

叶锦培, 陈仕香, 唐世斌, 等. 温度处理对六堡茶茶苗抗性生理和 DNA 甲基化水平的影响[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(16): 164–167.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.16.031

# 温度处理对六堡茶茶苗抗性生理 和 DNA 甲基化水平的影响

叶锦培<sup>1,2</sup>, 陈仕香<sup>1</sup>, 唐世斌<sup>1</sup>, 黄欣宇<sup>1,2</sup>, 黄爱萍<sup>1</sup>, 黎敏芝<sup>1,2</sup>, 李晓丽<sup>1</sup>

(1. 广西大学林学院, 广西南宁 53004; 2. 苍梧县国有天洪岭林场, 广西苍梧 543005)

**摘要:**于 25 ℃(CK)、15 ℃和 5 ℃条件下, 水培六堡茶茶苗 1 个月后, 测定叶片中 MDA 含量, CAT、SOD、POD 活性及 DNA 甲基化水平。结果表明, 温度从 25 ℃降到 5 ℃时, 六堡茶茶苗 MDA 含量、CAT 活性和 DNA 甲基化水平呈现“低–高–低”的趋势, 15 ℃时高于对照组, 表明适当低温对 MDA 含量、CAT 活性和 DNA 甲基化水平有较强的刺激作用, 当温度低到一定程度时, 则会对其有一定的抑制作用; SOD、POD 活性呈现“高–低–高”的趋势, 15 ℃时低于对照组, 5 ℃时高于对照组, 表明适当的低温对 SOD、POD 活性有一定的抑制作用, 而随着温度继续降低则会对其有促进作用。研究结果有利于了解六堡茶的抗寒机理, 并为六堡茶的耐寒种质资源选择提供参考依据和理论指导。

**关键词:**温度; 胁迫; 抗性生理; DNA 甲基化; 六堡茶

**中图分类号:** S571.101; TS272

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1002–1302(2020)16–0164–04

在生长过程中, 植物可能会遇到各种环境胁迫。植物处在逆境状态下, 其体内的活性氧会大量积累, 导致其不能正常生长, 甚至死亡。植物体内的保护酶可以清除过量的活性氧, 维持其动态平衡。保护酶 CAT(过氧化氢酶)、SOD(超氧化物歧化酶)、POD(过氧化物酶)在植物抗逆性方面发挥重要作用。低温诱导下抗氧化酶基因表达提高, 增强了这些抗氧化酶的活性以维持植物体内活性氧的动态平衡, 增强植物对低温的抗性。同时, 胁迫下植物叶片中 MDA 含量也会增大, 膜脂过氧化加剧, 膜透性增强。

DNA 甲基化是植物生长发育中普遍存在的一种现象。研究植物 DNA 甲基化与环境胁迫之间的关联, 可为环境胁迫对植物生长发育的影响提供理论基础, 为农林业生产发展提供指导。

六堡茶因最早产自于广西梧州市苍梧县六堡镇而得名<sup>[1]</sup>, 其生产历史悠久, 被列为全国二十四

名茶之一<sup>[2]</sup>。20 世纪 50 年代, 六堡茶主导香港市场, 后热销东南亚<sup>[3]</sup>。近年来, 随着黑茶的消费热潮, 六堡茶的年产量和出口量均出现快速增长<sup>[4]</sup>。六堡茶的区域品牌价值在黑茶类中一直稳居前列, 梧州市政府出台多项政策措施扶持六堡茶的健康可持续发展。

六堡茶原产地广西梧州地处北回归线以南, 气候温暖湿润, 因此六堡茶对于低温的适应性相对较弱, 特别是 2008 年的雨雪冰冻灾害席卷全国, 六堡茶产区也不能幸免。随着全球变暖, 近年来极端天气和气候事件频繁发生, 探讨六堡茶对低温的抗性以及遭受低温时的生理生化变化, 对于六堡茶的选育和栽培乃至产业的发展有重要意义。本研究通过在不同温度环境下对六堡茶茶苗进行水培, 探讨低温胁迫下六堡茶茶苗的抗性生理和 DNA 甲基化水平差异, 不仅可揭示六堡茶的抗寒机理, 同时为六堡茶的耐寒种质资源选择提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料及处理

本次试验材料选自广西苍梧县国有天洪岭林场六堡茶六堡群体种扦插苗, 所选茶苗长势大体一致(苗高约 30 cm)。把茶苗根系土壤洗净后放入盛有 1 L 1/2 Hoagland 营养液的水桶中水培, 使茶苗适应水培环境, 期间每周更换营养液。水培 1 个月后,

收稿日期: 2019–10–10

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31600493); 广西科技基地和人才专项(编号: 桂科 AD17129021); 广西大学项目(编号: 20170102); 广西自然科学基金(编号: 2017GXNSFAA198007)。

作者简介: 叶锦培(1964—), 男, 广西苍梧人, 高级工程师, 主要从事森林培育与林业经营管理研究。E-mail: thllccz@163.com。

通信作者: 唐世斌, 副教授, 硕士生导师, 主要从事风景园林、森林培育研究。E-mail: tshibin@163.com。

将茶苗分别置于全光照培养箱中培养,温度设置 3 个处理,分别为 5 ℃、15 ℃ 和 25 ℃ (CK),每处理 3 个重复水桶,每个水桶放置茶苗 11 株。在恒温条件下培养 1 个月,每周更换营养液。每日光照时间为 12 h(07:00—19:00),光照度为 7 500 lx。各处理 1 个月后,茶苗都长出嫩叶,采集枝条顶部新长出的 2~3 张嫩叶和芽保存在 4 ℃ 低温下用以测定生物指标。

## 1.2 抗性生理指标测定

采用南京建成生物工程研究所的试剂盒提取 MDA、CAT、SOD 和 POD,提取步骤参照试剂盒说明书。采用 TBA 法测定 MDA 含量,采用可见光法测定 CAT、POD 活性,采用羟胺法测定 SOD 活性。

## 1.3 DNA 甲基化水平

1.3.1 DNA 提取 六堡茶茶苗叶片基因组 DNA 的提取采用康为世纪生物科技有限公司的新型植物基因组 DNA 试剂盒,提取步骤参照试剂盒说明书,提取的 DNA 保存于 -20 ℃ 下。取 10  $\mu\text{L}$  DNA 提取液,采用紫外分光光度计测定  $D_{260\text{ nm}}$  和  $D_{280\text{ nm}}$ ,以  $D_{260\text{ nm}}$  估算 DNA 产率, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  判断 DNA 样品纯度。

1.3.2 DNA 甲基化水平测定 六堡茶茶苗叶片 DNA 中 5-甲基胞嘧啶和胞嘧啶的测定主要参照黑淑梅等的方法<sup>[5]</sup>,首先配制好 2 mol/L HCl 溶液和 4 mol/L NaOH 溶液各 1 L。移取上述 DNA 溶液 20  $\mu\text{L}$  于 1.5 mL 离心管中,再吸取 20  $\mu\text{L}$  2 mol/L HCl 于其离心管中,于恒温水浴锅中 80 ℃ 水解 120 min,水解后吸取 20  $\mu\text{L}$  4 mol/L NaOH 于离心管中以中和 HCl,4 000 r/min 离心分离 1 min,移取上清液于新的离心管中,待测 5-甲基胞嘧啶(5-MeC)的含量。

将 50 mg 胞嘧啶标准品溶解于 500  $\mu\text{L}$  的 TE 缓冲液中(浓度为 100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ),再取 0.75  $\mu\text{L}$  溶于 1.5 mL TE 缓冲液配制成浓度为 50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  的胞嘧啶标准品溶液。5-甲基胞嘧啶标准品溶液也以相同方式制备。

用高效液相色谱法测定六堡茶茶苗 DNA 甲基化水平。色谱柱:Hypersil BDS-C18 键合柱(5  $\mu\text{m}$ , 150 mm  $\times$  4.6 mm)。流动相的组成成分:5% 甲醇,4.75 mmol/L 己烷磺酸钠,0.2% 三乙醇胺。流动相用娃哈哈纯净水配制,再用磷酸将其 pH 值调为 5.5。流速:0.7 mL/min。检测波长:273 nm,进样量:10  $\mu\text{L}$ ,运行时间:15 min。胞嘧啶和 5-甲基胞

嘧啶标准品进样量分别为 2、4、6、8、10  $\mu\text{L}$ ,其对应的浓度为 10、20、30、40、50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

## 1.4 数据分析

六堡茶茶苗叶片 DNA 的胞嘧啶(C)和 5-甲基胞嘧啶(5-MeC)的含量,运用外标准法计算。先比较样品和标准品的峰面积,再根据公式 $[(5\text{-MeC})/(C+5\text{-MeC})] \times 100\%$  计算 5-MeC 的百分含量。用 MS Excel 2007 对所有数据进行整理后,用 SPSS 19.0 进行数据分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 低温对六堡茶茶苗抗性生理的影响

2.1.1 MDA 含量 从对照温度(25 ℃)降到 5 ℃ 时,MDA 含量呈现“低—高一低”的趋势(图 1-A)。对照 MDA 含量为 117.66 nmol/g,15 ℃ 时 MDA 含量高于对照组 73.07% (203.63 nmol/g),而 5 ℃ 时则低于对照组 22.37% (91.34 nmol/g)。适当的低温对 MDA 有较强的刺激作用,当温度低到一定程度时,则对 MDA 有一定的抑制作用。

2.1.2 CAT 活性 从对照温度(25 ℃)降到 5 ℃ 时,CAT 活性呈现“低—高—低”的趋势(图 1-B)。对照 CAT 活性为 2.25 U/mg,15 ℃ 时 CAT 活性高于对照组 64.44% (3.70 U/mg),而 5 ℃ 时则低于对照组 19.11% (1.82 U/mg)。适当的低温对 CAT 有较强的刺激作用,当温度低到一定程度时,则对 CAT 有一定的抑制作用。

2.1.3 SOD 活性 从对照温度(25 ℃)降到 5 ℃ 时,SOD 活性呈现“高一低—高”的趋势(图 1-C)。对照 SOD 活性为 1.97 U/mg,15 ℃ 时 SOD 活性低于对照组 7.11% (1.83 U/mg),而 5 ℃ 时则高于对照组 4.06% (2.05 U/mg)。适当的低温对 SOD 有一定的抑制作用,温度为 5 ℃ 时对 SOD 有促进作用。

2.1.4 POD 活性 从对照温度(25 ℃)降到 5 ℃ 时,POD 活性呈现“高一低—高”的趋势(图 1-D)。对照 POD 活性为 0.18 U/mg,15 ℃ 时 POD 活性低于对照组 55.56% (0.08 U/mg),而 5 ℃ 时则高于对照组 11.11% (0.20 U/mg)。适当的低温对 POD 有一定的抑制作用,随着温度的继续降低对 POD 有刺激作用。

### 2.2 低温对六堡茶茶苗 DNA 5-甲基化的影响

如图 2-A 和 2-B,以浓度( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )为横坐标,峰面积( $\times 10\ 000$ )为纵坐标绘制标准曲线。

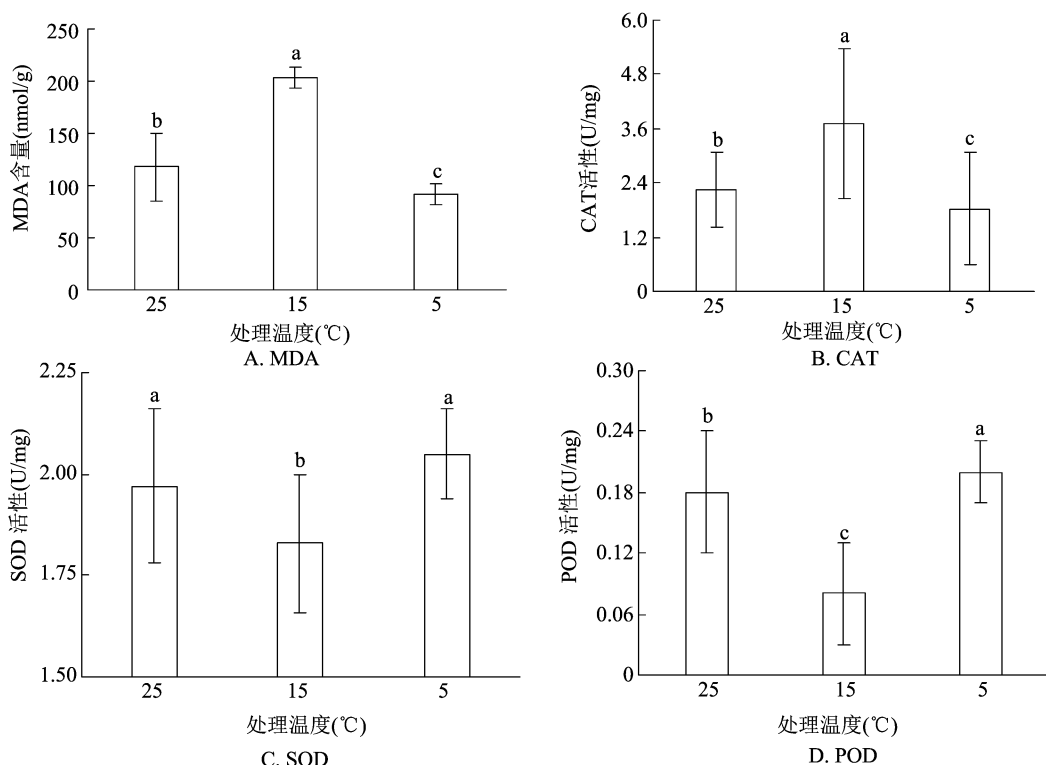


图1 低温胁迫对六堡茶茶苗抗性生理指标的影响

标准品胞嘧啶的线性方程为  $y = 12\,590x + 3\,212$ ,  $r^2 = 0.999\,6$ ; 标准品 5-甲基胞嘧啶线性方程为  $y = 37\,715x - 16\,156$ ,  $r^2 = 0.999\,6$ ; 说明胞嘧啶和 5-甲基胞嘧啶在  $0 \sim 50\, \mu\text{g}/\mu\text{L}$  范围内, 分别都有良好的线性关系。

从对照温度(25 °C)降到 5 °C 时, 六堡茶 DNA 甲

基化水平呈现“低-高-低”的趋势, 如图 3 所示。对照组 DNA 甲基化水平为 9.79%, 15 °C 时为 27.36%, 高于对照组 179.47%, 而 5 °C 时为 24.14%, 高于对照组 146.58%。结果表明, 适当的低温对 DNA 甲基化水平有一定刺激作用, 当温度低到一定程度时, 则对 DNA 甲基化水平有一定的抑制作用。

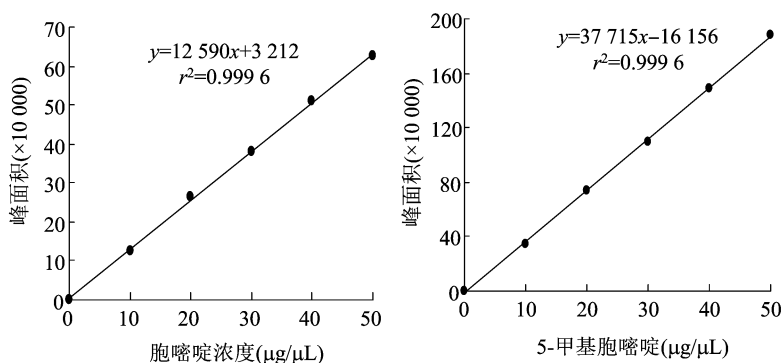


图2 胞嘧啶(A)和 5-甲基胞嘧啶(B)标准曲线

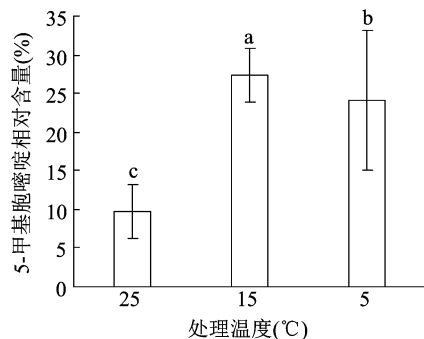


图3 低温胁迫对六堡茶茶苗 5-甲基胞嘧啶含量的影响

### 3 讨论与结论

#### 3.1 低温胁迫对六堡茶茶苗抗性生理的影响

活性氧是与氧代谢有关过程的中间产物, 其中以自由基形式存在的活性氧会导致植物不能正常生长发育, 加速植物衰老, 甚至导致死亡<sup>[6]</sup>。六堡

茶茶苗体内的活性氧和活性氧清除系统, 在正常情况下能够保持着动态平衡。当遭受到胁迫时, 六堡茶茶苗的光合作用受阻, 部分氧气被作为电子受体形成超氧阴离子自由基( $\text{O}_2^- \cdot$ ), 其体内就会累积超过动态平衡的活性氧, 超越活性氧清除系统的能力范围, 就会破坏细胞结构和功能, 使六堡茶茶苗

的生长受阻。

CAT、SOD 和 POD 是六堡茶茶苗体内酶催清除系统中的主要成员。在清除活性氧时,SOD 是第一个发挥作用的抗氧化酶,催化  $O_2^-$  发生歧化反应,产生  $H_2O_2$  和水。CAT 和 POD 可以阻断自由基链式反应,通过不同的方式把  $H_2O_2$  分解为水和氧气。六堡茶茶苗体内非酶系统产生的氧自由基,能攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸,引发脂质过氧化作用,并由此形成脂质过氧化物,使茶苗组织细胞受损伤。MDA 是脂质氧化终产物,作为膜脂过氧化指标,直接反映六堡茶茶苗的受损程度。

本研究表明,随着温度降低,MDA 含量先呈现上升状态,膜脂过氧化程度增大,在 15 ℃ 后开始下降,膜脂过氧化程度减小,说明 15 ℃ 的低温对六堡茶茶苗的生长有抑制作用,受损程度最大。随着温度降低,六堡茶茶苗的 CAT 活性先增加后降低,SOD 和 POD 则随着温度的降低先下降后上升。当 SOD 和 POD 活性较低时,为了维持活性氧与活性氧清除系统的平衡,CAT 活性增大,在维持活性氧平衡中发挥主要作用。在 15 ℃ 时,SOD 和 POD 活性降低的原因目前尚不明确,推测可能与茶苗对低温的适应机制有关,15 ℃ 可以导致酶活性的下降但不足以使 SOD 和 POD 在茶苗体内高度表达。同时,SOD、POD 活性与 MDA 含量紧密相关<sup>[7]</sup>,MDA 是自由基引起的膜脂过氧化的产物,而 SOD 则是清除自由基的主要抗氧化酶<sup>[8]</sup>,随着温度降低,六堡茶茶苗的 MDA 含量先升高后降低,SOD 活性先下降后升高,两者呈现负相关。低温抑制了六堡茶茶苗的 SOD 活性,使活性氧大量积累,MDA 含量增大,加大了膜脂过氧化程度,破坏了膜的完整性,使得茶苗叶片不能正常生长,进而危害六堡茶茶苗的整体。

### 3.2 低温胁迫对六堡茶茶苗 DNA 甲基化水平的影响

DNA 甲基化是六堡茶茶苗调控其基因表达的重要手段之一,在低温驯化过程中,某些与耐寒相关的基因被激活,从而使六堡茶茶苗适应低温逆境。Choi 等的研究表明,低温胁迫下植物的相关抗逆基因发生去甲基化,增加相应基因的表达量来应对低温逆境<sup>[9]</sup>。因此,低温(15 ℃ 和 5 ℃)下,六堡茶茶苗为了适应低温而使基因组总体上趋向于去甲基化从而调控某些耐寒基因表达,进而增强了六堡茶茶苗对低温的适应性。周艳华等利用 MSAP 技

术分析发现,与对照组相比,低温处理期间茶树样品和低温处理之后茶树样品,其基因组 DNA 同时发生甲基化和去甲基化,甲基化水平高于去甲基化水平,因此总体甲基化水平呈现增加趋势<sup>[10]</sup>,这与本研究结果相一致。

低温胁迫下,六堡茶茶苗 DNA 甲基化水平呈现先升高后降低的趋势,可能是因为温度从 25 ℃ 降到 15 ℃,对甲基转移酶、染色质甲基化酶和重新甲基化酶的活性抑制不大,甚至还有所促进,从而提高了六堡茶茶苗 DNA 甲基化水平。当温度进一步降低,则抑制了这些参与 DNA 甲基化酶的活性,从而使六堡茶茶苗的 DNA 甲基化水平有所降低。

本研究分别于 25 ℃、15 ℃ 和 5 ℃ 下水培六堡茶茶苗,测定叶片中 MDA 含量,CAT、SOD 和 POD 活性以及叶片中 DNA 甲基化水平。研究表明,适当低温对六堡茶茶苗叶片中 MDA 含量、CAT 活性和 DNA 甲基化水平有较强的刺激作用,当温度低到一定程度时,则会对其有一定的抑制作用。同时,适当的低温对六堡茶茶苗叶片中 SOD 和 POD 活性也有一定的抑制作用,而随着温度继续降低,则会对其有促进作用。本研究结果不仅可以揭示六堡茶的抗寒机理,而且可为六堡茶的耐寒种质资源选择提供理论指导。

### 参考文献:

- [1] 龙志荣,邱瑞瑾,马士成,等. 六堡茶研究进展[J]. 中国茶叶加工,2017(1):40-45.
- [2] 龙志荣,马士成,梅宇,等. 2013 年全国六堡茶产销形势分析报告[J]. 茶世界,2013(7):16-22.
- [3] 温志杰,石荣强,何勇强,等. 六堡茶渥堆过程中微生物种群变化的研究[J]. 安徽农业科学,2012,40(2):1009-1011.
- [4] 陈小强,叶阳,成浩,等. 六堡茶的理化分析研究[J]. 中国农学通报,2008(7):77-80.
- [5] 黑淑梅. 重金属铬对小麦根系 DNA 甲基化水平的影响[J]. 吉林农业科学,2012,37(2):14-15,26.
- [6] 陈巧艳,李迎迎,刘刘平,等. 低温胁迫对不同小麦品种结实率和活性氧代谢的影响[J]. 江苏农业科学,2018,46(11):63-65.
- [7] 王宝山,赵思齐. 干旱对小麦幼苗膜脂过氧化及保护酶的影响[J]. 山东师大学报:自然科学版,1987(1):29-38.
- [8] 勾晓华,王勋陵. 氟化氢对植物叶片中 SOD 酶活力和 MDA 含量的影响[J]. 西北植物学报,1995(5):71-76.
- [9] Choi C S, Sano H. Abiotic - stress induces demethylation and transcriptional activation of ageneencoding a glycerophosphodiesterase-like protein in tobacco plants[J]. Molecular Genetics and Genomics,2007,277(5):589-600.
- [10] 周艳华,曹红利,岳川,等. 冷驯化不同阶段茶树 DNA 甲基化模式的变化[J]. 作物学报,2015(7):1047-1055.