

## 不同海拔高度的烤烟淀粉合成动态研究

杨永霞, 石冰瑾, 王霄龙, 冯琦, 张松涛, 崔红\*

(河南农业大学 烟草行业栽培重点实验室, 河南 郑州 450002)

**摘 要:** 对云烟 87 在贵州毕节地区不同海拔高度、不同发育时期叶片的超微结构、淀粉含量、淀粉合成相关基因的表达进行研究。结果表明: 移栽后 35~50 d(移栽前期)高海拔地区烟叶淀粉含量稍高, 颗粒结合型淀粉合成酶基因(*GBSSI*)和淀粉分支酶基因(*SBE*)的表达较强, 但叶绿体淀粉粒超微结构无明显差异; 移栽后 65~95 d, 淀粉含量急剧增加, 叶绿体淀粉粒体积和数量均增加, *GBSSI* 和 *SBE* 的表达也较强; 移栽后 95 d, 高海拔地区烟叶叶绿体已充分降解, 中海拔地区的开始降解, 低海拔地区叶绿体仍保持完整; 一定海拔范围内, 在烟叶发育前期, 海拔高度越高, 淀粉积累越多, 发育后期高海拔地区烟叶叶绿体降解充分, 且 *GBSSI* 和 *SBE* 的表达减弱, 说明高海拔导致淀粉含量减少。

**关 键 词:** 烤烟; 海拔高度; 淀粉; 超微结构; 基因表达

中图分类号: S572

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2012)01-0022-05

## Dynamic metabolic analysis of tobacco starch biosynthesis at different altitudes

YANG Yong-xia, SHI Bing-jin, WANG Xiao-long, FENG Qi, ZHANG Song-tao, CUI Hong\*

(Key Laboratory of Tobacco Cultivation, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** In order to elucidate the influence of different altitudes to starch biosynthesis, we compared the ultrastructure of leaves and the starch contents as well as the expression of several key genes related to starch biosynthesis in Yun87 at different development stages. The results showed that on the 35 d and 50 d after transplanting, the starch content and the expression level of granule-bound starch synthase I(*GBSSI*) were little higher in the high altitude than those in the low altitude. But no obvious difference was found in the ultrastructure of leaves among different altitudes. From the 65 d to 95 d, starch contents showed sharp increase trend. Simultaneously, chloroplasts gradually changed with rapid enlarging and increasing of the accumulated starch granules. Correspondingly, during this period, the starch content and the expression level of *GBSSI* and starch branching enzyme(*SBE*) were higher in the low altitude than those in the high altitude. Especially, on the 95 d, chloroplasts had fully degraded, began to degrade and were still keep intact in high, middle and low altitude respectively. These results indicated that in early developing period, the higher the altitudes, the more the starch contents, but in the later developing period, it was quite the opposite.

**Key words:** flue-cured tobacco; altitudes; starch; ultrastructure; gene expression

烟草中淀粉的分解、转化、消耗和积累决定着烟叶内在品质和外观商品等级的优劣<sup>[1]</sup>。生态条件是影响淀粉代谢的重要因素。海拔高度不同, 土壤的类型和理化性质也随之变化, 进而影响烟叶品质<sup>[2]</sup>。

目前, 关于海拔高度对烟叶质量的影响研究较多<sup>[3]</sup>, 但对不同海拔高度下独特生态环境对烟叶淀粉超微结构和淀粉代谢基因表达的影响研究较少。贵州生态条件较为复杂, 属低纬山区, 为烤烟适宜种

收稿日期: 2011-11-14

基金项目: 国家烟草专卖局贵州省公司资助项目(GY2010003)

作者简介: 杨永霞(1980—), 女, 山东泰安人, 博士, 讲师, 主要从事烟草生物技术研究, yyx624@126.com; \*通信作者, cuihongr\_13@163.com

植区, 烟区海拔垂直变化大, 气候多变。笔者对贵州毕节种植烟区不同海拔高度下烟叶淀粉的超微结构、含量以及基因表达进行了研究, 现将结果报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试烤烟为云烟 87。

主要仪器设备有 RT-PCR 仪(Eppendorf 浓度梯度 PCR 仪); UVP 凝胶成像系统; 透射电子显微镜(日立 H-600)。

### 1.2 试验设计

烤烟于 2010 年分别在毕节植烟生态区的金沙县良种繁育基地(低海拔, 平均海拔约 900 m)、大方县双山镇(中海拔, 平均海拔约 1 500 m)和威宁自治区牛棚镇(高海拔, 平均海拔约 2 200 m)种植。栽培管理措施同当地大田。在烟草移栽后 35、50、65、80、95 d 进行样品采集。

### 1.3 烟叶叶绿体内淀粉粒超微结构观察

选取生长发育良好的中部叶 1 mm×3 mm, 采用 5%戊二醛溶液固定, 于冰箱内 4 ℃保存。采用透射电镜观察淀粉粒超微结构, 并拍照<sup>[4]</sup>。

### 1.4 淀粉含量的测定

选取生长发育良好的中部叶杀青, 研磨成粉末, 过 250 μm 孔径筛后密封保存。采取高氯酸超声萃取—连续流动法<sup>[5]</sup>测定样品中淀粉的含量。

### 1.5 淀粉代谢基因表达的检测

选取生长发育良好的不同烟株的 3 片中部叶, 于液氮中冷冻保存。采用 Trizol 法提取烟草总 RNA<sup>[6]</sup>, 通过随机引物法反转录合成 cDNA。采用 Premier Prime 5.0 软件, 根据 GenBank 发布的颗粒结合型淀粉合成酶基因(*GBSSI*<sup>[7]</sup>)、淀粉分支酶基因(*SBE*<sup>[7]</sup>)和 *L25* 的序列设计各基因扩增引物(表 1),

进行 RT-PCR。以 *L25* 烟草核糖体蛋白基因<sup>[8]</sup>作为内参基因。

PCR 体系: cDNA+diH<sub>2</sub>O 为 8 μL, 上游引物和下游引物均为 0.4 μL, 含染料的 Taqmix 为 10 μL。

反应程序: 94 ℃预变性 3 min; 94 ℃变性 30 s; 退火温度 *GBSSI* 为 51 ℃, *SBE* 为 50 ℃, *L25* 为 48.5 ℃; 72 ℃延伸 1 min; 35 个循环; 72 ℃延伸 5 min, 于 4 ℃保存。

表 1 扩增引物序列

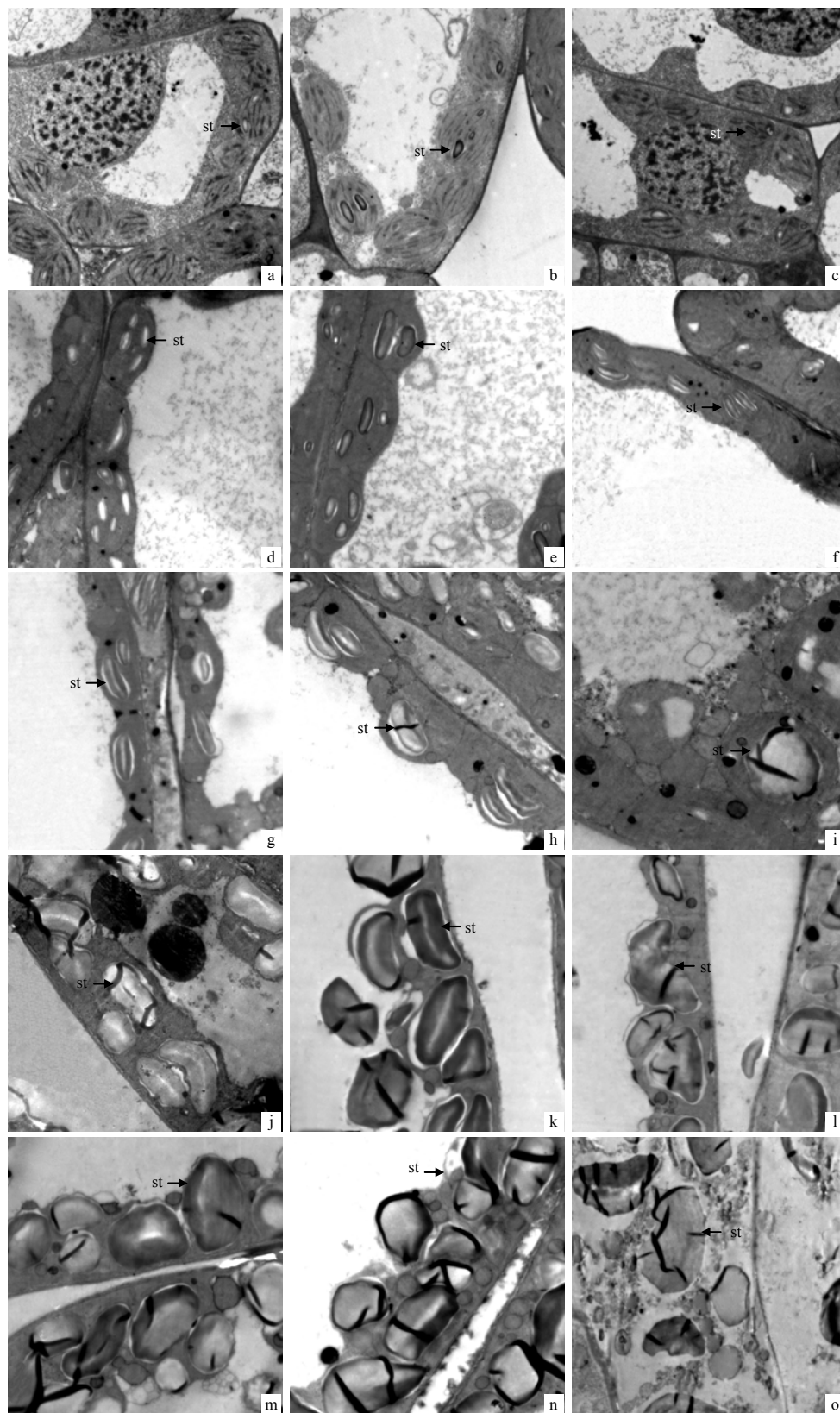
Table 1 Primer sequence and gene bank accession number		
基因名称	登录号	引物序列
<i>L25</i>	L18908	F: 5'-GCTTCTCTCGTCCCATCA-3'
		R: 5'-CCCCAAGTACCCCTCGTAT-3'
<i>GBSSI</i>	DQ069271	F: 5'-GGTAGGAAAATCAACTGGATG-3'
		R: 5'-TATCCATGCCATTACAAATCC-3'
<i>SBE</i>	AB028067	F: 5'-TATTTCAGCGAGGCTACAGATG-3'
		R: 5'-CATGAAATTGAGGTACCCCTC-3'

## 2 结果与分析

### 2.1 不同海拔高度及发育时期烟叶叶绿体的电镜观察结果

不同海拔高度烟叶在移栽后 35 d (图 1-a ~ c)、50 d (图 1-d ~ f)、65 d (图 1-g ~ i) 的叶绿体内淀粉粒数量和体积均差别不大; 同一海拔地区烟叶移栽后 35~65 d 叶绿体内淀粉粒只是在数量和体积上有少量增加。分析其原因, 可能是这段时期内物质代谢并不是以积累淀粉为主, 而是更多的用来维持生长发育。

移栽后 80 d 起(图 1-j ~ L), 不同海拔高度的烟株打顶后叶绿体内淀粉粒体积明显增大, 数量快速增多。移栽后 95 d (叶片采收期), 高海拔地区烟叶叶绿体降解已较充分(图 1-o), 淀粉粒多散落在细胞内部, 叶片叶绿体内淀粉较少; 中海拔地区烟叶开始降解(图 1-n); 低海拔地区叶绿体仍保持较好完整性(图 1-m), 未解离的叶绿体中可能还会有新的淀粉粒生成<sup>[9]</sup>。



a~c、d~f、g~i、j~l、m~o 分别为低、中和高海拔烟叶移栽后 35、50、65、80、95 d 叶绿体内淀粉粒( $\times 1\,000$ ) ; st 示淀粉粒 ; bar 为  $5.0\,\mu\text{m}$ 。

图 1 不同海拔高度及发育时期的烟叶叶绿体内淀粉粒超微结构

Fig.1 Starch grain ultrastructure of tobacco leaf chloroplast

## 2.2 不同海拔高度及发育时期烟叶的淀粉含量

由图2可以看出,不同海拔地区烟叶的淀粉含量均随移栽天数的推进而增加。移栽35~50 d,高海拔地区淀粉含量略高于其他地区;移栽65~95 d,同一海拔地区淀粉含量随移栽时间的推进而急剧增加,同一移栽时间随着海拔高度增加,淀粉含量反而不断降低。

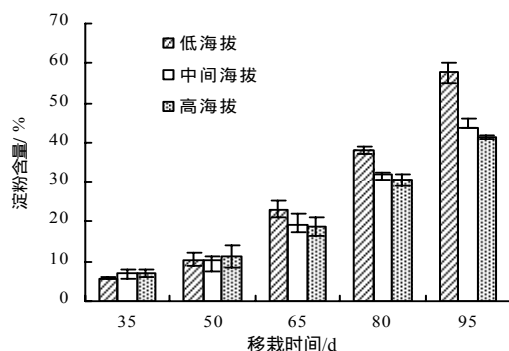


图 2 不同海拔地区各个发育时期烟叶的淀粉含量

Fig.2 Starch content of tobacco during developmental stages in different altitudes

## 2.3 淀粉代谢基因表达的检测

### 2.3.1 *GBSSI* 基因的表达检测

由图3可以看出,移栽后35 d和50 d,中、高海拔地区*GBSSI*基因的表达强度高于低海拔地区;移栽后65~95 d,高海拔地区*GBSSI*基因表达强度反而低于低、中海拔,可能是随着烟株的发育,高海拔地区低温强紫外线的环境条件使得以淀粉积累为主的碳积累代谢逐渐减弱,酶活性降低,这与淀粉粒超微结构(图1)显示的结果一致。

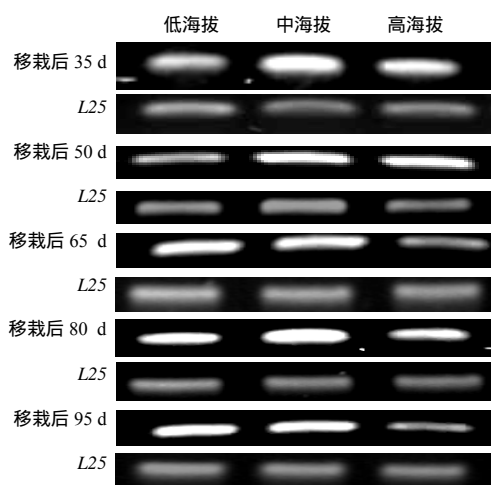


图 3 同一发育时期不同海拔高度 *GBSSI* 基因的检测结果

Fig.3 Expression level of *GBSSI* gene in the same development stages at different altitudes

由图4可以看出,不同海拔高度的烟叶*GBSSI*基因在35、95 d表达较弱,而50、65、80 d表达较强,但趋势略有不同,低、中海拔地区从移栽后65 d开始表达减弱,而高海拔地区则从50 d开始就逐渐减弱,表明高海拔地区烟叶后期直链淀粉的合成较低、中海拔地区的弱。

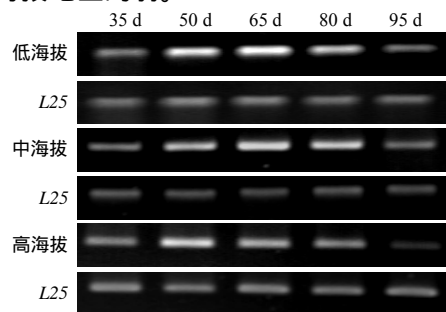


图 4 同一海拔高度不同发育时期 *GBSSI* 基因的检测结果

Fig.4 Expression level of *GBSSI* gene in the same elevation at different developmental stages

### 2.3.2 *SBE* 基因表达检测

从图5可以看出,不同时期低、中海拔地区烟叶*SBE*基因表达均强于高海拔地区,说明不同海拔地区烟叶支链淀粉的合成也呈增多的趋势,这与淀粉含量的测定结果略有出入,并没有明显表现出低海拔地区烟叶发育前期淀粉含量低而后期高的特点;移栽后65 d起,高海拔地区烟叶*SBE*基因与中、低海拔地区的表达差异并不明显,说明*SBE*受海拔高度影响可能不是特别敏感。

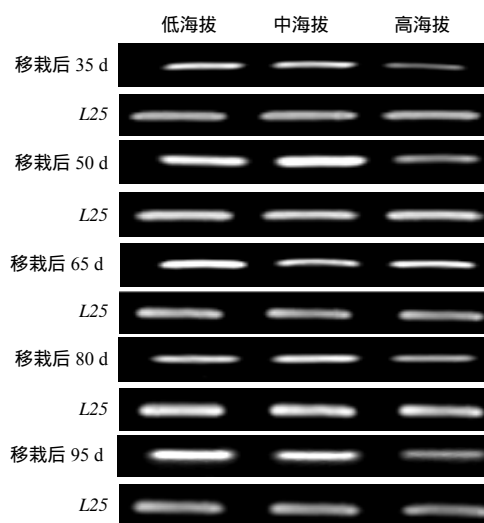


图 5 同一发育时期不同海拔高度 *SBE* 基因的检测结果

Fig.5 Expression level of *SBE* gene in the same development stages at different altitudes

从图 6 可以看出,同一海拔地区不同时期烟叶 *SBE* 基因的表达均为由弱到强,但条带亮度增加的幅度不同。低、中海拔地区烟叶 *SBE* 基因从移栽后 65 d 开始表达增强;高海拔地区则在各时期变化幅度较为均一,表明高海拔地区烟叶 *SBE* 基因的表达受环境影响比低、中海拔较小;低海拔地区烟叶 *SBE* 基因对环境条件更加敏感,其条带亮度变化较大。

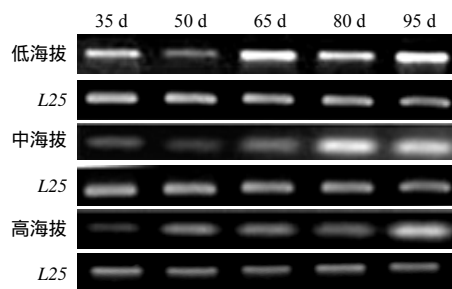


图 6 同一海拔高度不同发育时期 *SBE* 基因的检测结果

Fig.6 Expression level of *SBE* gene in the same elevation at different developmental stages

### 3 小 结

本研究结果表明,高海拔地区烟叶移栽后 35~50 d 淀粉含量较中、低海拔地区烟叶稍高,颗粒结合型淀粉合成酶基因(*GBSSI*)的表达较强,但叶绿体淀粉粒超微结构无明显差异,可能是由于移栽后 35~50 d 高海拔地区日照相对充足,植株淀粉积累相对较高<sup>[10]</sup>。

移栽后 65~95 d,不同海拔地区烟叶淀粉含量均急剧增加,低海拔地区淀粉含量开始高于高海拔地区,颗粒结合型淀粉合成酶基因(*GBSSI*)和淀粉分支酶基因(*SBE*)的表达也以低、中海拔强于高海拔。从叶绿体超微结构上看,移栽后 95 d 时,高海拔地区叶绿体已充分降解,中海拔地区叶绿体开始降解,而低海拔地区叶绿体仍保持完整,可能是由于这段时期低海拔地区随着气温升高,光照增强,光合作用产物从对生殖生长的供应转为在营养器官中积累,致使叶片中淀粉含量快速增加;而高海拔地区气温相对较低,紫外线强,昼夜温差大,叶绿

体降解严重,叶片的光合作用受影响,且低海拔地区未解离的叶绿体中可能还会有新的淀粉粒生成<sup>[8]</sup>,导致海拔较高地区烟叶淀粉含量低于海拔较低地区。

淀粉是光合作用的产物,地形、地貌、光质和光强等都会对淀粉代谢产生一定的影响。随着海拔高度的变化,这些因子均发生变化。总体来看,在一定海拔高度范围内,在烟叶发育前期,高海拔淀粉积累较多,而中、后期则呈现相反趋势。

### 参考文献:

- [1] Gong C, Yuan H, Chen J, et al. Studies on amylase and degradation of starch and pigment of tobacco leaf during process of flue-curing[J]. Agricultural Sciences in China, 2004(13): 931-936.
- [2] 黎妍妍, 李锡宏, 李进, 等. 不同海拔高度植烟区气候和土壤条件分析[J]. 湖北民族学院学报, 2008(3): 26-28.
- [3] 李自强, 刘新民, 董建新, 等. 罗平县海拔高度和土壤类型与烟叶化学成分的关系[J]. 中国烟草科学, 2010, 31(5): 44-48.
- [4] 朱法亮, 徐兴阳, 罗华元, 等. 植物透射电镜样品制备技术探讨[J]. 中国野生植物资源, 2006, 25(3): 41-43.
- [5] 王洪波, 徐玉琼, 王颖, 等. 高氯酸超声萃取—连续流动法测定烟草中的淀粉[J]. 烟草科技, 2009(5): 44-47.
- [6] 丁福章, 李继新, 袁有波, 等. 烟草不同组织总RNA的提取方法初探[J]. 中国农学通报, 2007, 23(12): 98-101.
- [7] 谭彩霞, 封超年, 陈静, 等. 作物淀粉合成关键酶及其基因表达的研究进展[J]. 麦类作物学报, 2008, 28(5): 912-919.
- [8] Gregor W, Schmidt, Sven K, et al. Stable internal reference genes for normalization of real-time RT-PCR in tobacco (*Nicotiana tabacum*) during development and abiotic stress[J]. Mol Genet Genomics, 2010, 283(3): 233-241.
- [9] 王程栋, 王树声, 申国明, 等. 不同成熟度烟草叶片细胞超微结构变化规律研究[J]. 中国烟草科学, 2007, 28(30): 30-34.
- [10] 关义新, 林葆, 凌碧莹. 光、氮及其互作对玉米幼苗叶片光合和碳、氮代谢的影响[J]. 作物学报, 2000, 26(6): 806-812.

责任编辑: 杨盛强