

UV-B 辐射对烟草(*Nicotiana tobacum*)叶片总多酚含量和 PPO 活性的影响

王 毅¹, 钟 楚², 陈宗瑜², 丁金玲³, 纪 鹏², 董陈文华²

1 红塔集团技术中心 玉溪 653100; 2 云南农业大学农学与生物技术学院 昆明 650201;

3 云南农业大学烟草学院 昆明 650201

摘 要: 采用盆栽试验,以烤烟品种 K326 为供试材料,选择空间范围不大的云南玉溪大营街和通海 2 个不同海拔高度的植烟区为试验点,并选择玉溪烟区种植烤烟海拔最高的通海县(1806.0 米),作为同一种植地分别减弱 0%、25%、50% 和 65% UV-B 辐射强度条件的控制试验区,探讨了烤烟生长过程中 PPO 活性和总多酚含量与 UV-B 辐射强度的时空动态变化之间的关系。结果表明:由于受两地不同降雨日数及云层覆盖的影响,UV-B 辐射强度并不随海拔高度的升高而升高;PPO 活性对 UV-B 辐射强度变化非常敏感,过高或过低的 UV-B 辐射强度将降低 PPO 活性,其中过高的 UV-B 辐射强度影响更大;在一定的 UV-B 辐射强度范围内,降低强度可提高 PPO 活性;与 PPO 活性相反,高的 UV-B 辐射强度可提高烟叶总多酚含量,但在一定辐射强度范围内,对其变化趋势影响不大;过低的 UV-B 辐射强度不仅降低总多酚含量,而且影响整个生长过程中总多酚含量的变化。

关键词: UV-B 辐射;烟草;多酚氧化酶;总多酚

doi: 10.3969/j.issn.1004-5708.2010.011

中图分类号: Q494, Q58, S572.01

文献标识码: A

文章编号: 1004-5708(2010)01-0049-04

Effects of UV-B radiation on total polyphenol content and PPO activity in flue-cured tobacco leaves

WANG Yi¹, ZHONG Chu², CHEN Zong-yu², DING Jin-ling³, JI Peng², DONG Chen-wen-hua²

1 Technical Center of Hongta Group, Yuxi 653100, China;

2 College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

3 College of Tobacco Science, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

Abstract: Tobacco variety K326 was potted in two different altitude districts Da Yingjie and Tong Hai in a small range of Yuxi City, and under 0%, 25%, 50%, and 65% reduced UV-B radiation conditions in Tong Hai, which is the highest region in Yuxi tobacco region as a control experiment. The changes of PPO (polyphenol oxidase) activity and total polyphenol content with change of UV-B radiation in the process of tobacco leaf development were studied. Results showed that, UV-B radiation was not enhanced with increase of altitude due to difference in rainfall days and coverage of cloud in these two regions. PPO activity was sensitive to UV-B radiation, it decreased rapidly when the UV-B radiation intensity was higher or lower than a particular range of value, but it was more sensitive to higher UV-B radiation. In a range of UV-B intensity, the tendency of PPO activity was not influenced by reduced UV-B. Contrast to PPO activity, higher UV-B increased content of total polyphenol, but the trends were not influenced in a particular range of UV-B intensity. Low UV-B intensity reduced content of polyphenol.

Key words: ultraviolet-B radiation; tobacco; polyphenol oxidase; total polyphenol

作者简介: 王毅,男,学士,高级农艺师,主要从事烟叶质量评价研究, E-mail: mnh@hongta.com

陈宗瑜(通讯作者),男,教授,主要研究方向为气候与环境生态学, E-mail: zchen191@vip.sohu.com

基金项目: 红塔集团玉溪烟叶生态评价体系(KX140346)子课题—玉溪烟区紫外辐射强度变化对烤烟质量影响的机理研究

收稿日期: 2008-10-06

多酚氧化酶(Polyphenol oxidase, PPO)是植物中一类能与Cu结合的金属蛋白酶,主要存在于正常光合细胞的类囊体及非光合细胞的质体中,专一性强,能分别催化单羟基酚和二羟基酚氧化为O-二酚和O-醌。通常PPO指的是儿茶酚氧化酶和漆酶的统称^[1]。在烟草中,PPO不仅催化氧化多酚类化合物形成醌来抵御病虫害,而且在调制过程中能催化氧化多酚类化合物为 σ -醌, σ -醌聚合成黑色素,很大程度上影响烟叶的外观和内在品质^[2]。因此,合理调控烟草中PPO活性,对优质烟叶的生产有重要意义。

在烟草中发现的酚类物质包括单宁类(绿原酸的异构体、咖啡酸和奎尼酸)、香豆素类(茛菪亭和茛菪亭的糖苷衍生物)、黄酮类(芸香苷、黄酮、鼠李糖、黄酮醇)、花色素类(花色素-3-芸香糖苷、花葵素-3-芸香苷、槲皮醇)和简单酚衍生物等,其中绿原酸、芸香苷和茛菪亭是烟草中最主要的酚类物质。它们与蛋白质结合或经多酚氧化酶催化棕色反应,对烟叶的品质有重要影响,而且他们也是烟草抗病虫的重要物质^[3]。

研究表明,减少紫外光可以降低烟草多酚类物质含量和PPO活性^[4]。云南烟草品质指标与海拔具有较强的相关性^[5-7],气候学理论与实践已经证明,随海拔高度的增加,太阳辐射也相应地增加,太阳紫外线B(UV-B)辐射强度具有同样的变化^[8],UV-B辐射强度随海拔高度的变化可能对烟草PPO活性和多酚化合物含量的累积有重要影响。本试验在云南2个地域相差不大而海拔相差较大的地区,通过盆栽方式,研究了UV-B辐射强度对烟叶生长过程中PPO活性和总多酚含量的影响,目的是为解释环境因子对云南烤烟品质

影响的机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验设计

试验在云南省玉溪市红塔区大营街镇烟草新技术集成与示范基地(24°21'N,102°33'E,1591.0 m)和通海县桑园育苗场(24°07'N,102°45'E,1806.0 m)进行。为统一栽培管理,土壤条件一致并采用盆栽,土壤为菜园土,前茬为甘蓝,土壤主要理化性质见表1。土壤经消毒后晾干装盆,瓷盆,规格为口径40 cm,底部直径35 cm,高40 cm,每盆装土15 kg。供试烤烟品种为K326,于2008年5月9日移栽,每株底肥施烟草专用肥(m(N):m(P₂O₅):m(K₂O)=12:6:24)47 g,钙镁磷肥47 g,追肥施烟草专用肥20 g,硫酸钾8 g。期间施烟草提苗肥(m(N):m(P₂O₅):m(K₂O)=12:6:24)3次,按大田栽培方式,烤烟行株距120 cm×50 cm,常规管理。

试验分两部分进行,自然环境条件下盆栽试验和减弱太阳UV-B辐射试验。减弱太阳UV-B辐射试验在各处理上方搭1.8 m高的长方形架子,设4处理:T1.盖0.040 mm厚聚乙烯膜,减弱25%太阳UV-B辐射;T2.盖0.068 mm厚聚乙烯膜,减弱50%太阳UV-B辐射和T3.盖Mylar膜,减弱65%太阳UV-B辐射,以自然环境条件下未减弱太阳UV-B辐射处理作为对照(C),每处理20盆,5月18日开始处理。减弱UV-B的各处理四周用相应的膜封住,下部留90 cm高以利于通风。各膜顶部平整,用电烙铁烫直径约5 mm,间距为20 cm×20 cm分布均匀的孔,以利于雨水通透。经测定,试验期间盖膜处理透光率均在80%左右。

表1 土壤主要理化性质

质地	pH	有机质/(g·kg ⁻¹)	碱解氮/(mg·kg ⁻¹)	速效磷/(mg·kg ⁻¹)	速效钾/(mg·kg ⁻¹)
粘壤	7.79	54.5	138	149.2	416.1

1.2 紫外辐射强度观测

玉溪和通海两地的UV-B辐射观测仪器都为法国产RADIOMETER紫外辐射仪,标准带宽为295~395 nm,中心波长为312 nm。规定在北京时间每天11:30~12:30时之间进行观测(雨天除外),仪器开启1 min后开始归零测量,5 min内记录最稳定的1个数值,10 min后记下最大值和最小值,同时记录当时的天气和天空状况。各时段UV-B辐射强度值是样品分析间隔时段辐射观测值总和的平均值。

1.3 分析方法

于试验各时间段选取2株具有代表性的烟株,取第8和第9叶位的叶片代表中部叶片,用鲜样进行分析。

1.3.1 多酚氧化酶活性的测定

参考赫建军等^[9]的方法,稍做改动。取1 g鲜样放入预冷的研钵中,加入pH5.7的磷酸缓冲液研磨成匀浆,2次离心后(1500 r/min,10 min和2000 r/min,10 min),用pH5.7的磷酸缓冲液定容到25 mL,4℃低温保存备用,然后在室温下放置2 h后放在40℃下保温40 min,以沸水中煮沸过的酶液作对照,在3.9 mL,pH5.7的磷酸缓冲液和1 mL儿茶酚的反应体系中加入1 mL样品液,在720型分光光度计上测定525 nm处1 min和10 min时的吸光值,以每分钟内A525变化0.01为1个多酚氧化酶活力单位,以比活力表示(0.01ΔA·g⁻¹m_t·min⁻¹)。

1.3.2 总多酚含量的测定

取 0.5 g 鲜样,加 1% 盐酸甲醇溶液(v(盐酸):v(甲醇)=1:99)5 mL,在 4℃ 黑暗条件下提取 24 h,用水稀释 250 倍后在 UV-120-02 紫外分光光度计上测定 280 nm 处 OD 值,以没食子酸做标准曲线,标准曲线浓度梯度为 0、1.0、2.5、5.0、10.0、15.0、20.0 和 25.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,总多酚含量以 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{m}_f$ 计。

2 结果与分析

2.1 太阳 UV-B 辐射的时空分布

玉溪大营街和通海 2 个试验地的纬度和经度相差不大,虽然海拔相差 200 多米,但两地的 UV-B 辐射不随海拔高度的增加而增强,而且在不同的时间段各自表现出不同的变化特征(见图 1)。两地太阳 UV-B 辐射在试验阶段随时间的推移,总体上都呈下降趋势。但通海在 6 月 28 日前和 7 月 11 日~7 月 22 日 2 个时段内 UV-B 值偏低,而大营街在 7 月 23 日~8 月 1 日及 8 月 8 日~8 月 15 日和 8 月 16~8 月 22 日 3 个时段内大幅上升。大营街 UV-B 辐射强度总体上大于通海,与低纬高原地区海拔与 UV-B 辐射关系的一般规律^[9]相悖。这与两地的天气特征有关,表现在同一时段内大营街晴天天气较多,而通海则多云及降雨天气较多,云的遮蔽对 UV-B 辐射的削减有很大作用^[10-11]。

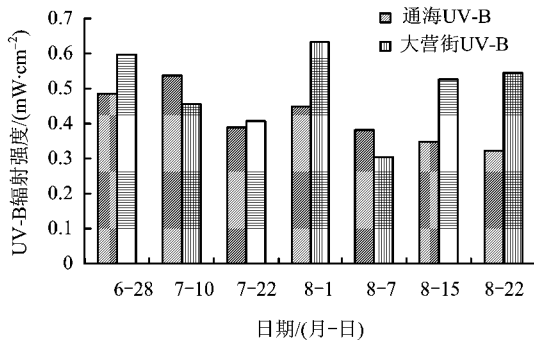


图 1 通海和大营街 UV-B 辐射强度变化

2.2 烟草叶片 PPO 活性变化

由图 2 可以看出,通海和大营街两地的烟叶 PPO 活性存在明显的差异,在烟叶发育的整个过程中,通海烟叶的 PPO 活性呈先上升后下降的变化,而大营街则出现先下降后上升的变化,但后阶段其活性已明显低于前阶段。通海处理各时段 PPO 活性都明显高于大营街处理,而 UV-B 辐射强度则是整个时段大营街高于通海,高强度的 UV-B 辐射极大地降低了 PPO 活性。在 8 月 7 日即工艺成熟期以前,通海处理 PPO 活性随着 UV-B 辐射呈相反变化。结果说明,PPO 活性对 UV-

B 辐射变化较为敏感。

烟草是喜光作物,光照强度对烟草的生长发育和品质有重要的影响。刘国顺等^[12]研究指出,在光照强度大于或等于 80% 自然光照条件下,光照强度对烟草的生长指标和光合指标没有大的影响。在我们的试验中,各盖膜处理光照强度均为自然光照条件下的 80% 左右,但 UV-B 辐射强度却相差较大。在整个试验过程中也发现,各处理的生育期,以及 T1、T2 和对照处理叶片成熟时间和成熟度均相似,但 T3 处理则相差较大,因此,可以认为,各处理之间的差异主要由 UV-B 辐射强度引起。

图 3 表明,减弱 UV-B 辐射对烟叶 PPO 活性没有大的影响,所有处理的 PPO 活性均在 7 月 22 日,即生理成熟期达到峰值,之后其活性呈下降趋势。整个过程中 T1 与对照变化一致,只是 T1 的 PPO 活性略大于对照。生理成熟期以前,T1 和 T2 提高了 PPO 活性,T3 却降低了 PPO 活性,之后则没有一定的规律性。结果说明,PPO 活性在生理成熟期以前对 UV-B 辐射强度较为敏感。

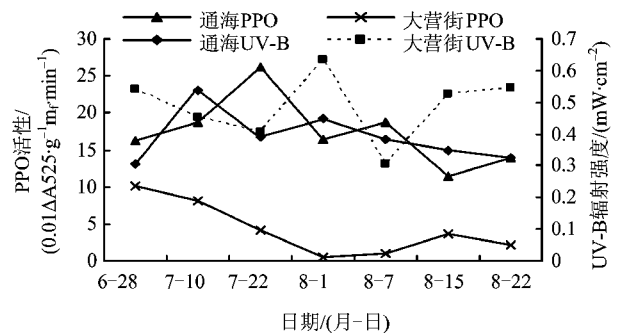


图 2 通海和大营街不同时期的烟叶 PPO 活性和 UV-B 辐射强度

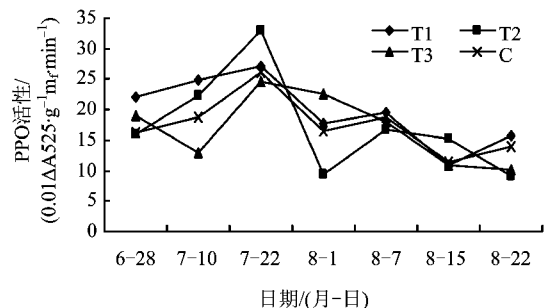


图 3 通海不同减弱 UV-B 处理烟叶 PPO 活性变化

两部分的试验结果都说明,在自然条件下,当 UV-B 辐射高于一定值时,烟叶 PPO 活性即急剧下降,而减弱部分 UV-B 辐射可以提高 PPO 活性,但 UV-B 辐射强度过低时,也会降低 PPO 活性。

2.3 烟草叶片总多酚含量变化

如图4所示,大营街处理各时段内总多酚含量与UV-B辐射具有相反的变化,而通海处理总多酚含量先随UV-B辐射强度增加而升高,但之后UV-B辐射强度下降和上升时,总多酚含量不变,后期UV-B辐射下降,总多酚含量才又开始上升。在烟叶的发育过程中,总多酚含量有2个上升较快的时期,分别为6月28日~7月10日和8月1日~8月7日,大致为旺长现蕾期~开花期和工艺成熟期。中间时段总多酚含量变化不大,工艺成熟期以后则有所下降。整个过程中,大营街烟叶总多酚含量高于通海,与它们的UV-B辐射强度是一致的。

图5说明,T3烟叶总多酚含量出现与其他处理明显不同的变化,在7月10日达到最大值后即迅速下降,进工艺成熟期以后基本保持不变,并为所有处理中最低值,说明过低的UV-B辐射强度严重降低烟叶总多酚含量。与对照不同,T1和T2第1阶段的上升时段较前者稍长,只是缩短了中间维持相对稳定的时间。后期3处理总多酚含量变化较一致,其含量大小为C>T1>T2>T3,说明进入工艺成熟中期以后,UV-B辐射强度对烟叶总多酚含量具有较大的影响。

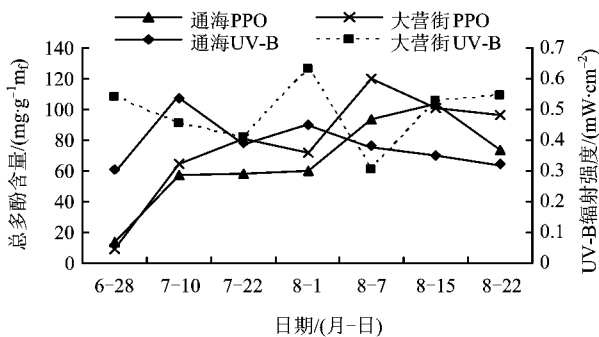


图4 通海和大营街不同时期的烟叶总多酚含量和UV-B辐射强度

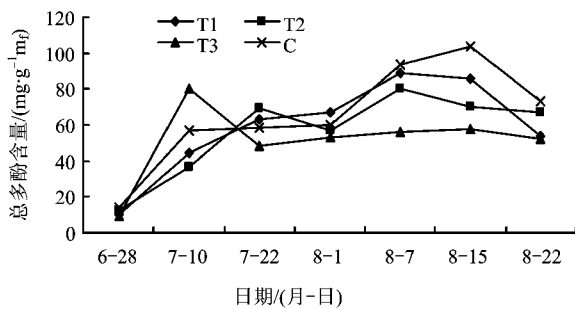


图5 通海不同减弱UV-B处理烟叶总多酚含量变化

3 结论与讨论

(1)试验结果表明,大营街和通海地域空间较为接

近,而海拔高度通海要高于大营街200多米,但UV-B辐射强度未出现随海拔高度的升高而增加,与大区域空间变化相比,存在较小地域内的特异性。总体上,在烤烟的生长季节内,大营街UV-B辐射高于通海,这与短期天气状况的差异有关。

(2)试验结果表明,PPO活性对UV-B辐射强度变化非常敏感,过高的UV-B辐射强度使PPO活性迅速降低,降低环境中的UV-B辐射不影响PPO活性的变化趋势,但在一定范围内可提高PPO活性,过低的UV-B辐射同样降低PPO活性,过高或过低的UV-B辐射抑制PPO活性的机理及UV-B辐射强度范围的确定还需进一步的研究。

(3)与PPO活性相反,高的UV-B辐射强度可提高烟叶总多酚含量。在一定范围内,总多酚含量的变化趋势变化不大,但过低的UV-B辐射强度不仅可降低总多酚含量,而且影响整个过程中总多酚含量的变化趋势。

(4)烟叶中总多酚含量通常与其他化学成分具有很好的相关性^[13]。本试验烟叶发育过程中总多酚含量的变化与PPO活性之间存在较密切的关系,总多酚含量的上升或下降可能是UV-B辐射对PPO活性的不同程度的抑制所引起的,减弱UV-B辐射强度处理在成熟中期以后总多酚含量变化只表现为UV-B辐射效应,与PPO活性的关系不明显,PPO与总多酚对UV-B辐射的响应机理及彼此之间的相互关系还有待深入研究。

(5)多酚化合物与烟叶颜色及烟叶的厚度密切相关,多酚化合物含量高,烟叶颜色也深,主要是由于多酚化合物被氧化成醌类物质及其聚合物等深色色素,导致酚类物质含量的降低和烟叶颜色的加深,同时厚度也增加^[14]。此外,多酚化合物及其分解产物还与烟草的香味有关,与烟草制品的等级呈正相关^[15]。PPO催化多酚物质参与棕色化反应,加深烟叶色泽,影响烘烤后烟叶的品质,因此,过高的PPO活性不利于优质烟叶的生产。试验中,大营街的烟叶具有最低的PPO活性和最高的总多酚含量,通过对比烘烤后各处理的烟叶发现,大营街的烟叶不仅色泽最好,而且烟叶厚,香气浓,说明在该试验条件下,大营街UV-B条件下生产的烤烟较其他UV-B处理效果要好。值得一提的是,本试验只是在小的地域范围内研究UV-B辐射对烤烟总多酚和PPO活性的影响,从二者的差异说明了相对较高UV-B辐射对烟叶品质形成的重要作用,但这个UV-B辐射范围目前还难以确定,需要在更大的地域范围内进行更加全面的试验才可能得出最终的结论。

(下转第57页)

参考文献

- [1] 胡荣海. 云南烟草栽培学[M]. 北京: 科学出版社, 2007.
- [2] 左天觉. 烟草的生产、生理和生物化学[M]. 朱尊权, 等译. 上海: 远东出版社, 1994.
- [3] 周冀衡. 烟草生理与生物化学[M]. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 1996.
- [4] 屈生彬, 张晨东, 殷端, 等. 不同质量类型香料烟品种在云南保山香料烟产区的适应性研究[J]. 中国烟草学报, 2008, 14(1): 32-36.
- [5] 殷端, 屈生彬. 香料烟品种在云南产区的适应性分析[J]. 西南农业学报, 2006, 19(4): 578-584.
- [6] 杨建卿, 江彤, 陈学平. 不同香料烟品种和品系对烟草黑茎病的抗病性研究[J]. 中国烟草学报, 2001, 7(3): 34-36.
- [7] 刘建利, 许树银. 优质香料烟品种杰尼克及其栽培技术要点[J]. 中国烟草科学, 2001(3): 47-48.
- [8] 张燕, 李天飞, 宗会, 等. 香料烟调制期间淀粉酶等生理生化指标动态变化[J]. 中国烟草科学, 2004(4): 23-26.
- [9] 屈生彬, 杨世波, 李光西, 等. 密度与施肥对香料烟成熟烟叶中几种酶活性及脯氨酸、丙二醛的影响初探[J]. 中国烟草科学, 2003(1): 18-22.
- [10] 屈生彬, 兰应海, 杨世波, 等. 不同成熟度香料烟叶生理生化特征研究[J]. 云南农业大学学报, 2004, 19(4): 405-408.
- [11] 朱广廉. 植物生理学实验[M]. 北京: 北京大学出版社, 1990.
- [12] 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 2版. 北京: 人民教育出版社, 1990.
- [13] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995.
- [14] 余叔文. 植物生理与分子生物学[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 1999.
- [15] 白宝璋, 孔祥生, 王玉昆, 等. 植物生理学(下: 实验教程)[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996.
- [16] 冉邦定, 刘敬业, 李天福, 等. 成熟度、施肥量、留叶数与烤烟组织结构和比叶重的关系[J]. 中国烟草, 1993(2): 2-6.

[上接第 52 页]

参考文献

- [1] 王曼玲, 胡中立, 周明全, 等. 植物多酚氧化酶的研究进展[J]. 植物学通报, 2005, 22(2): 215-222.
- [2] 彭新辉, 周清明, 易建华, 等. 烟草多酚氧化酶研究进展[J]. 烟草科技, 2006(12): 38-42.
- [3] 徐晓燕, 孙五三, 王能如. 烟草多酚类化合物的合成与烟叶品质的关系[J]. 中国烟草科学, 2003, 9(1): 3-5.
- [4] Zucker M, Nitsch C, Nitsch J P. The induction of flowering in *Nicotiana glauca*: Photoperiodic alternation of the chlorogenic acid concentration [J]. American Journal of Botany, 1985, 52: 271-277.
- [5] 王彪, 李天福, 王树会. 海拔高度与烟叶化学成分的相关分析[J]. 广西农业科学, 2006, 37(5): 537-539.
- [6] 王世英, 卢红, 杨骥. 不同种植海拔高度对曲靖地区烤烟主要化学成分的影响[J]. 西南农业学报, 2007, 20(1): 45-48.
- [7] 付亚丽, 卢红, 尹建雄, 等. 云南烤烟烟碱、总氮和粗蛋白含量与种植海拔的相关性分析[J]. 云南农业大学学报, 2007, 22(5): 666-680.
- [8] 周平, 陈宗瑜. 云南高原紫外辐射强度变化时空特征分析[J]. 自然资源学报, 2008, 23(3): 487-493.
- [9] 赫建军, 康宗利, 于洋. 植物生理学实验技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 100-101.
- [10] Guo S C, Chang Y L, Li H J. Preliminary analysis the relationship between UV and cloud during August to December, 2003 Kunming, China (part I) [J]. Yunnan geographic environment research, 2005, 17(1): 1-4.
- [11] Diaz S, Camili6n C, Deferrari G, et al. Ozone and UV Radiation over Southern South America: Climatology and Anomalies [J]. Photochemistry and Photobiology, 2006, 82(4): 834-843.
- [12] 刘国顺, 乔新荣, 王芳, 等. 光照强度对烤烟光合特性及其生长和品质的影响[J]. 西北植物学报, 2007, 27(9): 1833-1837.
- [13] 章平泉, 杜秀敏. 烤烟主要化学成分与多酚类物质的典型相关性分析[J]. 化工时刊, 2006, 20(7): 47-49.
- [14] 冯丽婷, 徐杰, 闫克玉, 等. 河南烤烟(40级)酚类物质含量及规律性研究[J]. 烟草科技, 1999(1): 22-24.
- [15] 闫克玉. 烟草化学[M]. 郑州: 郑州大学出版社, 2002: 159-160.