

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2023.05.002

茶叶中东莨菪素和东莨菪苷的测定及相关基因表达

曹红利¹, 王浩乾², 何梦迪², 岳川¹,
罗理勇¹, 曾亮¹, 郝心愿²

1. 西南大学 食品科学学院, 重庆 400715;

2. 中国农业科学院茶叶研究所/农业农村部茶树生物学与资源利用重点实验室, 杭州 310008

摘要: 东莨菪素和东莨菪苷是香豆素类化合物, 具有多种生物活性, 是传统中药丁公藤类生药的主要活性成分。茶树多酚、生物碱等次生代谢物丰富, 但有关东莨菪素和东莨菪苷代谢相关的研究还鲜有报道。本研究建立了利用高效液相色谱测定茶叶中东莨菪素和东莨菪苷的检测方法, 东莨菪素的平均回收率为 93.5%, 相对标准偏差(RSD)为 2.64%; 东莨菪苷的平均回收率为 91.7%, RSD 为 3.32%。利用该方法检测了不同发育时期新梢(鱼叶期到一芽三叶期)、不同处理(茶尺蠖为害和低温胁迫)叶片和不同品种/单株叶片中东莨菪素和东莨菪苷的质量分数变化。结果表明, 茶树新梢中东莨菪苷的质量分数高于东莨菪素, 并且其质量分数随新梢成熟度增加而升高, 而东莨菪素的质量分数变化无统计学意义; 东莨菪素和东莨菪苷的质量分数与茶树品种遗传差异相关, 其中东莨菪素质量分数为 18.34~50.88 $\mu\text{g/g}$, 东莨菪苷质量分数为 25.84~80.76 $\mu\text{g/g}$; 东莨菪素和东莨菪苷的质量分数受低温和茶尺蠖胁迫的影响差异无统计学意义。对不同发育阶段茶树新梢中东莨菪苷生物合成相关的基因表达水平进行检测, 结果表明, 合成通路上游基因的表达模式与东莨菪苷的积累模式间不存在显著的相关关系。研究结果为茶叶中东莨菪素和东莨菪苷的准确检测和开发利用以及选育高东莨菪素和东莨菪苷质量分数的茶树资源提供参考。

关键词: 茶树; 东莨菪素; 东莨菪苷; 质量分数检测; 基因表达

中图分类号: S571.1; Q344⁺.13

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2023)05-0013-09

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Detection of Scopoletin and Scopolin in Tea Leaves and Expression Analysis of the Genes Involved in Biosynthesis Pathway

CAO Hongli¹, WANG Haoqian², HE Mengdi², YUE Chuan¹,
LUO Liyong¹, ZENG Liang¹, HAO Xinyuan²

1. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Tea Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Tea Biology and Resources Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Hangzhou 310008, China

收稿日期: 2023-03-16

基金项目: 广东省重点领域研发计划项目(2020B020220004); 中央高校基本科研业务费项目(SWU-KR22016)。

作者简介: 曹红利, 博士, 讲师, 主要从事茶及饮料植物资源利用与品质研究。

Abstract: Scopoletin and scopolin are coumarin compounds with a variety of biological activities. They are the main active components of traditional Chinese medicine *Erycibe obtusifolia*. Tea plant is rich in polyphenols, alkaloids and other secondary metabolites. There are few reports on the metabolism of scopoletin and scopolin. In this study, a HPLC method was established to determine scopoletin and scopolin in fresh tea leaves. The average recovery of scopoletin was 93.5% with RSD at 2.64%. The average recovery of scopolin was 91.7% with RSD at 3.32%. This method was used to detect the changes of scopoletin and scopolin contents in tea leaves at different developmental stages (from fish leaf stage to one bud three leaves stage), different treatments (*Ectropis obliqua* damage and low temperature stress) and different tea varieties/individuals. The results showed that the content of scopolin was higher than that of scopoletin in the new tea shoots, and its content increased with the maturity of tea shoots, but the content of scopoletin did not change significantly. The contents of scopoletin and scopolin were related to the genetic difference of tea varieties/individuals, with contents of 18.34—50.88 $\mu\text{g/g}$ and 25.84—80.76 $\mu\text{g/g}$, respectively. Low temperature and *Ectropis obliqua* stress treatments showed no significant difference on the contents of scopoletin and scopolin. qRT-PCR analysis of scopolin synthesis related genes in shoots of tea plants at different developmental stages showed that there was no direct correlation between the expression of the genes in upstream pathways and the accumulation of scopolamine. The results will provide an important reference for the accurate detection of scopoletin and scopolin, development and utilization, and breeding of high content scopolamine tea germplasm.

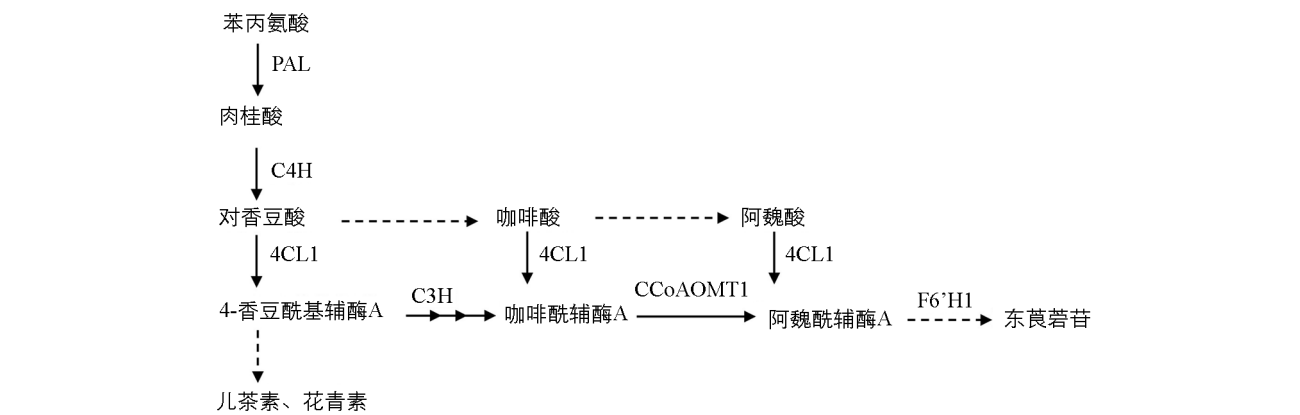
Key words: tea plant; scopoletin; scopolin; content detection; gene expression

中国茶文化历史悠久, 茶的消费量仅次于纯水, 与可可和咖啡并称为世界三大无酒精饮料^[1-2]. 儿茶素、咖啡碱和茶氨酸等是茶叶富含的特征性次生代谢产物, 是茶叶色、香、味等品质形成和饮茶保健功效发挥的物质基础^[3]. 茶树次生代谢丰富, 目前已知的代谢物数量多达 1 450 种^[4]; 对茶树次生代谢物的深入研究有助于茶叶功能性成分的开发和茶树资源的多元化利用.

东莨菪素是香豆素类化合物, 植物中主要以糖苷(东莨菪苷)的形式存在, 已知具有的药理活性包括抗肿瘤、防治高尿酸血症、降血压、降血脂、解痉、缩瞳和降低眼压、镇痛等^[5]. 目前已知东莨菪素在丁公藤、枸杞、桑树、华山参、白鹤藤等传统中药植物中有较高的含量^[6-11]. 其中, 丁公藤是东莨菪素的重要天然来源, 也是丁公藤发挥镇痛、抗炎、祛痰、平喘等药理作用的主要生化成分^[12-14]. 在烟草属的植物叶片中, 东莨菪素和东莨菪苷还可以起到植保素的作用, 直接参与抵抗腐生性病原真菌的感染^[15]. 茶树是包括香豆素类化合物在内的黄酮类物质积累丰富的代表物种, 但是截至目前有关茶树中东莨菪素及其糖苷的含量和检测方法的研究还鲜有报道.

香豆素类化合物广泛存在于植物中. 模式植物拟南芥中发现东莨菪素、东莨菪苷等香豆素类化合物主要在根中合成, 但是不同拟南芥材料中的含量存在显著差异^[16]. 已知东莨菪苷合成途径是类黄酮代谢途径的上游分支, 主要由 4-香豆酰基辅酶 A 经香豆酸-3-羟化酶、咖啡酰辅酶 A-O-甲基转移酶和阿魏酰辅酶 A-6'-羟化酶等催化形成(图 1), 但其合成的准确调控机制仍不清楚^[17-18]. 低温(10 $^{\circ}\text{C}$)条件下拟南芥的类黄酮代谢增强, 而在 *BEE1* (BRASSINOSTEROID ENHANCED EXPRESSION1) 和 *GRF* (G2-LIKE FLAVONOID REGULATOR) 突变体中包括东莨菪苷在内的香豆素类化合物合成显著降低, 下游的花青素合成增强^[18]. 因此 *BEE1* 和 *GRF* 基因可能是拟南芥中参与东莨菪苷生物合成的关键调控基因, 并受低温影响. 倒春寒低温条件下茶树新梢差异基因表达谱分析表明, 东莨菪碱合成相关信号通路被显著富集, 但茶树中 *BEE1* 和 *GRF* 的同源基因的表达水平并无显著差异^[19]. 因此, 茶树新梢中东莨菪苷的积累是否受低温影响, 其积累代谢的主要影响因素和主要调控基因有待进一步研究.

本研究建立了茶叶中东莨菪素和东莨菪苷的 HPLC 检测方法, 分析了茶树不同发育阶段、不同环境条件和不同品种/品系茶叶中东莨菪素和东莨菪苷的质量分数, 检测了茶树东莨菪素和东莨菪苷生物合成途径中相关基因的表达模式, 明确了东莨菪素和东莨菪苷积累的主要影响因素和相关基因的调控作用, 为茶叶中功能性成分的开发利用提供理论参考.



PAL: 苯丙氨酸解氨酶; C4H: 桂皮酸-4-羟化酶; C3H: 香豆酸-3-羟化酶; 4CL1: 对香豆酰辅酶 A 连接酶; CCoAOMT1: 咖啡酰辅酶 A-O-甲基转移酶; F6'H1: 阿魏酰辅酶 A-6'-羟化酶.

图 1 东茛菪苷的生物合成途径

1 材料与方法

1.1 试验材料及处理

以种植于中国农业科学院茶叶研究所试验茶园的 5 年生“龙井 43”盆栽茶树为材料, 于春季萌动期移入人工气候室(24 h 光周期: 13 h 光照/11 h 黑暗, 白天 24 ℃/夜晚 20 ℃, 湿度 70%), 待新梢萌发至鱼叶期、一芽一叶期、一芽二叶期和一芽三叶期时取新梢用于东茛菪碱、东茛菪苷质量分数测定和基因表达分析; 以选种圃种植的 3~5 年生的 20 个茶树品种/单株为材料, 统一采摘秋季顶端第 2~3 片成熟叶进行东茛菪碱和东茛菪苷质量分数测定, 分析其在品种间的差异.

低温胁迫试验以正常生长条件下的“龙井 43”盆栽茶树为材料, 分别在新梢萌发至鱼叶期、一芽一叶期、一芽二叶期和一芽三叶期时给予低温处理(24 h 光周期: 13 h 光照/11 h 黑暗, 白天 4 ℃/夜晚 2 ℃, 湿度 70%), 于处理后 24 h, 48 h 取新梢用于质量分数检测. 茶尺蠖为害试验同样以“龙井 43”盆栽茶树为材料, 于秋季茶树停止生长前接种二龄茶尺蠖幼虫, 每个处理枝条接种 3 头, 于接种 72 h 后采集为害叶片. 所有样品采集均设 3 个生物学重复, 采集样品立即投入液氮中冷冻, 在-80 ℃低温条件下保存备用.

1.2 东茛菪素与东茛菪苷质量分数检测

1.2.1 色谱条件

利用 ACQUITY UPLC 系统(Waters, 美国)进行检测. 色谱条件 1: X Bridge C18 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇(B)-0.1%甲酸水溶液(A)梯度洗脱; 洗脱程序为 0~10 min, 15%~34% B; 10~20 min, 34% B; 20~35 min, 34%~38% B; 检测波长 345 nm, 流速 1 mL/min, 柱温 25 ℃, 进样量 10 μL. 色谱条件 2: X Bridge C18 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇(B)-0.1%甲酸水溶液(A)梯度洗脱; 洗脱程序为 0~5 min, 15%~25% B; 5~10 min, 25%~30% B; 10~15 min, 30%~33% B; 15~20 min, 33%~36% B; 20~25 min, 36%~40% B; 检测波长 345 nm, 流速 1 mL/min, 柱温 25 ℃, 进样量 10 μL.

1.2.2 标准溶液的配制及标准曲线制作

准确称取东茛菪苷(CAS: 531-44-2, PhytoLab)和东茛菪素(CAS: 92-61-5, PhytoLab)标准品 2.000 mg 分别置于 10 mL 离心管中, 加入 4 mL 色谱纯甲醇超声溶解, 配成 500 μg/mL 的标准品溶液. 取该标准品溶液, 用色谱纯甲醇稀释成为系列梯度浓度的溶液, 上机检测, 根据峰面积大小和标准品浓度, 制作标准曲线.

1.2.3 样品溶液的制备

将茶叶样品置于冷冻干燥机 48 h 冻干后, 研磨成粉末, 准确称取样品 0.200 0 g 于 10 mL 离心管中, 加入纯甲醇 5 mL, 室温浸提 4 h 后, 4 000 r/min 离心 8 min, 用注射器吸取上清液过 0.45 μm 有机滤膜后收集于 2 mL 进样瓶中.

1.2.4 回收率试验

准确称取 0.200 0 g 样品粉末于 10 mL 离心管中,加入东莨菪苷 50.0 μg 和东莨菪素 20.0 μg 标准品,按样品溶液制备方法进行浸提并收集于进样瓶中.

1.3 核酸提取及表达分析

1.3.1 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

茶树总 RNA 按照多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒(CAT# DP441,天根生化科技有限公司,北京)的操作说明进行提取,用 NanoDrop ND2000 微量核酸蛋白测定仪测定 RNA 浓度,用 1%琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 质量, RNA 质量检测合格后,参照 PrimeScript © RT reagent Kit 反转录试剂盒(CAT# DRR037A,宝生物工程有限公司,大连)的说明书步骤,将 RNA 反转录合成 cDNA 用于基因表达分析.

1.3.2 基因表达分析

从“龙井 43”茶树基因组中筛选出东莨菪苷的生物合成途径中的关键酶编码基因 *CsPAL1*, *CsPAL2*, *CsC4H*, *Cs4CL2-1*, *Cs4CL2-2*, *Cs4CL3* 和 *CsCCoAOMT1* 等^[20],根据基因 cDNA 序列的特异性,利用 Primer-Blast 软件设计目的基因的荧光定量 PCR(qRT-PCR)引物(表 1). qRT-PCR 反应体系为:SYBR Mix(Roche, Basel, Switzerland)5.0 μL, cDNA 1.0 μL,上下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL,超纯水 3 μL,总体积 10 μL;充分混匀,短暂离心后,在 LightCycler 480 II 实时荧光定量 PCR 仪(罗氏,美国)上进行 PCR 扩增,反应程序为 95 ℃ 5 min, 95 ℃ 10 s, 56 ℃ 15 s, 12 ℃ 12 s, 45 个循环后增加溶解曲线.以茶树基因 *CsPTB* 为内参基因^[21],每个反应 3 次生物学重复,2 次技术重复,2^{-ΔCT} 或 2^{-ΔΔCT} 法分析结果.

表 1 茶树东莨菪素和东莨菪碱合成相关基因实时荧光定量引物

基因名称	引物名称	引物序列(5'~3')
<i>CsPAL1</i>	qRT-PAL1-F1	GTCAATGGCACAGCTGTCGGTTCT
	qRT-PAL1-R1	TCAATTTGGCCTGGATGGTGCTTCA
<i>CsPAL2</i>	qRT-PAL2-F1	TCCGTGCAGCAGTACTTACCCATTGAT
	qRT-PAL2-R1	CGCCACGTCTTGCATTTTCTACTTCTT
<i>CsC4H</i>	qRT-C4H-2-F1	TCCAAATCACCGAGCCAGACACCTAC
	qRT-C4H-2-R1	AAGCCACCACGCGTTTACCAAGATTT
<i>Cs4CL2-1</i>	qRT-4CL1-F1	TATTTGAACGACCCGGAGGC
	qRT-4CL1-R1	AACGGCAGCATCAGAGATGT
<i>Cs4CL2-2</i>	qRT-4CL2-F1	CCATTTGTGCCGCCGATTGTGTT
	qRT-4CL2-R1	GCCCTGCCTCTGTCAATTCATAGC
<i>Cs4CL3</i>	qRT-4CL3-F1	GGACCAGAGTACCGCAAGCCATTTTT
	qRT-4CL3-R1	AGGGAGCAGCCAGTTTCAGGGTCAA
<i>CsCCoAOMT1</i>	qRT-CCoAOMT1-F1	CGGAAATCAATGGGCAAAATAAGGAGA
	qRT-CCoAOMT1-R1	TGTCGAGTTGTTTCATGGGTTCAGG
<i>CsPTB</i>	qRT-CsPTB-F1	TGACCAAGCACACTCCAC ACTATCG
	qRT-CsPTB-R1	TGCCCCCTTATCATCATCCACAA

2 结果与分析

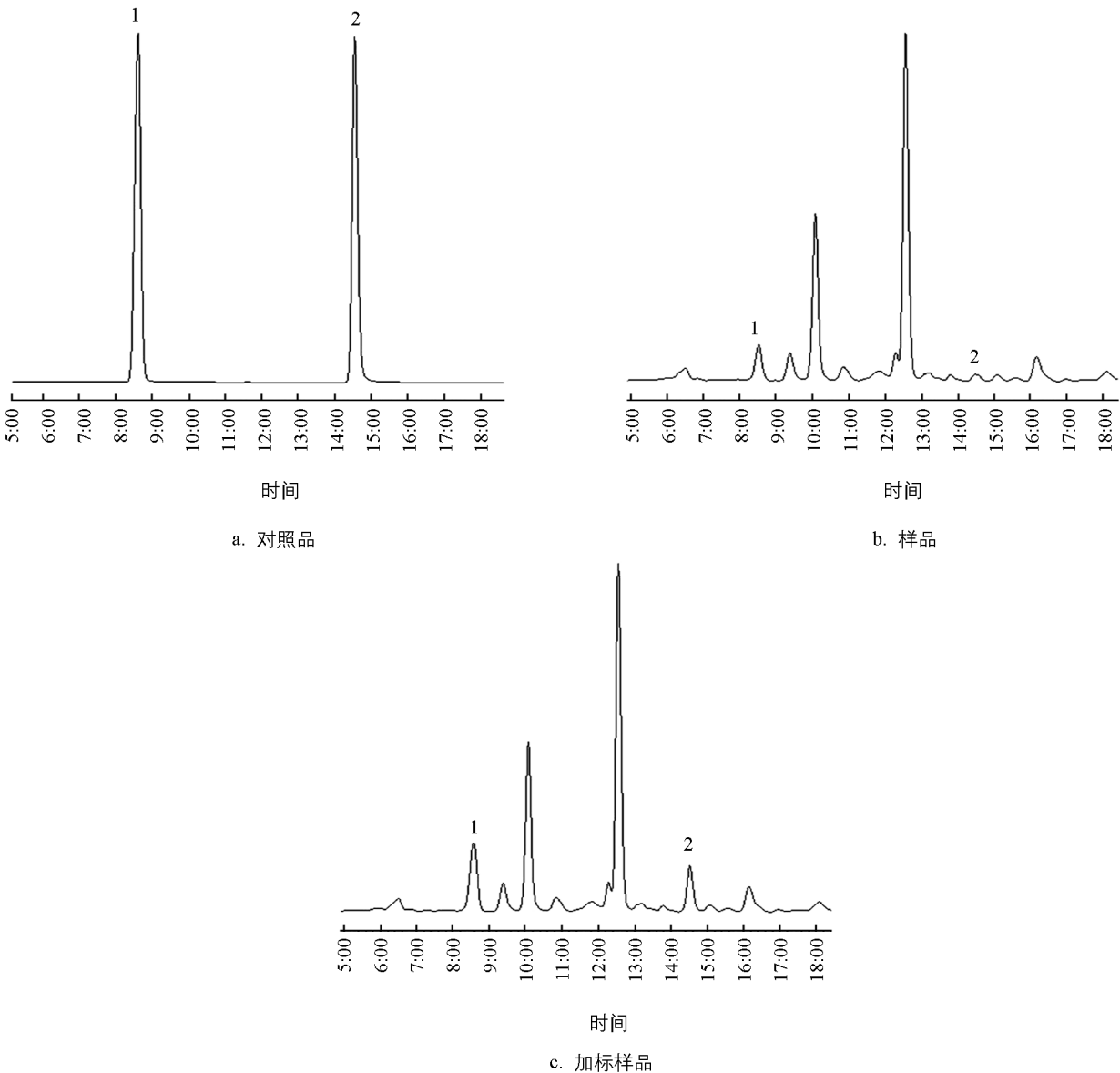
2.1 标准曲线及回收率

前人通过采用甲醇为提取溶剂,分别用 345 nm^[11], 346 nm^[22-23], 347 nm^[24] 等波长来测定一匹绸、参杞等植物中的东莨菪素和东莨菪苷.本研究通过全波长扫描显示,在茶树中东莨菪素和东莨菪苷的最大紫外吸收波长为 345 nm,因此把 345 nm 作为本研究的测定波长.将配制好的梯度浓度标准品溶液按色谱条件 1 进样,分析色谱图并记录峰面积,以峰面积为纵坐标、以对照品浓度为横坐标绘制标准曲线,计算 2 种

标准品的线性回归方程. 东莨菪素回归方程为 $y=32\,520.966\,20x-21\,613.773\,82$, $r=0.999\,8$, 在 $0.5\sim 64\,\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内呈良好线性关系; 东莨菪苷回归方程为 $y=17\,984.273\,65x-20\,044.097\,60$, $r=0.999\,9$, 在 $1\sim 128\,\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内呈良好线性关系.

将配制好的梯度浓度标准品溶液按色谱条件 2 进样, 分析色谱图并记录峰面积, 以峰面积为纵坐标、以对照品浓度为横坐标绘制标准曲线, 计算 2 种对照品的线性回归方程. 东莨菪素回归方程为 $y=33\,803.743\,801x-17\,723.041\,828$, $r=0.999\,821$, 在 $0.5\sim 64\,\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内呈良好线性关系; 东莨菪苷回归方程为 $y=18\,669.680\,731x-16\,520.198\,296$, $r=0.999\,9$, 在 $1\sim 128\,\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内呈良好线性关系.

东莨菪苷平均回收率为 91.7% , $\text{RSD}=3.32\%$ ($n=5$); 东莨菪素平均回收率为 93.5% , $\text{RSD}=2.64\%$ ($n=5$). 该结果与已报道的检测方法的效率基本一致, 表明 2 种色谱条件均具有较好的测定准确度, 均能够用于茶叶中东莨菪苷和东莨菪素的定量检测(图 2).



1 为东莨菪苷; 2 为东莨菪素.

图 2 茶叶样品的液相色谱

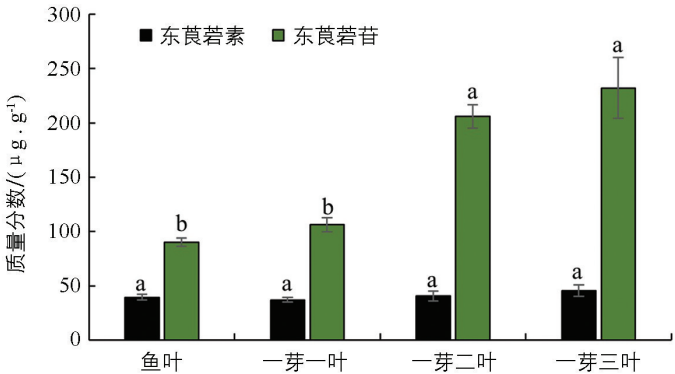
2.2 茶树新梢中东莨菪素和东莨菪苷质量分数测定

通过比较 2 种色谱条件对茶树新梢和成熟叶中东莨菪苷和东莨菪素的检测效果, 发现利用色谱条件

1 对茶树新梢进行检测得到的效果更理想,而茶树成熟叶检测需对梯度洗脱条件进行优化,宜采用色谱条件 2 进行检测. 本研究检测了“龙井 43”茶树不同萌发阶段新梢中的东茛菪苷和东茛菪素质量分数变化,结果显示,在茶芽萌发不同阶段的新梢中,东茛菪素的质量分数显著低于东茛菪苷的质量分数,且东茛菪素质量分数在不同阶段新梢中的质量分数变化差异无统计学意义,从鱼叶期到一芽三叶期的过程中,东茛菪素的质量分数变化不明显,均维持在相同的水平;而东茛菪苷的质量分数随着新梢成熟度的增加其质量分数显著升高,在一芽二叶和一芽三叶期新梢中质量分数显著高于鱼叶期和一芽一叶期,均达到 200 $\mu\text{g/g}$ 以上(图 3).

2.3 不同茶树材料中东茛菪素和东茛菪苷的质量分数检测

本研究选取包含中小叶种、大叶种、可可茶和叶色变异的茶树品种或单株 20 个材料,对这些材料中所含的东茛菪苷和东茛菪素的质量分数进行检测. 结果显示,不同茶树材料中东茛菪苷和东茛菪素的质量分数差异较大,东茛菪苷质量分数分布范围为 25.84~80.76 $\mu\text{g/g}$,而东茛菪素质量分数分布范围为 18.34~50.88 $\mu\text{g/g}$ (表 2).



不同处理间小写字母不同表示差异有统计学意义($p<0.05$).
图 3 不同发育阶段叶片中东茛菪素和东茛菪苷的质量分数

表 2 不同茶树材料中东茛菪素和东茛菪苷的质量分数

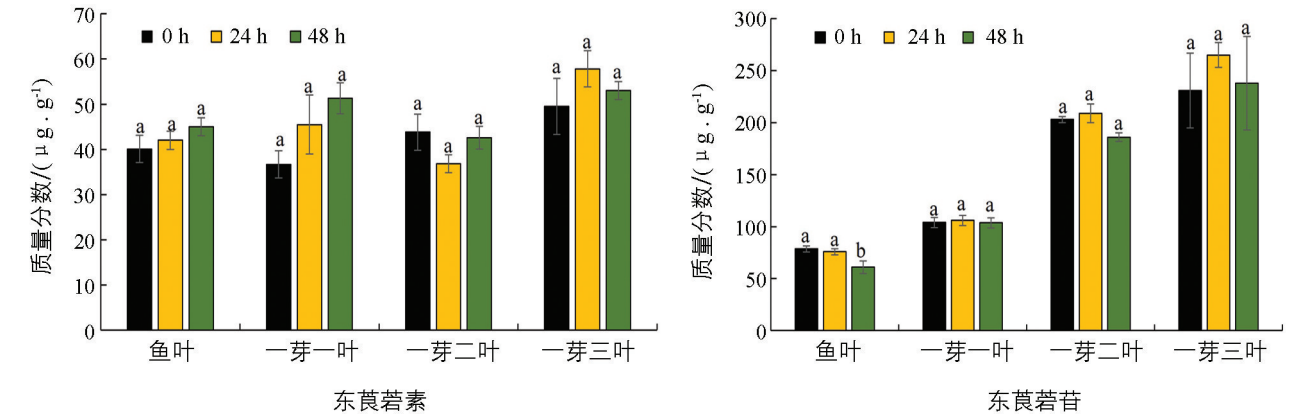
品种/株系名称	材料类型	东茛菪苷/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	东茛菪素/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
龙井 43	中小叶品种	41.84±0.04g	20.18±0.03b
2017M-49	大叶种单株	33.21±0.01b	50.88±0.05n
2018M-72	可可茶单株	43.06±0.10h	46.20±0.06l
CT2012-1	黄化变异单株	64.94±0.30q	35.11±0.02j
CT2012-5	黄化变异单株	49.00±0.16j	33.84±0.09i
CT2016-1	黄化变异单株	46.70±0.03i	37.82±0.06k
CT2016-2	黄化变异单株	25.84±0.15a	18.62±0.34a
CT2016-4	黄化变异单株	56.76±0.06m	29.80±0.02h
中黄 1 号	黄化变异品种	40.19±0.25f	24.14±0.01e
中黄 2 号	黄化变异品种	46.42±0.39i	47.64±0.22m
J-23	白化变异单株	38.64±0.05e	34.16±0.08i
J-06-M	白化变异单株	52.38±0.03l	29.26±0.12g
安吉白茶	白化变异品种	61.96±0.26p	21.68±0.03c
CT2013-1	紫色变异单株	50.93±0.14k	22.12±0.03d
CT2013-2	紫色变异单株	37.88±0.03d	25.96±0.04f
CT2010-1	紫色变异单株	37.72±0.02d	18.58±0.01a
CT2010-2	紫色变异单株	38.20±0.03d	24.03±0.04e
CT2010-3	紫色变异单株	34.82±0.08c	18.34±0.01a
中紫 1 号	紫色变异品种	59.34±0.15n	26.38±0.03f
紫娟	紫色变异品种	80.76±0.10r	21.60±0.07c

注: 同列数据后小写字母不同表示差异有统计学意义($p<0.05$).

报道显示, 丁公藤中东茛菪素和东茛菪苷的质量分数范围分别为 $80\sim380\text{ }\mu\text{g/g}$ 和 $150\sim1\,040\text{ }\mu\text{g/g}$ ^[24], 宁夏枸杞中东茛菪素和东茛菪苷的质量分数分别为 $27.5\sim57.3\text{ }\mu\text{g/g}$ 和 $59.5\sim167.6\text{ }\mu\text{g/g}$ ^[10], 一匹绸中东茛菪素和东茛菪苷的质量分数分别为 $38\sim240\text{ }\mu\text{g/g}$ 和 $140\sim1\,460\text{ }\mu\text{g/g}$ ^[22], 白花蛇舌草中东茛菪素的质量分数为 $6.5\sim17.8\text{ }\mu\text{g/g}$ ^[25]. 可以看出茶叶中东茛菪素和东茛菪苷的质量分数较白花蛇舌草、枸杞高或相当, 而低于一匹绸和丁公藤. 总体上茶叶中的东茛菪苷的质量分数高于东茛菪素, 在检测材料中仅在大叶种的 2017M-49 单株中东茛菪素的质量分数高于东茛菪苷. 本研究还发现黄化变异单株 CT2016-2 的东茛菪苷和东茛菪素的质量分数均较低; 紫色变异品种紫鹃中二者的总质量分数最高, 且主要是以东茛菪苷的形式存在, 其质量分数是东茛菪素的 3.7 倍; 白化品种安吉白茶中具有较高质量分数的东茛菪苷和相对较低的冬茛菪素.

2.4 东茛菪素和东茛菪苷在低温胁迫和茶尺蠖为害下的质量分数变化

为了探究生物与非生物胁迫是否对茶叶中东茛菪素和东茛菪苷质量分数有影响, 本研究分析了其在低温和茶尺蠖为害条件下茶树材料中的质量分数. 以茶树春季萌发至鱼叶、一芽一叶、一芽二叶和一芽三叶期的组织为材料, 分别进行低温胁迫处理, 并检测处理 48 h 内的物质质量分数变化. 结果显示, 在低温胁迫下, 东茛菪素的质量分数在各个时期的材料中变化均无统计学意义; 在鱼叶期低温胁迫处理 48 h 时, 东茛菪苷质量分数显著降低, 而在一芽一叶、一芽二叶和一芽三叶中的质量分数变化均无统计学意义(图 4). 在拟南芥中的研究表明, 东茛菪苷的生物合成受低温影响^[19], 这与本研究的结果不一致, 可能是由于物种间的差异以及茶叶中丰富的次生代谢物的影响. 茶尺蠖为害的样品分析结果显示, 茶叶在茶尺蠖为害后其体内的东茛菪素和东茛菪苷质量分数变化无统计学意义(图 5).

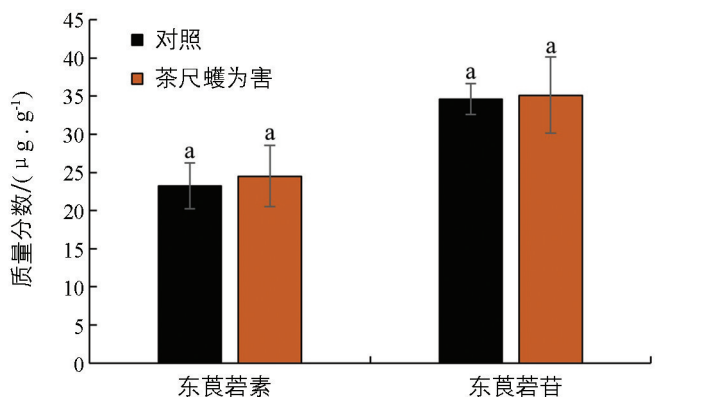


不同处理间小写字母不同表示差异有统计学意义($p<0.05$).

图 4 新梢中东茛菪素和东茛菪苷在低温胁迫下质量分数的变化

2.5 东茛菪苷合成相关基因在不同发育阶段新梢中的表达模式分析

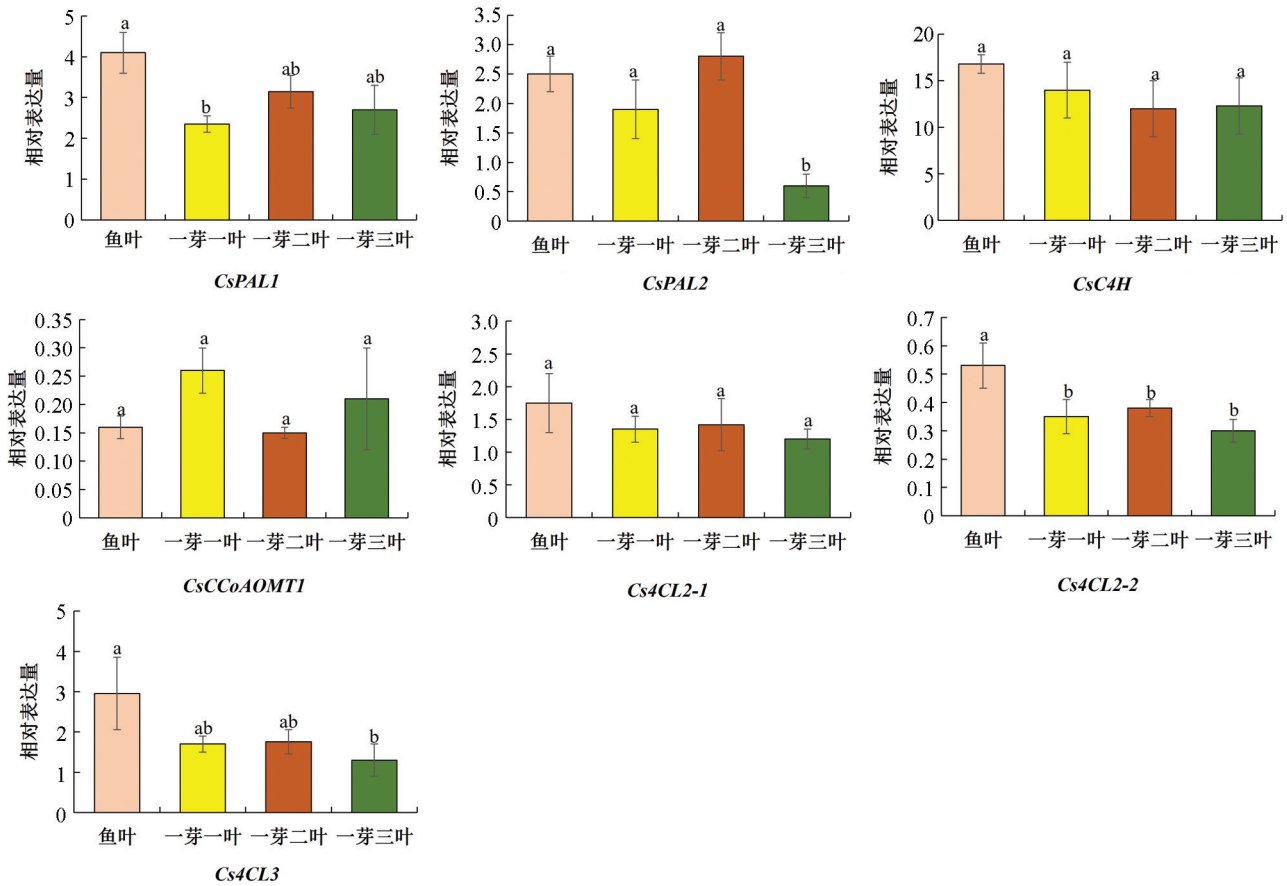
茶叶中东茛菪苷和东茛菪素的质量分数与新梢发育程度密切相关. 本研究基于“龙井 43”的基因组数据, 筛选出茶叶中东茛菪苷生物合成通路中的关键基因 *CsPALs*, *CsC4H*, *Cs4CLs* 和 *CsCCoAOMT1* 等, 检测这些基因在茶芽不同萌发阶段新梢中的表达模式变化. 结果显示, 这些基因在鱼叶期新梢中的表达量相对较高, 随着成熟度的增加, *CsPAL1*, *Cs4CL2-2* 和 *Cs4CL3* 的表达量降低, 到一芽三叶期时如 *CsPAL2* 等基因的表达量也显著降低, 而 *CsC4H*, *CsCCoAOMT1* 和 *Cs4CL2-1* 的表达在鱼叶期到一芽三叶期中的变化无统计学意义(图 6). 在新梢生长过程中, 整体上基因表达丰度与黄酮类生物合成高度相关, 但在合



不同处理间小写字母不同表示差异有统计学意义($p<0.05$).

图 5 东茛菪素和东茛菪苷在茶尺蠖为害叶片中的质量分数变化

成通路中的上游基因 *CsPALs*, *CsC4H* 和 *Cs4CLs* 的表达丰度与儿茶素和黄酮醇糖苷的积累量存在较低的相关关系^[26]. 这可能是由于次生代谢物质合成网络复杂, 且下游产物合成底物可能来自多个代谢途径, 导致上游基因表达水平与下游目标代谢物质量分数的高低不存在显著的相关关系.



不同处理间小写字母不同表示差异有统计学意义($p<0.05$).
图 6 东莨菪素和东莨菪苷合成相关基因在不同发育阶段叶片中的表达

3 结论

本研究建立了基于高效液相色谱测定茶叶中东莨菪素和东莨菪苷的方法, 并利用该方法分析了茶树不同发育时期新梢(鱼叶期到一芽三叶期)、茶尺蠖为害和低温等逆境胁迫处理下东莨菪素和东莨菪苷的质量分数变化, 结果显示茶叶中东莨菪苷的质量分数显著高于东莨菪素, 且东莨菪苷随着成熟度的增加而显著累积, 东莨菪素和东莨菪苷的质量分数受低温和茶尺蠖胁迫的影响较小. 对 20 个不同茶树品种/单株中的东莨菪素和东莨菪苷的质量分数进行检测结果显示, 不同茶树材料间东莨菪素和东莨菪苷的质量分数差异较大, 茶叶中东莨菪素质量分数为 18.34~50.88 $\mu\text{g/g}$, 东莨菪苷质量分数为 25.84~80.76 $\mu\text{g/g}$, 与部分中药材中的质量分数相近. 进一步对东莨菪苷生物合成相关的基因表达模式进行检测结果表明, 合成通路上游基因的表达模式与东莨菪苷的积累模式间不存在显著的相关关系. 总之, 由于茶叶中富含东莨菪素和东莨菪苷, 且具有重要的潜在保健功效, 能够为茶叶功能性成分开发和茶树资源多元化利用提供重要参考.

参考文献:

[1] 赵卓, 刘晨阳, 瓮青芬, 等. 茶六斑褐锦斑蛾 *Sorita pulchella* 线粒体基因组特征与系统发育分析 [J/OL]. 河南农业大学学报, (2022-11-11) [2022-11-20]. <https://doi.org/10.16445/j.cnki.1000-2340.20221110.001>.
[2] WEI C L, YANG H, WANG S B, et al. 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 of the United States of America, 2018, 115(18): E4151-E4158.

- [3] 陈睿. 茶叶功能性成分的化学组成及应用 [J]. 安徽农业科学, 2004, 32(5):1031-1033, 1036.
- [4] YUE Y, CHU G X, LIU X S, et al. TMDB: a Literature-Curated Database for Small Molecular Compounds Found from Tea [J]. BMC Plant Biology, 2014, 14: 243.
- [5] 魏丽娟, 周金培, 戴岳. 天然产物东茛菪素的研究进展 [J]. 海峡药学, 2009, 22(4):10-13.
- [6] 代雪平, 宋汉敏. 华山参中东茛菪苷的含量测定研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2012, 26(5): 66-68.
- [7] 余邦伟, 宋雪慧, 陈艳芬, 等. 白鹤藤的化学成分研究 [J]. 中药材, 2021, 44(4): 873-876.
- [8] 娄玉霞, 聂桂华, 李振国. 华山参中东茛菪内酯的含量测定方法研究 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31(6): 1137-1139.
- [9] 徐立, 稽长久, 谭宁华, 等. 桑树活性物质东茛菪素及东茛菪苷的分离鉴定 [J]. 蚕业科学, 2008, 34(4):593-596.
- [10] 徐飞, 王晓中, 张雷, 等. HPLC 测定宁夏枸杞中东茛菪素和东茛菪苷含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(13): 67-70.
- [11] 杨媛媛, 谢志民, 胡静, 等. 3 种丁公藤属植物中 8 个成分的含量测定 [J]. 中南药学, 2020, 18(6): 982-985.
- [12] 叶惠珍, 范椰新, 刘植蔚, 等. 丁公藤抗风湿有效成分的研究 [J]. 中草药, 1981, 12(5): 5-7.
- [13] 张紫佳, 张勉, 朱恩圆, 等. 丁公藤类药材及其混用品中总东茛菪内酯的含量测定 [J]. 中国药学杂志, 2004, 39(12): 936-938.
- [14] 朱惠兰, 黄金城. 丁公藤结晶 I (东茛菪素) 抗炎作用 [J]. 中草药, 1984, 15(10): 30-33.
- [15] 吴劲松. 植物对病原微生物的“化学防御”: 植保素的生物合成及其分子调控机制 [J]. 应用生态学报, 2020, 31(7): 2161-2167.
- [16] SIWINSKA J, KADZINSKI L, BANASIUK R, et al. Identification of QTLs Affecting Scopolin and Scopoletin Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. BMC Plant Biology, 2014, 14: 280.
- [17] SCHMID N B, GIEHL R F H, DÖLL S, et al. Feruloyl-CoA 6'-Hydroxylase1-Dependent Coumarins Mediate Iron Acquisition from Alkaline Substrates in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2014, 164(1): 160-172.
- [18] PETRIDIS A, DÖLL S, NICHELMANN L, et al. *Arabidopsis Thaliana* G2-LIKE FLAVONOID REGULATOR and BRASSINOSTEROID ENHANCED EXPRESSION₁ are Low-Temperature Regulators of Flavonoid Accumulation [J]. The New Phytologist, 2016, 211(3): 912-925.
- [19] HAO X Y, TANG H, WANG B, et al. Integrative Transcriptional and Metabolic Analyses Provide Insights into Cold Spell Response Mechanisms in Young Shoots of the Tea Plant [J]. Tree Physiology, 2018, 38(11): 1655-1671.
- [20] WANG X C, FENG H, CHANG Y X, et al. Population Sequencing Enhances Understanding of Tea Plant Evolution [J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 4447.
- [21] HAO X Y, DAVID H, CHAO W S, et al. Identification and Evaluation of Reliable Reference Genes for Quantitative real-time PCR Analysis in Tea Plant (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) [J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(12): 22155-22172.
- [22] 李兵, 蒙秋艳, 廖广凤, 等. HPLC 法测定一匹绸中东茛菪苷和东茛菪内酯的含量 [J]. 湖北农业科学, 2017, 56(1): 123-124, 152.
- [23] 谢婷. HPLC 梯度洗脱法同时测定参杞酒中的党参炔苷、东茛菪苷、东茛菪亭、槲皮素、山柰酚和异鼠李素 [J]. 国际药学研究杂志, 2016, 43(5): 998-1001.
- [24] 宋蔚, 刘锁兰, 李秀青, 等. HPLC 测定 4 种丁公藤类生药中东茛菪素及东茛菪苷的含量 [J]. 中国中药杂志, 2004, 29(2): 94-95.
- [25] 王勇, 杨秀荣, 张丽, 等. HPLC 法同时测定白花蛇舌草中槲皮素和东茛菪内酯的含量 [J]. 中国药师, 2019, 22(9): 1761-1763.
- [26] WU L Y, LV Y Q, YE Y, et al. Transcriptomic and Translatomic Analyses Reveal Insights into the Developmental Regulation of Secondary Metabolism in the Young Shoots of Tea Plants (*Camellia sinensis* L.) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(39): 10750-10762.