



普通高等教育“十三五”规划教材
普通高等教育茶学专业教材



TEA BIOTECHNOLOGY

茶叶生物技术

李远华 主编



中国轻工业出版社 | 全国百佳图书出版单位

普通高等教育“十三五”规划教材

普通高等教育茶学专业教材

茶叶生物技术

李远华 主编

 中国轻工业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

茶叶生物技术/李远华主编. —北京: 中国轻工业出版社, 2017. 6

普通高等教育“十三五”规划教材 普通高等教育茶学专业教材

ISBN 978-7-5184-1369-0

I. ①茶… II. ①李… III. ①茶叶—生物工程—高等学校—教材 IV. ①TS272

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2017) 第 077414 号

责任编辑: 贾 磊

加工编辑: 方朋飞 责任终审: 孟寿萱 封面设计: 锋尚设计

版式设计: 宋振全 责任校对: 晋 洁 责任监印: 张 可

出版发行: 中国轻工业出版社 (北京东长安街 6 号, 邮编: 100740)

印 刷: 北京君升印刷有限公司

经 销: 各地新华书店

版 次: 2017 年 6 月第 1 版第 1 次印刷

开 本: 787×1092 1/16 印张: 18.75

字 数: 410 千字

书 号: ISBN 978-7-5184-1369-0 定价: 44.00 元

邮购电话: 010-65241695 传真: 65128352

发行电话: 010-85119835 85119793 传真: 85113293

网 址: <http://www.chlip.com.cn>

Email: club@chlip.com.cn

如发现图书残缺请直接与我社邮购联系调换

151418J1X101ZBW

本书编写人员

主 编

李远华（武夷学院）

副主编

陆建良（浙江大学）

黄友谊（华中农业大学）

参 编（按姓氏笔画排序）

叶江华（武夷学院）

朱旭君（南京农业大学）

李亚莉（云南农业大学）

袁连玉（西南大学）

郭玉琼（福建农林大学）

蒋家月（安徽农业大学）

曾 亮（西南大学）

前言

我国是世界第一大产茶国，为茶产业培养优秀人才是茶学学科教学的重要责任。茶学学科属应用型学科，可从农学延伸到文化精神和市场营销。茶学学科不仅涉及农学，还涉及医学、药学、天然产物化学、功能食品学和软饮料科学等非茶学学科。茶叶产业链也由传统的育种、栽培、加工、贸易延伸到药业、生物化学、分子生物学、保健品、功能食品、食品添加剂、饮料工业、日化工业等多个新型产业领域。

茶叶生物技术是顺应茶学学科发展的新时代产物，是茶学与生物技术相结合的交叉学科，目的是利用生物技术解决茶产业面临的问题。目前我国未见专门的此类著作，与其他学科相比较为滞后，迫切需要编撰出版。为此，本人组织了国内开设有茶学学科的相关高校教师编写本书，编者全部是具有博士学位的茶学骨干教师，很多人具有国际学术交流背景。他们认真阅览了国内外先进的生物技术相关论文和书籍，结合茶产业的发展现状，撰写了具有很强专业性、学术性、权威性的章节。本书填补了茶学学科生物技术方面的空白，是一本很有突破性的新教材，适合我国各高等院校茶学专业的本科生和研究生使用，也可供相关研究工作者参考，对茶产业爱好者而言也是一本很好的专业阅读书籍。

本书由李远华担任主编并统稿。编写分工：武夷学院李远华、叶江华编写第一章绪论；安徽农业大学蒋家月编写第二章茶树细胞工程；华中农业大学黄友谊编写第三章茶叶酶工程；云南农业大学李亚莉编写第四章茶叶发酵工程；浙江大学陆建良编写第五章茶树基因工程；西南大学袁连玉编写第六章茶树基因组学；西南大学曾亮编写第七章茶树蛋白质组学；南京农业大学朱旭君编写第八章茶叶生物信息学；福建农林大学郭玉琼编写第九章茶叶生物技术安全性评价。

虽然编者尽了努力，但错漏之处在所难免，恳请广大读者批评指正，以便再版时修正和提高。

李远华

2016年10月28日



第一章 绪论	1
第一节 茶叶生物技术及其特点	1
第二节 我国茶叶生物技术发展现状与展望	2
第三节 生物技术对茶产业发展的影响	15
思考题	17
参考文献	17



第二章 茶树细胞工程	27
第一节 细胞工程理论与技术基础	27
第二节 茶树组织与器官培养	28
第三节 茶树细胞培养	38
第四节 茶树原生质体培养与细胞融合	44
思考题	49
参考文献	49



第三章 茶叶酶工程	55
第一节 茶叶酶及其应用现状	55
第二节 茶叶酶的来源与生产	61
第三节 茶叶酶的分离纯化	64
第四节 茶叶酶的固定化	70
第五节 茶叶酶工程应用	76
思考题	82
参考文献	82



第四章 茶叶发酵工程	89
第一节 茶叶微生物概述	89
第二节 茶叶微生物培养基制备与灭菌	95

第三节	茶叶微生物接种与扩繁	100
第四节	茶叶微生物发酵过程	105
第五节	茶叶微生物分离提纯	109
思考题		115
参考文献		115



第五章	茶树基因工程	121
第一节	茶树基因工程基础理论与技术	121
第二节	茶树基因克隆技术及其主要进展	141
第三节	茶树基因功能验证技术	151
思考题		164
参考文献		164



第六章	茶树基因组学	173
第一节	基因组学概论	173
第二节	茶树基因组多态性与作图	178
第三节	基因组的进化与分子系统学	186
第四节	茶树生物芯片的应用与发展	195
第五节	茶树分子标记及其应用	200
思考题		211
参考文献		211



第七章	茶树蛋白质组学	213
第一节	蛋白质组学概述	213
第二节	茶树蛋白质工程	217
第三节	双向凝胶电泳	223
第四节	非凝胶分离技术	230
思考题		232
参考文献		232



第八章	茶叶生物信息学	237
第一节	生物信息学的定义与发展历程	237

第二节	核酸及蛋白质数据库的应用	238
第三节	基因芯片微阵列数据分析	240
第四节	生物信息学与基因组学技术	246
第五节	生物信息学与蛋白质组学技术	249
思考题		251
参考文献		252



第九章	茶叶生物技术安全性评价	255
第一节	茶叶生物技术安全性	255
第二节	茶树转基因技术	262
第三节	茶叶生物技术专利与法规	265
思考题		283
参考文献		284

第一章 绪论

第一节 茶叶生物技术及其特点

生物技术 (Biotechnology) 按内容可分为细胞工程、酶工程、发酵工程、基因工程和蛋白质工程。生物技术最早由匈牙利工程师 Karl Ereky 在 1917 年提出, 1982 年国际经济合作及发展组织 (OECD) 将其定义为应用自然科学及工程学的原理、依靠生物作用剂的作用将物料进行加工以提供产品或用于为社会服务的技术。现代生物技术正在推动新的科技革命的形成, 基因组学、后基因组学、蛋白质组学、干细胞技术和组织工程学、系统生物学、植物转基因技术、体细胞克隆、生物芯片、基因治疗、生物药物等技术将发挥主导作用。

茶叶生物技术是茶学与生物技术相结合的交叉学科, 是利用生物技术解决茶产业面临的问题的应用型学科。20 世纪 60 年代末, 英国剑桥大学化学系对茶树幼茎切片进行培养, 探讨咖啡因合成途径。20 世纪 70 年代, Takino 等以及施兆鹏分别研究了单宁酶和果胶酶提高速溶茶制率、减少冷后浑及改善速溶茶汤色。利用发酵技术还可开发具有特殊风味及营养保健功效的新型茶叶制品 (如红茶菌、茶酒)。茶叶生物技术研究虽然起步较晚, 但进展较快, 当前已是茶学学科的热点之一, 特别是基因工程技术在茶叶中的应用发展突飞猛进, 如茶叶基因的分离转化、茶树基因组学研究等, 中国农业科学院茶叶研究所、安徽农业大学茶树生物学与资源利用国家重点实验室、浙江大学茶叶研究所等在此方面都取得了可喜成就。

茶叶生物技术综合了微生物学、细胞生物学、遗传学、植物生理学、生物化学、分子生物学、基因工程、细胞工程、微生物工程、生化工程、生物工程下游技术、发酵工程设备以及茶学等多个学科知识, 是典型的智力密集型产业, 需要高投入和高科技人才, 具有高风险、研发和产业化周期长、对资源依赖性强和对人才实验操作技能要求高等特征。我国茶叶生物技术研发应由积极跟踪为主转变为自主创新为主, 切实提高自主创新能力, 缩小与其他学科生物技术研究水平的差距, 使我国拥有一批具有自主知识产权的专利与标准; 由以单一技术突破为主转变为单一技术突破与多项技术的集成相结合, 全面提高我国茶叶生物技术及产业的整体水平; 由立足国内市场转变为面向国际市场, 充分发挥我国是世界茶叶原产地优势, 加速茶产业标准化、市场化、国际化进程; 由研究开发为主转变为研究开发与产业化协调, 加速培育新的茶叶经济

增长点。从事茶叶生物技术工作,必须了解和掌握国家生物技术产业政策、知识产权及生物工程安全条例等有关政策和法规。学好茶叶生物技术,是成为从事茶学与生物技术有关的应用研究、技术开发、生产管理和行政管理等工作的高级专门人才的必备条件。

第二节 我国茶叶生物技术的发展现状与展望

茶是源于我国、遍布世界的无酒精饮料之一。饮茶对人体有保健作用,《本草纲目》中就有茶叶药用功能的记载。现代科学研究也表明,茶是健康饮品,含有茶多酚、咖啡碱、茶多糖、茶氨酸、茶色素等生物活性物质,具有抑菌、抗病毒、防癌抗癌等多种保健功能。植物生物技术可从其研究对象上分为三个层次,即分子水平上的植物基因工程技术、细胞及亚细胞水平上的植物细胞工程技术以及器官水平上的植物组织培养技术。近年来,传统的茶叶育种与繁殖技术为茶叶产量的提高和品质的改善做出了较大贡献,然而由于传统技术自身的局限及对产品更高的需求,许多问题用传统的茶叶技术已无法解决。现代生物技术的应用可有望解决传统茶产业面临的许多难题,这样就产生了传统茶学与现代生物技术结合的新学科——茶叶生物技术,该技术将给茶学注入新的活力。

一、茶叶生物技术的研究现状

植物生物技术在植物繁殖方面已取得了巨大的成功,但由于种种原因,茶叶生物技术的许多研究目前还远远落后于其他作物。目前应用于茶学领域的生物技术主要有酶工程、基因工程、细胞工程、发酵工程等。

(一) 酶工程在茶学领域中的应用

茶叶酶工程的重要内容是利用酶的高效生物催化功能促进茶叶内不利及无效成分的有益转化,改善茶叶的色香味形及营养价值等综合品质。目前主要有多酚氧化酶、果胶酶、多糖水解酶、单宁酶、蛋白酶、 β -葡萄糖苷酶、纤维素酶等酶制剂已应用于茶学领域。

多酚氧化酶主要用于催化茶叶中多酚类氧化生成茶黄素和茶红素,同时使香气前体物质发生偶联氧化,产生各种香气成分,形成红茶基本风味。付赢萱等利用多酚氧化酶进行为期 18d 的普洱茶渥堆发酵,茶多酚、茶褐素等成分的变化差异显著,且在酶浓度为 1.6、3.2U/g 时,普洱茶达到了陈年普洱茶品质,汤色呈深橙红色、明亮,滋味醇厚回甘。

多糖水解酶水解叶组织细胞壁中不溶性多糖产生的生化破损作用,可使发酵茶坯酸化,提高多酚氧化酶活力,促使茶黄素形成及叶绿素降解。外源多糖水解酶可使红碎茶水浸出物、茶色素等品质成分含量增加,外形色泽和颗粒明显改善,从而较全面地改善红茶内、外品质。

单宁酶主要用于处理在速溶茶和液体茶饮料生产中出现的“冷后浑”现象。

蛋白酶主要用于降解茶叶中蛋白质而生成各种氨基酸,从而改善茶叶的香气和鲜



爽度,在红碎茶加工中添加蛋白酶可使氨基酸、茶红素含量提高,茶褐素明显下降,滋味增强,汤色变亮,香气变好;夏季绿茶加工过程中添加木瓜蛋白酶(Papain)能明显提高茶汤中氨基酸的含量,从而有效降低夏茶的苦涩味。

β -葡萄糖苷酶是将茶鲜叶中香气前体物质转化成游离态香气成分的关键酶,从茶叶中提取的 β -葡萄糖苷酶粗品可使夏季烘青绿茶中香叶醇的含量提高1~3倍,明显改善夏季绿茶香气。另有研究表明,外源单宁酶、果胶酶的加入能有效提高微滤功效和微滤液的生化产品得率,加酶微滤的平均膜通量提高30mL/min;同时,微滤中的水浸出物、茶多酚、氨基酸、咖啡碱、糖、儿茶素的得率都有较大提高。苏二正等使用海藻酸钠固定化单宁酶和 β -葡萄糖苷酶处理绿茶提取液,结果表明,5~30℃经酶处理过的提取液澄清度显著高于对照,且室温下贮藏三个月以上澄清度基本不变。

梁靖等研究纤维素酶的加入量、酶解温度、酶解时间对速溶茶提取率的影响,结果显示,使用纤维素酶可以有效提高速溶茶的提取率,其最佳工艺参数为酶量0.15U/mL、温度45℃、时间60min。

谭淑宜等研究了果胶酶提取和蛋白酶提取分别对红碎茶和绿茶提取液中茶多酚、氨基酸、咖啡碱及水浸出物含量的影响,结果表明,果胶酶对红碎茶和绿茶的提取均有一定的效果,水浸出物含量均有所提高;红碎茶和绿茶经蛋白酶提取,其提取液中氨基酸提取率分别比对照高196.8%和72.8%,可见蛋白酶有利于提高速溶茶滋味品质。

酶技术应用于速溶茶加工工艺取得了初步进展,在生产速溶茶时添加酶制剂对提高其感官品质、浸提率、冷溶性、茶叶利用率等方面都有较好的效果。酶反应条件要求严格,反应温度、pH、酶加入量、双酶或多酶组合配比等都影响酶的活力和酶作用的发挥,速溶茶不同的加工方法和加工工艺要求有不同的生化环境,所以具体应用时,需研究相关的配套工艺技术参数,以充分发挥酶的作用效果。岳鹏翔采用较低温度的水对茶叶进行长时间的提取,并在提取时加入果胶酶和单宁酶进行酶解,使茶叶中难溶于冷水的成分大量被提取出来或分解成可溶于冷水的成分,而对风味不产生影响,制得能完全溶解于5℃的水中且风味优良的速溶茶。王家建等以绿茶为原料,通过酶法辅助提取技术,研究纤维素酶和果胶酶双酶组合对速溶绿茶提取率及品质的影响,结果表明,酶法提取速溶茶中游离氨基酸、咖啡碱和茶多酚提取率均高于沸水提取,与日常泡茶相近,同时对沸水提取、酶法提取、沸水冲泡制得速溶茶进行感官评定比较,结果酶法制取的速溶茶在色泽、气味、口感等方面均优于沸水提取即传统提取工艺,更接近沸水冲泡即日常泡茶的品质。赵文净等分别以乌龙茶(八仙)和绿茶(梅占)为原料,研究添加不同浓度木瓜蛋白酶对速溶茶产品酯型儿茶素以及表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)含量的影响,结果表明添加茶叶量1.5‰和2.0‰的木瓜蛋白酶可以极显著提高速溶乌龙茶(八仙)中酯型儿茶素以及EGCG含量,而添加1.0‰和2.0‰的木瓜蛋白酶可以极显著提高速溶绿茶(梅占)中酯型儿茶素以及EGCE含量,表明在此实验条件下木瓜蛋白酶分解了蛋白质,减少了“茶乳酪”的形成,从而减少了茶多酚中酯型儿茶素以及EGCG的损失。

目前茶浓缩汁或茶饮料生产企业主要采用物理去除法对待茶沉淀,即先对茶汤或

茶浓缩汁进行冷藏处理,让其充分产生沉淀,然后再通过高速离心或者超滤膜将沉淀与澄清液分离,最后把茶沉淀丢弃,获得澄清的茶汤或浓缩汁。这种方法获得的澄清茶汤,后期不容易再产生沉淀,但是会损失一部分产品得率,也会在一定程度上影响产品的风味品质。通过对分离得到的茶沉淀进行单宁酶处理,然后再将其回填到原有茶汤中,充分利用沉淀的有效成分,可以减少茶风味品质和有效成分的损失。茶饮料浑浊、沉淀一直是困扰茶饮料行业的技术难题,目前主要采用的是物理去除或化学转溶等以牺牲茶饮料产品中茶叶成分的得率和风味品质的处理方法。许勇泉等采用单宁酶处理茶汤沉淀,可有效促进茶汤沉淀的复溶及回收利用,随着酶添加量的增加和酶解时间的延长,沉淀复溶程度逐步提高,可水解 98% 的酯型儿茶素,减少 82% 的再沉淀,最优参数:酶添加量为固形物总量的 2.0%,酶解温度 35℃,酶解时间 150min。Lu 等研究表明,单宁酶能将酯型儿茶素水解成简单儿茶素,从而有效降低茶汤沉淀的形成量,提高茶汤澄清度。李永福等采用外源酶改善发酵茶品质的研究表明,采用纤维素酶占鲜叶重 7.5‰、发酵温度 42℃、发酵时间 5h 的工艺能有效提高茶多酚、总黄酮、总多糖、游离氨基酸等影响茶叶品质的主要成分的含量。

随着茶叶加工的不断深入和酶技术的发展,根据酶具有专一性强、反应条件温和、催化效率高等优点,在基本不影响其他品质的前提下利用外源酶或酶制剂,有针对性地改善茶叶中某一类特定物质的含量,进而提高茶制品的品质与产量,已成为茶叶加工的一大研究主题。纤维素酶和半纤维素酶属于多糖水解酶类,可催化纤维素水解成小分子的糖类物质,从而增加茶汤的甜醇度;蛋白酶可将茶叶中的蛋白质水解成各种氨基酸,不仅能改善茶叶的香气和鲜爽度,而且可减少不溶性复合物的产生,提高茶汤的质量;酵母菌分泌的胞外酶,可使茶叶中含量较高的茶多酚、蛋白质、碳水化合物发生一系列的化学反应。康燕山等在研究普洱茶发酵过程中添加外源酶和外源酵母对其主要成分的影响中认为,添加外源酶(纤维素酶、半纤维素酶、蛋白酶)及外源酵母可以提高普洱茶游离氨基酸含量 49.0%,降低茶多酚含量 28.6%。于春花等研究了外源酶对普洱生茶浸提液品质的影响,结果显示 3 种酶对茶褐素氧化贡献由大到小的顺序为漆酶、蛋白酶、单宁酶;3 种酶最优配比为 0.15%、0.05%、0.03%,此条件下,茶多酚含量为 28.71%,与酶处理前比较降低了 8.45%,可溶性糖、氨基酸、茶褐素含量分别为 11.97%、3.58%、8.60%,是酶处理前的 3.49 倍、1.10 倍、4.32 倍。

目前,酶技术在渥堆发酵中的应用研究越来越多,其目的主要是缩短发酵周期及改善茶叶品质。李中皓等研究表明,蛋白酶用于普洱茶样品可以促进茶叶内含成分转化,改变内含成分间的比例,使茶汤滋味转为醇厚且甘甜。杨富亚等研究表明,一定浓度的单宁酶、蛋白酶、多酚氧化酶等复合酶制剂处理普洱茶样后可以明显改变内含成分含量,进而改善茶叶品质。还有研究表明,将多酚氧化酶喷洒于普洱茶样,经 40d 渥堆发酵后,茶多酚含量由原来的 10.15% 下降到 8.03%,茶褐素由 13.34% 上升到 13.60%,改善了茶叶品质。罗晶晶等研究指出,在夏季金观音鲜叶萎凋过程中添加纤维素酶、木瓜蛋白酶和木聚糖酶能显著提高茶红素、茶黄素和水浸出物,其中添加纤维素酶的效果最好,可使茶黄素含量达到 0.57%,茶红素含量达 10.93%,水浸出物含



量达 34.53%。

酶工程还可用于茶氨酸的合成和茶色素的生产。目前合成茶氨酸最有效的方法是建立在化学合成法和微生物发酵法基础上的酶转化法。汪东风等适当改进茶多酚工业化生产设备,运用酶技术成功实现了天然茶色素的工业化生产。酶传感器的应用也有报道,曾益等从鲜叶中提取多酚氧化酶,与氧电极耦合制成酶传感器,用于茶叶样品与茶多酚制品中茶多酚含量的测定,其结果与国家标准方法测定的结果相符,从而为茶多酚含量的测定建立了一种生物传感新方法。酶的固定化技术也取得了很大的进展。屠幼英等探讨了固定化多酚氧化酶膜催化儿茶素生产茶黄素的最佳反应条件,确定了酶膜法生产高纯度茶黄素的 5 个重要因素及最佳组合。关于 β -葡萄糖苷酶、单宁酶、多酚氧化酶的固定化技术的研究也有报道,李荣林等利用海藻酸钠包埋和戊二醛交联两种固定化技术共同作用对多酚氧化酶进行固定,并对其化学性质进行研究。程琦等采用自制的壳聚糖为载体对单宁酶(TA)固定化处理,酶活力回收率、偶联效率均较高。刘如石等采用海藻酸钙凝胶对单宁酶进行固定化,酶活力回收率高达 60.6%,对固定化单宁酶酶促反应的最适 pH、最适温度等性质的研究结果表明,其稳定性优于单宁酶。

(二) 基因工程在茶学领域中的应用

基因工程是在分子水平上对基因进行操作的复杂技术,是将外源基因通过体外重组后导入受体细胞内,使这个基因能在受体细胞内复制、转录、翻译表达的操作。它是根据人类的特殊需要,用人为的方法将具有遗传性的目的基因(DNA 片段)提取出来,在离体条件下用适当的工具酶进行切割、组合、拼接,然后与载体一起导入受体细胞中,以让外源物质在其中“安家落户”,进行正常的复制和表达,从而获得人类所需要的产品或建组成新的生物类型的一种新技术。目前应用于茶学领域的基因工程主要有以下几方面。

1. DNA 分子标记技术

脱氧核糖核酸(DNA)是生物最基本的遗传物质,DNA 分子标记技术对揭示茶树遗传变异规律、茶树种质资源的亲缘关系、起源、进化和分类等都有非常重要的意义。目前,DNA 分子标记系统已得到了长足发展,已发展了 10 多种 DNA 分子标记:限制性片段长度多态性(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP),随机扩增多态性 DNA(Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD),扩增片段长度多态性(Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP),简单重复序列(Simple Sequence Repeat, SSR),测定序列标签位点(Sequence-Tagged Sites, STS),序列特异性扩增区域(Sequence Characterized Amplified Region, SCAR),扩增多态性条带限制酶处理(Cleaved Amplified Polymorphic Sequences, CAPS),表达序列标签(Expressed Sequence Tag, EST)等。分子标记有诸多自身特异的优势:①不受实验组织类型和发育时间等方面的影响,实验个体的任何组织器官在各种时期都可能进行分析实验;②可完全不受环境因素的影响。环境的改变不能决定 DNA 的结构,即 DNA 的核苷酸序列是固定不变的;③标识的数目庞大,可覆盖全部的基因组;④遗传多态性高,因此具有大量变异的等位基因,也各不相同;⑤有很多标识为共显性,可有效地辨别出纯合 DNA 型及杂合

DNA 型, 收集全部的 DNA 遗传信息; ⑥DNA 分子标记技术更加简单、快捷、自动化; ⑦通过实验提取出的 DNA, 在合适条件下能长时间地进行保存, 这在进行物种或者基因的起源及决定性的鉴定上有利。因 DNA 分子标记技术具有高速、简便、高效等特点, 已用于茶树的亲缘关系鉴别、遗传多样性分析、分子遗传图谱的构建、种质资源的分子鉴定等方面。

现代生物技术的迅猛发展为茶树次生代谢的研究提供了重要的技术手段和方法。虽然茶树次级代谢的分子生物学研究起步较晚, 但目前是茶叶学科中最活跃和进展最快的一个领域。在此领域中业已分离和筛选出茶树特征性次级代谢物的相关功能基因, 并对其功能进行了研究。在茶树分子生物学研究中, 各种技术已成功应用于茶树 DNA 分子标记, 构建了茶树次级代谢物差减杂交 cDNA 文库、龙井 43 新梢和幼根的 cDNA 文库和阿萨姆杂交种 TV-1 嫩梢的 cDNA 文库; 并利用 cDNA 芯片技术获得了安吉白茶不同白化期的 671 个差异表达基因。Wu 等利用 454 测序技术对茶树叶部的转录组进行研究, 获得了 25637 个编码基因 (Unigene) 和 3767 个 EST-SSRs 标记。李娜娜等利用 Solexa 法对福鼎大白茶和小雪芽品种叶部的转录组进行研究, 获得了 79797 个编码基因和 6439 个 SSRs 标记。

对茶树种质的遗传特性进行有效的鉴定和评价, 有利于提高茶树种质资源研究与利用的水平。分子标记技术可用于研究茶树基因遗传变异情况、茶树居群分布及其进化关系, 可增加茶树育种的针对性, 提高育种效率。在茶树种质遗传多样性和种质亲缘关系研究方面, DNA 分子标记技术有着广泛的应用, 并以其扩增多态性丰富、准确性高、重复性好, 不受器官发育时期的特异性以及环境影响且易于分析等特点, 在种质鉴定和遗传基础分析等研究领域具有较大潜力。

扩增片段长度多态性技术是由 Zabeau 等于 1993 年发明的分子标记技术。扩增片段长度多态性是基于 (聚合酶链式反应) (PCR) 技术扩增基因组 DNA 限制性酶切片段, 并结合了限制性片段长度多态性和 PCR 技术特点, 具有多态性高、重复性好、假阳性低、所需模板 DNA 量少等特点, 非常适合在分子生物学基础相对薄弱的茶树研究中应用。目前扩增片段长度多态性技术在茶树研究中主要应用于遗传多样性分析及分子连锁图谱构建等方面。吴扬等应用扩增片段长度多态性技术分析黄金茶群体 111 个株系的遗传多样性与亲缘关系。选用多态性高、分辨力强的引物组合 E37M32、E41M33 与 E41M42 分别扩增样品基因组 DNA, 共得到 229 条清晰条带, 其中多态性条带 186 条, 多态位点百分比为 81.22%, 反映了样品基因组 DNA 具有较高的多态性。111 个样品得出的平均有效等位基因数 (N_e) 为 1.42 ± 0.35 , 平均奈氏基因多样性 (H) 为 0.25 ± 0.18 , 平均香农 (Shannon) 信息指数 (I) 为 0.38 ± 0.25 。应用 NTSY Spc2.1 软件计算得到 111 个样品间的相似系数为 0.65 ~ 0.99, 平均为 0.76。根据 (非加权组平均法) (UPGMA) 法, 将 111 个株系分成 8 大类群, 绘制样品扩增片段长度多态性聚类树状图。该研究为黄金茶种质资源的保护及利用, 从分子水平提供了一定的依据。

Matsumoto 等运用限制性片段长度多态性技术, 以苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 作为 DNA 标记, 对日本绿茶栽培种和 463 个本地茶树的遗传分化进行分析, 表明绿茶栽培种和本地茶树具有相同的起源。黄建安应用扩增片段长度多态性方法对 40 个茶树品种



及株系的遗传亲缘关系进行分析, 仅用3对引物, 就获得了226条清晰的扩增片段长度多态性条带, 其中多态性带207条, 多态性程度达到91.59%, 40个品种的遗传距离在0.13~0.48。聚类分析结果表明, 40个供试样品种可分成4个类群, 与形态分类学上理论预期结果一致。

田中淳一用茶树品种“薮北”及其育成品系“静一印杂131”的 F_1 个体, 经随机扩增多态性DNA标记, 使用166个引物, 检出105个标记。其中, 在 F_1 世代观察到分离的有82个标记。从“薮北”和“静一印杂131”分别检出6个连锁群, 同时还存在许多独立的标记, 并绘制了“薮北”与“静一印杂131”的部分遗传连锁图。黎星辉等利用随机扩增多态性DNA标记技术对人工杂交获得的 F_1 代植株进行亲子鉴定, 结果表明, 3个供试杂交后代确实来源于供试亲本云南大叶茶和汝城白毛茶。陈亮等利用随机扩增多态性DNA标记技术对中国的茶树优质资源进行分析, 其多态性达84.9%, 这表明中国茶树具有丰富的遗传多态性, 这与我国是茶树的原产地和起源中心有密切的关系。陈志丹等利用随机扩增多态性DNA分子标记技术构建了30份闽南乌龙茶茶树种质的DNA指纹图谱, 研究结果表明使用同一扩增引物的特异谱带类型和不同扩增引物的谱带类型组合可以有效鉴别闽南乌龙茶茶树种质资源; 10条随机扩增多态性DNA引物共扩增出103条谱带, 其中80条具有多态性, 占77.67%, 通过UPGMA法聚类分析, 30份茶树种质被聚为2个类群, 供试种质间的平均遗传相似系数为0.603, 遗传关系树状图在分子水平上清楚地显示了闽南乌龙茶茶树种质资源间的亲缘关系, 为评估供试样品的遗传演化地位并从中选择适宜种质作为亲本进行茶树育种研究提供了依据。

黄福平等用14条简单重复区间序列标记(ISSR)引物、20条随机扩增多态性DNA引物, 首次对茶树回交1代群体的分离模式进行了初步研究, 将符合1:1、3:1和1:3分离比例的126个随机扩增多态性DNA和简单重复区间序列标记构建“福鼎大白茶”回交1代分子连锁遗传图谱, 其中62个分子标记被归纳到7个连锁群, 这些为进一步克隆和转移这些目的基因奠定了科学基础。汪云冈等对所选取的佛香茶与拟似亲本的15份供试材料进行了简单重复区间序列标记亲缘关系的实验分析, 结果表明: 云抗10号与福鼎大白茶是佛香一号的亲本; 而福鼎大白茶的亲本则为佛香2号、佛香4号; 佛香3号、佛香5号的亲本是长叶白毫与福鼎大白茶。谭和平等使用加拿大公布的100个ISSR引物对所选取的32个茶树样品提取出的DNA进行扩增反应。根据其中所选出的2个引物的多态性可将32个茶树供试样品进行有效的鉴定, 并初步建立了这32个供试材料的简单重复区间序列标记分子指纹图谱。

2009年, 安徽农业大学茶学重点实验室启动茶树基因组研究计划, 对2个栽培种和1个古茶树进行了45倍深度基因组测序, 获得了基因和分子标记信息, 为茶树基因组测序方法和材料选择提供了重要依据; 同时进行了茶树全器官转录组与功能表达谱研究; 以茶树带芽茎段为外植体建立了离体再生体系。这些研究结果为进一步揭示茶树优质、高产和抗逆的分子机理提供了重要的基础数据与平台。

2. 基因克隆和表达

茶树基因的分离和克隆是茶树生物技术研究的重要内容之一, 也是茶树种质资源改良和利用以及茶树生物反应器研究的基础。重要功能基因的分离和克隆研究已有报

道。自 1994 年 Takeuchi 等报道了第一条茶树基因 *CHS* (查尔酮合成酶) 序列以来, 茶树基因克隆表达取得了较快的发展。

李远华等采用抑制性差减杂交 (SSH) 技术分析了 VA (泡囊-丛枝) 菌根处理后福鼎大白茶根系基因差异表达情况, 克隆了 *HMGR* 基因 (GenBank 登录号 KJ946250)、*GAGP* 基因 (GenBank, 登录号 KJ946251)、*Actin* 基因 (GenBank 登录号 KJ946252), 并进行了表达分析。获得了 *HMGR* 基因全长序列 2420bp, *HMGR* 蛋白分子质量约 63.5ku, 等电点为 6.8, 定位于线粒体膜或者内质网膜。研究还显示, *HMGR* 在茶树叶片中表达强度存在明显的品种差异, 同时对生物性和非生物性胁迫均有明显响应。获得的 *GAGP* 基因全长 3146bp, *GAGP* 蛋白分子质量约 106.9ku, 等电点为 8.42, 定位于线粒体内。定量 PCR 分析表明, *GAGP* 在茶树叶片中表达强度存在明显的品种差异, 对生物性和非生物性胁迫均有明显响应。获得的 *Actin* 基因长 1606bp, *Actin* 蛋白分子质量约 30.69ku, 等电点为 5.27, 定位于细胞核等亚细胞区。研究还显示, *Actin* 在不同品种中表达无显著差异, 对非生物性胁迫响应也较弱。

在红茶制造过程中, 茶叶中的多酚氧化酶 (Polyphenol Oxidase, PPO) 活力的高低对成茶品质具有特别重要的意义。根据发表的多酚氧化酶基因中的保守序列, 设计兼并引物, 利用巢式 PCR (nest-PCR) 技术, 克隆了茶树多酚氧化酶基因。在此基础上, 陈忠正等分别以适制红茶、适制绿茶的品种以及南昆山毛叶茶为研究材料, 克隆 *PPO* 基因全长序列, 分析 *PPO* 基因的本质差别。Misako Kato 等首次对咖啡碱合成酶 (TCS) 进行了纯化, 并对其相关性质进行了研究, 且成功地克隆了咖啡碱合成酶基因。余有本等通过 RT-PCR (反转录 PCR) 法扩增出茶树咖啡碱合酶 cDNA 编码区全序列, 并成功地使其在大肠杆菌中高效表达, 发现表达的融合蛋白主要在细胞质中以可溶的形式进行表达, 有少量在外周质中表达。李远华研究表明咖啡碱合成酶基因 mRNA 在叶片栅栏组织中表达信号强。Rawat 等于 2006 年从印度茶树中获得了与茶叶香气形成有关的 β -葡萄糖苷酶基因的部分序列 (登录号 AM285295)。李远华研究 β -葡萄糖苷酶基因 mRNA 主要在茶树叶片栅栏组织、叶主脉的薄壁组织表达; 不同品种之间的表达位置基本相似, 但表达信号却有差异。奚彪等利用农杆菌介导, 成功地进行了茶树遗传基因的转化。以 *GUS* 为报告基因, 比较了农杆菌法 (AGR)、基因枪法 (BOM) 及农杆菌与基因枪结合法 (BTA、BPA 和 BOA) 等对茶树遗传转化效率的影响。结果显示, 农杆菌与基因枪结合使用比两种方法单独使用更有助于提高转化的效率。王丽鸳等将 *E. coli* DH5a 的 γ -谷氨酰转肽酶基因转入到表达载体 pET.32a 中, 构建了具有较高茶氨酸生物合成能力的基因工程菌, 研究了不同诱导条件对基因工程菌催化合成茶氨酸的影响。这些研究将为茶树基因工程育种从根本上解决茶叶产量、质量问题提供理论依据和应用基础。

Singh 等克隆出茶树 *F3H* 基因, 并发现 *F3H* 基因能够编码 368 个氨基酸多肽。在茶树不同的发育时期, 叶子 *F3H* 的表达量与儿茶素含量呈现正相关关系。Singh 等还发现儿茶素的量反馈调控 *F3H* 基因的表达, 当茶树嫩梢中儿茶素含量为 50~100 μ mol/L 时, *F3H* 基因出现下调表达。Takeuchi 等从茶树嫩叶中分离获得 3 种均具有编码 389 个氨基酸残基的开放阅读框 (ORF) 的 *CHS* 基因: *CHS1*、*CHS2* 和 *CHS3*, 其长度分别为



1390bp、1405bp 和 1425bp; *CHS* 同时具有较保守的编码区, 不同科之间的氨基酸同源性在 80% 以上。*CHS* 在植物器官中特异表达, 有的在生殖器官中表达, 有的则在营养器官中表达, 这些表达的差异可能与器官形态建成、功能分化有一定的关系。马春雷等对茶树中 *CHI* 基因进行克隆并得出全长, 并预测其具有 29.17% 的 α -螺旋和 24.17% 的 β -折叠的二级结构的编码蛋白不是球蛋白。由于 *CHS* 基因与 *CHI* 基因 mRNA 协同表达导致其在植物的花冠、花药与球茎的发育过程中存在协同积累和消失现象并受光调控和紫外辐射诱导。孙美莲等同时对 4 个常用的管家基因在茶树中的应用进行分析, 得出 *GAPDH* 基因在不同生长发育期的茶叶中最稳定表达, 由此可见, 在实际研究中的内参基因只是在细胞处于特定条件下才相对地稳定表达。

安徽农业大学研究人员发现相关转录因子 MYB、WD40 和 bHLH 等参与了茶树中多酚类物质的代谢调控。此外, 还对茶树发育相关和组织特异性相关的酚类物质积累模式、63 个酚类物质合成相关结构基因和转录因子基因表达模式进行了相关分析。利用体外表达手段 (原核与真核), 对酚类物质合成关键酶基因 *CAD* (肉桂醇脱氢酶)、*ANR1*、*ANR2*、*DFR1*、*DFR2*、*LCR1*、*F3H*、*F3'5'H*、*MYB5* 功能进行了有效鉴定。Umar 等利用茶树 *F3H*、*DFR* 和 *LCR* 构建了大肠杆菌基因工程菌, 以圣草酚 (3', 4', 5, 7-四羟基黄酮) 为底物合成了 EC、ECG、(+)-C 和 CG。

由于一些特殊人群对咖啡碱敏感, 低咖啡碱茶树品种的选育一直是科研工作者的目标之一。Mohanpuria 等采用 RNA 干扰 (RNAi) 技术培育出 *TCS* 基因沉默的转基因茶树植株, 咖啡碱和可可碱的含量与对照组相比分别下降了 44% ~ 61% 和 46% ~ 67%; 同时, 还利用农杆菌侵染导入 RNAi 片段, 使得茶树幼苗新梢中咖啡碱和可可碱含量最高分别下降了 67% 和 61%。咖啡碱 (1, 3, 7-三甲基黄嘌呤) 代谢与腺嘌呤核苷酸代谢密切相关。茶树咖啡碱主要在幼嫩叶片和茶花中进行生物合成, 合成部位可能在叶绿体。Kato 等从茶树叶片中纯化出咖啡碱生物合成关键酶咖啡碱合成酶 (3-NMT + 7-NMT), 并对该酶基因进行克隆和测序。植物体内咖啡碱生物合成的核心途径为: 黄嘌呤核苷 $\rightarrow$ 7-甲基黄嘌呤核苷 $\rightarrow$ 7-甲基黄嘌呤 $\rightarrow$ 可可碱 $\rightarrow$ 咖啡碱, 其中包括 3 步由 *N*-甲基转移酶催化的转甲基化反应和 1 步由核糖核苷水解酶催化的脱核苷反应; 而咖啡碱的降解主要路径为咖啡碱 $\rightarrow$ 茶叶碱 $\rightarrow$ 3-甲基黄嘌呤 $\rightarrow$ 黄嘌呤 $\rightarrow$ 尿酸 $\rightarrow$ 尿囊素 $\rightarrow$ 尿囊酸 $\rightarrow$ 尿素 $\rightarrow$ $\text{NH}_3 + \text{CO}_2$ 。

茶树中萜烯类物质合成途径中的相关酶基因报道较少, 而更多地侧重在糖苷水解酶相关基因的研究。陈亮等研究发现, 8 个品种中茶树 β -葡萄糖苷酶基因表达量是 β -樱草糖苷酶的 2.4 ~ 45.6 倍, 但 β -葡萄糖苷酶活力测定结果与基因表达量之间的相关性不明显。

Punyasiri 等研究表明 *DFR/LAR* 在茶树中表达具有强偶联性, 它们是催化 C 和 GC 形成的关键酶。李彤等采用 RT-PCR 方法从安吉白茶叶片中克隆得到 1 个编码, 命名为 *CsDREB-A4b*, 研究表明该基因参与“安吉白茶”非生物胁迫的响应过程, 且在不同胁迫条件下具有表达差异性。刘硕谦等通过 SMART-RACE (cDNA 末端快速扩增法) 技术获得 *CsPDS3* 基因全长 cDNA 序列 (GenBank 登录号 KC915039), 全长 2326bp, 开放阅读框编码 582 个氨基酸, 蛋白质分子质量约为 64.9549ku。该基因推测