

黄茶“中黄 2 号”的亚细胞结构透射电镜观察

韦 康¹, 王丽鸳¹, 王新超¹, 陈建兴², 胡惜丽², 杨广谊², 成 浩^{*1}

(1.中国农业科学院 茶叶研究所,浙江 杭州 310008;2. 缙云县农业局,浙江 缙云 323000)

摘要: 利用透射电镜技术研究了黄化品种“中黄 2 号”与正常品种“龙井 43”第 2、6 叶的亚细胞结构差异。结果发现中黄 2 号与龙井 43 在细胞核、胞质、线粒体、高尔基体等亚细胞结构和分布规律方面基本一致,而叶绿体结构则有较大差异。中黄 2 号第 2 叶叶绿体明显偏小,且基粒片层堆叠少于龙井 43。其第 6 叶片层堆叠多于第二叶,但仍少于龙井 43。叶绿体内片层堆叠情况与其含量测定结果一致。同时,遮荫处理后中黄 2 号叶色变绿,叶绿体片层堆叠也增多。研究发现,中黄 2 号的黄化可能与其叶绿体基粒片层合成受阻有关,该结果为深入解析中黄 2 号黄化的机理打下基础。

关键词: 茶树;黄化变异品种;中黄 2 号;叶绿体;透射电镜

中图分类号: S 184 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2017)12-1246-05

Transmission Electron Microscopic Study of Subcellular Structure of Yellow Tea Cultivar ‘Zhonghuang 2’

WEI Kang¹, WANG Liyuan¹, WANG Xinchao¹, CHEN Jianxing²,
HU Xili², YANG Guangyi², CHENG Hao^{*1}

(1. Tea Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310008, China; 2. Jinyun Agricultural Bureau, Jinyun 323000, China)

Abstract: The subcellular structures of the second and sixth leaves of yellow tea cultivar "Zhonghuang 2" and normal green tea cultivar "Longjing 43" were studied by transmission electron microscope. It was found there were no significant differences in ultrastructure and distribution of nucleus, cytosol, mitochondrion and golgi apparatus. The largest difference was existed in chloroplast ultrastructure. Compared to Longjing 43, smaller chloroplasts and less grana lamellae were found in Zhonghuang 2. The chloroplast lamellae numbers were increased in the sixth leaves of Zhonghuang 2, but were still less than those in Longjing 43. The chloroplast lamellae numbers were consistent with the chlorophyll contents determined. Furthermore, the second leaves of Zhonghuang 2 turned green and the chloroplast lamellae numbers increased under shading treatment. In summary, it was the first finding that the yellow tea cultivar "Zhonghuang 2" was correlated with the

收稿日期: 2015-06-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(31470396);现代农业(茶叶)产业技术体系项目(CARS-23);浙江省自然科学基金项目(LY14C020001)。

作者简介: 韦 康(1981—),男,浙江东阳人,农学博士,副研究员,主要从事茶树分子生物学方面的研究。E-mail: weikang001@163.com

* 通信作者: 成 浩(1962—),男,浙江杭州人,理学博士,研究员,博士研究生导师,主要从事茶学方面的研究。E-mail: chenghao@mail.tricaas.com

引用本文: 韦康,王丽鸳,王新超,等. 黄茶“中黄 2 号”的亚细胞结构透射电镜观察[J]. 食品与生物技术学报,2017,36(12):1246-1250.

biosynthesis of chloroplast lamellae, which will also be a basis for further understanding its yellowing mechanism in Zhonghuang 2.

Keywords: tea plant, Yellow tea cultivar, Zhonghuang 2, chlorophyll, transmission electron microscope

“中黄2号”是由缙云农家茶园中发现的黄化单株选育而来。由它制成的黄茶具有三黄透三绿的特点,即外观色泽,金黄透绿,光润匀净;汤色,鹅黄隐绿,清澈明亮;叶底,玉黄含绿,鲜亮舒展^[1]。这些性状都与中黄2号在芽叶萌发阶段叶色发黄有关,见图1。经过近8年的无性繁育观察及3年多的品比试验,中黄2号的叶色及品质性状一直表现稳定,其特有的滋味及香气深受消费者的喜爱^[2]。目前,中黄2号已发展4 000余亩,不仅在浙江缙云种植,在四川、贵州等省也开始大力发展,是中茶所近年来重点推广的几个优质品种之一。



图1 中黄2号芽叶萌发照片

Fig. 1 Germinating leaves and buds of yellow tea cultivar “Zhonghuang 2”

中黄2号的优异品质来源于芽叶的黄化。经过长期观察发现,中黄2号在芽叶萌发初期叶色最黄,随着成熟度的提高,叶片逐渐返绿,而其成熟叶叶色与普通绿茶无异。那么,中黄2号黄化的机理是什么,在其萌发过程中哪些亚细胞结构发生了变化,这些变化与普通绿茶有哪些差异?这些问题目前还不得而知。对于其他植物的研究发现,芽叶的黄化或白化通常与叶绿素合成受阻有关^[3-8]。而通过透射电镜对茶树白化品种亚细胞结构观察也发现,叶绿体结构变化与白化性状息息相关^[9-10]。作者利用透射电镜技术系统分析了中黄2号第2(黄化)、6

叶(返绿),龙井43第2、6叶亚细胞结构的异同。通过亚细胞水平观察不同细胞器形态、构成的差异,初步推断中黄2号黄化的机制,为深入研究茶叶黄化对品质、香气等产生的影响打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料及取样

2012年6月20日在中国农业科学院茶叶研究所茶园分别取10个中黄2号与龙井43穗条,采用叶绿素仪(SPAD)分别测定其第2叶与第6叶叶绿素含量($n=10$)。

取上述测定完成的中黄2号和龙井43穗条第2、6叶叶片用刀片分别切成小块,放入1.5 mL离心管,加入2.5%戊二醛溶液,抽真空后放入4℃冰箱过夜。

另一方面,2012年6月20日在中国农业科学院茶叶研究所中黄2号茶园设置遮荫处理。处理1周后取遮荫处理及大田对照未遮荫处理中黄2号第2叶用于透射电镜研究。将样品用刀片分别切成小块后放入1.5 mL离心管,加入2.5%戊二醛溶液,抽真空后放入4℃冰箱过夜。

1.2 透射电镜观察

样品前处理参照陈常颂等的研究方法^[11]。待样品包埋好后,用Reichert超薄切片机切成70~90 nm的切片,用柠檬酸铅溶液处理切片15 min,用醋酸双氧铀50%乙醇饱和溶液再染色15 min,染色后的样品即可通过JEM-1230型透射电镜进行观察。

2 结果与分析

2.1 中黄2号与龙井43叶绿素相对含量比较

通过SPAD仪测定得到中黄2号、龙井43第2、6叶叶绿素相对含量的比较见图2。发现中黄2号第2、6叶的叶绿素相对含量都明显低于对照品种龙井43。特别是对第2叶的比较发现,中黄2号的叶绿素相对含量仅为龙井43的21.8%,这说明中黄2号在芽叶萌发初期叶绿素合成受阻。

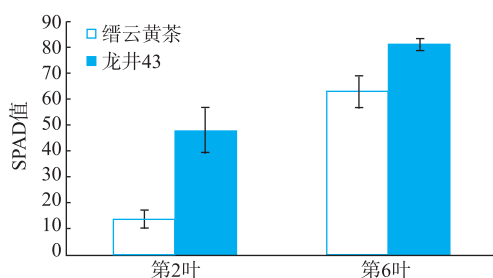


图2 中黄2号与龙井43第2、6叶叶绿素相对含量比较

Fig. 2 Chlorophyll contents of the second and sixth leaves in tea cultivar Zhonghuang 2 and Longjing 43

2.2 透射电镜比较中黄2号与龙井43亚细胞结构

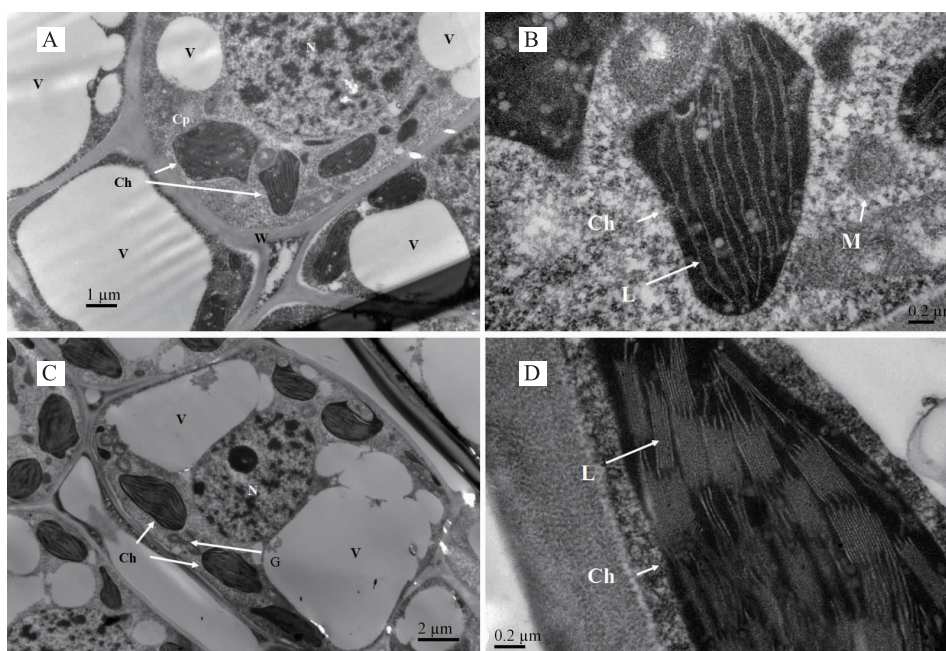
进一步通过透射电镜对中黄2号及龙井43亚细胞结构比较发现,中黄2号第2叶叶绿体较龙井43小,仅是后者的50%左右(图3A、C)。通过进一步放大透射电镜观察倍数可以发现,中黄2号叶绿体内基粒片层少且简单,没有形成片层堆叠(图3B)。而龙井43叶绿体内的基粒片层则极为发达,具有复杂的片层堆叠结构(图3D)。

中黄2号第6叶叶绿体明显增大,同时合成淀

粉粒的能力明显提高(图4A)。在多个叶绿体中都能发现淀粉粒的存在。而进一步放大观察可以发现中黄2号叶绿体中基粒片层明显增多(图4B)。但是和龙井43第6叶叶绿体结构相比,其基粒片层还是略少,同时片层的堆叠仍不如龙井43发达(图4D)。这些叶绿体内基粒片层结构的差异与之前样品叶绿素含量的结构正好吻合,说明中黄2号黄化可能与其叶绿体基粒片层结构合成较慢,无法有效形成片层堆叠有关。

2.3 遮荫对中黄2号叶绿体结构的影响

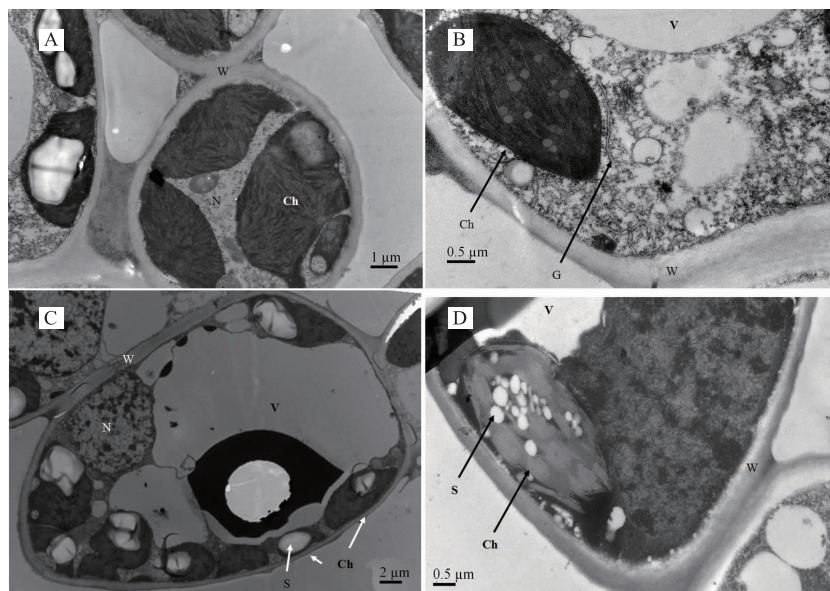
为进一步明确中黄2号黄化是否与其叶绿体基粒片层结构有关,对遮荫及对照条件下中黄2号第2叶亚细胞结构进行了观察,见图5。结果发现,遮荫后中黄2号叶绿体基粒片层堆叠明显增多(图5B);而对照叶绿体片层结构则十分松散,数量也很少(图5A)。该结果与之前中黄2号与龙井43亚细胞结构的比较一致,说明中黄2号黄化可能主要与叶绿体片层结构变化有关。



A、B为中黄2号;C、D为龙井43;Ch 叶绿体,Cp 细胞质,G 高尔基体,L 基粒片层,M 线粒体,N 细胞核,V 液泡,W 细胞壁

图3 中黄2号与龙井43第2叶亚细胞结构比较

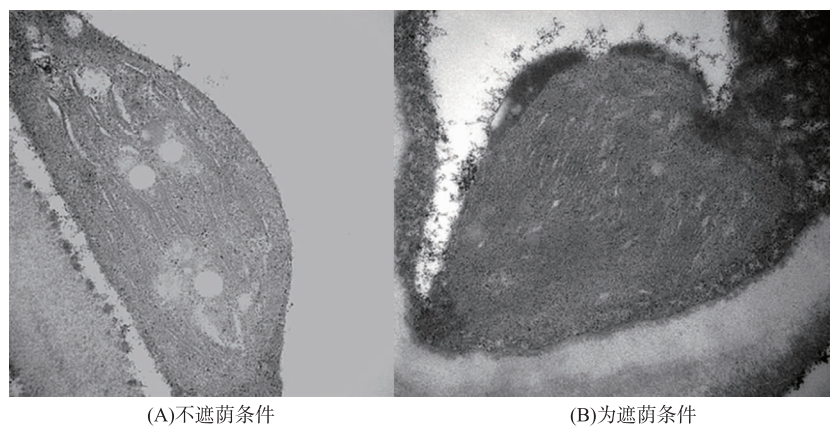
Fig. 3 Comparison of subcellular structures in the second leaves of Zhonghuang 2 and Longjing 43



A、B 为中黄 2 号;C、D 为龙井 43;Ch 叶绿体,Cp 细胞质,G 高尔基体,L 基粒片层,M 线粒体,N 细胞核,V 液泡,W 细胞壁

图 4 中黄 2 号与龙井 43 第 6 叶亚细胞结构比较

Fig. 4 Comparison of subcellular structures in the sixth leaves of Zhonghuang 2 and Longjing 43



(A)不遮荫条件

(B)为遮荫条件

图 5 遮荫与不遮荫条件下中黄 2 号第 2 叶叶绿体结构比较

Fig. 5 Effect of shading on chlorophyll structures in the second leaves of Zhonghuang 2

3 结 语

对于茶叶品质而言,黄化或白化品种与普通绿茶相比最大的特点是氨基酸含量高,酚类物质含量低^[9]。这导致黄化或白化茶滋味更加鲜爽,口感也更容易被更多消费者接受。前期通过采集多个地区种植的多个绿茶品种春茶样品,来研究气候条件和叶绿素相对含量对儿茶素组分、茶叶品质的影响^[12]。结果发现,适度低温、较低的叶绿素相对含量往往对应于较好的绿茶品质。这说明培育低叶绿素品种可以作为改良茶叶品质的一条途径。但叶绿素相对含

量过低往往对茶树的生长造成影响,完全无法合成叶绿素的茶树在苗期即死亡。如何平衡品质与生长的关系是茶树育种研究的关键。

过去对白化茶树品种的研究较多,如安吉白茶^[10]、小雪芽^[9]等。结果发现这些品种通常发生叶绿体退化、解体,叶绿体内部含有大量囊状小泡。对于黄化茶树品种的研究则很少。黄化茶是否也与叶绿体合成受阻有关,如果两者相关,为什么白化茶为全白色,而黄茶仍带有颜色,对于这些问题目前还缺乏相关报道,而透射电镜技术的发展和运用则为我们解答这些问题提供了条件。

作者首次采用透射电镜技术比较了中黄 2 号、龙井 43 第 2、6 叶亚细胞结构差异。结果发现:中黄 2 号叶绿体结构完整,没有出现解体或大量囊泡,但基粒片层堆叠明显少于龙井 43。这说明中黄 2 号黄化与基粒片层合成减缓有关,但叶绿体受损情况没有白茶严重^[9-10],这也解释了中黄 2 号为黄色而不是白色的原因。

总之,本研究首次发现中黄 2 号黄化可能与其叶绿体基粒片层堆叠减少有关。对于该现象的分子机制,特别是哪些基因的变化阻碍了基粒片层的合成,它们对品质性状是否有调控作用,其机制是什么,这些还需要通过二代测序技术、转基因等手段进一步分析。本研究的完成为后续深入研究黄茶黄化机理打下了基础。

参考文献:

- [1] PANG Weizhong. Introduction of Jinyun yellow tea cultivars[J]. **Lishui Agricultural Technology**, 2012, 1:54. (in Chinese)
- [2] HU Xili. Consideration of the development of yellow tea in Jinyun[J]. **China Tea**, 2013, 7:16-17. (in Chinese)
- [3] STOCKEL M, MEYER C, GEBAUER G. The degree of mycoheterotrophic carbon gain in green, variegated and vegetative albino individuals of *Cephalanthera damasonium* is related to leaf chlorophyll concentrations[J]. **New Phytologist**, 2011, 189(3): 790-796.
- [4] LYSENKO V. Fluorescence kinetic parameters and cyclic electron transport in guard cell chloroplasts of chlorophyll-deficient leaf tissues from variegated weeping fig (*Ficus benjamina* L.)[J]. **Planta**, 2012, 235(5): 1023-1033.
- [5] GUGLIELMINETTIA L, FREDIANIB M, CASTIGLIONE M R, et al. Characterization of normal and "albino" phenotypes in *Erythrina crista-galli*[J]. **Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics**, 2012, 65(3): 199-207.
- [6] SU N, HU M, WU D, et al. Disruption of a rice pentatricopeptide repeat protein causes a seedling-specific albino phenotype and its utilization to enhance seed purity in hybrid rice production[J]. **Plant Physiology**, 2012, 159(1): 227-238.
- [7] HAYASHI T M, TAKAHARA H, AHMED N, et al. A mutable albino allele in rice reveals that formation of thylakoid membranes requires SNOW-WHITE LEAF1 gene[J]. **Plant and Cell Physiology**, 2014, 55(1): 3-15.
- [8] CLARKE H J, KUMARI M, KHAN T N, et al. Poorly formed chloroplasts are barriers to successful interspecific hybridization in chickpea following in vitro embryo rescue[J]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 2011, 106(3): 465-473.
- [9] DU Y Y, CHEN H, ZHONG W L, et al. Effect of temperature on accumulation of chlorophylls and leaf ultrastructure of low temperature induced albino tea plant[J]. **African Journal of Biotechnology**, 2008, 7(12): 1881-1885.
- [10] LI Sufang, CHEN Shuyao, CHENG Hao. Studies on stages of the albescent phenomenon in tea plants-observation on the ultrastructure of the chloroplast[J]. **Journal of Tea Science**, 1995, 15(1): 23-26. (in Chinese)
- [11] WEI K, WANG L, ZHOU J, et al. Catechin contents in tea (*Camellia sinensis*) as affected by cultivar and environment and their relation to chlorophyll contents[J]. **Food Chemistry**, 2011, 125(1): 44-48.