

培养基中添加相关外源物对茶氨酸生物合成的影响

史成颖 徐乾 金璐 杨华 张正竹 宛晓春

安徽农业大学农业部茶叶生物化学与生物技术重点实验室, 合肥 230036

摘要 以龙井43的嫩叶等为材料,考察在培养基中添加茶氨酸合成前体物、代谢中间物及NO供体硝普钠对愈伤组织中茶氨酸含量的影响,并研究水培苗中添加一定浓度的硫酸铵对茶氨酸含量的影响。结果表明:培养基中添加25 mmol/L的盐酸乙胺可促进茶氨酸的合成,特别是在培养的第6~12天,愈伤组织中茶氨酸的含量增加明显,培养至第12天时,茶氨酸的含量最高,为108.96 $\mu\text{mol/g}$ (以干质量计),是对照的7.72倍;培养基中分别添加低浓度的谷氨酰胺、丙氨酸及谷氨酸钠可在一定程度上提高愈伤组织中的茶氨酸含量,其中添加5 mmol/L的谷氨酰胺时增加最为明显,茶氨酸含量是对照的近7倍;培养基中添加0.05或0.075 mmol/L的硝普钠时,茶氨酸的含量有所增加,但总体水平较低。水培苗营养液中添加硫酸铵至100 mg/L时,茶苗培养3 d时的茶氨酸含量是对照的2.25倍。

关键词 茶氨酸;愈伤组织;前体物;硝普钠;水培;硫酸铵

中图分类号 S 571.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)02-0171-06

茶氨酸(theanine, N-乙基- γ -L-谷氨酰胺),是日本学者 Sakato^[1]首次从绿茶中分离并命名的茶树特征性的非蛋白质氨基酸。迄今为止,除茶树外,只在1种蕈(*Xercomous badins*)内^[2]及2种山茶属(*Camellia japonica* and *Camellia sasanqua*)中发现有茶氨酸^[3],其中,茶氨酸在茶树(*Camellia sinensis*)中含量最高。茶氨酸是茶叶中的主要氨基酸,占茶树鲜叶干质量的1%~2%,具有焦糖香和类似味精的鲜爽味,能缓解苦涩味,增加茶汤的香甜味及改善滋味等作用。茶氨酸的含量与茶叶品质和等级呈强正相关,高达0.787~0.876,在很大程度上影响了绿茶的滋味品质,已成为评价茶叶品质的一个重要因子^[4]。同时,大量的研究表明,茶氨酸具有保健功能和药理作用,如神经保护、放松镇静、兴奋拮抗、抗癌、改善睡眠、增加免疫、降血压血脂及消除疲劳等功效^[5-8]。

茶氨酸不仅具有保健功能和药理作用,而且茶氨酸的合成与分解还与茶树氮代谢的调节和控制有关,茶氨酸以非毒性的形式储存和转运茶树中的氮,可缓解茶树高氮压力,改善茶树叶品质^[9-10]。尽管如此,目前对茶氨酸的合成机理还缺乏深入的研究。

为此,安徽农业大学茶叶重点实验室通过Sanger测序和Illumina测序方法获得了大量的unigenes,并且KEGG pathway分析结果显示:所获得的unigenes涵盖氨基酸等氮代谢途径中绝大多数基因,这将为今后建立数字化基因表达谱来研究茶氨酸代谢及相关氮代谢机理提供基础^[11]。

为了寻找茶氨酸含量较高的材料,为后续的差异表达筛选茶氨酸合成相关的基因提供基础,笔者在前人的研究基础上^[12-15],对培养基中添加外源物对茶氨酸生物合成的影响进行了系统的研究,并对信号分子NO对茶氨酸的生物合成的影响进行了研究。一方面以茶树嫩叶为材料,诱导培养出茶愈伤组织,加入前体物、代谢中间物及信号分子等来诱导茶氨酸的合成;另一方面通过往茶籽苗水培液中添加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 来诱导茶氨酸的合成。应用高效液相色谱来分析材料在诱导前后茶氨酸等成分含量的差异。

1 材料与方法

1.1 试验材料

MS培养基和茶树水培营养液用国产分析纯试

收稿日期:2010-03-31

基金项目:国家自然科学基金项目(30972400)和安徽省自然科学基金项目(KJ2010A106)

史成颖,博士研究生,研究方向:生物化学和分子生物学。E-mail: shichengying@sohu.com

通讯作者:宛晓春,博士,教授,研究方向:茶叶生物化学与天然产物研究开发。E-mail: xcwan@ahau.edu.cn

剂配制,龙井 43 的嫩叶(5 月份摘取)及龙井 43 茶籽苗等分别取于安徽农业大学农翠园及大杨店茶苗实验基地。

1.2 主要仪器设备

超净工作台(SW-CJ-1FB,苏州净化设备有限公司)、美菱冰箱(BCD-236,合肥美菱股份有限公司)、高压湿热灭菌锅(MLS-3750,SANYO Electric Co. Ltd)、智能人工气候培养柜(IRX-1000EC,杭州钱江仪器设备有限公司)、烘箱(DHG-9420A 型,上海精密试验设备有限公司)、Waters 600 高效液相色谱仪、Empower 色谱工作站、Waters 2489 紫外检测器、Waters 2475 荧光检测器(USA)、PL5243 PU1 RELAB Classic 超纯水系统(美国 Pall)、通气泵(购于花鸟花市)等。

1.3 试剂

L-茶氨酸(纯度 99.27%,江苏省金坛市前药制药原料厂)、乙腈(色谱纯,美国 TEDIA 公司)、Waters AccQ·Tag 化学品组件包(含 Waters AccQ·Fluor 试剂盒、Waters AccQ·Tag 氨基酸分析柱、Waters AccQ·Tag Eluent A、Waters 17 种氨基酸水解混合标样)、2,4-D、6-BA、KT、NAA、硝普钠及其他试剂均为国产分析纯。

1.4 试验方法

1)茶树愈伤组织的培养及茶氨酸前体物和代谢中间物的诱导。将从茶树(龙井 43)上摘下的嫩叶置于水中,加入洗涤剂后流动水冲洗 1 h 左右,然后在超净工作台上进行消毒处理。先用 70% 的乙醇浸泡 15~30 s,取出并用无菌水冲洗 1 次,接着倒入 0.1% HgCl_2 ,摇动 10 min,再用 5% 的次氯酸钠浸泡 2~3 min,最后用无菌水冲洗 5~6 次。

将消毒后的嫩叶转入放有滤纸的培养皿中,将叶片分成 2~4 mm^2 的小块(去脉),分别放置于具有不同激素配比的 MS 固体培养基中,激素配比分别为 2,4-D_{2.5} + KT_{0.5}、2,4-D_{2.0} + KT_{0.5}、NAA_{2.0} + 6-BA_{0.5}、NAA_{1.0} + 2,4-D_{1.0} + 6-BA_{0.5}(下标表示添加激素的质量浓度,mg/L),并用 Parafilm 膜封口后置于光照培养箱中培养。培养条件为(25±1)℃ 培养,光暗周期为 12 h/12 h,覆盖遮盖物以形成弱散光照射。每 3 周继代培养 1 次,约继代培养 16 次后开始用作试验材料。

①培养基中添加盐酸乙胺。在处理组培养基中添加盐酸乙胺,使盐酸乙胺的浓度为 25 mmol/L^[12],然后分别在培养 0、1、1.5、6、12、24 d

时取对照组和处理组样品测定茶氨酸等含量。

②培养基中分别添加不同浓度的谷氨酸钠、丙氨酸和谷氨酰胺。在培养基中分别添加不同浓度丙氨酸、谷氨酰胺和谷氨酸钠,各个浓度分别为 1、5、10、20、25 mmol/L,在愈伤组织培养 12 d 时分别取处理和对照材料测定茶氨酸等含量。

③培养基中添加硝普钠。在培养基中添加外源 NO 供体硝普钠,浓度分别为 0.05、0.075、0.15 mmol/L,于愈伤组织培养 12 d 时分别取处理和对照材料测定茶氨酸等含量。

2)茶籽苗水培及 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 诱导。在龙井 43 茶籽苗萌发后生长 4 个月左右,去掉其子叶后先在稀释的茶树水培营养液^[16]中预培养 1 周,然后移至全营养液中通气培养。将培养液中的初始硫酸铵浓度降低至原来的一半,每 2 周更换 1 次培养基。待 4~5 月份长出大量新生根时,添加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 使培养液中的 N 质量浓度为 100 mg/L,并分别在添加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 后的 0、1、3、6、9 d 时取茶苗根部,同时取未添加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的水培茶苗根部作为对照。

3)样品制备。分别称取诱导和对照材料放入已称质量的铝盒中,微波(中火,450 W)25 s 后,放入烘箱内 105℃ 烘干至恒质量。然后用研钵研碎,分别称取适量的样品,加入超纯水进行 100℃ 的水溶浸提 1 h,冷却后定容。浸提后先用滤纸过滤,然后用 0.45 μm 的滤膜过滤至洗净的 Eppendorf 管中待用。

4)色谱条件。Tag 氨基酸分析柱(3.9 mm×150 mm),吸附剂颗粒直径 4 μm ,柱温 37℃;流动相为醋酸盐-磷酸盐缓冲液(A 相)、乙腈(B 相)和水(C 相),梯度洗脱:0~18 min A 相 100%~95%、B 相 0%~5%,18~19 min A 相 95%~91%、B 相 5%~9%,19~29.5 min A 相 91%~83%、B 相 9%~17%,29.5~33 min B 相 17%~60%、C 相 0%~40%,33~36 min A 相 0%~100%、B 相 60%~0%,36~45 min A 相 100%~0%、B 相 0%~60%;流速 1 mL/min;紫外检测器波长为 248 nm,荧光检测器激发光波长为 250 nm,发射光波长为 395 nm;进样量为 5 μL 。

5)茶氨酸标样的制备及试样衍生。①氨基酸标样的制备及标准曲线的制作。取 40 μL Waters 水解氨基酸混合标样溶液(2.5 mmol/L),置于清洁的自动进样瓶中,加 40 μL 茶氨酸储存液(0.021 8 g 茶氨酸标样至 10 mL 超纯水中,浓度为 12.5

mmol/L)+920 μ L 超纯水,涡旋混匀后再用超纯水稀释成一系列梯度溶液,衍生后制作标准曲线。

②试样衍生。取衍生管 1 支,加入 10 μ L 用 0.45 μ m 滤头过滤的待测样或氨基酸混合标样,再加入 70 μ L 的 AccQ·Fluor 硼酸盐缓冲液,涡旋混匀后加 20 μ L 的 AccQ·Fluor 衍生试剂,涡旋 10 s 后室温下放置 1 min,用 Parafilm 膜封口,在 55 $^{\circ}$ C 烘箱中加热 10 min,上机检测。

6)数据统计分析。采用 Excel 和 DPS 进行数据统计分析。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织中添加前体物盐酸乙胺

茶树嫩叶培养 14~15 d 后,有愈伤组织出现,继代培养 5 次的愈伤组织生长情况如图 1。不同的激素组合都有愈伤组织出现,其中 2,4-D_{2.0} + KT_{0.5} 的激素组合生长状况最好。

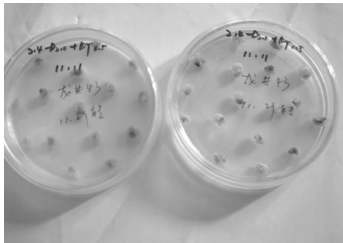


图 1 愈伤组织平板生长状况

Fig. 1 Growth state of tea callus in plates

愈伤组织中的茶氨酸检测结果(图 2)的差异显著性分析(Duncan 新复极差)显示,对照材料中的愈伤组织随生长时间的延长,含量基本保持不变,只是在第 12 天时稍有增加,对照组之间差异不显著;而与对照相比,培养基中添加盐酸乙胺的愈伤组织中的茶氨酸含量增加明显,特别是从愈伤转接培养的第 3~12 天,基本呈线性增加。在愈伤转接培养的第 6 天,盐酸乙胺诱导的愈伤组织中茶氨酸含量为 34.85 μ mol/g;在第 12 天时含量最高,为 108.96 μ mol/g (以干质量计),是对照的 7.72 倍,差异极显著($P<0.01$);12 d 以后,可能由于细胞衰老,茶氨酸含量在对照和盐酸乙胺诱导的愈伤组织中都开始减少。

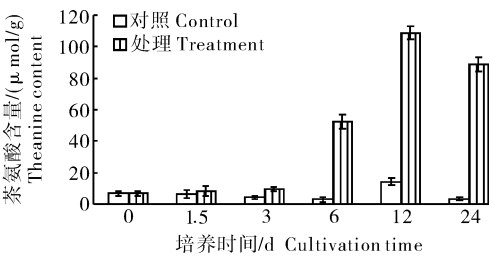


图 2 培养基中添加 25 mmol/L 盐酸乙胺后不同时间愈伤组织中茶氨酸含量的变化

Fig. 2 Changes of theanine after addition of 25 mmol/L ZtNH₂·HCl into medium with different cultivation time

2.2 培养基中添加谷氨酰胺、丙氨酸、谷氨酸钠

从图 3 可以看出,与对照相比,添加低浓度的谷

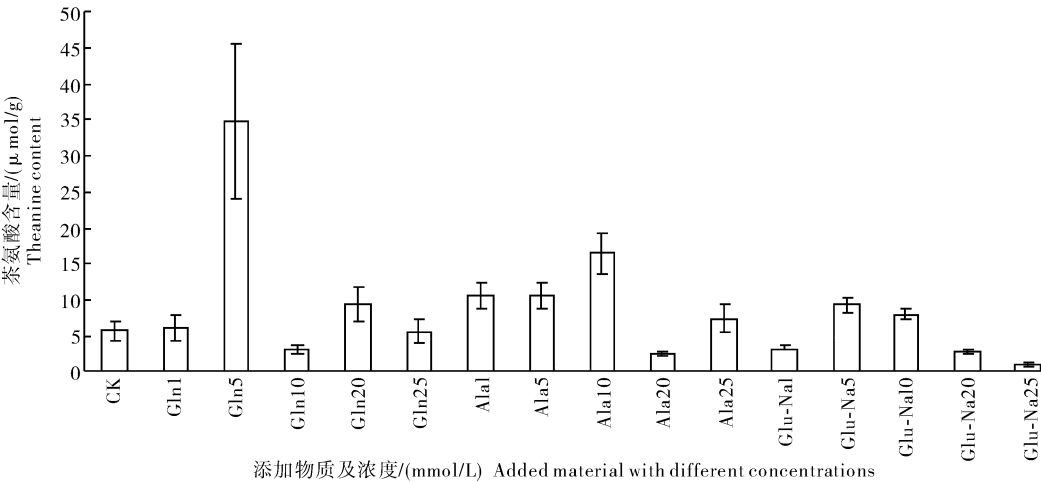


图 3 培养基中添加不同浓度的谷氨酰胺、丙氨酸或谷氨酸钠后愈伤组织中茶氨酸含量的变化

Fig. 3 Changes of theanine in callus after addition with different concentrations of glutamine, glutamate sodium or alanine into medium

CK、Gln、Ala、Glu-Na 分别代表对照、谷氨酰胺、丙氨酸及谷氨酸钠,其后数字 1、5、20 及 25 表示添加的浓度(mmol/L)。CK, Gln, Ala and Glu-Na represent control, glutamine, alanine and sodium glutamate, and the number followed with mean the concentrations (mmol/L) of addition.

氨酰胺(5 mmol/L)、丙氨酸(10 mmol/L)或谷氨酸钠(5 mmol/L)至培养基中时,愈伤组织中的茶氨酸含量有所增加,其中添加 5 mmol/L 谷氨酰胺时,茶氨酸含量增加最为明显,是对照的近 7 倍,差异极显著($P<0.01$)。添加高浓度的谷氨酰胺、丙氨酸及谷氨酸钠反而抑制茶氨酸的合成。

2.3 培养基中添加硝普钠

添加 0.05 和 0.075 mmol/L 的硝普钠至愈伤组织培养基中,可增加茶氨酸的含量,但添加 0.15 mmol/L 的硝普钠后茶氨酸的增加量开始下降,显

著性分析结果显示,对照与添加硝普钠至培养基中的茶氨酸含量差异显著($P<0.05$),但添加不同浓度之间差异不显著。硝普钠添加后丙氨酸的含量有一定的增加,差异在 5% 的水平上显著;对谷氨酸含量则影响不大。与添加前体物盐酸乙胺相比,添加硝普钠后茶氨酸的增加倍数相对于添加茶氨酸合成的前体物而言,茶氨酸含量增加较小,整体水平较低。

另外添加 0.05 mmol/L 的硝普钠后丝氨酸和脯氨酸的含量明显减少(图 4)。

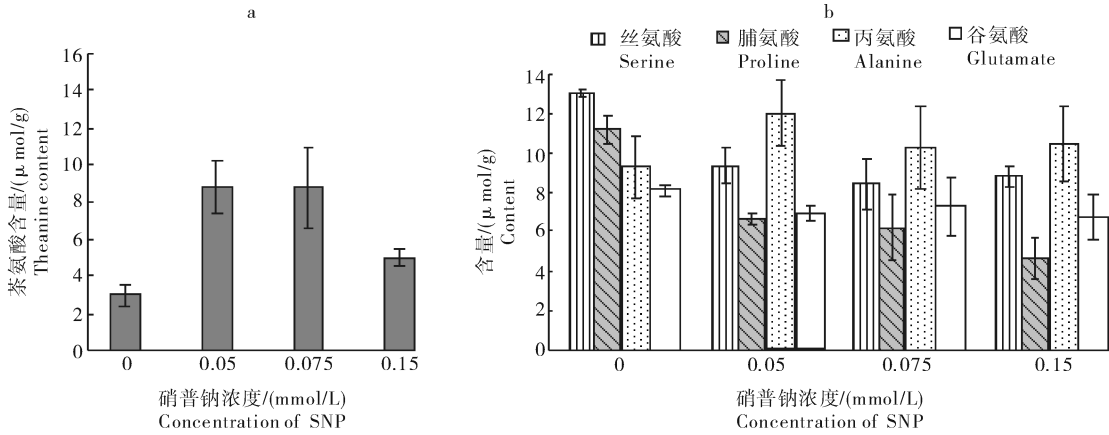


图 4 培养基中添加不同浓度的硝普钠后愈伤组织中茶氨酸(a)及一些氨基酸(b)含量的变化
Fig. 4 Changes of theanine(a) and some kinds of amino acids(b) in callus after addition of different concentrations of SNP into medium

2.4 茶树水培营养液中添加硫酸铵

从图 5 可以看出,茶苗生长在对照水培营养液中时其根部的茶氨酸含量从第 0~6 天一直保持缓慢的增长,6 d 后基本保持不变;而在水培营养液中添加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 后,从第 0~3 天时根部茶氨酸含量增加明显,第 3 天时处理组中的茶氨酸含量是对照的 2.25 倍,差异显著($P<0.05$);随后处理组茶苗根中的茶氨酸含量开始下降,第 9 天时反而低于对照。

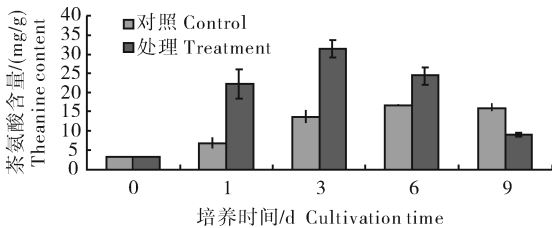


图 5 水培营养液中添加硫酸铵后不同时间茶苗根部茶氨酸含量的变化

Fig. 5 Changes of theanine in roots of tea plants with different cultivation time after addition of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ into cultivation liquid

3 讨论

20 世纪 60 至 80 年代,日本学者 Sasaoka 等^[17]和 Takeo 等^[18]通过同位素标记推定茶氨酸合成的直接前体物是谷氨酸和乙胺,其中乙胺被认为是丙氨酸脱羧酶将丙氨酸脱羧而得,而谷氨酰胺是茶氨酸代谢途径中重要的中间体。因此,笔者在培养基中添加前体物和代谢中间产物来提高茶氨酸的含量以筛选茶氨酸差异材料。

试验结果显示,培养基中添加 25 mmol/L 盐酸乙胺后,在愈伤组织生长 6 d 和 12 d 时,相对于对照,茶氨酸含量增加量明显,因此选取生长 6~12 d 的对照和盐酸乙胺诱导的愈伤组织作为差异表达材料是较好的选择。培养基中添加谷氨酰胺、丙氨酸或谷氨酸钠,低浓度时对茶氨酸的合成有一定的促进作用,特别是添加 5 mmol/L 的谷氨酰胺,增加效果较为明显,但相对于添加前体物盐酸乙胺,茶氨酸总量偏低;而高浓度时反而抑制愈伤组织中的茶氨酸合成。就添加前体物至愈伤组织培养基中而言,

添加盐酸乙胺是增加愈伤中茶氨酸含量的最有效手段,这可能与乙胺是茶氨酸合成的最直接前体有关^[18];同时,添加谷氨酸及丙氨酸对愈伤组织中茶氨酸含量的增加不显著,推测乙胺是愈伤组织中合成茶氨酸的限制因子。对于同时添加谷氨酰胺和盐酸乙胺是否会更显著地提高材料中的茶氨酸含量,有待进一步研究。

植物体内次生代谢物质的合成是受细胞内部相关基因调控的一系列复杂的生化反应过程,而环境因素等作为外界信号并不直接参与细胞内的次生代谢过程,因此,在植物细胞体内必然存在着相关胞内信号分子和相应的信号转导机制来感受并传导外界因子的刺激信号。NO作为一种重要的信号分子,近年来被广泛应用于调节一系列植物次生代谢产物的合成^[19],因此,笔者在培养基中试着添加作为NO供体的硝普钠(SNP)来增加材料中的茶氨酸含量。结果显示,当硝普钠浓度为0.05和0.075 mmol/L时,一定程度上可促进茶氨酸含量的增加,但相对于添加前体物及代谢中间物而言,茶氨酸总量偏低。究其原因,可能与愈伤组织培养转接次数过多、分化较为严重而引起茶氨酸起始含量偏低有关,也可能与NO作用效果有关。NO在促进茶氨酸含量增加的同时,丝氨酸和脯氨酸含量则明显减少。NO是否通过抑制丝氨酸和脯氨酸的合成途径而促进茶氨酸合成;另外,若将NO供体与诱导子水杨酸等共同加入,是否能更有效地促进茶氨酸的合成,这也有待进一步地研究。

有研究^[20]显示,茶树高度适应重氮氮的饲喂,且氮氮主要通过谷氨酰胺合成酶-谷氨酸合成酶途径及谷氨酸脱氢酶途径合成茶氨酸、谷氨酰胺和精氨酸,保存在茶树的各个器官。因此,设计在水培茶苗中添加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,结果显示,添加后3 d内可明显地促进茶苗合成茶氨酸,3 d时最高,是对照茶苗中的2.25倍。但相对于愈伤组织,茶苗中茶氨酸的增加倍数要低,这可能是因为茶苗吸收的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 不仅用于茶氨酸的合成,也应用于增加精氨酸、谷氨酰胺等其他一些氨基酸的含量(数据未显示)。诱导后茶苗中的茶氨酸含量从第3天后开始下降并在第9天后反而低于对照组中的茶氨酸,则可能由于添加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 后,水培营养液在后期积累离子浓度过高而引起。

参 考 文 献

- [1] SAKATO Y. The chemical constituents of tea Ⅲ. A new amide theanine[J]. J Agric Chem Soc Jpn, 1949, 23: 262-267.
- [2] CASIMIR J, JADOT J, RENARD M. Separation and characterization of N-ethyl- γ -glutamine in *Xerocomus badius* (*Boletus ladius*) [J]. Biochim Biophys Acta, 1960, 39: 462-468.
- [3] TSUSHIDA T, TAKEO T. Occurrence of theanine in *Camellia japonica* and *Camellia sasanqua* seedlings [J]. Agric Biol Chem, 1984, 48(11): 2861-2862.
- [4] 宛晓春. 茶叶生物化学[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 2003: 9-52.
- [5] YOKOGOSHI H, KOBAYASHI M, MOCHIZUKI M, et al. Effect of theanine, γ -glutamylethylamide, on brain monoamines and striatal dopamine release in conscious rats [J]. Neurochem Res, 1998, 23(5): 667-673.
- [6] JUNEJA L R, CHU D C, OKUBO T, et al. L-theanine, a unique amino acid of green tea and its relaxation effects in humans [J]. Trends Food Sci Tech, 1999, 10: 199-204.
- [7] GOMEZ-RAMIEZ M, HIGGINS B A, RYCROFT J A, et al. The deployment of intersensory selective attention: a high-density electrical mapping study of the effects of theanine [J]. Clin Neuropharmacol, 2007, 30(1): 25-38.
- [8] 陈玉琼, 唐海燕, 余志, 等. 梯田秀峰茶加工过程中主要生化成分的变化 [J]. 华中农业大学学报, 2010, 29(5): 644-647.
- [9] OH K, KATO T, XU H L. Transport of nitrogen assimilation in xylem vessels of green tea plants fed with $\text{NH}_4\text{-N}$ and $\text{NO}_3\text{-N}$ [J]. Pedosphere, 2008, 18(2): 222-226.
- [10] RUAN J Y, HAERDTER R, GERENDAS J. Impact of nitrogen supply on carbon/nitrogen allocation: a case study on amino acids and catechins in green tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] plants [J]. Plant Biol, 2010(12): 724-734.
- [11] 史成颖, 宛晓春, 江昌俊, 等. 茶苗嫩根 cDNA 文库的构建及 EST 分析 [J]. 南京农业大学学报, 2009, 32(1): 126-130.
- [12] MATSUURA T, KAKUDA T. Effects of precursor, temperature, and illumination on theanine accumulation on callus [J]. Agric Biol Chem, 1990, 54(9): 2283-2286.
- [13] ORIHARA Y, FURUYA T. Production of theanine and other γ -glutamyl derivatives by *Camellia sinensis* cultured cells [J]. Plant Cell Rep, 1990, 9: 65-68.
- [14] 成浩, 高秀清. 茶树悬浮细胞茶氨酸生物合成动态研究 [J]. 茶叶科学, 2004, 24(2): 115-118.
- [15] 吕虎, 华萍, 余继红, 等. $\text{ZnNH}_2 \cdot \text{HCl}$ 和剪切力对茶叶细胞悬浮培养中茶氨酸合成的影响 [J]. 西北植物学报, 2005, 25(7): 1472-1476.
- [16] 潘根生, 小西茂毅. 供铝条件下氮对茶苗生长发育的影响 [J]. 浙江农业大学学报, 1995(5): 461-464.
- [17] SASAOKA K, KITO M, INAGAKI H. Biosynthesis of theanine in tea seedlings. Synthesis of theanine by homogenate of tea

seedlings[J]. Agric Biol Chem,1963,27:467-468.

[18] TAKEO T. L-Alanine as a precursor of ethylamine in *Camellia sinensis* [J]. Phytochemistry,1974,13(8):1401-1406.

[19] 徐茂军. 一氧化氮:植物细胞次生代谢信号转导网络可能的关键节点[J]. 自然科学进展,2007,17(12):1622-1630.

[20] OKANO K, CHUTANI J, MATSUO K. Suitable level of nitrogen fertilizer for tea (*Camellia sinensis* L.) plants in relation to growth, photosynthesis, nitrogen uptaken and accumulation of free amino acids[J]. Jpn J Crop Sci,1997,66(2):279-287.

Effects of exogenous compounds on the synthesis of theanine after added into culture media

SHI Cheng-ying XU Qian JIN Lu YANG Hua ZHANG Zheng-zhu WAN Xiao-chun

Key Laboratory of Tea Biochemistry and Biotechnology, Ministry of Agriculture & Ministry of Education, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China

Abstract The effects of precursors, metabolic intermediate of theanine synthesis and the NO donor SNP (sodium nitroprusside) on the synthesis of theanine in tea callus were investigated by using HPLC (high performance liquid chromatography) to detect theanine contents, and an accumulation of theanine in the roots of tea plants with different cultivation time after addition of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ into cultivation liquid was also discussed. As a result, 25 mmol/L $\text{ZtNH}_2 \cdot \text{HCl}$ (ethylamine hydrochloride) could increase the content of theanine in callus significantly, especially in the callus grown from the 6th day to the 12th day. The theanine concentration in callus which grown for 12 days with addition of 25 mmol/L $\text{ZtNH}_2 \cdot \text{HCl}$ reached 108.96 $\mu\text{mol/g}$ in dry weight basis, 7.72 times of that in the control; addition of glutamine, alanine or sodium glutamate into medium with low concentrations could also increase theanine in callus, but the increasing amount was not very obvious compared to that with addition of 25 mmol/L $\text{ZtNH}_2 \cdot \text{HCl}$ with the exception of 5 mmol/L glutamine, which could boost the theanine to 7 times of that in the control. Addition of SNP with concentration of 0.05 or 0.075 mmol/L could increase the content of theanine in callus, but the increase amount was low in general. With addition of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ to 100 mg/L into cultivation liquid, the theanine content in tea plants was 2.25 times of that in the control on the 3rd day of the cultivation. The materials obtained with different theanine contents in this study could be used as materials for discovery of the genes correlated with theanine metabolism using digital gene expression profile in the future.

Key words theanine; callus; precursor; sodium nitroprusside(SNP); hydroponic culture; ammonium sulfate

(责任编辑:陆文昌)