

不同品种雪茄烟叶晾制后代谢组的差异分析

李楠芬¹, 于连营¹, 杨锦鹏², 余君², 汪社亮¹, 杨久红³, 林远², 杨荣洲¹,
丁广大¹, 杨春雷^{2*}, 徐芳森^{1*}

(1. 华中农业大学资源与环境学院, 微量元素研究中心, 武汉 430070; 2. 湖北省烟草科学研究院, 武汉 430030; 3. 中国烟草总公司湖北省公司, 武汉 430030)

摘要: 不同品种雪茄烟叶晾制后叶色存在显著差异。本研究以晾制后的雪茄烟品种楚雪 10 号(CX-010)和楚雪 14 号(CX-014)烟叶为材料, 运用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)联用技术开展非靶向代谢组学分析, 探索两品种烟叶在晾制后代谢物的相对含量差异及其与叶色的关系。结果表明, 两个品种晾制后的烟叶代谢物相对含量存在显著差异。与 CX-014 相比, CX-010 烟叶中游离氨基酸与生物碱相对含量总体较低, 脂质相对含量总体较高, 相差最大的 32 种差异代谢物包含 2 种氨基酸、10 种酚酸、3 种酰胺等物质。结合 KEGG 代谢通路分析, 发现精氨酸和脯氨酸代谢通路中脯氨酸生物合成途径在两品种间差异显著。差异代谢物的生理功能分析显示, 两品种烟叶晾制后的叶色差异主要与脯氨酸、水杨酸、黄酮类和生物碱的含量差异有关。

关键词: 雪茄烟叶; 代谢物; 非靶向代谢组; 品种差异; 晾制

Differential Analysis of Metabolomics of Cigar Tobacco Leaves of Different Varieties after Air-curing

LI Nanfen¹, YU Lianying¹, YANG Jinpeng², YU Jun², WANG Sheliang¹, YANG JiuHong³, LIN Yuan²,
YANG Rongzhou¹, DING Guangda¹, YANG Chunlei^{2*}, XU Fangsen^{1*}

(1. Center of Microelement Research, College of Resource and Environment, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. Academy of Tobacco Science Hubei Province, Wuhan 430030, China; 3. China National Tobacco Corporation Hubei Province, Wuhan 430030, China)

Abstract: there were significant differences in leaf color between different cigar tobacco varieties after air-curing. In this study, the non-targeted metabolomic analysis was performed using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) to investigate the relative abundance of metabolites and their relationship with the differences in leaf color after air-curing of cigar tobacco varieties Chuxue No. 10 (CX-010) and Chuxue No. 14 (CX-014). The results showed that there were significant metabolite abundance differences between tobacco leaves of the two varieties after air-curing. Compared with CX-014, the relative abundance of free amino acids and alkaloids in CX-010 tobacco leaves was generally lower, and the overall lipid content was higher. 32 different metabolites with the largest difference in difference multiplicity contained 2 amino acids, 10 phenolic acids, 3 amides and other substances. Combined with the analysis of the KEGG metabolic pathway, it was found that the proline biosynthesis pathway in the arginine and proline metabolic pathways differed significantly between the two varieties. The physiological function analysis of the differential metabolites showed that the differences in leaf color between the two varieties after air-curing might be mainly related to the differences in the contents of proline, salicylic acid, and flavonoids and alkaloids.

Keywords: cigar tobacco leaves; metabolites; metabolomics; cultivars difference; air-curing

雪茄烟成品的生产要经历育苗、移栽、采收、晾制、发酵、手工制作等过程, 其中烟叶晾制是提高雪茄烟产量和品质的重要环节。在晾制期间, 雪茄烟叶发生一系列复杂生物化学反应, 外观上表现为失绿、泛黄、变褐, 关键化学成分表现为游离氨基酸含量增加, 烟碱、糖类、多酚含量减少^[1-3]。雪

茄烟叶颜色与晾制过程中多酚、质体色素等物质的变化显著相关^[4-5], 一般认为雪茄烟叶以棕色或棕褐色为佳, 青色为差^[6]。湖北省烟草科学研究院种植的 5 个雪茄烟品种在相同晾制条件下晾制的烟叶叶色差异明显, 但具体原因不明确, 可能与基础的生化代谢相关。代谢组技术在研究外界环境对生物代

基金项目: 中国烟草总公司科技重大专项项目(110202001039, XJ-01)

作者简介: 李楠芬(1998-), 女, 在读硕士研究生, 主要从事植物营养生理研究, E-mail: linanfen@webmail.hzau.edu.cn

*通信作者。E-mail: 杨春雷, ycl193737@163.com; 徐芳森, fangsenxu@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2021-07-05

修回日期: 2022-01-04

代谢物影响方面应用广泛。李勇等^[7]通过代谢组技术对不同大田生长时间采收烤烟烟叶的代谢物进行分析,发现生长 137 d 烟叶中糖类、氨基酸、有机酸含量较低,而胡萝卜素降解产物、非酶棕色化反应产物、尼古丁代谢物含量较高。田培等^[8]利用代谢组学分析发现,抗病烤烟品种 G28 被显著激活的特有代谢通路包含萜类和聚酮类生物碱代谢,鸟氨酸、赖氨酸和烟酸生物碱代谢。目前,利用代谢组学技术研究晾晒期雪茄烟叶代谢物的研究较少。本研究选择两个晾晒后叶色差异大的品种楚雪 10 号和楚雪 14 号为试验材料,其中 CX-010 晾晒后烟叶呈青黄色,而 CX-014 晾晒后烟叶叶色为正常的红棕色,通过代谢组学分析两品种烟叶在晾晒后代谢产物的变化规律,以揭示两品种烟叶在晾晒后颜色差异大的生化代谢差异及可能的原因。

1 材料与方法

1.1 试验样品

试验于 2020 年在湖北省恩施土家族苗族自治州恩施市崔坝镇贺家村(E 109°47'42", N 30°27'27")实施,海拔高度 860 m。试验地土壤基本理化性质为:有机质 21.17 g/kg, pH 7.26, 碱解氮 66.05 mg/kg, 有效磷 52.63 mg/kg, 速效钾 128.30 mg/kg。两雪茄烟品种 CX-010 (楚雪 10 号)和 CX-014 (楚雪 14 号)的栽培和晾晒处理相同,4 月中旬完成移栽,田间种植行株距 110 cm×40 cm。试验小区肥料施用量为:有机肥 1500 kg/hm²,专用复合肥纯氮 150 kg/hm², N P₂O₅ K₂O=1 1.5 3,其他按照当地优质雪茄烟生产技术规范进行田间管理。选取适熟,长势一致的 CX-010 和 CX-014 中部叶片采收,在晾棚中进行自然晾晒。晾晒完成后的烟叶样品立即放入液氮中冷冻,样品带回实验室放入-80℃冰箱中储存备用。

1.2 实验仪器与试剂

Q Exactive™ HF-X 质谱仪(德国 Thermo Fisher 品牌);Vanquish UHPLC 色谱仪(德国 Thermo Fisher 品牌);Hypesil Gold column 色谱柱(100×2.1 mm, 1.9 μm, 美国 Thermo Fisher 品牌);D3024R 低温离心机(美国 Scilogex 品牌)。甲醇、甲酸、醋酸铵均购于美国赛默飞世尔科技公司,超纯水购于德国 Merck 公司,以上试剂纯度均为色谱级。

1.3 样品处理

烟草样品 取 100 mg 液氮研磨的样品(去梗),置于离心管中,加入 500 μL 的 80%甲醇水溶液,涡旋振荡后在冰浴中静置 5 min,然后在 15 000 g、4℃条件下离心 20 min;取一定量的上清液加入质谱级水,稀释至甲醇含量为 53%,在 15 000 g、4℃条件下离心 20 min,收集上清液进样 LC-MS/MS 进行分析,每个品种 6 次重复。

QC(质量控制)样本:从每个试验样本中取等体积样本混匀作为 QC 样本。

Blank(空白)样本:53%甲醇水溶液代替试验样本,前处理过程与试验样本相同。

1.4 色谱质谱分析条件

色谱条件:色谱柱为 Hypesil Gold column(C₁₈),柱温 40℃,流速 0.2 mL/min。

流动相条件:正离子模式下流动相 A 为 0.1% 甲酸,流动相 B 为甲醇;负离子模式下流动相 A 为 5 mmol/L 醋酸铵(pH 9.0),流动相 B 为甲醇。

质谱条件:采用正负离子扫描模式进行质谱信号采集,扫描范围选择 *m/z* 100~1500;ESI 源的设置如下:Spray Voltage, 3.2 kV;Sheath gas flow rate, 40 arb, Aux Gas flow rate, 10 arb;Capillary Temp, 320℃。MS/MS 二级扫描为 data-dependent scans。

1.5 数据处理与分析

使用 Compound Discoverer 3.1 数据处理软件对质谱鉴定的原始数据进行开展峰对齐-峰提取等步骤处理然后得到质荷比(*m/z*)保留时间以及物质峰面积等数据,通过比对 *mz*Cloud、*mz*Vault 和 Masslist 数据库进行代谢物鉴定。对鉴定到的代谢物在 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)、HMDB(Human Metabolome Database, <https://hmdb.ca/metabolites>)、LIPID MAPS 数据库进行功能和分类注释。使用 MetaX^[9]软件对数据进行对数转换及标准化处理,然后对代谢物进行主成分分析(Principal component analysis, PCA)、偏小二乘法判别分析(Partial Least Squares Discrimination Analysis, PLS-DA),再根据分组贡献值(Variable Importance in the Projection, VIP)和组间变化的显著性筛选得到差异代谢物。最后应用超几何检验对代谢物进行 KEGG 通路富集分析,得到代谢通路富集结果。本文图的绘制使用 R-3.4.3 软件和 Origin 2018 软件,表的制作使用 Excel 2010。

2 结果

2.1 CX-010 和 CX-014 晾晒烟叶代谢组的多元统计分析

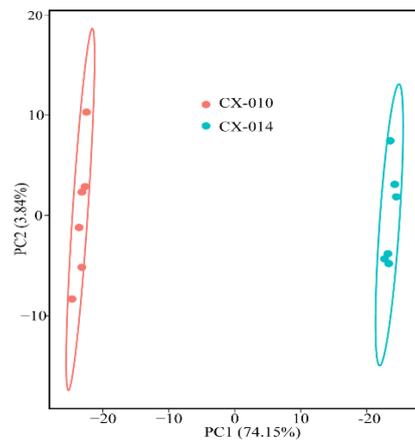
为了探究两雪茄品种晾晒后烟叶颜色差异与代谢物变化的可能关系，我们进行了晾晒后雪茄烟的代谢组学分析。PCA 分析表明，两组样本内分离趋势小且均处在 95% 置信区间内，两组样本间分离趋势明显（图 1），说明品种内样本间重复性较好，品种间的代谢差异大。为避免取样个体及环境等对分类信息的干扰，进一步进行 PLS-DA 分析，并采用 7 折交互验证（图 2a）和置换检验（图 2b）。由图 2a 可知模型解释率（ R^2Y ）为 100%，预测能力（ Q^2Y ）为 100%，表明建模稳定可靠。图 2b 中 R^2 为 0.95， Q^2 为 -0.69， $R^2 > Q^2$ 且 Q^2 回归线与 Y 轴截距小于 0，说明 PLS-DA 模型未“过拟合”并能较好地描述样本分类^[10]，即 2 个雪茄烟品种晾晒烟叶间的代谢物差异较大。

2.2 CX-010 和 CX-014 晾晒烟叶间的差异代谢物

差异代谢物的筛选主要参考 VIP、 FC 和 P -value 三个参数，VIP 是指 PLS-DA 模型第一主成分的变量投影重要度，表示代谢物对分组的贡献； FC (Fold Change) 指差异倍数，为每个代谢物在样本组中 6 个生物重复定量值均值的比值； P -value 是通过 T-test 计算得到，表示差异显著性水平。设定阈值 $VIP > 1.0$ ， $FC > 2.0$ 或 $FC < 0.5$ 且 P -value < 0.05 ，从鉴定到的 2241 种代谢物中筛选出差异代谢物 912 种，

占总代谢物的 40.70%，显著较高和较低差异代谢物数量差别不大。

根据物质峰面积得到的半定量数据来看，CX-014 中大多数游离氨基酸相对含量约为 CX-010 的 2~49 倍，脯氨酸相对含量最高，但 CX-010 的天冬酰胺与 L-天冬酰胺相对含量高出 CX-014 品种约 6 倍（图 3）。CX-014 中生物碱相对含量总体上较高，为 CX-010 的 5~40 倍，其中以烟碱相对含量最高，但 CX-010 中小檗碱和芽子碱相对含量高出 CX-014 品种 1.7 倍和 10.6 倍（图 4）。将脂质差异代谢物

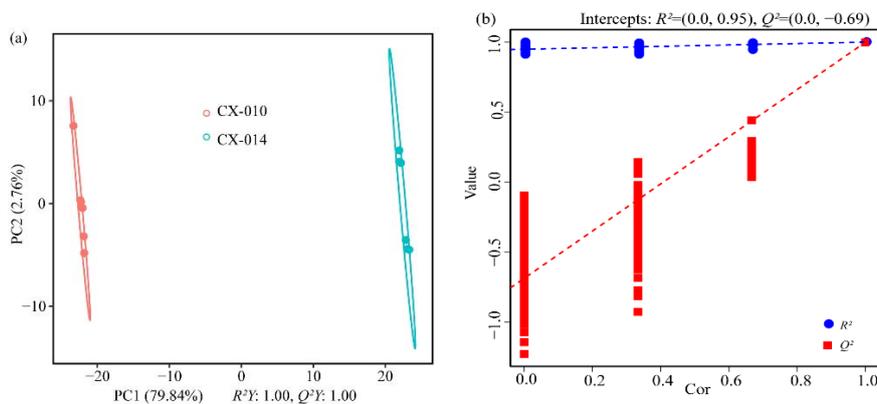


注：图中横坐标 PC1 和纵坐标 PC2 分别表示排名第一和第二的主成分的得分，椭圆为 95% 的置信区间。

Note: The abscissa PC1 and the ordinate PC2 in the figure represent the scores of the first and second principal components, respectively, and the ellipse is the 95% confidence interval.

图 1 CX-010 和 CX-014 代谢组的主成分分析

Fig. 1 Principal component analysis of CX-010 and CX-014 metabonomics

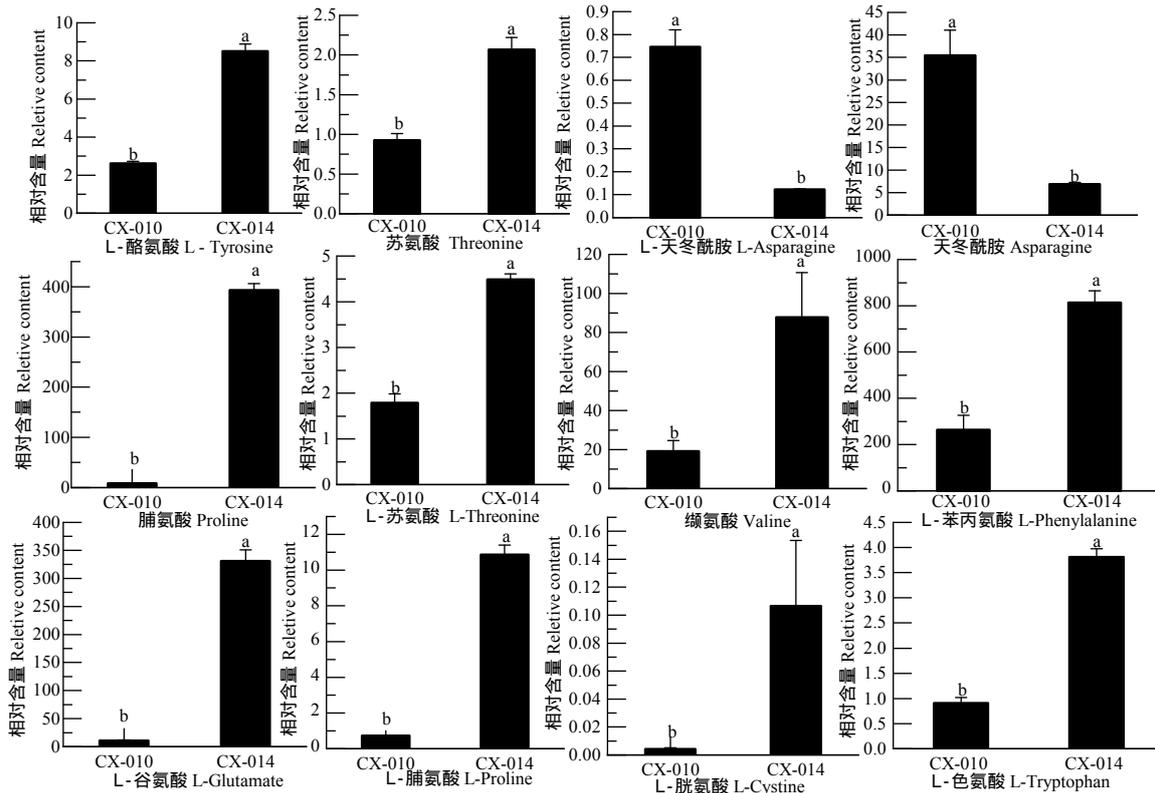


注：得分散点图中横坐标为样本在第一主成分上的得分，纵坐标为样本在第二主成分上的得分；排序验证图中，横坐标代表随机分组的 Y 与原始分组 Y 的相关性，纵坐标代表 R^2 和 Q^2 的得分。

Note: In the diagram 2(a), the abscissa is the score of the sample on the first principal component, the ordinate is the score of the sample on the second principal component. In the diagram 2(b), the abscissa represents the correlation between the Y of the random grouping and the original group Y , and the ordinate represents the scores of R^2 and Q^2 .

图 2 PLS-DA 的得分散点图及排序验证图

Fig. 2 PLS-DA of CX-010 versus CX-014: (a) score plot, (b) permutation analysis



注：图中数据为对检测到的质谱峰进行积分得到的峰面积值，表示代谢物的相对定量值，不同小写字母代表显著性差异 ($p < 0.05$)，图4相同。

Note: The data in the figure are the peak area values obtained by integrating the detected mass spectrum peaks, representing the relative quantitative values of metabolites. Different lowercase letters represent significant differences ($p < 0.05$), which is the same in Figure 4.

图3 CX-010和CX-014中差异氨基酸相对含量

Fig. 3 Relative content of free amino acids in CX-010 and CX-014

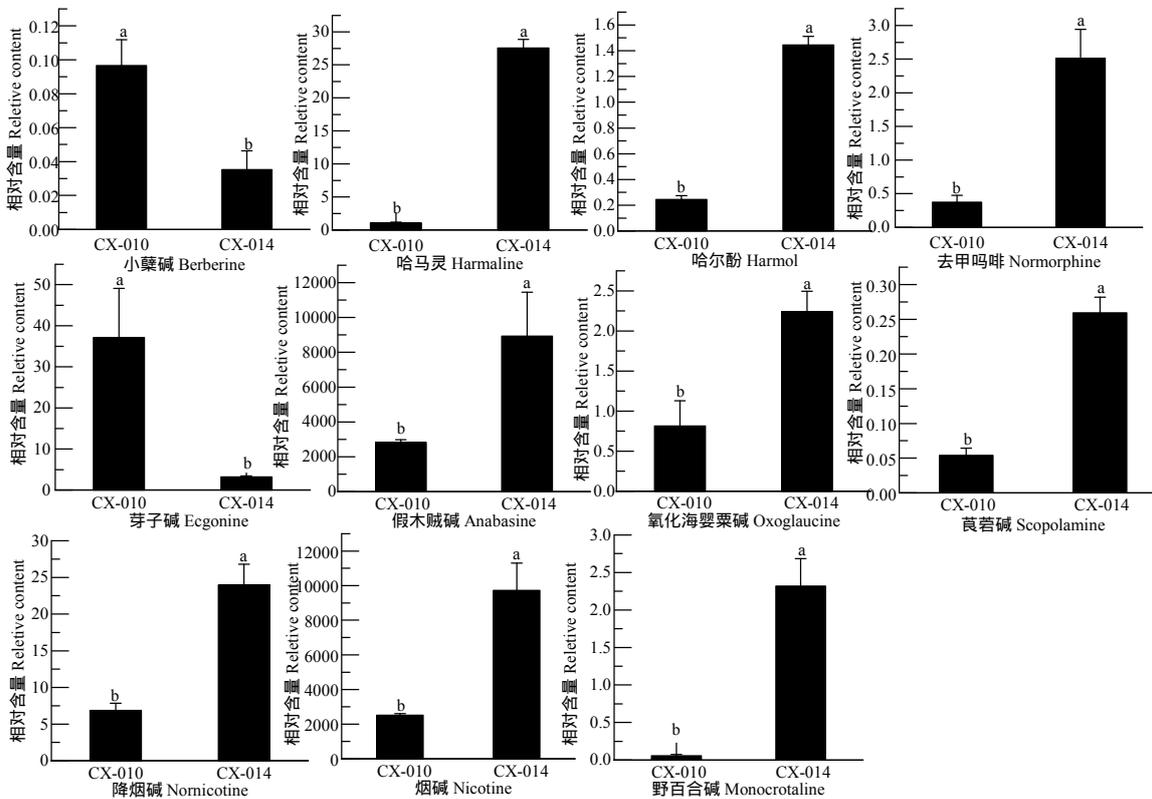


图4 CX-010和CX-014中差异生物碱相对含量

Fig. 4 Relative content of alkaloids in CX-010 and CX-014

相对定量值进行归一化转换并聚类得到的聚类热图(图 5), CX-010 中偏高脂质代谢物数目约占总数的 2/3, CX-010 中梔子黄素(Gardenin B)、5, 7, 3'-三羟基-6, 4', 5'-三甲氧基黄酮(5, 7, 3'-Trihydroxy-6, 4', 5'-trimethoxyflavone)、丁香黄素(Syringetin)、紫花牡荆素(Casticin)、鸢尾花素(Irisfloreantin)等黄酮物质相对含量均高于 CX-014 约 10~37 倍。

本文以 $|\log_2 [FC(A/B)]| > 5$ (A/B 为 CX-010 与 CX-014 代谢物相对含量之比), P -value < 0.001 为标准从 912 种差异代谢物中进一步筛选出 32 种差

异显著代谢物, 分别为 2 种氨基酸、10 种酚酸、3 种酰胺以及吡咯、吡啶、咪唑杂环类等物质(表 1)。在本研究中, 根据 $\log_2 [FC(A/B)]$ 的值, 可以看出 CX-010 品种中三甲基苯酚、可的宁氮-氧化物、烟酸核糖核苷等化合物相对含量都是显著高于 CX-014 品种, 相对含量最高的 3-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-1H-1,2,4-三唑-5-酚物质 FC 为 CX-014 的 209 倍。而 CX-010 品种中异香草酸、对苯二甲酸、水杨酸等代谢物相对含量显著低于 CX-014 品种, 相对含量最低的异香草酸 FC 仅为 CX-014 的 0.006 9 倍。

表 1 CX-010 和 CX-014 间的差异代谢物及其 $\log_2 [FC(A/B)]$ 值

Table 1 Differential metabolites between CX-010 versus CX-014 and its value of $\log_2 [FC(A/B)]$

代谢物 Metabolites	质荷比 m/z	保留时间 RT/min	VIP	p	$\log_2 [FC(A/B)]$
3-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-1H-1,2,4-三唑-5-酚 3-(4-methoxyphenyl)-1-methyl-1H-1,2,4-triazol-5-ol	206.092 56	7.48	1.52	< 0.001	7.71
4-甲基苯并三唑 4-Methylbenzotriazole	132.056 92	9.50	1.46	< 0.001	6.69
可的宁氮-氧化物 Cotinine N-oxide	193.097 18	4.07	1.42	< 0.001	6.41
烟酸核糖核苷 Nicotinate ribonucleoside	254.067 93	1.91	1.49	< 0.001	6.37
2-甲基-1H-苯并咪唑-5-羧酸 2-methyl-1H-benzimidazole-5-carboxylic acid	177.066 04	4.78	1.52	< 0.001	5.76
2, 3, 6-三甲苯酚 2,3,6-Trimethylphenol	135.081 89	7.00	1.41	< 0.001	5.55
N-(1,3-苯并二氧-5-基)-7-氯喹啉-4-胺 N-(1,3-benzodioxol-5-yl)-7-chloroquinolin-4-amine	299.057 74	7.84	1.36	< 0.001	5.51
吲哚-3-丙酮酸 Indole-3-pyruvic acid	204.065 58	11.07	1.46	< 0.001	5.47
1-(4-硝基苯基)哌啶 1-(4-nitrophenyl)piperidine	207.112 84	1.75	1.57	< 0.001	5.24
(1E)-1,7-双(4-羟基苯基)庚-1-乙二胺-3-酮 (1E)-1,7-bis(4-hydroxyphenyl)hept-1-en-3-one	295.136 51	8.39	1.06	< 0.01	5.22
己酰基肉碱 Hexanoylcarnitine	260.185 88	8.40	1.29	< 0.001	5.21
雌二醇 Estradiol	271.173 07	10.20	1.43	< 0.001	5.12
乙酰胆碱 Acetylcholine	146.117 55	1.32	1.54	< 0.001	5.10
3-(4-氯苯基)-2-氰基-5-(二甲基氨基)戊-2,4-亚氟酰胺 3-(4-chlorophenyl)-2-cyano-5-(dimethylamino)penta-2,4-dienamide	276.087 8	11.92	1.57	< 0.001	5.03
4-氧化脯氨酸 4-Oxoproline	128.035 34	1.30	1.48	< 0.001	-5.03
5-(叔丁基)-2-甲基-N-(5-甲基-3-异恶唑基)-3-呋喃酰胺 5-(tert-butyl)-2-methyl-N-(5-methyl-3-isoxazolyl)-3-furamide	261.125 06	6.50	1.40	< 0.001	-5.07
甲基脱氧胞苷 5-Methyldeoxycytidine	240.099 56	4.18	1.45	< 0.001	-5.11
氯氟氢菊酯 污-Cyhalothri	472.09	14.18	1.32	< 0.001	-5.16
3-羟基-N-(1-羟基-4-甲基戊烷-2-基)-5-氧代-6-苯己酰胺 3-hydroxy-N-(1-hydroxy-4-methylpentan-2-yl)-5-oxo-6-phenylhexanamide	322.20	5.95	1.47	< 0.001	-5.18
野百合碱 Monocrotaline	324.146 06	7.80	1.32	< 0.001	-5.34
辣椒素 Capsaicin	306.21	7.84	1.51	< 0.001	-5.46
脯氨酸 Proline	116.07	1.35	1.65	< 0.001	-5.56
2-异丙基苹果酸 2-Isopropylmalic acid	129.056	2.22	1.46	< 0.001	-5.59
8-异前列腺素 A2 8-iso Prostaglandin A2	315.200 1	12.38	1.46	< 0.001	-5.59
胎盘泌乳激素 PLH	388.19	13.41	1.56	< 0.001	-5.80
黄嘌呤核苷 Xanthosine	283.069 09	2.17	1.34	< 0.001	-5.99
4-(2-((4-甲氧基苯基)氨基)恶唑-5-基)苄腈 4-(2-((4-Methoxyphenyl) amino) oxazol-5-yl) benzonitrile	292.11	10.57	1.46	< 0.001	-6.12
全顺-4, 7, 10, 13, 16-二十碳五烯酸 all-cis-4,7,10,13,16-Docosapentaenoic acid	313.25	14.97	1.43	< 0.001	-6.19
4-甲基苯酚 4-Methylphenol	107.050 42	2.37	1.43	< 0.001	-6.38
水杨酸 Salicylic acid	137.024 67	2.08	1.43	< 0.001	-6.74
对苯二甲酸 Terephthalic acid	165.019 65	2.22	1.44	< 0.001	-7.14
异香草酸 Isovanillic acid	167.035 32	2.26	1.42	< 0.001	-7.18

注: A/B 为 CX-010 与 CX-014 代谢物相对含量之比。Note: A/B is the ratio of relative metabolite content of CX-010 versus CX-014.



注：CX-010_1-6和CX-014_1-6分别代表两品种代谢组分析的6个重复样品。

Note: CX-010_1-6 and CX-014_1-6 represent the six repeated samples for the analysis of metabolic groups of the two varieties, respectively.

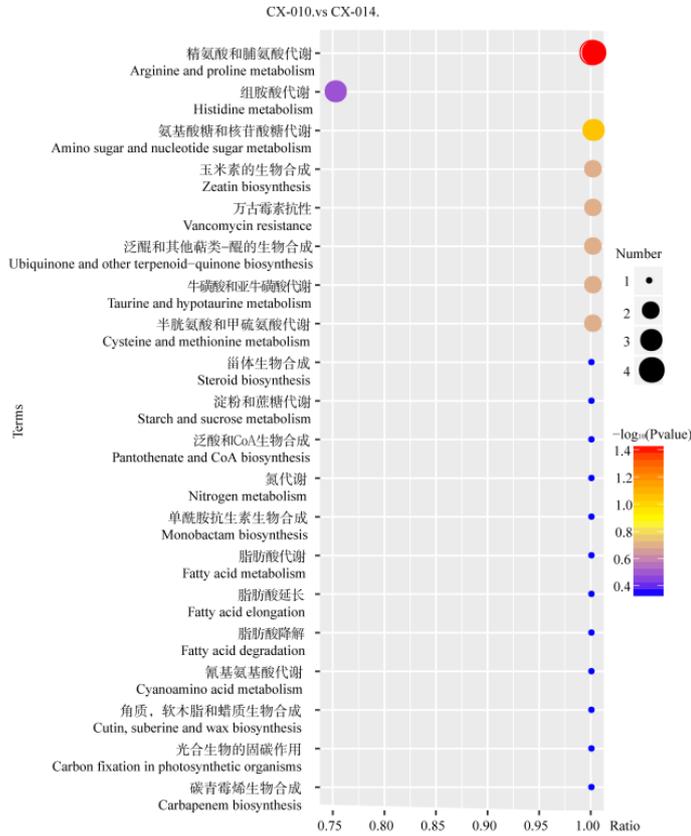
图5 CX-010和CX-014脂质差异代谢物聚类热图

Fig. 5 Hierarchical clustering analysis of differential lipid compounds between CX-010 and CX-014

2.3 基于 KEGG 数据库的代谢通路分析

为确定雪茄品种 CX-010 和 CX-014 差异代谢物的主要生物学功能，对这些差异代谢物进行了 KEGG 通路富集分析（以 P -value 0.05 为阈值）。结果表明，CX-010 和 CX-014 晾晒后烟叶中精氨酸

和脯氨酸代谢（Arginine and proline metabolism）通路差异最显著（图 6）。该代谢通路富集到的差异代谢物为 D-脯氨酸，5-氨基戊酸，4-氧化脯氨酸，L-谷氨酸，主要集中在脯氨酸生物合成上（图 7），在 CX-010 中相对含量均低于 CX-014。

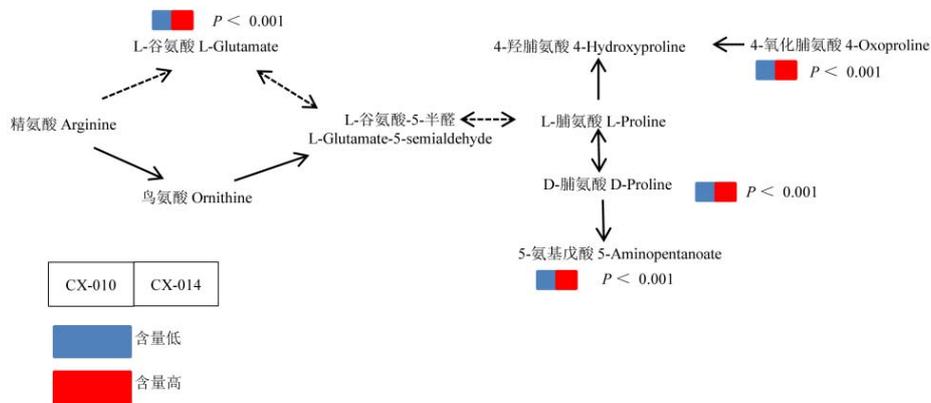


注：横坐标表示差异代谢物富集程度，点的颜色代表超几何检验的 P -value，点的大小代表相应通路中差异代谢物的数目。

Note: Horizontal coordinates indicate the enrichment of differential metabolites, the color of points represents the P -value of hypergeometric test, and point size represents the number of differential metabolites in the corresponding pathway.

图 6 KEGG 富集气泡图

Fig. 6 KEGG enrich scatterplot for CX-010 versus CX-014



注：展示的路径根据 KEGG 代谢通路数据库和相关文献绘出^[11]。

Note: The proposed metabolic pathways were based on KEGG PATHWAY Database (<https://www.genome.jp/KEGG/pathway.html>) and literature^[11].

图 7 富集差异代谢物代谢路径

Fig. 7 Enrichment of differential metabolite metabolic pathway

3 讨论

雪茄烟叶晾制时间较长,晾制初期叶绿素的降解、黄色素占比增大使得烟叶由绿变黄,在晾制中后期酶促棕色化反应和非酶促棕色化反应的发生导致烟叶变褐^[3,12]。本试验针对雪茄烟品种 CX-010 和 CX-014 晾制后的烟叶开展代谢组学分析未发现质体色素降解产物及非酶促棕色反应产物有明显的差异规律,这可能是由于晾制周期长,相关物质已经完成了转化。本研究发现在两个品种晾制后烟叶中相对含量最高的游离氨基酸为 L-苯丙氨酸、脯氨酸和 L-谷氨酸,这与张婕^[13]和赵田^[14]对烘烤后烟叶游离氨基酸含量的分析结果相似。SUEKAWA 等^[15]认为,脯氨酸通过影响酶-底物复合物抑制多酚氧化酶活性从而抑制水稻培养细胞的褐变,但是没有抑制烟草的褐化。脯氨酸能够影响植物的酶促棕色化反应,CX-010 和 CX-014 晾制后的烟叶中脯氨酸的差异可能与烟叶颜色表现有直接的关系。本研究中,CX-014 晾制后的烟叶中脯氨酸相对含量较高于 CX-010,并且 CX-014 晾制后的烟叶褐色要强于 CX-010,这与脯氨酸影响菠菜^[16]褐化类似,脯氨酸含量越高,多酚氧化酶活性越强,烟叶多酚被氧化,从而形成棕色物质。CX-010 烟叶呈现淡青黄色很可能是多酚氧化不完全导致的。此外,精氨酸和脯氨酸代谢被认为是与植物抗性变化相关的生理代谢活动,与植物响应和感知环境有关,精氨酸和脯氨酸代谢通路中脯氨酸、精氨酸及它们的代谢产物 NO、多胺都是参与植物抗逆过程的物质^[11,17]。本研究中,精氨酸和脯氨酸代谢为两品种雪茄晾制后烟叶差异最显著的代谢通路,说明两品种雪茄烟叶晾制期间响应晾制环境能力存在明显差异。由于两烟草品种中精氨酸和脯氨酸代谢路径中多种中间产物也存在显著差异,这些差异与烟草外观表现的联系还需要更多的试验解析。HE 等^[18]研究表明烤烟在受冷胁迫后烘烤的外观特性变差,烟叶过度褐化,而喷施水杨酸能够提高抗氧化酶活性,恢复烘烤烟叶外观色泽,并显著提高了脯氨酸含量。大量研究表明,外源水杨酸处理能够提升植物中脯氨酸含量^[18-20],说明水杨酸对脯氨酸可能存在调节作用。本研究中,CX-010 晾制后的烟叶中水杨酸与脯氨酸相对含量

较 CX-014 低,可能影响 CX-010 烟叶多酚氧化酶活性而导致多酚类物质未朝着有利于烟叶色泽方向进行。

烟叶调制时,芸香苷、绿原酸等无色多酚和带有某种颜色的花青素、黄酮素等物质在多酚氧化酶的作用下聚合为深棕色的醌类物质^[12]。这类物质形成过多导致烟叶颜色过深,烟叶外观质量相应下降。黄酮类化合物属于多酚,最早发现的黄酮类化合物呈黄色或淡黄色,故称黄酮。芸香苷、绿原酸和萜萘亭是烟草中含量最多的多酚物质,槲皮素、丁香黄素及鸢尾花素等物质虽然在烟草中含量不高,但颜色鲜艳,且以黄色为主^[21-23]。本研究 CX-010 晾制后叶色较 CX-014 黄,符合黄酮类物质的差异对外观颜色的影响规律,但晾晒烟一般以红黄色或红褐色为优^[3,6],因此可以调控 CX-010 烟叶晾制条件,使槲皮素、丁香黄素及鸢尾花素等物质在晾制期适当转换,以使得 CX-010 烟叶晾制叶色转好。

生物碱含量不仅影响雪茄烟的吃味,对烟叶颜色也有影响。彭新辉等^[24]对烤烟色泽和化学成分差异的相关性研究表明,柠檬黄烟叶中生物碱含量要低于桔黄烟叶,从柠檬黄到橘黄,颜色由浅至深,生物碱含量增加。李青山等^[25]也发现烤烟烟叶背面颜色参数与总植物碱呈显著正相关,说明色度与烟叶总植物碱有一定相关性。研究结果表明,两品种雪茄晾制后烟叶生物碱物质中,烟碱相对含量最高,这与前人研究结果一致^[2-3],CX-010 晾制后烟叶中大多数生物碱相对含量显著低于 CX-014,这说明生物碱含量的差异也可能是导致两品种晾制后烟叶叶色差异原因之一。

4 结论

本研究分析发现,与 CX-014 相比,CX-010 中游离氨基酸相对含量总体偏低,脯氨酸最为显著;生物碱相对含量总体偏低,以烟碱最为显著,但 CX-010 中脂质相对含量总体比 CX-014 高,CX-010 中黄酮相对含量偏高。以鸟氨酸为底物合成脯氨酸的脯氨酸生物合成途径是两品种晾制后烟叶差异最显著的代谢途径。推测可能是脯氨酸、水杨酸、黄酮和生物碱的相对含量差异导致了两品种晾制后烟叶叶色的差异。

参考文献

- [1] 刘博远, 赵松超, 李一凡, 等. 不同成熟度雪茄烟晾制过程碳水化合物及相关酶活性变化规律研究[J]. 中国农业科技导报, 2021, 23(4): 192-201.
LIU B Y, ZHAO S C, LI Y F, et al. Study on changes of carbohydrate and its related enzyme activities during drying of cigar with different maturities[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2021, 23(4): 192-201.
- [2] 徐世杰, 王浩, 王慧方, 等. 调制过程中不同温湿度条件对海南雪茄茄衣烟叶质量的影响[J]. 山东农业科学, 2016, 48(1): 29-34.
XU S J, WANG J, WANG H H, et al. Effects of temperature and humidity on cigar-wrapper tobacco quality in Hainan province during curing[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2016, 48(1): 29-34.
- [3] 宫长荣. 烟草调制学[M]. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2011.
GONG C R. Tobacco curing science[M]. 2nd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2011.
- [4] 高娅北, 钟秋, 王松峰, 等. 雪茄茄衣晾制过程中烟叶颜色和含水量变化及其相关分析[J]. 中国烟草科学, 2019, 40(2): 57-63, 72.
GAO Y B, ZHONG Q, WANG S F, et al. Changes in color and water content of tobacco leaves and their correlation during cigar wrapper airing[J]. Chinese Tobacco Science, 2019, 40(2): 57-63+72.
- [5] 卢绍浩, 张嘉雯, 赵喆, 等. 不同部位雪茄烟叶晾制过程中多酚、色素及相关酶活性的变化[J]. 中国烟草科学, 2019, 40(3): 84-90+98.
LU S H, ZHANG J W, ZHAO Z, et al. Changes of polyphenols, pigments and related enzyme activities in cigars leaves of different positions during air-curing[J]. Chinese Tobacco Science, 2019, 40(3): 84-90+98.
- [6] 闫新甫. 中外烟叶等级标准与应用指南[M]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
YAN X F. China and foreign courtiers' tobacco leaf grade standards and application guides[M]. Beijing: Standards Press of China, 2012.
- [7] 李勇, 逢涛, 李军营, 等. 大田生长时间对烟叶化学品质影响的代谢组学研究[C]//中国烟草学会学术年会优秀论文集, 2017: 3912-3921.
LI Y, FENG T, LI J Y, et al. Metabolomics research of tobacco chemical quality influenced by the length of field growth time[C]//China Tobacco Society Academic Annual Conference Excellent Proceedings, 2017: 3912-3921.
- [8] 田培, 李晓辉, 贺文俊, 等. 南方根结线虫侵染烟草抗感品种前后的代谢组学分析[J]. 中国烟草学报, 2019, 25(4): 81-92.
TIAN P, LI X H, HE W J, et al. Metabonomics analysis of resistant susceptible tobacco varieties before and after infection by *Meloidogyne incognita*[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2019, 25(4): 81-92.
- [9] WEN B, MEI Z L, ZENG C W, et al. MetaX: a flexible and comprehensive software for processing metabolomics data[J]. BMC Bioinformatics, 2017, 18(1): 183.
- [10] WANG J B, PU S B, SUN Y, et al. Metabolomic profiling of autoimmune hepatitis: the diagnostic utility of nuclear magnetic resonance spectroscopy[J]. Journal of Proteome Research, 2014, 13(8): 3792-3801.
- [11] 杨洪强, 高华君. 植物精氨酸及其代谢产物的生理功能[J]. 植物生理与分子生物学报, 2007, 33(1): 1-8.
YANG H Q, GAO H J. Physiological function of arginine and its metabolites in plants[J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2007, 33(1): 1-8.
- [12] 王瑞新. 烟草化学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.
WANG R X. Tobacco chemistry[M]. Beijing: China Agricultural Publishing House, 2003.
- [13] 张婕, 赵会纳, 朱文静, 等. 烘烤前后烟叶葡萄糖和氨基酸及 Amadori 化合物含量的差异分析[J]. 烟草科技, 2021, 54(11): 25-31.
ZHANG J, ZHAO H N, ZHU W J, et al. Variance analysis on glucose, free amino acids and Amadori compounds in tobacco leaves before and after flue-curing[J]. Tobacco Science and Technology, 2021, 54(11): 25-31.
- [14] 赵田. 不同栽培和调制措施对白肋烟和烤烟氨基酸含量的影响[D]. 郑州: 河南农业大学, 2012.
ZHAO T. Effects of different cultivation measures and curing methods on contents of free amino acids in flue-cured tobacco and burley tobacco[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2012.
- [15] SUEKAWA M, FUJIKAWA Y, ESAKA M. Exogenous proline has favorable effects on growth and browning suppression in rice but not in tobacco[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2019, 40(2): 391-395.
- [16] OZTURK L, DEMIR Y. In vivo and in vitro protective role of proline[J]. Plant Growth Regulation, 2002, 38(3): 259-264.
- [17] 陆畅. 鹅掌楸转录组研究及抗寒基因发掘[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2015.
LU C. Transcriptome analysis and cold resistant genes discovery of *Liriodendron chinese Sarg*[D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry, 2015.
- [18] HE X, LIU T X, REN K, et al. Salicylic acid effects on flue-cured tobacco quality and curing characteristics during harvesting and curing in cold stressed fields[J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11: 580-597.
- [19] 侯爽, 陈锦芬, 刘溶荣, 等. 外源水杨酸对烟草幼苗低温胁迫的缓解效应[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2020, 46(1): 14-20.
HOU S, CHEN J F, LIU R R, et al. Mitigative effect of exogenous salicylic acid on low temperature stress in tobacco seedlings[J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 2020, 46(1): 14-20.
- [20] 刁倩楠, 蒋雪君, 陈幼源, 等. 外源水杨酸预处理对低温胁迫下甜瓜幼苗生长及其抗逆生理特性的影响[J]. 西北植物学报, 2018, 38(11): 2072-2080.
DIAO Q N, JIANG X J, CHEN Y Y, et al. Effects of exogenous salicylic acid pretreatment on growth and resistance physiological indexes in melon seedling under chilling stress[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2018, 38(11): 2072-2080.
- [21] 徐德, 郑远静, 高方平, 等. 花色苷的生物合成及其影响因素研究进展[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(5): 1246-1253.
XU H, ZHENG Y J, GAO F P, et al. Advances in the biosynthesis and influencing factors of anthocyanins[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2019, 35(5): 1246-1253.
- [22] 朱青青. 黄花鸢尾叶片抗氧化系统和紫外吸收物质对增强 UV-B 辐射的响应[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2021.
ZHU Q Q. Responses of antioxidative system and uv-absorbing compounds in *Iris wilsonii* leaves to enhanced uv-radiation[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2021.
- [23] 宋恭帅, 刘家源, 袁雅雯, 等. 栀子黄脂质的制备、表面修饰及体外消化稳定性研究[J]. 核农学报, 2021, 35(12): 2799-2809.
SONG G S, LIU J Y, YUAN Y W, et al. Study on the preparation, surface modification and in vitro digestion stability of gardenia yellow liposomes[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2021, 35(12): 2799-2809.
- [24] 彭新辉, 易建华, 周清明, 等. 同部位不同等级烤烟的色泽和化学成分及其关系[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2008, 34(1): 39-43.
PENG X H, YI J H, ZHOU Q M, et al. Research on differences of color and luster, chemical components and their relationship between differently-graded flue-cured tobacco from identical part of tobacco plants[J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 2008, 34(1): 39-43.
- [25] 李青山, 矫海楠, 王传义, 等. 烟叶正背面颜色参数与色素和主要化学成分的关系研究[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(8): 332-336.
LI Q S, JIAO H N, WANG C Y, et al. Study on the relationship between color parameters of the front and back of tobacco leaves and pigments and main chemical components[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2016, 44(8): 332-336.