

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201310016

马林龙, 顾辰辰, 邓威威, 等. 大别山野生油茶中茶氨酸检测与茶氨酸合成酶基因克隆[J]. 广西植物, 2015, 35(1):92-98

Ma LL, Gu CC, Deng WW, et al. Determination of theanine and cloning of theanine synthetase gene in Dabieshan wild *Camellia oleifera*[J]. *Guihaia*, 2015, 35(1):92-98

大别山野生油茶中茶氨酸检测与茶氨酸合成酶基因克隆

马林龙, 顾辰辰, 邓威威, 金 阳, 宛晓春*

(安徽农业大学 农业部茶树生物学与茶叶加工重点实验室, 合肥 230036)

摘 要: 茶氨酸是茶树叶片中最丰富的游离氨基酸, 具有重要的生理药理功能, 但迄今仅在蘑菇、蕈和一些山茶科(属)植物中检测到茶氨酸。茶氨酸因有一种独特的风味特色“umami 鲜爽味”而被人类营养学广泛研究, 并发现合成茶氨酸的植物不仅在植物分类上具有积极意义, 而且对于植物资源的有效发掘有巨大经济价值; 同时还可以间接去研究茶树中茶氨酸的代谢机理以及茶氨酸合成酶的分离纯化和 TS 基因的克隆表达。该文运用 HPLC、LC-TOF/MS 对大别山地区野生幼年与成年油茶根、叶中茶氨酸进行检测, 并结合分子生物学手段对油茶中茶氨酸合成酶(theanine synthetase, TS)基因进行克隆与生物信息学分析。结果表明: 在幼年的油茶根中检测到茶氨酸, 含量为 $0.08 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (鲜重), 而在幼年的油茶叶片和成年油茶根、叶中均未检测到茶氨酸; 在幼年油茶根中克隆出一条长为 1 071 bp 油茶 TS 基因开放阅读框, 其基因序列与茶树谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS, AB117934)基因和 TS(DD410896)序列的同源性达到 98%, 氨基酸序列与茶树中 GS(AB117934)和 TS(DD410896)的相似性高达 99%。经生物信息学分析, 该序列编码的 TS 蛋白具有 20 个磷酸化位点, 不存在信号肽序列与跨膜结构, 含有卷曲螺旋结构的亲水性细胞质蛋白。该研究将为油茶新经济价值的发掘, 为茶氨酸在油茶中合成代谢途径的研究提供一定的理论基础, 同时也为进一步研究茶氨酸在茶树中代谢机理提供了新的研究思路。

关键词: 油茶; 茶氨酸; 茶氨酸合成酶; 基因克隆

中图分类号: Q943.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2015)01-0092-07

Determination of theanine and cloning of theanine synthetase gene in Dabieshan wild *Camellia oleifera*

MA Lin-Long, GU Chen-Chen, DENG Wei-Wei, JIN Yang, WAN Xiao-Chun*

(Key Laboratory of Tea Biology & Processing of Ministry of Agriculture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: Theanine was discovered as the most abundant free amino acid in *Camellia sinensis* leaves with many physiological and pharmacological function. However, only limited reports have subsequently been published about theanine in the plant kingdom, for instance, mushroom, *Xerocomus badius*, and some theaceae plants. Theanine has been extensively studied about human nutrition for tea unique taste characteristic “umami”. Moreover, synthesize theanine has not only positive significance in plant classification, but also great economic value for the effective exploration of the plant resources. Furthermore, the mechanism of theanine synthesis in *C. sinensis*, separation and purification of theanine synthetase and cloning and expression of TS gene were indirectly studied. And HPLC and LC-TOF/MS were applied to determine theanine in the roots and leaves in the young and mature Dabieshan wild *C. oleifera* plants

收稿日期: 2014-02-25 修回日期: 2014-09-18

基金项目: 国家自然科学基金(31300576, 31170283); 2012 年安徽省博士后研究人员科研活动经费资助项目; 安徽农业大学青年自然科学基金自然科学类重点项目(2011-15)。

作者简介: 马林龙(1988-), 男, 安徽庐江人, 硕士研究生, 主要从事茶叶生物化学与分子生物学方面的研究, (E-mail) myth1367101@126.com。

* 通讯作者: 宛晓春, 教授, 博士生导师, 主要从事茶叶生物化学、食品化学领域的研究, (E-mail) xcwan@ahau.edu.cn。

while molecular biology methods were used to clone theanine synthetase (TS) gene in *C. oleifera*; Bioinformatic analysis was carried out to analyze the gene sequence. The results revealed that the theanine content of roots in young *C. oleifera* plants was $0.08 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (fresh weight). However, theanine was not detected in leaves of young plants. It was also found there was no theanine in the roots and leaves in mature *C. oleifera* plants. One TS ORF (1 071 bp) was acquired from the roots in young *C. oleifera* plants. The homology of the cloned TS with glutamine synthetase gene (GS, AB117934) and TS (DD410896) were up to 98%. Moreover, the cloned TS showed a high similarity about 99% to GS (AB117934) and TS (DD410896) from *C. sinensis* at the protein levels. We found that there were 20 phosphorylation sites in the polypeptide chain after bioinformatic analysis. Bioinformatics prediction showed that the protein contained hydrophilic and wined helix domain. However, there was neither signal peptide nor transmembrane in the sequences, and the protein was non-secreted which functioned in the cell. This paper would provide theoretical basis and new approach for study of the synthesis, metabolic pathways and metabolic mechanism of theanine. Furthermore, it was beneficial to develop economical value of *C. Oleifera*.

Key words: *Camellia oleifera*; theanine; theanine synthetase; gene clone

茶氨酸(N-乙基- γ -L-谷氨酰胺)是茶树中最丰富的游离氨基酸(Yamaguchi *et al.*, 2000),迄今仅在蕁和某些山茶科(属)植物中有见报道(Casimir *et al.*, 1960; Li *et al.*, 2008; Tsushida *et al.*, 1984; Deng *et al.*, 2010)。目前,对于茶氨酸的健康功能报道很多,主要基于茶氨酸的降压安神、缓解生理及心理紧张、抗肿瘤以及拮抗咖啡碱引起的神经系统兴奋等重要生理功能(Kakuda, 2002; Kimura *et al.*, 2007; Smit *et al.*, 2000; Hindmarch *et al.*, 2000; Shimbo *et al.*, 2005)。因此,发现可以合成茶氨酸的新植物不仅在植物分类上具有积极意义,同时对于植物资源的有效发掘也具有巨大经济价值。

油茶(*Camellia oleifera*)是山茶科山茶属多年生常绿乔木,是我国特有的木本油料树种,对我国生态经济林的发展有着不可取代的作用(袁德义等, 2007),同时也是世界四大木本食用油料植物之一(庄瑞林, 2008; 胡芳名等, 2005)。Deng *et al.* (2010)在 21 种山茶科(属)植物中检测到茶氨酸的存在,但油茶叶片中是否含有茶氨酸,其自身是否具有茶氨酸的合成机制至今并不十分明确。本研究以大别山地区野生油茶苗(5 个月)和油茶植株(3 年生)为研究材料,对其中的叶部和根中是否含有茶氨酸进行了检测,并对油茶中的茶氨酸合成酶基因进行了克隆与序列分析。这些结果将为明确油茶中的茶氨酸代谢机制,提高油茶的经济价值具有重要作用。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 试验样品大别山野生幼年油茶苗

(5 个月)根、叶和大别山野生油茶植株(3 年生)根、叶,属于油茶中普通油茶寒露籽型(庄瑞林, 2008; 陈永忠, 2008; 金笑龙等, 2011),采于安徽省舒城县河棚镇安徽德昌苗木有限公司试验田。

1.1.2 试剂与仪器 试剂:色谱级乙腈(TEDIA 公司),L-茶氨酸(源叶生物科技有限公司),三氟乙酸(Sigma aldrich 公司),PrimeScript[®] II 1st strand cDNA Synthesis Kit (DRR019A)、PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase(DR010S)、La Taq (DRR002A*)、pMD18-T Vector(D101A)、DL 2 000 DNA Marker(D501S)购于 TaKaRa 公司。植物总 RNA 提取试剂盒(DP432)、胶回收试剂盒(DP209-02)、质粒提取试剂盒(DP103-02)购于 TIANGEN 公司。蒸馏水(屈臣氏)。其它试剂均为分析纯。仪器:飞行时间质谱仪(TOF-MS,美国 Agilent 公司),Waters 600 高效液相色谱,Phenomenex 粒径 $5 \mu\text{m}$ 的 ODS 250 mm \times 4.6 mm C18 反相柱。DK-8D 型电热恒温水槽(上海一恒科技有限公司),Eppendorf 5804R 低温离心机,Beckman AllegraTM 64R Cenrifuge, DHG-9240A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司),电子天平 AR124CN(奥豪斯仪器上海有限公司),BIO-RAD 的 S1010TM Thermal Cycler 和 Molecular Imager[®] ChemiDocTM XRS+ Imaging System。

1.2 方法

1.2.1 样品中茶氨酸的检测 称取油茶根、叶组织鲜重 0.5 g(准确至 0.000 1 g),微波炉内适度杀青,加 5 mL 沸水,于沸水浴中加热浸提 30 min(每隔 5 min 摇动 1 次),浸提完毕后进行研磨后,5 000 r/min 离心 10 min,取上清,将沉淀再次重复进行浸

提,将2次所得上清混合定容至10 mL,摇匀。取一部分试液,通过0.22 μm 水相滤膜过滤待测,采用三氟乙酸方法对样品中茶氨酸检测(施倩等,2006)。

茶氨酸 LC-TOF/MS 检测色谱条件:美国 Agilent 公司飞行时间质谱仪(TOF);真空脱气机;自动进样器;二级阵列检测器(DAD);流速 1 mL/min;流动相:A相 0.2%乙酸,B相 50%乙腈;线性变化范围为 0~20 min:A相 98%,B相 2%;20~30 min:A相 50%,B相 50%;30~31 min:A相 10%,B相 90%;31~40 min:A相 98%,B相 2%;二级阵列检测器实时监测强度的波长定为 280 nm 和 340 nm。紫外光谱连续记录 100 到 600 nm 的范围的波峰。电喷雾离子源(ESI);雾化气压 30 Psi;氮气流速 12 L/min;离子化电压为 4 500 V。

1.2.2 茶氨酸合成酶基因的克隆与测序 按 TIANGEN 公司的总 RNA 提取试剂盒(DP432)说明书,对幼年油茶根样品进行总 RNA 提取。用 Prime-Script[®] II 1st strand cDNA Synthesis Kit (DRR019A)将提取的总 RNA 反转录成 cDNA。根据在 GenBank 已登录的茶氨酸合成酶 TS (DD410896)基因的 ORF 序列设计引物:TS-F1:5'-CGCGGATCCATGTCTTTGCTATCAGATCT-3'/TS-R1:5'-TTGTCGACTCATGGCTTCCACAGCAGA-3'。按 PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase (DR010S)说明书扩增目的片段,用 TIANGEN 公司胶回收试剂盒对目的条带纯化,将目的片段末端加 A 然后连接到 pMD18-T Vector(D101A)中,转化到感受态细胞 DH5 α 中进行阳性克隆筛选送往 Invitrogen 公司进行测序。用生物学软件(DNAMAN, DNASTAR)对测序结果与 GenBank 已登录的相似序列进行比对分析。

1.2.3 茶氨酸合成酶基因的生物信息学分析 用生物学软件(DNAMAN, Mega4.0)对油茶 TS 蛋白氨基酸序列进行比对和进化树生成与分析,用 <http://web.expasy.org/protscale/>、<http://www.expasy.org/tools/>、<http://web.expasy.org/protscale/>(张哲敏等,2013),<http://www.cbs.dtu.dk/services/signalP/>、http://ch.embnet.org/software/tmpred_form.html(王琦等,2013),Netphos 2.0 Serve, <http://psort.nibb.ac.jp>(李娟等,2011)在线分析软件分别对油茶蛋白的亲/疏水性、信号肽、跨膜结构、磷酸化位点、亚细胞定位进行预测与分析。

2 结果与分析

2.1 油茶中茶氨酸 HPLC 和 LC-TOF/MS 分析

幼年油茶根与茶氨酸标样在 5.5 min 左右都有茶氨酸的特征峰出现(图 1),笔者初步认为幼年油茶根可能有茶氨酸的存在,但含量很低。为进一步确定幼年油茶根中是否含有茶氨酸,将幼年油茶根样品进行 LC-TOF/MS 检测分析,在保留时间 3.8 min 左右幼年油茶根和茶氨酸标样都有特征峰出现(图 2),MS 分析结果显示,样品的母离子峰的质荷比(m/z)为 175.1(图 3:A),母离子碎片峰的质荷比(m/z)为 158.1(图 3:B),数据分别与标准品茶氨酸数据一致(图 3:C,图 3:D),这证明幼年油茶根中有茶氨酸的存在。用三氟乙酸方法对幼年油茶根、叶和成年油茶根、叶样进行定量分析(图 1),在幼年油茶的根中检测到茶氨酸且含量为 0.08 mg \cdot g⁻¹ FW,而在幼年油茶叶和成年油茶根、叶中均未检测到茶氨酸存在。山茶科某些植物中也有类似报道, Tsushida *et al.*(1984)以山茶和茶梅为研究对象,指出山茶和茶梅中的茶氨酸是种子萌发期间所特有并随着山茶和茶梅的生长,茶氨酸含量减少,且在一年生山茶和茶梅新梢和根中均未检测到茶氨酸。

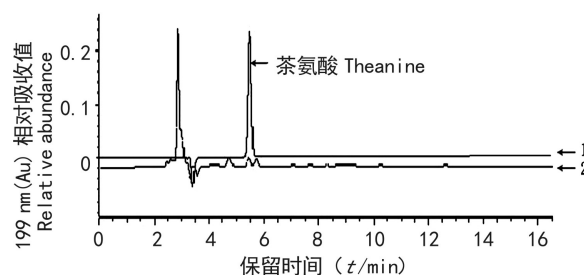


图 1 幼年油茶根及茶氨酸标样的 HPLC 色谱图

1. 茶氨酸标样; 2. 幼年油茶根样品。

Fig.1 HPLC chromatograms of theanine standard and the root sample of young *C. oleifera* plants

1. Theanine standard; 2. Identification of theanine in roots of young *C. oleifera* plants.

表 1 幼年和成年油茶中茶氨酸分析结果

Table 1 Determination of theanine in leaves and roots in the young and mature *C. oleifera* plants

| 样品名称 Samples | 幼年油茶 Young plant | | 成年油茶 Mature plant | |
|--|------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | 根 Root | 叶 Leaf | 根 Root | 叶 Leaf |
| 茶氨酸含量 Content of theanine (mg \cdot g ⁻¹ FW) | 0.08 \pm 0.02 | 未发现 Not detected | 未发现 Not detected | 未发现 Not detected |

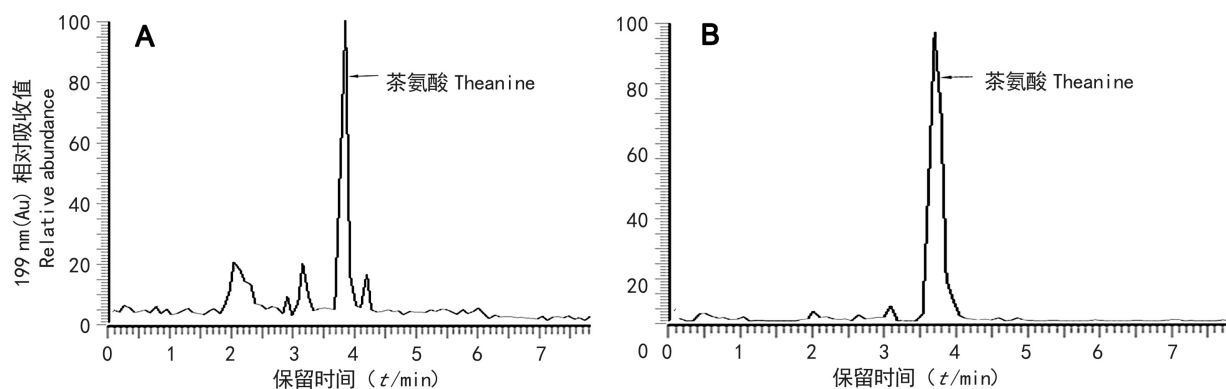


图 2 幼年油茶根(A)及茶氨酸标样(B) LC-TOF/MS 色谱图

Fig. 2 LC-TOF/MS chromatograms of the root sample of young *C. oleifera* plants (A) and theanine standard (B)

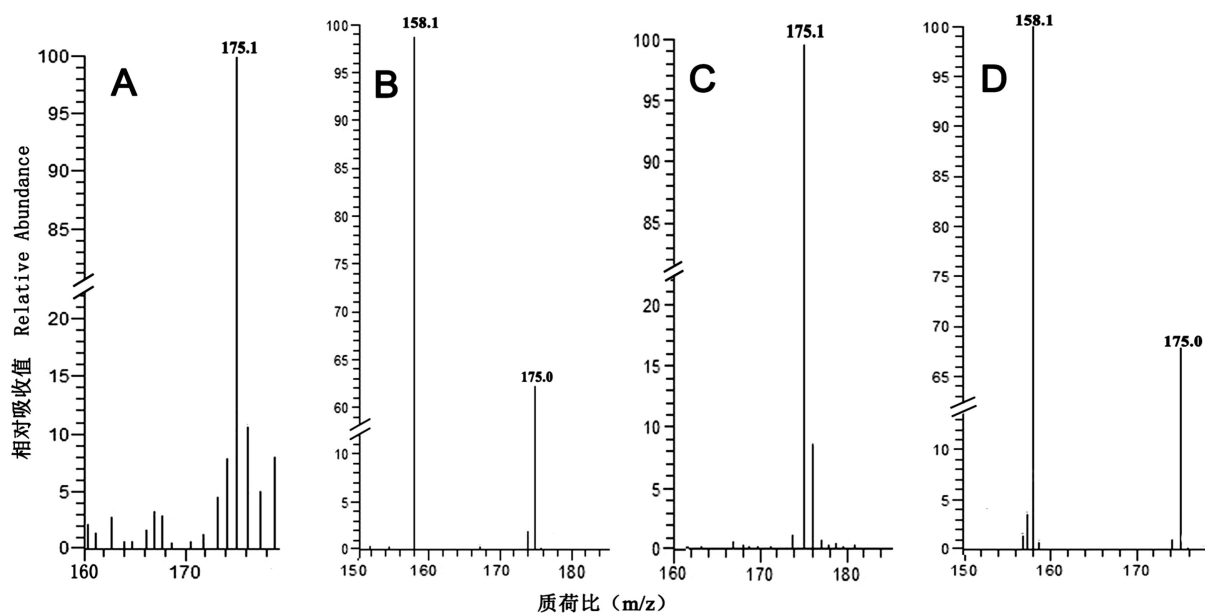


图 3 幼年油茶根的 LC-TOF/MS 分析 A. 幼年油茶根的一级 MS; B. 幼年油茶根的二级 MS;
C. 茶氨酸标品一级 MS; D. 茶氨酸标品二级 MS。

Fig. 3 LC-TOF/MS chromatograms of theanine in young *C. oleifera* root A. Identification of theanine in roots of young *C. oleifera* plants by MS; B. Identification of theanine in roots of young *C. oleifera* plants by MS²;
C. Identification of theanine standard by MS; D. Identification of theanine standard by MS².

2.2 油茶 TS 基因克隆及序列分析

在幼年油茶根中克隆了一条约 1 100 bp 的目的片段(图 3),经测序可得该片段长为 1 071 bp。将该序列与 GenBank 已登录的 *TS* 序列进行比较分析,所扩增的片段与 GenBank 中登录的 *TS* 开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)全长(1 071 bp)同源性很高。将测序结果在 NCBI 中比对发现,其基因序列与茶树 *GS* (AB117934) 和 *TS* (DD410896) 序列的同源性达到了 98%,但与茶树另一条 *TS* (DD410895) 一致性只有 82%,氨基酸序

列与茶树 *GS* (AB117934) 和 *TS* (DD410896) 同源性高达 99%。对油茶与茶树中 *TS*、*GS* 蛋白序列进化树分析可知,油茶 *TS* 序列与茶树 *TS* (DD410896) 序列聚类,而与茶树 *TS* (DD410895) 距离较远(图 5),推论油茶 *TS* 基因和茶树 *TS* 基因一样为 *GS* 基因家族成员,但是由于进化上的突变导致蛋白结构的变化从而改变了其催化的活性中心,形成新的催化功能。油茶与茶树的亲缘关系非常近,有着共同的进化祖先,其氨基酸序列和保守元件结构较为相似。而所克隆的油茶 *TS* 基因与茶树 *TS* 基因差异

可能由于种间关系的存在,在进化过程中基因突变引起的。

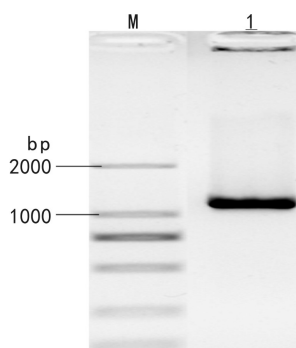


图 4 油茶 TS 全长 cDNA 的扩增

M. DNA 分子量标准; 1. 幼年油茶根 PCR 产物。

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis for the cloned full length TS of *C. oleifera* by PCR

M. DNA Marker; 1. PCR products of roots in young *C. oleifera* plants.

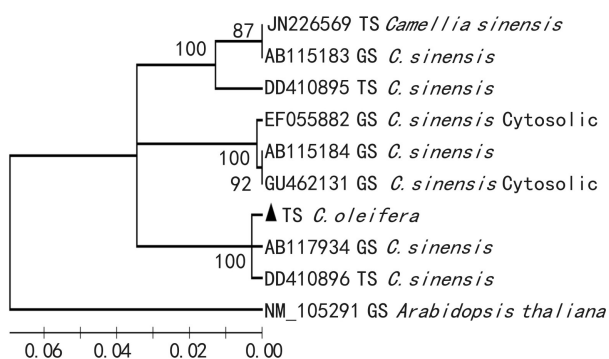


图 5 油茶与茶树中 TS、GS 蛋白序列进化树分析比较图

Fig. 5 Phylogenetic analysis on TS and GS in *C. oleifera* and *C. sinensis* at the protein level

扩增得到的 1 071 bp 碱基序列通过 dnastar 分析,共编码 356 个氨基酸,分子量 39 190.32 Da,理论等电点(PI)5.73,含有最丰富的氨基酸有甘氨酸(Gly)11.2%、异亮氨酸(Ile)7.6%、丙氨酸(Ala)7.6%、谷氨酸(Glu)6.7%,带负电荷的氨基酸数为 44,带正电荷的氨基酸数为 38。根据分值中正值越大,疏水性越高,负值越小,亲水性越高来判断蛋白的亲/疏水性,(图 6:A)中大数目的氨基酸是负值,因而油茶 TS 蛋白为亲水性蛋白;按照几率 > 50% 就可形成螺旋的规则,以 window = 14、21、28 为试验参数,由(图 6:B)可知油茶 TS 蛋白氨基酸序列中存在卷曲螺旋结构;根据分值大于 0.5 则预测为分泌蛋白,存在信号肽;小于 0.5 预测为非分泌蛋白,没有信号肽,由(图 6:C)可知油茶 TS 蛋白是一

种非分泌蛋白,无信号肽存在;从(图 6:D)可以看出油茶 TS 蛋白磷酸化位点数为 20 组成,丝氨酸(Ser)磷酸化的位点有 12 个,苏氨酸(Thr)磷酸化的位点有 3 个,酪氨酸(Tyr)磷酸化的位点有 5 个且非均匀分布于整个多肽链中;跨膜结构一般由 20 个疏水氨基酸残基形成 α -螺旋,由(图 6:E)可知,在多肽链 178~195、334~354 位置有 2 个由内向外螺旋结构,在 178~196、339~356 位置有 2 个由外向内螺旋结构,但分值较低,没超过 500,故油茶 TS 蛋白不存在跨膜结构域,属于非跨膜蛋白,不发生跨膜运动,在细胞内起作用;从(图 6:F)看出油茶 TS 蛋白在细胞质的过氧化物酶体中的可能性最大,可知油茶 TS 蛋白是一种细胞质蛋白。

3 讨论与结论

茶氨酸是茶树的特征性功能成分,迄今仅在蕁和某些山茶科(属)植物中有见报道(Casimir *et al.*, 1960; Li *et al.*, 2008; Tsushida *et al.*, 1984; Deng *et al.*, 2010)。但油茶目前主要从事其油料方面研究,对茶氨酸研究尚无文献报道。本研究表明,在幼年油茶根中检测到茶氨酸,含量为 $0.08 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (FW),在幼年油茶叶和成年油茶根、叶中均未检测到茶氨酸;或许是由于油茶中的茶氨酸含量极低,茶氨酸可能是油茶种子萌发期间所特有的并随着生长逐渐减少。这与山茶和茶梅中的茶氨酸是种子萌发期间所特有并随着山茶和茶梅的生长,茶氨酸含量减少,且在一年生山茶和茶梅新梢和根中均未检测到茶氨酸报道较为相似(Tsushida *et al.*, 1984),但对其机理至今尚未明确。

目前除从茶树中克隆几条 TS 基因序列外(李娟等, 2011),其它关于 TS 基因的克隆鲜有报道。研究发现:在幼年油茶根中扩增一条长为 1 071 bp 基因片段与 GenBank 中登录的 TS 基因开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)全长(1 071 bp)相当,在 NCBI 中比对发现,该基因序列与茶树 GS (AB117934)和 TS (DD410896)序列的同源性达到了 98%,但与茶树另一条 TS (DD410895)一致性只有 82%,氨基酸序列与茶树 GS (AB117934)和 TS (DD410896)同源性高达 99%,其蛋白质特征分析结果与安吉白茶 TS 蛋白质特征(李娟等, 2011)高度相似。并对油茶与茶树中 TS、GS 蛋白序列进化树分析发现,油茶 TS 基因和茶树 TS 基因一样为

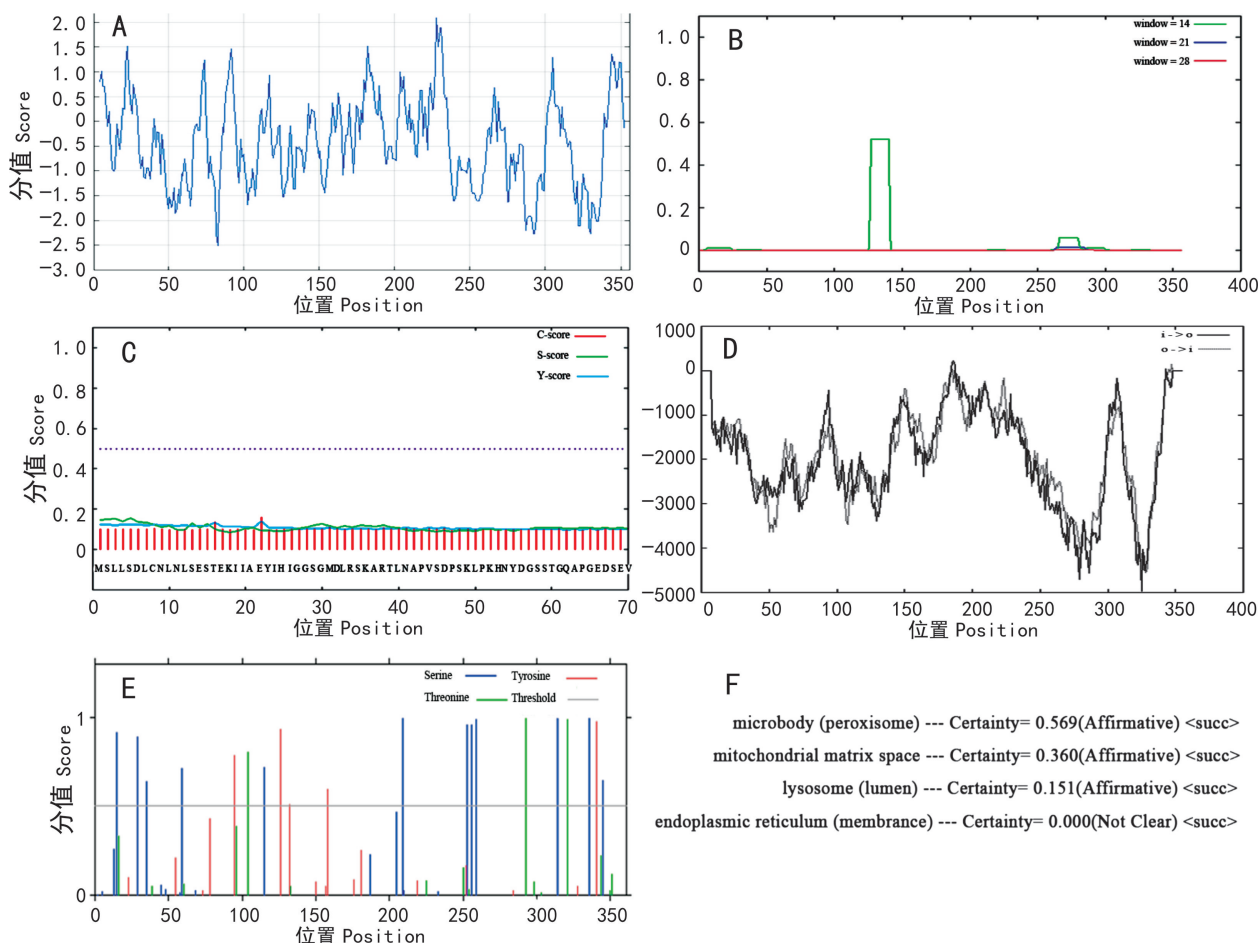


图 6 油茶 TS 蛋白质特征分析 A. 疏水性/亲水性预测; B. 氨基酸序列卷曲螺旋预测; C. 信号肽预测;
D. 氨基酸序列翻译后的磷酸化修饰预测; E. 跨膜区预测; F. 亚细胞定位预测。

Fig. 6 Analysis of characteristics about TS protein of *C. oleifera* A. Hydrophobicity/hydrophilicity prediction; B. Winded helix prediction of Amino acid sequence; C. Signal peptide prediction; D. Prediction of phosphorylation site modification in amino acid sequence; E. Prediction model for transmembrane domain; F. Subcellular localization prediction.

GS 基因家族成员,但是由于进化上的突变导致蛋白结构的变化从而改变了其催化的活性中心,形成新的蛋白功能。油茶与茶树的亲缘关系很近,它们有共同的进化祖先,其氨基酸序列和保守元件结构较为相似。所克隆的油茶 TS 基因与茶树 TS 基因差异可能由于种间关系的存在,在进化过程中基因突变引起的。

本研究用 HPLC 法在油茶中检测到了茶氨酸,并用 LC-TOF/MS 进行了质谱验证,首次在山茶科(属)植物中克隆了一条 ORF 长度为 1 071 bp 的 TS 基因序列。本研究为油茶新经济价值的发掘,为茶氨酸在油茶中合成代谢途径的研究提供一定理论基础。但对于茶氨酸为何仅存在于幼年的油茶根中需要进行深层次的研究,本文从油茶中克隆出的 TS 基因序列的表达和功能验证也需要继续深入。

参考文献:

- Casimir J, Jadot J, Renard M. 1960. Separation and characterization of N-ethyl- γ -glutamine in *Xerocomus badius* (*Boletus ladius*) [J]. *Biochim Biophys Acta*, (39):462-468
- Chen YZ(陈永忠). 2008. *Camellia oleifera* Fine Germplasm Resources(油茶优良种质资源)[M]. Beijing(北京): Chinese Forestry Publishing House(中国林业出版社),158-160
- Deng WW, Ogita S, Ashihara H. 2010. Distribution and biosynthesis of theanine in Theaceae plants[J]. *Plant Physiol Bioch*, **48**(1):70-72
- Hu FM(胡芳名), Tan XF(谭晓风), Liu HM(刘惠民). 2006. Cultivation and Utilization of Chinese Major Economic Tree Species(中国主要经济树种栽培与利用)[M]. Beijing(北京): Chinese Forestry Publishing House(中国林业出版社):369-384
- Hindmarch I, Rigney U, Stanley N, et al. 2000. A naturalistic investigation of the effects of day-long consumption of tea, coffee and water on alertness, sleep onset and sleep quality[J]. *Psychopharmacology (Berl)*, **149**:203-216
- Jin XL(金笑龙), Xiao ZD(肖正东), Chen SC(陈素传), et al.

2011. Variety selection of *Camellia oleifera* in Dabie mountains of Anhui province(安徽省大别山油茶选优研究)[J]. *Chin For Sci Technol* (林业科技开发), **25**(3):22-26
- Kakuda T. 2002. Neuroprotective effects of the green tea components theanine and catechins[J]. *Biol Pharm Bull*, **25**(12): 1 513-1 518
- Kimura K, Ozeki M, Juneja L, et al. 2007. L-Theanine reduces psychological and physiological stress responses [J]. *Biol Psychol*, **74**(1):39-45
- Li J(李娟), Deng TT(邓婷婷), Wu Y(吴扬), et al. 2011. Full-length cDNA cloning and sequence analysis of theanine synthetase gene in *Camellia sinensis*(茶氨酸合成酶基因的全长 cDNA 克隆及序列分)[J]. *Tea Sci*(茶叶科学), **31**(5):411-418
- Li J, Li P, Liu F. 2008. Production of theanine by *Xerocomus badius* (mushroom) using submerged fermentation[J]. *LWT-Food Sci Technol*, **41**(5):883-889
- Shi Q(施倩), Chen L(陈林), Li P(李平), et al. 2006. A method for determination of L-theanine with HPLC-PDAD in tea(茶叶中 L-茶氨酸 HPLC-PDAD 分析方法的建立)[J]. *J Anhui Agric Univ*(安徽农业大学学报), **33**(3):347-350
- Shimbo M, Nakamura K, Shi HJ, et al. 2005. Green tea consumption in everyday life and mental health[J]. *Public Health Nutr*, **8**(8):1 300-1 306
- Smit HJ, Rogers PJ. 2000. Effects of low doses of caffeine on cognitive performance, mood and thirst in lower and higher caffeine-consumers[J]. *Psychopharmacology(Berl)*, **152**(2):167-173
- Tsushida T, Takeo T. 1984. Occurrence of theanine in *Camellia japonica* and *Camellia sasanqua* seedlings [J]. *Agric Biol Chem*, **48**(11):2 861-2 862
- Wang Q(王琦), Feng EY(冯二艳), Wang R(王荣), et al. 2013. RACE cloning and bioinformatics analysis of nitrate reductase in *Beta vulgaris*(RACE 法克隆甜菜 NR 基因及生物信息学分析)[J]. *Guihaia*(广西植物), **33**(1):89-95
- Yamaguchi S, Ninomiya K. 2000. Umami and food palatability[J]. *J Nutr*, **130**(4):921-926
- Yuan DY(袁德义), Tan XF(谭晓凤), Hu QS(胡青素), et al. 2007. Study on camellia pollen characteristics and the vitality under different storage conditions(油茶花粉特性及其不同贮藏条件下生活力的研究)[J]. *J Zhejiang Fore Sci Technol* (浙江林业科技), **27**(5):57-60
- Zhang ZM(张哲敏), Sun P(孙萍), Wang WT(王旺田), et al. 2013. Bioinformatics analysis of *CBF2* in three different chilling resistance grapes and construction of plant expression vector(三种不同抗冻性葡萄中 *CBF2* 基因的生物信息学分析及植物表达载体构建)[J]. *Guihaia*(广西植物), **33**(1):82-88
- Zhuang RL(庄瑞林). 2008. *Camellia oleifera* in China(中国油茶)[M]. Second Edition(第二版) Beijing(北京): Chinese Forestry Publishing House(中国林业出版社):339-346

(上接第 76 页 Continue from page 76)

- [J]. *Guihaia*(广西植物), **32**(4):440-441
- Wang Y(王毅), Wang Y(王燕). 2010. *Habenaria anomaliflora*, a new record of Orchidaceae from China(中国兰科玉凤兰属一新记录种——奇花玉凤兰)[J]. *J Wuhan Bot Res*(武汉植物学研究), **28**(6):696-697
- Chen SC, Cribb PJ. 2009. *Habenaria Willdenow* [A]//Wu ZY, Raven PH, Hong DY (ed.), Flora of China[M]. Beijing: Science Press, **25**:144-160
- Govaerts R, Pfahl J, Campacci MA, et al. 2010. Word Checklist of Orchidaceae. The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew; <http://apps.kew.org/wcsp>
- Kurzweil H, Weber A. 1992. Flora morphology of Southern African Orchideae II. *Habenariinae*[J]. *Nordic J Bot*, **12**(1):39-61
- Kurzweil H. 2009. The genus *Habenaria* (Orchidaceae) in Thailand[J]. *Thai For Bull (Bot)*, Special Issue:7-105
- Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW et al. 2001. Genera Orchidacearum, Vol. 2[M]. Oxford University Press Inc: New York
- Seidenfaden G. 1977. Orchid genera in Thailand V. *Habenaria Willd*[J]. *Dansk Botanisk Arkiv*, **3**:65-146

(上接第 83 页 Continue from page 83)

- spectrometry(原子吸收光谱法测定蔬菜中的铁、锰、铜、铅和镉)[J]. *Spectr Lab*, **28**(1):72-73
- Zhou RL(周瑞莲), Wang G(王刚). 1997. Water stress induced changes in protective enzyme activities and effects of proline enhancement on drought resistance in pea(水分胁迫诱导下保护酶活性的变化和脯氨酸的增加对豌豆抗旱性的影响)[J]. *Acta Pratac Sin*(草业学报), **6**(4):39-43
- Zou CJ(邹春明), Han SJ(韩士杰), Xu WD(徐文锋), et al. 2003. Eco-physiological responses of *picea mongolica* ecotypes to drought stress(沙地云杉生态型对干旱胁迫的生理生态响应)[J]. *Chin J Appl Ecol*(应用生态学报), **14**(9):1 446-1 450
- Chong PF(种培芳), Su SP(苏世平), Li Y(李毅), Sun ZC(孙兆成). 2013. Physiological responses to PEG stress of *Reaumuria soongorica* seedlings from different geographical origins(不同地理种源红砂幼苗对 PEG 胁迫的生理响应)[J]. *Acta Pratac Sin*(草业学报), **1**(22):183-192
- Zheng QS(郑青松), Liu HY(刘海燕), Long XH(隆小华), et al. 2010. Effects of salt stress oil ionic absorption and distribution of rapeseed seedlings(盐胁迫对油菜幼苗离子吸收和分配的影响)[J]. *Chin J Soil Crop Sci*(中国油料作物学报), **32**(1):65-70