

引用格式:

王春波, 吕辉, 韦玲冬, 郭治友. 贵定雪芽茶树高 EGCG 品系代谢组学的比较研究[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2021, 47(4): 412–418.

WANG C B, LYU H, WEI L D, GUO Z Y. Metabolomics comparative study of Guidingxueya tea containing higher EGCG[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2021, 47(4): 412–418.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



贵定雪芽茶树高 EGCG 品系代谢组学的比较研究

王春波, 吕辉, 韦玲冬, 郭治友

(黔南民族师范学院生物科学与农学院, 贵州 都匀 558000)

摘要: 基于超高效液相色谱–四级杆串联飞行时间质谱(UPLC–QTOF–MS)分析, 运用 XCMS 软件、METLIN 数据库和 SIMCA–P 软件, 对贵定雪芽茶树表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)含量较高的 NW34 品系和对照组品系 NW48 进行了代谢物定性分析、定量分析和差异性筛选等代谢组学的比较研究, 共鉴定出 26 种显著差异代谢物, 包括氨基酸及多肽类(8 种)、黄酮类(4 种)、有机酸类(4 种)、核酸及其衍生物类(3 种)、生物碱类(2 种)、醛类(2 种)、糖类(1 种)、酚类(1 种)和烯类(1 种)。通路富集分析显示这些差异代谢物主要分布于 12 个代谢途径中, 其中类黄酮类生物合成代谢途径包含的差异代谢物最多(5 种), 芳香类化合物降解途径次之(4 种)。NW34 品系含有的 EGCG、表儿茶素(EC)、糖类和氨基酸含量高于 NW48 品系, 而咖啡碱含量却低于 NW48 品系, 表明贵定雪芽高 EGCG 茶树 NW34 更适合加工成绿茶。

关键词: 贵定雪芽茶; 代谢组学; 超高效液相色谱–四级杆串联飞行时间质谱

中图分类号: S571.101

文献标志码: A

文章编号: 1007–1032(2021)04–0412–07

Metabolomics comparative study of Guidingxueya tea containing higher EGCG

WANG Chunbo, LYU Hui, WEI Lingdong, GUO Zhiyou

(College of Biological Sciences and Agriculture, Qiannan Normal University for Nationalities, Duyun, Guizhou 558000, China)

Abstract: Ultra performance liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry(UPLC–QTOF–MS) was used to analyze the metabolites between Guidingxueya tea(NW34) containing higher epigallocatechin 7-O-gallate(EGCG) and the control group(NW48). XCMS software, METLIN database and SIMCA–P software were used to perform qualitative analysis, quantitative analysis and differential screening of metabolites. A total of 26 significantly different metabolites were identified, including 8 amino acids and peptides, 4 flavonoids, 4 organic acids, 3 nucleic acids and their derivatives, 2 alkaloids, 2 aldehydes, 1 sugar, 1 phenol, and 1 alkene. Pathway enrichment analysis showed that these differential metabolites are mainly distributed in 12 metabolic pathways, of which flavonoid biosynthesis contains the most differential metabolites(5 metabolites), followed by the degradation of aromatic compounds pathway(4 metabolites). In addition, the EGCG, epicatechin(EC), carbohydrates and amino acids metabolites contained in the NW34 strain are significantly higher than those in the NW48 strain, while the content of caffeine is lower than that in the NW48 strain, which indicates that the NW34 tea plant is more suitable for processing into green tea.

Keywords: Guidingxueya tea; metabolomics; ultra performance liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry(UPLC–QTOF–MS)

收稿日期: 2020–11–18

修回日期: 2021–02–05

基金项目: 国家自然科学基金项目(31660056); 贵州省教育厅青年科技人才成长项目(黔教合 KY 字[2020]211)

作者简介: 王春波(1987–), 男, 黑龙江海伦人, 博士, 副教授, 主要从事植物代谢组学研究, wchunb@mail2.sysu.edu.cn

贵定雪芽又名贵定鸟王茶,是中国国内少见的有碑文记载的朝廷贡茶,曾在清朝初被评为八大名茶之一^[1]。雪芽野生茶树主要分布在贵州中部贵定县云雾镇的云雾山中,海拔高度约 1300 m。贵定雪芽茶叶色鲜绿,叶芽壮实肥大,形状秀丽,茸毛较多,内含物丰富,是优良的育种资源^[2]。笔者前期研究发现,贵定雪芽茶树中 NW34 品系的鲜叶含有较高的表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG),加工后品质优良。以往关于雪芽茶的研究多集中在资源调查和香气成分等方面^[3-5],代谢组学方面的研究鲜有报道。目前,研究代谢组的方法很多,其中超高效液相色谱-四级杆串联飞行时间质谱(UPLC-QTOF-MS)技术因具有高通量和高灵敏度的特性^[6-8],已经广泛用于茶叶代谢物的定性和定量测定。鉴于此,笔者利用 UPLC-QTOF-MS 代谢组学技术,结合统计和多元数据分析方法,研究了贵定雪芽茶树高 EGCG 品系与其他品系的代谢差异,以期为贵定雪芽茶的良种选育和加工提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

2019 年 3 月,自贵定县云雾镇茶场采集贵定雪芽高 EGCG 茶树品系 NW34 和对照组 NW48 品系鲜叶各 7 个样本。

1.2 方法

1.2.1 样品制备

称取茶树鲜叶约 50 mg,加入 500 μ L 甲醇(含 5 μ g/mL L-2-氯-苯丙氨酸,内标),匀浆破碎 2 min 后,超声提取 15 min,4 $^{\circ}$ C、13 000 r/min 离心 15 min,取 200 μ L 上清,进样检测代谢物。另取等量的各待测样本混合,作为质控样本。

1.2.2 茶树品系代谢物的测定

超高效液相色谱-四级杆串联飞行时间质谱测定贵定雪芽茶树品系代谢物。

1) 色谱分析条件。Agilent 1290 超高效液相色谱仪。液相色谱柱为 XSelect $\text{HSS T3}(2.5 \mu\text{m}, 100 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm})$ 流动相 A 为体积分数 0.1%甲酸溶液,流动相 B 为体积分数 0.1%甲酸乙腈溶液;流速为 0.35 mL/min;柱温为 25 $^{\circ}$ C;进样量为 2 μ L。优化

的色谱梯度为:0~2 min 时,流动相 B 的洗脱体积分数为 5%;至 10 min 时,流动相 B 的洗脱体积分数由 5%逐渐增加到 95%;至 15 min 时,流动相 B 的洗脱体积分数为 95%;至 18 min 时,流动相 B 的洗脱体积分数由 95%逐渐降低到 5%。

2) 质谱分析条件。运用 TripleTOF 4600 型质谱仪,检测色谱柱上洗脱的代谢物,以正、负离子 2 种模式运行。优化后参数:毛细管电压,正离子模式为 4 kV,负离子模式为 3.5 kV;扫描范围 70~1000 m/z;扫描频率 7 Hz;毛细管温度 320 $^{\circ}$ C;鞘气流速 45 PSI;辅助气流速 15 PSI。

1.3 数据处理与分析

利用 XCMS 软件和 METLIN 数据库对茶树代谢物进行定性分析。①将超高效液相色谱-四级杆串联飞行时间质谱测定的贵定雪芽茶树品系代谢物数据通过安捷伦 Masshunter Qualitative Analysis 分析软件转换为通用格式(mz.data);②基于 R 语言 XCMS 程序对数据进行基线过滤、峰识别、积分、保留时间校正、峰对齐和归一化处理,得到一个数据矩阵;③将矩阵导入到 SIMCA-P 软件,用于代谢物的定量分析和后续的主成分分析(PCA)以及正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA),以检测代谢差异物^[9]。应用 MetaboAnalyst 软件和 KEGG 数据库进行代谢通路分析。最后利用 MeV 4.9 软件对差异代谢物进行热图分析。

2 结果与分析

2.1 贵定雪芽茶树品系代谢物的 UPLC-QTOF-MS 鉴定结果

基于 UPLC-QTOF-MS 技术,分析贵定雪芽茶树 NW34 和 NW48 品系的代谢产物,发现在正离子和负离子模式下,同时与一级 m/z 和碎片离子(二级)m/z 数据库匹配的代谢物数分别为 343 个和 159 个。鉴于在正离子模式下检测到的物质完全覆盖负离子模式下的,并且在后续的多元统计分析中正离子模式下的模型参数更为可靠和更具有预测性,因而后续数据分析都采用正离子模式下采集到的数据。图 1 为贵定雪芽茶树在质谱 ESI⁺ 条件模式下扫描的基峰图。从图 1 中可以看出,在保留时间 2.6~3.8 min 时,代谢物的相对丰度较高。

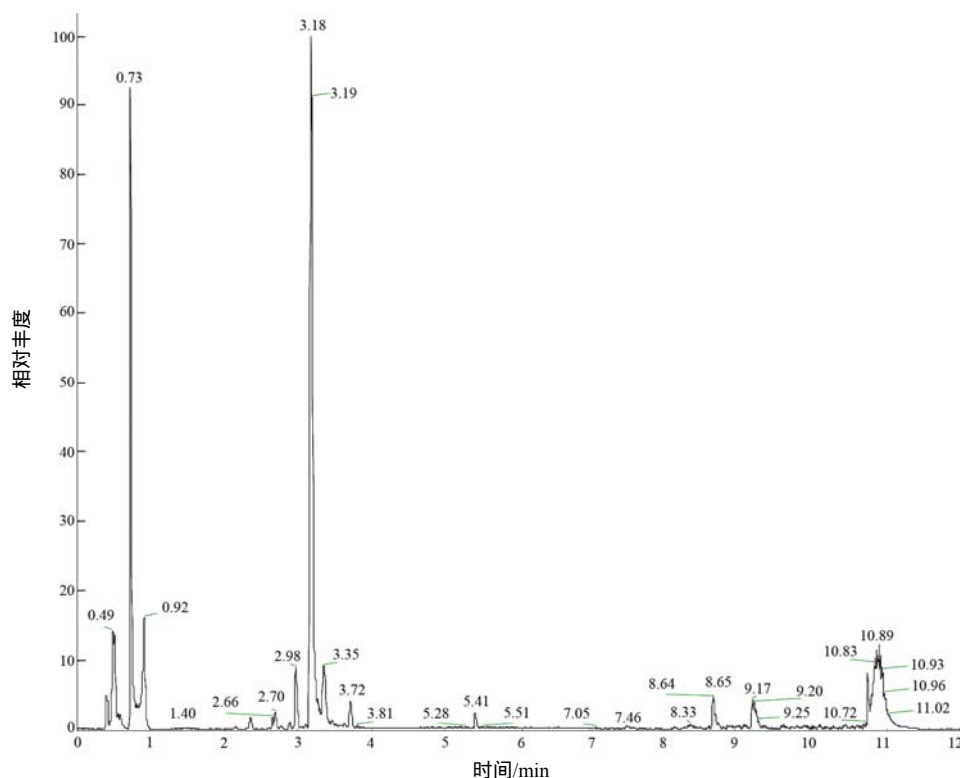


图1 贵定雪芽茶树品系正离子模式下代谢物的基峰图

Fig.1 Base peak map of Guidingxueya tea strains in positive ion mode

2.2 贵定雪芽茶树品系代谢产物的代谢组学多元统计分析

将正离子模式下收集到的数据进行主成分(PCA)和正交偏最小二乘判别(OPLS-DA)分析,结果表明,NW34品系和NW48品系呈现出明显的分离趋势(图2)。在PCA得分图中,主成分1和2的贡献率分别为60.5%和24.6%,样品累计贡献值超过85%,说明代表性较好。NW34的代谢产物主要

分布在主成分1的负轴位置,而NW48的代谢产物主要分布在主成分1的正轴位置,距离较远,表明NW34和NW48品系代谢物差异性较大。OPLS-DA得分图中,品系样本划分明确,没有分散。模型验证后,对X和Y矩阵的解释率 R^2 分别为89.2%和94.7%模型预测能力值 Q^2 为85.8%,均接近于1,说明正离子模型下采集到的数据具有较好的预测性和可靠性。

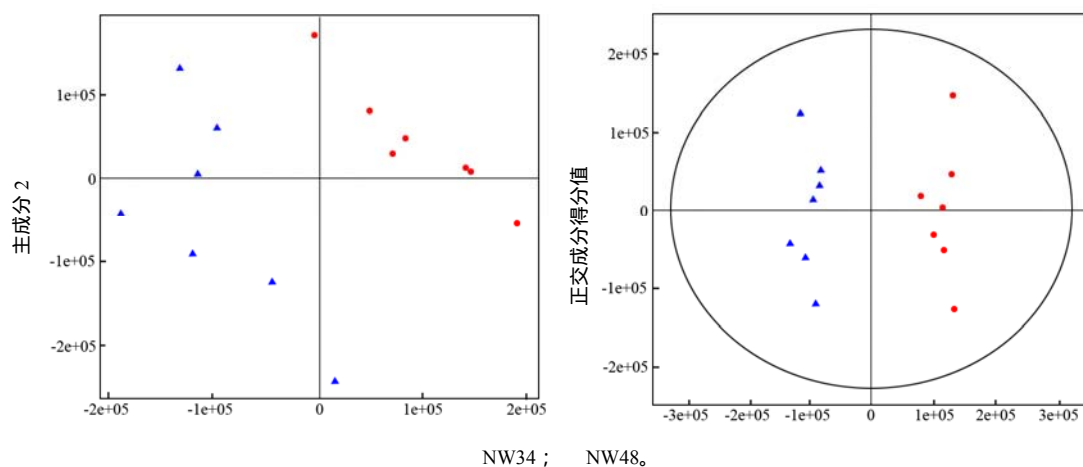


图2 贵定雪芽样品主成分分析和正交偏最小二乘判别分析

Fig.2 Principal component analysis (PCA) and orthogonal least squares discriminant analysis (OPLS-DA) of Guidingxueya tea samples

2.3 贵定雪芽茶树品系的差异代谢物和代谢通路

OPLS-DA 载荷图可以直观地显示不同品系样品间的差异代谢物, 其中的各点代表不同的代谢物, 距离坐标原点越远越分散的为显著差异代谢物。对贵定雪芽 2 个品系鉴定得到的 343 个代谢物进行差异性筛选(标准为 VIP > 1、 $P < 0.05$ 和 $FC > 2$), 共得到 26 种显著差异代谢物(图 3、表 1): 包括 8 种氨基酸及多肽类(1~8 号)、4 种黄酮类(9~12 号)、4 种有机酸类(13~16 号)、3 种核酸及其衍生物类(15~19 号)、2 种生物碱类(20~21 号)、2 种醛类(22~23 号)、1 种糖类(24 号)、1 种酚类(25 号)和 1 种烯类(26 号)。

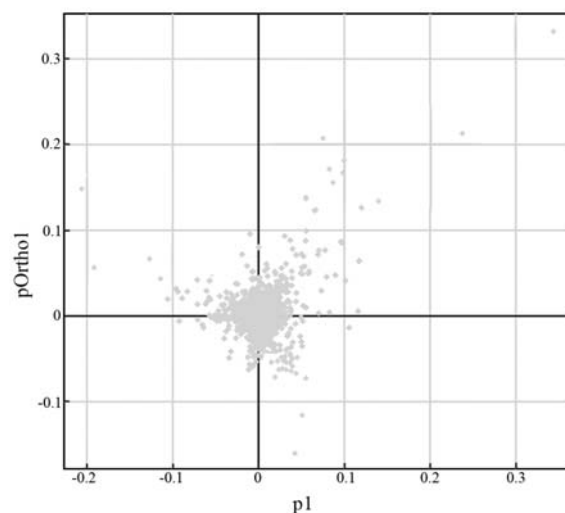


图 3 贵定雪芽茶树品系代谢物的正交偏最小二乘判别分析的载荷

Fig.3 Loading plot of orthogonal least squares discriminant analysis for metabolites of Guidingxueya tea strains

表 1 贵定雪芽茶树品系的差异代谢物

Table 1 The differential metabolites of Guidingxueya tea strains

| 编号 | 代谢物 | 保留时间/ min | 质荷比 | VIP 值 | $\log_2(FC)$ |
|----|---------------------|-----------|-----------|-------|--------------|
| 1 | 天冬氨酸 | 0.50 | 134.044 7 | 5.46 | 0.52 |
| 2 | 天冬氨酸-天冬氨酸-丝氨酸 | 3.01 | 336.104 9 | 1.49 | -0.76 |
| 3 | 亮氨酸-丝氨酸-组氨酸-天冬氨酸 | 4.47 | 471.219 3 | 1.84 | -0.74 |
| 4 | 天冬氨酸-色氨酸-脯氨酸 | 3.26 | 417.172 4 | 1.24 | -1.17 |
| 5 | 苯丙氨酸-色氨酸-甘氨酸 | 3.91 | 409.182 6 | 1.09 | 0.62 |
| 6 | 丝氨酸-蛋氨酸-精氨酸 | 3.87 | 393.187 7 | 1.87 | -0.99 |
| 7 | 天冬氨酸-苯丙氨酸-色氨酸 | 2.95 | 467.188 0 | 1.39 | -0.81 |
| 8 | 酪氨酸-精氨酸-甘氨酸 | 3.96 | 395.203 5 | 1.41 | -1.02 |
| 9 | 3,4,5,7-四羟基二氢黄酮 | 3.33 | 289.070 2 | 8.76 | -0.24 |
| 10 | 青酒缸酚 | 5.04 | 367.117 0 | 1.19 | -3.03 |
| 11 | 表没食子儿茶素没食子酸酯 | 3.35 | 459.091 5 | 14.42 | -0.26 |
| 12 | 表儿茶素 | 3.32 | 289.071 4 | 25.46 | 0.41 |
| 13 | 泛酸 | 2.61 | 220.117 8 | 3.15 | -0.51 |
| 14 | 吡啶-2,6-二甲酸 | 1.00 | 174.076 1 | 2.21 | 0.91 |
| 15 | 4R-氨基戊酸 | 0.55 | 118.086 2 | 4.63 | 0.77 |
| 16 | 对香豆酸 | 3.10 | 165.054 6 | 3.27 | -1.56 |
| 17 | 腺嘌呤 | 3.77 | 249.111 9 | 3.27 | -1.71 |
| 18 | 腺苷 | 2.16 | 268.103 7 | 4.83 | -0.43 |
| 19 | 乙烷鸟苷 | 2.62 | 312.129 8 | 2.20 | 0.88 |
| 20 | 咖啡碱 | 3.19 | 289.072 1 | 22.69 | -0.12 |
| 21 | N-羟基石房蛤毒素 | 2.33 | 316.136 3 | 3.72 | 0.87 |
| 22 | 苯乙醛 | 2.49 | 121.064 8 | 1.15 | -0.32 |
| 23 | 4-异丙苯甲醛 | 3.47 | 149.096 1 | 1.07 | 0.69 |
| 24 | α,β -海藻糖 | 2.46 | 365.106 0 | 1.07 | 1.46 |
| 25 | 间苯三酚 | 2.05 | 127.039 0 | 3.15 | -1.10 |
| 26 | 2-异丙基-1,4-己二烯 | 9.77 | 125.132 4 | 1.79 | -0.56 |

VIP 值为变量投影重要性指标; $\log_2(FC)$ 为代谢物差异倍数值的对数。

利用 KEGG 数据库对 26 个差异代谢物进行代谢通路分析。从富集图(图 4)中可以看出, 这些差异代谢物主要集中在 12 个代谢通路中, 其中类黄酮

类生物合成代谢途径包含的差异代谢物最多(5 个), 其次是芳香类化合物降解途径(4 个)的。

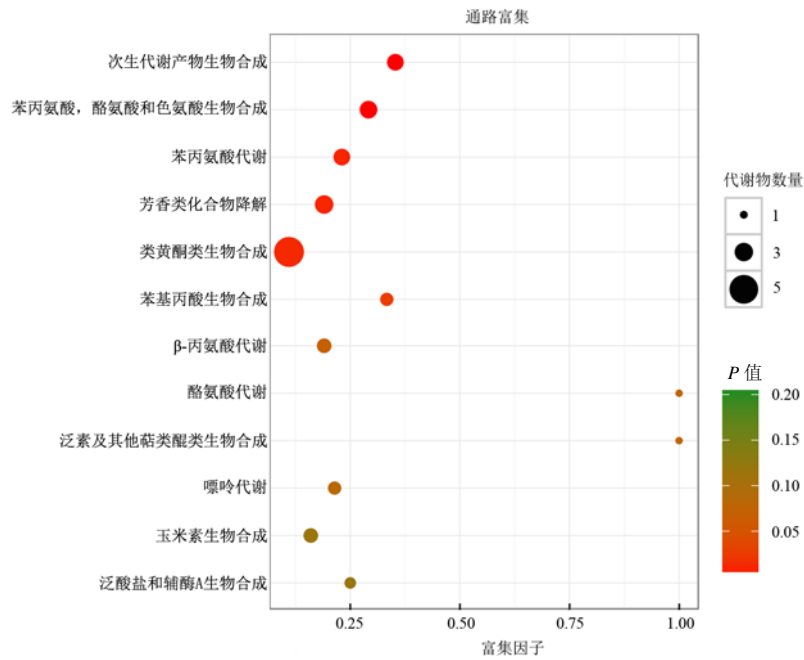


图 4 贵定雪芽茶树品系的差异代谢物通路富集图

Fig.4 Pathway enrichment of differential metabolites between Guidingxueya tea strains

根据 26 种差异代谢物的相对丰度进行热图分析, 红色表明代谢物相对丰度高于平均水平, 蓝色表明代谢物相对丰度低于平均水平。结果(图 5)显

示, NW34 品系含有的 EGCG、EC、糖类和氨基酸明显高于 NW48 品系的, 但咖啡碱、酚类和烯类代谢物的含量低于 NW48 品系的。

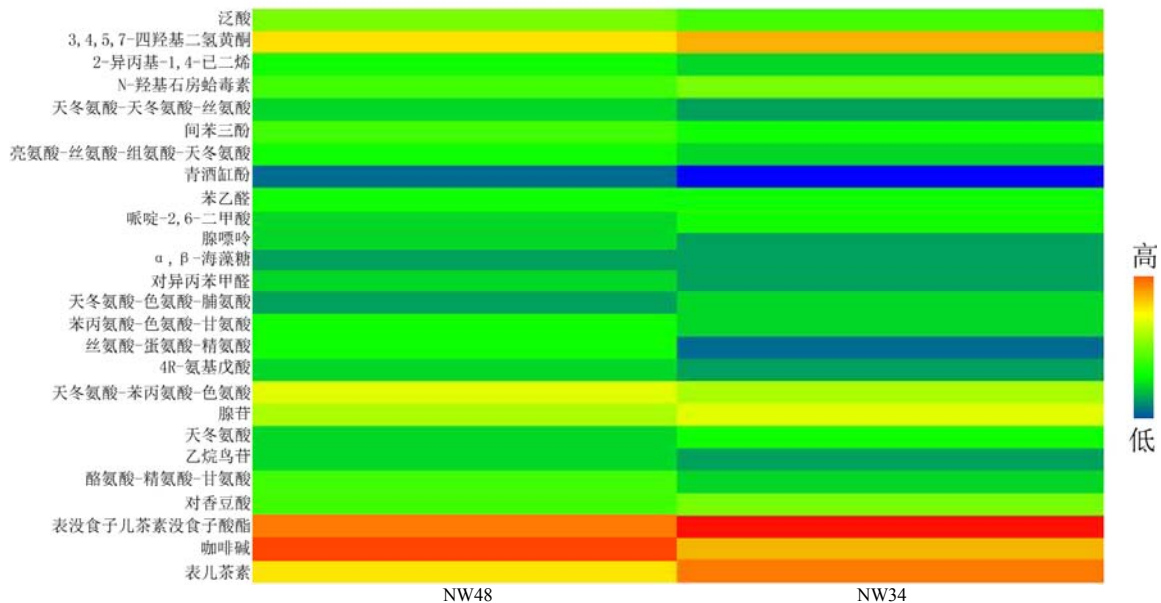


图 5 贵定雪芽茶树品系的差异代谢物热图

Fig.5 Heat map of differential metabolites between Guidingxueya tea strains

3 结论与讨论

不同品种(系)茶树叶片内含成分差异较大, 选择适制性好的茶树品种对于茶叶的加工和品质至关重要^[10-12]。茶叶中的不同内含成分赋予了茶叶不同的感官品质, 如茶叶的苦涩味主要来源于儿茶

素、茶皂素、黄酮醇-3-糖苷和咖啡因等, 茶汤中的香气成分主要来自芳香类化合物, 而游离的氨基酸和糖类则是鲜味的主要来源^[13]; 绿茶含有比其他茶类相对较高的儿茶素和较低的咖啡碱^[14]。

运用 UPLC-QTOF-MS 技术, 结合多元统计方法检测到 2 个贵定雪芽茶树品系的 26 个显著差异

代谢物, 主要分布在 12 个代谢通路中, 其中类黄酮类生物合成和芳香类化合物降解途径包含的差异代谢物较多。茶叶中类黄酮类物质对茶汤苦涩味的贡献较大, 芳香类化合物影响茶汤的香气^[15-16], NW34 品系和 NW48 品系的类黄酮类生物合成和芳香类化合物降解途径的差异, 或许决定了这 2 类化合物在鲜叶中的积累, 而直接影响茶叶的加工及其品质^[14]。

差异代谢物热图分析显示, NW34 品系中 EGCG、EC、天冬氨酸和 α,β -海藻糖的含量明显高于 NW48 品系的, 而 NW34 咖啡碱的含量要低于 NW48 品系的。EGCG 和 EC 都属于儿茶素, 而儿茶素含量的多寡直接决定茶叶的色、香、味。一般地, 儿茶素含量越高, 绿茶的品质越好^[17], 但过多的儿茶素会增加茶汤的苦涩味, 这就需要氨基酸的“鲜”味和糖的甜味来降低这种苦涩感。NW34 品系含有较高的天冬氨酸和 α,β -海藻糖, 可以淡化高含量 EGCG 和 EC 带来的苦涩味, 较低含量的咖啡碱可以进一步减少这种苦涩味, 增加绿茶的香气, 使得茶汤滋味更佳; 因此, 贵定雪芽高 EGCG 茶树品系 NW34 较 NW48 更适合加工成绿茶, 可作为绿茶品种选育的种质资源加以利用。

参考文献:

- [1] 肖正广. 贵定云雾贡茶的发展历史和文化渊源[J]. 茶叶, 2018, 44(4): 206–208.
XIAO Z G. The history and origin of Yunwu tribute tea[J]. Journal of Tea, 2018, 44(4): 206–208.
- [2] 王莹, 李岩, 王姝, 等. 低温胁迫下贵州云雾贡茶生长调节剂的变化[J]. 湖北农业科学, 2020, 59(8): 99–102.
WANG Y, LI Y, WANG S, et al. Changes of growth regulators of *Camellia sinensis*(L.) Kuntze var. *niaowangensis* Q. H. Chen. under low temperature stress in Guizhou[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2020, 59(8): 99–102.
- [3] 洪江, 江波, 胡明宇, 等. 不同栽培区域鸟王茶茶叶品质特征研究[J]. 南方农机, 2020, 51(4): 1–3.
HONG B, JIANG B, HU M Y, et al. The tea quality characteristics research of Guidingniaowang Tea in different cultivated area[J]. China Southern Agricultural Machinery, 2020, 51(4): 1–3.
- [4] 王春波, 吕辉, 韦玲冬, 等. 贵定鸟王茶的香气成分及其品质影响因素[J]. 贵州农业科学, 2019, 47(5): 94–98.
WANG C B, LYU H, WEI L D, et al. Influencing factors of aroma components and quality of Guidingniaowang Tea[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2019, 47(5): 94–98.
- [5] 张小琴, 周富裕, 杨春, 等. 贵定鸟王种茶树资源农艺性状和品质性状多样性分析[J]. 分子植物育种, 2015, 13(2): 415–423.
ZHANG X Q, ZHOU F Y, YANG C, et al. Diversity of tea germplasm resource(*Camellia sinensis* ‘Guidingniaowangzhong’) revealed based on agronomic and quality traits[J]. Molecular Plant Breeding, 2015, 13(2): 415–423.
- [6] 李万春. 气质联用在不同茶叶品质鉴定中的应用[D]. 南京: 南京理工大学, 2012.
LI W C. Application of GC/MS in different tea quality identification[D]. Nanjing: Nanjing University of Science and Technology, 2012.
- [7] 王丽鸳, 成浩, 周健, 等. 绿茶数字化多元化学指纹图谱建立初探[J]. 茶叶科学, 2007, 27(4): 335–342.
WANG L Y, CHENG H, ZHOU J, et al. A preliminary attempt to establish the digital multiple chemical fingerprints of green tea[J]. Journal of Tea Science, 2007, 27(4): 335–342.
- [8] RYU H W, YUK H J, AN J H, et al. Comparison of secondary metabolite changes in *Camellia sinensis* leaves depending on the growth stage[J]. Food Control, 2017, 73(8): 916–921.
- [9] DAI W D, YIN P Y, CHEN P, et al. Study of urinary steroid hormone disorders: difference between hepatocellular carcinoma in early stage and cirrhosis[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014, 406(18): 4325–4335.
- [10] GAI Z S, WANG Y, JANG J T, et al. The quality evaluation of tea(*Camellia sinensis*) varieties based on the metabolomics[J]. Hortscience, 2019, 54(3): 409–415.
- [11] JI H G, LEE Y R, LEE M S, et al. Metabolic phenotyping of various tea(*Camellia sinensis* L.) cultivars and understanding of their intrinsic metabolism[J]. Food Chemistry, 2017, 233(3): 321–330.
- [12] DAI W D, QI D D, YANG T, et al. Nontargeted analysis using ultraperformance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry uncovers the effects of harvest season on the metabolites and taste quality of tea(*Camellia sinensis* L.)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(44): 9869–9878.
- [13] LIU J W, ZHANG Q F, LIU M Y, et al. Metabolomic analyses reveal distinct change of metabolites and quality of green tea during the short duration of a single spring season[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(16): 3302–3309.

- [14] OWUOR P O , OBANDA M . Clonal variation in the individual theaflavin levels and their impact on astringency and sensory evaluations[J] . Food Chemistry , 1995 , 54(3) : 273–277 .
- [15] 赵仁亮, 吴丹, 姜依何, 等 . 不同产地黑毛茶加工的茯砖茶香气成分和品质分析[J] . 湖南农业大学学报(自然科学版), 2017 , 43(5) : 551–555 .
ZHAO R L , WU D , JIANG Y H , et al . Analysis on the aroma components and quality of Fu brick tea made with raw dark teas from different regions[J] . Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences) , 2017 , 43(5) : 551–555 .
- [16] DAI W D , XIE D C , LU M L , et al . Characterization of white tea metabolome : comparison against green and black tea by a nontargeted metabolomics approach[J] . Food Research International , 2017 , 96(8) : 40–45 .
- [17] 孙君, 朱留刚, 林志坤, 等 . 变温烘焙技术对丹桂乌龙茶香气品质的影响[J] . 茶叶科学, 2017 , 37(3) : 266–272 .
SUN J , ZHU L G , LIN Z K , et al . Effects of changeable baking techniques on aroma quality of Dangui oolong tea[J] . Journal of Tea Science , 2017 , 37(3) : 266–272 .

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 罗维

(上接第 411 页)

- [12] 王杰, 贾育衡, 赵昕 . 基于稀疏自编码器的烟叶成熟度分类[J] . 烟草科技, 2014 , 47(9) : 18–22 .
WANG J , JIA Y H , ZHAO X . Tobacco leaf maturity classification based on sparse auto-encoder[J] . Tobacco Science & Technology , 2014 , 47(9) : 18–22 .
- [13] 刘剑君, 杨铁钊, 朱宝川, 等 . 基于数字图像数据的烤烟成熟度指数研究[J] . 中国烟草学报, 2013 , 19(3) : 61–66 .
LIU J J , YANG T Z , ZHU B C , et al . Study on maturity index of flue-cured tobacco leaves based on digital image processing technique[J] . Acta Tabacaria Sinica , 2013 , 19(3) : 61–66 .
- [14] BREIMAN L . Random forests[J] . Machine Learning , 2001 , 45(1) : 5–32 .
- [15] 宾俊 . 广义灰色体系和无损分析技术在烟叶生产加工过程中的应用[D] . 长沙: 湖南农业大学, 2017 .
BIN J . Application of generalized grey system and nondestructive analysis technology in tobacco production and processing[D] . Changsha : Hunan Agricultural University , 2017 .
- [16] LIAW A , WIENER M . Classification and regression by randomForest[J] . R News , 2002 , 2(3) : 18–22 .
- [17] GALVÃO R K H , ARAUJO M C U , JOSE G É , et al . A method for calibration and validation subset partitioning[J] . Talanta , 2005 , 67(4) : 736–740 .
- [18] WEAVER J B , XU Y S , HEALY D M , et al . Filtering noise from images with wavelet transforms[J] . Magnetic Resonance in Medicine , 1991 , 21(2) : 288–295 .
- [19] 于铂, 郑丽敏, 田立军 . 基于颜色和纹理特征提取彩色图像的有意义区域[J] . 计算机工程, 2006 , 32(3) : 206–208 .
YU B , ZHENG L M , TIAN L J . Image segmentation for meaningful region based on color and texture[J] . Computer Engineering , 2006 , 32(3) : 206–208 .
- [20] 岳焕然, 李茂松, 安江勇 . 基于颜色和纹理特征的玉米干旱识别[J] . 中国农学通报, 2018 , 34(24) : 18–28 .
YUE H R , LI M S , AN J Y . Drought identification of maize based on color and texture features[J] . Chinese Agricultural Science Bulletin , 2018 , 34(24) : 18–28 .
- [21] 郑璞帆 . 陕南地区不同成熟度烟叶生理特性和烤后品质研究[D] . 杨凌: 西北农林科技大学, 2017 .
ZHENG P F . Studies on physiological characteristics and quality after curing of different maturity tobacco leaves in southern Shaanxi province[D] . Yangling , China : Northwest A & F University , 2017 .
- [22] 谷守辉 . 分析不同成熟度烟叶烘烤中颜色值和色素含量的变化[J] . 中国新技术新产品, 2019(9) : 75–76 .
GU S H . The changes of color value and pigment content in different maturity were analyzed[J] . New Technology & New Products of China , 2019(9) : 75–76 .
- [23] CAO H B , DENG H W , WANG Y P . Segmentation of M-FISH images for improved classification of chromosomes with an adaptive fuzzy C-means clustering algorithm[J] . IEEE Transactions on Fuzzy Systems , 2012 , 20(1) : 1–8 .
- [24] 罗俊海, 杨阳 . 基于数据融合的目标检测方法综述[J] . 控制与决策, 2020 , 35(1) : 1–15 .
LUO J H , YANG Y . An overview of target detection methods based on data fusion [J] . Control and Decision , 2020 , 35(1) : 1–15 .

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 罗维