

萎凋处理对乌龙茶风味品质形成的转录组分析

朱晨^{1,2,3,4}, 张舒婷^{1,2}, 周承哲^{1,2,3,4}, 石碧滢^{1,3,4}, 黄琳洁^{1,3,4}, 林玉玲^{1,2}, 赖钟雄^{1,2}, 郭玉琼^{1,3,4}

- 1 福建农林大学 园艺学院, 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 福建农林大学 茶学福建省高校重点实验室, 福建 福州 350002
- 4 福建农林大学 茶产业研究院, 福建 福州 350002

朱晨, 张舒婷, 周承哲, 石碧滢, 黄琳洁, 林玉玲, 赖钟雄, 郭玉琼. 萎凋处理对乌龙茶风味品质形成的转录组分析. 生物工程学报, 2022, 38(1): 303-327.

ZHU C, ZHANG ST, ZHOU CZ, SHI BY, HUANG LJ, LIN YL, LAI ZX, GUO YQ. Transcriptome analysis reveals the role of withering treatment in flavor formation of oolong tea (*Camellia sinensis*). Chin J Biotech, 2022, 38(1): 303-327.

摘要: 乌龙茶是一种高香型半发酵茶, 因其具有的花果香和鲜醇浓厚口感而广受消费者青睐。在乌龙茶加工过程中, 萎凋是促进乌龙茶风味品质形成的第一道工序。然而, 乌龙茶萎凋过程中影响风味品质形成的分子机制尚不明确。利用转录组测序对乌龙茶鲜叶、室内萎凋叶和日光萎凋叶进行分析。结果表明, 从3个样品中共鉴定出10 793个差异表达基因。KEGG富集分析显示, 差异表达基因主要富集在类黄酮合成、萜类化合物合成、植物激素信号转导和剪接体通路。从这4个富集通路中筛选出12个差异表达基因和4个差异剪接基因进行荧光定量PCR分析, 结果表明, 检测基因在萎凋处理过程中的表达模式与转录组数据集中的结果一致。对上述富集通路进行深入分析后发现, 日光萎凋处理后类黄酮合成基因的转录抑制、萜类化合物合成基因的转录增强、茉莉酸信号转导和可变剪接机制共同参与调控了日光萎凋叶中高花果香和低苦涩味的风味品质形成。研究结果有助于进一步了解日光萎凋处理在乌龙茶风味品质形成中的重要性。

关键词: 茶树; 萎凋; 风味品质; 转录组

Received: April 7, 2021; **Accepted:** May 28, 2021; **Published online:** June 15, 2021

Supported by: Earmarked Fund for China Agriculture Research System (CARS-19); Scientific Research Foundation of Graduate School of Fujian Agriculture and Forestry University (324-1122yb070); Scientific Research Foundation of Horticulture College of Fujian Agriculture and Forestry University (2019B01); “Double First-Class” Scientific and Technological Innovation Capacity and Enhancement Cultivation Plan of Fujian Agriculture and Forestry University (KSYLP004); 6.18 Tea Industry Technology Branch of Collaborative Innovation Institute (K1520001A); Fujian Agriculture and Forestry University Construction Project for Technological Innovation and Service System of Tea Industry Chain (K1520005A01); Special Fund Project for Scientific and Technological Innovation of Fujian Agriculture and Forestry University (CXZX2017537)

Corresponding authors: LAI Zhongxiong. E-mail: laizx01@163.com

GUO Yuqiong. E-mail: guoyq828@163.com

基金项目: 国家现代农业(茶叶)产业技术体系专项资金(CARS-19); 福建农林大学优秀博士学位论文资助基金(324-1122yb070); 福建农林大学园艺学院优秀博士学位论文资助基金(2019B01); 福建农林大学“双一流”建设科技创新能力提升培育计划(KSYLP004); 6.18协同创新院茶产业技术分院专项(K1520001A); 福建农林大学茶产业链科技创新与服务体系建设项目(K1520005A01); 福建农林大学科技创新专项基金(CXZX2017537)

Transcriptome analysis reveals the role of withering treatment in flavor formation of oolong tea (*Camellia sinensis*)

ZHU Chen^{1,2,3,4}, ZHANG Shuting^{1,2}, ZHOU Chengzhe^{1,2,3,4}, SHI Biying^{1,3,4}, HUANG Linjie^{1,3,4}, LIN Yuling^{1,2}, LAI Zhongxiong^{1,2}, GUO Yuqiong^{1,3,4}

1 College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China

2 Institute of Horticultural Biotechnology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China

3 Key Laboratory of Tea Science in Universities of Fujian Province, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China

4 Tea Industry Research Institute, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China

Abstract: Oolong tea is a semi-fermented tea with strong flavor, which is widely favored by consumers because of its floral and fruity aroma as well as fresh and mellow taste. During the processing of oolong tea, withering is the first indispensable process for improving flavor formation. However, the molecular mechanism that affects the flavor formation of oolong tea during withering remains unclear. Transcriptome sequencing was used to analyze the difference among the fresh leaves, indoor-withered leaves and solar-withered leaves of oolong tea. A total of 10 793 differentially expressed genes were identified from the three samples. KEGG enrichment analysis showed that the differentially expressed genes were mainly involved in flavonoid synthesis, terpenoid synthesis, plant hormone signal transduction and spliceosome pathways. Subsequently, twelve differentially expressed genes and four differential splicing genes were identified from the four enrichment pathways for fluorescence quantitative PCR analysis. The results showed that the expression patterns of the selected genes during withering were consistent with the results in the transcriptome datasets. Further analysis revealed that the transcriptional inhibition of flavonoid biosynthesis-related genes, the transcriptional enhancement of terpenoid biosynthesis-related genes, as well as the jasmonic acid signal transduction and the alternative splicing mechanism jointly contributed to the flavor formation of high floral and fruity aroma and low bitterness in solar-withered leaves. The results may facilitate better understanding the molecular mechanisms of solar-withering treatment in flavor formation of oolong tea.

Keywords: *Camellia sinensis*; withering; flavor quality; transcriptome

茶树 (*Camellia sinensis*) 起源于中国西南地区, 是我国重要的多年生经济作物之一。其中, 乌龙茶是我国特有的一种高香型半发酵茶类, 主产于福建省、广东省、中国台湾等地区, 因其具有独特优雅的花果香和鲜醇浓厚口感而享誉中外^[1]。乌龙茶独特风味品质的形成与其加工工艺关系密切。萎凋是乌龙茶采后加

工过程中的首要工序, 对乌龙茶独特风味的形成具有重要作用。在乌龙茶加工过程中, 需要根据茶叶的理化性状, 灵活适度进行日光萎凋处理。在日光萎凋处理中, 鲜叶会遭受干旱胁迫、高温胁迫和紫外线胁迫等多重环境胁迫的共同影响, 但由于萎凋叶仍保持相对完整的形态结构, 光合作用、蒸腾作用和植物激素信号

转导等生理活动仍在叶片中正常进行^[2-3]。此外,萎凋过程中还会发生多种生物化学反应和次生代谢产物丰度的变化,来维持叶片细胞膜的通透性和代谢平衡以应对环境胁迫带来的不利影响。外界胁迫可诱导植物产生许多次生代谢产物,这些次生代谢产物具有帮助植物抵御外界胁迫的作用^[4]。此外,茶叶中的次生代谢产物还赋予了茶叶独特的风味品质^[5]。类黄酮是茶叶中最重要的次生代谢产物,与乌龙茶滋味的形成密切相关,是茶叶苦涩味形成的主要原因^[6]。挥发性化合物也是评价乌龙茶风味品质的重要因子。有报道显示,乌龙茶中花果香品质的形成与挥发性萜类化合物密切相关^[7]。同时,逆境胁迫可以触发信号分子,特别是植物激素的生物合成^[8]。这些植物激素作为信号转导的主要信使,通过调控代谢物生物合成相关基因的表达水平,影响相关代谢物含量的变化^[9]。过去的大部分研究都集中在探究茶树采前代谢物含量变化与代谢途径中关键基因表达水平之间的相关性^[10-12],茶树采后生产相关研究仅仅局限于生产工序处理前后的次生代谢物含量测定^[13-16]。但尚未见到从转录调控角度揭示乌龙茶采后风味品质形成的报道。

高通量测序技术以较低的成本实现了较高的测序覆盖率,可以快速全面地挖掘样本中所有 mRNA 转录本的丰度信息。目前,转录组测序已广泛应用于茶叶风味品质形成相关基因信息的挖掘^[11-12,17]。Wang 等^[18]利用转录组测序,鉴定出参与儿茶素合成的 12 个结构基因。而萜类生物合成相关结构基因的鉴定和代谢通路绘制工作也已全部完成^[19]。随着染色体级别茶树基因组数据的公布^[20-23],为更深入研究编码基因的上游调控机制奠定了基础。可变剪接是指一个 mRNA 前体通过不同的剪接方式产生多种 mRNA 转录本的过程,是植物调控其编码基因表达水平的重要分子机制^[24-25]。研究表明,

可变剪接是植物应对逆境胁迫的重要方式,通过产生大量剪接转录本,增强转录本和编码蛋白的多样性来应对和缓解逆境胁迫带来的不利影响^[26-27]。尽管植物次生代谢产物的合成途径中存在大量可变剪接事件^[28-29],然而可变剪接在茶叶加工过程中对风味品质形成相关基因的具体调控机制及不同剪接转录本在茶叶风味品质形成的生物学功能尚不清楚。

为揭示 mRNA 在乌龙茶萎凋过程中影响风味品质形成的分子机制,本研究通过对鲜叶、室内萎凋叶和日光萎凋叶进行转录组测序,挖掘差异表达基因主要富集的代谢途径,鉴定可变剪接事件和差异剪接基因,对其中参与风味品质形成及其上游调控途径中的关键差异表达基因和差异剪接基因的表达模式进行深入分析。同时,还分析了差异剪接转录本的表达丰度和相关代谢物及植物激素的含量之间的相关性,以期进一步了解转录调控及可变剪接机制在乌龙茶风味品质形成中的具体作用以及日光萎凋对乌龙茶风味品质形成的重要性奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为种植于福建农林大学教学实践茶园 (E 119° 14', N 26° 05') 的铁观音茶树。采集长势一致的铁观音茶叶片,采摘标准为—芽三叶。将采集后的茶叶叶片等分为 3 部分,未进行任何处理的鲜叶作为对照组;第二部分的茶叶进行日光萎凋处理 (光照强度: $(40\ 000 \pm 1\ 000)$ lx; 温度: (25 ± 2) °C; 相对湿度: $(60\% \pm 5\%)$, 时间: 45 min); 第三部分的茶叶进行室内萎凋处理 (光照强度: (50 ± 5) lx, 其他参数和日光萎凋处理一致)。每个处理进行 3 次生物学重复,采集后的鲜叶 (FL)、室内萎凋叶 (IW) 和日光萎凋叶 (SW) 经液氮急速冷冻后

存放在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱储存备用。

1.2 RNA 提取与转录组测序

使用 TransZol UP 试剂盒 (全式金生物, 北京, 中国) 分别提取鲜叶、室内萎凋叶和日光萎凋叶的总 RNA。提取后 RNA 的质量和完整性分别利用 Agilent Bioanalyzer 2100 (安捷伦科技, 美国) 和 NanoDrop 2 000 (赛默飞世尔科技, 美国) 进行检测。利用 Oligo(dT)介导的 mRNA 富集法处理检测合格的 RNA, 随后加入破碎缓冲液将富集的 mRNA 进行随机打断。以打断后的 RNA 片段为模板, 使用六碱基随机引物进行反转录, 再合成 cDNA 第二链。将双链 cDNA 分别进行末端修复、5'末端磷酸化、连接上鼓泡接头后进行 PCR 扩增。PCR 产物升温变性解链后, 加入桥式引物将单链 cDNA 环化后获得 cDNA 文库。最后使用 BGISEQ-500 平台 (华大基因, 中国) 对 cDNA 文库进行高通量测序。对测序后的原始数据进行质量控制, 使用 SOAPnuke^[30]过滤去除接头序列、低质量序列以及含有未知碱基 N 比例超过 5% 的序列。采用 HISAT^[31]将过滤后的数据比对茶树染色体水平参考基因组^[20]。

1.3 转录组测序数据分析

转录本的相对表达水平使用 Bowtie2^[32]和 RSEM^[33]进行计算, 并采用 FPKM (fragments per kilobase per million mapped reads) 值对相对表达水平进行归一化处理。

基于 DEGseq 算法, 以 $|\text{fold change}| \geq 2$ 且 $Q\text{-value} \leq 0.001$ 作为筛选标准, 进行差异表达基因 (differentially expressed gene, DEG) 的筛选^[34]。随后将差异表达基因分别进行基因本体论 (gene ontology, GO) 和京都基因与基因组百科全书 (kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析, 以 $Q\text{-value} \leq 0.01$ 为阈值, 挖掘出差异

表达基因发挥主要的生物学功能或参与影响的生物学通路。相关差异表达基因的表达谱使用 Tbttools 进行可视化^[35]。

使用 rMATS 检测鲜叶、室内萎凋叶和日光萎凋叶中的可变剪接事件和差异剪接基因^[36]。采用三氯化铝比色法测定茶叶样品中的类黄酮含量, 使用紫外分光光度计测定茶样在 415 nm 处的吸光度, 并参照 Zhu 等^[37]的研究方法进行计算。参照 Tai 等^[11]的研究方法, 使用高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 系统进行儿茶素含量的测定, 检测波长为 278 nm, 柱温为 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。通过酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测样品中的赤霉素 (GA) 含量, 使用 Infinite M200 PRO 酶标仪 (帝肯, 瑞士) 进行吸光度测定, 计算方法参照 Zhu 等^[9]进行, 每个实验进行 3 次生物学重复。用于分析的相关代谢物及植物激素数据来自本课题组已报道的研究^[9,37]。采用 Pearson 相关系数对差异剪接转录本的转录丰度和相关代谢物及植物激素的含量进行相关性分析。

1.4 差异表达基因和差异剪接基因的转录水平验证

采用试剂盒 TransScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix (全式金生物, 中国) 将提取的 RNA 反转录合成 cDNA。使用 LightCycler 480 (罗氏集团, 瑞士) 对关键差异表达基因和差异剪接基因进行实时定量聚合酶链式反应 (quantitative realtime polymerase chain reaction, qRT-PCR) 扩增。以 GAPDH 和 $\beta\text{-actin}$ 为内参基因, 采用相对定量法 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 算法^[38], 以检测关键差异表达基因在不同萎凋处理中的表达水平。每个实验进行 3 次生物学重复。使用 SPSS 25 软件进行差异显著性分析, 相关引物信息见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列信息

Table 1 Primers used in qRT-PCR

Classification	Primer names	Accession No.	Forward primers (5'→3')	Reverse primers (5'→3')
Differentially expressed genes	<i>CsCHI</i>	CSS0035109	GCTCCGAGGCAGATGGATAC	TCCACACTCATCGTTGCTGT
	<i>CsC4H</i>	CSS0002506	GGCACGAACTTGACACCATG	TGCATCGTGGAGGTTTCATGT
	<i>CsHCT</i>	CSS0019978	GGGTTAGGCTGCCGATTCAT	TCATTGGTTGGACTCGGCAA
	<i>CsAACT</i>	CSS0022458	CATCCTCTCGGTTGCAGTGG	TGATGCACCTCCTCCTCCAT
	<i>CsDXS</i>	CSS0023867	TTGTTGGTGCAGATGGTCCT	TTGGTGGGAAGAATGGAGCCA
	<i>CsTPS</i>	CSS0027229	AGGACGAGTTGGAGAGAGGT	CCGAGCAAGGTTAACAGTGG
	<i>CsGH3</i>	CSS0001919	GCCTCTGGAGATTCGTGTGG	AAAGCTAACACACCTCGGCA
	<i>CsJAZ</i>	CSS0010510	GCAGCGAAACCAATCCTGTT	CACTGGCAGATCGGAATGAGT
	<i>CsMYC2</i>	CSS0019249	GAGACCAACATGTTCTCCA	CAACGACGACTGTGATCCCT
	<i>CsPrp5</i>	CSS0043015	ACAACAAGGAGGAAGCGGTT	AAAGCACAGGATCCTCGAGA
	<i>CsPrp22</i>	CSS0034806	AGCGCTGCCAATATCATCTCT	GCAACGGATGTGAGAGCTCT
	<i>CsSR</i>	CSS0017692	CACGCAGCAGTTCATTCAT	ACACGAGTTTCAGCGAGAGT
	Alternatively spliced isoforms	<i>CsFLS1</i>	CSS0013328	GACGATCTCTTCCACTGCGA
<i>CsFLS1-a</i>			CTGTGTGTGACTTTTGGCTGG	CGGACAAAGCAGATAAAGCCA
<i>CsFLS1-b</i>			CACTTAAACTGTGCCTGCCT	AGTATCACATCTCAGGCCCT
<i>CsFLS1-c</i>			AGGCATGCATAGAATGTGGT	TACAGTGGCGTATAACCTCT
<i>CsFLS1-d</i>			ATCTGAATCACTGGCCTTCA	TGGCATTGGTGGATTGAAAGC
<i>CsFLS2</i>		CSS0036983	ACGTGGAAGGTCTGCAGATT	TTGTCCACTGCACGACCTTC
<i>CsFLS2-a</i>			CTGGGAAGCTCACTCCTTGT	GGACAACGAGCACCATACGA
<i>CsFLS2-b</i>			TCGTATGGTGCTCGTTGTCC	CCCAGTCTCCATCTTACC
<i>CsFLS2-c</i>			GATTGTTACCAATGGAACTTATCG	TGGGGTAATCAAAGTGGTCA
<i>CsFLS2-d</i>			CCACAGTTTTTCATGGCCACAG	ACTGCCTGCATCCCTTCTTC
<i>CsGID1</i>		CSS0018506	ATCTACGACACCTTCTGCCG	CCAAGGTCTCGAGTGAACCC
<i>CsGID1-a</i>			CTTGTGGTAGACGGTAGGCA	GAGCCAAGGTCTCGAGTGAA
<i>CsPIF</i>		CSS0039844	ACAGGGTTTGCTGTTATGAGAG	GACGGCCAGATGAGAAGTT
<i>CsPIF-a</i>		TGCACGTGTTCAAGTAAGCAG	ACTTGATCTGGGTTGTTCCA	
Reference genes	<i>GAPDH</i>		TTGGCATCGTTGAGGGTCT	CAGTGGGAACACGGAAAGC
	<i>β-actin</i>		GCCATCTTTGATTGGAATGG	GGTGCCACAACCTTGATCTT

2 结果与分析

2.1 转录组测序质量评估

经过高通量测序后,从所有样品中共获得 662.40 Mb 的原始数据(表 2),对原始数据进行过滤后获得平均大小为 66.15 Mb 的有效数据。各样品中碱基数量分布范围为 6.56–6.70 Gb,且测序质量参数 Q30 均在 88.53%以上。将所有样品中的有效数据比对到参考基因组上,发现

转录组数据覆盖基因组数据的比值均在 80.98%以上,表明高通量测序数据覆盖度高、数据可靠,可用于后续试验分析。比对参考基因组后从 9 个样品中共鉴定出 40 189 个基因。随后,对基因的序列长度分布情况进行了分析(图 1),其中序列长度小于 1 000 bp 的基因数量为 16 101 个(40.06%),序列长度范围在 1 000–2 000 bp 内的基因数量为 15 659 个(38.96%),而序列长度超过 2 000 bp 的基因数量为 8 429 个

(20.98%)。进一步分析发现,序列长度在 3 000 bp 以上的基因数量最多,共有 2 754 个 (6.85%),而长度范围在 2 900–3 000 bp 内的基因数量最少,共有 303 个 (0.75%)。

2.2 差异表达基因的鉴定

从 3 个转录组中共鉴定出 10 793 个差异表达基因,其中鲜叶和室内萎凋叶 (FL vs. IW)

中有 6 688 个差异表达基因 (上调基因 3 703 个,下调基因 2 985 个);鲜叶和日光萎凋叶 (FL vs. SW) 中有 7 882 个差异表达基因 (上调基因 4 415 个,下调基因 3 467 个);室内萎凋叶和日光萎凋叶 (IW vs. SW) 中有 1 095 个差异表达基因 (上调基因 558 个,下调基因 537 个) (图 2A)。有 3 991 个差异表达基因为 FL vs. IW

表 2 转录组测序质量指标

Table 2 The quality indicators of transcriptome sequencing

Samples	Total raw reads (Mb)	Total clean reads (Mb)	Total clean Bases (Gb)	Clean reads Q20 (%)	Clean reads Q30 (%)	Clean reads Ratio (%)	Total mapping ratio (%)
FL1	72.22	65.60	6.56	96.84	88.85	90.84	82.62
FL2	72.22	65.78	6.58	96.81	88.53	91.08	83.13
FL3	72.22	65.62	6.56	96.77	88.72	90.87	83.25
IW1	74.70	66.12	6.61	96.55	88.53	88.51	81.40
IW2	74.70	66.29	6.63	96.64	88.77	88.74	81.69
IW3	74.70	66.55	6.66	96.63	88.73	89.09	80.98
SW1	74.71	66.97	6.70	96.83	89.25	89.65	82.47
SW2	74.71	66.70	6.67	96.69	88.81	89.28	82.52
SW3	72.22	65.72	6.57	97.07	89.81	91.01	82.03

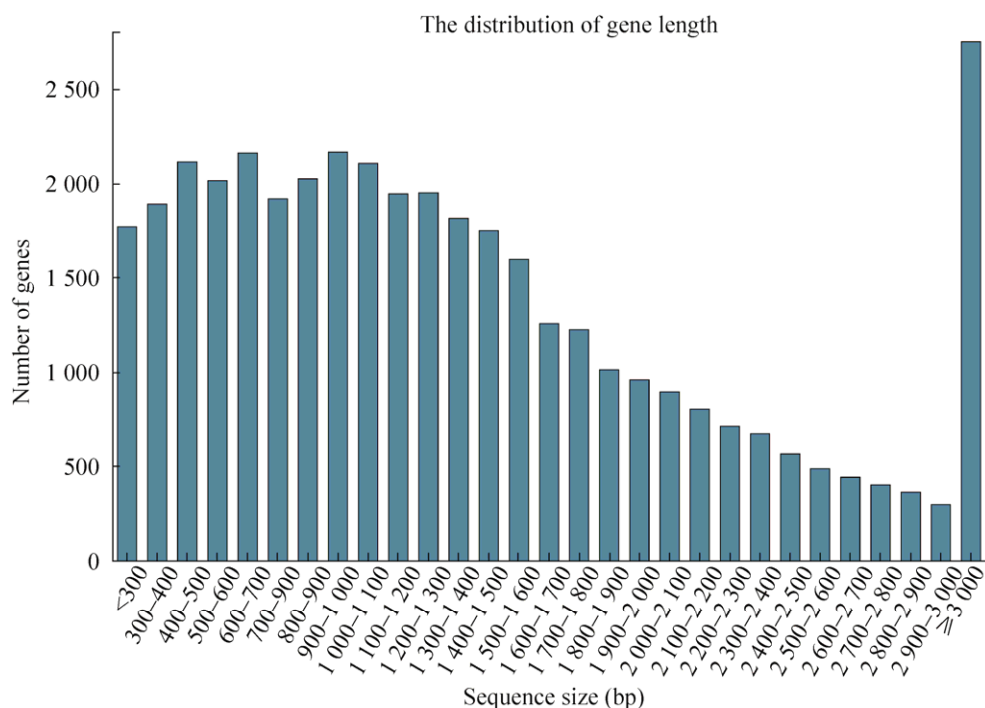


图 1 基因长度分布

Figure 1 The distribution of gene length.

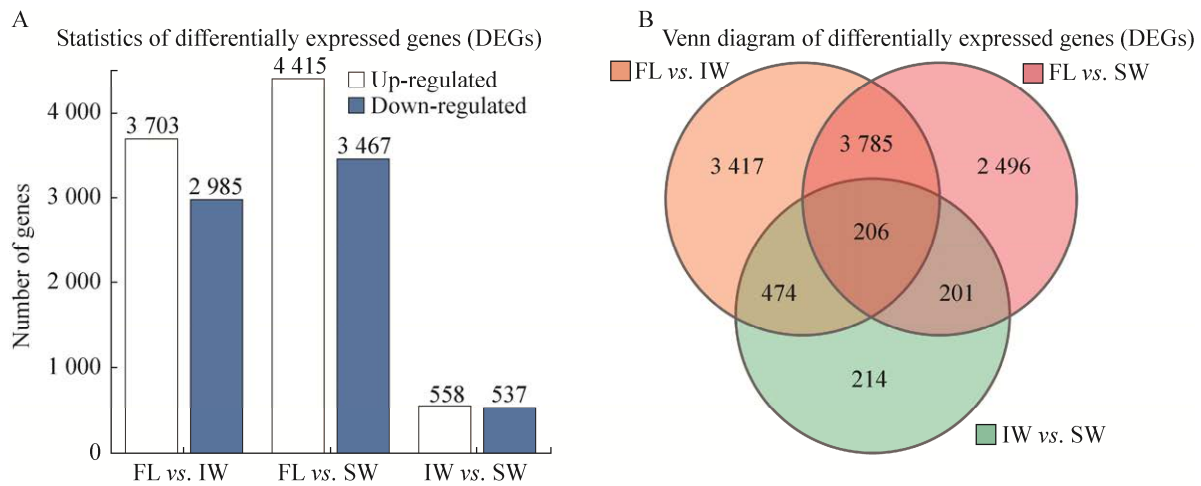


图 2 差异表达基因统计分析

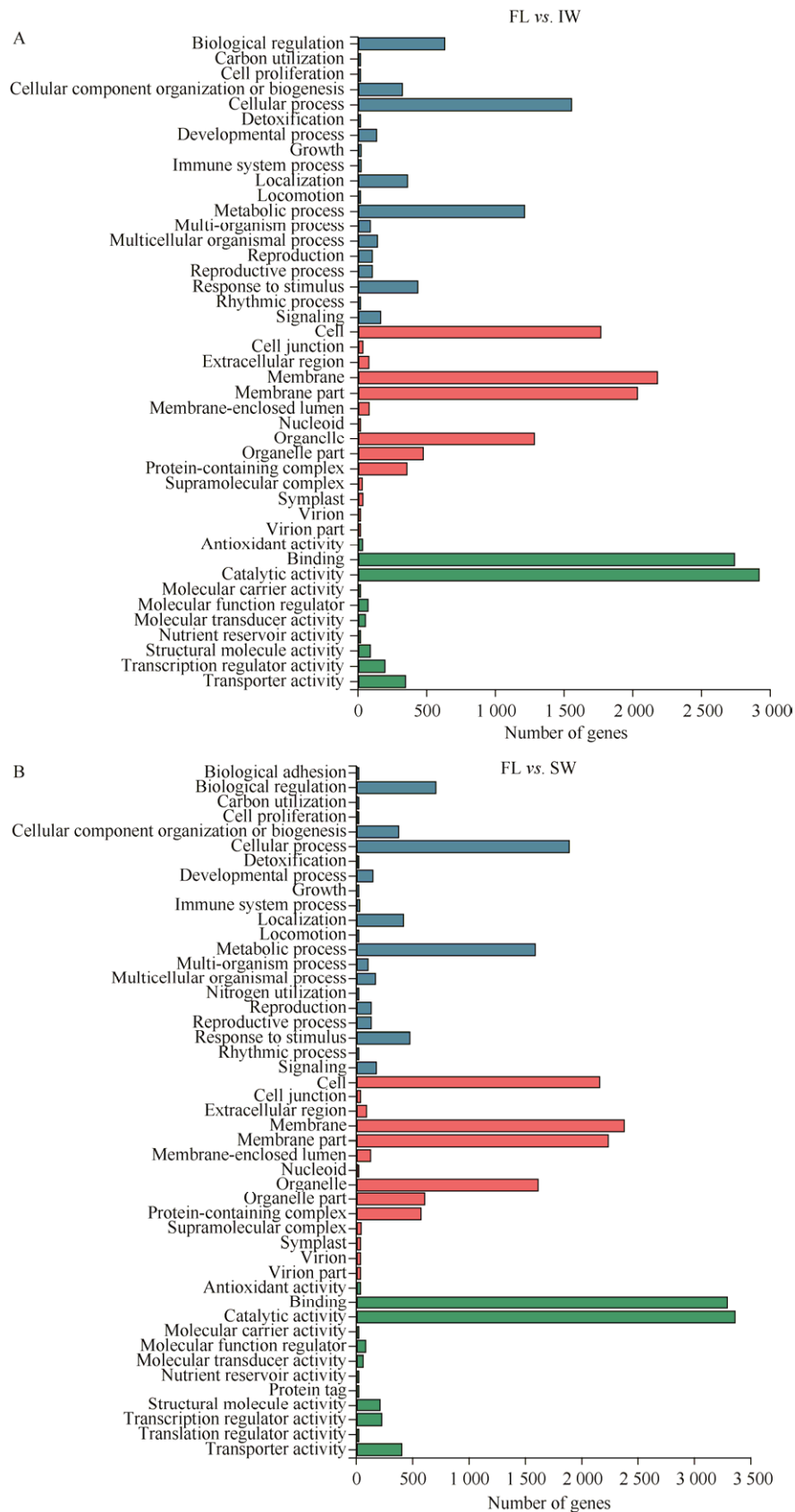
Figure 2 Statistical analysis of differentially expressed genes. (A) The total number of up-regulated and down-regulated genes in each group. (B) Venn diagram of all differentially expressed genes.

和 FL vs. SW 2 组所共有的 (图 2B), 表明萎凋处理可能引起这些基因的表达水平发生了显著变化。此外, 有 214 个表达基因只在 IW vs. SW 中呈现差异表达趋势, 推测这些差异表达基因可能是揭示室内萎凋和日光萎凋对茶叶风味品质形成的关键因素。

2.3 差异表达基因的 GO 富集分析

为初步明确差异表达基因在萎凋处理中发挥的具体生物学功能, 对上述已鉴定出的 10 793 个差异表达基因进行了 GO 富集分析。结果表明共有 8 789 个差异表达基因注释到 GO 数据库。在 FL vs. IW 中共有 5 479 个差异表达基因注释到生物过程、细胞组分及分子功能这 3 个 GO 一级功能分类 (图 3), 其中生物过程涉及 19 个 GO 二级功能分类, 参与细胞进程、代谢过程及生物调节的差异表达基因最多; 细胞组分中注释到 14 个 GO 二级功能分类, 其中差异表达基因主要富集在细胞膜、细胞膜组分和细胞; 而在分子功能中发现 10 个 GO 二级功能分类, 主要涉及催化活

性、结合及转运活性。在 FL vs. SW 中共有 6 445 个差异表达基因注释到 GO 数据库, 生物过程中注释到 21 个 GO 二级功能分类, 主要包括细胞进程、代谢过程和生物调节; 细胞组分中鉴定出 14 个 GO 二级功能分类, 其中差异表达基因主要富集于细胞膜、细胞膜组分和细胞; 而从分子功能中发现 12 个 GO 二级功能分类, 参与催化活性、结合及转运活性的差异表达基因数量最多。此后从 IW vs. SW 中发现共有 445 个差异表达基因涉及生物过程、细胞组分及分子功能。在生物过程中共鉴定出 17 个 GO 二级功能分类, 主要包括细胞进程、代谢过程及生物调节; 在细胞组分中注释到 13 个 GO 二级功能分类, 其中差异表达基因主要富集在细胞膜、细胞及细胞膜组分; 而在分子功能中发现 10 个 GO 二级功能分类, 主要涉及催化活性、结合和转运活性。从上述结果中发现, 萎凋处理影响了萎凋叶中代谢、合成和转运的生物学功能, 这可能会对茶叶风味品质的形成产生影响。



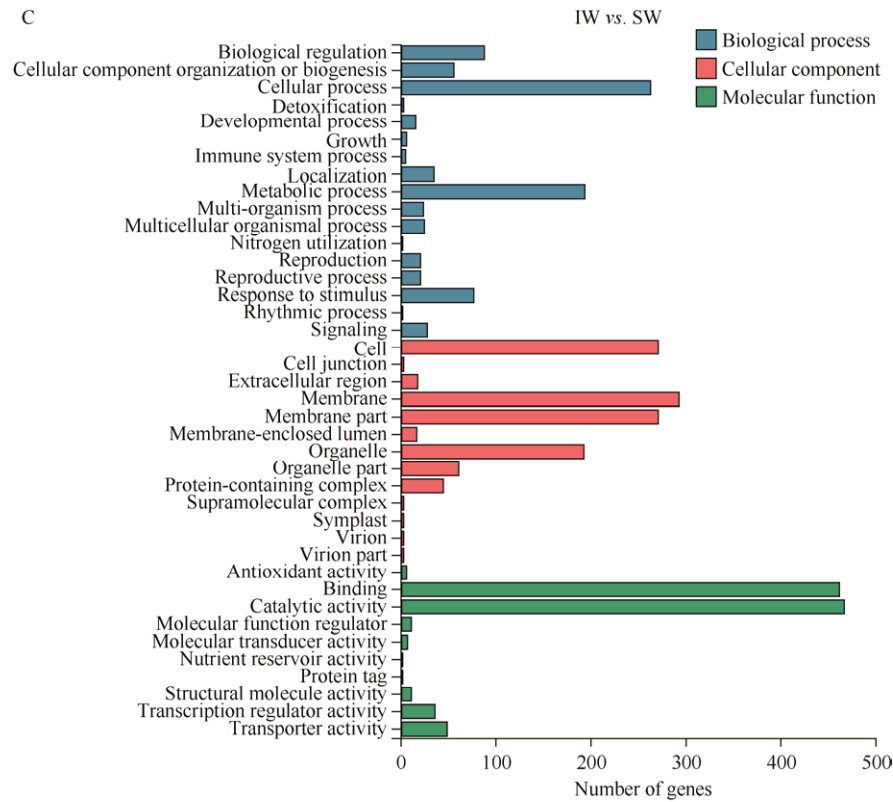


图3 差异表达基因的GO富集分析

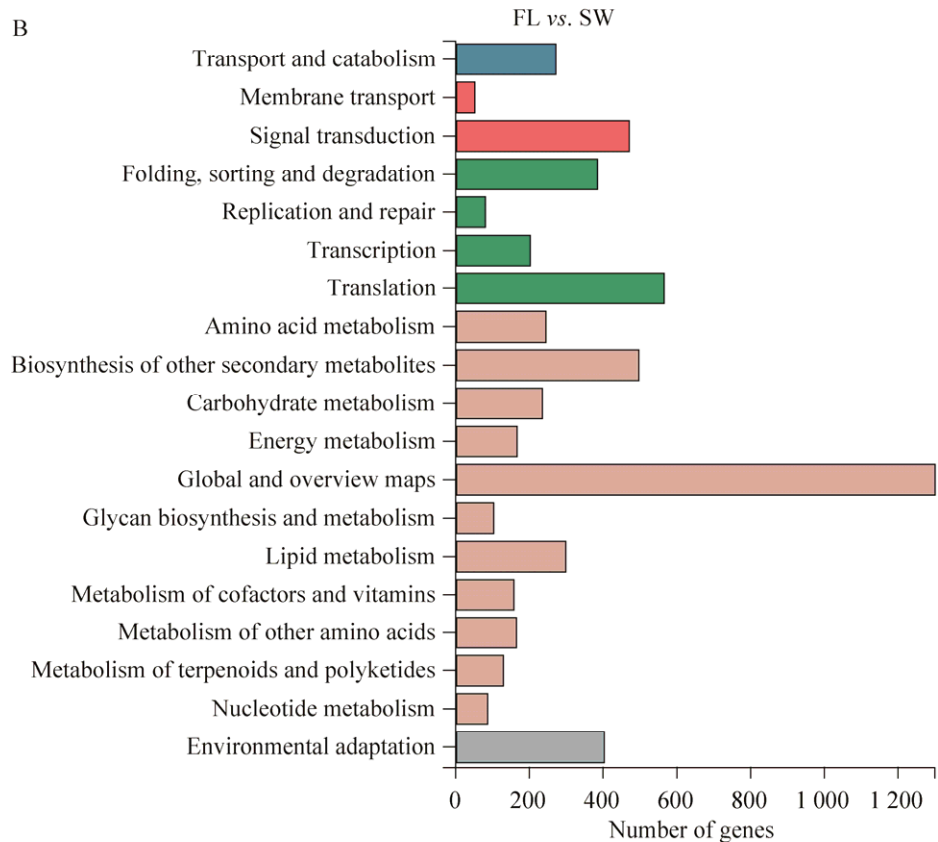
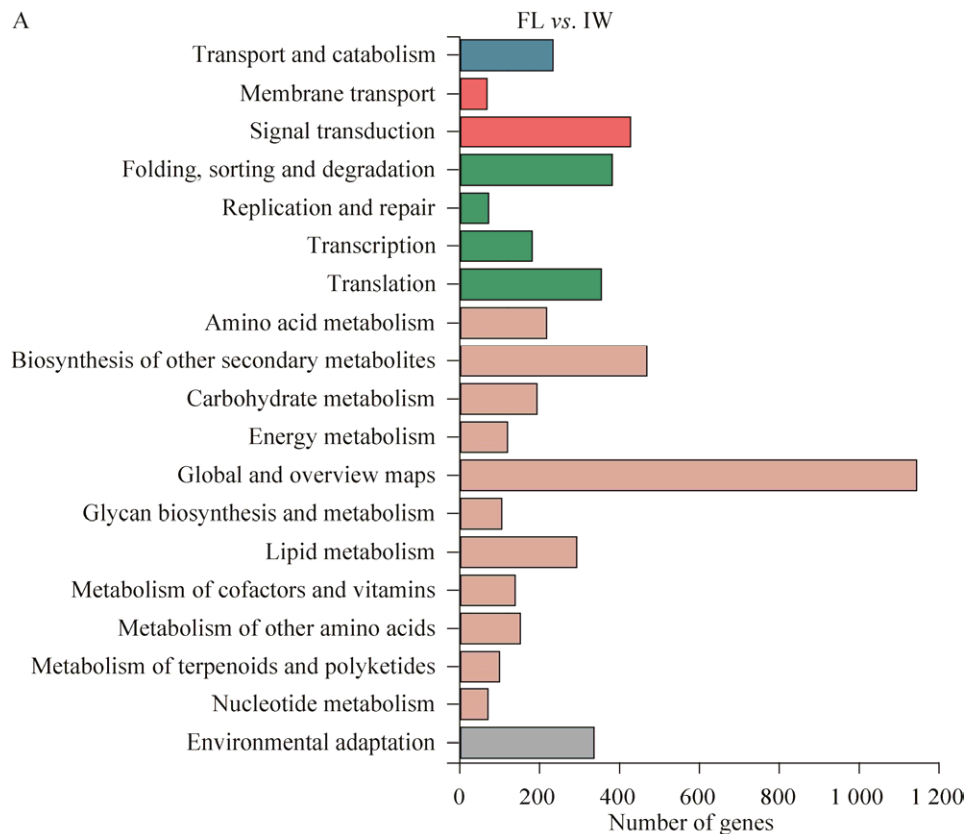
Figure 3 GO enrichment analysis of differentially expressed genes. (A) FL vs. IW. (B) FL vs. SW. (C) IW vs. SW.

2.4 差异表达基因的KEGG富集分析

为进一步研究不同萎凋处理后差异表达基因参与的代谢通路,对所有差异基因进行KEGG富集分析。结果显示,共有4 605个差异表达基因注释到5个KEGG一级分支和19个KEGG二级分支(图4)。在FL vs. IW中,除去全局纵览分支后,2 883个差异表达基因主要分布在次生代谢、信号转导、折叠,分类和降解、翻译及环境适应分支中。而对FL vs. SW中的3 372个差异表达基因和IW vs. SW中的436个差异表达基因进行分析后,发现在除去全局纵览分支后,两组比较中的差异表达基因都同样注释到和FL vs. IW中一致的5个KEGG二级分支中,表明萎凋处理不仅可能通过影响次生代谢中关键基因的表达,还可能通过植物激素

信号转导、蛋白质翻译、折叠和降解间接影响相关代谢中结构基因生物学功能的实现,进而参与调控茶叶风味品质形成的相关次生代谢通路。

对差异基因进行KEGG富集分析,结果显示(图5),FL vs. IW中差异表达基因主要富集在剪接体、植物激素信号转导、类黄酮合成、生物钟和萜类化合物合成通路。在FL vs. SW中,富集排名前五的通路与FL vs. IW中的一致。而IW vs. SW中的差异表达基因主要涉及剪接体、植物激素信号转导、萜类化合物合成、类黄酮合成及卟啉与叶绿素代谢通路。综合分析上述结果发现,有4个富集通路在3组比较中均有出现,其中类黄酮合成和萜类化合物合成通路与茶叶滋味和香气的形成关系密切,而



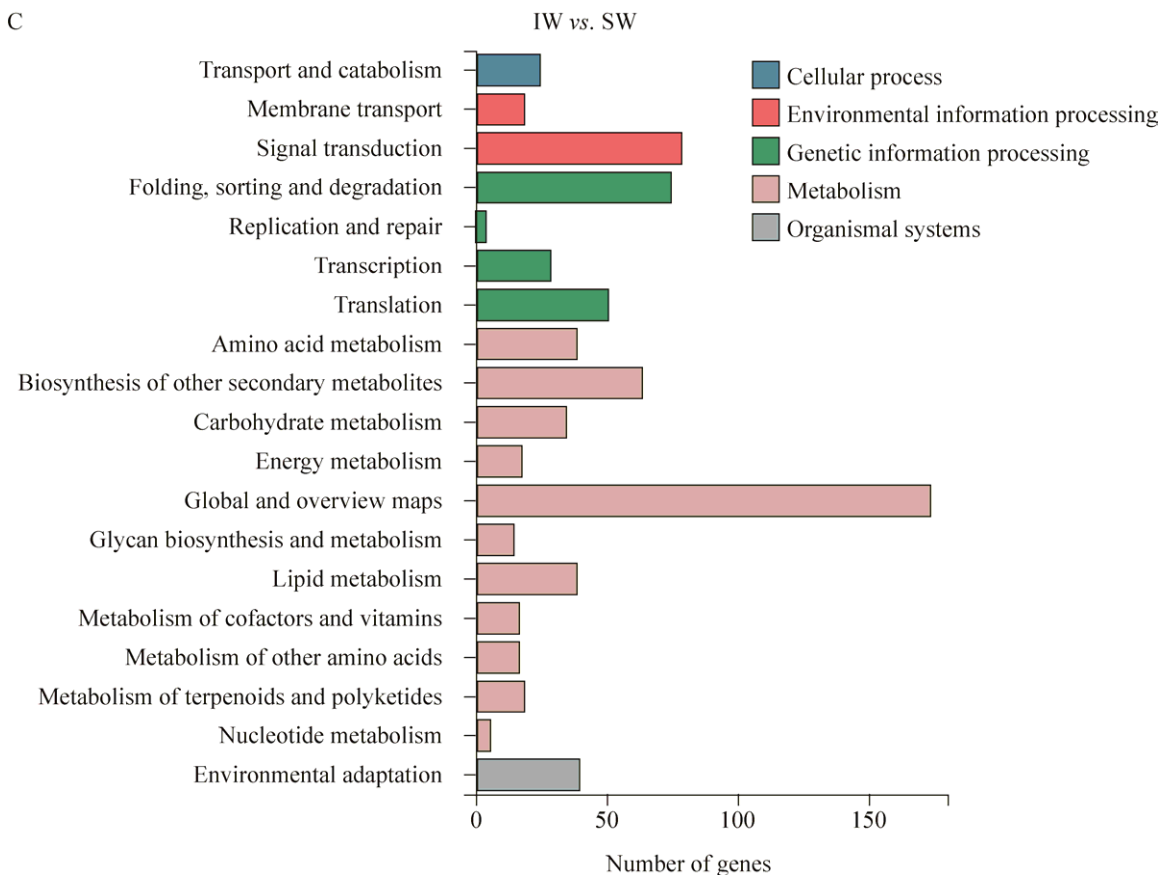


图4 差异表达基因的 KEGG 分类分析

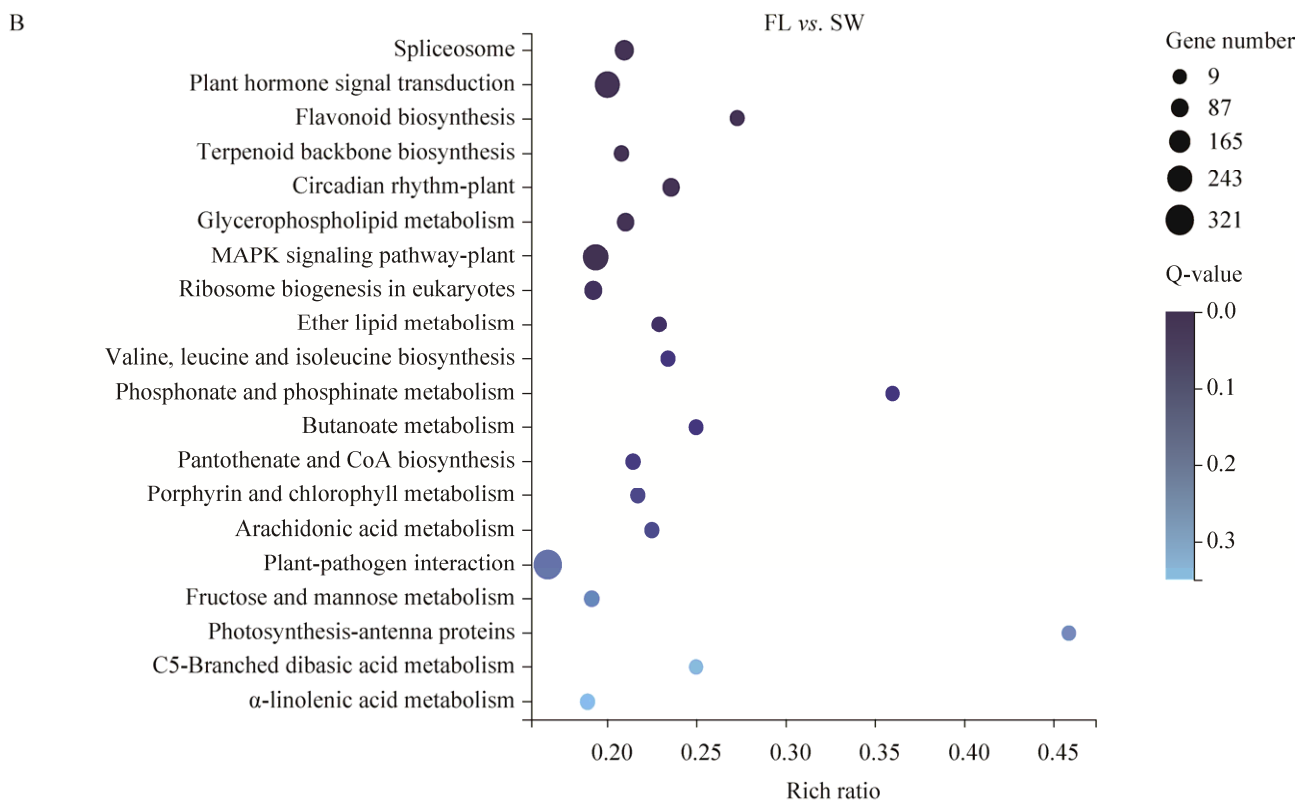
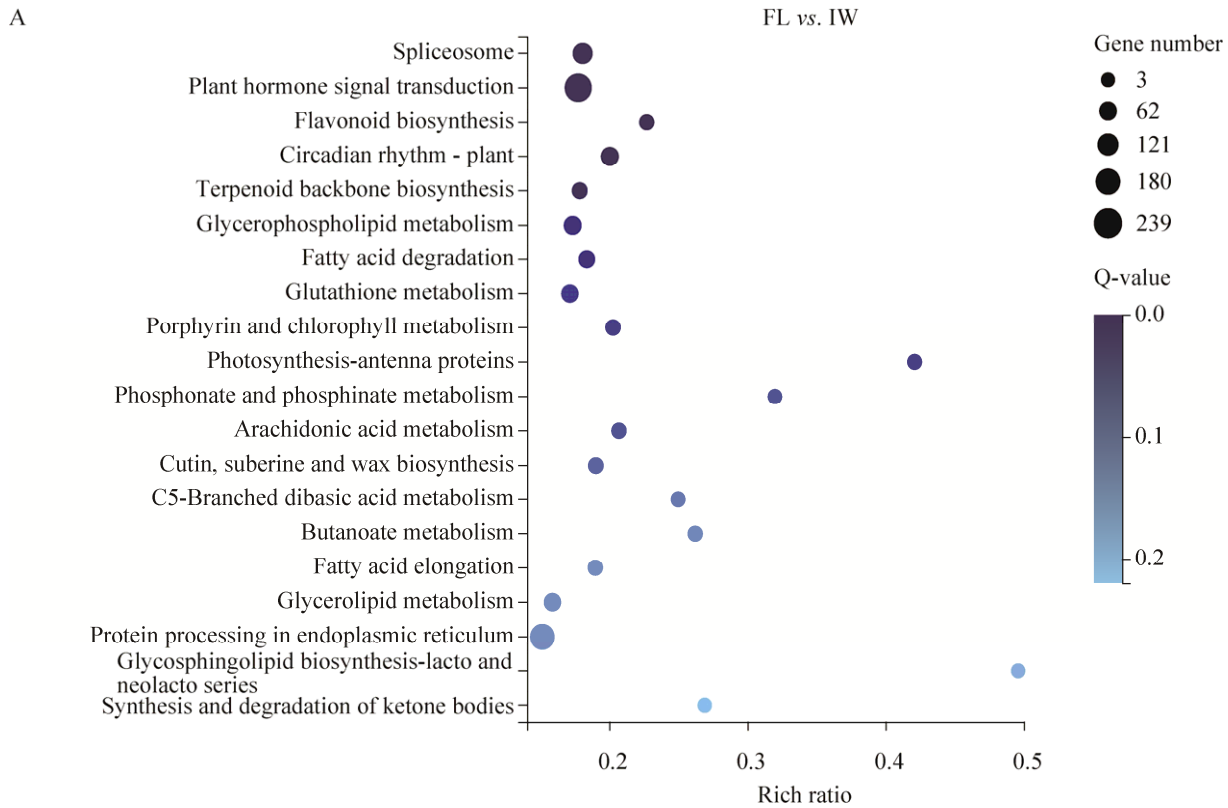
Figure 4 KEGG clustering analysis of differentially expressed genes. (A) FL vs. IW. (B) FL vs. SW. (C) IW vs. SW.

剪接体和植物激素信号转导通路在萎凋过程中可能通过间接影响次生代谢参与茶叶风味品质的形成。因此，选取这4个主要富集的KEGG代谢通路进行深入研究。

2.5 萎凋过程中茶叶风味品质形成相关基因挖掘与表达模式分析

KEGG分析发现萎凋过程中的差异表达基因主要富集于类黄酮合成、萜类化合物合成、植物激素信号转导及剪接体通路。其中，类黄酮合成通路中鉴定出的差异表达基因包括儿茶素合成基因 *C4H* (cinnamate 4-hydroxylase)、*CHI* (chalcone isomerase)、*F3H* (flavanone 3-hydroxylase)、*ANS* (anthocyanidin synthase)和 *LAR* (leucoanthocyanidin reductase)，黄烷醇合

成基因 *FLS* (flavonol synthase)以及木质素合成基因 *HCT* (hydroxycinnamoyltransferase)。而萜类化合物合成通路中共鉴定出11个上游差异表达基因和6个下游差异表达基因。其中上游基因可以细分为MEP (methylerythritol phosphate)分支基因和MVA (mevalonate)分支基因。MEP分支基因包括 *DXS* (1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase)、*CMK* (4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase)及 *HDS* (4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl-diphosphate synthase)，而MVA分支基因包括 *AACT* (acetyl-CoA C-acetyltransferase)、*HMGS* (hydroxymethylglutaryl-CoA synthase)和 *HMGR* (hydroxymethylglutaryl-CoA reductase)。萜类化合物合成中的下游差异表达基因则包括



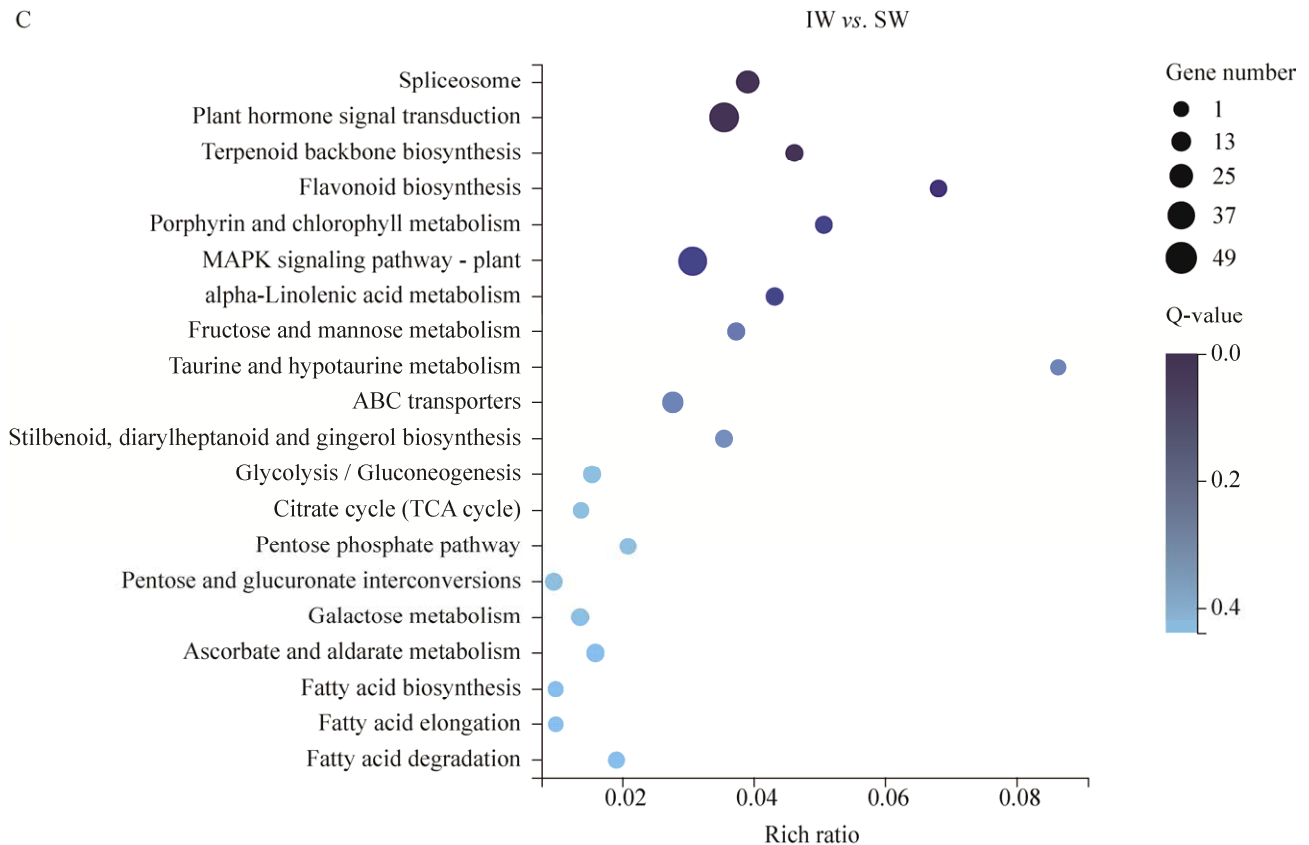


图 5 差异表达基因的 KEGG 富集分析

Figure 5 KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes. (A) FL vs. IW. (B) FL vs. SW. (C) IW vs. SW.

GGPPS (*geranylgeranyl diphosphate synthase*) 和 *TPS* (*terpene synthase*)。植物激素信号转导通路中的差异表达基因包括茉莉酸信号转导基因 *JAR* (*jasmonic acid-amino synthetase*)、*COII* (*coronatine-insensitive 1*)、*JAZ* (*jasmonate ZIM domain*)和 *MYC2* (*myelocytomatosis2*)，生长素信号转导基因 *GH3* (*gretchen hagen3*) 和 *SAUR* (*small auxin-up RNA*)，脱落酸信号转导基因 *PYL* (*pyrabactin resistance-like*)，油菜素内酯信号转导基因 *BRI1* (*brassinosteroid insensitive 1*)，与水杨酸信号转导基因 *TGA* (*transcription factor TGA*)。而剪接体通路中的差异表达基因涉及 *Prp5* (*pre-mRNA-splicing factor 5*)、*Prp22* (*pre-mRNA-splicing factor 22*)、*Sm* (*spliceosomal*

Sm protein) 和 *SR* (*serine/arginine-rich protein*)。随后，对上述基因的表达模式进行了分析。结果表明 (图 6)，儿茶素合成相关基因的表达水平受到萎凋处理的显著抑制，且日光萎凋处理后相关基因的表达水平最低。黄烷醇和木质素合成相关基因在鲜叶中呈现最低的转录水平，而在日光萎凋处理后出现了大幅度升高。在植物激素信号转导通路中，茉莉酸信号转导基因 *JAR*、*COII* 和 *MYC2* 的表达水平受到萎凋处理的显著诱导，而茉莉酸信号转导基因 *JAZ* 的表达则受到萎凋处理的显著抑制。在其他植物激素信号转导通路中，除油菜素内酯信号转导基因 *BRI1* 在萎凋叶中呈现低表达水平，脱落酸信号转导基因 *PYL*、水杨酸信号转导基因 *TGA* 与

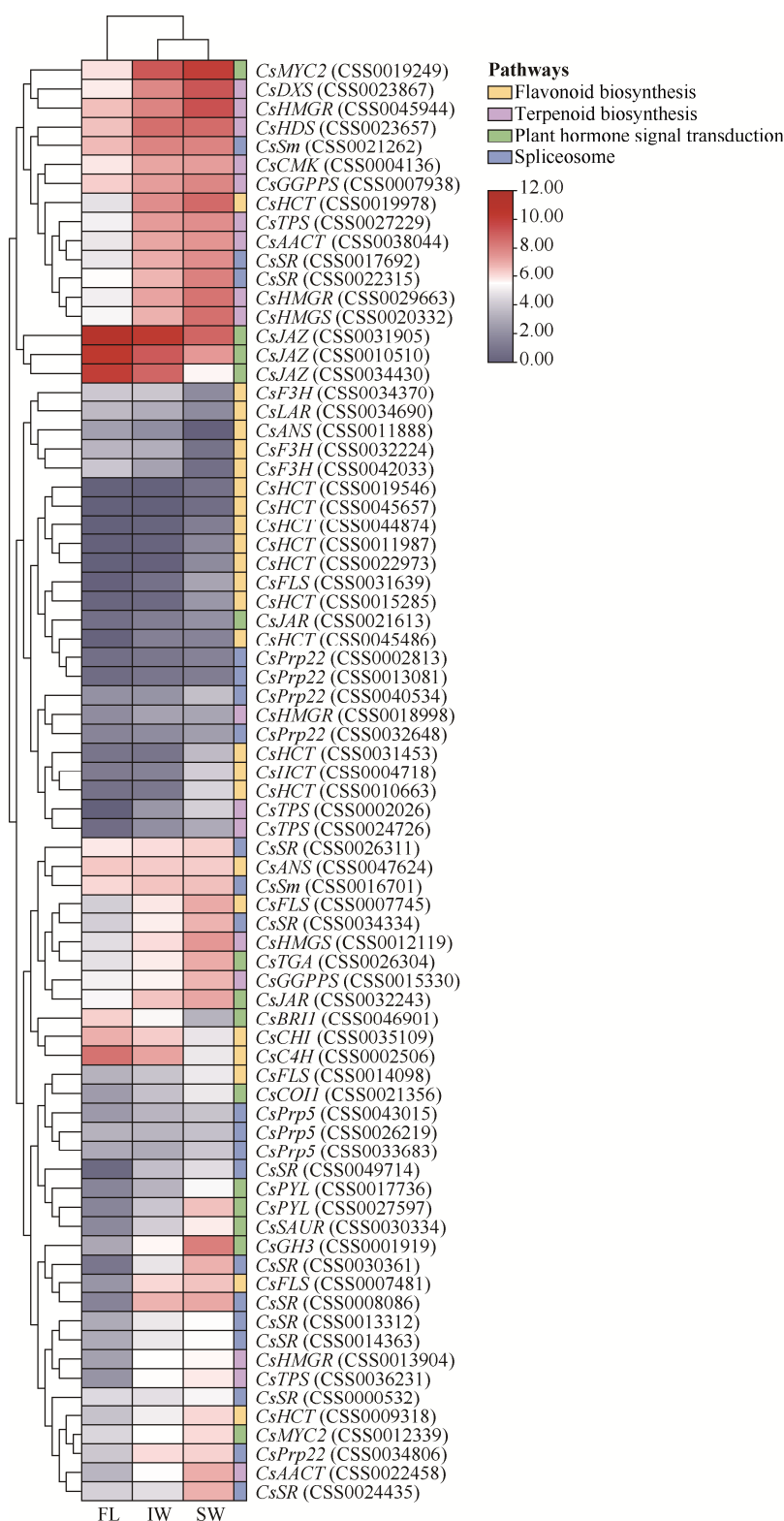


图 6 KEGG 主要富集通路相关差异表达基因的表达谱分析

Figure 6 Expression profiles of differentially expressed genes related to main KEGG enrichment pathways.

生长素信号转导基因 *GH3* 和 *SAUR* 的表达水平都在萎凋处理后呈现上升趋势。在萜类化合物合成通路中相关基因都在萎凋叶中出现高表达, 其中在日光萎凋叶中的转录丰度最高。相似地, 剪接体通路中鉴定出的差异表达基因均在日光萎凋叶中呈现最高表达水平, 在鲜叶中的表达水平最低。上述结果表明, 萎凋处理不仅直接影响相关风味代谢物合成通路中关键基因的表达水平, 还可能参与调节可变剪接事件, 使相关风味物质代谢中结构基因形成不同的转录本, 间接影响相关基因的表达水平, 进而影响茶叶风味的形成。

2.6 萎凋过程中可变剪接事件分析

上述 KEGG 分析发现剪接体通路为主要的富集通路之一, 且剪接体通路中核心基因 *Prp5*、*Prp22*、*Sm* 和 *SR* 的表达水平在不同萎凋处理后存在显著差异。有研究表明, 可变剪接是转录后调控基因表达的重要手段, 通过产生特异的可变剪接体, 可在植物应对逆境胁迫中发挥重要作用^[39]。因此, 对茶叶萎凋过程中的可变剪接事件进行了深入分析。从所有样本的 11 696 个基因中共鉴定出 31 872 个可变剪接事件 (表 3)。在室内萎凋叶和日光萎凋叶中鉴定出的可变剪接事件数分别为 10 334 和 11 446, 均多于鲜叶中发现的可变剪接事件数 (10 092), 表明萎凋处理促进了可变剪接事件数量的增加。进一步分析可变剪接类型, 发现在 3 个样本中最主要的可变剪接事件类型均为内含子滞

留 (retained intron, RI), 这与在玉米^[40]和棉花^[41]中鉴定的主要可变剪接事件类型一致。相较于鲜叶, RI 类型可变剪接事件在室内萎凋叶和日光萎凋叶中的数量出现了显著增加, 表明萎凋处理特别是日光萎凋处理显著提高了 RI 类型可变剪接事件的发生频次。

基于可变剪接基因的相对转录丰度 (FPKM), 对 FL vs. IW、FL vs. SW 和 IW vs. SW 三组比较中的差异剪接基因进行了分析鉴定 (表 4)。在 FL vs. IW 和 FL vs. SW 中鉴定出的差异剪接基因数分别为 303 和 590, 均多于 IW vs. SW 中发现的差异剪接基因数 (248), 表明萎凋处理显著诱导了大量差异剪接基因的产生。对所有差异剪接基因的可变剪接类型分析发现, 差异剪接基因中发生 RI 型可变剪接的基因数量最多, 这与鲜叶、室内萎凋叶和日光萎凋叶中的最主要可变剪接类型鉴定结果一致, 表明日光萎凋不仅会影响可变剪接数量的变化, 而且影响可变剪接转录本的表达水平, 产生大量的差异剪接基因。为进一步明确差异剪接基因在茶叶萎凋过程中行使的生物学功能, 对 FL vs. IW、FL vs. SW 和 IW vs. SW 三组比较中差异剪接基因进行 KEGG 富集分析, 结果显示 (图 7), FL vs. IW 中富集排名前五的通路分别为类黄酮合成、植物激素信号转导、果糖和甘露糖代谢、氨基酸合成及苯丙氨酸, 酪氨酸和色氨酸代谢通路。而类黄酮合成和植物激素信号转导通路在 FL vs. SW 和 IW vs. SW 这两组比较中也均属于富集排名前五的通路, 而萎凋过程中差异表达基

表 3 可变剪接事件统计

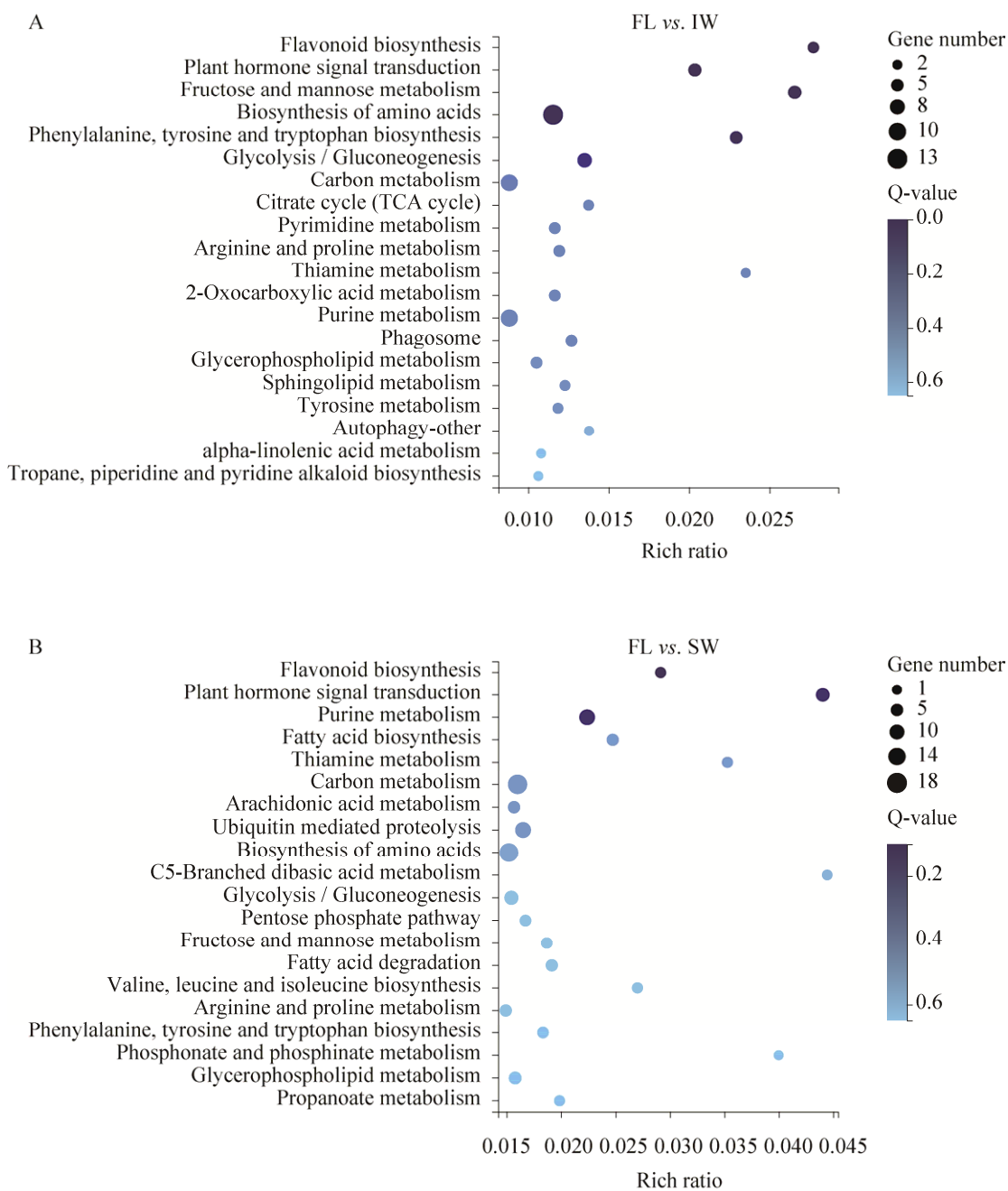
Table 3 Statistics of alternative splicing events

Samples	Alternative 5' splice site	Alternative 3' splice site	Mutually exclusive exon	Retained intron	Skipped exon	Total
FL	818	1 469	347	6 047	1 411	10 092
IW	797	1 404	403	6 387	1 343	10 334
SW	856	1 501	449	7 159	1 481	11 446

表 4 差异剪接基因统计

Table 4 Statistics of differential splicing genes

Pairwise comparison	Alternative 5' splice site	Alternative 3' splice site	Mutually exclusive exon	Retained intron	Skipped exon	Total
FL vs. IW	40	47	13	138	65	303
FL vs. SW	79	102	40	199	170	590
IW vs. SW	23	42	22	93	68	248



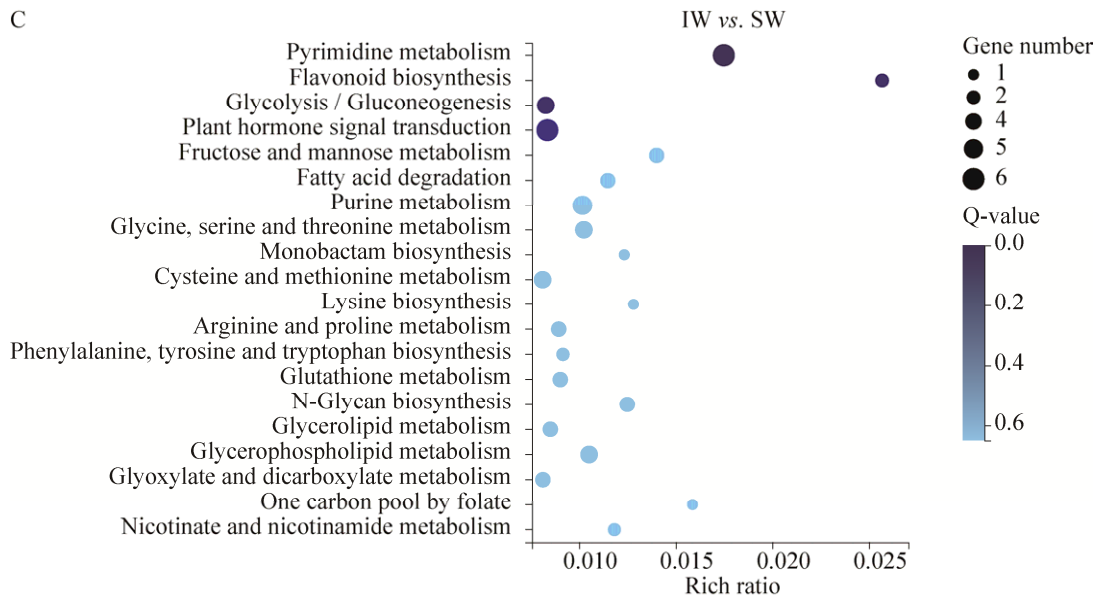


图 7 差异剪接基因的 KEGG 富集分析

Figure 7 KEGG enrichment analysis of differential splicing genes. (A) FL vs. IW. (B) FL vs. SW. (C) IW vs. SW.

因也主要活跃于上述两条通路。因此，在茶叶萎凋过程中，类黄酮合成和植物激素信号转导通路中相关结构基因的表达变化可能受到可变剪接调控机制的影响。

为了更好地理解可变剪接在茶叶萎凋过程中的调控机制，对类黄酮合成和植物激素信号转导通路中鉴定出的差异剪接基因进行了进一步分析(图 8A)。在类黄酮合成通路中，2 个差异剪接基因 *FLS* 各产生了 5 个可变剪接体。其中，2 个全长转录本 *CsFLS1* 和 *CsFLS2* 分别编码 313 个和 422 个氨基酸，同时含有 1 个完整的黄烷醇合成结构域。而植物激素信号转导基因 *CsPIF* (*phytochrome interacting factor*) 和 *CsGID1* (*gibberellin-insensitive dwarf 1*) 也存在多个差异剪接体。4 个 *CsFLS* 可变剪接转录本 (*CsFLS1-a*、*CsFLS1-b*、*CsFLS1-c* 和 *CsFLS2-d*) 和 1 个 *CsGID1* 可变剪接转录本 (*CsGID1-a*) 结构中都发现存在一个提前终止密码子 (PTC)，它在基因结构层面的显著变化可能会影

响编码蛋白正常生物学功能的实现。此外，其他非 PTC 型剪接转录本 (*CsFLS1-d*、*CsFLS2-a*、*CsFLS2-b*、*CsFLS2-c*、*CsPIF-a* 和 *CsPIF-b*) 存在内含子滞留或 5'/3' 段可变剪接，可能会导致获得或失去部分保守结构域，也可能引起可变剪接转录本产生功能分化。

随后，基于转录组检测的 FPKM 值，分析了上述可变剪接转录本在茶叶萎凋过程中的表达模式(图 8B)。类黄酮合成通路中的全长转录本 *CsFLS1* 在鲜叶中呈现最低的转录水平，而萎凋处理后 *CsFLS1* 的转录水平则出现了大幅度升高。*CsFLS1* 对应的 4 个可变剪接转录本 (*CsFLS1-a*、*CsFLS1-b*、*CsFLS1-c* 和 *CsFLS1-d*) 也遵循类似的表达模式。而 *CsFLS2* 的 4 个可变剪接转录本与全长转录本却呈现截然相反的表达水平，表明不同转录本之间在茶叶萎凋过程中可能存在潜在的功能差异。植物激素信号转导基因 *CsGID1* 和 *CsPIF* 及其对应的可变剪接转录本 (*CsGID1-a* 和 *CsPIF-a*) 的表达则受到

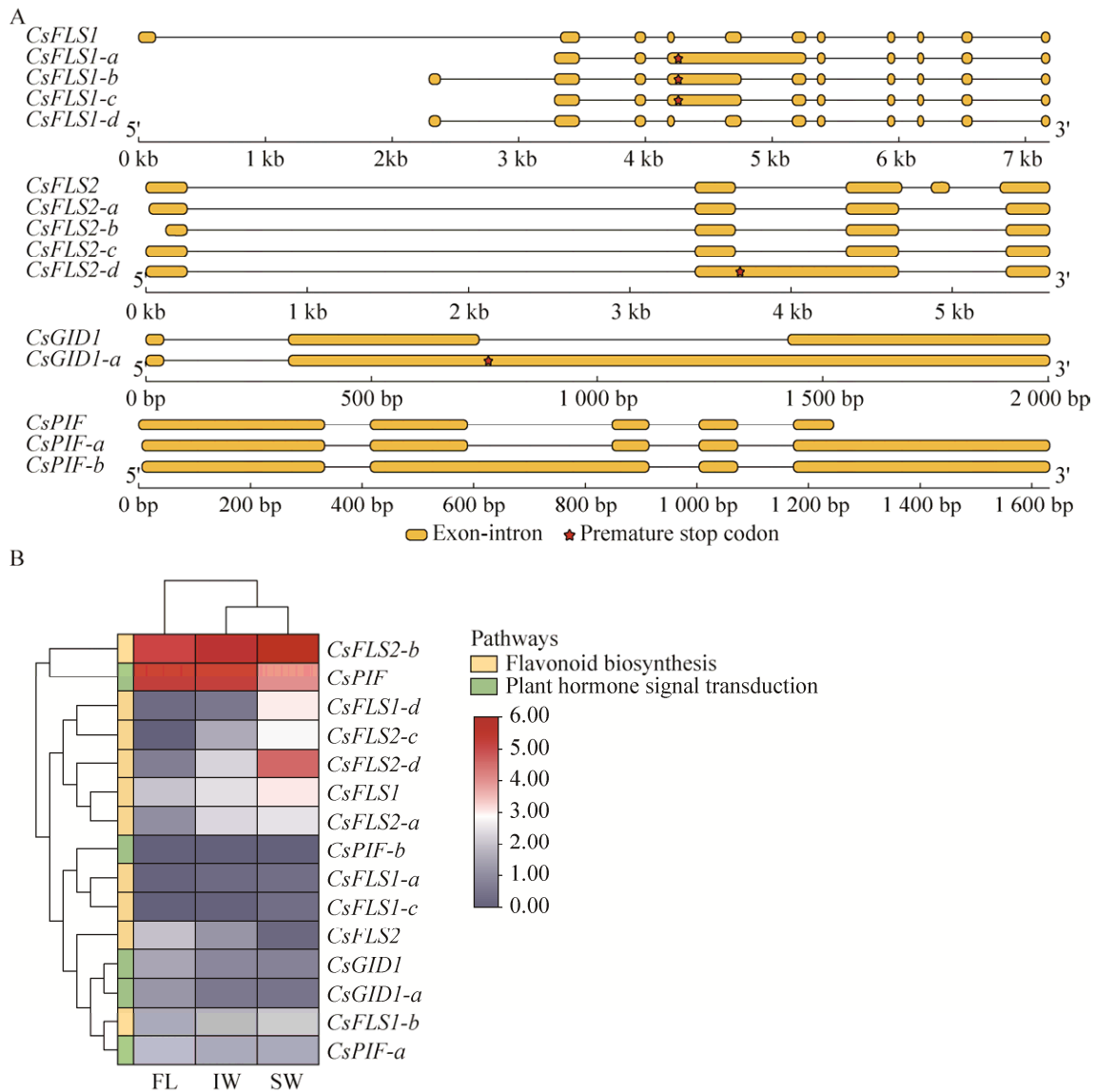


图 8 差异剪接基因的可变剪接转录本分析

Figure 8 Structural analysis (A) and expression profiles (B) of alternatively spliced isoforms of differential splicing genes.

萎凋处理的显著抑制,在室内萎凋叶中的表达水平最低。此外,PTC型剪接转录本在茶叶萎凋过程中的表达模式与其对应的全长转录本基本一致,但在各个样品中均呈现较低的表达水平。此外,*CsPIF-b*转录本,在鲜叶、室内萎凋叶和日光萎凋叶中均不表达,可能与内含子滞留引起的*CsPIF-b*基因结构发生显著改变

有关。

为进一步探究差异剪接转录本在类黄酮合成和植物激素信号转导通路中的具体作用,对差异剪接转录本的转录丰度和相关代谢物(总类黄酮和儿茶素)及植物激素(GA)含量之间的相关性进行了关联分析(表5)。全长转录本*CsFLS1*和其对应的4个可变剪接转录本

(*CsFLS1-a*、*CsFLS1-b*、*CsFLS1-c* 和 *CsFLS1-d*) 与类黄酮和儿茶素的含量呈负相关关系。而另一个全长转录本 *CsFLS2* 与类黄酮和儿茶素的含量存在正相关, 而其对应的 4 个可变剪接转录本 (*CsFLS2-a*、*CsFLS2-b*、*CsFLS2-c* 和 *CsFLS2-d*) 与类黄酮和儿茶素的含量呈负相关关系。在植物激素信号转导通路中, *CsGID1* 和 *CsPIF* 及其对应的可变剪接转录本 *CsGID1-a* 和 *CsPIF-a* 的转录水平与 GA 含量的变化趋势一致。此外, 我们还发现 PTC 型剪接转录本与代谢物或植物激素含量的相关性要弱于其对应的全长转录本, 推测可能与 PTC 型剪接转录本的基因结构不完整有关。

2.7 萎凋过程中差异表达基因和差异剪接基因的 qRT-PCR 分析

选择 KEGG 主要富集通路中的 12 个差异表达基因及类黄酮合成和植物激素信号转导通路中鉴定出的相关差异剪接基因进行 qRT-PCR 分析。结果显示 (图 9), 相关差异表达基因和差异剪接基因在茶叶萎凋过程中的表达模式与转录组数据集中的结果一致, 这证实了高通量测序数据及后续分析的可靠性与合理性。

3 讨论

3.1 日光萎凋叶中类黄酮合成基因的转录抑制与类黄酮含量的减少密切相关

萎凋是促进乌龙茶风味品质形成的第一道工序, 大量风味品质相关代谢物的含量在萎凋前后产生了显著变化^[3,14]。而在转录水平层面, 相关代谢途径中结构基因在乌龙茶萎凋过程中影响风味品质形成的分子机制尚不清楚。本研究通过对鲜叶、室内萎凋叶和日光萎凋叶进行转录组测序, 发现类黄酮合成通路是差异表达基因主要富集的通路之一。其中, *C4H* 负责催化香豆

酸及其衍生物, 为后续合成类黄酮代谢物提供前体物质^[42-43]。有研究表明, *C4H* 的转录水平与类黄酮和儿茶素的含量积累呈正相关^[44]。因此, 日光萎凋叶中低表达的 *C4H*, 可能会减少用于后续类黄酮合成的底物含量, 进而影响下游类黄酮和儿茶素的积累水平。有报道显示, 葡萄中 *CHI* 的上调促进了类黄酮的积累^[45]。而萎凋处理显著抑制了 *CHI* 的正常表达, 可能使萎凋叶中的类黄酮和儿茶素的合成受阻, 这与 Wang 等^[3]在萎凋处理后发现 *CHI* 的转录水平和儿茶素含量呈现下降的现象一致。此外, 类黄酮合成下游基因 *F3H*、*ANS* 和 *LAR* 的转录丰度也被证实与类黄酮和儿茶素的含量呈正相关^[12,46]。相较于鲜叶和室内萎凋叶, 日光萎凋叶中更低表达的 *F3H*、*ANS* 和 *LAR* 可能进一步限制了类黄酮合成代谢流进入儿茶素分支的合成方向。

表 5 差异剪接转录本、风味代谢物和植物激素的相关性分析

Table 5 Correlation analysis of alternatively spliced isoforms, flavor metabolites and phytohormones

Isoforms	Flavonoids	Catechins	GA
<i>CsFLS1</i>	-0.880**	-0.813**	-0.618
<i>CsFLS1-a</i>	-0.505	-0.521	-0.504
<i>CsFLS1-b</i>	-0.598	-0.630	-0.642
<i>CsFLS1-c</i>	-0.620	-0.638	-0.669
<i>CsFLS1-d</i>	-0.776*	-0.774*	-0.655
<i>CsFLS2</i>	0.377	0.445	0.360
<i>CsFLS2-a</i>	-0.742*	-0.755*	-0.627
<i>CsFLS2-b</i>	-0.792*	-0.723*	-0.638
<i>CsFLS2-c</i>	-0.805**	-0.822**	-0.805**
<i>CsFLS2-d</i>	-0.520	-0.540	-0.561
<i>CsGID1</i>	-0.515	-0.594	-0.716*
<i>CsGID1-a</i>	-0.563	-0.547	-0.662
<i>CsPIF</i>	0.570	0.544	0.750*
<i>CsPIF-a</i>	0.556	0.536	0.717*

Note: * indicates a significant correlation ($P < 0.05$); ** indicates a highly significant correlation ($P < 0.01$).

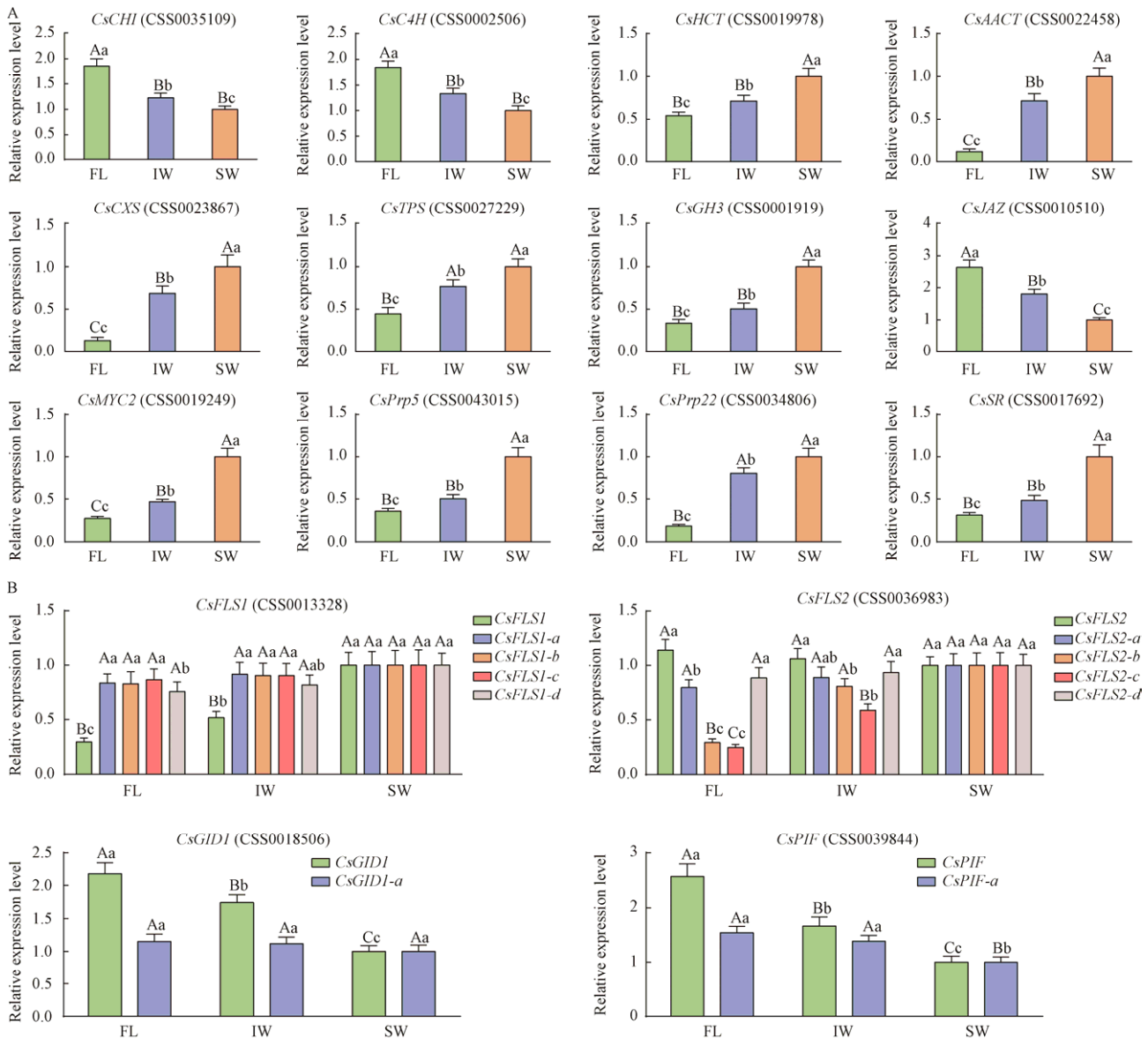


图9 萎凋过程中差异表达基因和差异剪接基因的表达模式分析

Figure 9 Expression analysis of differentially expressed genes (A) and differential splicing genes (B). Lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$); uppercase letters indicate highly significant differences ($P < 0.01$).

在日光萎凋叶中表达大幅升高的 *FLS*, 主要承担将二氢黄酮醇转化为黄酮醇的功能, 与 *ANS* 和 *LAR* 等儿茶素合成基因共同竞争同一前体物质二氢黄酮醇。有研究表明 *FLS* 的表达与儿茶素的积累呈负相关^[47]。因此, 室内萎凋叶中低表达的 *FLS* 可能对儿茶素的生物合成影响

较小, 而在日光萎凋叶中高表达的 *FLS* 则会显著抑制儿茶素的积累。而另一个在萎凋处理后出现上调表达的 *HCT*, 隶属于木质素合成途径。与类黄酮合成途径相似, 均位于苯丙烷代谢途径的下游。在拟南芥中, 木质素合成和类黄酮合成共同竞争苯丙烷代谢产生的同一前体物

质^[48]。Vanholme 等^[49]发现 *HCT* 的表达水平直接影响木质素在植物体内的积累。而本研究中发现,日光萎凋处理显著诱导了 *HCT* 的表达。高表达的 *HCT* 可能会抑制代谢流进入类黄酮合成分支,从而降低日光萎凋叶中类黄酮合成前体物质的丰度,减少类黄酮的积累量。而在之前的研究中也发现,日光萎凋处理后类黄酮和儿茶素的积累量均出现了显著下降^[1,37]。因此,我们推测日光萎凋处理后,类黄酮和儿茶素合成基因 *C4H*、*CHI*、*F3H*、*ANS* 和 *LAR* 的转录抑制及 *FLS* 和木质素合成基因 *HCT* 的转录激活,共同抑制了代谢流进入类黄酮和儿茶素合成分支,从而减少了日光萎凋叶中类黄酮和儿茶素的积累水平,上述结论仍需后续进一步的实验验证。此外,类黄酮和儿茶素还是评价乌龙茶滋味品质的关键代谢物。低含量的类黄酮和儿茶素有助于降低茶叶的苦涩味,适度提高茶汤的适口性^[50]。因此,日光萎凋比室内萎凋更有利于制作出滋味醇厚的乌龙茶。

3.2 日光萎凋叶中萜类化合物合成基因的转录增强促进了萜类化合物的积累

萜类化合物是茶叶中的主要香味物质,其含量的高低直接影响茶叶香气品质的形成^[51]。本研究中,萜类化合物合成也是主要的 KEGG 富集通路之一。在 MVA 分支中,以乙酰辅酶 A 为起始底物。而 MEP 的代谢底物为丙酮酸和甘油醛-3-磷酸。但这两条分支途径的最终产物均为异戊烯二磷酸 (isopentene diphosphate, IPP)。同时有报道显示,IPP 的生物合成量将直接调节下游萜类化合物的积累量^[52]。因此,高表达的 MEP 分支基因和 MVA 分支基因,有利于促进日光萎凋叶中积累更多的前体 IPP,并增强下游萜类化合物的合成代谢通量。而位于下游的 *GGPPS* 和 *TPS* 也是参与合成萜类化合物的关键基因。有报道显示,当植物遭受逆境胁迫

后,萜类化合物合成下游相关基因的表达水平均出现了上升,同时萜类化合物的含量也大幅度增加^[53-54]。在日光萎凋下,萎凋叶受到干旱、高温和紫外线等多种胁迫的协同影响,而室内萎凋叶则只受到干旱胁迫的影响。因此,日光萎凋叶相较于室内萎凋叶,在相同萎凋时间内受到逆境胁迫影响的程度更深。Zhao 等^[55]发现萜类化合物还是植物遭受环境胁迫影响后产生的通讯信号,提示附近尚未受到影响的植物立即启动防御系统,减轻逆境胁迫带来的负面影响。因此,胁迫程度更深的日光萎凋处理快速激活了萜类化合物合成下游基因 *GGPPS* 和 *TPS* 的表达水平,将上游大量积累的 IPP,迅速转化为具有逆境警示信号作用的萜类化合物,以缓解环境胁迫造成的不利影响,也从侧面进一步促进了日光萎凋叶中萜类化合物含量的显著上升,而在最新的报道中发现,日光萎凋处理后萜类化合物含量的大幅度增加也验证了我们上述的观点^[1,37]。因此,萜类化合物合成基因的转录激活可能是日光萎凋叶相较于室内萎凋叶具有更高含量萜类化合物的关键所在,而日光萎凋叶中高含量的萜类化合物又有利于促进高品质花果香的形成,这就解释了在乌龙茶萎凋过程中,日光萎凋比室内萎凋更易生产出高品质香气的乌龙茶。

3.3 茉莉酸信号转导和可变剪接机制可能参与了乌龙茶萎凋过程中风味品质的形成

在植物界中,植物激素是参与胁迫响应的重要调节因子^[56-57]。植物激素生物学功能的实现,不仅与植物激素的合成有关,而且与下游的植物激素信号转导也密切相关。植物激素信号转导通路在整合和协调上游分子信号,诱导和激活下游转录因子方面也扮演着重要的角色^[58-59]。本研究中,我们也发现差异表达基因也主要富集于植物激素信号转导通路。其中,茉莉酸信

号转导中共有 4 个基因 *JAR*、*COII*、*JAZ* 和 *MYC2* 在 3 组样品中的表达水平存在显著差异。有报道显示,茉莉酸可以作为激活剂,通过促进挥发性萜烯类化合物的合成来改善植物的香气^[60-63]。此外,在逆境胁迫影响下,植物体内茉莉酸的积累水平会迅速升高^[64]。而萎凋处理后,萎凋叶相对于鲜叶,茉莉酸的积累量出现显著上升^[8]。而高含量的茉莉酸还需要通过植物激素信号转导途径,才能激活下游挥发性萜烯类化合物的合成通路,促进萜烯类化合物的积累。在日光萎凋叶中上调表达的 *JAR* 和 *COII*,有利于将激素信号继续向下游传递。而位于 *COII* 下游的 *JAZ*,主要负责阻碍 *MYC2* 的正常转录。在低含量茉莉酸时,*JAZ* 阻碍茉莉酸信号的转导,是茉莉酸信号转导通路的负调控因子^[65]。而在胁迫程度更深的日光萎凋处理后,高表达的 *JAR* 和 *COII* 可通过传递上游的茉莉酸信号,启动 SCF^{COII} 泛素连接酶复合体进行 *JAZ* 的识别捕获,再将捕获后的 *JAZ* 通过泛素-26S 蛋白酶体途径进行降解,从而抑制了日光萎凋叶中 *JAZ* 的正常表达。随后,*JAZ* 对下游 *MYC2* 的抑制作用被解除,促进了 *MYC2* 转录水平的大幅度上升。有报道发现,过表达 *MYC2* 会增强 *TPS* 的转录水平,促进萜类化合物含量升高^[66]。这些结果表明,日光萎凋处理可能通过激活茉莉酸信号转导途径的 *JAR-COII-JAZ-MYC2* 级联调控模式,进而促进了日光萎凋叶中萜类化合物的大量积累,为后续高香型品质的形成奠定了物质基础。而上述级联调控模式与萜类化合物含量变化的具体关系,我们将在后续实验中进一步验证。

可变剪接被认为是一种选择性的表达调控机制,在植物应对生物和非生物胁迫的反应中起着重要作用^[67]。在茶树中,已有研究发现逆境胁迫会诱导大量可变剪接事件的发生^[26,68]。

与之前的研究一致,在类似逆境胁迫的萎凋处理后,日光萎凋叶和室内萎凋叶中鉴定出的可变剪接事件数量相较于鲜叶均出现了大幅度增加。同时,剪接体通路组成基因 *Prp5*、*Prp22*、*Sm* 和 *SR* 的转录水平在萎凋处理后均出现了显著上升,在日光萎凋叶中的表达量到达最高值。有研究表明,剪接体通路中核心基因转录丰度的提高有利于加快可变剪接的加工效率,从而产生更多的可变剪接基因^[69-71]。因此,我们推测日光萎凋处理后上调表达的 *Prp5*、*Prp22*、*Sm* 和 *SR* 可能是日光萎凋叶中可变剪接基因数量多于鲜叶和室内萎凋叶的原因。随后,对差异剪接基因进行 KEGG 富集分析发现,类黄酮合成和植物激素信号转导是萎凋过程中最为富集的两条通路。进一步分析两条通路中 4 个差异剪接基因的不同转录本发现,PTC 型剪接转录本在萎凋过程中的表达模式与其对应的全长转录本基本一致,但在各个样品中均呈现较低的表达水平,可能与 PTC 引起的基因关键保守结构域不完整或无义介导的 mRNA 降解机制^[72]有关,使发生可变剪接之后的转录本失去原有生物学功能。此外,可变剪接转录本 *CsFLS2-a*、*CsFLS2-b* 及 *CsFLS2-c* 与对应全长转录本 *CsFLS2* 在 3 个样品中呈现截然相反的表达水平。同时,*CsFLS2* 在 3 个样品中表达水平无显著变化,而 3 个可变剪接转录本在萎凋处理后表达水平显著升高,暗示这 3 个可变剪接转录本可能在乌龙茶萎凋过程中替代全长转录本发挥主要调控作用,而这一现象在拟南芥生物钟相关基因的研究中也有发现^[73]。因此,日光萎凋处理后高表达的可变剪接转录本 *CsFLS2-a*、*CsFLS2-b* 和 *CsFLS2-c* 可能减少了进入儿茶素合成分支的代谢通量,进而减少了日光萎凋叶中儿茶素的积累量。后续将展开对特定转录本的功能验证,进一步探究萎凋处理后可变剪接

机制与儿茶素合成之间的调控关系。

本研究通过对鲜叶、室内萎凋叶和日光萎凋叶进行转录组测序分析,发现日光萎凋处理后类黄酮合成基因的转录抑制和萜类化合物合成基因的转录增强,可能是促进了日光萎凋叶中苦涩类物质类黄酮含量减少与花果香物质萜类化合物含量上升的主要原因。同时,茉莉酸信号转导和可变剪接机制可能也共同参与了日光萎凋叶中高花果香和低苦涩味的风味品质形成。综上所述,本研究揭示了日光萎凋处理在乌龙茶优异风味品质形成的重要性,以及转录调控和可变剪接在风味代谢相关途径中的具体作用机制。

REFERENCES

- [1] Chen S, Liu H, Zhao X, et al. Non-targeted metabolomics analysis reveals dynamic changes of volatile and non-volatile metabolites during oolong tea manufacture. *Food Res Int*, 2020, 128: 108778.
- [2] Zeng L, Watanabe N, Yang Z. Understanding the biosyntheses and stress response mechanisms of aroma compounds in tea (*Camellia sinensis*) to safely and effectively improve tea aroma. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2019, 59(14): 2321-2334.
- [3] Wang Y, Zheng PC, Liu PP, et al. Novel insight into the role of withering process in characteristic flavor formation of teas using transcriptome analysis and metabolite profiling. *Food Chem*, 2019, 272: 313-322.
- [4] Bartwal A, Mall R, Lohani P, et al. Role of secondary metabolites and brassinosteroids in plant defense against environmental stresses. *J Plant Growth Regul*, 2013, 32(1): 216-232.
- [5] Zeng LT, Zhou XC, Su XG, et al. Chinese oolong tea: an aromatic beverage produced under multiple stresses. *Trends Food Sci Technol*, 2020, 106: 242-253.
- [6] Balentine DA, Wiseman SA, Bouwens LC. The chemistry of tea flavonoids. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1997, 37(8): 693-704.
- [7] Yang ZY, Baldermann S, Watanabe N. Recent studies of the volatile compounds in tea. *Food Res Int*, 2013, 53(2): 585-599.
- [8] Xu P, Su H, Zhao S, et al. Transcriptome and phytochemical analysis reveals the alteration of plant hormones, characteristic metabolites, and related gene expression in tea (*Camellia sinensis* L.) leaves during withering. *Plants*, 2020, 9(2): 204.
- [9] Zhu C, Zhang S, Zhou C, et al. Integrated transcriptome, microRNA, and phytochemical analyses reveal roles of phytohormone signal transduction and ABC transporters in flavor formation of oolong tea (*Camellia sinensis*) during solar withering. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(45): 12749-12767.
- [10] Li CF, Zhu Y, Yu Y, et al. Global transcriptome and gene regulation network for secondary metabolite biosynthesis of tea plant (*Camellia sinensis*). *BMC Genomics*, 2015, 16: 560.
- [11] Tai Y, Wei C, Yang H, et al. Transcriptomic and phytochemical analysis of the biosynthesis of characteristic constituents in tea (*Camellia sinensis*) compared with oil tea (*Camellia oleifera*). *BMC Plant Biol*, 2015, 15: 190.
- [12] Wang W, Xin H, Wang M, et al. Transcriptomic analysis reveals the molecular mechanisms of drought-stress-induced decreases in *Camellia sinensis* leaf quality. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 385.
- [13] Lin SY, Chen YL, Lee CL, et al. Monitoring volatile compound profiles and chemical compositions during the process of manufacturing semi-fermented oolong tea. *J Hortic Sci Biotechnol*, 2013, 88(2): 159-164.
- [14] Hu CJ, Li D, Ma YX, et al. Formation mechanism of the oolong tea characteristic aroma during bruising and withering treatment. *Food Chem*, 2018, 269: 202-211.
- [15] Zhang N, Jing T, Zhao M, et al. Untargeted metabolomics coupled with chemometrics analysis reveals potential non-volatile markers during oolong tea shaking. *Food Res Int*, 2019, 123: 125-134.
- [16] Chen Q, Shi J, Mu B, et al. Metabolomics combined with proteomics provides a novel interpretation of the changes in nonvolatile compounds during white tea processing. *Food Chem*, 2020, 332: 127412.
- [17] Wu ZJ, Li XH, Liu ZW, et al. *De novo* assembly and transcriptome characterization: novel insights into catechins biosynthesis in *Camellia sinensis*. *BMC Plant Biol*, 2014, 14: 277.
- [18] Wang WZ, Zhou YH, Wu YL, et al. Insight into catechins metabolic pathways of *Camellia sinensis* based on genome and transcriptome analysis. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(16): 4281-4293.
- [19] Xu QS, He YX, Yan XM, et al. Unraveling a crosstalk regulatory network of temporal aroma accumulation in tea plant (*Camellia sinensis*) leaves by integration of metabolomics and transcriptomics. *Environ Exp Bot*, 2018, 149: 81-94.
- [20] Xia EH, Tong W, Hou Y, et al. The reference genome

- of tea plant and resequencing of 81 diverse accessions provide insights into its genome evolution and adaptation. *Mol Plant*, 2020, 13(7): 1013-1026.
- [21] Zhang QJ, Li W, Li K, et al. The chromosome-level reference genome of tea tree unveils recent bursts of non-autonomous LTR retrotransposons in driving genome size evolution. *Mol Plant*, 2020, 13(7): 935-938.
- [22] Wang X, Feng H, Chang Y, et al. Population sequencing enhances understanding of tea plant evolution. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4447.
- [23] Zhang W, Zhang Y, Qiu H, et al. Genome assembly of wild tea tree DASZ reveals pedigree and selection history of tea varieties. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 3719.
- [24] Staiger D, Brown JWS. Alternative splicing at the intersection of biological timing, development, and stress responses. *Plant Cell*, 2013, 25(10): 3640-3656.
- [25] Reddy ASN, Marquez Y, Kalyna M, et al. Complexity of the alternative splicing landscape in plants. *Plant Cell*, 2013, 25(10): 3657-3683.
- [26] Li Y, Mi X, Zhao S, et al. Comprehensive profiling of alternative splicing landscape during cold acclimation in tea plant. *BMC Genomics*, 2020, 21(1): 65.
- [27] Keller M, Hu Y, Mesihovic A, et al. Alternative splicing in tomato pollen in response to heat stress. *DNA Res*, 2017, 24(2): 205-217.
- [28] Yuan Y, Chung JD, Fu X, et al. Alternative splicing and gene duplication differentially shaped the regulation of isochorismate synthase in *Populus* and *Arabidopsis*. *PNAS*, 2009, 106(51): 22020-22025.
- [29] Xu Q, Zhu J, Zhao S, et al. Transcriptome profiling using single-molecule direct RNA sequencing approach for in-depth understanding of genes in secondary metabolism pathways of *Camellia sinensis*. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1205.
- [30] Li RQ, Li YR, Kristiansen K, et al. SOAP: short oligonucleotide alignment program. *Bioinformatics*, 2008, 24(5): 713-714.
- [31] Kim D, Langmead B, Salzberg SL. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods*, 2015, 12(4): 357-360.
- [32] Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*, 2012, 9(4): 357-359.
- [33] Li B, Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12: 323.
- [34] Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*, 2014, 15(12): 550.
- [35] Chen C, Chen H, Zhang Y, et al. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Mol Plant*, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [36] Shen S, Park JW, Lu ZX, et al. rMATS: robust and flexible detection of differential alternative splicing from replicate RNA-Seq data. *PNAS*, 2014, 111(51): E5593-E5601.
- [37] Zhu C, Zhang S, Fu H, et al. Transcriptome and phytochemical analyses provide new insights into long non-coding RNAs modulating characteristic secondary metabolites of oolong tea (*Camellia sinensis*) in solar-withering. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 1638.
- [38] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [39] Chen MX, Zhang KL, Zhang M, et al. Alternative splicing and its regulatory role in woody plants. *Tree Physiol*, 2020, 40(11): 1475-1486.
- [40] Wang B, Tseng E, Regulski M, et al. Unveiling the complexity of the maize transcriptome by single-molecule long-read sequencing. *Nat Commun*, 2016, 7: 11708.
- [41] Wang M, Wang P, Liang F, et al. A global survey of alternative splicing in allopolyploid cotton: landscape, complexity and regulation. *New Phytol*, 2018, 217(1): 163-178.
- [42] Zhang Q, Yang WB, Liu JC, et al. Postharvest UV-C irradiation increased the flavonoids and anthocyanins accumulation, phenylpropanoid pathway gene expression, and antioxidant activity in sweet cherries (*Prunus avium* L.). *Postharvest Biol Technol*, 2021, 175: 111490.
- [43] Singh K, Kumar S, Rani A, et al. Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and cinnamate 4-hydroxylase (C4H) and catechins (flavan-3-ols) accumulation in tea. *Funct Integr Genomics*, 2009, 9(1): 125-134.
- [44] Liu M, Tian HL, Wu JH, et al. Relationship between gene expression and the accumulation of catechin during spring and autumn in tea plants (*Camellia sinensis* L.). *Hortic Res*, 2015, 2: 15011.
- [45] Wang HL, Wang W, Zhan JC, et al. Tissue-specific accumulation and subcellular localization of chalcone isomerase (CHI) in grapevine. *Plant Cell Tissue Organ Cult PCTOC*, 2019, 137(1): 125-137.
- [46] Wei CL, Yang H, Wang SB, et al. Draft genome sequence of *Camellia sinensis* var. *sinensis* provides insights into the evolution of the tea genome and tea quality. *PNAS*, 2018, 115(18): E4151-E4158.
- [47] Xiong L, Li J, Li Y, et al. Dynamic changes in catechin levels and catechin biosynthesis-related gene expression

- in albino tea plants (*Camellia sinensis* L.). *Plant Physiol Biochem*, 2013, 71: 132-143.
- [48] Besseau S, Hoffmann L, Geoffroy P, et al. Flavonoid accumulation in *Arabidopsis* repressed in lignin synthesis affects auxin transport and plant growth. *Plant Cell*, 2007, 19(1): 148-162.
- [49] Vanholme R, Demedts B, Morreel K, et al. Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiol*, 2010, 153(3): 895-905.
- [50] Lin N, Liu XY, Zhu WF, et al. Ambient ultraviolet B signal modulates tea flavor characteristics via shifting a metabolic flux in flavonoid biosynthesis. *J Agric Food Chem*, 2021, 69(11): 3401-3414.
- [51] Zhou HC, Shamala LF, Yi XK, et al. Analysis of terpene synthase family genes in *Camellia sinensis* with an emphasis on abiotic stress conditions. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 933.
- [52] Vranová E, Coman D, Gruișsem W. Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. *Annu Rev Plant Biol*, 2013, 64: 665-700.
- [53] Zhang X, Zhang Y, Wang YH, et al. Transcriptome analysis of *Cinnamomum chago*: a revelation of candidate genes for abiotic stress response and terpenoid and fatty acid biosyntheses. *Front Genet*, 2018, 9: 505.
- [54] Valifard M, Mohsenzadeh S, Kholdebarin B, et al. Effect of salt stress on terpenoid biosynthesis in *Salvia mirzayanii*: from gene to metabolite. *J Hortic Sci Biotechnol*, 2019, 94(3): 389-399.
- [55] Zhao M, Zhang N, Gao T, et al. Sesquiterpene glucosylation mediated by glucosyltransferase UGT91Q2 is involved in the modulation of cold stress tolerance in tea plants. *New Phytol*, 2020, 226(2): 362-372.
- [56] Blázquez MA, Nelson DC, Weijers D. Evolution of plant hormone response pathways. *Annu Rev Plant Biol*, 2020, 71: 327-353.
- [57] Larriue A, Vernoux T. Comparison of plant hormone signalling systems. *Essays Biochem*, 2015, 58: 165-181.
- [58] Davière JM, Achard P. A pivotal role of DELLAs in regulating multiple hormone signals. *Mol Plant*, 2016, 9(1): 10-20.
- [59] Zhou M, Memelink J. Jasmonate-responsive transcription factors regulating plant secondary metabolism. *Biotechnol Adv*, 2016, 34(4): 441-449.
- [60] Li JL, Zeng LT, Liao YY, et al. Influence of chloroplast defects on formation of jasmonic acid and characteristic aroma compounds in tea (*Camellia sinensis*) leaves exposed to postharvest stresses. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(5): E1044.
- [61] Yu Y, Lyu SH, Chen D, et al. Volatiles emitted at different flowering stages of *Jasminum sambac* and expression of genes related to α -farnesene biosynthesis. *Molecules*, 2017, 22(4): E546.
- [62] Zeng L, Zhou Y, Fu X, et al. Biosynthesis of jasmine lactone in tea (*Camellia sinensis*) leaves and its formation in response to multiple stresses. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(15): 3899-3909.
- [63] Shi J, Xie D, Qi D, et al. Methyl jasmonate-induced changes of flavor profiles during the processing of green, oolong, and black tea. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 781.
- [64] Howe GA, Major IT, Koo AJ. Modularity in jasmonate signaling for multistress resilience. *Annu Rev Plant Biol*, 2018, 69: 387-415.
- [65] Zhang F, Yao J, Ke J, et al. Structural basis of JAZ repression of MYC transcription factors in jasmonate signalling. *Nature*, 2015, 525(7568): 269-273.
- [66] Hong GJ, Xue XY, Mao YB, et al. *Arabidopsis* MYC2 interacts with DELLA proteins in regulating sesquiterpene synthase gene expression. *Plant Cell*, 2012, 24(6): 2635-2648.
- [67] Cui P, Xiong LM. Environmental stress and pre-mRNA splicing. *Mol Plant*, 2015, 8(9): 1302-1303.
- [68] Ding YQ, Wang Y, Qiu C, et al. Alternative splicing in tea plants was extensively triggered by drought, heat and their combined stresses. *PeerJ*, 2020, 8: e8258.
- [69] Linder P, Owttrim GW. Plant RNA helicases: linking aberrant and silencing RNA. *Trends Plant Sci*, 2009, 14(6): 344-352.
- [70] Tanabe N, Yoshimura K, Kimura A, et al. Differential expression of alternatively spliced mRNAs of *Arabidopsis* SR protein homologs, atSR30 and atSR45a, in response to environmental stress. *Plant Cell Physiol*, 2007, 48(7): 1036-1049.
- [71] Gahura O, Abrahámová K, Skruzny M, et al. Prp45 affects Prp22 partition in spliceosomal complexes and splicing efficiency of non-consensus substrates. *J Cell Biochem*, 2009, 106(1): 139-151.
- [72] Filichkin SA, Cumbie JS, Dharmawardhana P, et al. Environmental stresses modulate abundance and timing of alternatively spliced circadian transcripts in *Arabidopsis*. *Mol Plant*, 2015, 8(2): 207-227.
- [73] Más P, Kim WY, Somers DE, et al. Targeted degradation of TOC1 by ZTL modulates circadian function in *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 2003, 426(6966): 567-570.

(本文责编 郝丽芳)