<sup>1</sup>

<sup>1</sup>河南农业大学农学院, 郑州 450002; <sup>2</sup>郑州大学生物工程系, 郑州 450052; <sup>3</sup>武汉烟草(集团)有限公司, 武汉 430051

**提要** 水培法研究烟草打顶和喷施外源生长调节物质的结果表明: 打顶的比不打顶的烟草根中鸟氨酸脱羧酶(ODC)、腐胺 *N*-甲基转移酶(PMT)和 *N*-甲基腐胺氧化酶(MPO)活性升高, 烟叶中烟碱含量剧增; 打顶喷施 ABA 和 6-BA 烟叶中烟碱含量升高, 喷施 IAA 和 GA<sub>3</sub> 的下降, IAA 的效果更明显。

**关键词** 烟草; 烟碱; 鸟氨酸脱羧酶; 腐胺 *N*-甲基转移酶; *N*-甲基腐胺氧化酶; 植物生长调节物质

## Physiological Effects of Exogenous Plant Growth Regulators on Changes in Nicotine Content and Some Enzyme Activities in Tobacco Roots

LIU Hua-Shan<sup>1</sup>, ZHU Da-Heng<sup>2</sup>, HAN Jin-Feng<sup>1,\*</sup>, BI Qing-Wen<sup>3</sup>, ZENG Tao<sup>1</sup>

<sup>1</sup>College of Agronomy, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; <sup>2</sup>Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; <sup>3</sup>Wuhan Tobacco Group Co. LTD, Wuhan 430051, China

**Abstract** Effects of shoot topping and exogenous plant growth regulators on some enzyme activities and nicotine content of roots were studied. The results showed that the activities of ornithine decarboxylase(ODC), putrescine *N*-methyltransferase (PMT) and *N*-methylputrescine oxidase (MPO) and nicotine content in topping plants were higher than those in non-topping plants. Leaf spraying with ABA and 6-BA could increase the nicotine content in topping plants, but leaf spraying with IAA and GA<sub>3</sub> significantly decreased nicotine content. The effect of IAA was more than that of GA<sub>3</sub>.

**Key words** tobacco; nicotine; ornithine decarboxylase; putrescine *N*-methyltransferase; *N*-methylputrescine oxidase; plant growth regulators

烟草根系中的鸟氨酸脱羧酶(ornithine decarboxylase, ODC)、腐胺 *N*-甲基转移酶(putrescine *N*-methyltransferase, PMT)和 *N*-甲基腐胺氧化酶(*N*-methylputrescine oxidase, MPO)是烟碱生物合成中的关键酶, 其活性影响烟叶中烟碱的积累, 烟碱积累过多或过少影响烟叶吸食品质和卷烟工业的可用性<sup>[1, 2]</sup>。目前, 我国烟叶中烟碱含量偏高是多种因素影响的结果。已有实验表明, 氮肥施用量增加, 打顶高度降低, 光照期延长和腋芽控制等<sup>[3]</sup>均导致烟碱的积累。施用蒸腾抑制剂<sup>[4]</sup>和植物生长物质<sup>[5]</sup>, 以及施用单一化学物质降低烟碱含量<sup>[6, 7]</sup>已有所报道。但迄今还没有调节烟草叶中烟碱积累、降低烟碱含量的最有效途径和措施。本文从烟草中合成烟碱的酶活性、烟碱含量与叶面喷施外源生长调节物质之间的关系进行了探讨, 以期能为抑制或减少烟叶中烟碱的积累, 提高烟叶品质和可用性提供参考。

## 材料与方法

实验材料为烟草(*Nicotiana tabacum* L.)品种 K326。烟苗培育采用漂浮育苗法, 烟苗长到四叶时, 用作水培试验。营养液采用 Hoagland 的溶液配方, 烟苗管理按常规的溶液培养方法进行。烟苗长至 60 d 时打顶, 打顶后进行如下处理: 不打顶不加生长调节物质, 打顶不加生长调节物质, 打顶喷施 20 mg·L<sup>-1</sup> IAA、5 mg·L<sup>-1</sup> ABA、5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA 和 30 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>。

酶液制备按 Mizusaki 等<sup>[8]</sup>的方法, 植株样品按 1:2 (W/V) 比例加入 0.05 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl 缓冲

收稿 2004-07-27 修定 2005-01-17

资助 河南烟草公司项目(HJK2003002)。

\*通讯作者(E-mail: jinfenghan2002@126.com, Tel: 0371-3558113)。

液(pH 7.5), 内含  $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  巯基乙醇、 $0.005 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDTA、0.5% 抗坏血酸钠、2% PEG-400。快速匀浆后, 用4层纱布过滤, 滤液以  $10\,000\times g$  离心 10 min, 取 2 mL 上清液经过 SephadexG-25 层析柱(柱事先用  $0.025 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 Tris-HCl 缓冲液, pH 7.5, 内含  $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  巯基乙醇、 $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDTA 进行平衡), 洗脱液用于测定酶活性。所有操作过程均在  $4^\circ\text{C}$  条件下进行。

ODC 活性用鸟氨酸- $\text{C}^{14}$  释放的  $\text{CO}_2$  测定, 按文献 8 分析方法; PMT 活性通过测定腐胺与 S-腺苷-L-甲硫氨酸- $^{14}\text{CH}_3$  生成的 N-甲基腐胺- $^{14}\text{CH}_3$  的放射性方法进行<sup>[9]</sup>; MPO 活性通过测定 N-甲基吡咯生成的 1-甲基-2-氰吡咯烷的放射性强度方法<sup>[10]</sup> 进行, 以 30 min 形成  $1 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  反应产物为 1 个单位酶活性。上述酶活性测定, 每个样品重复 3

次, 取平均值。

DL-鸟氨酸-1-C ( $15 \text{ Ci}\cdot\text{mmol}^{-1}$ ) 和 S-腺苷-1-甲硫氨酸- $\text{CH}_3$  ( $0.5 \text{ mCi}\cdot\text{mmol}^{-1}$ ) 购自英国 Arnershan 放射中心。

取烟株自下而上第 12 片叶测定烟碱含量<sup>[11]</sup>。

## 实验结果

### 1 烟草根中烟碱合成酶活性和烟碱含量的变化

从表 1 可知, 不论打顶与否, 烟株生长 1~20 d 内, ODC、PMT 和 MPO 3 种酶活性均逐渐增强, 30 d 时降低, 打顶的酶活性比不打顶的高, 根系内 3 种酶活性与烟碱含量呈显著正相关 ( $r = 0.9975$ ), 其中 PMT 的活性比其它 2 种酶活性高。根系中合成的烟碱由于不断运到地上部, 因而根系中烟碱含量比叶中低, 打顶的比不打顶的高。

表 1 烟株根系烟碱合成酶活性和烟碱含量的变化

Table 1 Changes in ODC, PMT and MPO activities and nicotine content in tobacco roots

处理后 时间/d	处理	酶活性/ $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ (蛋白质)			烟碱含量/%	
		ODC	PMT	MPO	叶	根
1	不打顶	7.4±0.114	7.6±0.163	9.8±0.157	0.90±0.014	0.41±0.028
	打顶	10.2±0.122	15.1±0.191	12.1±0.183	1.15±0.023	0.56±0.027
10	不打顶	9.6±0.294	10.9±0.213	12.5±0.305	1.01±0.092	0.43±0.018
	打顶	19.1±0.252	30.5±0.156	20.6±0.211	2.13±0.007	0.62±0.029
20	不打顶	10.8±0.251	20.1±0.235	16.5±0.161	1.20±0.023	0.58±0.012
	打顶	25.3±0.272	43.4±0.129	28.7±0.283	2.61±0.019	0.74±0.014
30	不打顶	8.9±0.158	18.7±0.241	19.1±0.302	1.22±0.016	0.65±0.026
	打顶	18.6±0.176	21.9±0.204	19.4±0.197	3.10±0.015	0.91±0.024

### 2 生长调节物质处理的烟株中烟碱含量的变化

从表 2 可见, 无论打顶与否, 未用外源生长调节物质处理的叶和根中烟碱含量均随着生育期的延长而增加。打顶的烟株喷施各种外源生长调节物质的烟叶和根中烟碱含量差异较大: 经 ABA 和 6-BA 处理的烟碱含量升高; IAA 和  $\text{GA}_3$  处理的则下降, IAA 处理的下降更明显。不打顶喷施 IAA、ABA、6-BA 或  $\text{GA}_3$  后叶和根中烟碱含量比打顶喷施的低些, 其含量变化较小。

### 3 IAA 处理的烟株根中烟碱合成酶活性的变化

表 3 显示, IAA 处理与否的打顶和不打顶烟株根中, ODC、PMT、MPO 3 种酶活性逐渐增强, 20 d 后下降, 不打顶和打顶烟株喷施 IAA 比不喷施的明显低, 表明根中烟碱合成减弱, 因而

叶中烟碱积累减少。这与 Misusaki 等<sup>[9]</sup> 的结果一致。

## 讨 论

据报道, 打顶能引起烟株中激素代谢失调, 导致烟草根中 MPO 活性的变化<sup>[10]</sup>。本文结果表明: 烟株打顶显著提高根中与烟碱合成有关的 3 种关键酶的活性, 这可能是打顶后叶中烟碱含量剧增的原因。

打顶后喷施生长调节物质对烟草中烟碱含量有影响。我们的结果表明, 喷施 IAA 和  $\text{GA}_3$  后打顶烟草的叶中烟碱含量下降, 喷施 ABA 和 6-BA 则上升, 显示这些生长调节物质对烟碱积累的作用不同。从烟碱含量下降的结果来看, IAA 处理最明显。另外, 有文献称, 打顶还会促进根系生

表2 生长调节物质处理的烟株中烟碱含量的变化

Table 2 Changes in nicotine content in tobacco plants treated by growth regulators

处理	烟碱含量 / %							
	叶				根			
	1 d	10 d	20 d	30 d	1 d	10 d	20 d	30 d
不打顶, 不加生长调节物质	0.90±0.026	1.01±0.019	1.20±0.021	1.22±0.013	0.41±0.018	0.43±0.025	0.58±0.028	0.65±0.017
打顶, 不加生长调节物质	1.15±0.023	2.13±0.017	2.61±0.025	3.17±0.021	0.56±0.009	0.62±0.012	0.74±0.016	0.81±0.019
不打顶, +IAA	0.91±0.033	0.89±0.028	0.93±0.031	0.95±0.022	0.39±0.016	0.42±0.024	0.48±0.026	0.53±0.028
打顶, +IAA	1.01±0.015	1.63±0.030	2.22±0.028	2.54±0.025	0.51±0.013	0.66±0.015	0.78±0.019	0.87±0.025
不打顶, +ABA	1.03±0.031	1.06±0.026	1.09±0.018	1.12±0.014	0.38±0.021	0.42±0.026	0.46±0.020	0.52±0.032
打顶, +ABA	1.33±0.024	2.09±0.032	3.17±0.026	3.72±0.017	0.69±0.027	0.79±0.033	0.90±0.019	1.02±0.021
不打顶, +6-BA	0.81±0.018	0.83±0.024	0.86±0.033	0.92±0.024	0.34±0.012	0.38±0.022	0.41±0.029	0.43±0.027
打顶, +6-BA	1.07±0.015	2.01±0.026	2.92±0.029	3.55±0.020	0.63±0.008	0.76±0.011	0.82±0.025	0.95±0.031
不打顶, +GA <sub>3</sub>	0.92±0.030	0.94±0.028	0.97±0.027	1.01±0.025	0.39±0.025	0.41±0.022	0.43±0.014	0.48±0.018
打顶, +GA <sub>3</sub>	0.94±0.024	1.49±0.031	2.38±0.016	2.86±0.023	0.47±0.023	0.64±0.017	0.74±0.013	0.85±0.016

表3 IAA处理的烟草根中3种酶活性的变化

Table 3 Changes in three enzyme activities in tobacco roots treated by IAA

酶	处理	酶活性/U·g <sup>-1</sup> (蛋白质)			
		1 d	10 d	20 d	30 d
O D C	不打顶, +IAA	12.1±0.156	2.4±0.194	2.7±0.236	2.5±0.162
	打顶, +H <sub>2</sub> O	10.2±0.293	19.1±0.235	25.3±0.172	18.6±0.225
	打顶, +IAA	6.8±0.261	9.3±0.312	14.1±0.243	12.5±0.281
P M T	不打顶, +IAA	3.2±0.232	3.4±0.165	3.9±0.292	3.6±0.263
	打顶, +H <sub>2</sub> O	15.1±0.238	30.5±0.301	43.4±0.224	21.9±0.231
	打顶, +IAA	7.0±0.272	12.8±0.217	14.5±0.262	11.9±0.217
M P O	不打顶, +IAA	2.4±0.158	2.8±0.223	3.6±0.274	2.7±0.290
	打顶, +H <sub>2</sub> O	12.1±0.214	20.6±0.290	28.7±0.256	19.4±0.282
	打顶, +IAA	7.3±0.265	11.9±0.202	16.3±0.247	12.7±0.299

长和根尖 IAA 的形成, 最终导致根系 IAA 浓度增高, 从而抑制根系合成烟碱的 3 种酶的活性, 烟碱合成受阻<sup>[12]</sup>。可见, 喷施 IAA 可能是解决烟叶中烟碱含量过高的措施之一。

### 参考文献

- Tso TC. Production, Physiology, and Biochemistry of Tobacco Plant. Beltsville: Maryland IDEALS, Inc, 1992. 427~428
- Harada T. Studies of breeding of burley tobacco with respect to the nicotine-nornicotine conversion. Bull Morioka Tobacco Exp Station, 1985, 19: 1~80
- Davis DL, Nielsen MT. Tobacco Production, Chemistry and Technology. Oxford: Blackwell Science Limited, 1999. 271~272
- Yasumatsu N. Studies on the chemical regulation of alkaloid biosynthesis in tobacco plants. II. Inhibition of alkaloid biosynthesis by exogenous auxin. Agr Biol Chem, 1967, 31: 1441~1447
- Atkinsin WO, Kasperbauer J. Influence of sublethal foliar application of 2, 4-D on burley tobacco yield and composition. Agron J, 1970, 62: 421~424
- 刘华山, 韩锦峰, 杨素勤. 丙二酸对白肋烟烟碱含量的影响. 中国烟草学报, 2000, 6(3): 47~48
- 徐晓燕, 王松华, 武雪萍. 施肥及生长调节剂对烟碱含量的影响. 山西农业大学学报, 2002, (1): 18~22
- Mizusaki S, Tanabe Y, Noguchi M et al. Changes in activities of ornithine decarboxylase, putrescine N-methyltransferase and N-methylputrescine oxidase in tobacco roots in relation to nicotine biosynthesis. Plant Cell Physiol, 1973, 14: 103~110
- Mizusaki S, Tanabe Y, Noguchi M et al. N-methylputrescine oxidase from tobacco roots. Phytochem, 1972, 11: 2757~2762
- Mizusaki S, Tanabe Y, Noguchi M et al. Phytochemical studies on tobacco alkaloids. XIV. The occurrence and properties of putrescine N-methyltransferase in tobacco roots. Plant Cell Physiol, 1971, 12: 639~640
- 王瑞新. 烟草化学. 北京: 中国农业出版社, 2003. 102~104
- 梁峥, 郑光植. 高等植物的次级代谢. 植物生理学通讯, 1981, (1): 18~21