

不同生态区烟草叶片蛋白质组学的比较

崔 红¹, 冀 浩¹, 张 华¹, 邵惠芳¹, 李东宵², 陈 亮^{2,*}

(1. 烟草行业栽培重点实验室, 河南农业大学 郑州 450002; 2. 厦门大学生命科学学院 福建 厦门 361005)

摘要:为探讨不同生态区烟叶香气风格形成的机理,应用蛋白质双向电泳联用质谱技术,对河南平顶山(浓香型烟叶的典型生态区)和福建龙岩(清香型烟叶的典型生态区)的烟草(*Nicotina tabacum* L. cv. K326)叶片蛋白质组成进行了比较研究。结果发现,51 个蛋白质在两个生态区发生了差异表达,其中在河南表达量上升的有 15 个,在福建表达量上升的有 25 个。另外,还分别有 2 个和 9 个蛋白点为在河南和在福建样品中特异表达。采用 MALDI I-TOF/MS 进行肽质量指纹图谱分析,经 MSDB、NCBI 和 SwissPort 数据库查询,共鉴定出 25 种蛋白质,其中参与叶绿体发育、色素代谢、光合作用相关的蛋白在福建烟区高表达,与糖酵解途径相关的蛋白质在河南烟区中高表达。另外,在两生态区烟叶中都发现有相当数量的特异表达的抗逆和防御蛋白。首次在蛋白质组学水平对不同香气风格烟叶的形成机理进行了探讨。

关键词:烟草;香气风格;双向电泳;蛋白质组学

文章编号:1000-0933(2008)10-4873-08 中图分类号:Q945, Q946.1, Q948 文献标识码:A

Comparative analysis of leaf proteomes between tobacco plants growing in different ecological regions of China

CUI Hong¹, JI Hao¹, ZHANG Hua¹, SHAO Hui-Fang¹, LI Dong-Xiao², CHEN Liang^{2,*}

1 Key Lab of National Tobacco Cultivation, Henan Agricultural University, Zhengzhou, 450002 China

2 College of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China

Acta Ecologica Sinica, 2008, 28(10): 4873 ~ 4880.

Abstract: To explore the molecular mechanism of tobacco aroma style formation, protein profiles of mature leaves of tobacco (*Nicotina tabacum* L. cv. K326) plants grown respectively in Henan province (Central China) and Fujian province (South China), were compared using two-dimensional electrophoresis. Fifty-one proteins were found to be differentially expressed between tobacco plants from the two different ecological regions. Among them, 15 proteins were up-regulated and 2 were specific to Henan tobacco leaves, while 25 proteins were up-regulated and 9 were specific in Fujian tobacco leaves. Next, the differentially expressed proteins were subjected to MALDI-TOF analysis for identification. It turned out 25 proteins matching homologous sequences in MSDB and NCBI database. In particular, several proteins involved in chloroplast development, pigment metabolism, photosynthesis were up-regulated in Fujian tobacco leaves, while proteins involved in glycolytic pathway were relatively abundant in Henan tobacco leaves. In addition, some specific proteins related to stress responses were identified both in Henan and Fujian tobacco plants. Thus, the different expression patterns of leaf proteomes may contribute to the formation of special tobacco aroma style. To our knowledge, this was the first attempt to explore the mechanism of tobacco aroma style formation on a proteome level.

基金项目:烟草行业栽培重点实验室资助项目(06TCKL06004)

收稿日期:2007-07-13; 修订日期:2007-12-29

作者简介:崔红(1966~),女,河南郑州人,博士,主要从事烟草分子生物学研究. E-mail: cuihong @ 371.net

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: chenl304@163.com

Foundation item: The project was financially supported by Key Laboratory of Tobacco Cultivation (No. 06TCKL06004)

Received date: 2007-07-12; **Accepted date:** 2007-12-29

Biography: CUI Hong, Ph. D. mainly engaged in tobacco molecular biology. E-mail: cuihong @ 371.net

Key Words: *Nicotina tobaccum*; aromatic style; two-dimensional gel electrophoresis; comparative proteomics

烟叶的香气风格易受生态环境因素的影响。同一品种在不同的生态区种植,常表现出不同的香气风格。在长期生产实践中,我国烤烟香型主要划分为浓香型和清香型两大典型类型^[1];浓香型烤烟主产于河南、安徽、陕西等地,香气浓郁,劲头适中,烟灰呈灰色,有杂气和刺激性;清香型烤烟产于云南、福建、广东等地,清香淡雅,吸味舒适,烟味较淡,烟灰白色,杂气轻微。但这种划分是以人的感官为基础的,类型之间没有明显的界限和量化指标。20 世纪 70 年代以来,由于色谱、质谱、核磁共振等分析技术的发展,使得对烟叶香气成分的分离和鉴定成为可能。但由于香气物质代谢过程极为复杂,与香气特征相关的物质众多且含量极微,至今仍然不能对香型形成的机理以及主要香型的划分找到可靠的理论依据和指标体系,使得烟草种植区划、品质区划的研究缺乏理论基础,通过品种选育和农艺措施改进来提高烟叶香气品质的研究也存在一定障碍。

多年来,对于香气风格形成机理的研究,主要集中在常规化学成分和致香物的比较研究方面^[2~4]。迄今为止,有关不同香型风格的烟叶在转录组学和蛋白质组学水平上的比较研究,在国内外还未见报道。本研究采用蛋白质双向电泳联用质谱技术,以烟草栽培品种 K326 为材料,对其在浓香型和清香型典型生态区烟叶蛋白质表达谱进行比较研究,旨在探讨不同生态区烟叶在蛋白质组学水平存在的差异及其对香气风格形成的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

烟草品种 K326,分别种植于河南平顶山和福建龙岩,并按当地常规栽培措施进行管理。移栽后 70d,选取 9~11 叶位的中部叶片(成熟前期),迅速置于液氮中备用。

1.2 试剂

主要试剂两性电解质 pH 3.0~10.0、pH 5.0~8.0 和 pH 7.0~9.0 均为 Amersham Biosciences 公司产品;丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、SDS、TEMED、溴酚蓝等为 Sangon 公司产品;NP-40、碳酸氢铵、三氟乙酸(TFA)、ACN、HCCA 等为 Fluka 公司产品;尿素(超纯)、硫代硫酸钠、过硫酸铵、铁氢化钾、碳酸钾、 β -巯基乙醇等为 Amresco 公司产品;碘乙酰胺、DTT、Triton X-100 等为 Sigma 公司产品;胰蛋白酶为 Promega 公司产品。

1.3 蛋白质提取、二维凝胶电泳及图谱分析

参照何瑞峰等的方法^[5]进行叶片全蛋白提取,按照 Bradford 法^[6]测定裂解后的样品蛋白质浓度后,用裂解液定量至 80 $\mu\text{g}/20\mu\text{l}$ 浓度左右,分装, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷藏备用。

聚丙烯酰胺凝胶双向电泳参照何华勤^[7]及 O'Farrell 等^[8]的方法进行。银盐染色采用 Yan^[9] 等的方法稍做修改进行。

凝胶银染后使用 Umax powerlook III 扫描仪进行扫描,借助 Image Master 5.0 软件对图谱进行分析。当两两之间的 Radio 值大于 2.0 时,认为具有显著性差异。确定差异表达的蛋白质点,并从胶上挖取差异点。

1.4 质谱分析

将凝胶上的蛋白质差异点切下后,参照 Fernandez^[10] 等和 Gharahdaghi 等^[11] 的方法稍作修改进行蛋白质胶内消化,萃取出肽段。用 2 μl 0.5% TFA 溶解肽段,取 1 μl 样品加入等体积基质 HCCA 饱和溶液,混合均匀,上样 1 μl 至点样钢板。室温干燥后,使用德国 BRUKER 公司的 ReFlexTM III MALDI-TOF 质谱仪进行分析,在获得肽质量指纹图谱后进行标峰,并得到质谱分析数据。

1.5 生物信息学分析

将质谱分析所得数据。通过 MASCOT 软件进行查询。查询条件:对表观 pI 值及分子量未做要求;肽片段分子量最大容许误差范围为 150×10^{-6} ,蛋白种属选择绿色植物(green plant),不完全裂解位点 1 个,最少匹配肽段数规定为 3,碘乙酰胺处理,分别交换选择 MSDB 和 NCBI nr 数据库进行查询。

2 结果与分析

2.1 河南、福建烟叶蛋白电泳图谱分析

对河南平顶山、福建龙岩成熟前期 K326 中部叶片的蛋白质进行双向电泳,获得稳定性较好的二维凝胶图谱(图 1)。图谱存在“拖尾”现象,可能与烟草叶片中部分蛋白质含量丰富,并有大量的多糖、酚类等次生代谢物质存在有关。

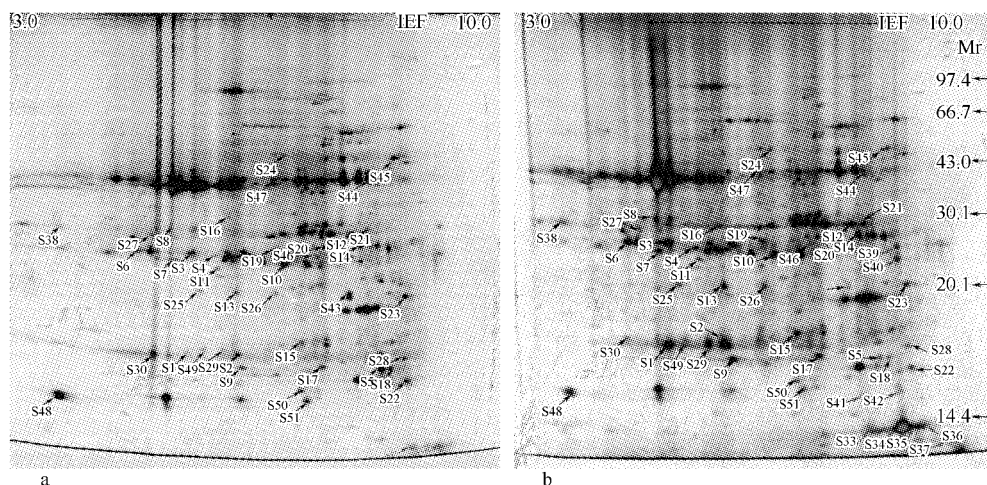


图 1 烟草 K326 在河南(a)和福建(b)的叶片总蛋白质的 2-D 电泳图

Fig. 1 2-DE patterns of K326 leaf total proteins from tobacco plants grown in Henan (a) and Fujian (b)

用 Image Master 5.0 软件进行图谱分析,每块胶上可以分离到 500 ~ 700 个清晰的蛋白质点,这些蛋白质点主要分布在等电点为 3 ~ 10,分子量 10 ~ 100 kDa 的范围内。将河南与福建样品的蛋白质胶比较,当 ratio 为 2.0 以上时,发现有 51 个蛋白质点差异表达。其中在河南表达量上升的有 15 个,在福建表达量上升的有 25 个。另外,还分别有 2 个和 9 个蛋白点为在河南和在福建样品中特异表达(图 2、图 3)

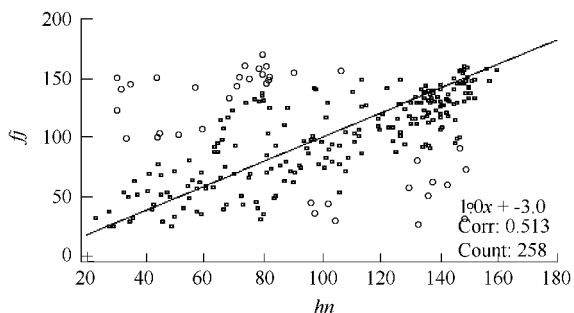


图 2 烟草品种 K326 叶片蛋白在河南和福建的差异表达散点图

Fig. 2 Scatter plot of protein expression profiles in tobacco leaves from Henan and Fujian

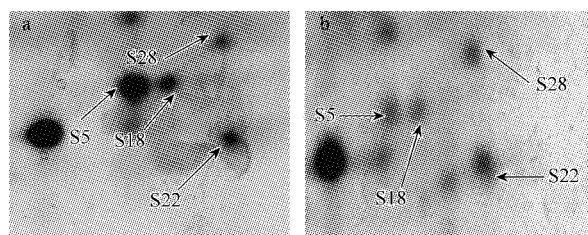


图 3 河南(a)和福建(b)样品中部分差异表达蛋白质点的放大图

Fig. 3 Examples of the differentially expressed proteins in Henan(a) and Fujian(b) (Magnified regions)

2.2 差异表达蛋白质的鉴定

对 51 个差异蛋白质点进行 MALDI-TOF/MS 分析,共获得了 34 个比较理想的蛋白的肽质量指纹图谱,其中 S48 的 PMF 如图 4 所示。

将所得的 34 个蛋白质的肽质量指纹图谱所得数据,使用软件去除杂质峰后,提交至 Msc0 网站,选用 MSDB 和 NCBIInr 数据库查询,共鉴定出 25 种匹配度较高蛋白,其中在河南表达量上升的有 8 个(表 1),在福建表达量上升的有 17 个(表 2)。另外 9 个没有查询到明显的同源匹配蛋白,或者其功能还未得到注释。

在河南生态区上调的 8 个蛋白中,2 个与碳代谢途径相关,分别为 NADH 脱氢酶(S4)和甘油醛-3-磷酸脱

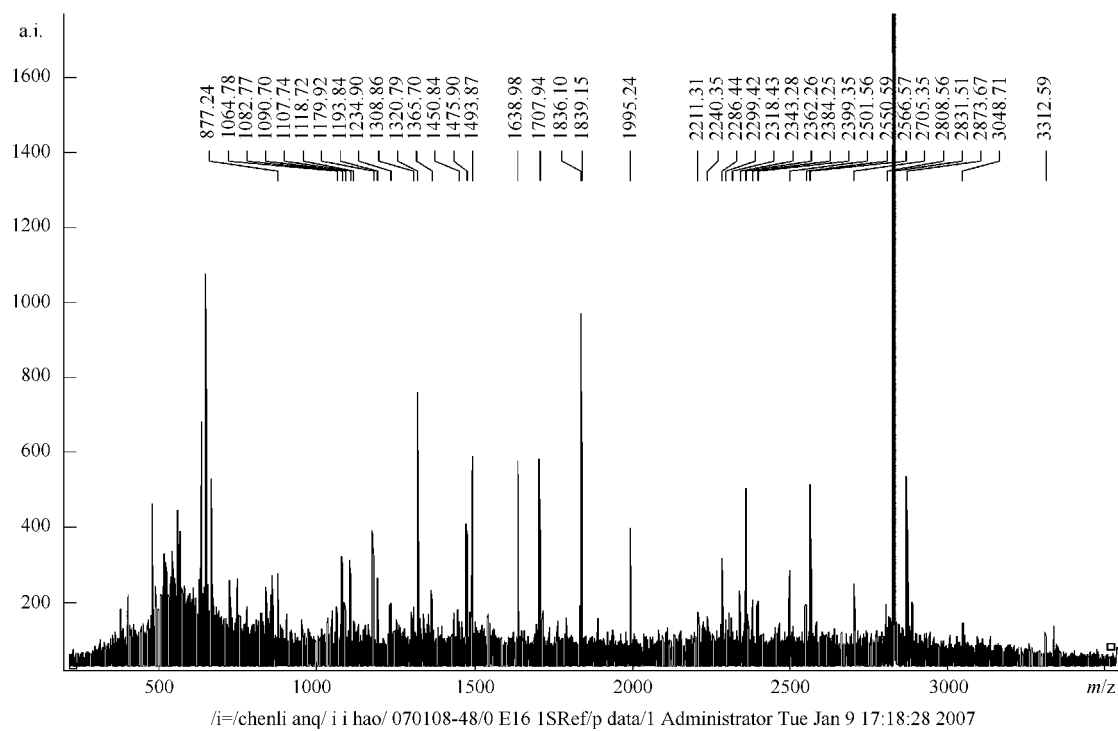


图4 蛋白质点 S48 的肽质量指纹图谱
Fig.4 Peptide mass fingerprinting (PMF) of the spot S48

氢酶(S30);2个与叶绿体发育和代谢相关,分别是衰老诱导叶绿素持绿蛋白(S10)和叶绿体 RNA 解旋酶 5 亚型蛋白(S50);2个与信号传导相关,分别为赤霉素-2 氧化酶(S5)和 MRGH21 信号传导类蛋白(S28)。另外,还有一个法尼基相关蛋白(S43)和一个防御响应蛋白-缩氨酸蛋氨酸亚砷还原酶的(S23)。

表 1 在河南烟草叶片中表达上调的部分蛋白的质谱鉴定(Ratio≥2.0)

| Table 1 Identification of Some up-regulated expression proteins in the tobacco leaves in Henan | | | | | |
|--|-----------------|-----------------|--|--------------|---------------------------|
| 蛋白点 Spot | 登录号 Acc. No. | 匹配数 Peptides | 蛋白质名称 Protein | 信号值 Ratio | 序列覆盖率(%) Seq. coverage |
| S4 | Q5MF33 | 4 | NADH 脱氢酶 NADH dehydrogenase subunit 9 | 3.45 | 36 |
| S5 | AAM62763 | 5 | 赤霉素-2 氧化酶 gibberellin 2- oxidase | 5.52 | 23 |
| S10 | Q4JFW8 | 3 | 衰老诱导叶绿体持绿蛋白 Senescence-inducible chloroplast stay-green protein | 2.27 | 20 |
| S23 | Q9XFZ6 | 3 | 缩氨酸蛋氨酸亚砷还原酶 Peptide methionine sulfoxide reductase PMSR1 | 4.20 | 32 |
| S28 | Q5DMV3 | 11 | MRGH21 信号传导类蛋白 MRGH21. - Cucumis melo (Muskmelon) | 2.11 | 53 |
| S30 | Q2KMG4 | 3 | 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase | 4.74 | 31 |
| S43 | Q8LGG1 | 3 | 法尼基相关蛋白 Farnesylated protein (ATFP6) | 4.51 | 34 |
| S50 | Q9FQ85 | 4 | 叶绿体 RNA 解旋酶 5 亚型蛋白 Putative chloroplast RNA helicase VDL'isoform5 | 4.25 | 29 |

在福建生态区上调的 17 个蛋白中,2 个与碳代谢相关,分别为淀粉合成酶(S34,特异表达点)和磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(S48);6 个与叶绿体发育和代谢相关,分别为 S3 核糖体蛋白(S13)、叶绿体 30S 核糖体蛋白

(S15)、叶绿素 a/b 绑定蛋白(S17)、Rps4 蛋白(S29)、叶绿体外膜转运蛋白(S35,特异表达点)、叶绿体 50S 核糖体蛋白(S37);3 个与蛋白质合成、修饰与信号传导相关,分别为 XH 结构域蛋白(S27)、甘氨酸合成酶(S39)、生长调节蛋白(S45);5 个与防御过程相关,分别为几丁质酶(S33,特异表达点)、细胞色素 P450 的相关蛋白(S2)、植物螯和肽酶 2 的蛋白(S20)、caffeoyl-辅酶 A-O-转甲基酶的抗性蛋白(S26)和富亮氨酸重复序列的与植物抗逆相关的抗性蛋白(S40);另外还有一个与萜类代谢相关的异戊烯转移酶(S1)。

表 2 在福建烟草叶片中表达上调的部分蛋白的质谱鉴定(Ratio≥2.0)

Table 2 Identification of Some up-regulated expression proteins in the tobacco leaves of Fujian

| 蛋白点 Spot | 登录号 Acc. No. | 匹配数 Peptides | 蛋白质 Protein | 信号值 Ratio | 序列覆盖率(%) Seq. coverage |
|-------------|-----------------|-----------------|--|--------------|---------------------------|
| S1 | Q1SS93 | 5 | 萜类环化酶 Terpenoid cyclases | 8.69 | 44 |
| S2 | Q9FRC0 | 5 | 细胞色素 P450 的相关蛋白 Putative cytochrome P450 - related protein | 3.91 | 35 |
| S13 | Q85UK5 | 3 | S3 核糖体蛋白 Putative Ribosomal protein S3 | 2.24 | 24 |
| S15 | CAA92551 | 4 | 叶绿体 30S 核糖体蛋白 Putative Chloroplast 30S ribosomal protein S4. | 2.11 | 59 |
| S17 | Q8W159 | 5 | 叶绿素 a/b 结合蛋白 Chlorophyll a/b binding protein. | 2.43 | 26 |
| S20 | Q84N18 | 5 | 植物螯和肽酶 2 Putative Phytochelatase synthase 2 | 2.34 | 20 |
| S26 | T03796 | 3 | caffeoyl-辅酶 A-O-转甲基酶 Putative caffeoyl-CoA O-methyltransferase | 2.93 | 15 |
| S27 | Q2QNA8 | 3 | XH 结构域蛋白 XH domain containing protein, expressed. | 2.25 | 21 |
| S29 | Q95E50 | 5 | Rps4 蛋白 Putative Rps4 (Fragment). | 2.11 | 27 |
| S33 | Q6XD74 | 4 | III 型几丁质酶 Putative Class III chitinase. | — | 32 |
| S34 | Q3HSW8 | 4 | 淀粉合成酶 Putative Granule-bound starch synthase. | — | 52 |
| S35 | Q5QJD5 | 3 | 叶绿体外膜转运蛋白 Putative Chloroplast outer envelope protein translocator Toc12. | — | 19 |
| S37 | RK12 | 5 | 质体 50S 核糖体蛋白 Putative Plastid 50S ribosomal protein L12. | 2.51 | 33 |
| S39 | Q6YZX5 | 5 | 甘氨酸酰胺核苷酸合成酶 Putative glycineamide ribonucleotide synthetase. | — | 13 |
| S40 | ABA96670 | 11 | 富亮氨酸重复序列蛋白 Leucine Rich Repeat | 4.93 | 27 |
| S45 | Q53PH8 | 3 | 生长调节蛋白 Growth regulator protein, putative | 2.42 | 17 |
| S48 | Q9M493 | 6 | 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 Phosphoenolpyruvate carboxylase | 2.54 | 22 |

3 讨论

河南烟区和福建烟区分属黄淮海烟区和长江中下游烟区^[12,13]。生态因素的差异赋予了河南和福建两地烟叶风格迥异的香气特征,而在蛋白质组学水平上,同一品种烟叶在两生态区蛋白质组成和含量上也表型出明显差异。

3.1 生态因素对烟叶叶绿体发育和物质代谢的影响

在河南与福建生态区烟叶中所鉴定出的差异蛋白中,有 8 个与叶绿体的发育和代谢有关,其中 4 个叶绿体基因编码的核糖体蛋白:S3 核糖体蛋白(S13)、叶绿体 30S 核糖体蛋白(S15)、叶绿体 50S 核糖体蛋白

(S37)和 Rps4 蛋白(S29),以及叶绿体外膜转运蛋白 Toc12(S35)都在福建烟区高(或特异)表达。叶绿体的核糖体蛋白与叶绿体内的蛋白质合成有关,而 Toc12 则与核基因编码的蛋白质向叶绿体的定向转运过程相关。多个叶绿体核糖体蛋白和 Toc12 蛋白在福建生态区的高表达,表明在福建特殊的光热生态条件下,叶绿体蛋白质的合成及运转更为活跃。

另外,叶绿素 a/b 结合蛋白(S17)在福建烟区高表达。由于叶绿素只有与叶绿素蛋白结合才能稳定存在,所以叶绿素结合蛋白的含量从某种程度上可以反应出叶绿素的代谢状况。衰老诱导叶绿素持绿蛋白(LeSGR1)(S10)在河南烟区高表达,该蛋白是从番茄果皮中发现的,在衰老诱导情况下能维持果皮叶绿素的稳定性,使其保持绿色。LeSGR1 的高表达,虽在一定程度上延长了叶绿体的光合作用寿命,维持了一定的物质积累水平,但也有可能影响叶绿素的正常分解代谢,使类胡萝卜素和叶绿素的比例发生变化。杨虹琦等^[14]的研究中也证明,福建烟叶中色素含量显著高于较高河南烟叶,而且两生态区烟叶叶绿素和类胡萝卜素的比例也有显著差异,并推断该差异是导致两生态区烟叶香气风格特色迥异的主要因素之一。

另一个在河南高表达的是叶绿体 RNA 解旋酶 5 亚型蛋白(S50),与叶绿体的早期分化和形态建成有关^[15]。该结果表明叶绿体的形态、结构和个体发育也会受到生态因素的影响。而关于福建、河南生态区叶片叶绿体结构和发育方面的差异还需要进一步研究。

3.2 生态因素对烟叶碳代谢的影响

在所鉴定的 4 个参与碳代谢的蛋白中,磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(S48)和淀粉合成酶(S34)在福建烟区烟草中高表达或特异表达。前者参与 CO₂ 的高效固定,后者参与淀粉合成。加之福建生态区与叶绿体蛋白质合成、运转及叶绿素相关等一系列蛋白的高表达,充分说明,福建烟区丰富的光热条件有利于烟草进行光合作用,烟草体内的碳水化合物合成代谢比较旺盛。甘油醛-3-磷酸脱氢酶(S30)和 NADH 脱氢酶(S4)在河南生态区高表达,由于二者参与糖酵解途径和光呼吸作用,反映出河南烟区烟草的碳水化合物分解代谢比较旺盛。烟叶化学成分的比较研究结果也证实河南烟叶与福建烟叶相比总糖及还原糖含量相对较低的特点^[2]。这可能与河南烤烟成熟期的昼夜温差较小,而水分条件较为适宜,烟株呼吸作用较强有关。

3.3 生态因素对烟草类萜代谢的影响。

类萜代谢是烟草的重要次生代谢途径之一。单萜、倍半萜、双萜属于次生代谢物质,是烟草叶面挥发物和腺体分泌的主要组成成分,与烟叶的抗性和香气品质密切相关^[16]。三萜、四萜化合物一般划分为初生代谢产物,如类胡萝卜素、叶绿素、赤霉素、脱落酸、甾醇等,是烟草生长发育所不可缺少的。试验中发现萜类环化酶(S1)在福建的表达量是河南的 8.69 倍,是两生态区表达差异最为显著的蛋白。该酶属萜类合成酶家族蛋白,这类蛋白的共同特点是都包含 10~12 个反向平行的特定的结构域,被分为鲨烯合酶,单萜合酶,倍半萜合酶等 6 个小群^[17]。至于该多肽具体属于哪一类群,还有待进一步研究。但由于类胡萝卜素含量及其降解产物在福建烟区烟叶中占有绝对优势,推测该酶可能是参与类胡萝卜素合成相关的鲨烯合酶。周冀衡等^[18]认为,类胡萝卜素含量高与低纬度有密切的关系,为适应强烈的紫外光,烟株通过增大合成类胡萝卜素来调节类囊体膜的物理性质;保护叶绿素分子和细胞膜系统不被强光氧化。这是烟草消除活性氧自由基的伤害,阻止脂质过氧化的一种适应性反应,同时也是清香型香气风格形成的主要因素之一。

在常规化学成分分析中,除了类胡萝卜素之外,二萜化合物-西柏烷类化合物及其降解产物在河南烟区烟叶含量较高,并被认为是浓香型烤烟化学成分的主要特征,但在本研究中并未检测到其它与萜类化合物合成相关的蛋白。其原因可能是由于西柏烷类物质作为叶面分泌物的主要成分,是在叶面腺毛腺头分泌细胞合成的,相关酶类仅存在于腺毛中^[19]。而腺毛蛋白质在叶片蛋白质中丰度很低,因而难以检测。

3.4 生态因素对烟草防御代谢的影响。

试验中还检测到一些与防御代谢相关的酶类,如 MRGH21 信号传导类蛋白(S28)是常见的植物抗病响应蛋白^[20];法尼基相关蛋白(S43),是一种金属离子结合蛋白,可能与金属离子胁迫及其转运有关,二者在河南烟区高表达。而其余 6 个防御相关蛋白:细胞色素 P450 的相关蛋白(S2),植物螯和肽酶 2 蛋白(S20),

caffeoyl-辅酶 A-O-转甲基酶(S26),富亮氨酸重复序列(S40),缩氨酸蛋氨酸亚砷还原酶(S23),III型几丁质酶,在福建的表达量均高于在河南的表达量。这些蛋白的表达差异,主要与所处的特殊病原环境有关。说明不同生态因素,会对烟草产生不同的生物或非生物因素的胁迫,尤其是病原微生物种类和数量方面产生差异,最终诱发了烟叶不同的抗病、抗逆机制。

除此之外,生态条件差异对烟草蛋白质、激素、核酸的生物合成,以及与信号传导相关的结构蛋白的表达也有一定影响。比如在河南高表达的赤霉素-2 氧化酶的蛋白(S5)参与了与光周期相关的调控过程^[21];在福建高表达的生长调节蛋白(S45)与烟草的生长发育相关,甘氨酸胺核苷酸合成酶(S39)则参与嘌呤核苷的合成。当然,要完全解析这些差异仍存在困难,尤其是目前基因组和蛋白组数据库中,与烟草相关的序列信息和功能注释还很不完备,质谱鉴定出来的蛋白还有待于进一步的验证,它们在烟草香气风格形成中的具体作用也有待于进一步研究。

References:

- [1] Liu G S. Tobacco planting. Beijing: China Agricultural Press, 2003. 19—29.
- [2] Tang Y J. Formation and development of tobacco with characteristic. Chinese Tobacco Science, 2004, 25(1):10—13.
- [3] Shi H Z, Liu G S. Tobacco flavor. Beijing: China Agricultural Press, 1998. 144—146.
- [4] Zhou J H, Yang H Q, Lin G H, *et al.* Studies on the Main Volatile Aroma Components in Tobacco from Different Flue — Cured Tobacco Production Regions. Journal of Hunan Agriculture University, 2004, 30(1):20—23.
- [5] He R F, Ding Y, Zhang J F, *et al.* Improvement in the two-dimensional electrophoresis of proteins from the leaves of plant. Hereditas, 2000, 22(5):319—321.
- [6] Wang J Z, Fan M. Manual of Protein Technology. Beijing: Science Press, 2000. 42—46.
- [7] Huang Q Y, Lin T, Chen F Y, *et al.* Analysis of the Defense Responsiveness in Hybrid Rice Minghui63 Against Bacterial Leaf Streak (*Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola*) Using Two-dimensional Electrophoresis and Mass Spectrometry. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2006, 45(5):86—90.
- [8] O'Farrell P S, Goodman H G, O'Farrell P H. High resolution two-dimension electrophoresis of basic as well as acidic proteins. Journal of Cell, 1997, 12: 1133—1142.
- [9] Yah J X, Wait R, Berkelman T, *et al.* A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization mass spectrometry. Electrophoresis, 2000, 21(17):3666—3672.
- [10] Fernandez J, Gharahdaghi F, Mische S M. Routine identification of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis gels or polyvinyl difluoride membranes using matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-massspectrometry. Electrophoresis, 1998, 19: 1035—1045.
- [11] Gharahdaghi F, Vinkler C R, Meagher D A, *et al.* Massspectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel; a method for the removal of silver ions enhance sensitivity. Electrophoresis, 1999, 20:601—605.
- [12] Chen J J, Chen H, Ma Z G, *et al.* Characters of Temporal and Spatial Distribution of Agro-meteorological Climate Resources and Their Impacts on Agricultural Production in Fujian Province. Chinese Journal of Agrometeorology, 2007, 28(1):1—4.
- [13] Zhang H F, Fan Y L. Application of Remote Sensing Monitoring of Crop Straw Burning by the Meteorological Satellite. Meteorology Journal Of Henan, 2005, (3):26—27.
- [14] Yang H Q, Zhou J H, Luo Z M, *et al.* Study on chromoplast pigments and its degrading products of the flue-cured tobacco from different producing regions in china. Journal of Southwest Agricultural University(Natural Science), 2004, (5):638—644.
- [15] Wang Y C, Duby G, Purnelle B, Boutry M. Tobacco VDL Gene Encodes a Plastid DEAD Box RNA Helicase and Is Involved in Chloroplast Differentiation and Plant Morphogenesis Plant Cell, 2000, 12(11), 2129—2142.
- [16] Cui H, Song ZH H. Recent advances in terpenoid metabolic engineering research and its prospective application in variety improvement in tobacco. Acta Tabacaria Sinica, 2003, 9(2):35—42.
- [17] Starks C M, Back K, Chappell J, *et al.* Structural basis for cyclic terpene biosynthesis by tobacco 5-epi-aristolochene synthase. Science, 1997, 277(5333):1815—1820.
- [18] Zhou J H, Wang R, Yang H Q, *et al.* The Comparison on the Content of Chromoplast Pigments and Volatile Aromatic Materials of Flue-Cured Tobacco from Domestic and Abroad. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2005, 31(2):128—132.
- [19] Guo Z, Wagner G J. Biosynthesis of cembratrienoids in cell-free extracts from trichome of *Nicotiana tabacum*. Plant Sci, 1995, 110, 1—10.

- [20] van Leeuwen H, Garcia-Mas J, Coca M, *et al.* Analysis of the melon genome in regions encompassing TIR-NBS-LRR resistance genes. *Mol. Genet. Genomics*, 2005, 273:240–251.
- [21] Dong Ju Lee, Jan A D, Zeevaart. Molecular Cloning of GA 2-Oxidase 3 from Spinach and its Ectopic Expression in *Nicotiana sylvestris*, *Plant Physiology*, 2005, 138(5), 243–254.

参考文献:

- [1] 刘国顺. 烟草栽培学. 北京: 中国农业出版社, 2003. 19~29.
- [2] 唐远驹. 试论特色烟叶的形成和开发. *中国烟草科学*, 2004, 25(1): 10~13.
- [3] 史宏志, 刘国顺. 烟草香味学. 北京: 中国农业出版社, 1998. 144~146.
- [4] 周冀衡, 杨虹琦, 林桂华, 等. 不同烤烟产区烟叶中主要挥发性香气物质的研究. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2004, 30(1): 20~23.
- [5] 何瑞锋, 丁毅, 张剑锋, 等. 植物叶片蛋白质双向电泳技术的改进与优化. *遗传*, 2000, 22(5): 319~321.
- [6] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 2000. 42~46.
- [7] 黄青云, 林涛, 陈芳育, 等. 双向电泳联用质谱技术研究水稻明恢 63 对细菌性条斑病侵染的应答. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2006, 45(5): 86~90.
- [12] 陈家金, 陈惠, 马治国, 等. 福建农业气候资源时空分布特征及其对农业生产的影响. *中国农业气象*, 2007, 28(1): 1~4.
- [13] 张海峰, 范玉兰. 河南省农业气候区划指标分析方法. *河南气象*, 2005, (3): 26~27.
- [14] 杨虹琦, 周冀衡, 罗泽民, 等. 不同烤烟产区质体色素及其降解产物的研究. *西南农业大学学报(自然科学版)*, 2004, (5): 638~644.
- [16] 崔红, 宋志红. 类萜代谢工程研究进展及在烟草品种改良中的应用前景. *中国烟草学报*, 2003, 9(2): 35~42.
- [18] 周冀衡, 王勇, 邵岩, 等. 产烟国部分烟区烤烟质体色素及主要挥发性香气物质含量的比较. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2005, 31(2): 128~132.