



中文核心期刊
中国科技核心期刊
中国科学引文数据库(CSCD)来源期刊

ISSN 1000-3142
CN 45-1134/Q
CODEN GUZHEI

广西植物

GUIHAIA



第42卷 第2期 Vol. 42 No. 2
2022年2月 Feb. 2022

特色/重要植物专题：苦苣苔、火龙果



广西壮族自治区 广西植物研究所 广西植物学会 主办
中国科学院
Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region
and Chinese Academy of Sciences
Guangxi Society of Botany



科学出版社
Science Press

出版

2
2022

<http://www.guihaia-journal.com>

《广西植物》第八届编辑委员会

特邀编委:

王文采 袁道先 孙汉董 庄文颖 李 玉 陈新滋 黄日波 路安民

Maxim S. Nuraliev (俄罗斯) Nikolay A. Vislobokov (俄罗斯) Michael Moeller (英国)

Do Van Truong (越南) 陈绍农 (美国) 田中直伸 (日本)

编 委 (按汉语拼音排序):

蔡 霞	陈保善	陈海珊	陈双林	陈喜文	陈银萍	陈之端	崔国发
戴传超	戴高兴	邓国富	邓云飞	丁 兰	杜彦君	段元文	冯佰利
冯汉青	耿宇鹏	郭 柯	侯学文	黄仕训	黄 涛	黄永林	简敏菲
江明喜	蒋巧媛	蒋忠诚	兰小中	黎云祥	李典鹏	李 强	李先琨
李艳红	连 宾	梁士楚	林新春	刘 演	龙春林	龙文兴	马姜明
马克平	马小军	牛东玲	潘争红	彭少麟	蒲高忠	邱明华	任 海
沈 宏	沈有信	沈泽昊	史刚荣	斯确多吉	苏 旭	田代科	王恒山
王令强	王明奎	王永飞	王玉国	韦昌联	韦 霄	温 放	武志强
向春雷	向悟生	徐大平	徐柱文	许 涵	许为斌	严岳鸿	严重玲
杨 朗	杨清培	杨小波	杨永川	杨章旗	杨子银	尹华军	于明坚
于胜祥	余迪求	余龙江	原作强	张海琴	张建业	张 强 ⁽¹⁾	张宪春
张忠华	赵昶灵	赵 平	赵志国	周立刚	周延清	邹天才	

青年编委 (按汉语拼音排序):

顾大彤	郭屹立	洪 欣	黄衡宇	李 嵘	李瑞丽	李 为	聂云鹏
潘复静	祁亮亮	谭运洪	王发明	王 嵘	韦玉梅	徐 风	吴 超
杨 慧	姚月锋	张 强 ⁽²⁾	张霄林				

名 誉 主 编: 马克平

主 编: 李先琨

副 主 编: 蒋巧媛 (常务) 李 莉

编辑部主任: 蒋巧媛 副主任: 李 莉

编 辑: 周翠鸣 邓斯丽

⁽¹⁾ 广西植物研究所; ⁽²⁾ 淮北师范大学生命科学学院。

目次

特色/重要植物专题:苦苣苔、火龙果

基于转录组的不同火龙果品种抗性差异分析 李健星, 谭艳芳, 李冬兴, 王 斌, 陈 婷, 黄甫昭, 陆树华(183)

不同光质补光对火龙果茎生理特性及开花结果的影响 谢佐沐, 蔡英健, 余若莹, 俞 超, 汪财生, 付 美, 郭 斌(191)

两种不同生境苦苣苔科植物的复苏特性及其对水分的光合和生理响应 李爱花, 王丹丹, 李唯奇(199)

贵州省野生苦苣苔科物种多样性与地理分布 黄 梅, 李美君, 黄 红, 张金权, 白新祥(210)

生态与生物地理

贡嘎山石松类和蕨类植物的多样性与海拔分布 胡佳玉, 蒋 勇, 王 宇, 张梦华, 张宪春(220)

青枯病与黑胫病混发烟株发病茎秆组织微生物群落结构与多样性 汪汉成, 向立刚, 郑 革, 蔡刘体, 余知和(228)

贵州野生兰科植物就地保护现状及保护空缺分析 叶 超, 刘 锋, 安明态, 杨焱冰(240)

南京老山秤锤树空间分布格局及种间关联性 董 鹏, 彭智奇, 朱 弘, 朱淑霞, 董京京, 翟飞飞, 钟育谦, 郑爱春, 王贤荣, 伊贤贵(247)

四种乡土珍贵阔叶树种叶功能性状的种内和种间变异 刘朝阳, 罗应华, 于 瀛, 蒙 检, 杨海菊(257)

遗传与育种

小立碗藓 *WRKY* 基因家族生物信息学分析 乔 刚, 李 莉, 姜 山(267)

纤枝短月藓 *BeLEA2* 基因的克隆及表达分析 李雪宝, 王 琦, 鄢 波(277)

香石竹 *DcSKP1* 基因克隆及表达分析 周旭红, 赵雪艳, 杨晓密, 吴学尉, 瞿素萍(286)

大豆 *GeBP* 转录因子基因家族的生物信息学分析 巩元勇, 赵丽华, 闫 飞, 朱丽红(294)

苦荞 *FtF5H* 基因克隆及表达分析 段 迎, 杨晓琳, 蔡苏云, 贺润丽, 尹桂芳, 王艳青, 卢文洁, 孙道旺, 王莉花(304)

技术与方法

基于叶片生理指标的小麦芽期耐盐性评价 王 伟, 刘艳涛, 王 志, 钮力亚, 于 亮, 陆 莉, 王奉芝, 王伟伟(315)

高粱幼穗分化与叶龄指数的关联研究 周 瑜, 黄 娟, 张亚勤, 吴 毓, 李泽碧(324)

战骨黄酮碳苷类化合物的大孔树脂富集工艺研究 党骄阳, 陈月圆, 颜小捷, 卢凤来, 李 霞, 李典鹏(333)

斑地锦 RT-qPCR 内参基因的筛选 宋美玲, 黄胜和, 陈祖杰, 邹嘉轩, 刘欢胜, 全文军(340)

责任编辑	周翠鸣	蒋巧媛	李 莉
责任校对	李 莉	周翠鸣	蒋巧媛 邓斯丽
英文编辑/校对	李 莉	邓斯丽	周翠鸣 蒋巧媛
封面/版式设计	蒋巧媛	周翠鸣	邓斯丽 李 莉

期刊基本参数: CN 45-1134/Q * 1981 * m * A4 * 166 * zh+en * P * ¥45.00 * 1200 * 18 * 2022-02

封面说明: 苦苣苔科植物全世界有 160 属, 3 800 余种, 截至 2022 年 2 月, 我国约有 45 属, 808 种, 主要分布于南部和西南部的石灰岩地区, 是我国南方喀斯特地貌生境的一个比较具有代表性的植物类群, 其株型多样、花色绚丽、花朵结构精巧等, 具有极高的观赏价值。因其生境独特, 是作为假山造景和垂直绿化的优良材料。调查发现, 具有较高观赏价值的种类有牛耳朵、红花大苞苣苔、斑叶汉克苣苔、荔波报春苣苔、吊石苣苔、蛛毛苣苔、半蒴苣苔等, 其中线柱苣苔属的一些种类, 其果为浆果, 白色球形, 十分精巧可爱。多样性丰富的属主要有广义报春苣苔属、广义马铃苣苔属、广义石山苣苔属、石蝴蝶属、半蒴苣苔属等。苦苣苔科植物大多具有较高观赏价值, 但几乎都处于野生状态。近年来, 研究员韦毅刚、温放带领研究团队培育了许多新品种, 如‘满月’‘神山之花’‘粉耳环’‘新娘捧花’等, 可进一步看出苦苣苔科植物具有较高的市场和经济开发价值, 在园艺产业上也具有很大的潜力。

照片示: 苦苣苔科代表性植物。1. 短毛报春苣苔; 2. 红花大苞苣苔; 3. 琦润石蝴蝶。照片由白新祥提供。相关内容详见本期正文 210~219 页黄梅等的文章。

CONTENTS

Special Subject of Special / Important Plant : Gesneriaceae and Pitaya

Resistance difference between different varieties of pitaya based on transcriptome data LI Jianxing, TAN Yanfang, LI Dongxing, WANG Bin, CHEN Ting, HUANG Fuzhao, LU Shuhua (183)

Effects of different supplemental light qualities on physiological characteristics, flowering and fruiting of pitaya stem XIE Zuomu, CAI Yingjian, YU Ruoying, YU Chao, WANG Caisheng, FU Mei, GUO Bin (191)

Resurrection characteristics, photosynthetic and physiological response to dehydration and rehydration of two species in Gesneriaceae with different habitats LI Aihua, WANG Dandan, LI Weiqi (199)

Species diversity and geographic distribution of wild Gesneriaceae in Guizhou HUANG Mei, LI Meijun, HUANG Hong, ZHANG Jinquan, BAI Xinxiang (210)

Ecology and Biogeography

Species diversity and altitudinal distribution of lycophytes and ferns in Gongga Mountain HU Jiayu, JIANG Yong, WANG Yu, ZHANG Menghua, ZHANG Xianchun (220)

Microbial community structure and diversity of tobacco stem tissue in the mixture occurrences of bacterial wilt and black shank WANG Hancheng, XIANG Ligang, ZHENG Ping, CAI Liuti, YU Zhihe (228)

Analysis on *in situ* conservation status and conservation vacancy of wild Orchidaceae in Guizhou Province YE Chao, LIU Feng, AN Mingtai, YANG Yanbing (240)

Spatial distribution patterns and interspecific correlation of *Sinojackia xylocarpa* in Laoshan Mountain of Nanjing DONG Peng, PENG Zhiqi, ZHU Hong, ZHU Shuxia, DONG Jingjing, ZHAI Feifei, ZHONG Yuqian, ZHENG Aichun, WANG Xianrong, YI Xiangui (247)

Interspecific and intraspecific variation in leaf functional traits of four local precious hardwood species LIU Zhaoyang, LUO Yinghua, YU Ying, MENG Jian, YANG Haiju (257)

Genetics and Breeding

Bioinformatics analysis of *WRKY* gene family in *Physcomitrella patens* QIAO Gang, LI Li, JIANG Shan (267)

Cloning and expression analysis of *BeLEA2* gene from *Brachymerium exile* LI Xuebao, WANG Qi, YAN Bo (277)

Clone and expression analysis of *DcSKP1* in *Dianthus caryophyllus* ZHOU Xuhong, ZHAO Xueyan, YANG Xiaomi, WU Xuewei, QU Suping (286)

Bioinformatics analysis of *GeBP* transcription factor gene family in *Glycin max* GONG Yuanyong, ZHAO Lihua, YAN Fei, ZHU Lihong (294)

Cloning and expression analysis of *FtF5H* gene from tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) DUAN Ying, YANG Xiaolin, CAI Suyun, HE Runli, YIN Guifang, WANG Yanqing, LU Wenjie, SUN Daowang, WANG Lihua (304)

Techniques and Methods

Comprehensive evaluation of salt tolerance in wheat based on physiological indexes of leaves at germination stage WANG Wei, LIU Yantao, WANG Zhi, NIU Liya, YU Liang, LU Li, WANG Fengzhi, WANG Weiwei (315)

Relationship between panicle differentiation and leaf age index of sorghum ZHOU Yu, HUANG Juan, ZHANG Yaqin, WU Yu, LI Zebi (324)

Purification technology of total flavonoid-*C*-glycosides of *Premna fulva* by macroporous resin DANG Jiaoyang, CHEN Yueyuan, YAN Xiaojie, LU Fenglai, LI Xia, LI Dianpeng (333)

Screening of reference genes for RT-qPCR in *Euphorbia maculata* SONG Meiling, HUANG Shenghe, CHEN Zujie, ZOU Jiaxuan, LIU Huansheng, QUAN Wenjun (340)

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202104014



李健星, 谭艳芳, 李冬兴, 等. 基于转录组的不同火龙果品种抗性差异分析 [J]. 广西植物, 2022, 42(2): 183–190.

LI JX, TAN YF, LI DX, et al. Resistance difference between different varieties of pitaya based on transcriptome data [J].

Guihaia, 2022, 42(2): 183–190.

基于转录组的不同火龙果品种抗性差异分析

李健星^{1,2}, 谭艳芳¹, 李冬兴^{1,2}, 王 斌^{1,2}, 陈 婷^{1,2}, 黄甫昭^{1,2}, 陆树华^{1,2*}

(1. 广西壮族自治区 广西植物研究所, 广西 桂林 541006; 2. 广西喀斯特植物保育与
中国科学院

恢复生态学重点实验室, 广西壮族自治区 广西植物研究所, 广西 桂林 541006)
中国科学院

摘 要: 不同的品种抗性不同,为进一步探究不同火龙果品种之间的抗性差异,为后续火龙果抗性育种提供参考,该研究利用 Illumina HiSeq 2000 测序平台对‘普通白肉’(BR)和‘厄瓜多尔黄龙’(EY)两个品种进行转录组测序分析,并参考 GO Ontology、KEGG 等公共数据库对差异表达基因进行功能分类与富集分析。结果表明:(1) BR 与 EY 共有 14 248 个差异基因,其中 5 446 个基因上调,8 802 个基因下调。(2) 相关 GO 功能分析表明这些差异基因主要参与酶催化活性、细胞组分、代谢过程等,其中参与氧化还原酶活性的 349 个差异基因在 BR 中表达量上调。(3) KEGG 通路分析显示,大部分差异基因富集在新陈代谢和生物合成等,其中参与角质、木栓质和蜡质生物合成的差异基因有 12 个,如 CYP86 和 CER1 等。参与氧化还原酶活性的差异基因在 BR 中较 EY 表达量上调,且显著富集,表明 BR 与 EY 在生长发育和细胞代谢过程差异显著。参与角质、木栓质和蜡质生物合成的差异基因在 BR 中表达量上调,此类基因在 BR 中具有较高的表达量且显著富集,表明 BR 可能具有较强的抗旱和抗病能力。

关键词: 火龙果, 转录组, 品种, 差异表达基因

中图分类号: Q943 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2022)02-0183-08

Resistance difference between different varieties of pitaya based on transcriptome data

LI Jianxing^{1,2}, TAN Yanfang¹, LI Dongxing^{1,2}, WANG Bin^{1,2}, CHEN Ting^{1,2},
HUANG Fuzhao^{1,2}, LU Shuhua^{1,2*}

(1. Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, Guangxi, China;

2. Guangxi Key Laboratory of Plant Conservation and Restoration Ecology in Karst Terrain, Guangxi Institute of Botany,
Guangxi Zhuang Autonomous Region and Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, Guangxi, China)

Abstract: Different varieties have different resistances. In order to further explore the resistance differences in different varieties of pitaya and to provide a reference for further study on breeding of pitaya resistance, we used Illumina HiSeq

收稿日期: 2021-07-04

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFC0507503,2019YFC0507504-03);广西创新驱动发展专项资金(桂科 AA2016100403-01);广西自然科学基金(2019GXNSFBA245097);广西喀斯特植物保育与恢复生态学重点实验室基金(19-050-6) [Supported by National Key Research and Development Program (2019YFC0507503, 2019YFC0507504-03); Innovation-Driven Development Special Fund of Guangxi (AA2016100403-01); Natural Science Foundation of Guangxi (2019GXNSFBA245097); Fund of Guangxi Key Laboratory of Plant Conservation and Restoration Ecology in Karst Terrain (19-050-6)]。

第一作者: 李健星(1992-), 硕士, 助理研究员, 主要从事植被生态学研究, (E-mail) jxlee140820@163.com。

*通信作者: 陆树华, 副研究员, 主要从事恢复生态学研究, (E-mail) lushuhua13@163.com。

2000 sequence platform to sequence the transcriptomes of ‘Putongbairou’ (BR) and ‘Ecuador Yellow’ (EY). Functional classification and enrichment analysis of differentially expressed genes (DEGs) were performed by reference to GO Ontology, KEGG and others databases. The results were as follows: (1) There were 14 248 DEGs between BR and EY, of which 5 446 genes were up-regulated and 8 802 genes were down-regulated. (2) GO functional analysis showed that these DEGs were mainly involved in enzyme catalytic activity, cell components, metabolic processes, etc. Among them, there were 349 differential genes involved in oxidoreductase activity. (3) KEGG pathway analysis showed that most of the DEGs were enriched in metabolism, biosynthesis, etc., and 12 key genes such as CYP86 and CER1 involving in cutin, suberine and wax biosynthesis. We found that the expressions of DEGs involved in oxidoreductase activity were higher in BR than those in EY, which significantly enriched, indicating that may be significant differences in growth and cell metabolism between BR and EY. DEGs involved in the cutin, suberine and wax biosynthesis were up-regulated in BR, and such genes had higher expressions in BR, and were significantly enriched, which suggest that BR may be superior drought and disease resistance than EY.

Key words: pitaya, transcriptome, varieties, differentially expressed genes

火龙果属仙人掌科 (Cactaceae)、量天尺属 (*Hylocereus* Britton & Rose) 或蛇鞭柱属 (*Selenicereus* Britton & Rose) 植物, 营养美味以及独特的外观使其成为消费者追捧的新兴热带水果 (陶金等, 2014)。近几年, 我国火龙果产业发展迅猛, 据最新数据, 截至 2020 年底, 全国火龙果种植面积已超过 100 万亩, 并形成以广西、广东、海南、云南和贵州五省 (区) 为核心的主产区。特别近年来在广西石漠化区推广种植成功, 形成贫困山区脱贫致富双赢的“果化模式”, 火龙果耐旱、耐瘠, 有利于石山地区水土保持, 在改善生态环境的同时又可增加可观的经济效益。作为一种新兴水果, 近年来国内外对火龙果的研究也越来越深入, 主要集中在不同品种的理化性质和营养价值、功能性物质提取、栽培技术、病虫害研究 (赵志平和杨春霞, 2006; Menezes et al., 2015; 陈煜等, 2017; 彭金轮, 2017; Kee et al., 2019; Magalhães et al., 2019; Rahmati et al., 2019), 转录组测序与微卫星引物开发 (杨仕美等, 2018; 武志江等, 2020), 属间亲缘关系、杂交及新品种的培育 (Tel-Zur et al., 2004a, b, 2011, 2012; Ortiz-Hernández & Carrillo-Salazar, 2012) 等方面。

量天尺属含有 14 个种, 世界范围内广泛栽培的火龙果主要为量天尺属植物, 有 *H. undatus*、*H. monacanthus* 和 *H. megalanthus* (Ortiz-Hernández & Carrillo-Salazar, 2012)。通过杂交, 目前火龙果品种繁多, 黄凤珠等 (2019) 收集了 218 份种质资源, 也有相关文献报道, 在种质资源保存过程中发现, 不同品种的火龙果其抗旱和抗病能力差异显著

(梁秋玲等, 2011; 李润唐等, 2017)。目前通过 RNA-seq 技术, 可获得大量的转录组序列信息, 开展基因表达与功能分析, 构建信号通路等。本文对火龙果品种‘普通白肉’和‘厄瓜多尔黄龙’植株幼嫩茎段组织进行转录组序列从头组装, 通过 Unigene 表达丰度分析、差异表达分析、GO 和 KEGG 富集分析等, 从转录组层面阐明火龙果不同品种之间的差异, 可为火龙果产业的发展、推广及应用提供一定的理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

火龙果品种‘普通白肉’ (BR, 以下简称‘白肉’)、‘厄瓜多尔黄龙’ (EY, 以下简称‘黄龙’) 均取自广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所火龙果研究基地 (图 1), 选取标记这两个品种茎段上开始出芽的位置, 待其生长 7 d, 取幼嫩茎段, 每个品种设 3 个生物学重复, 采集后立即放入液氮中, 交由北京诺禾致源生物信息科技有限公司进行测序。

1.2 文库构建

首先, 用带有 Oligo (dT) 的磁珠富集火龙果样品中的 mRNA; 然后, 将打断的 mRNA 作为模板, 合成二链 cDNA; 再进行纯化、末端修复、加 A 尾并连接测序接头; 最后, 进行 PCR 扩增, 纯化 PCR 产物, 构建文库。待文库检测合格后上机测序, 采用 Illumina HiSeq™ 2000 PE150 对样品转录组文库进行高通量测序。



图 1 实验用火龙果品种
Fig. 1 Varieties of pitaya used in the experiment

1.3 De novo 拼接和注释

过滤测序得到 Raw reads, 获得 Clean reads。在 Trinity 软件 (Grabherr et al., 2011) 中进行 De novo 拼接。在 NCBI blast 中将拼接完成的 Unigene 与 NCBI 非冗余蛋白序列数据库、NCBI 核酸序列数据库、Swiss-Prot 数据库、KOG (clusters of orthologous groups for eukaryotic complete genomes) 数据库和 KEGG (kyotoencyclopedia of genes and genomes) 数据库进行比对注释。利用 HMMER 3.0 package 与 Protein family (Pfam) 进行比对 ($hmmscan\ e-value \leq 1e^{-2}$)。在 Blast2go (<http://www.blast2go.com/b2ghome>) 软件和 WEGO 软件中进行 GO (gene ontology) 注释、分类统计。

1.4 差异基因表达分析

采用 DESeq2 (Love et al., 2014) 软件进行样品组间的差异表达分析, 将差异倍数 $|\log_2\text{FoldChange}| > 1$ 且 $\text{padj} < 0.05$ 作为筛选差异表达基因 (DEGs) 的条件。对符合条件的差异表达基因进行 GO Ontology 和 KEGG Pathway 分类, 利用超几何检验对注释到的不同的 GO ($P < 0.05$) 和 KEGG 条目 ($P < 0.05$) 进行富集分析。采用 FPKM 值 (fragments per kilobase of transcript per million fragments mapped) 来展现基因表达水平的高低, 在 R 软件中绘制差异基因表达量的火山图。

2 结果与分析

2.1 转录组测序与组装

为进一步探究不同品种火龙果的分子差异机

制, 对 2 个品种火龙果共 6 个样本进行 RNA-seq 分析, 获得平均 7.71 Gb Clean reads, Q30 均在 90% 以上, 总碱基中的 GC 数量比例为 49.06% (表 1), 表明测序结果良好, Clean reads 质量合格, 可进行下一步数据分析。

表 1 测序数据质量表
Table 1 Quality table of sequencing data

样品 Sample	原始 reads Raw reads	高质量 reads Clean reads	数据量 Clean- bases (Gb)	准确率>0.999 Q30 (%)	GC 含量 GC content (%)
BR_1	53 250 692	52 512 370	7.88	91.36	48.98
BR_2	50 237 344	49 478 466	7.42	90.77	49.56
BR_3	50 441 754	49 424 658	7.41	90.14	48.69
EY_1	58 014 828	56 782 758	8.52	91.12	48.82
EY_2	53 025 282	51 813 250	7.77	90.99	49.16
EY_3	49 516 914	48 245 168	7.24	90.75	49.19

注: BR_1、BR_2、BR_3 分别为火龙果‘白肉’的 3 个重复; EY_1、EY_2、EY_3 分别为火龙果‘黄龙’的 3 个重复。
Notes: BR_1, BR_2 and BR_3 are three biological duplicates of pitaya ‘Bairou’; EY_1, EY_2 and EY_3 are three biological duplicates of pitaya ‘Ecuador Yellow’.

2.2 火龙果转录组 Unigene 的功能注释

使用 BLAST 将所有 Unigene 与 NR、GO、KO、Swiss-Prot、PFAM、KOG、NT 共 7 个数据库进行一致性比对分析, 对各数据库注释的 Unigene 数目进行统计, 进而获得火龙果转录组 Unigene 的功能注释信息。结果表明, 28 551 条 Unigene (45.02%) 在 NR 数据库比对成功得到注释, 在 GO、KO、Swiss-

Prot 等数据库获得注释的 Unigene 数目依次为 23 082 (36. 40%)、11 011 (17. 36%)、21 352 (33.67%) (图 2)。4 493 条 Unigene 同时 在 所 有 数 据 库 中 注 释, 至 少 有 1 个 数 据 库 注 释 成 功 共 34 692 条 (54.71%) ,28 714 条 未 获 得 注 释。

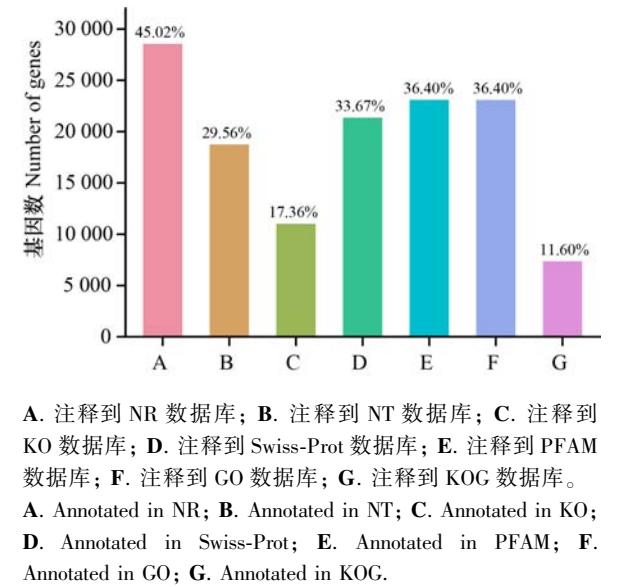


图 2 Unigene 注释结果柱状图

Fig. 2 Histogram of Unigene annotation results

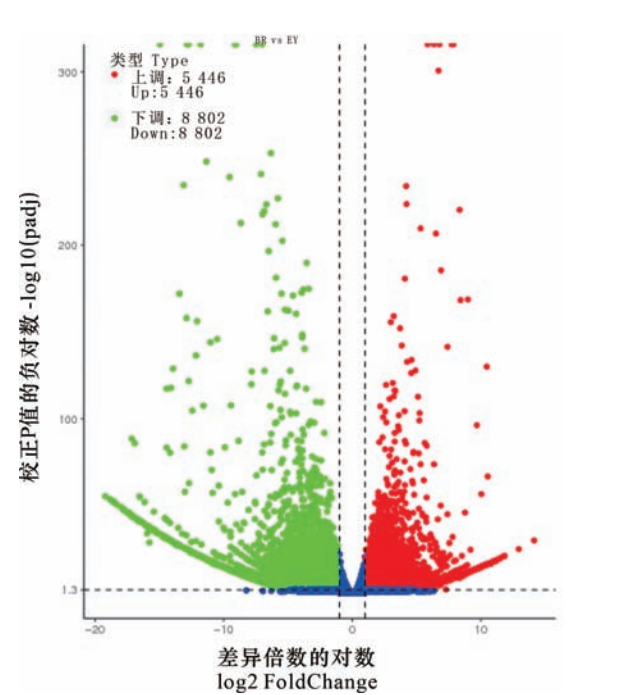
2.3 不同火龙果品种差异表达基因分析

对‘白肉’和‘黄龙’火龙果的差异表达基因进行分析。结果表明,‘白肉’和‘黄龙’火龙果之间有 14 248 个 差 异 基 因 ($p_{adj} < 0.05$ 且 $|\log_2\text{FoldChange}| > 1$)。其中,‘白肉’相对于‘黄龙’,有 5 446 个 基 因 上 调,表 达 量 高 于‘黄龙’;有 8 802 个 基 因 下 调,表 达 量 低 于‘黄龙’ (图 3)。

2.4 差异表达基因 GO 功能分类与富集分析

为分析‘白肉’与‘黄龙’差异基因的生物 学 功 能,将 14 248 个 差 异 基 因 注 释 到 GO Ontology 数 据 库 中,分 别 从 生 物 学 过 程 (biological process, BP)、细胞 组 分 (cellular component, CC) 和 分 子 功 能 (molecular function, MF) 3 个 方 面,其 中:在 生 物 学 过 程 分 类 中,参 与 氧 化 还 原 过 程、碳 水 化 合 物 代 谢 过 程 的 差 异 基 因 数 目 最 多,分 别 为 632 和 371 个;在 细 胞 组 分 分 类 中,主 要 是 被 膜 等 的 差 异 基 因 组 多,有 234 个;在 分 子 功 能 分 类 中,主 要 是 氧 化 还 原 酶 最 多,有 618 个。

以 富 集 P 值 小 于 0.05 作 为 富 集 标 准。在 生 物 过 程 分 类 中 富 集 了 包 括 DNA 整 合、mRNA 修 饰、



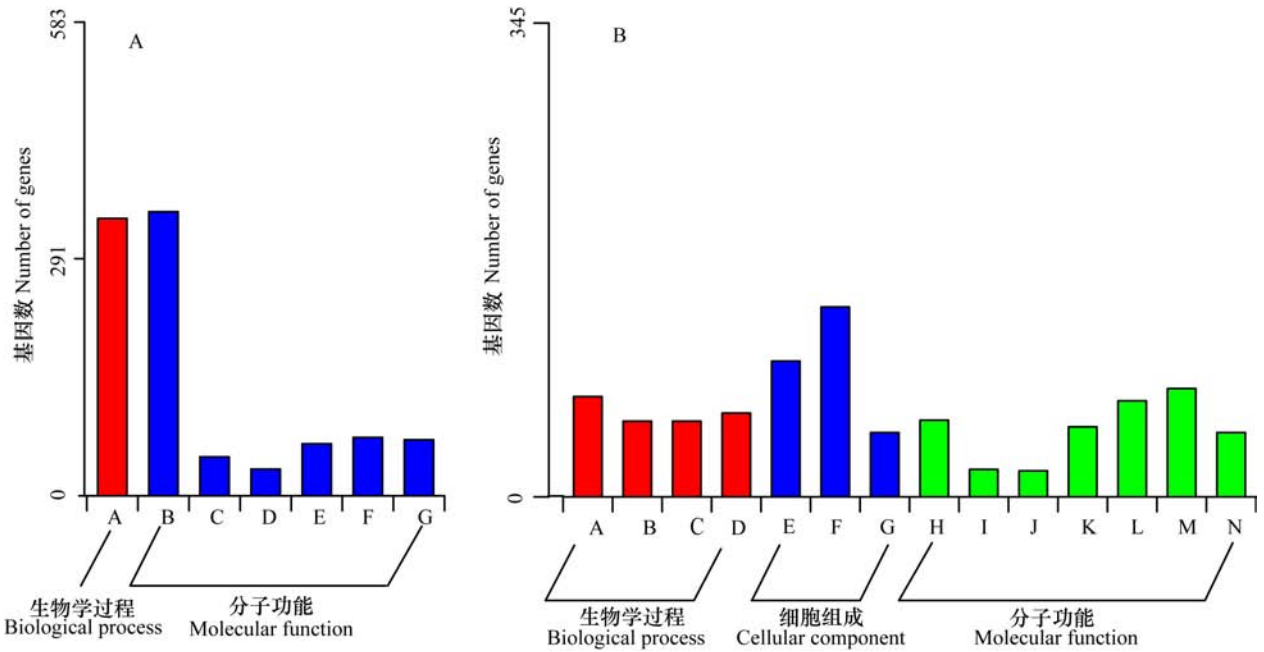
X、Y 坐标轴均取筛选条件值的对数形式,图中每个点代表一个差异表达基因,红色圆点表示有显著性差异的上调基因,绿色圆点表示有显著性差异的下调基因,蓝色圆点表示无显著性差异的基因。FoldChange 表示差异倍数, p_{adj} 表示校正后的 p value。

X-axis and Y-axis present threshold value in log transform. Each dot is a differential expressed genes. Dots in red mean up-regulated genes, dots in green mean down-regulated genes and dots in blue means non-regulated genes. FoldChange represents fold change, and p_{adj} represents the p value after correction .

图 3 BR vs EY 间基因差异表达分析火山图

Fig. 3 Volcano graph of differentially expressed genes in BR vs. EY

mRNA 甲基化、有丝分裂、RNA 甲基化等 39 个 条 目;在 细 胞 组 分 分 类 中 显 著 富 集 了 包 括 肌 质、肌 质 网 等 28 个 条 目;在 分 子 功 能 分 类 中 显 著 富 集 了 包 括 四 吡 咯 结 合、血 红 素 结 合、铁 离 子 结 合 等 54 项。结 果 说 明,‘白 肉’与‘黄 龙’在 生 长 发 育、细 胞 代 谢 过 程 等 方 面 存 在 差 异。对 上 调 和 下 调 的 差 异 基 因 分 别 进 行 功 能 分 类,在‘白 肉’与‘黄 龙’差 异 表 达 基 因 中 满 足 P 值 小 于 0.05 的 GO 条 目 即 为 GO 功 能 显 著 富 集,部 分 结 果 见 图 4。对 5 446 个 上 调 基 因 进 行 GO 功 能 分 类 与 富 集 分 析,结 果 显 示,在 生 物 学 过 程 分 类 中,参 与 氧 化 还 原 过 程 (oxidation-reduction process) 的 GO term 显 著 富 集,其 中 包 含 差 异 基 因 341 个;在 分 子 功 能 分 类 中,参 与 氧 化 还 原 酶 活 性 (oxidoreductase activity) 的 GO term 显 著



A: A. 氧化还原过程; B. 氧化还原酶活性; C. 抗氧化活性; D. 氧化还原酶活性, 作用于过氧化物作为受体; E. 铁离子结合; F. 四吡咯结合; G. 血红素结合。B: A. DNA 整合; B. mRNA 修饰; C. mRNA 甲基化; D. RNA 甲基化; E. 病毒壳体; F. virion 部件; G. RNA 定向 RNA 聚合酶复合物; H. mRNA 甲基转移酶活性; I. 氧裂解酶活性, 作用于磷酸盐; J. 萜烯合酶活性; K. ADP 结合; L. RNA 甲基转移酶活性; M. 腺苷甲硫氨酸依赖性甲基转移酶活性; N. RNA 定向 RNA 聚合酶活性。

A: A. Oxidation-reduction process; B. Oxidoreductase activities; C. Antioxidant activity; D. Oxidoreductase activity, acting on peroxide as acceptor; E. Iron ion binding; F. Tetrapyrrole binding; G. Heme binding. B: A. DNA integration; B. mRNA modification; C. mRNA methylation; D. RNA methylation; E. Viral capsid; F. Virion part; G. RNA-directed RNA polymerase complex; H. mRNA methyltransferase activity; I. Carbon-oxygen lyase activity, acting on phosphates; J. Terpene synthase activity; K. ADP binding; L. RNA methyltransferase activity; M. S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase activity; N. RNA-directed RNA polymerase activity.

图 4 BR vs EY 上调(A)和下调(B)差异表达基因的 GO 分类及富集分析

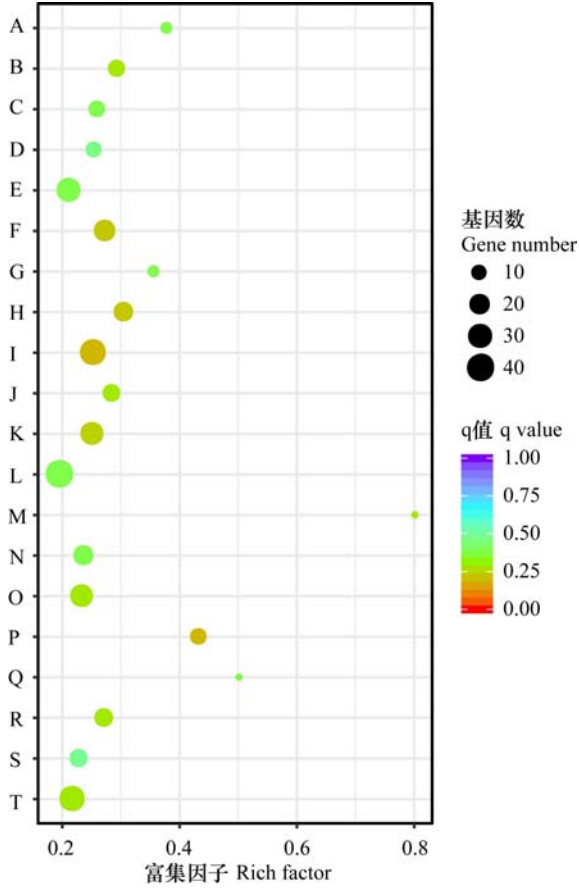
Fig. 4 GO classification and enrichment analysis of up-regulated (A) and down-regulated (B) differentially expressed genes in BR vs. EY

富集, 其中包含差异基因 349 个, 表明‘白肉’与‘黄龙’在生长发育、细胞代谢过程等方面存在差异; 在分子功能分类中, 抗氧化活性 (antioxidant activity) 的 GO term 富集, 表明‘白肉’和‘黄龙’在抗旱性方面有差异。在下调基因中, 主要集中在 DNA 整合 (DNA integration) 等方面, 差异无显著表现。

2.5 差异表达基因 KEGG Pathway 富集分析

‘白肉’与‘黄龙’共有 2 237 个差异表达基因注释到特定的 KEGG 通路中, 这些通路主要为新陈代谢、生物合成、糖酵解、信号传导、蛋白质加工等。其中: 注释到新陈代谢的差异基因 838 个, 占差异基因总注释数目的 37.5%; 注释到生物合成的差异基因 335 个, 占差异基因总注释数目的 15.0%。以 $P < 0.05$ 作为筛选显著富集的条件,

‘白肉’中表达量较‘黄龙’上调的差异基因主要富集在生物合成方面, 例如角质、木栓质和蜡质生物合成 (cutin, suberine and wax biosynthesis)、苯丙素的生物合成 (phenylpropanoid biosynthesis)、吲哚生物碱的生物合成 (indole alkaloid biosynthesis) 等 (图 5)。其中, 参与角质、木栓质和蜡质生物合成的差异基因有 12 个, 分别是 HHT1、CYP86B1、CYP86A1、FAR、CYP86A1、HHT1、PXG、CYP86A4S、K15404、CER1 FAR K15404、CER1 K15404、CER1。‘白肉’中表达量较‘黄龙’下调的差异基因主要富集在生物合成方面, 例如类倍半萜和三萜的生物合成 (sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis)、精氨酸的生物合成 (arginine biosynthesis)、脂肪酸的生物合成 (fatty acid biosynthesis) 等 (图 6)。

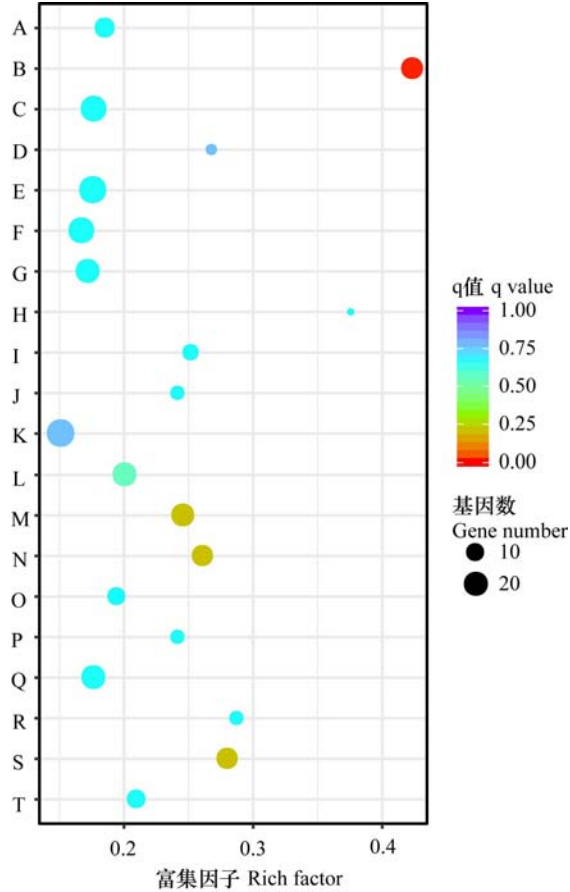


A. 维生素 B6 代谢; B. 泛醌和其他萜类醌生物合成; C. 酪氨酸代谢; D. RNA 聚合酶; E. 嘧啶代谢; F. 蛋白酶体; G. 光合作用天线蛋白; H. 光合作用; I. 苯丙素的生物合成; J. 苯丙氨酸代谢; K. 戊糖和葡萄糖醛酸相互转化; L. 氧化磷酸化; M. 吲哚生物碱生物合成; N. 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢; O. 半胱氨酸和蛋氨酸代谢; P. 角质、木栓质和蜡质生物合成; Q. 甜菜色素生物合成; R. 抗坏血酸盐和醛酸盐代谢; S. 精氨酸和脯氨酸代谢; T. 氨基糖和核苷酸糖代谢。

A. Vitamin B6 metabolism; B. Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis; C. Tyrosine metabolism; D. RNA polymerase; E. Pyrimidine metabolism; F. Proteasome; G. Photosynthesis-antenna proteins; H. Photosynthesis; I. Phenylpropanoid biosynthesis; J. Phenylalanine metabolism; K. Pentose and glucuronate interconversions; L. Oxidative phosphorylation; M. Indole alkaloid biosynthesis; N. Glycine, serine and threonine metabolism; O. Cysteine and methionine metabolism; P. Cutin, suberine and wax biosynthesis; Q. Betalain biosynthesis; R. Ascorbate and aldarate metabolism; S. Arginine and proline metabolism; T. Amino sugar and nucleotide sugar metabolism.

图 5 ‘白肉’与‘黄龙’火龙果差异表达上调基因富集前 20 的 KEGG 通路

Fig. 5 Top 20 KEGG pathways with enriched differentially expressed up-regulated genes in BR vs. EY



A. 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解; B. 类倍半萜和三萜的生物合成; C. RNA 降解; D. 核黄素代谢; E. 丙酮酸代谢; F. 苯丙素生物合成; G. 过氧化物酶体; H. 其他类型的 O-聚糖生物合成; I. 其他聚糖降解; J. 糖基磷脂酰肌醇-锚生物合成; K. 糖酵解/糖异生; L. 果糖和甘露糖代谢; M. 脂肪酸降解; N. 脂肪酸的生物合成; O. 昼夜节律-植物; P. 类胡萝卜素生物合成; Q. 光合生物的固碳作用; R. 生物素代谢; S. 精氨酸的生物合成; T. α -亚麻酸代谢。

A. Valine, leucine and isoleucine degradation; B. Sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis; C. RNA degradation; D. Riboflavin metabolism; E. Pyruvate metabolism; F. Phenylpropanoid biosynthesis; G. Peroxisome; H. Other types of O-glycan biosynthesis; I. Other glycan degradation; J. Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor biosynthesis; K. Glycolysis / Gluconeogenesis; L. Fructose and mannose metabolism; M. Fatty acid degradation; N. Fatty acid biosynthesis; O. Circadian rhythm-plant; P. Carotenoid biosynthesis; Q. Carbon fixation in photosynthetic organisms; R. Biotin metabolism; S. Arginine biosynthesis; T. α -Linolenic acid metabolism.

图 6 ‘白肉’与‘黄龙’差异表达下调基因富集前 20 的 KEGG 通路

Fig. 6 Top 20 KEGG pathways with enriched differentially expressed down-regulated genes in BR vs. EY

3 讨论与结论

高通量测序技术已经成为不同品种差异分析的常用策略,例如烟草(李智奕,2014)、大豆(张驰等,2015)、桂花(张雪松等,2016)、百香果(王宇等,2019)等。本研究利用 RNA-seq 技术对火龙果不同品种进行转录组学分析,基于良好的测序结果,进一步对‘白肉’与‘黄龙’火龙果的差异表达基因进行分析,发现共有 14 248 个差异表达基因,通过 GO Ontology 分析表明这些差异表达基因主要富集在新陈代谢、生物合成、糖酵解、信号传导、蛋白质加工等过程,说明‘黄龙’可能在生长发育、抗性方面与‘白肉’有差异。在分子功能分类中,与‘黄龙’相比,‘白肉’火龙果上调表达的基因中参与氧化还原酶活性的差异基因有 349 个,表明‘白肉’与‘黄龙’在生长发育、细胞代谢过程差异显著,‘白肉’比‘黄龙’的生长发育更快,代谢更加旺盛,与实际栽培种植过程中的现象相符。‘白肉’表现出比‘黄龙’更快的生长速度,在一年中结果的批次、果实的发育都有差异,‘白肉’一年结果大概 8 批,从授粉到成熟需要 28~30 d,‘黄龙’一年结果 2 批,夏果和冬果,成熟期需要 90~120 d。在分子功能分类中,两者抗氧化活性差异显著,表明‘白肉’和‘黄龙’在抗旱性方面有差异。为了在干旱环境中生存,仙人掌科植物必须具备干旱反应机制,特别是抗氧化防御系统。持续的干旱胁迫会导致氧化性物质,如 O_2 、 H_2O_2 、 O_2^- 、 OH 的积累,这些物质会损害细胞,甚至导致死亡(Fang & Xiong, 2015),这些抗氧化活性基因在‘白肉’中富集,上调表达,可能使得‘白肉’抗干旱能力强于‘黄龙’。

在 KEGG Pathway 中以 $P < 0.05$ 作为富集条件,在‘白肉’上调表达的基因中,主要富集在角质、木栓质和蜡质生物合成,其中参与角质、木栓质和蜡质生物合成的差异基因有 12 个,主要代表有 CYP86 和 CER1。植物蜡质是植物在进化过程中为了适应环境的变化而演变出来的一种结构,表皮蜡质在植物抵御外界不良环境、保持组织和器官功能、保证植物正常发育等方面具有重要作用(李魏强等,2006;胡晓敏等,2007;任春涛等,2019)。上表皮蜡沉积的主要功能是减少表皮的水分流失,这一特性有助于增强耐旱能力。此外,

在与草食性昆虫和植物病原真菌的相互作用中具有重要作用(Aarts et al., 1995),蜡质层在一定程度上可使植物免受低温胁迫作用(李婧婧等,2011)。其中,12 个关键基因参与角质、亚黄素和蜡的生物合成,如 CYP86 编码 ω -基脂肪酸的形成,促进软木脂生物合成,形成角质层。这些脂肪类生物聚合物可防止植物水分和营养流失以及病原体的感染(Aarts et al., 1995; Hofer et al., 2008)。CER1 编码参与长链醛转化为烷烃的蛋白,这是植物体中蜡生物合成的关键步骤(Hofer et al., 2008)。本研究对这些关键调控基因分析发现,此类基因在‘白肉’中具有较高的表达量,这些可能与植物的抗旱和抗病有关。

参考文献:

- AARTS MG, KEIJZER CJ, STIEKEMA WJ, et al., 1995. Molecular characterization of the CER1 gene of *Arabidopsis* involved in epicuticular wax biosynthesis and pollen fertility [J]. *Plant Cell*, 7 (12): 2115–2127.
- BALAO F, HERRERA J, TALAVERA S, 2011. Phenotypic consequences of polyploidy and genome size at the microevolutionary scale: a multivariate morphological approach [J]. *New phytol*, 192: 256–265.
- CHEN Y, XIA ZK, GUO Q, et al., 2017. Optimization of extraction technology of pitaya seed albumin by response surface method and studies on its antioxidant activity [J]. *Pharm Biot*, 24 (4): 315–320. [陈煜, 夏梓堃, 郭俏, 等, 2017. 火龙果籽白蛋白提取工艺及抗氧化能力研究 [J]. *药物生物技术*, 24(4): 315–320.]
- FANG YJ, XIONG LZ, 2015. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants [J]. *Cell Mol Life Sci*, 72(4): 673.
- GRABHERR MG, HAAS BJ, YASSOUR M, et al., 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome [J]. *Nat biotechnol*, 29: 644–652.
- HOFER R, BRIESEN I, BECK M, et al., 2008. The *Arabidopsis* cytochrome P450 CYP86A1 encodes a fatty acid omega-hydroxylase involved in suberin monomer biosynthesis [J]. *J Exp Bot*, 59: 2347–2360.
- HU XM, ZHANG ZF, RAO LQ, et al., 2007. Molecular biology research progress in the biosynthesis and genetic manipulation of plant cuticular wax [J]. *J Wuhan Bot Res*, 25(4): 377–380. [胡晓敏, 张志飞, 饶力群, 等, 2007. 植物角质层蜡质合成与调控的分子生物学研究进展 [J]. *植物科学学报*, 25(4): 377–380.]
- HUANG FZ, LU GF, WU ZJ, et al. 2019. Analysis of fruit quality and character diversity of pitaya germplasm resources [J]. *S Chin Fruit*, 48(6): 51–57. [黄凤珠, 陆贵锋, 武志江, 等, 2019. 火龙果种质资源果实品质性状多样性分析 [J]. *中国南方果树*, 48(6): 51–57.]

- KEE YJ, BAKAR MHA, HUDA-SHAKIRAH AR, et al., 2019. First report of reddish brown spot disease of red-fleshed dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) caused by *Nigrospora lacticola* and *Nigrospora sphaerica* in Malaysia [J]. *Crop Prot*, 122: 165–170.
- LI JJ, HUANG JH, XIE SC, 2001. Plant wax and its response to environmental conditions: an overview [J]. *Acta Ecol Sin*, 31 (2): 565–574. [李婧婧, 黄俊华, 谢树成, 2001. 植物蜡质及其与环境的关系 [J]. *生态学报*, 31(2): 565–574.]
- LI RT, WANG J, LIU HY, et al., 2017. Study on resistance of four pitaya cultivars to canker disease [J]. *Chin Trop Agric*, 75 (2): 70–73. [李润唐, 王静, 刘虹源, 等, 2017. 4 个火龙果品种对溃疡病的抗性研究 [J]. *中国热带农业*, 75(2): 70–73.]
- LI WQ, ZHANG ZB, LI JJ, 2006. Plant epicuticular wax and drought resistance as well as its molecular biology [J]. *J Plant Physiol Mol Biol*, 32(5): 505–512. [李魏强, 张正斌, 李景娟, 2006. 植物表皮蜡质与抗旱及其分子生物学 [J]. *植物生理与分子生物学学报*, 32(5): 505–512.]
- LI ZY, 2014. Transcriptome analysis of different tobacco leaves [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University. [李智奕, 2014. 国内不同烟草品种的烟叶转录组分析 [D]. 郑州: 河南农业大学.]
- LIANG QL, WEI J, LI XY, et al., 2011. Identification on causal agent of dragon fruit stem rot and in-door determination of fungicide toxicity [J]. *S Chin Fruit*, 40 (1): 9–12. [梁秋玲, 韦健, 李孝云, 等, 2011. 火龙果茎腐病病原鉴定及室内药剂毒力测定 [J]. *中国南方果树*, 40(1): 9–12.]
- LOVE MI, HUBER W, ANDERS S, 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 [J]. *Genome Biol*, 15 (12): 550.
- MAGALHAES DS, DA SILVA DM, RAMOS JD, et al., 2019. Changes in the physical and physico-chemical characteristics of red-pulp dragon fruit during its development [J]. *Sci Hortic*, 253: 180–186.
- MENEZES TP, RAMOS JD, BRUZI AT, et al., 2015. Artificial pollination and fruit quality in red pitaya [J]. *Biosci J*, 31: 801–807.
- ORTIZ-HERNANDEZ YD, CARRILLO-SALAZAR JA, 2012. Pitaya (*Hylocereus* spp.): A short review [J]. *Com Sci*, 3 (4): 220–237.
- PENG JL, 2017. Study on high quality and high yield cultivation techniques of pitaya — Taking red pitaya as an example [J]. *S Chin Agric*, 11 (12): 7–8. [彭金轮, 2017. 火龙果优质高产栽培技术探究——以红肉火龙果为例 [J]. *南方农业*, 11(12): 7–8.]
- RAHMATI S, ABDULLAH A, KANG OLJBC, et al., 2019. Effects of different microwave intensity on the extraction yield and physicochemical properties of pectin from dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) peels [J]. *Bioact Carbohydr Diet Fibre*, 18: 100186.
- REN CT, DONG LL, ZHANG XH, et al., 2019. Transcriptional regulation of plant cuticular wax synthesis and secretion [J]. *Plant Physiol J*, 55 (3): 265–273. [任春涛, 董路路, 张新华, 等, 2019. 植物表皮蜡质生物合成与分泌过程中的转录调控 [J]. *植物生理学报*, 55(3): 265–273.]
- TAO J, QIAO G, WEN XP, et al., 2014. Establishment and optimization of IRAP marker methodology in dragon fruit [J]. *J Huazhong Agric Univ*, 33 (4): 33–38. [陶金, 乔光, 文晓鹏, 等, 2014. 火龙果 IRAP 分子标记反应体系的建立与优化 [J]. *华中农业大学学报*, 33(4): 33–38.]
- TEL-ZUR N, ABBO S, BAR-ZVI D, et al., 2004a. Clone identification and genetic relationship among vine cacti from the genera *Hylocereus* and *Selenicereus* based on RAPD analysis [J]. *Sci Hortic*, 100 (1–4): 279–289.
- TEL-ZUR N, ABBO S, BAR-ZVI D, et al., 2004b. Genetic relationships among *Hylocereus* and *Selenicereus* vine cacti (Cactaceae): Evidence from hybridization and cytological studies [J]. *Ann Bot*, 4: 527–534.
- TEL-ZUR N, MIZRAHI Y, CISNEROS A, et al., 2011. Phenotypic and genomic characterization of vine cactus collection (Cactaceae) [J]. *Genet Resour Crop Evol*, 58: 1075–1085.
- TEL-ZUR N, MOUYAI J, CISNEROS A, et al., 2012. Intergeneric hybridization within the tribe *Hylocereeae*, subfamily Cactoideae (Cactaceae) [J]. *Isr J Plant Sci*, 60: 325–334.
- WANG Y, CHEN N, YUAN QF, et al., 2019. Transcriptome analysis of three different varieties of passion fruit [J]. *Seed*, 38(5): 1–7. [王宇, 陈楠, 袁启凤, 等, 2019. 3 个不同品种百香果转录组分析 [J]. *种子*, 38(5): 1–7.]
- WU ZJ, DENG HY, LIANG GD, et al., 2020. Construction of molecular identity card of pitaya germplasm resources using fluorescent SSR Markers [J]. *S Chin Fruit*, 49 (4): 20–28. [武志江, 邓海燕, 梁桂东, 等, 2020. 利用荧光标记 SSR 构建火龙果种质资源分子身份证 [J]. *中国南方果树*, 49(4): 20–28.]
- YANG SM, QIAO G, WEN XP, 2018. Establishment and optimization of EST-SSR marker methodology in pitaya [J]. *J Mount Agric Biol*, 37 (3): 14–20. [杨仕美, 乔光, 文晓鹏, 2018. 火龙果 EST-SSR 分子标记反应体系的建立与优化 [J]. *山地农业生物学报*, 37(3): 14–20.]
- ZHANG C, GAO ZR, DONG YK, et al., 2015. Transcriptome analysis of inflorescences from four soybean cultivars [J]. *Chin J Ecol*, 269 (12): 111–116. [张驰, 高振蕊, 董友魁, 等, 2015. 四个大豆栽培种的转录组分析 [J]. *生态学杂志*, 269(12): 111–116.]
- ZHANG XS, PEI JJ, ZHAO LG, et al., 2016. Transcriptome analysis of different *Osmanthus* reveals insight into the difference of *Osmanthus* oil components [J]. *Nat Prod Res Dev*, 28 (4): 529–535. [张雪松, 裴建军, 赵林果, 等, 2016. 不同品种桂花转录组分析及桂花精油成分差异的初步探讨 [J]. *天然产物研究与开发*, 28(4): 529–535.]
- ZHAO ZP, YANG CX, 2006. Development and prospect of pitaya [J]. *Chin Seed Ind*, 2: 13–14. [赵志平, 杨春霞, 2006. 火龙果的开发与发展前景 [J]. *中国种业*, 2: 13–14.]

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202010035

谢佐沐, 蔡英健, 余若莹, 等. 不同光质补光对火龙果茎生理特性及开花结果的影响 [J]. 广西植物, 2022, 42(2): 191–198.

XIE ZM, CAI YJ, YU RY, et al. Effects of different supplemental light qualities on physiological characteristics, flowering and fruiting of pitaya stem [J]. *Guihaia*, 2022, 42(2): 191–198.



不同光质补光对火龙果茎生理特性及开花结果的影响

谢佐沐¹, 蔡英健¹, 余若莹¹, 俞超^{1*}, 汪财生¹, 付美¹, 郭斌²

(1. 浙江万里学院 生物与环境学院, 浙江 宁波 315100; 2. 宁波传奇农业科技有限公司, 浙江 宁波 315100)

摘要: 为探究不同光质补光对火龙果茎生理特性的影响, 该文采用红光、白光、蓝光 3 种不同光质对火龙果进行夜间补光, 测定火龙果茎中可溶性糖、可溶性蛋白、叶绿素、线粒体蛋白、线粒体膜电位及细胞分裂素 (CTK)、吲哚乙酸 (IAA)、赤霉素 (GA) 3 种内源激素的含量, 并统计茎长、开花数、果实产量相关指标。结果表明: 3 种光质补光均可提高火龙果植株可溶性蛋白质含量, 补白光效果最佳; 3 种光质补光均可显著提高火龙果植株可溶性糖的含量, 补蓝光效果最佳; 补白光有利于叶绿素 a 和叶绿素 b 的含量增加, 补红光对其影响不显著, 而补蓝光会降低其含量; 补白光和蓝光均能显著降低 CTK 含量, 补白光和红光均能显著提高 IAA 含量, 补红光和蓝光均能显著提高 GA 含量; 补白光显著降低线粒体蛋白含量, 3 种光质补光对线粒体膜电位均无明显影响; 3 种光质补光对火龙果茎的生长无显著影响, 补红光和白光能显著提高开花率, 补红光能显著提高果实产量。综上认为, 补红光与白光对火龙果茎代谢产物、叶绿素、内源激素含量及开花数、果实产量有较明显的促进作用, 该研究结果可为光质调控技术促进火龙果植株的生长发育、开花结果提供借鉴。

关键词: 火龙果, 光质, 补光, 茎, 生理特性, 开花结果

中图分类号: Q945 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2022)02-0191-08

Effects of different supplemental light qualities on physiological characteristics, flowering and fruiting of pitaya stem

XIE Zuomu¹, CAI Yingjian¹, YU Ruoying¹, YU Chao^{1*},
WANG Caisheng¹, FU Mei¹, GUO Bin²

(1. College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315107, Zhejiang, China;
2. Ningbo Legend Agricultural Technology Co., Ltd., Ningbo 315100, Zhejiang, China)

Abstract: To investigate the effects of different supplemental light qualities on physiological characteristics of pitaya stems, red, white and blue lights were used as supplemental light sources at night. The contents of soluble sugar, soluble protein, chlorophyll, mitochondrial protein, mitochondrial membrane potential and three endogenous hormones (CTK, IAA, GA) were determined. The results showed that 3 kinds of light quality supplementation could significantly increase the soluble protein content of pitaya stems, and white light had the best effect; 3 kinds of light quality supplementation could significantly increase the soluble sugar content of pitaya stems, and blue light had the best effect; white light was beneficial to the increase of chlorophyll a and chlorophyll b content, while blue light had no significant effect on it, and blue light would reduce its content; white light and blue light could significantly reduce CTK content, white light and red light could significantly increase IAA content, red light and blue light could significantly increase GA content; white light could significantly reduce mitochondrial protein content, 3 kinds of light quality supplementation had no significant effect on mitochondrial membrane potential; 3 kinds of light quality supplementation had no significant effect on the growth of pitaya stem, red light and white light could significantly increase the flowering rate, and red light could significantly increase the fruit yield. In conclusion, red light and white light had a significant promoting effect on the metabolic products, chlorophyll, endogenous hormone content and flowering number and fruit yield of pitaya stem, and the research results could provide reference for light quality regulation technology to promote the growth and development, flowering and fruiting of pitaya plants.

收稿日期: 2021-03-28

基金项目: 浙江省公益技术应用农村农业项目 (LGN18C150002); 宁波市公益重大科技项目 (2019C10005); 宁波市农业科技公益项目 (202002N3015) [Supported by Zhejiang Province Public Welfare Technology Applied Research Project (LGN18C150002); Major Public Welfare Science and Technology Projects of Ningbo (2019C10005); Public Welfare Project of Ningbo (202002N3015)].

第一作者: 谢佐沐 (2000-), 研究方向为植物生理学, (E-mail) 1771172678@qq.com。

*通信作者: 俞超, 硕士, 高级实验师, 研究方向为植物生理学, (E-mail) yuchao.wanli@qq.com。

IAA, GA) were determined. The indicators of stem growth, flowering, fruit yield were counted. The results were as follows: Supplementing the three kinds of light could all increase the soluble protein contents in pitaya stems, and the white light had the best effect; Supplementing the three kinds of light could all significantly increase soluble sugar contents in pitaya stems, and the blue light had the best effect; Supplementing white light was beneficial to increase the contents of chlorophyll a and b, and supplementing red light had no significant effect on it, while blue light would reduce its content; Supplementing white light and blue light could significantly reduce the CTK contents, supplementing white light and red light could significantly increase the IAA contents, and supplementing red light and blue light could significantly increase the GA contents; Supplementing white light could significantly reduce the mitochondrial protein contents and the three kinds of supplement light had no obvious effect on the mitochondrial membrane potential; Supplementing the three kinds of light had no significant effects on the growth of pitaya stems, while supplementing red light and white light could significantly increase the flower formation rate, and supplementing red light could significantly increase the fruit yield. Comprehensive analysis deemed that supplementing red light and white light had obvious promoting effect on the contents of metabolites, chlorophyll, endogenous hormones of pitaya stems, flower formation rate and fruit yield. The research results can provide a reference for a technology of light quality controlling to improve the growth and development pitaya plants.

Key words: pitaya, light quality, light supplement, stem, physiological characteristics, flowering and fruiting

光是植物生长必不可少的环境因子之一,而光质是影响植物品质的关键因素(张勤涛等, 2018),与植物光合特性、生理指标、酶活性等密切相关。红光和蓝光是植物吸收和利用最多最重要的有效光源(Abidi et al., 2013)。红光通过调控植物光敏色素和光合器官,促进胚胎发育和化学物质合成(Choi et al., 2015),有利于茎叶生长并提高作物产量(Zhang et al., 2019)。蓝光与叶绿体形成、气孔开闭以及叶绿素、花青素的生物合成有密切关系(Li & Kubota, 2009),能促进植物幼苗茎的伸长、降低生物量(Folta, 2004)。光照时间是影响植物生长发育和形态建成的重要因素,不仅调控植物成花和花性分化,而且影响植物的营养生长和生理生化过程(尹钧, 2016)。暗期补光是设施栽培中广泛使用的环境调节技术,可以加快植物营养体的构建,从而促进植株生长(申宝营等, 2014)。该技术有利于增加幼苗的叶面积,提高叶片中叶绿素含量和净光合速率,并改变植物体内的激素含量,不同程度地提高植株可溶性糖、可溶性蛋白、游离氨基酸含量以及过氧化物酶(POD)活性(徐超华等, 2013)。

红心火龙果(*Hylocereus polyrhizus*)为仙人掌科(Cactaceae)量天尺属(*Hylocereus* Britton & Rose)植物,原产于中美地区,现广泛种植于中国的广西、广东、海南、福建、贵州等地。火龙果为长日照作物,最适条件为温度 25~35℃、光照时间 12 h,一般于 6—11 月结果。火龙果反季节技术研究表

明,补光可以促进火龙果开花,延长花期至 12 月(Jiang et al., 2012)。黄秋凤等(2019)研究表明,在葡萄的不同生长时期进行补光,会对果实品质造成明显影响。目前,浙江省的秋冬季节已广泛开展火龙果人工补光,诱导成花效果良好,并显著提高火龙果产量和果实品质(顾鑫慧等, 2020)。然而,在 7—9 月火龙果采摘上市的旺季,相比中国广西和广东以及越南等外地产火龙果,中国浙江本地产火龙果个头小、数量少,不具备价格和产量优势,能否利用光调控技术促进该时期火龙果生长及开花结果尚未可知。本研究以红心火龙果为材料,探究红、白、蓝 3 种光质补光对火龙果茎中可溶性蛋白、可溶性糖、叶绿素、线粒体、内源激素含量,以及火龙果茎生长、开花结果的影响,旨在利用光调控技术壮实火龙果枝条,促进树体积累养分,为开花结果提供良好的营养条件。

1 材料与方法

1.1 试验设计

试验于 2020 年 1—9 月在宁波市雅岛果蔬专业合作社火龙果种植基地进行,选取树龄 3 a 以上健壮无病、已能正常结果的红心火龙果品种‘柬埔寨红’,采用大棚内钢筋水泥柱独立式支架种植方式,架高 1.4 m,种植 3 行,每行 76 株,株行距 160 cm × 80 cm,每柱保留有效结果枝 12~20 条。晴天大棚内日均光强为 240 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,平均日

照时间 11 h。每隔 4 d 浇水施肥 1 次,每次每株平均灌水量为 1.5 L,平均施肥量为 3.23 g(1.37 g 硝酸钾、0.34 g 磷酸二氢铵、0.38 g 硫酸镁、0.90 g 四水硝酸钙和 0.24 g 尿素)。

补光试验组分别在 4 个间隔 20 m 的大棚中开展,分别为补红光组 R(波长 650 nm)、补蓝光组 B(波长 450 nm)、补白光组 W(波长 450~465 nm),不补光为对照组(CK),每组 120 株火龙果。

补光试验中,在距离火龙果植株上部 30 cm 处安装 T8 一体化 LED 红色/蓝色/白色灯管(1.2 m, 18 W),灯下方火龙果枝条表面光强为 150~220 lx,灯间距 50 cm,每行安装 10 根,日落后每天在 18:00—22:00 持续补光。取样时间为 2020 年 7—9 月,每月 15 日、30 日取样,每次取样采集最靠近光源、位于水泥柱上方的茎段 50 根。

1.2 指标测定

1.2.1 可溶性蛋白 采用 BCA 法测定可溶性蛋白含量。称取 1.0 g 茎段,研磨离心后按照 BCA 蛋白定量试剂盒(Solarbio PC0020,北京索莱宝科技有限公司)说明书进行可溶性蛋白含量测定。

1.2.2 可溶性糖 采用蒽酮法测定可溶性总糖含量。称取 1.0 g 茎段,研磨后烘干至恒重,沸水溶解后抽滤,定容至 100 mL,将 1 mL 提取液与 4 mL 蒽酮溶液混合,煮沸 10 min,用分光光度计(HITACHI F-7100,日本日立公司)测量波长 620 nm 下的吸光度值,制作葡萄糖标准曲线后计算可溶性总糖含量。

1.2.3 叶绿素 称取 0.2 g 茎段,剪碎后放入试管,加入 10 mL 丙酮乙醇混合溶液(1:1)浸泡,每隔 2 h 充分振荡,24 h 后用丙酮乙醇混合溶液(1:1)定容至 25 mL,测量样品在波长 645、663 nm 下的吸光度,依据 Arnon 公式计算叶绿素的含量(刘遵春等,2014)。

1.2.4 激素 采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定激素含量。称取 1.0 g 茎段放入 50 mL 离心管中,冷冻型高通量组织研磨器(SCIENTZ-48L,宁波新芝生物科技有限公司)研磨匀浆后,离心机(Eppendorf 5417R,德国艾本德公司)3 000 g 离心 10 min,分别按照赤霉素试剂盒(上海桥杜生物科技有限公司 PT96031)、吲哚乙酸试剂盒(上海桥杜生物科技有限公司 PT96035)、细胞分裂素试剂盒(上海桥杜生物科技有限公司 PT97115)说明书步骤检测茎中细胞分裂素(CTK)、吲哚乙酸(IAA)

以及赤霉素(GA)的含量。

1.2.5 线粒体蛋白及线粒体膜电位 称取 1.0 g 茎段,研磨后按照植物线粒体提取试剂盒(BestBio BB-3611)说明书提取完整线粒体,使用 BCA 蛋白定量试剂盒(Solarbio PC0020)测定线粒体蛋白含量。纯化后的线粒体根据膜电位检测试剂盒(Solarbio M8650)测定其膜电位,设置荧光分光光度计(HITACHI F-7100,日本日立公司)的激发波长 525 nm、发射波长 590 nm、狭缝宽度 5 nm,以单位质量火龙果茎线粒体产生的荧光强度表示线粒体膜电位的大小(姚婷婷等,2010)。

1.2.6 茎长、茎围、开花数 7 月初每个处理随机标记 100 根枝条,7—9 月每月 30 日用卷尺测量标记样本的茎长和枝条中部的三棱茎围。统计 7—9 月每批次标记枝条的开花数目。

1.2.7 果实大小和产量 在果实成熟期采摘果实,称重后计算各个处理区域的总产量。每个处理随机抽取 50 个果实,卷尺测量果实的横径和纵径。

1.3 数据统计分析

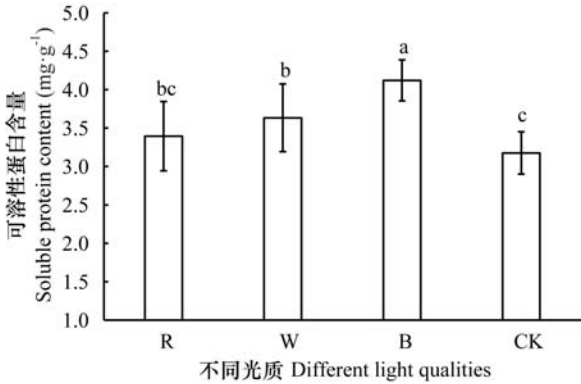
采用软件 Microsoft Excel 2013 和软件 IBM SPSS 26.0 进行数据处理,数据方差分析方法为邓肯(Dun-can)单因素分析法,不同字母表示各试验差异显著($\alpha=0.05$)。

2 结果与分析

2.1 不同光质对火龙果茎可溶性蛋白和可溶性糖含量的影响

由图 1 可知,补蓝光、补白光火龙果茎中的可溶性蛋白含量均显著高于 CK。补蓝光火龙果茎中的可溶性蛋白含量最高,高于 CK 29.7%;补白光高于 CK 14.4%;补红光火龙果茎可溶性蛋白的含量略有增加,高于 CK 6.9%,但差异不显著。图 1 结果表明,3 种光质补光均可促进火龙果植株可溶性蛋白质合成,且补蓝光效果最佳。

由图 2 可知,补红光、补白光、补蓝光的火龙果茎可溶性糖含量均显著高于 CK。补白光茎中的可溶性糖含量最高,高于 CK 68.8%;补红光茎中的可溶性糖含量高于 CK 39.0%;补蓝光茎中的可溶性糖含量高于 CK 27.6%。图 2 结果表明,3 种光质补光均可明显促进火龙果植株可溶性糖的积累,且补白光效果最佳。



R. 红光; **W.** 白光; **B.** 蓝光; **CK.** 对照。不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。下同。
R. Red light; **W.** White light; **B.** Blue light; **CK.** Control. Different small letters mean significant differences among different treatments ($P<0.05$). The same below.

图 1 不同光质补光对火龙果茎可溶性蛋白含量的影响
Fig. 1 Effects of different supplemental light qualities on soluble protein contents of pitaya stem

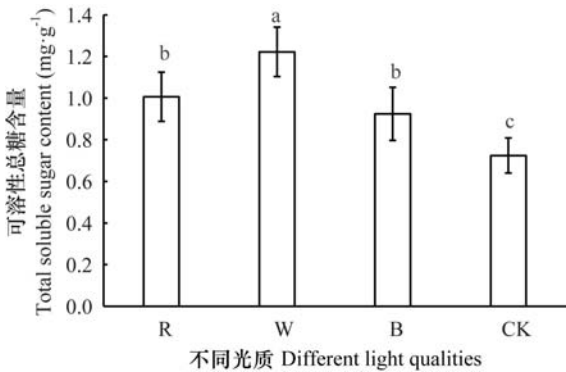


图 2 不同光质补光对火龙果茎可溶性糖含量的影响
Fig. 2 Effects of different supplemental light qualities on soluble sugar content of pitaya stem

2.2 不同光质补光对火龙果茎叶绿素含量的影响

不同光质补光后,火龙果茎叶绿素含量见图 3。与 CK 相比,补白光火龙果茎中叶绿素 a 和叶绿素 b 的含量分别显著增加了 21.4%和 25.0%;补蓝光后,茎中叶绿素 a 含量相比 CK 显著下降了 7.14%,叶绿素 b 和总叶绿素含量也略低于 CK,但差异不显著;补红光火龙果叶绿素 a、叶绿素 b 和总叶绿素含量与 CK 差异均不显著。

2.3 不同光质补光对火龙果茎内源激素含量的影响

由图 4 可知,补红光火龙果茎中 CTK 含量最

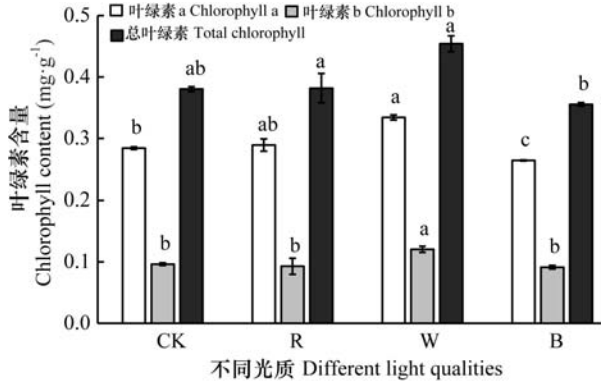


图 3 不同光质补光对火龙果茎叶绿素含量的影响
Fig. 3 Effects of different supplemental light qualities on chlorophyll contents of pitaya stem

高($0.781\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$),高于 CK 5.3%,但差异不显著;补白光和补蓝光火龙果茎中的 CTK 含量均显著下降,分别低于 CK 4.5%和 11.1%。

补白光和补红光均能显著提高火龙果茎中 IAA 的含量,补白光茎中 IAA 含量最高($0.891\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$),补红光其次($0.863\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$),分别高于 CK 11.8%和 8.3%。补蓝光茎中的 IAA 含量与 CK 相近,几乎无影响。

补红光和补蓝光均能显著提高火龙果茎中 GA 的含量,补红光茎中 GA 含量最高($0.472\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$),其次为补蓝光($0.451\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$),分别高于 CK 25.5%和 19.9%。补白光略高于 CK,但差异不显著。

综上所述,补红光能提高火龙果茎中 CTK、IAA 和 GA 的含量;补蓝光能降低火龙果茎中 CTK 含量,增加 GA 含量,不影响 IAA 含量;补白光能提高火龙果茎中 IAA 与 GA 含量,降低 CTK 含量。

2.4 不同光质补光对火龙果茎线粒体蛋白、线粒体膜电位的影响

由图 5 可知,红光、白光、蓝光 3 种补光处理均会使火龙果茎中线粒体蛋白含量下降,补白光茎中线粒体蛋白含量最少,低于 CK 33.3%,达到显著水平,补蓝光和补红光茎中线粒体蛋白含量与 CK 差异不显著。由图 6 可知,补蓝光和补白光均能提高火龙果茎的线粒体膜电位,分别高于 CK 27.8%和 11.1%,但差异均不显著;补红光后茎线粒体膜电位下降,低于 CK 11.1%,但差异不显著。这表明 3 种光质补光对茎线粒体膜电位的影响不明显。

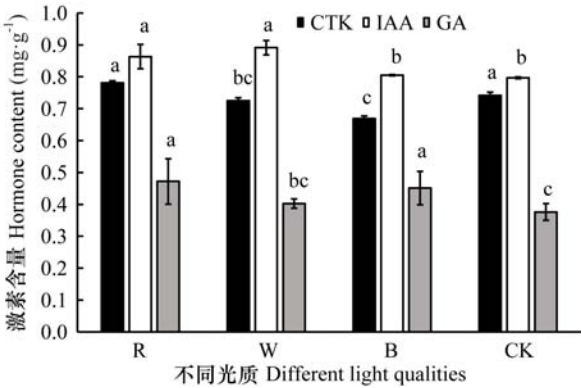


图 4 不同光质补光对火龙果茎激素含量的影响
Fig. 4 Effects of different supplemental light qualities on hormone contents of pitaya stem

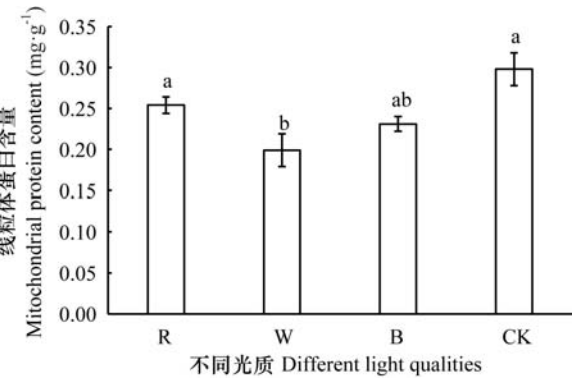


图 5 不同光质补光对火龙果茎线粒体蛋白含量的影响
Fig. 5 Effects of different supplemental light qualities on mitochondrial protein content of pitaya stem

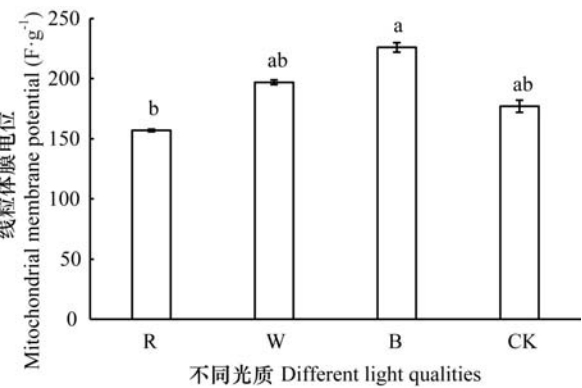


图 6 不同光质补光对火龙果茎线粒体膜电位的影响
Fig. 6 Effects of different supplemental light qualities on mitochondrial membrane potentials of pitaya stem

2.5 不同光质对火龙果茎长、茎围和开花数的影响

由表 1 可知，3 种光质补光的火龙果茎长、茎

围与 CK 相比，均无显著差异，表明光质补光对火龙果茎的生长几乎无影响。7 月，第一批补红光火龙果首花日期比其他补光处理提前 5 d。3 种补光处理之间的开花数目差异显著。其中：补红光和白光的开花数目显著高于 CK，分别提高了 26.7% 和 12.5%；补蓝光与 CK 差异不显著。结果表明，补红光和白光的促进开花效果最佳。

表 1 不同光质补光对火龙果茎生长及开花的影响
Table 1 Effects of different supplemental light qualities on the stem growth and the first flowering of pitaya

处理 Treatment	茎长 Stem length (cm)	茎围 Stem diameter (cm)	开花数 Flower number
R	83.25±2.26a	18.51±1.19a	626.73±4.07a
W	81.63±4.14a	18.15±4.02a	556.44±4.31b
B	82.66±4.34a	18.27±3.57a	503.69±3.61c
CK	82.81±2.08a	18.34±2.36a	494.55±4.48c

R. 红光；W. 白光；B. 蓝光；CK. 对照。不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。下同。
R. Red light；W. White light；B. Blue light；CK. Control. Different small letters mean significant differences among different treatments ($P<0.05$). The same below.

2.6 不同光质对火龙果果实的影响

由表 2 可知，3 种光质补光处理后，果实纵向最大周长和横向最大周长与 CK 无显著差异，表明 3 种光质补光对火龙果果型均无显著影响。3 种补光处理之间果实产量差异显著，其中补红光果实的产量最大，补白光其次，分别高于 CK 17.4% 和 11.5%，且差异显著；补蓝光与 CK 差异不显著。表 2 结果表明，补红光和补白光对于提高果实产量效果最佳。

表 2 不同光质补光对火龙果果实的影响
Table 2 Effects of different supplemental light qualities on pitaya fruit

处理 Treatment	纵向最大周长 Longitudinal maximum perimeter (cm)	横向最大周长 Transverse maximum perimeter (cm)	产量 Yield (kg·m ⁻²)
R	31.88±1.14a	26.77±1.44a	88.11±2.49a
W	30.71±2.42a	26.89±2.12a	83.73±3.67b
B	30.74±2.69a	26.32±2.11a	77.68±3.88c
CK	31.07±1.99a	25.65±1.88a	75.08±3.19c

3 讨论与结论

光质对高等植物的糖代谢和氮代谢具有调节作用。可溶性糖是植物体内碳水化合物转化和再利用的主要物质,反映了植株糖代谢状况;植物体中参与各种代谢的酶类大多是可溶性蛋白,其含量是判断植物氮代谢能力的重要依据(兰明忠,2019)。本研究发现补蓝光可显著增加火龙果茎可溶性蛋白含量,补白光可显著增加火龙果茎中的可溶性糖含量,与石蒜(李青竹等,2019)、矾根(谢苗苗等,2018)、青葱(高松等,2020)等植物相一致,表明蓝光能促进火龙果茎的氮代谢,白光有利于火龙果茎合成碳水化合物,促进其糖代谢。补红光可增加火龙果茎中可溶性蛋白和可溶性糖含量,但不如蓝光和白光影响显著(李慧敏和陆晓民,2016;王静等,2017),表明红光对火龙果茎的糖代谢和氮代谢具有促进作用。

作为光合作用能源和重要环境信号,光在光合产物合成和光形态发生中起重要作用。植物生长主要通过光合作用来实现,光合色素含量在一定程度上反映光合作用强度,其中叶绿素是主要的光能吸收物质,叶绿素含量的高低直接影响植物光合作用的光能利用效率(王燕等,2018)。对大多数植物而言,红光处理有利于提高叶片中叶绿素 a、叶绿素 b 和总叶绿素含量,蓝光处理后叶片中叶绿素较低,但能提高叶绿素 a/b 的比值(许莉等,2007;Bian et al., 2015)。本研究中,补白光提高了火龙果茎叶绿素 a、叶绿素 b 和总叶绿素的含量,从而促进茎的光合作用及产物积累,与缕丝花、油菜幼苗的研究结论相似(王爱民等,2001;陈志等 2013);红光处理对火龙果茎叶绿素 a、叶绿素 b 含量影响不显著,蓝光处理则会减少火龙果茎叶绿素 a、叶绿素 b 的含量,与许莉等(2007)对莴苣的研究结果有所不同,推测可能与光照时间及物种差异有关。

线粒体是细胞进行呼吸作用的主要场所,通过氧化磷酸化途径产生 ATP。线粒体膜电位是指生物膜两侧离子浓度不同所产生的跨膜电位差,反映线粒体功能的活性,是评价线粒体功能的敏感指标(Zamzami et al., 1995)。研究表明植物衰老过程中会积累大量的活性氧自由基(ROS)(Gualanduzzi et al., 2009),而过量的 ROS 则会引

起线粒体膜的氧化损伤,最终引起植物衰老(Qin et al., 2009)。补蓝光和补白光均能提高火龙果茎中线粒体的膜电位,显示出较高的线粒体活性,推测原因可能是蓝光和白光补光处理增加了火龙果茎中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)等抗氧化酶的活性,从而减少呼吸过程中积累的 ROS 对线粒体的伤害(吕梁,2019)。线粒体蛋白含量是评价线粒体功能的重要指标,与多种生物学功能密切相关,如呼吸电子传递链、三羧酸循环、糖酵解途径、线粒体载体、防御和胁迫响应等(吕梁,2019)。补白光、补蓝光、补红光均会导致火龙果茎线粒体蛋白含量有所下降,且补白光处理达到显著水平,表明补白光对线粒体蛋白合成的抑制效果最显著,其对线粒体功能的影响有待进一步研究。

内源激素对植物的生长发育起着重要的调控作用,夜间补光能改变植物体内源激素的含量,提高黄瓜幼苗(李海云和刘焕红,2013)、小麦(冉午玲等,2017)等叶片中的 IAA、GA 含量。本研究中,补白光不仅增加了火龙果茎中 IAA、GA 含量,而且茎中叶绿素、可溶性糖、蛋白质含量均高于对照。推测夜间补光后,GA 与 IAA 的含量提高,促进细胞壁扩容进而利于光合作用及光合产物积累。红光和补蓝光受体也参与调节植物内源激素的分泌(张曼曼等,2018)。本研究中,补红光和补蓝光能提高火龙果茎中 GA 含量,与番茄幼苗茎一致(郭奇等,2013),原因可能在于红光和蓝光能调节胚轴细胞对 GA 的敏感性,促进 GA 合成(Yamaguchi & Kamiya, 2001;Reid et al., 2002)。补红光可提高火龙果茎中 CTK 含量,补蓝光降低 CTK 含量,与卢素萍等(2016)研究结果一致,推测不同光质对 CTK 合成和运输效果不同。

补光试验对火龙果茎的生长均无显著影响而对开花结果影响明显,推测原因可能是火龙果作为热带长日照植物,7—9 月处于旺盛的生殖生长期,日落后不同光质的补光并不会显著促进火龙果茎的营养生长,而对于花芽的形成更有效。研究表明,光质可以影响植物开花,主要由不同光受体接受光和转导信号来完成。MYB、WRKY、bHLH 等转录因子参与调控植物生长发育、次生代谢,在光受体作用下影响植物开花;光受体也可以调控植物激素的合成,进而调节开花(宋佳丽,2016)。本研究中,补红光和补白光均可显著提高火龙果

的开花率,与越橘(王佳淇等,2020)、铁皮石斛(李茹等,2019)的研究结果一致。结合茎中相关物质的检测结果,推测补白光可以提高茎中代谢产物积累和叶绿素含量并促进开花,可能是光受体激活了转录因子调控途径;补红光可以提高茎中 IAA、GA、CTK 等激素含量并促进开花,可能是光受体激活了激素调控途径。

综上所述,红光与白光处理下的火龙果茎段的叶绿素、可溶性糖、可溶性蛋白、内源激素等指标均有显著提高。在今后的栽培试验中,可设置一定比例的红白光,研究红白光配比对火龙果枝条生长指标、光合呼吸、果实品质产量的影响,为壮实火龙果枝条、提高植株抗逆性、提升火龙果经济效益提供技术参考。

参考文献:

ABIDI F, GIRAULT T, DOUILLET O, et al., 2013. Blue light effects on rose photosynthesis and photomorphogenesis [J]. *Plant Biol*, 15(1): 67–74.

BIAN ZH, YANG QC, LIU WK, 2015. Effects of light quality on the accumulation of phytochemicals in vegetables produced in controlled environments: a review [J]. *J Agric Sci Technol*, 95(5): 869–877.

CHEN Z, SUN QL, WANG YT, et al., 2013. Influence of light quality on growth of oil rape seedlings [J]. *Agric Eng*, 3(6): 143–149. [陈志, 孙庆丽, 汪一婷, 等, 2013. 不同光质对油菜幼苗生长的影响[J]. *农业工程*, 3(6): 143–149.]

CHOI HG, MOON BY, KANG NJ, 2015. Effects of LED light on the production of strawberry during cultivation in a plastic greenhouse and in a growth chamber [J]. *Sci Hortic*, 189(25): 22–31.

FOLTA KM, 2004. Green light stimulates early stem elongation, antagonizing light-mediated growth inhibition [J]. *Plant Physiol*, 135(3): 1407–1416.

GAO S, LIU XN, LIU Y, et al., 2020. Response characteristics of green onion (*Allium fistulosum* L.) to LED light quality under artificial climate chamber[J]. *Sci Agric Sin*, 53(14): 2919–2928. [高松, 刘学娜, 刘颖, 等, 2020. 人工气候室控制条件下青葱对 LED 光质的响应特性[J]. *中国农业科学*, 53(14): 2919–2928.]

GUALANDUZZI S, BARALDI E, BRASCHI I, et al., 2009. Respiration, hydrogen peroxide levels and antioxidant enzyme activities during cold storage of zucchini squash fruit [J]. *Postharvest Biol Technol*, 52(1): 16–23.

GU XH, WANG B, WU YL, et al., 2020. Effects on flowering period and quality of red pitaya of supplemental treatment of different light quality in autumn and winter [J]. *J Zhejiang Wanli Univ*, 33(5): 96–100. [顾鑫慧, 王碧, 吴忆兰, 等, 2020. 不同光质补光处理对秋冬季红心火龙果花期和

品质的影响[J]. *浙江万里学院学报*, 33(5): 96–100.]

HUANG QF, XIE SY, CAO MM, et al., 2019. Effects of supplementary illumination at night on leaf nutrition and fruit quality for spring fruit of Kyoho grape [J]. *J S Agric*, 50(4): 781–787. [黄秋凤, 谢蜀豫, 曹慕明, 等, 2019. 夜间补光对巨峰葡萄春果叶片营养及果实品质的影响[J]. *南方农业学报*, 50(4): 781–787.]

LAN MZ, 2019. Effect of LED lights quality on the growth and photosynthesis of *Nageia nagi* seedlings [J]. *Subtrop Agric Res*, 15(3): 184–188. [兰明忠, 2019. LED 光质对竹柏幼苗生长和光合作用的影响[J]. *亚热带农业研究*, 15(3): 184–188.]

LI HY, LIU HH, 2013. Effects of supplementary illumination at night on hormones content and nutrient absorption of cucumber seedlings [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 29(16): 74–78. [李海云, 刘焕红, 2013. 夜间补光对黄瓜幼苗激素含量及养分吸收的影响[J]. *中国农学通报*, 29(16): 74–78.]

LI R, LI ZL, SHANG ZR, 2019. Effects of different light quality of LED on flowering of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo *in vitro* [J]. *J S Agric*, 50(7): 1550–1556. [李茹, 李枝林, 商正蕊, 等, 2019. 不同 LED 光质对铁皮石斛瓶内开花的影响[J]. *南方农业学报*, 50(7): 1550–1556.]

LIU ZC, FENG AY, HU HL, 2014. Study on chlorophyll extraction methods of leaf in persimmon [J]. *J Henan Inst Sci Technol*, (42): 12–15. [刘遵春, 冯爱英, 扈惠灵, 2014. 柿树叶叶绿素含量测定方法比较研究[J]. *河南科技学院学报*, (42): 12–15.]

LI Q, KUBOTA C, 2009. Effects of supplemental light quality on growth and phytochemicals of baby leaf lettuce [J]. *Environ Exp Bot*, 67(1): 59–64.

LI QZ, CAI YM, YANG Z, et al., 2019. Effects of the quality of LED light on the growth, physiological characteristics, and the accumulation of alkaloids in *Lycoris radiata* [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 25(6): 1414–1419. [李青竹, 蔡友铭, 杨贞, 等, 2019. 不同 LED 光质对石蒜幼苗生长、生理和生物碱积累的影响[J]. *应用与环境生物学报*, 25(6): 1414–1419.]

LI HM, LU XM, 2017. Effects of light quality on flowering, dynamic variation in physiological characteristics of pakchoi during budding and flowering stage [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 36(4): 730–737. [李慧敏, 陆晓民, 2017. 不同 LEDs 光质下普通白菜开花以及花期生理特性的动态变化[J]. *西北植物学报*, 36(4): 730–737.]

LU SP, ZHAO MQ, LIU PF, et al., 2016. Effect of light quality on endogenous hormone content and lipid peroxidation of membrane system during aging process of flue-cured tobacco leaf [J]. *J Agric Sci Technol*, 18(6): 44–51. [卢素萍, 赵铭钦, 刘鹏飞, 等, 2016. 光质对烤烟叶片衰老过程中内源激素含量和膜脂过氧化的影响[J]. *中国农业科技导报*, 18(6): 44–51.]

LÜ L, 2019. Mitochondrial energy metabolism and reactive oxygen species involved in early defense responses against pink rot and Si induced resistance of harvested muskmelons [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University: 15–19. [吕梁, 2019. 线粒体能量代谢和活性氧在粉霉病侵染及硅诱导甜瓜果实早期防御响应中的作用[D]. 兰州: 甘肃农业

大学: 15-19.]

- JIANG YL, LIAO YY, LIN TS, et al., 2012. The photo-period-regulated bud formation of red pitaya (*Hylocereus* sp.) [J]. Hort Sci, 47(8): 1063-1067.
- QIN GZ, MENG XH, WANG Q, et al., 2009. Oxidative damage of mitochondrial proteins contributes to fruit senescence: a redox proteomics analysis [J]. J Proteome Res, 8(5): 2449-2462.
- RAN WL, GUO JM, MA Y, et al., 2017. Effect of supplemental illumination at night on endogenous plant hormones content and photosynthetic characteristics in wheat leaves [J]. J Tritic Crops, 37(9): 1181-1186. [冉午玲, 郭家萌, 马野, 等, 2017. 夜间补光对小麦叶片激素含量及光合特性的影响[J]. 麦类作物学报, 37(9): 1181-1186.]
- REID JB, BOTWRIGHT NA, SMITH JJ, et al., 2002. Control of gibberellin levels and gene expression during-etiolation in pea [J]. Plant Physiol, 128(2): 734-741.
- SHEN BY, LI YN, ZHAO SQ, et al., 2014. Effect of dark period lighting regulation on cucumber seedling morphology and comprehensive evaluation analysis and comprehensive evaluation [J]. Trans Chin Soc Agric Eng, 30(22): 201-208. [申宝营, 李毅念, 赵三琴, 等, 2014. 暗期补光对黄瓜幼苗形态调节效果及综合评价[J]. 农业工程学报, 30(22): 201-208.]
- SONG JL, 2016. RNA-Seq-transcriptome analysis of sex differentiation in cucumber seedling under different light quality [D]. Guangzhou: South China Agricultural University. [宋佳丽, 2016. 光质调控黄瓜花性分化的转录组分析[D]. 广州: 华南农业大学.]
- WANG AM, XIAO W, DU WX, et al., 2001. The effect of light quality on growth and development of the test-tube seedlings of *Gypsophila elegans* [J]. J Xuzhou Norm Univ (Nat Sci Ed), (4): 56-58. [王爱民, 肖炜, 杜文雪, 等, 2001. 光质对缕丝花试管苗生长发育的影响[J]. 徐州师范大学学报(自然科学版), (4): 56-58.]
- WANG Y, ZHANG YJ, HE MS, et al., 2018. Effect of light quality on plant morphology and growth [J]. J Anhui Agric Sci, 46(19): 22-25. [王燕, 张亚见, 何茂盛, 等, 2018. 光质对植物形态结构和生长的影响[J]. 安徽农业科学, 46(19): 22-25.]
- WANG JQ, HE YY, WEI XT, et al., 2020. Effects of LED supplemental light on the growth and development of blueberry in greenhouse [J]. Acta Horticult Sin, 47(6): 1183-1193. [王佳淇, 何莹钰, 韦晓桐, 等, 2020. LED 补光组合对大棚越橘生长发育的影响[J]. 园艺学报, 47(6): 1183-1193.]
- WU Q, SU NN, CUI J, 2013. Effect of LED light treatments on growth and endogenous GA and IAA contents of tomato seedling [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 33(6): 1171-1176. [邬奇, 苏娜娜, 崔瑾, 2013. LED 光质对番茄幼苗生长及内源性 GA 和 IAA 含量的影响[J]. 西北植物学报, 33(6): 1171-1176.]
- XIE MM, SUN Y, YIN LQ, et al., 2018. Effects of different LED light qualities on growth and physiological characteristics of *Heuchera* spp. plantlets [J]. Mol Plant Breed, 16(6): 2001-2008. [谢苗苗, 孙翊, 殷丽青, 等, 2018. 不同 LED 光质对矾根组培苗生长和生理特性的影响[J]. 分子植物育种, 16(6): 2001-2008.]
- XU CH, LI JY, CUI MK, et al., 2013. Effects of supplemental lighting on growth and photosynthesis of tobacco leaves [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 33(4): 763-770. [徐超华, 李军营, 崔明昆, 等, 2013. 延长光照时间对烟草叶片生长发育及光合特性的影响[J]. 西北植物学报, 33(4): 763-770.]
- XU L, LIU SQ, QI LD, et al., 2007. Effect of light quality on leaf lettuce photosynthesis and chlorophyll fluorescence [J]. Chin Agric Sci Bull, 23(1): 96-100. [许莉, 刘世琦, 齐连东, 等, 2007. 不同光质对叶用莴苣光合作用及叶绿素荧光的影响[J]. 中国农学通报, 23(1): 96-100.]
- YAMAGUCHI S, KAMIYA Y, 2001. Gibberellins and light-stimulated seed germination [J]. J Plant Growth Regul, 20(4): 369-376.
- YAO TT, ZHU LQ, YANG S, et al., 2010. Effect of NO on oxidative damage to mitochondrial membrane in harvested plum fruit [J]. Sci Agric Sin, 43(13): 2767-2774. [姚婷婷, 朱丽琴, 杨双, 等, 2010. 一氧化氮对采后李果实线粒体膜氧化损伤的影响[J]. 中国农业科学, 43(13): 2767-2774.]
- YIN J, 2016. Review of thermo-photoperiod development of wheat (*Triticum aestivum* L.) I. The vernalization and photoperiod response of wheat varieties [J]. J Tritic Crops, 36(6): 681-688. [尹钧, 2016. 小麦温光发育研究进展 I. 春化和光周期发育规律[J]. 麦类作物学报, 36(6): 681-688.]
- ZAMZAMI N, MARCHETTI P, CASTEDO M, et al., 1995. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death *in vivo* [J]. J Exp Med, 181(5): 1661-1672.
- ZHANG MM, ZHAO XH, WEI ZF, et al., 2018. Effects of different LED light quality on growth and physiological characteristics of crabapple tissue culture seedlings [J]. Shandong Agric Sci, 50(10): 43-47. [张曼曼, 赵晓红, 魏宗法, 等, 2018. LED 不同光质对观赏海棠组培苗生长及生理特性的影响[J]. 山东农业科学, 50(10): 43-47.]
- ZHANG QT, LIANG SW, CAO JR, et al., 2018. Effects of different intensity of LED yellow light on the growth, photosynthetic characteristics and saponins content of *P. polyphylla* var. *yunnanensis* [J]. Mod Food Sci Technol, 34(3): 178-183. [张勤涛, 梁社往, 曹嘉芮, 等, 2018. 不同光强 LED 黄光对滇重楼生长、光合特性和皂苷含量的影响[J]. 现代食品科技, 34(3): 178-183.]
- ZHANG YT, ZHANG YQ, YANG QC, et al., 2019. Overhead supplemental far-red light stimulates tomato growth under intra-canopy lighting with LEDs [J]. J Integr Agric, 18(1): 62-69.
- ZORATTI L, SARALA M, CARVALHO E, et al., 2014. Monochromatic light increases anthocyanin content during fruit development in bilberry [J]. BMC Plant Biol, 14(1): 377.

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202101008



李爱花, 王丹丹, 李唯奇. 两种不同生境苦苣苔科植物的复苏特性及其对水分的光合和生理响应 [J]. 广西植物, 2022, 42(2): 199–209.

LI AH, WANG DD, LI WQ. Resurrection characteristics, photosynthetic and physiological response to dehydration and rehydration of two species in Gesneriaceae with different habitats [J]. Guihaia, 2022, 42(2): 199–209.

两种不同生境苦苣苔科植物的复苏特性 及其对水分的光合和生理响应

李爱花^{1,3}, 王丹丹^{2,3}, 李唯奇^{3*}

(1. 北京市植物园, 北京市花卉园艺工程技术研究中心, 城乡生态环境北京实验室, 北京 100093; 2. 贵州中医药大学药学院, 贵阳 550025; 3. 中国科学院昆明植物研究所种质资源库, 昆明 650204)

摘要: 复苏植物可以耐受极度干旱的环境, 脱水至 10% 相对水分含量后仍然可以复苏。苦苣苔科植物包含有较多复苏植物, 不同类群的复苏机理可能存在差异。该文选择分布在亚热带和温带石灰岩地区的锈色蛛毛苣苔 (*Paraboea rufescens*) 和心叶马铃苣苔 (*Oreocharis cordatula*) 两种苦苣苔科植物, 并对这两个物种的叶片先分别脱水 1、2、3 d, 再分别复水 1 d, 检测不同脱水复水过程的叶片形态、相对含水量 (RWC)、光合活性、膜完整性、渗透调节物质等指标的变化。结果表明: (1) 锈色蛛毛苣苔的叶圆片在脱水后即发生向内折叠, 脱水 2 d 时将叶上表面完全包裹, 同时表征最大光合潜力的叶绿素荧光 F_v/F_m 受到抑制; 而心叶马铃苣苔的叶片仅发生轻度皱缩, 且 F_v/F_m 基本维持对照水平, 同时具有更高的光保护能力 [$Y(NPQ)$]; 复水后, 两个物种的叶片均展开, F_v/F_m 恢复。(2) 两个物种均在脱水 2 d 时, RWC 降低至 5%, 相对电导率 (REC) 分别升高至 51.8% 和 56.2%, 渗透调节物质可溶性糖含量显著升高; 复水后, RWC、REC 和可溶性糖含量均恢复至对照水平。(3) 进一步脱水 3 d 时, 锈色蛛毛苣苔和心叶马铃苣苔叶片 RWC 均达到 1.5%, 复水后的 REC 升高至 95%, F_v/F_m 消失。(4) 锈色蛛毛苣苔在可复苏脱水复水过程的叶绿素 a + b 含量下降 50%, 而心叶马铃苣苔基本保持不变, 说明二者均为叶绿素维持型复苏植物, 可在脱水后复水时迅速恢复光合作用; 在脱水复水过程中, 两个物种的丙二醛 (MDA) 含量均无显著变化, 且保持极低水平, 说明两个物种在极度干旱条件下可以维持其细胞膜脂免于被氧化。综上所述, 两个物种可以耐受 5% RWC 脱水, 均为复苏植物。剧烈脱水时, 锈色蛛毛苣苔通过卷缩叶片来避免吸收过量光照对植物造成伤害; 而心叶马铃苣苔则通过光系统 II (PS II) 的光保护机制将吸收的过多能量通过热耗散形式散布出去, 从而保护其光系统的完整性。

关键词: 锈色蛛毛苣苔, 心叶马铃苣苔, 脱水, 复苏植物, 叶绿素荧光, 渗透调节物质, 丙二醛 (MDA), 光保护

中图分类号: Q945 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2022)02-0199-11

Resurrection characteristics, photosynthetic and physiological response to dehydration and rehydration of two species in Gesneriaceae with different habitats

LI Aihua^{1,3}, WANG Dandan^{2,3}, LI Weiqi^{3*}

收稿日期: 2021-03-23

基金项目: 北京市植物园园管课题项目 (BZ202103) [Supported by Beijing Botanical Garden Project (BZ202103)]。

第一作者: 李爱花 (1980-), 博士, 副研究员, 研究方向为濒危植物保育研究, (E-mail) liaihua@beijingbg.com。

* 通信作者: 李唯奇, 博士, 研究员, 研究方向为植物逆境分子生理生化研究, (E-mail) weiqili@mail.kib.ac.cn。

- (1. Beijing Floriculture Engineering Technology Research Center, Beijing Laboratory of Urban and Rural Ecological Environment, Beijing Botanical Garden, Beijing 100093, China; 2. College of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China; 3. Germplasm Bank of Wild Species, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

Abstract: Resurrection plants usually grow in extreme habitats and have the capacity to survive from lower relative water content to 10%. There are many resurrection plants in family Gesneriaceae, and the resuscitating mechanism of different species may be different. In order to investigate whether the two species have different resurrection characteristics and physiological mechanisms in response to drought, two species of Gesneriaceae, *Paraboea rufescens* and *Oreocharis cordatula*, which are distributed in subtropical and temperate limestone areas respectively, were selected in this study. Their leaves were dehydrated for 1, 2 and 3 d respectively, and then rehydrated for 1 day. The leaf morphology, relative water content (RWC), photosynthetic activity, photosynthetic pigments, membrane integrity and osmotic adjustment substances during different dehydration and rehydration treatments were detected and analyzed. The results were as follows: (1) The leaf discs of *Paraboea rufescens* folded inward after dehydration, and the leaf upper epidermis was completely wrapped after dehydrated for two days, and the chlorophyll fluorescence parameter F_v/F_m , which characterized the maximum photosynthetic potential, was inhibited; Comparatively, the leaf discs of *Oreocharis cordatula* shrunk slightly, maintained the F_v/F_m level, and had higher photoprotection ability [$Y(NPQ)$]; The leaf discs of both species spread out and the F_v/F_m recovered following rewatered. (2) After two days of dehydration, the RWC of the two species decreased to about 5%, the relative electricity conductivities (REC) increased to 51.8% and 56.2% respectively, and the contents of soluble sugar increased significantly; During the following rewatered, RWC, REC and soluble sugar all recovered to the control level. (3) After further dehydration for three days, RWC of leaf discs of two species reached about 1.5%, the conductivity increased to about 95% after rehydration, and the F_v/F_m disappeared. (4) Chlorophyll a+b contents of *Paraboea rufescens* decreased by 50% during resuscitable dehydration and rehydration, while *Oreocharis cordatula* remained basically unchanged, which indicated that both of them were homoiochlorophyllous desiccation tolerance species and could quickly resume photosynthesis after rehydration following dehydration; During dehydration and rehydration, the contents of malonaldehyde (MDA) had no significant change, and remained extremely low level, which indicated two species could keep their membrane lipids from being oxidized under extreme drought conditions. To sum up, these two species can survive from dehydration to lower level of 5% RWC, therefore, they are both resurrection plants. Under severe dehydration, *Paraboea rufescens* can avoid the damage from excessive light absorption by curling its leaves; however, *Oreocharis cordatula* can spread the excessive energy by heat dissipation through photoprotection of PS II, thus protecting its photosynthesis organs.

Key words: *Paraboea rufescens*, *Oreocharis cordatula*, dehydration, resurrection plant, chlorophyll fluorescence, osmotic adjustment substance, malonaldehyde (MDA), photoprotection

复苏植物通常可以耐受极度严酷的环境,经常出现在有零星雨季的生境中,包括分布在热带亚热带的荒漠地区 (Rascio & Rocca, 2005), 或降雨量相对丰富但存在岩溶干旱现象 (Zeng et al., 2007; 刘艳, 2016) 的喀斯特生境。复苏植物的植株通常矮小 (Moore et al., 2007), 在高等植物中比较少, 目前证实的有 350 多种 (Lèutttge et al., 2011), 并不断有新的具有复苏特性的物种被发现。复苏植物是探索植物脱水耐性的生理、生化和分子基础的最佳模型。对于复苏植物独特特性的研究和理解, 将有助于提高缺水条件下作物的产量。苦苣苔科植物中有较多复苏植物, 报道的已有二三十种 (Porembski, 2011)。锈色蛛毛苣苔

(*Paraboea rufescens*) 和心叶马铃苣苔 (*Oreocharis cordatula*) 均为苦苣苔科 (Gesneriaceae) 植物, 前者产于我国广西西南部、贵州南部及云南, 生于海拔 700~1 500 m 喀斯特生境的石灰岩上、岩石隙间, 后者产于云南省香格里拉县、四川省木里县等地, 生于海拔 2 100~2 700 m 的山顶、沟谷石灰岩上。而二者的生境被认为是复苏植物多样性的形成中心 (Rascio & Rocca, 2005)。锈色蛛毛苣苔为多年生草本, 根状茎木质化, 稀为亚灌木; 叶上表皮被蛛丝状绵毛, 后变近无毛, 下表皮通常密被彼此交织的毡毛, 毛簇生、星状或成树枝状分枝。心叶马铃苣苔为多年生无茎草本, 根状茎粗而短, 叶全部基生, 具柄; 叶片长圆状披针形或长圆状卵形, 边

缘具不规则圆齿,上表皮密被贴伏柔毛,下表皮密被淡褐色绢状绵毛(王文采等,1990)。

植物响应干旱会发生一系列生理生化变化。很多植物应对脱水会积累非水性物质如氨基酸和可溶性糖来代替水分以维持其细胞的原始体积(Farrant, 2000)。复苏植物水分缺失后,最常见的变化是可溶性糖大量积累,淀粉快速转化为葡萄糖(Bianchi et al., 1993; Muller et al., 1997)。也有研究发现,脱水时复苏植物中的渗透调节物质脯氨酸含量通常显著升高(Tymms & Gaff, 1979; Pandey et al., 2010)。干旱胁迫诱导产生的过氧化物会氧化细胞膜脂生成丙二醛(malonaldehyde, MDA),破坏膜的完整性。复苏植物 *Selaginella bryopteris* 在脱水至 10% 相对水分含量后 MDA 含量会上升 30% (Pandey et al., 2010),甚至增加两倍(Jovanovic et al., 2011),复水后均可恢复到对照水平。

叶绿体类囊体膜是植物进行光合作用的主要场所,在脱水和复水过程中,复苏植物的叶绿体发生改变。叶绿素维持型复苏植物(homoiochlorophyllous desiccation tolerance species, HDT)在脱水时可以保持其大部分叶绿素含量并维持其类囊体结构,类囊体膜结构仅有轻微损伤,复水后可以迅速恢复光合作用(Tuba et al., 1998; Strasser et al., 2010),适合短期间歇性缺水环境;而叶绿素丧失型复苏植物(poikilochlorophyllous desiccation tolerance species, PDT)脱水时叶绿素基本全部降解,复水时膜结构重新修复,叶绿素重新合成(Ingle et al., 2008)。总体上 PDT 比 HDT 需要更多的时间来复苏,因为它需要重新合成叶绿素并重构类囊体结构(Sherwin & Farrant, 1996)。因此,通过检测脱水复水过程复苏植物叶片的叶绿素含量,可以得知其光合器官对干旱环境的响应对策。叶绿素荧光是测量光合作用,特别是光系统 II (PS II) 光能转换的重要探针,可以探测到光系统对光能吸收、传递、耗散、分配等方面的变化,是研究和探测光合生理与逆境胁迫关系的理想手段(Roháček et al., 2008)。复苏植物的光合作用在脱水时均会发生改变,在温和脱水时,这类植物的光合活性变化较小;而在严重脱水时则完全丧失,复水后又可恢复(Farrant et al., 2003; Georgieva et al., 2005)。

基于此,本研究以分布在亚热带和温带石灰岩地区的锈色蛛毛苣苔和心叶马铃苣苔为研究对象,对其进行不同程度的脱水及脱水后复水处理,

检测脱水复水过程植物叶片的形态特征、光合活性指标、光合色素含量、膜完整性指标、渗透调节物质含量等变化,拟研究这两种苦苣苔科植物的耐脱水特性及其响应脱水复水机理的异同,为植物抗旱生理生化研究奠定理论基础,为基于植物生理生化特征的作物遗传改良提供科学指导。

1 材料与方法

1.1 试验材料

锈色蛛毛苣苔植株引自云南省石林县乃古石林内石灰岩缝隙,心叶马铃苣苔植株引自云南省香格里拉县石灰岩表面及缝隙,采样时周围的土壤与植株共同收集,引种后栽植在中国科学院昆明植物研究所种质资源库的引种驯化中心温室内。温室的温度 20~23 °C,光照 120 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,光周期为 12 h 光照/12 h 黑暗,相对湿度 60%。

1.2 试验处理

选取植株上成熟且完全展开的叶片,用打孔器制作直径 1.5 cm 的叶圆片。叶圆片在 15 °C、15% 相对湿度(relative humidity, RH)条件下进行快速脱水处理,分别脱水 1 d(Deh1)、2 d(Deh2)、3 d(Deh3);将 Deh1、Deh2、Deh3 的叶圆片进行复水处理,放到铺有吸水滤纸的培养皿上,置于 20 °C 黑暗条件下进行复水处理 24 h,分别标注为 Reh1、Reh2、Reh3。对不同脱水和复水处理取样,进行相对含水量(relative water content, RWC)、光合色素含量、叶绿素荧光参数、相对电导率(relative electricity conductivity, REC)、MDA、可溶性糖和脯氨酸含量的检测,每个处理 5 次重复。

1.3 检测指标及检测方法

1.3.1 相对含水量 参照 Barrs & Weatherley (1962),通过重量计算法得到 RWC,公式如下:

$$\text{RWC}(\%) = 100 \times [(\text{鲜重} - \text{干重}) / (\text{饱和鲜重} - \text{干重})]$$

式中:鲜重指正常生长的叶圆片重量;干重指 80 °C 烘烤 48 h 之后的叶圆片重量;将叶圆片放在水中吸水至重量不再增加时的重量,即为饱和鲜重。

1.3.2 叶绿素荧光 使用叶绿素荧光成像仪 [MAXI-Imaging Pulse-Amplitude (PAM) Instrument (Walz, Germany)] 测定叶圆片的叶绿素荧光,用 ImagingWin Software 软件进行分析。将叶圆片避光放置 20 min,进行暗适应,之后用叶绿素荧光成

像仪测定相关的荧光参数, F_v/F_m 、 $Y(\text{II})$ 和 $Y(\text{NPQ})$ 的计算公式如下:

$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m; Y(\text{II}) = (F_m - F_s)/F_m'; Y(\text{NPQ}) = (F_m - F_m')/F_m.$$

式中: F_v/F_m 为叶绿体光系统 II 的最大量子产量; $Y(\text{II})$ 为实际量子产量; $Y(\text{NPQ})$ 为非光化学淬灭耗散的能量; F_0 为暗适应 20 min 的最小荧光产率; F_m 为暗适应 20 min 后饱和脉冲测量的最大荧光产率; F_m' 为照光状态下, 光合作用稳定后饱和脉冲测量的最大荧光产率; F_s 为相对稳定状态的荧光产率。

1.3.3 叶绿素含量检测 将叶圆片用去离子水轻轻清洗, 之后浸泡在 3 mL N,N-二甲基-甲酰胺中, 置于摇床, 25 °C、80 r·min⁻¹ 振荡过夜。待叶片变为白色之后, 用分光光度计测定其在 480、647、664 nm 处的吸光值。按照以下公式计算:

$$C_{\text{Chla}} (\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}) = (12 \times A_{664} - 3.11 \times A_{647}) \times V/W;$$

$$C_{\text{Chlb}} (\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}) = (20.78 \times A_{647} - 4.88 \times A_{664}) \times V/W;$$

$$C_{\text{Caro}} = (1000 \times A_{480} \times V/W - 1.12 \times C_{\text{Chla}} - 34.07 \times C_{\text{Chlb}}) / 245.$$

式中: V 为提取溶液体积; W 为叶圆片干重; C_{Chla} 、 C_{Chlb} 、 C_{Caro} 分别表示叶圆片的叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素含量。

1.3.4 相对电导率 (REC) 将叶圆片置入洁净试管中, 加入 2 mL 室温去离子水至浸没植物材料, 将试管置于摇床, 25 °C、80 r·min⁻¹ 孵育 2 h, 用雷磁 DSS-II 型电导率仪测定试管溶液的电导率 C_1 ; 将试管于沸水浴中煮 30 min, 待样品冷却到室温后, 测得溶液电导率 C_2 ; 根据以下公式计算 REC:

$$\text{REC} (\%) = (C_1/C_2) \times 100.$$

1.3.5 MDA 含量检测, 用硫代巴比妥酸法 取叶圆片加入 2 mL 10% 三氯乙酸 (TCA), 研钵中研磨提取 2 min; 提取液转入离心管, 用 3 mL 10% TCA 冲洗研钵, 冲洗液与提取液合并; 9 500 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上清液, 用 10% TCA 溶液定容至 5 mL。取 1 mL 上清液, 加入 1 mL 0.6% 硫代巴比妥酸 (TBA), 100 °C 水浴加热 20 min, 迅速冷却; 4 °C 9 500 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液在 532、600、450 nm 测定吸光值。MDA 含量计算公式 (Heath & Packer, 1968) 如下:

$$C_{\text{MDA}} (\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{DW}) = [6.45 \times (A_{532} - A_{600}) - 0.56 \times A_{450}] \times V/W.$$

式中: V 表示提取液体积 (L), 本研究为 0.005 L; W 为组织干重 (g); C_{MDA} 为 MDA 含量。

1.3.6 可溶性糖和脯氨酸的提取和检测 参照 Li 等 (2004) 的方法, 将样品液氮研磨, 加入 4 mL 75% 乙醇, 转移至离心管, 置于摇床提取过夜。4 500 r·min⁻¹ 离心 15 min 后取上清。用于可溶性糖和脯氨酸测定。

可溶性糖检测采用蒽酮比色法, 取提取的上清液 40 μL 加蒽酮 2 mL, 100 °C 水浴 1 h, 测定 625 nm 吸光值。脯氨酸检测采用茚基水杨酸法, 取提取的上清液 600 μL 加茚三酮 900 μL, 100 °C 水浴 1 h, 按 1:3 (样品: 甲苯) 比例加入甲苯 4.5 mL, 振荡后 23 °C 温育 24 h, 取上清液测 520 nm 吸光值。

配制不同浓度的可溶性糖和脯氨酸标准溶液, 用上述的方法绘制标准曲线, 根据标准曲线计算出样品中可溶性糖和脯氨酸含量 (μg·mg⁻¹ DW)。

1.4 数据处理与分析

用 Q 检验法处理数据异常值。将要检测的一组数据按照从大到小的顺序排列; 用下面的公式计算出 Q 值。

$$Q_{\text{计算}} = \frac{|X_{\text{离群}} - X_{\text{邻近}}|}{X_{\text{max}} - X_{\text{min}}}.$$

式中: X_{max} 是检测数据中的最大测量值; X_{min} 是检测数据中的最小测量值; $X_{\text{离群}}$ 是要检测的数据; $X_{\text{邻近}}$ 为检测数据的邻近数据。本研究中, 重复数为 5, 则在 0.05 水平, 若 $Q_{\text{计算}} > 0.73$ (Welti et al., 2002), 则离群值应弃去; 否则应保留。

通过软件 SPSS 16.0, 采用 ANOVA 法进行数据间的差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 锈色蛛毛苣苔和心叶马铃苣苔脱水复水过程的叶片形态及相对含水量变化

由图 1:A 可知, 锈色蛛毛苣苔在脱水 1 d 时, 叶片即表现出严重卷缩, 叶背面锈毛完全露出, 叶绿素荧光 F_v/F_m 几乎消失, 复水 (Reh1) 后, 叶片逐渐展开, F_v/F_m 基本恢复到对照水平; 脱水 2 d 时, 叶片进一步卷缩, 复水 (Reh2) 后叶片仍然可以展开, F_v/F_m 恢复; 而脱水 3 d 后再复水的叶片不能完全展开, 且叶片变为褐色, 叶绿素荧光 F_v/F_m 完全消失。图 1:B 显示, 心叶马铃苣苔在脱水 1 d 时,

叶片平整,未出现卷缩,叶绿素荧光变化不大,复水(Reh1)后,叶片颜色及叶绿素荧光 F_v/F_m 与对照相似;脱水 2 d 时,叶片发生皱缩, F_v/F_m 仍然保持与对照类似水平,复水(Reh2)后叶片展开, F_v/F_m 恢复到类似对照水平;脱水 3 d 时,叶片进一步皱缩,叶绿素荧光 F_v/F_m 消失,再复水(Reh3)的叶片不能展开, F_v/F_m 变为 0。脱水复水过程的 RWC 结果(图 1:C)显示,锈色蛛毛苣苔和心叶马铃苣苔新鲜叶片的 RWC 相似,分别为 81.7% 和 79.9%,其失水速率基本一致,第 1 天下降到约为初始水平一半的值,第 2 天 RWC 分别迅速下降至 4.2% 和 5.6%,第 3 天分别约为 1.3% 和 1.5%。脱水 2 d 后复水,两个物种的 RWC 分别恢复到 78% 和 85%。由此可知,锈色蛛毛苣苔和心叶马铃苣苔在脱水 2 d 后,RWC 约为 5% 时,复水仍然可以复活;脱水 3 d,RWC 约为 1.5% 后,丧失活力。

2.2 锈色蛛毛苣苔和心叶马铃苣苔脱水复水过程的叶片叶绿素荧光光学参数变化

F_v/F_m 能反映植物的最大光能转化效率,即最大光合能力。不同脱水复水过程的叶片 F_v/F_m 结果(图 2)显示,在脱水 1、2 d 时,锈色蛛毛苣苔的 F_v/F_m 值急剧下降,Deh2 处理甚至下降到 0,但相应复水(Reh1、Reh2)后, F_v/F_m 值均可以恢复到对照水平;在脱水 3 d 时, F_v/F_m 值急剧下降到 0,复水后, F_v/F_m 值仍旧为 0,未能恢复,说明叶片的潜在最大光合能力消失。心叶马铃苣苔叶片的 F_v/F_m 值在 Deh1、Deh2、Reh1、Reh2 处理中,基本保持与对照相似的水平;脱水 3 d 后, F_v/F_m 值急剧下降,复水后完全消失。

$Y(II)$ 可以表征植物当前状态下的实际光能转换效率,由图 2 可知,光适应之后,锈色蛛毛苣苔和心叶马铃苣苔的叶片 $Y(II)$ 均很低,脱水 1 d 后,锈色蛛毛苣苔的 $Y(II)$ 有所升高,而心叶马铃苣苔继续下降;脱水 2 d 时,均无法检测到两个物种的 $Y(II)$;复水处理中,在 Reh2 处理时,锈色蛛毛苣苔和心叶马铃苣苔叶片的 $Y(II)$ 有小幅升高趋势,而在其他处理中,均无法检测到锈色蛛毛苣苔和心叶马铃苣苔的叶片 $Y(II)$ 。

$Y(NPQ)$ 是指 PS II 吸收的能量通过光保护机制耗散为热量的那部分能量,反映植物的光保护能力。由图 2 可知,锈色蛛毛苣苔和心叶马铃苣苔的 $Y(NPQ)$ 与 F_v/F_m 的整体变化趋势类似。然而,在心叶马铃苣苔中,脱水 1 d 的 $Y(NPQ)$ 较对

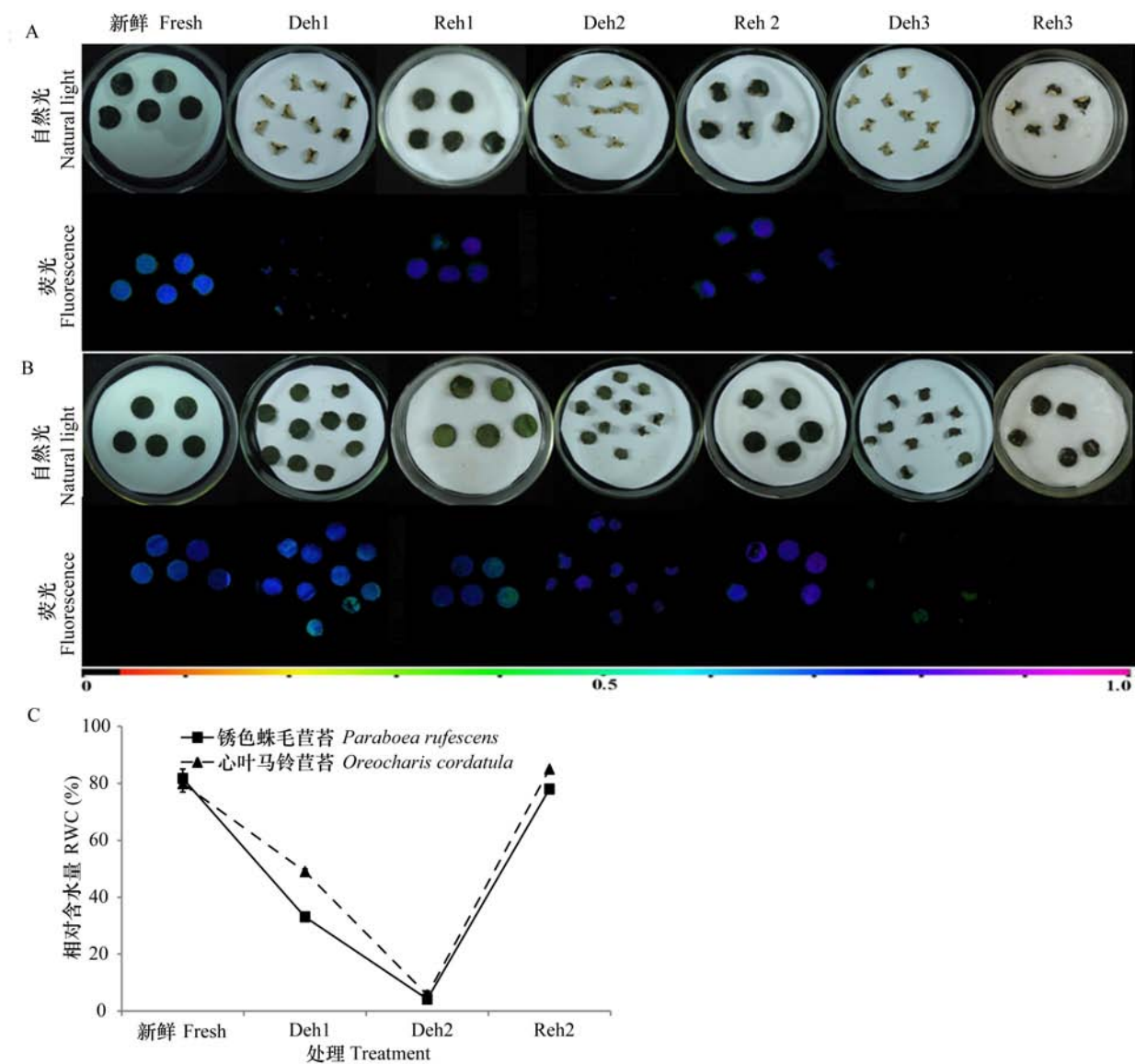
照有升高趋势,表明脱水 1 d 后心叶马铃苣苔的光保护能力提高;脱水 2 d 时,其 $Y(NPQ)$ 与其对照水平相当,此时无法检测到锈色蛛毛苣苔的 $Y(NPQ)$;Reh3 处理的 $Y(NPQ)$ 下降为 0,而其 F_v/F_m 值为 0.07,表明心叶马铃苣苔脱水 3 d 时,其 PS II 仍具有潜在光合能力,但已丧失光保护能力。这说明心叶马铃苣苔在脱水 1、2 d 时,其光保护能力较强。

2.3 锈色蛛毛苣苔和心叶马铃苣苔不同脱水复水处理的光合色素含量变化

锈色蛛毛苣苔和心叶马铃苣苔叶圆片在脱水复水过程的光合色素含量结果(表 1)显示,锈色蛛毛苣苔叶圆片在脱水 1、2 d 时,叶绿素 a 含量均较对照显著下降,脱水 2 d 复水(Reh2)后,叶绿素 a 含量升高,但未达到显著水平;叶绿素 b 含量、叶绿素 a+b 含量以及类胡萝卜素表现出相似的变化趋势,叶绿素 a+b 含量在脱水 2 d 时,下降 50%,类胡萝卜素含量下降 28%;而叶绿素 a/b 比值表现出相反的趋势,即 Deh1、Deh2 和 Reh2 处理中的叶绿素 a/b 比值均显著升高。心叶马铃苣苔叶片在脱水 1、2 d 时,与对照相比,叶绿素 a 含量均显著下降,Reh2 处理的叶绿素 a 含量升高,达到与对照相似水平;叶绿素 b 含量和叶绿素 a+b 含量在 Deh1 处理显著下降,而 Deh2 和 Reh2 处理中,与对照无显著差异;类胡萝卜素含量在处理过程中下降,但仅 Deh2 处理达到显著水平,其他处理均未达到显著水平;叶绿素 a/b 比值在整个脱水复水过程中均未发生改变。可见,锈色蛛毛苣苔和心叶马铃苣苔叶片在脱水复水过程的光合色素含量下降,表明光合色素发生部分降解,锈色蛛毛苣苔较心叶马铃苣苔降解更严重。

2.4 锈色蛛毛苣苔和心叶马铃苣苔脱水复水过程的膜损伤指标变化

质膜是植物应对胁迫的首要响应位点。脱水后叶片细胞的膜渗透性可能发生改变,膜渗透性的伤害程度可用相对电导率(REC)表示。由图 3 可知,脱水 1、2、3 d 后,锈色蛛毛苣苔的 REC 均逐渐升高,脱水 1 d 时与对照相比无显著变化,脱水 2 d 时较对照显著,升至 51.8%,在致死脱水 3 d 时,REC 最高,达到 95%;Reh1 和 Reh2 处理的叶圆片 REC 与相应脱水处理(Deh1 和 Deh2)没有显著差异,而 Reh3 较 Deh3 处理的 REC 显著下降,原因可能是脱水 3 d 时,叶片细胞已丧失活力,细



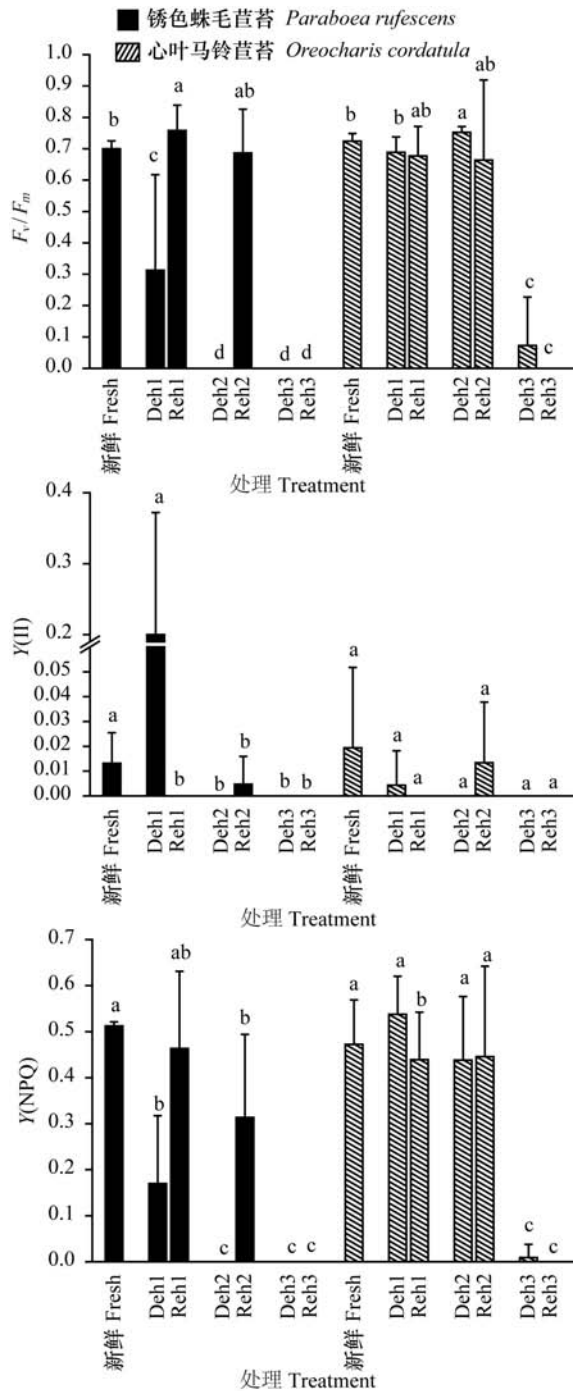
A. 锈色蛛毛茛苔叶圆片及其叶绿素荧光; B. 心叶马铃茛苔叶圆片及其叶绿素荧光; C. 相对含水量。
A. Leaf discs and their fluorescences of *Paraboea rufescens*; B. Leaf discs and their fluorescences of *Oreocharis cordatula*; C. Relative water content (RWC).

图 1 锈色蛛毛茛苔和心叶马铃茛苔不同脱水复水过程的叶圆片及其 F_v/F_m 和相对含水量
Fig. 1 Leaves discs and their F_v/F_m and RWC of *Paraboea rufescens* and *Oreocharis cordatula* during different dehydration and rehydration treatments

胞膜破裂,导致叶片内大量电解质泄露到叶片外面,因此电解质急剧下降。心叶马铃茛苔的叶圆片,在脱水 1 d 及复水时,其 REC 与对照类似,而脱水 2 d 时(Deh2)较对照显著,升高至 56.2%,致死脱水 3 d 时继续升高至 95.7%;脱水 2 d 后复水(Reh2)与脱水 2 d(Deh2)处理的 REC 无显著差异,Reh3 处理较 Deh3 处理有所下降。这表明两个

物种在脱水 1、2 d 时,膜发生损伤,但这不致命,仍然可以恢复,而脱水 3 d 后膜发生致命损伤,无法恢复。

细胞受到水分胁迫时会产生过氧化产物,这些过氧化产物会氧化膜脂生成膜脂过氧化产物 MDA。由图 3 可知,不同脱水复水过程,锈色蛛毛茛苔和心叶马铃茛苔的 MDA 含量虽有变化,但变



F_v/F_m : 光系统II最大光化学量子产量; $Y(II)$: 光系统II实际光化学量子产量; $Y(NPQ)$: 调节性能量耗散量子产量。不同小写字母表示同一物种不同处理间存在显著性差异($P<0.05$)。下同。
 F_v/F_m : Maximal photochemical efficiency of PS II; $Y(II)$: Actual photochemical efficiency of PS II; $Y(NPQ)$: Adjusted photochemical efficiency of PS II. Different small letters of the same species indicate significant differences among different treatments ($P<0.05$). The same below.

图2 锈色蛛毛苣苔和心叶马铃薯苣苔不同脱水复水过程的叶圆片叶绿素荧光参数
Fig. 2 Chlorophyll fluorescence parameters of *Paraboea rufescens* and *Oreocharis cordatula* leaves discs during different dehydration and rehydration treatments

化不显著,且与非复苏植物拟南芥(Li et al., 2014)相比,其含量保持很低水平,即其膜脂过氧化水平在脱水复水过程并未发生显著改变,即使是在致死脱水后复水处理(Reh3)中,MDA含量也未大幅上升。

2.5 锈色蛛毛苣苔和心叶马铃薯苣苔不同脱水复水过程的渗透调节物质变化

锈色蛛毛苣苔和心叶马铃薯苣苔脱水复水过程的可溶性糖含量(图4)显示,脱水1、2、3 d的可溶性糖含量均较对照显著升高,Deh3处理升高最多;复水后,锈色蛛毛苣苔的可溶性糖含量较相应脱水处理显著下降,而心叶马铃薯苣苔的可溶性糖含量在Deh1和Reh1之间无显著差异,脱水2、3 d后复水的可溶性糖含量较相应脱水处理显著下降。锈色蛛毛苣苔中,脯氨酸含量在脱水复水过程中,均无显著变化;而心叶马铃薯苣苔脱水2、3 d的脯氨酸含量较对照升高。然而,两个物种在脱水复水过程中,脯氨酸含量均为 $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ 数量级,在非复苏植物拟南芥中,对照条件下的脯氨酸含量为 $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ 数量级(Li et al., 2014)。

3 讨论与结论

大多复苏植物生长于年降雨量为160~570 mm(Hickel, 1967)的干旱半干旱地区。虽然锈色蛛毛苣苔和心叶马铃薯苣苔的原产地云南省石林县和香格里拉县相对荒漠地区年降雨量并不低(张忱, 2015; 刘盈曦等, 2016),但由于其喀斯特地貌的基岩裸露率高、土壤浅薄、保水性较差等原因致使出现岩溶干旱现象(Zeng et al., 2007; 刘艳, 2016)。干旱会影响植物的生理生化特征,严重失水时,原生质水完全丧失,细胞内仅剩余小部分束缚水(Bartels & Salamini, 2001)。本研究中,锈色蛛毛苣苔和心叶马铃薯苣苔的叶圆片在脱水至2 d时,叶圆片的RWC下降到5%左右,此时复水1 d叶圆片的RWC可以恢复到对照水平,远远低于复苏植物的可恢复RWC水平10%(Alpert, 2006),表明两个物种均为复苏植物。锈色蛛毛苣苔和心叶马铃薯苣苔叶圆片的脯氨酸和可溶性糖含量,以及在脱水和随后的复水过程中膜脂过氧化和离子渗漏结果,进一步证明了两个物种的复苏特性。叶片中的可溶性糖在脱水过程中略有积累;而脯氨酸含量在脱水以及复水过程中均保持较低水平

表 1 锈色蛛毛苣苔和心叶马铃苣苔叶圆片不同脱水复水过程的光合色素含量

Table 1 Photosynthetic pigments contents of *Paraboea rufescens* and *Oreocharis cordatula* leaves discs during different dehydration and rehydration treatments

色素 Pigment	物种 Species	含量 Content (mg · g ⁻¹)			
		新鲜 Fresh	Deh1	Deh2	Reh2
叶绿素 a Chla	锈色蛛毛苣苔 <i>Paraboea rufescens</i>	4.05±0.68a	2.68±0.35b	2.16±0.27b	2.61±0.32b
	心叶马铃苣苔 <i>Oreocharis cordatula</i>	3.65±0.69a	2.17±0.14b	2.57±0.06b	2.75±1.23ab
叶绿素 b Chlb	锈色蛛毛苣苔 <i>Paraboea rufescens</i>	1.53±0.25a	0.78±0.1b	0.63±0.06b	0.72±0.08b
	心叶马铃苣苔 <i>Oreocharis cordatula</i>	1.47±0.11a	0.98±0.06b	1.1±0.08ab	1.21±0.49ab
叶绿素 a/b Chla/b	锈色蛛毛苣苔 <i>Paraboea rufescens</i>	2.65±0.11b	3.46±0.19a	3.42±0.38a	3.63±0.2a
	心叶马铃苣苔 <i>Oreocharis cordatula</i>	2.3±0.17a	2.26±0.02a	2.24±0.02a	2.26±0.1a
叶绿素 a+b Chla+b	锈色蛛毛苣苔 <i>Paraboea rufescens</i>	5.58±0.92a	3.46±0.45b	2.8±0.35b	3.32±0.39b
	心叶马铃苣苔 <i>Oreocharis cordatula</i>	4.84±0.4a	3.15±0.19b	3.71±0.1ab	3.26±0.86ab
类胡萝卜素 Carotenoid	锈色蛛毛苣苔 <i>Paraboea rufescens</i>	0.92±0.16 a	0.68±0.02b	0.66±0.12b	0.73±0.1b
	心叶马铃苣苔 <i>Oreocharis cordatula</i>	0.96±0.15a	0.76±0.14ab	0.72±0.05b	0.8±0.26ab

注：同行不同小写字母表示不同处理间存在显著性差异 ($P<0.05$)。
Note: Different small letters in the same row indicate significant differences among different treatments ($P<0.05$).

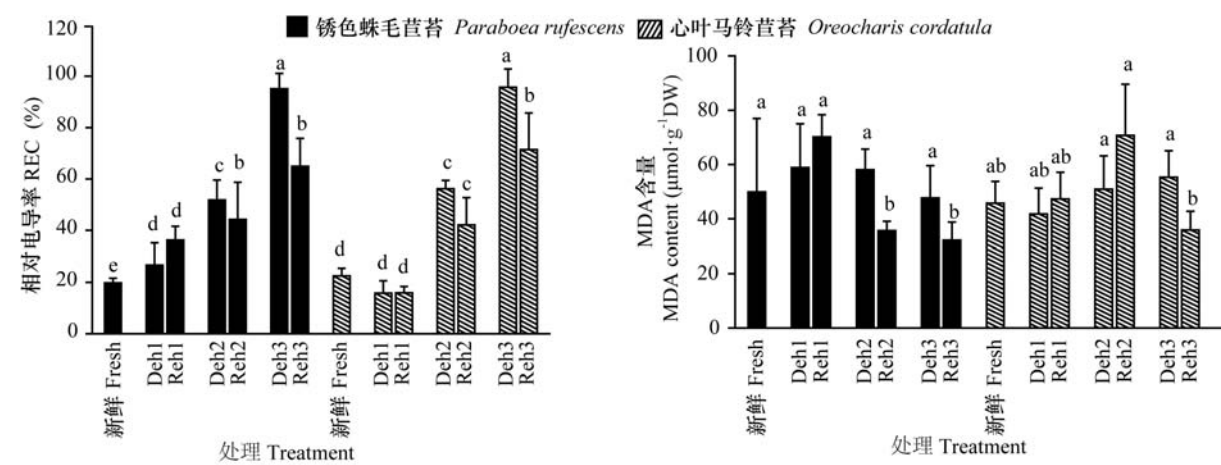


图 3 锈色蛛毛苣苔和心叶马铃苣苔叶圆片不同脱水复水过程的 REC 和 MDA 含量

Fig. 3 REC and MDA contents of *Paraboea rufescens* and *Oreocharis cordatula* leaves discs during different dehydration and rehydration treatments

且基本不变,这与其他复苏植物相同 (Bianchi, 1993; Georgieva et al., 2005; Li et al., 2014),推测脯氨酸可能不参与该类复苏植物耐受极度脱水的渗透调节过程 (Li et al., 2014)。膜的完整性可由 MDA 和离子渗漏的量指示,锈色蛛毛苣苔和心叶马铃苣苔在脱水 1、2 d 及相应复水时的 MDA 和离子渗漏量均较低,这与弥勒苣苔相似 (Li et al., 2014)。由此推测,在脱水复水过程中,这些复苏

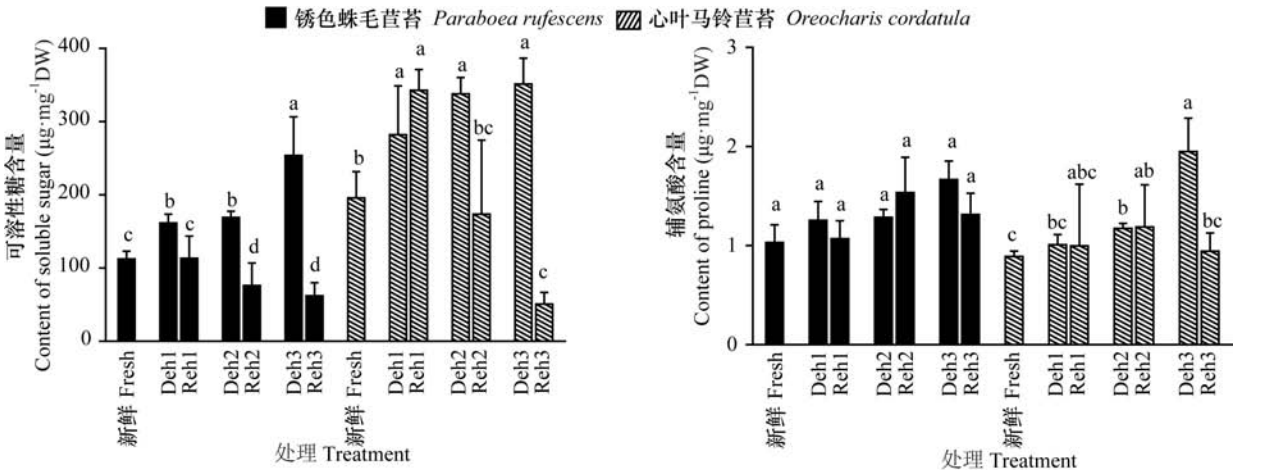


图 4 锈色蛛毛苣苔和心叶马铃苣苔叶圆片不同脱水复水过程的可溶性糖和脯氨酸含量
Fig. 4 Contents of soluble sugar and proline in *Paraboea rufescens* and *Oreocharis cordatula* leaves discs during different dehydration and rehydration treatments

植物的膜脂有其独特的保护机制,能够在极度干旱条件下维持其细胞膜脂的组成。这表明在可复苏脱水时,复苏植物可以保持较好的膜完整性。随着脱水程度加重,脱水 3 d 时,两个物种的 RWC 均降低至 1.5% 左右,光合活性降为 0,电解质几乎全部泄漏,此时复水,叶圆片的 RWC、光合活性均不能恢复到对照水平。这说明此时锈色蛛毛苣苔和心叶马铃苣苔的叶圆片过度脱水,叶片细胞内的束缚水也发生脱水 (Bartels & Salamini, 2001),叶片丧失恢复能力。

在脱水复水过程中,HDT 可以保持其光合色素水平及光合器官结构的完整性 (Drazic et al., 1999)。在黑暗干燥条件下,心叶马铃苣苔的叶绿素 a+b 含量在脱水至 5% 及复水时均未发生显著变化,表明该物种为叶绿素维持型复苏植物。而锈色蛛毛苣苔在脱水至 5% 时,叶绿素 a+b 含量下降约 50%,复水后短期内即可有升高趋势,区别于脱水后叶绿素完全降解,复水需要较长时间完成修复的 PDT (Lüttge et al., 2011),其仍然为 HDT,脱水后降解部分叶绿素,复水后迅速恢复其水平,这在复苏植物弥勒苣苔 (Li et al., 2014)、*Myrothamnus flabellifolia* (Farrant et al., 1999)、*Ramonda nathaliae* (Drazic et al., 1999)、*Craterostigma wilmsii* (Farrant et al., 2000) 等物种中也有发现。这种类型的复苏植物在复水后可以迅速恢复叶绿素水平,并修复类囊体结构 (Hallam & Luff, 1980),有利于植物迅速恢复光合作用状态

而进行物质合成,是植物生长在间歇性降雨环境的一种适应策略 (Sherwin & Farrant, 1996)。

脱水过程中叶绿素含量虽呈维持的趋势,但通常复苏植物叶片的光合活性在脱水时完全消失,复水后又能够恢复 (Georgieva et al., 2005; Evelin et al., 2012)。锈色蛛毛苣苔在脱水 1、2 d 后,其最大光合潜力参数 F_v/F_m 消失,相应复水后其值又可恢复到对照相似水平,这可能与先前报道的植物在干燥过程中具有保持光合结构完整性的保护机制有关 (Augusti et al., 2001; Bartels & Salamini, 2001)。心叶马铃苣苔叶圆片在脱水 1、2 d 时,区别于锈色蛛毛苣苔,其 F_v/F_m 值基本维持在对照水平。心叶马铃苣苔脱水时能够维持其 F_v/F_m 能力,可能是由于其能够通过光保护机制将过量的光耗散为热量 [$Y(NPQ)$],具有更强的光保护能力。脱水 3 d 时,无论是锈色蛛毛苣苔还是心叶马铃苣苔的叶圆片 F_v/F_m 值均消失,且复水也未能恢复。这是因为过度脱水导致叶圆片的叶绿素及类囊体结构受到破坏 (Tuba et al., 1996),而复水后叶圆片的叶绿体及内部结构迅速崩解。

叶片折叠和展开是复苏植物应对脱水及脱水后复水过程常见的形态适应特性 (Gaff, 1989)。本研究发现,锈色蛛毛苣苔的叶圆片在脱水后向内折叠,密被白色毡毛的叶背面露在外面,可以防止过量光照产生活性氧对叶片造成伤害 (Dalla Vecchia et al., 1998; Farrant et al., 2003)。心叶马铃苣苔脱水复水过程的叶圆片形态变化完全不

同,在脱水 1、2 d 时,其叶圆片相对平整,稍有皱缩;脱水 3 d 时,叶片有卷缩,但与锈色蛛毛苣苔相比程度轻很多。可见,锈色蛛毛苣苔和心叶马铃薯的叶片形态结构响应干旱的适应机制不同。

综上所述,锈色蛛毛苣苔和心叶马铃薯的叶圆片均可以耐受 5% RWC 的脱水,复水后其叶圆片的外部形态、叶绿素含量、光合活性、离子渗漏指标等均可以恢复到对照水平,继续脱水至 1.5% RWC,则上述指标均不能恢复,表明这两个物种均具有复苏特性。在应对脱水复水处理时,两个物种具有一些相同的生理生化变化。两种复苏植物均能够相对维持其叶绿素水平,便于植物在雨季来临能够迅速恢复光合作用进行生长。可溶性糖在锈色蛛毛苣苔和心叶马铃薯的脱水胁迫过程中起到渗透调节作用,而脯氨酸可能不参与该类复苏植物耐受极度脱水的渗透调节过程。两个物种的膜脂可能有其独特的保护机制,能够在极度干旱条件下维持其细胞膜脂免于被氧化的过程,而其机制需要进一步研究。但是,二者存在不同的响应机制,锈色蛛毛苣苔通过剧烈卷缩叶片来避免脱水时过量光照对植物造成的伤害;然而,心叶马铃薯则具有更强的光保护能力,在受到脱水胁迫时,其能够通过光保护机制将 PS II 吸收的过多能量通过热耗散形式散布出去,从而保护其光系统免受伤害。然而,这两个物种对脱水复水响应的差异,是否与其野外生境的差别有关系,需要进一步研究。

参考文献:

- ALPERT P, 2006. Constraints of tolerance: why are desiccation-tolerant organisms so small or rare [J]. *J Exp Biol*, 209: 1575–1584.
- AUGUSTI A, SCARTAZZA A, NAVARI-IZZOF, et al., 2001. Photosystem II photochemical efficiency, zeaxanthin, and antioxidant contents in the poikilohydric *Ramonda serbica* during dehydration and rehydration [J]. *Photosyn Res*, 67: 79–88.
- BARRS HD, WEATHERLEY PE, 1962. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves [J]. *Aust J Biol Sci*, 15(3): 413–428.
- BARTELS D, SALAMINI F, 2001. Desiccation tolerance in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. A contribution to the study of drought tolerance at the molecular level [J]. *Plant Physiol*, 127(4): 1346–1353.
- BIANCHI G, GAMBA A, LIMIROLI R, et al., 1993. The unusual sugar composition in leaves of the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolia* [J]. *Physiol Plantarum*, 87(2): 223–226.
- DALLA VECCHIA F, EL ASMAR T, CALAMASSI R, et al., 1998. Morphological and ultrastructural aspects of dehydration and rehydration in leaves of *Sporobolus stapfianus* [J]. *Plant Growth Regul*, 24(3): 219–228.
- DRAZIC G, MIHAILOVIC N, STEVANOVIC B, 1999. Chlorophyll metabolism in leaves of higher poikilohydric plants *Ramonda serbica* Pan, and *Ramonda nathaliae* Pan, et Petrov. during dehydration and rehydration [J]. *J Plant Physiol*, 154(3): 379–384.
- EVELIN RP, MIHAILOVA G, PETKOVA S, et al., 2012. Differences in physiological adaptation of *Haberlea rhodopensis* Friv. leaves and roots during dehydration-rehydration cycle [J]. *Acta Physiol Plant*, 34: 947–955.
- FARRANT JM, 2000. A comparison of mechanisms of desiccation tolerance among three angiosperm resurrection plant species [J]. *Plant Ecol*, 151(1): 29–39.
- FARRANT JM, COOPER K, KRUGER LA, et al., 1999. The effect of drying rate on the survival of three desiccation-tolerant angiosperm species [J]. *Ann Bot-London*, 84(3): 371–379.
- FARRANT JM, VANDER WILLIGEN C, LOFFELL DA, et al., 2003. An investigation into the role of light during desiccation of three angiosperm resurrection plants [J]. *Plant Cell Environ*, 26(8): 1275–1286.
- GAFF DF, 1989. Responses of desiccation tolerant ‘resurrection’ plants to water stress [M] // KREEB KH, RICHTER H, HINCKLEY TM. Structural and functional responses to environmental stresses: Water shortage. The Hague: SPB Academic Publishing: 255–268.
- GEORGIEVA K, MASLENKOVA L, PEEVA V, et al., 2005. Comparative study on the changes in photosynthetic activity of the homoiochlorophyllous desiccation-tolerant *Haberlea rhodopensis* and desiccation-sensitive spinach leaves during desiccation and rehydration [J]. *Photosynth Res*, 85(2): 191–203.
- HALLAM ND, LUFF SE, 1980. Fine structural changes in the leaves of the desiccation-tolerant plant *Talbotia elegans* during extreme water stress [J]. *Bot Gaz*, 141: 180–187.
- HEATH RL, PACHER L, 1968. Photo peroxidation in isolated chloroplast I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation [J]. *Arch Biochem Biophys*, 125: 189–198.
- HICKEL B, 1967. Zur Kenntnis einer xerophilen Wasserpflanze: *Chamaeigigas intrepidus* DTR. Aus Südwafrika [J]. *Int Revue Ges Hydrobiol*, 52(3): 361–400.
- INGLE RA, COLLETT H, COOPER K, et al., 2008. Chloroplast biogenesis during rehydration of the resurrection plant *Xerophyta humilis*: parallels to the etioplast-chloroplast transition [J]. *Plant Cell Environ*, 31(12): 1813–1824.

- JOVANOVIĆ Z, RAKIĆ T, STEVANOVIĆ B, et al., 2011. Characterization of oxidative and antioxidative events during dehydration and rehydration of resurrection plant *Ramonda nathaliae* [J]. *Plant Growth Regul*, 64(3): 231–240.
- LÈUTTGE U, BECK E, BARTELS D, 2011. Plant desiccation tolerance [M]. New York: Springer Publishing Company: 182–183.
- LI AH, WANG DD, YU BZ, et al., 2014. Maintenance or collapse: responses of extraplastidic membrane lipid composition to desiccation in the resurrection plant *Paraisometrum mileense* [J]. *PLoS ONE*, 9(7): e103430.
- LI WQ, LI MY, ZHANG WH, et al., 2004. The plasma membrane-bound phospholipase D δ enhances freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Nat Biotechnol*, 22(4): 427–433.
- LIU Y, 2016. Research of spatial and temporal of different land use types on surface soil moisture on the slope in the region of depression between karst hills, in Southwest of China [D]. Nanning: Guangxi University. [刘艳, 2016. 喀斯特峰丛洼地不同土地利用方式下表层土壤水分的时空规律研究 [D]. 南宁: 广西大学.]
- LIU YX, PENG GF, CHEN XG, et al., 2016. Climatic and environmental changes in Shangri-La in next 50 years according to wavelet analysis and multiple VAR regression prediction modeling [J]. *Resour Sci*, 38(9): 1754–1767. [刘盈曦, 彭贵芬, 陈先刚, 等, 2016. 香格里拉未来 50a 主要气候环境要素变化预估——基于小波分析和多元 VAR 回归预估模型 [J]. *资源科学*, 38(9): 1754–1767.]
- MOORE JP, LINDSEY GG, FARRANT JM, et al., 2007. An overview of the biology of the desiccation-tolerant resurrection plant *Myrothamnus flabellifolia* [J]. *Ann Bot-London*, 99(2): 211–217.
- MULLER J, SPRENGER N, BORTLIK K, et al., 1997. Desiccation increases sucrose levels in *Ramonda* and *Haberlea*, two genera of resurrection plants in the Gesneriaceae [J]. *Physiol Plantatum*, 100(1): 153–158.
- PANDEY V, RANJAN S, DEEBA F, et al., 2010. Desiccation-induced physiological and biochemical changes in resurrection plant *Selaginella bryopteris* [J]. *J Plant Physiol*, 167(16): 1351–1359.
- POREMBSKI S, 2011. Evolution, diversity, and habitats of poikilohydrous vascular plants: plant desiccation tolerance [M]. Berlin Heidelberg: Springer: 139–156.
- RASCIO N, ROCCA NL, 2005. Resurrection plants: the puzzle of surviving extreme vegetative desiccation [J]. *Crit Rev Plant Sci*, 24(3): 209–225.
- ROHÁČEK K, SOUKUPOVÁ J, BARTÁK M, 2008. Chlorophyll fluorescence: a wonderful tool to study plant physiology and plant stress [M]// SCHOEFS B. *Plant cell compartments*. India: Research Sigpost: 41–104.
- SHERWIN W, FARRANT M, 1996. Differences in rehydration of three desiccation-tolerant angiosperm species [J]. *Ann Bot-London*, 78(6): 703–710.
- STRASSER RJ, TSIMILLI-MICHAEL M, QIANGS, et al., 2010. Simultaneous *in vivo* recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis* [J]. *BBA-Bioenergetics*, 1797(6): 1313–1326.
- TUBA Z, LICHTENTHALER HK, CSINTALAN Z, et al., 1996. Loss of chlorophylls, cessation of photosynthetic CO₂ assimilation and respiration in the poikilochlorophyllous plant *Xerophyta scabrida* [J]. *Physiol Plantarum*, 96: 383–388.
- TUBA Z, PROTOR CF, CSINTALAN Z, 1998. Ecophysiological responses of homoiochlorophyllous and poikilochlorophyllous desiccation tolerant plants: a comparison and an ecological perspective [J]. *Plant Growth Regul*, 24(3): 211–217.
- TYMMS MJ, GAFF DF, 1979. Proline accumulation during water stress in resurrection plants [J]. *J Exp Bot*, 30(1): 165–168.
- WANG WC(WT), PAN KY, LI ZY, 1990. *Flora Reipublicae Popularis Sinicae: Gesneriaceae* [M]. Beijing: Science Press, 69: 151–466. [王文采, 潘开玉, 李振宇, 1990. 中国植物志: 苦苣苔科 [M]. 北京: 科学出版社, 69: 151–466.]
- WELTI R, LI WQ, LI MY, 2002. Profiling membrane lipids in plant stress responses role of phospholipase D alpha in freezing-induced lipid changes in *Arabidopsis* [J]. *J Biol Chem*, 277: 31994–32002.
- ZENG FP, PENG WX, SONG TQ, et al., 2007. Changes in vegetation after 22 years' natural restoration in the karst disturbed area in northwestern Guangxi, China [J]. *Acta Ecol Sin*, 27(12): 5110–5119.
- ZHANG C, WANG YM, LI YX, et al., 2015. Precipitation analysis of Shiling County during 2010–2013 [J]. *J Anhui Agric Sci*, 43(13): 245–246. [张忱, 王一鸣, 黎云霞, 等, 2015. 石林县 2010—2013 年降水情况分析 [J]. *安徽农业科学*, 43(13): 245–246.]

(责任编辑 蒋巧媛)

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202008055

黄梅, 李美君, 黄红, 等. 贵州省野生苦苣苔科物种多样性与地理分布 [J]. 广西植物, 2022, 42(2): 210–219.

HUANG M, LI MJ, HUANG H, et al. Species diversity and geographic distribution of wild Gesneriaceae in Guizhou [J].

Guihaia, 2022, 42(2): 210–219.



贵州省野生苦苣苔科物种多样性与地理分布

黄 梅, 李美君, 黄 红, 张金权, 白新祥*

(贵州大学 林学院, 贵阳 550025)

摘 要: 该研究在建立贵州省野生苦苣苔科植物名录和地理分布数据库的基础上, 对其物种多样性及地理分布格局进行研究。通过文献资料结合实地调查, 从物种组成、特有性、水平分布、垂直分布和相似性等方面进行分析, 并采用筛选算法确定贵州苦苣苔科植物分布的热点地区。结果表明: (1) 贵州省苦苣苔科植物共计 2 族 8 亚族 28 属 153 种 (含种下等级), 分布在 75 个县级行政区, 有 128/45 个中国/贵州特有种, 垂直分布以 900~1 300 m 海拔段最为丰富。 (2) 通过计算省级相似性系数, 发现贵州与广西的相似程度最高, 最后筛选得到 10 个热点县, 共代表了 75% 的苦苣苔科植物。 (3) 贵州省为典型的喀斯特高原山地, 苦苣苔科植物种类丰富, 尤其是广义马铃薯苣苔属、广义报春苣苔属、广义石山苣苔属和蛛毛苣苔属等, 有着较高的物种多样性和区域特有性。该研究可以为贵州省苦苣苔科植物资源保护和持续利用提供理论参考。

关键词: 苦苣苔科, 贵州省, 相似性系数, 热点地区, 垂直分布, 水平分布

中图分类号: Q944 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2022)02-0210-10

Species diversity and geographic distribution of wild Gesneriaceae in Guizhou

HUANG Mei, LI Meijun, HUANG Hong, ZHANG Jinquan, BAI Xinxiang*

(College of Forestry, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: In this study, the species diversity and geographical distribution pattern of wild Gesneriaceae in Guizhou Province were studied based on the establishment of a list and geographical distribution database of wild Gesneriaceae in Guizhou Province. The species composition, endemism, horizontal distribution, vertical distribution and similarity were analyzed, through the literature and a field investigation, and the hotspots of Gesneriaceae in Guizhou were determined by a complementary algorithm. The results are as follows: (1) There are 153 species (including subspecies) of Gesneriaceae in Guizhou Province, belonging to 2 tribes, 8 subtribes, and 28 genera. These plants are distributed among 75 county-level administrative districts. There are 128 species endemic to China and 45 endemic to Guizhou, and the vertical distribution is the most abundant at altitudes section of 900–1 300 m. (2) The calculation of the provincial similarity coefficient showed that Guizhou and Guangxi had the highest similarity. Finally, 10 hot spots were selected, representing 75% of the Gesneriaceae plants. (3) Guizhou Province is a typical karst plateau mountainous area that is

收稿日期: 2020–12–31

基金项目: 国家自然科学基金(31960328); 贵州省野生观赏植物资源调查(701256192201) [Supported by National Natural Science Foundation of China(31960328); Investigation of Wild Ornamental Plant Resources in Guizhou (701256192201)]。

第一作者: 黄梅(1996–), 硕士研究生, 主要从事野生观赏植物资源研究, (E-mail) 1719646010@qq.com。

* 通信作者: 白新祥, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事野生观赏植物种质资源和开发利用研究, (E-mail) 254715174@qq.com。

rich in species of Gesneriaceae, especially *Oreocharis*, *Primulina*, *Petrocodon* and *Paraboea*, which have high species diversity and regional specificity. This study can provide a theoretical reference for the conservation and sustainable utilization of Gesneriaceae plant resources in Guizhou Province.

Key words: Gesneriaceae, Guizhou Province, similarity coefficient, hot spots, vertical distribution, horizontal distribution

苦苣苔科 (Gesneriaceae) 在全世界约有 160 属 3 800 余种, 主要分布在亚洲东部和南部、非洲、欧洲南部、大洋洲、南美洲至墨西哥等热带至温带地区 (李振宇和王印政, 2005; 许为斌等, 2017; 葛玉珍等, 2020; 温放, 2020)。我国是苦苣苔科植物主要分布中心之一, 根据 Weber 分类系统, 截至 2020 年 11 月, 我国自然分布的苦苣苔科植物已记载有 2 族 14 亚族 45 属 786 种 (含种下等级), 10 个特有属, 11 个单型属 (韦毅刚等, 2010; 符龙飞等, 2019; 陆昭岑等, 2020; 温放等, 2019, 2020)。我国苦苣苔科植物只有台闽苣苔 [*Titanotrichum oldhamii* (Hemsl.) Soler.] 属于大岩桐亚科 (Subfam. Gesnerioideae) 并自成一族 [台闽苣苔族 (Tr. Titanotricheae T. Yamaz. ex W. T. Wang)], 其余都隶属于长蒴苣苔亚科 (Subfam. Didymocarpoideae) (洪欣等, 2019; 辛子兵等, 2019; 杨丽华等, 2019)。我国苦苣苔科植物绝大部分分布于桂、滇、黔、粤、川等省 (区) 的热带以及亚热带区域, 主要生于各种裸露的岩壁、喀斯特和丹霞地貌的石缝中、林下阴湿处或者岩溶洞穴入口处 (温放, 2008)。

贵州省地理位置特殊, 地形地貌复杂, 喀斯特地貌发育典型, 高原山地居多, 生境异质性程度高, 气候温暖湿润, 为苦苣苔科植物的生长提供了多样化的生境。从现有的文献资料可以发现, 贵州省野生苦苣苔科植物资源较为丰富, 且绝大多数为岩生种类, 具有独特的观赏性以及较高的物种多样性和区域特有性。对贵州省苦苣苔科植物的研究侧重于一些重要类群在区域尺度开展的资源调查和区系研究, 尤其是近几年有较多的新类群发表, 但现有的研究与苦苣苔科植物资源大省地位严重失衡。近年来随着苦苣苔科植物野外调查和分类学的不断发展, 尤其是分类系统的修订和新类群等相关研究相继发表, 使得贵州省苦苣苔科植物种类不断激增, 使学界对苦苣苔科植物的认识和研究造成了混乱与困扰, 因此, 很有必要对贵州省苦苣苔科植物资源进行系统整理和研究。同时, 随着近年来贵州省“大生态”战略的实

施, 生态环境持续向好, 尤其是伴随着交通条件的改善使得野外调查的可达性进一步增强, 考虑到苦苣苔科植物分布的狭域特征, 因此, 开展县级尺度下的文献资料整理和野外调查工作对摸清贵州省苦苣苔科植物本底资源尤为重要。本研究以贵州省苦苣苔科植物为研究对象, 结合最新的研究成果, 建立贵州省苦苣苔科植物名录, 从物种组成、特有性等方面对贵州省苦苣苔科植物的物种多样性进行分析, 进而探讨其地理分布特征及热点地区, 分析苦苣苔科植物分布的重要区域, 对今后贵州省苦苣苔科植物资源的野外调查、保护和开发利用具有科学指导意义。

1 数据与方法

1.1 名录确定

通过查阅《贵州植物志》(第 4 卷)、《中国植物志》(第 69 卷)、*Flora of China* (第 18 卷)、《中国苦苣苔科植物》《华南苦苣苔科植物》《贵州维管束植物编目》和《中国石蝴蝶属植物》等专著及贵州省各级自然保护区科学考察集和中国数字植物标本馆等基础资料 (李永康, 1988; 王文采, 1990; Wang et al., 1998; 李振宇和王印政, 2005; 韦毅刚等, 2010; 罗扬等, 2015; 邱志敬和刘正宇, 2015), 以截至 2020 年 11 月发表的硕博士论文、期刊论文中报道的贵州新类群进行补充。本文的贵州省苦苣苔科植物名录采用 Weber 分类系统 (Möller et al., 2016; 符龙飞等, 2019), 对其属、种的中文名、拉丁学名进行整理、校对和修订, 最终确定比较完整的贵州省苦苣苔科植物编目。

1.2 地理分布数据的收集及数据校正

通过收集有关苦苣苔科植物地理分布数据, 建立贵州省苦苣苔科植物地理分布数据库, 数据来源主要包括 (1) 植物志书: 《贵州植物志》(第 4 卷)、《中国植物志》(第 69 卷) 和 *Flora of China* (第 18 卷); (2) 学术专著: 《中国苦苣苔科植物》《华南苦苣苔科植物》《贵州维管束植物编目》《中

国石蝴蝶属植物》等;(3)学术论文:截至2020年11月发表的有关记录苦苣苔科植物地理分布的学术期刊和学位论文;(4)标本数据:中国数字植物标本馆的标本记录(<http://www.cvh.org.cn>);(5)贵州省各级自然保护区科考集。先提取上述资料中苦苣苔科植物地理分布信息,然后进一步筛选、整理和汇总,为了提高数据的精确性,删除重复记录 and 采自引种栽培区域的标本数据,并对地理数据进行校正和新旧地名转换,如CVH上的小河区并入花溪区、水城县更改为水城区、清镇县更改为清镇市等(参考2020年贵州省行政区划),最终建立贵州省苦苣苔科植物的地理分布数据库,数据库包括的属性有属名、种名、特有性、分布区域等。该数据库地理精度统一转换为县级行政单元。

基于建立的贵州省苦苣苔科植物地理分布数据库,利用ArcGIS 10.0软件将物种分布数据与贵州省行政区划图进行关联,采用Nature break (Jenks)分割方法对物种丰富度进行分级,绘制贵州省苦苣苔科植物县级尺度的物种丰富度地理分布图。

1.3 热点地区的确定

在贵州省苦苣苔科物种名录及地理分布数据库的支持下,基于物种丰富度进一步运用Dobson筛选算法来确定贵州苦苣苔科植物分布的热点地区。具体步骤为首先选取物种丰富度最高的县,然后将该区域中包含的物种从总名录中剔除,再选取剩余物种丰富度排序最高的县,重复以上筛选步骤直至将所有物种都剔除完后,最后筛选得到的县的集合为贵州苦苣苔科植物的热点地区,即包含物种丰富度最高且最为互补的区域(Dobson et al., 1997; 张晓龙, 2014; 张殷波等, 2015; 徐翔等, 2018)。在筛选过程中,如果遇到包含物种数相同的县,则优先选择面积较小的县,目的是为了得到用最小的土地面积涵盖最多该科物种丰富度的区域。

2 结果与分析

2.1 贵州苦苣苔科植物物种名录及数量的变化

本研究确立的贵州省野生苦苣苔科物种名录共记载2族8亚族28属153种(含种下等级),占中国苦苣苔科植物总物种数的19.47%(韩孟奇, 2018; Cai et al., 2019; 彭涛和徐婷, 2019; 杨加文和蔡磊, 2019; Fan et al., 2020; 汤升虎等, 2020; 徐婷,

2020),包含中国/贵州特有种分别为128/45种(附录1, <http://www.guihaia-journal.com> 在线发表)。近几年,我国苦苣苔科植物新类群出现了激增,以及亚科之下族、属的系统位置发生较大的变动和重新界定(Wei et al., 2010; Möller et al., 2011; Weber et al., 2011a, b, c; Middleton, 2014)。目前,贵州苦苣苔科植物编目不断更新,从1988年的82种到2005年的96种再到2015年的106种(李永康, 1988; 王文采, 1990; Wang et al., 1998; 李振宇和王印政, 2005),而后查阅截至2020年11月的相关文献陆续发现很多新记录种及新种,如都匀马铃苣苔(*Oreocharis duyunensis*)、白云岩蛛毛苣苔(*Paraboea dolomitica*)、小黄花石山苣苔(*Petrocodon luteoflorus*)等,数量上升到153种(Guo et al., 2018, 2020; Fu et al., 2019a, b; 苏兰英等, 2019; Cai et al., 2019; 李飒等, 2020; Xin et al., 2020)。

2.2 贵州苦苣苔科植物多样性

2.2.1 物种多样性分析 贵州分布的苦苣苔科植物主要是附生型,绝大多数种类分布在喀斯特和丹霞地貌,附生于岩石表面的腐殖质层或岩石缝中,少数种类生长在富含腐殖质的林下环境。贵州省苦苣苔科植物的族、亚族、属和种多样性高,有2个族,分别为盾座苣苔族(Tr. Epithemateae C. B. Clarke)和芒毛苣苔族(Tr. Trichosporeae Nees),8个亚族,分别为独叶苣苔亚族(Subtr. Monophyllaeinae A. Weber & Mich. Möller)、尖舌苣苔亚族(Subtr. Loxotidinae G. Don)、盾座苣苔亚族(Subtr. Epithematinae DC. ex Meisn)、凹柱苣苔亚族(Subtr. Litostigmatinae A. Weber & Mich. Möller)、珊瑚苣苔亚族(Subtr. Corallodiscinae A. Weber & Mich. Möller)、细蒴苣苔亚族(Subtr. Leptobaeinae C. B. Clarke)、长蒴苣苔亚族(Subtr. Didymocarpinae G. Don)、肿蒴苣苔亚族(Subtr. Loxocarpinae A. DC.),共有28属153种,占中国苦苣苔科植物总属数/总种数的62.22%/19.47%。其中有2个中国单型属在贵州有分布,即筒花苣苔属(*Briggsiopsis* K.Y. Pan)和粉毛苣苔属(*Middletonia* C. Puglisi)。中国特有种和贵州特有成分丰富,将特有种数占贵州省该科总种数的比例定义为特有率,得出中国特有种特有率为83.66%,贵州特有种特有率为29.41%,种数在10种以上的属有7个,总计114种,占贵州省苦苣苔科总数的74.51%,是贵州省苦苣苔科植物的主要组成部分(表1)。

表 1 贵州苦苣苔科植物属种数和特有种数

Table 1 Species and endemic species of Gesneriaceae in Guizhou

属名 Genus	种数 Species	占贵州 总种数的 比例 Ratio of species in Guizhou (%)	中国特有种数 Number of endemic species to China	贵州特有种数 Number of endemic species to Guizhou	中国特有种 特有率 Endemic species to China/ Total species in Guizhou (%)	贵州特有种 特有率 Endemic species to Guizhou/ Total species in Guizhou (%)
异叶苣苔属 <i>Whytockia</i>	3	1.96	3	1	1.96	0.65
尖舌苣苔属 <i>Rhynchoglossum</i>	1	0.65	0	0	0.00	0.00
盾座苣苔属 <i>Epithema</i>	1	0.65	0	0	0.00	0.00
凹柱苣苔属 <i>Litostigma</i>	1	0.65	1	1	0.65	0.65
珊瑚苣苔属 <i>Corallodiscus</i>	1	0.65	0	0	0.00	0.00
横蒴苣苔属 <i>Beccarinda</i>	1	0.65	0	0	0.00	0.00
线柱苣苔属 <i>Rhyncholechum</i>	2	1.31	0	0	0.00	0.00
马铃薯苣苔属 <i>Oreocharis</i>	30	19.61	30	15	19.61	9.80
筒花苣苔属 <i>Briggsiopsis</i>	1	0.65	1	0	0.65	0.00
漏斗苣苔属 <i>Raphiocarpus</i>	1	0.65	0	0	0.00	0.00
半蒴苣苔属 <i>Hemiboea</i>	19	12.42	18	4	11.76	2.61
石蝴蝶属 <i>Petrocosmea</i>	12	7.84	12	5	7.84	3.27
报春苣苔属 <i>Primulina</i>	21	13.73	20	5	13.07	3.27
汉克苣苔属 <i>Henckelia</i>	4	2.61	2	1	1.31	0.65
石山苣苔属 <i>Petrocodon</i>	12	7.84	10	8	6.54	5.23
长蒴苣苔属 <i>Didymocarpus</i>	4	2.61	4	0	2.61	0.00
圆唇苣苔属 <i>Gyrocheilos</i>	1	0.65	1	0	0.65	0.00
异唇苣苔属 <i>Allocheilos</i>	1	0.65	1	0	0.65	0.00
大苞苣苔属 <i>Anna</i>	2	1.31	2	1	1.31	0.65
斜柱苣苔属 <i>Loxostigma</i>	4	2.61	3	0	1.96	0.00
芒毛苣苔属 <i>Aeschynanthus</i>	3	1.96	1	0	0.65	0.00
吊石苣苔属 <i>Lysionotus</i>	10	6.54	7	1	4.58	0.65
光叶苣苔属 <i>Glabrella</i>	3	1.96	3	1	1.96	0.65
蛛毛苣苔属 <i>Paraboea</i>	10	6.54	6	2	3.92	1.31
旋蒴苣苔属 <i>Dorcoceras</i>	2	1.31	1	0	0.65	0.00
喜鹊苣苔属 <i>Ornithoboea</i>	1	0.65	0	0	0.00	0.00
粉毛苣苔属 <i>Middletonia</i>	1	0.65	1	0	0.65	0.00
长冠苣苔属 <i>Rhabdothamnopsis</i>	1	0.65	1	0	0.65	0.00

2.2.2 相似性系数分析 采用相似性系数法对两个地区植物相似性进行比较分析,其表达式如下:相似性系数 = $2w/(a+b)$ 。式中: a 为 a 地物种总数; b 为 b 地物种总数; w 为两地共有物种数。在植物区系地理的比较研究中,通常用属、种相似性系数(similarity coefficient)作为相似性程度最基本

的数量指标来分析不同区域植物区系间的亲缘关系(杨林等,2020)。在对贵州省苦苣苔科植物与其他地区(种数 ≥ 30 种的省、市、区)的共有种进行统计的基础上,计算出相似性系数(表 2)。

研究表明,贵州苦苣苔科植物与广西的相似程度最高,相似性系数为 25.37%。因为贵州是云

表 2 贵州省与其他省级行政区共有种相似性系数
Table 2 Similarity coefficients of common species between Guizhou Province and other provincial-level administrative regions

省级行政区 Provincial-level administrative region	共有种数 Number of common species	相似性系数 Similarity coefficient (%)
广西 Guangxi	60	25.37
四川 Sichuan	32	25.30
湖北 Hubei	22	23.40
云南 Yunnan	49	22.53
广东 Guangdong	25	18.66
湖南 Hunan	19	17.51
江西 Jiangxi	13	14.13
福建 Fujian	9	9.63
西藏 Tibet	6	6.00

贵高原向湘桂丘陵过渡的地带,桂黔相邻的地区属于赤水河流域(杨林等,2020),有着同类型喀斯特石灰岩地貌和气候类型,而且相邻地区物种丰富度都相对较高,因此,共有种类较多。

2.3 贵州省苦苣苔科植物地理分布

2.3.1 水平分布 通过实地调查结合相关资料对贵州省苦苣苔科植物地理分布数据进行统计,得出贵州省苦苣苔科植物物种分布较广,各州市均有分布,其中黔南布依族苗族自治州(以下简称黔南州)分布最为丰富,有 74 种,其次为黔西南布依族苗族自治州(以下简称黔西南州)58 种,其他依次为遵义市 46 种、黔东南苗族侗族自治州(以下简称黔东南州)33 种、铜仁市 30 种、贵阳市 24 种、毕节市 28 种,安顺市和六盘水市相对较少,分别为 17 种和 14 种。

在县级尺度上,共有 75 个县级行政区分布,按照物种丰富度排序,得到 ≥ 15 种的县级行政区共 10 个,包括荔波县、赤水市、兴义市、道真仡佬族苗族自治县(以下简称道真县)、贵定县、贞丰县、安龙县、江口县、罗甸县和兴仁市(图 1:a)。贵州特有种主要分布于 37 个县级行政区,特有率较高的地区在全省范围内呈现出离散的分布格局(图 1:b, c)。

植物的区系分化强度可以用区系分化率的大小,即种数/属数比值进行描述,比值越大区系分化率越小(张殷波等,2015)。部分地区物种丰富

度较高,但是属数量低,故区系分化率较低,贵州省区系分化率最低的区域主要为荔波县、道真县(图 1:d)。对比相同物种丰富度,属数量越多,种属比越小,区系分化率越高,反之亦然。

2.3.2 垂直分布 野生苦苣苔科植物在贵州省垂直分布特征比较明显,按 400 m 为一个梯度,划分为 7 个海拔段(赵熙黔和安明态,2015),即: H1(148~500 m)、H2(500~900 m)、H3(900~1 300 m)、H4(1 300~1 700 m)、H5(1 700~2 100 m)、H6(2 100~2 500 m)、H7(2 500~2 900 m)(表 3,图 2,图 3)。

由图 2 可知,贵州省苦苣苔科植物在垂直分布上 H3 海拔段属/种数分布最多,共计 24 属 99 种,其物种数占全省总数的 64.71%。总体来看,较低海拔段属种分布较丰富,当海拔达到 H3 时达到最大值,随后物种数和属数逐渐减少。由图 3 可知,不同属在不同海拔阶段分布差异较大,如马铃苣苔属的物种数量从 H1 海拔段增加至 H3 海拔段后开始不断减少,报春苣苔属和半蒴苣苔属主要分布于低海拔阶段,当海拔超过 900 m 时随着海拔的升高,逐渐减少。

通过统计各海拔段物种数量,并用 Jaccard 相似性系数来计算相似性系数(赵熙黔和安明态,2015;凌少军等,2017),其表达式如下: $C_j=j/(a+b-j)$,式中: C_j 为相似性系数; a 、 b 分别为 A、B 海拔段的苦苣苔科植物种类数量; j 为两海拔段共有的苦苣苔科植物数量。由表 4 可知,21 组相似性数据的平均值为 0.212 7,其中最小值为 0,最大值为 0.527 8。不同海拔段之间相距越远,生态环境差异越大,物种组成相似性系数越小,反之亦然。如 H1 与 H7 的相似性系数为 0,最低海拔与最高海拔分布的物种所适应的环境不同,无共同物种分布。中低海拔分布的物种最多但绝大多数具有特有性,共同物种较少,因此其相似性系数并不是最高。

2.4 热点地区

采用筛除算法(Dobson, 1997; 张晓龙,2014; 张殷波等,2015)对贵州省野生苦苣苔科植物分布的热点地区进行筛选,当包含物种数累计达到 75% 时共筛选得到 10 个县,分布 111 种苦苣苔科植物,包含荔波县、赤水市、兴义市、贞丰县、威宁彝族回族苗族自治县、江口县、贵定县、道真县、盘州市和沿河土家族自治县。其中荔波县分布有 51 种,成为

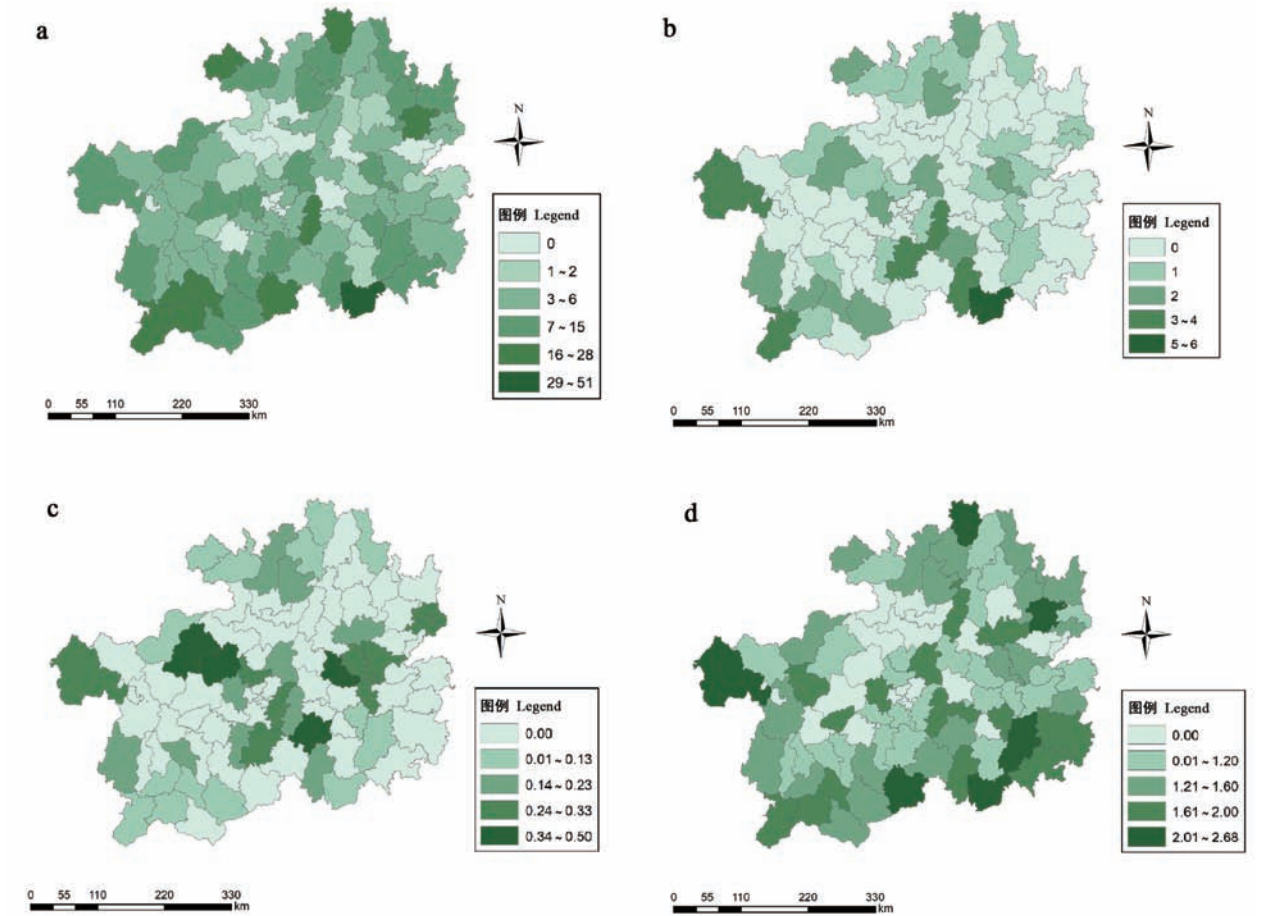
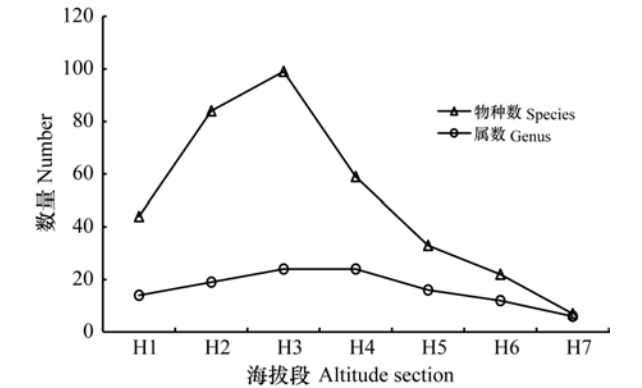


图 1 县级尺度下贵州野生苦苣苔科植物丰富度分布格局

Fig. 1 Distribution pattern of wild Gesneriaceae richness in Guizhou at county-level scale

表 3 不同海拔段的属种差异				
Table 3 Differences of genera and species at different altitudes				
海拔段 Altitude section (m)	代号 Code	属数 Genus	种数 Species	属种比 Ratio of genus/ species
148~500	H1	14	44	0.32
500~900	H2	19	84	0.23
900~1 300	H3	24	99	0.24
1 300~1 700	H4	24	59	0.41
1 700~2 100	H5	16	33	0.48
2 100~2 500	H6	12	22	0.55
2 500~2 900	H7	6	7	0.86



贵州省苦苣苔科植物种类最为丰富的县级行政区。分布 2 种的有 9 个县,剩下的县级区域只分布 1 种

苦苣苔科植物,且仅在该区域有分布,如文采后蕊苣苔 (*Oreocharis wentsaii*)、万山金盏苣苔 (*O.*

wanshanensis)、琦润石蝴蝶 (*Petrocosmea qiruniae*) 等。当包含物种数累计达到 100% 时共筛选得到 39 个热点县, 包含苦苣苔科植物 153 种(图 4)。

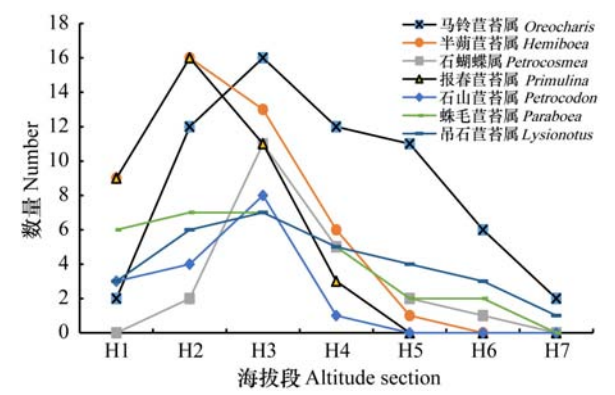


图 3 苦苣苔科植物不同海拔段优势属 (≥10) 差异
Fig. 3 Differences of dominant genera (≥ 10) in different altitudes of Gesneriaceae

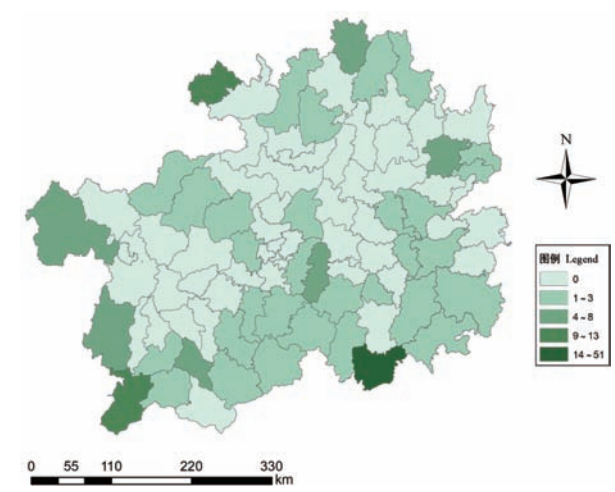


图 4 基于筛选算法确立的贵州省苦苣苔科植物分布的热点地区
Fig. 4 Hot spots of Gesneriaceae in Guizhou Province based on screening algorithm

3 讨论与结论

3.1 贵州省苦苣苔科植物物种多样性

贵州省地处云贵高原, 是南方喀斯特中心区域之一, 属于典型的亚热带季风气候类型。不同类型的地貌环境和气候条件为苦苣苔科植物的生长提供了多样的生境。据统计, 贵州省苦苣苔科植物共有 2 族 8 亚族 28 属 153 种, 占中国苦苣苔科植物总属数的 62.22%, 总种数的 19.47%, 是中

表 4 贵州省不同海拔段苦苣苔科植物物种相似性系数
Table 4 Similarity coefficients of Gesneriaceae species at different altitudes in Guizhou

海拔段 Altitude section	H2	H3	H4	H5	H6	H7
H1	0.406 6	0.254 4	0.197 7	0.069 4	0.047 6	0.000 0
H2		0.464 0	0.265 5	0.125 0	0.081 6	0.011 1
H3			0.436 4	0.222 2	0.130 8	0.039 2
H4				0.415 4	0.246 2	0.064 5
H5					0.527 8	0.142 9
H6						0.318 2

国苦苣苔科植物重要的分布中心之一, 中国特有种和贵州特有种种类丰富。广义马铃薯苣苔属、广义报春苣苔属、半蒴苣苔属、石蝴蝶属、石山苣苔属、蛛毛苣苔属和吊石苣苔属为贵州省的优势属, 共计 114 种。物种数排名前二的广西和云南, 其属数占中国苦苣苔科植物总属数分别为 73.33% 和 75.56%, 与贵州的属数差异不大, 但两省(区)的物种数占中国总种数的比例远高于贵州省, 分别为 40.71% 和 35.88%, 由此可见, 贵州省苦苣苔科植物资源的野外调查工作和研究还不够深入, 可能存在大量新类群未被发现。随着交通条件的改善以及各类旅游区和景区开发, 一定程度上降低了野外调查工作的难度, 在目前贵州省苦苣苔科植物地理分布现状的基础上, 进一步加强对该科植物的野外调查和系统研究, 将是今后一段时间贵州省苦苣苔科植物物种多样性工作的重点。

3.2 贵州省苦苣苔科植物地理分布格局

贵州省苦苣苔科植物分布十分广泛, 据统计在 75 个县级行政区均有分布, 集中分布在黔东南州、黔西南州和遵义市, 有 128/45 个中国/贵州特有种。苦苣苔科植物对生境要求较特殊, 因此, 该科植物的多样性格局可以间接地反映一个区域生物多样性丰富度的状况。分析特有苦苣苔科植物在每一区域内所占比例, 可以得到特有比例非常高的一些重要区域在贵州省呈现出离散的分布格局, 尤其是一些物种丰富度很低的地区特有种比例却很高, 这一结果与筛选算法得到 100% 物种时的热点地区相吻合。虽然这些区域的物种多样性较低, 但是分布了一些区域特有种, 因此, 不可替代性和补充贡献率较高, 为了进一步提高野生苦苣苔科植物的保护效率, 这些区域的保护优先性

应该得到提升。当包含物种数累计达到 100% 时, 共筛选得到 39 个热点县, 包含苦苣苔科植物 153 种, 在县级尺度上, 荔波县、兴义市和赤水市等为贵州省苦苣苔科植物集中分布区域, 其中, 荔波县成为贵州省苦苣苔科植物种类分布最丰富的县。在垂直分布上, 主要分布海拔为 500~1 700 m, 最大峰值在 900~1 300 m 海拔段。如贵州省的报春苣苔属、半蒴苣苔属大部分物种分布在海拔 900 m 及以下, 石山苣苔属多分布于海拔 500~1 000 m 处, 而马铃薯苣苔属则海拔分布跨度大, 在海拔 300~2 600 m 之间均有可能出现。

贵州与广西的相似程度最高, 可能因为贵州省大部分种类分布于南部, 与广西相邻, 地貌特征与气候类型都非常相似, 但数据显示, 相似性系数总体较低, 可能是调查不够全面, 还存在大量的新类群和共有种未被调查到; 又或许是各省独特的地理环境和温暖湿润的热带亚热带气候为野生苦苣苔科植物的生长发育提供了多样的生境条件, 使得贵州、广西、云南等地的苦苣苔科植物具较高的区域特有性, 如盘州马铃薯苣苔 (*Oreocharis panzhouensis*)、威宁短檐苣苔 (*O. pankaiyuae* var. *weiningense*)、卵瓣马铃薯苣苔 (*O. ovatilobata*) 等在贵州省仅分布于海拔 1 700 m 以上。因此, 高山深谷形成的生境隔离可能促进了苦苣苔科物种的形成与维持(韦毅刚等, 2004)。为了进一步提高贵州省苦苣苔科物种多样性, 应加强对热点地区以及特有性较高的区域进行系统考察, 同时需重视文献资料未覆盖的区域, 对适宜该科植物分布的小生境地带进行全面调查, 如常绿阔叶林林下、石灰岩岩壁上、洞穴、天坑、峡谷、近水地带等。

3.3 贵州省苦苣苔科植物资源保护与利用

苦苣苔科植物的保护工作刻不容缓, 在进行野外调研时发现, 少部分苦苣苔科植物种类呈现较大居群, 但有部分种群逐渐变小, 这是由于大部分苦苣苔科植物适宜的洞穴、石灰岩岩壁、峡谷等特殊生境遭到了破坏, 种群很难恢复, 还有一部分具有药用价值的种类被人类大量采挖, 造成居群破坏, 导致种群日趋减少甚至消亡, 所以自然环境的保护对野生苦苣苔科植物具有非常重要的意义。因此, 应该对贵州省苦苣苔科植物资源的保护引起重视, 尽快完善苦苣苔科植物的分布情况及种群现状信息, 加强苦苣苔科植物资源的调查和科学研究, 准确把握资源分布、数量、生长状态

等, 确定优先保护类群和优先保护区域, 防止物种消失; 了解重要区域内该科植物物种多样性的状况和面临的威胁, 制定针对性的保护措施, 积极开展对苦苣苔科植物热点地区内的人民群众进行科普宣传和教育, 采用以就地保护为主, 迁地保育为辅的指导原则来开展有效的保护工作, 减少和消除人为干扰, 从而提高苦苣苔科植物资源的保护成效。

苦苣苔科植物株型多样、花色绚丽、花朵结构精巧等, 具有较高的观赏价值, 深受人们的青睐。贵州省苦苣苔科植物种类丰富、适应类型多、一年四季几乎都有花开, 种内往往产生各种各样的形态变异, 具有极高的观赏价值, 但几乎都处于野生状态, 未能得到很好的开发利用。绝大部分种类喜生于潮湿的石灰岩岩壁、石缝、峡谷, 还有一部分喜生于密林下阴湿处, 可借鉴其自然环境下的生长特性与岩石及其他岩生观赏植物进行搭配, 营造出独具特色的景观。一些叶大株高花朵艳丽的种类, 如半蒴苣苔 (*Hemiboea subcapitata*)、荔波报春苣苔 (*Primulina liboensis*)、牛耳朵 (*P. eburnea*) 等, 以其耐荫的特性可作为林下花境、荫生地被等, 丰富了植物群落层次结构。总而言之, 该科植物是假山造景、盆花和花境等特色景观的优良材料, 具有很大的开发潜力, 因此, 建议深入研究苦苣苔科植物的种质资源, 引种驯化观赏价值较高的种类, 使美丽的野生苦苣苔科观赏植物走出深山, 应用到花卉产业中。

参考文献:

- CAI L, GUO Y, ZHANG RM, et al., 2019. *Oreocharis panzhouensis* (Gesneriaceae), a new species from karst regions in Guizhou, China [J]. *Phytotaxa*, 393 (3): 287–291.
- DOBSON AP, RODRIGUEZ JP, ROBERTS WM, et al., 1997. Geographic distribution of endangered species in the United States [J]. *Science*, 275: 550–553.
- FU LF, LI S, XIN ZB, et al., 2019. The changes of the Chinese names and scientific names of Gesneriaceae in China between Wang's and Weber's classifications for Gesneriaceae [J]. *Guangxi Sci*, 26(1): 118–131. [符龙飞, 黎舒, 辛子兵, 等, 2019. 中国苦苣苔科植物中王文采旧分类系统与 Weber 新分类系统的名实更替 [J]. *广西科学*, 26(1): 118–131.]
- FU Q, GUO Y, HUANG R, et al., 2019a. *Oreocharis ovatilobata* (Gesneriaceae), a new species from Guizhou, China [J]. *Ann Bot Fenn*, 56: 259–265.

- FU Q, XIA Y, GUO Y, et al., 2019b. *Oreocharis odontopetala*, a new species of Gesneriaceae from Guizhou, China [J]. *PhytoKeys*, 124: 1-9.
- FAN ZW, CAI L, YANG JW, et al., 2020. *Petrocodon luteoflorus* (Gesneriaceae), a new species from karst region in Guizhou, China [J]. *PhytoKeys*, 157: 167-173.
- GE YZ, XIN ZB, LI S, et al., 2020. Study on endangered degree and conserved levels for plants of Gesneriaceae in Guangxi [J]. *Guihaia*, 40(10): 1491-1504. [葛玉珍, 辛子兵, 黎舒, 等, 2020. 广西苦苣苔科植物濒危程度和优先保护序列研究 [J]. *广西植物*, 40(10): 1491-1504.]
- GUO ZY, LI ZY, XIANG XG, 2018. *Oreocharis duyunensis* (Gesneriaceae), a new species from Guizhou, China [J]. *Nord J Bot*, 36(9): 1-7.
- GUO ZY, WU ZW, XU WB, et al., 2020. *Paraboea dolomitica* (Gesneriaceae), a new species from Guizhou, China [J]. *PhytoKeys*, 153: 37-48.
- HAN MQ, 2018. Taxonomic studies of *Petrocosmea* (Gesneriaceae) in China [D]. Guilin: Guangxi Normal University. [韩孟奇, 2018. 中国石蝴蝶属(苦苣苔科)的分类学研究 [D]. 桂林: 广西师范大学.]
- HONG X, LI S, CAI L, et al., 2019. Preliminary study on the selecting/formulating rules of Chinese names of Chinese Gesneriaceae [J]. *Guangxi Sci*, 26(1): 17-36. [洪欣, 黎舒, 蔡磊, 等, 2019. 中国苦苣苔科植物物种中文名的选定/拟定原则建议初探 [J]. *广西科学*, 26(1): 17-36.]
- LI S, TANG SH, REN QF, et al., 2020. Notes on the newly-reported species (Gesneriaceae) from Guizhou, China (III) [J]. *Guizhou Sci*, 38(3): 1-5. [李飒, 汤升虎, 任启飞, 等, 2020. 贵州苦苣苔科植物新种资料(3) [J]. *贵州科学*, 38(3): 1-5.]
- LI YK, 1988. Flora of Guizhou: Vol. 4 [M]. Chengdu: Sichuan Minorities Press: 581-672. [李永康, 1988. 贵州植物志: 第4卷 [M]. 成都: 四川民族出版社: 581-672.]
- LI ZY, WANG YZ, 2005. Plants of Gesneriaceae in China [M]. Zhengzhou: Henan Science and Technology Publishing House. [李振宇, 王印政, 2005. 中国苦苣苔科植物 [M]. 郑州: 河南科学技术出版社.]
- LING SJ, MENG QW, TANG L, et al., 2017. Gesneriaceae on Hainan Island: distribution patterns and phylogenetic relationships [J]. *Biodivers Sci*, 25(8): 807-815. [凌少军, 孟千万, 唐亮, 等, 2017. 海南岛苦苣苔科植物的地理分布格局与系统发育关系 [J]. *生物多样性*, 25(8): 807-815.]
- LU ZC, NGUYEN KS, PHAN KL, et al., 2020. Discovery of a rare genus *Litostigma* (Gesneriaceae) from northern Vietnam with the supplementary description of *L. crystallinum* [J]. *Guihaia*, 40(10): 1445-1449. [陆昭岑, NGUYEN KHANG SINH, PHAN KE LOC, 等, 2020. 苦苣苔科凹柱苣苔属在越南的发现及水晶凹柱苣苔的补充描述 [J]. *广西植物*, 40(10): 1445-1449.]
- LUO Y, DENG LY, YANG CH, 2015. Guizhou vascular plant [M]. Beijing: China Forestry Publishing House: 406-412. [罗扬, 邓伦秀, 杨成华, 2015. 贵州维管束植物编目 [M]. 北京: 中国林业出版社: 406-412.]
- MIDDLETON DJ, 2014. A new genus of Gesneriaceae in China and the transfer of *Briggsia* species to other genera [J]. *Gardens Bull Singap*, 66(2): 195-205.
- MÖLLER M, MIDDLETON DJ, NISHII K, et al., 2011. A new delineation for *Oreocharis* incorporating an additional ten genera of Chinese Gesneriaceae [J]. *Phytotaxa*, 23: 1-36.
- MÖLLER M, WEI YG, WEN F, et al., 2016. You win some you lose some: updated generic delineations and classification of Gesneriaceae — implications for the family in China [J]. *Guihaia*, 36(1): 44-60. [MÖLLER MICHAEL, 韦毅刚, 温放, 等, 2016. 得与失: 苦苣苔科新的属级界定与分类系统——中国该科植物之变迁 [J]. *广西植物*, 36(1): 44-60.]
- PENG T, XU T, 2019. *Opithandra fargesii*, a newly recorded species of Gesneriaceae from Guizhou [J]. *Mol Plant Breed*, 17(8): 2724-2727. [彭涛, 徐婷, 2019. 贵州苦苣苔科一新记录种——皱叶后蕊苣苔 [J]. *分子植物育种*, 17(8): 2724-2727.]
- QIU ZJ, LIU ZY, 2015. Plants of *Petrocosmea* in China [M]. Beijing: Science Press. [邱志敬, 刘正宇, 2015. 中国石蝴蝶属植物 [M]. 北京: 科学出版社.]
- SU LY, PENG T, ZHAO ZG, et al., 2019. *Petrocodon chongqingensis*, a new species of Gesneriaceae from Chongqing City, China [J]. *Guihaia*, 39(8): 997-1006. [苏兰英, 彭涛, 赵志国, 等, 2019. 苦苣苔科石山苣苔属一新种——重庆石山苣苔 [J]. *广西植物*, 39(8): 997-1006.]
- TANG SH, LI S, YANG JW, et al., 2020. Catalogue of Gesneriaceae species in Guizhou, China [J]. *Guizhou Sci*, 38(1): 1-7. [汤升虎, 李飒, 杨加文, 等, 2020. 贵州苦苣苔科植物名录 [J]. *贵州科学*, 38(1): 1-7.]
- WANG WC (WT), 1990. Flora Reipublicae Popularis Sinicae [M]. Beijing: Science Press, 69: 125-581. [王文采, 1990. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 69: 125-581.]
- WANG WC (WT), PAN KY, LI ZY, et al., 1998. Gesneriaceae [M]// WU ZY, RAVEN PH. Flora of China. Beijing: Science Press; St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, 18: 244-401.
- WEBER A, MIDDLETON DJ, FORREST A, et al., 2011a. Molecular systematics and remodelling of *Chirita* and associated genera (Gesneriaceae) [J]. *Taxon*, 60(3): 767-790.
- WEBER A, WEI YG, PUGLISI C, et al., 2011b. A new definition of the genus *Petrocodon* (Gesneriaceae) [J]. *Phytotaxa*, 23: 49-67.
- WEBER A, WEI YG, SONTAG S, et al., 2011c. Inclusion of *Metabriggsia* into *Hemiboea* (Gesneriaceae) [J]. *Phytotaxa*, 23: 37-48.
- WEI YG, 2010. Gesneriaceae of South China [M]. Nanning:

- Guangxi Science and Technology Publishing House; 606–645. [韦毅刚, 2010. 华南苦苣苔科植物 [M]. 南宁: 广西科学技术出版社; 606–645.]
- WEI YG, WEN F, CHEN WH, et al., 2010. *Litostigma*, a new genus from China: A morphological link between basal and derived didymocarpoid Gesneriaceae [J]. *Edinb J Bot*, 67(1): 161–184.
- WEI YG, ZHONG SH, WEN HQ, 2004. Studies of the flora and ecology Gesneriaceae in Guangxi Province [J]. *Plant Divers Resour*, 26: 173–182. [韦毅刚, 钟树华, 文和群, 2004. 广西苦苣苔科植物区系和生态特点研究 [J]. 植物分类与资源学报, 26: 173–182.]
- WEN F, 2008. Studies on investigation and introduction of wild ornamental resources of Gesneriaceae in Guangxi [D]. Beijing: Beijing Forestry University. [温放, 2008. 广西苦苣苔科观赏植物资源调查与引种研究 [D]. 北京: 北京林业大学.]
- WEN F, 2020. Introduction of Gesneriaceae [J]. *Guihaia*, 40(10). [温放, 2020. 苦苣苔科植物介绍 [J]. 广西植物, 40(10).]
- WEN F, LI S, XIN ZB, et al., 2019. The updated plant list of Gesneriaceae in China under the new Chinese naming rules [J]. *Guangxi Sci*, 26(1): 37–63. [温放, 黎舒, 辛子兵, 等, 2019. 新中文命名规则下的最新中国苦苣苔科植物名录 [J]. 广西科学, 26(1): 37–63.]
- WEN F, WEI YG, FU LF, et al., 2020. The Checklist of Gesneriaceae in China [EB/OL]. The Gesneriad Conservation Center of China, <http://gccx.gxib.cn/cn/about-68.aspx>. [温放, 韦毅刚, 符龙飞, 等, 2020. 中国苦苣苔科植物名录 [EB/OL]. 中国苦苣苔科植物保育中心, <http://gccx.gxib.cn/cn/about-68.aspx>.]
- XIN ZB, FU LF, LI S, et al., 2019. The historical changes in the classification of Chinese Gesneriaceae: On the analysis of new taxonomic group qualifiedly published in China and new records of national distribution of this family [J]. *Guangxi Sci*, 26(1): 102–117. [辛子兵, 符龙飞, 黎舒, 等, 2019. 中国苦苣苔科植物的分类系统历史变化——兼论该科植物在我国合格发表的新分类群与国家级分布新记录情况分析 [J]. 广西科学, 26(1): 102–117.]
- XIN ZB, FU LF, HUANG ZJ, et al., 2020. *Petrocodon chishuiensis* (Gesneriaceae), a new species endemic to Guizhou, China [J]. *Taiwania*, 65(2): 181–186.
- XU T, 2020. A taxonomic study of Gesneriaceae at Guizhou Maolan National Nature Reserve [D]. Guiyang: Guizhou Normal University. [徐婷, 2020. 贵州茂兰国家级自然保护区苦苣苔科植物分类学研究 [D]. 贵阳: 贵州师范大学.]
- XU WB, GUO J, PAN B, et al., 2017. Diversity and distribution of Gesneriaceae in China [J]. *Guihaia*, 37(10): 1219–1226. [许为斌, 郭婧, 盘波, 等, 2017. 中国苦苣苔科植物的多样性与地理分布 [J]. 广西植物, 37(10): 1219–1226.]
- XU X, ZHANG HY, XIE T, et al., 2018. Elevational pattern of seed plant diversity in Xishuangbanna and its mechanisms [J]. *Biodivers Sci*, 26(7): 678–689. [徐翔, 张化永, 谢婷, 等, 2018. 西双版纳种子植物物种多样性的垂直格局及机制 [J]. 生物多样性, 26(7): 678–689.]
- YANG JW, CAI L, 2019. Four newly recorded species of Gesneriaceae in Guizhou Province [J]. *Guangxi Sci*, 26(1): 86–88. [杨加文, 蔡磊, 2019. 贵州苦苣苔科植物 4 新记录种 [J]. 广西科学, 26(1): 86–88.]
- YANG L, JIANG YL, YANG CH, et al., 2020. Study on germplasm resources of *Dendrobium* in Guizhou [J]. *Seed*, 39(2): 57–62. [杨林, 姜运力, 杨成华, 等, 2020. 贵州石斛属植物种类资源研究 [J]. 种子, 39(2): 57–62.]
- YANG LH, FENG C, XU MZ, et al., 2019. Synopsis of cytological studies on Didymocarpoideae (Gesneriaceae) under new classification system [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 27(5): 548–557. [杨丽华, 冯晨, 徐梅珍, 等, 2019. 新分类系统下长蒴苣苔亚科(苦苣苔科)细胞学研究概述 [J]. 热带亚热带植物学报, 27(5): 548–557.]
- ZHAO XQ, AN MT, 2015. Wild Orchidaceae plant resources in Guiyang [M]. Guiyang: Guizhou Science and Technology Publishing House. [赵熙黔, 安明志, 2015. 贵阳市野生兰科植物资源 [M]. 贵阳: 贵州科技出版社.]
- ZHANG XL, 2014. Study on geographic distribution pattern of the wild Orchidaceae plants in China [D]. Taiyuan: Shanxi University. [张晓龙, 2014. 中国野生兰科植物地理分布格局研究 [D]. 太原: 山西大学.]
- ZHANG YB, DU HD, JIN XH, et al., 2015. Species diversity and geographic distribution of wild Orchidaceae in China [J]. *Chin Sci Bull*, 60(2): 179–188. [张殷波, 杜昊东, 金效华, 等, 2015. 中国野生兰科植物物种多样性与地理分布 [J]. 科学通报, 60(2): 179–188.]

(责任编辑 周翠鸣)

附录 1 贵州省苦苣苔科植物名录

Appendix 1 List of Gesneriaceae plants in Guizhou Province

属名 Genus	序号 Serial number	种名 Species	中国/ 贵州特有种 Endemic species of China/Guizhou	分布 Distribution
异叶苣苔属 <i>Whytockia</i>	1	毕节异叶苣苔 <i>Whytockia bijeensis</i>	是/是 Yes/Yes	七星关区 Qixingguan District
	2	峨眉异叶苣苔 <i>W. wilsonii</i>	是/否 Yes/No	七星关区 Qixingguan District
	3	白花异叶苣苔 <i>W. tsiangiana</i>	是/否 Yes/No	贞丰县、兴仁市、印江土家族苗族自治县、江口县、从江县、七星关区、赤水市*、都匀市* Zhenfeng County, Xingren City, Yinjiang Tujia and Miao Autonomous County, Jiangkou County, Congjiang County, Qixingguan District, Chishui City*, Duyun City*
尖舌苣苔属 <i>Rhynchoglossum</i>	1	尖舌苣苔 <i>Rhynchoglossum obliquum</i>	否/否 No/No	册亨县、兴义市、荔波县、织金县*、望谟县*、紫云苗族布依族自治县* Ceheng County, Xingyi City, Libo County, Zhijin County*, Wangmo County*, Ziyun Miao and Buyi Autonomous County*
盾座苣苔属 <i>Epithema</i>	1	盾座苣苔 <i>Epithema carnosum</i>	否/否 No/No	兴义市、册亨县、荔波县*、望谟县*、水城区* Xingyi City, Ceheng County, Libo County*, Wangmo County*, Shuicheng District*
凹柱苣苔属 <i>Litostigma</i>	1	凹柱苣苔 <i>Litostigma coriaceifolium</i>	是/是 Yes/Yes	兴义市 Xingyi City
珊瑚苣苔属 <i>Corallo-discus</i>	1	珊瑚苣苔 <i>Corallo-discus lanuginosus</i>	否/否 No/No	道真仡佬族苗族自治县、盘州市、松桃苗族自治县、印江土家族苗族自治县、沿河土家族自治县、普安县、册亨县、晴隆县、大方县、七星关区、威宁彝族回族苗族自治县、赫章县、凯里市、西秀区、赤水市、贵定县、惠水县、习水县、兴义市、荔波县、思南县 Daozhen Gelao and Miao Autonomous County, Panzhou City, Songtao and Miao Autonomous County, Yinjiang Tujia and Miao Autonomous County, Yanhe Tujia Autonomous County, Pu'an County, Ceheng County, Qinglong County, Dafang County, Qixingguan District, Weining Yi and Hui and Miao Autonomous County, Hezhang County, Kaili City, Xixiu District, Chishui City, Guiding County, Huishui County, Xishui County, Xingyi City, Libo County, Sinan County
横蒴苣苔属 <i>Beccarinda</i>	1	横蒴苣苔 <i>Beccarinda tonkinensis</i>	否/否 No/No	望谟县、赤水市、绥阳县、荔波县 Wangmo County, Chishui City, Suiyang County, Libo County
线柱苣苔属 <i>Rhynchotechum</i>	1	线柱苣苔 <i>Rhynchotechum ellipticum</i>	否/否 No/No	安龙县、榕江县、荔波县、赤水市* Anlong County, Rongjiang County, Libo County, Chishui City*
	2	冠萼线柱苣苔 <i>R. formosanum</i>	否/否 No/No	都匀市 Duyun City
马铃苣苔属 <i>Oreocharis</i>	1	辐花苣苔 <i>Oreocharis esquirolii</i>	是/是 Yes/Yes	兴仁市、贞丰县 Xingren City, Zhenfeng County
	2	威宁短檐苣苔 <i>O. pankaiyuae</i> var. <i>weiningense</i>	是/是 Yes/Yes	威宁彝族回族苗族自治县 Weining Yi and Hui and Miao Autonomous County
	3	东川短檐苣苔 <i>O. mairei</i>	是/否 Yes/No	盘州市 Panzhou City
	4	南川金盏苣苔 <i>O. nanchuanica</i>	是/否 Yes/No	道真仡佬族苗族自治县 Daozhen Gelao and Miao Autonomous County
	5	万山金盏苣苔 <i>O. wanshanensis</i>	是/是 Yes/Yes	万山区 Wanshan District
	6	弥勒苣苔 <i>O. mileensis</i>	是/否 Yes/No	兴义市 Xingyi City
	7	川滇马铃苣苔 <i>O. henryana</i>	是/否 Yes/No	开阳县、威宁彝族回族苗族自治县、绥阳县、安龙县、织金县* Kaiyang County, Weining Yi and Hui and Miao Autonomous County, Suiyang County, Anlong County, Zhijin County*

续附录 1

属名 Genus	序号 Serial number	种名 Species	中国/ 贵州特有种 Endemic species of China/Guizhou	分布 Distribution
	8	长瓣马铃苣苔 <i>O. auricula</i>	是/否 Yes/No	印江土家族苗族自治县、江口县、雷山县、独山县、关岭布依族苗族自治县、荔波县、榕江县、三都水族自治县、罗甸县 Yinjiang Tujia and Miao Autonomous County, Jiangkou County, Leishan County, Dushan County, Guanling Buyi and Miao Autonomous County, Libo County, Rongjiang County, Sandu Shui Autonomous County, Luodian County
	9	短柄马铃苣苔 <i>O. brachypoda</i>	是/是 Yes/Yes	碧江区 Bijiang District
	10	贵州马铃苣苔 <i>O. cavaleriei</i>	是/是 Yes/Yes	龙里县 Longli County
	11	都匀马铃苣苔 <i>O. duyunensis</i>	是/是 Yes/Yes	都匀市 Duyun City
	12	盘州马铃苣苔 <i>O. panzhouensis</i>	是/是 Yes/Yes	盘州市 Panzhou City
	13	齿瓣粗筒苣苔 <i>O. odontopetala</i>	是/是 Yes/Yes	盘州市 Panzhou City
	14	直瓣苣苔 <i>O. saxatilis</i>	是/否 Yes/No	开阳县、清镇市、江口县、道真仡佬族苗族自治县 Kaiyang County, Qingzhen City, Jiangkou County, Daozhen Gelao and Miao Autonomous County
	15	凸瓣苣苔 <i>O. convexa</i>	是/否 Yes/No	威宁彝族回族苗族自治县 Weining Yi and Hui and Miao Autonomous County
	16	贵州直瓣苣苔 <i>O. notochlaena</i>	是/是 Yes/Yes	观山湖区、惠水县 Guanshanhu District, Huishui County
	17	鄂西粗筒苣苔 <i>O. speciosa</i>	是/否 Yes/No	道真仡佬族苗族自治县 Daozhen Gelao and Miao Autonomous County
	18	川鄂粗筒苣苔 <i>O. rosthornii</i>	是/否 Yes/No	印江土家族苗族自治县、江口县、清镇市、雷山县、道真仡佬族苗族自治县、赤水市、绥阳县、松桃苗族自治县、石阡县、贞丰县、兴仁市、普安县、盘州市、都匀市 * Yinjiang Tujia and Miao Autonomous County, Jiangkou County, Qingzhen City, Leishan County, Daozhen Gelao and Miao Autonomous County, Chishui City, Suiyang County, Songtao Miao Autonomous County, Shiqian County, Zhenfeng County, Xingren City, Pu'an County, Panzhou City, Duyun City *
	19	贞丰粗筒苣苔 <i>O. rosthornii</i> var. <i>crenulata</i>	是/是 Yes/Yes	贞丰县、石阡县 Zhenfeng County, Shiqian County
	20	锈毛粗筒苣苔 <i>O. rosthornii</i> var. <i>xingrenensis</i>	是/是 Yes/Yes	兴仁市 Xingren City
	21	紫花粗筒苣苔 <i>O. elegantissima</i>	是/是 Yes/Yes	贵定县、独山县、荔波县、赤水市、雷山县 Guiding County, Dushan County, Libo County, Chishui City, Leishan County
	22	平伐粗筒苣苔 <i>O. pinfaensis</i>	是/是 Yes/Yes	贵定县、都匀市 Guiding County, Duyun City
	23	小叶粗筒苣苔 <i>O. parvifolia</i>	是/是 Yes/Yes	贵定县 Guiding County
	24	灰叶后蕊苣苔 <i>O. cinerea</i>	是/否 Yes/No	剑河县 Jianhe County
	25	皱叶后蕊苣苔 <i>O. stenosphon</i>	是/否 Yes/No	江口县 Jiangkou County
	26	文采后蕊苣苔 <i>O. wentsaii</i>	是/否 Yes/No	台江县 Taijiang County
	27	卵瓣马铃苣苔 <i>O. ovatilobata</i>	是/是 Yes/Yes	盘州市 Panzhou City

续附录 1

属名 Genus	序号 Serial number	种名 Species	中国/ 贵州特有种 Endemic species of China/Guizhou	分布 Distribution
	28	东川粗筒苣苔 <i>O. tongtchouanensis</i>	是/否 Yes/No	道真仡佬族苗族自治县、贞丰县 Daozhen Gelao and Miao Autonomous County, Zhenfeng County
	29	浙皖粗筒苣苔 <i>O. chienii</i>	是/否 Yes/No	贞丰县 Zhenfeng County
	30	黄花直瓣苣苔 <i>O. gamosepala</i>	是/否 Yes/No	威宁彝族回族苗族自治县 Weining Yi and Hui and Miao Autonomous County
筒花苣苔属 <i>Briggsiopsis</i>	1	筒花苣苔 <i>Briggsiopsis delavayi</i>	是/否 Yes/No	习水县、赤水市 Xishui County, Chishui City
漏斗苣苔属 <i>Raphiocarpus</i>	1	大苞漏斗苣苔 <i>Raphiocarpus begoniifolius</i>	否/否 No/No	兴仁市、安龙县、册亨县、望谟县、绥阳县、荔波县、赤水市、贞丰县 Xingren City, Anlong County, Ceheng County, Wangmo County, Suiyang County, Libo County, Chishui City, Zhenfeng County
半蒴苣苔属 <i>Hemiboea</i>	1	单座苣苔 <i>Hemiboea ovalifolia</i>	是/否 Yes/No	荔波县、盘州市 Libo County, Panzhou City
	2	贵州半蒴苣苔 <i>H. cavaleriei</i>	是/否 Yes/No	贵定县、七星关区、兴仁市、安龙县、兴义市、册亨县、独山县、道真仡佬族苗族自治县、赤水市、荔波县、罗甸县、绥阳县 * Guiding County, Qixingguan District, Xingren City, Anlong County, Xingyi City, Ceheng County, Dushan County, Daozhen Gelao and Miao Autonomous County, Chishui City, Libo County, Luodian County, Suiyang County *
	3	疏脉半蒴苣苔 <i>H. cavaleriei</i> var. <i>paucinervis</i>	否/否 No/No	贵定县、兴义市、安龙县、荔波县、独山县、六枝特区 * Guiding County, Xingyi City, Anlong County, Libo County, Dushan County, Liuzhi Special Region *
	4	纤细半蒴苣苔 <i>H. gracilis</i>	是/否 Yes/No	印江土家族苗族自治县、施秉县、江口县、湄潭县、开阳县、三都水族自治县、锦屏县、道真仡佬族苗族自治县、赤水市、桐梓县、乌当区、龙里县、雷山县、荔波县 *、绥阳县 *、都匀市 * Yinjiang Tujia and Miao Autonomous County, Shibing County, Jiangkou County, Meitan County, Kaiyang County, Sandu Shui Autonomous County, Jinping County, Daozhen Gelao and Miao Autonomous County, Chishui City, Tongzi County, Wudang District, Longli County, Leishan County, Libo County *, Suiyang County *, Duyun City *
	5	卷瓣半蒴苣苔 <i>H. follicularis</i> var. <i>retroflexa</i>	是/否 Yes/No	荔波县 Libo County
	6	毛苞半蒴苣苔 <i>H. gracilis</i> var. <i>pilobracteata</i>	是/否 Yes/No	凯里市、雷山县、江口县、荔波县 *、台江县 *、开阳县 * Kaili City, Leishan County, Jiangkou County, Libo County *, Taijiang County *, Kaiyang County *
	7	半蒴苣苔 <i>H. subcapitata</i>	否/否 No/No	榕江县、惠水县、湄潭县、绥阳县、雷山县、剑河县、务川仡佬族苗族自治县、凤冈县、天柱县、江口县、沿河土家族自治县、印江土家族苗族自治县、册亨县、兴义市、赫章县、七星关区、花溪区、紫云苗族布依族自治县、息烽县、修文县、荔波县、贵定县、德江县、瓮安县、从江县、纳雍县、盘州市、道真仡佬族苗族自治县、赤水市、桐梓县、正安县、松桃苗族自治县、石阡县、乌当区、锦屏县、开阳县 * Rongjiang County, Huishui County, Meitan County, Suiyang County, Leishan County, Jianhe County, Wuchuan Gelao and Miao Autonomous County, Fenggang County, Tianzhu County, Jiangkou County, Yanhe Tujia Autonomous County, Yinjiang Tujia and Miao Autonomous County, Ceheng County, Xingyi City, Hezhang County, Qixingguan District, Huaxi District, Ziyun Miao and Buyi Autonomous County, Xifeng County, Xiwen County, Libo County, Guiding County, Dejiang County, Weng'an County, Congjiang County, Nayong County, Panzhou City, Daozhen Gelao and Miao Autonomous County, Chishui City, Tongzi County, Zheng'an County, Songtao Miao Autonomous County, Shiqian County, Wudang District, Jinping County, Kaiyang County *

续附录 1

属名 Genus	序号 Serial number	种名 Species	中国/ 贵州特有种 Endemic species of China/Guizhou	分布 Distribution
石蝴蝶属 <i>Petrocosmea</i>	8	短茎半蒴苣苔 <i>H. subacaulis</i>	是/否 Yes/No	镇远县、三穗县、黎平县 * Zhenyuan County, Sansui County, Liping County *
	9	柔毛半蒴苣苔 <i>H. mollifolia</i>	是/否 Yes/No	松桃苗族自治县、碧江区、榕江县、道真仡佬族苗族自治县、赤水市、石阡县、江口县 Songtao Miao Autonomous County, Bijiang District, Rongjiang County, Daozhen Gelao and Miao Autonomous County, Chishui City, Shiqian County, Jiangkou County
	10	毛果半蒴苣苔 <i>H. flaccida</i>	是/否 Yes/No	荔波县 Libo County
	11	小苞半蒴苣苔 <i>H. parvibracteata</i>	是/是 Yes/Yes	施秉县、道真仡佬族苗族自治县 Shibing County, Daozhen Gelao and Miao Autonomous County
	12	合萼半蒴苣苔 <i>H. gamosepala</i>	是/否 Yes/No	贞丰县、册亨县、望谟县、兴义市、安龙县、荔波县 * Zhenfeng County, Ceheng County, Wangmo County, Xingyi City, Anlong County, Libo County *
	13	华南半蒴苣苔 <i>H. follicularis</i>	是/否 Yes/No	册亨县、清镇市、兴义市、纳雍县、贞丰县、习水县、赤水市、荔波县、兴仁市、望谟县、都匀市 Ceheng County, Qingzhen City, Xingyi City, Nayong County, Zhenfeng County, Xishui County, Chishui City, Libo County, Xingren City, Wangmo County, Duyun City
	14	大苞半蒴苣苔 <i>H. magnibracteata</i>	是/否 Yes/No	荔波县 Libo County
	15	绥阳半蒴苣苔 <i>H. suiyangensis</i>	是/是 Yes/Yes	绥阳县 Suiyang County
	16	白花半蒴苣苔 <i>H. albiflora</i>	是/是 Yes/Yes	兴义市、安龙县 *、江口县 * Xingyi City, Anlong County *, Jiangkou County *
	17	王氏半蒴苣苔 <i>H. wangiana</i>	是/否 Yes/No	兴义市 Xingyi City
	18	拟单座半蒴苣苔 <i>H. pseudometabriggsia</i> #	是/是 Yes/Yes	开阳县、台江县 * Kaiyang County, Taijiang County *
	19	拟大苞半蒴苣苔 <i>H. pseudomagnibracteata</i>	是/否 Yes/No	荔波县 Libo County
	1	黄斑石蝴蝶 <i>Petrocosmea xanthomaculata</i>	是/是 Yes/Yes	沿河土族自治县 Yanhe Tujia Autonomous County
	2	贵州石蝴蝶 <i>P. cavaleriei</i>	是/否 Yes/No	平坝区、清镇市、赫章县、罗甸县、惠水县、荔波县、兴义市、镇宁布依族苗族自治县、织金县 *、紫云苗族布依族自治县 * Pingba District, Qingzhen City, Hezhang County, Luodian County, Huishui County, Libo County, Xingyi City, Zhenning Buyi and Miao Autonomous County, Zhijin County *, Ziyun Miao and Buyi Autonomous County *
	3	兴义石蝴蝶 <i>P. xingyiensis</i>	是/否 Yes/No	兴义市 Xingyi City
	4	青翠石蝴蝶 <i>P. viridis</i>	是/否 Yes/No	平塘县 Pingtang County
	5	汇药石蝴蝶 <i>P. confluens</i>	是/是 Yes/Yes	望谟县、盘州市 * Wangmo County, Panzhou City *
	6	滇黔石蝴蝶 <i>P. martinii</i>	是/否 Yes/No	平坝区、龙里县、清镇市、荔波县 Pingba District, Longli County, Qingzhen City, Libo County
	7	光蕊石蝴蝶 <i>P. leiandra</i>	是/是 Yes/Yes	清镇市 Qingzhen City
	8	琦润石蝴蝶 <i>P. qiruniae</i>	是/是 Yes/Yes	大方县 Dafang County

续附录 1

属名 Genus	序号 Serial number	种名 Species	中国/ 贵州特有种 Endemic species of China/Guizhou	分布 Distribution
报春苣苔属 <i>Primulina</i>	9	长药石蝴蝶 <i>Petrocosmea</i> × <i>longianthera</i>	是/否 Yes/No	兴义市、安龙县 Xingyi City, Anlong County
	10	合溪石蝴蝶 <i>P. hexiensis</i>	是/否 Yes/No	务川仡佬族苗族自治县、桐梓县 Wuchuan Gelao and Miao Autonomous County, Tongzi County
	11	文采石蝴蝶 <i>P. wentsaii</i> #	是/是 Yes/Yes	黔西县 Qianxi County
	12	紫云石蝴蝶 <i>P. ziyunensis</i> #	是/否 Yes/No	紫云苗族布依族自治县 Ziyun Miao and Buyi Autonomous County
	1	舌柱报春苣苔 <i>Primulina liguliformis</i>	是/否 Yes/No	安龙县、册亨县、罗甸县、荔波县 Anlong County, Ceheng County, Luodian County, Libo County
	2	牛耳朵 <i>P. eburnea</i>	是/否 Yes/No	册亨县、兴义市、安龙县、独山县、荔波县、瓮安县、平坝区、西秀区、道真仡佬族苗族自治县、正安县、赤水市、习水县、花溪区、贵定县、长顺县、平塘县、开阳县、德江县、绥阳县*、织金县* Ceheng County, Xingyi City, Anlong County, Dushan County, Libo County, Weng'an County, Pingba District, Xixiu District, Daozhen Gelao and Miao Autonomous County, Zheng'an County, Chishui City, Xishui County, Huaxi District, Guiding County, Changshun County, Pingtang County, Kaiyang County, Dejiang County, Suiyang County*, Zhijin County*
	3	钻萼报春苣苔 <i>P. subulatisepala</i>	是/否 Yes/No	务川仡佬族苗族自治县 Wuchuan Gelao and Miao Autonomous County
	4	钟冠报春苣苔 <i>P. swinglei</i>	否/否 No/No	兴义市 Xingyi City
	5	隆林报春苣苔 <i>P. lunglinensis</i>	是/否 Yes/No	独山县、兴义市、罗甸县 Dushan County, Xingyi City, Luodian County
	6	钝齿报春苣苔 <i>P. obtusidentata</i>	是/否 Yes/No	印江土家族苗族自治县、江口县 Yinjiang Tujia and Miao Autonomous County, Jiangkou County
	7	桂粤报春苣苔 <i>P. fordii</i>	是/否 Yes/No	沿河土家族自治县 Yanhe Tujia Autonomous County
	8	蚂蝗七 <i>P. fimbriseppala</i>	是/否 Yes/No	锦屏县、天柱县、荔波县、罗甸县、榕江县、从江县、赤水市、正安县、松桃苗族自治县 Jinping County, Tianzhu County, Libo County, Luodian County, Rongjiang County, Congjiang County, Chishui City, Zheng'an County, Songtao Miao Autonomous County
	9	短毛报春苣苔 <i>P. brachytricha</i>	是/否 Yes/No	荔波县 Libo County
	10	大苞短毛报春苣苔 <i>P. brachytricha</i> var. <i>magnibracteata</i>	是/是 Yes/Yes	荔波县 Libo County
	11	荔波报春苣苔 <i>P. liboensis</i>	是/否 Yes/No	荔波县、从江县、榕江县、平塘县* Libo County, Congjiang County, Rongjiang County, Pingtang County*
	12	少毛报春苣苔 <i>P. glabrescens</i>	是/是 Yes/Yes	荔波县 Libo County
	13	羽裂报春苣苔 <i>P. pinnatifida</i>	是/否 Yes/No	从江县、榕江县、江口县 Congjiang County, Rongjiang County, Jiangkou County
	14	细筒报春苣苔 <i>P. vestita</i>	是/否 Yes/No	清镇市、贵定县 Qingzhen City, Guiding County
	15	清镇报春苣苔 <i>P. secundiflora</i>	是/是 Yes/Yes	清镇市、兴义市 Qingzhen City, Xingyi City

续附录 1

属名 Genus	序号 Serial number	种名 Species	中国/ 贵州特有种 Endemic species of China/Guizhou	分布 Distribution
	16	神农架报春苣苔 <i>P. tenuituba</i>	是/否 Yes/No	碧江区、江口县、印江土家族苗族自治县、沿河土家族自治县 Bijiang District, Jiangkou County, Yinjiang Tujia and Miao Autonomous County, Yanhe Tujia Autonomous County
	17	锯缘报春苣苔 <i>P. serrulata</i>	是/是 Yes/Yes	榕江县 Rongjiang County
	18	长柱报春苣苔 <i>P. longistyla</i>	是/否 Yes/No	沿河土家族自治县、开阳县 * Yanhe Tujia Autonomous County, Kaiyang County *
	19	黄斑报春苣苔 <i>P. flavimaculata</i>	是/否 Yes/No	罗甸县 Luodian County
	20	南丹报春苣苔 <i>P. nandanensis</i>	是/否 Yes/No	荔波县 Libo County
	21	曲管报春苣苔 <i>P. flexusa</i>	是/是 Yes/Yes	都匀市 Duyun City
	1	康定汉克苣苔 <i>Henckelia tibetica</i>	是/否 Yes/No	赫章县、威宁彝族回族苗族自治县 Hezhang County, Weining Yi and Hui and Miao Autonomous County
汉克苣苔属 <i>Henckelia</i>	2	大叶汉克苣苔 <i>H. grandifolia</i>	否/否 No/No	贞丰县 Zhenfeng County
	3	斑叶汉克苣苔 <i>H. pumila</i>	否/否 No/No	盘州市、安龙县、兴仁市、贞丰县、紫云苗族布依族自治县、望谟县、普安县 *、水城区 * Panzhou City, Anlong County, Xingren City, Zhenfeng County, Ziyun Miao and Buyi Autonomous County, Wangmo County, Pu'an County *, Shuicheng District *
	4	威宁汉克苣苔 <i>H. lachenensis</i>	是/是 Yes/Yes	威宁彝族回族苗族自治县 Weining Yi and Hui and Miao Autonomous County
石山苣苔属 <i>Petrocodon</i>	1	齿缘石山苣苔 <i>Petrocodon dealbatus</i>	是/否 Yes/No	黎平县 Liping County
	2	反折石山苣苔 <i>P. retroflexus</i>	是/是 Yes/Yes	长顺县 Changshun County
	3	世纬苣苔 <i>P. scopulorum</i>	是/是 Yes/Yes	平坝区、修文县、习水县、正安县 Pingba District, Xiuwen County, Xishui County, Zheng'an County
	4	披针叶石山苣苔 <i>P. lancifolius</i>	是/是 Yes/Yes	惠水县、荔波县 *、罗甸县 * Huishui County, Libo County *, Luodian County *
	5	桐梓石山苣苔 <i>P. tongziensis</i>	是/是 Yes/Yes	桐梓县、绥阳县 * Tongzi County, Suiyang County *
	6	石山苣苔 <i>P. dealbatus</i>	是/是 Yes/Yes	荔波县、独山县、施秉县、黄平县、纳雍县、镇远县、道真仡佬族苗族自治县 Libo County, Dushan County, Shibing County, Huangping County, Nayong County, Zhenyuan County, Daozhen Gelao and Miao Autonomous County
	7	绵毛石山苣苔 <i>P. niveolanosus</i>	是/否 Yes/No	黔西南布依族苗族自治州 Qianxinan Buyi and Miao Autonomous Prefecture
	8	长筒石山苣苔 <i>P. longitubus</i>	是/是 Yes/Yes	望谟县 Wangmo County
	9	赤水石山苣苔 <i>P. chishuiensis</i>	是/是 Yes/Yes	赤水市 Chishui City
	10	小黄花石山苣苔 <i>P. luteoflorus</i>	是/是 Yes/Yes	荔波县 Libo County
	11	朱红苣苔 <i>P. coccineus</i>	否/否 No/No	荔波县 Libo County

续附录 1

属名 Genus	序号 Serial number	种名 Species	中国/ 贵州特有种 Endemic species of China/Guizhou	分布 Distribution
长蒴苣苔属 <i>Didymocarpus</i>	12	重庆石山苣苔 <i>P. chongqingensis</i> +	是/否 Yes/No	赤水市 * Chishui City *
	1	狭冠长蒴苣苔 <i>Didymocarpus stenanthos</i>	是/否 Yes/No	赤水市、正安县、江口县、雷山县、榕江县 Chishui City, Zheng'an County, Jiangkou County, Leishan County, Rongjiang County
	2	腺毛长蒴苣苔 <i>D. glandulosus</i>	是/否 Yes/No	兴义市、榕江县、从江县、赤水市、独山县 * Xingyi City, Rongjiang County, Congjiang County, Chishui City, Dushan County *
	3	短萼长蒴苣苔 <i>D. glandulosus</i> var. <i>minor</i>	是/否 Yes/No	从江县、榕江县 Congjiang County, Rongjiang County
	4	疏毛长蒴苣苔 <i>D. stenanthos</i> var. <i>pilosellus</i>	是/否 Yes/No	贞丰县、安龙县、贵定县、黄平县、雷山县、凯里市、施秉县、印江土家族苗族自治县、江口县、赤水市、榕江县、兴仁市、黔西县 Zhenfeng County, Anlong County, Guiding County, Huangping County, Leishan County, Kaili City, Shibing County, Yinjiang Tujia and Miao Autonomous County, Jiangkou County, Chishui City, Rongjiang County, Xingren City, Qianxi County
圆唇苣苔属 <i>Gyrocheilos</i>	1	稀裂圆唇苣苔 <i>Gyrocheilos retrotrichum</i> var. <i>oligolobum</i>	是/否 Yes/No	从江县 Congjiang County
异唇苣苔属 <i>Allocheilos</i>	1	异唇苣苔 <i>Allocheilos cortusiflorum</i>	是/否 Yes/No	兴义市、赤水市 Xingyi City, Chishui City
大苞苣苔属 <i>Anna</i>	1	红花大苞苣苔 <i>Anna rubidiflora</i>	是/是 Yes/Yes	开阳县、金沙县、习水县、桐梓县、大方县 * Kaiyang County, Jinsha County, Xishui County, Tongzi County, Dafang County *
	2	白花大苞苣苔 <i>A. ophiorrhizoides</i>	是/否 Yes/No	赤水市、罗甸县、荔波县、绥阳县、麻江县、都匀市、六枝特区 Chishui City, Luodian County, Libo County, Suiyang County, Majiang County, Duyun City, Liuzhi Special Region
斜柱苣苔属 <i>Loxostigma</i>	1	斜柱苣苔 <i>Loxostigma griffithii</i>	否/否 No/No	习水县、赤水市、贞丰县 Xishui County, Chishui City, Zhenfeng County
	2	滇黔斜柱苣苔 <i>L. cavaleriei</i>	是/否 Yes/No	贵定县、独山县 Guiding County, Dushan County
	3	光叶斜柱苣苔 <i>L. glabrifolium</i>	是/否 Yes/No	贞丰县 Zhenfeng County
	4	粗筒斜柱苣苔 <i>L. kurzii</i>	是/否 Yes/No	赤水市 Chishui City
芒毛苣苔属 <i>Aeschynanthus</i>	1	芒毛苣苔 <i>Aeschynanthus acuminatus</i>	否/否 No/No	贞丰县、赤水市、荔波县 Zhenfeng County, Chishui City, Libo County
	2	广西芒毛苣苔 <i>A. austroyunnanensis</i> var. <i>guangxiensis</i>	是/否 Yes/No	贞丰县、望谟县、平塘县 * Zhenfeng County, Wangmo County, Pingtang County *
	3	黄杨叶芒毛苣苔 <i>A. buxifolius</i>	否/否 No/No	兴仁市、关岭布依族苗族自治县、贵定县 Xingren City, Guanling Buyi and Miao Autonomous County, Guiding County
吊石苣苔属 <i>Lysionotus</i>	1	多齿吊石苣苔 <i>Lysionotus denticulosus</i>	是/否 Yes/No	荔波县、独山县 * Libo County, Dushan County *
	2	桂黔吊石苣苔 <i>L. aeschynanthoides</i>	是/否 Yes/No	晴隆县、兴义市、贞丰县 Qinglong County, Xingyi City, Zhenfeng County
	3	长圆吊石苣苔 <i>L. oblongifolius</i>	是/否 Yes/No	荔波县 Libo County
	4	异叶吊石苣苔 <i>L. heterophyllus</i>	是/否 Yes/No	桐梓县、镇远县、榕江县、石阡县、从江县、兴仁市 Tongzi County, Zhenyuan County, Rongjiang County, Shiqian County, Congjiang County, Xingren City

续附录 1

属名 Genus	序号 Serial number	种名 Species	中国/ 贵州特有种 Endemic species of China/Guizhou	分布 Distribution
	5	吊石苣苔 <i>L. pauciflorus</i>	否/否 No/No	镇远县、兴义市、雷山县、都匀市、平塘县、沿河土家族自治县、剑河县、道真仡佬族苗族自治县、西秀区、平坝区、盘州市、水城区、麻江县、清镇市、贵定县、汇川区、七星关区、威宁彝族回族苗族自治县、花溪区、兴仁市、册亨县、罗甸县、习水县、施秉县、石阡县、江口县、松桃苗族自治县、从江县、绥阳县、赤水市、镇宁布依族苗族自治县、榕江县、黎平县、锦屏县、瓮安县、三都水族自治县、德江县、印江土家族苗族自治县、修文县、乌当区、台江县、普安县、织金县、紫云苗族布依族自治县、关岭布依族苗族自治县、六枝特区、湄潭县、独山县*、南明区*、荔波县*、黄平县*、正安县*、仁怀市*、大方县*、红花岗区* Zhenyuan County, Xingyi City, Leishan County, Duyun City, Pingtang County, Yanhe Tujia Autonomous County, Jianhe County, Daozhen Gelao and Miao Autonomous County, Xixiu District, Pingba District, Panzhou City, Shuicheng District, Majiang County, Qingzhen City, Guiding County, Huichuan District, Qixingguan District, Weining Yi and Hui and Miao Autonomous County, Huaxi District, Xingren City, Ceheng County, Luodian County, Xishui County, Shibing County, Shiqian County, Jiangkou County, Songtao Miao Autonomous County, Congjiang County, Suiyang County, Chishui City, Zhenning Buyi and Miao Autonomous County, Rongjiang County, Liping County, Jinping County, Weng'an County, Sandu Shui Autonomous County, Dejiang County, Yinjiang Tujia and Miao Autonomous County, Xiuwen County, Wudang District, Taijiang County, Pu'an County, Zhijin County, Ziyun Miao and Buyi Autonomous County, Guanling Buyi and Miao Autonomous County, Liuzhi Special Region, Meitan County, Dushan County*, Nanming District*, Libo County*, Huangping County*, Zheng'an County*, Renhuai City*, Dafang County*, Honghuagang District*
	6	灰叶吊石苣苔 <i>L. pauciflorus</i> var. <i>indutus</i>	是/是 Yes/Yes	威宁彝族回族苗族自治县 Weining Yi and Hui and Miao Autonomous County
	7	齿叶吊石苣苔 <i>L. serratus</i>	否/否 No/No	兴仁市、兴义市、安龙县、罗甸县、西秀区、册亨县、望谟县、麻江县、平塘县、惠水县、道真仡佬族苗族自治县、水城区* Xingren City, Xingyi City, Anlong County, Luodian County, Xixiu District, Ceheng County, Wangmo County, Majiang County, Pingtang County, Huishui County, Daozhen Gelao and Miao Autonomous County, Shuicheng district*
	8	攀援吊石苣苔 <i>L. chingii</i>	否/否 No/No	荔波县、紫云苗族布依族自治县* Libo County, Ziyun Miao and Buyi Autonomous County*
	9	桑植吊石苣苔 <i>L. sangzhiensis</i>	是/否 Yes/No	江口县、印江土家族苗族自治县、松桃苗族自治县 Jiangkou County, Yinjiang Tujia and Miao Autonomous County, Songtao Miao Autonomous County
	10	凤山吊石苣苔 <i>L. fengshanensis</i>	是/否 Yes/No	荔波县 Libo County

续附录 1

属名 Genus	序号 Serial number	种名 Species	中国/ 贵州特有种 Endemic species of China/Guizhou	分布 Distribution
光叶苣苔属 <i>Glabrella</i>	1	革叶光叶苣苔 <i>Glabrella mihieri</i>	是/否 Yes/No	平坝区、兴义市、安龙县、花溪区、德江县、习水县、清镇市、镇宁布依族苗族自治县、紫云苗族布依族自治县、凯里市、七星关区、汇川区、大方县、惠水县、贵定县、道真仡佬族苗族自治县、赤水市、荔波县、绥阳县、仁怀市、正安县、沿河土家族自治县、松桃苗族自治县、雷山县、乌当区、望谟县、兴仁市、六枝特区、普安县、织金县、赫章县、开阳县*、施秉县* Pingba District, Xingyi City, Anlong County, Huaxi District, Dejiang County, Xishui County, Qingzhen City, Zhenning Buyi and Miao Autonomous County, Ziyun Buyi and Miao Autonomous County, Kaili City, Qixingguan District, Huichuan District, Dafang County, Huishui County, Guiding County, Daozhen Gelao and Miao Autonomous County, Chishui City, Libo County, Suiyang County, Renhuai City, Zheng'an County, Yanhe Tujia Autonomous County, Songtao Miao Autonomous County, Leishan County, Wudang District, Wangmo County, Xingren City, Liuzhi Special Region, Pu'an County, Zhijin County, Hezhang County, Kaiyang County*, Shibing County*
	2	盾叶光叶苣苔 <i>G. longipes</i>	是/否 Yes/No	兴仁市、安龙县、赤水市、绥阳县、施秉县 Xingren City, Anlong County, Chishui City, Suiyang County, Shibing County
	3	无毛光叶苣苔 <i>G. leiophylla</i>	是/是 Yes/Yes	惠水县 Huishui County
蛛毛苣苔属 <i>Paraboea</i>	1	锥序蛛毛苣苔 <i>Paraboea swinhoii</i>	否/否 No/No	独山县、荔波县、道真仡佬族苗族自治县 Dushan County, Libo County, Daozhen Gelao and Miao Autonomous County
	2	蛛毛苣苔 <i>P. sinensis</i>	否/否 No/No	印江土家族苗族自治县、沿河土家族自治县、七星关区、贵定县、荔波县、绥阳县、正安县、习水县、松桃苗族自治县、施秉县、兴仁市、兴义市、盘州市、纳雍县、清镇市、水城区* Yinjiang Tujia and Miao Autonomous County, Yanhe Tujia Autonomous County, Qixingguan District, Guiding County, Libo County, Suiyang County, Zheng'an County, Xishui County, Songtao Miao Autonomous County, Shibing County, Xingren City, Xingyi City, Panzhou City, Nayong County, Qingzhen City, Shuicheng District*
	3	锈色蛛毛苣苔 <i>P. rufescens</i>	否/否 No/No	安龙县、册亨县、独山县、关岭布依族苗族自治县、贵定县、荔波县、罗甸县、兴仁市、兴义市、镇宁布依族苗族自治县、道真仡佬族苗族自治县、威宁彝族回族苗族自治县、纳雍县、普定县、望谟县、紫云苗族布依族自治县、惠水县、清镇市、雷山县、施秉县、江口县、印江土家族苗族自治县、德江县、正安县、绥阳县 Anlong County, Ceheng County, Dushan County, Guanling Buyi and Miao Autonomous County, Guiding County, Libo County, Luodian County, Xingren City, Xingyi City, Zhenning Buyi and Miao Autonomous County, Daozhen Gelao and Miao Autonomous County, Weining Yi and Hui and Miao Autonomous County, Nayong County, Puding County, Wangmo County, Ziyun Miao and Buyi Autonomous County, Huishui County, Qingzhen City, Leishan County, Shibing County, Jiangkou County, Yinjiang Tujia and Miao Autonomous County, Dejiang County, Zheng'an County, Suiyang County
	4	白花蛛毛苣苔 <i>P. glutinosa</i>	是/否 Yes/No	罗甸县、长顺县、贵定县、平坝区、荔波县* Luodian County, Changshun County, Guiding County, Pingba District, Libo County*
	5	髯丝蛛毛苣苔 <i>P. martini</i>	是/否 Yes/No	罗甸县、荔波县、开阳县、望谟县* Luodian County, Libo County, Kaiyang County, Wangmo County*
	6	三苞蛛毛苣苔 <i>P. tribracteata</i>	是/否 Yes/No	荔波县 Libo County

续附录 1

属名 Genus	序号 Serial number	种名 Species	中国/ 贵州特有种 Endemic species of China/Guizhou	分布 Distribution
	7	厚叶蛛毛苣苔 <i>P. crassifolia</i>	是/否 Yes/No	松桃苗族自治县、江口县、碧江区、普定县、罗甸县、湄潭县、兴义市、道真仡佬族苗族自治县、开阳县、威宁彝族回族苗族自治县、晴隆县、沿河土家族自治县 Songtao Miao Autonomous County, Jiangkou County, Bijiang District, Puding County, Luodian County, Meitan County, Xingyi City, Daozhen Gelao and Miao Autonomous County, Kaiyang County, Weining Yi and Hui and Miao Autonomous County, Qinglong County, Yanhe Tujia Autonomous County
	8	独山蛛毛苣苔 <i>P. dushanensis</i>	是/是 Yes/Yes	独山县、望谟县 * Dushan County, Wangmo County *
	9	网脉蛛毛苣苔 <i>P. dictyoneura</i>	否/否 No/No	荔波县 Libo County
	10	白云岩蛛毛苣苔 <i>P. dolomitica</i>	是/是 Yes/Yes	施秉县、镇远县 Shibing County, Zhenyuan County
旋蒴苣苔属 <i>Dorcoceras</i>	1	地胆旋蒴苣苔 <i>Dorcoceras philippinense</i>	否/否 No/No	安龙县、长顺县、罗甸县、望谟县、荔波县 Anlong County, Changshun County, Luodian County, Wangmo County, Libo County
	2	旋蒴苣苔 <i>D. hygrometrica</i>	是/否 Yes/No	罗甸县、安龙县、望谟县、荔波县、道真仡佬族苗族自治县、赤水市、正安县、江口县、织金县、赫章县、册亨县 Luodian County, Anlong County, Wangmo County, Libo County, Daozhen Gelao and Miao Autonomous County, Chishui City, Zheng'an County, Jiangkou County, Zhijin County, Hezhang County, Ceheng County
喜鹊苣苔属 <i>Ornithoboea</i>	1	贵州喜鹊苣苔 <i>Ornithoboea feddei</i>	否/否 No/No	关岭布依族苗族自治县、贞丰县 Guanling Buyi and Miao Autonomous County, Zhenfeng County
粉毛苣苔属 <i>Middletonia</i>	1	粉毛苣苔 <i>Middletonia multiflora</i>	是/否 Yes/No	罗甸县、兴义市、荔波县 Luodian County, Xingyi City, Libo County
长冠苣苔属 <i>Rhabdothamnopsis</i>	1	长冠苣苔 <i>Rhabdothamnopsis chinensis</i>	是/否 Yes/No	长顺县、独山县、贵定县、罗甸县、安龙县、盘州市、荔波县、紫云苗族布依族自治县、开阳县 * Changshun County, Dushan County, Guiding County, Luodian County, Anlong County, Panzhou City, Libo County, Ziyun Miao and Buyi Autonomous County, Kaiyang County *

注：* 为实地调查到的新增分布区；#为待发表的种类；+为贵州省新记录种，正在发表中。

Note: Those marked with * are the newly increased distribution areas found in the field survey; those species marked with # are will to be published; those species marked with + are new records of Guizhou Province, which are being published.

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202011012

胡佳玉, 蒋勇, 王宇, 等. 贡嘎山石松类和蕨类植物的多样性与海拔分布 [J]. 广西植物, 2022, 42(2): 220–227.

HU JY, JIANG Y, WANG Y, et al. Species diversity and altitudinal distribution of lycophytes and ferns in Gongga Mountain [J]. *Guihaia*, 2022, 42(2): 220–227.



贡嘎山石松类和蕨类植物的多样性与海拔分布

胡佳玉^{1,2}, 蒋勇³, 王宇³, 张梦华^{1,2}, 张宪春^{1*}

(1. 中国科学院植物研究所, 系统与进化植物学国家重点实验室, 北京 100093; 2. 中国科学院大学 生命科学学院, 北京 100049; 3. 四川贡嘎山国家级自然保护区管理局, 四川 康定 626000)

摘要: 贡嘎山是横断山脉海拔最高的一座大山, 是研究山地植物多样性和海拔分布的理想地区。为了探讨贡嘎山地区石松类和蕨类植物多样性组成及海拔分布特点, 该研究基于野外考察、标本采集鉴定及文献考证, 对贡嘎山地区石松类和蕨类植物进行统计和分析。结果表明: (1) 贡嘎山地区有石松类植物 3 科 4 属 25 种, 蕨类植物有 23 科 56 属 291 种。 (2) 主要的珍稀濒危植物有 6 种, 分别是高寒水韭 (*Isoetes hypsophila*)、松叶蕨 (*Psilotum nudum*)、桫欏 (*Alsophila spinulosa*)、小叶中国蕨 (*Aleuritopteris albofusca*)、玉龙蕨 (*Polystichum glaciale*) 和扇蕨 (*Lepisorus palmatopedatus*)。 (3) 优势科为鳞毛蕨科 (*Dryopteridaceae*) 75 种、水龙骨科 (*Polypodiaceae*) 56 种、凤尾蕨科 (*Pteridaceae*) 54 种和蹄盖蕨科 (*Athyriaceae*) 37 种; 优势属为耳蕨属 (*Polystichum*) 45 种、鳞毛蕨属 (*Dryopteris*) 24 种、蹄盖蕨属 (*Athyrium*) 24 种和瓦韦属 (*Lepisorus*) 19 种。 (4) 区系以温带成分为主, 有 286 种 (93.77%)。随着海拔的上升, 石松类和蕨类的物种多样性逐渐增加, 2 000~3 000 m 海拔段的物种多样性最高, 为 20 科 46 属 192 种, 3 000 m 以上物种多样性逐渐下降, 4 500 m 以上仅分布有 4 种蕨类植物。此外, 该研究还发现, 随着海拔的升高, 中国-喜马拉雅成分逐渐增加。

关键词: 区系, 贡嘎山, 濒危物种, 温带成分, 海拔分布

中图分类号: Q948 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2022)02-0220-08

Species diversity and altitudinal distribution of lycophytes and ferns in Gongga Mountain

HU Jiayu^{1,2}, JIANG Yong³, WANG Yu³, ZHANG Menghua^{1,2}, ZHANG Xianchun^{1*}

(1. State Key Laboratory of Systematic and Evolutionary Botany, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China; 2. College of Life Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Gongga Mountain National Nature Reserve Administration Bureau, Kangding 626000, Sichuan, China)

Abstract: Gongga Mountain is the highest peak of Hengduan Mountains and is an adequate site to study species diversity and the successive distribution of species along altitude. In this study we present an account of the species diversity and floristic characters of lycophytes and ferns in Gongga Mountain based on field survey, specimens identification, and literatures reviewing. The results are as follows: (1) A total of 316 species of 60 genera in 26 families of lycophytes and ferns were recognised in this study. (2) Of these species, six species are assessed to be rare and endangered and need special protection in China. They are *Isoetes hypsophila*, *Psilotum nudum*, *Alsophila spinulosa*, *Aleuritopteris albofusca*,

收稿日期: 2021-01-19

基金项目: 国家自然科学基金 (31872651) [Supported by National Natural Science Foundation of China (31872651)]。

第一作者: 胡佳玉 (1997-), 硕士研究生, 研究方向为植物学, (E-mail) hujiaYu@ibcas.ac.cn。

* 通信作者: 张宪春, 博士, 研究员, 研究方向为植物学, (E-mail) zhangxc@ibcas.ac.cn。

Polystichum glaciale and *Lepisorus palmatopedatus*. (3) Of the fern flora in this mountain, the largest four families are Dryopteridaceae (75 species), Polypodiaceae (56 species), Pteridaceae (54 species), and Athyriaceae (37 species); The largest four genera are *Polystichum* (45 species), *Dryopteris* (24 species), *Athyrium* (24 species), and *Lepisorus* (19 species). (4) Temperate species are the dominant floristic elements (286 species, 93.77%) in this mountain. With the ascending of the elevation from 1 000 to 3 000 m, the species diversity gradually increases, which reaches the highest at the zone between 2 000–3 000 m where 192 species (belonging to 60 genera in 20 families) were recorded, and above 3 000 m, the species diversity declines, with only four species of ferns found over 4 500 m. When viewing the floristic elements, the Sino-Himalaya species are found to be gradually increased along the ascension of elevations.

Key words: floristics, Gongga Mountain, endangered species, temperate elements, altitudinal distribution

横断山脉是我国生物多样性最丰富、自然环境和生态系统最复杂的地区之一(应俊生和张志松,1984;李锡文和李捷,1993;钟祥浩,1998)。青藏高原-喜马拉雅-横断山脉地区拥有世界上最丰富的高山植物区系(Li et al., 2014)。横断山脉不仅是高山植物起源和分化的摇篮,而且是喜马拉雅和青藏高原物种多样性的主要来源(Ding et al., 2020)。由于受气候变化和人为干扰因素的影响,横断山脉地区被认为是全球生物多样性热点地区中最脆弱的地区之一(Boufford, 2014)。

贡嘎山位于横断山脉东北段,是横断山脉最高峰,拥有完整的垂直植被带谱(李文华等,1998;沈泽昊等,2001)。很多研究者认为,海拔是影响物种丰富度格局的决定性因素之一(Brown, 2001;李瑞年等,2013)。由于山体面积大,海拔落差高达6 000 m,地质活动频繁,气候条件复杂多样,贡嘎山的植被类型和植物种类极其丰富。石松类和蕨类植物是森林群落的重要组成部分,孔宪需和张丽兵(1996)曾报道贡嘎山地区有蕨类植物40科93属399种。但是,近20年来,随着分子系统学研究的深入,石松类和蕨类植物的科属概念发生了很大变化(PPG, 2016)。并且,近年来许多研究者对贡嘎山有了更深入的野外调查,增加了一些物种的分布记录,对以往一些标本的错误鉴定也进行了纠正。因此,有必要基于最新的物种名录对该地区石松类和蕨类植物进行区系分析。

本研究通过对贡嘎山地区多次的野外考察,标本采集与鉴定,基于最新的分类系统,对贡嘎山石松类和蕨类植物物种名录进行统计,探讨该地区石松类和蕨类植物的区系成分,并对不同海拔段的石松类和蕨类植物成分进行分析,为贡嘎山国家自然保护区石松类和蕨类植物资源的可持续利用和保护提供科学依据。

1 研究区域自然概况

贡嘎山国家级自然保护区位于四川省泸定县、康定县、九龙县和石棉县境内。地理位置为101°29′—102°12′ E、29°01′—30°05′ N,总面积409 143 hm²。贡嘎山主峰也是四川省最高峰,海拔7 556 m,其周围有45座6 000 m以上的山峰。贡嘎山地区地质构造活动频繁,随着山体的抬升,河流东西两坡形成高差近5 000 m的峡谷。

四川省贡嘎山国家级自然保护区主要属于温带高原气候,随着海拔梯度升高,出现了亚热带、暖温带、寒温带、亚寒带、寒带和极地带气候。在夏季,贡嘎山地区受东亚季风和南亚季风的影响,会有丰富的降水,降水量会随着海拔升高而增大。正是这种局部气候多样化的特点,为该地区形成复杂的植物区系提供了可能。

2 数据获取与分析方法

2.1 数据获取

2018—2020年期间,我们对贡嘎山地区进行多次野外考察,对贡嘎山地区境内4个县大部分地区进行了重点调查,包括康定县的折多山、沙德镇、新都桥、榆林乡、子梅村、雅家梗;泸定县的海螺沟、燕子沟、南门关沟、小河子沟;石棉县的草科、唐家沟、草科乡、田湾乡;九龙县的磨子沟、洪坝乡、汤古乡等,共采集植物标本6 338号。通过对这些标本进行鉴定,参考《中国植物志》《四川植物志》(孔宪需等,1988)、《横断山区维管植物》(王文采等,1993)与*Flora of China* (Wu et al., 2013)等相关资料并下载了中国数字植物标本馆(<http://www.cvh.ac.cn>)的相关记录,采用最新的石

松类和蕨类植物分类系统 PPG I (2016), 结合有关类群的最新研究成果, 如将扇蕨属 (*Neocheiropteris*) 和盾蕨属 (*Neolepisorus*) 等归入瓦韦属 (*Lepisorus*) (Zhao et al., 2019), 整理出贡嘎山地区石松类和蕨类的科属名录 (附表 1, [http://www. guihaia - journal.com](http://www.guihaia-journal.com) 在线发布)。

2.2 分析方法

2.2.1 区系地理成分划分 植物区系地理成分类型的划分参照吴征镒等 (2006, 2011) 和陆树刚 (2004) 的方法。其中, 热带亚洲-热带美洲间断分布、中亚分布、旧世界温带分布这 3 种类型在贡嘎山地区没有分布, 因此贡嘎山地区只划分为 12 种分布类型。在统计分析中, 忽略大部分分布亚型, 仅保留了东亚分布型的 3 个变型: 东亚广布 (S-J-H 型)、中国-日本变型 (S-J 型) 和中国-喜马拉雅变型 (S-H 型)。同时, 结合热带成分与温带成分的比值 (R/T 比值) 衡量区系的热带或温带属性 (彭华, 1996; 冯建孟和徐成东, 2008)。

2.2.2 海拔区域划分 由于《中国植物志》所记载的物种海拔信息为全国分布海拔, 对贡嘎山地区植物垂直分布格局分析不具有统计意义, 因此通过中国数字植物标本馆 (<http://www.cvh.ac.cn>) 下载该地区 4 个县 (康定县、泸定县、九龙县、石棉县) 的所有石松类和蕨类植物采集记录, 并结合 2018—2020 年贡嘎山维管植物本底调查考察队野外标本采集记录, 对每个物种采集地的海拔进行统计。海拔划分参照王志恒等 (2004) 的方法, 将贡嘎山地区由高到低依次分为若干个海拔段, 以 500 m 为一个海拔段, 由于该地区 1 000 m 以下地区面积较小, 且采集记录较少, 因此只统计海拔 1 000 m 以上的数据, 虽然贡嘎山主峰海拔高达 7 556 m, 但能够分布到海拔 4 500 m 以上的物种很少, 因此将海拔 4 500 m 以上作为一个海拔段。

3 结果与分析

3.1 石松类和蕨类植物的科、属和种类组成

贡嘎山地区有石松类和蕨类植物 26 科 60 属 316 种 (表 1), 其中石松类植物 3 科 4 属 25 种, 蕨类植物 23 科 56 属 291 种。按照周喜乐等 (2016) 的统计, 中国分布有石松类和蕨类植物 40 科 178 属 2 270 种, 贡嘎山地区石松类和蕨类植物分别占全国科的 65%、属的 33.71% 和种的 13.92%。

3.1.1 科的区系特征 优势科的确定以科在贡嘎山分布的种数大于 20 为标准, 贡嘎山地区优势科为鳞毛蕨科 (*Dryopteridaceae*) 75 种、水龙骨科 (*Polypodiaceae*) 56 种、凤尾蕨科 (*Pteridaceae*) 54 种和蹄盖蕨科 (*Athyriaceae*) 37 种。这 4 个优势科, 包含了 28 属和 222 种, 占总科数的 15.38%、总属数的 46.67%、总种数的 70.25%。其中: 鳞毛蕨科 4 属 75 种, 为世界分布型; 水龙骨科 4 属 75 种, 为泛热带分布型; 凤尾蕨科 9 属 54 种, 为热带亚洲和热带美洲分布型; 蹄盖蕨科 5 属 37 种, 广布全世界热带至寒温带各地, 以热带、亚热带山地为多。含有 10~19 种的科有石松科 (*Lycopodiaceae*)、卷柏科 (*Selaginellaceae*)、铁角蕨科 (*Aspleniaceae*)、金星蕨科 (*Thelypteridaceae*), 共 8 属 28 种; 含有 2~9 种的科有 10 科; 仅有 1 种的科有 8 科。

3.1.2 属的区系特征 优势属的确定以属在贡嘎山分布的种数大于 15 为标准, 共有 4 个优势属, 包括 112 种, 占该地区总数 35.44%。其中: 耳蕨属 (*Polystichum*) 45 种; 鳞毛蕨属 (*Dryopteris*) 24 种; 蹄盖蕨属 (*Athyrium*) 24 种; 瓦韦属 19 种。孔宪需 (1984) 在《四川蕨类植物地理特点》一文中提出的“耳蕨-鳞毛蕨类植物区系”基本反映了这一地区的类群特点。关于特有属的组成, 孔宪需和张丽兵 (1996) 认为贡嘎山有 7 个特有属, 但近年来系统生物学的研究表明, 该地区已无特有属, 其中: 中国蕨属 (*Sinopteris*) 归入粉背蕨属 (*Aleuritopteris*); 水鳖蕨属 (*Sinephropteris*) 归入铁角蕨属 (*Asplenium*); 滇蕨属 (*Cheilanthes*) 归入岩蕨属 (*Woodsia*); 玉龙蕨属 (*Sorolepidium*) 归入耳蕨属; 假钻毛蕨属 (*Paradavallodes*) 归入骨碎补属 (*Davallia*); 扇蕨属、宽带蕨属 (*Platygyria*) 归入瓦韦属。

3.1.3 珍稀濒危植物 贡嘎山地区分布有 316 种石松类和蕨类植物, 按照董仕勇等 (2017) 对中国石松类和蕨类植物红色名录评估的结果, 贡嘎山地区没有极危 (CR) 和濒危 (EN) 的物种, 但有 14 种易危 (VU) 或近危 (NT) 物种: 皱边石杉 (*Huperzia crispata*, 易危 VU)、高寒水韭 (*Isoetes hypsophila*, 易危 VU)、松叶蕨 (*Psilotum nudum*, 易危 VU)、脉纹鳞毛蕨 (*Dryopteris lachoonensis*, 易危 VU)、川滇槲蕨 (*Drynaria delavayi*, 易危 VU)、中华石杉 (*Huperzia chinensis*, 近危 NT)、垫状卷柏 (*Selaginella pulvinata*, 近危 NT)、绒毛阴地蕨 (*Botrychium lanuginosum*, 近

表 1 贡嘎山石松类和蕨类植物科、属、种数量统计

Table 1 Statistics on families, genera and species of lycophytes and ferns in Gongga Mountain

科 Family	属 Genus	种 Species	科 Family	属 Genus	种 Species
石松科 Lycopodiaceae	2	12	凤尾蕨科 Pteridaceae	9	54
卷柏科 Selaginellaceae	1	12	冷蕨科 Cystopteridaceae	2	7
水韭科 Isoëtaceae	1	1	铁角蕨科 Aspleniaceae	1	12
木贼科 Equisetaceae	1	6	金星蕨科 Thelypteridaceae	4	12
松叶蕨 Psilotaceae	1	1	岩蕨科 Woodsiaceae	1	5
瓶尔小草科 Ophioglossaceae	2	3	蹄盖蕨科 Athyriaceae	5	37
紫萁科 Osmundaceae	3	3	球子蕨科 Onocleaceae	2	2
膜蕨科 Hymenophyllaceae	1	4	乌毛蕨科 Blechnaceae	1	1
里白科 Gleicheniaceae	1	1	肿足蕨科 Hypodematiaceae	1	2
瘤足蕨科 Plagiogyriaceae	1	1	鳞毛蕨科 Dryopteridaceae	4	75
杪椋科 Cyatheaceae	1	1	肾蕨科 Nephrolepidaceae	1	1
鳞始蕨科 Lindsaeaceae	1	1	骨碎补科 Davalliaceae	1	3
碗蕨科 Dennstaedtiaceae	2	3	水龙骨科 Polypodiaceae	10	56
			总计 Total	60	316

危 NT)、杪椋(*Alsophila spinulosa*,近危 NT)、毛足铁线蕨(*Adiantum bonatianum*,近危 NT)、灰背铁线蕨(*A. myriosorum*,近危 NT)、玉龙蕨(*Polystichum glaciale*,近危 NT)、石莲姜槲蕨(*Drynaria propinqua*,近危 NT)、虎尾蒿蕨(*Tomophyllum subfalcata*,近危 NT)。通过野外调查,我们认为贡嘎山地区分布的高寒水韭、松叶蕨、杪椋、小叶中国蕨(*Aleuritopteris albofusca*)、玉龙蕨和扇蕨(*Lepisorus palmatopedatus*)等 6 种应该加以重点保护,其中杪椋在贡嘎山的分布为其最西北边界,并且在形态上有一定的变异,需要开展进一步的研究和加强保护。

3.2 石松类和蕨类植物的地理分布类型

由于采用的分类系统不同,以及近年来对于石松类和蕨类植物科属的划分变化较大,因此本文在划分地理成分时以种为单位进行讨论,更能准确反映其区系特性(表 2)。在贡嘎山地区物种的 12 个分布类型中(图 1):热带成分共 19 种,占非世界分布总种数的 6.23%;温带成分共 286 种,占非世界分布总种数的 93.77%,其中主要成分为东亚成分,共 166 种,占非世界分布总种数的 54.4%。

世界广布种有 11 种。主要有扁枝石松(*Lycopodium complanatum*)、节节草(*Equisetum ramosissimum*)、铁线蕨(*Adiantum capillus-veneris*)、

欧洲凤尾蕨(*Pteris cretica*)、冷蕨(*Cystopteris fragilis*)和肾蕨(*Nephrolepis cordifolia*)等。Good (1974)认为世界广布种对生境选择要求较低,在全球分布广泛,不能体现地理分布的代表性。因此,我们在计算区系成分比例时往往不包括世界广布型。

热带分布种有 19 种。其中:泛热带分布有 4 种,占非世界分布总种数的 1.31%,如蜈蚣草(*Pteris vittata*)、变异铁角蕨(*Asplenium varians*)等;旧大陆热带分布的有乌蕨(*Odontosoria chinensis*)、鞭叶铁线蕨(*Adiantum caudatum*) 2 种;热带亚洲-热带大洋洲分布的有笔管草(*Equisetum ramosissimum* subsp. *debile*)、柄叶瓶尔小草(*Ophioglossum petiolatum*)、毛叶假蹄盖蕨(*Deparia petersenii*) 3 种;热带亚洲-热带非洲分布的仅肿足蕨(*Hypodematium crenatum*) 1 种;热带亚洲分布的有 9 种,占非世界分布总种数的 2.95%,如黑足金粉蕨(*Onychium cryptogrammoides*)和尖裂假瘤蕨(*Selliguea oxyloba*)等。

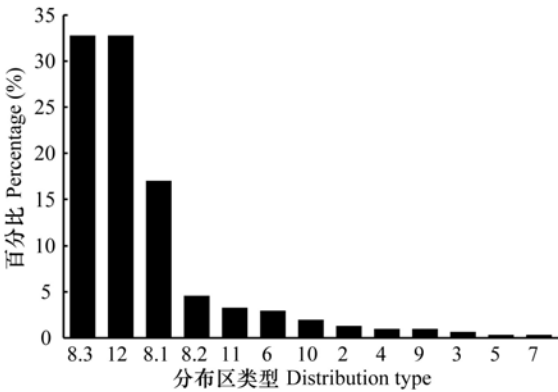
贡嘎山地区以温带成分种类最多,达 286 种。其中:北温带分布的有 10 种,占非世界分布总种数的 3.28%,如问荆(*Equisetum arvense*)、羽节蕨(*Gymnocarpium jessoense*)、卵果蕨(*Phegopteris connectilis*)和荚果蕨(*Matteuccia struthopteris*)等;温带亚洲分布的有 6 种,占非世界分布总种数的

表 2 贡嘎山石松类和蕨类植物分布区类型

Table 2 Distribution types of lycophytes and ferns on Gongga Mountain

分布区类型 Distribution type	种数 No. of species	百分比 Percentage (%)
1.世界广布 Cosmopolitan	11	—
2.泛热带分布 Pantropic	4	1.31
3.旧大陆热带分布 Old World Tropics	2	0.66
4.热带亚洲-热带大洋洲分布 Tropical Asia to Tropical Australasia	3	0.98
5.热带亚洲-热带非洲分布 Tropical Asia to Tropical Africa	1	0.33
6.热带亚洲分布 Tropical Asia	9	2.95
热带成分小计 Tropical elements (2-6)	19	6.23
7.中亚西亚至地中海分布 Mediterranean, West to Central Asia	1	0.33
8.东亚分布 East Asia	166	54.4
8.1 东亚广布(S-J-H)	52	17.00
8.2 中国-日本(S-J)	14	4.59
8.3 中国-喜马拉雅(S-H)	100	32.79
9.东亚-北美间断分布 E. Asia & N. America Disjunction	3	0.99
10.温带亚洲分布 Temperate Asia	6	1.97
11.北温带分布 North temperate	10	3.28
12.中国特有 Endemic to China	100	32.79
温带成分小计 Temperate elements (7-12)	286	93.77
总计 Total	316	100

1.97%,如珠蕨(*Cryptogramma raddeana*)、西北铁角蕨(*Asplenium nesii*)和北京铁角蕨(*A. pekinense*)等;东亚-北美间断分布的有桂皮紫萁(*Osmundastrum cinnamomeum*)、绒紫萁(*Claytosomeunda claytoniana*)和稀叶珠蕨(*Cryptogramma stelleri*)3种;中亚、西亚至地中海分布的仅欧洲金毛裸蕨(*Paragymnopteris marantae*)1种;温带成分的主要成分是东亚分布类型,多达166种,占非世界分布总种数的54.4%,是贡嘎山地区最主要的分布类型。东亚范围东至俄罗斯远东及日本、韩国,西至唐古特区、横断山区和青藏高原,南至泰国、老挝、越南北部。东亚分布又可以划分为3个变型:东亚广布(S-J-H型)、中国-日本(S-J型)、中国-喜马拉雅(S-H型)。东亚分布中又以中国-喜马拉雅分布数量最多,达100种,占非世界分布总种数的32.79%;其次为东亚广布,共53种,占非世界分布总种数的17%;最后为中国-日本分布,有14种,占非世界分布总种数的4.86%。



2. 泛热带分布; 3. 旧大陆热带分布; 4. 热带亚洲-热带大洋洲分布; 5. 热带亚洲-热带非洲分布; 6. 热带亚洲分布; 7. 中亚西亚至地中海分布; 8.1. 东亚广布; 8.2. 中国-日本; 8.3. 中国-喜马拉雅; 9. 东亚-北美间断分布; 10. 温带亚洲分布; 11. 北温带分布; 12. 中国特有。
2. Pantropic; 3. Old World Tropics; 4. Tropical Asia to Tropical Australasia; 5. Tropical Asia to Tropical Africa; 6. Tropical Asia; 7. Mediterranean, West to Central Asia; 8.1. S-J-H; 8.2. S-J; 8.3. S-H; 9. E. Asia & N. America Disjunction; 10. Temperate Asia; 11. North temperate; 12. Endemic to China.

图 1 贡嘎山石松类和蕨类植物分布区类型占比
Fig. 1 Percentage of distribution types of lycophytes and ferns in Gongga Mountain

中国特有分布类型在该地区计100种,占非世界分布总种数的32.79%,如峨眉石杉(*Huperzia emeiensis*)、康定石杉(*H. kangdingensis*)、高寒水韭、小叶中国蕨、川西金毛裸蕨(*Paragymnopteris bipinnata*)、峨眉蹄盖蕨(*Athyrium omeiense*)等。

R/T值是植物区系中热带成分与温带成分的比值,可以从大体上衡量区系的性质(彭华,1996)。R/T值的动态变化可以反映不同地区植物区系随着气候变化的发生规律。在相似纬度、相似海拔地区,一个地区的R/T值越高,其热带成分就越高,气候也更加温暖湿润。贡嘎山的R/T值为0.076<1,表明该地区温带成分占明显优势,具有强烈的温带性质。

3.3 石松类和蕨类植物的海拔分布

物种多样性随海拔的变化规律一直是高山植物区系的研究重点。例如:Whittaker & Niering (1975)对美国亚利桑那州的圣塔卡特岭娜山的研究发现,中海拔地段物种多样性最高;王志恒等(2004)通过对高黎贡山种子植物物种丰富度海拔梯度的变化研究发现,不同类群植物丰富度随

海拔的升高先迅速增高,后缓慢下降,中海拔区段物种丰富度最高。

统计贡嘎山不同海拔区段石松类和蕨类植物分布数量,由图 2 可知,在 1 000~1 500 m 海拔区段,石松类和蕨类植物分布数量较少,随着海拔的升高,分布数量也随之增加;在 2 000~3 000 m 海拔区段数量最多,共分布有 20 科 46 属 192 种,占总种数的 60.8%,说明该区段物种多样性最高。随着海拔升高至 3 000 m 以上,石松类和蕨类植物分布数量开始缓慢下降;在海拔 4 500 m 最低,仅有 4 种,即稀叶珠蕨、栗柄岩蕨 (*Woodsia cycloloba*)、玉龙蕨和穆坪耳蕨 (*Polystichum moupinense*),其中除穆坪耳蕨一般生于高山草甸外,其余均为岩生植物。

我们选择区系代表性明显的中国-喜马拉雅成分(S-H)分布型,对其在贡嘎山不同海拔区段分布数量进行统计分析,结果表明 S-H 成分数量随着海拔升高而逐渐增加,在海拔区段 2 500~3 000 m 物种数量最多,随后开始缓慢下降(图 3,图 4)。

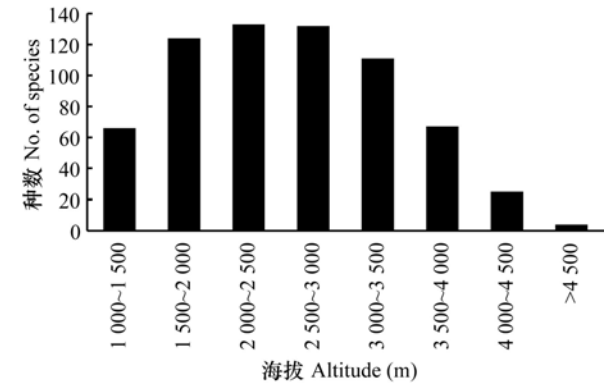


图 2 不同海拔梯度石松类和蕨类植物物种数量
Fig. 2 Number of species of lycophytes and ferns at different altitudinal zones

4 讨论与结论

本研究区系分析表明,贡嘎山地区的石松类和蕨类植物的地理成分主要为东亚分布,东亚分布成分中又以中国-喜马拉雅分布成分占比最大。这与贡嘎山地区种子植物区系的研究结果基本一致(伍杰等,2012),表明本地区与喜马拉雅地区的石松类和蕨类植物区系具有较近的地理亲缘。

本研究物种的垂直分布分析显示,贡嘎山石松类和蕨类植物在垂直分布上呈现出先增加后减

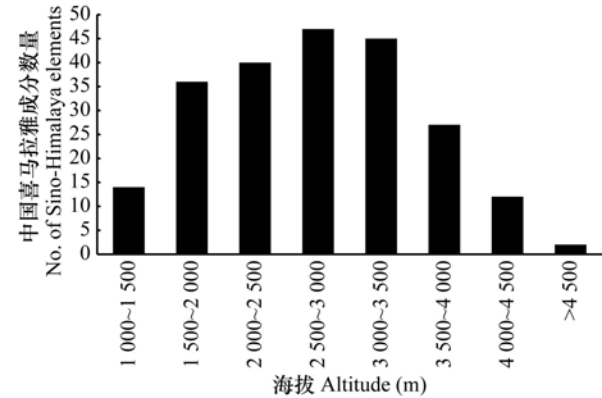


图 3 不同海拔梯度中国-喜马拉雅成分数量
Fig. 3 Number of Sino-Himalaya elements at different altitudinal zones

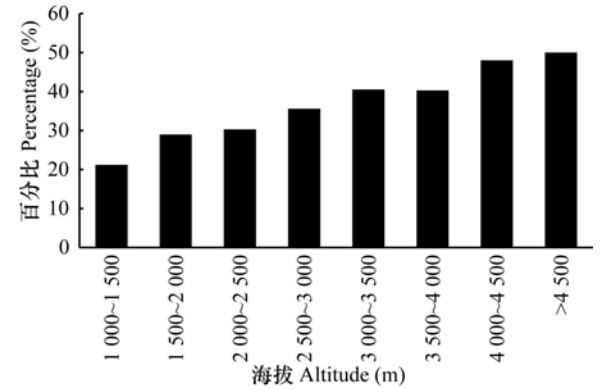


图 4 不同海拔梯度中国-喜马拉雅成分占比
Fig. 4 Percentage of Sino-Himalaya elements at different altitudinal zones

少的特点,在 2 000~3 000 m 的海拔段上物种数目最为丰富。中国-喜马拉雅成分的物种在垂直分布上也呈现出相似的变化规律,说明贡嘎山中海拔地段更适合石松类和蕨类植物生长,这可能是由于与低海拔和高海拔相比,中海拔的热量和水分环境都更充足。因此,中海拔地段物种丰富度最高。

贡嘎山地区之前报道的蕨类植物多达 40 科 93 属 399 种(孔宪需和张丽兵,1996),而本研究统计的结果是 26 科 60 属 316 种,二者相差悬殊。科、属数目相差较大的原因主要在于本文采用的是 PPG I (2016) 分类系统,而孔宪需和张丽兵(1996)采用的是秦仁昌分类系统。在 PPG I 系统里,科和属概念发生了很大的改变,如阴地蕨科被并入瓶尔小草科,中国蕨科、铁线蕨科、裸子蕨科

和书带蕨科被并入凤尾蕨科,蕨科被并入碗蕨科,以及槲蕨科、剑蕨科、睫毛蕨科被并入水龙骨科;中国蕨属被归入粉背蕨属,水鳖蕨属被归入铁角蕨属,滇蕨属被归入岩蕨属等。前后两次统计的物种数目相差较大,应归咎于标本的不同鉴定以及一些物种概念已经发生了改变,如睫毛卷柏(*Selaginella jugorum*)是松穗卷柏(*S. laxistrobila*)的错误鉴定,毛叶铁角蕨(*Asplenium praemorsum*)归并到西南铁角蕨(*A. aethiopicum*)以及泸定蹄盖蕨(*Athyrium ludingense*)应该是川滇蹄盖蕨(*A. mackinnonii*)的异名等等。

致谢 本项目得到贡嘎山保护区维管植物本底调查和贡嘎山国家自然保护区专项科研经费的资助,感谢中国科学院植物研究所的朱相云研究员、张树仁副研究员在野外考察、标本采集等方面提供的帮助和建议。

参考文献:

- BROWN JH, 2001. Mammals on mountain sides: elevational patterns of diversity [J]. *Global Ecol Biogeogr*, 10(1): 101-109.
- BOUFFORD DE, 2014. Biodiversity hotspot: China's Hengduan Mountains [J]. *Arnoldia*, 72(1): 24-35.
- DING WN, REE RH, SPICER RA, et al., 2020. Ancient orogenic and monsoon-driven assembly of the world's richest temperate alpine flora [J]. *Science*, 369(6503): 578-581.
- DONG SY, ZUO ZY, YAN YH, et al., 2017. Red list assessment of lycophytes and ferns in China [J]. *Biodivers Sci*, 25(7): 765-773. [董仕勇, 左裕政, 严岳鸿, 等, 2017. 中国石松类和蕨类植物的红色名录评估 [J]. *生物多样性*, 25(7): 765-773.]
- FENG JM, XU CD, 2008. Floristic equilibrium point and its biogeographic significance [J]. *Acta Bot Yunnan*, 30(4): 400-404. [冯建孟, 徐成东, 2008. 植物区系平衡点及其生物地理意义 [J]. *云南植物研究*, 30(4): 400-404.]
- GOOD R, 1974. The geography of the flowering plants [M]. London: Longman Publishing Group.
- KONG XX(KUNG HS), ZHANG LB, 1996. The features of the pteridophytic flora of Mt. Gongga (Minya Gonkar), Sichuan, China [J]. *Acta Bot Yunnan*, 18(2): 176-184. [孔宪需, 张丽兵, 1996. 贡嘎山蕨类植物区系的特点 [J]. *云南植物研究*, 18(2): 176-184.]
- KONG XX(KUNG HS), 1984. The phytogeographical features of pteridophytes of Sichuan, China with some remarks on the "Polysticho-Dryopteris flora" [J]. *Acta Bot Yunnan*, 6(1):

- 27-38. [孔宪需, 1984. 四川蕨类植物地理特点兼论“耳蕨-鳞毛蕨类植物区系” [J]. *云南植物研究*, 6(1): 27-38.]
- KONG XX (KUNG HS), GAO BC, FANG WP, et al., 1988. *Flora Sichuanica* (Vol.6) [M]. Chengdu: Sichuan Science & Technology Publishing House: 410. [孔宪需, 高宝纯, 方文培, 等, 1988. *四川植物志* (第6卷) [M]. 成都: 四川科学技术出版社: 410.]
- LI RN, DU F, LI YQ, et al., 2013. Altitudinal distribution pattern of seed plant diversity in Shangri-la County [J]. *J SW For Univ*, 33(6): 13-18. [李瑞年, 杜凡, 李云琴, 等, 2013. 香格里拉县种子植物多样性海拔分布格局 [J]. *西南林业大学学报*, 33(6): 13-18.]
- LI XH, ZHU XX, NIU Y, et al., 2014. Phylogenetic clustering and overdispersion for alpine plants along elevational gradient in the Hengduan Mountains Region, Southwest China [J]. *J Syst Evol*, 52(3): 280-288.
- LI XW, LI J, 1993. A preliminary floristic study on the seed plants from the region of Hengduan Mountain [J]. *Acta Bot Yunnan*, 15(3): 217-231. [李锡文, 李捷, 1993. 横断山脉地区种子植物区系的初步研究 [J]. *云南植物研究*, 15(3): 217-231.]
- LI WH, ZHOU XM, SHI PL, 1998. Ecosystem distribution pattern and its relation to hydrothermal factors in Qinghai-Xizang (Tibetan) Plateau// [M] LI WH, ZHOU XM. *Ecosystem of Qinghai-Xizang (Tibetan) Plateau and approach for their sustainable management*. Guangzhou: Guangdong Science & Technology Press: 19-28. [李文华, 周兴民, 石培礼, 1998. 青藏高原生态系统分布格局及其与水热因子的关系 [M]//李文华, 周兴民. *青藏高原生态系统及优化利用模式*. 广州: 广东科技出版社: 19-28.]
- LU SG, 2004. *Advances in Plant Science* (Vol. 6) [M]. Beijing: Higher Education Press: 29-42. [陆树刚, 2004. *植物科学进展* (第六卷) [M]. 北京: 高等教育出版社: 29-42.]
- PENG H, 1996. The floristic equilibrium point of seed plants in Mt. Wuliangshan [J]. *Acta Bot Yunnan*, 18(4): 385-397. [彭华, 1996. 无量山种子植物的区系平衡点 [J]. *云南植物研究*, 18(4): 385-397.]
- PPG, 2016. A community-derived classification for extant lycophytes and ferns [J]. *J Syst Evol*, 54(6): 563-603.
- SHEN ZH, FANG JY, LIU ZL, et al., 2001. Patterns of biodiversity along the vertical vegetation spectrum of the east aspect of Gongga Mountain [J]. *Acta Phytocool Sin*, 25(6): 721-732. [沈泽昊, 方精云, 刘增力, 等, 2001. 贡嘎山东坡植被垂直带谱的物种多样性格局分析 [J]. *植物生态学报*, 25(6): 721-732.]
- WANG WC(WT), WU SG, LANG KY, et al., 1993. *Vascular*

- plants of the Hengduan Mountains [M]. Beijing: Beijing Science Press: 1–185. [王文采, 武素功, 郎楷永, 等, 1993. 横断山区维管植物 [M]. 北京: 北京科学出版社: 1–185.]
- WANG ZH, CHEN AP, PIAO SL, et al., 2004. Pattern of species richness along an altitudinal gradient on Gaoligong Mountains, Southwest China [J]. Biodivers Sci, 12 (1): 82–88. [王志恒, 陈安平, 朴世龙, 等, 2004. 高黎贡山种子植物物种丰富度沿海拔梯度的变化 [J]. 生物多样性, 12(1): 82–88.]
- WHITTAKER RH, NIERING WA, 1975. Vegetation of the Santa Catalina Mountains, Arizona. V. Biomass, production and biodiversity along an elevational gradient [J]. Ecology, 56 (4): 771–790.
- WU J, YIN XM, LIU ZF, et al., 2012. Research on seed plant flora in Gongga Mountain Nature Reserve [J]. J Sichuan For Sci Technol, 33(1): 46–49. [伍杰, 尹学明, 刘兆发, 等, 2012. 贡嘎山自然保护区种子植物区系研究 [J]. 四川林业科技, 33(1): 46–49.]
- WU ZY, SUN H, ZHOU ZK, et al., 2011. Floristics of seed plants from China [M]. Beijing: Science Press: 1–492. [吴征镒, 孙航, 周浙昆, 等, 2011. 中国种子植物区系地理 [M]. 北京: 科学出版社: 1–492.]
- WU ZY, ZHOU ZK, SUN H, et al., 2006. The areal-types of seed plants and their origin and differentiation [M]. Kunming: Yunnan Science & Technology Press: 1–145. [吴征镒, 周浙昆, 孙航, 等, 2006. 种子植物分布区类型及其起源和分化 [M]. 昆明: 云南科技出版社: 1–145.]
- WU ZY, RAVEN P, HONG DY, 2013. Flora of China (Vol. 2–3) (Pteridophytes) [M]. Beijing: Science Press; St. Louis: Missouri Botanical Garden Press.
- YING JS (TS), ZHANG ZS, 1984. Endemism in the flora of China—studies on the endemic genera [J]. Acta Phytotax Sin, 22(4): 259–268. [应俊生, 张志松, 1984. 中国植物区系的特有现象—特有属的研究 [J]. 植物分类学报, 22(4): 259–268.]
- ZHAO CF, WEI R, ZHANG XC, et al., 2019. Backbone phylogeny of *Lepisorus* (Polypodiaceae) and a novel infrageneric classification based on the total evidence from plastid and morphological data [J]. Cladistics, 36: 235–258.
- ZHONG XH, 1998. Ecological characteristics and effects of natural environments in Qinghai-Xizang (Tibetan) Plateau [M]//LI WH, ZHOU XM. Ecosystem of Qinghai-Xizang (Tibetan) Plateau and approach for their sustainable management. Guangzhou: Guangdong Science & Technology Press: 1–18. [钟祥浩, 1998. 青藏高原自然生态环境特征与生态效应 [M]//李文华, 周兴民. 青藏高原生态系统及优化利用模式. 广州: 广东科技出版社: 1–18.]
- ZHOU XL, ZHANG XC, SUN JQ, et al., 2016. Diversity and distribution of lycophytes and ferns in China [J]. Biodivers Sci, 24(1): 102–107. [周喜乐, 张宪春, 孙久琼, 等, 2016. 中国石松类和蕨类植物的多样性与地理分布 [J]. 生物多样性, 24(1): 102–107.]

(责任编辑 蒋巧媛)

本文附表请到本刊网站 (http://www.guihaia-journal.com/ch/reader/create_pdf.aspx?file_no=220207&year_id=2022&quarter_id=2&falg=1) 下载。

附表 1 贡嘎山石松类和蕨类植物名录

Appendix table 1 Lycophytes and ferns list of Gongga Mountain

科名 Family	属名 Genus	种名 Species	引证标本/引证书籍 Specimen/Literature	
石松科 Lycopodiaceae	石杉属 <i>Huperzia</i>	中华石杉 <i>Huperzia chinensis</i>	张丽兵 2021(CDBI)	
		皱边石杉 <i>H. crispata</i>	胡文光 1418(SZ)	
		峨眉石杉 <i>H. emeiensis</i>	张丽兵 1096(CDBI)	
		锡金石杉 <i>H. herteriana</i>	张丽兵 1041(CDBI)	
		康定石杉 <i>H. kangdingensis</i>	黄治平 1777(NAS)	
		雷波石杉 <i>H. laipoensis</i>	朱大海 3922(HX)	
	石松属 <i>Lycopodium</i>	成层石松 <i>Lycopodium zonatum</i>	Harry Smith 11522(PE)	
		石松 <i>L. japonicum</i>	谢朝俊 41408(PE)	
		玉柏 <i>L. obscurum</i>	刘志安、陈洪 22590(CDBI)	
		多穗石松 <i>L. annotinum</i>	* 张宪春、蒋日红、黄尔峰 9029(PE)	
		扁枝石松 <i>L. complanatum</i>	植被组 32064(CDBI)	
		矮小扁枝石松 <i>L. veitchii</i>	* 张树仁、赵以民、张中帅 1896(PE)	
		卷柏科 Selaginellaceae	卷柏属 <i>Selaginella</i>	狭叶卷柏 <i>Selaginella mairei</i>
红枝卷柏 <i>S. sanguinolenta</i>	关克俭、王文采等 929(PE)			
鞘舌卷柏 <i>S. vaginata</i>	X.C.Zhang & L.Shi 979(PE)			
块茎卷柏 <i>S. chrysocaulos</i>	郎楷永、李良千、费勇 583(PE)			
兖州卷柏 <i>S. involvens</i>	植被组 25152(CDBI)			
垫状卷柏 <i>S. pulvinata</i>	X.C.Zhang & L.Shi 982(PE)			
松穗卷柏 <i>S. laxistrobila</i>	关克俭、王文采等 948(PE)			
细叶卷柏 <i>S. labordei</i>	X.C.Zhang & L.Shi 966(PE)			
异穗卷柏 <i>S. heterostachys</i>	T.P.Wang 9777(PE)			
小卷柏 <i>S. helvetica</i>	* 张宪春 6933(PE)			
细瘦卷柏 <i>S. vardei</i>	* 张宪春 901(PE)			
膜叶卷柏 <i>S. leptophylla</i>	* 张树仁、赵以民、张中帅 1851(PE)			
水韭科 Isoëtaceae	水韭属 <i>Isoëtes</i>			高寒水韭 <i>Isoëtes hypsophila</i>
木贼科 Equisetaceae	木贼属 <i>Equisetum</i>	问荆 <i>Equisetum arvense</i>	黄治平、罗正远、蒋卓然 1044(PE)	
		披散木贼 <i>E. diffusum</i>	郎楷永、李良千、费勇 519(KUN)	
		犬问荆 <i>E. palustre</i>	郎楷永、李良千、费勇 495(KUN)	
		斑纹木贼 <i>E. variegatum</i>	刘志安、陈洪 22279(CDBI)	
		笔管草 <i>E. ramosissimum</i> subsp. <i>debile</i>	应俊生 3538(PE)	
		节节草 <i>E. ramosissimum</i>	四川植被队 05312(CDBI)	
		松叶蕨科 Psilotaceae	松叶蕨属 <i>Psilotum</i>	松叶蕨 <i>Psilotum nudum</i>
瓶尔小草科 Ophioglossaceae	阴地蕨属 <i>Botrychium</i>	扇羽阴地蕨 <i>Botrychium lunaria</i>	魏太昌 20935(CDBI)	
		绒毛阴地蕨 <i>B. lanuginosum</i>	应俊生 4672(PE)	
瓶尔小草科 Ophioglossaceae	瓶尔小草属 <i>Ophioglossum</i>	柄叶瓶尔小草 <i>Ophioglossum petiolatum</i>	刘照光 4654(CDBI)	
		紫萁科 Osmundaceae	桂皮紫萁属 <i>Osmundastrum</i>	桂皮紫萁 <i>Osmundastrum cinnamomeum</i>
	紫萁属 <i>Osmunda</i>	绒紫萁属 <i>Claytosmunda</i>	绒紫萁 <i>Claytosmunda claytoniana</i>	J.I.Jeon et al. 1426(PE)
		紫萁属 <i>Osmunda</i>	紫萁 <i>Osmunda japonica</i>	植被组 25158(CDBI)

续附表 1

科名 Family	属名 Genus	种名 Species	引证标本/引证书籍 Specimen/Literature
膜蕨科 Hymenophyllaceae	膜蕨属 <i>Hymenophyllum</i>	华东膜蕨 <i>Hymenophyllum barbatum</i>	郎楷永、李良千、费勇 392(KUN)
		皱叶落蕨 <i>H. corrugatum</i>	郎楷永、李良千、费勇 311(PE)
		长柄落蕨 <i>H. polyanthos</i>	郎楷永、李良千、费勇 392(PE)
		宽片膜蕨 <i>H. simonsianum</i>	* 张宪春、曲上、黄尔峰 9480(PE)
里白科 Gleicheniaceae	里白属 <i>Diplazium</i>	里白 <i>Diplazium glaucum</i>	《四川植物志》第 6 卷
瘤足蕨科 Plagiogyriaceae	瘤足蕨属 <i>Plagiogyria</i>	粉背瘤足蕨 <i>Plagiogyria glauca</i>	* 张宪春、曲上、黄尔峰 9468(PE)
桫欏科 Cyatheaceae	桫欏属 <i>Alsophila</i>	桫欏 <i>Alsophila spinulosa</i>	* 张宪春、曲上、黄尔峰 9471(PE)
鳞始蕨科 Lindsaeaceae	乌蕨属 <i>Odontosoria</i>	乌蕨 <i>Odontosoria chinensis</i>	邓懋彬 476(NAS)
碗蕨科 Pteridiaceae	蕨属 <i>Pteridium</i>	蕨 <i>Pteridium aquilinum</i> var. <i>latiusculum</i>	胡文光 11543(WUK)
		毛轴蕨 <i>P. revolutum</i>	赵清盛 7601(SZ)
凤尾蕨科 Pteridaceae	稀子蕨属 <i>Monachosorum</i>	稀子蕨 <i>Monachosorum henryi</i>	刘志安 22873(IBSC)
	珠蕨属 <i>Cryptogramma</i>	稀叶珠蕨 <i>Cryptogramma stelleri</i>	刘振书 1408(SZ)
		高山珠蕨 <i>C. brunoniana</i>	* 张宪春 蒋日红 黄尔峰 8980(PE)
		珠蕨 <i>C. raddeana</i>	郭晓思、张丽兵 2250(WUK)
	凤尾蕨属 <i>Pteris</i>	井栏边草 <i>Pteris multifida</i>	孔宪需 051(PE)
		猪鬃凤尾蕨 <i>P. actinopteroides</i>	四川省植被组 23691(QTPMB)
		指叶凤尾蕨 <i>P. dactylina</i>	X.C.Zhang & L.Shi 970965(PE)
		刺齿半边旗 <i>P. dispar</i>	宋滋圃 12503(SZ)
		蜈蚣草 <i>P. vittata</i>	陈庆恒 4542(PE)
		欧洲凤尾蕨 <i>P. cretica</i>	周鹤昌 580(PE)
		狭叶凤尾蕨 <i>P. henryi</i>	X.C.Zhang & L.Shi 918(PE)
		西南凤尾蕨 <i>P. wallichiana</i>	祝文志 2356(CCAU)
	粉背蕨属 <i>Aleuritopteris</i>	银粉背蕨 <i>Aleuritopteris argentea</i>	张钢民 253(PE)
		华北粉背蕨 <i>A. kuhni</i>	张钢民 261(PE)
		薄叶粉背蕨 <i>A. leptolepis</i>	X.C.Zhang & L.Shi 961(PE)
		裸叶粉背蕨 <i>A. duclouxii</i>	X.C.Zhang & L.Shi 981(PE)
		陕西粉背蕨 <i>A. argentea</i> var. <i>obscura</i>	孔宪需 6277(CDBI)
		阔盖粉背蕨 <i>A. grisea</i>	董建 29557(CDBI)
		小叶中国蕨 <i>A. albofusca</i>	张钢民 243(PE)
		丽江粉背蕨 <i>A. likiangensis</i>	张宪春 NA(PE)
		绒毛粉背蕨 <i>A. subvillosa</i>	孔宪需 6061(CDBI)
		阔羽粉背蕨 <i>A. tamburii</i>	王清泉 22493(CDBI)
		莲座粉背蕨 <i>A. rosulata</i>	张钢民 257(PE)
	金粉蕨属 <i>Onychium</i>	木坪金粉蕨 <i>Onychium moupinense</i>	Harry Smith 13348(PE)
		蚀盖金粉蕨 <i>O. tenuifrons</i>	王文采等 1528(PE)
		黑足金粉蕨 <i>O. cryptogrammoides</i>	王清泉 21414(CDBI)
		野雉尾金粉蕨 <i>O. japonicum</i>	应俊生 4665(PE)
		栗柄金粉蕨 <i>O. lucidum</i>	刘照光 4656(PE)
		大理碎米蕨 <i>Cheilanthes hancockii</i>	四川省植被队 05316(CDBI)

续附表 1

科名 Family	属名 Genus	种名 Species	引证标本/引证书籍 Specimen/Literature
冷蕨科 Cystopteridaceae	铁线蕨属 <i>Adiantum</i>	旱蕨 <i>C. nitidula</i>	王文采等 1357(PE)
		西南旱蕨 <i>C. smithii</i>	X.C.Zhang & L.Shi 957(PE)
		云南旱蕨 <i>C. bhutanica</i>	孔宪需 6207(PE)
		凤尾旱蕨 <i>C. christii</i>	张钢民 260(PE)
		毛旱蕨 <i>C. trichophylla</i>	张钢民 266(PE)
		毛足铁线蕨 <i>Adiantum bonatianum</i>	应俊生 4689(PE)
		团羽铁线蕨 <i>A. capillus-junonis</i>	王文采等 1626(PE)
		铁线蕨 <i>A. capillus-veneris</i>	王文采等 1467(PE)
		白背铁线蕨 <i>A. davidii</i>	四川省植被队 05309(CDBI)
		月芽铁线蕨 <i>A. wattii</i>	王文采 1716(HIB)
		普通铁线蕨 <i>A. edgeworthii</i>	应俊生 4673(PE)
		峨嵋铁线蕨 <i>A. roborowskii</i> var. <i>faberi</i>	郭晓思 2107(WUK)
		长盖铁线蕨 <i>A. fimbriatum</i>	张钢民 267(PE)
		鞭叶铁线蕨 <i>A. caudatum</i>	* 张树仁、赵以民、张中帅 1862(PE)
		灰背铁线蕨 <i>A. myriosorum</i>	高贤明 06134(HX)
		掌叶铁线蕨 <i>A. pedatum</i>	刘振书 979(PE)
		陇南铁线蕨 <i>A. roborowskii</i>	郭晓思 2109(WUK)
		细叶铁线蕨 <i>A. venustum</i>	* 张树仁、赵以民、王继旋 1705(PE)
	书带蕨属 <i>Haplopteris</i>	书带蕨 <i>Haplopteris flexuosa</i>	D.E.Bofford et al. 33067(PE)
		平肋书带蕨 <i>H. fudzinoi</i>	胡孝宏 22071(CDBI)
	金毛裸蕨属 <i>Paragymnopteris</i>	滇西金毛裸蕨 <i>Paragymnopteris delavayi</i>	张钢民 268(PE)
		欧洲金毛裸蕨 <i>P. marantae</i>	应俊生 3417(PE)
		金毛裸蕨 <i>P. vestita</i>	王文采等 673(PE)
		川西金毛裸蕨 <i>P. bipinnata</i>	王文采等 1679(PE)
	凤了蕨属 <i>Coniogramme</i>	普通凤了蕨 <i>Coniogramme intermedia</i>	* 陈文俐、蒋善文、张中帅 1135(PE)
		尖齿凤了蕨 <i>C. affinis</i>	王清泉 22521(CDBI)
	冷蕨属 <i>Cystopteris</i>	皱孢冷蕨 <i>Cystopteris dickieana</i>	994 应俊生 3394(PE)
		冷蕨 <i>C. fragilis</i>	王文采等 1010(PE)
		高山冷蕨 <i>C. montana</i>	孔宪需 6042(PE)
		膜叶冷蕨 <i>C. pellucida</i>	孔宪需 6083(PE)
		宝兴冷蕨 <i>C. moupinensis</i>	王文采等 1268(PE)
	羽节蕨属 <i>Gymnocarpium</i>	东亚羽节蕨 <i>Gymnocarpium oyamense</i>	郭晓思 2624(WUK)
		羽节蕨 <i>G. jessoense</i>	张敦厚 497(PE)
铁角蕨科 Aspleniaceae	铁角蕨属 <i>Asplenium</i>	泸山铁角蕨 <i>Asplenium lushanense</i>	李安明等 1000346(PE)
		线柄铁角蕨 <i>A. capillipes</i>	石雷 968(PE)
		云南铁角蕨 <i>A. exiguum</i>	张宪春、石雷 055(PE)
		西北铁角蕨 <i>A. nesii</i>	应俊生 3362(PE)
		北京铁角蕨 <i>A. pekinense</i>	王文采等 110(PE)
		西南铁角蕨 <i>A. aethiopicum</i>	Harry Smith 13316(PE)

科名 Family	属名 Genus	种名 Species	引证标本/引证书籍 Specimen/Literature
金星蕨科 Thelypteridaceae	毛蕨属 <i>Cyclosorus</i>	卵叶铁角蕨 <i>A. ruta-muraria</i>	郭晓思 2110(WUK)
		华中铁角蕨 <i>A. sarelii</i>	王清泉 22050(CDBI)
		铁角蕨 <i>A. trichomanes</i>	Harry Smith 12828(PE)
		易变铁角蕨 <i>A. fugax</i>	* 张宪春、蒋日红、黄尔峰 8969(PE)
		细茎铁角蕨 <i>A. tenuicaule</i>	高贤明 G06151(WCSBG)
		变异铁角蕨 <i>A. varians</i>	刘振书 671(PE)
		渐尖毛蕨 <i>Cyclosorus acuminatus</i>	郭晓思 2670(WUK)
		方秆蕨 <i>C. erubescens</i>	孔宪需 6097(CDBI)
		粉红方秆蕨 <i>C. rufostramineus</i>	王清泉、刘志安、陈洪 22612(CDBI)
		披针新月蕨 <i>C. penangianus</i>	管中天 60164(PE)
		西南假毛蕨 <i>C. esquirolii</i>	应俊生 4684(PE)
		中日金星蕨 <i>Parathelypteris nipponica</i>	应俊生 4693(PE)
		延羽卵果蕨 <i>Phegopteris decursive-pinnata</i>	孔宪需 6133(CDBI)
		卵果蕨 <i>P. connectilis</i>	* 张宪春、卫然、于继高 10059(PE)
		禾秆紫柄蕨 <i>Pseudophegopteris microstegia</i>	《横断山区维管植物》
		星毛紫柄蕨 <i>P. levingei</i>	* 张宪春、向巧萍 6921(PE)
		光叶紫柄蕨 <i>P. pyrrhorhachis</i> var. <i>glabrata</i>	孔宪需 42249(PE)
		紫柄蕨 <i>P. pyrrhorhachis</i>	蒋卓然 1774(PE)
岩蕨科 Woodsiaceae	岩蕨属 <i>Woodsia</i>	康定岩蕨 <i>Woodsia kangdingensis</i>	郭晓思 2189(WUK)
		蜘蛛岩蕨 <i>W. andersonii</i>	郭晓思 2410(WUK)
		赤色岩蕨 <i>W. cinnamomea</i>	* 张树仁、赵以民、张中帅 1634(PE)
		栗柄岩蕨 <i>W. cycloloba</i>	* 张宪春、蒋日红、黄尔峰 8987(PE)
		密毛岩蕨 <i>W. rosthorniana</i>	应俊生 3364(PE)
蹄盖蕨科 Athyriaceae	角蕨属 <i>Cornopteris</i>	细齿角蕨 <i>Cornopteris crenulato-serrulata</i>	* 张宪春、卫然、于继高 10136(PE)
		日本安蕨 <i>Anisocampium niponicum</i>	孔宪需 6287(PE)
		大叶假冷蕨 <i>Athyrium atkinsonii</i>	孔宪需 6076(PE)
		坡生蹄盖蕨 <i>A. clivicola</i>	张丽兵、郭晓思 2055(WUK)
		希陶蹄盖蕨 <i>A. dentigerum</i>	胡文光 11137(WUK)
		毛翼蹄盖蕨 <i>A. dubium</i>	* 张宪春、向巧萍 6914(PE)
		方氏蹄盖蕨 <i>A. fangii</i>	* 张宪春、卫然 10132(PE)
		疏羽蹄盖蕨 <i>A. nephrodioides</i>	李全生 011(IMC)
		尖头蹄盖蕨 <i>A. vidalii</i>	* 张宪春、向巧萍 6916(PE)
		岩生蹄盖蕨 <i>A. rupicola</i>	* 张宪春、向巧萍 6935(PE)
		中华蹄盖蕨 <i>A. sinense</i>	张丽兵 2069(PE)
		华中蹄盖蕨 <i>A. wardii</i>	张丽兵、郭晓思 2055(WUK)
		睫毛盖假冷蕨 <i>A. schizochlamys</i>	植被组 29789(CDBI)
		三角叶假冷蕨 <i>A. subtriangulare</i>	黄治平 1827(NAS)
		鹿角蹄盖蕨 <i>A. araiostegioides</i>	* 张宪春、卫然、于继高 10164(PE)
		喜马拉雅蹄盖蕨 <i>A. fimbriatum</i>	* 张宪春、卫然、于继高 10150(PE)
		芽苞蹄盖蕨 <i>A. clarkei</i>	* 张宪春、卫然、于继高 10290(PE)

续附表 1

科名 Family	属名 Genus	种名 Species	引证标本/引证书籍 Specimen/Literature
		软刺蹄盖蕨 <i>A. strigillosum</i>	* 张宪春、卫然、于继高 10146(PE)
		俞氏蹄盖蕨 <i>A. yui</i>	* 向巧萍 NA(PE)
		峨眉蹄盖蕨 <i>A. omeiense</i>	* 张宪春、卫然、于继高 10270(PE)
		剑叶蹄盖蕨 <i>A. attenuatum</i>	* 张宪春、卫然、于继高 10250(PE)
		川滇蹄盖蕨 <i>A. mackinnonii</i>	* 张宪春 8997(PE)
		毛轴蹄盖蕨 <i>A. hirtirachis</i>	<i>Flora of China</i>
		湿生蹄盖蕨 <i>A. devoli</i>	* 张宪春、卫然、于继高 10117(PE)
		腺毛蹄盖蕨 <i>A. glandulosum</i>	* 张宪春、卫然、于继高 10317(PE)
		大卫假冷蕨 <i>A. davidii</i>	<i>Flora of China</i>
		华中对囊蕨 <i>Deparia shennongensis</i>	<i>Flora of China</i>
		大久保对囊蕨 <i>D. okuboana</i>	孔宪需 6095(PE)
		毛叶对囊蕨 <i>D. petersenii</i>	关克俭、王文采 1387(PE)
		九龙对囊蕨 <i>D. jiulongensis</i>	<i>Flora of China</i>
		六巴对囊蕨 <i>D. acuta</i> var. <i>liubaensis</i>	<i>Flora of China</i>
		泸定对囊蕨 <i>D. ludingensis</i>	<i>Flora of China</i>
		峨山对囊蕨 <i>D. wilsonii</i> var. <i>wilsoni</i>	<i>Flora of China</i>
		鄂西对囊蕨 <i>D. henryi</i>	X.C.Zhang et al. 932(PE)
		陕西对囊蕨 <i>D. giraldii</i>	孔宪需 6015(PE)
		大型短肠蕨 <i>Diplazium giganteum</i>	孔宪需 41539(SZ)
		鳞柄短肠蕨 <i>D. squamigerum</i>	关克俭、王文采 1387(PE)
球子蕨科 Onocleaceae	荚果蕨属 <i>Matteuccia</i>	荚果蕨 <i>Matteuccia struthopteris</i>	《横断山区维管植物》
	东方荚果蕨属 <i>Pentarhizidium</i>	中华荚果蕨 <i>Pentarhizidium intermedium</i>	* 张宪春、向巧萍 6913(PE)
乌毛蕨科 Blechnaceae	狗脊属 <i>Woodwardia</i>	顶芽狗脊 <i>Woodwardia unigemmata</i>	应俊生 3394(PE)
肿足蕨科 Hypodematiaceae	肿足蕨属 <i>Hypodematium</i>	肿足蕨 <i>Hypodematium crenatum</i>	X.C.Zhang & L.Shi 953(PE)
		光轴肿足蕨 <i>H. hirsutum</i>	应俊生 3489(PE)
鳞毛蕨科 Dryopteridaceae	复叶耳蕨属 <i>Arachniodes</i>	西南复叶耳蕨 <i>Arachniodes assamica</i>	* 张宪春、曲上、黄尔峰 9465(PE)
		华西复叶耳蕨 <i>A. simulans</i>	孔宪需 42545(HHBG)
	贯众属 <i>Cyrtomium</i>	刺齿贯众 <i>Cyrtomium caryotideum</i>	应俊生 4762(PE)
		贯众 <i>C. fortunei</i>	王文采等 1378(PE)
		小羽贯众 <i>C. lonchitoides</i>	四川省植被队 05277(CDBI)
		大叶贯众 <i>C. macrophyllum</i>	王清泉 22159(CDBI)
	鳞毛蕨属 <i>Dryopteris</i>	尖齿鳞毛蕨 <i>Dryopteris acutodentata</i>	李全生 0011(PE)
		华北鳞毛蕨 <i>D. goeringiana</i>	王清泉 22485(CDBI)
		豫陕鳞毛蕨 <i>D. pulcherrima</i>	孔宪需 6253(PE)
		多鳞鳞毛蕨 <i>D. barbiger</i>	李全生 016(IMC)
		金冠鳞毛蕨 <i>D. chrysocoma</i>	孔宪需 6062(CBDI)
		粗茎鳞毛蕨 <i>D. crassirhizoma</i>	四川省药普查队 16134(NAS)
		硬果鳞毛蕨 <i>D. fructuosa</i>	X.C.Zhang et al. 962(PE)
		粗齿鳞毛蕨 <i>D. juxtaposita</i>	谢朝俊 40569(PE)

续附表 1

科名 Family	属名 Genus	种名 Species	引证标本/引证书籍 Specimen/Literature
		近多鳞鳞毛蕨 <i>D. komarovii</i>	李全生 006 (IMC)
		脉纹鳞毛蕨 <i>D. lachoongensis</i>	孔宪需 1847 (CDBI)
		阔基鳞毛蕨 <i>D. latibasis</i>	张丽兵 983 (CDBI)
		大果鳞毛蕨 <i>D. panda</i>	张丽兵 1484 (CDBI)
		大羽鳞毛蕨 <i>D. wallichiana</i>	* 陈文俐、蒋善文、张中帅 932 (PE)
		密鳞鳞毛蕨 <i>D. pycnopteroides</i>	谢朝俊 41036 (PE)
		藏布鳞毛蕨 <i>D. redactopinnata</i>	孔宪需 6186 (CDBI)
		川西鳞毛蕨 <i>D. rosthornii</i>	刘志安 22118 (CDBI)
		纤维鳞毛蕨 <i>D. sinofibrillosa</i>	王文采等 676 (PE)
		褐鳞鳞毛蕨 <i>D. squamifera</i>	应俊生 3699 (PE)
		稀羽鳞毛蕨 <i>D. sparsa</i>	祝文志 2359 (CCAU)
		半育鳞毛蕨 <i>D. sublacera</i>	应俊生 4797 (CDBI)
		无柄鳞毛蕨 <i>D. submarginata</i>	四川省植被队 05285 (CDBI)
		膜边鳞毛蕨 <i>D. clarkei</i>	* 张宪春、蒋日红、黄尔峰 8858 (PE)
		陇蜀鳞毛蕨 <i>D. thibetica</i>	王清泉 22156 (CDBI)
		泡鳞鳞毛蕨 <i>D. kawakamii</i>	* 张宪春、曲上、黄尔峰 9483 (PE)
	耳蕨属 <i>Polystichum</i>	玉龙蕨 <i>Polystichum glaciale</i>	<i>Flora of China</i>
		小狭叶芽胞耳蕨 <i>P. atkinsonii</i>	黄治平、罗正远、蒋卓然 1779 (PE)
		尖头耳蕨 <i>P. acutipinnulum</i>	孔宪需 6043 (CDBI)
		刺叶耳蕨 <i>P. acanthophyllum</i>	* 张宪春、蒋日红、黄尔峰 (8824)
		巴郎耳蕨 <i>P. balansae</i>	郭晓思 782 (WUK)
		布朗耳蕨 <i>P. braunii</i>	郎楷永、李良千、费勇 391 (PE)
		薄叶耳蕨 <i>P. bakerianum</i>	应俊生 4092 (PE)
		喜马拉雅耳蕨 <i>P. garhwalicum</i>	四川植被队 05283 (CDBI)
		栗鳞耳蕨 <i>P. castaneum</i>	刘正宇 014 (IMC)
		涪陵耳蕨 <i>P. consimile</i>	李全生 017 (IMC)
		华北耳蕨 <i>P. craspedosorum</i>	《横断山区维管植物》
		轴果耳蕨 <i>P. costularisorum</i>	刘志安 22262 (CDBI)
		对生耳蕨 <i>P. deltodon</i>	高贤明 06132 (HX)
		缺耳耳蕨 <i>P. exauriforme</i>	张丽兵 2847 (CDBI)
		寒生耳蕨 <i>P. frigidicola</i>	* 张宪春、蒋日红、黄尔峰 9026 (PE)
		工布尔蕨 <i>P. gongboense</i>	王文采等 1401 (PE)
		草叶耳蕨 <i>P. herbaceum</i>	K.L.Chu 6042 (PE)
		康定耳蕨 <i>P. kangdingense</i>	孔宪需 6122 (PE)
		猫儿刺耳蕨 <i>P. stimulans</i>	<i>Flora of China</i>
		尼泊尔耳蕨 <i>P. nepalense</i>	<i>Flora of China</i>
		高山耳蕨 <i>P. otophorum</i>	<i>Flora of China</i>
		刚毛耳蕨 <i>P. setillosum</i>	<i>Flora of China</i>
		基芽耳蕨 <i>P. capillipes</i>	<i>Flora of China</i>

续附表 1

科名 Family	属名 Genus	种名 Species	引证标本/引证书籍 Specimen/Literature
		长刺耳蕨 <i>P. longispinosum</i>	<i>Flora of China</i>
		芒刺耳蕨 <i>P. hecatopteron</i>	<i>Flora of China</i>
		蚀盖耳蕨 <i>P. erosum</i>	《横断山区维管植物》
		拉钦耳蕨 <i>P. lachenense</i>	* 张宪春、卫然、于继高 11045 (PE)
		亮叶耳蕨 <i>P. lanceolatum</i>	《横断山区维管植物》
		中华耳蕨 <i>P. sinense</i>	李伟 6895 (CDBI)
		乌柄耳蕨 <i>P. melanostipes</i>	《横断山区维管植物》
		毛叶耳蕨 <i>P. mollissimum</i>	孔宪需、李伟、吕发强 6903 (CDBI)
		伴藓耳蕨 <i>P. muscicola</i>	<i>Flora of China</i>
		穆坪耳蕨 <i>P. moupinense</i>	植被组 31586 (CDBI)
		黛鳞耳蕨 <i>P. nigrum</i>	<i>Flora of China</i>
		革叶耳蕨 <i>P. neolobatum</i>	高贤明 06130 (HX)
		昌都耳蕨 <i>P. qamdoense</i>	郎楷永、李良千、费勇 779 (PE)
		红鳞耳蕨 <i>P. rufopaleaceum</i>	郎楷永、李良千、费勇 379 (PE)
		陕西耳蕨 <i>P. shensiense</i>	王文采等 1086 (PE)
		密鳞耳蕨 <i>P. squarrosum</i>	四川省植被队 05283 (CDBI)
		狭叶芽胞耳蕨 <i>P. stenophyllum</i>	郎楷永、李良千、费勇 390 (PE)
		秦岭耳蕨 <i>P. submite</i>	孔宪需 6074 (PE)
		尾叶耳蕨 <i>P. thomsonii</i>	王清泉、刘志安 22226 (CDBI)
		长羽芽胞耳蕨 <i>P. attenuatum</i>	* 张宪春、曲上、黄尔峰 9464 (PE)
		印西耳蕨 <i>P. mehrae</i>	* 张宪春、曲上、黄尔峰 9033 (PE)
		对马耳蕨 <i>P. tsus-simense</i>	管中天 60167 (PE)
肾蕨科 Nephrolepidaceae	肾蕨属 <i>Nephrolepis</i>	肾蕨 <i>Nephrolepis cordifolia</i>	方文培 12502 (SXZ)
骨碎补科 Davalliaceae	骨碎补属 <i>Davallia</i>	宿枝小膜盖蕨 <i>Davallia hookeri</i>	谢朝俊 42607 (PE)
		鳞轴小膜盖蕨 <i>D. perdurans</i>	植被组 31939 (CDBI)
		美小膜盖蕨 <i>D. pulchra</i>	* 张宪春、向巧萍 6940 (PE)
		褐柄剑蕨 <i>Loxogramme duclouxii</i>	孔宪需 6163 (CDBI)
		中华剑蕨 <i>L. chinensis</i>	应俊生 4784 (PE)
	连珠蕨属 <i>Aglaomorpha</i>	秦岭槲蕨 <i>Aglaomorpha baronii</i>	郭晓思 2542 (WUK)
		川滇槲蕨 <i>A. delavayi</i>	* 张宪春、向巧萍 6935 (PE)
		槲蕨 <i>A. fortunei</i>	谢朝俊 40785 (PE)
		石莲姜槲蕨 <i>A. propinqua</i>	孔宪需 6271 (PE)
		节肢蕨 <i>Selliguea lehmannii</i>	郭晓思 814 (WUK)
		狭羽节肢蕨 <i>S. tenuicauda</i>	郭晓思 2615 (WUK)
		琉璃节肢蕨 <i>S. himalayensis</i>	* 张宪春、曲上、黄尔峰 (9458)
		多羽节肢蕨 <i>S. mairei</i>	王清泉 21445 (CDBI)
		交连假瘤蕨 <i>S. conjuncta</i>	郎楷永、李良千、费勇 431 (PE)
		尖裂假瘤蕨 <i>S. oxyloba</i>	王文采等 1743 (PE)
		刺齿假瘤蕨 <i>S. glaucopsis</i>	费勇 903 (PE)
	修蕨属 <i>Selliguea</i>		

续附表 1

科名 Family	属名 Genus	种名 Species	引证标本/引证书籍 Specimen/Literature
		金鸡脚假瘤蕨 <i>S. hastata</i>	郎楷永、李良千、费勇 467(PE)
		喙叶假瘤蕨 <i>S. rhynchophylla</i>	郭晓思 2352(WUK)
		陕西假瘤蕨 <i>S. senanensis</i>	黄楷、黄治平 827(NAS)
		紫柄假瘤蕨 <i>S. crenatopinnata</i>	谢朝俊 41450(PE)
		弯弓假瘤蕨 <i>S. albidoglauca</i>	王清泉 22384(IBSC)
		钝羽假瘤蕨 <i>S. conmixta</i>	四川省林业厅勘察设计院森林勘察第二大队 0141(PE)
		斜下假瘤蕨 <i>S. stracheyi</i>	费勇 431(PE)
	石韦属 <i>Pyrrosia</i>	西南石韦 <i>Pyrrosia davidii</i>	刘照光 4506(PE)
		毡毛石韦 <i>P. drakeana</i>	姜恕 9913(PE)
		石韦 <i>P. lingua</i>	Harry Smith 13319(PE)
		有柄石韦 <i>P. petiolosa</i>	植被组 25154(CDBI)
		光石韦 <i>P. calvata</i>	李安明 150761(PE)
		柔软石韦 <i>P. porosa</i>	应俊生 4667(PE)
	锯蕨属 <i>Micropolypodium</i>	锡金锯蕨 <i>Micropolypodium sikkimense</i>	* 陈文俐、蒋善文、张中帅 1211(PE)
	睫毛蕨属 <i>Pleurosoriopsis</i>	睫毛蕨 <i>Pleurosoriopsis makinoi</i>	王清泉 22288(CDBI)
	瓦韦属 <i>Lepisorus</i>	丝带蕨 <i>Lepisorus miyoshianus</i>	植被组 32050(CDBI)
		扭瓦韦 <i>L. contortus</i>	王清泉 4601(CDBI)
		狭叶瓦韦 <i>L. angustus</i>	黄治平等 2615(PE)
		二色瓦韦 <i>L. bicolor</i>	X.C.Zhang & L.Shi 936(PE)
		网眼瓦韦 <i>L. clathratus</i>	* 张宪春、向巧萍 6934(PE)
		西藏瓦韦 <i>L. tibeticus</i>	应俊生 4899(PE)
		高山瓦韦 <i>L. eilophyllus</i>	* 张宪春、向巧萍 6932(PE)
		大瓦韦 <i>L. macrosphaerus</i>	关克俭等 1678(PE)
		黄瓦韦 <i>L. asterolepis</i>	王清泉 4688(CDBI)
		有边瓦韦 <i>L. marginatus</i>	植被组 31933(CDBI)
		白边瓦韦 <i>L. morrisonensis</i>	郎楷永等 190(PE)
		稀鳞瓦韦 <i>L. oligolepidus</i>	刘照光、王清泉 21935(CDBI)
		长瓦韦 <i>L. pseudonudus</i>	郎楷永等 302(PE)
		棕鳞瓦韦 <i>L. scolopendrium</i>	郭晓思 2078(WUK)
		瓦韦 <i>L. thunbergianus</i>	朱大海 3921(HX)
		鳞果星蕨 <i>L. buergerianus</i>	郭晓思 2607(WUK)
		江南星蕨 <i>L. fortunei</i>	王文采等 1480(PE)
		畸裂盾蕨 <i>L. ovatus</i> f. <i>monstrosus</i>	朱树平等 404(PE)
		扇蕨 <i>L. palmatopedatus</i>	王清泉 20147(CDBI)
	膜叶星蕨属 <i>Bosmania</i>	膜叶星蕨 <i>Bosmania membranacea</i>	应俊生 4745(PE)
	虎尾萼蕨属 <i>Tomophyllum</i>	虎尾萼蕨 <i>Tomophyllum donianum</i>	* 张宪春、卫然、于继高 NA(PE)
	棱脉蕨属 <i>Goniophlebium</i>	友水龙骨 <i>Goniophlebium amoenum</i>	费勇 487(PE)
		柔毛水龙骨 <i>G. amoenum</i> var. <i>pilosum</i>	四川省植被队 05287(CDBI)
		中华水龙骨 <i>G. chinense</i>	徐国洪 25221(CDBI)

续附表 1

科名 Family	属名 Genus	种名 Species	引证标本/引证书籍 Specimen/Literature
		濑水龙骨 <i>G. lachnopus</i>	王清泉 4607(CDBI)
		日本水龙骨 <i>G. niponicum</i>	高贤明 06088(HX)
		假毛柄水龙骨 <i>G. pseudolachnopus</i>	王清泉 4607(PE)
		篦齿蕨 <i>G. manmeiense</i>	应俊生等 4757(PE)

注：引证标本中 * 表示该标本还未数字化。
Note: * in the cited specimen indicates that the specimen has not been digitized.

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202007058

汪汉成, 向立刚, 郑苹, 等. 青枯病与黑胫病混发烟株发病茎秆组织微生物群落结构与多样性 [J]. 广西植物, 2022, 42(2): 228–239.

WANG HC, XIANG LG, ZHENG P, et al. Microbial community structure and diversity of tobacco stem tissue in the mixture occurrences of bacterial wilt and black shank [J]. *Guihaia*, 2022, 42(2): 228–239.



青枯病与黑胫病混发烟株发病茎秆组织微生物群落结构与多样性

汪汉成^{1*}, 向立刚^{1,2}, 郑苹¹, 蔡刘体¹, 余知和²

(1. 贵州省烟草科学研究院, 贵阳 550081; 2. 长江大学 生命科学学院, 湖北 荆州 434025)

摘要: 为了解青枯病与黑胫病混发烟株茎秆组织的微生物菌群组成, 该文采用 Illumina Miseq 高通量测序技术研究了青枯病与黑胫病混发烟株发病茎秆和健康烟株未发病茎秆组织的真菌、细菌群落结构与多样性。结果表明: (1) 发病茎秆组织中真菌群落丰富度与多样性较健康茎秆组织低, 细菌群落丰富度与多样性较健康茎秆组织高。 (2) 健康茎秆组织中的优势真菌属为隐球菌属 (*Cryptococcus*)、链格孢属 (*Alternaria*) 和镰刀菌属 (*Fusarium*), 三者相对丰度之和 > 80%。 (3) 发病茎秆组织中的优势真菌属为隐球菌属、链格孢属、镰刀菌属和 unclassified_f_Daviidiellaceae。 (4) norank_c_Cyanobacteria 和劳尔氏菌属 (*Ralstonia*) 为发病茎秆组织的优势细菌属。综上所述, 青枯病与黑胫病混发能够显著改变烟株茎秆真菌、细菌群落结构与多样性, 破坏其微生物群落的稳定。

关键词: 青枯病, 黑胫病, 微生物多样性, Illumina Miseq 高通量测序

中图分类号: Q945.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2022)02-0228-12

Microbial community structure and diversity of tobacco stem tissue in the mixture occurrences of bacterial wilt and black shank

WANG Hancheng^{1*}, XIANG Ligang^{1,2}, ZHENG Ping¹, CAI Liuti¹, YU Zhihe²

(1. Guizhou Academy of Tobacco Science, Guiyang 550081, China; 2. College of Life Science, Yangtze University, Jingzhou 434025, Hubei, China)

Abstract: In order to understand the composition of microbial flora in the stem tissue of tobacco plants mixed occurrence of bacterial wilt and black shank disease. Illumina Miseq high-throughput sequencing technology was used to study the structures and diversities of fungal and bacterial communities in diseased and healthy tobacco stems. The results were as follows: (1) The richness and diversity of the fungal community in the diseased stem tissue were lower than those in the

收稿日期: 2020-12-08

基金项目: 国家自然科学基金(31960550); 中国烟草总公司科技项目(110202101048[LS-08]); 贵州省科技厅优秀青年人才培养计划(黔科合平台人才[2017]5619); 中国烟草总公司贵州省公司科技项目(201914, 2020XM03) [Supported by National Natural Science Foundation of China(31960550); Science and Technology Project of China National Tobacco Corporation (110202101048[LS-08]); Outstanding Young Talent Training Program of Guizhou Provincial Science and Technology Department (QianKehe Platform Talents [2017] 5619); Science and Technology Project of China National Tobacco Corporation Guizhou Provincial Company (201914, 2020XM03)]。

第一作者: 汪汉成(1982-), 博士, 研究员, 主要从事植物保护研究, (E-mail) xiaobaaiyang126@hotmail.com。

* 通信作者

healthy stem tissue, and the richness and diversity of the bacterial community in the diseased stem tissue were higher than those in the healthy stem tissue. (2) *Cryptococcus*, *Alternaria* and *Fusarium* were the dominant fungi in the healthy stem tissue, and the sum of the relative abundances of the three genera were more than 80% of the fungal community. (3) *Cryptococcus*, *Alternaria*, *Fusarium* and unclassified_f_Davidiellaceae were the dominant fungi in the diseased stem tissues. (4) norank_c_Cyanobacteria and *Ralstonia* were the dominant bacteria in diseased stem tissues. The above results indicate that the mixture of bacterial wilt and black shank disease can significantly change the structures and diversities of fungal and bacterial communities, and can also destroy the stability of microbial community in tobacco stem tissue.

Key words: bacterial wilt, black shank, microbial diversity, Illumina Miseq high-throughput sequencing

烟草是我国重要的经济作物,常年植烟面积达 100 万 hm^2 ,烟草为我国农民增收和国家税收增长做出了很大的贡献(李石力,2017)。烟草根茎性病害是烟草生产上面临的主要难题,目前已有报道的烟草根茎性病害有烟草青枯病、黑胫病、根黑腐病、立枯病、猝倒病、低头黑病和空茎病等(柳德普和戴永平,2015)。其中,以烟草青枯病和黑胫病危害最为突出,其发生面积广,防治难度大,每年因这两种病害造成的经济损失高达数千万元。

烟草青枯病是由茄科劳尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)引起的典型土传维管束病害(霍沁建等,2007),能够侵染包括烟草在内的 50 多个科的 450 余种植物(Wicker et al., 2007)。茄科劳尔氏菌共分为 5 个生理小种,同时又分为 5 个生化型或生化变种(谭志琼等,2006;Kumar et al., 2014),我国报道的致病型茄科劳尔氏菌绝大多数为 1 型生理小种(黄福新等,1998;周泽科等,2013)。烟草黑胫病是由寄生疫霉烟草变种(*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*)引起(汪汉成等,2011),能够对各个生育期的烟株造成危害,且在团棵期和开花现蕾期最为严重(王海波等,2018)。与茄科劳尔氏菌一样,寄生疫霉烟草变种也存在多个生理小种,全世界已发现的寄生疫霉烟草变种共有 4 个生理小种(战徊旭等,2015;Gallup et al., 2018),烟草上常见的为 0 号、1 号生理小种(李斌等,2012;张超群等,2016)。因为自然条件下烟草青枯病与烟草黑胫病的发病条件极其相似,所以烟草青枯病与黑胫病常常出现混发的情况(刘烈花,2018;王新等,2018)。

随着高通量测序技术的快速发展与普及,越来越多的人将其应用于烟草微生态领域的研究,但大都侧重于根际土壤微生物(施河丽等,2018;

张笑宇等,2019)以及烟株内生菌(林丽等,2017;李盼盼等,2018)的研究,鲜有关于烟株茎秆组织微生态研究的报道。而根际土壤中诸如青枯菌等病原菌和其他微生物均可以通过维管束等转移至烟株茎、叶等部位,造成烟株地上部分尤其是茎秆微生物群落的变化,甚至失衡,因此,对于发病烟株茎秆微生物群落变化的研究十分必要。为了解烟株感染根茎性病害前后茎秆中微生物群落的变化,本实验室先后对感染青枯病烟株茎秆真菌、细菌群落结构(向立刚等,2019a),以及感染黑胫病烟株茎秆真菌、细菌群落结构(向立刚等,2019b)进行了研究,掌握了烟株感染青枯病、黑胫病后茎秆中优势真菌、细菌群落的组成情况。但尚不清楚青枯病与黑胫病混发对烟株发病茎秆组织中真、细菌群落的影响,因此,本文选取青枯病与黑胫病混发烟株茎秆和健康烟株茎秆,运用 Illumina 高通量测序技术研究同时感染青枯病和黑胫病烟株茎秆组织中真、细菌群落结构与多样性变化,以期揭示青枯病与黑胫病混发烟株茎秆组织的微生物菌群组成。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2018 年 8 月于贵州省福泉市烟草科学研究院种植‘云烟 87’品种的试验田(107°30'41" E, 26°44'48" N),随机选取 3 株出现明显青枯病与黑胫病混发病症的成熟期烟株,用经高温灭菌的剪刀剪取发病烟株发病茎秆组织 5 cm 长的样品,即为发病茎秆组(BJ),样品分别编号为 AHBJ、BHBJ 和 CHBJ;在相同田块,随机选取肉眼观察无明显病症且长势良好的 3 株健壮烟株作为健康茎秆组(J)样品,取与发病株等高的烟株茎秆组织样品,

样品编号为 AHJ、BHJ 和 CHJ。采集的组织样品立即装入无菌取样袋中,低温保藏带回实验室置于 -80°C 冰箱保存备用。

1.2 DNA 提取及目标片段 PCR 扩增

取冻存的茎秆组织样品,先用剪刀将其剪成小段,随后放入研钵中加入适量的液氮充分研磨成粉末状。称取 50 mg 组织粉末样品,采用植物组织 DNA 提取试剂盒(Qiagen, 69104)提取 DNA,具体操作步骤按其操作说明进行。以提取 DNA 为模板,分别对真菌转录间隔区的 ITS1 区域,细菌 16S rRNA 基因的 V3-V4 区进行扩增。ITS 区扩增引物为 ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') 和 ITS2R (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') (White et al., 1990),细菌 16S rRNA 基因扩增引物为 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')。PCR 扩增体系和反应程序参数参照陈乾丽等(2019)的方法进行。最后将满足建库要求的产物纯化后送至上海美吉生物医药科技有限公司进行 Miseq 文库构建和 Miseq PE300 平台(Illumina 公司)高通量测序。

1.3 生物信息学分析

使用 Trimmomatic 软件(Bolger et al., 2014)优化原始数据,首先根据序列首尾两端的 barcode 和引物区分样品,并调整序列方向,然后去除 50 bp 以下的序列以及含 N 碱基的序列,去掉引物错配数大于 2 的序列,最后过滤掉双端 reads 之间的 overlap 区长度小于 10 bp 以及错配率大于 0.2 的序列。优化后的序列用 FLASH 软件(Caporaso et al., 2011)进行序列拼接。用 UPARSE 软件(Edgar, 2013)对 97%相似度序列进行操作分类单元(operational taxonomic units, OTU)聚类。利用 RDP classifier(Wang et al., 2007)比对 Unite 数据库(<http://unite.ut.ee/index.php>),对每条 ITS 序列进行物种分类注释,比对 Silva(<http://www.arb-silva.de>)数据库,对每条 16S 序列进行物种分类注释。聚类后的 OTU 用于物种组成及差异分析、Venn 图绘制、Alpha 多样性分析(Sobs 指数、Ace 指数、Chao1 指数、Shannon 指数、Simpson 指数以及 Coverage 指数)等。本实验所有生物信息学分析均在上海美吉生物医药科技有限公司 I-Sanger 生信云网站平台(<http://www.i-sanger.com/project/index.html>)操作完成。

2 结果与分析

2.1 数据质控

本次实验样品真菌测序共获得 234 080 条高质量序列,最大序列长度 356 bp,最小序列长度 201 bp,平均序列长度 257 bp,其中发病茎秆组获得序列 116 717 条,健康茎秆组获得 117 363 条;细菌测序共获得 217 446 条高质量序列,最大序列长度 479 bp,最小序列长度 254 bp,平均序列长度 431 bp,发病茎秆组获得 108 023 条,健康茎秆组获得 109 423 条。其余单个样品详细质控信息见表 1。

2.2 OTU 聚类分析

如表 2 所示,发病茎秆组真菌菌落种类较健康茎秆组略有降低,其中门、纲、目、科、属、种和 OTU 数分别减少 2、3、5、11、14、17、31 个;发病茎秆组的细菌菌落较健康茎秆组增加,门、纲、目、科、属、种和 OTU 数量分别增加 4、6、17、27、61、82、93 个。因此,烟草青枯病和黑胫病混发降低了烟株茎秆真菌群落的物种多样性,增加了茎秆中细菌群落的多样性。

2.3 群落多样性、基本结构及组成分析

各样品的 Alpha 多样性指数如表 3 所示, Ace 指数、Chao1 指数和 Sobs 指数用于表示群落丰富度,其数值越大表示群落丰富度越高;Shannon 指数和 Simpson 指数表示群落多样性,Shannon 指数值越大或 Simpson 指数值越小表示群落多样性越高。样品的真菌群落表现为健康茎秆组真菌群落丰富度与多样性均高于发病茎秆组,但不存在显著性差异。健康茎秆组细菌群落丰富度与多样性低于发病茎秆组,不存在显著性差异。本次所有测序样品的 Coverage 指数均大于 0.99,表明测序结果能够较为真实地反映茎秆中实际的菌群组成情况。

图 1 为样品中真菌属和细菌属的相对丰度条形图,相对丰度低于 0.1% 的菌属归入其他(Others)。因为样本 CHBJ 与其余两发病烟株样本微生物组成存在明显差异,所以群落分析时不将此样本数据作为参考。由于数据库的限制,相对丰度条形图中还存在部分未鉴定出来的菌属,其以 unclassified_和 norank_开头。健康茎秆样品中优势真菌属为隐球菌属(*Cryptococcus*)、链格孢属(*Alternaria*)和镰刀菌属(*Fusarium*),三者的相对丰度之和大于 80%;发病茎秆各样品的优势真

表 1 测序样品数据质控

Table 1 Data quality control of sequencing samples

类型 Type	样品 Sample	序列数 Sequence number	平均序列长度 Mean sequence length (bp)	最小序列长度 Minimum sequence length (bp)	最大序列长度 Maximum sequence length (bp)
真菌 Fungi	AHBJ	40 455	299	203	343
	BHBJ	41 852	253	203	340
	CHBJ	34 410	245	215	339
	AHJ	43 434	246	203	356
	BHJ	39 271	250	201	349
	CHJ	34 658	251	203	340
细菌 Bacteria	AHBJ	39 997	429	338	451
	BHBJ	34 341	428	275	452
	CHBJ	33 685	442	254	475
	AHJ	42 345	427	281	451
	BHJ	30 459	428	378	479
	CHJ	36 619	433	330	461

表 2 发病烟株与健康烟株茎秆样品中真菌和细菌菌落各级别分类群的数量

Table 2 Numbers of different taxonomic groups of fungal and bacterial communities in stem samples of tobacco plants with bacterial wilt and black shank, and healthy tobacco plants

类型 Type	样品 Sample	门 Phylum	纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genus	种 Species	操作分类单元 OTU
真菌 Fungi	AHBJ	3	12	24	33	54	80	123
	BHBJ	3	11	17	23	35	49	62
	CHBJ	3	5	7	8	11	13	20
	总数 Total(BJ)	3	12	24	36	60	92	138
	AHJ	5	13	23	39	62	85	121
	BHJ	4	11	19	26	41	54	71
	CHJ	3	10	19	26	42	60	86
	总数 Total(J)	5	15	29	47	74	109	169
细菌 Bacteria	AHBJ	13	20	42	72	111	145	181
	BHBJ	8	14	23	35	49	70	97
	CHBJ	8	13	23	33	44	48	68
	总数 Total(BJ)	14	25	52	88	140	186	231
	AHJ	7	13	24	38	46	56	78
	BHJ	82	13	23	37	47	66	93
	CHJ	9	14	19	25	28	35	52
	总数 Total(J)	10	19	35	61	79	104	138

菌差异较大, AHBJ 中优势真菌为 unclassified_k_Fungi、隐球菌属和链格孢属, BHBJ 中优势真菌为镰刀菌属、unclassified_f_Davidiellaceae 和隐球菌属。norank_c_Cyanobacteria 在所有茎秆样品细菌群落中均为优势菌属, norank_f_Mitochondria 在 AHBJ、BHBJ、AHJ 和 BHJ 中相对丰度较高。发病茎秆样品中均存在青枯病病原菌劳尔氏菌属(*Ralstonia*), 但相对丰度差异较大, AHBJ 中相对丰度约为 2%, BHBJ 中约为 0.3%。健康茎秆 AHJ 和 CHJ 也存在劳尔氏菌属, 相对丰度分别为 0.5% 和 46.8%。

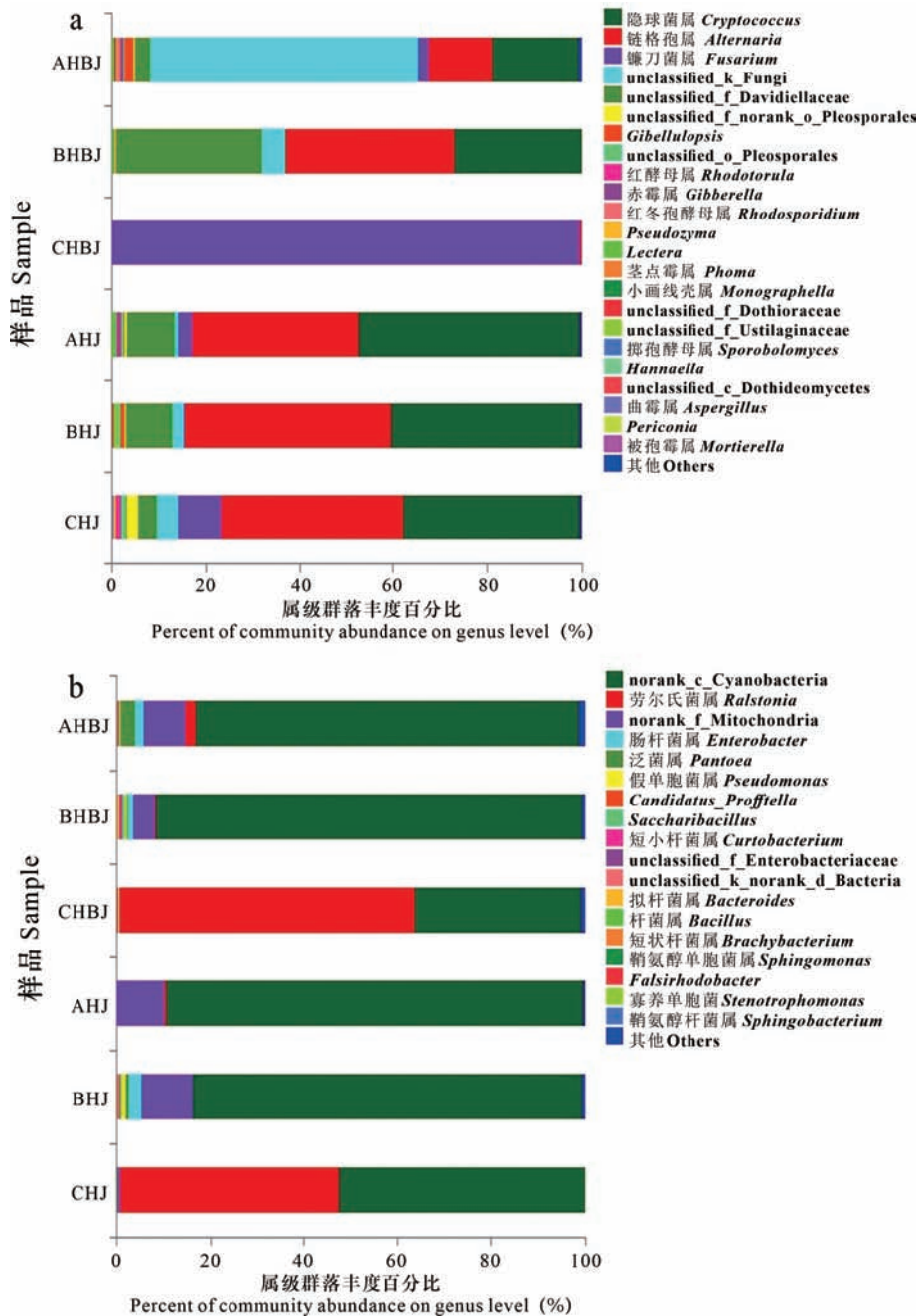
表 3 不同样品真菌和细菌群落 Alpha 多样性指数(属水平)

Table 3 Alpha diversity indexes of fungal and bacterial communities between different samples(genus level)							
类型 Type	样品 Sample	Ace 指数 Ace index	Chao1 指数 Chao1 index	Sobs 指数 Sobs index	Shannon 指数 Shannon index	Simpson 指数 Simpson index	Coverage 指数 Coverage index
真菌 Fungi	AHBJ	67.4	65	54	1.38	0.38	0.999 7
	BHBJ	48.6	68	35	1.30	0.30	0.999 7
	CHBJ	11.4	11	11	0.02	0.99	0.999 9
	平均 Average	42.47±28.50a	48±32.08a	33.33±21.55a	0.90±0.76a	0.56±0.38a	0.999 8±0.000 1a
	AHJ	122.9	81	62	1.32	0.36	0.999 5
	BHJ	112.0	61	41	1.24	0.37	0.999 7
	CHJ	51.5	54	42	1.51	0.30	0.999 7
	平均 Average	95.47±38.46a	65.33±14.01a	48.33±11.85a	1.36±0.14a	0.34±0.04a	0.999 6±0.000 1a
细菌 Bacteria	AHBJ	250.3	222	111	0.79	0.68	0.998 7
	BHBJ	115.5	87	49	0.48	0.82	0.999 5
	CHBJ	76.9	55	44	0.76	0.52	0.999 6
	平均 Average	147.57±91.04a	121.33±88.64a	68±37.32a	0.68±0.17a	0.67±0.15a	0.999 3±0.000 5a
	AHJ	64.2	61	46	0.40	0.80	0.999 6
	BHJ	101.2	77	47	0.69	0.70	0.999 5
	CHJ	34.0	32	28	0.75	0.49	0.999 8
	平均 Average	66.47±33.66a	56.67±22.81a	40.33±10.69a	0.61±0.19a	0.66±0.16a	0.999 6±0.000 2a

注：真菌和细菌样品同列不同字母代表差异性显著 ($P<0.05$)。
Note: Different letters in the same column represent significant differences in fungal and bacterial samples ($P<0.05$).

Venn 图(图 2)结果显示发病茎秆组与健康茎秆组样品共有的真菌属有 50 个,其中:隐球菌属、链格孢属、镰刀菌属、unclassified_k_Fungi、unclassified_f_Davidiellaceae 为主要菌属,所占百分比分别为 29.01%、28.58%、17.06%、11.95%、10.21%,其余菌属占比小于 1%;发病茎秆组样品中独有的属有 10 个,分别为 unclassified_f_norank_o_Sporidiobolales 占比 45.83%,*Myrmecridium*、绿僵菌属(*Metarhizium*)、unclassified _ f _ Psathyrellaceae 和枝孢霉属(*Cladosporium*) 占比均为 8.33%,瓶霉菌属(*Phialophora*)、unclassified _ c _ Exobasidiomycetes、unclassified_o_Trechisporales、篮状菌属(*Talaromyces*)和外瓶霉菌属(*Exophiala*) 占比均为 4.17%;健康茎秆组样品中独有的属有 24 个,物种数占总数百分比大于 1%的属分别为被孢霉属(*Mortierella*)42.97%,刺盘孢属(*Colletotrichum*) 18.75%, unclassified _ c _ norank_p_Zygomycota 11.72%, unclassified_f_norank 5.47%,帚枝霉属(*Sarocladium*) 2.34%, unclassified_f_Chactomiaceae、unclassified _ f _ norank _ o _ Trichosphaeriales、unclassified_o_Helotiales、*Lophiostoma*

和 *Auriculibuller* 占比均为 1.56%。
发病茎秆组与健康茎秆组样品共有的细菌属有 61 个,物种数占比大于 1%的属有 norank_c_Cyanobacteria 72.34%,劳尔氏菌属 19.03%和 norank_f_Mitochondria 5.84%;发病茎秆组中独有的细菌属有 79 个,物种数占比大于 1%的属有拟杆菌属(*Bacteroides*) 33.08%,*Paenochrobactrum* 8.40%, unclassified_f_Alcaligenaceae 6.62%,拟诺卡氏菌属(*Nocardiosis*) 7.38%,粪产碱菌属(*Alcaligenes*) 4.07%,塔特姆菌属(*Tatumella*) 3.56%,Incertae_Sedis_f_Lachnospiraceae 2.80%,链霉菌属(*Streptomyces*) 2.29%,假丁酸弧菌属(*Pseudobutyrvibrio*) 2.04%,萨特氏菌属(*Sutterella*) 1.78%,假黄色单胞菌属(*Pseudoxanthomonas*)、甲基杆菌属(*Methylobacillus*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、食酸菌属(*Acidovorax*)和分枝杆菌属(*Mycobacterium*) 占比均为 1.02%;健康茎秆组中独有的属为 18 个,*Allobaculum* 和 *Lachnoclostridium* 物种数占比均为 12.50%,*Akkermansi* 和不动杆菌属(*Acinetobacter*) 占比均为 8.33%,瘤胃球菌属 2



a. 样品真菌属相对丰度；b. 样品细菌属相对丰度。
a. Relative abundance of fungi genus in samples；b. Relative abundance of bacteria genus in samples.

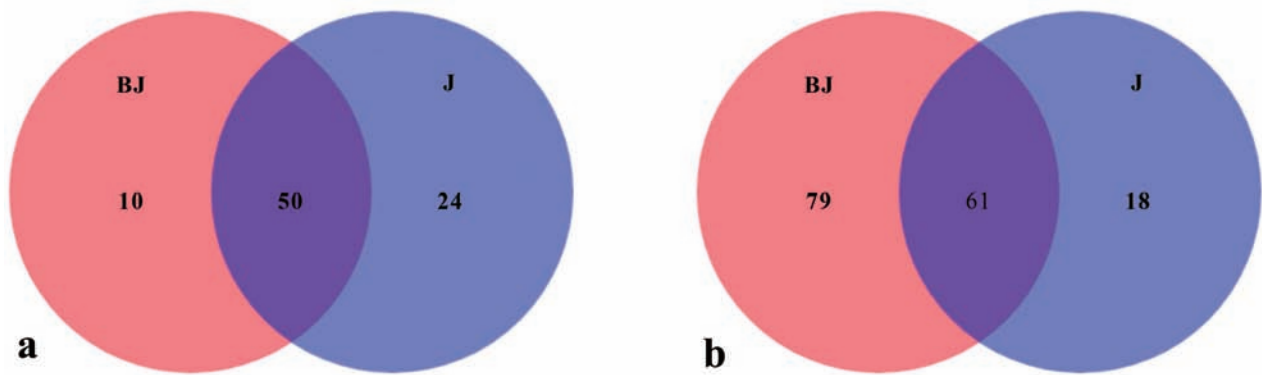
图 1 不同样品属水平的真菌、细菌群落相对丰度

Fig. 1 Relative abundance of fungal and bacterial communities of different samples at genus level

(*Ruminococcus_2*)、*Rheinheimera*、*Clostridium_sensu_stricto_1*、玫瑰单胞菌属(*Roseomonas*)、*Sulfuritalea*、*norank_f_FFCH7168*、*Niabella*、土壤芽胞杆菌属(*Solibacillus*)、*Pelomonas*、*Variibacter*、*Citricoccus*、亚硝化螺菌属(*Nitrosospira*)、*Byssovorax* 和拟普雷沃菌

属(*Alloprevotella*) 14 个菌属占比均为 4.17%。

图 3 为茎秆样品中相对丰度为前 30 的真菌、细菌菌群热图,热图上方与左边分别为样品层级聚类树和物种层级聚类树,两聚类树的聚类方式均为 Average。真菌菌群中 6 个样品共聚为两大



a. 真菌群落 Venn 图; b. 细菌群落 Venn 图。
a. Venn diagram of fungal community; b. Venn diagram of bacterial community.

图 2 发病茎秆与健康茎秆样品群落 Venn 图
Fig. 2 Venn diagrams of fungal and bacterial communities at genus level in stem samples of tobacco plants with bacterial wilt and black shank, and healthy tobacco plants

类,AHBJ、BHBJ、CHJ、AHJ 和 BHJ 聚为一类,CHBJ 单独聚为一类,表明 CHBJ 样品与其余 2 个发病烟株茎秆样品间样本距离差异较大,健康烟株茎秆样品间样本距离较小;细菌菌群中 CHBJ 与 CHJ 两样品聚为一类,其余 4 样品聚为一类,因此,细菌菌群中健康茎秆组与发病茎秆组内样本距离均存在较大差异。

2.4 Beta 多样性分析

通过主成分(PCA)分析健康与发病烟株茎秆中真菌、细菌在属水平组成上的差异。如图 4:a 所示,导致发病与健康烟株茎秆真菌群落产生差异的主要因素 PC1 和 PC2 分别占全部影响因素的 67.36%和 26.67%。其中:健康烟株 3 个茎秆样品真菌群落组成相似,样本距离较近;发病烟株 3 个茎秆样品真菌群落组成差异较大,样本距离较远;发病烟株 BHBJ 茎秆样品与健康烟株茎秆样品样本距离较近,真菌群落组成差异较小。由图 4:b 可知,导致发病与健康烟株茎秆样品细菌群产生差异的主要因素 PC1 和 PC2 分别占全部影响因素的 51.66%和 17.49%。在 PC1 的作用下健康烟株茎秆样品与发病茎秆 CHBJ 和 BHBJ 样品间细菌群落组成差异较小,AHBJ 样品与其余 5 个样品间差异较大。整体而言,烟株感染青枯病与黑胫病对茎秆真菌群落结构的影响较大,而对细菌群落结构的影响较小。

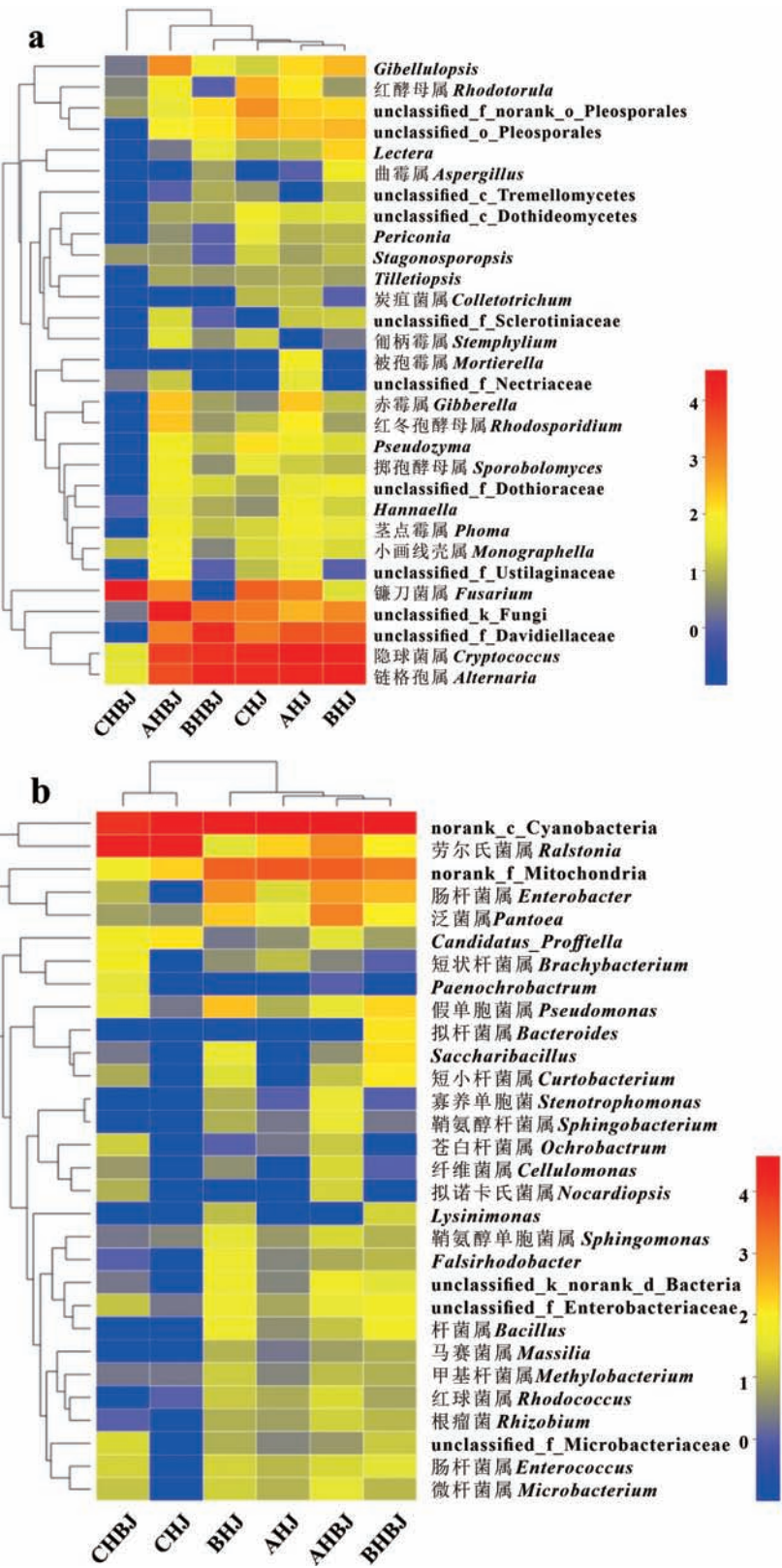
LEfSe 多级物种差异分析可用于寻找不同分组中具有统计学差异的生物标记菌群。由图 5:A 可

知,当 LDA 阈值为 4 时,健康烟株茎秆样品中担子菌门 Basidiomycota、Tremellomycetes 纲、Tremellales 目、norank_o_Tremellales 科、Bulleromyces 属和隐球菌属与发病茎秆样品存在显著性差异。如图 5:B 所示,发病茎秆与健康茎秆中细菌群落不存在具有统计学差异的生物标记菌群。

3 讨论与结论

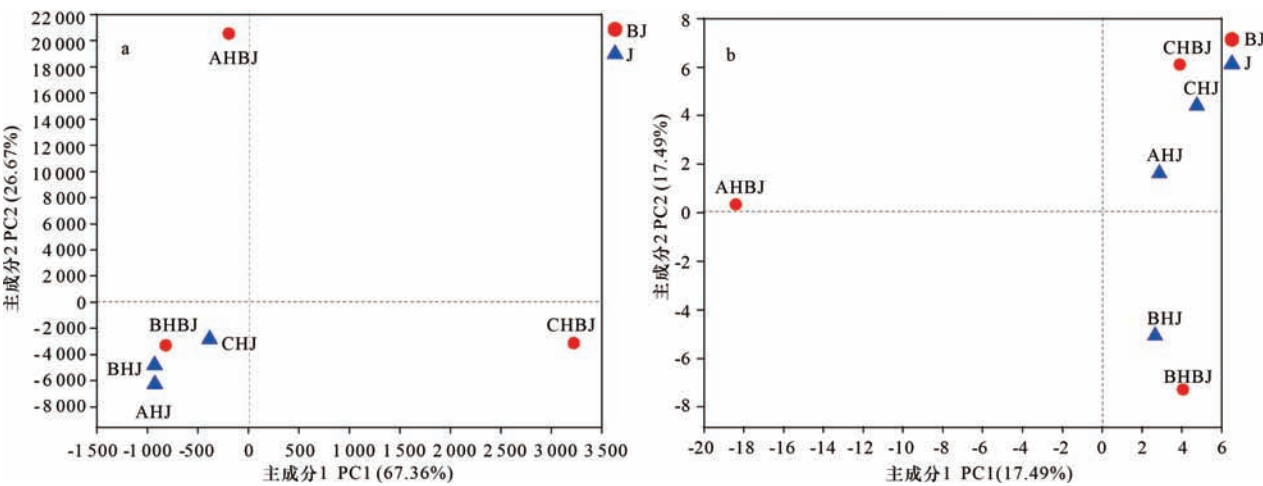
微生物群落的 Alpha 多样性指数用于反映微生物群落结构的复杂程度。一般而言,微生物群落结构越复杂,微生态环境越稳定,群落的多样性指数也就越高(贺纪正等,2013)。本研究中,发病茎秆样品较健康茎秆真菌群落种类降低,细菌群落种类增加;发病茎秆组样品真菌群落丰富度与多样性低于健康茎秆样品,细菌群落丰富度与多样性高于健康茎秆样品。说明健康烟株茎秆中真菌群落结构优于青枯病和黑胫病混发烟株茎秆,发病烟株茎秆细菌群落结构优于健康烟株茎秆。

健康烟株茎秆中隐球菌属、链格孢属和镰刀菌属为绝对优势菌属,而在发病烟株茎秆中不同样品中真菌组成存在较大差异;除以上 3 种菌属外,unclassified_f_Davidiellaceae 也为部分发病烟株茎秆中的优势菌属。隐球菌属多为人类疾病病原菌,关于隐球菌导致的植物病害鲜有报道。链格孢属在不同生境中广泛存在,多数链格孢菌能够引起多种植物病害(黄伟等,2016;刘迪等,2018),



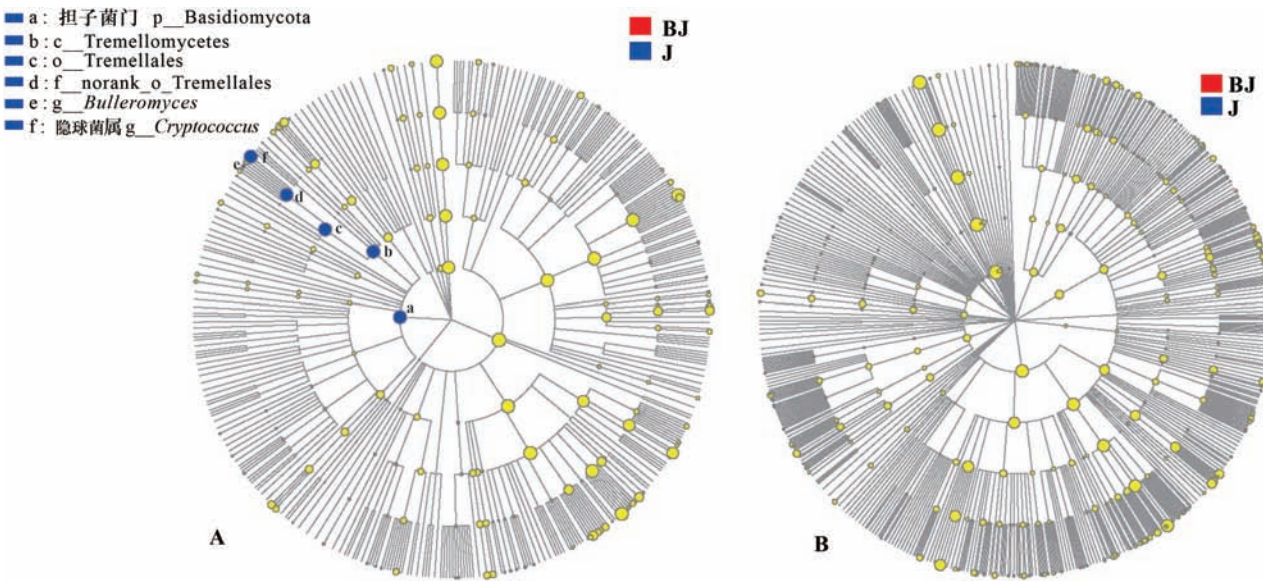
a. 样品真菌属相对丰度；b. 样品细菌属相对丰度。
a. Relative abundance of fungi genus in samples；b. Relative abundance of bacteria genus in samples.

图 3 不同样品中真菌属和细菌属的相对丰度热图
Fig. 3 Heat maps of the relative abundance of fungi genus and bacteria genus in different samples



a. 样品真菌群落主成分分析；b. 样品细菌群落主成分分析。
a. Principal component analysis of fungal community；b. Principal component analysis of bacterial community.

图 4 茎秆样品真菌、细菌群落主成分分析(属水平)
Fig. 4 Principal components analysis of fungal and bacterial communities (genus level)



A. 样品真菌群落 LEfSe 物种差异分析；B. 样品细菌群落 LEfSe 物种差异分析。
A. LEfSe species difference analysis of fungal community；B. LEfSe species difference analysis of bacterial community.

图 5 LEfSe 物种差异分析
Fig. 5 LEfSe species difference analysis

而某些链格孢菌由于具备高产纤维素酶的能力而具备开发成生防制剂的潜力。镰刀菌属由于种的差异,部分镰刀菌可产生激素,促进植株的生长发育,有的可降解纤维素和有机物,而另一部分则可侵染多种植株致使植株萎蔫和根部腐烂(张向民, 2005)。细菌群落中 norank_c_Cyanobacteria 为绝

对优势菌,但目前没有关于蓝细菌作为植物内生细菌的报道,其主要分布于淡水、海水和土壤中(李佳霖等,2015)。此次实验在烟株茎秆中检测出了蓝细菌,可能是烟株叶绿体 DNA 造成的污染,而 norank_f_Mitochondria 则可能是烟株细胞线粒体 DNA 造成的污染。此推断有待在今后的研

究中进一步验证。所有茎秆中均检测到了劳尔氏菌属,但为何健康烟株未表现出明显的发病迹象,可能与劳尔氏菌属中存在不同的生理小种有关,不同的生理小种致病力不同,有的生理小种致病力强,而有的却无致病力(邹阳等,2013)。有研究报道无致病力的茄科劳尔氏菌可诱导植株产生免疫能力,从而达到抵抗青枯病的效果(陈庆河,2001)。而作为黑胫病病原菌的寄生疫霉烟草变种因为其已划分为卵菌,不再归属于真菌,所以Unite 数据库中并没有相应的序列信息,因此,本次测序结果中未见 *Phytophthora* 属菌群。在本实验室前期研究结果中感染青枯病烟株茎秆组织中主要细菌属为劳尔氏菌属、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属(*Gemmatimonas*)和肠杆菌属(*Enterobacter*),主要真菌包括小画线壳属(*Monographella*)、隐球菌属、镰刀菌属和 *Coprinopsis*;感染黑胫病烟株茎秆组织中主要细菌属为 *norank_c_Cyanobacteria*,主要真菌属为隐球菌属、链格孢属、镰刀菌属和红酵母属(向立刚等,2019a,b)。相较于青枯病和黑胫病单独发病的茎秆组织,混合的发病茎秆组织中小画线壳属、*Coprinopsis* 和红酵母属真菌,假单胞菌属和芽孢杆菌属细菌降为非优势菌属。因此,青枯病、黑胫病混发对于烟株茎秆微生物群落的影响有别于两种病害单独发生造成影响的叠加。

发病烟株茎秆较健康烟株茎秆中独有的真菌属有 10 个,除去未鉴定到属的真菌,还有 *Myrmecridium*、绿僵菌属、枝孢霉属、瓶霉菌属、篮状菌属和外瓶霉菌属。绿僵菌属是广谱的昆虫病原真菌(陈名君等,2018),对植物是否存在致病作用目前尚无报道。枝孢霉属为常见的腐生真菌,部分枝孢霉属真菌为植物上的病原菌,侵染植株叶片、枝条和果实(吕靖雯等,2018),从病株茎秆中检测到该菌属,可能是茎秆感病腐烂后环境中的枝孢霉菌定殖的结果,进而加重烟株茎秆的腐烂程度。瓶霉菌属等真菌在发病烟株茎秆中可能的作用尚不明确。发病茎秆中独有的细菌属为 79 个,其中,拟杆菌属和粪产碱菌属主要为人类临床上常见病菌,能够寄居于人体呼吸道和肠道等部位,对烟草无致病报道。拟诺卡氏菌属是一个经典的丝状放线菌类群,能够合成酶抑制剂和抗生素等多种活性物质(李文均等,2016),对植物无致病潜力。链霉菌属多数为腐生好气性异养菌,大

部分链霉菌为非致病的污染菌或定殖菌。假丁酸弧菌属、假黄色单胞菌属和类芽孢杆菌属等发病茎秆中独有的菌属均没有使植物致病的报道。

青枯病与黑胫病混发能够明显导致烟株茎秆真菌、细菌群落结构与多样性的改变,破坏了烟株茎秆中微生物群落的稳定。发病后烟株茎秆中真菌群落丰富度与多样性降低,细菌群落丰富度与多样性增加,部分腐生真菌、细菌也广泛定殖于烟株茎秆上。研究结果增加了我们对青枯病与黑胫病混发烟株茎秆组织微生态的认识,但烟草青枯病菌先侵染、黑胫病菌后侵染,烟草黑胫病先侵染、青枯病菌后侵染,以及 2 种病原菌同时复合侵染引起的烟株病害微生态规律的研究仍有待下一步继续探索。

参考文献:

- BOLGER AM, LOHSE M, USADEL B, 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data [J]. *Bioinformatics*, 30(15): 2114–2120.
- CAPORASO JG, LAUBER CL, WALTERS WA, et al., 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 108 (Suppl. 1): 4516–4522.
- CHEN MJ, ZHANG X, HOU NS, et al., 2018. Species diversity of *Metarhizium* in Dabie Mountains in Anhui [J]. *Chin J Biol Cont*, 34(2): 274–279. [陈名君, 章西, 侯因嵩, 等, 2018. 安徽大别山区绿僵菌物种多样性 [J]. *中国生物防治学报*, 34(2): 274–279.]
- CHEN QL, LI Z, WANG HC, et al., 2019. Fungal composition and diversity of tobacco phyllosphere from cured tobacco leaves [J]. *Acta Microbiol Sin*, 59(12): 2401–2409. [陈乾丽, 李忠, 汪汉成, 等, 2019. 烤后不同霉变程度烟叶际真菌群落组成与多样性分析 [J]. *微生物学报*, 59(12): 2401–2409.]
- CHEN QH, 2001. Induced resistance of tomato to *Ralstonia solanacearum* by avirulent strains [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University. [陈庆河, 2001. 青枯无致病力菌株诱导番茄抗青枯病的研究 [D]. 福州: 福建农林大学.]
- EDGAR RC, 2013. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads [J]. *Nat Methods*, 10(10): 996–998.
- GALLUP CA, MCCORKLE KL, IVORS KL, et al., 2018. Characterization of the black shank pathogen, *Phytophthora nicotianae*, across North Carolina tobacco production areas

- [J]. Plant Dis, 102(6): 1108–1114.
- HE JZ, LI J, ZHENG YM, 2013. Thoughts on the microbial diversity-stability relationship in soil ecosystems [J]. Biodivers Sci, 21(4): 411–420. [贺纪正, 李晶, 郑袁明, 2013. 土壤生态系统微生物多样性-稳定性关系的思考 [J]. 生物多样性, 21(4): 411–420.]
- HUANG FX, CHEN YH, HUA JY, et al., 1998. Studies on the strains and the other physiological properties of *Pseudomonas solanacearum* of the tobacco in Guangxi [J]. J Plant Protect, 25(3): 240–244. [黄福新, 陈永惠, 华静月, 等, 1998. 广西烟草青枯菌菌系及其主要生理特性研究 [J]. 植物保护学报, 25(3): 240–244.]
- HUANG W, FENG ZS, BAI YJ, et al., 2016. Advances on methods to control fungal diseases of *Alternaria* spin postharvest [J]. Food & Mach, 32(3): 247–252. [黄伟, 冯作山, 白羽嘉, 等, 2016. 采后果实链格孢属真菌病害防治方法研究进展 [J]. 食品与机械, 32(3): 247–252.]
- HUO QJ, ZHANG S, WANG RY, 2007. Advance and control of tobacco bacterial wilt disease [J]. Chin Agric Sci Bull, 23(8): 364–368. [霍沁建, 张深, 王若焱, 2007. 烟草青枯病研究进展 [J]. 中国农学通报, 23(8): 364–368.]
- KUMAR A, PRAMEELA TP, SUSEELABHAI R, et al., 2014. Host specificity and genetic diversity of race 4 strains of *Ralstonia solanacearum* [J]. Plant Pathol, 63(5): 1138–1148.
- LI B, YANG YF, GONG GS, 2012. Isolating and identifying physiological races of *Phytophthora nicotianae* in Sichuan [J]. Tobacco Sci Technol, (10): 81–84. [李斌, 杨益芬, 龚国淑, 2012. 四川省烟草黑胫病菌生理小种的分离鉴定 [J]. 烟草科技, (10): 81–84.]
- LI JL, QIN S, 2015. Advances in molecular ecology of marine *Picocyanobacteria* [J]. Adv Earth Sci, 30(4): 477–486. [李佳霖, 秦松, 2015. 海洋微微型蓝细菌分子生态学进展 [J]. 地球科学进展, 30(4): 477–486.]
- LI PP, YUAN XL, LI JH, et al., 2018. Biodiversity and community structure of endophytic fungi isolated from *Nicotiana tabacum* L. [J]. Acta Microbiol Sin, 58(10): 1853–1863. [李盼盼, 袁晓龙, 李金海, 等, 2018. 湖北烟草内生真菌生物多样性和种群结构分析 [J]. 微生物学报, 58(10): 1853–1863.]
- LI SL, 2017. The mechanism research of tobacco bacterial wilt influenced by organic acid from root exudates [D]. Chongqing: Southwest University. [李石力, 2017. 有机酸类根系分泌物影响烟草青枯病发生的机制研究 [D]. 重庆: 西南大学.]
- LI WJ, ZHANG YG, 2016. Advances in studies on the genus *Nocardiopsis* [J]. Microbiol Chin, 43(5): 1123–1135. [李文均, 张永光, 2016. 拟诺卡氏菌属放线菌研究进展 [J]. 微生物学通报, 43(5): 1123–1135.]
- LIN L, CHEN ZB, HE QX, et al., 2017. Diversity of endophytic bacteria in different parts of tobacco [J]. Jiangsu Agric Sci, 45(22): 274–278. [林丽, 陈泽斌, 何群香, 等, 2017. 烟草不同部位内生细菌的多样性 [J]. 江苏农业科学, 45(22): 274–278.]
- LIU LH, 2018. Control effect of four biocontrol bacteria on tobacco black shank disease [J]. Plant Doctor, 31(4): 42–44. [刘烈花, 2018. 4种生防菌对烟草黑胫病的防治作用 [J]. 植物医生, 31(4): 42–44.]
- LIU D, YU D, WU JK, et al., 2018. Recent advance in research on medicinal plant diseases caused by *Alternaria* [J]. Res Pract Chin Med, 32(1): 80–83. [刘迪, 于丹, 吴军凯, 等, 2018. 药用植物链格孢属真菌病害及其防治的研究进展 [J]. 现代中药研究与实践, 32(1): 80–83.]
- LIU DP, DAI YP, 2015. Experiment on the control of tobacco root and stem diseases with different application time [J]. Fujian Agric, (4): 136–139. [柳德普, 戴永平, 2015. 不同施药时间对烟草根茎性病害防治试验 [J]. 福建农业, (4): 136–139.]
- LÜ JW, LIU R, LI GH, et al., 2018. Identification of pathogens causing fruit spot disease on *Citrus grandis* [J]. J Zhejiang Univ (Agric Life Sci), 44(6): 687–694. [吕靖雯, 刘蕊, 李国华, 等, 2018. 柚果面枝孢菌斑点病原原鉴定 [J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 44(6): 687–694.]
- SHI HL, XIANG BK, TAN J, et al., 2018. Analysis of bacterial community in rhizosphere soil of tobacco plant infected by bacterial wilt disease [J]. Acta Tab Sin, 24(5): 57–65. [施河丽, 向必坤, 谭军, 等, 2018. 烟草青枯病发病烟株根际土壤细菌群落分析 [J]. 中国烟草学报, 24(5): 57–65.]
- TAN ZQ, ZHANG RY, LI GZ, et al., 2006. Symptoms of bacterial wilt and identification of the causal organism on *Anthurium andraeanum* [J]. Acta Phytopathol Sin, 36(5): 392–396. [谭志琼, 张荣意, 李桂珍, 等, 2006. 红掌青枯病的症状和病原菌鉴定 [J]. 植物病理学报, 36(5): 392–396.]
- WANG HB, SHI J, LUO ZN, et al., 2018. Resistant identification of tobacco grafted seedlings to black shank [J]. Plant Protect, 44(3): 168–171. [王海波, 时焦, 雒振宁, 等, 2018. 烟草嫁接苗对黑胫病的抗性鉴定 [J]. 植物保护, 44(3): 168–171.]
- WANG HC, LI WH, FENG YG, et al., 2011. History and current status of chemical control of tobacco black shank [J]. Acta Tab Sin, 17(5): 96–102. [汪汉成, 李文红, 冯勇刚, 等, 2011. 烟草黑胫病化学防治的历史与现状 [J]. 中国烟草学报, 17(5): 96–102.]
- WANG Q, GARRITY GM, TIEDJE JM, et al., 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences

- into the new bacterial taxonomy [J]. Appl Environ Microb, 73(16): 5261–5267.
- WANG X, WU XR, WANG WF, et al., 2018. Indoor inoculation identification of tobacco mutants resistant to bacterial wilt [J]. Mol Plant Breed, 16(19): 6468–6475. [王新, 吴新儒, 王卫锋, 等, 2018. 烟草抗青枯病突变体的室内接种鉴定 [J]. 分子植物育种, 16(19): 6468–6475.]
- WHITE TJ, BRUNS T, LEE S, et al., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [J]. PCR protocols: a guide to methods and applications, 18(1): 315–322.
- WICKER E, GRASSART L, CORANSON-BEAUDU R, et al., 2007. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French west indies) exhibiting a new pathogenic potential [J]. Appl Environ Microb, 73(21): 6790–6801.
- XIANG LG, ZHOU H, WANG HC, et al., 2019a. Bacterial community structure and diversity of rhizosphere soil and stem of healthy and bacterial wilt tobacco plants [J]. Acta Microbiol Sin, 59(10): 1984–1999. [向立刚, 周浩, 汪汉成, 等, 2019a. 健康与感染青枯病烟株根际土壤与茎秆细菌群落结构与多样性 [J]. 微生物学报, 59(10): 1984–1999.]
- XIANG LG, WANG HC, GUO ZN, et al., 2019b. The influence of black shank disease infection on fungal community structure of rhizosphere soil and stem of tobacco plants [J]. Mycosystema, 38(12): 2099–2111. [向立刚, 汪汉成, 郭珍妮, 等, 2019b. 黑胫病感染对烟草茎秆及根际土壤真菌群落结构的影响 [J]. 菌物学报, 38(12): 2099–2111.]
- ZHAN HX, WEN NN, LUO DQ, et al., 2015. Races of *Phytophthora nicotianae* and their sensitivity to metalaxyl and dimethomorph in Luzhou, Sichuan [J]. Plant Protect, 41(6): 178–184. [战徊旭, 温娜娜, 罗定棋, 等, 2015. 泸州烟草黑胫病病原生理小种组成及对甲霜灵和烯酰吗啉的敏感性 [J]. 植物保护, 41(6): 178–184.]
- ZHANG CQ, ZHOU ZK, CHEN RH, et al., 2016. Preliminary report of research on *Phytophthora parasitica* physiological races in tobacco growing areas in Jiangxi Province [J]. Acta Tab Sin, 22(4): 107–110. [张超群, 周泽科, 陈荣华, 等, 2016. 江西烟区烟草黑胫病菌生理小种研究初报 [J]. 中国烟草学报, 22(4): 107–110.]
- ZHANG XM, 2005. History and current research on taxonomy of the genus *Fusarium* [J]. J Fung Res, 3(2): 59–62. [张向民, 2005. 镰刀菌属分类学研究历史与现状 [J]. 菌物研究, 3(2): 59–62.]
- ZHANG XY, DUAN HQ, LU AQ, et al., 2018. Variation of rhizosphere soil microbial flora in healthy and black shank-susceptible tobacco fields at different growth stages [J]. J Henan Agric Sci, 47(3): 63–69. [张笑宇, 段宏群, 芦阿虔, 等, 2018. 健康烟田与易感黑胫病烟田烟株不同生长期根际土壤微生物区系变化规律 [J]. 河南农业科学, 47(3): 63–69.]
- ZHOU ZK, ZHANG CQ, JIANG JX, et al., 2013. Identification of race and biovar of *Ralstonia solanacearum* from tobacco in Jiangxi Province [J]. Acta Agric Univ Jiangxi, 35(4): 738–742. [周泽科, 张超群, 蒋军喜, 等, 2013. 江西省烟草青枯菌生理小种及生化型鉴定 [J]. 江西农业大学学报, 35(4): 738–742.]
- ZOU Y, XIAO CG, MA GH, et al., 2013. Research progress on physiological specialization and pathotype identification of *Ralstonia solanacearum* [J]. Chin Plant Protect, 36(7): 21–28. [邹阳, 肖崇刚, 马冠华, 等, 2013. 青枯菌生理分化及致病型测定研究进展 [J]. 中国植保导刊, 36(7): 21–28.]

(责任编辑 周翠鸣)

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202004048



叶超, 刘锋, 安明态, 等. 贵州野生兰科植物就地保护现状及保护空缺分析 [J]. 广西植物, 2022, 42(2): 240–246.
YE C, LIU F, AN MT, et al. Analysis on *in situ* conservation status and conservation vacancy of wild Orchidaceae in Guizhou Province [J]. *Guihaia*, 2022, 42(2): 240–246.

贵州野生兰科植物就地保护现状及保护空缺分析

叶 超^{1,2}, 刘 锋^{1,2}, 安明态^{1,2*}, 杨焱冰^{1,2}

(1. 贵州大学 林学院, 贵阳 550025; 2. 贵州大学 生物多样性与自然保护研究中心, 贵阳 550025)

摘 要: 兰科(Orchidaceae)植物是植物界中最进化、种类最丰富的类群之一,有较高的环境要求和较强的生态系统依存性。由于很多兰科植物具有较高的观赏价值和药用价值,各地采挖频繁,导致其受威胁十分严重,已成为保护植物中的“旗舰”类群。该文基于文献资料和近年来课题组野外调查数据,分析贵州省野生兰科植物的地理分布状况、就地保护现状与保护空缺,以期为该地区野生兰科植物科学合理的保护管理提供参考。结果表明:(1)贵州省野生兰科植物共 343 种,其中在自然保护区内分布的物种有 291 种,就地保护率为 84.84%。(2)在兰科植物地理分布上,黔西南(221 种)>黔南(198 种)>遵义(135 种)>铜仁(110 种)>黔东南(101 种)>贵阳(82 种)>六盘水(79 种)>毕节(68 种)>安顺(65 种),黔西南和黔南分布的兰科植物及它们自然保护区内分布的兰科植物种类均远高于其他地区。(3)采用“累计筛选法”共鉴别出保护贡献率较高的前 14 个保护区,累计保护贡献率达 84.84%。总体而言,贵州省野生兰科植物受到了较全面的保护,但仍有部分物种未受到保护,且受威胁严重。

关键词: 兰科植物, 就地保护, 保护空缺, 保护贡献率, 贵州省

中图分类号: Q948 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2022)02-0240-07

Analysis on *in situ* conservation status and conservation vacancy of wild Orchidaceae in Guizhou Province

YE Chao^{1,2}, LIU Feng^{1,2}, AN Mingtai^{1,2*}, YANG Yanbing^{1,2}

(1. College of Forestry, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. Research Center for Biodiversity and Nature Conservation, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: Orchidaceae is one of the most rapidly evolved and abundant taxa in the plant kingdom. It has high environmental requirements and strong ecosystem dependence. Many Orchidaceae plants have high ornamental and medicinal values, therefore, they are frequently mined and threatened seriously, and have become the “flagship” taxa in the protected plants. Based on the literature and the field survey data of the research group in recent years, we analyzed the geographical distribution, the current situation of *in situ* conservation and conservation vacancy of wild orchids in

收稿日期: 2020-07-22

基金项目: 国家自然科学基金(31960042);国家林业和草原局野生植物保护管理项目(2019073004);生态环境部生物多样性保护重大工程专项(8-3-7-20-3) [Supported by National Natural Science Foundation of China (31960042); Wild Plant Protection and Management Project of State Forestry and Grassland Administration (2019073004); Special Project of Major Biodiversity Conservation Project of Ministry of Ecology and Environment(8-3-7-20-3)]。

第一作者: 叶超(1994-), 硕士研究生, 主要从事生物多样性保护(植物方向)与植物分类学研究, (E-mail) cqc4959@163.com。

通信作者: 安明态, 博士, 正高级实验师, 主要从事生物多样性保护(植物方向)、植物分类学与森林生态学研究, (E-mail) gdanmingtai@126.com。

Guizhou Province, so as to provide a reference for the scientific and reasonable conservation and management of wild orchids in this area. The results were as follows: (1) There are 343 species of wild orchids in Guizhou Province, among which 291 species are distributed in the nature reserve, and the *in situ* conservation rate is 84.84%. (2) In terms of geographical distribution, Qianxinan(221) > Qiannan (198) > Zunyi(135) > Tongren(110) > Qiandongnan(101) > Guiyang(82) > Liupanshui(79) > Bijie(68) > Anshun(65), the species of orchids in Qianxinan and Qiannan and their nature reserves are much higher than those in other areas. (3) The top 14 reserves with high conservation contribution rate were identified by “cumulative screening method”, and the cumulative conservation contribution rate reached 84.84%. In general, the wild Orchidaceae plants in Guizhou Province have been fully protected, but there are still some species not protected and seriously threatened.

Key words: Orchid, *in situ* conservation, conservation vacancy, conservation contribution rate, Guizhou Province

兰科 (Orchidaceae) 是有花植物中最大的科之一, 物种种数仅次于菊科, 且每年被描述的新物种中有 500 种出自这两个科 (Chase et al., 2015)。目前全世界约有兰科植物 736 属 28 000 种 (Christenhusz et al., 2016), 并且正在以每年 13 个属的速度被描述 (1994 年至 2004 年的平均值) (Schuiteman, 2004), 广泛分布于除两极和极端干旱沙漠地区以外的各种陆地生态系统中, 尤以热带地区分布最多 (Gustavo, 1996)。多年来, 兰科作为保护植物中的“旗舰”类群 (罗毅波等, 2003), 深受国内外研究者的青睐, 大量有关兰科植物的研究被报道。然而, 这些报道多集中在某些重要物种或类群的形态学 (李秀玲等, 2015; Necmettin, 2016)、细胞学 (Oliveira et al., 2015; Moraes et al., 2016)、菌根生物学 (Hajong et al., 2013)、传粉生物学 (任宗昕等, 2012)、育种及组培快繁技术 (Dong et al., 2015) 等方面, 有关兰科植物就地保护效率的研究极少, 目前仅见秦卫华等 (2012) 对中国 1 334 种兰科植物在 543 个自然保护区中的就地保护水平进行了划分, 并认为仅有 4.8% 的兰科植物受到了“有效保护”。中国作为世界上野生兰科植物最丰富的国家之一 (张殷波等, 2015), 目前共记录兰科植物 205 属 1 556 种 (王利松等, 2015), 约有 70% 的种类在国家级自然保护区等保护地内有分布, 就地保护 (*in situ* conservation) 成为了我国兰科植物保护的主要方式 (金效华, 2019)。就地保护是生物多样性保护最有效的措施 (马建章等, 2012), 而建立自然保护区是对生物资源进行就地保护最有效的途径 (张殷波等, 2019)。

西南高山峡谷区是我国野生兰科植物的重点分布区域, 其独特的地理位置和复杂的自然环境

为野生兰科植物提供了适宜的环境 (秦卫华等, 2012; 张殷波等, 2015)。贵州地处我国西南边陲, 是世界喀斯特地貌发育最典型的地区之一, 喀斯特面积占全省面积的 61.9% (李宗发, 2011), 地形多变, 山高谷深, 沟岭纵横, 气候垂直分异大, 水热资源充沛 (周政贤, 1992), 其复杂的环境和良好的水热条件为兰科植物的生存提供了条件。贵州省自 1978 年建立第一个自然保护区——梵净山自然保护区以来, 至今已建成 124 个自然保护区 (<http://www.mee.gov.cn/stbh/zrbhdjg/201611/P020161125559865886359.pdf>), 总面积达 8 898.2 km², 占全省面积的 5.05%。但是, 这些保护区对贵州省野生兰科植物的保护情况与保护贡献率如何仍有待研究。本研究以贵州省野生兰科植物为研究对象, 分析自然保护区内外的兰科植物地理分布特点及其保护现状, 评价其就地保护及保护空缺, 对有关部门制定兰科植物的保护策略和管理方案具有一定的理论指导意义。

1 数据与方法

1.1 数据来源

本文兰科植物名录的资料收集截至 2020 年 3 月 30 日。主要查阅了《贵州野生兰科植物鉴别手册》(陈东升等, 2019)、《贵州维管束植物编目》(罗扬等, 2015)、《贵州野生兰科植物》(周庆, 2017)、《贵阳市野生兰科植物资源》(赵熙黔和安明态, 2015)、省内已出版的自然保护区科学考察集 (张华海等, 2006; 罗杨等, 2010; 喻理飞等, 2016) 等相关专著与近年来已发表的兰科植物新纪录等相关资料 (金效华等, 2002; 冉景丞和鲁成巍, 2009; 杨焱冰等, 2017), 以及课题组近年来在

承担贵州省第二次全国重点保护野生植物资源调查、贵州省相关保护区综合科学考察、林木种质资源调查、自然保护区生物多样性监测等工作中收集的兰科植物资料,整理得出贵州省野生兰科植物共计 343 种(表 1),依据 Species 2000 China Node(<http://www.sp2000.org.cn>) 的分类系统,隶属于 92 属。

表 1 贵州野生兰科植物组成及受胁等级
Table 1 Composition and endangered levels
of wild Orchidaceae in Guizhou

受威胁等级 Endangered level	保护区内分布 Distribution in the protected area	保护区外分布 Distribution outside protected areas	合计 Total
极危 Critically endangered	13	3	16
濒危 Endangered	38	12	50
易危 Vulnerable	61	3	64
近危 Near threatened	47	7	54
无危 Least concern	123	21	144
数据缺乏 Data deficient	9	6	15
合计 Total	291	52	343

注:此处保护区内分布是指只要在贵州省任一保护区内有分布的物种,即列入。
Note: The species in the protected area here are listed as long as they are distributed in any protected area in Guizhou Province.

1.2 自然保护区保护贡献率分析

本研究从保护野生兰科植物的角度出发,采用累计筛选法(张股波等,2014)来评价贵州省现有自然保护区对野生兰科植物的保护贡献率。此方法依据“保护物种最多”“互补性最高”及“保护面积最小”3 个原则,在自然保护区网络中鉴别出对贵州省野生兰科植物保护贡献率最高且补充贡献率也较高的自然保护区。具体步骤如下:首先,统计贵州省现有的 124 个保护区中已知分布的野生兰科植物的物种数,按从多到少排序,将包含野生兰科植物种类数量最多且面积最小的保护区作为对兰科植物保护贡献率第一位的保护区,同时认为该保护区内所包含的兰科植物已受到保护,将其从总的兰科

植物中剔除;然后,将其他的自然保护区按照包含剩余野生兰科植物的种类数量按照从多到少排序,选出此时包含兰科植物种类数量最多且所占面积最小的自然保护区作为保护贡献率第二位的保护区;之后,再重复以上步骤,直到所有的在保护区内有分布的野生兰科植物均被剔除掉;最后,得到贵州省野生兰科植物保护贡献率最高以及补充贡献率也较高的自然保护区位序。

2 结果与分析

2.1 野生兰科植物地理分布特点及就地保护现状

贵州省已知的 343 种野生兰科植物广泛分布于全省境内(图 1),分布极不均衡,地区差异极大。其中:以西南部的黔西南州分布最多(221 种),占贵州省野生兰科植物的 63.56%;其次为黔南州(198 种),占 57.73%;黔中的安顺市分布最少,仅有 65 种,占 18.95%。贵州省 25 个自然保护区(10 个国家级、6 个省级和 9 个县级)内有 291 种野生兰科植物分布,就地保护率达 84.84%。各行政区的就地保护率虽有一定的差异,但总体上仍较好。如毕节市分布的 68 种在保护区内均有分布,就地保护率最高,为 100%;黔东南州和六盘水市分别有 1 种、2 种未在保护区内有分布,就地保护率分别为 99.04%和 96.77%;黔西南州有 31 种未分布于保护区内,就地保护率较其他各地州市差,但其就地保护率仍达 85.02%,表明贵州省自然保护区对野生兰科植物的就地保护成效较佳,远高于我国兰科就地保护率(51.9%)(秦卫华等,2012)。

尽管如此,贵州省兰科植物受威胁程度仍非常高。贵州省野生兰科植物处于受威胁(极危、濒危和易危)等级的有 130 种,占我国高等植物受威胁物种(3 879 种)(覃海宁等,2017)的 3.35%,占我国受威胁兰科植物(653 种)的 19.91%,占贵州省兰科植物的 37.90%。其中,极危种在保护区内分布的有 13 种,占贵州省野生兰科植物极危种的 81.25%,濒危种 38 种,占 76.00%,易危种 61 种,占 87.14%。总体来看,全省达到易危以上等级的物种绝大多数通过保护区方式得到了保护,但由于兰科植物多为重要观赏植物和药用植物,全省各地采挖兰科植物现象严重,导致兰科植物资源急剧减少甚至区域性灭绝率显著提高,而且兰科植物暂时未纳入国家保护植物名录,保护力度不

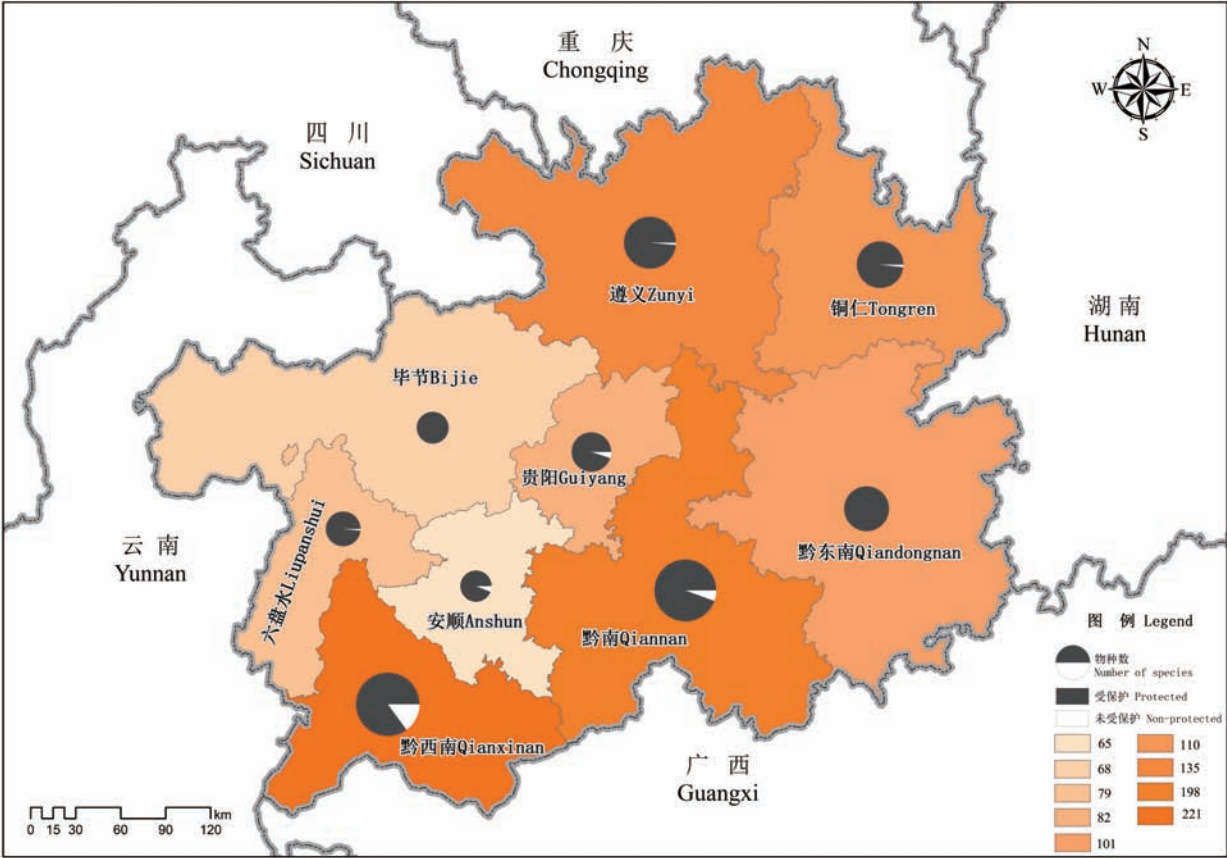


图 1 贵州省野生兰科植物地理分布

Fig. 1 Geographical distribution of wild Orchidaceae in Guizhou Province

足,兰科植物受威胁状况并没有得到缓解。

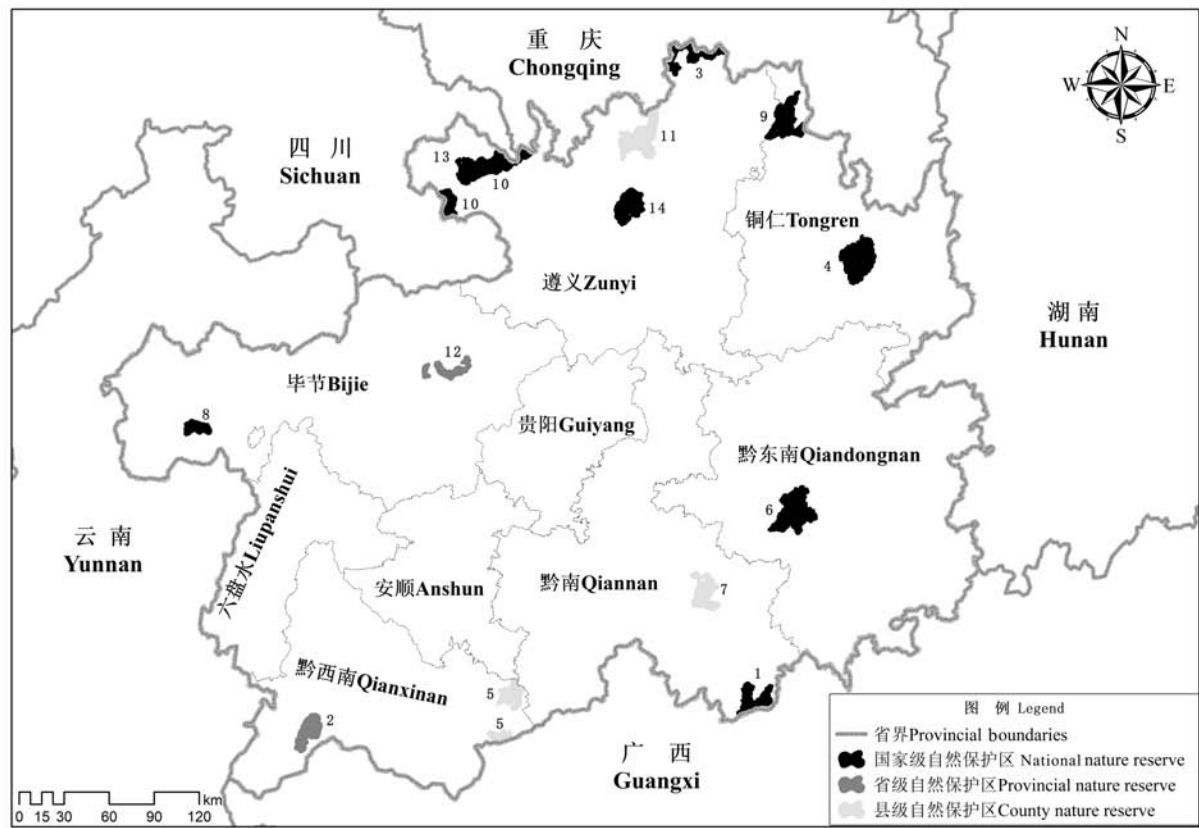
2.2 保护空缺

目前,贵州省野生兰科植物有 52 种未见在保护区内分布,其中:极危 3 种,为杏黄兜兰(*Paphiopedilum armeniacum*)、贵州杜鹃兰(*Cremastra guizhouensis*)、丽江杓兰(*Cypripedium lichiangense*);濒危种包括贵州地宝兰(*Geodorum eulophioides*)、文山兜兰(*Paphiopedilum wenshanense*)和斑叶杓兰(*Cypripedium margaritaceum*)等 12 种;易危种包括合柱兰(*Diplomeris pulchella*)、滇藏斑叶兰(*Goodyera robusta*)和长距美冠兰(*Eulophia faberi*)等 9 种;近危种包括离萼杓兰(*Cypripedium plectrochilum*)、宽药隔玉凤花(*Habenaria limprichtii*)和喙房坡参(*Habenaria rostrata*)等 8 种;无危种包括流苏金石斛(*Flickingeria fimbriata*)、湿地玉凤花(*Habenaria humidicola*)和白肋线柱兰(*Zeuxine goodyeroides*)等 20 种。这些种多为近年来发表的新种或新记录

种,在贵州省内仅有零星的分布,如贵州杜鹃兰和丽江杓兰等 39 种均只记录到一个分布点,喙房坡参仅在镇宁县发现 3 株,且还受放牧的威胁。

2.3 自然保护区的保护贡献率

经筛选后,贵州省自然保护区对野生兰科植物保护贡献率最高的是茂兰国家级自然保护区(129 种),占贵州省兰科植物总数的 37.61%;其次,筛选出补充保护贡献率最高的是坡岗州级自然保护区,补充保护物种数 48 种,累计保护物种 177 种,累计保护贡献率达到 51.60%;随后依次筛选出大沙河国家级自然保护区、梵净山国家级自然保护区、望谟苏铁县级自然保护区和雷公山国家级自然保护区,这 4 个保护区共补充保护物种 93 种,累计保护物种 270 种,累计保护贡献率达到 78.72%。通过筛选,共得到 14 个保护贡献率最高且最互补的保护区(图 2),并将贵州省在自然保护区内有分布的 291 种野生兰科植物完全包含在



1. 茂兰国家级自然保护区; 2. 坡岗州级自然保护区; 3. 大沙河国家级自然保护区; 4. 梵净山国家级自然保护区; 5. 望漠苏铁自然保护区; 6. 雷公山国家级自然保护区; 7. 都柳江源湿地自然保护区; 8. 草海国家级自然保护区; 9. 麻阳河国家级自然保护区; 10. 习水国家级自然保护区; 11. 湄潭自然保护区; 12. 百里杜鹃省级自然保护区; 13. 赤水桫欏国家级自然保护区; 14. 宽阔水国家级自然保护区。
1. Maolan National Nature Reserve; 2. Pogang Municipal Nature Reserve; 3. Dashahe National Nature Reserve; 4. Fanjingshan National Nature Reserve; 5. Wangmo Cycas Nature Reserve; 6. Leigongshan National Nature Reserve; 7. Duliu River Wetland Nature Reserve; 8. Caohai National Nature Reserve; 9. Mayanghe National Nature Reserve; 10. Xishui National Nature Reserve; 11. Fuhun Nature Reserve; 12. Baili Azalea Provincial Nature Reserve; 13. Chishui Alsophila National Nature Reserve; 14. Kuankuoshui National Nature Reserve.

图 2 14 个保护贡献率最高且最互补的自然保护区
Fig. 2 14 the most complementary nature reserves with the highest conservation contribution rate

内,总面积占贵州省保护区总面积的 38.07%,累计保护贡献率达到 84.84%。通过本研究得出,筛选得到的前 14 个自然保护区对贵州省野生兰科植物的保护贡献率最高。其中,有 9 个为国家级自然保护区、2 个省级自然保护区,合计达 11 个省级以上保护区,占前 14 个保护区的 78.57%,表明省级以上自然保护区尤其是国家级自然保护区对贵州省野生兰科植物有较高的保护贡献率且保护成效显著。贵州省国家级自然保护区中仅佛顶山国家级自然保护区未筛选到,但其仍保护了 45 种野生兰科植物。

3 讨论与结论

贵州省野生兰科植物种类较多,分布广泛,生境复杂,调查难度高,即使是物种最基本分布数据的获取仍是任重道远,兰科植物分布面积、资源数量等数据的获取尤为困难,在很大程度上限制了对野生兰科植物资源现状的客观评估,难以逐一对研究对象的种群数量和分布面积实施详细的调查。因此,在进行保护效果的评价过程中,本文仅以野生兰科植物在保护区内是否有分布为依据,

对其就地保护现状进行初步评价。

本研究采用累计筛选法得出在野生兰科植物保护中应优先考虑的保护区,这 14 个保护区的累计保护贡献率即可涵盖贵州省 124 个保护区种分布的全部兰科植物物种。但是,此评价方法没有考虑物种间的差异性及物种的遗传多样性,且只要在保护区内有分布的物种,我们即认为其已受到保护,未涉及到种群数量、种群分布面积以及其在保护区内具体的分布环境等指标,存在一定的局限性。今后可以通过更为全面的调查与监测来完善贵州省野生兰科植物数据库,进而对贵州省野生兰科植物的实际地理分布以及就地保护现状进行更为精确和科学的评价。

对于评估结果中的 52 种目前未受到自然保护区保护的兰科植物,39 个物种仅在 1 个县内发现有分布,兴义、安龙、兴仁分别有 10 种、7 种和 6 种未分布于保护区内。兰科植物的多样性能客观地反映一个地区生物多样性的状况(金效华等, 2011),结合这些兰科植物的分布情况,将这些种的分布地列为贵州省生物多样性的保护空缺地,对这些保护空缺物种新建或扩建保护区,可以为贵州省野生兰科植物的就地保护工作以及贵州省自然保护区的进一步优化提供一定的依据。如兴义的坡岗自然保护区,可在条件允许的情况下进行扩建;紫云县发现较大面积的硬叶兜兰种群以及其他十余种兰科植物的分布,且正面临放牧的干扰,可以考虑建立兰科植物的保护小区甚至保护区。针对某些不适合或不便进行就地保护的种(如丽江杓兰、喙房坡参),可结合迁地保护将其引种至植物园等迁地保护中心进行保护。在进行保护效率评估中,在 5 个以上保护区内实现了就地保护的物种有 75 种,占贵州省野生兰科植物的 21.87%。然而,大部分兰科植物,尤其是一些贵州特有种分布范围极其狭窄,仅在少数的一个或几个保护区内实现就地保护,甚至有些物种(如狭瓣玉凤花、贵州石仙桃)自发表后在贵州野外未见。因此,在保护区内必须加强基础研究工作,进行系统的本底资源调查,对保护区内野生兰科植物的分布进行长期的监测,实时掌握其种群动态变化,进行群落学特性的研究,真正保证就地保护成效。

通过近年来课题组在全省的调查研究,初步确定北盘江地区(尤其是下游地区)为贵州省兰科植物分布最丰富的地区,然而,该区域也是兰科植

物丧失最严重的地区。由于很多兰科植物具有较高的观赏价值或药用价值,许多人对国兰、兜兰、石斛、天麻等价值较高的兰科植物基本上是遇着即挖、逢见必采。而且,在法律上,兰科植物的保护在我国尚缺乏法律依据,这些兰科植物与普通杂草无异,在各大网络平台上公开叫卖,并且运输畅通无阻,各地林业管理部门执法无依据,无法有效制止市场兜售和偷采盗采事件,使得兰花交易更加频繁。因此,兰科植物的立法保护迫在眉睫。然而,科学合理的保护是需要资源清、本底明为前提的,以研究促保护是野生植物资源保护的有效途径。目前,国家已经高度重视兰科植物的保护工作,国家林业和草原局 2019 年已经启动了全国野生兰科植物资源调查评估,贵州省列入首批调查省区。国家第二批重点保护野生植物名录的编制工作已经启动,兰科植物作为野生植物保护中的“旗舰”类群,有望得到国家法律保护,兰科植物的保护研究也必将引起更多人关注。

参考文献:

- CHASE MW, CAMERON KM, FREUDENSTEIN JV, et al., 2015. An updated classification of Orchidaceae [J]. Bot J Linn Soc, 177(2): 151-174.
- CHRISTENHUSZ MJM, BYNG JW, 2016. The number of known plants species in the world and its annual increase [J]. Phytotaxa, 261(3): 201-217.
- DONG GK, KANG KK, BEEN CG, 2015. Development of intergeneric hybrids between wind orchids (*Sedirea japonica* and *Neofinetia falcata*) and moth orchids (*Phalaenopsis alliances*) [J]. Horti Environ Biotechnol, 56(1): 67-78.
- GUSTAVO AR, 1996. The orchid family [M]//IUCN/SSC Orchid Specialist Group (ed.), Orchids-Status Survey and Conservation Action Plan. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK: 3-4.
- HAJONG S, KUMARIA S, 2013. Comparative study of key phosphorus and nitrogen metabolizing enzymes in mycorrhizal and non-mycorrhizal plants of *Dendrobium chrysanthum* Wall. ex Lindl. [J]. Acta Physiol Plant, 35(7): 2311-2322.
- JIN XH, 2019. Remarkable achievements have been made in the protection of orchids in China [J]. Land Green, (1): 46-47. [金效华, 2019. 中国兰科植物保护取得显著成就 [J]. 国土绿化, (1): 46-47.]
- JIN XH, JI ZH, QIN HN, et al., 2002. Novelities of the Orchidaceae of Guizhou, China [J]. Acta Phytotax Sin, (1): 82-88. [金效华, 吉占和, 覃海宁, 等, 2002. 贵州兰科植物增补 [J]. 植物分类学报, (1): 82-88.]
- JIN XH, XIANG XG, CHEN B, 2011. Biodiversity of orchids in remnant native forests in Nujiang Valley, Yunnan

- Province, China [J]. *Biodivers Sci*, 19(1): 120–123. [金效华, 向小果, 陈彬, 2011. 怒江河谷低海拔地区残存原生植被中兰科植物多样性 [J]. 生物多样性, 19(1): 120–123.]
- LI XL, ZHOU JY, WANG XG, et al., 2015. Identification of *Paphiopedilum concolor* and its relative species [J]. *SW Chin J Agric Sci*, 28(5): 2223–2227. [李秀玲, 周锦业, 王晓国, 等, 2015. 同色兜兰及其近缘种鉴别研究 [J]. 西南农业学报, 28(5): 2223–2227.]
- LI ZF, 2011. Partition of karst landform in Guizhou [J]. *Guizhou Geol*, 28(3): 177–181. [李宗发, 2011. 贵州喀斯特地貌分区 [J]. 贵州地质, 28(3): 177–181.]
- LUO Y, DENG LX, YANG CH, 2015. Guizhou vascular plant catalogue [M]. Beijing: China Forestry Press: 533–554. [罗扬, 邓伦秀, 杨成华, 2015. 贵州维管束植物编目 [M]. 北京: 中国林业出版社: 533–554.]
- LUO Y, LIU L, 2010. Scientific survey of the Wangmo Caycad Nature Reserve of Guizhou [M]. Guiyang: Guizhou Science and Technology Press: 297–301. [罗杨, 刘浪, 2010. 贵州望漠苏铁自然保护区科学考察集 [M]. 贵阳: 贵州科技出版社: 297–301.]
- LUO YB, JIA JS, WANG CL, 2003. A general review of the conservation status of Chinese orchids [J]. *Biodivers Sci*, 11(1): 70–77. [罗毅波, 贾建生, 王春玲, 2003. 中国兰科植物保育的现状和展望 [J]. 生物多样性, 11(1): 70–77.]
- MA JZ, RONG K, CHENG K, 2012. Research and practice on biodiversity in situ conservation in China: progress and prospect [J]. *Biodivers Sci*, 20(5): 551–558. [马建章, 戎可, 程鲲, 2012. 中国生物多样性就地保护的研究与实践 [J]. 生物多样性, 20(5): 551–558.]
- MORAES AP, KOEHLER S, CABRAL JS, et al., 2016. Karyotype diversity and genome size variation in Neotropical Maxillariinae orchids [J]. *Plant Biol*, 19(2): 298–308.
- NECMETTIN G, 2016. Seed micromorphology of *Orchis Tourn. ex L.* (Orchidaceae) and allied genera growing in Edirne Province, Turkey [J]. *Phytokeys*, 68(68): 9–25.
- OLIVEIRA IGD, MORAES AP, DE ALMEIDA EM, et al., 2015. Chromosomal evolution in *Pleurothallidinae* (Orchidaceae: Epidendroideae) with an emphasis on the genus *Acianthera*: chromosome numbers and heterochromatin [J]. *Bot J Linn Soc*, 178(1): 102–120.
- QIN HN, YANG Y, DONG SY, et al., 2017. Threatened species list of China's higher plants [J]. *Biodivers Sci*, 25(7): 696–744. [覃海宁, 杨永, 董仕勇, 等, 2017. 中国高等植物受威胁物种名录 [J]. 生物多样性, 25(7): 696–744.]
- QIN WH, JIANG MK, XU WG, et al., 2012. Assessment of *in situ* conservation of 1,334 native orchids in China [J]. *Biodivers Sci*, 20(2): 177–183. [秦卫华, 蒋明康, 徐网谷, 等, 2012. 中国1,334种兰科植物就地保护状况评价 [J]. 生物多样性, 20(2): 177–183.]
- RAN JC, LU CW, 2009. Current situation and protection and utilization ways of Orchidaceae plant resources in Maolan Nature Reserve [J]. *J Anhui Agric Sci*, 37(11): 5209–5211. [冉景丞, 鲁成巍, 2009. 茂兰自然保护区兰科植物资源现状及保护利用途径 [J]. 安徽农业科学, 37(11): 5209–5211.]
- REN ZX, WANG H, LUO YB, 2012. Deceptive pollination of orchids [J]. *Biodivers Sci*, 20(3): 270–279. [任宗昕, 王红, 罗毅波, 2012. 兰科植物欺骗性传粉 [J]. 生物多样性, 20(3): 270–279.]
- SCHUITEMAN A, 2004. *Devogelia* (Orchidaceae), a new genus from the Moluccas and New Guinea [J]. *Blum J Plant Taxon Plant Geogra*, 49(2): 361–366.
- WANG LS, JIA Y, ZHANG XC, et al., 2015. Overview of higher plant diversity in China [J]. *Biodivers Sci*, 23(2): 217–224. [王利松, 贾渝, 张宪春, 等, 2015. 中国高等植物多样性 [J]. 生物多样性, 23(2): 217–224.]
- YANG YB, WEI HY, AN MT, et al., 2017. New distribution records of Orchidaceae in Guizhou Province [J]. *J Mt Agric Biol*, 36(6): 74–76. [杨焱冰, 魏海燕, 安明态, 等, 2017. 贵州省兰科植物新记录 [J]. 山地农业生物学报, 36(6): 74–76.]
- YU LF, SU HJ, AN MT, et al., 2016. The scientific survey in Fodingshan Nature Reserve—Wuling Mountain-miaoling Junction Conservation Area, a priority area for biodiversity conservation in China [M]. Guiyang: Guizhou Science and Technology Press: 150–155. [喻理飞, 粟海军, 安明态, 等, 2016. 贵州佛顶山生物多样性——中国生物多样性保护优先区武陵山——苗岭结点保护区研究 [M]. 贵阳: 贵州科技出版社: 150–155.]
- ZHANG HH, LONG QD, LIAO DP, 2006. Comprehensive scientific survey of the Xingyi Pogang Nature Reserve [M]. Guiyang: Guizhou Science and Technology Press: 85–90. [张华海, 龙启德, 廖德平, 2006. 兴义坡岗自然保护区综合科学考察集 [M]. 贵阳: 贵州科技出版社: 85–90.]
- ZHANG YB, DU HD, JIN XH, et al., 2015. Species diversity and geographic distribution of wild Orchidaceae in China [J]. *Chin Sci Bull*, 60(2): 179–188. [张殷波, 杜昊东, 金效华, 等, 2015. 中国野生兰科植物物种多样性与地理分布 [J]. 科学通报, 60(2): 179–188.]
- ZHANG YB, LIU YL, QIN H, et al., 2019. Prediction on spatial migration of suitable distribution of *Elaeagnus mollis* under climate change conditions in Shanxi Province, China [J]. *Chin J Appl Ecol*, 30(2): 496–502. [张殷波, 刘彦岚, 秦浩, 等, 2019. 气候变化条件下山西翅果油树适宜分布区的空间迁移预测 [J]. 应用生态学报, 30(2): 496–502.]
- ZHANG YB, ZHANG XL, YUAN H, 2014. Assessing the *in situ* conservation status of key protected wild plants in Shanxi Province [J]. *Biodivers Sci*, 22(2): 167–173. [张殷波, 张晓龙, 苑虎, 2014. 山西省重点保护野生植物就地保护现状 [J]. 生物多样性, 22(2): 167–173.]
- ZHAO XQ, AN MT, 2015. Wild orchid plant resources in Guiyang [M]. Guiyang: Guizhou Science and Technology Press: 127–281. [赵熙黔, 安明态, 2015. 贵阳市野生兰科植物资源 [M]. 贵阳: 贵州科技出版社: 127–281.]
- ZHOU Q, 2017. Wild orchids in guizhou [M]. Guiyang: Guizhou Science and Technology Press: 1–456. [周庆, 2017. 贵州野生兰科植物 [M]. 贵阳: 贵州科技出版社: 1–456.]
- ZHOU ZX, 1992. Guizhou forest [M]. Guiyang: Guizhou Science and Technology Press: 26–33. [周政贤, 1992. 贵州森林 [M]. 贵阳: 贵州科技出版社: 26–33.]

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202004025



董鹏, 彭智奇, 朱弘, 等. 南京老山秤锤树空间分布格局及种间关联性 [J]. 广西植物, 2022, 42(2): 247–256.

DONG P, PENG ZQ, ZHU H, et al. Spatial distribution patterns and interspecific correlation of *Sinojackia xylocarpa* in Laoshan Mountain of Nanjing [J]. Guihaia, 2022, 42(2): 247–256.

南京老山秤锤树空间分布格局及种间关联性

董鹏¹, 彭智奇¹, 朱弘^{1,2}, 朱淑霞¹, 董京京¹, 翟飞飞³,
钟育谦³, 郑爱春⁴, 王贤荣¹, 伊贤贵^{1*}

(1. 南京林业大学 南方现代林业协同创新中心 生物与环境学院, 南京 210037; 2. 浙江省林业科学研究院, 杭州 310023; 3. 江苏省野生动植物保护站, 南京 210037; 4. 南京市浦口林业站 南京 210037)

摘要:以南京老山 1 hm²样地秤锤树(*Sinojackia xylocarpa*)天然种群为研究对象,运用成对 $g(r)$ 函数,选择完全随机模型、异质泊松模型与先决条件零模型,分析秤锤树种群结构和空间分布格局及其空间关联性,从空间格局角度来深入认识其种群结构和分布格局及形成该格局可能存在的机制并提出保护建议。结果表明:(1)秤锤树天然种群中小径个体数量占优,属于增长型种群。(2)种内空间分布研究中,基于完全随机模型分析,秤锤树种群在尺度 0~26 m 时为聚集分布,尺度 29~30 m 时为均匀分布;基于异质泊松模型分析,秤锤树种群在 0~23 m 时为聚集分布,尺度 27~30 m 时为均匀分布。秤锤树空间分布表现为由聚集分布向均匀分布变化。(3)主要种间关联性研究中,秤锤树与朴树(*Celtis sinensis*)的种间关联性表现为小尺度下负关联,随着空间尺度的增加变为正关联。秤锤树与黄连木(*Pistacia chinensis*)和秤锤树与三角槭(*Acer buergerianum*)的种间关联性大致相同,基本为大尺度下正关联,偶尔出现负关联和无关联。上述结果表明,秤锤树种群更新状况良好,种群空间分布以聚集分布为主,其主要受种间竞争、扩散限制与密度制约的影响。基于种群现状开展就地保护与适当干扰其生存群落,是濒危物种秤锤树的科学有效的保护措施。

关键词: 秤锤树, 点格局分析, 空间分布格局, 种间关联性, 南京老山**中图分类号:** Q948 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2022)02-0247-10

Spatial distribution patterns and interspecific correlation of *Sinojackia xylocarpa* in Laoshan Mountain of Nanjing

DONG Peng¹, PENG Zhiqi¹, ZHU Hong^{1,2}, ZHU Shuxia¹, DONG Jingjing¹, ZHAI Feifei³,
ZHONG Yuqian³, ZHENG Aichun⁴, WANG Xianrong¹, YI Xiangui^{1*}

(1. Collaborative Innovation Center of the Southern Modern Forestry, College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 2. Zhejiang Academy of Forestry, Hangzhou 310023, China; 3. Jiangsu Wildlife Protection Station, Nanjing 210037, China; 4. Nanjing Pukou Forestry Station, Nanjing 210037, China)

Abstract: The species of *Sinojackia xylocarpa* in sample plot of 1 hm² in Laoshan Mountain of Nanjing was taken as the object of study. Using the pairing correlation function $g(r)$ and three null models: complete spatial randomness (CSR), heterogeneous Poisson (HP) and antecedent condition (AC) to analyze the relation between the structure and spatial

收稿日期: 2020-09-22**基金项目:** 绿色江苏专项资金(021108043);第二次全国重点保护野生植物资源调查专项资金(031010251) [Supported by Special Fund of Green Jiangsu (021108043); Special Fund of the Second National Key Protection of Wild Plant Resource Survey (031010251)].**第一作者:** 董鹏(1995-), 硕士研究生, 研究方向植物学, (E-mail) 15996310353@163.com。**通信作者:** 伊贤贵, 硕士, 讲师, 研究方向植物分类学, (E-mail) yixiangui@njfu.edu.cn。

distribution of the population. The potential mechanism of this pattern formation could be deeply recognized from the view of spatial pattern. The results were as follows: (1) The number of individuals of small DBH class in natural *S. xylocarpa* population was dominant, and it was a growing population. (2) In the study of point pattern analysis, the *S. xylocarpa* population showed the aggregate distribution at scale 0–26 m, and uniformly distribution at scale 29–30 m based on the CSR; and the *S. xylocarpa* population showed the aggregate distribution at scale 0–23 m, and uniformly distribution at scale 27–30 m based on the HP. The spatial distribution pattern of *S. xylocarpa* showed a trend of changing from aggregate distribution to uniformly distribution. (3) In the study of interspecific correlation, the spatial relationship between *S. xylocarpa* and *Celtis sinensis* showed from the negative correlation to the positive correlation. The spatial relationship between *Sinojackia xylocarpa* and *Pistacia chinensis* and that between *Sinojackia xylocarpa* and *Acer buergerianum* were about the same. There were positive correlations between them on a large scale, and occasionally negative correlation and no correlation. The above results indicate that *Sinojackia xylocarpa* population is in a good regeneration state. The spatial distribution pattern of *S. xylocarpa* population is basically aggregate distribution, and is mainly affected by interspecific competition, diffusion restriction and density restriction. Based on population status, carrying out *in situ* protection and appropriately disturbing the community are a scientific and effective protection measure for the endangered species of *S. xylocarpa*.

Key words: *Sinojackia xylocarpa*, point pattern analysis, spatial distribution pattern, interspecific correlation, Laoshan Mountain of Nanjing

种群的空间分布格局是指种群内所有个体在一定空间范围内的分布情况 (Lan et al., 2012; Velázquez et al., 2016), 能够反映种间关系 (侯向阳和韩进轩, 1997)、种间的共存机制 (何增丽等, 2017)、推测种群演替格局形成的过程 (龚直文等, 2010) 等, 是生态学研究的热点之一 (McIntire & Fajardo, 2009; 陈倩等, 2018)。研究植物空间格局的方法很多, 目前采用点格局分析的手段成为主流, 点格局分析在一定空间范围内不受尺度限制, 能够将每个个体视为二维空间中的点, 从而最大限度地利用物种的空间位置信息分析种群分布格局或不同种群间的关联性, 具体应用于研究物种分布受环境差异的影响 (郭屹立等, 2015)、物种空间分布与种间关联性 (胡满等, 2019)、濒危植物空间分布格局 (周赛霞等, 2019)、群落中优势种群空间格局 (王亚飞等, 2020) 等。开展强调物种空间分布和种群结构的调查与研究是对野外极小种群的保护与拯救 (黄小等, 2020), 其研究结果对珍稀濒危植物保护与生物多样性维持方面至关重要。

秤锤树 (*Sinojackia xylocarpa*) 是我国特有的安息香科植物, 被列入国家 II 级重点保护野生植物名录。由我国著名植物学家胡先骕发表于 1928 年, 其模式标本采自南京。秤锤树种子具有深度休眠性 (贾书果和沈永宝, 2007), 并且木质化的厚种皮难以吸引动物传播, 导致秤锤树自然更新能力弱与种子扩散有限, 加之人类生产严重破坏其

片段化生境, 20 世纪 70 年代后在南京多次调查中均未发现野生秤锤树, 一度被部分学者认为秤锤树在南京野外已灭绝 (郝日明等, 2000; 陈瑞冰等, 2015)。全国第二次重点保护野生植物资源调查于南京老山国家森林公园内重新发现秤锤树天然种群 (杨国栋等, 2018)。

南京老山国家森林公园为秤锤树重要的原生分布区, 在人为活动干扰频繁的华东地区, 秤锤树物种研究对于珍稀濒危物种与极小种群相关研究具有重要的借鉴意义。目前仅有对其生存环境的分析报道 (杨国栋等, 2018), 尚无对其空间分布与种群结构的研究。该文以老山 1 hm² 样地中的秤锤树为研究对象, 通过 $g(r)$ 成对函数和不同零模型对该种空间分布与空间关联性分析, 探讨种间竞争、环境因素、自身生物学特性等对其空间格局影响, 以期揭示秤锤树种群生存现状以及群落优势物种空间关系, 为原生分布区内秤锤树天然种群的保护提供理论依据。

1 研究区与方法

1.1 研究区概况

南京老山国家森林公园位于江苏省南京市西北郊, 118°30' E、30°40' N, 被誉为“南京绿肺”“江北明珠” (钟华瀚等, 2018), 目前是江苏省最大的国家森林公园。地貌属低山丘陵, 地处亚热带季

风气候区,冬冷夏热,四季分明,平均降雨量 1 106.5 mm,年平均温度 15.4 ℃,年极端气温最高 39.7 ℃,最低 -13.1 ℃,年平均降水量 1 106 mm,日照充足,雨量充沛。森林面积约 5 440.36 hm²,区域自然植被属次生发育的落叶阔叶与常绿阔叶混交林,以朴树(*Celtis sinensis*)、黄连木(*Pistacia chinensis*)、三角槭(*Acer buergerianum*)、榉树(*Zelkova serrata*)、枫杨(*Pterocarya stenoptera*)与盐肤木(*Rhus chinensis*)等为主。

1.2 研究方法

1.2.1 样地设置 在南京老山选取秤锤树天然种群主要分布区(图 1),设置 1 hm²的样地,以大样方西南角为坐标原点,南北方向为纵轴,东西方向为横轴,东西长 100 m,南北长 100 m,分成 400 个 5 m × 5 m 的小样方进行实地调研。调查森林群落信息:乔木层植物的物种名、主干编号、胸径、树高、冠幅、坐标;灌木层植物的物种名、高度、冠幅、盖度;草本层植物的物种名、盖度、高度。

1.2.2 重要值计算 分别计算乔木层和灌木层重要值(王世彤等,2018):

乔木重要值(%)=(相对多度+相对频度+相对显著度)/3;灌木重要值(%)=(相对多度+相对频度+相对盖度)/3;相对多度(%)=(某个种的株数/所有种的总株数)×100;相对频度(%)=(某个种的频度/所有种的频度)×100;相对显著度(%)=(某个种的胸高断面面积/所有种的胸高段面积之和)×100;相对盖度(%)=(某个种的盖度之和/所有种的盖度之和)×100。

1.2.3 种群径级划分 采用径级代替龄级的方法(金鑫等,2018;黄小等,2021),本研究结合样地内秤锤树径级特征,将秤锤树径级划分为 9 个径级:I 级 DBH<2 cm,Ⅱ级 2≤DBH<4 cm,Ⅲ级 4≤DBH<6 cm,Ⅳ级 6≤DBH<8 cm,Ⅴ级 8≤DBH<10 cm,Ⅵ级 10≤DBH<12 cm,Ⅶ级 12≤DBH<14 cm,Ⅷ级 14≤DBH<16 cm,Ⅸ级 DBH≥16 cm。

1.2.4 点格局分析 植物群落的分布格局与空间尺度关系紧密。本文点格局分析采用单变量 $g(r)$ 函数和双变量 $g_{12}(r)$ 函数进行分析。点格局分析通过 199 次 Monte Carlo 随机模拟,模拟 99% 的置信区间(Wiegand et al.,2006)并分别利用模拟的最大值和最小值生成上下两条包迹线,最大距离不超过样地较短边长的一半(张金屯,1998),本研究取 30 m。计算公式如下:

$$g(r) = \frac{1}{2\pi r} \frac{dk(r)}{dr}; g_{12}(r) = \frac{1}{2\pi r} \frac{dk_{12}(r)}{dr}。$$

式中: r 为空间尺度距离。单变量 $g(r)$ 函数中,当 $g(r)$ 值分别处于包迹线的上、内、下时,种群空间分布分别为聚集分布、随机分布、均匀分布;双变量 $g_{12}(r)$ 函数中,当 $g_{12}(r)$ 值分别处于包迹线的上、内、下时,种间关联性变现为正关联、无关联、负关联(张健等,2007;梁爽等,2014)。

1.2.5 零模型选择 空间格局由物种和环境共同作用形成,某一尺度下的空间格局由特定的原因形成,为了揭示生态学过程选择合适的零模型将有助于认识种群空间格局的内在特征(王鑫厅等,2012),本研究中单变量 $g(r)$ 函数采用完全随机模型(complete spatial randomness, CSR)和异质泊松模型(heterogeneous Poisson, HP);双变量 $g_{12}(r)$ 函数采用完全随机模型(CSR)和先决条件零模型(antecedent condition, AC)。CSR 是点格局中最常用最简单的模型,该模型中个体之间相互独立,且出现在研究范围内任何位置的几率相等。HP 和 AC 有排除环境异质性的优点,若在大于 10 m 尺度上呈聚集分布,可以解释为受环境异质性的影响(黄小等,2021);HP 和 AC 排除环境异质性后,若小尺度还是呈聚集分布,解释为受扩散限制影响。

本研究的数据处理是由 R 3.6.1 版本中的“spatstat”程序包(Baddeley & Turner, 2005)完成,使用 R 3.6.1 软件完成绘图。

2 结果与分析

2.1 秤锤树群落结构特征

由表 1 可知,乔木层中重要值(>1%)的物种共计 11 种,它们的相对密度和相对显著度之和所占的百分比分别为 89.46% 和 85.64%。重要值前五物种的相对密度和相对显著度之和所占的百分比分别为 61.77% 和 60.36%,表明这五个物种在整个样方中占主导地位。其中,朴树的数量、频度、显著度在整个样地中占绝对优势,说明朴树为该样地的优势种和建群种。虽然目标物种秤锤树在整个样地中数量较多,但频度和显著度较低,因此,呈聚集分布,其重要值在乔木层中靠前,是样地中的优势种。

取灌木层重要值前十的物种,朴树、八角枫与三角槭同样出现在乔木层重要值前十之中。灌木层中朴树数量、频度、盖度及重要值最大,在灌木

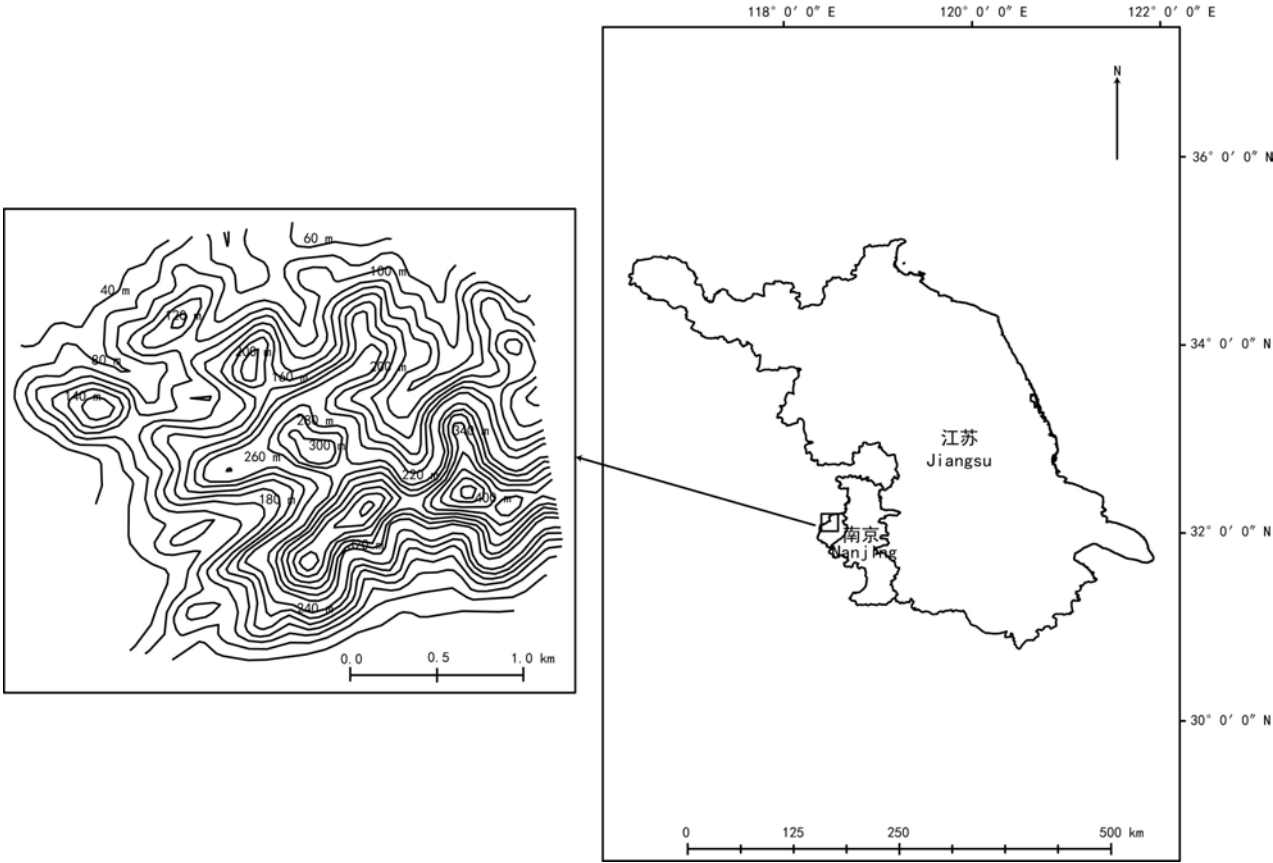


图 1 南京老山国家森林公园天然秤锤树种群分布位置

Fig. 1 Location of the natural population of *Sinojackia xylocarpa* in Laoshan Mountain National Forest Park of Nanjing

层中依旧占据绝对优势。相比之下乔木层的优势种黄连木和秤锤树在灌木层中的重要值表现很低,其中灌木层中的秤锤树相对数量和相对频度仅为 2.78% 和 1.81%,重要值为 1.53%(表 1)。秤锤树在乔木层与灌木层重要值的变化明显,表明灌木层中秤锤树的幼苗数量较少,种群的恢复与发展会受到其他物种竞争影响或环境变化影响。

2.2 径级分布

如图 2 的秤锤树胸径(DBH)统计所示,该秤锤树种群中乔木层秤锤树总量为 432 棵。其中:胸径在 $2 \leq \text{DBH} < 4$ cm 之间的个体数最多,为 199 棵,占比为 46.06%;胸径在 $4 \leq \text{DBH} < 6$ cm 之间的数量为 109 棵,占比为 25.23%。该样地中胸径大于 10 cm 的秤锤树仅有 7 棵,占比为 1.62%,其中最大的一棵胸径为 17.00 cm。样地中秤锤树多以小径木为主,径级分布呈现出“J”型,属于典型的成长型种群,还未达到种群稳定状态。

2.3 秤锤树空间分布

如图 3:A 所示,基于 CSR 模型,秤锤树在 0~26 m 尺度下为聚集分布,并且聚集程度逐渐下降,29~30 m 尺度下呈现均匀分布。如图 3:B 所示,基于 HP 模型,秤锤树在 0~23 m 尺度下为聚集分布,23~27 m 尺度下为随机分布,27~30 m 尺度下为均匀分布。通过 CSR 和 HP 模型对比,小尺度上都呈聚集分布,表明其空间分布受扩散限制影响。

图 2 表明秤锤树种群以小径木为主,因此,对胸径 $0 \text{ cm} < \text{DBH} < 6 \text{ cm}$ 的秤锤树进行空间分布分析,结果如图 4 所示。在 CSR 模型中,0~27 m 为聚集分布,27~29 m 为随机分布,29~30 m 为均匀分布。在 HP 模型中,0~23 m 为聚集分布,23~26 m 为随机分布,26~30 m 为均匀分布。小径秤锤树群体聚集分布为主要分布类型,由聚集分布向均匀分布变化。HP 模型下,随机分布与均匀分布尺度范围增加。

表 1 群落重要值

Table 1 Important values of communities

乔木层树种 Species in arborous layer	数量 Number	频度 Frequency	显著度 Significance	重要值 Important value (%)
朴树 <i>Celtis sinensis</i>	944	284	38 455.58	25.55
秤锤树 <i>Sinojackia xylocarpa</i>	432	60	6 823.29	9.00
黄连木 <i>Pistacia chinensis</i>	148	104	18 130.30	6.30
三角槭 <i>Acer buergerianum</i>	83	42	2 441.80	2.90
梧桐 <i>Firmiana simplex</i>	59	45	6 449.59	2.65
楝木 <i>Cornus macrophylla</i>	59	44	4 473.39	2.61
八角枫 <i>Alangium chinense</i>	45	32	2 828.88	1.93
红柴枝 <i>Meliosma oldhamii</i>	49	28	2 843.46	1.84
杨树 <i>Populus simonii</i>	48	28	17 091.21	1.83
黄檀 <i>Dalbergia hupeana</i>	25	22	1 944.12	1.23
黄荆 <i>Vitex negundo</i>	35	16	1 097.09	1.16
灌木层树种 Species in shrub layer	数量 Number	频度 Frequency	盖度 Coverage	重要值 Important value (%)
朴树 <i>Celtis sinensis</i>	96	76	48.04	8.28
茶条槭 <i>Acer tataricum</i>	60	60	18.37	5.81
八角枫 <i>A. chinense</i>	64	52	45.50	5.59
老鸦柿 <i>Diospyros rhombifolia</i>	56	48	19.94	5.02
三角槭 <i>Acer buergerianum</i>	52	48	33.91	4.83
高粱泡 <i>Rubus lambertianus</i>	32	32	19.56	3.10
小蜡 <i>Ligustrum sinense</i>	32	32	5.78	3.10
臭椿 <i>Ailanthus altissima</i>	28	28	9.20	2.71
毛楝 <i>Cornus walteri</i>	28	24	10.36	2.51
竹叶花椒 <i>Zanthoxylum armatum</i>	24	24	2.45	2.32
柘 <i>Maclura tricuspidata</i>	24	24	2.29	2.32
黄连木 <i>Pistacia chinensis</i>	24	20	20.10	2.12
雀梅藤 <i>Sageretia thea</i>	16	16	3.05	1.55
秤锤树 <i>Sinojackia xylocarpa</i>	20	12	30.14	1.53

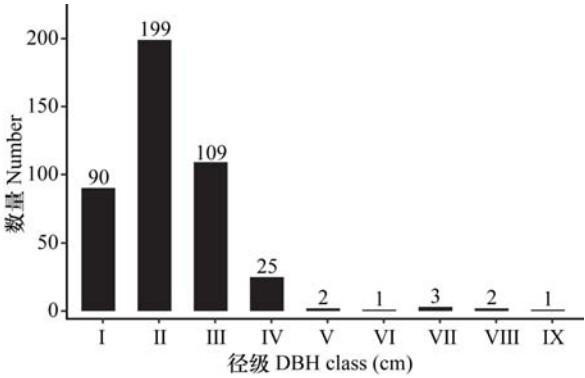


图 2 秤锤树径级结构

Fig. 2 DBH structure of *Sinojackia xylocarpa*

通过上述结果得到秤锤树小径木群体以及秤锤树种群分布趋势相似,均以聚集分布为主;HP模型下,小尺度上仍为聚集分布,随机分布与均匀分布尺度范围变大,空间分布受扩散限制影响。

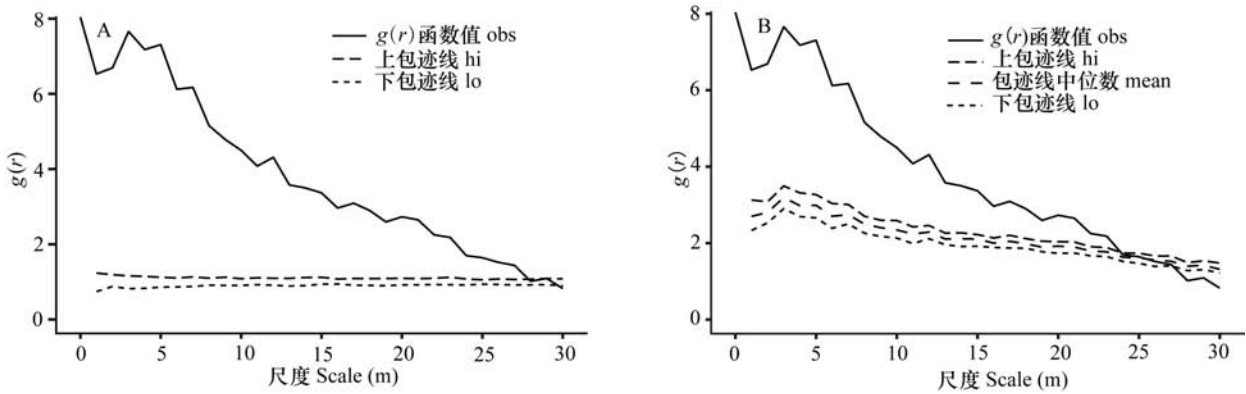
2.4 种间关联性

结果如图 5 所示,秤锤树种群主要分布于样方平缓地带,其中样地东部区域集中分布,西南区域零星分布,呈现出“条带”状;朴树、黄连木、三角槭在样地中均匀分布,其中朴树数量最多;梧桐数量最少,主要分布在样地的中部区域。

如图 6 所示,基于 CSR 模型,秤锤树与朴树在 1~12 m 尺度下呈负关联,在 15~30 m 尺度下正关联;秤锤树与黄连木在 6~7 m、11~30 m 尺度下呈正关联,其他尺度无关联;秤锤树与三角槭在 2~30 m 尺度下呈正关联;秤锤树与梧桐在 2~10 m 尺度下无关联,在 10~30 m 尺度下呈正关联。秤锤树与群落中优势物种关联性的共同点为在大尺度上表现出正关联。

如图 7 所示,基于 AC 模型消除环境异质性的情况下,秤锤树与朴树在 1~16 m 尺度下呈负关联,在 21~30 m 尺度下呈正关联;秤锤树与黄连木在 6~7 m、12~16 m、25~30 m 尺度下呈正关联,在其余尺度下无关联;秤锤树与三角槭在 15~16 m、26~30 m 尺度下正关联,在其余尺度下呈无关联;秤锤树与梧桐在 2~6 m 尺度下呈负关联,在 11~30 m 尺度下呈正关联。

AC 模型下,秤锤树分别与黄连木、三角槭以及梧桐的关联性显著变化,表现为正关联性减少,负关联性或无关联性增多;CSR 与 AC 两种模型下仅有秤锤树与朴树表现出强的负关联性。



A. 完全随机模型 (CSR) ; B. 异质泊松模型 (HP)。下同。
A. Complete spatial randomness (CSR) ; B. Heterogeneous Poisson (HP). The same below.

图 3 秤锤树空间分布格局
Fig. 3 Spatial distribution pattern of *Sinojackia xylocarpa*

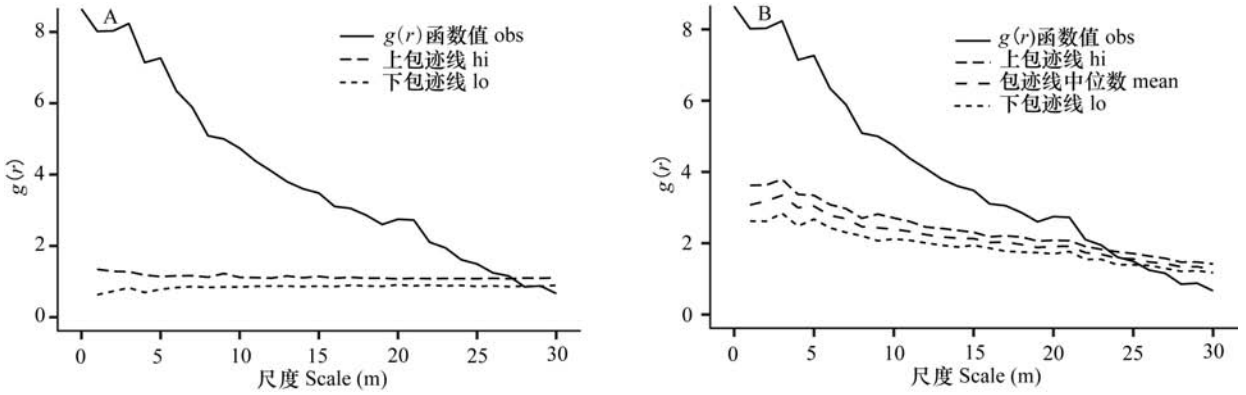


图 4 胸径 0 cm<DBH<6 cm 秤锤树空间分布格局
Fig. 4 Spatial distribution pattern of *Sinojackia xylocarpa* at 0 cm<DBH<6 cm

3 讨论与结论

在自然环境下,种群的空间分布与自身生物学特性、种子扩散的限制 (Seidler & Plotkin, 2006)、密度制约 (王进等, 2019) 及环境因子 (黄小等, 2021) 等有关。基于 CSR 模型探究秤锤树空间分布格局, 结果表明秤锤树在 0~26 m 尺度下表现为聚集分布, 表明秤锤树分布受环境异质性影响。通过 HP 模型消除环境异质性后, 0~23 m 尺度下仍表现为聚集分布, 说明其空间分布受种子扩散传播限制。秤锤树种子具有数量多与重量大特点, 其在种子扩散时主要靠重力传播, 扩散限制使其种子会更多落在母株周围, 随着与母株的距离增加种子数量会减少, 因而在小尺度上表现出

聚集分布。聚集分布有利于发挥群体效应 (韩路等, 2007), 群体效应产生的庇护效果使秤锤树种群抵御其他物种的入侵, 使自身种群能够更好地发展, 向种群稳定阶段更好地过渡。随着种群的不断生长, 对资源和空间的需求不断增多, 密度制约使秤锤树种群内部竞争日益严重, 造成部分个体逐渐死亡, 因此, 秤锤树在 27~30 m 尺度上会表现出随机分布或均匀分布。由此可见, 老山地区的秤锤树空间分布主要受种子扩散限制和密度制约影响; 在就地与迁地保护中, 解除秤锤树种子扩散限制与人工疏苗有助于其种群分布区的扩张。

基于 CSR 与 AC 模型探究群落中优势物种的空间关联性, 正关联性是由于物种间相互依赖或者物种处于异质环境下, 对环境有相同的适应性 (金鑫等, 2018); 负关联则是由于物种间的竞争或

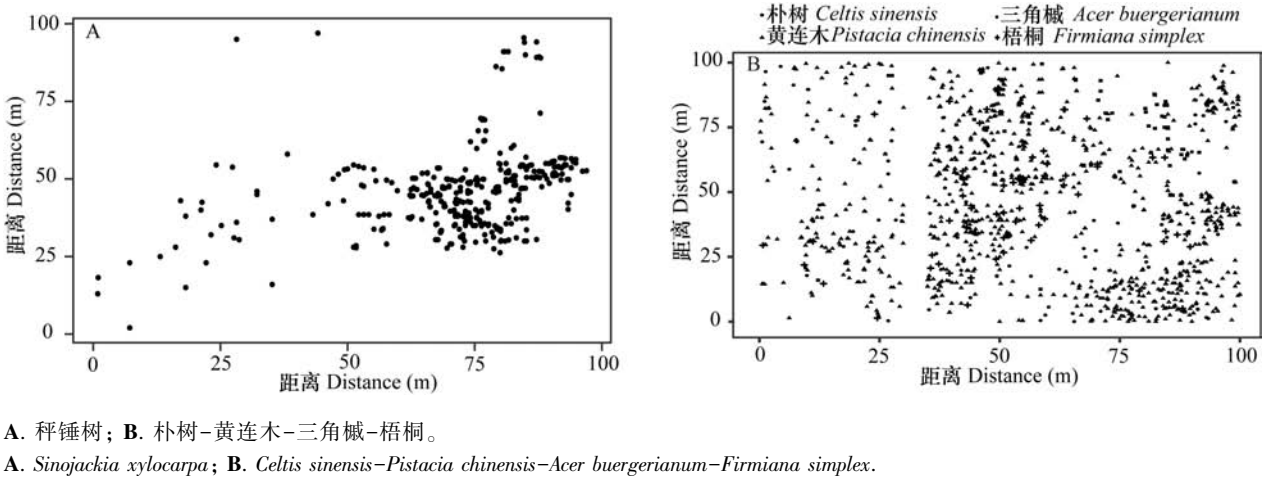


图 5 群落中重要值前五物种分布图

Fig. 5 Scatter distribution patterns of top five species with importance value of community

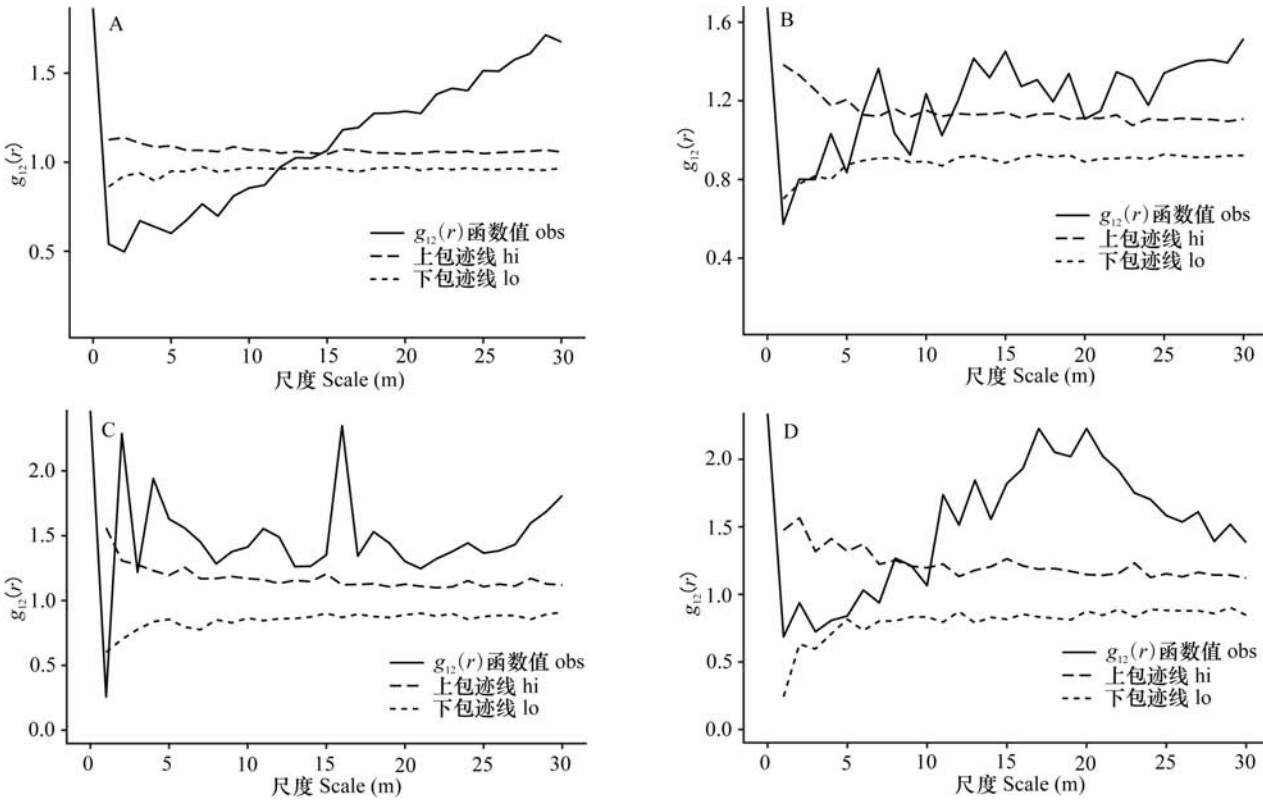


图 6 基于完全随机模型(CSR)的种间关联性

Fig. 6 Interspecific correlation based on complete spatial randomness (CSR)

者对于环境需求的差异造成的综合影响(Gray & He,2009)。秤锤树与朴树的空间关联性,CSR 与 AC 模型在 1~12 m 尺度下都呈负关联,解释为秤锤树受扩散限制影响在小尺度下的聚集分布产生

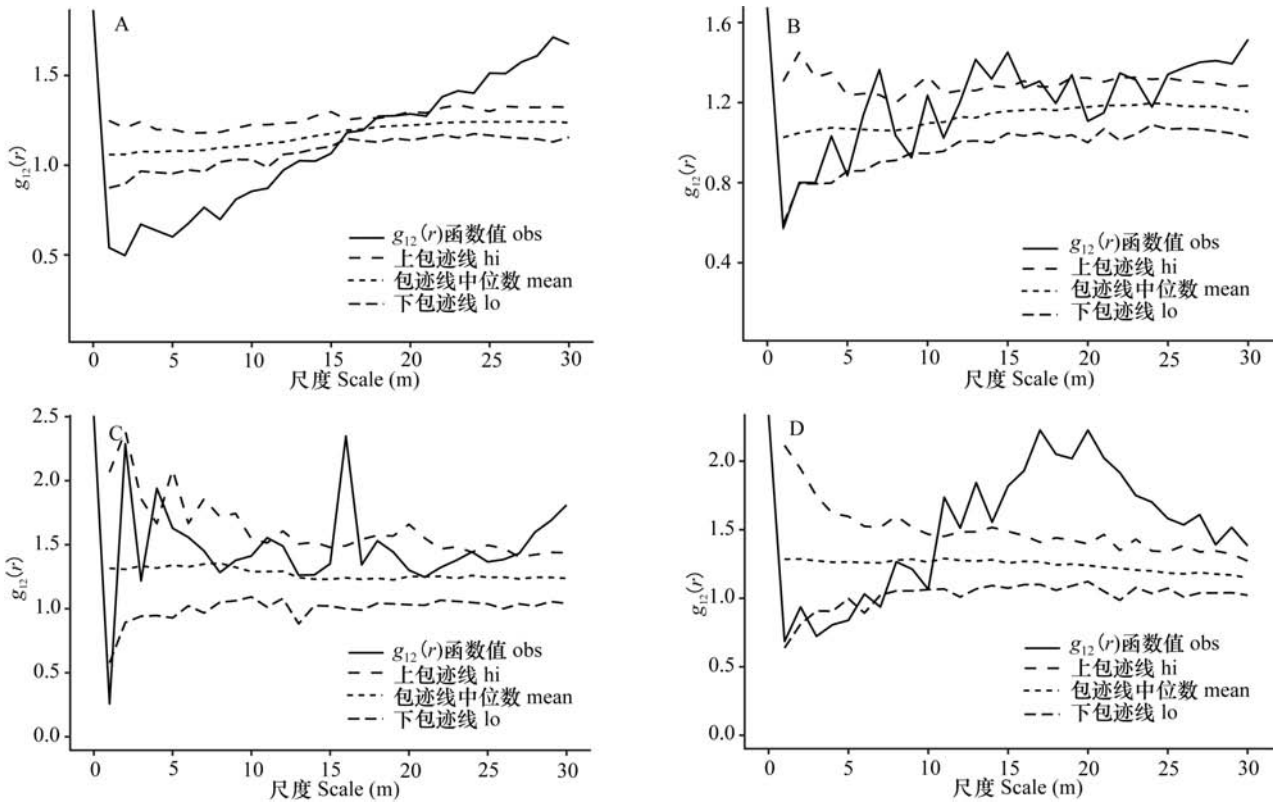


图 7 基于先决条件零模型(AC)的种间关联性

Fig. 7 Interspecific correlation based on antecedent condition (AC)

“庇护效果”与朴树种群展开竞争；21~30 m 都表现为正关联性，可能因为两个种群发展到稳定阶段后两者对环境有相同的偏好；对 0~30 m 整体尺度进行分析，结果揭示两者对环境资源需求存在相似性以及生态位的重叠，两者间的竞争会严重影响秤锤树种群演替。秤锤树与黄连木、秤锤树与三角槭的关联性在 CSR 与 AC 模型下变化明显，无关联急剧增加、正关联减少，说明两两之间竞争弱，生态位重叠很少。秤锤树与梧桐的关联性在两种模型中变化小，仍是在小尺度为无关联、大尺度为正关联，说明两者在小尺度上生态位重叠很少，大尺度上对环境需求的相似性。对群落优势物种的空间关联性研究中，仅有秤锤树与朴树在 CSR 和 AC 模型中负关联性明显，说明群落中优势度高的物种更加影响秤锤树种群的演替。

南京老山地区秤锤树天然种群分布样地中物种组成较丰富，种间分布密度差异大，群落中落叶树种优势明显，符合北亚热带地带性落叶阔叶林的特征。乔木层中朴树、黄连木、三角槭在整个样

方中均匀分布，朴树的种群数量远大于其他树种，朴树作为样地的优势种和建群种，一定程度上影响了秤锤树等种群的扩张。样地内秤锤树种群数量多但频度低，集中分布在样地的东部区域，由于处于人类干扰活动频繁区域，且秤锤树为生长速度较慢的灌木型树种，导致大径级植株数量少，而小径级种群比例极高。其种群结构表现为增长型种群结构，未达到稳定状态，在种间竞争与群落演替过程中容易受其他种群竞争和环境变化影响，对生存群落其他优势物种适当的干扰有助于秤锤树种群的演替与发展。

综上所述，南京老山国家森林公园秤锤树种群目前以低幼龄树为主，种群结构处于增长阶段，在整个群落中多为聚集分布，其主要受种间竞争、扩散限制与密度制约因素的影响。通过人工种子扩散以及人工疏苗等方法，解除秤锤树种子扩散与密度限制，维持与适当干扰其生存植物群落，开展就地保护与迁地保护等措施，可以有效地促进秤锤树天然种群的保护、恢复与扩张。

参考文献:

- BADDELEY A, TURNER R, 2005. Spatstat: an R package for analyzing spatial point patterns [J]. J Statist Software, 12(1): 1–42.
- CHEN Q, CHEN J, ZHONG JJ, et al., 2018. Interspecific association and functional group classification of the dominant populations in shrub layer in secondary forest of *Pinus tabulaeformis* in Qinling Mountain, China [J]. Chin J Appl Ecol, 29(6): 1736–1744. [陈倩, 陈杰, 钟娇娇, 等, 2018. 秦岭山地油松天然次生林灌木层主要种群种间联结性与功能群划分 [J]. 应用生态学报, 29(6): 1736–1744.]
- CHEN RB, ZHANG GF, LIU J, et al., 2015. Endangerment grade and protection priority of rare plant species in Baohuashan National Forest Park, Jiangsu Province [J]. J Ecol Rural Environ, 31(2): 174–179. [陈瑞冰, 张光富, 刘娟, 等, 2015. 江苏宝华山国家森林公园珍稀植物的濒危等级及优先保护 [J]. 生态与农村环境学报, 31(2): 174–179.]
- CONDIT R, ASHTON PS, BAKER P, et al., 2000. Spatial patterns in the distribution of tropical tree species [J]. Science, 288: 1414–1418.
- GONG ZW, GU L, KANG XG, et al., 2010. Spatial pattern of forests during secondary succession in Changbai Mountain, northeastern China [J]. J Beijing For Univ, 32(2): 92–99. [龚直文, 顾丽, 亢新刚, 等, 2010. 长白山森林次生演替过程中林木空间格局研究 [J]. 北京林业大学学报, 32(2): 92–99.]
- GRAY L, HE FL, 2009. Spatial point-pattern analysis for detecting density-dependent competition in a boreal chronosequence of Alberta [J]. For Ecol Manag, 259(1): 98–106.
- GUO YL, WANG B, XIANG WS, et al., 2015. Spatial distribution of tree species in a tropical karst seasonal rainforest in Nonggang, Guangxi, southern China [J]. Biodivers Sci, 23(2): 183–191. [郭屹立, 王斌, 向悟生, 等, 2015. 广西弄岗北热带喀斯特季节性雨林监测样地种群空间点格局分析 [J]. 生物多样性, 23(2): 183–191.]
- HAN L, WANG HZ, PENG J, et al., 2007. Spatial distribution patterns and dynamics of major population in *Populus euphratica* forest in upper reaches of Tarim River [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 27(8): 1668–1673. [韩路, 王海珍, 彭杰, 等, 2007. 塔里木河上游天然胡杨林种群空间分布格局与动态研究 [J]. 西北植物学报, 27(8): 1668–1673.]
- HAO RM, HUANG ZY, LIU XJ, et al., 2000. The natural distribution and characteristics of the rare and endangered plants in Jiangsu, China [J]. Biodivers Sci, 8(2): 153–162. [郝日明, 黄致远, 刘兴剑, 等, 2000. 中国珍稀濒危保护植物在江苏省的自然分布及其特点 [J]. 生物多样性, 8(2): 153–162.]
- HE ZL, XU H, QIN XS, et al., 2017. Spatial distribution patterns and association of two Apocynaceae plants in the tropical mountain rainforests of Jianfengling, Hainan Island, China [J]. Biodivers Sci, 25(10): 1065–1074. [何增丽, 许涵, 秦新生, 等, 2017. 海南尖峰岭热带山地雨林 2 种夹竹桃科植物的空间分布格局与关联性 [J]. 生物多样性, 25(10): 1065–1074.]
- HOU XY, HAN JX, 1997. Simulation analysis of spatial patterns of main species in the Korean-pine broadleaved forest in Changbai Mountain [J]. Chin J Plant Ecol, 21(3): 47–54. [侯向阳, 韩进轩, 1997. 长白山红松林主要树种空间格局的模拟分析 [J]. 植物生态学报, 21(3): 47–54.]
- HU M, ZENG SQ, LONG SS, 2019. Spatial distribution patterns and associations of the main tree species in *Cyclobalanopsis glauca* secondary forest [J]. J Cent S Univ Technol, 39(6): 66–71. [胡满, 曾思齐, 龙时胜, 2019. 青冈栎次生林主要树种空间分布格局及其关联性研究 [J]. 中南林业科技大学学报, 39(6): 66–71.]
- HUANG X, ZHU J, YAO L, et al., 2020. The structure and spatial distribution pattern of native *Metasequia glaytostroboides* population [J]. Biodivers Sci, 40(1): 1–12. [黄小, 朱江, 姚兰, 等, 2020. 水杉原生种群结构及空间分布格局 [J]. 生物多样性, 40(1): 1–12.]
- HUANG X, YAO L, AI XR, et al., 2021. Spatial distribution pattern and association of two species of the *Litsea* in largeplot in Mulinzi Nature Reserve [J]. Guihaia, 41(8): 1333–1345. [黄小, 姚兰, 艾训儒, 等, 2021. 木林子大样地两个木姜子属物种空间分布格局及关联性 [J]. 广西植物, 41(8): 1333–1345.]
- JIA SG, SHEN YB, 2007. Research progress on *Sinojackia xylocarpa* Hu [J]. J Jiangsu For Sci Technol, 34(6): 41–45. [贾书果, 沈永宝, 2007. 秤锤树的研究进展 [J]. 江苏林业科技, 34(6): 41–45.]
- JIN X, ZHANG QD, XU Q, et al., 2018. Population distribution patterns and interspecific spatial associations of *Acanthopanax senticosus* populations in Lingkong Mountain, Shanxi Province, China [J]. Plant Sci J, 36(3): 327–335. [金鑫, 张钦弟, 许强, 等, 2018. 山西灵空山刺五加种群空间分布格局及种间空间关联性 [J]. 植物科学学报, 36(3): 327–335.]
- LAN GY, GETZIN S, WIEGAND T, et al., 2012. Spatial distribution and interspecific associations of tree species in a tropical seasonal rain forest of China [J]. PLoS ONE, 7(9): e46074.
- LIANG S, XU H, LIN JY, et al., 2014. Spatial distribution pattern of the dominant species *Gironniera subaequalis* in tropical montane rainforest of Jianfengling, Hainan Island, China [J]. Chin J Plant Ecol, 38(12): 1273–1282. [梁爽, 许涵, 林家怡, 等, 2014. 尖峰岭热带山地雨林优势树种白颜树空间分布格局 [J]. 植物生态学报, 38(12):

- 1273–1282.]
- MCINTIRE EJB, FAJARDO A, 2009. Beyond description: the active and effective way to infer processes from spatial patterns [J]. *Ecology*, 90(1): 46–56.
- SEIDLER TG, PLOTKIN JB, 2006. Seed dispersal and spatial pattern in tropical trees [J]. *Plos Biol*, 4(11): 2132–2137.
- VELÁZQUEZ E, MARTÍNEZ I, GETZIN S, et al., 2016. An evaluation of the state of spatial point pattern analysis in ecology [J]. *Ecography*, 39(11): 1042–1055.
- WANG J, AI XR, ZHU J, et al., 2019. Population structure and spatial distribution pattern of dominant species *Eurya alata* in Mulinzi Nature Reserve, Hubei Province [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 39(11): 2053–2063. [王进, 艾训儒, 朱江, 等, 2019. 木林子保护区优势种翅柃种群结构与空间分布格局 [J]. 西北植物学报, 39(11): 2053–2063.]
- WANG ST, WU H, LIU MT, et al., 2018. Community structure and dynamics of a remnant forest dominated by a plant species with extremely small population (*Sinojackia huangmeiensis*) in central China [J]. *Biodivers Sci*, 26(7): 749–759. [王世彤, 吴浩, 刘梦婷, 等, 2018. 极小种群野生植物黄梅秤锤树群落结构与动态 [J]. 生物多样性, 26(7): 749–759.]
- WANG XT, HOU YL, LIANG CZ, et al., 2012. Point pattern analysis based on different null models for detecting spatial patterns [J]. *Biodivers Sci*, 20(2): 151–158. [王鑫厅, 侯亚丽, 梁存柱, 等, 2012. 基于不同零模型的点格局分析 [J]. 生物多样性, 20(2): 151–158.]
- WANG YF, QU MX, LAN HY, et al., 2020. Spatial pattern and interspecific correlation of dominant population in Spruce-fir-Koren pine forest [J]. *J Centr S Univ For Tcehnol*, 40(1): 49–58. [王亚飞, 曲美学, 兰航宇, 等, 2020. 云冷杉红松林内优势种群的空间格局及种间关联性 [J]. 中南林业科技大学学报, 40(1): 49–58.]
- WIEGAND T, KISSLING WD, CIPRIOTTI PA, et al., 2006. Extending point pattern analysis for objects of finite size and irregular shape [J]. *J Ecol*, 94(4): 825–837.
- YANG GD, JI XY, CHEN L, et al., 2018. Spatial distribution and environmental interpretation of wild *Sinojackia xylocarpa* communities based on self-organizing map (SOM) [J]. *Biodivers Sci*, 26(12): 1268–1276. [杨国栋, 季芯悦, 陈林, 等, 2018. 基于 SOM 的野生秤锤树群落的空间分布和环境解释 [J]. 生物多样性, 26(12): 1268–1276.]
- ZHANG J, HAO ZQ, SONG B, et al., 2007. Spatial distribution patterns and associations of *Pinus koraiensis* and *Tilia amurensis* in broad-leaved Korean pine mixed forest in Changbai Mountains [J]. *Chin J Appl Ecol*, 18(8): 1681–1687. [张健, 郝占庆, 宋波, 等, 2007. 长白山阔叶红松林中红松与紫椴的空间分布格局及其关联性 [J]. 应用生态学报, 18(8): 1681–1687.]
- ZHANG JT, 1998. Analysis of spatial point patterns for plant species [J]. *Chin J Plant Ecol*, 22(4): 57–62. [张金屯, 1998. 植物种群空间分布的点格局分析 [J]. 植物生态学报, 22(4): 57–62.]
- ZHONG HH, HU RT, YUAN LF, et al., 2018. Analysis on the alternation of butterfly diversity in Laoshan National Forest Park [J]. *J Jiangsu For Sci Technol*, 45(6): 34–38. [钟华瀚, 胡润涛, 袁李飞, 等, 2018. 老山国家森林公园蝴蝶物种调查及分析 [J]. 江苏林业科技, 45(6): 34–38.]
- ZHOU SX, PENG YS, GAO PX, et al., 2019. Spatial pattern and association of main species in endangered plant *Sinojackia rehderiana* community [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 27(4): 349–358. [周赛霞, 彭焱松, 高浦新, 等, 2019. 濒危植物狭果秤锤树群落内主要树种的空间分布格局和关联性 [J]. 热带亚热带植物学报, 27(4): 349–358.]

(责任编辑 周翠鸣)

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202001005

刘朝阳, 罗应华, 于瀛, 等. 四种乡土珍贵阔叶树种叶功能性状的种内和种间变异 [J]. 广西植物, 2022, 42(2): 257–266.
LIU ZY, LUO YH, YU Y, et al. Interspecific and intraspecific variation in leaf functional traits of four local precious hardwood species [J]. *Guihaia*, 2022, 42(2): 257–266.



四种乡土珍贵阔叶树种叶功能性状的种内和种间变异

刘朝阳¹, 罗应华^{1*}, 于 瀛¹, 蒙 检¹, 杨海菊²

(1. 广西大学 林学院, 南宁 530004; 2. 广西壮族自治区生态环境监测中心, 南宁 530028)

摘 要: 植物功能性状种间性状变异反映不同物种的生活史对策, 种内性状变异反映了同一物种不同个体应对不同环境的性状应答。人工林均一的环境有利于深入分析不同树种种内和种间变异。该研究以南宁良凤江林场的四种乡土珍贵阔叶树种[观光木(*Tsoongiodendron odorum*)、红锥(*Castanopsis hystrix*)、灰木莲(*Magnolia blumei*)和望天树(*Parashorea chinensis*)]为研究对象, 对其叶功能性状的种内和种间变异进行研究。结果表明: (1) 同一高度的不同种植物大部分叶功能形状差异显著, 只有极少数叶功能性状差异不显著。相较于其他三种植物, 红锥的叶鲜重、叶厚度、叶面积、叶干重、比叶面积和叶含水率较小, 但红锥的比叶重、叶干物质质量和叶组织密度较大。(2) 不同高度的同一树种叶功能性状存在差异, 不同的树种差异表现不同。高度对叶功能性状的影响为灰木莲>望天树>观光木>红锥。随着高度的变化, 9 种叶功能性状中, 叶厚度和叶组织密度表现最稳定, 叶面积和叶干重变化较大; 比叶面积呈下降趋势, 比叶重呈上升趋势。(3) 随着树龄的增大, 灰木莲的叶功能性状变化最大, 红锥的叶功能性状表现最稳定, 树龄对叶功能性状的影响为灰木莲>观光木/望天树>红锥。9 种叶功能性状中, 受到树龄影响最大的是叶厚度和叶组织密度, 影响最小的是叶鲜重、叶干重和叶面积; 四种树种的叶功能性状随树龄的变化差异显著, 但不具有明显规律性。(4) 叶干物质质量与叶厚度相关性不显著, 叶含水率与叶厚度、叶面积、叶干重和比叶重相关性不显著, 其余各功能性状存在一定的相关性。综上结果可知, 植物各功能性状之间存在一定的相关性, 彼此相互协调适应环境的变化。该研究结果对于乡土珍贵阔叶树种的人工林种植具有一定的指导意义。

关键词: 种内变异, 种间变异, 变异系数, 高度, 树龄, 相关性, 叶功能性状

中图分类号: Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2022)02-0257-10

Interspecific and intraspecific variation in leaf functional traits of four local precious hardwood species

LIU Zhaoyang¹, LUO Yinghua^{1*}, YU Ying¹, MENG Jian¹, YANG Haiju²

(1. Forestry College of Guangxi University, Nanning 530004, China; 2. Ecological Environment Monitoring Center of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530028, China)

Abstract: Interspecific trait variation of functional traits in plants reflects the life history strategies of different species, and intraspecific trait variation reflects the responses of different individuals of the same species to different

收稿日期: 2020-06-13

基金项目: 国家自然科学基金(31200330); 南宁树木园优质用材树种科研项目; 广西重点研发计划(桂科 AB18050014) [Supported by National Natural Science Foundation of China (31200330); Nanning Arboretum High-Quality Timber Tree Species Research Project; Guangxi Key R & D Program (Guike AB18050014)]。

第一作者: 刘朝阳(1994-), 硕士研究生, 研究方向为森林生态学, (E-mail) 919656446@qq.com。

*通信作者: 罗应华, 博士, 副教授, 研究方向为生物多样性, (E-mail) 66206540@qq.com。

environments. The homogeneous environment of plantation is conducive to the in-depth analysis of intraspecific and interspecific variation of different trees. In this study, the intraspecific and interspecific variations of four native and precious hardwood species (*Tsoongiodendron odorum*, *Castanopsis hystrix*, *Magnolia blumei*, and *Parashorea chinensis*) in Liangfengjiang Forest plantation were studied. The results were as follows: (1) Most of the leaves of four plants of the same height had significant differences in functional traits, but only a few leaves had no significant differences in functional traits. Compared with the other three plants, the *Castanopsis hystrix* has lower leaf fresh weight, leaf thickness, leaf area, leaf dry weight, specific leaf area and leaf water content, but the *C. hystrix* has higher specific leaf weight, leaf dry matter content and leaf tissue density. (2) There were differences in leaf functional traits of the same tree species at different heights, and the differences in tree species were different. Effects of height on leaf function traits were *Magnolia blumei*>*Parashorea chinensis*>*Tsoongiodendron odorum*>*Castanopsis hystrix*. As the change of height, nine kinds of leaf tissue functional traits, leaf thickness and leaf tissue density were the most stable performance, leaf area and leaf dry weight change were bigger. Specific leaf area showed a downward trend, specific leaf weight showed an upward trend. (3) With the growth of the tree age, the leaf functional traits of *Magnolia blumei* changed the most, and the leaf functional traits of *Castanopsis hystrix* were the most stable. Effects of tree age on leaf functional traits were *Magnolia blumei*>*Parashorea chinensis*/*Tsoongiodendron odorum*>*Castanopsis hystrix*. Among the nine leaf functional traits, leaf thickness and leaf tissue density were the most affected by tree age, and leaf fresh weight, leaf dry weight and leaf area were the least affected. The leaf functional traits of the four tree species varied significantly with tree age, but did not showed obvious regularity. (4) There was no significant correlation between leaf dry matter content and leaf thickness, and there was no significant correlation between leaf water content and leaf thickness, leaf area, leaf dry weight and specific leaf weight, while there was a certain correlation between other functional traits. The above results indicate that plant functional traits have certain correlations among them, and coordinate with each other to adapt to changes in the environment. The results of this study have a certain guiding significance for the plantation of local precious hardwood species.

Key words: intraspecific variation, interspecific variation, variation coefficient, height, tree age, correlation, leaf function traits

植物功能性状是指一切对植物的定居、生存和适应有着重要影响的植物属性,这些属性对生态系统功能具有显著影响,并能反映出植物对外在环境的适应策略(刘金环等,2006;马姜明等,2012;刘晓娟和马克平,2015)。在所有的植物性状中,叶功能性状与植株生物量和植物对资源的获取、利用及利用效率的关系最为密切(Westoby, 1998; Vendramini et al., 2002),与植物个体、群落、生态系统具有密切相关性,可直观反映不同物种适应环境变化所形成的生存策略(毛伟等,2012)。

植物功能性状变异是指植物在不同群落组织水平和空间尺度下,在自身遗传基因与外部环境共同作用下所产生的变化,其广泛存在于单一植株个体内、种内、物种间和群落间(熊梦辉,2015)。植物功能性状变异主要分为种内变异和种间变异两大类。种间变异包括物种在长期进化过程中形成的稳定的性状特征差异,也与环境筛选有关(Cornwell & Ackerly, 2009)。过去,学者们普遍关

注种间变异的研究,认为种间变异远大于种内变异(Fajardo & Piper, 2011; Jackson et al., 2013)。但是近年来,越来越多的研究表明:物种间的性状变异研究具有一定的局限性,植物性状的变异,不仅受其稳定性遗传的影响,也会因环境的变化呈现较强的表型可塑性(Albert et al., 2010; Messier et al., 2010; Paine et al., 2011)。Jung 等(2014)的研究表明种内变异相较于种间变异贡献更大,在植物群落中,种内差异随处可见。

在天然的群落中,环境各因素的空间异质性极其复杂,各种因素的综合作用使得植物功能性状展现出极其复杂的种间和种内变异。而人工林群落中环境因子相对均匀,从地表到林冠,光照条件呈现有规律的变化,同一时间种植林木又为不同树种功能性状种间变异的研究提供了良好的实验素材。本研究选取了良凤江林场人工种植的四种乡土珍贵树种[观光木(*Tsoongiodendron odorum*)、红锥(*Castanopsis hystrix*)、灰木莲(*Magnolia blumei*)和

望天树 (*Parashorea chinensis*)], 基于个体层次, 对其叶功能性状 (叶鲜重、叶厚度、叶面积、叶干重、比叶面积、比叶重、叶干物质质量、叶含水率和叶组织密度) 进行研究, 旨在通过相同林龄相同环境条件下探讨不同植物叶功能性状的种间变异, 而对于同一个物种, 通过对比不同林龄和不同光照条件下, 探究植物叶功能性状种内变异, 研究结果和研究方法皆具有一定的理论意义, 同时, 研究结果对于乡土珍贵阔叶树种的人工种植具有一定的指导意义。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

研究区位于南宁良凤江林场连山区域 (108°15'14"—108°22'22" E, 22°34'31"—22°46'51" N)。位于南宁盆地的中部, 以低丘地貌为主, 有少量的阶地和台地。地势南高北低, 北部山岭起伏不大, 地形开阔, 南部高差较大。最高峰为南部的大药岭, 海拔 346.5 m。最低处为近邕江之滨的地带, 海拔 80 m, 相对高差在 80~200 m 之间。坡度为 20°~30°。斜坡和陡坡林地占 80% 以上。地处北回归线以南, 属亚热带南缘季风气候, 冬短夏长, 冬无严寒, 夏无酷暑, 水热条件十分丰富。年平均气温 21.6 °C, 1 月均温 12.8 °C, 7 月均温 28 °C, 极端高温 40 °C, 极端低温 -1.5 °C, ≥ 10 °C 的年活动积温 7 600 °C, 年降雨量 1 280 mm, 雨量多集中在 5 月至 9 月, 占全年降雨量的 71%, 无霜期达 342 d, 少有冰冻, 极适宜林木生长。

1.2 样品采集

2019 年 8 月中旬于研究区选取观光木、红锥、灰木莲、望天树四种乡土珍贵树种, 选取的林分具有相似的经营背景 (实验样地在 2001 年之前种植马尾松, 2001—2012 年种植桉树纯林, 之后种植现存树种)。每个树种选取 2012、2014 和 2017 年种植的植株各 3 株 (表 1), 每株分上、中、下 3 层进行采集, 每层采集东西南北 4 个方向生长良好的当年生小枝各一枝, 小枝包括茎、叶两部分, 每层小枝分 1 袋装, 记录, 放入保温箱 (保持小枝处于新鲜状态)。带回实验室, 将其茎叶分离, 每层小枝选取 10 片完好无破损叶片。

1.3 功能性状的测定

用 CanoScan LiDE 300 扫描仪结合 Photoshop

测定其叶面积 (leaf area, LA)。用精度为 0.01 mm 的电子游标卡尺在叶片的前、中、末端 (尽量避开叶脉) 分别测量叶片厚度 (leaf thickness, LT), 取平均值作为叶厚度。用电子天平称量叶鲜量 (leaf fresh weight, LFW), 精确到 0.01 g, 将取出的叶片放入 70 °C 烘箱内烘干至恒重后, 称量叶干重 (leaf dry weight, LDW)。各性状的计算公式如下:

比叶面积 (specific leaf area, SLA, $\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) = LA/LDW;

比叶重 (specific leaf weight, SLW, $\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$) = LDW/LA;

叶干物质质量 (leaf dry matter content, LDMC, $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) = LDW/LFW;

叶含水率 (leaf water content, LWC, %) = (LFW-LDW)/LFW $\times 100$;

叶组织密度 (leaf tissue density, LTD, $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$) = LDW/(LA $\times$ LT)。

1.4 数据处理

使用 Excel 2010 软件对数据进行记录和计算, 使用 SPSS 22.0 软件对其进行单因素方差分析和 Pearson 相关性分析, 使用 Origin 2018 软件进行制图。

2 结果与分析

2.1 种间差异分析

通过对同一高度、相同树龄的不同植物叶功能形状进行单因素方差分析。由图 1 可知, 同一高度的四种植物的大部分叶功能形状差异显著, 只有极少数叶功能性状差异不显著。3 个高度层次上, 相较于其他三种植物, 红锥的叶鲜重、叶厚度、叶面积、叶干重、比叶面积和叶含水率均最小, 但红锥的比叶重、叶干物质质量和叶组织密度最大。下层叶功能形状中, 叶鲜重的变异系数最大 (86.56%), 叶含水率的变异系数最小 (25.85%); 中层叶功能形状中, 叶鲜重变化最大 (73.55%), 叶含水率的变化最小 (23.19%); 上层叶功能形状中, 变化最大的是叶鲜重 (76.74%), 变化最小的是比叶面积 (27.26%)。植物中层的 9 种叶功能性状的变异系数均小于上、下两个层次。

2.2 种内不同高度的叶功能性状变异

研究结果显示, 不同高度的叶功能性状存在差异, 不同的树种差异表现不同。由图 2 可知, 随

表 1 研究对象的概况
Table 1 An overview of the research objects

树种 Tree species	科名 Family	属名 Genus	群落类型 Community type	种植年份 Planted year	树高 Tree height ($\bar{x}\pm s$) (m)
观光木 <i>Tsoongiodendron odorum</i>	木兰科 Magnoliaceae	观光木属 <i>Tsoongiodendron</i> Chun	人工林 Plantation	2012/2014/2017	8.1±2.6
红锥 <i>Castanopsis hystrix</i>	壳斗科 Fagaceae	锥属 <i>Castanopsis</i> (D. Don) Spach	人工林 Plantation	2012/2014/2017	9.3±4.2
灰木莲 <i>Magnolia glanca</i>	木兰科 Magnoliaceae	木莲属 <i>Manglietia</i> Blume	混交林 Mixed forest	2012/2014/2017	15.7±7.8
望天树 <i>Parashorea chinensis</i>	龙脑香科 Dipterocarpaceae	柳安属 <i>Parashorea</i> Kurz	人工林 Plantation	2012/2014/2017	5.7±3.2

着高度的变化,灰木莲的 9 种叶功能性状均差异显著,其中,比叶面积、比叶重、叶干物质质量、叶含水率和叶组织密度差异极显著;红锥的叶功能性状中只有叶组织密度差异显著。四种树种的功能性状受高度影响的表现为灰木莲>望天树>观光木>红锥。9 种叶功能性状中,叶厚度和叶组织密度表现最稳定,分别只有 1 种植物差异显著;叶面积和叶干重变化较大,观光木、灰木莲和望天树均差异显著。9 种功能性状随着高度的升高,比叶面积呈下降趋势,比叶重呈上升趋势;叶鲜重、叶厚度、叶面积、叶干重、叶干物质质量、叶含水率和叶组织密度没有明显的变化规律,不同树种的叶功能性状呈现不同的变化趋势(图 2)。

2.3 种内不同树龄的叶功能性变异

由图 3 可知,随着树龄的变化,四种树种中,灰木莲的叶功能性状变化最大,只有叶面积差异不显著,其余各功能性状均差异显著;红锥的叶功能性状表现最稳定,只有叶厚度、叶干物质质量、叶含水率和叶组织密度差异显著。树龄对叶功能性状的影响为灰木莲>观光木/望天树>红锥。9 种叶功能性状中,受到树龄影响最大的是叶厚度和叶组织密度(四种树种均差异显著),影响最小的是叶鲜重、叶干重和叶面积,只有两种树种差异显著。由图 3 可知,四种树种的叶功能性状随树龄的变化差异显著,但不具有明显规律性。结合图 2 可知,树龄对叶功能性状的影响大于高度对叶功能性状的影响。

2.4 各功能性状相关性分析

由表 2 可知,叶鲜重与叶厚度、叶面积、叶干重、叶含水率、比叶面积呈极显著正相关($P<0.01$,下同),与比叶重、叶干物质质量、叶组织密度呈极显

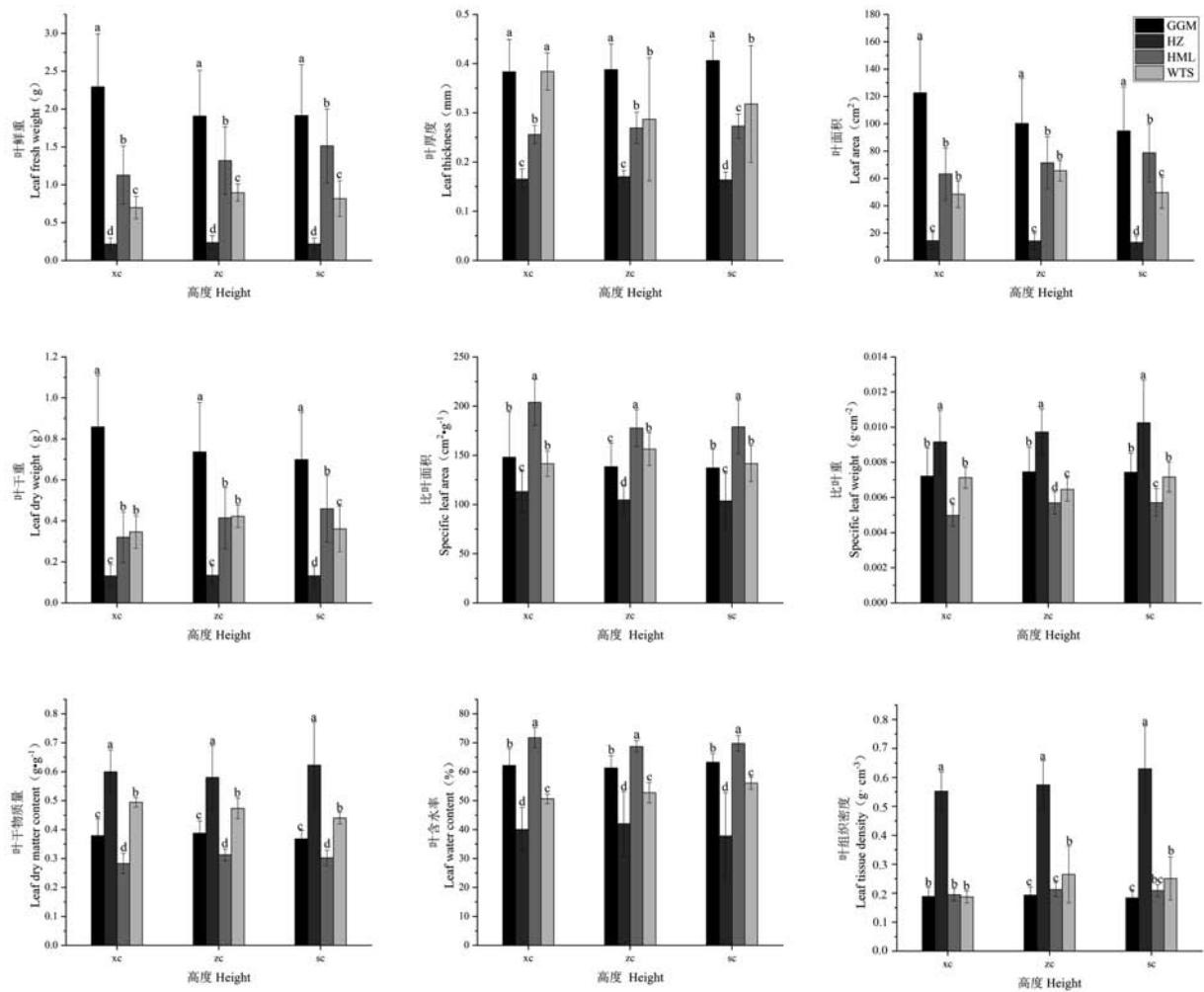
著负相关;叶厚度与叶面积、叶干重呈极显著正相关,与比叶重、叶组织密度呈极显著负相关,与比叶面积呈显著相关性($P<0.05$,下同);叶面积与叶干重、比叶面积呈极显著正相关,与比叶重、叶组织密度呈极显著负相关,与叶干物质质量呈显著负相关;叶干重与比叶面积呈极显著正相关,与比叶重、叶组织密度呈极显著负相关,与叶干物质质量呈显著负相关;比叶面积与比叶重、叶干物质质量、叶组织密度呈极显著负相关,与叶含水率呈显著正相关;比叶重与叶干物质质量、叶组织密度呈极显著正相关;叶干物质质量与叶含水率呈极显著正相关,与叶组织密度呈极显著负相关;叶含水率与叶组织密度呈显著负相关。

3 讨论与结论

3.1 不同树种叶功能性状种间变异特征

研究结果显示,相同树龄和高度的不同树种叶功能性状差异明显,这反映出植物适应环境采取的策略不同以及植物本身的遗传特性(刘晓娟和马克平,2015)。本研究中,相较于其他三种植物,红锥的叶鲜重、叶厚度、叶面积、叶干重、比叶面积和叶含水率均最小,但红锥的比叶重、叶干物质质量和叶组织密度最大。一般而言,叶干物质质量和叶组织密度越大,说明植物用于叶片建成的养分投入越大,比叶重越大,植物的储水空间越小,导致叶含水率和比叶面积越小,意味着植物生长较为缓慢。对比四种树种叶功能性状,红锥变化最小,反映出红锥叶功能性状较稳定,说明其对于恶劣环境的抵抗能力也较强。

在本研究中,3 个高度层次上,变化最大的叶



GGM. 观光木; **HZ.** 红锥; **HML.** 灰木莲; **WTS.** 望天树; **XC.** 下层; **ZC.** 中层; **SC.** 上层。柱状图上的小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。下同。
GGM. *Tsoongiodendron odorum*; **HZ.** *Castanopsis hystrix*; **HML.** *Magnolia blumei*; **WTS.** *Parashorea chinensis*; **XC.** Lower layer; **ZC.** Middle layer; **SC.** Upper layer. Lowercase letters in the bar chart indicate significant differences ($P<0.05$). The same below.

图1 同一高度的不同树种叶功能性状多重比较(LSD)

Fig. 1 Multiple comparisons (LSD) of functional traits of leaves of different tree species at the same height

功能性状均为叶鲜重,这是由于其本身的性质决定的,因为随着其他各功能性状的变化,叶鲜重均会改变,这反映出叶鲜重同其余叶功能性状密切相关。中层和下层叶功能性状中,变化最小的是叶含水率,上层的叶功能性状中,比叶面积变化最小,这可能是因为人工群落中,中下层的光照相对较弱,因而叶片光合作用产生的水分较少,叶片的蒸腾作用也较弱,所以叶片的含水率较为稳定。而植物上层的光照条件较好,叶片通过光合作用产生的养分可以满足植物自身的生长和生活需

求,不需要再通过改变比叶面积来提升其光合效率,同时,植物上层的蒸腾作用也较强,因此,上层的叶功能性状中,表现最稳定的是比叶面积。

3.2 不同高度的叶功能性状的变异特征

不同高度的叶功能性状存在差异,不同的树种差异表现不同。其中,红锥的叶功能性状中只有叶组织密度在高度梯度上具有显著差异,灰木莲的叶功能性状在高度梯度上均具有显著差异。这可能是由于本研究选取的样地位于同一地区,且具有高度相似的种植背景,降雨、温度和海拔等环境因子

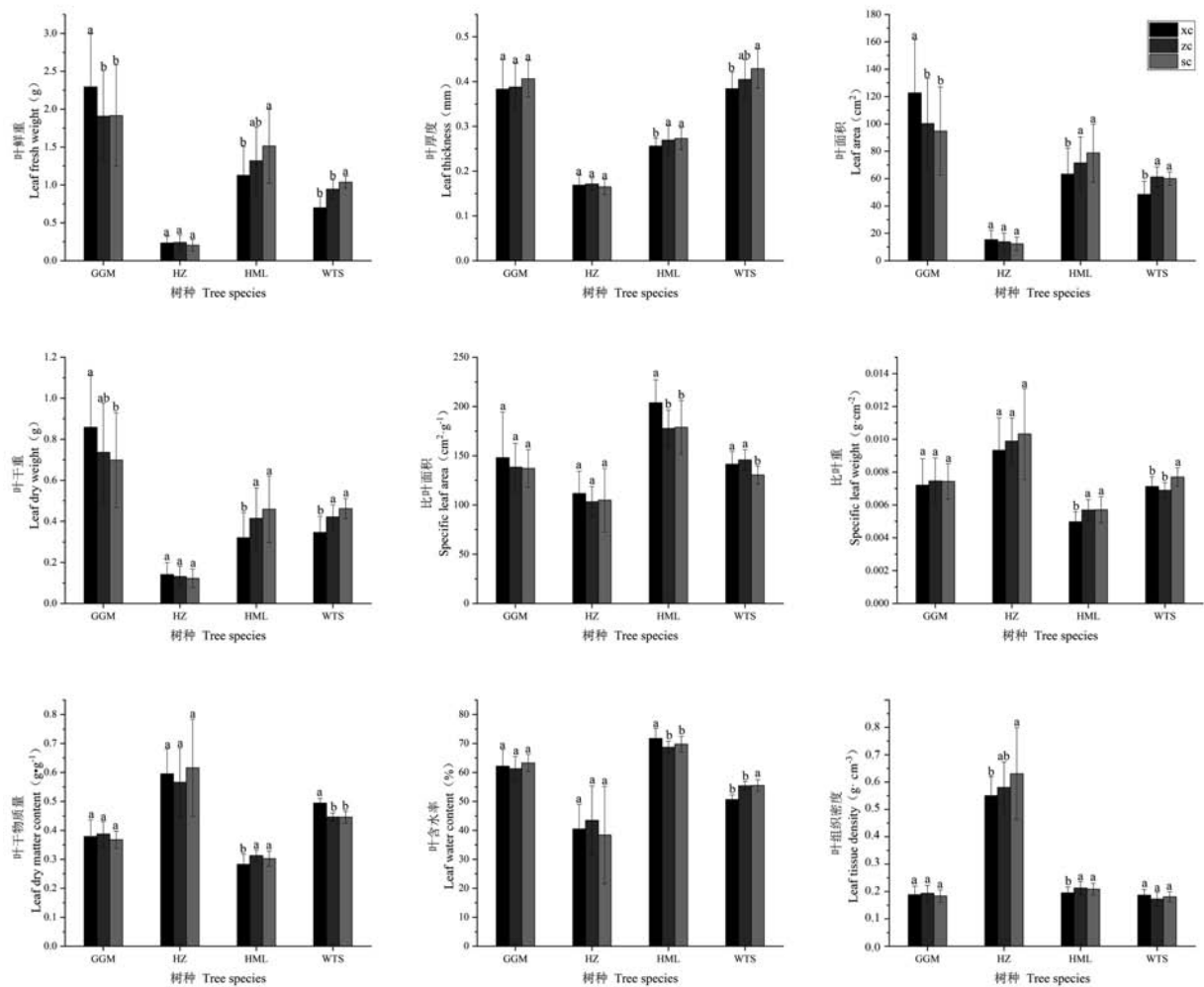


图 2 不同高度叶功能性状多重比较(LSD)

Fig. 2 Multiple comparisons (LSD) of functional traits of leaves at different heights

对于叶功能性状的影响较小,在群落中,受高度变化影响最大的是林分密度,不同高度的林分密度,光照条件不同。因此,可以推测光照对叶功能性状的影响为灰木莲>望天树>观光木>红锥。

比叶面积大小直接反映植物对光资源吸收和碳获取的能力,叶干物质含量可表征植物对养分的保存能力,这两个指标是植物对生境适应的关键叶性状(Bodegom et al., 2014)。随着高度的升高,四种乡土珍贵树种的比叶面积呈下降趋势,而比叶重呈上升趋势,在群落中,随着高度的增高,透光度增大,较高的小枝叶片具有较好的光照条件,比叶面积下降,这个结果与Wright等(2004)的研究结果相似。研究结果显示四种乡土珍贵树种的比叶面积和叶含水率为灰木莲>望天树>观光

木>红锥,说明比叶面积越大,叶含水率越大,这是由于较高的比叶面积,光合效率较高,对水分的需求也越高,因此植物的叶含水率较高,这个结果与宋贺等(2016)的研究相似。叶干物质质量越高,植物投入叶片建成的比例越高,叶片的耐受性越高,植物对养分的积累能力越强(程雯等,2019)。本研究中灰木莲和望天树的叶干物质质量随着高度的变化呈显著差异,但变化趋势不同。灰木莲的叶干物质质量随着采样高度的增大,呈现先增大后减小的趋势,而望天树则呈现逐渐减小的趋势,这反映出两种植物不同的养分分配策略。灰木莲中层的叶片产生的养分多用于叶片建成,上下两层的叶片养分多用于植株生长;而望天树则是下层叶片养分多用于叶片建成,上层多用于植株生长。

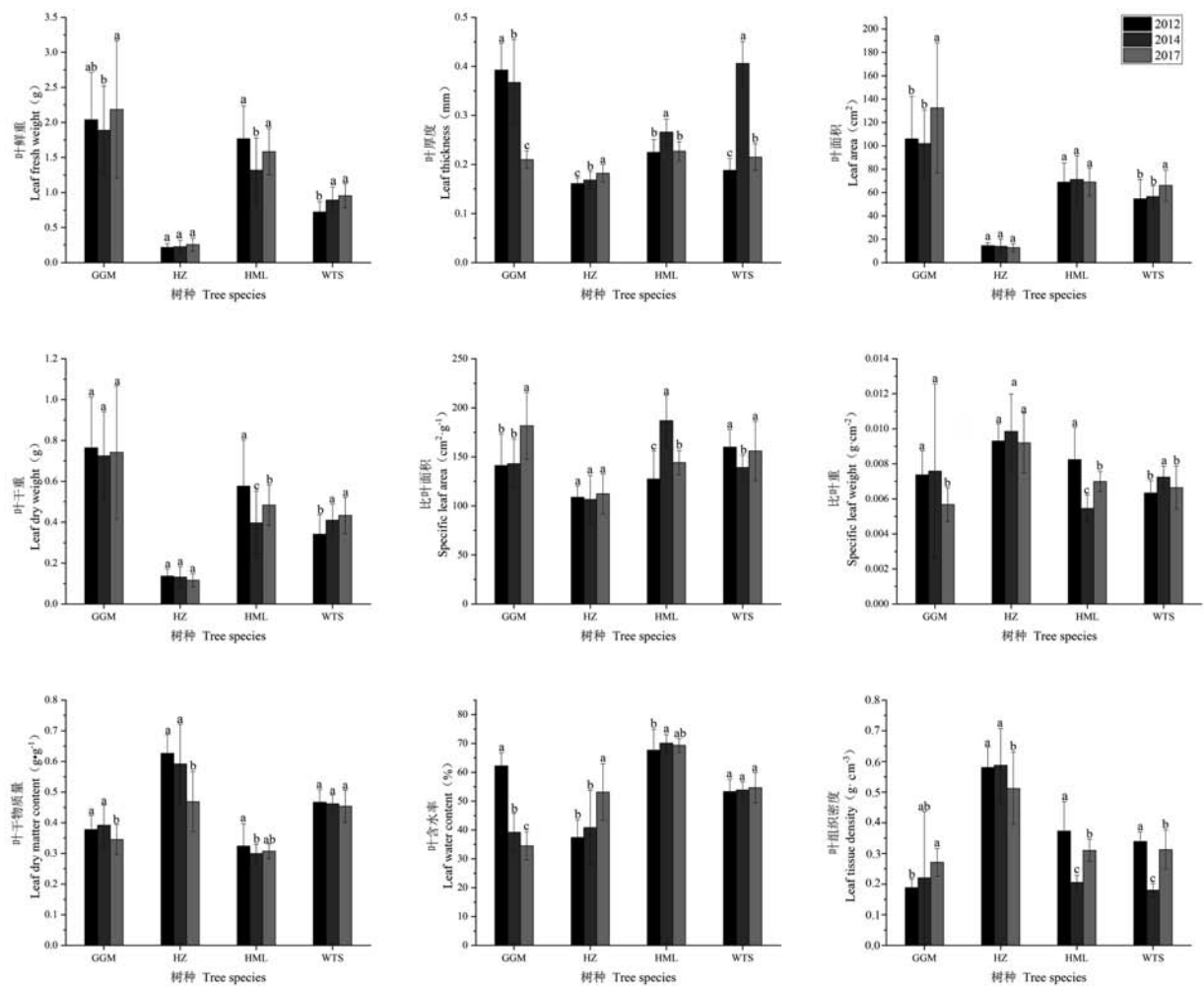


图3 不同树龄叶功能性状多重比较(LSD)
Fig. 3 Multiple comparison (LSD) of functional traits of leaves at different tree ages

3.3 不同树龄的叶功能性状变异特征

据研究结果可知,随着树龄的变化,观光木、红锥、灰木莲和望天树等四种乡土珍贵树种的叶功能性状具有显著差异,且大于高度梯度上的变化,但没有明显规律。在本研究中,随着树龄的变化,只有红锥的比叶面积差异不显著,但红锥的叶干物质质量却随着树龄的增大而增大,而呈现显著的变化趋势。一般而言,高的比叶面积和低的叶片干物质含量代表植物拥有高的捕光能力,能够快速获取养分,有利于提高植物的生产性能;低的比叶面积和高的叶干物质含量表示植物获取营养可能受阻(Wright et al., 2005)。说明红锥的生长随着树龄的增大而趋于稳定,光合作用所产生的养分多用于叶片建成,以提高叶片的耐受性。而

其他三种植物的生长随着树龄的变化没有呈现明显的规律性,这可能是由于这三种植物在3个树龄段依然处于高速生长期,性状表现不稳定,它们的比叶面积均大于红锥,而叶干物质质量却小于红锥,也证明了它们的叶片产生的养分更多地用于植株生长。比叶重指的是一定干物质投资所展开的捕光表面积数量,与植物的光拦截效率直接相关,可用来反映植物的碳获取策略,对植物的相对生长速率具有重要影响(Wilson et al., 1999)。本研究中,只有红锥的比叶重随树龄变化差异不显著,说明红锥的生长速率相对稳定,也印证了上文的观点。随着树龄的变化,四种乡土珍贵树种的叶功能性状中只有叶厚度和叶组织密度具有明显差异,但不具有明显的规律性,这可能是由于处于

表 2 叶功能性状相关性分析
Table 2 Correlation analysis of leaf functional traits

叶性状 Leaf functional trait	叶鲜重 Leaf fresh weight	叶厚度 Leaf thickness	叶面积 Leaf area	叶干重 Leaf dry weight	比叶面积 Specific leaf area	比叶重 Specific leaf weight	叶干物质质量 Leaf dry matter content	叶含水率 Leaf water content
叶厚度 Leaf thickness	0.581 **							
叶面积 Leaf area	0.946 **	0.537 **						
叶干重 Leaf dry weight	0.957 **	0.622 **	0.932 **					
比叶面积 Specific leaf area	0.257 **	0.085 *	0.406 **	0.114 **				
比叶重 Specific leaf weight	-0.235 **	-0.141 **	-0.374 **	-0.143 **	-0.767 **			
叶干物质质量 Leaf dry matter content	-0.205 **	-0.080	-0.105 *	-0.088 *	-0.140 **	0.111 **		
叶含水率 Leaf water content	0.106 **	0.027	-0.001	-0.002	0.092 *	-0.080	-0.974 **	
叶组织密度 Leaf tissue density	-0.569 **	-0.664 **	-0.637 **	-0.522 **	-0.655 **	0.795 **	0.148 **	-0.095 *

注：* 和 ** 分别表示在 0.05 和 0.01 水平相关性显著。
Note: * and ** indicate significant correlations at the 0.05 and 0.01 levels, respectively.

不同生长阶段的植株,受外部环境因素而采取的养分分配策略不同,而叶厚度与叶组织密度的变化则是叶片随植株养分分配策略改变的外在表现,这两个性状对于外部环境变化所带来的影响较为敏感。

本研究表明,树龄对叶功能性状的影响大于高度对叶功能性状的影响。这可能是因为植物处于不同生长阶段,植物本身的需求不同,采取的生存策略有较大的差异。比如在幼龄阶段,植物需要快速生长从而提升自身对于环境的适应能力,所以幼树一般具有较大的比叶面积和较小的叶干物质质量;而在成树阶段,植物叶片一般具有较低的比叶面积和较大的叶干物质质量。且植物各功能性状之间存在关联性(见下文),因此,植物各功能性状随着树龄的变化会发生较大改变,而高度只对植物的部分功能性状有影响,且不同植物的生活习性不同,高度对其影响程度也不同。

3.4 植物叶功能性状相关性分析

植物各功能性状不是独立发挥作用的,各性状间存在一定的相关性,通过一系列性状组合的调整和平衡以适应特定生境(Baraloto et al., 2010; Freschet et al., 2010)。叶片功能性状之间存在多种关联性,一系列叶片功能性状组合同时

发生作用,以实现植物对环境的适应,这反映了植物对环境适应策略的趋同性(程雯等,2019)。

比叶面积和叶干物质质量能够反映出植物利用资源效率,是植物适应各种生境的关键表现特征,具有重要的生态学意义。本研究中,比叶面积与叶干物质质量呈显著负相关,这与 Wright 等(2001)和 Roche 等(2004)的研究结果一致。说明比叶面积较小,叶干物质质量反映出植物具有较高的资源利用效率,体现了其对恶劣环境的适应性;而比叶面积较大,叶干物质质量较小,则反映出植物对于资源的利用效率较低,对于不良环境的抵抗能力也较差(冯秋红等,2009)。叶干物质质量与叶组织密度能够反映出植物用于叶片建成的养分投入,较大的叶干物质质量和叶组织密度,说明植物光合作用产生的养分多用于叶片的构建,导致叶组织密度增大,叶含水率降低,同时,叶片内部的水分向叶表面扩散的阻力增大,从而导致植物的抗旱性增强(Wilson et al., 1999; 王瑞丽等,2016)。这在本研究中再次得到验证,研究结果表明,叶干物质质量与叶组织密度呈极显著正相关,叶含水率与叶干物质质量均呈极显著负相关,与叶组织密度呈显著负相关。植物叶厚度对植物具有重要意义,叶片越厚,植物的储水能力越强,植物抗干旱的能力

越强,反之,植物叶片越薄,植物储水能力越弱,植物抗干旱能力越弱。在本研究中,叶厚度与叶干物质量和叶含水率相关性不显著,说明叶厚度的变化主要来自其余叶功能性状的影响。这可能是由于良凤江林场位于亚热带地区,气候湿润,气温较高,降雨充足,较适合植物生存,而叶干物质量是反映植物对恶劣环境的适应,且叶含水率与叶干物质量呈极显著负相关,因此,叶厚度不受叶干物质量和叶含水率的直接影响。

植物功能性状之间普遍存在相关性,植物功能性状之间的关系反映出植物适应环境的生存策略。不同环境条件下,植物通过不同的功能性状组合来适应环境,这形成了植物对环境的协同进化。

3.5 结论

植物功能性状的种内和种间变异普遍存在,影响功能性状变异的因素多种多样。本研究结果显示,在同一地区植物群落中,植物叶功能性状受高度和树龄的影响,不同的植物受影响程度不同。因此,良凤江林场在未来的营林过程中,结合不同树种,选择适当的营林策略,可以提高林木产量。比如红锥等受高度和树龄影响较小的树种,可以选择较大的种植密度,且各个树龄的植株可以混种,高低搭配;而灰木莲等受高度和树龄影响较大的树种,则需要选择相对较小的种植密度,且一个林分最好保持相同的树龄。本研究结果表明植物各功能性状之间存在一定的相关性,彼此相互协调适应环境的变化,这一结果也进一步证实了植物叶性状之间的相关关系是陆地生态系统植物特征的一般规律。本研究主要测定了植物的叶功能性状,进一步的研究还需结合样地土壤等环境因素做深入分析,探索该地区植物叶功能性状的环境影响因素。

参考文献:

ALBERT CH, THUILLER W, YOCCOZ NG, et al., 2010. Intraspecific functional variability: extent, structure and sources of variation [J]. *J Ecol*, 98(3): 604–613.

BODEGOM PMV, DOUMA JC, VERHEIJEN LM, 2014. A fully traits-based approach to modeling global vegetation distribution [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111(38): 13733–13738.

BARALOTO C, PAINE CET, POORTER L, et al., 2010. Decoupled leaf and stem economics in rain forest trees [J]. *Ecol Lett*, 13(11): 1338–1347

CORNWELL WK, ACKERLY DD, 2009. Community assembly and shifts in plant trait distributions across an environmental gradient in coastal California [J]. *Ecol Monogr*, 79(1): 109–126.

CHENG W, YU YH, XIONG KN, et al., 2019. Leaf functional traits of dominant species in karst plateau-canyon areas [J]. *Guihaia*, 39(8): 1039–1049. [程雯,喻阳华,熊康宁,等,2019.喀斯特高原峡谷优势种叶片功能性状分析[J].*广西植物*, 39(8): 1039–1049.]

FAJARDO A, PIPER FI, 2018. Intraspecific trait variation and covariation in a widespread tree species (*Nothofagus pumilio*) in southern Chile [J]. *New Phytol*, 189(1): 259–271.

FRESCHER GT, CORNELISSEN JHC, LOGTESTIGN RSPV, et al., 2010. Evidence of the ‘plant economics spectrum’ in a subarctic flora [J]. *J Ecol*, 98(2): 362–373.

FENG QH, SHI ZM, DONG LL, et al., 2009. Functional traits of deciduous trees and their relationships with meteorological factors in NSTEC [J]. *Chin J Agrometeorol*, 30(1): 79–83. [冯秋红,史作民,董莉莉,等,2009.南北样带落叶乔木功能性状及其与气象因子的关系[J].*中国农业气象*, 30(1): 79–83.]

JACKSON BG, PELZER DA, WARDLE DA, et al., 2013. The within-species leaf economic spectrum does not predict leaf litter decomposability at either the within-species or whole community levels [J]. *J Ecol*, 101(6): 1409–1419.

JUNG V, ALBER CH, VIOLLE C, et al., 2014. Intraspecific trait variability mediates the response of subalpine grassland communities to extreme drought events [J]. *J Ecol*, 102(1): 45–53.

LIU XJ, MA KP, 2015. Advances in plant functional traits [J]. *Sci Sin Vit*, 45(4): 325–339. [刘晓娟,马克平,2015.植物功能性状研究进展[J].*中国科学:生命科学*, 45(4): 325–339.]

LIU JH, ZENG DH, LEE DK, 2006. Leaf characters and their relationships of major plants in the southeastern part of horqin sandy land [J]. *Chin J Ecol*, 25(8): 921–925. [刘金环,曾德慧,DonKoo LEE,2006.科尔沁沙地东南部地区主要植物叶片性状及其相互关系[J].*生态学杂志*, 25(8): 921–925.]

LIU RH, LIANG SC, HUANG DL, et al., 2018. Cross-scale variation of functional traits of woody plants along the riverbank of the Lijiang River [J]. *Acta Ecol Sin*, 43(1): 16–26. [刘润红,梁士楚,黄冬柳,等,2018.漓江河岸带木本植物功能性状跨尺度变异研究[J].*生态学报*, 43(1): 16–26.]

- MAOW, LI YL, ZHANG TH, et al., 2012. Overview of plant leaf traits in ecology at different scales [J]. J Desert Res, 32 (1): 33–41. [毛伟, 李玉霖, 张铜会, 等, 2012. 不同尺度生态学中植物叶性状研究概述 [J]. 中国沙漠, 32(1): 33–41.]
- MA JM, ZHANG XJ, LIANG SC, et al., 2012. Study on leaf characteristics of common plants in Yaoshan, Guilin [J]. J Guangxi Norm Univ (Nat Sci Ed), 30(1): 77–85. [马姜明, 张秀珍, 梁士楚, 等, 2012. 桂林尧山常见植物叶片性状研究 [J]. 广西师范大学学报(自然科学版), 30(1): 77–82.]
- MESSIER J, MCGILL BJ, LECHOWICA MJ, 2010. How do traits vary across ecological scales? A case for trait-based ecology [J]. Ecol Lett, 13(7): 838–848.
- PAINI CET, BARALOTO C, CHAVE J, et al., 2011. Functional traits of individual trees reveal ecological constraints on community assembly in tropical rain forests [J]. Oikos, 120(5): 720–727.
- QI DH, WEN ZM, YANG SS, et al., 2015. Trait-based responses and adaptation of *Artemisia sacrorum* to environmental changes [J]. Chin J Appl Ecol, 26(7): 1921–1927. [戚德辉, 温仲明, 杨士梭, 等, 2015. 基于功能性状的铁杆蒿对环境变化的响应与适应 [J]. 应用生态学报, 26(7): 1921–1927.]
- ROCHE P, DIAZBURLINSON N, GACHET S, 2004. Congruency analysis of species ranking based on leaf traits: Which traits are the more reliable? [J]. Plant Ecol, 174(1): 37–48.
- SONG H, YU HY, CHEN YT, et al., 2016. Leaf economics spectrum among different plant functional types in Beijing Botanical Garden, China [J]. Chin J Appl Ecol, 27(6): 1861–1869. [宋贺, 于鸿莹, 陈莹婷, 等, 2016. 北京植物园不同功能型植物叶经济谱 [J]. 应用生态学报, 27(6): 1861–1869.]
- VENDRAMINI F, SANDRA D, GURVICH DE, et al., 2002. Leaf traits as indicators of resource-use strategy in floras with succulent species [J]. New Phytol, 154(1): 147–157.
- WESTOBY M, 1998. A leaf-height-seed (LHS) plant ecology strategy scheme [J]. Plant Soil, 199(2): 213–227.
- WILSON PJ, THOMPSON K, HODGSON JG, 1999. Specific leaf area and leaf dry matter content as alternative predictors of plant strategies [J]. New Phytol, 143(1): 155–162.
- WRIGHT IJ, REICH PB, CORNELISSEN JHC, et al., 2005. Modulation of leaf economic traits and trait relationships by climate [J]. Global Ecol Biogeogr, 14(5): 411–421.
- WRIGHT IJ, REICH PB, JOHANNES HC, et al., 2005. Assessing the generality of global leaf trait relationships [J]. New Phytol, 166(2): 485–496.
- WRIGHT IJ, REICH PB, WESTOBY M, et al., 2004. The worldwide leaf economics spectrum [J]. Nature, 428(6985): 821–827.
- WRIGHT IJ, REICH PB, WESTOBY M, et al., 2001. Strategy shifts in leaf physiology, structure and nutrient content between species of high and low-rainfall, and high and low-nutrient habitats [J]. Funct Ecol, 15(4): 423–434.
- WANG RL, YU GR, HE NP, et al., 2016. Altitudinal variation in the covariation of stomatal traits with leaf functional traits in Changbai Mountain [J]. Acta Ecol Sin, 36(8): 2175–2184. [王瑞丽, 于贵瑞, 何念鹏, 等, 2016. 气孔特征与叶片功能性状之间关联性沿海拔梯度的变化规律——以长白山为例 [J]. 生态学报, 36(8): 2175–2184.]
- XIONG MH, 2015. Correlation and differentiation law of plant functional traits in tropical cloud forest in hainan [D]. Haikou: Hainan University. [熊梦辉, 2015. 海南热带云雾林植物功能性状的关联及分异规律 [D]. 海口: 海南大学.]
- ZHANG X, WANG ZN, LU JY, et al., 2016. Responses of leaf traits to drought at different growth stages of alfalfa [J]. Acta Ecol Sin, 36(9): 2669–2676. [张曦, 王振南, 陆皎云, 等, 2016. 紫花苜蓿叶性状对干旱的阶段响应 [J]. 生态学报, 36(9): 2669–2676.]

(责任编辑 周翠鸣)

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202007039

乔刚, 李莉, 姜山. 小立碗藓 *WRKY* 基因家族生物信息学分析 [J]. 广西植物, 2022, 42(2): 267–276.QIAO G, LI L, JIANG S. Bioinformatics analysis of *WRKY* gene family in *Physcomitrella patens* [J]. *Guihaia*, 2022, 42(2): 267–276.

小立碗藓 *WRKY* 基因家族生物信息学分析

乔 刚¹, 李 莉², 姜 山^{2*}

(1. 贵州师范大学 生命科学学院, 贵阳 550001; 2. 贵州师范大学 国际教育学院, 贵阳 550001)

摘 要: *WRKY* 作为最先在植物中发现的转录因子, 在植物生长发育等过程中发挥重要作用。为了更好地研究小立碗藓 *WRKY* 蛋白的结构与功能, 该文以 Pfam 数据库中 *WRKY* 基因家族数据 (登录号为 PF03106) 为材料, 分析了小立碗藓 (*Physcomitrella patens*) *WRKY* 基因家族成员的理化性质、蛋白质的二级结构预测、染色体定位、内外显子分布及系统进化关系。结果表明: (1) 小立碗藓 *WRKY* 基因家族成员共有 38 个基因, 根据 *WRKY* 保守结构域个数和锌指结构类型分成 I、II 两大类, 不含第 III 类 (锌指结构为 C2HC 型), 其中部分基因 *WRKY* 保守结构域发生变异。 (2) *WRKY* 蛋白氨基酸长度在 216~775 aa 之间、相对分子质量在 24.5~82.8 kDa 之间, 亚细胞定位显示 *WRKY* 家族成员蛋白质定位于细胞核中。 (3) *WRKY* 蛋白的二级结构以 α -螺旋、延伸链、 β -转角、无规卷曲四种构成元件构成, 除 PpWRKY11 (α -螺旋为主) 外, 其余无规卷曲占比高达 70%。 (4) 与拟南芥的系统进化关系表明, 植物在进化过程中 *WRKY* 家族成员的数目与进化方式发生改变, *WRKY* 基因家族成员外显子的个数为 3~7 个。 (5) 小立碗藓 *WRKY* 基因家族成员无规则分散于 21 条染色体上, 并未形成基因簇。该研究通过分析 *WRKY* 基因家族的基本结构与性质, 能为后续深入研究 *WRKY* 转录因子的功能奠定基础。

关键词: 小立碗藓, *WRKY* 转录因子, 基因家族分析, 生物信息

中图分类号: Q943 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2022)02-0267-10

Bioinformatics analysis of *WRKY* gene family in *Physcomitrella patens*

QIAO Gang¹, LI Li², JIANG Shan^{2*}

(1. School of Life Sciences, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China; 2. School of International Education, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China)

Abstract: As a transcription factor first found in plants, *WRKY* plays an important role in plant growth and development. However, it has not been studied in *Physcomitrella patens*. By using the *WRKY* gene family data (accession number is PF03106) in Pfam database, this paper studied the basic information of *WRKY* in *P. patens*, which included physicochemical properties, protein secondary structure prediction, chromosome localization, exon and intron distribution and phylogenetic relationship. The results were as follows: (1) The *WRKY* gene family in *P. patens* consisted of 38 members which were divided into two major categories—I and II, and the conserved domains of some *WRKY* genes

收稿日期: 2020-11-28

基金项目: 国家自然科学基金 (31260426, 31560508) [Supported by National Natural Science Foundation of China (31260426, 31560508)]。

第一作者: 乔刚 (1992-), 硕士研究生, 主要从事植物分子生物学研究, (E-mail) 2335603452@qq.com。

*通信作者: 姜山, 博士, 教授, 研究方向为植物病理学, (E-mail) kyosan200312@hotmail.com。

had mutated. (2) The amino acid length of WRKY protein was 216–775 aa and the relative molecular mass was 24.5–82.8 kDa; Subcellular location showed that the proteins of WRKY gene family were distributed in the nucleus. (3) The secondary structure of WRKY protein was composed of four constituent elements: α -helix, extended strand, β -turn, and random coil; Except for PpWRKY11 (α -helix dominated), the proportion of random coil was up to 70%. (4) The phylogenetic relationship with *Arabidopsis* showed that the number of the WRKY family members and the way of their revolution had changed in the process of plants' evolution, the number of exons of WRKY gene family members were 3–7. (5) The members of WRKY gene were randomly dispersed on 21 chromosomes without forming a gene cluster. This study analyzed the basic structure and properties of the WRKY gene family, and it was found that the WRKY gene family of *Physcomitrella patens* has evolutionary diversity and unique variability in conserved domains, laying the foundation for subsequent research.

Key words: *Physcomitrella patens*, WRKY transcription factor, gene family analysis, bioinformatics

目前,在植物中发现 60 多个转录因子家族 (Kaplan-Levy et al., 2012; Qin et al., 2014), 其中研究较多的有 MYB、NAC、WRKY、SBP、GARS 等。WRKY(transcription factor)作为最先在植物中发现的转录因子 (Wang et al., 2015), 它由 N-端的 WRKY 保守结构域 (WRKYGQK) 和 C-端的锌指结构组成 (Wang et al., 2018)。根据保守结构域的个数和锌指结构的类型, 可将 WRKY 转录因子分成三类: I 类, 含有 2 个 WRKY 结构域、锌指结构为 C2H2 型; II 类, 含有单个结构域, 锌指结构为 C2H2 (CX4-5-C-X22-23-H-X1-H), 由此将其分为五个亚型 (II a、II b、II c、II d、II e); III 类, 单个保守结构域、锌指为 C2HC (C-X7-C-X23-HX) 型 (Song et al., 2015; Jia et al., 2018)。但是, 在低等植物中不含有第 III 类类型的 WRKY 转录因子 (苏琦等, 2007)。

小立碗藓 (*Physcomitrella patens*) 作为高等植物中的低等类群, 它的优势主要体现在以下几点: (1) 小立碗藓基因组测序结果已知 (<http://www.cosmoss.org/>) (Rensing et al., 2008), 大小为 511 Mb, 染色体共有 27 条 (Rensing et al., 2002); (2) 同源重组率高; (3) 生长周期短、易于扩繁 (Xu et al., 2009); (4) 细胞结构简单, 表型能直接观察。因此, 小立碗藓已成为研究植物基因结构与功能的一种理想植物 (蓝雨纯等, 2020)。

随着生物技术的发展, WRKY 转录因子不断被发现。目前, 已经鉴定出绿藻中有 3 个 WRKY 转录因子 (Rinerson et al., 2015)、卷柏 19 个 (Li et al., 2016)、山松 83 个 (Liu et al., 2009)、拟南芥 74 个 (Ulker et al., 2004)、水稻 97 个 (Xu et al., 2016)。同时, WRKY 作为转录因子已经被证明调控植物多重生理功能 (Eulgem et al., 2000)。有研究发现, WRKY 转录因子参与植物对干旱、高温、低温等非

生物胁迫的应答反应 (Chen et al., 2012) 以及植物对病原菌的抗性 (Sham et al., 2017), 如水稻 OsWRKY13 参与抵抗水稻稻瘟病菌 (*Magnaporthe grisea*) 的感染 (Schlutenhofer & Yuan, 2014), AtWRKY8 在盐胁迫下表达出现增加, 进而增强植株对盐胁迫的抗性 (Chen et al., 2013); WRKY 转录因子与植物的生长发育 (Chen et al., 2019) 和代谢产物生物的合成 (Zhang et al., 2018; Liu et al., 2019) 密切相关, 但在小立碗藓中, WRKY 是否参与防御反应及其作用机制却鲜有报道。随着生物技术、计算机技术与大数据的迅猛发展 (Pearson, 2001), 人们对于未知领域的研究也不断加强。生物信息学技术作为一门新兴的时尚学科, 结合计算机数据收集与分析, 不断探索未知基因的结构与功能, 使得预测结果逐渐具有说服力, 为科学研究做出了很大贡献, 这一技术广泛应用于蛋白分析、基因结构预测等众多领域。因此, 本文通过生物信息学分析研究 WRKY 基因家族成员的基本信息、保守结构域分析、染色体定位、内外显子分布等信息, 旨在为后续研究小立碗藓 WRKY 蛋白的结构与功能提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

Bio-linux 操作系统; 虚拟机 virtual Box; 各种数据库, 即 Pfam (<http://pfam.xfam.org/>)、Ensembl Plants (Bolseret al., 2017) (<http://plants.ensembl.org/index.html>)、phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>); 在线构图工具及可视化软件, 即 Adobe illustrator、TBtools 等。

1.2 小立碗藓 WRKY 基因家族的确定

在 Pfam 数据库下载 WRKY 蛋白保守结构域

(*.hmm) 文件, 在 Ensembl Plants 数据库中下载小立碗藓基因组的 cds、cdna、pep、gff3 等序列作为备用文件。

在小立碗藓蛋白质数据库检索含有 *WRKY* (PF03106) 基因家族结构域的蛋白质序列(李昊阳等, 2014), 通过 E 值初筛, 再用 SMART 网站 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 进行手动筛选, 最终结果用于后续研究。

1.3 小立碗藓 *WRKY* 基因家族成员的理化性质分析与亚细胞定位

由 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/protparam-doc.html>) 网站预测家族成员的等电点 (PI)、相对分子质量、氨基酸长度、蛋白质疏水性等性质; 通过 PLOC (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLOC-2/>)、Plant-mPLOC (植物细胞定位) 预测家族成员在细胞中的位置分布。

1.4 小立碗藓 *WRKY* 基因家族成员蛋白的二级结构分析

将确定的小立碗藓 *WRKY* 基因家族蛋白质的氨基酸序列通过在线网站 HNN Secondary Structure Prediction (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 预测其二级结构各构型的占比。

1.5 小立碗藓 *WRKY* 基因家族成员系统发育树的构建

利用 MEGA 7.0 软件进行进化树构建, 程序选

用最大似然法, Bootstrap 值设定为 1 000, 其他设定参数以系统默认值为准。

1.6 小立碗藓 *WRKY* 基因家族成员内外显子及保守结构域分析

由 MEME 在线网 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>), 预测蛋白质的保守结构域的 motif 模型信息。通过 <http://gsds.cbi.pku.edu.cn/> 网站绘制小立碗藓 *WRKY* 基因家族成员的内外显子分布图, 由 AI 软件合并绘图。

1.7 小立碗藓 *WRKY* 基因家族成员的染色体定位图

将 *WRKY* 蛋白所对应的氨基酸序列及成员在小立碗藓基因组中对应的名称文件、小立碗藓 27 条染色体的长度信息; 由 http://mg2c.iask.in/mg2c_v2.0/ 在线网站绘制染色体定位图, 通过 TBtools 工具进行可视化修饰。

2 结果与分析

2.1 小立碗藓 *WRKY* 基因家族成员的确定

通过对 38 个 *WRKY* 家族成员的保守结构域序列比对将 *WRKY* 家族成员主要分为以下几类: I 类(3 个基因)、II a(5 个基因)、II b(6 个基因)、II c(5 个基因)、II d(13 个基因)、II e(6 个基因)、不含第三类(C2HC 型), 其中部分基因的保守结构域序列发生变异(表 1)。

表 1 小立碗藓 *WRKY* 保守结构域的变异
Table 1 Variation of conserved domain of *Physcomitrella patens* *WRKY*

基因名称 Gene name	<i>WRKY</i> 结构域序列 <i>WRKY</i> domain sequence	变异后保守结构域序列 Conserved domain sequence after mutation	分组 Groups
<i>PpWRKY7</i>	WRKYGQK	WKKYGNK	II a
<i>PpWRKY8</i>	WRKYGQK	WKKYGNK	II a
<i>PpWRKY14</i>	WRKYGQK	WKKYGNK	II a
<i>PpWRKY25</i>	WRKYGQK	WRKYGHK	II d
<i>PpWRKY30</i>	WRKYGQK	WRKYGQN	II b
<i>PpWRKY32</i>	WRKYGQK	WKKYGNK	II a
<i>PpWRKY35</i>	WRKYGQK	WKKYGNK	II a

2.2 小立碗藓 *WRKY* 基因家族成员理化性质分析及亚细胞定位

由表 2 可知, 整个家族成员的氨基酸序列长度在 216~775 aa 之间, *PpWRKY25* 最小, *PpWRKY10* 最大。 *WRKY* 蛋白氨基酸的理论等电点 PI 值在 5.10~9.79 之间, 蛋白质的相对分子质量在 24.5~

82.8 kDa 之间, 与氨基酸数量成正比。另外, 通过蛋白质疏水性数值可以得到 *PpWRKY25*、*PpWRKY30*、*PpWRKY36* 既具有疏水性又有亲水性, 其数值在 -0.5~+0.5 之间。负值越大说明亲水性越强, 其他氨基酸都为亲水氨基酸。PLOC 亚细胞定位结果表明小立碗藓 *WRKY* 蛋白全部分布在细胞核中。

表 2 小立碗藓 WRKY 转录因子理化性质分析

Table 2 Analysis of physicochemical properties of WRKY transcription factors in <i>Physcomitrella patens</i>					
基因名称 Gene name	等电点 PI	分子量 Molecular weight (kDa)	氨基酸长度 Length of amino acid (aa)	亚细胞定位 Subcellular localization	蛋白质疏水性 Grand average of hydropathicity (GRAVY)
<i>PpWRKY1</i>	9.71	43.1	395	Nucleus 细胞核	-0.693
<i>PpWRKY2</i>	6.41	82.0	765	Nucleus 细胞核	-0.601
<i>PpWRKY3</i>	8.79	75.4	705	Nucleus 细胞核	-0.970
<i>PpWRKY4</i>	9.76	43.2	396	Nucleus 细胞核	-0.655
<i>PpWRKY5</i>	9.10	74.2	684	Nucleus 细胞核	-1.052
<i>PpWRKY6</i>	6.62	81.3	761	Nucleus 细胞核	-0.560
<i>PpWRKY7</i>	6.08	37.7	343	Nucleus 细胞核	-1.047
<i>PpWRKY8</i>	7.68	40.3	365	Nucleus 细胞核	-0.936
<i>PpWRKY9</i>	6.71	60.6	558	Nucleus 细胞核	-0.648
<i>PpWRKY10</i>	8.21	82.8	775	Nucleus 细胞核	-0.751
<i>PpWRKY11</i>	9.79	42.8	385	Nucleus 细胞核	-0.719
<i>PpWRKY12</i>	5.66	55.8	507	Nucleus 细胞核	-0.845
<i>PpWRKY13</i>	5.89	41.1	372	Nucleus 细胞核	-0.991
<i>PpWRKY14</i>	8.31	65.2	589	Nucleus 细胞核	-0.759
<i>PpWRKY15</i>	9.75	43.2	395	Nucleus 细胞核	-0.643
<i>PpWRKY16</i>	5.69	71.2	642	Nucleus 细胞核	-0.840
<i>PpWRKY17</i>	9.72	42.4	385	Nucleus 细胞核	-0.829
<i>PpWRKY18</i>	8.55	48.7	437	Nucleus 细胞核	-0.688
<i>PpWRKY19</i>	8.45	78.9	749	Nucleus 细胞核	-0.717
<i>PpWRKY20</i>	7.60	55.7	504	Nucleus 细胞核	-0.820
<i>PpWRKY21</i>	6.06	59.3	533	Nucleus 细胞核	-0.754
<i>PpWRKY22</i>	5.76	56.6	511	Nucleus 细胞核	-0.809
<i>PpWRKY23</i>	6.46	81.7	758	Nucleus 细胞核	-0.813
<i>PpWRKY24</i>	5.27	63.0	579	Nucleus 细胞核	-0.637
<i>PpWRKY25</i>	7.15	24.5	216	Nucleus 细胞核	-0.295
<i>PpWRKY26</i>	7.37	80.5	740	Nucleus 细胞核	-0.694
<i>PpWRKY27</i>	5.10	52.8	480	Nucleus 细胞核	-0.752
<i>PpWRKY28</i>	5.62	62.8	576	Nucleus 细胞核	-0.789
<i>PpWRKY29</i>	5.40	64.0	584	Nucleus 细胞核	-0.806
<i>PpWRKY30</i>	8.01	44.3	409	Nucleus 细胞核	-0.463
<i>PpWRKY31</i>	5.33	57.2	525	Nucleus 细胞核	-0.737
<i>PpWRKY32</i>	5.94	59.9	532	Nucleus 细胞核	-0.955
<i>PpWRKY33</i>	7.79	61.2	566	Nucleus 细胞核	-0.720
<i>PpWRKY34</i>	5.99	63.2	588	Nucleus 细胞核	-0.571
<i>PpWRKY35</i>	5.67	48.1	435	Nucleus 细胞核	-0.571
<i>PpWRKY36</i>	8.71	52.7	491	Nucleus 细胞核	-0.454
<i>PpWRKY37</i>	8.23	79.5	748	Nucleus 细胞核	-0.512
<i>PpWRKY38</i>	5.96	79.3	723	Nucleus 细胞核	-0.867

2.3 小立碗藓 WRKY 基因家族成员二级结构预测

由表 3 可知,小立碗藓 WRKY 基因家族成员的蛋白质由四种结构元件构成(α-螺旋、延伸链、β-转角、无规卷曲),其中以无规卷曲为主要构成元

件,最高为 PpWRKY19,占比达 73.83%,其次是 α-螺旋;而 PpWRKY11 结果与家族成员不同,以 α-螺旋为主,占比高达 42.34%,无规卷曲为39.74%。另外两种构成元件占比均较小,比较稳定。

2.4 小立碗藓 *WRKY* 基因家族成员系统进化关系分析

从图 1 小立碗藓 *WRKY* 基因家族成员的进化树分析可以看出, *WRKY* 基因家族成员在进化的过程中已经发生了改变, 38 个基因分布在不同的五个分支上(分别含有 I 型基因 3 个、II a 型基因 5 个、II b 型基因 6 个、II c 型基因 5 个、II d 型基因 13 个、II e 型 6 个)。从进化树还可以看出, 小立碗藓与拟南芥在进化上具有一定的差异性, 其中的 II a、II d 并未聚集在同一分支, 说明植物由低等向高等进化的过程中基因的进化方式发生了改变, 出现了分化。

2.5 小立碗藓 *WRKY* 基因家族成员内外显子分布及结构域分析

小立碗藓 *WRKY* 家族成员主要分布在几个不同的分支, 在进化上既具有差异性又具有相似性。由图 2; B 可知, 小立碗藓 *WRKY* 基因家族成员内外显子分布图, 外显子的个数为 3~7 个。其中, I 型有 4~6 个外显子、II a 与 II e 型外显子 4 个、II b 型含外显子 3~7 个、II c 型外显子 3 个、大多数 II d 型含有外显子 3 个。内含子的长度可以通过图下比例尺推断得到。由图 2; C 可知, 不同 *WRKY* 基因所对应的蛋白结构域共有 10 个 motif, 不同基因对应的 motif 也有所不同。由表 4 可知, 每个 motif 的宽度、E-value 值、对应 motif 的 Logo 图; 氨基酸宽度最大为 50, 最低仅有 21。这 38 个家族成员中约有 50% 具有两个保守结构域, 最多含有四个; 而 II a (*PpWRKY7*、*PpWRKY8*、*PpWRKY14*、*PpWRKY35*) 都只含有一个 motif 5 的保守结构域, 并未形成稳定的 motif 1-motif 3 的稳定结构。

2.6 小立碗藓 *WRKY* 基因家族成员的染色体分布

由图 3 可知, 通过分析最终将 38 个 *WRKY* 基因定位在小立碗藓 27 条染色体中的 21 条, I 型 (*PpWRKY3*、*PpWRKY5*、*PpWRKY19*) 分布于第 8、第 3、第 2 号染色体; II a 型 (*PpWRKY35*、*PpWRKY31*、*PpWRKY8*、*PpWRKY7*、*PpWRKY14*) 分布于第 14、第 4、第 27、第 6、第 5 号染色体; II b 型 (*PpWRKY36*、*PpWRKY30*、*PpWRKY2*、*PpWRKY6*、*PpWRKY37*、*PpWRKY26*) 分布于第 11、第 7、第 13、第 3、第 12、第 4 号染色体; II c 型 (*PpWRKY34*、*PpWRKY9*、*PpWRKY33*、*PpWRKY24*、*PpWRKY28*) 分布于第 20、第 24、第 23、第 3、第 13 号染色体; II d 型 (*PpWRKY29*、*PpWRKY22*、*PpWRKY25*、*PpWRKY38*、*PpWRKY16*、*PpWRKY10*、*PpWRKY23*、*PpWRKY21*、

表 3 小立碗藓 *WRKY* 蛋白质二级结构分析
Table 3 Secondary structure analysis of *WRKY* protein in *Physcomitrella patens*

基因名称 Gene name	二级结构 Secondary structure (%)			
	α-螺旋 α-helix	延伸链 Extended strand	β-转角 β-turn	无规卷曲 Random coil
<i>PpWRKY1</i>	26.33	12.91	6.08	54.68
<i>PpWRKY2</i>	32.03	13.59	2.61	51.76
<i>PpWRKY3</i>	14.61	9.50	3.97	71.91
<i>PpWRKY4</i>	21.97	15.91	6.06	56.06
<i>PpWRKY5</i>	16.96	8.63	4.24	70.18
<i>PpWRKY6</i>	29.57	13.53	3.55	53.55
<i>PpWRKY7</i>	15.74	13.70	6.71	63.85
<i>PpWRKY8</i>	22.74	15.34	7.67	54.25
<i>PpWRKY9</i>	24.37	8.96	3.41	63.26
<i>PpWRKY10</i>	19.35	9.81	6.97	63.87
<i>PpWRKY11</i>	42.34	11.34	6.49	39.74
<i>PpWRKY12</i>	31.76	8.88	6.90	52.47
<i>PpWRKY13</i>	33.39	10.19	5.49	50.94
<i>PpWRKY14</i>	26.32	10.53	3.90	59.25
<i>PpWRKY15</i>	25.06	14.94	8.35	51.65
<i>PpWRKY16</i>	28.19	12.15	6.70	52.96
<i>PpWRKY17</i>	25.45	12.47	4.94	51.74
<i>PpWRKY18</i>	24.49	10.76	6.18	58.58
<i>PpWRKY19</i>	12.68	9.35	4.14	73.83
<i>PpWRKY20</i>	33.73	8.13	4.76	53.37
<i>PpWRKY21</i>	27.77	10.51	5.44	56.29
<i>PpWRKY22</i>	19.37	9.59	6.65	64.38
<i>PpWRKY23</i>	18.07	8.05	5.41	68.47
<i>PpWRKY24</i>	17.10	12.61	7.77	62.52
<i>PpWRKY25</i>	43.06	7.41	1.85	47.69
<i>PpWRKY26</i>	27.43	12.70	2.97	56.98
<i>PpWRKY27</i>	32.29	8.96	5.42	53.33
<i>PpWRKY28</i>	21.18	11.81	4.69	62.33
<i>PpWRKY29</i>	27.10	9.42	7.53	55.14
<i>PpWRKY30</i>	27.63	15.65	6.60	50.12
<i>PpWRKY31</i>	20.00	9.33	3.24	67.43
<i>PpWRKY32</i>	29.89	11.28	4.51	54.32
<i>PpWRKY33</i>	23.85	8.83	4.42	62.90
<i>PpWRKY34</i>	27.55	9.01	4.42	59.01
<i>PpWRKY35</i>	23.91	9.89	5.06	61.15
<i>PpWRKY36</i>	32.59	13.65	6.31	47.45
<i>PpWRKY37</i>	26.60	12.70	3.07	57.62
<i>PpWRKY38</i>	27.25	6.64	5.67	60.44

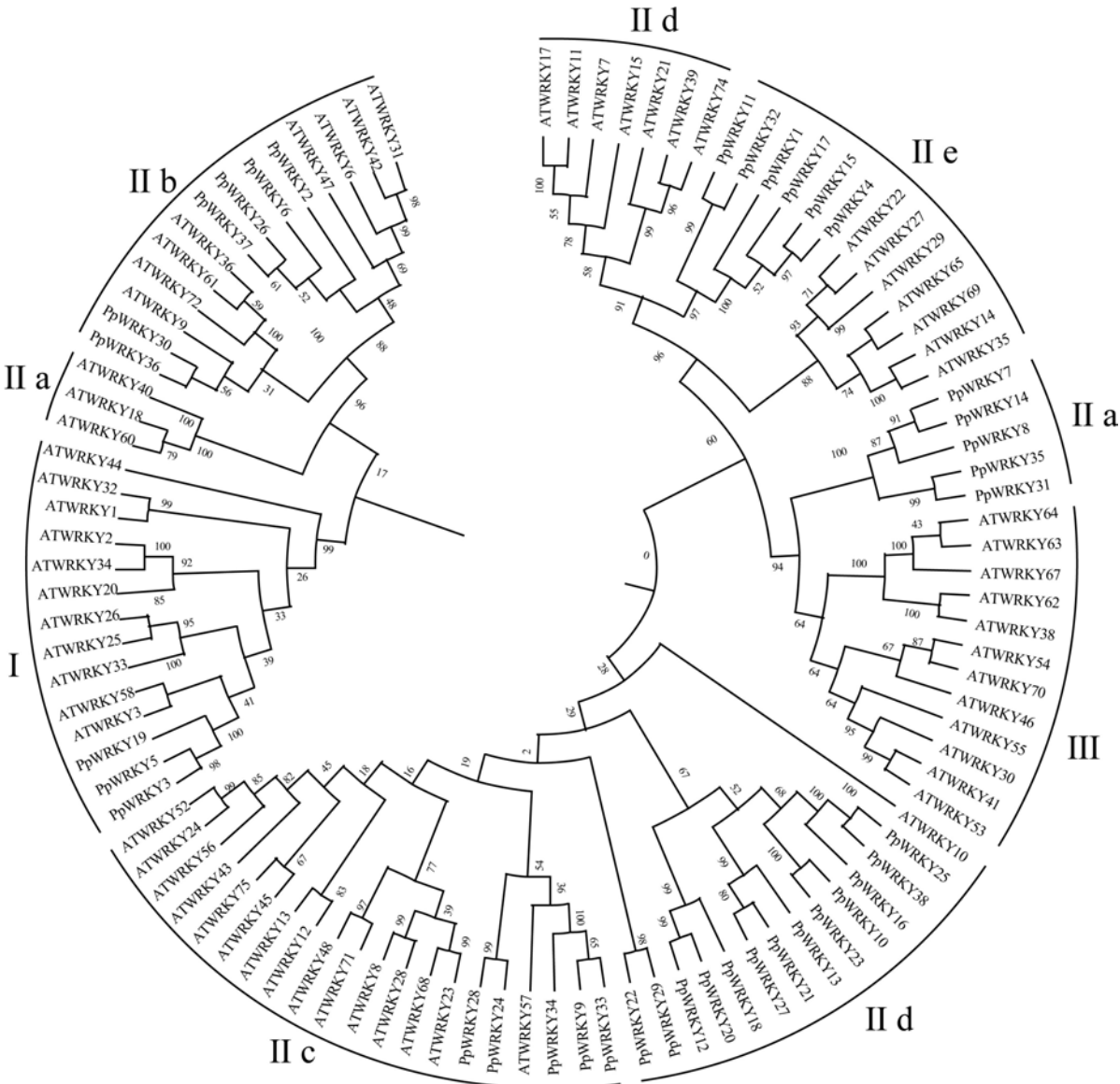


图 1 小立碗藓与拟南芥 WRKY 系统发育树
Fig. 1 Phylogenetic trees of WRKY in *Physcomitrella patens* and *Arabidopsis*

PpWRKY27、*PpWRKY13*、*PpWRKY18*、*PpWRKY20*、*PpWRKY12*) 分布于第 2、第 11、第 11、第 26、第 3、第 8、第 3、第 19、第 22、第 21、第 2、第 7、第 11 号染色体; II e (*PpWRKY15*、*PpWRKY4*、*PpWRKY17*、*PpWRKY1*、*PpWRKY11*、*PpWRKY32*) 分布于第 2、第 1、第 17、第 14、第 7、第 2 号染色体。同一类型 II d 中 *PpWRKY29* 与 *PpWRKY18*、*PpWRKY22* 与 *PpWRKY25* 分别分布同一染色体上; II e 中 *PpWRKY15* 与 *PpWRKY32* 分布于同一染色体上,其他基因在染色体上呈现出明显的非均匀分布,所

有基因在染色体上并未形成基因簇 (Bai et al., 2002)。

3 讨论与结论

本研究通过生物信息学分析鉴定小立碗藓 *WRKY* 基因家族共包含 38 个基因,与拟南芥比较可以发现,在植物从早期水生到陆生、低等到高等进化过程中,*WRKY* 基因是不断扩张丰富的,也意味着该家族有新功能的引入。根据 *WRKY* 结构域

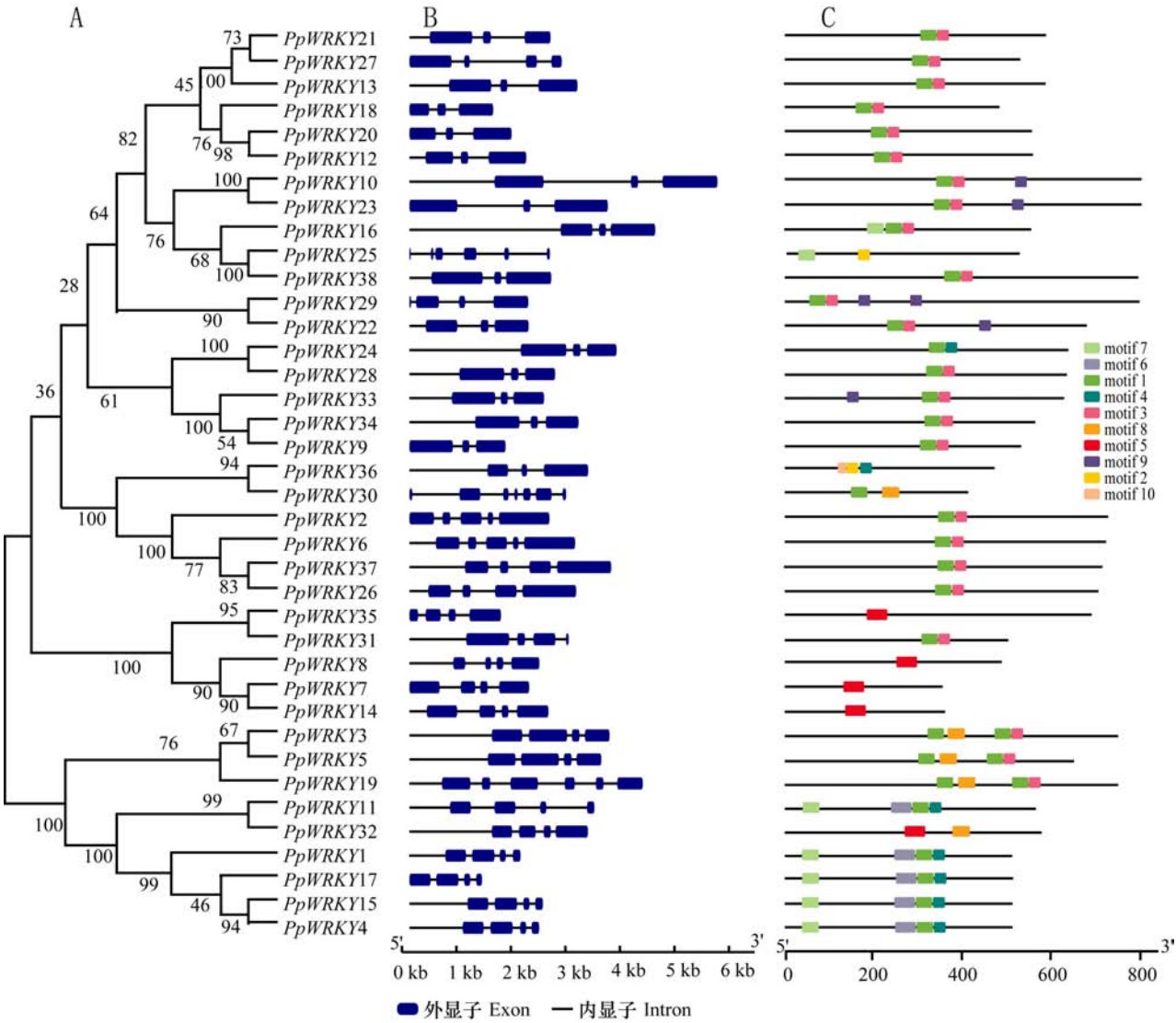


图 2 小立碗藓 *WRKY* 基因进化关系 (A) 和内外显子分布图 (B) 以及小立碗藓 *WRKY* 蛋白结构域的 motif 模型 (C)

Fig. 2 Evolutionary relationship (A) and distribution of exons and introns (B) of *Physcomitrella patens* *WRKY* gene family, and motif model of the *WRKY* protein domain of *P. patens* (C)

和锌指结构将小立碗藓 *WRKY* 家族分成两大类 (I 型 3 个、II a 型 5 个、II b 型 6 个、II c 型 5 个、II d 型 13 个、II e 型 6 个, 不含 III 型); 而在高等模式植物拟南芥中含 III 型基因 14 个 (Ulker et al., 2004)、水稻含有 47 个 (Ross et al., 2007), 且在高等植物中几乎所有的 III 类 *WRKY* 因子都参与生物胁迫反应, 而低等植物不含第 III 类 *WRKY* 因子 (苏琦等, 2007)。本实验室前期转录组数据显示, 小立碗藓在接种灰霉菌的过程中 *PpWRKY10* 出现表达量的上调, 说明 *WRKY* 转录因子参与了植物对

灰霉菌的防御反应 (实验数据未发表), 但关于具体的防御机制仍有待深入研究。进化分析表明 I 型被认为是 II 型与 III 型的原始祖先, II 型与 III 型是通过 I 型 C 末端或 N 末端 *WRKY* 结构域的变化或缺失演变而来 (Zhang et al., 2005), 说明植物由低等向高等进化的过程中对环境的适应能力不同最终可能导致进化的类型不同, 高等植物 *WRKY* 家族中的 III 型可能由 I 型在应对环境压力过程中产生, 表明 *WRKY* 基因家族在进化过程中具有多样性, 基因功能不断进化。

表 4 WRKY 转录因子的预测 motif 列表

Table 4 Predictive motif list of WRKY transcription factors

基序名 Motif name	宽度 Width (aa)	E-value	Logo
motif 1	40	1.9e-1485	
motif 2	29	2.0e-1224	
motif 3	29	1.4e-1039	
motif 4	29	5.2e-969	
motif 5	50	2.0e-660	
motif 6	50	4.4e-592	
motif 7	41	3.3e-561	
motif 8	42	1.2e-349	
motif 9	29	4.8e-368	
motif 10	21	4.1e-286	

通过结构分析发现,小立碗藓部分Ⅱ型 *WRKY* 基因保守结构域发生变异, 主要涉及 WKYGNK、WRKYGHK、WRKYGQN 三种变异类型。张凡等 (2018) 研究表明,WRKY 家族保守结构域大都是 ‘Q’ 突变为 ‘E’ ‘K’ 或 ‘S’, 这些变异会导致 WRKY 蛋白与 DNA 结合的活性减弱, 并且不同变异类型对植株的功能影响也不相同。水稻 *OSWRKY45* 中 ‘Q’ 变异为 ‘K’ 后, 其表达量在植株不同部位均出现了上调表达, 并且在干旱胁迫下转基因的植株表现出更好的恢复力, 过表达 *OSWRKY45* 植株的抗病与抗旱能力显著提高 (Qiu & Yu, 2009)。但是, 在小立碗藓中出现了由 ‘Q’ 突变为 ‘H’ 的不同变异类型, 结合实验室前期数据植株在接种灰霉菌后突变基因并未上调表达, 可能突变基因并未参与生物胁迫反应, 是否参与非生物胁迫目前尚未见有报道。本研究结果为后续深入研究其基因功能提供了方向。对 WRKY 家族保守结构域的 motif 模型分析发现, 家族成员中出

现 motif 的缺失, 并未全部形成 motif 1-motif 3 的稳定结构, 解释了由单个保守结构域构成的Ⅱa型 WRKY 保守结构域部分发生突变的原因, 表明物种可能在变异中不断获得进化。蛋白质的二级结构除 PpWRKY11 以 α -螺旋为主要构成元件外, 其他基因均以无规卷曲 (占比达 70%) 为主要构成元件, 且蛋白全分布于细胞核中。染色体定位显示, 38 个基因分散分布于小立碗藓的 21 条染色体上, 呈现明显的不规则分布; 毛果杨中 86 个 *WRKY* 家族基因在染色体上也呈现不规则分布 (He et al., 2012)。

从进化关系图来看, WRKY 家族的聚类与分析一致, 结构上 WRKY 蛋白保守程度较高, 但也存在变异的情况, 说明小立碗藓 WRKY 转录因子在进化过程中具有多样性。其中, 结构域突变基因除了 Ppwrky25 没聚在一起外, 其他均聚合在同一分支上, 说明这些转录因子可能具有相似的功能, 此现象同样出现在土豆 WRKY 转录因子中 (Liu et al., 2017)。

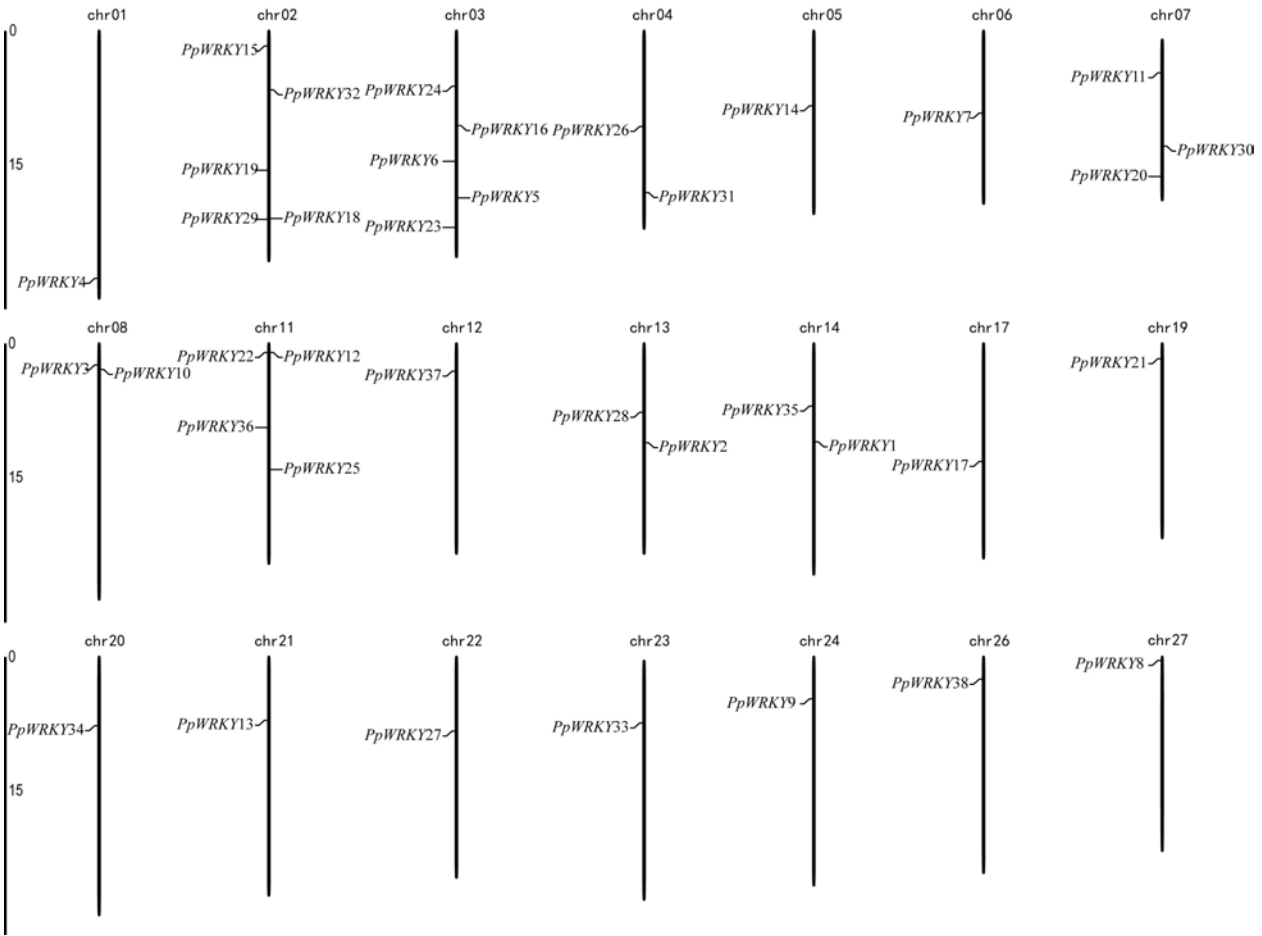


图 3 小立碗藓 *WRKY* 基因家族的染色体分布图
Fig. 3 Chromosome distribution of *WRKY* gene family

WRKY 基因在植物生长发育及抗逆境胁迫中具有重要意义,一直是研究的热点问题,但在小立碗藓中 *WRKY* 基因的研究较少。本文在基因水平上对 *WRKY* 基因展开研究,为后续深入研究 *WRKY* 蛋白的结构与功能奠定了基础。

参考文献：

BAI J, PENNILL LA, NING JC, et al., 2002. Diversity in nucleotide binding site-leucine-rich repeat genes in cereals [J]. Cytogenet Genome Res, 12(12): 1871–1884.
BOLSER DM, RUQRTI B, ROBERT J, et al., 2017. Ensembl plants: Integrating tools for visualizing, mining, and analyzing plant genomics data [J]. Methods Mol Biol, 1533: 1–31.
CHEN LG, ZHANG LP, LI DB, et al., 2013. WRKY8 transcription factor functions in the TMV-cg defense response

by mediating both abscisic acid and ethylene signaling in *Arabidopsis* [J]. PNAS, 110(21): E1963–E1971.
CHEN X, CHEN RH, WANG YF, et al., 2019. Genome-Wide Identification of WRKY Transcription Factors in Chinese jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) and their involvement in fruit developing, ripening, and abiotic stress [J]. Genes, 10(5): 360.
EULGEM T, RUSHTON PJ, ROBATZEK S, et al., 2000. The WRKY superfamily of plant transcription factors [J]. Trends Plant Sci, 5(5): 199–206.
HE HS, DONG Q, SHAO YH, et al., 2012. Genome-wide survey and characterization of the WRKY gene family in *Populus trichocarpa* [J]. Plant Cell Reports, 31(7): 1199–1217.
ISHIGURO S, NAKAMURA K, 1994. Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein, SPF1, that recognizes SP8 sequences in the 5'upstream regions of genes coding for sporamin and β -amylase from sweet potato [J]. Mol Gen Genet, 244(6): 563–571.
JIA CH, WANG Z, ZHANG JB, et al., 2018. Cloning and expression analysis of eight WRKY transcription factors in

- bananas [J]. Chin J Trop Crop, 39(11): 87–93. [贾彩红, 王卓, 张建斌, 等, 2018. 香蕉中 8 个 WRKY 转录因子的克隆及表达分析 [J]. 热带作物学报, 39(11): 87–93.]
- KAPLAN-LEVY RN, BREWER PB, QUON T, et al., 2012. The Trihelix family of transcription factors—light, stress and development [J]. Trends Plant Sci, 17(3): 163–171.
- LAN YC, HUANG B, WEI J, et al., 2020. Identification and bioinformatics analysis of the expansin gene family of *Physcomitrella patens* [J]. Guihaia, 40(6): 854–863. [蓝雨纯, 黄彬, 韦娇, 等, 2020. 小立碗藓扩展蛋白基因家族的鉴定与生物信息学分析 [J]. 广西植物, 40(6): 854–863.]
- LIU Y, CAO T, CHEN JW, 2007. Advances on the study of the moss *Physcomitrella patens*, a potential model plant [J]. Guihaia, 27(1): 90–94. [刘艳, 曹同, 陈静文, 2007. 有前景的模式植物小立碗藓的研究新进展 [J]. 广西植物, 27(1): 90–94.]
- LIU JJ, EKRAMODDOULLAH AKJ, 2009. Identification and characterization of the WRKY transcription factor family in *Pinus monticola* [J]. Genome, 52(1): 77–88.
- LIU QN, LIU Y, XIN ZZ, et al., 2017. Genome-wide identification and characterization of the WRKY gene family in potato (*Solanum tuberosum*) [J]. Biochem Syst Ecol, 71: 212–218.
- LIU Y, YANG TY, LIN ZK, et al., 2019. A WRKY transcription factor PbrWRKY53 from *Pyrus betulaefolia* is involved in drought tolerance and AsA accumulation [J]. Plant Biotechnol, 17(9): 1770–1787.
- LI HY, SHI Y, DING YN, et al., 2014. Bioinformatics analysis of expansin gene family in poplar genome [J]. J Beijing For Univ, 36(2): 59–67. [李昊阳, 施杨, 丁亚娜, 等, 2014. 杨树扩展蛋白基因家族的生物信息学分析 [J]. 北京林业大学学报, 36(2): 59–67.]
- LI MY, XU ZS, TIAN C, et al., 2016. Genomic identification of WRKY transcription factors in carrot (*Daucus carota*) and analysis of evolution and homologous groups for plants [J]. Sci Rep, 6: 23101.
- PEARSONNR, 2001. Training for bioinformatics and computational biology [J]. Bioinformatics, 17(9): 761–762.
- QIN Y, MA X, YU GH, et al., 2014. Evolutionary history of trihelix family and their functional diversification [J]. DNA Res, 21(5): 499–510.
- QIU YP, YU DQ, 2009. Over-expression of the stress-induced OsWRKY45 enhances disease resistance and droughttolerance in *Arabidopsis* [J]. Environ Exp Bot, 65(1): 35–47.
- RENSING SA, ROMBAUTS S, PEER YVD, et al., 2002. Moss transcriptome and beyond [J]. Trends Plant Sci, 7(12): 535–538.
- ROSS CA, LIU Y, SHEN QJ, 2007. The WRKY gene family in rice (*Oryza sativa*) [J]. J Integr Plant Biol, 49(6): 827–842.
- RINERSON CI, RABARA RC, TRIPATHIP, et al., 2015. The evolution of WRKY transcription factors [J]. BMC Plant Biol, 15(1): 66.
- SCHUTTENHOFER C, YUAN L, 2014. Regulation of specialized metabolism by WRKY transcription factors [J]. Plant Physiol, 167(2): 295–306.
- SU Q, SHANG YH, DU MY, et al., 2007. Progress on plant WRKY transcription factor [J]. Chin Agric Sci Bull, 23(5): 94–98. [苏琦, 尚宇航, 杜密英, 等, 2007. 植物 WRKY 转录因子研究进展 [J]. 中国农学通报, 23(5): 94–98.]
- SONG H, SUN WH, YANG GF, et al., 2018. WRKY transcription factors in legumes [J]. BMC Plant Biol, 18(1): 243.
- ULKER B, SOSICH IEJ, 2004. WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function [J]. Curr Opin Plant Biol, 7(5): 491–498.
- WANG YY, FENG L, ZHU YX, et al., 2015. Comparative genomic analysis of the WRKY III gene family in populus, grape, arabidopsis and rice [J]. Biol Direct, 10: 28.
- WANG CT, RU JN, LIU YW, et al., 2018. Maize WRKY transcription factor *ZmWRKY106* confers drought and heat tolerance in transgenic plants [J]. Int J Mol Sci, 19(10): 2–15.
- XU ZY, ZHANG DD, HU J, et al., 2009. Comparative genome analysis of lignin biosynthesis gene families across the plant kingdom [J]. BMC Bioinformatics, 10 (Suppl. 11): 1471–1486.
- XU HJ, WATANABE KA, ZHANG LY, et al., 2016. WRKY transcription factor genes in wild rice *Oryza nivara* [J]. DNA Res, 23(4): 311–323.
- ZHAO H, ZHAO XG, HE YK, et al., 2004. *Physcomitrella patens*, a potential model system in plant molecular biology [J]. Chin Bull Bot, 21(2): 129–138. [赵奂, 赵晓刚, 何奕昆, 等, 2004. 植物分子生物学研究极具前景的模式系统—小立碗藓 [J]. 植物学报, 21(2): 129–138.]
- ZHANG F, YIN J, GUO YQ, et al., 2018. Research advances on WRKYtranscription factors [J]. Biotechnol Bull, 34(1): 40–48. [张凡, 尹俊龙, 郭英琪, 等, 2018, WRKY 转录因子的研究进展 [J]. 生物技术通报, 34(1): 40–48.]
- ZHANG M, CHEN Y, NIE L, et al., 2018. Transcriptome-wide identification and screening of WRKY factors involved in the regulation of taxol biosynthesis in *Taxus chinensis* [J]. Sci Reports, 8(1): 5197.
- ZHANG YJ, WANG LJ, 2005. The WRKY transcription factor superfamily: its origin in eukaryotes and expansion in plants [J]. BMC Evol Biol, 5(1): 1.

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202004018

李雪宝, 王琦, 鄢波. 纤枝短月蕨 *BeLEA2* 基因的克隆及表达分析 [J]. 广西植物, 2022, 42(2): 277–285.LI XB, WANG Q, YAN B, et al. Cloning and expression analysis of *BeLEA2* gene from *Brachymenium exile* [J]. Guihaia, 2022, 42(2): 277–285.

纤枝短月蕨 *BeLEA2* 基因的克隆及表达分析

李雪宝^{1,3}, 王琦², 鄢波^{1,3*}

(1. 西南林业大学 园林园艺学院, 昆明 650224; 2. 四川大学 生命科学学院, 成都 610065;

3. 国家林业和草原局西南风景园林工程技术研究中心, 昆明 650224)

摘要: 为探究纤枝短月蕨 *LEA2* 基因的结构和表达特征, 该研究以纤枝短月蕨为材料, 首次利用 PCR 克隆技术得到纤枝短月蕨 *BeLEA2* 基因序列, 并对该基因进行分析。结果表明: (1) 该基因序列中含有 2 个外显子和 1 个内含子, 其开放阅读框 (ORF) 为 456 bp, 编码 151 个氨基酸, 预测其相对分子质量为 16 515.96 Da。 (2) 将纤枝短月蕨与其他植物 *LEA2* 基因氨基酸序列进行比对, 构建系统进化树, 结果显示纤枝短月蕨与小立碗蕨的亲缘关系最近。 (3) 利用 HiTail-PCR 技术克隆获得 1 072 bp 的 *BeLEA2* 启动子序列, 用 PlantCARE 在线工具对该启动子的顺式作用元件进行预测, 结果表明该启动子除了含有核心启动子元件 TATA-box 和 CAAT-box 外, 还含有 ABRE、MYB、MYC、MYB 结合位点 (MBS) 等其他顺式元件。 (4) 实时荧光定量 PCR 分析表明, *BeLEA2* 基因在纤枝短月蕨不同发育时期和不同组织中都有表达, 且对脱水胁迫有响应。以上结果为进一步探究 *LEA2* 基因在苔藓植物中的功能及作用机制奠定了基础。

关键词: 纤枝短月蕨, *LEA2* 基因, 启动子, 脱水胁迫, 表达

中图分类号: Q943 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2022)02-0277-09

Cloning and expression analysis of *BeLEA2* gene from *Brachymenium exile*

LI Xuebao^{1,3}, WANG Qi², YAN Bo^{1,3*}

(1. College of Landscape Architecture and Horticulture Sciences, Southwest Forestry University, Kunming, 650224; 2. College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065; 3. Southwest Research Center for Landscape Architecture Engineering, State Forestry and Grassland Administration, Kunming 650224)

Abstract: The purpose of this study was to explore the structural and expression characteristics of *LEA2* genes from *Brachymenium exile*. *BeLEA2* gene was firstly isolated and analyzed by polymerase chain reaction (PCR). The results were as follows: (1) Gene structure analysis showed that *BeLEA2* gene contained 2 exons and 1 intron and contained an open reading frame (ORF) of 456 bp encoding a protein of 151 amino acids, and its molecular mass was predicted to be 16 515.96 Da. (2) The phylogenetic analysis of *LEA2* with other *LEA2* in different plants revealed that *BeLEA2* from *B. exile* and *LEA2* from *Physcomitrella patens* belonged to the same branch of evolutionary distance. (3) The promoter sequence of the *BeLEA2* gene of 1 072 bp was isolated from *Brachymenium exile* by high-efficiency hermal asymmetric interlaced

收稿日期: 2020-07-22

基金项目: 国家自然科学基金 (31160177); 云南省高校科技创新团队支持计划项目 [Supported by National Natural Science Foundation of China (31160177); Project for Innovative Research Team (in Science and Technology) in Colleges and Universities of Yunnan Province]。

第一作者: 李雪宝 (1994-), 硕士研究生, 研究方向为植物分子生物学, (E-mail) 421043791@qq.com。

*通信作者: 鄢波, 博士, 教授, 主要从事植物分子生物方向研究工作, (E-mail) yanbodr@aliyun.com。

polymerase chain reaction (HiTail-PCR) and analyzed by PlantCARE, the results showed that it had TATA-box, CAAT-box, ABRE, MYB, MYC, MYB binding site and other *cis*-acting elements. (4) Quantitative real-time PCR analysis indicated that *BeLEA2* expressed in different stages and tissues of *B. exile*, and *BeLEA2* responded to dehydration stress. These results lay a foundation for further study on the function of *LEA2* gene in bryophytes.

Key words: *Brachymerium exile*, *LEA2* gene, promoter, dehydration stress, expression

水分是植物体生长所必需的重要组成部分,缺水会干扰植物正常的生理活动,而干旱、高温、盐碱等逆境都会使植物体细胞大量失水(潘瑞炽, 2012)。同时我国也是世界上盐碱地面积最多的国家之一,干旱和荒漠化问题非常严重(张建锋等, 2002)。到 2014 年底,我国土地荒漠化面积约为 26 115.93 万 hm^2 , 约占我国国土面积的 27.20%(屠志方等, 2016)。盐碱和干旱不仅减缓了我国林业的高速发展,同时也会给我国的生态环境造成很大的破坏。因此,进行耐盐/耐干旱的研究非常重要。

纤枝短月藓(*Brachymerium exile*)属于真藓科短月藓属(黎兴江, 2006),生长在裸露的岩壁和极端干旱的环境中,具有较强的耐干旱能力。苔藓植物中存在抗氧化防御系统,可以有效地应对外界的干旱胁迫,在面对一些极端的外界环境时可以表现出极强的抗逆性(张萍等, 2005)。通过研究植物的抗逆型基因,探究植物的耐盐/耐旱机理,培养耐盐/耐旱作物或林木对保持我国农业生态的可持续发展,改善我国生态环境具有极大的作用。

LEA 蛋白(late embryogenesis abundant proteins),即胚胎发育后期丰富蛋白,是植物胚胎发育后期种子中大量积累的一类蛋白,最早发现于棉花胚胎发育后期的子叶中(Dure et al., 1981)。随后,在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、小麦(*Triticum aestivum*)、番茄(*Solanum lycopersicum*)、水稻(*Oryza sativa*)和油菜(*Brassica napus*)等植物中也同样发现了 LEA 蛋白的存在(Wang et al., 2006; Hundertmark & Hinch, 2008; Cao & Li, 2015; Yu et al., 2016; Bhattacharya et al., 2019)。尽管 LEA 蛋白在植物界中具有较为广泛的分布,但它并不是植物界所特有的一类蛋白,在真菌、细菌和某些无脊椎动物中也同样存在 LEA 蛋白(Tunnacliffe et al., 2005; Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2006; Hand et al., 2007)。

到目前为止,已从多种不同植物中分离出 *LEA* 基因的启动子序列,分析结果表明 *LEA* 基因的启动子中具有不止一种压力响应相关的顺式作用元件,表明 *LEA* 基因与干旱等非生物胁迫的调控密

切相关(Huang et al., 2016; Ibrahim et al., 2019; Nagaraju et al., 2019)。通过分析 *LEA* 基因结构得出,其内含子数目的差异较小,同时内含子数目通常不多于 3 个,基因结构的保守性较高(Huang et al., 2016; Wu et al., 2018)。

本研究对纤枝短月藓 *BeLEA2* 启动子基因进行了分离,将纤枝短月藓与其他植物 *LEA2* 基因氨基酸序列加以比对,构建系统进化树;对纤枝短月藓进行脱水胁迫处理,并对 *LEA2* 基因进行实时荧光定量分析,以期为 *LEA2* 基因的表达特性及其功能研究奠定理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 植物材料

研究所需纤枝短月藓采于昆明市郊区,保存于西南林业大学实验室内。清洗后进行 DNA 的提取,用于 *BeLEA2* 基因和启动子的克隆。

分别选取两组长势相同且良好的纤枝短月藓,分别选取有性世代和无性世代的配子体部分和孢子体部分。一组采用新鲜植株不予以处理,另一组洗净后,给予脱水胁迫 2 h 处理,进行 RNA 的提取,逆转录为 cDNA,用于表达分析。

1.2 纤枝短月藓 *BeLEA2* 基因的克隆

采用 TIANGEN 公司的小量植物(叶)总 DNA 抽提试剂盒来提取纤枝短月藓的基因组 DNA,采用 OMEGA 公司的总 RNA 提取试剂盒提取纤枝短月藓的总 RNA,选用逆转录试剂盒(全式金),将上一步所得的 RNA 逆转录为 cDNA。

根据本实验室的转录组测序结果(未公布),设计出该基因特异性引物 LEA2-F: ATGCGCGGGTTGT TGAACAAAG; LEA2-R: TTAGAAGATGTCCGACAGT GTG。分别以 cDNA 和 DNA 为模板,进行 PCR 扩增。反应体系为 2×Taq PCR Master Mix 20 μL ; 正向引物 1 μL 、反向引物 1 μL 、ddH₂O 16 μL 、DNA 模板 2 μL 。PCR 扩增程序:预变性,95 $^{\circ}\text{C}$, 3 min; 变性,95 $^{\circ}\text{C}$, 15 s, 退火,60 $^{\circ}\text{C}$, 30 s, 延伸,72 $^{\circ}\text{C}$, 90 s, 35 个

循环;延伸,72 ℃, 10 min;4 ℃保存。PCR 产物回收后,将其连接到克隆载体 PMD18-T 中,送生工生物工程股份有限公司进行测序。

1.3 纤枝短月藓 *BeLEA2* 基因启动子的克隆

将纤枝短月藓的 DNA 作为模板,依照 *BeLEA2* 基因 DNA 全长序列设计出三轮的特异性引物:LEA2-1R:CGAAGACGGTAGGTGATCTCG;LEA2-2R:ACGATGGACTCCAGTCCGGCCGTTGTGGATCATGACGTTACTC;LEA2-3R:GGTGACGTTCCCGATGTCCAC。参照 Liu & Chen(2007)的办法,使用 HiTail-PCR 方法进行启动子的扩增分离。

1.4 生物信息学分析

利用 ExPASy-ProtParam 分析氨基酸的理化性质;使用在线软件 GSDS 2.0 分析基因的结构信息;利用 NetPhos 3.1 Server 软件预测磷酸化位点;利用 NetOGlyc 1.1 Server 软件预测 O-糖基化位点;利用 NetNGlyc 1.0 Server 预测 N-糖基化位点(徐志文等,2019);利用 Prot Scale 软件得到蛋白质亲疏水性图;利用 SOPMA 软件进行二级结构预测分析;利用 Swiss-Model 通过同源建模建立三级模型;利用 DNAMAN 6.0 软件获得多序列结构域比对图;利用 MEGA X 软件构建系统进化树;利用 PlantCARE 软件分析基因的启动子区域中所包括的转录调控元件。

1.5 实时荧光定量 PCR 分析

根据所获得的 *BeLEA2* 基因的序列,设计荧光定量专用引物, L2-F: GCGACAGGGAGATTACCTCC、L2-R: GTCGTAGTCGATATCCCAGTC。内参基因为 *Actin* 基因,设计引物 A-F:CTGTACGGCAACATCGTGCTG、A-R:CCAGACACTGTACTTCCTCTC,以 cDNA 为模板,按照 TB Green® Premix Ex Taq™ II 说明书进行操作,反应体系为 SYBR Premix Ex Taq 10 μL;ROX Reference Dye 0.4 μL、正向引物 0.8 μL、反向引物 0.8 μL、ddH₂O 6 μL、cDNA 模板 2 μL。反应程序:预变性,95 ℃,30 s;变性,95 ℃,5 s,退火,60 ℃,30 s,40 个循环。每个样品设置 3 次重复,使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 *BeLEA2* 基因的相对变量值。

2 结果与分析

2.1 *BeLEA2* 基因的克隆与结构分析

以纤枝短月藓 cDNA 为模板,结合引物 LEA2-F 和 LEA2-R 进行 PCR 扩增,经测序得到 456 bp 的序

列。以 DNA 为模板,结合引物 LEA2-F 和 LEA2-R 进行 PCR 扩增,经测序得到 1 168 bp 的序列,得到两条序列的长度不一致,表明序列中有内含子。

根据转录组序列分析表明,该基因包含 82 bp 5' UTR 和 266 bp 3' UTR,其开放阅读框长度为 456 bp,编码 151 个氨基酸(图 1)。其基因组序列全长长度为 1 168 bp,同时含有 1 个内含子和 2 个外显子(图 2)。经 Pfam 分析得出,LEA2 蛋白在 45~140 氨基酸位点含有 LEA2 结构域,表明该基因属于 LEA2 家族,将该基因命名为 *BeLEA2*。

2.2 *BeLEA2* 基因的生物信息学分析

使用 ProtParam 软件预测 *BeLEA2* 编码蛋白质的相对分子质量为 16 515.96 Da,理论等电点为 5.74,分子式为 C₇₃₂H₁₁₇₉N₁₉₇O₂₂₄S₆。*BeLEA2* 所编码蛋白的氨基酸组成中,亮氨酸含量最高,占到了总氨基酸的 9.9%;其次为缬氨酸和天冬氨酸,分别占总氨基酸的 8.6% 和 9.3%。脂肪系数为 101.32,平均亲水性为 -0.071,是亲水蛋白(图 3);不稳定指数为 17.01,属于稳定性蛋白。

预测发现 *BeLEA2* 蛋白发生磷酸化修饰的位点共有 10 个,其中丝氨酸的磷酸化位点和苏氨酸的磷酸化位点各 4 个,而酪氨酸的磷酸化位点最少,为 2 个。*BeLEA2* 蛋白中不含有发生 O-糖基化和 N-糖基化的位点。

使用 SOPMA 软件预测 *BeLEA2* 蛋白的二级结构。结果表明,该蛋白二级结构主要由无规则卷曲(Random coil)、β 转角(Beta turn)、延伸链(Extended strand)和 α 螺旋(Alpha helix)构成。其中:无规则卷曲最多,占氨基酸序列的 45.03%;其次为延伸链和 α 螺旋,分别占 29.80% 和 21.19%;β 转角最少(3.97%)。通过 Swiss-Model 对纤枝短月藓 *BeLEA2* 蛋白的三级结构进行预测分析,以拟南芥 LEA14 蛋白为模板进行同源建模,预测的 *BeLEA2* 蛋白三级结构中含有 1 个 α 螺旋和 10 个 β 折叠。

2.3 *BeLEA2* 基因的启动子元件

以纤枝短月藓 DNA 为模板,通过 HiTail-PCR 扩增 *BeLEA2* 基因启动子序列,得到了 1 072 bp 的 *BeLEA2* 基因启动子序列。

通过对启动子元件进行分析,结果显示 *BeLEA2* 基因启动子具有典型的 CAAT-box 和 TATA-box 元件。在 *BeLEA2* 基因启动子区含大量非生物胁迫响应顺式作用元件,主要包括茉莉酸甲酯响应元件(methyl jasmonate response element,CGTCA-motif);

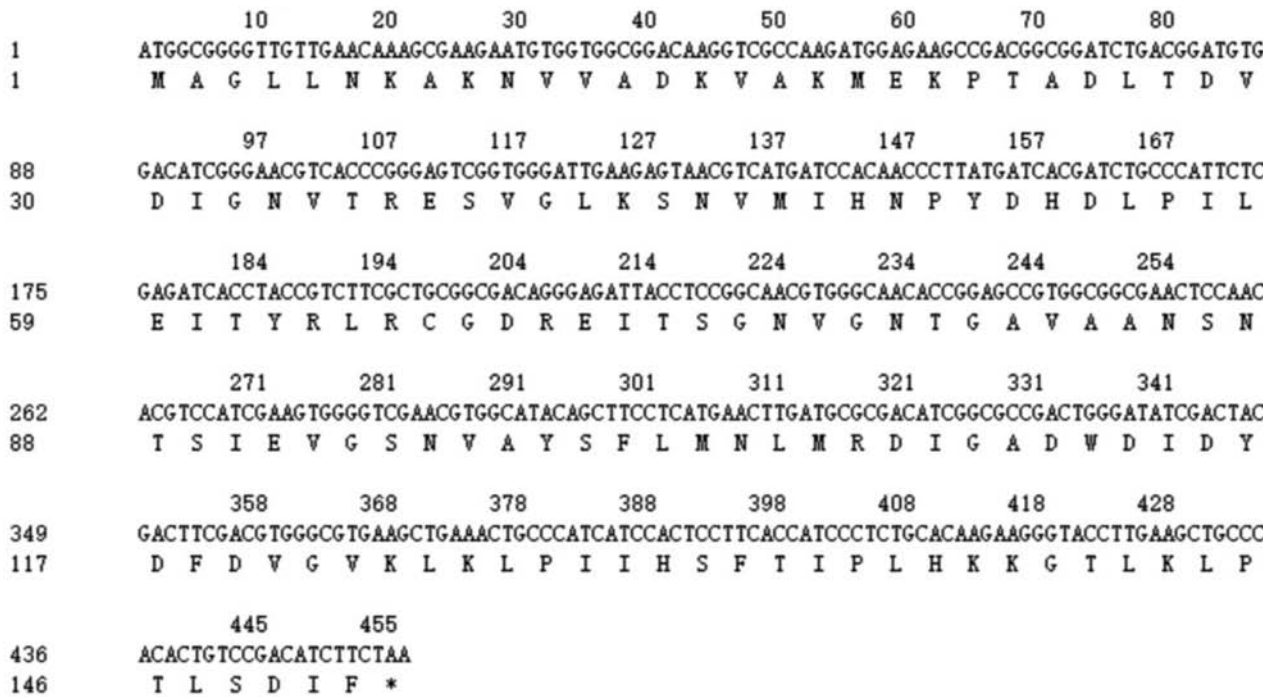


图 1 纤枝短月藓 *BeLEA2* 的 CDS 序列及其编码的氨基酸序列

Fig. 1 CDS sequences and deduced amino acids sequences of *BeLEA2* from *Brachymerium exile*

脱落酸响应元件 (abscisic acid responsive element, ABRE); 还含有光响应作用元件 Sp1 和与分生组织有联系的作用元件 CAT-box; 与启动子响应调控或活性有关的元件 CCAAT-box; MYB 结合位点 (MYB binding site, MBS); MYC 和 MYB 元件, 这两类元件都是转录因子作用元件, 都和 ABA 或干旱诱导的表达调控有联系; 除此之外, 还含有 G-box、F-box、A-box、I-box、TCT-motif、TCCC-motif、TGACG-motif、CCGTCC-motif、GATA-motif、GT1-motif 等元件, 其中 ABRE 元件含量较高。说明 *BeLEA2* 的转录将受到这些元件的影响和调控。

2.4 *BeLEA2* 氨基酸序列比对分析

将 *BeLEA2* 编码的氨基酸序列在 NCBI 数据库中进行 Blastp 对比, 结果表明其与小立碗藓 (*Physcomitrella patens*, XP_024360796.1)、海枣 (*Phoenix dactylifera*, XP_008795021.1)、花旗松 (*Pseudotsuga menziesii*, CAA10047.1)、玉米 (*Zea mays*, NP_001142311.1)、甘蔗 (*Saccharum officinarum*, ACT53873.1)、北美云杉 (*Picea sitchensis*, ADM74314.1)、菠萝 (*Ananas comosus*, OAY80542.1)、高粱 (*Sorghum bicolor*, XP_002441588.1)、黍 (*Panicum miliaceum*, RLN27694.1)、木槿 (*Hibiscus syriacus*,

KAE8699781.1)、阿月浑子 (*Pistacia vera*, XP_031249202.1)、月季 (*Rosa chinensis*, XP_024175981.1) 的 *LEA2* 蛋白同源, 并且它们之间的相似性较高。利用 DNAMAN 6.0 软件将 *LEA2* 和其他物种的氨基酸序列进行多序列比对, 结果显示, *BeLEA2* 蛋白与其他物种 *LEA2* 蛋白具有高度的相似性, 总体表现为 C 端较保守, N 端保守性较差 (图 4)。

2.5 *LEA2* 蛋白系统进化分析

使用 MEGA X 软件的近邻相接法构建纤枝短月藓 *LEA2* 蛋白的系统进化树, 进一步探究 *BeLEA2* 蛋白与其他物种的 *LEA2* 蛋白的进化关系。由图 5 可知, 整个系统发育树分为 2 个大的分支, 纤枝短月藓首先与小立碗藓聚为一支, 其进化关系最为接近; 裸子植物与苔藓植物聚在一支, 其亲缘关系比较接近; 而单子叶植物和双子叶植物的 *LEA2* 蛋白同属于两个不同的分支, 同时与纤枝短月藓有较远的亲缘关系。

2.6 *BeLEA2* 基因实时荧光定量分析

实时荧光定量分析的结果表明, 在未作处理的条件下, *BeLEA2* 基因在纤枝短月藓不同的发育时期和部位中都有表达, 特别是在有性世代的配子体中表达量最多, 其次是无性世代的配子体, 无

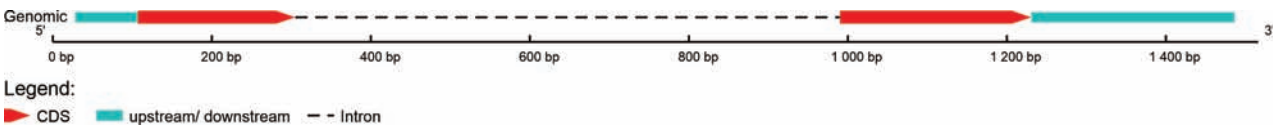


图 2 纤枝短月蕨 *BeLEA2* 基因结构

Fig. 2 Structures of *BeLEA2* gene from *Brachymenium exile*

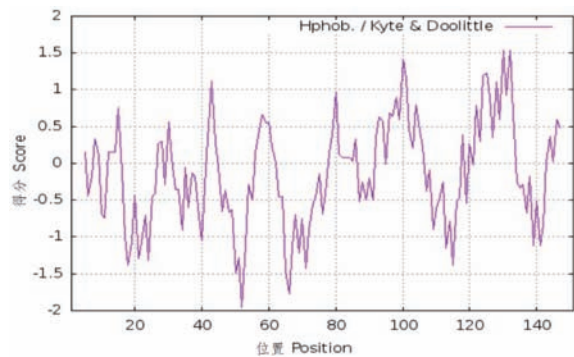


图 3 *BeLEA2* 蛋白的疏水性预测

Fig. 3 Predicted hydrophobic information of *BeLEA2* protein

性世代的孢子体最低,差异极显著(图 6)。为了分析 *BeLEA2* 是否受到脱水胁迫的诱导,本研究将纤枝短月蕨植株各部位都进行了 2 h 的自然脱水处理。在脱水胁迫条件下,*BeLEA2* 基因在有性世代的配子体中表达量最高,其次是无性世代的孢子体,无性世代的配子体最低,差异极显著(图 7)。分析结果证明,不管是正常条件还是脱水胁迫处理,*BeLEA2* 蛋白都在有性世代时期表达量最高,表明 *BeLEA2* 基因可能在有性世代的生长发育过程中具有关键作用。

在脱水胁迫下,有性世代时期的配子体表达量降低(图 8),差异显著;而无性世代时期的配子体表达量增加,约为正常植株的 5.4 倍(图 9),差异显著;无性世代时期的孢子体表达量有所上升,约为正常植株的 98 倍(图 10),差异极为显著。表明 *BeLEA2* 基因可能参与干旱胁迫的响应基因,这与启动子区顺式作用元件预测结果一致,揭示 *BeLEA2* 蛋白在脱水条件下可能对孢子体的发育具有重要作用。

3 讨论与结论

苔藓植物是一种结构简单的小型绿色植物,

一直以来都以其特殊的生理结构在植物体的进化研究方面占据着重要地位。苔藓植物在世界各地均有着广泛的分布,在潮湿阴暗的地区尤为常见,在高温、干旱等恶劣环境中仍能够正常存活。目前,我国土地荒漠化现象日趋严重,由于地理特征、气候环境因素等影响,极易发生干旱、高温等极端天气,极大影响了植物的正常生长,甚至造成植物大面积枯萎、死亡。但在某些植物中存在着大量的抗逆机制,在植物面临胁迫时,可以通过一些功能性蛋白直接参与胁迫响应(Campo et al., 2014)。而 LEA 蛋白就属于此类功能性蛋白。根据相关研究和资料表明,LEA 基因与干旱等非生物胁迫的调控密切相关(Hundertmark & Hinch, 2008; Magwanga et al., 2017; Muvunyi et al., 2018; İbrahim et al., 2019)。水稻(*Oryza sativa*)幼苗中,*OsLEA19a* 基因在受到干旱胁迫下会大量表达(胡廷章等,2011);小麦(*Triticum aestivum*)中的 *TaLEA5* 基因只有在干旱胁迫时才会表达(刘露露等,2014);将大豆(*Glycine max*)LEA 基因转化至大肠杆菌(*Escherichia coli*)中,在高盐胁迫下的存活率大幅度提高(Lan et al., 2005)。综上所述,LEA 基因参与了植物体干旱、高盐等胁迫的响应,这与本研究结果保持一致。

通过分析可知,*BeLEA2* 基因 ORF 序列为 456 bp,编码 151 个氨基酸,根据 Pfam 数据库对于 LEA 蛋白家族的分类,该基因属于 *LEA2* 家族。纤枝短月蕨 *BeLEA2* 基因启动子中不仅含有 CAAT-box 和 TATA-box 等基本的元件,同时还有和压力响应相关的顺式作用元件,例如,逆境激素 ABA 的主要调控元件(ABRE、MYC 和 MYB)以及 MYB 的结合位点和茉莉酸甲酯响应元件等元件。推测 *BeLEA2* 基因可能会受这些非生物胁迫的调控(Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2005; Du et al., 2013; Huang et al., 2016; 李莎莎等,2018; Nagaraju et al., 2019)。这说明 *BeLEA2* 在纤枝短月蕨的抗逆性中有非常重要的作用,具有深入研究的价值。

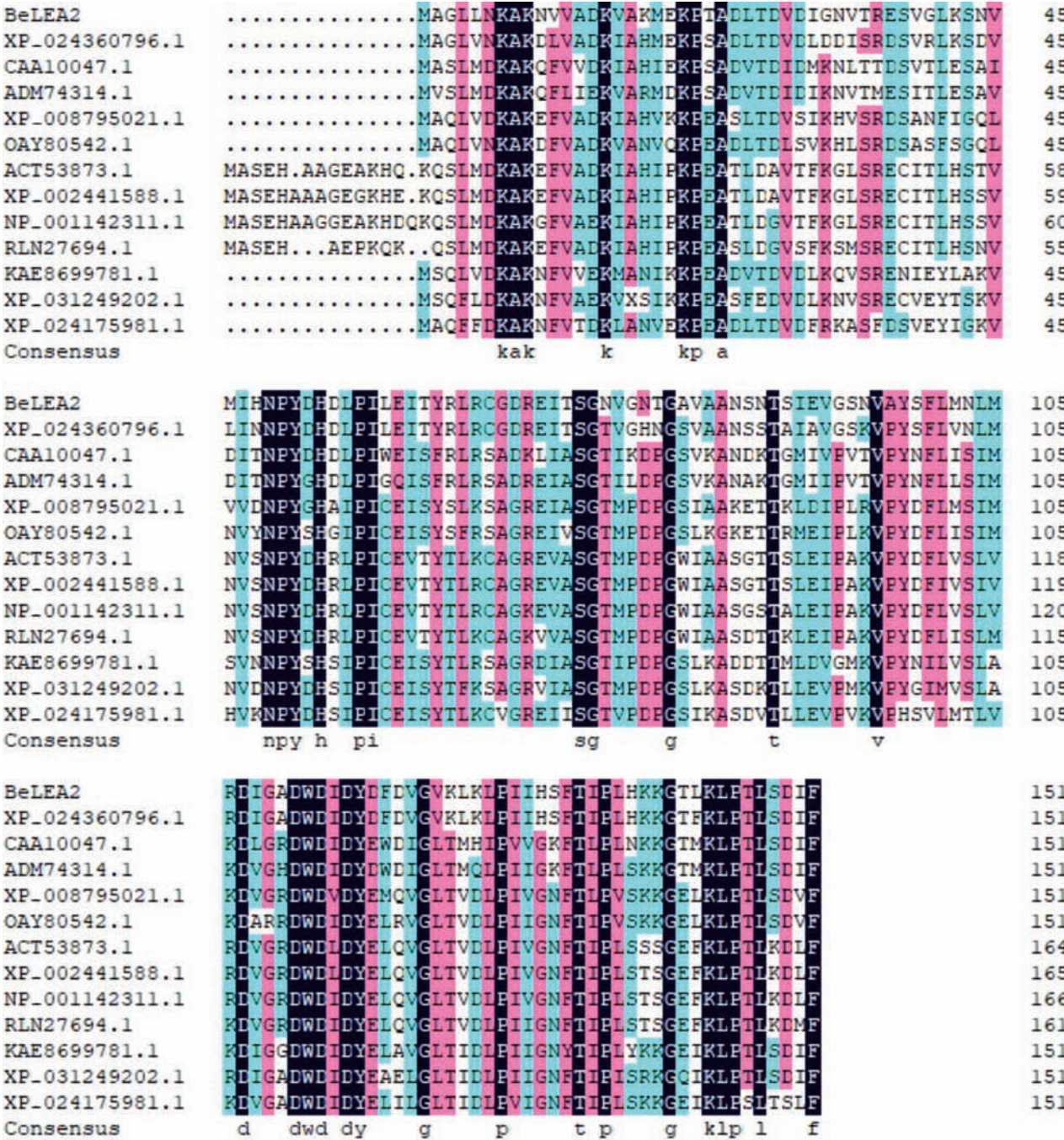


图 4 纤枝短月藓与其他物种 *LEA2* 氨基酸序列的多重比对

Fig. 4 Alignment of amino acid sequences of *LEA2* from *Brachymenium exile* and other different plants

从纤枝短月藓 *LEA2* 建立的系统发育树分析可以得出:*LEA2* 基因在不同的分类单元中都可以明显地区分开,传统分类的系统进化树和基于 *LEA2* 构建的结果一致。值得关注的是,苔藓植物 *LEA2* 基因与裸子植物 *LEA2* 基因的系统位置较为接近,这是否反映了它们的 *LEA2* 基因很可

能具有相近的共同祖先,还需更多的研究资料查证。

实时荧光定量分析表明,不管是未经处理还是经脱水胁迫处理,*BeLEA2* 基因在不同时期及不同部位中皆有表达,且在有性世代时期表达量最高,揭示 *BeLEA2* 基因可能在有性世代的生长发育

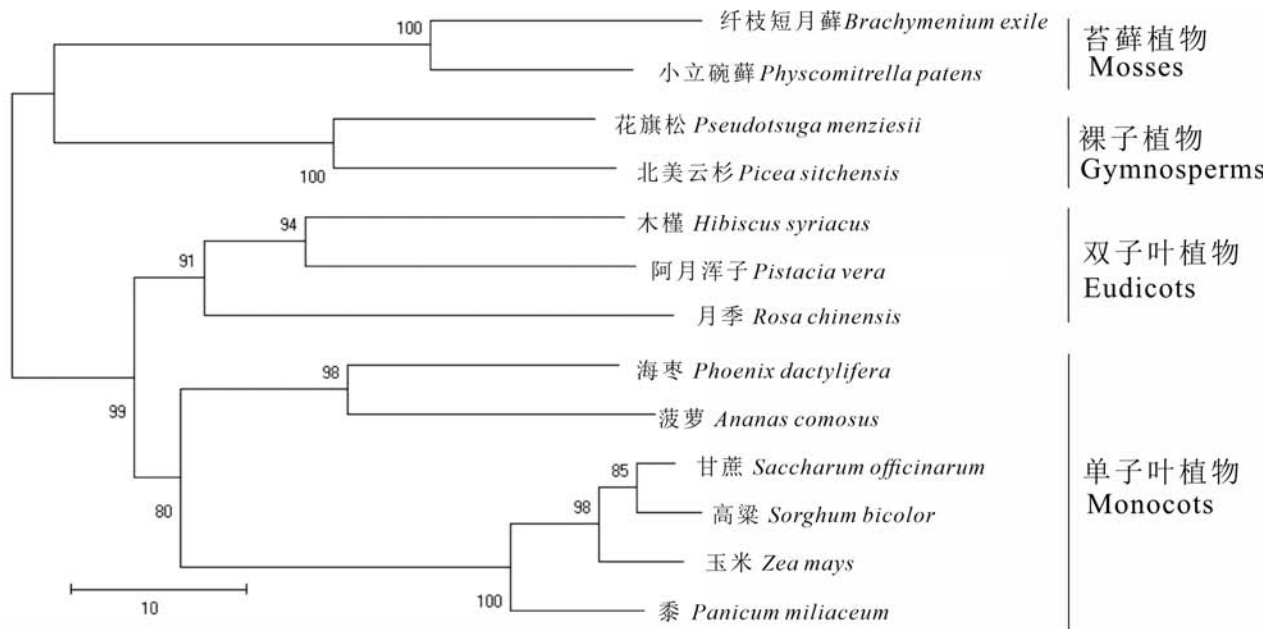
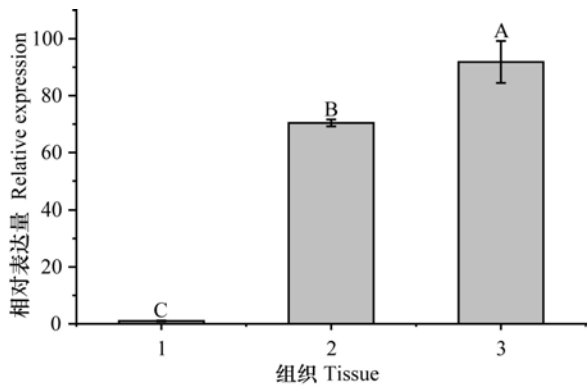


图 5 纤枝短月蕨 *BeLEA2* 与其他物种 *LEA2* 蛋白的系统进化树
Fig. 5 Phylogenetic tree of *BeLEA2* from *Brachymerium exile* and *LEA2* proteins from other species

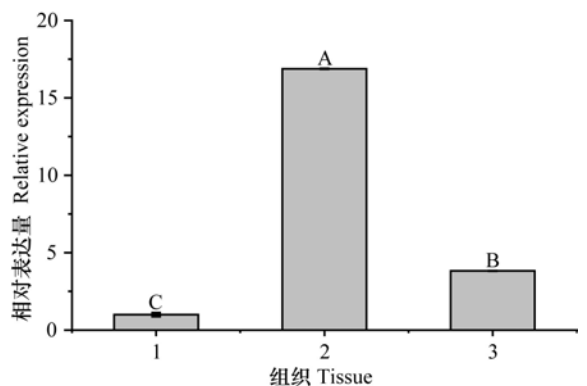


1. 无性世代的孢子体；2. 无性世代的配子体；3. 有性世代的配子体。不同字母表示 0.01 水平上显著性差异。下同。
1. Sporophyte of the asexual generation；2. Gametophyte of the asexual generation；3. Gametophyte of the sexual generation. Different letters mean significant differences at 0.01 level. The same below.

图 6 纤枝短月蕨不同组织部位中 *BeLEA2* 的表达分析
Fig. 6 Expression analysis of *BeLEA2* in different tissues of *Brachymerium exile*

过程中起重要作用。脱水胁迫后, *BeLEA2* 基因表达量变化差异明显, 在有性世代发育时期的表达下降, 而在无性世代发育时期表达上升, 揭示了该基因在纤枝短月蕨不同生长发育时期对脱水胁迫的响应机制可能不同。

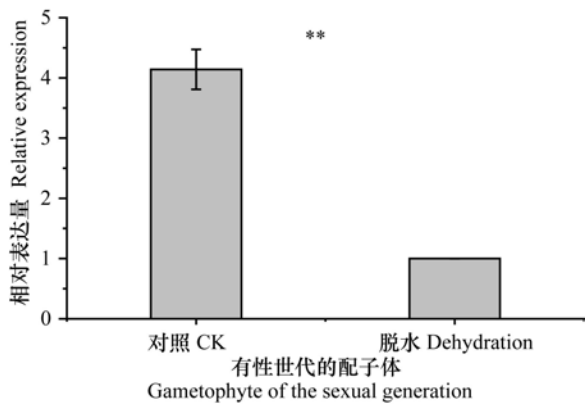
本研究首次从纤枝短月蕨中克隆分析了



1. 无性世代的配子体；2. 有性世代的配子体；3. 无性世代的孢子体。
1. Gametophyte of the asexual generation；2. Gametophyte of the sexual generation；3. Sporophyte of the asexual generation.

图 7 纤枝短月蕨在脱水处理下 *BeLEA2* 的表达分析
Fig. 7 Expression analysis of *BeLEA2* in *Brachymerium exile* under dehydration treatment

BeLEA2 基因, 并进行了初步表达分析, 结果显示纤枝短月蕨中 *BeLEA2* 基因在脱水胁迫时有较高的表达, 表明 *BeLEA2* 基因参与了纤枝短月蕨脱水胁迫的响应。本研究对深入了解 *LEA2* 基因在苔藓植物生长发育过程中的功能, 分析 *LEA2* 蛋白植物抗逆的分子机制以及深入探究苔藓植物的抗逆机制具有重要意义。



** 表示在 0.01 水平上显著性差异。下同。
** means significant differences at 0.01 level. The same below.

图 8 纤枝短月蕨有性世代的配子体在脱水处理下 *BeLEA2* 的表达分析
Fig. 8 Expression analysis of *BeLEA2* in gametophyte of the sexual generation from *Brachymenium exile* under dehydration treatment

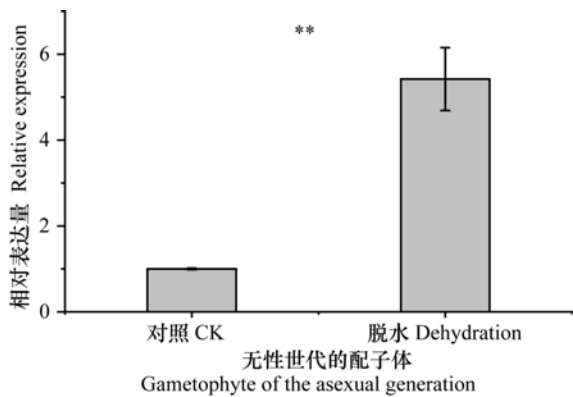
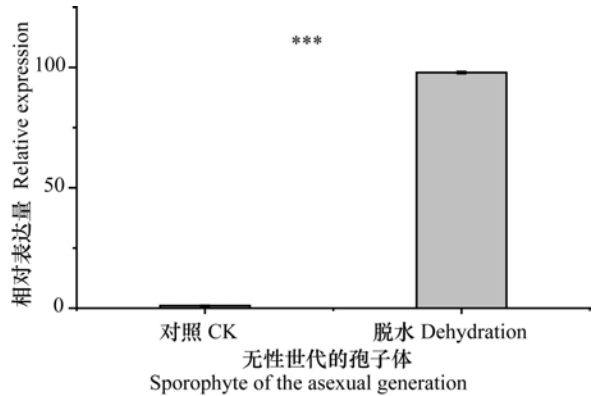


图 9 纤枝短月蕨无性世代的配子体在脱水处理下 *BeLEA2* 的表达分析
Fig. 9 Expression analysis of *BeLEA2* in gametophyte of the asexual generation from *Brachymenium exile* under dehydration treatment



*** 表示在 0.001 水平上显著性差异。
*** means significant differences at 0.001 level.

图 10 纤枝短月蕨无性世代的孢子体在脱水处理下 *BeLEA2* 的表达分析
Fig. 10 Expression analysis of *BeLEA2* in sporophyte of the asexual generation from *Brachymenium exile* under dehydration treatment

Overexpression of a calcium-dependent protein kinase confers salt and drought tolerance in rice by preventing membrane lipid peroxidation [J]. *Plant Physiol*, 165(2): 688.

DU DL, ZHANG QX, CHENG TR, et al., 2013. Genome-wide identification and analysis of late embryogenesis abundant (LEA) genes in *Prunus mume* [J]. *Mol Biol Rep*, 40(2): 1937–1946.

DURE L, GREENWAY SC, GALAU GA, 1981. Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination; changing messenger ribonucleic acid populations as shown by *in vitro* and *in vivo* protein synthesis [J]. *Biochemistry-USA*, 20(14): 4162–4168.

HAND S, JONES D, MENZE M, et al., 2007. Life without water: expression of plant *LEA* genes by an anhydrobiotic arthropod [J]. *J Exp Zool*, 307(1): 62–66.

HU YZ, WU YM, CHEN ZG, et al., 2011. Molecular cloning, expression character and bioinformatics analysis of *OsLEA19a* from rice [J]. *Acta Agric Boreal-Sin*, 26(6): 73–78. [胡廷章, 吴应梅, 陈再刚, 等, 2011. 水稻 *OsLEA19a* 基因的克隆、表达及生物信息学分析 [J]. *华北农学报*, 26(6): 73–78.]

HUANG Z, ZHONG XJ, HE J, et al., 2016. Genome-wide identification, characterization, and stress-responsive expression profiling of genes encoding LEA (late embryogenesis abundant) proteins in Moso Bamboo (*Phyllostachys edulis*) [J]. *PLoS ONE*, 11(11): e0165953.

HUNDERTMARK M, HINCHA DK, 2008. LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana* [J]. *BMC Genet*, 9(1): 118.

İBRAHIME M, KIBAR U, KAZAN K, et al., 2019. Genome-

参考文献:

BHATTACHARYA S, DHAR S, BANERJEE A, et al., 2019. Structural, functional, and evolutionary analysis of late embryogenesis abundant proteins (LEA) in *Triticum aestivum*; A detailed molecular level biochemistry using in silica approach [J]. *Comput Biol Chem*, 82: 9–24.

CAO J, LI X, 2015. Identification and phylogenetic analysis of late embryogenesis abundant proteins family in tomato (*Solanum lycopersicum*) [J]. *Planta*, 241(3): 757–772.

CAMPO S, BALDRICH P, MESSEGUER J, et al., 2014

- wide identification of the LEA protein gene family in grapevine (*Vitis vinifera* L.) [J]. Tree Genetics & Genomes, 15(4): 55.
- LAN Y, CAI D, ZHENG YZ, 2005. Expression in *Escherichia coli* of three different soybean late embryogenesis abundant (LEA) genes to investigate enhanced stress tolerance [J]. J Integr Plant Biol, 47(5): 613–621.
- LIANG Y, XIONG ZY, ZHENG JX, et al., 2016. Genome-wide identification, structural analysis and new insights into late embryogenesis abundant (LEA) gene family formation pattern in *Brassica napus* [J]. Sci Rep, 6(1): 24265.
- LI SS, DU TZ, AN KL, et al., 2018. Identification and expression analysis of *SmLEA* gene family in *Salvia miltiorrhiza* [J]. J Agric Biol Biotechnol, 26(9): 1514–1526. [李莎莎, 杜堂志, 安克莉, 等, 2018. 丹参 *SmLEA* 家族基因的鉴定和表达分析 [J]. 农业生物技术学报, 26(9): 1514–1526.]
- LI XJ, 2006. Flora bryophytorum Sinicorum [M]. Beijing: Science Press. [黎兴江, 2006. 中国苔藓志 [M]. 北京: 科学出版社.]
- LIU LL, CHEN L, ZHANG CY, et al., 2014. Characterization of two *LEA* genes and their response to abiotic stresses in wheat [J]. Chin Agric Sci, 47(19): 3736–3745. [刘露露, 陈雷, 张春艳, 等, 2014. 两个小麦 *LEA* 基因的特征及其对非生物胁迫的响应 [J]. 中国农业科学, 47(19): 3736–3745.]
- LIU YG, CHEN Y, 2007. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences [J]. Biol Technique, 43(5): 649–656.
- MAGWANGA R, LU P, KIRUNGU J, et al., 2017. Characterization of the late embryogenesis abundant (LEA) protein family and their role in drought stress tolerance in upland cotton [J]. BMC Genet, 19(1): 6.
- MUVUNYI BP, YAN Q, WU F, et al., 2018. Mining late embryogenesis abundant (LEA) family genes in *Cleistogenes songorica*, a xerophyte perennial desert plant [J]. Int J Mol Sci, 19(11): 6.
- NAGARAJU M, KUMAR SA, REDDY PS, et al., 2019. Genome-scale identification, classification, and tissue specific expression analysis of late embryogenesis abundant (LEA) genes under abiotic stress conditions in *Sorghum bicolor* L. [J]. PLoS ONE, 14(1): e0209980.
- PAN RZ, 2012. Plant physiology [M]. Beijing: Higher Education Press. [潘瑞炽, 2012. 植物生理学 [M]. 北京: 高等教育出版社.]
- SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, 2006. Gene networks involved in drought stress response and tolerance [J]. J Exp Bot, 58(2): 221–227.
- TU ZF, LI MX, SUN T, 2016. The status and trend analysis of desertification and sandification [J]. For Resourc Manag, (1): 1–5. [屠志方, 李梦先, 孙涛, 2016. 第五次全国荒漠化和沙化监测结果及分析 [J]. 林业资源管理, (1): 1–5.]
- TUNNACLIFFE A, LAPINSKI J, MCGEE B, 2005. A putative LEA protein, but no trehalose, is present in anhydrobiotic bdelloid rotifers [J]. Hydrobiologia, 546(1): 315–321.
- WANG XS, ZHU HB, JIN GL, et al., 2006. Genome-scale identification and analysis of *LEA* genes in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Plant Sci, 172(2): 414–420.
- WU CL, HU W, YAN Y, et al., 2018. The late embryogenesis abundant protein family in cassava (*Manihot esculenta* Crantz): genome-wide characterization and expression during abiotic stress [J]. Molecules, 23(5): 1196.
- XU ZW, REN XM, ZHAO M, et al., 2019. Cloning and expression analysis of storage protein *hexamerin* genes in *Tenebrio molitor* [J]. J SW For Univ (Nat Sci Ed), 39(4): 96–102. [徐志文, 任雪敏, 赵满, 等, 2019. 黄粉甲储存蛋白 *hexamerin* 基因的克隆及表达分析 [J]. 西南林业大学学报(自然科学版), 39(4): 96–102.]
- YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K, 2005. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters [J]. Trends Plant Sci, 10(2): 88–94.
- ZHANG JF, SONG YM, XING SJ, et al., 2002. Saline soil amelioration and forestation techniques [J]. J NE For Univ, 30(6): 124–129. [张建锋, 宋玉民, 邢尚军, 等, 2002. 盐碱地改良利用与造林技术 [J]. 东北林业大学学报, 30(6): 124–129.]
- ZHANG P, BAI XL, ZHONG XL, 2005. Advances in the desiccation tolerance of mosses [J]. Bull Bot, 22(1): 107–114. [张萍, 白学良, 钟秀丽, 2005. 苔藓植物耐旱机制研究进展 [J]. 植物学通报, 22(1): 107–114.]

(责任编辑 周翠鸣)

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202003044

周旭红, 赵雪艳, 杨晓密, 等. 香石竹 *DcSKP1* 基因克隆及表达分析 [J]. 广西植物, 2022, 42(2): 286–293.ZHOU XH, ZHAO XY, YANG XM, et al. Clone and expression analysis of *DcSKP1* in *Dianthus caryophyllus* [J]. Guihaia, 2022, 42(2): 286–293.

香石竹 *DcSKP1* 基因克隆及表达分析

周旭红^{1,2}, 赵雪艳³, 杨晓密², 吴学尉³, 瞿素萍^{1*}

(1. 云南省农业科学院 花卉研究所, 昆明 650205; 2. 云南中医药大学 科技处, 昆明 650500; 3. 云南大学 农学院, 昆明 650500)

摘要: *SKP1* 基因是 SCF E3 泛素连接酶蛋白复合物的核心成分, 参与多种生物过程。然而, 香石竹 *SKP1* 基因还未被克隆, 该文利用 RT-PCR 结合 RACE 技术, 从香石竹 (*Dianthus caryophyllus*) 的花药中分离克隆了 1 个减数分裂相关基因 *SKP1* 的全长 cDNA 序列, 命名为 *DcSKP1* (GenBank 登录号为 MK931293)。结果表明: (1) *DcSKP1* 基因 cDNA 全长序列为 962 bp, 含有 1 个长度为 567 bp 的 ORF, 该基因编码 188 个氨基酸。(2) 蛋白序列比对显示, *DcSKP1* 中存在一个高度保守 TPEE 基序, 还具有 Skp1_POZ 结构域和 Skp1 结构域, 并与拟南芥的 *SKP1* 聚集在一个分支上。(3) 利用荧光定量 PCR 对香石竹 *DcSKP1* 基因表达模式进行研究, 发现 *DcSKP1* 基因在各个组织部位都有表达, 在花药中的表达量高于茎、叶组织, 且在幼小的花药中表达量最高, 随着花药发育的进程表达量下降。由此推测, *DcSKP1* 基因可能在香石竹减数分裂中具有重要作用。

关键词: 香石竹, *DcSKP1*, 减数分裂, 生物信息学分析, 基因表达分析

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2022)02-0286-08

Clone and expression analysis of *DcSKP1* in *Dianthus caryophyllus*

ZHOU Xuhong^{1,2}, ZHAO Xueyan³, YANG Xiaomi², WU Xuewei³, QU Suping^{1*}

(1. Flower Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, China; 2. Yunnan University of Chinese Medicine, Science and Technology Department, Kunming 650500, China; 3. School of Agriculture, Yunnan University, Kunming 650500, China)

Abstract: *SKP1* gene is the core component of the SCF (Cul1-Rbx1-Skp1-F box) E3 ubiquitin ligase protein complex and is involved in many different biological processes. However, the *SKP1* gene of carnation has not been cloned. In this study, a new *DcSKP1* gene (the accession number in GenBank was MK931293) was isolated from the flower of *Dianthus caryophyllus* by using RT-PCR and RACE approaches. The results were as follows: (1) The full length cDNA sequence of *DcSKP1* was 962 bp, and a ORF of 567 bp encoded 188 amino acids. (2) Protein sequence alignment showed that *DcSKP1* had a highly conserved TPEE motif, Skp1_POZ domain and Skp1 domain, and clustered on a branch with *Arabidopsis thaliana* Skp1. (3) The *DcSKP1* gene expression pattern of *Dianthus caryophyllus* was studied by qRT-PCR, and it was found that the *DcSKP1* gene was expressed in all tissue sites, the expression level in anthers was higher than

收稿日期: 2020-05-06

基金项目: 国家自然科学基金(31860570); 云南省万人计划青年拔尖人才项目(YNWR-QNBJ-2018-389); 教育部部省合建重点项目(2018BSHJ0108) [Supported by National Natural Science Foundation of China (31860570); Young Talents Project of Yunnan Ten Thousand Plan (YNWR-QNBJ-2018-389); Emphasis Project of Education Ministry and Provincial Cooperation (2018BSHJ0108)]。

第一作者: 周旭红(1978-), 博士, 研究员, 主要从事花卉遗传育种研究, (E-mail) zhouxuhong7801@126.com。

*通信作者: 瞿素萍, 硕士, 研究员, 研究方向为花卉标准制定, (E-mail) 1035496319@qq.com。

that in stem and leaf tissues, the expression level was the highest in young anthers, and the expression level decreased with the development of anthers. It is speculated that *DcSKP1* gene may play an important role in carnation meiosis in *D. caryophyllus*.

Key words: *Dianthus caryophyllus*, *DcSKP1*, meiosis, bioinformatics analysis, gene expression analysis

许多细胞事件,如信号转导、细胞周期调节和转录的机制主要由泛素介导的蛋白降解所调控 (Hershko & Ciechanover, 1998; Ning et al., 2016)。泛素化是一个三酶级联的过程,首先泛素被泛素激活酶(E1)激活,然后转移到泛素结合酶(E2)上,在泛素连接酶(E3)的帮助下与底物蛋白的赖氨酸残基结合,赋予底物特异性(刘卫霞等, 2002)。多个泛素分子可以附着在蛋白底物上已有的泛素分子上形成多泛素链,多泛素化的蛋白通常被 26S 蛋白酶体降解。SCF 复合物形成已知最大的 E3 泛素蛋白连接酶 (Schulman et al., 2000), SCFs 参与关键蛋白的泛素化,控制细胞周期进展和转录控制等基本生物学过程(孙新艳等, 2017)。拟南芥 *SKP1-like-1* (*ASK1*), 编码连接 Cullin 和 F-box 蛋白的 SCF 亚基 (Yang et al., 1999)。已有研究表明, *ASK1* 可以与 F-box 蛋白相互作用 (Takahashi et al., 2004), 由于这些 F-box 蛋白在不同的通路中发挥着重要作用(郑鸿平和李逸平, 2011), *ASK1* 作为 SCFs 中的关键成分, 在拟南芥中广泛地表达, 且在许多发育和生理过程中可能具有重要功能(叶佑丕, 2014; Lu et al., 2016)。拟南芥 *ask1* 突变体在雄性减数分裂、花器官发育和营养生长方面存在缺陷。*ask1-1* 最早检测到的缺陷发生在细线期到偶线期的转化过程中, 核仁未能迁移到核外周, 同源染色体不发生联会 (Wang et al., 2004), *ASK1-1* 突变也导致拟南芥雄性减数分裂中重组频率的增加 (Wang & Yang, 2006) 和雄性不育 (Yang et al., 1999)。

香石竹是四大鲜切花之一, 具有较高的产量和产值。目前, 香石竹的育种主要还是采用传统的杂交育种, 包括种间杂交和种内杂交育种方式; 自然芽变或是采用辐射来诱导芽变也是香石竹育种方法之一; 此外, 也会利用转基因技术的方法培育蓝色香石竹 (Fukui et al., 2003) 及抗衰老 (余义勋和包满珠, 2004)、抗枯萎病 (胡忠亮等, 2018) 和耐热 (吴姗姗, 2014) 等品系。但有关调控参与香石竹减数分裂的基因来创制优异香石竹品种的研究较少, 这极大地阻碍了香石竹育种的

进程。*SKP1* 基因可调控花器官发育和减数分裂, 但香石竹 *SKP1* 基因还未被克隆。本研究通过克隆香石竹 *SKP1* 基因, 研究其在花药和茎叶的表达模式, 为深入了解香石竹花发育的分子机制及运用于香石竹育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

所用香石竹 (*Dianthus caryophyllus*) ‘罗加特’采集地点为云南集创园艺科技有限公司宝峰基地。2018 年 9 月采集香石竹茎、叶组织和不同发育时期的花蕾, 并用镊子取出幼嫩的花药, 液氮速冻后置于 -80 °C 冰箱保存备用。

1.2 试验方法

1.2.1 *DcSKP1* 基因克隆与生物信息学分析 取 -80 °C 冰箱保存的香石竹花药, 加入磁珠, 放入全自动样品快速研磨机中, 研磨 60 s。迅速倒出磁珠, 快速加入 1 mL Trizol 试剂 (Invitrogen 美国) 于离心管中, RNA 提取按 Trizol 试剂盒的说明书进行操作。合成 cDNA 第一链使用 Takara 公司的 PrimeScript-RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒, 按试剂盒的说明书进行操作。特异的引物根据已公布的香石竹基因组序列 (<http://carnation.kazusa.or.jp/blast.html>) 进行设计, 先扩增中间片断, 再根据中间片断的序列设计 3'-RACE 和 5'-RACE 引物, 按照 SMARTer® RACE 5'/3' Kit (Takara 日本) 试剂盒的操作扩增 3'-RACE 和 5'-RACE cDNA 序列, 最后再设计全长引物, 扩增全长 cDNA 序列。引物序列如表 1。

使用 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 比对分析目的基因的同源序列, 该基因及其他物种 *SKP1* 基因的氨基酸相似性比对分析用 DNAMEN 软件, 并使用 MEGA 6.0 软件画系统进化树。蛋白的分子量和理论等电点预测采用 ExPASy ProtParam 分析, 蛋白的亚细胞定位在线预测用 PSORTII 分析, 蛋白的信号肽预测用 Signal P 4.1 分析, 磷酸化位点预测采用 Net Phos

2.0 分析,蛋白跨膜结构预测用 TMHMM 2.0 分析,蛋白亲水性预测用 Protscale 软件分析。

1.2.2 *DcSKP1* 基因的表达分析 选取长度为 1.1~1.2 cm 的花蕾、1.3~1.4 cm 的花蕾和 1.5~1.6 cm 的花蕾,取出花药,以及叶和茎的组织各三份,放入液氮中速冻。提取 RNA 并逆转录为 cDNA,

cDNA 稀释 10 倍保存在-20 ℃的冰箱中备用,作为荧光定量 PCR 模板。GAPDH 为内参基因,引物为 GAPDH 579-F 和 GAPDH 788-R,*DcSKP1* 引物为 Dea36455-1153F 和 Dea36455-1265R (表 1)。做三次生物学和实验重复,采用 SPSS 12.0 软件分析数据并作图。

表 1 香石竹 *DcSKP1* 基因 cDNA 克隆和表达分析引物

Table 1 Primers used for *DcSKP1* cDNA cloning and expression analysis

用途 Description		引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
中间片断 Intermediate fragment		SKP1-34F	TGGGATAAGGAATTTCTTGAAG
		SKP1-1601R	GAACTTGAATCAAAGCGGAAGAA
3'-RACE	第一轮 The first round	SKP1-101F	AAACTGTCGCAGACATGATGAGAGGGAA
	第二轮 The second round	SKP1-165F	TAACGAATACACCGAGGAGGAAGAAGCG
5'-RACE	第一轮 The first round	SKP1-645R	TCTTGATCTCCGCTTCTTCTCCTCG
	第二轮 The second round	SKP1-587R	TGATCTCATCTGGGGTCTTCCCTCTCA
ORF 扩增 Amplification of ORF		Skp1-9F	ACAACCTTCTCACACCCAAAAA
		Skp1-929R	TCAAATGAACTTGAATCAAAGC
qRT-PCR		Dea36455-1153F	GCCTGCTGGACTTGACCTG
		Dea36455-1265R	CGCTTCTTCTCTCCTCGGTGTA
		GAPDH 579-F	CAGTGGGCACACGGAAGC
		GAPDH 788-R	TGGCATCGTTGAGGGTCT

2 结果与分析

2.1 克隆 *DcSKP1* 基因全长 cDNA 序列

以提取的香石竹花药 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。首先扩增中间片断,通过 3'-RACE 与 5'-RACE 技术扩增 *DcSKP1* 基因 3'端和 5'端序列,根据拼接后的 cDNA 全长序列设计引物扩增包括完整 ORF 在内的 *DcSKP1* 基因全长 cDNA 序列,扩增的产物见图 1。*DcSKP1* 基因中间片段扩增测序得到了 500 bp 的序列(图 1:A),*DcSKP1* 基因 5'端和 3'端序列测序后得到了长度分别为 376 bp(图 1:B)和 567 bp(图 1:C)序列,将以上克隆得到的 3 段序列拼接后得到一个长度为 962 bp 的 *DcSKP1* 全长 cDNA 序列。再设计引物扩增 cDNA 全长包括完整 ORF 在内的 921 bp 的序列(图 1:D),该序列与拼接后序列的碱基完全一致。克隆结果表明,*DcSKP1* 基因 cDNA 全长序列为 962 bp,含有 1

个长度为 567 bp 的 ORF,该基因编码 188 个氨基酸,命名为 *DcSKP1* (GenBank 登录号 MK931293)。

2.2 *DcSKP1* 氨基酸序列比对及进化分析

利用 DNAMAN 软件比对分析多个不同物种 *Skp1* 基因编码的氨基酸序列,发现 *DcSKP1* 基因存在一个高度保守 TPEE 基序(157~160 氨基酸),基序很可能与糖基化翻译后修饰有关。该香石竹蛋白质还具有 Skp1_POZ 结构域(18~77 氨基酸)和 Skp1 结构域(139~186 氨基酸)(图 2)。SKP1 蛋白可分为两种类型的蛋白和三种类型的基因 (Kong et al., 2010)。I 型蛋白由 Ia 型和 Ib 型基因编码,具有两个保守区域(Skp1_POZ 和 Skp1)和两个可变区域。II 型蛋白由 II 型基因编码,与 I 型蛋白有很大不同。II 型蛋白含有一个额外的 c 端区域。Ia 型基因包含单个内含子,而 Ib 型基因不包含任何内含子。II 型基因在多个位置有多个内含子 (Min et al., 2012)。本研究分离的 *DcSKP1* 基因包含一个内含子,归为 I 型蛋白和 Ia 型基因。

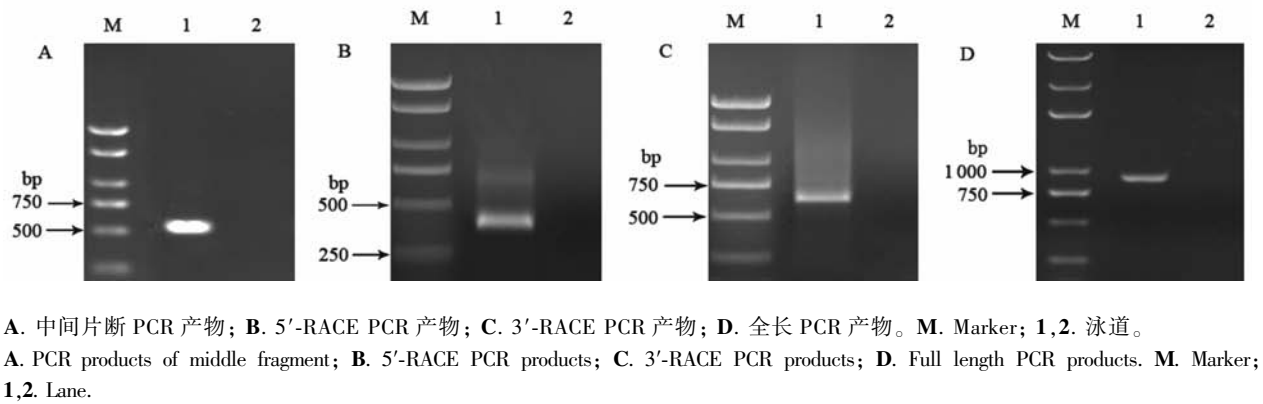
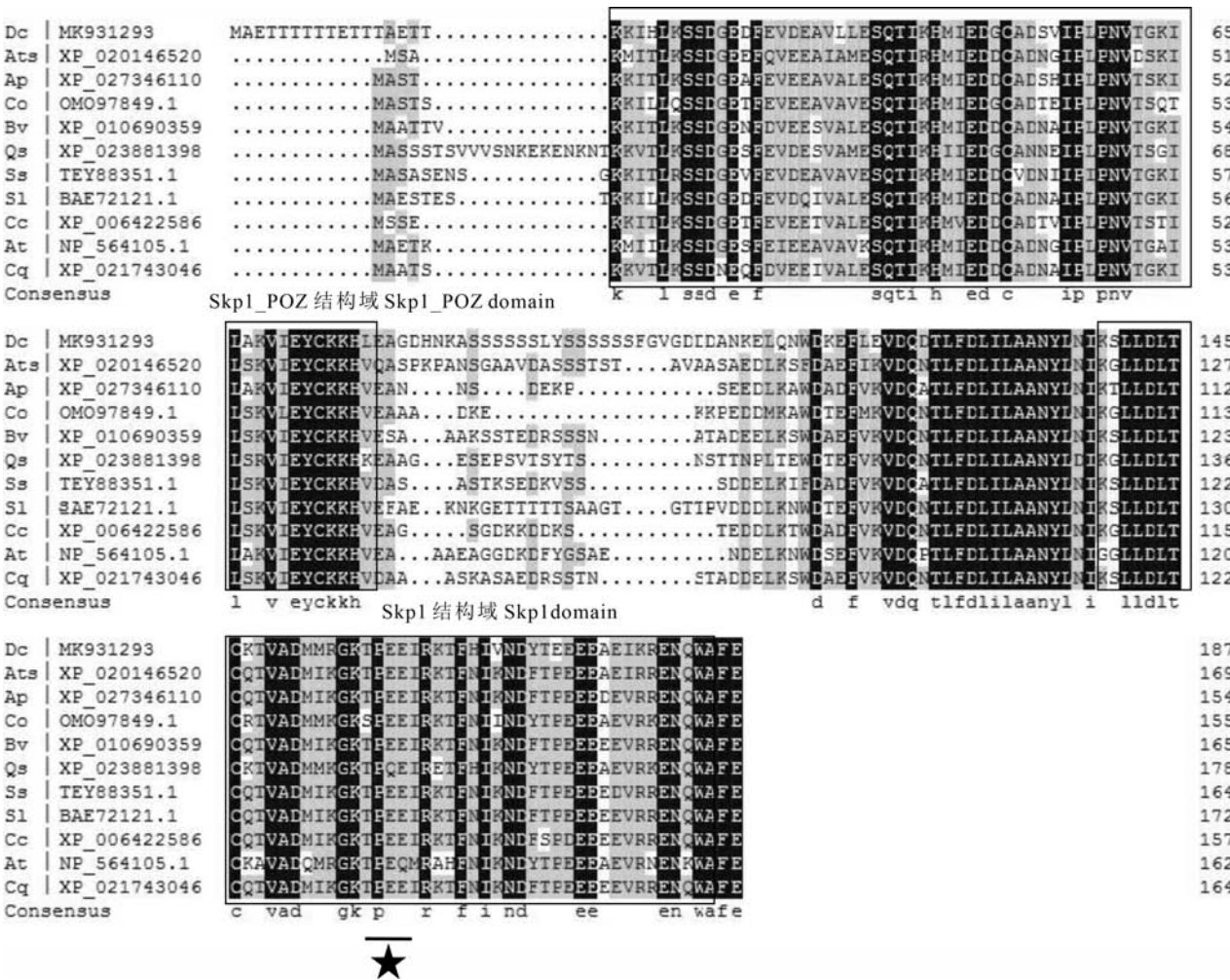


图 1 *DcSKP1* 基因中间片段、RACE 产物和全长 cDNA 序列扩增

Fig. 1 Amplification of the middle fragment, RACE products and full length sequence of *DcSKP1* cDNA



Dc. 香石竹；Ats. 节节麦；Ap. 相思子；Co. 长蒴黄麻；Bv. 红甜菜；Qs. 欧洲栓皮栎；Ss. 一串红；Sl. 叉枝蝇子草；Cc. 克莱门柚；At. 拟南芥；Cq. 藜麦。星号表示 TPEE 基序。

Dc. *Dianthus caryophyllus*; Ats. *Aegilops tauschii* subsp. *Strangulata*; Ap. *Abrus precatorius*; Co. *Corchorus olitorius*; Bv. *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*; Qs. *Quercus suber*; Ss. *Salvia splendens*; Sl. *Silene latifolia*; Cc. *Citrus clementina*; At. *Arabidopsis thaliana*; Cq. *Chenopodium quinoa*. The asterisk indicates the TPEE motif.

图 2 植物 *Skp1* 氨基酸序列的比对

Fig. 2 Alignment of plant *Skp1* amino acid sequences

采用最大似然法 (maximum likelihood, ML) 将其他物种的 *SKP1* 基因与香石竹 *DcSKP1* 氨基酸序列进行比对, 建立系统进化树, 结果显示其与拟南芥的 *SKP1* 聚集在一个分支上 (图 3), 表明这两个基因的同源性最高。

2.3 香石竹 *DcSKP1* 生物信息学分析

对 *DcSKP1* 进行氨基酸组成成分及理化性质分析, *DcSKP1* 的分子式为 $C_{913}H_{1443}N_{237}O_{317}S_7$, 理论等电点为 4.52, 分子量为 21 036.32 Da。该蛋白正电荷残基为 19, 负电荷残基为 38, 预测不稳定指数为 47.83, 为不稳定蛋白。香石竹 *DcSKP1* 氨基酸组成中主要为 Glu 和 Leu, 其中 Glu 所占比例约为 11.7%, Thr 所占比例约为 10.1%。预测 *DcSKP1* 蛋白的亚细胞定位可能 52.2% 在细胞核中, 26.1% 在细胞质中, 4.3% 在高尔基体中, 4.3% 在细胞骨架中, 4.3% 在过氧化物酶体中, 4.3% 在质膜和 4.3% 在线粒体中。*DcSKP1* 蛋白的信号肽无峰值出现 (图 4), 说明 *DcSKP1* 蛋白不存在信号肽, 也说明该蛋白不属于分泌蛋白。蛋白跨膜结构预测 *DcSKP1* 没有跨膜螺旋, 说明 *DcSKP1* 是一个非跨膜蛋白。预测磷酸化位点发现在该蛋白质序列中可能含有 48 个磷酸化位点 (score>0.5), 包含 16 个丝氨酸位点, 12 个苏氨酸位点和 1 个酪氨酸位点 (图 5)。蛋白质疏水性和亲水性预测, 该蛋白最可能是亲水性蛋白 (MIN: -2.489, MAX: 2.011) (图 6)。

2.4 *DcSKP1* 基因的荧光定量表达分析

荧光定量 PCR 结果显示, *DcSKP1* 基因在香石竹花药 3 个不同发育时期均有表达, 但表达趋势逐渐下降, 花蕾长度为 1.1~1.2 cm (Stage 1) 时的花药表达量最高, 花蕾长度为 1.3~1.6 cm (Stage 2 和 Stage 3) 时期的花药表达量低, 且 Stage 1 与 Stage 2 和 Stage 3 有显著差异, 在茎和叶中表达量更低, 与花药中的表达量有显著差异 (图 7)。由此可见, *DcSKP1* 基因可能与香石竹花药发育相关, 尤其与减数分裂有关。

3 讨论和结论

SCF 能参与一系列的生物学反应, 包括信号转导、转录和细胞周期调控 (宋瑜龙, 2011; 孙新艳等, 2017)。SCF 复合物在酵母系统中被发现, 并且在细胞周期底物泛素化降解过程中发挥重要作用 (Feldman et al., 1997)。SCF 复合物由三个亚

基组成: Cullin (CDC53)、SKP1 和 F-box 蛋白, SKP1 是 SCF E3 泛素连接酶蛋白复合物的核心成分, 参与多种生物过程。在这个复合物中, SKP1 是一种连接蛋白, 与 Cullin 和 F-box 蛋白结合。SKP1 可以与许多 F-box 蛋白相互作用, 泛素化不同的底物特异性因子 (Vierstra & Smalle, 2004)。烟草 *SKP1* 基因具有 Skp1 结构域 (张付云等, 2007; 夏江宏等, 2015), 亚细胞定位发现 NtSKP1 蛋白在胞浆和核部位均有表达 (张付云等, 2009)。香石竹 *DcSKP1* 基因存在 Skp1_POZ 结构域和 Skp1 结构域, 还具有一个高度保守 TPEE 基序, 很可能与糖基化的翻译后修饰有关, 香石竹 *DcSKP1* 基因通过软件预测主要定位于细胞核。

拟南芥 *SKP1* (*atk1-1*) 突变体的雄性育性降低, 有活力的花粉粒减少, 雄配子减数分裂异常。*atk1-1* 突变体中的雄性减数分裂产生反常数量的不同大小的小孢子, 减数分裂纺锤体缺乏正常纺锤体的双极结构, 这种异常的纺锤体可能是染色体异常分离和随后的孢子和花粉异常的原因, *atk1-1* 染色体在中期 I 中不正确排列也可能与异常的纺锤体有关 (Chen et al., 2002)。此外, ASK1 还抑制花粉减数分裂中的重组 (Wang & Yang, 2006)。宋瑜龙 (2011) 对小麦的研究表明, *SKP1* 表达量急剧下降, 可能会使细胞分裂不能正常进行, 从而导致小麦花粉粒的生长发育受到影响, 过早地趋于死亡, 同时, *SKP1* 蛋白也会大幅度下降, 大量的 SCF 复合体很难形成, 泛素蛋白酶体途径受阻, 导致一些细胞周期抑制蛋白降解不及时, 进而影响花粉粒的活性, 引起雄性不育的发生。本研究中香石竹 *DcSKP1* 基因在幼小的花药中表达量高, 随着花药的不断发育表达量有所下降, 而幼小的花药正在进行减数分裂, 提示 *DcSKP1* 基因可能参与香石竹减数分裂过程。

水稻 *OmSKP1* 主要定位于细胞核, *OmSKP1* 在营养组织 (叶) 和生殖组织 (花) 中都有表达, 且花中的表达水平明显高于叶片, 说明 *OmSKP1* 主要在花中进行表达 (范锡麟, 2013)。小麦 *TSK1* 基因在花药、幼根以及花顶端分生组织等分生较旺盛的组织中有较强的表达, 暗示该基因可能参与植物细胞分裂相关的过程 (李驰峻, 2006)。小麦在可育和不育株中, 随着花药生长时期 (单核期、二核期、三核期) 的推后, *SKP1* 基因的相对表达量都逐步降低。但在同一个发育期, 可育花药中 *SKP1*

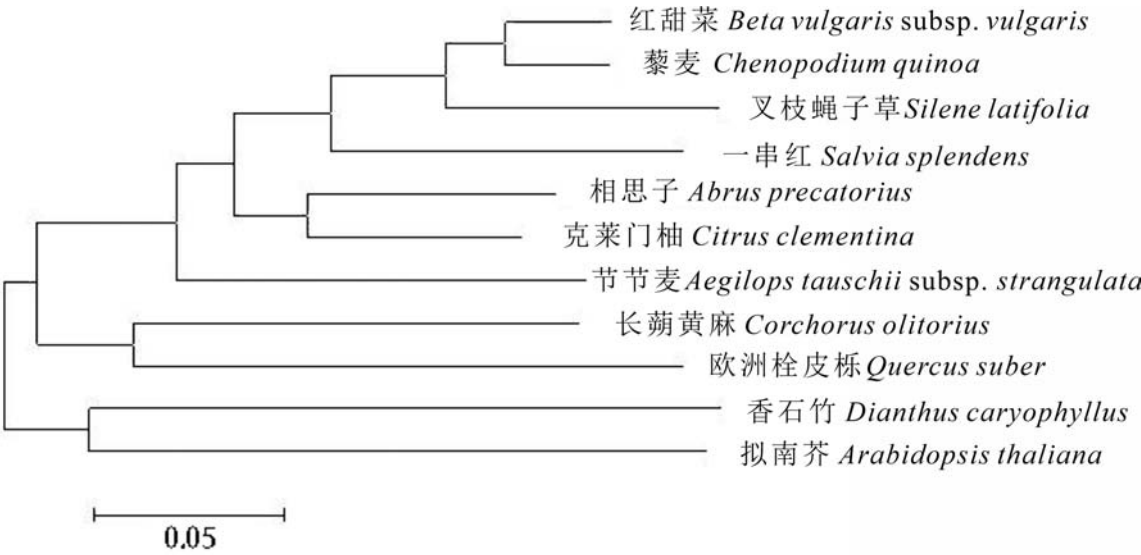


图 3 植物 Skp1 蛋白的系统进化树
Fig. 3 Phylogenetic tree of plant Skp1 proteins

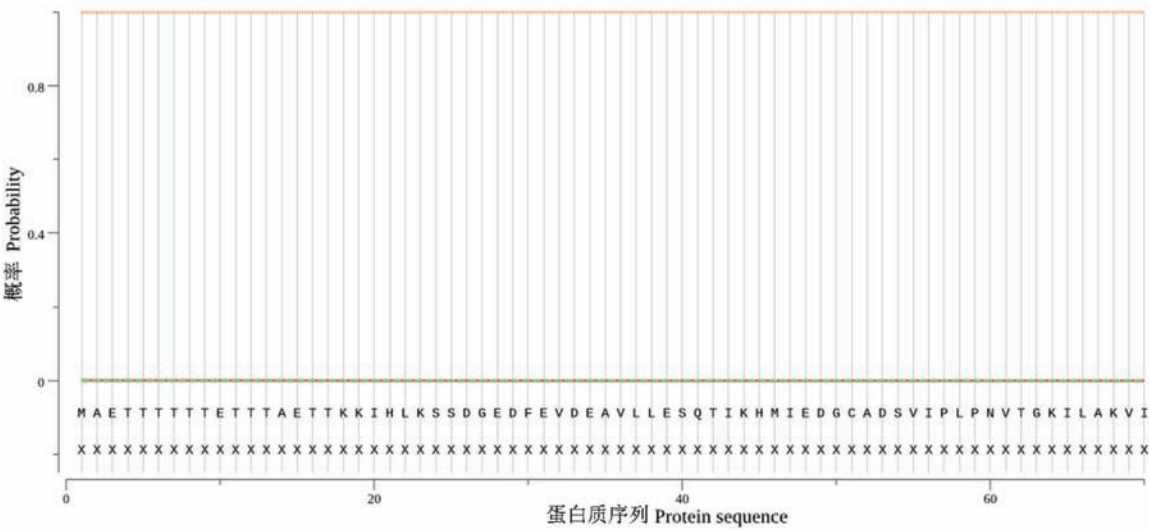


图 4 *DcSKP1* 信号肽预测
Fig. 4 Prediction of signal peptides in *DcSKP1*

基因的相对表达量比不育株花药中 *SKP1* 基因的相对表达量高 (宋瑜龙, 2011)。在拟南芥中, *ASK1* 基因在生殖生长和营养生长整个过程中都有持续、广泛的表达,而在有丝分裂旺盛的部位以及减数分裂部位有更高的表达量 (Porat et al., 1998)。 *ASK1* 基因的表达量在减数分裂细胞周期中有波动,从细线期到粗线期出现一个峰值水平。因此,细线期到粗线期对于 *ASK1* 的功能似乎至关重要 (Wang & Yang, 2006)。草莓 *FaSKP1-1* 基因

在植物的各个组织部位如根、叶、茎、花瓣、花柱、花托、花粉及果实中均有表达 (殷姗姗等, 2016)。本研究对香石竹 *DcSKP1* 基因表达模式进行研究,结果发现 *DcSKP1* 基因在各个组织部位都有表达,在花药中的表达量高于茎、叶组织,且表达量具有显著差异。这表明 *DcSKP1* 基因与花药的发育有关,可能参与香石竹减数分裂的过程。本研究结果为研究香石竹花粉败育的原因、减数分裂调控的信号通路和培育优异的植物新品种奠定了基础。

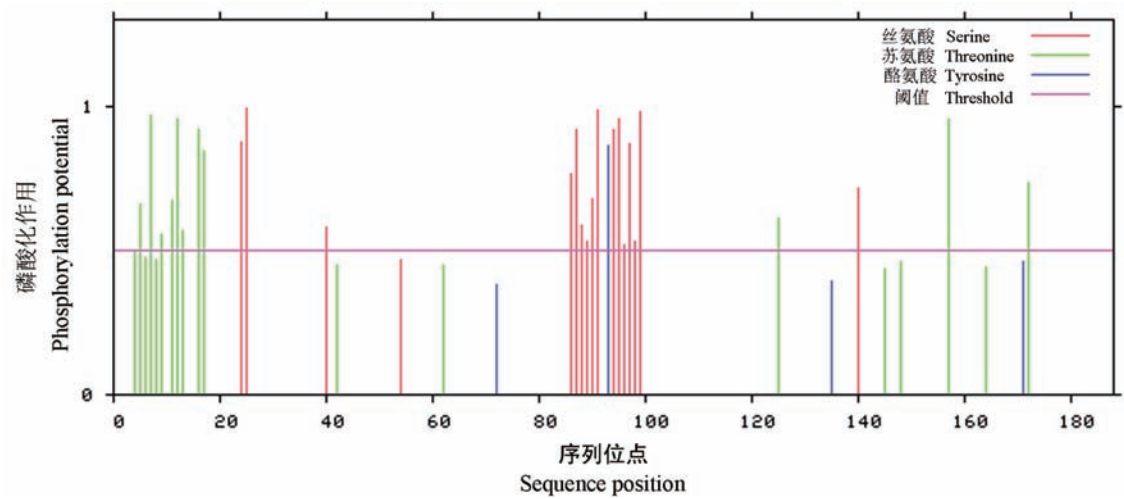


图 5 DcSKP1 磷酸化位点预测结果
Fig. 5 Results of phosphorylation sites prediction in DcSKP1

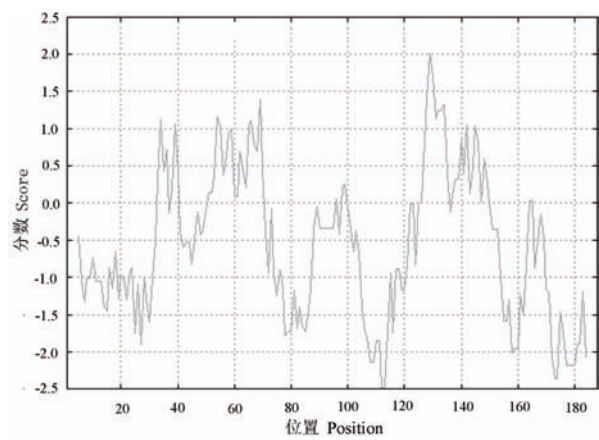
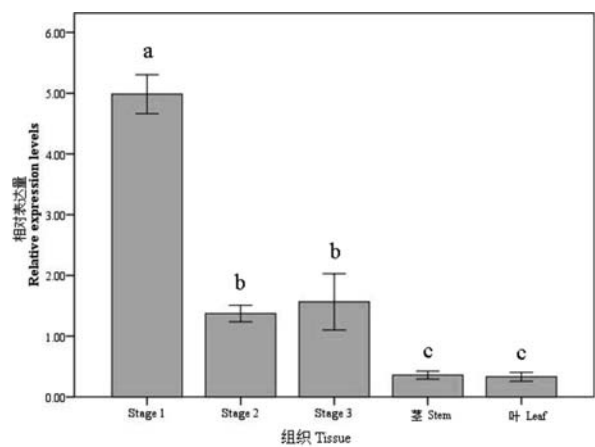


图 6 DcSKP1 蛋白亲疏水性分析
Fig. 6 Analysis of hydrophilicity and hydrophobicity of DcSKP1 protein



Stage 1. 花蕾长度为 1.1~1.2 cm 的花药; Stage 2. 花蕾长度为 1.3~1.4 cm 的花药; Stage 3. 花蕾长度为 1.5~1.6 cm 的花药。不同字母表示显著差异 ($P<0.05$)。
Stage 1. Anthers with a flower bud length of 1.1–1.2 cm; Stage 2. Anthers with a flower bud length of 1.3–1.4 cm; Stage 3. Anthers with a flower bud length of 1.5–1.6 cm. Different letters indicate significant differences ($P<0.05$).

图 7 DcSKP1 RT-qPCR 表达分析
Fig. 7 DcSKP1 RT-qPCR expression analysis

参考文献:

CHEN C, MARCUS A, LI W, et al, 2002. The *Arabidopsis* ATK1 gene is required for spindle morphogenesis in male meiosis [J]. *Development*, 129(10): 2401–2409.
FAN XL, 2013. Expression and purification of *OmSKP1* with point mutations and primary analysis of protein interaction *in vitro* [D]. Changsha: Hunan Agricultural University. [范锡麟, 2013. 小粒野生稻 *OmSKP1* 的点突变蛋白表达纯化与体外互作的初步分析 [D]. 长沙: 湖南农业大学.]
FELDMAN RMR, CORRELL CC, KAPLAN KB, et al., 1997. A complex of cdc4p, skp1p, and cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated cdk inhibitor sic1p [J]. *Cell*, 91(2): 221–230.
FUKUI Y, TANAKA Y, KUSUMI T, et al., 2003. A rationale for the shift in colour towards blue in transgenic carnation

flowers expressing the flavonoid 3', 5'-hydroxylase gene [J]. *Phytochemistry*, 63(1): 15–23.
HERSHKO A, CIECHANOVER A, 1998. The ubiquitin system [J]. *Ann Rev Biochem*, 67(1): 425–479.
HU ZL, ZOU DX, HAN ZM, et al., 2018. Identification and screening on wilt resistance of transgenic carnation seedlings [J]. *Bull Sci Technol*, 34(2): 62–65. [胡忠亮, 邹东霞, 韩正敏, 等, 2018. 转基因香石竹抗枯萎病品系的鉴定及筛选 [J]. *科技通报*, 34(2): 62–65.]

- KONG H, LANDHERR LL, FROHLICH MW, et al., 2010. Patterns of gene duplication in the plant SKP1 gene family in angiosperms: Evidence for multiple mechanisms of rapid gene birth [J]. *Plant J*, 50(5): 873–885.
- LI CJ, 2006. Cloning and functional analysis of *TSK1*, a *SKP1* homologue from wheat [D]. Beijing: Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences. [李驰峻, 2006. 小麦 *SKP1* 同源基因 *TSK1* 的克隆和功能分析 [D]. 北京: 中国科学院植物研究所.]
- LIU WX, PENG XZ, YUAN JG, 2002. SCF (Skp1- Cul1- F-box protein) complex and its function in cell cycle [J]. *J Chin Biotechnol*, 22(3): 1–3. [刘卫霞, 彭小忠, 袁建刚, 2002. SCF (Skp1-Cul1-F-box 蛋白) 复合物及其在细胞周期中的作用 [J]. 中国生物工程杂志, 22(3): 1–3.]
- LU D, NI W, STANLEY BA, 2016. Proteomics and transcriptomics analyses of *Arabidopsis* floral buds uncover important functions of *ARABIDOPSIS SKP1-LIKE1* [J]. *BMC Plant Biol*, 16(1): 61.
- MIN JH, KIM DY, SEO YW, 2012. SKP1-like-related genes interact with various F-box proteins and may form SCF complexes with Cullin-F-box proteins in wheat [J]. *Mol Biol Rep*, 40(2): 969–981.
- NING Z, SCHULMAN BA, LANGZHOUS S, et al., 2016. Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F box Skp2 SCF ubiquitin ligase complex [J]. *Nature*, 416(6882): 703–709.
- PORAT R, LU PZ, O'NEILL SD, 1998. *Arabidopsis SKP1*, a homologue of a cell cycle regulator gene, is predominantly expressed in meristematic cells [J]. *Planta*, 204(3): 345–351.
- SCHULMAN BA, CARRANO AC, JEFFREY PD, et al., 2000. Insights into SCF ubiquitin ligases from the structure of the Skp1-Skp2 complex [J]. *Nature*, 408(6810): 381–386.
- SONG YL, 2011. Cloning and expression analysis of *SKP1* gene related to male sterility in wheat [D]. Yangling: Northwest A & F University. [宋瑜龙, 2011. 小麦雄性不育相关基因 *SKP1* 的克隆与表达分析 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学.]
- SUN XY, WEI Y, HAN XY, et al., 2017. Prokaryotic expression of cucumber Skp1 in *Escherichia coli* and preparation of Antiserum [J]. *Acta Agric Boreal-Sin*, 32(6): 73–77. [孙新艳, 魏莹, 韩晓玉, 等, 2017. 黄瓜 S 期激酶相关蛋白 Skp1 的原核表达及其多克隆抗体的制备 [J]. 华北农学报, 32(6): 73–77.]
- TAKAHASHI N, KURODA H, KUROMORI T, et al., 2004. Expression and interaction analysis of *Arabidopsis* Skp1-related genes [J]. *Plant Cell Physiol*, 45(1): 83–91.
- VIERSTRA RD, SMALLE J, 2004. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway [J]. *Ann Rev Plant Biol*, 55(1): 555–590.
- WANG YX, WU H, LIANG GQ, et al., 2004. Defects in nucleolar migration and synapsis in male prophase [J]. *Plant Reprod*, 16(6): 273–282.
- WANG YX, YANG M, 2006. The *ARABIDOPSIS SKP1-LIKE1* (*ASK1*) protein acts predominately from leptotene to pachytene and represses homologous recombination in male meiosis [J]. *Planta*, 223(3): 613–617.
- WU SS, 2014. Study on high temperature tolerance of transgenic carnation by *PmHSP25.3* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. [吴珊珊, 2014. 转 *PmHSP25.3* 基因香石竹植株耐热性研究 [D]. 武汉: 华中农业大学.]
- XIA JH, ZENG B, LI WY, et al., 2015. Cloning and bioinformatics analysis of self-incompatibility gene *SSK1* of wild almond in Xinjiang [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 31(25): 107–112 [夏江宏, 曾斌, 李伟阳, 等, 2015. 新疆野扁桃自交不亲和基因 *SSK1* 的克隆及生物信息学分析 [J]. 中国农学通报, 31(25): 107–112.]
- YANG M, HU Y, LODHI M, et al., 1999. The *Arabidopsis SKP1-LIKE1* gene is essential for male meiosis and may control homologue separation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(20): 11416–11421.
- YE YP, 2014. Research progress on *ASK* genes in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol J*, 50(6): 683–690. [叶佑丕, 2014. 拟南芥 *ASK* 基因研究进展 [J]. 植物生理学报, 50(6): 683–690.]
- YIN SS, LI MF, WANG H, et al., 2016. Cloning and expression analysis of *FaSKP1-1* genes in strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) [J]. *J Chin Agric Univ*, 21(12): 28–34. [殷姗姗, 李茂福, 王华, 等, 2016. 草莓 *FaSKP1-1* 基因的克隆与表达分析 [J]. 中国农业大学学报, 21(12): 28–34.]
- YU YX, BAO MZ, 2004. Prolonging the vase life of carnation 'Mabel' through integrating repeated acc oxidase genes into its genome [J]. *J Plant Physiol Mol Biol*, 30(5): 541–545. [余义勋, 包满珠, 2004. 通过转重复结构的 ACC 氧化酶基因延长香石竹的瓶插期 [J]. 植物生理与分子生物学学报, 30(5): 541–545.]
- ZHANG FY, BAI XF, DU YG, et al., 2007. Cloning and analysis of the full length cDNA of *SKP1* gene from *Nicotiana tabacum* var. *samsun* NN and its expression in *E. coli* [J]. *Acta Agron Sin*, 33(4): 693–696. [张付云, 白雪芳, 杜昱光, 等, 2007. 烟草 *SKP1* 基因 cDNA 的克隆分析及原核表达 [J]. 作物学报, 33(4): 693–696.]
- ZHANG FY, CHEN SY, ZHAO XM, et al., 2009. Construction of *NtSKP1-GFP* plant expression vector and subcellular location [J]. *Acta Agric Boreal-Occident Sin*, 18(4): 144–148. [张付云, 陈士云, 赵小明, 等, 2009. *NtSKP1-GFP* 植物表达载体的构建及亚细胞定位 [J]. 西北农业学报, 18(4): 144–148.]
- ZHAO DZ, YANG M, SOLAVA J, et al., 2015. The *ASK1* gene regulates development and interacts with the *ufo* gene to control floral organ identity in *Arabidopsis* [J]. *Genesis*, 25(3): 209–223.
- ZHAO DZ, YANG XH, QUAN L, et al., 2006. *ASK1*, a *SKP1* homolog, is required for nuclear reorganization, presynaptic homolog juxtaposition and the proper distribution of cohesin during meiosis in *Arabidopsis* [J]. *Plant Mol Biol*, 62(1–2): 99–110.
- ZHAO DZ, YU QL, CHEN M, et al., 2001. The *ASK1* gene regulates B function gene expression in cooperation with *UFO* and *LEAFY* in *Arabidopsis* [J]. *Development*, 128(14): 2735–2746.
- ZHENG HP, LI YP, 2011. The essential regulator of cellular activities—F-box protein [J]. *Chem Life*, 31(5): 619–624. [郑鸿平, 李逸平, 2011. 调控细胞活动不可或缺的重要分子——F-box 蛋白 [J]. 生命的化学, 31(5): 619–624.]

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202007034

巩元勇, 赵丽华, 闫飞, 等. 大豆 *GeBP* 转录因子基因家族的生物信息学分析 [J]. 广西植物, 2022, 42(2): 294–303.
GONG YY, ZHAO LH, YAN F, et al. Bioinformatics analysis of *GeBP* transcription factor gene family in *Glycin max* [J].
Guihaia, 2022, 42(2): 294–303.



大豆 *GeBP* 转录因子基因家族的生物信息学分析

巩元勇*, 赵丽华, 闫飞, 朱丽红

(攀枝花学院 生物与化学工程学院(农学院), 四川 攀枝花 617000)

摘要: *GeBP* 转录因子调控植物表皮毛的生长发育, 并且参与控制植物叶片的发育。该文利用生物信息学方法, 在大豆全基因组范围内搜索 *GeBP* 基因家族, 并从氨基酸理化性质、基因结构、染色体的物理分布、系统进化、序列比对、功能结构域、组织表达情况等基本特征方面对 *GmGeBP* 基因家族进行分析。结果表明: (1) 共获得 9 个 *GmGeBP* 转录因子基因家族成员, 其中仅 2 个基因含有内含子, 且都只有 1 个内含子, 表明该家族成员基因构造比较简单但稳定。(2) *GmGeBP* 编码的蛋白分子量为 39.65~49.24 kD, 理论等电点为 4.65~9.08; 这些成员基本上都是酸性氨基酸, 属于亲水性、不稳定蛋白。(3) 这 9 个基因不均匀的分布于 7 条染色体上, 10 和 20 号染色体上分别分布 2 个 *GeBP* 基因, 3、5、13、15、19 号染色体上各分布 1 个基因。(4) 系统进化分析表明, 大豆与拟南芥对应的 *GeBP* 成员亲缘关系较近, 分别聚类到 4 个分支, 而与水稻的距离较远。(5) 结构域分析表明, 9 个 *GmGeBP* 成员都包含 DUF573 结构域, 推测该部分在 *GeBP* 转录因子中很可能是与靶标基因顺式作用元件互作的结构域。(6) 通过分析大豆 *GmGeBP* 转录因子基因家族的组织表达, 发现不同基因在大豆不同组织的表达量不同, 具有一定的特异性。该文对大豆 *GeBP* 转录因子基因家族的分析 and 鉴定为进一步研究大豆表皮毛发育的分子作用提供了理论基础。

关键词: 大豆, *GeBP* 转录因子, 生物信息, 组织表达

中图分类号: Q943 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2022)02-0294-10

Bioinformatics analysis of *GeBP* transcription factor gene family in *Glycin max*

GONG Yuanyong*, ZHAO Lihua, YAN Fei, ZHU Lihong

(Biological and Chemical Engineering College (Agricultural College), Panzhihua University, Panzhihua 617000, Sichuan, China)

Abstract: It has been clarified that *GeBP* transcription factor regulates the growth and development of plant epidermal hair and participates in the control of plant leaf development. The bioinformatics methods were used to identify the *GeBP* gene family in the whole *Glycin max* (soybean) genome, and from physicochemical properties of amino acids, as well as gene structure, physical distribution of chromosomes, phylogenetic tree, and multiple sequence comparison, the functional domain, tissues expression and other basic characteristics of *GmGeBP* gene family were analyzed. The results

收稿日期: 2020-11-30

基金项目: 国家自然科学基金(31301682); 金沙江干热河谷生态修复与治理创新研究团队专项经费(035200179); 攀枝花大学科技园发展有限责任公司种子资金“双创”项目(2019-46) [Supported by National Natural Science Foundation of China (31301682); Special Fund for Research Team of Ecological Restoration and Governance Innovation in Dry Hot Valley of Jinsha River (035200179); “Double Creation” Project of Seed Fund of Panzhihua University Science Park Development Co., Ltd. (2019-46)]。

第一作者: 巩元勇(1982-), 博士, 副教授, 主要从事植物生物技术研究, (E-mail) ggy2011qh@163.com。

*通信作者

were as follows: (1) A total of nine members of *GmGeBP* transcription factor gene family were identified, of which only two genes contained introns and all had only one intron, indicating that the gene structure of the family members is relatively simple but stable. (2) The molecular weights of *GmGeBP*s were 39.65–49.24 kD, and the theoretical isoelectric point was 4.65–9.08; these members were basically acidic amino acids, which were hydrophilic and unstable proteins. (3) The chromosome physical distribution showed that nine genes were unevenly distributed on seven chromosomes, two *GeBP* genes on chromosome 10 and 20 respectively, and one gene on chromosome 3, 5, 13, 15 and 19, respectively. (4) The phylogenetic analysis showed that *GeBP* members of *Glycin max* and *Arabidopsis thaliana* were closely related, clustered into four branches respectively, but far away from *Oryza sativa*. (5) The analysis of domains showed that all the nine *GmGeBP* members contained DUF573 domain, which was probably the domain interacting with cis-acting elements of target genes in *GeBP* transcription factors. (6) By analyzing the expression of *GmGeBP* transcription factor gene family, we found that the expressions of different genes in different tissues were different, with a certain specificity. The analysis and identification of *GmGeBP* transcription factor gene family provide the theoretical basis for further studying the molecular role of *Glycin max* epidermal development.

Key words: *Glycin max*, *GeBP* transcription factor, bioinformatics, tissue expression

表皮毛广泛分布于陆地植物的叶片、茎秆以及花萼等地上部器官的表面,是植物表皮细胞分化形成的一种特殊的细胞形态。表皮毛是植物的第一道保护屏障,通过调节水分的蒸腾作用,减缓叶片的热负荷,增强对冷冻或紫外线的耐受性,增强植物抵御昆虫捕食的防御能力。转录因子是生物体生长发育过程中一类重要的调节因子,高等生物体因其机体的复杂性需要更多的转录因子参与。*GeBP* (*GLABROUS1* enhancer binding protein) 是一类植物特有的转录因子,拟南芥 *GeBP* 可以通过与 *GL1* (*GLABROUS1*) 基因的互作调控来控制表皮毛的发生(普利等, 2003)。*GeBP* 包含中央 DNA 结合区、bZIP 转录因子保守域和 C 末端保守区,然而这个 bZIP 转录因子保守域有别于经典的 bZIP 转录因子保守域,且真正发挥功能的是中央 DNA 结合区和 C 末端保守区,所以 *GeBP* 是植物中一类新的转录因子蛋白(Curaba et al., 2003; Chevalier et al., 2008)。当前只在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、水稻 (*Oryza sativa*)、番茄 (*Solanum lycopersicum*) 和毛竹 (*Phyllostachys edulis*) 中有关于 *GeBP* 转录因子基因家族的报道,这四种植物 *GeBP* 基因家族成员分别是 22 个(Chevalier et al., 2008)、15 个(石蕾, 2013)、10 个(陈凯等, 2019) 和 16 个(单雪萌等, 2020),关于 *GeBP* 转录因子具体功能的报道还很少。

在植物中,转录因子通常参与激素途径与激素互作来调控植物的发育。*GeBP* 蛋白可与 *GL1* 基因顺式调控元件结合调控该基因的转录,*GL1* 基因属于 *myb* 基因,参与决定表皮细胞且被赤霉素

和细胞分裂素调控(Gan et al., 2007);*GeBP* 基因的表达受到 *KNOX* 家族转录因子 *BP* (*BREVIPEDICELLUS*) 基因的正向调控(Curaba et al., 2004),*KNOX* 在茎端分生组织正向调控细胞分裂素途径(Jasinski et al., 2005),由此推测 *GeBP* 可能通过调控赤霉素和细胞分裂素途径来控制表皮毛的发生(Chevalier et al., 2008)。

Ray 等(2011)研究发现 C_2H_2 、 C_2C_2 、 C_3H 、LIM、PHD、WRKY、ZF-HD 和 ZIM 等锌指类转录因子成员,以及 *GeBP*、*jumonji*、*MBF1* 和 *ULT* 等转录因子家族在缺水条件下出现表达差异。一般认为 *MBF1*、*jumonji*、*ULT* 和 *GeBP* 这四类转录因子家族主要参与植物发育过程和植物激素反应(Curaba et al., 2003; Noh et al., 2004; Kenichi et al., 2004; Carles et al., 2005; Chevalier et al., 2008),通常不参与胁迫条件下的应激反应性,然而在水分亏缺胁迫条件下都表现为表达上调,表明 *GeBP* 等转录因子在植物对干旱逆境的反应中发挥一定的作用。新近研究发现, *LiGeBP*、*LiMYB*、*LibZIP*、*LieBp-2* 和 *LiERF* 五类转录因子可能是薰衣草中单萜合酶的激活剂, *LiGeBP* 可能参与控制薰衣草中单萜合酶的合成(Sarker et al., 2019)。

大豆(*Glycin max*)起源于中国,随着人类活动范围的扩大已经广泛种植于世界各地,并成为世界性的重要经济作物,为人类提供了主要的植物油和植物蛋白,同时也是动物饲料蛋白质的主要来源。大豆表皮毛同其他植物的一样,也是典型的单细胞结构,不存在分支。研究证实,大豆表皮毛的密度同抗虫和抗旱等性状密切相关,但关于

大豆表皮毛发育的分子基础研究还鲜有报道。大豆基因组测序工作已于 2010 年完成并公布 (Schmutz et al., 2010), 这为大豆相关基因家族及功能基因在基因组水平上的探索研究提供了可能。大豆 *WRKY*、*ERF*、*Dof* 等转录因子基因家族在全基因组层面的分析报道也越来越多 (Yu et al., 2016; Song et al., 2016; 翟莹等, 2016, 2019; 刘蓓等, 2020), 但是还未见有关于大豆 *GeBP* 转录因子基因家族的研究报道。本研究通过生物信息学的方法, 从基因的核苷酸序列长度和氨基酸序列的基本理化性质、基因在染色体的物理定位、基因结构、系统进化树、序列对比、功能结构域分布、基因在不同组织的表达情况等基本特征方面对大豆 *GeBP* 转录因子基因家族进行全面预测和分析, 为进一步深入探究大豆 *GeBP* 转录因子基因家族的生理生化功能提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

从植物转录因子数据库 PlantTFDB (<http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/>) 搜索获得拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、水稻 (*Oryza sativa*) 和大豆 (*Glycine max*) 这 3 个物种 *GeBP* 转录因子基因家族共 40 个成员的基因座位置信息, 然后从 JGI 的 Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) 搜索获得水稻、大豆和拟南芥的 *GeBP* 转录因子基因的编码区及 CDS 序列和氨基酸序列, 同时获得大豆 *GeBP* 转录因子基因家族在不同组织部位表达的 FPKM (Fragments Per Kilobase of transcript per Million fragments mapped) 值。

1.2 方法

1.2.1 大豆 *GeBP* 基因家族基本信息获取 利用 DNASTAR Lasergene 软件中的 EditSeq 分析获得大豆 *GeBP* 基因的编码区和 CDS 序列长度, 用 Expasy (<https://web.expasy.org/protparam/>) 在线分析大豆 *GeBP* 的氨基酸序列, 获得氨基酸残基长度、分子质量、理论等电点、不稳定系数、亲水性指数等基因基本信息。

1.2.2 大豆 *GeBP* 基因染色体定位 大豆 *GeBP* 基因在染色体的位置信息来自 Phytozome 大豆基因组数据库, 从 NCBI 的 Genome Data Viewer (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/>) 获得大豆每条

染色体的总长度, 根据这些信息用 maplnspect 软件绘制大豆 *GeBP* 基因在染色体上的物理分布图。

1.2.3 大豆 *GeBP* 基因的生物信息学分析 用 GSDS9 (Gene Structure Dispely Server, <http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) (Hu et al., 2015) 在线绘制大豆和拟南芥 *GeBP* 基因结构图; 用 MEGA 7 软件采用邻接法 NJ (Neighbor-Joining) 构建大豆、拟南芥和水稻 *GeBP* 基因家族氨基酸序列的系统进化树 (Kumar et al., 2018), 校验参数 Bootstrap = 1 000; 运用 DNAMAN 软件对大豆 *GeBP* 基因家族的氨基酸序列进行多重序列比对; 用 Lasergene 软件的 MegAlign 分析大豆 *GeBP* 基因家族氨基酸序列间的相似性; 用 Pfam 32.0 (<http://pfam.xfam.org/>) 在线搜寻鉴定大豆 *GeBP* 蛋白序列功能结构域 (Domain) 的存在情况。

1.2.4 大豆 *GeBP* 基因在不同组织的表达 用 Hemi 软件 (<http://hemi.biocuckoo.org/down.php>) 绘制大豆 *GeBP* 基因在花 (flower)、叶 (leaves)、根瘤 (nodules)、荚果 (pod)、根 (root)、根毛 (root hair)、种子 (seed)、茎尖分生组织 (shoot apical meristem)、茎 (stem) 等 9 个不同组织的表达热图。

2 结果与分析

2.1 大豆 *GeBP* 基因的基本信息及染色体定位

通过在植物转录因子数据库 PlantTFDB 搜索获得大豆转录因子 *GeBP* 基因成员, 共获得 9 个大豆无表皮毛增强子结合蛋白基因, 分别命名为 *GmGeBP1*~*9* (表 1)。在 Phytozome 大豆基因组数据库搜索获得这 9 个基因所对应的编码区序列、CDS 序列、氨基酸序列, 并用 Expasy 在线分析氨基酸序列获得蛋白质序列基本的理化性质信息。

如图 1 所示, *GmGeBP* 转录因子家族的 9 个成员分别分布在 7 条染色体上, 其中 10 号染色体上有 *GmGeBP3* 和 *GmGeBP4* 两个 *GeBP* 基因, 20 号染色体上有 *GmGeBP8* 和 *GmGeBP9* 两个 *GeBP* 基因, 其余染色体各有一个 *GeBP* 基因。有 7 个大豆 *GeBP* 基因的编码区长度和 CDS 长度一样, 表明这些 *GeBP* 基因结构中不含有内含子; 只有 *GmGeBP2* 和 *GmGeBP4* 这两个基因的编码区长度和 CDS 长度不一样, 说明这两个基因在基因结构上包含内含子。大豆 *GeBP* 基因翻译后蛋白质的长度在 353~448 个氨基酸之间。其中 5 个成员蛋白质长

表 1 大豆 *GeBP* 基因家族成员基本信息

Table 1 Basic information of *GeBP* gene family in *Glycine max*

基因名称 Gene name	基因座 ID Locus ID	编码区长度 Length of coding region (bp)	CDS 长度 Length of CDS (bp)	蛋白质长度 Protein length (aa)	分子质量 MW (kD)	理论等电点 Isoelectric point (pI)	不稳定系数 Instability index	亲水性指数 Hydropathy index
<i>GmGeBP1</i>	Glyma.03G245200	1 218	1 218	40	44.61	5.00	60.84	-0.752
<i>GmGeBP2</i>	Glyma.05G088300	1 294	1 164	387	43.23	9.08	46.87	-0.950
<i>GmGeBP3</i>	Glyma.10G160000	1 119	1 119	372	41.29	4.75	53.99	-0.706
<i>GmGeBP4</i>	Glyma.10G160100	1 160	1 128	375	43.15	5.20	55.57	-0.749
<i>GmGeBP5</i>	Glyma.13G251000	1 347	1 347	448	49.24	5.26	65.50	-1.221
<i>GmGeBP6</i>	Glyma.15G063300	1 314	1 314	437	48.35	5.48	69.85	-1.300
<i>GmGeBP7</i>	Glyma.19G242600	1 215	1 215	404	44.74	4.81	56.93	-0.805
<i>GmGeBP8</i>	Glyma.20G228300	1 074	1 074	357	41.06	4.93	63.02	-0.786
<i>GmGeBP9</i>	Glyma.20G228500	1 062	1 062	353	39.65	4.65	67.12	-0.778

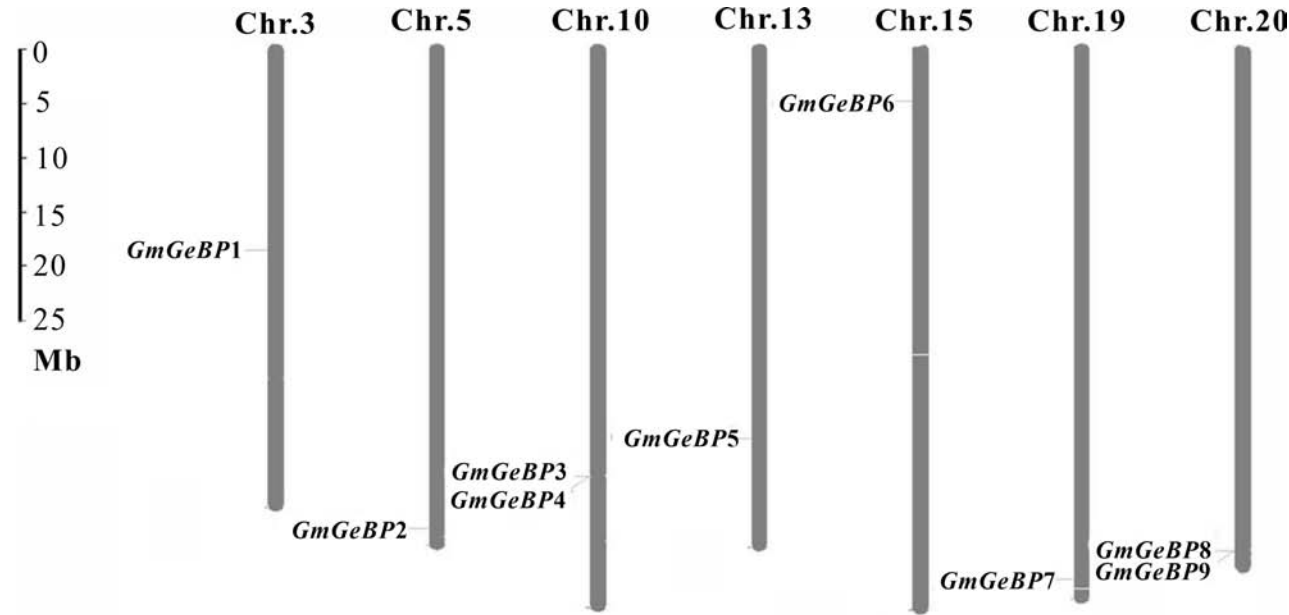


图 1 *GmGeBP* 基因的染色体物理定位

Fig. 1 Chromosome physical location of *GmGeBP* genes

度在 300~400 个氨基酸之间;有 4 个家族成员的
长度在 400~500 个氨基酸之间。其中;*GmGeBP5*
的氨基酸长度最长,为 448 aa,其分子质量也是最
大,为 49.24 kD;*GmGeBP9* 的氨基酸长度最短,为
353 aa,其分子质量也是最小,为 39.65 kD。这 9
个 *GeBP* 蛋白的理论等电点也存在一定的差异,其
理论等电点值在 4.65~9.08 之间,只有 *GmGeBP2*
的理论等电点为 9.08,是碱性氨基酸,其余 8 个

GeBP 蛋白理论等电点均小于 7,为酸性氨基酸。
蛋白质的不稳定系数是用来分析该蛋白是否是稳
定蛋白,如果不稳定系数大于 40,则表明是不稳定
蛋白;反之,如果不稳定系数小于 40,则表明是稳
定蛋白,*GmGeBP* 所有的不稳定系数都大于 40,说
明这些蛋白都是不稳定蛋白。亲水性指数大于
+0.5 的为疏水性蛋白,亲水性指数若小于-0.5 的
则为亲水性蛋白,如果介于-0.5~+0.5 之间则为

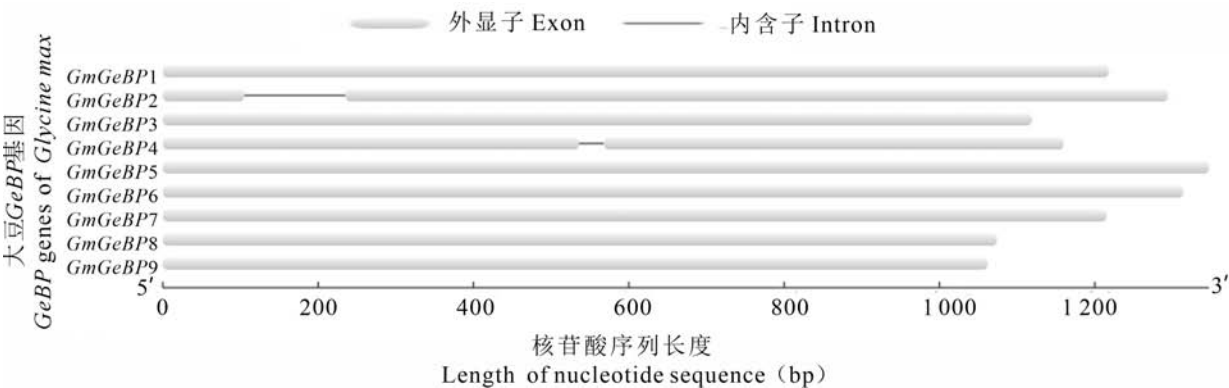


图 2 大豆 *GeBP* 基因结构图
Fig. 2 Structure map of *GeBP* genes in *Glycine max*

两性蛋白,所有 GmGeBP 蛋白的亲水性指数都小于-0.5,说明这些蛋白都是亲水性蛋白。

大豆共有 20 对 40 条染色体,基因在染色体上的分布用 1-20 号染色体来表示。大豆 *GeBP* 基因家族共有 9 个成员,不均匀的分布在 Chr3、Chr5、Chr10、Chr13、Chr15、Chr19 和 Chr20 7 条染色体上。其中,在 Chr10 和 Chr20 上各分布有两个 *GeBP* 基因,从后面的序列一致性及进化树分析结果可见,尽管 *GmGeBP3* 和 *GmGeBP4*、*GmGeBP8* 和 *GmGeBP9* 这两组基因在物理位置上距离很近,但是它们之间在进化上不存在复制关系,是独立进化的。由图 1 可知,这些基因在染色体上相对独立存在,在染色体上没有以基因簇的形式存在。

2.2 *GeBP* 基因结构分析

利用大豆和拟南芥 *GeBP* 基因家族成员的编码区序列和 CDS 序列通过 GSDS 在线构建基因结构图,用图像直观地研究 *GeBP* 基因的结构情况。如图 2 所示,大豆中的 9 条 *GeBP* 基因有 7 个不包含内含子,另外两个有内含子的基因也只包含一个内含子。在进行基因克隆研究基因功能的时候,没有内含子的基因可以直接通过提取的 DNA 为模板来获得基因序列,而没有必要提取 RNA 之后再反转录作为扩增模板。

本研究发现拟南芥 22 个 *GeBP* 基因有 16 个成员也没有内含子,有 6 个基因包含内含子,其中有 4 个基因均只含有 1 个内含子,1 个基因含有 3 个内含子,1 个基因含有 4 个内含子(图 3)。总体来看,*GeBP* 基因的基因结构在不同植物上都表现的比较稳定,因为没有内含子存在或存在很少的

内含子,在转录时不易形成可变剪接体。

2.3 构建 *GeBP* 基因家族进化树

为进一步了解 *GeBP* 基因家族系统进化关系,本研究选取 20 个拟南芥 *GeBP* 基因、11 个水稻 *GeBP* 基因、9 个大豆 *GeBP* 基因 3 种植物的 *GeBP* 基因进行比对分析,利用 MEGA 7 的邻接法构建这 40 个 *GeBP* 蛋白序列的进化树。其中,为了方便辨识,在图形处理上,将大豆基因标注黑色圆形,拟南芥基因标注白色圆形,水稻基因标注白色方框。如图 4 所示,进化树可以分为 4 个大的分支,分别含有 14 个、10 个、6 个和 10 个 *GeBP* 基因。在第一个分支,三个物种的基因都有;第二个分支只包含拟南芥的基因;第三个分支基因数量最少,但是包含有拟南芥和大豆的基因;第四个分支以水稻基因为主,仅有一个来源拟南芥的基因。可见,因大豆和拟南芥同属双子叶植物的缘故,这两个物种的基因在进化关系上要更近一些。

从单个基因的进化关系来看,相同物种间的基因进化关系最近,如大豆的 *GmGeBP1* 和 *GmGeBP7*, *GmGeBP3* 和 *GmGeBP9*, *GmGeBP4* 和 *GmGeBP8*, 拟南芥的 *AtGeBP10* 和 *AtGeBP21*, *AtGeBP3* 和 *AtGeBP6*, *AtGeBP8* 和 *AtGeBP15*, 水稻的 *OsGeBP6* 和 *OsGeBP9*, *OsGeBP3* 和 *OsGeBP5*, *OsGeBP4* 和 *OsGeBP8* 等。表明 *GeBP* 基因在物种间进化上比较保守。

2.4 大豆 *GeBP* 基因家族的序列比对和结构域分析

进行序列比对的目的是从核酸以及氨基酸的层次来分析序列的相同点和不同点,进而推测它们的结构、功能以及进化上的联系。大豆 *GeBP* 家族

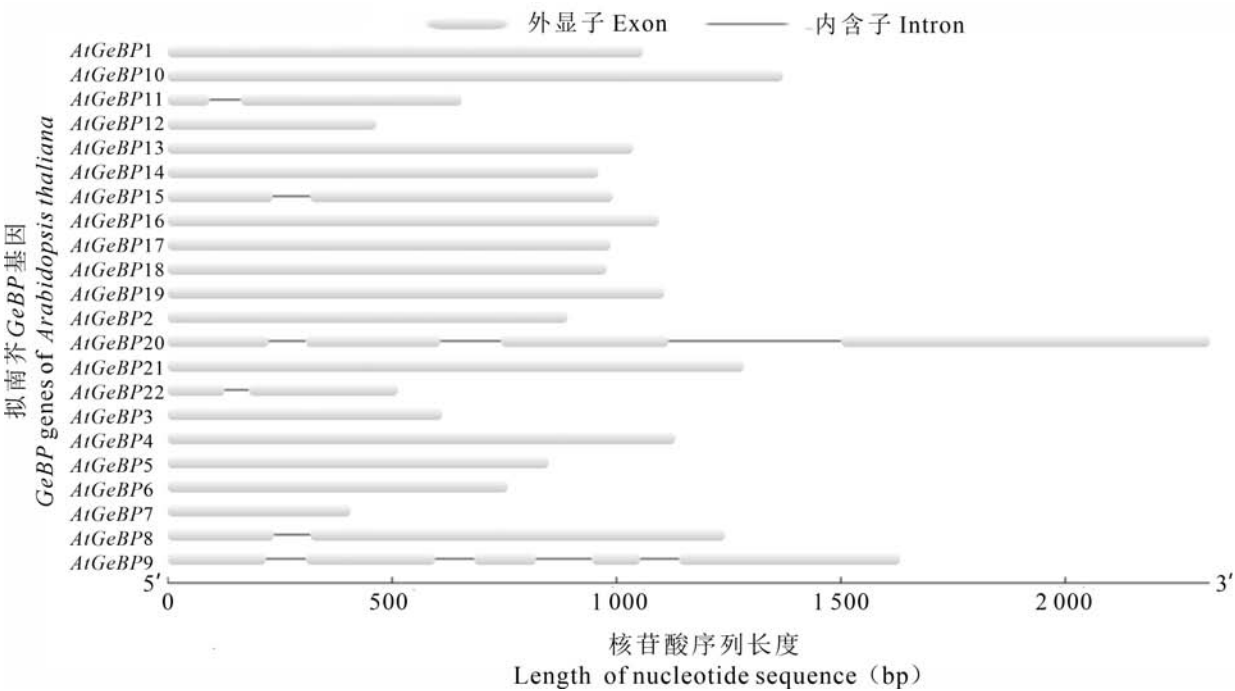


图 3 拟南芥 *GeBP* 基因结构图

Fig. 3 Structure map of *GeBP* genes in *Arabidopsis thaliana*

成员含有大约 131 个氨基酸组成的功能结构域,功能结构域含有大量的碱性氨基酸:精氨酸(R)和赖氨酸(K)。不同物种间 *GeBP* 蛋白的氨基酸序列的一致性比较低(结果没有展示)。大豆的 *GeBP* 蛋白质氨基酸多重序列比对的结果表明,大豆本身的 *GeBP* 蛋白质氨基酸序列的一致性也不是很高,所有成员共有的氨基酸序列非常少(图 5)。

通过分析大豆 *GeBP* 基因家族成员之间的氨基酸序列的一致性发现,尽管整体序列一致性比较低,但有些成员之间的一致性较高:*GmGeBP1* 和 *GmGeBP7* 的一致性最高(90.2%),其次是 *GmGeBP3* 和 *GmGeBP9*(88.5%),然后是 *GmGeBP4* 和 *GmGeBP8*(87.4%),最后是 *GmGeBP5* 和 *GmGeBP6*(86.6%),这些都是一致性在 85% 以上的序列,同进化树的分析结果也相似。氨基酸序列一致性高,表明在功能上这些基因也可能类似或互补。

如图 6 所示,大豆所有的 9 个 *GmGeBP* 成员都包含 DUF573 结构域,属于 DUF573 超家族。尽管标注为未知功能结构域,但是可以推测该部分在 *GeBP* 转录因子氨基酸序列中很可能与靶标基因顺式作用元件互作的结构域,但是不同 *GmGeBP*

中 DUF573 功能结构域所处的位置存在一定的差异,这可能是导致不同 *GmGeBP* 功能差异的原因之一。

2.5 大豆 *GeBP* 基因在不同组织的表达分析

从总体来看,大豆 *GmGeBP* 家族成员在所有组织中都有表达,其中 *GmGeBP4* 和 *GmGeBP8* 在各个组织中的表达量相对其他基因都普遍偏低(图 7)。从单个基因来看,*GmGeBP1* 在所有组织中都表达,在花和种子中表达量最高,在叶、结节、荚果、根、根毛、茎尖分生组织、茎表达量次之;*GmGeBP2* 在叶、结节、荚果、根毛、种子、茎尖分生组织、茎的表达比在花和根中表达量更高;*GmGeBP3* 的表达主要集中在花器官中,在叶、结节、荚果、根、根毛、种子的表达中次之,在茎尖分生组织、茎的表达量更少;*GmGeBP4* 在各组织中表达量较低;*GmGeBP5* 在花、叶、结节、荚果、根、根毛、种子、茎尖分生组织、茎中均有表达;*GmGeBP6* 在花、叶、结节、荚果、根、根毛、种子、茎尖分生组织、茎中均有表达,在叶和根毛表达量最高;*GmGeBP7* 在花、叶、结节、荚果、根、根毛、种子、茎尖分生组织、茎中均有表达,在花、叶、荚果、种子中表达最高;*GmGeBP8* 在花中表达量最高,在其他

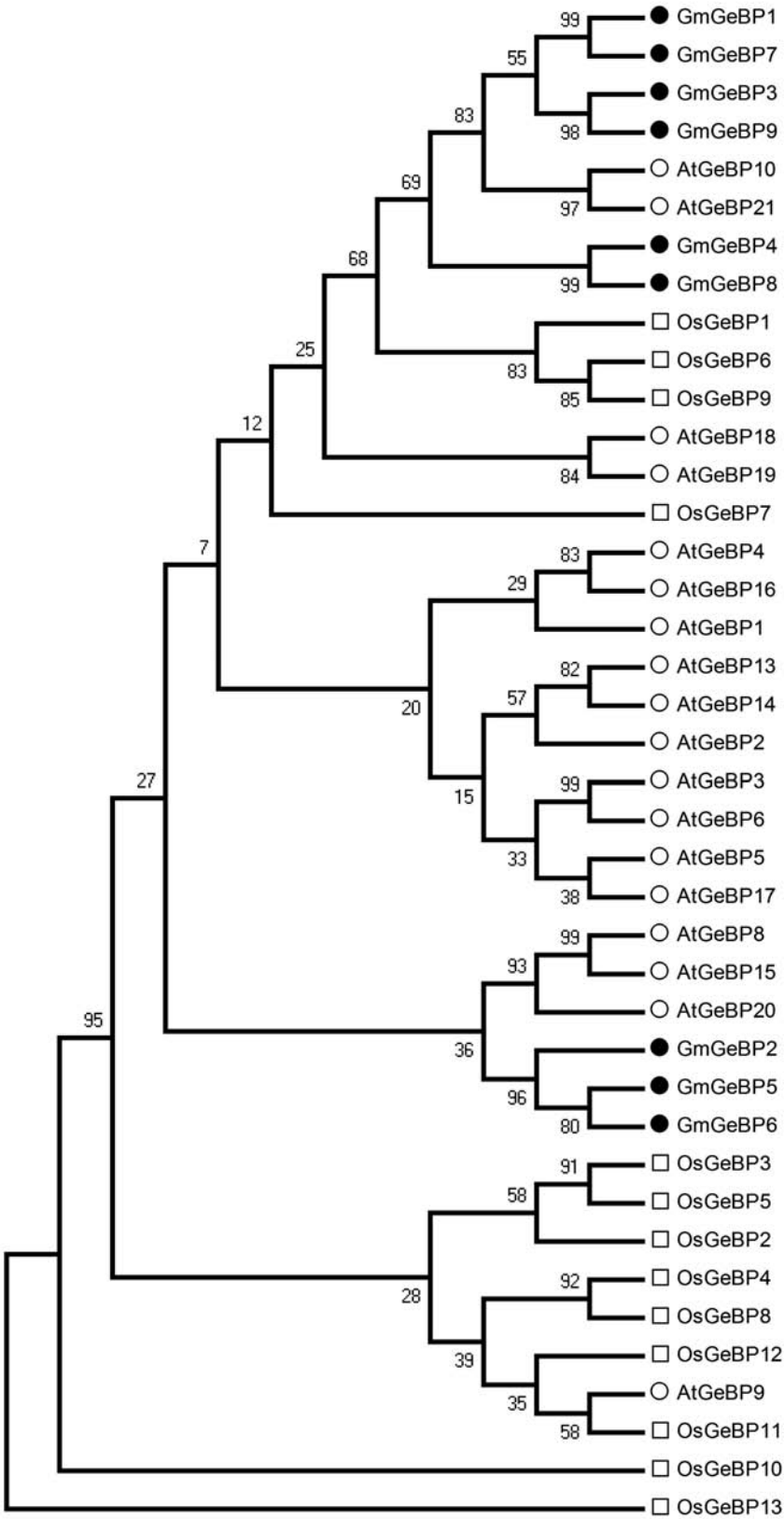


图 4 AtGeBP、GmGeBP 和 OsGeBP 蛋白系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of AtGeBP, GmGeBP and OsGeBP proteins

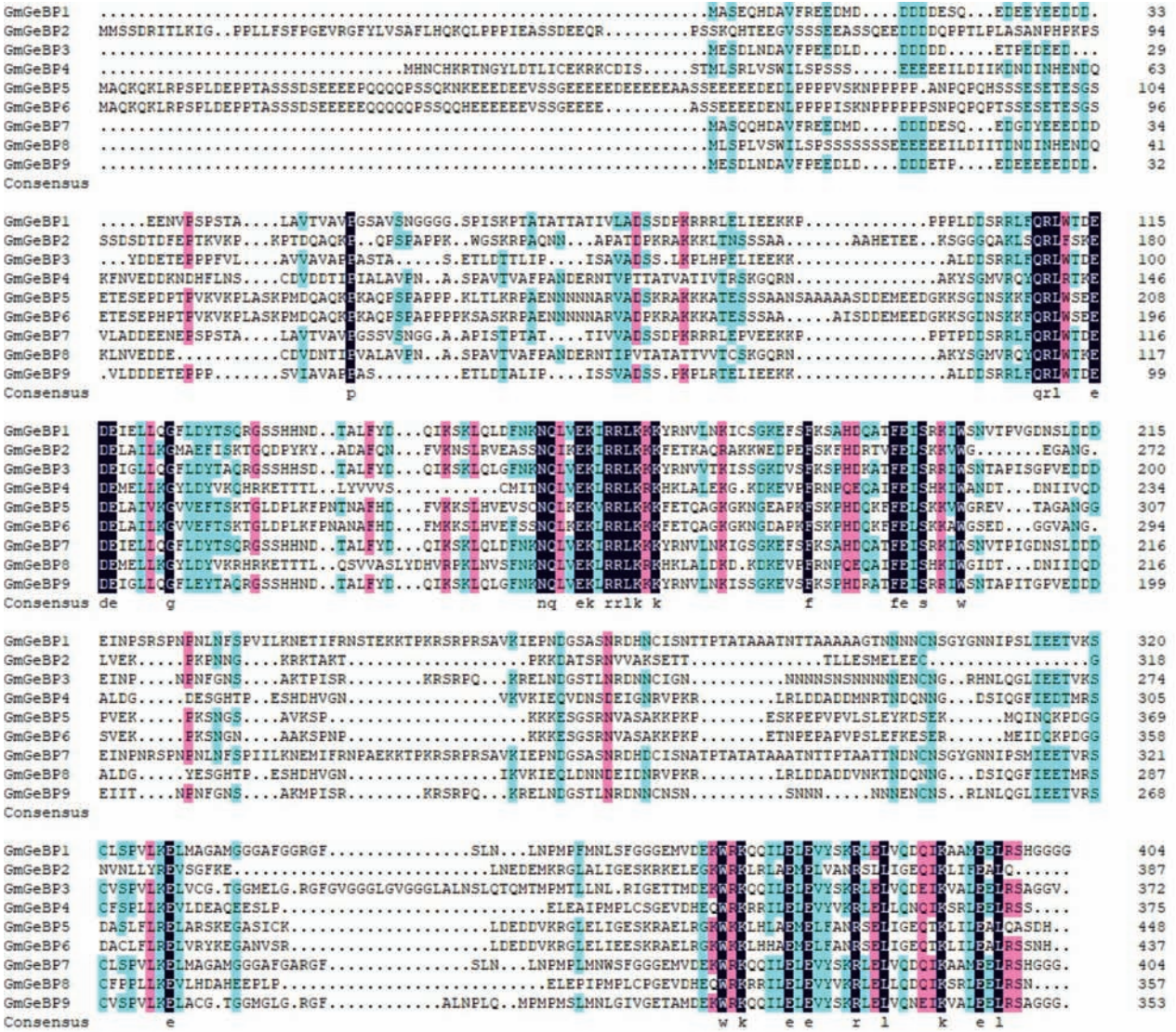


图 5 大豆 *GeBP* 蛋白质多序列对比图

Fig. 5 Multi-sequence comparison diagram of *GeBP* proteins in *Glycine max*

组织表达量低;*GmGeBP9*在花、叶、根组织中表达量高,在花中表达量最高。

数据分析结果表明,同一基因在不同位置的表达量不一样,同一位置表达所对应的基因表达量也有差异,对此分析得到*GmGeBP*家族成员的表达具有一定的特异性,且各成员之间不尽相同。因此,一定程度上基因的功能取决基因在不同时期不同组织和器官的表达情况。

3 讨论与结论

对植物转录因子的研究,似乎更偏向于参与

逆境胁迫反应途径相关的转录因子。以 *WRKY* 转录因子为例, *WRKY* 转录因子是植物体特有一类成员数量庞大的转录因子家族,广泛地参与到植物对多种生物和非生物胁迫的反应过程 (Jiang et al., 2017),是当前研究最热的植物转录因子之一。2020 年 7 月 20 日在中国知网 (<https://www.cnki.net/>) 搜索篇名含有 *WRKY* 的文章,共找到 1 512 条结果,不仅有数量众多的对不同植物种类 *WRKY* 转录因子基因家族的全基因组鉴定和分析,还有很多对单个 *WRKY* 基因相关功能的研究。反观对 *GeBP* 的搜索,只找到 7 篇文章,植物只涉及拟南芥、水稻、番茄和毛竹 4 种,尽管最早关于

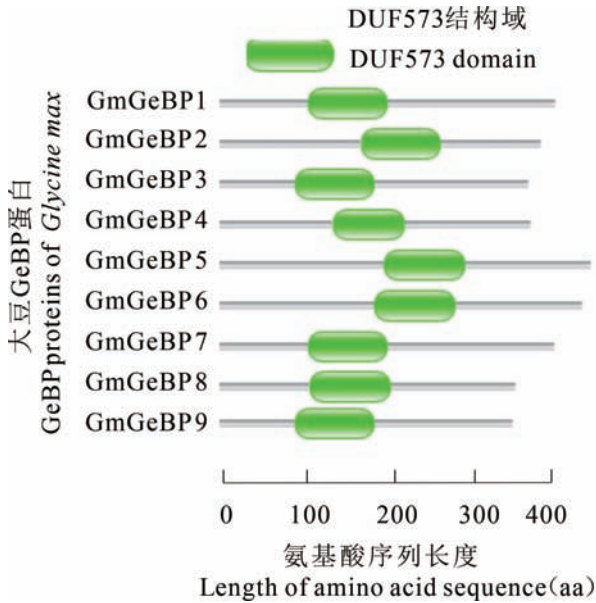
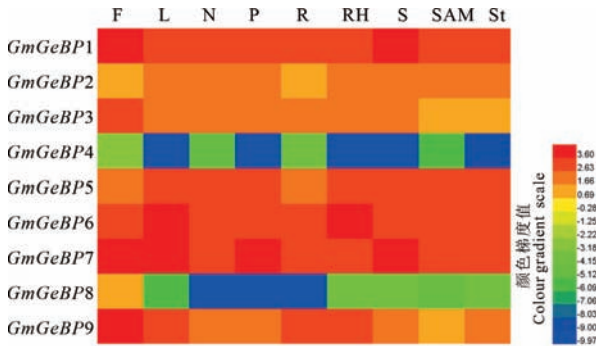


图 6 大豆 GeBP 蛋白功能结构域分布
Fig. 6 Distribution of functional domains of GmGeBP proteins in *Glycine max*



F. 花; L. 叶; N. 根瘤; P. 荚果; R. 根; RH. 根毛; S. 种子; SAM. 茎尖分生组织; St. 茎。
F. Flower; L. Leaf; N. Nodules; P. Pod; R. Root; RH. Root hair; S. Seed; SAM. Shoot apical meristem; St. Stem.

图 7 *GmGeBP* 基因在不同组织的表达热图
Fig. 7 Expression heat map of *GmGeBP* genes in different tissues

GeBP 基因研究的文章发表于 2003 年 (Curaba et al., 2003),但是这十几年来对 *GeBP* 转录因子的研究还是非常缓慢,*GeBP* 基因的很多功能还不明确。

从已经报道的结果来看,植物 *GeBP* 转录因子基因家族成员数量不是很多,拟南芥包含的 *GeBP* 成员最多,有 22 个 (Chevalier et al., 2008);毛竹

含有 16 个成员 (单雪萌等,2020);水稻含有 15 个成员 (石蕾,2013);番茄含有 10 个成员 (陈凯等,2019);本文鉴定的大豆 *GeBP* 成员更少,只有 9 个。*GeBP* 转录因子家族成员基因结构相对简单,不含有内含子的基因所占比例很高。毛竹有 13 个成员没有内含子,这 3 个有内含子的基因,有 2 个只有 1 个内含子 (单雪萌等,2020);番茄有 8 个成员没有内含子,2 个基因有内含子,其中 1 个基因只有 1 个内含子 (单雪萌等,2020);拟南芥有 16 个成员没有内含子,6 个有内含子的基因有 4 个只有 1 个内含子;大豆有 7 个成员没有内含子,剩下有内含子的 2 个基因都只有 1 个内含子。由此可见,*GeBP* 转录因子基因家族由于多数成员不含内含子,在转录时减少了出现可变剪接体的几率,基因在进化时就更加稳定和保守。

在进化关系上,本文的研究结果同其他研究类似,单-双子叶植物之间各自的进化关系最近,同时都有一个分支为双子叶植物所特有,且相同物种间的家族成员的进化关系要高于不同物种间的进化关系 (陈凯等,2019;单雪萌等,2020),这些都表明 *GeBP* 转录因子基因家族在进化上的保守性。所有报道的和本文的 *GeBP* 转录因子蛋白都有 DUF573 功能结构域 (陈凯等,2019;单雪萌等,2020),尽管该结构域的功能未知,推测该功能域应该位于转录因子的中央 DNA 结合区,可与靶基因的顺式作用元件结合调控基因的表达,但因为 DUF573 功能结构域在转录因子上的位置不同,所以在调控靶基因的表达上也存在差异。

基因的表达模式同基因的功能密切相关。总体来看,不同物种 *GeBP* 转录因子基因在各自物种不同组织和不同发育时期都有表达,很多只是表达强弱的差异 (陈凯等,2019;单雪萌等,2020),表明 *GeBP* 转录因子基因在不同组织和不同发育时期都发挥有重要作用。对毛竹 16 个 *PeGeBP*s 基因的表达研究发现,其中有 12 个 *PeGeBP*s 基因在带有表皮毛的叶、箨、箨片以及纤毛中的表达量高于无表皮毛的笋,表明它们在表皮毛的形成中应该发挥了主要功能 (单雪萌等,2020)。表皮毛在大豆植株上的分布位于叶片、茎秆、豆荚和花萼等地上部器官表面,结合 *GeBP* 转录因子基因调控表皮毛生长发育的功能,*GmGeBP7* 和 *GmGeBP6* 是研究大豆调控表皮毛生长发育的最佳候选基因。

本研究通过生物信息学的方法,从植物转录

因子数据库和大豆基因组搜寻获得 9 个 *GeBP* 转录因子基因, 随后对家族成员基因的核苷酸序列长度和氨基酸序列的基本理化性质、基因在染色体的物理定位、基因结构、系统进化树、序列对比、功能结构域分布、基因在不同组织的表达模式进行综合的预测和分析, 研究结果将为进一步深入探究大豆 *GeBP* 转录因子基因的功能机制提供理论依据和参考价值。

参考文献:

- CARLES CC, CHOFFNES-INADA D, REVILLE K, et al., 2008. ULTRAPETALA1 encodes a SAND domain putative transcriptional regulator that controls shoot and floral meristem activity in *Arabidopsis* [J]. *Development*, 132(5): 897–911.
- CHEN K, LIU JQ, SONG HH, et al., 2017. Identification, evolution and expression analysis of GeBP transcription factors family in tomato [J]. *Mol Plant Breed*, 15(9): 3438–3445. [陈凯, 刘金秋, 宋海慧, 等, 2017. 番茄 GeBP 转录因子家族的鉴定及其进化和表达分析 [J]. *分子植物育种*, 15(9): 3438–3445.]
- CHEVALIER F, PERAZZA D, LAPORTE F, et al., 2008. GeBP and GeBP-like proteins are noncanonical leucine-zipper transcription factors that regulate cytokinin response in *arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 146(3): 1142–1154.
- CURABA J, HERZOG M, VACHON G, et al., 2003. GeBP, the first member of a new gene family in *Arabidopsis*, encodes a nuclear protein with DNA-binding activity and is regulated by KNAT1 [J]. *Plant J*, 33(2): 305–317.
- CURABA J, MORITZT, BLERVAQUE R, et al., 2004. *AtGA3ox2*, a key gene responsible for bioactive gibberellin biosynthesis, is regulated during embryogenesis by LEAFY COTYLEDON2 and FUSCA3 in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 136(3): 3660–3669.
- HU B, JIN J, GUO AY, et al., 2015. GSDB 2.0: an upgraded gene feature visualization server [J]. *Bioinformatics*, 31(8): 1296–1297.
- JASINSKI S, PIAZZA P, CRAFT J, et al., 2005. KNOX action in *Arabidopsis* is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities [J]. *Curr Biol*, 15(17): 1560–1565.
- JIANG JJ, MA SH, YE NH, et al., 2017. WRKY transcription factors in plant responses to stresses [J]. *J Integr Plant Biol*, 59(2): 86–101.
- KUMAR S, STECHER G, LI M, et al., 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms [J]. *Mol Biol Evol*, 35(6): 1547–1549.
- LIU B, QIU S, HE JQ, et al., 2020. Bioinformatics analysis and expression of eight Dof transcription factors in soybean under drought stress [J]. *Soybean Sci*, 39(3): 377–383. [刘蓓, 邱爽, 何佳琦, 等, 2020. 8 个大豆 Dof 转录因子的生物信息学分析及干旱诱导表达 [J]. *大豆科学*, 39(3): 377–383.]
- NOH B, LEE SH, KIM HJ, et al., 2004. Divergent roles of a pair of homologous jumonji/zinc-finger-class transcription factor proteins in the regulation of *Arabidopsis* flowering time [J]. *Plant Cell*, 16(10): 2601–2613.
- PU L, SUO JF, XUE YB, 2003. Molecular control of plant trichome development [J]. *Acta Genet Sin*, 30(11): 1078–1084. [普莉, 索金凤, 薛勇彪, 2003. 植物表皮毛发育的分子遗传控制 [J]. *遗传学报*, 30(11): 1078–1084.]
- RAY S, DANSANA PK, GIRI J, et al., 2011. Modulation of transcription factor and metabolic pathway genes in response to water-deficit stress in rice [J]. *Funct Integr Genomics*, 11(1): 157–178.
- SARKER LS, ADAL AM, MAHMOUD SS, 2019. Diverse transcription factors control monoterpene synthase expression in lavender (*Lavandula*) [J]. *Planta*, 251(1): 1–5.
- SHAN XM, YANG KB, SHI JJ, et al., 2020. Genomewide identification and expression analysis of GeBP transcription factor gene family in moso bamboo [J]. *J Nanjing For Univ (Nat Sci Ed)*, 44(3): 41–48. [单雪萌, 杨克彬, 史晶晶, 等, 2020. 毛竹 GeBP 转录因子家族的全基因组鉴定和表达分析 [J]. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 44(3): 41–48.]
- SHI L, 2013. Preliminary functional analysis of the GeBP gene family in rice [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. [石蕾, 2013. 水稻 GeBP 家族基因的功能初探 [D]. 武汉: 华中农业大学.]
- SONG H, WANG PF, HOU L, et al., 2016. Global Analysis of WRKY genes and their response to dehydration and salt stress in soybean [J]. *Front Plant Sci*, 7: 9.
- KENICHI T, TOSHIHIRO T, SUSUMU H, et al., 2004. Three *Arabidopsis* MBF1 homologs with distinct expression profiles play roles as transcriptional co-activators [J]. *Plant Cell Physiol*, 45(2): 225–231.
- YU YC, WANG N, HU RB, et al., 2016. Genome-wide identification of soybean WRKY transcription factors in response to salt stress [J]. *Springerplus*, 5(1): 920.
- ZHAI Y, QIU S, ZHANG J, et al., 2019. Bioinformatics and expression analysis of three Dof transcription factors in soybean [J]. *Acta Agric Boreal-Sin*, 34(6): 14–19. [翟莹, 邱爽, 张军, 等, 2019. 大豆中 3 个 Dof 转录因子的生物信息学及表达分析 [J]. *华北农学报*, 34(6): 14–19.]
- ZHAI Y, ZHANG J, ZHAO Y, et al., 2016. Bioinformatics and expression analysis of 5 newfound ERF genes in soybean [J]. *Acta Agric Zhejiang*, 28(10): 1644–1649. [翟莹, 张军, 赵艳, 等, 2016. 大豆 5 个新发现 ERF 基因的生物信息学及表达分析 [J]. *浙江农业学报*, 28(10): 1644–1649.]

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202012039



段迎, 杨晓琳, 蔡苏云, 等. 苦荞 *FtF5H* 基因克隆及表达分析 [J]. 广西植物, 2022, 42(2): 304–314.

DUAN Y, YANG XL, CAI SY, et al. Cloning and expression analysis of *FtF5H* gene from tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) [J]. *Guihaia*, 2022, 42(2): 304–314.

苦荞 *FtF5H* 基因克隆及表达分析

段迎¹, 杨晓琳¹, 蔡苏云¹, 贺润丽^{1*}, 尹桂芳², 王艳青²,
卢文洁², 孙道旺², 王莉花²

(1. 山西中医药大学 中药与食品工程学院, 太原 030619; 2. 云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所/云南省农业生物技术重点实验室/农业部西南作物基因资源与种质创制重点实验室, 昆明 650201)

摘 要: 阿魏酸-5-羟化酶 (Ferulate 5-hydroxylase) 是调控 S 型木质素合成的关键酶, 为研究其在苦荞木质素生物合成途径中的分子机制, 该文从苦荞转录组数据中筛选获得一个 *F5H* 基因, 命名为 *FtF5H* (GenBank 登录号: MW455111), 采用生物信息学方法对苦荞 *F5H* 蛋白的理化性质、信号肽、跨膜结构、亚细胞定位、亲疏水性、蛋白质二级结构、蛋白质三级结构、氨基酸结构、系统进化树等进行分析和预测, 并运用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术分析 *FtF5H* 基因在厚果壳苦荞与薄果壳苦荞的叶、花、茎、果壳中的差异表达。结果表明: (1) *FtF5H* 基因序列包含 1 395 bp 的完整 cDNA 开放阅读框, 编码 464 个氨基酸。 (2) *FtF5H* 蛋白具有 P450 超家族结构, 为亲水性稳定酸性蛋白, 不具有跨膜结构域, 且为非分泌性蛋白。 (3) *FtF5H* 蛋白的二级结构主要由 α -螺旋和无规则卷曲组成, 三级结构预测显示 *FtF5H* 蛋白与 5ylw.1.A 的相似度较高。 (4) 系统进化分析显示 *FtF5H* 属于 CYP84A 亚家族。 (5) qRT-PCR 显示 *FtF5H* 基因在两种苦荞中的不同部位均有表达, 且在厚果壳苦荞果壳中的表达量是薄果壳的 5 倍, 表达具有极显著差异。该研究为进一步研究苦荞木质素合成的分子调控机制奠定了基础, 对苦荞新品种的培育具有重要意义。

关键词: 苦荞, RT-PCR 克隆, 阿魏酸-5-羟化酶, 生物信息学分析, 基因表达

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2022)02-0304-11

Cloning and expression analysis of *FtF5H* gene from tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*)

DUAN Ying¹, YANG Xiaolin¹, CAI Suyun¹, HE Runli^{1*}, YIN Guifang²,
WANG Yanqing², LU Wenjie², SUN Daowang², WANG Lihua²

(1. College of Traditional Chinese Medicine and Food Engineering, Shanxi University of Chinese Medicine, Taiyuan 030619, China; 2. Yunnan Provincial Key Laboratory of Agricultural Biotechnology/ Key Laboratory of Southwestern Crop Gene Resources and Germplasm Innovation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Biotechnology and Germplasm Resources Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650201, China)

收稿日期: 2021-03-11

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金 (31460379); 国家燕麦荞麦产业技术体系“荞麦病虫害防控”项目 (CARS-07-C-2); 山西省重点研发计划项目 (201803D221012-6); 阳泉市中药材产业专项 (SZY-YQZX-2019005) [Supported by National Natural Science Foundation of China (31460379); National Technical System of Oat and Buckwheat “Plant Diseases and Insect Pests Control of Buckwheat” (CARS-07-C-2); Key Research and Development Project of Shanxi (201803D221012-6); Special Project of Traditional Chinese Medicine Industry in Yangquan City (SZY-YQZX-2019005)]。

第一作者: 段迎 (1996-), 硕士研究生, 主要研究方向为中药资源开发与利用, (E-mail) 18434376630@163.com。

通信作者: 贺润丽, 博士, 教授, 主要研究方向为中药资源开发与利用, (E-mail) herunli666@163.com。

Abstract: Ferulate 5-hydroxylase is a key enzyme that regulates the synthesis of S-type lignin. To study the molecular mechanism of ferulate 5-hydroxylase in lignin synthesis pathway of *Fagopyrum tataricum*, a *FtF5H* (GenBank accession number: MW455111) gene identified from *F. tataricum* RNA-seq data was screened and analyzed by bioinformatics methods including the physicochemical properties, signal peptide, transmembrane structure, subcellular localization, hydrophilicity, protein secondary structure and tertiary structure, amino acid structure, as well as phylogenetic tree. In addition, the real-time quantitative PCR (qRT-PCR) was applied to analyze the expression pattern of *FtF5H* gene in leaves, flowers, stems and husks of thick husk tartary buckwheat and thin husk tartary buckwheat. The results were as follows: (1) *FtF5H* gene sequence included completed open reading frame with 1 395 bp, coding for 464 amino acids. (2) The *FtF5H* protein was predicted to have P450 superfamily structure, and *FtF5H* protein, a non-secretory protein, was a hydrophilic, stable and acidic protein without transmembrane domain. (3) The *FtF5H* protein secondary structure was predicted to be mainly composed of α -helix and random coil, and its prediction of tertiary structure showed a high similarity with 5ylw.1.A. (4) Phylogenetic analysis showed that *FtF5H* belonged to the CYP84A subfamily. (5) In addition, qRT-PCR showed that the *FtF5H* gene was expressed in different parts of the two kinds of tartary buckwheat, and the expression level in the thick husk tartary buckwheat was four times higher than that in the thin husk, with extremely significant differences. The research establish a foundation for further study on the molecular regulation mechanism of lignin synthesis in tartary buckwheat, and has important research significance for the cultivation of new tartary buckwheat varieties.

Key words: tartary buckwheat, RT-PCR cloning, ferulate 5-hydroxylase, bioinformatics analysis, gene expression

苦荞 (*Fagopyrum tataricum*) 为药食两用作物, 性味苦、平、寒, 具益气力、续精神、利耳目、降气、宽肠健胃等作用, 被誉为“五谷之王”“三降食品”(朱云辉和郭元新, 2014)。栽培苦荞通常果壳较厚, 壳比率为 20%~30%, 果壳坚韧, 脱壳率从 2% 到 6% 不等 (Song et al., 2019), 难以脱壳生产整粒苦荞米, 不易制得高芦丁含量麸皮层全营养苦荞米, 一定程度上降低了苦荞的活性物质与营养功效 (陈庆富等, 2015); 在苦荞种子直接磨粉加工中会有少量壳粉混入, 导致适口性下降, 也限制了苦荞产品的精深加工, 严重影响苦荞产业的发展。‘小米荞’是我国云南、贵州等地的一种易脱壳地方品种, 脱壳率最高达 93% (Song et al., 2019), 作为一种特殊资源, ‘小米荞’对研究苦荞薄果壳特性的遗传规律、功能基因、品种培育及加工生产等方面均具有重要的理论和现实意义。

F5H 属于细胞色素 P450 的单氧化物酶 (Meyer et al., 1998), Meyer 等人于 1996 年第一次从香枫中分离得到, 是 CYP84 家族成员, 具有重要的生物学功能, 该基因能催化阿魏酸、松柏醇、松柏醛生成 5-羟基阿魏酸、5-羟基松柏醇和 5-羟基松柏醛, 是调控 S 型木质素合成的关键酶 (Humphreys & Chapple, 2002)。目前, 已经从拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) (Franke et al., 2000)、当归 (*Angelica sinensis*) (温随超, 2015)、毛白杨 (*Populus tomentosa*) (陈雪等,

2015)、亚麻 (*Linum usitatissimum*) (王进, 2009)、油菜 (*Brassica campestris*) (李扬等, 2013) 等植物中克隆到 *F5H* 基因, 但尚未发现 *F5H* 基因在苦荞中被克隆的相关报道。

吴朝昕 (2020) 对厚果壳和薄果壳苦荞的果壳成分研究发现, 不同品种厚果壳苦荞的果壳木质素平均含量均高于薄果壳苦荞。课题组前期在‘云荞 1 号’和‘小米荞’杂交 F_2 代群体中, 对厚果壳和薄果壳进行转录组测序比较分析 (数据未发表), 发现木质素生物合成途径大部分基因在苦荞厚果壳的表达量高于薄果壳, 推测苦荞果壳厚可能由于积累了较多的木质素。转录组测序表明 *F5H* 基因在厚果壳的表达量显著高于薄果壳。为研究 *F5H* 基因在苦荞木质素合成中的作用, 本研究采用 RT-PCR 法克隆‘云荞 1 号’和‘小米荞’的 *FtF5H* 基因, 对其进行生物信息学分析、实时荧光定量 PCR 验证, 为进一步研究该基因功能提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

苦荞厚果壳材料‘云荞 1 号’为云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所选育品种, 薄果壳材料‘小米荞’为云南省地方品种。剥离‘云荞

1号’和‘小米荞’不同发育期的果壳,将剥离的果壳分别混合在一起作为基因克隆的材料;实时荧光定量PCR分析用‘云荞1号’、‘小米荞’不同组织部位材料(结实期的叶、花、茎、果壳)。

1.2 RNA 提取与 cDNA 第一链合成

根据 Trizol 提取试剂盒说明进行总 RNA 提取,1.5%琼脂糖凝胶电泳检测所有样品 RNA 的完整性。cDNA 第一链合成:在 0.2 mL PCR 管中加入 5 μ L 总 RNA、1 μ L 随机引物、1 μ L ddH₂O,70 $^{\circ}$ C 温浴 5 min,冰浴 2 min,离心加入 2.0 μ L 5 $\times$ First-Strand Buffer、0.5 μ L 10 mmol $\cdot$ L⁻¹ dNTP、0.25 μ L Rnase inhibitor、0.25 μ L Reverse Transcriptase,总体积 10.0 μ L,42 $^{\circ}$ C 温浴 60 min,72 $^{\circ}$ C 温浴 10 min。

1.3 FtF5H 基因克隆

根据转录组测序获得的阿魏酸-5-羟基化酶(*FtF5H*)基因的核苷酸序列设计 4 条特异引物(表 1)。RT-PCR 反应体系如下:cDNA 模板 1 μ L、dNTPs(10 mmol $\cdot$ L⁻¹) 0.2 μ L、2 $\times$ GC Buffer I 12.5 μ L、TaqDNA 聚合酶(5 U $\cdot$ μ L⁻¹) 0.2 μ L、ddH₂O 10.1 μ L、F(10 μ mol $\cdot$ L⁻¹) 0.5 μ L、R (10 μ mol $\cdot$ L⁻¹) 0.5 μ L。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,58 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s,共循环 33 次;72 $^{\circ}$ C 修复延伸 7 min。PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测,把目的条带切胶回收,送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

表 1 引物序列及用途

Table 1 Sequence and usage of primers

用途 Usage	引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
RT-PCR	FtF5H-119F	TTCTTAGCCACGGCGGTCT
	FtF5H-1494R	GGTAACTCCCACGTGAAGCATTG
	FtF5H-1298F	AAGGACTCGTGGGATGACCTT
	FtF5H-1882R	ACATTGCATGCTTGATTGCAGTATA
实时荧光 定量 PCR qRT-PCR	H3-F	AAGAAGTCCCACAGATACCGC
	H3-R	AGCCTCCTGAAGAGCTAGCAC
	FtF5H-F	TCGGTTCGTGATGAGGTGG
	FtF5H-R	CCCGGTAGATTACGTTCTTTGT

1.4 克隆基因的生物信息学分析

利用 NCBI ORF finder 在线程序及 Conserved

domains 数据库对测序获得的 cDNA 序列进行开放阅读框及保守功能结构域分析;通过 ProtParam 对蛋白理化性质进行分析;利用 ProtScale 对蛋白亲疏水性进行分析;采用 TMHMM Server v.2.0 分析编码氨基酸的跨膜结构域;利用 SignalP 5.0 Server 预测信号肽;利用 NetPhos 3.1 Server 进行磷酸化位点预测;利用 Psort 分析亚细胞定位情况;通过 SOPMA 及 SWISS-MODEL 预测蛋白的二级和三级结构;编码蛋白多重序列比对采用 DNAMAN 软件;Neighbor-joining 系统进化树用 MEGA 6.0 构建(陈媿颖等,2017)。

1.5 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析

采用 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒分别提取‘云荞1号’和‘小米荞’叶、花、茎、果壳 8 个组织的总 RNA,反转录得到第一链 cDNA,以其为模板进行 qRT-PCR 分析,每个样品设 3 次技术重复。实时荧光定量 PCR 反应体系:10 μ L 2 $\times$ SG Fast qPCR Master Mix、2 μ L cDNA 模板、上下引物各 0.4 μ L、ddH₂O 7.2 μ L。扩增程序:95 $^{\circ}$ C 3 min,95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,循环 45 次。以苦荞 H3(JF769134.1)为内参基因,采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算 *FtF5H* 的相对表达量,反应所用引物见表 1。

2 结果与分析

2.1 苦荞总 RNA 提取与 FtF5H 基因克隆

提取的总 RNA 经 1.5%琼脂糖凝胶电泳,在紫外透射光下观察 RNA 条带清晰可见,亮度比在 1:1~2:1 之间,表明 RNA 基本未降解,可用于后续基因克隆。利用 RT-PCR 分别克隆获得‘云荞1号’和‘小米荞’的 *F5H* 基因,产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳分析,电泳结果见图 1。对 qRT-PCR 产物进行测序拼接,结果发现‘云荞1号’和‘小米荞’的 *F5H* 基因核酸序列完全一致,且与转录组测序序列相同。ORF finder 分析结果表明,2 条基因序列均含有一个完整的长度为 1 395 bp 的开放阅读框,编码 464 个氨基酸,将该基因命名为 *FtF5H* (GenBank 登录号:MW455111)。利用 DNAMAN 将核苷酸序列翻译成氨基酸,如图 2 所示。

2.2 FtF5H 基因编码蛋白的生物信息学分析

2.2.1 理化性质分析 利用 ProtParam 软件对 FtF5H 蛋白理化性质进行预测,发现 FtF5H 蛋白分子式为 C₂₃₄₆H₃₆₇₇N₆₃₇O₆₈₀S₂₈,理论分子量 52 583.54

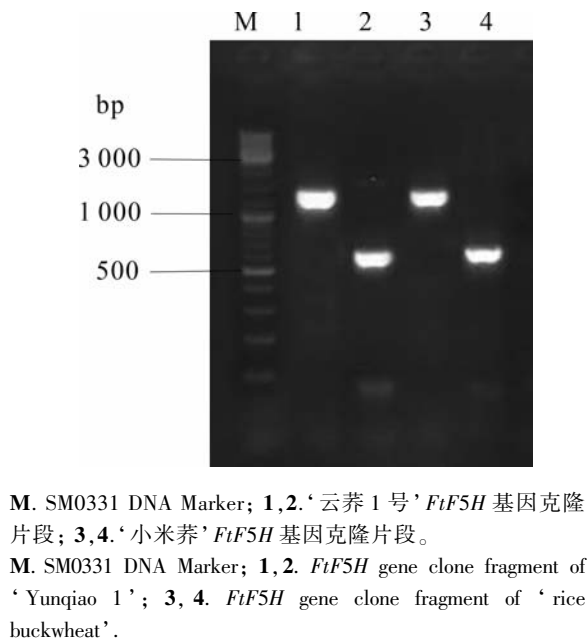


图 1 *FtF5H* 克隆片段的 PCR 电泳图

Fig. 1 Electrophoresis results of *FtF5H* fragments

Da, 亲水性平均系数 (GRAVY) 为 -0.234, 不稳定系数 (II) 为 36.57, 为稳定蛋白, 脂溶指数为 82.65, 负电荷残基 (Asp+Glu) 63 个, 正电荷残基 (Arg+Lys) 56 个, 理论等电点 5.76, 偏酸性, 推测该蛋白为亲水性稳定酸性蛋白。通过 Conserved domains 数据库对 FtF5H 保守结构域进行分析, 发现该蛋白有一个 P450 保守域, 属于 P450 超家族 (图 3)。

通过 ProtScale 在线软件, 以 Hphob./Kyte & Dodittle 为标度, 对苦荞 FtF5H 蛋白质进行了分析, 以氨基酸序列为横坐标, 氨基酸标度为纵坐标, 亲水性越强, 则分值越小。FtF5H 最高分值 1.967 出现在多肽链中的第 256 位氨基酸, 该位点的氨基酸疏水性最强; 最低分值 -2.856 出现在 362 位氨基酸, 证明该位点的氨基酸亲水性最强。NetPhos 3.1 Server 预测显示, FtF5H 整条多肽链中分值在阈值 0.5 以上的氨基酸位点共有 36 个, 其中丝氨酸 (Ser) 22 个, 苏氨酸 (Thr) 13 个, 酪氨酸 (Tyr) 1 个。这些位点可能发生磷酸化反应, 从而对蛋白的活性与功能产生调控作用。

通过 SignalP 5.0 Server 在线软件对苦荞、芭蕾苹果 (XP 008372753.2)、白梨 (AGR44939.1)、喜树 (AAT39511.1)、稻 (BAF43423.1)、桃 (XP 007203643.1)、柳枝稷 (AFH89638.1)、欧洲甜樱

桃 (XP 021802881.1)、藜麦 (XP 021718110.1) 及大叶藻 (KMZ63113.1) 10 种植物的 *F5H* 基因的蛋白质信号肽进行预测比对, 结果均不存在信号肽, 为非分泌性蛋白 (表 2)。因此, 推测 *F5H* 基因可能在游离核糖体上合成后不经蛋白转运, 直接在细胞质基质的特定部位中行使催化功能 (张太奎等, 2013)。利用 Psort 对该 10 种植物 F5H 蛋白进行亚细胞定位预测, 发现除柳枝稷定位在细胞骨架外, 其余均在叶绿体。基于 *F5H* 基因编码蛋白的信号肽和亚细胞定位进行 SPSS 聚类分析, 结果见图 4, 双子叶陆生植物桃、欧洲甜樱桃、芭蕾苹果、白梨、苦荞、喜树、藜麦聚为一支, 稻、大叶藻聚为一支, 柳枝稷单独为一支, 推测与 *F5H* 的作用机制有关。

TMHMM 软件预测显示, 苦荞、柳枝稷、大叶藻不具有跨膜结构域。芭蕾苹果、白梨、喜树、稻、桃、欧洲甜樱桃、藜麦均各含有 1 个跨膜结构域, 说明植物种类不同, 其 *F5H* 基因编码蛋白质的跨膜区域存在情况不同。

2.2.2 FtF5H 的结构预测 通过 SOPMA 对蛋白质的二级结构进行在线预测, 发现 FtF5H 含有丰富的二级结构, 无规则卷曲占 36.21%, α -螺旋占 46.12%, 延伸链占 12.28%, β -转角占 5.39% (图 5)。利用 SWISS-MODEL 对蛋白质的三级结构进行预测, 结果见图 6:A。FtF5H 蛋白第 5 位~455 位氨基酸与数据库目标蛋白 5ylw.1.A 的序列相似度为 33.49%。QMEAN 值是 -2.83。GMQE (global model quality estimation, 全球性模型质量估测) 值为 0.71, GMQE 值在 0~1 之间, 越接近 1, 建模质量越好, 表明建模可信度高。结合芭蕾苹果 (XP 008372753.2)、白梨 (AGR44939.1)、新疆梨 (QHS84908.1)、喜树 (AAT39511.1)、葡萄 (XP 002272644.1)、桃 (XP 007203643.1)、扁桃 (BBH07995.1)、紫苜蓿 (ABB02161.1)、欧洲甜樱桃 (XP 021802881.1) 的蛋白质三维结构骨架进行分析, 发现该基因编码的蛋白质具有典型的结构域, 即含铁原卟啉功能域 (图 6:B) 和锰离子功能域 (图 6:C) (张太奎等, 2015)。

2.2.3 氨基酸结构分析及系统进化树构建 采用 NCBI 的 BlastP 在线程序, 查找 FtF5H 的同源氨基酸序列, 比对结果表明 FtF5H 氨基酸序列与 GenBank 中相关序列同源性在 73.12%~77.42% 之间。利用 DNAMAN 进行多重序列比对, 发现苦荞

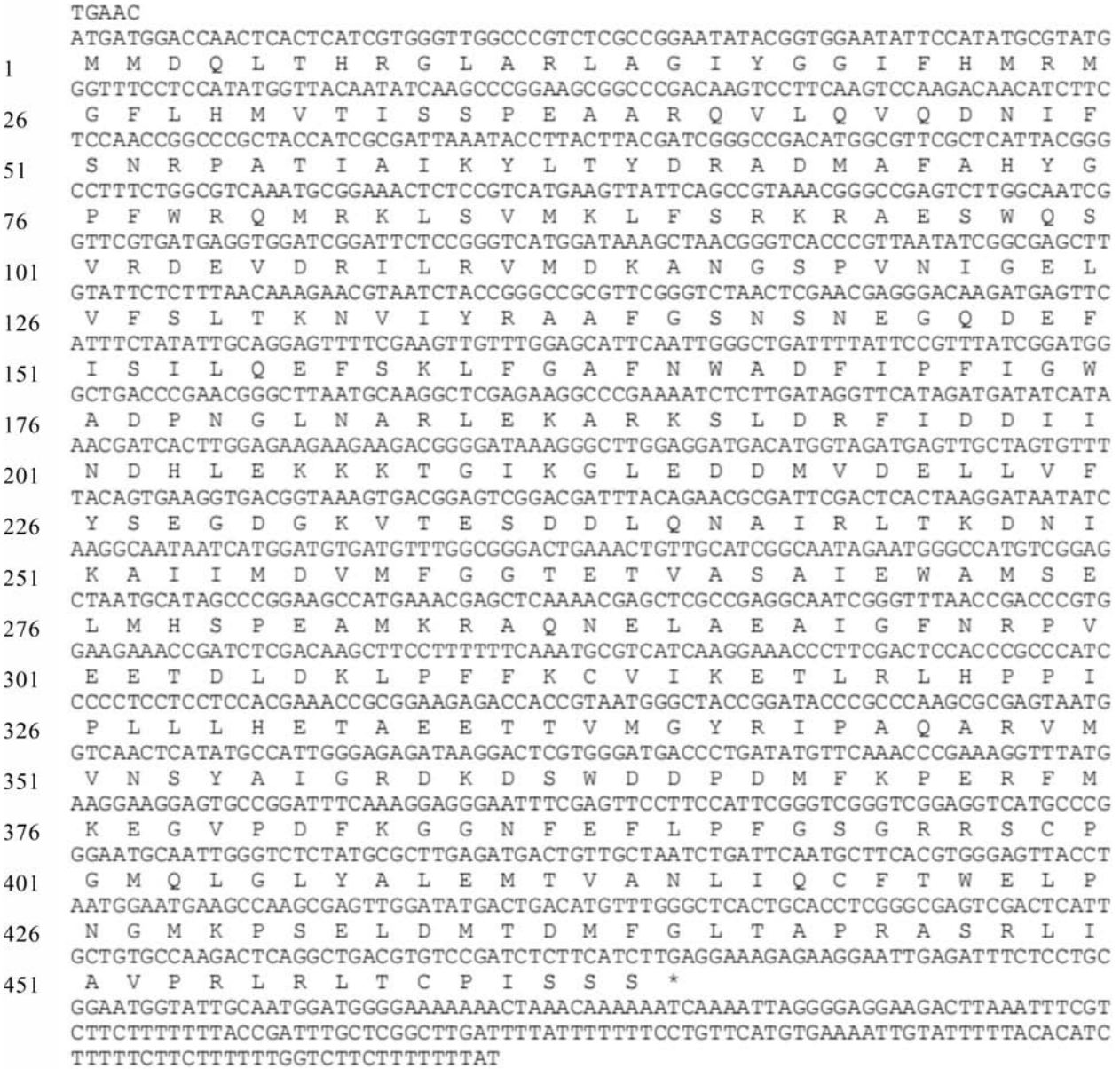


图 2 *FtF5H* 核苷酸序列及氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide sequence and amino acid sequence of *FtF5H*

FtF5H 与参与比对植物的 *F5H* 氨基酸序列的相似性高达 84.79%，含有血红素结合结构域 FxxGxxxCxG(图 7)，其中保守的半胱氨酸充当血红素铁的第五个配体(Chapple, 1998)，证明 *FtF5H* 属于 P450 家族。

运用 MEGA 6.0 软件并采用邻接法构建系统进化树，结果显示苦荞 *FtF5H* 与藜麦的 *CYP84A1* 聚为一小簇，说明其同源性最高，相关研究报道拟南芥阿魏酸-5-羟化酶 *AtCYP84A1* 的表达与木质素

生物合成的定量以及发育调控有关(Ruegger et al., 1999)，本研究克隆得到的苦荞 *FtF5H* 与拟南芥及其他植物的 *CYP84A1* 聚在一支(图 8)，说明其可能与苦荞木质素合成及调控有关(Zhang et al., 2019)。

2.2.4 *FtF5H* 基因相对定量分析 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)分析 *FtF5H* 基因在厚果壳与薄果壳苦荞不同器官的表达水平，结果发现 *FtF5H* 基因在苦荞不同器官的表达量不同，在厚果壳‘云荞

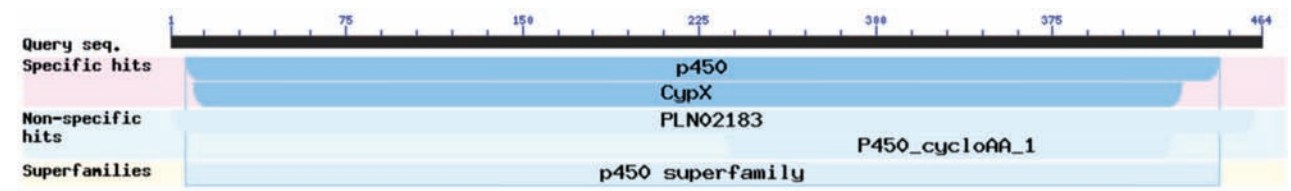


图 3 FtF5H 蛋白保守结构域分析

Fig. 3 Analysis of the conserved domains of FtF5H protein

表 2 10 种植物 *F5H* 基因编码蛋白质信号肽的对比分析

Table 2 Signal peptide prediction for proteins encoded by *F5H* of 10 plants

物种 Species	氨基酸最高 原始剪切位点 Highest original cleavage site of amino acid		最高信号肽 剪切位点 Highest signal peptide cleavage site		最高综合 剪切位点 Highest comprehensive splicing site		氨基酸残基的 平均信号肽 Average signal peptide of amino acid residues		信号肽 Signal peptide
	位点 Site	得分 Score	位点 Site	得分 Score	位点 Site	得分 Score	位点 Site	得分 Score	
苦荞 <i>Fagopyrum tataricum</i>	31	0.113	40	0.151	33	0.385	1~39	0.200	无 No
芭蕾苹果 <i>Malus domestica</i>	33	0.153	33	0.202	9	0.548	1~32	0.268	无 No
白梨 <i>Pyrus × bretschneideri</i>	33	0.134	14	0.163	9	0.511	1~13	0.268	无 No
喜树 <i>Camptotheca acuminata</i>	38	0.152	38	0.183	32	0.402	1~37	0.221	无 No
稻 <i>Oryza sativa</i>	28	0.360	4	0.256	1	0.631	1~3	0.611	无 No
桃 <i>Prunus persica</i>	32	0.157	11	0.169	8	0.439	1~10	0.308	无 No
柳枝稷 <i>Panicum virgatum</i>	56	0.142	56	0.119	54	0.132	1~55	0.098	无 No
欧洲甜樱桃 <i>Prunus avium</i>	32	0.157	11	0.163	8	0.415	1~10	0.295	无 No
藜麦 <i>Chenopodium quinoa</i>	34	0.133	18	0.144	10	0.307	1~17	0.185	无 No
大叶藻 <i>Zostera marina</i>	22	0.192	2	0.247	1	0.598	1~1	0.598	无 No

1 号’中的相对表达量由小到大依次为叶、花、茎、果壳,而在薄果壳‘小米荞’中则是茎、果壳、花、叶。同一器官相比,除叶外,*FtF5H* 在厚果壳‘云荞 1 号’各个部位的表达量均高于薄果壳‘小米荞’,且差异极显著(图 9)。*FtF5H* 在苦荞厚果壳中的表达量是薄果壳的 5 倍,与前期转录组实验结果基本一致。

3 讨论与结论

苦荞作为自然界中少见的药食两用作物,具有极高的药用价值及营养功效。如何将薄果壳性状

转入栽培品种,育成既易脱壳又高产优质的苦荞新品种成为研究热点。Song 等(2019)对厚壳苦荞和薄壳苦荞纤维素和木质素含量变化与脱皮效率之间关系进行研究,结果表明随着脱壳效率的降低(厚壳),木质素含量减少,纤维素含量增加;吴朝昕(2020)发现薄壳苦荞果壳纤维素和木质素含量显著低于厚壳苦荞,二者研究结果不同。本课题组通过转录组测序发现木质素生物合成途径大部分基因在苦荞薄果壳表达量低于厚果壳。为了进一步探究苦荞薄果壳形成的分子机制,本研究克隆了薄果壳和厚果壳的 *F5H* 基因,序列比对发现二者序列完全一致,且与转录组测序结果一致。

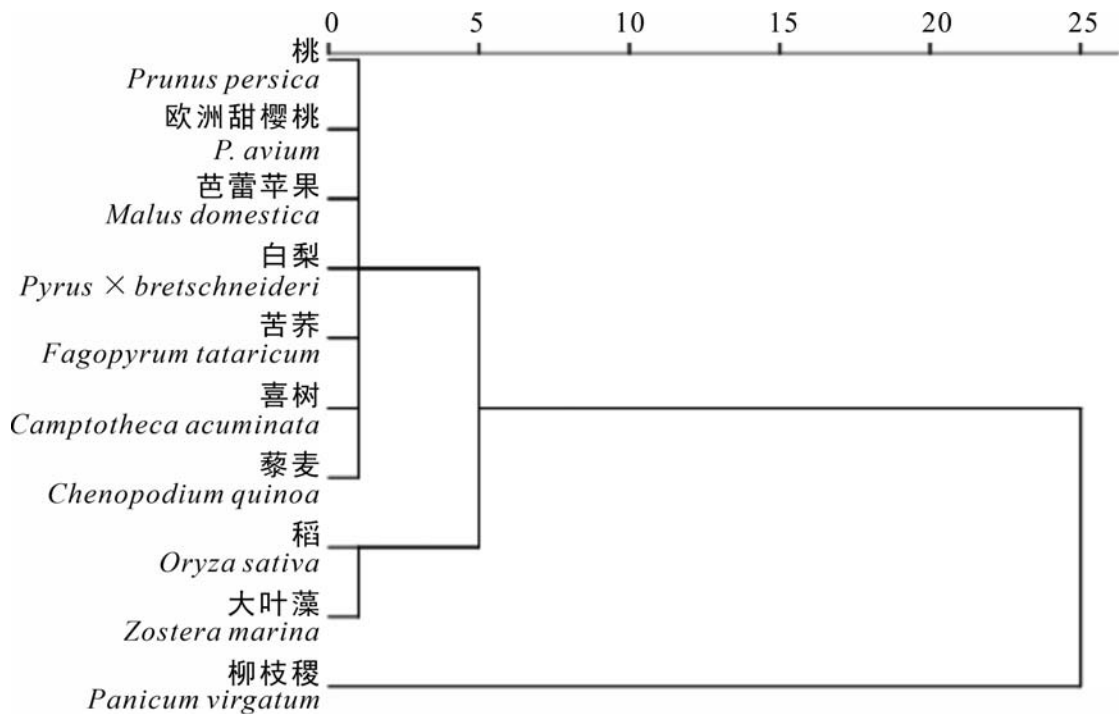


图 4 基于 F5H 编码蛋白质的信号肽及亚细胞定位的 10 种植物聚类分析图
Fig. 4 A cluster diagram of 10 species of plants based on signal peptide and subcellular localization predicted on proteins encoded by F5H

F5H 是调控植物木质素合成的关键酶基因,在木质素形成过程中起重要作用,通过生物信息学分析,发现克隆的苦荞 *F5H* 蛋白有一个 P450 保守域,属于 P450 超家族,与石榴(冯立娟等,2018)、尾叶桉(肖玉菲等,2018)、毛白杨(王轶男等,2014)中的研究结果一致。苦荞 *F5H* 蛋白有数量不同的丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸 3 个磷酸化位点,与石榴(冯立娟等,2018)中的研究结果一致。*F5H* 磷酸化后可以改变蛋白质活性,从而调节苦荞的生长发育过程。多重序列比对发现苦荞 *FtF5H* 与其他植物 *F5H* 氨基酸序列的相似性高达 84.79%,证明该基因比较保守。系统进化分析结果表明,苦荞 *FtF5H* 基因与藜麦亲缘关系最近,且与其他双子叶植物的 *F5H* 基因亲缘较近,而与单子叶植物水稻、柳枝稷、稷、黄藤的亲缘关系较远,表明该基因在双子叶及单子叶植物纲之间同源性差异较大。

Shafrin 等(2015)下调黄麻的 *F5H* 基因,发现与非转基因植物相比,整个茎中酸不溶性木质素含量降低约 25%,纤维木质素降低 12%~15%。肖玉菲等(2018)在对尾叶桉的研究中发现,*EuF5H* 在半木质化茎中表达量最高,在嫩茎中最低。甘

蓝型油菜植株根、根茎和茎中木质素含量高低与抗倒能力成正相关,且 *F5H* 基因在抗倒伏油菜薹期根部、茎部以及开花期根部表达量明显高于易倒伏材料(李尧臣和戚存扣,2011)。本研究 *FtF5H* 基因在厚果壳‘云荞 1 号’茎、花、果壳的表达量均高于薄果壳‘小米荞’,各器官之间的表达有极显著差异,且 *FtF5H* 在厚果壳中的表达量是薄果壳的 5 倍,推测 *FtF5H* 基因在薄果壳苦荞低表达与薄果壳的木质素合成和积累少有关。

Takeda 等(2017)对水稻的研究发现,*OsF5H1* 表达是控制水稻细胞壁中 S/G 木质素组成的主要因素。徐超等(2015)对砀山酥梨果实 *F5H* 基因的研究发现 *PbF5H* 参与调控梨果实 S 木质素单体的合成,影响木质素 G/S 比值。Tetreault 等(2020)的研究发现,高粱 *F5H*(*SbF5H*)的过表达增加了 S-木质素含量。木质素合成有着复杂的代谢网络,多个基因共同调控它的代谢。*F5H* 基因作为一个多基因家族,并非所有 *F5H* 基因均在 G/S 的转化中发挥作用。因此,本研究获得的 *FtF5H* 基因在薄果壳苦荞木质素生物合成途径的功能仍需进一步研究。

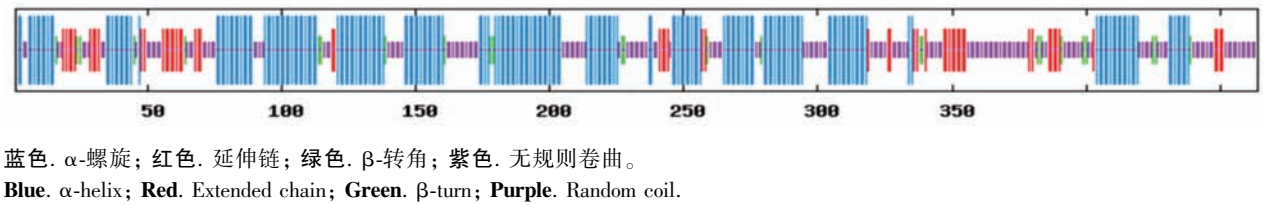
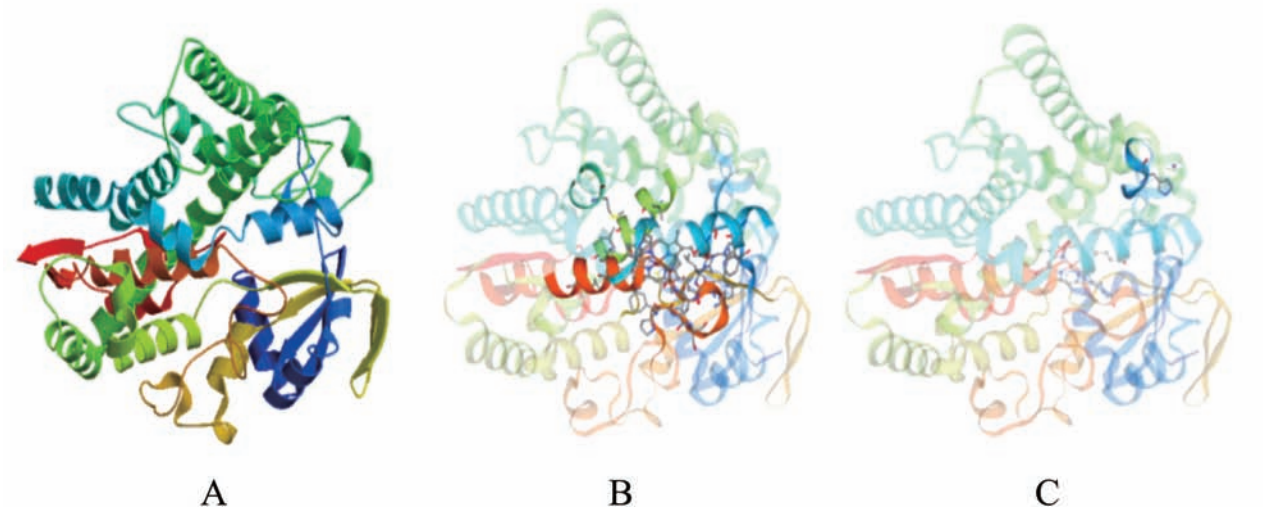


图 5 *FtF5H* 蛋白质二级结构预测
Fig. 5 Prediction of the secondary structure of *FtF5H* protein



A. *FtF5H* 蛋白三级结构; B. 含铁原卟啉功能域; C. 锰离子功能域。
A. Tertiary structure of *FtF5H*; B. Functional domain of protoporphyrin containing iron; C. Functional domain of manganese (II) ion.

图 6 *F5H* 基因编码蛋白质三级结构及苦荞 *FtF5H* 蛋白质三级结构预测
Fig. 6 Prediction of tertiary structure of protein encoded by *F5H* gene and tertiary structure prediction of *FtF5H* protein

参考文献：

CHAPPLE C, 1998. Molecular-genetic analysis of plant cytochrome P450-dependent monooxygenases [J]. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 49(1): 311-343.

CHEN QF, CHEN QJ, SHI TX, et al., 2015. Inheritance of tartary buckwheat thick shell character and its relationships with yield factors [J]. *Crops*, 2: 27-31. [陈庆富, 陈其皎, 石桃雄, 等, 2015. 苦荞厚果壳性状的遗传及其与产量因素的相关性研究 [J]. *作物杂志*, 2: 27-31.]

CHEN X, CHEN XM, GAI Y, 2015. Lignin biosynthesis in tobacco with regulated expression of poplar ferulate 5-hydroxylase [J]. *Guangdong Agric Sci*, 42(11): 42-47. [陈雪, 陈雪梅, 盖颖, 2015. 毛白杨阿魏酸-5-羟化酶对烟草木质素的影响 [J]. *广东农业科学*, 42(11): 42-47.]

CHEN TY, LIU J, YUAN Y, et al., 2017. Bioinformatics analysis and expressed level of Auxin response factor genes in *Scutellaria baicalensis* [J]. *Acta Pharm Sin*, 52(11): 1770-1776. [陈媿颖, 刘娟, 袁媛, 等, 2017. 黄芩 ARF 基因家族生物信息学及表达分析 [J]. *药学学报*, 52(11): 1770-1776.]

FRANKE R, MCMICHA CM, MEYER K, et al., 2000. Modified lignin in tobacco and poplar plants over-expressing the *Arabidopsis* gene encoding ferulate 5-hydroxylase [J]. *Plant J*, 22(3): 223-234.

FENG LJ, YIN YL, YANG XM, et al., 2018. Identification and Bioinformatics Analysis of *F5H* Gene Family in Pomegranate [C]//Pomegranate Branch of the Chinese Horticultural Society. Progress in Research on Pomegranate in China (3)—The 3rd Representative Conference of the Pomegranate Branch of the Chinese Horticultural Society and the First China Sihong Soft Seed Pomegranate Summit Forum, Proceedings of the National Pomegranate Industry Technology Innovation Alliance Preparatory Meeting. Sihong: Chinese Horticultural Society: 9. [冯立娟, 尹燕雷, 杨雪梅, 等,

芭蕾苹果 <i>Malus domestica</i>	MDYLLQSLQPLQSMTPLLLIIFLLFLPIFRFR.....RFFPYFPFGKGLFLIGNLMDCHTHRGLAKIAKYGGIFHIRMGLH	82
白梨 <i>Pyrus × bretschneideri</i>	MDSLLQSLQPLKSMTPLVFIIFLLFLPIFRFR.....RLFFPYFPFGKGLFLIGNLMDCHTHRGLAKIAKYGGIFHIRMGLH	82
新疆梨 <i>P. sinkiangensis</i>	MDSLLQSLQPLKSMTPLLLIIFLLFLPIFRFR.....RFFPYFPFGKGLFLIGNLMDCHTHRGLAKIAKYGGIFHIRMGLH	82
喜树 <i>Camptotheca acuminata</i>	MEMDALRCVLHPMTAL...FFIAPLFFIF...ILSRLL...RKLFFPYFPFGNGLFLVGNMMDCHTHRGLAKIAKYGGIFHIRMGLH	81
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	MDSIMEGLQPLQMTL...LFIIFLLILLGLVSRLL...RRFFPYFPFGKGLFLIGSNLMDCHTHRGLAKIAKYGGIFHIRMGLH	80
桃 <i>Prunus persica</i>	MDSLLQSLQPLQPMT...LFFIIFFLFLSGLVLYLSRRRSFYPPFGTGLFIIGNLMDCHTHRGLAKIAKYGGIFHIRMGLH	83
扁桃 <i>P. dulcis</i>	MHTTENYSTHFKNTSMHSDLLQALQPLQPMT...FFIIFFLFLSGLVLYLSRRRSFYPPFGTGLFIIGNLMDCHTHRGLAKIAKYGGIFHIRMGLH	99
紫苜蓿 <i>Medicago sativa</i>	MDSLLKFFIMVNLKEEFLMAVMVFLITLLGLMSRII...RRFFPYFPFGKGLFIIGNLMDCHTHRGLAKIAKYGGIFHIRMGLH	87
欧洲甜樱桃 <i>Prunus avium</i>	MDSLLQSLQPLQPMT...LFFIIFFLFLSGLVLYLSRRRSFYPPFGTGLFIIGNLMDCHTHRGLAKIAKYGGIFHIRMGLH	83
FtF5H	MDSLLQSLQPLQPMT...LFFIIFFLFLSGLVLYLSRRRSFYPPFGTGLFIIGNLMDCHTHRGLAKIAKYGGIFHIRMGLH	29
	mdq thr gla a yggifh irmg lh	
芭蕾苹果 <i>Malus domestica</i>	MVAISNFIARQVLQVDNIFSNRPATIAISYLTIDRADMAFAFYGGFWQRMKRLVVKLFSSRKAESWESVRDEVISVAVRTIVHVGSVNVIGELVPSL	182
白梨 <i>Pyrus × bretschneideri</i>	MVAISNFIARQVLQVDNIFSNRPATIAISYLTIDRADMAFAFYGGFWQRMKRLVVKLFSSRKAESWESVRDEVISVAVRTIVHVGSVNVIGELVPSL	182
新疆梨 <i>P. sinkiangensis</i>	MVAISNFIARQVLQVDNIFSNRPATIAISYLTIDRADMAFAFYGGFWQRMKRLVVKLFSSRKAESWESVRDEVISVAVRTIVHVGSVNVIGELVPSL	182
喜树 <i>Camptotheca acuminata</i>	MVAISNFIARQVLQVDNIFSNRPATIAISYLTIDRADMAFAFYGGFWQRMKRLVVKLFSSRKAESWESVRDEVISVAVRTIVHVGSVNVIGELVPSL	181
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	MVGISSEFIARQVLQVDNIFSNRPATIAISYLTIDRADMAFAFYGGFWQRMKRLVVKLFSSRKAESWESVRDEVISVAVRTIVHVGSVNVIGELVPSL	180
桃 <i>Prunus persica</i>	MVGISNFIARQVLQVDNIFSNRPATIAISYLTIDRADMAFAFYGGFWQRMKRLVVKLFSSRKAESWESVRDEVISVAVRTIVHVGSVNVIGELVPSL	183
扁桃 <i>P. dulcis</i>	MVGISNFIARQVLQVDNIFSNRPATIAISYLTIDRADMAFAFYGGFWQRMKRLVVKLFSSRKAESWESVRDEVISVAVRTIVHVGSVNVIGELVPSL	199
紫苜蓿 <i>Medicago sativa</i>	MVAISNFIARQVLQVDNIFSNRPATIAISYLTIDRADMAFAFYGGFWQRMKRLVVKLFSSRKAESWESVRDEVISVAVRTIVHVGSVNVIGELVPSL	187
欧洲甜樱桃 <i>Prunus avium</i>	MVGISNFIARQVLQVDNIFSNRPATIAISYLTIDRADMAFAFYGGFWQRMKRLVVKLFSSRKAESWESVRDEVISVAVRTIVHVGSVNVIGELVPSL	183
FtF5H	MVAISNFIARQVLQVDNIFSNRPATIAISYLTIDRADMAFAFYGGFWQRMKRLVVKLFSSRKAESWESVRDEVISVAVRTIVHVGSVNVIGELVPSL	129
	m s arqlvqvdnifsnrpat ai yltidradmafa yggfwqrmkl vmklfsrk aesw vr ev z g vnigelvf l	
芭蕾苹果 <i>Malus domestica</i>	TKNNIYRAAFGTSCEGQDEFIILQEFESKLFAGFNIDFHSGLGWDFGGLNRIARARSLERFIDIIIDHMERKKN...GKGVSDGETDMVDLILF	280
白梨 <i>Pyrus × bretschneideri</i>	TKNNIYRAAFGTSCEGQDEFIILQEFESKLFAGFNIDFHSGLGWDFGGLNRIARARSLERFIDIIIDHMERKKN...NKGKLVSDGETDMVDLILF	280
新疆梨 <i>P. sinkiangensis</i>	TKNNIYRAAFGTSCEGQDEFIILQEFESKLFAGFNIDFHSGLGWDFGGLNRIARARSLERFIDIIIDHMERKKN...GKGVSDGETDMVDLILF	280
喜树 <i>Camptotheca acuminata</i>	TRDIIYRAAFGTSCEGQDEFIILQEFESKLFAGFNIDFHSGLGWDFGGLNRIARARSLERFIDIIIDHMERKKN...RNVVD.SDGGMVDLILF	278
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	TKNNIYRAAFGTSCEGQDEFIILQEFESKLFAGFNIDFHSGLGWDFGGLNRIARARSLERFIDIIIDHMERKKN...NNDSDVDLILF	278
桃 <i>Prunus persica</i>	TKNNIYRAAFGTSCEGQDEFIILQEFESKLFAGFNIDFHSGLGWDFGGLNRIARARSLERFIDIIIDHMERKKN...SEGNGGETDMVDLILF	283
扁桃 <i>P. dulcis</i>	TKNNIYRAAFGTSCEGQDEFIILQEFESKLFAGFNIDFHSGLGWDFGGLNRIARARSLERFIDIIIDHMERKKN...SEGNGGETDMVDLILF	297
紫苜蓿 <i>Medicago sativa</i>	TKNNIYRAAFGTSCEGQDEFIILQEFESKLFAGFNIDFHSGLGWDFGGLNRIARARSLERFIDIIIDHMERKKN...VVDEEDDMVDLILF	282
欧洲甜樱桃 <i>Prunus avium</i>	TKNNIYRAAFGTSCEGQDEFIILQEFESKLFAGFNIDFHSGLGWDFGGLNRIARARSLERFIDIIIDHMERKKN...SEGNGGETDMVDLILF	281
FtF5H	TKNNIYRAAFGTSCEGQDEFIILQEFESKLFAGFNIDFHSGLGWDFGGLNRIARARSLERFIDIIIDHMERKKN...GKGVSDGETDMVDLILF	225
	t iyraafg s egqdefi ilqefesklfagfn df p dp gln rl ar ld fid ii h k dmvd il f	
芭蕾苹果 <i>Malus domestica</i>	YSEAAKVYSESDILQNAIRLTS DNIAKAIIMVFMGGTETVASAIEWMSPDMKSPDKRYVCELAUVVGLDRREEEDFEKLTYYKCAIKETLRLPPI	380
白梨 <i>Pyrus × bretschneideri</i>	YSEAAKVYSESDILQNAIRLTS DNIAKAIIMVFMGGTETVASAIEWMSPDMKSPDKRYVCELAUVVGLDRREEEDFEKLTYYKCAIKETLRLPPI	380
新疆梨 <i>P. sinkiangensis</i>	YSEAAKVYSESDILQNAIRLTS DNIAKAIIMVFMGGTETVASAIEWMSPDMKSPDKRYVCELAUVVGLDRREEEDFEKLTYYKCAIKETLRLPPI	380
喜树 <i>Camptotheca acuminata</i>	YSEAAKVYSESDILQNAIRLTS DNIAKAIIMVFMGGTETVASAIEWMSPDMKSPDKRYVCELAUVVGLDRREEEDFEKLTYYKCAIKETLRLPPI	377
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	YSEAAKVYSESDILQNAIRLTS DNIAKAIIMVFMGGTETVASAIEWMSPDMKSPDKRYVCELAUVVGLDRREEEDFEKLTYYKCAIKETLRLPPI	377
桃 <i>Prunus persica</i>	YSEAAKVYSESDILQNAIRLTS DNIAKAIIMVFMGGTETVASAIEWMSPDMKSPDKRYVCELAUVVGLDRREEEDFEKLTYYKCAIKETLRLPPI	383
扁桃 <i>P. dulcis</i>	YSEAAKVYSESDILQNAIRLTS DNIAKAIIMVFMGGTETVASAIEWMSPDMKSPDKRYVCELAUVVGLDRREEEDFEKLTYYKCAIKETLRLPPI	397
紫苜蓿 <i>Medicago sativa</i>	YSEAAKVYSESDILQNAIRLTS DNIAKAIIMVFMGGTETVASAIEWMSPDMKSPDKRYVCELAUVVGLDRREEEDFEKLTYYKCAIKETLRLPPI	382
欧洲甜樱桃 <i>Prunus avium</i>	YSEAAKVYSESDILQNAIRLTS DNIAKAIIMVFMGGTETVASAIEWMSPDMKSPDKRYVCELAUVVGLDRREEEDFEKLTYYKCAIKETLRLPPI	381
FtF5H	YSEADGVKVTESDILQNAIRLTS DNIAKAIIMVFMGGTETVASAIEWMSPDMKSPDKRYVCELAUVVGLDRREEEDFEKLTYYKCAIKETLRLPPI	325
	ys d l i lt dnikaaim vfmgg tetvasaiew m m pe k q ela g r ee d lk kc ketrlr ppl	
芭蕾苹果 <i>Malus domestica</i>	PLLLHETSEDVAVGYYRIEKKSRVMINAWAIGRDKSDWEDAESFKFRRFKEGVPDFKGSNFEFIFGSGRRSCPQMQLGLYHDEMVAHLLHCFWTWLP	480
白梨 <i>Pyrus × bretschneideri</i>	PLLLHETSEDVAVGYYRIEKKSRVMINAWAIGRDKSDWEDAESFKFRRFKEGVPDFKGSNFEFIFGSGRRSCPQMQLGLYHDEMVAHLLHCFWTWLP	480
新疆梨 <i>P. sinkiangensis</i>	PLLLHETSEDVAVGYYRIEKKSRVMINAWAIGRDKSDWEDAESFKFRRFKEGVPDFKGSNFEFIFGSGRRSCPQMQLGLYHDEMVAHLLHCFWTWLP	480
喜树 <i>Camptotheca acuminata</i>	PLLLHETSEDVAVGYYRIEKKSRVMINAWAIGRDKSDWEDAESFKFRRFKEGVPDFKGSNFEFIFGSGRRSCPQMQLGLYHDEMVAHLLHCFWTWLP	477
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	PLLLHETSEDVAVGYYRIEKKSRVMINAWAIGRDKSDWEDAESFKFRRFKEGVPDFKGSNFEFIFGSGRRSCPQMQLGLYHDEMVAHLLHCFWTWLP	477
桃 <i>Prunus persica</i>	PLLLHETSEDVAVGYYRIEKKSRVMINAWAIGRDKSDWEDAESFKFRRFKEGVPDFKGSNFEFIFGSGRRSCPQMQLGLYHDEMVAHLLHCFWTWLP	483
扁桃 <i>P. dulcis</i>	PLLLHETSEDVAVGYYRIEKKSRVMINAWAIGRDKSDWEDAESFKFRRFKEGVPDFKGSNFEFIFGSGRRSCPQMQLGLYHDEMVAHLLHCFWTWLP	497
紫苜蓿 <i>Medicago sativa</i>	PLLLHETSEDVAVGYYRIEKKSRVMINAWAIGRDKSDWEDAESFKFRRFKEGVPDFKGSNFEFIFGSGRRSCPQMQLGLYHDEMVAHLLHCFWTWLP	482
欧洲甜樱桃 <i>Prunus avium</i>	PLLLHETSEDVAVGYYRIEKKSRVMINAWAIGRDKSDWEDAESFKFRRFKEGVPDFKGSNFEFIFGSGRRSCPQMQLGLYHDEMVAHLLHCFWTWLP	481
FtF5H	PLLLHETSEDVAVGYYRIEKKSRVMINAWAIGRDKSDWEDAESFKFRRFKEGVPDFKGSNFEFIFGSGRRSCPQMQLGLYHDEMVAHLLHCFWTWLP	425
	plllhet e v gy ip rvm n awaigrd ksdw edaes fkr r f k egv p d f k g s n f e f i f g s g r r s c p g m q l g l y h d e m v a h l l h c f t w l p	
芭蕾苹果 <i>Malus domestica</i>	IGMKPSEDIMNDVFGLTAPRASRLIAVESRRVVCPL..	516
白梨 <i>Pyrus × bretschneideri</i>	IGMKPSEDIMNDVFGLTAPRASRLIAVESRRVVCPL..	516
新疆梨 <i>P. sinkiangensis</i>	IGMKPSEDIMNDVFGLTAPRASRLIAVESRRVVCPL..	516
喜树 <i>Camptotheca acuminata</i>	IGMKPSEDITIDVFGLTAPRATLIVAVESRLICPL..	514
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	IGMKPSEDIMNDVFGLTAPRASRLIAVESRRVVCPL..	514
桃 <i>Prunus persica</i>	IGMKPSEDIMNDVFGLTAPRASRLIAVESRRVVCPL..	519
扁桃 <i>P. dulcis</i>	IGMKPSEDIMNDVFGLTAPRASRLIAVESRRVVCPL..	533
紫苜蓿 <i>Medicago sativa</i>	IGMKPSEDIMNDVFGLTAPRASRLIAVESRRVVCPL..	519
欧洲甜樱桃 <i>Prunus avium</i>	IGMKPSEDIMNDVFGLTAPRASRLIAVESRRVVCPL..	517
FtF5H	IGMKPSEDITIDVFGLTAPRASRLIAVESRLICPL..	463
	gm k p s e d i m n d v f g l t a p r a s r l i a v e s r r v v c p l . .	

红框为血红素结构域。
Red frame is heme domain.

图7 苦养 FtF5H 蛋白的多序列比对

Fig. 7 Multiple sequence alignment of FtF5H protein

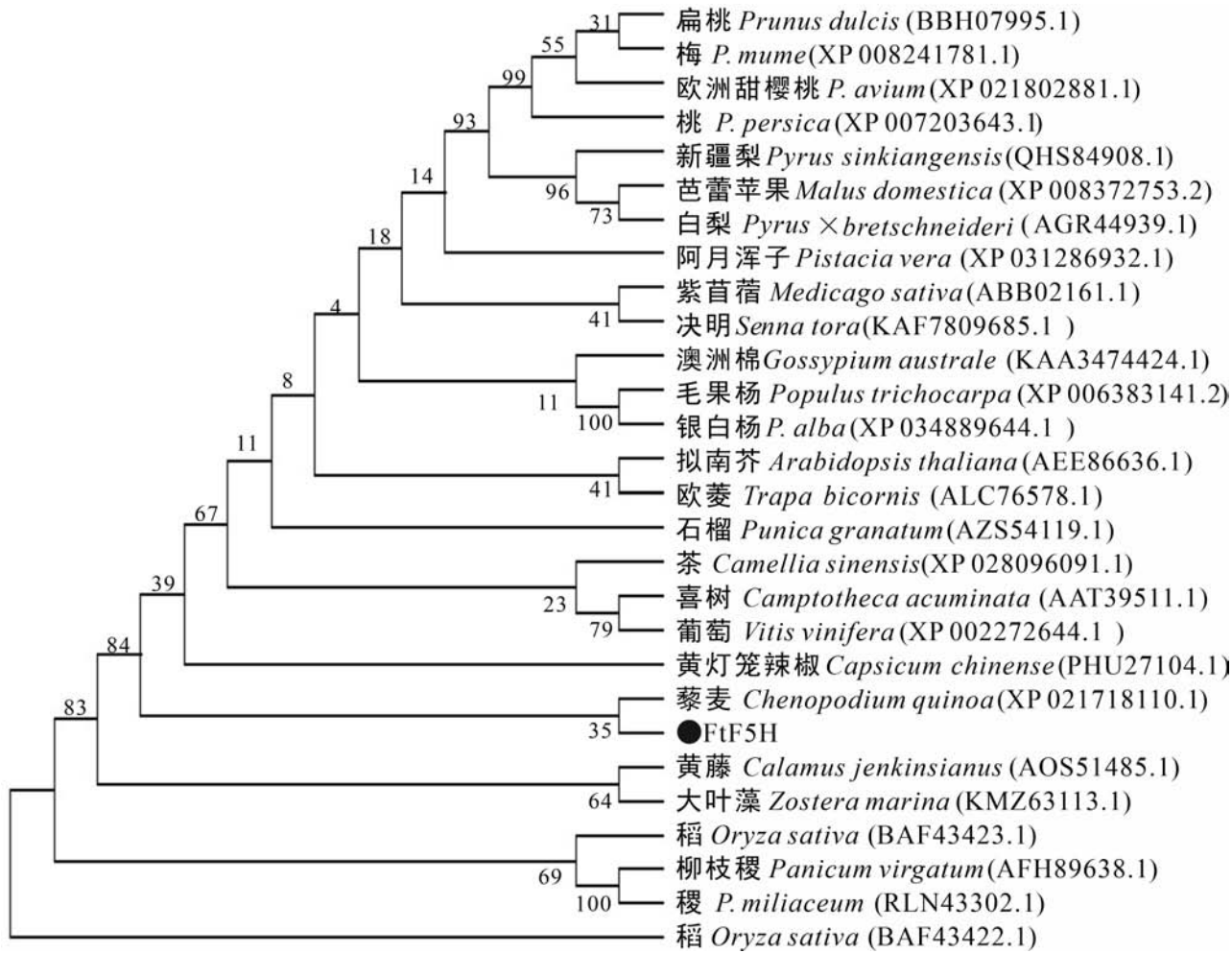
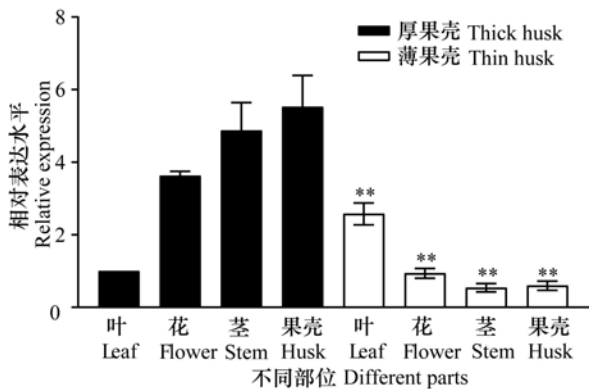


图 8 苦荞 *FtF5H* 与其他 *F5H* 蛋白系统进化树
Fig. 8 Phylogenetic tree of *FtF5H* and other *F5H* proteins



** 表示显著性差异 ($P<0.05$)。
** indicates significant differents ($P<0.05$).

图 9 *FtF5H* 基因在苦荞不同组织部位的相对表达水平
Fig. 9 Relative expression levels of *FtF5H* gene in different tissues of tartary buckwheat

联盟筹备会论文集 [C]. 泗洪: 中国园艺学会: 9.]
HUMPHREYS JM, CHAPPLE C, 2002. Rewriting the lignin roadmap [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 5(3): 224–229.
LI YC, QI CK, 2011. Lignin content and key gene expression in lignin synthesis of *Brassica napus* L. with lodging resistance [J]. *Jiangsu J Agric Sci*, 27(3): 481–487. [李尧臣, 戚存扣, 2011. 抗倒伏甘蓝型油菜 (*Brassica napus* L.) 木质素含量及木质素合成关键基因的表达 [J]. *江苏农业学报*, 27(3): 481–487.]
LI Y, GU H, QI CK, 2013. Expression of lignin synthesis key genes of *F5H*, *4CL* and *COMT* on lodging resistance of *Brassica napus* L. [J]. *Chin J Oil Crop Sci*, 35(1): 24–28. [李扬, 顾慧, 戚存扣, 2013. 甘蓝型油菜木质素合成关键基因 *F5H*、*4CL* 和 *COMT* 的定量表达 [J]. *中国油料作物学报*, 35(1): 24–28.]
MEYER K, CUSUMANO JC, SOMERVILLE C, et al., 1996. Ferulate-5-hydroxylase from *Arabidopsis thaliana* defines a new family of cytochrome P450-dependent

- monooxygenases [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 93(14): 6869–6874.
- MEYER K, SHIRLEY AM, CUSUMANO JC, et al., 1998. Lignin monomer composition is determined by the expression of a cytochrome P450-dependent monooxygenase in *Arabidopsis* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 95(12): 6619–6623.
- RUEGGER M, MEYER K, CUSUMANO JC, et al., 1999. Regulation of ferulate-5-hydroxylase expression in *Arabidopsis* in the context of sinapate ester biosynthesis [J]. Plant Physiol, 119(1): 101–110.
- SHAFRIN F, DAS SS, SANAN-MISHRA N, et al., 2015. Artificial miRNA-mediated down-regulation of two monolignoid biosynthetic genes (C3H and F5H) cause reduction in lignin content in jute [J]. Plant Mol Biol, 89(4–5): 511–527.
- SONG C, MA CR, XIANG DB, 2019. Variations in accumulation of lignin and cellulose and metabolic changes in seed hull provide insight into dehulling characteristic of tartary buckwheat seeds [J]. Int J Mol Sci, 20(3): 524.
- TAKEDA Y, KOSHIBA T, TOBIMATSU Y, et al., 2017. Regulation of CONIFERALDEHYDE 5-HYDROXYLASE expression to modulate cell wall lignin structure in rice [J]. Planta, 246(2): 337–349.
- TETREAULT HM, GRIES T, PALMER NA, et al., 2020. Overexpression of ferulate 5-hydroxylase increases syringyl units in *Sorghum bicolor* [J]. Plant Mol Biol, 103(3): 269–285.
- WANG J, 2009. Cloning and expression analysis of flax (*Linum usitatissimum*) critical lignin metabolism genes [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences: 1–66. [王进, 2009. 亚麻(*Linum usitatissimum*)木质素合成关键酶基因的克隆及表达分析 [D]. 北京: 中国农业科学院: 1–66.]
- WANG YN, CHEN X, GAI Y, 2014. Cloning and bioinformatics analysis on lignin synthetase gene Ferulate-5-hydroxylase of *Populus tomentosa* [J]. Guangdong Agric Sci, 41(20): 131–135. [王轶男, 陈雪, 盖颖, 2014. 毛白杨木质素合成酶基因 F5H 克隆与生物信息学分析 [J]. 广东农业科学, 41(20): 131–135.]
- WEN SC, 2015. Effect of potassium on related genes expression of ferulic acid biosynthesis in Chinese Angelica [D]. Lanzhou: Gansu University of Traditional Chinese Medicine: 1–87. [温随超, 2015. 钾素营养对当归阿魏酸生物合成相关基因表达的影响 [D]. 兰州: 甘肃中医药大学: 1–87.]
- WU CX, 2020. Shell structure of ricetartary buckwheat and its transcriptome analysis during development [D]. Guiyang: Guizhou Normal University: 1–82. [吴朝昕, 2020. 薄壳苦荞果壳结构及其发育中的转录组学分析 [D]. 贵阳: 贵州师范大学: 1–82.]
- XU C, FANG Z, YANG FM, et al., 2015. Analysis of *F5H* expression and stone cell development in *Pyrus bretschneideri* cv. Dangshan Su fruit [J]. Plant Physiol J, 51(5): 778–784. [徐超, 方志, 杨芳梅, 等, 2015. 砀山酥梨果实 F5H 表达与石细胞发育的分析 [J]. 植物生理学报, 51(5): 778–784.]
- XIAO YF, LIU HL, LIU XS, et al., 2018. Cloning, expression and sequence analysis of *F5H* gene in *Eucalyptus urophylla* clone GLU4 [J]. Biotechnology, 28(3): 205–211. [肖玉菲, 刘海龙, 刘雄盛, 等, 2018. 尾叶桉 GLU4 无性系 F5H 基因的克隆表达及序列分析 [J]. 生物技术, 28(3): 205–211.]
- ZHANG TK, LIU Z, ZHU FM, et al., 2013. Bioinformatics analysis of chalcone synzyme genes from ten kinds of ornamental plants [J]. J W Chin For Sci, 42(5): 62–68. [张太奎, 刘峥, 朱芳明, 等, 2013. 10 种观赏植物查尔酮合成酶基因生物信息学分析 [J]. 西部林业科学, 42(5): 62–68.]
- ZHU YH, GUO YX, 2014. Research progress in development and utilization of tartary buckwheat resource in China [J]. Sci Technol Food Ind, 35(24): 360–365. [朱云辉, 郭元新, 2014. 我国苦荞资源的开发利用研究进展 [J]. 食品工业科技, 35(24): 360–365.]
- ZHANG TK, ZONG D, ZHU FM, et al., 2015. The marker gene ACO of fruits preservation [J]. J Yunnan Agric Univ (Nat Sci Ed), 30(2): 245–251. [张太奎, 纵丹, 朱芳明, 等, 2015. 果树果实保鲜力强弱标记基因 ACO [J]. 云南农业大学学报(自然科学), 30(2): 245–251.]
- ZHANG TK, LIU CY, HUANG XB, et al., 2019. Land-plant phylogenomic and pomegranate transcriptomic analyses reveal an evolutionary scenario of *CYP75* genes subsequent to whole genome duplications [J]. J Plant Biol, 62: 48–60.

(责任编辑 蒋巧媛)

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202007054



王伟, 刘艳涛, 王志, 等. 基于叶片生理指标的小麦芽期耐盐性评价 [J]. 广西植物, 2022, 42(2): 315–323.

WANG W, LIU YT, WANG Z, et al. Comprehensive evaluation of salt tolerance in wheat based on physiological indexes of leaves at germination stage [J]. Guihaia, 2022, 42(2): 315–323.

基于叶片生理指标的小麦芽期耐盐性评价

王伟¹, 刘艳涛², 王志¹, 钮力亚¹, 于亮¹, 陆莉¹, 王奉芝¹, 王伟伟^{1*}

(1. 河北省农作物耐盐碱评价与遗传改良重点实验室/沧州市农林科学院, 河北 沧州 061000; 2. 沧州职业技术学院, 河北 沧州 061000)

摘要: 土壤盐渍化严重影响小麦生产, 提高小麦耐盐性是应对土壤盐渍化的主要生物途径之一。小麦芽期亦是对盐分较为敏感的时期, 小麦芽期耐盐性的强弱对盐碱地小麦种植至关重要。为探讨利用叶片生理指标进行小麦芽期耐盐性评价的可行性, 该文以沧麦 6005 及其 73 个叠氮化钠诱变家系为试验材料, 在超纯水和 40% 人工海水条件下, 对芽期叶片中脯氨酸、可溶性糖、总蛋白和可溶性蛋白含量及过氧化物酶 (POD)、过氧化氢酶 (CAT) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 活性等进行测定, 利用主成分分析和聚类分析进行小麦芽期耐盐性综合评价。结果表明: (1) 在 40% 人工海水盐胁迫下, 小麦芽期叶片中脯氨酸和可溶性糖含量增加, 总蛋白和可溶性蛋白含量降低。POD 活性增强, 而 CAT 和 SOD 活性减弱。(2) 主成分分析中第 1 和第 4 主成分是小麦芽期叶片耐盐的酶活响应因子, 第 2 和第 3 主成分是小麦芽期叶片耐盐的渗透调节因子。(3) 在耐盐性评价中, 沧麦 6005 芽期耐盐性鉴定等级为 2 级 (耐盐), 耐盐等级鉴定为 1 级 (高耐) 的家系为 SAM1、SAM49 和 SAM59, 这与田间生产实践经验一致。综上结果表明, POD、CAT 和 SOD 的活性以及脯氨酸和可溶性糖含量可作为小麦芽期耐盐性评价的叶片生理指标。该研究结果可为利用叶片生理指标进行小麦芽期耐盐性评价提供参考。

关键词: 小麦, 芽期, 生理指标, 耐盐性, 综合评价

中图分类号: Q945 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2022)02-0315-09

Comprehensive evaluation of salt tolerance in wheat based on physiological indexes of leaves at germination stage

WANG Wei¹, LIU Yantao², WANG Zhi¹, NIU Liya¹, YU Liang¹,
LU Li¹, WANG Fengzhi¹, WANG Weiwei^{1*}

(1. Hebei Key Laboratory of Crop Salt-Alkali Tolerance Evaluation and Genetic Improvement / Cangzhou Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Cangzhou 061000, Hebei, China; 2. Cangzhou Technical College, Cangzhou 061000, Hebei, China)

Abstract: Soil salinization seriously impacts wheat (*Triticum aestivum*) production. Improving salinity tolerance is one of the main biological approaches responding to the problem. The germination stage is also sensitive to salt, and the salt

收稿日期: 2020-11-24

基金项目: 沧州市农林科学院博士基金 (D0001); 国家农业部小麦产业技术体系项目 (CARS3-2-5); 中央引导地方科技发展资金项目 (206Z6301G) [Supported by Doctoral Foundation of Cangzhou Academy of Agriculture and Forestry Sciences (D0001); Project of Wheat Industry Technology System of Ministry of Agriculture (CARS3-2-5); Project of Local Science and Technology Development Guided by the Central Government (206Z6301G)]。

第一作者: 王伟 (1979-), 博士, 副研究员, 研究方向为小麦遗传育种, (E-mail) stddev@163.com。

*通信作者: 王伟伟 (1985-), 博士, 研究方向为作物遗传育种, (E-mail) wangww1002@163.com。

tolerance at the germination stage is very important for wheat planting in saline-alkali land. In order to explore the feasibility of using physiological indexes of leaves to evaluate salt tolerance of wheat at germination stage, CM6005 and its 73 sodium azide mutagenesis families were used as experimental materials. The contents of proline, soluble sugar, total protein and soluble protein, as well as the activities of peroxidase (POD), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) in the leaves were measured under the conditions of ultra-pure water and 40% artificial sea water, and principal component analysis and cluster analysis were used to evaluate the salt tolerance of the wheats. The results were as follows: (1) Under 40% artificial sea water salt stress, the contents of proline and soluble sugar increased, while those of total protein and soluble protein decreased. The activity of POD increased, however, the activities of CAT and SOD decreased. (2) In principal component analysis, the first and the fourth principal components were two factors of the response of salt-tolerant enzyme system, and the second and third principal components were the main two factors of osmotic adjustment of salt tolerance in wheat leaves at the stage of germination. (3) In the evaluation of salt tolerance, the salt-tolerant grade of CM6005 was 2(salt tolerance), and that of the lines was 1(high salt tolerance), which were SAM1, SAM49 and SAM59. All the above results indicate that the activities of POD, CAT and SOD as well as the contents of proline and soluble sugar can be used as physiological indexes to evaluate the salt tolerance of wheat at germination stage. These results can be used as a reference for the evaluation of salt tolerance in wheat based on physiological indexes of leaves at the germination stage.

Key words: wheat, germination stage, physiological index, salt tolerance, comprehensive evaluation

土壤盐渍化是制约粮食生产的重要因素之一。筛选和利用耐盐碱植物新品种是一种有效的盐碱地生物改良的手段(张巧凤等,2013)。小麦是世界上主要的粮食作物之一,所以,选育耐盐碱小麦新品种具有重要意义。小麦的生长发育始于种子发芽,小麦芽期的耐盐性是指在盐胁迫条件下种子吸水膨胀,萌动生根的综合能力。有研究表明,小麦在重度盐碱地中出苗时间延迟,出苗率显著降低(赵旭等,2005)。因此,选择芽期耐盐性较强的小麦品种是保障盐碱地小麦种植的基础,也是生产上“一播全苗”的重要依据。

在盐碱地种麦的农业生产中,培育和推广耐盐碱的小麦品种是发展盐碱地小麦生产最为经济有效的措施(王萌萌等,2012)。化学诱变育种是小麦新品种选育和种质资源创新的重要手段之一(Cheng et al., 1990)。叠氮化钠(NaN_3)是应用于植物化学诱变的高效低毒的诱变剂之一,其已在小麦、玉米、水稻等农作物上加以应用(曹欣等, 1991; Gao et al., 1992; Kiruki et al., 2006; 姜振峰等, 2006; Valentina et al., 2008)。张希太等(2011)研究小麦叠氮化钠诱变后代在株高、芒型、穗型等农艺性状的变异特征,并从分子水平上证明叠氮化钠对小麦的诱变效果。目前,少有基于小麦生理指标的检测对利用叠氮化钠诱变构建的小麦突变体库进行耐盐性研究的报道。

小麦耐盐种质资源的鉴定和评价是培育耐盐碱小麦品种重要的前提和保证(张巧凤等,2013)。可通过小麦形态指标如出苗率、株高、穗长、穗数、穗粒数等评价出小麦的耐盐碱性(Mguis et al., 2008; Naruoka et al., 2011; Rathod & Anand, 2016)。从生理生化指标上,刘恩良等(2013)研究发现耐盐小麦品种具有较高的渗透调节能力。丙二醛(MDA)、过氧化物酶(POD)、叶绿素含量等生理生化指标在盐碱胁迫下与对照相比有明显增加(时丽冉等,2018; Wu et al., 2019; Ibrahim et al., 2020)。而且,尚玥等(2017)研究了不同倍性小麦生长到三叶期时生理指标的变化。另外,激素亦与植物的耐盐碱性联系紧密,其中脱落酸和乙烯被视为逆境激素(Kefu et al., 1991; Haihua et al., 2004; Waskiewicz et al., 2013)。小麦芽期对盐胁迫较为敏感,芽期的耐盐性评价多基于发芽率、芽长、根长等形态指标(刘旭等,2001; 刘妍妍等,2014)。本研究以沧麦 6005 及其 73 个叠氮化钠诱变的突变家系作为研究对象,采用 40% 人工海水配方作为盐胁迫处理,基于小麦叶片生理指标的检测,研究小麦诱变群体家系萌发期的耐盐性,并与沧麦 6005 进行比较分析,以期发掘出适合河北省滨海盐碱地实际农业生产环境的强耐盐小麦种质资源,这对培育耐盐的小麦新品种具有十分重要的意义。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

供试材料均为沧州市农林科学院小麦课题组选育, 沧麦 6005 及其 73 个叠氮化钠诱变家系(编号为 SAM1-SAM76, 其中 SAM31、SAM32 和 SAM52 缺失), 2019 年种植于沧州市农林科学院前营实验基地, 种子收获后在室内进行小麦芽期叶片生理指标检测。

1.2 材料培养与处理

根据人工海水配方(刘旭等, 2001; 刘妍妍等, 2014)配置人工海水, 按照体积稀释为 40%。在培养皿中放两层滤纸, 分别加入去离子水(对照)和 40% 人工海水(处理)15 mL, 每个处理 30 粒种子, 3 次重复。置于光照培养箱发芽(22 ℃ 恒温, 光照 12 h)。7 d 后对幼苗叶片生理指标进行测定。试验检测植物总蛋白、可溶性蛋白、可溶性糖和脯氨酸的含量, 过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)的活性, 各生理指标采用 ELISA 试剂盒检测, 参照江苏科特生物技术有限公司的操作手册进行测定。最后计算各指标的相对值, 各指标的相对值(%) = 处理指标值/对照指标值×100(吴纪中等, 2014; 彭智等, 2017)。

1.3 测定方法

1.3.1 总蛋白含量 取 0.5 g 小麦叶片, 加入 1.5 mL 预冷的内含 0.1% PVP, 0.1 mol · L⁻¹ EDTA, 1 mol · L⁻¹ 抗坏血酸磷酸(pH = 7.8)缓冲液, 4 ℃ 冰浴研磨, 15 000 g 离心 30 min, 取上清液, 用考马斯亮蓝 G-250 做显色剂, 分光光度计在波长 595 nm 处测定 OD 值, 以牛血清白蛋白为标准并根据标准曲线计算蛋白质质量分数。

1.3.2 可溶性蛋白含量 取 50 mg 小麦叶片, 液氮研磨充分, 加入浓度为 0.01 mol · L⁻¹、pH 值为 7.4 的 PBS 匀浆 5 000 g 离心 15 min, 取上清液。取 10 μL 上清液, 加入包被好的酶标板中, 37 ℃ 孵育 30 min, 洗板, 加入酶标二抗, 37 ℃ 温育 30 min, 洗板, 加入显色液 A、B, 加入终止液, 在酶标仪波长 450 nm 处读数, 以试剂盒中可溶性蛋白标准品为标准, 根据标准曲线计算可溶性蛋白的浓度。

1.3.3 脯氨酸含量 取 50 mg 小麦叶片, 液氮研磨充分, 加入浓度为 0.01 mol · L⁻¹、pH 值 7.4 的 PBS 匀浆, 5 000 g 离心 15 min, 取上清液。取 0.5 mL

样本+0.5 mL 冰乙酸+0.5 mL 酸性茚三酮于有盖试管中, 置沸水浴中保温 30 min(盖紧, 防止水分散失), 每 10 min 振荡一次。待冷却后, 在试管中加入 1 mL 甲苯, 振荡 30 s, 静置片刻, 使色素转至甲苯中; 吸取 0.8 ~ 1 mL 上层溶液于 1 mL 玻璃比色皿中, 于 520 nm 波长处比色, 记录吸光值。根据公式计算出样本中脯氨酸的浓度。

1.3.4 可溶性糖含量 称取约 0.1 ~ 0.2 g 样本, 加入 1 mL 蒸馏水研磨成匀浆, 倒入有盖离心管中, 沸水浴 10 min(盖紧, 以防止水分散失), 冷却后, 8 000 g 常温离心 10 min, 取上清液于 10 mL 试管中, 用蒸馏水定容至 10 mL, 摇匀备用。取 200 μL 样本加样, 分光光度计预热 30 min 以上, 调节波长至 620 nm, 蒸馏水调零。以可溶性糖为标准, 根据标准曲线计算可溶性糖浓度。

1.3.5 POD、CAT 和 SOD 的活性 取 50 mg 小麦叶片, 液氮研磨充分, 加入浓度为 0.01 mol · L⁻¹、pH 值 7.4 的 PBS 匀浆, 5 000 g 离心 15 min, 取上清液。取 10 μL 上清液, 加入包被好的酶标板中, 37 ℃ 孵育 30 min, 洗板, 加入酶标二抗, 37 ℃ 温育 30 min, 洗板, 加入显色液 A、B, 加入终止液, 在酶标仪波长 450 nm 处读数, 以试剂盒中 POD 标准品、CAT 标准品和 SOD 标准品为标准, 分别根据各自标准曲线计算 POD 活性、CAT 活性和 SOD 活性(Becana et al., 1986; Li et al., 2015)。

1.4 统计分析

采用软件 Excel 2010 和软件 SPSS 21.0 进行数据的整理和统计分析, 计算各性状的均值和相对值, 进行描述性统计分析, 简单相关和偏相关分析。首先, 对各指标的相对值进行主成分分析, 得到各试验材料的主成分因子得分; 然后, 将各因子得分采用隶属函数法, 获得各材料耐盐性的综合评价值; 最后, 对各材料的耐盐性综合评价值进行聚类分析, 划分各材料的耐盐性等级(彭智等, 2017)。

2 结果与分析

2.1 人工海水胁迫下沧麦 6005 叠氮化钠诱变群体芽期生理指标的变化

表 1 结果表明: 在 40% 人工海水胁迫下, 小麦芽期叶片中脯氨酸和可溶性糖含量增加, 增幅分别为 75.17% 和 47.20%; 可溶性蛋白和总蛋白浓度降低, 降幅分别为 46.31% 和 33.82%。同时, 40%

表 1 人工海水胁迫下沧麦 6005 叠氮化钠诱变群体芽期生理指标的比较

Table 1 Physiological indexes comparison of the wheat population from CM6005 induced by sodium azide treated with artificial sea water at germination stage

项目 Item		脯氨酸 Proline (ng · L ⁻¹)	可溶性糖 Soluble sugar (mg · g ⁻¹)	可溶性 蛋白 Soluble protein (mg · mL ⁻¹)	总蛋白 Total protein (mg · mL ⁻¹)	过氧化物酶 POD (U · L ⁻¹)	过氧化氢酶 CAT (U · mL ⁻¹)	超氧化物 歧化酶 SOD (U · L ⁻¹)
对照 CK	最大值 Max	2 193.97	1.54	24.25	67.46	19.57	14.69	3 943.12
	最小值 Min	994.60	0.94	17.06	48.56	8.60	8.39	1 548.57
	均值 Average	1 600.90	1.25	20.73	58.96	14.15	11.73	2 844.49
	标准差 SD	356.14	0.18	2.10	55.90	3.24	1.95	760.40
	变异系数 CV (%)	22.25	14.70	10.14	9.48	22.90	16.61	26.73
处理 T	最大值 Max	3 433.80	2.18	14.12	47.02	30.75	11.09	3 944.72
	最小值 Min	2 244.55	1.55	7.70	30.70	19.68	5.70	1 585.69
	均值 Average	2 804.34	1.84	11.13	39.02	25.81	8.39	2 763.92
	标准差 SD	345.19	0.19	1.71	50.29	3.55	1.53	671.30
	变异系数 CV (%)	12.31	10.21	15.37	12.89	13.75	18.29	24.29
	处理与对照差值 T-CK	1 203.44 ↑	0.59 ↑	9.60 ↓	19.94 ↓	11.66 ↑	3.34 ↓	80.57 ↓
	变化幅度 Range (%)	75.17	47.20	46.31	33.82	82.40	28.47	2.83

注：CK. 对照；T. 处理；Max. 最大值；Min. 最小值；SD. 标准差；CV. 变异系数。
Note: CK. Control; T. Treatment; Max. Maximum; Min. Minimum; SD. Standard deviation; CV. Coefficient of variation.

人工海水盐胁迫对小麦芽期叶片酶活性系统的影响表现为,POD 活性增强,CAT 和 SOD 活性减弱,增强/减弱幅度分别为 82.40%、28.47%和 2.83%。说明小麦芽期叶片中渗透调节物质脯氨酸和可溶性糖含量的增加,有利于保护细胞水势,以维持小麦正常生理特性。而 SOD、POD、CAT 是植物细胞内清除活性氧过程中最主要的抗氧化酶类,人工海水胁迫对小麦叶片中抗氧化酶活性的影响不一,三者的协同作用可使小麦植株在一定程度上减缓或防御盐胁迫。

2.2 人工海水胁迫下沧麦 6005 叠氮化钠诱变群体芽期叶片耐盐生理指标的相关分析

表 2 结果表明:相对脯氨酸含量和相对总蛋白含量呈显著负相关,相对 SOD 活性和相对 CAT 活性呈极显著正相关,其余相对指标两两之间简单相关关系不显著。表 3 结果表明:相对 SOD 活性和相对 CAT 活性之间偏相关关系极显著存在,其余相对指标两两之间偏相关系数均不显著。相关分析和偏相关分析结果表明,基于小麦芽期叶片生理检测数据进行耐盐性鉴定时,需重点考虑相对 SOD 活性和相对 CAT 活性,同时需要把文中 7

个生理指标进行简化。因此,本研究进一步用主成分分析法,把多个指标转换成少量独立的综合指标,以准确评价小麦耐盐性。

2.3 人工海水胁迫下沧麦 6005 叠氮化钠诱变群体芽期叶片耐盐生理指标的主成分分析

对沧麦 6005 及其叠氮化钠诱变群体 73 个家系芽期叶片的 7 个耐盐生理指标进行主成分分析,表 4 结果表明:可以选择 4 个独立的主成分作为小麦芽期耐盐鉴定综合生理指标,能解释总变异的 70.66%,基本代表了 7 个原始指标的绝大部分信息。

单指标的特征向量绝对值越大,在主成分中的作用就越大,各叶片生理指标的特征向量见表 5。第 1 主成分中起主要作用的指标是相对 CAT 和相对 SOD,是盐胁迫的酶活因子 I;第 2 主成分中起主要作用的指标是相对脯氨酸含量,是盐胁迫的渗透调节因子 I;第 3 主成分中起主要作用的指标是相对可溶性糖含量,是盐胁迫的渗透调节因子 II;第 4 主成分中起主要作用的指标是相对 POD 活性,是盐胁迫的酶活因子 II。其中,主成分 1 和 4 主要表现为小麦芽期叶片耐盐的酶活系

表 2 人工海水胁迫下沧麦 6005 叠氮化钠诱变群体芽期叶片耐盐指标的简单相关系数

Table 2 Correlation coefficients between the traits of the wheat population from CM6005 induced by sodium azide treated with artificial sea water at germination stage							
指标 Index	相对脯氨酸 Relative proline	相对可溶性糖 Relative soluble sugar	相对可溶性蛋白 Relative soluble protein	相对总蛋白 Relative total protein	相对过氧化物酶 Relative POD	相对过氧化氢酶 Relative CAT	相对超氧化物歧化酶 Relative SOD
相对脯氨酸 Relative proline	1						
相对可溶性糖 Relative soluble sugar	0.069 6	1					
相对可溶性蛋白 Relative soluble protein	-0.041 1	-0.051 1	1				
相对总蛋白 Relative total protein	-0.242 5 *	0.034 0	-0.014 8	1			
相对过氧化物酶 Relative POD	-0.081 4	-0.049 7	-0.050 0	0.049 3	1		
相对过氧化氢酶 Relative CAT	0.190 6	-0.058 6	-0.164 2	-0.183 9	-0.085 3	1	
相对超氧化物歧化酶 Relative SOD	-0.014 7	-0.060 9	-0.117 1	0.015 9	-0.051 8	0.438 9 **	1

注：* 表示显著差异 ($P<0.05$)；** 表示极显著差异 ($P<0.01$)。下同。
Note: * represents significant differences ($P<0.05$)；** represents extremely significant differences ($P<0.01$). The same below.

表 3 人工海水胁迫下沧麦 6005 叠氮化钠诱变群体芽期叶片耐盐生理指标的偏相关系数

Table 3 Partial correlation coefficients between the traits of the wheat population from CM6005 induced by sodium azide treated with artificial sea water at germination stage							
指标 Index	相对脯氨酸 Relative proline	相对可溶性糖 Relative soluble sugar	相对可溶性蛋白 Relative soluble protein	相对总蛋白 Relative total protein	相对过氧化物酶 Relative POD	相对过氧化氢酶 Relative CAT	相对超氧化物歧化酶 Relative SOD
相对脯氨酸 Relative proline	1						
相对可溶性糖 Relative soluble sugar	0.081 3	1					
相对可溶性蛋白 Relative soluble protein	-0.023 7	-0.064 4	1				
相对总蛋白 Relative total protein	-0.207 2	0.219 1	-0.041 0	1			
相对过氧化物酶 Relative POD	-0.059 7	-0.055 9	-0.069 7	0.022 1	1		
相对过氧化氢酶 Relative CAT	0.171 7	-0.054 2	-0.132 2	-0.168 2	-0.059 5	1	
相对超氧化物歧化酶 Relative SOD	-0.089 8	-0.038 9	-0.052 3	0.087 7	-0.030 9	0.440 8 **	1

统响应的 2 个因子,均与小麦盐胁迫响应抗氧化酶系统有关,主要体现小麦芽期叶片耐盐的酶活表现。主成分 2 和 3 主要表现为小麦芽期叶片耐盐的渗透调节作用的 2 个因子。

2.4 人工海水胁迫下沧麦 6005 叠氮化钠诱变群体芽期耐盐性综合评价

用主成分分析获得的每个材料各主成分的因子得分作为鉴定小麦芽期叶片耐盐生理的综合指

表 4 各主成分的特征值和贡献率

Table 4 Eigenvalue and contribution rate of different principal components

项目 Item	主成分 Principal component			
	1	2	3	4
特征值 Eigenvalue	1.627 5	1.239 1	1.063 7	1.015 6
贡献率 Contribution rate (%)	23.249 8	17.701 2	15.195 3	14.509 0
累积贡献率 Accumulative contribution rate (%)	23.249 8	40.951 0	56.146 3	70.655 3

表 5 主成分分析中的特征向量

Table 5 Feature vector of the principal component analysis

指标 Index	特征向量 Feature vector			
	1	2	3	4
相对脯氨酸 Relative proline	0.337 6	-0.620 6	0.107 6	-0.186 9
相对可溶性糖 Relative soluble sugar	-0.069 0	-0.262 7	0.815 3	0.186 7
相对可溶性蛋白 Relative soluble protein	-0.332 9	-0.288 4	-0.455 9	0.390 3
相对总蛋白 Relative total protein	-0.408 9	0.382 4	0.270 8	0.280 6
相对过氧化物酶 Relative POD	-0.222 9	0.280 4	-0.023 8	-0.818 2
相对过氧化氢酶 Relative CAT	0.828 4	0.155 5	-0.050 5	0.024 6
相对超氧化物歧化酶 Relative SOD	0.646 0	0.409 7	-0.044 3	0.211 5

标,计算各时期各综合指标的隶属函数值及权重值,进而得到各材料叶片生理指标的耐盐性综合评价 D 值(表 6)。D 值是纯数,取值范围为 [0, 1],D 值越大,说明耐盐性越强。然后,采用 K-均值聚类方法,将供试材料的耐盐性分为高耐、耐盐、中耐、敏感、高感 5 个级别(表 7)。

表 6 结果表明:沧麦 6005 芽期耐盐性鉴定等级为 2 级(耐盐),耐盐等级鉴定为 1 级(高耐)的家系为 SAM1、SAM49 和 SAM59,而且 SAM1、SAM49 和 SAM59 的田间耐盐综合表现亦优于沧麦 6005。这表明基于小麦芽期叶片生理指标检测结果,用耐盐性综合评价 D 值表示小麦耐盐性强

弱的方法具有可行性,而且与实践经验较为一致。

表 7 结果表明:小麦芽期 5 个耐盐级别材料的份数依次为 3、17、22、22、10,分别占供试材料的 4.05%、22.97%、29.73%、29.73%、13.51%。基于小麦芽期叶片生理指标的耐盐性鉴定结果,芽期表现为高耐和耐盐(1 级和 2 级)的小麦材料共计 20 个,约占所有供试材料的 1/3。

3 讨论

小麦的耐盐性受多种因素共同影响。小麦在应答盐胁迫时,涉及到许多生理生化反应。因此,为了更加准确地评价小麦的耐盐性,必须考虑到多种生理指标的共同作用(王智明等,2014)。因此,本文主要探讨在人工海水盐胁迫下小麦叶片生理指标的变化以及生理指标对小麦芽期耐盐性鉴定评价的影响。而且,小麦芽期耐盐性鉴定可在较短时间内对大量品种(系)进行鉴定,可用于大批量小麦品种(系)耐盐性初步评价,有助于小麦耐盐品种的选育。

3.1 人工海水胁迫对小麦芽期叶片生理指标的影响

脯氨酸和可溶性糖是植物细胞质内重要渗透调节物质,植物通过不断地积累脯氨酸、可溶性糖等有机质来适应不同的盐碱环境,脯氨酸和可溶性糖的积累是植物抗盐、耐盐的一项应激性保护措施(王智明等,2014)。本研究中,在 40%人工海水盐胁迫下,小麦芽期叶片中的脯氨酸和可溶性糖含量均比对照高,植株以此来适应盐分条件,维持渗透调节系统的稳定,这与前人研究结果较为一致(杨升等,2010)。

植物体内的抗氧化酶在消除超氧化物自由基方面具有重要作用(赵锁劳和窦延玲,1998),CAT、POD 和 SOD 协调作用,共同维护活性氧代谢平衡。另有研究表明,在盐逆境下,SOD、CAT、POD 等酶活性降低(曾华,2017)。本研究中,在人工海水盐胁迫下 POD 活性增强,而 CAT 和 SOD 活性降低。这可能是因为小麦的耐盐性不仅是受多种因素共同影响的复杂数量性状,而且不同小麦品种的耐盐机制也不尽相同,从而使得不同试验材料在盐胁迫下对某一具体生理指标的反应也不一致。

另外,盐胁迫打破了植物体内蛋白质代谢的

表 6 沧麦 6005 及其叠氮化钠诱变群体芽期的耐盐鉴定结果

Table 6 Identification of salt tolerance of CM6005 and its population induced by sodium azide at the germination stage

材料 Material	D 值 D value	等级 Grade	材料 Material	D 值 D value	等级 Grade	材料 Material	D 值 D value	等级 Grade
SAM1	0.703 6	1	SAM23	0.460 3	3	SAM28	0.384 8	4
SAM49	0.723 3	1	SAM29	0.494 2	3	SAM34	0.440 7	4
SAM59	0.687 3	1	SAM30	0.549 8	3	SAM40	0.419 0	4
CM6005	0.603 7	2	SAM33	0.514 7	3	SAM42	0.401 9	4
SAM2	0.559 6	2	SAM38	0.526 4	3	SAM43	0.427 8	4
SAM6	0.600 4	2	SAM41	0.471 5	3	SAM47	0.378 8	4
SAM9	0.600 2	2	SAM44	0.518 7	3	SAM51	0.406 5	4
SAM14	0.566 9	2	SAM48	0.507 2	3	SAM62	0.395 4	4
SAM20	0.618 1	2	SAM50	0.528 3	3	SAM63	0.383 7	4
SAM22	0.574 4	2	SAM53	0.479 4	3	SAM67	0.410 2	4
SAM26	0.614 0	2	SAM55	0.527 7	3	SAM69	0.412 9	4
SAM35	0.647 8	2	SAM56	0.472 6	3	SAM72	0.385 8	4
SAM36	0.604 9	2	SAM65	0.486 5	3	SAM74	0.395 2	4
SAM39	0.611 4	2	SAM66	0.496 4	3	SAM75	0.442 4	4
SAM54	0.556 9	2	SAM68	0.549 8	3	SAM3	0.351 4	5
SAM57	0.615 5	2	SAM70	0.497 3	3	SAM7	0.336 1	5
SAM58	0.605 0	2	SAM76	0.532 8	3	SAM13	0.305 6	5
SAM61	0.618 7	2	SAM4	0.368 6	4	SAM25	0.325 1	5
SAM64	0.597 8	2	SAM12	0.398 1	4	SAM27	0.334 3	5
SAM73	0.590 8	2	SAM16	0.391 8	4	SAM37	0.314 3	5
SAM5	0.496 8	3	SAM17	0.436 0	4	SAM45	0.353 4	5
SAM8	0.506 7	3	SAM18	0.411 8	4	SAM46	0.340 2	5
SAM10	0.529 2	3	SAM19	0.423 7	4	SAM60	0.293 7	5
SAM11	0.480 4	3	SAM21	0.447 2	4	SAM71	0.321 9	5
SAM15	0.478 9	3	SAM24	0.430 7	4			

表 7 基于小麦芽期叶片生理指标的耐盐性评价

Table 7 Evaluation of salt tolerance in the wheat population based on physiological indexes of leaves at the germination stage

耐盐性 Salt tolerance	级别 Grade	材料数 Number of materials	百分比 Percentage (%)
高耐 High tolerance	1	3	4.05
耐盐 Tolerance	2	17	22.97
中耐 Middle tolerance	3	22	29.73
敏感 Sensitivity	4	22	29.73
高感 High sensitivity	5	10	13.51

平衡,使蛋白质降解速率远大于合成速率,一般情况下过多的盐分条件会抑制蛋白质合成而促进其分解,最终使细胞质内可溶性蛋白质含量随盐胁迫

强度的增加而降低(刘建巍和朱宏,2014)。本研究中人工海水盐胁迫下小麦芽期叶片中的总蛋白和可溶性蛋白含量均降低,这与刘建巍和朱宏(2014)研究结果较为一致。

3.2 基于芽期叶片生理指标的耐盐性鉴定

本研究基于 7 个叶片生理指标。首先,在主成分分析的基础上,将 7 个生理指标降维为 4 个独立的主成分因子,分别为 2 个酶活响应因子和 2 个渗透调节因子;然后,利用隶属函数法和权重值获得每个材料的综合评价 D 值,作为衡量一个品种(系)芽期耐盐性强弱的标准,可排除环境的影响;最后,对 D 值进行聚类分析和小麦芽期耐盐性等级划分,这较为客观地评价了小麦芽期耐盐性。另外,从耐盐鉴定生理指标的筛选上,已有研究表明,POD 是植物体内普遍存在的活性较高的一种

酶,可作为植物耐盐性评价的指标(彭玉梅等,2014)。由此可见,抗氧化酶系统中 POD、CAT、SOD 活性及耐盐渗透调节剂脯氨酸和可溶性糖含量可作为小麦芽期叶片生理指标对其进行耐盐性鉴定。而叶片中总蛋白和可溶性蛋白含量,能否作为小麦耐盐鉴定的生理指标还有待于进一步研究。

3.3 人工海水胁迫下小麦芽期耐盐性评价

小麦的耐盐性鉴定多集中在芽期和苗期,以芽长、根长等形态指标鉴定为主(刘旭等,2001;刘妍妍等,2014)。本研究主要基于小麦芽期叶片的生理指标进行耐盐性鉴定,评价结果中沧麦 6005 耐盐等级鉴定为 2 级(耐盐)。沧麦 6005 是一个耐盐碱性突出的小麦品种,这与生产实践经验相符。另外,鉴定出耐盐性比沧麦 6005 强的新品系为 SAM1、SAM49 和 SAM59,这也与家系的田间耐盐性表现一致。综合结果表明,本文采用 40% 人工海水胁迫,基于小麦芽期叶片生理指标的检测,采用相应的统计分析方法可实现小麦芽期耐盐性的鉴定与评价。该方法可操作性强、周期短、效率高,可用于大批量小麦材料耐盐性初步筛选,是一种室内高效、快速、可行的小麦芽期耐盐性鉴定的方法。

4 结 论

(1)在 40% 人工海水盐胁迫下,小麦芽期叶片中脯氨酸和可溶性糖含量增加;总蛋白和可溶性蛋白含量降低;POD 活性增强,CAT 和 SOD 活性减弱。

(2)相对 SOD 活性和相对 CAT 活性之间相互促进,共同表现为小麦芽期叶片对人工海水盐胁迫的同向响应。

(3)主成分分析将 7 个单项指标综合为 4 个相互独立的综合指标,其中,第 1 和第 4 主成分主要表现为小麦芽期叶片耐盐的酶活系统响应的 2 个因子,第 2 和第 3 主成分主要表现为小麦芽期叶片耐盐的渗透调节作用的 2 个因子。POD、CAT、SOD 的活性,以及脯氨酸和可溶性糖含量可作为小麦芽期耐盐性鉴定筛选的叶片生理指标。

(4)聚类分析将沧麦 6005 和 73 个家系分为 5 类。其中,沧麦 6005 芽期耐盐性鉴定等级为 2 级(耐盐),耐盐等级鉴定为 1 级(高耐)的家系为 SAM1、SAM49 和 SAM59。

参考文献:

- BECANA M, APARICIO-TEJO P, IRIGOYEN JJ, et al., 1986. Some enzymes of hydrogen peroxide metabolism in leaves and root nodules of *Medicago sativa* [J]. *Plant Physiol*, 82(4): 1169-1171.
- CHENG XY, GAO MW, LIANG ZQ, 1990. Effect of mutagenic treatments on somaclonal variation in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Plant Breed*, 105(1): 47-52.
- CAO X, YANG YF, QIAN QH, 1991. Mutagenic efficiencies of sodium azide in different barley cultivars [J]. *Acta Agric Zhejiangensis*, 3(3): 143-146. [曹欣, 杨煜峰, 钱强华, 1991. 叠氮化钠对不同大麦品种的诱变效应 [J]. *浙江农业学报*, 3(3): 143-146.]
- GILL BS, APPELS R, OBERHOLSTER AMB, et al., 2004. A workshop report on wheat genome sequencing: international genome research on wheat consortium [J]. *Genetics*, 168(2): 1087-1096.
- GURMANI AR, KHAN SU, MABOOD F, et al., 2014. Screening and selection of synthetic hexaploid wheat germplasm for salinity tolerance based on physiological and biochemical characters [J]. *Int J Agric Biol*, 16(4): 684-690.
- GUPTA PK, MIR RR, MOHAN A, et al., 2008. Wheat genomics: present status and future prospects [J]. *Int J Plant Genom*, 2008: 1-36.
- GAO MW, CAI QH, LIANG ZQ, 1992. *In vitro* culture of hybrid Indica rice combined with mutagenesis [J]. *Plant Breed*, 108(2): 104-110.
- HAI HR, SHEN W, XU L, 2004. Nitric oxide involved in the abscisic acid induced proline accumulation in wheat seedling leaves under saline stress [J]. *Acta Bot Sin*, 46(11): 1307-1315.
- IBRAHIM AA, NESMA S, CHEN YB, et al., 2020. Stomatal and photosynthetic traits are associated with investigating sodium chloride tolerance of *Brassica napus* L. cultivars [J]. *Plants*, 9(1): 62.
- JIANG ZF, LIU ZH, LI WB, et al., 2006. M₁ mutagenic effect on soybean induced by NaN₃ [J]. *Acta Agric Nucl Sin*, 20(3): 10-11. [姜振峰, 刘志华, 李文滨, 等, 2006. 叠氮化钠对大豆 M₁ 的生物学诱变效应 [J]. *核农学报*, 20(3): 10-11.]
- KIRUKI S, AONEK L, LIMO M, 2006. Azide-based mutagenesis suppresses *Striga hermonthica* seed germination and parasitism on maize varieties [J]. *Afr J Biotechnol*, 5(10): 866-870.
- KEFU Z, MUNNS R, KING RW, 1991. Absciscic acid levels in NaCl-treated barley, cotton and salinebush [J]. *Australian J Plant Physiol*, 18(1): 17-24.
- LIU X, SI J, ZHANG XY, et al., 2001. Screening salt tolerance germplasms and tagging the tolerance gene(s) using microsatellite (SSR) markers in wheat [J]. *Acta Bot Sin*, 43(9): 948-954. [刘旭, 史娟, 张学勇, 等, 2001. 小麦耐盐种质的筛选鉴定和耐盐基因的标记 [J]. *植物学报*, 43(9): 948-954.]
- LIU YY, WU JZ, XU ZY, et al., 2014. Identification methods of salt-tolerance at germination and seedling stage of wheat under artificial sea water stress [J]. *Acta Phytophysiol Sin*,

- 50(2): 214–222. [刘妍妍, 吴纪中, 许璋阳, 等, 2014. 人工海水胁迫下小麦芽期和苗期的耐盐性鉴定方法 [J]. 植物生理学报, 50(2): 214–222.]
- LIU EL, JIN P, MA L, 2013. Study on screening out salt tolerance indexes of xinjiang winter wheat and their relevant analysis and evaluation [J]. Xinjiang Agric Sci, 50(5): 809–816. [刘恩良, 金平, 马林, 等, 2013. 新疆冬小麦耐盐指标筛选及分析评价研究 [J]. 新疆农业科学, 50(5): 809–816.]
- LIU JW, ZHU H, 2014. The determination of wheat seed germination under salt stress and physiological indicators [J]. J Harbin Norm Univ (Nat Sci Ed), 30(3): 133–136. [刘建巍, 朱宏, 2014. 盐胁迫下小麦种子萌发及生理指标的测定 [J]. 哈尔滨师范大学学报(自然科学版), 30(3): 133–136.]
- LI Z, ZHANG Y, PENG DD, et al., 2015. Corrigendum: Polyamine regulates tolerance to water stress in leaves of white clover associated with antioxidant defense and dehydrin genes via involvement in calcium messenger system and hydrogen peroxide signaling [J]. Front Physiol, 6: 280.
- MGUIS K, BRAHIM NB, ALBOUCHI A, et al., 2008. Phenotypic responses of the wild wheat relative *Aegilops geniculata* Roth and wheat (*Triticum durum* Desf.) to experimentally imposed saline stress [J]. Genet Resour Crop Evol, 55(5): 665–674.
- NARUOKA Y, TALBERT LE, LANNING SP, et al., 2011. Identification of quantitative trait loci for productive tiller number and its relationship to agronomic traits in spring wheat [J]. Tag Theoret Appl Genet, 123(6): 1043–1053.
- PENG Z, LI L, LIU YP, et al., 2017. Evaluation of salinity tolerance in wheat (*Triticum aestivum*) genotypes at germination and seedling stages [J]. J Plant Genet Resour, 18(4): 638–645. [彭智, 李龙, 柳玉平, 等, 2017. 小麦芽期和苗期耐盐性综合评价 [J]. 植物遗传资源学报, 18(4): 638–645.]
- PENG YM, SHI GL, CUI HM, 2014. Salt tolerance evaluation of processing tomato lines based on physiological traits at seedling stages [J]. Agric Res Arid Areas, 32(5): 61–66. [彭玉梅, 石国亮, 崔辉梅, 2014. 加工番茄幼苗期耐盐生理指标筛选级耐盐性综合评价 [J]. 干旱地区农业研究, 32(5): 61–66.]
- RATHOD GR, ANAND A, 2016. Effect of seed magnetopriming on growth, yield and Na/K ratio in wheat (*Triticum aestivum* L.) under saline stress [J]. Ind J Plant Physiol, 21(1): 15–22.
- SHI LR, BAI LR, LÜ YC, et al., 2018. Analysis of salt tolerance at the seedling stage of wheat hybrid variety Heng 9966 [J]. Crops, (6): 149–153. [时丽冉, 白丽荣, 吕亚慈, 等, 2018. 小麦杂交品种衡 9966 苗期耐盐性分析 [J]. 作物杂志, (6): 149–153.]
- SHANG Y, LIU T, WU LJ, et al., 2017. Different adaptations to salt stress in different ploidies of wheat [J]. Guihaia, 37(12): 1560–1571. [尚玥, 刘韬, 吴丽军, 等, 2017. 不同倍性小麦对盐胁迫的适应性差异 [J]. 广西植物, 37(12): 1560–1571.]
- VALENTINA T, RICCARDO B, MARIA CS, et al., 2008. A resource for the discovery of chemically induced mutants in barley [J]. Plant Biotechnol J, 6(5): 477–485.
- WU JZ, LIU YY, WANG C, et al., 2014. Screening and identification of wheat germplasm for salt tolerance using artificial sea water [J]. J Plant Genet Resour, 15(5): 948–953. [吴纪中, 刘妍妍, 王冲, 等, 2014. 人工海水胁迫下小麦种质资源的耐盐性筛选与鉴定 [J]. 植物遗传资源学报, 15(5): 948–953.]
- WASKIEWIC Z, AGBIESZK A, BESZTERDA M, et al., 2013. ABA: Role in plant signaling under saline stress [M]//AHMAD P, AZOOZ MM, PRASAD MNV. Saline Stress in Plants. New York: Springer.
- WANG MM, JIANG QY, HU Z, et al., 2012. Evaluation for salt tolerance of wheat cultivars [J]. J Plant Genet Resour, 13(2): 189–194. [王萌萌, 姜奇彦, 胡正, 等, 2012. 小麦品种资源耐盐性鉴定 [J]. 植物遗传资源学报, 13(2): 189–194.]
- WANG ZM, ZHANG FJ, XU X, 2014. Advances on physiological and biochemical indexes of salt tolerance in plant [J]. Hubei Agric Sci, 53(7): 1493–1496. [王智明, 张峰举, 许兴, 2014. 植物耐盐生理生化指标研究进展 [J]. 湖北农业科学, 53(7): 1493–1496.]
- WU XY, SHU S, WANG Y, et al., 2019. Exogenous putrescine alleviates photoinhibition caused by salt stress through cooperation with cyclic electron flow in cucumber [J]. Photosynth Res, 141(3): 303–314.
- YANG S, ZHAN HX, ZHANG L, 2010. Physiological and biochemical indices of salt tolerance and scanning of salt-tolerance plants: A Review [J]. J NW For Univ, 25(3): 59–65. [杨升, 张华新, 张丽, 2010. 植物耐盐生理生化指标及耐盐植物筛选综述 [J]. 西北林学院学报, 25(3): 59–65.]
- ZHAO SL, DOU YL, 1998. A review of identification indicators for wheat salt tolerance [J]. Acta Univ Agric Boreal-Occident, 26(6): 80–85. [赵锁劳, 窦延玲, 1998. 小麦耐盐性鉴定指标及其分析评价 [J]. 西北农业大学学报, 26(6): 80–85.]
- ZENG H, 2017. Research progress on mechanism of plant salinity tolerance [J]. N Rice, 47(2): 58–61. [曾华, 2017. 植物耐盐碱机制研究进展 [J]. 北方水稻, 47(2): 58–61.]
- ZHANG QF, CHEN ZJ, WU JZ, et al., 2013. Screening for salinity tolerance at germination and seedling stages in wheat germplasm [J]. J Plant Genet Resour, 14(4): 620–626. [张巧凤, 陈宗金, 吴纪中, 等, 2013. 小麦种质芽期和苗期的耐盐性鉴定评价 [J]. 植物遗传资源学报, 14(4): 620–626.]
- ZHANG XT, XIE SQ, ZHANG YB, et al., 2011. New wheat germplasms from variational descendants of ‘Zhongyu5’ induced by NaN_3 and assessment of genetic diversity using SSR markers [J]. SW Chin J Agric Sci, 24(4): 1239–1242. [张希太, 谢淑芹, 张彦波, 等, 2011. 利用 NaN_3 诱变“中育 5 号”选育变异种质系及 SSR 分析 [J]. 西南农业学报, 24(4): 1239–1242.]
- ZHAO X, WANG LQ, ZHOU CJ, et al., 2005. Effects of salt stress on germination and emergence of different winter wheat genotypes [J]. Agric Res Arid Areas, 23(4): 108–112. [赵旭, 王林权, 周春菊, 等, 2005. 盐胁迫对不同基因型冬小麦发芽和出苗的影响 [J]. 干旱地区农业研究, 23(4): 108–112.]

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202004038

周瑜, 黄娟, 张亚勤, 等. 高粱幼穗分化与叶龄指数的关联研究 [J]. 广西植物, 2022, 42(2): 324–332.

ZHOU Y, HUANG J, ZHANG YQ, et al. Relationship between panicle differentiation and leaf age index of sorghum [J].

Guihaia, 2022, 42(2): 324–332.



高粱幼穗分化与叶龄指数的关联研究

周 瑜, 黄 娟, 张亚勤, 吴 毓, 李泽碧 *

(重庆市农业科学院特色作物研究所, 重庆 永川 402160)

摘 要: 为明确高粱穗分化进程的简易叶龄诊断方法, 该文以杂交种‘晋渝糯 3 号’和常规种‘国窖红 1 号’为供试材料, 设置 3 个播期, 观察幼穗分化进程及对应的叶龄, 分析各分化阶段与叶龄及叶龄指数的对应关系。结果表明: (1) 高粱幼穗分化过程可划分为 5 个时期(营养生长期、生长锥伸长期、枝梗分化期、小穗小花分化期和雌雄蕊分化期), 不育的有柄小穗可发育到雌雄蕊分化期。(2) 随着播期的推迟, 幼穗分化开始日期提前, 持续时间缩短, 穗分化各时期的叶龄和叶龄指数减小, 但品种间存在差异。(3) 高粱幼穗分化各时期与对应的叶龄指数存在直线回归关系, 其方程通式为 $Y_i = bX_i + a$ (Y_i : 幼穗分化期, X_i : 叶龄指数)。(4) 随着播期的推迟, ‘晋渝糯 3 号’的 b 和 $|a|$ 值逐渐增大, 而‘国窖红 1 号’的 b 和 $|a|$ 值则逐渐减小。综上所述, 可根据叶龄指数推测高粱幼穗分化进程, 该研究结果为高粱栽培管理指标化提供参考。

关键词: 高粱, 幼穗分化, 叶龄指数, 播期

中图分类号: Q944 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2022)02-0324-09

Relationship between panicle differentiation and leaf age index of sorghum

ZHOU Yu, HUANG Juan, ZHANG Yaqin, WU Yu, LI Zebi *

(Institute of Characteristic Crops Research, Chongqing Academy of Agricultural Sciences, Yongchuan 402160, Chongqing, China)

Abstract: In order to determine an easy leaf age (LA) diagnostic method of panicle differentiation stage of sorghum, the panicle differentiation of sorghum and the relationship between differentiation stage and LA and leaf age index (LAI) were investigated. Hybrid cultivar ‘Jinyunuo 3’ and conventional cultivar ‘Guojiaohong 1’ were used as materials planted in three sowing dates, the panicle differentiation stage and corresponding LA were recorded. The results were as follows: (1) The panicle differentiation could be divided into five stages, i. e. vegetative stage, elongation stage, panicle branch differentiation stage, spikelet and floret differentiation stage, gynoecium and stamen formation stage. The sterile spikelet with stalk could develop to gynoecium and stamen formation stage. (2) With the detention of sowing date, the starting date of panicle differentiation was advanced, and the growth duration shorted, and LA and LAI of each stage of panicle differentiation were decreased, but there were differences among varieties. (3) The relationship between the panicle differentiation stage and LAI conformed to linear regression correlation, with a formula of panicle differentiation stage (Y_i)

收稿日期: 2020-05-29

基金项目: 重庆市自然科学基金 (cstc2019jcyj-msxmX0125); 永川区自然科学基金 (Ycstc, 2019nb0101; Ycstc, 2019nb0102) [Supported by Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2019jcyj-msxmX0125); Natural Science Foundation of Yongchuan District (Ycstc, 2019nb0101; Ycstc, 2019nb0102)].

第一作者: 周瑜 (1987-), 博士, 助理研究员, 研究方向为作物高效栽培, (E-mail) xinganmermer@163.com。

* 通信作者: 李泽碧, 硕士, 助理研究员, 主要从事作物遗传育种与栽培技术研究, (E-mail) lizebi291525@163.com。

to LAI (X_i) of $Y_i = bX_i + a$. (4) With the detention of sowing date, the parameter b and $|a|$ in formula of ‘Jinyunuo 3’ were increased, while those of ‘Guojiaohong 1’ were decreased. To sum up, it is viable to infer panicle differentiation stage applying LAI, and the results provide theoretical basis for sorghum cultivation index management.

Key words: sorghum, panicle differentiation, leaf age index, sowing date

高粱(*Sorghum bicolor*)抗逆性强、粮饲酿能源兼用、经济价值高、适应性广,能在干旱贫瘠坡地等边际土壤种植并获得稳定产量,大力发展高粱生产对保障粮食安全、提高农民收入具有积极作用。穗分化是作物生长发育的关键时期,自此植株由营养生长转向生殖生长,库源关系转变,光合产物分配至穗部和籽粒(Streck et al., 2009)。穗分化对穗粒数和产量形成至关重要,而穗分化过程极易受环境影响(Wang et al., 2009),因此,穗分化阶段肥水管理对高产稳产起关键性作用。判断穗分化进程往往通过分解植株直接进行观察,会对植株造成毁灭性伤害,而通过其他器官形态推断穗分化进程简便易行,其中叶片出生和穗分化的对应关系,是形态诊断的核心内容,对栽培指标化管理具有重要作用(李存东等,2000)。

郭仲琛(1959)对高粱生长锥的发育过程进行了详细观察,根据库别尔曼(1958)的方法,将高粱穗分化划分为8个阶段;李淮滨等(1999)将穗分化过程与外部形态、栽培技术结合,将穗分化过程修改为6个阶段。幼穗分化进程与外部器官发育关系密切,大麦幼穗分化各阶段与叶龄、叶龄余数、叶枕距均存在不同程度的对应关系(吴兴如等,2000),对应关系依品种类型而不同,春性品种在小花原基分化期节间开始伸长,拔节期基本与药隔期同步,冬性品种在三联期节间开始伸长,拔节期处于雌雄蕊分化期;随品种冬性程度增加,穗分化各时期叶龄随之增大(钟代彬和李正玮,1995)。郑国清等(2003)根据玉米叶龄与雌雄穗的同伸关系,建立了雌雄穗建成模型,模型具有合理的数学与生物学意义。

穗分化与外部器官发育的相关性在水稻(凌启鸿等,1980,1983)、玉米(董红芬等,2010;宋碧等,2011)、小麦(李文雄和曾寒冰,1979;李存东等,2001)、谷子(王绍滨,2001)等作物上的研究较多,而高粱几乎未涉及,且不同基因型和播期对穗分化的影响亦未见报道。本研究对不同播期下不同品种高粱幼穗分化的过程进行观察,研究高粱穗分化与叶龄及叶龄指数的对应关系,探索幼穗分化的叶龄诊断方法,为高粱生产栽培管理指标化提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

杂交种‘晋渝糯3号’和常规种‘国窖红1号’,分别由重庆市农业科学院特色作物研究所和四川省农业科学院水稻高粱研究所提供。

试验于2018年在重庆市农业科学院渝西作物试验站(重庆市永川区卫星湖街道南华村,107.64° E、29.52° N,海拔298 m)实施,供试土壤为紫色土,耕层土壤 pH 为 5.6,有机质含量 22.3 g · kg⁻¹,全氮 1.31 g · kg⁻¹,速效氮 119.0 mg · kg⁻¹,速效磷 25.0 mg · kg⁻¹,速效钾 74.7 mg · kg⁻¹。试验地前茬休闲,栽培管理同高产示范田。试验设置4月4日(1)、4月24日(2)和5月16日(3)3个播期,行长5 m,行距0.5 m,小区面积 50 m²(5 m×10 m),种植密度为 7 000 株 · 667 m⁻²。穴播,3~4 叶期间苗,5~6 叶期定苗,每穴留苗2株。

1.2 测定方法

高粱5叶期时每小区选取具有代表性的植株80株进行标记,用红色油漆笔在同侧叶片上划线代表叶龄,每隔2 d选3株进行解剖观察,并记录对应的叶龄。

幼穗分化观察:植株逐层剥去叶鞘和苞叶至露出幼穗,在江南 NSZ-608T 体视显微镜下观察并拍照。幼穗分化时期参照段胜军等(1998)方法划分,发育后期以中上部的小穗、小花所处阶段来代表分化进程。

叶龄(leaf age, LA):已出叶片数,未全展开叶按照与上一张全展叶比值估算(杨从党等,2013)。

总叶龄(total leaf age, TLA):叶片全部展开后,以20株的总叶片数平均值表示。

叶龄指数(leaf age index, LAI):叶龄与总叶龄的百分比,即 $LAI(\%) = LA/TLA \times 100$ 。

1.3 数据分析

采用 Microsoft Excel 2007 软件进行数据整理、回归分析和作图。

2 结果与分析

2.1 高粱幼穗分化过程

高粱幼穗分化可分为 5 个时期,即营养生长期、生长锥伸长期、枝梗分化期、小穗小花分化期和雌雄蕊分化期,不同品种不同播期幼穗开始分化的时期和各阶段持续时间存在差异,但分化的方式和形态基本一致。以‘晋渝糯 3 号’幼穗发育为例,描述高粱幼穗分化过程(图 1)。

2.1.1 营养生长期 生长锥在胚胎时期就存在,高粱幼苗出土后至幼穗分化前,生长锥呈光滑的半球体(图 1:A)。营养生长期生长锥随着植株生长略为膨大,基部产生半圆形互生突起,即为叶原基(图 1:B)。叶原基膨大覆盖整个生长锥,分化展开形成幼叶。

2.1.2 生长锥伸长期 叶原基停止分化,叶片和茎节数确定,生长锥开始伸长,基部膨大,顶端逐渐变尖,生长锥由半球形变成圆锥形(图 1:C),表明植株进入幼穗分化阶段,开始进行生殖生长。茎基部第一节间开始伸长,进入拔节期。

2.1.3 枝梗分化期 高粱生长锥伸长期很短,生长锥没有显著抽长的状态,顶端稍微变尖基部就产生突起,形成一级枝梗原基(图 1:D, E),分化自下而上进行,呈向顶式生长。当顶部一级枝梗即将分化完成时,基部一级枝梗底部两侧开始突起,分化出二级枝梗,二级枝梗也是向顶式分化,因此,一级枝梗整体上呈三角形(图 1:F)。顶部二级枝梗尚在分化时,中部二级枝梗两侧开始进行三级枝梗分化(图 1:G)。生长锥中下部二级、三级枝梗分化较早,因此,可产生三级、四级枝梗原基,小穗原基从三级、四级枝梗原基上产生,而顶端枝梗分化较慢,只产生二级枝梗原基,直接在二级枝梗原基上产生小穗原基。枝梗分化期是决定枝梗数和小穗数的关键时期,影响结实粒数。

2.1.4 小穗小花分化期 三级枝梗分化完成后,从穗上部开始逐渐向下,三级枝梗上产生乳头状突起(图 1:H),即为小穗原基,小穗原基继续分化,也产生乳头状突起,即为小花原基(图 1:I),枝梗顶端排列有 3 个小穗原基,以下均为 2 个小穗原基(图 1:J)。小穗原基顶部钝圆,基部产生类似叶原基形式的环状突起,自下往上层叠互生,分别为外颖、内颖、小花的外稃和内稃,雌雄蕊原基在内外稃中间。

2.1.5 雌雄蕊分化期 小花原基继续膨大伸长,顶端分化出 3 个圆形突起,即为雄蕊原基,3 个雄蕊原基中央隆起 1 个较大的圆形突起,即为雌蕊原基(图 1:K, L)。内外颖、内外稃继续伸长增大,将雌雄蕊包裹其中(图 1:M)。雄蕊原基伸长增大,呈透明四棱状,同时雌蕊原基体积增大,顶端形成 2 个角状突起并伸长(图 1:N)。有柄小穗内可育小花雌雄蕊停止分化,仅内外颖和内外稃伸长增大。无柄小穗内可育小花雌雄蕊继续生长,花药变黄,子房膨大,柱头出现羽毛状突起(图 1:O)。

2.2 播期对高粱幼穗分化进程的影响

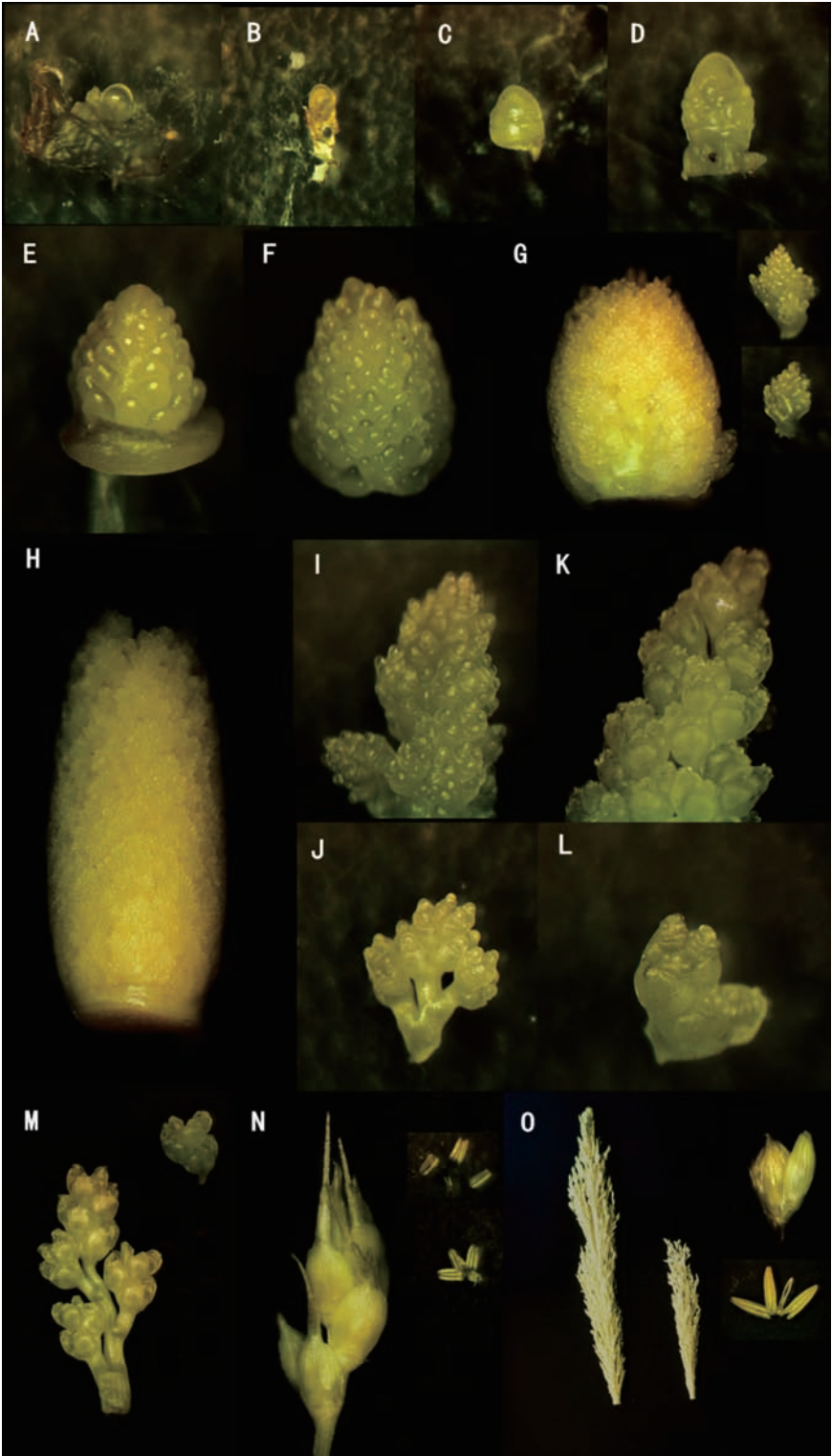
表 1 结果显示,随着播期的推迟,幼穗分化起始日期逐渐提前,分化持续时间缩短,抽穗至成熟天数减少,生育期缩短。比较变异系数可知:3 个播期间‘晋渝糯 3 号’幼穗分化起始时间变化幅度较大,而幼穗分化持续时间和抽穗至成熟天数的变化幅度均较小;‘国窖红 1 号’幼穗分化起始时间和幼穗分化持续时间变化幅度均较大,而抽穗至成熟天数变化幅度较小。播期对‘国窖红 1 号’生育期的影响较大。

随着播期的推迟,拔节到生长锥伸长期(Ⅱ)、枝梗分化期(Ⅲ)和雌雄蕊分化期(Ⅴ)逐渐缩短,生长锥伸长期(Ⅱ)和小穗小花分化期(Ⅳ)在播期间均无差异。通过比较变异系数发现,‘国窖红 1 号’均比‘晋渝糯 3 号’变异幅度大。

2.3 播期对高粱叶龄及叶龄指数的影响

由表 2、图 2 可知:随着播期推迟,‘晋渝糯 3 号’在拔节期、生长锥伸长期(Ⅱ)和雌雄蕊分化期(Ⅴ)叶龄逐渐减小,其他时期叶龄在 3 个播期间差异不明显;‘国窖红 1 号’的叶龄在各个时期均随播期推迟而减小。

随播期的推迟,叶片生长速率逐渐提高,‘晋渝糯 3 号’在 3 个播期的出叶速度分别为每天 0.28、0.30 和 0.35 片,‘国窖红 1 号’分别为每天 0.25、0.29 和 0.34 片。其中,出苗至拔节阶段,2 个品种出叶速度差异不明显,播期 1 在每天 0.25 片左右,播期 2 与播期 3 在 0.27~0.29 之间,‘晋渝糯 3 号’略低于‘国窖红 1 号’。拔节至抽穗,叶片生长速率随播期推迟而增加,‘晋渝糯 3 号’3 个播期分别为每天 0.31、0.33 和 0.42 片,‘国窖红 1 号’分别为每天 0.25、0.28 和 0.39 片,播期 1 与播期 2 之间出叶速度相近,明显低于播期 3。‘晋渝糯 3 号’在幼穗分化各个时期的叶龄均低于‘国



A-B. 营养生长期；C. 生长锥伸长期；D-E. 一级枝梗分化期；F. 二级枝梗分化期；G. 三级枝梗分化期；H-J. 小穗小花分化期；K-O. 雌雄蕊分化期。

A-B. Vegetative stage；C. Elongation stage；D-E. Primary panicle branch differentiation stage；F. Secondary panicle branch differentiation stage；G. Third panicle branch differentiation stage；H-J. Spikelet and floret differentiation stage；K-O. Gynoecium and stamen formation stage.

图1 ‘晋渝糯3号’的幼穗分化过程

Fig. 1 Panicle differentiation stages of ‘Jinyunuo 3’

表 1 不同播期下高粱幼穗各分化时期的开始日期及持续天数

Table 1		Starting date and lasting days of each panicle differentiation stage in different sowing dates																	
品种 Cultivar	处理 Treatment	出苗期 Seeding stage		拔节期 Jointing stage		Ⅱ		Ⅲ				Ⅳ		Ⅴ		抽穗期 Heading stage		成熟期 Mature stage	
		日期 Date	天数 Days (d)	日期 Date	天数 Days (d)			日期 Date	日期 Date	日期 Date	天数 Days (d)					日期 Date	天数 Days (d)	日期 Date	天数 Days (d)
						Ⅲ-1	Ⅲ-2					Ⅲ-3							
晋渝糯 3 号’ ‘Jinyunuo 3’	1	4/11	32	5/13	6	5/19	3	5/22	5/25	5/29	10	6/1	4	6/5	8	6/13	42	7/25	112
	2	5/1	27	5/28	6	6/3	3	6/6	6/7	6/13	9	6/15	4	6/19	8	6/27	39	8/5	103
	3	5/22	24	6/15	4	6/19	3	6/22	6/25	6/27	7	6/29	4	7/3	7	7/10	35	8/14	90
	CV (%)	14.61		21.65		0		17.63				0		7.53		9.08		10.88	
国窖红 1 号’ Guojiaohong 1’	1	4/12	34	5/16	10	5/26	3	5/29	6/1	6/5	13	6/11	4	6/15	11	6/26	36	8/1	119
	2	5/1	26	5/27	7	6/3	3	6/6	6/7	6/13	12	6/18	4	6/22	9	7/1	36	8/6	104
	3	5/22	26	6/17	4	6/21	3	6/24	6/25	6/29	8	7/2	4	7/6	6	7/12	35	8/16	92
	CV (%)	16.11		42.86		0		24.05				0		29.04		1.62		12.88	

注：Ⅱ. 生长锥伸长期；Ⅲ-1. 一级枝梗分化期；Ⅲ-2. 二级枝梗分化期；Ⅲ-3. 三级枝梗分化期；Ⅳ. 小穗小花分化期；Ⅴ. 雌雄蕊分化期；CV. 变异系数(%)。日期格式为“月/日”。下同。

Note: Ⅱ. Elongation stage; Ⅲ-1. Primary panicle branch differentiation stage; Ⅲ-2. Secondary panicle branch differentiation stage; Ⅲ-3. Third panicle branch differentiation stage; Ⅳ. Spikelet and floret differentiation stage; Ⅴ. Gynoecium and stamen formation stage. CV. Coefficient of variation (%). The date format: “Month/Day”. The same below.

表 2 不同播期下高粱幼穗各分化时期的叶龄和叶龄指数

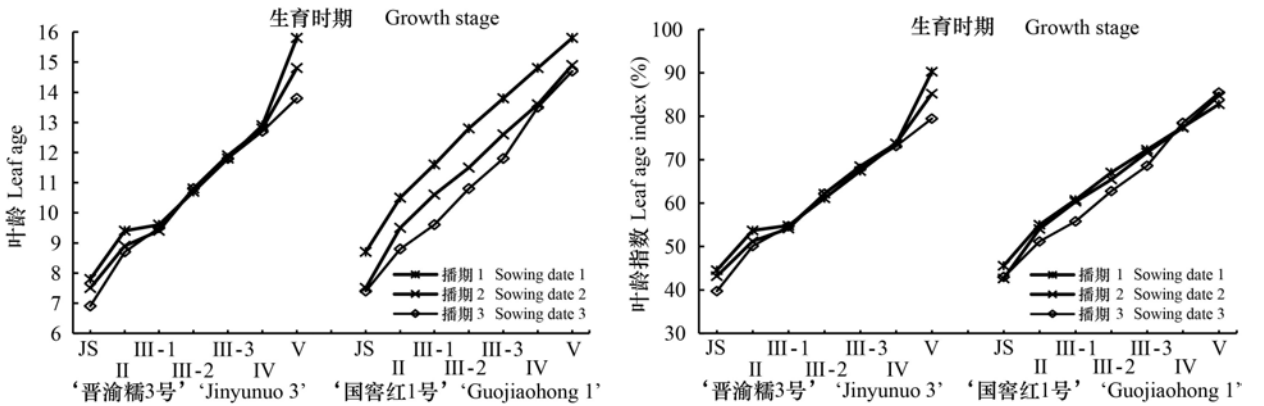
Table 2 Leaf age (LA) and leaf age index (LAI) of each panicle differentiation stage in different sowing dates																	
品种 Cultivar	处理 Treatment	拔节期 Jointing stage		Ⅱ		Ⅲ-1		Ⅲ-2		Ⅲ-3		Ⅳ		Ⅴ		成熟期 Mature stage	
		LA	LAI														
‘晋渝糯 3 号’ ‘Jinyunuo 3’	1	7.8	44.57	9.4	53.71	9.6	54.86	10.7	61.14	11.8	67.43	12.9	73.71	15.8	90.29	17.5	
	2	7.5	43.19	8.9	51.26	9.4	54.14	10.8	62.20	11.9	68.53	12.8	73.72	14.8	85.24	17.36	
	3	6.9	39.74	8.7	50.10	9.5	54.71	10.8	62.20	11.8	67.96	12.7	73.14	13.8	79.48	17.36	
	均值 Average	7.4	42.50	9	51.69	9.5	54.57	10.77	61.85	11.83	67.97	12.8	73.52	14.8	85.00	17.41	
	CV (%)	6.19	5.86	4.01	3.57	1.05	0.70	0.54	0.99	0.49	0.81	0.78	0.45	6.76	6.36	0.45	
‘国窖红 1 号’ ‘Guojiaohong 1’	1	8.7	45.59	10.5	55.02	11.6	60.79	12.8	67.07	13.8	72.31	14.8	77.55	15.8	82.79	19.08	
	2	7.5	42.68	9.5	54.07	10.6	60.33	11.5	65.45	12.6	71.71	13.6	77.40	14.9	84.80	17.57	
	3	7.4	43.02	8.8	51.16	9.6	55.81	10.8	62.79	11.8	68.60	13.5	78.49	14.7	85.47	17.20	
	均值 Average	7.87	43.77	9.6	53.42	10.6	58.98	11.7	65.10	12.73	70.88	13.97	77.81	15.13	84.35	17.95	
	CV (%)	9.20	3.63	8.90	3.76	9.43	4.66	8.67	3.32	7.91	2.81	5.18	0.76	3.87	1.65	5.56	

注：LA. 叶龄；LAI. 叶龄指数(%)；TLA. 总叶龄。

Note: LA. Leaf age; LAI. Leaf age index (%); TLA. Total leaf age.

窖红 1 号’。成熟期总叶龄随着播期推迟而减小，通过比较变异系数可知，‘晋渝糯 3 号’的总叶龄受播期的影响较‘国窖红 1 号’小。

叶龄指数在高粱各个生育时期随播期的变化趋势与叶龄类似。随着播期的推迟，‘晋渝糯 3 号’在拔节期、生长锥伸长期(Ⅱ)和雌雄蕊分化期(Ⅴ)叶龄指数逐渐减小，其他时期叶龄指数在 3 个播期间差异不明显；‘国窖红 1 号’在生长锥伸



JS. 拔节期; II. 生长锥伸长期; III-1. 一级枝梗分化期; III-2 二级枝梗分化期; III-3 三级枝梗分化期; IV. 小穗小花分化期; V. 雌雄蕊分化期。
JS. Jointing stage; II. Elongation stage; III-1. Primary panicle branch differentiation stage; III-2. Secondary panicle branch differentiation stage; III-3. Third panicle branch differentiation stage; IV. Spikelet and floret differentiation stage; V. Gynoecium and stamen formation stage.

图 2 高粱不同生育时期的叶龄和叶龄指数
Fig. 2 Leaf age and leaf age index of sorghum in different growth stages

长期(II)和枝梗分化期(III)叶龄指数逐渐减小,拔节期和小穗小花分化期(IV)叶龄指数在播期 2 最小,雌雄蕊分化期(V)叶龄指数逐渐增加。‘晋渝糯 3 号’在幼穗分化各个时期的叶龄指数均低于‘国窖红 1 号’。同一幼穗分化阶段不同播期间叶龄指数的 CV 值较小,表明幼穗分化阶段与叶龄指数的对应关系更为稳定,受环境影响较小。

2.4 高粱幼穗分化与叶龄指数的关联

回归分析发现,不同播期下幼穗分化阶段与叶龄指数的关系均为线性相关,可用直线回归方程 $Y_i=bX_i+a$ (Y_i 为幼穗分化阶段, X_i 为叶龄指数, a, b 表示系数) 表示, R^2 为 0.937 3~0.993 1, 表现出极显著正相关(表 3)。

随着播期的推迟,‘晋渝糯 3 号’的 b 和 $|a|$ 值逐渐增大,而‘国窖红 1 号’则逐渐减小。对‘晋渝糯 3 号’和‘国窖红 1 号’的系数 b, a 进行差异显著性 t 检验, $t_{bJ3} = 29.661, t_{aJ3} = -25.717, t_{bG1} = 23.525, t_{aG1} = -11.451 (t_{0.01} = 5.841, n = 3)$, 各系数间的差异达极显著水平,表明 2 个品种在 3 个播期条件下的直线回归方程之间存在极显著性差异,无法拟合出一个通用的直线回归方程来表示高粱幼穗分化时期与叶龄指数之间的关系。

公式 $X = (2-a)/b$ 表示高粱幼穗分化起始期,即生长锥伸长期(II)的理论叶龄指数。由表 3 可知:2 个品种的理论叶龄指数均随着播期的推迟而

下降,与田间表现一致,表明播期对高粱开始幼穗分化时的叶龄指数存在显著影响;公式 $Y = 5/b$ 表示理论上高粱幼穗分化起始和终止时叶龄指数差值,品种之间存在差异,‘晋渝糯 3 号’的值随播期推迟逐渐减小,‘国窖红 1 号’的值随播期推迟而逐渐增大,而两个品种的幼穗分化持续时间均随播期逐渐缩短,表明‘晋渝糯 3 号’在穗分化阶段的出叶速度在播期间较为稳定,而‘国窖红 1 号’受播期影响较大。

3 讨论

3.1 高粱幼穗分化过程

高粱的花序是圆锥花序,穗轴上着生一级枝梗,一级枝梗上着生二级枝梗,二级枝梗上着生三级枝梗(李涛,2001)。枝梗末端着生小穗簇,小穗簇由无柄小穗和有柄小穗构成,无柄小穗结实,有柄小穗不结实。本研究发现,不育的有柄小穗内小花可发育到雌雄蕊分化期,雄蕊原基呈透明四棱状,雌蕊原基顶端形成 2 个角状突起,而后才停止分化。笔者在其他高粱材料中发现,无柄小穗去雄后,次日有柄小穗花药依旧伸出,表明有柄小穗内小花的雄蕊可继续分化,而雌蕊是否继续分化,以及造成该现象的确切原因有待进一步研究。

3.2 播期对高粱幼穗分化的影响

播期变化,使高粱各生育阶段所处的温度、光

表 3 幼穗分化与叶龄指数的线性回归分析

Table 3 Liner regression analysis of panicle differentiation and leaf age index

品种 Cultivar	处理 Treatment	b	X	a	R ²	F	(2-a)/b	5/b
‘晋渝糯 3 号’ ‘Jinyunuo 3’	Y ₁	0.138 3	X ₁	-4.808 8	0.937 3	74.799	49.232 1	36.153 3
	Y ₂	0.148 6	X ₂	-5.301 6	0.983 9	306.395	49.135 9	33.647 4
	Y ₃	0.155 4	X ₃	-5.486 1	0.990 8	538.677	48.173 1	32.175 0
	t-test	29.661 **		25.717 **			144.469 **	29.271 **
‘国窖红 1 号’ ‘Guojiaohong 1’	Y ₁	0.164 8	X ₁	-6.855 4	0.989 9	492.077	53.734 2	30.339 8
	Y ₂	0.149 9	X ₂	-5.774 6	0.987 2	385.941	51.865 2	33.355 6
	Y ₃	0.142 8	X ₃	-5.083 5	0.993 1	724.032	49.604 3	35.014 0
	t-test	23.525 **		11.451 **			43.329 **	24.049 **

注：** 表示在 0.01 水平上差异显著。
Note: ** indicates significant differences at 0.01 level.

照和水分条件不同,从而影响高粱生育进程。随播期推迟,高粱全生育期显著变短,主要由于出苗至抽穗的时间缩短(张恩艳,2015;周瑜等,2019)。玉米全生育期随播期推迟而缩短,雄穗分化期亦缩短,而雌穗分化期受播期影响不大(刘昌继,1996)。本研究中,随着播期的推迟,幼穗分化开始日期逐渐提前,幼穗分化持续时间逐渐缩短。播期对小麦幼穗分化阶段的伸长期、单棱期、二棱期影响较大,品种春性越强,幼穗分化进程越快(郇庆炉等,2003)。本试验中,播期仅对‘晋渝糯 3 号’幼穗分化起始时期影响较大,对‘国窖红 1 号’幼穗分化起始时期和持续时间影响均较大。

3.3 播期对高粱的叶龄及叶龄指数的影响

穗分化起始期的叶龄在基因型和播期间存在差异。穗分化时水稻的叶片数目在品种间差异明显,但 Yin & Kropff(1998)认为穗分化时未展开叶片数目是稳定的,平均为 3 片叶。而 Streck 等(2009)认为该结论不适用于所有水稻品种,因为总叶片数不同,穗分化时未展开叶片数目可从 1 到 5 或 6。大麦同一品种不同播期幼穗分化各阶段对应的叶龄基本一致,同一播期不同品种幼穗分化各阶段对应的叶龄差异明显(吴兴如等,2000)。本试验中,随着播期的推迟,‘晋渝糯 3 号’在拔节期、生长锥伸长期和雌雄蕊分化期叶龄逐渐减小,‘国窖红 1 号’的叶龄在各个时期均随播期推迟而减小。温度对出叶有促进作用,在小麦上表现为春播小麦穗分化各期的叶龄均比秋播

大(钟代彬和李正玮,1995)。本研究结果显示,叶龄指数在高粱各个生育时期随播期的变化趋势与叶龄类似,但幼穗分化阶段与叶龄指数的对应关系更稳定,在播期间变化较小,这与李国瑜等(2017)在夏谷上的研究基本一致。

3.4 高粱幼穗分化与叶龄指数的关联

幼穗分化各阶段与叶龄指数存在显著的相关关系,通过建立回归方程,用叶龄指数推断穗分化进程,已在小麦(李存东等,2000)、玉米(曹彬等,2005)、谷子(卢海博等,2012;李国瑜等,2017)等作物上得到广泛应用。然而,应用叶龄指数描述高粱发育进程的研究较少。本研究结果显示,高粱幼穗分化阶段与叶龄指数符合直线回归关系,直线回归方程为 $Y_i=bX_i+a$,随着播期的推迟,‘晋渝糯 3 号’的 b 和 |a| 值逐渐增大,而‘国窖红 1 号’的 b 和 |a| 值则逐渐减小,不同品种和播期的回归方程各系数间存在极显著差异,用直线回归方程来表示不同播期下高粱幼穗分化时期与叶龄指数的关系需要进一步研究。

4 结论

高粱幼穗分化可划分为 5 个时期:营养生长期、生长锥伸长期、枝梗分化期、小穗小花分化期和雌雄蕊分化期,不育的有柄小穗可发育到雌雄蕊分化期。随着播期的推迟,幼穗分化开始日期提前,幼穗分化持续时间缩短,穗分化各时期的叶

龄减小,但品种间存在差异。高粱幼穗分化阶段与叶龄指数符合直线回归关系。

参考文献:

- CAO B, ZHANG SJ, SUN ZY, et al., 2005. Research report of regression relationship between leaf number index and spike differentiation in maize [J]. J Maize Sci, 13(1): 86–88. [曹彬, 张世杰, 孙占育, 等, 2005. 玉米叶龄指数与穗分化回归关系的研究初报 [J]. 玉米科学, 13(1): 86–88.]
- DONG HF, LI H, LI AJ, et al., 2010. Relationships between spike and stem growth and female spike differentiation under different densities [J]. J Maize Sci, 18(5): 65–71. [董红芬, 李洪, 李爱军, 等, 2010. 不同密度下玉米穗茎生长与雌穗分化的关系 [J]. 玉米科学, 18(5): 65–71.]
- DUAN SJ, DIAO XM, ZHAO LY, 1998. Electronic scanning observation of developmental morphology of inflorescence in foxtail millet [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 18(3): 406–410. [段胜军, 刁现民, 赵连元, 1998. 谷子穗分化的扫描电镜观察 [J]. 西北植物学报, 18(3): 406–410.]
- GAO QL, XUE X, WU YE, et al., 2003. Effects of sowing times on the spike differentiation of different wheat varieties under the climate of warm winter [J]. Chin J Appl Ecol, 14(10): 1627–1631. [郜庆炉, 薛香, 吴玉娥, 等, 2003. 暖冬条件下播期对不同小麦幼穗分化的影响 [J]. 应用生态学报, 14(10): 1627–1631.]
- GUO ZC (KOU JS), 1959. Developmental morphology of the inflorescence of *Sorghum vulgare* Pers [J]. J Integr Plant Biol, (3): 215–220. [郭仲琛, 1959. 高粱花序的发育形态 [J]. 植物学报, (3): 215–220.]
- КЫПЕПМАН ФМ, 1958. The formation stage of grain in Gramineae [M]. Beijing: Science Press. [库别尔曼 ФМ, 1958. 禾本科植物结实器官的形成阶段 [M]. 北京: 科学出版社.]
- LI CD, CAO WX, DAI TB, et al., 2001. Effects of different varieties and sowing dates on development stages of wheat [J]. Chin J Appl Ecol, 12(2): 218–222. [李存东, 曹卫星, 戴廷波, 等, 2001. 小麦不同品种和播期对发育阶段的效应 [J]. 应用生态学报, 12(2): 218–222.]
- LI CD, CAO WX, LUO WH, et al., 2000. Relationship between leaf emergence on main stem and spike differentiation stages in wheat [J]. Sci Agric Sin, 33(1): 33–38. [李存东, 曹卫星, 罗卫红, 等, 2000. 小麦叶片出生与穗分化关系的研究 [J]. 中国农业科学, 33(1): 33–38.]
- LI GY, CONG XJ, QIN L, et al., 2017. Effects of sowing dates on panicle differentiation and leaf number index of summer-sowing foxtail millet [*Setaria italica* (L.) Beauv.] [J]. Sci Agric Sin, 50(4): 612–624. [李国瑜, 丛新军, 秦岭, 等, 2017. 播期对夏谷幼穗分化及叶龄指数的影响 [J]. 中国农业科学, 50(4): 612–624.]
- LI HB, LI WY, HOU LB, et al., 1999. Panicle differentiation and top-dressing in sorghum [J]. Liaoning Agric Sci, (2): 5–8. [李淮滨, 李文跃, 侯立白, 等, 1999. 高粱穗分化与追肥 [J]. 辽宁农业科学, (2): 5–8.]
- LI T, 2001. Study on the ear structure of sorghum [J]. Hortic & Seed, 21(3): 18–20. [李涛, 2001. 高粱穗结构的研究 [J]. 园艺与种苗, 21(3): 18–20.]
- LI WX(WH), ZENG(TSENG) HB, 1979. The characteristics of spike differentiation and its relationship to high-yielding culture in spring wheat [J]. Sci Agric Sin, (1): 1–9. [李文雄, 曾寒冰, 1979. 春小麦穗分化的特点及其与高产栽培的关系 [J]. 中国农业科学, (1): 1–9.]
- LING CH, CAI JZ, SU ZF, 1980. The practical value of using the “leaf index” and “leaf remainder” in determining the stages of panicle-differentiation in rice plant [J]. Sci Agric Sin, (4): 1–11. [凌启鸿, 蔡建中, 苏祖芳, 1980. 叶龄余数在稻穗分化进程鉴定中的应用价值 [J]. 中国农业科学, (4): 1–11.]
- LING QH(CH), SU ZF, ZHANG(CHANG) HC, et al., 1983. The leaf-age-model of development process in different varieties of rice [J]. Sci Agric Sin, (1): 9–18. [凌启鸿, 苏祖芳, 张洪程, 等, 1983. 水稻品种不同生育类型的叶龄模式 [J]. 中国农业科学, (1): 9–18.]
- LIU CJ, 1996. Effects of different sowing dates on the ear differentiation and yield of maize [J]. Cult Plant, (5): 37–38. [刘昌继, 1996. 不同播期对玉米穗分化及产量的影响 [J]. 耕作与栽培, (5): 37–38.]
- LU HB, LI HQ, GONG XC, et al., 2012. Research on relationship between spike differentiation stages and leaf number index in Zhangzagu (*Setaria italica*) [J]. Guangdong Agric Sci, 39(19): 42–43. [卢海博, 李鸿强, 龚学臣, 等, 2012. 张杂谷穗分化时期与叶龄指数关系的研究 [J]. 广东农业科学, 39(19): 42–43.]
- SONG B, AN W, YUAN CL, et al., 2011. Study on relationship between the leaf born and spike differentiation for both spring and summer sowed maize varieties [J]. Hubei Agric Sci, 50(21): 4343–4347. [宋碧, 安伟, 袁朝兰, 等, 2011. 玉米品种春播与夏播叶片出生与穗分化的关系 [J]. 湖北农业科学, 50(21): 4343–4347.]
- STRECK NA, LAGO I, BOSCO LC, et al., 2009. Relationship between panicle differentiation and main stem leaf number in rice genotypes and red rice biotypes [J]. Sci Agric, 66(2): 195–203.
- WANG SB, 2001. Relationship between leaf growth young panicle differentiation and morphological characters in millet

- [J]. Heilongjiang Agric Sci, (6): 23–24. [王绍滨, 2001. 谷子叶片生长及幼穗分化与外部形态的关系 [J]. 黑龙江农业科学, (6): 23–24.]
- WANG YM, CHEN SY, SUN HY, et al., 2009. Effects of different cultivation practices on soil temperature and wheat spike differentiation [J]. Cereal Res Comm, 37 (4): 575–584.
- WU XR, LI HL, ZHAO JX, 2000. Studies on young panicle differentiation and phenotype diagnoses of barley [J]. J Yunnan Agric Univ, 15(1): 42–45. [吴兴如, 李怀莉, 赵俊秀, 2000. 大麦不同品种不同播期幼穗分化时期形态诊断研究 [J]. 云南农业大学学报, 15(1): 42–45.]
- YANG CD, LI GH, LI GY, et al., 2013. Establishment of leaf age model of rice varieties at different altitude environments in Yunnan Province, China [J]. SW Chin J Agric Sci, 26 (4): 1372–1377. [杨从党, 李刚华, 李贵勇, 等, 2013. 云南省立体生态稻区水稻叶龄模式建立 [J]. 西南农业学报, 26(4): 1372–1377.]
- YIN XY, KROPFF MJ, 1998. The effect of photoperiod on interval between panicle initiation and flowering in rice [J]. Field Crop Res, 57(3): 301–307.
- ZHANG EY, 2015. Effects of sowing period and density on summer sorhum growth and yield [D]. Jinzhong: Shanxi Agricultural University: 16. [张恩艳, 2015. 播期、密度对夏播高粱生长发育及产量的影响 [D]. 晋中: 山西农业大学: 16.]
- ZHENG GQ, DUAN SF, YAN SB, et al., 2003. Simulation models of the development of leaf age and organs in maize [J]. J Maize Sci, 11(4): 63–66. [郑国清, 段韶芬, 阎书波, 等, 2003. 玉米叶龄与器官发育模拟模型 [J]. 玉米科学, 11(4): 63–66.]
- ZHONG DB, LI ZW, 1995. Studies on the homologous relation of ear-differentiation and morphological characteristics with long daylenth and vernalization treatment in barley [J]. J Zhejiang Agric Univ, 21(3): 289–292. [钟代彬, 李正玮, 1995. 长日和春化条件下大麦幼穗分化与外部形态的对应关系 [J]. 浙江农业大学学报, 21(3): 289–292.]
- ZHOU Y, HUANG J, WU Y, et al., 2019. Effects of sowing date on the growth and yield of direct seeding sorghum of different varieties [J]. J Yunnan Agric Univ (Nat Sci Ed), 34(3): 384–392. [周瑜, 黄娟, 吴毓, 等, 2019. 播期对直播高粱生长发育及产量的影响 [J]. 云南农业大学学报(自然科学版), 34(3): 384–392.]

(责任编辑 周翠鸣)

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202010011

党骄阳, 陈月圆, 颜小捷, 等. 战骨黄酮碳苷类化合物的大孔树脂富集工艺研究 [J]. 广西植物, 2022, 42(2): 333–339.
DANG JY, CHEN YY, YAN XJ, et al. Purification technology of total flavonoid-C-glycosides of *Premna fulva* by macroporous resin [J]. Guihaia, 2022, 42(2): 333–339.



战骨黄酮碳苷类化合物的大孔树脂富集工艺研究

党骄阳^{1,2}, 陈月圆², 颜小捷², 卢凤来², 李霞¹, 李典鹏^{2*}

(1. 桂林理工大学 化学与生物工程学院, 广西 桂林 541006; 2. 广西壮族自治区 广西植物研究所, 中国科学院 广西植物功能物质研究与利用重点实验室, 广西 桂林 541006)

摘要: 黄酮碳苷, 作为战骨植物中的有效成分之一, 具有抗骨关节炎的功效。为优化植物战骨茎中总黄酮碳苷的富集纯化工艺, 该研究以战骨中 5 个黄酮碳苷为考察指标, 通过对 13 种大孔树脂的静态吸附与解吸实验, 优选出合适的大孔树脂, 利用高效液相色谱对结果进行检测, 然后利用正交工艺优化富集纯化条件。结果表明: (1) XAD-16N 型大孔树脂对植物战骨茎中黄酮碳苷具有较好的吸附和解吸效果, 通过单因素筛选及正交工艺优化, 最终确定其最佳富集纯化工艺为上样浓度为原提取液稀释 2 倍、上样流速 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 、洗脱液浓度 60% 乙醇。(2) 总黄酮碳苷的含量由 1.73% (原植物中含量) 提高到 14.50%, 提高了 7.38 倍。以上结果表明, 优化的提取工艺稳定可行, 筛选的大孔树脂富集纯化效果良好, 为植物战骨茎的药物开发提供数据参考。

关键词: 战骨, 黄酮碳苷, 大孔树脂, 正交试验

中图分类号: Q946 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2022)02-0333-07

Purification technology of total flavonoid-C-glycosides of *Premna fulva* by macroporous resin

DANG Jiaoyang^{1,2}, CHEN Yueyuan², YAN Xiaojie², LU Fenglai², LI Xia¹, LI Dianpeng^{2*}

(1. College of Chemistry and Bioengineering, Guilin University of Technology, Guilin 541006, Guangxi, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Functional Phytochemicals Research and Utilization, Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, Guangxi, China)

Abstract: Flavonoid-C-glycosides, as one kind of the effective components in *Premna fulva*, have the effect of antigen-induced arthritis. In order to optimize the enrichment and purification process of *P. fulva* stems, through static adsorption and desorption experiments on 13 kinds of macroporous resins with five flavonoid-C-glycosides in *P. fulva* stems as the index, a suitable macroporous resin was selected, and the results were tested by the HPLC, and then the orthogonal process was used to optimize the enrichment and purification conditions. The results were as follows: (1) XAD-16N macroporous resin has good adsorption and desorption effects on the five flavonoid -C-glycosides in *P. fulva* stems.

收稿日期: 2020-12-02

基金项目: 广西创新驱动发展专项(桂科 AA18118015); 广西自然科学基金(2018GXNSFAA294031); 中央引导地方科技发展专项(桂科 ZY20111010) [Supported by Innovation-Driven Development Special Project of Guangxi (AA18118015); Natural Science Foundation of Guangxi (2018GXNSFAA294031); Special Project of Local Science and Technology Development Guided by the Central Government (ZY20111010)].

第一作者: 党骄阳(1996-), 硕士研究生, 研究方向为药物研发与转化, (E-mail) 545121289@qq.com。

*通信作者: 李典鹏, 博士, 研究员, 主要从事植物化学研究, (E-mail) ldp@gxib.cn。

Through single factor screening and orthogonal process optimization, the best enrichment and purification process was finally determined as that the loading concentration was two times the original extract diluted, the loading flow rate was $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, and the eluent concentration was 60% ethanol. (2) The contents of five flavonoid-C-glycosides increased from 1.73% (in the original plant) to 14.50%, an increase of 7.38 times. All the results indicate that the selected extraction process is stable and feasible, and the selected macroporous resin has good separation and purification effects, which provides a reference for the drug development of *P. fulva* stems.

Key words: *Premna fulva*, flavonoid-C-glycosides, macroporous resin, orthogonal test

战骨又名黄毛豆腐柴(*Premna fulva*), 马鞭草科豆腐柴属植物, 其根、茎、叶均可以入药。分布于广西南宁、龙州平果等地(戴春燕等, 2007; 史艳财等, 2010)。具有祛风止痛等功效, 民间常用于治疗腰腿疼痛、跌打扭伤、风湿性和类风湿性关节炎等, 是广西的地道药材(蒋才武等, 2004)。战骨作为广西道地药材, 药用历史悠久。文献调研发现对战骨的研究主要集中在化学成分(潘洪平, 2002; 吴雪莉等, 2016)、药理(叶勇等, 2018)及相关制剂的药效、临床研究(陈苍海, 2018)等方面。方刚(2018)明确战骨的主要成分为柚皮素等黄酮类化合物, 并对黄酮类成分研究进行了提取工艺研究(李小燕等, 2005)。最新研究发现, 以战骨为原料的单方制剂产品健骨注射液的抗骨关节炎的功效成分主要为 5 个黄酮碳苷(Chen et al., 2019)。且梁玉婷等(2018)报道基于 UFLC-Triple TOF-MS/MS 技术, 从战骨植物中指认出 18 个黄酮碳苷类化合物异构体, 说明战骨植物中含有丰富的碳苷黄酮。战骨中黄酮碳苷的提取采用天然低共熔溶剂(NADESs)可高效提取黄酮碳苷(陈月圆等, 2020), 总黄酮碳苷实际得率为 $17.37 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 显著高于现有传统有机溶剂提取工艺($13.70 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), 但是, 该黄酮碳苷类提取物中仍普遍含有萜类、多糖、蛋白质、木脂素等多种杂质, 严重制约了黄酮碳苷类化合物的实际应用。因此, 非常有必要开发出一种有效的方法用以生产高纯度的战骨黄酮碳苷类化合物。本文建立了富集战骨中黄酮碳苷类化合物的纯化方法, 黄酮碳苷类化合物作为战骨植物中的主要功效成分, 为了进一步开发和利用战骨中的黄酮碳苷类化合物, 及现有产品制剂(如健骨注射液)的二次开发和利用。

大孔树脂作为一种有机高聚物吸附剂, 具有吸附性好、选择性强、吸附速度快、可重复利用的特点, 已广泛应用于黄酮类成分的分离纯化以及化学医药等领域(汪洪武和刘艳清, 2005; 刘丹等, 2016)。战骨黄酮碳苷的 NADESs 提取液能否运用大孔树脂富集纯化研究未见报道, 故本文采用

大孔树脂法对战骨植物中的 5 个黄酮碳苷的 NADESs 提取液进行富集纯化研究。通过比较 13 种大孔树脂对战骨植物中 5 个总黄酮碳苷的吸附效率, 筛选出了一种对战骨具有高吸附分离效率的树脂, 通过单因素实验及正交试验对该树脂的工艺条件进行了优化。

1 材料与方法

1.1 材料和实验仪器

战骨购于广西玉林药材市场, 经广西植物研究所唐辉研究员鉴定为马鞭草科豆腐柴属植物黄毛豆腐柴(*Premna fulva*)的根茎。凭证样品保存于广西植物功能物质研究与利用重点实验室。

5 个黄酮碳苷对照品(芹菜素-6, 8-二-C- β -D-葡萄糖苷、芹菜素-6-C- β -D-木糖-8-C- β -D-葡萄糖苷、芹菜素-6-C- β -D-木糖-8-C- β -D-半乳糖苷、芹菜素-6-C- β -D-葡萄糖-8-C- β -D-木糖苷和芹菜素-6-C- β -D-半乳糖-8-C- β -D-木糖苷), 实验室自制, 纯度大于 95%; 大孔树脂 HPD-750、HPD-BJQH、HPD-100、D296、LSA-700B、LX-T5、NKA、XAD-16N, 赛普锐斯(北京)科技有限公司; FPA53, 北京慧德易科技有限公司; LX-38、LX-T28、LX-60, 西安蓝晓科技新材料股份有限公司; D101, 沧州宝恩吸附材料科技有限公司; 氯化胆碱, 郑州超凡化工有限公司; 1, 3-丙二醇, 山东绿健生物技术有限公司; 甲醇为色谱纯, 安徽天地高纯溶剂有限公司; 娃哈哈饮用纯净水, 杭州娃哈哈集团有限公司。

岛津 LC-2030C 型液相色谱仪, 岛津企业管理(中国)有限公司; JP-040 型数控超声波清洗器, 深圳市洁盟清洗设备有限公司; LQ-A10002 型电子天平, 瑞安市安特称重设备有限公司; N-1300 旋转蒸发仪, 上海爱朗仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 对照品的制备 将战骨的茎磨成粉末, 用 40% 乙醇浸泡两周, 将提取液浓缩后, 经大孔树脂、C18、MCI 等柱材料分离划段, 得到富含 5 个黄酮碳

苷的部位,最后按照 Chen 等(2019)的方法,采用循环高速逆流色谱法成功得到 5 个黄酮碳苷对照品。

1.2.2 战骨 NADESs 提取液的制备 根据课题组前期优化的战骨绿色提取溶剂天然深共晶溶剂 (NADESs)的提取工艺(陈月圆等,2020),取干燥的战骨粉末适量过筛(80 目),按照专利的方法提取战骨茎总黄酮碳苷,收集上清液,备用。

1.2.3 色谱条件及对照品溶液的配制 色谱条件:Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱(250 mm × 4.6 mm,5 μm);柱温为 30 ℃;流动相 0.1%甲酸水溶液(A)-甲醇(B);梯度洗脱程序为 0~20 min、10%~30%B,20~45 min、30%~40%B;流速为 1.0 mL · min⁻¹;检测波长为 280 nm;进样量为 20 μL。

标准溶液的配置:分别精确称取一定质量的 5 个对照品 7.6、5.1、7.2、5.7、2.8 mg,用无水乙醇在 10 mL 的容量瓶中定容,制成浓度为 0.760、0.516、0.726、0.576、0.286 mg · mL⁻¹的贮备液,分别将 5 个贮备液稀释一定的倍数,取 5、10、15、20 μL 进行液相分析。

1.2.4 标准曲线的建立 采用外标法定量,以色谱峰面积(Y)为纵坐标,对照品浓度(X,μg · mL⁻¹)为横坐标,进行线性回归分析,得到标准曲线回归方程。将最低浓度标准工作溶液重复进样 10 次,计算标准偏差,分别以 3 倍和 10 倍标准偏差为方法的检出限(LOD)和定量限(LOQ),结果见表 1。可以看出,方法的线性良好,且灵敏度较高。

表 1 5 个黄酮碳苷化合物的标准曲线
Table 1 Standard curves of five flavonoid-C-glycosides compounds

化合物 Compound	标准曲线 Standard curve line	R ²	检出限 LOD (μg)	定量限 LOQ (μg)
芹菜素-6,8-二-C-β-D-葡萄糖苷(1) Apigenin6,8-di-C-β-D-glucopyranoside(1)	Y=10 000 000X+81 351	0.999 2	0.18	0.54
芹菜素-6-C-β-D-木糖-8-C-β-D-葡萄糖苷(2) Apigenin6-C-β-D-xylopyranosyl-8-C-β-D-glucopyranoside(2)	Y=4 466 420X-6 968.9	0.997 7	0.14	0.43
芹菜素-6-C-β-D-木糖-8-C-β-D-半乳糖苷(3) Apigenin6-C-β-D-xylopyranosyl-8-C-β-D-galactopyranoside(3)	Y=7 239 770X-154 149	0.993 6	0.24	0.72
芹菜素-6-C-β-D-葡萄糖-8-C-β-D-木糖苷(4) Apigenin6-C-β-D-glucopyranosyl-8-C-β-D-xylopyranoside(4)	Y=3 091 590X-5 670.3	0.991 8	0.19	0.57
芹菜素-6-C-β-D-半乳糖-8-C-β-D-木糖苷(5) Apigenin-6-C-β-D-galactopyranosyl-8-C-β-D-xylopyranoside(5)	Y=8 174 940X+15 891	0.999 8	0.06	0.18

注: LOD. 检出限; LOQ. 定量限。
Note: LOD. Limit of detection; LOQ. Limit of quantification.

1.2.5 大孔树脂的选择

1.2.5.1 大孔树脂的预处理 分别称取一定量 HPD-750、HPD-BJQ、HPD-100、D296、LSA-700B、LX-T5、NKA、XAD-16N、FPA53、LX-38、LX-T28、LX-60 和 D101 共 13 种大孔树脂,用乙醇浸泡 24 h,用蒸馏水反复清洗至无味,备用。

1.2.5.2 静态吸附性能 选择上述预处理好的大孔树脂各 50 g,分别置于 500 mL 锥形瓶中,各加入 250 mL 的提取液,25 ℃下恒温恒速振荡吸附 24 h,抽滤,每组做 3 个平行实验,取滤液测定 5 个黄酮碳苷的总质量。然后用去离子水清洗 3 次树脂,用滤纸将树脂表面的水分吸干,转入 500 mL 锥形瓶中,加入 80%的乙醇 250 mL,于 25 ℃下恒温恒速振荡解吸 12 h,取上清液测定 5 个总黄酮的总质量,按照下列公式计算吸附率与解吸率,比

较静态吸附性能,从 13 种树脂中筛出吸附性能最佳的树脂。

吸附率(%)=(原液中 5 个黄酮碳苷总质量-吸附后滤液中 5 个黄酮碳苷总质量)/原液 5 个黄酮碳苷总质量×100;

解吸率(%)=解吸后溶液中 5 个黄酮碳苷的总质量/树脂吸附的 5 个黄酮碳苷总质量×100。

1.2.6 泄露曲线的绘制 根据 1.2.5.2 的筛选结果,将大孔树脂预处理好后,湿法装样,取提取液原液上柱,每份 60 mL,以固定的流速进行动态吸附,分别接出每一份流出液,测出流出液中 5 个黄酮碳苷的含量,绘制泄露曲线。

1.2.7 单因素实验及正交优化试验 按照 1.2.2 提取液的制备方法,制备提取液。以吸附率和解吸率作为综合考查的指标,在其他因素相同的情况

下,分别考查提取液上样浓度[原提取液稀释 1 倍、稀释 2 倍、原液(0 倍)]、上样流速(1、2、3 BV·h⁻¹)、洗脱液浓度(50%、60%、70%乙醇)、洗脱液用量(1、2、3 BV)对吸附率和解吸率的影响。

根据单因素实验的筛选结果,从提取液上样浓度、上样速度、洗脱液浓度、洗脱液用量中筛选出上样浓度、上样流速、洗脱液浓度 3 个影响较大的因素为自变量,考察战骨中 5 个主要活性黄酮碳苷在树脂中的总解吸率及在洗脱液中的含量为指标,设计 L₉组(3⁴)正交试验,正交试验因素与水平见表 2。总解吸率及含量按照下式计算。

解吸率(%)= 洗脱液中 5 个活性黄酮碳苷的总质量/原液中 5 个黄酮碳苷总质量在树脂中的总吸附质量×100;

含量(%)= $\frac{\text{洗脱液中总黄酮碳苷的质量}}{\text{洗脱液总质量}} \times 100$ 。

表 2 因素水平
Table 2 Factor level

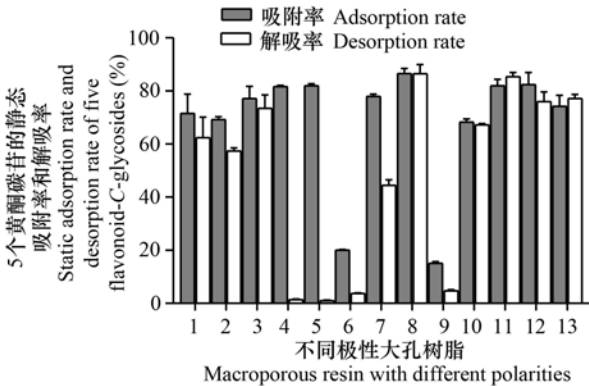
水平 Level	A 上样浓度 Extract concentration (g·mL ⁻¹)	B 上样流速 Extract flow rate (BV·h ⁻¹)	C 洗脱液浓度 Eluent concentration (%)
1	1(1 倍, one time)	1	50
2	0.5(2 倍, two times)	2	60
3	2(0 倍, 0 time)	3	70

2 结果与分析

2.1 树脂静态吸附性能比较

静态吸附结果(图 1)表明:战骨 5 个黄酮碳苷的静态吸附率较优的树脂为 XAD-16N(86.65%)、LX-60(83.51%)、LX-T28(81.92%),树脂间差异性不显著($P>0.05$)。D296 和 LSA-700B 对战骨 5 个黄酮碳苷的静态吸附率也较好(81.71%, 82.00%),但是两者的解吸率只有 1.44%、1.03%,其原因是这两类树脂为脱色型树脂,其吸附量用酸和碱均无法将其洗脱。而 LX-T5、FPA53 两个树脂吸附性能和解吸性能相对都比较差,吸附率和解吸率都比较低。尤为重要的是,与现有战骨制剂健骨注射液工业处理的树脂 D101 相比(王静宇和杜日建,2014),XAD-16N、LX-60、LX-T28 三种树脂吸附率均显著优于 D101(74.30%),而 4 种树脂在静态解吸率上均无显著差异。故又采用动态

吸附和解吸考察此 4 种树脂的泄露曲线。



1. HPD-750; 2. HPD-BQJH; 3. HPD-100; 4. D296; 5. LSA-700B; 6. LX-T5; 7. NKA; 8. XAD-16N; 9. FPA53; 10. LX-38; 11. LX-T28; 12. LX-60; 13. D101.

图 1 不同极性大孔树脂对战骨 5 个总黄酮碳苷的静态吸附率和解吸率比较

Fig. 1 Comparison of the static adsorption rate and desorption rate of macroporous resins with different polarities on five flavonoid-C-glycosides

2.2 吸附泄露曲线

分别绘制 XAD-16N、LX-T28、LX-60、D101 大孔树脂的泄露曲线,由图 2 可知,随着上样量的增加,5 个黄酮碳苷的泄漏量逐渐增加,当份数增大到动态饱和和吸附时,泄露量增加的趋势明显上升,即大孔树脂达到动态饱和吸附。不同树脂对战骨植物 5 个黄酮碳苷的吸附量有所差异,泄漏量也有所不同。其中,XAD-16N 的泄漏量最少吸附量最多,其次是 D101,接着是 LX-T28,而 LX-60 树脂的吸附量最低,因此选用 XAD-16N 做动态吸附实验。

2.3 战骨黄酮碳苷优化工艺

2.3.1 提取液上样浓度 上柱液浓度分别为原提取液稀释 1 倍、稀释 2 倍、原液(0 倍),每份 100 mL,分别以 2 BV·h⁻¹(每小时 2 倍柱体积)的流速通过 XAD-16N 型大孔树脂,用纯水洗脱至流出液为无色,收集过柱液,用 70%乙醇洗脱 3 BV,收集洗脱液。每组实验做 3 个平行,按 2.2 方法测定 5 个黄酮碳苷的总含量,计算 5 个黄酮碳苷的总吸附率和总解吸率。从表 3 可以看出,原液稀释 1 倍与原液稀释 2 倍两者的吸附率都是 100%,但使用原液上样时,吸附率却只有 67.32%;而解吸率原液和原液稀释 1 倍差异性并不显著,原液稀释 2 倍最小,综上考虑,故确定上样浓度为原液稀释 1 倍。

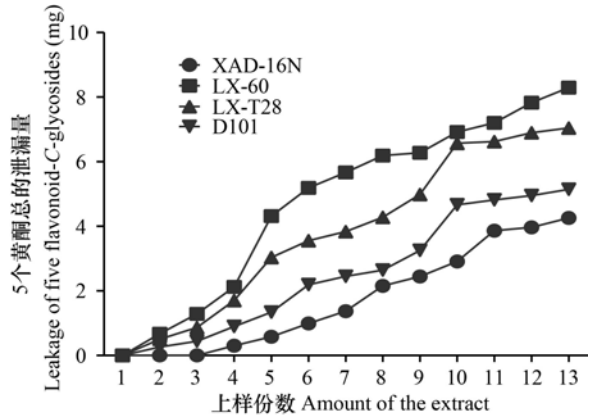


图2 战骨黄酮碳苷提取液的泄露曲线
Fig. 2 Leakage curve of five flavonoid-C-glycosides from *Premna fulva*

表3 提取液上样浓度对战骨5个黄酮碳苷吸附率和解吸率的影响
Table 3 Effects of sample concentration on adsorption rate and desorption rate of five flavonoid-C-glycosides from *Premna fulva*

上柱液浓度 Concentration of column liquid	吸附率 Adsorption rate (%)	解吸率 Desorption rate (%)
原液稀释1倍 Dilute the solution one time	100	93.43
原液稀释2倍 Dilute the solution two times	100	85.24
原液 Stock solution	67.32	94.61

2.3.2 上样速度 根据2.3.1的筛选结果,固定上柱液浓度(原液稀释1倍),如表4所示,不同的上样流速对战骨植物总黄酮在XAD-16N型大孔树脂中吸附率和解吸率存在影响,上样流速为1、2 BV·h⁻¹时吸附率一样,3 BV·h⁻¹时吸附率显著下降,而解吸率随着上样流速的增大逐渐变小,综合考虑确定上样流速为1 BV·h⁻¹。

2.3.3 洗脱液浓度 取浓度为原液稀释1倍上柱液的4份,每份100 mL,以1 BV·h⁻¹的流速通过XAD-16N型大孔树脂,用纯水洗脱至流出液为无色,收集过柱液,分别用50%、60%、70%、80%的乙醇洗脱3 BV,收集洗脱液,测定洗脱液中总黄酮的含量。从表5可以看出4个浓度下的吸附率都一样,但解吸率随着浓度的增加逐渐增大,当洗脱液浓度为70%与80%时,解吸率差异并不显著。因

此,从节约溶剂的角度考虑,最终确定洗脱液的浓度为70%。

表4 不同上样速度对纯化战骨5个黄酮碳苷吸附率和解吸率的影响
Table 4 Effects of flow rate on adsorption rate and desorption rate of five flavonoid-C-glycosides from *Premna fulva*

上样流速 Sample flow rate (BV·h ⁻¹)	吸附率 Adsorption rate (%)	解吸率 Desorption rate (%)
1	100	97.9
2	100	86.1
3	81.2	85.3

表5 不同洗脱液浓度对纯化战骨5个黄酮碳苷吸附率和解吸率的影响
Table 5 Effects of different eluent concentrations on adsorption rate and desorption rate of five flavonoid-C-glycosides from *Premna fulva*

洗脱液浓度 Eluent concentration (%)	吸附率 Adsorption rate (%)	解吸率 Desorption rate (%)
50	100	78.72
60	100	87.71
70	100	94.33
80	100	91.42

2.3.4 洗脱液用量 按照经单因素考察后2.3.3的方法,饱和吸附后,用纯水洗脱至流出液为无色,分别用70%的乙醇溶液洗脱1、2、3、4 BV,收集洗脱液。每组实验做3个平行,按1.2.7测定和计算5个黄酮碳苷的总含量,并计算5个黄酮碳苷的总吸附率和总解吸率。从表6可以看出,洗脱液用量为1 BV的时候解吸率最小,只有81.24%;随着洗脱液体积的增大,解吸率逐渐增大,当洗脱液用量为4 BV时,解吸率达到最大,为98.61%。这说明少体积洗脱液并不能将黄酮碳苷全部洗脱,而洗脱液用量为3 BV时解吸率为95.92%,与4 BV相差不大,从节约溶剂的角度考虑,最终确定洗脱液用量为3 BV。

2.3.5 正交试验 根据单因素实验的结果,按照表2的正交试验设计,试验结果见表7。由极差分析结果可知,树脂XAD-16N影响纯化战骨植物中5个黄酮碳苷的工艺因素依次为B>C>A,即上样

表 6 不同洗脱液用量对纯化战骨 5 个
黄酮碳苷吸附率和解吸率的影响

Table 6 Effects of different eluent dosages on adsorption
rate and desorption rate of five flavonoid-C-
glycosides from *Premna fulva*

洗脱液用量 Eluent dosage (BV)	吸附率 Adsorption rate (%)	解吸率 Desorption rate (%)
1	100	81.24
2	100	89.32
3	100	95.92
4	100	98.61

表 7 实验设计及结果

Table 7 Experimental design and results

序号 Serial number	因素 Factor			含量 Content (%)
	A	B	C	
1	1	1	50	7.21
2	1	2	60	12.73
3	1	3	70	7.33
4	0.5	1	60	12.27
5	0.5	2	70	9.55
6	0.5	3	50	8.27
7	2	1	70	12.69
8	2	2	50	10.26
9	2	3	60	5.74
K_1	9.09	10.72	8.58	—
K_2	10.03	10.84	10.24	—
K_3	9.56	7.11	9.86	—
R	0.94	3.74	1.67	—

流速>洗脱液浓度 >上样浓度。由表 8 的方差分析结果可知,因素 A、B、C 均无显著影响 ($P>0.05$)。战骨植物中 5 个黄酮碳苷提取理论最优水平为 A_2 、 B_2 、 C_2 ,即上样浓度为原液稀释 2 倍、上样流速 $2\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 、洗脱液浓度 60%乙醇。

2.4 验证试验

采用 2.3.5 最优工艺进行 3 次验证试验,结果见表 9。由表 9 可知,5 个总黄酮碳苷的含量为 14.50%,而由原植物提取液中 5 个总黄酮碳苷的含量为 1.73%,实验结果确证筛选得到的大孔树脂 XAD-16N 富集纯化效果良好。

3 讨论与结论

大孔树脂具有高交联度和多永久性孔隙的特

表 8 方差分析

Table 8 Variance analysis

方差来源 Source of variance	偏差平方和 Square sum of deviation	自由度 Degree of freedom	F 比 F ratio	F 临界值 critical value	P 值 P value
A	1.34	2	0.062	19.000	>0.05
B	27.01	2	1.252	19.000	>0.05
C	4.56	2	0.212	19.000	>0.05
F(误差) F (error)	21.57	2	—	—	—

表 9 验证试验结果 ($n=3$)

Table 9 Verification test results ($n=3$)

指标 Index	试验号 Test number			平均值±标准差 $\bar{x}\pm s$ (%)
	1 (%)	2 (%)	3 (%)	
总黄酮碳苷解吸率 Desorption rate of five flavonoid-C-glycosides	90.55	97.35	91.25	93.05±3.74
总黄酮碳苷的含量 Content of five flavonoid-C-glycosides	14.27	14.91	14.32	14.50±0.36

性,广被用于黄酮类化合物的分离和提纯。大孔树脂能从植物提取物中分离黄酮类化合物的优势是由于黄酮类化合物本身的特性,因为它们的苷元上有苯环和几个氢基,有助于具有适当的平均孔径、极性和表面积的大孔吸附树脂吸附这些化合物。结果表明,XAD-16N 作为理想树脂用于战骨中黄酮碳苷提取液(天然深共晶溶剂作为提取媒介)的富集纯化的吸附和解吸能力最强,说明大孔树脂的大孔径($560\sim 710\text{ }\mu\text{m}$)、大比表面积($800\text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$)和苯乙烯系基质最适合于战骨提取物中黄酮碳苷的吸附和释放。故战骨提取物大极性的黄酮碳苷与大极性树脂之间的极性匹配主要归因于氢键和范德华相互作用。

乙醇是一种有机溶剂,具有可回收、价格低廉、毒性低且对人类无安全威胁等优点。因此,本研究选择它作为脱附剂。实验结果表明,黄酮碳苷类化合物的解吸率与乙醇浓度成正比,这意味着随着解吸率的增加,乙醇浓度也会增加。达到峰值后,解吸率随乙醇浓度的进一步增加而趋于平缓。吸附在树脂上的分子间作用力与溶解在溶剂中的分子间相互作用对黄酮碳苷类化合物从树

脂上的解吸具有重要作用。而且, XAD-16N 成功地富集了战骨中存在的黄酮碳苷类化合物, 并能选择性地吸附黄酮碳苷类化合物。与传统的纯化工艺 (D101) 相比, 树脂 XAD-16N 的吸附率 (86.65%) 和解吸率 (86.54%), 均显著优于 D101 (吸附率 74.30%, 解吸率 77.21%)。本研究通过单因素筛选及正交工艺优化, 最终确定其最佳富集纯化工艺为上样浓度为原提取液稀释 2 倍、上样流速 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 、洗脱液为 60% 乙醇。总黄酮碳苷的含量由 1.73% (原植物中含量) 提高到 14.50%, 提高了 7.38 倍。因此, 本研究开发了一种简单有效的从战骨植物中提取黄酮碳苷的方法。该方法操作简单, 回收率高, 工艺稳定可行, 可为今后战骨工业大批量生产提供一定的参考价值。

参考文献:

CHEN YY, YAN XJ, LU FL, et al., 2019. Preparation of flavonedi-C-glycoside isomers from Jian-Gu injection (*Premna fulva* Craib.) using recycling counter-current chromatography [J]. J Chromatogr A, (1599): 180–186.

CHEN Z, HAO LD, ZHONG W, 2016. Clinical efficacy of pain spot injection with Jiangu injection in acute lumbar sprain [J]. J Guangdong Med Univ, 34(3): 295–297. [陈宙, 郝林端, 钟文, 2016. 健骨注射液痛点注射治疗急性腰扭伤的临床观察 [J]. 广东医学院学报, 34(3): 295–297.]

CHEN CH, 2018. Clinical observation on treatment of knee osteoarthritis with acupotomy combined with manipulation and Jiangu injection [J]. Chin Manipul Rehabil Med, 9(6): 53–54. [陈苍海, 2018. 针刀结合手法与健骨注射液治疗膝关节骨关节炎的临床观察 [J]. 按摩与康复医学, 9(6): 53–54.]

CHEN YY, DANG JY, YAN XJ, et al., 2020–05–19. Deep eutectic solvent and method for extracting flavone diglycoside from *Premna fulva* Craib [P]. CN: 111171095A. [陈月圆, 党骄阳, 颜小捷, 等, 2020–05–19. 深共晶溶剂及从战骨中提取黄酮二糖碳苷的方法 [P]. 广西壮族自冶区: CN: 111171095A.]

DAI CY, CHEN GY, ZHU GY, et al., 2007. Study on the chemical constituents of *Premna fulva* Craib [J]. Chin Trad Herb Drugs, 38(1): 34–35. [戴春燕, 陈光英, 朱国元, 等, 2007. 战骨茎的化学成分研究 [J]. 中草药, 38(1): 34–35.]

FANG G, 2018. General situation and progress of research on *Premna fulva* Craib in recent 8 years [J]. Mod Med Health Res, 2(6): 136–137. [方刚, 2018. 壮药战骨近 8 年研究概况与进展 [J]. 现代医学与健康研究电子杂志, 2(6): 136–137.]

JIANG CW, ZENG CH, LIU SY, 2004. Characters and microscopic identification of *Premna fulva* Craib [J]. J Chin Med Mat, 27(11): 811–813. [蒋才武, 曾春晖, 刘寿养,

2004. 壮族药战骨的性状与显微鉴别 [J]. 中药材, 27(11): 811–813.]

LIANG YT, WANG JY, SU WW, et al., 2018. Chemical constituents of *Premna fulva* Craib by UFLC-Triple TOF-MS/MS [J]. Centr S Pharm, 16(10): 1369–1373. [梁玉婷, 王静宇, 苏薇薇, 等, 2018. 基于 UFLC-Triple TOF-MS/MS 的壮药战骨化学成分分析 [J]. 中南药学, 16(10): 1369–1373.]

LI XY, LUO WQ, YANG LF, et al., 2005. Studies on the process for extraction of *Premna fulva* Craib by orthogonal experiments [J]. J Guangxi Univ Natl (Nat Sci Ed), 11(4): 121–123. [李小燕, 罗伟强, 杨立芳, 等, 2005. 正交实验研究壮药战骨中黄酮类化合物的提取工艺 [J]. 广西民族学院学报(自然科学版), 11(4): 121–123.]

LIU D, WU YH, LI WH, et al., 2016. Application of macroporous adsorptive resins in separation and purification of natural products [J]. Chin Trad Herb Drugs, 47(15): 2764–2770. [刘丹, 吴叶红, 李玮桓, 等, 2016. 大孔吸附树脂在天然产物分离纯化中的应用 [J]. 中草药, 47(15): 2764–2770.]

PAN HP, 2002. Progress in chemical constituents, pharmacological research and clinical application of *Premna fulva* Craib [J]. Guangxi Med J, 24(3): 365–367. [潘洪平, 2002. 黄豆豆腐柴化学成分、药理研究及临床应用进展 [J]. 广西医学, 24(3): 365–367.]

SHI YC, WEI JQ, JIANG YS, et al., 2010. Extraction condition and quantitative analysis of flavonoid in different sections of *Premna fulva* Craib [J]. J Guangxi Nor Univ (Nat Sci Ed), 28(2): 57–60. [史艳财, 韦记青, 蒋运生, 等, 2010. 战骨总黄酮提取工艺及不同部位含量测定研究 [J]. 广西师范大学学报(自然科学版), 28(2): 57–60.]

WU XL, QI CL, WANG H, et al., 2016. A new flavonoid glycoside from the stem barks of *Premna fulva* [J]. J Chin Pharm Univ, 47(6): 678–682. [吴雪莉, 戚楚露, 汪豪, 等, 2016. 战骨中一个新的黄酮苷类成分 [J]. 中国药科大学学报, 47(6): 678–682.]

WANG HW, LIU YQ, 2005. Research progress in the application of macroporous adsorption resins [J]. J Chin Med Mat, 28(4): 353–356. [汪洪武, 刘艳清, 2005. 大孔吸附树脂的应用研究进展 [J]. 中药材, 28(4): 353–356.]

WANG JY, DU RJ, 2014–04–09. An improved method for the production process of Jiangu injection [P]. CN: 103705652A. [王静宇, 杜日建, 2014–04–09. 一种健骨注射液生产工艺的改进方法 [P]. CN: 103705652A.]

YE Y, TAN N, YU Q, et al., 2018. Study on anti-inflammatory and analgesic effects of total flavonoids extract of Zhuang medicine *Premna fulva* for rats/mice by transdermal administration [J]. Chin Pharm, 29(15): 2090–2094. [叶勇, 覃妮, 庾茜, 等, 2018. 壮药战骨总黄酮提取物经皮给药对大鼠/小鼠的抗炎、镇痛作用研究 [J]. 中国药房, 29(15): 2090–2094.]

ZHANG CL, LIAO GH, LIU WX, 1979. *Premna fulva* Craib injection [J]. Chin Trad Herb Drugs, 10(2): 27–28. [张超良, 廖国辉, 刘文侠, 1979. 战骨注射液 [J]. 中草药通讯, 10(2): 27–28.]

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202101081



宋美玲, 黄胜和, 陈祖杰, 等. 斑地锦 RT-qPCR 内参基因的筛选 [J]. 广西植物, 2022, 42(2): 340–348.
SONG ML, HUANG SH, CHEN ZJ, et al. Screening of reference genes for RT-qPCR in *Euphorbia maculata* [J]. *Guihaia*, 2022, 42(2): 340–348.

斑地锦 RT-qPCR 内参基因的筛选

宋美玲¹, 黄胜和^{1*}, 陈祖杰², 邹嘉轩³, 刘欢胜³, 全文军³

(1. 江西中医药高等专科学校 医学基础部, 江西 抚州 344000; 2. 南昌大学 江西医学院, 南昌 330031; 3. 南昌大学 抚州医学院, 江西 抚州 344000)

摘要: 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 的前提条件之一是具有合适的内参基因。为筛选斑地锦 (*Euphorbia maculata*) 合适的 RT-qPCR 内参基因, 该文利用同源克隆法克隆斑地锦 *GAPDH*、*EF-1 α* 、*act*、*UBQ*、*TUB- α* 、*eIF-4A*、*CYP* 等基因片段, RT-qPCR 检测 7 个候选内参基因在斑地锦不同生长期根、茎、叶和果实中的表达情况, 并用 *geNorm*、*NormFinder* 和 *BestKeeper* 等生物学软件对各候选基因表达稳定性进行评价。结果表明: (1) 克隆的 *GAPDH*、*EF-1 α* 、*act*、*UBQ*、*TUB- α* 、*eIF-4A*、*CYP* 基因片段为 729、808、753、422、233、656、313 bp, 分别编码 242、269、250、140、77、218、103 个氨基酸, 与其他植物相应氨基酸序列的最高同源性均在 85% 以上。(2) 综合 3 个分析软件分析内参基因表达稳定性得出, 表达稳定性排名为 *UBQ* > *EF-1 α* > *TUB- α* > *eIF-4A* > *GAPDH* > *CYP* > *act*。因此, 可以选取 *UBQ* 作为斑地锦 RT-qPCR 分析的内参基因, 用于不同生长期基因组织特异性表达研究。

关键词: 斑地锦, 基因克隆, 内参基因, RT-qPCR

中图分类号: Q943; R286.12 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2022)02-0340-09

Screening of reference genes for RT-qPCR in *Euphorbia maculata*

SONG Meiling¹, HUANG Shenghe^{1*}, CHEN Zujie²,
ZOU Jiaxuan³, LIU Huansheng³, QUAN Wenjun³

(1. Department of Basic Medicine, Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 344000, Jiangxi, China; 2. Jiangxi Medical College, Nanchang University, Nanchang 330031, China; 3. Fuzhou Medical College, Nanchang University, Fuzhou 344000, Jiangxi, China)

Abstract: The suitable reference genes is a prerequisite for real-time quantitative PCR (RT-qPCR). In order to find a suitable reference gene for gene expression analysis using RT-qPCR in *Euphorbia maculata*, *GAPDH*, *EF-1 α* , *act*, *UBQ*, *TUB- α* , *eIF-4A*, and *CYP* gene fragments from roots, stems, leaves and fruits at different growth stages were cloned with the method of homologous cloning. Subsequently, the expression patterns of the seven candidate reference genes were obtained by RT-qPCR in *E. maculata*, and the expression stability was assessed by *geNorm*, *NormFinder*, and *BestKeeper*. The results were as follows: (1) The fragment sequences of *GAPDH*, *EF-1 α* , *act*, *UBQ*, *TUB- α* , *eIF-4A* and *CYP* contained 729 bp (encoding 242 amino acids), 808 bp (encoding 269 amino acids), 753 bp (encoding

收稿日期: 2021-04-19

基金项目: 江西省教育厅科学技术研究项目 (GJJ191230) [Supported by Scientific and Technological Research Program of Jiangxi Education Department (GJJ191230)]。

第一作者: 宋美玲 (1989-), 硕士, 讲师, 主要从事药用植物生物技术研究, (E-mail) sml0703@163.com。

* 通信作者: 黄胜和, 博士, 副教授, 主要从事药用植物生物技术研究, (E-mail) hsh712@163.com。

250 amino acids), 422 bp (encoding 140 amino acids), 233 bp (encoding 77 amino acids), 656 bp (encoding 218 amino acids), and 313 bp (encoding 103 amino acids), respectively. And the seven amino acid sequences shared over 85% identity with other *GAPDH*, *EF-1 α* , *act*, *UBQ*, *TUB- α* , *eIF-4A*, *CYP* by BLAST in GenBank. (2) The order of expression stability was *UBQ* > *EF-1 α* > *TUB- α* > *eIF-4A* > *GAPDH* > *CYP* > *act* by geNorm, NormFinder, and BestKeeper. Therefore, *UBQ* can be selected as a reference gene for RT-qPCR in *E. maculata* using for gene expression analysis in different plant tissues at different growth stages.

Key words: *Euphorbia maculata*, gene cloning, reference genes, RT-qPCR

地锦草药材为大戟科大戟属一年生草本植物地锦(*Euphorbia humifusa*)或斑地锦(*E. maculata*)的干燥全草,又名鬼见愁、血筋草、奶汁草等,分布于中国江苏、江西、浙江、湖北、河南、河北、新疆和内蒙古等地(中国科学院中国植物志编辑委员会, 1997),是中医、维医、蒙医常用药材,具有清热解毒、凉血止血、利湿退黄等功效,主治痢疾、泄泻、咯血、尿血、便血、崩漏、疮疖肿痛、湿热黄疸等(国家药典委员会, 2015),目前已开发有肠炎宁片、三七止血片、泻痢宁片等中成药。斑地锦主要含有黄酮类、萜类、酚酸类和生物碱类等成分,具有抗氧化、抗炎、抗菌、止血、免疫调节等作用(柳润辉等, 2001; 安惠霞等, 2008)。目前,斑地锦研究多聚焦在质量标准控制、药理学作用、化学成分的提取及鉴定等方面(胡建新等, 2018; Tian et al., 2019),分子生物学相关研究报道较少。

实时荧光定量 PCR 是在普通 PCR 的基础上引入荧光基团,通过相应的荧光信号积聚实时监测整个反应的进程,为未知序列进行定量分析的方法,其特异性强、灵敏度高、重复性好、定量准确(张玉芳等, 2014; Wang et al., 2019),已经成为分子生物学中研究基因表达的重要工具之一,而使用合适的内参基因是获得可信定量结果的前提(Shakeel et al., 2018)。在实际应用中, RNA 提取、cDNA 合成及 PCR 扩增效率等因素会直接影响实验结果,因此常用表达稳定的内参基因进行校正和标准化(Bustin, 2002),以减少样品之间和样品内部的误差。最近研究表明,内参基因不存在绝对通用性,若不经筛选而以一种基因作为任何条件下的内参,得到的结果精确度大幅度降低,甚至错误(Zhu et al., 2019)。另外,单一传统的内参基因有时会对结果精确性产生影响,新内参基因将逐渐取代某些表达稳定性差的管家基因(Nguyen et al., 2018),或应用内参基因组合有效地减少基因表达误差(袁伟等, 2012),以获得更准确的分析结果。

同时,基于基因芯片技术和基因表达数据库的筛选(Liang et al., 2018),也将有助于获得更可靠的内参基因。因此,在分析目标基因表达之前,有必要对候选内参基因进行筛选与评估,而评价内参基因表达稳定性的软件较多,其中 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 应用较为广泛(Kiarash et al., 2018; Zhong et al., 2019)。目前,常用的内参基因有 *act*(actin)、*GAPDH*(glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase)、*EF-1 α* (elongation factor-1 alpha)、*UBQ*(ubiquitin)、*TUB- α* (tubulin alpha)、*eIF-4A*(eukaryotic translation initiation factor 4A)、*CYP*(cyclophilin)、18S *rRNA*(18S ribosomal RNA)等(Haller et al., 2004; Kozera & Rapacz, 2013)。为筛选斑地锦合适的 RT-qPCR 内参基因,本研究同源克隆斑地锦 *GAPDH*、*EF-1 α* 、*act*、*UBQ*、*TUB- α* 、*eIF-4A*、*CYP* 等 7 个候选内参基因片段,RT-qPCR 检测在斑地锦不同生长期(苗期、花期、果期)根、茎、叶和果实中的表达情况,利用 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 等软件对各候选基因表达稳定性进行评价,为斑地锦不同生长期基因组织特异性表达研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

斑地锦种子由江西天施康生态中药种植有限公司惠赠,种植于南昌大学抚州医学院实验田,经江西中医药高等专科学校药学系中药教研室鉴定为斑地锦。分别采集种植 70 d 后的苗期(未开花)、花期(开 3 朵以上的花且未结果)的根、茎、叶,以及果期(结 3 个以上的果)的根、茎、叶、果,每个样品皆为 3 株以上的混合样品,采集后立即置于 -80 °C 冰箱备用。

1.2 主要试剂与仪器

植物总 RNA 提取试剂盒(Spin Column Plant Total RNA Purification Kit)、胶回收试剂盒(SanPrep

Column DNA Gel Extraction Kit)、引物合成、测序等, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 反转录试剂盒(PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser)、荧光定量 PCR 试剂(PrimeScript™ RT Master Mix)等, 购于宝生物工程(大连)有限公司; Pfu 酶(TransStart® FastPfu DNA Polymerase)、Taq 酶、T-载体(*pEASY*®-Blunt Simple Cloning Kit), 购于北京全式金生物技术有限公司。

普通 PCR 仪(T100™ Thermal Cycler)、荧光定量 PCR 仪(CFX96 Real-Time)等, 美国 Bio-Rad 公司; 超微量分光光度计(NanoDrop One), 美国 Thermo Scientific 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成 斑地锦不同生长期根、茎、叶、果实总 RNA 的提取和 cDNA 的合成皆参照试剂盒说明书操作。总 RNA 提取后通过琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量, 并用超微量分光光度计测定 RNA 浓度, 以保证后续实验的进行。

1.3.2 引物设计 在 GenBank 中查询相关序列, 尤其是同科植物蓖麻(*Ricinus communis*)、麻疯树(*Jatropha curcas*)和橡胶树(*Hevea brasiliensis*)等的 *GAPDH*、*EF-1 α* 、*act*、*UBQ*、*TUB- α* 、*eIF-4A*、*CYP* 的基因序列, 比对找出高度保守区段, 分别设计克隆斑地锦相关基因的简并引物。后续根据测序结果, 利用 Primer Premier 5.0 软件分别设计 RT-qPCR 引物。本实验所用引物见表 1。

1.3.3 候选内参基因片段的克隆与分析 PCR 反应体系(25 μ L): 5 $\times$ GC Buffer 5 μ L, dNTPs(各 2.5 mmol $\cdot$ L⁻¹) 2.5 μ L, 简并引物 F(10 μ mol $\cdot$ L⁻¹)、R(10 μ mol $\cdot$ L⁻¹) 各 1 μ L, cDNA 模板 1 μ L, Pfu 酶(5 U $\cdot$ μ L⁻¹) 0.3 μ L, 灭菌 ddH₂O 14.2 μ L。扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 相应退火温度 30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 目的片段的回收纯化按照试剂盒操作说明进行。将回收的 DNA 片段连接 T-载体后转化大肠杆菌 DH5 α , 菌液 PCR 鉴定阳性克隆, 送测序。所得序列在 GenBank 中进行 BLAST 比对。

1.3.4 RT-qPCR 引物检测与熔解曲线分析 为检验引物特异性, 排除引物二聚体及非特异性扩增产物对结果的影响, 用相应引物 qF、qR 进行普通 PCR, 然后进行 RT-qPCR, 再加热 RT-qPCR 产物从 65 $^{\circ}$ C 到 95 $^{\circ}$ C, 每隔 0.5 $^{\circ}$ C 停留 5 s 检测 1 次荧光强

度以获取熔解曲线。RT-qPCR 反应体系(20 μ L): 2 $\times$ SYBR Green qPCR Master Mix 10 μ L, 引物 qF(10 μ mol $\cdot$ L⁻¹)、qR(10 μ mol $\cdot$ L⁻¹) 各 0.4 μ L, cDNA 模板 2 μ L, 灭菌 ddH₂O 7.2 μ L; 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 相应退火温度 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。

1.3.5 候选内参基因的筛选 分别将样品总 RNA 的反转录产物 cDNA 作为模板, 进行 RT-qPCR 扩增, geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 软件对 3 个候选内参基因表达稳定性进行评估。将 Ct 值转化为相对表达量(吴建阳等, 2017), 按照公式 $Q = 2^{(Ct_{min} - Ct_{sample})}$ 进行转化, 用于 geNorm 和 NormFinder 软件分析, 于 BestKeeper 软件中直接输入 Ct 值进行分析, 最后进行综合排名, 得出最适合斑地锦不同生长期基因组织特异性表达研究的内参基因。

2 结果与分析

2.1 候选内参基因片段的克隆与分析

以总 RNA 反转录所得到的 cDNA 为模板, 相应简并引物 F、R 为引物进行 PCR 扩增, 扩增产物大小符合预期(图 1)。对其测序后显示, 克隆的 *GAPDH*、*EF-1 α* 、*act*、*UBQ*、*TUB- α* 、*eIF-4A*、*CYP* 基因片段分别为 729、808、753、422、233、656、313 bp, 分别编码 242、269、250、140、77、218、103 个氨基酸。将氨基酸序列在 GenBank 中进行 BLAST 比对后, *GAPDH*、*EF-1 α* 、*act*、*UBQ*、*TUB- α* 、*eIF-4A*、*CYP* 分别与 莒 苳 *GAPDH* (XP023733724)、蓖麻 *EF-1 α* (XP002518073)、荔枝 *act* (ADV17460)、山梨猕猴桃 *UBQ* (GFZ13847.1)、大麦 *TUB- α* (CAB76917.1)、玉米 *eIF-4A* (U17979.1)、油桐 *CYP* (ARV78452.1) 的同源性为 95%、99%、100%、99%、99%、87%、86%。将相应核苷酸序列登录到 GenBank, 获得登录号 *EmGAPDH* (MT044466)、*EmEF-1 α* (MT044465)、*Emactin* (MT044464)、*EmUBQ* (MW815120)、*EmelF-4A* (MW815119)、*EmTUB- α* (MW815118)、*EmCYP* (MW815117)。

2.2 RT-qPCR 引物检测与熔解曲线分析

用相应引物 qF、qR 进行普通 PCR 扩增, 产物长度与预期一致(图 2)。将荧光定量 RT-PCR 产物进行熔解曲线分析, 各基因引物的熔解曲线均显示为单峰(图 3)。以上结果表明, 本实验所设计定量引物无引物二聚体及非特异性扩增, 可用于后续的 RT-qPCR 分析。

表 1 基因片段克隆引物和 qPCR 引物

Table 1 Cloning and qPCR primer sequences for candidate reference genes

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	退火温度 Annealing temperature (℃)	片段长度 Fragment length (bp)	备注 Remark
GAPDH-F	MGTTCATGGTCAVTGGAAGC	56	730	克隆基因片段
GAPDH-R	CAATTCCWGCCTTGCCATC			Cloning for gene fragment
EF-1α-F	YTGyTGyAACAAGATGGATGC	56	805	克隆基因片段
EF-1α-R	GATCCTTCTTCTCAACACTCTT			Cloning for gene fragment
act-F	CTGGATTGCTGGAGATGATG	57	750	克隆基因片段
act-R	ATTTCATGATGGAGTTGTAAGTGG			Cloning for gene fragment
UBQ-F	ATGCAGATCTTYGTGAARACCCT	57	420	克隆基因片段
UBQ-R	CAGTAGTGCGGRTCGAAGTGGT			Cloning for gene fragment
TUB-α-F	TGARCCHTCDCYATGATGG	51	240	克隆基因片段
TUB-α-R	CAHACAGCYCTYTGMACCTT			Cloning for gene fragment
eIF-4A-F	GAGCTDGCHCAGCARATTGAGAARGT	58	650	克隆基因片段
eIF-4A-F	AGDGARACYTGYTGVACRTCRAACC			Cloning for gene fragment
CYP-F	GAGAACTTCMGGGCNCTC	53	310	克隆基因片段
CYP-R	CTGSCCGAACACGACG			Cloning for gene fragment
Oligo (dT) ₁₈	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT			cDNA 合成
				Synthesis of cDNA
GAPDH-qF	TGATCTCACAGTCAGGCTCG	55	147	RT-qPCR
GAPDH-qR	TGACCTGCTGTCGCCAAC			
EF-1α-qF	CCTCCACATTGCTGTCAAG	55	167	RT-qPCR
EF-1α-qR	ATGGAGGGTACTCAGAGAAGG			
act-qF	CCACTGGTATTGTTCTGGAC	53	169	RT-qPCR
act-qR	TGCGGTTGTGGTGAAAGACT			
UBQ-qF	ATAACCTCGAGGTCGAGTC	53	166	RT-qPCR
UBQ-qR	TGGAGAGTGGACTCCTTCTG			
TUB-α-qF	TGCCTCATGTACCGTGCTG	55	178	RT-qPCR
TUB-α-qR	ACAGCTCTTTGAACCTTGGC			
eIF-4A-qF	TCTTCCAGTTGCTACCAACC	53	189	RT-qPCR
eIF-4A-qF	GTCTCGAGCTTCCACTCTTC			
CYP-qF	AAGCCTCTCCACTACAAAGG	53	162	RT-qPCR
CYP-qR	GAATTCAGGACCGGTCTG			

2.3 候选内参基因的 Ct 值分析

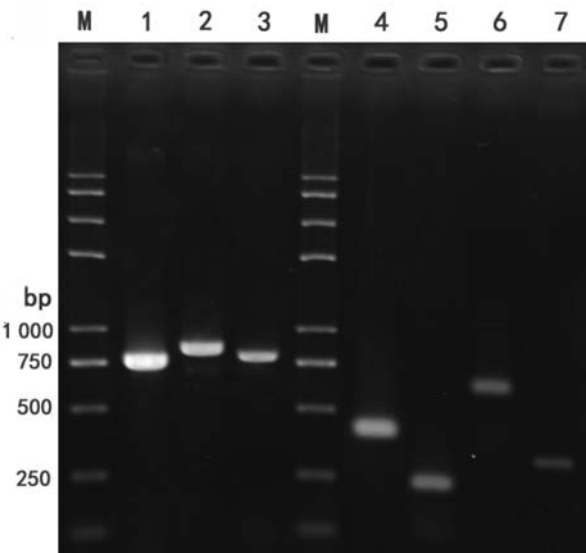
对斑地锦不同生长期各组织(根、茎、叶和果)的 cDNA 样品进行 RT-qPCR 扩增,运用 Ct 值评估各内参基因的表达量,Ct 值与其表达量成反比,即 Ct 值越小,表达量越高。内参基因的表达值排序为 *EF-1α*>*TUB-α*>*eIF-4A*>*UBQ*>*CYP*>*GAPDH*>*act*, Ct 值分别为 17.04~19.55、18.52~21.81、18.58~22.04、20.19~22.90、20.63~24.99、21.85~24.95、24.44~29.26(图 4)。3 次重复之间各内参基因的

表达量变动较小,且表达量都有所变化。

2.4 候选内参基因表达稳定性分析

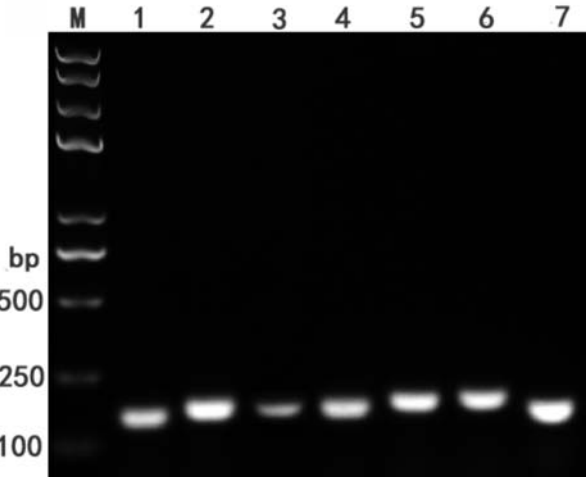
2.4.1 geNorm 软件分析 geNorm 软件通过计算稳定系数 M 来分析基因表达稳定性,M 值越小,稳定性越好。除 *act* 外,6 个候选内参基因在不同组织中表达的 M 值都小于 1.5,稳定性排名为 *UBQ*>*TUB-α*>*EF-1α*>*eIF-4A*>*GAPDH*>*CYP*>*act*(表 2)。

2.4.2 NormFinder 软件分析 与 geNorm 类似, NormFinder 软件也是通过各候选内参基因的 M 值



M. Marker; 1. *GAPDH*; 2. *EF-1α*; 3. *act*; 4. *UBQ*; 5. *TUB-α*; 6. *eIF-4A*; 7. *CYP*.

图 1 克隆引物(F 和 R)PCR 扩增候选基因的结果
Fig. 1 PCR products of candidate reference genes using primers (F and R)



M. Marker; 1. *GAPDH*; 2. *EF-1α*; 3. *act*; 4. *UBQ*; 5. *TUB-α*; 6. *eIF-4A*; 7. *CYP*.

图 2 克隆引物 (qF 和 qR)PCR 扩增候选基因的结果
Fig. 2 PCR products of candidate reference genes using primers (qF and qR)

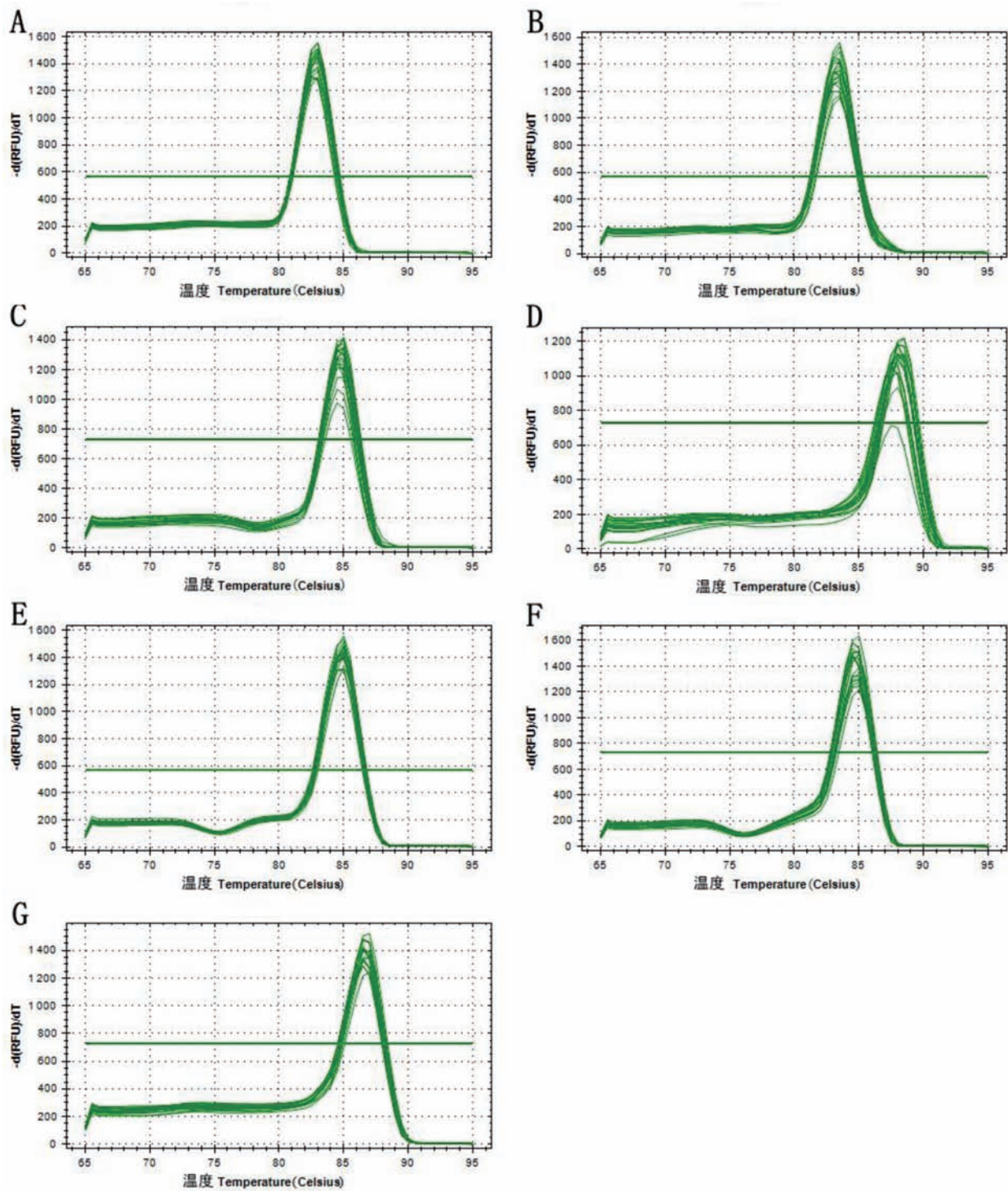
评估其表达稳定性。经 NormFinder 软件分析,7 个内参基因在各组织中的表达稳定程度存在差异,按 M 值大小排序为 *UBQ*>*TUB-α*>*EF-1α*>*eIF-4A*>*GAPDH*>*CYP*>*act*(表 3)。*UBQ* 的 M 值最低,总体稳定性最好。

2.4.3 BestKeeper 软件分析 BestKeeper 直接根据各基因的 Ct 值,计算标准偏差(standard deviation,SD)和变异系数(coefficient of variation,CV)来评估各内参基因的稳定性。一般来说,稳定的内参基因具有较小的 SD 值和 CV 值。BestKeeper 分析的基因表达稳定性排名为 *EF-1α*>*UBQ*>*eIF-4A*>*GAPDH*>*TUB-α*>*CYP*>*act*(表 4)。其中,*EF-1α*、*UBQ*、*eIF-4A* 的 SD 值和 CV 值比较相近,表达都相对稳定。

2.4.4 综合分析 由于各内参基因在 3 个软件中的排序略有差异,故运用几何平均值算法进行各候选内参基因的综合排名,内参基因几何平均值越低,则其稳定性越好。各内参基因在斑地锦不同生长期的不同组织中表达稳定性综合排名为 *UBQ*>*EF-1α*>*TUB-α*>*eIF-4A*>*GAPDH*>*CYP*>*act*(表 5)。

3 讨论与结论

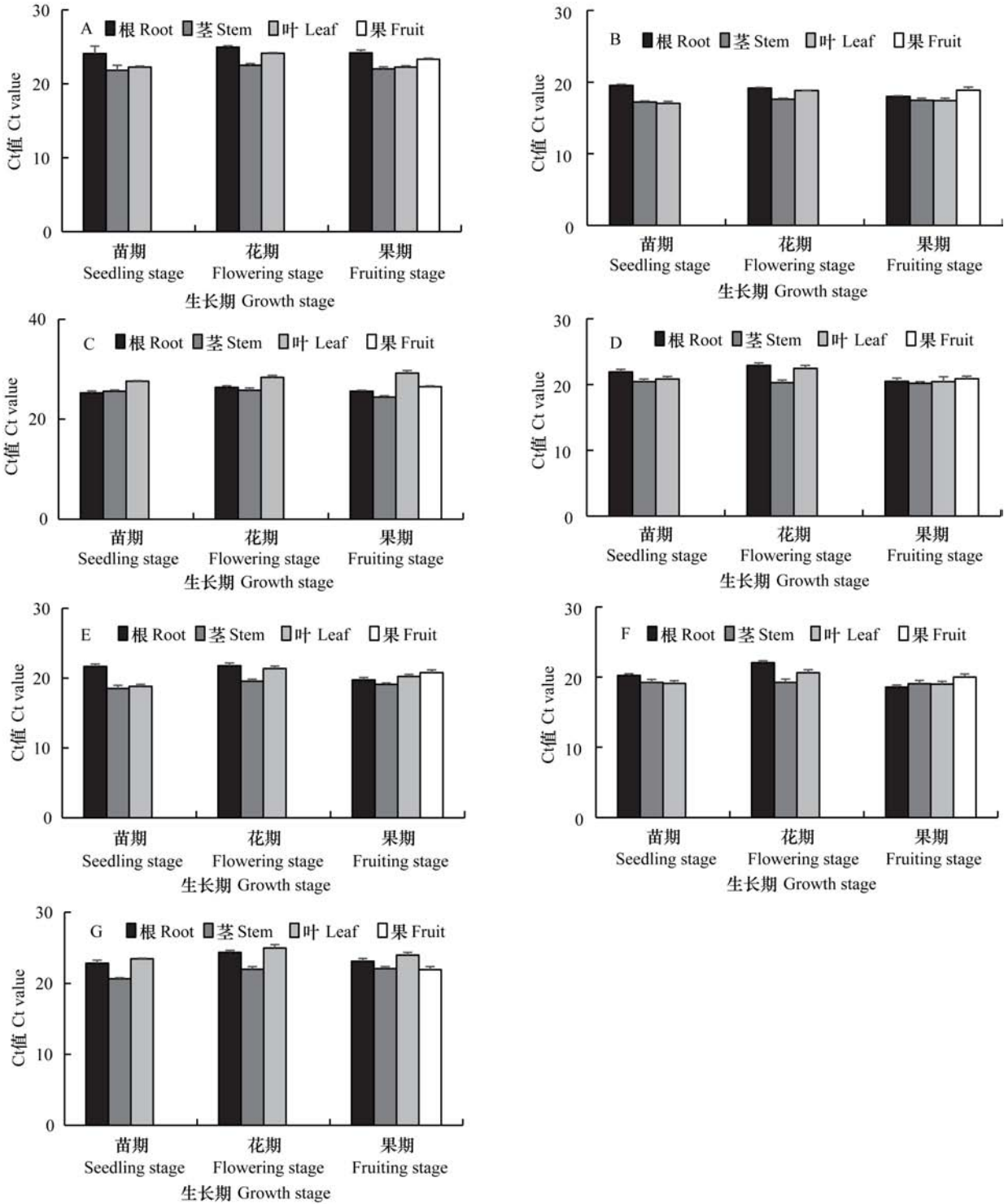
地锦草是中医、维医、蒙医常用药材,主要含有黄酮类、萜类、酚酸类和生物碱类等,其中槲皮素含量作为其质量标准,目前,斑地锦的分子生物学相关报道较少。本研究首次克隆了斑地锦 *GAPDH*、*EF-1α*、*act*、*UBQ*、*TUB-α*、*eIF-4A*、*CYP* 等常用的传统内参基因片段,并作为候选内参基因进行 RT-qPCR,分别用 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 评价在各生长期(苗期、花期、果期)根、茎、叶和果实中的表达稳定性。本实验中,各候选内参基因在不同生长期各组织中的表达丰度除 *act* 外都较高,Ct 值皆在 25 以下,符合要求。由于 3 个评估软件采用不同统计学算法,分析结果通常存在差异,需要综合分析得到最适合的内参基因(Kiarash et al., 2018;Zhong et al., 2019),其中 geNorm 和 NormFinder 的分析结果较为一致,*UBQ*、*TUB-α*、*EF-1α*、*eIF-4A*、*GAPDH* 的 M 值都小于 1,比较稳定,最佳内参基因为 *UBQ*,而 BestKeeper 评价结果与前二者略有差异,*EF-1α*、*UBQ*、*eIF-4A*、*GAPDH* 的 SD 值小于 1,该软件筛选的最优内参基因为 *EF-1α*,而 *UBQ* 和 *eIF-4A* 表达也比较稳定,与 *EF-1α* 并无明显差异。*UBQ* 是泛素蛋白,与蛋白质调节系统有关,参与细胞代谢过程,*UBQ* 是常用的内参基因,在许多植物中得到应用,例如分析芍药花瓣不同发育时期和不同组织的基因表达时可选用 *UBQ* 作为内参基因(李健, 2017)。*EF-1α* 是转录延伸因子 α 亚基基因,在真



A. *GAPDH*; B. *EF-1α*; C. *act*; D. *UBQ*; E. *TUB-α*; F. *eIF-4A*; G. *CYP*.

图 3 候选基因熔解曲线
Fig. 3 Melting curves of candidate reference genes

核生物中参与转录控制、凋亡以及信号转导等一系列重要的生命活动过程,也是较为常用的内参基因,在朱顶红不同组织中表达较稳定(刘晓婷等, 2018)。 *GAPDH*、*act*、*TUB-α*、*eIF-4A*、*CYP* 等不是斑



A. GAPDH; B. EF-1 α ; C. act; D. UBQ; E. TUB- α ; F. eIF-4A; G. CYP.

图 4 内参基因在各生长期不同组织样品中的 RT-qPCR Ct 值

Fig. 4 Ct values of RT-qPCR for candidate reference genes in different tissues at different growth stages

地锦各生长期不同组织RT-qPCR 的合适内参基因,但在其他一些植物中可能稳定表达,这也证明在不

同植物或不同实验条件下进行 RT-qPCR 有必要对内参基因进行筛选与评估 (Kozera & Rapacz,

2013)。因此,若研究斑地锦不同生长期基因组织特异性表达时,可以选取 *UBQ* 作为内参基因,如果选择内参基因组合,则 *UBQ* 和 *EF-1 α* 较为合适。此结果为后续斑地锦分子生物学相关研究提供了便利条件。当然,随着斑地锦基因发掘和表达研究的深入,不排除会出现更稳定的内参基因。

表 2 geNorm 分析内参基因的表达稳定性

Table 2 Expression stability of candidate reference genes analyzed by geNorm

基因 Gene	M 值 M value	排名 Rank
<i>UBQ</i>	0.82	1
<i>TUB-α</i>	0.90	2
<i>EF-1α</i>	0.91	3
<i>eIF-4A</i>	0.94	4
<i>GAPDH</i>	0.96	5
<i>CYP</i>	1.17	6
<i>act</i>	1.65	7

表 3 NormFinder 分析内参基因的表达稳定性

Table 3 Expression stability of candidate reference genes analyzed by NormFinder

基因 Gene	M 值 M value	排名 Rank
<i>UBQ</i>	0.19	1
<i>TUB-α</i>	0.35	2
<i>EF-1α</i>	0.42	3
<i>eIF-4A</i>	0.43	4
<i>GAPDH</i>	0.44	5
<i>CYP</i>	0.59	6
<i>act</i>	1.08	7

表 4 BestKeeper 分析内参基因的表达稳定性

Table 4 Expression stability of candidate reference genes analyzed by BestKeeper

基因 Gene	SD 值 SD value	CV 值 CV value	排名 Rank
<i>EF-1α</i>	0.79	4.36	1
<i>UBQ</i>	0.80	3.81	2
<i>eIF-4A</i>	0.81	4.10	3
<i>GAPDH</i>	0.98	4.23	4
<i>TUB-α</i>	1.01	5.02	5
<i>CYP</i>	1.05	4.56	6
<i>act</i>	1.16	4.40	7

表 5 各内参基因表达稳定性综合排名

Table 5 Comprehensive rank of expression stability of candidate reference genes

基因 Gene	geNorm	NormFinder	Best- Keeper	几何 平均值 Geome- trical mean	综合 排名 Compre- hensive rank
<i>UBQ</i>	1	1	2	1.33	1
<i>EF-1α</i>	3	3	1	2.33	2
<i>TUB-α</i>	2	2	5	3.00	3
<i>eIF-4A</i>	4	4	3	3.67	4
<i>GAPDH</i>	5	5	4	4.67	5
<i>CYP</i>	6	6	6	6.00	6
<i>act</i>	7	7	7	7.00	7

参考文献：

AN HX, LI ZJ, GULINA D, et al., 2008. Research advance of the uighur medicine Dijincao [J]. Lishizhen Med Mat Med Res, 19(12): 2866–2868. [安惠霞, 李治建, 古丽娜·达吾提, 等, 2008. 地锦草的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 19(12): 2866–2868.]

BUSTIN S, 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR RT-PCR: trends and problems [J]. J Mol Endocrinol, 29(1): 23–29.

Chinese Pharmacopoeia Commission, 2015. The Pharmacopoeia of the People’s Republic of China (Vol. I) [M]. Beijing: China Medical Science Press: 127. [国家药典委员会, 2015. 中华人民共和国药典(一部) [M]. 北京: 中国医药科技出版社: 127.]

Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae Agendae Academiae Sinicae Edita, 1997. Flora Reipublicae Popularis Sinicae (Vol. 3) [M]. Beijing: Science Press, 44: 49–50. [中国科学院中国植物志编辑委员会, 1997. 中国植物志(第三分册) [M]. 北京: 科学出版社, 44: 49–50.]

HALLER F, KULLE B, SCHWAGER S, et al., 2004. Equivalence test in quantitative reverse transcription polymerase suitable for normalization chain reaction: Confirmation of reference genes [J]. Anal Biochem, 335(1): 1–9.

HU JX, XI XT, WANG XM, et al., 2018. Mechanism of *Humifuse euphorbia* in regulating tumor angiogenesis by NF- κ B/VEGF signal pathway [J]. Chin J Exp Trad Med Form, 24(20): 167–172. [胡建新, 席晓甜, 王晓敏, 等, 2018. 地锦草调控 NF- κ B/VEGF 信号通路抑制肿瘤血管生成的机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 24(20): 167–172.]

KIARASH JG, WILDE HD, AMIRMAHANI F, et al., 2018. Selection and validation of reference genes for

- normalization of RT-qPCR gene expression in wheat (*Triticum durum* L.) under drought and salt stresses [J]. *J Genet*, 97(5): 1433–1444.
- KOZERA B, RAPACZ M, 2013. Reference genes in real-time PCR [J]. *J Appl Genet*, 54(4): 391–406.
- LI J, 2017. Selection and validation of reference genes for quantitative real-time PCR in herbaceous peony [J]. *Mol Plant Breed*, 15(7): 2544–2549. [李健, 2017. 芍药实时定量 PCR 内参基因的筛选和验证 [J]. *分子植物育种*, 15(7): 2544–2549.]
- LIANG WX, ZOU XX, CARBALLAR-LEJARAZU R, et al., 2018. Selection and evaluation of reference genes for RT-qPCR analysis in *Euscaphiskonishii* Hayata based on transcriptome data [J]. *Plant Methods*, 14(1): 42.
- LIU RH, WANG HB, KONG LY, 2001. Studies on chemical constituents of *Euphorbia humifusa* [J]. *Chin Trad Herb Drugs*, 32(2): 107–108. [柳润辉, 王汉波, 孔令义, 2001. 地锦草化学成分的研究 [J]. *中草药*, 32(2): 107–108.]
- LIU XT, WANG SL, XUE JQ, et al., 2018. Selection of reference genes for quantitative real-Time PCR in different tissue and organ of barbadoslily [J]. *Acta Hortic Sin*, 45(5): 919–930. [刘晓婷, 王顺利, 薛璟祺, 等, 2018. 朱顶红实时荧光定量 PCR 中不同组织器官内参基因的筛选 [J]. *园艺学报*, 45(5): 919–930.]
- NGUYEN N, SUOKAS M, KARPPINEN K, et al., 2018. Recognition of candidate transcription factors related to bilberry fruit ripening by de novo transcriptome and RT-qPCR analyses [J]. *Sci Rep*, 8(1): 1–12.
- SHAKEEL M, RODRIGUEZ A, TAHIR UB, et al., 2018. Gene expression studies of reference genes for quantitative real-time PCR: an overview in insects [J]. *Biotechnol Lett*, 40(2): 227–236.
- TIAN S, WEN E, MI N, et al., 2019. Determination of three active components in *Euphorbia humifusa* Will. U dsing high-performance liquid chromatography with diode-array detection and autophagy and apoptosis analysis of normal rat kidney and HeLa cells [J]. *Pharmacogn Mag*, 15(61): 348.
- WANG YZ, DAI MS, CAI DY, et al., 2019. Screening for quantitative real-time PCR reference genes with high stable expression using the mRNA-sequencing data for pear [J]. *Tree Genet Genom*, 15(4): 54.
- WU JY, HE B, DU YJ, et al., 2017. Analysis method of systematically evaluating stability of reference genes using geNorm, NormFinder and BestKeeper [J]. *Mod Agric Sci Technol*, (5): 278–281. [吴建阳, 何冰, 杜玉洁, 等, 2017. 利用 geNorm, NormFinder 和 BestKeeper 软件进行内参基因稳定性分析的方法 [J]. *现代农业科技*, (5): 278–281.]
- YUAN W, WAN HJ, YANG YJ, 2012. Characterization and selection of reference genes for real-time quantitative RT-PCR of plants [J]. *Chin Bull Bot*, 47(4): 427–436. [袁伟, 万红建, 杨悦俭, 2012. 植物实时荧光定量 PCR 内参基因的特点及选择 [J]. *植物学报*, 47(4): 427–436.]
- ZHANG YF, ZHAO LJ, ZENG YL, 2014. Selection and application of reference genes for gene expression studies [J]. *Plant Physiol J*, 50(8): 1119–1125. [张玉芳, 赵丽娟, 曾幼玲, 2014. 基因表达研究中内参基因的选择与应用 [J]. *植物生理学报*, 50(8): 1119–1125.]
- ZHONG SL, ZHOU SY, YANG SJ, et al., 2019. Identification of internal control genes for circular RNAs [J]. *Biotechnol Lett*, 41(10): 1111–1119.
- ZHU LF, YANG CQ, YOU YH, et al., 2019. Validation of reference genes for RT-qPCR analysis in peel and flesh of six apple cultivars (*Malus domestica*) at diverse stages of fruit development [J]. *Sci Hortic*, 244: 165–171.

(责任编辑 李 莉)

回眸 2021 年, 恰逢《广西植物》创刊 40 周年, 共有 550 位专家学者参与《广西植物》同行评议, 为《广西植物》稳步提高学术质量、提升学术影响力、创办一流学术期刊提供了强有力的保障, 衷心感谢各位专家学者的大力支持和无私奉献! 展望 2022 年, 期待再与您携手共进、一起向未来! 真诚祝愿大家在新的一年里身体健康! 阖家幸福! 事业顺利! 万事如意!

《广西植物》2021 年度审稿专家名单

(按姓氏拼音排序, 审稿时间为 2021 年 1 月 1 日至 12 月 31 日, 如有疏漏, 容日后补刊)

安明志	敖明章	白 岩	包曙光	包维楷	蔡爱华	蔡 磊	蔡 霞	蔡艳飞	蔡燕飞	蔡永立	柴胜丰
常朝阳	陈 彬	陈彩艳	陈海珊	陈洪松	陈建中	陈军文	陈丽萍	陈庆富	陈圣宾	陈世龙	陈双林 ¹
陈双林 ²	陈 翔	陈小红	陈小勇	陈学林	陈亚军	陈 艳	陈 晔	陈银萍	陈月圆	陈之端	陈卓梅
崔国发	戴高兴	邓家刚	邓 艳	邓荫伟	邓云飞	邓振山	丁炳扬	丁 兰	丁雨龙	董登峰	董莉娜
董仕勇	杜道林	杜 凡	杜 虎	杜 钦	杜彦君	杜云龙	段学武	樊洪泓	范七君	范 伟	冯佰利
冯汉青	冯源恒	付 春	付 岗	甘礼社	高程海	高继海	高 乞	高庆波	高 伟	高小丽	耿长安
龚 洵	顾大形	顾 垒	顾生玖	关 萍	郭 柯	郭丽秀	郭水良	郭屹立	哈斯阿古拉	哈斯巴根	
韩 广	韩建刚	韩文轩	韩月彭	郝 刚	郝清玉	何斌源	何 兵	何东进	何国振	何新华	何寻阳
何跃军	何中声	洪 欣	侯学良	侯学文	胡春华	胡钧铭	胡 秀	胡 秀	黄邦全	黄 芬	黄甫昭
黄国弟	黄衡宇	黄建勋	黄忠良	黄宁珍	黄 涛	黄天放	黄雪蔓	黄永吉	黄永林	黄俞沁	黄玉吉
黄 远	黄云峰	黄忠良	黄祖宾	季孔庶	贾晓鹏	简敏菲	简少芬	简曙光	江明喜	姜 沁	姜 勇
姜正旺	蒋代华	蒋巧媛	蒋日红	蒋水元	蒋显斌	蒋显锋	蒋晓山	金双侠	金效华	孔卫青	旷远文
拉 琼	兰小中	黎胜红	黎晓峰	黎 茵	黎云祥	李 峰	李伏生	李海云	李焕秀	李惠英	李火根
李金天	李 进	李钧敏	李 蕾	李 鹏	李莲芳	李良波	李 琳	李 璐	李 欠	李庆军	李 群
李素霞	李先琨	李雪华	李杨瑞	李意德	李在留	李战彪	李振基	李志辉	李忠虎	利毛才让	连 宾
梁 芳	梁桂东	梁士楚	梁小敏	梁月明	廖建雄	廖明安	廖文波	廖咏梅	林春蕊	林 祁	林树燕
林新春	刘柏林	刘 冰	刘 博	刘布鸣	刘承帅	刘 迪	刘东明	刘 锋	刘光立	刘国锋	刘 华
刘 慧	刘济明	刘佳佳	刘杰 ^①	刘 杰 ^②	刘林德	刘 录	刘 楠	刘 鹏	刘 萍	刘 强	刘庆华
刘 凤	刘文耀	刘亚令	刘 演	刘银占	刘云国	刘仲健	龙春林	卢凤来	陆 露	陆顺忠	吕宪国
吕秀兰	伦志明	罗大庆	罗毅波	骆海玉	马丹炜	马姜明	马克平	马履一	马朋飞	马小军	马晓惠
满建民	苗翠苹	莫贻友	莫廷辉	慕军鹏	纳 智	倪士峰	倪 穗	宁德生	宁云芬	欧晓昆	欧阳帅
潘复静	潘争红	逢 涛	彭长连	彭宏祥	彭 冶	蒲高忠	祁亮亮	齐永文	秦 垦	秦新民	秦新生
秦徐杰	仇 硕	邱黛玉	邱广龙	邱明华	权秋梅	任 海	容 丽	沙 伟	申仕康	申文辉	申亚梅
沈国春	沈 浩	沈瑞池	沈有信	盛茂银	时成俏	时小东	史刚荣	史卫东	史艳财	宋 坤	宋松泉
宋同清	宋跃朋	宋振巧	宋柱秋	苏利荣	苏天明	苏 旭	苏志尧	孙纪全	孙 坤	孙 涛	孙卫邦
孙现超	孙振元	谭 勇	谭运洪	唐凤鸾	唐光大	唐罗忠	唐赛春	唐绍清	唐占辉	陶玉华	滕红丽
滕丽华	田 斌	田建平	田 野	田志宏	童毅华	涂冬萍	汪诗平	汪 燕	汪正祥	王爱勤	王宝生
王趁义	王崇云	王 丹	王发明	王 非	王恒山	王 红	王 华	王 欢	王 晖	王剑峰	王 婧
王桔红	王 娟	王 磊	王利民	王亮生	王明奎	王鹏良	王青锋	王任翔	王瑞江	王少锋	王少奎
王曙光	王四海	王旺田	王 伟	王伟伟	王学春	王 艺	王 毅	王永飞	王永壮	王雨华	王玉花
王仲朗	韦桂宁	韦树根	韦 霄	韦小丽	韦玉梅	尉秋实	魏守兴	温 放	吴 超	吴承祯	吴强盛
吴圣进	吴沿友	吴志华	伍艳芳	武志江	武志强	向春雷	向达兵	向悟生	向小果	肖 冬	肖国樱
肖 强	肖月娥	谢春东	辛培尧	熊康宁	熊康宁	熊 雷	徐大平	徐凤霞	徐刚标	徐广平	徐贵青
徐立安	徐玲玲	徐文芬	徐艳琴	徐 勇	徐兆师	许长征	许 涵	许莉萍	许为斌	薛彬娥	薛彬娥
薛进军	薛培英	鄢 波	闫俊华	闫兴富	严寒静	严岳鸿	严重玲	阎恩荣	羊学荣	杨春霞	杨福生
杨 华	杨 慧	杨利民	杨期和	杨奇勇	杨清培	杨世雄	杨小波	杨小生	杨 艳	杨永川	杨泽良
杨章旗	杨子明	姚慧鹏	姚瑞玲	姚月峰	易湘茜	尹光彩	尹林克	应智霞	尤 扬	尤业明	于方明
于福科	于景华	于明坚	于胜祥	于应文	余龙江	余 岩	余知和	俞筱押	玉米提·哈力克	张彩飞	张 峰
喻阳华	原作强	袁秀云	曾炳山	曾凡锁	曾少华	曾宋君	曾祥玲	曾昭霞	张爱丽	张彩飞	张 峰
张钢民	张国防	张恒庆	张建亮	张建业	张金林	张金龙	张金屯	张金渝	张 军	张 力	张林魁
张 玲	张 璐	张美莉	张强 ⁽¹⁾	张强 ⁽²⁾	张荣京	张瑞菊	张松林	张太奎	张 伟	张文根	张文治
张宪春	张小卉	张晓东	张晓梅	张云海	张 亚	张艳军	张一平	张占江	张照远	张 震	张志强
张志耘	张中峰	张忠华	张子龙	张自斌	张宗申	招礼军	赵彩云	赵长明	赵昶灵	赵 桦	赵惠恩
赵惠新	赵建成	赵建立	赵莉娜	赵 平	赵 琦	赵雪利	赵 杨	赵懿琛	赵志光	赵志国	赵遵田
郑兰兰	仲崇禄	周 兵	周存宇	周凤琴	周 浩	周俊辉	周立刚	周晓君	周雪峰	周延清	周 燕
周毅峰	周永红	周浙昆	朱 华	朱建华	朱 凯	朱丽薇	朱师丹	朱昀昊	邹双全	邹天才	左爱学

¹中国林业科学研究院亚热带林业研究所; ²南京师范大学生命科学学院。①中国科学院昆明植物研究所; ②贵州师范大学生命科学学院。③淮北师范大学生命科学学院; ④广西植物研究所。

广西植物被国际和国内重要数据库收录:

- ☆ 俄罗斯《文摘杂志》(AJ, VINITI, Abstract Journal)
- ☆ 美国《化学文摘》(CA, Chemical Abstracts)
- ☆ 英国《国际农业与生物科学研究中心(全文库)》(CABI)
- ☆ 英国《全球健康》(Global Health)
- ☆ 美国《剑桥科学文摘》(CSA: NS)
- ☆ 波兰《哥白尼索引》(IC, Index of Copernicus)
- ☆ 日本《日本科学技术振兴机构数据库》(JST, Japan Science and Technology Agency)
- ☆ 美国《乌利希国际期刊指南》(Ulrich's, PD)
- ☆ 美国《史蒂芬斯全文数据库—艾博思科数据库》(EBSCOhost)
- ☆ 英国《邱园索引》(Index Kewensis)
- ☆ 美国《柯尔比科学文化信息中心》(CICSC)
- ☆ 中国《中文核心期刊要目总览》—中文核心期刊
- ☆ 中国科技论文统计与分析数据库(CSTPCD)—中国科技核心期刊
- ☆ 中国科学引文数据库(CSCD)、科学引文数据库(SCD)
- ☆ 中国生物学文献数据库(CBAD)、中国生物学文摘(CBA)
- ☆ 中国学术期刊文摘数据库(CSAD)、中国化学化工文摘(网络版)
- ☆ 中国期刊全文数据库(CJFD)
- ☆ 中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)
- ☆ 中国知识资源总库—中国科技期刊精品数据库(<http://epub.cnki.net>)
- ☆ 中国知网《中国学术期刊(网络版)》(CAJ-N)首批收录期刊(<http://navi.cnki.net/knavi/JournalDetail?pcode=CJFD&pykm=GXZW>)
- ☆ 中文科技期刊数据库(SWIC) (<http://www.cqvip.com>)
- ☆ 中国核心期刊(遴选)数据库(<http://wanfangdata.com.cn>)
- ☆ 中国生物医学文献服务系统(SinoMed) (<http://www.sinomed.ac.cn>)
- ☆ 中国台湾华艺中文电子期刊服务资料库—思博网(CEPS)(<http://www.ceps.com.tw>)
- ☆ 博看网(<http://www.bokee.com>)、龙源期刊网(<http://www.qikan.com.cn>)
- ☆ 中国科学院科技论文预发布平台(ChinaXiv)(<http://chinaxiv.org>)
- ☆ 中国科学院科技期刊开放获取平台(CAS-OAJ)(<http://www.oaj.cas.cn>)
- ☆ 国家科技期刊开放平台 (<http://doaj.istic.ac.cn>)

广西植物

月刊, 1981年创刊
第42卷 第2期 2022年2月

GUIHAIA

Monthly, Started in 1981
Vol. 42 No. 2 Feb. 2022

主管单位: 广西科学院
主办单位: 广西壮族自治区 广西植物研究所
中国科学院
广西植物学会
名誉主编: 马克平
主编: 李先琨
副主编: 蒋巧媛(常务) 李莉
编辑单位: 《广西植物》编辑部
地址: 桂林市雁山 邮编: 541006
电话/传真: (0773) 3550074
电子信箱: guihaia@gxib.cn
网址: <http://www.guihaia-journal.com>
出版单位: 科学出版社
(北京东黄城根北街16号 邮编: 100717)
印刷装订: 桂林日报印刷厂
订购处: 全国各地邮局
总发行: 科学出版社
国内发行: 中国邮政集团公司桂林市分公司
海外总发行: 中国国际图书贸易集团有限公司
(北京399信箱)

Supervised by Guangxi Academy of Sciences
Sponsored by Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang
Autonomous Region and Chinese Academy of Sciences
Guangxi Society of Botany
Honorary Editor-in-Chief: MA Keping
Editor-in-Chief: LI Xiankun
Associate Editors-in-Chief: JIANG Qiaoyuan(Managing) LI Li
Edited by Editorial Office of GUIHAIA
Addr.: Yanshan, Guilin 541006, Guangxi, China
Tel./Fax: 86-773-3550074
E-mail: guihaia@gxib.cn
<http://www.guihaia-journal.com>
Published by Science Press
(16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China)
Printed by Guilin Daily Printer (China)
Subscribed by All Local Post Offices in China
Distributed by Science Press
Domestically Distributed by Guilin Branch of China Post Group
Overseas Distributed by China International Book Trading Corporation
(P.O.Box 399, Beijing)

ISSN 1000-3142
CN 45-1134/Q

国内定价: 45.00元
国内邮发代号: 48-43
国外发行代号: MO-5054

版权所有© 国内外公开发刊



(购买本刊请扫上方二维码)

ISSN 1000-3142

