

海拔对不同基因型烤烟西柏三烯二醇含量的影响

赵华新¹, 武丹凤², 姬小明^{2*}, 赵铭钦², 尤芳芳²

(1. 河南农业大学 生命科学学院, 河南 郑州 450002; 2. 河南农业大学 烟草学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 为探索不同海拔条件下不同基因型烤烟西柏三烯二醇含量动态变化的差异, 采用气质联用方法, 研究了毕节地区金沙县(海拔 840 m)、大方县(海拔 1 430 m)、威宁县(海拔 2 100 m)3 个不同海拔区内, 云烟 87、云烟 97、毕纳 1 号烤烟生长发育过程中中部叶 α -西柏三烯二醇含量、 β -西柏三烯二醇含量及二者比值的变化规律。结果表明: 在低海拔地区烟叶生育期内西柏三烯二醇含量的动态变化比较剧烈, 高海拔变化比较平缓。不同海拔条件下烤烟成熟期的西柏三烯二醇含量差异较大, 云烟 87 和云烟 97 表现为高海拔地区 > 低海拔地区, 毕纳 1 号无论在低海拔和高海拔地区西柏三烯二醇含量均较高。不同海拔下同一基因型烤烟 α -西柏三烯二醇和 β -西柏三烯二醇比值存在差异, 二者比值表现为金沙县 > 大方县 > 威宁县, 说明在低海拔处更易积累 α -西柏三烯二醇。

关键词: 烤烟; 海拔; 基因型; 西柏三烯二醇

中图分类号: S572 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2014)05-0056-06

Effects of Altitude on Duvatrienediol Content in Different Genotypes of Flue-cured Tobacco

ZHAO Hua-xin¹, WU Dan-feng², JI Xiao-ming^{2*}, ZHAO Ming-qin², YOU Fang-fang²

(1. College of Life Sciences, Henan Agriculture University, Zhengzhou 450002, China;

2. College of Tobacco, Henan Agriculture University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In order to study the dynamic change of duvatrienediol content in different genotypes of flue-cured tobacco at different altitudes, GC-MS was used to study the contents of α -DVT, β -DVT and the value of α/β -DVT in middle leaves of Yunyan 87, Yunyan 97 and Bina 1 during the growth period of flue-cured tobacco at different altitudes of 840, 1 430 and 2 100 m respectively in Jinsha, Dafang and Weinining county. The results indicated that the dynamic change of duvatrienediol content was drastic at low altitude, but was gentle at high altitude. There was significant difference in the ripening time of flue-cured tobacco under different altitudes. The duvatrienediol content was higher at high altitude than that at low altitude in Yunyan 87 and Yunyan 97, whereas it was high both at high and low altitude in Bina 1. The value of α/β -DVT for the same genotype of flue-cured tobacco was different under different altitudes, among which Jinsha > Dafang > Weinining county. It suggested that low altitude was beneficial for the accumulation of α -DVT.

Key words: flue-cured tobacco; altitude; genotype; duvatrienediol

烟叶表面的可分泌型腺毛在生长过程中会分泌一种胶状液体, 称之为腺毛分泌物, 腺毛分泌物对烟草的抗虫性有重要作用, 同时与烟草的香气和吃味密

切相关^[1-2]。Severson 等^[3]研究表明, 腺毛分泌物约占鲜叶质量的 0.5%~10%。Roberts 等^[4]首先对腺毛分泌物进行了分离定性, 结果表明, 其中含有双萜

收稿日期: 2013-11-12

基金项目: 贵州省烟草公司重大科技攻关项目(GY2010003)

作者简介: 赵华新(1972-), 男, 河南宁陵人, 在读硕士研究生, 研究方向: 化学分析与生物化学。

E-mail: zhaohuaxin2010@126.com

* 通讯作者: 姬小明(1972-), 女, 河南舞钢人, 副教授, 博士, 主要从事烟草化学和香精香料方面的研究。

E-mail: jxm0371@163.com

类化合物,主要为 α -4,8,13-西柏三烯-1,3-二醇和 β -4,8,13-西柏三烯-1,3-二醇(α -西柏三烯二醇和 β -西柏三烯二醇)。目前,西柏三烯二醇已被证实是烟叶香味成分的重要前体物,通过一定的降解途径可形成多种醛、酮等致香成分,其降解产物可达 60 多种,代表性的有茄酮、茄尼呋喃、降茄二酮等,其中茄酮在烟叶中存在数量较大,赋予烟草一种醇和酮的味道^[5]。近年来,有关土壤、水分和光照等生态因素及施肥等栽培因素对腺毛分泌物影响的研究较多,但是温度、地形、地貌、海拔等因素对腺毛分泌物的影响尚未见报道^[6-7]。不同海拔条件下烤烟生长过程中西柏三烯二醇含量以及 α -西柏三烯二醇/ β -西柏三烯二醇比值(α / β -西柏三烯二醇)的动态变化规律未见报道。鉴

于此,在毕节地区研究了海拔对不同基因型烤烟中部叶西柏三烯二醇含量和 α / β -西柏三烯二醇比值动态变化的影响,旨在为毕节产区烤烟的质量评价及区域化种植提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验地概况与供试材料

试验于 2011 年在贵州省毕节地区金沙县、大方县和威宁县进行,3 个试点的生态条件见表 1。各试点选择茬口一致(玉米茬)、土壤均为黄壤、肥力中等的烟田作为试验地,田间地势平坦,排灌方便。供试烤烟(*Nicotiana tabacum* L.)基因型为云烟 87、云烟 97、毕纳 1 号。

表 1 3 个试点的生态条件

试验地点	海拔/m	年均温度/℃	年降雨量/mm	年日照时数/h	无霜期/d	地理位置
金沙县	840	14.5	1 142.5	1 532.1	221	106°22′022″E、27°45′921″N
大方县	1 430	11.8	1 150.4	1 335.5	257	105°61′298″E、27°14′149″N
威宁县	2 100	11.2	1 339.0	1 026.2	203	104°27′871″E、26°85′627″N

1.2 试验设计

在金沙县、大方县和威宁县 3 个试验地点,均采用单因子随机区组设计,以烤烟品种作为单因素,重复 3 次,5 月 18 日移栽,种植行距 110 cm、株距 50 cm。小区面积均为 666.7 m²。施氮量 87.5 kg/hm²,N:P₂O₅:K₂O=1:1:2.5,各试验地均采用相同的施肥手段和田间管理措施。所用肥料为烟草专用肥、饼肥、发酵农家肥。

1.3 样品采集与处理

于烟株返苗后,在各试验点挑选生长发育较为均匀一致的烟株 300 株,分别挂牌标记。选取中部(第 11~12 片叶)烟叶,按照叶龄(移栽后 50、60、70、80、90 d)进行取样,每次每小区取 5 株用于杀青处理与成分分析。

杀青样处理方法:将田间鲜样于 105℃杀青 30 min后 60℃烘干至恒质量,粉碎后过孔径为 0.3 mm筛,装袋封口,4℃冷藏。

1.4 西柏三烯二醇含量的测定

1.4.1 仪器与试剂 仪器:TRAVE ULTRA GC/DSQ II MS 型气相色谱质谱联用仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)、BS210S 型分析天平(德国 Sartorius 公司)、KQ-400M 型超声波清洗器(东莞市科桥超声设备有限公司)、DK-8D 型电热恒温水槽(上海一恒科技有限公司)、DCY-36G 氮吹仪(青岛海科仪器有限公司)。

试剂:二氯甲烷、无水硫酸钠、DMF(N,N-二甲基甲酰胺)(分析纯,天津科密欧),正己烷、乙酸乙酯(色谱纯,天津赛孚瑞科技有限公司),乙腈(色谱纯,美国 Dikma 公司)。标准品:正十七烷醇(美国 Alfa Aesar 公司,纯度 98%),N,O-双三甲基三氟乙酰胺(BSTFA)(美国 Alfa Aesar 公司,纯度 98%)。内标溶液:正十七烷醇标准溶液(用于测定回收率),具体制备方法:称取 0.218 0 g 正十七烷醇溶解于二氯甲烷中,然后定容于 100 mL 的容量瓶中,其质量浓度为 2.180 mg/mL。

1.4.2 样品前处理方法 准确称取 0.400 g 粉碎的烟末,置于 40 mL 色谱瓶中,加入 0.5 mL 内标溶液,加入 10 mL 乙腈;超声萃取 10 min 后加入无水硫酸钠适量除水。等溶液透明澄清后,用移液枪移取上层清液 1 mL 加入到 1.5 mL 的色谱瓶中,然后用氮吹仪将溶液吹干;然后加入 0.25 mL DMF 和 0.25 mL BSTFA,在 75℃水浴中进行衍生化反应 60 min,取出即为待测液^[8]。

1.4.3 仪器条件 GC 条件:色谱柱为 DB-5MSUI 石英毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm);进样口温度:250℃;程序升温:40℃保持 2 min,然后以 6℃/min 升温至 180℃保持 2 min,以 2℃/min 升温至 280℃保持 20 min;载气:高纯氦气;载气流速:恒流 0.8 mL/min;进样量:1.0 L,分流比:15:1。

MS 条件:传输线温度 250℃,EI 离子源温度

280 ℃, 电离能量 70 eV, 质量数介于 50~650 amu; 检索谱库 NIST08。

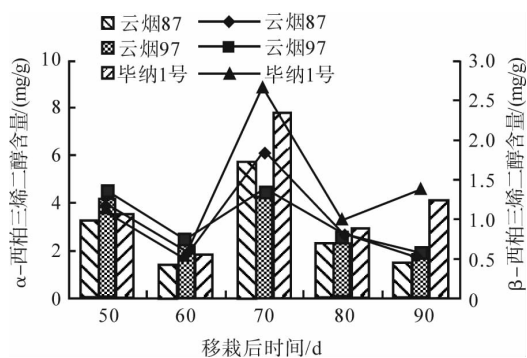
1.5 数据处理

采用 Excel 2003 进行数据处理与分析。

2 结果与分析

2.1 同一海拔条件下不同基因型烤烟叶片西柏三烯二醇含量变化

2.1.1 金沙县 由图 1、2 可见, 云烟 87、云烟 97 在生长发育过程中中部叶 α -西柏三烯二醇、 β -西柏三烯二醇含量均呈现降低—升高—降低的趋势; 毕纳 1 号则表现为降低—升高—降低—升高, 呈现 W 变化的趋势; 3 个烤烟品种均在移栽后 70 d 达到最大值, 说明此时细胞代谢旺盛, 腺毛的分泌细胞逐渐发育成熟, 分泌能力增强, 单位叶面积分泌物量稳定增加。此时, 3 种基因型烤烟西柏三烯二醇总含量表现为毕纳 1 号 > 云烟 87 > 云烟 97。说明毕纳 1 号腺毛分泌西柏三烯二醇能力强于云烟 87 和云烟 97。移栽后 90 d, 西柏三烯二醇含量整体呈下降趋势, 3 种基因型烤烟的西柏三烯二醇总含量表现为毕纳 1 号 > 云烟 97 > 云烟 87, 说明随着叶片的成熟, 腺毛萎缩甚至脱落, 密度下降, 导致单位叶面积



柱形代表 α -西柏三烯二醇, 折线代表 β -西柏三烯二醇, 下同

图 1 金沙县不同基因型烤烟中部叶西柏三烯二醇含量的变化

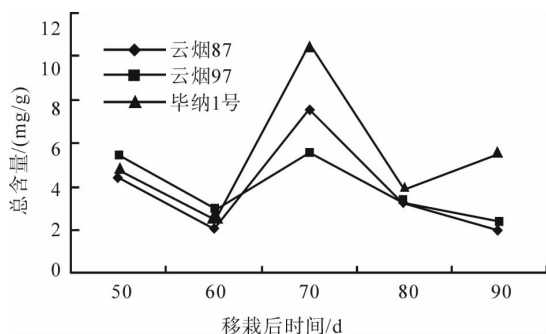


图 2 金沙县不同基因型烤烟中部叶西柏三烯二醇总含量的变化

分泌物量下降, 西柏三烯二醇含量也有所下降。但是毕纳 1 号成熟期腺毛分泌能力仍然比较强。

2.1.2 大方县 由图 3、4 可知, 云烟 87 在生长发育过程中中部叶的 α -西柏三烯二醇、 β -西柏三烯二醇含量呈降低—升高—降低趋势; 云烟 97、毕纳 1 号均呈升高—降低的趋势。总体分析, 大方县这 3 种基因型烤烟中部叶的 α -西柏三烯二醇、 β -西柏三烯二醇含量最高值均出现在移栽后 70 d, 说明 3 种基因型烤烟在大方县均于移栽后 70 d 达到最大分泌能力, 此时云烟 97 > 毕纳 1 号 > 云烟 87; 成熟期, 烟叶中 α -西柏三烯二醇、 β -西柏三烯二醇含量均迅速下降, 西柏三烯二醇总含量表现为云烟 87 > 毕纳 1 号 > 云烟 97, 说明成熟期云烟 87 的西柏三烯二醇含量仍比较高。

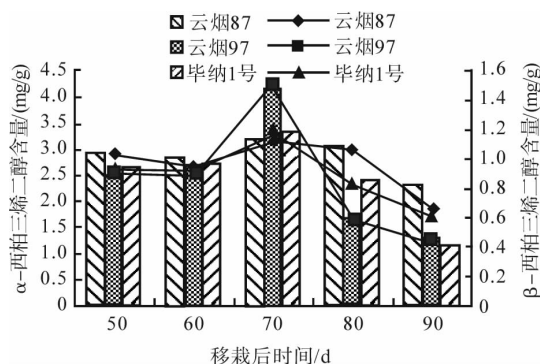
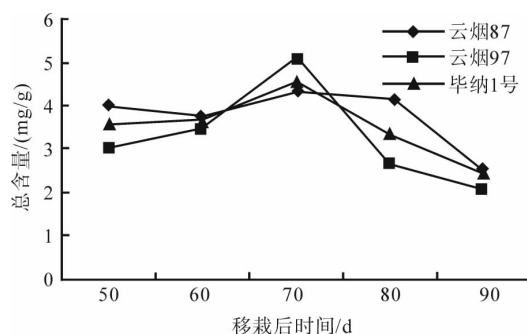


图 3 大方县不同基因型烤烟中部叶西柏三烯二醇含量的变化



柱形代表 α -西柏三烯二醇, 折线代表 β -西柏三烯二醇, 下同

图 4 大方县不同基因型烤烟中部叶西柏三烯二醇总含量的变化

2.1.3 威宁县 图 5、6 表明: 云烟 87、毕纳 1 号在生长发育过程中中部叶 α -西柏三烯二醇、 β -西柏三烯二醇含量呈降低—升高—降低的趋势; 云烟 97 则表现为先升高再降低, 呈倒 V 形变化。其中, 云烟 87 和云烟 97 在移栽后 70 d 达到峰值, 毕纳 1 号在移栽后 80 d 达到峰值, 且其峰值含量表现为: 云烟 87 > 毕纳 1 号 > 云烟 97, 说明移栽后不同基因型烤烟达到西柏三烯二醇分泌峰值的时间不同; 至成熟

期,随着腺毛萎缩及脱落,西柏三烯二醇含量整体呈下降趋势,3种基因型烤烟的西柏三烯二醇总含量表现为毕纳1号>云烟87>云烟97。

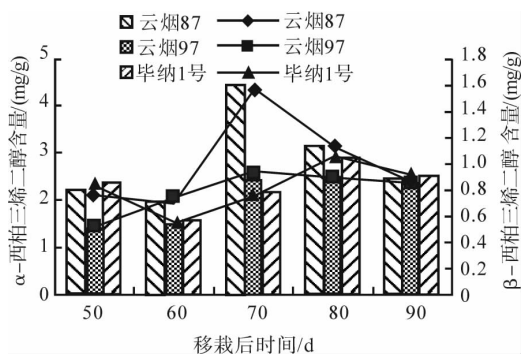


图5 威宁县不同基因型烤烟中部叶西柏三烯二醇含量的变化

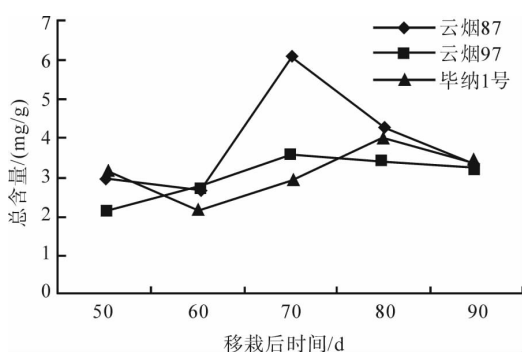


图6 威宁县不同基因型烤烟中部叶西柏三烯二醇总含量的变化

2.2 不同海拔条件下同一基因型烤烟叶片西柏三烯二醇含量的变化

2.2.1 云烟87 由图7、8可见,云烟87在生长发育过程中的 α -西柏三烯二醇、 β -西柏三烯二醇含量呈降低—升高—降低趋势;从整体趋势来看,高海拔(大方县、威宁县)西柏三烯二醇含量变化平缓,低海拔(金沙县)西柏三烯二醇含量变化比较剧烈; α -西柏三烯二醇、 β -西柏三烯二醇含量的最大值均出

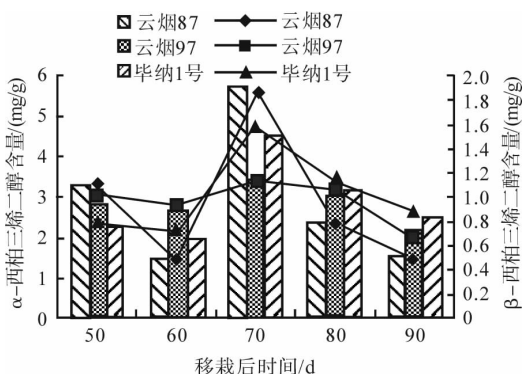


图7 不同海拔条件下云烟87中部叶西柏三烯二醇含量的变化

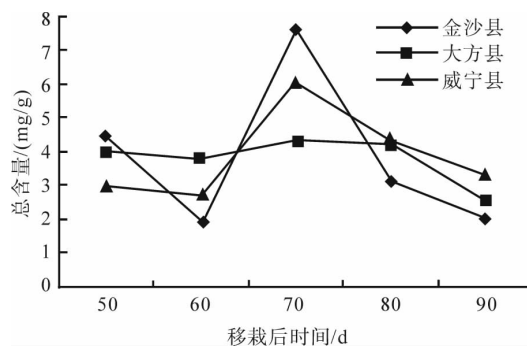


图8 不同海拔条件下云烟87中部叶西柏三烯二醇总含量的变化

现在移栽后70d,此时金沙县>威宁县>大方县,说明在细胞旺盛生长的时候,云烟87在低海拔地方分泌能力较强;移栽后90d则表现为威宁县>大方县>金沙县,说明在高海拔条件下,成熟期云烟87的西柏三烯二醇降解较少,含量更高一些。

2.2.2 云烟97 由图9、10可见,云烟97在生长发育过程中的 α -西柏三烯二醇、 β -西柏三烯二醇含量在金沙县呈降低—升高—降低趋势,在大方县、威宁县呈升高—降低趋势,呈倒V形变化,说明海拔影响西柏三烯二醇的积累;从整体趋势来看,高海拔条件下烤烟叶片西柏三烯二醇含量变化平缓,低海拔变化比较剧烈;西柏三烯二醇总含量的最

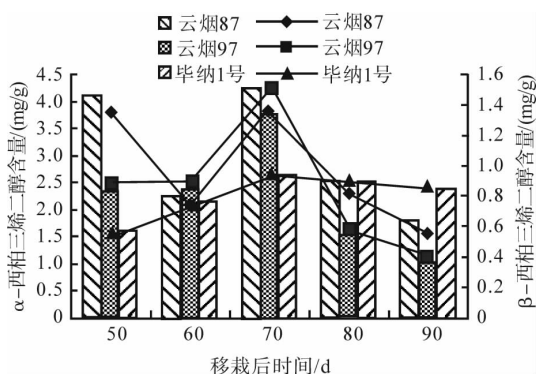


图9 不同海拔条件下云烟97中部叶西柏三烯二醇含量变化

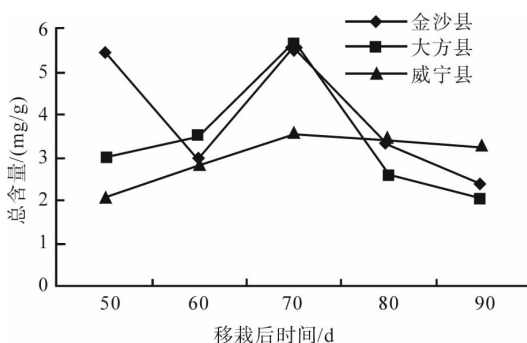


图10 不同海拔条件下云烟97中部叶西柏三烯二醇总含量变化

大值均出现于移栽后 70 d, 此时, 金沙县 > 大方县 > 威宁县, 说明在旺盛生长时期, 低海拔更有利于云烟 97 分泌西柏三烯二醇; 移栽后 90 d, 西柏三烯二醇含量表现为威宁县 > 金沙县 > 大方县, 说明云烟 97 在高海拔条件下, 和云烟 87 一致, 成熟期西柏三烯二醇降解较少。

2.2.3 毕纳 1 号 由图 11、12 可见, 毕纳 1 号在生长发育过程中的 α -西柏三烯二醇、 β -西柏三烯二醇含量在金沙县表现为降低—升高—降低—升高, 呈现 W 变化, 在大方县表现为先升高再降低, 而在威宁县表现为降低—升高—降低; 从整体趋势来看, 毕纳 1 号西柏三烯二醇含量的变化趋势类似于云烟 87 和云烟 97, 高海拔平缓一些, 低海拔比较剧烈; 在金沙县、大方县西柏三烯二醇总含量的最大值出现于移栽后 70 d, 而在威宁县移栽后 80 d 才达峰值, 且峰值表现为: 金沙县 > 大方县 > 威宁县, 说明在旺盛生长期, 低海拔有利于西柏三烯二醇的分泌, 毕纳 1 号在高海拔发育较缓慢, 达到峰值时间较晚; 移栽后 90 d 时, 西柏三烯二醇总含量表现为金沙县 > 威宁县 > 大方县, 即成熟期毕纳 1 号在大方县含量最低, 降解最多。

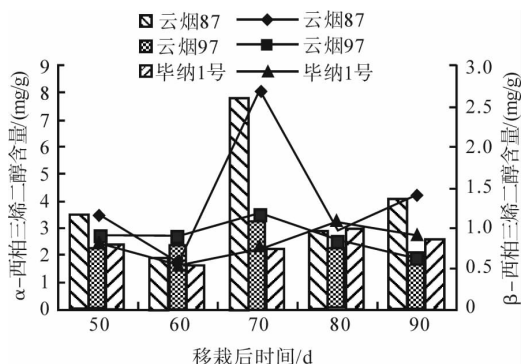


图 11 不同海拔条件下毕纳 1 号中部叶西柏三烯二醇含量变化

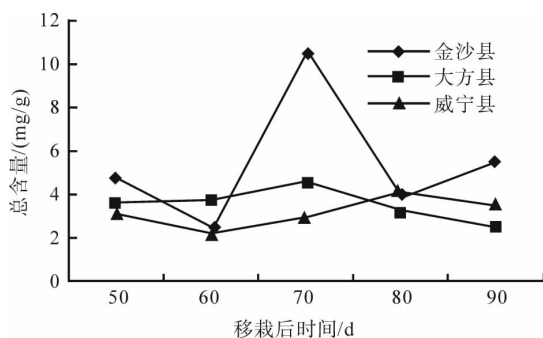


图 12 不同海拔条件下毕纳 1 号中部叶西柏三烯二醇总含量变化

2.3 不同海拔条件下烤烟 α - β -西柏三烯二醇比值的变化

由图 13—15 可见: 不同海拔条件下同一基因型烤烟 α -西柏三烯二醇和 β -西柏三烯二醇比值存在明显差异, 表现为低海拔 > 中海拔 > 高海拔, 说明在低海拔处更易积累 α -西柏三烯二醇, 在同一海拔下不同基因型烤烟之间比值差异不大。

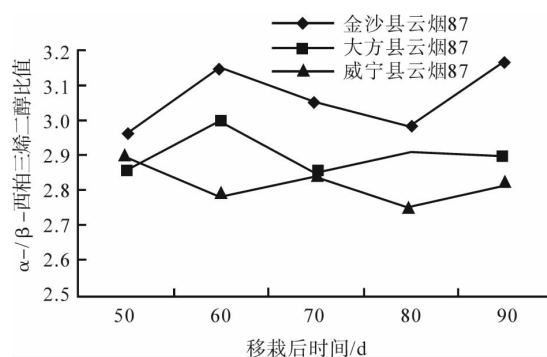


图 13 不同海拔条件下云烟 87 中部叶 α - β -西柏三烯二醇比值的变化

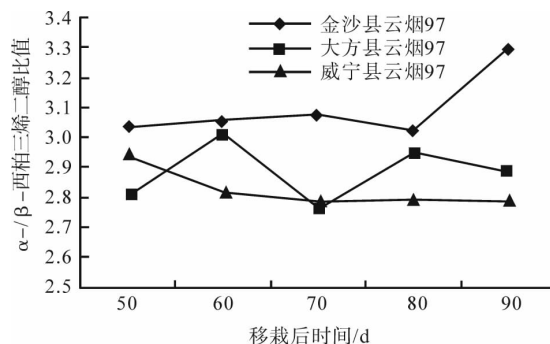


图 14 不同海拔条件下云烟 97 中部叶 α - β -西柏三烯二醇比值的变化

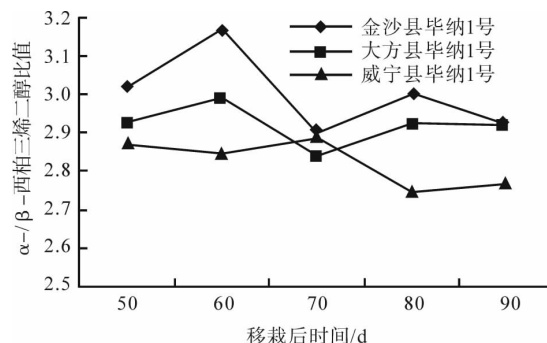


图 15 不同海拔条件下毕纳 1 号中部叶 α - β -西柏三烯二醇比值变化

3 结论与讨论

烟草腺毛分泌物与烟叶香气物质产生密切相关, 腺毛分泌物种类很多, 有双萜类、烷烃类、糖酯类

等,大都是烟草香味物质的重要前体^[9-10],其不仅受内在遗传物质的影响,而且受生长环境等众多外在因素的影响^[11]。本研究发现, α -西柏三烯二醇、 β -西柏三烯二醇的含量及西柏三烯二醇总含量的动态变化既受基因型的影响也受海拔的影响。除威宁县的毕纳 1 号在移栽后 80 d 达到峰值外,其他基因型均在移栽后 70 d 有 1 次峰值出现。在低海拔地区随着生育进程的推进, α -西柏三烯二醇、 β -西柏三烯二醇的含量及西柏三烯二醇总含量变幅更大,而高海拔下的变幅比较平缓,这可能和低海拔地区生育期温度较高、降雨量较少有关。

韩锦峰等^[12]研究认为,成熟期腺毛分泌物含量越高说明烟叶品质越好。本研究发现,在低海拔地区(金沙县)成熟期烟叶中 α -西柏三烯二醇、 β -西柏三烯二醇的含量及西柏三烯二醇总含量均以毕纳 1 号最高,在中海拔地区(大方县)以云烟 87 含量最高,在高海拔地区(威宁县)以毕纳 1 号最高。说明不论是在低海拔地区还是在高海拔地区,毕纳 1 号成熟期腺毛密度仍比较大,分泌能力较强,含有较多的西柏三烯二醇类物质。根据高海拔地区毕纳 1 号分泌能力最强的时候出现在移栽后 80 d 前后,可知毕纳 1 号在高海拔发育较慢,西柏三烯二醇含量降解也慢一些,采收期可能西柏三烯二醇含量并没有充分降解,因此毕纳 1 号更适合在低海拔种植。对云烟 87、云烟 97 来说,在威宁县,成熟期的 α -西柏三烯二醇、 β -西柏三烯二醇的含量及西柏三烯二醇总含量均较高,说明高海拔地区有利于云烟 87 和云烟 97 腺毛分泌物的积累,这和前人^[13]的香气物质成分含量随着海拔增高而增加的研究结果一致。威宁县海拔较高,雨水较多,成熟期温度较低,可能是导致成熟期西柏三烯二醇不易降解的主要原因,形成了当地特有的清甜风格特征烤烟。毕纳 1 号成熟期 α -西柏三烯二醇、 β -西柏三烯二醇的含量及西柏三烯二醇总含量在金沙县和威宁县都比较高。金沙地区烟叶虽然也属于中间香型,但为典型的醇甜风格,说明生态条件会影响烟叶的化学成分,同时也说明影响烟叶风格的不仅仅是西柏三烯二醇一类物质。

前人^[3-4,9,14]研究表明, α -西柏三烯二醇和 β -西柏三烯二醇一般以 3:1 的比例存在。本研究结果表明,毕节地区同一基因型烤烟不同海拔下 α -西柏三烯二醇和 β -西柏三烯二醇比值均在 3 左右,和前

人^[3-4,9,14]研究结果一致。进一步的研究发现,该比值随海拔有一定变化,总体表现为金沙县>大方县>威宁县,说明在低海拔处更易积累 α -西柏三烯二醇,在同一海拔下,不同基因型之间比值差异不大。说明 α -西柏三烯二醇和 β -西柏三烯二醇的比值主要受海拔条件的影响,受基因型影响较小。

参考文献:

- [1] 王宝华,吴帼英,黄静勋.烟叶植物学特性的观察 I、烤烟烟叶腺毛的密度及其与烟叶品质和化学成分的关系[J].中国烟草,1983(2):1-6.
- [2] 紫明,毛建华,李鹏飞,等.洗刷烟叶表面对烤烟致香物质的影响[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2008,32(4):382-384.
- [3] Severson R F, Arrendale R F, Chortyk O T, et al. Quantitation of the major cuticular components from green leaf of different tobacco types[J]. Agric Food Chem, 1984, 32:566-570.
- [4] Roberts D L, Rowland R L. Macrocyclic diterpenes and β -4,8,13-duvatriene-1,3-diols from tobacco[J]. J Org Chem, 1962, 27:3985-3995.
- [5] 蔡莉莉.香料烟表面成分的分离及烟草成分中主要二萜和蔗糖酯的气相色谱/质谱分析[D].郑州:郑州烟草研究院,2006.
- [6] 邱慧慧,史宏志,张大纯.烟草叶片腺毛及其分泌物研究进展[J].贵州农业科学,2009,37(8):61-64.
- [7] 张纪利,戴才萍,李章海.生态栽培因素对烟叶腺毛密度及分泌物的影响综述[J].安徽农业科学,2010,38(23):12439-12440.
- [8] 魏跃伟.烤烟腺毛分泌物的气质联用分析[D].郑州:郑州大学,2012.
- [9] 史宏志,刘国顺,杨惠娟,等.烟草香味学[M].北京:中国农业出版社,2011.
- [10] 韩富根.烟草化学[M].北京:中国农业出版社,2010.
- [11] 左天觉.烟草的生产、生理与生物化学[M].朱尊权,译.上海:上海远东出版社,1993.
- [12] 韩锦峰,王广山,远彤,等.烤烟叶面分泌物的初步研究[J].中国烟草,1995(2):10-13.
- [13] 李章海,李继新,潘文杰,等.贵州不同生态区域烤后烟叶表面提取物差异及其对烟叶风格的影响[J].中国烟草科学,2011,32(5):1-5.
- [14] Marysia B, Miedzybrodaka W, Yeoman M M. Patterns of accumulation of duvatrienediols in shoot cultures of tobacco[J]. Plant Cell Rep, 1993, 12:441-444.