

· 研究报告 ·



外源物质对茶树耐寒及蔗糖代谢关键基因表达的影响

杨小青¹, 黄晓琴^{1*}, 韩晓阳¹, 刘腾飞², 岳晓伟¹, 伊冉¹

¹山东农业大学园艺科学与工程学院, 泰安 271018; ²山东省果树研究所, 泰安 271018

摘要 冬春季节低温伤害是影响茶树(*Camellia sinensis*)生产的重要因素。以茶树盆栽苗为试验材料, 通过喷施不同浓度的γ-氨基丁酸(GABA)、绿藻粉和竹醋液溶液, 研究低温胁迫下3种外源物质对茶树耐寒能力的影响, 并对蔗糖代谢关键基因SPS、SUS4、INV4和INV5表达量及耐寒相关生理指标进行分析, 解析外源物质影响茶树耐寒性的生理与分子机制。结果表明, 低温胁迫下, 用不同浓度GABA、绿藻粉和竹醋液喷施处理茶树盆栽苗叶片, 其冻害指数和相对电导率显著低于对照; 可溶性糖含量显著高于对照, 以10 mmol·L⁻¹ GABA、0.22 mg·mL⁻¹绿藻粉及2.5 mg·mL⁻¹竹醋液处理效果最佳。低温胁迫下, 与清水处理相比, 分别用10 mmol·L⁻¹ GABA、0.22 mg·mL⁻¹绿藻粉或2.5 mg·mL⁻¹竹醋液处理茶树盆栽苗后, 茶树苗丙二醛含量显著降低, 抗氧化酶活性显著提高; 叶片叶绿素、可溶性糖和脯氨酸含量显著增加, 蔗糖含量在处理72小时后分别增加了15.24%、11.39%和5.97%; SPS、SUS4、INV4和INV5基因的表达量显著升高。实验结果表明, GABA、绿藻粉和竹醋液能显著增强茶树的耐寒性。研究结果可为茶树抗寒剂的筛选提供理论依据。

关键词 茶树, 低温胁迫, 可溶性糖, 蔗糖, 抗寒剂

杨小青, 黄晓琴, 韩晓阳, 刘腾飞, 岳晓伟, 伊冉 (2020). 外源物质对茶树耐寒及蔗糖代谢关键基因表达的影响. 植物学报 55, 21–30.

茶业是我国的传统特色产业, 在农民增收致富中起重要作用。茶树(*Camellia sinensis*)为山茶科山茶属多年生常绿木本植物, 起源于温暖湿润的西南地区(王平盛和虞富莲, 2002), 形成了喜温怕寒的特性。因此, 低温是影响茶树分布与种植的重要生态因子。近年来, 全球气候变暖, 茶树物候期提前, 外加早生、特早生无性系茶树良种的推广应用, 导致春茶开园提早、茶树冻害频发, 茶叶生产遭受巨大损失(张贱根, 2006)。山东茶区属于茶树次适宜生长区, 在冬春季节时常遭受低温伤害, 使茶叶生产受到严重影响。目前, 无论南方还是北方茶区, 低温伤害已成为影响茶树生产的重要因素, 防御低温伤害已成为茶叶生产的重要课题。

抵御茶树低温伤害的措施除选育耐寒茶树品种外, 物理及化学防治方法也常被应用于茶叶生产(王育平, 2014)。例如, 在茶树上喷洒NaHSO₃(陈杭芳, 2007)、壳聚糖(孙世利等, 2008)、超敏蛋白(周琳等, 2014)、外源ABA(张丽等, 2012)和竹醋液(黄伟峰等,

2012)可防御低温伤害。选育耐寒茶树品种需要的年限较长, 相比而言化学防治低温伤害具有操作简便和成本低的特点。前人研究表明, 外源物质γ-氨基丁酸(GABA)(黄娟, 2015)和绿藻粉(艾沙江·买买提等, 2016)能增强甜瓜(*Cucumis melo*)、黄瓜(*C. sativus*)和梨(*Pyrus spp.*)等作物的抗冻性, 提高植株体内渗透调节物质含量, 减轻膜脂过氧化造成的原生质内结冰对植物组织的伤害程度。但GABA和绿藻粉等外源物质能否提高茶树抗冻性, 缓解低温胁迫的伤害鲜有报道。在前人研究的基础上, 我们选取3种无毒副作用的物质γ-氨基丁酸、绿藻粉和竹醋液进行防治茶树低温伤害实验。前期研究表明, 可溶性糖的积累与植物的耐寒相关性较强, 尤其是蔗糖含量与茶树耐寒性呈正相关(Ruan, 2014)。而喷施外源物质对蔗糖代谢关键基因表达的影响尚未见报道。

本实验以平阳特早盆栽苗为材料, 探究低温胁迫下施用GABA、绿藻粉和竹醋液对茶树叶片细胞膜氧化伤害、渗透调节物质及蔗糖代谢关键基因表达的影

收稿日期: 2019-02-13; 接受日期: 2019-05-07

* 通讯作者。E-mail: 31532504@qq.com

响,旨在明确GABA、绿藻粉和竹醋液对茶树低温胁迫伤害的缓解效果及其分子机制,以期为山东茶树抗寒剂的筛选提供理论依据,同时为缓解茶树低温胁迫伤害提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料 with 处理

以一年生平阳特早盆栽茶树(*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze)苗为试材,于2017年11月在山东农业大学北校区实验站温室进行实验。选取长势基本一致、无病虫害的一年生平阳特早盆栽苗,定植于盆中,每盆3株。盆内栽培基质为草炭和蛭石,按1:1的体积比混合。采用单因素试验设计。共设置12个处理:对照为清水;绿藻粉溶液浓度梯度为0.67、0.33、0.22和0.17 mg·mL⁻¹;竹醋液浓度梯度为5.0、3.3、2.5和2.0 mg·mL⁻¹;γ-氨基丁酸浓度梯度为5、10和20 mmol·L⁻¹。每3天喷施1次,连续喷3次。处理后将供试茶苗置于冷光源低温培养箱中,温度设为0℃(盆栽苗未经低温锻炼,通过温度筛选实验得出),光照强度为125 μmol·m⁻²·s⁻¹,相对湿度为70%–75%,光周期为12小时光照/12小时黑暗。分别在处理后0、1、2和4天测定叶片冻害指数、相对电导率和可溶性糖含量,确定各外源物质的最佳施用浓度。

进一步研究外源物质对茶树盆栽苗低温胁迫的缓解作用及其内在机制。选取另一批长势一致、无病虫害的一年生平阳特早盆栽苗进行实验。实验设置4个处理:清水、0.22 mg·mL⁻¹绿藻粉溶液、2.5 mg·mL⁻¹竹醋液溶液和10 mmol·L⁻¹ GABA。各处理选取30株长势基本一致的盆栽苗,分别喷施清水、0.22 mg·mL⁻¹绿藻粉溶液、2.5 mg·mL⁻¹竹醋液溶液和10 mmol·L⁻¹ GABA溶液,每3天喷施1次,连续喷3次。处理后,将盆栽苗置于冷光源低温培养箱中,设置温度为0℃,光照强度为125 μmol·m⁻²·s⁻¹,相对湿度为70%–75%,光周期为12小时光照/12小时黑暗。测定植株叶片色素、可溶性糖、脯氨酸、蔗糖、丙二醛含量及抗氧化酶活性。为研究低温胁迫下不同外源物质对蔗糖磷酸合成酶SPS、蔗糖合成酶SUS、细胞壁型转化酶INV4和液泡型转化酶INV5基因表达量的影响,分别于0、3、6、12、24、48和72小时取叶片(每个处理分别在3个不同植株选取叶位相同的叶

片,混合采样),液氮速冻,–80℃保存,用于测定基因相对表达量。

1.2 试剂

供试竹醋液购自湖州市德清县家意炭业有限公司。其理化指标如下:黄褐色液体,密度为1.0102 g·cm⁻³ (25℃下测定),pH3.03,吸光度1.85 (420 nm处)。绿藻粉购自云南德科特生物工程有限公司,其主要成分为蛋白质、脂肪、碳水化合物、纤维素、叶绿素和矿物质等。GABA购自Sigma公司。

1.3 指标测定

1.3.1 冻害指数

统计低温胁迫下叶片的伤害情况。认定标准为只要叶片出现萎蔫、水渍状和失绿等症状,均被认为发生冻害。统计各处理所有植株发生冻害的叶片数以及总叶片数。每处理设3次重复,结果取平均值。

冻害指数(%)=(植株出现冻害症状的叶片数/植株总叶片数)×100

1.3.2 生理指标

相对电导率按照李合生(1999)的方法测定。叶片色素含量测定用分光光度法。可溶性糖含量测定用蒽酮比色法。脯氨酸含量测定采用酸性茚三酮显色法。根系活力测定采用TTC法。过氧化氢酶(CAT)活性测定采用紫外吸收法。丙二醛(MDA)含量测定采用硫代巴比妥酸(TBA)比色法。过氧化物酶(POD)活性测定采用愈创木酚显色法。超氧化物歧化酶(SOD)活性测定采用氮蓝四唑光化还原法。每处理设3次重复,结果取平均值。

1.3.3 蔗糖含量

蔗糖含量测定采用高效液相色谱法。高效液相色谱仪配有RID-10示差检测器,色谱柱为Kro-masilNH₂ (250 mm×4.6 mm),流动相为纯水,流速0.6 mL·min⁻¹,柱温80℃,进样量10 μL。

提取方法:称取0.2 g样品,加入80%乙醇,充分研磨后过夜浸提,4℃、7 104 ×g离心10分钟,取上清液,用氮气吹至不含有有机相,定容至0.5 mL,用针头式过滤器过滤到带有内衬管的样品瓶中待测。每处理设3个重复,结果取平均值。

1.4 实时荧光定量PCR分析

采用EASYspin Plus植物RNA快速提取试剂盒(北京爱德莱生物科技有限公司)提取样品RNA。用于实时荧光定量PCR的cDNA利用反转录试剂盒(Perfect Real Time, TaKaRa)获得。实时荧光定量PCR采用试剂盒SYBR Green PCR Premix Ex Taq (宝生物公司), 参照操作说明书进行。引物序列见表1。用CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, USA)进行实时荧光定量PCR。反应程序为: 95°C预变性30秒; 95°C变性5秒, 58°C退火30秒, 40个循环。所有实时荧光定量PCR反应均设3次生物学重复和3次技术重复。数据采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行计算分析。

表1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Sequences (5'-3')
ACTIN-F	GCCATCTTTGATTGGAATGG
ACTIN-R	GGTGCCACAACCTTGATCTT
SPS-F	ACCTGGAGGCGATTCTGGATG
SPS-R	TTCCAAATCCGCCAGCACATA
SUS4-F	TCCTACACTCCGCACCAAGG
SUS4-R	AGCATCTCTTCATGTAGTAA
INV4-F	TGACAAAACAAAGGCTCGACT
INV4-R	CTAAAACACCATAGCCAAGA
INV5-F	CTAAATCTCGATCCTCCTAC
INV5-R	CCAGATAGCAGGAGGACACG

1.5 数据处理

实验数据用Excel 2007软件作图。用SPSS 20.0软件对数据进行单因素方差分析及差异显著性检验(Duncan's新复极差法, $P<0.05$)。

2 结果与讨论

2.1 3种外源物质对低温胁迫下茶树叶片冻害指数的影响

低温胁迫下, 茶树盆栽苗叶片受到不同程度的损伤, 出现萎蔫和水渍状等冻害症状, 对叶片生理功能造成一定影响。在低温胁迫过后, 我们对不同处理的叶片冻害指数进行统计分析, 结果(图1)表明, 相对于CK (清水)处理, 不同浓度的GABA、绿藻粉和竹醋液处理可降低叶片的冻害指数, 减轻叶片萎蔫程

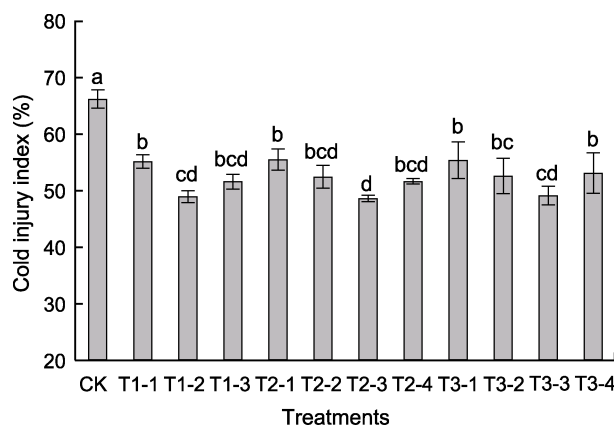


图1 低温胁迫下不同浓度GABA、绿藻粉和竹醋液处理对茶树叶片冻害指数的影响

CK: 清水; T1-1: 5 mmol·L⁻¹ GABA; T1-2: 10 mmol·L⁻¹ GABA; T1-3: 20 mmol·L⁻¹ GABA; T2-1: 0.67 mg·mL⁻¹绿藻粉; T2-2: 0.33 mg·mL⁻¹绿藻粉; T2-3: 0.22 mg·mL⁻¹绿藻粉; T2-4: 0.17 mg·mL⁻¹绿藻粉; T3-1: 5.0 mg·mL⁻¹竹醋液; T3-2: 3.3 mg·mL⁻¹竹醋液; T3-3: 2.5 mg·mL⁻¹竹醋液; T3-4: 2.0 mg·mL⁻¹竹醋液。不同小写字母表示各处理间差异显著($P<0.05$)。

Figure 1 The effect of GABA, chlorella powder and bamboo vinegar treatments on cold injury index of tea leaves under low temperature stress

CK: Water; T1-1: 5 mmol·L⁻¹ GABA; T1-2: 10 mmol·L⁻¹ GABA; T1-3: 20 mmol·L⁻¹ GABA; T2-1: 0.67 mg·mL⁻¹ chlorella powder; T2-2: 0.33 mg·mL⁻¹ chlorella powder; T2-3: 0.22 mg·mL⁻¹ chlorella powder; T2-4: 0.17 mg·mL⁻¹ chlorella powder; T3-1: 5.0 mg·mL⁻¹ bamboo vinegar; T3-2: 3.3 mg·mL⁻¹ bamboo vinegar; T3-3: 2.5 mg·mL⁻¹ bamboo vinegar; T3-4: 2.0 mg·mL⁻¹ bamboo vinegar. Different lowercase letters indicate significant differences among the treatments ($P<0.05$).

度, 其中以10 mmol·L⁻¹ GABA、0.22 mg·mL⁻¹绿藻粉和2.5 mg·mL⁻¹竹醋液处理效果最佳。

2.2 3种外源物质对低温胁迫下茶树叶片相对电导率的影响

电导率是衡量茶树植株体内细胞内容物扩散到细胞外的一项生理指标, 反映了细胞质膜受伤害的程度。低温胁迫下, 茶树叶片的相对电导率呈上升趋势, 且随着时间的延长, 上升幅度显著增加(图2)。低温胁迫下, 茶树叶片的电导率在0-4天均呈显著上升趋势, 喷施清水处理的叶片相对电导率升高幅度最大, 与清水处理相比, 不同浓度的GABA、绿藻粉和竹醋液处理可以降低叶片的相对电导率, 其中以0.22 mg·mL⁻¹

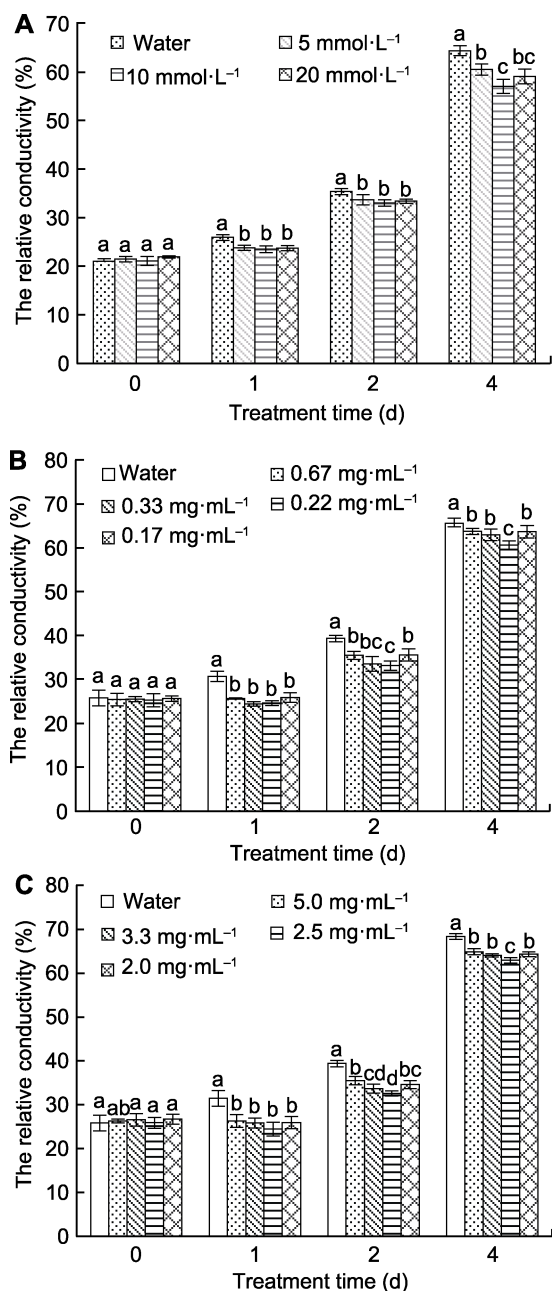


图2 低温胁迫下不同浓度GABA (A)、绿藻粉(B)和竹醋液(C)处理的茶树叶片相对电导率
数据为3次重复的平均值。柱上不同小写字母表示各处理间差异显著($P < 0.05$)。

Figure 2 The relative conductivity of tea leaves treated with different concentrations of GABA (A), chlorella powder (B) and bamboo vinegar (C) under low temperature stress
The data are means of three replicates. Different lowercase letters above the bars indicate significant differences among the treatments ($P < 0.05$).

绿藻粉(图2B)和2.5 mg·mL⁻¹竹醋液(图2C)的处理效

果最为显著, 10 mmol·L⁻¹ GABA (图2A)作用效果较为明显。上述结果表明, GABA、绿藻粉和竹醋液处理能够减轻低温对叶片细胞质膜的伤害。

2.3 3种外源物质对低温胁迫下茶树叶片可溶性糖含量的影响

低温胁迫下, 茶树叶片的可溶性糖含量呈上升趋势, 且随着时间的延长, 可溶性糖含量增加更为显著(图3)。低温胁迫下, 叶片的可溶性糖含量在0—4天呈上升趋势, 与清水处理相比, 不同浓度的GABA、绿藻粉和竹醋液处理能够提高叶片的可溶性糖含量, 其中10 mmol·L⁻¹ GABA (图3A)、0.22 mg·mL⁻¹绿藻粉(图3B)和2.5 mg·mL⁻¹竹醋液(图3C)效果最为明显, 在第4天分别比清水处理增加了6.68%、7.18%和13.05%。可溶性糖含量与温度变化密切相关, 其含量增加能显著增强细胞的抗逆能力, 说明GABA、绿藻粉和竹醋液处理能调节叶片细胞渗透压, 保护膜稳定性。综上, GABA、绿藻粉和竹醋液能够增强茶树盆栽苗的抗冻能力, 其中以10 mmol·L⁻¹ GABA、0.22 mg·mL⁻¹绿藻粉和2.5 mg·mL⁻¹竹醋液效果最佳。

2.4 3种外源物质对低温胁迫下茶树叶片叶绿素含量的影响

低温胁迫下, 10 mmol·L⁻¹ GABA、0.22 mg·mL⁻¹绿藻粉及2.5 mg·mL⁻¹竹醋液处理的茶树盆栽苗叶片叶绿素含量与对照相比显著增加(图4)。低温胁迫72小时, 与对照相比, 10 mg·L⁻¹ GABA、0.22 mg·mL⁻¹绿藻粉及2.5 mg·mL⁻¹竹醋液处理组的叶绿素a含量分别增加了7.18%、20.65%和12.05%; 叶绿素b含量分别增加了13.81%、28.25%和14.84%; 类胡萝卜素含量分别增加了7.74%、14.91%和6.21%, 且差异显著($P < 0.05$)。以上结果表明, 喷施GABA、绿藻粉和竹醋液能够缓解低温胁迫对叶片的伤害, 有利于植株进行光合作用。

2.5 3种外源物质对低温胁迫下茶树可溶性糖、脯氨酸和蔗糖含量的影响

低温胁迫下, 10 mmol·L⁻¹ GABA、0.22 mg·mL⁻¹绿藻粉及2.5 mg·mL⁻¹竹醋液处理的茶树盆栽苗叶片可溶性糖、脯氨酸和蔗糖含量与对照相比均显著增加(图5)。低温胁迫下, 茶树盆栽苗叶片可溶性糖、脯氨酸和蔗糖含量呈上升趋势, 且随处理时间的延长含量升

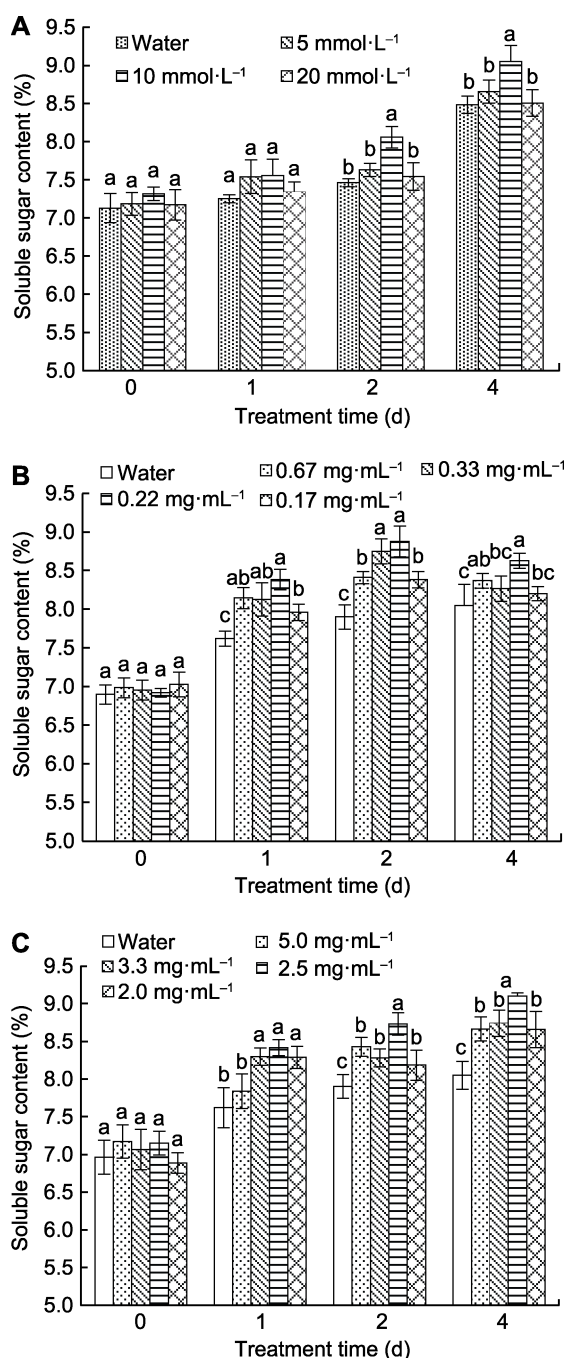


图3 低温胁迫下不同浓度GABA (A)、绿藻粉(B)和竹醋液(C)处理的茶树叶片可溶性糖含量
数据为3次重复的平均值。柱上不同小写字母表示各处理间差异显著($P<0.05$)。

Figure 3 The soluble sugar content of tea leaves treated with different concentrations of GABA (A), chlorella powder (B) and bamboo vinegar (C) under low temperature stress
The data are means of three replicates. Different lowercase letters above the bars indicate significant differences among the treatments ($P<0.05$).

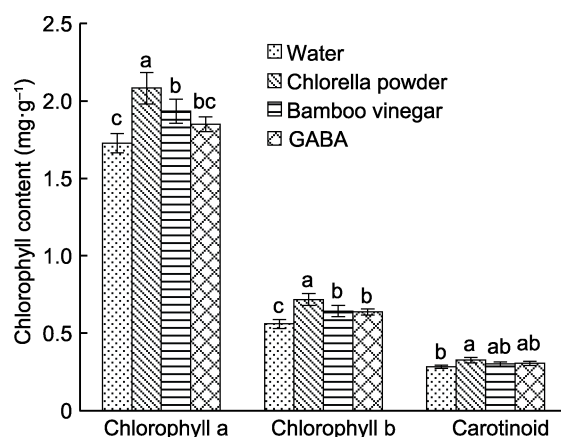


图4 低温胁迫下GABA、绿藻粉和竹醋液处理的茶树叶片叶绿素含量
数据为3次重复的平均值。柱上不同小写字母表示各处理间差异显著($P<0.05$)。

Figure 4 The chlorophyll content of tea leaves treated with GABA, chlorella powder and bamboo vinegar under low temperature stress
The data are means of three replicates. Different lowercase letters above the bars indicate significant differences among the treatments ($P<0.05$).

高。脯氨酸含量在处理0–6小时,可溶性糖含量在处理12–72小时,蔗糖含量在处理12–72小时上升趋势最为显著。与对照相比,10 mmol·L⁻¹ GABA、0.22 mg·mL⁻¹绿藻粉及2.5 mg·mL⁻¹竹醋液处理12小时,可溶性糖含量分别增加了9.14%、15.59%和9.91%;处理72小时,分别增加了21.06%、18.34%和17.66%,且差异显著($P<0.05$)。10 mmol·L⁻¹ GABA、0.22 mg·mL⁻¹绿藻粉及2.5 mg·mL⁻¹竹醋液处理6小时,脯氨酸含量分别增加了8.78%、9.23%和9.01%;处理72小时,脯氨酸含量分别增加了20.18%、26.78%和23.67%,且差异显著($P<0.05$)。10 mmol·L⁻¹ GABA、0.22 mg·mL⁻¹绿藻粉和2.5 mg·mL⁻¹竹醋液处理12小时,蔗糖含量分别增加了17.22%、9.75%和14.44%;处理72小时,分别增加了15.24%、11.39%和5.97%,且差异显著($P<0.05$)。可溶性糖和脯氨酸含量与温度变化密切相关,其含量增加能显著增强细胞的抗逆能力,植物体内蔗糖的积累能够维持低聚糖正常的代谢水平,且蔗糖可以通过多种途径增加代谢物的水平和某些酶的数量和活性。以上结果表明,喷施GABA、绿藻粉和竹醋液能够调节叶片细胞渗透压,保护膜稳定性,进而提高植株的抗寒能力。

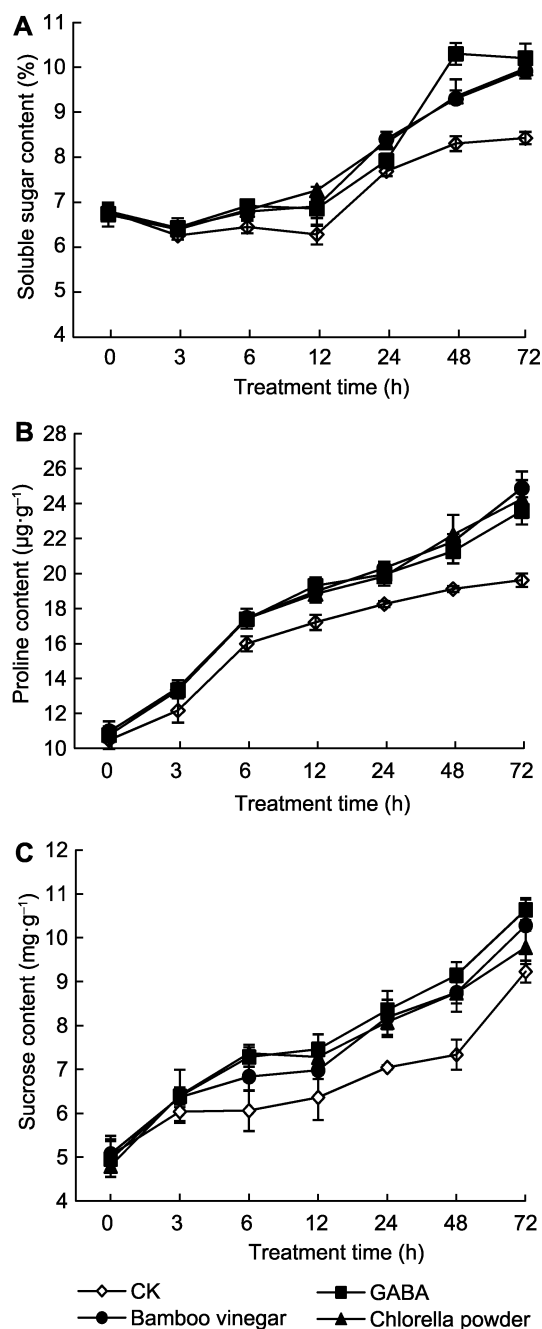


图5 低温胁迫下GABA、绿藻粉和竹醋液处理的茶树叶片可溶性糖(A)、脯氨酸(B)和蔗糖(C)含量

Figure 5 The soluble sugar (A), proline (B) and sucrose (C) content of tea leaves treated with GABA, chlorella powder and bamboo vinegar under low temperature stress

2.6 3种外源物质对低温胁迫下茶树丙二醛含量及抗氧化酶活性的影响

实验结果表明, $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ GABA、 $0.22\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 绿藻

粉及 $2.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 竹醋液处理能显著降低低温胁迫下细胞内丙二醛(MDA)的积累量(图6A), 提高CAT (图6B)、POD (图6C)和SOD (图6D)的活性。处理12小时, GABA、绿藻粉及竹醋液处理组MDA含量比CK处理分别降低了12.15%、10.38%和10.83%, CAT活性分别提高了18.35%、22.02%和31.19%, POD活性分别提高了13.53%、12.35%和11.76%, SOD活性分别提高了12.06%、18.14%和13.44%; 处理72小时, GABA、绿藻粉及竹醋液处理组MDA含量比CK处理分别降低了12.06%、15.01%和12.39%, CAT活性分别提高了19.08%、25.66%和23.37%, POD活性分别提高了9.13%、17.31%和17.31%, SOD活性分别提高了9.86%、11.11%和14.16%, 均差异显著($P<0.05$)。MDA的积累量能够反映膜脂过氧化作用和细胞膜结构受破坏程度, 过氧化氢酶、过氧化物酶和超氧化物歧化酶是防止氧自由基对细胞膜伤害的关键酶, 对清除低温下自由基伤害起重要作用。以上结果表明, GABA、绿藻粉及竹醋液处理能够降低低温对细胞膜的伤害。

2.7 3种外源物质对低温胁迫下茶树蔗糖代谢关键基因表达的影响

低温胁迫下, *SPS*、*SUS4*、*INV4*和*INV5*表达量呈显著上升趋势, $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ GABA、 $0.22\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 绿藻粉和 $2.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 竹醋液处理能进一步提高*SPS*、*SUS4*、*INV4*和*INV5*的相对表达量(图7)。低温处理24–48小时, 各基因相对表达量达最高水平。处理48小时, GABA、竹醋液和绿藻粉处理组*SPS*表达量分别提高了2.20、2.26和2.06倍(图7A); GABA、竹醋液和绿藻粉处理组*SUS4*表达量分别提高了5.12、5.23和5.43倍(图7B); GABA、竹醋液和绿藻粉处理组*INV4*表达量分别提高了3.24、2.86和2.50倍(图7C); GABA、竹醋液和绿藻粉处理组*INV5*表达量分别提高了4.52、5.22和3.66倍(图7D), 均差异显著($P<0.05$)。

2.8 讨论

茶树的抗寒性是其长期适应低温胁迫过程中经自然选择而逐步发展形成的一系列抵抗机制。例如, 低温诱导抗寒基因大量转录、表达, 从而增加细胞内渗透调节物质和抗氧化物质的含量以使植物适应冷环境

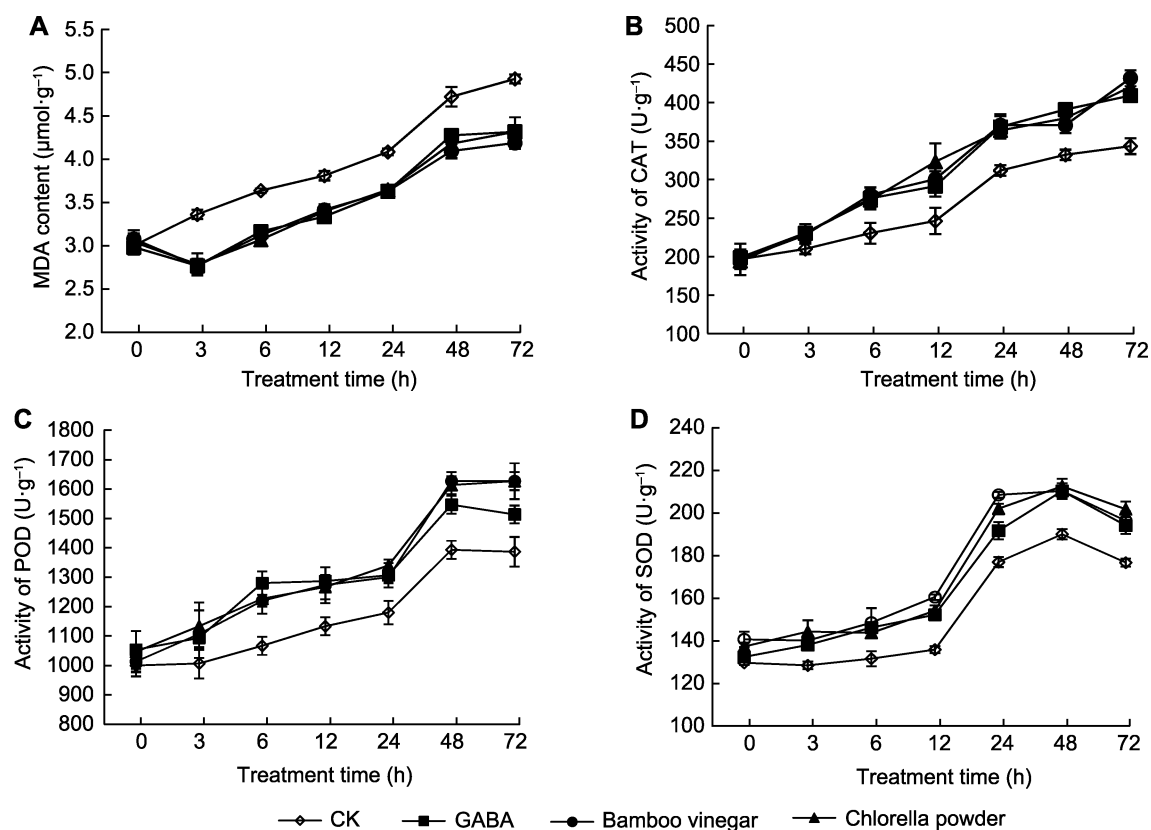


图6 低温胁迫下GABA、绿藻粉和竹醋液处理的茶树叶片丙二醛(MDA)含量(A)以及过氧化氢酶(CAT) (B)、过氧化物酶(POD) (C)和超氧化物歧化酶(SOD) (D)活性

Figure 6 The malondialdehyde (MDA) content (A) and activities of catalase (CAT) (B), peroxidase (POD) (C), superoxide dismutase (SOD) (D) of tea leaves treated with GABA, chlorella powder and bamboo vinegar under low temperature stress

(许英等, 2015)。喷施外源物质GABA、竹醋液和绿藻粉, 对减轻低温胁迫对茶树细胞膜的伤害、增加渗透调节物质含量、提高抗寒相关基因的表达水平, 进而增强茶树抗寒性具有显著作用。

细胞膜的流动性和稳定性是细胞及植物的生命活动基础, 寒冷环境中膜脂的过氧化也会破坏膜系统的稳定性。植物遭受寒害后, 原生质膜受到损伤和破坏, 透性增强, 电解质外渗率增大(丁菲, 2012)。本实验表明, 与清水处理相比, GABA、竹醋液和绿藻粉处理的茶树盆栽苗叶片相对电导率和丙二醛含量显著降低, 抗氧化酶活性显著增强。丙二醛作为膜脂过氧化的主要产物之一, 其积累是活性氧毒害作用的表现(Dhindsa and Mztowe, 1981; 陈贵等, 1991), 且植物因低温引起的代谢失调产生过多的氧自由基, 而保护酶可以清除氧自由基从而保护细胞膜结构(田景花等, 2015; 林郑和等, 2018)。GABA、竹醋液和绿藻

粉处理使茶树体内维持较高的保护酶活性, 减轻细胞内溶质外漏, 增强植株的抗寒能力。

糖类物质的积累是植物抵御寒冷的重要途径, 糖代谢与植物低温胁迫响应密切相关。前人研究表明, 植物细胞内可溶性糖含量直接影响植物的抗寒能力(Benina et al., 2013)。本研究表明, GABA、竹醋液和绿藻粉处理的茶树盆栽苗叶片可溶性糖和蔗糖含量显著增加, 与蔗糖代谢相关酶的编码基因SPS、SUS4、INV4和INV5表达量显著增高。

低温胁迫下, SPS、SUS和INV等多种与蔗糖相关的酶活性或其编码基因的表达水平被诱导, 通过调控蔗糖代谢响应低温(Baud et al., 2004; 岳川, 2015)。蔗糖磷酸合成酶(SPS)是蔗糖合成过程中的限速酶, 是分配光合产物蔗糖和淀粉的关键点(葛菁, 2012), 其活性直接影响分配的方向, 与蔗糖形成呈正相关, 而与淀粉形成呈负相关。当植物受到胁迫时, SPS

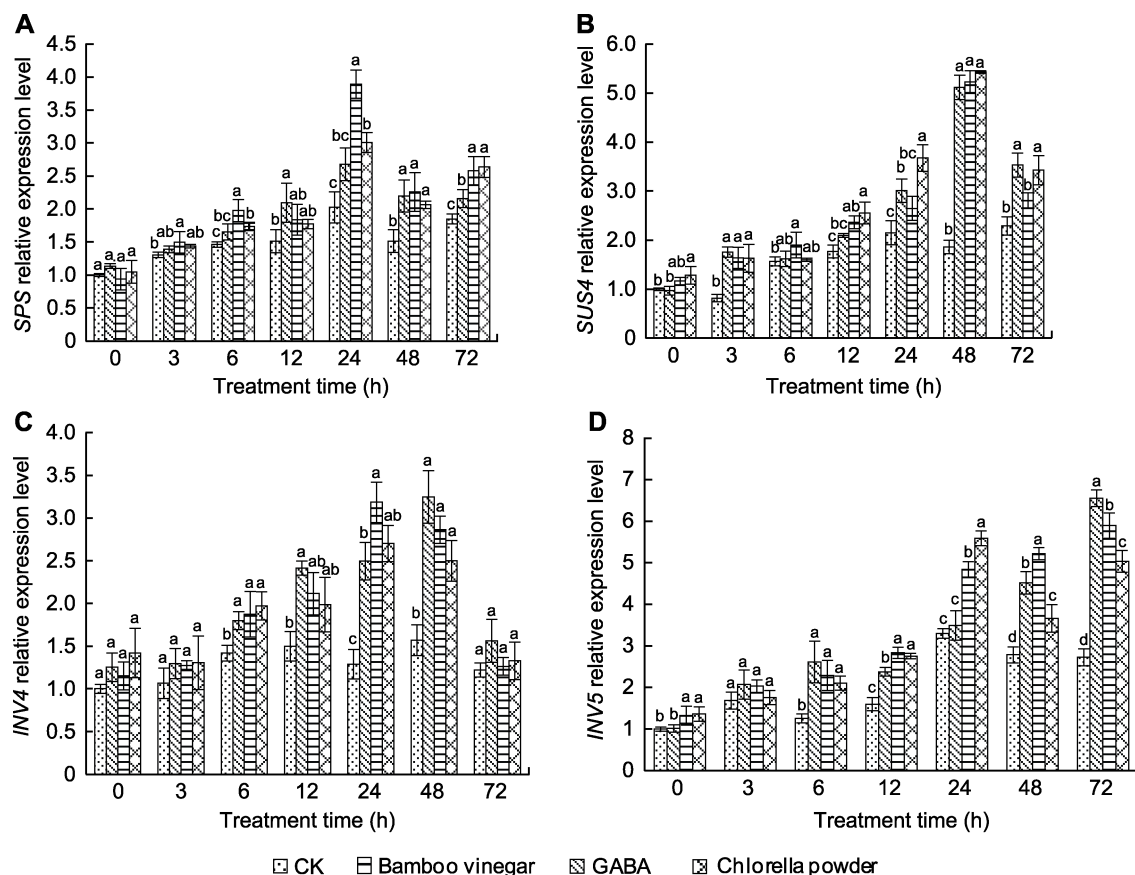


图7 低温胁迫下GABA、绿藻粉和竹醋液处理的茶叶叶片SPS (A)、SUS4 (B)、INV4 (C)和INV5 (D)基因表达量数据为3次重复的平均值。柱上不同小写字母表示各处理间差异显著($P < 0.05$)。

Figure 7 The effect of GABA, chlorella powder and bamboo vinegar on the expression of SPS (A), SUS4 (B), INV4 (C), and INV5 (D) genes in tea leaves under low temperature stress

The data are means of three replicates. Different lowercase letters above the bars indicate significant differences among the treatments ($P < 0.05$).

活性迅速升高,促进淀粉水解并大量合成蔗糖(刘凌霄等, 2005)。蔗糖含量升高有利于细胞渗透势的提高,防止低温下细胞结冰。蔗糖转化酶(INV)在植物糖代谢中发挥关键作用,植物组织中存在多种INV同工酶形式(刘慧英和朱祝军, 2002)。而蔗糖通过蔗糖合成酶(SUS)或转化酶(INV)的作用可以分解成葡萄糖和果糖,以使其渗透调节效果加倍,从而更有效地维持低温下细胞的渗透势(Ruan, 2014)。此外,糖类由于拥有很多羟基,能够替代水与磷脂头部进行氢键结合,取代失去的结合水,进而维持膜表面水化状态,维持细胞膜的稳定性(Otting et al., 1991)。因此, GABA、竹醋液和绿藻粉对调节可溶性糖(特别是蔗糖)含量、提高茶树渗透调节物质含量具有重要作用。

低温胁迫通过抑制酶活性(熊先军和刘明月, 2005)、损伤膜系统(王连荣和刘铁铮, 2010)以及破坏细胞结构(Dong et al., 1980)等限制植物的生长发育,对植物造成伤害。低温胁迫下,植物光合系统活性降低(孙鲁龙等, 2017)。叶绿素含量对茶树的光合作用有重要影响,影响植株的物质积累。研究表明, GABA、竹醋液和绿藻粉处理的茶树盆栽苗叶绿素含量显著高于清水处理。叶绿素是绿色植物进行光合作用的主要色素,与光合作用关系密切,其含量在一定程度上反映植物同化物质的能力(王素平等, 2006)。GABA、竹醋液和绿藻粉能够通过影响茶树的叶绿素含量增强植株应对低温的能力。

综上所述,低温胁迫下,对茶树盆栽苗喷施

10 mmol·L⁻¹ GABA、0.22 mg·mL⁻¹绿藻粉和2.5 mg·mL⁻¹竹醋液均可上调蔗糖相关酶编码基因SPS、SUS4、INV4和INV5的表达量, 提高叶片可溶性糖和脯氨酸含量及抗氧化酶活性, 缓解低温胁迫下叶片细胞膜氧化, 减轻低温胁迫对茶树盆栽苗的伤害。

参考文献

- 艾沙江·买买提, 张校立, 梅闯, 闫鹏, 王继勋 (2016). 保水剂、绿藻粉处理对库尔勒香梨抗冻能力的影响. 新疆农业科学 53, 445–454.
- 陈贵, 胡文玉, 谢甫继, 张立军 (1991). 提取植物体内MDA的溶剂及MDA作为衰老指标的探讨. 植物生理学通讯 27, 44–46.
- 陈杭芳 (2007). NaHSO₃提高春茶产量、品质和抗冻性机制探讨. 硕士论文. 杭州: 浙江大学. pp. 27–35.
- 丁菲 (2012). 低温胁迫下与茶树糖代谢相关基因的克隆与表达. 硕士论文. 合肥: 安徽农业大学. pp. 1–8.
- 葛菁 (2012). HPLC-ELSD测定茶树可溶性糖含量及GS基因的克隆与表达. 硕士论文. 合肥: 安徽农业大学. pp. 3–5.
- 黄娟 (2015). 外源GABA对温度胁迫下黄瓜生长的影响. 硕士论文. 重庆: 西南大学. pp. 25–42.
- 黄伟峰, 商晗武, 高永生, 胡剑光, 余秋珠, 王道泽 (2012). 竹醋基液抗寒剂对茶树抗寒性的影响. 茶叶科学 32, 432–440.
- 李合生 (1999). 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社. pp. 164–165.
- 林郑和, 钟秋生, 游小妹, 陈志辉, 陈常颂, 单睿阳, 阮其春 (2018). 低温胁迫对茶树抗氧化酶活性的影响. 茶叶科学 38, 363–371.
- 刘慧英, 朱祝军 (2002). 转化酶在高等植物蔗糖代谢中的作用研究进展. 植物学报 19, 666–674.
- 刘凌霄, 沈法富, 卢合全, 韩庆点, 刘云国 (2005). 蔗糖代谢中蔗糖磷酸合成酶(SPS)的研究进展. 分子植物育种 3, 275–281.
- 孙鲁龙, 耿庆伟, 邢浩, 杜远鹏, 翟衡 (2017). 低温处理葡萄根系对叶片PSII活性的影响. 植物学报 52, 159–166.
- 孙世利, 骆耀平, 潘顺顺, 凌彩金, 苗爱清, 赵超艺 (2008). 壳聚糖对茶树抗寒性相关指标的影响研究. 广东农业科学 (12), 34–37.
- 田景花, 王红霞, 张志华, 高仪 (2015). 低温逆境对不同核桃品种抗氧化系统及超微结构的影响. 应用生态学报 26, 1320–1326.
- 王连荣, 刘铁铮 (2010). 果树抗寒生理与防寒措施的研究进展. 安徽农业科学 38, 9483–9484.
- 王平盛, 虞富莲 (2002). 中国野生大茶树的地理分布、多样性及其利用价值. 茶业科学 22, 105–108, 134.
- 王素平, 郭世荣, 胡晓辉, 李璟, 焦彦生 (2006). 盐胁迫对黄瓜幼苗叶片光合色素含量的影响. 江西农业大学学报 28, 32–38.
- 王育平 (2014). 茶树冻害成因及预防补救措施. 福建农业科技 (5), 47–49.
- 熊先军, 刘明月 (2005). 辣椒抗寒性生理生化研究进展. 辣椒杂志 1, 9–12.
- 许英, 陈建华, 朱爱国, 栾明宝, 王晓飞, 孙志民 (2015). 低温胁迫下植物响应机理的研究进展. 中国麻业科学 37, 40–49.
- 岳川 (2015). 茶树糖类相关基因的挖掘及其在茶树冷驯化中的表达研究. 博士论文. 北京: 中国农业科学院. pp. 52–75.
- 张贱根 (2006). 茶树冻害的发生与预防补救措施. 茶业通报 28(1), 12–13.
- 张丽, 周欣, 蒋家月, 江昌俊, 朱政 (2012). 外源ABA对茶树抗寒生理指标的影响. 茶业通报 34, 72–74.
- 周琳, 陈暄, 王玉花, 朱旭君, 黎星辉, 房婉萍 (2014). 超敏蛋白对低温胁迫下茶树生理特性的影响. 园艺学报 41, 746–754.
- Baud S, Vaultier MN, Rochat C (2004). Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 55, 397–409.
- Benina M, Obata T, Mehterov N, Ivanov I, Petrov V, Toneva V, Fernie AR, Gechev TS (2013). Comparative metabolic profiling of *Haberlea rhodopensis*, *Thellungiella halophylla*, and *Arabidopsis thaliana* exposed to low temperature. *Front Plant Sci* 4, 499.
- Dhindsa RS, Matowe W (1981). Drought tolerance in two mosses: correlated with enzymatic defence against lipid peroxidation. *J Exp Bot* 32, 79–91.
- Dong HZ, Sun LH, Jian LC (1980). Ultrastructural changes in leaf cells of wheat varieties with different cold resistance after freezing-thawing of the plants. *Acta Bot Sin* 22, 339–342.
- Otting G, Liepinsh E, Wuthrich K (1991). Protein hydration in aqueous solution. *Science* 254, 974–980.
- Ruan YL (2014). Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling. *Ann Rev Plant Biol* 65, 33–67.

Effect of Exogenous Substances on Cold Tolerance and Key Sucrose Metabolic Gene Expression in *Camellia sinensis*

Xiaoqing Yang¹, Xiaoqin Huang^{1*}, Xiaoyang Han¹, Tengfei Liu², Xiaowei Yue¹, Ran Yi¹

¹College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China

²Shandong Institute of Pomology, Tai'an 271018, China

Abstract In recent years, low temperature damage in winter and spring has become an important factor affecting tea production. We used tea tree (*Camellia sinensis*) potted seedlings to test the effect of GABA, chlorella powder and bamboo vinegar on sucrose-related gene expression (*SPS*, *SUS4*, *INV4*, *INV5*) and cold-tolerant related physiological indexes. Different concentrations of the three kinds of exogenous substances were sprayed on seedlings under cold stress. We analyzed the expression of *SPS*, *SUS4*, *INV4* and *INV5* of the key sucrose-coding genes as well as the physiological indexes related to cold tolerance to determine the possible physiological and molecular mechanisms of the effect of exogenous substance spraying on cold tolerance of tea trees. The frost index and relative conductivity were significantly lower after application of GABA, chlorella powder or bamboo vinegar than control values and the soluble sugar content was increased. The optimal application concentration for GABA, chlorella powder and bamboo vinegar was 10 mmol·L⁻¹, 0.22 mg·mL⁻¹ and 2.5 mg·mL⁻¹, respectively. Malondialdehyde content was significantly decreased and antioxidant enzyme activity was increased; chlorophyll, soluble sugar and proline content was also increased. Sucrose content was increased by 15.24%, 11.39% and 5.97%, respectively, after 72 h treatment. The expression of *SPS*, *SUS4*, *INV4* and *INV5* in leaves was significantly increased with 10 mmol·L⁻¹ GABA, 0.22 mg·mL⁻¹ chlorella powder and 2.5 mg·mL⁻¹ bamboo vinegar. Thus, GABA, chlorophyll powder and bamboo vinegar can significantly improve the cold tolerance of tea plants. We provide a theoretical basis for the cryoprotectant selection for tea plants.

Key words tea tree, low temperature stress, soluble sugar, sucrose, cryoprotectant

Yang XQ, Huang XQ, Han XY, Liu TF, Yue XW, Yi R (2020). Effect of exogenous substances on cold tolerance and key sucrose metabolic gene expression in *Camellia sinensis*. *Chin Bull Bot* **55**, 21–30.

* Author for correspondence. E-mail: 31532504@qq.com

(责任编辑: 白羽红)