

于连营, 杨锦鹏, 余君, 等. 基于代谢组学分析雪茄烟叶晾制时“青斑”组织的代谢差异及形成原因[J]. 华中农业大学学报, 2022, 41(1): 152-159. DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2022.01.014

# 基于代谢组学分析雪茄烟叶晾制时“青斑”组织的代谢差异及形成原因

于连营<sup>1</sup>, 杨锦鹏<sup>2</sup>, 余君<sup>2</sup>, 李楠芬<sup>1</sup>, 杨荣洲<sup>1</sup>,  
汪社亮<sup>1</sup>, 丁广大<sup>1</sup>, 杨春雷<sup>2</sup>, 徐芳森<sup>1</sup>

1. 华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室/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

**摘要** 为探究雪茄烟叶自然晾制过程中青色斑点(简称“青斑”)形成的生理机制及代谢差异, 提高茄衣烟叶外观品质, 改进晾制技术, 以雪茄烟‘楚雪 10 号’品种为试验材料, 利用高压液相色谱串联质谱(HPLC-MS/MS)非靶向代谢组学技术, 分析烟叶“青斑”和正常两组织部位的代谢差异。研究结果表明:“青斑”部位叶绿素和绿原酸含量显著高于正常部位, 大量未分解的叶绿素和绿原酸在晾制末期沉积是“青斑”形成的生理基础;“青斑”和正常两组织部位间, 酪氨酸代谢、苯丙氨酸代谢和类黄酮生物合成途径具有显著差异;绿原酸和二氢玉米素可作为“青斑”形成过程的化学标记物, 晾制过程中可检测其含量高下来监测是否会出现“青斑”;烟叶变黄期晾房湿度骤降且波动过大, 可能是形成“青斑”的外部环境因素, 建议采用湿度可控晾房晾制并适当提高变黄期湿度。

**关键词** 雪茄烟; 茄衣; “青斑”; 叶绿素; 非靶向代谢组学; 烟叶

**中图分类号** S 572      **文献标识码** A      **文章编号** 1000-2421(2022)01-0152-08

晾制过程是雪茄烟生产的关键步骤, 新鲜烟叶在晾制过程中外观颜色会发生显著变化, 这种外观变化与叶绿素、类胡萝卜素等质体色素关系密切。新鲜烟叶由于叶绿素含量较高而呈绿色<sup>[1]</sup>, 在晾制过程中叶绿素被不断降解, 而类胡萝卜素降解速度远低于叶绿素, 导致类胡萝卜素与叶绿素的比值不断升高, 使烟叶颜色逐渐转为黄色<sup>[2]</sup>, 质体色素含量高低影响晾制后烟叶的外观质量。茄衣烟叶作为雪茄产品可被消费者直观评价, 对其在晾制过程中所形成的外观颜色要求较高<sup>[3]</sup>, 因此, 茄衣的外观质量直接决定了雪茄烟的品质与档次<sup>[4]</sup>。

茄衣烟叶在自然晾制过程中易出现青色斑点(简称“青斑”), 影响烟叶外观质量和内在品质, 代谢组学技术被广泛应用于研究植物外观颜色变化<sup>[5-6]</sup>, 但基于代谢组学技术探究雪茄烟晾制过程外观颜色变化尚未见报道。本研究以茄衣烟叶‘楚雪 10 号’品种为试验材料, 利用高压液相色谱串联质谱(HPLC-MS/MS)非靶向代谢组学技术, 探究晾制

期间烟叶“青斑”和正常组织部位代谢差异及“青斑”形成的可能原因, 以期在晾制期间避免叶片产生“青斑”、提高烟叶外观质量提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验概况

试验于 2020 年在湖北省恩施州崔坝晾晒烟基地(30°27'N, 109°47'E; 海拔 860 m)开展。供试材料为雪茄烟品种‘楚雪 10 号’(CX-010)。田间试验小区长 8.0 m、宽 4.0 m, 共四行区, 每行 20 株。供试土壤基本理化性质: 碱解氮 66.05 mg/kg、有机质 21.17 g/kg、有效磷 52.63 mg/kg、速效钾 128.30 mg/kg、pH 值 7.26。栽培中基施有机肥 100 kg/667 m<sup>2</sup>, 氮磷钾化肥按 N : P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> : K<sub>2</sub>O = 1 : 1.5 : 3 配比施用, 管理按照当地雪茄烟叶生产技术规范统一进行。成熟后采收中部烟叶, 挂入 4 m × 7 m 晾房, 随外界气温进行自然晾制。晾制期间每隔 1 h 记录 1 次温湿度, 晾房温湿度曲线如

收稿日期: 2021-10-21

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

于连营, E-mail: yulianying@webmail.hzau.edu.cn

通信作者: 徐芳森, E-mail: fangsenxu@mail.hzau.edu.cn;

杨春雷, E-mail: ycl193737@163.com

图 1 所示,平均温度为 23.01 °C,平均湿度为 83.7%。晾制期间叶片出现了不同程度的青色斑点(图 2),图 2 所示烟叶为取自晾制末期的样品,右上角为“青斑”和正常部位放大图。晾制结束后在晾房随机取烟叶样品并迅速置于干冰中,随后转移至 -80 °C 超低温冰箱中保存。样品分析前从超低温冰箱中取出烟叶,用打孔器和刀片快速挖出烟叶“青斑”部位,设为样品处理 G(Green spot),同时取无“青斑”的正常部位设为样品处理 N(Normal)。

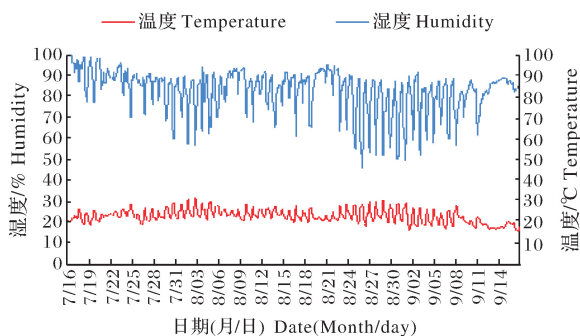


图 1 晾房温湿度曲线图

Fig.1 Temperature and humidity curve of drying room



图 2 晾制期间产生的“青斑”现象

Fig.2 “Green spot” phenotype during air-curing period

## 1.2 叶绿素含量测定

叶绿素含量的测定采用 95%乙醇浸提,分光光度法测定<sup>[7]</sup>。

## 1.3 代谢物提取

“青斑”(G)和正常(N)2组处理各设置6个重复,记为G1~G6,N1~N6。取经液氮研磨过的“青斑”样品和正常样品各100 mg于EP管中,加入500 μL的80%甲醇(纯度:LC-MS grade)水溶液。涡旋震荡后于冰浴中静置5 min,然后于13 000 r/min、4 °C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%。再次放入13 000 r/min、4 °C离心20 min并收集上清液。从每个试验样本中取等体积样本混匀作为质控(quality control,

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

## 1.4 代谢产物测定方法

色谱柱为 HypesilGold column(C18),色谱分离条件设置为:流速 0.2 mL/min、柱温 40 °C;正离子模式流动相 A 为 0.1%甲酸,流动相 B 为甲醇;负离子模式流动相 A 为 5 mmol/L 醋酸铵(pH=9.0),流动相 B 为甲醇,流动相梯度洗脱程序见表 1。质谱参数如下:喷雾电压 3.2 kV,鞘层气体流速 40 mL/min,辅助气体流速 10 mL/min,毛细管温度 320 °C,扫描范围: $m/z$  100~1 500。

表 1 流动相梯度

Table 1 The gradient of mobile phase

时间/min Time	流速/(mL/min) Flow rate	流动相 A/% Mobile phase A	流动相 B/% Mobile phase B
0	0.2	98	2
1.5	0.2	98	2
12	0.2	0	100
14	0.2	0	100
17	0.2	98	2

## 1.5 数据处理

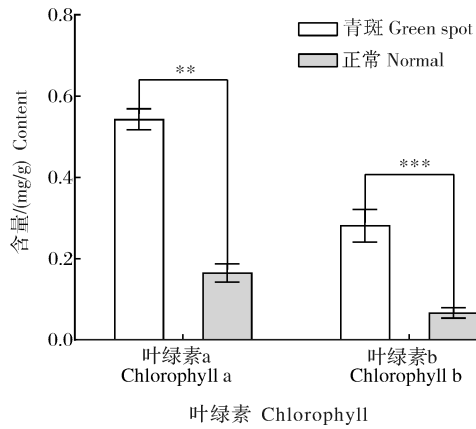
质谱检测原始文件导入 Compound Discoverer 3.1 软件进行谱图处理及数据库检索,用 Blank 样本去除背景离子并对定量结果进行归一化,使用 MetaX 软件对数据进行对数转换及标准化处理。差异代谢物筛选主要参考 VIP(variable importance in the projection)、FC(fold change)和 P 值参数。VIP 是指 PLS-DA 模型第一主成分的变量投影重要度<sup>[8]</sup>,数值越大表示该差异物质对样品组间分类判别的影响强度和解释能力越强;FC 指差异倍数,本研究中 FC 为“青斑”(G)/正常(N);P 值表示差异显著性水平。使用 Microsoft Excel 2010 进行数据整理计算,软件 GraphPad Prism 9 绘图和方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 “青斑”部位与正常部位叶绿素的含量

“青斑”部位与正常部位的叶绿素含量如图 3 所示,“青斑”部位叶绿素 a、b 含量都显著高于正常部位。正常部位烟叶叶绿素 a 含量平均为 0.165 mg/g,“青斑”部位烟叶叶绿素 a 平均含量达到 0.543 mg/g,是正常部位的 3.29 倍。正常部位叶绿素 b 平均含量为 0.066 mg/g,“青斑”部位叶绿素 b 平均含量达到 0.281 mg/g,是正常部位的 4.26 倍。

这表明青色斑点中叶绿素含量高是呈现“青斑”的主要原因。



\*\* 和 \*\*\* 分别表示在 0.01 和 0.001 水平上显著相关。  
\*\* and \*\*\* indicate significant correlation at the level of 0.01 and 0.001, respectively.

图 3 “青斑”部位与正常部位的叶绿素含量对比  
Fig.3 Comparison of chlorophyll content between green spot part and normal part

## 2.2 主成分分析

所有试验样本和 QC 样本的主成分分析 (principal component analysis, PCA) 如图 4 所示。从总样本 PCA 图 (图 4A) 可以看出, QC 样本点的分布较为聚集且位于中心区域, 说明 QC 样本差异较小, 分析方法的稳定性好、数据质量高。从 G、N 两组样本 PCA 图 (图 4B) 可以看出, 第 1 成分 (PC1) 对样本的贡献率为 64.94%, 第 2 成分 (PC2) 对样本的贡献率为 6.21%。每个处理内部的样本点分布集中, 说明组内样本重复性较好, 代谢物高度一致; 不同处理间样本点分布明显分离, 说明“青斑”部位和正常部位之间代谢物存在显著差异。

## 2.3 偏最小二乘法判别分析

“青斑”部位 (G) 与正常部位 (N) 之间的 PLS-DA 模型如图 5 所示。由得分散点图 (图 5A) 可以看出, G、N 两组样本显著分离, 结果与 PCA 分析一致。  $R^2_Y = 1.00$ ,  $Q^2_Y = 0.99$ ,  $R^2 = 0.94$ , 表明 PLS-DA 模型建立良好, 预测能力较好。从排序验证图 (图 5B)

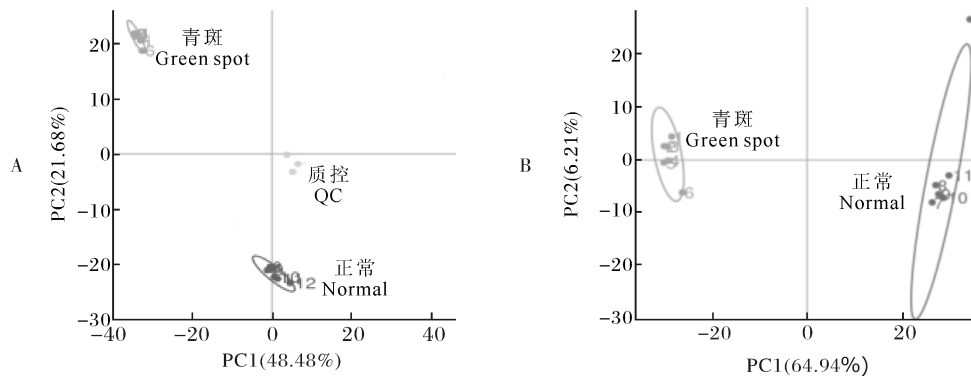


图 4 总样本 PCA 图 (A) 和 G、N 两组样本 PCA 图 (B)

Fig.4 PCA diagram of total sample (A) and PCA diagram between group G and N (B)

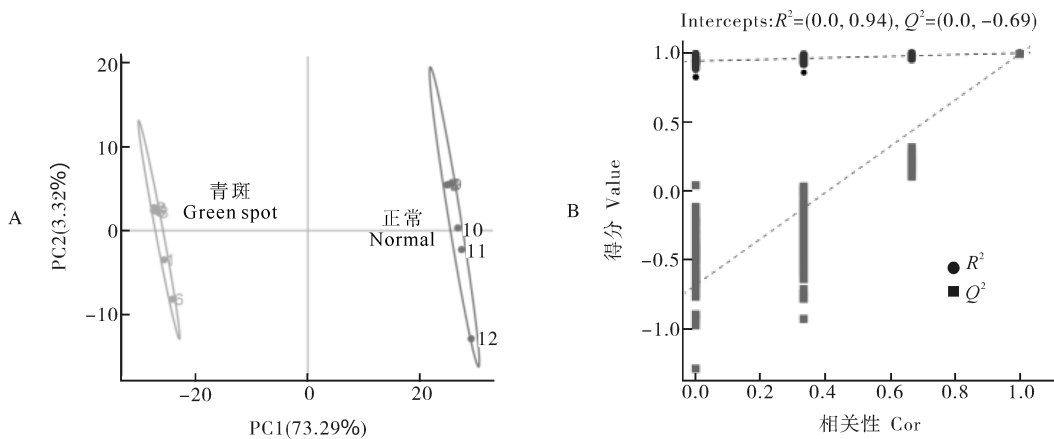


图 5 PLS-DA 得分散点图 (A) 和排序验证图 (B)

Fig.5 Scatter plot of PLS-DA score (A) and sort verification diagram (B)

中可以看出,  $R^2$  回归线位于  $Q^2$  回归线上方,  $Q^2$  回归线与  $Y$  轴截距为  $-0.69$ , 小于  $0$ , 表明模型未“过拟合”, 可以较好地描述样本并作为寻找生物标记物的前提。

## 2.4 差异代谢物筛选

本研究设定阈值  $VIP > 1.0$ ,  $FC > 4.0$  或  $FC < 0.25$ ,  $P < 0.01$ <sup>[9-10]</sup> 对所有代谢物进行筛选。两组织部位共检测到代谢物总数 1 430 个, 其中“青斑”部位与正常部位间存在显著差异的代谢物 109 个, 包括 25 个显著上调代谢物和 84 个显著下调代谢物。

对鉴定到的代谢物进行功能和分类注释, 109 个显著差异代谢物在 Human Metabolome Database(HMDB)数据库中成功分类注释到 61 个, 包括 50 个下调代谢物和 11 个上调代谢物(表 2)。由表 2 可见, 两组织部位显著差异代谢物中氨基酸、肽及其类似物最多, 共 25 个, 占成功分类注释代谢物总数的 41.0%。“青斑”部位仅有色氨酸 1 种氨基酸含量显著高于正常部位, 而正常部位  $L$ -苯丙氨酸、酪氨酸等 24 种氨基酸、肽及其类似物显著高于“青斑”部位。

表 2 两组织部位中显著差异物注释结果

Table 2 Annotation results of important foreign bodies in two tissue parts

类别 Category	下调代谢物 Down regulated metabolites	上调代谢物 Up regulated metabolites
氨基酸、肽及其类似物 Amino acids, peptides, and analogues	$L$ -天门冬氨酸 $L$ -Aspartic acid, $N$ -乙酰甘氨酸 $N$ -Acetyl-glycine, $L$ -高胱氨酸 $L$ -Homocystine, $N$ - $\alpha$ -乙酰- $L$ -赖氨酸 $N$ - $\alpha$ -Acetyl- $L$ -lysine, 丙酰脯氨酸 Valylproline, 精氨酸琥珀酸 Argininosuccinic acid, 酪氨酸 Tyrosine, 4-胍基丁酸 4-Guanidinobutyric acid, $L$ -苯丙氨酸 $L$ -Phenylalanine, $L$ -环丝氨酸 $L$ -Cycloserine, 谷氨酰胺 Glutamine, $L$ -谷氨酰- $L$ -谷氨酸 $L$ -Glutamyl- $L$ -glutamic acid, $\gamma$ -谷氨酰基亮氨酸 $\gamma$ -Glutamylleucine, $N$ -乙酰苯丙氨酸 $N$ -Acetyl-phenylalanine, $L$ - $O$ -磷酸丝氨酸 $O$ -Phospho- $L$ -serine, $N$ -乙酰-天冬氨酸-谷氨酸 $N$ -Acetyl-Asp-Glu, 苯乙酰甘氨酸 Phenylacetyl-glycine, 吡啶乙酸谷氨酸 IAA-Glu, $N$ - $\alpha$ -乙酰- $L$ -精氨酸 $N$ - $\alpha$ -Acetyl- $L$ -arginine, 天冬氨酸谷氨酸 Asp-Glu, 丙氨酸-异亮氨酸 Ala-Ile, 1-氨基环丙烷羧酸 1-Aminocyclopropanecarboxylic acid, 泛硫乙胺 Pantetheine, $\gamma$ -氨基丁酸 $\gamma$ -Aminobutyric acid	色氨酸 Tryptanthrin
类黄酮 Flavonoid	山奈酚 Kaempferol, 儿茶素 Catechin, 表没食子儿茶素 Epigallocatechin, 山奈酚-3- $O$ -半乳糖苷 Kaempferol-3- $O$ -galactoside	
生物碱 Alkaloid	蒜藜芦碱 Jervine, 10-羟基喜树碱 10-Hydroxycamptothecin, 乌头碱 Sogorine, 羽扇豆碱 Lupinine, 文多灵碱 Vindoline, 千里光碱 Sene-ionine, 紫堇醇灵碱 Corynoline	商陆皂苷 Phytolaccagenin, 麦冬皂苷 Ophiopogonin, 岩白菜素 Bergenin, 青藤碱 Sinomenine, 紫草素 Shikonin
有机酸 Organic acid	丙二酸 Malonic acid, 苯甲酸 Benzoic acid, $L$ -苹果酸 $L$ -Malic acid	
有机氮化合物 Organic nitrogen compounds		组胺 Histamine
有机杂环化合物 Organoheterocyclic compounds	5-羟基色氨酸 5-Hydroxytryptophan, $DL$ -色氨酸 $DL$ -Tryptophan, 二氢玉米素 Dihydrozeatin, 吡啶 Indole, 卡巴多 Carbadox, 咖啡豆醇 Kahweol	
苯环型化合物 Benzenoids	4-羟基苯乙酸 4-Hydroxyphenylacetic acid, 3-甲氧基酪胺 3-Methoxytyramine, 马尿酸 Hippuric acid	大黄酸 Rhein
脂肪酰基 Fatty acyls	脱硫生物素 Desthioibiotin, 十三烷二酸 1,11-Undecanedicarboxylic acid	十七烷酸 Heptadecanoic acid
有机氧化物 Organooxygen compounds	$D$ -木酮糖 $D$ -Xylulose, 泛酸 Pantothenic acid	绿原酸 Chlorogenic acid

## 2.5 潜在化学标记物筛选

为寻找雪茄烟叶“青斑”与正常组织部位的潜在化学标记物, 对显著上调差异物按  $VIP$  值排序, 发现绿原酸  $VIP$  值最高, 为 1.70; 按  $FC$  值排序发现绿原酸排名第二, 差异倍数为 13.42。由此可见, 其在上调代谢物中具有重要意义, 可作为“青斑”形成的关键化学标记物。在显著下调差异物中, 筛选发现

二氢玉米素  $FC$  值最大, 高达 29.12, 远高于其他下调差异物。最终筛选出绿原酸和二氢玉米素作为“青斑”形成过程的化学标记物, 使用箱形图比较其在两组织部位间的含量丰度差异(图 6)。

## 2.6 KEGG 通路富集分析

将两组织部位间显著差异代谢物注释到 KEGG 数据库, 通过 Pathway 分析确定代谢物参与

的最主要的生化代谢途径是氨基酸代谢,富集到差异代谢物 56 个,占差异代谢物总数的 51.4%。进一步借助超几何检验方法得到通路富集的  $P$  值,本研

究设定  $P \leq 0.05$  的通路为显著富集通路,共筛选出 3 条显著性差异代谢通路,每条通路富集到的代谢物如表 3 所示。

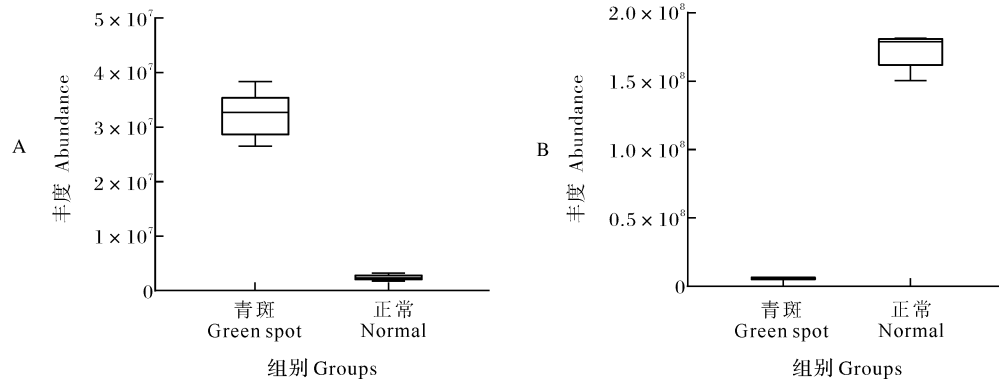


图 6 绿原酸(A)和二氢玉米素(B)的相对含量丰度

Fig.6 Relative content abundance of chlorogenic acid(A) and dihydrozeatin(B)

表 3 显著差异通路及其富集代谢物

Table 3 Significant difference pathway and its metabolite enrichment

通路 ID Map ID	代谢途径 Metabolic pathway	$P$ 值 $P$ value	富集的代谢物名称 The name of enriched metabolite
Map 00350	酪氨酸代谢 Tyrosine metabolism	0.046 4	红景天苷 Salidroside, 对香豆酸 <i>p</i> -Coumaric acid, 酪醇 Tyrosol, 3-甲氧酪胺 3-Methoxytyramine, 4-羟基苯乙酸 4-Hydroxyphenylacetic acid
Map 00360	苯丙氨酸代谢 Phenylalanine metabolism	0.047 1	苯乙酰甘氨酸 Phenylacetyl-glycine, 对香豆酸 <i>p</i> -Coumaric acid, 苯乙酰谷氨酰胺 Phenylacetylglutamine, 马尿酸 Hippuric acid, <i>L</i> -苯丙氨酸 <i>L</i> -Phenylalanine, 苯甲酸 Benzoic acid
Map 00941	类黄酮生物合成 Flavonoid biosynthesis	0.049 3	绿原酸 Chlorogenic acid, 儿茶素 Catechin, 表没食子儿茶素 Epigallocatechin, 山奈酚 Kaempferol, 5- <i>O</i> -咖啡酰莽草酸 5- <i>O</i> -Caffeoylshikimic acid

由表 3 可以看出,“青斑”(G)和正常(N)2 组处理间酪氨酸代谢、苯丙氨酸代谢和类黄酮生物合成途径具有显著差异,其中类黄酮生物合成途径富集到了化学标记物——绿原酸。基于 KEGG Pathway 代谢通路数据库,绘制了晾晒烟叶中绿原酸生物合成及类黄酮生物合成途径(图 7)。

本研究发现雪茄烟叶中绿原酸生物合成途径有 2 条,第 1 条途径为对香豆酸 CoA 经对香豆酰奎宁酸合成绿原酸,第 2 条途径为对香豆酸 CoA 经对香豆酰莽草酸、咖啡酰莽草酸最终合成绿原酸。由图 7 可见,在类黄酮生物合成途径中,山奈酚参与雪茄烟叶黄酮醇的生物合成,二氢山奈酚、二氢杨梅素和二氢槲皮素则共同参与调控烟叶花青素的代谢。

### 3 讨论

#### 3.1 雪茄烟叶晾晒期间“青斑”产生的生理机制

在植物体中,叶绿素主要与蛋白质、脂类相结合以复合体的形式存在于叶绿体中。鲜烟叶中与叶绿素结合的蛋白质约占蛋白质总量的 50%,当蛋白质充分降解时,绝大部分叶绿素也被降解<sup>[11]</sup>。烟叶蛋

白质在晾晒过程中会降解成氨基酸或多肽,对鉴定到的代谢物进行分类注释时发现“青斑”和正常部位之间的显著差异代谢物主要是氨基酸、多肽类物质,正常部位氨基酸、多肽和类似物有 24 个显著增多,占下调代谢物总数的 28.6%,而“青斑”部位仅有 1 种氨基酸上调,占上调代谢物总数的 4.0%。通过 Pathway 分析可以确定代谢物参与的最主要的生化代谢途径是氨基酸代谢,富集到差异代谢物 56 个,占差异代谢物总数的 51.4%。上述差异说明正常部位烟叶蛋白质分解较充分,而“青斑”部位烟叶仅有少量蛋白质降解。烟叶叶绿素在晾晒过程会降解形成新植二烯、植物呋喃和吡咯衍生物等产物<sup>[12]</sup>,在分析“青斑”和正常组织的显著差异代谢物中,笔者发现 3 种呋喃类物质和 3 种吡咯衍生物下调,而其他新植二烯、植物呋喃和吡咯衍生物等代谢产物未发现下调。此外,“青斑”部位叶绿素含量是正常部位的 3.57 倍。因此,结合 2 组处理的代谢组学差异及叶绿素含量等方面的对比分析结果,推测雪茄烟叶片在晾晒期间,叶绿素分解不完全是“青斑”产生的主要原因。

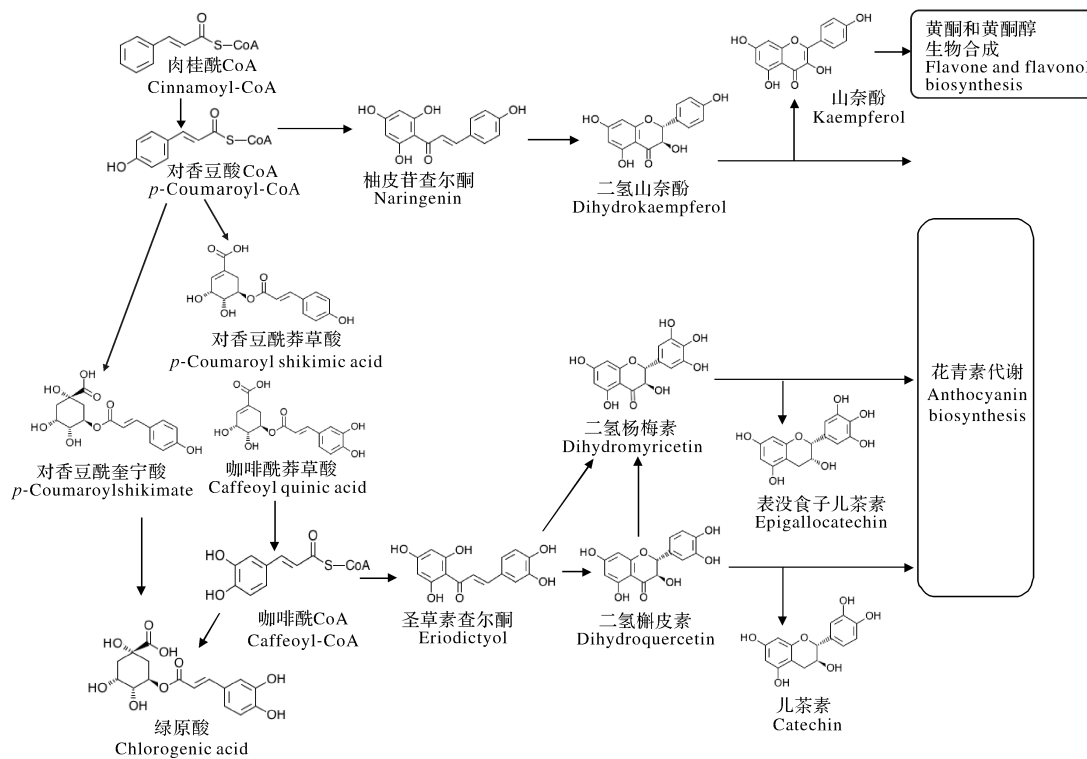


图7 雪茄烟叶中类黄酮生物合成通路

Fig.7 Pathway map of flavonoid biosynthesis in cigar tobacco

本研究发现“青斑”与正常部位类黄酮生物合成途径为差异途径且该途径富集到了化学标记物——绿原酸(表3),绿原酸是烟草中主要的酚类化合物,占总多酚的75%~90%<sup>[13]</sup>,在晾制过程中会通过酶促棕色化反应形成醌类等棕色色素使烟叶颜色转深<sup>[14]</sup>,基于代谢组学分析发现“青斑”部位绿原酸含量显著高于正常部位,“青斑”部位大量绿原酸未发生酶促棕色化反应,未被氧化成棕色色素,这可能也是“青斑”形成的原因之一。其余4种代谢物儿茶素、表没食子儿茶素、5-O-咖啡酰莽草酸和山奈酚均为下调代谢物,参与调控烟叶黄酮醇合成和花青素代谢(图7),有研究表明,类黄酮中的山奈酚及其糖苷和花青素可以调控黄色形成<sup>[15-16]</sup>,这些代谢物在正常部位含量显著高于“青斑”部位,可能与正常部位烟叶变黄有关。

### 3.2 雪茄烟叶晾制期间“青斑”产生的环境因素

湿度是影响雪茄烟叶叶绿素降解的一个关键因素,同时水分又是许多代谢过程的重要原料。结合温湿度记录图(图1)可以看出,在晾制第4天至第14天期间晾房湿度较低、波动较大,该时段对应雪茄烟叶晾制的变色期,是烟叶色素降解的关键时期,有80%以上的叶绿素被降解<sup>[1]</sup>。戴培刚等<sup>[17]</sup>研究表明,烟叶失水过快容易形成青烟。本研究中,变黄

期湿度仅有70%左右,远低于正常湿度(80%~85%),导致细胞快速失水死亡、大量叶绿素无法降解。残留的叶绿素在晾制过程中沉积,可能是“青斑”产生的环境因素,建议采用湿度可控晾房晾制,适当提高变黄期湿度。

### 3.3 关于“青斑”形成过程的化学标记物

在雪茄烟叶晾制过程中绿原酸含量在变黄初期较高,随晾制时间延长而不断降低<sup>[18]</sup>。本研究发现晾制末期“青斑”部位绿原酸含量仍较高,说明在变黄期时“青斑”部位叶片细胞代谢缓慢或已死亡,导致大量绿原酸无法分解,最终在“青斑”部位显著富集。卢绍浩等<sup>[19]</sup>研究表明,绿原酸含量高低与色素含量存在一定正相关性。内源性化学标记物是差异研究中用来区分彼此的特征物质,经大量研究目前已形成了系统的代谢组学策略来寻找植物中的内源性化学标记物,并成功应用于甘蓝<sup>[20]</sup>、青花菜<sup>[21]</sup>等作物的差异研究。本研究应用上述方法筛选化学标记物,发现绿原酸在上调代谢物中VIP值及FC值排名分别是第一和第二。因此,绿原酸可以作为“青斑”形成过程的标记物质。

二氢玉米素是两组织部位差异倍数最大的物质,差异倍数为29.12,其化学结构和生理活性与玉米素相似,二者都是植物体内主要的游离细胞分裂

素,具有促进细胞分裂和代谢、保持细胞活力的作用<sup>[22]</sup>。正常部位二氢玉米素含量高,细胞代谢旺盛,有利于叶绿素分解,“青斑”部位二氢玉米素含量较低,细胞代谢活动较弱,叶绿素降解缓慢,二氢玉米素可作为区别“青斑”与正常部位的标记物质。结合绿原酸的分析,在雪茄烟叶晾制变色期监测绿原酸和二氢玉米素的含量变化,可作为预判叶片是否会产生“青斑”的有效手段,对茄衣烟叶而言具有重要的理论价值和生产意义。

综上,雪茄烟叶在晾制过程中叶绿素降解不完全,大量的绿原酸未被氧化成深色色素,因此,推测残留的叶绿素和绿原酸在晾制末期沉积是晾制烟叶“青斑”产生的生理机制。在雪茄烟叶晾制变色期监测绿原酸和二氢玉米素的含量变化,可作为预判叶片是否会产生“青斑”的有效手段之一。

### 参考文献 References

- [1] 宫长荣.烟草调制学[M].北京:中国农业出版社,2003:207. GONG C R. Tobacco modulation [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2003: 207 (in Chinese).
- [2] 杨式华,徐济仓,盛冀萍,等.烟草中质体色素研究进展[J].云南化工,2007,34(1):69-73,76. YANG S H, XU J C, SHENG J P, et al. Research progress on plastid pigment from tobacco[J]. Yunnan chemical technology, 2007, 34(1): 69-73, 76 (in Chinese with English abstract).
- [3] 秦艳青,李爱军,范静苑,等.优质雪茄茄衣生产技术探讨[J].江西农业学报,2012,24(7):101-103. QIN Y Q, LI A J, FAN J Y, et al. Discussion on production technology of high-quality cigar wrapper[J]. Acta agriculturae Jiangxi, 2012, 24(7): 101-103 (in Chinese with English abstract).
- [4] 时向东,王志强,刘艳芳,等.遮荫对雪茄外包皮烟生长和光合特性的影响[J].西北植物学报,2006,26(8):1718-1721. SHI X D, WEN Z Q, LIU Y F, et al. Effects of shading on growth and photosynthetic capabilities of tobacco leaves of cigar-wrapper use[J]. Acta botanica boreali-occidentalia sinica, 2006, 26(8): 1718-1721 (in Chinese with English abstract).
- [5] ZHANG Q, WANG L L, LIU Z G, et al. Transcriptome and metabolome profiling unveil the mechanisms of *Ziziphus jujuba* Mill. peel coloration[J/OL]. Food chemistry, 2020, 312: 125903 [2021-10-21]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125903>.
- [6] 贾聪,芦鑫,高锦鸿,等.基于代谢组学分析不同颜色花生红皮的组成差异[J].食品科学,2019,40(19):46-51. JIA C, LU X, GAO J H, et al. Metabolomic analysis of differences in chemical composition of peanut skins with different colors[J]. Food science, 2019, 40(19): 46-51 (in Chinese with English abstract).
- [7] 王学奎,黄见良.植物生理生化实验原理与技术[M].3版.北京:高等教育出版社,2015. WANG X K, HUANG J L. Principles and techniques of plant physiological biochemical experiment[M]. 3rd. Beijing: Higher Education Press, 2015 (in Chinese).
- [8] HEISCHMANN S, QUINN K, CRUICKSHANK-QUINN C, et al. Exploratory metabolomics profiling in the kainic acid rat model reveals depletion of 25-hydroxyvitamin D3 during epileptogenesis[J/OL]. Scientific reports, 2016, 6: 31424 [2021-10-21]. <https://doi.org/10.1038/srep31424>.
- [9] HASPEL J A, CHETTIMADA S, SHAIK R S, et al. Circadian rhythm reprogramming during lung inflammation[J/OL]. Nature communications, 2014, 5: 4753 [2021-10-21]. <https://doi.org/10.1038/ncomms5753>.
- [10] SREEKUMAR A, POISSON L M, RAJENDIRAN T M, et al. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression[J]. Nature, 2009, 457(7231): 910-914.
- [11] 王瑞新.烟草化学[M].北京:中国农业出版社,2003:87. WANG R X. Tobacco chemistry[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2003: 87 (in Chinese).
- [12] 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[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2005,31(2):128-132. ZHOU J H, WANG Y, SHAO Y, et al. The comparison on the content of chromoplast pigments and volatile aromatic materials of flue-cured tobacco from domestic and abroad[J]. Journal of Hunan Agricultural University (natural science edition), 2005, 31(2): 128-132 (in Chinese with English abstract).
- [13] 朱小茜,徐晓燕,黄义德,等.多酚类物质对烟草品质的影响[J].安徽农业科学,2005,33(8):1910-1911. ZHU X X, XU X Y, HUANG Y D, et al. Effect of polyphenol material on the tobacco quality[J]. Journal of Anhui agricultural sciences, 2005, 33(8): 1910-1911 (in Chinese with English abstract).
- [14] 过伟民,张骏,刘阳,等.烤烟质体色素及多酚与外观质量关系研究[J].中国烟草学报,2009,15(2):33-40. GUO W M, ZHANG J, LIU Y, et al. Research on relationship between sensory quality and plastid pigment and polyphenol in flue-cured tobacco[J]. Acta tabacaria sinica, 2009, 15(2): 33-40 (in Chinese with English abstract).
- [15] 成梦琳,张艳艳,赵大球,等.芍药黄色花瓣中黄酮醇及其糖苷类化合物组成分析[J].天然产物研究与开发,2018,30(8):1340-1345. CHENG M L, ZHANG Y Y, ZHAO D Q, et al. Composition analysis of flavonols and their glycosides in yellow flowers of herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) cultivars[J]. Natural product research and development, 2018, 30(8): 1340-1345 (in Chinese with English abstract).
- [16] 周琳,王雁,彭镇华.黄色花形成机制及基因工程研究进展[J].林业科学,2009,45(2):111-119. ZHOU L, WANG Y, PENG Z H. Advances in study on formation mechanism and genetic engineering of yellow flowers[J]. Scientia silvae sinicae, 2009, 45(2): 111-119 (in Chinese with English abstract).
- [17] 戴培刚,陈爱国,谢利忠,等.几个烤烟品种成熟期及采后的色素和水分含量变化[J].中国烟草科学,2009,30(5):6-9. DAI P G, CHEN A G, XIE L Z, et al. Changes of pigment and water

- contents during ripeness and post-harvest stage for several flue-cured tobacco varieties[J]. Chinese tobacco science, 2009, 30(5): 6-9 (in Chinese with English abstract).
- [18] 卢绍浩, 张嘉雯, 赵喆, 等. 晾制温度对雪茄烟叶多酚类物质代谢的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2021, 49(3): 18-26. LU S H, ZHANG J W, ZHAO Z, et al. Effect of temperature on polyphenols metabolism of cigar tobacco leaf during air-curing process[J]. Journal of Northwest A & F University (natural science edition), 2021, 49(3): 18-26 (in Chinese with English abstract).
- [19] 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 (in Chinese with English abstract).
- [20] KIM J, JUNG Y, SONG B, et al. Discrimination of cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) cultivars grown in different geographical areas using  $^1\text{H}$  NMR-based metabolomics[J]. Food chemistry, 2013, 137(1/2/3/4): 68-75.
- [21] 杨青青, 王智荣, 彭林, 等. 基于代谢组学分析两种产地青花椒中非挥发性成分的差异[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(12): 216-223. YANG Q Q, WANG Z R, PENG L, et al. Metabolomic analysis of non-volatile chemical components in *Zanthoxylum schinifolium* Sieb. et Zucc. from two origins[J]. Food and fermentation industries, 2021, 47(12): 216-223 (in Chinese with English abstract).
- [22] AI L F, YUE Z L, MA Y S, et al. Simple and rapid determination of  $\text{N}^6$ - $(\Delta^2$ -isopentenyl)adenine, zeatin, and dihydrozeatin in plants using on-line cleanup liquid chromatography coupled with hybrid quadrupole-Orbitrap high-resolution mass spectrometry[J]. Journal of separation science, 2015, 38(11): 1858-1865.

## Metabolomic analysis of metabolic differences and causes of green spot tissue of cigar tobacco during air-curing

YU Lianying<sup>1</sup>, YANG Jinpeng<sup>2</sup>, YU Jun<sup>2</sup>, LI Nanfen<sup>1</sup>, YANG Rongzhou<sup>1</sup>,  
WANG Sheliang<sup>1</sup>, DING Guangda<sup>1</sup>, YANG Chunlei<sup>2</sup>, XU Fangsen<sup>1</sup>

1. National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement/Microelement Research Center,  
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China  
2. Academy of Tobacco Science of Hubei Province, Wuhan 430030, China

**Abstract** In order to explore the physiological mechanism and metabolic differences of the green spots ("GrS") formed during the natural air-curing process of cigar tobacco, to improve the appearance quality of wrapper tobacco leaves, and to improve the air-curing technology, the cigar tobacco 'Chuxue 10' was used as an experiment materials, using high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) non-targeted metabolomics technology to analyze the metabolic differences between the GrS and normal tissues of tobacco leaves. The results of the study showed that the contents of chlorophyll and chlorogenic acid in GrS were significantly higher than those in normal parts, and a large amount of undecomposed chlorophyll and chlorogenic acid deposited at the end of the drying period was the physiological basis for the formation of GrS. There were significant differences in tyrosine metabolism, phenylalanine metabolism and flavonoid biosynthesis between GrS and normal tissues. Chlorogenic acid and dihydrozeatin can be used as chemical markers in the formation process of GrS, and their content can be detected to monitor whether there will be GrS in the process of air drying. During the yellowing period of tobacco leaves, the humidity in the drying room drops suddenly and the extreme difference is too large, which may be the external environmental factor for the formation of GrS. It is recommended to use the humidity controlled drying room and appropriately increase the humidity in the yellowing period.

**Keywords** cigar tobacco; wrapper; green spots; chlorophyll; non-targeted metabolomics; tobacco

(责任编辑: 赵琳琳)