

短期遮阴对茶树嘌呤碱、氨基酸和儿茶素生物合成的影响

顾辰辰, 王荣秀, 江丽娜, 邓威威*

(安徽农业大学茶树生物学与资源利用国家重点实验室, 合肥 230036)

摘要: 研究了遮阴处理对茶树嘌呤碱、氨基酸和多酚类化合物生物合成的影响。对一年生茶树扦插苗短期遮阴处理后, 通过高效液相色谱和荧光定量 PCR 技术分别对茶树三大代谢产物含量(嘌呤碱代谢, 氨基酸代谢, 多酚类代谢)及生物合成途径中关键基因的表达水平进行检测。结果表明, 短期遮阴处理使得儿茶素总量略下调, 可抑制咖啡碱的合成, 大幅提高氨基酸的合成。遮阴 8 d 可以使其氨基酸总量增加 58.5%, 其中茶氨酸含量增加了近 6 倍。从基因表达差异分析来看, 短期遮阴处理对一些基因的表达影响很大, 如 *TCSI*、*PAL*、*F3'H* 和 *ANR2*。遮阴处理对茶树扦插苗中嘌呤碱、氨基酸和多酚类化合物的生物合成有一定的影响作用。

关键词: 高效液相色谱; 荧光定量 PCR; 咖啡碱; 氨基酸; 多酚类化合物; 生物合成

中图分类号: S571.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2017)01-0001-06

Short-term shading influencing the biosynthesis of caffeine, theanine and catechins in tea (*Camellia sinensis*)

GU Chenchen, WANG Rongxiu, JIANG Lina, DENG Weiwei

(State Key Laboratory of Tea Plant Biology and Utilization, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: In this paper, we investigated the influence of short-term shading on the biosynthesis of purine alkaloids, amino acids and catechins. We analyzed the content of three major metabolites (the metabolisms of purine alkaloids, amino acids and polyphenols) and the expression of key genes in biosynthesis pathways in tea (*Camellia sinensis*) by HPLC (high performance liquid chromatography) and fluorescence quantitative PCR. Our data revealed that short-term shading slightly down-regulated the total catechins and restrained the biosynthesis of caffeine. Moreover, short-term shading had notable effects on amino acids biosynthesis by increasing 58.5%. The content of theanine had about sixfold increase compared with the control group, and it was remarkably correlated with the expression of some genes, such as *TCSI*, *PAL*, *F3'H* and *ANR2* according to the differential expression of these genes. The results showed that shading has certain relation with the biosynthesis of purine alkaloids, amino acids and polyphenols in rooted tea cuttings.

Key words: HPLC; qRT-PCR; caffeine; amino acid; polyphenols; biosynthesis

茶树 (*Camellia sinensis*) 原产中国云贵高原及其边缘地区的原始森林中, 为 C₃ 叶用经济作物, 生态习性喜荫喜湿^[1]。茶树的物质代谢不仅由自身的遗传特性决定, 同时也受外部环境、栽培方法影响。光照是茶树光合作用的必要条件, 影响碳、氮代谢的比例^[2]。近年来的研究表明遮阴可明显改变茶园微域生态环境, 进而影响茶树的光合作用、营养物质吸收、代谢及其在茶树体内的重新分配等一

系列生理与生化过程, 最终影响到茶叶产量与自然品质^[3]。随着生活水平的提高, 现在人们对茶叶品质的要求越来越高, 适度遮阴可以促进茶树光合作用的进行, 有利于有机物的积累, 对茶品质有提高作用^[1]。但是, 对于茶树经遮阴处理后, 其咖啡碱、氨基酸及多酚类物质的生物合成情况报道较少。本试验采用一年生茶树扦插苗为研究材料, 通过短期遮阴处理 0~8 d 后, 对其包含咖啡碱在内的嘌呤

收稿日期: 2016-09-05

基金项目: 国家自然科学基金(31300576)资助。

作者简介: 顾辰辰, 硕士研究生。E-mail: 499435329@qq.com

* 通信作者: 邓威威, 副教授。E-mail: dengweiwei@ahau.edu.cn

碱、氨基酸及多酚类化合物进行检测,并用 qRT-PCR 技术对这三大代谢途径中关键基因的表达情况进行研究,旨在找出在遮阴处理过程中,茶树嘌呤碱、氨基酸、多酚类的生物合成情况,研究结果将为茶树栽培技术和改良茶叶品质提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

将生长势基本一致的一年生茶树扦插苗(龙井43),用透光率(20±5)%的遮阳网进行遮阴处理,于0、1和8d分别取其顶端一芽一叶,样品快速称重后,立即用液氮冷冻,置于-80℃冰箱保存备用。

1.2 茶叶中氨基酸、嘌呤碱、多酚类化合物含量测定

茶叶水分测定按 GB/T 8304-2002 标准测定^[4],茶样中氨基酸、嘌呤碱的提取方法如下:取出事先冷冻的茶样 0.5 g(准确至 0.0001 g),用热水浸提法进行茶样提取后定容至 10 mL,混匀。取一部分试液过 0.22 μm 滤膜,待测。对于茶样中多酚类化合物的提取方法为:取出事先冷冻的茶样 0.5 g(准确至 0.0001 g),用 80%的甲醇进行研磨提取后定容至 10 mL,混匀。取一部分试液过 0.22 μm 滤膜,待测。

1.2.1 HPLC 法检测氨基酸含量的色谱条件 美国 Waters 600 型高效液相色谱仪,2475 荧光检测器(λ_{ex}=250 nm, λ_{em}=395 nm),流速 1 mL·min⁻¹;

流动相为: A 相磷酸缓冲盐溶液(1:10), B 相 100% 乙腈; C 相纯水(屈臣氏蒸馏水);液相柱: Waters 公司的 AccQ·Tag C₁₈ 氨基酸专用分析柱;线性变化范围为: 0~17 min, A 相 100%; 17~24 min, A 相 91%, B 相 5%, C 相 4%; 24~32 min, A 相 80%, B 相 17%, C 相 3%; 32~34 min, A 相 68%, B 相 20%, C 相 12%; 34~35 min, A 相 68%, B 相 20%, C 相 12%; 35~38 min, A 相 0%, B 相 60%, C 相 40%; 38~45 min, A 相 100%。

1.2.2 嘌呤碱 HPLC 检测色谱条件 美国 Waters 600 型高效液相色谱仪,2489 可见紫外检测器,检测波长 274 nm,流速 1 mL·min⁻¹。流动相为: A 相 0.2%乙酸, B 相 100%乙腈;液相柱: Phenomenex 粒径 5 μm 的 ODS250 × 4.6 mm C₁₈ 反相柱。线性变化范围为: 0~25 min, A 相 92%, B 相 8%; 25~30 min, A 相 83%, B 相 17%; 30~32 min, A 相 10%, B 相 90%; 35~40 min, A 相 92%, B 相 8%。

1.2.3 儿茶素 HPLC 检测色谱条件 色谱条件除检测波长为 278 nm,流动相的线性洗脱条件为: 0~16 min, A 相 94%, B 相 6%; 16~22 min, A 相 86%, B 相 14%; 22~32 min, A 相 85%, B 相 15%; 32~37 min, A 相 82%, B 相 18%; 37~45 min, A 相 71%, B 相 29%; 45~50 min, A 相 55%, B 相 45%; 51~60 min, A 相 94%, B 相 6%。

表 1 嘌呤碱、氨基酸、儿茶素代谢关键基因引物序列

Table 1 Primer sequences of key genes for purine alkaloids, amino acids, catechins metabolisms

基因 Gene	序列号 Accession number	引物序列(5'→3') Primer sequence
<i>GAPDH</i>	XM_002263109	F-TTGGCATCGTTGAGGGTCT; R-CAGTGGGAACACGGAAAGC
<i>TCSI</i>	AB031280	F-AGCAAAGCTACCGAAGACCA; R-TCCACACAAGAGCAAAAATGC
<i>sAMS</i>	AJ277206	F-CTTACGCCATTGGTGTTCCT; R-GGCAGCAGTCTTCAAGAACC
<i>TIDH</i>	EU106658	F-TGCTGAAAGAAGTGGTGTGC; R-TCCCTTTTGTCTATTGCTTCC
<i>GS</i>	AB117984	F-ATGTCTCTTCTCCGATCTTTGC; R-TTACGGTTCCAGAGATGTTGT
<i>TS</i>	DD410895	F-CTCAGAAGCAAAGCCAGGAC; R-CCGGCCAACCCTAATGGA
<i>PAL</i>	D26596	F-TCTGCCAAGCCGTAGATTTGA; R-AACGCCCATAGTTAGAACGCG
<i>DFR1</i>	AB018685.1	F-ATTGGCAGAGAAAGCAGCAT; R-GTGATTAGCTTGGTGGGAA
<i>DFR2</i>	AB018686.1	F-TTGGGCAATGCTAGCACA; R-TGCCTTCCACAAGCTGAG
<i>ANR1</i>	AY169404	F-TTTAAAAGCCTGCGCGAAAG; R-ATGACAAGCCCCGTTCCAT
<i>ANR2</i>	AY641729	F-GCGAAGTTGATCCTCTCGTC; R-AACCACATCGTCAAGTGAACA
<i>F3'H</i>	GQ438849	F-ACCTTTCGACTTCACCCATCAAC; R-TAACTGGACCATACGCAACCCTA
<i>UFGT</i>	GH618818	F-GGCAAGAAGCTAATAGGGTCGTT; R-TTGTATCATTCGGAAGTGgTGGg

1.3 荧光定量 PCR 分析

1.3.1 总 RNA 提取 总 RNA 提取为改进后的(CTAB)法,采用 RNAprep pure Plant Kit(TIANGEN 公司),RNA 质量通过琼脂糖凝胶电

泳和核酸蛋白测定仪 NANOPROP ND-1000(Thermo)进行检测。

1.3.2 RNA 反转录 cDNA 第一链合成 取 4 μg 总 RNA 于 20 μL 溶液中,按 PrimeScript RT Master

Mix Perfect Time 试剂盒 (TaKaRa 公司) 方法操作, 将各样品总 RNA 反转录合成 cDNA 第一链。获得的 cDNA 置于 -20°C 贮藏备用。

1.3.3 引物的设计 根据在 GenBank 登录的基因序列和 Primer Premier 5.0 软件设计引物, 咖啡碱, 茶氨酸, 儿茶素代谢相关的关键酶基因(分别是 *sAMS*, *TCS1*, *TIDH*; *TS*, *GS*; *PAL*, *DFR1*, *DFR2*, *ANR1*, *ANR2*, *F3'H*, *UFGT*), 内参为 *GAPDH*。(引物序列见表 1)。

1.3.4 荧光定量 PCR PCR 反应体系包含 $2\ \mu\text{L}$ 稀释 cDNA, $10\ \mu\text{L}$ SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa 公司), 和 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 特异性引物于 $20\ \mu\text{L}$ 。PCR 扩增反应在 C-1000 Thermal Cycler(BIO-RAD 公司) 进行。反应条件为 95°C 预变性 30 s、 95°C 变性 5 s、 60°C 退火 30 s, 39 个循环。根据公式 $Q=E\Delta Ct$, 对每个扩增样品的 *Ct* 值计算各基因的相对表达量 *Q*。

各基因相对表达量通过 *GAPDH* 表达量校正。

2 结果与分析

2.1 样品中氨基酸、嘌呤碱、多酚类化合物的含量

2.1.1 样品中嘌呤碱物质分析结果 茶树中的嘌呤碱包括咖啡碱、可可碱、茶叶碱、黄嘌呤、次黄嘌呤、拟黄嘌呤等, 其中咖啡碱的含量最多。咖啡碱是茶叶重要的滋味物质和主要品质成分之一, 是一种黄嘌呤生物碱化合物, 其与茶黄素以氢键缔合后形成的复合物具有鲜爽味, 对茶叶品质有很大的影响^[5]。根据表 2 可见, 遮阴后 7-甲基黄嘌呤、可可碱和茶叶碱的含量随着遮阴天数的增多而增加, 特别是 7-甲基黄嘌呤增加较为明显; 在遮阴的整体过程中, 茶叶碱略微上升, 而咖啡碱和嘌呤碱总含量呈先下降后上升的趋势, 总体上来说略低于对照; 在遮阴的整体过程中, 茶叶碱基本没有变化。

表 2 遮阴处理后嘌呤碱含量变化

嘌呤碱种类 Purine alkaloids	遮阴处理 Shading		
	0 d	1 d	8 d
7-甲基黄嘌呤 7-Methylxantine	0.10 ± 0.03	0.20 ± 0.05	0.35 ± 0.01
可可碱 Theobromine	0.19 ± 0.00	0.20 ± 0.07	0.25 ± 0.05
茶叶碱 Theophylline	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.01
咖啡碱 Caffeine	12.67 ± 0.99	10.50 ± 0.77	12.12 ± 1.26
嘌呤碱总量 Total purine alkaloids	13.02 ± 1.03	10.96 ± 0.90	12.79 ± 1.33

表 3 遮阴处理后氨基酸含量变化

游离氨基酸 Amino acids	遮阴处理 Shading		
	0 d	1 d	8 d
天冬氨酸 (Asp)	1.29 ± 0.32	1.46 ± 0.23	0.88 ± 0.07
丝氨酸 (Ser)	2.62 ± 1.05	1.86 ± 0.47	4.66 ± 1.12
谷氨酸 (Glu)	2.75 ± 0.53	3.56 ± 0.51	4.40 ± 0.32
甘氨酸 (Gly)	0.39 ± 0.11	0.52 ± 0.41	0.41 ± 0.10
组氨酸 (His)	0.45 ± 0.05	0.46 ± 0.13	0.53 ± 0.02
精氨酸 (Arg)	0.21 ± 0.09	0.55 ± 0.09	1.66 ± 0.70
苏氨酸 (Thr)	0.39 ± 0.11	0.42 ± 0.06	0.65 ± 0.28
丙氨酸 (Ala)	0.55 ± 0.11	0.60 ± 0.20	0.64 ± 0.05
脯氨酸 (Pro)	0.88 ± 0.24	0.53 ± 0.23	0.38 ± 0.06
茶氨酸 (Theanine)	0.14 ± 0.05	0.55 ± 0.07	0.97 ± 0.17
半胱氨酸 (Cys)	0.22 ± 0.06	0.27 ± 0.02	0.28 ± 0.14
酪氨酸 (Tyr)	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.02
缬氨酸 (Val)	0.13 ± 0.02	0.12 ± 0.06	0.12 ± 0.01
蛋氨酸 (Met)	0.29 ± 0.01	0.33 ± 0.02	0.38 ± 0.19
赖氨酸 (Lys)	0.09 ± 0.05	0.16 ± 0.00	0.35 ± 0.15
异亮氨酸 (Ile)	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.13 ± 0.04
亮氨酸 (Leu)	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.03
苯丙氨酸 (Phe)	0.13 ± 0.01	0.16 ± 0.03	0.32 ± 0.10
氨基酸总量 Total amino acids	10.73 ± 2.81	11.74 ± 2.56	16.82 ± 3.57

表 4 遮阴处理后儿茶素含量的变化

儿茶素种类 Types of catechins	遮阴处理 Shading		
	0 d	1 d	8 d
茶没食子素 Theogallin	1.20 ± 0.63	1.12 ± 0.31	1.00 ± 0.16
没食子儿茶素 GC	2.07 ± 0.02	2.77 ± 0.53	2.14 ± 0.85
表没食子儿茶素 EGC	20.55 ± 0.56	19.24 ± 1.39	14.53 ± 3.85
儿茶素 C	0.09 ± 0.04	0.41 ± 0.11	0.19 ± 0.04
表儿茶素 EC	15.10 ± 0.87	14.78 ± 0.63	11.05 ± 3.31
表没食子儿茶素没食子酸酯 EGCG	18.11 ± 1.42	16.72 ± 3.22	20.07 ± 1.02
表儿茶素没食子酸酯 ECG	9.93 ± 0.57	10.90 ± 1.71	10.98 ± 1.01
儿茶素总量 Total tea catechin	67.05 ± 4.07	65.93 ± 7.88	59.95 ± 10.16

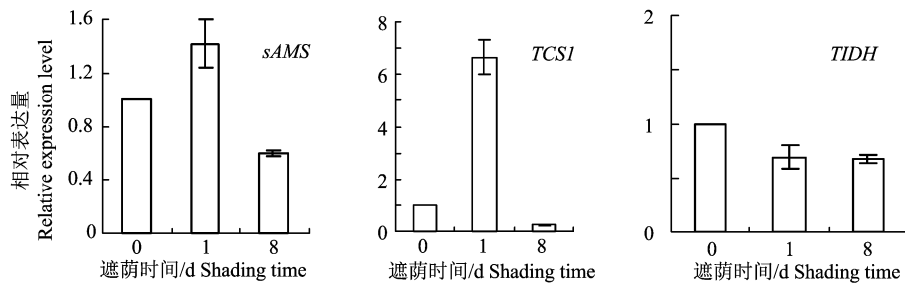


图 1 遮阴处理后嘌呤碱代谢途径关键基因 qRT-PCR 分析

Figure 1 The key gene expressions of purine alkaloids biosynthesis by quantitative real time RT-PCR after shade treatment

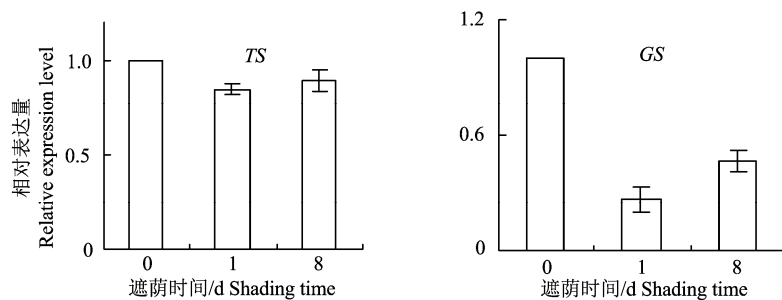


图 2 遮阴处理后茶氨酸代谢途径关键基因 qRT-PCR 分析

Figure 2 The key enzyme gene expressions in theanine biosynthesis by quantitative real time RT-PCR after shade treatment

2.1.2 样品氨基酸含量分析结果 氨基酸是构成茶叶滋味的重要组成部分，在茶叶滋味的协调中具有重要作用，是提高茶叶鲜爽度的重要物质^[5]。遮阴后氨基酸含量如表 3 所示。从表 3 中可以看出，遮阴有利于氨基酸的积累，遮阴后氨基酸总量明显增多，其中 Arg 含量增加了近 7 倍，Ser 的含量增加了 2 倍。

茶氨酸作为茶叶中特有的氨基酸，含量约为新茶的 1%~2%，是组成茶叶鲜爽香味的重要物质之一，尤其对绿茶品质有较大的影响^[5]。由表 3 可以看出，茶氨酸的含量在遮阴后变化显著，增加了近 6 倍。

2.1.3 样品儿茶素组成成分分析结果 茶叶中多酚类的含量一般在 18%~36%（干重）之间，它们与茶树的生长发育、新陈代谢和茶叶品质关系非常密

切，对人体也具有重要的生理活性。由表 4 可见，酯型儿茶素 EGCG，ECG 有先减低后升高的趋势，而非酯型儿茶素中除 C 有增加外，EGC，EC 均发生不同程度的下降，儿茶素总量随遮阴处理有下降趋势。

2.2 茶氨酸、嘌呤碱、多酚类化合物合成途径中关键基因的表达分析

用 qRT-PCR 分析遮阴后茶树叶片咖啡碱，茶氨酸，儿茶素代谢相关的关键基因（分别是 *sAMS*，*TCSI*，*TIDH*；*TS*，*GS*；*PAL*，*DFR1*，*DFR2*，*ANR1*，*ANR2*，*F3'H*，*UFGT*），内参为 *GAPDH*。

2.2.1 咖啡碱生物合成途径中关键基因的表达分析

在茶树和咖啡中，咖啡碱是由黄嘌呤核苷→7-甲基黄嘌呤核苷→7-甲基黄嘌呤→可可碱→咖啡碱途径合成^[6]。Suzuki 等总结出合成咖啡碱的 7-甲基黄

嘌呤有 3 个来源途径, 分别为: AMP 途径, IMP 途径和 GMP 途径^[6], 随后 Koshiishi 等发现除此之外还有 sAMS 途径^[7]。TCS1 (咖啡碱合成酶) 是茶树咖啡碱合成中的关键酶, 具有催化后两步甲基化反应的双重催化活性, 可以催化生成可可碱和咖啡碱; sAMS (S-腺苷甲硫氨酸合成酶) 参与了 sAMS 途径; TIDH (次黄嘌呤核苷酸脱氢酶) 是 AMP、IMP

和 GMP 途径形成 7-甲基黄嘌呤必需的酶。由图 1 可知, 遮阴后, *sAMS* 的表达量呈现先上升 (1 d) 后下降 (8 d) 的趋势; 从 *TCS1* 的表达情况来看, 在遮阴 1 d 时, 显著提高 (表达量约为遮阴 0 d 的 6 倍); 但是在遮阴 8 d 时, 表达量显著下降。*TIDH* 随着遮阴天数增加, 呈现略微下降的趋势。

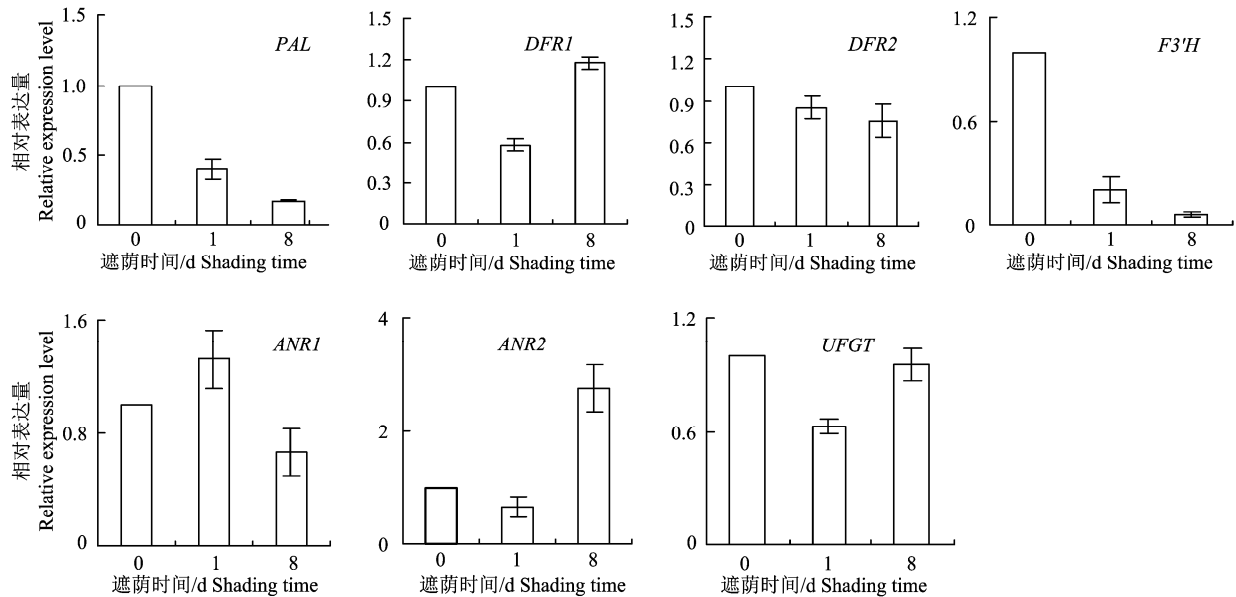


图 3 遮阴处理后多酚类代谢途径关键基因 qRT-PCR 分析

Figure 3 The key gene expressions in tea polyphenols biosynthesis by quantitative real time RT-PCR after shade treatment

2.2.2 茶氨酸生物合成途径基因的表达分析 TS (茶氨酸合成酶) 是茶氨酸合成代谢的关键酶, 它催化乙胺 (由 Ala 生成) 和 Glu 合成 Theanine; GS (谷氨酰胺合成酶) 将 Glu 的氨贮存在 Gln 的酰胺基内, Gln 之后作为氨的供体, 通过 GS 的作用, 将酰胺的氨基转至 α -酮戊二酸, 生成 Glu^[8]。由图 2 可知, *TS* 在遮阴过程中呈现先略有下降后上升的趋势; *GS* 下降明显, 遮阴 1 d 比遮阴 0 d 下降了 73.5%, 遮阴 8 d 比遮阴 0 d 下降了 53.5%。

2.2.3 多酚类化合物代谢途径中关键基因的表达分析 *PAL* (苯丙氨酸解氨酶) 是连接初生代谢与次生代谢途径的纽带, 是多酚类代谢的起始酶^[7]。由图 3 可知, 遮阴后该基因表达量大幅下降, 遮阴 1 d、8 d 比遮阴前分别减少 59.8% 和 82.9%。*DFR* (二氢黄酮醇 4-还原酶) 是合成花青素和原花青素的关键酶, 该酶催化形成黄烷-3,4-二醇 (无色花青素), 无色花青素又是花色苷、儿茶素和原花色苷合成的共同前体^[9], 该酶有两个同源基因 *DFR1* 和 *DFR2*, 图 3 表明, 二者在遮阴 0 d 时表达量基本一致, 在遮阴 1 d 时都下降, *DFR1* 下降的多, 遮阴 8 d 时,

DFR1 表达量升高, 并高于对照, 而 *DFR2* 继续下降。Xie 等研究发现 *ANR* 能利用 *NADPH*, 使花色苷转变成相应的顺式黄烷-3-醇, 如儿茶素 EC 和 EGC^[10]; 该酶有同源基因 *ANR1* 和 *ANR2*, 本实验中两者在遮阴过程中表达趋势是相反的, *ANR1* 先升后降, *ANR2* 先稍降后大幅增加。*UFGT* (类黄酮糖基转移酶) 是催化无色花青素转化为花青素的酶, 图 3 中该基因在遮阴 0、1 和 8 d 的表达趋势呈先下降后上升。*F3'H* (类黄酮 3'-羟化酶) 经研究显示其活性与黄烷酮类, 黄酮类, 二氢黄酮醇, 黄酮醇类生物合成相关^[11], 该酶随着遮阴天数的增加, 表达量显著下降。

3 讨论

在研究遮阴对茶树嘌呤碱代谢的影响过程中发现, 咖啡碱的含量呈现先下降后上升的趋势。对其代谢过程中关键酶基因进行定量分析可知, 在遮阴 1 d 后, *sAMS* 表达量下降, *TIDH* 上升, 二者催化的途径生成的 7-甲基黄嘌呤增加, 同时 *TCS1* 上升, 与之对应的咖啡碱的含量反而稍有下降; 随遮阴延

长, 3种基因的表达量均成下降趋势, 特别是 *TCS1* 下降到 1/6, 然而从其代谢物咖啡碱的含量来看, 其含量呈现上升趋势, 但是比起遮阴前的含量还是有所下降的。这与基因表达的情况不能够完全吻合, 可能与基因表达的滞后性有关。此外, Koshiishi 等研究表明, 在光处理和暗处理下的茶树叶片中光照条件的改变对 *TCS* 基因的表达并没有影响^[12]。这一结论与本实验的研究不太相同, 可能透光率会影响 *TCS* 的表达, 从而影响咖啡碱的含量, 这有待进一步研究。

关于遮阴对茶树氨基酸的影响, 可以看出遮阴处理使得氨基酸总量和主要的氨基酸含量呈上升趋势。尤其是茶叶主要的滋味成分茶氨酸, 其在遮阴处理下, 明显呈现增长趋势, 说明光照对茶树中茶氨酸含量有很大影响。前人研究证明改变透光率对茶叶中氨基酸含量有很大的影响^[1], 本实验与其实验结果一致。茶氨酸的合成前提物谷氨酸的含量也随着遮阴时间的延长而成上升趋势。丙氨酸, 作为合成乙胺的前体物质, 其变化趋势与茶氨酸、谷氨酸一致。对于茶氨酸合成酶基因 (*TS*) 而言, 在遮阴处理下, 其基因的表达量随着遮阴时间的延长变化不大。而合成谷氨酰胺的谷氨酰胺合成酶基因 (*GS*), 随着遮阴时间的延长呈现先下降后上升的趋势, 但是上升的程度较之遮阴前的基因表达仍有所下降, 这可能是由于茶氨酸的合成竞争了谷氨酰胺合成的底物 (谷氨酸)。

对于遮阴过程中的多酚类化合物的合成而言, 过度遮阴会使其含量降低^[13], 其中儿茶素总量呈下降趋势。而酯型儿茶素 (ECG, EGCG) 在遮阴处理下呈略微上升趋势。从多酚类化合物合成过程中涉及的关键基因的表达情况分析, 其合成途径中的上游基因 *PAL* 和 *F3'H* 都呈大幅下降的表达趋势, 这或许与儿茶素总量的下降趋势有关。*DFR1* 和 *DFR2* 在 C 和 GC 的合成途径中有调控作用。GC 遮阴处理后, 基本没有变化, 而 C 在遮阴 0~1 d 时下降, 1~8 d 时上升, 且超过遮阴前的含量, 从 *DFR1* 先下降后上升、*DFR2* 缓慢下降的基因表达情况可以得出, 同源基因 *DFR1* 对 C 的调控作用明显, *DFR2* 对 GC 的调控作用明显。*DFR1*、*DFR2*、*ANR1* 和 *ANR2* 共同调节 EC、ECG 和 EGC、EGCG 的合成。遮阴过程中, *ANR1* 先升后降, *ANR2* 相反, 两者在调控作用上互补, 这或许是酯型儿茶素 ECG, ECG 和非酯型儿茶素 EGC, EC 变化趋势有所差异的原因。

4 结论

本试验对一年生扦插苗进行遮阴处理, 研究了茶树最为重要的三大代谢产物茶氨酸、咖啡碱、儿茶素的生物合成情况, 并利用 qRT-PCR 技术对代谢途径中涉及的关键基因进行了基因表达分析。研究发现遮阴处理对茶氨酸的合成有促进作用, 而咖啡碱含量则相对降低, 同时总儿茶素含量略微下调, 而酯型儿茶素, 如 ECG, EGCG 在遮阴处理下呈现略微上升的趋势, 研究结果将为茶树栽培技术和改良茶叶品质提供理论依据。

参考文献:

- [1] 张文锦, 林春莲, 熊明民. 茶树遮荫效应研究进展[J]. 福建农业学报, 2007, 22(4): 457-460.
- [2] 李文金, 杨普香, 黎小萍. 茶园遮荫对茶树新梢内含成分的影响[J]. 中国茶叶, 2003, 25(4): 19-20.
- [3] 陈佩, 杨知建, 肖润林. 遮荫对茶园生态环境及其茶树光合作用和产量的影响研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(11): 5604-5605.
- [4] 中华全国供销合作总社. 茶磨碎试样的制备及其干物质含量测定: GB/T 8303-2002[S]. 北京: 中国标准出版社, 2002: 111-112.
- [5] 侯渝嘉, 彭萍, 李中林, 等. 不同遮荫水平对夏秋季茶叶原料品质的影响[J]. 南方农业, 2008, 2(5): 12-14.
- [6] SUZUKI T, ASHIHARA H, WALLER G R. Purine and purine alkaloid metabolism in *Camellia* and *Coffea* plants[J]. Phytochemistry, 1992, 31(8): 2575-2584.
- [7] KOSHIISHI C, KATO A, YAMA S, et al. A new caffeine biosynthetic pathway in tea leaves: utilisation of adenosine released from the S-adenosyl-L-methionine cycle[J]. FEBS Lett, 2001, 499(1/2): 50-54.
- [8] 宛晓春. 茶叶生物化学[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 2003: 138-139.
- [9] 夏涛, 高丽萍. 类黄酮及茶儿茶素生物合成途径及其调控研究进展[J]. 中国农业科学, 2009, 42(8): 2899-2908.
- [10] XIE D Y, SHARMA S B, PAIVA N L, et al. Role of anthocyanidin reductase, encoded by *BANYULS* in plant flavonoid biosynthesis[J]. Science, 2003, 299(5605): 396-399.
- [11] HAGMANN M L, HELLER W, GRISEBACH H. Induction and characterization of a microsomal flavonoid 3'-Hydroxylase from parsley cell cultures[J]. Eur J Biochem, 1983, 134(3): 547-554.
- [12] KOSHIISHI C, ITO E, KATO A, et al. Purine alkaloid biosynthesis in young leaves of *Camellia sinensis*, in light and darkness[J]. J Plant Res, 2000, 113(2): 217-221.
- [13] 周晨阳, 金基强, 姚明哲, 等. 茶树等植物中嘌呤生物碱代谢研究进展[J]. 茶叶科学, 2011, 31(2): 87-94.