

# 茶树抗冻机制研究进展

李先文, 张苏锋, 陈世锋

(信阳师范学院 生命科学学院, 河南 信阳 464000)

**摘要:** 从形态结构、生理生化和分子生物学 3 个层面综述了茶树抗冻性方面的研究成果, 并提出, 茶树抗冻机制研究不仅要服务于茶树防冻减灾和抗冻育种, 为解决茶树冻害奠定理论基础, 还应将其作为解读常绿木本植物与草本和落叶木本植物间冷驯化差异分子机制的切入点。

**关键词:** 茶树; 抗冻机制; 形态学; 生理生化特性; 分子生物学

**中图分类号:** Q945.78 S184      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1004-3268(2012)09-0014-04

## Advances in Research on Antifreeze Mechanism of Tea Plants

LI Xian-wen, ZHANG Su-feng, CHEN Shi-feng

(College of Life Science, Xinyang Normal University, Xinyang 464000, China)

**Abstract:** The research progress of antifreeze mechanism of tea plants was summarized from the three perspectives of morphology, physiology and molecular biology. The antifreeze mechanism not only provided a basis for frost mitigation and improved variety breeding, but also was conferred as the breakthrough point to illustrate the different mechanisms of cold acclimation between evergreen woody plants and deciduous woody plants or herbaceous plants.

**Key words:** tea plants; antifreeze mechanism; morphology; physiological and biochemical characters; molecular biology

茶叶富含茶多酚、茶氨酸、咖啡碱和多种维生素, 具有防癌、抑癌、降血压和减肥等医疗功效, 是最受欢迎的饮品, 也是生产天然咖啡因、儿茶素和茶氨酸等药物的最佳原料, 因此, 茶叶是最具开发价值的植物材料之一, 许多国家都将其作为一种重要的木本经济作物<sup>[1-2]</sup>。目前, 茶树已被引种于多种不同的农业气候区, 生长范围已遍及 50 多个国家和地区, 我国已有 20 个省、市、自治区大量种植, 茶叶已成为其主产区农村经济的重要支柱产业和出口创汇的优势农业产业。然而, 许多地区每年初冬的骤至寒潮和早春的“倒春寒”气候, 常常使茶树遭受冻害, 严重影响着春茶的开采时间、产量和质量, 造成了严重的经济损失, 例如, 浙江省 2008 年就有近半数的茶园受冻, 直接经济损失 9.88 亿元<sup>[3]</sup>。另外, 位置较高的生产香高味浓、无污染名优茶的山坡茶园也常遭

受冻害。所以, 茶树冻害是茶叶生产中的重大问题和制约茶叶产业发展的突出问题<sup>[4]</sup>。研究茶树的抗冻机制和防冻措施对于茶叶生产的防冻减灾和抗冻育种都有重要的指导意义。自 20 世纪以来, 人们在茶树叶片的解剖结构、生化成分、质膜透性、细胞液浓度、保护酶活性等方面已经有了较系统的研究, 对茶树冻害发生的原因以及相应防御措施也进行了探讨<sup>[5-7]</sup>。此外, 近年来, 有关茶树冷驯化的分子生物学研究已迅速展开, 并取得了一些进展。为此, 对该领域的研究成果做一综述, 以便为今后进一步的研究提供参考。

### 1 茶树抗冻性的形态学研究

在 20 世纪, 人们已对引起茶树冻害的主要因素进行了广泛调查和研究, 认为茶树冻害的发生是外

收稿日期: 2012-03-28

基金项目: 河南省科技攻关项目(082102150009); 信阳师范学院博士启动基金项目

作者简介: 李先文(1961-), 男, 河南新县人, 教授, 博士, 主要从事茶树生理和分子生物学研究。E-mail: xianwenli01@sina.com

因与内因相互作用的结果。

低温是引发茶树冻害的主要外在因素。一般来说,气温越低且持续时间越长,茶树冻害越严重,而且干旱和大风可加深冻害的程度。试验证明<sup>[3,8]</sup>,冰核活性细菌的存在也是诱发或加重冻害的重要原因,在无冰核细菌存在时,植物能耐 $-6\sim-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的低温而不发生冻害,而冰核活性细菌的存在可使茶树在 $-2\sim-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下体内水分结冰,诱发冻害。另外,茶园的土壤肥力、空气湿度以及冻后解冻的天气条件等均对茶树冻害程度产生影响<sup>[9-10]</sup>。

决定茶树抗冻性的内在因素是其形态结构、生理生化等遗传特性,这些特性与品种特质密切相关。因此,品种是影响茶树冻害发生程度的主要内因,不同茶树品种对低温适应能力差异的根本原因是其基因型不同。有学者对来自不同国家茶树的抗冻性进行研究<sup>[4]</sup>,结果表明,中国、日本和朝鲜的茶树品种抗冻性较强,印度、斯里兰卡和缅甸等国的品种抗冻性较弱。对茶树形态结构水平的研究表明<sup>[4,11]</sup>,中国北方的茶树品种叶小、叶厚色深、保护组织发达,抗冻能力较强;而南方的茶树品种叶薄色浅、保护组织不发达,易受低温危害。南方乔木型或半乔木型的大叶种茶树在突遭低于 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的气温时就会受冻,而灌木型的中小叶种茶树要在 $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下才会出现冻害症状。抗冻性不同的茶树品种叶片的内部结构也有明显差别,抗寒品种普遍具有叶片较小,栅栏组织层数多、厚度大,栅栏组织与海绵组织的比值较高等特点。调查结果还表明,茶树不同器官的抗冻能力有明显差异,叶片抗冻能力最强,茎次之,根的抗冻性相对来说最弱。此外,茶树的树龄、树势、不同的发育阶段抗寒能力也有较大差异,随着树龄增加,抗寒力有增强的趋势<sup>[10-11]</sup>。然而,有关茶树冻害以及冷驯化时亚细胞结构方面变化的研究目前还很少,今后的研究工作应注意涉及。

## 2 茶树抗冻性的生理生化研究

茶树等常绿木本植物与很多草本植物一样,其抗冻性都关系到一系列生理生化特性,主要包括:(1)细胞膜系统对低温反应非常敏感,所以,植物叶片细胞质膜的通透性可以反映细胞受低温损伤的程度。经低温处理后,叶片细胞的相对电导率可作为茶树抗寒性的早期鉴定指标,其数值的大小与膜受伤害程度成正比,与植株的抗冻性成反比。因为细胞遭受寒冻损伤后,质膜通透性增大,胞内电解质外渗增多,使相对电导率变大。(2)叶片细胞内可溶性

糖含量和可溶性蛋白含量等生理指标与植株抗冻性间存在显著相关性。这是因为,可溶性糖既可调节细胞渗透压、增大保水能力,又可保护蛋白质免遭低温而变性凝固<sup>[4]</sup>。(3)植株的胁迫保护性酶类与其抗冻性有着密切的关系。植物的胁迫保护系统包括SOD(超氧化物歧化酶)、CAT(过氧化氢酶)、POX(过氧化物酶)、谷胱甘肽过氧化物酶等酶类以及维生素E、维生素A、维生素C、辅酶Q、类胡萝卜素等还原性物质。抗冻性强的茶树品系的SOD、CAT的活性在低温时能够维持较高的水平,且SOD、POX同工酶总活力及谱带数目明显多于或高于抗性弱的品系<sup>[1]</sup>。罗军武等<sup>[12]</sup>研究认为,SOD、CAT活性及可溶性蛋白质含量可用作茶树抗寒性鉴定的生理生化指标,抗寒性强的品种其SOD、CAT活性和可溶性蛋白质含量较高,而抗寒性弱的品种中其含量较低。(4)低温时光合强度和呼吸强度较弱的茶树品种,对不良环境的抵抗力远高于代谢较强、生长活跃的品种。光合作用速率的降低有利于茶树抗冻,这也可能是茶树等常绿木本植物适应低温环境的一种积极措施<sup>[9,13]</sup>。日本农林省茶叶试验场对幼龄茶树从秋季到初春期间碳素同化作用的测定表明,若以其9—10月份碳素同化量为100%,12月至翌年1月期间该数值仅为30%,3月增至45%左右。这说明茶树可通过减弱光合作用强度来适应低温季节<sup>[8,12]</sup>。(5)细胞含水量在不同温度下的变幅与植物抗冻性相关,变幅越大,意味着细胞自身调节水分状况的能力越强,抗寒能力就越强。因为含水量越高即意味着自由水与束缚水的比例越大,细胞间隙的自由水在 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下时便开始结冰,而束缚水的冰点在 $-20\sim-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ <sup>[8,11]</sup>。所以,减少自由水含量就会降低植株体内结冰的温度,从而减轻冻害。

目前,对上述叶片生理指标与茶树抗冻性关系的综合分析显示,质膜相对通透性在反映植株抗冻性关系程度上得分最高,相关度达45%左右;可溶性糖含量的相关度次之,大约为30%;而可溶性蛋白含量的抗冻性相关度为25%左右<sup>[2,8]</sup>。这些研究成果为茶树抗冻品种的选育提供了更科学的生理鉴定指标。

## 3 茶树抗冻性的分子生物学研究

茶树的分子生物学研究起步较晚,其功能基因克隆始于1992年<sup>[14]</sup>,至2004年2月7日,在dbEST中登录的茶树EST仅有5条<sup>[15]</sup>。2005年,陈亮等<sup>[15]</sup>报道了国内第1个茶树cDNA文库的构建及其EST

测序成功率分析。近年来,茶树的分子生物学研究进展迅速,到 2012 年 1 月 1 日,已可从数据库中查到 15 567 条茶树 EST 信息,蛋白质信息达 800 条。茶树分子生物学研究已成为茶叶科学中最活跃和进展最快的领域之一,许多国家(包括中国、日本、印度等)的学者都转向从事茶树基因的克隆及其功能的研究,目前已在茶叶品质及次生代谢物合成相关基因克隆研究方面做出了不少成绩,如克隆并研究了茶香味相关基因,茶多酚、茶氨酸及咖啡因等合成相关酶的基因以及多个茶树细胞周期调控蛋白的基因<sup>[1,16-17]</sup>。茶树是我国主要的经济作物之一,我国科研工作者在茶树多个方面的研究处在世界前列。

茶树冷诱导基因的克隆等研究工作始于 2006 年,目前已见报道或登录到数据库中的基因有数十个,这落后于草本植物。草本植物冷诱导基因的克隆及研究在 20 世纪 90 年代就已开始,现已得到研究的冷诱导基因就超过百个,其中包括多种转录因子[如 CBF(C-重复原件结合因子)、ICE1(CBF 表达诱导因子 1)、bZIP(碱性亮氨酸拉链蛋白)等]、多种与冷胁迫信号转导相关的蛋白(如有丝分裂原蛋白激酶、受体蛋白激酶、核糖体蛋白激酶和磷酸酯酶等)以及多种与初级和次级代谢相关酶的基因。而且在拟南芥等模式植物中,一个冷诱导基因的调控网络已初步绘制出来<sup>[18-20]</sup>。在茶树冷诱导基因方面的研究已有报道,如安徽农业大学的江昌俊研究组利用 cDNA-AFLP 技术分析了茶籽在低温贮藏过程中差异表达基因,克隆出了 10 个低温差异表达片段,包括小分子量热激蛋白、MYB 类转录因子、衰老相关蛋白、F-box 家族蛋白、蛋白激酶、磷酸二酯酶等基因高度同源的片段<sup>[16]</sup>,2011 年又克隆到 ERF(ethylene-responsive-element-binding factor, AP2/EREBP 家族成员)基因<sup>[21]</sup>;南京农业大学的邹中伟等<sup>[3]</sup>利用 cDNA-AFLP 技术在茶树中发现了 10 个与低温胁迫诱导相关的基因,其中 4 个可在数据库中找到同源序列,其他 6 个片段在数据库中找不到相似序列,可能是新基因;印度的 Paul 等<sup>[22]</sup>克隆了茶树的 WCOR413 冷驯化相关蛋白的基因(ACH87173);本研究组多年来一直在从事茶树抗冻性相关的生理生化和分子生物学研究,2006 年构建了茶树的冷诱导 cDNA 文库,并通过差减杂交筛选到 10 个冷诱导的 EST,包括编码 CBF、锌指蛋白、CsCOR1(一种细胞壁蛋白)、早期光诱导蛋白、 $\beta$ -淀粉酶等的基因,并提交到了数据库<sup>[23-25]</sup>。从已有的研究结果来看,已获得的茶树冷诱导基因中有

些与其他植物中发现的冷调节基因是类似的,如 CBF、ELIP 基因等<sup>[23,26]</sup>。但是,也有一些新基因,如 CsCOR1 基因(在数据库中搜索不到与其有明显相似性的序列)<sup>[25]</sup>。它们在增强茶树抗冻能力中,有些有显著效应(如 CBF、ICE1<sup>[26]</sup>或信号转导因子基因),但更多的是控制数量性状的微效基因。

随着研究的不断深入,人们进一步认识到研究茶树的抗冻性和冷驯化机制还具有更重要的理论意义和更广阔的应用价值。这是因为,(1)尽管对草本植物的冷驯化已有较深入的研究,对木本植物的冷驯化研究也已广泛展开,多种木本植物(如蓝莓、北美杜鹃、苹果、杨树和海滨松等)的冷诱导基因已被筛选,有一些已得到了进一步研究<sup>[20,27-28]</sup>,但是人们发现木本植物虽然也具有与草本植物同源的 ICE1-CBF 信号途径及相关成分<sup>[23,26]</sup>,但两者的冷驯化有所不同,木本植物的抗冻潜力更大(例如从冷驯化前后的半致死温度来看,冬黑麦分别为  $-5^{\circ}\text{C}$  和  $-30^{\circ}\text{C}$ ,而北美杜鹃的是  $-7^{\circ}\text{C}$  和  $-53^{\circ}\text{C}$ ),冷驯化机制也更复杂(有季节性驯化和休眠现象)<sup>[19,27]</sup>,所涉及的基因也有差别,例如,苹果的低温反应基因中有 20% 左右属于新基因<sup>[20]</sup>。然而,目前对木本植物特有的冷反应基因以及基因间互作的研究报道还很少,对其冷驯化潜能和遇冷休眠等复杂机制还缺乏了解。所以,研究木本植物的冷驯化机制有助于发掘和利用其抗冻潜力。(2)常绿木本植物的叶是研究木本植物冷驯化过程及其早期事件的良好材料。因为在落叶木本植物中,冷驯化通常首先表现为叶衰老和芽休眠。所以,其冷驯化过程不仅涉及冷反应基因,也牵涉到衰老和休眠反应基因,故很难专一性分析冷驯化基因的调控机制。而在茶树等常绿木本植物叶的冷驯化中就不存在衰老、休眠等干扰<sup>[19,27]</sup>。所以,今后应对茶树冷驯化机制研究的认识提升到一个新的高度——将其作为研究常绿木本植物与草本和落叶木本植物间冷驯化差异机制的切入点。可以相信,这一研究方向必将深化人们对茶树乃至整个植物界抗冻性和冷驯化机制的理解。

#### 参考文献:

- [1] Vyas D, Kumar S. Purification and partial characterization of a low temperature responsive  $\text{Mn}^{2+}$ -SOD from tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze.) [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 329: 831-838.
- [2] 李南薇,詹金广,陈少航. 茶多酚分离提取和应用研究进展[J]. 天津农业科学, 2010, 19(4): 8-10.

- [3] 邹中伟,房婉萍,张定,等.低温胁迫下茶树基因表达的差异分析[J].茶叶科学,2008,28(4):249-254.
- [4] 房用,慕宗昭,于连家,等.山东茶树品种及高效茶园栽培技术[J].林业科技开发,2005,19(3):62-64.
- [5] 杨新国.茶树冻害发生原因及防御补救措施[J].现代农业科技,2011(21):198-198.
- [6] 徐应槐.茶树冻害与旱热害的发生与防护[J].现代农业科技,2009(9):211.
- [7] 汪成云,陈雪飞.农业技术在茶叶抗晚霜冻害的应用试验[J].现代农业科技,2006(5):81.
- [8] 孙健,何天良,江昌俊.茶树上冰核活性细菌的分离、鉴定及防治[J].安徽农业大学学报,2011,38(4):1-4.
- [9] 高玳珍.茶树冻害与防冻技术的研究进展[J].湖南农业学报,1995,21(2):129-133.
- [10] 孙仲序,刘静,邱治霖,等.山东省茶树抗寒变异特性的研究[J].茶叶科学,2003,23(1):61-65.
- [11] 江昌俊,李叶云,韦朝领.茶树冻害减灾避灾关键技术与应用[J].茶业通报,2009,31(3):105-108.
- [12] 罗军武,唐和平,黄意欢,等.茶树不同抗寒性品种间保护酶类活性的差异[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2007,27(2):94-96.
- [13] 房婉萍,邹中伟,侯喜林,等.茶树冷胁迫诱导 *H1-his-tone* 基因克隆与序列分析[J].西北植物学报,2009,29(8):1514-1519.
- [14] 赵丽萍,马春雷,陈亮.茶树幼根 cDNA 文库构建及其表达序列标签特性分析[J].分子植物育种,2008(5):893-898.
- [15] 陈亮,赵丽萍,高其康.茶树新梢 cDNA 克隆测序和表达序列标签(ESTs)特性分析[J].农业生物技术学报,2005,13(1):21-25.
- [16] 张莉,江昌俊,胥振国,等.用 cDNA-AFLP 技术研究茶树种子在低温贮藏过程中差异基因的表达[J].安徽农业大学学报,2008,35(3):319-323.
- [17] Peng Y, Lin W, Wei H, *et al.* Phylogenetic analysis and seasonal cold acclimation associated expression of early light-induced protein genes of *Rhododendron catawbiense* [J]. *Physiol Plant*, 2008, 132(1):44-52.
- [18] Lee B, Henderson D A, Zhu J K. The *Arabidopsis* cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1 [J]. *The Plant Cell*, 2005, 17:3155-3175.
- [19] Novillo F, Alonso J M, Ecker J R, *et al.* CBF2/ DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101:3985-3990.
- [20] Wisniewskia M, Bassett C, Norelli J, *et al.* Expressed sequence tag analysis of the response of apple (*Malus × domestica* 'Royal Gala') to low temperature and water deficit [J]. *Physiologia Plantarum*, 2008, 133: 298-317.
- [21] 陈林波,房超,王郁,等.茶树抗逆相关基因 *ERF* 的克隆与表达特性分析[J].茶叶科学,2011,31(1):53-58.
- [22] Paul A, Kumar S, Ahuja P S. Cloning of full length cDNA encoding cold acclimation protein WCOR413-like protein from *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze [EB/OL]. [2012-05-21]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ACH87173>.
- [23] Wang L, Li X, Zhao Q, *et al.* Identification of genes induced in response to low-temperature treatment in tea leaves [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2009, 27:257-265.
- [24] 谢素霞,张媛,郭凯琳,等.一个新的茶树黄酮醇合酶基因的克隆和表达分析[J].植物生理学通讯,2009(11):1093-1097.
- [25] Li X W, Feng Z G, Yang H M, *et al.* A novel cold-regulated gene from *Camellia sinensis*, *CsCOR1*, enhances salt-and dehydration-tolerance in tobacco [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 394(2):354-359.
- [26] Wang Y, Jiang C J, Li Y Y, *et al.* *CsICE1* and *CsCBF1*; two transcription factors involved in cold responses in *Camellia sinensis* [J]. *Plant Cell Rep*, 2012, 31(1):27-34.
- [27] Wei H, Dhanaraj A L, Rowland L J, *et al.* Comparative analysis of expressed sequence tags from cold-acclimated and non-acclimated leaves of *Rhododendron catawbiense* Michx [J]. *Planta*, 2005, 221:406-416.
- [28] Luo L, Lin S Z, Zheng H Q, *et al.* The role of antioxidant system in freezing acclimation-induced freezing resistance of *Populus suaveolens* cuttings [J]. *Forestry Studies in China*, 2007, 9(2):107-113.