

引文格式: 李嘉亮, 胡杨, 卢敏, 等. 基于代谢组学分析明火熏烤烟叶的代谢差异及形成机制[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2024, 39(4): 80–90. DOI: [10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).202305026](https://doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).202305026)

基于代谢组学分析明火熏烤烟叶的 代谢差异及形成机制*

李嘉亮¹, 胡杨², 卢敏², 杜晓姣², 陈颐³, 胡彬彬³, 何承刚^{1**}, 邹聪明^{2**}

(1. 云南农业大学烟草学院, 云南昆明 650201;

2. 云南省楚雄州烟草公司, 云南楚雄 675000;

3. 云南省烟草农业科学研究院, 云南昆明 650021)

摘要:【目的】运用代谢组学技术分析明火熏烤烟叶的代谢差异及其形成机制。【方法】以烤烟品种 K326 为试验材料, 进行明火熏烤(X)和常规烘烤(CK)对比试验, 利用代谢组学技术分析 2 种调制方法的代谢差异, 并探讨其形成机制。【结果】KEGG 富集结果表明: 在 X-38 vs CK-38 比较组中, 亚油酸代谢和植物激素信号转导是富集最显著的 2 条通路; 在 X-42 vs CK-42 比较组中, 糖酵解/糖异生和氨基酸的生物合成是富集最显著的 2 条通路; 在 CK-42 vs CK-38 比较组和 X-42 vs X-38 比较组中, 亚油酸代谢和核苷酸代谢是富集最显著的 2 条通路。在 4 个比较组中, 上调表达的代谢物包括游离脂肪酸、氨基酸及其衍生物、酚酸类、糖类、有机酸、生物碱、核苷酸及其衍生物等。【结论】明火熏烤烟叶的差异代谢物包含大量酸性代谢物。形成差异的原因是明火熏烤使烟叶额外受到烟雾和光热辐射胁迫, 促使其形成更多的代谢物。

关键词: 代谢组学; 明火熏烤; KEGG; 差异代谢物

中图分类号: S572.01

文献标志码: A

文章编号: 1004-390X (2024) 04-0080-11

Metabolomic Analysis of Metabolic Differences and Formation Mechanisms in Open Fire-cured Tobacco Leaves

LI Jialiang¹, HU Yang², LU Min², DU Xiaojiao², CHEN Yi³,
HU Binbin³, HE Chenggang¹, ZOU Congming²

(1. College of Tobacco Science, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. Chuxiong Prefecture Tobacco Company of Yunnan Province, Chuxiong 675000, China;

3. Yunnan Academy of Tobacco Agriculture Science, Kunming 650021, China)

Abstract: [Purpose] To analyze the metabolic differences and formation mechanisms in open fire-cured tobacco leaves by metabolomics techniques. [Methods] Tobacco cultivar K326 was used as the test material for a comparative study between open fire-curing (X) and conventional curing (CK). Metabolomic techniques were employed to analyze the metabolic differences between the two curing

收稿日期: 2023-05-19

修回日期: 2024-07-28

网络首发日期: 2024-09-09

*基金项目: 云南省烟草农业科学研究院科技计划一般项目 (2022530401641006); 中国烟草总公司重大专项项目 [110202001015(XX-11)]; 云南省烟草专卖局科技项目 (2020530000241004); 云南省技术创新人才项目 (202305AD160036); 云南省科技厅基础研究专项面上项目 (202001AT070013)。

作者简介: 李嘉亮 (1996—), 男, 山西晋城人, 在读硕士研究生, 主要从事烟草调制技术研究。

E-mail: 1197417627@qq.com

**通信作者 Corresponding authors: 何承刚 (1972—), 男, 甘肃民勤人, 博士, 副教授, 主要从事烤烟生理与生态研究。E-mail: chengganghe63@163.com; 邹聪明 (1983—), 男, 福建福州人, 博士, 副研究员, 主要从事烟叶栽培与调制研究。E-mail: zoucongmingzcm@163.com

网络首发地址: <https://link.cnki.net/urlid/53.1044.S.20240907.2258.001>



methods and to explore their formation mechanisms. [Results] KEGG enrichment results indicated that: in the X-38 vs CK-38 comparison groups, linoleic acid metabolism and plant hormone signal transduction were the two most significantly enriched pathways; in the X-42 vs CK-42 comparison groups, glycolysis/gluconeogenesis and amino acid biosynthesis were the two most significantly enriched pathways; in the CK-42 vs CK-38 and X-42 vs X-38 comparison groups, linoleic acid metabolism and nucleotide metabolism were the two most significantly enriched pathways. The up-regulated metabolites in all four comparison groups included free fatty acids, amino acids and their derivatives, phenolic acids, sugars, organic acids, alkaloids, nucleotides and their derivatives.

[Conclusion] The differential metabolites in open fire-cured tobacco leaves include a large number of acidic metabolites. The formation of these differences is due to additional environmental stresses such as smoke and thermal radiation experienced during open fire-curing, which lead to the production of more metabolites in open fire-cured tobacco leaves.

Keywords: metabolomics; open fire-curing; KEGG; differential metabolites

明火熏烤是美洲调制烟叶的古老方法之一。在调制过程中,加入具有特殊香味的木料,使烟叶在调制时增加了木料燃烧后的酚类物质,从而使明火熏烤烟叶与其他调制方式得到的烟叶在化学成分上存在差异,木香突出,形成独特风味。目前该调制方法在一些国家仍有应用,但略有改进。在调制过程中,烟叶直接接触烟雾,使其颜色深、味道浓郁,并带有一种杂酚油的香气,这种调制烟叶通常作为调味原料之一用于卷烟生产^[1],在制作鼻烟、嚼烟以及雪茄烟时也配合应用。明火熏烤烟的生产量较低,使用该调制方法的国家主要有美国^[2-3]、印度尼西亚、意大利、马拉维^[4-6]等。中国鲜有明火熏烤的相关研究,该调制方法主要用于制作口含烟^[7-8]。关于明火熏烤烟的香气成分,LEFFINGWELL等^[9]利用超临界二氧化碳提取熏烟的香气挥发物质发现:除了预期的烟草成分外,主要的香气挥发物还包括阔叶木烟气中木质素热解产生的酚类物质。

代谢组学效仿基因组学和蛋白质组学的思路,定量分析生物体内的所有代谢产物,并寻找这些代谢产物与生理和病理变化之间的相关性。该研究方法是系统生物学的一部分,主要关注分子质量小于1000的小分子物质^[10]。20世纪70年代诞生的代谢物谱分析是代谢组学相关研究的开端。使用气相色谱—质谱联用技术对患者体液中的代谢物进行定性和定量分析是常见的研究方法,从而对疾病进行诊断和分析^[11]。代谢组学作为一门新兴学科,是在转录组学和蛋白质组学之后逐渐发展起来的。目前,核磁共振、质谱及相

关联用技术、红外光谱、紫外吸收、荧光散射等分离分析技术被广泛应用于代谢组学研究^[11-12]。彭翠云^[13]研究表明:豫中烟区上部叶延迟约8d采收能够促进9种氨基酸的合成以及淀粉和蔗糖代谢,通过抑制不饱和脂肪酸以及托品烷、哌啶、吡啶等生物碱的合成来降低烟叶中的烟碱含量,从而减少其刺激性。田培等^[14]研究发现:烟草抗病品种G28和感病品种长脖黄被南方根结线虫侵染后,从提取的样品中发现与抗病相关的代谢通路存在明显差异,差异代谢物包括生物碱、脂肪酸、类黄酮、萜类、聚酮等,其中感病品种被显著激活的代谢通路有5条,而抗病品种多达10条,不同品种对南方根结线虫的防御能力也存在差异。李勇等^[15]基于气相色谱—质谱方法建立了烟草根部代谢物定性信息库,对红花大金元与TN90根部的代谢组差异进行研究,发现缬氨酸等8种氨基酸、乙醇酸等7种有机酸、果糖等4种糖类物质在2种烟草根部的含量存在显著差异。本研究旨在运用代谢组学技术分析明火熏烤烟叶与常规烘烤烟叶的代谢差异及其形成机制,进一步拓宽代谢组学在烟草领域的应用前景。

1 材料与方法

1.1 试验地点与供试材料

本研究在云南省大理白族自治州湾桥镇进行。供试烟草(*Nicotiana tabacum* L.)品种为K326,栽培管理按照当地优质烟叶生产技术规范进行。封顶后,摘除2~3片底脚叶,留叶20片,以确保烟株生长均匀且营养均衡。采摘成熟度一致的

烟株中部叶 (11~13 叶位) 备用。

1.2 试验设计

采烤期采收同一地块、同一部位、同一成熟度的烟叶，分别进行常规烘烤 (CK) 与明火熏烤 (X)。常规烘烤在密集烤房中进行，明火熏烤在明火熏烤房中进行，烘烤工艺见图 1。明火熏烤采用四段式熏烤工艺，熏烤前在明火熏烤房地面适当位置摆放火炉，以木炭、柴和木屑为燃料，用于产生烟雾，通过观察温湿度，在适当的时间进入明火熏烤房中添加木炭、柴和木屑，根据工艺

完成熏烤。在 38 和 42 ℃ 2 个时期采集样品 ($n=5$) 并立即放入液氮中，随后转移到-80 ℃ 冰箱，以备后续代谢组学分析使用。其中，明火熏烤的样品分别编号为 X-38 和 X-42，常规烘烤的样品分别编号为 CK-38 和 CK-42。

1.3 烤后烟叶的感官质量评吸

烤后烟叶感官质量由 7 位云南中烟工业有限责任公司技术中心的专家进行评价。由于明火熏烤是一种创新工艺，不属于烤烟特定风格，没有对应的评分标准，故仅进行描述性评价。

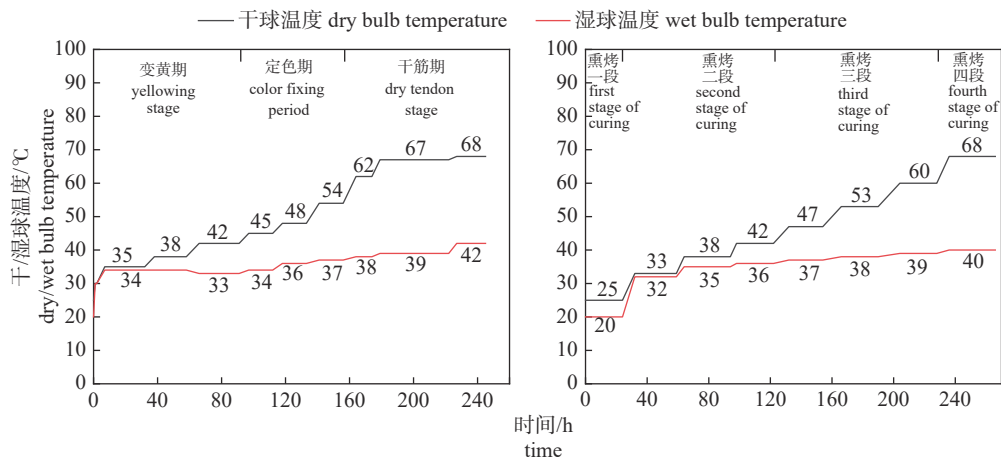


图 1 密集烤房常规烘烤 (左) 和明火熏烤 (右) 工艺

Fig. 1 Process of conventional curing in dense roasting room (left) and open fire-curing (right)

1.4 烟叶代谢组学的测定

1.4.1 样品提取

在真空冷冻干燥机 (Scientz-100F) 中放入生物样品进行冷冻干燥；然后用研磨仪 (MM 400, Retsch) 30 Hz、1.5 min 研磨样品至粉末状；随后用电子天平 (MS105DM) 称量样品粉末 50 mg，放入体积分数为 70% 的甲醇内标提取液 1 000 μ L 中 (若样本不足 50 mg，则按照每 50 mg 样本加入提取剂 1 000 μ L 的比例加入)；再加入石油醚 500 μ L，涡旋 5 min，静置分层，于 4 ℃ 条件下 12 000 r/min 离心 10 min；移取全部上清液过 0.22 μ m PTFE 滤膜至棕色进样瓶的玻璃内衬管内，-20 ℃ 保存，用于液相色谱—串联质谱 (LC-MS/MS) 分析。

1.4.2 色谱质谱采集条件

数据采集仪器系统主要由超高效液相色谱 (ultra performance liquid chromatography, UPLC) (ExionLC™ AD) 和串联质谱 (tandem mass spectrometry, MS/MS)(Applied Biosystems 4500 QTRAP)

组成。超高效液相色谱的色谱柱为 Agilent SB-C18，粒径 1.8 μ m，规格为 2.1 mm $\times$ 100.0 mm；流动相 A 相为超纯水 (加入 0.1% 甲酸)，B 相为乙腈 (加入 0.1% 甲酸)；洗脱时柱温 40 ℃，样品进量 4 μ L；洗脱梯度见表 1。

表 1 代谢组学液相色谱洗脱梯度
Tab. 1 Metabolomics liquid chromatography gradient elution

时间/min time	流速/(mL·min ⁻¹) velocity of flow	流动相 A/% mobile phase A	流动相 B/% mobile phase B
0.00	0.35	95	5
9.00	0.35	5	95
10.00	0.35	5	95
11.00	0.35	95	5
14.00	0.35	95	5

质谱条件相关参数：温度 550 ℃，正离子模式电压 5 500 V，负离子模式电压-4 500 V，离子源气体 (ion source gas, GS) I、GS II 和气帘气体 (curtain gas, CUR) 分别为 50、60 和 25 psi (1 psi=

6.895 kPa),碰撞诱导电离参数设置为高,碰撞气体(氮气)为中等。通过进一步调整去簇电压(declustering potential, DP)和碰撞能量(collision energy, CE),选择适当的参数值,对每个质谱多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)离子对进行优化。根据不同时间段内洗脱的代谢物,选定1组特定的MRM离子对进行监测。

1.4.3 代谢物定性与定量

使用自建数据库(metware database, MWDB)对代谢物进行定性,物质的成分基于二级谱信息确定。分析过程中,去除同位素信号以及与 K^+ 、 Na^+ 、 NH_4^+ 离子相关的冗余信号。通过三重四极杆质谱仪中的MRM模式完成代谢物的定量分析。三重四极杆在MRM模式下,首先筛选出目标物质的前体离子;随后对前体离子进行碰撞诱导电离并断裂成多个碎片离子,过滤筛选出所需的特定碎片离子,以提高定量的精确性和重复性;最后分析得到各样本代谢物的质谱数据,并完成峰面积积分。

1.4.4 数据质控

基于数据库比对的结果进行数据质控和定量,实施一系列质量评估(quality assessment, QA)、质量控制(quality control, QC)、样本分析、数据标准化等步骤以完成数据的质量管控。

制备QC样本时使用混合样品提取物,旨在评估相同处理方法下样品的重复性。仪器分析时,每10个检测样品中插入1个QC样本,以监测分析过程的重复性。通过分析样品间的相关性,评估组内样品间的生物学重复性。使用皮尔逊相关系数(Pearson's correlation coefficient, r)衡量生物学重复的相关性, $|r|$ 越接近1,说明2个重复样品的相关性越强。通过比较不同QC样本的质谱检测分析得到总离子流图,评估代谢物检测系统的性能和稳定性,并判断代谢物检测技术是否具有高重复性。同时,对样本(包括QC样本)进行主成分分析(principal component analysis, PCA),初步了解各组样本之间的总体代谢物差异及组内样本的变异情况。

1.4.5 差异代谢物分析

通过利用京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)数据库对代谢物进行注释,并对通路类型进行分类。代谢组学数据因具有高维和海量的特点,需要采

用单变量和多变量统计分析相结合的方法,从多个角度对数据进行分析,以准确地挖掘差异代谢物。单变量统计分析方法包括假设检验和差异倍数分析;多变量统计分析方法包括PCA和正交偏最小二乘法判别分析(orthogonal least squares discriminant analysis, OPLS-DA)等。通过建立基于OPLS-DA模型(至少生物学重复 ≥ 3)的变量投影重要性分析值(variable importance in the projection, VIP),初步筛选出在不同样本之间存在显著差异的代谢物;结合单变量分析的 P 值或差异倍数(fold change, FC)值进一步筛选出差异代谢物,设定阈值为 $VIP > 1.0$, $FC > 2.0$ 或 $FC < 0.5$, $P < 0.05$ 。

将筛选出的差异代谢物匹配到KEGG数据库中,进而获得代谢物参与的通路信息,对注释结果进行富集分析,并将结果用气泡图进行展示。富集因子(enrichment factor)是差异代谢物数量与该通路中已注释的全部代谢物数量的比值,其值越大,表示该通路的富集程度越高。用超几何分布的计算结果(P 值)衡量某通路是否与差异代谢物相关联,其计算公式为:

$$P = 1 - \sum_{i=0}^{m-1} \frac{\binom{M}{i} \binom{N-M}{n-i}}{\binom{N}{n}}。$$

式中: N 为全部代谢物中具有KEGG注释的代谢物数量, n 为 N 中差异代谢物的数量, M 为 N 中某KEGG通路的代谢物数量, m 为 M 中某KEGG通路的差异代谢物数量。 P 值越接近于0,表示富集越显著。

2 结果与分析

2.1 明火熏烤与常规烘烤烟叶的感官质量

常规烘烤烟叶的烟草本香较突出,香气量较足,香气细绵柔,成熟烟香纯正,略有酸香,刺激性较小,劲头适中,微有木质气和枯焦气,余味较干净,湿润感较好。明火熏烤烟叶具有优雅

2.2 样本的稳定性和相关性

由表2可知:本研究QC样本的相关系数(r)均 ≥ 0.98 ,说明试验过程非常稳定,数据质量较高。由图2可知:不同QC样本在正离子模式

和负离子模式下质谱峰的保留时间和峰面积高度重合,说明仪器的检测准确性很高,可以获得高质量的数据,即代谢物检测方法可靠、稳定,可用于大规模的代谢组学研究。

表 2 质控样本 (QC) 的相关性
Tab. 2 Correlation of quality control (QC) samples

	QC01	QC02	QC03
QC01	1.00		
QC02	0.98	1.00	
QC03	0.99	0.98	1.00

注: QC1~QC3 分别表示 3 个质控样本。
Note: QC1-QC3 represent the three quality control samples respectively.

2.3 总样本 PCA 分析

由图 3 可知:第 1 主成分 (PC1) 的得分为 33.77%,第 2 主成分 (PC2) 的得分为 18.79%。在 38~42 ℃ 时,CK 样本的 PC1 没有随温度升高而发生分离,但 X 样本的 PC1 随温度升高而发生了分离;在相同温度下,CK 样本和 X 样本均表现出分离现象,但对于 PC2 而言,38 ℃ 时 2 个处理未发生明显分离。

2.4 代谢物的 KEGG 功能注释

在 X-38 vs CK-38 比较组中,KEGG 通路共注释出 314 种代谢物,共有 71 条代谢通路 (图 4a)。

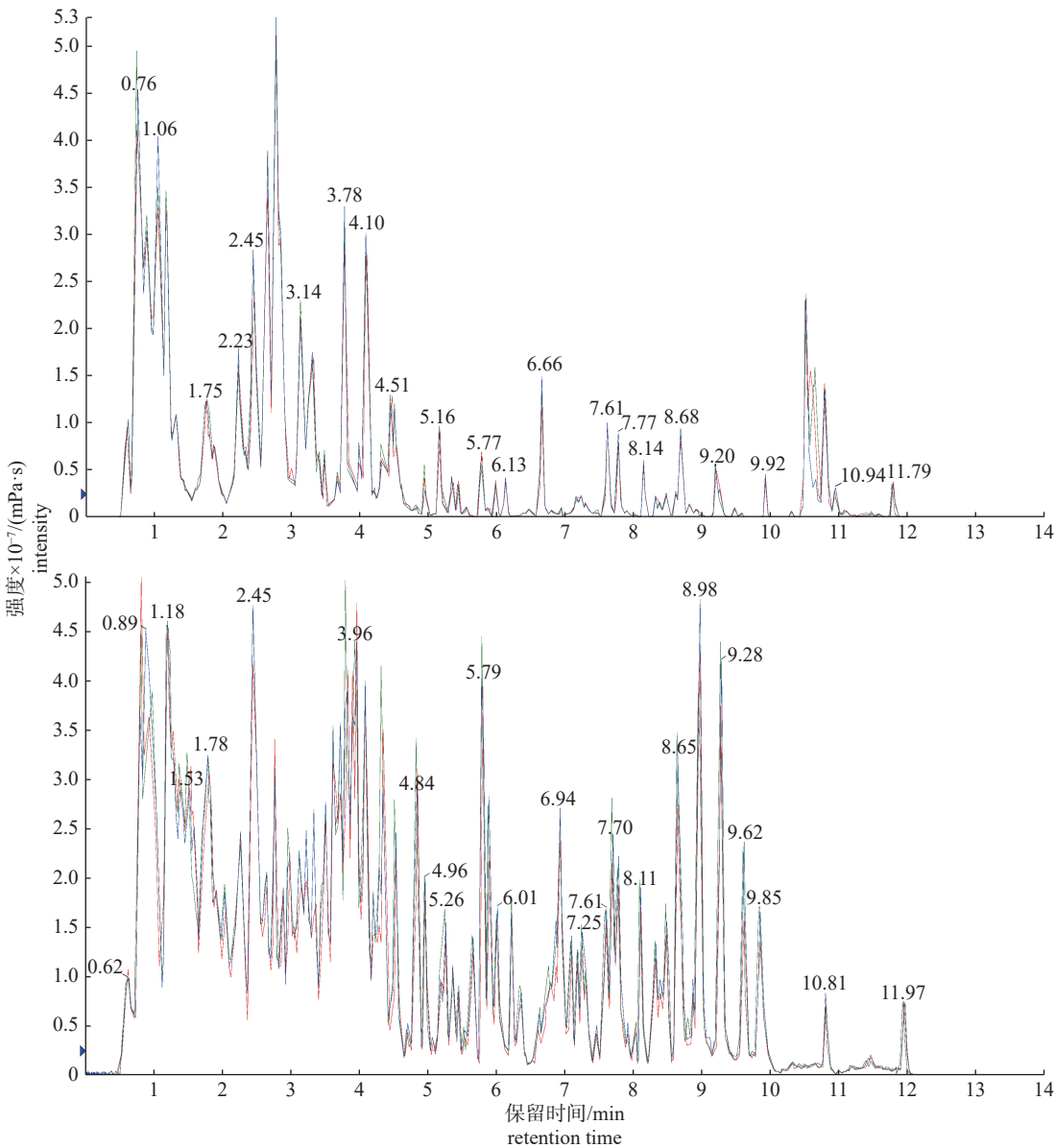


图 2 正 (上)、负 (下) 离子模式下 QC 样品的总离子流
Fig. 2 Total ion chromatography of QC samples under positive (above) and negative (below) ion mode

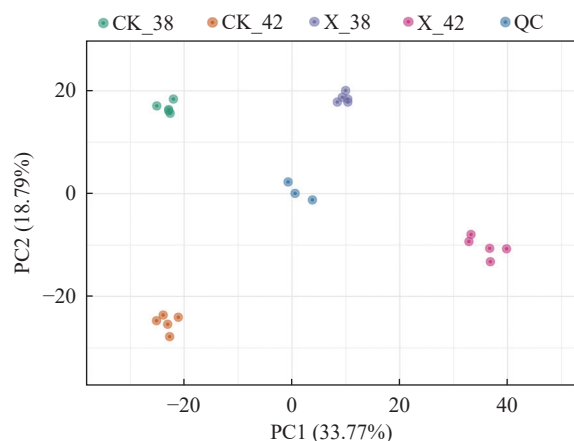


图3 总样本的主成分(PCA)分析

Fig. 3 Principal component analysis (PCA) of total samples

其中,代谢通路中注释的代谢物最多(68种),其次是次生代谢物的生物合成(35种),辅因子的生物合成通路注释出13种代谢物,氨基酸的生物合成和亚油酸代谢均注释出9种代谢物。

在X-42 vs CK-42比较组中,KEGG通路共注释出499种代谢物,共有81条代谢通路(图4b)。其中,注释代谢物数量排名前5的代谢通路为代谢途径、次生代谢物的生物合成、辅因子的生物合成、氨基酸的生物合成、2-氧甲酸代谢,分别注释出92、52、22、20、14种代谢物。

在CK-42 vs CK-38比较组中,KEGG通路共注释出300种代谢物,共有65条代谢通路(图5a)。其中,代谢途径中注释的代谢物最多(65种),次生代谢物的生物合成通路注释出29种代谢物,亚油酸代谢通路和辅因子的生物合成通路注释出13种代谢物,核苷酸代谢通路注释出11种代谢物。

在X-42 vs X-38比较组中,KEGG通路共注释出211种代谢物,共有58条代谢通路(图5b)。其中,注释代谢物数量排名前6的代谢通路为代谢途径、次生代谢物的生物合成、亚油酸代谢、辅因子的生物合成、核苷酸代谢、ABC转运蛋白,分别注释出55、22、9、8、7、7种代谢物。

2.5 差异代谢物

由表3和图6可知:在X-38 vs CK-38比较组中,鉴定出差异显著代谢物434种,其中上调代谢物386种,下调代谢物48种;在X-42 vs CK-42比较组中,鉴定出差异显著代谢物477种,其中上调代谢物340种,下调代谢物137种;在CK-

42 vs CK-38比较组中,鉴定出差异显著代谢物309种,其中上调代谢物275种,下调代谢物34种;在X-42 vs X-38比较组中,鉴定出差异显著代谢物316种,其中上调代谢物260种,下调代谢物56种。在4个比较组中,上调表达的代谢物包括游离脂肪酸、氨基酸及其衍生物、酚酸类、糖类、有机酸、生物碱、核苷酸及其衍生物等。

2.6 差异代谢物的KEGG通路富集分析

X-38 vs CK-38比较组的15个差异代谢物富集于亚油酸代谢,4个差异代谢物富集于植物激素信号转导,10个差异代谢物富集于赖氨酸降解(图7a);X-42 vs CK-42比较组的7个差异代谢物富集于糖酵解/糖异生,39个差异代谢物富集于氨基酸的生物合成,25个差异代谢物富集于2-氧甲酸代谢(图7b);CK-42 vs CK-38比较组的15个差异代谢物富集于亚油酸代谢,19个差异代谢物富集于核苷酸代谢,9个差异代谢物富集于 α -亚麻酸代谢(图7c);X-42 vs X-38比较组的15个差异代谢物富集于亚油酸代谢,19个差异代谢物富集于核苷酸代谢,16个差异代谢物富集于嘌呤代谢(图7d)。

3 讨论

3.1 相同温度下不同调制方法烟叶的代谢差异

研究表明:亚油酸、亚麻酸等不饱和脂肪酸的代谢途径不仅可以通过下游的过氧化物裂解酶产生短链醛和醇,在逆境中起作用;还可以通过丙二烯合酶产生茉莉酸类物质,抵御逆境胁迫^[16]。异亮氨酸能与茉莉酸缀合,形成茉莉酸—异亮氨酸复合物,终止茉莉酸信号传导,降低茉莉酸含量^[17]。本研究发现:在38℃时,明火熏烤烟叶富集了植物激素信号转导通路中的茉莉酸、茉莉酰-L-异亮氨酸和水杨酸3种代谢物,其表达均上调,这可能是因为38℃正值烟叶变黄的关键时期,明火熏烤过程中烟叶受到的胁迫更强烈,为抵御逆境胁迫,烟叶代谢生成更多的茉莉酸、茉莉酰-L-异亮氨酸和水杨酸,这与前人的研究结果^[17-18]相似。植物糖代谢和氨基酸代谢的相关研究表明:糖酵解可为植物提供能量和代谢中间产物,同时参与植物的生长发育和胁迫响应;糖异生在植物中起着重要作用,能够满足植物生长发育和代谢的需求^[19-21]。氨基酸的生物合成与植物的逆境响应密切相关,植物在受到环境胁迫时会

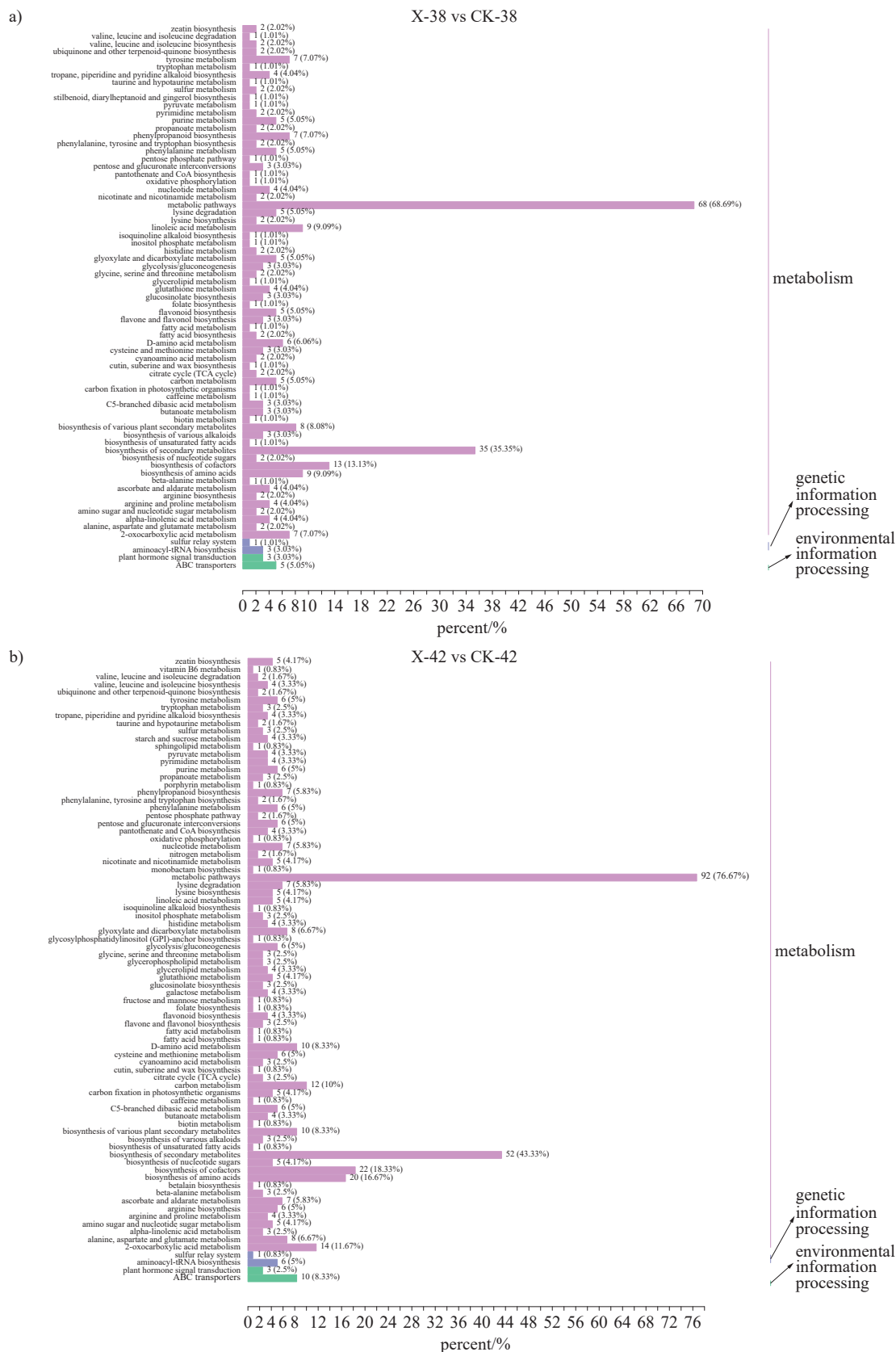


图 4 相同温度不同调制方式处理烟叶的差异常代谢物 KEGG 分类图

Fig. 4 KEGG taxonomic diagram of differential metabolites in tobacco leaves by different curing methods under the same temperature

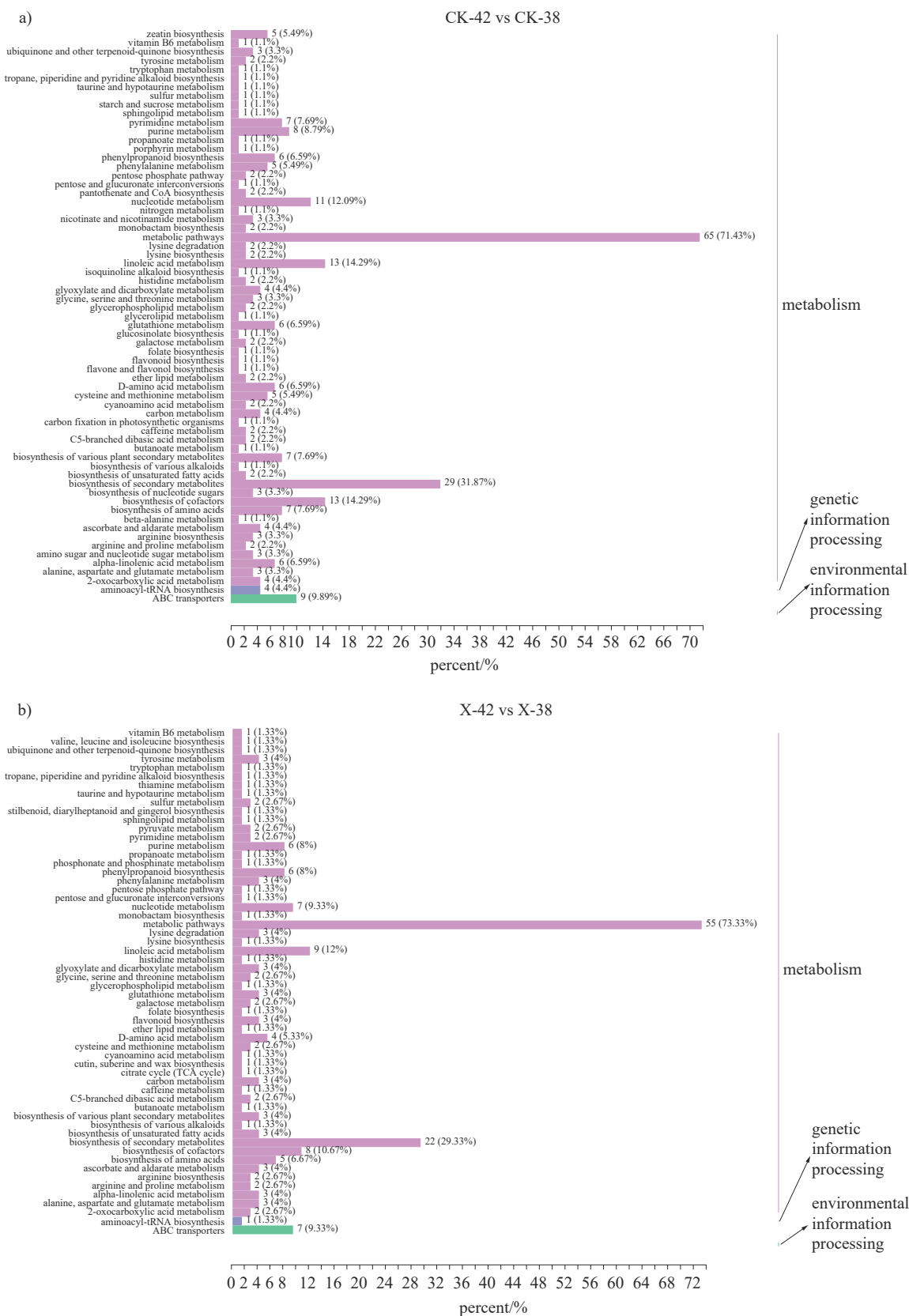
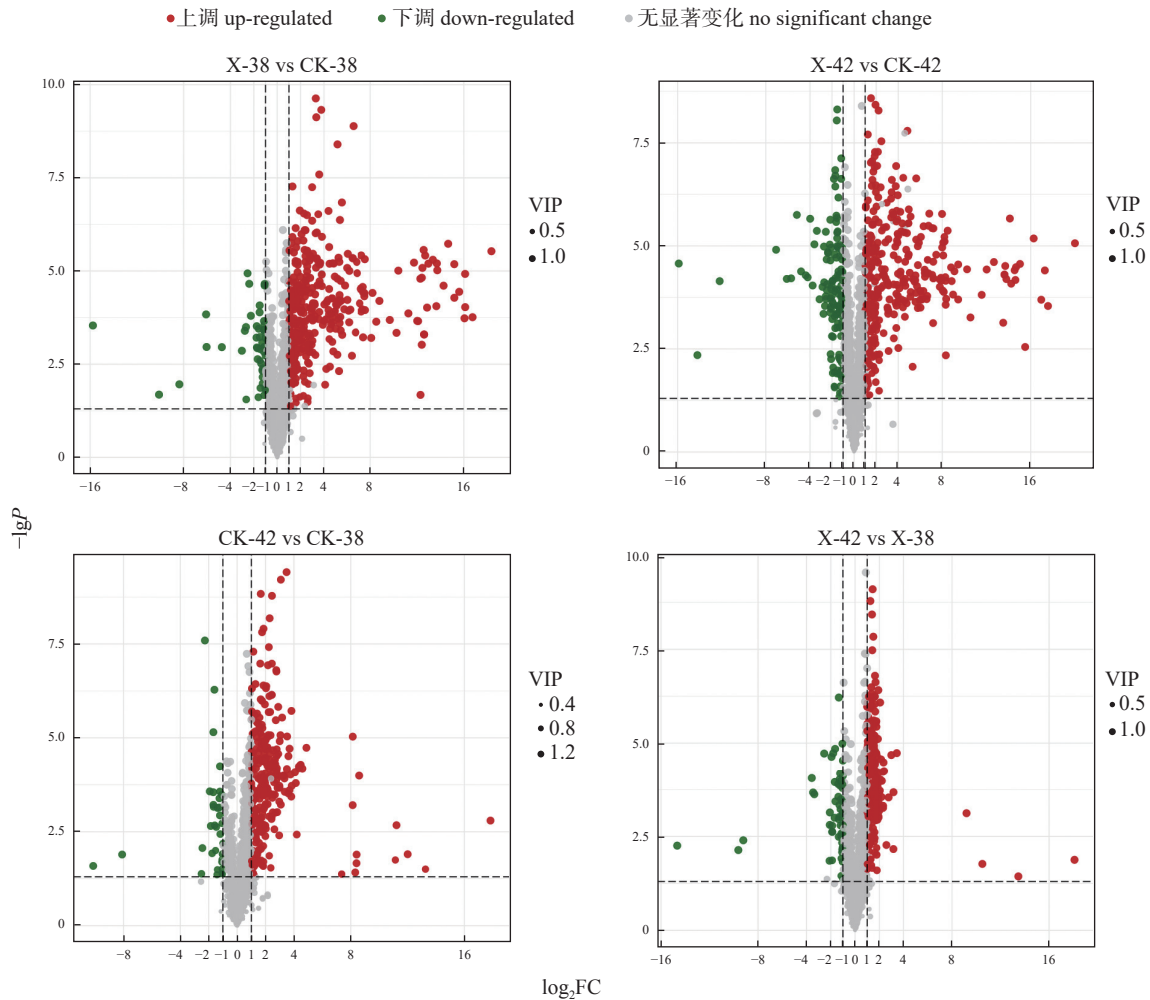


图 5 相同调制方式不同温度处理烟叶的差异代谢物 KEGG 分类图

Fig. 5 KEGG taxonomic diagram of differential metabolites in tobacco leaves under different temperatures by the same curing method

表 3 差异代谢物筛选结果
Tab. 3 Screening results of differential metabolites

比较组 comparison group	代谢物总数 total number of metabolites	差异显著代谢物数量 number of differential metabolites	上调代谢物数量 number of up-regulated metabolites	下调代谢物数量 number of down-regulated metabolites
X-38 vs CK-38	1656	434	386	48
X-42 vs CK-42	1657	477	340	137
CK-42 vs CK-38	1638	309	275	34
X-42 vs X-38	1657	316	260	56



注：FC. 差异倍数。
Note: FC. fold change.

图 6 差异代谢物火山图
Fig. 6 Volcanic map of differential metabolites

调节氨基酸的代谢和合成，以适应环境变化^[22-26]。在本研究中，42 ℃ 时，明火熏烤烟叶富集了糖酵解/糖异生通路中的差异代谢物，包括葡萄糖-1-磷酸、熊果苷、水杨苷等 5 种代谢物，其表达上调；富集在氨基酸生物合成通路中的差异代谢物包括草酰乙酸、L-天冬氨酸、L-赖氨酸、L-谷氨

酰胺等 15 种氨基酸及其衍生物，其表达也上调。这可能是因为 42 ℃ 是烟叶变黄的另一关键温度，此时明火熏烤过程中烟叶代谢活跃，需要更多的能量，导致葡萄糖-1-磷酸等代谢物增加；同时，烟叶为增强抗逆性，也代谢生成了草酰乙酸、L-天冬氨酸、L-赖氨酸等氨基酸及其衍生物。

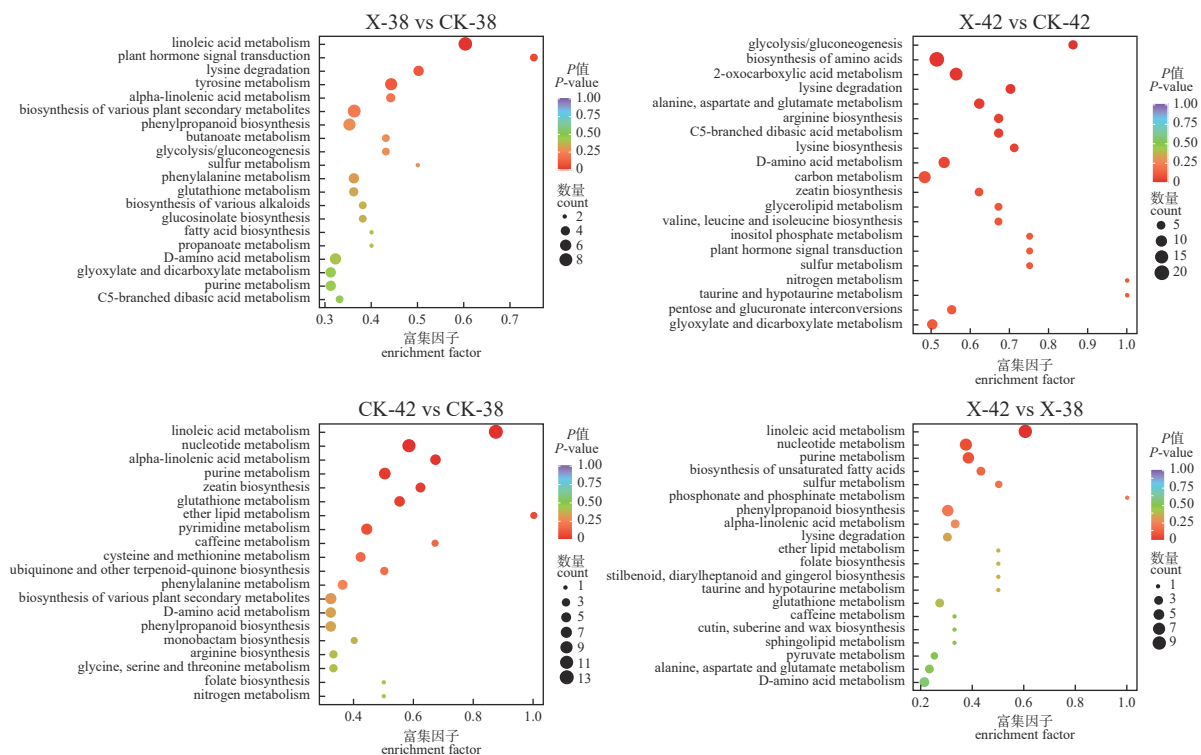


图7 差异代谢物KEGG富集图

Fig. 7 KEGG enrichment diagram of differential metabolites

3.2 不同温度下相同调制方法烟叶的代谢差异

研究表明:嘌呤代谢可以提高植物对高温的适应性^[27]。黄嘌呤脱氢酶是嘌呤代谢的重要酶,参与调控植物的正常生长和非生物胁迫下的衰老过程。增强黄嘌呤脱氢酶的活性可以调节尿素相关物质的合成,提高植物抗氧化能力,有效延缓植物的衰老过程,提高产量^[28]。嘧啶核苷酸是最基本的细胞成分之一,不仅参与DNA和RNA的合成,还参与其他细胞成分的代谢。植物嘧啶可以产生有毒的次生代谢物,用作防御化合物^[29]。在本研究中,明火熏烤和常规烘烤的温度从38℃升至42℃,亚油酸代谢通路和核苷酸代谢通路的多种代谢物表达上调。这可能是由于该阶段温度升高为主要胁迫,烟叶为提高自身对高温的适应,代谢出更多的嘌呤和不饱和脂肪酸。但2种调制方法上调的差异代谢物不同,这可能是由于明火熏烤除了高温胁迫外,还存在烟雾胁迫和辐射胁迫。

4 结论

明火熏烤烟叶上调的代谢产物主要包括呈酸性的游离脂肪酸、糖类、氨基酸及其衍生物和酚

酸类,形成这些代谢产物的主要原因是明火熏烤过程中,烟叶额外受到烟雾和光热辐射的胁迫。

[参考文献]

- [1] 刘国顺. 烟草栽培学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2016.
- [2] SIFOLA M I, CARRINO L, COZZOLINO E, et al. A survey of fertility program responses of kentucky dark fire-cured tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) yield and quality for cigars manufacture in the Benevento Province (southern Italy)[J]. Beiträ ge zur Tabakforschung International, 2018, 28(1): 14. DOI: [10.2478/cttr-2018-0003](https://doi.org/10.2478/cttr-2018-0003).
- [3] GIACOMO M D, PAOLINO M, SILVESTRO D, et al. Microbial community structure and dynamics of dark fire-cured tobacco fermentation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(3): 825. DOI: [10.1128/AEM.02378-06](https://doi.org/10.1128/AEM.02378-06).
- [4] TANTON T W, ABINGTON J B. The effect of different cultural practices upon the major diseases of dark fire-cured tobacco in Malawi[J]. PANS, 1979, 25(2): 158. DOI: [10.1080/09670877909411691](https://doi.org/10.1080/09670877909411691).
- [5] ABINGTON J B, TANTON T W. Effects of variety, fertilizer and environment on fire-cured tobacco in Malawi[J]. Experimental Agriculture, 1979, 15(2): 153. DOI: [10.1017/S0014479700000545](https://doi.org/10.1017/S0014479700000545).
- [6] TANTON T W, ABINGTON J B. Factors affecting yields of dark fire-cured tobacco in Malawi[J]. Experimental Agriculture, 1979, 15(4): 353. DOI: [10.1017/S0014479700012990](https://doi.org/10.1017/S0014479700012990).

- [7] 张兴伟, 邢丽敏, 齐义良, 等. 新型烟草制品未来发展探讨[J]. 中国烟草科学, 2015, 36(4): 110. DOI: [10.13496/j.issn.1007-5119.2015.04.020](#).
- [8] 蔡洁云, 王惠平, 李雪梅, 等. 无烟气烟草制品现状及发展趋势[J]. 云南民族大学学报(自然科学版), 2019, 28(2): 121. DOI: [10.3969/j.issn.1672-8513.2019.02.005](#).
- [9] LEFFINGWELL J C, ALFORD E D, LEFFINGWELL D. Aroma constituents of a supercritical CO₂ extract of kentucky dark fire-cured tobacco[J]. Leffingwell Reports, 2013, 5(1): 1. DOI: [10.13140/RG.2.2.12294.37440](#).
- [10] FIEHN O, KOPKA J, DÖRMANN P, et al. Metabolite profiling for plant functional genomics[J]. Nature Biotechnology, 2000, 18(11): 1157. DOI: [10.1038/81137](#).
- [11] HARDY N W, HALL R D. Plant metabolomics: methods and protocols[M]. Totowa: Humana Press, 2012.
- [12] 顾渝娟, 吴振先. 代谢组学在植物研究中的应用[J]. 广东农业科学, 2012, 39(4): 105. DOI: [10.16768/j.issn.1004-874x.2012.04.003](#).
- [13] 彭翠云. 延迟采收对豫中烤烟上部叶生理指标和代谢组学的影响[D]. 郑州: 河南农业大学, 2021.
- [14] 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. DOI: [10.16472/j.chinatobacco.2018.261](#).
- [15] 李勇, 林茜, 逢涛, 等. 基于气相色谱—质谱的烟草根部代谢组学方法建立及应用[J]. 分析试验室, 2017, 36(8): 910. DOI: [10.13595/j.cnki.issn1000-0720.2017.0195](#).
- [16] 邵琪, 解群杰, 刘贺娟, 等. 接种枯萎病菌对甜瓜脂氧合酶活性及基因表达的影响[J]. 植物生理学报, 2016, 52(4): 479. DOI: [10.13592/j.cnki.ppj.2015.0473](#).
- [17] 马俊卿. 基于多组学方法研究AMF共生诱导的玉米根系分泌物变化及变化机理[D]. 南宁: 广西大学, 2022.
- [18] 张坤, 孙仕仙, 石傲傲, 等. 扑草净胁迫下香根草叶片的代谢组学研究[J]. 西南林业大学学报(自然科学), 2022, 42(3): 90. DOI: [10.11929/j.swfu.202108076](#).
- [19] 徐忠山. 利用多组学联合分析燕麦响应干旱胁迫及盐胁迫的分子机制[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2021.
- [20] 杜宪. 高温、CO₂耦合作用对结果期温室黄瓜生理生化及代谢组学影响的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2022.
- [21] LI Z Q, ZHANG Y, LI H, et al. Genome-wide characterization and expression analysis provide basis to the biological function of cotton *FBA* genes[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 696698. DOI: [10.3389/FPLS.2021.696698](#).
- [22] 张蕾, 阮羽萱, 潘娇, 等. 甘蓝型油菜响应干旱胁迫的转录组分析[J]. 江苏农业科学, 2023, 51(5): 51. DOI: [10.15889/j.issn.1002-1302.2023.05.007](#).
- [23] 王弛, 刘慧, 刘芳, 等. 基于代谢组学探究金线莲对铅胁迫的响应机制[J]. 南方农业学报, 2022, 53(12): 3478. DOI: [10.3969/j.issn.2095-1191.2022.12.019](#).
- [24] 甄熙. 野生罗布麻生态适应性及响应盐胁迫机制研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2022.
- [25] 赵景娜. 植物乳植杆菌P9对甲拌磷胁迫的响应机制研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2022.
- [26] 刘苏宁, 王力荣, 方伟超, 等. 基于广泛靶向代谢组学的桃芽抗寒代谢物的筛选与鉴定[J]. 果树学报, 2023, 40(1): 1. DOI: [10.13925/j.cnki.gsxb.20220371](#).
- [27] 罗素雅, 虞新磊, 陈琼琳, 等. 利用代谢组学揭示脱落酸对高温胁迫龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)的作用机制[J]. 海洋与湖沼, 2022, 53(1): 224. DOI: [10.11693/hyhz20210800173](#).
- [28] HAN R C, HE X F, PAN X H, et al. Enhancing xanthine dehydrogenase activity is an effective way to delay leaf senescence and increase rice yield[J]. Rice, 2020, 13(1): 16. DOI: [10.1186/s12284-020-00375-7](#).
- [29] KAUFER C, ZHOU L, SANTOSO D, et al. Regulation of pyrimidine metabolism in plants[J]. Frontiers in Bioscience, 2004, 9(2): 1611. DOI: [10.2741/1349](#).

责任编辑: 何馨成