



中文核心期刊、中国科技核心期刊
中国科学引文数据库来源期刊
中国科协精品科技期刊工程项目
Scopus、EBSCO、CA、CAB、JST、FSTA等收录

ISSN 1000-369X

CN 33-1115/S

茶叶科学

Journal of Tea Science



ISSN 1000-369X



9 771000 369206

08>

2023

第43卷 第4期

Vol.43 No.4

中国茶叶学会 中国农业科学院茶叶研究所 主办

SPONSORED BY CHINA TEA SCIENCE SOCIETY
AND TEA RESEARCH INSTITUTE, CAAS

机构简介

湖南农业大学茶学教育部重点实验室 国家植物功能成分利用工程技术研究中心 省部共建植物功能成分利用协同创新中心

湖南农业大学茶学教育部重点实验室是2003年由教育部批准成立。国家植物功能成分利用工程技术研究中心，是以茶学教育部重点实验室和湖南省天然产物工程技术研究中心为主体，2009年由科技部批准组建，2013年通过验收，这是我国植物提取物领域唯一的、湖南省属高校中第一个、湖南农业领域第二个国家工程技术研究中心。由湖南省与教育部联合共建的“省部共建植物功能成分利用协同创新中心”批准于2019年，前身是成立于2013年的湖南省植物功能成分利用协同创新中心，以国家植物功能成分利用工程技术研究中心、茶学教育部重点实验室、科技部药用植物资源国际合作基地等为主要平台依托，集聚海内外茶叶功能成分及天然产物研究领域优秀人才组建而成。国家茶叶产业技术体系深加工研究室、加工研究室也是以上述研究平台为依托。

重点实验室和研究中心现有教学科研固定人员42人。其中，院士1人，教授20人，副教授12人，具有博士学位者35人，是一支多学科交叉、年轻化、国际化的研究团队。刘仲华教授领衔的“园艺植物功能成分优异资源高效利用”研究团队入选教育部创新团队（2009），刘仲华教授领衔的“茶叶功能成分利用与深加工”研究团队入选全国农业科研杰出人才及创新团队（2012）。

在茶叶科学研究领域，主要设有5个研究方向：茶叶功能成分利用与深加工、茶树生物技术与种质创新、茶叶加工理论与新技术、茶树生理与高效栽培、茶文化与茶业经济。在植物功能成分利用研究领域，主要设有5个研究方向：植物功能成分分离纯化技术、植物优异资源优选与改良的生物技术、植物功能成分分析检测技术、植物功能成分功效评价与作用机理、植物功能成分终端产品研发。现有实验室面积7 000多平方米，拥有价值5 000万元的现代先进仪器设备，有效支撑茶叶科学及植物功能成分利用研究。

近5年来，先后承担国家级、部省级重大或重点项目40多项，累计获得科学研究、平台建设和人才计划经费资助1亿多元。实验室和研究中心先后在国内外核心刊物和学术会议上发表学术论文350多篇，其中被SCI收录100余篇，主编或参编出版学术专著和教材30多部，获得国家发明专利授权80多项。近10年来，在茶叶科学研究领域，先后获国家科技进步二等奖2项、湖南省科技进步一等奖3项、首届湖南省十大科技创新奖1项、湖南省技术发明二等奖1项、湖南省科技进步二等奖3项及部省级科技进步三等奖3项。

茶学学科和植物功能成分利用研究方向具备博士后、博士、硕士、国外留学生等多层次人才培养条件。茶学领域，每年招收博士后研究工作人员4~5名，博士研究生10~12名，硕士研究生30~35名；还向全球招收“茶叶深加工理论与技术国际研讨班”“植物功能成分利用技术国际研讨班”学员。湖南农业大学是我国茶学高级专业技术人才和植物功能成分利用领域高端人才的重要培养基地。

地址：湖南省长沙市芙蓉区湖南农业大学11教学楼北栋 邮编：410128

电话：0731-84635304 传真：0731-84635306

E-mail: larkin-liu@163.com



目 次

综述

茶多糖研究的现状与发展趋势.....李焱, 林泳峰, 刘文美, 邹泽华, 刘光明, 刘庆梅 (447)

研究报告

扁刺蛾线粒体基因组全序列特征及系统发育分析

.....江宏燕, 陈世春, 廖姝然, 陈亭旭, 杨普香, 谢小群, 王晓庆 (460)

茶树地方群体种资源叶片表型及生化组分多样性分析

.....唐璐, 李长乐, 葛悦, 王璞, 赵华, 王明乐, 王郁, 郭飞, 倪德江 (473)

高温和干旱胁迫下茶树叶片内源激素含量变化及其相关基因的表达分析

.....唐子贻, 杜玥, 杨宏斌, 黎星辉, 余有本, 王伟东 (489)

云南省典型茶园重金属元素地球化学特征及风险性评估.....谢萌丽, 常河, 周晓华, 杨天福, 龙坤 (501)

基于高通量测序技术探究套种灵芝的茶树根际土壤真菌群落结构特征

.....韩海东, 周柳婷, 黄小云, 俞成然, 黄秀声 (513)

不同抗虫性茶树品种的叶色及挥发物差异性研究

.....孙悦, 刘梦月, 高晨曦, 吴全金, 曹士先, 余顺甜, 陈志丹, 金珊, 孙威江 (525)

化学农药对茶小绿叶蝉成虫的防效及其原因探究

.....邹佳婷, 郭宇航, 边磊, 罗宗秀, 李兆群, 修春丽, 付楠霞, 蔡晓明 (544)

厌氧处理条件下紫娟茶化学成分的变化及其对体外 ACE 活性的影响

.....杨高中, 施江, 张悦, 彭群华, 林智, 吕海鹏 (553)

茶多酚对茶食品中还原糖检测方法的影响.....盛政, 杜文凯, 王崇崇, 张博安, 张海华, 杜琪 (567)

鸠坑龙井茶对高脂饮食 C57BL/6 小鼠肝脂肪变性 SREBPs 通路信号的影响及肠道菌群调节

作用研究.....龚明秀, 袁懿炜, 张一帆, 叶江成, 郭丽, 李晓军, 黄皓, 毛宇骁, 赵芸, 赵进 (576)

Journal of Tea Science

Vol. 43, No. 4

August, 2023

Contents

Review

Present Status and Development Trends of Research on Tea Polysaccharides

.....LI Yan, LIN Yongfeng, LIU Wenmei, et al (447)

Research Paper

The Complete Mitochondrial Genome Sequence and Phylogenetic Analysis of *Thouesia sinensis*

.....JIANG Hongyan, CHEN Shichun, LIAO Shuran, et al (460)

Diversity Analysis of Leaf Phenotype and Biochemical Components in Tea Local Population Resources

.....TANG Lu, LI Changle, GE Yue, et al (473)

Changes of Endogenous Hormone Contents and Expression Analysis of Related Genes in Leaves of Tea

Plants Under Heat and Drought Stresses.....TANG Ziyi, DU Yue, YANG Hongbin, et al (489)

Geochemical Characteristics and Risk Assessment of Heavy Metals in Typical Tea Gardens in Yunnan

Province.....XIE Mengli, CHANG He, ZHOU Xiaohua, et al (501)

The Characteristics of Fungal Community Structure in Tea Rhizosphere Soil Interplanted with

Ganoderma lucidum Based on High-throughput Sequencing Technology

.....HAN Haidong, ZHOU Liuting, HUANG Xiaoyun, et al (513)

Study on the Differences of Leaf Color and Volatiles of Different Insect-resistance Tea Cultivars

.....SUN Yue, LIU Mengyue, GAO Chenxi, et al (525)

Study on the Control Effect of Chemical Pesticides on the *Empoasca onukii* Adults

.....ZOU Jiating, GUO Yuhang, BIAN Lei, et al (544)

Changes in Chemical Composition of Zijuan Tea under Anaerobic Treatment Conditions and

Their Effects on *in vitro* ACE Activity.....YANG Gaozhong, SHI Jiang, ZHANG Yue, et al (553)

Effect of Tea Polyphenols on the Determination of Reducing Sugar in Tea Food

.....SHENG Zheng, DU Wenkai, WANG Chongchong, et al (567)

Effect of Jiukeng Longjing Tea on SREBPs Signaling Pathway and Gut Microbiota Regulation in

High-fat Diet C57BL/6 Mice with Hepatic Steatosis

.....GONG Mingxiu, YUAN Yiwei, ZHANG Yifan, et al (576)

茶多糖研究的现状与发展趋势

李焱¹, 林泳峰¹, 刘文美^{2,3,4}, 邹泽华^{2,3,4}, 刘光明¹, 刘庆梅^{1*}

1. 集美大学海洋食品与生物工程学院, 福建省海洋功能食品工程技术研究中心, 福建 厦门 361021;
2. 厦门和美科盛生物技术有限公司, 福建 厦门 361026; 3. 三明市明八味产业研究院, 福建 三明 353000;
4. 长汀县绿色经济生态健康产业研究院, 福建 龙岩 366300

摘要: 茶多糖是茶叶中的重要活性成分, 研究茶多糖的性质、推动茶多糖产品的开发将有利于茶产业及健康产业的发展。对 Web of Science 数据库中近十年茶多糖相关文献进行了可视化分析。结果显示, 2013—2022 年, 茶多糖相关主题发文量总体呈增长趋势; 关键词的共现、突现、频次分析结果均表明茶多糖的抗氧化性是持续的研究热点, 这也可能是未来研究的主要趋势之一。当前, 全球范围内茶多糖的研究主要集中在单糖组成、溶解性、乳化性等理化性质和抗氧化、抗肿瘤、抗糖尿病等生物活性方面。茶多糖虽具有多种生物活性, 但相关的机理解析仍不够深入; 最新研究表明茶多糖能够影响肠道菌群, 具有良好的益生元潜力。另外, 茶多糖相关产品的转化和开发尤为不足, 研究者们未来可聚焦于利用茶多糖开发生物膜制品、药物递送产品及功能性食品等。总结茶多糖领域研究的主要内容和热点方向, 旨在为该领域的研究者及茶多糖产业的发展提供参考。

关键词: 茶多糖; 可视化分析; 抗氧化; 肠道菌群

中图分类号: S571.1; Q946.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-369X(2023)04-447-13

Present Status and Development Trends of Research on Tea Polysaccharides

LI Yan¹, LIN Yongfeng¹, LIU Wenmei^{2,3,4}, ZOU Zehua^{2,3,4}, LIU Guangming¹, LIU Qingmei^{1*}

1. College of Ocean Food and Biological Engineering, Jimei University, Marine Functional Food Engineering Technology Research Center of Fujian Province, Xiamen 361021, China; 2. Xiamen Sci-plus Biotech Co., Ltd., Xiamen 361026, China;
3. San Ming MING BAWEI Industry Research Institute, Sanming 353000, China;
4. Changting County Green Economy Ecological Health Industry Research Institute, Longyan 366300, China

Abstract: Tea polysaccharides are important active ingredients in tea. Studying the properties of tea polysaccharides and promoting the development of tea polysaccharides products will benefit both the tea industry and the health industry. In the present paper, literatures related to tea polysaccharides from the Web of Science database over the past decade were visually analyzed. The results show that the overall number of papers related to tea polysaccharides showed an increasing trend from 2013 to 2022. The co-occurrence, emergence and frequency analysis of keywords show that the antioxidant activities of tea polysaccharides are a continuous research hotspot, which may also be one of the main trends in future research. At present, global research on tea polysaccharides mainly focuses on the physicochemical properties including monosaccharide composition, solubility, emulsification and biological activities such as antioxidation, anticancer and antidiabetic. Although tea polysaccharides exhibit a variety of biological activities, the underlying mechanisms are still not well understood. Recent studies have shown that tea

收稿日期: 2023-05-09

修订日期: 2023-06-24

基金项目: 国家自然科学基金 (32001695、32072336)、福建省科技计划项目 (2021L3013)

作者简介: 李焱, 女, 硕士研究生, 主要从事茶多糖免疫调节活性方面研究, 676292470@qq.com。*通信作者: liuqingmei1229@163.com

polysaccharides can exert probiotic potential by affecting gut microbiota. In addition, the transformation and development of tea polysaccharide-related products are particularly insufficient. In the future, researchers can focus on developing biofilm products, drug delivery vehicles and functional foods using tea polysaccharides. Overall, the present paper summarized the main contents and hot spots in the field of tea polysaccharides, aiming to serve as a reference for researchers in this field as well as for the development of the tea polysaccharide industry.

Keywords: tea polysaccharides, visual analysis, antioxidation, gut microbiota

茶叶源自中国,目前已传播至 160 多个国家,是全球消费最广泛的植物性饮料^[1]。茶叶主要分为绿茶、红茶、黄茶、白茶、乌龙茶和黑茶六大类^[2]。茶叶中的生物活性成分主要有茶多酚和茶多糖等^[3],茶多糖主要来源于茶叶、茶花和茶叶籽^[4];与茶多酚相比,茶多糖更为稳定,关于其性质、活性、结构的研究正处于初步探索阶段。目前,研究者们通常采用热水提取、酶法处理或超声辅助提取茶多糖,并发现茶多糖具有抗氧化、抗肿瘤、免疫调节、抗糖尿病等生物活性^[4],有望将其应用于功能性食品及医药制剂^[5]。

统计分析文献数据,能够捕捉对应研究领域研究动态,通过分析最近一段时间内的研究热点,还能预测该领域的研究趋势^[6-7]。随着茶产业的发展,关于茶多糖的研究内容也逐渐丰富,但目前尚缺乏对其进行统计分析的科学文献数据,关于茶多糖研究现状与发展趋势的系统总结尚不完善。因此,本文对 Web of Science (WOS) 数据库中关于茶多糖研究的文献进行了可视化分析,并基于分析结果解析了茶多糖研究的现状和发展趋势,旨在阐明茶多糖的研究热点,预测其发展方向,为深入研究茶多糖的生物活性及产品开发提供理论指导,为相关领域的研究者们提供参考。

1 茶多糖研究可视化分析

可视化分析结果能够显示某一研究的总体发展趋势,揭示相关研究领域的热度时期以及学者们的重视程度^[8-9]。2013—2022 年 WOS 数据库中以茶多糖为主题的文献共计 827 篇,年发文量总体呈稳步增长趋势,近 5 年的发文

量占据整体区间的 68.32%;由此可见,近年来茶多糖研究已受到越来越多研究者的重视。

1.1 Citespace 可视化分析

Citespace 知识可视化软件是华裔学者陈超美开发的知识图谱绘制工具^[10],其分析图谱能够直观展现科学知识领域的信息全景,探索该领域的关键文献、热点研究和前沿方向^[7,11]。以 Web of Science 为检索平台,查找主题为“tea polysaccharide”的文章。对 WOS 数据库中 2013 年 1 月 1 日—2022 年 12 月 31 日发表的核心文献进行专业检索,勾选论文、综述选项,设置语种为英语,共筛选出 827 篇文献(2023 年 1 月 2 日检索)。在 JAVA 运行环境下^[10],使用 Citespace 软件 6.1.R6 版本对筛选的 827 篇文献的 Keywords 进行共现分析、聚类分析和突显分析。

关键词是对文献核心内容的提炼和概括,代表文章的主题。对以“tea polysaccharide”为主题词所筛选文献的关键词进行可视化分析,可以解释 WOS 数据库中 2013—2022 年茶多糖的研究现状与发展趋势。图 1 为 WOS 数据库中茶多糖研究的关键词共现图谱,每个节点代表 1 个关键词,节点的大小代表关键词出现的频次,关键词间的连线表示两者出现在同一篇文章中;线条的粗细代表关键词之间关系的重要程度^[12]。由图 1 可知,除主题词“tea polysaccharide”之外,茶多糖研究领域高频且重要的关键词有 antioxidant activity、green tea 和 in vitro 等,即抗氧化活性、绿茶多糖、体外研究是近十年来茶多糖研究的主要关注点。关键词共现图谱中有出现 polyphenol (茶多酚),表示在茶多糖相关的研究中通常会涉及

茶多酚^[13-14]。

关键词突现指的是某一关键词在短时间内的使用频次显著增加, 关键词突现分析可揭示某一研究领域快速增长的热点, 预测对应学科研究的新兴趋势^[15]。利用 Citespace 软件获得 2013—2022 年间茶多糖研究的突现关键词如图 2 所示。由图 2 可知, 不同年份研究者所关注的研究热点不同。第一阶段为 2013—2018 年, 茶多糖研究突现的关键词主要有 acidic polysaccharide (酸性多糖)、response surface methodology (响应面法)、epigallocatechin gallate (没食子酸), 说明这一阶段茶多糖的研究热点主要为提取茶多糖、分析茶多糖的物

理性质。第二阶段为 2017—2020 年, 突现的关键词主要有 immunomodulatory activity (免疫调节活性)、water soluble polysaccharide (水溶性多糖), 说明这一阶段茶多糖的研究热点主要为茶多糖的免疫调节活性及理化性质。第三阶段为 2019—2022 年, 突现的关键词主要有 tea polysaccharide conjugate (茶多糖偶联物) 和 chain fatty acid (链式脂肪酸), 说明这一阶段茶多糖的研究热点主要为茶多糖偶联物及其与肠道菌群的关系。由于茶多糖的生物活性与其结构特性密切相关^[16], 所以在这 3 个阶段中虽然研究热点不同, 但均呈现理化性质与生物活性共同发展的特点。

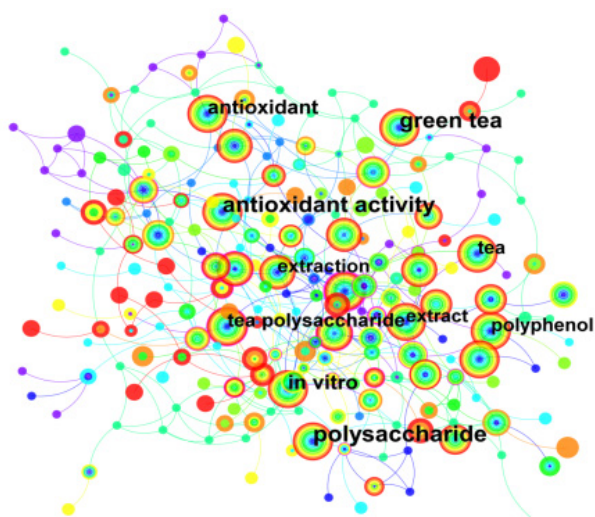


图 1 WOS 数据库中茶多糖的关键词共现图谱

Fig. 1 Keyword co-occurrence analysis of tea polysaccharides in WOS database

1.2 茶多糖关键词频数分析

研究热点指某研究领域中被关注的焦点, 可代表某一阶段中该研究领域所聚焦的主要问题; 关键词的出现频次可揭示科学研究的热点及趋势^[17]。利用文献计量分析平台 (<https://bibliometric.com>) 对 827 篇文献的主要关键词在每年出现的次数进行累加, 得到 WOS 数据库中茶多糖研究的主要关键词年度分布 (图 3)。由图 3 可知, 关键词频数呈现逐年上升趋势。其中, polysaccharide (多糖)

与 tea polysaccharide (茶多糖) 的出现频次总体上呈稳定上升趋势。由于茶多糖相关文献的年度发文量与年度关键词频数都呈现逐年上升的趋势, 因此, 可以初步预测未来与茶多糖相关的研究可能会越来越多。antioxidant (抗氧化性) 的出现频次虽有所波动, 但其每年出现频次均位居第二, 说明在世界范围内茶多糖的研究热点主要聚焦于抗氧化性。在被分析的 827 篇文献中, 用细胞试验对茶多糖抗氧化活性验证的研究还较少, 考虑到茶多糖的生物安

全性,用细胞试验验证其抗氧化性可能会成为新的趋势。*chain fatty acid* 是 2019—2022 年间的突现关键词(图 2), 关键词 *gut microbiota* 的出现频数在 2019 年和 2022 年明显上升(图 3), 说明茶多糖对肠道菌群的影响在 2019—2022 年成为了新的研究热点。茶多糖虽然不能被机体消化吸收,但其能作为肠道菌群的碳

源可以通过影响菌群比例和丰度发挥益生元作用^[18]。例如, Li 等^[19]研究发现, 茶多糖通过调节肠道菌群、改善宿主代谢, 发挥降血糖和降血脂的作用。红茶水提物能够通过调节肠道微生物群和宿主组织中的基因表达来减少饮食诱导的小鼠肥胖^[20]。由此可见, 茶多糖可通过影响肠道菌群发挥改善疾病的作用。

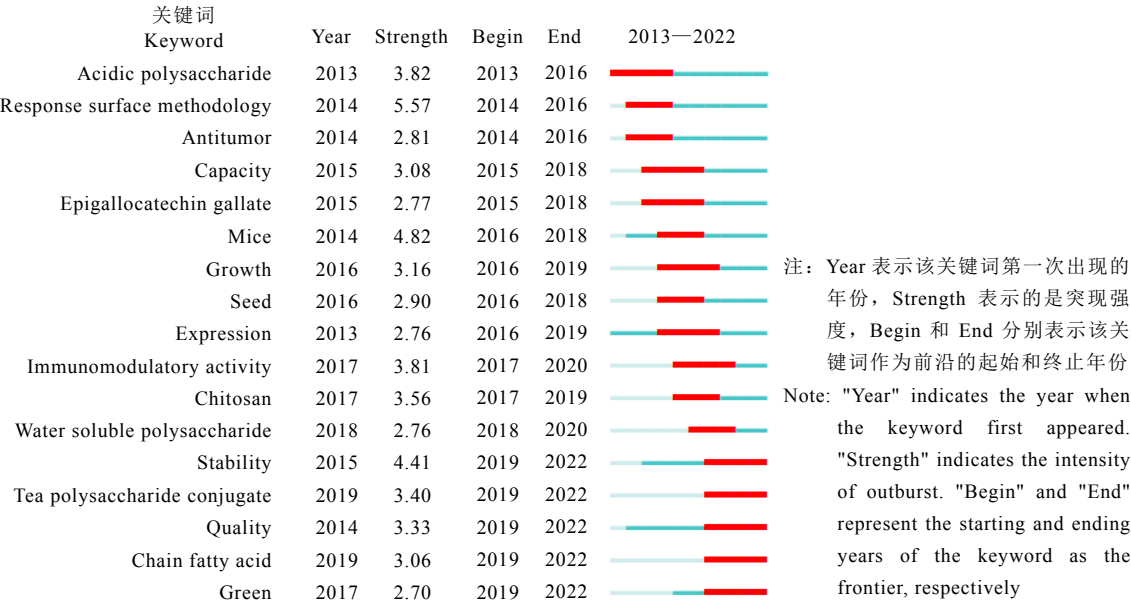


图 2 WOS 数据库中茶多糖研究的关键词突现分析

Fig. 2 Burst keywords analysis of tea polysaccharide research in WOS database

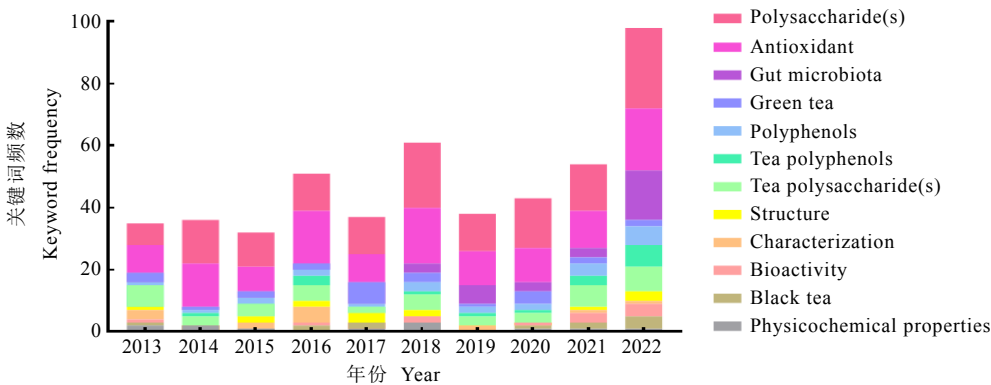


图 3 WOS 数据库中茶多糖研究主要关键词年度分布

Fig. 3 Annual distribution of keywords in tea polysaccharide research in WOS database

2 茶多糖的研究现状

学者们对茶多糖的研究主要集中于理化性质解析及生物活性探索方面。WOS 数据库中,发表茶多糖相关文章的期刊学科类别主要为食品科学及科技 (Food Science & Technology, 341 篇)、化学应用 (Chemistry Applied, 234 篇)、生物化学和分子生物学 (Biochemistry & Molecular Biology, 213 篇),说明茶多糖的主要发展方向为食品科学、化学和生物学,主要涉及茶多糖的抗氧化性^[21-23]、茶多糖对肠道菌群的影响^[18,24-26]和茶多糖的结构特性^[27-28]研究。

2.1 茶多糖的理化性质

茶多糖的理化性质包括单糖组成、糖醛酸和蛋白质的含量、平均分子量、溶解度、粘度、乳化性及茶多糖的结构^[29-30]。研究表明,茶多糖通常由半乳糖、阿拉伯糖、鼠李糖等 2~10 个单糖经糖苷键连接而成^[30],不同原料或不同制备方法得到的茶多糖具有不同的单糖组成。糖醛酸是糖中伯羟基被氧化成羧基后形成的化合物及其衍生物,在茶多糖中比其他组分更稳定^[31],含有糖醛酸的茶多糖组分可能具有更高的生物活性^[4]。研究发现,茶多糖在反复脱蛋白后仍然含有少量蛋白质,说明大多数茶多糖是与蛋白质结合的多糖偶联物^[4]。值得注意的是,随着发酵及储存时间的延长,茶多糖的糖醛酸及蛋白质含量可能会升高^[32],从不同发酵程度茶叶中提取的茶多糖在生物活性上也有差异^[33]。平均分子量是判断多糖化学性质的重要指标,由于茶多糖的原料较为丰富,所以不同来源的茶多糖的分子量分布范围较广。分子量小的多糖可能具有更低的粘度,因此更容易进入细胞^[30],其生物活性也就越高^[34-35]。但分子量太小的多糖可能无法形成活性结构,例如, Wang 等^[36]研究发现,茶叶籽多糖的分子量较小,与分子量较大的茶叶多糖和茶花多糖相比,其抗氧化作用更弱。茶多糖含有较多极性基团^[37],因此具有很强的亲水

性,其亲水性与分子量有关,分子量小的茶多糖溶解度更高^[30]。适当加热会促进茶多糖的溶解,这也是大多数研究选择用热水提取茶多糖的原因。多糖分子在溶液中以无规卷曲的形式存在^[38],所以多糖在水溶液中具有高粘度,甚至形成凝胶。目前的研究发现,茶多糖的分子量与其粘度呈正相关^[39]。乳化剂是生产食品、药品、化妆品的重要原料,从天然植物中提取的多糖作为乳化剂或许会有更高的生物安全性。近年来,研究者们陆续开始探索茶多糖的乳化特性。Chen 等^[40]研究发现,不同分子量的绿茶多糖在乳化性能上具有差异。Li 等^[41]从青砖茶中获得了具有良好乳化性能和抗氧化活性的茶多糖缀合物。茶多糖的化学结构包括糖苷键的类型及位置、单糖序列、分子链构象等^[4,29-30]。研究表明,不同的糖苷键还可能影响茶多糖的生物活性^[42],具有 1→3 糖苷键和 1→6 糖苷键的茶多糖通常具有生物活性^[43-45]。但总的来说,由于茶多糖是一种复杂的大分子杂多糖,因此目前仍没有理想的方法阐述其结构与生物活性之间的关系。

2.2 茶多糖的生物活性

茶多糖具有抗氧化、抗癌、抗糖尿病、抗炎等生物活性。目前,已被报道的茶多糖约有 120 余种^[44]。研究表明,青砖茶^[46]、茯砖茶^[47]、黄茶^[48]等茶叶中的多糖均具有抗氧化活性^[49-52]。多数研究通过茶多糖的 1,1-二苯基-2-苦基肼 (1,1-diphenyl-2-bitterhydrazine, DPPH) 自由基、超氧阴离子自由基、羟基自由基清除活性等化学反应来验证茶多糖的抗氧化性。近年来,逐渐有研究者利用体外细胞模型或小鼠模型来验证茶多糖的抗氧化作用。例如, Fan 等^[53]通过构建人脐静脉内皮细胞模型验证了茶多糖的抗氧化活性。另外,研究者们通过细胞模型和动物模型验证了茶多糖对乳腺癌、胃癌、肝癌、结肠癌等的抑制作用^[4]。Liu 等^[54]研究表明,绿茶多糖可通过抑制小鼠结肠癌细胞的增殖和侵袭发挥抗癌潜力。Wang 等^[55]研究发现,紫阳绿茶中的富硒茶多糖能够在体内外抑

制人骨肉瘤 U-2 OS 细胞增殖,发挥抗癌作用。由成熟茶叶制成的茶饮在中国和日本民间被用来治疗糖尿病^[31], Wang 等^[56]的研究表明,五峰绿茶中发挥治疗糖尿病效果的关键成分是茶多糖。目前报道具有抗糖尿病活性的茶多糖主要来源于绿茶,茶多糖抗糖尿病活性可能是通过调控 cAMP-PKA 或 PI3K/Akt 信号通路实现的^[56-57]。Chung 等^[58]研究认为,茶多糖具有降血糖作用,其作用机理可能通过抑制淀粉水解成葡萄糖,延缓葡萄糖的吸收和运输,从而降低血糖。此外,研究者们还发现茶多糖具有抗炎活性和免疫调节活性。例如,Zhao 等^[59]发现,富硒茶多糖通过增强肠道屏障、调节肠道菌群改善了小鼠的溃疡性结肠炎。Kim 等^[60]从绿茶中提取了儿茶素、黄酮醇及粗多糖,发现三者的联合治疗能减弱气道上皮细胞中粉尘颗粒诱导的炎症基因表达。茶多糖可通过降低促炎细胞因子水平,增加抗炎细胞因子水平的方式改善小鼠结肠炎^[61]。Cheng 等^[62]通过昆明小鼠的 S-180 癌症异种移植模型验证了富硒茶多糖的免疫调节活性。同时,茶多糖的结构与其生物活性之间具有密不可分的关系^[44],Chen 等^[27]研究发现,超高压处理后的茶多糖的初级和空间结构均被改变,其糖醛酸含量和生物活性提高。也有研究者称,活性多糖的结构直接决定其生物活性^[63];杨玉洁等^[64]对具有降血糖活性的多糖进行了系统总结,发现多糖的降血糖活性与其分子量、单糖组成、糖苷键、高级结构及多糖基团相关。目前的研究虽发现茶多糖具有多种生物活性,但尚缺乏对其构效关系的解析,部分文献虽同时探索了茶多糖的理化性质及生物活性,但并未研究其相互作用关系。因此,研究者在解析茶多糖的结构和生物活性时也应重点关注其构效关系。

3 茶多糖研究的发展趋势

随着相关研究的深入,茶多糖具有多种生物活性的优势逐渐凸显,但目前的研究仍处于

对其生物活性的初步探究阶段,尚未对相关机理进行深入解析。同时,与茶多糖生物活性相关的产品转化也相对较少。因此,为促进茶多糖的开发利用,研究者们未来需要深入探究茶多糖对应生物活性的作用机理、开发与之生物活性对应的健康产品。

3.1 茶多糖生物活性的机理解析

本文总结了茶多糖发挥生物活性的相关机理,如图 4 所示。现有的研究虽表明茶多糖具有多种生物活性,但对其发挥生物活性的作用机理的探究尚有不足。尽管许多研究者们发现了茶多糖具有抗氧化活性,但大多数研究都仅通过体外化学反应进行验证,目前还缺乏解析茶多糖在动物体内抗氧化机制的研究。利用小鼠模型验证茶多糖抗氧化性的研究通常仅测定了小鼠肝/肾和血液中超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶等生化参数值^[65-66],而未对茶多糖在小鼠体内发挥抗氧化活性的途径进行解析。

相比之下,研究茶多糖发挥降血糖、抗癌、免疫调节作用的文献已开始探索相关作用机理。除了前文提到的抑制淀粉水解成葡萄糖外,茶多糖发挥抗糖尿病活性的另一可能途径是通过在体内清除自由基,减弱自由基对胰岛 β 细胞的损伤,使胰岛素分泌增加,提高胰岛素敏感性,诱导葡萄糖激酶的生成,促进糖分解以降低血糖^[67]。此外,Xu 等^[31]研究表明,茶多糖偶联物的潜在抗肿瘤机制主要为直接抑制肿瘤细胞生长,促进肿瘤细胞凋亡,或通过改善免疫系统促进癌细胞的早期凋亡,但与上述机制相关的信号通路还有待探索。免疫调节作用是天然植物多糖的重要活性之一,已有研究表明,茶多糖可通过增加 toll 样受体 7 的吞噬活性^[68]、增加自然杀伤细胞活性^[69]、调节炎症相关细胞因子^[70]等方式发挥免疫调节作用。

肠道是机体最大的免疫器官,茶多糖的免疫调节作用主要通过影响肠道免疫来实现,这是因为茶多糖不会被口腔及胃肠道内的酶所

消化,而是在进入大肠后作为碳源被肠道菌群利用^[24];菌群代谢产生的短链脂肪酸、吲哚衍生物、多胺等物质经肠道吸收后能参与调节机体的生理功能,发挥抗炎、免疫调节等作用^[71]。正因如此,大多数利用动物模型探究茶多糖抗炎活性的研究都与结肠炎^[59]或由结肠炎诱导的癌变^[54,61]有关。此外,Chen 等^[72]利用体外结肠发酵模型也证明了肠道菌群可通过利用茯砖茶多糖产生短链脂肪酸等有利代谢产物改变发酵体系 pH,进而改善炎症性肠病患者的肠道菌群比例和丰度。综上所述,茶多糖通过调节肠道菌群的代谢影响肠道稳态可能是其发挥各种生物活性的重要途径^[31]。因此,研究者们在对茶多糖改善机体疾病的研究中可重点关注茶多糖对肠道稳态的调节。

3.2 茶多糖相关产品的应用

已有研究证明,动植物多糖及海藻多糖可作为食品保鲜薄膜改善果蔬、肉类、海产品等食物的贮藏品质^[73]。与合成薄膜相比,多糖薄膜具有更好的气体阻隔性能,以及可食用和可生物降解等优点^[74]。然而,多糖在薄膜中会表现出较差的阻水性能,因此,为了改善薄

膜的耐水性和机械性能,研究者们通常会在多糖薄膜中掺入蛋白质^[75],使薄膜成为偶联聚合物。在乳液体系里,偶联物中的蛋白质会吸附在油表面,而亲水部分则突出到水溶液中;当多糖链缓慢吸附到界面上后,蛋白质会被解开并暴露出疏水氨基酸,然后在油相中重新排列;至此,蛋白质和多糖分别分布于油水界面,使偶联物形成粘弹性膜^[76]。而茶多糖是一种多糖与蛋白质的偶联物,兼具多糖及蛋白质作为食品保鲜膜的优点,以及多种生物活性,所以具有开发成食品保鲜膜及生物膜的潜力。同时,茶多糖具有良好的乳化性能^[40-41],故有望应用于饮料、烘焙食品、肉制品和果酱生产中,以增加产品的粘度和稳定性,改善产品的质地,提高食品的质量^[77]。

天然来源的多糖具有低毒性、可再生、生物相容性高等优点,可用作药物载体。Li 等^[78]利用茶多糖和玉米醇溶蛋白制备了包埋紫杉醇(一种抗癌药)的纳米颗粒,并通过体外试验发现这种纳米颗粒能起到缓慢释放药物的作用;Fan 等^[79]合成了一种负载 Mn 离子的茶多糖纳米颗粒,并发现这种纳米颗粒在小鼠体内具有比单独使用茶多糖更有效的降血糖作用;

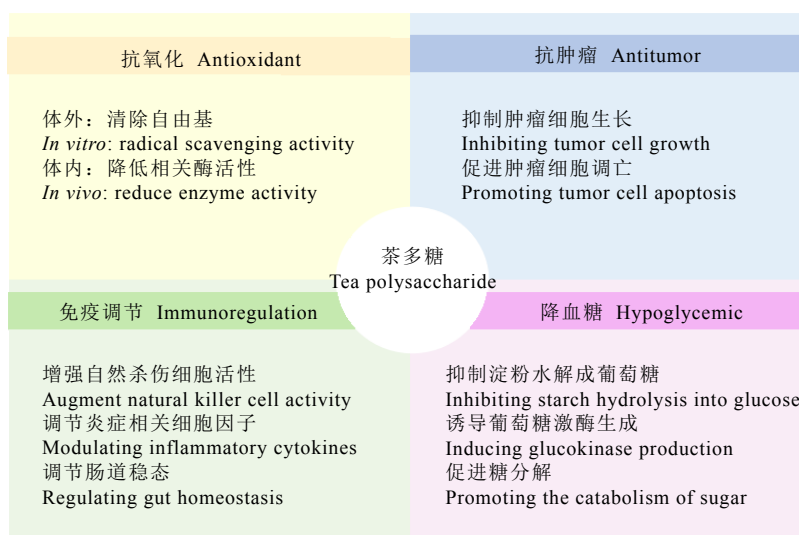


图 4 茶多糖的生物活性及相关机理

Fig. 4 Biological activity and related mechanism of tea polysaccharides

由此可见，茶多糖作为药物载体或微胶囊型药品应用于医药领域。一些具有抗炎、抗氧化、抗癌作用的植物多糖常被应用于护肤品中^[80]，以预防皮肤的老化或癌变，表明茶多糖还具有应用于化妆品的潜力。基于茶多糖能够调节肠道菌群，具有益生元特性，还可被用于开发为益生元产品，起到增强免疫力或改善疾病的作用。考虑到茶多糖的抗糖尿病特性，研究者们可将其开发为适宜糖尿病患者食用的特殊医学用途食品。此外，茶多糖虽已被证实具有多种生物活性，但与之相关的临床产品及应用却较

为罕见。可以参考的是，研究者们从黄芪、人参等植物中提取了具有抗癌活性的多糖，并以静脉注射液的形式将它们用于癌症患者的临床治疗^[81]。

本文对茶多糖相关产品的转化研究进行了总结（表 1）。总的来说，茶多糖具有优良的乳化特性及抗氧化、抗癌、降血糖等多种生物活性，在功能性食品及医药产品方面具有巨大应用潜力；为促进茶多糖及茶产业的发展，研究者们还应重点关注茶多糖在功能性食品、生物膜、医疗制剂等方向的产品转化。

表 1 茶多糖的产品开发及应用前景

Table 1 Product development and application prospect of tea polysaccharides

产品形式	创新发现	应用前景	文献
Form of product	Innovative discovery	Prospect of application	Reference
乳化剂 Emulsifier	高分子量茶多糖具有更好的乳化稳定性	天然乳化剂	[40]
	茶多糖具有很强的抗氧化活性，可用于制备稳定的纳米乳液	抗氧化剂、乳化剂两用产品	[41]
	茶多糖乳化剂可防止液滴聚集和相分离，保护儿茶素免受氧化	抗氧化剂、乳化剂两用产品	[82]
	对茶多糖偶联物高温处理后储存稳定性提高	天然乳化剂	[83]
	茶多糖提高了赋形剂乳液的物理稳定性、增强了其抗氧化活性	提高油性生物活性成分的生物利用度	[84]
纳米颗粒 Nanoparticle	茶多糖和玉米醇溶蛋白制备的包埋紫杉醇纳米颗粒具有缓慢释放药物的作用	药物载体或微胶囊	[78]
	Mn ²⁺ 介导的茶多糖纳米颗粒预防 2 型糖尿病	预防糖尿病的载体	[79]
	茶多糖包封硒纳米颗粒具有良好稳定性，能抑制癌细胞增殖	抗癌药物载体	[85]
	阳离子支链茶多糖纳米颗粒可将药物靶向递送至肝细胞	肝脏靶向药物的递送载体	[86]

4 结论与展望

茶多糖是茶叶的重要成分及主要活性成分，解析茶多糖的理化性质、探究其生物活性，对开发茶多糖相关产品具有重大意义。促进茶多糖相关产品转化不仅能推动茶产业发展，也有利于全民大健康产业的发展。近十年来，WOS 数据库中关于茶多糖研究的发文量逐年增多，本文对茶多糖相关研究进行了总结分析。总的来说，茶多糖的理化性质及生物活性为该领域的主要研究热点。在理化性质方面，大多数研究探索了茶多糖的单糖组成、平均分子量及糖醛酸含量。在生物活性方面，研究者们主要关注茶多糖的抗氧化活性，近年来逐渐开始探索其抗癌、抗炎、抗糖尿病等生物活性。

2019—2022 年关于茶多糖对肠道菌群影响的文章数量出现明显增长，这或将成为解析茶多糖如何发挥生物活性的新途径。

尽管现代研究已发现茶多糖具有抗氧化、抗癌、抗糖尿病等多种生物活性，但随着发文量的增多，与之相关的产品转化研究未见增长，关于其发挥生物活性的机理解析也不够深入。这是由于茶多糖的结构复杂、多糖的结构测定和性质分析等未形成体系，给多糖的产品转化和临床应用带来了很大的限制。随着技术的进步，茶多糖产业的发展将更加迅猛。为促进茶多糖的开发和利用，需要对茶多糖进行更为深入地研究，以便解析其构效关系及发挥生物活性的作用机制。由于茶多糖具有特殊的理化性质及生物活性，可考虑食品保鲜剂、生物

膜制品、药物递送载体、益生元产品、特医食品、抗癌药物等相关产品的转化。

参考文献

- [1] 程利增, 朱将雄, 周慧, 等. 茶多糖提取纯化、结构活性及应用研究进展[J]. 中国茶叶, 2021, 43(8): 7-15.
- Cheng L Z, Zhu J X, Zhou H, et al. Research progress on the extraction, purification, structures, activities and application of tea polysaccharides [J]. China Tea, 2021, 43(8): 7-15.
- [2] 翁昆, 张亚丽. GB/T 30766—2014《茶叶分类》简介[J]. 中国标准导报, 2015(1): 34-35.
- Weng K, Zhang Y L. Introduction to GB/T 30766-2014 "Classification of Tea" [J]. China Quality and Standards Review, 2015(1): 34-35.
- [3] 欧阳建, 周方, 卢丹敏, 等. 茶多糖调控肥胖作用研究进展[J]. 茶叶科学, 2020, 40(5): 565-575.
- Ouyang J, Zhou F, Lu D M, et al. Research progress of tea polysaccharides in regulating obesity [J]. Journal of Tea Science, 2020, 40(5): 565-575.
- [4] Chen G, Yuan Q, Saeeuddin M, et al. Recent advances in tea polysaccharides: extraction, purification, physicochemical characterization and bioactivities [J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 153: 663-678.
- [5] 翁蔚, 李书魁, 张琴梅, 等. 茶多糖的组成与保健功效研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(12): 7261-7264.
- Weng W, Li S K, Zhang Q M, et al. Research progress of composition and health function of tea polysaccharide [J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2021, 36(12): 7261-7264.
- [6] 李东旭, 陈富桥. 基于 CiteSpace 文献计量分析的中国茶产业经济研究现状与展望[J]. 华中农业大学学报, 2022, 41(5): 57-67.
- Li D X, Chen F Q. Situation and prospect of studies on tea industry in China based on CiteSpace bibliometric analysis [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2022, 41(5): 57-67.
- [7] 张鑫, 王吉, 胡静荣, 等. 基于 Citespace 和文献计量分析平台的鱼糜研究可视化分析[J]. 食品科学, 2023, 44(1): 362-370.
- Zhang X, Wang J, Hu J R, et al. Visual analysis of surimi research based on Citespace and bibliometric analysis platform [J]. Food Science, 2023, 44(1): 362-370.
- [8] Sun Y Q, Wu S M, Gong G Y. Trends of research on polycyclic aromatic hydrocarbons in food: a 20-year perspective from 1997 to 2017 [J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 83: 86-98.
- [9] Chen S Y, Han R, Liu H T. A bibliometric and visualization analysis of intermittent fasting [J]. Frontiers in Public Health, 2022, 10: 946795. doi: 10.3389/fpubh.2022.946795.
- [10] 陈悦, 陈超美, 刘则渊, 等. CiteSpace 知识图谱的方法论功能[J]. 科学学研究, 2015, 33(2): 242-253.
- Chen Y, Chen C M, Liu Z Y, et al. The methodology function of CiteSpace mapping knowledge domains [J]. Studies in Science of Science, 2015, 33(2): 242-253.
- [11] 周钰, 刘庆梅, 张军, 等. 基于 Citespace 对抗食物过敏研究领域的可视化分析[J]. 中国食品学报, 2021, 21(6): 366-374.
- Zhou Y, Liu Q M, Zhang J, et al. Visualization analysis of anti food allergy research based on Citespace [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(6): 366-374.
- [12] 吴晓秋, 吕娜. 基于关键词共现频率的热点分析方法研究[J]. 情报理论与实践, 2012, 35(8): 115-119.
- Wu X Q, Lü N. Research on the hot spot analysis method based on keyword co occurrence frequency [J]. Information Studies: Theory & Application, 2012, 35(8): 115-119.
- [13] Li X, Chen S, Li J E, et al. Chemical composition and antioxidant activities of polysaccharides from *Yingshan Cloud Mist* tea [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2019, 2019: 1915967. doi: 10.1155/2019/1915967.
- [14] Guo L, Guo J C, Zhu W C, et al. Optimized synchronous extraction process of tea polyphenols and polysaccharides from Huaguoshan Yunwu tea and their antioxidant activities [J]. Food and Bioproducts Processing, 2016, 100: 303-310.
- [15] 穆军芳, 张丽鑫, 杨光. 基于 WOS 的国际农业生态学研究热点与前沿探究[J]. 中国生态农业学报(中英文), 2022: 1-12. [2023-05-09]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/13.1432.S.20221228.1328.002.html>.
- Mu J F, Zhang L X, Yang G, et al. A Study on the research hotspots and emerging trends of international agroecology based on WOS [J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2022: 1-12. [2023-05-09]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/13.1432.S.20221228.1328.002.html>.
- [16] Qu J L, Huang P, Zhang L, et al. Hepatoprotective effect of plant polysaccharides from natural resources: a review of the mechanisms and structure-activity relationship [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020,

- 161: 24-34.
- [17] Xu Y L, Wang Y J, He J L, et al. Antibacterial properties of lactoferrin: a bibliometric analysis from 2000 to early 2022 [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 947102. doi: 10.3389/fmicb.2022.947102.
- [18] Chen G J, Zeng Z Q, Xie M H, et al. Fermentation characteristics and probiotic activity of a purified fraction of polysaccharides from Fuzhuan brick tea [J]. *Food Science and Human Wellness*, 2022, 11(3): 727-737.
- [19] Li H S, Fang Q Y, Nie Q X, et al. Hypoglycemic and hypolipidemic mechanism of tea polysaccharides on type 2 diabetic rats via gut microbiota and metabolism alteration [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(37): 10015-10028.
- [20] Liu X L, Hu G S, Wang A H, et al. Black tea reduces diet-induced obesity in mice via modulation of gut microbiota and gene expression in host tissues [J]. *Nutrients*, 2022, 14(8): 1635. doi: 10.3390/nu14081635.
- [21] Wang Y L, Zhao Y, Andrae-Marobela K, et al. Tea polysaccharides as food antioxidants: an old woman's tale? [J]. *Food Chemistry*, 2013, 138(2/3): 1923-1927.
- [22] Lu X S, Zhao Y, Sun Y F, et al. Characterisation of polysaccharides from green tea of Huangshan Maofeng with antioxidant and hepatoprotective effects [J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(4): 3415-3423.
- [23] Xu P, Wu J, Zhang Y, et al. Physicochemical characterization of puerh tea polysaccharides and their antioxidant and α -glycosidase inhibition [J]. *Journal of Functional Foods*, 2014, 6: 545-554.
- [24] Chen G J, Xie M H, Wan P, et al. Digestion under saliva, simulated gastric and small intestinal conditions and fermentation *in vitro* by human intestinal microbiota of polysaccharides from Fuzhuan brick tea [J]. *Food Chemistry*, 2018, 244: 331-339.
- [25] Chen D, Chen G J, Ding Y, et al. Polysaccharides from the flowers of tea (*Camellia sinensis* L.) modulate gut health and ameliorate cyclophosphamide-induced immunosuppression [J]. *Journal of Functional Foods*, 2019, 61: 103470. doi: 10.1016/j.jff.2019.103470.
- [26] Wu D T, Liu W, Yuan Q, et al. Dynamic variations in physicochemical characteristics of oolong tea polysaccharides during simulated digestion and fecal fermentation *in vitro* [J]. *Food Chemistry: X*, 2022, 14: 100288. doi: 10.1016/j.fochx.2022.100288.
- [27] Chen H, Huang Y Z, Zhou C C, et al. Effects of ultra-high pressure treatment on structure and bioactivity of polysaccharides from large leaf yellow tea [J]. *Food Chemistry*, 2022, 387: 132862. doi: 10.1016/j.foodchem.2022.132862.
- [28] Jin F, Jia L Y, Tu Y Y. Structural analysis of an acidic polysaccharide isolated from white tea [J]. *Food Science and Biotechnology*, 2015, 24(5): 1623-1628.
- [29] Nie S P, Xie M Y. A review on the isolation and structure of tea polysaccharides and their bioactivities [J]. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25(2): 144-149.
- [30] Wang Q, Yang X Y, Zhu C W, et al. Advances in the utilization of tea polysaccharides: preparation, physicochemical properties, and health benefits [J]. *Polymers*, 2022, 14(14): 2775. doi: 10.3390/polym14142775.
- [31] Xu A A, Lai W Y, Chen P, et al. A comprehensive review on polysaccharide conjugates derived from tea leaves: composition, structure, function and application [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2021, 114: 83-99.
- [32] Qin H N, Huang L, Teng J W, et al. Purification, characterization, and bioactivity of Liupao tea polysaccharides before and after fermentation [J]. *Food Chemistry*, 2021, 353: 129419. doi: 10.1016/j.foodchem.2021.129419.
- [33] Xiang G, Sun H P, Chen Y Y, et al. Antioxidant and hypoglycemic activity of tea polysaccharides with different degrees of fermentation [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 228: 224-233.
- [34] Sun X Y, Wang J M, Ouyang J, et al. Antioxidant activities and repair effects on oxidatively damaged HK-2 cells of tea polysaccharides with different molecular weights [J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 2018: 5297539. doi: 10.1155/2018/5297539.
- [35] Zhang X, Chen H X, Zhang N, et al. Extrusion treatment for improved physicochemical and antioxidant properties of high-molecular weight polysaccharides isolated from coarse tea [J]. *Food Research International*, 2013, 53(2): 726-731.
- [36] Wang Y F, Mao F F, Wei X L. Characterization and antioxidant activities of polysaccharides from leaves, flowers and seeds of green tea [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 88(1): 146-153.
- [37] Zhu J X, Yu C, Han Z, et al. Comparative analysis of existence form for selenium and structural characteristics in artificial selenium-enriched and synthetic selenized green

- tea polysaccharides [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 154: 1408-1418.
- [38] Junker F, Michalski K, Guthausen G, et al. Characterization of covalent, feruloylated polysaccharide gels by pulsed field gradient-stimulated echo (PFG-STE)-NMR [J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 267: 118232. doi: 10.1016/j.carbpol.2021.118232.
- [39] Wang J Y, Liu W, Chen Z Q, et al. Physicochemical characterization of the oolong tea polysaccharides with high molecular weight and their synergistic effects in combination with polyphenols on hepatocellular carcinoma [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, 90: 160-170.
- [40] Chen X Q, Wu X F, Zhang K, et al. Purification, characterization, and emulsification stability of high- and low-molecular-weight fractions of polysaccharide conjugates extracted from green tea [J]. Food Hydrocolloids, 2022, 129: 107667. doi: 10.1016/j.foodhyd.2022.107667.
- [41] Li Q, Zhao T T, Shi J L, et al. Physicochemical characterization, emulsifying and antioxidant properties of the polysaccharide conjugates from Chin brick tea (*Camellia sinensis*) [J]. Food Chemistry, 2022, 395: 133625. doi: 10.1016/j.foodchem.2022.133625.
- [42] Li W, Wang K Q, Sun Y, et al. Influences of structures of galactooligosaccharides and fructooligosaccharides on the fermentation *in vitro* by human intestinal microbiota [J]. Journal of Functional Foods, 2015, 13: 158-168.
- [43] Chen H X, Qu Z S, Fu L L, et al. Physicochemical properties and antioxidant capacity of 3 polysaccharides from green tea, oolong tea, and black tea [J]. Journal of Food Science, 2009, 74(6): 469-474.
- [44] Hu T, Wu P, Zhan J F, et al. Structure variety and its potential effects on biological activity of tea polysaccharides [J]. Food Science and Human Wellness, 2022, 11(3): 587-597.
- [45] Chen H X, Wang Z S, Qu Z S, et al. Physicochemical characterization and antioxidant activity of a polysaccharide isolated from oolong tea [J]. European Food Research and Technology, 2009, 229(4): 629-635.
- [46] Yang X H, Huang M J, Qin C Q, et al. Structural characterization and evaluation of the antioxidant activities of polysaccharides extracted from Qingzhuan brick tea [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 101: 768-775.
- [47] Chen G J, Wang M J, Xie M H, et al. Evaluation of chemical property, cytotoxicity and antioxidant activity *in vitro* and *in vivo* of polysaccharides from Fuzhuan brick teas [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 116: 120-127.
- [48] Wang H S, Chen J R, Ren P F, et al. Ultrasound irradiation alters the spatial structure and improves the antioxidant activity of the yellow tea polysaccharide [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2021, 70: 105355. doi: 10.1016/j.ultsonch.2020.105355.
- [49] Zheng Q R, Li W F, Zhang H, et al. Optimizing synchronous extraction and antioxidant activity evaluation of polyphenols and polysaccharides from Ya'an Tibetan tea (*Camellia sinensis*) [J]. Food Science & Nutrition, 2019, 8(1): 489-499.
- [50] Xu P, Chen H, Wang Y Q, et al. Oral administration of puerh tea polysaccharides lowers blood glucose levels and enhances antioxidant status in alloxan-induced diabetic mice [J]. Journal of Food Science, 2012, 77(11): 246-252.
- [51] Guo R, Zhang J A, Liu X, et al. Pectic polysaccharides from Biluochun tea: a comparative study in macromolecular characteristics, fine structures and radical scavenging activities *in vitro* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 195: 598-608.
- [52] Tang Y Y, Sheng J F, He X M, et al. Novel antioxidant and hypoglycemic water-soluble polysaccharides from jasmine tea [J]. Foods, 2021, 10(10): 2375. doi: 10.3390/foods10102375.
- [53] Fan M H, Zhu J X, Qian Y L, et al. Effect of purity of tea polysaccharides on its antioxidant and hypoglycemic activities [J]. Journal of Food Biochemistry, 2020, 44(8): e13277. doi: 10.1111/jfbc.13277.
- [54] Liu L Q, Li H S, Nie S P, et al. Tea polysaccharide prevents colitis-associated carcinogenesis in mice by inhibiting the proliferation and invasion of tumor cells [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(2): 506. doi: 10.3390/ijms19020506.
- [55] Wang Y C, Chen J, Zhang D Z, et al. Tumoricidal effects of a selenium (Se)-polysaccharide from Ziyang green tea on human osteosarcoma U-2 OS cells [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 98(1): 1186-1190.
- [56] Wang H J, Shi S S, Bao B, et al. Structure characterization of an arabinogalactan from green tea and its anti-diabetic effect [J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 124: 98-108.
- [57] Li S Q, Chen H X, Wang J, et al. Involvement of the

- PI3K/Akt signal pathway in the hypoglycemic effects of tea polysaccharides on diabetic mice [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 81: 967-974.
- [58] Chung J O, Yoo S H, Lee Y E, et al. Hypoglycemic potential of whole green tea: water-soluble green tea polysaccharides combined with green tea extract delays digestibility and intestinal glucose transport of rice starch [J]. *Food & Function*, 2019, 10(2): 746-753.
- [59] Zhao Y N, Chen H, Li W T, et al. Selenium-containing tea polysaccharides ameliorate DSS-induced ulcerative colitis via enhancing the intestinal barrier and regulating the gut microbiota [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 209: 356-366.
- [60] Kim J, Choi H, Choi D H, et al. Application of green tea catechins, polysaccharides, and flavonol prevent fine dust induced bronchial damage by modulating inflammation and airway cilia [J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 2232. doi: 10.1038/s41598-021-81989-9.
- [61] Liu L Q, Nie S P, Shen M Y, et al. Tea polysaccharides inhibit colitis-associated colorectal cancer via interleukin-6/STAT3 pathway [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(17): 4384-4393.
- [62] Cheng L Z, Chen L, Yang Q Q, et al. Antitumor activity of Se-containing tea polysaccharides against sarcoma 180 and comparison with regular tea polysaccharides and Se-yeast [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 120: 853-858.
- [63] 王兆梅, 李琳, 郭祀远, 等. 活性多糖构效关系研究评述 [J]. *现代化工*, 2002(8): 18-21, 23.
- Wang Z M, Li L, Guo S Y, et al. Review on structure-activity relationship of active polysaccharides [J]. *Modern Chemical Industry*, 2002(8): 18-21, 23.
- [64] 杨玉洁, 刘静宜, 谭艳, 等. 多糖降血糖活性构效关系及作用机制研究进展 [J]. *食品科学*, 2021, 42(23): 355-363.
- Yang Y J, Liu J Y, Tan Y, et al. Progress in understanding the structure-activity relationship and hypoglycemic mechanism of polysaccharides [J]. *Food Science*, 2021, 42(23): 355-363.
- [65] Wang D Y, Zhao Y, Sun Y F, et al. Protective effects of Ziyang tea polysaccharides on CCl₄-induced oxidative liver damage in mice [J]. *Food Chemistry*, 2014, 143: 371-378.
- [66] 倪德江, 陈玉琼, 宋春和, 等. 乌龙茶多糖对糖尿病大鼠肝肾抗氧化功能及组织形态的影响 [J]. *茶叶科学*, 2003, 23(1): 11-15.
- Ni D J, Chen Y Q, Song C H, et al. Effect of oolong tea polysaccharide on hepatic-nephritic antioxidation and histomorphology in the diabetic rats [J]. *Journal of Tea Science*, 2003, 23(1): 11-15.
- [67] 江和源. 茶叶降血糖活性及对糖尿病的功效与机理 [J]. *中国茶叶*, 2019, 41(2): 1-6.
- Jiang H Y. Hypoglycemic activity of tea and its effect and mechanism on diabetes [J]. *China Tea*, 2019, 41(2): 1-6.
- [68] Monobe M N M, Ema K, Kato F M K, et al. Immunostimulating activity of a crude polysaccharide derived from green tea (*Camellia sinensis*) extract [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(4): 1423-1427.
- [69] Yuan C F, Li Z H, Peng F, et al. Combination of selenium-enriched green tea polysaccharides and Huo-ji polysaccharides synergistically enhances antioxidant and immune activity in mice [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2015, 95(15): 3211-3217.
- [70] Chen X Q, Zhang Z F, Gao Z M, et al. Physicochemical properties and cell-based bioactivity of Pu'erh tea polysaccharide conjugates [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 104: 1294-1301.
- [71] Ho Do M, Seo Y S, Park H Y. Polysaccharides: bowel health and gut microbiota [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2021, 61(7): 1212-1224.
- [72] Chen G J, Wang M J, Zeng Z Q, et al. Fuzhuan brick tea polysaccharides serve as a promising candidate for remodeling the gut microbiota from colitis subjects *in vitro*: fermentation characteristic and anti-inflammatory activity [J]. *Food Chemistry*, 2022, 391: 133203. doi: 10.1016/j.foodchem.2022.133203.
- [73] Li N, Zhou S Y, Yang X B, et al. Applications of natural polysaccharide-based pH-sensitive films in food packaging: current research and future trends [J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2022, 82(1): 103200. doi: 10.1016/j.ifset.2022.103200.
- [74] Shahidi F, Hossain A. Preservation of aquatic food using edible films and coatings containing essential oils: a review [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2022, 62(1): 66-105.
- [75] Azeredo H M C, Waldron K W. Crosslinking in polysaccharide and protein films and coatings for food contact: a review [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2016, 52: 109-122.

- [76] Shao P, Feng J R, Sun P L, et al. Recent advances in improving stability of food emulsion by plant polysaccharides [J]. *Food Research International*, 2020, 137: 109376. doi: 10.1016/j.foodres.2020.109376.
- [77] Tang Q L, Huang G L. Improving method, properties and application of polysaccharide as emulsifier [J]. *Food Chemistry*, 2022, 376: 131937. doi: 10.1016/j.foodchem.2021.131937.
- [78] Li S Q, Wang X M, Li W W, et al. Preparation and characterization of a novel conformed bipolymer paclitaxel-nanoparticle using tea polysaccharides and zein [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 146: 52-57.
- [79] Fan M H, Zhang X, Zhao Y, et al. Mn(II)-mediated self-assembly of tea polysaccharide nanoparticles and their functional role in mice with type 2 diabetes [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2022, 14(27): 30607-30617.
- [80] Albuquerque P B S, De Oliveira W F, Dos Santos Silva P M, et al. Skincare application of medicinal plant polysaccharides: a review [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2022, 277: 118824. doi: 10.1016/j.carbpol.2021.118824.
- [81] 李焱, 林泳峰, 刘文美, 等. 食药同源植物多糖调控肠道稳态的研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(2): 25-33.
- Li Y, Lin Y F, Liu W M, et al. Research progress on regulating intestinal steady-state of polysaccharides from food-medicine homologous plants [J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2023, 14(2): 25-33.
- [82] Chen X Q, Han Y, Meng H, et al. Characteristics of the emulsion stabilized by polysaccharide conjugates alkali-extracted from green tea residue and its protective effect on catechins [J]. *Industrial Crops and Products*, 2019, 140: 111611. doi: 10.1016/j.indcrop.2019.111611.
- [83] Chen X Q, Zhang Y T, Han Y, et al. Emulsifying properties of polysaccharide conjugates prepared from chin-brick tea [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(36): 10165-10173.
- [84] Wang C, Fu Y X, Cao Y, et al. Enhancement of lycopene bioaccessibility in tomatoes using excipient emulsions: effect of dark tea polysaccharides [J]. *Food Research International*, 2023, 163: 112123. doi: 10.1016/j.foodres.2022.112123.
- [85] Lin X R, Mu J J, Chen Z Z, et al. Stabilization and functionalization of selenium nanoparticles mediated by green tea and Pu-erh tea polysaccharides [J]. *Industrial Crops and Products*, 2023, 194: 116312. doi: 10.1016/j.indcrop.2023.116312.
- [86] Wu S Y, Li N, Yang C, et al. Synthesis of cationic branched tea polysaccharide derivatives for targeted delivery of siRNA to hepatocytes [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 118: 808-815.

扁刺蛾线粒体基因组全序列特征及系统发育分析

江宏燕¹, 陈世春¹, 廖姝然¹, 陈亭旭¹, 杨普香², 谢小群², 王晓庆^{1*}

1. 重庆市农业科学院茶叶研究所, 重庆 402160; 2. 江西省经济作物研究所, 江西 南昌 330203

摘要: 扁刺蛾 (*Thosea sinensis*) 具有分布广、多食性、危害大等特点, 是我国重要的农林业害虫。为报道来自江西的扁刺蛾线粒体基因组, 了解其线粒体基因组的多样性与差异, 探究刺蛾科昆虫线粒体基因组进化规律。通过 Sanger 测序后拼接、校正、注释获得扁刺蛾的线粒体全基因组序列, 并基于蛋白质编码基因序列构建了鳞翅目 17 个科 26 种蛾类昆虫的系统发育树。结果显示, 扁刺蛾线粒体基因组是 1 个大小为 15 540 bp 的闭合环状双链 DNA 分子, 共编码 37 个基因, 包括 13 个蛋白质编码基因, 2 个核糖体 RNA 基因和 22 个转运 RNA 基因, 还有 1 个 425 bp 的控制区, 基因排列与鳞翅目双孔类 (Ditrysia) 昆虫相同。通过与其他刺蛾的全序列和蛋白质编码基因序列对比相似度, 结果显示, 扁刺蛾与茶刺蛾 (*Iragoides fasciata*) 的相似度最高, 与褐边绿刺蛾 (*Parasa consocia*) 相似度最低。系统发育分析结果表明, 扁刺蛾与茶刺蛾的亲缘关系最近, 其次为龟形小刺蛾 (*Narosa nigrisigna*), 鳞翅目昆虫各科均聚为一支。本研究为深入研究扁刺蛾的起源、遗传多样性、迁移和分化, 以及对农药的抗性提供科学依据。

关键词: 刺蛾科; 扁刺蛾; 线粒体基因组; 系统发育

中图分类号: S571.1; S435.711

文献标识码: A

文章编号: 1000-369X(2023)04-460-13

The Complete Mitochondrial Genome Sequence and Phylogenetic Analysis of *Thosea sinensis*

JIANG Hongyan¹, CHEN Shichun¹, LIAO Shuran¹, CHEN Tingxu¹,

YANG Puxiang², XIE Xiaoqun², WANG Xiaoping^{1*}

1. Tea Research Institute of Chongqing Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 402160, China;

2. Jiangxi Cash Crops Research Institute, Nanchang 330203, China

Abstract: *Thosea sinensis* is an important agricultural and forestry pest in China with characteristics of wide distribution, polyphagy, and high damage. The purpose of this study was to report the mitochondrial genome of *T. sinensis* collected from Jiangxi, investigate its diversity and difference, and explore the evolutionary characteristics of Limacodidae insects. After Sanger sequencing, the complete mitochondrial genome sequence of *T. sinensis* was obtained by splicing, correcting and annotating, and the phylogenetic tree of 26 moth species in 17 families of Lepidoptera was constructed based on the protein sequences. The complete mitochondrial genome sequence was 15 540 bp in size, encoding 37 genes, including 13 protein-coding genes, 2 ribosomal RNAs, 22 transfer RNA genes, and 1 control region of 425 bp. The gene arrangement is the same as that of the Ditrysia moths. By comparing the similarity of the full sequence and protein-coding genes of the mitochondrial genomes with other moths, the results show that the similarity between *T. sinensis* and *Iragoides fasciata* was the highest, and that between *T. sinensis* and *Parasa consocia* was the lowest. Phylogenetic analysis shows that the closest relationship of *T. sinensis* was with

收稿日期: 2023-04-13

修订日期: 2023-05-30

基金项目: 国家茶叶产业技术体系 (CARS-19)

作者简介: 江宏燕, 女, 助理研究员, 从事茶树害虫综合防控研究, jianghy925@sina.com。*通信作者: wangxiaoping2891@126.com

Iragoides fasciata, followed by *Narosa nigrisigna*, and all the moths from Lepidoptera were clustered into one branch. This study provided a scientific basis for further research on the origin, genetic diversity, migration, and differentiation of *T. sinensis*, as well as its resistance to pesticides.

Keywords: Limacodidae, *Thosea sinensis*, mitochondrial genome, phylogeny

扁刺蛾 (*Thosea sinensis*) 俗称洋辣子、火辣子和刺虫等, 属鳞翅目 (Lepidoptera) 刺蛾科 (Limacodidae), 分布广泛, 在我国的台湾、福建、广东、广西、海南、云南、贵州、四川、湖南、江西、浙江、江苏、安徽、湖北、河南、甘肃、山东及陕西等地均有分布^[1]。扁刺蛾的寄主植物丰富多样, 主要危害茶树、油茶树、樱花树等植物, 幼虫取食叶片, 轻则影响树势, 重则导致植株死亡^[2]。幼虫具毒刺, 触及皮肤, 轻者红肿、疼痛, 严重时威胁生命, 极大地妨碍了采茶与田间作业。近年来, 围绕乡村振兴和茶旅融合发展的产业需求, 为推动茶产业转型升级, 着力打造观光茶园。而在一些主产茶区的林间和林-茶结合地带的茶园中出现了该虫不同程度的为害, 其暴发为害的风险大大提升, 不仅影响茶叶的质量和产量, 更影响了茶园的正常生产管理^[3-4]。

昆虫线粒体基因组具有许多共同特征, 包括基因组较小、基因数目少、基因组成稳定、基因排列相对保守、重组率低、碱基突变率高和母系遗传性等特点, 在昆虫的种类鉴定、种群遗传结构、系统发育研究和外来入侵物种管理中得到广泛应用^[5-6]。鳞翅目是昆虫纲中第二大目, 包括蛾 (Moths) 和蝶 (Butterflies) 两类, 种类分布极广, 以热带地区最为丰富, 目前已描述的约有 16 万个物种^[7], 刺蛾科是鳞翅目中相对较小的类群, 全世界已记载 301 属 1 672 种^[8]。与其他科昆虫相比, 刺蛾科线粒体基因组全序列的测序工作开展较晚, 2016 年才首次报道了黄刺蛾 (*Monema flavescens*) 的线粒体全基因组数据^[9]; Bian 等^[10]报道了扁刺蛾的完整线粒体基因组, 确定了刺蛾科在鳞翅目中的系统地位。目前 GenBank 上已报道的刺蛾科线粒体基因组仅 6 种 11 个 (截止

2023 年 3 月 1 日), 相比现有的刺蛾科物种数量, 刺蛾科线粒体基因组的测序工作有待加强, 刺蛾个体变异丰富、近缘种间相似性较高, 不易形态分类鉴定, 易造成同物异名。昆虫线粒体 DNA 存在适应性演化^[11], 本研究报道的扁刺蛾采自江西省南昌市茶树和樱花树间作的茶园中, 扁刺蛾食光樱花树叶片后转移至茶园取食危害, 近几年持续暴发成灾, 在当地适应能力极强^[12-13], 线粒体基因组信息可为评判种群对周围环境的适应能力提供依据。本研究利用 Sanger 测序获得扁刺蛾线粒体基因组全序列, 对扁刺蛾的基因组全序列特征进行分析, 综合比较分析已报道的刺蛾科线粒体基因组的结构特点, 并构建鳞翅目双孔类 (Ditrysia) 17 个科 26 种蛾类昆虫的系统发育树, 以期对鳞翅目刺蛾科昆虫的精准鉴定、分子生物学及综合防控等研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用虫于 2018 年 8 月采集自江西省南昌市茶园, 采集到的样本带回实验室, 将活体昆虫样本放入无水乙醇中, 放置于 -20 °C 冰箱保存备用。

1.2 DNA 提取、PCR 扩增、测序

DNA 的提取: 挑选乙醇浸泡后保存完好的刺蛾样品, 经处理后, 采用快速 DNA 提取检测试剂盒 (北京天根生化科技有限公司) 按照说明书完成提取, 使用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop 2000 分光光度计检测 DNA 的质量与浓度。

PCR 扩增: 利用鳞翅目其他昆虫的线粒体基因组序列设计 PCR 引物, 使用 Taq HS

DNA 聚合酶 (TaKaRa) 进行扩增。扩增条件: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 55~60 °C 退火 30~50 s, 72 °C 延伸 1~3 min, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 总反应体积为 50 μ L。用 1.5% 琼脂糖凝胶检测 PCR 产物质量, 然后将产物送至转导精进 (武汉) 生物技术有限公司进行 Sanger 双向测序。

1.3 线粒体基因组的注释与分析

PCR 扩增产物序列通过 CLC Genomics Workbench 8.5 软件进行校正和拼接, 获得了扁刺蛾的完整线粒体基因组, 线粒体基因组序列通过 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 上的 ORF Finder 和 MITOS WebServer 程序^[14]进行注释, 并利用 blastn 和 blastp 与其他刺蛾科线粒体基因组进行鉴定比对, 确定控制区和 37 个基因的位置及大小。tRNA 基因及其三叶草二级结构通过 ARWEN 和 tRNAscan-SE 软件进行预测^[15-16], 并手动校正。通过 DAMBE 软件分析蛋白质编码基因的氨基酸使用情况和同义密码子使用度 (Relative synonymous codon usage, RSCU)^[17]。使用 DNAMAN 软件对扁刺蛾 (MN661155、MK1226244)、黄刺蛾 (KY628213)、茶刺蛾 (*Iragoides fasciata*, MK250437)、龟形小刺蛾 (*Narosa nigrisigna*, MH675969)、双齿绿刺蛾 (*Latoia hilarata*, MK122617)、褐边绿刺蛾 (*Parasa consocia*, KX108765) 6 种刺蛾全序列及其蛋白质编码基因的核苷酸进行序列比对分析。

1.4 系统发育分析

从 GenBank 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) 下载已报道的鳞翅目线粒体全基因组序列进行系统发育分析。使用 MEGA 7.0^[18]的默认设置对 13 个蛋白编码基因的序列进行比对, 氨基酸序列直接比对, DNA 序列以无脊椎动物线粒体基因组密码子 (Invertebrate mitochondrion) 翻译成氨基酸序列之后比对, 再反翻译获得比对后的 DNA 序

列。将比对后的每个基因序列分别使用 Gblocks 程序中的 *condon/protein* 识别保守区域^[19], 完成之后进行序列组装, 组装完整的氨基酸序列和核苷酸序列利用最大似然法 (Maximum likelihood method, ML) 构建系统发育树^[20-21], 采用 Bootstrap (1 000 次重复) 检验系统树各分支节点的置信值。

2 结果与分析

2.1 扁刺蛾基因组全序列分析

扁刺蛾线粒体基因组序列全长 15 540 bp (GenBank 登录号: MN661155), 由 1 个控制区 (Control region, CR)、2 个核糖体 RNA (rRNA)、13 个蛋白质编码基因 (Protein-coding genes, PCG) 和 22 个转运 RNA (tRNA) 组成, 呈双链闭合环状 (图 1), 基因排列与鳞翅目双孔类昆虫相同。*nad5* 的长度最长 (1 725 bp), *trnR* 最短仅 (64 bp)。2 个 rRNA (*rrns*、*rrnL*)、4 个 PCG (*nad5*、*nad4*、*nad4L*、*nad1*)、控制区和 8 个 tRNA (*trnF*、*trnH*、*trnP*、*trnL1*、*trnV*、*trnQ*、*trnC*、*trnY*) 位于基因组 N 链, 其他的 9 个 PCG 和 14 个 tRNA 位于 J 链。

在扁刺蛾线粒体基因组的 37 个基因中, 相邻基因之间存在着基因间隔和基因重叠现象, 其中基因间隔区有 20 处, 共 270 bp。*trnQ* 和 *nad2* 之间间隔最长, 为 54 bp; 其次是 *nad4L* 和 *trnT*, 为 27 bp。基因重叠较少, 仅有 3 处, 共 16 bp, 分别位于 *atp8* 和 *atp6*、*trnT* 和 *trnP*、*trnW* 和 *trnC* 之间, 重叠序列分别为 7、1、8 bp; 既无重叠又无间隔的区域共有 14 处。蛋白编码基因中 AT 含量最高的为 *atp8*, 达 92.73%; 最低的为 *cox1*, 为 71.33% (表 1)。

扁刺蛾线粒体基因组的 A、T、C、G 的碱基含量分别为 39.40%、41.54%、11.52% 和 7.54%, AT 含量为 80.94%, GC 含量为 19.06%, 具有明显的 AT 偏好性。AT 偏斜和 GC 偏斜均为负值, 表明基因组全序列中碱基 A 和 G 的含量分别低于 T 和 C; 蛋白质编码基因中 AT 含量为 79.07%, 比全序列 AT 的含量稍低, 碱

基 A 含量小于 T, 而 G 的含量高于 C; tRNA 和 rRNA 中碱基 A 和 G 的含量分别高于 T 和 C, 控制区则相反 (表 2)。

2.2 扁刺蛾蛋白编码基因

13 个 PCG 的长度在 165~1 725 bp, 共计 11 163 bp, 占总基因组的 71.83%。13 个 PCG 中, 除 *cox1* 以 CGA 起始, 其他均以 ATN(ATA、ATC、ATG、ATT) 起始, 10 个以 TAA 为终止密码子, *cox1*、*cox2* 和 *nad4* 以 T 终止, 这种不完全终止密码子 T 比较常见。蛋白质编码基因的氨基酸使用频率 (图 2A) 和同义密码子使用度 (图 2B) 的分析结果显示, 扁刺蛾 13 个 PCG 中使用频繁的氨基酸依次为 Leu (14.52%)、Ile (12.12%)、Phe (10.70%)、Asn (8.20%)、Met (7.39%), Cys 的使用频率最低 (0.91%); 进一步分析发现, 以 A 和 U 结尾的同义密码

子使用度高于以 G 和 C 结尾的, 与昆虫线粒体基因组的 AT 偏好性特征一致。

2.3 tRNA 和 rRNA 基因

扁刺蛾线粒体基因组包含 22 个 tRNA (图 3), 长度在 64~71 bp。22 个 tRNA 中, 21 个 tRNA 能构建典型的三叶草二级结构, 而 *trnS_I* 缺失了 DHC 臂, 该现象在昆虫线粒体基因组中较常见^[22]。同时, 部分 tRNA 的二级结构还存在 G-U、U-U 和 A-C 等非经典配对, G-U 弱配共 19 处, U-U 错配共 6 处, A-C 错配 1 处, 这种错配常出现在其他昆虫类群 tRNA 二级结构中, 可维持 tRNA 二级结构的稳定性。*rrnL* 位于 *trnL_I* 与 *trnV* 之间, *rrnS* 位于 *trnV* 与 CR 之间, 长度分别为 1 419 bp 和 783 bp, AT 含量分别为 85.55%和 85.70%, 具有 AT 偏向性。

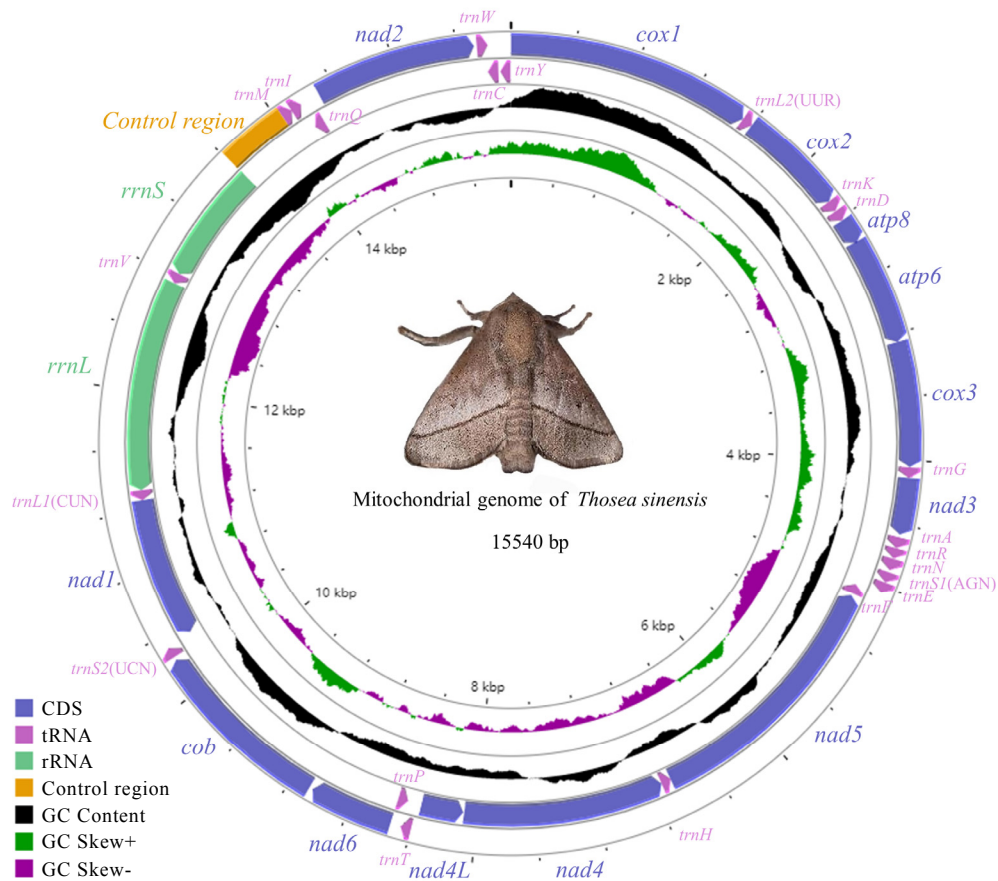


图 1 扁刺蛾线粒体基因组结构
Fig. 1 Structure of mitochondrial genome of *T. sinensis*

表 1 扁刺蛾线粒体基因组的基因组成

Table 1 Gene composition of the mitochondrial genome of *T. sinensis*

基因 Gene	范围/bp Region	方向 Direction	长度/bp Size	基因间隔/bp INC	AT/%	AT-偏斜 AT-skew	GC-偏斜 GC-skew	初始密码子 Start codon	终止密码子 Stop codon
<i>cox1</i>	1~1 531	F	1 531	4	71.33	-0.125	-0.052	CGA	T
<i>trnL₂</i>	1 532~1 599	F	68	0	76.47	-0.077	0.000	—	—
<i>cox2</i>	1 600~2 275	F	676	0	77.37	-0.090	-0.124	ATA	T
<i>trnK</i>	2 276~2 346	F	71	0	71.83	-0.059	0.000	—	—
<i>trnD</i>	2 349~2 417	F	69	2	88.41	0.115	0.000	—	—
<i>atp8</i>	2 418~2 582	F	165	0	92.73	-0.007	-0.500	ATC	TAA
<i>atp6</i>	2 576~3 253	F	678	-7	79.65	-0.130	-0.217	ATG	TAA
<i>cox3</i>	3 254~4 039	F	786	0	73.54	-0.118	-0.067	ATG	TAA
<i>trnG</i>	4 042~4 107	F	66	2	90.91	-0.067	0.000	—	—
<i>nad3</i>	4 108~4 461	F	354	0	80.79	-0.203	-0.147	ATT	TAA
<i>trnA</i>	4 480~4 549	F	70	18	85.71	0.067	0.000	—	—
<i>trnR</i>	4 550~4 613	F	64	0	78.13	-0.040	0.000	—	—
<i>trnN</i>	4 617~4 689	F	73	3	82.19	0.133	0.077	—	—
<i>trnS₁</i>	4 706~4 771	F	66	16	78.79	-0.038	0.000	—	—
<i>trnE</i>	4 773~4 843	F	71	1	92.96	-0.061	-0.200	—	—
<i>trnF</i>	4 852~4 918	R	67	8	82.09	0.091	0.667	—	—
<i>nad5</i>	4 934~6 658	R	1 725	15	81.86	-0.163	0.316	ATT	TAA
<i>trnH</i>	6 677~6 743	R	67	18	89.55	-0.100	0.429	—	—
<i>nad4</i>	6 744~8 082	R	1 339	0	81.25	-0.142	0.315	ATG	T
<i>nad4L</i>	8 090~8 371	R	282	7	82.62	-0.219	0.347	ATT	TAA
<i>trnT</i>	8 399~8 463	F	65	27	86.15	0.000	0.111	—	—
<i>trnP</i>	8 463~8 528	R	66	-1	83.33	0.091	0.455	—	—
<i>nad6</i>	8 531~9 055	F	525	2	87.24	-0.201	-0.224	ATT	TAA
<i>cob</i>	9 079~10 230	F	1 152	23	75.00	-0.134	-0.188	ATG	TAA
<i>trnS₂</i>	10 250~10 316	F	67	19	82.09	0.018	0.333	—	—
<i>nad1</i>	10 335~11 270	R	936	18	79.06	-0.168	0.276	ATG	TAA
<i>trnL₁</i>	11 271~11 337	R	67	0	76.12	0.098	0.625	—	—
<i>rrnL</i>	11 338~12 756	R	1 419	0	85.55	0.053	0.327	—	—
<i>trnV</i>	12 757~12 826	R	70	0	81.43	0.088	0.385	—	—
<i>rrnS</i>	12 827~13 609	R	783	0	85.70	0.013	0.393	—	—
<i>CR</i>	13 610~14 034	—	425	0	94.12	-0.050	-0.280	—	—
<i>trnM</i>	14 035~14 102	F	68	0	80.88	-0.018	-0.231	—	—
<i>trnI</i>	14 103~14 171	F	69	0	75.36	-0.115	0.176	—	—
<i>trnQ</i>	14 176~14 244	R	69	4	85.51	0.051	-0.400	—	—
<i>nad2</i>	14 299~15 312	F	1 014	54	84.81	-0.202	-0.208	ATT	TAA
<i>trnW</i>	15 329~15 396	F	68	16	85.29	0.000	-0.200	—	—
<i>trnC</i>	15 389~15 456	R	68	-8	80.88	-0.018	0.231	—	—
<i>trnY</i>	15 470~15 536	R	67	13	77.61	0.077	0.333	—	—

注：AT-偏斜=(A-T)/(A+T)，GC-偏斜=(G-C)/(G+C)

Note: AT-skew=(A-T)/(A+T), GC-skew=(G-C)/(G+C)

表 2 扁刺蛾线粒体基因组的核苷酸组成

Table 2 Nucleotide composition of the mitochondrial genome of *T. sinensis*

基因序列 Gene sequences	长度/bp Length	A/%	C/%	G/%	T/%	AT/%	GC/%	AT 偏斜 AT-skew	GC 偏斜 GC-skew
全基因组 Whole genome	15 540	39.40	11.52	7.54	41.54	80.94	19.06	-0.026	-0.209
蛋白编码基因 PCG	11 163	33.62	10.26	10.67	45.45	79.07	20.93	-0.150	0.020
tRNA	1 496	41.64	7.55	10.09	40.71	82.35	17.65	0.011	0.144
rRNA	2 202	44.46	4.68	9.72	41.14	85.60	14.40	0.039	0.350
控制区 CR	425	44.71	27.29	2.12	49.41	94.12	5.88	-0.050	-0.280

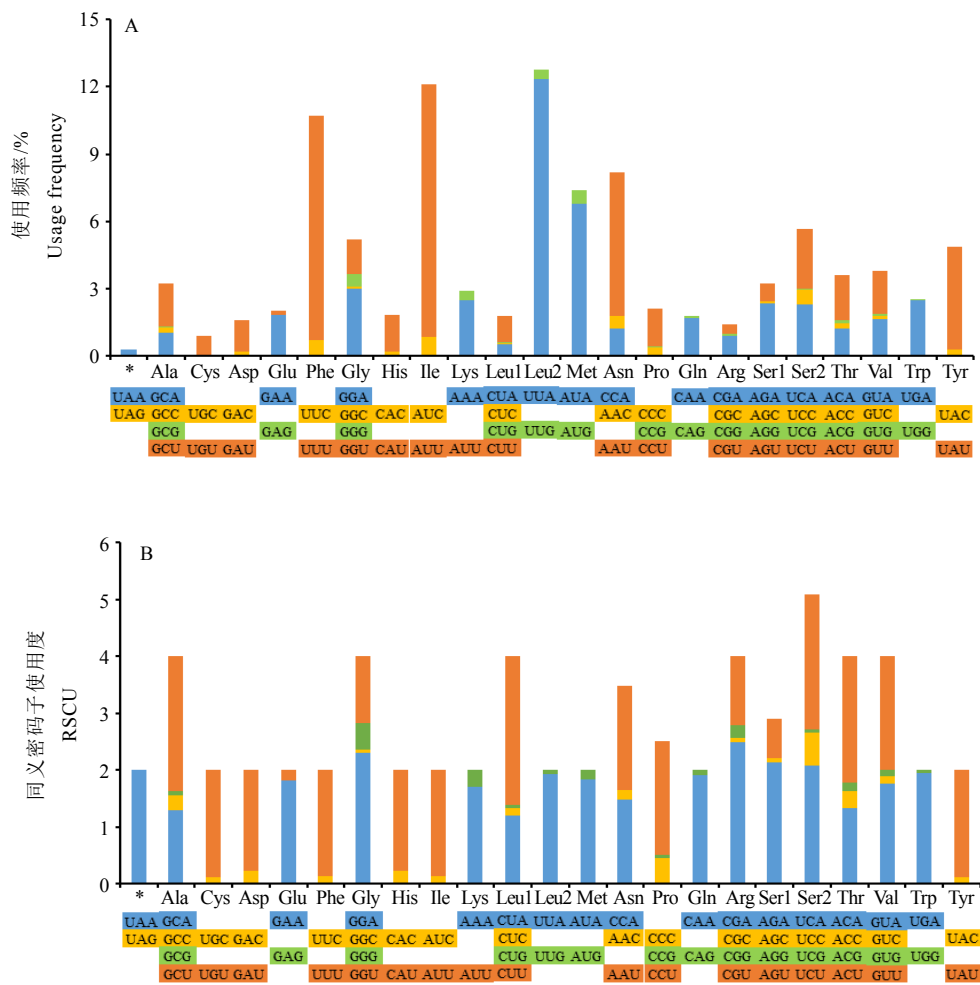


图 2 扁刺蛾线粒体基因组中蛋白质编码基因的氨基酸使用频率 (A) 和同义密码子使用度 (B)
Fig. 2 Amino acid usage frequency (A) and synonymous codon usage (B) of protein-coding genes in the mitochondrial genome of *T. sinensis*

2.4 控制区

由图 4 可知, 扁刺蛾线粒体基因组的控制区位于 *rrnS* 和 *trnM* 之间, 长度为 425 bp, AT 含量是基因组各区域中最高的 (94.12%), 在 *rrnS* 基因的下流有 1 段基序“ATAGA”和 19 bp 的 poly T 结构, 末端有 1 个 9 bp 的 poly A 结构, 扁刺蛾控制区发现了 3 个微卫星(AT)_n 元件, 已报道的扁刺蛾线粒体基因组的控制区微卫星(AT)_n 元件仅有 1 个微卫星(AT)₁₀ 元件^[10],

但没有发现串联重复。这些特征在鳞翅目昆虫线粒体基因组的控制区较为常见^[23-25]。

刺蛾科昆虫线粒体基因组的控制区中, 通常有 1 段 20~26 bp 的引导序列, 除龟形小刺蛾的 poly T 结构仅有 16 bp, 扁刺蛾、黄刺蛾、茶刺蛾、龟形小刺蛾、双齿绿刺蛾和褐边绿刺蛾的 poly T 长度一致, 微卫星(AT)_n 元件有 1~3 个, 除双齿绿刺蛾的 poly A 结构有突变外, 其他刺蛾均比较保守, 通常为 8~11 bp。

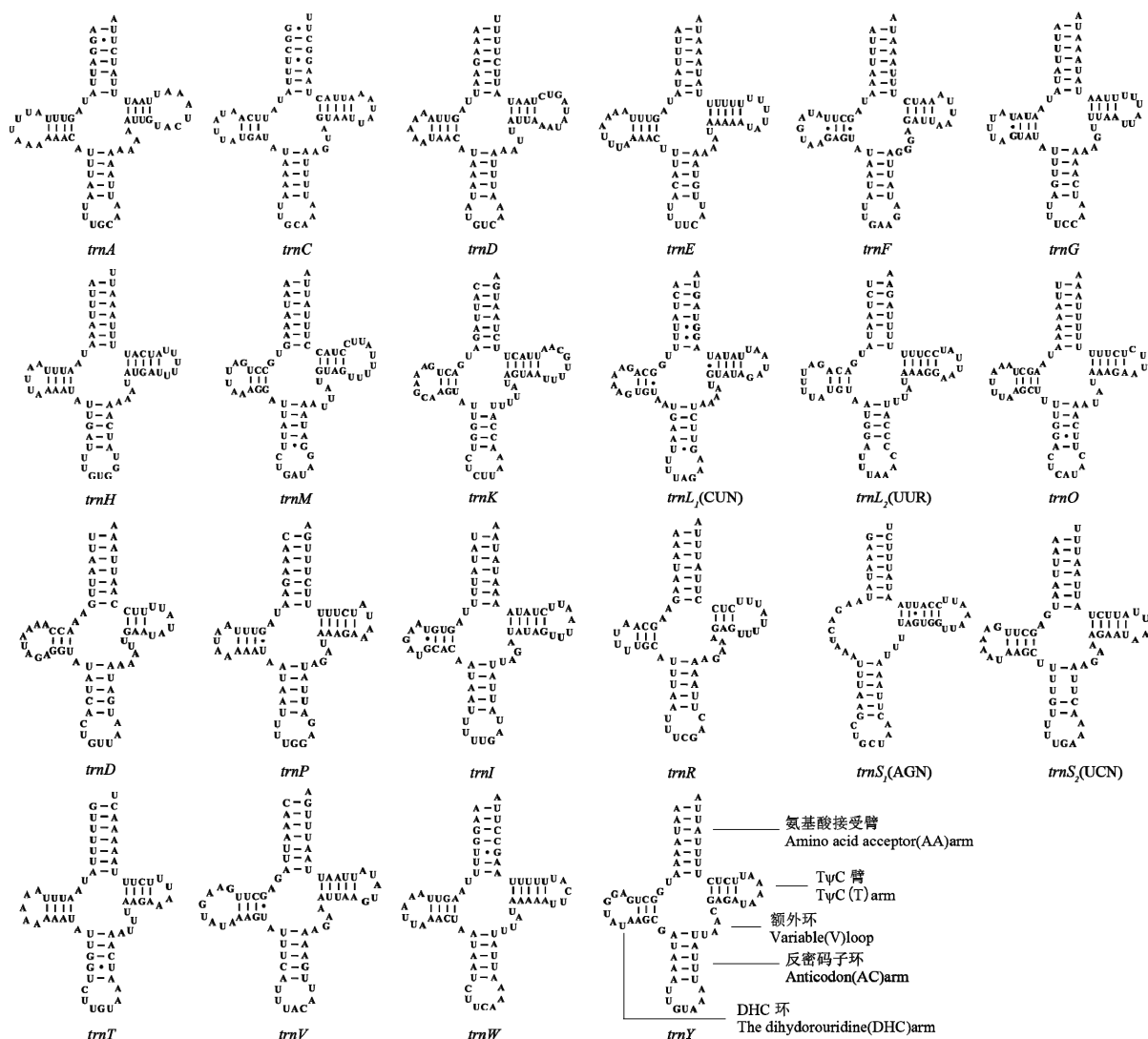


图 3 扁刺蛾线粒体基因 tRNA 预测二级结构

Fig. 3 Prediction of tRNA secondary structures in the mitochondrial genome of *T. sinensis*

2.5 6 种刺蛾的基因组比较及序列比对

对 6 种刺蛾线粒体基因组核苷酸组成进行分析 (表 3), 6 种刺蛾线粒体基因组长度范围在 15 292~15 645 bp, AT 含量均大于 80%, 扁刺蛾线粒体基因组较大, 仅次于茶刺蛾。由表 4 可知, 本研究的扁刺蛾 1 与其他 5 种刺蛾相比, 基于线粒体基因组全序列和 PCG 序列对

比结果可以看出, 与茶刺蛾的相似度最大, 为 84.96%, 与黄刺蛾、龟形小刺蛾和双齿绿刺蛾相似度差距不大, 与褐边绿刺蛾的相似度最小为 82.29%; 基于 PCG 的对比结果中, 扁刺蛾 1 与茶刺蛾相似度最大为 90.66%, 与褐边绿刺蛾的相似度最小, 说明扁刺蛾与茶刺蛾的相似度最高, 与褐边绿刺蛾相似度最低。

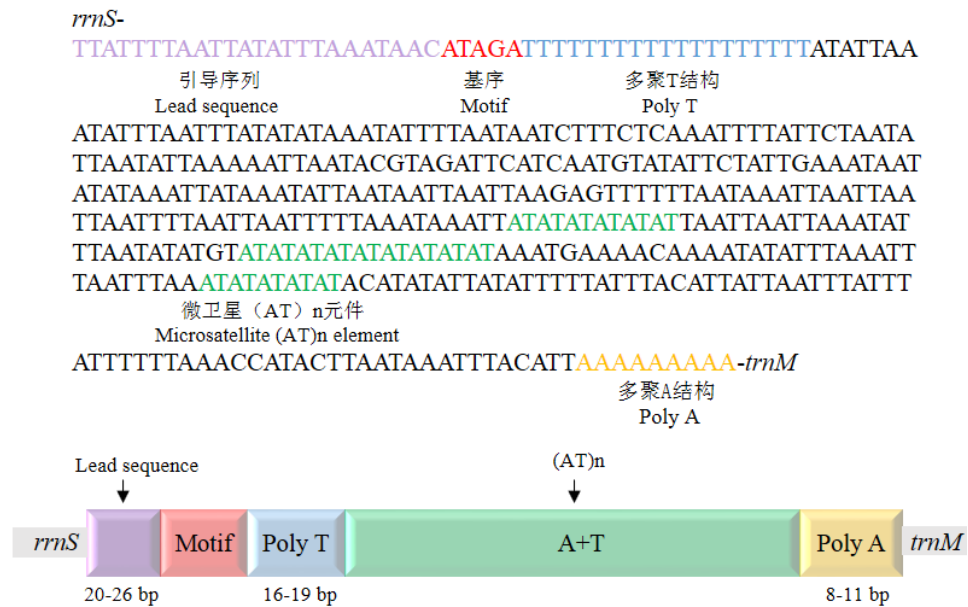


图 4 扁刺蛾和刺蛾科线粒体基因组控制区的结构

Fig. 4 Structure of the control region in the mitochondrial genomes of *T. sinensis* and Limacodidae

表 3 6 种刺蛾线粒体基因组核苷酸组成

Table 3 Nucleotide composition of six species of Limacodidae

物种 Species	GenBank 登录号 GenBank accession No.	全基因组 Whole genome		PCG		tRNA		CR	
		大小/bp	AT/%	大小/bp	AT/%	大小/bp	AT/%	大小/bp	AT/%
扁刺蛾 <i>T. sinensis</i>	MN661155	15 540	80.94	11 163	79.07	1 496	82.35	425	94.12
扁刺蛾 <i>T. sinensis</i>	MK122624	15 544	81.00	11 184	79.20	1 474	82.20	424	93.20
黄刺蛾 <i>M. flavescens</i>	KY628213	15 396	80.50	11 145	78.70	1 513	82.40	401	93.30
茶刺蛾 <i>I. fasciata</i>	MK250437	15 645	82.03	11 186	80.23	1 490	82.68	431	94.20
龟形小刺蛾 <i>N. nigrisigna</i>	MH675969	15 292	81.21	11 172	79.51	1 487	82.25	377	96.82
双齿绿刺蛾 <i>L. hilarata</i>	MK122617	15 306	80.97	11 243	79.35	1 480	82.70	374	93.05
褐边绿刺蛾 <i>P. consocia</i>	KX108765	15 296	80.58	11 134	78.84	1 485	82.09	373	95.17

表 4 6 种刺蛾线粒体基因组相似度比较

Table 4 Mitochondrial genome similarity of six species in Limacodidae

物种 Species	扁刺蛾 1 <i>T. sinensis</i> 1	扁刺蛾 2 <i>T. sinensis</i> 2	黄刺蛾 <i>M. flavescens</i>	茶刺蛾 <i>I. fasciata</i>	龟形小刺蛾 <i>N. nigrisigna</i>	双齿绿刺蛾 <i>L. hilarata</i>	褐边绿刺蛾 <i>P. consocia</i>
扁刺蛾 1 <i>T. sinensis</i> 1	—	97.75	83.49	84.96	83.28	83.33	82.29
扁刺蛾 2 <i>T. sinensis</i> 2	97.87	—	83.42	84.45	79.45	83.40	82.13
黄刺蛾 <i>M. flavescens</i>	84.75	84.55	—	79.86	80.16	85.82	85.02
茶刺蛾 <i>I. fasciata</i>	90.66	90.70	85.36	—	83.21	79.68	79.07
龟形小刺蛾 <i>N. nigrisigna</i>	84.45	84.28	84.69	84.93	—	80.38	79.83
双齿绿刺蛾 <i>L. hilarata</i>	84.51	84.63	86.82	85.26	84.54	—	87.55
褐边绿刺蛾 <i>P. consocia</i>	83.87	83.66	86.21	84.38	84.20	88.25	—

注: 扁刺蛾 1 的 GenBank 登录号为 MN661155, 扁刺蛾 2 的 GenBank 登录号为 MK122624。上三角基于全序列对比的相似度, 下三角基于编码蛋白基因比对的相似度

Note: *T. sinensis* 1 GenBank accession number is MN661155, *T. sinensis* 2 GenBank accession number is MK122624. The number above the diagonal is based on the alignment of complete sequence, the number below the diagonal is based on the alignment of PCG

2.6 系统发育分析

以黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*, GenBank 登录号: DMU37541) 为外群, 构建了基于 26 种鳞翅目双孔次目蛾类昆虫 13 个 PCG 的核苷酸与氨基酸序列的系统发育树(图

5)。结果显示, 扁刺蛾、茶刺蛾、黄刺蛾、龟形小刺蛾、双齿绿刺蛾和褐边绿刺蛾同属于刺蛾科, 以 100%的支持率聚为一支(图 5)。结果表明, 扁刺蛾与茶刺蛾的亲缘关系最近, 其次为龟形小刺蛾, 鳞翅目各科均聚为一支。

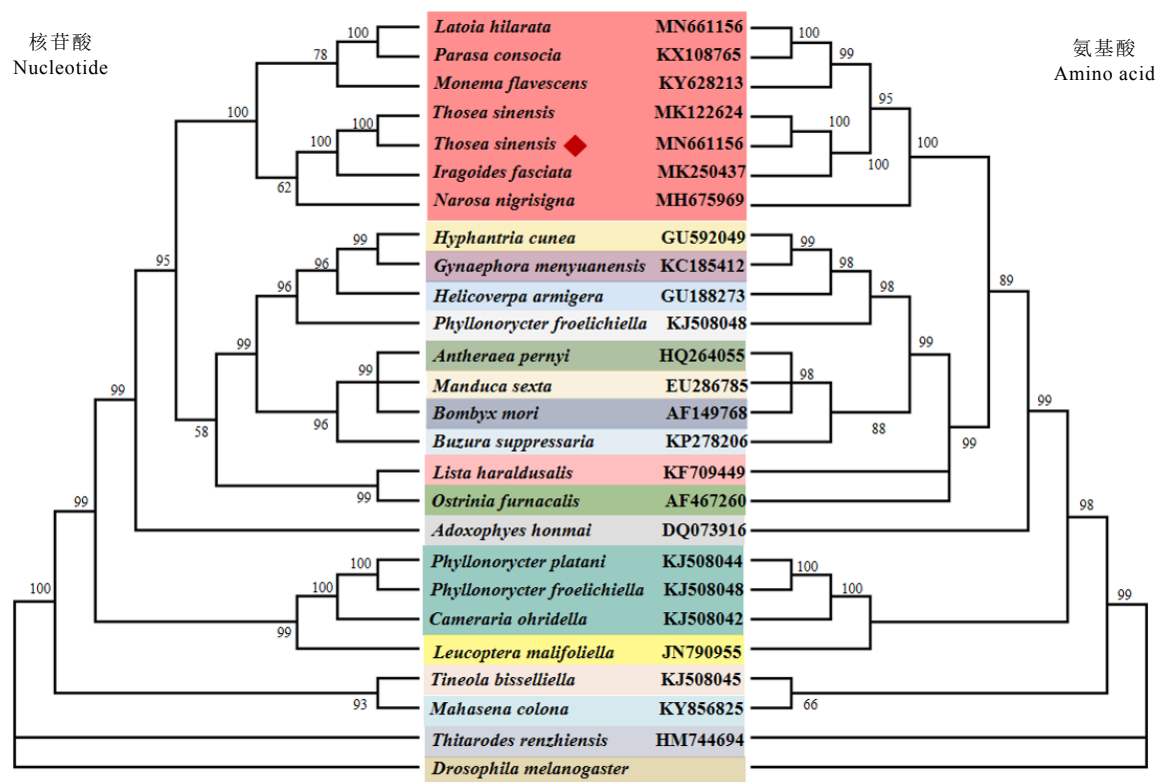


图 5 26 种蛾类昆虫的系统发育树

Fig. 5 Maximum-likelihood (ML) phylogenetic tree of 26 species of Lepidoptera

3 讨论

鳞翅目害虫是农林业主要害虫之一, 目前 GenBank 上鳞翅目昆虫的线粒体基因组全序列有 1 000 多个, 长度一般为 15~16 kb, AT 含量在 76%~80%, 而刺蛾科线粒体基因组碱基 AT 含量达 80%以上, 表现出典型高 AT 含量。多数刺蛾科昆虫蛋白编码区除 *cox1* 以 CGA 起始, 其他均以 ATN 起始, 以 TAA 和 T 为终止密码子, 不完整的终止密码子会在转录形成 mRNA 后转变成完整的终止密码子^[26],

这种现象普遍存在于大多数鳞翅目线粒体基因组中^[24]。tRNA 是发生基因重排的热点区域, 但刺蛾科昆虫基因重排现象不常见, 除褐缘绿刺蛾外, 其他 5 种刺蛾线粒体基因排列顺序相同, 褐缘绿刺蛾发现 1 处基因重排, 即 *trnA* 与 *trnR* 的位置发生了置换^[27], rRNA 的位置则比较固定。已报道的刺蛾线粒体基因组的 *trnS_I* 的二级结构都缺少 DHU 臂, 但后期可被修复形成典型的三叶草结构^[28-29]。

刺蛾科昆虫控制区均有 ATAGA 基序、Ploy-T 结构、微卫星(AT)_n 元件和 Ploy-A 结构

这 4 个保守元素,尤其是 poly-T 结构没有发生碱基突变,表明刺蛾科昆虫物种演化较稳定。在许多鳞翅目昆虫中并无微卫星(AT)_n 元件^[24],有学者认为 $n \geq 8$ ^[5],但马尾松毛虫(*Dendrolimus punctatus*)和云南松毛虫(*Dendrolimus houi*)控制区都仅有 1 个微卫星(AT)₇ 元件^[30-31],Bian 等^[10]报道了江苏扁刺蛾控制区有 1 个微卫星(AT)₁₀ 元件,但我们发现还存在 1 个微卫星(AT)₉ 元件,目前 n 并没有统一的标准,本研究将 $n \geq 5$ 的 AT 重复定为微卫星(AT)_n 元件,关于控制区微卫星元件的特点还有待进一步研究。鳞翅目的原始小蛾类物种的控制区中,基序 ATAGA 结构和 poly-T 结构发生的突变较为频繁^[24],刺蛾科中除双齿绿刺蛾的 poly A 结构有突变外,其他均比较保守。不同物种的线粒体基因组控制区长度差异较大,甚至同一物种不同地理种群之间的差异也较大,如已报道的重庆茶网蝽与陕西安康茶网蝽,控制区相差 1 463 bp^[32-33],刺蛾科昆虫也有这种现象,如 GenBank 中的褐边绿刺蛾(登录号:OK149235、KX108765)的控制区相差 232 bp。控制区 AT 含量高、含有大量重复序列以及能形成稳定的二级结构,使得控制区测序难度较大^[34-37],是由测序差异引起的还是控制区本身的特点,有待进一步研究。

有研究者证实灰飞虱自然种群中存在两类线粒体 DNA,且 II 类由 I 类演化而来,灰飞虱线粒体 DNA 的变异带来了生殖和耐寒力方面的优势,使其能够在种群中得到扩散^[11]。通常情况下昆虫同一物种的两个地理种群的线粒体基因组全序列相似度达 99%,Bian 等^[10]报道的扁刺蛾采自江苏省,与本研究的江西扁刺蛾线粒体基因组全序列相似度为 97.75%,13 个 PCG 的相似度为 97.87%,差异较大,说明这两个扁刺蛾地理种群的线粒体基因组存在着一定程度的差异。这种差异可能是由于在进化过程中不同地区的扁刺蛾经历了不同的地理环境或不同寄主的生态压力,从而导致了

线粒体的蛋白表达和合成基因的变化。同时,近几年有报道扁刺蛾在江西南昌果园和茶园泛滥成灾^[13],推测扁刺蛾线粒体 DNA 可能也存在地理和寄主环境方面的适应性演化,但后续还需更多样本的测序和生物学研究。

基于 26 种鳞翅目蛾类昆虫 13 个 PCG 的核苷酸与氨基酸序列构建系统发育树较为一致,刺蛾科昆虫均聚为一支,自展值为 100%,其系统发育关系为[龟形小刺蛾+(扁刺蛾+茶刺蛾)]+[(双齿绿刺蛾+褐缘绿刺蛾)+黄刺蛾],由此可见,刺蛾科在鳞翅目蛾类昆虫中的系统发育关系较稳定,在许多研究中均被证实^[9-10,27,38-40],两个刺蛾在系统发育树上聚为一支,进一步明确了扁刺蛾的线粒体基因组信息。将分子与传统形态分类学结合,不仅能验证形态分类学的准确性,还可以较为准确地鉴定在形态上难以分辨的相似种,是今后昆虫分类研究的主要方向^[41]。Li 等^[42]收集了昆虫纲多个目的形态种信息、核基因和线粒体基因数据,评估已知形态种与包含隐存种的分子种数量,发现每个昆虫形态种平均对应 3.1 个物种。性信息素和昆虫病毒专一性强,鳞翅目害虫的精准鉴定,可为后期对其进行性信息素诱杀和病毒制剂等精准绿色防控技术的开发打下基础。如茶尺蠖(*Ectropis obliqua*)和灰茶尺蠖(*E. grisea*)是茶树害虫尺蠖类的 2 个近缘种,长期以来都把它们看作茶尺蠖,但在实际使用茶尺蠖病毒和性诱剂时发现,不同茶区尺蠖对茶尺蠖病毒和性诱剂的敏感性存在差异^[43-44],利用线粒体基因组序列正确鉴定害虫种类对精准指导田间防治意义重大。线粒体基因组信息也被广泛应用于害虫捕食性天敌摄食分析,在生物防治中,需明确天敌的食物谱并对其捕食量进行估算,基于形态学的传统研究方法不仅耗时耗力,且无法满足农业生态系统中重要的捕食性天敌蜘蛛类的食谱分析,利用害虫的 DNA 条形码与 PCR 技术可对蜘蛛的摄食进行精确定量分析,实际应用价值极大^[45-46]。

本研究通过测定江西省南昌市茶园扁刺

蛾线粒体全基因组序列, 分析其全序列特征、与其他刺蛾昆虫线粒体基因组的差异以及与 26 种鳞翅目物种间的系统发育关系, 既丰富了刺蛾科线粒体基因组数据库, 也为刺蛾科物种精准鉴定、系统进化分析和防控研究提供基础。

参考文献

- [1] 肖强, 唐美君, 周孝贵. 茶树病虫和天敌名录[M]. 北京: 中国农业出版社, 2020: 104.
Xiao Q, Tang M J, Zhou X G. List of tea pests and natural enemies [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2020: 104.
- [2] 张汉鹄, 谭济才. 中国茶树害虫及其无公害治理[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 2004.
Zhang H H, Tan J C. Chinese tea pests and their pollution-free control [M]. Hefei: Anhui Science and Technology Press, 2004.
- [3] 谢小群, 贺望兴, 石旭平, 等. 三种微生物农药对扁刺蛾幼虫的毒力试验[J]. 茶叶通讯, 2020, 47(4): 617-622.
Xie X Q, He W X, Shi X P, et al. Toxicity test of three kinds of microbial pesticides on *Thosesa senensis* Walker [J]. Journal of Tea Communication, 2020, 47(4): 617-622.
- [4] 崔林, 刘月生. 茶园扁刺蛾的发生及防治[J]. 中国茶叶, 2005, 27(2): 21.
Cui L, Liu Y S. Occurrence and control of *Thosesa senensis* in tea garden [J]. Chinese Tea, 2005, 27(2): 21.
- [5] 王维, 孟智启, 石放雄, 等. 鳞翅目昆虫比较线粒体基因组学研究进展[J]. 科学通报, 2013, 58(30): 3017-3029.
Wang W, Meng Z Q, Shi F X, et al. Advances in comparative mitochondrial genomics of Lepidoptera [J]. Chinese Science Bulletin, 2013, 58(30): 3017-3029.
- [6] 魏书军, 陈学新. 昆虫比较线粒体基因组学研究进展[J]. 应用昆虫学报, 2011, 48(6): 1573-1585.
Wei S J, Chen X X. Advances in comparative mitochondrial genomics in insects [J]. Journal of Applied Entomology, 2011, 48(6): 1573-1585.
- [7] 古丽扎尔·阿不都克力木, 张秀英, 苏比奴尔·艾力, 等. 中国鳞翅目新物种 2021 年年度报告[J]. 生物多样性, 2022, 30(8): 37-45.
Gulzar A, Zhang X Y, Subinur E, et al. Annual report of new taxa for Chinese Lepidoptera in 2021 [J]. Biodiversity Science, 2022, 30(8): 37-45.
- [8] Zhang Z Q. Animal biodiversity: an outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness [J]. Zootaxa, 2011, 3148: 1. doi: 10.11646/zootaxa.3148.1.10.
- [9] Liu Q N, Xin Z Z, Bian D D, et al. The first complete mitochondrial genome for the subfamily Limacodidae and implications for the higher phylogeny of Lepidoptera [J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 35878. doi: 10.1038/srep35878.
- [10] Bian D D, Ye W T, Dai M L, et al. Phylogenetic relationships of Limacodidae and insights into the higher phylogeny of Lepidoptera [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 159: 356-363.
- [11] Sun J T, Duan X Z, Hoffmann A A, et al. Mitochondrial variation in small brown planthoppers linked to multiple traits and probably reflecting a complex evolutionary trajectory [J]. Molecular Ecology, 2019, 28(14): 3306-3323.
- [12] 贺望兴, 谢小群, 杨普香, 等. 茶园扁刺蛾生防菌筛选、鉴定及其发酵条件优化[J]. 福建农业学报, 2022, 37(11): 1463-1469.
He W X, Xie X Q, Yang P X, et al. Identification and culture optimization of effective biocontrol agent on *Thosesa senensis* for tea plantations [J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2022, 37(11): 1463-1469.
- [13] 王金昌, 类承凤, 陈俊晖, 等. 扁刺蛾核型多角体病毒新分离株的基因组测序与分析[J]. 病毒学报, 2023, 39(1): 185-198.
Wang J C, Lei C F, Chen J H, et al. Genome sequencing and analyses of a new strain of *Thosesa sinensis* nucleopolyhedrovirus (OxocNPV-Ts) [J]. Chinese Journal of Virology, 2023, 39(1): 185-198.
- [14] Bernt M, Donath A, Jühling F, et al. MITOS: improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2013, 69(2): 313-319.
- [15] Laslett D, Canbäck B. ARWEN: a program to detect tRNA genes in metazoan mitochondrial nucleotide sequences [J]. Bioinformatics, 2008, 24(2): 172-175.
- [16] Lowe T M, Eddy S R. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(5): 955-964.
- [17] Xia X H. DAMBE7: new and improved tools for data analysis in molecular biology and evolution [J]. Molecular Biology and Evolution, 2018, 35(6): 1550-1552.
- [18] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1506-1514.

- 1870-1874.
- [19] Castresana J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2000, 17(4): 540-552.
- [20] Guindon S, Dufayard J F, Lefort V, et al. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0 [J]. *Systematic Biology*, 2010, 59(3): 307-321.
- [21] Lefort V, Longueville J E, Gascuel O. SMS: smart model selection in PhyML [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2017, 34(9): 2422-2424.
- [22] Cameron S L. Insect mitochondrial genomics: implications for evolution and phylogeny [J]. *Annual Review of Entomology*, 2014, 59(1): 95-117.
- [23] Kong W Q, Yang J H. The complete mitochondrial genome of *Rondotia menciaana* (Lepidoptera: Bombycidae) [J]. *Journal of Insect Science*, 2015, 15(1): 48. doi: 10.1093/jisesa/iev032.
- [24] 陈鲁. 鳞翅目昆虫线粒体基因组的结构特征分析[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2021.
- Chen L. Structural characteristics of mitochondrial genome in Lepidoptera [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2021.
- [25] 张敏, 赵盼, 尹洁, 等. 小红珠绢蝶线粒体基因组特征及基于线粒体基因组的蝶类高级阶元系统发育关系分析[J]. *昆虫学报*, 2017, 60(11): 1324-1338.
- Zhang M, Zhao P, Yin J, et al. Mitochondrial genome characteristics and phylogenetic relationship analysis of the higher order members of the butterflies based on mitochondrial genome [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2017, 60(11): 1324-1338.
- [26] Cao S Y, Wu X B, Yan P, et al. Complete nucleotide sequences and gene organization of mitochondrial genome of *Bufo gargarizans* [J]. *Mitochondrion*, 2016, 6(4): 186-193.
- [27] Liu Q N, Xin Z Z, Zhu X Y, et al. A transfer RNA gene rearrangement in the lepidopteran mitochondrial genome [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017, 489(2): 149-154.
- [28] Segovia R, Pett W, Trewick S, et al. Extensive and evolutionarily persistent mitochondrial tRNA editing in velvet worms (Phylum Onychophora) [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2873-2881.
- [29] Lavrov D V, Brown W M, Boore J L. A novel type of RNA editing occurs in the mitochondrial tRNAs of the centipede *Lithobius Forficatus* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 97(25): 13738-13742.
- [30] 社会聪, 王瑶, 方加兴, 等. 马尾松毛虫线粒体全基因组的测定与分析[J]. *林业科学*, 2019, 55(12): 162-172.
- Du H C, Wang Y, Fang J X, et al. Sequencing and analysis of the complete mitochondrial genome of *Dendrolimus punctatus* (Lepidoptera: Lasiocampidae) [J]. *Forestry Science*, 2019, 55(12): 162-172.
- [31] 王瑶, 孔祥波, 张苏芳, 等. 云南松毛虫线粒体基因组全序列测定和分析[J]. *林业科学研究*, 2019, 35(5): 11-20.
- Wang Y, Kong X B, Zhang S F, et al. Sequencing and analysis of complete mitochondrial genome of *Dendrolimus houi* Lajonquiere (Lepidoptera: Lasiocampidae) [J]. *Forestry Science Research*, 2019, 35(5): 11-20.
- [32] 杨金宏, 谢满超, 文欣茹, 等. 茶网蝽线粒体基因组全序列测定及系统发育分析[J]. *茶叶科学*, 2022, 46(6): 839-850.
- Yang J H, Xie M C, Wen X R, et al. The complete mitochondrial genome sequence and phylogenetic analysis of the *Stephanitis chinensis* [J]. *Journal of Tea Science*, 2022, 46(6): 839-850.
- [33] Li P W, Wang X Q, Chen S C, et al. The complete mitochondrial genome of the tea lace bug, *Stephanitis chinensis* (Hemiptera: Tingidae) [J]. *Mitochondrial DNA Part B*, 2017, 2(2): 607-608.
- [34] Hua J M, Li M, Dong P Z, et al. Comparative and phylogenomic studies on the mitochondrial genomes of Pentatomomorpha (Insecta: Hemiptera: Heteroptera) [J]. *BMC Genomics*, 2008, 9: 610. doi: 10.1186/1471-2164-9-610.
- [35] Li H, Liu H Y, Song F, et al. Comparative mitogenomic analysis of damselfly bugs representing three tribes in the family Nabidae (Insecta: Hemiptera) [J]. *Plos One*, 2012, 7(9): e45925. doi: 10.1371/journal.pone.0045925.
- [36] Wang Y, Huang X L, Qiao G X. Comparative analysis of mitochondrial genomes of five aphid species (Hemiptera: Aphididae) and phylogenetic implications [J]. *Plos One*, 2013, 8(10): e77511. doi: 10.1371/journal.pone.0077511.
- [37] 郭仲龙, 袁明龙. 半翅目昆虫线粒体基因组学研究进展[J]. *中国科学: 生命科学*, 2016, 46(2): 151-166.
- Guo Z L, Yuan M L. Research progress of mitochondrial genomes of Hemiptera insects [J]. *Scientia Sinica (Vita)*, 2016, 46(2): 151-166.

- [38] Jiang H Y, Chen S C, Peng P, et al. The complete mitochondrial genome of a slug moth, *Narosa nigrisigna* (Lepidoptera: Limacodidae) [J]. Mitochondrial DNA Part B, 2019, 4(1): 320-321.
- [39] Jiang H Y, Chen S C, Hu X, et al. Characterization of the complete mitochondrial genome of the tea slug moth, *Iragoides fasciata* (Lepidoptera: Limacodidae) [J]. Mitochondrial DNA Part B, 2022, 7(8): 1545-1547.
- [40] Peng S Y, Zhang Y, Zhang X C, et al. Complete mitochondrial genome of *Cnidocampa flavescens* (Lepidoptera: Limacodidae) [J]. Mitochondrial DNA Part B, 2017, 2(2): 534-535.
- [41] 陈晓晓, 袁周伟, 苑晓伟, 等. 叶蝉线粒体基因组全序列结构研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(6): 2565-2577.
- Chen X X, Yuan Z W, Yuan X W, et al. Advances in mitochondrial genome complete sequence structure of leafhopper [J]. Genomics and Applied Biology, 2020, 39(6): 2565-2577.
- [42] Li X, Wiens J J. Estimating global biodiversity: the role of cryptic insect species [J]. Systematic Biology, 2023, 72(2): 391-403.
- [43] 肖强. 茶园害虫“双胞胎”——茶尺蠖和灰茶尺蠖的识别[J]. 中国茶叶, 2019, 41(11): 11-12.
- Xiao Q. Identification of "twins" of pests in tea garden-tea inchworm and grey tea inchworm [J]. China Tea, 2019, 41(11): 11-12.
- [44] 张家侠, 孙钦玉, 葛超美, 等. 4 种性诱剂诱芯对茶园尺蠖的引诱与预测效果[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(20): 86-88.
- Zhang J X, Sun Q Y, Ge C M, et al. The lure and prediction effect of four kinds of sex attractants on inchworm in tea garden [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2018, 46(20): 86-88.
- [45] Furlong F M. Knowing your enemies: integrating molecular and ecological methods to assess the impact of arthropod predators on crop pests [J]. Insect Science, 2015, 22(1): 6-19.
- [46] 颜亨梅, 钟文涛. 动物捕食性天敌摄食分析方法的研究进展[J]. 生命科学研究, 2021, 25(1): 1-8.
- Yan H M, Zhong W T. Research progress of feeding analysis methods for predatory animals [J]. Life Science Research, 2021, 25(1): 1-8.

《茶叶科学》征订征稿启事

《茶叶科学》——中文核心、中国科技核心、中国科学引文数据库(CSCD)、中国农业核心等核心期刊, 已被国内的中国知网、万方、维普、超星、中教等各大数据库全文收录, 也被国外的 Scopus、FSTA、EBSCO、CA、CABI 等大型知名数据库收录。期刊影响因子等评价指标列同类期刊前列。

《茶叶科学》主要报道最新涉茶科技成果, 内容包括茶树栽培、育种种植、病虫害防治、生理生化、茶叶加工、茶机械、茶经济文化、茶饮料、茶食品和保健品、茶健康等。

投稿请在《茶叶科学》网站 (www.tea-science.com) 的采编系统上投稿。

《茶叶科学》为双月刊, 大 16 开本。每期定价 50 元, 全年订价 300 元。为简化手续, 可一次订购今后 1~3 年的期刊。款到即寄期刊 (免邮费)。

银行开户行: 中国农业银行杭州市西湖支行, **户名:** 中国农业科学院茶叶研究所开户, **账号:** 19000101040005296。银行汇款时请在附言中注明“茶叶科学”。

汇款后, 请将汇款凭证及填好的《茶叶科学》征订函 (请在 www.tea-science.com/CN/column/column9.shtml 下载) 发送至编辑部电子邮箱 (cykx@vip.163.com)。

电话: 0571-86651482

E-mail: cykx@vip.163.com (订刊)

网址: www.tea-science.com

茶树地方群体种资源叶片表型及生化组分多样性分析

唐璐, 李长乐, 葛悦, 王璞, 赵华, 王明乐, 王郁, 郭飞*, 倪德江

华中农业大学园艺林学学院果蔬园艺作物种质创新与利用全国重点实验室, 湖北 武汉 430070

摘要: 为保护茶树种质资源和促进茶树种质创新, 对来自全国 12 个省份的 32 份茶树地方群体种资源表型性状及生化组分多样性进行了研究。结果表明, 16 个表型性状的遗传多样性指数变化范围为 0.81~1.94, 供试群体表型遗传多样性较高; 叶面积、叶形、叶面、芽叶茸毛、叶尖、叶身 6 个表型性状变异的累计贡献率为 71.78%, 是造成供试茶树群体表型差异的主要因素; 综合两年生化成分测定结果, 供试样品咖啡碱含量变异系数 (17.95% 和 14.55%) 最大, 其次是茶多酚含量变异系数 (13.61% 和 8.11%), 游离氨基酸变异系数 (5.62% 和 7.52%) 最小; 基于生化组分含量测定结果进行聚类分析将供试茶树群体划分为 3 个类群, 分别包含不同类型的种质。从供试茶树地方群体种资源的地理分布范围来看, 供试种质生化成分含量呈现出地域差异。

关键词: 茶树地方群体种; 表型性状; 生化组分; 多样性

中图分类号: S571.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-369X(2023)04-473-16

Diversity Analysis of Leaf Phenotype and Biochemical Components in Tea Local Population Resources

TANG Lu, LI Changle, GE Yue, WANG Pu, ZHAO Hua, WANG Mingle,

WANG Yu, GUO Fei*, NI Dejiang

National Key Laboratory for Germplasm Innovation & Utilization of Horticultural Crops, College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract: In order to protect tea germplasm resources and promote tea germplasm innovation, the phenotypic character and biochemical component diversity of 32 tea germplasm resources from 12 provinces were studied. The results showed that the genetic diversity index of 16 phenotypic character ranged from 0.81 to 1.94, and the phenotypic genetic diversity of the test population was high. The cumulative contribution rate of the six phenotypic characters including leaf area, leaf shape, leaf upper surface, young shoot pubescence, leaf tip shape and leaf cross section were 71.78%, which was the main factor causing the phenotypic difference of the tested tea population. Based on the determination results of biochemical components in two years, the variation coefficient of caffeine content (17.95% and 14.55%) was the largest, followed by the variation coefficient of tea polyphenol content (13.61% and 8.11%). The variation coefficient of free amino acid (5.62% and 7.52%) was the lowest. Cluster analysis based on the results of biochemical component content determination was conducted to divide the tested tea tree populations into three groups, each including different types of germplasm. From the geographical distribution of the tested tea populations, the content of biochemical components showed regional differences.

Keywords: tea local population species, phenotypic character, biochemical components, diversity

收稿日期: 2023-05-06

修订日期: 2023-07-17

基金项目: 农业生物种质资源挖掘与利用(2022YFD1200505)、沧州市建设国家可持续发展议程创新示范区科技专项(202204AC100001-A01)

作者简介: 唐璐, 女, 硕士研究生, 主要从事茶树种质资源方面研究, Tanglu@webmail.hzau.edu.cn。*通信作者: guofei@mail.hzau.edu.cn

茶树 [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze], 作为一种经济价值极高的叶用作物, 被广泛栽培于国内多个省份。近年来, 随着茶产业的蓬勃发展, 对优质、特异、多元茶树种质资源的需求日益增长, 发掘和保护优异茶树种质资源的重要性日益凸显。茶树地方群体种对其所在茶区生态条件和生产模式具有良好的适应性, 经过长期的自然或人工选择育种, 为茶树品种改良提供了丰富的资源。当前育成的无性系茶树品种多是从茶树地方群体种中采用单株系统选育而来, 如龙井 43 [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze cv. *Longjing* 43] 是从浙江龙井群体种中单株系统选育而来。因此, 茶树地方群体种既可作为育种材料, 从中筛选出具有特异性状 (表型性状特异、经济性状特异) 的新品种应用于生产, 也是研究不同地域茶树亲缘关系、传播方向、演化规律的重要材料, 对其开展遗传多样性研究具有重要意义。

开展茶树遗传多样性研究是保护、开发、利用茶树种质资源的前提, 是茶树创新育种和基因遗传改良的基础^[1]。对茶树表型性状进行测量、统计是最早的遗传多样性分析方法, 该方法具有直观、操作简单、成本低的优势, 从表型上便可直接选择到与目标性状相关联的个体或群体^[2]。茶树作为叶用经济作物, 其叶片性状观测在茶树种质资源鉴定中具有重要地位^[3]。植物在逆境胁迫下, 出于自我保护会启动自身的抗逆机制来适应环境变化, 长期的逆境胁迫会产生不可逆的植物表型变异, 基于表型的遗传多样性研究对探究植物对环境的适应性及其进化方向都具有重要意义^[4]。以植物主要代谢产物差异为基础进行遗传多样性研究的方法^[5]有助于指导茶树育种, 培育特异种质, 运用的分析方法主要有光谱分析法和色谱分析法。茶多酚、咖啡碱、游离氨基酸是茶叶中主要的次生代谢产物, 这些生化组分的含量与茶叶品质息息相关, 各物质之间的比例差异使不同茶树品种适制性不同。刘彤^[6]、莫岚等^[7]分别对广西省内柳州及来宾野生茶树群

体的主要生化特征进行了鉴定和遗传多样性分析, 通过聚类分析, 揭示了不同茶树群体的适制性和品质特征。对群体种资源的研究有利于发掘生化成分特异的植株。有学者从广东省茶树群体种中发现了具有高茶多酚、高氨基酸及高儿茶素含量的群体^[8-9]; 对四川地区茶树资源的生化组分表型多样性研究发现, 该地区茶树资源的水浸出物含量较高^[10]; 在对广西省不同区域茶树群体种的研究中也发现桂南区域种质的茶多酚、水浸出物及咖啡碱含量较高, 桂北区域种质的氨基酸含量较高^[11]。因此, 通过研究不同茶树品种间叶片表型与生化组分的差异, 能从不同角度阐释茶树的遗传多样性水平^[12]。

目前茶树种质资源方面的研究主要集中于某一区域 (省份), 对不同区域 (省份) 间茶树群体种资源的综合比较研究较少, 不利于直观探究不同地域茶树群体种之间的相关性与差异性^[13]。本研究搜集了来自全国 12 个省份的 32 份茶树群体品种资源, 对其新梢芽叶、成熟叶片表型数据进行测量统计, 采用主成分分析和聚类分析法对叶片表型性状的多样性展开研究, 揭示了不同地区茶树群体种可能的遗传背景; 测定样品的主要生化成分游离氨基酸、咖啡碱、茶多酚含量, 并进行遗传多样性分析及聚类分析, 揭示了不同地区茶树种质资源生化成分含量规律。基于表型性状分析和生化组分含量的分析开展茶树群体种资源遗传多样性研究, 以期深入了解不同类型的茶树地方群体种, 明确国内群体种质的区域差异与遗传结构, 为其演化过程中茶树表型性状、生化成分含量的变化研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为在全国 12 个省份收集的 32 份茶树地方群体种资源, 均为当地具有一定影响力的群体种资源。供试地方群体种茶树经实地考察、多人鉴定后于 2015 年统一收集种子

并播种在营养钵内，随后于 2016 年 3 月定植于华中农业大学茶学试验基地茶园种质资源圃。供试茶树种质的名称、来源、编号等信息见表 1。试验基地位于东经 114°35′，北纬 30°47′，海拔 29.5 m，年平均温度 17.9 ℃，年均降雨量 2 012 mm，相对湿度 70.3%，属亚热带季风气候。茶园种质资源圃行距 1 m，地势平缓，立地条件和栽培管理措施基本一致。

1.2 茶树叶片表型性状观测方法

参照陈亮等^[14]编著的《茶树种质资源描述规范和数据标准》，对 32 份供试群体种茶树的新梢芽叶及成熟叶片表型性状进行观测、统计。从每份群体种资源中随机选取 10 株作为观测材料，共计观测 320 株茶树种质。性状观测由 2 人同时进行，对茶树的芽叶色泽、芽叶茸毛、叶片着生状态、叶色、叶身、叶质等 16 个表型性状进行观测、记录，12 个质量性状描述代码及 4 个数量性状统计方法如表 2 所示。

1.3 茶树种质生化成分检测方法

生化成分含量测定样品取样采用混样法，分别于 2019 年 4 月和 2020 年 7 月在供试茶树三分之二植株新梢发育为一芽二叶（平展）期采摘其新梢一芽二叶，为避免采摘样品受种植区域影响，每份种质分 3 个区域，每个区域内随机混合采摘 1 份样品，即进行 3 次生物学重复，采摘下的样品用液氮处理后于-80 ℃超低温

冰箱预冷，随后真空冷冻干燥固样。

生化成分检测方法采用紫外吸光光度法，干物质含量测定参照 GB/T 8303—2013；游离氨基酸总量测定参照 GB/T 8314—2013；咖啡碱含量测定参照 GB/T 8312—2013；茶多酚含量测定参照 GB/T 8313—2018。每份样品均进行 3 次技术重复。

1.4 数据处理

根据田间统计结果及质量性状的赋值标准将质量性状数值化，使用 Excel 2019 整理并计算表型性状的分布频率、Shannon-weaver 多样性指数、标准差、变异系数、平均值等；使用数据处理软件 IBM SPSS Statistics 26 进行主成分分析（PCA）及欧式遗传距离（Euclidean distance）的计算；基于 IBM SPSS Statistics 26 计算得出的欧式遗传距离矩阵，利用 MEGA 7 采用非加权组平均法(UPGMA)对供试材料进行聚类分析。其中变异系数 $CV=SD/MN\times 100\%$ ，SD 为标准差，MN 为平均值；Shannon-weaver 指数 $H'=-\sum P_i \ln P_i$ ，其中 P_i 为该性状第 i 个描述值出现的频率；数值型性状经质量化处理后计算 Shannon-weaver 多样性指数，参照郭荣华等^[15]的数值型性状质量化处理方法将每一性状的观测值赋予不同的等级。使用 SPSS Statistics 26 进行数据处理，使用 TB tools 绘制热图（Heat map）。

表 1 供试材料的名称及原产地
Table 1 Name and origin of samples used in this study

编号 No.	种质名称 Germplasm name	原产地 Origin	编号 No.	种质名称 Germplasm name	原产地 Origin	编号 No.	种质名称 Germplasm name	原产地 Origin
1	石阡苔茶	贵州	12	南山白毛茶	广西	23	信阳种	河南
2	宜春群体种	江西	13	修水群体种	江西	24	黄山种	安徽
3	鸠坑种	浙江	14	永修群体种	江西	25	十里香	云南
4	都匀毛尖	贵州	15	遂川群体种	江西	26	鸟王茶	贵州
5	竹山大黑叶	湖北	16	黎家坪群体种	湖北	27	祁门种	安徽
6	江华苦茶	湖南	17	浮梁种	江西	28	紫阳种	陕西
7	城步峒茶	湖南	18	冯家台群体种	湖北	29	勐库大叶茶	云南
8	坦洋菜茶	福建	19	宜昌大叶茶	湖北	30	罗坑群体种	广东
9	上犹群体种	江西	20	汝城白毛茶	湖南	31	六堡茶	广西
10	龙井种	浙江	21	云台山种	湖南	32	凤庆大叶茶	云南
11	婺源种	江西	22	牙己茶	广西			

表 2 新梢和叶片的质量性状描述代码及数量性状统计方法

Table 2 Description code of quality character and statistical methods for quantitative character of new shoots and leaves

器官	性状	测定方法和赋值标准
Organ	Character	Determination method and assignment standard
新梢	芽叶色泽	1. 玉白色, 2. 黄绿色, 3. 淡绿色, 4. 绿色, 5. 紫绿色
	芽叶茸毛	1. 无 2. 少, 3. 中 4. 多, 5. 特多
成熟叶片	着生状态	1. 上斜, 2. 稍上斜, 3. 水平, 4. 下垂
	叶色	1. 黄绿色, 2. 浅绿色, 3. 绿色, 4. 深绿色
	叶面	1. 平, 2. 微隆起, 3. 隆起
	叶身	1. 内折, 2. 平, 3. 稍背卷
	叶缘	1. 平, 2. 微波, 3. 波
	叶尖	1. 急尖, 2. 渐尖, 3. 钝尖, 4. 圆尖
	叶齿锐度	1. 锐, 2. 中, 3. 钝
	叶质	1. 柔软, 2. 中, 3. 硬
	叶形	1. 近圆形, 2. 卵形, 3. 椭圆形, 4. 长椭圆形, 5. 披针形
	叶片大小	1. 小叶, 2. 中叶, 3. 大叶, 4. 特大叶
	叶长	直尺测量, 精确到 0.1 cm
	叶宽	直尺测量, 精确到 0.1 cm
	长宽比	叶长/叶宽
	叶面积	叶长 (cm) × 叶宽 (cm) × 0.7

2 结果与分析

2.1 茶树叶片表型性状的遗传多样性分析

2.1.1 茶树叶片形态学性状的遗传多样性分析

基于供试茶树表型性状观测结果,对描述型性状分布频率及遗传多样性指数进行统计,结果如表 3 所示。12 个描述型性状中遗传多样性最小的是叶缘 (0.81), 最大的是芽叶色泽 (1.27)。根据多样性指数从高到低排序, 依次是芽叶色泽>叶片着生状态>叶形>叶色>叶质>叶身>叶齿>芽叶茸毛>叶面>叶尖>叶片大小>叶缘。供试群体的芽叶色泽以淡绿色为主, 占比 42.44%; 大多数植株芽叶茸毛数量表现为中等, 占比 55.95%; 成熟叶片着生状态以水平着生为主, 占 44.69%, 其次是稍上斜着生, 占 27.97%, 下垂着生占比最少, 为 8.68%; 叶色大多表现为绿色及深绿色, 分别占比 58.84%和 23.15%; 叶面主要表现为平和微隆起, 分别占比 47.59%和 44.70%; 叶身以平为主, 占比 54.02%; 叶缘微波占比最高, 为 63.67%, 平其次, 占 30.87%; 叶尖主要表现为渐尖, 占比 67.85%; 叶齿锐度多表现为

中等锐度, 占 54.98%; 叶质中等硬度的占比最高, 为 51.77%; 叶形以椭圆形居多, 占 52.09%, 其次是长椭圆形, 占 28.62%; 叶片大小以中、小叶为主, 其中小叶占比 62.06%, 中叶占比 31.51%。

对供试茶树数值型性状的遗传多样性进行统计, 结果见表 4。从整体来看, 供试茶树的数量性状表现出丰富的多样性: 供试材料叶长范围为 4.00~18.00 cm, 平均为 8.12 cm; 叶宽的变化范围为 1.70~8.60 cm, 平均为 3.42 cm; 长宽比最小值为 0.93, 最大值为 4.00, 平均值为 2.41; 叶面积指数从 5.60 cm² 到 73.71 cm² 不等, 平均值为 20.48 cm²。供试植株各数量性状遗传多样性指数范围为 1.77~1.94, 皆高于质量性状。变异系数以叶面积 (53.33%) 最大, 其次是叶宽 (26.71%), 再次为叶长 (26.12%), 叶片长宽比的变异系数最小, 为 17.09%。

2.1.2 茶树叶片形态学性状的主成分分析

对供试茶树的表型性状进行主成分分析, 得到各主成分特征值变化折线图 (图 1)。其中横坐标显示的是 16 个主成分, 纵坐标显示

表 3 描述型表型性状的分布频率和多样性指数

Table 3 Distribution frequency and Shannon-weaver index of non-numerical character

性状 Character	描述代码 Description code					Shannon-weaver 指数 H'
	1	2	3	4	5	
芽叶色泽 Young shoot colour	0.00	27.97	42.44	18.97	10.61	1.27
芽叶茸毛 Young shoot pubescence	0.00	26.69	55.95	17.36	0.00	0.98
着生状态 Leaf attitude	18.65	27.97	44.69	8.68	—	1.24
叶色 Leaf colour	2.57	15.43	58.84	23.15	—	1.03
叶面 Leaf upper surface	47.59	44.70	7.72	—	—	0.91
叶身 Leaf cross section	27.33	54.02	18.65	—	—	1.00
叶缘 Leaf margin undulation	30.87	63.67	5.47	—	—	0.81
叶尖 Leaf apex shape	14.79	67.85	16.08	1.29	—	0.90
叶齿 Leaf serration	17.04	54.98	27.97	—	—	0.99
叶质 Leaf texture	29.58	51.77	18.65	—	—	1.01
叶形 Leaf shape	10.93	1.29	52.09	28.62	7.07	1.18
叶片大小 Leaf size	62.06	31.51	5.79	0.64	—	0.86

的是各主成分对应的特征值，由图可知前 6 个主成分都包含较大的特征值（特征值>1）、折线较为陡峭，第 7 个主成分之后折线趋于平缓，说明前 6 个主成分包含的信息量大。对各主成分的特征值、贡献率、累计贡献率进行统计（表 5），结果表明前 6 个主成分的累计贡献率达 71.78%，能较好地概括 16 个表型性状的大部分信息。其中第一主成分贡献率为 25.49%，主要受叶长、叶宽、叶面积和叶片大小的影响，载荷值分别为 0.87、0.93、0.96 和 0.91，表现为高度正相关，其中占主导地位的是叶面积；第二主成分主要受到长宽比和叶形的影响，载荷值为 0.83 和 0.88，贡献率为 13.16%，其中占主导地位的是叶形；第三主成分贡献率为 10.21%，与叶色、叶面、叶身、叶缘、叶质呈正相关，载荷值分别为 0.47、0.55、0.52、0.44、0.48，与叶齿呈负相关，载荷值为-0.43，其中占主导地位的是叶面及叶身；第四主成分与芽叶茸毛高度正相关，载荷值为 0.79，与叶缘高度负相关，载荷值为 -0.60，贡献率为 9.04%；第五主成分主要受叶面的影响，载荷值为 0.60，贡献率为 7.05%；第六主成分主要受叶尖性状的影响，载荷值为 0.51，贡献率为 6.83%。综合来看，叶面积、叶形、叶面、芽叶茸毛、叶尖、叶身这 6 个表型性

状可以反映出 16 个表型性状 71.78%的信息，是造成供试茶树群体表型差异的主要因素。

2.1.3 茶树叶片形态学性状的种质聚类分析

根据供试材料的 16 个表型性状信息，采用非加权平均法（UPMGA）基于欧式遗传距离对 32 份茶树群体种质进行聚类分析(图 2)。聚类分析结果表明，供试茶树种质被划分为 4 个类群。类群 I 包括 2 个亚群，亚群 a 包含龙井种等 9 个群体种，亚群 b 包括石阡苔茶等 6 个群体种。其主要特征是叶片以中小叶为主、叶质中等、叶缘微波、叶身内折、芽叶茸毛少、芽叶色泽绿。类群 II 包括黄山种等 8 个群体种，其主要特征是叶片以中小叶为主、芽叶色泽黄绿及淡绿、芽叶茸毛多、叶缘平、叶形椭圆形。类群 III 包括黎家坪群体种等 7 个群体种，其主要特征是叶片以小叶为主、芽叶茸毛中等、叶片着生状态上斜及稍上斜、叶色绿色、叶质中等偏硬。类群 IV 包括勐库大叶茶和凤庆大叶茶，主要特征是大叶种、叶质柔软、叶齿较钝、叶面微隆起、叶色淡绿色、芽叶茸毛中等。

2.2 茶树种质主要生化成分的遗传多样性分析

2.2.1 主要生化成分含量遗传多样性分布

春季样品测定结果显示（图 3），供试茶

树种质的游离氨基酸含量范围为 34~49 mg·g⁻¹ (干重), 其中氨基酸含量在 37~40 mg·g⁻¹ 的茶树材料有 15 份 (占比 46.88%), 游离氨基酸含量在 >40~43 mg·g⁻¹ 的茶树材料有 8 份 (占比 25.00%); 供试茶树材料的咖啡碱含量在 20~45 mg·g⁻¹, 其中 12 份茶树材料咖啡碱

含量在 30~35 mg·g⁻¹ (占比 37.50%), 9 份茶树材料咖啡碱含量在 >35~40 mg·g⁻¹ (占比 28.13%); 供试茶树材料的茶多酚含量位于 212~352 mg·g⁻¹, 其中 19 份茶树材料的茶多酚含量在 268~296 mg·g⁻¹ (占比 59.38%)。

表 4 数值型表型性状的变异情况和分布特征

Table 4 The variation and distribution of numerical character of tea germplasm

编号 No.	种质名称 Germplasm name	叶长 Leaf length/cm	叶宽 Leaf width/cm	长宽比 Leaf aspect ratio	叶面积 Leaf area/cm ²
1	石阡苔茶	8.10±1.22	3.18±0.34	2.55±0.27	18.22±4.35
2	宜春群体种	9.24±0.85	3.88±0.61	2.44±0.37	25.32±5.88
3	鸠坑种	8.89±1.02	3.51±0.59	2.58±0.45	22.09±5.74
4	都匀毛尖	7.80±1.02	3.57±0.77	2.24±0.39	19.73±6.21
5	竹山大黑叶	6.96±0.77	3.02±0.34	2.32±0.22	14.82±2.79
6	江华苦茶	8.11±1.12	3.44±0.26	2.37±0.38	19.50±2.91
7	城步峒茶	8.18±1.51	3.38±0.72	2.44±0.19	19.99±7.63
8	坦洋菜茶	9.22±1.75	3.60±0.58	2.57±0.32	23.70±7.57
9	上犹群体种	7.16±1.21	3.49±1.89	2.33±0.77	18.03±11.5
10	龙井种	6.95±1.64	2.85±0.58	2.49±0.67	14.14±5.29
11	婺源种	6.94±1.20	2.90±0.57	2.42±0.34	14.41±5.19
12	南山白毛茶	6.66±1.61	2.72±0.62	2.47±0.37	13.22±5.81
13	修水群体种	8.22±1.84	3.33±0.74	2.48±0.34	19.86±7.96
14	永修群体种	6.61±1.34	2.69±0.68	2.50±0.43	12.86±5.26
15	遂川群体种	7.50±1.70	3.11±0.33	2.40±0.38	16.61±5.78
16	黎家坪群体种	9.39±2.89	3.60±1.12	2.68±0.62	25.35±15.72
17	浮梁种	6.66±0.95	2.80±0.44	2.40±0.34	13.21±3.51
18	冯家台群体种	6.06±1.70	2.44±0.62	2.51±0.42	10.88±6.04
19	宜昌大叶茶	6.75±0.85	2.75±0.53	2.52±0.51	13.10±3.43
20	汝城白毛茶	7.97±1.87	3.45±0.81	2.33±0.38	19.93±8.60
21	云台山种	8.43±1.32	3.44±0.74	2.49±0.27	20.82±7.30
22	牙己茶	8.08±1.58	3.64±0.65	2.22±0.19	21.18±7.53
23	信阳种	8.44±1.06	3.52±0.46	2.37±0.35	21.04±4.96
24	黄山种	7.09±1.23	3.37±0.47	2.11±0.30	16.93±4.73
25	十里香	7.83±1.39	3.40±0.45	2.28±0.67	18.92±4.89
26	鸟王茶	9.19±1.14	4.16±1.01	2.28±0.38	27.28±9.32
27	祁门种	7.22±0.87	3.06±0.30	2.36±0.22	15.57±2.99
28	紫阳种	7.97±1.08	3.64±0.46	2.19±0.16	20.57±5.10
29	勐库大叶茶	12.67±1.36	5.13±0.77	2.49±0.24	46.01±10.63
30	罗坑群体种	6.08±0.92	2.67±0.49	2.34±0.44	11.62±3.75
31	六堡茶	9.91±3.62	3.81±0.63	2.56±0.57	27.58±14.69
32	凤庆大叶茶	12.51±2.27	5.26±1.07	2.43±0.44	46.88±15.88
最小值 Minimum value		4.00 cm	1.70 cm	0.93	5.60 cm ²
最大值 Maximum value		18.00 cm	8.60 cm	4.00	73.71 cm ²
平均值 Mean value		8.12 cm	3.42 cm	2.41	20.48 cm ²
标准差 Standard deviation		2.12 cm	0.91 cm	0.41	10.92 cm ²
变异系数 Coefficient of variation/%		26.12	26.71	17.09	53.33
Shannon-weaver 多样性指数		1.90	1.89	1.94	1.77
Shannon-weaver diversity index					

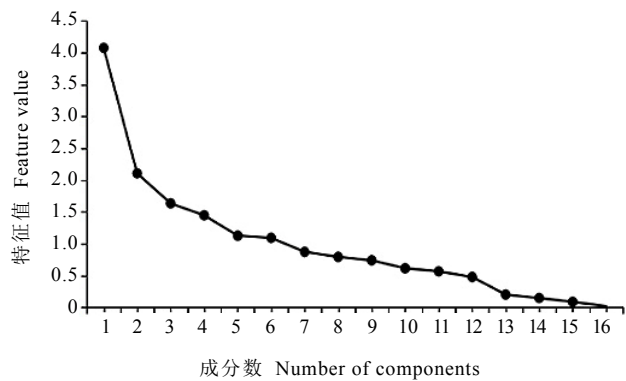


图 1 主成分特征值变化折线图

Fig. 1 Line chart of principal component feature value changes

表 5 基于 16 个表型性状的茶树群体种质主成分分析

Table 5 Principal component analysis of tea germplasm based on 16 phenotypic characters

性状 Character	主成分分析 Principal components analysis					
	1	2	3	4	5	6
芽叶色泽 Young shoot colour	-0.02	0.24	-0.20	-0.21	0.29	-0.68
芽叶茸毛 Young shoot pubescence	0.15	-0.15	0.06	0.79	-0.06	0.04
着生状态 Leaf attitude	0.38	-0.23	-0.25	-0.41	-0.08	0.35
叶色 Leaf colour	-0.43	0.09	0.47	0.34	-0.34	-0.21
叶面 Leaf upper surface	0.07	-0.01	0.55	0.03	0.60	0.10
叶身 Leaf cross section	-0.06	-0.20	0.52	0.15	0.43	-0.04
叶缘 Leaf margin undulation	-0.12	0.24	0.44	-0.60	0.11	-0.01
叶尖 Leaf apex shape	-0.18	-0.42	-0.15	0.02	0.28	0.51
叶齿 Leaf serration	0.32	-0.10	-0.43	0.06	0.16	-0.25
叶质 Leaf texture	-0.33	0.03	0.48	-0.27	-0.48	0.09
叶长 Leaf length	0.87	0.38	0.11	0.05	-0.08	0.07
叶宽 Leaf width	0.93	-0.13	0.19	-0.02	-0.06	-0.03
长宽比 Leaf aspect ratio	-0.24	0.83	-0.14	0.14	0.12	0.26
叶形 Leaf shape	-0.15	0.88	-0.11	0.11	0.10	0.24
叶面积 Leaf area	0.96	0.14	0.14	0.02	-0.05	0.02
叶片大小 Leaf size	0.91	0.14	0.15	0.02	-0.05	0.01
特征值 Feature value	4.08	2.12	1.63	1.45	1.13	1.09
贡献率 Contributing rate/%	25.49	13.16	10.21	9.04	7.05	6.83
累计贡献率 Cumulative contribution rate/%	25.49	38.65	48.86	57.91	64.95	71.78

2.2.2 主要生化成分含量遗传多样性分析

对 32 份茶树地方群体种资源的两年生化成分含量进行测定、统计，供试材料表现出丰富的遗传多样性，结果见表 6。从整体上看，春季，供试材料的游离氨基酸含量平均值为 32.28 mg·g⁻¹（干重），变异系数为 5.78%，其中鸟王茶含量最低（27.12 mg·g⁻¹），宜春群体

种含量最高（36.48 mg·g⁻¹）；咖啡碱含量平均值为 21.54 mg·g⁻¹，变异系数为 18.63%，变化范围 12.29~31.19 mg·g⁻¹，含量最低的是鸟王茶，含量最高的是遂川群体种；茶多酚含量平均值为 200.40 mg·g⁻¹，变异系数为 13.61%，含量最低的是宜春群体种（153.71 mg·g⁻¹），含量最高的是江华苦茶（277.07 mg·g⁻¹）。2020

年夏季供试材料的游离氨基酸含量平均值为 $40.52 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 变异系数为 7.52%, 竹山大黑叶含量最低 ($36.49 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), 十里香含量最高, 为 $46.90 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$; 咖啡碱含量平均值为 $33.81 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 变异系数为 14.55%, 凤庆大叶

茶含量最低 ($22.70 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), 遂川群体种含量最高, 为 $42.11 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$; 茶多酚含量平均值为 $282.00 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 变异系数为 8.11%, 变化范围为 $214.18 \sim 349.93 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 龙井种含量最低, 江华苦茶含量最高。

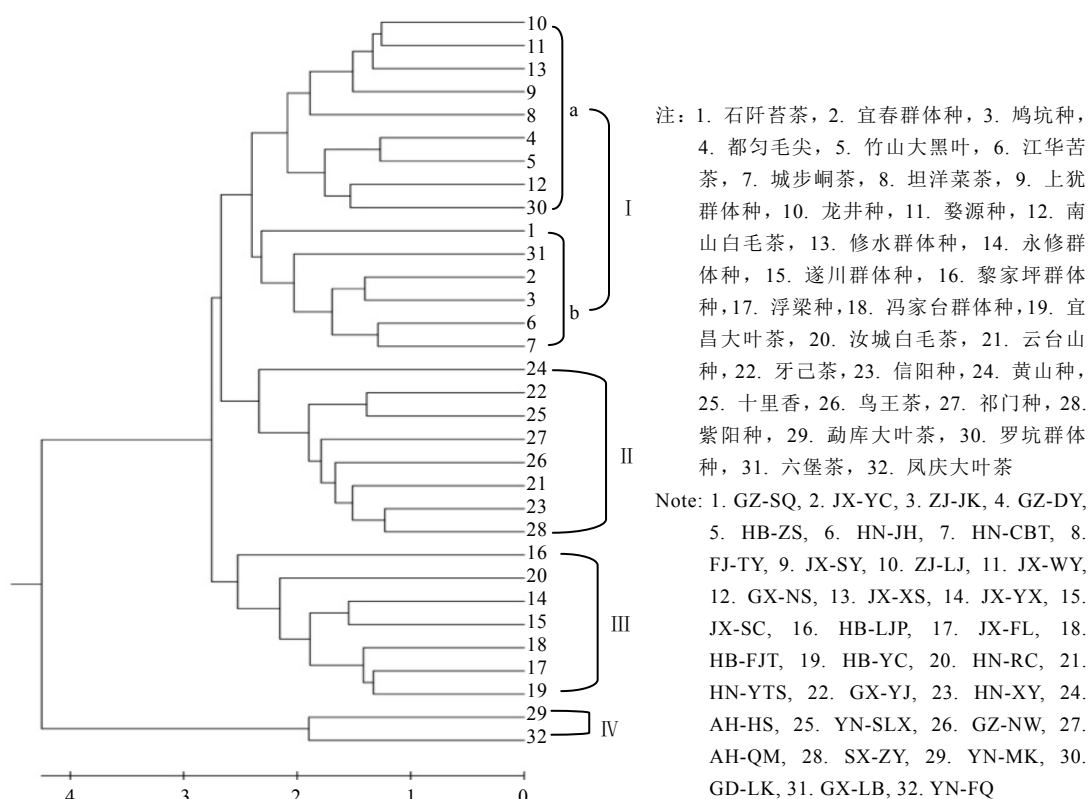


图 2 基于表型性状变异的聚类分析

Fig. 2 Cluster analysis based on phenotypic character

综合两季生化成分含量的测定结果对含量特异的茶树种质材料进行挖掘, 结果表明, 春季样品中宜春群体种的茶多酚含量最低, 夏季样品中其茶多酚含量亦低于大部分群体种; 江华苦茶在春、夏两季中咖啡碱和茶多酚含量都较高; 龙井种的茶多酚含量在春、夏两季中皆相对较低; 遂川群体种春、夏两季咖啡碱含量皆为最高; 黎家坪群体种多酚含量相对较高, 且游离氨基酸含量在春季样品中最高, 在

夏季样品中亦相对较高; 十里香游离氨基酸含量在夏季样品中最高, 春季亦较高; 鸟王茶在两季节的氨基酸和咖啡碱含量均极低; 罗坑群体种在两季节中的氨基酸含量均极高; 凤庆大叶茶在两季中的咖啡碱含量均极低。

2.2.3 茶树种质主要生化成分的聚类分析

使用 TB tools 对夏季茶树地方群体种资源的生化成分含量数据进行归一化处理后, 基于欧式遗传距离采用最长距离法 (Complete)

聚类并绘制热图, 结果如图 4 所示, 供试茶树群体种被划分为 3 个类群。类群 I 包含遂川群体种等 9 个群体种, 其主要特征是氨基酸含量中等偏低, 咖啡碱含量较高。类群 II 包含 3 个亚群, 亚群 a 包括江华苦茶、城步峒茶、黎家坪群体种和祁门种, 其主要特征是咖啡碱和茶多酚含量较高, 氨基酸含量中等, 其中江华苦茶具有极高的茶多酚含量; 亚群 b 包括石阡苔茶等 6 个群体种, 其主要特征是氨基酸含量较低, 咖啡碱和茶多酚含量居中; 亚群 c 包括鸟王茶、宜昌大叶茶、云台山种和紫阳种, 其主要特征是氨基酸含量偏低, 咖啡碱和茶多酚含量低。类群 III 包含凤庆大叶茶等 9 个群体种, 除龙井种外氨基酸含量皆高于其他群体种, 凤庆大叶种的咖啡碱含量在供试群体中最低。

从供试种质资源来源省份的地理分布范围来看 (表 7), 来自同一辖区内的茶树种质资源多聚为一类, 江西省有 5 份供试茶树群体

种聚在一起, 来自湖南、湖北、安徽的全部种质聚在类群 II 中, 来自云南、广西的全部种质聚在类群 III 中。贵州省和江西省茶树种质资源表现出丰富的多样性, 分别属于两种及以上类群: 贵州省 (I、II)、江西省 (I、II、III)。

3 讨论

3.1 茶树叶片表型性状的遗传多样性分析

表型性状是区分不同群体种茶树的重要依据^[16], 本研究对 32 份供试茶树种质资源的表型性状进行遗传多样性分析, 16 个表型性状的 Shannon-weaver 遗传多样性指数变化范围为 0.81~1.94。其中 12 个描述型性状的遗传多样性指数最小值为 0.81, 最大值为 1.27, 远高于前人关于鸠坑茶树资源及贵州古茶树芽叶质量性状调查所得的遗传多样性指数^[17-18], 说明供试材料表型性状变异较为丰富。整体

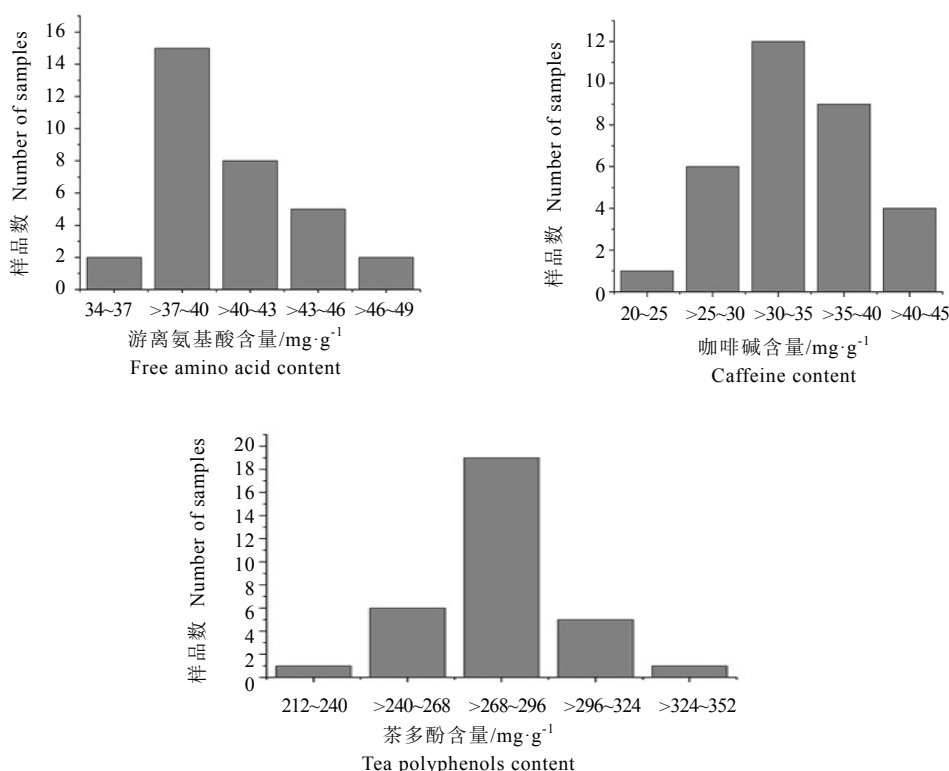


图 3 夏季样品主要生化成分含量分布图

Fig. 3 The content distribution map of main biochemical components in summer samples

表 6 32 份种质资源主要生化成分含量

Table 6 The content of main biochemical components in 32 germplasm resources

编号 No.	种质名称 Germplasm name	2019 年春季 2019 year spring/mg·g ⁻¹			2020 年夏季 2020 year summer/mg·g ⁻¹		
		游离氨基酸	咖啡碱	茶多酚	游离氨基酸	咖啡碱	茶多酚
1	石阡苔茶	29.43±0.48	19.42±2.64	210.09±13.57	36.93±0.87	36.06±1.04	293.49±12.38
2	宜春群体种	36.48±0.54	26.46±3.46	153.71±4.42	39.56±2.45	41.19±1.78	269.51±7.80
3	鸠坑种	33.78±0.27	25.76±0.27	211.27±0.34	40.28±1.24	40.57±3.84	269.39±24.06
4	都匀毛尖	31.02±15.55	19.43±5.91	184.91±58.78	37.32±1.74	39.89±3.26	255.43±17.22
5	竹山大黑叶	30.74±15.38	20.24±6.05	178.26±56.57	36.49±3.20	33.01±1.64	278.11±22.64
6	江华苦茶	32.34±0.26	29.77±0.65	277.07±2.18	41.28±0.58	36.20±3.97	349.93±11.77
7	城步峒茶	32.21±16.71	20.62±7.05	205.61±66.31	41.14±2.44	37.02±3.07	284.65±6.48
8	坦洋菜茶	32.24±1.19	21.41±4.98	184.41±15.31	39.24±2.19	37.81±2.43	270.21±4.27
9	上犹群体种	33.17±3.41	24.69±2.24	232.18±0.55	44.09±2.51	29.31±5.82	300.97±37.86
10	龙井种	32.02±0.77	20.88±1.65	174.77±6.35	38.38±2.16	27.33±5.35	214.18±20.92
11	婺源种	35.03±2.60	21.07±0.34	197.76±4.75	38.45±2.50	38.31±1.37	300.32±6.01
12	南山白毛茶	33.37±2.25	16.30±1.13	198.96±11.27	45.10±3.30	31.40±4.39	282.69±11.64
13	修水群体种	32.36±2.35	23.15±2.79	208.96±30.12	38.30±0.89	37.99±1.74	292.61±34.96
14	永修群体种	30.60±1.41	22.54±4.15	169.36±35.08	37.29±0.57	34.72±2.95	278.14±5.76
15	遂川群体种	33.39±1.82	31.19±1.58	189.72±10.58	38.17±1.56	42.11±1.33	286.58±10.42
16	黎家坪群体种	35.47±17.79	20.82±6.36	241.79±79.61	40.86±2.52	32.44±2.47	316.18±13.02
17	浮梁种	31.61±0.13	19.61±1.30	170.68±7.31	39.09±2.64	39.79±2.03	294.64±9.86
18	冯家台群体种	32.21±16.18	20.90±4.24	175.25±24.24	38.41±1.63	34.45±3.31	303.68±25.74
19	宜昌大叶茶	31.24±15.63	23.73±7.01	194.53±62.04	39.36±2.43	32.37±0.98	264.55±6.46
20	汝城白毛茶	31.70±1.53	25.25±3.42	218.40±53.44	38.30±1.17	30.34±0.64	290.90±11.32
21	云台山种	31.86±2.08	19.46±0.33	219.07±8.98	40.15±1.60	28.80±4.14	268.08±27.56
22	牙己茶	32.78±4.19	20.46±5.31	185.78±18.55	42.54±4.42	32.48±2.99	294.65±20.99
23	信阳种	29.48±0.62	20.60±1.89	167.38±1.23	39.05±1.12	40.87±0.66	259.28±11.49
24	黄山种	31.09±1.07	19.29±3.75	180.71±28.32	37.88±0.94	31.68±3.57	284.04±8.89
25	十里香	32.28±1.32	18.89±0.58	204.49±14.06	46.90±4.25	30.84±3.21	293.23±7.54
26	鸟王茶	27.12±0.23	12.29±1.18	179.54±2.16	38.08±1.60	26.79±2.96	297.18±15.91
27	祁门种	31.91±2.57	22.88±1.97	214.24±10.32	40.48±2.13	31.88±2.80	293.14±11.86
28	紫阳种	33.28±1.23	26.28±0.40	195.60±7.33	40.77±1.51	28.59±3.42	262.75±21.58
29	勐库大叶茶	33.40±0.84	25.51±1.21	259.13±6.28	46.33±0.96	36.41±2.15	279.65±9.29
30	罗坑群体种	34.76±0.65	16.36±1.10	185.37±4.47	45.12±6.08	27.69±2.19	272.89±32.55
31	六堡茶	34.01±0.86	19.17±2.60	216.64±5.15	45.47±2.52	30.75±5.23	263.79±15.54
32	凤庆大叶茶	30.71±5.04	14.92±2.77	227.26±4.47	45.93±2.00	22.70±2.37	258.98±14.73
最小值 Minimum value/mg·g ⁻¹		27.12	12.29	153.71	36.49	22.70	214.18
最大值 Maximum value/mg·g ⁻¹		36.48	31.19	277.07	46.90	42.11	349.93
平均值 Mean value/mg·g ⁻¹		32.28	21.54	200.40	40.52	33.81	282.00
标准差 Standard deviation/mg·g ⁻¹		1.87	4.01	27.28	3.05	4.92	22.88
变异系数 Coefficient of variation/%		5.78	18.63	13.61	7.52	14.55	8.11

看, 供试茶树种质的芽叶色泽以淡绿色为主, 芽叶茸毛数量表现为中等, 成熟叶片着生状态以水平为主, 叶色大多表现为绿色, 叶面主要表现为平, 叶身以平为主, 叶缘大多表现为微波, 叶尖主要表现为渐尖, 叶齿锐度多表现为中等锐度, 叶质主要表现为中等硬度, 叶形以

椭圆形和长椭圆形为主, 叶片大小以中小叶为主, 其中小叶占比较多, 与周炎花^[19]关于国内茶树品种芽叶表型的调查结果较为一致。

不同种质表型性状主成分分析也可作为种质评价的一种手段, 目前已被广泛用于杨梅、猕猴桃、柑橘、苹果等种质资源的评价工

作中^[20-25], 通过计算不同种质的综合得分, 可以实现对优异种质资源的快速便捷筛选。茶树 16 个表型性状的主成分分析及聚类分析结果表明, 叶面积、叶形、叶面、芽叶茸毛、叶尖、叶身这 6 个表型性状是造成供试茶树群体表型差异的主要因素; 供试茶树除类群 IV 表现为大叶种外, 其余 3 个类群皆表现为中、小叶种, 其中类群 III 叶片偏小; 类群 II 叶形以椭圆形为主, 其余类群叶形多在椭圆、长椭圆间变异; 类群 IV 叶面多表现为隆起, 类群 I 中亚群 b 多表现为平; 芽叶茸毛以类群 I 中亚群 b 最多, 类群 I 中亚群 a 最少; 类群 IV 尖多表现为急尖和渐尖, 其他类群多表现为渐尖; 类群 III 叶身

包含平和稍背卷两大类型, 类群 I 和类群 IV 叶身多表现为内折、平。主成分分析筛选得到的 6 个性状基本上可以将聚类分析划分的四大类型区分开, 且亲缘关系近、地域位置近的材料大多聚在一起。林子翔^[26]对观赏辣椒种质进行了主成分分析, 挖掘了影响观赏辣椒价值的主要农艺性状, 并在此基础上进行聚类分析, 39 份供试材料被划分为 3 个类型, 各类型之间特征显著、且差异较大, 与本研究结果相似。本研究主成分分析中第四主成分与芽叶茸毛高度正相关 (载荷值为 0.79), 与叶缘高度负相关 (载荷值为 -0.6), 推测叶缘与芽叶茸毛存在相关性。

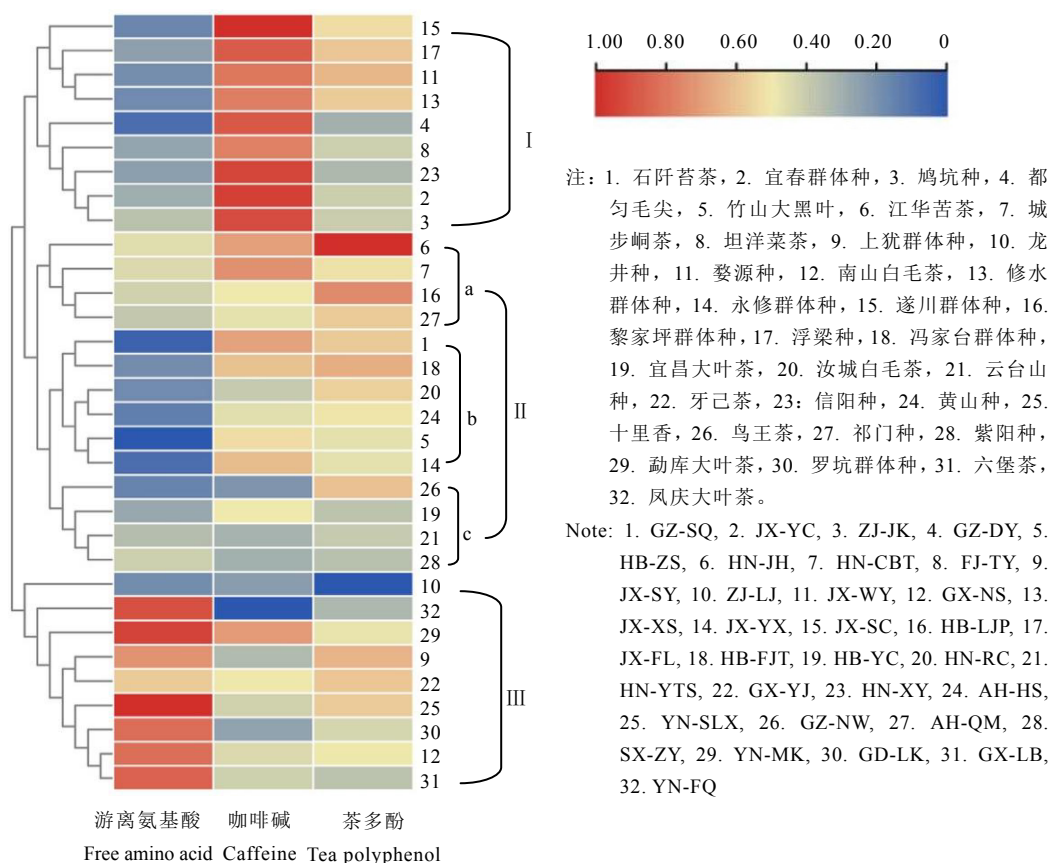


图 4 基于主要生化成分含量的聚类分析

Fig. 4 Cluster analysis based on the contents of main biochemical components

表 7 基于主要生化成分含量的 32 份茶树群体种资源
聚类族群

Table 7 Cluster groups of 32 tea population resources
based on the contents of main biochemical components

族群	编号	品质名称	原产地
Cluster	No.	Cultivar name	Origin
I	15	遂川群体种	江西
	17	浮梁种	江西
	11	婺源种	江西
	13	修水群体种	江西
	4	都匀毛尖	贵州
	8	坦洋菜茶	福建
	23	信阳种	河南
	2	宜春群体种	江西
	3	鸠坑种	浙江
II	6	江华苦茶	湖南
	7	城步峒茶	湖南
	16	黎家坪群体种	湖北
	27	祁门种	安徽
	1	石阡苔茶	贵州
	18	冯家台群体种	湖北
	20	汝城白毛茶	湖南
	24	黄山种	安徽
	5	竹山大黑叶	湖北
	14	永修群体种	江西
	26	乌王茶	贵州
	19	宜昌大叶茶	湖北
	21	云台山种	湖南
	28	紫阳种	陕西
III	10	龙井种	浙江
	32	凤庆大叶茶	云南
	29	勐库大叶茶	云南
	9	上犹群体种	江西
	22	牙己茶	广西
	25	十里香	云南
	30	罗坑群体种	广东
	12	南山白毛茶	广西
	31	六堡茶	广西

3.2 茶树种质主要生化成分的遗传多样性分析

两年供试样品生化成分测定结果表明,供试茶树种质资源的游离氨基酸、茶多酚、咖啡碱含量总体上符合正态分布,且表现出丰富的遗传多样性,供试样品咖啡碱含量的变异系数(17.95%和 14.55%)最大,其次为茶多酚含量的变异系数(13.61%和 8.11%),再次为游离氨基酸的变异系数(5.62%和 7.52%),说明

供试样品中资源类型丰富,可为选育生化成分含量特异(如低咖啡碱含量、低茶多酚含量等)的优良茶树单株提供参考。在立地条件和栽培管理措施基本一致的情况下,供试材料咖啡碱含量的差异较大,这与宁功伟等^[27]、董方等^[28]、丁帅涛等^[29]的研究结果相似,推测原因可能是不同茶树品种间遗传背景差异所导致。咖啡碱合成通路中 *N*-甲基转移酶基因(*NMT*)^[30]、咖啡碱合成酶基因(*CsTCSI*)^[31]等关键酶基因及 *CsMYB184*^[32]、*CsNAC7*^[33]等转录因子的表达水平均会影响茶类植物中咖啡碱的含量。Jin 等^[34]研究表明,低咖啡碱茶树品种中存在两种控制咖啡碱生物合成的分子机制,即低转录水平的 *TCSI* 等位基因或其编码的仅具有可可碱合成酶活性的蛋白质。除此之外,植物体内的生物碱与其抗逆性有关,具有抵御病害、应对环境胁迫等生理作用,咖啡碱作为茶树体内最主要的生物碱,其含量的差异与不同品种间抗逆性的联系有待进一步研究。综合测定两年的生化含量,结果发现,生化成分含量特异的地方群体种资源有 9 份:宜春群体种(低茶多酚含量)、江华苦茶(高咖啡碱和茶多酚含量)、龙井种(低茶多酚含量)、遂川群体种(高咖啡碱含量)、黎家坪群体种(高茶多酚含量、高氨基酸含量)、十里香(高氨基酸含量)、乌王茶(低咖啡碱含量)、罗坑群体种(高氨基酸含量)、凤庆大叶茶(低咖啡碱含量),其中凤庆大叶茶咖啡碱含量极低,且两年测定结果一致,可以作为筛选低咖啡碱含量种质或研究茶树品种苦味改良的育种材料^[35]。目前针对特定人群的低咖啡碱产品开发取得了快速进展,但大多数脱咖啡碱工艺会影响产品的风味且增加了额外的加工成本,因此选育低咖啡碱茶树品种具有广阔发展前景^[36]。蒋会兵等^[37]通过对云南省内 51 份茶树地方品种进行生化成分测定,筛选出包括凤庆大叶茶在内的 4 份具有较低咖啡碱含量的茶树地方群体种资源,以及昆明十里香在内的适制绿茶的群体种,与本研究结果一致。对 32 份供试茶树群

体种的生化成分含量测定结果进行聚类分析, 供试茶树群体被划分为 3 类, 分别包含不同类型的种质资源: 类群 I 的主要特征是咖啡碱含量较高; 类群 II 中亚群 c 主要表现为较低的咖啡碱和茶多酚含量; 类群 III 包含具有较高氨基酸含量、较低咖啡碱含量的种质资源。茶树群体种变异类型多但自然变异具有不确定性, 对各群体种基于生化成分含量划分类群, 了解群体种的共性, 可为育种材料及相关代谢研究的材料选择、核心种质的筛选提供科学依据。

从各类型茶树种质资源地理分布范围来看, 不同类型的茶树种质资源分布具有明显的地域差异: 类群 III 除龙井种外主要分布在广东、广西、云南等茶区, 这些茶区位于中国西南及南方; 而其他省份种质资源除上犹群体种外皆属于类群 I、类群 II。其中来自贵州省、江西省的供试茶树群体种分布于多个类群, 说明这些地区包含的茶树群体种质资源丰富。姚明哲^[38]、陈勋等^[39]基于 SSR 分子标记技术对茶树种质进行遗传多样性进行了研究, 结果亦表明, 江西省、贵州省的茶树种质在中国各省份茶树种质资源中表现出中度偏高的遗传多样性水平。另外, 随着无性系品种的推广、引进, 大多栽植地方群体种的茶园被改植换代, 群体种质遭到破坏, 若不及时加以保护, 会导致物种基因多样性降低、大量种质类型丢失^[40]。中国西南地区作为茶树起源的中心地带, 江西省作为茶树传播、演化的中间地带, 含有丰富的茶树群体种质资源^[41], 应重点开展这些地区茶树地方群体种表型性状、生化性状、遗传背景、群体结构研究工作, 推进茶树群体种质的发掘与保护, 加快核心种质库的建立, 为茶树遗传育种提供更多宝贵的种质材料^[42]。

3.3 基于表型与生化成分两种聚类结果的比较

利用聚类分析对茶树品种资源进行分类能够快捷、准确地得出资源间的相似性并展现出品种的综合性状, 被灵活运用于育种工作的亲本选配环节。本研究基于表型性状与主要生化成分分别对 32 份供试材料进行聚类分析,

不同分析标准聚类结果不完全一致, 基于表型性状的分析将供试材料分为 4 类, 而基于主要生化成分的分析将供试材料分为 3 类。基于表型的聚类结果中聚在类群 I 的石阡苔茶、竹山大黑叶、上犹群体种、龙井种、南山白毛茶、罗坑群体种、六堡茶在基于生化成分的聚类结果中分离至类群 II 与类群 III; 基于表型的聚类结果中聚在类群 II 的信阳种、牙己茶、十里香在基于生化成分的聚类结果中分离至类群 I 与类群 III; 基于表型的聚类结果中聚在类群 III 的遂川群体种、浮梁种在基于生化成分的聚类结果中分离至类群 I。两种聚类结果也有相同的地方, 例如基于表型性状的聚类分析中聚为类群 IV 的勐库大叶茶与凤庆大叶茶在基于生化成分的分析结果中依旧聚在同一类中, 且距离相近; 黎家坪群体种、冯家台群体种、汝城白毛茶、永修群体种、宜昌大叶茶始终在同一类群中; 祁门种、黄山种、鸟王茶、云台山种、紫阳种总是聚在同一类群。

综合分析两种聚类结果表明, 表型性状与生化成分间具有一定相关性, 说明供试材料遗传多样性丰富、遗传背景复杂。表型多样性是遗传多样性与环境多样性共同作用的结果^[43], 有研究表明, 茶树表型性状易受环境条件影响, 尤其是数量性状变异较大, 表现出丰富的遗传多样性^[44]。生化成分含量水平的变异在长期的自然选择与人为驯化下发生了明显的变异^[45]。两种聚类结果的差异表明, 依据单一表型或生化成分的聚类分析只能作为参考, 在实际应用中还需结合更深层且灵敏度更高的分子标记方法, 综合考虑表型、生化成分与 DNA 分子间的遗传多样性, 才能高效精准地指导茶树育种工作。

参考文献

- [1] 郭燕, 张树航, 李颖, 等. 燕山板栗种质资源叶片表型性状多样性研究[J]. 园艺学报, 2022, 49(8): 1673-1688.
Guo Y, Zhang S H, Li Y, et al. Diversity analysis of leaves phenotypic traits of Yanshan Chestnut [J]. Acta

- Horticulturae Sinica, 2022, 49(8): 1673-1688.
- [2] 姬广磊. 黄鲛鳢 (*Lophius litulon*) 形态特征及其遗传学研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2007.
- Ji G L. Study on the morphological characters and genetics of *Lophius litulon* [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2007.
- [3] 陈琪予, 马建强, 陈杰丹, 等. 利用图像特征分析茶树成熟叶表型的遗传多样性[J]. 茶叶科学, 2022, 42(5): 649-660.
- Chen Q Y, Ma J Q, Chen J D, et al. Genetic diversity of mature leaves of tea germplasms based on image features [J]. Journal of Tea Science, 2022, 42(5): 649-660.
- [4] Naegele R P, Mitchell J, Hausbeck M K. Genetic diversity, population structure, and heritability of fruit traits in *Capsicum annuum* [J]. PLoS One, 2016, 11(7): e0156969. doi: 10.1371/journal.pone.0156969
- [5] 吴国林. 基于 ISSR 和 SSR 标记的鄱阳湖流域野生菰种质资源遗传多样性研究[D]. 南昌: 江西农业大学, 2014.
- Wu G L. Studies on genetic diversity of germplasm resources of *Zizania latifolia* (Griseb.) Trucz. based on ISSR and SSR markers [D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2014.
- [6] 刘彤. 柳州九万山野生茶树种质资源研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2016.
- Liu T. The research of Liuzhou Jiuwan Mountain wild tea germplasm resources [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2016.
- [7] 莫岚, 黄亚辉, 赵文芳, 等. 金秀野生茶树群体的生化特征[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2018, 47(4): 409-414.
- Mo L, Huang Y H, Zhao W F, et al. Analysis of biochemical components of wild tea colonies in Jinxiu [J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition), 2018, 47(4): 409-414.
- [8] 晏嫦好, 李家贤, 黄华林, 等. 广东茶树群体品种品质成分差异初步研究[J]. 广东农业科学, 2009, 59(12): 39-41.
- Yan C Y, Li J X, Huang H L, et al. Study on differences in quality composition of Guangdong tea germplasms [J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2009, 59(12): 39-41.
- [9] 黄亚辉, 罗荣康, 晏嫦好, 等. 连南茶树种质资源叶片表型性状及生化成分的研究[J]. 广东茶业, 2017, 45(6): 11-13.
- Huang Y H, Luo R K, Yan C Y, et al. Study on leaf phenotypic traits and biochemical components of tea germplasm resources in Liannan [J]. Guangdong Tea Industry, 2017, 45(6): 11-13.
- [10] 王小萍, 唐晓波, 王迎春, 等. 52 份茶树资源生化组分的表型多样性分析[J]. 茶叶科学, 2012, 32(2): 129-134.
- Wang X P, Tang X B, Wang Y C, et al. Phenotypic diversity analysis of biochemical composition in 52 tea germplasms [J]. Journal of Tea Science, 2012, 32(2): 129-134.
- [11] 甘春萍, 邓慧群, 陈佳, 等. 广西地方群体品种主要生化成分分析研究[J]. 农业与技术, 2012, 32(4): 95-99.
- Gan C P, Deng H Q, Chen J, et al. Analysis of main biochemical components of Guangxi local population varieties [J]. Agriculture and Technology, 2012, 32(4): 95-99.
- [12] 万明轩. 菠菜表型三维点云数据分析与形态品质指标遗传多样性研究[D]. 上海: 上海师范大学, 2020.
- Wan M X. Study on analysis of three-dimensional point cloud data of spinach phenotype and genetic diversity of morphological quality index [D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2020.
- [13] 张悦, 索玉静, 孙鹏, 等. 柿种质资源果实形态多样性分析[J]. 园艺学报, 2022, 49(7): 1473-1490.
- Zhang Y, Suo Y J, Sun P, et al. Analysis on fruit morphological diversity of persimmon germplasm resources [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2022, 49(7): 1473-1490.
- [14] 陈亮, 杨亚军. 茶树种质资源描述规范和数据标准[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005.
- Chen L, Yang Y J. Description specification and data standard of tea germplasm resources [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2005.
- [15] 郭荣华, 刘志斋, 蔡一林, 等. 两个历史上重要的玉米地方品种群体的表型多样性评价[J]. 玉米科学, 2009, 17(2): 24-28.
- Guo R H, Liu Z Z, Cai Y L, et al. Evaluation of phenotypic diversity for two maize landrace population shaving historical importance in China [J]. Journal of Maize Sciences, 2009, 17(2): 24-28.
- [16] 丁洲, 李焯昕, 袁艺, 等. 安徽茶区优良群体种的表型性状和遗传多样性分析[J]. 茶叶科学, 2018, 38(2): 155-161.
- Ding Z, Li Y X, Yuan Y, et al. Phenotypic traits and genetic diversity of elite tea population in Anhui (China) [J]. Journal of Tea Science, 2018, 38(2): 155-161.
- [17] 黄海涛, 王风雷, 王贤波, 等. 鸠坑茶树资源芽叶表型性状的多样性分析[J]. 浙江农业科学, 2013, 64(3): 251-254.
- Huang H T, Wang F L, Wang X B, et al. Diversity analysis

- of bud and leaf phenotypic traits of Jiukeng tea resources [J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 2013, 64(3): 251-254.
- [18] 刘青. 贵州三都县古茶树遗传多样性研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2020.
- Liu Q. Genetic diversity of ancient tea trees in Sandu County, Guizhou Province [D]. Guiyang: Guizhou University, 2020.
- [19] 周炎花. 基于叶片形态和 EST-SSR 茶树遗传多样性与遗传演化研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2010.
- Zhou Y H. Study of genetic diversity and genetic evolution of tea germplasms based on leaf morphology and EST-SSR markers [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2010.
- [20] 胡波, 李国元, 谢志兵, 等. 主成分分析法在冬枣果实贮藏特性分析中的应用[J]. 食品科技, 2014, 39(2): 44-47.
- Hu B, Li G Y, Xie Z B, et al. Application of principle component analysis on winter jujube storage characteristic [J]. Food Science and Technology, 2014, 39(2): 44-47.
- [21] 杨玲, 张彩霞, 康国栋, 等. ‘华红’苹果果肉的流变特性及其主成分分析[J]. 中国农业科学, 2015, 48(12): 2417-2427.
- Yang L, Zhang C X, Kang G D, et al. Rheologic properties of ‘Huahong’ apple pulp and their principal component analysis [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2015, 48(12): 2417-2427.
- [22] 郎彬彬, 黄春辉, 朱博, 等. 基于果实相关性状的江西野生毛花猕猴桃初级核心种质的构建方法研究[J]. 果树学报, 2016, 33(7): 794-803.
- Lang B B, Huang C H, Zhu B, et al. Study on the method of constructing a primary core collection of Jiangxi wild *Actinidia eriantha* based on fruit traits [J]. Journal of Fruit Science, 2016, 33(7): 794-803.
- [23] 李伟, 郇海燕, 陈杭君, 等. 基于主成分分析的不同品种杨梅果实综合品质评价[J]. 中国食品学报, 2017, 17(6): 161-171.
- Li W, Gao H Y, Chen H J, et al. Evaluation of comprehensive quality of different varieties of bayberry based on principal components analysis [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2017, 17(6): 161-171.
- [24] 李勋兰, 洪林, 王武, 等. 晚熟杂柑新品种果实品质综合评价[J]. 果树学报, 2018, 35(2): 195-203.
- Li X L, Hong L, Wang W, et al. Comprehensive evaluation of fruit quality of new late-maturing mandarin cultivars [J]. Journal of Fruit Science, 2018, 35(2): 195-203.
- [25] 吕正鑫, 贺艳群, 贾东峰, 等. 猕猴桃种质资源表型性状遗传多样性分析[J]. 园艺学报, 2022, 49(7): 1571-1581.
- Lü Z X, He Y Q, Jia D F, et al. Genetic diversity analysis of phenotypic traits for kiwifruit germplasm resource [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2022, 49(7): 1571-1581.
- [26] 林子翔. 观赏辣椒种质资源园艺性状的多元统计分析与种质创新研究[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2020.
- Lin Z X. Multivariate statistical analysis and germplasm innovation of ornamental pepper germplasm resources [D]. Hangzhou: Zhejiang A&F University, 2020.
- [27] 宁功伟, 杨盛美, 段志芬, 等. 云南野生茶树厚轴茶种质资源化学成分多样性分析[J/OL]. 分子植物育种, 2023: 1-20[2023-05-06]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail//46.1068.S.20230118.1701.005.html>.
- Ning G W, Yang S M, Duan Z F, et al. Diversity analysis of chemical components of wild tea germplasm resources (*Camellia crassocolumna*) in Yunnan [J/OL]. Molecular Plant Breeding, 2023: 1-20[2023-05-06]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail//46.1068.S.20230118.1701.005.html>.
- [28] 董方, 李小飞, 沈思言, 等. 江西茶树资源的遗传多样性分析及优异种质筛选[J]. 江西农业大学学报, 2022, 44(6): 1466-1477.
- Dong F, Li X F, Shen S Y, et al. Genetic diversity analysis and screening of excellent germplasm of tea plant resources in Jiangxi [J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2022, 44(6): 1466-1477.
- [29] 丁帅涛, 程晓梅, 张亚, 等. 基于表型性状和生化成分的陕西茶树种质资源遗传多样性研究[J]. 西北农业学报, 2019, 28(4): 607-619.
- Ding S T, Cheng X M, Zhang Y, et al. Genetic diversity in phenotypic traits and biochemical components of tea resources in Shanxi [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2019, 28(4): 607-619.
- [30] Zhang Y R, Fu J M, Zhou Q Y, et al. Metabolite profiling and transcriptome analysis revealed the conserved transcriptional regulation mechanism of caffeine biosynthesis in tea and coffee germplasm plants [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(10): 3239-3251.
- [31] Li G D, Li Y, Yao X Z, et al. Establishment of a virus-induced gene-silencing (VIGS) system in tea plant and its use in the functional analysis of *CsTCS1* [J].

- International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(1): 392. doi: 10.3390/ijms24010392.
- [32] Li P H, Ye Z L, Fu J M, et al. CsMYB184 regulates caffeine biosynthesis in tea plants [J]. Plant Biotechnology Journal, 2022, 20(6): 1012-1014.
- [33] Ma W H, Kang X, Liu P, et al. The NAC-like transcription factor CsNAC7 positively regulates the caffeine biosynthesis-related gene *yhNMT1* in *Camellia sinensis* [J]. Horticulture Research, 2022, 9: uhab046. doi: 10.1093/hr/uhab046.
- [34] Jin J Q, Yao M Z, Ma C L, et al. Natural allelic variations of TCS1 play a crucial role in caffeine biosynthesis of tea plant and its related species [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2016, 100(12): 18-26.
- [35] 蔡志翔, 严娟, 宿子文, 等. 不同类型桃种质资源主要酚类物质含量评价[J]. 园艺学报, 2022, 49(5): 1008-1022.
- Cai Z X, Yan J, Su Z W, et al. Genetic diversity analysis of phenotypic traits for kiwifruit germplasm resources [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2022, 49(5): 1008-1022.
- [36] Zhu Q F, Liu L J, Lu X F, et al. The biosynthesis of EGCG, theanine and caffeine in response to temperature is mediated by hormone signal transduction factors in tea plant (*Camellia sinensis* L.) [J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 14. doi: 10.3389/fpls.2023.1149182.
- [37] 蒋会兵, 田易萍, 陈林波, 等. 云南茶树地方品种农艺性状与品质性状遗传多样性分析[J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(4): 634-640.
- Jiang H B, Tian Y P, Chen L B, et al. Diversity of tea landraces based on agronomic and quality traits in Yunnan Province [J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2013, 14(4): 634-640.
- [38] 姚明哲. 利用 ISSR 和 EST-SSR 标记研究中国茶树资源的遗传多样性和遗传结构[D]. 杭州: 浙江大学, 2009.
- Yao M Z. Studies on genetic diversity and structure of tea germplasm in China based on ISSR and EST-SSR markers [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2009.
- [39] 陈勋, 龚自明. 基于 EST-SSR 标记的湖北茶树种质资源遗传多样性分析[J]. 分子植物育种, 2017, 15(5): 1831-1838.
- Chen X, Gong Z M. Analysis of genetic diversity with EST-SSR markers for tea germplasm in Hubei Province [J]. Molecular Plant Breeding, 2017, 15(5): 1831-1838.
- [40] 张晓丽, 郭辉, 王海岗, 等. 中国普通野生稻与栽培稻种 SSR 多样性的比较分析[J]. 作物学报, 2008, 105(4): 591-597.
- Zhang X L, Guo H, Wang H G, et al. Comparative assessment of SSR allelic diversity in wild and cultivated rice in China [J]. Acta Agronomica Sinica, 2008, 105(4): 591-597.
- [41] 刘振, 赵洋, 杨培迪, 等. 湖南省茶树种质资源现状及研究进展[J]. 茶叶通讯, 2011, 38(3): 7-10, 18.
- Liu Z, Zhao Y, Yang P D, et al. The status and research progress of Hunan tea germplasm [J]. Tea Communication, 2011, 38(3): 7-10, 18.
- [42] 马建强, 姚明哲, 陈亮. 茶树种质资源研究进展[J]. 茶叶科学, 2015, 35(1): 11-16.
- Ma J Q, Yao M Z, Chen L. Research progress on germplasms of tea plant (*Camellia sinensis*) [J]. Journal of Tea Science, 2015, 35(1): 11-16.
- [43] 张见明. 26 份武夷名丛茶树种质资源秋茶生化成分多样性分析[J]. 武夷学院学报, 2016, 35(9): 1-7.
- Zhang J M. Diversity analysis of biochemical components in autumn shoots of 26 Wuyi Mingcong tea plant germplasm resources [J]. Journal of Wuyi University, 2016, 35(9): 1-7.
- [44] 乔婷婷. 茶树资源遗传多样性及其表型性状关联 EST-SSR 位点的初步鉴定[D]. 北京: 中国农业科学院, 2010.
- Qiao T T. Genetic diversity of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) and association analysis on phenotypic traits with EST-SSR markers [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2010.
- [45] 齐冬晴. 不同茶树品种(品系)鲜叶香气及其表型差异的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2015.
- Qi D Q. Studies on the tea leaves aroma components and phenotypic differences of different tea varieties [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2015.

高温和干旱胁迫下茶树叶片内源激素含量 变化及其相关基因的表达分析

唐子贻¹, 杜玥¹, 杨宏斌¹, 黎星辉², 余有本^{1*}, 王伟东^{1*}

1. 西北农林科技大学园艺学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095

摘要: 高温干旱极端环境严重影响茶树生长发育, 以及茶叶产量和品质, 激素作为植物响应逆境胁迫的重要信号因子, 其在茶树响应高温和干旱胁迫过程中的分子机理少有报道。以龙井长叶为材料, 对高温和干旱胁迫下茶树叶片中内源激素含量的变化及其相关基因的表达水平进行了系统分析。结果表明, 高温和干旱胁迫下茶树叶片中生长素 (IAA)、赤霉素 (GA₃) 含量显著降低, 玉米素核苷 (ZR) 含量略有升高, 推测茶树通过减少促生类激素来延缓生长以适应胁迫影响; 同时, 大量 IAA、GA₃、ZR 生物合成和信号响应相关的基因显著差异表达, 为解释激素含量变化及信号转导提供了分子基础。脱落酸 (ABA) 和茉莉酸 (JA) 作为逆境响应激素其含量在高温和干旱胁迫下均显著增加, 这可能依赖于 ZEP、NCED、SDR 等 ABA 生物合成途径基因和 LOX、OPR、ACX 等 JA 生物合成途径基因的上调表达; 另外, 许多 PYR/PYL、PP2C 等 ABA 信号途径基因以及 JAZ、MYC2 等 JA 信号途径基因也显著差异表达, 暗示了 ABA 和 JA 信号途径在茶树响应高温和干旱胁迫过程中的重要作用。研究结果为进一步探究茶树依赖内源激素的高温干旱胁迫响应分子机理提供理论参考。

关键词: 茶树; 内源激素; 脱落酸; 茉莉酸; 基因表达分析; 非生物胁迫

中图分类号: S571.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-369X(2023)04-489-12

Changes of Endogenous Hormone Contents and Expression Analysis of Related Genes in Leaves of Tea Plants Under Heat and Drought Stresses

TANG Ziyi¹, DU Yue¹, YANG Hongbin¹, LI Xinghui², YU Youben^{1*}, WANG Weidong^{1*}

1. College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling 712100, China;

2. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: Extreme environments, such as heat and drought, seriously affect the growth and development of tea plants and the quality of tea production. Hormones are important signaling factors, but the molecular mechanisms of hormones involved in the response of tea plants to heat and drought stresses are rarely reported. In this study, we systematically analyzed the changes in endogenous hormone contents and the expression levels of related genes in leaves of tea plants under heat and drought stresses. The results show that the contents of IAA and GA₃ were significantly reduced and the contents of ZR were slightly increased in leaves of tea plants under heat and drought

收稿日期: 2023-03-24

修订日期: 2023-07-13

基金项目: 陕西省重点研发计划项目 (2022NY-154)、陕西省农业专项资金项目 [NYKJ-2022-YL(XN)37]、国家茶叶产业技术体系 (CARS-19)、西北农林科技大学科技推广重点项目 (TGZX2022-2)

作者简介: 唐子贻, 女, 硕士研究生, 主要从事茶树栽培育种及分子生物学研究。*通信作者: yyben@163.com; wangweidong@nwfau.edu.cn

stresses, which were presumably used to delay the growth of tea plants to adapt to the environment stresses. Meanwhile, many genes related to biosynthesis and signal response of IAA, GA₃ and ZR were significantly differentially expressed, which provided a molecular basis for explaining the hormone content changes and signal transduction. In addition, the contents of ABA and JA increased significantly under both heat and drought stresses, which may depend on the up-regulated expressions of ABA biosynthetic pathway genes such as *ZEP*, *NCED*, *SDR* and JA biosynthetic pathway genes such as *LOX*, *OPR*, *ACX*. Furthermore, many ABA signal responsive genes such as *PYR/PYL*, *PP2C* and JA signal responsive genes such as *JAZ*, *MYC2* were also significantly differentially expressed, suggesting the important role of ABA and JA signaling pathways in the response of tea plants to heat and drought stresses. These results provided theoretical references for further exploring the molecular mechanisms of tea plants response to heat and drought stresses, which rely on endogenous hormones.

Keywords: tea plant, endogenous hormone, ABA, JA, gene expression analysis, abiotic stress

茶树 [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] 是我国重要的经济作物, 其栽培过程中经常遭受各种不良环境的影响。近年来全球气候变暖, 随之而来的高温干旱极端天气对茶树生长发育造成了极大损害, 严重影响了茶叶的产量和品质^[1]。因此, 了解茶树高温和干旱胁迫响应机理, 对提高茶树高温、干旱抗性, 培育高抗优良茶树品种至关重要。

植物激素是植物体内一类重要的小分子有机化合物, 如脱落酸(ABA)、赤霉素(GA₃)、生长素(IAA)、玉米素核苷(ZR)、水杨酸(SA)、茉莉酸(JA)、乙烯(ET)、独脚金内酯(SL)等, 不仅参与调控植物正常生长发育, 而且在植物抵抗外界胁迫干扰中也发挥重要作用^[2-3]。面对不良环境, 植物往往通过调节内源激素含量与比例响应外界变化, 调控基因表达, 改变生理状态, 从而提高植物逆境生存能力^[4-5]。而现有研究亦表明, 植物激素对于茶树逆境响应同样至关重要^[6-7]。例如, ABA通过调控茶树叶片气孔开闭以减少干旱胁迫下水分的流失^[8]; SA通过 *SNCI* 基因激活茶树 *NPR1*-非依赖型抗性通路, 从而增强茶树对干旱胁迫的耐受性^[9]; 茶树通过调节 ABA 等生长抑制类激素与 IAA、GA 等生长促进类激素平衡来应对低温胁迫^[10]; JA 能够通过调控 *JAZ* 家族基因表达提高茶树对多种逆境胁迫的适应能力^[11]。此外, 外源激素施用也被证实对缓解极端温度以及重金属胁迫对茶树的

伤害有显著效果^[12]。然而, 关于高温和干旱胁迫下茶树内源激素的分子响应机理研究较为有限。

因此, 本研究通过分析高温和干旱胁迫下茶树叶片中内源激素的含量变化, 结合转录组数据探究内源激素, 特别是 ABA 与 JA 合成代谢及信号响应相关基因的表达变化趋势, 以期明确内源激素参与茶树高温和干旱胁迫响应的分子机制提供参考。

1 材料和方法

1.1 试验材料与处理

供试材料为两年生龙井长叶品种茶树水培苗, 于西北农林科技大学人工气候温室进行预培养, 培养条件为 12 h 光照/12 h 黑暗, 光照温度 25 ℃, 黑暗温度 22 ℃, 空气相对湿度 (75±5)%, 营养液每周更换 1 次。选取生长健壮、长势一致的茶苗分别进行高温 (40 ℃) 和干旱 (20% PEG 6000) 胁迫处理, 在高温胁迫处理 0 h (CK)、2 h (HT2)、6 h (HT6)、12 h (HT12) 和 24 h (HT24), 以及干旱胁迫处理 0 h (CK)、2 h (PEG2)、12 h (PEG12)、24 h (PEG24) 和 48 h (PEG48) 取新梢第 2~3 叶位的嫩叶并于液氮中速冻, -80 ℃ 冰箱保存备用。每个时间点设 3 个生物学重复。

1.2 激素含量测定

内源激素的提取和纯化参考曾光辉等^[13]

方法, 将茶树叶片样品置于预冷的研钵, 加提取液充分研磨后离心取上清液, 上清液经 C₁₈ 固相萃取柱纯化后稀释定容备用。通过酶联免疫吸附法(ELISA)测定 IAA、GA₃、ZR、ABA、JA 激素的含量, 所用试剂盒由中国农业大学提供。每个样品重复测定 3 次。

1.3 差异表达基因分析

转录组原始数据 (SRA ID : PRJNA428407) 用 Fastp 进行质控后获得高质量 clean reads, 使用 Hisat2 将其比对到舒茶早品种茶树基因组^[14], 用 FeatureCounts 软件对基因 counts 数进行统计和标准化, 并以 TPM (Transcripts per kilobase million) 表示基因的表达水平^[15]。采用 edgeR 软件包对基因表达进行差异分析, 以 $|\text{Log}_2 \text{FC}| \geq 1$ 且 $\text{FDR} < 0.05$ 为标准筛选显著差异表达基因 (Differentially expressed genes, DEGs)。

1.4 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 验证

以 CTAB 法提取叶片样品总 RNA, 并利用 5×All-In-One RT MasterMix 试剂盒(ABM,

温哥华, 加拿大) 合成 cDNA 用于后续分析。根据 DEGs 序列设计特异性定量引物 (表 1), 以茶树 *β-actin* 作为内参基因, 按照 ChamQ SYBR qPCR Master Mix (Q311-02) 试剂盒说明书进行 qRT-PCR 分析。PCR 反应体系: 2×ChamQ SYBR qPCR MasterMix 10 μL, 上下游引物各 0.4 μL, cDNA 2 μL, ddH₂O 7.2 μL。反应程序: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 40 个循环。每个样品设 3 次重复, 采用 2^{-ΔΔC_T} 法计算基因的相对表达量。

1.5 数据统计分析

使用 IBM SPSS v20.0 软件对试验数据进行统计分析, 用单因素 ANOVA 进行方差分析, 用 Duncan’s 新复极差法进行多重比较, 用皮尔逊相关系数法对激素含量和相关基因表达水平进行相关性分析。

2 结果与分析

2.1 高温胁迫对茶树叶片内源激素含量的影响

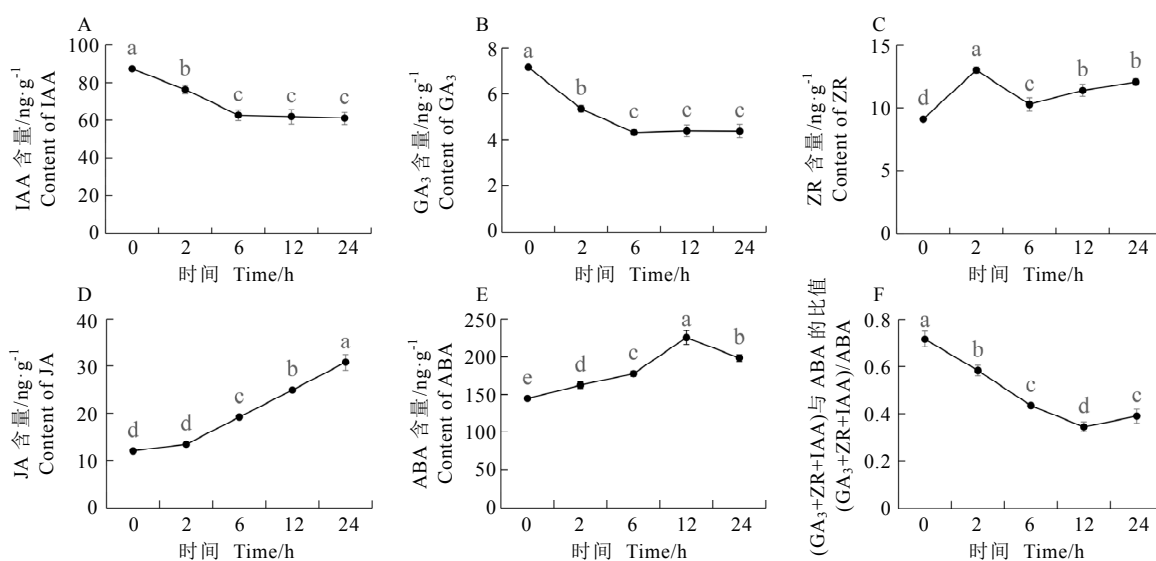
如图 1A 和 1B 所示, 高温胁迫下茶树叶

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因 ID Gene ID	基因名称 Gene name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
HQ420251.1	<i>β-actin</i>	F CTGCGTGATGGTCAGGTCAT
		R GCTGGGAGCAAGAGCAGTAA
CSS0030705	<i>SDR</i>	F AGAGCATTGTACGCCTATTC
		R AACTGCACGGAGAACATTAT
CSS0047561	<i>LOX</i>	F TGGACACGGTCGCGTTCACTTTGT
		R AATGAGCGGTGCCGAGTTTCACTT
CSS0026777	<i>JAR1</i>	F GACCCTGAGGAAGTCATAGA
		R GTATCACCATCCACCATTCTC
CSS0031905	<i>JAZ1</i>	F CCAGTACCTGAAGGAGAAGA
		R CCAGACTGCTGTGGAATAA
CSS0033791	<i>NCED</i>	F CGTGGTGGGTCTCCTGTGGTGTAT
		R ACTTCGTCGGTCTCGGGCTCTT
CSS0017736	<i>PYR</i>	F CCAGTATATGGCGAGTTCAC
		R CAGCTCTGAGGAAGTGTTT
CSS0037945	<i>OPR</i>	F CGCTTCGCCTTGGAATA
		R CCCACCAGCAGCAATAAA
CSS0010510	<i>JAZ1</i>	F ACTCATTCGGATCTGCCAGTGCCAA
		R TGAAGAAGTCGATGGACCGCCATGT

片中 IAA 和 GA_3 含量显著降低, 在高温处理 6 h 时较 CK 分别降低了 28.25% 和 39.44%, 之后其含量均维持在一定水平。ZR 含量在高温胁迫处理 2 h 时迅速上升, 较 CK 升高了 41.85%, 之后有所降低并随处理时间的延长而缓慢上升, 整体呈现出上升趋势 (图 1C)。JA 含量随着胁迫时间延长不断升高, 至处理 24 h 时含量高达 $30.80 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, 较 CK 增加了

155.81% (图 1D); 类似的, ABA 含量在高温胁迫处理后显著增加, 在处理 12 h 时含量达 $225.20 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, 较 CK 增加了 55.74%, 随后稍有下降, 整体呈上升趋势 (图 1E)。另外, ($GA_3 + ZR + IAA$) 与 ABA 比值在高温胁迫下迅速降低, 但在处理 24 h 时有所回升, 暗示了茶树叶片基于激素水平平衡的潜在高温胁迫适应能力。



注: 不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平上差异显著。下同

Note: Different lowercase letters indicate significant difference at $P < 0.05$ level. The same below

图 1 高温胁迫下茶树叶片中 IAA、 GA_3 、ZR、JA 和 ABA 含量变化

Fig. 1 Content changes of IAA, GA_3 , ZR, JA and ABA in tea leaves under heat stress

2.2 干旱胁迫对茶树叶片内源激素含量的影响

干旱胁迫下茶树叶片中 IAA 含量显著降低, 处理 12 h 后维持在一定水平, 整体较 CK 降低了 25% 左右 (图 2A); 类似的, GA_3 含量在干旱胁迫处理初期亦显著降低, 在处理 12 h 时较对照组降低了 34.18%, 之后开始回升 (图 2B); 相反, ZR 含量在干旱胁迫处理后逐渐升高并在 24 h 后开始下降 (图 2C)。JA 含量随着干旱胁迫时间延长不断升高, 在处理 24 h 后增速明显加快, 处理 48 h 时含量较 CK 增加了 86.98% (图 2D); ABA 含量在干旱胁迫下也显著增加, 在处理 24 h 时含量达 $224.89 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$,

较 CK 增加了 55.53%, 之后略有降低 (图 2E)。

($GA_3 + ZR + IAA$) 与 ABA 比值在高温胁迫下迅速降低, 处理 24 h 后趋于稳定, 维持在较低水平 (图 2F)。

2.3 IAA、 GA_3 、ZR 合成代谢及信号响应相关差异表达基因分析

高温或干旱胁迫下发现大量激素信号相关的 DEGs, 其中 IAA 相关的 DEGs 数量明显高于 GA_3 和 ZR 相关 DEGs 数量 (表 2)。IAA 生物合成相关的黄素单加氧酶基因 (Flavin-containing monooxygenase gene) *YUCCA* 在高温和干旱胁迫处理后均显著下调

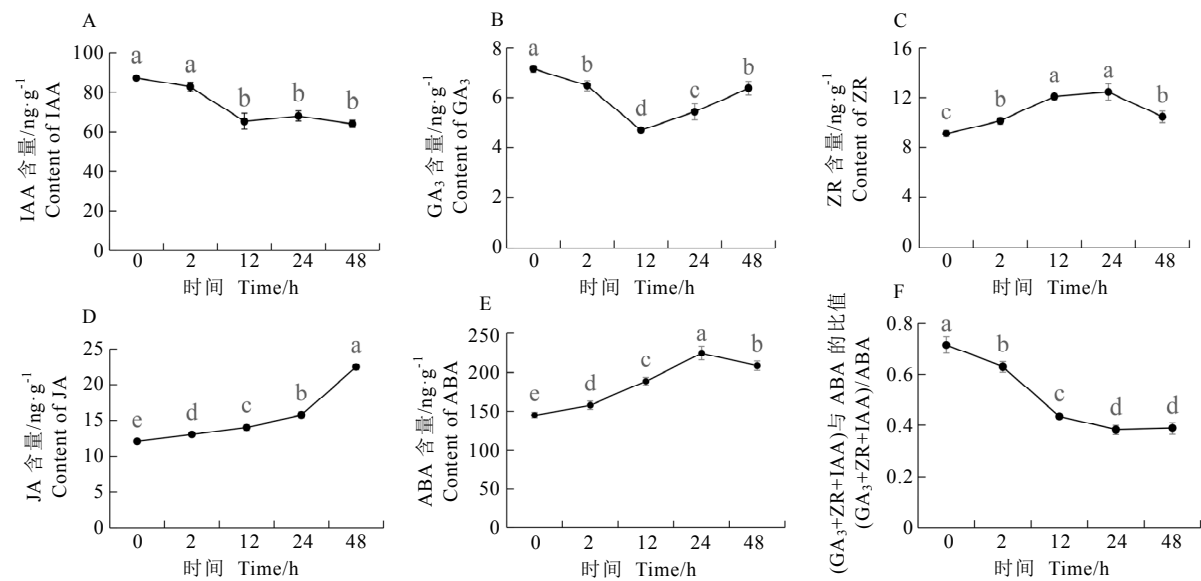


图 2 干旱胁迫下茶树叶片中 IAA、GA₃、ZR、JA 和 ABA 含量变化
Fig. 2 Content changes of IAA, GA₃, ZR, JA and ABA in tea leaves under drought stress

表 2 茶树叶片植物激素信号转导通路中的差异表达基因
Table 2 DEGs in phytohormone signal transduction pathway of tea plants

激素	差异表达基因	Differential expression gene	关键基因	基因注释
Hormone	高温	干旱	Key gene	Gene annotation
IAA	174 (52↑, 122↓)	99 (78↑, 21↓)	<i>YUCCA</i> (↓)	Flavin-containing monooxygenase
			<i>ARF</i> (先↓后↑)	Auxin response factor
			<i>AUX</i> (先↓后↑)	Auxin influx carrier
			<i>SAUR</i> (先↓后↑)	SAUR family protein
			<i>GH3</i> (先↓后↑)	Auxin responsive GH3 gene family
GA ₃	30 (9↑, 21↓)	25 (14↑, 11↓)	<i>GA2ox</i> (↓)	Gibberellin 2-oxidase
			<i>GA3ox</i> (↑)	Gibberellin 3-oxidase
			<i>GA20ox</i> (↑)	Gibberellin 20-oxidase
			<i>GID1</i> (↓或↑)	Gibberellin receptor GID1
ZR	29 (22↑, 7↓)	22 (17↑, 5↓)	<i>IPT</i> (↑)	Isopentenyltransferase
			<i>LOG</i> (↑)	CTK nucleoside 5'-monophosphate phosphoribohydrolase
			<i>ZOG</i> (↑)	Zeatin O-glucosyltransferase
			<i>AHK</i> (↑)	Arabidopsis His kinase
			<i>AHP</i> (↑)	Arabidopsis His phosphotransfer protein

注: ↑表示上调表达, ↓表示下调表达
Note: ↑ indicates up-regulated expression, and ↓ indicates down-regulated expression

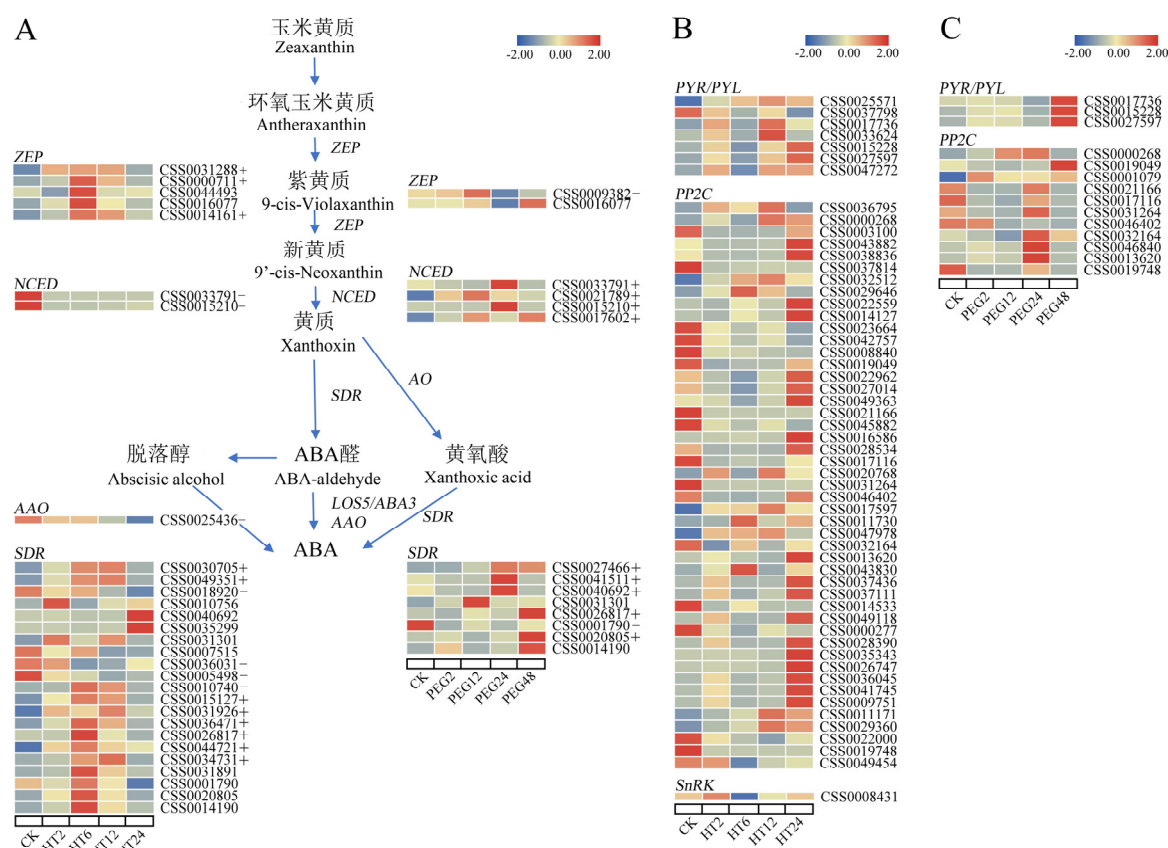
表达, 其可能是胁迫下 IAA 含量降低的关键调控因子; 多个 IAA 信号响应基因, 如 *SAUR*、*GH3*、*AUX* 和 *ARF*, 在胁迫下呈现出先下调后上调的表达趋势。GA₃ 相关 DEGs 以下调基因为主, 但是调控活性 GAs 生成的关键酶基

因 *GA20ox* 与 *GA3ox* 上调表达, 而诱导 GAs 失活的 *GA2ox* 下调表达, 这与胁迫中 GA₃ 含量下降恰恰相反, 结合 GA₁、GA₄ 等其他具有生物活性 GAs 同样受上述关键酶调控, 推测 *GA20ox*、*GA3ox* 和 *GA2ox* 表达水平变化可能

有利于其他活性 GAs 的生成, 而竞争性限制了 GA₃ 合成。另外, 关键赤霉素受体基因 *GID1* 在高温胁迫下为下调表达, 而在干旱胁迫下为上调表达, 表明其不同胁迫下具有不同的响应机制。ZR 相关 DEGs 以上调为主, 包括生物合成关键酶基因 *IPT*、*LOG*, 活性调控酶基因 *ZOG*, 以及信号转导途径关键基因 *AHK* 和 *AHP* 等。

2.4 ABA 生物合成及信号响应相关差异表达基因分析

如图 3A 所示, ABA 生物合成途径大量调控酶基因在高温胁迫下上调表达, 尤其是玉米黄素环氧酶基因 (Zeaxanthin epoxidase gene, *ZEP*) 和短链脱氢酶/还原酶基因 (Short-chain dehydrogenase/reductase gene, *SDR*), 且



注: A 为 ABA 合成途径 DEGs 表达谱, B 和 C 为 ABA 信号响应途径 DEGs 表达谱。ZEP 为玉米黄素环氧酶基因, NCED 为 9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧酶基因, SDR 为短链脱氢酶/还原酶基因, AAO 为脱落醛氧化酶基因, AO 为醛氧化酶基因, PYR/PYL 为 ABA 受体蛋白基因, PP2C 为蛋白磷酸酶 2C 基因。+ 表示基因表达水平与激素含量呈正相关, - 表示基因表达水平与激素含量呈负相关

Note: A, expression profile of DEGs in ABA synthesis pathway. B and C, expression profile of DEGs in ABA signal response pathway. ZEP, zeaxanthin epoxidase gene, NCED, 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene. SDR, short-chain dehydrogenase/reductase gene. AAO, abscisic aldehyde oxidase gene. AO, aldehyde oxidase gene. PYR/PYL, pyrabactin resistance/PYR1-like gene. PP2C, protein phosphatase 2C gene. + indicates positive correlation between gene expression level and hormone content. - indicates negative correlation between gene expression level and hormone content

图 3 ABA 合成与信号响应途径相关差异表达基因的表达谱

Fig. 3 Expression profiles of DEGs involved in ABA synthesis and signal transduction in tea plants

表达水平的增加主要集中在处理后的 2、6、12 h, 而在处理后 24 h 时基因表达水平均有所回落, 这与高温胁迫下茶树叶片中 ABA 含量的变化趋势几乎一致; 然而, 9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧酶基因(9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase gene, *NCED*)和脱落醛氧化酶基因(Absciscic aldehyde oxidase gene, *AAO*)在高温胁迫处理下均为下调表达。干旱胁迫下, *ZEP*、*NCED* 和 *SDR* 均为上调表达, 且表达水平的增加主要集中在处理 12 h 以后。同时, 相关性分析结果显示, 高温胁迫下的多个 *ZEP*、*SDR* 基因表达水平以及干旱胁迫下的多个 *NCED*、*SDR* 基因表达水平与 ABA 含量呈正相关, 表明其可能分别在高温和干旱胁迫诱导的 ABA 积累中发挥关键作用(图 3A)。另外, ABA 受体蛋白基因(Pyrabactin resistance/PYR1-like gene, *PYR/PYL*)和蛋白磷酸酶 2C 基因(Protein phosphatase 2C gene, *PP2C*)作为 ABA 信号途径中的核心因子, 高温和干旱胁迫下大量编码基因显著差异表达, 其中 *PYR/PYL* 以上调表达为主, 而 *PP2C* 整体呈现出先下调表达后上调表达的变化趋势, 这与 ABA 含量变化趋势相反(图 3B 和 3C)。

2.5 JA 生物合成及信号响应相关差异表达基因分析

高温胁迫下, JA 生物合成途径中的 α -亚麻酸脂氧合酶基因(Lipoxygenase gene, *LOX*)、12-氧代植物二烯酸还原酶基因(12-oxophytodienoate reductase gene, *OPR*)、OPC8-CoA 连接酶基因(OPC8-CoA ligase gene, *OPCL*)、酯酰辅酶 A 氧化酶基因(Acyl-CoA oxidase gene, *ACX*)主要为上调表达, 而丙二烯氧化合成酶基因(Allene oxide synthase gene, *AOS*)和丙二烯氧化环化酶基因(Allene oxide cyclase gene, *AOC*)则主要为下调表达; 与之不同, 干旱胁迫下几乎所有的关键酶基因均为上调表达, 尤其是在干旱胁迫处理 24 h 时, 这可能是高温胁迫处理 48 h 时 JA 含量增加迅速的重要原因(图 4A)。同

时, 高温胁迫下的多个 *LOX*、*OPR*、*ACX* 基因表达水平以及干旱胁迫下的多个 *LOX*、*AOS*、*OPR*、*ACX* 基因表达水平与 JA 含量呈正相关, 表明其可能分别在高温和干旱胁迫诱导的 JA 积累中发挥关键作用(图 4A)。另一方面, JA 信号响应相关基因在高温和干旱胁迫下展现出完全不同的表达趋势, 其中茉莉酰氨基酸结合物合成酶基因(JA conjugate synthase gene, *JAR1*)、茉莉酸 ZIM 结构域蛋白基因(Jasmonate ZIM-domain protein gene, *JAZs*)以及 bHLH 转录因子髓细胞组织增生蛋白基因(Myelocytomatosis proteins gene, *MYC2*)基因均为下调表达, 而干旱胁迫下 *JAZ* 和 *MYC2* 差异表达基因均显著上调表达, 表明 JA 可能通过不同的信号响应途径参与了茶树对高温和干旱胁迫的响应(图 4B 和 4C)。

2.6 差异表达基因 qRT-PCR 验证

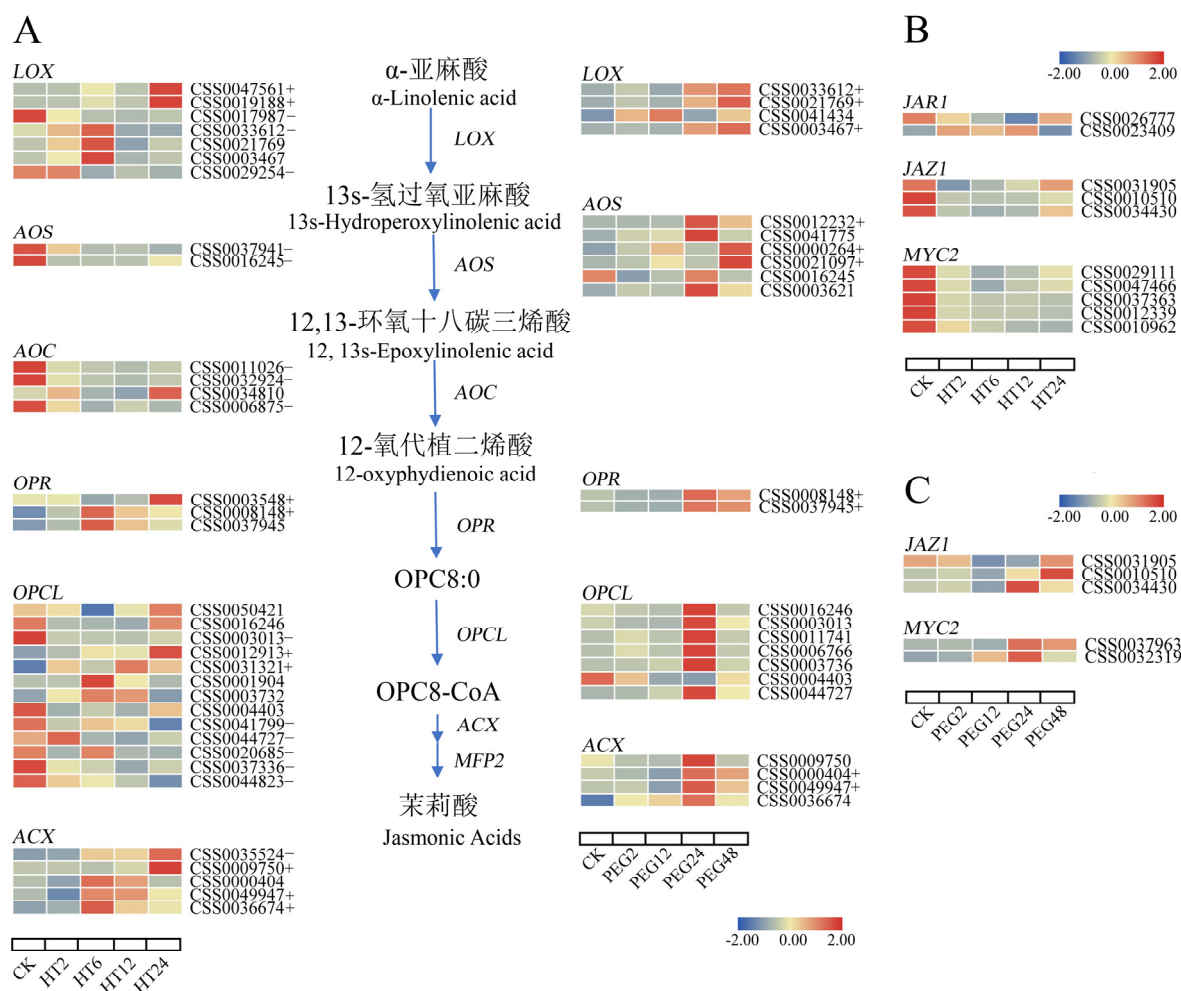
对 ABA 和 JA 生物合成或信号响应过程中的 8 个差异表达基因进行 qRT-PCR 验证, 结果显示高温或干旱胁迫下基因表达水平与转录组分析结果呈现出类似的变化趋势(图 5), 表明 RNA-Seq 数据具有较高的可靠性。

3 讨论

植物激素作为植物胁迫响应的关键内源因子, 通过不同激素信号途径的复杂网络及其相互间的信号交叉实现了对胁迫响应的精细调控^[16]。IAA、GA₃ 和 ZR 是植物体中促进生长发育的核心激素, 其中 IAA 对植物细胞极性发育、细胞伸长至关重要, GA₃ 能够调控气孔开闭、减少植物蒸腾以及促进植物生长, ZR 可促进细胞分裂、扩大和延缓叶片衰老^[17-18]。大量研究证实, 逆境条件下植物通过减少促生类激素以延缓生长, 从而抵御不良影响。我们的研究也发现高温和干旱胁迫下, 茶树叶片中 IAA 和 GA₃ 的含量均显著降低, 这与澳洲茶树、栀子、苜蓿和黑麦草在高温或干旱胁迫下 IAA 和 GA₃ 含量变化一致^[19-22]。不同的是, 高温和干旱胁迫下茶树叶片中 ZR 含量变

化虽均有上升但趋势略有不同。前人研究证实,不同植物或同种植物不同逆境胁迫下 ZR 含量往往表现出不同的变化趋势,这种差异性变化表明了 ZR 在植物响应不良环境过程中功

能的多元性^[23]。另外,基于转录组数据的差异基因分析发现,*YUCCA*、*GA2ox*、*LOG*、*ZOG* 等 IAA、GA₃、ZR 生物合成关键基因显著差异表达,其可能主导了高温和干旱胁迫下茶树



注: A 为 JA 合成途径 DEGs 表达谱, B、C 为 JA 信号响应途径 DEGs 表达谱。*LOX* 为 α-亚麻酸脂氧合酶基因, *AOS* 为丙二烯氧化合成酶基因, *AOC* 为丙二烯氧化环化酶基因, *OPR* 为 12-氧代植物二烯酸还原酶基因, *OPCL* 为 OPC8-CoA 连接酶基因, *ACX* 为酯酰辅酶 A 氧化酶基因, *JAR1* 为茉莉酰氨基酸结合物合成酶基因, *JAZ1* 为茉莉酸 ZIM 结构域蛋白基因, *MYC2* 为髓细胞组织增生蛋白 2 基因。+ 表示基因表达水平与激素含量呈正相关, - 表示基因表达水平与激素含量呈负相关

Note: A, expression profile of DEGs in JA synthesis pathway. B and C, expression profile of DEGs in JA signal response pathway. *LOX*, lipxygenase gene. *AOS*, allene oxide synthase gene. *AOC*, allene oxide cyclase gene. *OPR*, 12-oxophytodienoate reductase gene. *OPCL*, OPC8-CoA ligase gene. *ACX*, acyl-CoA oxidase gene. *JAR1*, JA conjugate synthase gene. *JAZ1*, jasmonate ZIM-domain protein gene. *MYC2*, myelocytomatosis proteins 2 gene. + indicates positive correlation between gene expression level and hormone content. - indicates negative correlation between gene expression level and hormone content

图 4 JA 合成与信号响应途径相关差异表达基因的表达谱

Fig. 4 Expression profiles of DEGs involved in JA synthesis and signal transduction in tea plants

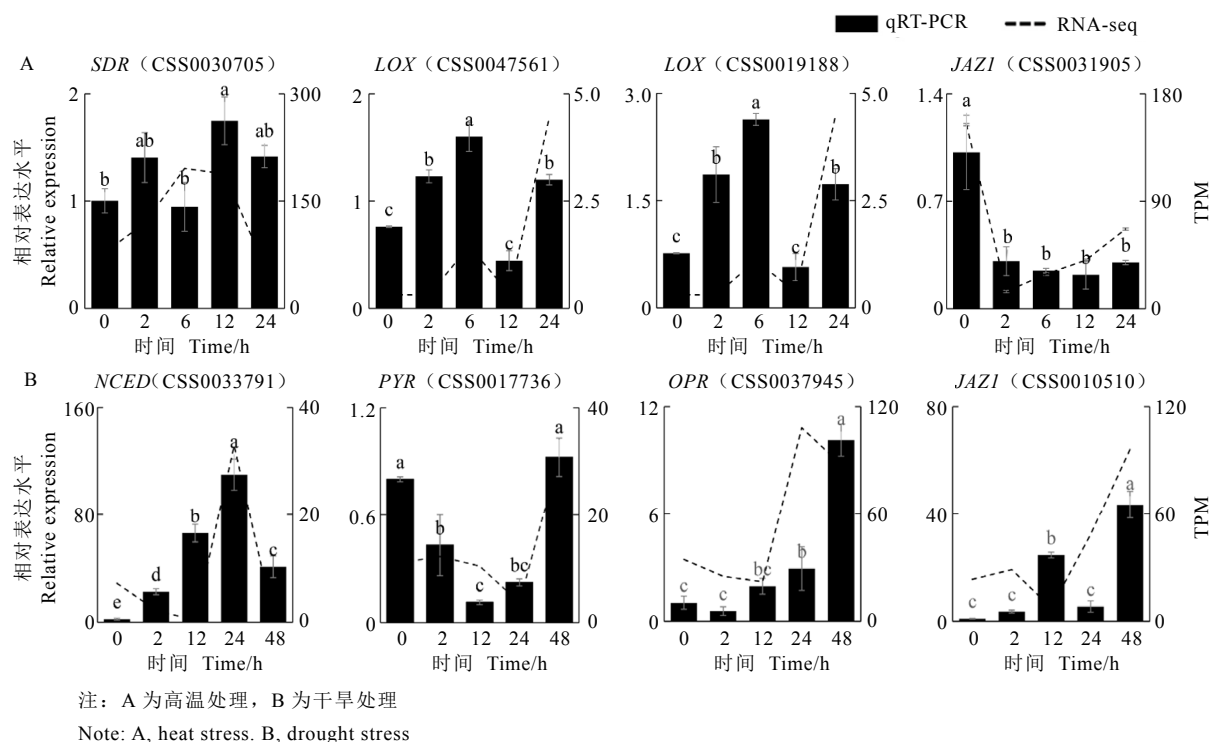


图 5 qRT-PCR 验证转录组数据

Fig. 5 qRT-PCR validation of RNA-Seq data

叶片相关激素含量变化;同时,相关激素信号途径下游大量响应基因亦显著差异表达,如 *ARF*、*GIDI*、*AHK*、*AHP* 等,这些结果解释了高温和干旱胁迫影响茶树叶片 IAA、GA₃ 和 ZR 含量的分子基础,也暗示了相关激素参与茶树高温和干旱胁迫响应的潜在信号途径。

ABA 作为一种逆境激素,在植物响应各种逆境胁迫过程中发挥着重要作用,如干旱胁迫下 ABA 迅速积累并通过诱导叶片气孔关闭减少水分流失以抵御胁迫损伤^[24],ABA 通过维持水稻碳平衡和能量平衡以阻止高温胁迫导致的花粉败育^[25]。本研究中,高温和干旱胁迫均诱导了茶树叶片 ABA 的快速积累,表明内源 ABA 参与了茶树对高温和干旱胁迫的适应过程,这与前人的研究一致^[26]。目前,对于 ABA 生物合成途径已有较为清晰的认知,其中 *NCED* 被认为是该途径的关键限速

酶,是逆境胁迫下调控 ABA 含量变化的重要因子^[27]。干旱胁迫下,我们发现多个 *NCED* 编码基因显著上调表达,且其表达水平与 ABA 含量变化呈正相关,推测其在干旱胁迫诱导茶树叶片 ABA 积累中发挥重要作用。然而,高温胁迫下 *NCED* 编码基因却下调表达,暗示其不同于干旱胁迫下的作用机制,这仍需继续研究。相比之下,*ZEP* 和 *SDR* 编码基因则在高温和干旱胁迫下均以上调表达为主,且多个基因表达水平与 ABA 含量变化呈正相关,表明其可能以类似的作用机制参与了高温和干旱胁迫诱导茶树叶片 ABA 合成积累过程。另一方面,*PYR/PYL* 与 *PP2C* 是 ABA 信号转导途径的核心因子,其编码基因在高温和干旱下显著差异表达,其中 *PYR/PYL* 的表达趋势与 ABA 含量变化趋势一致,而 *PP2C* 则与之相反。结合植物 ABA 信号途径推测,

PYR/PYL 响应高温和干旱胁迫通过诱导 ABA 变化抑制负调控因子 *PP2C*, 进而调控下游高温和干旱响应基因的表达, 从而激活了茶树对高温和干旱胁迫的适应性过程^[28]。

JA 也被证实广泛参与了植物对逆境胁迫的响应, 结合前人研究和含量测定结果表明 JA 同样被诱导参与茶树响应高温和干旱胁迫过程^[29], 而且该过程伴随着 *LOX*、*AOS*、*OPR*、*OPCL* 和 *ACX* 等 JA 生物合成途径相关基因表达水平的增加, 尽管响应时间上在高温和干旱胁迫下有所差异, 但与相应胁迫下 JA 含量的变化趋势高度拟合, 尤其是 *LOX*、*OPR*、*ACX* 基因, 这充分证明了上述基因表达水平的变化是高温和干旱胁迫诱导茶树叶片中 JA 积累的重要原因^[30]。*JAZ-MYC2* 模块是研究最多的 JA 信号转导途径过程, 本研究也发现多个 *JAZ*、*MYC2* 基因显著差异表达, 但其在高温和干旱胁迫下完全展现出相反的表达模式, 说明茶树在响应高温和干旱胁迫过程中所依赖的 JA 信号途径可能有所差异^[31]。事实上, 基于 *JAZ-MYC2* 模块的 JA 信号途径不仅取决于基因的表达水平, 同时与相关蛋白的修饰密切相关, 如 *JAZ* 的泛素化^[32], *MYC2* 的磷酸化和泛素化等^[33-34], 其在茶树逆境响应过程中的功能机制有待进一步研究。

本研究系统分析了高温和干旱胁迫下茶树叶片中内源激素 IAA、GA₃、ZR、JA 和 ABA 含量的动态变化, 并基于转录组数据分析了各激素生物合成及信号转导相关基因表达水平变化, 为进一步探究茶树依赖内源激素的高温 and 干旱胁迫响应分子机理提供了前期基础。然而, 植物激素在各生命过程中并非单独发挥作用, 各种激素之间既相辅相成, 又相互制约^[35]。因此, 探究逆境胁迫下茶树内源激素间的协调关系, 以及信号串扰机制具有重要意义, 这也将是我们今后研究工作的重点方向。

参考文献

[1] Zeng L T, Watanabe N H R, Yang Z Y. Understanding the

biosyntheses and stress response mechanisms of aroma compounds in tea (*Camellia sinensis*) to safely and effectively improve tea aroma [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2019, 59(14): 2321-2334.

[2] Jogawat A, Yadav B, Chhaya, et al. Crosstalk between phytohormones and secondary metabolites in the drought stress tolerance of crop plants: a review [J]. Physiologia Plantarum, 2021, 172(2): 1106-1132.

[3] Bittner A, Ciesla A, Gruden K, et al. Organelles and phytohormones: a network of interactions in plant stress responses [J]. Journal of Experimental Botany, 2022, 73(21): 7165-7181.

[4] Li H, Teng R M, Liu J X, et al. Identification and analysis of genes involved in auxin, abscisic acid, gibberellin, and brassinosteroid metabolisms under drought stress in tender shoots of tea plants [J]. DNA and Cell Biology, 2019, 38(11): 1292-1302.

[5] 岳川, 曾建明, 章志芳, 等. 茶树中植物激素研究进展[J]. 茶叶科学, 2012, 32(5): 382-392.

Yue C, Zeng J M, Zhang Z F, et al. Research progress in the phytohormone of tea plant (*Camellia sinensis*) [J]. Journal of Tea Science, 2012, 32(5): 382-392.

[6] 李梦菡, 吉艳艳, 张丽平, 等. 植物激素在茶树应对非生物逆境中的作用研究进展[J]. 中国茶叶, 2022, 44(10): 8-15.

Li M H, Ji Y Y, Zhang L P, et al. Research progress on the role of plant hormones in tea plant coping with abiotic stress [J]. China Tea, 2022, 44(10): 8-15.

[7] Gai Z S, Wang Y, Ding Y Q, et al. Exogenous abscisic acid induces the lipid and flavonoid metabolism of tea plants under drought stress [J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 12275. doi: 10.1038/s41598-020-69080-1.

[8] 周琳, 徐辉, 朱旭君, 等. 脱落酸对干旱胁迫下茶树生理特性的影响[J]. 茶叶科学, 2014, 34(5): 473-480.

Zhou L, Xu H, Zhu X J, et al. Effect of abscisic acid on physiological characteristics of tea plant under drought stress [J]. Journal of Tea Science, 2014, 34(5): 473-480.

[9] Liu S C, Jin J Q, Ma J Q, et al. Transcriptomic analysis of tea plant responding to drought stress and recovery [J]. Plos One, 2016, 11(1): e0147306. doi: 10.1371/journal.pone.0147306.

[10] 王莹, 李岩, 王姝, 等. 低温胁迫下贵州云雾贡茶生长调节剂的变化[J]. 湖北农业科学, 2020, 59(8): 99-102.

Wang Y, Li Y, Wang S, et al. Changes of growth regulators of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze var. *niaowangensis* Q. H. Chen under low temperature stress in Guizhou [J]. Hubei

- Agricultural Sciences, 2020, 59(8): 99-102.
- [11] Shen J Z, Zou Z W, Xing H Q, et al. Genome-wide analysis reveals stress and hormone responsive patterns of JAZ family genes in *Camellia sinensis* [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(7): 2433. doi: 10.3390/ijms21072433.
- [12] Li X, Ahammed G J, Zhang X N, et al. Melatonin-mediated regulation of anthocyanin biosynthesis and antioxidant defense confer tolerance to arsenic stress in *Camellia sinensis* L [J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 403: 123922. doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.123922.
- [13] 曾光辉, 马青平, 王伟东, 等. 自然低温对茶树内源激素含量的影响[J]. 茶叶科学, 2016, 36(1): 85-91.
- Zeng G H, Ma Q P, Wang W D. et al. Effect of natural low-temperature on endogenous hormones of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze plant [J]. Journal of Tea Science, 2016, 36(1): 85-91.
- [14] 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]. PNAS, 2018, 115(18): E4151-E4158.
- [15] 徐媛. 干旱胁迫下花生转录组与小 RNA 测序及相关基因的表达分析[D]. 桂林: 广西师范大学, 2020.
- Xu Y. Sequencing of transcriptome and small RNA and expression analysis of related genes in peanut under drought stress [D]. Guilin: Guangxi Normal University, 2020.
- [16] Li Y, Wang Y P, Tan S T, et al. Root growth adaptation is mediated by PYLs ABA receptor-PP2A protein phosphatase complex [J]. Advanced Science, 2020, 7(3): 1901455. doi: 10.1002/advs.201901455.
- [17] Shen Z, Zhang Y H, Zhang L, et al. Changes in the distribution of endogenous hormones in *Phyllostachys edulis* 'Pachyloen' during bamboo shooting [J]. Plos One, 2020, 15(12): e0241806. doi: 10.1371/journal.pone.0241806.
- [18] Wang H Y, Cui K, He C Y, et al. Endogenous hormonal equilibrium linked to bamboo culm development [J]. Genetics and Molecular Research, 2015, 14(3): 11312-11323.
- [19] 陈博雯, 覃子海, 张烨, 等. 干旱胁迫下澳洲茶树生理活性及内源激素动态变化研究[J]. 山东农业科学, 2019, 51(10): 55-59.
- Chen B W, Qin Z H, Zhang Y, et al. Dynamic changes of physiological activities and endogenous hormones in *Melaleuca alternifolia* under drought stress [J]. Shandong Agricultural Sciences, 2019, 51(10): 55-59.
- [20] 王得运, 刘培培, 陈云婷, 等. 干旱胁迫对栀子内源激素含量的影响[J]. 中国农业科技导报, 2021, 23(4): 58-63.
- Wang D Y, Liu P P, Chen Y T, et al. Effect of drought stress on endogenous hormone content of *Gardenia jasminoides* Ellis [J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2021, 23(4): 58-63.
- [21] 王日明, 熊兴耀. 高温胁迫对黑麦草生长及生理代谢的影响[J]. 草业学报, 2016, 25(8): 81-90.
- Wang R M, Xiong X Y. Effect of temperature stress on growth and metabolism in perennial ryegrass [J]. Acta Prataculturae Sinica, 2016, 25(8): 81-90.
- [22] 朱琨, 李波, 邬婷婷. 高温胁迫对苜蓿愈伤组织内源激素含量的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2021(12): 102-106.
- Zhu K, Li B, Wu T T. Effect of high temperature stress on endogenous hormone content in alfalfa callus [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2021(12): 102-106.
- [23] Liu X Z, Huang B R. Cytokinin effects on creeping bentgrass response to heat stress: II. Leaf senescence and antioxidant metabolism [J]. Crop Science, 2002, 42(2): 466-472.
- [24] Li S L, Li X N, Wei Z H, et al. ABA-mediated modulation of elevated CO₂ on stomatal response to drought [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2020, 56: 174-180.
- [25] Islam M R, 符冠富, 奉保华, 等. “稻清”减轻水稻穗期高温伤害的原因分析[J]. 中国稻米, 2018, 24(3): 21-24.
- Islam M R, Fu G F, Feng B H, et al. Physiological mechanisms involved in “Daoqing” alleviating the damage on rice under heat stress [J]. China Rice, 2018, 24(3): 21-24.
- [26] Xu P, Zhang X Y, Su H, et al. Genome-wide analysis of PYL-PP2C-SnRK2s family in *Camellia sinensis* [J]. Bioengineered, 2020, 11(1): 103-115.
- [27] Pei X X, Wang X Y, Fu G Y, et al. Identification and functional analysis of 9-*cis*-epoxy carotenoid dioxygenase (NCED) homologs in *G. hirsutum* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 182: 298-310.
- [28] Jahan A, Komatsu K, Wakida-Sekiya M, et al. Archetypal roles of an abscisic acid receptor in drought and sugar responses in liverworts [J]. Plant Physiology, 2019, 179(1): 317-328.
- [29] Nie X H, Zhao S Q, Hao Y Q, et al. Transcriptome analysis reveals key genes involved in the resistance to *Cryphonectria parasitica* during early disease development

- in Chinese chestnut [J]. BMC Plant Biology, 2023, 23(1): 79. doi: 10.1186/s12870-023-04072-7.
- [30] Zhao W C, Huang H, Wang J J, et al. Jasmonic acid enhances osmotic stress responses by MYC2-mediated inhibition of *protein phosphatase 2C1* and *response regulators 26* transcription factor in tomato [J]. Plant Journal, 2022, 113(3): 546-561.
- [31] Wang Y C, Xu H F, Liu W J, et al. Methyl jasmonate enhances apple' cold tolerance through the JAZ-MYC2 pathway [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2019, 136(1): 75-84.
- [32] Thines B, Katsir L, Melotto M, et al. JAZ repressor proteins are targets of the SCF^{COI1} complex during jasmonate signalling [J]. Nature, 2007, 448(7154): 661-665.
- [33] Chico J M, Lechner E, Fernandez-Barbero G, et al. CUL3^{BPM} E3 ubiquitin ligases regulate MYC2, MYC3, and MYC4 stability and JA responses [J]. PNAS, 2020, 117(11): 6205-6215.
- [34] Jung C, Zhao P Z, Seo J S, et al. PLANT U-BOX PROTEIN10 regulates MYC2 stability in arabidopsis [J]. Plant Cell, 2015, 27(7): 2016-2031.
- [35] Nakano M, Omae N, Tsuda K. Inter-organismal phytohormone networks in plant-microbe interactions [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2022, 68: 102258. doi: 10.1016/j.pbi.2022.102258.



云南省典型茶园重金属元素地球化学特征及风险性评估

谢萌丽¹, 常河^{1*}, 周晓华², 杨天福², 龙坤¹

1. 昆明理工大学国土资源工程学院, 云南 昆明 650093;

2. 云南省地质矿产勘查开发局中心实验室(国土资源部昆明矿产资源监督检测中心), 云南 昆明 650218

摘要:为探明茶园地质背景与茶叶之间重金属元素含量的关系与现状,以云南省勐库茶园和景迈茶园中的岩石、土壤和茶叶为研究对象,测定10种重金属元素(Hg、Cd、Pb、Co、Cr、Cu、Mn、Ni、Zn、As)的含量,采用多元统计分析和空间分析方法对茶园重金属进行特征总结和风险评价。结果表明:(1)与地壳元素丰度相比,勐库茶园和景迈茶园岩石中的As是富集元素,勐库茶园岩石中的Hg和景迈茶园岩石中Mn元素是贫乏元素;(2)勐库茶园土壤主要以As和Cr污染为主,景迈茶园土壤主要以Cr和Cu污染为主,均为轻度污染,土壤质量良好;(3)茶叶重金属元素的平均含量顺序主要为Mn>Zn>Cu>Ni>Cr,富集能力依次是Mn>Zn>Hg>Cu>Ni,仅有勐库茶园个别茶样As含量超标,茶叶中重金属含量总体处于安全级别;(4)勐库茶园和景迈茶园茶叶中Mn非致癌风险最高,勐库茶园茶叶As致癌风险最高,景迈茶园茶叶Cr致癌风险最高,其余重金属元素处于安全范围内。

关键词: 重金属; 变异系数; 地累积指数; 富集; 健康风险

中图分类号:S571.1;S151.9

文献标识码:A

文章编号:1000-369X(2023)04-501-12

Geochemical Characteristics and Risk Assessment of Heavy Metals in Typical Tea Gardens in Yunnan Province

XIE Mengli¹, CHANG He^{1*}, ZHOU Xiaohua², YANG Tianfu², LONG Kun¹

1. Faculty of Land and Resources Engineering, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650093, China; 2. Central Laboratory of Yunnan Geology and Mineral Exploration Development Bureau (Kunming Mineral Monitoring and Inspecting Centre of Ministry of Land and Resources), Kunming 650218, China

Abstract: In order to explore the relationship and the current situation between the geological background of tea garden and the content of heavy metal elements in tea, the rocks, soil and tea in Mengku tea garden and Jingmai tea garden in Yunnan Province were selected as the research objects. The contents of 10 heavy metal elements (Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn, Mn, As) were determined. Multivariate statistical analysis and spatial analysis were used to summarize the characteristics and risk assessment of heavy metals in tea gardens. The results show that: (1) compared with the abundance of elements in the crust, the rocks in Mengku and Jingmai tea gardens were rich in As. While the rocks of Mengku tea garden were poor in Hg and the rocks of Jingmai tea garden were poor in Mn. (2) The soil of Mengku tea garden was mainly polluted by As and Cr. The soil of Jingmai tea garden was mainly polluted by Cr and Cu. They were all lightly polluted and had good soil quality. (3) The average contents of heavy metal elements in tea followed the order of Mn>Zn>Cu>Ni>Cr. The accumulation ability followed the order of Mn>Zn>Hg>Cu>Ni. Only a few tea samples from Mengku tea garden had As content exceeding the standard. And

收稿日期: 2023-02-13

修订日期: 2023-04-30

基金项目: 国家自然科学基金(42167052)、云南省科技厅基金(202101AT070277)、基础研究专项-青年项目(202201AU070091)

作者简介: 谢萌丽, 女, 硕士研究生, 主要从事农业地质方面的研究, 1079460428@qq.com。*通信作者: 22786473@qq.com

the heavy metal contents in tea were generally at the safe level. (4) For tea samples from Mengku and Jingmai tea gardens, Mn had the highest non-carcinogenic risk. As in Mengku tea had the highest carcinogenic risk. Cr in Jingmai tea had the highest carcinogenic risk. And other heavy metal elements were within the safe range.

Keywords: heavy metals, coefficient of variation, geoaccumulation index, enrichment, health risks

重金属具有较强的稳定性和毒性,影响农产品质量、生态安全和人类健康^[1]。随着工业化进程的迅速发展,地质环境问题已成为研究热点。成土母质是土壤重金属的原始来源,农用物质和生活输入会使重金属蓄积在土壤中,农产品中的重金属含量会受到地质背景和人为因素的共同影响^[2]。茶是世界上非常受欢迎的非酒精饮料之一,饮茶有助于人体对矿质元素的吸收,起到营养保健的作用。但当茶树生长的土壤中重金属浓度超过一定阈值后,会对茶树生长造成伤害,且在茶叶中累积,最终通过口服摄入途径向人体迁移,不仅影响茶叶质量,更会危害人体健康。

已有大量学者对茶园地质背景和茶叶中重金属问题展开研究,二叠系石灰岩和寒武系白云岩发育的土壤重金属浓度明显高于志留系碎屑岩发育的土壤^[3],发育于花岗岩母质的茶园土壤中 Zn 含量较低,在土壤中配施有机肥可提高茶叶中的 Zn 含量^[4],茶叶中 Mn 和 Cr 含量与对应土壤中 Mn 和 Cr 含量呈线性增长趋势^[5],冬季茶叶中 Cr、As、Cd、Mn 和 Pb 的含量比夏季茶叶高^[6],持续摄入 Cr 会在人体组织中积累,引起慢性健康风险^[7]。云南省有色金属矿产资源丰富,土壤中 Cu、Cr、Pb 和 Cd 等重金属含量偏高现象实际存在^[8]。以往大范围调查的土壤重金属数据难以支撑培植优质农产品和区域治理土壤污染,小范围且有针对性地探究则具有实际指导意义^[9]。

目前关于勐库茶园和景迈茶园地质背景重金属含量特征及茶叶健康风险评价等研究空缺,有必要开展两地区的重金属含量调查,评估饮茶健康风险,有效保障茶叶绿色种植和地质背景安全。因此,本研究采集了勐库茶园和景迈茶园中的岩石、土壤和茶叶样品,研究

重金属元素的地球化学特征、污染现状、影响因素及人体健康风险评价,旨在为云南茶产业的保护和发展提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

云南大叶种茶是典型的高原特色农作物之一,云南省临沧市双江县勐库茶园和景迈茶园是大叶种茶的优质产区。勐库(MK)茶园出露地层由老到新依次为古生代变质地层双江地区澜沧群 b 段(Pz_1ln^b)、 a 段(Pz_1ln^a)及三叠纪侵入岩 $\gamma_5^{1(a)}$ 。澜沧群 b 段岩性主要是石英片岩、石榴石片岩、变粒岩、角闪斜长岩及石榴石岩,澜沧群 a 段岩性主要是片岩、变粒岩夹石榴石片岩, $\gamma_5^{1(a)}$ 岩性主要是花岗岩边缘相。勐库茶园所处位置经历过强烈的动力变质作用和区域变质作用,具有强烈的风化剥蚀,茶园内出现南北向逆断层和东西向平移断层,构造活动十分丰富。土壤类型以黄棕壤、红壤为主,多为中壤土。

景迈(JM)茶园出露地层由老到新依次为侏罗系中统花开左组下段(J_2h^1)、上元古界澜沧群南坑河组(Pt_3n)、惠民组上段(Pt_3h^2)和下段(Pt_3h^1)。 J_2h^1 岩性主要以紫红色石英砾岩、砂岩为主, Pt_3n 岩性主要以灰白色绢云硅质石英砂岩夹微晶片岩为主, Pt_3h^2 岩性主要以绿泥片岩、绢云片岩为主。土壤类型以紫红壤、赤红壤和红壤为主。研究区地质背景及采样点位置分布如图 1 所示。

1.2 样品采集与处理

1.2.1 样品采集预处理

本研究在勐库茶园采集了 8 份岩石、16 份土壤、8 份茶叶样品,在景迈茶园采集了 3

份岩石、7 份土壤、5 份茶叶样品, JM01 点处未采集到 C 层土壤和岩石样品, JM05 处仅采集茶叶样品。在采样点处凿 1 个深约 2 m 的土壤剖面, 岩石由地质锤在底部取出, 沿剖面侧部用塑料铲分别取 C 层土壤样品(深约 1 m)、

A 层土壤样品(深约 0.5 m), 在对应的茶树上采集茶叶(一芽两叶)。各样品均由 3~5 个子样混合, 岩石和土壤样品装入透气布袋, 茶叶样品装入透气网袋, 标记编号并详细记录周边信息。

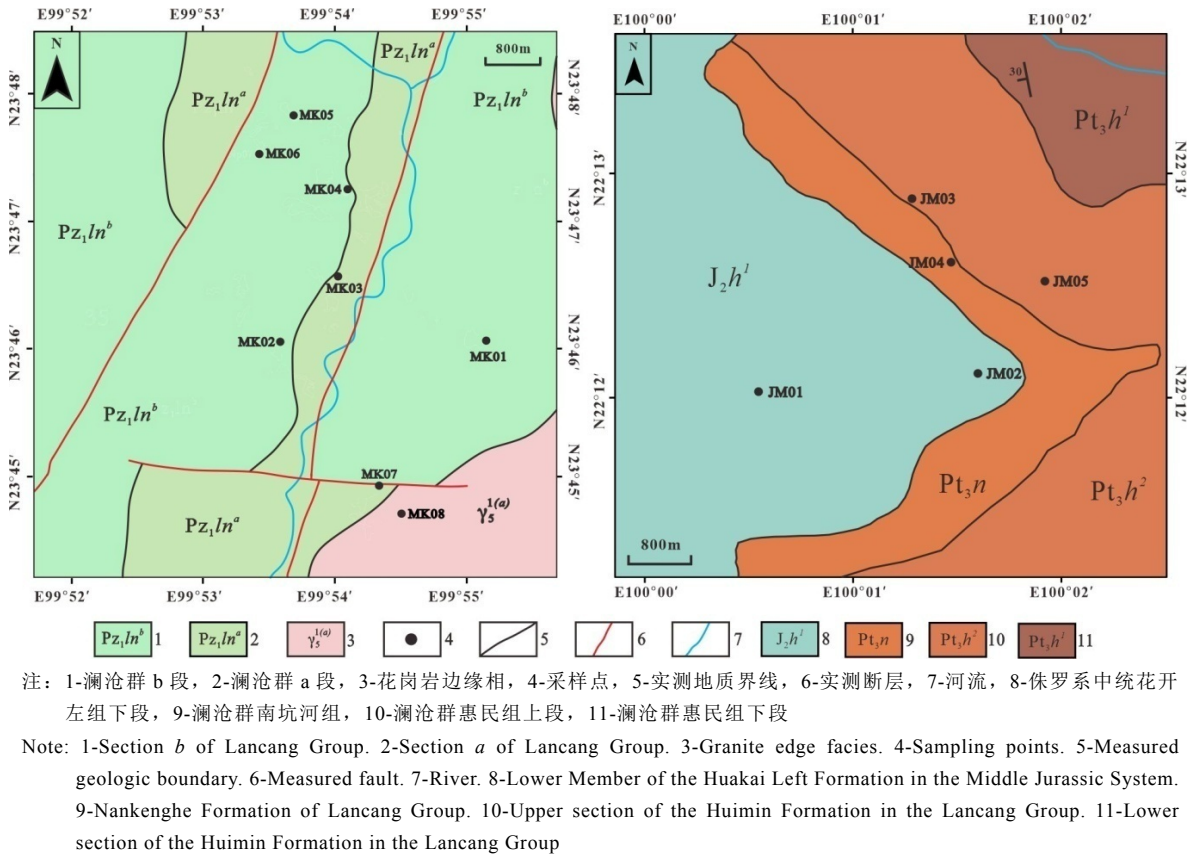


图 1 研究区地质背景及采样点位置分布

Fig. 1 Geological background and sampling point location distribution in the study

将岩石样品置于电热鼓风干燥箱中 105 ℃ 烘干, 使用辊式破碎机破碎至小于 2 mm, 采用四分法缩分至检测所需数量, 使用无污染行星式球磨机破碎至 0.075 mm 用于检测。将土壤样品 40 ℃ 风干, 用橡胶锤或木棒碾压破碎后, 剔除植物根系、碎石等杂物, 提拉法混匀, 使用研钵研磨至可以全部通过孔径 2 mm 尼龙筛, 采用四分法缩分至检测所需数量, 研钵研磨过 160 目尼龙筛用于检测。将茶叶样品用自来水、去离子水各冲洗 3 次, 再充分风干,

经破碎机破碎至可以全部通过 200 目尼龙筛后用于检测。

1.2.2 化学分析

土壤和岩石中 Cd 和 Pb 由电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)测定, 检出限为 0.01 mg·kg⁻¹ 和 0.5 mg·kg⁻¹; Co、Cr、Cu、Ni、Zn 和 Mn 由电感耦合等离子体原子发射光谱法(ICP-AES)测定, 检出限分别为 0.5、1、0.5、0.2、1 mg·kg⁻¹ 和 2 mg·kg⁻¹; As 和 Hg 由氢化物发生-原子荧光光谱法(AFS)测定, 检出

限为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $0.000 5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。茶叶样品中的 Hg、Cd、Pb、Co、Cr、Mn、Ni、Zn、As 采用 DZ/T 0253.1—2014 方法测定, Hg 采用 DZ/T 0253.3—2014 方法测定。

所有检测分析均在云南省地质矿产勘查开发局中心实验室(国土资源部昆明矿产资源监督检测中心)完成。化学分析时, 遵循质量保证和质量控制(QA/QC)协议, 以确保结果的可靠性和准确性。高质量的去离子水用于清洗玻璃器皿, 制备标准品和稀释样品。分析试剂空白, 然后对数据进行空白校正, 以消除分析误差。

1.3 评价指标

1.3.1 变异系数

变异系数(C_v)可以消除数据之间量纲波动的影响, 客观反映研究区内元素的空间分布差异性。 $C_v < 10\%$ 为弱变异, $10\% \leq C_v \leq 100\%$ 为中等变异, $C_v > 100\%$ 为强变异^[10]。

$$C_v = \frac{\text{标准偏差}}{\text{平均值}} \dots\dots\dots (1)$$

1.3.2 生物富集系数

生物富集系数(BF)指茶叶中重金属元素含量与其生长土壤中相应重金属元素含量的比值, 可评估茶叶从土壤中富集该元素的能力, $BF > 1$ 表示在迁移过程中富集, $BF < 1$ 则表示亏损^[11]。

$$BF = \frac{\text{茶叶中某元素含量}}{\text{土壤中相应元素含量}} \dots\dots\dots (2)$$

1.3.3 土壤地累积指数污染评价

土壤重金属污染评价采用德国科学家 Muller 提出的地累积指数(I_{geo}), 能够反映土壤中重金属的累积程度, 在一定程度上量化土壤环境受人类活动的影响, 已被广泛应用于河湖沉积物和土壤重金属污染程度评价^[12]。 I_{geo} 计算公式如下:

$$I_{geo} = \log_2 \left(\frac{C_i}{1.5B_i} \right) \dots\dots\dots (3)$$

式中, C_i 为样品中元素 i 的含量 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); B_i 为元素 i 的背景值^[13]。根据 I_{geo}

值的不同分级^[14], 其中 $I_{geo} < 0$, 表示无污染; $0 \leq I_{geo} < 1$, 表示轻度污染; $1 \leq I_{geo} < 2$, 表示轻中度污染; $2 \leq I_{geo} < 3$, 表示偏重污染; $3 \leq I_{geo} < 4$, 表示重度污染; $4 \leq I_{geo} < 5$, 表示严重污染; $5 \leq I_{geo}$, 表示极严重污染。

1.3.4 健康风险评估

采用美国环境保护署(USEPA)推荐的健康风险评估模型量化饮茶的暴露风险, 所有评估指标均基于平均每日摄入量(ADI, $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)^[15]。本研究的风险评估计算采用各元素含量的平均值计算。

$$ADI = \frac{C \times IR \times EF \times ED}{BW \times AT} \dots\dots\dots (4)$$

式中, C 为茶叶的重金属元素含量 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); IR 为茶的平均每日摄入量, 假设为 $1 \text{ L} \cdot \text{d}^{-1}$ ^[16]; EF 表示暴露频率, 假设为 $365 \text{ d} \cdot \text{a}^{-1}$; ED 为暴露持续时间, 假设为 57 a ; AT 为时间段, 单位为 d , 可计算为 $AT = ED \times 365$; BW 是暴露人群的体质量, 假设成人为 61.75 kg 。用 HQ 来评估茶叶中某种重金属元素的非致癌风险, 总非致癌风险 THQ 是某样品中所有重金属元素 HQ 值的总和。

$$HQ_i = \frac{ADI_i}{RfD_i} \dots\dots\dots (5)$$

$$THQ = \sum_{i=1}^n HQ_i \dots\dots\dots (6)$$

式中, RfD_i 是重金属元素 i 的参考口服剂量 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), Cd、Co、Cr、Cu、Hg、Ni、Pb、Zn、Mn 和 As 的 RfD_i 值分别为 0.001 0、0.003 0、0.003 0、0.040 0、0.001 0、0.020 0、0.003 5、0.300 0、0.140 0、0.003 0, HQ 值和 THQ 值小于 1 表示非致癌健康风险处于安全等级, HQ 值和 THQ 值大于 1 表示存在显著的不良非癌症影响^[17]。

$$Risk_i = ADI_i \times SF_i \dots\dots\dots (7)$$

$$Risk_{Total} = \sum_{i=1}^n Risk_i \dots\dots\dots (8)$$

式中, $Risk_i$ 为某种重金属元素 i 的致癌风险, $Risk_{Total}$ 为所有重金属元素的健康风险总和。 SF 为癌症斜率因子, Cd、Cr、Pb、As 的 SF 分别为 15、0.5、0.008 5、1.5, 其他元素暂无参考标准值。致癌风险等级分为无风险

($<10^{-6}$)、可耐受风险($10^{-6}\sim 10^{-4}$)和不可耐受风险($>10^{-4}$)^[18]。

1.4 数据处理

采用 Microsoft Excel 2019 软件统计重金属元素的最大值、最小值、平均值、标准差和变异系数,计算茶叶对重金属元素的富集系数,评估茶叶健康风险。采用 Origin 9.0 绘制土壤重金属元素地累积指数污染评价图。所有图形均采用 CorelDRAW 2020 进一步绘制加工。

2 结果与分析

2.1 岩石重金属元素地球化学特征

2.1.1 岩石矿物组分

岩石由矿物组成,矿物含量的多少取决于成岩的物质条件 and 环境。勐库茶园地区经历了 3 期变质作用,华力西期变质作用新生石英、白云母、绢云母、黑云母、绿泥石、钠长石和斜长石等变质矿物,印支期变质作用使矿物退变、岩石糜棱岩化和碎裂岩化^[19]。景迈茶园地区主要由海陆交互的红色碎屑沉积构成,含有多层变质铁矿,每套地层角度整合/不整合于其他地层^[20]。

勐库茶园和景迈茶园不同地层的岩石中矿物组分及岩性特征如表 1 所示。可以看出,勐库茶园的岩性基础主要是片岩、糜棱岩和花岗岩,景迈茶园的岩性基础主要为石英砂岩。勐库茶园中 Pz_1ln^a 地层与 $\gamma_5^{(a)}$ 地层上岩石中的

矿物组分相似,石英和云母含量略低于 Pz_1ln^b 地层上的岩石,但长石、绿泥石、褐铁矿高于 Pz_1ln^b 地层上的岩石。这些变化与该地区的变质风化作用及丰富的构造活动密不可分。景迈茶园岩石中的矿物主要以石英和云母为主,景迈茶园岩石中的石英含量普遍高于勐库茶园。

2.1.2 岩石重金属元素含量特征

岩石制约着土壤的类型和肥力,也是茶叶矿物营养物质的资源库。研究区岩石重金属含量统计结果如表 2 所示。勐库茶园岩石中 Hg、Cd、Cu 平均含量低于景迈茶园,Co、Cr、Mn、Ni、Zn、As 平均含量高于景迈茶园,两茶园 Pb 平均含量相同。与地壳元素丰度相比,勐库茶园岩石中 Cu、As 和景迈茶园岩石中 Hg、Cu、As 的平均含量高于地壳元素丰度值,勐库茶园和景迈茶园岩石中的 As 含量较为丰富,分别约为地壳丰度的 36.7 倍和 8.0 倍;勐库茶园岩石中的 Hg 含量仅为地壳丰度的 25.0%,景迈茶园中的 Mn 含量仅为地壳丰度的 15.5%,表明勐库茶园岩石中的 Hg 元素和景迈茶园岩石中的 Mn 元素最缺乏。勐库茶园岩石样品中的 Cu 和 As 属于强变异,空间差异性较大,其他重金属元素属于中等变异;景迈茶园的所有重金属元素均属于中等变异。

2.2 土壤重金属元素地球化学特征

2.2.1 土壤重金属元素含量特征

深层土由岩石风化而来,主控因素为成土

表 1 研究区岩性特征及矿物组分

Table 1 Lithologic characteristics and mineral components in the study

茶园	地层代号	样品	岩性	石英	云母	长石	绿泥石	褐铁矿	高岭石	方解石
Tea garden	Stratum code	Sample	Rock character	Quartz	Mica	Feldspar	Chlorite	Ferromagnetite	Kaolinite	Calcite
勐库 MK	Pz_1ln^b	MK01	褐灰色花岗质初糜棱岩	78.53	7.83	1.33	—	1.46	6.18	—
	Pz_1ln^b	MK02	褐灰色白云母石英片岩	73.99	21.74	2.07	2.20	—	—	—
	Pz_1ln^b	MK06	褐灰色二云片岩	61.43	35.73	1.74	1.10	—	—	—
	Pz_1ln^a	MK03	浅褐灰色长英质糜棱岩	50.03	7.83	14.53	19.67	7.94	—	—
	$\gamma_5^{(a)}$	MK08	浅灰色细粒黑云母花岗岩	55.98	7.83	26.64	—	7.94	—	—
景迈	Pt_3n	JM03	灰白色绢云硅质石英砂岩	90.69	5.21	—	1.07	—	—	3.03
JM	J_2h^I	JM02	紫红色石英砂岩	87.50	12.50	—	—	—	—	—

量均高于 Cr, Cr 高于其他元素含量, 继承岩石中 Mn 含量最高的特征; Hg、Cd、Pb、Co、Cr、Mn、Ni、Zn 等元素在 A 层土壤中含量较高, Cu 元素在 C 层土壤中含量较高。勐库茶园 C 层土壤中的 As 含量高于 A 层土壤中的 As 含量, 继承了岩石强变异的特点。与云南省 A 层土壤背景值相比, 勐库茶园 A 层土壤中 Hg、Cr、As 和景迈茶园 A 层土壤中 Hg、Cr、Cu、Mn 的平均含量高于背景值。与云南省 C 层土壤背景值相比, 勐库茶园 C 层土壤中 Cr、As 和景迈茶园 C 层土壤中 Hg、Cr、Cu 的平均含量高于背景值。与农用地土壤污染风险筛选值相比, 勐库茶园土壤中的 As 和景迈茶园土壤中的 Cu 含量较高, 存在一定的土壤污染风险。

2.2.2 土壤重金属元素地累积指数污染评价

以云南省 A 层和 C 层土壤重金属背景值为参照, 采用地累积指数法对研究区 A 层土壤和 C 层土壤中 10 种重金属元素 (Hg、Cd、Pb、Co、Cr、Cu、Mn、Ni、Zn、As) 污染情况进行评价, 结果如图 2 所示。勐库茶园 A 层土壤中 As 和 Cr 整体属于轻度污染, 个别样点中的 As 达到了偏重污染程度, 个别样点中的 Hg 和 Mn 出现轻度污染现象。勐库茶园 C 层土壤中 As 整体呈现轻度污染状态, 个别样点中的 As 达到了偏重污染程度, 个别样点中的 Cr 和 Cu 属于轻度污染。结合岩石特征可知, 勐库茶园土壤中 As 和 Cr 污染主要是由地质背景引起的, Hg 的个别污染可能来源于人为活动输入^[24]。景迈茶园 A 层土壤中重

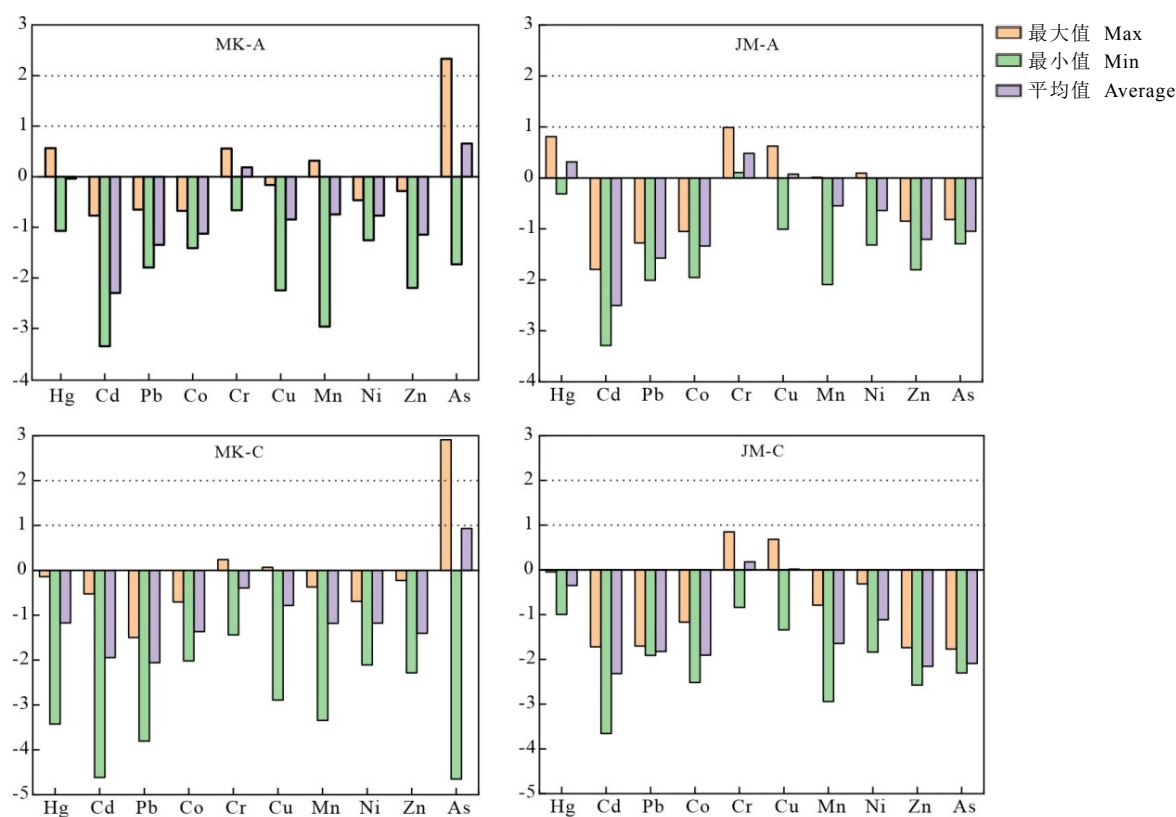


图 2 研究区土壤中重金属元素地累积指数污染评价结果

Fig. 2 Assessment results of the accumulation index pollution of heavy metal elements in the soils of the study area

金属污染程度整体较勐库茶园轻，其中，Hg、Cr、Cu 整体呈现轻度污染，个别样点中的 Cr 出现轻中度污染现象。景迈茶园 C 层土壤中仅出现 Cr 和 Cu 的轻度污染。景迈茶园土壤中 Hg、Cr、Cu 污染主要是由地质背景引起的。

2.3 茶叶重金属元素地球化学特征

2.3.1 茶叶重金属元素含量特征

研究区茶叶样品中重金属元素含量统计结果如表 4 所示。勐库茶园茶叶样品中重金属元素的平均含量大小为 $Mn > Zn > Cu > Ni > Cr > As > Pb > Co > Hg > Cd$ ，景迈茶园茶叶样品中重金属元素的平均含量大小为 $Mn > Zn > Cu > Ni > Cr > Pb > Co > Hg > As > Cd$ ，由此可知 Mn、Zn、Cu、Ni、Cr 为本研究茶叶中主要的重金属元素。勐库茶园茶叶中 Hg、Cd、Pb 和 As 的平均含量高于景迈茶园茶叶，而景迈茶园茶叶中 Co、Cr、Cu、Mn、Ni 和 Zn 高于勐库茶园茶叶。研究区内，除勐库茶园茶叶中个别样品出现 As 超标外，其他茶叶样品中

的重金属含量均低于茶叶安全标准值。研究区茶叶样品中的 As 元素变异系数均大于 100%，

表明采样点之间 As 元素的含量差异较大。

2.3.2 茶叶重金属元素富集能力

重金属元素从土壤到茶叶的迁移和积累是其进入食物链的主要途径。研究区茶叶样品对重金属元素的生物富集系数如表 5 所示。勐库茶园茶叶从土壤中富集重金属的能力为 $Mn > Hg > Zn > Cu > Cd > Ni > Pb > As > Co > Cr$ ，景迈茶园茶叶从土壤中富集重金属的能力为 $Mn > Zn > Hg > Cu \approx Cd > Ni > Pb > Co > Cr > As$ 。茶叶普遍对 Mn 具有高富集能力^[26]，其次是 Zn、Hg、Cu、Ni，研究表明，Mn、Zn、Cu、Ni 是茶树生长发育所必须的元素^[27]，说明研究区茶叶整体质量较好。茶叶对 Cr 的富集能力较小，可能是因为茶树吸收土壤中的 Cr 后主要累积在茶树根部，往叶片上迁移能力很弱^[28]。

表 4 研究区茶叶样品中重金属元素含量统计结果

Table 4 Statistical results of heavy metal contents in tea samples from the study area

茶园	统计量	汞	镉	铅	钴	铬	铜	锰	镍	锌	砷
Tea garden	Statistics	Hg	Cd	Pb	Co	Cr	Cu	Mn	Ni	Zn	As
勐库 MK (n=8)	平均值/ $mg \cdot kg^{-1}$	0.028	0.012	0.487	0.096	0.785	8.727	723	4.425	13.898	0.627
	最大值/ $mg \cdot kg^{-1}$	0.058	0.026	0.577	0.124	1.567	10.048	1 098	7.276	17.089	2.344
	最小值/ $mg \cdot kg^{-1}$	0.013	0.006	0.355	0.059	0.266	5.025	356	1.602	12.134	0.076
	标准差	0.014	0.006	0.080	0.022	0.377	1.580	264	1.853	1.455	0.689
	变异系数/%	52	55	16	23	48	18	37	42	10	110
景迈 JM (n=5)	平均值/ $mg \cdot kg^{-1}$	0.021	0.009	0.332	0.103	1.237	11.595	989	6.180	19.420	0.013
	最大值/ $mg \cdot kg^{-1}$	0.031	0.019	0.394	0.155	3.472	13.347	1 695	9.509	25.417	0.038
	最小值/ $mg \cdot kg^{-1}$	0.013	0.003	0.269	0.039	0.515	8.627	596	3.401	15.069	0.000
	标准差	0.008	0.006	0.042	0.042	1.122	1.581	404	2.083	4.006	0.014
	变异系数/%	38	64	13	41	91	14	41	34	21	107
茶叶标准 ^[25] / $mg \cdot kg^{-1}$		0.3	1	5	—	5	30	—	—	—	2
Tea standard											

表 5 研究区茶叶样品重金属元素生物富集系数

Table 5 Biological factor of heavy metal elements in tea samples from the study area

茶园	汞	镉	铅	钴	铬	铜	锰	镍	锌	砷
Tea garden	Hg	Cd	Pb	Co	Cr	Cu	Mn	Ni	Zn	As
勐库 MK	0.328	0.177	0.020	0.008	0.007	0.225	1.291	0.118	0.229	0.014
景迈 JM	0.195	0.159	0.016	0.010	0.009	0.159	1.539	0.151	0.333	0.001

2.3.3 茶叶重金属元素健康风险评估

人体健康风险评估模型可以定量评估饮茶对人体的潜在危害^[29]。研究区茶园茶叶样品重金属元素健康风险指标结果如表 6 所示。可以看出,勐库茶园和景迈茶园茶叶样品中日平均摄入量较高的重金属元素为 Mn、Zn 和 Cu。勐库茶园茶叶样品中的非致癌风险平均值大小顺序为 Mn>As>Co>Cr>Ni>Cu>Pb>Zn>Hg>Cd, 景迈茶园茶叶样品中的非致癌风险平均值大小顺序为 Mn>Cr>Co>Ni>Cu>Pb>Zn>As>Hg>Cd。勐库茶园茶叶样品中 As 的致癌风险平均值最大, 景迈茶园茶叶样品中 Cr 的致癌风险平均值最大, 均超过 10⁻⁴。

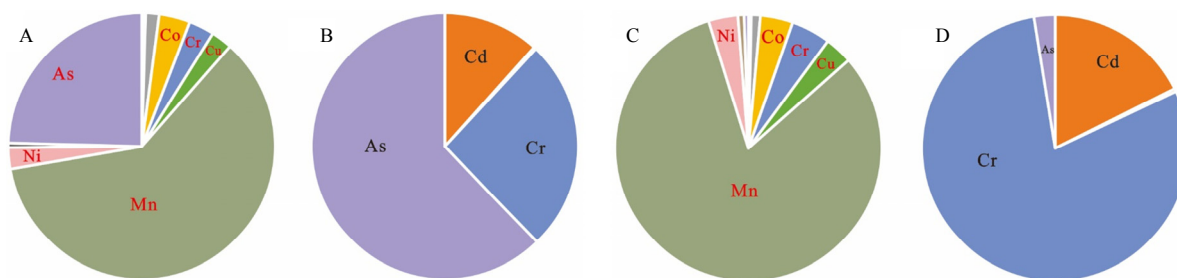
研究区茶叶样品重金属元素的 THQ 和 Risk_{Total} 贡献百分比如图 3 所示。勐库茶园茶叶样品中 Mn 的 HQ 平均值 (0.953) 接近 1, 约占 THD 的 60.75%, As 元素约占 THD 的

24.59%。景迈茶园茶叶样品中 Mn 的 HQ 值 (1.304) 大于 1, 约占 THD 值的 81.65%。勐库茶园茶叶样品中重金属元素 Risk 平均值占比大小为 As>Cr>Cd>Pb, 景迈茶园茶叶样品中重金属元素 Risk 平均值占比大小为 Cr>Cd>As>Pb。综上, 勐库茶园茶叶样品和景迈茶园茶叶样品中 Mn 元素的非致癌风险最高, 茶树自身的基因组控制了 Mn 元素在茶叶中的富集^[22, 30]。在勐库茶园茶叶中 As 元素致癌风险最高, 在景迈茶园茶叶中 Cr 元素致癌风险最高, 与茶园 As 和 Cr 的地球化学背景值高有关。

根据健康风险评价结果可知, 研究区茶叶中的 Mn 会对人体造成轻度不可接受的非致癌风险, 勐库茶园茶叶中的 As 和景迈茶园茶叶中的 Cr 会对人体造成轻度不可接受的致癌风险, 其他重金属元素引起的风险是可接受的。因此, 为了降低饮茶带来的风险, 应将

表 6 重金属元素的日平均摄入量 (ADI) 和非致癌风险 (HQ) 和致癌风险 (Risk)
Table 6 Average daily intake (ADI) and non-carcinogenic risk (HQ) and carcinogenic risk (Risk) of heavy metal elements

茶园 Tea garden	元素 Element	日平均摄入量 ADI/mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹			非致癌风险 HQ			致癌风险 Risk		
		平均值	最大值	最小值	平均值	最大值	最小值	平均值	最大值	最小值
勐库 MK	Hg	5.145×10 ⁻⁶	1.071×10 ⁻⁵	2.390×10 ⁻⁶	0.005	0.011	0.002	—	—	—
	Cd	2.174×10 ⁻⁶	4.847×10 ⁻⁶	1.082×10 ⁻⁶	0.002	0.005	0.001	3.261×10 ⁻⁵	7.271×10 ⁻⁵	1.623×10 ⁻⁵
	Pb	8.994×10 ⁻⁵	1.065×10 ⁻⁴	6.547×10 ⁻⁵	0.026	0.030	0.019	7.645×10 ⁻⁷	9.055×10 ⁻⁷	5.565×10 ⁻⁷
	Co	1.772×10 ⁻⁵	2.287×10 ⁻⁵	1.097×10 ⁻⁵	0.059	0.076	0.037	—	—	—
	Cr	1.449×10 ⁻⁴	2.893×10 ⁻⁴	4.904×10 ⁻⁵	0.048	0.096	0.016	7.245×10 ⁻⁵	1.446×10 ⁻⁴	2.452×10 ⁻⁵
	Cu	1.611×10 ⁻³	1.855×10 ⁻³	9.276×10 ⁻⁴	0.040	0.046	0.023	—	—	—
	Mn	1.335×10 ⁻¹	2.028×10 ⁻¹	6.568×10 ⁻²	0.953	1.448	0.469	—	—	—
	Ni	8.169×10 ⁻⁴	1.343×10 ⁻³	2.958×10 ⁻⁴	0.041	0.067	0.015	—	—	—
	Zn	2.566×10 ⁻³	3.155×10 ⁻³	2.240×10 ⁻³	0.009	0.011	0.007	—	—	—
	As	1.158×10 ⁻⁴	4.328×10 ⁻⁴	1.409×10 ⁻⁵	0.386	1.443	0.047	1.737×10 ⁻⁴	6.492×10 ⁻⁴	2.113×10 ⁻⁵
	合计	—	—	—	1.569	3.234	0.637	2.795×10 ⁻⁴	8.674×10 ⁻⁴	6.244×10 ⁻⁵
景迈 JM	Hg	3.892×10 ⁻⁶	5.787×10 ⁻⁶	2.380×10 ⁻⁶	0.004	0.006	0.002	—	—	—
	Cd	1.690×10 ⁻⁶	3.484×10 ⁻⁶	6.157×10 ⁻⁷	0.002	0.003	0.001	2.536×10 ⁻⁵	5.227×10 ⁻⁵	9.236×10 ⁻⁶
	Pb	6.135×10 ⁻⁵	7.273×10 ⁻⁵	4.963×10 ⁻⁵	0.018	0.021	0.014	5.214×10 ⁻⁷	6.182×10 ⁻⁷	4.219×10 ⁻⁷
	Co	1.892×10 ⁻⁵	2.856×10 ⁻⁵	7.212×10 ⁻⁶	0.063	0.095	0.024	—	—	—
	Cr	2.284×10 ⁻⁴	6.411×10 ⁻⁴	9.509×10 ⁻⁵	0.076	0.214	0.032	1.142×10 ⁻⁴	3.205×10 ⁻⁴	4.755×10 ⁻⁵
	Cu	2.141×10 ⁻³	2.464×10 ⁻³	1.593×10 ⁻³	0.054	0.062	0.040	—	—	—
	Mn	1.826×10 ⁻¹	3.129×10 ⁻¹	1.101×10 ⁻¹	1.304	2.235	0.787	—	—	—
	Ni	1.141×10 ⁻³	1.756×10 ⁻³	6.278×10 ⁻⁴	0.057	0.088	0.031	—	—	—
	Zn	3.585×10 ⁻³	4.692×10 ⁻³	2.782×10 ⁻³	0.012	0.016	0.009	—	—	—
	As	2.460×10 ⁻⁶	7.071×10 ⁻⁶	0	0.008	0.024	0.000	3.689×10 ⁻⁶	1.061×10 ⁻⁵	0
	合计	—	—	—	1.597	2.762	0.940	1.438×10 ⁻⁴	3.840×10 ⁻⁴	5.720×10 ⁻⁵



注：A，勐库茶叶样品 THQ 贡献百分比；B，勐库茶叶样品 Risk_{Total} 贡献百分比；C，景迈茶叶样品 THQ 贡献百分比；D，景迈茶叶样品 Risk_{Total} 贡献百分比

Note: A, THQ contribution percentage of Mengku tea samples. B, Risk_{Total} contribution percentage of Mengku tea samples. C, THQ contribution percentage of Jingmai tea sample. D, Risk_{Total} contribution percentage of Jingmai tea samples

图 3 重金属元素 THQ 和 Risk_{Total} 的贡献百分比

Fig. 3 The percentage contribution of THQ and Risk_{Total} of heavy metal elements

Mn 和 As 优先作为勐库茶园的风险控制对象，将 Mn 和 Cr 优先作为景迈茶园的风险控制对象，对地质背景和土壤给予更多关注和监测，定期对茶园土壤中的 Mn、As 和 Cr 进行管控，选择合适的肥料来固定茶园中重金属的转移和积累。

3 结论

本研究总结了勐库茶园和景迈茶园岩石、土壤和茶叶样品的重金属元素地球化学特征，系统阐述了茶园地质背景对茶叶的影响及岩石、土壤、茶叶三者之间关联性，同时对茶园的土壤和茶叶样品进行了重金属元素风险评估。研究表明，勐库茶园岩性主要以片岩、糜棱岩和花岗岩为主，景迈茶园岩性主要以砂岩为主。勐库茶园岩石、C 层土壤、A 层土壤样品中的 Cr、As 含量均高于背景值，且 As 为强变异，空间分布差异性较大。景迈茶园岩石、C 层土壤、A 层土壤样品中的 Hg、Cu 含量均高于背景，岩石风化会使土壤 Cr 含量升高。本研究茶叶样品中 Mn、Zn、Cu、Ni、Cr 含量较高，且强烈富集 Mn 元素。

勐库茶园土壤中的 Cr、As 污染主要是地

质背景引起的，个别样点 Mn 污染可能源于茶叶的强富集能力，个别样点 Hg 污染可能源于人为输入；景迈茶园土壤中的 Hg、Cr、Cu 污染主要是地质背景引起的。勐库茶园和景迈茶园茶叶样品中日平均摄入量较高的重金属元素为 Mn、Zn 和 Cu，非致癌风险值中 Mn 元素占比最大。勐库茶园茶叶样品中 As 致癌风险占比最大，景迈茶园茶叶样品中 Cr 致癌风险占比最大，实际生产中应长期对茶园土壤和茶叶中的 Mn、Hg、As 和 Cr 进行监测调控。

参考文献

- [1] 陈雅丽, 翁莉萍, 马杰, 等. 近十年中国土壤重金属污染源解析研究进展[J]. 农业环境科学学报, 2019, 38(10): 2219-2238.
Chen Y L, Weng L P, Ma J, et al. Review on the last ten years of research on source identification of heavy metal pollution in soils [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2019, 38(10): 2219-2238.
- [2] Li Q H, Li C F, Liu L J, et al. Geochemical characteristics of heavy metals of bedrock, soil, and tea in a metamorphic rock area of Guizhou Province, China [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2023, 30(3): 7402-7414.
- [3] Zhang J, Yang R D, Li Y C, et al. Distribution, accumulation,

- and potential risks of heavy metals in soil and tea leaves from geologically different plantations [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020, 195: 110475. doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.110475.
- [4] 颜明娟, 林诚, 陈子聪, 等. 福鼎白茶茶园土壤有效锌与茶叶锌含量的相关性分析[J]. *福建农业科技*, 2021, 51(2): 41-45.
- Yan M J, Lin C, Chen Z C, et al. Correlation analysis of the available zinc content in soil of Fuding white tea gardens and the zinc content in tea leaves [J]. *Fujian Agricultural Science and Technology*, 2021, 51(2): 41-45.
- [5] Wen B, Li L, Duan Y, et al. Zn, Ni, Mn, Cr, Pb and Cu in soil-tea ecosystem: the concentrations, spatial relationship and potential control [J]. *Chemosphere*, 2018, 204: 92-100.
- [6] 崔世展, 沈宝华, 杨婉秋. 云南凤庆茶园不同季节茶叶中重金属元素的含量分布特征[J]. *昆明学院学报*, 2021, 43(3): 38-40.
- Cui S Z, Shen B H, Yang W Q. Distribution characteristics of heavy metal content in tea leaves in different seasons from Fengqing tea plantation in Yunnan [J]. *Journal of Kunming University*, 2021, 43(3): 38-40.
- [7] Areo O M, Njobeh P B. Risk assessment of heavy metals in rooibos (*Aspalathus linearis*) tea consumed in South Africa [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021, 28(42): 59687-59695.
- [8] 石航源, 王鹏, 郑家桐, 等. 中国省域土壤重金属空间分布特征及分区分管管控对策[J/OL]. *环境科学*, 2022: 1-17 [2023-04-30]. <https://doi.org/10.13227/j.hjx.202208160>.
- Shi H Y, Wang P, Zheng J T, et al. Spatial distribution of soil heavy metals and regional control strategies in China at province level [J/OL]. *Environmental Science*, 2022: 1-17 [2023-04-30]. <https://doi.org/10.13227/j.hjx.202208160>.
- [9] 和淑娟, 曾沛艺, 杨牧青, 等. 云南省农用地土壤重金属高背景值区域发展绿色食品品牌的对策建议[J]. *环境科学导刊*, 2022, 41(5): 42-44, 89.
- He S J, Zeng P Y, Yang M Q, et al. Countermeasures and suggestions on developing green food label in high background value of heavy metals in agricultural land in Yunnan Province [J]. *Introduction to Environmental Science*, 2022, 41(5): 42-44, 89.
- [10] 李煜, 张萍, 吴红, 等. 六盘水市六枝特区茶园茶叶与土壤中微量元素的相关性分析[J]. *现代农业科技*, 2022(11): 6-10.
- Li Y, Zhang P, Wu H, et al. Correlation analysis on tea and soil trace elements in tea garden of Liuzhi special district, Liupanshui City [J]. *Modern Agricultural Technology*, 2022(11): 6-10.
- [11] Sabir M, Baltreinaite-Gedienė E, Ditta A, et al. Bioaccumulation of heavy metals in a soil-plant system from an open dumpsite and the associated health risks through multiple routes [J]. *Sustainability*, 2022, 14(20): 13223. doi: 10.3390/su142013223.
- [12] 陈文轩, 李茜, 王珍, 等. 中国农田土壤重金属空间分布特征及污染评价[J]. *环境科学*, 2020, 41(6): 2822-2833.
- Chen W X, Li Q, Wang Z, et al. Spatial distribution characteristics and pollution evaluation of heavy metals in arable land soil of China [J]. *Environmental Science*, 2020, 41(6): 2822-2833.
- [13] 中国环境监测总站. 中国土壤元素背景值[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1990.
- China Environmental Monitoring Station. Background values of soil elements in China [M]. Beijing: China Environmental Science Press, 1990.
- [14] 陈航, 王颖, 王澍. 铜山矿区周边农田土壤重金属来源解析及污染评价[J]. *环境科学*, 2022, 43(5): 2719-2731.
- Chen H, Wang Y, Wang S. Source analysis and pollution assessment of heavy metals in farmland soil around Tongshan mining area [J]. *Environmental Science*, 2022, 43(5): 2719-2731.
- [15] Peng C Y, Zhu X H, Hou R Y, et al. Aluminum and heavy metal accumulation in tea leaves: an interplay of environmental and plant factors and an assessment of exposure risks to consumers [J]. *Journal of Food Science*, 2018, 83(4): 1165-1172.
- [16] Mostafa G A E, Alsarhani E, Alsalahi R. Assessment of heavy metals in infused tea marketed in Riyadh, Saudi Arabia, using inductively coupled plasma-mass spectrometry: human health risk assessment [J]. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 2022. doi: 10.1080/03067319.2022.2045284.
- [17] Tao C J, Song Y X, Chen Z, et al. Geological load and health risk of heavy metals uptake by tea from soil: what are the significant influencing factors [J]. *Catena*, 2021, 204: 105419. doi: 10.1016/j.catena.2021.105419.
- [18] Kong F J, Chen Y C, Huang L, et al. Human health risk visualization of potentially toxic elements in farmland soil: a combined method of source and probability [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 211:

111922. doi: 10.1016/j.ecoenv.2021.111922.
- [19] 李静, 孙载波, 黄亮, 等. 滇西勐库退变质榴辉岩的 P-T-t 轨迹及地质意义[J]. 岩石学报, 2017, 33(7): 2285-2301.
- Li J, Sun Z B, Huang L, et al. P-T-t path and geological significance of retrograded eclogites from Mengku area in western Yunnan Province, China [J]. *Acta Petrologica Sinica*, 2017, 33(7): 2285-2301.
- [20] 陈楠. 云南澜沧县打马河铅锌矿区构造地球化学特征及成矿预测研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2014.
- Chen N. Geochemical characteristics and ore prediction of the Pb-Zn polymetallic district in Damahe of Lancang County, Yunnan [D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2014.
- [21] 黎彤. 化学元素的地球丰度[J]. 地球化学, 1976(3): 167-174.
- Li T. Chemical element abundances in the earth and its major shells [J]. *Geochemistry*, 1976(3): 167-174.
- [22] 张建. 贵州茶叶主产区环境地球化学特征与产地来源示踪研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2020.
- Zhang J. Environmentally geochemical characteristics and geographical origin authentication of tea from major tea producing areas in Guizhou province, China [D]. Guiyang: Guizhou University, 2020.
- [23] 李勛之, 姜璐, 王国庆, 等. 不同国家农用地土壤环境标准比较与启示[J]. 环境科学, 2022, 43(2): 577-585.
- Li X Z, Jiang R, Wang G Q, et al. A comparative study of soil environmental standards for agricultural land among different countries and its implication for China [J]. *Environmental Science*, 2022, 43(2): 577-585.
- [24] 曾金樱, 田秀芳, 邱星群, 等. 汕头市湖库型饮用水源地周边土壤重金属污染评价及源解析[J]. 环境科学导刊, 2022, 41(1): 66-70.
- Zeng J Y, Tian X F, Qiu X Q, et al. Pollution assessment and source interpretation of heavy metals in soils around lake and reservoir-type drinking water sources in Shantou City [J]. *Introduction to Environmental Science*, 2022, 41(1): 66-70.
- [25] 佚名. 《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》(GB 2761—2017) 及《食品安全国家标准 食品中污染物限量》(GB 2762—2017) 解读[J]. 中国食品卫生杂志, 2017, 29(2): 154, 229, 237, 250.
- Anonymous. Interpretation of mycotoxins limits in national food safety standard (GB 2761-2017) and pollutants limits in national food safety standard (GB 2762-2017) [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2017, 29(2): 154, 229, 237, 250.
- [26] 黄华斌, 于瑞莲, 卞凯, 等. 铁观音茶园土壤-茶叶中稀土元素的地球化学特征[J]. 稀土, 2018, 39(2): 141-147.
- Huang H B, Yu R L, Bian K, et al. Geochemical characteristics of rare earth elements in Tieguanyin tea garden soil tea [J]. *Rare Earth*, 2018, 39(2): 141-147.
- [27] 周国华, 孙彬彬, 贺灵, 等. 安溪土壤-茶叶铅含量关系与土壤铅临界值研究[J]. 物探与化探, 2016, 40(1): 148-153.
- Zhou G H, Sun B B, He L, et al. Study on the relationship between lead content in soil and tea in Anxi and the critical value of soil lead [J]. *Geophysical and Chemical Exploration*, 2016, 40(1): 148-153.
- [28] Wu X L, Zhang D, Wang F, et al. Risk assessment of metal(loid)s in tea from seven producing provinces in China [J]. *Science of the Total Environment*, 2023, 856: 159140. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.159140.
- [29] 林承奇, 王凤婷, 胡恭任, 等. 安溪铁观音茶园土壤-茶叶重金属健康风险评价[J]. 食品工业, 2021, 42(5): 492-496.
- Lin C Q, Wang F T, Hu G R, et al. Health risk assessment of heavy metals in soil-tea system from Tieguanyin tea garden of Anxi County [J]. *Food Industry*, 2021, 42(5): 492-496.

基于高通量测序技术探究套种灵芝的茶树 根际土壤真菌群落结构特征

韩海东, 周柳婷*, 黄小云, 俞成然, 黄秀声*

福建省农业科学院农业生态研究所/福建省丘陵地区循环农业工程技术研究中心, 福建 福州 350013

摘要: 茶园套种灵芝是将茶叶加工的废弃物资源化再利用的生态循环间作模式, 所形成的复合群体可以更彻底地覆盖地面, 在改善土壤微生物群落结构, 维持土壤微生态系统平衡等方面发挥重要作用。以未套种 (CK)、套种 1 年 (A1)、套种 2 年 (A2)、套种 3 年 (A3) 的茶树根际土壤为研究对象, 利用 Miseq PE300 高通量测序技术探究土壤真菌群落结构变化特征。结果表明, 与 CK 相比, 套种灵芝显著提高了茶树根际土壤碱解氮、速效磷、速效钾及有机碳含量, 其中 A3 土壤升幅最高, 各养分含量分别达 32.36%、13.01%、69.21%和 9.56%。 α 多样性指数表明, 茶树根际土壤真菌群落 Observed species 指数和 Chao1 指数呈现 CK>A3>A1>A2; ACE 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数呈现 A3>CK>A1>A2。 β 多样性指数表明, A2 与 CK、A1、A3 的茶树根际土壤真菌群落组成结构差异相对较大。分类学分析发现, 茶树根际土壤真菌分布于 18 门 48 纲 135 目 309 科 632 属。在门水平上, 子囊菌门 (Ascomycota) 是 CK、A1 和 A3 的优势菌门, 相对丰度分别为 71.28%、68.74%和 51.79%; 担子菌门 (Basidiomycota) 是 A2 的优势菌门, 相对丰度为 64.48%。在属水平上, 与 CK 相比, 套种灵芝的茶树根际土壤 A1 中角担菌属 (*Ceratobasidium*)、被孢霉属 (*Mortierella*)、毛孢子菌属 (*Piedraia*) 和三形菌属 (*Saitozyma*) 分别显著上升 59.14、1.34、3.70 倍和 1.92 倍 ($P<0.05$); A2 土壤的古根菌属 (*Archaeorhizomyces*) 显著下降 76.81%, 而棉革菌属 (*Tomentella*) 和支孢瓶霉属 (*Cladophialophora*) 分别显著上升 788.43 倍和 36.24 倍 ($P<0.05$); A3 土壤的被孢霉属和灵芝属 (*Ganoderma*) 分别显著上升 1.09 倍和 0.81 倍 ($P<0.05$)。综上所述, 茶园套种灵芝可有效调节茶树根际土壤真菌群落组成结构, 改善茶园土壤微生态环境, 为茶园可持续绿色发展提供理论依据。

关键词: 茶园; 套种灵芝; 根际土壤; 真菌群落结构

中图分类号: S571.1; S154.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-369X(2023)04-513-12

The Characteristics of Fungal Community Structure in Tea Rhizosphere Soil Interplanted with *Ganoderma lucidum* Based on High-throughput Sequencing Technology

HAN Haidong, ZHOU Liuting*, HUANG Xiaoyun, YU Chengran, HUANG Xiusheng*

Agricultural Ecology Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fujian Engineering and Technology Research Center for
Recycling Agriculture, Fuzhou 350013, China

收稿日期: 2023-05-24

修订日期: 2023-07-10

基金项目: 福建省公益类科研院所专项 (2020R1021004、2020R1021002、2023R1019002)、福建省人民政府-中国农业科学院“5511”
协同创新工程 (XTCXGC2021010)、福建省农业科学院项目 (CXTD2021009-1)

作者简介: 韩海东, 男, 副研究员, 主要从事生态循环农业与山地茶园有机种植研究。*通信作者: zlt0616@126.com; hxs706@163.com

Abstract: The tea plantation with *Ganoderma lucidum* is an ecological cycle intercropping model of resource utilization of tea processing waste, and the composite community formed can cover the ground more thoroughly and play an important role in improving the soil microbial community structure and maintaining the balance of soil microbiological system. In this study, we investigated the changes of tea rhizosphere soil fungal community structure in uncropped (CK), intercropping 1 year (A1), intercropping 2 years (A2) and intercropping 3 years (A3) using Miseq PE300 high-throughput sequencing technology. The results show that: (1) compared with CK, interplanting *Ganoderma lucidum* significantly increased the contents of available nitrogen, available phosphorus, available potassium and organic carbon in tea rhizosphere soil, with soil of A3 having the highest increase, reaching 32.36%, 13.01%, 69.21% and 9.56%, respectively. (2) The α diversity index shows that the observed species and Chao1 index of tea rhizosphere soil fungal community were CK>A3>A1>A2. ACE index, Shannon index and Simpson index showed A3>CK>A1>A2. (3) The β diversity index shows that the composition and structure of fungal community in tea rhizosphere soil of A2 were relatively different from those of CK, A1 and A3. (4) Through taxonomic analysis, it is found that tea rhizosphere soil fungi were distributed in 18 phyla, 48 classes, 135 orders, 309 families and 632 genera. At phylum level, Ascomycota was the dominant phylum of CK, A1 and A3, with relative abundances of 71.28%, 68.74% and 51.79%, respectively. Basidiomycota was the dominant phylum of A2 with a relative abundance of 64.48%. At the genus level, compared with CK, the contents of *Ceratobasidium*, *Mortierella*, *Piedraia* and *Saitozyma* in A1 were significantly increased by 59.14, 1.34, 3.70 and 1.92 times, respectively ($P<0.05$). The relative abundance of *Archaeorhizomyces* in A2 decreased significantly by 76.81%, while that of *Tomentella* and *Cladophialophora* increased by 788.43 and 36.24 times, respectively ($P<0.05$). The *Mortierella* and *Ganoderma* in A3 soil significantly increased 1.09 and 0.81 times, respectively ($P<0.05$). In summary, the interplanting *Ganoderma lucidum* in tea gardens can effectively regulate the composition and structure of tea rhizosphere soil fungal community, improve the soil micro-ecological environment and this study provided a theoretical basis for the technical model to promote the sustainable green development of tea plantation.

Keywords: tea plantation, intercropping *Ganoderma lucidum*, rhizosphere soil, fungal community structure

福建省茶产业发展历史悠久,茶产业既是千亿产业链“三产融合”的特色产业,也是我国助力全面推进新农村发展和乡村振兴的优势产业^[1]。然而,由于福建省“八山一水一分田”的地形特征,大部分茶园由丘陵山地开发而来,茶农为了追求茶叶产量而不断进行茶园彻底清杂,使茶园生物多样性遭受严重破坏和损失,导致土壤养分流失,保水透气性降低。此外,茶树属于喜酸富铝植物,进一步加剧了茶园土壤酸化、微生物数量减少、微生物群落多样性降低等一系列生态环境问题,严重威胁茶树根际土壤质量^[2]。

科学的间套作模式是茶园生境管理的有效措施之一,可以提高茶园生物多样性,改善和丰富土壤微生物种类、数量及活性,提高茶园保益控害的生态系统服务功能^[3]。研究表

明,茶园间套种白三叶草、黑麦草、圆叶决明、平托花生、百喜草等绿肥作物后,土壤微生物种类和数量显著增加,尤其土壤中有益真菌菌属的相对丰度显著提高^[4-8]。茶园间作食用菌有利于提高水、热、光和空间等生境资源的利用率,进而改变土壤微生物生命活动的物质基础和生存条件^[9-10]。有研究表明,茶树套种长根菇的间作模式可显著提高土壤速效氮、磷、钾含量,但对土壤有机质和 pH 影响不明显^[11]。间作灵芝后茶园土壤变形菌门(Proteobacteria)相对丰度显著提高 21.18%,而酸杆菌门(Acidobacteria)和芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)的相对丰度显著降低 15.09%和 53.52%;在属水平上,间作灵芝处理显著提高了土壤有益微生物菌属相对丰度^[12]。目前关于茶园套种食用菌间作模式的研究多

集中于土壤理化性质、茶叶品质及产量、土壤细菌群落种类和数量等方面,对茶树根际土壤真菌群落组成结构的研究未见报道。

高通量测序技术具有通量高、灵敏度高、准确度高、样本量较低等优点,可以更深入全面地揭示环境中微生物组成结构及多样性变化^[13]。因此,本研究以未套种(CK)、套种1年(A1)、套种2年(A2)和套种3年(A3)的茶树根际土壤为研究对象,采用 Miseq PE300 高通量测序技术探讨套种灵芝对茶树根际土壤真菌群落结构的影响,为该生态循环间作模式服务茶产业可持续发展提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验小区概况与设计

1.1.1 试验区域概况

试验样地选址于武夷山市张天福有机茶园示范基地(117°5'50" E, 27°38'21" N)。该基地占地面积 3 000 m²,地处中亚热带季风湿润气候区,平均海拔 335 m。试验茶树品种为奇丹,树龄 5 年。试验区土壤质地为砂壤土,理化性质如下: pH 5.60、有机质 35.70 g·kg⁻¹、全氮 1.75 g·kg⁻¹、全磷 0.95 g·kg⁻¹、全钾 7.23 g·kg⁻¹、碱解氮 174.06 mg·kg⁻¹、速效磷 76.30 mg·kg⁻¹、速效钾 266.01 mg·kg⁻¹。

1.1.2 试验小区设计

在试验园区内地形地势及茶树长势基本一致的山地上设置 4 个样地:未套种(CK)、套种1年(A1)、套种2年(A2)和套种3年(A3),每个样地随机设 3 个 100 m²的重复小区,共 12 个小区,小区间设保护行。分别于 2017 年(A3)、2018 年(A2)、2019 年(A1)开沟套种灵芝。套种方法:每年 5 月上旬茶叶采收完毕后,在每个小区的茶树树冠垂直下方土层开凿约 20 cm 深沟,将 250 根灵芝菌棒脱去塑料外膜并填埋于深沟内,覆土。每年 7 月中上旬采摘灵芝,菌棒留置于土壤中。灵芝菌棒质量约 2 kg,长度约 40 cm,配方为 70%茶梗、10%木粉、15%麦麸及 5%其他,有机碳

和有机氮含量分别为 165 g·kg⁻¹和 3.2 g·kg⁻¹。

1.2 试验方法

1.2.1 土壤样品采集

2020 年 9 月,在每个小区内随机选择 5 株长势相近的茶树,逐层铲除表层覆土,剪下茶树细根分枝并轻轻抖落根围土,用小毛刷收集仍紧贴于细根表面的根际土壤至无菌袋中,并迅速用液氮冷冻保存。将每个小区内取得的 5 份根际土壤混匀为 1 份土样,共获得 12 份土壤样品。土样通过 2 mm 筛去除细根、碎石等杂物后,将每份土样混匀分成 2 份装入无菌袋,每份 5 g,一份保存于 4 °C 冰箱用于测定土壤基础理化指标,另一份用液氮冷冻运输至北京奥维森基因科技有限公司进行 ITS1 MiSeq PE300 测序。

1.2.2 土壤真菌群落结构分析

根际土壤真菌 DNA 提取与 PCR 扩增:采用 PowerSoil DNA Isolation Kit 试剂盒(MoBio Laboratories, Inc., CA)抽提根际土壤基因组 DNA,利用 1%琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 片段大小,并通过 Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, 美国)测定 DNA 浓度。以稀释至 1 ng·μL⁻¹的基因组 DNA 为模板,对土壤真菌 ITS1 区进行 PCR 扩增,扩增引物为 ITS1-F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTA A-3')和 ITS2-R (5'-TGCGTTCTTCATCGATG C-3'),采用 1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物质量。

1.3 数据分析

通过 Illumina MiSeq 平台进行 Paired-end 测序,下机数据经 QIIME (v 1.8.0) 软件过滤、拼接、去除嵌合体后,剔除碱基模糊、引物错配或长度小于 150 bp 的低质量序列。利用 QIIME (v 1.8.0) 和 Uclust (v 1.2.22) 对 97% 相似度的有效序列分配运算分类单元 (Operational taxonomic unit, OTU),与 Silva 数据库比对后,得到每个 OTU 对应的物种分类信息。运用 Mothur 软件 (v 1.31.2) 进行 α

多样性分析；基于 Weighted Unifrac 距离矩阵，利用 R (v 3.1.1) 软件包的非加权组平均法 (UPGMA) 进行聚类分析；通过 Bray-Curtis 算法计算 β 多样性距离矩阵，基于系统进化信息比较各样品间的物种群落差异。具体的数据分析软件和算法参考北京奥维森基因科技有限公司官方网站的说明。使用 SPSS 16.0 进行数据方差分析，通过 LSD 比较法进行差异显著性分析 ($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 套种灵芝后茶树根际土壤理化性质变化特征

由表 1 可知，套种灵芝的栽培模式提高了茶树根际土壤 pH 值，但差异不显著，即茶园套种灵芝在一定程度上可能会缓解土壤酸化现象。4 个土壤样品中，A2 土壤的 pH 值最高 (5.83)，CK 的 pH 值最低 (5.63)。与 CK 相比，碱解氮、速效磷、速效钾及有机碳含量在 A1、A2 和 A3 的土壤中均显著上升 ($P<0.05$)，且在 A3 根际土壤中的含量均最高，分别比 CK 显著上升 32.36%、13.01%、69.21% 和 9.56%；A2 和 A3 茶树根际土壤的全氮和全磷显著高于 CK 和 A1，全氮含量最高的 A3 比 A1 显著上升 22.83%，全磷含量最高的 A2 比 CK 显著上升 71.13% ($P<0.05$)；与 CK 相比，

A1 和 A2 的微生物量碳含量显著下降 27.16% 和 21.84% ($P<0.05$)，在 A3 中略有上升，但差异不显著。

2.2 套种灵芝后茶树根际土壤真菌群落 α 多样性分析

α 多样性是常用于反映微生物群落丰富度和均匀性的综合指标。本试验共产生 4 069 个 OTU，经过抽平处理剩余 3 797。基于抽平后的 OTU 聚类结果进行 α 多样性分析，结果表明，随着测序深度增加，Shannon-Wiener 稀释曲线趋于平坦 (图 1)，表明样本测序量已基本饱和，能够反映样本大部分真菌的物种信息。由表 2 可知，与 CK 相比，A1 和 A2 茶树根际土壤观察到的物种数、Chao1 指数、ACE 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数均随着灵芝套种年限增加而降低，A2 的降幅分别为 32.39%、24.21%、22.85%、41.99% 和 29.90%。与 A1 和 A2 相比，A3 观察到的物种数、Chao1 指数、ACE 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数均升高，其中 A3 观察到的物种数、ACE 指数和 Shannon 指数与 A1 和 A2 差异显著 ($P<0.05$)。A3 茶树根际土壤的 ACE 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数均最高，分别比最低的 A2 显著提高 29.72%、83.58% 和 44.12%。

表 1 不同处理茶树根际土壤理化性质

Table 1 Physicochemical properties of tea rhizosphere soil under different treatments

项目 Item	CK	A1	A2	A3
pH	5.63±0.06 ^a	5.74±0.12 ^a	5.83±0.19 ^a	5.67±0.05 ^a
碱解氮 Available nitrogen/mg·kg ⁻¹	198.77±0.15 ^d	229.04±0.87 ^c	244.22±0.11 ^b	263.10±0.40 ^a
速效磷 Available phosphorus/mg·kg ⁻¹	82.23±0.15 ^d	86.63±0.25 ^b	84.83±0.61 ^c	92.93±0.45 ^a
速效钾 Available potassium/mg·kg ⁻¹	246.07±0.45 ^d	320.07±0.75 ^c	385.07±0.85 ^b	416.37±0.31 ^a
全氮 Total nitrogen/g·kg ⁻¹	1.85±0.07 ^b	1.84±0.10 ^b	2.19±0.08 ^a	2.26±0.04 ^a
全磷 Total phosphorus/g·kg ⁻¹	0.97±0.09 ^b	1.04±0.06 ^b	1.66±0.11 ^a	1.51±0.06 ^a
全钾 Total potassium/g·kg ⁻¹	7.27±0.11 ^{bc}	7.32±0.09 ^b	6.96±0.27 ^c	8.39±0.16 ^a
有机碳 Organic carbon/g·kg ⁻¹	20.82±0.12 ^d	21.31±0.12 ^c	22.29±0.14 ^b	22.81±0.11 ^a
微生物量碳 Microbial biomass carbon/mg·kg ⁻¹	591.82±33.17 ^a	431.08±47.12 ^b	462.54±51.48 ^b	602.29±16.41 ^a

注：每行不同字母表示差异达显著水平 ($P<0.05$, n=3)

Note: Different letters in each line indicate significant differences ($P < 0.05$, n=3)

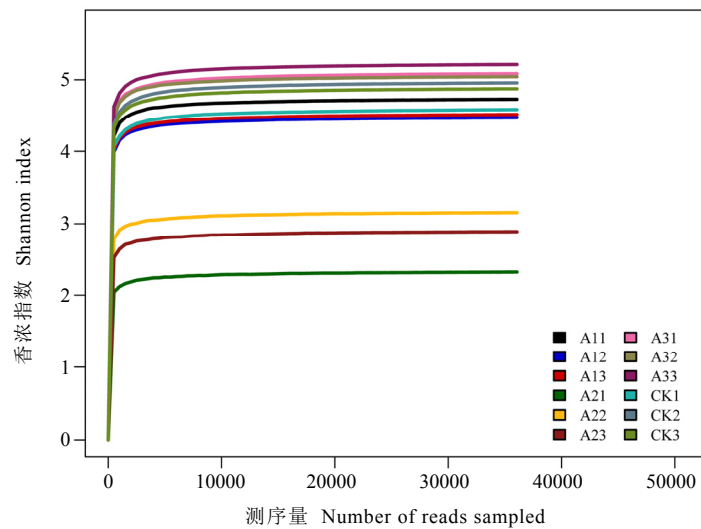


图 1 不同处理茶树根际土壤真菌群落 Shannon-Wiener 曲线

Fig. 1 Shannon-Wiener curves of fungal community in tea rhizosphere soil under different treatments

表 2 不同处理茶树根际土壤真菌群落多样性指数

Table 2 Diversity index of tea rhizosphere soil fungal community under different treatments

处理	观察到的物种数	Chao1 指数	ACE 指数	Shannon 指数	Simpson 指数	覆盖率/%
Treatment	Observed species	Chao1 index	ACE index	Shannon index	Simpson index	Coverage
CK	1 562.00±42.32 ^a	2 119.42±114.63 ^a	2 127.01±93.24 ^a	6.93±0.28 ^{ab}	0.97±0.01 ^a	98.67±0.58 ^a
A1	1 332.33±37.43 ^b	1 799.76±148.12 ^{ab}	1 809.08±123.44 ^b	6.59±0.20 ^b	0.96±0.01 ^a	99.00±0.00 ^a
A2	1 056.00±136.67 ^c	1 606.33±267.55 ^b	1 641.06±211.97 ^b	4.02±0.61 ^c	0.68±0.08 ^b	99.00±0.00 ^a
A3	1 544.87±54.56 ^a	2 070.32±69.23 ^a	2 128.86±36.93 ^a	7.38±0.12 ^a	0.98±0.00 ^a	99.00±0.00 ^a

注: 每列不同字母表示差异达显著水平 ($P < 0.05$, $n=3$)

Note: Different letters in each column indicate significant differences ($P < 0.05$, $n=3$)

2.3 套种灵芝后茶树根际土壤真菌群落β多样性分析

基于 OTU 的茶树根际土壤真菌群落 PCA 分析如图 2 所示, 相同颜色的 3 个重复样本聚集在一起, 说明不同处理组内生物学重复性较好。主成分 1 (PC1) 与主成分 2 (PC2) 分别解释变量方差的 45.64% 和 25.21%, 两者累计贡献率达 70.85%。PC1 将 A2 的 OTU 群落与 CK、A1、A3 明显区分开, PC2 将 A1、A2 的 OTU 群落与 CK、A3 明显区分开。CK 与 A3 距离较近, 与 A1、A2 距离较远, 说明套种灵芝菌棒 1 年和 2 年对茶树根际土壤真菌群落多样性的影响较大, 套种 3 年影响程度减小。由层次聚类分析可知 (图 3), CK 土壤的 OTU

群落首先与 A3 聚集为 1 个群体, 之后再与 A1 聚集, 最后与 A2 聚集形成系统发生树。β多样性分析结果表明, 不同处理的茶树根际土壤真菌群落组成结构存在较大差异, 尤其是 CK 土壤与 A2 土壤的真菌群落多样性差异较为明显。

2.4 套种灵芝后茶树根际土壤真菌群落组成结构变化

2.4.1 基于门水平不同处理茶树根际土壤真菌群落结构

在茶树根际土壤真菌群落中共检测到 18 个门, 其中, 相对丰度前 5 位的优势类群依次是子囊菌门 (Ascomycota, 29.01%~71.28%)、担子菌门 (Basidiomycota, 13.51%~64.48%)、

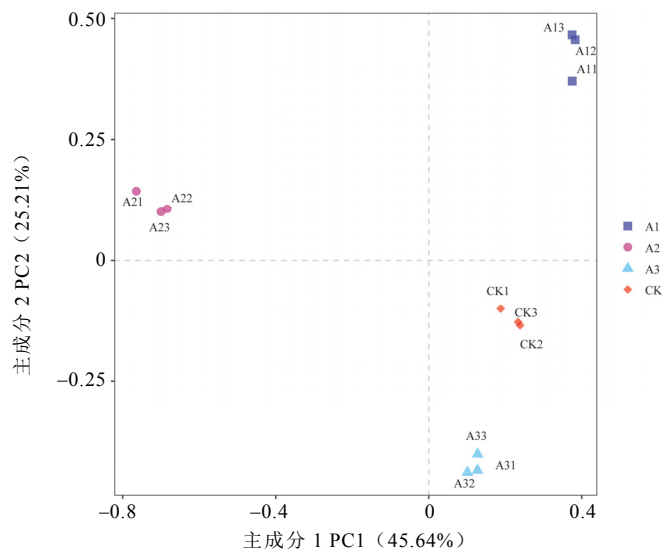


图 2 不同处理茶树根际土壤真菌群落 PCA 分析

Fig. 2 PCA analysis of fungal communities in tea rhizosphere soil under different treatments

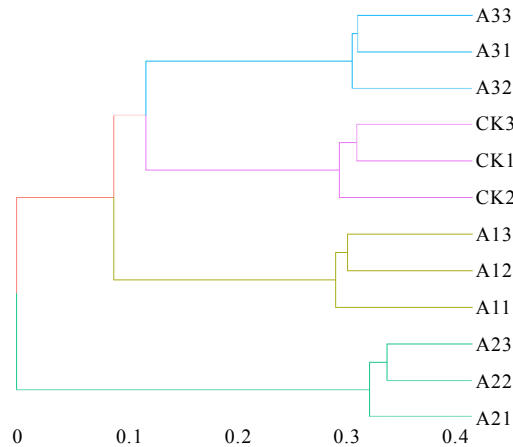


图 3 不同处理茶树根际土壤真菌群落的层次聚类分析

Fig. 3 Hierarchical clustering analysis of fungal communities in tea rhizosphere soil under different treatments

表 3 不同处理茶树根际土壤真菌优势菌门相对丰度

Table 3 The relative abundance of major fungal phyla in tea rhizosphere soil under different treatment

门 Phylum	CK	A1	A2	A3	%
子囊菌门 Ascomycota	71.28±0.39 ^a	68.74±2.72 ^a	29.01±5.18 ^c	51.79±4.81 ^b	
担子菌门 Basidiomycota	13.51±0.55 ^c	18.85±1.28 ^c	64.48±6.89 ^a	29.75±4.63 ^b	
未定义菌门 Unidentified	8.85±1.23 ^a	5.45±1.25 ^b	3.55±1.29 ^b	9.28±0.64 ^a	
被孢霉门 Mortierellomycota	1.41±0.45 ^b	3.19±0.66 ^a	1.01±0.23 ^b	2.88±0.59 ^a	
球囊菌门 Glomeromycota	2.74±0.24 ^a	1.88±0.27 ^b	1.39±0.09 ^c	2.78±0.29 ^a	

注：每行不同字母表示差异达显著水平（ $P < 0.05$, $n=3$ ）

Note: Different letters in each line indicate significant differences ($P < 0.05$, $n=3$)

未定义菌门 (unidentified, 3.55%~9.28%)、被孢霉门 (Mortierellomycota, 1.01%~3.19%) 和球囊菌门 (Glomeromycota, 1.39%~2.78%) (表 3)。子囊菌门是 CK、A1 和 A3 土壤的优势菌门, 相对丰度分别为 71.28%、68.74%和 51.79%; 而 A2 土壤的优势菌门为担子菌门, 相对丰度为 64.48%。

2.4.2 基于属水平不同处理茶树根际土壤真菌群落结构

由表 4 可知, 基于属水平上, 未定义菌属 (unidentified)、古根菌属 (*Archaeorhizomyces*)、棉革菌属 (*Tomentella*)、角担菌属 (*Ceratobasidium*) 和支孢瓶霉属 (*Cladophialophora*) 是套种灵芝茶树根际土壤的优势菌属 (前 5)。其中, CK、A1 和 A3 土壤中丰度最高的是未定义菌属, 相对丰度分别为 45.02%、29.70%和 53.63%; 而 A2 土壤中棉革菌属丰度最高, 相对丰度为 55.26%。与 CK 相比, A1 土壤中角担菌属、被孢霉属 (*Mortierella*)、毛孢子菌属 (*Piedraia*) 和三形菌属 (*Saitozyma*) 分别显著上升 59.14、1.34、3.70 倍和 1.92 倍 ($P < 0.05$); A2 土壤的古根菌属显著下降 76.81%, 而棉革菌属和支孢瓶霉属分别显著上

升 788.43 倍和 36.24 倍 ($P < 0.05$); A3 土壤的被孢霉属和灵芝属 (*Ganoderma*) 分别显著上升 1.09 倍和 0.81 倍 ($P < 0.05$)。此外, 热图结果也表明, 不同处理茶树根际土壤真菌群落组成结构发生明显变化 (图 4)。

2.4.3 不同处理茶树根际土壤真菌群落差异物种分析

多级物种差异判别分析 (Linear discriminant analysis effect size, LEfSe) 可实现多个分组之间的比较, 还可在分组内部进行亚组比较分析, 从而找到组间在丰度上有显著差异的物种 (即生物标志物, Biomaker) ($LDA\ score \geq 4, P < 0.05$)。由门到属的分类层级可知, 部分真菌群落类群富集特征显著。如子囊菌门、被孢霉门和担子菌门分别可作为 CK、A1 和 A2 根际土壤真菌群落的生物标志物, 而罗兹菌门 (*Rozellomycota*) 和未定义菌门在 A3 土壤中丰度最高 (图 5)。在 CK、A1、A2 和 A3 土壤中分别有 10 个 (1 门 2 纲 3 目 4 科)、20 个 (1 门 4 纲 8 目 7 科)、6 个 (1 门 1 纲 2 目 2 科)、16 个 (2 门 3 纲 6 目 5 科) 具有统计学差异的生物标志物。

表 4 不同处理茶树根际土壤优势真菌相对丰度 (属水平)

Table 4 The relative abundance of dominant fungi in tea rhizosphere soil under different treatments (genus level)

属 Genus	CK	A1	A2	A3	%
未定义菌属 Unidentified	45.02±1.23 ^b	29.70±1.92 ^c	16.48±4.13 ^d	53.63±3.88 ^a	
古根菌属 <i>Archaeorhizomyces</i>	30.62±3.71 ^a	23.32±3.02 ^b	7.10±1.18 ^c	10.86±1.13 ^c	
棉革菌属 <i>Tomentella</i>	0.07±0.07 ^b	0.04±0.02 ^b	55.26±7.82 ^a	0.47±0.06 ^b	
角担菌属 <i>Ceratobasidium</i>	0.14±0.02 ^b	8.42±0.69 ^a	0.01±0.01 ^b	0.03±0.03 ^b	
支孢瓶霉属 <i>Cladophialophora</i>	0.21±0.17 ^b	0.06±0.02 ^b	7.82±3.07 ^a	0.29±0.06 ^b	
被孢霉属 <i>Mortierella</i>	1.36±0.42 ^b	3.18±0.67 ^a	0.94±0.19 ^b	2.84±0.58 ^a	
毛孢子菌属 <i>Piedraia</i>	1.08±0.29 ^b	5.08±2.12 ^a	0.46±0.05 ^b	0.59±0.27 ^b	
三形菌属 <i>Saitozyma</i>	0.95±0.27 ^b	2.77±0.88 ^a	0.68±0.23 ^b	1.55±0.60 ^b	
小核衣属 <i>Pyrenula</i>	0.02±0.01 ^a	4.45±5.57 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	
灵芝属 <i>Ganoderma</i>	1.15±0.28 ^b	0.18±0.04 ^c	0.23±0.02 ^c	2.08±0.91 ^a	

注: 每行不同字母表示差异达显著水平 ($P < 0.05, n=3$)

Note: Different letters in each line indicate significant differences ($P < 0.05, n=3$)

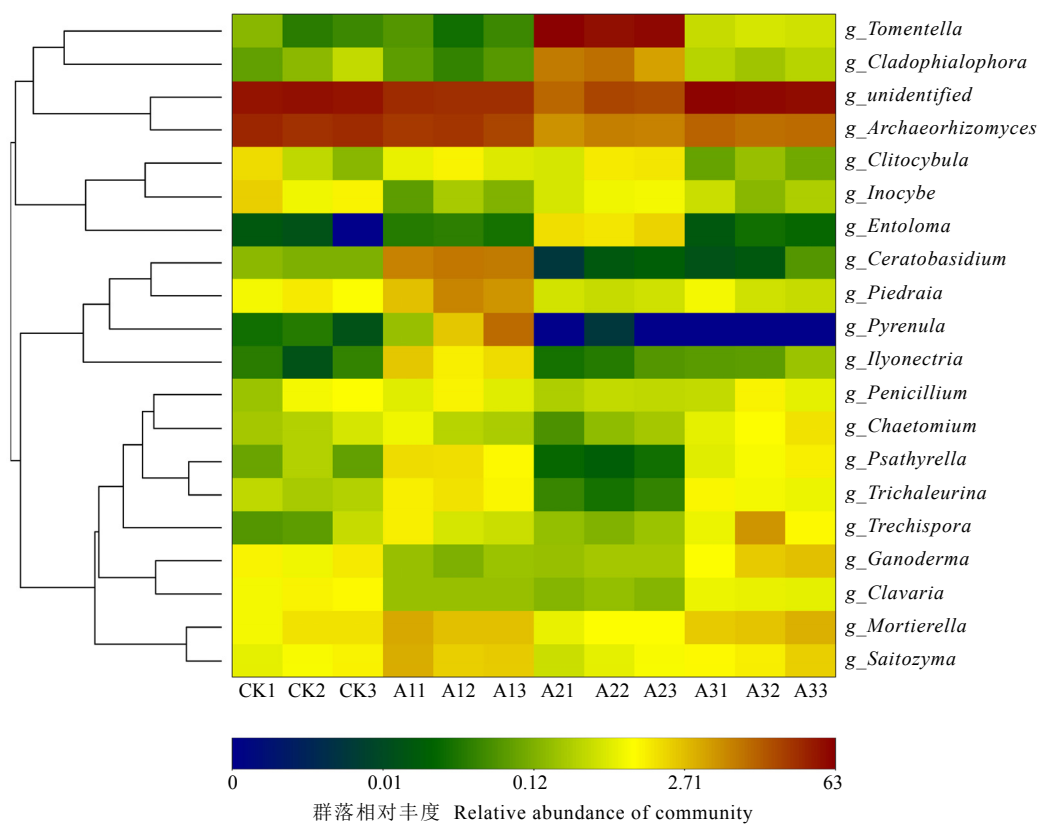


图 4 不同处理茶树根际土壤真菌群落热图分析（属水平）

Fig. 4 Heat map analysis of fungal community in tea rhizosphere soil under different treatments (genus level)

3 讨论

3.1 套种灵芝提高茶树根际土壤肥力

茶树根际土壤理化性质结果表明，套种灵芝的栽培模式提高了茶树根际土壤 pH 值，即茶园套种灵芝在一定程度上可能会缓解土壤酸化进程；茶树根际土壤碱解氮、速效磷、速效钾及有机碳含量在套种灵芝后显著提高（表 1），研究结果与蒋玉兰等^[11]和李振武等^[14]通过茶园间套作食用菌的结果相似。这可能是因 为食用菌采收后的菌棒中仍含有大量菌丝残体，可为土壤提供蛋白质、氨基酸和矿物质等营养成分，进而促进茶树根系吸收营养物质。可见，茶园套种灵芝的生态栽植模式在平衡土壤酸碱度、改善土壤肥力方面具有调节作用。

3.2 套种灵芝改变茶树根际土壤真菌群落多样性

根际土壤微生物多样性是植物生长和土壤健康的重要驱动力，与植物生长、养分循环、病害抑制、污染物降解等土壤生态功能息息相关^[15]，丰富度和均匀度较高的微生物群落拥有更广泛的生活史策略，可以提高土壤生态系统应对外界负面干扰的抵抗力和恢复力^[16]。前人研究表明，合理的间套作可显著提高根际土壤微生物群落多样性及稳定性，改善植物根际微环境进而提高作物产量及品质^[17-18]。本研究中，由不同处理茶树根际土壤真菌群落 α 多样性指数可知，套种灵芝后 A1 和 A2 的茶树根际土壤真菌群落多样性指数显著降低，而 A3 土壤中真菌群落多样性指数与 CK 相比无

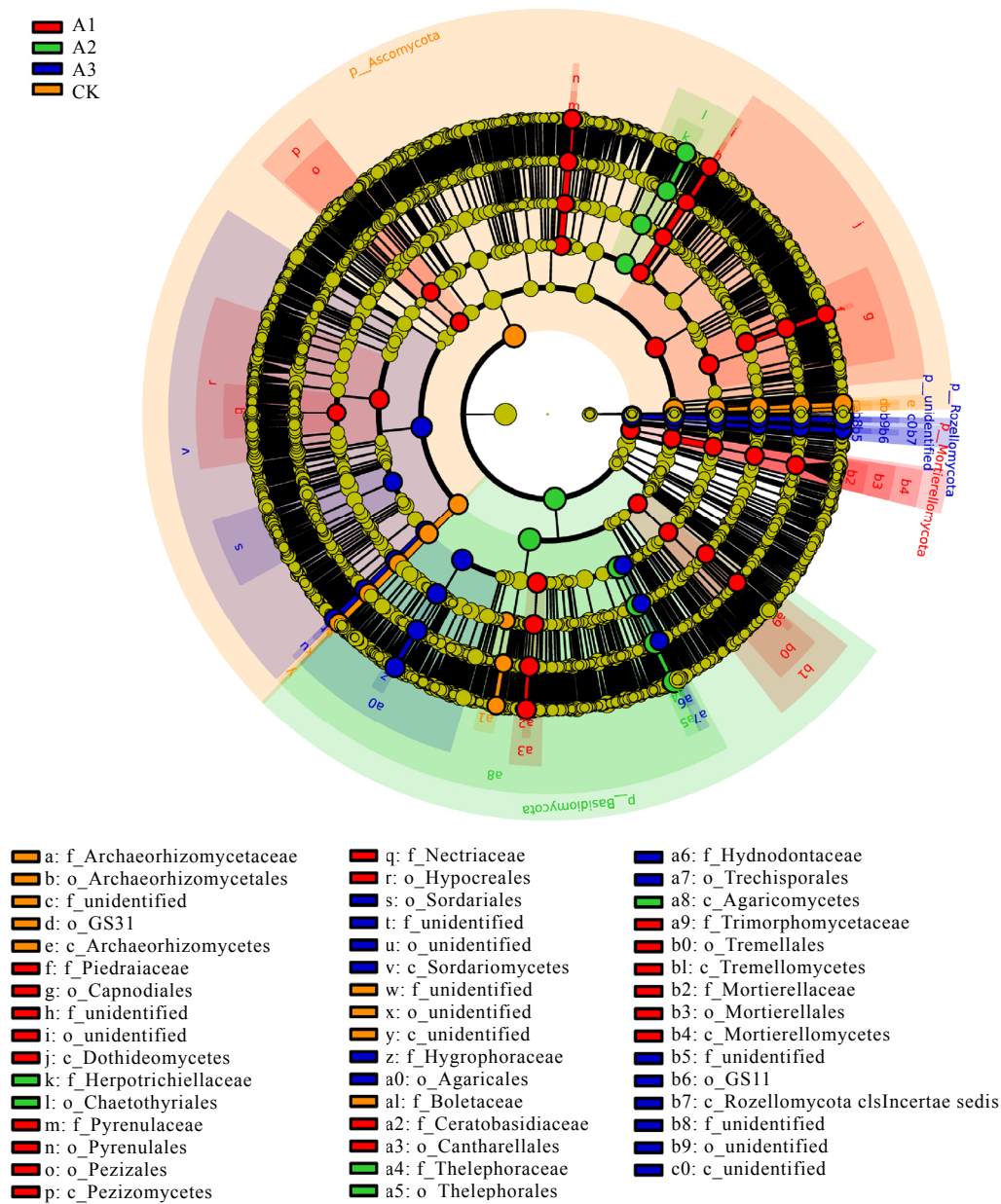


图 5 不同处理茶树根际土壤真菌群落 LEfSe 生物标志物

Fig. 5 LEfSe biomarkers of fungal community in tea rhizosphere soil under different treatments

显著性差异（表 2）。傅海平等^[19]探究绿肥间作对茶树根际土壤真菌群落多样性的影响，其结果与本研究相似。研究表明，栽植于地表的植被是驱动根际土壤真菌群落 α 多样性变化的主要因素^[20]。因此，我们推测茶树套种灵

芝后，其根际微域可能形成了“茶—灵芝—土壤”紧密互作的共生网络，进而影响土壤真菌群落结构多样性。此外，本研究采用 UPGMA 方法对样本进行层次聚类分析，通过树枝结构描述和比较多个样本间的相似性与差异性，分

枝长度越短, 样本相似度越高^[21]。结果表明, 套种灵芝的 A2 茶树根际土壤与 CK、A1、A3 的真菌群落组成结构差异相对较大(图 2 和图 3)。大量研究证实, 根际土壤特性是影响土壤真菌群落结构 β 多样性的关键因素, 尤其是土壤 pH 值^[22-23], 推测套种灵芝后茶树根际土壤真菌群落结构 β 多样性的差异可能受土壤 pH 值影响较大。

3.3 套种灵芝改善茶树根际土壤真菌群落结构

根际微生物是土壤生态系统能量流动、物质循环和信息传递的主要驱动者, 对维持土壤生产力至关重要^[24]。相较于细菌, 真菌具有更强的吸收营养物质和降解复杂有机物的能力^[25]。研究表明, 目前已知 98% 的土壤生态系统真菌均属于子囊菌门和担子菌门, 且属于子囊菌门的真菌数量大于担子菌门^[26]。本研究中, 土壤真菌门水平分布特征为常见类群比例较高, 其中子囊菌门和担子菌门的相对丰度之和达 81.54%~93.49%, 其余门类仅占 6.51%~18.46%。担子菌门大多为腐生菌, 可以分解木质素、纤维素等大分子化合物^[27]。套种灵芝显著提高了担子菌门的相对丰度。灵芝子实体采收后, 将其菌棒覆土归埋的栽培模式为茶树根际土壤提供大量营养源, 进而为担子菌门菌群定殖及发展提供了较好的营养物质基础。基于属水平而言, 套种灵芝显著提高茶树根际土壤角担菌属、被孢霉属、毛孢子菌属、三形菌属、棉革菌属、支孢瓶霉属和灵芝属的相对丰度, 而古根菌属的相对丰度显著降低。有研究表明, 被孢霉属具有溶磷性^[28]、分解纤维素及木质素^[29]、提高土壤酶活性^[30]、增加土壤养分含量^[31]的潜力。棉革菌属是常见的可与共生植物根系形成外生菌根 (Ectomycorrhiza, ECM) 的类群, 菌根共生体具有提高宿主植物对土壤矿质营养元素的吸收和累积、增强植物抗逆性等特征^[32]。可见, 灵芝采收后其菌棒覆土回归茶园的栽培模式可富集有益菌加速菌棒降解或形成菌根共生体, 有利于茶树土壤养分均衡供给, 促进植

株生长发育。大量研究证实, 套种模式必然会改变土壤温度、光照、水分、孔隙度、养分等一系列土壤环境因子, 植物根系分泌物和组织脱落物、凋落物等也会随之改变, 对根际微生物的代谢和生长发育产生直接或间接影响, 进而对根际微生物种类、数量和分布产生影响^[33-34]。因此, 推测套种灵芝后茶树根际产生的生态效应对土壤真菌具有一定选择性作用, 最终导致茶树真菌群落组成结构产生差异。然而, 根际土壤环境因子与微生物的互作对影响土壤微生物群落结构是否具有协同效应仍需进一步研究。

本研究揭示了茶树根际土壤真菌群落多样性及组成结构对灵芝不同套种年限的响应, 为恢复茶园生态系统多样性及根际土壤环境质量提供绿色途径。

参考文献

- [1] 李艳姣, 林春桃, 范水生, 等. 福建茶产业发展与供给侧结构性改革互动协调研究[J]. 农业展望, 2021, 17(9): 108-114.
Li Y J, Lin C T, Fan S S, et al. Study on the interaction and coordination between tea industry development and supply-side structural reform in Fujian [J]. Agricultural Outlook, 2021, 17(9): 108-114.
- [2] 廖万有, 王宏树, 苏有键, 等. 我国茶园土壤的退化问题及其防治[C]//中国茶叶学会. 茶叶科技创新与产业发展学术研讨会论文集, 重庆: [出版者不详], 2009: 185-193.
Liao W Y, Wang H S, Su Y J, et al. Soil degeneration and its prevention in Chinese tea gardens [C]//China Tea Science Society. Proceedings of the symposium on technological innovation and industrial development of tea. Chongqing: [s.n.], 2009: 185-193.
- [3] 史凡, 黄泓晶, 陈燕婷, 等. 间套作功能植物对茶园生态系统服务功能的影响[J]. 茶叶科学, 2022, 42(2): 151-168.
Shi F, Huang H J, Chen Y T, et al. Effects of intercropping functional plants on the ecosystem functions and services in tea garden [J]. Journal of Tea Science, 2022, 42(2): 151-168.
- [4] 齐龙波, 周卫军, 郭海彦, 等. 覆盖和间作对亚热带红壤茶园土壤磷营养的影响[J]. 中国生态农业学报, 2008, 16(3): 593-597.

- Qi L B, Zhou W J, Guo H Y, et al. Phosphorus nutrient characteristics of tea plantation soils under rice-straw mulch and white-clover intercropping in hilly red-soils of South China [J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2008, 16(3): 593-597.
- [5] 宋莉, 廖万有, 王辉军, 等. 套种绿肥对茶园土壤理化性状的影响[J]. 土壤, 2016, 48(4): 675-679.
- Song L, Liao W Y, Wang Y J, et al. Effects of interplanting green manure on soil physico-chemical characters in tea plantation [J]. Soils, 2016, 48(4): 675-679.
- [6] 沈程文, 肖润林, 徐华勤. 覆盖与间作对亚热带丘陵区茶园土壤微生物量的影响[J]. 水土保持学报, 2006, 20(3): 141-144.
- Shen C W, Xiao R L, Xu H Q. Effects of cover and intercropping on soil microbial biomass of tea plantations in subtropical hilly region [J]. Journal of Soil and Water Conservation, 2006, 20(3): 141-144.
- [7] 徐华勤, 肖润林, 宋同清, 等. 稻草覆盖与间作三叶草对丘陵茶园土壤微生物群落功能的影响[J]. 生物多样性, 2008, 16(2): 166-174.
- Xu H Q, Xiao R L, Song T Q, et al. Effects of mulching and intercropping on the functional diversity of soil microbial communities in tea plantations [J]. Biodiversity Science, 2008, 16(2): 166-174.
- [8] 林黎. 草种组合套种对山地茶园土壤性状及茶叶品质的影响[J]. 茶叶学报, 2017, 58(4): 174-178.
- Lin L. Physiochemical properties of soil and quality of tea affected by combination inter-cropping in hilly tea plantation [J]. Acta Tea Sinica, 2017, 58(4): 174-178.
- [9] Li Y C, Li Z, Li Z W, et al. Variations of rhizosphere bacterial communities in tea (*Camellia sinensis* L.) continuous cropping soil by high-throughput pyrosequencing approach [J]. Journal of Applied Microbiology, 2016, 121(3): 787-799.
- [10] 黄伟. 浅论食用菌返生态野生栽培[J]. 中国食用菌, 2008, 27(5): 33-34.
- Huang W. Superficial view on ecological wild cultivation of edible fungi [J]. Edible Fungi of China, 2008, 27(5): 33-34.
- [11] 蒋玉兰, 张海华, 潘俊娴, 等. 茶树和长根菇间作试验研究[J]. 中国食用菌, 2018, 37(6): 32-35, 39.
- Jiang Y L, Zhang H H, Pan J X, et al. Experiment study on intercropping of tea trees and *Oudemansiella radicata* [J]. Edible Fungi of China, 2018, 37(6): 32-35, 39.
- [12] 李艳春, 林忠宁, 陆燕, 等. 茶园间作灵芝对土壤细菌多样性性和群落结构的影响[J]. 福建农业学报, 2019, 34(6): 690-696.
- Li Y C, Lin Z N, Lu Z, et al. Microbial diversity and structure in soil under tea bushes *Ganoderma lucidum* intercropping [J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2019, 34(6): 690-696.
- [13] 严丽君, 王普, 施启龙, 等. 动物食性分析在生态学中的应用研究进展——基于 DNA 宏条形码技术[J]. 生态学报, 2023, 43(8): 3007-3019.
- Yan L J, Wang P, Shi Q L, et al. Applications of animal diet analysis based on DNA metabarcoding in ecological research [J]. Acta Ecologica Sinica, 2023, 43(8): 3007-3019.
- [14] 李振武, 韩海东, 陈敏健, 等. 套种食用菌对茶园土壤和茶树生长的效应[J]. 福建农业学报, 2013, 28(11): 1088-1092.
- Li Z W, Han H D, Chen M J, et al. Effects of intercropping *Stropharia Rugoso-annulata* on tea garden soil and tea growth [J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2013, 28(11): 1088-1092.
- [15] Labouyrie M, Ballabio C, Romero F, et al. Patterns in soil microbial diversity across Europe [J]. Nature Communications, 2023, 14(1): 3311. doi: 10.1038/s41467-023-37937-4.
- [16] Saleem M, Hu J, Jousset A. More than the sum of its parts: microbiome biodiversity as a driver of plant growth and soil health [J]. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 2019, 50(1): 145-168.
- [17] 赵佳佳, 李季, 杜相革. 不同生产模式对土壤微生物种群数量的影响[J]. 华北农学报, 2011, 26(s1): 220-224.
- Zhao J J, Li J, Du X G. Dynamics of soil microbial community in the experiment of organic, green and conventional vegetable production systems [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2011, 26(s1): 220-224.
- [18] 林雁冰, 薛泉宏, 颜霞. 不同栽培模式下玉米根系对土壤微生物区系的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2008, 36(12): 101-107.
- Lin Y B, Xue Q H, Yan X. Effects of the maize root on soil microbial flora under different cultivation patterns [J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2008, 36(12): 101-107.
- [19] 傅海平, 周品谦, 王沅江, 等. 绿肥间作对茶树根际土壤真菌群落的影响[J]. 茶叶通讯, 2020, 47(3): 406-415.
- Fu H P, Zhou P Q, Wang Y J, et al. Effects of intercropping different green manures on fungal community characteristics

- in rhizosphere soil of tea plant [J]. Journal of Tea Communication, 2020, 47(3): 406-415.
- [20] Christopher W S, Anna R. Comment on “global diversity and geography of soil fungi” [J]. Science, 2015, 348(6242): 1438-1438.
- [21] Wei Z, Yu D. Analysis of the succession of structure of the bacteria community in soil from long-term continuous cotton cropping in Xinjiang using high-throughput sequencing [J]. Archives of Microbiology, 2018, 200(4): 653-662.
- [22] Zhang T, Wang N F, Liu H Y, et al. Soil pH is a key determinant of soil fungal community composition in the Ny-Ålesund region, Svalbard (High Arctic) [J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 227. doi: 10.3389/fmicb.2016.00227.
- [23] Lauber C L, Strickland M S, Bradford M A, et al. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2008, 40(9): 2407-2415.
- [24] Prakash J, Mishra S. Role of beneficial soil microbes in alleviating climatic stresses in plants [M]//Kumar A, Singh J, Ferreira L F R. Microbiome under changing climate: implications and solutions. Cambridge: Woodhead Publishing, 2022: 29-68.
- [25] Peroh D. Plant-associated fungal communities in the light of meta'omics [J]. Fungal Diversity, 2015, 75: 1-25.
- [26] Wang H Y, Guo S Y, Huang M R, et al. Ascomycota has a faster evolutionary rate and higher species diversity than Basidiomycota [J]. Science China life Sciences, 2010, 53(10): 1163-1169.
- [27] Lynch M D J, Thorn R G. Diversity of Basidiomycetes in Michigan agricultural soils [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(11): 7050-7056.
- [28] Osorio N W, Habte M. Soil phosphate desorption induced by a phosphate-solubilizing fungus [J]. Communications in Soil Science & Plant Analysis, 2014, 45(4): 451-460.
- [29] 陈力力, 刘金, 李梦丹, 等. 水稻-油菜双序列复种免耕、翻耕土壤真菌多样性[J]. 激光生物学报, 2018, 27(1): 60-68, 59.
- Chen L L, Liu J, Li M D, et al. Diversity of filamentous fungus community in paddy fields with different tillage methods [J]. Acta Laser Biology Sinica, 2018, 27(1): 60-68, 59.
- [30] Zhang H, Wu X, Li G, et al. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing fungus (*Mortierella* sp.) and their effects on *Kosteletzkya virginica* growth and enzyme activities of rhizosphere and bulk soils at different salinities [J]. Biology and Fertility of Soils, 2011, 47(5): 543-554.
- [31] Li F, Chen L, Redmile-Gordon M, et al. *Mortierella elongata*'s roles in organic agriculture and crop growth promotion in a mineral soil [J]. Land Degradation and Development, 2018, 29(6): 1642-1651.
- [32] 林双双, 孙向伟, 王晓娟, 等. 我国菌根学研究进展及其应用展望[J]. 草业学报, 2013, 22(5): 310-325.
- Lin S S, Sun X W, Wang X J, et al. Mycorrhizal studies and their application prospects in China [J]. Acta Prataculturae Sinica, 2013, 22(5): 310-325.
- [33] Li S M, Fan W, Xu G, et al. Bio-organic fertilizers improve *Dendrocalamus farinosus* growth by remolding the soil microbiome and metabolome [J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1117355. doi: 10.3389/fmicb.2023.1117355.
- [34] Zhou X G, Zhang J Y, Rahman M K U, et al. Interspecific plant interaction via root exudates structures the disease suppressiveness of rhizosphere microbiomes [J]. Molecular Plant, 2023, 16(5): 849-864.

不同抗虫性茶树品种的叶色及挥发物差异性研究

孙悦^{1,3}, 刘梦月^{2,3}, 高晨曦^{1,3}, 吴全金⁴, 曹士先⁵, 余顺甜⁵, 陈志丹^{2,3}, 金珊^{1*}, 孙威江^{1,3*}

1. 福建农林大学园艺学院, 福建 福州 350002; 2. 福建农林大学安溪茶学院, 福建 泉州 362400;
3. 海峡两岸特色作物安全生产省部共建协同创新中心, 福建 福州 350002; 4. 福建开放大学文经学院, 福建 福州 350003;
5. 武夷星茶业有限公司, 福建 武夷山 354301

摘要: 为探究不同抗虫性茶树品种的叶色及挥发物差异性, 对 11 个茶树品种进行为期 2 年的田间虫口密度调查, 通过田间枝条室内孵化试验和室内生命参数测定试验, 佐证了田间种群密度作为抗性分级标准的可靠性; 并测定色差及叶片单位叶面积蜡质含量, 用气相色谱-质谱联用仪 (GC-MS) 对未被病虫为害的一芽二叶新梢的挥发物进行检测, 以期筛选不同抗虫性茶树品种间的差异物。结果显示, 小贯松村叶蝉 (*Matsumurasca onukii*) 趋向于叶片色彩较暗、黄色较淡的茶树品种; 茶棍蓟马 (*Dendrothrips minowai*) 趋向色彩鲜亮、饱和度高、黄色偏高的茶树品种, 且茶棍蓟马更重视叶背的色泽。在挥发物方面, 小贯松村叶蝉种群密度与芳樟醇的相对含量呈显著正相关, 与壬醛、十二烷的相对含量呈显著负相关。茶棍蓟马的种群密度与十二烷和苯乙醇的相对含量呈显著正相关。十二烷对小贯松村叶蝉和茶棍蓟马作用不同, 其含量和茶树叶片蜡质含量与种群密度间的关系呈现相同趋势, 这说明同一种挥发物对不同昆虫会产生不同的趋向反应。

关键词: 茶树; 小贯松村叶蝉; 茶棍蓟马; 叶色; 挥发物; 抗性

中图分类号: S571.1; S326

文献标识码: A

文章编号: 1000-369X(2023)04-525-19

Study on the Differences of Leaf Color and Volatiles of Different Insect-resistance Tea Cultivars

SUN Yue^{1,3}, LIU Mengyue^{2,3}, GAO Chenxi^{1,3}, WU Qianjin⁴, CAO Shixian⁵,
YU Shuntian⁵, CHEN Zhidan^{2,3}, JIN Shan^{1*}, SUN Weijiang^{1,3*}

1. College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Anxi College of Tea, Fujian Agriculture and Forestry University, Quanzhou 362400, China; 3. Ministerial and Provincial Joint Innovation Centre for Safety Production of Cross-Strait Crops, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 4. College of Law, Chinese Studies & Economics, the Open University of Fujian, Fuzhou 350003, China; 5. Wuyi Star Tea Industrial Company Limited, Wuyishan 354301, China

Abstract: In order to explore the differences in leaf color and volatiles of different insect-resistant tea cultivars, a two-year field population density survey was conducted on 11 tea cultivars. Through the indoor incubation test of field branches and the indoor life parameter determination test, the reliability of field population density as the resistance grading standard was proved. The color difference and wax content per unit leaf area of leaves were determined, and the volatiles of new shoots of one bud and two leaves that were not harmed by pests and diseases were detected by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) in order to screen the differences among different

收稿日期: 2023-02-28

修订日期: 2023-05-15

基金项目: 中国白茶研究院开放课题项目 (BCY2021K0100)、福建农林大学“双一流”建设科技创新能力提升培育计划项目 (KSYLC005)、福鼎市现代国家农业 (白茶) 产业园白茶种质资源保护提升项目 (KH220095A)、福建张天福茶叶发展基金会科技创新基金 (FJZTF01)

作者简介: 孙悦, 女, 硕士研究生, 主要从事茶树栽培育种与生物技术方面研究。*通信作者: jinshan0313@163.com; swj8103@126.com

insect-resistant tea cultivars. The results show that, *M. onukii* preferred tea cultivars with darker, lighter yellow leaves. *D. minowai* preferred tea cultivars with brighter, more saturated colors and a higher yellow color, and *D. minowai* placed more emphasis on the color of the leaf back. In terms of volatiles, the population densities of *M. onukii* were significantly and positively correlated with the relative content of linalool and negatively correlated with the relative contents of nonanal and dodecane. Population densities of *D. minowai* were significantly and positively correlated with the relative levels of dodecane and phenylethanol. The effects of dodecane on *M. onukii* and *D. minowai* were opposite, and the same trend was observed for the relationship between wax and population density in tea leaves, suggesting that the same volatile substance may have different reactions to different insects.

Keywords: tea plant, *Matsumurasca onukii*, *Dendrothrips minowai*, leaf color, volatile components, resistance

小贯松村叶蝉 (*Matsumurasca onukii*) 属半翅目 (Hemiptera) 叶蝉科 (Cicadellidae), 以成、若虫刺吸为害茶树嫩梢芽叶。茶棍蓟马 (*Dendrothrips minowai*) 属缨翅目 (Thysanoptera) 蓟马科 (Thripidae), 以锉吸式口器吸食茶树新梢汁液, 虫体微小、生活隐蔽, 为害山茶科的多种经济作物, 尤以茶树最为严重^[1]。近年来, 茶园中小贯松村叶蝉和茶棍蓟马为害发生频繁, 大发生年份常导致高达 50% 以上的茶叶产量受损, 年防治费用占茶树病虫害总防治费用的 60% 以上^[2]。

植物与昆虫长期协同进化过程中, 害虫在接触寄主前, 会利用触角的化学感受器对植物挥发物进行探测和识别, 利用视觉对植物光感、色感进行判断, 根据所获信息做出相应的行为选择^[3]。而植物自身也逐渐形成了以次生性物质为主的化学防御体系, 其中最为重要的是释放挥发性有机化合物 (Volatile organic compounds, VOCs)^[4]。植物通过释放挥发物, 不仅能减少害虫的数量^[5], 还可“警告”邻近植物有害虫或病原微生物来袭^[6]。这种寄主本身具有的对害虫产生吸引或避害的作用, 属于品种抗虫或感虫特性的范畴^[7]。从该角度切入, 选育高抗品种用于有害生物综合治理 (Integrated pest management, IPM) 将更生态、更经济。目前较多关于茶树挥发性物质对小贯松村叶蝉的引诱或趋避、毒杀作用的报道^[8-10], 但尚未见针对茶棍蓟马或同时对两种取食方式接近的害虫有趋向作用的化合物筛选的研

究报道。

本研究基于 2 年的田间虫口密度调查, 对 11 个茶树品种抗小贯松村叶蝉、茶棍蓟马的程度进行抗性分级, 以未被病虫为害的茶树新梢为材料, 研究不同抗性级别茶树品种的叶色差异及鲜叶挥发物组成, 以期探究茶树叶片及挥发物对小贯松村叶蝉和茶棍蓟马具有趋向作用的成分, 为有效选育茶树抗虫品种提供科学依据, 并为生态调控、种群监测及开发植物源引诱或趋避剂提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验环境与材料

2021 年、2022 年在福建省武夷山市武夷星茶树种质资源圃开展试验, 资源圃地处东经 118° 0' 3.82", 北纬 27° 42' 48.99", 海拔 217.4 m, 属亚热带季风性湿润气候。供试茶树品种为白鸡冠 (BJG)、黄玫瑰 (HMG)、黄观音 (HGY)、瑞香 (RX)、大红袍 (DHP)、白牡丹 (BMD)、奇兰 (QL)、黄棪 (HD)、梅占 (MZ)、水仙 (SX)、紫娟 (ZJ), 各品种茶树处于同一管理措施、同一生态环境的地块中, 坡度一致, 每个品种依次排列 5 行, 约 250 m²。调查害虫为小贯松村叶蝉和茶棍蓟马。

1.2 试验方法

1.2.1 茶样采集

2021 年 4 月, 采集未被病虫为害的一芽二叶新梢, 液氮固样, 真空冷冻干燥机干燥

30 h,干燥后将样品置于多样品组织研磨仪粉碎,时长 1 min,然后装入塑封袋置于 -20°C 冰箱备用。

1.2.2 田间种群密度调查

采用 5 点取样法^[11]对每个品种调查记录茶树嫩梢上的小贯松村叶蝉和茶棍蓟马的虫口发生量(每点 50 个一芽二叶),2021 年 6 月 6 日—10 月 26 日,累计调查 21 次;2022 年 5 月 25 日—7 月 27 日,累计调查 7 次。

1.2.3 田间枝条虫口孵化试验

参照金珊^[12]的试验方法,2021 年 7 月进行田间枝条虫口孵化试验,20 次重复。人工气候室温度为 $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$,相对湿度为 70%~75%,光照时间 L:D=14:10。

1.2.4 室内生命参数测定

供应枝条:2022 年 6 月初对紫娟、黄桢、黄观音、白鸡冠茶树试验地分别量定 10 m 茶行进行修剪,并喷施生物农药,5%天然除虫菊水剂 800 倍液(5% Pyrethrins SL)^[13],参照施龙清^[14]的方法搭建防虫棚,1 周后,再进行 1 次生物农药喷施,确保茶枝无虫口。7 月初,药物挥发散尽,待茶树新梢成熟,采集茶树大小基本一致的嫩梢作为试验枝条,供应虫体营养生长。

饲养虫源:2022 年 6 月,在武夷星茶树种质资源圃的福云 6 号茶树上捕捉小贯松村叶蝉成虫,用体式显微镜辨别性别,雌雄配对,饲养于养虫笼内的茶枝(福云 6 号,40~50 cm 长、健康无虫害)上,花泥保水培养,放置于温度 $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$,相对湿度 70%~75%,光照时间 L:D=14:10 的人工气候室,饲养 3 代以上,将同一天孵化的 1 龄若虫作为供试昆虫。

饲养皿、养虫瓶制作:选择高 2 cm,直径 9 cm 的培养皿,皿盖上均匀扎 10 个孔,皿内放入大小合适的方块花泥,用该装置作为小贯松村叶蝉饲养皿。在透明塑料杯(底部直径 7.2 cm,杯口直径 11.9 cm,高 16.2 cm)杯壁扎 10 个小孔,保持杯内通风,倒扣于培养皿中,培养皿(直径 14 cm,高 1.5 cm)内放置

直径为 14 cm 的滤纸,保水处置,内部装上块状花泥,便于插入枝条,用该装置作为小贯松村叶蝉养虫瓶。

生命参数记录:(1)试验前 1 d,将供应虫源的茶树(福云 6 号)枝条刷净,保证枝条上无虫,取同一天孵出的 1 日龄小贯松村叶蝉 80 只;(2)每个饲养皿中放入 1 只 1 日龄小贯松村叶蝉,单皿单养,80 个重复;(3)每日早晚各加水 1 次,当天更换 1 次新梢,更换时记录虫体若虫历期,以发现白色虫蜕确定龄期;(4)虫体从若虫羽化为成虫当天,进行同天羽化雌雄配对,转入养虫瓶内(瓶内加入大小基本一致具木质部的一芽四叶嫩梢,保湿放置),离体新梢采摘于遮虫网内新发的枝条,每天更换养虫瓶内新梢。(5)逐日查看每对雌雄成虫,记录成虫的死亡时间。逐日观察每个品种每次重复被更换的离体新梢,记录若虫孵化时间和头数。若当天羽化的成虫雌雄数量不对等,则使用备用虫源配对补齐。配对后,继续记录试验虫源的寿命。若试验虫源雌虫的配偶先死亡,则随机从备用虫源中为其另选配偶进行配对,但补充的雄虫寿命不统计在内;若雌虫死亡,则雄虫单独培养直至死亡。

1.2.5 色差测定

色差计为 ADCI 全自动色差计(北京辰泰克仪器技术有限公司),白板校正后,测定芽下第三叶正面与背面,获得 L^* 、 a^* 、 b^* 的测量值,10 次生物学重复,通过 L^* 、 a^* 、 b^* 计算出颜色差异值(ΔE)、色调彩度(Cab)、色彩饱和度(Sab),其中各项色差指标中的 s 下角标代表叶片的表面;b 下角标代表叶片的背面。 L^* 是衡量色彩明暗程度的指标,其值越大,表示表面越亮; a^* 是衡量红绿程度的指标,其为正值时表示偏红色,为负值时表示偏绿色; b^* 是衡量黄蓝程度的指标,其为正值时表示偏黄色,为负值时表示偏蓝色,绝对值越大表示黄色或蓝色越深。

1.2.6 叶片蜡质含量测定

参照刘勇等^[15]的方法进行调整,随机剪

取 10 根 40~50 cm 带有芽头的茶树枝条插入花泥, 黑暗处理 3 h, 取 10 个健康完整的芽下第二叶, 测量叶片长、宽后清水冲洗, 置于烧杯中, 加入 50 mL 三氯甲烷, 提取 5 s, 转移至旋转仪 (52 ℃) 中浓缩至 10~20 mL, 倒入已称重过的培养皿 (称重质量记为 W_1), 放入通风厨风干后称重记为 W_2 , 计算出茶树单位叶面积的蜡质含量。

叶面积 (S) 计算公式为 $S=0.7 \times \text{叶长} \times \text{叶宽}$; 单位叶面积蜡质含量 ($W_{\text{蜡}}$) 计算公式为 $W_{\text{蜡}}=(W_2-W_1)/S$, 单位为 $\text{mg} \cdot \text{cm}^{-2}$

1.2.7 香气挥发物检测

参照吴少玲等^[16]的方法进行测定, 使用石碧滢等^[17]的方法对挥发物定性, 峰面积归一化法计算各挥发性成分的相对含量。

1.3 数据分析

采用 Excel 2020 对数据平均值和标准误进行计算, 使用 IBM SPSS Statistics 26 单因素 ANOVA 检验进行方差分析; 使用 SIMCA 14.0 进行正交偏最小二乘判别分析 (Orthogonal partial least squares-discrimination analysis, OPLS-DA); 采用 TBtools 和 GraphPad Prism 7 绘图。

2 结果与分析

2.1 种群发生密度

小贯松村叶蝉与茶棍蓟马对同一生境条件的不同茶树品种为害存在明显偏好差异, 各茶树新梢上的虫口种群密度存在显著差异。2 年的种群密度平均值结果显示 (表 1), 小贯松村叶蝉总虫口量为每 50 梢 42.60~161.80 头, 茶棍蓟马总虫口量为每 50 梢 49.30~355.90 头。2021 年和 2022 年的两种刺吸式害虫的虫口高发期均集中于 6 月—7 月, 处于夏茶期 (图 1), 该时间段, 11 个茶树品种均遭受 2 种植食性害虫不同程度的危害。

2.2 抗性分级

将 2 年的种群密度结果聚类分析, 结果如图 2 所示。11 个茶树品种对小贯松村叶蝉的抗性等级聚为 3 类: 紫娟和梅占为感虫 (S) 等级, 水仙、黄桃、奇兰、白牡丹、大红袍和瑞香为中感 (M) 等级, 黄观音、黄玫瑰和白鸡冠为抗虫 (R) 等级。对茶棍蓟马的抗性等级聚为 4 类: 黄玫瑰为感虫 (S) 等级, 白鸡冠和瑞香为中感 (MS) 等级, 奇兰和黄观音为中抗 (MR) 等级, 白牡丹、黄桃、大红袍、紫娟、梅占和水仙为抗虫 (R) 等级。

表 1 11 个茶树品种上小贯松村叶蝉和茶棍蓟马的种群密度
Table 1 Population density of *M. onukii* and *D. minowai* in 11 tea cultivars

品种 Cultivars	2 年的种群密度 (每 50 个茶梢) Population density for two years (per 50 tea shoot)	
	小贯松村叶蝉 <i>M. onukii</i>	茶棍蓟马 <i>D. minowai</i>
紫娟 ZJ	161.80±5.62 ^a	69.50±5.17 ^{ef}
梅占 MZ	104.50±6.37 ^{ab}	59.90±5.41 ^{ef}
水仙 SX	91.70±5.91 ^{bc}	49.30±3.20 ^f
黄桃 HD	83.30±11.18 ^{cd}	122.00±12.90 ^{de}
奇兰 QL	82.80±5.01 ^{cd}	200.80±20.17 ^{bc}
白牡丹 BMD	75.80±5.82 ^{cde}	125.80±5.64 ^{de}
大红袍 DHP	72.70±3.53 ^{de}	89.10±5.64 ^{ef}
瑞香 RX	64.80±3.26 ^{ef}	261.40±10.35 ^b
黄玫瑰 HMG	46.20±2.01 ^g	355.90±63.45 ^a
黄观音 HGY	51.70±3.78 ^{fg}	178.20±13.04 ^{cd}
白鸡冠 BJG	42.60±1.99 ^g	263.60±19.49 ^b

注: 表中所列数据为平均值±标准误; 同列不同字母表示差异显著 ($P<0.05$), 下同

Note: Data in the table are mean ± SE. The different letters in the same column represent significant differences ($P<0.05$). The same blew

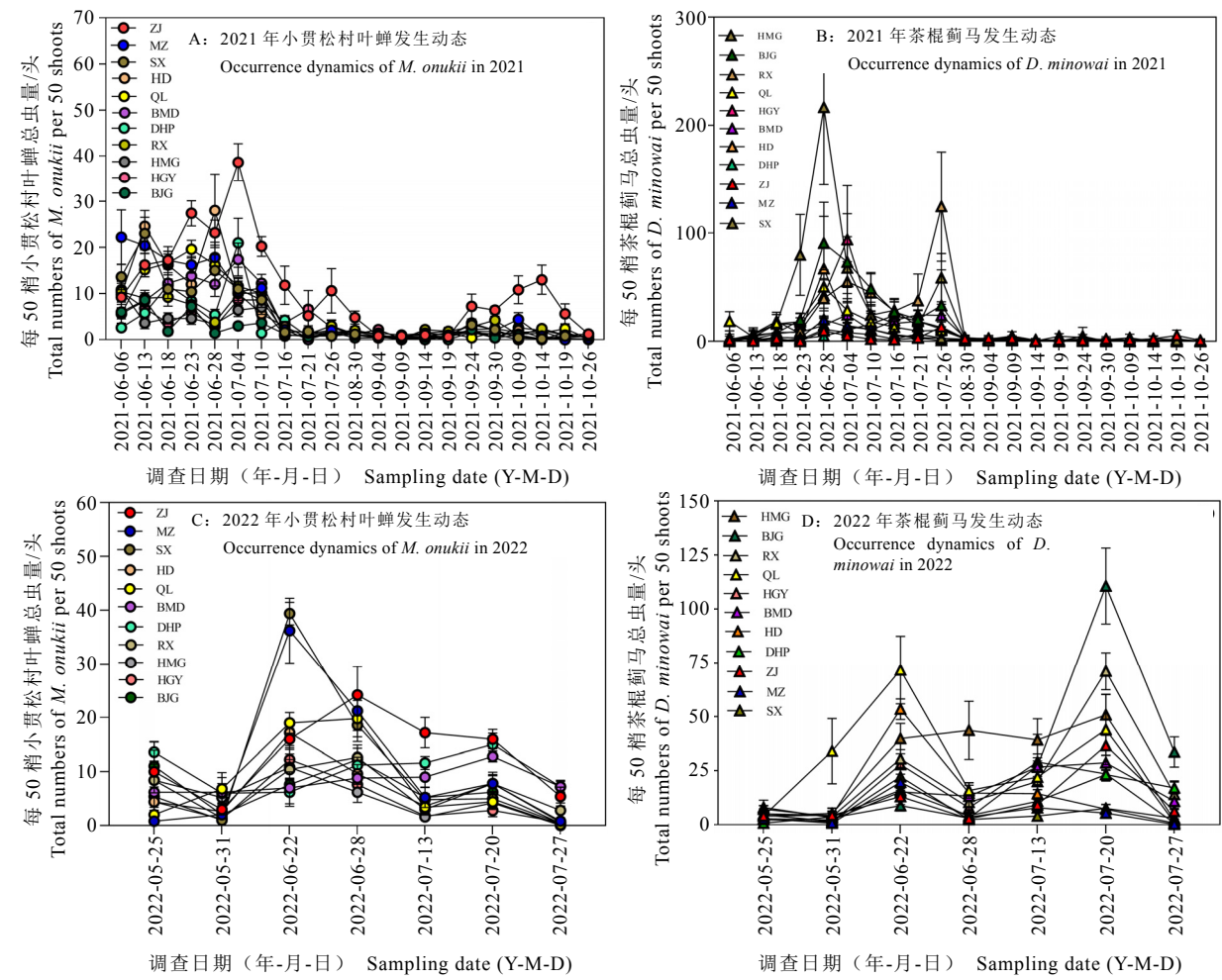
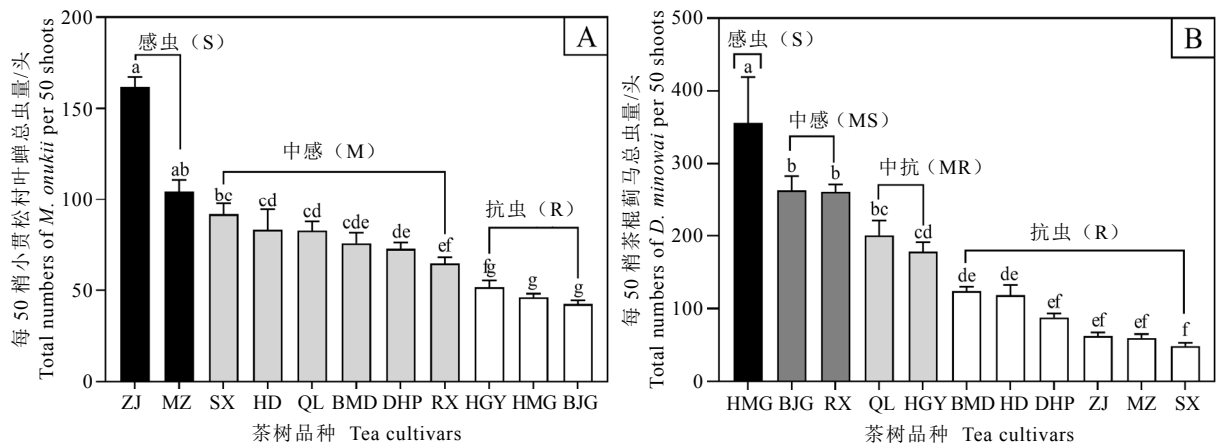


图 1 不同年份 11 个茶树品种的虫害发生动态

Fig. 1 Population dynamics of pests in the 11 tea cultivars



注: 不同字母代表差异显著 ($P < 0.05$)

Note: The different letters represent significant differences ($P < 0.05$)

图 2 11 个茶树品种抗性等级 (2 年平均值)

Fig. 2 Resistance classification of the 11 tea cultivars (2-year average)

2.3 室内验证结果

2.3.1 田间枝条室内孵化试验结果

茶枝上茶棍蓟马每日的若虫孵化量远高于小贯松村叶蝉,可直观比较茶棍蓟马在不同茶树品种的产卵偏好。将若虫孵化量与种群密度关联分析发现(图3),茶棍蓟马的种群密度与次日的若虫孵化量呈显著正相关($P < 0.05$),与其他天的若虫孵化量均呈正相关趋势。这说明以田间种群密度为抗虫性标准划分茶树对茶棍蓟马的抗性等级,具有一定的可靠性,而茶树对小贯松村叶蝉的抗性分级需进一步验证。

2.3.2 小贯松村叶蝉生命历程

利用2021年的分级结果^[18],筛选代表不同抗性级别的茶树品种各1个,分别为紫娟、黄桧、黄观音、白鸡冠。通过室内饲养小贯松村叶蝉,探究不同品种对昆虫生长发育的影响。小贯松村叶蝉若虫有5个龄期,羽化为成虫后才可辨别雌雄。小贯松村叶蝉在各品种上的发育历期如表2所示,1~3龄的若虫历期约1~2 d,4~5龄的平均历期为2~3 d。饲养在黄桧上的若虫发育期显著短于另外3个品种,

雌、雄成虫的生命历期均显著长于紫娟和白鸡冠的,说明取食黄桧的小贯松村叶蝉生长发育更快,成虫存活期更长。但取食紫娟和黄桧的小贯松村叶蝉的总体生命周期无显著差异,通过生命周期只能将黄桧、紫娟与黄观音、白鸡冠区分开。

2.3.3 小贯松村叶蝉存活率

观测不同茶树品种上小贯松村叶蝉若虫在各阶段的存活率,进一步比较不同茶树品种对小贯松村叶蝉生存繁衍的适应度。图4所示,4个茶树品种上的若虫存活率在50%~81%,3~5龄、若虫的存活率排序为紫娟>黄桧>黄观音>白鸡冠。若虫在黄观音与白鸡冠上的存活率十分接近,这与生命周期呈现一致规律;在紫娟和黄桧上的存活率差异明显,且高于黄观音和黄桧,黄桧上的小贯松村叶蝉虽然生长发育快,成虫存活期长,但存活率低,这说明紫娟更适宜小贯松村叶蝉的种群发展。按田间种群密度进行抗性划分,这4个品种的抗性表现为白鸡冠>黄观音>黄桧>紫娟;室内室外结果基本一致,佐证了以田间种群密度作为茶树抗虫性的划分标准具有可靠性。

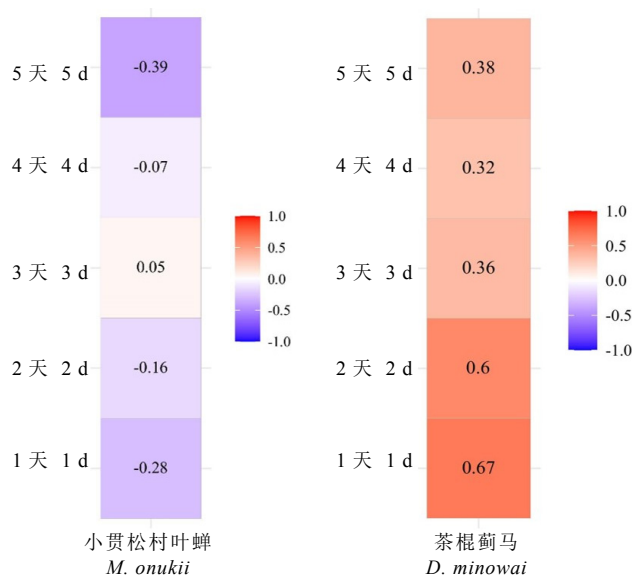


图3 孵化量与种群密度的相关性

Fig. 3 Correlation between numbers of incubation and population density

表 2 4 个茶树品种上小贯松村叶蝉各阶段发育历期
Table 2 Developmental duration of different stages of *M. onukii* in 4 tea cultivars

发育阶段	发育历期 Developmental duration/d			
Development stage	紫娟	黄桃	黄观音	白鸡冠
1 龄 1 st instar nymph	1.76±0.05 ^b	1.58±0.07 ^c	1.99±0.06 ^a	2.00±0.06 ^a
2 龄 2 nd instar nymph	1.78±0.07 ^a	1.41±0.06 ^b	1.72±0.07 ^a	1.72±0.07 ^a
3 龄 3 rd instar nymph	1.83±0.07 ^a	1.60±0.07 ^a	1.81±0.08 ^a	1.80±0.09 ^a
4 龄 4 th instar nymph	2.17±0.08 ^a	1.76±0.08 ^b	2.27±0.12 ^a	2.02±0.11 ^{ab}
5 龄 5 th instar nymph	2.82±0.11 ^a	2.15±0.08 ^b	2.74±0.15 ^a	2.70±0.14 ^a
若虫 Nymph	10.11±0.12 ^a	8.42±0.14 ^b	10.43±0.24 ^a	10.24±0.21 ^a
成虫 Adult	33.32±1.49 ^b	43.45±1.96 ^a	38.23±2.39 ^{ab}	33.13±1.97 ^b
雌成虫 Female adult	34.85±2.18 ^b	44.14±4.08 ^a	37.26±3.19 ^{ab}	33.22±2.63 ^b
雄成虫 Male adult	31.97±2.05 ^b	43.12±2.18 ^a	39.17±3.59 ^{ab}	33.05±3.01 ^b
雌虫寿命 Female adult lifespan	45.29±2.16 ^a	52.43±4.01 ^a	48.30±3.06 ^a	43.87±2.57 ^a
雄虫寿命 Male adult lifespan	41.79±2.01 ^b	51.60±2.18 ^a	49.00±3.66 ^{ab}	42.86±2.93 ^b
生命周期 Life cycle	36.67±1.91 ^a	38.31±2.65 ^a	28.60±2.55 ^b	25.02±2.18 ^b

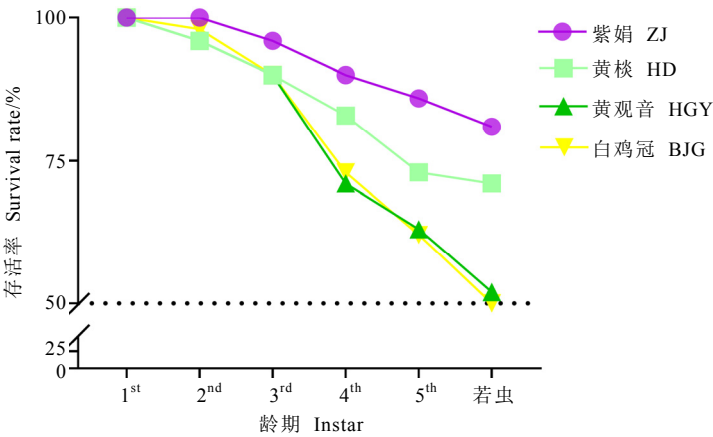


图 4 4 个茶树品种上的小贯松村叶蝉若虫存活率
Fig. 4 Survival rate of nymph of *M. onukii* in 4 tea cultivars

2.4 不同茶树品种的色差分析

表 3 和表 4 显示, 仅白牡丹和梅占的叶背色差不明显 ($\Delta E < 1$), 其他品种间均可被区分。种群密度与茶树叶片的色差具有强相关性 (图 5), 色差各项指标与小贯松村叶蝉种群密度显著负相关 ($P < 0.05$), 与茶棍蓟马种群密度显著正相关 ($P < 0.05$), 表明茶树叶色对小贯松村叶蝉与茶棍蓟马的寄主定位起重要作用。其中 a^* 值 (红绿程度) 对 2 种主要刺吸式害虫的寄主定位选择影响均无明显作用, 主要是叶片的 L^* (色彩明暗度) 和 b^* (黄

蓝程度)、 Cab (色调彩度) 和 Sab (色彩饱和度) 发挥作用, 但 Sab_s 、 Cab_s^* 和 b_s^* 与茶棍蓟马种群密度的相关性不显著, 这说明茶棍蓟马在寄主定位选择时更在意叶背的色彩呈现。

2.5 不同抗虫级别茶树品种的挥发物差异分析

通过固相微萃取法 (SPME-GC-MS) 对 11 个不同抗性级别的茶树品种一芽二叶新梢挥发物进行鉴定, 共鉴定出 49 种挥发物 (表 5), 共有挥发物 12 种 (图 6), 表明不同抗虫级别茶树品种间存在明显差异。如图 7 所示, 总挥发物分为 8 类, 醇类 14 种 (33.55%~68.57%),

醛类 8 种（4.69%~25.58%）、酯类 9 种（2.89%~25.64%）、烯烴类 8 种（0.58%~2.90%）、烷烴类 5 种（0.22%~3.80%）、酮类 2 种（0~1.31%）、酚类 1 种（0.10%~0.56%）、其他 2 种（0~1.23%），所有品种间均为醇类挥发物相对含量最高，其次为醛类、酯类。

为探究挥发物中哪类物质参与影响刺吸式害虫的寄主定位选择，将各类挥发物相对含量与种群密度进行关联分析，结果显示（表

6），小贯松村叶蝉种群密度与醇类挥发物相对含量呈显著正相关（ $P<0.05$ ， $r=0.636$ ），与醛类呈负相关但不显著（ $r=-0.446$ ），与烷烴类挥发物相对含量呈显著负相关（ $P<0.05$ ， $r=-0.668$ ）；而烷烴类挥发物与茶棍蓟马种群密度呈极显著正相关（ $P<0.01$ ， $r=0.737$ ）。说明茶树鲜叶挥发物中参与影响两种刺吸式害虫对茶树寄主定位的主要是醇类和烷烴类，醛类次之。

表 3 茶树芽下第 3 叶片叶表色差参数 ΔE 表
Table 3 Surface color difference parameter ΔE of the third tea leaves

品种 Cultivar	紫娟 ZJ	梅占 MZ	水仙 SX	黄桃 HD	奇兰 QL	白牡丹 BMD	大红袍 DHP	瑞香 RX	黄观音 HGY	黄玫瑰 HMG	白鸡冠 BJG
紫娟 ZJ	0										
梅占 MZ	16.38	0									
水仙 SX	19.41	5.24	0								
黄桃 HD	31.50	15.32	13.04	0							
奇兰 QL	12.18	4.66	8.23	19.36	0						
白牡丹 BMD	14.93	1.90	5.37	16.61	3.15	0					
大红袍 DHP	12.73	5.73	9.45	19.42	2.34	4.64	0				
瑞香 RX	20.50	4.73	2.62	11.22	8.67	5.65	9.46	0			
黄观音 HGY	30.36	14.18	12.35	1.62	18.20	15.52	18.16	10.33	0		
黄玫瑰 HMG	28.29	12.80	12.36	6.14	16.24	14.09	15.67	10.04	4.63	0	
白鸡冠 BJG	47.10	31.11	29.66	16.71	35.00	32.56	34.54	27.63	17.33	18.89	0

注：ΔE<1 表示色差不明显；1<ΔE<2 表示色差只有经验丰富的观察者才能注意到；2<ΔE<3.5 表示没有经验的观察者会注意到色差；3.5<ΔE<5 表示色差明显；5<ΔE 对观察者来说能清晰辨别色差；同下
Note: ΔE<1, color difference is not obvious. 1<ΔE<2, color difference can only be noticed by experienced observers. 2<ΔE<3.5, inexperienced observers can notice the chromatic aberration. 3.5<ΔE<5 indicates obvious color difference. 5<ΔE, the color difference can be clearly distinguished. The same below

表 4 茶树芽下第 3 叶片叶背色差参数 ΔE 表
Table 4 Color difference parameter ΔE on the back of the third tea leaves

品种 Cultivar	紫娟 ZJ	梅占 MZ	水仙 SX	黄桃 HD	奇兰 QL	白牡丹 BMD	大红袍 DHP	瑞香 RX	黄观音 HGY	黄玫瑰 HMG	白鸡冠 BJG
紫娟 ZJ	0										
梅占 MZ	9.70	0									
水仙 SX	12.47	3.37	0								
黄桃 HD	17.46	8.41	5.24	0							
奇兰 QL	7.56	2.15	5.16	10.3	0						
白牡丹 BMD	9.46	0.56	3.67	8.60	2.02	0					
大红袍 DHP	9.09	1.17	4.21	9.02	1.90	0.63	0				
瑞香 RX	11.93	3.18	2.11	5.78	4.86	3.14	3.43	0			
黄观音 HGY	18.35	8.95	5.91	2.77	10.94	9.27	9.79	7.08	0		
黄玫瑰 HMG	16.32	7.42	4.16	3.13	9.18	7.78	8.34	5.76	2.65	0	
白鸡冠 BJG	27.13	18.09	15.13	11.57	19.95	18.50	19.08	16.59	9.58	11.13	0

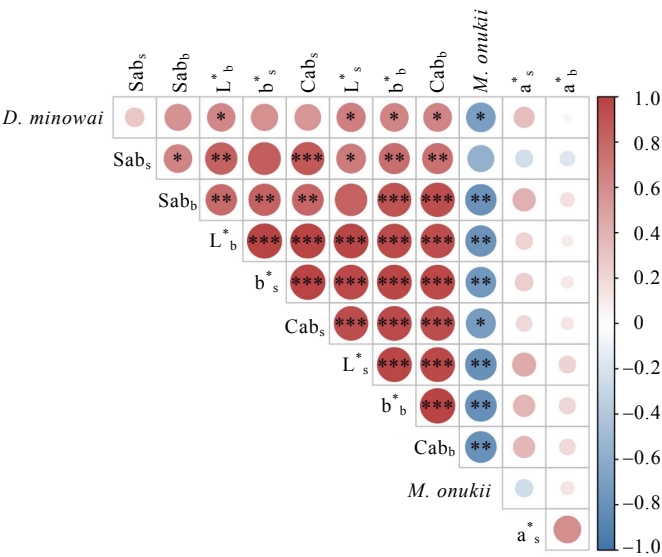
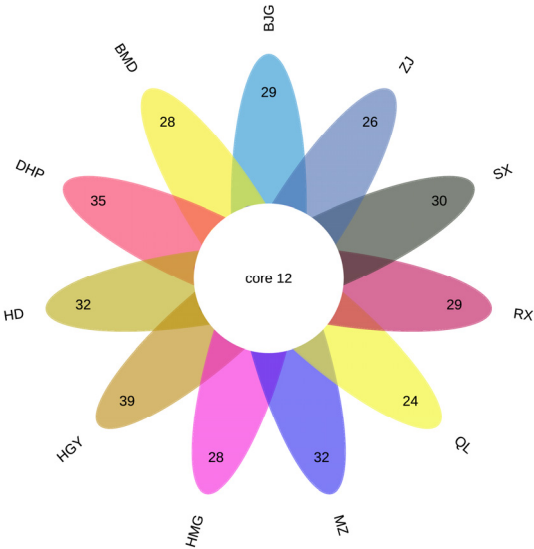


图 5 虫口密度与叶片色差的相关性

Fig. 5 Correlation between insect density and leaf color difference



注: 数字代表每组的挥发物的种类;
core 12 表示共有成分 12 种

Note: Numbers represent the type of
volatile components in each
group. Core 12 represents 12
common components

图 6 11 个茶树品种的挥发物韦恩图

Fig. 6 Venn diagram of volatiles of 11 tea cultivars

表 5 11 个茶树品种挥发性物质相对含量
Table 5 Relative contents of volatile compounds in 11 tea cultivars

类别 Category	化合物 Compound	相对含量 Relative content/%										
		紫娟	梅占	水仙	黄桢	奇兰	白牡丹	大红袍	瑞香	黄观音	黄玫瑰	白鸡冠
醇类 Alcohols	叶醇	0.05±0.07 ^a	0.01±0.00 ^a	0.29±0.08 ^a	0.02±0.01 ^a	0.01±0.00 ^a	0.01±0.00 ^a	0.39±0.03 ^a	0.54±0.75 ^a	—	—	—
	2-庚醇	0.19±0.03	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2-乙基己醇	0.78±0.06 ^{bcd}	0.95±0.03 ^{bcd}	0.83±0.04 ^{bcd}	0.53±0.04 ^{cd}	0.44±0.40 ^{cd}	1.07±0.11 ^{bcd}	1.27±1.03 ^{bc}	0.86±0.21 ^{bcd}	1.52±0.48 ^b	0.17±0.01 ^d	2.65±0.28 ^a
	苯甲醇	0.41±0.17 ^{ab}	0.08±0.11 ^b	0.05±0.07 ^b	—	0.28±0.03 ^b	—	1.57±1.78 ^a	—	—	—	0.40±0.23 ^{ab}
	顺- α , α -5-三甲基-5-乙烯基 四氢化呋喃-2-甲醇	1.24±0.06 ^{cd}	3.28±0.78 ^{bcd}	2.70±0.00 ^{bcd}	5.01±0.19 ^{bcd}	0.51±0.04 ^d	0.84±0.04 ^d	5.92±4.95 ^{ab}	2.81±0.54 ^{bcd}	7.79±1.00 ^a	5.16±0.03 ^{ab}	2.71±0.26 ^{bcd}
	反- α , α -5-三甲基-5-乙烯基 四氢化-2-呋喃甲醇	7.76±0.50 ^{bc}	6.87±1.79 ^c	5.63±0.17 ^{bc}	9.48±0.23 ^{bc}	2.11±0.01 ^d	1.95±0.13 ^d	11.27±4.73 ^b	7.25±0.18 ^c	16.84±1.75 ^a	16.27±0.11 ^a	7.98±0.62 ^{bc}
	芳樟醇	62.75±6.63 ^a	28.91±0.86 ^{cde}	36.11±5.58 ^{bc}	40.13±0.42 ^b	19.64±3.21 ^{ef}	10.61±1.45 ^{fg}	7.85±8.42 ^e	26.22±2.08 ^{cde}	24.46±4.41 ^{de}	31.70±0.65 ^{bcd}	24.78±5.82 ^{de}
	苯乙醇	0.60±0.20 ^b	2.31±0.28 ^{ab}	—	1.32±0.04 ^{ab}	1.37±0.01 ^{ab}	0.77±0.10 ^b	0.55±0.69 ^b	2.12±2.98 ^b	1.45±0.17 ^{ab}	3.65±0.04 ^a	1.97±0.88 ^{ab}
	2,2,6-三甲基-6-乙烯基四 氢-2H-呋喃-3-醇	1.16±0.15 ^a	0.21±0.02 ^a	0.27±0.01 ^a	0.62±0.00 ^a	0.15±0.02 ^a	0.15±0.01 ^a	4.25±5.92 ^a	0.61±0.14 ^a	1.15±0.01 ^a	0.97±0.10 ^a	0.96±0.02 ^a
	1-壬醇	—	0.10±0.01 ^{abc}	—	0.05±0.00 ^{bc}	0.09±0.01 ^{abc}	0.15±0.02 ^{abc}	0.17±0.15 ^{ab}	0.06±0.01 ^{ab}	0.15±0.16 ^{abc}	0.05±0.00 ^{bc}	0.22±0.04 ^a
	橙花醇	0.15±0.00 ^b	0.52±0.01 ^a	—	—	0.45±0.10 ^a	0.10±0.02 ^b	0.15±0.01 ^b	—	—	0.16±0.08 ^b	—
	香叶醇	2.49±0.31 ^d	23.68±0.45 ^b	16.34±4.26 ^{cd}	10.28±1.24 ^{cd}	47.75±0.04 ^a	23.23±0.52 ^b	8.64±11.59 ^{cd}	11.20±3.37 ^{cd}	5.97±0.85 ^d	16.09±0.85 ^{bc}	1.92±0.31 ^d
	2-十六醇	—	0.06±0.01 ^{bc}	0.07±0.01 ^{bc}	—	—	—	0.22±0.10 ^a	—	0.13±0.07 ^b	—	—
	橙花叔醇	—	0.14±0.04 ^{cde}	0.18±0.02 ^{cd}	0.10±0.00 ^{de}	—	0.37±0.01 ^b	0.26±0.14 ^{bc}	—	0.12±0.02 ^{de}	0.14±0.02 ^{cde}	0.67±0.12 ^a
烯烃类 Olefin	柠檬烯	0.22±0.01 ^a	0.23±0.01 ^a	0.15±0.04 ^a	0.16±0.04 ^a	0.27±0.01 ^a	0.17±0.08 ^a	1.60±2.04 ^a	0.11±0.07 ^a	0.12±0.04 ^a	0.14±0.01 ^a	0.19±0.04 ^a
	α -蒎烯	0.65±0.05 ^b	0.70±0.04 ^b	0.72±0.04 ^b	0.46±0.04 ^c	0.91±0.04 ^a	0.32±0.00 ^d	—	0.37±0.04 ^{cd}	0.27±0.06 ^d	0.37±0.11 ^{cd}	—
	异茨烯	0.28±0.08 ^b	0.37±0.04 ^b	—	0.26±0.04 ^b	—	—	0.80±0.54 ^a	—	—	—	0.39±0.01 ^b
	γ -松油烯	—	0.11±0.01 ^a	—	0.10±0.01 ^{ab}	—	—	—	0.04±0.02 ^{bc}	0.06±0.06 ^{bc}	0.13±0.03 ^a	—
	(-)- α -萜蒎烯	—	—	—	—	—	—	0.15±0.08 ^a	—	0.08±0.04 ^b	0.05±0.01 ^{bc}	—
	β -石竹烯	—	0.05±0.01 ^d	—	0.11±0.01 ^c	—	—	—	—	0.32±0.03 ^a	0.22±0.01 ^b	—
	Δ -杜松烯	—	—	0.05±0.00 ^b	0.05±0.01 ^b	—	0.16±0.04 ^a	0.15±0.11 ^a	—	0.14±0.00 ^a	0.06±0.01 ^b	—
	α -柏木烯	—	—	—	—	—	—	0.21±0.20 ^a	—	0.05±0.01 ^b	—	—

注：同行不同小写字母代表 $P < 0.05$ 水平差异显著

Note: Different lowercase letters in the same line represent significant differences at the $P < 0.05$ level

续表 5

类别 Category	化合物 Compound	相对含量 Relative content/%										
		紫娟	梅占	水仙	黄桃	奇兰	白牡丹	大红袍	瑞香	黄观音	黄玫瑰	白鸡冠
醛类 Aldehyde	2-己烯醛	—	—	0.01±0.00 ^a	0.02±0.01 ^a	—	—	—	—	0.01±0.00 ^a	—	0.02±0.00 ^a
	庚醛	—	—	—	—	—	—	0.31±0.00	—	—	—	—
	(Z)-3-己烯醛	—	—	—	—	—	—	—	—	0.05±0.02 ^a	—	—
	壬醛	—	—	1.38±0.12 ^{abc}	—	—	0.82±0.15 ^c	1.23±1.00 ^{abc}	1.12±0.37 ^{abc}	1.71±0.16 ^a	0.86±0.06 ^{bc}	1.64±0.13 ^{ab}
	癸醛	—	—	—	—	—	—	—	—	0.16±0.05 ^b	—	0.39±0.15 ^a
	β -环柠檬醛	0.15±0.00 ^{ab}	0.12±0.01 ^{ab}	0.10±0.01 ^b	0.12±0.02 ^c	0.15±0.03 ^{ab}	—	0.17±0.05 ^a	0.14±0.05 ^{ab}	0.18±0.01 ^a	—	0.15±0.02 ^{ab}
	(Z)-3,7-二甲基-2,6-辛二烯醛	—	0.64±0.06 ^a	0.26±0.01 ^a	0.23±0.01 ^a	0.84±0.07 ^a	0.29±0.01 ^a	6.36±8.75 ^a	0.17±0.07 ^a	0.12±0.01 ^a	0.25±0.01 ^a	—
	柠檬醛	0.11±0.02 ^{ef}	1.21±0.08 ^b	0.58±0.01 ^{cd}	0.60±0.02 ^{cd}	1.77±0.07 ^a	0.81±0.01 ^c	0.33±0.23 ^{de}	0.36±0.28 ^{de}	0.36±0.06 ^{de}	0.68±0.01 ^c	—
酯类 Esters	乙酸叶醇酯	2.29±0.16 ^c	0.73±0.17 ^c	5.21±0.06 ^{bc}	0.55±0.07 ^c	1.88±0.35 ^c	24.34±5.08 ^a	10.65±0.65 ^b	10.90±8.92 ^b	0.71±0.12 ^c	0.43±0.02 ^c	0.35±0.03 ^c
	乙酸反-2-己烯酯	—	—	—	—	—	0.29±0.25 ^a	0.09±0.12 ^b	—	—	—	—
	(E)-己-3-烯基丁酸酯	0.10±0.03 ^b	0.14±0.09 ^b	0.62±0.13 ^b	0.12±0.01 ^b	—	—	0.26±0.04 ^b	1.71±1.07 ^a	0.16±0.04 ^b	0.07±0.00 ^b	—
	水杨酸甲酯	4.54±0.04 ^a	3.31±0.58 ^a	3.78±1.32 ^a	2.11±0.21 ^a	1.01±0.20 ^a	0.51±0.13 ^a	4.34±5.84 ^a	2.60±0.32 ^a	0.95±0.29 ^a	2.29±0.14 ^a	3.45±0.92 ^a
	异戊酸叶醇酯	—	—	0.28±0.06 ^a	—	—	—	—	0.41±0.43 ^a	—	—	—
	癸酸甲酯	—	—	—	—	—	—	—	—	0.13±0.01 ^b	—	1.96±0.29 ^a
	己酸叶醇酯	—	—	0.12±0.01 ^a	—	—	0.32±0.08 ^a	2.05±2.80 ^a	0.34±0.25 ^a	—	—	—
	邻苯二甲酸二异丁酯	0.21±0.09 ^b	0.15±0.04 ^{bc}	0.07±0.03 ^{cd}	0.10±0.03 ^c	—	—	0.64±0.05 ^a	0.07±0.02 ^{cd}	0.10±0.01 ^c	—	—
烷烃类 Alkanes	棕榈酸甲酯	—	0.12±0.09 ^a	—	0.07±0.01 ^a	—	0.19±0.20 ^a	—	0.25±0.33 ^a	0.17±0.01 ^a	—	—
	癸烷	0.07±0.04 ^b	0.06±0.08 ^b	0.15±0.18 ^b	0.11±0.01 ^b	0.18±0.06 ^b	0.24±0.01 ^{ab}	0.16±0.01 ^b	0.25±0.13 ^{ab}	0.30±0.21 ^{ab}	0.21±0.04 ^b	0.49±0.15 ^a
	十一烷	—	—	—	—	—	0.17±0.01 ^a	—	—	—	—	—
	十二烷	—	—	—	1.24±0.09 ^b	0.93±0.06 ^b	0.88±0.01 ^b	—	1.35±0.77 ^a	0.86±0.35 ^b	1.21±0.01 ^b	2.17±0.04 ^a
	十四烷	0.21±0.11 ^{cde}	—	—	0.62±0.11 ^{abc}	0.45±0.16 ^{bcd}	0.68±0.10 ^b	0.40±0.25 ^{bcde}	0.73±0.36 ^{ab}	0.07±0.01 ^{de}	0.47±0.05 ^{bcd}	0.94±0.30 ^a
	正二十七烷	0.07±0.03 ^c	0.06±0.00 ^c	0.07±0.03 ^c	0.11±0.03 ^{abc}	0.08±0.04 ^{bc}	0.19±0.03 ^{ab}	0.13±0.06 ^{abc}	0.17±0.10 ^{abc}	0.19±0.07 ^{ab}	0.09±0.01 ^{bc}	0.21±0.04 ^a
酮类 Ketones	茉莉酮	—	0.30±0.09 ^b	0.78±0.50 ^a	—	—	—	—	—	1.06±0.37 ^a	—	—
	β -紫罗兰酮	0.17±0.05 ^{abc}	0.13±0.02 ^{abc}	0.13±0.02 ^{abc}	0.15±0.00 ^{abc}	0.11±0.01 ^{abc}	—	0.25±0.13 ^a	0.20±0.18 ^{ab}	0.26±0.02 ^a	0.08±0.01 ^{bc}	0.16±0.01 ^{abc}
酚类 Phenols	2,4-二叔丁基苯酚	0.16±0.12 ^b	0.25±0.03 ^{ab}	0.10±0.08 ^b	0.12±0.04 ^b	0.13±0.04 ^b	0.26±0.06 ^{ab}	0.15±0.04 ^b	0.36±0.29 ^{ab}	0.31±0.09 ^{ab}	0.13±0.02 ^b	0.56±0.30 ^a
其他 Others	吡嗪	—	—	—	—	—	—	—	—	1.14±0.13	—	—
	咖啡因	0.07±0.01 ^{ab}	0.11±0.01 ^{ab}	0.42±0.44 ^{ab}	0.14±0.01 ^{ab}	—	—	0.44±0.30 ^a	—	0.09±0.03 ^{ab}	—	0.44±0.18 ^a

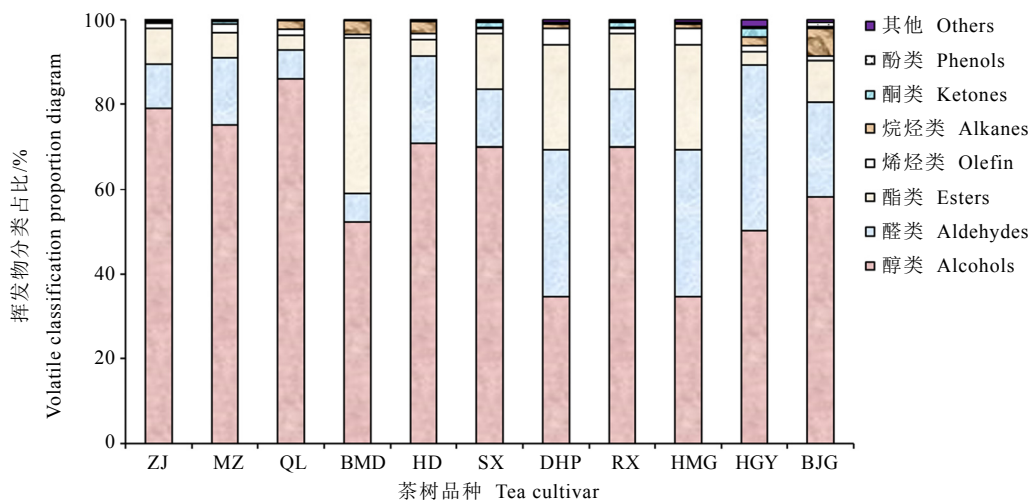


图 7 不同茶树品种挥发物分类占比
Fig. 7 Classification proportion of volatiles in different tea cultivars

表 6 挥发性分类物质与虫口种群密度的相关性
Table 6 Correlation between volatile taxonomic substances and population density

害虫 Pest	醇类 Alcohols	醛类 Aldehyde	酯类 Esters	烯烃类 Olefin	烷烃类 Alkanes	酮类 Ketones	酚类 Phenols	其他 Others
小贯松村叶蝉 <i>M. ounkii</i>	0.636*	-0.446	-0.004	-0.419	-0.668*	-0.264	0.374	-0.096
茶棍蓟马 <i>D. Minowai</i>	-0.146	0.231	-0.214	0.16	0.737**	-0.108	-0.435	-0.328

注：*表示在 0.05 水平（双侧）上显著相关；**表示在 0.01 水平（双侧）上显著相关
Note: * means significant correlation at 0.05 level (bilateral). ** means significant correlation at 0.01 level (bilateral)

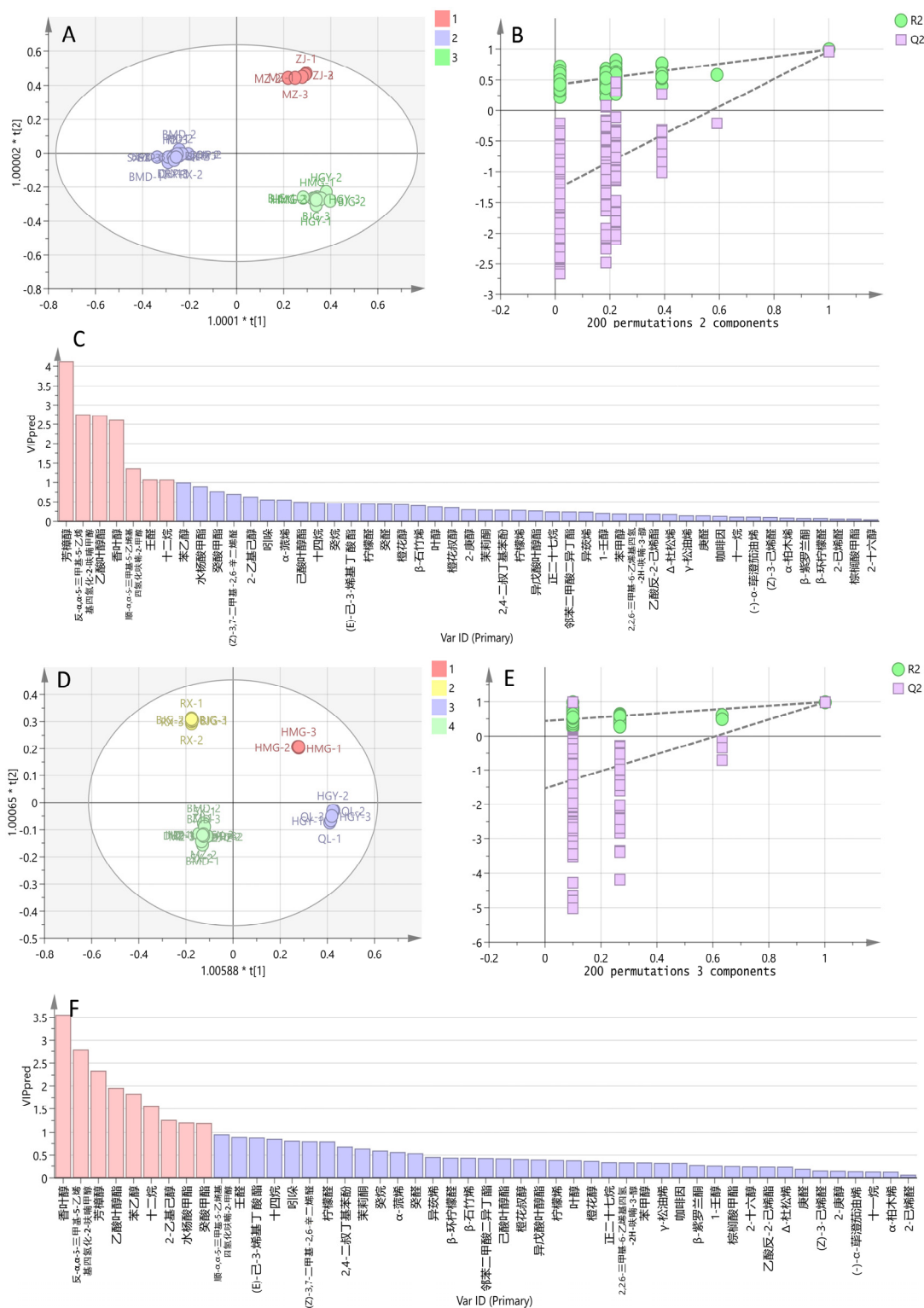
2.6 不同抗虫性茶树品种挥发物的 OPLS-DA 分析

基于不同抗虫性级别的茶树品种鲜叶挥发物，构建有监督模式的 OPLS-DA 模型，小贯松村叶蝉模型的拟合参数为 $R^2X=0.992$ ， $R^2Y=0.993$ ， $Q^2=0.972$ ；茶棍蓟马模型的拟合参数为 $R^2X=0.998$ ， $R^2Y=0.994$ ， $Q^2=0.981$ 。设置随机排列 200 次的置换检验（图 8B、8E）， Q^2 拟合回归直线均与 Y 轴的截距小于 0，斜率为正，表明所建模型均不存在过度拟合现象，模型较为可靠（小贯松村叶蝉： $R^2=0.422$ ， $Q^2=-1.29$ ；茶棍蓟马： $R^2=0.418$ ， $Q^2=-1.22$ ），能有效对不同抗虫性级别茶树品种的挥发物进行判别分析。

由得分矩阵图可知，OPLS-DA 模型中所有点均在 95%置信区间内，各组间区分明显。

按茶树品种对小贯松村叶蝉的感虫（1）、中感（2）、抗虫（3）等级分组（图 8A），感虫品种聚在第 1 象限，中感品种聚在第 2、3 象限，抗虫品种聚在第 4 象限，表明对小贯松村叶蝉不同抗性级别的茶树品种的特征挥发物存在差异。按茶树品种对茶棍蓟马的感虫（1）、中感（2）、中抗（3）、抗虫（4）等级分组（图 8D），4 组各占一个象限，不同分组的特征挥发物相对含量间存在明显差异，能有效区分不同茶树品种对茶棍蓟马的抗性程度。

图 8C 和图 8F 显示，OPLS-DA 模型中 VIP（Variable importance in projection）>1 的特征挥发物分别有 7 个（小贯松村叶蝉）与 9 个（茶棍蓟马），这些特征挥发物可能是引起不同茶树品种抗虫性差异的关键性物质。



注: A、B、C 分别为不同抗小贵松村叶蝉级别茶树品种挥发物的 OPLS-DA 得分图、置换检验图及变量重要因子; D、E、F 分别为不同抗茶藨虱马级茶树品种挥发物的 OPLS-DA 得分图、置换检验图及变量重要因子

Note: OPLS-DA score map (A), replacement test map (B) and variable important factor (C) of tea cultivars with different resistance to *M. oenoneii*. OPLS-DA score map (D), replacement test map (E) and variable important factor (F) of tea cultivars with different resistance to *D. minowai*

图 8 不同抗虫性茶树品种挥发物的 OPLS-DA 分析

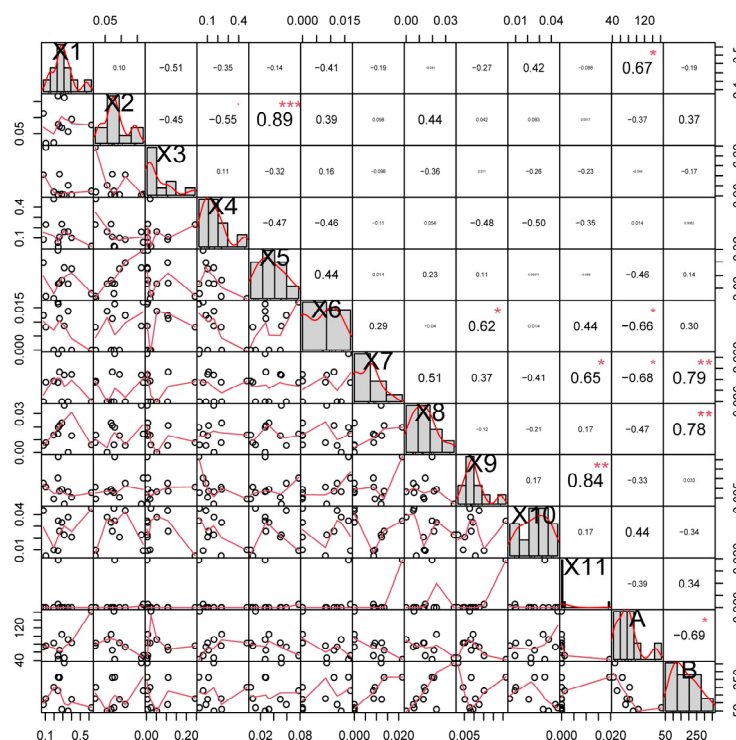
Fig. 8 OPLS-DA analysis of volatile organic compounds in different insect-resistant tea cultivars

2.7 特征挥发物与抗虫性的相关性分析

VIP 值显示, 芳樟醇、反- α,α -5-三甲基-5-乙基四氢化-2-呋喃甲醇、乙酸叶醇酯、香叶醇、顺- α,α -5-三甲基-5-乙基四氢化呋喃-2-甲醇、壬醛、十二烷是界定 11 个茶树品种感抗小贯松村叶蝉级别的特征挥发物; 香叶醇、反- α,α -5-三甲基-5-乙基四氢化-2-呋喃甲醇、芳樟醇、乙酸叶醇酯、苯乙醇、十二烷、2-乙基己醇、水杨酸甲酯、癸酸甲酯是区分 11 个茶树品种感抗茶棍蓟马级别的特征挥发物; 有 4 种挥发物共同参与了茶树对两种刺吸式害虫的抗性界定。

将种群密度与特征挥发物进行 pearson 相

关性分析 (图 9), 结果显示, 小贯松村叶蝉种群密度与芳樟醇相对含量呈显著正相关 ($P < 0.05$, $r = 0.67$); 与壬醛、十二烷相对含量呈显著负相关 ($P < 0.05$, $r_1 = -0.66$, $r_2 = -0.68$), 说明芳樟醇可能对小贯松村叶蝉具有引诱活性, 壬醛、十二烷对小贯松村叶蝉具有趋避或毒害作用。茶棍蓟马种群密度与十二烷和苯乙醇呈极显著正相关 ($P < 0.01$, $r_1 = 0.79$, $r_2 = 0.78$), 表明十二烷和苯乙醇对茶棍蓟马可能存在引诱作用。十二烷对小贯松村叶蝉和茶棍蓟马的作用不同, 且小贯松村叶蝉和茶棍蓟马的种群密度呈显著负相关, 推测十二烷可能参与影响小贯松村叶蝉和茶棍蓟马之间的生态位竞争。



注: X1 为芳樟醇, X2 为反- α,α -5-三甲基-5-乙基四氢化-2-呋喃甲醇, X3 为乙酸叶醇酯, X4 为香叶醇, X5 为顺- α,α -5-三甲基-5-乙基四氢化呋喃-2-甲醇, X6 为壬醛, X7 为十二烷, X8 为苯乙醇, X9 为 2-乙基己醇, X10 为水杨酸甲酯, X11 为癸酸甲酯, A 表示小贯松村叶蝉 2 年虫口密度均值, B 表示茶棍蓟马 2 年虫口密度均值

Note: X1, linalool. X2, tetrahydro- α,α -5-trimethyl-5-vinylfuran-2-methanol. X3, trans-2-Hexenyl acetate. X4, geraniol. X5, cis- α,α -5-trimethyl-5-vinyltetrahydrofuran-2-methanol. X6, 1-nonanal. X7, dodecane. X8, phenethylalcohol. X9, 2-ethylhexanol. X10, methylsalicylate. X11, methyl decanoate. A, total numbers of *M. onukii* (2-year average). B, total numbers of *D. minowai* (2-year average)

图 9 特征挥发性物质与虫口密度的相关性

Fig. 9 Correlation between characteristic volatile substances and population densities

2.8 不同抗虫性茶树品种单位叶面积蜡质含量差异分析

为探究叶片蜡质含量是否参与影响茶树抵御两种刺吸式害虫的为害, 对不同茶树品种进行单位叶面积蜡质含量的测定, 结果如图 10 所示。11 个茶树品种的单位叶面积蜡质含量在 $0.19 \sim 1.09 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-2}$, 其中, 白鸡冠单位叶面积蜡质含量最高, 大红袍最低。不同抗虫级别的茶树品种间存在部分显著差异, 单位叶面积蜡质含量与小贯松村叶蝉的种群密度呈负相关, 与茶棍蓟马种群密度呈正相关 ($r=0.376$), 但均不显著。烷烃类挥发物主要来自叶片蜡质层, 十二烷含量与单位叶面积蜡质含量呈现的结果一致。

3 讨论

种群发生数量是害虫抗性鉴定关键的判别指标, 田间种群密度是最直观的呈现方式^[19]。本研究对 11 个茶树品种进行为期 2 年的连续性调查, 将各品种对小贯松村叶蝉的抗性聚为 3 级 (感虫、中感、抗虫), 对茶棍蓟马抗性聚为 4 级 (感虫、中感、中抗、抗虫)。各品种的抗性差异显著, 是茶树物理抗性^[20-21]、化

学抗性^[22-23]、诱导抗性^[24-25]共同作用的结果。本研究以连续 2 年的田间种群密度为抗性分级标准, 利用田间枝条室内孵化试验和室内生命参数测定验证田间种群密度作为抗性分级标准的可靠性。结果显示, 枝条孵化的茶棍蓟马数量连续 5 d 均与茶棍蓟马种群密度呈正相关, 小贯松村叶蝉的室内生命参数与种群密度划分结果呈现一致性, 表明两种刺吸式害虫以田间种群密度为抗性分级标准具有可靠性, 能有效反映抗虫性程度。

3.1 茶树叶片色差对两种刺吸式害虫的抗性影响

昆虫寄主定位决定其食性和生态位, 昆虫在远距离寄主定位前, 视觉占主导作用^[26]。刺吸式昆虫均具单眼和复眼, 可对寄主植物的颜色、形状、大小等进行识别^[27]。本研究发现, 茶棍蓟马更倾向叶色黄、色调彩度高及色彩饱和度强的茶树品种, 与林金丽等^[28]和 Bian 等^[29]研究结果一致。本研究结果显示, 小贯松村叶蝉更倾向选择叶色偏深、色调彩度低及色彩饱和度弱的茶树品种。小贯松村叶蝉和茶棍蓟马被多种颜色所吸引, 但更趋向选择黄绿或草绿品种^[30]。寄主植物主要为绿色与

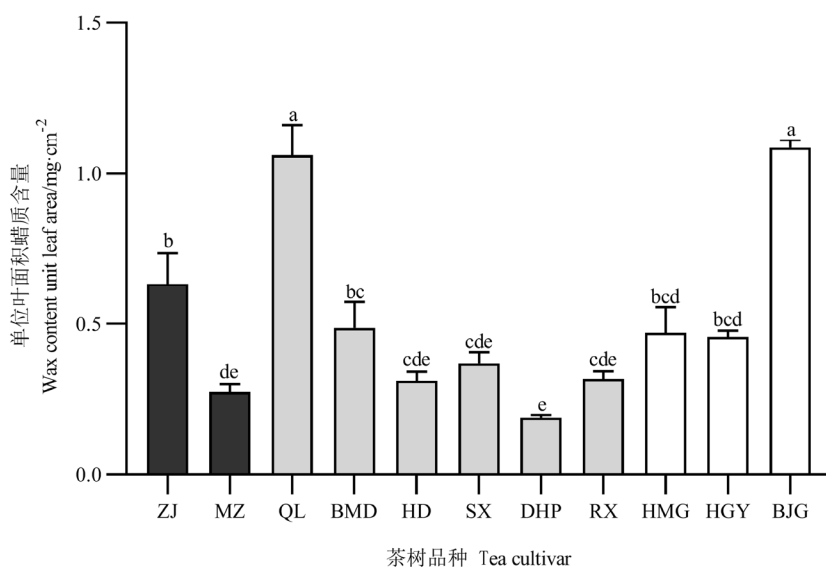


图 10 11 个茶树品种的单位叶面积蜡质含量

Fig. 10 Wax content per unit leaf area of 11 tea cultivars

黄绿色之间的差异时,昆虫更倾向于黄绿色,黄绿色比其他颜色更为显眼,目标群体更清晰,更易引诱害虫,更易感虫,B型烟粉虱^[31]也有相同趋向性。在本研究结果中,茶棍蓟马更倾向黄绿色,小贯松村叶蝉更倾向绿色,其原因可能是茶棍蓟马更具种群优势所造成的。如Bian等^[29]筛选验证茶棍蓟马和茶黄蓟马更受吸引的颜色。结果发现,在同一生境下,茶黄蓟马倾向草绿色,茶棍蓟马更倾向于黄绿色。而王琛等^[32]仅单独对茶黄蓟马趋色性进行试验,发现室内的茶黄蓟马嗜好颜色为黄绿色,显著高于对其他颜色的偏好。乔利等^[33]单独测试小贯小绿叶蝉成虫的趋光行为,发现小贯小绿叶蝉成虫对黄光(590~595 nm)趋向性相对较强,其次为紫光(420~425 nm)。叶火香等^[34]在多种植食性昆虫的存在下进行大田试验,发现小贯松村叶蝉强烈趋向于芽绿和素馨黄色板,芽绿色板诱捕的虫口数显著高于素馨黄色板,这说明种群优势参与影响害虫的视觉寄主定位。

3.2 茶树特征挥发物对两种刺吸式害虫寄主选择的影响

茶树叶片挥发物在很大程度上由芳樟醇、香叶醇等单萜烯醇类化合物和苯甲醇、苯乙醇等芳香族化合物以及青叶醇等不饱和脂肪族化合物决定。脂肪酸过氧化降解生成青叶醇、己烯醛等不饱和脂肪族醇、醛类化合物^[35],这些挥发性有机化合物通过被动扩散、囊泡或专门的质膜转运体(PT)从植物中释放到空气中,成为了草食动物捕食性天敌的引诱剂^[36]。本研究发现,芳樟醇对小贯松村叶蝉具有引诱活性,壬醛、十二烷对小贯松村叶蝉具有趋避或毒害作用。韩宝瑜^[37]和赵冬香等^[38]试验均证实芳樟醇对小贯松村叶蝉具有引诱活性。金珊等^[39]和任倩倩等^[40]的结果也表明芳樟醇对小贯松村叶蝉具有强烈引诱作用。张辉等^[41]研究发现,被茶跗线螨不同程度为害的福云6号挥发物中均检测到了壬醛。壬醛具有强烈的油脂气息和柑橘气味,而十二烷来自于叶片蜡

质层^[42],这可能是茶树能够抵御小贯松村叶蝉为害的部分原因。

本研究还发现,苯乙醇可能对茶棍蓟马存在引诱作用。苯乙醇具有清甜的玫瑰花香,Teulon等^[43]利用该特点研究发现苯乙醇能显著提高对烟蓟马的引诱效果。十二烷对茶棍蓟马的作用与小贯松村叶蝉不同,刘莹等^[44]发现十二烷能显著驱避圆柏大痣小蜂雄成虫,而陈旭鹏^[45]利用白榆树干挥发物中的十二烷和柠檬烯等物质制成的引诱剂对榆木蠹蛾的引诱效果明显,这说明同种挥发物对不同的昆虫会产生不同的趋向作用。本研究通过直接采集茶树鲜叶收集挥发物,而非活体采集,可能存在部分挥发物在茶树活体状态下不释放,本研究将最终筛选的差异特征挥发物与前人的研究比对,发现壬醛、十二烷、芳樟醇、苯乙醇均有在茶树活体鲜叶挥发物中释放^[39,46]。

本研究通过对不同抗小贯松村叶蝉和茶棍蓟马级别的茶树种质资源进行叶片色差测定与挥发物鉴定,初步发现小贯松村叶蝉趋向于叶片色彩较暗、黄色较淡的茶树品种;茶棍蓟马趋向色彩鲜亮、饱和度高、黄色偏高的茶树品种。芳樟醇、壬醛、十二烷是小贯松村叶蝉寄主定位的关键特征挥发物,而苯乙醇和十二烷是影响茶棍蓟马寄主定位的关键特征挥发物。今后将进一步利用室内试验验证该结果,找寻小贯松村叶蝉和茶棍蓟马对寄主植物色差选择的原因,并筛选关键组分或混合组分的最佳浓度,为小贯松村叶蝉和茶棍蓟马的生态调控、种群监测及开发高效的植物源引诱剂提供可靠的理论依据。

参考文献

- [1] 任倩倩. 抗、感茶树品种对茶小绿叶蝉取食诱导的防御反应[D]. 福州: 福建农林大学, 2020.
Ren Q Q. The defense strategies of resistant and susceptible tea cultivars in response to *Empoasca onukii* feeding [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2020.
- [2] Chen L L, Yuan P, Pozsgai G, et al. The impact of cover

- crops on the predatory mite *Anystis baccarum* (Acari, Anystidae) and the leafhopper pest *Empoasca onukii* (Hemiptera, Cicadellidae) in a tea plantation [J]. Pest Management Science, 2019, 75(12): 3371-3380.
- [3] 唐美君, 肖强. 茶树病虫害及天敌图谱[M]. 北京: 中国农业出版社, 2018.
- Tang M J, Xiao Q. Colored pitiorial handbook of tea plant pests and natural enemies [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2018.
- [4] Affeldt H A, Thimijan R W, Smith F F, et al. Response of the green-house whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) and the vegetable leafminer (Diptera: Afromyzidae) to photospectra [J]. Journal of Economic Entomology, 1983, 76(6): 1405-1409.
- [5] Snoeren T A L, Peter W, Jong D E, et al. Ecogenomic approach to the role of herbivore-induced plant volatiles in community ecology [J]. Journal of Ecology, 2007, 95(1): 17-26.
- [6] Kessler A, Baldwin I T. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature [J]. Science, 2001, 291(5511): 2141-2144.
- [7] Shulaev V, Silverman P, Raskin I. Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance [J]. Nature, 1997, 385(6618): 718-721.
- [8] 蔡晓明. 三种茶树害虫诱导茶树挥发物的释放规律[D]. 北京: 中国农业科学院, 2009.
- Cai X M. The emission of tea plant volatiles induced by three herbivore insect pests [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2009.
- [9] 钮羽群, 王梦馨, 崔林, 等. 迷迭香挥发物不同组合对假眼小绿叶蝉行为的调控[J]. 生态学报, 2015, 35(7): 2380-2387.
- Niu Y Q, Wang M X, Cui L, et al. Control of the tea green leafhopper via volatile compounds of rosemary: the potential for further development of a Push-Pull strategy [J]. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(7): 2380-2387.
- [10] 王梦馨, 李辉仙, 武文竹, 等. 假眼小绿叶蝉对茶梢挥发物的行为反应[J]. 应用昆虫学报, 2016, 53(3): 507-515.
- Wang M X, Li H X, Wu W Z, et al. Behavioral responses of *Empoasca vitis* Göthe to volatiles from tea shoots [J]. Chinese Journal of Applied Entomology, 2016, 53(3): 507-515.
- [11] 王蔚, 吴满容, 张思校, 等. 茶小绿叶蝉在福建省茶树品种上的选择机制初探[J]. 河南农业科学, 2016, 45(4): 80-84.
- Wang W, Wu M R, Zhang S X, et al. Preliminary study on selection mechanism of *Empoasca onukii* on tea varieties in Fujian Province [J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2016, 45(4): 80-84.
- [12] 金珊. 不同茶树品种抗假眼小绿叶蝉机理研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2012.
- Jin S. Resistance mechanisms of tea plant cultivars to tea green leafhopper [D]. Xianyang: Northwest A&F University, 2012.
- [13] 李红莉, 崔宏春, 黄海涛, 等. 联苯菊酯等 4 种杀虫剂对茶小贯小绿叶蝉的田间防效[J]. 浙江农业科学, 2021, 62(3): 565-566.
- Li H L, Cui H C, Huang H T, et al. Field control effect of 4 insecticides such as bifenthrin on *Empoasca onukii* [J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 2021, 62(3): 565-566.
- [14] 施龙清. 福建茶小绿叶蝉种类鉴定及其对光的行为响应[D]. 福州: 福建农林大学, 2016.
- Shi L Q. Identification of the tea green leafhopper in Fujian, China, and its behavioral responses to varying light conditions [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2016.
- [15] 刘勇, 陈巨莲, 程登发. 不同小麦品种(系)叶片表面蜡质对两种麦蚜取食的影响[J]. 应用生态学报, 2007(8): 1785-1788.
- Liu Y, Cheng J L, Cheng D F. Effects of wheat leaf surface waxes on the feeding of two wheat aphid species [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2007(8): 1785-1788.
- [16] 吴少玲, 王治会, 商虎, 等. 不同堆青时间对白牡丹茶风味品质差异分析[J]. 茶叶科学, 2023, 43(1): 78-90.
- Wu S L, Wang Z H, Shang H, et al. Effect of pile-up processing duration on flavor quality of white tea [J]. Journal of Tea Science, 2023, 43(1): 78-90.
- [17] 石碧滢, 周承哲, 田采云, 等. 不同贮藏时间白牡丹茶风味品质差异分析[J/OL]. 食品科学, 2022: 1-23 [2023-01-12]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.220221125.1537.012.html>.
- Shi B Y, Zhou C Z, Tian C Y, et al. Analysis of flavor quality differences between white peony tea with different storage time [J/OL]. Food Science, 2022: 1-23 [2022-12-11]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20221125.1537.012.html>.
- [18] 孙悦, 吴俊, 韦朝领, 等. 抗小贯松村叶蝉和茶棍蓟马的

- 茶树种质筛选及其抗性相关因素分析[J]. 茶叶科学, 2022, 42(5): 689-704.
- Sun Y, Wu J, Wei C L, et al. Screening of tea germplasm resistant to *Matsumurasca Onukii* and *Dendrothrips minowai* Priesner and analysis of resistance-related factors [J]. Journal of Tea Science, 2022, 42(5):689-704.
- [19] 杨春, 孟泽洪, 李帅, 等. 贵州茶园茶棍蓟马和小贯小绿叶蝉种群动态及主栽茶树品种寄主抗性[J]. 南方农业学报, 2021, 52(3): 671-681.
- Yang C, Meng Z H, Li S, et al. Population dynamics of *Dendrothrips minowai* Priesner and *Empoasca onukii* Matsuda and host resistance of major tea varieties in Guizhou [J]. Journal of Southern Agriculture, 2021, 52(3): 671-681.
- [20] Sun Q Y, Chen W L, Ge C M, et al. Correlation of tea green leafhopper occurrence with leaf structure and biochemical components in different tea cultivars [J]. International Journal of Pest Management, 2023, 69(2): 109-119.
- [21] 刘丰静, 冉伟, 李喜旺, 等. 小贯小绿叶蝉在 5 个茶树品种(系)上的蜜露排泄量与茶树叶片结构比较[J]. 茶叶科学, 2020, 40(5): 625-631.
- Liu F J, Ran W, Li X W, et al. The comparison of leaf structures and *Matsumurasca onukii* honeydew excretion among five tea cultivars (strains) [J]. Journal of Tea Science, 2020, 40(5): 625-631.
- [22] 金珊, 孙晓玲, 张新忠, 等. 8 个茶树品种生化成分分析及抗性成分的初步鉴定[J]. 应用昆虫学报, 2016, 53(3): 516-527.
- Jin S, Sun X L, Zhang X Z, et al. Chemical analysis of 8 tea cultivars with different levels of resistance to *Empoasca vitis* Göthe and a preliminary identification of the chemical basis of this resistance [J]. Chinese Journal of Applied Entomology, 2016, 53(3): 516-527.
- [23] 郑雨婷, 王梦馨, 崔林, 等. 基于 EPG 技术分析茶树品种对茶小绿叶蝉的抗性及其相关的抗性物质[J]. 生态学报, 2017, 37(23): 8015-8028.
- Zheng Y T, Wang M X, Cui L, et al. Resistance of tea cultivars to the tea green leafhopper analyzed by EPG technique and their resistance-related substances [J]. Acta Ecologica Sinica, 2017, 37(23): 8015-8028.
- [24] Liao Y Y, Yu Z M, Liu X Y, et al. Effect of major tea insect attack on formation of quality-related nonvolatile specialized metabolites in tea (*Camellia sinensis*) leaves [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(24): 6716-6724.
- [25] Wang M X, Han S J, Wu Y Q, et al. Tea green leafhopper-induced synomone attracts the egg parasitoids, mymarids to suppress the leafhopper [J]. Pest Management Science, 2023. doi: 10.1002/ps.7563.
- [26] 边磊, 孙晓玲, 高宇, 等. 昆虫光趋性机理及其应用进展[J]. 应用昆虫学报, 2012, 49(6): 1677-1686.
- Bian L, Sun X L, Gao Y, et al. Research on the light tropism of insects and the progress in application [J]. Chinese Journal of Applied Entomology, 2012, 49(6): 1677-1686.
- [27] Knolhoff L M, Heckel D G. Behavioral assays for studies of host plant choice and adaptation in herbivorous insects [J]. Annual Review of Entomology, 2014, 59(1): 263-278.
- [28] 林金丽, 韩宝瑜, 周孝贵, 等. 色彩对茶园昆虫的引诱力[J]. 生态学报, 2009, 29(8): 4303-4316.
- Lin J L, Han B Y, Zhou X G, et al. The attraction of color to insects in tea garden [J]. Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(8): 4303-4316.
- [29] Bian L, Yang P X, Yao Y J, et al. Effect of trap color, height, and orientation on the capture of yellow and stick tea thrips (Thysanoptera: Thripidae) and nontarget insects in tea gardens [J]. Journal of Economic Entomology, 2016, 109(3): 1241-1248.
- [30] Mohammad H A T, Nazrul I M, Zhang Y, et al. Leaf morphological characters can be a factor for intra-variety preference of whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) among eggplant varieties [J]. Plos One, 2016, 11(4): e0153880. doi: 10.1371/journal.pone.0153880.
- [31] 曹凤勤, 刘万学, 万方浩, 等. 寄主挥发物、叶色在 B 型烟粉虱寄主选择中的作用[J]. 应用昆虫学报, 2008, 45(3): 431-436.
- Cao F Q, Liu W X, Wan F H, et al. Behavior selection of *Bemisia tabaci* B-biotype to different host plants and colors [J]. Chinese Journal of Applied Entomology, 2008, 45(3): 431-436.
- [32] 王琛, 朱文静, 符悦冠, 等. 茶黄蓟马嗜好颜色筛选及监测效果测定[J]. 环境昆虫学报, 2015, 37(1): 107-115.
- Wang C, Zhu W J, Fu Y G, et al. Screening of preferred color and field evaluation for monitoring *Scirtothrips dorsalis* Hood (Thysanoptera: Thripidae) [J]. Journal of Environmental Entomology, 2015, 37(1): 107-115.
- [33] 乔利, 金银利, 蒋月丽, 等. 光谱对小贯小绿叶蝉趋光行为的影响[J]. 环境昆虫学报, 2022, 44(5): 1197-1204.
- Qiao L, Jin Y L, Jiang Y L, et al. Effects of spectra on

- phototactic behavior of the *Empoasca onukii* Matsuda [J]. Journal of Environmental Entomology, 2022, 44(5): 1197-1204.
- [34] 叶火香, 韩善捷, 韩宝瑜. 假眼小绿叶蝉趋色性及茶梢信息物质强化其趋色性的效应[J]. 安徽农业大学学报, 2015, 42(6): 868-872.
- Ye H X, Han S J, Han B Y. Phototaxis of tea green leafhopper and strengthening effect of infochemicals from tea shoots on its phototaxis [J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2015, 42(6): 868-872.
- [35] Zeng L T, Watanabe N, Yang Z Y. Understanding the biosyntheses and stress response mechanisms of aroma compounds in tea (*Camellia sinensis*) to safely and effectively improve tea aroma [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2019, 59(14): 2321-2334.
- [36] 张冬桃, 孙君, 叶乃兴, 等. 茶树萜烯类香气物质合成相关酶研究进展[J]. 茶叶学报, 2015, 56(2): 68-79.
- Zhang D T, Sun J, Ye N X, et al. Research progress of enzymes associated with terpene synthesis in *Camellia sinensis* [J]. Acta Tea Sinica, 2015, 56(2): 68-79.
- [37] 韩宝瑜. 茶树-茶蚜-捕食、寄生性天敌间定位、取食的物理、化学通讯机制[D]. 北京: 中国农业科学院, 1999.
- Han B Y. The physical and chemical communication mechanism of tea plant-tea aphid-predator and parasitoid positioning and feeding [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 1999.
- [38] 赵冬香, 高景林, 陈宗懋, 等. 假眼小绿叶蝉对茶树挥发物的定向行为反应[J]. 华南农业大学学报(自然科学版), 2002, 23(4): 27-29.
- Zhao D X, Gao J L, Cheng Z M, et al. Orientation response of *Empoasca vitis* to tea shoots volatiles [J]. Journal of South China Agricultural University (Natural Science Edition), 2002, 23(4): 27-29.
- [39] 金珊, 韩李伟, 叶乃兴, 等. 茶小绿叶蝉危害乌龙茶茶树品种的挥发物分析[J]. 热带作物学报, 2019, 40(3): 576-582.
- Jin S, Han L W, Ye N X, et al. Analysis on volatiles of Oolong tea varieties induced by *Empoasca* sp. [J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2019, 40(3): 576-582.
- [40] 任倩倩, 庄明珠, 蔡晓明, 等. 小贯小绿叶蝉取食诱导抗、感茶树品种挥发物的释放[J]. 茶叶科学, 2020, 40(6): 795-806.
- Ren Q Q, Zhuang M Z, Cai X M, et al. The release of volatiles in resistant and susceptible tea cultivars under *Empoasca onukii* feeding [J]. Journal of Tea Science, 2020, 40(6): 795-806.
- [41] 张辉, 李慧玲, 王定锋, 等. 茶跗线螨为害程度对福云 6 号鲜叶芳香物质的影响[J]. 福建农业学报, 2015, 30(9): 896-900.
- Zhang H, Li H L, Wang D F, et al. Aromatics in fresh leaves of Fuyun 6 (*Camellia sinensis* cv.) under *Polyphagotarsonemus latus* stress [J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2015, 30(9): 896-900.
- [42] 李晓维, 程江辉, 韩海斌, 等. 植物次生代谢物质对蓟马的行为调控作用及其在蓟马防控中的应用[J]. 昆虫学报, 2022, 65(9): 1222-1246.
- Li X W, Cheng J H, Han H B, et al. Behavioral manipulation of the plant secondary metabolites to thrips and their application in thrips management [J]. Acta Entomologica Sinica, 2022, 65(9): 1222-1246.
- [43] Teulon D A J, Davidson M M, Hedderley D I, et al. 4-pyridyl carbonyl and related compounds as thrips lures: effectiveness for onion thrips and new zealand flower thrips in field experiments [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(15): 6198-6205.
- [44] 刘莹, 吕东, 陈立, 等. 圆柏大瘿小蜂对祁连圆柏挥发物的触角电位和行为反应[J]. 生态学报, 2023, 43(9): 3828-3839.
- Liu Y, Lü D, Chen L, et al. Electroant-ennagram and responses of *Megastigmus sabinae* to volatiles of *Sabina przewalskii* [J]. Acta Ecologica Sinica, 2023, 43(9): 3828-3839.
- [45] 陈旭鹏. 榆木蠹蛾三种寄主树干挥发物分析及植源性引诱剂的筛选[D]. 晋中: 山西农业大学, 2016.
- Cheng X P. Identification of volatiles from three host plants attractive for *Holcocerus vicarius* Walker and the development of plant volatile attractant [D]. Jinzhong: Shanxi Agricultural University, 2016.
- [46] 孙廷哲, 岂泽华, 梁可欣, 等. 蚜害茶树挥发物组分变化的聚类分析[J]. 植物学报, 2021, 56(4): 422-432.
- Sun T Z, Qi Z H, Liang K X, et al. Clustering analysis of volatile components from the tea plants infested by tea aphid (*Toxotera aurantia*) [J]. Chinese Bulletin of Botany, 2021, 56(4): 422-432.

化学农药对茶小绿叶蝉成虫的防效及其原因探究

邹佳婷^{1,2}, 郭宇航^{1,2}, 边磊¹, 罗宗秀¹, 李兆群¹, 修春丽¹, 付楠霞¹, 蔡晓明^{1*}

1. 中国农业科学院茶叶研究所, 浙江 杭州 310008; 2. 中国农业科学院研究生院, 北京 100081

摘要: 茶小绿叶蝉 (*Empoasca onukii* Matsuda) 是茶园重要害虫, 目前主要以化学防治为主, 但化学农药对成虫的防治效果尚不明确。通过田间试验, 评估了化学农药对茶小绿叶蝉成虫的防效; 并通过室内模拟试验, 探究成虫防效不佳的原因。结果显示, 田间对若虫防效很好的化学农药对成虫的防治效果不理想。室内研究显示, 以田间施药浓度甚至更低的浓度喷施整株茶梢时, 成虫死亡率均为 100%。当茶梢中部着药时, 成虫死亡率最高, 为 63.33%~71.67%; 但茶梢顶部着药时, 成虫死亡率仅为 20.00%~28.33%。当茶梢顶部着药时, 通过增加茶梢周围的遮光范围或降低茶梢顶部的光照强度, 可增加成虫的死亡率。这些结果表明, 茶小绿叶蝉成虫活动范围主要在茶梢中部应是化学农药不能在田间对其有效控制的主要原因, 且成虫这一习性与光强有着一定的关系。这一发现为田间茶小绿叶蝉成虫的防治提供了借鉴, 有助于进一步提高化学农药对茶小绿叶蝉的防治效果。

关键词: 茶小绿叶蝉; 成虫; 化学农药; 防治效果; 影响因素

中图分类号: S571.1; S435.711

文献标识码: A

文章编号: 1000-369X(2023)04-544-09

Study on the Control Effect of Chemical Pesticides on the *Empoasca onukii* Adults

ZOU Jiating^{1,2}, GUO Yuhang^{1,2}, BIAN Lei¹, LUO Zongxiu¹, LI Zhaoqun¹,
XIU Chunli¹, FU Nanxia¹, CAI Xiaoming^{1*}

1. Tea Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310008, China;

2. Graduate School of Chinese Academy of Agriculture Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: *Empoasca onukii* is an important pest in tea gardens. Currently, the control was mainly depended on chemical pesticides, but less attention was paid to the control effect on the adults. In this study, the control effects of chemical pesticides on the adult *E. onukii* were evaluated through field experiments, and the reasons for the poor control efficiency were investigated by laboratory test. The results show that the chemical pesticides with good control effects on nymphs in the field did not have ideal control effects on adults. Indoor studies have shown that when spraying the entire tea shoots at concentrations even lower than those in the field, the adult mortality rates were 100%. Furthermore, the adult mortality rates were the highest (63.33%~71.67%) when the pesticides were applied at the middle part of tea plant shoots, and the adult mortality rates were the lowest (20.00%~28.33%) when applied at the top of shoots. Moreover, the adult mortality rate could be increased by increasing the shading range around the shoots or reducing the light intensity at the top of the shoots, when the pesticides were applied at the top of shoots. These results indicate that the main reason for the poor control efficiencies of chemical pesticides on the adult *E. onukii* in field is that the adults mainly live in the middle part of tea plant shoots. This phenomenon should also be

收稿日期: 2023-05-08

修订日期: 2023-07-20

基金项目: 国家茶叶产业技术体系 (CARS-19)、国家重点研发计划 (2022YFD1600803)

作者简介: 邹佳婷, 女, 硕士研究生, 主要从事茶树病虫害方面的研究, 2108485362@qq.com。*通信作者: cxm_d@tricaas.com

related with light intensity. This finding provided a reference for the control of the adult *E. onukii*, and helped to enhance the control effects of chemical pesticides on *E. onukii*.

Keywords: *Empoasca onukii*, adults, chemical pesticides, control effect, affecting factors

茶小绿叶蝉是茶园中的首要害虫, 个体小不易被发现, 世代重叠严重且繁殖力强, 在我国茶园危害较广^[1]。茶小绿叶蝉偏爱幼嫩部位的芽、叶、茎, 常常取食茶树嫩梢的汁液, 导致叶肉组织细胞被破坏, 茶叶萎焉, 严重时甚至枯萎似火烧状, 造成茶叶品质和产量的严重下降^[2]。

目前, 仍缺乏高效防治茶小绿叶蝉的化学农药替代技术, 田间主要还是使用虫螨腈、茚虫威、啉虫酰胺等化学农药进行防治^[3]。同时, 以往大多数是通过茶小绿叶蝉若虫进行化学农药的田间药效评估, 但这些农药防治成虫的效果尚不清楚。与若虫危害相比, 成虫能够在茶树韧皮部进行产卵, 使后代持续不断的危害茶树^[4]。因此, 明确化学农药对成虫的防治效果具有重要意义。

本研究首先通过田间试验评估了化学农药对茶小绿叶蝉成虫的防效, 然后开展室内模拟试验, 从药剂浓度和着药部位探究影响成虫防效不佳的原因, 并从茶枝底部向上的遮挡范围和光照强度两方面探究光强的影响, 以期为田间茶小绿叶蝉成虫的防治提供更多的参考。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

试验所用的茶小绿叶蝉成虫采自浙江省杭州市中国农业科学院茶叶研究所试验茶园, 茶树品种为龙井 43。试虫采回后, 置于养虫室中饲养。养虫室温度为 24~27 °C, 相对湿度为 65%~75%, 光周期为 14L:10D, 饲养茶枝采自龙井 43 茶树。

1.2 试验药剂

40%啉虫·丁醚脲悬浮剂(啉虫酰胺 5%+

丁醚脲 35%)、15%啉虫酰胺悬浮剂和 30%啉虫酰胺·茚虫威悬浮剂(啉虫酰胺 20%+茚虫威 10%)购自福建省德盛生物工程有限公司, 240 g·L⁻¹ 虫螨腈悬浮剂购自山东潍坊双星农药有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 田间药效试验

于 2020 年 6 月 10 日和 2020 年 10 月 3 日在浙江省绍兴市柯桥区平水镇开展 2 次药效试验。供试施药器械为电动背负式喷雾器, 用水量为 675 L·hm⁻²。啉虫酰胺、虫螨腈和茚虫威的有效成分用量均大于中国农药信息网上登记的最高用药量。

2020 年 6 月 10 日的试验设置 3 个处理。处理一为 15%啉虫酰胺悬浮剂, 有效成分用量为 225 g·hm⁻²; 处理二为 40%啉虫·丁醚脲悬浮剂, 有效成分用量为 540 g·hm⁻²; 处理三为清水对照。各处理 4 个重复小区, 每个重复小区为长 20 m 的 5 条茶行, 小区间隔 10 m。分别于药前和药后 1 d 和 3 d 调查茶小绿叶蝉成虫和若虫的数量。

2020 年 10 月 3 日的试验设置 3 个处理。处理一为 15%啉虫酰胺悬浮剂与 240 g·L⁻¹ 虫螨腈悬浮剂混合喷施, 有效成分用量分别为 225 g·hm⁻² 和 216 g·hm⁻²; 处理二为 30%啉虫酰胺·茚虫威悬浮剂, 有效成分用量为 405 g·hm⁻²; 处理三为清水对照。各处理 3 个重复小区, 每个重复小区为长 20 m 的 5 条茶行, 小区间隔 10 m。于药前和药后 3 d 和 7 d 调查茶小绿叶蝉成虫的数量。

在每个重复小区的中间 3 条茶行采用黄板进行成虫虫口调查。每条茶行在距地头 6 m 和 14 m 处各放置 1 块黄板, 黄板垂直于茶蓬面并高出其 10 cm 左右。每次调查前 1 d 放置

黄板, 24 h 后调查黄板上的叶蝉数量。按照 GB/T 17980.56—2004, 在晴天晨露未干时或阴天全天进行调查, 每个小区每次随机调查 100 个一芽二叶上的若虫数。

1.3.2 15%啮虫酰胺悬浮剂不同稀释倍数对茶小绿叶蝉成虫死亡率影响的试验

试验测试 15%啮虫酰胺悬浮剂不同稀释倍数对成虫死亡率的影响。设置 4 个处理, 分别为 450 倍液 (即田间施药浓度)、900 倍液、1 350 倍液、清水对照。选取离体的一芽十叶龙井 43 茶梢进行试验, 梢长为 30~34 cm。茶枝整株喷施药液, 至滴水状态, 待完全晾干后插入被保鲜膜覆盖的浸水花泥中, 再将其用玻璃管 (长 34 cm, 直径 5 cm) 罩住。每个玻璃管放 3 株茶枝, 玻璃管顶端用保鲜膜覆盖, 保鲜膜上扎小孔以便透气。玻璃管放置在采光良好的窗户旁, 光照为自然光, 室温为 (25±1)℃。上午 10 点从玻璃管底部引入 15 头茶小绿叶蝉成虫, 雌雄随机。各处理重复 3 次, 于

1 d 后统计茶小绿叶蝉成虫死亡数。

1.3.3 不同着药部位对茶小绿叶蝉成虫死亡率影响的试验

试验测试茶枝不同部位蘸取 15%啮虫酰胺悬浮剂 900 倍液对成虫死亡率的影响。共设置 3 个处理, 分别为顶部 (一芽三叶) 着药、中部 (即第 4 叶到第 7 叶) 着药和底部 (即第 8 叶到第 10 叶) 着药处理, 以整株茶枝喷施清水作为对照, 计算校正死亡率。选取离体的一芽十叶龙井 43 茶梢进行试验, 梢长为 30~34 cm。为模拟田间茶丛较为郁闭的环境, 从玻璃管的底部向上用 15 cm 的黑布进行遮挡 (底部至芽下第 7 叶), 具体如图 1 所示, 其他试验步骤同 1.3.2 章节。各处理重复 4 次, 于 1 d 后统计茶小绿叶蝉成虫死亡数。另外, 选取了节间长度明显较短的一芽十叶龙井 43 茶梢重复上述试验。茶梢长度 20~24 cm, 遮光黑布高 7 cm (底部至芽下第 7 叶)。其他试验步骤同 1.3.2 章节。

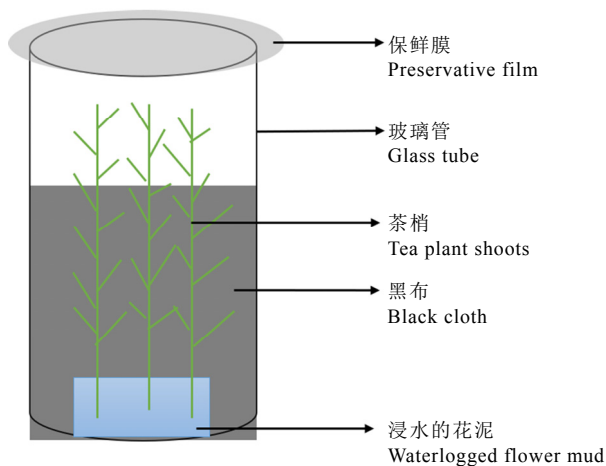


图 1 试验装置图

Fig. 1 Diagram of the experimental setup

1.3.4 不同遮光范围对顶部着药时茶小绿叶蝉成虫死亡率影响的试验

试验测试从茶枝底部向上的遮挡范围对茶梢顶部着药时成虫死亡率的影响。设置 4

个处理, 分别为遮光 0%、遮光 30% (从底部到芽下第 7 叶黑布遮挡)、遮光 60% (从底部到芽下第 4 叶黑布遮挡) 和遮光 100% (从底部到芽黑布遮挡), 同时以茶梢顶部蘸取清水

作为对照,计算校正死亡率。选取离体的一芽十叶龙井43茶梢进行试验,梢长为30~34 cm。茶梢顶部(一芽三叶)蘸取15%啉虫酰胺悬浮剂900倍液。其他试验步骤同1.3.2章节。

1.3.5 不同光照强度对顶部着药时茶小绿叶蝉成虫死亡率影响的试验

试验测试不同光照强度对茶梢顶部着药时成虫死亡率的影响。试验于暗室中进行,设置强光(6根80 W的LED灯管)和弱光(2根28 W的LED灯管)处理,以茶梢顶部蘸取清水作为对照,计算校正死亡率。选取离体的一芽十叶龙井43茶梢进行试验,梢长为30~34 cm。LED灯管放置在茶梢顶部正上方20 cm处,玻璃管的底部至芽下第7叶用黑布(高15 cm)遮挡,茶梢顶部(一芽三叶)蘸取15%啉虫酰胺悬浮剂900倍液,其他试验步骤同1.3.2章节。

1.4 数据分析

田间防效计算公式如下:

虫口减退率=[(处理前虫口基数-处理后虫口基数)/处理前虫口基数]×100%;

防治效果=[(处理区虫口减退率-对照区虫口减退率)/(1-对照区虫口减退率)]×100%。

室内试验校正死亡率计算公式如下(各试

验中对照组死亡率均小于5%):

死亡率=死亡的个体数/总样本的个体数×100%;

校正死亡率=(处理组死亡率-对照组死亡率)/(1-对照组死亡率)×100%。

利用SPSS 26.0软件进行统计分析。化学农药对茶小绿叶蝉成虫和若虫的田间防治效果和两种光照强度对顶部着药时茶小绿叶蝉成虫死亡率的影响采用 t 检验;不同着药部位对茶小绿叶蝉成虫死亡率的影响和不同遮光范围对顶部着药时茶小绿叶蝉成虫死亡率的影响采用单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 不同化学农药对茶小绿叶蝉的田间防治效果

如图2所示,15%啉虫酰胺悬浮剂、40%啉虫·丁醚脲悬浮剂在药后1 d和3 d对茶小绿叶蝉若虫的防治效果均在80%以上,而对成虫的防治效果均不到50%。并且将同样用药量的15%啉虫酰胺悬浮剂与240 g·L⁻¹虫螨腈悬浮剂混合喷施时,其药后3 d和7 d对成虫的防治效果仍不到50%;施用30%啉虫酰胺·茚虫威悬浮剂时也得到相似的结果(图3)。

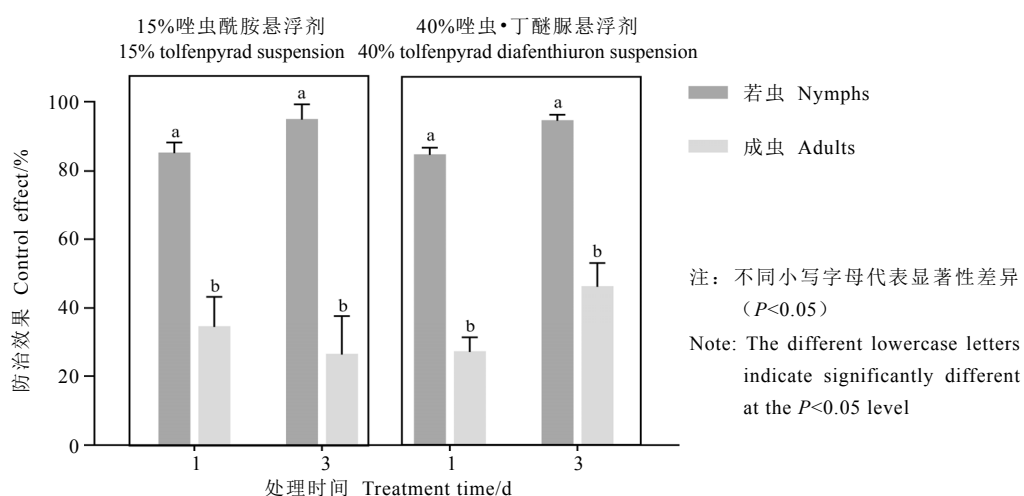


图2 不同化学农药对茶小绿叶蝉成虫和若虫的防治效果

Fig. 2 Control effects of different chemical pesticides on *E. onukii* adults and nymphs

2.2 15%唑虫酰胺悬浮剂稀释倍数对茶小绿叶蝉成虫死亡率的影响

由图 4 可知, 15%唑虫酰胺悬浮剂对茶小绿叶蝉成虫具有非常好的毒杀效果。当稀释倍数为田间施药浓度(450 倍液)甚至更低(900 倍液和 1 350 倍液)时, 成虫的校正死亡率均为 100%。

2.3 着药部位对茶小绿叶蝉成虫死亡率的影响

从图 5 中可以看出, 长茶梢(梢长 30~34 cm)的龙井 43, 中部着药时成虫的校正死亡率为 71.67%, 而顶部和底部着药时成虫的校正死亡率均不到 30%。同样, 选取短茶梢(梢长 20~24 cm)再次试验时, 也得到了相似的结果。

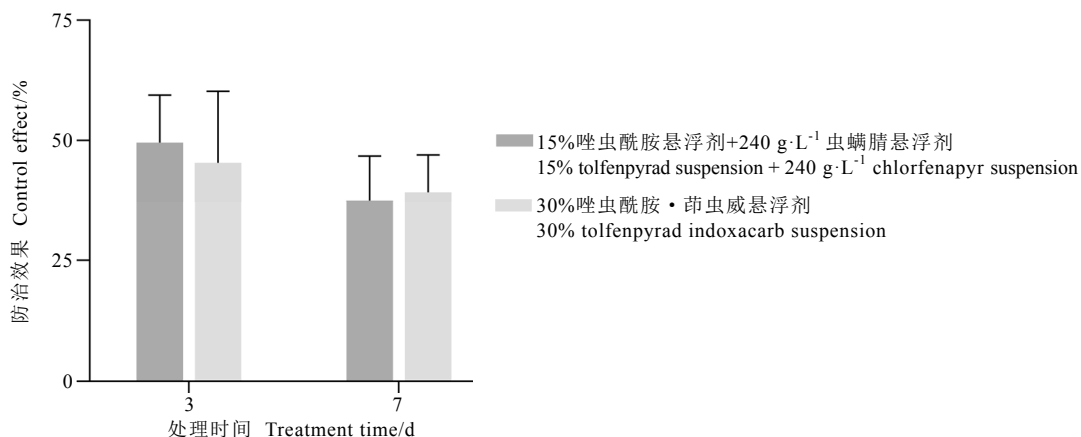


图 3 不同化学农药对茶小绿叶蝉成虫的防治效果

Fig. 3 Control effects of different chemical pesticides on *E. onukii* adults

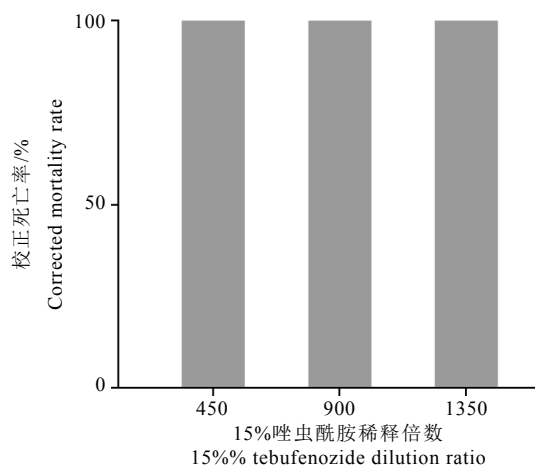


图 4 15%唑虫酰胺悬浮剂稀释倍数对茶小绿叶蝉成虫死亡率的影响

Fig. 4 Effect of dilution ratios of 15% tebufenozide suspension on the mortality rate of *E. onukii* adults

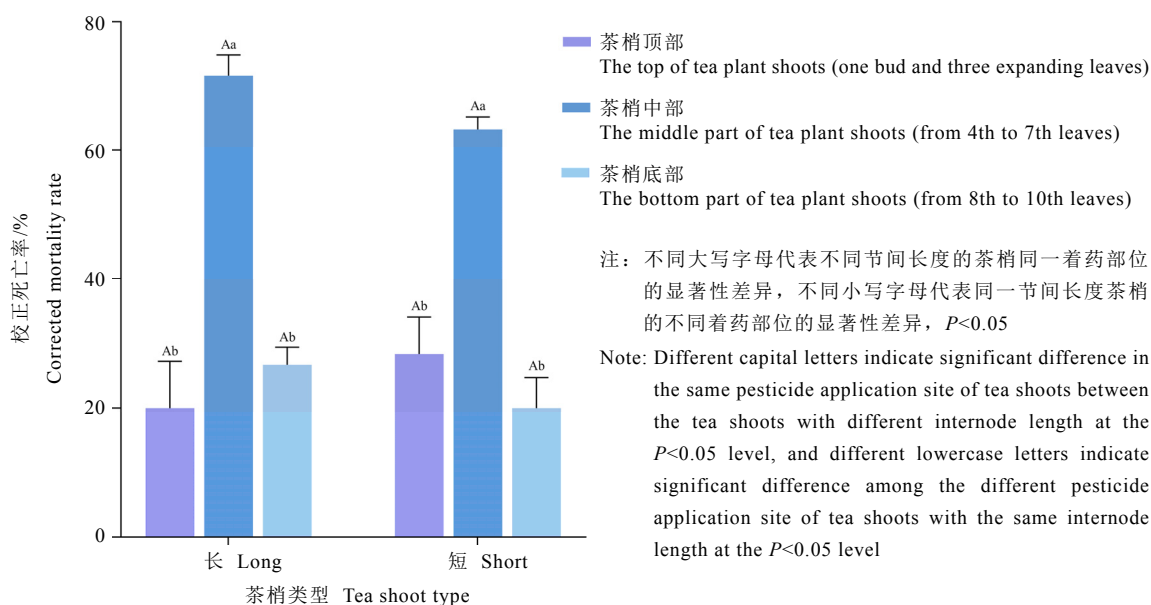


图 5 着药部位对茶小绿叶蝉成虫死亡率的影响

Fig. 5 Effect of pesticide application site on the mortality rate of *E. onukii* adults

2.4 遮光范围对顶部着药时茶小绿叶蝉成虫死亡率的影响

由图 6 可知, 顶部着药时, 随着从茶梢底部向上遮挡范围的增加, 成虫的校正死亡率呈上升趋势。遮光范围为 0%、30%、60%、100% 时, 成虫的校正死亡率分别为 11.11%、17.78%、35.56%、44.44%。其中, 遮光范围 0% 和 30% 之间以及 60% 和 100% 之间差异不显著, 遮光范围 0% 和 30% 分别与 60% 和 100% 的校正死亡率具有显著差异。

2.5 光照强度对顶部着药时茶小绿叶蝉成虫死亡率的影响

如图 7 所示, 茶梢顶部着药时, 在其正上方给予弱光照时成虫的校正死亡率为 55.56%, 给予强光照时成虫校正死亡率不足 20%, 二者存在显著差异。

3 讨论

茶小绿叶蝉是我国茶园中的首要害虫, 目前其防治方法以化学防治为主。其中低水溶性

的啮虫酰胺、丁醚脲、虫螨腈、茚虫威都是高效、安全的防治药剂, 在田间对茶小绿叶蝉若虫都具有很好的防治效果^[5-9]。本研究显示, 15% 啮虫酰胺悬浮剂、40% 啮虫·丁醚脲悬浮剂对若虫的防效均在 80% 以上, 对茶小绿叶蝉成虫的防治效果却不甚理想, 均不到 50%。并且将 15% 啮虫酰胺悬浮剂与 240 g·L⁻¹ 虫螨腈悬浮剂混合喷施, 或使用更高剂量的 15% 啮虫酰胺与茚虫威的混配制剂, 对茶小绿叶蝉成虫的防效仍未达到 50%。针对该现象, 本研究推测了两种可能: 一是相较于茶小绿叶蝉若虫, 成虫的耐药性更强, 所需的致死浓度更高, 而田间的施药浓度并未达到成虫的致死浓度; 二是由于田间茶小绿叶蝉成虫与若虫在茶丛间的活动范围并不完全一致, 导致成虫不能或较少接触到着落在茶树篷面的化学药剂。本研究室内生测显示, 当茶梢整株喷施田间施药浓度 (即 15% 啮虫酰胺悬浮剂稀释 450 倍) 或更低浓度时, 1 d 后茶小绿叶蝉成虫死亡率达 100%。因此, 排除了因田间施药浓度过低而导致成虫死亡率低的可能。

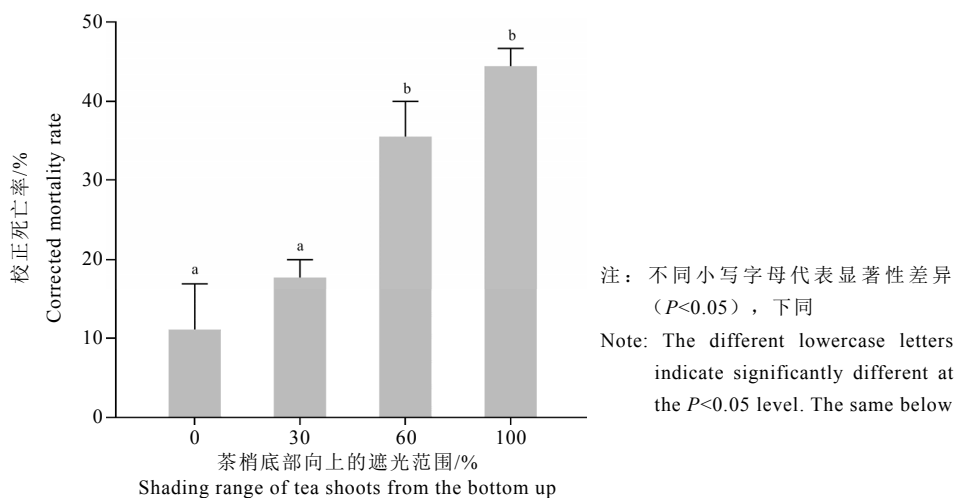


图 6 遮光范围对茶梢顶部着药时茶小绿叶蝉成虫死亡率的影响

Fig. 6 Effect of shading range on the mortality rate of *E. onukii* adults when pesticides were applied at the top of tea shoots

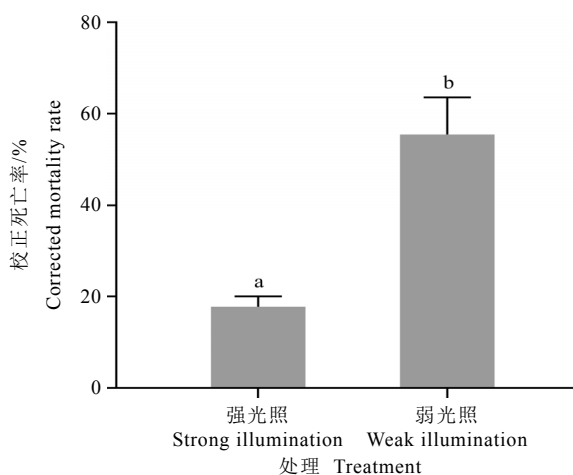


图 7 光照强度对茶梢顶部着药时茶小绿叶蝉成虫死亡率的影响

Fig. 7 Effect of light intensity on the mortality rate of *E. onukii* adults when pesticides were applied at the top of tea shoots

为了验证推测二，探究了茶梢不同着药部位对茶小绿叶蝉成虫死亡率的影响。本研究发现，不论茶枝节间长短，当茶枝中部（第 4 叶到第 7 叶）着药时，成虫死亡率最高，为 60% 以上；而茶梢顶部（一芽三叶）和底部（第 8 叶到第 10 叶）着药时，成虫死亡率均不到 30%，表明茶小绿叶蝉成虫在茶丛间的活动范围多为中部。边磊等^[10]也曾观察到在没有外

界影响时成虫多栖息在茶树嫩梢 3~5 叶。由于茶树冠层内叶片上下交叠和茶树篷面相对郁闭，常规施药器械喷施的药液绝大多数因叶片遮挡而沉积在冠层。有研究发现，药液在茶树中层的沉积量不足篷面的十分之一^[11]，由此导致茶小绿叶蝉成虫较难接触到药剂，因此田间喷施化学农药对成虫防效不佳。而茶小绿叶蝉若虫具有很强的趋嫩性，常聚集在芽下 2~3

叶^[12],易接触到着落在茶树篷面的药剂,因而保证了喷施药剂对若虫的防治效果。

本研究进一步分析了成虫喜欢在茶梢中部活动的原因。当茶梢顶部着药时,通过增加茶梢周围从下至上的遮光范围或降低茶梢顶部的光照强度,均可显著增加茶小绿叶蝉成虫的死亡率。因此,畏强光可能是导致成虫喜欢在茶梢中部活动的主要原因。如高宇等^[13]的研究发现,悬挂在田间的诱虫板在清晨、傍晚诱集到的成虫量最多,可达全天诱捕量的89.62%。冉隆贵等^[14]发现,在光照最强的中午时分,诱虫板上几乎诱集不到茶小绿叶蝉成虫。当然,成虫畏强光和成虫在田间活动习性还需更加细致的研究。

田间喷施药剂时,若能提高对茶小绿叶蝉成虫的防效,将有效减少茶园中茶小绿叶蝉的落卵量,控制下一代若虫的发生,提高长期防治效果,从而减少化学农药的使用。田间施药时,可通过以下3种途径增强药剂的穿透性,即提高茶梢中部的着药量来提高对茶小绿叶蝉成虫的防治效果。

(1) 使用电动背负式风送喷雾器。风机产生的气流能够显著增加雾滴的运动能力,增强雾滴穿透性,使农药易于在冠层内部沉积。相较于常规喷雾器,该喷雾器可使番茄冠层中上层的药液沉积量提高1.6倍左右^[15]。

(2) 适当减小雾滴粒径。在一定范围内,雾滴粒径越小,穿透力越强^[16]。有研究表明,当雾滴粒径由大(315.7 μm)变小(238.8 μm),其在小麦冠层中部的沉积量也会逐步提高^[17]。

(3) 添加合适的助剂。有机硅、植物油、非离子表面活性剂等助剂可通过改变药液的理化性质影响农药沉积^[18]。在植保无人机中应用较多,如添加0.6%植物油助剂(Aero-mate320)后无人机喷出的雾滴在水稻冠层中层的沉积量可提高75%^[19]。

参考文献

[1] 李金玉,王庆森,李良德,等.茶小绿叶蝉种名变更及其

种群发生与生物生态环境关系的研究进展[J].福建农业学报,2022,37(1):123-130.

Li J Y, Wang Q S, Li L D, et al. Research progress on the dominant species identification of tea green leafhopper and the relationship between its population and the biological and ecological environment [J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2022, 37(1): 123-130.

[2] Backus E A, Serrano M S, Ranger C M. Mechanisms of hopperburn: an overview of insect taxonomy, behavior, and physiology [J]. Annual Review of Entomology, 2005, 50: 125-151.

[3] 杨洁.三种农药在茶树上的残留归趋及对茶小绿叶蝉防治效果研究[D].北京:中国农业科学院,2020.

Yang J. Residual fate of three pesticides on tea plants and control effect of tea leafhopper, *Empoasca onukii* Matsuda [D]. Beijing: Chinese Academy of Agriculture Sciences, 2020.

[4] 曾莉,王平盛,许玫.茶树对假眼小绿叶蝉的抗性研究[J].茶叶科学,2001,21(2):90-93.

Zeng L, Wang P S, Xu M. Studies on the resistance of tea plant to leafhopper (*Empoasca vitis* Göthe) [J]. Journal of Tea Science, 2001, 21(2): 90-93.

[5] 张余杰,陈文龙,杨琳,等.小贯小绿叶蝉的化防农药及其抗药性发展状况[J].农药,2017,56(4):239-245.

Zhang Y J, Chen W L, Yang L, et al. Pesticides in chemical control and resistance development of *Empoasca onukii* [J]. Agrochemicals, 2017, 56(4): 239-245.

[6] Wang X R, Zhang X Z, Wang Z H, et al. Dissipation behavior and risk assessment of tolfenpyrad from tea bushes to consuming [J]. Science of the Total Environment, 2022, 806: 150771. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.150771.

[7] Yang J, Luo F J, Zhou L, et al. Residue reduction and risk evaluation of chlorfenapyr residue in tea planting, tea processing, and tea brewing [J]. Science of the Total Environment, 2020, 738: 139613. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.139613.

[8] 张新忠,罗逢健,陈宗懋,等.分散固相萃取净化超高效液相色谱串联质谱法研究茶叶与茶汤中茛虫威残留降解规律[J].分析测试学报,2013,32(1):1-8.

Zhang X Z, Luo F J, Chen Z M, et al. Study of indoxacarb residue degradation in tea and tea infusion by ultra high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry after dispersive solid phase extraction cleanup [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2013, 32(1):

- 1-8.
- [9] 龙家寰, 张维强, 张盈, 等. 丁醚脲及其代谢物和甲维盐在茶树上的残留及消解动态[J]. 农药, 2023, 62(1): 43-48.
- Long J H, Zhang W Q, Zhang Y, et al. Residue and dissipation dynamics of diafenthiuron, its metabolites and emamectin benzoate in tea tree [J]. Agrochemicals, 2023, 62(1): 43-48.
- [10] 边磊, 孙晓玲, 陈宗懋. 假眼小绿叶蝉的日飞行活动性及成虫飞行能力的研究[J]. 茶叶科学, 2014, 34(3): 248-252.
- Bian L, Sun X L, Chen Z M. Studies on daily flight activity and adult flight capacity of *Empoasca vitis* Göthe [J]. Journal of Tea Science, 2014, 34(3): 248-252.
- [11] 许姗姗, 郭萧, 彭萍, 等. 几种喷雾器在茶园中的使用性能与效果对比研究[J]. 西南农业学报, 2012, 25(6): 2311-2315.
- Xu S S, Guo X, Peng P, et al. Comparison on performances of several knapsack sprayers in tea garden [J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2012, 25(6): 2311-2315.
- [12] 金珊. 不同茶树品种抗假眼小绿叶蝉机理研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012.
- Jin S. Resistance mechanisms of tea plant cultivars to tea green leafhopper [D]. Yangling: Northwest Agriculture and Forestry University, 2012.
- [13] 高宇, 孙晓玲, 边磊, 等. 假眼小绿叶蝉成虫在茶园中的活动规律研究[J]. 北方园艺, 2013, 295(16): 134-136.
- Gao Y, Sun X L, Bian L, et al. Study on activity rhythms of adult *Empoasca vitis* Göthe in tea plantations [J]. Northern Horticulture, 2013, 295(16): 134-136.
- [14] 冉隆贵, 谢震宇, 肖斌, 等. 诱虫黄板对陕西茶区小贯小绿叶蝉及天敌蜘蛛的影响[J]. 西南农业学报, 2016, 29(11): 2594-2597.
- Ran L G, Xie Z Y, Xiao B, et al. Effects of yellow trapping card on *Empoasca* (Matsumurasc) *onukii* and spiders in shanxi tea pantation [J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2016, 29(11): 2594-2597.
- [15] 王士林, 宋坚利, 何雄奎, 等. 电动背负式风送喷雾器设计与作业性能试验[J]. 农业工程学报, 2016, 32(21): 67-73.
- Wang S L, Song J L, He X K, et al. Design of air-assisted electric knapsack sprayer and experiment of its operation performance [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2016, 32(21): 67-73.
- [16] 兰玉彬, 彭瑾, 金济. 农药喷雾粒径的研究现状与发展[J]. 华南农业大学学报, 2016, 37(6): 1-9.
- Lan Y B, Peng J, Jin J. Research status and development of pesticide spraying droplet size [J]. Journal of South China Agricultural University, 2016, 37(6): 1-9.
- [17] 杨希娃, 周继中, 何雄奎, 等. 喷头类型对药液沉积和麦蚜防效的影响[J]. 农业工程学报, 2012, 28(7): 46-50.
- Yang X W, Zhou J Z, He X K, et al. Influences of nozzle types on pesticide deposition and insecticidal effect to wheat aphids [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2012, 28(7): 46-50.
- [18] 韩鹏, 崔宗胤, 闫晓静, 等. 三类喷雾助剂在植保无人机精准果树作业模式下对丘陵柑橘雾滴沉积分布的影响[J]. 农药学报, 2020, 22(6): 1076-1084.
- Han P, Cui Z Y, Yan X J, et al. Effect of three types of spray adjuvants on the distribution of spray droplet deposition in hilly citrus under precise fruit tree operation mode of unmanned aerial vehicles [J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2020, 22(6): 1076-1084.
- [19] 陈奕璇, 石鑫, 覃贵亮, 等. 植物油助剂 Aero-mate 320 对植保无人机稻田低容量喷雾沉积利用率的提升效果及其机理分析[J]. 植物保护学报, 2021, 48(3): 510-517.
- Chen Y X, Shi X, Qin G L, et al. The mechanism and effect of the vegetable oil adjuvant aero-mate 320 in improving the deposition utilization rate of pesticides applied by plant protection unmanned aerial vehicles in rice field [J]. Journal of Plant Protection, 2021, 48(3): 510-517.

厌氧处理条件下紫娟茶化学成分的变化及其 对体外 ACE 活性的影响

杨高中^{1,2}, 施江¹, 张悦¹, 彭群华¹, 林智^{1*}, 吕海鹏^{1*}

1. 中国农业科学院茶叶研究所/农业农村部特种经济动植物生物学与遗传育种重点实验室, 浙江 杭州 310008;

2. 中国农业科学院研究生院, 北京 100081

摘要: 以紫娟茶树鲜叶为研究对象, 对厌氧处理后制备的冻干样、绿茶、红茶、白茶等茶样中主要非挥发性成分(包括儿茶素、氨基酸、花青素等)进行测定, 并采用高效液相色谱法评估其体外血管紧张素转换酶(Angiotensin-converting enzyme, ACE)抑制活性; 此外, 尝试通过分子对接模拟试验研究茶叶中主要化学成分和 ACE 之间潜在的互作机制。结果表明, 经厌氧处理后的冻干样中 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)含量增加至 $1.72 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 显著高于未厌氧处理茶样的 $0.04 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ($P < 0.05$)。厌氧处理后不同的加工工艺对茶样中的氨基酸和多酚类化合物的组成及含量影响较大; 采用白茶工艺能提高茶样中氨基酸组分含量, 而冻干工艺能最大程度保留茶样中多酚类化合物含量。紫娟茶树鲜叶样品经厌氧处理后, 体外 ACE 抑制活性显著增强 ($P < 0.05$); 厌氧处理后采用冷冻干燥工艺所制样品的 ACE 抑制活性最强, 显著高于采用绿茶、白茶和红茶加工工艺制作的样品 ($P < 0.05$)。此外, 分子对接模拟试验发现, 茶叶中的主要化学成分与 ACE 的相互作用强度与其分子结构中的亲水基团和芳香环结构有关。研究结果有助于揭示厌氧处理对紫娟茶 ACE 抑制活性的影响, 为开发具有潜在治疗高血压等特殊功能型紫娟茶产品提供理论依据。

关键词: 茶; γ -氨基丁酸; 厌氧处理; 加工工艺; 血管紧张素转换酶

中图分类号: S571.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-369X(2023)04-553-14

Changes in Chemical Composition of Zijuan Tea under Anaerobic Treatment Conditions and Their Effects on *in vitro* ACE Activity

YANG Gaozhong^{1,2}, SHI Jiang¹, ZHANG Yue¹, PENG Qunhua¹, LIN Zhi^{1*}, LÜ Haipeng^{1*}

1. Tea Research Institute of the Chinese Academy of Agricultural Science/Key Laboratory of Biology, Genetics and Breeding of Special Economic Animals and Plants, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Hangzhou 310008, China; 2. Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: In this study, fresh leaves of Zijuan tea were treated with anaerobic treatment and used to make freeze-dried, green, black and white tea samples. The main non-volatile components (such as catechins, amino acids, anthocyanins) in these samples were determined and their *in vitro* angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory activities were evaluated by high performance liquid chromatography. In addition, molecular docking simulation experiments were conducted to investigate the potential interaction mechanisms between the major chemical components in tea and ACE. The results show that the GABA content in the freeze-dried samples after anaerobic

收稿日期: 2023-04-17

修订日期: 2023-05-14

基金项目: 国家茶叶产业技术体系(CARS-19)、中国农业科学院科技创新工程项目(CAAS-ASTIP-2014-TRICAAS)

作者简介: 杨高中, 男, 硕士研究生, 主要从事茶叶品质化学与营养健康方面研究。*通信作者: linz@tricaas.com; lvhaipeng@tricaas.com

treatment increased to $1.72 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, which was significantly higher than that in the tea samples without anaerobic treatment ($0.04 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $P < 0.05$). The composition and contents of amino acids and polyphenolic compounds in the tea samples were significantly affected by the processing methods after anaerobic treatment. The white tea process could increase the contents of amino acid components in the tea samples, while the freeze-drying process could maximize the retention of polyphenolic compounds in the tea samples. The *in vitro* ACE inhibitory activity of Zijuan tea fresh leaf samples was significantly enhanced after anaerobic treatment ($P < 0.05$); the strongest ACE activity inhibition was observed in samples prepared by freeze-drying process after anaerobic treatment, which was significantly higher than that of samples prepared by green, white, and black tea processing methods ($P < 0.05$). In addition, molecular docking simulation experiments reveal that the strength of the interaction between the main chemical components in tea and ACE was related to the hydrophilic groups and aromatic ring structures in their molecular structures. The results of the study helped to reveal the effect of anaerobic treatment on the ACE inhibitory activity of Zijuan tea and provided a theoretical basis for the development of special functional Zijuan tea products with potential treatment of hypertension.

Keywords: tea, γ -aminobutyric acid, anaerobic treatment, processing technology, angiotensin-converting enzyme

高血压是心血管疾病和过早死亡的一个重要的可改变的风险因素。从 1990 年到 2019 年,全球 30~79 岁的高血压人群几乎翻了一番^[1]。血管紧张素转换酶 (Angiotensin-converting enzyme, ACE) 是肾素-血管紧张素系统中的一个关键酶,负责通过血管收缩调节血管张力,其失调可能导致高血压和心脑血管疾病^[2]。抑制 ACE 可以有效降低血压,减少血栓形成和心脑血管疾病的风险,长期以来,抑制剂对 ACE 的体外抑制活性被作为筛选天然 ACE 抑制剂的重要因素^[3]。

近年来,紫芽茶以其特殊的风味品质和保健功能引起了大家广泛关注^[4]。与传统的绿叶茶相比,紫叶茶具有较多的生物活性成分^[5],其中许多是潜在的天然 ACE 抑制剂,包括表没食子儿茶素没食子酸酯 (Epigallocatechin gallate, EGCG)^[6]、表没食子儿茶素-3-*O*-(3"-*O*-甲基)没食子酸酯 [Epigallocatechin 3-*O*-(3"-*O*-methyl)gallate, EGCG3"Me]^[7]、原花青素^[8]和花青素^[9]等,它们通过体外模型被证实具有显著的 ACE 抑制活性。紫娟 (*Camellia sinensis* var. *assamica*) 是云南省农业科学院茶叶研究所从云南大叶群体种中选育而来,是我国最具代表性的紫芽茶品种之一。此前有报道称,在动物研究中,紫娟茶比云南大叶种茶树鲜叶制成的茶

样具有更强的降血压效果^[10]。值得注意的是, γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 被认为是一种重要的生物活性物质,可能在预防心血管疾病,特别是降低血压方面发挥有益的作用^[11]。厌氧处理已被证实是提高茶叶产品中 GABA 含量的有效方法^[12-13]。因此,推测经过厌氧处理后,通过增加紫娟茶中的 GABA 含量,可以提高其 ACE 抑制活性,有望开发出一些具有治疗高血压的紫娟茶产品,满足不同茶叶消费者对健康食品的特殊需求。

本研究以紫娟茶树鲜叶为研究对象,对厌氧处理后制备的冻干样、绿茶、红茶、白茶等茶样中主要非挥发性成分 (儿茶素、氨基酸、花青素等) 进行测定,并采用高效液相色谱法评估其体外 ACE 抑制活性^[14-15]; 尝试通过分子对接模拟试验研究茶叶中主要化学成分 (如儿茶素、茶黄素、花青素、GABA 等) 和 ACE 之间潜在的互作机制,旨在阐明厌氧处理后不同加工工艺对紫娟茶体外 ACE 抑制活性的影响,为开发具有潜在降血压的特殊紫娟茶产品提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 样品制备方法

紫娟茶树鲜叶(采摘标准为一芽三叶)于2022年6月8日采摘自中国农业科学院茶叶研究所嵊州基地。样品的制备流程及详细工艺参数如图1所示,将1 kg鲜叶摊放处理8 h后,立即在液氮中预冻处理,随后使用真空冷冻干燥机进行冷冻干燥,标记为对照组。此外,将5 kg鲜叶分装入塑料袋,并进行真空处理8 h。随后各取出1 kg鲜叶分别采用真空冷冻冻干以及白茶和绿茶加工工艺制备茶样,剩余2 kg鲜叶采用红茶加工工艺制备红茶样。使用研磨机将所有样品研磨成粉末,并保存在-20℃冰箱待进一步分析。

1.1.2 主要试剂

儿茶素(Catechin, C)、表儿茶素(Epicatechin, EC)、儿茶素没食子酸酯(Catechingallate, CG)、表儿茶素没食子酸酯(Epicatechingallate, ECG)、没食子儿茶素(Gallocatechin, GC)、表没食子儿茶素(Epigallocatechin, EGC)、没食子儿茶素没食子酸酯(Gallocatechingallate, GCG)、EGCG、EGCG3"Me (98.0%)、茶黄素(Theaflavin, TF)、茶黄素-3-没食子酸酯(Theaflavin-3-

gallate, TF3G)、茶黄素-3'-没食子酸酯(Theaflavin-3'-gallate, TF3'G)、茶黄素-3,3'-双没食子酸酯(Theaflavin-3,3'-digallate, TFDG)、马尿酰-组氨酸-亮氨酸(Hippuryl-histidyl-leucine, HHL)(BR, 98.0%)、马尿酸(>98.0%)、硼酸-硼砂缓冲液(pH 8.3)购自上海源叶生物技术有限公司。天冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯基丙氨酸、组氨酸、色氨酸、精氨酸、胱氨酸、赖氨酸、没食子酸(Gallic acid, GA)、GABA(纯度为95.0%~99.0%)、GABA(97.0%)和ACE($\geq 2.0 \text{ units} \cdot \text{mg}^{-1}$)购自上海Sigma-Aldrich公司。*L*-茶氨酸(>99.0%)和甲酸(>98.0%)购自北京百灵威科技有限公司。茚三酮(固体)和柠檬酸锂盐缓冲液(pH分别为2.9、4.2、8.0)购自杭州津本科学仪器有限公司。磷酸(85%~90%)、氯化钾和三氟乙酸($\geq 98.0\%$)购自上海麦克林生化科技有限公司。乙腈和甲醇(色谱纯)购自德国默克公司。纯净水购自杭州娃哈哈集团有限公司。

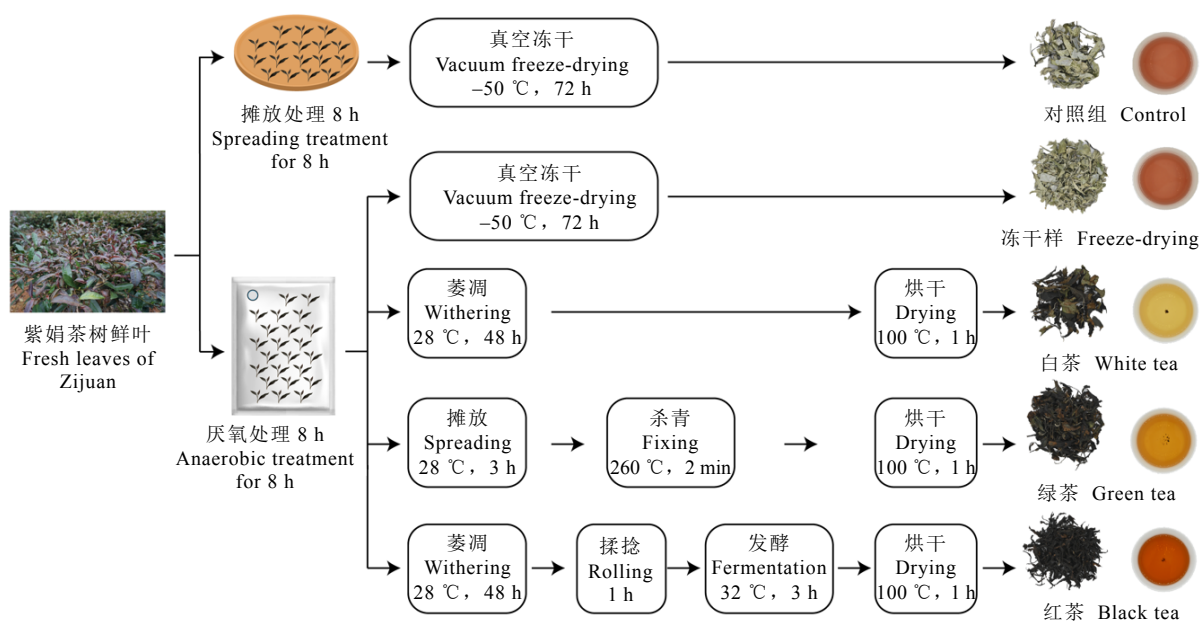


图1 不同工艺紫娟茶叶加工流程图

Fig. 1 Flow chart of Zijuan tea leaves with different processes

1.2 仪器与设备

杀青机、揉捻机、烘焙提香机购于福建省安溪佳友机械有限公司,智能人工气候室购于宁波普朗特仪器有限公司,电子天平(AB107-S型)购于瑞士Mettler Toledo公司,真空冷冻干燥机(FD5-10B型)购于美国GOLD-SIM公司,研磨机购于德国IKA公司,电热恒温水浴锅(DK-S11型)购于上海森信实验仪器有限公司,离心机(Centrifuge 5810 R型)购于德国Eppendorf公司,分光光度计(UV-3600型)、高效液相色谱系统(LC-20A型)配备WondaSil C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)购于日本岛津公司,超高效液相色谱系统(Acquity H-Class)配备Acquity UPLC BEH C₁₈柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)购于英国Waters公司,氨基酸分析仪(S-433D型)配备Sykam阳离子LCAK07/Li柱(4.6 mm×150 mm)购于德国Sykam公司。

1.3 方法

1.3.1 茶多酚和茶黄素分析检测方法

茶样中茶多酚含量的测定参考 GB/T 8313—2018《茶叶中茶多酚和儿茶素类含量的检测方法》进行;4种茶黄素类成分的含量测定参考 GB/T 30483—2013《茶叶中茶黄素的测定-高效液相色谱法》进行。

1.3.2 氨基酸分析检测方法

茶样中氨基酸含量的测定参考 Yang 等^[16]的方法并稍作修改,采用氨基酸分析仪进行定性定量。称取 100 mg 的茶粉,加入 10 mL 的沸水并在 100 °C 下提取 15 min,每间隔 5 min 摇匀 1 次。冷却后,将混合溶液在离心机中以 8 000 r·min⁻¹ 离心 10 min。将上清液用 0.45 μm 的膜过滤,并储存在 4 °C 下进行氨基酸分析。氨基酸在 Na⁺型磺酸基强酸性阳离子交换树脂上分离。流动相由 pH 为 2.9、4.2、8.0 的柠檬酸锂盐缓冲液组成,流速为 0.45 mL·min⁻¹。茚三酮流速为 0.25 mL·min⁻¹,反应器温度 130 °C,进样量为 10 μL,柱温设定为 40 °C,

检测波长设定为 570 nm 和 440 nm。采用外标法对茶样中的氨基酸成分进行定量。

1.3.3 儿茶素、咖啡碱、GA 含量分析检测方法

茶样中儿茶素、咖啡碱、GA 含量的测定参考 Yang 等^[16]的方法并稍作修改,采用 UPLC 配备 Acquity UPLC BEH C₁₈ 柱进行定性定量。称取 0.2 g 茶粉,加入 10 mL 预热的 70% 甲醇水溶液(V:V),70 °C 水浴 30 min,每间隔 5 min 混匀 1 次。待冷却后 4 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,用纯净水稀释 10 倍后,过 0.22 μm 尼龙膜装入进样瓶待测。柱温 35 °C,进样量 5 μL,检测波长 280 nm,流速 0.35 mL·min⁻¹。溶剂 A 为含 0.1% (V:V) 甲酸的水溶液,溶剂 B 为纯甲醇。线性梯度洗脱曲线如下:0 min, 3% B 相;3.0 min, 8% B 相;7.5 min, 20% B 相;11.0 min, 20% B 相;13.0 min, 60% B 相;14.5 min, 60% B 相;15.0 min, 3% B 相;19.0 min, 3% B 相。儿茶素和咖啡碱的含量采用外标法测定。

1.3.4 花青素分析检测方法

待测茶样提取同 1.3.1 章节。茶样中花青素总量通过 pH 示差法测定^[17]。pH=1.0 的缓冲液为 0.2 mol·L⁻¹ 盐酸-氯化钾缓冲液,pH=4.5 的缓冲液为 0.4 mol·L⁻¹ 乙酸钠。样品的稀释通过限制待测样品在 520 nm 处的吸光度在 0.2~0.8 来确定。所有样品分别用 pH=1.0 和 pH=4.5 缓冲液稀释 4 倍。静置 50 min 后用分光光度计分别在 520 nm 和 700 nm 处测量吸光度。总花青素含量(TAC;每克提取物中矢车菊素-3-O-葡萄糖苷当量的毫克数)按以下公式计算:

$$TAC = \frac{A \times MW \times DF \times V}{\epsilon \times L \times W}$$

式中,A 为吸光度值,DF 为稀释系数,V 为最终体积(mL),W 为茶叶样品的质量(g),MW 为矢车菊素-3-O-葡萄糖苷的分子量(449.2 g·mol⁻¹)。L 为光程(cm),ε 为矢车菊素-3-O-葡萄糖苷在 520 nm 处的摩尔消光系数(2.69×10⁴ L·mol⁻¹·cm⁻¹)。比吸光度 A

定义为:

$$A=(A_1-A_2)-(A_3-A_4)$$

式中, A_1 为样品采用 pH=1.0 的缓冲液稀释后在 520 nm 处测定的吸光度, A_2 为样品采用 pH=1.0 的缓冲液稀释后在 700 nm 处测定的吸光度, A_3 为样品采用 pH=4.5 的缓冲液稀释后在 520 nm 处测定的吸光度, A_4 为样品采用 pH=4.5 的缓冲液稀释后在 700 nm 处测定的吸光度。

1.3.5 ACE 抑制活性分析方法

采用 HPLC 方法检测不同加工工艺茶样的 ACE 抑制活性强度, 参考文献[14-15]方法并稍加修改。称取 100 mg 的茶粉加入 10 mL 的 100 °C 沸水提取, 沸水浴提取 15 min, 每隔 5 min 涡旋 1 次。冷却后, 样品在冷冻离心机中以 8 000 r·min⁻¹ 离心 10 min。将上清液通过 0.45 μm 的膜过滤并储存在 4 °C 待测。

以 HHL 作为 ACE 的反应底物。将 0.25 units 的 ACE 固体溶于 2.5 mL 的 0.2 mol·L⁻¹ 硼酸-硼砂缓冲溶液 (0.2 mol·L⁻¹ NaCl, pH 8.3) 配制成 ACE 溶液, 称取 29.1 mg 的 HHL 固体溶于 15 mL 的 0.2 mol·L⁻¹ 硼酸-硼砂缓冲溶液 (0.2 mol·L⁻¹ NaCl, pH 8.3) 配制成 HHL 溶液 (5 mmol·L⁻¹)。将 20 μL 的 ACE 溶液与 50 μL 不同质量浓度 (0.5、1、2、4、8 mg·mL⁻¹) 的茶叶样品分别混合, 在 37 °C 水浴锅中孵育 10 min, 随后加入 100 μL 的 HHL (5 mmol·L⁻¹), 漩涡摇匀后立即在 37 °C 下酶促反应 60 min, 最后加入 300 μL 的 1.0 mol·L⁻¹ 盐酸终止反应。

体系溶液采用 0.45 μm 水系滤膜过滤后进行 HPLC 检测分析马尿酸的含量。检测波长为 228 nm, 柱温为 35 °C, 进样量为 10 μL, 流速为 1 mL·min⁻¹, 流动相 A 为超纯水 (含 0.1% 三氟乙酸), B 相为纯乙腈, 洗脱条件为 75% 的 A 相和 25% 的 B 相等度洗脱。为了避免样品颜色可能产生的影响, 以加入样品但不加 ACE 溶液作为样品空白组 (表 1)。

ACE 抑制活性根据以下公式计算:

$$\text{ACE 抑制活性} = \frac{(a-b)-(c-d)}{(a-b)} \times 100\%$$

式中, a 为对照组马尿酸的峰面积, b 为空白组马尿酸的峰面积; c 为样品组马尿酸的峰面积; d 为样品空白组马尿酸的峰面积。

1.3.6 分子对接分析方法

为了在分子水平上模拟化合物和 ACE 之间的相互作用, 使用 AutodockVina 1.2.3 (Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA) 进行分子对接模拟^[18]。从蛋白质数据库 (<http://www.rcsb.org>) 获得人类 ACE-利辛普利复合物 (蛋白质 ID: 1O86) 的三维晶体结构, 作为对接过程中的受体。茶黄素和儿茶素等对接配体的三维结构从美国国家医学图书馆 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 获得, 使用 ChemBio3DUltra 14.0 软件 (Cambridge Soft, Cambridge, MA, USA) 进行能量最小化。在对接之前, 除去 1O86 中的所有杂分子和水, 但保留锌原子和甘氨酸, 并添加极性氢。以锌原子坐标为中心 (x : 43.821, y : 38.240,

表 1 体外 ACE 抑制率测定方法

Table 1 *In vitro* determination of ACE inhibition rate

试剂 Reagents	对照组 Control group	空白组 Blank group	样品组 Sample group	样品空白组 Sample blank group
样品 Samples/μL	0	0	50	50
ACE 溶液 ACE solution/μL	20	0	20	0
缓冲液 Buffers/μL	50	70	0	20
37 °C 水浴 10 min				
HHL 溶液 HHL solution/μL	100	100	100	100
37 °C 水浴 60 min				
加入 300 μL 的 1 mol·L ⁻¹ 盐酸终止反应, 并在 228 nm 处用 HPLC 进行检测				

z: 46.712), 对接网格大小为 $22.5 \text{ \AA} \times 22.5 \text{ \AA} \times 22.5 \text{ \AA}$, 网格间距为 0.375 \AA 。配体和 ACE 模型之间的分子对接采用 AutodockVina 1.2.3 软件进行。使用拉马克遗传算法, 运行 64 次。

通过比较化合物的对接姿势中的结合能值, 根据活性口袋中的最低结合能确定最佳构象, 所有的对接都重复 3 次。配体和 ACE 模型之间的结合力类型通过在线网站 (<https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>) 分析。采用 PyMOL 2.5.4 软件 (DeLano Scientific LLC, CA, USA) 分析蛋白质-配体之间的相互作用并可可视化作图。

1.4 数据处理

采用 GraphPad Prism 9 软件 (GraphPad Software, San Diego, USA) 进行单因素方差分析 (ANOVA) 并计算 IC_{50} 值, IC_{50} 值被定义为抑制一半 ACE 活性所需的抑制剂的浓度, 通过 ACE 抑制率和抑制剂浓度的非线性曲线拟合计算。使用 TBtools 软件进行热图分析。

2 结果与分析

2.1 厌氧处理后茶叶中氨基酸组成及含量分析

紫娟茶树鲜叶经厌氧处理后采用不同加工工艺制备的茶叶样品中氨基酸组成及含量如图 2 所示。经厌氧处理后的冻干样中 GABA 含量显著增加至 $1.72 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ($P < 0.05$), 而未厌氧的常规冻干茶样中仅为 $0.04 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。不同加工工艺制备的绿茶、白茶和红茶样品中, 绿茶样的 GABA 含量最高 ($1.68 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), 其次为白茶样 ($1.58 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), 红茶样最低 ($1.23 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)。据报道, 采用中茶 108 茶树品种鲜叶经厌氧处理制备的绿茶和白茶的 GABA 含量分别为 2.21 、 $1.08 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 而制备的红茶的 GABA 含量最低, 仅为 $0.86 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ [18], 这与本研究结果基本一致, 表明茶鲜叶厌氧处理后采用绿茶加工工艺, 有望获得富含 GABA 的特殊功能型茶产品。此外, 茶叶中其他一些氨基酸组分

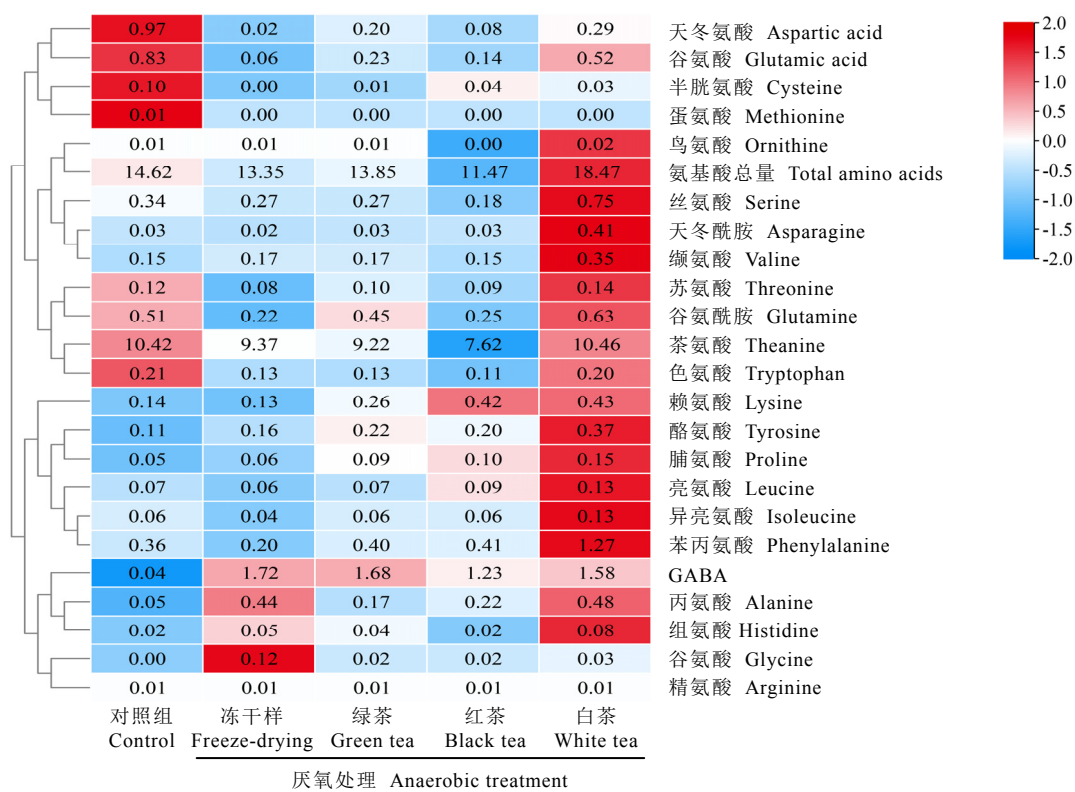
也发生了显著变化, 例如谷氨酸含量在常规冻干样 (对照) 中含量最高 ($0.83 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), 而在厌氧冻干样中显著下降至 $0.06 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ($P < 0.05$), 与厌氧冻干样相比, 厌氧处理后制备的绿茶、红茶和白茶样中含量均显著增加, 尤其是白茶样中, 其含量增加至 $0.52 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ($P < 0.05$)。结果表明在厌氧处理结束后, 谷氨酸等作为 GABA 合成前体的氨基酸能够通过其他途径进行补充, 在天冬氨酸和谷氨酰胺也观察到相似的变化规律。不同茶样中氨基酸总量也存在显著差异, 常规冻干茶样的显著高于厌氧冻干茶样 ($P < 0.05$), 鲜叶经厌氧处理后加工成成品茶, 白茶中的最高 ($18.47 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), 而红茶中的最低 ($11.46 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), 其原因是萎凋过程中蛋白质水解形成大量游离氨基酸 [19], 而红茶在发酵过程中氨基酸成分转化为挥发性成分导致含量显著降低 [20]。

2.2 厌氧处理后茶叶中多酚类及咖啡碱含量分析

不同加工工艺对紫娟茶样中多酚类和咖啡碱含量的影响如表 2 所示。采用冻干处理能最大限度保留紫娟茶样中类黄酮成分, 而加工成绿茶、红茶和白茶产品后, 类黄酮成分含量呈现出不同程度下降。茶鲜叶经 8 h 厌氧处理后, 冻干样的 EC、ECG 及 GCG 含量均显著高于常规冻干茶样 ($P < 0.05$)。通常, 采用绿茶和白茶加工工艺能较好地保留茶鲜叶中茶多酚成分, 而红茶因发酵促进了茶多酚氧化形成聚合物如茶黄素类 (主要包括 TF、TF3G、TF3'G、TFDG 4 种) 和茶红素类等, 从而导致其含量显著下降 [19]。然而, 相较于厌氧处理冻干茶样, 绿茶样和白茶样的绝大部分儿茶素组分以及茶多酚含量均显著下降。在厌氧处理后, 绿茶摊放和白茶萎凋过程观察到部分叶片黄变或红梗, 结合绿茶样和白茶样中的茶黄素总量较高 (分别为 $7.01 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $6.67 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), 均显著高于冻干样中的茶黄素总量, 推断可能是由于茶鲜叶直接放入真空袋进行抽真空处理导致部分叶片出现机械损伤, 因此在摊放和

萎凋过程中叶片中部分茶多酚成分发生了酶促氧化生成茶黄素和茶红素等茶色素类成分。其中,相较于厌氧冻干样,绿茶和白茶的儿茶素总量分别下降了 91.46 mg·g⁻¹ 和 98.14 mg·g⁻¹,然而,茶黄素总量仅分别增加了 4.83 mg·g⁻¹ 和 4.49 mg·g⁻¹。值得注意的是,EGCG3"Me 是紫娟茶样的特殊功能成分,在厌氧冻干样中含量为 13.05 mg·g⁻¹,在红茶样中仅为 0.29 mg·g⁻¹,这与以往的研究结果相似^[21]。此外,3 种成品茶中 GA 含量均显著高于冻干茶样,可能是由于在加工过程中,部分酯型儿茶素会水解成非酯型儿茶素并释放 GA,导致 GA 含量显著增加^[20]。此外,冻干处理能较好地保留紫娟茶树鲜叶中花青素成分,厌氧冻干样中其总量为

0.95 mg·g⁻¹,略高于常规冻干样(0.91 mg·g⁻¹),两者差异不显著,而与冻干茶样相比,成品茶中花青素总量均显著降低($P<0.05$),尤其是红茶样中最低,为 0.10 mg·g⁻¹。据报道^[22-23],与紫娟茶树鲜叶相比,加工成绿茶和红茶后花青素含量分别下降了 60.78%和 92.90%,这与本研究结果相似,可能是由于加工过程中的高温和发酵条件导致花青素成分降解。由此可见,为了更好地保持厌氧处理后茶样中类黄酮成分,尤其是 EGCG3"Me 和花青素等特殊成分,应采用真空冷冻干燥进行加工。此外,常规冻干和厌氧冻干茶样中咖啡碱含量分别为 37.67 mg·g⁻¹ 和 37.55 mg·g⁻¹,两者之间无显著差异,表明厌氧处理对茶样中咖啡碱含量无显



注: 热图中的数值为茶样中相应氨基酸的平均含量, 单位为 mg·g⁻¹。对每行数值进行归一化处理, 热图的图例通过颜色和数值的对应关系, 将不同数值范围映射到不同的颜色

Note: The values in the heat map are the average contents of the corresponding amino acids in the tea samples in mg·g⁻¹. Normalizing each row of values, the legend of the heatmap is mapped to different ranges of values by the correspondence between colors and values

图 2 不同加工工艺紫娟茶样中氨基酸含量热图

Fig. 2 Heatmap of amino acid contents in Zijuan tea samples with different processing methods

表 2 不同加工工艺紫娟茶样中多酚类和咖啡碱含量

Table 2 Polyphenols and caffeine contents in Zijuan tea samples with different processing methods

化学成分 Chemical composition	常规冻干 Conventional freeze-drying	厌氧冻干 Anaerobic freeze-drying	厌氧绿茶 Anaerobic green tea	厌氧红茶 Anaerobic black tea	厌氧白茶 Anaerobic white tea
C/mg·g ⁻¹	14.36±0.96 ^a	15.31±0.79 ^a	15.38±0.11 ^a	6.57±0.22 ^b	14.98±0.19 ^a
EC/mg·g ⁻¹	28.33±0.15 ^b	30.34±0.12 ^a	16.62±0.04 ^c	2.73±0.26 ^c	15.27±0.05 ^d
GC/mg·g ⁻¹	8.89±0.05 ^a	8.90±0.10 ^a	7.22±0.27 ^b	7.27±0.14 ^b	6.93±0.01 ^c
EGC/mg·g ⁻¹	41.67±0.03 ^a	41.12±0.45 ^a	17.24±0.13 ^b	2.28±0.04 ^c	15.84±1.09 ^b
ECG/mg·g ⁻¹	38.60±0.04 ^b	39.73±0.08 ^a	26.15±0.37 ^c	3.88±0.03 ^d	26.05±0.20 ^c
GCG/mg·g ⁻¹	1.40±0.05 ^c	2.06±0.14 ^a	2.00±0.04 ^{ab}	0.95±0.02 ^d	1.79±0.10 ^b
EGCG/mg·g ⁻¹	68.88±0.47 ^a	68.38±0.56 ^a	30.82±0.58 ^b	4.89±0.28 ^d	27.17±0.34 ^c
EGCG3"Me/mg·g ⁻¹	13.16±0.07 ^a	13.05±0.16 ^a	11.99±0.02 ^c	0.29±0.03 ^d	12.70±0.17 ^b
儿茶素总量 Total catechins/mg·g ⁻¹	215.30±0.47 ^a	218.88±0.76 ^a	127.42±0.42 ^b	24.86±0.63 ^d	120.74±1.57 ^c
GA/mg·g ⁻¹	0.61±0.00 ^c	0.08±0.00 ^d	1.20±0.01 ^b	1.53±0.01 ^a	1.23±0.01 ^b
花青素总量 Total anthocyanins/mg·g ⁻¹	0.91±0.01 ^a	0.95±0.02 ^a	0.58±0.01 ^b	0.10±0.04 ^c	0.64±0.06 ^b
咖啡碱 Caffeine/mg·g ⁻¹	37.67±0.03 ^b	37.55±0.04 ^b	37.19±0.03 ^c	35.33±0.01 ^d	38.97±0.01 ^a
TF/mg·g ⁻¹	1.26±0.01 ^d	1.47±0.01 ^c	2.77±0.02 ^b	3.65±0.02 ^a	2.78±0.01 ^b
TF3G/mg·g ⁻¹	0.17±0.01 ^d	0.21±0.01 ^c	0.93±0.01 ^a	0.85±0.01 ^b	0.83±0.00 ^b
TF3'G/mg·g ⁻¹	0.12±0.01 ^c	0.19±0.02 ^d	1.26±0.02 ^a	1.19±0.04 ^b	1.04±0.03 ^c
TFDG/mg·g ⁻¹	0.24±0.03 ^c	0.30±0.02 ^c	2.04±0.03 ^b	2.41±0.06 ^a	2.02±0.02 ^b
茶黄素总量 Total theaflavins/mg·g ⁻¹	1.79±0.04 ^c	2.18±0.04 ^d	7.01±0.06 ^b	8.31±0.07 ^a	6.67±0.06 ^c
茶多酚 Tea polyphenols/%	26.92±0.03 ^a	26.73±0.08 ^a	20.87±0.22 ^b	13.48±0.27 ^c	21.34±0.16 ^b

注：数据以平均值±标准差（SD）表示。同一行中的不同字母表示通过 Tukey 检验，各茶类之间的差异显著（ $P<0.05$ ）

Note: The data are expressed as the mean ± standard deviation (SD). The different letters in the same row indicate that the difference between the teas is significant through Tukey test ($P<0.05$)

著影响。相较于冻干茶样，白茶样中咖啡碱含量显著增加至 $38.97 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ，而红茶样中则显著下降至 $35.33 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ （ $P<0.05$ ），均存在显著性差异。

2.3 不同类型茶叶对 ACE 的抑制活性分析

如图 3A 所示，通过 HPLC 系统对 HA 和 HHL 混合标准品进行检测，两者能很好地分离。HA 进样质量浓度为 $0.0125 \sim 0.4000 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，HA 峰面积 $Y(\text{mAU} \cdot \text{min})$ 与浓度 $X(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$ 的线性关系良好，回归方程为 $Y=39\,561\,808X+197\,970$ ， $R^2=0.9978$ （图 3B）。表明在该浓度范围内，HA 浓度与峰面积具有较好的线性关系，故样品中的 HA 峰面积能反映样品中 HA 的含量，进而反映 ACE 抑制活性。

IC_{50} 值被定义为抑制一半 ACE 活性所需抑制剂的浓度，数值越小表明抑制剂对 ACE 抑制活性越强。如图 4 所示，常规冻干和厌氧冻干茶叶样品的 IC_{50} 值分别为 $3.247 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$

和 $2.608 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。厌氧冻干茶叶样品的 IC_{50} 值显著低于常规冻干茶叶样品的 IC_{50} 值（ $P<0.05$ ），说明厌氧处理可以提高紫娟茶树鲜叶样品的 ACE 抑制活性。结合非挥发性化学成分的分析，推断样品的 ACE 抑制活性增强可能与厌氧处理后样品中的 GCG、ECG、EC 和 GABA 等成分增加有关。此外，将该批次厌氧处理后的紫娟茶树鲜叶按照绿茶、红茶和白茶加工工艺制备成茶产品后，相较于厌氧冻干样，其 ACE 抑制活性的 IC_{50} 值（分别为 $3.603 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $5.420 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 及 $3.457 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ）均显著增加（ $P<0.05$ ）。其中绿茶样和白茶样之间没有显著差异，但两者均显著低于红茶样。由此可知，茶鲜叶经厌氧处理后采用绿茶和白茶的加工工艺能够更好地保持其对 ACE 的抑制活性。最近的研究表明，厌氧处理可以增加桑树叶片中的 GABA 含量，并能提高桑叶提取物的体外 ACE 抑制活性^[24]，这支持了 GABA

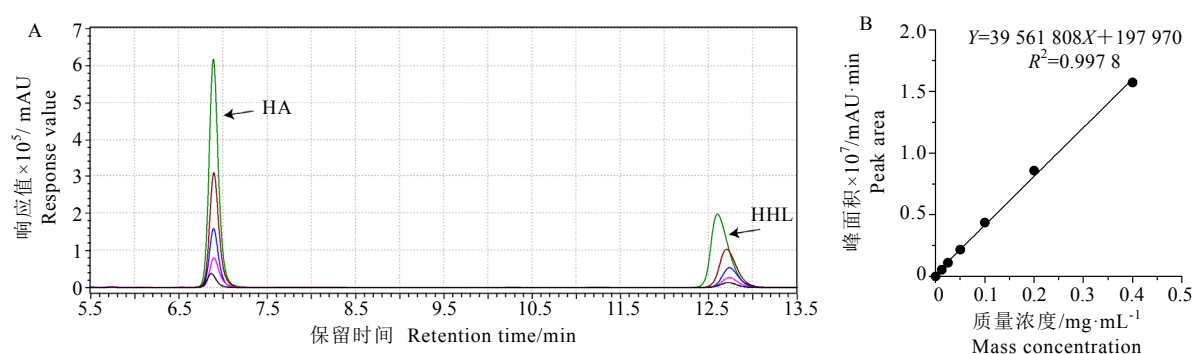


图 3 HHL 和 HA 的色谱分离图 (A) 以及 HA 的标准曲线图 (B)

Fig. 3 Chromatographic separation of HHL and HA (A) and standard curve of HA (B)

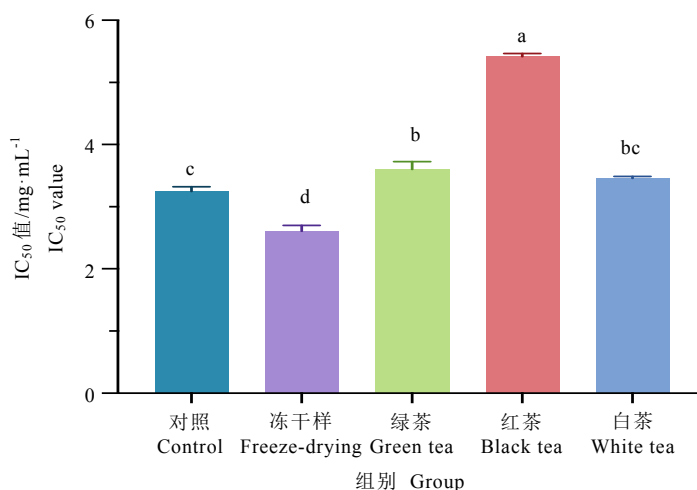


图 4 不同茶叶样品的体外 ACE 抑制活性

Fig. 4 *In vitro* ACE inhibitory activity of different tea samples

可能具有作为 ACE 抑制剂的潜力。结合不同茶样中氨基酸含量的分析结果 (图 2), 绿茶样和白茶样中的 GABA 含量均高于红茶样, 因此, GABA 可能是厌氧处理后茶样中的重要抑制剂成分。常规冻干和厌氧白茶对 ACE 抑制活性无显著差异, 而常规冻干样中 GABA 含量显著低于厌氧白茶, 表明茶样中除了 GABA 还存在其他对 ACE 具有强抑制活性的成分。Dong 等^[6]发现, 绿茶中的茶多酚能直接钝化体外 ACE 的活性, 显示出较强的体外 ACE 抑制活性。杨高中等^[18]研究报道, 中茶 108 茶树品种的鲜叶经厌氧处理后加工而成

的不同类型茶叶样品对 ACE 的抑制活性不同, 其中, 绿茶对 ACE 的抑制率较高, 白茶次之, 红茶的抑制活性最弱, 这与本研究结果基本一致。在本研究中, 不同加工工艺制成的茶样中的茶多酚含量差异显著, 其中, 冻干样中茶多酚含量显著高于绿茶样和白茶样, 红茶样中茶多酚含量最低, 这与各个茶样的 ACE 抑制活性强弱相对应, 表明茶样中的茶多酚可能是重要的 ACE 抑制剂。

茶叶中主要化学成分与其体外 ACE 抑制活性的 IC_{50} 值的皮尔逊相关性分析见表 3。相关性系数为正值时, 表明该化合物含量越高,

样品体外 ACE 抑制活性的 IC₅₀ 值越大（即体外 ACE 抑制活性越弱）；而相关性系数为负值时，表明该化合物含量越高，样品体外 ACE 抑制活性的 IC₅₀ 值越小（即体外 ACE 抑制活性越强），可以推断该化学成分可能是茶样中主要的抑制剂成分。由表 3 可知，不同茶样的体外 ACE 抑制活性的 IC₅₀ 值与茶样中的花青素总量以及 ECG 的相关性系数均为-0.97，达到极显著负相关水平（ $P<0.01$ ）；与茶样中的 EGCG3"Me、茶多酚、GCG、儿茶素总量、

EGCG 等化学成分的相关系数在-0.95~-0.92，达到显著负相关水平（ $P<0.05$ ）。因此，推断这些成分可能是茶样中发挥体外 ACE 抑制活性的主要化学成分。值得注意的是，GABA 与茶样的体外 ACE 抑制活性的 IC₅₀ 值的相关系数为-0.04，表明 GABA 对茶样的体外 ACE 抑制活性贡献不大。此外，茶黄素类成分和 GA 成分与茶样的体外 ACE 抑制活性的 IC₅₀ 值均呈正相关，相关系数在 0.61~0.84，但均未达到显著水平（ $P>0.05$ ）。

表 3 茶叶中主要化学成分与其体外 ACE 抑制活性的相关性分析

Table 3 Correlation analysis of the main chemical components in tea with their *in vitro* ACE inhibitory activities

序号	化学成分	与 IC ₅₀ 值的相关性系数	序号	化学成分	与 IC ₅₀ 值的相关性系数
No.	Chemical composition	Correlation coefficient with IC ₅₀ value	No.	Chemical composition	Correlation coefficient with IC ₅₀ value
1	花青素总量	-0.97**	11	茶氨酸	-0.77
2	ECG	-0.97**	12	咖啡碱	-0.76
3	EGCG3"Me	-0.95*	13	GC	-0.57
4	茶多酚	-0.94*	14	GABA	-0.04
5	GCG	-0.93*	15	TF3G	0.61
6	EC	-0.93*	16	TFDG	0.72
7	C	-0.93*	17	TF3'G	0.75
8	儿茶素总量	-0.92*	18	GA	0.82
9	EGCG	-0.92*	19	茶黄素总量	0.83
10	EGC	-0.85	20	TF	0.84

注：采用皮尔逊相关性进行分析，相关性 P 值用符号*表示，其中*表示 $P<0.05$ ，**表示 $P<0.01$
Note: The Pearson correlation was used for the analysis, and the correlation P values are indicated by the symbol *, * indicates $P<0.05$ and ** indicates $P<0.01$

2.4 分子对接分析

茶叶中的主要化学成分与 ACE 模型分子对接的结合亲和力结果如表 4 所示。结合亲和力是指在结合过程中释放的能量，其绝对值越大，结合越容易发生。因此，可以根据结合亲和力的大小预测化合物对 ACE 的抑制活性强度^[25]。分子对接结果显示，茶黄素类化合物与 ACE 分子对接的结合亲和力绝对值最大（10.49~11.37 kcal·mol⁻¹），显著高于其他成分（ $P<0.05$ ），表明茶黄素类可能是红茶中发挥 ACE 抑制活性的重要成分。此外，飞燕草素-3-*O*-半乳糖苷和矢车菊素-3-*O*-半乳糖苷是紫娟茶树鲜叶中含量最丰富的两种花青素组分^[5]，它们与 ACE 分子对接的结合亲和力

绝对值分别为 9.46、8.91 kcal·mol⁻¹。EGCG3"Me 也是紫娟茶树鲜叶中的特殊功能成分，其与 ACE 的结合亲和力绝对值为 9.43 kcal·mol⁻¹，高于未甲基化的 EGCG（9.34 kcal·mol⁻¹）和非酯型儿茶素 EC（8.29 kcal·mol⁻¹）。相比之下，GABA 与 ACE 的结合亲和力绝对值为 3.91 kcal·mol⁻¹，显著小于其他化学成分（ $P<0.05$ ），表明 GABA 对体外 ACE 抑制活性可能较弱。然而，分子对接结果仅从理论层面揭示这些成分对 ACE 抑制活性的强弱，后续还要开展 ACE 抑制活性试验进行验证。

分子对接模拟表明，茶黄素类成分对 ACE 抑制活性可能强于花青素和儿茶素类成分。然而，2.3 章节的相关性分析结果则表明茶黄素类与茶样的体外 ACE 抑制活性的 IC₅₀ 值均呈

相关(即表明茶黄素类并不是茶样中抑制体外 ACE 活性的主要成分),两者结果不一致。相较于厌氧冻干茶样,尽管茶黄素类成分的含量在 3 种成品茶样(绿茶、红茶和白茶)中均显著积累,但增加量相对较低($4.49\sim 6.13\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$);然而 3 种成品茶样中儿茶素总量急剧下降,这可能是导致成品茶样的 ACE 抑制活性低于厌氧冻干茶样的主要原因。因此,尽管茶黄素类成分对 ACE 抑制活性可能强于花青素和儿茶素类成分,但由于其在茶叶中的含量相对较低,其可能并非是茶叶中主要发挥体外 ACE 抑制活性的成分。值得注意的是,以往的研究报道 GABA 在体内具有降低动物和人类高血压的健康功效,GABA 一方面可以通过抑制 ACE 活性和减少血管紧张素 II 的合成来降低血压,另一方面可以作用于中枢神经系统,通过调节突触前 GABA_B 受体抑制去甲肾上腺素释放或通过 GABA_A 受体抑制节后交感神经,从而引起血管扩张^[11,26]。此外,GABA 具有更高的口服生物利用度和穿越血脑屏障能力,这可能有助于 GABA 在体内发挥更有效的降压活性^[11]。然而,茶黄素类、儿茶素类(尤其是酯型儿茶素)和花青素类成分的生物利用度相对较低^[27],因此,有必要对这些成分在体内的降血压作用机制进一步研究。

TF3G、飞燕草素-3-*O*-半乳糖苷、EGCG、EC、GA 和 GABA 等 6 个代表性化合物与 ACE 蛋白受体的分子对接的结合袋和相互作用分

析如图 5 所示。通过分子对接可以预测分子中的特定功能区域与目标蛋白质中结合位点之间的互作关系,对筛选天然生物活性抑制剂具有参考价值^[28]。ACE 的主要活性部位由 3 个活性口袋(S1、S2 和 S1')和 Zn^{2+} 组成。S1 口袋包含 Ala354、Glu384 和 Tyr523, S2 口袋包含 Gln281、His353、Lys511、His513 和 Tyr520,而 S1'口袋只包含 Glu162^[29-30]。分子对接结果表明,6 种化合物都可以进入 ACE 的疏水口袋,形成稳定的疏水键。Shukor 等^[31]研究发现,一些官能团,如羟基和羧基,可能作为氢键受体或供体促进配体化合物与 ACE 之间的相互作用。然而,配体化合物与 ACE 之间相互作用的强弱也受到化合物空间结构等因素的影响。其中,TF3G 主要与 ACE 的 Ala354、Arg522、His353 等残基形成 12 个氢键,键距为 $2.3\text{ \AA}\sim 3.2\text{ \AA}$;还与 Zn^{2+} 螯合形成 1 个键距为 2.7 \AA 的氢键。飞燕草素-3-*O*-半乳糖苷与 ACE 的 Tyr523、Glu384、Glu403 和 Glu411 等残基形成 9 个氢键,键距为 $2.8\text{ \AA}\sim 3.2\text{ \AA}$ 。此外,EGCG 主要与 ACE 的 Glu384、Glu411、Arg522 和 Tyr523 等残基形成 8 个氢键,键距为 $2.7\text{ \AA}\sim 3.1\text{ \AA}$ 。与 EGCG 相比,EC 由于缺乏没食子酰基,与 ACE 残基 His387、Glu411、Tyr523 等形成 6 个氢键。酯型儿茶素水解后形成的 GA 则可以与 ACE 残基 Glu411 和 Gly404 形成 6 个氢键,而且 GA 的苯环还与 His387 的咪唑环形成 1 个 π 堆积,键距为 3.9 \AA 。

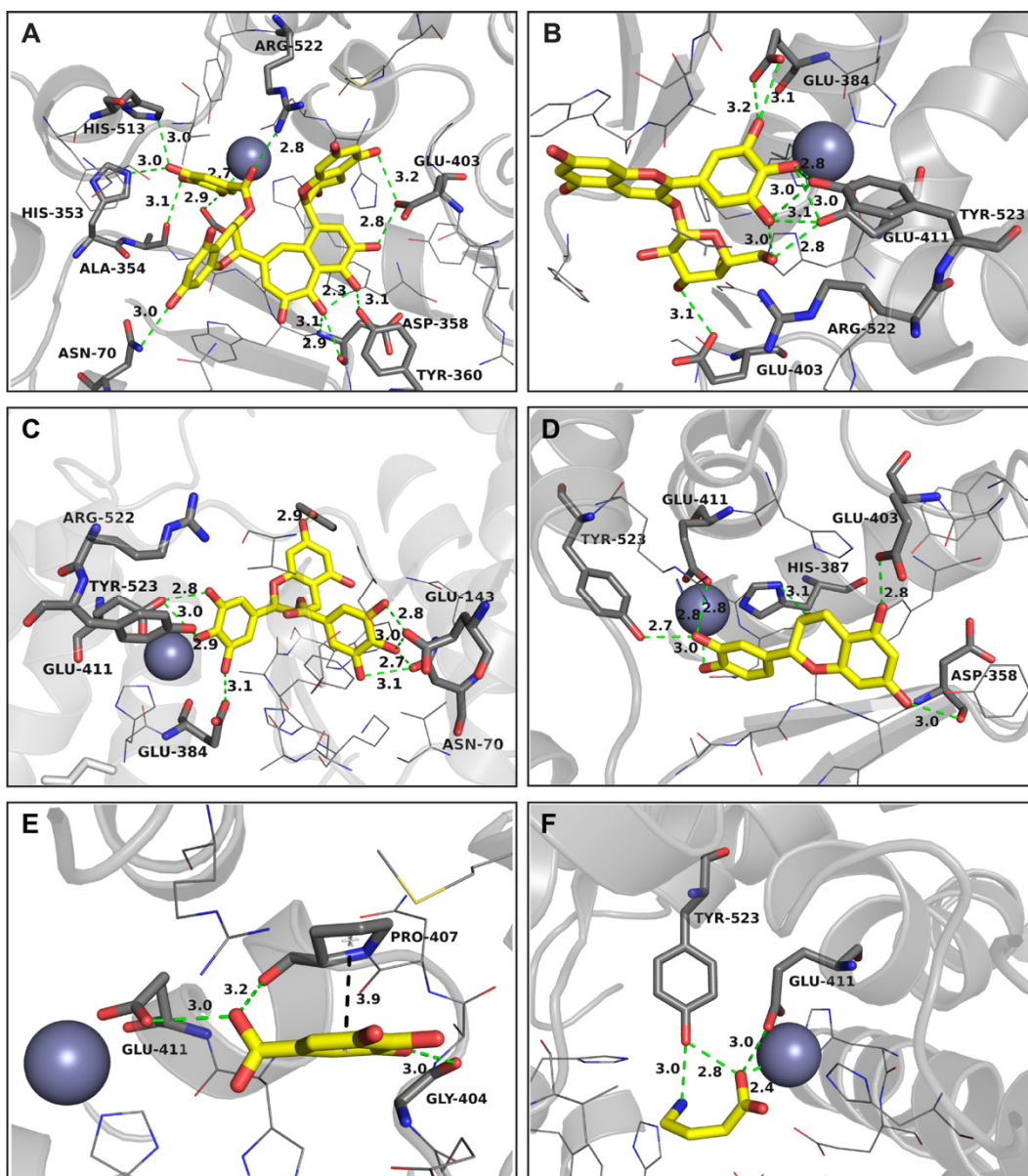
表 4 茶叶中主要化学成分与 ACE 的分子对接的结合亲和力

Table 4 Binding energy of the main chemical components in tea with ACE for molecular docking

序号 No.	化合物 Chemical compounds	结合亲和力/ $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ Combining affinity	序号 No.	化合物 Chemical compounds	结合亲和力/ $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ Combining affinity
1	TF3G	-11.37 ± 0.23^a	8	ECG	-9.25 ± 0.03^e
2	TF3'G	-10.93 ± 0.16^b	9	矢车菊素-3- <i>O</i> -半乳糖苷	-8.91 ± 0.01^f
3	TFDG	-10.76 ± 0.31^b	10	EC	-8.29 ± 0.02^g
4	TF	-10.49 ± 0.01^c	11	咖啡碱	-5.92 ± 0.01^h
5	飞燕草素-3- <i>O</i> -半乳糖苷	-9.46 ± 0.03^d	12	GA	-5.65 ± 0.00^i
6	EGCG3''Me	-9.43 ± 0.01^d	13	茶氨酸	-5.61 ± 0.05^i
7	EGCG	-9.34 ± 0.03^{de}	14	GABA	-3.91 ± 0.00^j

注:数据以平均值 \pm 标准差(SD)表示。同一列中的不同字母表示经 Tukey 多重比较检验,各化合物之间存在显著差异($P<0.05$)

Note: The data are expressed as the mean \pm standard deviation (SD). The different letters in the same column indicate a significant difference between the compounds by Tukey's multiple comparisons test ($P<0.05$)



注: A 为茶黄素-3-没食子酸酯, B 为飞燕草素-3-O-半乳糖苷, C 为表没食子儿茶素没食子酸酯, D 为表儿茶素, E 为没食子酸, F 为 γ -氨基丁酸。绿色虚线代表氢键, 黑色虚线代表 π 堆叠

Note: A, theaflavin-3-gallate. B, delphinidin-3-O-galactoside. C, EGCG. D, EC. E, GA. F, GABA. The green dotted line represented the hydrogen bond, and the black dotted line represented the π -stacking

图 5 6 个代表性化合物与 ACE 的分子对接作用分析

Fig. 5 Molecular docking interaction analysis of six representative compounds with ACE

GABA 可与 Tyr523 和 Glu411 的 ACE 残基形成 3 个氢键, 且 GABA 可以深入隧道, 直接与 Zn^{2+} 螯合 (键距为 2.4 Å)。分子对接结果表明, 6 种成分主要与 ACE 的 S1 和 S2 口袋相互作用, 而 TF3G 和 GABA 还能与 ACE 的

Zn^{2+} 相互作用。茶黄素类与 ACE 的结合能力强于花青素类以及儿茶素类成分, 可能与其分子结构中包含更多的亲水基团和芳香环结构有关, 使其能够与 ACE 中的多个结构域发生相互作用。GABA 与 ACE 的结合能力弱, 可

能是由于其分子量相对较小、结构较为简单,导致其与 ACE 之间的相互作用较弱。

3 结论

本研究表明,厌氧处理能显著提高紫娟茶树鲜叶中 GABA 含量,而厌氧处理后不同的加工工艺不仅对茶样中的氨基酸组成及含量影响较大,还显著影响茶叶中多酚类化合物的组成和含量;采用冻干工艺能最大程度保留茶样中多酚类化合物含量,其次为绿茶和白茶工艺,红茶工艺保留茶样中多酚类化合物含量最低。此外,厌氧处理能显著提高紫娟茶的体外 ACE 抑制活性。紫娟茶树鲜叶经厌氧处理后,采用冻干工艺制备的样品体外 ACE 抑制活性最强,其次是采用绿茶和白茶工艺制备的样品,而采用红茶工艺制备的样品 ACE 抑制活性最弱。相关性分析表明,茶叶中的茶多酚,尤其是儿茶素类成分可能是主要的体外 ACE 抑制活性成分,而与厌氧处理后 GABA 的增加无关。分子对接结果表明,茶黄素类成分与 ACE 的相互作用强于花青素类和儿茶素类成分, GABA 最弱,这可能与其分子结构包含更多的亲水基团和芳香环结构有关。后续有必要开展茶黄素类、儿茶素类和 GABA 等功能成分的体内试验以明确其降血压作用。研究结果有助于揭示厌氧处理对紫娟茶的体外 ACE 抑制活性的影响,为开发具有潜在治疗高血压的特殊功能型紫娟茶产品提供理论依据。

参考文献

- [1] Zhou B, Carrillo-larco R M, Danaei G, et al. Worldwide trends in hypertension prevalence and progress in treatment and control from 1990 to 2019: a pooled analysis of 1201 population-representative studies with 104 million participants [J]. The Lancet, 2021, 398(10304): 957-980.
- [2] Li X C, Zhang J, Zhuo J L. The vasoprotective axes of the renin-angiotensin system: physiological relevance and therapeutic implications in cardiovascular, hypertensive and kidney diseases [J]. Pharmacological Research, 2017, 125: 21-38.
- [3] Wu J, Liao W, Udenigwe C C. Revisiting the mechanisms of ACE inhibitory peptides from food proteins [J]. Trends in Food Science & Technology, 2017, 69: 214-219.
- [4] Yang G Z, Meng Q, Shi J, et al. Special tea products featuring functional components: health benefits and processing strategies [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2023, 22(3): 1686-1721.
- [5] Shi J, Simal-gandara J, Mei J, et al. Insight into the pigmented anthocyanins and the major potential co-pigmented flavonoids in purple-coloured leaf teas [J]. Food Chemistry, 2021, 363: 130278. doi: 10.1016/j.foodchem.2021.130278.
- [6] Dong J, Xu X, Liang Y, et al. Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) activity by polyphenols from tea (*Camellia sinensis*) and links to processing method [J]. Food & Function, 2011, 2(6): 310. doi: 10.1039/c1fo10023h.
- [7] Kurita I, Maeda-yamamoto M, Tachibana H, et al. Antihypertensive effect of Benifuuki tea containing O-methylated EGCG [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(3): 1903-1908.
- [8] Fan W D, Zong H R, Zhao T, et al. Bioactivities and mechanisms of dietary proanthocyanidins on blood pressure lowering: a critical review of *in vivo* and clinical studies [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022: 1-17. doi: 10.1080/10408398.2022.2132375.
- [9] Ockermann P, Headley L, Lizio R, et al. A review of the properties of anthocyanins and their influence on factors affecting cardiometabolic and cognitive health [J]. Nutrients, 2021, 13(8): 2831. doi: 10.3390/nu13082831.
- [10] 包云秀, 夏丽飞, 李友勇, 等. 茶树新品种‘紫娟’[J]. 园艺学报, 2008, 35(6): 934.
Bao Y X, Xia L F, Li Y Y, et al. A new tea tree cultivar ‘Zjuan’ [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2008, 35(6): 934.
- [11] Hinton T, Johnston G A R. GABA-enriched teas as neuro-nutraceuticals [J]. Neurochemistry International, 2020, 141: 104895. doi: 10.1016/j.neuint.2020.104895.
- [12] Dai W D, Xie D C, Lin Z, et al. A nontargeted and targeted metabolomics study on the dynamic changes in metabolite levels during the anaerobic treatment of γ -aminobutyric acid (GABA) tea [J]. LWT, 2020, 126: 109313. doi: 10.1016/j.lwt.2020.109313.
- [13] Chen Q, Zhang Y M, Tao M M, et al. Comparative metabolic responses and adaptive strategies of tea leaves (*Camellia sinensis*) to N_2 and CO_2 anaerobic treatment by a nontargeted metabolomics approach [J]. Journal of

- Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(36): 9565-9572.
- [14] Yin Z T, Yan R Y, Jiang Y S, et al. Identification of peptides in Qingke baijiu and evaluation of its angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activity and stability [J]. Food Chemistry, 2022, 395: 133551. doi: 10.1016/j.foodchem.2022.133551.
- [15] Wei D, Fan W L, Xu Y. Identification of water-soluble peptides in distilled spent grain and its angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activity based on UPLC-Q-TOF-MS and proteomics analysis [J]. Food Chemistry, 2021, 353: 129521. doi: 10.1016/j.foodchem.2021.129521.
- [16] Yang C, Hu Z Y, Lu M L, et al. Application of metabolomics profiling in the analysis of metabolites and taste quality in different subtypes of white tea [J]. Food Research International, 2018, 106: 909-919.
- [17] Da Silva T B V, Castilho P A, De Sá-nakanishi A B, et al. The inhibitory action of purple tea on *in vivo* starch digestion compared to other *Camellia sinensis* teas [J]. Food Research International, 2021, 150: 110781. doi: 10.1016/j.foodres.2021.110781.
- [18] 杨高中, 彭群华, 张悦, 等. 厌氧处理对不同类型茶叶的氨基酸组成及生物活性的影响[J]. 茶叶科学, 2022, 42(2): 222-232.
- Yang G Z, Peng Q H, Zhang Y, et al. Effects of anaerobic treatment on amino acid composition and biological activities of different type teas [J]. Journal of Tea Science, 2022, 42(2): 222-232.
- [19] Wang Y, Kan Z, Thompson H J, et al. Impact of six typical processing methods on the chemical composition of tea leaves using a single *Camellia sinensis* cultivar, Longjing 43 [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(19): 5423-5436.
- [20] Yu F, Chen C, Chen S N, et al. Dynamic changes and mechanisms of organic acids during black tea manufacturing process [J]. Food Control, 2022, 132: 108535. doi: 10.1016/j.foodcont.2021.108535.
- [21] 吕海鹏, 杨停, 梁名志, 等. “紫娟”茶中的 EGCG3"Me 成分研究[J]. 现代食品科技, 2014, 30(9): 286-289, 296.
- Lü H P, Yang T, Liang M Z, et al. Study of EGCG3"Me content in Zijuan tea [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(9): 286-289, 296.
- [22] 时鸿迪, 王邦政, 李乾, 等. 不同加工工艺下‘紫娟’茶品质的比较[J]. 中国农学通报, 2020, 36(34): 142-147.
- Shi H D, Wang B Z, Li Q, et al. The quality of ‘Zijuan’ tea under different processing techniques: a comparative analysis [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2020, 36(34): 142-147.
- [23] Lü H P, Dai W D, Tan J F, et al. Identification of the anthocyanins from the purple leaf coloured tea cultivar Zijuan (*Camellia sinensis* var. *assamica*) and characterization of their antioxidant activities [J]. Journal of Functional Foods, 2015, 17: 449-458.
- [24] Tu J, Liu G H, Jin Y C, et al. Enrichment of γ -aminobutyric acid in mulberry leaves and the inhibitory effects of the water extract on ACE and α -glucosidase activity [J]. Industrial Crops and Products, 2022, 177: 114485. doi: 10.1016/j.indcrop.2021.114485.
- [25] Wu Y, Han Z S, Wen M C, et al. Screening of α -glucosidase inhibitors in large-leaf yellow tea by offline bioassay coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Food Science and Human Wellness, 2022, 11(3): 627-634.
- [26] Diana M, Quílez J, Rafecas M. Gamma-aminobutyric acid as a bioactive compound in foods: a review [J]. Journal of Functional Foods, 2014, 10: 407-420.
- [27] Liu Z, Bruins M E, Ni L, et al. Green and black tea phenolics: bioavailability, transformation by colonic microbiota, and modulation of colonic microbiota [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(32): 8469-8477.
- [28] Wang X M, Chen H X, Fu X G, et al. A novel antioxidant and ACE inhibitory peptide from rice bran protein: biochemical characterization and molecular docking study [J]. LWT, 2017, 75: 93-99. doi: 10.1016/j.lwt.2016.08.047.
- [29] Shih Y H, Chen F A, Wang L F, et al. Discovery and study of novel antihypertensive peptides derived from cassia obtusifoliaseeds [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(28): 7810-7820.
- [30] Mirzaei M, Mirdamadi S, Ehsani M R, et al. Production of antioxidant and ACE-inhibitory peptides from *Kluyveromyces marxianus* protein hydrolysates: purification and molecular docking [J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2018, 26(2): 696-705.
- [31] Shukor N A, Van Camp J, Gonzales G B, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitory effects by plant phenolic compounds: a study of structure activity relationships [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(48): 11832-11839. doi:10.1021/jf404641v.

茶多酚对茶食品中还原糖检测方法的影响

盛政¹, 杜文凯², 王崇崇¹, 张博安¹, 张海华^{1*}, 杜琪珍^{1*}

1. 浙江农林大学食品与健康学院, 浙江 杭州 311300; 2. 浙江省粮油产品质量检验中心, 浙江 杭州 310012

摘要: 为寻找准确测定茶面制品消化产物中还原糖含量的方法, 选取了表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG)、没食子酸、原花青素和阿魏酸 4 种典型酚类物质, 分别以单独的酚类、酚类与葡萄糖共混、酚类与淀粉酶解物共混体系为样品, 研究酚类物质对 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 法、葡萄糖氧化酶/过氧化物酶 (GOPOD) 法和荧光辅助糖电泳 (FACE) 法定量测定还原糖的影响。结果发现, 阿魏酸对 DNS 法无影响, EGCG、没食子酸和原花青素可与 DNS 反应显色, 表明其会影响 DNS 法的准确性; 4 种酚类物质均显著降低了 GOPOD 法测定的葡萄糖结果, 而 FACE 法不受酚类影响且能直观表征淀粉酶解物中低聚还原糖分布。因此, FACE 法在测定茶面制品及其酶解消化物中还原糖含量方面有较好的应用价值。

关键词: 茶食品; 茶多酚; EGCG; 还原糖含量; 荧光辅助糖电泳

中图分类号: S571.1; Q946.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-369X(2023)04-567-09

Effect of Tea Polyphenols on the Determination of Reducing Sugar in Tea Food

SHENG Zheng¹, DU Wenkai², WANG Chongchong¹, ZHANG Boan¹, ZHANG Haihua^{1*}, DU Qizhen^{1*}

1. College of Food and Health, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Hangzhou 311300, China;

2. Zhejiang Quality Inspection Center of Grain and Oil Products, Hangzhou 310012, China

Abstract: In order to find an accurate method to determine the content of reducing sugar in the digestive products of tea noodle products, phenolic acid, phenolic and glucose blending systems and phenolic and amylase blending systems alone were used to study the effects of four typical phenols including epigallocatechin gallate (EGCG), gallic acid, proanthocyanidin and ferulic acid on the quantitative determination of reducing sugars by 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method, glucose oxidase/peroxidase (GOPOD) method and fluorescence-assisted sugar electrophoresis (FACE) method. The results show that ferulic acid had no effect on the DNS method, while EGCG, gallic acid and proanthocyanidin could react with DNS, indicating that they would affect the accuracy of the DNS method. All four phenolic substances significantly reduced the glucose results determined by GOPOD method, while the FACE method was not affected by phenols and could visually characterize the distribution of oligo reducing sugar in the amylase hydrolysate. Therefore, the FACE method has a good application value in determining the content of reducing sugars in tea noodle products and their enzymatic digestion products.

Keywords: tea food, tea polyphenols, EGCG, reducing sugar content, fluorescence-assisted sugar electrophoresis

茶是世界上消费量最大的饮料之一, 因其含有丰富的茶多酚、矿物质、膳食纤维等营养

收稿日期: 2023-03-02

修订日期: 2023-05-11

基金项目: 浙江农林大学科研发展基金人才启动项目 (203402000601)

作者简介: 盛政, 男, 硕士研究生, 主要从事食品加工与营养强化方面的研究。*通信作者: 18758884373@163.com; Qizhendu@163.com

素,可预防肥胖、代谢综合征、糖尿病、癌症等慢性疾病而被广泛关注^[1-4]。茶面制品是茶或茶的功能成分融入以粮食为主料加工而成的食品^[5]。茶面制品作为一种新型复合食品,是发挥茶的保健功能的重要方式,契合人们对于食品的健康功能性新需求。

茶多酚良好的生理活性使其在健康食品的开发和功能强化方面表现出较高的应用潜力,尤其是在预防糖尿病,以及防控餐后高血糖反应等方面是目前研究的热点^[6],而准确检测还原糖含量是这方面研究工作科学性的关键和前提。当前测定食品还原糖广泛使用的化学方法有 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法和葡萄糖氧化酶/过氧化物酶试剂盒(GOPOD)法^[7-8],具有快速便捷、价格低、易操作的优点。例如,采用 DNS 法测定还原糖含量用于表征基于淀粉酶抑制的茉莉花茶拼配效果^[9];采用 DNS 法测定文冠果芽茶与叶茶的还原糖和可溶性

多糖^[10];GOPOD 法则常被用于测定绿茶面条、EGCG-木薯淀粉等茶面食品中淀粉的消化率^[11-12]。此外,还有荧光辅助糖电泳法(FACE),可测定单糖和寡糖分布^[13]。但在尝试采用 DNS 法和 GOPOD 法测定含有茶多酚的还原糖体系时发现茶多酚的存在可能干扰了还原糖测定结果的准确性。因此,有必要评估多酚类物质对 DNS 法、GOPOD 法和 FACE 法测定还原糖的影响,以期找到适用于多酚共存体系中还原糖的检测方法。

基于此,本研究选取茶多酚中没食子酸、阿魏酸、表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)、原花青素 4 种单体,分别对应羟基苯甲酸类酚酸、羟基肉桂酸类酚酸、单体黄烷醇类和聚合黄烷醇类 4 种类型多酚(图 1^[14-15]),研究其对 DNS 法、GOPOD 法和 FACE 法测定还原糖的影响,并分析其可能的原因,以期找到适用的还原糖测定方法。

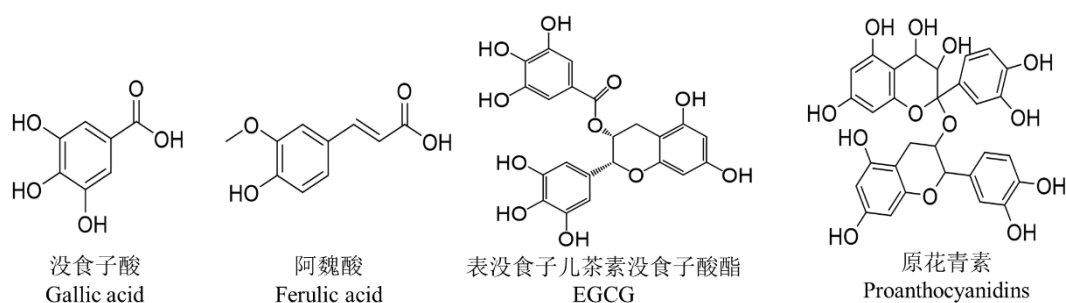


图 1 4 种类型酚类物质分子结构

Fig. 1 Molecular structures of four phenolic substances

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

小麦淀粉(含量 $\geq 87\%$)食品级,购于山东渠风食品科技有限公司;EGCG(纯度 $\geq 98\%$)食品级,购于江苏德和生物科技有限公司;葡萄糖($\geq 99\%$)、麦芽糖($\geq 95\%$)、麦芽三糖($\geq 95\%$)、麦芽四糖($\geq 98\%$)、麦

芽五糖($\geq 95\%$)、麦芽六糖($\geq 95\%$)、麦芽七糖($\geq 90\%$)和麦芽八糖($\geq 90\%$) 8 种还原糖标准品, α -淀粉酶(货号 S31769, $2 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$),三羟甲基氨基甲烷盐酸盐和磷酸二氢钠,购于上海源叶生物科技有限公司;阿魏酸($\geq 99\%$)、没食子酸($\geq 99\%$)、原花青素($\geq 95\%$)、 N,N' -亚甲基双丙烯酰胺(NAPP, $\geq 99\%$)、 N,N,N,N -四甲基乙二胺(TEMED、

≥99%)、丙烯酰胺 (≥99%)、8-氨基 1,3,6-萘三磺酸二钠盐 (ANTS, ≥98%)、过硫酸铵 (≥99%) 和氰基硼氢化钠 (NaCNBH_3 , ≥95%), 购于上海麦克林生化科技有限公司; 葡萄糖氧化酶/过氧化物酶试剂盒购于南京建成生物工程研究所。

1.2 仪器与设备

真空冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司), PHS-920 型 pH 计(上海骋克仪器有限公司), JY04S-3C 凝胶成像分析系统(北京君意东方电泳设备有限公司), DYY-6C 电泳仪电源和 DYCZ-24EN 型双垂直电泳仪(北京六一生物科技有限公司), SYC-C 型电热恒温调速振荡器(上海新苗医疗器械制造有限公司), HBS-1096A 酶标仪(南京德铁实验设备有限公司), UV-6100A 紫外分光光度计(上海 Metash 仪器有限公司)。

1.3 淀粉酶解物的制备

将 5.0 g 小麦淀粉分散在 150 mL 磷酸盐缓冲液中 ($0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 5.2), 混合均匀后在 37 °C 恒温振荡水浴锅中预热 5 min。随后向淀粉溶液中加入 1 mL α -淀粉酶, 于 37 °C 水浴 20 min。然后, 将淀粉溶液沸水浴 5 min 以灭活 α -淀粉酶。冷却至室温后, 在 4 °C、8 000 g 转速下离心 5 min, 保留上清液。

1.4 还原糖测定方法

1.4.1 DNS 比色法

以单独葡萄糖溶液 ($0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)、多酚-葡萄糖混合液(多酚质量浓度依次为 0、1、5、10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 葡萄糖质量浓度为 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和多酚-淀粉酶解物混合溶液(多酚质量浓度依次为 0、1、5、10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为样品, 分别标记为 G、PG、PS; 葡萄糖溶液(质量浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为还原糖标准品。

取 1.0 mL 样品与 0.5 mL DNS 溶液均匀混合后, 置于沸水浴 5 min 转至冰水冷却后, 加

水 4 mL, 以水为空白在 540 nm 下测定吸光度^[16], 采用线性回归法拟合回归曲线。

1.4.2 GOPOD 法

使用葡萄糖氧化酶/过氧化物酶试剂盒, 按试剂盒说明, 在 505 nm 处测定 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 葡萄糖溶液和多酚-葡萄糖混合溶液(多酚质量浓度依次为 0、1、5、10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 葡萄糖质量浓度为 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 吸光值。

1.4.3 荧光辅助糖电泳法 (FACE)

分别配制葡萄糖、麦芽糖、麦芽标准品系列溶液, 配制的质量浓度都为 1、2、3、4 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; 配制酚类物质-淀粉酶解液样品, 配制的酚类物质质量浓度依次为 1、5、10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

按照 FACE 法流程处理^[17], 具体操作如下:

样品衍生处理: 用 NaCNBH_3 和 ANTS 溶液各 10 μL 在 37 °C 下衍生样品 16 h 后进行冷冻干燥。使用时用 250 μL 甘油水溶液 (1:4, $V:V$) 复溶。

分离胶的制备: 制备 60% (W/V) 丙烯酰胺、1.6% (W/V) N,N' -亚甲基双丙烯酰胺的凝胶贮存液, 微孔滤膜过滤。储备凝胶缓冲溶液为 pH 8.8、 $1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl。每 10 mL 分离胶由 5 mL 凝胶贮存液, 2.5 mL 储备凝胶缓冲溶液, 2.5 mL 去离子水, 50 μL 过硫酸铵, 10 μL TEMED 组成。凝胶长 13 cm, 厚 1.0 mm, 孔宽为 0.5 cm。

电泳条件: 使用垂直凝胶电泳仪, 加入 pH 8.8 的 Tris-HCl 电泳缓冲溶液, 然后每个泳道上样 2 μL 衍生样品。在 10 °C 循环冷却水、150 V 电压中, 电泳到荧光前沿移动至凝胶底部。

凝胶成像: 电泳后采用凝胶成像仪的透射紫外模式, 可视化记录后, 使用配套软件 (Gelpro32) 扫描凝胶荧光强度。

1.5 数据处理

所有试验结果均为 3 次平行试验的平均值。采用 Origin 2021 软件画图, 采用 SPSS 25 软件在 $P < 0.05$ 水平下进行单因素方差分析

(ANOVA) 确定统计显著性。

2 结果与分析

2.1 酚类对 DNS 法测定还原糖含量的影响

DNS 法测定还原糖的本质是利用氧化还原反应原理, 即 3,5-二硝基水杨酸的硝基被还原糖还原为氨基显色, 而还原糖被氧化成糖酸 (图 2A)。当用酚类物质替代还原糖与 DNS 反应时, 发现除阿魏酸以外, 其他 3 种酚类物质均会与 DNS 发生显色反应 (图 2B), 且等浓度下显色强度顺序为原花青素>EGCG>没食子酸, 这可能与酚类型尤其是酚羟基数量有关^[18-20]。阿魏酸属于羟基肉桂酸类酚酸, 其与 DNS 试剂无显色反应的原因, 可能是其结构中邻位甲氧基对酚羟基活性产生了影响^[21]。3 种显色的酚类物质与葡萄糖相比, 等浓度下吸光度都要弱一些, 说明葡萄糖更优先与 DNS 反应。进一步分别对 EGCG、没食子酸和原花青素的 DNS 显色反应进行浓度-吸光度线性相关性拟合, 得出 EGCG、没食子酸和原花青素浓度与吸光度的相关系数 (R^2) 分别为 0.980、0.896、0.996, 这说明 EGCG、没食子酸和原花青素与 DNS 反应存在较高的浓度线性依赖。

当酚类物质与葡萄糖共存时, 没食子酸 (羟基苯甲酸类酚酸)、EGCG (单多酚) 和原花青素 (聚合多酚) 都提高葡萄糖的吸光度值 (图 2D), 说明共存体系中 3 种酚类物质仍与 DNS 发生了显色反应。将酚类物质浓度与吸光度进一步线性拟合, 发现 EGCG、没食子酸仍保持较高的浓度线性相关, EGCG、没食子酸浓度与吸光度的相关系数 (R^2) 分别为 0.995 和 0.947, 但原花青素由于是聚合多酚, 容易发生络合反应, 导致浓度线性关系不强, 相关系数 (R^2) 仅为 0.783。当酚类物质与淀粉酶解物 (不同聚合度的还原糖) 共存时, 吸光度变化与葡萄糖共混体系相似, 即 EGCG、没食子酸保持浓度线性相关性, EGCG、没食子酸浓度与吸光度的相关系数 (R^2) 分别为

0.994 和 0.987, 原花青素相关系数 (R^2) 仅为 0.778 (图 2E)。

从 3 类不同样品体系与 DNS 显色反应结果看, EGCG、没食子酸、原花青素代表的 3 类酚类物质都会与 DNS 发生显色反应且具有浓度依赖性, 根据单色光吸光度具有线性加和特性, 在线性浓度范围内可通过调整试验参比排除酚类影响。

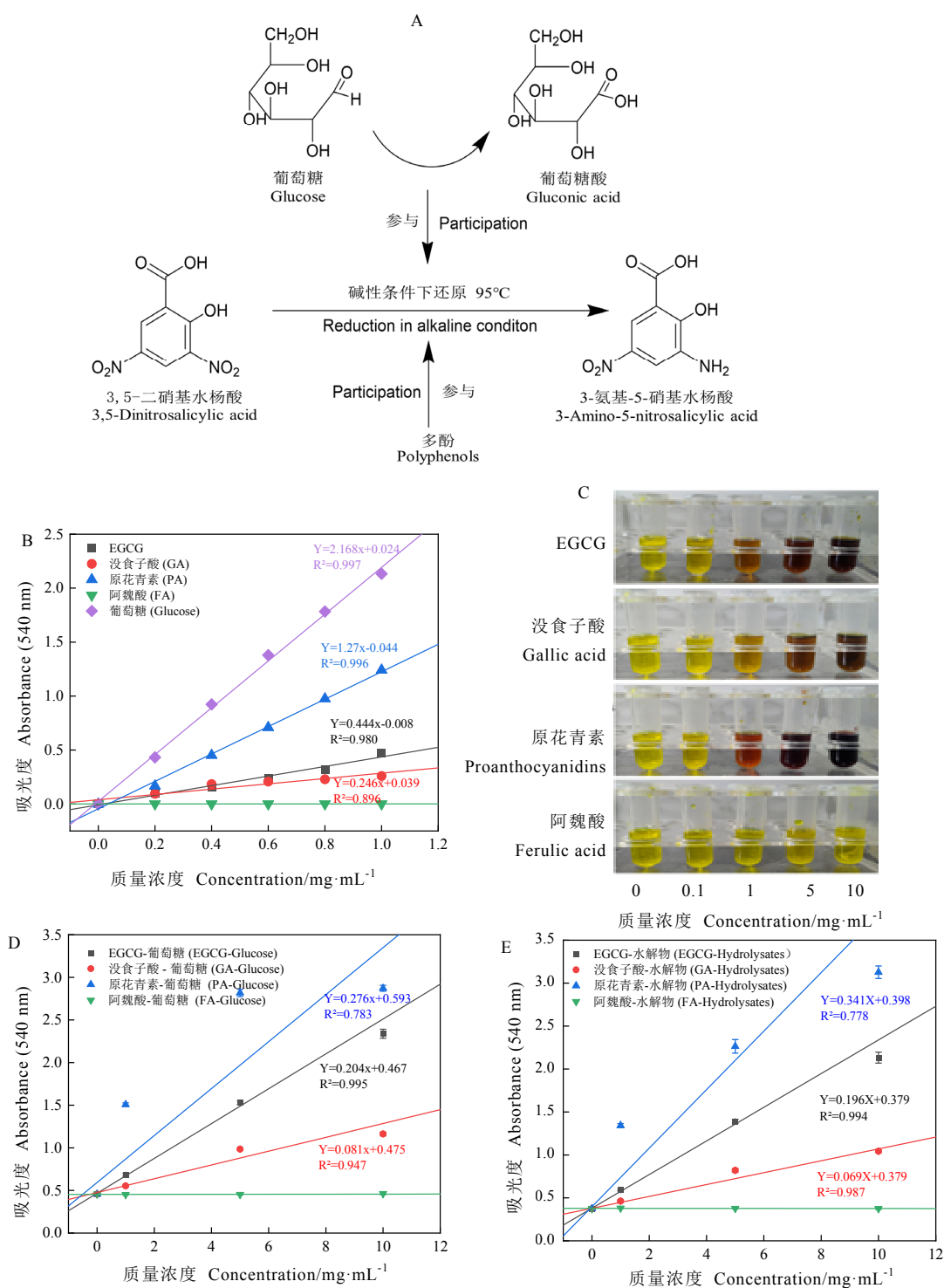
2.2 酚类对 GOPOD 法测定还原糖含量的影响

如图 3A 所示, GOPOD 法的原理是葡萄糖经过葡萄糖氧化酶作用生成葡萄糖酸和过氧化氢, 进一步过氧化氢在过氧化酶的作用下, 将还原性的 4-氨基安替比林与酚偶联缩合成红色的醌亚胺类化合物^[22]。如图 3B 所示, 采用 GOPOD 法检测 EGCG、原花青素、没食子酸和阿魏酸分别与葡萄糖共混体系中还原糖含量, 发现吸光度都会显著降低, 这说明 4 种酚类物质参与了 GOPOD 反应过程。而 EGCG 和原花青素质量浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 与葡萄糖相比, 吸光度显著增加 ($P < 0.05$), 这是由于高浓度 EGCG 或原花青素与试剂盒反应产生悬浊物。

从 GOPOD 法的反应原理上可知, 多酚可能通过 3 种途径参与葡萄糖试剂盒反应: (1) 酚类物质影响葡萄糖氧化酶氧化葡萄糖的生成物 (过氧化氢)^[23]; (2) 酚类物质与试剂盒中的 4-氨基安替比林反应, 从而抑制显色物质的生成^[20]; (3) 酚类物质直接抑制葡萄糖氧化酶和过氧化氢酶的活性^[24]。因此, GOPOD 法并不适用于茶食品中还原糖的直接测定。

2.3 酚类对 FACE 法测定还原糖含量的影响

FACE 法的原理是还原糖与 ANTS 发生衍生化形成不稳定亚胺, 然后通过氰基硼氢化钠选择性还原亚胺形成稳定胺, 再通过聚丙烯酰胺凝胶将反应样品电泳分离出不同聚合度的还原糖 ANTS 衍生物^[25], 如图 4A 所示。从原理上推测, 多酚无醛基, 因此不能参与 ANTS 衍生反应。



注: A 为 DNS 反应示意图, B 为酚类体系, C 为酚类与 DNS 试剂反应的实物图, D 为酚类-葡萄糖体系, E 为酚类-水解物体系

Note: A, the DNS response diagram. B, the phenolic system. C, the physical diagram of the reaction of phenols with DNS reagent. D, the phenol-glucose system. E, the phenol-hydrolysate system

图 2 酚类对 DNS 法的影响

Fig. 2 Effect of polyphenols on the DNS method

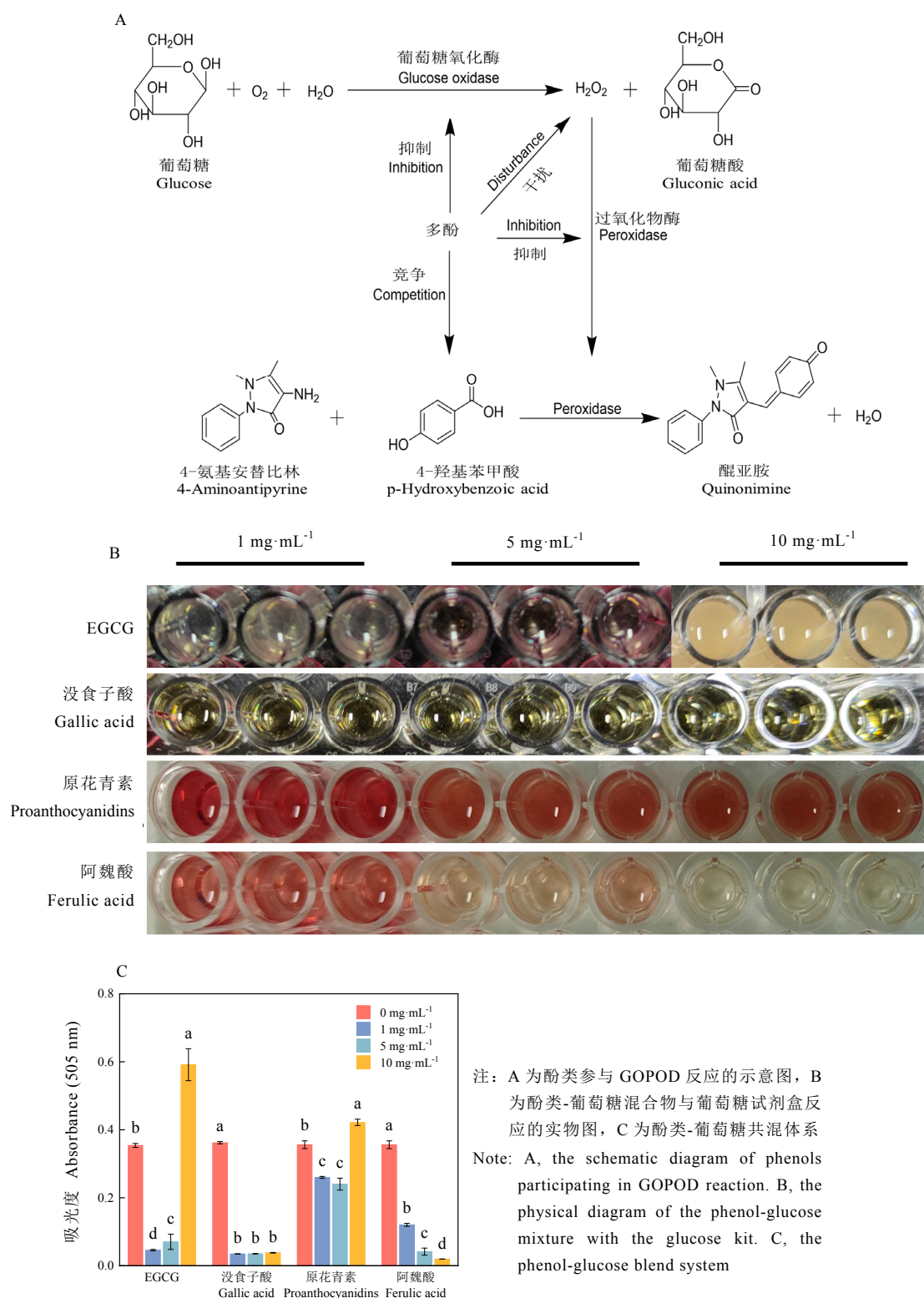
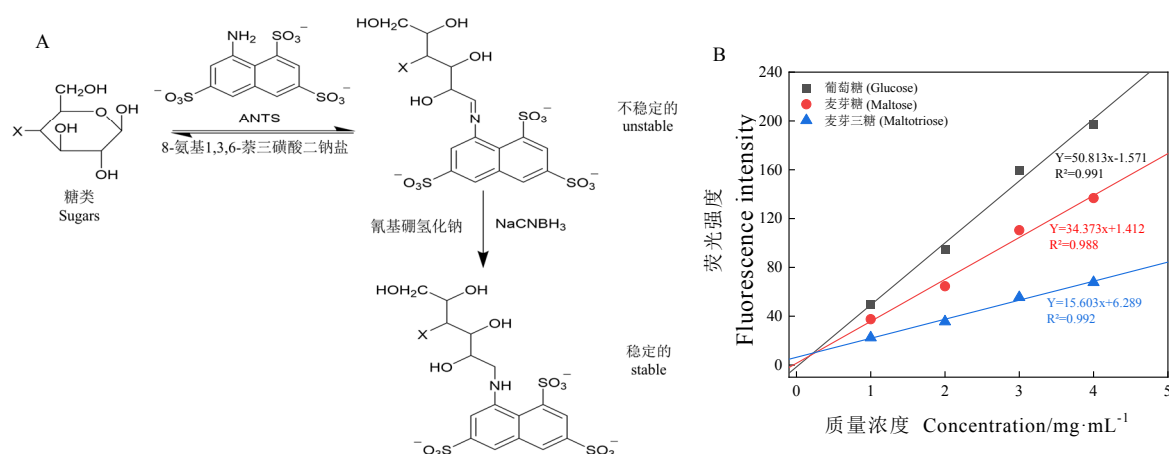


图 3 酚类对葡萄糖氧化酶/过氧化物酶试剂盒法的影响

Fig. 3 Effect of polyphenols on the GOPOD method



注: A 为 FACE 法的反应示意图; B 为葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖与荧光强度的关系

Note: A, the schematic diagram of the response of the FACE method. B, the relationship between glucose, maltose, maltotriose and fluorescence intensity

图 4 还原糖衍生反应和糖浓度与荧光强度的线性关系

Fig. 4 Derivatives plots of reducing sugar, and the linear relationship between sugar concentration and fluorescence intensity

如图 4B 所示, 葡萄糖、麦芽糖和麦芽三糖的浓度与荧光强度显示出良好的线性关系, R^2 分别为 0.991、0.988、0.992, 表明可以利用荧光强度计算糖浓度。FACE 法能分离葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖、麦芽四糖、麦芽五糖、麦芽六糖、麦芽七糖、麦芽八糖, 并且在 4 种酚类物质对应的泳道上无荧光条带 (图 5A), 试验验证了 EGCG、没食子酸、原花青素、阿魏酸不参与 ANTS 衍生反应。进一步采用不同浓度的酚类物质与淀粉酶解物 (低聚还原糖) 共混, 研究共混样品的 FACE 荧光显色情况, 发现酚类-淀粉酶解物的荧光条带分布及强度与对照淀粉酶解物无显著差异, 说明酚类不影响低聚还原糖的测定 (图 5B~5D)。因此, 采用 FACE 法测定还原糖是科学可行的。

此外, 与 DNS 法和 GOPOD 法相比, FACE 法还可同时获得淀粉酶解物中低聚糖的分布情况, 有助于阐释酚类物质对淀粉酶的酶解特性及酶解产物的影响。

3 结论

本文通过将 EGCG、没食子酸、原花青素和阿魏酸 4 种类型酚类物质单独、与葡萄糖共混、与淀粉酶解物共混 3 类样品体系, 研究了酚类物质对还原糖测定常用的 DNS 法、GOPOD 法和 FACE 法的影响。结果表明, 对 DNS 法而言, 阿魏酸无影响, 而 EGCG、没食子酸和原花青素能够与 DNS 发生显色反应且呈浓度线性相关性, 增加了 DNS 法测定的吸光度, 意味着酚类物质的存在可能会使常规 DNS 法测定结果偏高, 建议通过更换参比进行方法改良; 对 GOPOD 法来说, EGCG、没食子酸、原花青素和阿魏酸能参与酶促反应生成显色物质, 导致测定结果偏离真值, 因此该方法应用时需考虑去除体系中的酚类物质再测定还原糖; 4 种酚类物质均对 FACE 方法无干扰, 且 FACE 方法还能同时获得低聚还原糖的分布信息, 是定量测定含酚类物质体系中还原糖含量的良好方法。

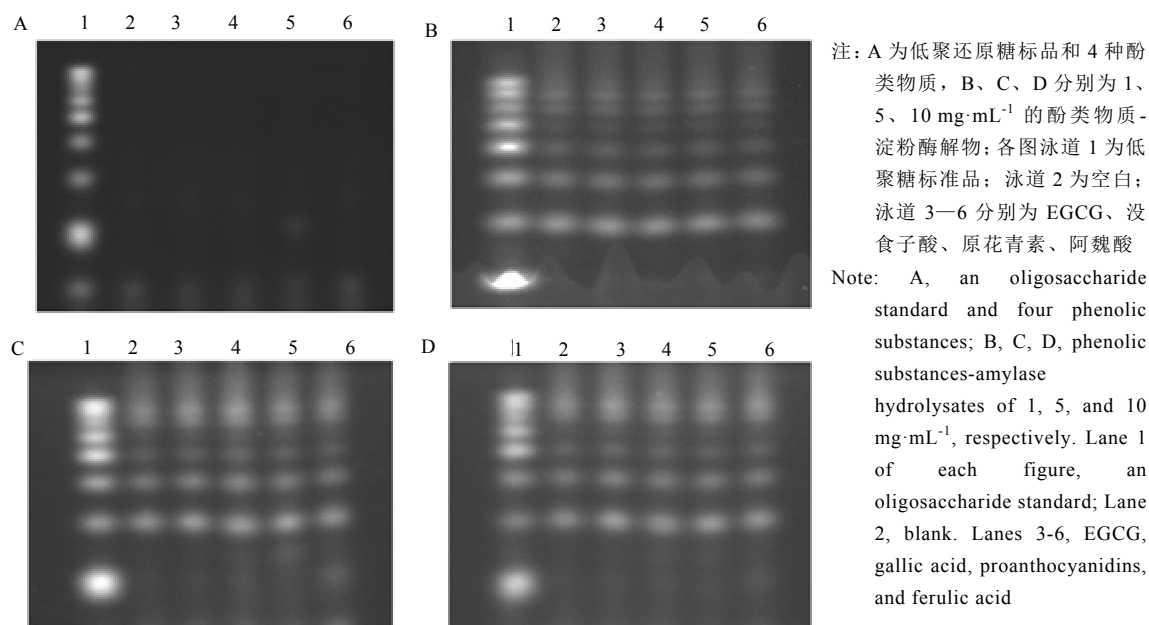


图 5 酚类对 FACE 法的影响

Fig. 5 Effect of polyphenols on the FACE method

参考文献

- [1] Zhang Z Y, Liu C W, Fang W W, et al. Research progress on the lipid-lowering and weight loss effects of tea and the mechanism of its functional components [J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2023, 112: 109210. doi: 10.1016/j.jnutbio.2022.109210.
- [2] Jalaludin I, Kim J. Comparison of ultraviolet and refractive index detections in the HPLC analysis of sugars [J]. Food Chemistry, 2021, 365: 130514. doi: 10.1016/j.foodchem.2021.130514.
- [3] Fang J, Sureda A, Silva A S, et al. Trends of tea in cardiovascular health and disease: a critical review [J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 88: 385-396. doi: 10.1016/j.tifs.2019.04.001.
- [4] Yang C S, Wang H, Sheridan Z P. Studies on prevention of obesity, metabolic syndrome, diabetes, cardiovascular diseases and cancer by tea [J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2018, 26(1): 1-13.
- [5] 张士康. 茶面制品的产业前景[J]. 茶博览, 2018(2): 76-77.
- [6] Lai W F, Baig M, Wong W T, et al. Epigallocatechin-3-gallate in functional food development: from concept to reality [J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 102: 271-279. doi: 10.1016/j.tifs.2020.04.001.
- [7] Saleh K, Duraisamy R. Sugar and ethanol production potential of sweet potato (*Ipomoea batatas*) as an alternative energy feedstock: processing and physicochemical characterizations [J]. Heliyon, 2021, 7(11): e08402. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e08402.
- [8] 张雅琦, 阮长青, 张东杰, 等. 抗性淀粉的分析方法研究进展[J]. 中国粮油学报, 2023, 38(3): 188-195.
- [9] 曾文治, 雷郑延, 周欢, 等. 基于 α -淀粉酶活性抑制率的茉莉花茶拼配研究[J]. 食品工业, 2019, 40(1): 163-168.
- [10] 杨眷俚, 许雪蓉, 张振军, 等. 文冠果芽茶与叶茶主要营养成分成分分析及抗氧化活性评价[J]. 食品工业科技,

- 2022, 43(15): 366-373.
- Yang J L, Xu X R, Zhang Z J, et al. Main nutritional and functional ingredients and antioxidant evaluation of *Xanthoceras sorbifolia* bunge bud tea and leaf tea [J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(15): 366-373.
- [11] Zhu S, Liu B, Wang F, et al. Characterization and in vitro digestion properties of cassava starch and epigallocatechin-3-gallate (EGCG) blend [J]. LWT, 2021, 137: 110398. doi: 10.1016/j.lwt.2020.110398.
- [12] 魏香玉, 于鲲, 吴迪, 等. 绿茶粉对高粱挂面品质及消化特性的影响[J]. 食品与发酵工业, 2022: 1-9[2023-03-02]. doi: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.032210.
- Wei X Y, Yu K, Wu D, et al. Effect of green tea powder on the quality and digestibility of sorghum noodles [J]. Food and Fermentation Industries [J]. Food and Fermentation Industries, 2022: 1-9[2023-03-02]. doi: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.032210.
- [13] Xu S Y, Kan J, Hu Z, et al. Quantification of neoagaro-oligosaccharide production through enzymatic hydrolysis and its anti-oxidant activities [J]. Molecules, 2018, 23(6): 1354. doi: 10.3390/molecules23061354
- [14] Kraithong S, Teerapattarakarn N, Balasubramanian B, et al. Bioactive compounds in tea: effect of imbalanced intake on digestive enzymes activity, cytochrome inhibition and drug interaction [J]. South African Journal of Botany, 2022, 150: 58-68.
- [15] Cianciosi D, Forbes-Hernández T Y, Regolo L, et al. The reciprocal interaction between polyphenols and other dietary compounds: impact on bioavailability, antioxidant capacity and other physico-chemical and nutritional parameters [J]. Food Chemistry, 2022, 375: 131904. doi: 10.1016/j.sajb.2022.07.003.
- [16] 郭有辉, 周娟, 胡露, 等. DNS 光度法测定风味鱿鱼中淀粉、还原糖和蔗糖的含量[J]. 理化检验(化学分册), 2019, 55(4): 463-466.
- Guo Y H, Zhou J, Hu L, et al. Determination of starch, reducing sugar and sucrose in flavored squid by DNS photometric method [J]. Physical Testing and Chemical Analysis (Part B: Chemical Analysis), 2019, 55(4): 463-466.
- [17] Jackson P. High-resolution polyacrylamide gel electrophoresis of fluorophore-labeled reducing saccharides [J]. Methods in Enzymology, 1994, 230: 250-265. doi: 10.1016/0076-6879(94)30017-8.
- [18] Platzer M, Kiese S, Tybussek T, et al. Radical scavenging mechanisms of phenolic compounds: a quantitative structure-property relationship (QSPR) study [J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 882458. doi: 10.3389/fnut.2022.882458.
- [19] Olszowy M. What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants? [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2019, 144: 135-143.
- [20] Lim J, Zhang X W, Ferruzzi M G, et al. Starch digested product analysis by HPAEC reveals structural specificity of flavonoids in the inhibition of mammalian α -amylase and α -glucosidases [J]. Food Chemistry, 2019, 288: 413-421.
- [21] Yang B, Chen F, Hua Y L, et al. Prooxidant activities of quercetin, *p*-coumaric acid and their derivatives analysed by quantitative structure-activity relationship [J]. Food Chemistry, 2012, 131(2): 508-512.
- [22] 李兵, 肖香兰, 杨永红, 等. 国内外淀粉含量的检测标准现状及检测方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(9): 3830-3839.
- Li B, Xiao X L, Yang Y H, et al. Current situation of standard methods and research progress of starch content determination at China and abroad [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(9): 3830-3839.
- [23] Tama A, Bartosz G, Sadowska-Bartosz I. Is hydrogen peroxide generated in wine? [J]. Food Bioscience, 2022, 45: 101487. doi: 10.1016/j.fbio.2021.101487.
- [24] Khan M R, Volpe S, Salucci E, et al. Active caseinate/guar gum films incorporated with gallic acid: physicochemical properties and release kinetics [J]. Journal of Food Engineering, 2022, 335: 111190. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2022.111190.
- [25] O'Shea M G, Samuel M S, Konik C M, et al. Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE) of oligosaccharides: efficiency of labelling and high-resolution separation [J]. Carbohydrate Research, 1998, 307(1): 1-12.

鸠坑龙井茶对高脂饮食 C57BL/6 小鼠肝脂肪变性 SREBPs 通路信号的影响及肠道菌群调节作用研究

龚明秀^{1,2}, 袁懿炜^{1,2}, 张一帆^{1,2}, 叶江成^{1,2}, 郭丽³, 李晓军⁴,
黄皓⁴, 毛宇骁⁵, 赵芸⁵, 赵进^{1,2*}

1. 中国计量大学生命科学学院, 食品营养与质量安全研究所, 浙江 杭州 310018; 2. 特色农产品品质与危害物控制技术浙江省重点实验室, 浙江 杭州 310018; 3. 中国农业科学院茶叶研究所, 浙江 杭州 310008; 4. 浙江艺福堂茶业有限公司博士创新工作站, 浙江 杭州 311500; 5. 杭州市农业科学研究院, 浙江 杭州 310024

摘要: 探究鸠坑龙井茶水提物 (LJT) 对小鼠肝组织脂质代谢 SREBPs 通路信号影响及肠道菌群的调节作用。通过高脂饮食诱导小鼠构建非酒精性脂肪肝 (NAFL) 模型, 并给予 LJT (300 mg·kg⁻¹) 灌胃干预。定期记录小鼠的体质量, 检测小鼠血清生化指标和葡萄糖耐受水平, 观察并分析 Hematoxylin-Eosin (HE) 染色、油红 O 染色肝组织切片特征; 应用 Real-time qPCR 技术检测小鼠肝组织 SREBPs 通路 7 个基因 (*SREBP-1c*、*FAS*、*SCD-1*、*ACC-1*、*SREBP-2*、*HMGCR*、*PPAR γ*) 的相对表达量, 采用蛋白免疫印记技术 (Western Blot) 分析肝组织蛋白质表达水平, 同时对小鼠肠道菌群进行高通量测序 (16 S rDNA) 并分析其结构。结果显示, LJT 干预后小鼠体质量、血糖 AUC、血清 TG、TC、LDL-C 和肝脏中 TG、TC 水平有显著下降, 龙井组小鼠肝组织 *SREBP-1c*、*FAS*、*ACC-1*、*SCD-1* 和 *PPAR γ* 蛋白表达水平降低, *SREBP-1c*、*SCD-1*、*FAS*、*ACC-1*、*SREBP-2*、*HMGCR*、*PPAR γ* 基因的相对表达量显著下调; 16 S rDNA 分析发现, 小鼠肠道菌群门水平主要为 Firmicutes、Bacteroidota、Desulfobacterota 和 Actinobacteriota 4 类, LJT 有效延缓了高脂饮食引起的 Firmicutes 相对丰度升高和 Bacteroidota 相对丰度下降趋势, 并增加了肠道菌群的物种丰度。结果表明, LJT 能够干预小鼠肝脂肪变性 SREBPs 通路信号表达, 改善小鼠肠道菌群紊乱, 具有降脂减肥作用。

关键词: 鸠坑龙井茶; 非酒精性脂肪肝; SREBPs 通路; 肠道菌群紊乱; 降脂作用

中图分类号: S571.1, R151.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-369X(2023)04-576-17

Effect of Jiukeng Longjing Tea on SREBPs Signaling Pathway and Gut Microbiota Regulation in High-fat Diet C57BL/6 Mice with Hepatic Steatosis

GONG Mingxiu^{1,2}, YUAN Yiwei^{1,2}, ZHANG Yifan^{1,2}, YE Jiangcheng^{1,2}, GUO Li³,
LI Xiaojun⁴, HUANG Hao⁴, MAO Yuxiao⁵, ZHAO Yun⁵, ZHAO Jin^{1,2*}

1. Institute of Food Nutrition and Quality Safety, College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China; 2. Key Laboratory of Pecialty Agri-product Quality and Hazard Controlling Technology of Zhejiang Province, Hangzhou 310018, China; 3. Tea Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310008, China; 4. Doctor Innovation Workstation of Zhejiang Yifutang Tea Industry Co., Ltd., Hangzhou 311500, China; 5. Hangzhou Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310024, China

收稿日期: 2023-01-16

修订日期: 2023-04-12

基金项目: 浙江省重点研发计划项目 (2020C02045)、杭州市农业与社会发展科研项目 (202203A06、202203A11、202203B09)、开化茶产业提升浙江省团队科技特派员项目、杭州市科技特派员项目 (20221122180)、衢州市重点科技攻关项目科技强农专项 (2023k098)

作者简介: 龚明秀, 女, 硕士研究生, 主要从事药食同源植物营养与功效评价研究。*通信作者: zhaojin@cjl.edu.cn

Abstract: To investigate the effect of Jiukeng Longjing tea water extract (LJT) on liver steatosis and the regulation of gut microbiota in C57BL/6 mice fed with high-fat diet, a non-alcoholic fatty liver model was established in mice induced by a high-fat diet, and LJT (300 mg·kg⁻¹) was gavaged for intervention. The body weight of mice was recorded regularly, and serum biochemical indicators such as AST, ALT, TC, TG, LDL-C, HDL-C, and glucose tolerance levels were measured. The characteristics of HE staining and oil red O staining liver tissue sections were observed and analyzed. Real-time qPCR technology was used to detect the expressions of seven genes including *SREBP-1c*, *FAS*, *SCD-1*, *ACC-1*, *SREBP-2*, *HMGCR*, and *PPAR γ* in mouse liver tissues. The relative expressions of proteins related to lipid metabolism were studied by western blot. At the same time, the gut microbiota of mice was sequenced by high-throughput sequencing (16 S rDNA) and its structure was analyzed. The results show that the body weight, blood glucose AUC, serum TG, TC, LDL-C, and liver TG, TC levels significantly decreased under LJT intervention. Western blot shows that LJT intervention reduced the expressions of *SREBP-1c*, *FAS*, *ACC-1*, *SCD-1*, and *PPAR γ* in liver tissue of mice. LJT also significantly downregulated the relative expressions of *SREBP-1c*, *SCD-1*, *FAS*, *ACC-1*, *SREBP-2*, *HMGCR* and *PPAR γ* in liver tissue. The 16 S rDNA detection reveals that the levels of gut microbiota were mainly classified into four categories: Firmicutes, Bacteroidota, Desulfobacterota, and Actinobaciota. LJT could effectively alleviate the trend of increasing the relative abundance of Firmicutes and decreasing the relative abundance of Bacteroidota caused by high-fat diet, and increase the species abundance of gut microbiota. Therefore, LJT could interfere with the signal expression of SREBPs pathway in mouse liver steatosis, and improve the disturbance of gut microbiota in mice, thereby achieve the effect of reducing fat and weight loss.

Keywords: Jiukeng Longjing tea, non-alcoholic fatty liver, SREBPs path, gut microbiota dysbiosis, lipid-lowering effect

非酒精性脂肪肝病 (Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是指除酒精、药物和单基因遗传等肝损伤原因外,导致的肝细胞内脂质积聚引起的综合征,肝细胞内甘油三酯的积聚(即肝脂肪变性)是 NAFLD 的标志^[1]。其发展过程包括从非酒精性脂肪肝 (Non-alcoholic fatty liver, NAFL) 到非酒精性脂肪性肝炎 (Non-alcoholic steato-hepatitis, NASH), 甚至是晚期的肝纤维化和肝硬化^[2]。此症状与心血管疾病^[3]、肥胖^[4]、II 型糖尿病^[5]和肝外恶性肿瘤^[6]等代谢疾病密切相关。报道显示, NAFLD 成为我国发病率最高的慢性肝病,在部分地区达 25%^[7]。肠道菌群与 NAFLD 密切相关,可以通过激活固醇调节元件结合蛋白 (Sterol regulatory element binding proteins, SREBPs) 来影响宿主脂质代谢^[8]。SREBPs 是调控胆固醇、甘油三酯和脂肪酸从头合成的关键核转录因子,通过调节 SREBPs 信号通路抑制肝脏中脂质沉积,缓解 NAFLD 症状。

《地理标志产品 龙井茶》(GB/T 18650—2008)指出,鸠坑种是适宜加工龙井茶的茶

树良种,其芽叶肥壮,持嫩性强,内含物质丰富,具有相对丰富的香气成分^[9-10]。茶多酚具有良好的降脂作用,且降脂功效的强弱与其浓度呈正相关^[11]。Li 等^[12]研究发现龙井茶能预防酒精引起的肝脏脂质的累积, Ma 等^[13]研究显示绿茶通过调节 SREBPs 信号通路抑制肝脏中脂质沉积。本研究通过高脂饮食诱导 C57BL/6 小鼠构建非酒精性肝脂肪变性模型,研究鸠坑龙井茶水提物对小鼠肝组织脂质代谢 SREBPs 通路信号的影响及肠道菌群的调节作用,进而解析鸠坑龙井茶改善小鼠 NAFLD 功效的作用机理,旨在为促进鸠坑龙井茶产品的功效应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2021 年 11 月 19 日采摘桐庐茶园的鸠坑种茶树鲜叶,按照龙井茶工艺加工制作龙井茶。

8 周龄雄性 SPF 级 C57BL/6 小鼠购自杭州子源实验动物科技有限公司,使用许可证号

为 SYXK (浙) 2018-0009。

小鼠普通饲料(蛋白质 20.6%、脂肪 12%、碳水化合物 67.4%)购自江苏省协同医药生物工程有限责任公司,高脂饲料(蛋白质 26.2%、脂肪 34.9%、碳水化合物 26.3%)购自无锡帆泊生物技术有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 指标测定

水分含量参照 GB 5009.3—2016 直接干燥法,水浸出物含量参照 GB/T 8305—2013 方法,咖啡碱含量参照 GB/T 8312—2013 紫外分光光度法,茶多酚及儿茶素含量参照 GB/T 8313—2018 方法,游离氨基酸含量参照 GB/T 8314—2013 方法,可溶性糖含量采用苯酚-硫酸法^[14],可溶性蛋白含量测定采用微孔酶标法。

1.2.2 动物实验

动物实验经中国计量大学动物伦理委员会批准(批件号:2022 年第 28 号)。40 只体质量为(23.00±1.00) g 的 C57BL/6 雄性小鼠,安置在常规环境(12 h 光/暗循环)中,自由取食饮水,适应性饲养 1 周后进行随机分组,分为正常组(Normal)、高脂组(Model)、阳性对照组(简称阳性组,Control)和鸠坑龙井茶水提物干预组(简称龙井组,LJT),小鼠分组方案如表 1 所示,小鼠每天进行灌胃。鸠坑龙井茶水提物的制备参照 Li 等^[15]的方法并进行完善,用 95 ℃ 热水按料液比 1:20 浸提茶制品 5 min,趁热抽滤、旋蒸得浓缩滤液,然后-55 ℃ 冷冻干燥 24 h 得到茶水提取物冻干粉,用于配置灌胃所需茶汤。

每周测定小鼠体质量,在第 9 周饲养结束后解剖小鼠,观察并记录小鼠、肝脏和附睾脂肪形态,按照下列公式计算 Lee's 指数:

$$\text{Lee's 指数} = \frac{\sqrt[3]{m}}{l} \times 1000$$

式中, m 为小鼠体质量, g; l 为小鼠体长, cm。

1.2.3 口服葡萄糖耐受量实验(OGTT)

在小鼠饲喂第 5 周,禁食不禁水 12 h,测定各组小鼠空腹血糖值。小鼠灌胃 20%葡萄糖水溶液(2 g·kg⁻¹),在小鼠空腹和灌胃后第 15、30、60、120 min,分别用罗氏血糖仪和检测试纸条依次测定相应时间点的小鼠血糖值,计算时间-血糖曲线下面积(AUC)。

1.2.4 小鼠血清采集

在小鼠培养第 9 周,禁食不禁水过夜(12 h)。禁食结束后,采用眼球取血方式采集小鼠鲜血于抗凝管中静置 2 h,然后以 3 000 r·min⁻¹ 冷冻离心(4 ℃) 10 min,收集上层血清并及时储存于-80 ℃ 冰柜。

1.2.5 血清和肝脏常规指标测定

血清和肝脏中高密度脂蛋白胆固醇(High-density lipoprotein, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(Low-density lipoprotein, LDL-C)、总胆固醇(Total cholesterol, TC)、总甘油三酯(Total triglyceride, TG)和总蛋白(Total protein, TP)等含量,谷草转氨酶(Aspartate aminotransferase, AST)和谷丙转氨酶(Alanine aminotransferase, ALT)的活性采用南京建成生物工程研究所试剂盒测定。

表 1 小鼠分组方案

Table 1 Experimental scheme of grouping mice

组别 Group	数量 Number/只	饲料 Feed	灌胃物 Gavage
正常组 Normal	10	普通饲料	生理盐水
高脂组 Model	10	高脂饲料	生理盐水
阳性组 Control	10	高脂饲料	阿托伐他汀钙片(10 mg·kg ⁻¹)
龙井组 LJT	10	高脂饲料	鸠坑龙井茶水提物(300 mg·kg ⁻¹)

1.2.6 肝脏组织染色

采集小鼠肝组织并置于 10%福尔马林组织固定液中 48 h,参考冯琳等^[16]方法并对其进行油红 O 染色和 HE 染色切片制作。

1.2.7 蛋白免疫印记

小鼠肝脏样品液氮保存送至杭州纽贝生物有限公司,采用蛋白质印迹技术(Western blot)分析小鼠肝组织脂质代谢相关蛋白质表达情况。通过 SuperSignal[®] West Dura Extended Duration Substrate 进行显影和定影,使用 Image J 1.8.0 图像处理软件(美国)分析条带的光密度值,每个条带重复 3 次,目的蛋白相对表达量=[目的蛋白(光密度值)/内参(光密度值)]×10ⁿ。

1.2.8 实时荧光定量 PCR

根据 TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extrraction Kit 试剂盒说明书提取总 RNA,并进行逆转录将总 RNA 转化为单链 cDNA;采用 Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)进行 RT-qPCR,基因表达水平采用比较循环阈值(2^{-ΔΔC_T})方法计算。引物序列见表 2。

1.2.9 肠道菌群检测

采集小鼠结肠部位内容物,提取样品总 DNA 后,根据保守区设计得到引物,在引物末端加上测序接头,进行 PCR 扩增并对其产物进行纯化、定量和均一化形成测序文库并进行文库质检,质检合格的文库用 Illumina

NovaSeq 6000 进行测序。测序由北京擎科生物公司完成。

1.3 数据分析

数据采用平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)表示,使用 SPSS 20.0 软件分析数据,并用 Origin 2022 作图。采用单因素方差分析和 Duncan 检验进行多重比较, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 鸠坑龙井茶主要理化成分检测结果

鸠坑龙井茶主要理化成分检测结果如表 3 所示。鸠坑龙井茶中水浸出物含量为(31.590±0.292)%,茶多酚含量为(19.773±0.284)%,可溶性糖含量为(4.656±0.070)%,可溶性蛋白含量为(4.103±0.026)%,咖啡碱含量为(2.455±0.012)%,水分含量为(5.173±0.132)%。

2.2 鸠坑龙井茶对高脂饮食小鼠脏器、体质量和 Lee's 指数的影响

鸠坑龙井茶对小鼠形体的影响如图 1 所示。由图 1A 可知,经过 9 周的高脂饮食诱导性饲养,高脂组、阳性组和龙井组小鼠的体型明显比正常组肥大,其中龙井组小鼠体型比高脂组瘦小;正常组小鼠肝脏呈现为健康的深红褐色,高脂组肝脏颜色偏黄,有明显脂肪聚积现象,阳性组和龙井组小鼠肝组织形态与正常组相近;高脂组小鼠附睾脂肪体积与其他 3 组

表 2 荧光定量 PCR 引物序列
Table 2 Primer sequences of fluorescent quantitative PCR

基因名称	序列号	引物序列 (5'-3')	
Gene name	Sequence No.	Primer sequence (5'-3')	
<i>GAPDH</i>	NM_008084	F: GAAGGTCGGTGTGAACGGATTTG;	R: CATGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
<i>SREBP-1c</i>	NM_011480	F: GATGTGCGAACTGGACACAG;	R: CATAGGGGGCGTCAAACAG
<i>SCD-1</i>	NM_009127.4	F: GCAAGCTCTACACCTGCCTCTTC;	R: CAGCCGTGCCTTGTAAGTTCTG
<i>ACC-1</i>	NM_133360.3	F: CGTGCAATCCGATTGTTGTCATG;	R: GGAACATAGTGGTCTGCCATCT
<i>FAS</i>	NM_007988.3	F: AGAGATCCCAGACGCTTCT;	R: GCTTGGTCCTTTGAAGTCGAAGA
<i>PPARγ</i>	NM_001127330	F: CTCCAAGAATACCAAAGTGCGA;	R: GCCTGATGCTTTATCCCCACA
<i>SREBP-2</i>	NM_033218	F: TGGGCGATGAGCTGACTCT;	R: CAAATCAGGGAAGCTCTCCAC
<i>HMGCR</i>	NM_008255	F: TGTTCACCGGCAACAACAAGA;	R: CCGCGTTATCGTCAGGATGA

有明差异。

小鼠饲喂期间体质量和体形变化情况如图 1B 和图 1C 所示。高脂组小鼠体质量和 Lee's 指数显著高于正常组 ($P<0.05$)，阳性组和龙井组小鼠体质量显著低于高脂组 ($P<0.05$)。研究结果显示，高脂饮食能够诱导小鼠肥胖与小鼠肝组织脂肪堆积，并导致肝脂肪变性，而通过长期饮食鸠坑龙井茶能减缓或者改善小鼠肝脂肪变性症状。

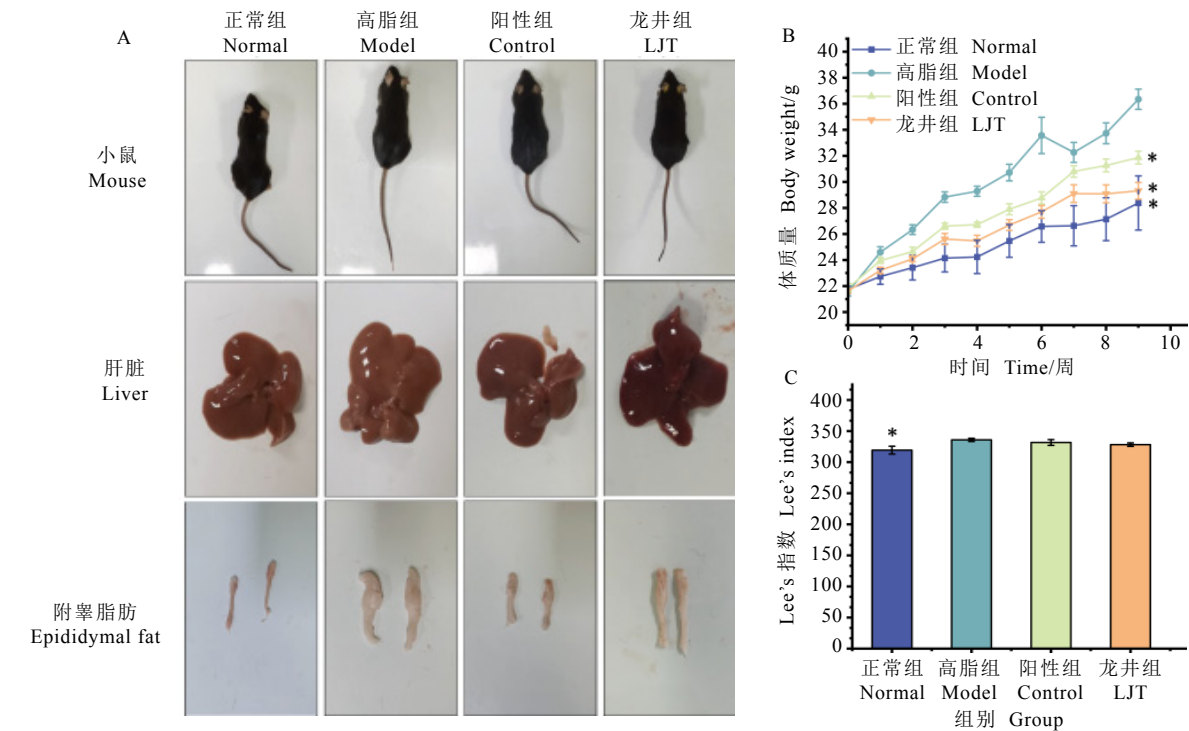
2.3 小鼠血糖耐受水平检测分析

小鼠血糖变化如图 2 所示。正常组小鼠血糖值在口服葡萄糖溶液 15 min 后达到最高水平，120 min 后下降至接近正常水平，并且正常组小鼠在口服糖期间 AUC 值显著低于高脂组 ($P<0.01$)；高脂组、阳性组和龙井组小鼠血糖在口服葡萄糖后 30 min 达到最高水平，120 min 后高脂组血糖水平仍高于正常组，而阳性组、龙井组小鼠血糖值趋近于正常组水

表 3 鸠坑龙井茶中主要理化成分含量

Table 3 Contents of main physical and chemical components in Jiukeng Longjing tea

成分 Component	含量 Content	%
水浸出物 Aqueous extrac	31.590±0.292	
茶多酚 Tea polyphenols	19.773±0.284	
可溶性糖 Soluble sugar	4.656±0.070	
可溶性蛋白 Soluble protein	4.103±0.026	
咖啡碱 Caffeine	2.455±0.012	
游离氨基酸 Free amino acid	2.027±0.001	
水分 Moisture	5.173±0.132	



注：A 为小鼠体型、肝脏和附睾脂肪，B 为 0~9 周小鼠体质量变化，C 为小鼠 Lee's 指数。*表示与高脂组相比 $P<0.05$
Note: A, mouse, liver and epididymal fat. B, the changes in body mass of mice at 0-9 weeks. C, Lee's index. * indicates $P<0.05$ compared to the model group

图 1 鸠坑龙井茶对小鼠的影响
Fig. 1 Effect of Jiukeng Longjing tea on mice

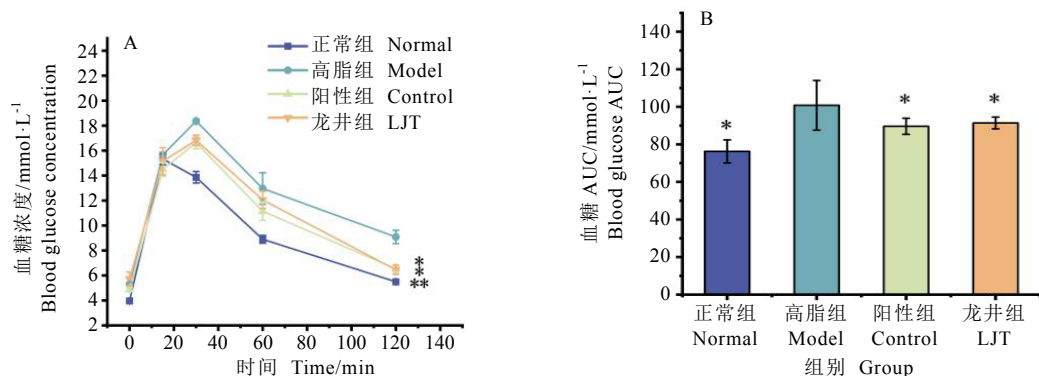
平, 并显著低于高脂组 ($P<0.05$)。

由图 2B 可知, 与高脂组小鼠相比, 正常组、阳性组和龙井组的小鼠血糖 AUC 均显著下降 ($P<0.05$)。检测结果表明, 高脂饮食能引起 C57BL/6 小鼠葡萄糖耐受能力受损, 通过长期灌胃龙井茶水提物能有效改善小鼠葡萄糖耐受性。

2.4 小鼠血清生化指标检测分析

小鼠血清生化指标变化趋势如图 3。由图

3A~D 可知, 与高脂组相比, 正常组、阳性组和龙井组小鼠的 TC、TG 和 LDL-C 值显著降低 ($P<0.05$), 各组间的 HDL-C 无显著差异。小鼠血清中酶活性水平如图 3E 和 3F 所示, 高脂组小鼠 AST 酶活性水平显著高于正常组 ($P<0.01$), 但仍处于正常水平范围内, 龙井组小鼠血清 AST 酶活性水平显著低于高脂组 ($P<0.05$); 小鼠血清 ALT 酶活性在各组间不具有统计学差异。结果表明, 鸬坑龙井茶能

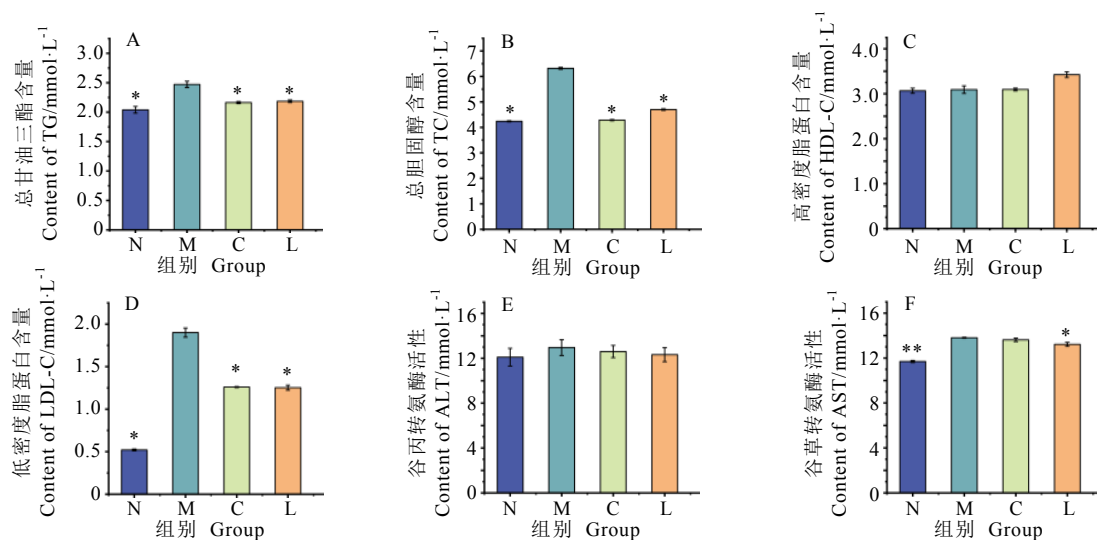


注: A 为小鼠 OGTT 血糖变化曲线, B 为小鼠 OGTT 曲线下面积。*表示与高脂组相比 $P<0.05$, **表示与高脂组相比 $P<0.01$, 下同

Note: A, mouse OGTT blood glucose change curve. B, area under the mouse OGTT curve. * indicates $P<0.05$ compared to the model group, ** indicates $P<0.01$ compared to the model group, the same below

图 2 小鼠 OGTT 时间-血糖变化曲线及其曲线下面积

Fig. 2 Mouse OGTT time-glucose change curve and the area under the curve



注: N 为正常组, M 为高脂组, C 为阳性组, L 为龙井组

Note: N, normal. M, model. C, control. L, LJT

图 3 小鼠血清各项生化指标变化趋势

Fig. 3 Serum biochemical indexes of mice

有效降低高脂饮食引起的小鼠血脂含量,推测长期饮用鸠坑龙井茶能够降低血脂累积水平。

2.5 小鼠肝组织脂肪变性检测分析

小鼠肝组织脂质含量如图 4。由图 4A 和 4B 可以得出,高脂饮食能够显著增加小鼠肝脏 TG 和 TC 的含量 ($P<0.05$),阳性药物和鸠坑龙井茶具有显著降低小鼠肝脏 TG 和 TC 的作用 ($P<0.05$)。

HE 染色结果显示(图 4C),正常组的小鼠肝细胞排列紧密,肝小叶结构清晰,脂肪空泡密度小;高脂组小鼠肝细胞排列较松散,肝

小叶结构不清晰,大量的脂肪空泡聚集在细胞核周围,少量炎性细胞浸润现象,但无气球样病变;阳性组和龙井组小鼠肝细胞结构中脂肪空泡减少,炎性细胞浸润现象几乎消失。油红 O 染色结果显示(4D),正常组小鼠肝组织中甘油三酯的含量较少,高脂组小鼠肝组织甘油三酯遍布大部分或整个细胞质,且含量显著高于正常组 ($P<0.05$),阳性组和龙井组小鼠肝组织甘油三酯含量显著低于高脂组 ($P<0.05$)。肝组织切片病理观察结果表明,高脂饮食诱发小鼠肝组织脂肪堆积并发生变性,而长期饮食鸠坑龙井茶能有效缓解该症状。

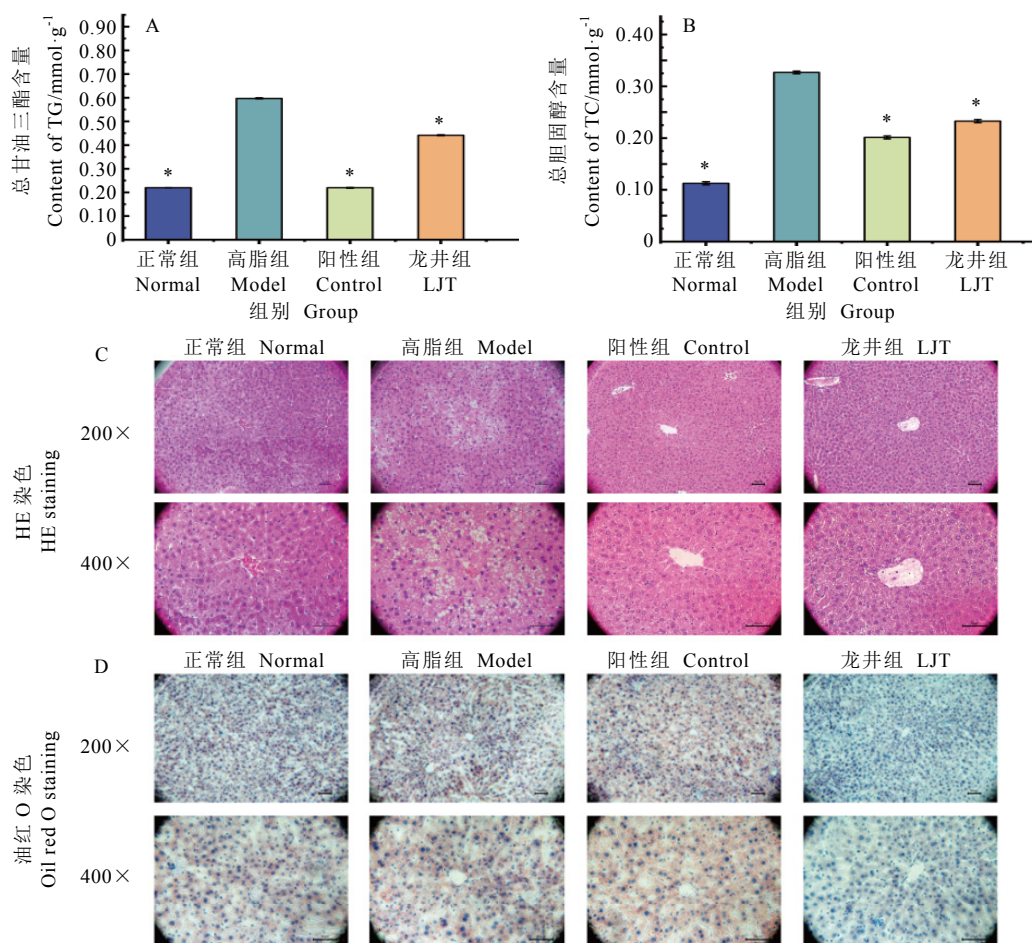


图 4 小鼠肝组织脂质含量

Fig. 4 Lipid contents in liver

2.6 鸬坑龙井茶对肝组织脂质代谢通路信号的影响

小鼠肝脏蛋白免疫印迹结果如图 5A 所示。分析图 5A 和图 5B 可知,与高脂组相比,正常组、阳性组和龙井组 $PPAR\gamma$ 相对表达量显著降低 ($P<0.05$);由图 5A、图 5C~F 可知,正常组、阳性组和龙井组中 $SREBP-1c$ 、 $SCD-1$ 、 FAS 蛋白表达量显著低于高脂组 ($P<0.05$)。与高脂组相比,阳性组、龙井组 $p-ACC-1/ACC-1$ 值显著升高,结果表明,阳性药物与鸬坑龙井茶都具有影响高脂饮食小鼠肝组织脂质合成代谢过程的效应。

由图 6A 可知,正常组、阳性组和龙井组 $PPAR\gamma$ 相对表达量显著低于高脂组 ($P<0.05$),说明高脂饮食促使小鼠肝组织 $PPAR\gamma$ 相对表达量增加,促进脂质合成代谢。由图 6B 可知,高脂组小鼠肝组织中 $SREBP-1c$ 、 FAS 、 $SCD-1$

和 $ACC-1$ 基因相对表达量显著高于正常组 ($P<0.05$);与高脂组相比,经阳性药物和鸬坑龙井茶干预后,小鼠肝组织 $SREBP-1c$ 、 FAS 、 $SCD-1$ 和 $ACC-1$ 基因表达水平显著下降 ($P<0.05$)。图 6C 显示,高脂组小鼠肝组织中 $SREBP-2$ 和 $HMGCR$ 基因表达水平显著高于其他组 ($P<0.05$),说明高脂组中胆固醇合成显著增加,鸬坑龙井茶干预能抑制高脂小鼠肝组织胆固醇合成过程。

2.7 小鼠肠道菌群检测分析

各组小鼠肠道菌群分类操作单元 (Operational taxonomic units, OTUs) 韦恩图如图 7 所示。检测分析获得正常组小鼠肠道菌群有 457 种 OTUs,高脂组、阳性组和龙井组分别获得 327、319、389 种 OTUs,分别有 201、194、229 种 OTUs 与正常组相同,表明龙井组小鼠肠道菌群构成与正常组最为相似。

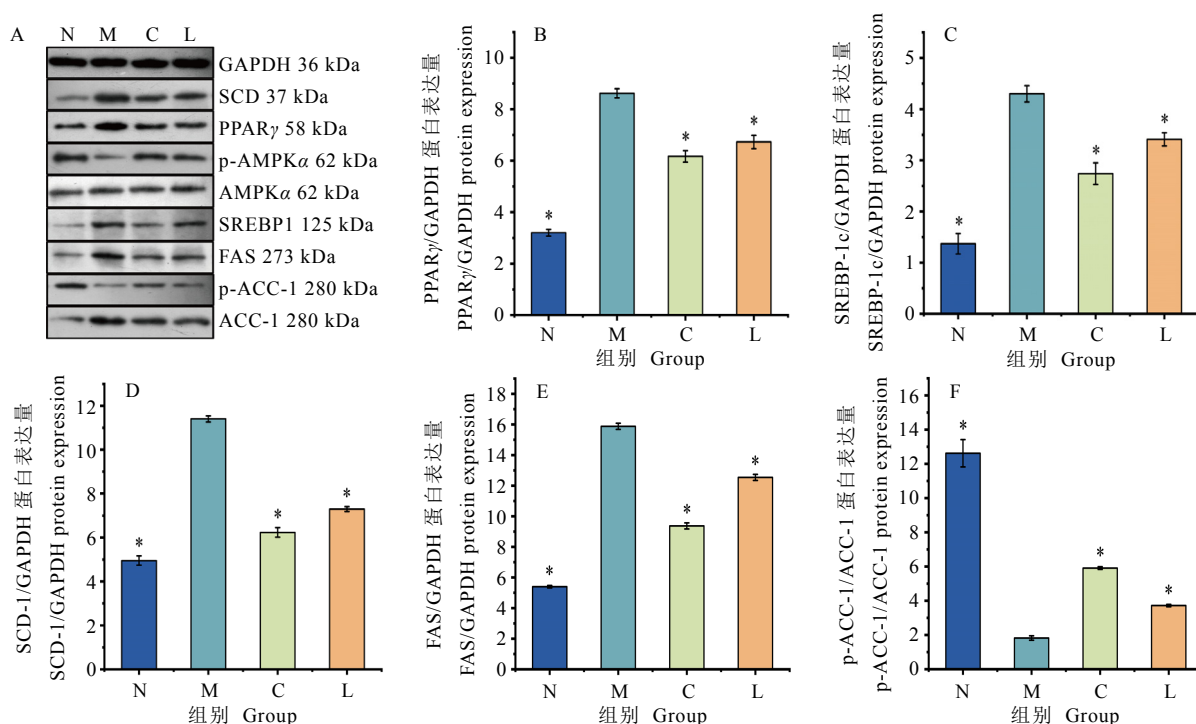


图 5 小鼠肝组织脂质代谢蛋白表达量

Fig. 5 Expression of lipid metabolizing protein in mouse liver

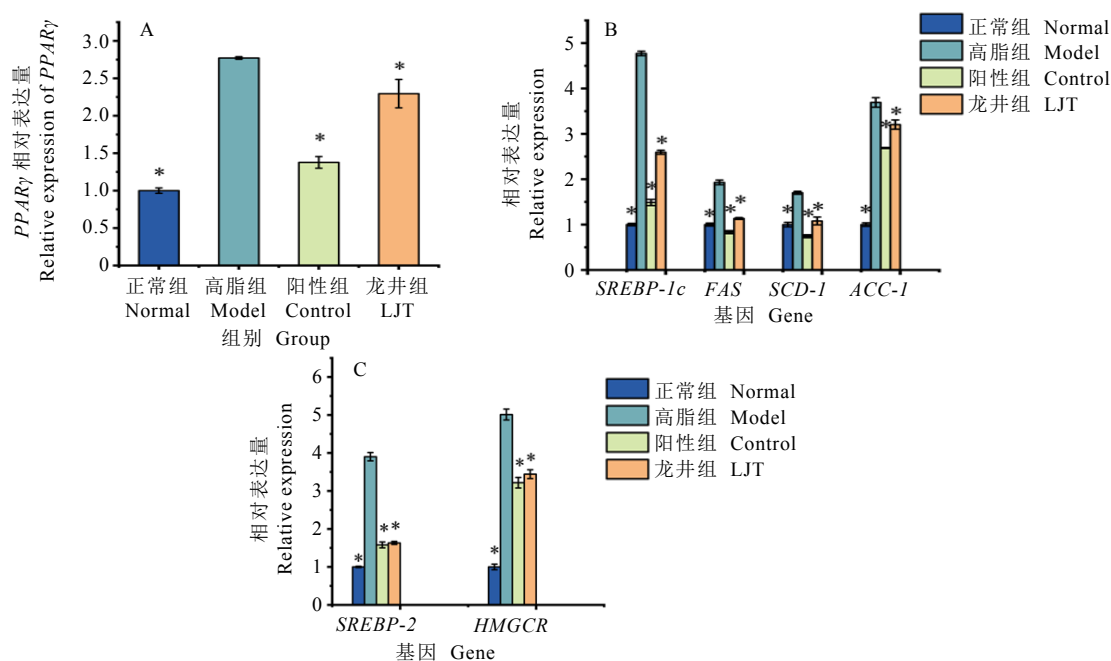


图 6 小鼠肝组织脂质代谢基因相对表达量

Fig. 6 Relative expressions of lipid metabolism genes in mouse liver

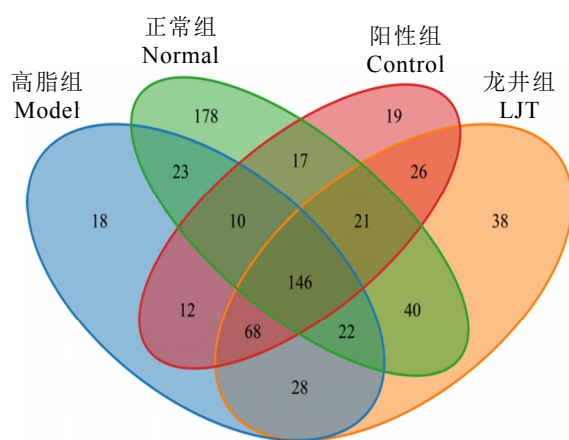


图 7 OTUs 韦恩图

Fig. 7 OTUs Venn diagram

2.7.1 肠道菌群的多样性分析

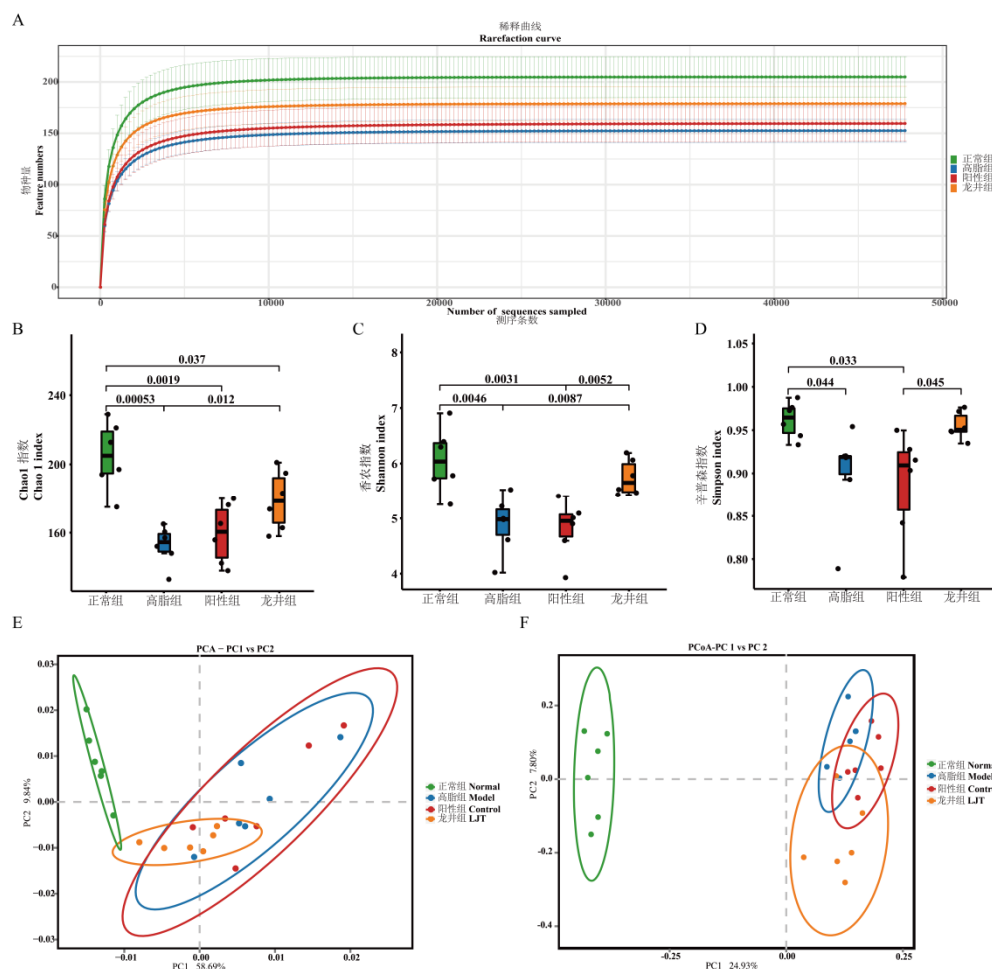
由稀释曲线 (图 8A) 可知, 样品测序量充分, 测序深度足以覆盖大多数菌群, 可进行数据分析。菌群物种的多样性和丰度由 α 多样性分析体现 (图 8B~D), 由 Chao1 指数图可见, 与正常组相比, 高脂组小鼠肠道菌群丰度极显著降低 ($P<0.01$), 阳性组和龙井组显著

降低 ($P<0.05$); 由香农指数和辛普森指数所示, 正常组菌群多样性良好, 高脂饮食导致肠道菌群多样性显著降低; 与高脂组相比, 龙井组香农指数显著增高 ($P<0.05$), 而正常组、龙井组之间辛普森指数无显著差异。

β 多样性主要通过 PCA 和 PCoA 体现出来 (图 8E 和 8F), 由 PCA 图 (PC1 和 PC2 分别占小鼠肠道菌群结构总体差异的 58.69% 和 9.84%) 结果可知, 正常组与高脂组、阳性组、龙井组肠道菌群组成结构两两之间存在差异, 但是鸠坑龙井茶干预后小鼠肠道菌群的组成结构趋近于正常组, 说明鸠坑龙井茶具有改善高脂饮食导致的小鼠肠道菌群多样性紊乱效应, 并且促使小鼠肠道菌群结构趋向于正常组小鼠肠道菌群生态。

2.7.2 肠道菌群组成分析

肠道菌群各水平上分布如图 9 所示。在门水平上主要检测到 Firmicutes、Bacteroidota、Desulfobacterota 和 Actinobacteriota 等 4 种菌群 (图 9A)。与正常组相比, 高脂组小鼠肠

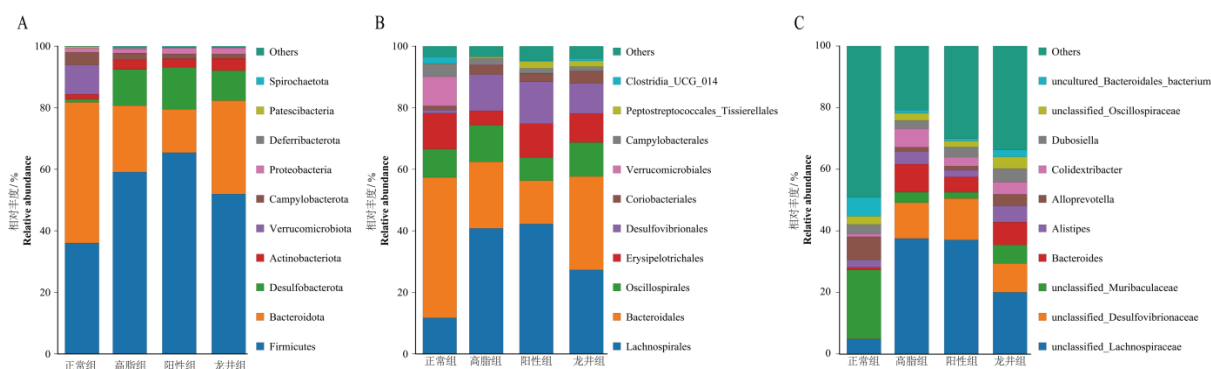


注: A 为稀释曲线, B 为 Chao1 指数, C 为香农指数, D 为辛普森指数, E 为 PCA 图, F 为 PCoA 图

Note: A, Dilution curve. B, Chao1 index. C, Shannon index. D, Simpson index. E, PCA diagram. F, PCoA diagram

图 8 小鼠肠道菌群多样性分析

Fig. 8 Diversity analysis of gut microbiota in mice



注: A 为门水平上菌群分布, B 为目水平菌群分布, C 为属水平菌群分布

Note: A, distribution at the level of the phylum. B, distribution of bacteria at the level of the order. C, distribution of bacteria at the level of the genus

图 9 各水平上菌种分布

Fig. 9 Species distribution at each level

道菌群中 *Desulfobacterota* 的相对丰度增加, 并且 *Firmicutes/Bacteroidota* 比值 (F/B 值) 提高; 经龙井茶干预后, 小鼠肠道菌群中 *Firmicutes* 相对丰度降低, *Bacteroidota* 相对丰度增加, F/B 值降低趋势明显, 显示小鼠肠道菌群组成有改善效果。

在目水平上主要检测到 *Lachnospirales*、*Bacteroidales*、*Oscillospirales*、*Erysipelotrichales*、*Desulfovibrionales*、*Coriobacteriales* 等菌群(图 9B)。与正常组相比, 高脂组小鼠肠道菌群中 *Lachnospirales*、*Desulfovibrionales*、*Oscillospirales*、*Coriobacteriales*、*Peptostreptococcales*、*Tissierellales* 的相对丰度升高, 而 *Bacteroidales*、*Erysipelotrichales*、*Verrucomicrobiales*、*Campylobacteriales* 和 *Clostridia_UCG_014* 的相对丰度降低; 阳性组小鼠肠道菌群中 *Lachnospirales*、*Peptostreptococcales*、*Tissierellales*、*Erysipelotrichales* 和 *Clostridia_UCG_014* 相对丰度进一步升高, *Bacteroidales*、*Oscillospirales* 和 *Campylobacteriales* 相对丰度降低; 龙井组小鼠肠道菌群中 *Lachnospirales*、*Desulfovibrionales* 和 *Campylobacteriales* 相对丰度降低, 同时 *Bacteroidales*、*Erysipelotrichales*、*Coriobacteriales*、*Peptostreptococcales*、*Tissierellales* 和 *Clostridia_UCG_014* 相对丰度升高。

小鼠的肠道菌群在属水平的分布如图 9C 所示。与正常组相比, 高脂组小鼠肠道菌群中 *unclassified_Lachnospiraceae*、*unclassified_Desulfovibrionaceae*、*Bacteroides*、*Alistipes* 和 *Colidextribacter* 的相对丰度上调, 同时 *unclassified_Muribaculaceae*、*Alloprevotella* 和 *uncultured_Bacteroidales_bacterium* 相对丰度下调; 阳性组小鼠肠道菌群经阳性药物干预后, *unclassified_Muribaculaceae*、*Bacteroides*、*Colidextribacter* 和 *Alistipes* 相对丰度下降, 而 *unclassified_Desulfovibrionaceae* 相对丰度上升; 龙井组小鼠肠道菌群经鸠坑龙井茶干预后, *unclassified_Lachnospiraceae*、*unclassified_Desulfovibrionaceae*、*Bacteroides* 和 *Colidextri-*

bacter 相对丰度下降, *unclassified_Muribaculaceae*、*Alloprevotella*、*Alistipes*、*unclassified_Oscillospiraceae* 和 *Dubosiella* 相对丰度上升。

2.7.3 LEfSe 分析

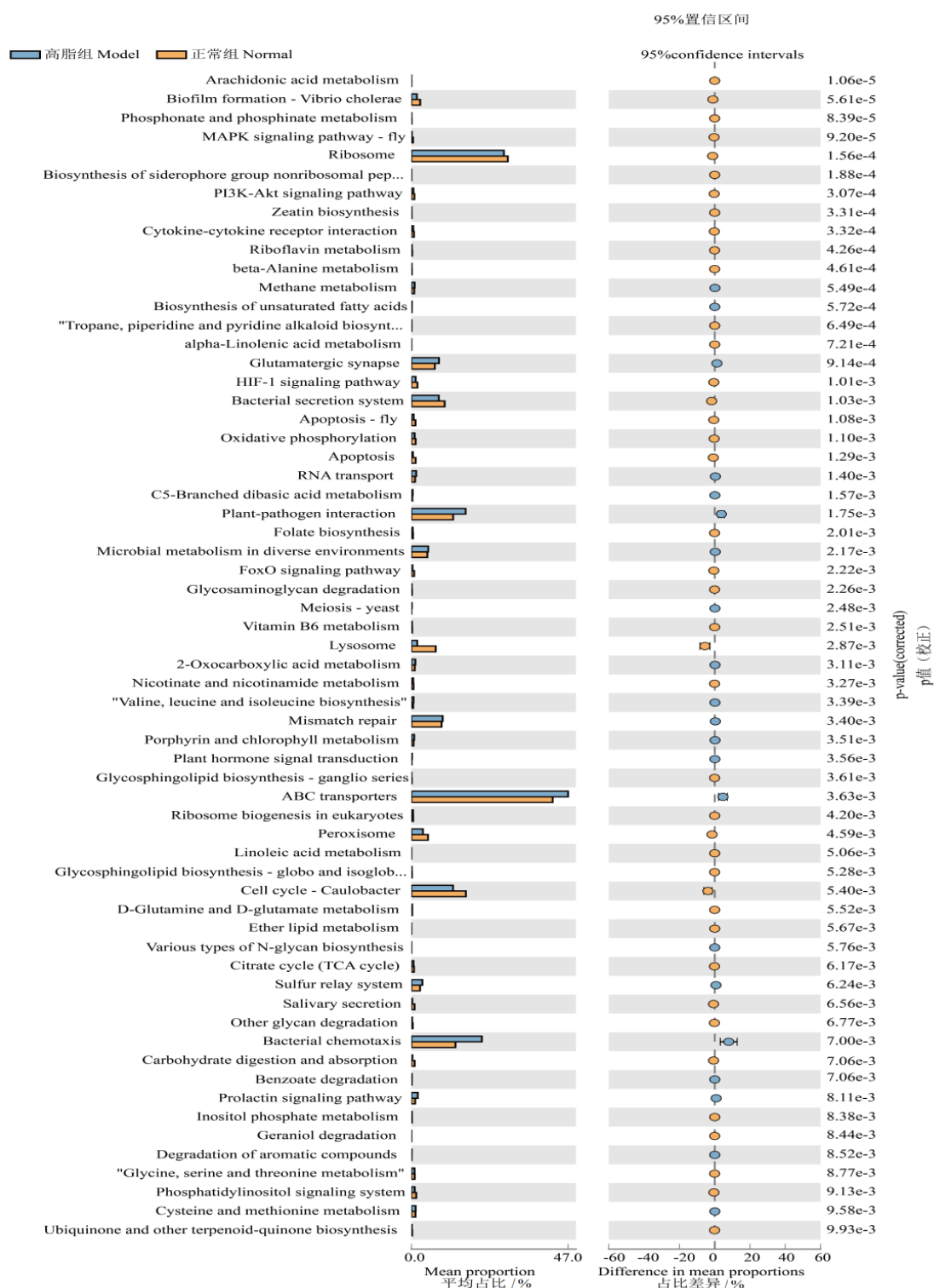
经 LEfSe 多级物种差异线性判别分析 ($LDA \geq 4$), 各组小鼠体内菌群变化结果如图 10 所示。正常组小鼠肠道中主要标志性菌属为 *unclassified_Muribaculaceae*、*Akkermansia*、*Ileibacterium*、*Alloprevotella*、*uncultured_Bacteroidales_bacterium*、*Lachnospiraceae_NK4A136_group* 和 *unclassified_Clostridia_UCG_014*; 高脂组小鼠主要标志性菌属为 *Bacteroides* 和 *Colidextribacter*; 阳性组小鼠主要标志性菌属为 *unclassified_Desulfovibrionaceae*、*Faecalibaculum*、*Blautia* 和 *Candidatus_Stoquefichus*; 龙井组标志性菌属主要为 *Erysipelatoclostridium*。

2.7.4 KEGG 通路功能性预测分析

由图 11A 所示, 与正常组相比, 高脂组下调花生四烯酸代谢、磷酸盐和次磷酸盐代谢、核黄素代谢、丙氨酸代谢、 α -亚麻酸代谢、维生素 B6 代谢、烟酸和烟酰胺代谢、亚油酸代谢、*D*-谷氨酰胺和 *D*-谷氨酸代谢、入脂代谢、磷酸肌醇代谢和甘氨酸, 丝氨酸和苏氨酸代谢, 上调甲烷代谢、C5-支链二元酸代谢、2-氧羧酸代谢、卟啉与叶绿素代谢和半胱氨酸、蛋氨酸代谢。由图 11B 所示, 与高脂组相比, 龙井组下调次生代谢的生物合成、C5-支链二元酸代谢、淀粉和蔗糖代谢、氨基酸代谢和氮代谢, 推测鸠坑龙井茶具有调节 C5-支链二元酸代谢作用。

2.7.5 小鼠肠道菌群丰度与生化指标相关性分析

肠道菌群丰度与小鼠生化指标相关性结果如图 12A 所示。小鼠体质量与 *Patescibacteria* 相对丰度负相关; TG 含量与 *Bacteroidota* 和 *Patescibacteria* 相对丰度负相关, 与 *Desulfobacterota* 相对丰度正相关; LDL-C 含量与 *Bacteroidota*、*Cyanobacteria*、*Patescibacteria* 和 *Verrucomicrobiota* 相对丰度

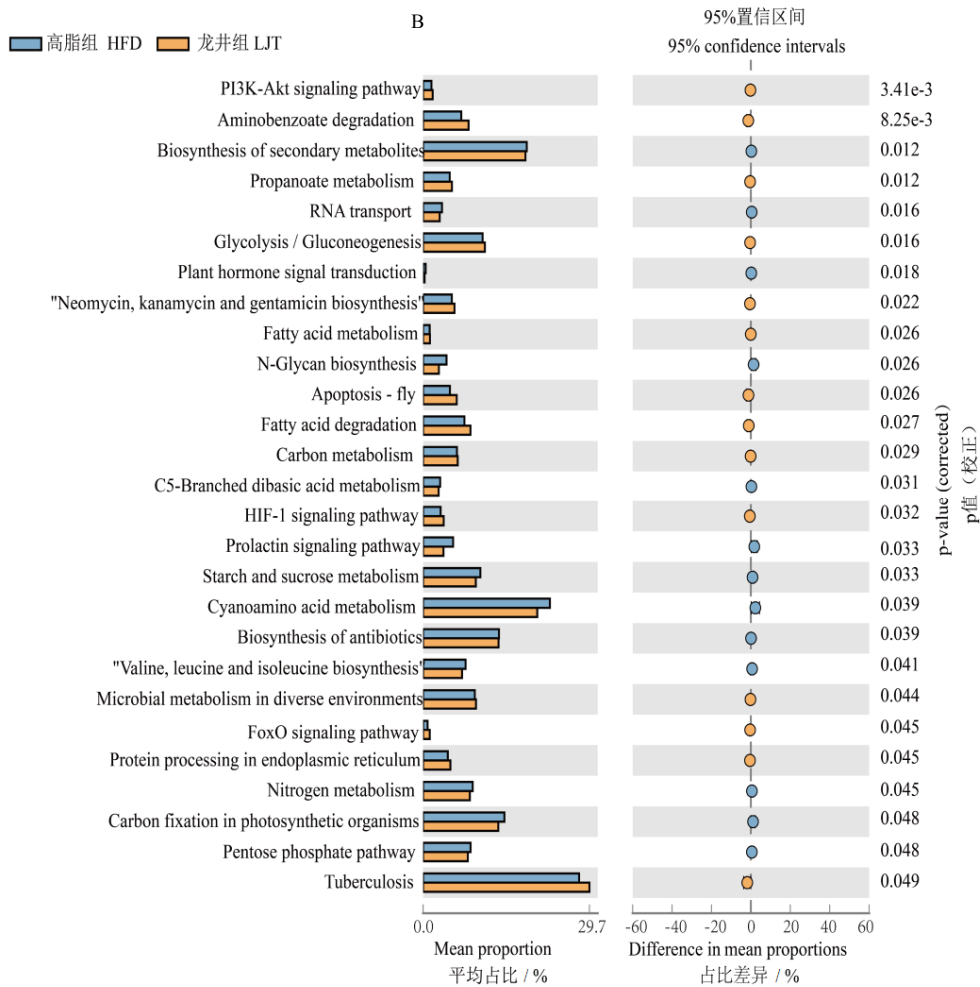


注：A 为正常组与高脂组 KEGG 对比（由于数据过多，仅展示人类疾病分类且 $P < 0.01$ ），B 为高脂组与龙井组 KEGG 对比

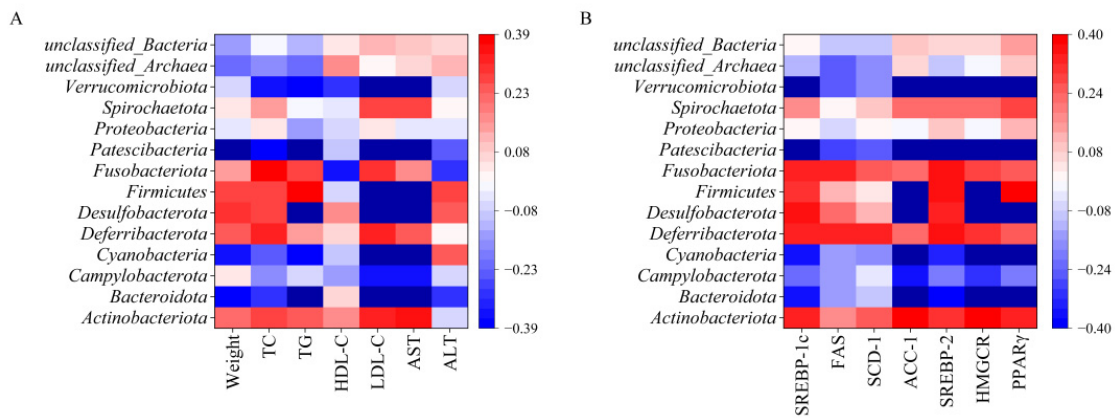
Note: A, KEGG comparison between the normal group and the HFD (due to the excessive data, only human disease and $P < 0.01$ parts are displayed). B, KEGG comparison between HFD and LJT

图 11 KEGG 功能差异图

Fig. 11 Difference of KEGG function



续图 11
Continued Fig. 11



注: A 为小鼠体质量、血清生化指标与肠道菌群丰度相关性, B 为小鼠肝脂质代谢基因相对表达量与肠道菌群丰度相关性
Note: A, correlation between body weight and serum biochemical indices and the relative abundance of gut microbiota in mice.
B, correlation between the relative expression of lipid metabolism genes and the relative abundance of gut microbiota in mice

图 12 肠道菌群丰度与小鼠生化指标相关性

Fig. 12 Correlation between the relative abundance of gut microbiota and biochemical indices in mice

和 *Firmicutes* 相对丰度正相关。其中, 与小鼠体质量及血清指标相关性最高的肠道菌种为 *Bacteroidota* 和 *Firmicutes*。

肠道菌群丰度与小鼠肝脂质代谢通路基因相对含量相关性分析如图 12B 所示。SREBP-1 基因相对含量与 *Patescibacteria*、*Verrucomicrobiota* 和 *unclassified_Archaea* 相对丰度呈负相关, ACC-1 基因相对含量与 *Bacteroidota*、*Cyanobacteria*、*Patescibacteria* 和 *Verrucomicrobiota* 相对丰度呈负相关, 与 *Desulfovibacterota* 和 *Firmicutes* 呈正相关; SREBP-2 基因相对含量与 *Patescibacteria* 和 *Verrucomicrobiota* 相对丰度呈负相关; HMGCR 基因相对含量与 *Bacteroidota*、*Cyanobacteria*、*Patescibacteria* 和 *Verrucomicrobiota* 相对丰度呈正相关; 与 *Desulfovibacterota* 和 *Firmicutes* 相对丰度呈正相关; PPAR γ 基因相对含量与 *Bacteroidota*、*Campylobacterota*、*Cyanobacteria*、*Patescibacteria* 和 *Verrucomicrobiota* 相对丰度呈负相关, 与 *Desulfovibacterota* 相对丰度呈正相关。其中, 小鼠肝脂质代谢基因相对含量与 *Verrucomicrobiota*、*Bacteroidota* 和 *Cyanobacteria* 肠道菌种丰度相关性最高。

3 讨论

本研究以 C57BL/6 小鼠为研究对象, 经 9 周高脂饮食诱导模型组小鼠血脂升高、肝组织脂肪变性、糖耐受能力下降和肠道菌群紊乱, 与相关研究报道结果具有相似性^[17-20], 进一步佐证本研究中 NAFL 小鼠造模成功的科学性和可信度。与高脂组相比, 经龙井茶水提物干预, 小鼠的体质量、血脂水平、肝组织脂肪变性症状得到缓解, 小鼠肠道菌群多样性和丰度明显增加并趋于正常组肠道菌群生态。

在脂肪代谢过程中, PPAR γ 是启动脂肪细胞分化的起点^[21]。PPAR γ 在脂肪分化方面具有决定性作用^[22]。SREBP-1c 可靶向促进脂质合成基因 *ACC-1*、*FAS*、*SCD-1* 的表达, 推动脂肪酸的合成, 在 TG 和 TC 合成中发挥重

要作用^[23], 其异常高表达会导致肝 TG 积累和脂代谢紊乱。通过龙井茶水提物干预, 促使高脂饮食诱导的小鼠肝组织脂肪合成关键酶 AMPK 活性增强, 调控脂质代谢通路信号 p-ACC-1/ACC-1 比例升高, 降低 ACC-1 蛋白质表达水平, 从而抑制脂肪酸合成, 减少肝组织脂质蓄积^[24]。本研究结果显示, 鸠坑龙井茶水提物具有抑制脂质代谢通路 SREBP-1c 及其下游脂联素基因 *SCD-1*、*FAS* 和 *ACC-1* 的相对表达量, 阻断肝组织脂肪持续堆积, 延缓肝组织脂肪变性, 进而缓解 NAFLD 的进展。

SREBPs 存在 3 种形式的亚型, 除 SREBP-1c 外还存在 SREBP-1a 和 SREBP-2^[25]。SREBP-2 是体内参与调节细胞胆固醇代谢合成相关酶类的基因调控因子, 可直接作用于 TC 合成途径的限速酶 HMGCR, 从而直接调节胆固醇的合成, 同时还反馈调节减少内源性胆固醇的生物合成^[26]。本研究结果显示, 鸠坑龙井茶水提物具有降低小鼠肝组织 *SREBP-2* 和 *HMGCR* 基因相对表达量, 减少肝脏内胆固醇从头合成。

人体肠道中寄生的细菌数量有近 10^{14} , 调控人体对摄入饮食的消化吸收, 是决定能量转化率的重要组分。本研究结果显示, 鸠坑龙井茶水提物能够改善 NAFLD 小鼠的肠道菌群结构, 使其接近正常小鼠肠道菌群的生态。肠道菌群在门水平中的主要菌为 *Bacteroidota*、*Firmicutes*、*Actinobacteriota* 和 *Proteobacteria*, 占肠道菌群的 98%, 肠道和肝脏通过门静脉直接关联, 通过“肠-肝轴”影响肝脏脂质代谢^[27], 肠道菌群失衡是促进 NAFLD 的重要因素^[28]。已有研究报道, 高脂饮食 C57BL/6 小鼠与正常饮食小鼠相比, 肠道菌群中厚壁菌门的种类和数量增加, 而拟杆菌门的种类和数量下降^[29], F/B 值升高^[30], F/B 值常被用来作为肠道菌群有序性的评判标准。本研究结果证实了高脂饮食能够引起小鼠肠道菌群中 F/B 值升高, 而龙井组小鼠肠道菌群 F/B 值下降, 表明鸠坑龙井水提物具有调节和改善小鼠肠道菌群紊乱的

作用效应。

Guo 等^[31]研究发现, *Desulfovibrionales* 在结肠中产生 H₂S, 抑制结肠上皮细胞呼吸作用^[32], 抑制丁酸盐等短链脂肪酸 (SCFAs) 的生成。本研究发现, *Desulfovibrionales* 在高脂组小鼠肠道菌群中相对丰度上升, 而在龙井组相对丰度下降。Carter 等^[33]研究发现, *Lachnospiraceae* 和 *Erysipelotrichales* 能促进丁酸盐的产生, *Muribaculaceae* 相对丰度与丙酸含量有很强的相关性^[34], 丁酸可刺激食欲抑制激素分泌, 促脂质代谢从而减缓 NAFLD^[35-36]。本研究分析发现, 鸠坑龙井茶水提物干预后, 小鼠肠道菌群中 *Muribaculaceae*、*Lachnospiraceae* 和 *Erysipelotrichales* 相对丰度增加, 表明鸠坑龙井茶水提物具有促进肠道菌群代谢产生友好型短链脂肪酸的效应, 进而缓解小鼠 NAFLD 症状。

参考文献

- [1] Hardy T, Oakley F, Anstee Q M, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and disease spectrum [J]. Annual Review of Pathology, 2016, 11: 451-496.
- [2] Paternostro R, Trauner M. Current treatment of non-alcoholic fatty liver disease [J]. Journal of Internal Medicine, 2022, 292(2): 190-204.
- [3] Brouwers M C G J, Simons N, Stehouwer C D A, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular disease: assessing the evidence for causality [J]. Diabetologia, 2020, 63(2): 253-260.
- [4] Carmiel-Haggai M, Cederbaum A I, Nieto N. A high-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats [J]. The FASEB Journal, 2005, 19(1): 136-138.
- [5] El-Koofy N M, Anwar G M, El-Raziky M S, et al. The association of metabolic syndrome, insulin resistance and non-alcoholic fatty liver disease in overweight/obese children [J]. Saudi Journal of Gastroenterology, 2012, 18(1): 44-49.
- [6] Powell E E, Wong V W, Rinella M. Non-alcoholic fatty liver disease [J]. Lancet, 2021, 397(10290): 2212-2224.
- [7] Bashiardes S, Shapiro H, Rozin S, et al. Non-alcoholic fatty liver and the gut microbiota [J]. Molecular Metabolism, 2016, 5(9): 782-794.
- [8] Charroux B, Royet J. Gut-derived peptidoglycan remotely inhibits bacteria dependent activation of SREBP by *Drosophila* adipocytes [J]. Plos Genetics, 2022, 18(3): e1010098. doi: 10.1371/journal.pgen.1010098.
- [9] 朱萌, 邵晨阳, 张悦, 等. 不同茶树品种龙井茶香气成分差异分析[J]. 食品工业科技, 2018, 39(23): 241-246, 254. Zhu Y, Shao C Y, Zhang Y, et al. Comparison of differences in aroma constituents of Longjing tea produced from different tea germplasms [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(23): 241-246, 254.
- [10] 孙达, 龚恕, 崔宏春, 等. 不同品种茶树春秋鲜叶超微绿茶粉适制性研究 [J]. 浙江农业学报, 2021, 33(3): 437-446. Sun D, Gong S, Cui H C, et al. Suitability of fresh spring and autumn leaves from different tea cultivars for ultramicro green tea powder production [J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2021, 33(3): 437-446.
- [11] 王素敏, 徐欢欢, 黄业伟, 等. 茶多酚的降脂作用及其机制研究进展[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(10): 219-224. Wang S M, Xu H H, Huang Y W, et al. Review on the effect of tea polyphenols in hypolipidemic and its mechanism [J]. Food Research and Development, 2016, 37(10): 219-224.
- [12] Li B Y, Li H Y, Zhou D D, et al. Effects of different green tea extracts on chronic alcohol induced-fatty liver disease by ameliorating oxidative stress and inflammation in mice [J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 5188205. doi: 10.1155/2021/5188205.
- [13] Ma H, Zhang B, Hu Y, et al. The novel intervention effect of cold green tea beverage on high-fat diet induced obesity in mice [J]. Journal of Functional Foods, 2020, 75: 104279. doi: 10.1016/j.jff.2020.104279.
- [14] 王忠民, 吴谋成, 李小定, 等. 葡萄糖的提取及含量测定[J]. 新疆农业大学学报, 2002, 25(2): 57-58. Wang Z M, Wu M C, Li X D, et al. Extraction and contents, measurement of the VLP [J]. Journal of Xinjiang Agricultural University, 2002, 25(2): 57-58.
- [15] Li M, Xu J, Zhang Y, et al. Comparative analysis of fecal metabolite profiles in HFD-induced obese mice after oral administration of Huangjinya green tea extract [J]. Food and Chemical Toxicology, 2020, 145: 111744. doi: 10.1016/j.fct.2020.111744.
- [16] 冯琳, 龚自明, 刘盼盼, 等. 青砖毛茶对高脂饮食小鼠肠道微生物的影响[J]. 中国食品学报, 2021, 21(7): 87-96.

- Feng L, Gong Z M, Liu P P, et al. Effects of Qingzhuan Maocha on gut microbiota in high-fat diet fed mice [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(7): 87-96.
- [17] Ma H, Zhang B, Hu Y, et al. Correlation analysis of intestinal redox state with the gut microbiota reveals the positive intervention of tea polyphenols on hyperlipidemia in high fat diet fed mice [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(26): 7325-7335.
- [18] Velázquez K T, Enos R T, Bader J E, et al. Prolonged high-fat-diet feeding promotes non-alcoholic fatty liver disease and alters gut microbiota in mice [J]. World Journal of Hepatology, 2019, 11(8): 619-637.
- [19] Aydos L R, Do Amaral L A, De Souza R S, et al. Nonalcoholic fatty liver disease induced by high-fat diet in C57BL/6 models [J]. Nutrients, 2019, 11(12): 3067. doi: 10.3390/nu11123067.
- [20] Yin J, Li Y, Han H, et al. Melatonin reprogramming of gut microbiota improves lipid dysmetabolism in high-fat diet-fed mice [J]. Journal of Pineal Research, 2018, 65(4): e12524. doi: 10.1111/jpi.12524.
- [21] 黄玉晶. 邻苯二甲酸酯母体暴露对早产和胎儿发育的影响及过氧化物酶体增殖物激活受体在其中的作用研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2014.
- Huang Y J. The role of peroxisome proliferator activated receptor in the effects of gestation exposure to phthalates on preterm delivery and fetal development [D]. Chongqing: Army Medical University, 2014.
- [22] 刘亚茹, 苗志国, 高明磊, 等. PPAR γ 在动物脂肪发育中的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2019(1): 32-35.
- Liu Y R, Miao Z G, Gao M L, et al. Research advance on PPAR γ in animal adipose tissue [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2019(1): 32-35.
- [23] Shi W, Hou T, Guo D, et al. Evaluation of hypolipidemic peptide (Val-Phe-Val-Arg-Asn) virtual screened from chickpea peptides by pharmacophore model in high-fat diet-induced obese rat [J]. Journal of Functional Foods, 2019, 54: 136-145.
- [24] Geng T T, Liu Y, Xu Y T, et al. H19 lncRNA promotes skeletal muscle insulin sensitivity in part by targeting AMPK [J]. Diabetes, 2018, 67(11): 2183-2198.
- [25] Loregger A, Raaben M, Nieuwenhuis J, et al. Haploid genetic screens identify SPRING/C12ORF49 as a determinant of SREBP signaling and cholesterol metabolism [J]. Nature Communications, 2020, 11: 1128. doi: 10.1038/s41467-020-14811-1.
- [26] Wei S, Espenshade P J. Expanding roles for SREBP in metabolism [J]. Cell Metabolism, 2012, 16(4): 414-419.
- [27] Milosevic I, Vujovic A, Barac A, et al. Gut-liver axis, gut microbiota, and its modulation in the management of liver diseases: a review of the literature [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(2): 395. doi: 10.3390/ijms20020395.
- [28] Soderborg T K, Clark S E, Mulligan C E, et al. The gut microbiota in infants of obese mothers increases inflammation and susceptibility to NAFLD [J]. Nature Communications, 2018, 9: 4462. doi: 10.1038/s41467-018-06929-0.
- [29] Ley R E, Bäckhed F, Turnbaugh P, et al. Obesity alters gut microbial ecology [J]. PNAS, 2005, 102(31): 11070-11075.
- [30] Do M H, Lee H B, Oh M J, et al. Polysaccharide fraction from greens of *Raphanus sativus* alleviates high fat diet-induced obesity [J]. Food Chemistry, 2021, 33: 128395. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.128395.
- [31] Guo J L, Han X, Zhan J C, et al. Vanillin alleviates high fat diet-induced obesity and improves the gut microbiota composition [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2733. doi: 10.3389/fmicb.2018.02733.
- [32] Beaumont M, Andriamihaja M, Lan A, et al. Detrimental effects for colonocytes of an increased exposure to luminal hydrogen sulfide: the adaptive response [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2016, 93: 155-164.
- [33] Carter J K, Bhattacharya D, Borgerding J N, et al. Modeling dysbiosis of human NASH in mice: loss of gut microbiome diversity and overgrowth of *Erysipelotrichales* [J]. Plos One, 2021, 16(1): e0244763.
- [34] Smith B J, Miller R A, Ericsson A C, et al. Changes in the gut microbiome and fermentation products concurrent with enhanced longevity in acarbose-treated mice [J]. BMC Microbiology, 2019, 19: 130. doi: 10.1186/s12866-019-1494-7.
- [35] Musso G, Gambino R, Cassader M. Obesity, diabetes, and gut microbiota: the hygiene hypothesis expanded? [J]. Diabetes Care, 2010, 33(10): 2277-2284.
- [36] Den Besten G, Bleeker A, Gerding A, et al. Short-chain fatty acids protect against high-fat diet-induced obesity via a PPAR γ -dependent switch from lipogenesis to fat oxidation [J]. Diabetes, 2015, 64(7): 2398-2408.

机构简介

安徽农业大学茶树生物学与资源利用国家重点实验室

茶学学科是安徽农业大学的传统优势学科，前身为 1939 年创建的复旦大学农学院茶叶专修科，是全国茶学学科的摇篮。茶树生物学与资源利用国家重点实验室是在著名茶学家王泽农、陈椽教授等创建的茶学专业实验室基础上发展而成，实验室先后获批农业部(1997 年)、安徽省(1998 年)、教育部(2003 年)重点实验室，并于 2015 年 1 月 20 日获批为科技部和安徽省共建的国家重点实验室，2016 年 11 月获教育部批准建设茶叶化学与健康国际合作联合实验室，2017 年，依托的茶学学科入选安徽省世界一流学科奖补资金项目，2018 年 3 月成为安徽省实验室(首批十个之一)。

实验室现有使用面积 12 000 m²，固定人员 71 名，其中教授 31 名、副教授 27 名。国家级人才 4 人、安徽省学术与技术带头人 8 人、安徽省高校拔尖人才 5 人、国家茶叶产业技术体系岗位专家 1 人、安徽省茶叶产业体系岗位专家 11 人，已形成了一支拥有 20 个 PI 研究团队、多学科交叉的研究队伍，并获批为安徽省首批省级科技创新团队、安徽省 115 产业创新团队、教育部创新团队发展计划”创新团队、“全省十大优秀产业创新团队”、第五届“全国专业技术人员先进集体”、首批“全国高校黄大年式教师团队”“111”引智基地。

实验室自 2015 年获批建设以来，承担国家级及省部级项目或课题 205 项(包括国家重点研发项目 2 项、区域联合基金重点项目 4 项、国基金国际合作重点项目 1 项、国家自然科学基金 47 项、省攻关项目 42 项)；发表 SCI 论文 556 篇(其中 JCR 一区 SCI 论文 396 篇)；获得授权的国家发明专利 103 项；开发 12 个茶叶新产品；制修订国家和国际标准 6 项；选育 7 个省级以上茶树新品种，其中国家级品种 4 个；转化科研成果 32 项；获得省部级及其以上科技成果奖 14 项，其中国家科学技术进步二等奖 1 项，安徽省科学技术一等奖 2 项。在茶树基因组学、次生代谢与茶叶化学、茶与健康研究方向上优势明显，并在国内外同领域具有显著的学术影响力。

茶树生物学与资源利用国家重点实验室以“创新机制、突出特色，坚持标准、省部共建、以省为主”为建设运行原则，针对国内外茶叶科技与茶产业发展趋势，以茶学领域科学问题和茶产业需求为导向，以茶产业特色和重大需求为指引，并依托单位的学科优势，围绕茶树生理生态与种质创新、茶树次生代谢与品质化学、茶的健康功能及作用机制、茶叶质量安全与加工利用四个方向，开展茶树生物学与资源利用领域的基础理论与共性技术研究，发挥聚集培育人才、原始创新、交流合作、技术开发和科技服务五项职能，形成新理论、新知识，新品种、优原料，新功效、新用途，新技术、新产品等创新成果，打造国内重要的茶叶科学与技术的研究基地、优秀科技人才荟萃之地、高层次人才培育基地，为我省以及全国茶产业的健康可持续发展提供重要的人才保障和科技支撑。

地址：安徽省合肥市长江西路 130 号安徽农业大学，邮编：230036

电话：0551-65786765，65780360 传真：0551-65780360

E-mail: tealab@ahau.edu.cn 网址：tealab.ahau.edu.cn



《茶叶科学》第九届编辑委员会

主任委员 (Chairman): 陈宗懋 (CHEN Zongmao) 刘仲华 (LIU Zhonghua)
副主任委员 (Vice-Chairman): 姜仁华 (JIANG Renhua) 李大祥 (LI Daxiang)
王岳飞 (WANG Yuefei)

成员 (Member of Editorial Board):

Eliud Kiplimo Kireger (肯尼亚籍)	何青元: 研究员	唐 茜: 教授
Hang Xiao (美国籍)	黄建安: 教授	童华荣: 教授
Huafu Wang (英国籍)	黄晓琴: 副教授	王新超: 研究员
I Sarath B Abeysinghe (斯里兰卡籍)	黄友谊: 教授	王岳飞: 教授
Maichael C. Qian (美国籍)	江用文: 研究员	王 云: 研究员
N. Muraleedharan (印度籍)	姜仁华: 研究员	韦静峰: 研究员
Shigehiro Kodomari (日本籍)	黎星辉: 教授	韦 康: 研究员
Xianquan Shi (加拿大籍)	李大祥: 教授	武传宇: 教授
陈常颂: 研究员	李 鑫: 研究员	夏 涛: 教授
陈红平: 研究员	李中林: 研究员	肖文军: 教授
陈华才: 研究员	林金科: 教授	颜建云: 教授
陈 亮: 研究员	刘少群: 副研究员	杨秀芳: 研究员
陈宗懋: 研究员	刘仲华: 教授	杨子银: 研究员
丁 勇: 研究员	陆建良: 教授	尹军峰: 研究员
丁兆堂: 教授	吕才有: 教授	尤志明: 研究员
杜琪珍: 研究员	吕立堂: 教授	余有本: 教授
房婉萍: 教授	倪德江: 教授	曾 亮: 教授
高立志: 教授	阮建云: 研究员	张丽霞: 教授
高士伟: 研究员	宋传奎: 教授	张曙光: 研究员
龚加顺: 教授	宋志禹: 副研究员	张正竹: 教授
关剑平: 教授	苏祝成: 教授	章明奎: 教授
管 曦: 副教授	孙威江: 教授	周 利: 研究员
何普明: 教授	汤 哲: 教授	周玉峰: 研究员
	唐劲驰: 研究员	

茶 叶 科 学 (Chaye Kexue)

(双月刊, 1964年创刊)

2023年 第43卷 第4期

JOURNAL OF TEA SCIENCE

(Bi-monthly, Started in 1964)

2023 Vol. 43 No. 4

主管单位: 中国科学技术协会
主办单位: 中国茶叶学会
中国农业科学院茶叶研究所
编辑出版: 《茶叶科学》编辑部
主 编: 江用文
执行主编: 翁 蔚
副 主 编: 谷记平
责任编辑: 黄 晨 赵 锋
地 址: 浙江省杭州市梅灵南路9号, 邮编: 310008
电 话: 0571-86651482、86651902
邮 箱: cykx@vip.163.com
网 址: www.tea-science.com
印 刷: 杭州嘉业印务有限公司
出版日期: 2023年8月15日

Responsible Institution: China Association for
Science and Technology
Sponsored by: China Tea Science Society
Tea Research Institute, CAAS
Editing and Publishing: Editorial Office, Journal of
Tea Science
Editor-in-Chief: JIANG Yongwen
Executive Editors-in-Chief: WENG Wei
Associate Editor-in-Chief: GU Jiping
Editors in Charge: HUANG Chen ZHAO Feng
Address: Editorial Office Journal of Tea Science, 9 South
Meiling Road, Hangzhou 310008, P. R. China
Tel: +86-571-86651482, 86651902
E-mail: cykx@vip.163.com
Website: www.tea-science.com
Publishing date: 8-15-2023

ISSN 1000-369X CODEN-CHKEF4 国外发行代码: SA6717
CN 33-1115/S

国内定价: 300元/年
国外定价: US \$ 300/year