

网络出版时间:2019-03-07 13:33 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2019.09.005  
网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20190307.1332.010.html

# 烤烟成熟期淀粉代谢关键酶活性与基因表达研究

潘飞龙<sup>1</sup>, 田维强<sup>2</sup>, 宋朝鹏<sup>1</sup>, 郑明伟<sup>2</sup>, 夏志林<sup>2</sup>, 刘明宏<sup>2</sup>, 苟剑渝<sup>2</sup>, 李成刚<sup>3</sup>

(1 河南农业大学 烟草学院, 河南 郑州 450002; 2 贵州省烟草公司遵义市公司, 贵州 遵义 563000;

3 河南中烟工业有限责任公司, 河南 郑州 450016)

**【摘要】**【目的】探讨烤烟成熟期淀粉积累状况与淀粉代谢关键酶活性及其基因表达的关系,明确烤烟成熟期淀粉代谢的分子调控机制,为优质烟叶生产提供理论依据。【方法】以不同淀粉积累型烤烟品种秦烟 96 和豫烟 6 号为材料,测定成熟期烟叶淀粉含量及比例(直链淀粉、支链淀粉)和淀粉代谢关键酶活性,并对其关键酶基因(*NtAGPase*、*NtGBSS I*、*NtSSS*、*NtSBE*、*NtDBE*、*Nt $\alpha$ -amylase* 和 *Nt $\beta$ -amylase*)进行实时荧光定量 PCR 分析。【结果】在烤烟发育成熟期,烟叶淀粉、直链淀粉和支链淀粉含量呈先升高后降低的变化趋势,烟叶生理成熟期(移栽后 85 d)其含量最高;随着烟叶的成熟,烟叶中支链淀粉所占比例逐渐增加。烤烟成熟期 *AGPase*、*GBSS I*、*SSS*、*SBE* 和 *DBE* 活性呈先升高后降低的变化趋势,而烟叶淀粉酶活性则随着烟叶的成熟先降低后升高,烟叶过熟时其活性显著升高;与烟叶淀粉代谢关键酶活性变化趋势不同,其相关基因表达量变化差异较大。烟叶打顶至适熟阶段,*AGPase* 和 *GBSS I* 活性与烟叶直链淀粉含量相关性显著,对烟叶直链淀粉的积累贡献最大,*NtGBSS I* 对直链淀粉代谢起主要调控作用;*SSS*、*SBE* 和 *DBE* 活性对烟叶支链淀粉积累起重要作用,*NtSBE* 和 *NtDBE* 对烟叶支链淀粉代谢起主要调控作用。当烟叶由适熟至过熟时,淀粉酶( $\alpha$ -淀粉酶、 $\beta$ -淀粉酶)主要参与烟叶的淀粉代谢活动。同一生态环境和栽培条件下,秦烟 96 淀粉积累较多,具有较高的支链淀粉比例。【结论】烤烟碳水化合物积累以淀粉为主,*AGPase* 和 *GBSS I* 是影响直链淀粉积累的关键酶,*SSS*、*SBE* 和 *DBE* 对支链淀粉积累有重要作用,*SBE* 和 *DBE* 活性的差异可能是造成烟叶直链淀粉与支链淀粉比值不同的重要原因。

**【关键词】** 烤烟;成熟期;淀粉代谢;淀粉代谢酶活性;基因表达

**【中图分类号】** S572.01

**【文献标志码】** A

**【文章编号】** 1671-9387(2019)09-0033-11

## Activities of key enzymes related with starch metabolism and gene expression in flue-cured tobacco at maturity

PAN Feilong<sup>1</sup>, TIAN Weiqiang<sup>2</sup>, SONG Zhaopeng<sup>1</sup>, ZHENG Mingwei<sup>2</sup>, XIA Zhilin<sup>2</sup>,  
LIU Minghong<sup>2</sup>, GOU Jianyu<sup>2</sup>, LI Chenggang<sup>3</sup>

(1 College of Tobacco Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China; 2 Zunyi Branch, Guizhou Tobacco Company, Zunyi, Guizhou 563000, China; 3 Henan Tobacco Industrial Limited Company, Zhengzhou, Henan 450016, China)

**Abstract:** 【Objective】 This study explored the relationship between starch accumulation status, key enzyme activity and gene expression during the mature period of flue-cured tobacco to understand the molecular regulation mechanism of starch metabolism and provide theoretical basis for the production of high quality tobacco. 【Method】 Starch accumulating tobacco varieties of Qinyan 96 and Yuyan 6 were used to measure the starch content and ratio (amylose, amylopectin) and key enzyme activities of starch metabolism in flue-cured tobacco at maturity. The key enzyme genes (*NtAGPase*, *NtGBSS I*, *NtSSS*, *NtSBE*,

**【收稿日期】** 2018-08-06

**【基金项目】** 河南中烟工业有限责任公司科技创新项目“碳氮专用复合肥工程研发”(ZW2014005);贵州省烟草公司遵义市公司资助项目“密集烤房散叶烘烤烤香工艺研究”(2015-09)

**【作者简介】** 潘飞龙(1993—),男,河南洛阳人,在读硕士,主要从事烟草调制与加工研究。E-mail: pfl136@163.com

**【通信作者】** 李成刚(1969—),男,河南郑州人,工程师,硕士,主要从事烟叶原料及卷烟研发研究。E-mail: 409295114@qq.com

*NtDBE*, *Nt $\alpha$ -amylase* and *Nt $\beta$ -amylase*) were analyzed by real-time quantitative PCR. 【Result】 At the maturity stage of flue-cured tobacco, contents of starch, amylose and amylopectin in tobacco leaves increased first and then decreased with the highest values at the physiological maturity of tobacco leaves (85 d after transplanting). With the maturing of tobacco leaves, the proportion of amylopectin in tobacco leaves gradually increased. The activities of AGPase, GBSS I, SSS, SBE and DBE in flue-cured tobacco increased first and then decreased. The activity of amylase in tobacco leaves decreased firstly and increased significantly at overripe stage. Different from the key enzyme activities of tobacco starch metabolism, the expression of related genes varied greatly. From the topping to proper maturity, the activities of AGPase and GBSS I were significantly correlated with amylose content, and contributed the most to the accumulation of amylose in tobacco leaves. *NtGBSS I* played a major role in the regulation of amylose metabolism. The activities of SSS, SBE and DBE enzymes played an important role in the accumulation of amylopectin in tobacco leaves. *NtSBE* and *NtDBE* played a major role in the regulation of amylopectin metabolism in tobacco leaves. From proper maturity to overripe stage, amylases ( $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase) mainly involved in the starch metabolism of tobacco leaves. Under same ecological environment and cultivation conditions, Qinyan 96 accumulated more starch and had higher amylopectin proportion. 【Conclusion】 Flue-cured tobacco accumulated carbohydrate predominantly as starch. AGPase and GBSS I were key enzymes affecting amylose accumulation. SSS, SBE and DBE played an important role in amylopectin accumulation. The difference in enzyme activities between SBE and DBE may be an important cause of the difference in ratio of amylose to amylopectin in tobacco leaves.

**Key words:** flue-cured tobacco; mature stage; starch metabolism; starch metabolic enzyme activity; gene expression

烟草(*Nicotiana tabacum* L.)属茄科一年生或有限多年生草本植物,在我国南北各省广泛种植,是以收获叶片为目标的一种重要经济作物,其中烤烟种植范围最广,是卷烟工业的主要原料。烤烟是以积累淀粉为主的粉叶类植物<sup>[1]</sup>,成熟鲜烟叶中淀粉含量可达 40%<sup>[2]</sup>,淀粉代谢作为烤烟最基本的初生代谢,直接影响着烟叶的基本生命活动<sup>[3]</sup>。烤烟成熟期烟叶淀粉的合成、积累、分解、转化状况,决定了烤后烟叶内部各化学成分之间的协调程度<sup>[4]</sup>,进而影响烟叶的外观商品质量及内在品质<sup>[5]</sup>。因此,研究烤烟成熟期淀粉精细结构、淀粉代谢关键酶活性及基因表达模式,对探究烟叶品质形成作用机理及制定优质烟叶生产策略均有重要意义。

烤烟淀粉代谢是一个淀粉由积累到降解的动态变化过程<sup>[6]</sup>。前人通过对大豆、水稻等<sup>[7-9]</sup>作物研究发现,植物生长发育过程中对淀粉生物合成有重要影响的酶主要有 5 种,分别为 1,6-二磷酸腺苷葡萄糖焦磷酸化酶(ADP-glucose pyrophosphorylase, AGPase)、颗粒结合型淀粉合成酶(granule-bound starch synthase, GBSS)、可溶性淀粉合成酶(soluble starch synthase, SSS)、淀粉分支酶(starch branching enzyme, SBE)和淀粉去分支酶(de-

branching enzyme, DBE)。有研究表明,直链淀粉含量及直链淀粉与支链淀粉的比例对粮食作物口感起决定性作用<sup>[10-11]</sup>,淀粉组分含量及比例不同会影响淀粉粒的大小、结构以及酶解性能<sup>[12]</sup>,淀粉的酶解程度与直链淀粉含量呈反比,直链淀粉含量越高,淀粉抗酶解性越强<sup>[13]</sup>。就烤烟淀粉代谢而言,烟叶淀粉的生物合成是一个复杂的生化过程,是多种酶协同互作的结果。烤烟淀粉代谢受遗传因素、环境条件和栽培措施等的共同影响<sup>[14]</sup>,是一种多基因调控与环境因素交互作用的结果。邓云龙等<sup>[15]</sup>研究发现,不同品种烤烟大田后期烟叶淀粉积累变化一致,但其淀粉积累量有显著差异。贾宏昉等<sup>[16]</sup>研究发现,土壤中增施腐熟秸秆可增强淀粉代谢相关基因 *NtAGPase* 和 *NtGBSS I* 的表达量,促进烤烟成熟期烟叶碳代谢,进而提高烟叶品质。杨胜男等<sup>[17]</sup>研究发现,复合有机肥可改善烟叶细胞淀粉积累,并改变淀粉组分比例。

淀粉是烤烟的主要内含物质之一,成熟期烤烟淀粉代谢旺盛<sup>[18]</sup>,其含量和比例最终影响烤后烟叶品质。虽然有关烤烟发育过程中碳水化合物积累和淀粉代谢调控方面的研究逐年增多,但迄今为止,对烤烟成熟期淀粉精细结构、淀粉代谢酶活性与基因

表达模式系统性的研究却鲜有报道。本研究以不同淀粉积累型烤烟品种秦烟 96 和豫烟 6 号为材料,研究烤烟成熟期淀粉含量及比例、淀粉代谢关键酶活性与其基因表达的变化,探讨淀粉精细结构与淀粉代谢关键酶活性及其基因表达的关系,以阐明烤烟成熟期淀粉代谢的分子调控机制,为优质烟叶生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于 2017 年在河南省洛阳市洛宁县小界卫洼烟叶标准化生产示范田进行。试验地位于东经 111°38′,北纬 34°26′,海拔 1 114.6 m;该区属于暖温带大陆性季风气候,年平均气温 13.7℃,日照 2217.6 h,年降雨量 600~800 mm。试验地土壤为黄棕壤,土壤基本理化性质:pH 7.26,有机质含量 13.52 g/kg,碱解氮含量 75.18 mg/kg,速效磷含量 9.17 mg/kg,速效钾含量 164.37 mg/kg。

选用当地主栽烤烟品种秦烟 96 和豫烟 6 号为试验材料。试验田内统一技术标准,全面落实漂浮育苗、平衡施肥、地膜覆盖、清棵培土、化学抑芽等技术措施,实施机械化作业、水肥一体化灌溉技术,其中水肥一体化采用烟叶水肥一体化自动注灌设备(贵州瑞欣现代农业有限公司)。烟苗于 2017 年 5 月 8 日移栽,收获时单株有效叶数 18~20 片,以培育“中棵烟”目标要求进行田间管理。烟田施氮量为 72 kg/hm<sup>2</sup>,施用肥料为烟草专用复合肥(云南云叶化肥股份有限公司), $m(\text{N}):m(\text{P}_2\text{O}_5):m(\text{K}_2\text{O})=1:1:2$ 。烟叶于移栽后 65 d 打顶,打顶后 30 d 中部叶进入适熟阶段。

1.2 试验设计

试验采用随机区组设计,重复 3 次,共 36 个小区,小区面积 16.5 m<sup>2</sup>,行株距 1.1 m×0.5 m,每个试验小区植烟 30 株。试验设置 6 个取样时期处理,

烟叶打顶当天即移栽后 65 d 开始取样,随后每隔 10 d 取样 1 次,共取样 6 次。取样时选取小区内长势均匀一致的烟株,每个品种各 6 株,选取大小均匀一致的中部叶(10~12 叶位),去除主脉,选取第 6~7 支脉叶肉组织,混合样品,每份样品约 10 g,置于液氮中速冻,然后于一 80℃冰箱中保存,用于淀粉含量、淀粉代谢关键酶活性和基因表达分析。每个时期进行 3 次重复。

1.3 测定项目及方法

1.3.1 淀粉含量测定 烟叶中直链淀粉和支链淀粉含量测定参照吴玉萍等<sup>[19]</sup>的方法,采用 AA3 型连续流动化学分析仪(德国 BRAN+LUEBBE 公司生产)测定。采用液氮研磨新鲜烟叶,用乙醇-饱和氯化钠溶液进行脱色处理,随后用 40%高氯酸溶液提取,直链淀粉和支链淀粉分别在 600 nm 和 570 nm 波长下显色,其中直链淀粉采用在线氢氧化钠碱液分两次进样,支链淀粉直接进样显色,根据标准曲线计算直链淀粉和支链淀粉含量。

1.3.2 淀粉代谢关键酶活性测定 1,6-二磷酸腺苷葡萄糖焦磷酸化酶(ADP-glucose pyrophosphorylase,AGPase)、颗粒结合型淀粉合成酶(granule-bound starch synthase,GBSS)、可溶性淀粉合成酶(soluble starch synthase,SSS)、淀粉分支酶(starch branching enzyme,SBE)、淀粉去分支酶(debranching enzyme,DBE)、 $\alpha$ -淀粉酶( $\alpha$ -amylase)和  $\beta$ -淀粉酶( $\beta$ -amylase)活性分别按照 AGPase、GBSS、SSS、SBE、DBE、 $\alpha$ -淀粉酶和  $\beta$ -淀粉酶试剂盒说明书(苏州科铭生物技术有限公司)测定。

1.3.3 淀粉代谢关键酶基因表达分析 采用改良 CTAB 法<sup>[20]</sup>提取烟叶样品总 RNA,通过随机引物法反转录合成 cDNA<sup>[21]</sup>。从 GenBank 核酸数据库中检索烟草 AGPase、GBSS、SSS、SBE、DBE、 $\alpha$ -amylase 和  $\beta$ -amylase 序列,利用 Roche LCPDS2 设计引物,见表 1,其中烟草核糖体蛋白基因 L25 作为内参基因。

表 1 淀粉代谢相关基因 qRT-PCR 引物序列

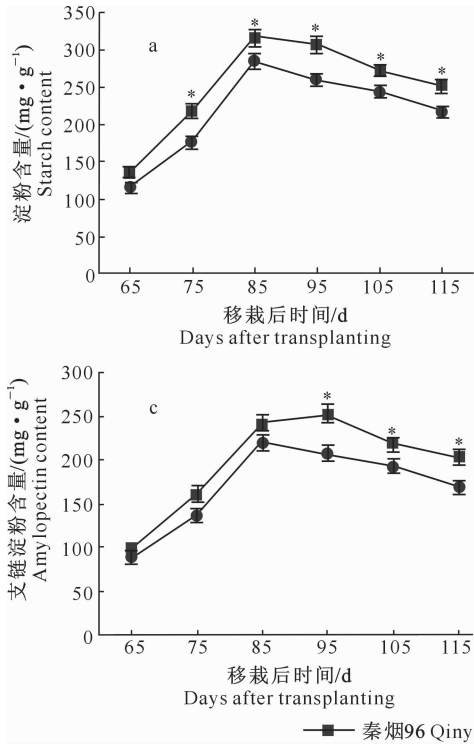
Table 1 Primers for qRT-PCR of starch metabolism related genes

| 基因名称<br>Gene name   | 基因 ID<br>Gene ID | 引物序列(5'→3')<br>Primer sequence (5'→3')              |
|---------------------|------------------|-----------------------------------------------------|
| NtAGPase            | DQ399915         | F:CGTGATAAGTTCCTTGTGG R:TCACATTGTCCCCTATACGG        |
| NtGBSS I            | DQ069270.1       | F:GGTAGGAAAATCAACTGGATG R:TATCCATGCCATTCACAATCC     |
| NtSSS               | DQ021463         | F:CGGGACAATATTCAATTTCGTC R:GGTGGGAAACTGGAACACTAAA   |
| NtSBE               | AB028067         | F:TATTTCAGCGAGGCTACAGATG R:CATGAAATTGAGGTACCCCTC    |
| NtDBE               | DQ021462         | F:AGTTGGTCTCACTACAGGACATC R:GGCAAAGAACAATCTAAAGCAGC |
| Nt $\alpha$ amylase | DQ021455         | F:ATATTGCAGGCCTTCAACTGGG R:TGGAAGGTAACCTTCAGGAGACAA |
| Nt $\beta$ amylase  | DQ021457         | F:TGAGCTATTGGAAATGGCGAAGA R:AAGAGGGATCGTGCAGGAATCA  |
| NtL25               | L18908           | F:CCCCTACCACAGAGTCTGC R:AAGGGTGTTGTTGTCTCAATCTT     |

使用 HiScript® II qRT SuperMix II 试剂配制反应体系于 PCR 仪 (ABI9700) 中合成第一链 cDNA。按照 Invitrogen 公司的 Real Master Mix (SYBR Green) 试剂盒操作指导, 采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 的方法检测基因的相对表达量。反应程序为: 95 ℃ 预热 5 min, 95 ℃ 变性 10 s, 60 ℃ 退火 30 s, 循环 40 次。每个样品均设置 3 次重复。采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  算法<sup>[22]</sup> 对试验结果进行分析。

1.4 数据处理

试验数据采用 Microsoft Excel 2010 进行整理,

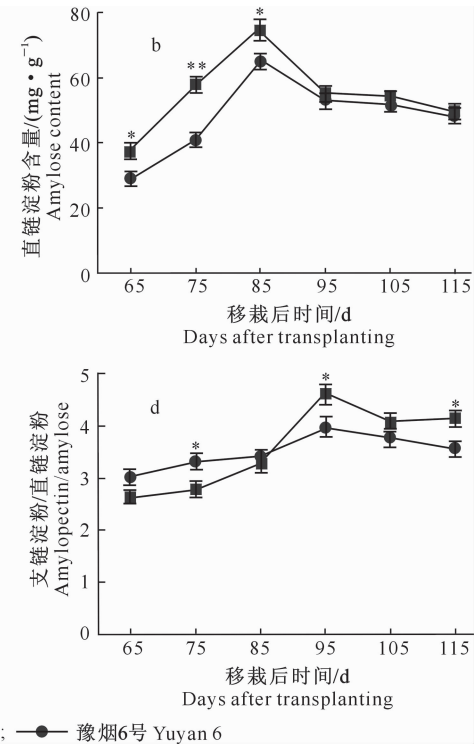


采用 Origin 9.1 进行绘图, 采用 SPSS 22.0 统计软件进行 Pearson 相关性分析及单因素方差分析, 单因素方差分析采用新复极差法, 显著性水平  $P < 0.05$ , 极显著性水平  $P < 0.01$ 。

2 结果与分析

2.1 烤烟成熟期烟叶淀粉含量的变化

烤烟成熟期烟叶淀粉组分含量及比例的变化见图 1。



\* 和 \*\* 分别表示在  $P < 0.05$  和  $P < 0.01$  水平上差异显著。下同  
\* and \*\* indicate significant difference at  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ . The same below

图 1 烤烟成熟期烟叶淀粉组分含量及比例的变化

Fig. 1 Changes of contents and proportions of starch components in flue-cured tobacco leaves at mature stage

如图 1-a 所示, 秦烟 96 和豫烟 6 号在整个烤烟成熟期烟叶淀粉含量呈先升高后降低的变化趋势, 烟叶打顶 (移栽后 65 d) 后, 叶片内淀粉快速积累, 两个品种烟叶淀粉含量均于移栽后 85 d 达到高峰, 其淀粉含量分别为 317.4 和 285.6 mg/g; 从移栽后 75 d 开始, 秦烟 96 烟叶淀粉含量显著高于豫烟 6 号。与烟叶淀粉积累规律相似, 烟叶内直链淀粉和支链淀粉含量也呈先升高后降低的单峰波动变化 (图 1-b、c), 移栽后 85 d 之前, 秦烟 96 叶片内直链淀粉含量显著或极显著高于豫烟 6 号, 此后两个品种烟叶直链淀粉含量差异不显著; 秦烟 96 烟叶支链淀粉开始积累至达到峰值的时间长于豫烟 6 号, 其支链淀粉含量于移栽后 95 d 达到高峰。移栽后 85 d 之前,

豫烟 6 号烟叶支链淀粉与直链淀粉的比值高于秦烟 96 (图 1-d); 移栽后 95 d, 秦烟 96 烟叶支链淀粉与直链淀粉的比值快速升高, 显著高于豫烟 6 号烟叶支链淀粉与直链淀粉的比值, 此后其比值波动下降。

2.2 烤烟成熟期淀粉代谢关键酶活性的变化

秦烟 96 烟叶中 AGPase 活性从移栽后 65 d 开始快速升高, 至移栽后 85 d 达到高峰, 之后快速下降; 豫烟 6 号烟叶中 AGPase 活性变化趋势与秦烟 96 相似, 但其活性低于秦烟 96 (图 2-a)。两个品种烤烟 GBSS I 活性在整个烤烟成熟期均较高, 随着烤烟的成熟 GBSS I 活性呈先升高后降低的变化趋势, 且在成熟期差异不显著 (图 2-b)。

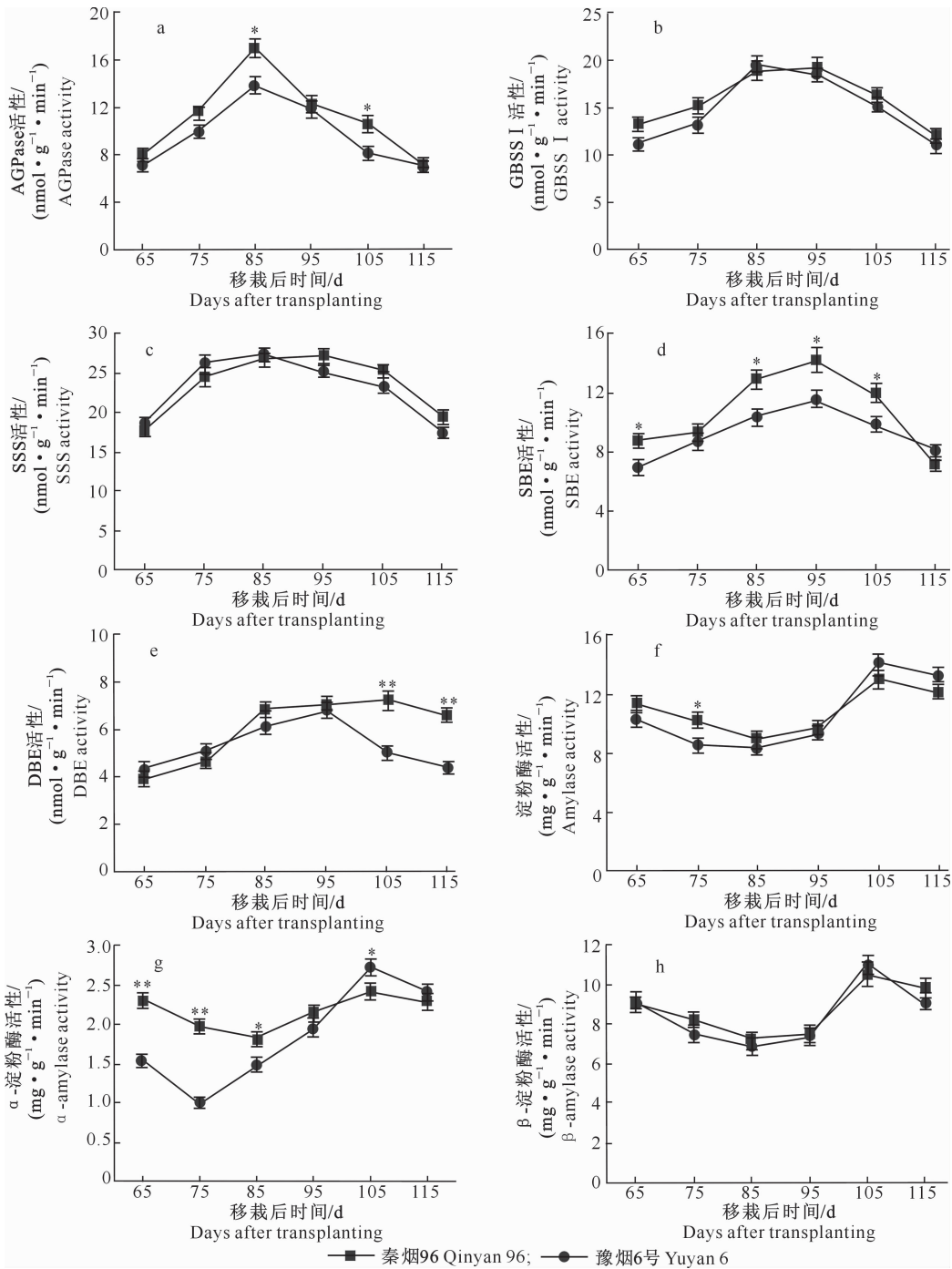


图 2 烤烟成熟期淀粉代谢关键酶活性的变化

Fig. 2 Changes of key enzyme activities in starch metabolism of flue-cured tobacco at mature stage

如图 2-c 所示,烤烟成熟期烟叶 SSS 活性呈先升高后降低的变化趋势,但两个品种烤烟 SSS 活性达到峰值的时间略有不同,豫烟 6 号 SSS 活性峰值时间早于秦烟 96。在整个烤烟成熟期,秦烟 96 和豫烟 6 号烟叶 SBE 活性变化趋势虽然一致,呈单峰波动变化,但秦烟 96 烟叶 SBE 活性显著高于豫烟 6 号;移栽后 95 d,秦烟 96 和豫烟 6 号 SBE 活性达到最高,分别为 14.23 和 11.57  $\text{nmol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ (图 2-d)。秦烟 96 和豫烟 6 号烟叶 DBE 活性在移栽后 95

d 之前变化趋势相似,DBE 活性随着烤烟的成熟逐渐升高;但移栽后 95 d 之后,两者 DBE 活性差异较大,秦烟 96 仍保持较高的 DBE 活性,呈波动缓慢降低,而豫烟 6 号烟叶 DBE 活性则快速降低(图 2-e)。在整个烤烟成熟期,秦烟 96 和豫烟 6 号烟叶淀粉酶活性呈先降低后升高再降低的波动变化趋势,移栽后 95 d 之后,其淀粉酶活性快速升高,至移栽后 105 d 达到峰值,随后淀粉酶活性略有降低(图 2-f)。虽然在烤烟成熟期两个品种烤烟  $\alpha$ -淀粉酶活性

变化趋势相似,但与秦烟 96 相比,豫烟 6 号烟叶  $\alpha$ -淀粉酶活性波动较大;移栽后 105 d,秦烟 96 和豫烟 6 号烟叶  $\alpha$ -淀粉酶活性达到最高,分别为 2.42 和 2.73 mg/(g · min)(图 2-g)。秦烟 96 和豫烟 6 号烟叶  $\beta$ -淀粉酶活性变化趋势与淀粉酶活性一致,移栽后 105 d,两者  $\beta$ -淀粉酶活性达到峰值,分别为 12.98 和 14.13 mg/(g · min)(图 2-h)。

2.3 烤烟成熟期淀粉代谢关键酶基因表达量的变化

如图 3 所示,通过对秦烟 96 和豫烟 6 号成熟期

烟叶淀粉代谢相关基因(*NtAGPase*、*NtGBSS I*、*NtSSS*、*NtSBE*、*NtDBE*、*Nt $\alpha$ -amylase*、*Nt $\beta$ -amylase*)表达量的分析发现,在烟叶整个成熟阶段,*NtAGPase* 基因表达量呈先升高后降低的变化趋势,秦烟 96 和豫烟 6 号在移栽后 85~95 d 具有较高的 *NtAGPase* 基因表达量,之后其表达量快速下调。从移栽后 65 d 开始,*NtGBSS I* 基因表达量逐渐上调,至移栽后 95 d,其表达量达到最高,豫烟 6 号 *NtGBSS I* 基因表达量显著高于秦烟 96。

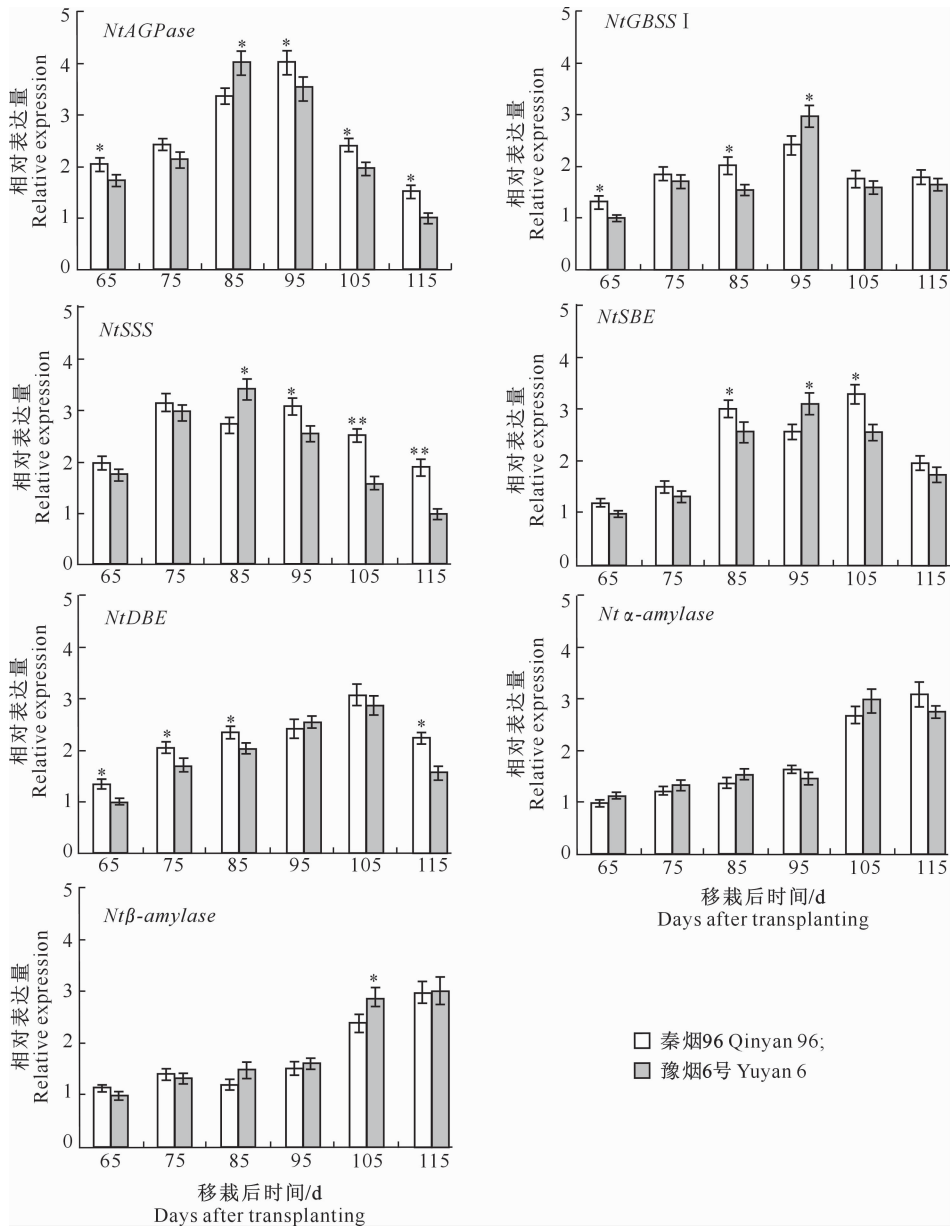


图 3 烤烟成熟期淀粉代谢关键酶基因相对表达量的变化

Fig. 3 Changes of expression levels of key enzyme genes in starch metabolism in flue-cured tobacco at mature stage

秦烟 96 烟叶 *NtSSS* 基因表达量在成熟期呈双峰波动变化,移栽后 75 d 其表达量达到第一个峰值;而豫烟 6 号 *NtSSS* 基因表达量变化趋势与之不同,*NtSSS* 基因表达量呈先升高后降低的单峰变化趋势,移栽后 85 d 其表达量达到最高(图 3)。烤烟成熟期 *NtSBE* 基因表达量变化趋势与 *NtSSS* 基

因表达量一致,但其达到峰值的时间略有不同。在整个烤烟成熟期,秦烟 96 和豫烟 6 号 *NtDBE* 基因表达量先升高后降低,移栽后 105 d, *NtDBE* 基因表达量达到最高。

移栽后 65~95 d,秦烟 96 和豫烟 6 号烟叶 *Ntα-amylase* 基因表达量较低,移栽后 95 d 之后,其表达量显著上调,并保持较高的表达水平(图 3)。烟叶中 *Ntβ-amylase* 基因表达量变化规律与 *Ntα-amylase* 基因表达量相似,其基因表达量也于移栽后 95 d 之后快速上调。

2.4 烤烟成熟期淀粉代谢关键酶活性及其基因表达量与淀粉含量的相关性

由表 2 可知,烤烟打顶至适熟阶段,烟叶中 AG-Pase、GBSS I、SSS、SBE 和 DBE 活性与烟叶淀粉含量之间达显著或极显著正相关水平;AGPase、GBSS I 与烟叶直链淀粉含量之间达极显著正相关水平;SSS、SBE、DBE 与烟叶支链淀粉含量之间达显著或极显著正相关水平;SBE、DBE 与烟叶支链淀

粉与直链淀粉的比值达显著正相关水平;而烟叶中淀粉酶、α-淀粉酶和 β-淀粉酶活性则与烟叶中淀粉含量及比例相关性较弱。烟叶适熟至过熟阶段,烟叶中 AGPase、GBSS I、SSS、SBE 和 DBE 活性与烟叶淀粉含量相关性减弱,而烟叶中淀粉酶(α-淀粉酶、β-淀粉酶)活性与烟叶淀粉含量及比例相关性显著增强,达显著或极显著负相关水平。

通过对烤烟成熟期淀粉代谢关键酶基因表达量与淀粉含量及比例之间相关系数的关联度分析,结果(表 3)显示,烟叶打顶至适熟阶段,所有淀粉代谢关键酶基因表达量与烟叶淀粉含量及比例呈正相关,但其相关性与淀粉代谢关键酶活性相比波动较大,且大部分相关性减弱。烟叶适熟至过熟阶段, *Ntα-amylase* 和 *Ntβ-amylase* 基因表达量与烟叶淀粉含量及比例相关性显著增强,达显著或极显著负相关水平; *NtAGPase*、*NtGBSS I* 和 *NtSSS* 基因表达量与烟叶支链淀粉与直链淀粉的比值达显著或极显著正相关水平。

表 2 烤烟成熟期淀粉代谢关键酶活性与淀粉含量的相关性

| Table 2 Correlation between key enzyme activities of starch metabolism and starch content in flue-cured tobacco at mature stage |                                  |          |          |         |          |          |                |                    |                    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|----------|----------|---------|----------|----------|----------------|--------------------|--------------------|
| 发育阶段<br>Developmental stage                                                                                                     | 指标<br>Norm                       | AGPase   | GBSS I   | SSS     | SBE      | DBE      | 淀粉酶<br>Amylase | α-淀粉酶<br>α-amylase | β-淀粉酶<br>β-amylase |
| 打顶至适熟<br>Topping to proper maturity                                                                                             | 淀粉 Starch                        | 0.936 *  | 0.979 ** | 0.906 * | 0.925 *  | 0.968 ** | -0.387         | -0.006             | -0.217             |
|                                                                                                                                 | 直链淀粉 Amylose                     | 0.971 ** | 0.958 ** | 0.734   | 0.744    | 0.805    | -0.411         | -0.329             | -0.279             |
|                                                                                                                                 | 支链淀粉 Amylopectin                 | 0.823    | 0.824    | 0.889 * | 0.965 ** | 0.915 *  | -0.202         | 0.066              | -0.355             |
|                                                                                                                                 | 支链淀粉/直链淀粉<br>Amylopectin/Amylose | 0.437    | 0.769    | 0.579   | 0.909 *  | 0.865 *  | -0.365         | 0.537              | -0.585             |
| 适熟至过熟<br>Proper maturity to overripe stage                                                                                      | 淀粉 Starch                        | 0.697    | 0.838 *  | 0.701   | 0.720    | 0.061    | -0.952 **      | -0.914 *           | -0.878 *           |
|                                                                                                                                 | 直链淀粉 Amylose                     | 0.530    | 0.725    | 0.603   | 0.592    | -0.141   | -0.971 **      | -0.933 *           | -0.958 **          |
|                                                                                                                                 | 支链淀粉 Amylopectin                 | 0.720    | 0.852 *  | 0.712   | 0.737    | 0.095    | -0.985 **      | -0.973 **          | -0.917 *           |
|                                                                                                                                 | 支链淀粉/直链淀粉<br>Amylopectin/Amylose | 0.886 *  | 0.755    | 0.758   | 0.754    | 0.434    | -0.841 *       | -0.916 *           | -0.811             |

注:打顶至适熟. 移栽后 65~95 d;适熟至过熟. 移栽后 95~115 d。\* 和 \*\* 分别表示在  $P<0.05$  和  $P<0.01$  水平上显著。下同。  
Note:Topping to proper maturity. 65—95 days after transplanting;Proper maturity to overripe stage. 95—115 days after transplanting.  
\* and \*\* indicate significant difference at  $P<0.05$  and  $P<0.01$ . The same below.

表 3 烤烟成熟期淀粉代谢关键酶基因相对表达量与淀粉含量的相关性

| Table 3 Correlation between starch metabolism key enzyme activities and gene expression in flue-cured tobacco at maturity |                                  |                 |                 |              |              |              |                    |                    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|-----------------|-----------------|--------------|--------------|--------------|--------------------|--------------------|
| 发育阶段<br>Developmental stage                                                                                               | 指标<br>Norm                       | <i>NtAGPase</i> | <i>NtGBSS I</i> | <i>NtSSS</i> | <i>NtSBE</i> | <i>NtDBE</i> | <i>Ntα-amylase</i> | <i>Ntβ-amylase</i> |
| 打顶至适熟<br>Topping to proper maturity                                                                                       | 淀粉 Starch                        | 0.901 *         | 0.747           | 0.766        | 0.869 *      | 0.907 *      | 0.245              | 0.326              |
|                                                                                                                           | 直链淀粉 Amylose                     | 0.831 *         | 0.901 *         | 0.801        | 0.758        | 0.791        | 0.341              | 0.618              |
|                                                                                                                           | 支链淀粉 Amylopectin                 | 0.983 **        | 0.792           | 0.736        | 0.980 **     | 0.955 **     | 0.573              | 0.314              |
|                                                                                                                           | 支链淀粉/直链淀粉<br>Amylopectin/Amylose | 0.819           | 0.961 **        | 0.382        | 0.803        | 0.854 *      | 0.462              | 0.482              |
| 适熟至过熟<br>Proper maturity to overripe stage                                                                                | 淀粉 Starch                        | 0.603           | 0.695           | 0.836 *      | 0.882 *      | 0.464        | -0.903 *           | -0.944 **          |
|                                                                                                                           | 直链淀粉 Amylose                     | 0.409           | 0.492           | 0.697        | 0.778        | 0.531        | -0.839 *           | -0.831 *           |
|                                                                                                                           | 支链淀粉 Amylopectin                 | 0.631           | 0.725           | 0.654        | 0.871 *      | 0.449        | -0.954 **          | -0.897 *           |
|                                                                                                                           | 支链淀粉/直链淀粉<br>Amylopectin/Amylose | 0.858 *         | 0.953 **        | 0.947 **     | 0.664        | 0.254        | -0.966 **          | -0.907 *           |

如图 4 所示,分析了烤烟打顶至适熟、适熟至过熟发育阶段淀粉代谢关键酶活性与各相关基因表达量之间的相关性,结果表明,烟叶打顶至适熟阶段,大部分烟叶淀粉代谢关键酶基因表达量与各相关酶活性呈正相关水平,淀粉酶和  $\beta$ -淀粉酶活性与各相关基因表达量呈负相关。烟叶适熟至过熟阶段,烟

叶中 AGPase、GBSS I、SSS、SBE 和 DBE 活性与各相关基因表达量之间相关性减弱,而淀粉酶、 $\alpha$ -淀粉酶和  $\beta$ -淀粉酶活性与各相关基因表达量之间相关性显著增强,其中 *Nt $\alpha$ -amylase* 和 *Nt $\beta$ -amylase* 基因表达量与淀粉酶( $\alpha$ -淀粉酶、 $\beta$ -淀粉酶)活性达显著或极显著正相关。

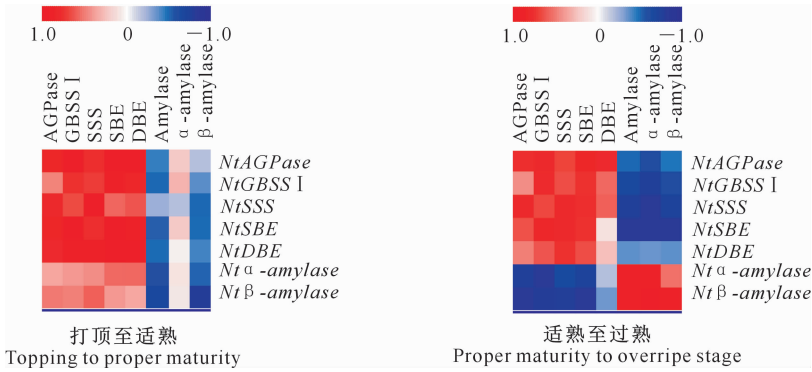


图 4 烤烟成熟期淀粉代谢关键酶活性与基因相对表达量的相关性

Fig. 4 Correlation between key enzyme activities of starch metabolism and gene expression in flue-cured tobacco at mature stage

3 讨论

烤烟成熟期烟叶淀粉快速合成、积累,代谢旺盛。牛德新等<sup>[23]</sup>研究表明,随着烟叶的成熟,烟叶淀粉含量呈上升趋势。杨胜男等<sup>[17]</sup>研究表明,烟叶成熟期淀粉含量逐渐上升,至烟叶生理成熟期达到最高,随后淀粉含量下降;直链淀粉和支链淀粉含量变化趋势与总淀粉含量变化一致,但支链淀粉含量达到峰值的时间则提前。本研究结果表现出相似的变化规律,秦烟 96 和豫烟 6 号从移栽后 65 d 淀粉快速积累,标志着烟叶生长进入成熟阶段;移栽后 85 d 淀粉含量达到峰值,说明此时烟叶为生理成熟期,淀粉含量最高,当烟叶适熟(移栽后 95 d)时,两个品种烟叶淀粉含量稍有降低,但秦烟 96 淀粉含量显著高于豫烟 6 号,说明不同基因型烤烟淀粉代谢存在一定差异<sup>[24]</sup>,秦烟 96 烟叶淀粉代谢活动高于豫烟 6 号。通过对成熟期烟叶淀粉组成比例研究发现,烟叶淀粉中支链淀粉含量显著高于直链淀粉,直链淀粉和支链淀粉含量变化趋势与总淀粉含量变化相同,呈先升高后降低的单峰波动变化,烟叶生理成熟期直链淀粉和支链淀粉含量最高,烟叶适熟时支链淀粉所占比例最高,这与前人的研究不同<sup>[13]</sup>,这可能与烤烟品种及田间管理措施有关,有待进一步研究。成熟期烤烟积累大量淀粉,其中大部分淀粉在烟叶烘烤变黄期降解,而直链淀粉含量所占比例

越高,烟叶淀粉易形成结晶区,烟叶淀粉不易降解,烤后烟叶淀粉含量较高,烟叶品质降低。

植物果实发育期间淀粉积累强度与淀粉代谢相关酶活性紧密相连<sup>[25]</sup>,AGPase 是高等植物淀粉生物合成第一个关键调节酶<sup>[26]</sup>,催化 G-1-P 和 ATP 生成淀粉前体物质,其活性大小决定淀粉合成速率及淀粉合成量的多少<sup>[27]</sup>。大量研究表明,抑制 AGPase 活性可导致淀粉生物合成部分或完全停止,而 AGPase 基因过表达可提高转基因作物种子质量及淀粉含量<sup>[28]</sup>。本研究发现,从移栽后 65 d 开始,烟叶 AGPase 活性逐渐增强,烟叶生理成熟期(移栽后 85 d)时 AGPase 活性最高,此时烟叶淀粉含量最高;烟叶工艺成熟期(移栽后 95 d)AGPase 活性显著降低,相应的烟叶淀粉含量呈不同程度降低,但支链淀粉与直链淀粉的比值显著升高,表明烟叶直链淀粉降解速率高于支链淀粉,这可能与 SBE、DBE 等酶活性有关;与豫烟 6 号相比,秦烟 96 具有更高的 AGPase 活性及淀粉含量,这与 Petreikov 等<sup>[29]</sup>在番茄上的研究结果一致。GBSS 是直链淀粉合成的关键酶<sup>[30]</sup>,它通过  $\alpha$ -1,4-D-糖苷键将 ADPG 中葡萄糖残基与葡聚糖非还原端相连接,形成线性大分子。本研究发现,烤烟成熟期 GBSS I 活性与直链淀粉含量变化趋势一致,进一步证实了 GBSS I 对直链淀粉合成的重要性。

SSS 与 GBSS 功能相同,通过  $\alpha$ -1,4-D-糖苷键

将 ADPG 中葡萄糖残基与葡聚糖非还原端相连接,但其主要存在于质体基质中,与 SBE 共同参与直链淀粉的合成<sup>[31]</sup>。SBE 又称 Q 酶,它不仅能水解  $\alpha$ -1,4-糖苷键连接的葡聚糖链,还能将切下的短链通过  $\alpha$ -1,6-糖苷键与受体链连接,形成支链淀粉的分支结构<sup>[32]</sup>。有研究认为 DBE 对支链淀粉分支进行修饰,最终合成具有一定晶体结构的淀粉晶体<sup>[33]</sup>。Nakamura 等<sup>[34]</sup>认为, SBE 与 DBE 活性之间的动态平衡对支链淀粉  $\alpha$ -1,4-侧链的长度分配起着决定性作用。本研究结果发现,在整个烤烟成熟发育期,SSS、SBE 和 DBE 活性均呈先升高后降低的单峰变化趋势,自移栽后 65 d,三者酶活性快速增强,烟叶支链淀粉含量升高;烟叶工艺成熟期(移栽后 95 d),秦烟 96 具有更高的 SSS 和 SBE 活性,相应的秦烟 96 具有更高的支链淀粉含量及比例,这与前人研究结果一致。淀粉降解主要通过淀粉酶( $\alpha$ -淀粉酶、 $\beta$ -淀粉酶)进行。本研究发现,自烟叶移栽后 95 d 达到工艺成熟,烟叶淀粉酶活性逐渐升高,淀粉降解,说明烟叶逐渐进入过熟阶段,淀粉代谢逐渐减弱。

淀粉代谢相关基因参与调控烟叶的淀粉代谢<sup>[35]</sup>。本研究发现,秦烟 96 和豫烟 6 号 *NtAGPase* 基因表达量在成熟期呈先升高后降低的变化趋势,移栽后 85~95 d *NtAGPase* 基因表达量较高,之后快速下调,这与贾宏昉等<sup>[16]</sup>的研究结果一致。烟叶中 *NtGBSS I* 基因表达量与 GBSS I 活性相似,移栽后 95 d 豫烟 6 号具有较高的 *NtGBSS I* 基因表达量,但其直链淀粉含量少于秦烟 96,这可能是因为秦烟 96 成熟前期直链淀粉积累较多。成熟期秦烟 96 烟叶 *NtSSS* 基因表达量呈双峰波动变化,而豫烟 6 号 *NtSSS* 基因表达量则呈单峰变化, *NtSBE* 基因表达量变化趋势与 *NtSSS* 基因表达量一致,而两个品种烤烟 *NtDBE* 基因表达量则呈先升高后降低的变化趋势;秦烟 96 在烟叶成熟期 *NtSSS*、*NtSBE* 和 *NtDBE* 基因表达量高于豫烟 6 号,这可能是导致秦烟 96 烟叶支链淀粉含量高于豫烟 6 号的主要原因,这与杨胜男等<sup>[17]</sup>的研究结果一致。移栽后 105 d,秦烟 96 和豫烟 6 号烟叶 *Nt $\alpha$ -amylase* 和 *Nt $\beta$ -amylase* 基因表达量显著上调,说明烟叶生长进入衰老阶段,淀粉代谢减弱。

综合分析烤烟成熟期打顶至适熟、适熟至过熟发育阶段淀粉含量及比例、淀粉代谢关键酶活性与基因表达量之间的关联性可知,烟叶打顶至适熟阶段,AGPase、GBSS I、SSS、SBE 和 DBE 活性与烟

叶淀粉含量之间达显著或极显著正相关水平,其中 AGPase、GBSS I 与烟叶直链淀粉含量达极显著正相关水平,SSS、SBE、DBE 与烟叶支链淀粉含量之间达显著或极显著正相关水平,这进一步证实了 GBSS I 是直链淀粉合成的关键酶,SSS、SBE 和 DBE 是支链淀粉合成关键酶;SBE、DBE 与烟叶中支链淀粉与直链淀粉的比值达显著正相关水平,说明 SBE 和 DBE 是调控烟叶支链淀粉与直链淀粉比例的关键酶。烟叶适熟至过熟阶段,AGPase、GBSS I、SSS、SBE 和 DBE 活性与烟叶淀粉含量相关性减弱,而淀粉酶( $\alpha$ -淀粉酶、 $\beta$ -淀粉酶)活性则与烟叶淀粉含量及比例相关性显著增强,说明当烟叶进入过熟阶段后,对烟叶淀粉代谢起主要调控作用的是淀粉酶( $\alpha$ -淀粉酶、 $\beta$ -淀粉酶)。烤烟成熟期淀粉代谢相关基因与淀粉含量及比例相关性略低于淀粉代谢关键酶活性与淀粉含量及比例相关性,说明淀粉代谢关键酶直接参与烟叶淀粉代谢的调控,而淀粉代谢相关基因则是在分子层面对烟叶淀粉代谢进行调控。

综上所述,烤烟成熟期经历了复杂的生理生化变化过程,淀粉代谢是一个受多种酶、多种基因调控的代谢活动。此外,淀粉代谢产生的糖类往往作为信号分子,与激素、氮等信号协同调控淀粉代谢和基因表达,由此进一步表明烟叶淀粉代谢的复杂性。

## 4 结 论

烤烟碳水化合物积累以淀粉为主,在烤烟发育成熟期,烟叶淀粉、直链淀粉和支链淀粉含量呈先升高后降低的变化趋势,烟叶生理成熟期其含量最高。烟叶打顶至适熟阶段,AGPase 和 GBSS I 对烟叶直链淀粉的积累贡献最大,*NtGBSS I* 对直链淀粉代谢起主要调控作用;SSS、SBE 和 DBE 活性对烟叶支链淀粉积累起重要作用,*NtSBE* 和 *NtDBE* 对烟叶支链淀粉代谢起主要调控作用。当烟叶过熟时,淀粉酶( $\alpha$ -淀粉酶、 $\beta$ -淀粉酶)主要参与烟叶的淀粉代谢活动。同一生态环境和栽培条件下,秦烟 96 淀粉积累较多,具有较高的支链淀粉比例,SBE 和 DBE 活性的差异可能是造成烟叶直链淀粉与支链淀粉比例不同的主要原因。

## [参考文献]

- [1] 熊福生,高煜珠,詹永昌,等.植物叶片蔗糖,淀粉积累与其降解酶活性关系研究[J].作物学报,1994,20(1):52-58.  
Xiong F S, Gao Y Z, Zhan Y C, et al. Relationship between su-

- crose and starch accumulation and its activity of degrading enzymes in plant leaves [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 1994, 20(1):52-58.
- [2] 王怀珠, 杨焕文, 郭红英, 等. 淀粉类酶降解鲜烟叶中淀粉的研究 [J]. *中国烟草科学*, 2005, 26(2):37-39.  
Wang H Z, Yang H W, Guo H Y, et al. Effects of additional amylase on degradation of starch in fresh tobacco leaves during flue-curing [J]. *Chinese Tobacco Science*, 2005, 26(2):37-39.
- [3] 刘国顺, 何永秋, 杨永锋, 等. 不同钾肥配施对烤烟质体色素和碳氮代谢及品质的影响 [J]. *中国烟草科学*, 2013, 34(6):49-55.  
Liu G S, He Y Q, Yang Y F, et al. Effects of combining application of various potassium fertilizers on plastid pigment, carbon-nitrogen metabolism and quality in flue-cured tobacco [J]. *Chinese Tobacco Science*, 2013, 34(6):49-55.
- [4] 宫长荣. 烟草调制学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2011.  
Gong C R. Tobacco modulation [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2011.
- [5] Weeks W W. Chemistry of tobacco constituents influencing flavor and aroma [J]. *Rec Adv Tob Sci*, 1985, 11(2):175-200.
- [6] 王红丽, 杨惠娟, 苏菲, 等. 氮用量对烤烟成熟期叶片碳氮代谢及蒴类代谢相关基因表达的影响 [J]. *中国烟草学报*, 2014, 20(5):116-120.  
Wang H L, Yang H J, Su F, et al. Effects of nitrogen on expression of key genes related to carbon/nitrogen metabolism and terpenoid metabolism in maturing flue-cured tobacco leaves [J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2014, 20(5):116-120.
- [7] 夏叔芳, 於新建. 大豆叶片淀粉的降解及淀粉降解酶 [J]. *植物生理学报*, 1989(2):153-157.  
Xia S F, Yu X J. Starch degradation and degradative enzymes in soybean leaves [J]. *Plant Physiology Communications*, 1989(2):153-157.
- [8] Akihiro T, Mizuno K, Fujimura T. Gene expression of ADP-glucose pyrophosphorylase and starch contents in rice cultured cells are cooperatively regulated by sucrose and ABA [J]. *Plant & Cell Physiology*, 2005, 46(6):937-946.
- [9] Suzuki K, Hattori A, Tanaka S, et al. High-coverage profiling analysis of genes expressed during rice seed development, using an improved amplified fragment length polymorphism technique [J]. *Functional & Integrative Genomics*, 2005, 5(2):117-127.
- [10] Ramesh M, Ali S Z, Bhattacharya K R. Structure of rice starch and its relation to cooked-rice texture [J]. *Carbohydrate Polymers*, 1999, 38(4):337-347.
- [11] Vandeputte G E, Vermeylen R, Geeroms J, et al. Rice starches: III. structural aspects provide insight in amylopectin retrogradation properties and gel texture [J]. *Journal of Cereal Science*, 2003, 38(1):61-68.
- [12] 邱礼平, 温其标. 不同链淀粉含量玉米淀粉结构特性及其降解性能的研究 [J]. *粮油加工与食品机械*, 2005(10):83-86.  
Qiu L P, Wen Q B. Study on structural characteristics and degradability of corn starch with different amylose content [J]. *Machinery for Cereals Oil and Food Processing*, 2005(10):83-86.
- [13] 李佳佳, 卢未琴, 高群玉. 不同链淀粉含量玉米微晶淀粉理化性质研究 [J]. *粮食与油脂*, 2011(2):13-17.  
Li J J, Lu W Q, Gao Q Y. Studies on physicochemical properties of microcrystalline starches made from different content of amylose [J]. *Cereals & Oils*, 2011(2):13-17.
- [14] 张生杰, 黄元炯, 任庆成, 等. 不同基因型烤烟烟叶碳氮代谢差异研究 [J]. *华北农学报*, 2010, 25(3):217-220.  
Zhang S J, Huang Y J, Ren Q C, et al. Differences in foliar carbon and nitrogen metabolism among genotypes of flue-cured tobacco [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2010, 25(3):217-220.
- [15] 邓云龙, 孔光辉, 武锦坤, 等. 氮素营养对烤烟叶片淀粉积累及 SPS、淀粉酶活性的影响 [J]. *烟草科技*, 2001, 34(11):34-37.  
Deng Y L, Kong G H, Wu J K, et al. Effect of nitrogen nutrition on starch accumulation and activity of SPS and diastase in tobacco leaves [J]. *Tobacco Science & Technology*, 2001, 34(11):34-37.
- [16] 贾宏昉, 陈红丽, 黄化刚, 等. 施用腐熟秸秆肥对烤烟成熟期碳代谢途径影响的初报 [J]. *中国烟草学报*, 2014, 20(4):48-52.  
Jia H F, Chen H L, Huang H G, et al. Preliminary report on effect of applying rotten straw fertilizer on carbon metabolism in maturing flue-cured tobacco [J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2014, 20(4):48-52.
- [17] 杨胜男, 张洪映, 连文力, 等. 复合有机肥对烤烟淀粉生物合成的影响 [J]. *中国烟草学报*, 2016, 22(1):64-70.  
Yang S N, Zhang H Y, Lian W L, et al. Effect of compound organic fertilizer on starch biosynthesis in flue-cured tobacco leaves [J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2016, 22(1):64-70.
- [18] 刘国顺. 烟草栽培学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.  
Liu G S. Tobacco cultivation [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2003.
- [19] 吴玉萍, 高云才, 徐昭梅, 等. 连续流动法测定新鲜烟叶中的直链淀粉和支链淀粉 [J]. *云南大学学报(自然科学版)*, 2018, 40(2):315-320.  
Wu Y P, Gao Y C, Xu Z M, et al. Determination of amylose and amylopectin of fresh tobacco by continuous flow method [J]. *Journal of Yunnan University(Natural Sciences Edition)*, 2018, 40(2):315-320.
- [20] Wan S B, Tian L, Tian R R, et al. Involvement of phospholipase D in the low temperature acclimation-induced thermotolerance in grape berry [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2009, 47(6):504-510.
- [21] 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.  
Ding F Z, Li J X, Yuan Y B, et al. Effective isolation of total RNA from tobacco tissues [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2007, 23(12):98-101.
- [22] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup>

Delta C(T)) method [J]. Methods,2001,25(4):402-408.

[23] 牛德新,连文力,崔红,等.施氮量对烤烟成熟期中部烟叶碳氮代谢及相关基因表达的影响[J].烟草科技,2017,50(8):10-15.

Niu D X,Lian W L,Cui H,et al. Effects of nitrogen application rate on carbon and nitrogen metabolisms and related gene expression in middle leaves of flue-cured tobacco at mature stage [J]. Tobacco Science & Technology,2017,50(8):10-15.

[24] 张会芳.烤烟叶片淀粉含量的遗传变异及农艺措施调控研究[D].郑州:河南农业大学,2005.

Zhang H F. Study on genetic variation and regulation of agro-nomic measures for starch content in flue-cured tobacco leaves [D]. Zhengzhou:Henan Agricultural University,2005.

[25] 张慧琴,谢鸣,张琛,等.猕猴桃果实发育过程中淀粉积累差异及其糖代谢特性[J].中国农业科学,2014,47(17):3453-3464.

Zhang H Q,Xie M,Zhang C,et al. Difference in starch accumulation and characterization of sugar metabolism during fruit development of kiwi fruit [J]. Scientia Agricultura Sinica,2014,47(17):3453-3464.

[26] Kang G,Liu G,Peng X,et al. Increasing the starch content and grain weight of common wheat by overexpression of the cytosolic AGPase large subunit gene [J]. Plant Physiology and Biochemistry,2013,73(6):93-98.

[27] 袁亮,潘光堂,张志明,等.植物中淀粉的代谢及其调控研究进展[J].分子植物育种,2006(S2):65-72.

Yuan L,Pan G T,Zhang Z M,et al. Research progress of starch metabolism and its regulation in plants [J]. Molecular Plant Breeding,2006(S2):65-72.

[28] Li N,Zhang S,Zhao Y,et al. Over-expression of AGPase genes enhances seed weight and starch content in transgenic maize [J]. Planta,2011,233(2):241-250.

[29] Petreikov M,Shen S,Yeselson Y,et al. Temporally extended gene expression of the ADP-Glc pyrophosphorylase large subunit(AgpL1)leads to increased enzyme activity in developing tomato fruit [J]. Planta,2006,224(6):1465-1479.

[30] Jeon J S,Ryoo N,Hahn T R,et al. Starch biosynthesis in cereal endosperm [J]. Plant Physiology and Biochemistry,2010,48(6):383-392.

[31] 刘玉汇,王丽,杨宏羽,等.植物淀粉分支酶基因的研究进展[J].麦类作物学报,2010,30(3):581-586.

Liu Y H,Wang L,Yang H Y,et al. Advances of research on plant starch branching enzyme gene [J]. Journal of Triticeae Crops,2010,30(3):581-586.

[32] Takeda Y,Guan H P,Preiss J. Branching of amylose by the branching isoenzymes of maize endosperm [J]. Carbohydrate Research,1993,240(9):253-263.

[33] Ball S,Guan H P,James M,et al. From glycogen to amylopectin:a model for the biogenesis of the plant starch granule [J]. Cell,1996,86(3):349-352.

[34] Nakamura Y,Yuki K. Changes in enzyme activities associated with carbohydrate metabolism during the development of rice endosperm [J]. Plant Science,1992,82(1):15-20.

[35] 蒋博文,王涛,宋朝鹏,等.采后烟叶碳代谢的动态变化分析[J].中国烟草科学,2018,39(1):32-41.

Jiang B W,Wang T,Song C P,et al. Dynamic analysis of carbon metabolism in tobacco leaves after harvest [J]. Chinese Tobacco Science,2018,39(1):32-41.

.....

(上接第 32 页)

[18] Heemann V,Brummer U,Paulsen C,et al. Composition of the leaf surface gum of some nicotiana species and *Nicotiana tabacum* cultivars [J]. Phytochemistry,1983,22:133-135.

[19] 王冬,孙九哲,彭玉富,等.不同品种(系)烤烟西柏三烯二醇代谢差异研究[J].中国烟草学报,2014,20(6):63-69.

Wang D,Sun J Z,Peng Y F,et al. Metabolism differences of cembratrien-diols in different tobacco cultivars [J]. Acta Tabacaria Sinica,2014,20(6):63-69.

[20] 王国平.烟草冷杉醇合成基因功能分析及功能标记开发[D].北京:中国农业科学院,2016.

Wang G P. Functional analysis and marker development of cis-abnieol synthesis gene in tobacco [D]. Beijing:Chinese Academy of Agricultural Sciences,2016.

[21] Rodríguez A,Shimada T,Cervera M,et al. Resistance to pathogens in terpene down-regulated orange fruits inversely correlates with the accumulation of D-limonene in peel oil glands [J]. Plant Signaling & Behavior,2015,10(6):e1028704.

[22] Hamano Y,Kuzuyama T,Itoh N,et al. Functional analysis of eubacterial diterpene cyclases responsible for biosynthesis of a diterpene antibiotic, terpentecin [J]. Journal of Biological Chemistry,2002,277(40):37098-37104.