

茶树类黄酮合成与积累的组织器官特异性研究

刘亚军¹, 蒋晓岚², 李伟伟¹, 赵磊², 王云生¹, 刘莉², 高丽萍^{1*}, 夏涛^{2*}

(1. 安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230036; 2. 安徽农业大学教育部茶叶生物化学与生物技术重点实验室, 合肥 230036)

摘要: 类黄酮是茶树的主要次生代谢产物, 对决定茶叶品质及其健康功效具有重要作用。利用 LC-TOF/MS、qRT-PCR 等技术研究了茶树类黄酮合成积累的组织器官特异性。结果显示, 茶树不同器官中, 鲜叶中的酚酸、儿茶素和黄酮醇化合物种类较多且含量较高, 原花青素含量低但种类多, 而在根中则相反。从基因表达差异上看, 从鲜叶到茎到根, *4CL*、*CHI*、*F3H* 和 *F3'5'H* 表达依次降低。酶学实验显示, 从鲜叶到茎到根, DFR/LAR 和 ANR 酶活在鲜叶和茎中无明显差异, 而在根中只检测到微弱的 DFR/LAR 活性。在不同发育时期鲜叶中, 儿茶素含量在一叶中最高, 芽其次; 黄酮醇的含量在一叶和二叶中较高; 花青素的含量随着鲜叶发育依次减少。qRT-PCR 结果显示, *PAL*、*C4H*、*CHS*、*F3'H*、*F3'5'H*、*DFR*、*LAR* 和 *ANR* 基因的表达与不同发育时期鲜叶中儿茶素和黄酮醇积累规律一致。酶学实验显示, 随着鲜叶的发育, DFR/LAR 的活性依次降低, ANR 的活性呈增高趋势, 它们的变化与酯型 C 和 EGC 含量趋势相吻合。

关键词: 茶树; 类黄酮; 积累; 组织器官特异性

中图分类号: S571.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2013)04-0552-07

Tissue-specific biosynthesis and accumulation of flavonoids in tea plant

LIU Ya-jun¹, JIANG Xiao-lan², LI Wei-wei¹, ZHAO Lei², WANG Yun-sheng¹, LIU Li², GAO Li-ping¹, XIA Tao²

(1. School of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. Key Laboratory of Tea Biochemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: Flavonoids, as the main secondary metabolite in tea plant [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze], shows decisive effects on the quality of tea and health functions. The tissue-specific synthesis and accumulation of flavonoids in tea plant were investigated by LC-TOF/MS and qRT-PCR. The result showed that phenolic acids, catechins, flavonols in different tissues and organs were abundant in the contents and diverse in the components, and the contents of proanthocyanidins were low. The components were rich in the leaves, while less in the roots. In term of gene expression, expression levels of *4CL*, *CHI*, *F3H* and *F3'5'H* decreased in turn from the leaf, stem to the root. Enzymatic experiment showed there was no obvious difference in activities of DFR/LAR and ANR in the leaves and stems, while the weak activity of DFR/LAR was detected in the root. In leaves at different developmental stages, the content of catechin was the highest in the first leaf, followed by bud. The content of flavonol was high in the first and second leaf. The content of anthocyanin was reduced with the development of the leaves. The result of qRT-PCR showed that gene expression patterns of *PAL*, *C4H*, *CHS*, *F3'H*, *F3'5'H*, *DFR*, *LAR* and *ANR* were consistent with accumulation of catechins and flavonols in the leaves at different developmental stages. Enzymatic experiment showed that with the development of the fresh leaf, the activity of DFR/LAR reduced, in contrast, the activity of ANR increased gradually, which was consistent with trends of C and EGC accumulation.

Key words: *Camellia sinensis*; flavonoid; accumulation; specificity of tissue and organ

收稿日期: 2013-05-08

基金项目: 国家自然科学基金(31170647, 31170282 和 31270730), 安徽省自然科学基金(11040606M73)和安徽省高校自然科学基金(KJ2012A110)共同资助。

作者简介: 刘亚军, 男, 博士, 讲师。Email: liuyajun1228@163.com

* 通信作者: 夏涛, 男, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: xiatao62@126.com

高丽萍, 女, 教授。E-mail: gaolp62@126.com

多酚类物质是茶树 [*Camellia sinensis*(L.)O. Kuntze] 中主要的次生代谢产物, 其含量可达鲜叶和嫩茎干重的 18%~36%, 其中儿茶素(catechins)约占多酚总量的 70%。儿茶素属于类黄酮(Flavonoids)物质中的黄烷-3-醇类物质, 是茶树最特殊的次生代谢产物, 其含量约占茶叶干物质的 12%~24%, 是决定茶叶品质和健康功效的最重要成分^[1]。关于儿茶素的生物合成途径已经较为清晰^[2]。茶树中的酚类物质具有多样性, 包括黄烷醇类、黄酮醇类、酚酸、黄酮、花青素和原花青素。它们的合成呈现网络途径, 既有交叉也有分支, 因此调控具有复杂性。综合考虑茶树中酚类物质的合成积累、研究相关基因的表达模式、相关儿茶素合成代谢酶类的变化规律之间的相互关系。对于探明茶树酚类物质生物合成网络途径及其复杂的分子调控机制, 并进一步开展茶树酚类物质的代谢组学研究, 具有理论意义和应用价值。为此, 作者拟利用 LC-TOF/MS、分光光度计等技术研究主要酚类物质在茶树不同器官、叶片不同发育时期的积累规律; 利用 qRT-PCR 技术和酶学分析手段, 研究茶树类黄酮主要合成酶和基因在不同器官、叶片不同发育时期的表达规律。

1 材料与方法

1.1 材料

茶树(*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze.) 根、茎、叶采自安徽农业大学教学基地。

1.2 主要试剂与仪器

主要试剂: 儿茶素类(儿茶素 C、表儿茶素 EC、没食子儿茶素 GC、表没食子儿茶素 EGC、表儿茶素没食子酸酯 EGC、表没食子儿茶素没食子酸酯 EGCG)、没食子酸(GA), 以上标准品购自上海融禾医药科技有限公司; 1-O-没食子酰- β -D-葡萄糖(β -glucogallin, β G), 购自香港先进科技有限公司; 矢车菊色素(自制)。

主要仪器: WATERS600 紫外检测器高效液相色谱仪(美国 WATERS 公司)、飞行时间质谱(TOF-MS, 美国 Agilent 公司)、UV-2800 型紫外可见分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司), MiniOpticon™ Real-Time PCR system(BIO-RAD 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 茶叶中多酚的提取 儿茶素类、酚酸与黄酮醇类提取: 分别取茶的嫩叶、幼茎、茶幼根各 1 g, 加少许石英砂, 研磨至粉碎, 于液氮研磨成粉末状, 加入 3 mL 甲醇研磨至匀浆, 5000 r·min⁻¹ 离心 10

min, 取上清, 沉淀用 3 mL 甲醇清洗 2 次, 合并上清液, 并定容至 10 mL, 即为儿茶素类、酚酸与黄酮醇类提取液, 样品用 0.22 μ m 有机膜过滤后待测。

花青素提取: 鲜叶中的花青素提取方法采用 Pang 的方法^[3]。分别取鲜叶、幼茎、茶幼根各 0.5 g 于液氮下研磨至粉末状, 加入 5 mL 0.1% 盐酸甲醇(w/v), 超声波提取 1 h, 于 5000 r·min⁻¹ 下离心 10 min。吸取 2 mL 上清液加入 2 mL 水和 2 mL 三氯甲烷充分摇匀后于 5000 r·min⁻¹ 下离心 10 min, 去除叶绿素; 取上清液, 即为花青素提取液。样品用 0.22 μ m 有机膜过滤后待测。

原花青素提取^[4]: 分别取鲜叶、幼茎、茶幼根各 0.5 g, 液氮研磨成粉末状, 加入 3 mL 原花青素提取液(含 0.5% 乙酸的 70% 丙酮水(v/v))研磨至匀浆, 于 5000 r·min⁻¹ 下离心 10 min, 取上清液, 沉淀用 3 mL 提取液清洗 2 次, 合并上清液, 并定容至 10 mL; 吸取 2 mL 上清液加入 2 mL 水和 2 mL 三氯甲烷且充分摇匀后于 5000 r·min⁻¹ 下离心 10 min 去除叶绿素; 上清液即为可溶性原花青素提取液, 沉淀物为不溶性原花青素。取 0.5 mL 上清液和所有的沉淀物, 加入 3 mL 95% 正丁醇-盐酸(95/5, v/v), 95℃ 热解 1 h, 冷却后, 于 5000 r·min⁻¹ 下离心 10 min, 收集上清液, 即分别为可溶性和不溶性原花青素热解液。样品用 0.22 μ m 有机膜过滤后待测。

1.3.2 茶叶中多酚定性分析 儿茶素类、酚酸、黄酮醇、原花青素及花青素定性检测的 LC-TOF-MS 分析条件: 美国 Agilent 公司飞行时间质谱仪(TOF); 真空脱气机; 柱温箱(设定为 25℃); 样品 0.22 μ m 有机膜上过滤, 自动进样器; 二极管阵列检测器(DAD); 色谱柱: Phenomenex Synergi 4 u Fusion-RP80 column (5 μ m, 250×4.6 mm); 流速, 1.0 mL·min⁻¹; 进样量: 5 μ L。流动相 A: 1% 乙酸, B: 100% 乙腈, 洗脱梯度为: 10 min 内 B 相从 0 升到 10%, 30 min 内 B 相从 10% 升到 13%, 65 min 内 B 相从 13% 升到 16%, 81 min 内 B 相从 16% 升到 33%, 85 min B 相从 33% 升到 90%, 90 min B 相保持 90%。二极管阵列检测器实时监测强度的波长定为波长 280 和 345 nm。紫外光谱连续记录 200 到 600 nm 的范围的波峰。电喷雾离子源(ESI), 雾化气压 30 Psi, 离子化电压为 3500 V, 碎片电压 175 V, 氮气流速 12 L·min⁻¹。大部分物质采用阴离子模式检测, 而花青素采用正离子模式检测。

以上酚类物质通过对比标准品 LC-MS 的保留时间及离子峰、全波长扫描特征峰以及质子化或去

质子化分子量和参考文献进行定性分析^[4-7]。

1.3.3 茶叶中多酚定量分析 儿茶素、酚酸通过对 HPLC 标准品峰面积定量。黄酮醇直接以峰面积相对定量。

可溶性原花青素的检测(花青素反应),取可溶性原花青素提取液 0.5 mL,加入 3 mL 95%正丁醇-盐酸(95/5, v/v), 95℃ 热解 1 h, 热解溶液室温冷却后测 550 nm 和 600 nm 吸收值。对照组为热解前样品,以排除上清液中花青素干扰。不溶性原花青素的检测(花青素反应),取原花青素沉淀物,加入 3 mL 95%正丁醇-盐酸, 95℃ 热解 1 h, 室温冷却后, 5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 检测上清液 550 nm 和 600 nm 吸收值。以矢车菊色素为标准品,用 550 nm 和 600 nm 吸收值差计算可溶及不溶性原花青素含量。

花青素分析,直接取花青素提取液于 530 nm 和 600 nm 测吸光值。以 530 nm 与 600 nm 吸收值差计算花青素相对含量。以矢车菊色素为标准品,计算花青素含量。

1.3.4 DFR/LAR 和 ANR 酶活检测 取 1~2 g 茶鲜叶加入等量 PVPP 和少量石英砂,加入液氮研磨,加入 pH 7.4 的 PBS 缓冲液继续研磨至匀浆,然后在

12 000 r·min⁻¹、4℃ 条件下离心 15 min, 取上清液即为粗酶液。粗酶液放于 4℃ 冰箱中保存备用。粗酶液蛋白浓度利用牛血清蛋白作为标准蛋白,采用 Bradford's^[8]方法测定。

ANR 酶活检测参照 Zhang 的方法^[9]。反应体系包括 0.0625 mmol·L⁻¹ 氯化氢啉、1 mmol·L⁻¹ 辅酶 NADPH、0.5 mmol·L⁻¹ Vc 和 0.1 mmol·L⁻¹ pH 6.5 的磷酸缓冲液,粗酶液若干(150 μg 蛋白),总体积为 1.5 mL。加入 NADPH 启动反应,对照为不含底物的反应体系。于 45℃ 下反应,用 2 800 UV/VIS 型紫外可见分光光度计检测 340 nm 体系吸光度值的变化并计算酶活性。对照实验,酶液为加热至 100℃ 酶蛋白。

DFR 酶活检测参照高可君的方法^[10]。反应体系包括 0.1 mmol·L⁻¹ 二氢槲皮素、1 mmol·L⁻¹ 辅酶 NADPH 和 0.1 mol·L⁻¹ pH 7.5 的磷酸缓冲液,粗酶液(150 μg 蛋白),总体积为 1.5 mL。其他条件同 ANR 酶活检测方法。

DFR/LAR 和 ANR 相对酶活计算:以芽和叶中的酶活为 100%酶活,分别计算不同发育时期鲜叶和不同组织器官中的相对酶活。

表 1 茶树类黄酮生物合成中相关基因的引物设计

Table 1 The primer sequences for genes involved in flavonoid biosynthesis in *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze.

基因名 Gene name	基因登陆号 Accession number	引物序列 Primer sequence	引物长度/bp Length of PCR product
<i>β-Actin</i>	FE861557	F5'-GCCATCTTTGATTGGAATGG-3' R5'-GGTGCCACAACCTTGATCTT-3'	175
<i>PAL</i>	D26596	F5'-TCTGCCAAGCCGTAGATTTGA-3' R5'-AACGCCCATAGTTAGAACGCG-3'	101
<i>C4H</i>	AY641731	F5'-TAGAATGGGGCA TAGCAG-3' R5'-GTAGGGGAGTTGTAGGTGT-3'	125
<i>4CL</i>	DQ194356.1	F5'-GAGCGAAATCCCGACAGT-3' R5'-TCCAGCAACGCCCTAT-3'	294
<i>CHS</i>	AY169403	F5'-GGCAATCAAAGAATGGGG-3' R5'-ATGGGCGAAGACCGAGT-3'	122
<i>CHI</i>	DQ904329	F5'-AGATTTCTCGGCTTCCAG-3' R5'-CTCTTTATGCTTCCTTGTC-3'	141
<i>F3H</i>	AY641730	F5'-CTACTCAAGATGGCCCGACAA-3' R5'-ACAACACCTCCAGCAACTTGC-3'	101
<i>F3'H</i>	GQ438849	F5'-ACCTTTGACTTCACCCATCAAC-3' R5'-TAACTGGACCATACGCAACCCTA-3'	294
<i>F3'5'H</i>	DQ194358	F5'-GGCAGACTCTGGGAAGAT-3' R5'-CGGCTACAAGAATCCGACCTA-3'	133
<i>DFR</i>	AB018685	F5'-ATTGGCAGAGAAAGCAGCAT-3' R5'-GTGATTAGGCTTGGTGGGAA-3'	120
<i>LAR</i>	AY169404	F5'-TTTAAAAGCCTGCGCGAAAG-3' R5'-ATGACAAGCCCCGTTCCAT-3'	102
<i>ANS</i>	AY830416	F5'-GGCCACAAGTGCCTACAATTG-3' R5'-CCCATGATTCACCAAATGCA-3'	128
<i>ANR</i>	AY641729	F5'-GCGAAGTTGATCCTCTCGTC-3' R5'-AACCACATCGTCAAGTGAACA-3'	198

1.3.5 类黄酮合成途径中相关基因转录水平 qRT-PCR 分析 RNA 提取和基因转录水平 qRT-PCR

分析参考 Zhao 的方法^[11]。类黄酮合成相关基因和荧光定量特异性引物见表 1, 内参基因为 *β-actin* 管

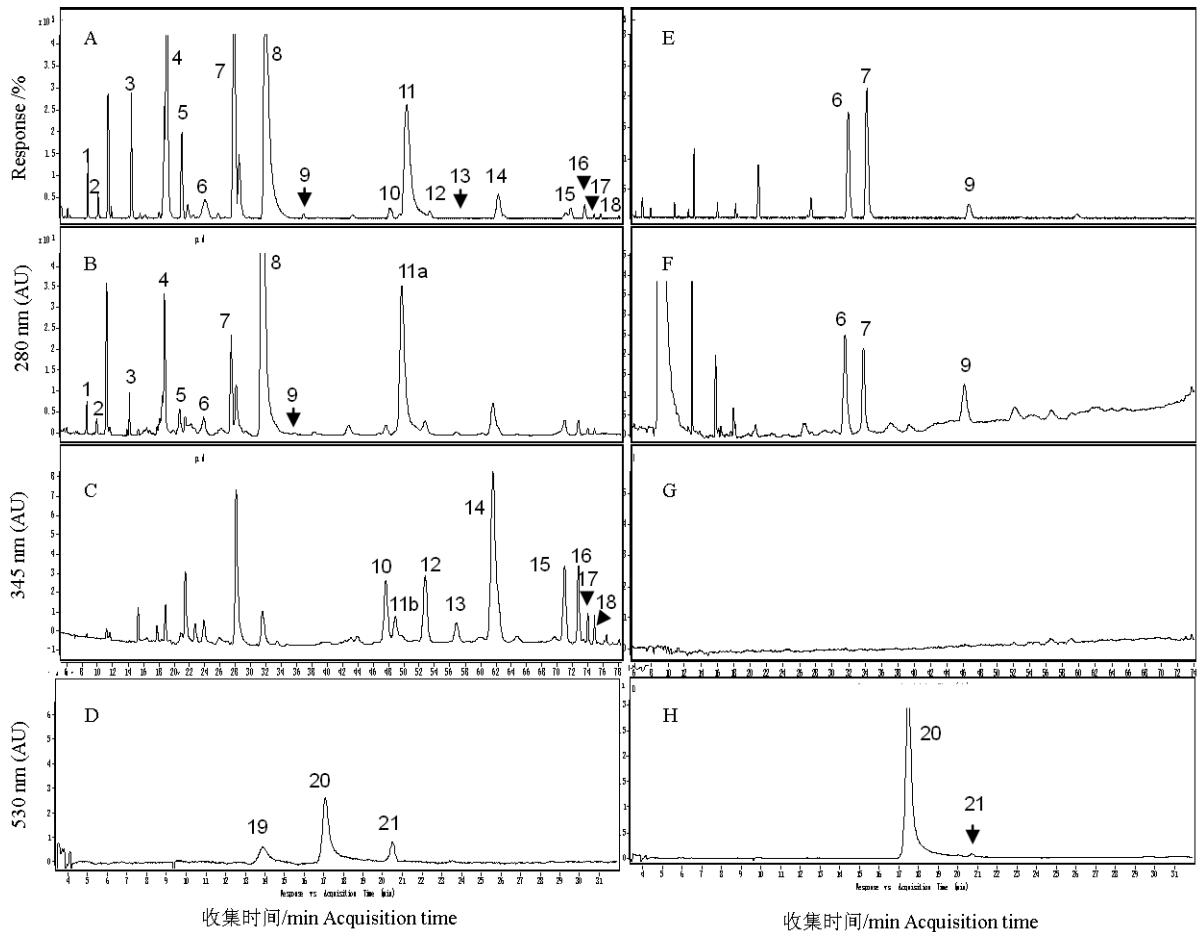
家基因。

2 结果与分析

2.1 茶树不同器官酚类物质合成与积累的特点

LC-TOF/MS 分析结果显示, 从儿茶素的组分和含量差异来看(图 1A、1B 和图 2A、2B), 鲜叶以表型儿茶素为主, 其中酯型儿茶素 EGCG 含量最高, 达鲜叶干重的 6.87%, 非酯型儿茶素 EGC 达鲜叶干重的 3.12%。茎中儿茶素种类与鲜叶相同, 但含量较鲜叶低, 其中酯型儿茶素与非酯型儿茶素含量相

近(图 2A、2B)。而根中只检测到儿茶素 EC (图 1F 和图 2B)。从儿茶素的聚合物(原花青素)的差异来看, 鲜叶中原花青素含量最低(图 2A), 其花青素反应产物为 B 环一羟基、双羟基和三羟基花青素, 但 B 环双羟基产物含量最高(图 1D)。根中原花青素含量最高, 其花青素反应产物主要是 B 环双羟基的花青素(2 H)。从黄酮醇的含量和组分差异来看, 鲜叶中黄酮醇类化合物种类多 (图 2A)。茎中黄酮醇种类与鲜叶相似(数据略)。而在根中黄酮醇种类较少 (图 1G)、含量较低(图 2A)。

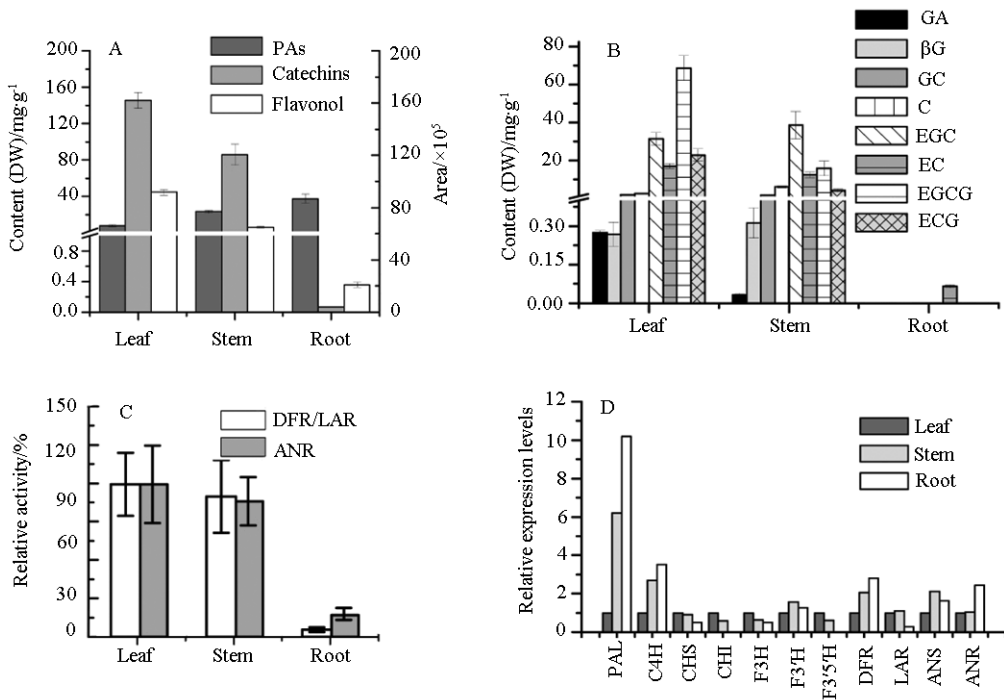


A 和 E 分别是茶鲜叶和根提取物中多酚总离子流色谱图; B 和 F 分别是茶鲜叶和根提取物中酚酸和儿茶素的 HPLC 分析; C 和 G 分别是茶鲜叶和根提取物中黄酮醇的 HPLC 分析; D 和 H 分别是茶鲜叶和根提取物盐酸丁醇水解后花青素的 HPLC 分析 1, 1-O-没食子酰- β -D-葡萄糖(β G); 2, 没食子酸; 3, 儿茶素; 4, 没食子儿茶素; 5, 儿茶素; 6, 原花青素二聚体; 7, 表儿茶素; 8, 表没食子儿茶素没食子酸酯; 9, 原花青素三聚体; 11a, 表儿茶素没食子酸酯; 10, 11b, 12~18, 黄酮醇; 19, 飞燕草色素; 20, 花青色素; 21, 天竺葵色素

A and E, Total ion chromatography of polyphenols in leaf and root extracts, respectively; B and F, HPLC analysis of phenolic acids and catechins in leaf and root extracts, respectively; C and G, HPLC analysis of flavonols in leaf and root extracts, respectively; D and H, HPLC of anthocyanins in root and leaf extracts after acid hydrolysis with *n*-butanol-HCL. 1, β -glucogallin; 2, gallic acid; 3, (+)-gallocatechin; 4, (-)-epigallocatechin; 5, (+)-catechin; 6, procyanidin dimer; 7, (-)-epicatechin; 8, (-)-epigallocatechin-3-gallate; 9, procyanidin trimer; 11a, (-)-epicatechin-3-gallate; 10, 11b, 12-18, flavonols. 19, delphinidin; 20, cyanidin; 21, pelargonidin

图 1 茶树鲜叶和根中多酚的 LC-TOF/MS 分析

Figure 1 LC-TOF/MS assay for polyphenols in leaf and root extracts



A 和 B, 茶树不同器官类黄酮合成相关的多酚含量; C, 茶树不同器官类黄酮合成关键酶酶活分析; D, 茶树不同器官黄酮合成的相关基因表达分析。注: 黄酮醇含量以 HPLC 色谱图峰面积计算

A and B, The content of polyphenols related to flavonoid biosynthesis in different organs; C, Enzymatic activities analysis of key enzymes involved in flavonoid biosynthesis in different organs; D, Expression of genes involved in flavonoid biosynthesis in different organs. Note: The flavonol content was calculated from the area of the peak in HPLC chromatograms

图 2 茶树不同器官类黄酮合成相关的多酚含量、酶活、基因表达分析

Figure 2 Analysis of polyphenols content, enzymatic activities and expression of genes related to flavonoid biosynthesis in different organs of the tea plant

酶学分析表明(图 2C), 鲜叶和茎中 DFR/LAR 和 ANR 酶活相近; 根中 ANR 酶活远低于叶和茎中的酶活, 而根中 DFR/LAR 酶活微弱。

荧光定量分析结果(图 2D)显示, 从鲜叶、茎到根, 类黄酮合成相关的 *CHI*、*F3H* 和 *F3'5'H* 基因依次降低。这可能直接地导致了根中黄酮醇含量显著降低、B 环三羟基儿茶素(EGCG, EGC 和 GC)、黄酮醇 (槲皮素)和原花青素(飞燕草色素)的缺失(图 1 和 图 2)。

根中微弱的 DFR/LAR 酶活, 很可能导致根中 C 的缺失。是否 *PAL*、*C4H*、*DFR* 和 *ANR* 基因的高水平表达与根中高水平积累 PAs 有关, 需要进一步研究。

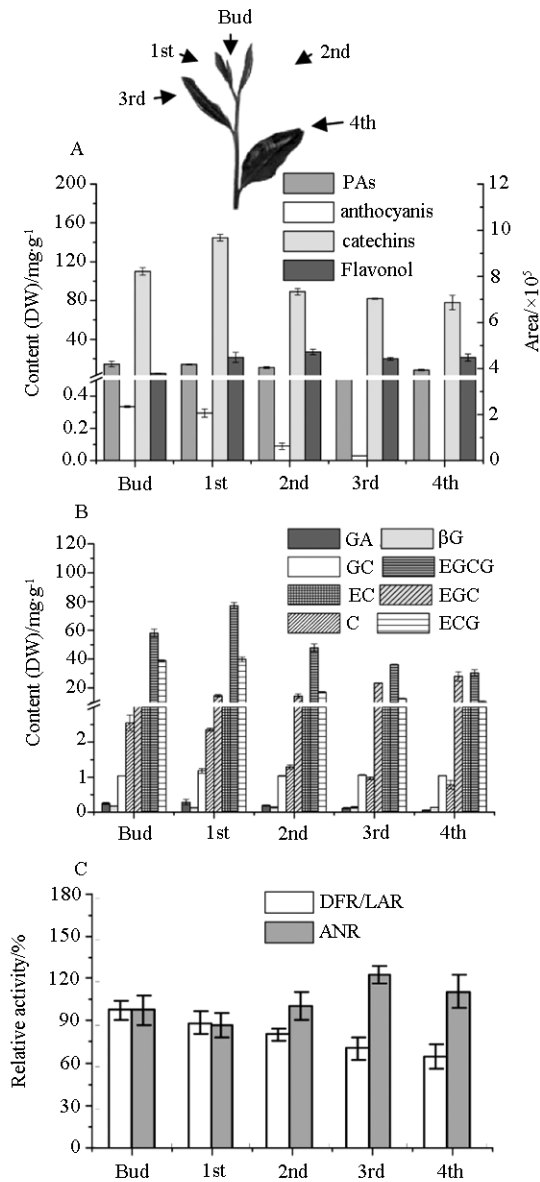
2.2 茶树鲜叶不同发育时期涉及类黄酮合成、酚类物质合成与积累的特点

定量分析结果显示(图 3), 酚酸的积累主要集中在幼嫩组织, 在芽中高表达, 且随着叶的发育含量逐渐降低。黄酮醇类含量在一叶和二叶中较高, 成熟叶中下降, 但值得注意的是, 新生的芽中黄酮醇类的含量特别低。儿茶素总含量的变化趋势是一叶

中最高, 其次是芽(图 3A), 在成熟叶中儿茶素的含量明显少于一叶。儿茶素单体 GC, C 和 EC 在随着鲜叶发育程度增加, EGC 含量依次上升, 不同发育时期鲜叶中含量较低且相对稳定, 相反酯型 EGCG 和 ECG 的含量依次下降。与单体黄烷-3-醇相比, 不同发育时期鲜叶中的原花青素含量很低且变化相对稳定(图 3B), 其中, 幼嫩组织的含量比成熟的略高, 变化趋势与单体儿茶素的基本一致。虽然在叶片发育过程中, 黄烷-3-醇含量有变化, 但是从变化幅度看, 小于黄酮醇类和酚酸的变化。花青素的总体水平较低, 且随着鲜叶发育依次减少(图 3A)。酶学检测表明, 随着鲜叶的发育, DFR/LAR 的活性依次降低, 相反 ANR 的活性, 随着鲜叶的发育, 呈上升趋势。三叶 ANR 酶活最高(图 3A)。

荧光定量分析(图 4)表明, 在鲜叶不同发育时期, *PAL*、*C4H*、*CHS*、*F3'H*、*F3'5'H*、*DFR*、*LAR* 和 *ANR* 基因的表达水平与儿茶素和黄酮醇积累规律一致。从一叶到四叶 *F3'5'H* 转录水平无明显区别。ANR 基因表达水平与相应的酶活变化趋势一致^[12]。但是不同发育阶段的鲜叶中 *DFR*、*LAR* 和

ANR 基因表达水平和酶活变化与 C、GC、EC 和 EGC 的积累并不完全一致。



A 和 B, 茶树不同发育时期鲜叶中类黄酮合成相关的多酚含量; C, 茶树不同发育时期鲜叶中类黄酮合成关键酶活分析。注: 黄酮醇含量以 HPLC 色谱图峰面积计算

A and B, polyphenols contents involved in flavonoid biosynthesis in leaves at different development stages; C, Enzymatic activities analysis of key enzymes involved in flavonoid biosynthesis in tea leaves at different development stages. Note: The flavonol content was calculated from the area of the peak in HPLC chromatograms

图 3 茶树不同发育时期鲜叶中类黄酮合成相关的多酚含量、酶活分析

Figure 3 Analysis of polyphenols content and enzymatic activities involved in flavonoid biosynthesis in tea leaves at different development stages

3 讨论

本试验对茶树中的酚类物质进行了定性定量分析, 研究了主要酚类物质在茶树不同器官、叶片不同发育时期的积累规律。研究结果显示, 不同器官中酚类物质种类及含量差异较大。在鲜叶和茎中的儿茶素、黄酮醇、酚酸组分较多且含量较高; 而在根中则相反, 只能检测到少量 B 环双羟基的儿茶素和黄酮醇。茶树叶中原花青素主要以儿茶素的二聚和三聚体形式存在, 含量少种类多; 根中则可能以多聚的形式存在, 含量高于叶和茎。qRT-PCR 结果显示, 从鲜叶到茎到根, *CHI*、*F3H* 和 *F3'5'H* 表达依次降低, 这些差异可能与根中儿茶素和黄酮醇含量低、缺乏 B 环三羟基化合物有关。酶学实验显示, 从鲜叶到茎到根, *DFR/LAR* 和 *ANR* 酶活逐渐降低, 在鲜叶和茎中无明显差异, 而根中微弱的 *DFR/LAR* 酶活, 很可能导致根中 C 的缺失。

鲜叶不同发育时期酚类物质表现出不同的变化规律。虽然在叶片发育过程中, 黄烷-3-醇含量有变化, 但是从变化幅度看, 小于黄酮醇类和酚酸的变化。鲜叶中花青素的含量较低, 且随着鲜叶发育依次减少。qRT-PCR 结果显示, *PAL*、*F3H*、*LAR* 和 *DFR* 基因的表达与不同发育时期鲜叶中儿茶素和黄酮醇积累规律相一致。酶学实验数据显示, 随着鲜叶的发育, *DFR/LAR* 的活性依次降低, 相反 *ANR* 的活性呈增高趋势, 它们的变化与酯型 C 的含量依次下降, 而 EGC 含量依次上升趋势相吻合。值得进一步研究的是根和叶中原花青素积累差异的原因, 为什么叶中有大量的单体儿茶素却较少聚合的原花青素, 而根中却相反, 其中的机制是什么^[13-14]? 有没有可能是叶中高水平的儿茶素 C 环 3-位的没食子化反应妨碍了原花青素的聚合。茶树儿茶素的积累可能受到合成、水解或氧化、糖苷化、甲基化和聚合作用多种因素的共同影响^[14]。

不同发育阶段的鲜叶常常被用来研究儿茶素合成与代谢规律^[15], 他们的研究通常只考虑儿茶素积累水平和基因表达之间的关系。我们研究发现, 有时难以阐述儿茶素积累与基因表达之间的关系。原因之一, 儿茶素的积累可能受到合成、水解或氧化、糖苷化、甲基化和聚合作用多种因素共同影响^[14]。原因之二, 酚类物质合成基因常常是以多基因家族形式存在, 这些基因表达模式并不清晰^[16]。今后将对茶树儿茶素合成、积累、转移的规律展开进一步研究。

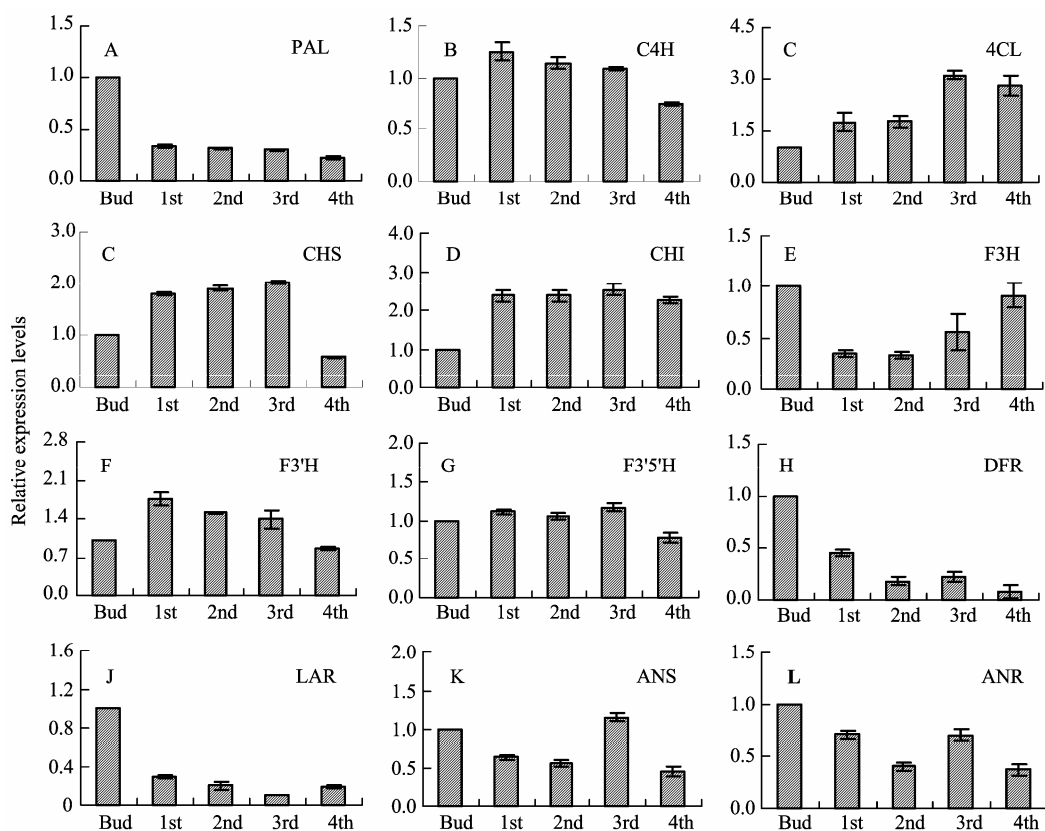


图 4 茶树不同发育时期鲜叶中类黄酮合成途径中基因表达分析

Figure 4 Expression of genes involved in flavonoids biosynthesis pathway in leaves at different developmental stages

参考文献:

- [1] He Q, Yao K, Jia D, et al. Determination of total catechins in tea extracts by HPLC and spectrophotometry[J]. Nat Prod Res, 2009, 23(1): 93-100.
- [2] Dixon R A, Xie D Y, Sharma S B. Proanthocyanidins--a final frontier in flavonoid research?[J]. New Phytol, 2005, 165(1): 9-28.
- [3] Haslam E, Cai Y. Plant polyphenols (vegetable tannins): gallic acid metabolism[J]. Natural Product Reports. 1994, 11(1): 41-66.
- [4] Pang Y, Peel G J, Sharma S B, et al. A transcript profiling approach reveals an epicatechin-specific glucosyltransferase expressed in the seed coat of *Medicago truncatula*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008, 105(37): 14210- 14215.
- [5] Lin L Z, Chen P, Harnly J M. New phenolic components and chromatographic profiles of green and fermented teas[J]. J Agric Food Chem, 2008, 56(17): 8130-8140.
- [6] Ashihara H, Deng W W, Mullen W et al. Distribution and biosynthesis of flavan-3-ols in *Camellia sinensis* seedlings and expression of genes encoding biosynthetic enzymes[J]. Phytochemistry, 2010, 71(5/6): 559-566.
- [7] Jiang X, Liu Y, Li W, et al. Tissue-specific, development-dependent phenolic compounds accumulation profile and gene expression pattern in tea plant [*Camellia sinensis*][J]. plos one, 2013.
- [8] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254.
- [9] Zhang X, Liu Y, Gao K, et al. Characterisation of anthocyanidin reductase from Shuchazao green tea[J]. J Sci Food Agr, 2012, 92(7): 1533-1539.
- [10] 高可君. 茶叶中二氢黄酮醇还原酶/无色花青素还原酶性质研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2008.
- [11] Zhao L, Gao L, Wang H, et al. The R2R3-MYB, bHLH, WD40, and related transcription factors in flavonoid biosynthesis[J]. Funct Integr Genomics, 2012.
- [12] Agati G, Pinelli P, Cortes Ebner S, et al. Nondestructive evaluation of anthocyanins in olive (*Olea europaea*) fruits by in situ chlorophyll fluorescence spectroscopy[J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(5): 1354-1363.
- [13] Savitri Kumar N, Maduwantha B W, Kumar V, et al. Separation of proanthocyanidins isolated from tea leaves using high-speed counter-current chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1216(19): 4295- 4302.
- [14] Peel G J, Dixon R A. Detection and quantification of engineered proanthocyanidins in transgenic plants[J]. Natural Product Communications, 2007, 2(10): 1009-1014.
- [15] Singh K, Rani A, Paul A, et al. Differential display mediated cloning of anthocyanidin reductase gene from tea (*Camellia sinensis*) and its relationship with the concentration of epicatechins[J]. Tree Physiol, 2009, 29(6): 837-846.
- [16] Wu X, Prior R L. Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries[J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(7): 2589-2599.