

文章编号:1000-8551(2019)09-1724-10

高氨基酸和高茶氨酸茶树资源筛选

方开星 姜晓辉 秦丹丹 李红建 黄华林 潘晨东 李波 吴华玲*

(广东省农业科学院茶叶研究所/广东省茶树资源创新利用重点实验室,广东 广州 510640)

摘要:为筛选高氨基酸和高茶氨酸茶树资源及探究茶树中茶氨酸与氨基酸含量之间的关系,本研究利用茚三酮显色法结合酶标仪检测技术测定 218 份茶树资源春季一芽二叶蒸青样的氨基酸含量,利用高效液相色谱法测定了其茶氨酸含量。结果表明,218 份资源的氨基酸含量介于 1.50%~8.98%之间,其中高氨基酸茶树资源(氨基酸含量 $\geq 5\%$)55 份;茶氨酸含量介于 0%~4.03%之间,其中高茶氨酸茶树资源(茶氨酸含量 $\geq 3\%$)13 份,不含茶氨酸的茶树资源 4 份;茶氨酸与氨基酸含量的比值介于 0~0.78 之间,且集中分布于 0.2~0.5 之间,二者的相关性系数达 0.752,呈极显著正相关。本研究筛选获得了一批氨基酸特异的茶树资源,为高氨基酸和高茶氨酸茶树新品种选育及其形成的分子机理研究奠定了基础。

关键词:茶树;氨基酸;茶氨酸;种质资源

DOI:10.11869/j.issn.100-8551.2019.09.1724

氨基酸是茶树中一类重要的化学物质。茶树中存在 28 种氨基酸,且一般以茶树的特征性组分茶氨酸含量最多,约占游离氨基酸的 30%~70%^[1]。氨基酸总量对茶叶的滋味、香气、汤色、叶底等具有影响^[2-4],与茶叶品质呈显著正相关^[5]。此外,大量研究表明,茶氨酸具有镇静、安神、保护神经、降血压、降血脂、抗肿瘤、肝保护、增强免疫等功能^[6-11]。因此,高氨基酸和高茶氨酸茶树新品种选育是茶树遗传改良的重要方向。

一般认为茶树一芽二叶氨基酸总量大于 5% 为高氨基酸资源^[12],茶氨酸含量大于 3% 为高茶氨酸资源^[13]。近年来,诸多研究者以高氨基酸和高茶氨酸含量为参考指标对国内茶叶资源进行了广泛筛选,获得了一大批高氨基酸茶树种质。如赵洋等^[14]对湖南湘西保靖县葫芦镇黄金村的一个高氨基酸茶树群体共 76 份资源进行氨基酸含量测定,获得 36 份高氨基酸茶树资源,1 份高茶氨酸茶树资源,并选育了黄金茶 1 号、黄金茶 2 号和黄金茶 168 号这 3 个高氨基酸茶树新品种。金孝芳等^[15]对湖北的茶树资源进行筛选获

得了 E1 和 20-2-1 这 2 个高氨基酸茶树资源。此外,一些黄化和白化变异品种具有高氨基酸特性,根据其受环境影响又可分为光照敏感突变型茶树(如黄金芽、白鸡冠和中黄 1 号等)和温度敏感突变型茶树(如安吉白茶)^[16-17]。由于高氨基酸茶树资源在不同地理环境条件下含量存在差异且大部分具有高氨基酸,因此在华南地区筛选综合性状优良的高氨基酸茶树资源具有重要意义。

广东省农业科学院茶叶研究所茶树资源与育种团队一直致力于茶树种质资源收集、保存、鉴评与新品种选育研究,建有“广东省茶树种质资源库”,现保存国内外茶树种质资源共 1 800 余份,涵盖大叶、中叶、小叶、乔木、小乔木、灌木等多种类型。为充分利用这些资源,从中筛选出高氨基酸和高茶氨酸茶树种质,本研究对收集保存的 218 份茶树核心材料的氨基酸含量和茶氨酸含量进行测定,以期对优良高氨基酸和高茶氨酸茶树新品种选育及其形成机理研究提供一定的理论依据。

收稿日期:2019-02-21 接受日期:2019-05-04

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项(CARS-19),广东省科技计划项目(2014A020208056,2016A030303032,2014A030313567),广州市科技计划项目(201506010018)

作者简介:方开星,男,助理研究员,主要从事茶树育种与分子生物学研究。E-mail:fangkaixing321@163.com

* **通讯作者:**吴华玲,女,副研究员,主要从事茶树育种与分子生物学研究。E-mail:wuhualing@163.com

1 材料与方法

1.1 试验材料

以保存于广东省农业科学院茶叶研究所广东省茶树资源库的218份茶树资源[包括茶及其变种(阿萨姆变种、白毛茶变种和毛叶茶变种)]为研究对象。

1.2 氨基酸标准曲线绘制

准确称量0.2 g谷氨酸粉末,溶解于70 mL水中,并在100 mL容量瓶中定容,配置成 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的谷氨酸母液。用移液管分别吸取0.25、0.375、0.5、0.625、0.75、1、1.25、2.5、3.75 mL的母液于5 mL容量瓶中,定容配置成浓度分别为0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.40、0.50、1.00、1.50 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的工作液。

谷氨酸溶液经0.22 μm 滤膜抽滤后,分别取0.5 mL pH值8.0的磷酸缓冲液及0.5 mL 2%茚三酮溶液于10 mL的离心管中混匀,然后置于100℃水浴锅中加热15 min,期间每隔3 min混匀一次。加热结束后取出,在室温下冷却。定容至10 mL后,取250 μL 于96孔酶标板上,并检测吸光度值。通过吸光度值推算氨基酸含量。每个样品设4次重复。

1.3 茶氨酸标准曲线绘制

准确称量茶氨酸0.2 g溶解于80 mL水中,并用容量瓶定容到100 mL,配置成 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的母液,分别取0.025、0.050、0.075、0.100、0.125、0.150、0.200、0.250、0.500、0.750 mL,用水稀释定容至100 mL,制备成0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.40、0.50、1.00、1.50 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的工作液。

茶氨酸检测之前根据安捷伦公司氨基酸衍生试剂包中提供的方法进行邻苯二甲醛(o-phthalaldehyde, OPA)柱前衍生。流动相A为 $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$ (pH值8.0);流动相B为乙腈:甲醇:水(45:45:10, v:v)的混合物。流速为 $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长为338 nm。梯度洗脱程序详见表1。

表1 梯度洗脱程序
Table 1 Program of gradient elution

	时间 Time/min						
	0	1.0	9.8	10.0	12.0	12.5	14.0
流动相 A Mobile phase A/%	90	90	43	0	0	90	90
流动相 B Mobile phase B/%	10	10	57	100	100	10	10

1.4 样品制备

春季采集218份茶树种质资源新梢一芽二叶,采用蒸气杀青、烘箱干燥固样,并用YM203磨碎机(奥克斯,中国)进行研磨,过0.1 mm孔径筛,备用。准确称量0.1 g样品于10 mL玻璃离心管中,用移液管加入10 mL 100℃的超纯水并密封。混匀后置于100℃水浴锅中加热45 min,每隔10 min混匀一次。每个样品设3次生物学重复。冷却后用5417R离心机(Eppendorf, 德国)低速离心后抽滤。参照1.2和1.3进行样品氨基酸和茶氨酸含量的测定。

2 结果与分析

2.1 218份茶树资源一芽二叶氨基酸含量测定

将10个不同梯度浓度的谷氨酸经显色反应后冷却,定容,取250 μL 于96孔板中。利用酶标仪测定吸光度,绘制标准曲线,标准曲线公式为 $y=0.6018x+0.1492$,其中 x 为氨基酸浓度, y 为吸光度值(图1)。通过推算,氨基酸干物质含量=(OD值 $\times 10-1.492$)/ $0.6018 \times 100\%$ 。将218份种质资源的样品与茚三酮溶液反应后,加入到96孔板中,每列2个样品,每个样品4个重复,不同样品在96孔板中显色存在差异,表明不同资源的氨基酸含量不同,颜色越深氨基酸含量越高(图2,因种质样品较多,故仅随机选取的23份种质样品显色示意图)。利用酶标仪对96孔板进行吸光度测定,结合标准曲线进行换算,获得不同茶树种质氨基酸含量(表2)。结果表明,218份资源一芽二叶氨基酸含量介于1.50%~8.98%之间,呈正态分布(图3),其中氨基酸含量介于3.00%~5.00%之间的样品有118个,占样品数的54.1%,氨基酸含量介于2.00%~6.00%的样品有191个,占样品数的87.6%。氨基酸总量 $\geq 5.00\%$ 的高氨基酸茶树资源有55个,占总量的25.2%,其中含量分布介于5%~6%的资源有37个,占总样品数的17.0%;含量分布介于6%~7%的资

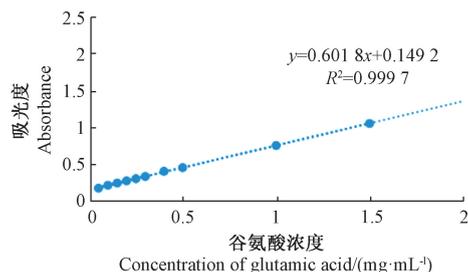


图1 氨基酸标准曲线

Fig.1 Standard curve of amino acid

表 2 218 份茶树种质氨基酸和茶氨酸含量
Tbale 2 Content of amino acid and theanine in 218 tea germplasm

样品名称 Sample name	氨基酸含量 Amino acid content/%	茶氨酸含量 Theanine content/%	茶氨酸的占比 The ratio of theanine to amino acid	样品名称 Sample name	氨基酸含量 Amino acid content/%	茶氨酸含量 Theanine content/%	茶氨酸的占比 The ratio of theanine to amino acid
凌云 11 号 Lingyun No. 11	8.98	3.83	0.43	单丛 1 号 Dancong No. 1	4.13	1.38	0.33
凌云 6 号 Lingyun No. 6	8.33	4.03	0.48	本山 1 号 Benshan No. 1	4.12	1.64	0.40
短节白毫 Duanjiebaihao	8.15	4.01	0.49	金牡丹 Jinmudan	4.12	1.17	0.28
云南大叶 Yunnandaye	7.96	3.64	0.46	安坊种 Ankuangzhong	4.11	1.66	0.40
紫牡丹 Zimudan	6.82	2.48	0.36	鸿雁 6 号 Hongyan No. 6	4.11	0.96	0.23
黄玫瑰 Huanmeigui	6.81	2.10	0.31	鸿雁 4 号 Hongyan No. 4	4.01	1.26	0.31
惠阳小叶 1 号 Huiyangxiaoye No. 1	6.76	3.04	0.45	瑞香 Ruixiang	4.01	1.31	0.33
金观音 Jinguanyin	6.58	2.22	0.34	储叶齐 12 号 Chuyeqi No. 12	3.99	2.07	0.52
肯尼亚 12 号 Kenniya No. 12	6.48	3.37	0.52	凌云 16 号 Lingyun No. 16	3.96	2.90	0.73
凌云 4 号 Lingyun No. 4	6.40	3.02	0.47	新选 7 号 Xinxuan No. 7	3.95	1.14	0.29
广州小叶白心 4 号 Guangzhouxiaoyebaixin No. 4	6.37	2.79	0.44	浙农 113 Zhenong No. 113	3.94	1.53	0.39
肯尼亚 8 号 Kenniya No. 8	6.33	2.89	0.46	乐昌白毛 14 号 Lechangbaimao No. 14	3.92	0.98	0.25
浙农 21 号 Zhenong No. 21	6.15	1.92	0.31	红叶 1 号 Hongye No. 1	3.91	1.92	0.49
肯尼亚 7 号 Kenniya No. 7	6.15	2.75	0.45	黔湄 809 Qianmei 809	3.89	2.19	0.56
凌云 7 号 Lingyun No. 7	6.15	2.38	0.39	英红 8 号 Yinghong No. 8	3.87	1.21	0.31
凌云 18 号 Lingyun No. 18	6.07	3.16	0.52	单丛 27 号 Dancong No. 27	3.86	0.68	0.18
黄水水仙 Huangyeshuixian	6.05	2.40	0.40	冬芽 1 号 Dongya No. 1	3.77	1.24	0.33
云魂 Yunhun	6.02	3.38	0.56	乐昌白毛 3 号 Lechangbaimao No. 3	3.75	0.91	0.24
黄奇 Huangqi	6.00	3.12	0.52	鸿雁 12 号 Hongyan No. 12	3.74	1.19	0.32
凤庆 1 号 Fengqing No. 1	6.00	3.37	0.56	新选 5 号 Xinxuan No. 5	3.73	0.48	0.13
湖南东湖早 Hunandonghuzao	5.93	2.26	0.38	鸿雁 3 号 Hongyan No. 3	3.70	1.04	0.28
高州红芽 1 号 Gaozhouhongya No. 1	5.84	1.92	0.33	冬芽 6 号 Dongya No. 6	3.66	1.24	0.34
优选 2 号 Youxuan No. 2	5.73	2.65	0.46	笔架茶 1 号 Bijiacha No. 1	3.64	1.36	0.37
矮丰 Aifeng	5.73	2.10	0.37	肯尼亚 1 号 Kenniya No. 1	3.61	1.22	0.34
湖南湘波绿 Hunanxiangbolu	5.66	2.26	0.40	乐昌白毛 10 号 Lechangbaimao No. 10	3.59	0.69	0.19

表 2(续)

样品名称 Sample name	氨基酸含量 Amino acid content/%	茶氨酸含量 Theanine content/%	茶氨酸的占比 The ratio of theanine to amino acid	样品名称 Sample name	氨基酸含量 Amino acid content/%	茶氨酸含量 Theanine content/%	茶氨酸的占比 The ratio of theanine to amino acid
黄叶早 Huangyeyao	5.64	1.86	0.33	金钥匙 Jinyaoshi	3.57	0.47	0.13
优选 16 号 Youxuan No. 16	5.55	2.10	0.38	丹霞 8 号 Danxia No. 8	3.57	0.73	0.20
辐优 1 号 Fuyou No. 1	5.53	2.37	0.43	新选 1 号 Xinxuan No. 1	3.57	0.66	0.18
茗科 4 号 Mingke No. 4	5.53	1.88	0.34	D1	3.56	1.69	0.48
广宁大叶青心 5 号 Guangningdayeqingxin No. 5	5.51	1.85	0.34	B22	3.56	0.00	0.00
五岭红 Wulinghong	5.49	2.08	0.38	大坝白毛 6 号 Dababaimao No. 6	3.56	0.78	0.22
云大单株 7 号 Yundadanzhu No. 7	5.48	1.99	0.36	红叶 15 号 Hongye No. 15	3.54	1.69	0.48
鸡笼刊 Jilongkan	5.45	2.21	0.40	龙门种 9 号 Longmenzhong No. 9	3.53	1.38	0.39
青峰 Qingfeng	5.43	1.47	0.27	八仙 16 号 Baxian No. 16	3.53	1.16	0.33
英红 1 号 Yinghong No. 1	5.40	2.77	0.51	白牡丹 Baimudan	3.52	1.01	0.29
英红 5 号 Yinghong No. 5	5.34	1.97	0.37	冬芽 8 号 Dongya No. 8	3.51	1.96	0.56
乐昌白毛 16 号 Lechangbaimao No. 16	5.28	1.80	0.34	茗丰 Mingfeng	3.51	1.77	0.50
碧云 Biyun	5.27	1.61	0.31	优选 10 号 Youxuan No. 10	3.50	2.18	0.62
广州小叶白心 1 号 Guangzhouxiaoyebaixin No. 1	5.25	1.47	0.28	柚叶香 Youyexiang	3.50	0.66	0.19
单丛 21 号 Dancong No. 21	5.25	1.53	0.29	山茄叶 Shanqieye	3.47	0.65	0.19
饶平中叶 3 号 Raopingzhongye No. 3	5.23	1.76	0.34	辐优 3 号 Fuyou No. 3	3.43	1.75	0.51
茗科 3 号 Mingke No. 3	5.18	2.76	0.53	辐优 2 号 Fuyou No. 2	3.40	0.95	0.28
冬芽 9 号 Dongya No. 9	5.17	1.92	0.37	半天妖 Bantianyao	3.39	0.71	0.21
蒲坑 2 号 Pukeng No. 2	5.17	2.10	0.41	大坝白毛 2 号 Dababaimao No. 2	3.37	0.52	0.15
凤庆 2 号 Fengqing No. 2	5.13	1.78	0.35	桂北大叶 4 号 Guibeidaye No. 4	3.37	1.18	0.35
青心 1 号 Qingxin No. 1	5.11	2.08	0.41	A35	3.35	0.12	0.04
红叶 13 号 Hongye No. 13	5.11	0.89	0.17	新选 10 号 Xinxuan No. 10	3.35	1.69	0.50
格鲁吉亚 4 号 Gelujiya No. 4	5.09	1.66	0.33	红叶 16 号 Hongye No. 16	3.35	1.29	0.39
食足白毛 6 号 Shizubaimao No. 6	5.09	2.21	0.43	桂红 3 号 Guihong No. 3	3.33	1.08	0.32
优选 7 号 Youxuan No. 7	5.09	1.59	0.31	乐昌白毛 2 号 Lechangbaimao No. 2	3.33	0.64	0.19
龙门种 1 号 Longmenzhong No.1	5.08	1.95	0.38	毛叶茶 544 Maoyecha 544	3.31	0.74	0.22

表 2(续)

样品名称 Sample name	氨基酸含量 Amino acid content/%	茶氨酸含量 Theanine content/%	茶氨酸的占比 The ratio of theanine to amino acid	样品名称 Sample name	氨基酸含量 Amino acid content/%	茶氨酸含量 Theanine content/%	茶氨酸的占比 The ratio of theanine to amino acid
奇兰香 Qilangxiang	5.06	1.65	0.33	黔辐 4 号 Qianfu No. 4	3.27	1.82	0.56
红叶 10 号 Hongye No. 10	5.05	2.67	0.53	KT18 号 KT No. 18	3.26	1.87	0.57
单丛 22 号 Dangcong No.22	5.05	1.75	0.35	半山圆茶 20 号 Banshanyuancha No. 20	3.24	0.64	0.20
迎霜 Yingshuang	5.00	2.18	0.44	新选 2 号 Xinxuan No. 2	3.23	2.47	0.76
D16	4.99	1.93	0.39	新选 3 号 Xinxuan No. 3	3.22	1.46	0.45
红叶 17 号 Hongye No. 17	4.99	1.64	0.33	英茶祁门 6 号 Yingchaqimen No. 6	3.17	0.67	0.21
英红 10 号 Yinghong No. 10	4.98	2.49	0.50	半山圆茶 10 号 Banshanyuancha No. 10	3.13	0.73	0.23
大坝白毛 1 号 Dababaimao No. 1	4.97	2.07	0.42	肯尼亚 27 号 Kenniya No. 27	3.13	1.00	0.32
冬芽 2 号 Dongya No. 2	4.97	1.38	0.28	福云 6 号 Fuyun No. 6	3.11	1.78	0.57
广宁大叶青心 4 号 Guangningdayeqingxin No. 4	4.96	3.88	0.78	D29	3.06	0.00	0.00
鸿雁 13 号 Hongyan No. 13	4.95	1.52	0.31	半山圆茶 12 号 Banshanyuancha No. 12	3.03	0.53	0.17
米兰香 Milanxiang	4.94	1.58	0.32	单丛 3 号 Dancong No. 3	3.02	1.43	0.47
冬芽 7 号 Dongya No. 7	4.92	1.76	0.36	D4	2.99	0.00	0.00
观音 18 号 Guanyin No. 18	4.91	2.68	0.54	新选 9 号 Xinxuan No. 9	2.98	0.43	0.14
普宁小叶 1 号 Puningxiaoye No. 1	4.91	0.72	0.15	早春毫 Zaochunhao	2.96	0.77	0.26
尚婆茶 Shangpocha	4.91	1.63	0.33	丹桂 Dangui	2.96	1.11	0.38
毛叶茶 437 Maoyecha 437	4.90	0.53	0.11	英茶祁门 5 号 Yingchaqimen No. 5	2.93	0.72	0.24
金龙茶 3 号 Jinlongcha No. 3	4.90	2.11	0.43	惠阳小叶 2 号 Huiyangxiaoye No. 2	2.87	2.24	0.78
云大淡绿 Yundadanlv	4.89	1.44	0.30	资源 83 Ziyuan No. 83	2.84	1.41	0.49
江西上梅州种 Jiangxishangmeizhouzhong	4.87	1.50	0.31	辐优 4 号 Fuyou No. 4	2.82	1.44	0.51
鸿雁 8 号 Hongyan No. 8	4.86	2.07	0.42	乐昌白毛 5 号 Lechangbaimao No. 5	2.82	0.57	0.20
肯尼亚 11 号 Kenniya No. 11	4.86	2.19	0.45	MY355	2.82	0.00	0.00
优选 17 号 Youxuan No. 17	4.82	1.73	0.36	凌云 22 号 Lingyun No. 22	2.80	0.71	0.25
红叶 24 号 Hongye No. 24	4.80	1.62	0.34	大叶奇兰 2 号 Dayeqilan No. 2	2.77	0.78	0.28
英红 11 号 Yinghong No. 11	4.76	1.96	0.41	半山圆茶 8 号 Banshanyuancha No. 8	2.75	0.74	0.27
友谊茶 Youyicha	4.76	1.46	0.31	隆卷茶 Longjuancha	2.74	1.02	0.37

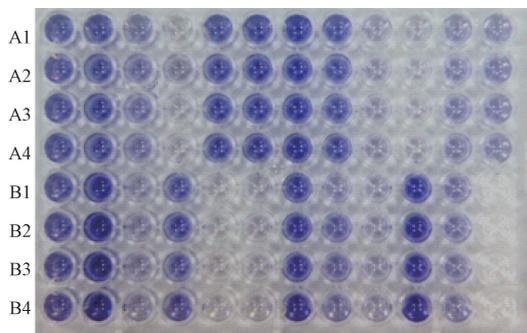
表 2(续)

样品名称 Sample name	氨基酸含量 Amino acid content/%	茶氨酸含量 Theanine content/%	茶氨酸的占比 The ratio of theanine to amino acid	样品名称 Sample name	氨基酸含量 Amino acid content/%	茶氨酸含量 Theanine content/%	茶氨酸的占比 The ratio of theanine to amino acid
广宁大叶青心 3 号 Guangningdayeqingxin No. 3	4.76	1.12	0.24	丹霞 1 号 Danxia No. 1	2.74	1.66	0.61
紫鹃 Zijuan	4.73	1.73	0.37	浙农 12 号 Zhenong No. 12	2.72	1.07	0.39
红叶 20 号 Hongye No. 20	4.73	1.86	0.39	君山银针 1 号 Junshanyinzen No. 1	2.71	1.54	0.57
英红 4 号 Yinghong No. 4	4.72	1.19	0.25	朝阳 Chaoyang	2.70	0.38	0.14
劲峰 Jingfeng	4.71	1.74	0.37	优选 4 号 Youxuan No. 4	2.65	0.40	0.15
凌云 10 号 Lingyun No. 10	4.71	3.44	0.73	八仙 43 Baxian No. 43	2.65	1.55	0.58
凌云 3 号 Lingyun No. 3	4.69	2.79	0.59	白瑞香 Bairuixiang	2.58	1.07	0.42
湖南楮叶齐 Hunanchuyeqi	4.68	1.42	0.30	半山圆茶 21 号 Banshanyuancha No. 21	2.58	0.39	0.15
鸿雁 9 号 Hongyan No. 9	4.64	1.89	0.41	C14	2.56	0.36	0.14
福云 7 号 Fuyun No. 7	4.60	1.79	0.39	丹妃 Danfei	2.44	1.19	0.49
红叶 22 号 Hongye No. 22	4.59	2.92	0.64	六堡茶 Liubaocha	2.44	0.98	0.40
白云 595 Baiyun 595	4.56	1.03	0.23	黄金桂 Huangjingui	2.34	1.15	0.49
和平小叶 1 号 Hepingxiaoye No. 1	4.55	1.07	0.24	桂红 4 号 Guihong No. 4	2.32	0.71	0.31
边洪 21 号 Bianhong No. 21	4.52	1.28	0.28	食足白毛 7 号 Shizubaimao No. 7	2.28	0.76	0.33
凌云 2 号 Lingyun No. 2	4.52	1.57	0.35	A26	2.22	0.05	0.02
青心乌龙 Qingxinwulong	4.48	1.21	0.27	凌云 1 号 Lingyun No. 1	2.21	1.00	0.45
春萱 Chunxuan	4.47	1.28	0.29	KT12 号 KT12 No. 12	2.20	1.01	0.46
高州红芽 2 号 Gaozhouhongya No. 2	4.45	1.83	0.41	饶平中叶 5 号 Raopingzhongye No. 5	2.17	0.84	0.39
瑞茗 Ruiming	4.42	1.20	0.27	大坝白毛 4 号 Dababaimai No. 4	2.17	0.95	0.44
冬芽 10 号 Dongya No. 10	4.42	1.62	0.37	红叶 4 号 Hongye No. 4	2.17	1.31	0.61
乐昌白毛 4 号 Lechangbaimao No. 4	4.37	1.57	0.36	观音 8 号 Guanyin No. 8	2.16	0.76	0.35
肯尼亚 301/1 Kenniya 301/1	4.35	1.44	0.33	冬芽 1 号 Dongya No. 1	2.15	1.00	0.47
鸿雁 7 号 Hongyan No. 7	4.35	1.08	0.25	A6	2.06	0.02	0.01
英茶祁门 1 号 Yingchaqimen No. 1	4.34	1.15	0.26	观音 1 号 Guanyin No. 1	1.99	1.05	0.53
芽巴茶 Yabacha	4.31	1.46	0.34	黔湄 419 Qianmei 419	1.78	0.84	0.47
新选 12 号 Xinxuan No. 12	4.29	1.62	0.38	红芽佛手 Hongyafoshou	1.76	0.79	0.45

表 2(续)

样品名称 Sample name	氨基酸含量 Amino acid content/%	茶氨酸含量 Theanine content/%	茶氨酸的占比 The ratio of theanine to amino acid	样品名称 Sample name	氨基酸含量 Amino acid content/%	茶氨酸含量 Theanine content/%	茶氨酸的占比 The ratio of theanine to amino acid
新选 4 号 Xinxuan No. 4	4.29	1.41	0.33	红叶 6 号 Hongye No. 6	1.75	0.95	0.54
春兰 Chunlan	4.26	1.63	0.38	八仙 45 号 Baxian No. 45	1.72	0.75	0.44
广州小叶白心 3 号 Guangzhouxiaoyebaixin No. 3	4.26	1.70	0.40	金龙茶 2 号 Jinlongcha No. 2	1.69	0.76	0.45
乌叶单丛 Wuyedancong	4.23	1.68	0.40	新选 11 号 Xinxuan No. 11	1.68	1.01	0.60
龙门种 6 号 Longmenzhong No. 6	4.20	0.75	0.18	冬芽 5 号 Dongya No. 5	1.60	0.54	0.34
冬芽 5 号 Dongya No. 5	4.18	0.83	0.20	优选 8 号 Youxuan No. 8	1.50	0.62	0.41

源有 14 个, 占总样品数的 6.4%; 含量>7%的资源有 4 个, 占总样品数的 1.8%, 含量介于 7%~8%的资源有 1 个, 含量介于 8%~9%的资源 3 个(表 2)。



注: 每一列包含 2 个样品(A1~4 为一个样品的 4 个重复; B1~4 为一个样品的 4 个重复)。

Note: Each column contains two samples (A1-4 are four replicates of a sample. B1-4 are four repeats of a sample).

图 2 氨基酸显色反应

Fig.2 Chromogenic reaction of amino acid

2.2 218 份茶树资源一芽二叶茶氨酸含量分析

利用高效液相色谱仪对不同浓度的茶氨酸工作液进行检测(图 4), 根据检测结果绘制标准曲线。通过换算可得茶树茶氨酸含量 = 峰面积/52.36 × 100%。同时, 对 218 份茶树资源一芽二叶茶氨酸含量进行测定, 检测结果表明, 218 份茶树样品的茶氨酸介于 0%~4.03%之间(表 2), 呈正态分布(图 5)。茶氨酸含量主要分布于 1%~2%之间, 呈中等水平, 该区间样品数共 111 个, 占总样品数的 50.9%, 茶氨酸 ≥ 3% 的样品有 13 个, 占样品总数 6.0%, 分别为凌云 11 号(3.83%)、凌云 6 号(4.03%)、短节白毫(4.01%)、广宁大叶青心 4 号(3.88%)、云南大叶(3.64%)、凌云

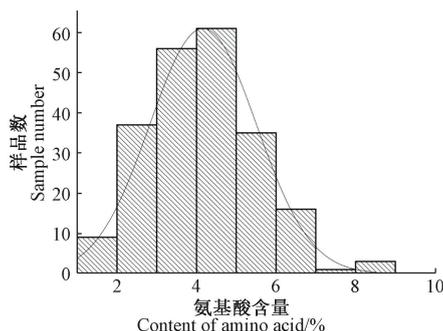


图 3 218 份茶树资源氨基酸含量正态分布图

Fig.3 Normal distribution of amino acid contents of 218 tea germplasm

10 号(3.44%)、云魂(3.38%)、凤庆 1 号(3.37%)、肯尼亚 12 号(3.37%)、凌云 18 号(3.16%)、黄奇(3.12%)、惠阳小叶 1 号(3.04%) 和凌云 4 号(3.02%)。此外, MY355、D4、D29 和 B22 这 4 份毛叶茶资源无茶氨酸, 占样品总数的 1.8%(表 2)。

2.3 218 份茶树资源一芽二叶茶氨酸/氨基酸含量的比值

对 218 份茶树资源一芽二叶茶氨酸与氨基酸含量的比值进行分析, 结果表明, 茶氨酸与氨基酸含量的比值在 0~0.78 之间(表 2), 呈正态分布(图 6)。茶氨酸与氨基酸含量的比值主要分布于 0.2~0.5 之间, 该区间样品数 155 个, 占总样品数的 71.1%。茶氨酸与氨基酸含量的比值 > 0.6 的样品有 10 个, 占样品总数的 4.6%, 分别为广宁大叶青心 4 号(0.78)、惠阳小叶 2 号(0.78)、新选 2 号(0.77)、凌云 16 号(0.73)、凌云 10 号(0.73)、红叶 22 号(0.64)、优选 10 号(0.62)、红叶 4 号(0.61)、丹霞 1 号(0.61) 和新选 11 号

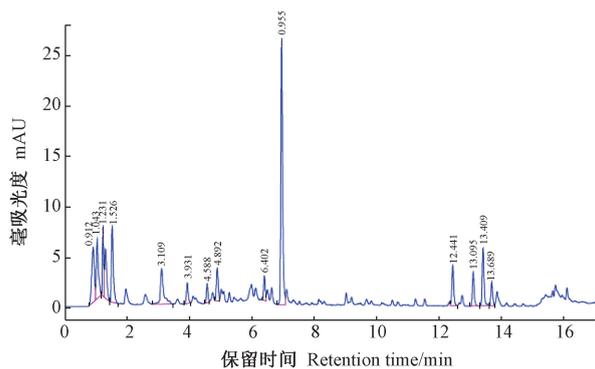


图 4 高效液相色谱法测定茶叶中茶氨酸含量

Fig.4 Theanine contents of tea germplasm determined by HPLC

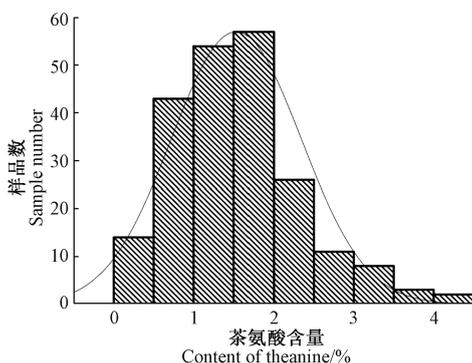


图 5 218 份资源茶氨酸含量正态分布图

Fig.5 Normal distribution of theanine contents of 218 tea germplasm

(0.61)。对 218 个样品的氨基酸和茶氨酸含量进行相关性分析,发现茶叶中的茶氨酸与氨基酸含量相关性系数达 0.752, R^2 为 0.564,呈极显著正相关。

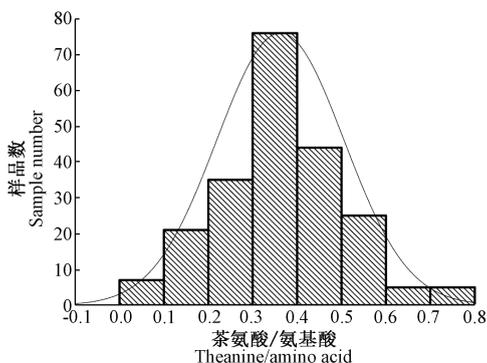


图 6 218 份茶树资源茶氨酸与氨基酸含量比值的正态分布图

Fig.6 Normal distribution of ratio value of theanine content to amino acid content of 218 tea germplasm

3 讨论

氨基酸含量是影响茶树品种成茶品质的重要参考因子,氨基酸尤其是茶氨酸与绿茶品质呈显著正相关^[18-19]。高氨基酸和高茶氨酸茶树资源在自然界分布较少,从中选育获得综合性状好的品种更少,安吉白茶是目前报道最多、应用范围最广的高氨基酸茶树品种,由于其鲜爽甘醇的优异品质,其推广应用极大带动了茶叶产业的发展,取得了较好的经济和社会效益^[20]。但由于氨基酸和茶氨酸含量是由多基因控制的数量性状,受光照、温度及土壤养分等环境影响较大,同一品种在不同地方其含量存在差异^[21-22]。广东地处热带与亚热带交融区,温度相对较高,低于 19℃ 的时间短,不利于温度敏感型的安吉白茶形成高氨基酸特性^[23],因此安吉白茶不适合在以广东为代表的华南地区种植。为选育适合广东乃至华南茶区种植的高茶氨酸茶树品种,本研究通过对保存于广东省茶树种质资源库的 218 份核心种质进行氨基酸及茶氨酸检测,共获得了 55 份高氨基酸茶树资源和 13 份高茶氨酸资源。

游离氨基酸是一种含氮化学物质^[24-25],国标法利用茚三酮显色结合分光光度计法对样品氨基酸含量进行测定^[26],测定样品用量较大(蒸青样 3 g)。当分析的茶树种质资源数量较多时,利用国标法进行氨基酸测定非常耗时,且某些稀有种质由于可用于分析的样品有限,而无法进行氨基酸检测。而本研究创新开发的基于茚三酮显色结合酶标仪的微量法可以快速对样品进行检测^[27]。检测结果显示茶氨酸与氨基酸含量的比值介于 0~0.78 之间,且主要分布于 0.2~0.5 之间,这与前人研究发现茶叶中茶氨酸含量约占游离总氨基酸的 30%~70% 存在差别^[28],其原因可能是本研究采用茚三酮显色法测定总游离氨基酸含量值偏大的缘故。相关性研究表明,茶氨酸与氨基酸含量的相关系数为 0.752,呈极显著正相关,因此在大规模的资源筛选时,可先根据各资源已知的氨基酸总量推测其茶氨酸大概的含量,缩小资源筛选范围,再采用液相色谱进行茶氨酸精确测定,快速定向选育出高茶氨酸种质。

茶叶中游离氨基酸多达 28 种^[29],其共同决定了茶叶中总氨基酸含量。不同的茶树种质体内的氨基酸的种类及含量存在较大差异。如尹杰等^[30]对贵州名茶的氨基酸组成及含量进行研究发现,贵州各种名茶除茶氨酸外还存在其他含量突出的氨基酸,如都匀毛尖的酪氨酸、丙氨酸、谷氨酸含量较高;遵义毛峰的苯

丙氨酸、胱氨酸含量高;湄江翠片的谷氨酸;山京翠芽的赖氨酸和羊艾毛峰的天冬氨酸含量较高。上述结果表明,不同品种氨基酸种类和含量的差异影响了氨基酸的总量,同时也造成了茶叶香气和滋味的不同。对于本研究筛选出高茶氨酸茶树种质,今后将有必要进一步跟踪测定各氨基酸组份含量。

作为茶叶中最重要的氨基酸,茶氨酸是茶叶次生代谢物的重点研究对象^[31]。茶氨酸的代谢通路基本已经探明^[32-35],但是有关茶树形成高茶氨酸的调控机制的研究尚鲜见报道。目前已报道的主要是以低温敏感型和光照敏感型资源为材料通过多组学技术手段,对其高茶氨酸形成的机制进行解析^[36-37]。正常的茶树品种受温度和光照的影响较低温敏感型和光照敏感型资源小,可能从其他途径调控高茶氨酸的形成^[38]。本研究筛选了多份高茶氨酸及低茶氨酸茶树资源,为茶树高茶氨酸形成的调控机理研究提供了丰富的材料。随着茶树基因的公布^[39-40],可充分利用茶氨酸特异资源开展数量性状位点(quantitative trait locus, QTL)定位、关联分析及多组学技术获得与其相关的分子标记、基因、蛋白及特征代谢物,解析其高含量形成的机理。

4 结 论

本研究对 218 份茶树资源春季一芽二叶氨基酸及茶氨酸含量进行测定,筛选获得了 55 份高氨基酸茶树资源,13 份高茶氨酸茶树资源和 4 份无茶氨酸茶树资源。本研究为高氨基酸总量及高茶氨酸含量茶树新品种选育、茶氨酸合成机理研究提供了材料基础。

参 考 文 献:

- [1] 袁新跃,江和源,张建勇. 茶叶功能成分提取制备专题(三):茶氨酸的提取制备技术[J]. 中国茶叶, 2009, 31(3): 4-6
- [2] Zhu M, Li N, Zhao M, Yu W, Wu J. Metabolomic profiling delineate taste qualities of tea leaf pubescence[J]. Food Research International, 2017, 94:36-44
- [3] 刘霞林. 茶叶中糖类研究进展[J]. 茶叶, 2004, 27(3):27-28
- [4] 乔小燕,吴华玲,韩雪文,王曦,卓敏,邵燕华,谢汉茂,陈栋. 仁化白毛茶生化成分与成品白茶品质的相关性研究[J]. 核农学报, 2015, 29(12):2327-2333
- [5] Guo X Y, Song C K, Ho C T, Wan X C. Contribution of L-theanine to the formation of 2,5-dimethylpyrazine, a key roasted peanutty flavor in oolong tea during manufacturing processes [J]. Food Chemistry, 2018, 263:18-28
- [6] Finger A, Kuhr S, Engelhardt U. Chromatography of tea constituents [J]. Journal of Chromatography A, 1992, 624(1/2): 293-315
- [7] Kahathuduwa C, Dassanayake T, Amarakoon A, Weerasinghe V. Acute effects of theanine, caffeine and theanine-caffeine combination on attention[J]. Nutritional Neuroscience, 2017, 20(6): 369-377
- [8] 帅玉英,张涛,江波,沐万孟. 茶氨酸的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(11): 117-123
- [9] Sumathi T, Asha D, Nagarajan G, Sreenivas A, Nivedha R. L-theanine alleviates the neuropathological changes induced by pcb (aroclor 1254) via inhibiting upregulation of inflammatory cytokines and oxidative stress in rat brain [J]. Environmental Toxicology & Pharmacology, 2016, 42: 99-117
- [10] Zhang G, Miura Y, Yakasaki K. Effects of dietary powdered green tea and theanine on tumorgrowth and endogenous hyperlipidemia in hepatoma-bearing rats [J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 2002, 66(4): 771-716
- [11] 揭红东,韩奇鹏,谭支良,周传社,孔志伟,陈亮,任傲. 茶氨酸代谢及其细胞生物学功能研究与应用[J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(12): 5302-5308
- [12] 杜琪珍,李名君,刘维华. 茶组植物的化学分类及数值分类[J]. 茶叶科学, 1990, 10(2):1-12
- [13] 中国农业科学院茶叶研究所,云南省农业科学院茶叶研究所. NY/T 2031-2011 农作物优异种质资源评价规范茶树[S]. 北京:中国标准出版社, 2011
- [14] 赵洋,杨培迪,刘振,成杨,杨阳. 高氨基酸黄金茶种质资源筛选鉴定[J]. 茶叶通讯, 2017, 44(3):13-16
- [15] 金孝芳,马林龙,刘艳丽,曹丹,龚自明. 6 个高氨基酸茶树品种(系)主要生化成分分析[J]. 茶叶学报, 2017, 58(2): 58-62
- [16] Wu J, Chen Z, Sun W, Deng T, Chen M. De novo sequencing of the leaf transcriptome reveals complex light-responsive regulatory networks in *Camellia sinensis* cv. Baijiguan [J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 332
- [17] Song L B, Ma Q P, Zou Z W, Sun K, Yao Y T, Tao J H, Kaleri N A, Li X H. Molecular link between leaf coloration and gene expression of flavonoid and carotenoid biosynthesis in *Camellia sinensis* cultivar huangjiya [J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 803
- [18] 吴瑞梅,艾施荣,吴彦红,刘桦. 基于近红外光谱的绿茶滋味品质估测模型[J]. 核农学报, 2013, 27(10): 1495-1500
- [19] Wang Y, Yang X, Lin K. Simultaneous determination of theanine, gallic acid, purine alkaloids, catechins, and theaflavins in black tea using HPLC [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2010, 45: 1263-1269
- [20] 赖建红. 安吉白茶产业转型期的思考与探索[J]. 中国茶叶, 2016(3): 10-11
- [21] Wang W, Xin H, Wang M, Ma Q, Wang L, Kaleri N, Wang Y, Li X. Transcriptomic analysis reveals the molecular mechanisms of drought-stress-induced decreases in *Camellia sinensis* leaf quality [J]. Frontiers in Plant Science, 2016,7:385
- [22] Deng W, Ogita S, Ashihara H. Biosynthesis of theanine (gamma-ethylamino-L-glutamic acid) in seedlings of *Camellia sinensis* [J]. Phytochemistry Letters, 2008, 1: 115-119
- [23] 郭水连,吴春燕,郭卫平. 江西宜春引种安吉白茶的气候适应性分析[J]. 茶叶学报, 2016(3):34-37

- [24] 方开星, 姜晓辉, 吴华玲. 茶树茶氨酸的代谢及其育种研究进展[J]. 园艺学报, 2016, 43(9):1791-1802
- [25] Zhang G. Amino acid species and leaching characters in tea (*Camellia sinensis*) using ion chromatography with integrated amperometric detection[J]. International Journal of Food, 2011, 7(5):1-12
- [26] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 8134-2013 茶 游离氨基酸总量的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013
- [27] 方开星, 吴华玲, 姜晓辉, 秦丹丹. 高茶氨酸茶树资源快速筛选方法: 中国, ZL2016109917759[P]. 2016-11-11
- [28] 王进美, 黄大节. N-端基茚三酮溶液显色法测试国产羊毛的化学损伤[J]. 西安工程科技学院学报, 1993(3): 220-223
- [29] 夏静, 李布青. 用生理体液法测定茶叶中的游离氨基酸[J]. 茶叶通报, 1990(2): 27-29
- [30] 尹杰, 高相福. 贵州名茶氨基酸含量及其组成与品质的关系[J]. 贵州农业科学, 1998(1):29-31
- [31] 陈琪, 孟祥宇, 江雪梅, 于淑伟, 宛晓春. 茶树茶氨酸代谢相关基因表达组织特异性分析[J]. 核农学报, 2015, 29(7):1285-1291
- [32] Deng W W, Fei Y, Wang S, Wan X C, Zhang Z Z, Hu X Y. Effect of shade treatment on theanine biosynthesis in *Camellia Sinensis* seedlings[J]. Plant Growth Regulation, 2013, 71(3): 295-299
- [33] 谢学民, 杨贤强, 沈毓渭, 汪东风, 厉龙明. 不同技术措施对碳氮在茶树内分布及茶叶品质的影响[J]. 核农学报, 1993, 7(1):29-36
- [34] Wei C L, Yang H, Wang S B, Zhao J, Liu C, Gao L P, Xia E H, Lu Y, Tai Y L, She G B, Sun J, Cao H S, Tong W, Gao Q, Li Y Y, Deng W W, Jiang X L, Wang W Z, Chen Q, Zhang S H, Li H J, Wu J L, Wang P, Li P H, Shi C Y, Zheng F Y, Jian J B, Huang B, Shan D, Shi M M, Fang C B, Yue Y, Li F D, Li D X, Wei S, Han B, Jiang C J, Yin Y, Xia T, Zhang Z Z, Benentzen J L, Zhao S C, Wang X C, Wan X. Draft genome sequence of *Camellia sinensis* var. *Sinensis* provides insights into the evolution of the tea genome and tea quality[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2018, 115(18): E4151-E4158
- [35] Cheng S H, Fu X M, Wang X Q, Liao Y, Zeng L T, Dong F, Yang Z Y. Studies on the biochemical formation pathway of the amino acid L-theanine in tea (*Camellia sinensis*) and other plants[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2017, 65(33):7210-7216
- [36] 李素芳, 陈树尧, 成浩. 茶树阶段性返白现象的初步研究[J]. 中国茶叶, 1994, 16(2):26-27
- [37] 李素芳. 安吉白茶返白机理的研究[J]. 中国计量学院学报, 2002, 13(3): 214-217
- [38] 李小杰. 茶树游离氨基酸的 QTL 定位于遗传解析[D]. 浙江: 中国农业科学院茶叶研究所, 2017
- [39] 季鹏章, 张俊, 王平盛, 王玲仙, 夏江东, 黄兴齐. 一个与茶树高茶氨酸含量连锁的 RAPD 标记的研究[J]. 西南农业学报, 2007, 20(3): 466-469
- [40] 张俊, 王平盛, 季鹏章. 茶树高茶氨酸 RAPD 多态性标记研究[J]. 云南农业大学学报, 2004, 19(3): 243-245

Selection of Tea Germplasm With High Contents of Amino Acid and Theanine

FANG Kaixing JIANG Xiaohui QIN Dandan LI Hongjian HUANG Hualin
PAN Chendong LI Bo WU Hualing*

(Tea Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences/Guangdong Key Laboratory of Tea
Plant Resources Innovation and Utilization, Guangzhou, Guangdong 510640)

Abstract: In order to screen tea germplasms with high contents of amino acid and theanine and explore the relationship between the contents of amino acid and theanine, in present research, we detected the amino acid contents of steamed one bud and two leaves from spring shoots of 218 tea germplasms by ninhydrin colorimetry combining with microplate assay, and the theanine contents by HPLC. The results showed that, the contents of amino acid ranged 1.50%~8.98%, among which 55 samples had high amino acid contents ($\geq 5\%$); the contents of theanine varied from 0 to 4.03%, among which 13 samples had high level ($\geq 3\%$) of theanine and four samples had no theanine; the ratio of theanine content to total amino acid content distributed was 0 to 0.78, mainly ranging from 0.2 to 0.5. In addition, the correlation coefficient between them reached to 0.752, indicating a significant positive correlation. In summary, a batch of specific tea germplasms with extreme amino acid contents had been screened in this study, which provides the foundation for selecting new tea plant varieties with high amino acid and high theanine contents and studying the molecular mechanism of accumulating amino acid.

Keywords: tea plant, amino acid, theanine, germplasm resource