

水杨酸对乌龙茶咖啡碱代谢生理特性的影响

蔡金福 (泉州市种植业管理站, 福建泉州 362000)

摘要 [目的]研究外源水杨酸对乌龙茶咖啡碱合成代谢的影响。[方法]以乌龙茶品种“铁观音”幼苗为试验材料,分析外源水杨酸对乌龙茶叶片咖啡碱含量、咖啡碱合成酶基因表达及其合成途径中间代谢产物含量的影响。[结果]外源水杨酸提高乌龙茶叶片咖啡碱含量、激活乌龙茶咖啡碱合成酶的基因表达,增加咖啡碱可可碱、1,7-二甲基黄嘌呤和茶碱等合成途径中间产物的含量,有利于咖啡碱的累积。[结论]水杨酸对咖啡碱生物合成具有浓度效应,2.0 mmol/L 水杨酸最有利于铁观音咖啡碱的生物合成。

关键词 铁观音;外源水杨酸;咖啡碱;生理特性;基因表达

中图分类号 S571.1 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)19-0048-03

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2020.19.014



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Effects of Salicylic Acid on the Physiological Characteristics of Caffeine Metabolism in Oolong Tea

CAI Jin-fu (Quanzhou Municipal Bureau of Agriculture Planting Station, Quanzhou, Fujian 362000)

Abstract [Objective] To study the effects of exogenous salicylic acid on the synthesis and metabolism of caffeine in Oolong tea. [Method] The seedlings of Tieguanyin, a oolong tea variety, were used to study the effects of different concentrations of salicylic acid on the gene expression of caffeine, caffeine synthetase and the content of intermediate products of caffeine synthesis pathway. [Result] Exogenous salicylic acid increased the content of caffeine in Oolong tea, activated the gene expression of caffeine synthetase, and increased the content of theobromine, 1,7-dimethylxanthine and theophylline, the intermediate products of caffeine synthesis pathway, so as to promote the biosynthesis of caffeine. [Conclusion] Salicylic acid has a concentration effect on caffeine metabolism, 2.0 mmol/L salicylic acid is the most favorable for caffeine production.

Key words Tieguanyin; Exogenous salicylic acid; Caffeine; Physiological characteristics; Gene expression

福建是全国最大的乌龙茶生产省份和发源地,生产历史悠久,产品特色明显,在国内外市场享有较高的声誉。福建素有“茶树良种王国”之称,也是国内乌龙茶茶树品种资源最丰富的地区^[1]。茶叶品质主要包括茶叶中的氨基酸指数以及茶多酚的含量,还包括咖啡碱以及可溶性糖的含量等。咖啡碱是茶汤中苦味的重要物质基础,对茶叶品质有非常重要的影响^[2]。它具有兴奋神经中枢、提神和醒脑的功效,同时对人的呼吸和心脏系统也有兴奋作用^[3]。另外,咖啡碱在治疗癌症、阿尔兹海默病、帕金森病^[4]等方面也有一定的作用。

水杨酸是小分子酚类化合物,普遍存在于植物体内,通过调节植物的各代谢途径,从而诱导植物体内合成酚类、黄酮类等次生代谢产物^[5-6]。外源水杨酸在植物抗性应用方面已有相关报道^[7-9],咖啡碱代谢研究主要集中于微生物发酵、外源诱导物 ZMZ 和合成基因功能等方面^[10-11],利用外源水杨酸调节咖啡碱代谢的研究鲜见报道^[12]。鉴于此,笔者对“铁观音”2年生盆栽苗喷施外源水杨酸进行了研究,分析乌龙茶叶片咖啡碱含量、咖啡碱合成酶基因表达和咖啡碱合成途径中前体物质含量的变化,探索乌龙茶茶树咖啡碱生物合成的生理特性,旨在为乌龙茶高产优质栽培提供理论依据。

1 材料与方

1.1 试验材料 以种植于安溪茶叶生产基地内的2年生“铁观音”乌龙茶幼苗为材料,铁观音幼苗健康且生长健壮。将铁观音幼苗种植于塑料盆中,每盆种植3株;培养1个月,待幼苗正常生长后,选取枝梢长势相对一致的盆栽苗用于试验。

1.2 试验设计 2019年4—5月对茶树进行喷施水杨酸处理,浓度分别为1.0、2.0、3.0和4.0 mmol/L,对照处理为蒸馏水,共设计5个处理,每盆为1个处理,每个处理3次重复,随机区组设计,各处理间隔50 cm 摆放。在晴朗天气09:00前叶面喷施水杨酸,每个星期喷施1次,共处理4次;试验期间用塑料薄膜遮挡自然降雨,其他按茶园田间管理进行。试验结束后采集成熟功能性叶片用于各项生理指标测定,叶片选取位于相同方向和节位的枝条。

1.3 测定项目与方法

1.3.1 样品的制备 各处理采集的茶叶样品分为2份,其中1份烘干制备成干样,另1份用新鲜样品;样品分别采用热水浸提、热水超声波、75%乙醇浸提、75%乙醇超声波4种方式进行提取待测液。提取方法为:称取样品150 mg,置于25 mL 烧瓶中,加入沸水(或75%乙醇)20 mL,在水浴中浸泡45 min(或超声提取45 min),过滤,定容至25 mL,置于-4℃冰箱中备用。

1.3.2 咖啡碱合成途径相关物质含量的测定。采用高效液相色谱法测定咖啡碱合成途径中间产物可可碱、1,7-二甲基黄嘌呤、茶碱和咖啡碱4种物质含量^[13]。色谱柱采用 Inertsil-ODC C₁₈ (250.0 mm×4.6 mm, 5 μm), 35℃柱温;流动相为甲醇/超纯水=40/60,流速为0.4 mL/min,20 μL进样量;在271 nm 波长下检测。

1.3.3 咖啡碱合成酶基因表达。RNA 提取采用 TaKaRa MiniBEST Plant RNA Extraction Kit 试剂盒;以总 RNA 为模板合成 cDNA 第1链;以 cDNA 为模板应用 SYBR Premix Ex-TaqTMI 试剂盒进行荧光定量表达,咖啡碱合成酶基因(TCS)引物(表1)由生工生物工程(上海)股份有限公司提供。

以 GADPH 为内参基因,每个样品对照基因与测定基因

基金项目 福建省产业技术创新联合项目(闽发改高技[2014]514号);泉州市科技计划项目(2018N16)。

作者简介 蔡金福(1977—),男,福建南安人,高级农艺师,从事茶树品种选育与高效生产技术研究。

收稿日期 2019-12-18;修回日期 2020-03-06

分别设 3 个重复和 1 个阴性对照,反应结束后观察溶解曲线及扩增曲线,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行相对表达量计算。

表 1 咖啡碱合成酶基因引物序列

Table 1 The primer sequences of caffeine synthase genes

序号 Code	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
1	TCS-F	TGAGGAAGTTCCTGTTATGTGATGG
2	TCS-R	TGGTGCCTGACTAAGCCAATGAAC
3	GAPDH-F	TTGGCATCGTTGAGGGTCT
4	GAPDH-R	CAGTGGGAACACGGAAAGC

1.4 数据处理与分析 采用 Microsoft Excel 2013 进行数据整理和图表制作,采用 Duncan's 新复极差法进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 咖啡碱前体物质含量的回归方程 咖啡碱合成途径中的主要物质有 1,7-二甲基黄嘌呤、可可碱、咖啡碱和茶碱。采用高效液相色谱法建立 4 种物质标准样品的回归方程,4 种物质标准品混合溶液的分离图谱见图 1。从图 1 可以看出,咖啡碱合成途径 4 种物质的保留时间不同,其出峰先后顺序分别为可可碱、1,7-二甲基黄嘌呤、茶碱和咖啡碱。

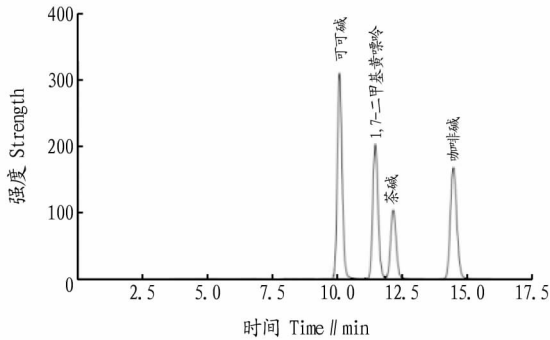


图 1 咖啡碱前体物质标准品高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of caffeine standard

以 4 种物质标准品溶液浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标进行线性回归分析,这 4 种物质的相关系数均大于 0.99,符合回归方程要求,建立咖啡碱合成途径中间物质 1,7-二甲基黄嘌呤、可可碱、咖啡碱和茶碱的回归方程(表 2)。

表 2 咖啡碱前体物质回归方程

Table 2 Linear regression equation of the caffeine standard

物质 Substance	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient (R)
可可碱 Theobromine	$y = 45\ 481x - 112\ 477$	0.998 1
茶碱 Theophylline	$y = 69\ 374x + 210\ 277$	1.000 0
咖啡碱 Caffeine	$y = 158\ 200x - 402\ 864$	0.998 9
1,7-二甲基黄嘌呤 1,7-theophylline	$y = 269\ 151x - 831\ 860$	0.998 3

注: y 为峰面积; x 为样品浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

Note: y was peak area, X was sample concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

2.2 样品提取方式对咖啡碱含量的影响 样品制备和提取方法对茶叶咖啡碱含量有直接影响。由图 2 可知,样品烘干后咖啡碱含量显著高于鲜样,咖啡碱含量提高了 98.4%~

190.0%,其中 75%乙醇超声处理的咖啡碱含量最高,为 $7.549\ \mu\text{g}/\text{mg}$,这主要是由于烘干降低样品的含水量,从而提高咖啡碱含量。

不同提取方式中,热水结合超声波处理的咖啡碱含量高于热水浸提处理,乙醇结合超声波处理的咖啡碱含量显著高于乙醇浸提处理,这是由于超声波处理加快样品中细胞破裂有利于咖啡碱的提取。提取溶剂中,75%乙醇处理的咖啡碱含量显著高于热水处理,这是由于有机溶剂能促进咖啡碱溶解,从而提高咖啡碱提取效果。因此,75%乙醇结合超声波处理样品能准确提取茶叶中咖啡碱。

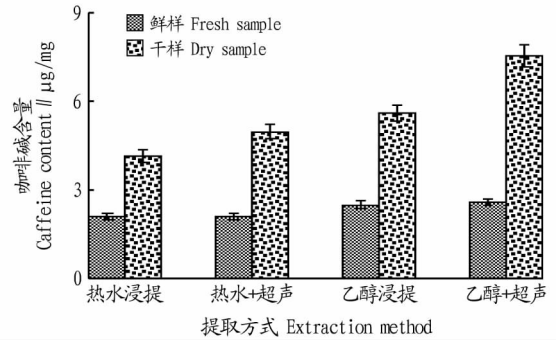
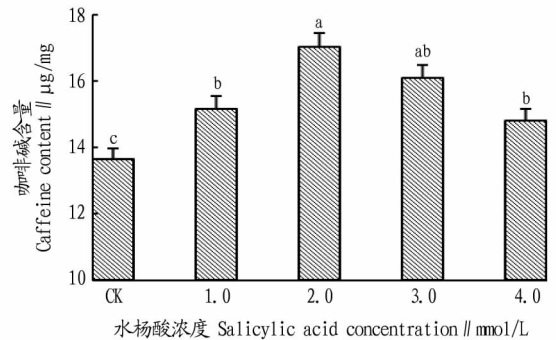


图 2 不同提取方法对咖啡碱含量的影响

Fig. 2 Effects of different extraction methods on caffeine content

2.3 水杨酸对乌龙茶咖啡碱含量的影响 乌龙茶树喷施水杨酸能够提高茶叶咖啡碱含量。由图 3 可知,随着水杨酸浓度的增加,茶叶咖啡碱含量出现先升高后下降的变化,且水杨酸处理的咖啡碱含量均显著高于对照;2.0 mmol/L 水杨酸条件下,咖啡碱含量达到最大值,比对照增加 29.3%;随后咖啡碱含量缓慢下降;4.0 mmol/L 水杨酸时,咖啡碱含量降为最低值,但仍高于对照。因此,水杨酸对咖啡碱合成起到明显的促进作用。



注:不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著

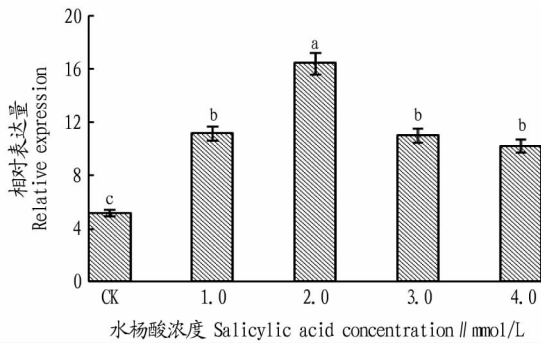
Note: Different lowercases indicated significant difference at 0.05 level

图 3 水杨酸浓度对乌龙茶咖啡碱含量的影响

Fig. 3 Effects of salicylic acid concentration on the content of caffeine in Oolong tea

2.4 水杨酸对乌龙茶咖啡碱合成酶基因表达的影响 咖啡碱合成酶(TCS)是茶树中咖啡碱合成途径的关键酶基因。由图 3 可知,喷施水杨酸后,茶树的咖啡碱合成酶基因相对表达量显著提高;随着水杨酸浓度的增加,TCS 基因相对表达量呈先上升后下降的趋势,2 mmol/L 水杨酸条件下, TCS

基因相对表达量达到最大值,比对照增加 2.18 倍;随后 TCS 基因表达量下降;4 mmol/L 水杨酸条件下,TCS 基因相对表达量降为最低值,但比对照增加 98.06%,且显著高于对照。



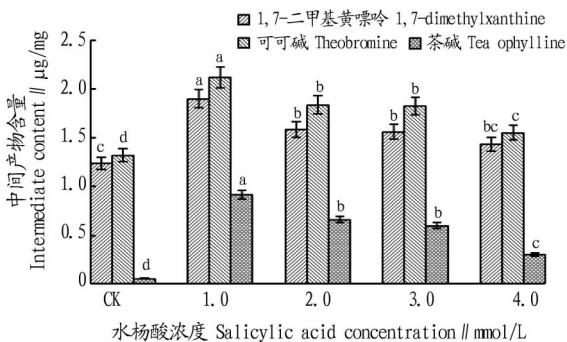
注:不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著

Note: Different lowercases indicated significant difference at 0.05 level

图 4 水杨酸浓度对咖啡碱合成酶基因表达的影响

Fig. 4 Effects of salicylic acid concentration on gene expression of caffeine synthetase in Oolong tea

2.5 水杨酸对咖啡碱合成途径中间物含量的影响 可可碱、1,7-二甲基黄嘌呤和茶碱是咖啡碱合成途径中间产物,是咖啡碱的前体物质,直接影响咖啡碱的生成。由图 5 可知,咖啡碱合成途径前体物质含量的变化与咖啡碱含量变化基本一致。水杨酸处理均显著提高可可碱、1,7-二甲基黄嘌呤和茶碱含量;随着水杨酸浓度逐渐升高,咖啡碱合成途径 3 种前体物质呈先升高后下降的趋势;1.0 mmol/L 水杨酸条件下,3 种前体物质可可碱、1,7-二甲基黄嘌呤和茶碱含量均达到最大值,分别比对照增加 60.89%、53.51% 和 498.69%;随后这 3 种前体物质含量均逐渐降低;水杨酸浓度为 4.0 mmol/L 时,3 种前体物质含量降为最低值,但仍显著高于对照。



注:不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著

Note: Different lowercases indicated significant difference at 0.05 level

图 5 水杨酸浓度对咖啡碱合成途径中间产物含量的影响

Fig. 5 Effects of salicylic acid concentration on intermediate content in caffeine synthesis pathway of Oolong tea

3 结论与讨论

水杨酸是植物抗逆的内源信号物,可以激活植物的防御反应,诱导植物体内某些次生代谢产物的生物合成^[5]。植物中高浓度的水杨酸可诱导香豆素、类胡萝卜素等多种羟基苯

甲酸和羟基苯丙烯酸衍生物的合成^[14]。水杨酸处理丹参细胞可增加丹参细胞里酚类物质,也可提高超氧化物歧化酶、过氧化物酶和羟基苯丙酮酸双氧化酶等酶的活性^[15]。添加低浓度水杨酸提高人参皂苷和糖苷的合成量^[16-17]。在黄芩愈伤组织继代培养中添加 50 $\mu\text{mol/L}$ 水杨酸时,黄芩苷含量提高 1.63 倍^[18]。该研究中喷施 2.0 mmol/L 水杨酸可显著促进茶树咖啡碱含量的增加,而较高浓度的水杨酸对咖啡碱的生成不明显,这与前人的研究报道基本一致。因此,叶面喷施适宜浓度的外源水杨酸(2.0 mmol/L)可以提高茶树咖啡碱含量,有效促进咖啡碱积累。

水杨酸还可以诱导植物体内某些次生代谢产物的生物合成^[19]。咖啡碱作为茶树中重要的次生代谢产物,其体内合成也受到咖啡碱合成代谢途径基因表达的调控^[12,20]。Maluf 等^[21]发现高咖啡碱含量的果实中咖啡碱合成酶表达量较高,低咖啡碱含量的果实中咖啡碱合成酶表达量较低。李金等^[22]比较茶树咖啡碱合成途径中 TCS1、TIDH、SAMS 的基因表达量差异与咖啡碱含量的相关性后,发现 TCS1 对茶树咖啡碱的合成起到重要作用。邓威威等^[23]克隆出茶树咖啡碱合成酶基因,构建了 TCS1 原核表达质粒,同时成功制备了抗 TCS1 的多克隆抗体。该研究中咖啡碱合成酶(TCS1)对咖啡碱合成代谢起到主要作用,2.0 mmol/L 水杨酸有利于提高咖啡碱合成途径酶基因的表达。目前,虽然克隆了部分参与咖啡碱合成代谢的关键酶基因,但是咖啡碱代谢途径的转录调控网络还不清楚;水杨酸等外源物对铁观音咖啡碱代谢调控机理仍有待进一步研究。

参考文献

- [1] 刘建福,王文建,黄昆. 中国乌龙茶种质资源图鉴[M]. 厦门:厦门大学出版社,2018.
- [2] 付蕾,陈立贵,袁新强,等. 从茶叶中提取咖啡碱的研究[J]. 安徽农业科学,2008,36(9):3730-3731.
- [3] HILDEBRAND J S, PATEL A V, MCCULLOUGH M L, et al. Coffee, tea, and fatal oral/ pharyngeal cancer in a large prospective US cohort [J]. American journal of epidemiology, 2012, 177(1): 50-58.
- [4] MAIA L, DE MENDONÇA A. Does caffeine intake protect from Alzheimer's disease? [J]. Eur J Neurol, 2002, 9(4): 377-382.
- [5] 李铂,唐志书,王楠,等. 叶面喷施水杨酸对当归幼苗生理特性和保护酶活性的影响[J]. 中国现代中药, 2019, 21(5): 634-637.
- [6] 孟雪娇,邱昆,丁国华. 水杨酸在植物体内的生理作用研究进展[J]. 中国农学通报, 2010, 26(15): 207-214.
- [7] 巴青松,宋瑜龙,张兰兰,等. 根施水杨酸对铅胁迫下小麦根系生长发育的影响[J]. 干旱地区农业研究, 2019, 37(1): 208-213.
- [8] 王立红,李星星,孙影影,等. 外源水杨酸对 NaCl 胁迫下棉花幼苗生长生理特性的影响[J]. 西北植物学报, 2017, 37(1): 154-162.
- [9] 孙玉珺,秦东玲,伊凡,等. 外源水杨酸对低温胁迫下玉米幼苗生长及生理特性的影响[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(4): 726-734.
- [10] 马存强,李静,周斌星,等. 黑曲霉发酵对咖啡碱代谢的影响[J]. 江西农业学报, 2014, 26(5): 42-46.
- [11] 张明泽,林金科,吴亮宇,等. 外源诱导物 ZMZ 对茶树新梢咖啡碱及其他生化成分含量的影响[J]. 福建茶叶, 2013(1): 25-26.
- [12] 田奥磊. 武夷岩茶大红袍茶氨酸和咖啡碱代谢生理特性研究[D]. 厦门:华侨大学, 2018.
- [13] 王嘉琦,贾丽,夏敏. 液相色谱法测定饮料中咖啡因、可可碱和茶碱[J]. 现代食品科技, 2011, 27(1): 114-116.
- [14] SHARMA M, SHARMA A, KUMAR A, et al. Enhancement of secondary metabolites in cultured plant cells through stress stimulus [J]. Am J Plant Physiol, 2011, 6(2): 50-71.

优先使用新一代抗生素或大剂量、大组方进行治疗,长期以往容易导致细菌产生耐药性。近些年,大肠杆菌的耐药率和耐药谱不断增高,而且目前被发现的大肠杆菌的血清型有很多种^[11],很大程度上增加了兽医工作者的工作难度,还间接导致食品安全问题的越来越严重,尤其是蛋鸡和肉鸡携带的耐药基因会通过食物链等方式传给人类^[12],危害食品安全和人类健康。该试验结果显示各种抗菌药物对不同地区的大肠杆菌病原菌的敏感度不一样,产生的原因应该是与各地区的用药史有关,由于检测的病鸡来源于不同地区,所以导致不同地区的大肠杆菌对各种药物的敏感度不一样^[13]。通过药敏试验可选择发病场的敏感药物对患有大肠杆菌病的鸡群进行治疗,能达到较好的治疗效果,也能避免细菌耐药性的产生。

3.2 减少药物残留的方法 随着抗生素的广泛使用,药物的残留导致动物源性的食品安全问题越来越严重,尤其体现在蛋鸡和肉鸡上,它们体内携带的耐药基因和药物残留会通过食物链等方式传给人类,严重危害食品安全和人类健康^[14]。中药组方或单方治疗模式便应运而生,因为中药在目前没有被发现很强的耐药性,相比于抗生素中耐药性其危害可以忽略不计,因为中药组方主要调节机制就是改善机体内的新陈代谢,使之调节到平衡稳态,缺点就是没有抗生素效果来的有效和快速。因此,在减少药物残留方面,在速成的肉鸡前期发病可选用疗效快速的西药组方,同时也要注意

用药剂量和疗程,合理用药。等病情稳定后再改用中药组方进行疗效巩固,应分开该场保健和常用治疗药物。此外,蛋鸡在生长期可选用西药组方,开产后发病的可选用无抗组方,在最大程度上减少药物的残留问题。

参考文献

- [1] 霍清合. 大肠杆菌病多发原因及防治[J]. 家禽科学, 2005(3): 22-23.
 - [2] 杨玉荣. 鸡大肠杆菌对 β -内酰胺类抗生素的耐药性及其感染治疗的研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2005.
 - [3] 恽时锋, 潘震寰, 郑明珠. 鸡大肠杆菌病研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2008, 30(6): 277-280.
 - [4] 苏建青, 褚秀玲, 刘文强, 等. 中草药防治鸡大肠杆菌病的机理和临床应用效果[J]. 湖北农业科学, 2009, 48(8): 1964-1965, 2003.
 - [5] 中国药典委员会. 兽药国家标准化学药品、中药卷: 第1册[S]. 北京: 化学工业出版社, 2013: 65, 108.
 - [6] 中国药典委员会. 中华人民共和国兽药典(2015年版)[S]. 北京: 中国农业出版社, 2016.
 - [7] 赵景田. 中药治疗鸡大肠杆菌病[J]. 河南畜牧兽医, 2003, 24(11): 50.
 - [8] 彭贵青, 吴斌, 刘梦元. 仔猪致病性大肠杆菌分离鉴定及药敏试验[J]. 养殖与饲料, 2013(5): 29-31.
 - [9] 刘萍, 胡世君, 周秀富. 某鸡场大肠杆菌和沙门氏菌病原的分离鉴定及药敏试验[J]. 畜禽业, 2005(7): 40-42.
 - [10] 昌莉丽, 李华坤, 刘桂兰. 中西药联用对禽源大肠杆菌的体外抑菌效果研究[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(16): 5037-5038.
 - [11] 阮祥春, 曾明华, 黄媛媛, 等. 安徽省部分地区致病性大肠杆菌耐药性分析[J]. 安徽农业大学学报, 2013, 40(3): 430-433.
 - [12] 戴秀美, 常维山. 2012年我国部分地区猪源大肠杆菌耐药性分析[J]. 畜禽业, 2013(1): 50-52.
 - [13] 郝智慧, 肖希龙, 邱梅, 等. 不同区域鸡大肠杆菌对抗菌药的耐药性比较[J]. 中国兽医科学, 2009, 39(1): 84-88.
 - [14] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-third informational supplement[S]. Wayne, PA: CLSI, 2015.
- (上接第50页)
- [15] 王春丽, 梁宗锁, 李殿荣, 等. 茉莉酸甲酯和水杨酸对丹参幼苗中蔗糖代谢和酚酸类物质积累的影响[J]. 西北植物学报, 2011, 31(7): 1405-1410.
 - [16] 陈竞天, 易斌, 陈艾萌, 等. 苗期喷施水杨酸对甜叶菊主要农艺性状和糖苷含量的影响[J]. 西北植物学报, 2019, 39(1): 149-155.
 - [17] 张悦, 王义, 蒋世翠, 等. 水杨酸诱导下人参培养物差异表达基因片段的克隆[J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(2): 245-250.
 - [18] 孟书亦, 马秀杰, 韩梅, 等. 水杨酸对黄芩愈伤组织抗氧化酶活性及黄酮苷含量的影响[J]. 分子植物育种, 2017, 15(10): 4179-4183.
 - [19] LIU Y H, LIANG Z S, ZHANG Y J. Induction and *in vitro* alkaloid yield of calluses and protocorm-like bodies (PLBs) from *Pinellia ternate* [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 2010, 46(3): 239-245.
 - [20] 李梅, 徐丹旎, 李丽江, 等. 咖啡树咖啡碱合成相关基因研究进展[J]. 热带农业科学, 2018, 38(9): 45-48.
 - [21] MALUF M P, DA SILVA C C, DE OLIVEIRA M DE P A, et al. Altered expression of the caffeine synthase gene in a naturally caffeine-free mutant of *Coffea arabica* [J]. *Genetics and molecular biology*, 2009, 32(4): 802-810.
 - [22] 李金, 魏艳丽, 庞磊, 等. 茶树咖啡碱合成途径中 TCS1, TIDH, SAMS 的基因表达量差异及其与咖啡碱含量的相关性[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(10): 21-24.
 - [23] 邓威威, 金阳, 李旻, 等. 茶树咖啡碱合成酶基因原核表达及其抗体制备与鉴定[J]. 植物研究, 2015, 35(3): 333-339.