

乌龙茶加工过程中(Z)-3-己烯醛与(E)-2-己烯醛转化关键调控基因的筛选与表达分析

吴晴阳^{1,2}, 周子维^{1,2,3}, 杨云^{1,2}, 胡清财^{1,2}, 黄慧清^{1,2}, 林佳琪¹, 吴宗杰¹, 赖钟雄², 孙云^{1,*}
(1.福建农林大学园艺学院, 茶学福建省高校重点实验室, 福建 福州 350002; 2.福建农林大学园艺植物生物工程研究所, 福建 福州 350002; 3.宁德师范学院生命科学学院, 福建 宁德 352000)

摘要: 通过检测乌龙茶加工过程中(Z)-3-己烯醛和(E)-2-己烯醛的变化, 并结合转录组数据筛选4条(3Z):(2E)-己烯醛异构酶((3Z):(2E)-hexenal isomerase, HI)关键基因, 对(Z)-3-己烯醛和(E)-2-己烯醛二者变化趋势与基因表达水平进行相关性分析。结果表明, 在加工过程中, (Z)-3-己烯醛和(E)-2-己烯醛大体呈现“此消彼长”的动态变化趋势; 摇青工艺的机械损伤促使(Z)-3-己烯醛上升, (E)-2-己烯醛下降; 而摇青后的摊放则有利于(Z)-3-己烯醛向(E)-2-己烯醛转化, 使得(E)-2-己烯醛逐渐增加。筛选获得的4条CsHI基因总体上对机械损伤和失水胁迫有较好的响应。系统发育进化树的构建发现CsHI与包括茶树、胡萝卜等物种在内的多条类萌发素蛋白具有较近的亲缘关系。本研究为明确乌龙茶加工过程中挥发性物质的形成与转化机理及乌龙茶品质提升提供一定参考依据。

关键词: 乌龙茶; 加工过程; (Z)-3-己烯醛; (E)-2-己烯醛; (3Z):(2E)-己烯醛异构酶

Screening and Expression Analysis of Key Regulator Genes Associated with (Z)-3-Hexenal and (E)-2-Hexenal Transformation during Manufacturing Process of Oolong Tea

WU Qingyang^{1,2}, ZHOU Ziwei^{1,2,3}, YANG Yun^{1,2}, HU Qingcai^{1,2}, HUANG Huiqing^{1,2}, LIN Jiaqi¹, WU Zongjie¹, LAI Zhongxiong², SUN Yun^{1,*}
(1. Key Laboratory of Tea Science in Fujian Province, College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Institute of Horticultural Biotechnology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 3. College of Life Science, Ningde Normal University, Ningde 352000, China)

Abstract: In this study, the contents of (Z)-3-hexenal and (E)-2-hexenal during oolong tea processing were measured and four (3Z):(2E)-hexenal isomerase (HI) genes were selected based on transcriptomic data. Meanwhile, the correlation between the changes of (Z)-3-hexenal and (E)-2-hexenal contents and related gene expression was analyzed. The results indicated that during oolong tea processing, one of the two compounds fell, while the other rose. Mechanical damage caused by tossing increased and reduced the contents of (Z)-3-hexenal and (E)-2-hexenal, respectively. Subsequent spreading contributed to the transformation of (Z)-3-hexenal into (E)-2-hexenal, resulting in an increase in the content of (E)-2-hexenal. The four selected genes all responded to mechanical stress and water deficit stress. The constructed phylogenetic tree indicated that CsHI was closely related to many germin-like proteins in plants such as tea (*Camellia sinensis*) and carrot (*Daucus carota*). This study provides a reference for clarifying the formation and transformation mechanism of volatile substances during oolong tea processing and improving the quality of oolong tea.

Keywords: oolong tea; processing; (Z)-3-hexenal; (E)-2-hexenal; (3Z):(2E)-hexenal isomerase

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220826-322

中图分类号: TS272.5

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2023)16-0205-08

收稿日期: 2022-08-26

基金项目: 财政部和农业农村部: 国家现代农业(茶叶)产业技术体系建设专项(CARS-19);

福建农林大学茶产业链科技创新与服务体系建设项目(K1520005A06);

福建张天福茶叶发展基金会科技创新基金项目(FJZTF01); 福建省自然科学基金项目(2021J05271);

宁德师范学院人才项目(2022Y05)

第一作者简介: 吴晴阳(1998—)(ORCID: 0000-0003-3939-8485), 女, 硕士研究生, 研究方向为茶叶加工与品质。

E-mail: doris1831036881@126.com

*通信作者简介: 孙云(1964—)(ORCID: 0000-0002-3074-3468), 女, 教授, 博士, 研究方向为茶叶加工与品质。

E-mail: sunyun1125@126.com

引文格式:

吴晴阳, 周子维, 杨云, 等. 乌龙茶加工过程中(Z)-3-己烯醛与(E)-2-己烯醛转化关键调控基因的筛选与表达分析[J]. 食品科学, 2023, 44(16): 205-212. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220826-322. <http://www.spkx.net.cn>

WU Qingyang, ZHOU Ziwei, YANG Yun, et al. Screening and expression analysis of key regulator genes associated with (Z)-3-hexenal and (E)-2-hexenal transformation during manufacturing process of oolong tea[J]. Food Science, 2023, 44(16): 205-212. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220826-322. <http://www.spkx.net.cn>

绿叶挥发物是一类气态小分子物质, 主要由挥发性脂肪酸衍生物中的C₆醇类、醛类、酸类等构成^[1], 在植物受到如病原体侵害^[2]、昆虫取食^[3-4]、机械损伤^[5]等胁迫时产生。

植物次生代谢众多途径中, 脂肪酸代谢途径参与了绿叶挥发物的相关转变, 其中, 亚油酸可作为前体物质, 经过脂肪氧合酶(lipoxygenase, LOX)和氢过氧化物酶(hydroperoxidelyase, HPL)催化下生成氢过氧化物(hydroperoxide, HPOD), 再经氧化酶作用生成C₆醛, 最终经由乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, ADH)的作用生成相关醇类^[6]。类似地, α -亚麻酸同样也可经LOX作用生成氢过氧亚麻酸(hydroperoxy octadecatrienoic acid, HPOT), 再经HPL作用生成(Z)-3-己烯醛后, 可经过(3Z):(2E)-己烯醛异构酶((3Z):(2E)-hexenal isomerase, HI)作用, 将(Z)-3-己烯醛转化为(E)-2-己烯醛^[7](图1)。(Z)-3-己烯醛作为重要的绿叶挥发物之一, 与(E)-2-己烯醛互为异构体^[8], 同样在植物防御具有重要作用。近年来对(Z)-3-己烯醛的研究与应用已经深入植物抗性^[9-10]、虫害防御^[11]、环境生态^[12]等领域, HI的异构功能也得到进一步研究。

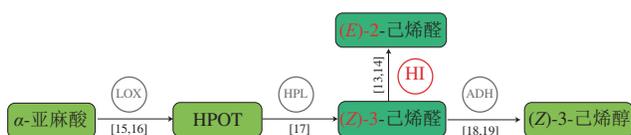


图1 α -亚麻酸代谢转化及参与调控的基因

Fig. 1 Transformation of α -linolenic acid and its regulator genes

HI属于Cupin蛋白家族的一员, 此蛋白家族具有广泛生物活性, 值得注意的是其参与细菌中碳水化合物异构酶和表异构酶活性的修饰功能^[20]。而碳水化合物与脂肪酸代谢物的关系极为密切, 碳水化合物可为脂肪酸的合成^[21]、氧化^[22]提供原料。因此, 推测HI在脂肪酸代谢途径上也存在异构功能。其次, 在如辣椒^[23]、黄瓜^[24]、葡萄^[13]等作物中, (Z)-3-己烯醛同样发挥着构成果实特征香气、充当信号因子、防御害虫等作用, 并且参与(Z)-3-己烯醛与(E)-2-己烯醛异构的相关HI基因也被鉴定出来。更重要的是, Chen Cong等^[14]也将茶叶中对(Z)-3-己烯醛与(E)-2-己烯醛之间转化具有调控作用的异构酶CsHI鉴定出来, 这对探究茶叶香气物质转化具有重要意义。然而,

具体针对乌龙茶加工过程中相关CsHI基因与茶叶香气转化的研究却有待进一步探索。

茶树鲜叶响应非生物胁迫时会散发绿叶挥发物^[25], 前人研究也证实, 在乌龙茶加工过程中, 茶树鲜叶经过萎凋、做青、杀青等加工工序, 香气动态变化主要呈现为青草气的逐渐逸失以及清香、花果香的形成与积累^[26]。参与此香气转变过程的(Z)-3-己烯醛具有青草气, 而(E)-2-己烯醛具有清香、果香^[27-28], 明确参与调控这两种化合物之间转化的基因及其表达水平亦可为解释乌龙茶加工过程中香气转变的原因提供参考。

乌龙茶是我国特有的茶类, 以其独特的香气与滋味品质闻名于世。本研究以乌龙茶鲜叶、萎凋叶、摇青叶、等时间摊放叶为实验材料, 通过对比样品中(Z)-3-己烯醛和(E)-2-己烯醛的变化趋势, 利用Cupin筛选调控(Z)-3-己烯醛、(E)-2-己烯醛转化关系之间的基因, 计算基于转录组数据筛选出CsHI基因的相对表达水平, 分析乌龙茶加工过程中(Z)-3-己烯醛和(E)-2-己烯醛的转化机制, 旨在为阐明乌龙茶香气物质的变化规律提供参考, 从而为乌龙茶品质形成机理提供借鉴。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

黄旦品种春季1芽3叶无病虫害, 采摘于福建农林大学茶学教学科研实践基地茶树资源圃。

RNAprep Pure多糖多酚植物总RNA提取试剂盒 天根生化科技(北京)有限公司; PrimeScriptTM RT Reagent Kit with gDNA Eraser、SYBR[®] Premix Ex TaqTM 大连宝生物工程有限公司。

1.2 仪器与设备

6CYQT-60型摇青机、LGJ-25C型真空冷冻干燥机 北京四环生物制药有限公司; 7890B气相色谱-质谱联用仪 美国安捷伦公司; MPS多功能自动进样系统 德国格斯特尔公司; Pegasus HT飞行时间质谱 美国力可公司; Allegra 64R台式高速冷冻离心机 美国贝克曼库尔特公司; K5500超微量分光光度计 北京凯奥公司; LightCycler 480实时荧光定量聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)仪 美国罗氏公司; 萃取针PDMS/DVB9(23 Ga, Plain, 65 μ m) 美国Supelco公司。

1.3 方法

1.3.1 实验处理及分组

样品于2018年10月1日下午3—5时采集，采摘标准为1芽3叶，要求老嫩程度均一、无病虫害的黄旦鲜叶（H1），鲜叶采摘后进行30 min萎凋，获得萎凋叶（H2）。萎凋后的做青加工先后有3次，摇青机速度控制在25 r/min，摇青时间控制在5 min，每次摇青后进行60 min的晾青。分别在3次摇青阶段前后采集500 g样品，标注为H3~H7，作为实验组（EG）。在采集实验组摇青过程样品的同时，分别取同一时间段的未经做青工序的萎凋叶样品各500 g，标注为CK3~CK7，作为对照组（CK）。以上每个取样设3个重复。所有样品用锡箔纸包好后，快速放入液氮后取出，于-70℃冷藏（图2）。

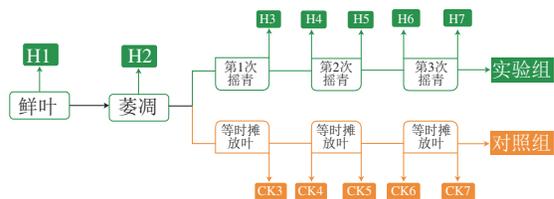


图2 乌龙茶加工过程取样点

Fig. 2 Sampling points during manufacturing process of oolong tea

1.3.2 香气检测

茶样经真空冷冻干燥处理72 h后，采用研钵充分研磨至粉末状，称取2.0 g茶叶粉末于20 mL顶空瓶，密封后利用顶空固相微萃取法提取挥发性物质，并用气相色谱-飞行时间串联质谱进行检测。固相微萃取条件：萃取针PDMS/DVB9设定孵育温度为80℃，孵育时间为31 min，萃取时间为60 min，解吸时间为3.5 min。色谱条件：色谱柱Rxi-5silMS（30 m×0.25 mm，0.25 μm），进样口温度设定为250℃，传输线温度设定为275℃，以氦气为载气，流速为1 mL/min。程序升温过程分别是50℃保持5 min，再以3℃/min速率升至210℃后保持3 min，此后再以15℃/min速率升至23℃；不分流进样品。质谱条件：溶剂延迟时间设定为300 s，扫描范围控制在30~500 u，采集速率为10 Spec/s；检测器电压为1 530 V，电子电离能量为70 eV，离子源温度为250℃。

为鉴定出(Z)-3-己烯醛和(E)-2-己烯醛组分，利用仪器自带软件对测得挥发性代谢产物数据进行分析处理，并与美国国家标准技术局化学（The National Institute of Standards and Technology, NIST）数据库标准质谱进行比较，查对有关质谱资料，分析基峰、质核比和相对峰度等方面，结合保留时间和质谱分别对各峰加以确认，从而鉴定出目标产物。最后以峰面积>1%的色谱峰作为有效观测值，凭借峰面积归一化法确定(Z)-3-己烯醛和(E)-2-己烯醛组分在各样品中的百分含量。

1.3.3 茶树全基因组来源

由TPIA（http://tpia.teaplant.org/）下载茶树中国种

（*Camellia sinensis* cv. *sinensis*）舒茶早染色体级别基因组的蛋白注释序列（CSSChrLev20200506PEP）。从Pfam数据库（http://pfam.xfam.org/）获得Cupin结构域的隐马尔可夫模型（Hidden Markov Model, HMM）的多重序列比对的文件（Stockholm file），并生成PF00190的种子文件。运用hmmer-3.0windows（http://eddylab.org/software/hmmer3/3.0/）软件包中“hmmbuild”程序自建HI的hmm文件，并以建立好的hmm文件，运用软件包中“hmmsearch”程序获得44条候选*CsHI*基因。乌龙茶生产过程样茶叶全转录组数据委托华大基因BGISEQ-500平台完成。

1.3.4 系统发育进化树的构建

对筛选获得的*CsHI*基因家族成员的核酸序列在GenBank数据库（https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi）中进行对比，获得其他植物物种的同源序列，使用MEGA7.0以邻接法构建的系统发育树保存为NWK文档，利用iTOL网站（http://itol.embl.de/）对系统发育树进行可视化处理。

1.3.5 总RNA的提取与cDNA的合成参照

依据RNAprep Pure Plant Kit说明，以离心柱法抽提1.3.1节中鲜叶、萎凋叶及实验组、对照组茶树叶片加工过程中的总RNA，利用超微量核酸分析仪检测其浓度和纯度，利用1.2%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。采用PrimeScript™ RT Reagent Kit逆转录合成cDNA，将获得的cDNA文库置于-20℃条件下贮藏备用。

1.3.6 实时PCR（real-time PCR）检测

采用SYBR® Premix Ex Taq™试剂盒对黄旦叶片的*CsHI*基因表达情况进行检测。利用DNAMAN设计目的基因的特异性引物如表1所示。以*CsGADPH*为内参基因，反应体系总共20.0 μL，包括SYBR Green Master Mix 10.0 μL，正、反向引物各0.8 μL，灭菌水7.4 μL，cDNA模板1.0 μL。扩增程序设定为：95℃预变性30 s，95℃变性5 s，60℃退火30 s，72℃延伸30 s，进行40个循环。采用2^{-ΔΔCt}分别计算出相关基因的相对表达量。

表1 real-time PCR特异性引物

Table 1 Specific primers used for real-time PCR

基因名称	上游5'-3'	下游5'-3'	温度/℃	产物长度/bp
<i>CsHI1</i>	CAAAGACACCAAATCTGCTG	TGTTTCGTGGAGTGAGGAG	56	107
<i>CsHI2</i>	CCAAGTTCATTGCTGAG	AATACCATTCTGCTGTGC	56	142
<i>CsHI3</i>	AACTCTCTGCTCTTCGGTGA	TGGTTTGGCTATCCCTTC	56	200
<i>CsHI4</i>	CATCATCAAAGCCGCTG	ACGACAAGCAAGATTCAGA	56	150
<i>CsGADPH</i>	TTGGCATCGTTGAGGGTCT	CAGTGGGAACACGGAAAGC	61	206

1.4 数据处理

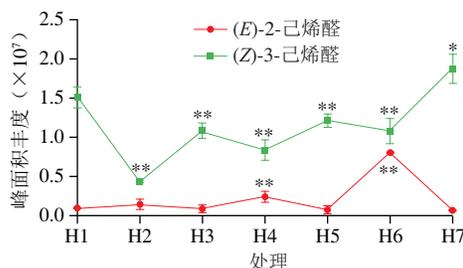
采用Graphpad Prism 6.0和SPSS20对实验数据进行分析及制图，分别利用ANOVA并Tukey法和独立样本t检验，衡量实验组与对照组中(Z)-3-己烯醛和(E)-2-己烯醛含量及*CsHI*相关基因表达水平的组内差异和组间差异显著性；利用Pearson相关系数评估(Z)-3-己烯醛和(E)-2-己烯醛含量与*CsHI*基因表达水平的相关性。

2 结果与分析

2.1 乌龙茶加工过程中(Z)-3-己烯醛和(E)-2-己烯醛的鉴定及其动态变化分析

利用顶空固相萃取法结合气相色谱-飞行时间串联质谱技术,对加工过程中的乌龙茶样品进行香气物质检测,基于NIST数据谱库鉴定(Z)-3-己烯醛和(E)-2-己烯醛组分的离子峰,并依据此两种物质的变化趋势绘制折线图。如图3所示,在乌龙茶加工过程中的做青阶段,(Z)-3-己烯醛和(E)-2-己烯醛大体呈现“此消彼长”的动态变化趋势。值得注意的是,每次摇青工艺的进行都促使(Z)-3-己烯醛呈现上升趋势,并在第3次摇青(H7)处达到峰值。而每次摇青后经过一定时间的堆放处理,例如第1次摇青后至第2次摇青开始前的堆放过程,即H3~H4阶段,以及第2次摇青后至第3次摇青开始前的堆放过程,即H5~H6阶段,(Z)-3-己烯醛则呈现减少趋势。在前期加工过程,(E)-2-己烯醛含量处于较小波动状态。值得注意的是,与(Z)-3-己烯醛变化趋势相反,(E)-2-己烯醛在萎凋以及第1、2、3次摇青后的堆放过程,都呈现逐渐上升的趋势,并在第3次摇青前(H6)达到峰值。在茶树鲜叶离体至萎凋阶段(H1~H2)以及在第1次摇青结束至第2次摇青开始前的堆放阶段(H3~H4),(E)-2-己烯醛较小幅度增加;而在加工中后期即第2次摇青结束至第3次摇青开始前的堆放阶段(H5~H6),(E)-2-己烯醛呈明显增加趋势;在第3次摇青结束后(H7),(E)-2-己烯醛又迅速下降。对比(Z)-3-己烯醛和(E)-2-己烯醛在鲜叶(H1)和各加工过程节点中的组内差异性,发现(E)-2-己烯醛仅在H4和H6处存在极显著差异($P<0.01$);而(Z)-3-己烯醛则在H2~H6处存在极显著差异($P<0.01$),在H7处存在显著差异($P<0.05$)。

总体来看,(Z)-3-己烯醛在做青期间变化幅度较(E)-2-己烯醛明显,并且两种物质之间的增减变化呈现一定程度的相反趋势和互补趋势。



与H1相比,*差异显著($P<0.05$);**差异极显著($P<0.01$)。

图3 乌龙茶加工过程中(Z)-3-己烯醛和(E)-2-己烯醛峰面积丰度变化
Fig. 3 Changes in peak area of (Z)-3-hexenal and (E)-2-hexenal during oolong tea processing

2.2 基于转录组数据的HI合成基因的筛选

通过Me_V软件作图后对比筛选出的44个转录本的每个千碱基的转录每百万映射读取的片段(fragments

per kilobase of exon model per million mapped fragments, FPKM)热图,结果如图4所示。依据热图的聚类,可将44条基因划分为3个大类。第1大类具体包含CL711.Contig9_All、Unigene15913_All等14条基因在内的较低表达的基因,此大类的基因在鲜叶乃至加工过程中表现出低表达状态。第2大类包含CL5954.Contig6_All、CL7529.Contig2_All在内的18条基因,此大类包含的基因表达水平较高;值得注意的是,此类基因在不同处理过程中普遍有较高表达,并且如Unigene19480_All等基因在经过摇青处理(H7)后表达量较鲜叶(H1)和萎凋(H2)处理上调,在经过长时间的堆放(CK7)后也有较高的表达;基因Unigene33696_All则在鲜叶(H1)和萎凋(H2)处理中含有较高表达量,但经过摇青(H7)处理和长时间堆放(CK7)后表达量下降。第3大类包含Unigene43037_All、Unigene1394_All在内的12条基因,此大类基因多处于中表达水平,个别基因在经过摇青处理后表达量上调,如CL1621.Contig3_All、Unigene23067_All等,亦有基因如Unigene43037_All、Unigene1394_All等呈现表达量下降。

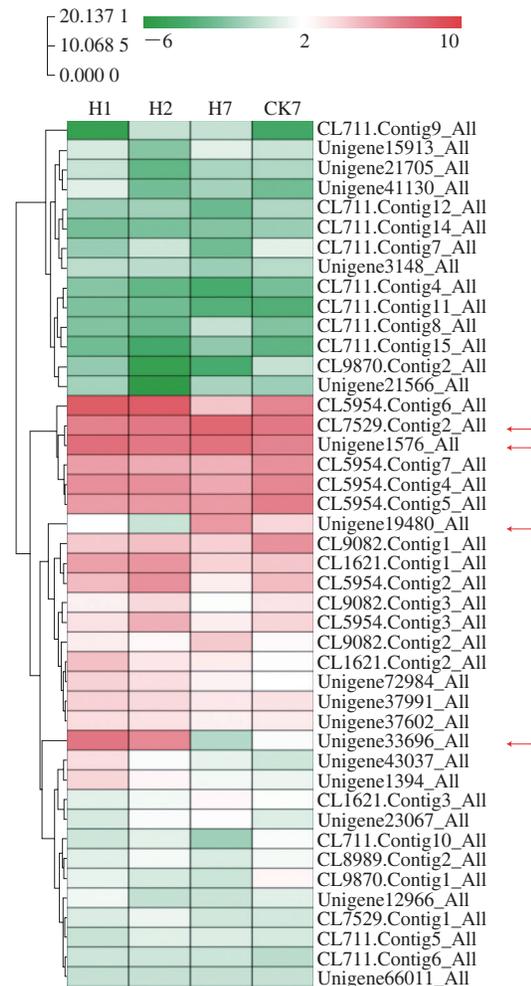


图4 基于转录组数据CsHI在乌龙茶加工过程中FPKM值
Fig. 4 FPKM value of CsHI during manufacturing process of oolong tea based on transcriptomic data

考虑FPKM大于10的转录本，并且结合对比差异倍数，筛选出CL7529.Contig2_All、Unigene19480_All、Unigene1576_All和Unigene33696_All 4条候选基因进行后续研究将其分别命名为*CsHI1*、*CsHI2*、*CsHI3*和*CsHI4*。

2.3 乌龙茶加工过程中*CsHI*基因的表达水平和验证

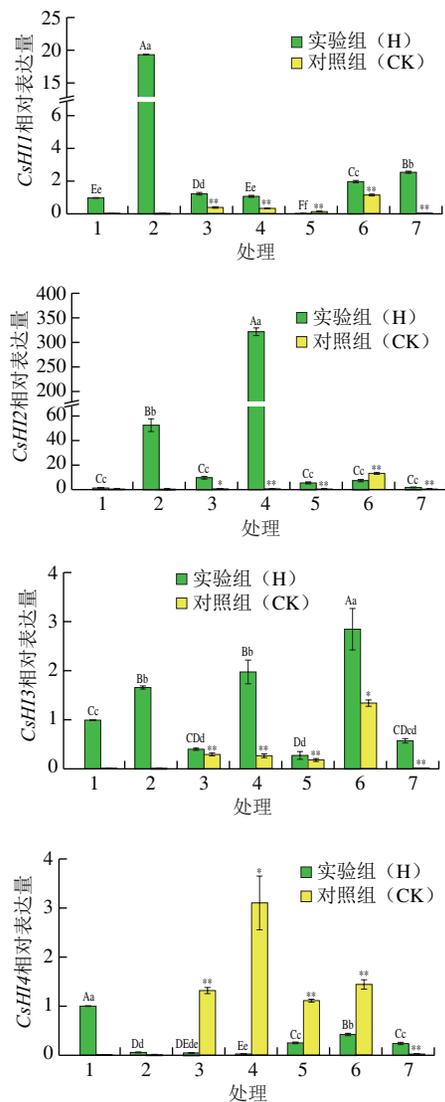
*CsHI*基因已被证实具有异构作用，其在乌龙茶加工过程中的表达水平还有待验证。因此，结合转录组数据，根据real-time PCR结果中4条候选基因表达量水平衡量在加工各个阶段*CsHI*基因的表达量，结果如图5所示。在实验组中，*CsHI1*在萎凋(H2)处有最高表达量(19.36)，但随着做青工艺的进行，表达量呈现下降趋势，在做青后期略微上升。在对照组中，表达量呈现波动上升的趋势，在H6处达到最大值(1.97)，并且是对照CK6(1.16)的1.7倍。结合差异性分析显示，H3~H7实验组与对照组间存在极显著差异($P < 0.01$)，同时也存在极显著组间差异($P < 0.01$)。

与*CsHI1*类似，*CsHI2*在H2处也具有较高的表达量(52.62)，但其表达量在H4处达到峰值(321.92)，并在随后处理中显著下降。在对照组中，仅在CK6处测得较高的表达水平(13.27)，是实验组H6(7.33)处表达量的1.8倍。结合差异性分析显示，除H3与CK3存在显著差异($P < 0.05$)外，H4~H7与相应的对照组之间存在极显著差异。

与前两个基因的变化趋势稍有不同，*CsHI3*呈现随着加工的推进而表达量波动上升的总体趋势，值得注意的是，在第1次摇青开始的H3处以及第2次摇青开始的H5处，*CsHI3*的表达量显著下降(0.41, 0.28)，而在摇青结束后的H4和H6处，*CsHI3*的表达量却显著提升(1.97, 2.83)，并在H6处达到最高值，并且相对应的CK6同样拥有对照组中的最高表达量(1.34)。除H6与CK6之间存在显著差异($P < 0.05$)外，其余处理之间均存在极显著差异($P < 0.01$)；并且H6与其他处理均存在极显著的组间差异($P < 0.01$)。

对比前3个基因在实验组做青环节中的表达模式，*CsHI4*则在对照组中拥有更高的表达，值得注意的是，伴随着茶树鲜叶离体，并经历了一定时间的摊放，*CsHI4*的表达量逐渐上升并在CK4处达到最高值(3.10)，随后呈现下降趋势。而实验组中的表达量则在摇青后期H6处呈现较高水平(0.43)。H3与CK3、H5与CK5、H6与CK6、H7与CK7存在极显著差异($P < 0.01$)，仅在H4与CK4处存在显著差异($P < 0.05$)，并且H4与其他处理存在组间极显著差异($P < 0.01$)。

结合热图中4条*CsHI*基因在不同处理中的表达水平，发现4条基因的表达水平及变化趋势与转录组表达水平基本吻合，因此进行下一步研究。



大写字母不同表示不同节点差异极显著 ($P < 0.01$)，小写字母不同表示不同节点差异显著 ($P < 0.05$)；*，同一节点差异显著 ($P < 0.05$)，**，同一节点差异极显著 ($P < 0.01$)。

图5 乌龙茶加工过程中相关4条*CsHI*基因的相对表达水平

Fig. 5 Relative expression levels of four *CsHI* genes during oolong tea manufacturing

2.4 乌龙茶加工过程中(Z)-3-己烯醛与(E)-2-己烯醛和*CsHI*基因相对表达水平关联性分析

利用Pearson相关系数评估乌龙茶加工过程中，所筛选的4条茶树*CsHI*基因的表达水平与(Z)-3-己烯醛和(E)-2-己烯醛的相关性，结果如表2~5所示。将实验组与对照组的处理划分进行相关性分析，具体是划分为实验组中H1~H3，即茶树鲜叶到第1次摇青结束处理为一组，H4~H5即第2次摇青前及摇青结束的处理为一组，H6~H7即第3次摇青前及摇青结束的处理为一组；对照组中以CK3~CK5为一组，即第1次摇青结束至第2次摇青结束的等时摊放对照为一组，CK6~CK7即第3次摇青开始及摇青结束的等时摊放对照为一组。

在*CsH11*基因表达量与(Z)-3-己烯醛和(E)-2-己烯醛的关联性分析中,实验组H1~H3处理中,*CsH11*基因表达量与(Z)-3-己烯醛存在负相关,并与(E)-2-己烯醛显著相关,可以推测此时的乌龙前期茶萎凋及摇青带来的失水、机械胁迫促使*CsH11*表达,(Z)-3-己烯醛下降,进而形成(E)-2-己烯醛。然而,在H4~H5处理中,*CsH11*与(Z)-3-己烯醛和(E)-2-己烯醛之间分别存在极显著相关,在H6~H7处理中,则存在负相关,推测此时乌龙茶加工已经进行至中后期,(Z)-3-己烯醛并未完全消散,(E)-2-己烯醛也在茶叶中拥有一定含量,结合*CsH11*基因的表达水平,推测*CsH11*对后期连续的机械胁迫响应较弱。在对照组中,*CsH11*基因只在CK6~CK7处理与(Z)-3-己烯醛和(E)-2-己烯醛存在极显著相关性,亦有助于支撑*CsH11*基因对较长时间失水胁迫具有较好的响应。

在*CsH12*基因表达量与(Z)-3-己烯醛和(E)-2-己烯醛的关联性分析中同样发现,此基因在H1~H3处理下与(Z)-3-己烯醛之间存在负相关,然而却与(E)-2-己烯醛无显著相关性,并在乌龙茶加工中后期H4~H5、H6~H7阶段与(Z)-3-己烯醛和(E)-2-己烯醛都存在极显著相关性。联系实际生产过程,较为短暂的摇青过程促使大量具有青草气、清香的物质以挥发物形态快速逸失,而摇青后摊放也以较缓慢的过程生成乌龙茶的风味物质,其中也包括(Z)-3-己烯醛和(E)-2-己烯醛。在对照组中,*CsH12*基因同样在CK6~CK7处理中与(Z)-3-己烯醛和(E)-2-己烯醛存在极显著相关性。因此推测*CsH12*基因在经过前期较长时间萎凋后,由于第1次摇青的机械胁迫,诱导(Z)-3-己烯醛转变为(E)-2-己烯醛;结合此基因的表达水平,发现在后续的加工过程中,此基因对摇青后的摊放处理具有较高的响应,推测其同样对摇青后的失水胁迫具有较好的响应。

与*CsH12*基因类似,在*CsH13*基因表达量与(Z)-3-己烯醛和(E)-2-己烯醛的关联性分析中,此基因在H1~H3处理下仅与(Z)-3-己烯醛存在负相关,然而并未得到其与(E)-2-己烯醛存在相关性,在H4~H5、H6~H7、CK6~CK7等处理下同样存在极显著的相关性。然而结合*CsH13*基因在乌龙茶加工过程中的表达水平,发现其呈现随着加工工艺的推进,实验组中基因表达量呈现波动上升的趋势,具体在摇青后的摊放过程有上调的表达量,推测经过摇青快速且加猛烈的机械胁迫后,缓慢失水更有助于此基因的表达,且机械胁迫对此基因的表达具有一定的抑制作用。

与前3条基因不同,在*CsH14*基因表达量与(Z)-3-己烯醛和(E)-2-己烯醛的关联性分析中,实验组中此基因与(E)-2-己烯醛存在负相关,并且在H4~H5处理中与(Z)-3-己烯醛和(E)-2-己烯醛存在极显著负相关,在H6~H7处理中则与(Z)-3-己烯醛和(E)-2-己烯醛存在极显著正相

关。在对照组中,*CsH14*基因在CK3~CK5处与(E)-2-己烯醛负相关,在CK6~CK7与(Z)-3-己烯醛和(E)-2-己烯醛有极显著相关性。结合*CsH14*基因在不同处理中的表达水平,发现在前期乌龙茶加工过程中,实验组摇青带来的胁迫对此基因的表达具有抑制作用;相反,在对照组中,与萎凋、摊放等工艺有关的失水胁迫则促使*CsH14*基因表达量上调。这或许可以解释不同处理下,*CsH14*基因和(E)-2-己烯醛存在较大比例的负相关的关系,原因是前期加工带来的机械损伤未能有效促使(Z)-3-己烯醛向(E)-2-己烯醛转化,反而是长时间的摊放失水明显诱导*CsH14*基因的表达。

表2 乌龙茶加工过程中(Z)-3-己烯醛与(E)-2-己烯醛和*CsH11*基因相对表达水平的关联性分析

Table 2 Correlation coefficients between (Z)-3-hexenal and (E)-2-hexenal contents and relative expression level of *CsH11*

项目	<i>CsH11</i> 基因表达量				
	H1~H3	H4~H5	H6~H7	CK3~CK5	CK6~CK7
(Z)-3-己烯醛含量	-0.241	1.000**	-1.000	0.847	1.000**
(E)-2-己烯醛含量	0.999*	1.000**	-1.000	0.250	1.000**

注: *显著相关($P < 0.05$); **极显著相关($P < 0.01$)。下同

表3 乌龙茶加工过程中(Z)-3-己烯醛与(E)-2-己烯醛和*CsH12*基因相对表达水平的关联性分析

Table 3 Correlation coefficients between (Z)-3-hexenal and (E)-2-hexenal contents and relative expression level of *CsH12*

项目	<i>CsH12</i> 基因表达量				
	H1~H3	H4~H5	H6~H7	CK3~CK5	CK6~CK7
(Z)-3-己烯醛含量	-0.379	1.000**	1.000**	0.086	1.000**
(E)-2-己烯醛含量	0.982	1.000**	1.000**	0.923	1.000**

表4 乌龙茶加工过程中(Z)-3-己烯醛与(E)-2-己烯醛含量和*CsH13*基因相对表达水平的相关性分析

Table 4 Correlation coefficients between (Z)-3-hexenal and (E)-2-hexenal contents and relative expression level of *CsH13*

项目	<i>CsH13</i> 基因表达量				
	H1~H3	H4~H5	H6~H7	CK3~CK5	CK6~CK7
(Z)-3-己烯醛含量	-0.256	1.000**	1.000**	0.318	1.000**
(E)-2-己烯醛含量	0.879	1.000**	1.000**	0.807	1.000**

表5 乌龙茶加工过程中(Z)-3-己烯醛与(E)-2-己烯醛和*CsH14*基因相对表达水平的相关性分析

Table 5 Correlation coefficient between (Z)-3-hexenal and (E)-2-hexenal contents and relative expression level of *CsH14*

项目	<i>CsH14</i> 基因表达量				
	H1~H3	H4~H5	H6~H7	CK3~CK5	CK6~CK7
(Z)-3-己烯醛含量	0.963	-1.000**	1.000**	0.992	1.000**
(E)-2-己烯醛含量	-0.456	-1.000**	1.000**	-0.183	1.000**

2.5 4条*CsHI*基因的生物信息学分析

为了解*CsHI*基因家族成员和其他物种相关基因之间亲缘关系和进化距离,在NCBI上对获得的4个茶树*HI*基因的核酸序列进行在BLAST,并利用MEGA7.0结合在线工具iTOL (<http://itol.embl.de/upload.cgi>)构建转录组中

筛选获得的包括Unigene33696_All、Unigene19480_All、Unigene1576_All、CL7529.Coting2_All在内的核酸序列系统发育进化树，如图6所示。结果表明，存在胡萝卜、向日葵、百日菊、桑、川桑、葡萄、番木瓜、一串红、麻风树、咖啡、二粒小麦、水稻12个物种的17个与茶树CsHI基因核酸序列相似的核酸序列，构建的系统发育进化树划分为4个大类，标记为a~d。其中，a大类成员包括Unigene33696_All，茶树中与生长素结合蛋白、类萌发素蛋白相关的两条基因与其密切相关，同样具有较近亲缘关系的基因也包括胡萝卜、向日葵、百日菊、白桑、川桑等物种在内的生长素结合蛋白、类萌发素蛋白等相关基因。b大类成员包含Unigene19480_All，除与茶树中球蛋白贮藏蛋白相关的基因具有较高同源性之外，此基因与葡萄中相关功能的蛋白也具有较近的亲缘关系。c大类成员包含Unigene1576_All，与Unigene33696_All类似，具有与番木瓜、一串红、麻风树、茶树等物种中的类萌发素蛋白相关的基因具有较近亲缘关系。CL7529.Coting2_All归属于d大类，其与咖啡、一串红、二粒小麦、水稻中类萌发素蛋白相关的基因具较高相似度，同样也具有与茶树类萌发素蛋白相关的基因聚在同一分支。结合进化树HI基因家族成员普遍与类萌发素蛋白相关的基因具有较近的同源性，推测HI基因可能具有相关的生物学功能。

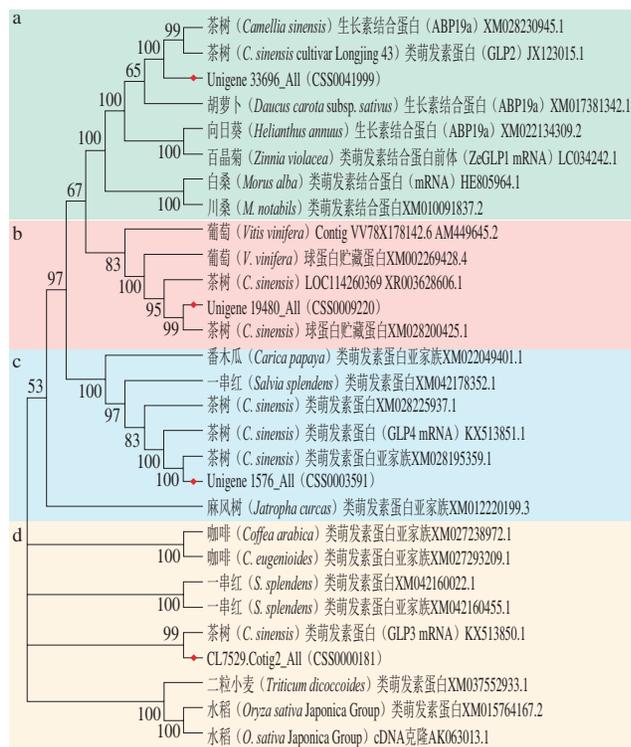


图6 基于CsHI基因核酸序列同源性构建的系统发育进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree based on nucleotide sequence homology of CsHI

3 讨论与结论

3.1 HI在动植物中的属性

(Z)-3-己烯醛与(E)-2-己烯醛都是重要的绿叶挥发物^[29]。在HI的作用下，(Z)-3-己烯醛可异构为(E)-2-己烯醛。在以黄瓜果实为实验材料的研究中，HI也具备将转化为(Z,Z)-3,6-壬二烯醛转化为(E,Z)-2,6-壬二烯醛的功能，这两种物质同时也是黄瓜果实的挥发性风味成分^[17]。在鳞翅目昆虫口腔分泌物中也鉴定出HI，为研究植物-昆虫关系生存关系提供借鉴^[30]。

在有关HI的研究中发现，HI具有Cupin蛋白结构域。Cupin来源于拉丁语“Cupa”，意思是指至少由6个β-折叠片形成的桶状结构^[31]。具有2个Cupin结构域的蛋白最早于高等植物种子贮藏蛋白中发现^[32]。在本研究构建的进化树中发现，茶树中球蛋白贮藏蛋白基因与HI聚集在同一分支，此蛋白具有保守的Cupin结构域，是Cupin蛋白超家族的一员。同样，在进化树中显现出的许多与HI较近亲缘关系的其他物种中的类萌发素蛋白，同样含有β-折叠桶状结构域，二者均属于Cupin蛋白家族。由于大多数Cupin蛋白家族成员都具有致敏性，且致敏蛋白涵盖来自坚果^[33-34]、花生^[35]、大豆^[36]、芝麻^[37]等物种，因此不仅在植物的抗性研究方面，在食品、医药的研究中Cupin蛋白的研究也十分受人关注。

3.2 乌龙茶加工过程中(Z)-3-己烯醛与(E)-2-己烯醛的转化和关键基因的表达

早期有关茶树(Z)-3-己烯醛及其衍生物的研究，多聚焦在(Z)-3-己烯醛和(Z)-3-己烯醇。研究发现，在绿茶的春茶中，(Z)-3-己烯醇是代表香气成分之一^[38]，并且(Z)-3-己烯醇是构成绿茶栗香与清香的赋香物质^[39]；乌龙茶的做青工艺也有助于(Z)-3-己烯醇形成与积累，相关CsADH基因也对做青过程的机械损伤与失水双重胁迫具有良好响应^[23]。

在有关茶树HI基因的研究中，Chen Cong等^[19]利用茶树叶片在进行不同时间萎凋的同时，设置机械损伤及失水、低温等胁迫，经鉴定CsHI基因表达水平在低温萎凋(10℃)前4h内呈上升趋势，后又下降；在机械损伤与失水胁迫处理中，经历8h萎凋后达到表达量最大值。该研究结果说明CsHI对非生物胁迫有较好响应，同时也说明了胁迫处理后经过缓慢的、长时间的萎凋，有助于CsHI表达，这与本实验结果一致。本研究以加工过程中的乌龙茶为实验样品，检测不同加工环节(Z)-3-己烯醛和(E)-2-己烯醛的含量，筛选调控(Z)-3-己烯醛向(E)-2-己烯醛转化的关键基因及其表达水平鉴定。结果发现，(Z)-3-己烯醛向(E)-2-己烯醛转化主要发生在乌龙茶摇青后的摊放阶段，叶片反复经过摇青机械力的损伤，细胞破碎率增加，促使CsHI基因响应表达；摇青后的静置摊放，给

予(Z)-3-己烯醛逐渐向(E)-2-己烯醛转化的充足时间。这或许可以解释,在实际生产中,将呈现萎软状态的叶片进行做青,促使茶叶“走水还阳”,即由于主脉中水分向叶片输送,使叶片恢复一定的挺直状态,在此期间,反复的做青促使茶叶香气逐渐由青草气向清香、花果香转变,从而影响乌龙茶品质形成。而(Z)-3-己烯醛与(E)-2-己烯醛分别是构成茶叶青草气、清香或花果香的重要物质。因此,该结果将为筛选乌龙茶特征香气物质与机理研究提供参考,也将为乌龙茶的加工技术提升与品质调控提供借鉴。

参考文献:

- [1] 李芳芳,陶书田,张虎平.植物挥发性有机物合成研究进展[J].生物技术通报,2015,31(3):17-24. DOI:10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2015.04.003.
- [2] 赵璐玲,马卫宾,谢岩碧.绿叶挥发物反式-2-己烯醛对储藏玉米中黄曲霉生长的抑制作用[J].河南工业大学学报(自然科学版),2018,39(2):65-71. DOI:10.16433/j.cnki.issn1673-2383.2018.02.011.
- [3] 郭亚红,衡森,周福才,等.芹菜植株挥发物对蔬菜烟粉虱的驱避作用[J].环境昆虫学报,2019,41(4):900-907.
- [4] 原二亮,郭慧娟,李凤超,等.豌豆蚜为害下CO₂浓度升高对两种不同固氮能力蒺藜苜蓿间接防御的影响[J].植物保护学报,2017,44(2):290-297. DOI:10.13802/j.cnki.zwbhxb.2017.2016183.
- [5] 刘苗苗.黄瓜脂过氧化氢物裂解酶基因CsHPLs参与醛类香气合成的初步分析[D].杨凌:西北农林科技大学,2018.
- [6] 王欢欢,马越,白冰,等.番茄果实呈香组分及其代谢途径研究进展[J].中国瓜菜,2018,31(12):1-4. DOI:10.16861/j.cnki.zggc.2018.0249.
- [7] 周帅,林富平,王玉魁,等.樟树幼苗机械损伤叶片对挥发性有机化合物及叶绿素荧光参数的影响[J].植物生态学报,2012,36(7):671-680.
- [8] 郭慧媛,马元丹,王丹,等.模拟酸雨对毛竹叶片抗氧化酶活性及释放绿叶挥发物的影响[J].植物生态学报,2014,38(8):896-903.
- [9] 张续周,李金秋,陈雪津,等.低温胁迫下乙酸叶醇酯对茶树耐寒性生理生化的影响[J].江苏农业科学,2021,49(24):127-132. DOI:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.24.022.
- [10] 胡双玲.绿叶挥发物和组蛋白H3K4甲基化在茶树干旱胁迫响应中的功能研究[D].武汉:华中农业大学,2019.
- [11] 钮羽群.七种寄主和非寄主植物气味诱或避假眼小绿叶蝉机理研究[D].杭州:中国计量学院,2014.
- [12] 刘孟龙,李响,高振,等.气象因子对赤霞珠果实GLVs香气的影响[J].果树学报,2021,38(11):1890-1899. DOI:10.13925/j.cnki.gsxb.20210252.
- [13] LIN J, MASSONNET M, CANTU D. The genetic basis of grape and wine aroma[J]. Horticulture Research, 2019, 6(1): 1-24. DOI:10.1038/s41438-019-0163-1.
- [14] CHEN C, YU F, WEN X L, et al. Characterization of a new (Z)-3:(E)-2-hexenal isomerase from tea (*Camellia sinensis*) involved in the conversion of (Z)-3-hexenal to (E)-2-hexenal[J]. Food Chemistry, 2022, 383: 132463-132463. DOI:10.1016/J.FOODCHEM.2022.132463.
- [15] LIU S A, HAN B Y. Differential expression pattern of an acidic 9/13-lipoxygenase in flower opening and senescence and in leaf response to phloem feeders in the tea plant[J]. BMC Plant Biology, 2010, 10: 228-242. DOI:10.1186/1471-2229-10-228.
- [16] ZHOU Z W, WU Q Y, YANG Y, et al. The dynamic change in fatty acids during the postharvest process of oolong tea production. Molecules, 2022, 27: 4298. DOI:10.3390/MOLECULES27134298.
- [17] MATSUI K, TOYOTA H, KAJIWARA T, et al. Fatty acid hydroperoxide cleaving enzyme, hydroperoxide lyase, from tea leaves[J]. Phytochemistry, 1991, 30(7): 2109-2113. DOI:10.1016/0031-9422(91)83596-D.
- [18] ZHOU Z W, WU Q Y, YAO Z L, et al. Dynamics of ADH and related genes responsible for the transformation of C₆-aldehydes to C₆-alcohols during the postharvest process of oolong tea[J]. Food Science & Nutrition, 2019, 8(11): 104-113. DOI:10.1002/fsn3.1272.
- [19] LIU S R, GUO L X, ZHOU Q Y, et al. Identification and functional analysis of two alcohol dehydrogenase genes involved in catalyzing the reduction of (Z)-3-hexenal into (Z)-3-hexenol in tea plants (*Camellia sinensis*) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(6): 1830-1839. DOI:10.1021/ACS.JAFC.1C06984.
- [20] DUNWELL J M, CULHAM A, CARTER C E, et al. Evolution of functional diversity in the cupin superfamily[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2001, 26(12): 740-746. DOI:10.1016/S0968-0004(01)01981-8.
- [21] 黄伟,朱顺妮,王忠铭,等.氮缺乏条件下小球藻碳水化合物与脂肪酸的合成规律研究[J].太阳能学报,2014,35(12):2559-2564.
- [22] 叶勇,全建平,吴杰,等.家畜肠道微生物代谢组学研究进展[J].家畜生态学报,2020,41(3):1-8.
- [23] KUNISHIMA M, YAMAUCHI Y, MIZUTANI M, et al. Identification of (Z)-3:(E)-2-hexenal isomerases essential to the production of the leaf aldehyde in plants[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2016, 291(27): 14023-14033. DOI:10.1074/jbc.M116.726687.
- [24] ELEN I A S, HENK L D, LUUK S, et al. Identification and characterization of (3Z):(2E)-hexenal isomerases from cucumber[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 1342. DOI:10.3389/fpls.2017.01342.
- [25] 周子维,刘宝顺,武清扬,等.基于LOX-HPL途径的武夷肉桂加工中香气物质的形成与调控[J].食品与生物技术学报,2021,40(1):100-111.
- [26] 吴晴阳,周子维,倪子鑫,等.代谢组学在乌龙茶品质形成过程中的研究进展[J].食品安全质量检测学报,2022,13(7):2129-2136. DOI:10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.2022.07.051.
- [27] 秦玲,康文怀,张志雯,等. HS-SPME-GC/MS分析油桃果实C₆醇醛挥发性成分变化[J].现代食品科技,2015,31(8):301-307. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.8.047.
- [28] 张鹏,王云舒,李江阔,等.不同气调方式对甜樱桃贮藏后货架期芳香物质的影响[J].食品与发酵工业,2016,42(6):173-181. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.201606031.
- [29] 吴丽婷,程国亭,梁燕.植物绿叶挥发物的生物胁迫防御功能研究进展[J].中国蔬菜,2021(8):27-32. DOI:10.19928/j.cnki.1000-6346.2021.0049.
- [30] ALLMANN S. Isomers of green leaf volatiles in *Nicotiana attenuata* and their role in plant-insect interactions[J]. Wöhrmann Printing Service, 2012, 149(12): 270-270.
- [31] 樊锦瑞,王磊,邹俊杰. PRNs基因家族研究进展[J].生物技术进展,2022,12(3):325-331. DOI:10.19586/j.2095-2341.2021.190.
- [32] 李平,王转花. Cupin家族食物性过敏原表位研究进展[J].细胞与分子免疫学杂志,2011,27(5):590-592. DOI:10.13423/j.cnki.cjmi.006011.
- [33] 闫永凤.关于坚果过敏的研究进展[J].医疗装备,2022,35(9):187-191.
- [34] 郝梦真,李欣芮,牟瑶,等.基于耐消化肽的核桃主要过敏原Jug r 2的线性表位筛选[J].中国食品学报,2022,22(2):1-10. DOI:10.16429/j.1009-7848.2022.02.001.
- [35] 常雪娇.烘焙加工对花生主要过敏原蛋白Arah2的结构和致敏性影响[D].南昌:南昌大学,2021.
- [36] 李堂昊.超高压及热处理对β-伴大豆球蛋白致敏性的影响机理研究[D].郑州:河南工业大学,2021.
- [37] 任秀,王亚萍,白继超,等.纯芝麻酱中花生致敏蛋白Ara h2、Ara h3及芝麻蛋白2S albumin的分析鉴定比较[J].现代食品科技,2022,38(4):62-68. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.4.0487.
- [38] 朱荫,杨婷,施江,等.西湖龙井茶香气成分的全二维气相色谱-飞行时间质谱分析[J].中国农业科学,2015,48(20):4120-4146.
- [39] 尤秋爽,李勤,朱荫,等.不同香型绿茶的香气成分组成及香型形成的影响因素分析[J].中国茶叶,2022,44(1):7-18.