



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
首批林草科技重点期刊

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

广西植物

GUIHAIA



第42卷 第8期 Vol. 42 No. 8
2022年8月 Aug. 2022

海岛与海岸植物研究 专栏



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 出版
Science Press

8
2022

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

欢迎您投稿·订阅
http://www.guihaia-journal.com

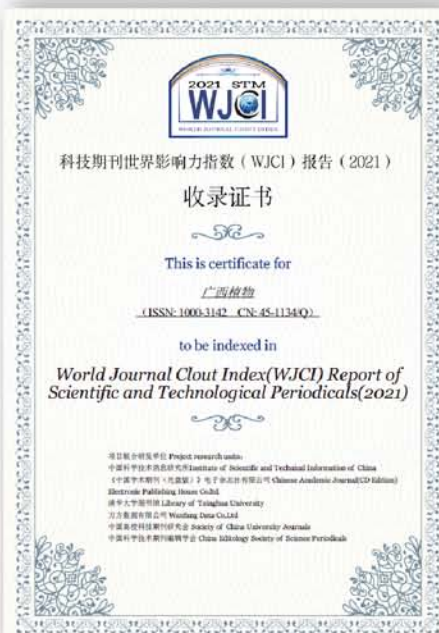
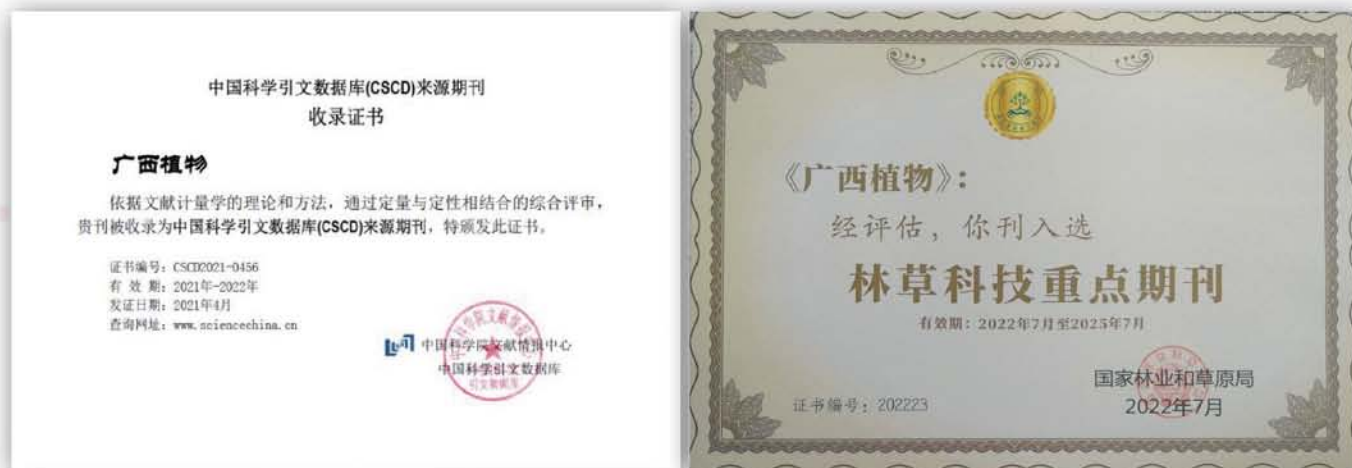
支撑生态文明建设和区域经济社会发展
报道植物科学新理论、新发现、新技术和新方法

《广西植物》月刊

《广西植物》是广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所和广西植物学会主办、科学出版社出版、国内外公开发行的植物学综合性学术期刊，为《中文核心期刊要目总览》收录的“中文核心期刊”、中国科学引文数据库收录的“CSCD来源期刊”、中国科技论文统计源期刊收录的“中国科技核心期刊”、林草科技重点期刊。本刊纸质出版平均发表周期为4~5个月，网络在线数字出版（录用定稿网络首发为2周内、本刊网站预发表为2周内）。

特色栏目内容（包括但不限于）：“一带一路”和东盟沿线植物多样性研究；喀斯特（岩溶/洞穴/天坑）植物与植被研究；药用（民族）植物与大健康；环境植物学—污染或受损环境的植物修复；植物—微生物（内生菌）、植物—动物相互作用；重要/特色植物遗传资源及其种质创新；海岛与海岸植物研究；珍稀濒危植物、特有植物与极小种群研究；入侵植物生物学研究及其防治技术；植物功能物质及其有效利用；苦苣苔科植物及其持续利用；国家重点保护野生植物研究。

固定栏目内容：系统与进化植物学、植物生态学、植物生理学、植物地理学、植物资源学、植物细胞学、植物遗传学、植物发育与生殖学、植物化学与化学生物学、植物保护学、植物营养学、植物病理学、民族植物学、生物多样性、分子生物学、生物信息学。



目次

专栏：海岛与海岸植物研究

北部湾海洋植物及其共附生微生物次级代谢产物研究进展(综述) 高程海, 夏家朗, 梁考云, 刘永宏, 易湘茜 (1259)

上海大金山岛植被分类与制图——基于网格化清查方法 许洛山, 朱晓彤, 王万胜, 杜运才, 汪彦颖, 梁启明, 郑丽婷, 阎恩荣 (1273)

滨海沙地植物厚藤叶片生理特征的季节变化 金 贇, 朱栗琼, 招礼军, 化 彬, 权佳惠, 刘金炽 (1284)

广西三种真红树植物可培养细菌多样性及其生物活性初筛 黎芳婷, 李 蜜, 徐淑芬, 王慧敏, 刘永宏, 高程海 (1294)

木麻黄原生境种子萌发及幼苗存活的影响因素分析 王 玉, 郝清玉 (1304)

木麻黄纯林及其混交林对土壤剖面理化性质的影响 王小燕, 薛 杨, 宿少锋, 林之盼, 雷湘龄, 王耀山 (1315)

专题：植物多样性

贵州省国家公园选址及其植物多样性保育研究 谢 波, 杨广斌, 李 蔓, 李亦秋 (1325)

海南主要陆域自然保护地兰科植物多样性与生境的关联分析 周 康, 张 哲, 宋希强, 李大程, 陈权衡, 张中扬, 李霖明 (1337)

遗传与育种

利用 F-MSAP 分析菜心表观遗传多样性 史卫东 (1357)

基于 SSR 标记的大明松天然群体遗传多样性分析 罗群凤, 冯源恒, 吴东山, 杨章旗 (1367)

香合欢 EST-SSR 标记开发及种间通用性研究 安 琪, 冯源恒, 杨章旗, 胡 拉 (1374)

四个竹秆变异毛竹变型的全基因组序列分析 牟少华, 李 娟, 李雪平, 高 健 (1383)

三种厚朴叶绿体基因组的比较研究 张 敏, 尹彦棚, 周罗静, 任 波, 王 丽, 时小东, 侯飞侠, 彭 成, 高继海 (1394)

北美鹅掌楸 *LAGO1* 基因的克隆、表达及其启动子分析 魏灵敏, 温少莹, 马际凯, 夏 辉, 李嘉昱, 吴栩佳, 李火根 (1402)

紫玉兰‘红元宝’*M3GT1* 基因的克隆及表达分析 王卓为, 戴梦怡, 程少禹, 王小德, 王亚玲, 申亚梅, 张 超 (1417)

紫金牛叶绿体基因组密码子偏好性分析 郭 松, 梁湘兰, 黄青青, 卢 祥, 严其伟, 张 鹏, 覃逸明 (1426)

葡萄 *CBF4* 基因生物信息学及其对低温和硅酸钾响应分析 张红梅, 王旺田, 张 芮, 杨 科, 王宝强, 王翠玲 (1433)

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

期刊基本参数: CN 45-1134/Q * 1981 * m * A4 * 182 * zh+en * P * ¥45.00 * 1200 * 17 * 2022-08

封面说明: 红树植物 (mangrove plants) 是指生长在热带和亚热带海岸潮间带, 周期性被海水浸淹的木本植物。红树植物在全球有 29 科 86 种, 可分为真红树植物和半红树植物。生长在红树林中所有的草本及藤本植物被称为伴生红树植物。中国有红树植物 21 科 42 种, 主要分布在海南、广西、广东、福建和台湾等省(区)沿海滩涂。亚洲热带和亚热带国家的沿海地区有把红树植物当做民间药物的传统。现代研究证明, 红树植物及其内生微生物因处于特殊生存环境, 促使其产生大量萜类、生物碱、黄酮类、多糖等结构新颖的次级代谢产物, 具有良好的抗菌、抗氧化、抗肿瘤、抗炎、增强机体免疫力等功效。

照片示: 部分代表性红树植物。1. 厚藤; 2. 木榄; 3. 木榄胚轴。封面照片由易湘茜提供。相关内容详见本期正文 1259~1272 页高程海等的文章。

CONTENTS

Special Column: Island and Coastal Plant Research

Research progress on secondary metabolites of marine plants and their co-epiphytic microorganisms in the Beibu Gulf
(Review) GAO Chenghai, XIA Jialang, LIANG Kaoyun, LIU Yonghong, YI Xiangxi(1259)

Vegetation classification and mapping of Dajinshan Island: A grid inventory-based approach XU Mingshan,
ZHU Xiaotong, WANG Wansheng, DU Yuncai, WANG Yanying, LIANG Qiming, ZHENG Liting, YAN Enrong(1273)

Seasonal changes of leaf physiological characteristics of *Ipomoea pes-caprae* in coastal sand
..... JIN Yun, ZHU Liqiong, ZHAO Lijun, HUA Bin, QUAN Jiahui, LIU Jinchi(1284)

Diversity and biological activity of culturable bacteria in three true mangrove plants of Guangxi
..... LI Fangting, LI Mi, XU Shufen, WANG Huimin, LIU Yonghong, GAO Chenghai(1294)

Impact factors on seed germination and seedling survival in *Casuarina equisetifolia* natural habitat
..... WANG Yu, HAO Qingyu(1304)

Effects of pure and mixed plantations of *Casuarina equisetifolia* on soil profile physico-chemical properties
..... WANG Xiaoyan, XUE Yang, SU Shaofeng, LIN Zhipan, LEI Xiangling, WANG Yaoshan(1315)

Special Subject: Plant diversity

Site selection and plant diversity conservation of national park in Guizhou Province
..... XIE Bo, YANG Guangbin, LI Man, LI Yiqiu(1325)

Association analysis of orchid diversity and habitat in main land nature reserves in Hainan
... ZHOU Kang, ZHANG Zhe, SONG Xiqiang, LI Dacheng, CHEN Zhiheng, ZHANG Zhongyang, LI Linming(1337)

Genetic and Breeding

Epigenetic diversity of Chinese flowering cabbage revealed by F-MSAP SHI Weidong(1357)

Genetic diversity of *Pinus taiwanensis* var. *damingshanensis* natural populations by SSR markers
..... LUO Qunfeng, FENG Yuanheng, WU Dongshan, YANG Zhangqi(1367)

EST-SSR marker development and interspecific generality of *Albizia odoratissima*
..... AN Qi, FENG Yuanheng, YANG Zhangqi, HU La(1374)

Genomic sequence analysis of four culm variants of Moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) on culm
..... MU Shaohua, LI Juan, LI Xueping, GAO Jian(1383)

Comparative study on chloroplast genomes of three *Magnolia* species
ZHANG Min, YIN Yanpeng, ZHOU Luoqing, REN Bo, WANG Li, SHI Xiaodong, HOU Feixia, PENG Cheng, GAO Jihai(1394)

Cloning, expression and promoter analysis of *LtAGO1* from *Liriodendron tulipifera*
..... WEI Lingmin, WEN Shaoying, MA Jikai, XIA Hui, LI Jiayu, WU Xujia, LI Huogen(1402)

Cloning and expression analysis of *ML3GT1* in *Magnolia liliflora* ‘Hongyuanbao’
WANG Zhuowei, DAI Mengyi, CHENG Shaoyu, WANG Xiaode, WANG Yaling, SHEN Yamei, ZHANG Chao(1417)

Codon usage bias in the chloroplast genome of *Ventilago leiocarpa*
..... GUO Song, LIANG Xianglan, HUANG Qingqing, LU Xiang, YAN Qiwei, ZHANG Peng, QIN Yiming(1426)

Bioinformatics of grape *CBF4* gene and its response to low temperature and potassium silicate
..... ZHANG Hongmei, WANG Wangtian, ZHANG Rui, YANG Ke, WANG Baoqiang, WANG Cuiling(1433)

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202105052

高程海, 夏家朗, 梁考云, 等. 北部湾海洋植物及其共附生微生物次级代谢产物研究进展 [J]. 广西植物, 2022, 42(8): 1259–1272.

GAO CH, XIA JL, LIANG KY, et al. Research progress on secondary metabolites of marine plants and their co-epiphytic microorganisms in the Beibu Gulf [J]. *Guihaia*, 2022, 42(8): 1259–1272.



北部湾海洋植物及其共附生微生物 次级代谢产物研究进展

高程海, 夏家朗, 梁考云, 刘永宏, 易湘茜*

(广西中医药大学 海洋药物研究院/药学院, 南宁 530200)

摘要: 海洋植物及其共附生微生物是海洋生物的重要组成部分,能够产生许多结构新颖、活性独特的次级代谢产物,承担多种生理生态功能。北部湾海洋植物物种资源丰富,据统计,海洋植物有 3 门 43 种。该文综述了从 2002 年起北部湾海洋植物及其共附生微生物次级代谢产物的研究进展,从 11 种红树植物和 7 种共附生微生物中获得 59 个新化合物和 35 个已知活性化合物,从 3 种海草植物中获得 3 个新化合物和 7 个已知活性化合物,从 6 种海藻植物和 1 种共附生微生物中获得 25 个新化合物和 8 个已知活性化合物,主要涉及结构类型有萜类、生物碱、黄酮类、甾醇,多数具有良好的抗菌、抗氧化、抗肿瘤、抗炎、增强机体免疫力等功效。在此基础上,进一步提出了北部湾海洋植物研究方向及后续的研究建议。该综述为深入研究和开发利用北部湾海洋植物及其共附生微生物提供了参考。

关键词: 北部湾, 海洋植物, 海洋微生物, 次级代谢产物, 生物活性

中图分类号: Q946 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2022)08-1259-14

Research progress on secondary metabolites of marine plants and their co-epiphytic microorganisms in the Beibu Gulf

GAO Chenghai, XIA Jialang, LIANG Kaoyun, LIU Yonghong, YI Xiangxi*

(*Institutes of Marine Drugs/Faculty of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China*)

收稿日期: 2022-01-08

基金项目: 国家自然科学基金(81903533, U20A20101, 82060640); 广西自然科学基金创新团队项目(2020GXNSFGA297002); 广西自然科学基金面上项目(2018GXNSFAA281268); 广西八桂学者专项; 广西中医药大学桂派中医药传承创新团队项目(2022A007) [Supported by National Natural Science Foundation of China(81903533, U20A20101, 82060640); Guangxi Natural Science Fund Innovative Team Project(2020GXNSFGA297002); General Project of Guangxi Natural Science Foundation(2018GXNSFAA281268); Special Fund for Bagui Scholars of Guangxi; Guangxi University of Chinese Medicine “Guipai Traditional Chinese Medicine Inheritance and Innovation Team” Project(2022A007)]。

第一作者: 高程海(1979-), 博士, 研究员, 硕士研究生导师, 主要从事海洋药用微生物资源与应用研究, (E-mail) 1178740043@qq.com。

通信作者: 易湘茜, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事海洋药用红树及其共附生微生物资源和物质基础研究, (E-mail) 42672960@qq.com。

Abstract: Marine plants and their co-epiphytic microorganisms are important compositions of marine organisms, and can produce many secondary metabolites with novel structures and unique activities and have various physiological and ecological functions. The Beibu Gulf is rich in marine plant species resources. According to statistics, there are 43 species of marine plants in three phyla. This paper reviews the research progress of the secondary metabolites of marine plants and their co-epiphytic microorganisms in the Beibu Gulf since 2002. A total of 59 new compounds and 35 known active compounds were obtained from 11 species of mangrove plants and seven species of co-epiphytic microorganisms, and three new compounds and seven known active compounds were obtained from three species of seagrass plants. A total of 25 new compounds and eight known active compounds were obtained from six species of algae plants and one species of co-epiphytic microorganism, which mainly involved terpenoids, alkaloids, flavonoids and sterols, most of which had good anti-bacterial, anti-oxidation, anti-tumor, anti-inflammatory and enhancing the body immunity. Based on the above results, further research suggestions are put forward. The review provides a reference for further study and utilization of marine plants and their co-epiphytic microorganisms in the Beibu Gulf.

Key words: Beibu Gulf, marine plant, marine microorganism, secondary metabolite, biological activity

海洋总面积约占地球总面积的 71%。海洋环境多具有低温、高压、低氧、寡营养、高盐等极端环境特性。海洋环境特殊性使得海洋生物拥有巨大的生物多样性,种类有 20 多万种。同时,海洋生物也具有独特的化学多样性,截至 2019 年年底,从海洋生物中分离鉴定超过 32 000 个新化合物,部分为新结构化合物(Carroll et al., 2021)。海洋植物及其共附生微生物作为海洋生物中重要的组成部分,产生的新化合物一直占有相当的数量。海洋天然产物特有结构及特异高效的生物活性为创新药物的设计和开发提供了思路。基于海洋天然产物或其衍生物开发而成功上市的国际一类创新药物有 17 个,进入 I 期、II 期和 III 期临床研究的创新药物分别有 8 个、12 个和 8 个,即将进入临床试验的有 4 个(王成等,2019)。中国食品药品监督管理局批准国内研发上市海洋药物有 9 个,其中 7 个来源于海洋藻类,分别为藻酸双酯钠片、海麒舒肝、海昆肾喜、甘糖酯、甘露醇烟酸酯片、降糖宁片、螺旋藻片。在中国食品药品监督管理局批准进入临床的 13 个海洋类药物中,8 个药物来源于藻类(张善文等,2018;冯贻东和冯汉林,2021)。因此,海洋植物及其共生微生物来源活性化合物的研究是当下海洋天然产物研究的热点,为开发创新药物提供了坚实的物质基础。

北部湾位于中国南海的西北部,东临中国广东雷州半岛和海南岛,北临中国广西壮族自治区,西临越南,通过中国的琼州海峡和南海相连。北部湾地处热带和亚热带,既是我国生物多样性最丰富的海域之一,也是我国海洋药用资源最丰富的区域之

一,具有开展海洋药物研究与开发得天独厚的资源优势。在北部湾民间,具有多种海洋植物的药用经验。红树因生长在潮间带而成为沿海居民最常用的海洋植物,其中以京族使用红树最具代表性,多用于抗炎、清热解毒、治扭伤和止泻(杜钦等,2016)。海草用于治疗发热、皮肤病、肌肉疼痛和甲状腺肿大等疾病(Kim et al., 2021),而海藻多用于化痰、利尿、消肿(龚世禹等,2020)。北部湾海洋植物主要包括红树、海草、海藻等 3 个种群,共附生微生物的主要研究对象为细菌和真菌。多年来,针对北部湾海洋植物及其共附生微生物次级代谢产物已有大量的研究,但综述性的文献报道尚未发现,仅见对国内外或北部湾某个区域的海洋化学成分的综述性报道(王友绍等,2004;高程海,2011;徐新亚等,2020),并且没有涉及近几年的最新研究成果。为了更全面和深入了解北部湾海洋植物及其共附生微生物次级代谢产物的研究进展,本文对北部湾海洋植物及其共附生微生物中结构新颖、活性显著的次级代谢产物的文献进行整理、分析和探讨,为后续研究和有效开发北部湾海洋植物及其共附生微生物资源提供参考依据。

1 北部湾红树及其共附生微生物次级代谢产物

红树是指生长在热带和亚热带海岸潮间带,周期性被海水浸淹的木本植物。北部湾滩涂分布着大片的红树林,主要区域包括中国海南西部的临高

县、儋州市和东方市, 中国广东的雷州半岛, 中国广西沿海以及与中国广西相邻的越南北部临海区域。北部湾红树林保护区主要有广西的山口红树林国家级自然保护区和北仑河口国家级自然保护区、海南的彩桥红树林县级自然保护区和新英湾红树林市级自然保护区、广东湛江红树林国家级自然保护区等。由于红树林处于高盐、强风、高温、强紫外辐射和缺氧污泥的特殊环境, 因此促使红树植物及其共附生微生物中产生大量与治疗人类重大疾病有关的结构新颖的次级代谢产物(Wu et al., 2008; Li et al., 2009)。

1.1 真红树植物及其共附生微生物次级代谢产物

1.1.1 桐花树次级代谢产物 桐花树(*Aegiceras corniculatum*)属于紫金牛科蜡烛果属, 是常见的优势红树植物, 常被用来镇痛、驱虫、抗菌(宁小清等, 2013)。王继栋等(2006a)从广西北海采集的桐花树枝叶中获得的镰叶芹二醇(**1**)对II型糖尿病的靶标分子蛋白酪氨酸酯酶1B(PTP1B)显示较好的抑制活性, IC_{50} 值为 $(9.15 \pm 2.48) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。化合物**1**与镰叶芹醇联用治疗组与对照组相比, 大于3 mm的肿瘤数量减少了约83%, 具有较好的抗肿瘤活性, 对防治肠癌有积极作用(Morten et al., 2017)。白藜芦醇(**2**)是王继栋等(2006a)从桐花树中获得的又一个代表性活性成分, 是一种天然抗氧化剂(Salehib et al., 2018), 具有预防冠心病、缺血性心脏病和抑制肿瘤作用(Su et al., 2019; Alrafashr et al., 2020)。近年来, 许多研究者通过化学和生物等技术来进行白藜芦醇的全合成研究。如图1所示, 丁华平等(2020)以对甲氧基肉桂醛为起始原料, 先在碱性条件下和丙酮发生羟醛缩合反应, 脱去甲基, 上苄基保护基, 再环合、水解、脱羧、脱氢和脱保护得到白藜芦醇。该化学合成路径总收率达40%, 具有较高的工业化生产潜在价值。植物细胞悬浮培养技术因其生产成本低、产品质量高、不破坏自然资源而成为现阶段工业生产白藜芦醇的方法(李燕等, 2009)。

Vinh等(2020)从采自越南广宁省的桐花树叶中中获得1个新皂苷3-*O*-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-(6'-*O*-methyl) glucuronopyranosyl]-13 β , 28-epoxy-3 β , 16 α -dihydroxyolean (**3**)和3个已知化合物(3 β , 16 α , 20 α)-3, 16, 28-trihydroxyolean-12-en-29-

oic acid 3-*O*- β -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2)-*O*-[β -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 4)]- α -larabinopyranoside (**4**)、aegicoroside A (**5**)、sakurasosaponin (**6**)。化合物**4**、**5**是细胞炎症因子IL-12p40、IL-6、TNF- α 的有效抑制剂, IC_{50} 值分别为 2.37 ± 0.46 、 5.12 ± 0.58 、 $2.38 \pm 0.31 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以及 2.37 ± 0.46 、 5.12 ± 0.58 、 $2.38 \pm 0.31 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。化合物**3**、**6**在 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时能显著促进B16F10黑色素瘤细胞凋亡, 具有开发成治疗黑色素瘤新药的潜力。化合物**5**、**6**具有抗肿瘤活性, 对MCF7、A549和HCT116细胞系具有较强的细胞毒性, IC_{50} 值范围为 $(2.89 \pm 0.02) \sim (9.86 \pm 0.21) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (Vinh et al., 2017)。

1.1.2 老鼠簕共附生微生物次级代谢产物 老鼠簕(*Acanthus ilicifolius*)为爵床科老鼠簕属植物, 主要分布在我国海南、广西、福建等地, 具有消炎、消肿、治疗胃痛和咳嗽等作用(宁小清等, 2013)。Cai等(2017)从广西山口红树林自然保护区老鼠簕叶片的内生真菌 *Talaromyces stipitatus* 中获得2个新化合物 talaromyones A-B (**7-8**)和2个已知化合物 purpactin A (**9**)和 tenellic acids A (**10**)。化合物**8**、**9**、**10**显示中等抑制 α -葡萄糖苷酶活性, IC_{50} 值范围为 $48.4 \sim 99.8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。化合物**8**对枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)具有抗菌活性, MIC值为 $12.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。化合物**9**是TMEM16A介导的Cl⁻通道的抑制剂, IC_{50} 值约为 $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 可能有助于治疗与黏液高分泌相关的疾病(Chantapol et al., 2021)。化合物**10**具有抗人肝癌细胞活性, IC_{50} 值为 $62.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (温露等, 2006)。

1.1.3 白骨壤及其共附生微生物次级代谢产物 白骨壤(*Avicennia marina*)又名海榄雌, 为马鞭草科海榄雌属植物, 具有避孕作用, 还可用于治疗感冒、痢疾和喉咙痛。易湘茜研究组对广西北海市的白骨壤果实中抗氧化成分进行了深入研究, 从中获得4个新苯乙醇苷 marinoids F-I (**11-14**)(Yi et al., 2014)和4个新酚类化合物 marinoids J-M (**15-18**)(Gao et al., 2014), 1个新咖啡酸衍生物 maricaffeolide A (**19**)和1个新甾烷衍生物 maricyclohexene A (**20**)(Xie et al., 2015)。运用细胞法(CAA)测试抗氧化活性发现, 化合物**14**、**16**、**17**、**19**显示出中等抗氧化活性, EC_{50} 值分别为 26 、 23.0 ± 0.71 、 36.2 ± 1.83 、 $24 \pm 0.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。活性研究发现, 化合物**15**可有效改善VD大鼠的认

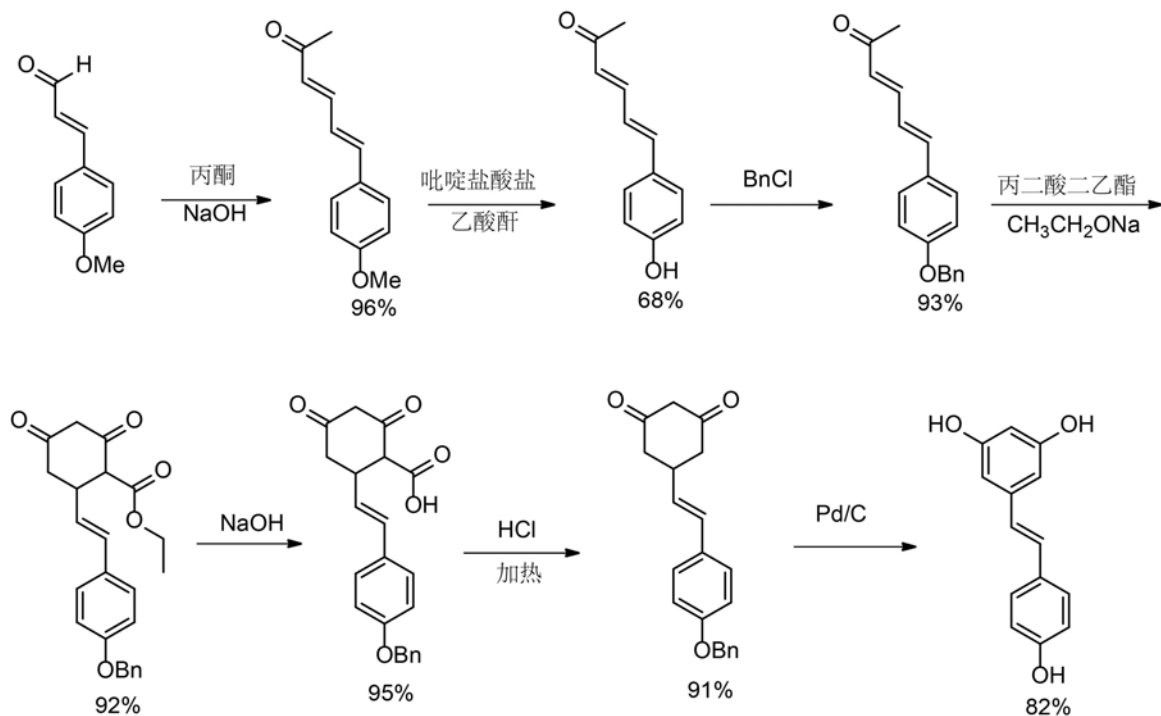


图1 白藜芦醇的化学合成路线(丁华平等, 2020)

Fig. 1 Chemical synthesis of resveratrol

知障碍,在 $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 治疗 VD 大鼠后,大鼠 MDA 水平降低 27.53%、NO 水平降低 20.41%、GSH-Px 活性提高 11.26%、SOD 活性提高 20.38% (Yi et al., 2020b)。

林永成研究组(Pan et al., 2010)从广西山口的白骨壤根部分离出真菌 *Phoma* sp. 中获得 1 个新内酯 1,8-dihydroxy-10-methoxy-3-methyldibenzo[*b,e*]oxepine-6,11-dione (**21**) 和 2 个新咕吨酮类化合物 1-hydroxy-8-(hydroxymethyl)-6-methoxy-3-methyl-9*H*-xanthen-9-one (**22**)、1-hydroxy-8-(hydroxymethyl)-3-methoxy-6-methyl-9*H*-xanthen-9-one (**23**)。化合物 **21**、**22** 对人口腔表皮样癌细胞 KB 和 KBv200 均无细胞毒活性。

1.1.4 木榄及其共附生微生物次级代谢产物 木榄 (*Bruguiera gymnorhiza*) 为红树科木榄属植物,常用于治疗咽喉肿痛、泄泻腹痛、出血、疟疾(谢雷卉等, 2018)。郭跃伟研究组对从广东湛江、广西山口红树林保护区等地采集的木榄茎叶中获得了木榄二硫醇(**24**)、木榄八硫醇(**25**)、*trans*-3,3'-dihydroxy-1,5,1,5-tetrathiacyclodecane (**26**)、*cis*-3,3'-dihydroxy-1,5,1',5'-tetrathiacyclodecane (**27**)、gymnorrhizol

(**28**) (Sun & Guo, 2004; 刘海利等, 2008; Huang et al., 2009) 等一系列结构新颖的含硫化合物。化合物 **24**、**28** 为新型 PTP1B 抑制剂, IC_{50} 值分别为 17.5、14.9 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。通过对化合物 **28** 的全合成进行研究,使用 Bunte 盐和硫醇的金属盐反应最终成功制备了化合物 **28**,合成反应见图 2。同时,开展构效关系和改变环上的二硫键为单硫键,采用四步法合成了木榄二硫醇(Chen et al., 2013),具体见图 3。郭跃伟团队在合成化合物 **28** 的过程中得到了一系列衍生物,其中 **5a** 对包括 TCPTP 在内的其他 PTP1B 表现出较强的选择性,**7j** 表现出最强的 PTP1B 抑制活性, IC_{50} 值为 4.54 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (Gong et al., 2007)。

尚随胜(2006)从广西合浦县采集的木榄皮中获得的甜菊醇(**29**)具有较好的抗肿瘤活性, IC_{50} 为 92 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。化合物 **29** 能抑制 α -葡萄糖苷酶和 HMG-CoA 还原酶,对 α -葡萄糖苷酶和 HMG-CoA 还原酶的 IC_{50} 值分别为 68.75、44.99 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (张军等, 2021)。

高程海研究组从广西北仑河口采集的木榄胚轴中获得的新生物碱 gymnorrhizin A (**30**) 对乙型肝炎表面抗原(HbsAg)和乙型肝炎 e 抗原(HbeAg)

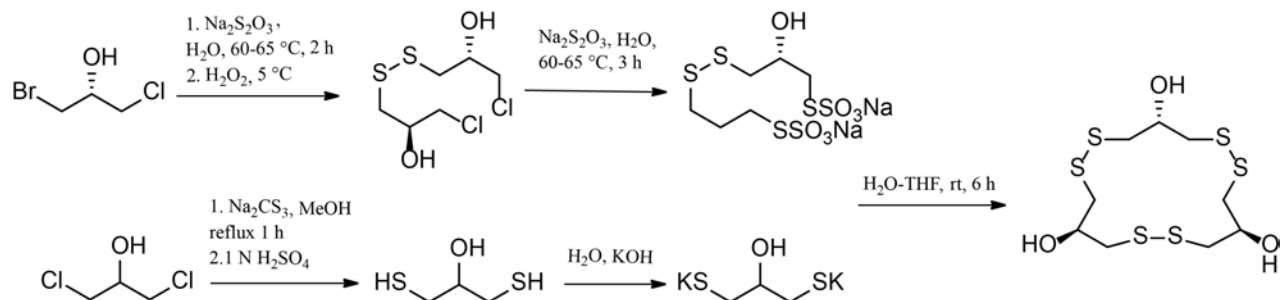
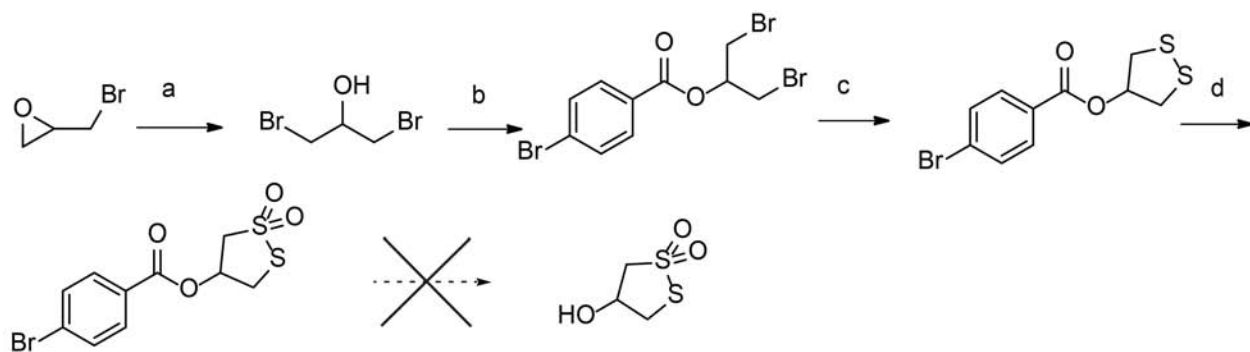


图 2 gymnorrhizol 的合成路线

Fig. 2 Synthesis of gymnorrhizol (Gong et al., 2007)



Reagents and conditions: (a) 40% aqueous HBr, CH_2Cl_2 , 0 °C, 5 h, 85%; (b) 4-bromobenzoic acid, EDCl, DMAP, CH_2Cl_2 , rt, 12 h, 88%; (c) Na_2S_2 , cat. TBAB, CHCl_3 , rt, 5 h, 60%; (d) Oxone, NaHCO_3 , acetone, 2 h, 81%.

图 3 木榄二硫醇的合成路线

Fig. 3 Synthesis of bruguiesulfurol (Chen et al., 2013)

的 IC_{50} 值分别为 4.37、4.89 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 治疗指数 (TI) 值分别为 2.68、2.40 (陈志勇等, 2016)。获得的已知化合物茛菪亭 (31)、开环异落叶松脂素 (32)、lyoniresinol-3 α -O- β -D-glucopyranosides (33) 对肿瘤细胞株 A549 显示出弱抑制活性, IC_{50} 值分别为 290.2、323.0、209.3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (易湘茜等, 2013a)。brugymnoside A (34) 显示出高抗氧化活性, EC_{50} 值为 $(11.79 \pm 0.78) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (Yao et al., 2017)。4 个新环己基乙腈衍生物 menisdaurins B-E (35–38) 有显著抗乙肝病毒活性, EC_{50} 值范围为 $(5.1 \pm 0.2) \sim (87.7 \pm 5.8) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Yi et al., 2015)。

林永成研究组从广西木榄枝条分离的内生真菌 *Aspergillus terreus* 中获得 1 个新化合物 8-hydroxyl-2-[1-hydroxyethyl]-5, 7-dimethoxynaphtho [2, 3-b] thiophene-4, 9-dione (39) 和 5 个已知化合物 anhydrojavanici (40)、8-O-methylbostrycoidin (41)、

3 β , 5 α -dihydroxy-(22E, 24R)-ergosta-7, 22-dien-6-one (42)、NGA0187 (43)、beauvericin (44)。化合物 40–41 和化合物 43–44 对 α -乙酰胆碱酯酶起显著抑制作用, IC_{50} 值分别为 2.01、6.71、1.89、3.09 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。化合物 42、44 对 MCF-7、A549、Hela 和 KB 细胞有细胞毒性, IC_{50} 值分别为 4.98 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 2.02 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (MCF-7)、1.95 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 0.82 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (A549)、0.68 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 1.14 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (Hela)、1.50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 1.10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (KB) (Deng et al., 2013a)。后续研究获得 1 个新化合物 botrysphaerin F (45), 化合物 45 对 MCF-7 和 HL-60 癌细胞生长有抑制作用, IC_{50} 值为 4.49、3.43 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (Deng et al., 2013b)。Chen 等 (2007) 从广西木榄的根部青霉属内生真菌 *Penicillium thomi* 中获得 1 个新联苯类化合物 4'5-dihydroxy-2, 3-dimethoxy-4 (hydroxypropyl)-biphenyl (46), 其对肿瘤细胞株 A549、HepG2 和 HT29 有细胞毒活性, IC_{50} 值分别为

10.1、12.2、8.9 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。孙承航研究组从广西山口红树林采集的木榄叶片中分离的一株白色链霉菌 (*Streptomyces albidoflavus*) 中获得化合物 (2R,3S,6S,7R,8R)-8-butyl-3-(3-formamido-2-hydroxybenzamido)-2,6-dimethyl-4,9-dioxo-1,5-dioxonan-7-ylacetate (47), 化合物 47 对烟草赤星病菌 (*Alternaria alternata*)、番茄灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*) 和番茄早疫病菌 (*Alternaria solani*) 的 MIC 值分别为 0.01、0.06、0.03 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 优于商品杀菌剂杀芽素 (Yan et al., 2010)。后续从该菌中获得的 5,8-二烯十四酸 (48) 有强杀线虫活性, 剂量为 27.3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对秀丽隐杆线虫有活性, IC_{50} 值为 162.8 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (Tao et al., 2012)。

1.1.5 海漆及其共附生微生物次级代谢产物 海漆 (*Excoecaria agallocha*) 为大戟科海漆属植物, 常用于治疗便秘、皮肤溃疡、手足肿毒, 此外还具有壮阳功效 (宁小清等, 2013)。Wang 和 Guo (2005) 以及 Wang 等 (2005, 2006) 从广西山口红树林国家级自然保护区的海漆中获得 10 个新的二萜类化合物为 agallochaols A-J (49-58)。李泳新等 (2010) 从广西北海采集的海漆中获得 1 个新酚苷 1-(3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzyl)-6-O-galloyl-1-O- β -D-glucopyranoside (59)。

Li 等 (2016) 从广东湛江红树林国家级自然保护区采集的海漆中所分离出的 1 株二孢属内生真菌 *Lasiodiplodia* sp. 中获得了 4 个新大环内酯 13-hydroxy-15-methoxy-3-methyl-3,4,5,6,9,10-hexahydro-1H-benzo[c][1]oxacyclododecine-1,7(8H)-dione (60), 15-hydroxy-17-methoxy-3-methyl-3,4,5,6,9,10-octahydro-1H-benzo[c][1]oxacyclododecine-1,11(12H)-dione (61), 15-methoxy-3-methyl-3,4,5,6,7,8,9,10-octahydro-1H-benzo[c][1]oxacyclododecine-1,12,13-trione (62), ethyl-2,4-dihydroxy-6-(8'-hydroxynonyl)-Benzoate (63)。化合物 63 对人单核细胞型淋巴瘤细胞株 THP1、人转移性乳腺导管腺癌细胞株 MDA-MB-435、人非小细胞肺癌细胞株 A549、人肝细胞癌细胞株 HepG2 和人结直肠癌细胞株 HCT-116 有中等细胞毒活性, 其他化合物无明显的细胞毒活性。

1.1.6 秋茄及其共附生微生物次级代谢产物 秋茄 (*Kandelia candel*) 为红树科秋茄属植物, 是最耐寒的红树植物种类, 在越南以及中国广东、广西、海南等地均有广泛分布, 常用于治疗止血、烫伤和

风湿性关节炎 (宁小清等, 2013)。陈铁寓和龙盛京 (2006) 从广西山口镇秋茄茎皮中分离出的化合物白桦脂酸 (64)、齐墩果酸 (65) 对 CNE-1 细胞具有弱细胞毒活性, IC_{50} 值分别为 8192、3532 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

Liu 等 (2020) 从广西山口镇秋茄胚轴分离的内生真菌 *Talaromyces* sp. 中获得了 2 个新化合物 talanaphthoquinone A-B (66, 67) 和 1 个已知化合物 6-[1-(acetyloxy)ethyl]-5-hydroxy-2,7-dimethoxy-1,4-naphthalenedione (68)。化合物 68 能降低促炎因子白细胞介素 1、白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 (TNF)- α 的基因水平。Huang 等 (2013) 从广西山口国家级红树林保护区采集的秋茄叶内生真菌 *Penicillium* sp. 中获得 1 个新化合物 α -吡喃酮混源萜烯 arigsugacin I (69) 以及 2 个已知化合物 arigsugacins F (70) 和 territrem B (71)。3 个化合物都有抗乙酰胆碱酯酶活性, IC_{50} 值分别为 0.64 ± 0.08 、 0.37 ± 0.11 、 7.03 ± 0.20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.1.7 榄李次级代谢产物 榄李 (*Lumnitzera racemosa*) 为使君子科榄李属植物, 常被用于治疗糖尿病、腹泻、疟疾 (宁小清等, 2013)。王继栋等 (2006b) 从榄李中分离到的 2 个活性次级代谢产物 2-methyl-1,3-dihydroxy-5-tridecylbenzene (72) 和 1,3-dihydroxy-5-undecylbenzene (73) 对蛋白酪氨酸磷酸酶 1B (PTP1B) 显示抑制活性, IC_{50} 值分别为 13.38 ± 1.98 、 10.40 ± 0.88 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.1.8 海桑属次级代谢产物 拟海桑 (*Sonneratia paracaseolaris*) 和无瓣海桑 (*S. apetala*) 为桃金娘目海桑科海桑属植物。民间将海桑果实捣烂成糊状, 用来止血或治疗扭伤, 其叶、花和果实用水煎可作为内科用药 (易湘茜等, 2013b)。Chen 等 (2011) 从广东湛江采集的红树科拟海桑茎皮的甲醇萃取物获得 α -丁烯酸内酯的二聚体 (74), 其对双特异性磷酸酶表现出很好的抑制活性, IC_{50} 值为 6.44 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。易湘茜研究组从广西北仑河口采集的无瓣海桑果实中分离鉴定的异鼠李素 (75)、木栓酮 (76)、熊果酸 (77) 对 HepG2 显示出抗氧化活性, 其 EC_{50} 值分别为 25.8 ± 1.3 、 62.1 ± 3.5 、 45.2 ± 2.8 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (易湘茜等, 2013b)。无瓣海桑果实提取物能有效延缓小鼠的衰老和提高其记忆能力 (李家怡等, 2019; 易湘茜等, 2019), 通过对无瓣海桑果实中起

延缓衰老的部位进行深入挖掘,发现了4个新化合物 sonneradons A-D (**78-81**),化合物**78**对线虫具有最显著的抗衰老作用,在浓度为100、300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,分别增加线虫的生存时间为30.83% $\pm$ 0.74%、34.48% $\pm$ 0.92%。此外,化合物**78**还能显著减轻线虫因衰老引起的泵送和弯曲减少,表明化合物**78**在抗衰老方面具有很大的应用潜力。分子对接(molecular docking)表明,HSF-1通路可能是化合物**78**抗衰老作用的关键通路(Yi et al., 2020a)。

1.2 半红树植物及其共附生微生物次级代谢产物

1.2.1 海芒果次级代谢产物 海芒果(*Cerbera manghas*),又名海芒果,属于夹竹桃科海芒果属,主要分布于我国的广东、广西和台湾,常被用于催吐、泻下以及制作外科膏药和麻醉药。Deng等(2014)从广西防城港采集的海芒果中提取出1种强心甙(-)-17 β -Neriifolin(**82**),化合物**82**对红蜘蛛的雌成虫、蛹、幼虫、卵具有高度的触杀活性,24 h内的 IC_{50} 值分别为0.28、0.29、0.28、1.45 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.2.2 苦槛蓝及其共附生微生物次级代谢产物 苦槛蓝(*Myoporum bontiodes*)为多年生灌木或乔木,具有驱风、解毒等作用(叶慧娟,2014)。谷文祥研究组从采自广东省雷州半岛的苦槛蓝叶中鉴定的化合物5,7-二羟基二氢黄酮(**83**)对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌有一定的抑制作用,MIC值为62.50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (戴航,2013;叶慧娟等,2014)。桔皮素(**84**)、甜橙素(**85**)、二氢山柰酚(**86**)、木犀草素(**87**)对香蕉炭疽菌具有较好的抑菌活性, IC_{50} 值分别为271.99、159.22、192.67、81.10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

Wang等(2015)从中国雷州半岛的苦槛蓝根部分离得到的1株内生真菌 *Alternaria* sp. 中获得新的环己烯酮($\pm$)-(4*R**,5*S**,6*S**)-3-amino-4,5,6-trihydroxy-2-methoxy-5-methyl-2-cyclohexen-1-one(**88**)和环戊烯酮衍生物($\pm$)-(4*S**,5*S**)-trihydroxy-3-methoxy-4-methoxycarbonyl-5-methyl-2-cyclopenten-1-one(**89**),2个新的咕吨酮衍生物4-chloro-1,5-dihydroxy-3-hydroxymethyl-6-methoxycarbonyl-xanthen-9-one(**90**)和2,8-dimethoxy-1,6-dimethoxy-carbonyl-xanthen-9-one(**91**)。化合物**88**、**89**显示出有效的ABTS清除活性, EC_{50} 值分别为8.19 $\pm$ 0.15、16.09 $\pm$ 0.01 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,化合物**89**、**90**对禾谷镰孢菌的MIC值分别为215.52、107.14 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,化合物**90**抗香蕉炭疽病菌的MIC值为214.29 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.2.3 水黄皮共附生微生物次级代谢产物 水黄皮(*Pongamia pinnata*)属于蝶形花科水黄皮属,常被用于催吐、癣疥和治疗疮疮、糖尿病等(宁小清等,2013)。谭德超等(2018)研究发现水黄皮醇提物有抑制前列腺癌DU145、PC3细胞增殖的作用。从广西水黄皮茎组织内生真菌 *Nigrospora* sp. 中获得3个新的化合物6-*O*-desmethyldechlorogriseofulvin(**92**)、6'-hydroxygriseofulvin(**93**)和2,3-didehydro-19a-hydr-oxyl-14-epicochloquinone B(**94**)。化合物**94**对人乳腺癌细胞株MCF-7、胰腺癌细胞株SW1990、肝癌细胞株SMMC7721均具有强细胞毒活性, IC_{50} 值分别为4、5、7 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Zhou et al., 2012)。

2 北部湾海草次级代谢产物

海草(seagrass)是生长于热带和温带海域浅水中的单子叶植物,全球海草有72种(Duffy et al., 2019),中国现有海草22种,隶属于4科10属,约占全球海草种类数的30%。海草次级代谢产物具有抑菌、抗氧化和防污损生物附着等生物活性(Kim et al., 2021)。目前,主要对北部湾海草中眼子菜科的大叶藻属、针叶藻属、二药藻属,水鳖草科的喜盐草中次级代谢产物进行了研究(郑凤英等,2013)。步琳(2015)从广西北海采集的喜盐草中获得2个黄酮类化合物芹菜素-7-*O*- β -葡萄糖苷(**95**)、柯伊利素-7-*O*- β -葡萄糖苷(**96**)。化合物**95**、**96**都具有清除羟基自由基的能力, IC_{50} 值分别为0.53、0.44 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。Li和Peng(2013)研究表明,化合物**95**还能抑制HIV病毒复制,具有抗HIV病毒的生物活性。漆淑华研究组从海南省采集的海菖蒲(*Enhalus acoroides*)中获得的木犀草素(**87**)、胡萝卜苷(**97**)和二十六醇(**98**)显示出细胞毒性,化合物**97**、**98**有抑制海洋细菌 *Loktanelle hongkongensis* 的活性,抑菌圈分别为3.10 $\pm$ 0.59、4.25 $\pm$ 0.67 mm。化合物**87**、**98**和木犀草素-4'-葡萄糖醛酸苷(**99**)对 *Pseudoalteromonas piscida*、*Rhodovulum* sp.、*Ruegeria* sp.、*Vibrio alginolyticus*、*V. furnissi*、*V. haliotocoli*、*V. harveyi* 7株海洋污损指示菌显示出弱抑制活性,抑菌圈范围在(2.00 $\pm$ 0.17)~(3.34 $\pm$ 0.44)mm之间。化合物**99**显示出显著抑制苔藓虫活性, EC_{50} 值为0.52 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Qi et al., 2008)。此外,从海南省陵水县采集的泰来草中分离出了1种新苯乙烷衍生物(*S*)-methoxy-(3',5'-dimethoxy-

4'-hydroxyphenyl) ethaneol (**100**) (Qi et al., 2012)。Wang 等 (2019) 从海菖蒲中分离到 2 个新型二萜 enhoidin A (**101**) 和 enhoidin B (**102**), 化合物 **101** 具有较低的细胞毒活性, IC_{50} 值范围为 $40 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 化合物 **102** 无细胞毒活性, IC_{50} 值 $> 77 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。Zhu 等 (2019) 从海菖蒲中分离得到的 luteolin-7-*O*-glucuronide (**103**) 具有杀藻活性, EC_{50} 值为 $34.29 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 具有作为新型杀藻剂的潜在应用价值。

3 北部湾藻类及其共附生微生物次级代谢产物

北部湾海藻种类多、资源丰富, 拥有褐藻门、红藻门、绿藻门 3 门, 其中红藻的物种最丰富, 绿藻的种类最少 (丁兰平等, 2014)。

3.1 褐藻门藻类及其共附生微生物次级代谢产物

马尾藻 (*Sargassum confusum*) 属于褐藻门圆子纲墨角藻目马尾藻科, 具有止血、消炎、清除体热等功能, 有较高药用价值 (Li et al., 2017)。汤海峰等 (2002) 从广西北海的褐藻果叶马尾藻 (*S. carpophyllum*) 中分离得到戈米辛 N (**104**)、13~2S-羟基脱镁叶绿素 a (**105**)、脱镁叶绿素 a (**106**)。化合物 **104**~**106** 都有诱导稻瘟霉菌丝变形活性, 最小表形浓度分别为 157 、 282 、 $287 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。 **104** 能抑制人早幼粒细胞白血病 HL-60, IC_{50} 值为 $4.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。化合物 **105**、**106** 在 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时对人乳腺癌细胞株 MCF-7 抑制率分别为 43%、10%, 对人肿瘤细胞株 A549 的抑制率为 24%、9%。化合物 **106** 可抑制多种人癌细胞生长, 在 $14 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ 光辐射下, 不同类型的癌细胞均存在光动力效应, IC_{50} 值为 $70 \sim 200 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 特别是在抗前列腺癌方面表现出很大的潜力, 联合 PDT 治疗处理人前列腺癌细胞 PC-3M, 其存活率显著降低到约 10% (谢立国等, 2021)。徐石海等 (2002) 从广西北海匏枝马尾藻 (*S. polycystum*) 中获得新化合物豆甾-3 β -羟基-5, 23, 25-三烯 (**107**)。鼠尾藻 (*S. thunbergii*) 为北太平洋西部特有的暖带性海藻, 在我国的辽东半岛南至雷州半岛常见分布。金京等 (2011) 从海南临高新盈镇海域鼠尾藻 (*S. thunbergii*) 乙醇提取物中分离得到有卤虫致死活性的化合物 2- [(3S, 7S, 11S) -3-hydroxy-3, 7, 11,

15-tetramethylhexadecyl]-3, 5, 6-trimethylcyclohexa 2, 5-diene-1, 4-dione (**108**)、盐藻甾酮 (**109**)、过氧化麦角甾醇 (**110**)。3 个化合物在浓度为 $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时卤虫致死率分别为 54.3%、44.5%、45.5%。化合物 **110** 还有中强度的斑马鱼胚胎致死毒性, 72 h 的 EC_{50} 值为 $21.7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。Peng 等 (2018) 从雷州半岛北部湾沿岸的褐藻 (*S. naozhouenes*) 分离出 1 个新异戊二烯衍生物 sargassumone (**111**) 和已知结构的降异戊二烯 (+)-epiloliolide (**112**), 化合物 **111** 对 DPPH 自由基的 EC_{50} 值为 $17 \pm 0.35 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 且对白色念珠菌 (*Candida albicans*)、耐氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的抑菌圈分别为 6.50 ± 0.20 、 8.20 ± 0.11 、 $7.00 \pm 0.20 \text{ mm}$ 。

Yang 等 (2006) 从中国广东湛江 1 株褐藻马尾藻 (*Sargassum*) 内生真菌 (*Sargassum* sp.) 中获得 2 个新大环内酯 6-oxo-de-*O*-methylsargassolide (**113**) 和 (*E*)-9-etheno-lasiodiplodin (**114**)。

3.2 红藻门藻类次级代谢产物

关灼斌 (2020) 从广东湛江市徐闻海域刺枝鱼栖苔 (*Acanthophora spicifera*) 中获得新吡咯酮生物碱 (*R, E*)-4-ethylidene-3-hydroxy-3-methylpyrrolidine-2, 5-dione (**115**) 和新单萜内酯 isololiolide A (**116**)。化合物 **116** 具有细胞毒性, 能够通过激活 caspase-3、降低 Bcl-2 水平、增加 p53 表达和 PARP 切割诱导肝癌细胞凋亡 (Catarina et al., 2016)。Lin 等 (2020) 从同一地点的刺枝鱼栖苔中获得新吡咯酮生物碱 acanthophoraine A (**117**)。

3.3 绿藻门藻类次级代谢产物

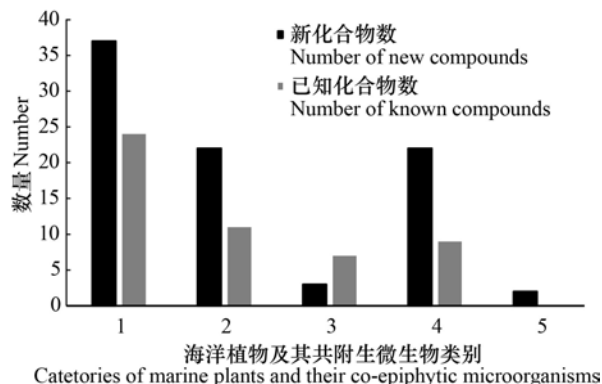
刘定权等 (2012) 从中国广东湛江南海海域采集的总状蕨藻 (*Caulerpa racemose*) 中获得 racemosols A-C (**118**–**120**)、racemosol D (**121**)、racemosins A-C (**122**–**124**)、caulerchlorin (**125**)、(23*E*)-B Sitost-23-ene-28-one (**126**)、(8*E*, 12*Z*, 15*Z*)-10-hydroxy-8, 12, 15-octadecatrien-4, 6 diynoic acid (**127**)、caulerterpenoids A-B (**128**–**129**) 12 个新化合物。化合物 **125** 对新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*) 有一定的抑制活性。李代春等 (2020) 从广东省湛江市徐闻县总状蕨藻中分离得到 6 个新化合物 caulerpalide A (**130**)、(+)-caulerpalide B (**131**)、(-)-caulerpalide B (**132**)、caulerine A (**133**)、caulerspiro A-B (**134**–**135**)。ursolic acid (**136**) 对粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 和金黄色葡萄球菌

(*Staphylococcus aureus*) 有显著抑制增殖作用, MIC 值分别为 8、32 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

4 结论

北部湾海域是我国生物多样性最丰富的海域之一,其海洋植物及其共附生微生物资源是我国海洋资源的重要组成部分。本文通过综述北部湾海洋植物及其共附生微生物次级代谢产物的研究进展,共获得 136 个化合物,从 11 种红树植物中获得 37 个新化合物和 24 个已知化合物,从 7 株红树共附生微生物中获得 22 个新化合物和 11 个已知活性化合物,从 3 种海草植物中获得 3 个新化合物和 7 个已知活性化合物,从 6 种海藻中获得 23 个新化合物和 8 个已知化合物,从海藻共附生微生物中获得 2 个新化合物。如图 4 所示,对北部湾海洋植物及其共附生次级代谢产物数量统计表明,红树及其共附生微生物是近年来的研究热点,其次级代谢产物占比最高,这与物种数量相对丰富、位于滩涂采摘便利、拥有广泛的民间药用基础有关。海草和海藻及其共附生微生物的研究相对较少,原因可能为海草和海藻具有季节性、采集样品较困难、需配备特殊的交通工具和采集工具,以上原因都会对开展研究工作有一定的影响。通过对海藻及其共附生微生物的次级代谢产物数量统计发现,虽然其研究较晚,但新代谢产物数量占比最高,现阶段对海藻及其共附生微生物的研究主要在大型藻类,而微型藻类及其共附生微生物较少涉及。可见,这是今后海洋天然产物研究的一个重要方向。

通过对北部湾海洋植物及其共附生微生物次级代谢产物结构及其数量统计发现(图 5,图 6),次级代谢产物以萜类、黄酮类、内脂类、甾体、生物碱、酚酸类等居多,同时一些结构新颖和活性显著的化合物陆续被挖掘出来,这与海洋植物及其共附生微生物所处高盐、高温及其低氧的海洋环境有关,丰富的次级代谢产物结构为新药发现提供了更多可能。由关注海洋植物及其共附生微生物的次级代谢产物结构与活性相关性可知,以上次级代谢产物大多数具有良好的抗菌杀菌、抗炎、抗氧化、抗肿瘤、治疗心血管疾病以及免疫调节功能等功效。红树次级代谢产物活性较丰富,追溯原因因为红树植物在北部湾民间多有药用记载,科研人员以此对其进行目的更加明确的研究,如木榄



1. 红树; 2. 红树共附生微生物; 3. 海草; 4. 海藻; 5. 海藻共附生微生物。

1. Mangrove; 2. Mangrove co-epiphytic microorganisms; 3. Seagrass; 4. Algae; 5. Algae co-epiphytic microorganisms.

图 4 海洋植物及其共附生微生物次级代谢产物数量
Fig. 4 Number of secondary metabolites of marine plants and their co-epiphytic microorganisms

在民间具有清热解毒之功,京族医书有其主治乙型肝炎的记录,从中分离出具抗乙型肝炎活性的生物碱和腈类化合物。榄李在民间有治疗糖尿病的功效,从榄李中分离到对 PT1B 起抑制活性的甾体化学成分。白骨壤在民间有预防感冒、提高免疫力的功效,从中分离出了起抗氧化和抗炎作用的苯乙醇苷类和新酚类化合物等。红树的化学成分及其药理活性的研究为许多药物的研究与开发提供了参考依据,如从桐花树中分离出的天然抗氧化剂白藜芦醇,从木榄中分离出的 PTP1B 抑制剂,白骨壤中能有效改善 VD 大鼠的新酚类化合物和能治疗心血管性痴呆的苯乙醇苷片剂等。海草的次级代谢产物主要为黄酮类、酚类、脂类化合物,活性为抑菌和清除自由基等。海藻主要含多糖类、多酚类、萜类等次级代谢产物,具有抗氧化、抗菌、调节免疫、抗肿瘤、抗凝血、降血糖等活性。海洋植物共附生微生物的次级代谢产物是近些年开始研究的热点,以真菌、细菌和放线菌为主,其次级代谢产物主要包括生物碱、萜类、酚酸类、甾醇类等,具有抗肿瘤、抗菌、抗炎、杀虫等活性。丰富的次级代谢产物结构类型呈现出多种药理活性,现阶段对起显著活性化合物的构效关系研究及其成药性评价也是一大热点,从中获得化合物的最佳结构类型为研制新型药物提供了先导化合物。

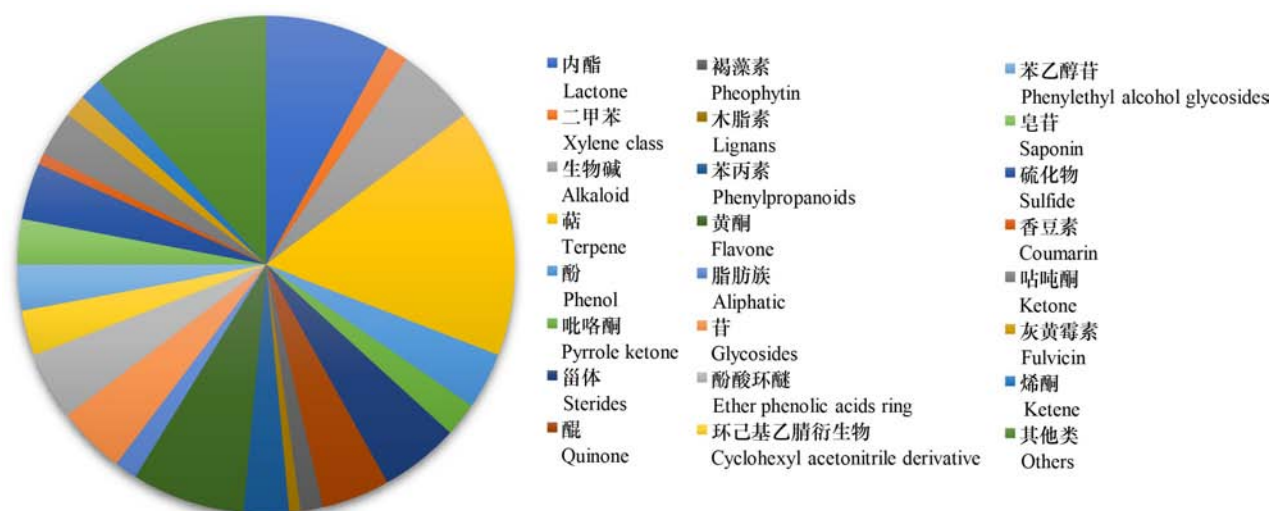
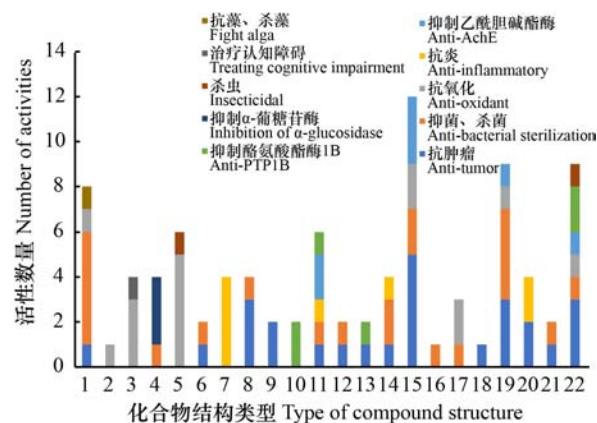


图 5 海洋植物及其共附生微生物次级代谢产物结构类型

Fig. 5 Structural types of secondary metabolites of marine plants and their co-epiphytic microorganisms



1. 黄酮; 2. 苯乙醇苷; 3. 酚; 4. 酚酸环醚; 5. 苷; 6. 褐藻素; 7. 环己基乙腈衍生物; 8. 苯丙素; 9. 灰黄霉素; 10. 硫化物; 11. 醌; 12. 木脂素; 13. 内酯; 14. 生物碱; 15. 萜; 16. 咕吨酮; 17. 烯酮; 18. 香豆素; 19. 甾体; 20. 皂苷; 21. 脂肪族化合物; 22. 其他类。

1. Phenylpropanoids; 2. Phenylethyl alcohol glycosides; 3. Phenol; 4. Ether phenolic acids ring; 5. Glycosides; 6. Pheophytin; 7. Cyclohexyl acetonitrile derivative; 8. Flavone; 9. Fulvicin; 10. Sulfide; 11. Quinone; 12. Lignans; 13. Lactone; 14. Alkaloid; 15. Terpene; 16. Ketone; 17. Ketene; 18. Coumarin; 19. Sterides; 20. Saponin; 21. Aliphatic; 22. Others.

图 6 海洋植物及其共附生微生物次级代谢产物结构与活性关系统计

Fig. 6 The relationship between structural types and activities of secondary metabolites of marine plants and their co-epiphytic microorganisms

5 展望

北部湾地处热带和亚热带区域,拥有国内面积最大红树林区和多个海草床生长区。红树林和海草床生态系统都拥有丰富的海洋微生物类群。目前,国际上海洋药物领域重点关注海洋微生物来源的结构新颖活性化合物,已经成为研究热点(马丽丽等,2021)。中国在海洋大型藻类来源寡糖类化合物及其创新药物领域领先全球,而北部湾海洋植物寡糖研究基本未见文献报道。南方医科大学吴军研究员从中国南海前沟藻属底栖甲藻新物种中发现了超级碳链化合物的新家族成员 benthol A (Jiang et al., 2021),表明海洋微藻的中分子化合物领域具有巨大研究空间。

海洋生物医药产业是向海经济的重要组成部分,是潜力巨大的战略性新兴产业,复合增速是海洋生产总值增速的2倍,是近十年来海洋产业中增长最快的领域。北部湾海洋植物及其共附生微生物中活性次级代谢产物研究是海洋生物医药产业的基础和核心,虽然学者们在此研究过程中已获得了较多的研究成果,但在探索过程中仍然存在许多不足和面临着艰难的挑战,如样品采集过程困难、样品量稀缺、因化合物量缺乏而导致药理学研究停止、未见成药性或临床研究、理论与研究

实际应用脱节、运用新技术较少等。因此,将北部湾海洋可持续植物资源优势合理地利用起来,从中挖掘出更多有价值的海洋新药尤为重要。

建议从以下 7 个方面继续开展研究:(1)对北部湾海洋植物合理开发利用,继续扩大北部湾海洋植物深度挖掘其次生代谢产物的范围,获得更多结构新颖的次级代谢产物,扩大活性筛选范围,加深活性探测层次,开展作用机理研究;(2)开展活性显著、结构新颖、机理清晰的次级代谢产物的化学合成或生物合成研究,完全解决后续临床前研究或临床试验的药源不足问题;(3)充分挖掘海洋植物共附生微生物种类,通过深入研究海洋微生物活性次级代谢产物,扩大北部湾海洋药库规模,增加候选药物种类;(4)整合区内外研究单位、药厂和医院资源,产学研用单位充分协作,加大北部湾来源且活性显著次级代谢产物成药性和临床研究的力度;(5)寡糖类药物现在为国际研究热点,北部湾海洋植物中寡糖类次级代谢产物研究方兴未艾,建议更多关注北部湾海洋植物中寡糖类活性次级代谢产物研究;(6)开展北部湾海洋微藻分类学研究,建立海洋微藻实验室内养殖体系,开启北部湾海洋微藻中分子化合物研究序幕;(7)人工智能(AI)已经广泛应用在靶点药物研发、药物挖掘、化合物筛选、预测 ADMET 性质、药物晶型预测、病理生物学研究、药物再利用等医药研发重点研究领域,应用 AI 开展药物研究事半功倍。因此,应该借助 AI 深度参与北部湾海洋植物及其共附生微生物中新型次级代谢产物的发现与创新药物成药性和临床研究,加快创新药物研究进度。

参考文献:

- ALRAFAS HR, BUSBEE PB, CHITRALA KN, et al., 2020. Alterations in the gut microbiome and suppression of histone deacetylases by resveratrol are associated with attenuation of colonic inflammation and protection against colorectal cancer [J]. *J Clin Med*, 9(6): 1796–1821.
- BU L, 2015. Study on extraction, purification and antioxidant activity of flavonoids from *Halophilus halophylla* [D]. Qingdao: Ocean University of China. [步琳, 2015. 喜盐草黄酮类化合物的提取、纯化及抗氧化活性研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学.]
- CAI RL, CHEN SH, LONG YH, et al., 2017. Depsidones from *talaromyces stipitatus* SK-4, an endophytic fungus of the mangrove plant *Acanthus ilicifolius* [J]. *Phytochem Lett*, 20: 196–199.
- CARROLL AR, COPP BR, DAVIS RA, et al., 2021. Marine natural products [J]. *Nat Prod Res*, 38(2): 362–413.
- CHEN GY, ZHU Y, WANG H, et al., 2007. The metabolites of a mangrove endophytic fungus, *Penicillium thomi* [J]. *Asian Nat Prod*, 9(2): 159–164.
- CHEN J, JIANG CS, MA WQ, et al., 2013. The first synthesis of natural disulfide bruguesulfurol and biological evaluation of its derivatives as a novel scaffold for PTP1B inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 23(18): 5061–5065.
- CHEN TY, LONG SJ, 2006. Study on chemical constituents and pharmacological action of *Kandelia candel* [J]. *J NW Pharm*, 21(3): 137–138. [陈铁寓, 龙盛京, 2006. 秋茄的化学成分和药理作用研究概况 [J]. 西北药学杂志, 21(3): 137–138.]
- CHEN XL, LIU HL, LI J, et al., 2011. Paracaseolide A, first α -alkylbutenolide dimer with an unusual tetraquinane oxacage bislactone skeleton from Chinese mangrove *Sonneratia paracaseolaris* [J]. *Org Lett*, 13(19): 5032–5035.
- CHEN ZY, QU CH, LU J, et al., 2016. Study on a new alkaloid from the *Bruguiera gymnorrhiza* of Rhizoma xylem and its anti-hepatitis B virus activity [J]. *Guihaia*, 36(2): 236–239. [陈志勇, 曲彩红, 卢静, 等, 2016. 木榄胚轴中一个新生物碱及其抗乙肝病毒活性研究 [J]. 广西植物, 36(2): 236–239.]
- DAI H, HUANG LL, GUO YH, et al., 2013. Flavonoids in the leaves of *Myoporum bontioides* A. Gray [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 21(3): 266–272. [戴航, 黄立兰, 郭育晖, 等, 2013. 苦檻蓝叶中的黄酮类化合物 [J]. 热带亚热带植物学报, 21(3): 266–272.]
- DENG CM, HUANG CH, WU QL, et al., 2013a. A new sesquiterpene from the mangrove endophytic fungus *Aspergillus terreus* (No. GX7-3B) [J]. *Nat Prod Res*, 27(20): 1882–1887.
- DENG CM, LIU SX, HUANG CH, et al., 2013b. Secondary metabolites of a mangrove endophytic fungus *Aspergillus terreus* (No. GX7-3B) from the South China Sea [J]. *Mar Drugs*, 11(7): 2616–2624.
- DENG YC, LIAO YM, LI JJ, et al., 2014. Acaricidal activity against *panonychus citri* and active ingredient of the mangrove plant *Cerbera manghas* [J]. *Nat Prod Com*, 9(9): 1265–1268.
- DING HP, GU QX, JIANG CF, et al., 2020. Synthesis of resveratrol [J]. *J Yangzhou Univ (Nat Sci Ed)*, 23(4): 22–26. [丁华平, 顾祁昕, 蒋程飞, 等, 2020. 白藜芦醇的合成 [J]. 扬州大学学报(自然科学版), 23(4): 22–26.]
- DING LP, WANG Z, HUANG BX, et al., 2014. Research and application prospect of macroalgae resources in Beibu Gulf [J]. *Guangxi Sci*, 21(6): 561–568. [丁兰平, 王展, 黄冰心, 2014. 北部湾大型海藻资源研究及应用展望 [J]. 广西科学, 21(6): 561–568.]
- DU Q, WEI WM, MI DQ, 2016. Knowledge and existing status of medicinal ethnobotany of mangrove among Jing people in Guangxi [J]. *Guihaia*, 36(4): 405–412. [杜钦, 韦文猛, 米东清, 2016. 京族药用红树林民族植物学知识及现状 [J]. 广西植物, 36(4): 405–412.]
- DUFFY JE, LISABDRO BC, JOAQUIN T, et al., 2019.

- Toward a coordinated global observing system for seagrasses and marine macroalgae [J]. *Front Mar Sci*, 6: 317.
- FENG YD, FENG HL, 2021. Progress and analysis of modern marine medicine research and development [J]. *J Appl Ocean*, 40(2): 366–371. [冯贻东, 冯汉林, 2021. 现代海洋药物研发进展与浅析 [J]. *应用海洋学报*, 40(2): 366–371.]
- GAO CH, YI XX, HE BJ, et al., 2011. Advances in studies on chemical constituents and biological activities of mangrove plants in Guangxi [J]. *Guangxi Acad Sci*, 27(3): 251–256. [高程海, 易湘茜, 何碧娟, 等, 2011. 广西红树植物化学成分及生物活性研究进展 [J]. *广西科学院学报*, 27(3): 251–256.]
- GAO CH, YI XX, XIE WP, et al., 2014. New antioxidative secondary metabolites from the fruits of a Beibu Gulf mangrove, *Avicennia marina* [J]. *Mar Drugs*, 12(8): 4353–4360.
- GONG JX, SHEN X, YAO LG, et al., 2007. Total synthesis of gymnorhizol, an unprecedented 15-membered macrocyclic polydisulfide from the Chinese mangrove *Bruguiera gymnorhiza* [J]. *Org Lett*, 9(9): 1715–1716.
- GONG SY, LIU YL, LI SM, et al., 2020. Research progress of marine traditional Chinese medicine [J]. *Anhui Agric Sci*, 48(8): 26–29. [龚世禹, 刘艺琳, 李世明, 等, 2020. 海洋中药的研究进展 [J]. *安徽农业科学*, 48(8): 26–29.]
- GUAN ZB, 2020. Study on the secondary metabolites of the perichoides of seaweed [D]. Ji'nan: Ji'nan University. [关灼斌, 2020. 海藻刺枝鱼栖苔的次生代谢产物研究 [D]. 暨南: 暨南大学.]
- HUANG XS, SUN XF, DING B, et al., 2013. A new anti-acetylcholinesterase α -pyrone meroterpenoid, arigsugacin I, from mangrove endophytic fungus *Penicillium* sp. sk5GW1L of *Kandelia candel* [J]. *Planta Med*, 79(16): 1572–1575.
- HUANG XY, WANG Q, LIU HL, et al., 2009. Diastereoisomeric macrocyclic polydisulfides from the mangrove *Bruguiera gymnorhiza* [J]. *Phytochemistry*, 70(17): 2096–2100.
- JIANG ZP, SUN SH, YU Y, et al., 2021. Discovery of benthol A and its challenging stereochemical assignment: opening up a new window for skeletal diversity of super-carbon-chain compounds [J]. *Chem Sci*, 12(30): 10197–10206.
- JIN J, SHAO CL, CUI YD, et al., 2011. Study on secondary metabolites and their bioactivity of a species of sargactyloides from South China Sea [J]. *J Ocean Univ Chin* (Nat Sci Ed), 41(S1): 369–373. [金京, 邵长伦, 崔怡迪, 等, 2011. 一种南海鼠尾藻次级代谢产物及其克生活性研究 [J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 41(S1): 369–373.]
- KIM DH, MAHOMOODALLY MF, SADEER NB, et al., 2021. Nutritional and bioactive potential of seagrasses: A review [J]. *S Afr J Bot*, 137: 216–227.
- KOBAEK-LARSEN M, EL-HOURI RB, CHRISTENSEN LP, et al., 2017. Dietary polyacetylenes, falcarinol and falcarinol, isolated from carrots prevents the formation of neoplastic lesions in the colon of azoxymethane-induced rats [J]. *Food Funct*, 8(3): 964–974.
- LI C, LI XS, YOU LJ, et al., 2017. Fractionation preliminary structural characterization and bioactivities of polysaccharides from *Sargassum pallidum* [J]. *Carbohydr Polym*, 155: 261–270.
- LI DC, 2020. Studies on the chemical constituents of tubular varieties of pteridophyta racematis [D]. Ji'nan: Ji'nan University. [李代春, 2020. 总状蕨藻管状变种的化学成分研究 [D]. 暨南: 暨南大学.]
- LI J, XUE YY, YUAN J, et al., 2016. Lasiodiplodins from mangrove endophytic fungus *Lasiodiplodia* sp. 318# [J]. *Nat Prod Res*, 30(7): 755–760.
- LI JY, YI XX, DU ZC, et al., 2019. Effects of the extracts of *Sonneratia apetala* fruit on antioxidative ability in aging mice induced by D-galactose [J]. *Mod Trad Chin Med Mat Med-World Sci Technol*, 21(4): 647–651. [李家怡, 易湘茜, 杜正彩, 等, 2019. 无瓣海桑果实提取物对 D-半乳糖致衰老小鼠抗氧化能力的影响 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 21(4): 647–651.]
- LI MY, XIAO Q, PAN JY, et al., 2009. Natural products from semi-mangrove flora: source, chemistry and bioactivities [J]. *Nat Prod Res*, 26(2): 281–298.
- LI T, PENG T, 2013. Traditional Chinese herbal medicine as a source of molecules with antiviral activity [J]. *Ant Res*, 97(1): 1–9.
- LI Y, DAI JK, QI Y, et al., 2009. Pharmacological action and synthesis pathway of resveratrol [J]. *Anhui Agric Sci*, 37(11): 4844–4845. [李燕, 戴佳锟, 祁洋, 等, 2009. 白藜芦醇的药理作用及其合成途径研究进展 [J]. *安徽农业科学*, 37(11): 4844–4845.]
- LI YX, YU X, YU SJ, et al., 2010. Phenolic glucopyranosides from the Chinese mangrove plant *Excoecaria agallocha* L. [J]. *J Chin Pharm Sci*, 19(4): 256–259. [李泳新, 于霞, 于善江, 等, 2010. 红树植物海漆中的酚苷类化合物 [J]. *J Chin Pharm Sci*, 19(4): 256–259.]
- LIN JL, LIANG YQ, LIAO XJ, et al., 2020. Acanthophoraine A, a new pyrrolidine alkaloid from the red alga *Acanthophora spicifera* [J]. *Nat Prod Res*, 34(14): 2065–2070.
- LIU DQ, 2012. Studies on chemical constituents and biological activities of *Caulerpa racemosa* from the South China Sea [D]. Nanchang: Nanchang University. [刘定权, 2012. 中国南海总状蕨藻(*Caulerpa racemosa*)化学成分及生物活性研究 [D]. 南昌: 南昌大学.]
- LIU HJ, YAN C, LI CQ, et al., 2020. Naphthoquinone derivatives with anti-inflammatory activity from mangrove-derived endophytic fungus *Talaromyces* sp. SK-S009 [J]. *Molecules*, 25(3): 576–584.
- LIU HL, SHEN X, JIANG HL, et al., 2008. Studies on the structure of novel and rare polydisulfide macrocyclic compounds from the Chinese mangrove plant, *Bruguiera gymnorhiza* [J]. *Org Chem*, 28(2): 246–251. [刘海利, 沈旭, 蒋华良, 等, 2008. 中国红树植物木榄 *Bruguiera gymnorhiza* 中新颖罕见多聚二硫大环化合物的结构研究 [J]. *有机化学*, 28(2): 246–251.]
- MA LL, TIAN XP, LI GJ, et al., 2021. Research status and trend of natural products derived from marine microorganisms [J]. *J Trop Ocean*, 40(5): 134–146. [马丽丽, 田新朋, 李桂菊, 等, 2021. 海洋微生物来源天然产物研究现状与态势 [J]. *热带海洋学报*, 40(5): 134–146.]

- NING XQ, LIN YB, TAN YF, et al., 2013. Study on the species of medicinal mangrove plants in Guangxi and their folk medicinal effects [J]. *Guid Chin Med*, 11(18): 73–75. [宁小清, 林莹波, 谈远锋, 等, 2013. 广西药用红树植物种类及其民间药用功效研究 [J]. 中国医药指南, 11(18): 73–75.]
- PAN JH, DNEG JJ, CHEN YG, et al., 2010. New lactone and xanthone derivatives produced by a mangrove endophytic fungus *Phoma* sp. SK3RW1M from the South China Sea [J]. *Helv Chim Acta*, 93: 1369–1374.
- PENG Y, HUANG RM, LIN XP, et al., 2018. Norisoprenoids from the brown alga *Sargassum Naozhouense* Tseng et Lu [J]. *Molecules*, 23(2): 348–356.
- QI SH, HUANG LS, HE F, et al., 2012. Phytochemical and chemotaxonomic investigation of seagrass *Thalassia hemprichii* (Ehrenb.) aschers (Hydrocharitaceae) [J]. *Biochem Syst Ecol*, 43: 128–131.
- QI SH, ZHANG S, QIAN PY, et al., 2008. Antifeedant, antibacterial, and antilarval compounds from the South China Sea seagrass *Enhalus acoroides* [J]. *Bot Mar*, 51(5): 441–447.
- SALEHI B, MISHRA AP, NIGAM M, et al., 2018. Resveratrol: a double-edged sword in health benefits [J]. *Biol Med*, 6(3): 91–111.
- SHANG SS, 2006. Study on chemical constituents and biological activity of mangrove plant, *Bruguiera gymnorrhiza* [D]. Nanning: Guangxi Medical University. [尚随胜, 2006. 红树林植物木榄化学成分及生物活性研究 [D]. 南宁: 广西医科大学.]
- SU XY, ZHAO PQ, LI N, et al., 2019. Chemoprotective effects of resveratrol against diethylnitrosamine induced hepatocellular carcinoma in wistar rats [J]. *Int J Pharm*, 15(5): 549–559.
- SUN YQ, GUO YW, 2004. Gymnorrhizol, an unusual macrocyclic polydisulfide from the Chinese mangrove *Bruguiera gymnorrhiza* [J]. *Tetrahedron Lett*, 45(28): 5533–5535.
- TAN DC, LUO H, DENG JG, et al., 2018. Screening antitumor activity of four mangrove plants in Guangxi coastal area [J]. *Guihaia*, 38(10): 1267–1276. [谭德超, 罗花, 邓家刚, 等, 2018. 广西沿海四种红树植物抗肿瘤活性的筛选 [J]. 广西植物, 38(10): 1267–1276.]
- TANG HF, YI YH, YAO XS, et al., 2002. Studies on chemical constituents of sargassum from brown alga fruit leaves [J]. *Chin Mar Med*, 21(6): 11–15. [汤海峰, 易杨华, 姚新生, 等, 2002. 褐藻果叶马尾藻化学成分的研究 [J]. 中国海洋药物, 21(6): 11–15.]
- TAO L, HABDEN X, HAN NN, et al., 2012. Separation, purification and structural identification of an active nematocidal component from the fermentation broth of endophytic streptomyces I07A – 01824 from mangrove ecosystem [J]. *Chin Med Biol*, 7(1): 5–8. [陶玲, 旭格拉·哈布丁, 韩宁宁, 等, 2012. 红树林植物内生放线菌 I07A–01824 发酵液中杀线虫活性成分的分离、纯化与鉴定 [J]. 中国医药生物技术, 7(1): 5–8.]
- VINH LB, NGUYET NTM, YANG SY, et al., 2017. Cytotoxic triterpene saponins from the mangrove *Aegiceras corniculatum* [J]. *Nat Prod Res*, 33(5): 1–7.
- VINH LB, PHONG NV, ALI I, et al., 2020. Identification of potential anti-inflammatory and melanoma cytotoxic compounds from *Aegiceras corniculatum* [J]. *Med Chem Res*, 29(11): 2020–2027.
- VIZETTO-DUARTE C, CUSTODIO L, GANGADHAR KN, et al., 2016. Isololiolide, a carotenoid metabolite isolated from the brown alga *Cystoseira tamariscifolia* is cytotoxic and able to induce apoptosis in hepatocarcinoma cells through caspase-3 activation, decreased Bcl-2 levels, increased p53 expression and PARP cleavage [J]. *Phytomedicine*, 23(5): 550–557.
- WANG C, ZHANG JG, LIU WD, et al., 2019. Progress in marine drug research and development [J]. *Chin Mar Med*, 38(6): 35–69. [王成, 张国建, 刘文典, 等, 2019. 海洋药物研究开发进展 [J]. 中国海洋药物, 38(6): 35–69.]
- WANG JD, DONG ML, ZHANG W, et al., 2006a. Chemical constituents of mangrove plant, *Aegiceras corniculatum* [J]. *Chin Nat Med*, 4(4): 275–277. [王继栋, 董美玲, 张文, 等, 2006a. 红树林植物桐花树的化学成分 [J]. 中国天然药物, 4(4): 275–277.]
- WANG JD, DONG ML, ZHANG W, et al., 2006b. Chemical constituents of mangrove plant, *L. racemose* [J]. *Chin Nat Med*, 4(3): 185–187. [王继栋, 董美玲, 张文, 等, 2006b. 红树林植物榄李的化学成分 [J]. 中国天然药物, 4(3): 185–187.]
- WANG JD, GUO YW, 2005. Agallochaols A and B, two new diterpenes from the Chinese mangrove *Excoecaria agallocha* L. [J]. *Helv Chim Acta*, 87(11): 2829–2833.
- WANG JD, LI ZY, GUO YW, et al., 2005. Secoisotrisane and isopimarane-type diterpenoids from the Chinese mangrove *Excoecaria agallocha* [J]. *Helv Chim Acta*, 88(5): 979–985.
- WANG JD, LI ZY, XIANG WS, et al., 2006. Further new secoisotrisane diterpenoids from the Chinese mangrove *Excoecaria agallocha* [J]. *Helv Chim Acta*, 89(7): 1367–1372.
- WANG JH, DING WJ, WANG RM, et al., 2015. Identification and bioactivity of compounds from the mangrove endophytic fungus *Alternaria* sp. [J]. *Mar Drugs*, 13(7): 4492–4504.
- WANG XB, SUN ZH, FAN LX, et al., 2019. Two novel diterpenes from the stems and leaves of tropical seagrass *Enhalus acoroides* in the South China Sea [J]. *Nat Prod Res*, 35(9): 1465–1473.
- WANG YS, HE L, WANG QJ, et al., 2004. Research progress on chemical constituents and pharmacology of medicinal mangrove plants [J]. *Chin Mar Med*, 23(2): 26–31. [王友绍, 何磊, 王清吉, 等, 2004. 药用红树植物的化学成分及其药理研究进展 [J]. 中国海洋药物, 23(2): 26–31.]
- WEN L, LIN YC, ZHAO LB, et al., 2006. Studies on metabolites of mangrove symbiotic fungus *Paecilomyces* sp. Tree 1–7 [J]. *J Chin Med Mat*, 29(8): 782–785. [温露, 林永成, 赵丽冰, 等, 2006. 红树林共生真菌 *Paecilomyces* sp. Tree 1–7 代谢产物的研究 [J]. 中药材, 29(8): 782–785.]
- WU J, XIAO Q, XU J, et al., 2008. Natural products from true mangrove flora: source, chemistry and bioactivities [J]. *Nat*

- Prod Res, 25(5): 955–981.
- XIE LG, TAN WL, ZHU GD, et al., 2021. Research progress of pheophorbide a-photodynamic therapy against prostate cancer [J]. Chin J Cell Biol, 43(3): 592–600. [谢立国, 谭文莉, 朱国东, 等, 2021. 脱镁叶绿素 a-光动力疗法抗前列腺癌的研究进展 [J]. 中国细胞生物学学报, 43(3): 592–600.]
- XIE LH, HOU XT, DENG JG, et al., 2018. Research progress on chemical constituents and pharmacological effect of *Bruguiera gymnorrhiza* [J]. Chin J Exp Trad Med, 24(21): 225–234. [谢蕾卉, 侯小涛, 邓家刚, 等, 2018. 木榄化学成分和药理活性研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 24(21): 225–234.]
- XIE XX, YAN WP, HUANG DM, et al., 2015. Two new secondary metabolites from the fruits of mangrove *Avicennia marina* [J]. Z fur Naturforsch B, 70(9): 691–694.
- XU SH, DING LS, WANG MK, et al., 2002. Studies on the chemical constituents of *Sargassum serpentine* [J]. Organ Chem, 9(2): 138–140. [徐石海, 丁立生, 王明奎, 等, 2002. 匍枝马尾藻的化学成分研究 [J]. 有机化学, 9(2): 138–140.]
- XU XY, YANG H, NING XQ, et al., 2020. Advances in marine microbial species diversity and chemical diversity in the Beibu Gulf [J]. Guangxi Sci, 27(5): 433–450. [徐新亚, 杨宏, 宁小清, 等, 2020. 北部湾海洋微生物物种多样性与化学多样性研究进展 [J]. 广西科学, 27(5): 433–450.]
- YAN LL, HAN NN, ZHANG YQ, et al., 2010. Antimycin A18 produced by an endophytic streptomyces albidoflavus isolated from a mangrove plant [J]. J Antibiot, 63(5): 259–261.
- YANG RY, LI CY, LIN YC, et al., 2006. Lactones from a brown alga endophytic fungus (No. ZZF36) from the South China Sea and their antimicrobial activities [J]. Bioorg Med Chem Lett, 16(16): 4205–4208.
- YAO JE, SHEN ML, YI XX, et al., 2017. A New 8-hydroxyquercetagenin glycoside from the hypocotyls of mangrove *Bruguiera gymnorrhiza* [J]. Chem Nat Comp, 53(1): 33–35.
- YE HJ, DAI H, WU LX, et al., 2014. Study on chemical constituents and antibacterial activity of leaves of *Myoporum bontiodides* A. Gray [J]. J Trop Subtrop Bot, 22(3): 307–313. [叶慧娟, 戴航, 吴伦秀, 等, 2014. 苦檻蓝叶的化学成分及其抑菌活性研究 [J]. 热带亚热带植物学报, 22(3): 307–313.]
- YIMNUAL C, SATITSRI S, NINGSIH BNS, et al., 2021. A fungus-derived purpactin A as an inhibitor of TMEM16A chloride channels and mucin secretion in airway epithelial cells [J]. Biomed Pharmacoth, 139: 111583.
- YI XX, GAO CH, HE BJ, et al., 2013a. Study on phenylpropanoids from hypocotyls of the mangrove plant *Bruguiera gymnorrhiza* [J]. Guihaia, 33(2): 191–194. [易湘茜, 高程海, 何碧娟, 等, 2013a. 红树植物木榄胚轴中苯丙素类化学成分研究 [J]. 广西植物, 33(2): 191–194.]
- YI XX, GAO CH, YI W, et al., 2013b. Study on the antioxidant activities in the fruits of *Sonneratia apetala* [J]. J Guangxi Acad Sci, 29(4): 217–219. [易湘茜, 高程海, 易蔚, 等, 2013b. 红树无瓣海桑果实中抗氧化活性成分研究 [J]. 广西科学院学报, 29(4): 217–219.]
- YI XX, CHEN Y, XIE WP, et al., 2014. Four new jacaranone analogs from the fruits of a Beibu Gulf mangrove *Avicennia marina* [J]. Mar Drugs, 12(5): 2515–2525.
- YI XX, DENG JG, HOU XT, et al., 2015. Four new cyclohexylideneacetone derivatives from the hypocotyl of mangrove (*Bruguiera gymnorrhiza*) [J]. Molecules, 20(8): 14565–14575.
- YI XX, LI JY, DU ZC, et al., 2019. Effects of *Sonneratia apetala* fruit extract on learning and memory ability of aging mice and its mechanism [J]. Guihaia, 39(11): 1534–1540. [易湘茜, 李家怡, 杜正彩, 等, 2019. 无瓣海桑果实提取物对衰老小鼠学习记忆能力的影响及其机制研究 [J]. 广西植物, 39(11): 1534–1540.]
- YI XX, JIANG S, QIN M, et al., 2020a. Compounds from the fruits of mangrove *Sonneratia apetala*: Isolation, molecular docking and antiaging effects using a *Caenorhabditis elegans* model [J]. Bioorg Chem, 99: 103813–103820.
- YI XX, LI JY, TANG ZZ, et al., 2020b. Marinoid J, a phenylglycoside from *Avicennia marina* fruit, ameliorates cognitive impairment in rat vascular dementia: a quantitative iTRAQ proteomic study [J]. Pharm Biol, 58(1): 1211–1220.
- ZHANG J, WANG F, WANG H, et al., 2021. Molecular mechanism of inhibition of α -Glucosidase and HMG CoA reductase activities by steviol and isosteviol [J]. Sci Technol Food Ind, 42(24): 8–15. [张军, 王芳, 王杭, 等, 2021. 甜菊醇、异甜菊醇抑制 α -葡萄糖苷酶和 HMG-CoA 还原酶的分子机制研究 [J]. 食品工业科技, 42(24): 8–15.]
- ZHANG SW, HUANG HB, GUI C, et al., 2018. Marine medicine and its development progress [J]. Chin Mar Med, 37(3): 77–92. [张善文, 黄洪波, 桂春, 等, 2018. 海洋药物及其研发进展 [J]. 中国海洋药物, 37(3): 77–92.]
- ZHENG FY, QIU GL, FAN HQ, et al., 2013. Diversity, distribution and conservation of seagrass in China [J]. Biodivers Sci, 21(5): 517–526. [郑凤英, 邱广龙, 范航清, 等, 2013. 中国海草的多样性、分布及保护 [J]. 生物多样性, 21(5): 517–526.]
- ZHU JY, XIAO H, CHEN Q, et al., 2019. Growth inhibition of phaeocystis globosa induced by luteolin-7-O-glucuronide from seagrass *Enhalus acoroides* [J]. Int J Environ Res Public Health, 16(14): 2615.
- ZHUO S, LI XM, LI CS, et al., 2012. Diverse secondary metabolites produced by marine-derived fungus *Nigrospora* sp. MA75 on various culture media [J]. Chem Biodivers, 9(7): 1338–1348.

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202007010

许沼山, 朱晓彤, 王万胜, 等. 上海大金山岛植被分类与制图——基于网格化清查方法 [J]. 广西植物, 2022, 42(8): 1273–1283.

XU MS, ZHU XT, WANG WS, et al. Vegetation classification and mapping of Dajinshan Island: A grid inventory-based approach [J]. *Guihaia*, 2022, 42(8): 1273–1283.

上海大金山岛植被分类与制图——基于网格化清查方法

许沼山¹, 朱晓彤¹, 王万胜², 杜运才², 汪彦颖², 梁启明¹, 郑丽婷¹, 阎恩荣^{1*}

(1. 浙江普陀山森林生态系统定位观测研究站, 上海市城市化生态过程与生态恢复重点实验室, 生态与环境科学学院, 华东师范大学, 上海 200241; 2. 上海市金山区海洋海塘管理所, 上海 201508)

摘要: 网格化清查方法有助于准确诊断一个地区的植被性质, 并为探索植被分类方法提供支持。该研究以上海大金山岛为对象, 借助航拍影像等间距地将其划分为 140 个清查网格 (40 m × 40 m), 按照统计样方法逐网格调查植物群落特征, 综合运用列表法和双向指示种法, 进行植被分类并绘制现状植被图。按照新修订的植被三级分类系统进行分类: 一级单位根据植被型, 大金山岛植被划分为落叶阔叶林、常绿落叶阔叶混交林、常绿阔叶林、落叶阔叶灌丛、常绿落叶阔叶混交灌丛、常绿阔叶灌丛和草丛; 二级单位根据优势种和植物区系特征, 可划分出 15 种群丛或群落类型; 三级单位根据群落年龄和外貌可划分为 22 种群落类型。以上结果表明, 大金山岛不仅是上海市物种多样性最高的区域, 也拥有华东海岛最典型、最多样的自然半自然森林群落。就植被状态而言, 地带性森林群落处于演替中后期, 但少数次生植被处于演替前期, 且面临着猴群干扰导致的植被发育停滞不前等生态问题。关于植被分类方法, 网格化清查方法可充分揭示植物群丛连续性中包含间断性和过渡性群落的现象。

关键词: 群落多样性, 统计样方法, 物种组成, 植被群丛, 植被性质**中图分类号:** Q948 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2022)08-1273-11

Vegetation classification and mapping of Dajinshan Island: A grid inventory-based approach

XU Mingshan¹, ZHU Xiaotong¹, WANG Wansheng², DU Yuncai², WANG Yanying²,
LIANG Qiming¹, ZHENG Liting¹, YAN Enrong^{1*}

(1. Putuo Forest Ecosystem Research and Observation Station, Shanghai Key Laboratory for Urban Ecological Processes and Eco-Restoration, School of Ecological and Environmental Sciences, East China Normal University, Shanghai 200241, China; 2. Jinshan Ocean and Coast Management Institute of Shanghai, Shanghai 201508, China)

收稿日期: 2020-11-30**基金项目:** 国家自然科学基金 (31770467); 上海市大金山岛植被等岛陆调查项目 (17-60129); 上海市城市生态过程与生态恢复重点实验室开放基金 [Supported by National Natural Science Foundation of China (31770467); Project of Investigation of Vegetation Resources on Dajinshan Island (17-60129); Open Fund of Shanghai Key Laboratory for Urban Ecological Processes and Eco-Restoration]。**第一作者:** 许沼山 (1988-), 博士, 研究方向为岛屿生物地理学, (E-mail) xums0123@163.com。**通信作者:** 阎恩荣, 博士, 教授, 研究方向为功能生态学和海岛生态学, (E-mail) eryan@des.ecnu.edu.cn。

Abstract: The grid inventory-based approach is helpful for diagnosing vegetation properties of a given region, and provides support to explore the methods of vegetation classification. In this study, Dajinshan Island in Shanghai City was selected to conduct vegetation classification and vegetation mapping according to the methods of Tabulation and Two-Way Indicator Species Analysis. We divided this island into 140 regular grids (40 m × 40 m) based on an unmanned aerial vehicle image, and then surveyed community composition by using the Braun-Blanquet method and quadrat-based census across the grids. Under the newly revised three-level vegetation classification system, the first level of classification (i.e., vegetation type) included deciduous broad-leaved forest, evergreen and deciduous broad-leaved mixed forest, evergreen broad-leaved forest, deciduous broad-leaved shrubland, evergreen and deciduous broad-leaved mixed shrubland, evergreen broad-leaved shrubland, and grassland. According to the dominant species and floristic characteristics, the second level of classification included 15 types of associations or communities. The third level included 22 types of communities based on physiognomy and community age. These results indicate that Dajinshan Island is not only a species-richest region in Shanghai, but also possesses the most typical and diverse natural or semi-nature forest communities across islands in East China. In terms of vegetation status, zonal forest communities develop to the middle and late successional stages, but a few secondary vegetation still stop in the early successional stage, which encounter to the ecological problems such as development stagnation caused by monkey disturbance. With respect to the vegetation classification methods, the grid inventory-based technique can fully reveal the phenomena of intermittent and transitional communities in the continuity of flora.

Key words: community diversity, Braun-Blanquet method, species composition, vegetation association, vegetation properties

植被分类对认识植被性质和群落结构特征与环境关系等非常重要(Jennings et al., 2009; 宋永昌, 2017)。长期以来, 植被分类存在“连续性”和“间断性”的争论, 主要形成了以 Clements 为代表的机体论学派(organismic school)和 Gleason 为代表的个体论学派(individualistic school)。至今为止, 各地植被分类方案还未就群落边界和属性等问题达成一致(田广红等, 2015)。不过, 总体而言, 诸如中国植被分类方案(80 年分类方案)所提出, 植被分类遵循植物群落学, 即以植物群落本身特征作为分类依据, 同时兼顾群落间的生态关系。宋永昌等(2017)指出, 植被分类的高级单位以生态外貌原则为主, 而中、低级单位则注重种类组成和群落结构, 对于复杂的植被, 必须兼顾外貌、优势种和特征种, 但无论从理论还是实践出发, 植被分类应坚持生态学原则(丁涛等, 2011; 阎恩荣等, 2017)。

无论如何, 植被调查的全面性和完整性决定了分类的准确性。但是, 对一个地区的植被进行全面清查是不可能的。因缺乏详细的植被调查资料, 在植被分类中, 通常不能全面反映群落类型的多样性。同时, 一般采用的典型样地抽样调查通常基于研究者的主观判断, 若经验不足, 可能会划分出错误的植被类型(张晓丽, 2007; 杨筑筑等, 2017)。更为重要的是, 由于缺乏充分的植被样地

调查资料, 也会导致植被分类结果无法客观评价具体群落类型的代表性和典型性(孙小伟等, 2018; 陈惠君等, 2019)。

海岛具有清晰的边界和较小的面积等自然属性, 为植被的网格化全面清查提供了便利, 从而成为研究植物群落“连续性”和“间断性”关系的理想对象, 有助于全面揭示一个具体地点植物群落的多样性, 并准确划分群落类型。当前, 还没有应用网格化清查方法研究整个海岛植被分类的案例, 尤其缺乏基于连续植物群落划分植被和群落类型的工作(蔡红燕等, 2016; 许洛山等, 2018)。

大金山岛是上海地区野生植物资源与乡土植物基因最为丰富的区域, 拥有上海唯一的地带性自然植被——常绿落叶阔叶混交林, 该植被类型在北亚热带区域具有典型性和代表性(杨永川等, 2002)。本研究基于无人机遥感影像, 将大金山岛划分为小班网格, 结合典型样地法和统计样方法对全岛植被进行连片调查, 并采用简化的植被三级分类系统: 一级单位结合了新分类系统中的植被纲和植被型组, 二级单位采用群丛或群落, 三级单位考虑演替阶段群落的差异, 即群落的年龄问题, 对大金山岛植被进行分类并制图。此外, 针对大金山岛的植被现状, 提出切实的保护方案。本研究旨在探讨植被分类的“连续性”和“间断性”

问题,也为大金山岛的植被保护与管理提供理论支撑。

1 材料与方 法

1.1 研究区域概况

大金山岛(121°24'25" E、30°41'42" N)位于杭州湾东北部,距上海市金山嘴 6.2 km,是金山三岛海洋生态核心保护区最大的海岛(靳亚丽等,2017)。大金山岛外部形态呈菱形,中部宽阔,西部狭窄,最长处 963 m,最宽处 437 m,陆域面积约 0.23 km²,海岸线长 2 390 m,最高海拔 103.4 m。大金山岛是上海市海拔最高的基岩岛,岩性以酸性石英斑岩为主,其中夹杂有流纹岩、英安岩、火山角砾岩等。属亚热带海洋性气候,主要受东亚季风和太平洋暖湿气团影响,温暖湿润,四季分明,年均温度和降雨量分别为 16 ℃ 和 1 020 mm(朱春玲等,2008)。土壤为褐色山地黄壤,pH 值为 4.5~4.7。大金山岛自 1978 年驻岛部队撤离后,植被逐渐恢复并进入次生演替阶段。1993 年,建立上海市金山三岛海洋生态自然保护区,由于长期保护,大金山岛自然植被生长良好,植物资源丰富(王万胜,2017)。

1.2 植被调查

2017 年 7—10 月,全面开展大金山岛植被调查。首先,根据高精度的无人机影像,规则地、等间距地将全岛划分为 140 个网格(40 m × 40 m)(图 1)。其次,采用法瑞学派的典型样地法(Braun-Blanquet)记录每个网格中的植物群落名称、中心位置坐标、群落垂直结构、物种组成、多优度-聚集度、多盖度等级和平均高度等。最后,选取 13 个典型植物群落建立固定样地(图 1),森林样地面积为 20 m × 20 m,灌丛面积为 10 m × 10 m,按照统计样方法(quadrat-based census),调查样地内所有株高大于 0.5 m 的木本植物,记录胸径、树高、枝下高、叶下高、冠幅等,典型群落的基本特征见表 1。全岛共发现种子植物 338 种,隶属于 105 科、238 属。

1.3 植被分类

首先,计算 13 个典型植物群落的重要值,其中物种相对盖度用相对胸高断面面积表示(叶涛等,2014),具体计算如下:

重要值=(物种相对多度+相对盖度+相对树高)/3×100% (1)

其次,对于典型样地法获得的数据,将多优

度-聚集度(5 级)量化为相对重要值,每级占 20%。在 140 个样地中,按群落的垂直结构分为乔木层、灌木层、草本层,计算各层内物种的重要值,得到样地水平上的物种重要值矩阵。

最后,结合群落特征,按 Ellenberg 列表法进行植被分类,同时结合双向指示种分析法划分群落类型(张峰和张金屯,2000;陶楚等,2014),因涉及 140 个样地,文中仅列出 13 个典型植物群落样地木本植物种的重要值排序(包括乔木层和灌木层),详见表 2。

1.4 植被制图

植被制图指按照一定的群落生态学原理和方法,将一个地区的植被分布状况按比例绘制成图,能够揭示植被和环境间的生态关系,反映植被的历史发展进程。现状植被制图以现存植被为对象,将原生群落和代偿群落按一定比例尺绘制成图(宋永昌,2017)。本文根据植物群落的局域坐标,按照植被分类基本单位,并根据一定比例尺及各分类单位的布局确定单位等级。虽然在植被调查时将全岛分为 140 个等间距的网格调查,但实际的群落边界并不规则,因此在处理群落边界时,应参照以无人机拍摄的群落外貌差异,结合实地调查以及地形地貌和明显的道路等,尽可能将低级单位群丛或群落绘制在地图上,并结合实地验证。

2 结果与分 析

2.1 植被类型和群落结构特征

大金山岛植被组成中,乔木和灌木主体以落叶树种占优势,常绿阔叶树种在部分地段作为建群种出现(青冈栎和红楠),或在落叶林灌木层成为优势种(柃木),既反映了典型的地带性特征,又表明了植被向演替顶级阶段发展的良好潜能和态势。如表 3 所示,大金山岛植被的一级单位可划分为以下 7 种:落叶阔叶林、常绿落叶阔叶混交林、常绿阔叶林、落叶阔叶灌丛、常绿落叶阔叶混交灌丛、常绿阔叶灌丛和草丛。根据优势种和植物区系特征。二级单位可划分出 16 种群丛或群落;三级单位按照演替阶段和群落年龄可划分 22 种群落。

2.1.1 落叶阔叶林

(1) 柃木-紫金牛/椿叶花椒+朴树群丛

落叶阔叶林中,柃木-紫金牛/椿叶花椒+朴树群丛分布面积最大,主要沿山脊线和北坡分布,紫金牛是该群丛草本层的指示种。野桐(*Mallotus*

表 1 大金山岛 13 个典型植物群落的基本特征

Table 1 Basic characteristics of 13 typical plant communities on Dajinshan Island

植物群落 Plant community	纬度 Latitude (N)	经度 Longitude (E)	面积 Area (m ²)	乔木层 平均 高度 Average height of tree layer (m)	灌木层 平均 高度 Average height of shrub layer (m)	物种密度 Species density (species · m ⁻²)	物种 丰富度 Species richness	植被类型 Vegetation type
青冈栎群落 1 <i>Cyclobalanopsis glauca</i> community 1	30°41′34.40″	121°25′00.23″	20×20	6.05	2.41	0.77	17	常绿阔叶林 Evergreen broad-leaved forest
青冈栎群落 2 <i>Cyclobalanopsis glauca</i> community 2	30°41′31.75″	121°25′09.17″	20×20	9.09	2.28	0.17	8	常绿阔叶林 Evergreen broad-leaved forest
青冈栎群落 3 <i>Cyclobalanopsis glauca</i> community 3	30°41′31.29″	121°25′13.65″	20×20	5.52	2.37	0.55	10	常绿阔叶林 Evergreen broad-leaved forest
天竺桂群落 <i>Cinnamomum japonicum</i> community	30°41′31.42″	121°25′12.71″	10×20	5.83	2.89	0.39	7	常绿阔叶林 Evergreen broad-leaved forest
麻栎群落 <i>Quercus acutissima</i> community	30°41′33.37″	121°24′56.01″	10×10	6.67	2.22	0.34	28	落叶阔叶林 Deciduous broad-leaved forest
野桐群落 1 <i>Mallotus tenuifolius</i> community 1	30°41′34.10″	121°24′56.94″	20×20	5.51	2.23	0.36	13	落叶阔叶林 Deciduous broad-leaved forest
野桐群落 2 <i>Mallotus tenuifolius</i> community 2	30°41′34.57″	121°24′58.71″	20×20	5.96	2.28	0.48	21	落叶阔叶林 Deciduous broad-leaved forest
野桐群落 3 <i>Mallotus tenuifolius</i> community 3	30°41′32.02″	121°24′58.72″	10×40	5.55	2.00	0.54	20	落叶阔叶林 Deciduous broad-leaved forest
椿叶花椒-桉木群落 <i>Zanthoxylum ailanthoides-Eurya japonica</i> community	30°41′34.23″	121°25′03.41″	20×20	6.35	2.34	0.61	18	落叶阔叶林 Deciduous broad-leaved forest
朴树群落 <i>Celtis sinensis</i> community	30°41′32.40″	121°25′07.65″	20×20	7.77	2.00	0.42	17	落叶阔叶林 Deciduous broad-leaved forest
小叶女贞群落 <i>Ligustrum quihoui</i> community	30°41′31.47″	121°25′05.69″	10×10	5.32	2.36	0.36	11	常绿灌丛 Evergreen shrubland
红楠群落 <i>Machilus thunbergii</i> community	30°41′34.87″	121°25′05.69″	20×20	8.93	2.29	0.21	8	常绿阔叶林 Evergreen broad-leaved forest
丝绵木群落 <i>Euonymus maackii</i> community	30°41′29.25″	121°25′16.12″	20×20	6.06	2.31	0.37	15	落叶灌丛 Deciduous shrubland

japonicus)多占据该群丛的亚乔木层或灌木层,分布范围较大,在成熟落叶林不能成为乔木层优势种。椿叶花椒和朴树为优势种的群落类型在大金山岛最为典型,根据两者的个体组成比例,可形成4种群落类型,其主要特征如下。①椿叶花椒群落:是大金山岛典型的崩塌地群落,主要分布于山坡基部近海崩塌地,群落内砾石较多。乔木层平均高度为6.5 m,伴生有野桐、山合欢(*Albizia kalkora*)、丝绵木(*Euonymus maackill*)等。灌木层

优势种有柘木、算盘子(*Glochidion puberum*)、厚叶石斑木(*Rhaphiolepis umbellata*)、桉木和小叶女贞等,平均高度为3.5 m。林下伴生少量桉木和小叶女贞等,该群落处于演替中后期。②椿叶花椒+朴树群落:集中在北坡边缘,乔木层平均高度为7 m,优势种为椿叶花椒和朴树;灌木层高度为2.6 m,有柘木、海桐和薜荔(*Ficus pumila*)等;草本层主要有贯众(*Cyrtomium fortunei*)和络石等。③朴树+桑群落:分布面积较小,主要在中部坡面。其分层结

表 2 大金山岛 13 个典型植物群落中木本植物的重要值

Table 2 Importance values of woody species of 13 typical plant communities on Dajinshan Island

	青冈栎 群落 1 <i>Cycloba- lanopsis glauca</i> community 1	青冈栎 群落 2 <i>Cycloba- lanopsis glauca</i> community 2	青冈栎 群落 3 <i>Cycloba- lanopsis glauca</i> community 3	天竺桂 群落 <i>Cinnamo- mum japonicum</i> community	麻栎 群落 <i>Quercus acutissima</i> community	野桐 群落 1 <i>Mallotus tenuifolius</i> community 1	野桐 群落 2 <i>Mallotus tenuifolius</i> community 2	野桐 群落 3 <i>Mallotus tenuifolius</i> community 3	椿叶花椒- 桉木群落 <i>Zanthoxylum ailanthoides- Eurya japonica</i> community	朴树 群落 <i>Celtis sinensis</i> community	小叶女贞 群落 <i>Ligustrum quihoui</i> community	红楠 群落 <i>Machilus thunbergii</i> community	丝绵木群落 <i>Euonymus maackii</i> community
白檀 <i>Symplocos paniculata</i>	0.044	0.195	0.038	0.096	0.048	0.176	0.034	—	—	—	0.028	—	—
臭椿 <i>Ailanthus altissima</i>	—	—	0.026	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
椿叶花椒 <i>Zanthoxylum ailanthoides</i>	—	—	0.183	0.118	—	—	0.030	—	0.417	0.103	0.240	—	—
楸木 <i>Aralia elata</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.181	—	—
豆梨 <i>Pyrus calleryana</i>	—	—	—	—	—	0.047	0.148	—	—	—	0.053	—	—
海桐 <i>Pittosporum tobira</i>	—	—	—	—	—	—	—	0.279	—	0.288	—	—	—
海州常山 <i>Clerodendrum trichotomum</i>	—	—	—	—	—	—	0.028	—	—	—	0.030	—	0.093
红楠 <i>Machilus thunbergii</i>	—	—	—	—	—	—	—	0.140	—	0.206	—	0.210	—
胡颓子 <i>Elaeagnus pungens</i>	—	—	—	—	0.239	—	0.129	—	—	—	0.112	—	—
黄连木 <i>Pistacia chinensis</i>	—	—	—	0.439	—	—	—	—	—	—	—	—	0.136
黄檀 <i>Dalbergia hupeana</i>	0.069	—	0.148	—	0.262	0.205	0.124	—	—	—	0.063	—	—
桉木 <i>Eurya japonica</i>	0.120	0.197	0.047	0.097	—	—	—	—	—	—	—	0.167	—
麻栎 <i>Quercus acutissima</i>	—	—	—	—	0.095	—	0.133	—	—	—	—	—	—
牛奶子 <i>Elaeagnus umbellata</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.093
朴树 <i>Celtis sinensis</i>	—	0.165	0.027	—	—	0.049	0.026	—	—	0.115	—	—	0.185
青冈栎 <i>Cyclobalanopsis glauca</i>	0.109	0.230	0.092	0.055	—	—	—	—	—	—	—	—	—
桑 <i>Morus alba</i>	0.143	—	—	—	—	—	0.128	—	0.167	—	—	—	0.093
石栎 <i>Lithocarpus glaber</i>	—	—	0.032	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
丝绵木 <i>Euonymus maackii</i>	—	—	—	—	—	0.099	—	—	0.250	—	—	—	0.148
算盘子 <i>Glochidion puberum</i>	—	—	—	—	—	0.135	0.049	—	—	—	0.045	—	—
天仙果 <i>Ficus erecta</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.048	—
天竺桂 <i>Cinnamomum japonicum</i>	0.159	0.065	0.116	0.122	0.239	—	—	—	—	—	—	0.213	—
香樟 <i>Cinnamomum camphora</i>	0.051	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
小蜡 <i>Ligustrum sinense</i>	—	0.098	0.092	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
小叶女贞 <i>Ligustrum quihoui</i>	—	—	0.169	—	0.048	—	0.022	—	—	—	0.120	0.130	0.093
盐肤木 <i>Rhus chinensis</i>	0.159	—	—	—	—	—	0.046	—	—	—	—	—	—
野桐 <i>Mallotus tenuifolius</i>	0.146	0.051	0.030	0.073	0.071	0.168	0.102	0.581	0.167	0.288	0.064	0.233	0.093

构明显,乔木层平均高度为 6 m,伴生有白檀和楝 (*Melia azedarach*);灌木层优势树种较多,有胡颓子 (*Elaeagnus pungens*)、构树、海州常山 (*Clerodendrum trichotomum*)和丝绵木等,平均高度为 2.6 m。④朴树群落:是大金山岛典型的地形顶极群落,分布面积最大,主要在东坡及中坡以南,林内湿润并且有

基岩裸露。群落处于演替中后期,物种组成多样,乔木层平均高度为 6.5 m,混生有野桐、乌桕 (*Sapium sebiferum*)等;灌木层主要有楝、金樱子 (*Rosa laevigata*)、白檀、构树和小叶女贞等;草本层主要有鸭跖草、龙葵 (*Solanum nigrum*)、酢浆草、海金沙、贯众等。

表 3 大金山岛植被类型分类结果

Table 3 Results of vegetation classification of Dajinshan Island

一级单位 The first class	二级单位 The second class	三级单位 The third class
植被型 Vegetation type	群丛或群落 Association or community	演替阶段群落 Successional community
落叶阔叶林 Deciduous broad-leaved forest	桫欏-紫金牛/樟叶花椒+朴树群丛 <i>Eurya japonica</i> - <i>Ardisia japonica</i> / <i>Zanthoxylum ailanthoides</i> + <i>Celtis sinensis</i> association	樟叶花椒群落 <i>Zanthoxylum ailanthoides</i> community
		樟叶花椒+朴树群落 <i>Zanthoxylum ailanthoides</i> + <i>Celtis sinensis</i> community
		朴树+桑群落 <i>Celtis sinensis</i> + <i>Morus alba</i> community
		朴树群落 <i>Celtis sinensis</i> community
		丝绵木+野桐群落 <i>Euonymus maackii</i> + <i>Mallotus tenuifolius</i> community
		丝绵木+野桐幼林 <i>Euonymus maackii</i> + <i>Mallotus tenuifolius</i> young forest
		黄连木+野桐群落 <i>Pistacia chinensis</i> + <i>Mallotus tenuifolius</i> community
		黄连木幼林 <i>Pistacia chinensis</i> young forest
		麻栎群落 <i>Quercus acutissima</i> community
		黄檀群落 <i>Dalbergia hupeana</i> community
常绿落叶阔叶混交林 Evergreen and deciduous broad-leaved mixed forest	小叶女贞+野桐群落 <i>Ligustrum quihoui</i> + <i>Mallotus tenuifolius</i> community	野桐群落 <i>Mallotus tenuifolius</i> community
		小叶女贞+野桐群落 <i>Ligustrum quihoui</i> + <i>Mallotus tenuifolius</i> community
		青冈栎+野桐群落 <i>Cyclobalanopsis glauca</i> + <i>Mallotus tenuifolius</i> community
		青冈栎群落 <i>Cyclobalanopsis glauca</i> community
		天竺桂群落 <i>Cinnamomum japonicum</i> community
		红楠群落 <i>Machilus thunbergii</i> community
		樟群落 <i>Cinnamomum camphora</i> community
		小果蔷薇群落 <i>Rosa cymose</i> community
		野桐+海桐群落 <i>Mallotus tenuifolius</i> + <i>Pittosporum tobira</i> community
		海桐群落 <i>Pittosporum tobira</i> community
落叶阔叶灌丛 Deciduous broad-leaved shrubland	小果蔷薇群落 <i>Rosa cymose</i> community	小果蔷薇群落 <i>Rosa cymose</i> community
		野桐+海桐群落 <i>Mallotus tenuifolius</i> + <i>Pittosporum tobira</i> community
		海桐群落 <i>Pittosporum tobira</i> community
常绿阔叶灌丛 Evergreen broad-leaved shrubland	五节芒群落 <i>Miscanthus floridulus</i> community	五节芒群落 <i>Miscanthus floridulus</i> community
		滨旋花群落 <i>Calystegia soldanella</i> community
		滨旋花群落 <i>Calystegia soldanella</i> community

(2) 柘木-鸭跖草/丝绵木+黄连木群丛

该群丛主要以黄连木和丝绵木为优势树种形成不同群落类型,在东坡及南坡较为集中,其中鸭跖草是该群丛草本层的指示种。黄连木和丝绵木均为喜光落叶树种,生境适应性强。根据两者与野桐的不同比例,也可形成4种群落类型,其主要特征如下。①丝绵木+野桐群落:主要分布在岛体中坡和南坡,乔木层伴生椿叶花椒、楝和朴树等,平均高度为6 m;灌木层平均高度为2.5 m,有海州常山、构树、算盘子、小叶女贞等。蛇葡萄(*Ampelopsis sinica*)作为层外伴生种,多呈攀援状缠绕在乔木上;草本层种类较单一,以络石和酢浆草为主。②丝绵木+野桐幼林:是丝绵木+野桐群落的演替前期类型,分布在东坡和南坡。平均高度为3 m,主要物种为丝绵木、野桐、酢浆草、络石、金樱子等。③黄连木+野桐群落:主要分布在山脊坡面上部及南部近海边缘,林内干燥。乔木层优势种为野桐和黄连木,平均高度为7 m,伴生有朴树、构树、丝绵木、柘木等;灌木层有少量青冈栎;草本层有酢浆草、络石、鸭跖草等。④黄连木幼林:分布区较散乱,由于海风干扰,林分发育较慢,处于演替前期。平均高度为5.5 m,优势种为黄连木,伴生有小叶女贞、柘木和薛荔等;草本层有狗牙根(*Cynodon dactylon*)、沿阶草(*Ophiopogon bodinieri*)和贯众等。

(3) 麻栎群落

大金山岛的麻栎为人工栽植,分布在栈道两侧及营房周围,抗风性强。麻栎群落层次结构明显,乔木层平均高度为8 m,以麻栎、无患子(*Sapindus mukorossi*)和臭椿(*Ailanthus altissima*)为主,伴生有野桐;灌木层平均高度4.5 m,主要有小果蔷薇、小叶女贞、黄檀和海州常山,伴生有野葡萄和蛇葡萄;草本层物种较单一,以络石、鸭跖草和红盖鳞毛蕨(*Dryopteris erythrosora*)为主。

(4) 黄檀群落

分布于岛体中部,林内干燥,有裸露的基岩。乔木层平均高度为6.5 m,混生有野桐、朴树、楝和椿叶花椒等;灌木层平均高度为2.5 m,小果蔷薇和小叶女贞优势度显著,同时层外分布野葡萄和蛇葡萄等;草本层有酢浆草、鸭跖草、络石和滨海前胡(*Peucedanum japonicum*)等。

(5) 野桐群落

该群落类型分布面积较大,尤其在北坡、灯塔四周和栈道入口最为典型,处于演替中前期,林内

较湿润。群落结构层次清晰,乔木层平均高度为5 m,伴生有构树(*Broussonetia papyrifera*)、白檀(*Symplocos paniculata*)和小叶女贞等;灌木层平均高度为2.6 m,伴生种有野葡萄(*Ampelopsis brevipedunculata*)。草本层常见酢浆草(*Oxalis corniculata*)、络石(*Trachelospermum jasminoides*)、海金沙(*Lygodium japonicum*)等。

2.1.2 常绿落叶阔叶混交林 该植被类型属于上海地区的典型地带性森林,大致有以下两个群落类型。①小叶女贞+野桐群落:分布在岛体东坡,群落可分为两层,乔木层平均高度为5.5 m,以黄连木和小叶女贞为优势种;灌木层平均高度为2.5 m,有白檀、天竺桂等;草本层除络石、红盖鳞毛蕨等常见种外,还有小叶女贞、白檀的幼苗。②青冈栎+野桐群落:该群落类型零星分布在岛体北坡,群落结构简单,树种单一。该林分可分为两层,乔木层平均高度为6 m,以野桐和青冈栎为优势种;灌木层以白檀为主,平均高度为2.3 m。

2.1.3 常绿阔叶林 大金山岛的常绿阔叶林是上海市唯一存留的半自然地带性植被,主要类型包括青冈栎群落、红楠群落、天竺桂群落和樟群落。各群落特征如下:①青冈栎群落:分布在岛体东部和中部山脊及其北坡顶部,林内阴暗,岩石裸露。乔木层平均高度为7.7 m,青冈栎占绝对优势;灌木层平均高度为2.5 m,伴生有柃木、天竺桂、野桐、黄连木和小果蔷薇等;草本层主要有沿阶草、海金沙、络石等,同时有许多青冈栎幼苗。②红楠群落:集中在北坡地形较陡的坡面,林内阴湿,存有巨大岩石。群落结构层次非常明显,乔木层平均高度为12.5 m,有高大的红楠;灌木层平均高度为2.6 m,主要有小叶女贞、柃木、朴树和野桐等;草本层主要有芙蓉菊(*Crossostephium chinense*)、五节芒和红盖鳞毛蕨等。③天竺桂群落:分布面积较小,群落结构简单,物种单一。乔木层平均高度为6.5 m,天竺桂占绝对优势,混生有少量野桐;灌木层平均高度为2.9 m,柃木和白檀为优势种;几乎没有草本。④樟群落:在岛上呈小块分布,主要在东部坡面顶部。林分单一,乔木层平均高度为8 m,樟占绝对优势;没有灌木层,草本层平均高度为0.45 m,物种有络石、红盖鳞毛蕨等。

2.1.4 落叶阔叶灌丛 落叶阔叶灌丛分布在岛体脊线中部,受人类干扰较少。落叶阔叶灌丛以小果蔷薇为优势种,分布在南坡中部,林相较乱,植株稠密。灌木层平均高度为2.8 m,伴生有乌桕、

野桐、丝绵木、厚叶石斑木、海桐和金樱子。

2.1.5 常绿落叶阔叶混交灌丛 常绿落叶阔叶混交灌丛以海桐和野桐为优势种,分布于东坡近岸,受海风影响较大,土层较薄,长期处于灌丛状态。群落平均高度为 4.5 m,伴生丝绵木和乌桕等;草本层有芙蓉菊、酢浆草、石竹(*Dianthus chinensis*)和加拿大一枝黄花等。

2.1.6 常绿阔叶灌丛 常绿阔叶灌丛主要以海桐群落为代表,分布在岛体东部近岸基岩,对恶劣生境有很好的适应性。群落结构比较简单,偶有乔木散生,植株生长密集。群落平均高度为 1.6 m,伴生小果蔷薇、滨柃(*Eurya emarginata*)、厚叶石斑木等;草本层以络石、芙蓉菊、狗牙根为主。

2.1.7 草丛 大金山岛草丛类型分布不多,主要见于海边礁石附近,有五节芒草丛和滨旋花草丛。其中,五节芒草丛生长在东部山脚岩石附近,上层为五节芒,下层伴生山莓(*Rubus corchorifolius*)、白茅(*Imperata cylindrica*)等,也常见其他禾本科植物,一般平均高度为 0.5 m。滨旋花草丛以滨旋花为优势种,伴生厚叶石斑木和芙蓉菊等,在南坡及北坡岩石附近均有分布。

2.2 大金山岛植被图

如图 2 所示,大金山岛形似蝌蚪,落叶阔叶林主要分布于山顶周围和北坡靠近尾部,以柃木-紫金牛/椿叶花椒+朴树群落为主;麻栎和黄檀群落分布在下坡,该区域土壤较贫瘠,地形不稳定。常绿落叶阔叶混交林分布在南坡和北坡的山坳中,地势较陡,但土壤条件较好。常绿阔叶林分布在岛的东侧,地势较平坦,土壤肥沃;常绿阔叶灌丛有小果蔷薇群落,分布稀少,集中在南坡较陡的区域。常绿落叶阔叶混交灌丛集中在南坡端,岩石风化严重,土壤贫瘠,常年受大风侵袭,植被较矮。常绿阔叶灌丛海桐群落非常稀少,仅分布在岛体东侧小片区域。草丛极少,仅分布于岛边礁石周边。

3 讨论与结论

3.1 大金山岛植被性质诊断

大金山岛是上海市物种多样性最高的区域,每平方千米达 1 470 种。其中,被子植物 72 科 267 种,苔藓植物 19 科 35 种,蕨类植物 14 科 26 种。根据这次基于网格化清查,发现大金山岛拥有华东海岛最典型、最多样的自然半自然森林群落,中

生生境顶极群落为常绿落叶阔叶混交林,北坡湿润地段和山脊地段为常绿阔叶林。大金山岛还有华东海岛唯一的天然古树群落——红楠群落、丝绵木群落、椿叶花椒群落等。总体来看,地带性顶极植物群落多处于半原始状态,如红楠、椿叶花椒、朴树群落,但青冈栎林由于历史砍伐和猕猴干扰,处于萌生更新阶段,群落不稳定。天竺桂、小叶女贞、丝绵木处于干扰后的次生演替中后期阶段。与之相比,大金山岛绝大部分地段的植被处于演替中前期,野桐群落分布面积最大。

从植被结构和功能方面考虑,大金山岛植被也面临以下 5 个方面的生态问题:第一,地带性顶极植被加速消失。红楠群落、椿叶花椒群落、天竺桂群落、小叶女贞群落、樟群落等,由于修筑防波堤和猕猴干扰等影响而加速消失。通过对比 2000 年、2012 年、2018 年的植物调查结果(杨永川等,2002;达良俊等,2014),发现丝绵木-算盘子群落、黄檀群落、豆梨群落、黄连木群落和樟群落已经消失。第二,稀有种群加速消失。大金山岛有非常珍贵的稀有物种,但与前期调查相比,如野生樟、扁萼疣鳞苔(*Cololejeunea raduliloba*)等几乎消失殆尽,唯一的 1 株野生舟山新木姜子(*Neolitsea sericea*)由于山体崩塌而死亡。野生樟也只剩下为数不多的几株,且没有幼苗更新。天竺桂、红楠等稀有种群的规模在逐渐缩小。第三,次生灌丛严重影响植被质量。大金山岛因猕猴和人为干扰,植被演替进程过慢,林间布满藤本和夹杂阳性树种,以及岛体东侧山坡布满金樱子,整体植被质量较低。第四,古树及其后续资源受损严重。大金山岛因常年受东南季风、台风、地质灾害影响,古树及其后续资源有枯死、断枝、树皮开裂的现象,且周边杂草丛生。第五,植物入侵现象依然存在。从调查结果来看,大金山岛面临毛竹、花竹、加拿大一枝黄花等入侵风险,尤其加拿大一枝黄花规模在扩大。

3.2 大金山岛植被分类的一些思考

本研究基于网格化清查方法,将大金山岛植被划分为 7 种植被型,16 种群丛或群落和 22 种演替阶段群落类型,基本精确揭示了大金山岛植被的全面特征和群落多样性。在本次分类中,将群丛和群落作为植被类型划分的基本单位,是以特征种、鉴别种(diagnostic species)或标志种(indicative species)为低级单位的分类依据。这与《美国植被分类规范》中的群丛定义基本相符(宋永昌,2011;宋永昌等,2013),也与宋永昌等(2017)

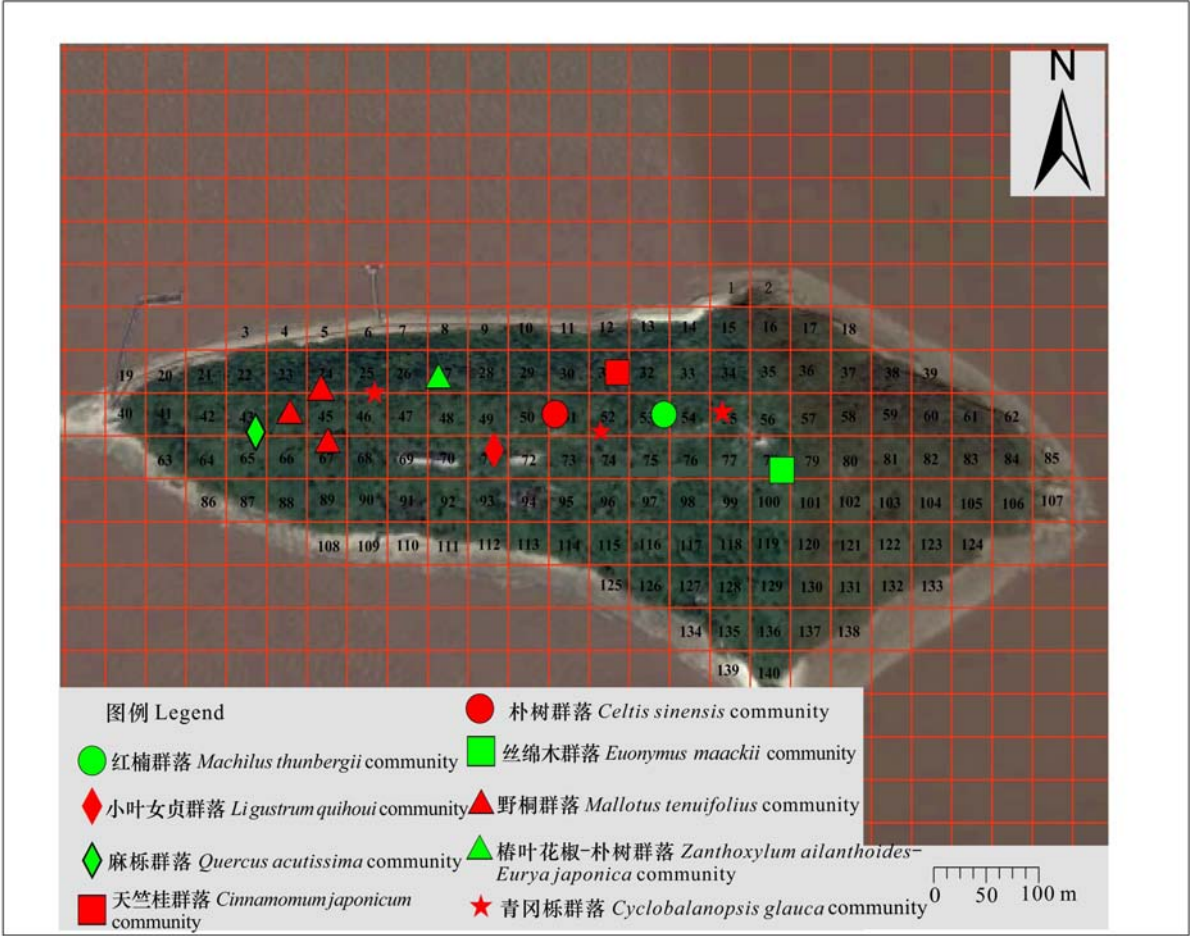


图 1 大金山岛 140 个植被网格及 13 个典型植物群落

Fig. 1 Distribution of 140 vegetation grids and 13 typical plant communities on Dajinshan Island

所建议的将中国植被分类单位中的群丛修订为“层片结构相同,优势层片优势种相同,种类组成基本一致,并具有相同标志种组的群落联合”是完全相同的。这种强调标志种一致的划分方法可保证最小分类单位群丛具有一致的生态特征、生境条件和动态特点(宋永昌,2017)。以大金山岛分布面积最大的两大群丛类型为例,柃木-紫金牛/椿叶花椒+朴树群丛所包含的椿叶花椒群落、椿叶花椒+朴树群落、朴树+桑群落和朴树群落四种类型,虽然各群落物种组成比例不同,但椿叶花椒和朴树始终是各群落的优势层片,群落垂直结构基本相似,柃木始终是灌木层的优势种,草本层的紫金牛指示该群丛分布在潮湿生境。相类似,柃木-鸭跖草/丝绵木+黄连木群丛体现了在碱性土壤中,以不同比例丝绵木和黄连木为优势层片,以野桐为灌木优势种所形成不同群落类型。

本次植被分类还考虑了群落年龄在分类中的意义。以往对于亚热带山地灌丛通常按其外貌划分为灌丛类型,但事实上,很多次生灌丛是时间演替序列上的森林幼林,隶属森林群落的早期时间序列类型(吴征镒,1980;孙小伟等,2018)。因此,本次植被分类着重就此问题就行了区别对待,将处于演替序列早期的次生灌丛划分为幼林,如丝绵木+野桐幼林和黄连木幼林。与之对照,对于确属典型生态意义,即:其外貌永远为灌丛的类型才划分为灌丛,在华东海岛,最具典型意义的灌丛并不是各森林演替阶段的前期类型,而是以海桐、滨柃等为优势种的常绿阔叶灌丛和以小果蔷薇、野桐等为优势种的落叶阔叶灌丛。

另外,本研究所采用的网格化连续清查方法也为讨论植被群落的连续性和间断性问题提供了机会。通过比较本次和以往的大金山岛植被分类

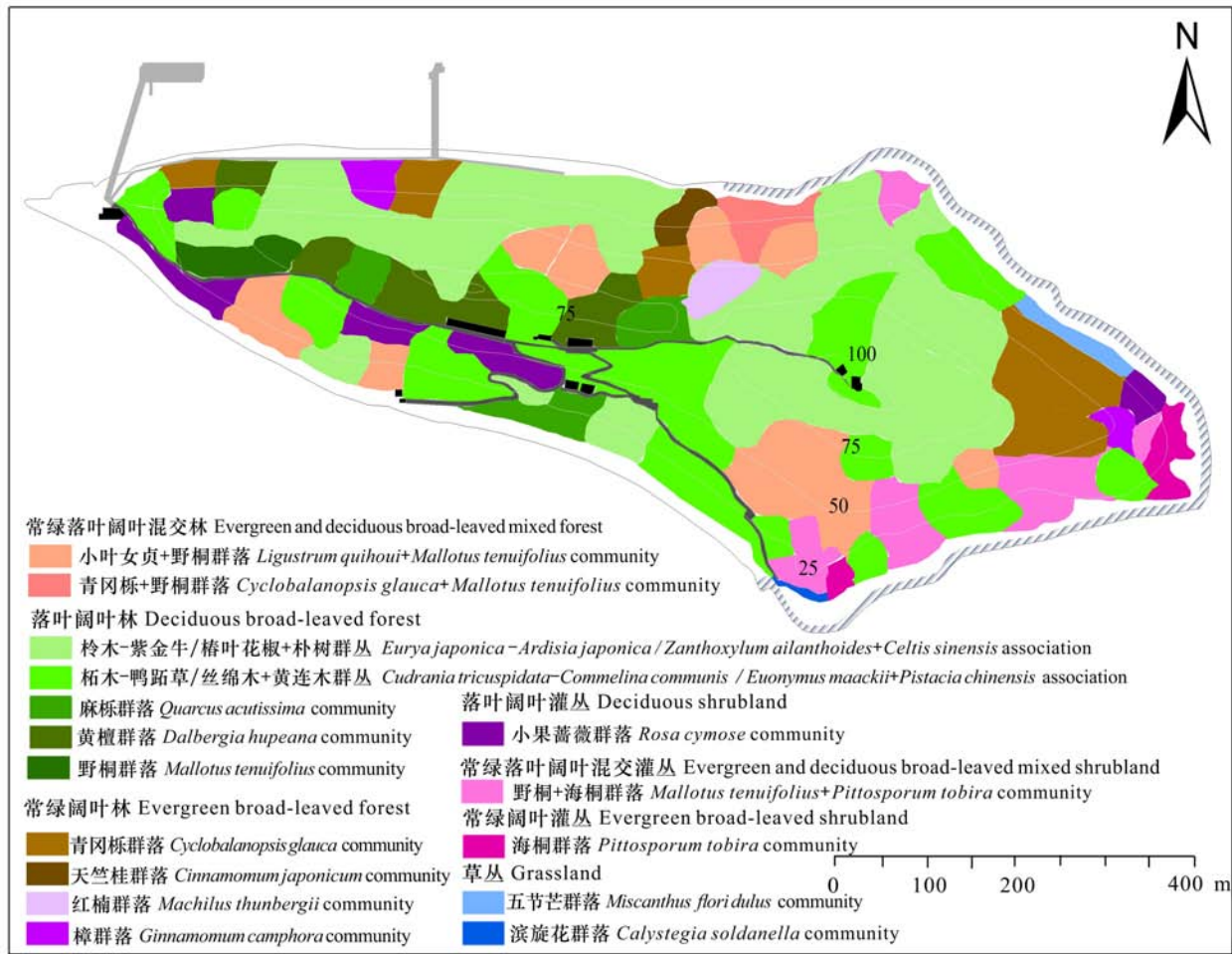


图 2 大金山岛植被类型
Fig. 2 Vegetation types of Dajinshan Island

结果来看(程浚洋,2017),基于网格化清查数据的植被分类结果基本可以充分反映植物群落连续性中存在间断性的客观事实,即在连续中也有间断(宋永昌等,2017)。对于森林植被而言,连续分布中的过渡群落是客观存在的(孙小伟等,2018)。本研究结果表明,植被分类的基本单位群丛可以基本反映植被的连续性,即在较大尺度,以若干优势种为优势层片所形成的群丛保持连续,但随微环境变化,优势物种组成比例,特别是灌木层物种组成会发生一定程度更替,从而形成不同的群落类型,甚至不同的群落年龄,从而反映了连续性中包含间断性的现象。同时,本研究也发现,在不同的连续群丛中也存在过渡群落,如野桐群落等,这种群落的优势种由于适应性广,因此既可参与组

成其他群丛,又可在特殊生境形成单优群落。由此可见,自然界中植物群落的连续性和间断性并非完全独立,而是相互兼容。总之,基于网格化清查数据的植被分类研究启示我们,在未来的研究中,尽可能的全面调查有助于掌握一个地区植被的全貌和多样性。

致谢 感谢华东师范大学何东、尹芳、苏田、妥彬、郭超、刘翔宇、李亮等参与野外调查。

参考文献:

CAI YH, SONG ZY, LI YW, et al., 2016. A review and outlook of terrestrial and insular vegetation classification research in China [J]. Acta Oceanol Sin, 38(4): 95-

108. [蔡燕红, 宋振亚, 李亚蔚, 等, 2016. 中国陆地与海岛植被分类研究综述与展望 [J]. 海洋学报, 38(4): 95–108.]
- CHEN HJ, DU H, SONG TQ, et al., 2019. Numerical classification of associations and their stabilities of karst evergreen deciduous broad-leaved mixed forests in Mulun National Nature Reserve [J]. Biodivers Sci, 27(10): 1056–1068. [陈惠君, 杜虎, 宋同清, 等, 2019. 木论喀斯特常绿阔叶混交林群丛数量分类及稳定性 [J]. 生物多样性, 27(10): 1056–1068.]
- CHEN JY, 2017. Plant community types and functional diversity of islands forests in Eastern China [D]. Shanghai: East China Normal University. [程浚洋, 2017. 中国东部海岛植物群落类型与功能多样性 [D]. 上海: 华东师范大学.]
- DA LJ, YANG YC, CHEN YP, 2014. The diversity of plant community on Dajinshan Island, Shanghai [J]. J Chin Urban For, 2(3): 20–25. [达良俊, 杨永川, 陈燕萍, 2014. 上海大金山岛的自然植物群落多样性 [J]. 中国城市林业, 2(3): 20–25.]
- DING T, NING SJ, SU ZM. 2011. Classification system and characteristics of evergreen broad-leaved forest in Guangxi Province Region [J]. Guihaia, 31(6): 764–769. [丁涛, 宁世江, 苏宗明, 2011. 广西常绿阔叶林分类系统及其特点 [J]. 广西植物, 31(6): 764–769.]
- JENNINGS MD, FABER LD, LOUCKS OL, et al., 2009. Standards for associations and alliances of the US natural vegetation classification [J]. Ecol Monogr, 79(2): 173–199.
- JIN YL, LI BC, GENG L, et al., 2017. Soil fauna community in different natural vegetation types of Dajinshan Island, Shanghai [J]. Biodivers Sci, 25(3): 304–311. [靳亚丽, 李必成, 耿龙, 等, 2017. 上海大金山岛不同植被类型下土壤动物群落多样性 [J]. 生物多样性, 25(3): 304–311.]
- SONG YC, 2011. Recognition and proposal on the vegetation classification system of China [J]. Chin J Plant Ecol, 35(8): 882–892. [宋永昌, 2011. 对中国植被分类系统的认知和建议 [J]. 植物生态学报, 35(8): 882–892.]
- SONG YC, 2017. Vegetation Ecology (2nd ed) [M]. Beijing: Higher Education Press. [宋永昌, 2017. 植被生态学 (第二版) [M]. 北京: 高等教育出版社.]
- SONG YC, YAN ER, SONG K, 2017. An update of the vegetation classification in China [J]. Chin J Plant Ecol, 41(2): 269–278. [宋永昌, 阎恩荣, 宋坤, 2017. 再议中国的植被分类系统 [J]. 植物生态学报, 41(2): 269–278.]
- SONG YC, WANG XH, YAN ER, 2013. Evergreen broad-leaved forests in China-classification, ecology, conservation [M]. Beijing: Science Press. [宋永昌, 王希华, 阎恩荣, 2013. 中国常绿阔叶林——分类, 生态, 保育 [M]. 北京: 科学出版社.]
- SUN XW, YANG QS, LIU HM, et al., 2018. Classification of plant associations based on a 20 hm² dynamics plot of evergreen broad-leaved forest in Mt. Tiantong, Zhejiang, China [J]. Chin J Plant Ecol, 42(5): 550–561. [孙小伟, 杨庆松, 刘何铭, 等, 2018. 基于浙江天童 20 hm²常绿阔叶林动态监测样地的群丛划分 [J]. 植物生态学报, 42(5): 550–561.]
- TAO C, CHEN YK, YANG XB, et al., 2014. Quantitative classification and ordination of vegetations in Tongguling National Nature Reserve, Hainan [J]. Chin Agric Sci Bull, 30(22): 84–91. [陶楚, 陈玉凯, 杨小波, 等, 2014. 海南铜鼓岭国家级自然保护区植被数量分类与排序 [J]. 中国农学通报, 30(22): 84–91.]
- TIAN GH, HUANG KY, LI Z, et al., 2015. Vegetation classification system and characteristics of main plant communities in Zhuhai City [J]. Guangdong For Sci Technol, 31(2): 15–21. [田广红, 黄康有, 李贞, 等, 2015. 珠海市植被分类系统和主要植物群落特征 [J]. 广东林业科技, 31(2): 15–21.]
- WANG WS, 2017. Vegetation resources and protection strategies of Dajinshan Island in Shanghai [J]. Ocean Dev Manage, 34(6): 40–45. [王万胜, 2017. 上海大金山岛植被资源状况及保护对策 [J]. 海洋开发与管理, 34(6): 40–45.]
- WU ZY, 1980. Chinese vegetation [M]. Beijing: Science Press. [吴征镒, 1980. 中国植被 [M]. 北京: 科学出版社.]
- XU MS, ZHAO CL, LIU XY, et al., 2018. Vegetation regionalization scheme in Putuo Island, Zhejiang Province [J]. J Zhejiang A & F Univ, 35(4): 657–663. [许沼山, 赵慈良, 刘翔宇, 等, 2018. 浙江普陀山岛植被区划方案 [J]. 浙江农林大学学报, 35(4): 657–663.]
- YAN ER, ZHAO CL, HU JF. 2017. Vegetation in Putuo Island — type, structure, function and management [M]. Beijing: Science Press. [阎恩荣, 赵慈良, 胡军飞, 2017. 普陀山植被——类型、结构、功能、管护 [M]. 北京: 科学出版社.]
- YANF YC, DA LJ, QIN XK, 2002. A Study on the Flora of Dajinshan Island in Shanghai, China [J]. J Wuhan Bot Res, 20(6): 433–437. [杨永川, 达良俊, 秦祥堃, 2002. 上海大金山岛种子植物区系的研究 [J]. 武汉植物学研究, 20(6): 433–437.]
- YANG ZZ, LÜ XT, SONG YT, et al., 2017. A comparative study on the classification methods of grassland plant communities: A case of Hulunbuir grassland [J]. Chin J Ecol, 36(8): 2375–2384. [杨筑筑, 吕晓涛, 宋彦涛, 等, 2017. 草原植物群落分类方法的比较研究——以呼伦贝尔草原为例 [J]. 生态学杂志, 36(8): 2375–2384.]
- YE T, 2014. The research on species diversity composite index [D]. Changsha: Central South University Forestry Technology. [叶涛, 2014. 物种多样性综合指数研究 [D]. 长沙: 中南林业科技大学.]
- ZHANG F, ZHANG JT, 2000. Research progress of numerical classification and ordination of vegetation in China [J]. J Shanxi Univ (Nat Sci Ed), 23(3): 278–282. [张峰, 张金屯, 2000. 我国植被数量分类和排序研究进展 [J]. 山西大学学报(自然科学版), 23(3): 278–282.]
- ZHANG XL, 2007. The study on classification technology of forest vegetation in Beijing mountain area [D]. Beijing: Beijing Forestry University. [张晓丽, 2007. 北京山区森林植被分类技术研究 [D]. 北京: 北京林业大学.]
- ZHU CL, HAN YJ, XIE JZ, et al., 2008. Investigation and analysis of forest communities in Dajinshan Island, Shanghai [J]. Chin For Sci Technol, 22(6): 57–59. [朱春玲, 韩玉洁, 谢锦忠, 等, 2008. 上海大金山岛森林群落调查与特征分析 [J]. 林业科技开发, 22(6): 57–59.]

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202104012

金贇, 朱栗琼, 招礼军, 等. 滨海沙地植物厚藤叶片生理特征的季节变化 [J]. 广西植物, 2022, 42(8): 1284–1293.
JIN Y, ZHU LQ, ZHAO LJ, et al. Seasonal changes of leaf physiological characteristics of *Ipomoea pes-caprae* in coastal sand [J]. Guihaia, 2022, 42(8): 1284–1293.



滨海沙地植物厚藤叶片生理特征的季节变化

金 贇, 朱栗琼, 招礼军*, 化 彬, 权佳惠, 刘金炽

(广西大学 林学院, 广西森林生态与保育重点实验室, 南宁 530004)

摘 要: 滨海沙地条件恶劣, 季节气候环境差异较大, 植物生存困难。厚藤是南方滨海沙地广泛分布的重要固沙植物。为探究厚藤对不同季节环境变化的适应机制, 研究其叶片生理性状的季节变化, 该文以广西滨海沙地自然生长的厚藤为实验材料, 分别测定了不同季节厚藤叶片的叶绿素含量、渗透物质含量、抗氧化酶活性、叶绿素荧光参数等生理指标, 并进行相关性分析和主成分分析。结果表明: (1) 叶绿素含量随季节变化的趋势一致, 春季均显著大于其他三个季节, 但叶绿素 a/b 在各季节间无显著变化。 (2) 叶绿素荧光参数的 F_v/F_m 和 F_v/F_o 具有相同的变化趋势, 整体表现为夏冬季显著高于春秋季节。 (3) 脯氨酸含量随季节逐渐增大, 冬季时含量最高; 可溶性糖含量冬季显著高于其他三个季节; 丙二醛 (MDA) 含量各季节间差异不显著。 (4) 春季的超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和过氧化氢酶 (CAT) 活性显著高于其他季节, 夏秋冬季节间无显著差异; 过氧化物酶 (POD) 活性在各季节间差异不显著。 (5) 相关性分析和主成分分析显示, 各生理指标与气候因子间存在一定的关联。温度和日照数显著影响可溶性糖含量; 叶绿素含量和抗氧化酶活性能够较好地反映厚藤对季节气候变化的响应。综上可知, 厚藤可通过调节叶绿素 a 与叶绿素 b 含量使叶绿素 a/b 保持稳定, 同时提高渗透调节物质含量和抗氧化酶活性以适应季节变化, 其中光合作用和抗氧化酶系统是影响其季节性适应能力的关键。

关键词: 厚藤, 叶片, 生理指标, 季节变化, 适应性

中图分类号: Q945.79 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2022)08-1284-10

Seasonal changes of leaf physiological characteristics of *Ipomoea pes-caprae* in coastal sand

JIN Yun, ZHU Liqiong, ZHAO Lijun*, HUA Bin, QUAN Jiahui, LIU Jinchi

(Forestry College of Guangxi University, Guangxi Key Laboratory of Forest Ecology and Conservation, Nanning 530004)

Abstract: Poor conditions, and quite differences in seasonal climate environment in coastal sandy land makes it difficult for plants to survive. *Ipomoea pes-caprae* is an important sand-fixing plant widely distributed in southern coastal sandy land. In order to explore the adaptation mechanism of *I. pes-caprae* to environmental changes in different seasons, the seasonal changes of its leaf physiological traits were studied. In this paper, *I. pes-caprae* grown up naturally in coastal

收稿日期: 2021-07-27

基金项目: 国家自然科学基金 (31260093); 广西自然科学基金 (2013GXNSFAA019057) [Supported by National Natural Science Foundation of China (31260093); Natural Science Foundation of Guangxi (2013GXNSFAA019057)]。

第一作者: 金贇 (1996-), 硕士研究生, 研究方向为森林生态学, (E-mail) 961412458@qq.com。

* 通信作者: 招礼军, 博士, 教授, 研究方向为森林生态学, (E-mail) zhlj-70@163.com。

sand of Guangxi was taken as experimental material, and the physiological indexes such as the contents of chlorophyll, the contents of osmotic substance, antioxidant enzyme activities and chlorophyll fluorescence parameters of the *I. pes-caprae* leaves in different seasons were measured, and the correlation analysis and principal component analysis were also carried out. The results were as follows: (1) Chlorophyll contents had the same trend with season changes, which was significantly higher in spring than those in other three seasons, but chlorophyll a/b had no significant change among seasons. (2) F_v/F_m and F_v/F_o of chlorophyll fluorescence parameters also had the same change trends, which were significantly higher in summer and winter than those in spring and autumn. (3) Proline content increased gradually with seasons, and reached the highest level in winter. Soluble sugar content in winter was significantly higher than those in other three seasons. There was no significant differences in malondialdehyde (MDA) contents among seasons. (4) The activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in spring were significantly higher than those in other seasons, but there was no significant differences among summer, autumn and winter. There was no significant differences in peroxidase (POD) activities among seasons. (5) There was a certain correlation between physiological indexes and climate factors by correlation analysis and principal component analysis. Temperature and sunshine duration significantly affected the contents of soluble sugar. Chlorophyll contents and antioxidant enzyme activities could better reflect the response of *I. pes-caprae* leaves to seasonal climate change. To sum up, the chlorophyll a/b can be kept stable by adjusting the contents of chlorophyll a and chlorophyll b, and meanwhile, the contents of osmotic adjustment substances and the activities of antioxidant enzymes can improve it to adapt to seasonal changes, among which photosynthesis and antioxidant enzymes system are the key factors affecting its seasonal adaptability.

Key words: *Ipomoea pes-caprae*, leaf, physiological index, seasonal changes, adaptability

滨海沙地处于海陆交界地带,物质与能量变化剧烈。在全球气候变暖的背景下,滨海沙地气候变化异常、极端天气频发,极端易变的环境限制了大部分植物在该地区定居生长(Griffiths & Orians, 2003; Lum & Barton, 2020)。季节更替引起温度、水分及光照等多个环境因子改变,植物生理特征在季节变化中受环境因子影响会做出适应性变化,其变化程度和规律反映了植物适应能力的强弱和对环境的适应策略(蒋志荣等, 2008)。沙生植物作为滨海沙地生态系统的重要组成部分,在海岸带生态稳定中发挥重要作用(赵艳云等, 2014),其对环境变化的响应和适应策略成为了生态研究的热点问题之一。研究发现,滨海沙地植物长期适应环境变化,在生理上形成了对季节性环境变化的适应机制,如在夏秋季节受强光胁迫,滨海沙地植物光合作用效率降低,气孔逐渐关闭保护植物避免过多失水和高光灼伤(蔡水花等, 2014; 葛露露等, 2018); 冬季低温干旱下,植物叶片养分含量和酶促代谢物 SOD、POD 和 CAT 的活性增高,叶片能够积累更多养分并提高细胞活性抵御低温伤害(Fernanda et al., 2014; 张秋芳等, 2019; Carlo et al., 2019)等。这些生理性适应机制主要表现为光合作用、渗透调节、酶系统保护作用的功能调节,使滨海沙地植物能够在极端恶劣生境中得以存活繁衍(吴锡麟等, 2013; 童升洪等, 2020)。

厚藤(*Ipomoea pes-caprae*)又名马鞍藤,系旋花科(Convolvulaceae)番薯属(*Ipomoea*)多年生匍匐藤本植物,广布于全球热带及亚热带沿海地区,是广西海岸沙生植物区系中的优势种和建群种。研究表明,厚藤拥有大量不定根且匍匐茎延伸可长达 10 m,有防风固沙和恢复生态等重要生态功能,在滨海生态恢复和重建过程具有重要应用价值(Jung et al., 2020)。近年来,有关厚藤耐旱策略(Kamakura & Furukawa, 2008)、耐盐机理(杜月青等, 2011; Liu et al., 2020)及自身药用价值等方面的研究均有报道(冯小慧等, 2018; 杜成智等, 2019)。但是,关于厚藤对滨海沙地这一特殊生境的生理生态适应性研究尚未见报道。叶片是植物进行光合作用的场所,对环境的变化较为敏感,其生理性状能较好地反映植物对环境的高度适应能力和在复杂生境下的自我调控能力(李旭等, 2020)。鉴于此,本文以原生境下的厚藤为研究对象,在测定分析厚藤叶片的生理学特征在自然环境下季节变化规律的基础上,探讨厚藤叶片各生理指标与环境因子间的关系,拟回答科学问题“厚藤在适应不同季节水热变化过程中具有怎样的生理生化响应特征?”,从而阐明厚藤在滨海沙地特殊生境下应对环境变化的适应策略,为其开发利用及滨海沙地植被恢复提供理论指导和科学依据。

1 材料与方 法

1.1 研究区域概况

研究地位于广西防城港东兴市江平镇万尾金滩(108°12′—108°18′ E, 21°51′—21°53′ N),属南亚热带海洋性季风气候,年平均气温 22.6 ℃,历年最高气温为 36.5 ℃,最低气温为 2.8 ℃,年降水量约为 2 890.5 mm,集中于 6—8 月,约占全年降雨量 68%,年均日照数约为 1 494.3 h。土壤类型主要为滨海盐土(砂质),pH 6.69,含有机质 3.96 g · kg⁻¹,全氮 0.19 g · kg⁻¹,全磷 0.11 g · kg⁻¹,全钾 3.09 g · kg⁻¹。区内植被以草本及灌木为主,群落

优势种有厚藤、老鼠芳(*Spinifex littoreus*)、单叶蔓荆(*Vitex rotundifolia*)、绢毛飘拂草(*Fimbristylis sericea*)等。

1.2 样品采集

根据华南地区气候季节划分(简茂球,1994),分别于 2017 年 4 月(春季)、7 月(夏季)、9 月(秋季)、11 月(冬季)进行样品采集,不同采样季节气象条件见表 1。在研究区域内选择具有代表性的厚藤群落设置 3 个 10 m × 10 m 的样地,每个样地内选择 5 株生长状况相似,长势一致的厚藤成熟植株,对植株近顶端的成熟叶片进行叶绿素荧光测定,并采集 5~8 片放入冰袋保存,迅速带回实验室测定各生理指标。

表 1 2017 年防城港环境因子季节性平均值及变化范围

Table 1 Seasonal averages and variation ranges of environmental factors in Fangchenggang in 2017

环境因子 Environmental factor	春季 Spring		夏季 Summer		秋季 Autumn		冬季 Winter	
	平均值 Average	变化范围 Variation range	平均值 Average	变化范围 Variation range	平均值 Average	变化范围 Variation range	平均值 Average	变化范围 Variation range
降水 Rainfall (mm)	55.1	34.0~76.2	542.2	174.0~849.0	213.2	203.0~223.3	46.4	20.3~69.2
平均气温 Average temperature (℃)	20.7	18.6~22.7	27.3	25.9~27.8	25.9	23.9~28.0	17.0	15.2~19.6
日照数 Sunshine duration (h)	76.9	40.3~113.4	150.7	135.9~168.7	188.0	183.7~197.2	89.3	61.9~105.8

注:数据资料来源于防城港市统计年鉴。
Note: The data come from Fangchenggang City Statistical Yearbook.

1.3 叶片生理指标测定

在野外样地采用 Hansatech 叶绿素荧光仪(PEA)测定待测叶片的最小荧光(F_o)、最大荧光(F_m),计算 PS II 最大光能转化效率 [$F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$] 以及 PS II 光化学潜在活性 [$F_v/F_o = (F_m - F_o)/F_o$]。将样品带回实验室后,参照李合生(2000)的方法,采用研磨-分光光度计法测定叶绿素含量,酸性茚三酮法测定脯氨酸含量,蒽酮比色法测定可溶性糖的含量,硫代巴比妥酸法测定丙二醛(MDA)含量,愈创木酚比色法测定过氧化物酶(POD)活性,氮蓝四唑(NBT)法测定超氧化物歧化酶(SOD)活性,高锰酸钾滴定法测定过氧化氢酶(CAT)活性。各项生理指标重复测定 3 次。

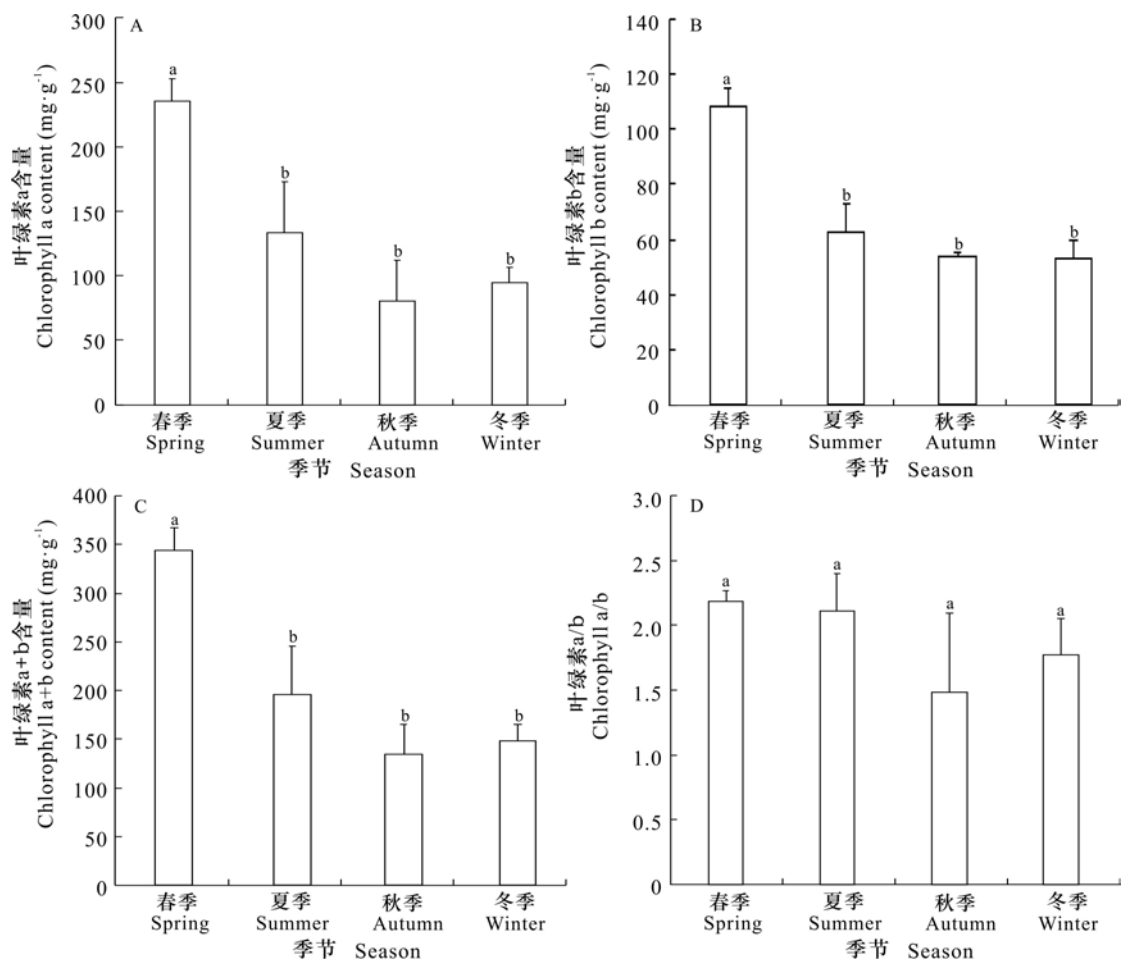
1.4 数据处理

数据采用 Excel 2013 软件进行数据统计和图表绘制,采用 SPSS 25.0 软件进行显著性检验、相关性分析、主成分分析。

2 结果与分 析

2.1 不同季节厚藤叶片叶绿素含量变化

叶绿素作为光合主要色素,其含量决定了植物光合过程中对光能的获取能力,受环境因子变化影响。由图 1 可知,厚藤叶绿素含量随季节更替整体呈现出递减趋势,即春季>夏季>冬季>秋季。厚藤叶片叶绿素 a、叶绿素 b、叶绿素 a+b 含量均在春季显著高于其他三个季节($P<0.05$),而自夏季开始下降,随后保持稳定趋势($P>0.05$)。可见在春季,厚藤具有较强的捕光能力。由于叶绿素 a 和叶绿素 b 的光合特性略有不同,其含量变化及比值会对植物的光合作用产生不同影响。图 1: A,B 结果显示,夏季叶绿素 a 和叶绿素 b 显著下降,叶绿素 a 的下降幅度是叶绿素 b 的 3 倍,叶绿素 a/b 虽有变化但整体在 1.48~2.18 之间波动(图



不同小写字母表示不同季节间存在显著差异 ($P<0.05$)。下同。
Different lowercase letters indicate significant differences among different seasons ($P<0.05$). The same below.

图 1 厚藤叶片叶绿素含量季节变化
Fig. 1 Seasonal changes of chlorophyll contents in *Ipomoea pes-caprae* leaves

1:D), 始终低于理论值 3 : 1, 未达显著水平 ($P>0.05$)。表明厚藤叶片对光能的捕获方式受季节变化发生改变, 但始终保持较强的光能利用效率。

2.2 厚藤叶片叶绿素荧光参数的季节变化

PS II 最大光能转化效率 (F_v/F_m) 和 PS II 潜在活性 (F_v/F_o) 是衡量光抑制程度的重要指标。有研究认为, 植物 F_v/F_m 在非胁迫状态下为 0.75 ~ 0.85, 0.44 可作为 PS II 是否受损的临界值, 该值越低, 反映植物受到光抑制的程度越高 (Kalaji et al., 2016)。由图 2 可知, 厚藤叶片不同季节 F_v/F_m 和 F_v/F_o 变化趋势一致, 夏季和冬季间无显著差异 ($P>0.05$), 显著高于春季和秋季 ($P<0.05$), F_v/F_m 在春季和秋季分别为 0.49 和 0.48, 接近受损临界值, 而夏季和冬季分别为 0.75 和 0.74, 接近于非胁迫状态区间最低值。 F_v/F_o 在春季和

秋季分别为 1.01 和 0.96, 而夏季和冬季分别为 2.94 和 2.86。表明厚藤春季和秋季 PS II 反应中心受到抑制, PS II 潜在活性较低。

2.3 不同季节厚藤叶片渗透物质含量及抗氧化酶活性变化

渗透调节物质的累积可以增加植物细胞溶质浓度, 降低渗透势保持膨压, 维持细胞正常形态和生理代谢, 对植物抵抗非生物胁迫有着重要作用。研究结果显示, 厚藤叶片脯氨酸含量随季节变化呈上升趋势 (图 3:A), 冬季含量显著高于其他三季 ($P<0.05$), 分别为春季的 4.3 倍、夏季的 3.7 倍、秋季的 1.2 倍, 秋季含量显著高于春季、夏季, 且春夏之间无显著差异 ($P>0.05$)。可见叶片在秋、冬季节开始合成积累脯氨酸, 在冬季含量达到顶峰, 表现较高渗透调节能力。冬季可溶性糖含

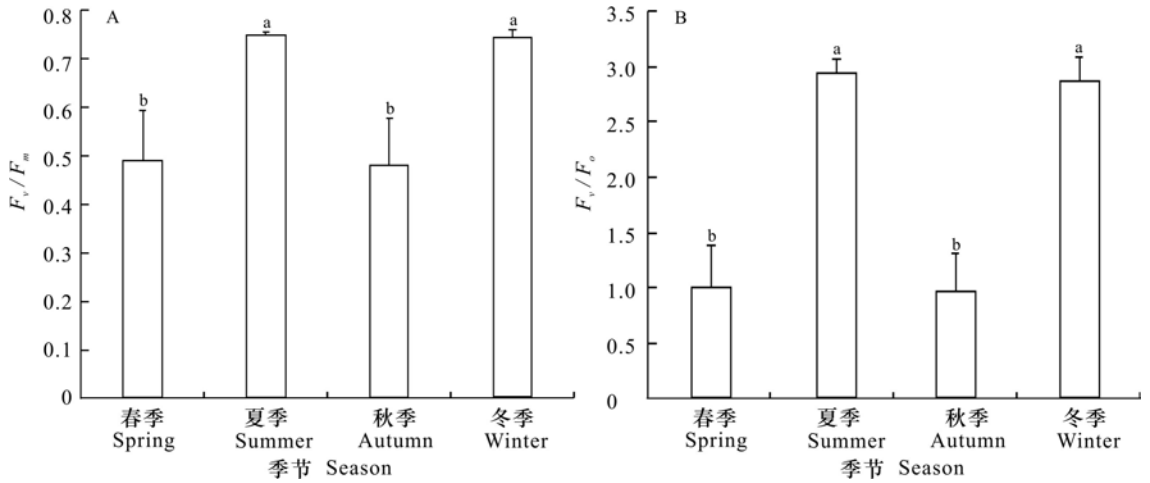


图 2 厚藤叶片叶绿荧光素参数季节变化

Fig. 2 Seasonal changes of chlorophyll fluorescence parameters in *Ipomoea pes-caprae* leaves

量显著高于其他三个季节 ($P<0.05$) (图 3:B), 分别是春季的 1.66 倍、夏季的 2.44 倍、秋季的 2.92 倍, 说明可溶性糖在冬季大量合成并累积, 而其他三个季节的消耗速度大于合成速度。MDA 是膜质过氧化的产物, 由图 3:C 可知, MDA 含量随季节变化差异不大, 整体在 $0.21\sim1.48\text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ 之间浮动, 未达到显著水平 ($P>0.05$), 表明各季节厚藤叶片内活性氧的产生与清除处于动态平衡, 细胞膜脂过氧化作用较弱, 膜脂未受到严重活性氧毒害。

抗氧化酶是植物活性氧 (ROS) 清除系统中的重要酶, 能维持活性氧自由基产生与清除系统的平衡 (耿东梅等, 2014), 当植物受到逆境伤害时, 抗氧化酶活性被激发以清除植物体内多余的 ROS, 保护植物膜系统。研究结果显示: 厚藤叶片中过氧化物酶 (POD) 活性随季节变化而呈现上升趋势 (图 4:A), 各季节间差异不显著 ($P>0.05$), 在春季活性最低, 为 $65.26\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, 夏季、秋季、冬季 POD 活性分别为 93.00 、 137.66 、 $160.26\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, 冬季达到最高值; 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性夏季、秋季、冬季间差异不显著 ($P>0.05$) (图 4:B), 春季显著高于其他三个季节 ($P<0.05$), 是夏季的 8.61 倍、秋季的 4.25 倍、冬季的 8.3 倍; 过氧化氢酶 (CAT) 活性变化趋势与 SOD 活性一致, 春季活性最高, 达到 $298.07\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, 是其他季节的 5 倍左右。可见厚藤叶片组织中 SOD 和 CAT 较 POD 对植物的保护作用明显, 且叶片抗氧化能力在春季最强, 说明厚藤叶片在春季受到逆境胁迫压力较大, 叶片组织中 SOD 和 CAT 活性被激发, 共同保护厚藤细胞膜系统免受环境伤害。

2.4 厚藤生理指标与环境因子相关性分析及主成分分析

将厚藤叶片各项生理指标与气候因子进行相关性分析, 得到相关系数矩阵 (表 2)。由表 2 可知, 厚藤叶片各生理指标之间存在相关性, 叶绿素含量与脯氨酸呈显著负相关 ($P<0.05$), 与 CAT 和 SOD 活性呈极显著正相关 ($P<0.01$), 表明厚藤叶绿素含量与渗透调节和抗氧化作用紧密相关。SOD 与 MDA 有显著正相关 ($P<0.05$), 且与 CAT 有极显著正相关关系 ($P<0.01$), 与 F_v/F_m 和 F_v/F_o 有显著负相关关系 ($P<0.05$), 说明抗氧化酶活性对细胞膜脂化程度和植物光合作用产生影响。温度和日照数与可溶性糖有极显著负相关关系, 说明对可溶性糖含量产生显著影响。

植物对环境变化的响应是多个生理生化机制综合作用的结果, 单个指标无法准确反映植物对环境变化的响应情况。因此, 本研究对厚藤季节变化影响下的 10 个生理指标进行主成分分析 (表 3)。由表 3 可知, 10 项生理指标可转化为 3 项综合指标, 即成分 1、成分 2、成分 3, 贡献率累积达 88.050% (大于 85%), 能反映各生理指标的相对重要性和相互关系。在主成分因子载荷分析中, 因子载荷高, 说明对其所在主成分影响较大。在主成分 1 中, SOD 活性、CAT 活性和叶绿素 b 含量因子载荷高, 对主成分 1 影响较大, 主要包含抗氧化酶系统和光合作用系统的相关特征指标。在主成分 2 中, 脯氨酸含量、可溶性糖含量及 POD 活性影响较大, 主要为渗透调节物质含量, 反映叶片渗透调节能力。在主成分 3 中, F_v/F_m 和 F_v/F_o 以及

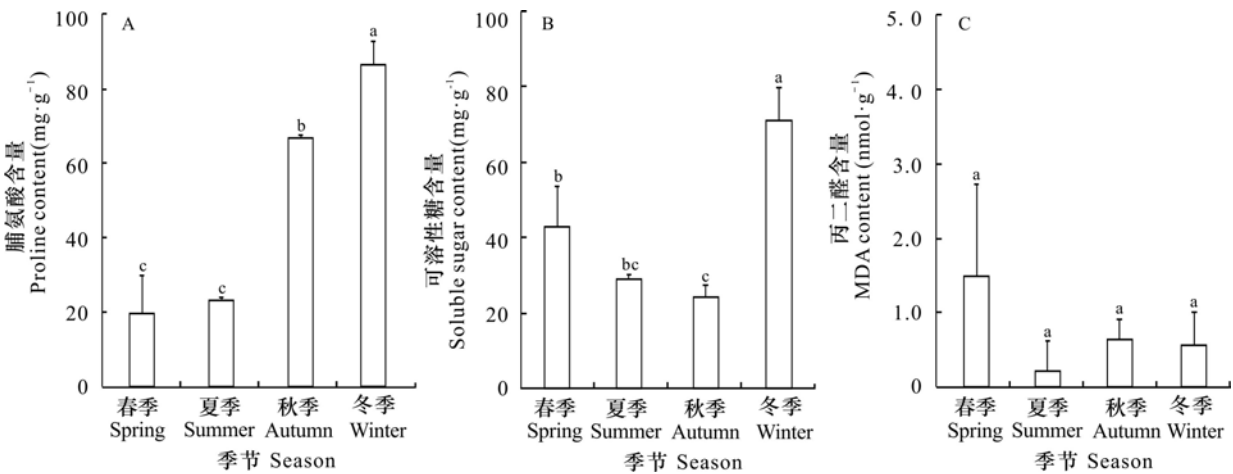


图 3 厚藤渗透物质含量季节变化

Fig. 3 Seasonal changes of osmotic substances contents in *Ipomoea pes-caprae* leaves

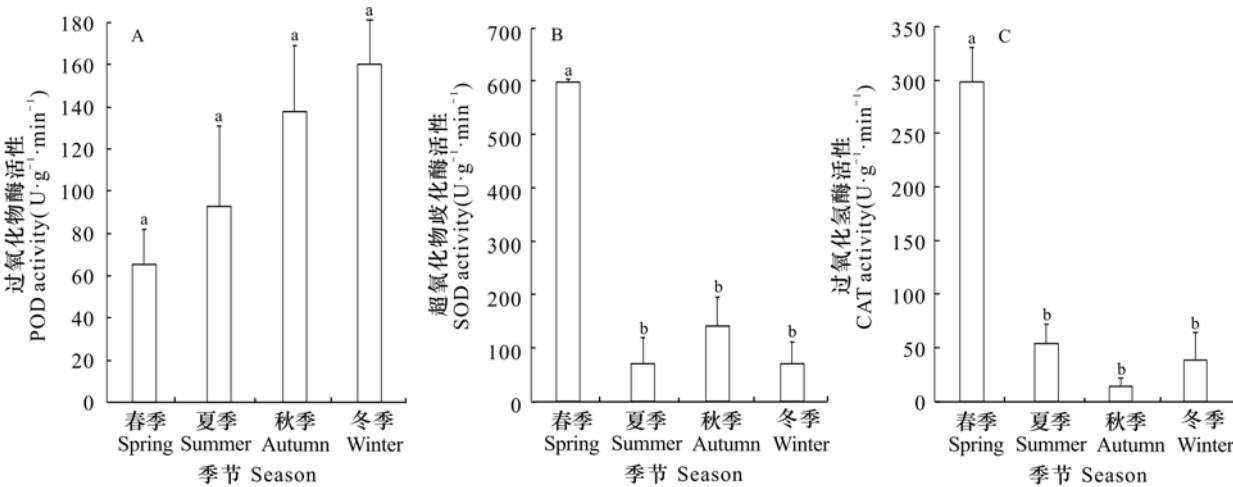


图 4 厚藤抗氧化酶活性季节变化

Fig. 4 Seasonal changes of antioxidant enzyme activities in *Ipomoea pes-caprae* leaves

可溶性糖含量因子载荷较高, F_v/F_m 和 F_v/F_o 与植物光合作用强弱有关,可溶性糖是植物光合作用重要产物,集中反映了植物光合作用情况。因此,抗氧化酶系统、光合作用与渗透调节在厚藤的季节性适应机制中都起着重要作用,其中光合作用和抗氧化酶系统作用显著,是影响厚藤季节性适应能力的关键。

3 讨论与结论

广西滨海沙地属亚热带海洋性季风气候,季节更替所带来的温度、湿度及光强变化剧烈,影响植物的生长发育。当环境因子的变化引起植物

不适应时,植物生理特征会做出适应性改变以适应环境变化。

叶绿素具有能量转换和捕捉光能的作用,叶绿素含量与光合作用紧密相关 (Ilze & Antons, 2017; 吕丹等, 2019)。大多数植物在受到逆境胁迫时,叶绿素酶活性提高,促进叶绿体的降解和抑制其合成,使得叶绿素含量降低,光合作用减弱 (周余华和梁宇翔, 2021),也有研究表明,一些抗逆性较强的树种如沙木蓼 (*Atraphaxis bracteata*)、多花怪柳 (*Tamarix hohenackeri*) 等在干旱胁迫下叶片叶绿素含量升高,表现出较强抗旱能力 (罗青红等, 2014; 孙龙等, 2014)。尽管叶绿素在光合作用过程中的重要性已被承认,但其与光合作用能力之

表 2 厚藤叶片生理指标间的相关性分析

Table 2 Correlation analysis of physiological indexes of *Ipomoea pes-caprae* leaves

	脯氨酸 Proline	可溶性糖 Soluble sugar	过氧化物酶 POD	丙二醛 MDA	过氧化氢酶 CAT	超氧化物歧化酶 SOD	叶绿素 a Chla	叶绿素 b Chlb	叶绿素 a+b Chla+b	叶绿素 a/b Chla/b	F_v/F_m	F_v/F_o	降水 Rainfall	平均气温 Average tempe- rature	日照数 Sunshine duration
脯氨酸 Proline	1														
可溶性糖 Soluble sugar	0.460	1													
过氧化物酶 POD	0.545	0.298	1												
丙二醛 MDA	-0.296	0.206	-0.052	1											
过氧化氢酶 CAT	-0.607*	0.038	-0.311	0.534	1										
超氧化物歧化酶 SOD	-0.556	-0.043	-0.367	0.596*	0.942**	1									
叶绿素 a Chla	-0.725**	0.002	-0.374	0.522	0.922**	0.830**	1								
叶绿素 b Chlb	-0.687*	-0.001	-0.312	0.635*	0.962**	0.935**	0.954**	1							
叶绿素 a+b Chla+b	-0.721**	0.001	-0.361	0.557	0.941**	0.865**	0.997**	0.975**	1						
叶绿素 a/b Chla/b	-0.570	0.023	-0.360	0.094	0.517	0.316	0.756**	0.528	0.703*	1					
F_v/F_m	0.152	0.413	0.112	-0.547	-0.425	-0.596*	-0.312	-0.457	-0.353	0.136	1				
F_v/F_o	0.157	0.419	0.083	-0.495	-0.459	-0.644*	-0.328	-0.489	-0.374	0.149	0.976**	1			
降水 Rainfall	-0.430	-0.497	-0.110	-0.406	-0.375	-0.489	-0.167	-0.304	-0.205	0.194	0.466	0.510	1		
平均气温 Average temperature	-0.359	-0.919**	-0.111	-0.212	-0.308	-0.219	-0.202	-0.202	-0.204	-0.129	-0.235	-0.236	0.653*	1	
日照数 Sunshine duration	-0.208	-0.898**	-0.068	-0.092	-0.243	-0.077	-0.209	-0.146	-0.194	-0.275	-0.496	-0.516	0.343	0.934**	1

注：**表示在 0.01 水平(双尾)相关性显著;*表示在 0.05 水平(双尾)相关性显著。
Note: ** indicates significant correlation at the 0.01 level (two-tailed); * indicates significant correlation at the 0.05 level (two-tailed).

间的关系仍然存在争议,黄丽(2013)认为叶绿素含量不能完全反映光合能力差异。本研究发现,厚藤在干旱低温的春季,叶绿素含量升高,但与光合作用相关的 F_v/F_m 、 F_v/F_o 和可溶性糖含量指标降低,说明春季叶绿素含量的增加可能不会加强厚藤的光合作用,而是由于胁迫环境下,植物渗透压增大抑制了叶绿素降解有关基因的表达,加上细胞失水导致叶绿素浓度上升,与靳月等(2018)和张曦等(2016)的研究结果相类似。叶绿素 a 和叶绿素 b 在光合作用中功能不同,潘昕等(2013)提出叶绿素 a/b 的值可以用来判断植物的抗旱能力,干旱胁迫下叶绿素 a/b 的值变化幅度越小,植物抗旱能力越强。在季节变化过程中,随着夏、秋、冬季节降雨增多,日照数增大,叶绿素含量下降,叶绿素 a 的下降幅度是叶绿素 b 的 3 倍,可能是由于是逆境下光合系统的还原端产生 ROS,在

ROS 作用下叶绿素 a 比叶绿素 b 更易被分解破坏(陈士超等,2017)。而叶绿素 a/b 始终保持稳定且低于阳生植物理论值(3 : 1),表现出厚藤具有较强的抗旱性和适应性,可保护光合作用反应中心免受过剩光能的伤害(张金玲等,2017; Ayumi & Ryouichi, 2019)。

叶绿素荧光是光合作用的探针,任何环境因子对光合作用的影响都可以通过叶绿素荧光动力学参数快速、灵敏且无损伤地反映出来(耿东梅等,2014)。 F_v/F_o 代表了 PS II 潜在活性, F_v/F_m 是表征植物是否受到环境胁迫的重要指标(Kalaji et al., 2016)。在自然环境中,厚藤 F_v/F_m 在春季和秋季降幅明显,接近 PS II 受损临界值,可见厚藤春季和秋季 PS II 反应中心受到抑制,PS II 潜在活性较低,但 PS II 仍未受到损害。这可能是由于春季较高含量的叶绿素对 PS II 反应中心的结构

表 3 厚藤叶片生理指标初始因子载荷矩阵
Table 3 Initial factor loading matrix of leaf physiological indexes for *Ipomoea pes-caprae*

生理指标 Physiological index	成分 1 Ingredient 1	成分 2 Ingredient 2	成分 3 Ingredient 3
F_v/F_m	-0.707	-0.270	0.635
F_v/F_o	-0.719	-0.277	0.625
脯氨酸 Proline	-0.621	0.678	-0.126
可溶性糖 Soluble sugar	-0.164	0.590	0.757
过氧化物酶 POD	-0.392	0.672	-0.046
丙二醛 MDA	0.697	0.439	0.106
过氧化氢酶 CAT	0.912	-0.034	0.308
超氧化物歧化酶 SOD	0.964	0.031	0.088
叶绿素 a Chla	0.855	-0.189	0.378
叶绿素 b Chlb	0.929	0.266	0.177
贡献率 Contribution rate (%)	54.208	17.100	16.741
累积贡献率 Cumulative contribution rate (%)	54.208	71.309	88.050

和功能有一定的保护作用,但严峻的干旱环境条件仍然使 PS II 反应中心处于抑制状态(肖瑞雪等,2018)。在秋季降雨量增加,干旱胁迫得到缓解的同时,高温强光条件下厚藤叶绿素循环机制发生改变,引起叶绿素 a/b 的值下降,厚藤捕获有效光组成变化进而抑制了光系统作用,与葛露露等(2018)研究结果相一致。

脯氨酸和可溶性糖是重要的有机渗透调节物质,其含量积累可以提高植物细胞液的渗透压,增强细胞的吸收保水能力,是植物抵御逆境胁迫的重要生理调节机制(车韦才等,2020)。研究发现,短枝木麻黄(*Casuarina equisetifolia*)通过增强渗透调节能力和降低膜脂过氧化作用来适应外界环境变化(李楠等,2019),单叶蔓荆叶片在逆境下积累的脯氨酸在抑制细胞膜脂过氧化和维护细胞膜稳定上起重要作用(周瑞莲等,2013)。在本研究中,厚藤叶片中脯氨酸和可溶性糖含量随季节变化明显,而 MDA 质量摩尔浓度无显著变化,说明厚藤可通过调整渗透调节物质含量避免细胞膜系统膜脂过氧化,对自然生境下环境变化表现出较强适应性;而脯氨酸含量随季节变化上升,在冬季达到最高,即水分严重亏缺和气温较低的季节,此时植物体内累积大量脯氨酸,一方面发挥渗透调节作用缓解水分散失保护植物体内原生质,另一方面可以调节活性氧的产生和清除,保护细胞膜结构

完整。由此可见,叶片中脯氨酸的累积是厚藤应对低温干旱逆境的有效防护措施,与朱军涛等(2011)的研究结果相同。厚藤叶片可溶性糖含量与温度和日照数呈极显著负相关关系,在冬季显著增高,春、夏、秋季节呈下降趋势,表明可溶性糖含量在这三个季节逐渐被消耗,而在冬季合成积累。可能是由于厚藤在冬季合成和储存更多可溶性糖为越冬做准备,而到了春季,随季节变化气温回升,光照数增加,植物呼吸作用增强,消耗了大量可溶性糖。这与李培广等(2012)对梭梭树的研究结果一致。

保护酶系统 SOD、POD、CAT 作为植物内源的 ROS 清除剂,可通过协同作用减少 ROS 对植物细胞造成的伤害,MDA 是植物细胞质膜过氧化物的最终产物,可用于衡量细胞受活性氧类物质伤害的程度(梁芳等,2021)。在本研究中,厚藤叶片 MDA 含量四季无显著差异,其 SOD 和 CAT 酶活性在春季显著高于其他季节,结合叶绿素含量变化以及厚藤叶片生理指标间的相关性分析,发现 SOD 和 CAT 活性与叶绿素含量之间存在极显著正相关关系,认为是在春季厚藤失水引起叶绿素含量上升但未发生有效光合作用,导致 ROS 增多激发 SOD 和 CAT 活性,使得细胞中 MDA 保持较低水平,维护细胞膜的完整性。随着降雨量增加,植物干旱胁迫解除,植物细胞维持相对稳态,ROS 对细胞膜的胁迫程度下降。因此,尽管 SOD、CAT 活性相较春季有所下降,但 MDA 含量依然保持较低水平。此外,本研究还发现 POD 活性随季节呈上升趋势,与 CAT、SOD 活性变化趋势不同,可见 SOD、POD 和 CAT 活性相互此消彼长,使抗氧化酶活性总体维持较高水平,说明厚藤具有极其强大的抗氧化酶系统以适应环境变化,与荩草(*Arthraxon hispidus*)抗氧化酶系统对于干旱和遮阴的响应机制相似(孙帅等,2018)。

相关性和主成分分析显示,各指标和气候因子间存在相关性,温度和日照数对可溶性糖含量影响显著,叶绿素含量和抗氧化酶活性能够较好地反映厚藤对季节变化的响应情况。厚藤可通过抗氧化酶系统、光合作用与渗透调节作用来适应环境季节性变化,其中光合作用和抗氧化酶系统作用是厚藤适应季节变化的关键。

综上所述,厚藤叶片生理指标具有显著的季节变化特征。随着季节变化,厚藤可通过调整叶绿素 a 与叶绿素 b 下降速度使叶绿素 a/b 保持稳定,同时提高渗透调节物质含量和抗氧化酶活性

以适应季节变化,因此可作为沙地生态恢复前期建群种。

参考文献:

- AYUMI T, RYOUICHI T, 2019. The biochemistry, physiology, and evolution of the chlorophyll cycle [J]. *Adv Bot Res*, 90(3): 183–212.
- CAI SH, LI T, ZHOU GX, et al., 2016. Gas exchange characteristics in the mangrove associate *Hibiscus tiliaceus* [J]. *Guihaia*, 36(4): 397–404. [蔡水花, 李婷, 周光霞, 等, 2016. 半红树植物黄槿的气体交换特性 [J]. *广西植物*, 36(4): 397–404.]
- CARLO S, STEFANIA B, CARMELINA S, 2019. Seasonal and microclimatic influences on the ecophysiology of Mediterranean coastal dune plants [J]. *Estuar Coast Shelf Sci*, 219(2): 317–327.
- CHE WC, SUN YT, LIANG YC, et al., 2020. The study on the ecophysiological mechanism of *Lavandula angustifolia* Mill. adapting to cold area [J]. *Nat Sci J Harbin Norm Univ*, 36(2): 60–69. [车韦才, 孙宇婷, 梁雨晨, 等, 2020. 狭叶薰衣草适应高寒地区生长的生理生态机制研究 [J]. *哈尔滨师范大学自然科学学报*, 36(2): 60–69.]
- CHEN SC, WANG M, WANG J, et al., 2017. Response of seed germination and seedling physiological characteristics of *Medicago sativa* to the simulated osmotic potential of PEG6000 [J]. *Chin J Appl Ecol*, 28(9): 2923–2931. [陈士超, 王猛, 汪季, 等, 2017. 紫花苜蓿种子萌发及幼苗生理特性对 PEG6000 模拟渗透势的响应 [J]. *应用生态学报*, 28(9): 2923–2931.]
- DU CZ, HOU XT, HAO EW, et al., 2019. Research progress on chemical composition and pharmacological effects of marine plant Chinese medicine [J]. *Guangxi Sci*, 26(5): 466–476. [杜成智, 侯小涛, 郝二伟, 等, 2019. 植物类海洋中药化学成分及药理作用研究进展 [J]. *广西科学*, 26(5): 466–476.]
- DU YQ, LIU JQ, CHEN LC, et al., 2011. Salt stress on four species of climbing plants [J]. *J Zhejiang For Sci Technol*, 31(4): 51–57. [杜月青, 刘建强, 陈立潮, 等, 2011. 鳝藤等 4 种藤本植物耐盐性试验 [J]. *浙江林业科技*, 31(4): 51–57.]
- FENG XH, DENG JG, QIN JF, et al., 2018. Research progress on chemical constituents of marine medicine *Ipomoea pes-caprae* and their pharmacological activities [J]. *Chin Trad Herb Drugs*, 49(4): 955–964. [冯小慧, 邓家刚, 秦健峰, 等, 2018. 海洋中药厚藤的化学成分及药理活性研究进展 [J]. *中草药*, 49(4): 955–964.]
- FERNANDA F, ARLETE S, SOFIA P, et al., 2014. Regional environmental gradients influence ecophysiological responses of dominant coastal dune plants to changes in local conditions [J]. *J Coastal Res*, 30(5): 893–903.
- GE LL, MENG QQ, LIN Y, et al., 2018. Diurnal and seasonal changes of chlorophyll fluorescence parameters of three shelterbelts in sandy coastal plain areas [J]. *J NW For Univ*, 33(5): 58–65. [葛露露, 孟庆权, 林宇, 等, 2018. 滨海沙地 3 种防护林树种不同季节叶绿素荧光参数日动态及季相变化 [J]. *西北林学院学报*, 33(5): 58–65.]
- GENG DM, SHAN LS, LI Y, et al., 2014. Effects of soil water stress on chlorophyll fluorescence and antioxidant enzyme activity in *Reaumuria soongorica* seedlings [J]. *Chin Bull Bot*, 49(3): 282–291. [耿东梅, 单立山, 李毅, 等, 2014. 土壤水分胁迫对红砂幼苗叶绿素荧光和抗氧化酶活性的影响 [J]. *植物学报*, 49(3): 282–291.]
- GRIFFITHS ME, ORIAN CM, 2003. Salt spray differentially affects water status necrosis and growth coastal species [J]. *Amer J Bot*, 90(8): 1188–1196.
- HUANG L, 2013. The seasonal dynamics of photosynthesis of *Kandelia candel*, *Avicennia marina*, *Aegiceras corniculatum* and *Bruguiera gymnorrhiza* in Zhangjiang estuary [J]. *Wetl Sci*, 11(1): 82–89. [黄丽, 2013. 福建省漳江口秋茄、桐花树、白骨壤和木榄光合作用季节动态研究 [J]. *湿地科学*, 11(1): 82–89.]
- ILZE S, ANTONS R, 2017. Effect of nitrogen and sulphur fertilization on chlorophyll content in winter wheat [J]. *Rural Sustain Res*, 37(332): 29–37.
- JIAN MQ, 1994. The division of seasons for the South China region [J]. *Acta Sci Nat Univ Sunyatseni*, 33(2): 131–133. [简茂球, 1994. 华南地区气候季节的划分 [J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 33(2): 131–133.]
- JIANG ZR, LIANG XT, ZHU G, et al., 2008. Sensitivity of three tree species reaction to seasonal variation and its relation to antistress ability [J]. *J NW For Univ*, 4(6): 46–49. [蒋志荣, 梁旭婷, 朱恭, 等, 2008. 3 树种对季节变化反应的敏感度及其与抗逆能力的关系 [J]. *西北林学院学报*, 4(6): 46–49.]
- JIN Y, LI TH, WEN SZ, et al., 2018. Growth and physiological characteristics of *Phoebe bournei* seedling under drought stress [J]. *J Cent S Univ For Technol*, 38(9): 50–57. [靳月, 李铁华, 文仕知, 等, 2018. 干旱胁迫对闽楠幼苗的生长和生理特性的影响 [J]. *中南林业科技大学学报*, 38(9): 50–57.]
- JUNG TL, LIN ZY, MING YC, et al., 2020. Growth characteristics and anti-wind erosion ability of three tropical foredune pioneer species for sand dune stabilization [J]. *Sustainability*, 12(8): 33–53.
- KALAJI HM, JAJOO A, OUKARROUM A, et al., 2016. Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. [J] *Acta Physiol Plant*, 38(4): 102–112.
- KAMAKURA M, FURUKAWA A, 2008. Responses of individual stomata in *Ipomoea pes-caprae* to various CO₂ concentrations [J]. *Physiol Plant*, 132(3): 255–261.
- LI HS, 2000. Experimental principles and techniques of plant physiology and biochemistry [M]. Beijing: Higher Education Press. [李合生, 2000. 植物生理生化实验原理与技术 [M]. 北京: 高等教育出版社.]
- LI N, LI HP, JIANG B, et al., 2019. Physiological response to low temperature stress in *Casuarina equisetifolia* seedlings [J]. *J Zhejiang A & F Univ*, 36(4): 678–686. [李楠, 李贺鹏, 江波, 等, 2019. 短枝木麻黄幼苗对低温胁迫的生理响应 [J]. *浙江农林大学学报*, 36(4): 678–686.]

- LI PG, ZHOU HY, CHEN CY, et al., 2012. Seasonal variations of soluble sugars in dominant plant species in Alxa Desert of northwest China [J]. *Chin Ecol*, 31(12): 3018–3023. [李培广, 周海燕, 陈翠云, 等, 2012. 阿拉善荒漠优势植物可溶性糖的季节变化 [J]. 生态学杂志, 31(12): 3018–3023.]
- LI X, WU T, CHENG Y, et al., 2020. Ecophysiological adaptability of four tree species in the southern subtropical evergreen broad-leaved forest to warming [J]. *Chin J Plant Ecol*, 44(12): 1203–1214. [李旭, 吴婷, 程严, 等, 2020. 南亚热带常绿阔叶林4个树种对增温的生理生态适应能力比较 [J]. 植物生态学报, 44(12): 1203–1214.]
- LIANG F, TAN XH, DENG X, et al., 2021. Growth and physiological responses of semi-mangrove plant *Barringtonia racemosa* to waterlogging and salinity stress [J]. *Guihaia*, 41(6): 872–882. [梁芳, 檀小辉, 邓旭, 等, 2021. 半红树植物玉蕊对淹水-盐度胁迫的生长及生理响应 [J]. 广西植物, 41(6): 872–882.]
- LIU Y, DAI XB, ZHAO LK, et al., 2020. RNA-seq reveals the salt tolerance of *Ipomoea pes-caprae*, a wild relative of sweet potato [J]. *J Plant Physiol*, 255(5): 153–276.
- LÜ D, WU GL, QIU D, et al., 2019. Variation patterns of leaf pigments of an evergreen garden plant *Cinnamomum camphora* in urban area [J]. *J Biol*, 36(6): 59–63. [吕丹, 吴甘霖, 邱东, 等, 2019. 城市常绿园林植物香樟叶片色素变异特征研究 [J]. 生物学杂志, 36(6): 59–63.]
- LUM TD, BARTON KE, 2020. Ontogenetic variation in salinity tolerance and ecophysiology of coastal dune plants [J]. *Ann Bot*, 125(2): 301–314.
- LUO QH, JI XM, NING HS, et al., 2014. Photosynthetic characteristics and relationship the ecological factors of three sandy shrubs under irrigation condition [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 34(11): 2296–2302. [罗青红, 吉小敏, 宁虎森, 等, 2014. 灌溉条件下3种沙生灌木光合特性及其与生态因子的关系 [J]. 西北植物学报, 34(11): 2296–2302.]
- PAN X, QIU Q, LI JY, et al., 2013. Effects of drought stress on chlorophyll content of two fast-growing tree species [J]. *Eucalypt Sci Technol*, 30(3): 17–22. [潘昕, 邱权, 李吉跃, 等, 2013. 干旱胁迫对两种速生树种叶绿素含量的影响 [J]. 桉树科技, 30(3): 17–22.]
- SUN L, PENG ZD, WANG C, et al., 2014. Effect of drought stress on photosynthetic characteristics of two energy resource sandy shrubs [J]. *J Nanjing For Univ (Nat Sci Ed)*, 38(2): 99–104. [孙龙, 彭祚登, 王冲, 等, 2014. 干旱胁迫对两种沙地灌木能源树种光合特性的影响 [J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 38(2): 99–104.]
- SUN S, ZHANG XJ, LIU JP, et al., 2018. Synergistic effects of shade and drought on the physiological metabolism and resistance system of *Arthraxon hispidus* [J]. *Acta Ecol Sin*, 38(5): 1770–1779. [孙帅, 张小晶, 刘金平, 等, 2018. 遮阴和干旱对荩草生理代谢及抗性系统影响的协同作用 [J]. 生态学报, 38(5): 1770–1779.]
- TONG SH, LIU N, WANG J, et al., 2020 Ecological and physiological adaptabilities of *Catharanthus roseus* to tropical coral island [J]. *Guihaia*, 40(3): 384–394. [童升洪, 刘楠, 王俊, 等, 2020. 长春花(*Catharanthus roseus*)对热带珊瑚岛生理生态适应性研究 [J]. 广西植物, 40(3): 384–394.]
- WU XL, YE GF, WU WY, et al., 2013. Transpiration rate and influencing environmental factors of *Casuarina equisetifolia* on coastal sand [J]. *J Fujian Coll For*, 33(1): 1–6. [吴锡麟, 叶功富, 吴文英, 等, 2013. 滨海沙地木麻黄蒸腾速率及其影响因子 [J]. 福建林学院学报, 33(1): 1–6.]
- XIAO RX, LÜ JX, JIA CS, et al., 2018. Effect of exogenous brassinosteroid on physiological characteristics of *Paeonia ostii* ‘Fengdan’ [J]. *Plant Physiol J*, 54(9): 1417–1425. [肖瑞雪, 吕静霞, 贾长松, 等, 2018. 外源油菜素内酯对油用牡丹‘凤丹’生理特性的影响 [J]. 植物生理学报, 54(9): 1417–1425.]
- ZHANG JL, CHENG D, LI YL, et al., 2017. Nutrient and metabolic responses of the leaves of *Cunninghamia lanceolata* seedlings to warming and reduced precipitation in different seasons [J]. *Chin Bull Bot*, 52(3): 278–289. [张金玲, 程达, 李玉灵, 等, 2017. 光和水胁迫对臭柏实生幼苗光化学效率及色素组成的影响 [J]. 植物学报, 52(3): 278–289.]
- ZHANG QF, LÜ CP, ZHOU JC, et al., 2019. Nutrient and metabolic responses of the leaves of *Cunninghamia lanceolata* seedlings to warming and reduced precipitation in different seasons [J]. *Chin J Appl Ecol*, 30(2): 420–428. [张秋芳, 吕春平, 周嘉聪, 等, 2019. 不同季节杉木幼苗叶片养分和代谢组分对增温和减少降水的响应 [J]. 应用生态学报, 30(2): 420–428.]
- ZHANG X, WANG ZN, LU JY, et al., 2016. Responses of leaf traits to drought at different growthstages 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.]
- ZHAO YY, LU ZH, LIU JT, et al., 2014. Advance in distribution, adaptability and succession of plant communities in coastal dune [J]. *Wetl Sci*, 12(3): 401–408. [赵艳云, 陆兆华, 刘京涛, 等, 2014. 海岸沙丘植物群落分布、适应性和演替研究进展 [J]. 湿地科学, 12(3): 401–408.]
- ZHOU RL, WANG J, YANG SQ, et al., 2013. Physiological response of *Vitex trifolia* to sand burial in the sand coast [J]. *Acta Ecol Sin*, 33(6): 1973–1981. [周瑞莲, 王进, 杨淑琴, 等, 2013. 海滨沙滩单叶蔓荆对沙埋的生理响应特征 [J]. 生态学报, 33(6): 1973–1981.]
- ZHOU YH, LIANG YX, 2021. Influence of high temperature stress on physiological factors of *Cornus florida* seedling leaves [J]. *Jiangsu Agric Sci*, 49(11): 85–92. [周余华, 梁宇翔, 2021. 高温胁迫对多花楸木幼苗叶片生理因子的影响 [J]. 江苏农业科学, 49(11): 85–92.]
- ZHU JT, LI XY, ZHANG XM, et al., 2011. Seasonal change of antioxidative enzymes and osmotic regulation in four desert plants [J]. *J Desert Res*, 31(6): 1467–1471. [朱军涛, 李向义, 张希明, 等, 2011. 4种荒漠植物的抗氧化系统和渗透调节的季节变化 [J]. 中国沙漠, 31(6): 1467–1471.]

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202012038

黎芳婷, 李蜜, 徐淑芬, 等. 广西三种真红树植物可培养细菌多样性及其生物活性初筛 [J]. 广西植物, 2022, 42(8): 1294–1303.

LI FT, LI M, XU SF, et al. Diversity and biological activity of culturable bacteria in three true mangrove plants of Guangxi [J]. *Guihaia*, 2022, 42(8): 1294–1303.



广西三种真红树植物可培养细菌多样性及其生物活性初筛

黎芳婷, 李蜜, 徐淑芬, 王慧敏, 刘永宏, 高程海*

(广西中医药大学 海洋药物研究院/药学院, 南宁 530200)

摘要: 为了挖掘真红树植物潜在细菌新物种和生物活性物质, 丰富红树林微生物多样性, 为新型活性产品开发提供菌株资源。该文从秋茄、木榄和红海榄三种广西来源的真红树植物及其生境中, 按根、茎、叶、花、果实和泥土分成 22 份样品, 选用 8 种不同培养基分离可培养细菌, 通过 16S rRNA 基因序列鉴定, 分析其多样性, 采用纸片法筛选细菌发酵粗提物的抑菌活性, 点植法测试其酶活性。结果表明: (1) 共分离获得可培养细菌 35 株, 隶属于 23 个科 28 个属, 芽孢杆菌属占细菌总数的 14.3%, 为优势菌属, 同时发现 11 株潜在的新细菌资源。(2) 活性筛选获得 4 株细菌具有抑菌活性, 16 株细菌具有酶活性, 芽孢杆菌属是酶活性优势菌属。综上所述, 广西真红树植物可培养细菌多样性丰富, 部分细菌具有抑菌活性和酶活性, 在新型抗生素和酶应用方面具有一定的开发潜力。

关键词: 真红树植物, 细菌, 物种多样性, 抑菌活性, 酶活性

中图分类号: Q939.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2022)08-1294-10

Diversity and biological activity of culturable bacteria in three true mangrove plants of Guangxi

LI Fangting, LI Mi, XU Shufen, WANG Huimin, LIU Yonghong, GAO Chenghai*

(Institutes of Marine Drugs/Faculty of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China)

Abstract: This study aims to explore potential new bacterial species and bioactive substances in true mangrove plants, which can enrich the diversity of mangrove microorganisms and provide strain resources for the development of new active products. A total of 22 samples were collected from three true mangrove plants of *Kandelia candel*, *Bruguiera*

收稿日期: 2021-04-04

基金项目: 国家自然科学基金委员会-广西联合重点资助项目 (U20A20101); 广西自然科学基金创新团队项目 (2020GXNSFGA297002); 广西中医药大学岐黄工程高层次人才团队培育项目 (2018006); 广西“八桂学者”专项; 广西中医药大学海洋药物研究院专项科研经费 (2018ZD005) [Supported by Joint Fund of NSFC-Guangxi (U20A20101); Guangxi Natural Science Foundation Innovative Team Project (2020GXNSFGA297002); Development Program of High-level Talent Team under Qihuang Project of Guangxi University of Chinese Medicine (2018006); Special Fund for Bagui Scholars of Guangxi; Special Program for Scientific Research Project under Institutes of Marine Drugs of Guangxi University of Chinese Medicine (2018ZD005)]。

第一作者: 黎芳婷 (1996-), 硕士研究生, 主要从事海洋中药物质基础与产品开发研究, (E-mail) 1183969242@qq.com。

通信作者: 高程海, 博士, 研究员, 硕士研究生导师, 主要从事海洋药用微生物资源与应用研究, (E-mail) 1178740043@qq.com。

gymnorhiza, *Rhizophora stylosa*, and their habitats, in Guangxi coastal area. Then 22 samples were divided according to different parts such as roots, stems, leaves, flowers, fruits and soils. Eight different culture media were used to isolate culturable bacteria, and 16S rRNA gene sequences were used to identify bacteria and analyze diversity. For cultured bacteria, the antibacterial and enzyme activities of fermented crude extracts were screened with Kirby-Bauer method and spot planting method, respectively. The results were as follows: (1) Based on sequencing results of 16S rRNA gene, a total of 35 strains of culturable bacteria were isolated, belonging to 28 genera and 23 families. *Bacillus* accounted for 14.3% of the total bacteria, which was the dominant bacteria. Meanwhile, 11 potential new bacterial species were found. (2) Four strains of bacteria showed antibacterial activities, 16 strains had enzyme activities, and *Bacillus* was the dominant strain in enzyme activities. The above results show that Guangxi true mangrove plants are rich in bacterial diversity, and some bacteria show antibacterial activities and enzyme activities. The new bacterial species and active strains had certain development potential in the new antibiotics and enzymes application.

Key words: true mangrove plants, bacteria, species diversity, antibacterial activity, enzyme activity

红树林生境同时兼备海陆特质,具有高湿度、高盐、缺氧、强辐射及潮汐等环境特征。为了获得生存必需的营养,红树林生境中的微生物被迫与红树植物共生,导致微生物易产生遗传变异从而使其物种多样性丰富,代谢产物活性独特。真红树植物作为红树林生境中的优势种(姜舒等, 2020),是挖掘新菌种和活性菌株的理想载体。广西红树林资源丰富,其面积为全国红树林面积的三分之一,其中真红树植物有 12 种(廖宝文和张乔民, 2014),是巨大的微生物资源宝库。长期以来关于广西海域微生物活性物质的研究主要集中在红树林生境的放线菌,关于红树植物内生细菌的报道相对较少。姜明国课题组(吴家法等, 2017; 石松标等, 2018; 王聪等, 2019) 和黄大林课题组(黄大林, 2013; 陈建宏等, 2018; 郑红芸等, 2019) 主要致力于对广西红树林生境中放线菌多样性及其生物活性研究。Jiang 等(2018) 从广西北仑河口多种真红树植物中分离到 101 株内生放线菌中,一株被鉴定为新种, 35 株具有显著的抑菌活性。近年来研究发现,红树植物及其根际淤泥中可培养细菌也可产生抑菌、抗肿瘤(Gong et al., 2018) 和延缓衰老等生物活性的代谢产物。李菲等(2016) 从茅尾海无瓣海桑中分离得到 38 株内生细菌,其中 5 株为潜在新物种, 5 株具有较强的细胞毒活性。李家怡等(2017) 从广西山口分离得到 17 株红海榄内生细菌,发现 3 株潜在新菌, 2 株对副溶血弧菌具有较强抑菌活性。李蜜等(2020) 从徐闻分离到 33 株真红树植物内生细菌,其中 10 株为潜在新种或新属, 2 株有显著杀线虫活性。李蜜等(2020) 从海南西海岸的 14 份真红树样品中

分离到内生细菌 38 株, 3 株对秀丽隐杆线虫有显著延缓衰老活性。由此可见,真红树植物可培养细菌物种多样性丰富,代谢产物活性独特,值得我们深入挖掘。研究广西沿海真红树可培养细菌多样性,挖掘新型活性菌株,对完善该海域微生物多样性及新型活性化合物开发具有重要意义。

由于抗生素的滥用,导致多种超级细菌产生,出现越来越多的难治性感染。细菌耐药性已经成为一场国际性的公共卫生危机,是亟须解决的全球性问题(刘丹华等, 2019),研发新型抗耐药菌抗生素迫在眉睫。细菌是产生抗生素及生物活性物质重要微生物资源。蛋白酶、纤维素酶和淀粉酶是高效的生物活性酶,影响生物体的生理活动,在食品、医药和化工等生物技术方面有巨大的应用价值(马军等, 2016)。红树植物共生细菌多样性丰富,能产生多种酶活性类物质和抗生素类化合物(Ntabo et al., 2018),是潜在酶活性物质及新型抗生素的重要来源。因此,本实验设计合适的分离培养基,以期从广西三种真红树植物及其根际淤泥中分离获得更多未培养细菌,并分析其可培养细菌多样性。通过筛选可培养细菌的抑菌和酶活性,为新型抗生素和酶活性物质提供菌株资源,并为后续广西真红树植物资源开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集 为了探究不同地点及植物部位对真红树植物可培养细菌的影响,课题组于 2019

年 12 月 21 日在广西沿海区域采集三种真红树植物的根、茎、叶、花、果实和泥土,按照不同地点分成 22 份样品。具体信息见表 1,根部位样品 4 份,茎部分 6 份,叶部分 6 份,花部分 1 份,果实 2 份,

泥土 3 份。经北仑河口红树林自然保护区吴志鹤鉴定,3 种真红树分别为秋茄 (*Kandelia cande*)、木榄 (*Bruguiera gymnorrhiza*) 和红海榄 (*Rhizophora stylosa*)。

表 1 样品采样信息
Table 1 Information of collected samples

样品编号 Sample code	植物类型 Plant type	样品部位 Sample part	经纬度 Longitude and latitude
F1	秋茄 1 <i>Kandelia cande</i> 1	根、叶、茎、泥土 Root, leaf, stem, soil	108°42'06 E、21°39'04 N
F2	秋茄 2 <i>K. cande</i> 2	根、叶、茎、泥土 Root, leaf, stem, soil	108°31'25 E、21°53'15 N
F3	木榄 1 <i>Bruguiera gymnorrhiza</i> 1	果、叶、茎 Fruit, leaf, stem	108°13'47 E、21°36'57 N
F4	木榄 2 <i>B. gymnorrhiza</i> 2	花、叶、茎 Flower, leaf, stem	108°13'47 E、21°36'57 N
F5	木榄 3 <i>B. gymnorrhiza</i> 3	果、根、叶、茎、泥土 Fruit, root, leaf, stem, soil	108°13'47 E、21°36'57 N
F6	红海榄 <i>Rhizophora stylosa</i>	叶、茎、根 Leaf, stem, root	108°13'47 E、21°36'57 N

1.1.2 试剂 16S rRNA 基因扩增引物对 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 购于全式金生物技术有限公司(中国,北京);Chelex-100 树脂,2× Easy Taq Supermix BioRad 购于 BioRad 公司(美国);5%的次氯酸钠溶液购于朗索医用消毒剂有限公司(中国,杭州);其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养基 分离培养基:参考李蜜等(2020)方法配制培养基 P3、P7、AGG、M5、M7、M9、M10、M11。发酵培养基:改良 ISP2 液体培养基。酶活性筛选培养基:参考赵雅慧等(2018)方法制作。纤维素酶筛选培养基:LB 培养基中加入 1%的羧甲基纤维素钠和 1.5%的琼脂。淀粉酶筛选培养基:LB 培养基中加入 1%淀粉和 1.5%琼脂。蛋白酶筛选培养基:脱脂奶粉 1%,葡萄糖 1%,琼脂 1.5%。

1.1.4 指示菌 无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) NCTC 8181、海豚链球菌 (*S. iniae*) CAIM 527、沙门氏菌 (*Salmonella*)。以上指示菌均由华南农业大学张晓勇课题组提供。

1.2 实验方法

1.2.1 样品的处理 参考李蜜等(2020)的方法,真红树植物样品用 5%次氯酸钠溶液浸泡 8 min,无

菌水冲洗干净,75%乙醇中浸泡 5 min,无菌水冲洗至无乙醇味。取以上样品约 2 g 于无菌研钵中,加入 2 mL 无菌海水研匀即得原液。参考李菲等(2018)的方法,泥土样品除去杂质,取约 2.0 g 于装有 20 mL 无菌水(内有玻璃珠)的锥形瓶中,放入摇床摇匀,充分均质即得原液。所有样品原液置于 4 ℃冰箱保存。选取 M7、P7、M11、M10、M5、AGG、P3、M9 8 种分离培养基,取样品的 10⁻⁴悬液 100 μL 涂布(李蜜等,2020)。

1.2.2 可培养细菌的分离纯化、鉴定、保藏 参考吴家法等(2017)的方法,将分离培养平板置于 28 ℃恒温培养箱培养 2~8 周。长出细菌后,挑取质地光滑的单菌落,三线法在 ISP2 纯化培养基分离纯化,直至获得纯净菌株,记录菌株数量及其形态特征。参考 Chelex-100 法(周双清等,2010)提取已纯化细菌的基因组 DNA,参照 Walsh 等(1991)的方法对细菌基因组 DNA 进行 PCR 梯度扩增。1%琼脂糖凝胶电泳检测阳性扩增产物委托上海美吉生物医药技术有限公司广州分公司进行测序。经 DNA Star 软件整理 16S rRNA 基因测序结果,用数据库 EzBioCloud(<http://www.eztaxon.org/>)(2009)及 Blast 网站进行相似性比对。纯化的菌株保藏于 20%(V/V)甘油管中,置于-80 ℃超低温冰箱中保存。

1.2.3 细菌发酵粗提物的活性筛选

1.2.3.1 细菌发酵及粗提物提取 参考李蜜等(2020)的方法发酵可培养细菌,离心收集的发酵液用等体积的乙酸乙酯萃取,减压蒸干乙酸乙酯层,用甲醇溶解收集,挥干甲醇即得细菌发酵粗提物,置于4℃冰箱保存备用。

1.2.3.2 细菌抑菌实验 检定板的制备:参考许敏等(2016)的方法,将生长良好的指示菌接种于装有50 mL已灭菌LB液体培养基的三角瓶中,180 r·min⁻¹摇床培养9 h得到对数生长期的指示菌混悬液,取混悬液加入灭菌后低于55℃的LB(A)培养基中,稀释成0.3%的浓度。灭菌的LB固体培养基倾注到培养皿中,凝固后,再倾注一层加有指示菌的培养基,待其凝固即得检定板。

纸片扩散法进行抑菌活性检测:参考曾臻和谭强来(2019)的方法,用甲醇溶解配成20 mg·mL⁻¹的细菌发酵粗提物,吸取5 μL至直径为6 mm的无菌滤纸片上(加入5 μL甲醇的滤纸片作阴性对照),挥干甲醇,贴于检定板表面,于37℃培养24 h,观察并记录抑菌圈的大小,实验重复3次,计算抑菌圈平均值。

1.2.3.3 细菌酶活性实验 酶活性菌株的筛选:参考杨桂柳等(2015)的方法,点植法将对数生长期的细菌接种于相应的酶活性平板培养基上,28℃恒温培养4~6 d,观察细菌生长情况和菌落周围是否出现透明圈,实验重复3次。

2 结果与分析

2.1 三种真红树植物可培养细菌多样性分析

经菌落形态排重和16S rRNA基因测序比对分析,共获得35株可培养细菌。35株菌株分布在23个科28个属,35株可培养细菌物种组成如表2所示。其中,芽孢杆菌属(*Bacillus*)占菌株总数14.3%,属于优势菌属,此结果与其他学者研究相同(韩敏敏等,2020),这表明芽孢杆菌属占红树植物微生物统治地位。Kim等(2014)认为16S rRNA基因序列相似性小于98.65%的菌株有80%为潜在新物种。对三种真红树植物可培养细菌进行新颖性分析,发现35株细菌中有11株细菌的16S rRNA基因序列相似性低于98.65%,分别为GXIMD 7462、GXIMD 7066、GXIMD 7477、GXIMD 7064、GXIMD 7063、GXIMD 7115、GXIMD 7761、GXIMD 7498、

GXIMD 7121、GXIMD 7463、GXIMD 7518,可能为潜在新物种,图1为潜在新菌与相似度最高对照菌的N-J系统进化树。11个潜在新物种隶属于9科11属,其中GXIMD 7477和GXIMD 7761分别与纤维单胞菌属的巴基斯坦纤维单胞菌(*Cellulomonas pakistanensis*)和*Marmoricola*属的*Marmoricola korecus*相似度最高,可能为稀有放线菌。说明真红树植物可培养细菌多样性丰富,可为研究生物活性物质提供良好的菌株资源。

2.2 35株细菌在不同真红树植物、植物部位及培养基中的分布

不同植物种类及不同植物生境影响其可培养细菌的丰富程度。如图2所示,从不同样品中分离得到细菌多样性依次是木榄3>红海榄>秋茄2>秋茄1>木榄2>木榄1。3株木榄均采集于防城港,但分离到的菌株种类及数量不同,可能由于植物采集时的老嫩程度及所取的植物组织部位差异所致。两株秋茄分别采样于北海海域两个采样点,采集地点不一致,分离到的细菌种属数量和物种完全不同。秋茄1(F1)分离得到的8株细菌为喜盐嗜冷菌(*Algoriphagus halophilus*)、*Aurantimonas coralicida*、特基拉芽孢杆菌(*Bacillus tequilensis*)、越南芽孢杆菌(*B. vietnamensis*)、海水纪氏菌(*Jiella aquimaris*)、*Labrenzia* sp.、植物内微球菌(*Micrococcus endophyticus*)、杀珊瑚橙色单胞菌(*Aurantimonas coralicida*),秋茄2(F2)分离获得的细菌为拉氏无色杆菌(*Achromobacter ruhlandii*)、*Asticcacaulis solisilvae*、暹罗芽孢杆菌(*Bacillus siamensis*)、枯草芽孢杆菌(*B. vanillea*)、*Fictibacillus halophilus*、*Marmoricola korecus*、*Mycobacterium conceptionense*、*Paenibacillus urinalis*、*Shinella daejeonensis*,两株秋茄植物共有细菌属为芽孢杆菌属,其余均为各自的特有属。由此可见,真红树植物生长不同阶段及植物生境差异可显著影响其可培养细菌物种多样性。

不同部位的细菌多样性不同。由图3可知:从6份植物组织茎中分离获得11株可培养细菌,隶属于9个属;4份植物组织根中分离得到的10株细菌隶属于9个属;3份泥土样品分离得到的10株细菌隶属于7个属;6份植物组织叶中分离得到的8株细菌隶属于8个属;1份植物组织花中分离得到的2株细菌隶属于2个属;2份果实中分离得到1株细菌。本研究从植物组织茎中分离得到的

表 2 35 株可培养细菌的物种组成

Table 2 Species composition of 35 strains of culturable bacteria

菌株编号 Strain code	来源 Origin	培养基 Culture medium	相近种 Similar species	相似度 Similarity (%)
GXIMD 7462	F2 根 F2 root	M10	<i>Asticcacaulis solisilvae</i>	96.88
GXIMD 7066	F1 茎 F1 stem	P3	<i>Aurantimonas coralicida</i>	98.05
GXIMD 7477	F3 叶 F3 leaf	AGG	巴基斯坦纤维单胞菌 <i>Cellulomonas pakistanensis</i>	96.72
GXIMD 7064	F1 茎 F1 stem	AGG、P3	柠檬色赤杆菌 <i>Erythrobacter citreus</i>	98.58
GXIMD 7063	F1 茎 F1stem	P3	海水纪氏菌 <i>Jiella aquimaris</i>	96.61
GXIMD 7115	F6 根 F6 root	P7	解脂科迪单胞菌 <i>Kordiimonas lipolytica</i>	94.72
GXIMD 7761	F2 叶 F2 leaf	P3	<i>Marmoricola korecus</i>	98.56
GXIMD 7498	F5 茎 F5 stem	M9	<i>Massilia oculi</i>	97.91
GXIMD 7121	F6 根 F6 root	M9、M10、M11	<i>Rhizobium helanshanense</i>	96.62
GXIMD 7463	F2 根 F2 root	P3	<i>Shinella daejeonensis</i>	96.33
GXIMD 7518	F4 叶 F4 leaf	M5	鞘氨醇单胞菌 <i>Sphingomonas panni</i>	96.66
GXIMD 7789	F4 花 F4 flower	M7	<i>Achromobacter denitrificans</i>	99.87
GXIMD 7762	F1 叶 F1 leaf	M11	拉氏无色杆菌 <i>A. ruhlandii</i>	99.87
GXIMD 7147	F1 泥土、F5 泥土 F1 soil, F5 soil	P3	喜盐噬冷菌 <i>Algoriphagus halophilus</i>	99.22
GXIMD 7146	F5 泥土 F5 soil	AGG	食环氧化物交替赤细菌 <i>Altererythrobacter epoxidivorans</i>	99.22
GXIMD 7838	F4 茎 F4 stem	M9	<i>Bacillus qingshengii</i>	99.34
GXIMD 7132	F5 泥土、F2 茎、F6 根 F5 soil, F2 stem, F6 root	P7、M7、P3	暹罗芽孢杆菌 <i>B. siamensis</i>	99.61
GXIMD 7017	F1 泥土 F1 soil	M11	特基拉芽孢杆菌 <i>B. tequilensis</i>	99.87
GXIMD 7743	F6 茎 F6 stem	M10	枯草芽孢杆菌 <i>B. vanillea</i>	99.04
GXIMD 7027	F1 泥土 F1 soil	P3	越南芽孢杆菌 <i>B. vietnamensis</i>	98.7
GXIMD 7117	F6 泥土 F6 soil	M10	大洋金色球菌 <i>Croceicoccus pelagius</i>	99.35
GXIMD 7792	F4 花、F2 泥土 F4 flower, F2 soil	M10、AGG	<i>Fictibacillus halophilus</i>	100
GXIMD 7143	F1 茎、F5 泥土 F1 stem, F5 soil	M5	<i>Labrenzia</i> sp.	100
GXIMD 7615	F6 根、F5 泥土 F6 root, F5 soil	AGG、M11、M10	白色拉布伦茨氏菌 <i>L. alba</i>	99.09
GXIMD 7120	F6 根 F6 root	M11	盐拉布伦茨氏菌 <i>L. salina</i>	99.22
GXIMD 7123	F6 根 F6 root	M9	沉积物苍黄球菌 <i>Luteococcus sediminum</i>	98.71
GXIMD 7130	F5 泥土 F5 soil	M7	微杆菌 <i>Microbacterium thalassium</i>	99.34
GXIMD 7834	F1 叶 F1 leaf	M9、P7	植物内微球菌 <i>Micrococcus endophyticus</i>	99.74
GXIMD 7442	F2 泥土 F2 soil	AGG	<i>Mycobacterium conceptionense</i>	98.97
GXIMD 7744	F6 茎 F6 stem	M11	<i>Paenibacillus urinalis</i>	99.59
GXIMD 7402	F5 叶 F5 leaf	M11	马氏副球菌 <i>Paracoccus marcusii</i>	99.74
GXIMD 7499	F5 茎、叶 F5 stem, leaf	M5、M11	恶臭假单胞菌 <i>Pseudomonas putida</i>	99.61
GXIMD 7747	F5 果 F5 fruit	M10	海雪嗜冷杆菌 <i>Psychrobacter nivimaris</i>	99.87
GXIMD 7516	F5 茎 F5 stem	M10	食吡啉红球菌 <i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	99.74
GXIMD 7116	F6 根 F6 root	M10	光滑链霉菌 <i>Streptomyces levis</i>	99.09

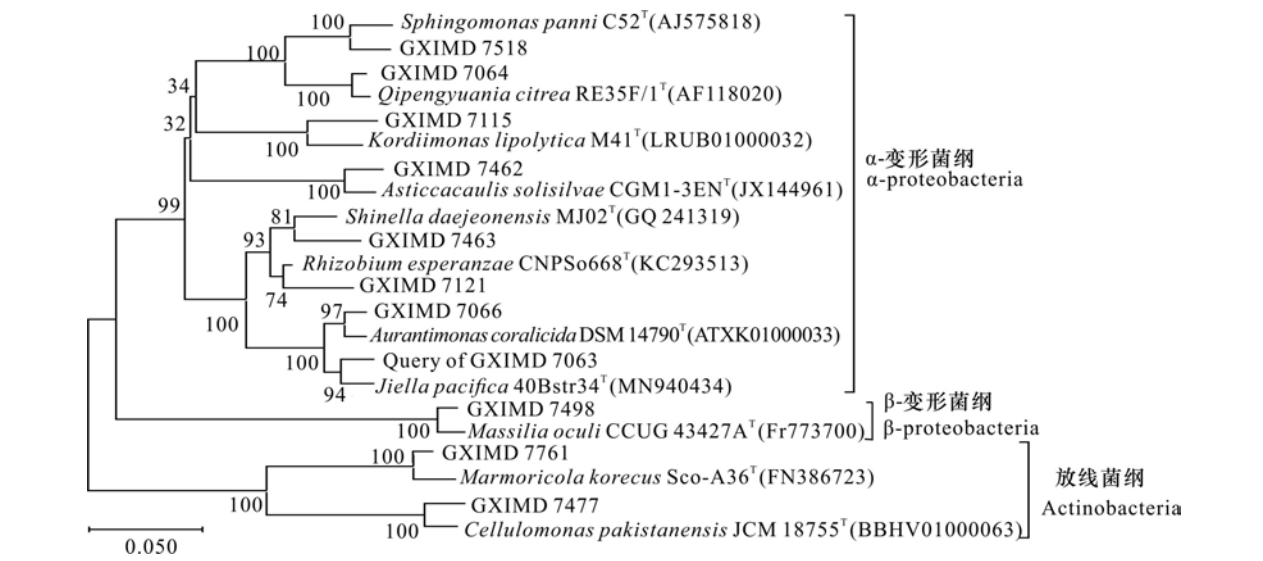


图 1 潜在新菌的 16S rRNA 基因序列 N-J 系统发育树

Fig. 1 N-J phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences of potential new bacteria

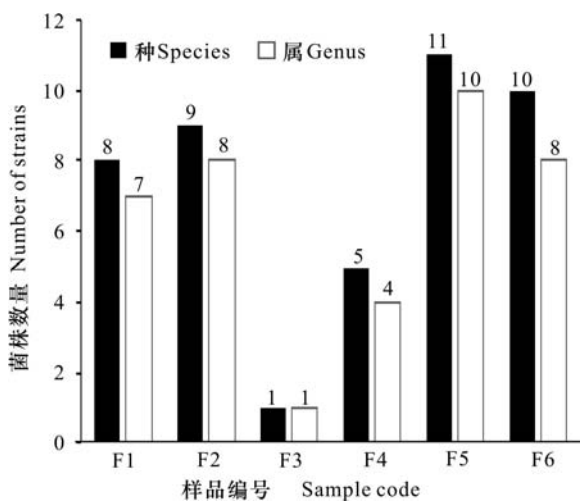


图 2 不同植物分离得到的可培养细菌分布情况

Fig. 2 Distribution of culturable bacteria isolated from different plants

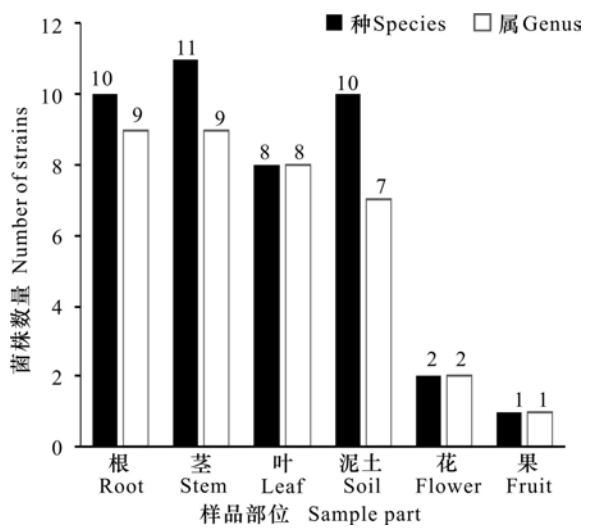


图 3 不同部位分离得到的可培养细菌分布情况

Fig. 3 Distribution of culturable bacteria isolated from different parts

细菌数量及多样性均最多,从果实中分离得到的细菌最少。

不同培养基分离得到的细菌多样性依次是 M10 > M11 = P3 > AGG > M9 > P7 > M5 > M7 (图 4)。由此可见,M10(棉籽糖-L-组氨酸培养基)和 M11(葡萄糖-酸水解酪素培养基)培养基分离获得的细菌数量和物种多样性均有较明显的优势,可能是 L-组氨酸和酸水解酪素等物质能满足

细菌生长的营养需求。此结果与其他学者的研究有所区别,李蜜等(2020)从海南西海岸红树林伴生植物分离到的放线菌中,M7 培养基得到的放线菌数量最多,而 M11 培养基分离到的放线菌最少。可能由于放线菌和细菌生长所需的必要营养成分不同,今后可选用 M7、M10 和 M11 培养基作为分离培养红树可培养细菌的主要参考培养基。

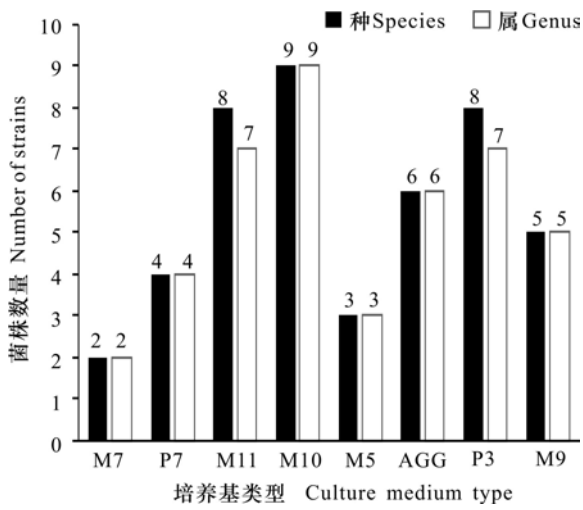


图 4 不同培养基分离得到的可培养细菌分布情况
Fig. 4 Distribution of culturable bacteria isolated from different media

表 3 4 株有抑菌活性细菌的抑菌检测结果
Table 3 Results of antibacterial test of four antibacterial active bacteria

指示菌 Indicator bacteria	活性菌株 Active strain	抑菌圈大小 Size of antibacterial circle (mm)
无乳链球菌 <i>Streptococcus agalactiae</i>	GXIMD 7027	12.1±0.263
	GXIMD 7747	12.2±0.289
	GXIMD 7518	11.3±0.252
海豚链球菌 <i>Streptococcus iniae</i>	GXIMD 7027	11.4±0.116
	GXIMD 7498	12.3±0.252
	GXIMD 7747	16.4±0.153
	GXIMD 7518	17.4±0.115
沙门氏菌 <i>Salmonella</i>	GXIMD 7498	10.2±0.058

2.3 三种真红树植物可培养细菌粗提物生物活性分析

2.3.1 可培养细菌的抑菌活性分析 无乳链球菌和海豚链球菌是人畜共患的致病菌,可给水产养殖业造成巨大损失,感染人体可导致脑膜炎等疾病,病死率较高。由于抗生素的滥用,无乳链球菌对青霉素、磺胺二甲基嘧啶和链霉素等普遍耐药,这一问题亟须解决。用滤纸片扩散法对细菌发酵粗提物,进行抑菌活性筛选,共筛选获得 4 株可培

养细菌的发酵粗提物,其中至少对一种指示菌有抑制活性,阳性率为 11.4%。如表 3 所示,菌株 GXIMD 7747、GXIMD 7027 和 GXIMD 7518 同时对无乳链球菌和海豚链球菌有抑制作用, GXIMD 7498同时对沙门氏菌和海豚链球菌有抑制作用。活性菌株 GXIMD 7498 与菌株 *Massilia oculi* 最高相似度分别为 97.91%,来源于木榄 3(F5)的茎; GXIMD 7518 与菌株鞘氨醇单胞菌 (*Sphingomonas panni*) 最高相似度为 98.31%,来源于木榄 2(F4)的叶子。这两株活性菌株可能为潜在新物种,说明新型菌株在挖掘新化合物领域具有重要的开发价值。

2.3.2 可培养细菌的酶活性分析 蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶是生物活性物质,与人类生活密切相关,在医药食品及化工业等领域具有巨大的市场潜力。通过选育酶活性的细菌,可大规模发酵制备蛋白酶、纤维素酶和淀粉酶活性物质。真红树植物可培养细菌酶活性结果如表 4 所示,共获得 16 株至少有一种酶活性的可培养细菌,阳性率为 45.7%,芽孢杆菌属对酶活性比较敏感。菌株暹罗芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、特基拉芽孢杆菌和微杆菌 (*Microbacterium thalassium*) 同时具有淀粉酶、蛋白酶和纤维素酶活性,占酶活性总菌株数的 25%。16 株酶活性菌株中,2 株同时具有蛋白酶和淀粉酶活性,占酶活性菌株的 12.5%(图 5)。1 株同时具有淀粉酶和纤维素酶活性,占酶活性菌株的 6.25%;有 2 种以上酶活性的菌株有 7 株,占酶活性菌株的 43.75%;具有纤维素酶活性的菌株最多,有 13 株,占酶活性菌株的 81.25%;具有蛋白酶和淀粉酶活性的菌株均为 7 株,占酶活性菌株 43.75%。以上结果表明真红树植物可培养细菌具有显著的酶活性,以纤维素酶活性尤为突出。后续通过优化发酵条件,可以生产酶活性物质应用于医药、食品及化工领域。

3 讨论与结论

随着陆地资源的不断开发,普通环境下筛选具有独特活性的新菌种越来越困难。因此,红树林特殊生境中的微生物资源逐渐引起研究者的关注。本研究利用 8 种不同营养成分的分离培养基对 22 份真红树植物组织及根际淤泥可培养细菌进行分离纯化,尽可能丰富未培养和难培养红树

表 4 红树植物可培养细菌酶活性结果

Table 4 Results of enzyme activities of culturable bacteria in mangrove plants

菌株编号 Strain code	相似物种 Similar species	蛋白酶 Protease	淀粉酶 Amylase	纤维素酶 Cellulase
GXIMD 7063	海水纪氏菌 <i>Jiella aquimaris</i>	-	-	+
GXIMD 7516	食吡啉红球菌 <i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	-	+	+
GXIMD 7499	恶臭假单胞菌 <i>Pseudomonas putida</i>	-	-	+
GXIMD 7123	沉积物苍黄球菌 <i>Luteococcus sediminum</i>	-	-	+
GXIMD 7743	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus vanillea</i>	+	+	+
GXIMD 7132	暹罗芽孢杆菌 <i>B. siamensis</i>	+	+	+
GXIMD 7120	盐拉布伦茨氏菌 <i>Labrenzia salina</i>	-	-	+
GXIMD 7518	鞘氨醇单胞菌 <i>Sphingomonas hankookensis</i>	-	-	+
GXIMD 7017	特基拉芽孢杆菌 <i>Bacillus tequilensis</i>	+	+	+
GXIMD 7116	光滑链霉菌 <i>Streptomyces levis</i>	-	-	+
GXIMD 7121	<i>Rhizobium helanshanense</i>	-	-	+
GXIMD 7130	微杆菌 <i>Microbacterium thalassium</i>	+	+	+
GXIMD 7442	<i>Mycobacterium conceptionense</i>	-	-	+
GXIMD 7027	越南芽孢杆菌 <i>Bacillus vietnamensis</i>	+	+	-
GXIMD 7792	<i>Fictibacillus halophilus</i>	+	+	-
GXIMD7143	<i>Labrenzia</i> sp.	+	-	-

注: +表示阳性; -表示阴性。
Note: + means positive; - means negative.

微生物资源,共获得 35 株菌株,分布在 23 个科 28 个属。两株秋茄分别采样于北海海域两个采样点,分离到的细菌种属数量和物种完全不同。原因是红树林特殊的环境迫使细菌与红树植物共生,地点不同,红树林生境会有所差别,因此不同地点的同一种红树植物可培养细菌具有地点特异性。本研究中从植物组织茎中分离得到的细菌数量及多样性均最多,从果实中分离得到的细菌最少,此结果与魏玉珍等(2010)、李家怡等(2017)

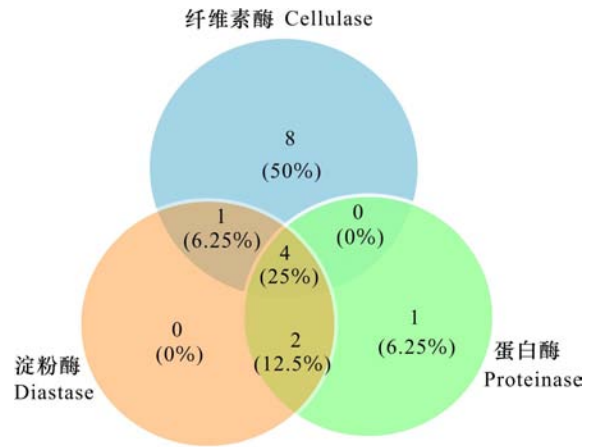


图 5 酶活性结果分析维恩图

Fig. 5 Venn diagram of enzyme activity result analysis

及李蜜等(2020)研究结果有所差别,可能是由于样品采集地点和季节影响不同植物组织细菌的多样性(解修超,2007),也可能与选取的植物组织数量差异及样品处理方式有关。针对广西沿海同一种真红树植物组织对其可培养细菌的分布及生物学特征是否有特异性影响,还需进一步探索。就物种新颖性分析,分离获得 11 株细菌 16S rRNA 基因序列相似性低于 98.65%的潜在新菌种,分布于秋茄的根和茎、木榄的叶以及红海榄的根部位,分别在 M7、P7、M11、M10、M5、AGG、P3、M9 培养基上培养出来,其中有 5 株从寡营养的燕麦粉琼脂培养基 P3 上培养获得,说明红树林特殊生境中,共生较多寡营养细菌,P3 培养基可以作为发现真红树植物潜在新菌的主要参考培养基。后续对潜在新菌进行多项分类鉴定,可为挖掘新的活性化合物提供菌源。

菌株 GXIMD 7477、GXIMD 7027 和 GXIMD 7518 发酵粗提物同时对无乳链球菌和海豚链球菌有抑制作用,GXIMD 7518 同时具有抑菌和酶活性,这说明细菌的代谢产物中可能同时存在具有多种活性化合物,也可能是一种化合物有多种活性,后续可以进一步探究。活性菌株 GXIMD 7498 与菌株 *Massilia oculi* 最高相似度为 97.91%,从木榄 3 (F5) 茎组织的 M9 培养基中分离得到,抑菌活性菌株 GXIMD 7518 与菌株鞘氨醇单胞菌 (*Sphingomonas panni*) 最高相似度为 98.31%,从木榄 2 (F4) 叶组织的 M5 培养基中分离到,这两株活

性菌株可能为潜在新物种。说明针对细菌生长所必需养分,通过设计多种不同成分的培养基分离纯化不同样品的可培养细菌,更容易分离得到未培养的潜在活性新菌种。前人研究发现,酶活性菌株 GXIMD 7132 暹罗芽孢杆菌能产生促进植物生长的吡啶乙酸(Suliasih & Widawati, 2020),可用作消毒剂,对抗浮游细菌和生物膜驻留细菌(Awan et al., 2020)。由此可见,本研究分离得到的活性菌株有开发成药物和生物技术产品的潜力。广西真红树植物可培养细菌的物种多样性丰富,后续通过优化活性菌株发酵条件,运用化学分离方法,分离粗提取物中类抗生素和酶活性物质,可为研究新型抗生素及开发水产养殖药物提供新的药效基础物质,在食品、医药以及化工业等方面有一定开发潜能。

参考文献:

AWAN SA, KHAN I, RAZA MA, et al., 2020. *Bacillus siamensis* reduces cadmium accumulation and improves growth and antioxidant defense system in two wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties [J]. *Plants*, 9(7): 1–14.

GONG B, CHEN S, LAN WW, et al., 2018. Antibacterial and antitumor potential of actinomycetes isolated from mangrove soil in the maowei sea of the southern coast of China [J]. *Iran J Pharm Res*, 17(4): 1339–1346.

HAN MM, LI M, GAO CH, et al., 2020. Study on bacterial diversity and biological activity of rhizosphere soil of four true mangrove plants on the west coast of Hainan [J]. *J S Agric*, 51(2): 327–334. [韩敏敏, 李蜜, 高程海, 等, 2020. 海南西海岸 4 种真红树植物根际土壤细菌多样性及其生物活性研究 [J]. *南方农业学报*, 51(2): 327–334.]

HUANG DL, DAI ZK, MO G, et al., 2013. Screening and antibacterial activity of actinomycetes from mangrove soil in Beibu Gulf of Guangxi [J]. *Lishizhen Med Mat Med Res*, 24(4): 857–859. [黄大林, 戴支凯, 莫刚, 等, 2013. 广西北部湾红树林土壤放线菌的筛选和抗菌活性研究 [J]. *时珍国医国药*, 24(4): 857–859.]

JIANG S, LI M, HOU SS, et al., 2020. Diversity of endophytic actinomycetes and preliminary screening of their anti-aging activity in mangrove on the west coast of Hainan [J]. *Guihaia*, 40(3): 327–334. [姜舒, 李蜜, 侯师师, 等, 2020. 海南西海岸真红树内生放线菌多样性及其延缓衰老活性初筛 [J]. *广西植物*, 40(3): 327–334.]

JIANG YJ, JI YY, LI JQ, et al., 2020. A new compound from the marine-derived *Streptomyces* sp. SS13M [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 22(7): 701–706.

JIANG ZK, TUO L, HUANG DL, et al., 2018. Diversity, novelty, and antimicrobial activity of endophytic actinobacteria from mangrove plants in Beilun Bstuary National Nature Reserve of Guangxi, China [J]. *Front Microbiol*, 9(4): 868–879.

KIM KH, ROH SW, CHANG HW, et al., 2009. *Nitratedreductor basaltis* sp. nov., isolated from black beach sand [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 59(1): 135–138.

KIM M, OH HS, PARK SC, et al., 2014. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 64(2): 346–351.

LI F, GAO CH, ZHU LB, et al., 2016. Diversity and cytotoxicity of endophytic bacteria from *Sonneratia apetala* in Maowei Sea [J]. *Microbiol Chin*, 56(4): 689–697. [李菲, 高程海, 竺利波, 等, 2016. 茅尾海无瓣海桑内生细菌多样性及其细胞毒活性 [J]. *微生物学报*, 56(4): 689–697.]

LI F, GAO CH, YU L, et al., 2018. Study on diversity and antibacterial activity of endophytic and rhizospheric bacteria in *Spiraea manshurica* [J]. *Guihaia*, 38(7): 924–933. [李菲, 高程海, 余炼, 等, 2018. 川蔓藻内生及根际细菌多样性与抗菌活性研究 [J]. *广西植物*, 38(7): 924–933.]

LI M, GAO CH, JIANG S, et al., 2020. Diversity and anti-aging activity of endophytic bacteria in mangrove on the west coast of Hainan [J]. *Guihaia*, 40(3): 311–319. [李蜜, 高程海, 姜舒, 等, 2020. 海南西海岸真红树内生细菌多样性及其延缓衰老活性研究 [J]. *广西植物*, 40(3): 311–319.]

LI M, HOU SS, YIN JL, et al., 2020. Species diversity and nematicidal activity of endophytic bacteria in mangrove in Xuwen sea area of Beibu Gulf [J]. *Guihaia*, 40(3): 301–310. [李蜜, 侯师师, 银江林, 等, 2020. 北部湾徐闻海域红树内生细菌物种多样性及其杀线虫活性研究 [J]. *广西植物*, 40(3): 301–310.]

LIAO BW, ZHANG QM, 2014. Distribution, area and tree species composition of mangrove in China [J]. *Wetland Sci*, 12(4): 436–440. [廖宝文, 张乔民, 2014. 中国红树林的分布、面积和树种组成 [J]. *湿地科学*, 12(4): 436–440.]

LIU DH, ZHANG XW, ZHANG C, 2019. Antibiotic abuse and superbugs [J]. *World Not Ant*, 40(1): 1–4. [刘丹华, 张晓伟, 张翀, 2019. 抗生素滥用与超级细菌 [J]. *国外医药抗生素分册*, 40(1): 1–4.]

MA J, WANG YR, HOU P, et al., 2016. Identification of a cellulase-producing *Bacillus* from mangrove rhizosphere soil and analysis of its enzymatic properties [J]. *Oceanol et Limnol Sin*, 47(5): 997–1004. [马军, 王耀嵘, 侯萍, 等, 2016. 一株源于红树林根际土壤产纤维素酶芽孢杆菌的鉴定及其酶学性质分析 [J]. *海洋与湖沼*, 47(5): 997–1004.]

- NTABO RM, NYAMACHE AK, LWANDE W, et al., 2018. Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates from selected mangrove plants in Kenya [J]. *Microbiol Open*, 12(1): 354–363.
- SHI SB, YANG LF, JIANG MG, et al., 2018. Comparison of actinomycetes isolation media in Maowei Hai mangrove habitat in Beibu Gulf, Guangxi [J]. *Microbiol Chin*, 45(11): 2331–2340. [石松标, 杨立芳, 姜明国, 等, 2018. 广西北部湾茅尾海红树林生境放线菌分离培养基的比较 [J]. *微生物学通报*, 45(11): 2331–2340.]
- SULIASIH S, WIDAWATI S, 2020. Isolation of indole acetic acid (IAA) producing *Bacillus siamensis* from peat and optimization of the culture conditions for maximum IAA production [J]. *IOP Conf Ser: Earth Environ Sci*, 572(1): 1–11.
- WALSH PS, METZGER DA, HIGUSHI R, 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material [J]. *Biol Technol*, 10(4): 506–513.
- WANG C, WANG K, JIANG MG, et al., 2019. Isolation and screening of actinomycetes from Guangxi Beibu Gulf and identification of their active products [J]. *Nat Prod Res Dev*, 31(7): 1170–1176. [王聪, 王坤, 姜明国, 等, 2019. 广西北部湾放线菌的分离筛选及活性产物的鉴定 [J]. *天然产物研究与开发*, 31(7): 1170–1176.]
- WANG X, WU WH, CHEN ZH, et al., 2010. Research progress on structural characteristics and biological activities of marine microbial secondary metabolites [J]. *Chin J Nat Med*, 8(4): 309–320. [王幸, 吴文惠, 陈志华, 等, 2010. 海洋微生物次生代谢产物的结构特征和生物活性的研究进展 [J]. *中国天然药物*, 8(4): 309–320.]
- WEI YZ, ZHANG YQ, ZHAO LL, et al., 2010. Isolation, screening and preliminary identification of endophytic actinomycetes from mangrove forest in Shankou, Guangxi [J]. *Microbiol Chin*, 37(6): 823–828. [魏玉珍, 张玉琴, 赵莉莉, 等, 2010. 广西山口红树林内生放线菌的分离、筛选及初步鉴定 [J]. *微生物学通报*, 37(6): 823–828.]
- WU JF, WU ST, LI ZM, et al., 2017. Diversity of culturable actinomycetes in mangrove soil of Maowei Hai and its activity against *Fusarium oxysporum* [J]. *Chin J Antibiot*, 42(4): 294–301. [吴家法, 吴思婷, 李智鸣, 等, 2017. 茅尾海红树林土壤可培养放线菌多样性及其抗尖孢镰刀菌活性分析 [J]. *中国抗生素杂志*, 42(4): 294–301.]
- XIE XC, 2017. Isolation and identification of endophytic actinomycetes from mangrove plants and isolation and identification of active metabolites from two marine *Streptomyces* strains [D]. Haikou: Hainan University. [解修超, 2007. 红树植物内生放线菌的分离鉴定和 2 株海洋链霉菌活性代谢产物的分离鉴定 [D]. 海口: 海南大学.]
- YANG GL, YANG LF, JIANG MG, et al., 2015. Isolation, identification and activity of endophytic actinomycetes from mangrove forest in Beilun River [J]. *Chin J Agric Biotechnol*, 23(7): 894–904. [杨桂柳, 杨立芳, 姜明国, 等, 2015. 北仑河红树林内生放线菌分离、鉴定及活性研究 [J]. *农业生物技术学报*, 23(7): 894–904.]
- YANG GL, 2015. Isolation, identification and activity screening of endophytic actinomycetes from Guangxi mangrove plants [D]. Nanning: Guangxi University for Nationalities. [杨桂柳, 2015. 广西红树植物内生放线菌分离、鉴定及活性筛选 [D]. 南宁: 广西民族大学.]
- ZENG ZH, TANG QL, 2019. Isolation and identification of marine microorganisms and evaluation of their antibacterial and antitumor activities [J]. *World Latest Med Inf*, 19(24): 109–110. [曾臻, 谭强来, 2019. 海洋源微生物的分离、鉴定及抗菌与抗肿瘤活性评价 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 19(24): 109–110.]
- ZHAO YH, ZHANG SL, WU JF, et al., 2018. Diversity and activity screening of culturable bacteria in rhizosphere soil of mangrove in Shankou [J]. *Acta Oceanol Sin*, 40(8): 138–151. [赵雅慧, 张舒琳, 吴家法, 等, 2018. 山口红树林根际土壤可培养细菌多样性及其活性筛选 [J]. *海洋学报*, 40(8): 138–151.]
- ZHENG HY, WU Y, HUANG DL, et al., 2019. Diversity and antibacterial activity of actinomycetes in mud around mangrove roots in Maowei Hai, Guangxi [J]. *J Chin Antibiot*, 44(9): 1020–1028. [郑红芸, 吴越, 黄大林, 等, 2019. 广西茅尾海红树林根围淤泥放线菌多样性及抗菌活性 [J]. *中国抗生素杂志*, 44(9): 1020–1028.]
- ZHOU SQ, HUANG XL, HUANG DY, et al., 2010. Rapid extraction of actinomycete DNA by Chelex-100 as PCR amplification template [J]. *Biotechnol Bull*, 26(2): 123–125. [周双清, 黄小龙, 黄东益, 等, 2010. Chelex-100 快速提取放线菌 DNA 作为 PCR 扩增模板 [J]. *生物技术通报*, 26(2): 123–125.]

(责任编辑 周翠鸣)

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202009044

王玉, 郝清玉. 木麻黄原生境种子萌发及幼苗存活的影响因素分析 [J]. 广西植物, 2022, 42(8): 1304–1314.

WANG Y, HAO QY. Impact factors on seed germination and seedling survival in *Casuarina equisetifolia* natural habitat [J].

Guihaia, 2022, 42(8): 1304–1314.



木麻黄原生境种子萌发及幼苗存活的影响因素分析

王 玉, 郝清玉*

(热带岛屿生态学教育部重点实验室, 海南省热带动植物生态学重点实验室, 海南师范大学 生命科学院, 海口 571158)

摘 要: 木麻黄无法天然更新已严重影响了海南岛木麻黄海防林发挥其永续的防护效能。该文以海口木麻黄海防林为原生境试验基地, 采用 5 因素 2 水平的因子试验设计方法, 共设计 36 个处理组合, 探究木麻黄种子萌发及幼苗存活的影响因素及障碍因子。结果表明: (1) 木麻黄种子发芽率最高的处理组合为林窗-不浇水-沙土-保水-盖土(GJ0SBM), 发芽率为 37.33%, 显著高于其他处理组合($P<0.05$); 平均株最高的处理组合为林窗-浇水-红土-不保水-不盖土(GJRB0M0), 平均株高为 6.43 cm/53 d, 显著高于其他处理组合($P<0.05$); 存活率最高的组合为林窗-浇水-沙土-保水-盖土(GJSBM), 存活率为 79.00%/73 d, 显著高于其他处理组合($P<0.05$)。 (2) 林分光照条件和盖土方式是木麻黄种子发芽率及发芽势的影响因素, 保水方式对种子发芽速度有显著影响。 (3) 林分光照条件是影响木麻黄幼苗株高的影响因素。 (4) 浇水方式是影响木麻黄幼苗存活率的主要影响因素。综上所述, 木麻黄自身无法天然更新的障碍机制不在于种子萌发, 而是因为木麻黄幼苗在海南旱季因缺乏必要的水分而无法存活, 从而导致其自身无法天然更新。

关键词: 木麻黄海防林, 原生境试验, 种子萌发, 幼苗存活, 海南岛

中图分类号: Q945 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2022)08-1304-11

Impact factors on seed germination and seedling survival in *Casuarina equisetifolia* natural habitat

WANG Yu, HAO Qingyu*

(Ministry of Education Key Laboratory for Ecology of Tropical Islands, Key Laboratory of Tropical Animal and Plant Ecology of Hainan Province, College of Life Sciences, Hainan Normal University, Haikou 571158, China)

Abstract: The sustainable protective efficiency of *Casuarina equisetifolia* coastal protection forest (CCPF) in Hainan Island has been seriously affected as *C. equisetifolia* itself can not regenerate naturally. In this paper, Haikou CC PF was taken as the test area of the natural habitat, and a total of 36 treatment combinations were designed by using 5-factor 2-level factor test method to explore the impact factors and barrier factors of *C. equisetifolia* seed germination and seedling survival. The results were as follows: (1) The treatment combination with the highest seed germination rate of *C.*

收稿日期: 2021-01-26

基金项目: 国家自然科学基金(31760202) [Supported by National Natural Science Foundation of China (31760202)]。

第一作者: 王玉 (1994-), 硕士研究生, 研究方向为植物生态学, (E-mail) wangyu6369@163.com。

*通信作者: 郝清玉, 博士, 教授, 研究方向为恢复生态学, (E-mail) hnhaoqy@126.com。

equisetifolia was canopy gap-not watering-sandy soil-water retention-covering soil (GJSBM), with 37.33% of the germination rate, which was significantly higher than those of other treatment combinations ($P<0.05$). The treatment combination with the highest average plant height was canopy gap-watering-red soil-no water retention-not covering soil (GJRB0M0), with the plant height of 6.43 cm in 53 d, which was significantly higher than those of other treatment combinations ($P<0.05$). The treatment combination with the highest survival rate was canopy gap-watering-sandy soil-water retention-covering soil (GJSBM), with 79.00% of the survival rate for 73 d, which was significantly higher than those of other treatment combinations ($P<0.05$). (2) Stand light conditions and covering soil patterns were the impact factors for seed germination rate and germination potential of *C. equisetifolia*, while water retention patterns had significant effects on seed germination speed. (3) Stand light conditions were the impact factors for *C. equisetifolia* seedling plant height. (4) Watering treatment was the main factor affecting the survival rate of *C. equisetifolia* seedlings. In summary, the barrier mechanism of *C. equisetifolia* natural regeneration unable to survive in Hainan dry season is not for the seed germination, but for the lack of necessary water, resulting in the failure of *C. equisetifolia* itself natural regeneration.

Key words: *Casuarina equisetifolia* coastal protection forest (CCPF), natural habitat test, seed germination, seedling survival, Hainan Island

木麻黄(*Casuarina equisetifolia*)是海南岛人工防护林的建群树种,在1 823 km的海岸线中,由木麻黄为主构建的沿海防护林带长约1 450 km,面积达5.6万 hm^2 (刘强和张亚辉,2002),木麻黄海防林当之无愧成为海南岛防风固沙及生态安全的天然屏障。木麻黄生长迅速(张勇等,2017),抗风力强,耐土壤贫瘠,不惧沙埋,具有相当好的地域适应性及抗风沙能力,已成为我国南方滨海防风固沙的优良先锋树种(Chen et al., 2018)。然而,木麻黄作为外来树种也存在一些生态风险及天然更新质量不佳等问题。例如:林下积累较厚的凋落物层,不易分解,易引起森林火灾等(郝清玉等,2020);木麻黄自身未见有天然更新,局部其他树种天然更新良好的比例较低,仅为15.1%(杨彬等,2020b)。

天然更新是林木通过自身繁殖能力形成新一代幼林的过程,包括植物开花和结实、种子扩散和萌发、幼苗建成和生长等过程(Harper, 1977),其中种子萌发和幼苗建成是植物生活史最为关键和脆弱的系列过程(Nathan & Muller-Landau, 2000)。天然更新是森林近自然经营的重要原则,也是森林可持续经营的有效途径(唐继新等,2020)。木麻黄是外来植物,人工种子育苗和无性繁殖技术都比较成熟,但在海南岛无法实现天然更新,因此迫切需要揭示木麻黄海防林无法实现天然更新的障碍机制,以便更好发挥其永续的防护效能。森林自然更新过程极为复杂,树种成功天然更新(种子繁殖)必须同时满足三个条件:(1)种源数量充

足,质量良好;(2)适宜种子萌发的微生境(彭闪江等,2004);(3)幼苗和幼树成功存活的生态条件(王玉等,2020)。研究表明,木麻黄种子雨雨量充足($712.60\sim 1\,765\text{ grain}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{a}^{-1}$),散播时间较长(9 M),新鲜种子质量良好,发芽率为58.43%,因此条件(1)种源不是木麻黄天然更新的限制因子(杨彬等,2019;Yang et al., 2020)。为了进一步探究条件(2)微生境条件是否存在限制种子萌发的可能性,在实验室进行了种子萌发限制生态因子的实验,结果表明:pH、盐度、温度对木麻黄种子发芽率均无显著影响,但PEG溶液浓度及浇水频率对木麻黄种子发芽率具有显著影响,表明水分是影响种子萌发的重要因素之一(王玉等,2020)。光照时间、光照强度和光质均对木麻黄种子萌发也有影响(管康林,1984)。杨彬等(2020a)研究表明,气候因子、木麻黄林分密度和木麻黄凋落物积累量是影响木麻黄海防林林下植物(幼苗、幼树)天然更新的主要因素。木麻黄含有多种化感物质,对不同植物种子萌发及幼苗的生长具有抑制和促进双重作用。例如:木麻黄水浸液对青皮(*Vatica mangachapoi*)种子的萌发具有抑制作用(王春晴等,2012),对木麻黄自身种子则无抑制作用(王玉等,2020);木麻黄水浸液对潺槁(*Litsea glutinosa*)苗的生长有促进作用(陈旭阳等,2013),但小枝提取物则显著抑制木麻黄幼苗的生长(邓兰桂等,1996)。这些研究结果表明,木麻黄化感对自身天然更新的抑制作用有限,尽管会影响到

木麻黄幼苗的生长,但并非是制约木麻黄自身无法天然更新的障碍因子。综上所述,光照和水分是影响木麻黄种子萌发的主要影响因素。

上述关于木麻黄种子萌发的研究均在实验室条件下进行,然而在木麻黄原生境条件下,木麻黄种子是否能够顺利萌发?幼苗是否能够存活?还未见报道。本文以木麻黄原生境为试验基地,采用因子试验设计方法,分为容器和林地对照试验组,研究光照、盖土、保水、浇水、基质处理对种子萌发及幼苗生长的影响,分析木麻黄种子萌发和幼苗存活的最佳生态条件和影响因素,从而进一步揭示木麻黄自身无法天然更新的障碍机制,为木麻黄海防林的永续经营及人工林向“近自然林”方向转化提供理论基础和技术支持。

1 研究区概况与研究方法

1.1 研究区概况

研究区域位于海南省海口市后尾村附近的木麻黄沿海防护林,110°26′30.71″ E、20°02′36.73″ N,属于热带季风气候。全年日照时间长,辐射能量大,年平均日照时数为2 000 h以上,太阳辐射量可达460 548~50 241.6 J·cm⁻²·a⁻¹。年平均气温为24.3℃,最高平均气温为28℃左右,最低平均气温为18℃左右。年平均降水量为2 067 mm,年平均蒸发量为1 834 mm,常年风向以东南风和东北风为主,年平均风速为3.4 m·s⁻¹。试验期间,平均温度为25.3~19.0℃,极端最高温度为34.5~31.2℃,平均月降水量为224.4~34.9 mm,降水天数为12.5~7.3 d,平均风速为2.5~2.4 m·s⁻¹(海口历史天气预报查询,2019)。试验初期为雨季,降雨量较多,试验后期为旱季,降雨量则较少。土壤为滨海沙土,贫瘠,pH值为6.1。土壤养分含量:氨态氮为16.559 mg·kg⁻¹,有效磷为11.606 mg·kg⁻¹,速效钾为10.742 mg·kg⁻¹。木麻黄林分密度为1 750.00 plant·hm⁻²,平均胸径为7.27 cm,平均树高为9.33 m,凋落物厚度为6.00 cm,郁闭度为0.80,光照度为11 524 lx。

1.2 试验设计及研究方法

为探究木麻黄原生境种子萌发及幼苗存活的最佳生态条件及影响因素,本试验采用因子试验设计方法,选择对木麻黄种子萌发具有潜在影响的光照、浇水、保水、基质和盖土作为处理因素,其

中保水、基质和盖土处理是影响种子微生境土壤水分的间接因素。本试验采用容器和林地2个试验组,其中林地(沙地)为对照组,模拟种子的自然萌发及幼苗生长情况,容器组为试验处理组。容器组指种子萌发试验是在木麻黄原生境林地上设置的容器内进行的,而林地对照组试验是指木麻黄种子直接撒播到林地上。试验容器为高18 cm,口径为9 cm的塑料杯。杯内基质的深度约为12 cm。容器组设计为5因素2水平。(1)光照条件:林窗中和林冠下,其中林窗中的处理组合完全暴露在强光下,林窗直径约8 m,林冠下的处理组合则处于木麻黄林冠的底荫条件下。(2)种子盖土处理:盖土和不盖土,其中盖土厚度为0.3~0.5 cm。(3)保水处理:保水和不保水,其中试验容器底部扎孔为不保水处理,不扎孔则为保水处理。保水性从小到大依次为林地(滨海沙土)、容器不保水和容器保水。(4)浇水处理:浇水和不浇水,其中不浇水处理完全依靠自然降雨,试验过程不进行任何浇水;浇水处理除了自然降雨外,还定期补充水分,试验初期每3天前往木麻黄原生境试验地一次,发现基质干燥则补充水分,补水量以基质浇透为准。(5)基质:沙土和红土,其中沙土与沙地土相同,保水性红土好于沙土。林地对照组不进行任何浇水和保水处理,设计为2因素2水平,分别为光照条件和种子盖土处理,2个水平同上,其中基质为沙地,因此在浇水和保水处理分析中,林地处理组分别属于沙地不浇水和沙地不保水。容器组为2⁵=32个处理组合,林地组为2²=4个处理组合,2个试验组共计36个处理组合,试验处理组合详见表1。每处理组合设置3个重复,每重复播散50粒种子。供试种子于2019年10月初采自海口后尾村附近的木麻黄海防林。

另外,为了避免雨量过大,将试验容器内的种子冲走,在容器上壁距离杯口2 cm处扎漏水小孔,用于排除容器内过量的雨水。2个试验组上方安置白色塑料网,以防止林内种子雨散播到试验组影响试验结果。

1.3 数据收集、处理与分析

种子萌发及幼苗生长试验开始于2019年10月13日,至2019年12月25日结束,共计73 d,一般每3天记录一次种子萌发或幼苗存活数量,但试验末期,间隔期长达20 d,以分析较长时间不进行人工浇水干预对幼苗存活率的影响。

表 1 种子萌发试验处理因素及试验组合

Table 1 Treatment factors and test combinations for the seed germination test

处理 编号 Treatment code	处理组合 Treatment combination	光照 Light		浇水 Watering		基质 Matrix			保水 Water retention		盖土 Covering soil		备注 Note
		林窗 G	林冠 C	浇水 J	不浇水 J0	沙土 S	红土 R	沙地 D	保水 B	不保水 B0	盖土 M	不盖土 M0	
1	GJSBM	✓		✓		✓			✓		✓		容器组 Container group
2	GJSBM0	✓		✓		✓			✓			✓	
3	GJSB0M	✓		✓		✓				✓	✓		
4	GJSB0M0	✓		✓		✓				✓		✓	
5	GJRBM	✓		✓			✓		✓		✓		
6	GJRBM0	✓		✓			✓		✓			✓	
7	GJRB0M	✓		✓			✓			✓	✓		
8	GJRB0M0	✓		✓			✓			✓		✓	
9	GJOSBM	✓			✓	✓			✓		✓		
10	GJOSBM0	✓			✓	✓			✓			✓	
11	GJOSB0M	✓			✓	✓				✓	✓		
12	GJOSB0M0	✓			✓	✓				✓		✓	
13	GJORBM	✓			✓		✓		✓		✓		
14	GJORBM0	✓			✓		✓		✓			✓	
15	GJORB0M	✓			✓		✓			✓	✓		
16	GJORB0M0	✓			✓		✓			✓		✓	
17	CJSBM		✓	✓		✓			✓		✓		林地组 Forest land group
18	CJSBM0		✓	✓		✓			✓			✓	
19	CJSB0M		✓	✓		✓				✓	✓		
20	CJSB0M0		✓	✓		✓				✓		✓	
21	CJRBM		✓	✓			✓		✓		✓		
22	CJRBM0		✓	✓			✓		✓			✓	
23	CJRB0M		✓	✓			✓			✓	✓		
24	CJRB0M0		✓	✓			✓			✓		✓	
25	CJOSBM		✓		✓	✓			✓		✓		
26	CJOSBM0		✓		✓	✓			✓			✓	
27	CJOSB0M		✓		✓	✓				✓	✓		
28	CJOSB0M0		✓		✓	✓				✓		✓	
29	CJORBM		✓		✓		✓		✓		✓		
30	CJORBM0		✓		✓		✓		✓			✓	
31	CJORB0M		✓		✓		✓			✓	✓		
32	CJORB0M0		✓		✓		✓			✓		✓	
33	GJ0DB0M	✓			✓			✓		✓	✓		林地组 Forest land group
34	GJ0DB0M0	✓			✓			✓		✓		✓	
35	CJ0DB0M		✓		✓			✓		✓	✓		
36	CJ0DB0M0		✓		✓			✓		✓		✓	

注：G. 林窗；C. 林冠；J. 浇水；J0. 不浇水；S. 沙土；R. 红土；D. 沙地；B. 保水；B0. 不保水；M. 盖土；M0. 不盖土。下同。

Note: G. Canopy gap; C. Crown canopy; J. Watering; J0. Not watering; S. Sandy soil; R. Red soil; D. Sand; B. Water retention; B0. Not water retention; M. Covering soil; M0. Not covering soil. The same below.

发芽率 $G_R(\%) = N_1/N \times 100$, 其中 N_1 为供试种子发芽粒数, N 为供试种子总粒数。发芽速度 $G_V = \sum(D \times n) / \sum n(d)$, 其中 G_V 为平均发芽速度, 即种子发芽所需要的平均时间, D 为从种子种植算起的天数, n 为相应各日正常发芽粒数。发芽势 $G_p(\%) = N_m/N \times 100$, 其中 N_m 为种子发芽达到最高

峰时种子发芽粒数。相对发芽率 $G_r(\%) = N_t/N_1 \times 100$, 其中 N_t 为 t 时刻种子发芽粒数。幼苗存活率与相对发芽率公式相同, N_1 含义也相同, 但 N_t 为 t 时刻幼苗存活的数量。

差异性检验均使用 GIM 单变量方差分析 (Duncan 多重比较)。上述统计过程均在 Excel 2019 和 SPSS 17.0 软件中完成。

2 结果与分析

2.1 木麻黄原生境种子萌发的影响因素

由图 1 可知, 36 个处理组合中, 发芽率从低到高变化明显, 其中发芽率最高组合 (GJOSBM) 比最低组合 (CJRB0M) 高 5 471.64%。根据方差分析结果, 36 个处理组合可分为 3 组, 即与发芽率最低组合无显著差异组 (15 个处理组合)、与发芽率最高组合无显著差异组 (17 个处理组合) 和与发芽率最低、最高组合均有显著差异组 (4 个处理组合)。其中, 在这 15 个发芽率较低的处理组合中, 林冠占 88.00%, 不浇水占 73.33%, 沙地占 26.67% (林地对照组全部), 沙土和红土各占 40.00% 和 33.33%, 不保水占 60.00%, 不盖土占 73.33%。在 17 个发芽率较高的处理组合中, 林窗占 82.35%, 浇水、沙土、保水处理分别占 52.94%, 盖土占 64.71%。

由图 2 至图 4 可知, 在各种处理中, 沙地均显著低于容器的种子发芽率和发芽势, 但发芽速度沙地则更快。此外, 林地种子平均发芽率很低, 仅为 2.83%, 显著低于容器不浇水种子平均发芽率 (20.79%) ($P < 0.01$)。在容器试验组中, 光照条件和盖土方式是影响种子发芽率和发芽势的 2 个因素, 保水方式则影响发芽速度, 其中发芽率和发芽势为林窗中显著高于林冠下, 盖土显著高于不盖土。在发芽速度方面, 仅不同保水方式存在显著差异, 其中保水方式显著慢于不保水方式。

2.2 木麻黄原生境幼苗生长的影响因素

由表 2 可知, 试验历经 53 d 后, 36 个处理组合中, 幼苗仍存活的处理组合仅剩 15 个, 存活的处理组合数仅为 41.67%。在存活的 15 个处理组合中, 平均株高最高的处理组合 (GJRB0M0) 显著高于平均株高最小的处理组合 (CJ0RBM), 两者相差 2.88 倍。其中, 在与平均株高最高的处理组合无显著差异的 5 个处理组合中, 浇水处理占 100%,

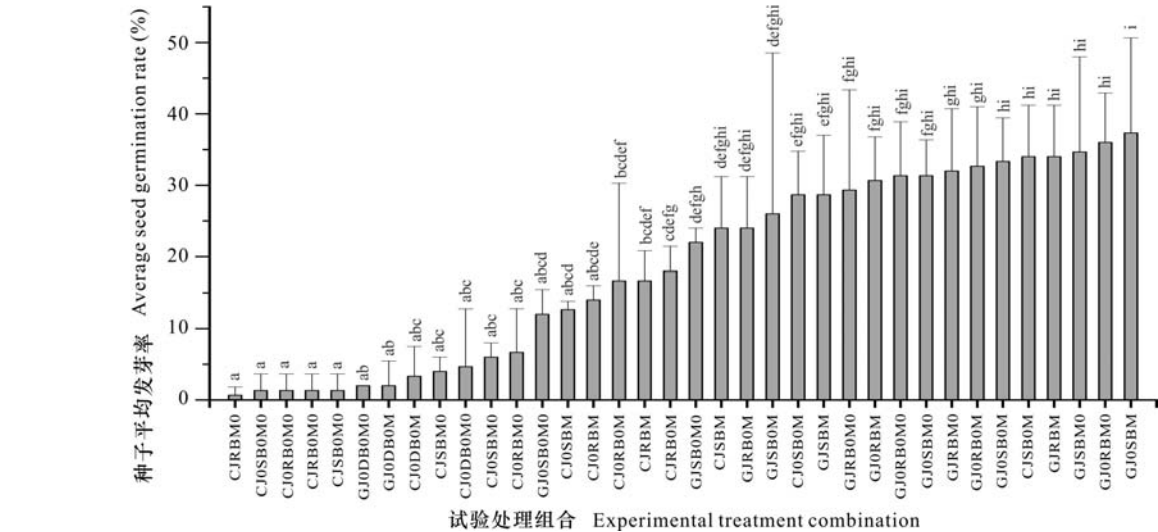
红土基质和林窗条件各占 80%。在不同的处理组合中, 存活株数也存在差异显著, 其中在与存活株数最多的组合 (GJSBM) 无显著差异的 5 个处理组合中, 林窗和浇水处理各占 100%, 红土基质和不保水处理各占 60%, 盖土处理占 80%。

方差分析结果表明, 在 5 个处理因素中, 仅光照条件和保水处理是影响幼苗株高的 2 个因素, 其中平均株高为林窗中显著高于林冠下, 不保水处理显著高于保水处理 (图 5)。

2.3 幼苗存活率的影响因素

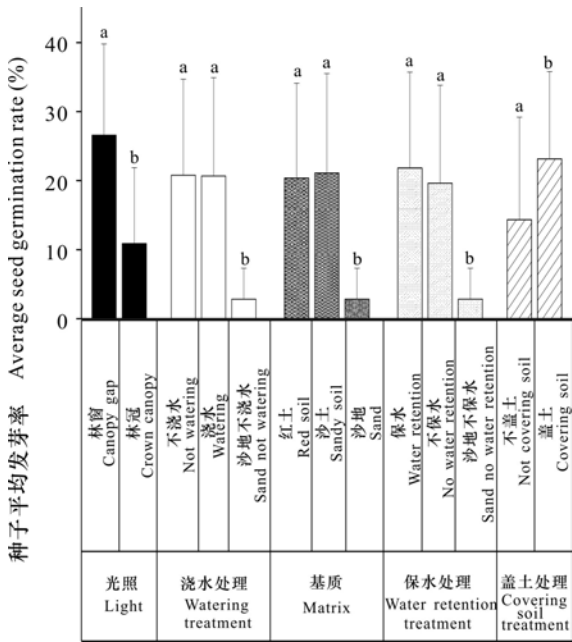
2.3.1 幼苗存活率最佳组合 截止到试验末期, 36 个处理组合中, 仅剩 8 个组合的木麻黄幼苗保持存活, 平均存活率为 39.79%, 其中存活率最低的组合为林窗-浇水-沙土-不保水-盖土 (GJSB0M), 存活率仅为 9.33%, 存活率最高的组合为林窗-浇水-沙土-保水-盖土 (GJSBM), 存活率为 79.00%, 两者相差 8.47 倍 (图 6)。在这 8 条存活率曲线中, 存活率最高的 GJSBM 曲线变化最为平稳, 一直保持较高的幼苗存活率, 仅在试验末期出现一次明显递减。存活率最低的 GJSB0M 曲线则出现 3 次递减。其他存活曲线则基本上介于存活率最高和最低的 2 条曲线之间, 呈波动变化。8 个存活的处理组合中, 浇水方式占 100%, 沙土基质和盖土方式各占 75%, 林冠下占 62.5%, 保水和不保水各占 50%。另外, CJRB0M、CJSBM 和 CJRBM 与存活率最高的处理组合 GJSBM 均无显著差异, 这 4 个处理组合的幼苗存活率显著高于其他 4 个组合 ($P < 0.05$), 浇水和盖土方式均占 100%, 林冠和保水各占 75%, 沙土和红土基质各占 50%。

2.3.2 浇水处理对幼苗存活率的影响 在图 7 和图 8 中, 每条曲线的峰值是种子相对发芽率和幼苗存活率的临界点, 峰值左侧为种子相对发芽率, 呈逐渐增加趋势, 峰值右侧为幼苗存活率, 呈逐渐递减趋势, 且不同处理方式容器组的幼苗存活率显著高于沙土的 ($P < 0.05$)。由图 7 幼苗存活率变化曲线可知, 截止 11 月 6 日, 沙地幼苗存活率已经为 0, 容器组 2 种浇水方式的幼苗存活率则保持在 60% 以上。容器组中, 不浇水处理的幼苗存活率分别在 11 月 6—10 日期间及 11 月 20 日至 12 月 25 日期间出现 2 次快速递减。浇水处理的幼苗存活率则仅在试验末期出现一次快速递减, 其原因是试验末期浇水间隔期较长, 为 20 d。方差分析结果表明, 浇水处理下幼苗存活率显著高于不浇



不同字母表示不同处理组合在 0.05 水平上呈显著差异。
Different letters show significant differences among different treatment combinations at 0.05 level.

图 1 不同处理组合种子发芽率
Fig. 1 Average seed germination rates of different treatment combinations



不同处理中不同小写字母表示在 0.05 水平上呈显著差异。
Different lowercase letters in different treatments show significant differences at 0.05 level. The same below.

图 2 不同处理方法种子平均发芽率
Fig. 2 Average seed germination rates of different treatment methods

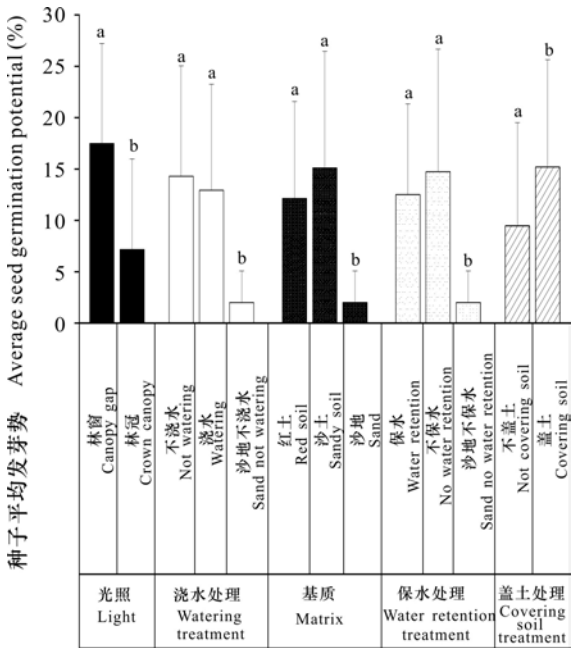


图 3 不同处理方法种子平均发芽势
Fig. 3 Average seed germination potentials of different treatment methods

水处理的($P<0.05$)。因此,容器组与否和浇水方式是影响幼苗存活率的 2 个因素。

2.3.3 其他处理因素对幼苗存活率的影响 总体而言,光照对种子相对发芽率有显著影响($P<0.05$),但对最终的幼苗存活率则无显著影响。从 2 条曲线的变化趋势来看,林窗中幼苗的存活率曲线递减迅速,林冠下变化则较为平缓,但截止到试

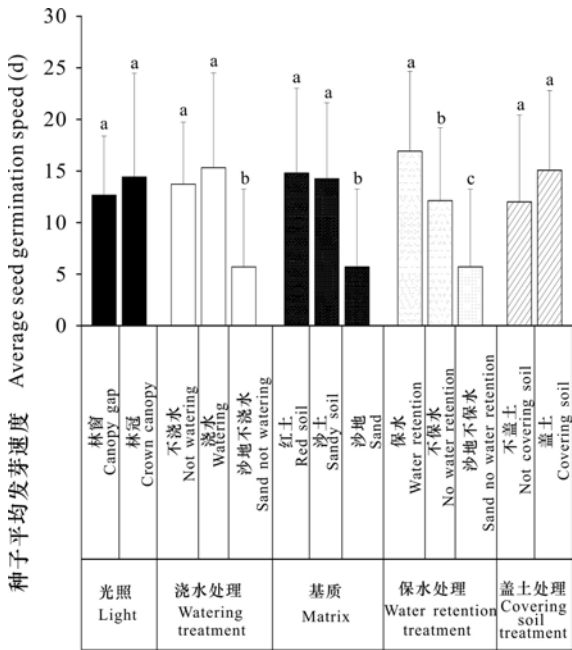


图 4 不同处理方法种子平均发芽速度
Fig. 4 Average seed germination speeds of different treatment methods

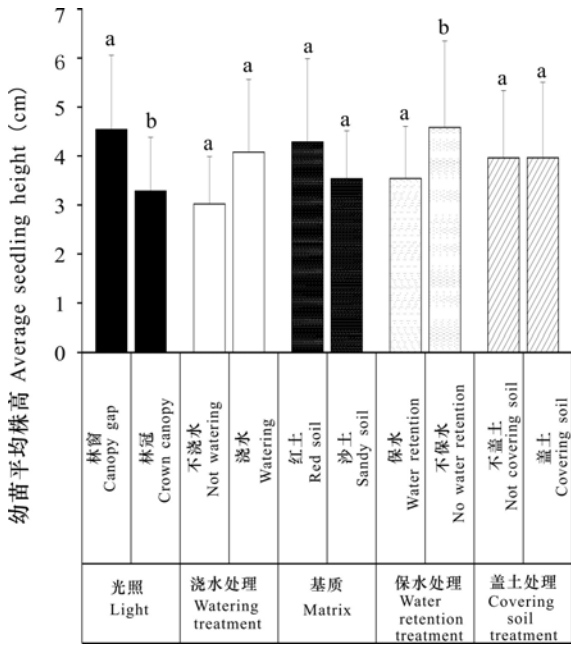


图 5 不同处理方式的幼苗平均株高
Fig. 5 Average seedling heights of different treatment methods

表 2 木麻黄幼苗历经 53 d 的生长情况
Table 2 Growth of *Casuarina equisetifolia* seedlings after 53 d

处理组合 Treatment combination	平均株高 Average plant height (cm)	存活株数 Survival plant number	重复样本数 Replication sample number
CJ0RBM	2.23a	3.50ab	2
CJRBM	2.62a	6.33abcd	3
GJSB0M0	2.76ab	6.33abcd	3
CJSBM	2.78ab	6.00abc	3
GJSBM0	2.95	2.00	1
CJSBM0	3.33abc	1.50a	2
CJRB0M	3.59abc	6.00abc	3
CJ0RBM0	3.82abc	2.00a	2
GJSB0M	4.03abc	6.00abc	2
GJSBM	4.06abc	12.33e	3
GJRBM0	4.38abcd	6.33abcd	3
GJRBM	4.88bcd	12.00de	3
CJSB0M	5.06cd	8.00bcde	2
GJRB0M	6.23d	10.00cde	3
GJRB0M0	6.43d	9.00bcde	2
合计 Total	3.96	6.97	37

注：各列中不同处理组合的不同字母表示在 0.05 水平上呈显著差异。
Note: Different letters of different treatment combinations in each column indicate significant differences at the 0.05 level.

验末期,林窗和林冠下的幼苗的存活率已逐渐接近,且两者之间无显著差异($P>0.05$) (图 8:A)。沙土和红土基质的种子相对发芽率和幼苗存活率均显著高于沙地基质,但沙土和红土 2 种基质的种子的相对发芽率和幼苗的存活率均无显著差异($P>0.05$) (图 8:B)。

盖土处理对种子相对发芽率有显著影响($P<0.05$),但对后期幼苗存活率基本没有影响,因为盖土和不盖土方式的 2 条幼苗存活率曲线基本是平行递减的,二者之间的差异是由种子相对发芽率存在显著差异而造成(图 8:C)。由图 8:D 可知,容器组 2 种保水处理的种子相对发芽率和幼苗存活率均显著高于沙地不保水处理($P<0.05$)。保水处理的 2 条曲线在峰值点左侧的种子相对发芽率出现交替上升的变化,2 条曲线虽然彼此相接近,但在交叉点之前和之后,不同保水方式的种子相对发芽率呈显著差异($P<0.05$)。从峰值点右侧的存活率曲线上来看,保水处理较不保水处理的幼苗存活率曲线变化更为平缓,但在试验末期,保水与不保水处理的幼苗存活率已无显著差异($P>0.05$)。虽然保水处理对幼苗存活率的影响效果并不明显,但仍好于不保水处理。

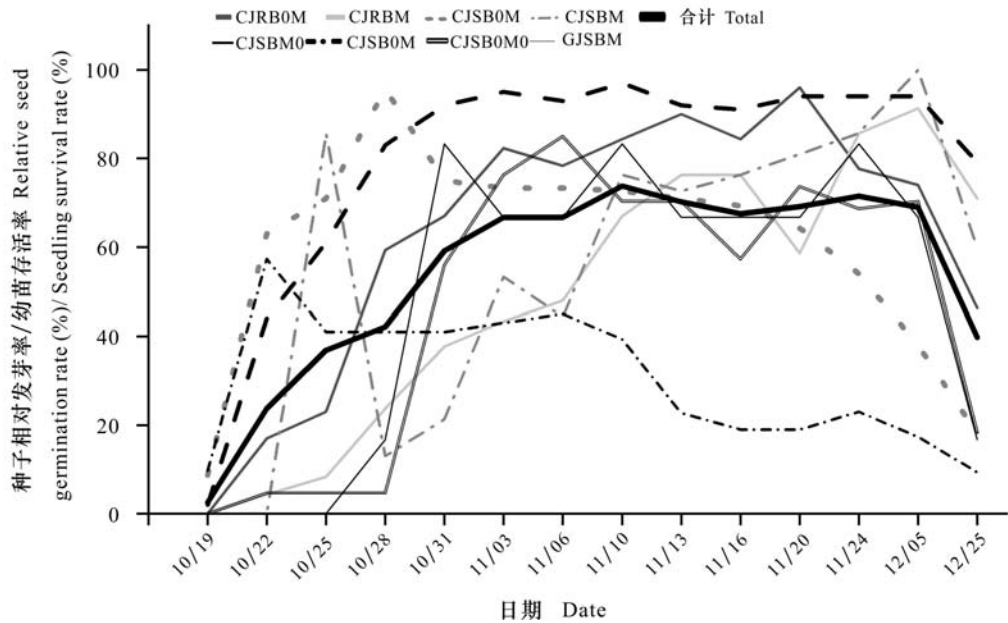


图 6 不同处理组合的种子相对发芽率及历经 73 d 幼苗的存活率

Fig. 6 Relative seed germination rates and seedling survival rates of different treatment combinations for 73 d

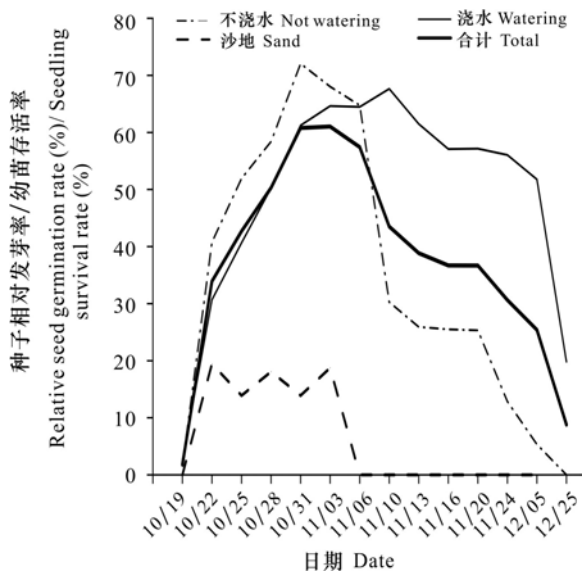


图 7 浇水处理对种子相对发芽率及幼苗存活率的影响

Fig. 7 Effects of watering treatments on relative seed germination and seedling survival rates

3 讨论与结论

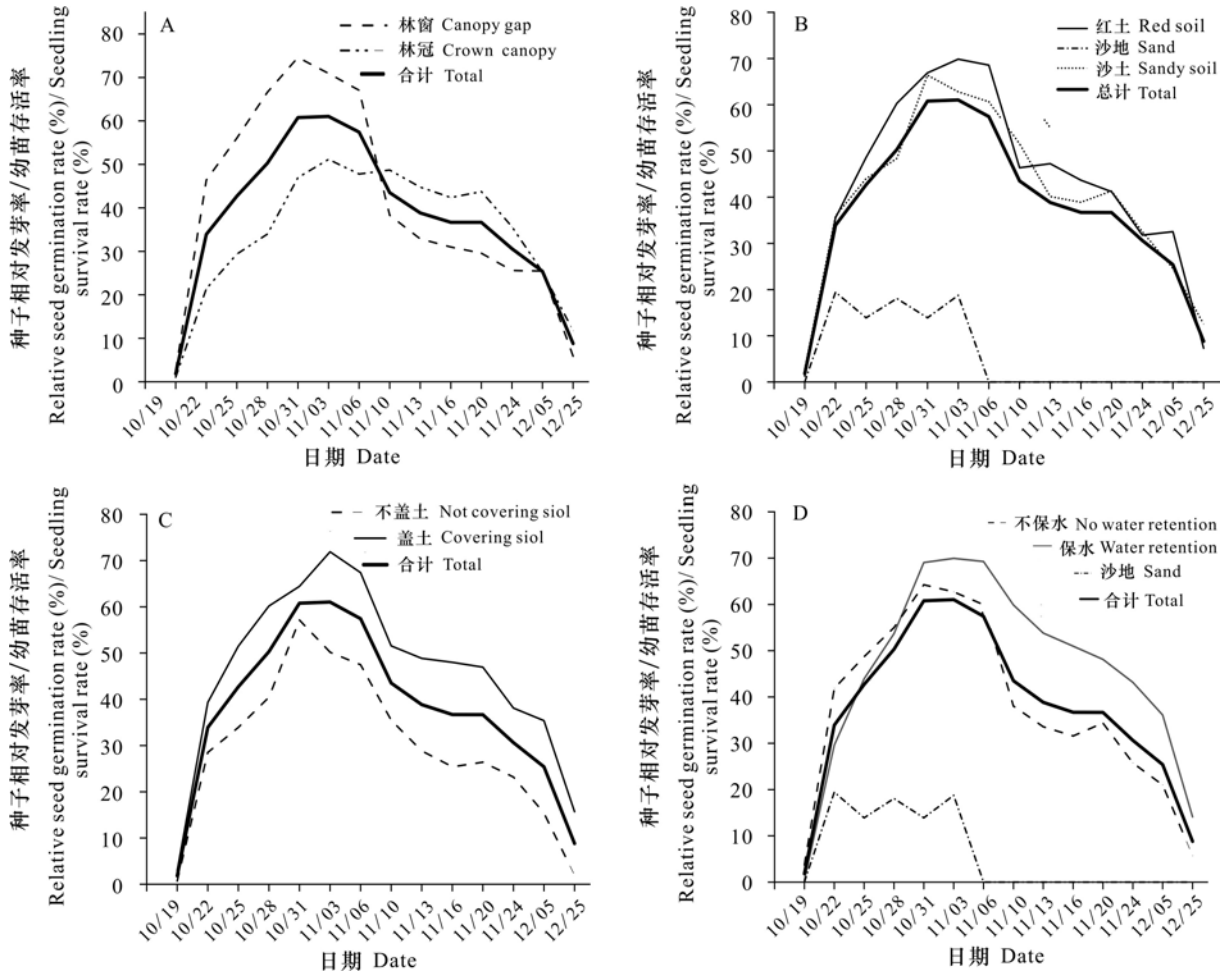
3.1 不同处理的综合作用显著影响木麻黄种子萌发和幼苗存活

种子萌发的影响因素很多,但因植物种类及生

境不同,其制约因素也不同,其中侧柏种子萌发受制于土壤水分的有效性和适度的光照条件(王斐等,2015)。干旱区种子在飞播后的成活率低,主要受制于温度、土壤水分和种子埋藏深度(郑坚等,2016)。木麻黄种子萌发的最佳处理组合为林窗-不浇水-沙土-保水-盖土(GJOSBM),而种子萌发的最差处理组合为林冠-浇水-红土-保水-不盖土(CJRBM0),二者的处理方式几乎相反,表明不同处理的组合方式显著影响木麻黄种子发芽率。另外,从 17 个发芽率较高的处理组合中,可以发现有利于木麻黄种子萌发的因子从大到小依次为林窗、盖土、浇水或保水或沙土。木麻黄幼苗存活的最佳处理组合与种子萌发的最佳处理组合有所不同,其主要区别是浇水方式的不同,表明浇水处理的不同影响种子的萌发和存活。其主要原因是种子萌发期为海南雨季,水分不是种子萌发的制约因子,因此,不需要浇水,而幼苗生长期则为旱季,水分成为了幼苗存活的制约因子,因此需要浇水。另外,基于 4 个幼苗存活率较高的处理组合,便会发现有利于木麻黄幼苗存活的因子从大到小依次为浇水或盖土、林冠或保水、沙土或红土。

3.2 木麻黄原生境林地基质不利于木麻黄种子萌发及幼苗存活

由于容器不浇水与林地对照组仅在保水性方



A. 光照处理对种子相对发芽率及幼苗存活率的影响; B. 三种基质对种子相对发芽率及幼苗存活率的影响; C. 盖土处理对种子相对发芽率及幼苗存活率的影响; D. 保水处理对种子相对发芽率及幼苗存活率的影响。

A. Effects of light treatment on relative seed germination rate and seedling survival rate; B. Effects of three kinds of matrix on relative seed germination rate and seedling survival rate; C. Effects of soil covering treatment on relative seed germination rate and seedling survival rate; D. Effects of water retention treatment on relative seed germination rate and seedling survival rate.

图 8 不同处理方式对种子相对发芽率及幼苗存活率的影响

Fig. 8 Effects of different treatment methods on relative seed germination and seedling survival rates

面存在不同,因此林地对照组的发芽率显著低于容器不浇水控制组,说明基质的保水性对种子的发芽率具有显著影响,这与王玉等(2020)和茆伟等(2007)的研究结果一致。木麻黄原生境林地滨海沙土,其保水性较差,因此不利于木麻黄种子的萌发及幼苗存活。然而,保水处理对容器组种子萌发率无显著差异,其主要原因可能是容器组2种保水方式的保水性差异较小的缘故。

3.3 林分光照条件、盖土方式是影响木麻黄种子发芽率及发芽势的影响因素

光照是植物种子萌发过程中的重要生态环境

影响因子之一(黄振英等,2001)。林窗和林冠不同光照条件下,木麻黄种子发芽率差异显著,并且林窗中更有利于种子萌发,这与木麻黄发芽率随光照时间和光照强度的增加而提高(管康林,1984)的研究结果相一致,表明光照条件是调控木麻黄种子萌发的重要条件之一。盖土与否及盖土深度对种子萌发率也具有较大影响。刘永辉等(2016)研究表明,杜松种子萌发率、萌发势和发芽指数随埋土深度的增加均呈先增加后下降的趋势。本研究表明,盖土方式显著提高木麻黄种子的发芽率及发芽势,其原因是盖土方式为种子萌

发提供了相对恒定的湿度环境。容器组保水及浇水处理对种子发芽率没有显著影响,其原因可能是种子萌发期间的 10 月份是海南的雨季,月降雨天数较多(12.5 d),月降雨量较为充足(224.4 mm)的缘故(海口历史天气预报查询,2019)。

3.4 林分光照条件是影响木麻黄幼苗株高的主要因素

植物幼苗期对光照的需求复杂敏感,不同树种对光照的需求有所不同(王雁等,2002)。木麻黄幼苗平均株高在林窗中显著高于林冠下,表明木麻黄种子萌发有需光性,且幼苗生长具有喜光性。这与降香黄檀(*Dalbergia odorifera*)幼苗期宜在全光照环境下生长相一致(郑坚等,2016)。当浇水频繁($1 \text{ time} \cdot 3^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)时,由于水分充足,因此保水处理基本上对株高无显著影响。平均株高最高的 5 个组合中,全部为浇水处理,且 80% 为红土基质,表明浇水和红土基质对幼苗株高具有一定影响。另外,在仅剩的 2 个不浇水的组合中,全部为林冠-红土-保水组合,表明在不浇水情况下,水分成为限制因子,只有在水分蒸发较慢的林冠下,保水相对较好的红土基质中,并通过保水方式的综合作用,才能最大限度地保留有限的水分,使幼苗得以存活生长。这符合遮荫能缓解部分干旱对植株的负面影响,支持“促进理论”学说(刘翠菊等,2018)。因此,在雨水不足的情况下,保水方式有利于幼苗的存活,并会影响其株高。

3.5 浇水方式是影响幼苗存活率的主要因素

在幼苗定居阶段,土壤水分通常是影响植物幼苗存活的主要限制因子,土壤水分的缺乏经常是导致幼苗死亡的首要原因(龙立群和李欣荣,2003)。各种处理方式中,盖土方式对后期幼苗存活率基本没有影响,基质、光照条件和保水处理对其影响均不明显,但浇水方式则有显著影响,且试验末期存活的处理组合全部为浇水方式,表明土壤水分是木麻黄幼苗存活的主要限制因子。在林冠下、红土和沙土不同基质对幼苗存活率无显著影响($P>0.05$);在林窗中,幼苗存活率则为沙土基质显著高于红土基质($P<0.05$)。该结果表明,基质对幼苗存活率的影响与光照条件有关。此外,幼苗较高存活率的组合中,沙土占 75%,其原因可能是在连续多天不下雨的情况下,幼苗在疏松的沙土中比在板结的红土中更易于吸收环境中的空气水分。浇水方式影响木麻黄幼苗存活率主要是因为后期幼苗生长期(11—12 月)处于海南的

旱季,降雨量和降雨天数锐减,分别为 81.3~34.9 mm 和 7.9~7.3 d(海口历史天气预报查询,2019)。结合气象资料和存活率曲线的变化过程可以看出,幼苗存活率的快速递减均与期间连续多日不下雨密切相关(海口历史天气预报查询,2019)。这表明木麻黄幼苗抗干旱胁迫能力较弱,安全度过海南旱季间断性的连续 6~15 d 的无雨期十分困难。

综上所述,沙地的保水性显著影响原生境种子的萌发率,光照条件显著影响幼苗的株高,浇水方式则显著影响幼苗的存活率。由此可以推测,木麻黄自身无法天然更新的障碍机制不是种子萌发的问题,而是幼苗在旱季无法存活。

参考文献:

- CHANG W, WU JG, LIU YH, 2007. Research advance in seed germination of desert woody plants [J]. *Chin J Appl Ecol*, (2): 436–444. [裴伟, 吴建国, 刘艳红, 2007. 荒漠木本植物种子萌发研究进展 [J]. *应用生态学报*, (2): 436–444.]
- CHEN XY, YANG M, 2018. Ecological response of *Casuarina equisetifolia* to environmental stress in coastal dunes in China [J]. *J For Res*, 23(3): 173–182. [陈旭阳, 杨梅, 2013. 木麻黄水浸液对潺槁幼苗生长的影响 [J]. *安徽农学通报*, 19(9): 39–41.]
- DENG LG, KONG CH, LUO SM, 1996. Isolation and identification of extract from *Casuarina equisetifolia* branchlet and its allelopathy on seedling growth [J]. *Chin J Appl Ecol*, 7(2): 145–149. [邓兰桂, 孔垂华, 骆世明, 1996. 木麻黄小枝提取物的分离鉴定及其对幼苗的化感作用 [J]. *应用生态学报*, 7(2): 145–149.]
- GUAN KL, 1984. A physiological study on the seed light germination of *Casuarina equisetifolia* [J]. *J Zhejiang For Coll*, 1: 89–95. [管康林, 1984. 木麻黄种子的光萌发生理研究 [J]. *浙江林学院学报*, 1: 89–95.]
- Haikou historical weather forecast query _Haikou weather record in October 2019 _ report after weather [online] Available: <http://www.tianqihoubao.com/lishi/haikou/month/201910.html> (May 7, 2020). [海口历史天气预报查询_2019 年 10 月份海口天气记录_天气后报 [online] Available: <http://www.tianqihoubao.com/lishi/haikou/month/201910.html> (May 7, 2020).]
- HAO QY, YANG B, ZHOU YP, 2020. Quantitative characteristics and impact factors of litter accumulation for *Casuarina equisetifolia* [J]. *J For Environ*, 40(4): 356–362. [郝清玉, 杨彬, 周玉萍, 2020. 木麻黄凋落物现存量的数量特征及影响因素 [J]. *森林与环境学报*, 40(4): 356–362.]
- HARPER JL, 1977. *The population biology of plants* [M]. New York: New York Academic Press.

- HUANG ZY, ZHANG XS, YITZCHAK G, et al., 2001. Influence of Light, temperature and salinity on the seed germination of *Haloxylon ammodendron* [J]. Acta Phytophysiol Sin, 27(3): 275–280. [黄振英, 张新时, YITZCHAK G, 等, 2001. 光照、温度和盐分对梭梭种子萌发的影响 [J]. 植物生理学报, 27(3): 275–280.]
- LIU CJ, GUO X, WANG KL, et al., 2018. Ecophysiological responses of *Camellia japonica* (Naidong) to different light and water conditions [J]. Chin J Appl Ecol, 29(4): 1125–1132. [刘翠菊, 郭霄, 王奎玲, 等, 2018. 耐冬山茶对不同光照和水分生理生态学响应 [J]. 应用生态学报, 29(4): 1125–1132.]
- LIU Q, ZHANG YH, 2002. Investigation of root nodules and discussion of the factors which affect nodulation in *Casuarina equisetifolia* plantations in Haikou [J]. Sci Silv Sin, 38(5): 175–180. [刘强, 张亚辉, 2002. 海口地区木麻黄林根瘤调查及影响结瘤的因子探讨 [J]. 林业科学, 38(5): 175–180.]
- LIU YH, MA ZH, 2016. Influencing factors on seed germination of *Juniperus rigida* from Helan Mountain [J]. J NW Agric For Univ (Nat Sci Ed), 44(6): 62–70. [刘永辉, 马振华, 2016. 贺兰山杜松种子萌发的影响因素研究 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 44(6): 62–70.]
- LONG LQ, LI XR, 2003. Effects of soil microbiotic crusts on seedling survival and seedling growth of two annual plants [J]. J Des Res, (6): 53–57. [龙利群, 李新荣, 2003. 土壤微生物结皮对两种一年生植物幼苗存活和生长的影响 [J]. 中国沙漠, (6): 53–57.]
- NATHAN R, MULLER-LANDAU HC, 2000. Spatial patterns of seed dispersal, their determinants and consequences for recruitment [J]. Trends Ecol Evol, 15(7): 278–285.
- PENG SJ, HUANG ZL, PENG SL, et al., 2004. Factors influencing mortality of seed and seedling in plant nature regeneration process [J]. Guihaia, 24(2): 113–121. [彭闪江, 黄忠良, 彭少麟, 等, 2004. 植物天然更新过程中种子和幼苗死亡的影响因素 [J]. 广西植物, 24(2): 113–121.]
- RICHARDSON DM, PYSEK P, REJMANEK M, et al., 2000. Naturalization and invasion of alien plant: Concepts and definitions [J]. Divers Distrib, 6(2): 93–107.
- TANG JX, JIA HY, ZENG J, et al., 2020. Effects of cutting methods on natural regeneration of *Mytilaria laosensis* plantation [J]. J Beijing For Univ, 42(8): 12–21. [唐继新, 贾宏炎, 曾冀, 等, 2020. 采伐方式对米老排人工林天然更新的影响 [J]. 北京林业大学学报, 42(8): 12–21.]
- WANG Y, YANG B, HAO QY, 2020. Limiting ecological factors for seed germination of *Casuarina equisetifolia* [J]. Guihaia, 40(3): 403–411. [王玉, 杨彬, 郝清玉, 2020. 木麻黄种子萌发的限制生态因子 [J]. 广西植物, 40(3): 403–411.]
- WANG CQ, LIU Q, ZHANG YJ, et al., 2012. Isolation and identification of the aqueous extract from *Casuarina equisetifolia* and allelopathy effects on the seed germination of *Vatica mangachapoi* [J]. J NW For Univ, 27(3): 80–86. [王春晴, 刘强, 张渝杰, 等, 2012. 木麻黄水浸液对青皮种子的化感效应 [J]. 西北林学院学报, 27(3): 80–86.]
- WAND Y, SU XH, PENG ZH, 2002. Review of studies on plant shade-tolerance [J]. For Res, 15(3): 349–353. [王雁, 苏雪痕, 彭镇华, 2002. 植物耐荫性研究进展 [J]. 林业科学研究, 15(3): 349–353.]
- WANG F, WU DJ, ZANG LP, et al., 2015. Seed intensive germination in *Platyclusus orientalis* plantation [J]. Shandong For Sci Technol, 45(6): 1–8. [王斐, 吴德军, 臧丽鹏, 等, 2015. 侧柏林地种子集中萌发的解析 [J]. 山东林业科技, 45(6): 1–8.]
- YANG B, WANG Y, HAO QY, 2019. Spatial and temporal dynamics of seed rain of *Casuarina equisetifolia* coastal protection forest [J]. J Trop Subtrop Bot, 27(4): 367–375. [杨彬, 王玉, 郝清玉, 2019. 木麻黄海防林种子雨的时空动态 [J]. 热带亚热带植物学报, 27(4): 367–375.]
- YANG B, WANG Y, HAO QY, 2020a. Natural regeneration characteristics and selection of regeneration tree species of *Casuarina equisetifolia* coastal windbreaks in Hainan Island [J]. Guihaia, 40(3): 412–421. [杨彬, 王玉, 郝清玉, 2020a. 海南岛木麻黄海防林天然更新特征及更新树种筛选 [J]. 广西植物, 40(3): 412–421.]
- YANG B, WANG Y, HAO QY, 2020b. Impact factors of undergrowth natural regeneration for *Casuarina equisetifolia* forests in Hainan Island [J]. Guihaia, 40(3): 422–432. [杨彬, 王玉, 郝清玉, 2020b. 海南岛木麻黄林下植物天然更新影响因素的研究 [J]. 广西植物, 40(3): 422–432.]
- YANG B, HAO QY, 2020. Selection of mixed species of *Casuarina equisetifolia* L. based on natural regeneration properties [J]. Plant Sci J, 38(2): 221–232. [杨彬, 郝清玉, 2020. 基于天然更新性能筛选海南岛木麻黄海防林混交树种 [J]. 植物科学学报, 38(2): 221–232.]
- YANG B, WANG Y, HAO QY, 2020. Seasonal dynamics and spatial distribution pattern of seed rain in a monocultural *Casuarina equisetifolia* coastal protection forest [C]. Krabi, Thailand, 2019, Thailan: Kasetsart Agricultural and Agro-Industrial Product Improvement Institute, Kasetsart University: 80–90.
- ZHENG J, WU ZH, CHEN QX, et al., 2016. Influence of shading on growth and physiology of *Dalbergia odorifera* seedlings [J]. Sci Silv Sin, 52(12): 50–57. [郑坚, 吴朝辉, 陈秋夏, 等, 2016. 遮荫对降香黄檀幼苗生长和生理的影响 [J]. 林业科学, 52(12): 50–57.]
- ZHANG Y, ZHONG CL, CHEN Y, et al., 2017. Studies on growth processes of *Casuarina* clones in Hainan Island [J]. For Res, 30(4): 588–594. [张勇, 仲崇禄, 陈羽, 等, 2017. 海南木麻黄无性系生长过程研究 [J]. 林业科学研究, 30(4): 588–594.]
- ZHENG YR, XIE ZX, GAO Y, et al., 2003. Ecological restoration in northern china: germination characteristics of 9 key species in relation to air seeding [J]. Belgian Bot, 136(2): 129–138.

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202012048

王小燕, 薛杨, 宿少锋, 等. 木麻黄纯林及其混交林对土壤剖面理化性质的影响 [J]. 广西植物, 2022, 42(8): 1315–1324.
WANG XY, XUE Y, SU SF, et al. Effects of pure and mixed plantations of *Casuarina equisetifolia* on soil profile physico-chemical properties [J]. *Guihaia*, 2022, 42(8): 1315–1324.



木麻黄纯林及其混交林对土壤剖面理化性质的影响

王小燕¹, 薛 杨¹, 宿少锋¹, 林之盼¹, 雷湘龄¹, 王耀山^{2*}

(1. 海南省林业科学研究院(海南省红树林研究院), 海口 571100; 2. 海南省农业学校, 海口 571100)

摘 要: 为明确混交林对木麻黄林地土壤肥力的改善作用, 该文选取海南岛北部滨海沙地木麻黄纯林、木麻黄-琼崖海棠混交林、木麻黄-大叶相思混交林 3 种林分类型, 通过采集土壤剖面样品, 分析腐殖质层、0~100 cm 土壤各层次的理化性质、分布特征及其林分间差异。结果表明: (1) 与纯林相比, 木麻黄-琼崖海棠混交林可显著提高腐殖质层以及 20~40 cm 土壤层 pH, 增幅分别为 6.11% 和 5.97%。(2) 与纯林相比, 木麻黄-琼崖海棠混交林和木麻黄-大叶相思混交林均可显著提高各层土壤的有机碳和全氮含量, 有机碳含量增幅分别为 69.8%~358.3% 和 90.2%~908.3%, 全氮含量增幅分别为 44.1%~160.7% 和 31.4%~210.7%; 另外, 木麻黄-琼崖海棠混交林还可显著提高 0~100 cm 各土层的全磷含量, 增幅为 20.8%~39.6%, 而木麻黄-大叶相思混交林可显著提高 20~100 cm 各土层的全磷含量, 增幅为 25.0%~39.6%; 木麻黄-大叶相思混交林对腐殖质层速效养分的改善效果较好, 而两种混交林均可显著提高各土层的速效钾含量。(3) 方差分析表明, 林分类型和土层深度对林下有机碳、全氮、全磷、有效磷、硝态氮和铵态氮含量均有极显著的交互作用影响。综上结果认为, 木麻黄混交林对林下土壤肥力具有明显的改善作用。建议在构建木麻黄防风林时应重点考虑混交林模式, 尤其是与大叶相思混交林的种植模式来更好地提升土壤肥力, 以保障可持续生产。

关键词: 木麻黄, 混交林, 海南岛, 土壤剖面, 理化性质

中图分类号: Q948 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2022)08-1315-10

Effects of pure and mixed plantations of *Casuarina equisetifolia* on soil profile physico-chemical properties

WANG Xiaoyan¹, XUE Yang¹, SU Shaofeng¹, LIN Zhipan¹,
LEI Xiangling², WANG Yaoshan^{2*}

(1. Hainan Academy of Forestry (Hainan Academy of Mangrove), Haikou 571100, China; 2. Hainan Agricultural School, Haikou 571100, China)

Abstract: In order to clarify the improvement effect of mixed plantations on soil fertility of *Casuarina equisetifolia* plantations, three forest plantations were selected, i.e. pure plantation of *Casuarina equisetifolia*, mixed plantation with

收稿日期: 2021-04-07

基金项目: 海南省科研院所技术创新专项基础性科研工作 (jcxk202003); 国家林业公益性行业科研专项 (201304320) [Supported by Technical Innovation Special Basic Scientific Research Work of Scientific Research Institutes in Hainan Province (jcxk202003); National Forestry Public Welfare Profession Special Project of Scientific Research (201304320)]。

第一作者: 王小燕 (1983-), 林业工程师, 研究方向为森林生态学, (E-mail) 77671524@qq.com。

* 通信作者: 王耀山, 硕士, 高级讲师, 研究方向为森林生态学, (E-mail) 20521610@qq.com。

Casuarina equisetifolia and *Calophyllum inophyllum*, mixed plantation with *Casuarina equisetifolia* and *Acacia auriculiformis* in coastal sandy land at Northern Hainan Island. By collecting soil profile samples from different plantations, the distribution characteristics of soil physico-chemical properties and their differences among plantations were discussed. The results were as follows: (1) Compared with the pure plantation of *Casuarina equisetifolia*, the mixed plantation with *Casuarina equisetifolia* and *Calophyllum inophyllum* significantly increased pH by 6.11% and 5.97% at the humus horizon and 20–40 cm soil depth, respectively. (2) Compared with the pure plantation of *Casuarina equisetifolia*, the contents of soil organic carbon (SOC) was increased by 69.8%–358.3% and 90.2%–908.3%, and the contents of soil total nitrogen (TN) was increased by 44.1%–160.7% and 31.4%–210.7% in different soil depths of two mixed plantations, respectively; The contents of soil total phosphorus (TP) increased by 20.8%–39.6% in different soil depths from 0–100 cm in mixed plantation with *Casuarina equisetifolia* and *Calophyllum inophyllum*, and increased by 25.0%–39.6% of 20–100 cm soil depth of mixed plantation with *Casuarina equisetifolia* and *Acacia auriculiformis*; The mixed plantation with *Casuarina equisetifolia* and *Acacia auriculiformis* showed the better improving effect on available nutrients in humus horizon than the other plantations, while both mixed plantations could significantly increase the available potassium contents in different soil depths. (3) Variance analysis showed that plantation type and soil depth had significantly interactive effects on the contents of SOC, TN, TP, available phosphorus (AP), nitrate nitrogen (NO_3^- -N) and ammonium nitrogen (NH_4^+ -N). In conclusion, the mixed *Casuarina equisetifolia* plantations can significantly improve the soil fertility. Hence, in order to ensure the sustainable production, more attention should be paid to the mixed plantation structures, especially with *Acacia auriculiformis*, to get better fertility.

Key words: *Casuarina equisetifolia*, mixed plantation, Hainan Island, soil profile, physico-chemical property

木麻黄(*Casuarina equisetifolia*)原产于澳大利亚、越南等地,自20世纪50年代被引入我国以来,已成为我国东南沿海防护林的主栽树种,从福建至广东、海南,其种植面积达30万 hm^2 (仲崇禄等,2005)。木麻黄具有生长迅速、防风固沙强、抗御海潮及风暴、改善沿海生态环境、提供用材等作用,经过多年的栽培,已显现出相当好的地域适应性(Chen et al., 2018; 杨彬和郝清玉,2020),并且有力地推动了沿海地区经济稳步发展,保障了沿海居民的稳定生活(杜建会等,2014)。海南岛位于我国南海北部,具有1 528.4 km的海岸线,其中宜林海岸线长达1 105 km,约占总海岸线长的72.03%(姚晓静等,2013)。木麻黄防护林在海南岛海岸线的大面积构建,全岛风沙危害问题基本得到了解决(刘成路等,2013)。

由于木麻黄人工林树种组成单一化严重、结构配置重视不足,多代连栽和林分结构较为简单,木麻黄林逐渐出现了较多的生态问题,如林带稳定性和生物多样性下降、自身遗传多样性降低、病虫害频发、林地碳汇功能减弱、土壤整体地力衰退、防护效能减弱,甚至造成生态环境的恶化(Leelamanie, 2016; 王璇等, 2017; 徐志霞等, 2018)。冯剑等(2016)通过研究榄仁树与木麻黄

的混交林型,发现木麻黄的根系、凋落物等化感物质均降低了榄仁树幼苗的存活率,并影响其幼苗生长发育。黄舒静等(2009)研究发现,木麻黄化感物质对自身幼苗的生长也有明显的抑制作用,这种化感物质积累、林地土壤养分耗竭等也是造成木麻黄自身更新困难的主要原因。Zhou等(2019)研究表明,长期纯林的种植模式加剧了木麻黄根际土壤的微生态失衡,并显著降低了土壤微生物群落结构,造成土壤退化。目前普遍认为,营造良好的混交林是提高人工林生物多样性和生态稳定性的有效措施,而且还在地力衰退的防治方面发挥重要作用(盛炜彤,2018; Pereira et al., 2019)。综上所述,针对目前木麻黄林分结构单一造成的土壤肥力衰退等问题,本研究在海南北部海岸线选取了3种林分类型(木麻黄纯林,木麻黄和琼崖海棠混交林,木麻黄和大叶相思混交林,其中琼崖海棠和大叶相思已被证实是具有较强更新潜力的树种),通过分析林下土壤剖面理化性质分布特征及其林分间的差异,探讨防护林结构对土壤肥力指标的影响,以期达到增强林带稳定性和防护功能连续性、改善土壤肥力的目的,最终为我国东南沿海木麻黄防护林体系建设提供树种选择和配置依据。

1 材料与方 法

1.1 研究区概 况

研究区域为海南省海口市灵山镇后尾村,位于海南省东北部海岸带,地理位置为 115°58'31.0" E、40°27'35.5" N,该区域地势平坦,海拔高度在 8~10 m 之间。属热带海洋性季风气候,为湿润气候区,干湿季节明显,年均降雨量为 1 684 mm,多集中于 5—9 月,年均气温为 23.8 ℃。土壤类型为海风、海水搬运后形成的砂质砖红壤,土壤疏松且水肥条件较差。

1.2 样地布设、土样采集及测定

试验选取该区域代表性的 3 种林分类型,分别为木麻黄纯林(*Casuarina equisetifolia*, *Cas.*)、木麻黄-琼崖海棠混交林(*Casuarina equisetifolia* × *Calophyllum inophyllum*, *Cas.* × *Cal.*)、木麻黄-大叶相思混交林(*Casuarina equisetifolia* × *Acacia*

auriculiformis, *Cas.* × *Aca.*)。样地基本概况如表 1 所示,林下主要草本植被类型如表 2 所示。采用典型取样方法,如图 1 所示,在以上 3 种林分中各设置 3 个 20 m × 20 m 的代表性方形样方,在每个样方中选择代表性的土壤调查地段,各挖取 1 个 0~100 cm 的土壤剖面,除去凋落物层后,按照 0 层(腐殖质层)、0~20 cm、20~40 cm、40~60 cm 和 60~100 cm 土层分层取混合土样,共计 45 个土样,其中通过观察确定土壤腐殖质层(色暗、疏松),其与表层土壤具有明显差异。将所有样品带回实验室,经风干、磨细过筛后,用于土壤理化性状的测定(鲁如坤, 2000)。分别采用电位法测定 pH,重铬酸钾-外加加热法测定有机碳,半微量定氮法测定全氮,酸溶-钼锑抗比色法测定全磷含量,碱溶-火焰光度计法测定全钾含量,Bray I 提取-钼锑抗吸光光度法测定有效磷含量,乙酸铵浸提-火焰光度计法测定速效钾含量,氯化钾浸提-连续流动分析仪法测定硝态氮和铵态氮含量。

表 1 样地基本概况
Table 1 Basic general situation of experimental sites

样地 Sample site	科 Family	属 Genus	物种 Species	种植 时间 Planting time	平均胸径 Average diameter (cm)	平均高度 Average height (m)	平均冠幅 Average crown width (m × m)	草本盖度 Herbage coverage (%)	凋落物 厚度 Litter thickness (cm)
木麻黄纯林 <i>Casuarina equisetifolia</i> (<i>Cas.</i>)	木麻黄科 Casuarinaceae	木麻黄属 <i>Casuarina</i>	木麻黄 <i>Casuarina equisetifolia</i>	2009	17.2	11.3	4.0×3.7	50~55	5.1
木麻黄-琼崖海棠混交林 <i>Casuarina equisetifolia</i> × <i>Calophyllum inophyllum</i> (<i>Cas.</i> × <i>Cal.</i>)	木麻黄科 Casuarinaceae	木麻黄属 <i>Casuarina</i>	木麻黄 <i>Casuarina equisetifolia</i>	2004	20.5	10.0	3.8×3.5		
	藤黄科 Calophyllaceae	红厚壳属 <i>Calophyllum</i>	琼崖海棠 <i>Calophyllum inophyllum</i>	2005	2.0	2.2	0.6×1.1	75~80	8.1
木麻黄-大叶相思混交林 <i>Casuarina equisetifolia</i> × <i>Acacia auriculiformis</i> (<i>Cas.</i> × <i>Aca.</i>)	木麻黄科 Casuarinaceae	木麻黄属 <i>Casuarina</i>	木麻黄 <i>Casuarina equisetifolia</i>	2007	12.5	9.2	3.0×3.2		
	豆科 Fabaceae	金合欢属 <i>Acacia</i>	大叶相思 <i>Acacia auriculiformis</i>	2007	10.5	8.0	3.5×3.8	50~55	6.2

1.3 统计分 析

采用 Microsoft Excel 2010 软件进行数据整理,SPSS 18.0 软件对数据进行统计分析,用单因素方差分析比较 3 种林分类型同一土层土壤理化性质的差异性,利用最小差异显著性法(LSD)对各水平间的

差异进行分析,用双因素方差分析 3 种林分类型、不同土层对土壤理化性质的交互影响,用 Pearson 相关性对土壤理化性质间的相关性进行分析,显著性水平设置为 $P<0.05$ 。统计图使用 Origin 8.0 软件进行制作。

表 2 样地林下主要草本层植被类型

Table 2 Herbaceous vegetation types of experimental sites under forest

木麻黄纯林 <i>Casuarina equisetifolia</i>			木麻黄-琼崖海棠混交林 <i>Casuarina equisetifolia</i> × <i>Calophyllum inophyllum</i>			木麻黄-大叶相思混交林 <i>Casuarina equisetifolia</i> × <i>Acacia auriculiformis</i>		
科 Family	属 Genus	种 Species	科 Family	属 Genus	种 Species	科 Family	属 Genus	种 Species
菊科 <i>Asteraceae</i>	胜红蓟属 <i>Ageratum</i>	胜红蓟 <i>Ageratum conyzoides</i>	菊科 <i>Asteraceae</i>	胜红蓟属 <i>Ageratum</i>	胜红蓟 <i>Ageratum conyzoides</i>	禾本科 <i>Poaceae</i>	狗牙根属 <i>Cynodon</i>	狗牙根 <i>Cynodon dactylon</i>
				泽兰属 <i>Chromolaena</i>	飞机草 <i>Chromolaena odorata</i>		地毯草属 <i>Axonopus</i>	地毯草 <i>Axonopus compressus</i>
	泽兰属 <i>Chromolaena</i>	飞机草 <i>Chromolaena odorata</i>	大戟科 <i>Euphorbiaceae</i>	地杨桃属 <i>Sebastiania</i>	地杨桃 <i>Sebastiania chamaelea</i>		黍属 <i>Panicum</i>	铺地黍 <i>Panicum repens</i>
	斑鸠菊属 <i>Vernonia</i>	夜香牛 <i>Vernonia cinerea</i>		油柑属 <i>Phyllanthus</i>	叶下珠 <i>Phyllanthus urinaria</i>		鸭嘴草属 <i>Ischaemum</i>	鸭嘴草 <i>Ischaemum ciliare</i>
	一点红属 <i>Emilia</i>	一点红 <i>Emilia sonchifolia</i>	茜草科 <i>Rubiaceae</i>	鸡屎藤属 <i>Paederia</i>	鸡屎藤 <i>Paederia foetida</i>	豆科 <i>Fabaceae</i>	刀豆属 <i>Canavalia</i>	海刀豆 <i>Canavalia maritima</i>
禾本科 <i>Poaceae</i>	黍属 <i>Panicum</i>	短叶黍 <i>Panicum brevifolium</i>		丰花草属 <i>Borreria</i>	丰花草 <i>Borreria stricta</i>		黄眼草属 <i>Xyris</i>	黄眼草 <i>Xyris indica</i>
	结缕草属 <i>Zoysia</i>	结缕草 <i>Zoysia japonica</i>	禾本科 <i>Poaceae</i>	狗牙根属 <i>Cynodon</i>	狗牙根 <i>Cynodon dactylon</i>	茅膏菜科 <i>Droseraceae</i>	锦地罗属 <i>Drosera</i>	锦地罗 <i>Drosera burmanni</i>
茜草科 <i>Rubiaceae</i>	丰花草属 <i>Borreria</i>	丰花草 <i>Borreria stricta</i>	西番莲科 <i>Passifloraceae</i>	西番莲属 <i>Passiflora</i>	龙珠果 <i>Passiflora foetida</i>		茅膏菜属 <i>Drosera</i>	茅膏草 <i>Drosera peltata</i>
豆科 <i>Fabaceae</i>	含羞草属 <i>Mimosa</i>	含羞草 <i>Mimosa pudica</i>	苋科 <i>Amaranthaceae</i>	牛膝属 <i>Achyranthes</i>	牛膝 <i>Achyranthes bidentata</i>	莎草科 <i>Cyperaceae</i>	莎草属 <i>Cyperus</i>	莎草 <i>Cyperus rotundus</i>
锦葵科 <i>Malvaceae</i>	黄花棣属 <i>Sida</i>	黄花棣 <i>Sida acuta</i>	鸭跖草科 <i>Commelinaceae</i>	鸭跖草属 <i>Murdannia</i>	水竹叶 <i>Murdannia trigueta</i>	鸭跖草科 <i>Commelinaceae</i>	鸭跖草属 <i>Murdannia</i>	水竹叶 <i>Murdannia trigueta</i>
大戟科 <i>Euphorbiaceae</i>	油柑属 <i>Phyllanthus</i>	叶下珠 <i>Phyllanthus urinaria</i>				大戟科 <i>Euphorbiaceae</i>	油柑属 <i>Phyllanthus</i>	叶下珠 <i>Phyllanthus urinaria</i>
鸭跖草科 <i>Commelinaceae</i>	鸭跖草属 <i>Murdannia</i>	水竹叶 <i>Murdannia trigueta</i>						

2 结果与分析

2.1 不同林分类型土壤 pH 分布特征

由图 2 可知,不同林分下土壤 pH 随剖面深度的增加呈逐渐增加的趋势,其中木麻黄纯林、木麻黄-琼崖海棠混交林、木麻黄-大叶相思混交林 pH 变幅分别为 4.47~5.50、4.75~5.90、4.60~5.65。3 种林分类型间 pH 大小顺序为木麻黄-琼崖海棠混交林>木麻黄-大叶相思混交林、木麻黄纯林。其中,在腐殖质层和 20~40 cm 土层下各林分 pH 间差异显著($P<0.05$);在腐殖质层,木麻黄-琼崖海棠混交

林显著高于其他两种林分,较木麻黄纯林高 0.27 个单位,增幅达 6.11%,较木麻黄-大叶相思混交林高 0.15 个单位,增幅达 3.26%;20~40 cm 土层,木麻黄-琼崖海棠混交林较木麻黄纯林高 0.32 个单位,增幅为 5.97%。通过方差分析发现,林分类型和剖面深度均对 pH 有极显著的影响($P<0.01$),林型和剖面深度的交互作用则对 pH 无显著影响。

2.2 土壤剖面有机碳和全氮分布特征

不同林分土壤剖面有机碳和全氮含量以及 C/N 分布特征如图 3 所示。由图 3 可知,土壤有机碳和全氮含量均随剖面深度的增加呈显著降低的趋势,其中木麻黄纯林、木麻黄-琼崖海棠混交林、木麻

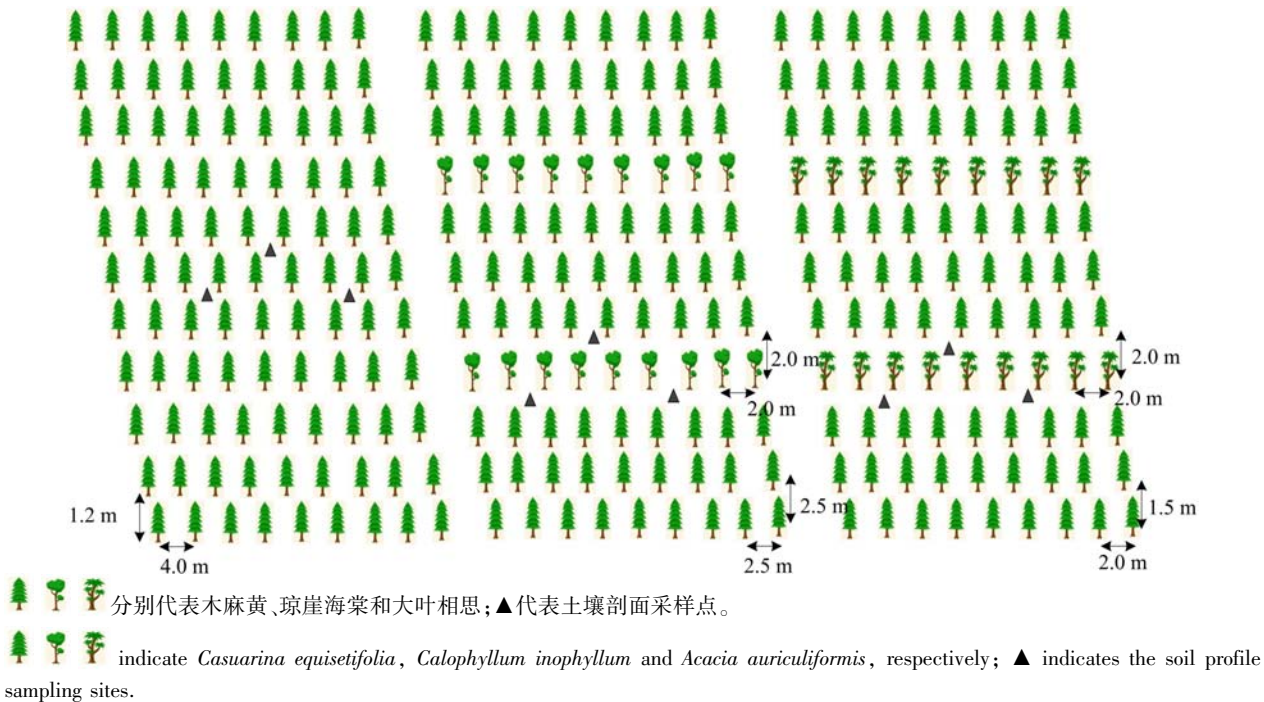
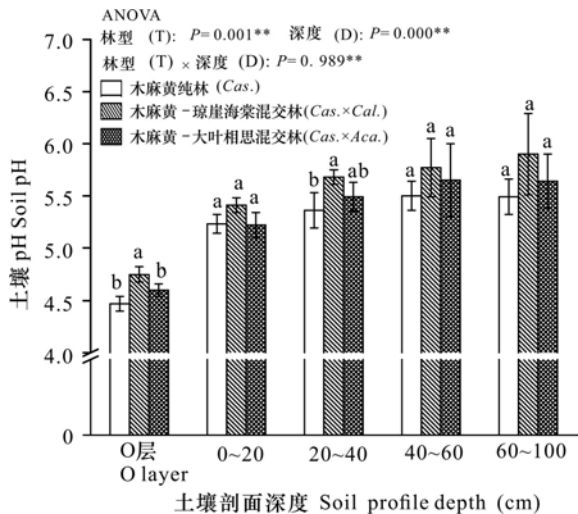


图 1 不同林分类型种植示意图

Fig. 1 Planting diagram of different plantations



T 表示林分类型；D 表示土壤剖面深度。* 和 ** 分别表示在 0.05 和 0.01 水平上差异显著。下同。

T indicates plantation type; D indicates soil profile depth. * and ** indicate significant differences at 0.05 and 0.01 levels, respectively. The same below.

图 2 不同林分类型土壤剖面 pH 分布特征

Fig. 2 pH distribution characteristics of soil profile in different plantations

黄-大叶相思混交林土壤有机碳含量变幅分别为 0.08~8.80、0.37~20.80、0.79~24.62 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，全氮含

量变幅分别为 0.03~0.48、0.05~0.69、0.08~0.83 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。3 种林分类型间土壤有机碳和全氮含量的大小顺序标线为木麻黄-大叶相思混交林>木麻黄-琼崖海棠混交林>木麻黄纯林,其中,不同土层各林分间差异均达到显著水平 ($P < 0.05$)。与木麻黄纯林相比,木麻黄-琼崖海棠混交林各层土壤有机碳和全氮含量增幅范围分别为 69.8%~358.3% 和 44.1%~160.7%,木麻黄-大叶相思混交林增幅范围分别为 90.2%~908.3% 和 31.4%~210.7%,有机碳含量增幅高于全氮增幅。从 C/N 比来看,依然为腐殖质层高于其他土层,木麻黄-大叶相思混交林显著高于木麻黄纯林。从方差分析可以看出,林分类型、剖面深度以及二者的交互作用对土壤有机碳含量、全氮含量以及 C/N 均有极显著影响。

2.3 土壤剖面全磷和全钾分布特征

由图 4 可知,土壤全磷和全钾含量均随剖面深度的增加呈降低的趋势。木麻黄纯林、木麻黄-琼崖海棠混交林、木麻黄-大叶相思混交林剖面土壤全磷含量变幅分别为 0.107~0.287、0.137~0.300、0.149~0.337 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,全钾含量变幅分别为 0.098%~0.133%、0.112%~0.142%、0.120%~0.150%,3 种林分类型间土壤全磷和全钾含量的大

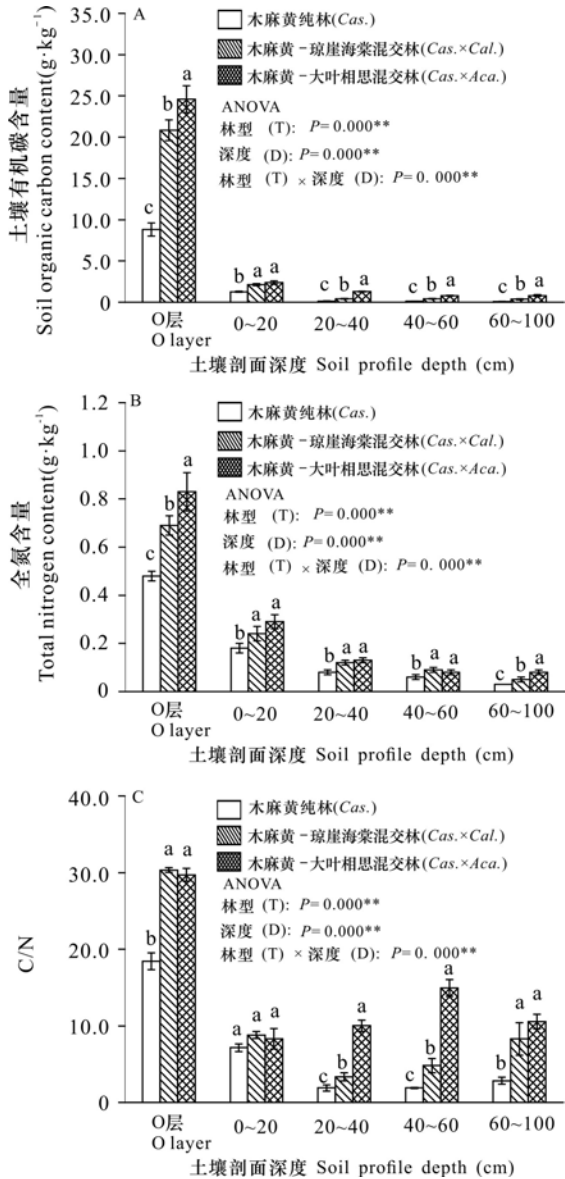


图3 不同林分类型土壤剖面有机碳含量、全氮含量和C/N分布特征

Fig. 3 Soil organic carbon contents, total nitrogen contents and C/N distribution characteristics of soil profile in different plantations

小顺序基本表现为木麻黄纯林小于木麻黄-大叶相思混交林和木麻黄-琼崖海棠混交林。就全磷含量而言,0~20 cm 土层下,木麻黄-琼崖海棠混交林显著高于木麻黄纯林和木麻黄-大叶相思混交林,增幅分别为 39.6%和 23.4%,而在 20~100 cm 各土层下木麻黄混交林均显著高于木麻黄纯林,木麻黄-琼崖海棠混交林增幅为 20.8%~28.2%,木麻黄-大叶相思混交林增幅为 25.0%~39.6%;就全钾含量而

言,40~60 cm 土层下,木麻黄-大叶相思混交林显著高于木麻黄纯林,增幅为 20.6%。从方差分析结果来看,林分类型、剖面深度均对全磷和全钾含量有极显著影响,而二者交互作用均对全磷含量有极显著影响($P<0.01$)。

2.4 土壤剖面速效养分分布特征

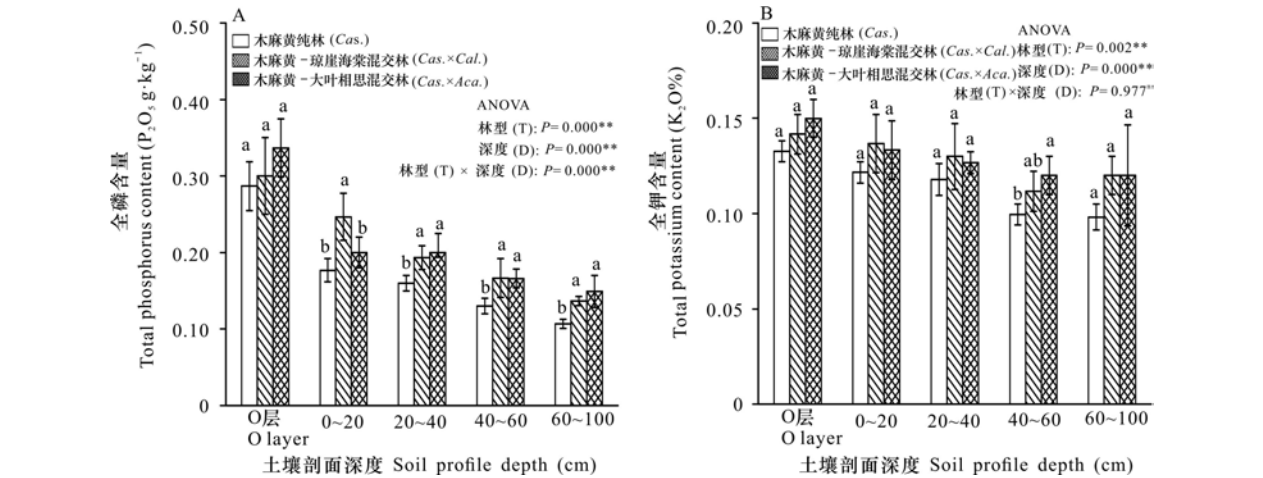
不同林分下土壤剖面速效养分分布特征如图 5 所示。3 种林分类型有效磷含量变幅分别为木麻黄纯林 1.30~1.74 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、木麻黄-琼崖海棠混交林 1.66~2.09 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、木麻黄-大叶相思混交林 1.29~2.21 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。其中,木麻黄纯林的腐殖质层有效磷含量低于其他土层,而两种混交林的腐殖质层则高于其他土层,且随剖面深度的增加呈降低的趋势。同时,两种混交林腐殖质层显著高于木麻黄纯林,增幅分别为 60.5%和 70.2%,然而较深层次(20~100 cm)土壤下,木麻黄-大叶相思混交林有效磷含量相对于其他两种林型较低。方差分析表明,林分类型、剖面深度以及二者交互作用均对有效磷含量有极显著影响($P<0.01$)。

随剖面深度的增加,各林分速效钾含量均呈降低的趋势。3 种林分类型土壤速效钾含量变幅为木麻黄纯林 2.05~13.58 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、木麻黄-琼崖海棠混交林 2.47~14.23 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、木麻黄-大叶相思混交林 3.70~16.22 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$;各土层速效钾含量均表现为木麻黄-大叶相思混交林>木麻黄-琼崖海棠混交林>木麻黄纯林,与木麻黄纯林相比,木麻黄-琼崖海棠混交林和木麻黄-大叶相思混交林各土层速效钾含量增幅分别为 4.8%~87.2%和 19.4%~98.2%。方差分析显示,林分类型和剖面深度均对速效钾含量有极显著影响($P<0.01$),而二者交互作用对其无显著影响。

随剖面深度的增加,硝态氮和铵态氮含量均呈明显降低的趋势,腐殖质层显著高于其他土层。腐殖质层下的各林分间土壤硝态氮和铵态氮含量差异显著,其中木麻黄-大叶相思混交林均显著高于木麻黄纯林和木麻黄-琼崖海棠混交林,硝态氮含量增幅分别为 21.8%和 21.0%,铵态氮含量增幅分别为 162.6%和 66.8%。方差分析表明,林分类型、剖面深度以及二者交互作用均对硝态氮和铵态氮含量有极显著影响($P<0.01$)。

2.5 土壤剖面理化性状相关分析

通过分析 3 种林分条件下不同理化性状之间的相关关系发现(表 3),土壤 pH 与有机碳、全氮、全



ns表示无显著性差异。
ns indicates no significant differences.

图 4 不同林分类型土壤剖面全磷含量和全钾含量分布特征

Fig. 4 Total phosphorus and total potassium contents distribution characteristics of soil profile in different plantations

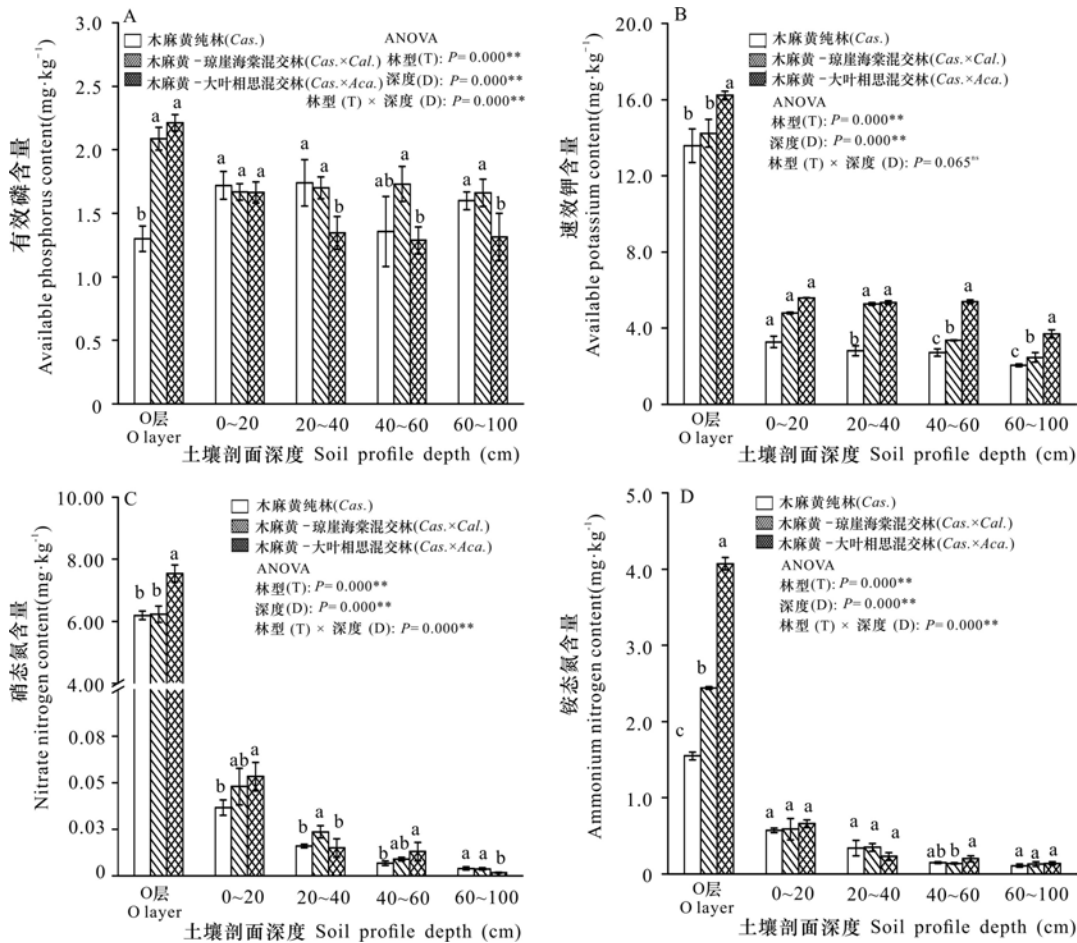


图 5 不同林分类型土壤剖面有效磷、速效钾、硝态氮和铵态氮含量分布特征

Fig. 5 Available phosphorus, available potassium, nitrate nitrogen and ammonium nitrogen contents distribution characteristics of soil profile in different plantations

表 3 不同林分类型土壤理化性质间的相关关系

Table 3 Correlation coefficients between soil physico-chemical properties of different plantations

项目 Item	pH	有机碳 SOC	全氮 TN	全磷 TP	全钾 TK	有效磷 AP	速效钾 AK	硝态氮 NIN	铵态氮 AMN
pH	1								
有机碳 SOC	-0.749**	1							
全氮 TN	-0.807**	0.968**	1						
全磷 TP	-0.773**	0.830**	0.895**	1					
全钾 TK	-0.436**	0.582**	0.664**	0.687**	1				
有效磷 AP	-0.295*	0.639**	0.582**	0.476**	0.387**	1			
速效钾 AK	-0.785**	0.917**	0.934**	0.868**	0.604**	0.410**	1		
硝态氮 NIN	-0.832**	0.937**	0.939**	0.832**	0.532**	0.462**	0.962**	1	
铵态氮 AMN	-0.769**	0.973**	0.962**	0.843**	0.600**	0.641**	0.904**	0.925**	1

注：*和**分别表示在 0.05 和 0.01 水平显著相关。**SOC.** 土壤有机碳；**TN.** 全氮；**TP.** 全磷；**TK.** 全钾；**AP.** 有效磷；**AK.** 速效钾；**NIN.** 硝态氮；**AMN.** 铵态氮。

Note: * and ** indicate significant correlations at 0.05 and 0.01 levels, respectively. **SOC.** Soil organic carbon; **TN.** Total nitrogen; **TP.** Total phousphorus; **TK.** Total potassium; **AP.** Available phousphorus; **AK.** Available potassium; **NIN.** Nitrate nitrogen; **AMN.** Ammonium nitrogen.

磷、全钾、有效磷、速效钾、硝态氮和铵态氮含量均呈显著或极显著的负相关关系,其他土壤养分含量间均呈显著或极显著的正相关关系,其中,有机碳含量与全氮、硝态氮以及铵态氮含量间的相关系数高于其他指标。

3 讨论与结论

本研究结果表明,与木麻黄纯林相比,木麻黄-琼崖海棠混交林可有效改善土壤酸度,提高各层土壤 pH,而木麻黄-大叶相思混交林与木麻黄纯林间无显著差异。总的来看,混交林模式改善土壤 pH 的作用机制可能有以下三方面原因。第一,酚酸类是土壤最具化感潜力的化学物质之一,纯林根系分泌物中各类酚酸物质的含量均显著高于混交林,而酚酸含量又与土壤 pH 呈负相关,因此,与纯林相比,混交林根系间的相互作用减弱了根系分泌物的酚酸物质含量,进而改善土壤 pH(柴旭光,2016);第二,混交林枯落物产量和丰富度高于纯林(赵燕波等,2015),从而产生更多的中间产物和腐殖质,而有机质中的酸性基团(-COOH)提供了大量的阳离子交换位点,枯落物通过释放更多的阳离子,进而中和土壤氢离子,减缓土壤的酸化(汪思龙和陈楚莹,1992);第三,有学者认为混交林种植会通过提升土壤 pH 进而抑制土壤铝有效性,对缓解植物铝毒有改善作用(雷波等,2014)。综上所述,合

理的混交林模式在一定程度上可以减缓木麻黄林地土壤的酸化。

土壤有机质是衡量森林土壤肥力的重要指标,其主要来源于植物地上枯落物和地下根系的输入,是指示土壤肥力与健康的关键指标(杨承栋,2016)。本研究表明,不同木麻黄林分类型土壤有机碳和全氮含量总体随土层加深呈下降趋势,腐殖质层有机碳和全氮含量明显高于其他各层土壤,表现明显的“表聚”现象,且琼崖海棠、大叶相思与木麻黄混交林的这种现象较木麻黄纯林更明显。一方面,森林枯落物归还到土壤中后,主要覆盖在地表,而枯落物中主要成分为碳,其次为氮,二者在地表逐年富集进而造成了明显的层次性;另一方面,混交林与纯林相比,混合枯落物的非加和效应加速了其分解和转化速率,进而有效提升了土壤有机碳含量,增强林地容蓄能力,更有利于混交林植物的生长和林分的稳定(熊勇等,2012)。两种混交林相比,木麻黄-大叶相思混交林的层次性更明显,一方面与大叶相思混交林枯落物产量高于琼崖海棠混交林有关(薛杨等,2014);另一方面可能是由于大叶相思的根瘤菌固定氮气,对土壤的增氮效果和改土效果较好(唐国勇等,2012)。以往研究表明,大叶相思人工林的树冠较高,叶面积大,枯落物产量高且分解快,养分元素能够较快地进行系统内循环,维持土壤肥力,同时还可有效降低风速,削弱强风影响,提高林分防护功能(高成杰等,2014)。生

产中值得注意的是,大叶相思树冠开展,在木麻黄和大叶相思混交造林时,最好将两个树种交接行的行距适当加大,以避免木麻黄受到底荫而影响生长,或者在生长后期对大叶相思做适当修剪,减少种间树冠过度重叠(陈德旺,2003)。

本研究发现,与木麻黄纯林相比,两种混交林对土壤全磷含量的改善效果均较好,对全钾含量亦有一定的提升作用。主要由于滨海沙地保水保肥能力差,加之降雨量集中且大,造成土壤中钾离子径流、淋洗损失严重(丁效东等,2016),通过混交林种植可以增加植被覆盖度,起到抗侵蚀作用;另外,还可通过产生大量枯落物增加输入到土壤中的磷和钾含量,进而提高土壤全磷和全钾贮量。从土壤速效养分来看,速效钾、硝态氮和铵态氮含量在不同林分类型下均表现出明显的“表聚”现象,主要原因为腐殖质层和上层土壤中有机质含量较高,降低了速效养分随降雨向下层土壤淋洗。通过分析土壤理化性质之间的相关性发现,土壤 pH 与有机碳、全氮、全磷、全钾以及速效养分含量均呈显著或极显著负相关,而土壤养分间均呈显著或极显著正相关。以往研究认为,在适当降低土壤 pH 的情况下,提高养分含量,可以增加人工林的土壤微生物数量,进而改善林地土壤微生态环境(梁国华等,2015)。综上所述,木麻黄不同林分类型下的土壤理化性质存在差异,生产实践中,可以通过合理的混交林种植来改善林内枯落物的组成及性质,不断提高土壤中有机质含量,改善土壤理化性质和土壤肥力,进而促使滨海沙地木麻黄防风林的可持续生产和发展。

参考文献:

- CHAI XG, 2016. Effect of stand composition variation of pH value and content of organic matter [J]. Prot For Sci Technol, 34(10): 27–28. [柴旭光, 2016. 林分组成对林下土壤 pH 及有机质含量变化的影响 [J]. 防护林科技, 34(10): 27–28.]
- CHEN DZ, YE GF, GAO W, et al., 2018. Ecological response of *Casuarina equisetifolia* to environmental stress in coastal dunes in China [J]. J For Res, 23(3): 1–10.
- CHEN DW, 2003. Study on the growth, protective function and soil fertility of mixed forest of *Casuarina* and *Acacia auriculaeformis* [J]. For Sci Technol, 8(3): 13–15. [陈德旺, 2003. 木麻黄大叶相思混交林生长效果、防护功能和土壤肥力研究 [J]. 防护林科技, 8(3): 13–15.]
- DING XD, ZHANG SR, LOU JH, et al., 2016. Effects of combined organic manure and phosphorus fertilizer on the phosphorus leaching risk in coastal saline soil [J]. Ecol Environ Sci, 25(7): 1169–1173. [丁效东, 张士荣, 娄金华, 等, 2016. 有机肥与磷肥配施对滨海盐渍化土壤磷素淋洗风险的影响 [J]. 生态环境学报, 25(7): 1169–1173.]
- DU JH, LIU AL, DONG YX, et al., 2014. Architectural characteristics of roots in typical coastal psammophytes of South China [J]. Chin J Plant Ecol, 38(8): 888–895. [杜建会, 刘安隆, 董玉祥, 等, 2014. 华南海岸典型沙生植物根系构型特征 [J]. 植物生态学报, 38(8): 888–895.]
- FENG J, LIU Q, WANG J, et al., 2016. Effects of leachates from *Casuarina equisetifolia* on growth and physiological and biochemical characteristics of *Terminalia catappa* seedlings [J]. Guihaia, 36(3): 308–314. [冯剑, 刘强, 王瑾, 等, 2016. 木麻黄浸提液对榄仁树幼苗生长及生理生化的影响 [J]. 广西植物, 36(3): 308–314.]
- GAO CJ, LI K, TANG GY, et al., 2014. Nutrient accumulation and cycling in pure and mixed plantations of *Azadirachta indica* and *Acacia auriculiformis* in a dry-hot valley, Yunnan Province, southwest China [J]. Chin J Appl Ecol, 25(7): 1889–1897. [高成杰, 李昆, 唐国勇, 等, 2014. 云南干热河谷印楝和大叶相思人工纯林与混交林养分循环特征 [J]. 应用生态学报, 25(7): 1889–1897.]
- HUANG SJ, ZENG Q, ZHANG LH, et al., 2009. Effects of tannin extracted from *Casuarina equisetifolia* branchlets on the growth and tannin contents of its seedlings [J]. J Trop Subtrop Bot, 17(5): 471–476. [黄舒静, 曾琦, 张立华, 等, 2009. 短枝木麻黄小枝单宁对其幼苗生长及单宁含量的效应 [J]. 热带亚热带植物学报, 17(5): 471–476.]
- LEELAMANIE D, 2016. Occurrence and distribution of water repellency in size fractionated coastal dune sand in Sri Lanka under *Casuarina* shelterbelt [J]. Catena, 142: 206–212.
- LEI B, LIU B, LUO CD, et al., 2014. Catabatic effect from artificial mixed plantation of *Cunninghamia lanceolata* on soil aluminum toxicity [J]. Acta Ecol Sin, 34(11): 2884–2891. [雷波, 刘彬, 罗承德, 等, 2014. 杉木人工混交林对土壤铝毒害的缓解作用 [J]. 生态学报, 34(11): 2884–2891.]
- LIANG GH, WU JP, XIONG X, et al., 2015. Responses of soil pH value and soil microbial biomass carbon and nitrogen to simulated acid rain in three successional subtropical forests at Dinghushan Nature Reserve [J]. Ecol Environ Sci, 24(6): 911–918. [梁国华, 吴建平, 熊鑫, 等, 2015. 鼎湖山不同演替阶段森林土壤 pH 值和土壤微生物量碳氮对模拟酸雨的响应 [J]. 生态环境学报, 24(6): 911–918.]
- LIU CL, RAN YH, TAO Y, et al., 2013. The present situation investigation of coastline *Casuarina* forest in Hainan Island [J]. For Resour Manag, 4(2): 102–106. [刘成路, 冉焰辉, 陶悠, 等, 2013. 海南岛海岸线木麻黄林现状调查 [J]. 林业资源管理, 4(2): 102–106.]

- LU RK, 2000. Analysis method of soil agricultural chemistry [M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press. [鲁如坤, 2000. 土壤农业化学分析方法 [M]. 北京: 中国农业科技出版社.]
- PEREIRAAPA, DURRER A, GUMIERE T, et al., 2019. Mixed *Eucalyptus* plantations induce changes in microbial communities and increase biological functions in the soil and litter layers [J]. For Ecol Manag, 433: 332–342.
- SHENG WT, 2018. On the maintenance of long-term productivity of plantation in China [J]. For Res, 31(1): 1–14. [盛炜彤, 2018. 关于我国人工林长期生产力的保持 [J]. 林业科学研究, 31(1): 1–14.]
- TANG GY, LI K, SUN YY, et al., 2012. Nitrogen-fixation potential of nodules in four types of nitrogen-fixation plants and their influencing factors in dry-hot valley [J]. For Res, 25(4): 432–437. [唐国勇, 李昆, 孙永玉, 等, 2012. 干热河谷 4 种固氮植物根瘤固氮潜力及其影响因素 [J]. 林业科学研究, 25(4): 432–437.]
- WANG SL, CHEN CY, 1992. Preliminary studies on the buffering effects of forest litter on soil acidification [J]. Chin J Environ Sci, 13(5): 36–41. [汪思龙, 陈楚莹, 1992. 森林凋落物对土壤酸化缓冲作用的初步研究 [J]. 环境科学, 13(5): 36–41.]
- WANG X, LI HM, CAO TT, et al., 2017. The diversity of soil fungi and allelopathic potentials of special fungal metabolites in *Casuarina equisetifolia* woodlands of different stand ages [J]. Chin J Appl Environ Biol, 23(4): 670–677. [王璇, 李慧敏, 曹婷婷, 等, 2017. 不同林龄木麻黄林地土壤真菌多样性及特有真菌代谢产物化感潜力 [J]. 应用与环境生物学报, 23(4): 670–677.]
- XIONG Y, XU GQ, WU L, 2012. Progress on non-additive effects of mixed litter decomposition [J]. Environ Sci Technol, 35(9): 56–60. [熊勇, 许光勤, 吴兰, 2012. 混合凋落物分解非加和性效应研究进展 [J]. 环境科学与技术, 35(9): 56–60.]
- XU ZX, LI XR, CAI LZ, et al., 2018. Analysis of soil microbial community and enzyme activity of *Casuarina equisetifolia* plantations at different stand ages in Hainan [J]. J NW A & F Univ (Nat Sci Ed), 46(10): 1–14. [徐志霞, 李小容, 蔡莲子, 等, 2018. 海南不同林龄木麻黄海防林土壤微生物群落组成与酶活性的动态分析 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 46(10): 24–34.]
- XUE Y, CHEN YQ, LIU XZ, et al, 2014. Comparisons of soil chemical properties under four typical forest stands in Northeast Hainan [J]. Ecol Sci, 33(6): 1142–1146. [薛杨, 陈毅青, 刘宪钊, 等, 2014. 海南东北部 4 种典型人工林土壤化学性质研究 [J]. 生态科学, 33(6): 1142–1146.]
- YANG B, HAO QY, 2020. Selection of mixed species of *Casuarina equisetifolia* L. based on natural regeneration properties [J]. Plant Sci J, 38(2): 221–232. [杨彬, 郝清玉, 2020. 基于天然更新性能筛选海南岛木麻黄海防林混交树种 [J]. 植物科学学报, 38(2): 221–232.]
- YANG CD, 2016. Decline of quantity and quality of soil organic matter is the key factor restricting the growth of plantation in China [J]. Sci Silv Sin, 52(12): 1–12. [杨承栋, 2016. 我国人工林土壤有机质的量和质下降是制约林木生长的关键因子 [J]. 林业科学, 52(12): 1–12.]
- YAO XJ, GAO Y, DU YY, et al., 2013. Spatial and temporal changes of Hainan coastline in the past 30 years based on RS [J]. J Nat Resour, 28(1): 114–125. [姚晓静, 高义, 杜云艳, 等, 2013. 基于遥感技术的近 30 a 海南岛海岸线时空变化 [J]. 自然资源学报, 28(1): 114–125.]
- ZHAO YB, JI TW, ZHANG DJ, et al., 2015. Soil physicochemical properties, biomass and nutrient contents of forest litter in mixed plantations of *Eucalyptus grandis* and three tree species [J]. Chin J Appl Environ Biol, 21(5): 948–953. [赵燕波, 纪托未, 张丹桔, 等, 2015. 3 个树种与巨桉混交土壤理化性质、凋落物量和养分含量特征 [J]. 应用与环境生物学报, 21(5): 948–953.]
- ZHONG CL, BAI JY, ZHANG Y, 2005. Introduction and conservation of *Casuarina* trees in China [J]. For Res, 18(3): 345–350. [仲崇禄, 白嘉雨, 张勇, 2005. 我国木麻黄种质资源引种与保存 [J]. 林业科学研究, 18(3): 345–350.]
- ZHOU LT, LI JJ, LUO Y, et al., 2019. Variation in soil fungal community structure during successive rotations of *Casuarina equisetifolia* plantations as determined by high-throughput sequencing analysis [J]. Plant Growth Regul, 87(3): 445–453.

(责任编辑 周翠鸣)

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202010015

谢波, 杨广斌, 李蔓, 等. 贵州省国家公园选址及其植物多样性保育研究 [J]. 广西植物, 2022, 42(8): 1325–1336.

XIE B, YANG GB, LI M, et al. Site selection and plant diversity conservation of national park in Guizhou Province [J]. *Guihaia*, 2022, 42(8): 1325–1336.



贵州省国家公园选址及其植物多样性保育研究

谢 波^{1,2}, 杨广斌^{1,2*}, 李 蔓^{1,2}, 李亦秋^{1,2}

(1. 贵州师范大学 地理与环境科学学院, 贵阳 550001; 2. 贵州省山地资源与环境遥感应用重点实验室, 贵阳 550000)

摘 要: 贵州省生态资源丰富, 建立国家公园有利于集中规范化管理生态资源。为了分析贵州省国家级自然保护区的空间分布特征, 筛选出优势景观资源聚集区作为国家公园候选区, 该文借助 ArcGis 空间分析工具对现有的 5 类 113 处保护地进行空间分布特征分析, 筛选出国家公园试点候选区并对其进行资源评价。结果表明: (1) 贵州省国家级自然保护区总体呈凝聚型分布, 重叠度高, 将保护地聚集区作为景观优势聚集区划定了 8 个国家公园试点候选区。 (2) 通过对聚集区主要代表性资源分析和专家评分得出, 分值排在前列的聚集区可以考虑作为国家公园试点区进行推荐, 分值最高的赤水-习水区可优先选为国家公园试点区。 (3) 赤水-习水区资源的国家代表性、适宜性、国有性和社会可行性等, 满足设立国家公园优先整合交叉重叠保护地的基本原则, 其植物多样性保育价值重大。该研究结果为国家公园的选址提供了新的思路, 并为以国家公园为主体的自然保护区体系建立以及国家公园植物多样性保育提供了参考依据。

关键词: 贵州省, 国家公园选址, 国家级自然保护区, 空间分布, 植物多样性保育, 层次分析法

中图分类号: Q948 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2022)08-1325-12

Site selection and plant diversity conservation of national park in Guizhou Province

XIE Bo^{1,2}, YANG Guangbin^{1,2*}, LI Man^{1,2}, LI Yiqiu^{1,2}

(1. School of Geography and Enviroment Sciences, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China; 2. Guizhou Key Laboratory of Mountainous Resources and Environment Remote Sensing, Guiyang 550000, China)

Abstract: Guizhou Province is rich in ecological resources, and the establishment of national park is conducive to centralized and standardized management of ecological resources. In order to analyze the spatial distribution characteristics of national nature reserves in Guizhou Province, and to screen out the advantageous landscape resource gathering areas for the selection of national parks, we analyzed the spatial distribution characteristics of 113 protected

收稿日期: 2021-05-06

基金项目: 国家自然科学基金(U1812401); 贵州省科技计划重大专项([2019]1218, [2019]1222, [2020]1Z031); 贵州师范大学资助博士科研项目(GZNU [2017]8, GZNU [2017]9) [Supported by National Natural Science Foundation of China (U1812401); Key Science and Technology Project of Guizhou Province ([2019]1218, [2019]1222, [2020]1Z031); Guizhou Normal University Doctoral Fund (GZNU [2017]8, GZNU [2017]9)]。

第一作者: 谢波(1996-), 硕士研究生, 研究方向为地理信息系统应用与研究, (E-mail) 1204983953@qq.com。

通信作者: 杨广斌, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事地理信息系统的开发与应用研究, (E-mail) ygbyln@163.com。

areas in five categories by ArcGis spatial analysis tool, and screened out the candidate areas of national park pilots and evaluated their resources. The results are as follows: (1) The national nature reserves in Guizhou Province are distributed in a cohesive way with a high degree of overlap, and eight national park pilot candidate areas are delimited by taking the reserve gathering area as the landscape advantage area. (2) Based on the analysis of the main representative resources of the gathering areas and the experts' scores, the concentration areas with higher scores can be recommended as the national park pilot areas, and the highest score in Chishui-Xishui area can be selected as the national park experimental area. (3) The national representativeness, suitability, state-owned and social feasibility of Chishui-Xishui area resources can meet the basic principle of setting up national parks with priority to integrate the overlapping protected areas, and its plant diversity conservation is of great value. The results of this study provide a new idea for choosing location of national parks and a reference for the establishment of national parks based on nature reserve system and the conservation of plant diversity in national parks.

Key words: Guizhou Province, national park site, national natural protected area, space distribution, plant diversity conservation, analytic hierarchy process (AHP)

自然保护地是由各级政府划定,通过法律和其他有效手段对重要自然生态系统、自然遗迹、自然景观及其所承载的自然资源、生态功能和文化价值等进行长期保护管理的特定区域(唐小平等, 2019),为我国野生动物种群和高等植物群落的多样性保育发挥了重要作用(严重玲, 1994)。然而,大多数保护地在建立之初,主要以抢救式保护为主,管理水平滞后,出现了建而不管、管而不力、人地关系突出等问题(欧阳志云等, 2002)。中共中央办公厅、国务院办公厅 2019 年 6 月发布的《关于建立以国家公园为主体的自然保护地体系的指导意见》(以下简称《方案》)中提出,要建立以国家公园为主体,自然保护区为基础的自然保护地体系,为自然保护地的优化管理指引方向。一些学者从宏观、定性的角度,以国家尺度和流域空间为基础,分析自然保护地的空间分布特征和自然人文条件建设国家公园的可行性(王连勇和霍伦贺斯特·斯蒂芬, 2014)。朱里莹等(2019)以热点探测为基础,对省域尺度的国家公园试点进行了研究和分析;薛冰洁等(2017)和王恒等(2013)通过对单个国家公园的评价分析,确定其选址范围的大小及其功能分区状况;赵勇等(2009)和黄春华等(2012)根据植物濒危的原因和保护区的实际情况对植物多样性保育提出了相应的对策。

贵州省位于中国南方喀斯特地区,特殊的自然条件使其呈现生态环境多样、生物种类丰富、生态系统服务价值巨大的现状(金勇等, 2019)。贵州省自然保护地体系相对较为成熟,拥有世界级和国家级保护地 5 类共 113 处(侯伟, 2019)。本

研究以贵州省省域范围为单元、国家级自然保护地为基础,将保护地优势景观资源聚集区作为国家公园候选区,综合候选区主要代表性景观资源与潜在资源的评价分析和专家评分进行国家公园的选址,并对国家公园试点区植物多样性的保育提出建议,能够使自然资源、生态系统、植物多样性等在被保护的同时,充分发挥其优势作用,进一步推动区域的可持续发展,以期为国家公园的选址提供新的思路和参考。

1 材料与方法

1.1 数据来源及数据处理

国家级自然保护地保护区的范围和主要保护物种来源于贵州省林业局官方网站(<http://ljj.guizhou.gov.cn/>),数据统计截止时间为 2020 年 1 月 1 日),通过提取保护地的质心,得到保护地的点要素(图 1)。贵州省各类区划图来源于贵州省地图集(贵州省国土资源厅, 2005),通过扫描、配准、矢量化整理得到各类型的区划图;区域生产总值和人口数据来自贵州省 2018 年统计年鉴。

1.2 研究方法

1.2.1 最邻近点指数 最邻近点指数用于表达点状数据在空间上的分布类型,分布结构有均匀、随机和集聚 3 种形式。贵州省国家级自然保护地经过质心抽取后呈点状分布,由 ArcGis 中最邻近点指数工具进行判断(吴佳雨, 2014)。公式如下:

$$r_E = \frac{1}{\sqrt{2n/A}} \quad (1)$$

$$R=\frac{\bar{r}}{r_E}\tag{2}$$

式中： r_E 为预期平均距离； A 为区域面积； n 为区域内点的数量； R 为最邻近点指数， $\bar{r}$ 为实际上的平均观测距离。当最邻近点指数 $R<1$ 时，表明点状要素为集聚分布； $R=1$ 时，为随机分布； $R>1$ 时，为均匀分布。

1.2.2 核密度指数 用于描述点状数据的密度大小在区域内的空间聚集特征(李全林等,2012)。运用 ArcGis 中 Kernel 工具,对自然保护地点要素及面要素分别进行核密度分析。假定各类保护地的重要性一致,认为区域内保护地的聚集程度可以代表优质景观资源的聚集性,对其进行整合,选定为国家公园的候选区。公式如下：

$$f(x,y)=\frac{1}{nh^2}\sum_{j=1}^nL\left(\frac{d_j}{n}\right)\tag{3}$$

式中： $f(x,y)$ 是指位置 (x,y) 的核密度值； n 为保护地数量； h 为带宽； L 为核函数； d_j 为位置距第 j 个观测位置的距离。该值越高,表明国家级自然保护地空间分布密度越大,反之则越小。

1.2.3 层次分析法(AHP法) 层次分析法(analytic hierarchy process,简称 AHP 法)是一种对定性问题进行定量分析的多准则决策方法(王恒等,2013)。首先,根据国家公园候选区潜在资源评价指标,分别邀请林业管理、土地管理、风景园林规划和自然地理共 10 位专家进行了两轮专家意见征询和打分;然后,通过 AHP 法得出候选区的分值和位次。公式如下：

$$E=\sum_{i=1}^nQ_iP_i\tag{4}$$

式中： E 为国家公园候选区的综合评价结果； Q_i 为第 i 个评价因子的权重； P_i 为第 i 个评价因子的评价分值； n 为评价因子的数目。

2 国家公园候选区选址

2.1 国家公园候选区选定

2.1.1 保护地空间分布类型 通过 ArcGis 10.2 中最邻近点指数工具对自然保护地空间分布类型进行计算(表 1)。由表 1 可知,单个类别保护地的最邻近点指数 R 都大于 1,趋于均匀分布,总保护地平均观测距离 $\bar{r}=0.17$,预期平均距离 $r_E=0.20$,最邻近比率(最邻近点指数) $R=0.84$,即各保护地之

间实际观测距离与预期观测距离的均值之比 R 小于 1,表明贵州省国家级自然保护地总体上呈集聚分布状态。

表 1 贵州省国家级自然保护地最邻近点指数
Table 1 Nearest neighbor index of national natural protected areas in Guizhou Province

保护地类型 Protected area type	数量 Number	面积 Area (km ²)	$\bar{r}$	r_E	R
自然保护地 Natural protected area	113	9 507.17	0.17	0.20	0.84
自然保护区 Natural reserve	11	3 070.93	0.8	0.56	1.42
风景名胜区 Landscape and famous scenery	18	3 773.89	0.71	0.48	1.49
地质公园 Geopark	9	108.86	0.94	0.54	1.76
森林公园 Forest park	30	1 870.22	0.37	0.33	1.10
湿地公园 Wetland park	45	683.27	0.40	0.30	1.31

2.1.2 保护地空间分布聚集度分析 自然保护地质心核密度分布格局(图 2)显示,贵州省自然保护地在空间分布上形成 6 个比较密集的中心,并向四周扩散。整体上,以北部赤水-习水一带的质心核密度最高;中部较为集聚,以安顺、贵阳黔中地区到黔东南州以“一”字形排开,其余四周核密度值都相对较为稀疏。自然保护地面积核密度分布格局(图 3)显示,贵州省自然保护地在空间分布上主要有 5 个密集区。赤水-习水一带密度最高,其次是黔东南和铜仁分布有 3 个密集区,以及黔西南的马岭河峡谷密集区。

2.1.3 保护地空间分布聚集度分析 贵州省国家级自然保护地整体呈集聚分布,且主要集中聚集在一定范围的区域,满足以聚集区作为优势景观资源聚集区的条件。根据现有 113 个国家级自然保护地的空间分布特征,结合自然保护地质心核密度和面积核密度的聚集区,筛选出聚集度高的区域,并进行适当的收缩,最终划定了 8 个贵州省自然保护地聚集区作为国家公园候选区。为了方便命名,以聚集区主要县域单元名称组合或主要地级市与县域单元名称组合作为国家公园候选区的名称。如图 4 所示(利用罗马数字表示候选区的名称,下同)。

2.2 国家公园候选区潜在资源评价指标

根据《方案》中对国家公园选址的要求,参考前人(陈鑫峰,2002;张希武,2018;舒旻,2018;侯伟,2019)对于国家公园选点的研究选定若干个评价指标及评分标准,并参考王恒(2013)层次分析评价模型的方法,对各指标因子进行权重分配,得

到各评价指标的权重值(表2)。

2.3 国家公园候选区潜在资源指标分析

2.3.1 候选区景观资源 根据贵州省国家级自然保护区地名录和贵州植被(黄威廉和屠玉麟,1983)等相关资料,对国家公园候选区具有代表性和独特性的景观资源进行筛选,具体如表3所示。

表 2 国家公园试点区选址的评价指标
Table 2 Evaluation index of site selection in national park pilot areas

一级指标 Firstly-level index	二级指标 Secondary-level index	评价内容 Evaluation content	权重 Weight
I ₁ 资源的国家 家代表性 National representation of resources	I ₁₁ 自然景观 Natural landscape	具有不存在人为扰动或退化的自然景观 There is no artificial disturbance or degradation of the natural landscape	0.051 5
	I ₁₂ 生物多样性 Biodiversity	生态系统、群落、生境以及动植物物种的种类或丰富度高的区域 Types of ecosystems, communities, habitats, and biological species or areas with high abundance	0.082 0
	I ₁₃ 特殊物种保护 Special species protection	珍稀、濒危生物物种的集中分布区域 Concentrated distribution area of rare and endangered biological species	0.091 7
	I ₁₄ 地质地貌 Geological landscape	地质地貌全球或全国范围内具有重要保护和研究价值的区域 Geological and geomorphological areas with important protection and research value globally or nationwide	0.031 2
	I ₁₅ 古生物遗迹 Paleontological relics	具有代表地球与生物的演化进程古生物遗迹的区域 It has an area representing the ancient biological relics of the evolution process of the earth and living things	0.050 3
	I ₁₆ 科学研究 Scientific research	具有科学研究价值的区域 Areas with scientific research value	0.092 0
	I ₁₇ 历史纪念价值 Historical value	具有历史纪念价值和意义的区域 An area with historical memorial value and significance	0.061 5
I ₂ 资源的适宜性 Suitability of resources	I ₂₁ 面积 Area	总面积不小于 100 km ² Area not less than 100 km ²	0.073 3
	I ₂₂ 保护地类型 Type of protected area	保护地类型丰富,功能完整的区域 An area with rich types of protected areas and complete functions	0.082 8
	I ₂₃ 空间 Space	范围完整,相对集中连片的区域 Complete range, relatively concentrated connected area	0.043 3
	I ₂₄ 边界 Boundary	边界易于识别和确定的区域 Boundary easy to identify and identify	0.063 4
I ₃ 资源的国有性 Nationalization of resources	I ₃₁ 资源权属 Resource tenure	权属清楚,不存在纠纷 The ownership is clear and there is no dispute	0.082 8
	I ₃₂ 国有土/林地 State soil/forest land	占国家公园总面积在 60%以上 It accounts for more than 60% of the total area of the national park	0.078 2
I ₄ 资源的社会可行性 Social feasibility of resources	I ₄₁ 人口 Population	人口密度每平方千米不高于 200 人,无县级以上城市 Population density is not more than 200 person · km ⁻² , no city above county level	0.023 7
	I ₄₂ 产业 Industry	无大型重工业、农业建设 No large heavy industry, agricultural construction	0.020 3
	I ₄₃ 交通 Traffic	交通便利 Convenient transportation	0.021 0
I ₅ 附加项 Additional item		公园有其他较为独特之处,可以加分项 The park has other more unique features that can add points	0.051 0

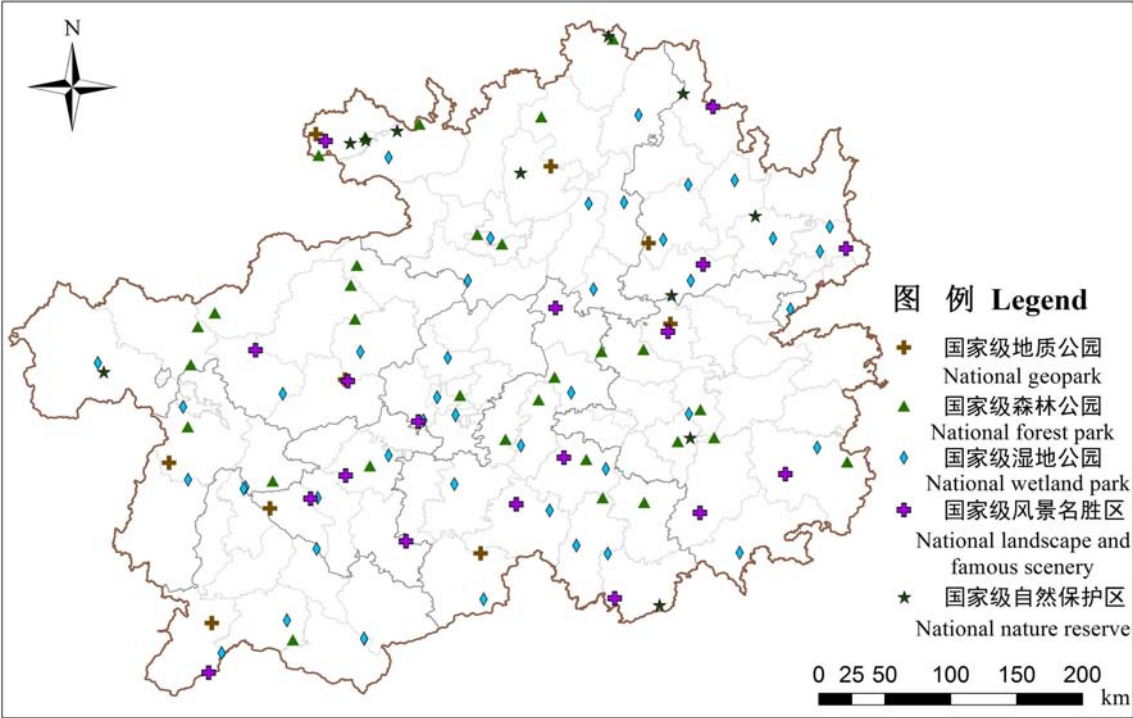


图 1 贵州省国家级自然保护地空间分布
Fig. 1 Spatial distribution of national natural protected areas in Guizhou Province

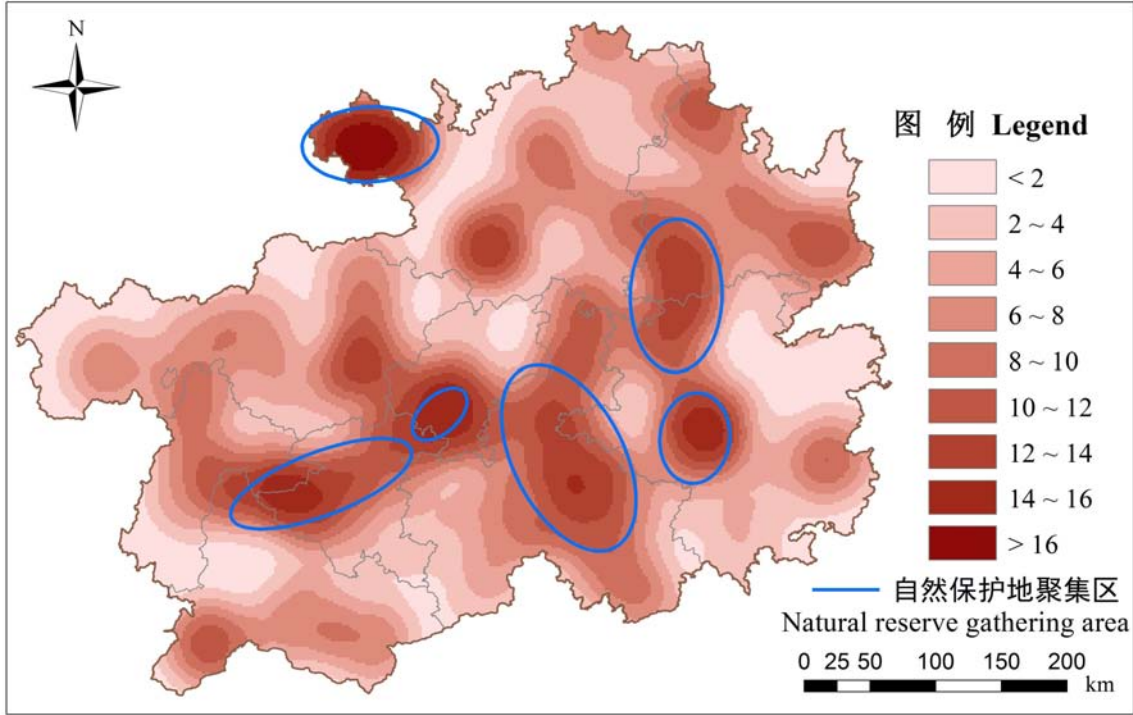


图 2 国家级自然保护地质心核密度分布
Fig. 2 Core kernel density distribution of national natural protected areas in Guizhou Province

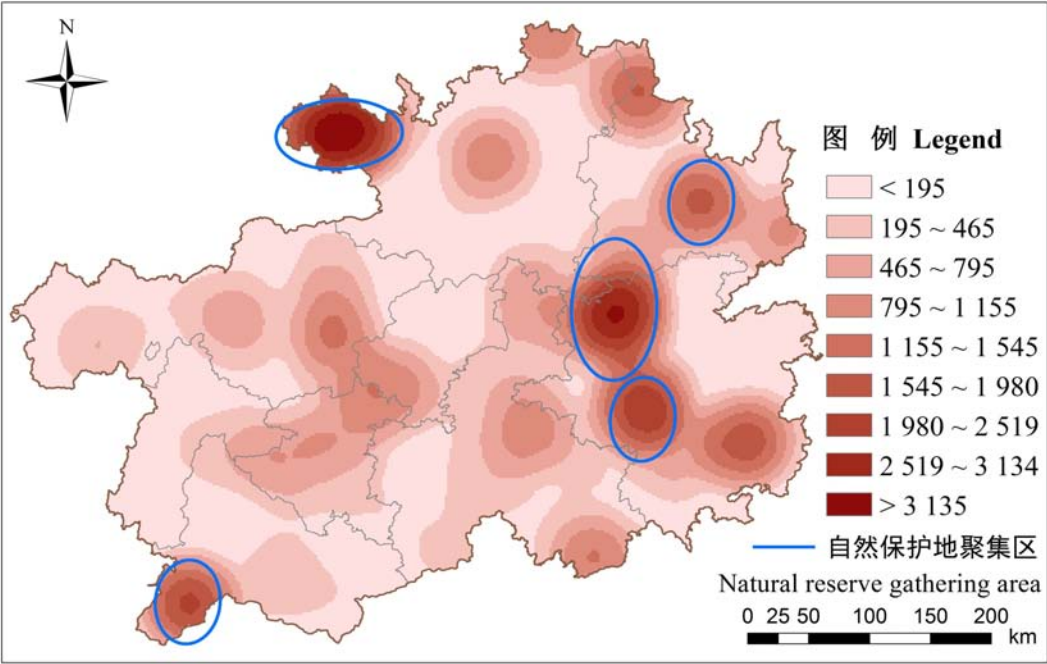
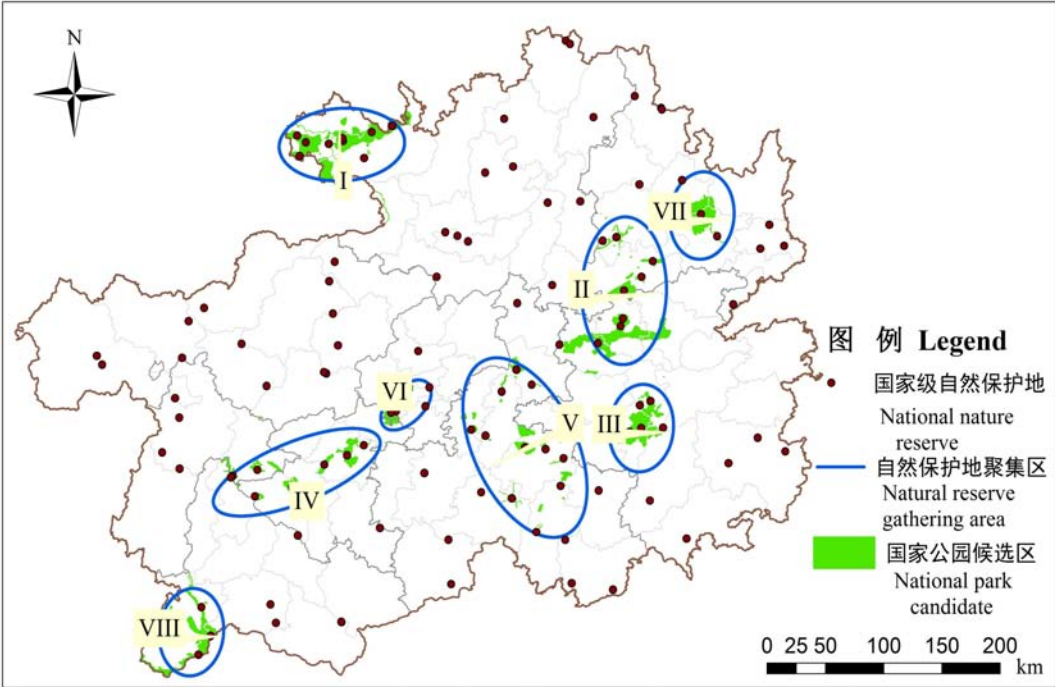


图 3 国家级自然保护地面积核密度分布

Fig. 3 Areas kernel density distribution of national natural protected areas in Guizhou Province



I. 赤水-习水区; II. 施秉-石阡区; III. 雷山-台江区; IV. 关岭-西秀区; V. 都匀-贵定-福泉区; VI. 贵阳-清镇区; VII. 江口-印江区; VIII. 兴义-马岭河区。下同。
I. Chishui-Xishui area; II. Shibing-Shiqian area; III. Leishan-Taijiang area; IV. Guanling-Xixiu area; V. Duyun-Guiding-Fuquan area; VI. Guiyang-Qingzhen area; VII. Jiangkou-Yinjiang area; VIII. Xingyi-Malinghe area. The same below.

图 4 贵州省国家公园候选区

Fig. 4 Candidate areas of national park in Guizhou Province

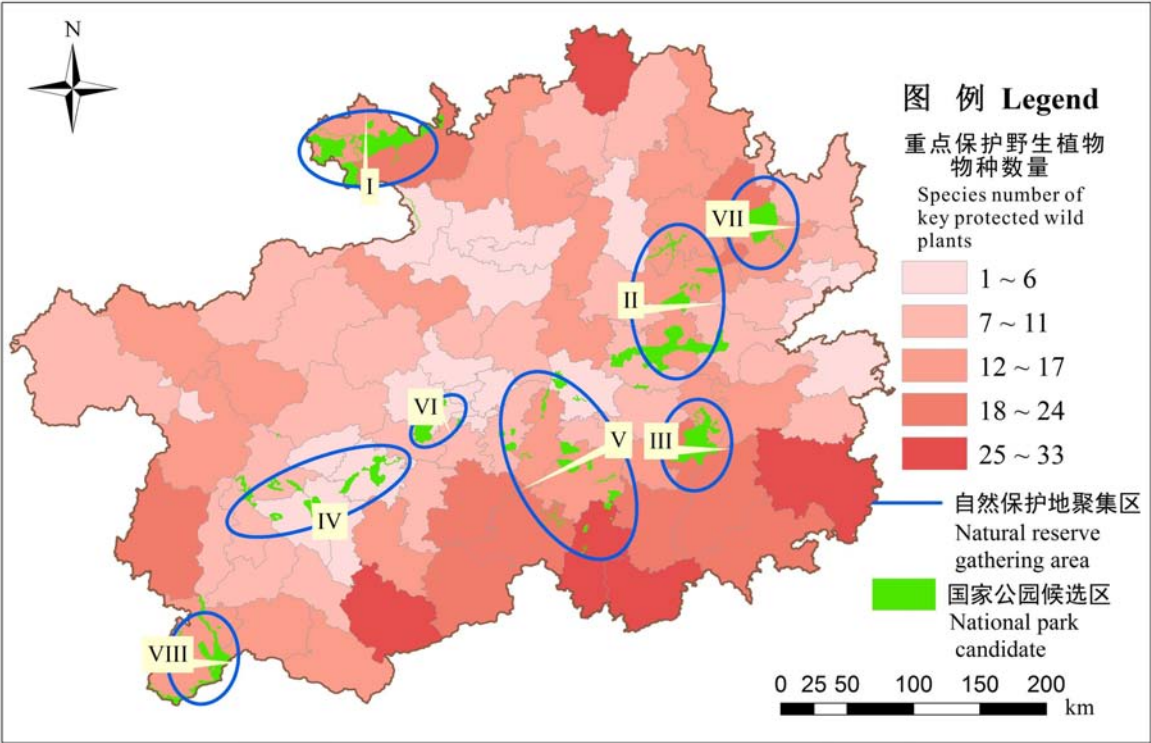


图 5 贵州省国家重点保护野生植物物种数量县域分布图

Fig. 5 Distribution of the national key protected plant species in county units of Guizhou Province

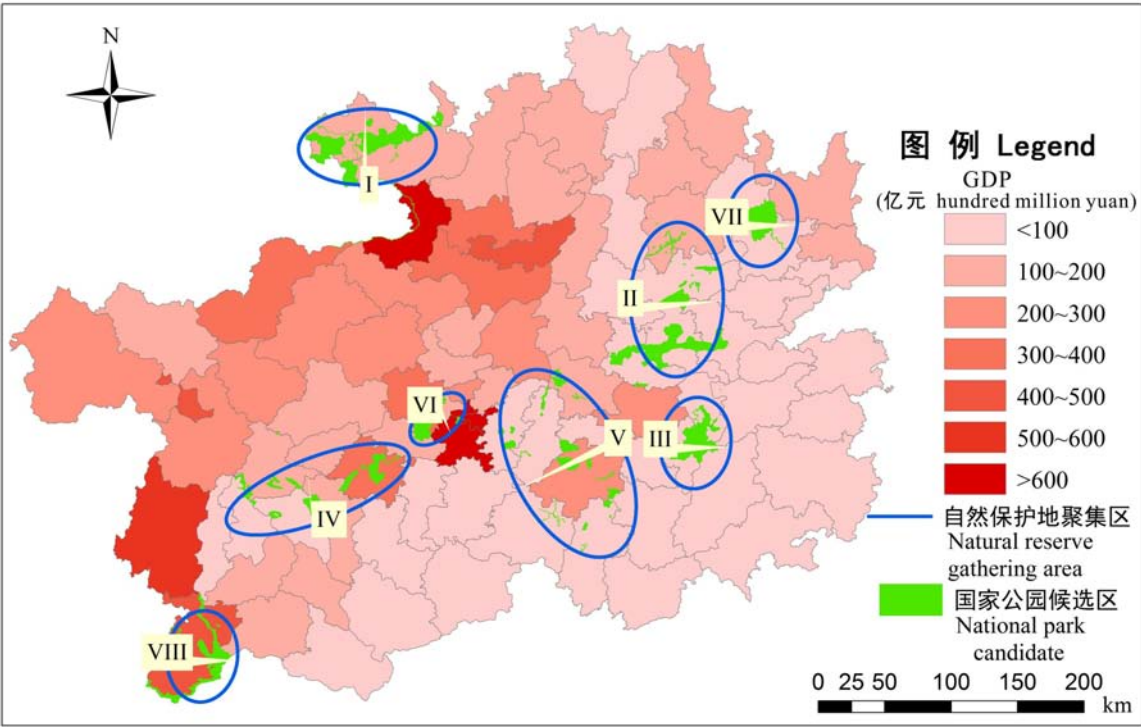


图 6 贵州省 2018 年 GDP 数量分布图

Fig. 6 Distribution map of Guizhou Province's GDP in 2018

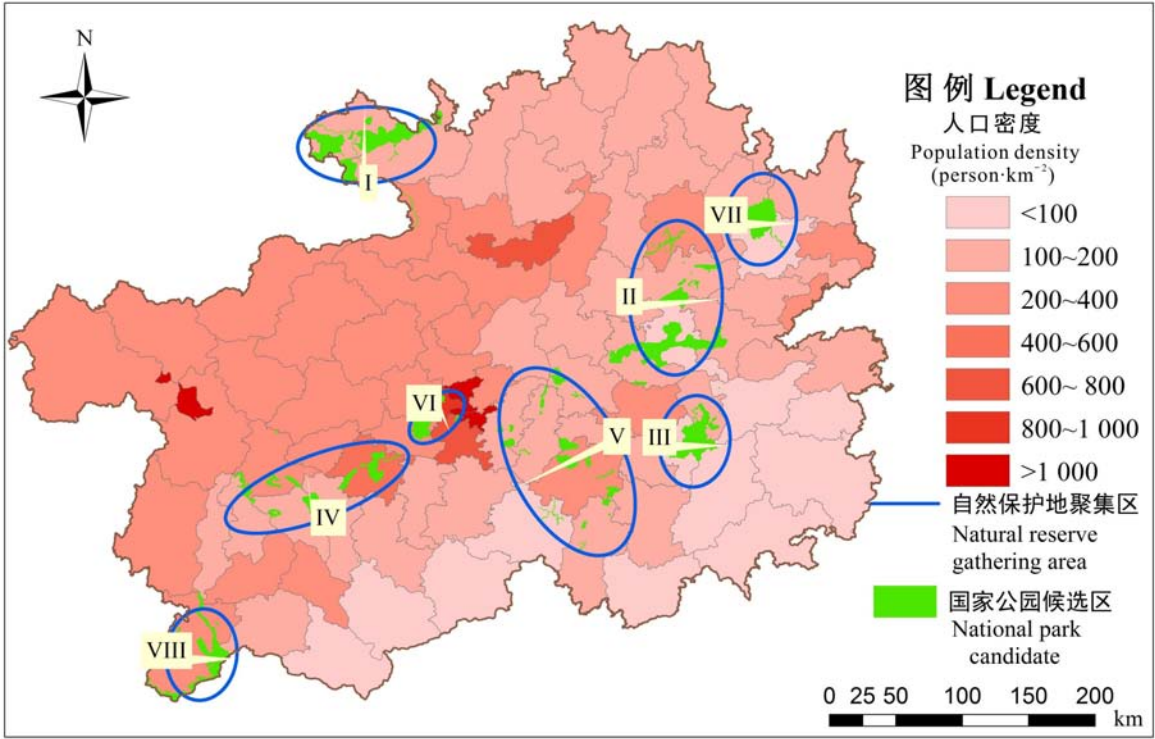


图 7 贵州省 2018 年人口密度分布图

Fig. 7 Population density distribution map of Guizhou Province in 2018

贵州省动植物资源十分丰富,据《贵州省国土资源资料汇编》中的初步调查和统计,全省有脊椎动物 807 种,其中两栖类 60 种、爬行类 99 种、鸟类 403 种、哺乳类 134 种;全省种子植物有 196 科、1 400 余属、近 5 000 种。候选区作为国家级自然保护地的主要聚集区,汇集了大量的优势动植物资源。从表 3 可以看出,候选区代表性景观资源丰富,各类自然景观和生态系统完整,生物多样性丰富,特殊动植物物种种类多,黔中地区的 IV(关岭-西秀区)、V(都匀-贵定-福泉区)和 VI(贵阳-清镇区)候选区的代表性景观资源明显要低于其他的公园候选区,资源优势相对较弱。

2.3.2 候选区的植物多样性 根据贵州省国家重点保护野生植物物种数量分布数据(金勇等, 2019),按照县域进行统计,具体见图 5。由图 5 可知,贵州省国家重点保护野生植物数量丰富,目前已知的重点保护野生植物物种有 42 科、66 属、85 种。其中,南部县域以及北部道真县的重点保护野生植物物种分布数量整体较高,并向中部逐渐减少,望谟、独山、荔波和黎平县的物种数量都在

25~33 种之间;而贵阳和安顺一带,以及北部遵义汇川、仁怀、播州和东部天柱、玉屏等县的重点保护野生植物物种分布数量最低,分布数量在 1~6 种之间。值得注意的是,有的保护植物物种较多的县域并不在国家公园候选区内,主要原因在于其分布的县域内国家级自然保护地的聚集程度较低,不符合优势景观资源聚集区的原则,可以考虑在重点保护植物物种较多的县域建立相应的植物保护优先区,加强对植物多样性的保育。从国家公园候选区的范围来看,IV(关岭-西秀区)、VI(贵阳-清镇区)候选区范围内的重点保护野生植物数量最少,在 1~6 种之间。其余候选区所分布的县域重点保护植物物种都在 15 个以上,其中都匀-贵定-福泉区范围内县域的保护植物物种共 65 种,施秉-石阡区范围内共 62 种,江口-印江区和雷山-台江区范围内均为 38 种,赤水-习水区范围内共 37 种,兴义-马岭河区范围内保护植物物种最低(为 31 种)。

2.3.3 候选区的经济发展水平 以贵州省县级行政单位 2018 年 GDP 总量为基础,进行分层设色并

表 3 国家公园候选区的主要代表性景观资源（部分）

Table 3 Representative landscape resources in the national park candidate area（Part）

候选区 Candidate area	主要代表性和独特性景观资源 Main representative and unique landscape resources
I	“中国丹霞”世界自然遗产地、同纬度最广泛常绿阔叶林带、桫欏、福建柏、红豆杉、三尖杉、鹅掌楸等 “China Danxia” world natural heritage site, the widest evergreen broad-leaved forest belt at the same latitude, <i>Alsophila spinulosa</i> , <i>Fokienia hodginsi</i> , <i>Taxus chinensis</i> , <i>Cephalotaxus fortunei</i> , <i>Liriodendron chinense</i> , etc.
II	“南方喀斯特”世界自然遗产地、喀斯特森林生态系统、银杏、桢楠、金钱槭、苏门羚、大鲵、灵猫等珍稀动植物 “Southern Karst” world natural heritage site, karst forest ecosystem, <i>Ginkgo biloba</i> , <i>Phoebe zhennan</i> , <i>Dipteronia sinensis</i> , <i>Capricornis sumatraensis</i> , <i>Andrias davidianus</i> , <i>Viverridae</i>
III	森林生态系统、苗族圣地、秃杉、香果树、翠柏、马尾树、猕猴、穿山甲、林麝等 Forest ecosystem, holy land of Miao, <i>Taiwania cryptomerioides</i> , <i>Emmenopterys henryi</i> , <i>Calocedrus macrolepis</i> , <i>Rhoiptelea chiliantha</i> , <i>Macaca</i> , <i>Manis pentadactyla</i> , <i>Moschus berezovskii</i> , etc.
IV	湿地生态系统、森林生态系统、化石群 Wetland ecosystem, forest ecosystem, fossil group
V	湿地生态系统、森林生态系统 Wetland ecosystem, forest ecosystem
VI	湿地生态系统 Wetland ecosystem
VII	“梵净山”世界自然遗产地、佛教名山、森林生态系统、珙桐、钟萼木、梵净山冷杉、黔金丝猴、华南虎、云豹等 “Mount Fanjing” World natural heritage site, Buddhist mountains, forest ecosystem, <i>Davidia involucrata</i> , <i>Bretschneidera sinensis</i> , <i>Abies fanjingshanensis</i> , <i>Rhinopithecus brelichi</i> , <i>Panthera tigris amoyensis</i> , <i>Neofelis nebulosa</i> , etc.
VIII	喀斯特峡谷地貌、喀斯特峰林、沟谷季雨林、血桐、贵州苏铁 Karst canyon landform, karst fenglin, valley rainforest, <i>Macaranga tanarius</i> , <i>Cycas guizhouensis</i>

表 4 贵州省国家公园候选区潜在资源专家评分表

Table 4 Expert rating form for potential resources in candidate areas of national parks in Guizhou Province

一级指标 Firstly-level index	权重 Weight	二级指标 Secondary-level index	权重 Weight	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
I ₁	0.460 2	I ₁₁	0.051 5	0.23	0.23	0.21	0.19	0.19	0.19	0.20	0.19
		I ₁₂	0.082 0	0.59	0.57	0.54	0.48	0.48	0.47	0.50	0.48
		I ₁₃	0.091 7	0.74	0.71	0.68	0.60	0.60	0.59	0.63	0.61
		I ₁₄	0.031 2	0.09	0.08	0.08	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07
		I ₁₅	0.050 3	0.22	0.22	0.20	0.18	0.18	0.18	0.19	0.18
		I ₁₆	0.092 0	0.74	0.72	0.69	0.60	0.60	0.59	0.63	0.61
		I ₁₇	0.061 5	0.33	0.32	0.31	0.27	0.27	0.26	0.28	0.27
I ₂	0.262 8	I ₂₁	0.073 3	0.47	0.46	0.44	0.38	0.38	0.38	0.40	0.39
		I ₂₂	0.082 8	0.60	0.58	0.56	0.49	0.49	0.48	0.51	0.49
		I ₂₃	0.043 3	0.16	0.16	0.15	0.13	0.13	0.13	0.14	0.13
		I ₂₄	0.063 4	0.35	0.34	0.33	0.29	0.29	0.28	0.30	0.29
I ₃	0.161 0	I ₃₁	0.082 8	0.60	0.58	0.56	0.49	0.49	0.48	0.51	0.49
		I ₃₂	0.078 2	0.54	0.52	0.50	0.43	0.43	0.43	0.46	0.44
I ₄	0.065 0	I ₄₁	0.023 7	0.05	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
		I ₄₂	0.020 3	0.04	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
		I ₄₃	0.021 0	0.04	0.04	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
I ₅	0.051 0	I ₅	0.051 0	0.23	0.22	0.21	0.18	0.18	0.18	0.20	0.19
总分值 Total value			1	6.04	5.83	5.56	4.87	4.87	4.81	5.15	4.94

叠加自然保护地聚集区和国家公园候选区,具体见图 6。由图 6 可知,贵州省 2018 年的 GDP 总量

在空间上的分布极不均匀,总体来说呈东南向西北逐渐增加的趋势,全省县域的平均 GDP 为

168.38 亿元。2018 年,GDP 总量最高的分别是云岩区、南明区、仁怀市、花溪区和盘州市,均在 500 亿元以上。从国家公园候选区所在范围内县域的平均 GDP 来看,国家公园候选区与经济相关性的不大,国家公园候选区大多分布在 200 亿元以下的县域。其中,贵阳-清镇区的平均 GDP 最高,为 459.37 亿元;其次是兴义-马岭河区,平均 GDP 为 267.68 亿元;关岭-西秀区、赤水-习水区和都匀-贵定-福泉区平均 GDP 都在 100 亿元以上,分别为 172.90、140.86、115.59 亿元;最小的是江口-印江区、施秉-石阡区和雷山-台江区,平均 GDP 都在 100 亿元以下,分别为 92.97、70.49、32.81 亿元。

2.3.4 候选区的人口密度 以贵州省县级行政单位 2018 年人口总量为基础,除以县域面积得到贵州省县域人口密度,进行分层设色并叠加自然保护地聚集区和国家公园候选区,具体见图 7。由图 7 可知,贵州省 2018 年人口密度高值分布主要集中在贵州中部和西北部,东南部、南部和东北部相对较低,全省县域的平均人口密度每平方千米为 393.93 人。2018 年,人口密度最高的分别是云岩区、南明区、中山区、白云区,每平方千米均在 1 000 人以上,其中云岩区最高(每平方千米为 10 359.19 人)。从国家公园候选区所在范围内县域的平均人口密度来看,人口密度与国家公园候选区的分布呈负相关关系,从生态保护的角度来看,人地关系的比例小,更有利于保护地的建立和管理。其中,贵阳-清镇区的平均人口密度最高,每平方千米为 1 610.97 人;其次是关岭-西秀区和兴义-马岭河区,平均人口密度每平方千米分别为 257.15、224.11 人;平均人口密度每平方千米在 100~200 人之间的有赤水-习水区、施秉-石阡区、都匀-贵定-福泉区、江口-印江区和雷山-台江区,每平方千米分别为 151.48、144.22、138.38、137.149、100.44 人。

3 贵州省国家公园试点选择

基于贵州省各类自然、人文、生态区划的分布和文献查阅(贵州省国土资源厅,2005),以及国家公园候选区的潜在资源条件,共邀请 10 位专家进行了两轮的意见征询,并按照表 2 中的评价指标对候选区进行打分,以优(10~9)、良(8~7)、

中(6~5)、差(4~0)四个等级作为评价指标的评判标准,最终根据评价指标的权重计算出候选区的量化分值,结果见表 4。由表 4 可知,分值在 5 分以上的有赤水-习水区、施秉-石阡区、雷山-台江区、江口-印江区,可以作为国家公园试点区进行推荐,其中排分最高的是赤水-习水区,可以考虑选为国家公园试点区。

赤水-习水国家公园试点区内国家级自然保护地分布聚集程度最高、优势景观资源的聚集程度好。从国家代表性来看,试点区内国家级自然保护地成立时间早,自然景观受到人为因素的破坏和扰动较少;在地貌上跨越了赤水低山河谷区和习水-务川中山峡谷区,区域内以丹霞地貌为主,地势起伏大、地形复杂多样;试点区森林覆盖率高,具有全球同纬度最广阔的常绿阔叶林带,植物多样性丰富,分布有桫欏(*Alsophila spinulosa*)、福建柏(*Fokienia hodginsii*)和红豆杉(*Taxus chinensis*)等 37 种重点保护植物和 20 多种稀有或特有植物种、29 种珍稀濒危动物(孙亚莉和屠玉麟,2004)。风景名胜区的景观组合配合好,观赏价值极高,丹霞地貌作为世界自然遗产地,具有极为重要的科学研究价值和保护意义。

从适宜性来看,国家级自然保护地种类分布齐全,共有 5 类 9 处,能够发挥国家公园的多种功能;保护地基本上呈连片分布,核密度高,重叠度大(约 45%),边界易于识别和确定;在各类自然区划中分布密集度都较高,保护地总面积高达 1 300 km²,可划入国家公园的保护地范围较广。

从国有性来看,保护地建立时间早,基础设施建设已相对成熟,后期建设投入会较少;保护地集中分布在赤水、习水两县内,同属于遵义市,资源权属清楚,土地和林地的国有性高,便于国家公园的建立和后期统一管理。

从社会可行性来看,人口密度在全省范围内较小,每平方千米均在 100~200 人之间,经济水平处于 100~200 亿元之间,建设国家公园能够免受频繁人为活动的影响并与经济相协调。

4 讨论与结论

4.1 讨论

4.1.1 关于选址 近年来,建立以国家公园为主体的自然保护地体系是一个全新的课题,在贵州省

从资源价值方面关于国家公园试点区选址的研究和讨论中,梵净山、大苗岭、赤水-习水一带的丹霞地貌等地呼声都比较高,与评分结果排名靠前的候选区基本符合,但目前具体的选址还未有定论。

本文从自然保护地的空间分布出发,以保护地优势景观资源聚集区作为国家公园候选区,综合候选区主要代表性景观资源与潜在资源的评价分析和专家评分进行国家公园的选址,得出赤水-习水区可优先选为国家公园试点区。赤水-习水国家公园试点区的建立,对于世界遗产地“中国丹霞”的研究价值和全球自然生态系统的保护具有重要意义,有利于解决赤水-习水区内多个保护地交叉重叠、多头管理的问题,有利于对该区域常绿阔叶林森林生态系统和植物多样性的保护、保育进行集中规范化管理,进一步丰富群落的植物多样性,提高其生态、社会及经济效益。但是,仅以空间分布的密集程度作为优势景观资源区来进行国家公园的选址还存在一定的局限性,在具体选址工作的实施中还需要对相应的指标进行细化。国家公园试点区选址及植物多样性保育所受的影响因素颇多,如跨省域合作、公园结构组成、景观资源整合、公园管理、统筹人地关系、政府决策以及建设资金来源等问题仍有待进一步的讨论。

4.1.2 关于植物多样性保育 赤水-习水国家公园试点区范围内植物多样性丰富,建立国家公园对植物多样性保育研究具有极为重要的生态价值和意义。为维持赤水-习水区植物物种的多样性,在国家公园建设的总体规划中要将植物多样性保育考虑进去,建议采取以下措施:(1)从赤水-习水国家公园试点区植物物种的生存现状、分布、面积、种群个体数量、群落结构、生长习性、生境状况、濒危程度、面临的主要问题及其成因等方面,对植物物种进行普查,建立植物物种数据库,为植物多样性保育的规划和管理提供科学的依据。(2)建立赤水-习水国家公园试点区的管理法规,通过地方课程教育和社区宣传等多种方式传播植物多样性的价值和意义;扩大公园试点区周边对“非植物资源”和“非消耗性植物资源”使用价值的开发和利用,改变单一以种植为主的生产格局,杜绝垦荒种植,推进退耕还林还草进程,发展珍贵中药材种植,打造生态旅游品牌,将旅游资源优势转化为经济和环境优势。(3)加强赤水-习水区植物生长环境的改善和修复,提高植物生存环境的质量,控制

毛竹生长对其他珍稀植物群落优势地位的威胁,对分布面积小的濒危植物,可专门设立保护点进行管理;在赤水-习水区建立全国性质的桫欏、楠木和水青树等珍稀濒危植物迁地保存中心和繁殖圃,采集植物的遗传物质进行迁地和离体保护;在试点区周边建立珍稀濒危植物实验圃或展览园,保护和繁育珍稀濒危植物的同时,还可以对植物多样性保育进行展览、宣传。(4)进一步加大对赤水-习水区植物物种的生长繁殖特点、生境需求和病虫害的研究,以便合理地选择甚至创造适宜植物生长的环境,更有效地实现植物多样性保育和资源可持续利用,从而促进经济社会和谐发展。

4.2 结论

通过对贵州省国家级自然保护地的空间分布特征进行分析,筛选出国家公园候选区,并以候选区为基础单元,对各候选区潜在资源进行分析评价,结合专家评分选出国家公园的试点区。(1)贵州省国家级自然保护地总体呈凝聚型分布,可以将保护地聚集区视为优势景观资源区进行国家公园试点进行筛选。(2)优势景观资源聚集区主要代表性资源分析和专家评分得出:分值排在前列的聚集区可以考虑作为国家公园试点区进行推荐,分值最高的赤水-习水区可优先选为国家公园试点区。(3)赤水-习水区自然条件优越、植物多样性丰富,珍稀濒危动植物物种分布数量多,保护地类型齐全、面积广、基础设施成熟、资源权属清楚,满足设立国家公园优先整合交叉重叠保护地的基本原则。

参考文献:

- CHEN XF, 2002. National Park system of USA and its resource criteria and the procedure of appraisalment and authorization [J]. *World For Res*, 15(2): 49-55. [陈鑫峰, 2002. 美国国家公园体系及其资源标准和评审程序 [J]. *世界林业研究*, 15(2): 49-55.]
- Guizhou Provincial Department of Land and Resources, 2005. Guizhou Province atlas [M]. Beijing: China Cartographic Publishing House. [贵州省国土资源厅, 2005. 贵州省地图集 [M]. 北京: 中国地图出版社.]
- HOU W, 2019. Discussing the feasibility of establishing a National Park in Guizhou Province based on the resource level [J]. *J Centr S Univ For Technol (Soc Sci Ed)*, 13(4): 14-19. [侯伟, 2019. 贵州省建立国家公园的可行性—基于资源层面 [J]. *中南林业科技大学学报(社会科学)*

- 学版), 13(4): 14-19.]
- HUANG CH, GAO HY, LIAO Q, et al., 2012. Biodiversity and conservation of rare and endangered plants in Tianjingshan National Forest Park in Guangdong [J]. J Agric Sci, 40(24): 11936-11938. [黄春华, 高华业, 廖琦, 等, 2012. 广东天井山国家森林公园珍稀濒危植物多样性及保育研究 [J]. 安徽农业科学, 40(24): 11936-11938.]
- HUANG WL, TU YL, 1983. Vegetation zoning in Guizhou [J]. J Guizhou Norm Univ (Nat Sci Ed), (1): 26-47. [黄威廉, 屠玉麟, 1983. 贵州植被区划 [J]. 贵州师范大学学报(自然科学版), (1): 26-47.]
- JIN Y, AN MT, CUI XY, et al., 2019. Analysis of species abundance distribution feature and protection priority area of national protected wild plants in Guizhou Province [J]. Guihaia, 39(12): 1710-1723. [金勇, 安明态, 崔兴勇, 等, 2019. 贵州省国家重点保护野生植物物种丰富度分布特征及保护优先区分析 [J]. 广西植物, 39(12): 1710-1723.]
- LI QL, MA XD, SHENG Y, 2012. Analysis of spatial pattern of rural settlement in Northern Jiangsu [J]. Geogr Res, 31(2): 144-154. [李全林, 马晓冬, 沈一, 2012. 苏北地区乡村聚落的空间格局 [J]. 地理研究, 31(2): 144-154.]
- OUYANG ZY, WANG XK, MIAO H, et al., 2002. Discussion on the problems and countermeasures of China Nature Reserve management system [J]. Sci Technol Rev, (1): 49-52. [欧阳志云, 王效科, 苗鸿, 等, 2002. 我国自然保护区管理体制所面临的问题与对策探讨 [J]. 科技导报, (1): 49-52.]
- SHU M, 2018. Conception of China's National Park legal system [J]. For Constr, (5): 148-150. [舒旻, 2018. 中国国家公园法律体系构想 [J]. 林业建设, (5): 148-150.]
- SUN YL, TU YL, 2004. The present situation and conservation about the endangered plants and animals in the Chishui *Alsophila spinulosa* Natural Reserve [J]. J Guizhou Norm Univ (Nat Sci Ed), 22(4): 22-26. [孙亚莉, 屠玉麟, 2004. 赤水桫欏自然保护区受危物种现状及保护 [J]. 贵州师范大学学报(自然科学版), 22(4): 22-26.]
- TANG XP, JIANG YF, LIU ZL, et al., 2019. Top-level design of the natural protected area system in China [J]. For Resour Manag, (3): 1-7. [唐小平, 蒋亚芳, 刘增力, 等, 2019. 中国自然保护地体系的顶层设计 [J]. 林业资源管理, (3): 1-7.]
- WANG H, 2013. Location of the National Marine Park: A case study of Changshan Islands in Dalian [J]. J Nat Resour, 28(3): 492-503. [王恒, 2013. 国家海洋公园选址研究——以大连长山群岛为例 [J]. 自然资源学报, 28(3): 492-503.]
- WANG LY, STEVEN H, 2014. Building a unified chinese national park system: Historical lessons learned from the United States [J]. Geogr Res, 33(12): 2407-2417. [王连勇, 霍伦贺斯特·斯蒂芬, 2014. 创建统一的中华国家公园体系——美国历史经验的启示 [J]. 地理研究, 33(12): 2407-2417.]
- WU JY, 2014. Study on spatial distribution characteristics of Chinese national parks [J]. Geogr Res, 33(9): 1747-1757. [吴佳雨, 2014. 国家级风景名胜区空间分布特征 [J]. 地理研究, 33(9): 1747-1757.]
- XUE BJ, ZHANG YJ, AN TT, et al., 2017. Discussion on national park site selection for flagship giant panda species [J]. J Chin Urban For, 15(2): 24-28. [薛冰洁, 张玉钧, 安童童, 等, 2017. 旗舰种大熊猫国家公园选址研究 [J]. 中国城市林业, 15(2): 24-28.]
- YAN CL, 1994. On the protection of plant diversity in karst mountain area of Guizhou [J]. Resour Environ Yangtze Basin, 3(2): 136-140. [严重玲, 1994. 论贵州岩溶山区植物物种多样性的保护 [J]. 长江流域资源与环境, 3(2): 136-140.]
- ZHANG XW, 2018. Establishment of natural protected area system based on national park [J]. For Constr, (5): 38-46. [张希武, 2018. 建立以国家公园为主体的自然保护地体系 [J]. 林业建设, (5): 38-46.]
- ZHAO Y, SHAO WL, LIU ZG, et al., 2009. Study on the diversities, protections and cultures of Orchidaceous plants in Fujian Huboliao Nature Reserve [J]. J Fujian For Sci & Technol, 36(2): 110-114. [赵勇, 邵伟丽, 刘志高, 等, 2009. 福建虎伯寮自然保护区兰科植物多样性与保育研究 [J]. 福建林业科技, 36(2): 110-114.]
- ZHU LY, LAN SR, XUN S, 2019. National park location in Fujian based on spatial distribution characteristics of national protected areas [J]. Geogr Geogr Inform Sci, 35(2): 97-103. [朱里莹, 兰思仁, 徐姗, 2019. 基于国家级保护地空间分布特征的国家公园选址研究——以福建省为例 [J]. 地理与地理信息科学, 35(2): 97-103.]

(责任编辑 蒋巧媛)

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202103037

周康, 张哲, 宋希强, 等. 海南主要陆域自然保护地兰科植物多样性与生境的关联分析 [J]. 广西植物, 2022, 42(8): 1337–1356.

ZHOU K, ZHANG Z, SONG XQ, et al. Association analysis of orchid diversity and habitat in main land nature reserves in Hainan [J]. Guihaia, 2022, 42(8): 1337–1356.



海南主要陆域自然保护地兰科植物多样性与生境的关联分析

周 康, 张 哲, 宋希强*, 李大程, 陈枳衡, 张中扬, 李霖明

(海南省热带特色花木资源生物学重点实验室/海南大学 林学院, 海口 570228)

摘 要: 为了掌握海南主要陆域自然保护地内野生兰科植物的物种多样性现状以及制约其发展的关键生境因子, 对该地区进行兰科植物资源调查并分析兰科植物多样性的空间分布格局, 进一步采用典范对应分析 (CCA) 探索生境因子对兰科植物组成的影响, 最后运用广义线性模型 (GLM) 框架下的负二项回归拟合兰科植物丰富度和多度对生境变异的响应。结果表明: (1) 共发现兰科植物 67 属 193 种, 为海南兰科植物分布的绝对中心。(2) 水平方向上, 霸王岭兰科植物丰富度高但居群相对拥挤, 而五指山最大的海拔落差带来了更加多样化的小生境类型和宽阔的生存空间, 孕育了种类丰富且分布均匀的兰科植物资源。(3) 垂直方向上, 中海拔地区兰科植物种类最为丰富且种间竞争较为激烈, 高海拔地区则存在明显的优势类群。(4) 海拔变化对兰科植物物种组成变异有着非常高的解释率, 而喀斯特和河谷地貌的显著影响也不容忽视。(5) 多因子综合作用共同影响着兰科植物的多样性, 其中坡度、河谷地貌、喀斯特地貌的显著正效应和枫香林的显著负效应受其他协变量的影响较小, 是驱动兰科植物丰富度和多度变化的关键生境因子。综上所述, 中高海拔地区以及特殊地貌 (如河谷和喀斯特地貌) 应作为兰科植物多样性的优先保护区域。

关键词: 兰科植物多样性, 生境, 典范对应分析, 广义线性模型, 自然保护地

中图分类号: Q948 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2022)08-1337-20

Association analysis of orchid diversity and habitat in main land nature reserves in Hainan

ZHOU Kang, ZHANG Zhe, SONG Xiqiang*, LI Dacheng,
CHEN Zhiheng, ZHANG Zhongyang, LI Linming

(Key Laboratory of Biology of Tropical Flower Resources of Hainan Province/College of Forestry, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: To grasp the current status of orchid diversity in main land nature reserves in Hainan and the key habitat factor restricting their development, conducted an investigation of orchid resource in the study area and analyzed the

收稿日期: 2021-05-20

基金项目: 国家林业和草原局兰科植物资源专项调查项目 (2020070708) [Supported by Special Survey Project of Wild Orchid Resources of National Forestry and Grassland Administration (2020070708)]。

第一作者: 周康 (1995-), 硕士, 研究方向为兰科植物资源与利用, (E-mail) 1244473395@qq.com。

* 通信作者: 宋希强, 博士, 教授, 研究方向为园林植物资源与利用, (E-mail) songstrong@hainu.edu.cn。

spatial distribution pattern of orchid diversity, the canonical correspondence analysis (CCA) was used to explore the influence of habitat factors on the composition of orchid, and finally the negative binomial regression under the framework of generalized linear model (GLM) was used to fit the response of the richness and abundance of orchid to habitat variation. The results are as follows: (1) A total of 193 species in 67 genera of orchids are found in the study area, which is the absolute center of the distribution of orchid in Hainan. (2) In the horizontal direction, Bawangling has high richness of orchid but relatively crowded population, while the largest elevation difference in Wuzhishan brings more diversified niche types and wide living spaces, giving birth to a rich and even distribution of orchid. (3) In the vertical direction, orchids are the most rich in mid-elevation area and the inter-species competition is fierce, while high-elevation area have obvious dominant groups. (4) The elevation factor has a very high explanatory rate for the variation of orchid composition, and the significant influence of karst and river valley landform can also not be ignored. (5) The comprehensive effect of multiple factors affects the diversity of orchid, among them, the significant positive effect of slope, valley landform, and karst landform and the significant negative effect of *Liquidambar formosana* forest are less affected by other covariate, which is the key habitat factor that drives change in the richness and abundance of orchid. In summary, middle and high elevation areas and special landforms (such as river valley and karst) should be considered as priority protection area for orchid diversity.

Key words: orchid diversity, habitat, canonical correspondence analysis (CCA), generalized liner model (GLM), nature reserve

兰科植物一般分布于温暖、湿润、通风且具散射光的环境中,生境特点决定了其地理分布的不均匀性,水平方向主要集中在热带及亚热带地区,垂直方向上以山地为分布中心,而低海拔平原地区则零星分布(Crain & Melania, 2020)。此外,兰科植物拥有高等植物中最全的生活类型,在大范围上,种类丰富且分布广泛;但在小尺度上,由于独特的生活型、生活史特征和特殊的生境需求(Michae & Mark, 2009; Schödelbauerova et al., 2009),多以小种群或小区域分布,较其他植物类群更容易遭受生境退化与丧失的威胁(Nigel & Kingsley, 2009)。

生存环境的差异,导致不同区域的兰科植物种类组成和数量多寡有显著的差别,简单的分析推测对野生兰花资源的保护极其不利。因此,系统全面地分析兰科植物多样性与具体生境因子的关系将有助于了解影响其多样性变化的关键因素,进而提出更有针对性的保护策略。近年来,探索影响植物多样性的关键因子的研究逐渐成为热点,其中区域面积、隔离程度、地形地貌、气候等因子成为主要研究对象(Traxmandlová et al., 2018)。研究表明,在大尺度水平上,区域面积是物种数量的决定性因素,其次是隔离程度、温度和降水,但针对某一特定类群,植物多样性的驱动因素可能会偏离这样的模式(Kreft et al., 2008)。有学者指出,物种分布面积本身不太可能驱动物种的形成,

地理隔离程度被认为是主要驱动因素(Price & Wagner, 2004; Kisel & Barraclough, 2010; Franklin et al., 2013),也就是说面积本身或生境地多样性是驱动物种与面积关系的主要因素(Triantis et al., 2003)。在岛屿兰科植物多样性与生境的关系研究中,面积与气候和地形预测因素的高度解释力以及这些变量之间的强相关性表明,随着面积的增加,由气候和地形地貌共同组成的生境多样性的增加可能是物种与面积关系的主要驱动力(Keppel et al., 2016)。越来越多的证据指出,生境多样性驱动了兰科植物多样性的变化,在小尺度水平上将各生境因素细化,比较各因素之间的相对重要性成为研究兰科植物多样性生境驱动因素的重要方向(Triantis et al., 2012)。目前,研究最深入的生境因子是海拔(Traveset et al., 2014; Zhang et al., 2015),而全球性的开放数据库的建立使得地形地貌和气候因子同样易于量化获取,二者也成为研究热点(Stein et al., 2014)。上述研究共同促成了更加精细化的兰科植物多样性与生境多样性的相关关系,为野生兰科植物资源的保育提供了颇具实际意义的信息。

海南野生兰科植物资源多样性研究指出,绝大多数兰花都分布在岛屿的中部和南部山区,通常集中生长于海拔 500~1 500 m 潮湿的热带森林中(Hu et al., 2015)。有研究者运用除趋势对应

分析(DCA)等方法,对霸王岭林区不同森林类型中的附生兰科植物的多样性和分布情况进行了研究,比较分析发现分布海拔范围相近的森林类型中的附生兰相似性更高,山地常绿林和山顶矮林附生兰科植物的相似性高达88.9%,较高海拔的3种森林类型(山地雨林、山地常绿林、山顶矮林)中,附生兰科植物的丰富度和多度均显著高于较低海拔的3种森林类型(热带季雨林、低地雨林、热带针叶林),这表明海拔和森林类型的变化对该地区附生兰科植物多样性具有显著影响,同时也反映了二者的显著相关性(刘广福等,2010)。宁瑶(2018)结合3S技术和MaxEnt物种分布模型,初步探究了珍稀濒危种华石斛(*Dendrobium sinense*)对部分气候和地形地貌因子的适应性,并以此预测出其潜在适宜分布地为较为凉爽、暖季气温不高且海拔在1 000 m以上的中山山地。但整体来看,海南关于生境与兰科植物多样性的关系的研究资料相对不足,且研究对象不全面,范围狭窄,方法单一,缺少大范围内多因素作用机理和关联分析的综合研究。

近年来,生物多样性面临生境破坏带来的巨大威胁,保护工作迫在眉睫。研究区域涵盖了海南岛中南部6个主要自然保护地,整合了全海南最为宝贵的生物资源,由于长期受到人类活动干扰及自身生境的特殊性与脆弱性等因素的影响,该区域的生物多样性逐年减少,随着热带雨林国家公园建设的方兴未艾,此地的生物多样性保护工作迫在眉睫,而兰科植物的多样性可在一定程度上反映区域性的生物多样性维持和保护状况(金效华等,2011;田怀珍等,2013)。在这样的大背景下,该研究针对海南主要陆域自然保护地的野生兰科植物开展实地资源调查。拟回答以下科学问题:(1)兰科植物资源的物种多样性和分布格局现状;(2)影响兰科植物多样性的关键生境因子有哪些。上述研究结果将有助于深入掌握该区域的兰科植物的种群大小、资源分布、生存环境适应规律等,为相关单位制定兰科植物保育策略提供本底资料和科学依据。

1 研究方法

1.1 研究区概况

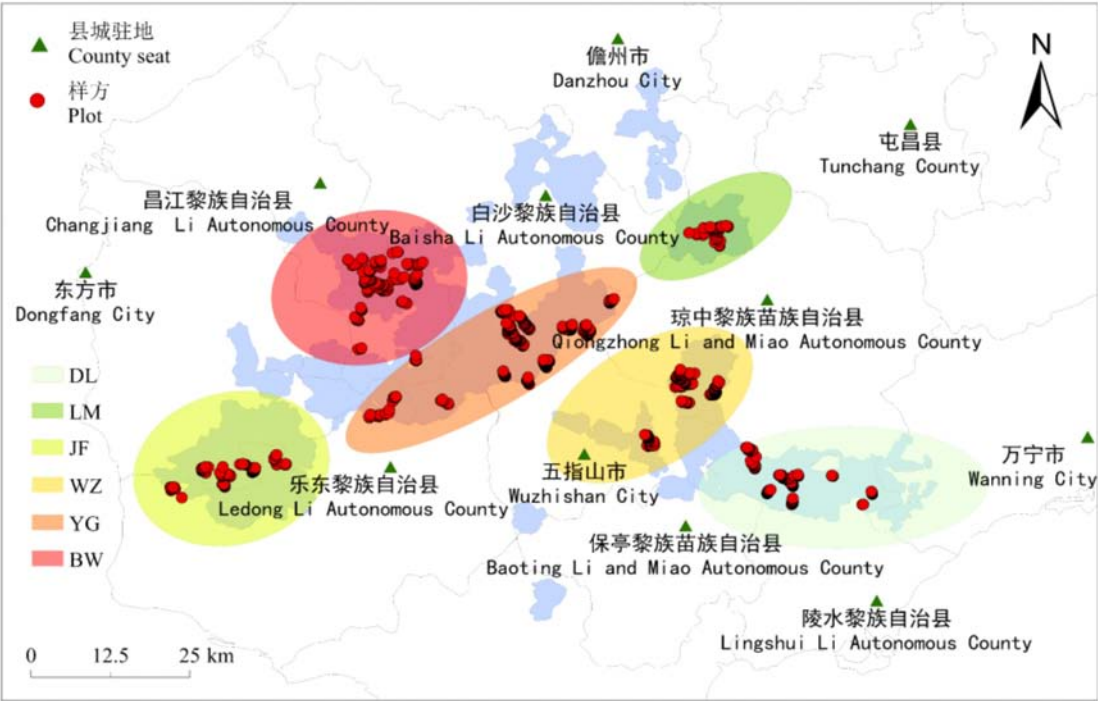
研究样方全部位于海南中南部的霸王岭国家

级自然保护区(BW)、尖峰岭国家级自然保护区(JF)、鹦哥岭国家级自然保护区(YG)、五指山国家级自然保护区(WZ)以及吊罗山国家级自然保护区(DL)和黎母山省级自然保护区(LM)6个主要自然保护地内。其内海拔超过1 400 m的山峰有五指山(1 867 m)、鹦哥岭(1 812 m)、猴猕岭(1 655 m)、黑岭(1 560 m)、三角山(1 499 m)、尖峰岭(1 412 m)、黎母山(1 411 m)等。气候类型为热带海洋性季风气候,干湿季较为分明,年均气温22.5~26.0℃,年均降雨量为1 759 mm。土壤类型以砖红壤为主,随海拔的上升逐渐过渡为赤红壤、山地黄壤和山顶草甸土,王下乡部分地区为喀斯特溶岩地质。研究区是我国分布最集中、保存最完好、连片面积最大的热带雨林的主要组成部分,复杂的地质和气候因素共同造就了丰富的生物多样性,众多海南特有的生物资源分布于此,其中不乏极其珍稀、濒危的兰科植物。

1.2 野外调查

1.2.1 样线和样方设置 2020年7月至2020年12月开展了为期半年的野外调查工作。在课题组长达二十年的调查基础上,综合考虑兰科植物的生物学特性、生活型、生境特点和植被类型等,选择具有代表性的地段设置样线。基本要求如下:(1)样线长度依实际情况而定,一般不小于1 000 m;(2)样方、样木均设置在样线两侧各20 m内的位置,各样方之间的距离不小于10 m;(3)也可选择一些孤立的大树、残存的自然植被、特殊的物种等单独设置样方;(4)样方大小为5 m×5 m,样木为冠幅不小于5 m×5 m的乔木。最终在黎母岭、斧头岭、雅加大岭、东五石峰、王下、俄贤岭、尖峰岭、叉河口、南开、鹦哥嘴、青介、五指山主峰、青春岭、什坡、三角山、吊罗后山、枫果山等地共布设92条样线,1 840个样方(图1),样方垂直分布范围111~1 867 m。

1.2.2 调查内容 记录兰科植物种名、个体数量、生活型以及物候期;样方植被类型、经纬度、海拔、地形地貌、坡位、坡向、坡度、郁闭度以及外界干扰程度等信息;进行疑难种的少量标本采集、照片拍摄,用于种类鉴定,数据记录标准如下。(1)根据生活基质的不同,分为4种生活类型:地生、地生/石生、附生、附生/石生,腐生兰计入地生类。(2)海拔梯度: H_1 (100~300 m)、 H_2 (300~500 m)、 H_3 (500~700 m)、 H_4 (700~900 m)、 H_5 (900~1 100 m)、 H_6 (1 100~1 300 m)、 H_7 (1 300 m~1 500 m)、



蓝色区域表示研究区范围,白色区域表示非保护区。
Blue area represents the scope of the study areas, white area represents the non-protected areas.

图 1 研究区域样方示意图
Fig. 1 Diagram of the plots in the study area

$H_8(>1\,500\text{ m})$ 。(3) 植被类型: 热带季雨林、热带低地雨林、枫香林、热带山地雨林、热带山地常绿林、山顶矮林。(4) 地形地貌: 低山丘陵、中山山地、河谷地貌、喀斯特地貌。(5) 坡位: 谷地、下部、中下部、中部、中上部、上部、山脊、山顶。(6) 坡向: 阴坡(北)、半阴坡(东北、西北、东)、半阳坡(西、东南、西南)、阳坡(南)、无坡向。(7) 外界干扰程度: 无干扰、轻微干扰、中度干扰、强度干扰。(8) 计数困难的部分生于树上或岩石上的兰科植物, 具有假鳞茎的计算活的假鳞茎数量, 否则按照植株或茎或根状茎的数量进行计算。(9) 兰科植物命名和分类系统参考《中国野生兰科植物原色图鉴》(金效华等, 2019)。

1.3 数据分析

1.3.1 多样性指数 首先运用软件 Excel 2019 进行各海拔段兰科植物种类和数量的统计分析, 计算 Gleason 丰富度指数 (D_{MG})、Shannon-Wiener 多样性指数 (H')、Pielou 均匀度指数 (E)、Simpson 优势度

指数 (λ) (马克平, 1994), 计算公式如下:

(1) $D_{MG} = \frac{S - 1}{\ln N}$;

(2) $H' = - \sum_{i=1}^S P_i \ln P_i$;

(3) $E = \frac{H'}{\ln S}$;

(4) $\lambda = \sum_{i=1}^S \frac{N_i(N_i - 1)}{N(N - 1)}$ 。

式中: S 为物种数目; P_i 为 N_i/N ; N_i 表示第 i 个种的个体数; N 表示所有兰科植物的个体总数。

1.3.2 物种组成与生境因子的关系 CCA 排序 采用单峰模型中的约束性排序-典范对应分析 (canonical correspondence analysis, CCA) 探索生境因子与物种组成之间的关系。物种数据矩阵由 193 种兰科植物在 1 840 个样方内的存在与否 (0, 1) 组成, 矩阵为 1 840 行 $\times$ 193 列。生境数据矩阵由野外调查中记录的样方和其对应的实测生境因

子数据组成,考虑到植被类型和海拔的显著相关性,选择连续性较好的海拔因子,另外,外界干扰程度由自然环境和人为活动共同构成,对物种组成的塑造存在较大偶然性,也不考虑在内,最终选择了海拔、地形地貌、坡位、坡向、坡度、郁闭度 6 个生境因子,矩阵为 1 840 行 × 6 列。该分析的数据处理和出图均采用 Canoco 5 软件。

1.3.3 物种丰富度及多度与生境因子的 GLM 回归分析 基于广义线性模型 (generalized liner model, GLM) 的多元扩展的方法可以明确地解释物种丰度数据 (包括多度) 的超分散现象 (Benesh & Kalbe, 2016)。本研究采用 R 语言 Mvabund 包来拟合广义线性模型,从而探究生境因子对研究区域野生兰科植物丰富度和多度变异的影响。选取 1 840 个样方的物种丰富度和多度数据,二者皆为计数数据,假设其符合负二项分布,它与生境因子之间可用对数函数连接,之后用 7 种生境因子 (植被类型、海拔、地形地貌、坡向、坡度、郁闭度、干扰程度) 共同拟合模型。为了获得准确的结果,本次分析基于 9 999 次自检验估计显著性。

2 结果与分析

2.1 兰科植物的物种组成情况

本次野外调查共发现了分属于 4 个亚科的 67 属 193 种兰科植物 (除去未鉴定出的种,详细名录见附表),分别占到了海南岛野生兰科植物总数 (102 属 317 种) 的 65.7% 和 60.9%。图 2 统计结果显示,万代兰族和柄唇兰族 (Podochileae) 都超过了 10 个属,其内绝大多数种属于典型的热带亚热带附生型兰科植物,在海南岛处于优势地位;沼兰族虽然只有 3 属,但在种类数上却占有绝对优势,有 55 种之多。从表 1 的种属组成结果来看,寡种属占比高达 47.8%,主要集中在贝母兰族 (Arethusea) 以及万代兰族;种类数占比最大的是 2~5 种的小属,以粉药兰族 (Cranichideae) 和柄唇兰族为主;包括石豆兰属 (*Bulbophyllum*)、石斛属、兰属 (*Cymbidium*) 和隔距兰属 (*Cleisostoma*) 等在内的几个传统大属在本次调查中仍然占比最大,占到总种类数的 37.8%。

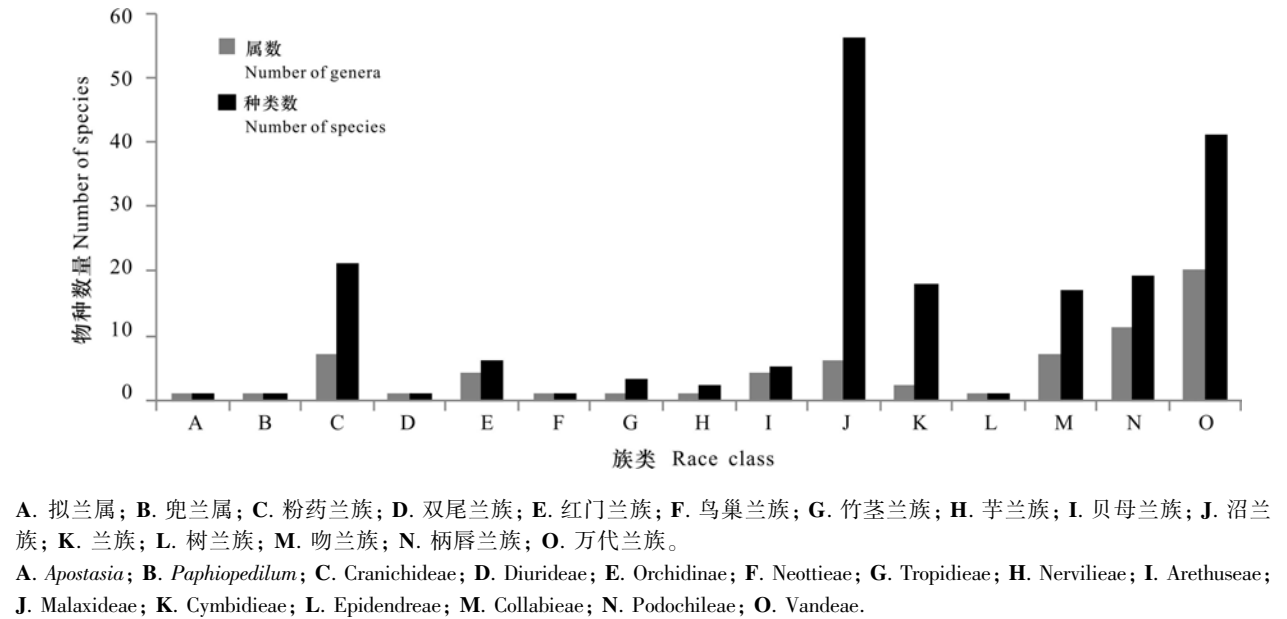


图 2 兰科植物在各族中的属和种数量分布
Fig. 2 Distribution of the genera and species of orchid in various races

2.2 兰科植物多样性水平分布格局

采用 4 种多样性指数来描述研究区域兰科植物多样性的水平变化规律。从表 2 可以看出, Margalef 丰富度指数 (D_{MC}) 与简单物种数量呈明显

正相关,对于全部种类而言,霸王岭的兰科植物丰富度指数达到了 13.432 1,此地生境异质性极强,拥有五花八门的小生境区块,十分有利于兰科植物的遗传分化。附生型兰科植物则有所不同,鹦

表 1 兰科植物属和种数量的统计结果
Table 1 Statistical result of numbers of genera
and species of orchid

属的分级 Grade of genus	属数 Number of genera	种数 Number of species
含 1 种 Containing 1 species	32 (47.8%)	32 (16.6%)
含 2~5 种 Containing 2~5 species	29 (43.3%)	81 (42.0%)
含 6~10 种 Containing 6~10 species	1 (1.5%)	7 (3.6%)
含 11~20 种 Containing 11~20 species	5 (7.5%)	73 (37.8%)
含 21 种及以上 Containing 21 species and more than	0 (0%)	0 (0%)
合计 Total	67 (100.0%)	193 (100.0%)

注：括号中的百分数分别表示各级的属数（或种数）占调查的兰科植物总属数（或总种数）的比例。
Note: Percentages in the brackets represent the ratio of genus number (or species number) in each grade of total genus number (or total species number) of orchid.

哥岭的丰富度指数最大 ($D_{MC}=3.790\ 7$), 鹦哥岭山脉是海南岛最长的一条山脉, 自西南向东北延伸, 成为海南岛东西部的分界岭, 热带季风在吊罗山和五指山的阻挡下到达这里变得微弱, 但正是这微弱的水汽资源却深受兰花的喜爱, 相对干燥的空气和平行密布的开阔河谷成为附生兰科植物的天堂。‘附生/石生’型兰科植物种类最多, 丰富度指数自然也比其他生活型更高, 其中黎母山和尖峰岭相对较小, 黎母山纬度最高, 温度条件不适合部分热带‘附生/石生’型兰科植物的生存, 而尖峰岭地区处于海南岛西部最干燥的地区, 加之近年来极端气候频发, 中低海拔地区时常遭遇极端干旱天气, 造成大量兰花的死亡。地生型兰科植物丰富度指数最大值出现在海拔落差最大的五指山, 达到了 3.839 2, 明显高于其他保护地。‘地生/石生’型兰科植物丰富度指数最大值仍然出现在霸王岭, 这里有广阔的热带针叶林带, 被松针覆盖的薄土层, 拥有兰科植物需要的丰富的养分和水分, 且排水良好, 斑叶兰属 (*Goodyera*)、带唇兰属 (*Tainia*)、虾脊兰属 (*Calanthe*) 等属的部分兰科植物适宜在此生长繁殖。

Shannon-Wiener 多样性指数 (H') 不仅能够体现某一群落内兰科植物的多寡, 还能测量群落的异质性, 因此是一个内涵丰富的指标, 其与均匀度

指数呈明显正相关, 即多样性指数越大, 群落物种的异质性就越大, 分布更为均匀, Pielou 均匀度指数 (E) 也会更大。从研究结果来看, 五指山的兰科植物多样性指数最高 ($H'=3.705\ 7$), 鹦哥岭次之 ($H'=3.625\ 3$), 尖峰岭明显小于其他保护地, 只有 2.495 5, 由此推断尖峰岭的兰科植物异质性较低, 存在明显的优势种, 据实地调查结果可知, 尖峰岭中海拔段河谷拥有丰富多样的兰科植物, 部分克隆繁殖的‘附生/石生’型兰科植物如戟唇石豆兰 (*Bulbophyllum depressum*)、芳香石豆兰 (*Bulbophyllum ambrosia*) 通常在裸露的岩石上或者枯木上成片集中生长, 数量惊人, 因此造成多样性指数和均匀度指数都较低, 这从该地‘附生/石生’型兰科植物的多样性指数和均匀度指数便能看出 ($H'=2.226\ 2$, $E=0.550\ 6$)。

Simpson 优势度指数 (λ) 与均匀度指数呈明显负相关, 用来测度群落优势种的优势程度, 一般优势度较大的群落均匀度不会太高。本次调查结果显示, 霸王岭地生型兰科植物的优势度指数 ($\lambda=0.635\ 1$) 明显高于其他保护地, 究其原因, 主要是因为石灰岩地区有极大的红花斑叶兰 (*Goodyera rubicunda*) 居群, 成为所在小群落的优势类群。而吊罗山大吊罗中高海拔的林缘山坡上有不计其数的竹叶兰 (*Arundina graminifolia*) 居群分布, 另外二裂叶虾脊兰 (*Calanthe speciosa*) 等喜爱生长在高海拔阴湿沟谷下石壁薄土层的兰科植物也占据了一定的草本生态位优势, 因此在‘地生/石生’种类中拥有较高的优势度指数 ($\lambda=0.605\ 9$)。

2.3 兰科植物多样性垂直分布格局

对各海拔段兰科植物的多样性进行比较以探究兰科植物组成的多样性、均匀度以及优势度随海拔的动态变化趋势 (表 3)。从表 2 可以看出, 全部种类和两种生活型大类的兰科植物的丰富度指数都在 H_4 海拔段出现峰值, 向两侧延伸则出现缓慢下降, 这与简单种类数量的变化趋势一致。无论是全部兰科植物还是附生大类的兰科植物, H_4 海拔段的多样性指数均为最高 ($H'=3.686\ 5$ 、 $3.461\ 3$)。值得注意的是, H_2 海拔段比相邻的 H_3 海拔段的多样性指数更高, 这与丰富度指数的大小关系不同, 暗示 H_2 比 H_3 的物种异质性要小一些。而地生大类的兰科植物则在更高的 H_6 海拔段拥有多样性指数的最大值 ($H'=2.669\ 8$), 说明此类兰科植物虽然也在中海拔段最丰富, 但是更高

表 2 不同保护地兰科植物多样性指数

Table 2 Diversity indexes of orchid in different reserves

生活型 Life type	保护地 Rserve	样方数 Number of plots	物种数 Number of species	个体数 Number of individuals	丰富度指数 D_{MG}	多样性指数 H'	均匀度指数 E	优势度指数 λ
总体 Total	LM	81	94	41 064	8.754 7	3.139 4	0.691 0	0.085 1
	BW	323	156	102 697	13.432 1	3.578 1	0.708 6	0.046 7
	JF	234	122	84 882	10.661 7	2.495 5	0.519 5	0.207 6
	YG	566	138	60 394	12.444 8	3.625 3	0.735 8	0.054 0
	WZ	394	127	29 848	12.228 4	3.705 7	0.765 0	0.045 3
	DL	247	112	38 343	10.517 0	3.286 3	0.696 5	0.059 1
附生 Epihytic	LM	13	22	4 484	2.497 5	1.978 3	0.640 0	0.196 4
	BW	48	32	5 059	3.634 7	2.849 9	0.822 3	0.078 1
	JF	16	28	1 357	3.743 2	2.216 6	0.665 2	0.189 2
	YG	73	33	4 636	3.790 7	2.475 6	0.708 0	0.122 6
	WZ	48	25	2 314	3.098 1	2.581 6	0.802 0	0.106 7
	DL	23	22	1 447	2.885 7	2.081 2	0.673 3	0.182 2
‘附生/石生’ ‘Epihytic/Lithophytic’	LM	52	46	34 257	4.309 7	2.675 5	0.698 8	0.118 2
	BW	191	65	86 913	5.627 5	3.171 6	0.759 8	0.061 5
	JF	166	57	79 748	4.961 6	2.226 2	0.550 6	0.234 8
	YG	310	60	50 764	5.445 3	3.155 7	0.770 8	0.074 4
	WZ	233	55	25 362	5.324 9	3.242 1	0.809 0	0.061 3
	DL	153	57	34 740	5.356 0	3.027 9	0.748 9	0.069 9
地生 Terrestrial	LM	7	9	387	1.342 6	1.771 7	0.806 3	0.207 7
	BW	37	28	5 873	3.111 3	0.959 4	0.287 9	0.635 1
	JF	20	18	461	2.771 7	2.409 1	0.833 5	0.113 9
	YG	90	21	2 054	2.622 1	2.370 0	0.778 4	0.117 8
	WZ	50	26	673	3.839 2	2.627 7	0.806 5	0.106 7
	DL	27	17	312	2.786 0	2.342 2	0.826 7	0.120 2
‘地生/石生’ ‘Terrestrial/Lithophytic’	LM	9	17	1 938	2.113 8	1.985 9	0.700 9	0.200 6
	BW	47	31	4 852	3.534 8	2.151 8	0.626 6	0.179 8
	JF	32	19	3 316	2.220 4	1.938 0	0.658 2	0.193 8
	YG	93	24	2 940	2.880 0	1.991 1	0.626 5	0.250 0
	WZ	63	21	1 499	2.735 0	2.373 3	0.779 5	0.122 0
	DL	44	16	1 844	1.994 8	0.984 4	0.355 1	0.605 9

的 H₆海拔段有相当的物种丰富度,且种类之间异质性更低,相互竞争关系较弱,形成了比较温和的群落生态。

对于全部或者附生大类的兰花而言,均匀度指数与优势度指数这对负相关的指数都在 H₃海拔段有各自的最小值(0.582 8、0.595 9)和最大值(0.166 7、0.187 4),即该海拔段的兰科植物群落异质性较高,不同种之间差异明显,且竞争十分激烈,具有明显的优势种,附生大类的兰科植物这一特征最为明显。结合实际情况可知,H₃海拔段的

开阔河谷拥有成片分布的多花脆兰(*Acampe rigida*)、海南石斛(*Dendrobium hainanense*)、剑叶石斛(*Dendrobium spatella*)等,它们完全占据了石生草本层和附生层的优势生态位,制约了其他兰花甚至非兰花种类的生长。而二者的均匀度指数最大值(0.755 3、0.802 1)都出现在最高的 H₈海拔段,这里的兰科植物丰富度都较低,优势度最小值(0.041 0、0.048 4)则同为 H₄海拔段,前述结果已经表明该海拔段兰科植物最为丰富,复杂的种类构成削弱了部分优势种的作用。

表 3 不同海拔段兰科植物多样性指数
Table 3 Diversity index of orchid at different elevational bands

生活型 Life type	海拔段 Elevational band	样方数 Number of plots	物种数 Number of species	个体数 Number of individuals	丰富度指数 D_{MC}	多样性指数 H'	均匀度指数 E	优势度指数 λ
总体 Total	H ₁	93	57	6 600	6.367 4	2.921 3	0.722 5	0.094 1
	H ₂	326	116	46 993	10.690 0	3.252 7	0.684 3	0.088 4
	H ₃	524	147	108 475	12.592 4	2.920 6	0.585 2	0.166 7
	H ₄	351	160	63 766	14.372 3	3.686 5	0.726 4	0.041 0
	H ₅	266	122	47 735	11.231 3	3.406 7	0.709 1	0.061 0
	H ₆	198	86	50 694	7.846 0	2.945 4	0.661 2	0.085 4
	H ₇	72	60	31 045	5.704 2	2.536 0	0.619 4	0.120 4
	H ₈	15	15	1 920	1.851 8	2.045 5	0.755 3	0.164 1
附生、‘附生/石生’ Epiphytic, ‘Epiphytic/ Lithophytic’	H ₁	87	44	5 388	5.004 7	2.648 0	0.699 7	0.126 2
	H ₂	279	84	43 523	7.770 8	3.028 3	0.683 5	0.102 2
	H ₃	426	94	10 2175	8.062 8	2.707 4	0.595 9	0.187 4
	H ₄	266	100	57 183	9.037 8	3.461 3	0.751 6	0.048 4
	H ₅	198	82	42 450	7.601 3	3.168 1	0.718 9	0.073 7
	H ₆	156	52	48 465	4.727 2	2.769 5	0.700 9	0.093 2
	H ₇	53	43	30 112	4.072 7	2.407 2	0.640 0	0.127 9
	H ₈	9	10	1 797	1.201 0	1.846 9	0.802 1	0.185 7
地生、‘地生/石生’ Terrestrial, ‘Terrestrial/ Lithophytic’	H ₁	18	13	1 212	1.690 1	1.539 5	0.600 2	0.297 0
	H ₂	105	32	3 470	3.802 8	2.499 3	0.721 1	0.134 0
	H ₃	196	53	6 300	5.944 0	2.563 3	0.645 6	0.146 3
	H ₄	154	60	6 583	6.710 5	2.425 4	0.592 4	0.195 5
	H ₅	120	40	5 285	4.549 4	2.179 5	0.590 8	0.219 6
	H ₆	101	34	2 229	4.280 5	2.669 8	0.757 1	0.103 5
	H ₇	43	17	933	2.339 7	2.204 4	0.778 1	0.132 1
	H ₈	7	5	123	0.831 2	1.232 4	0.765 7	0.355 6

地生大类的兰科植物的均匀度和优势度分布格局有所不同。首先,各海拔段之间兰花均匀度指数的差异并不明显,因为偏地生型的兰科植物丰富度不及附生大类,而且它们通常位于植物群落的底部,对由海拔梯度变化带来的环境变化的敏感性相对较低。1 500 m 以上的山顶矮林地带地生兰种类不多,其中以绒叶斑叶兰 (*Goodyera velutina*)、小舌唇兰 (*Platanthera minor*)、云叶兰 (*Nephelaphyllum tenuiflorum*) 等种类的植株数量最为丰富,它们的多度远超其他兰花,这导致 H₈ 海拔段拥有最高的生态优势度($\lambda=0.355\ 6$)。

2.4 兰科植物组成与生境因子的关系

从表 4 可以看出,CCA 排序结果解释了物种组成总变异的 6.2%,基于所有典范特征值之和的蒙特卡洛随机置换检验为极显著 ($P=0.002$),这暗示兰科植物组成格局与所选生境因子之间强烈的相关关系。CCA 前两轴有比第 3 和第 4 轴更高

的特征值(0.658 3、0.370 9),表明前两轴在对物种组成变异的解释中起主导作用,它们分别解释了物种组成总变异的 1.19%和 0.67%。从生境因子与典范轴之间的相关系数可以清晰地看到,海拔、中山山地地形以及中下部坡位与第 1 轴显著负相关(−0.891 0、−0.737 4、−0.474 0),而河谷、低山丘陵地形和喀斯特地貌则与之显著正相关(0.486 8、0.315 7、0.200 6),说明该轴综合反映了海拔、地形地貌以及坡位的梯度,但主要是海拔和地形地貌(高的相关系数);喀斯特地貌、西北坡向以及坡度与第 2 轴显著正相关(0.683 6、0.276 5、0.244 7),河谷地貌和谷地坡位则与第 2 轴负相关(−0.405 9、−0.261 4),说明该轴主要反映了地形地貌梯度,同时也反映了坡位、坡向和坡度梯度。基于蒙特卡洛随机置换的检验结果表明,除部分坡位和坡向因子对兰科植物组成变异的解释率未达到显著水平外,其余生境因子均较显著地解释

表 4 生境因子与 CCA 前 4 排序轴的
相关系数及排序概要

Table 4 Correlation coefficient between habitat
factor and the first four CCA ordination
axis and ordination summary

生境因子及排序概要 Summary of habitat factor and ordination	第 1 轴 Axis 1	第 2 轴 Axis 2	第 3 轴 Axis 3	第 4 轴 Axis 4
海拔 Elevation	-0.891 0	0.152 9	-0.078 2	0.020 6
河谷 River valley	0.486 8	-0.405 9	-0.240 6	-0.223 2
中山山地 Middle mountainous	-0.737 4	-0.034 6	0.204 3	0.074 8
低山丘陵 Low mountainous	0.315 7	0.049 4	0.353 5	0.313 1
喀斯特 Karst	0.200 6	0.683 6	-0.209 1	0.008 0
中部 Middle	-0.072 7	0.197 4	0.132 7	-0.307 2
平地 Flat ground	0.140 1	-0.196 0	-0.128 2	-0.063 6
中下部 Lower middle	-0.474 0	0.184 8	-0.040 2	0.204 8
中上部 Upper middle	0.110 5	0.021 1	0.132 0	0.013 8
山顶 Hilltop	-0.090 5	0.234 5	-0.230 1	0.226 0
山脊 Ridge	-0.057 1	-0.040 3	0.023 7	-0.041 7
下部 Lower	0.297 9	0.016 2	0.123 5	0.278 4
谷地 Valley	0.250 6	-0.261 4	0.048 8	-0.182 7
西方 West	-0.052 7	0.136 6	-0.094 7	0.165 2
东北方 Northeast	0.001 6	0.009 9	-0.213 6	0.132 7
东南方 Southeast	0.084 7	-0.019 7	0.132 8	0.114 6
南方 South	0.039 2	-0.072 4	0.146 4	-0.006 5
东方 East	0.001 5	-0.093 7	-0.063 7	-0.102 1
西南方 Southwest	-0.186 4	-0.036 6	0.094 3	-0.003 7
西北方 Northwest	-0.019 1	0.276 5	0.062 5	-0.242 3
北方 North	0.059 4	-0.098 6	0.020 0	-0.015 3
无方向 Non-direction	0.060 5	-0.145 9	-0.137 4	-0.027 5
坡度 Slope	-0.076 2	0.244 7	0.079 3	0.075 7
郁闭度 Canopy density	-0.078 2	0.079 4	0.332 1	-0.111 8
特征值 Eigenvalues	0.658 3	0.370 9	0.280 9	0.255 5
物种组成变异累积解释率 Explained variation (cumulative) of species composition	1.19	1.86	2.36	2.82
典范轴的相关性 Pseudo-canonical correlation	0.919 1	0.769 8	0.699 1	0.660 5
物种-环境关系累积解释率 Explained fitted variation (cumulative) of species- environment	19.15	29.94	38.11	45.54

注：所有典范轴的显著性测验为 $Pseudo-F=2.0$, $P=0.000\ 2$ 。
Note: Significant tests of all canonical axes are $Pseudo-F=2.0$,
 $P=0.000\ 2$.

了兰科植物组成的变异,其中解释变异量最多的是海拔(1.2%),其次为喀斯特和河谷地貌(0.6%; 0.4%),另外两种地形、郁闭度以及中部和谷地坡位也解释了一定的物种组成变异(表 5)。

在进行排序分析的 193 种兰科植物中,分布较广的种有石仙桃(*Pholidota chinensis*)、密花石斛(*Dendrobium densiflorum*)、海南石斛、纯色万代兰(*Vanda subconcolor*)、大叶寄树兰(*Robiquetia spatulata*)等,发生样方数都超过了 100 个,分别占到总样方数的 8.97%、8.04%、6.36%、6.09% 和 5.65%。但分布样方数仅为 1 的稀有种类也达到了 31 种,包括坛花兰(*Acanthephippium sylhetense*)、莫氏曲唇兰(*Panisea moi*)、三色槌柱兰(*Robiquetia insectifera*)、心叶带唇兰(*Tainia cordifolia*)、五指山石豆兰(*Bulbophyllum wuzhishanense*)、中华坛花兰(*Acanthephippium gougahense*)等。双序图(图 3)中展示的受生境因子影响最显著的 30 种兰科植物可以明显划分为四个小组:第一组包括绒叶斑叶兰、乐东石豆兰(*Bulbophyllum ledungense*)、虎斑卷瓣兰(*B. retusiusculum* var. *tigrinum*)等,其类群主要分布在海拔较高的中山山地,坡度和郁闭度适中且坡向靠西南方向时有最适值;第二组包括橙黄玉凤花(*Habenaria rhodocheila*)、火焰兰(*Renanthera coccinea*)、大尖囊蝴蝶兰(*Phalaenopsis deliciosa*)、大叶寄树兰等,它们偏向于分布在中低海拔的开阔河谷地区,郁闭度和坡度都相对较小;第三组包括纯色万代兰、钗子股(*Luisia morsei*)、多花脆兰、长茎羊耳蒜(*Liparis viridiflora*)和流苏金石斛(*Dendrobium plicatile*),主要分布在海拔不高的低山丘陵地带的较陡的崖壁上,且周围有一定乔灌丛遮挡;第四组则对喀斯特地貌有强烈的偏好性,主要包括云南石仙桃(*Pholidota yunnanensis*)、红花斑叶兰、泽泻虾脊兰(*Calanthe alismatifolia*)、卵叶带唇兰(*Tainia longiscapa*)、海南蝴蝶兰(*Phalaenopsis hainanensis*)等。其他未展示的大部分种类出现在排序图中心点附近,他们的分布受到生境因子的综合影响相对较小。

2.5 兰科植物丰富度与生境因子的关系

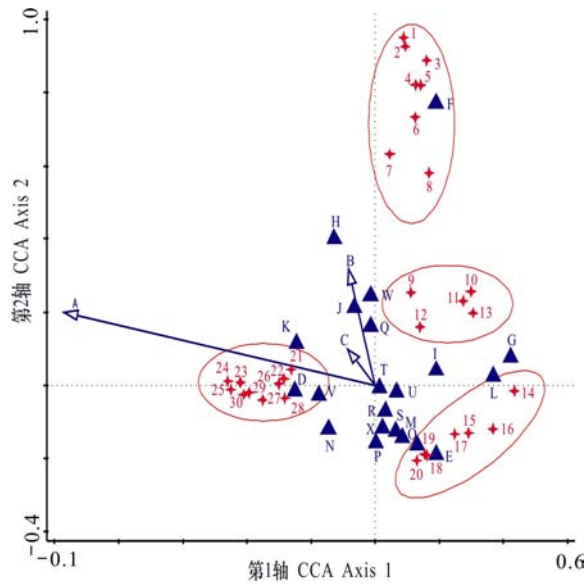
针对 1 840 个样方中的 193 种兰科植物,首先分析了生境因子与兰科植物丰富度的简单数量关系(图 4)。较高海拔的 3 种(热带山地常绿林、山地雨林、山顶矮林)植被类型中兰科植物丰富度差异不明显,但位于热带山地常绿林中的样方的兰

表 5 生境因子对物种组成的解释率

Table 5 Interpretation rate of habitat factor on species composition				
生境因子 Habitat factor	解释率 Interpretation rate (%)	贡献率 Contribution rate (%)	Pseudo-F	P
海拔 Elevation	1.2	18.6	7.6	0.002
喀斯特 Karst	0.6	10.4	4.3	0.002
河谷 River valley	0.4	6.9	2.8	0.002
中部 Middle	0.3	5.5	2.3	0.002
低山丘陵 Low mountainous	0.3	5.1	2.1	0.004
中山山地 Middle mountainous	0.3	5.1	2.1	0.002
郁闭度 Canopy density	0.3	4.9	2.0	0.002
谷地 Valley	0.3	5.0	2.1	0.002
下部 Lower	0.2	4.0	1.7	0.030
西北方 Northwest	0.2	3.9	1.6	0.002
坡度 Slope	0.2	3.8	1.6	0.004
山顶 Hilltop	0.2	3.7	1.6	0.068
中上部 Upper middle	0.2	3.6	1.5	0.052
中下部 Lower middle	0.2	3.2	1.3	0.03
西南方 Southwest	0.2	3.3	1.4	0.06
东北方 Northeast	0.2	3.2	1.3	0.082
东南方 Southeast	0.2	3.1	1.3	0.072
无方向 Non-direction	0.2	3.0	1.2	0.064
北方 North	0.1	2.4	1.0	0.478
西方 West	0.1	2.2	0.9	0.700
山脊 Ridge	0.1	2.2	0.9	0.478
东方 East	0.1	2.2	0.9	0.562
南方 South	0.1	2.2	0.9	0.666
全部 Total	6.2	100	2.0	0.000 2

注：解释率的显著性分别由 CCA 和偏 CCA 排序时 9 999 次蒙特卡洛随机置换检验决定。

Note: The significance of the interpretation rate is determined by the 9 999 Monte Carlo permutation tests when ranking CCA and partial CCA respectively.



A. 海拔; B. 坡度; C. 郁闭度; D. 中山山地; E. 河谷; F. 喀斯特; G. 低山丘陵; H. 山顶; I. 中上部; J. 中部; K. 中下部; L. 下部; M. 平地; N. 山脊; O. 谷地; P. 东方; Q. 西方; R. 南方; S. 北方; T. 东北方; U. 东南方; V. 西南方; W. 西北方; X. 无方向。1. 泽泻虾脊兰; 2. 红花斑叶兰; 3. 毛萼玉凤花; 4. 海南蝴蝶兰; 5. 卵叶带唇兰; 6. 叠鞘石斛; 7. 云南石仙桃; 8. 无茎盆距兰; 9. 纯色万代兰; 10. 多花脆兰; 11. 长茎羊耳蒜; 12. 流苏金石斛; 13. 钗子股; 14. 火焰兰; 15. 大叶寄树兰; 16. 大尖囊蝴蝶兰; 17. 橙黄玉凤花; 18. 戟唇石豆兰; 19. 剑叶石斛; 20. 匙萼卷瓣兰; 21. 流苏贝母兰; 22. 美花隔距兰; 23. 华石斛; 24. 绒叶斑叶兰; 25. 厚唇兰; 26. 钟兰; 27. 粗茎苹兰; 28. 虎斑卷瓣兰; 29. 黄兰; 30. 乐东石豆兰。◆代表物种, 箭头和▲代表生境因子。

A. Elevation; B. Slope; C. Canopy density; D. Middle mountain; E. River valley; F. Karst; G. Low mountain and hill; H. Hilltop; I. Upper middle; J. Middle; K. Lower middle; M. Flat ground; N. Ridge; O. Valley; P. East; Q. West; R. South; S. North; T. Northeast; U. Southeast; V. Southwest; W. Northwest; X. Non-direction. 1. *Calanthe alismaefolia*; 2. *Goodyera grandis*; 3. *Habenaria ciliolaris*; 4. *Phalaenopsis hainanensis*; 5. *Tainia ovifolia*; 6. *Dendrobium denneanum*; 7. *Pholidota yunnanensis*; 8. *Gastrochilus obliquus*; 9. *Vanda subconcolor*; 10. *Acampe rigida*; 11. *Liparis viridiflora*; 12. *Dendrobium plicatile*; 13. *Luisia morsei*; 14. *Renanthera coccinea*; 15. *Robiquetia spatulata*; 16. *Phalaenopsis deliciosa*; 17. *Habenaria rhodocheila*; 18. *Bulbophyllum Depressum*; 19. *Dendrobium spatella*; 20. *Bulbophyllum spathulatum*; 21. *Coelogyne fimbriata*; 22. *Cleisostoma birmanicum*; 23. *Dendrobium sinense*; 24. *Goodyera velutina*; 25. *Dendrobium mariae*; 26. *Campanulorchis thao*; 27. *Pinalia amica*; 28. *Bulbophyllum retusiusculum* var. *tigridum*; 29. *Cephalantheropsis gracilis*; 30. *Bulbophyllum ledungense*. ◆ represents species, arrow and ▲ represent habitat factors.

图 3 兰科植物组成与生境因子的 CCA 双序图

Fig. 3 CCA bi-plot of orchid composition and habitat factor

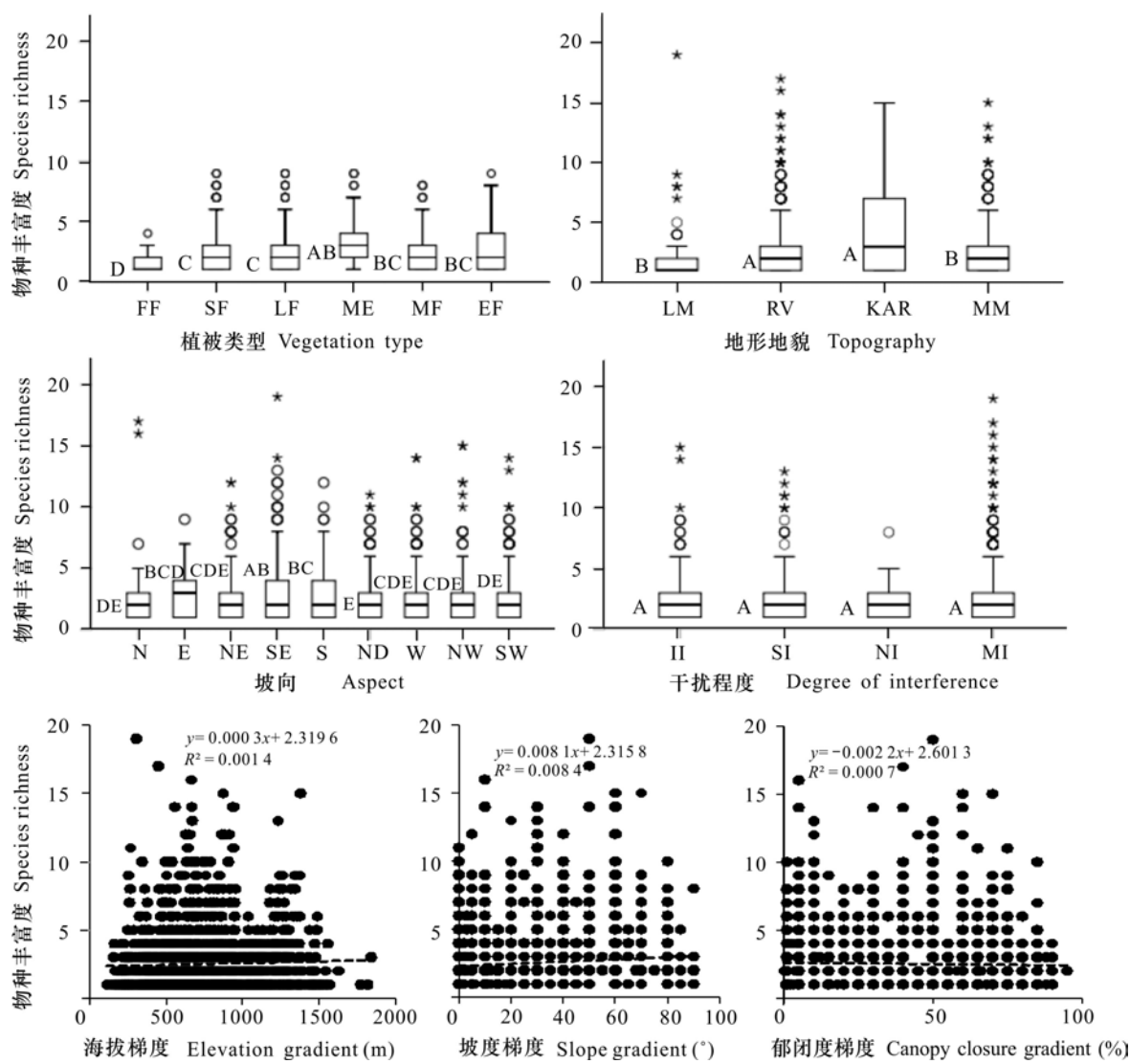
科植物的丰富度显著高于较低海拔的热带低地雨林、枫香林、热带季雨林。喀斯特溶岩地区兰科植物的丰富度最高且样方之间差异较小,河谷地区兰科植物的丰富度也很高,低山丘陵和中山山地之间无显著差异,且丰富度水平均显著低于前两者。9种坡向类型下的丰富度分布结果显示位于东南坡、东坡和南坡几类阳坡条件下的样方中兰科植物丰富度凸显出一定优势,而无坡向的样方兰科植物丰富度显著低于其他坡向。不同干扰程度下样方的兰科植物丰富度差异不明显,合理的解释是一定程度的外界干扰并不能短时间内完全毁灭某些兰科植物,而且适度的干扰可能有利于部分兰花的生长。值得注意的是,以上统计结果均显示丰富度数据存在较多离群值,降低了简单方差分析结果的准确性。针对连续变量散点图的线性拟合情况也不乐观(R^2 值都很小),说明这3种生境因子与兰科植物丰富度之间同样不能完全用简单的一元线性关系来解释。另外,简单方差分析只能进行各生境因子影响下样方兰科植物丰富度的差异比较,而无法判断生境因子对样方兰科植物丰富度变异的影响程度和趋势。

因此,采用基于GLM框架下的负二项回归来分别拟合生境因子对兰科植物丰富度的独立效应。从表6可以看出,植被类型、地形地貌、坡向以及坡度4个因子的独立效应都是极显著的(Wald=5.896, $P=3e-04$; Wald=9.407, $P=1e-04$; Wald=5.811, $P=3e-04$; Wald=4.372, $P=1e-04$),这表明在忽略其他任何协变量的影响下,兰科植物丰富度都与它们相关。除低山丘陵外的其他3种地形地貌因子对兰科植物丰富度存在明显的正效应,以喀斯特地貌最为显著,回归系数达到了0.85。东南方坡向带了的充足光照适合更多种兰科植物定殖于此,这与简单方差分析结果类似。陡坡同样能够促进样方中兰科植物丰富度的增加。4种有显著效应的植被类型中,只有山地常绿林拥有正回归系数(regression coefficient, RC, $RC=0.17$),枫香林、热带季雨林、热带山地雨林都存在一定的负效应,猜测与后三者人为破坏程度更大有关。值得注意的是,海拔变化在独立模型中对兰科植物丰富度的影响不显著,暗示了海拔梯度的显著效应可能要依赖其他因子的共同参与。仍然使用负二项回归来拟合生境因子的多元线性回归模型,以探究多因素共同作用的结果。

由表7可以看出,与一元回归模型不同,海拔因子的影响效应达到了显著水平(Wald=2.160, $P=0.0404$, $RC=3.3191e-04$),说明在野外实际条件下,海拔梯度的变化会对兰科植物的丰富度变异产生显著影响,这与前文猜测吻合,也符合实际观测情况。郁闭度和外界干扰程度无论是在独立模型还是在全模型中,都未表现出对丰富度变化的显著影响,这可能是因为调查的193种兰科植物生活型全面、生态习性千差万别,对光条件的要求并非梯度变化而是更复杂的相互选择过程,另外,适当的外界干扰例如人为非过度采挖活动对兰科植物丰富度的影响并不大。

2.6 兰科植物多度与生境因子的关系

对于兰科植物而言,当居群以某些克隆繁殖习性强的附生兰为主时,多度数据具有比丰富度更明显的离散特征,它们完全偏离正态性,常规的统计方法如 t 检验、一般线性模型等都难以适用。因此,本研究直接采用广义线性模型框架下的负二项回归进行二者的关系拟合。表8中针对单一变量的拟合结果显示,除了郁闭度(Wald=3.102, $P=0.0654$)和干扰程度(Wald=3.936, $P=0.123$)的效应不显著以外,其他生境因子的全模型均达到了极显著水平。其中,植被类型的变化能够极显著得影响兰科植物多度大小,山地常绿林和山顶矮林的回归系数分别为0.68和0.75,随着这两种植被类型中样方数增多,会促进兰科植物多度的上升,与之相反的是枫香林(Wald=8.191, $P=0.0001$, $RC=-2.2386$),在五指山和鹦哥岭的中高海拔河谷或者山地,会有成片的枫香林存在,其内分布较多的兰科植物包括纯色万代兰、大序隔距兰(*Cleisostoma paniculatum*)等万代兰族附生兰,底层则以带唇兰属部分种为主,这里林分组成单一,而且受到放牧、采挖等人为活动的严重干扰,兰科植物多度普遍较低。除低山丘陵外的3种地形地貌因子都对多度变化存在极显著的正效应,喀斯特地貌极其多样化的生境类型,中低海拔河谷充足的水热资源,高海拔山地通风良好且空气湿润,都存在适合部分兰科植物的大量繁殖扩散的条件。坡向因子的高影响力(Wald=5.343, $P=0.0004$, $RC=-0.8504$)则是由无坡向的平缓区域带来的,由此可见低海拔丘陵台地或者山脉间的过渡缓坡带兰科植物多度都很低,相对单一的垂直林冠结构不利于兰花种子的扩散繁殖。另



FF. 枫香林; SF. 热带季雨林; LF. 热带低地雨林; ME. 山地常绿林; MF. 热带山地雨林; EF. 山顶矮林; LM. 低山丘陵; RV. 河谷; KAR. 喀斯特; MM. 中山山地; ND. 无方向; II. 强度干扰; SI. 轻微干扰; NI. 无干扰; MI. 中度干扰。箱线图表示中位数和第 25/75 百分位数, o 和 ★ 表示离群值。图中的大写字母相同与否表示二者是否有显著性差异。
FF. *Liquidambar formosana* forest; SF. Tropical monsoon forest; LF. Tropical lowland rain forest; ME. Tropical mountain evergreen forest; MF. Tropical montane rain forest; EF. Tropical elfin forest; LM. Low mountain; RV. River valley; KAR. Karst; MM. Middle mountain; ND. Non-direction; II. Intensity interference; SI. Slightly interference; NI. No interference; MI. Moderate interference. Boxes represents the median and the 25th/75th percentile, o and ★ indicate outliers. Whether the capital letters in the figure are the same or not indicates whether there is significant difference between the two.

图 4 生境因子与兰科植物丰富度的关系

Fig. 4 Relationship between different habitat factors and the richness of orchid

外,两个连续变量(海拔和坡度)具有显著的独立效应,即海拔差异能够带来明显的适宜生境变异,陡坡则能增加兰科植物的生存空间和受光照质量,从而促进兰科植物的大量繁殖。

对于生境因子的多元线性回归拟合结果显示

(表 9)。首先,全模型为极显著($Wald = 22.88$, $P = 0.0011$),这说明所选生境因子的综合作用能够显著影响兰科植物的多度,而且对多度变异的解释量要高于对丰富度变异的解释量。但与单因素模型拟合结果不同的是,热带季雨林、山顶矮林、

表 6 兰科植物丰富度一元回归模型中生境因子的显著性

Table 6 Significance of habitat factor in the univariate GLM of richness of orchid

	生境因子 Habitat factor	Wald 统计量 Wald value	Pr (>wald)	回归系数 Regression coefficient
植被类型 Vegetation type	全模型 Full model	5.896	3e-04***	
	枫香林 <i>Liquidambar formosana</i> forest	3.497	0.003 0**	-0.602 3
	热带季雨林 Tropical monsoon forest	2.535	0.024 9*	-0.111 2
	热带山地常绿林 Tropical mountain evergreen forest	2.396	0.029 7*	0.168 6
	热带山顶矮林 Tropical elfin forest	0.322	0.773 1	0.032 3
	热带山地雨林 Tropical montane rain forest	2.498	0.022 3*	-0.131 2
	海拔 Elevation	1.774	0.112	0.000 1
	地形地貌 Topography	9.407	1e-04***	
坡向 Aspect	河谷 River valley	4.952	0.000 1***	0.371 2
	喀斯特 Karst	7.653	0.000 1***	0.852 9
	中山山地 Middle mountainous	2.332	0.034 2*	0.174 0
	全模型 Full model	5.811	3e-04***	
	东北方 Northeast	0.729	0.506 8	0.068 4
	东方 East	1.888	0.085 0 [○]	0.226 3
	东南方 Southeast	3.548	0.001 0***	0.314 6
	南方 South	1.214	0.270 1	0.102 0
坡度 Slope 郁闭度 Canopy closure 干扰程度 Degree of interference	无方向 Non-direction	0.155	0.889 4	-0.013 5
	西北方 Northwest	0.774	0.483 0	0.067 9
	西方 West	1.415	0.208 6	0.136 9
	全模型 Full model	4.372	1e-04***	0.003 1
	全模型 Full model	0.77	0.452 0	-0.000 3
	全模型 Full model	2.255	0.248	
	轻微干扰 Slightly interference	2.008	0.074 9 [○]	0.123 2
	无干扰 No interference	0.339	0.759 5	-0.049 9
	中度干扰 Moderate interference	1.680	0.131 8	0.082 5

注：[○]表示 $P<0.1$ ；*表示 $P<0.05$ ；**表示 $P<0.01$ ；***表示 $P<0.001$ 。下同。

Note: [○] indicates $P<0.1$ ；* indicates $P<0.05$ ；** indicates $P<0.01$ ；*** indicates $P<0.001$. The same below.

中山山地以及坡向因子的效应不再显著,而坡度和海拔仍然是不可或缺的多度主导因素。以上结果说明在野外实际生境条件下,多因素之间综合作用共同影响兰科植物的多度,部分因子的影响被其他决定性更强的因子包含在内,不再具有显著性,而且海拔、坡度的显著正效应(RC = 0.000 9; 0.008 7)和枫香林的显著负效应(RC = -2.554 2)受其他生境因子影响较小。

3 讨论与结论

3.1 兰科植物物种多样性

本研究通过半年不间断的实地资源调查,初步对海南岛主要陆域自然保护地内的野生兰科植物资源状况进行了一次摸底。发现了镰叶盆距兰(*Gastrochilus acinacifolius*)、保亭羊耳蒜(*Liparis*

表 7 兰科植物丰富度多元回归模型中生境因子的显著性
Table 7 Significance of habitat factor in the multiple GLM of richness of orchid

生境因子 Habitat factor		Wald 统计量 Wald value	Pr (>wald)	回归系数 Regression coefficient
全模型 Full model		15.03	1e-04***	
植被类型 Vegetation type	枫香林 Liquidambar formosana forest	4.456	0.000 1***	-7.577 7
	热带季雨林 Tropical monsoon forest	3.029	0.006 6**	-1.662 7
	热带山地常绿林 Tropical mountain evergreen forest	1.661	0.115 7	1.725 5
	热带山顶矮林 Tropical elfin forest	0.287	0.791 7	-3.984 9
	热带山地雨林 Tropical montane rain forest	2.159	0.044 9*	-1.516 7
海拔 Elevation		2.160	0.040 4*	3.319 1
地形地貌 Topography	河谷 River valley	4.413	0.000 2***	3.410 1
	喀斯特 Karst	6.637	0.000 1***	7.847 5
	中山山地 Middle mountainous	0.772	0.475 0	-6.974 8
坡向 Aspect	东北方 Northeast	0.324	0.760 7	2.986 0
	东方 East	1.375	0.201 2	1.604 1
	东南方 Southeast	3.594	0.001 0***	3.110 8
	南方 South	1.352	0.203 3	1.105 2
	无方向 Non-direction	0.086	0.933 3	-7.698 6
	西北方 Northwest	0.012	0.991 2	-9.900 0
	西方 West	0.365	0.730 9	3.465 6
坡度 Slope		2.874	0.008 0**	2.306 9
郁闭度 Canopy closure		0.107	0.913 4	3.175 3
干扰程度 Degree of interference	轻微干扰 Slightly interference	1.234	0.252 1	7.647 6
	无干扰 No interference	0.448	0.673 5	6.474 8
	中度干扰 Moderate interference	0.335	0.758 6	-1.654 5

bautingensis)、黎氏兰(*Cymbidium lüi*)等海南特有和中国仅海南有分布的兰科植物共 19 种,占到目前有记载的海南特有类群的将近一半(翟俊文等, 2016), 其中还不乏独占春(*Cymbidium eburneum*)、美花兰(*C. insigne*)、珍珠矮(*C. Nanulum*)、兰屿芋兰(*Nervilia lanyuensis*)、卵叶带唇兰等珍稀濒危种。种属分布以中小型属为主, 但种类数量却集中分布在几个大属中, 石豆兰属共发现 19 种, 石斛属和兰属都为 16 种, 与全海南岛的情况差距不大(余文刚, 2014)。这一方面说明上述几个属的兰科植物分布范围较广, 另一方面也反映了研究区域为海南岛兰科植物分布的绝对中心, 需要重点关注和保护。

与海南岛以往调查历史资料相比, 此次调查结果是除鹦哥岭和尖峰岭以外其他保护地关于

兰科植物资源数量与分布等信息最新最全的记载(施国政, 2008; 卢刚等, 2018)。另外, 与我国东南部热带亚热带地区的部分自然保护地记载的兰科植物资料对比发现(程志全, 2015), 研究区域的兰科植物丰富度显著高于除玉山外的其他保护地, 虽然一定程度得益于整个区域的面积较大, 但即使是单一保护地的兰科植物丰富度同样名列前茅。综上所述, 研究区域不仅是海南岛兰科植物分布的绝对中心, 同样是我国热带亚热带兰科植物最为丰富的地区之一。

3.2 海拔对于兰科植物多样性的影响

物种多样性与海拔之间的关系一直是生物多样性研究的热点问题, 因为在如此小的距离变异下却有较大的气候变化出现(Acharya et al., 2011)。已有许多研究表明海拔梯度是包含光照、

表 8 兰科植物多度一元回归模型中生境因子的显著性

Table 8 Significance of habitat factor in the univariate GLM of abundance of orchid

	生境因子 Habitat factor	Wald 统计量 Wald value	Pr (>wald)	回归系数 Regression coefficient
植被类型 Vegetation type	全模型 Full model	10.75	1e-04 ***	
	枫香林 <i>Liquidambar formosana</i> forest	8.191	0.000 1 ***	-2.238 6
	热带季雨林 Tropical monsoon forest	0.103	0.951 2	-0.008 7
	热带山地常绿林 Tropical mountain evergreen forest	4.759	0.005 5 **	0.678 8
	热带山顶矮林 Tropical elfin forest	3.836	0.021 6 *	0.754 6
	热带山地雨林 Tropical montane rain forest	0.360	0.833 9	0.035 8
海拔 Elevation 地形地貌 Topography	全模型 Full model	8.154	1e-04 ***	0.000 9
	全模型 Full model	8.167	1e-04 ***	
	河谷 River valley	7.708	1e-04 ***	1.031 0
	喀斯特 Karst	5.854	3e-04 ***	1.384 6
	中山山地 Middle mountainous	6.265	3e-04 ***	0.825 3
坡向 Aspect	全模型 Full model	8.643	1e-04 ***	
	东北方 Northeast	1.401	0.381 8	-0.243 4
	东方 East	1.679	0.286 2	-0.388 1
	东南方 Southeast	0.446	0.777 1	0.075 0
	南方 South	1.285	0.423 7	-0.199 6
	无方向 Non-direction	5.343	0.000 4 ***	-0.850 4
	西北方 Northwest	2.332	0.139 7	-0.378 0
	西方 West	2.119	0.177 2	-0.383 6
	全模型 Full model	6.23	6e-04 ***	0.008 7
坡度 Slope 郁闭度 Canopy closure 干扰程度 Degree of interference	全模型 Full model	3.102	0.065 4 [○]	-0.001 9
	全模型 Full model	3.936	0.123 0	
	轻微干扰 Slightly interference	0.103	0.954 4	-0.012 1
	无干扰 No interference	0.011	0.994 1	-0.003 0
	中度干扰 Moderate interference	2.966	0.071 8 [○]	0.273 3

温度、湿度等多种环境因子的综合气候轴(李晓芳,2017),另有学者指出海拔在一定范围内还反映了植物受到外界人为干扰的种类和强度大小(Kevin, 2000)。研究区域的兰科植物丰富度在海拔梯度上的变化呈现的“驼峰”形式已经被广泛证实是一种基本分布格局(Lorenzo et al., 2007; Sherman et al., 2008; Zhang et al., 2015),中海拔地区拥有较为适宜的温度、降水、光照,适合大多数兰科植物的生长(Tang & Ohsawa, 1997),因此种类最丰富(常学向等,2004)。我们还发现,不同生活类型的兰科植物均具有该种分布形式,只是强弱程度存在一定差异,这可能是因为中海拔段

林分层次最为丰富,从而具备了适宜各种生活型兰科植物生长的水分、光照、土壤以及植被条件,但各种生活型兰科植物对于小生境要求不尽相同,加之基础种群数量的差异导致变化强弱有所不同(田怀珍和邢福武,2008)。值得注意的是,基于GLM回归分析的结果显示海拔对于兰科植物丰富度的影响并非独立存在,而是在其他地形地貌因子存在的情况下才有显著影响,这进一步说明了海拔对于兰科植物丰富度的影响是一个复杂的综合作用过程,目前对于物种丰富度沿海拔梯度变化的单峰模型的解释假说除了气候(水分和能量)外,还主要包括面积、几何限制(Geometric

表 9 兰科植物多度多元回归模型中生境因子的显著性

Table 9 Significance of habitat factor in the multiple GLM of abundance of orchid

	生境因子 Habitat factor	Wald 统计量 Wald value	Pr (>wald)	回归系数 Regression coefficient
全模型 Full model		22.88	0.001 1	
植被类型 Vegetation type	枫香林 <i>Liquidambar formosana</i> forest	9.700	0.000 9***	-2.554 2
	热带季雨林 Tropical monsoon forest	0.685	0.661 3	-0.070 4
	热带山地常绿林 Tropical mountain evergreen forest	0.378	0.797 6	-0.075 3
	热带山顶矮林 Tropical elfin forest	1.124	0.452 8	-0.297 4
	热带山地雨林 Tropical montane rain forest	2.616	0.080 8 [○]	-0.332 1
海拔 Elevation		8.234	0.001 1**	0.002 4
地形地貌 Topography	河谷 River valley	6.118	0.001 3***	0.811 8
	喀斯特 Karst	3.707	0.013 2*	0.876 1
	中山山地 Middle mountainous	2.061	0.172 2	-0.322 8
坡向 Aspect	东北方 Northeast	1.542	0.307 9	-0.255 5
	东方 East	0.987	0.507 6	-0.216 4
	东南方 Southeast	2.338	0.118 6	0.372 7
	南方 South	1.232	0.416 2	-0.180 7
	无方向 Non-direction	2.915	0.050 2 [○]	-0.464 9
	西北方 Northwest	2.119	0.153 9	-0.326 4
	西方 West	2.564	0.090 0 [○]	-0.443 8
坡度 Slope		5.755	0.001 2**	0.008 8
郁闭度 Canopy closure		2.475	0.054 1 [○]	-0.001 4
干扰程度 Degree of interference	轻微干扰 Slightly interference	0.794	0.599 1	0.091 0
	无干扰 No interference	1.585	0.298 0	0.409 5
	中度干扰 Moderate interference	0.361	0.812 5	-0.032 4

constraints)等(Tang & Ohsawa, 1997;李巧燕和王襄平,2013),由此推断地形地貌因子可能和面积存在一定的相关关系。除丰富度之外,兰科植物组成也存在明显海拔变异,CCA 排序结果显示不同海拔段的样方内兰科植物组成存在明显不同,海拔较低时,温度较高,但降雨和通风不足,是部分万代兰族兰花适应的闷热环境,高海拔地区温度较低、湿度大、光照充足且十分通风,沼兰族和粉药兰族的部分种类钟爱此环境,而中海拔段植被类型最为复杂多样,以山地雨林为主,还包括部分热带针叶林等,典型的生境特征是温度和湿度都很高,光照和通风条件都适中,适合最多种类兰科植物的生长。GLM 回归分析显示兰科植物多度也受到海拔因子的显著影响,且该种影响在一定程度上不受其他生境因子的限制,表明兰科植物

多度和海拔之间的关系可能相对简单一些,但兰科植物多度受到计数方法、主观臆测、计数精度等多种因素的影响,且数据过于离散不服从正态性(Benesh & Kalbe, 2016),因此可能需要更广的取样范围和更统一的计数方法运用其中才能得出更准确的结果。

3.3 生活型对兰科植物多样性的影响

生活型的差异使不同兰科植物对生境条件的要求有显著的差异,二者的相互选择共同决定了各生活型兰科植物在地理分布上的偏好性和不均匀性。从前人研究结果可以发现,在垂直方向上 4 种生活型的兰科植物虽然都在中海拔地区拥有较高的丰富度和多度,但附生/石生类型在各海拔段都为优势类群,它们多属于石斛属、石豆兰属、羊耳蒜属、沼兰属(*Malaxis*)、隔距兰属以及广义的毛

兰属(*Eria*),一般生长在裸露岩石或其他植物上而不吸收其营养,生活史全部或部分时期生长在空气中不与地面接触(Benzing, 1990),这导致其附载基质的稳定性较低,很容易受到营养和水分供应缺乏的威胁,因此能够适应这一生态位的兰花对附生环境的要求非常高,而一旦适应下来就能成为明显的优势种(刘强等,2010)。本次调查中,中低海拔地区的河谷和喀斯特地貌光照充足,水气资源丰富,既能为兰花提供充足的水分,又避免了大量水分累积导致的涝害,这里的裸露岩石或者树干中上部以及树冠层生长着大量的‘附生/石生’型兰花,例如纯色万代兰、多花脆兰、大叶寄树兰、火焰兰、大尖囊蝴蝶兰、直唇卷瓣兰(*Bulbophyllum delitescens*)等,而在远离河谷的低山丘陵,兰花的多样性相对较低,只有钗子股、金塔隔距兰(*Cleisostoma filiforme*)等种分布较广;中高海拔地区温度低,但空气更加湿润,各种石斛和石豆兰集中高密度分布,通过假鳞茎进行的克隆繁殖成为主要的繁殖方式,假鳞茎是附生兰科植物的特化专一的营养贮藏器官,在附生兰科植物的生长和更新中具有重要作用(Khee et al., 2000);山地常绿林和山顶矮林地区温度较低,长期受到台风的侵扰,钟兰(*Campanulorchis thao*)、流苏贝母兰(*Coelogyne fimbriata*)、华石斛、芳香石豆兰、丛生羊耳蒜(*Liparis cespitosa*)等种类因为株体小且拥有假鳞茎,抗性较强,通常成片密集分布,成为这一区域的优势类群。以粉药兰族、红门兰族、兰属为主的地生型兰科植物呈现出完全不同的分布格局,这类兰花无明显分布偏好性。针对某一特定种属例如兰属,寒兰(*Cymbidium kanran*)、墨兰(*C. sinense*)、建兰(*C. ensifolium*)主要分布在中高海拔松针较多的薄腐殖土层中,美花兰、莎叶兰(*C. cyperifolium*)等则喜欢生长在更加凉爽且湿度充足的高海拔山脊或者山顶薄土层中。粉药兰族的斑叶兰属和翻唇兰属(*Hetaeria*)兰科植物为较为广布的种类,对海拔和地形地貌没有专性要求,而金线兰属(*Anoectochilus*)基本分布在中高海拔阴湿凉爽的林下腐殖土或岩石上,血叶兰(*Ludisia discolor*)则集中分布在中低海拔闷热的河谷边岩石苔藓层上。

3.4 其他生境因子对兰科植物多样性的影响

植被类型与海拔的关系尤为密切,不同植被类型分布在不同的海拔段内,一定程度上可以说

是海拔变化塑造了植被类型的多样化(刘广福等, 2010)。但植被类型带来的差异不仅限于由海拔因素驱动的温度、水分等,还意味着由植物物种组成成分、林冠层结构引起的光照、生存竞争强度的变化(李德志和臧润国,2004)。因此在本研究中,植被类型在兰科植物的丰富度和多度中都存在由枫香林引起的显著负效应,而且是不依赖海拔独立存在的。总而言之,植被类型对于兰科植物多样性的影响不能简单归结于海拔变化,更加复杂的综合作用过程值得深入探究。喀斯特地貌作为研究区域十分重要的地形地貌组成部分,具有极其复杂多样的小生境类型(钟云芳等,2014),这使之成为兰花生长的天堂,兰科植物的种类、密度、多度都令人叹为观止,调查中喀斯特溶岩地区一个样方最多能达到 17 种兰科植物,CCA 排序和 GLM 回归分析的结果都显示了其在兰科植物组成、丰富度、多度中的显著影响。河谷对于兰科植物丰富度和多度的影响程度都超过了喀斯特地貌,究其原因,河谷两侧拥有充足的光照,河流水分的蒸发为附生兰科植物提供了恰当的水分供应,而不间断的微风和水流增加了种子传播距离,另外,河谷还能一定程度上抵挡台风的侵扰,成为大批附生型兰科植物的“避难所”。坡位主要用于描述成坡的相对位置,各种坡位的土壤水肥条件有很大差别(田迅等,2015),这可能是影响植物多样性的重要因素,但在多数研究中,坡位因素一直由于获取较为困难且误差较大的原因,被作为次要因子考虑。本研究对于生境因子的 CCA 排序结果显示,除山脊之外的其他坡位类型对兰科植物组成变异的解释率和贡献率都达到了显著水平以上,有力地说明了不同的成坡位置所形成的独特的水肥小生境条件对兰科植物组成变化较强的驱动性。坡向和坡度通过影响生境的温度和湿度进而影响物种组成,一般情况下阳坡比阴坡光照条件更好,但土壤含水量和湿度相对较低(Leps & Smilauer, 2003)。该研究针对兰科植物丰富度和多度的 GLM 回归分析中指出了坡向的显著效应,其中东南方坡向对兰科植物丰富度的正向影响是很稳定的,即在一元模型和多元模型中,具有东南坡向样方的增加都有利于形成更高的兰科植物丰富度。东南方坡向属于半阳坡,光照条件适中,且时常受到东南方暖湿气流的光顾,为兰科植物提供了极佳的条件,相较于其他坡向适合更多兰科

植物的定殖。但在多度分析的多元模型中,坡向因子受其他协变量影响较大,并未体现出显著效应,猜测可能是受到海拔等因子的影响,海拔过高存在台风侵扰,海拔太低暖湿气流被阻隔,因此对多度的影响力有所下降。陡坡的土壤或砂石水分含量较少但排水良好,适合大多数地生或石生兰科植物生长,而对于附生型兰科植物来说,坡度越大意味着能获得更多光照(李成俊等,2013),在我们的研究中,坡度对兰科植物丰富度和多度的影响都是显著的,在物种组成变化中也有显著的解释率,由此可见坡度的增加不但具有因促进了独特小生境形成而带来的物种选择作用,而且有利于兰科植物的大量繁殖。光照条件是海拔、地形地貌、土壤养分等立地条件中影响林下植物组成的主要因素之一(Huang et al., 2008; Tinya et al., 2009),郁闭度则是影响光照强度和持续时间最直接的因素,郁闭度对林下植物多样性的显著影响已经被广泛证实(曹梦等,2018;王媚臻等,2019)。本研究中郁闭度确实对兰科植物的组成具有一定影响,但对于丰富度和多度的效应均不显著,可能是因为不同郁闭度大小作某一小生境中兰科植物定殖重要的环境选择依据,但达不到精细的兰花种类和数量选择水平。

3.5 基于关键生境因子的兰科植物资源保育策略

本研究中用于解释物种多样性的生境因子之间可能存在复杂的相互作用,这使得他们对于兰科植物多样性的解释存在一定的重叠效应(Tsiftsis, 2020),但这并不能否定文中指出的相关生境因子的重要性。通过此次调查和分析,我们发现8种生境因子对兰科植物多样性都有不同侧重点的显著影响,其中以植被类型、海拔和地形地貌因子的效应最为显著。根据兰科植物多样性与生境因子的相互适应结果,提出一下资源保育策略:(1)研究区域拥有海南岛几乎全部的植被类型,丰富的植被类型为不同的兰科植物营造了与之相适应的生存环境,中高海拔段的山地雨林拥有极其丰富的兰科植物资源,而高海拔段的山地常绿林和山顶矮林中则存在例如美花兰、卷萼兜兰(*Paphiopedilum appletonianum*)、五指山石豆兰等珍稀濒危类群。因此,在今后的保育工作中应重点关注中高海拔地区的生境保护。(2)喀斯特溶岩山地同样存在着丰富的兰科植物资源,本研究指出该地貌是驱动兰科植物生长和分化的关键生

境因子,但由于这一地区长期处于保护区的一般控制区,生境破坏严重,历史因素如上世纪的金矿开采活动,人居活动干扰如经济林栽植、挖掘野生花梨的炸山挖石,以及附近水泥厂的采矿活动等,导致部分石灰岩山地轻则寸草不生,重则直接被夷为平地,这不仅使兰科植物资源多样性遭受到巨大破坏,更是对石灰岩专性植物的毁灭性打击。应该加强对当地村民的正确管理、引导及宣传,并且通过各类扶贫战略的实施使当地村民摆脱靠山吃山的窘境,这对于兰科植物重要自然栖息地的恢复和就地保护十分必要。(3)兰科植物保护不是盲目的一刀切,应该理清轻重缓急,而且保护工作最好是在防止人为破坏的基本要求下通过改善生境条件来进行,因为与生境的长期相互适应使得兰科植物对其原生境有高度的依赖性,这种关系一旦被打破,就难以恢复到其最初的良好生长状况。

参考文献:

- ACHARYA KP, VETAAS OR, BIRKS HJB, 2011. Orchid species richness along Himalayan elevational gradients [J]. *J Biogeogr*, 38: 1821–1833.
- BENESH DP, KALBE M, 2016. Experimental parasite community ecology: intraspecific variation in a large tapeworm affects community assembly [J]. *J Anim Ecol*, 85(4): 1004–1013.
- BENZING DH, 1990. *Vascular epiphytes* [M]. New York: Cambridge University Press.
- CAO M, PAN P, OUYANG XZ, et al., 2018. Relationships between the composition and diversity of understory vegetation and environmental factors in aerially seeded *Pinus massoniana* plantations [J]. *Chin J Ecol*, 37(1): 1–8. [曹梦, 潘萍, 欧阳勋志, 等, 2018. 飞播马尾松林林下植被组成、多样性及其与环境因子的关系 [J]. *生态学杂志*, 37(1): 1–8.]
- CHANG XX, ZHAO WZ, ZHAO AF, 2004. Species diversity of pasture community at different altitude levels in Qilian Mountains [J]. *Chin J Appl Ecol*, 15(9): 1599–1603. [常学向, 赵文智, 赵爱芬, 2004. 祁连山区不同海拔草地群落的物种多样性 [J]. *应用生态学报*, 15(9): 1599–1603.]
- CRAIN BJ, MELANIA F, 2020. Biogeographical analyses to facilitate targeted conservation of orchid diversity hotspots in Costa Rica [J]. *Divers Distrib*. DOI: 10.1111/ddi.13062.
- CHENG ZQ, 2015. Species diversity and Conservation of orchids of Daiyunshan Nature Reserve, Fujian and taxonomic

- study of *Zeuxine* (Orchidaceae) in China [D]. Shanghai: East China Normal University: 13–15. [程志全, 2015. 福建戴云山国家级自然保护区兰科植物物种多样性及其保护与中国线柱兰属的分类学研究 [D]. 上海: 华东师范大学: 13–15.]
- FRANKLIN J, KEPPEL G, WEBB EL, et al., 2013. Dispersal limitation, speciation, environmental filtering and niche differentiation influence forest tree communities in west Polynesia [J]. *J Biogeogr*, 40: 988–999.
- HU XY, ZHU J, SONG XQ, et al., 2015. Orchid diversity in China's Hainan Island: Distribution and conservation [J]. *Collect Bot*, 34: 1–9.
- HUANG BQ, YANG XQ, YU FH, et al., 2008. Surprisingly high orchid diversity in travertine and forest areas in the Huanglong valley, China, and implications for conservation [J]. *Biodivers Conserv*, 17(11): 2773.
- JIN XH, LI JW, YE DP, 2019. Atlas of native orchids in China [M]. Zhengzhou: Henan Science and Technology Press. [金效华, 李剑武, 叶德平, 2019. 中国野生兰科植物原色图鉴 [M]. 郑州: 河南科学技术出版社.]
- 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.]
- KEPPEL G, GILLESPIE TW, ORMEROD P, et al., 2016. Habitat diversity predicts orchid diversity in the tropical south-west Pacific [J]. *J Biogeogr*, 43: 2332–2342.
- KEVIN JG, 2000. Global patterns in biodiversity [J]. *Nature*, 405(6783): 220–227.
- KHEE C, NG Y, HEW CS, 2000. Orchid pseudobulbs—'false' bulbs with a genuine importance in orchid growth and survival [J]. *Sci Hort-Amsterdam*, 83: 165–172.
- KISEL Y, BARRACLOUGHTG, 2010. Speciation has a spatial scale that depends on levels of gene flow [J]. *Am Nat*, 175: 316–334.
- KREFT H, JETZ W, MUTKE J, et al., 2008. Global diversity of island floras from a macroecological perspective [J]. *Ecol Lett*, 11: 116–127.
- LEP J, MILAUER P, 2003. Multivariate analysis of ecological data using CANOCO [M]. UK: Cambridge University Press.
- LI CJ, SUN Q, CHEN Z, et al., 2013. Effects of roadside slope gradient on plant diversity during revegetation [J]. *Bull Bot Res*, 33(4): 477–483. [李成俊, 孙琦, 陈璋, 等, 2013. 道路边坡坡度对植被恢复中物种多样性的影响研究 [J]. *植物研究*, 33(4): 477–483.]
- LI QY, WANG XP, 2013. Elevational pattern of species richness in the Three Gorges region of the Yangtze River: effect of climate, geometric constraints, area and topographical heterogeneity [J]. *Bidivers Sci*, 21(2): 141–152. [李巧燕, 王襄平, 2013. 长江三峡库区物种多样性的垂直分布格局: 气候、几何限制、面积及地形异质性的影响 [J]. *生物多样性*, 21(2): 141–152.]
- LI XF, 2017. Study on species diversity and conservation of orchids in “Qinglong-Guanling” section of karst gorge in Beipanjiang [D]. Guiyang: Guizhou University: 28. [李晓芳, 2017. 北盘江喀斯特峡谷区“晴隆–关岭”段兰科物种多样性及其保护研究 [D]. 贵阳: 贵州大学: 28.]
- LI YD, ZANG YG, 2004. The research advances on the structure and function of forest canopy, as well as their temporal and spatial changes [J]. *World For Res*, (3): 12–16. [李德志, 臧润国, 2004. 森林冠层结构与功能及其时空变化研究进展 [J]. *世界林业研究*, (3): 12–16.]
- LIU GF, ZANG RG, DING Y, et al., 2010. Diversity and distribution of epiphytic orchids in different types of old-growth tropical forests in Bawangling National Nature Reserve, Hainan Island, China [J]. *Chin J Plant Ecol*, 34(4): 396–408. [刘广福, 臧润国, 丁易, 等, 2010. 海南霸王岭不同森林类型附生兰科植物的多样性和分布 [J]. *植物生态学报*, 34(4): 396–408.]
- LIU Q, YING SH, LAN QY, 2010. Research advances in population dynamics of Orchidaceae [J]. *Chin J Appl Ecol*, 21(11): 2980–2985. [刘强, 殷寿华, 兰芹英, 2010. 兰科植物种群动态研究进展 [J]. *应用生态学报*, 21(11): 2980–2985.]
- LORENZO M, MICHELE S, SEBASTIAN K, et al., 2007. Effects of local factors on plant species richness and composition of alpine meadows [J]. *Agric Ecosyst Environ*, 119(3/4): 281–288.
- LU G, FANG ZS, LIU L, et al., 2018. A field guide to the Orchids of Yinggeling, Hainan [M]. Haikou: Hainan Publishing House. [卢刚, 方赞山, 刘磊, 等, 2018. 海南鹦哥岭兰科植物图鉴 [M]. 海口: 海南出版社.]
- MARK P, QIAN YQ, 1944. Principles and methods of biodiversity research [M]. Beijing: China Science and Technology Press: 149–173. [马克平, 钱迎倩, 1994. 生物多样性研究的原理与方法 [M]. 北京: 中国科学技术出版社: 149–173.]
- MICHAEL FF, MARK WC, 2009. Orchid biology: from Linnaeus via Darwin to the 21st century [J]. *Ann Bot*, 104(3): 359–364.
- NIGEL DS, KINGSLEY WD, 2009. Terrestrial orchid conservation in the age of extinction [J]. *Ann Bot*, 104(3): 543–556.
- NING Y, 2018. Simulation of suitable habitat distribution of two kinds of endemic plants in Hainan based on MaxEnt and 3S technology under climate change [D]. Haikou: Hainan University: 30–36. [宁瑶, 2018. 气候变化下基于 MaxEnt 和 3S 技术的两种海南特有植物的适宜生境分布模拟 [D]. 海口: 海南大学: 30–36]
- PRICE JP, WAGNERWL, 2004. Speciation in Hawaiian angiosperm lineages: cause, consequence, and mode

- [J]. *Evolution*, 58: 2185–2200.
- SCHÖDELBAUEROVA I, ROBERTS DL, KINDLMANN P, 2009. Size of protected areas is the main determinant of species diversity in orchids [J]. *Biol Conserv*, 142(10): 2329–2334.
- SHERMAN R, MULLEN R, LI HM, et al., 2008. Spatial patterns of plant diversity and communities in Alpine ecosystems of the Heng duan Mountains, northwest Yunnan, China [J]. *J Plant Ecol*, 1(2): 117–136.
- SHI GZ, ZHOU TF, YIN TG, 2008. Distribution and conservation strategies for wild orchid resources in Jianfengling, Hailan Island [J]. *J Fujian For Sci Technol*, (3): 203–207. [施国政, 周铁峰, 尹光天, 2008. 海南岛尖峰岭野生兰科植物资源分布与保护对策 [J]. *福建林业科技*, (3): 203–207.]
- STEIN A, GERSTNER K, KREFT H, 2014. Environmental heterogeneity as a universal driver of species richness across taxa, biomes and spatial scales [J]. *Ecol Lett*, 17: 866–880.
- TANG CQ, OHSAWA M, 1997. Zonal transition of evergreen, deciduous, and coniferous forests along the altitudinal gradient on a humid subtropical mountain, Mt. Emei, Sichuan, China [J]. *Plant Ecol*, 133: 63–78.
- TIAN HZ, CHEN L, XING FW, 2013. Species diversity and conservation of orchids in Nanling National Nature Reserve, Guangdong [J]. *Biodivers Sci*, 21(2): 224–234. [田怀珍, 陈林, 邢福武, 2013. 广东南岭国家级自然保护区兰科植物物种多样性及其保护 [J]. *生物多样性*, 21(2): 224–234.]
- TIAN HZ, XING FW, 2008. Elevational diversity patterns of orchids in Nanling National Nature Reserve, northern Guangdong Province [J]. *Biodivers Sci*, 16(1): 75–82. [田怀珍, 邢福武, 2008. 南岭国家级自然保护区兰科植物物种多样性的海拔梯度格局 [J]. *生物多样性*, 16(1): 75–82.]
- TIAN X, GAO K, ZHANG LJ, et al., 2015. Effects of slope position on spatial distribution of soil water and vegetation in sandy land [J]. *Bull Soil Water Conserv*, 35(5): 12–16. [田迅, 高凯, 张丽娟, 等, 2015. 坡位对土壤水分及植被空间分布的影响 [J]. *水土保持通报*, 35(5): 12–16.]
- TINYA F, MÁRIALIGETI S, KIRÁLY I, et al., 2009. The effect of light conditions on herbs, bryophytes and seedlings of temperate mixed forests in örség, Western Hungary [J]. *Plant Ecol*, 204(1): 69–81.
- TRAVERSE A, KUEFFER C, DAEHLER CC, 2014. Global and regional nested patterns of non-native invasive floras on tropical islands [J]. *J Biogeogr*, 41: 823–832.
- TRAXMANDLOVÁ I, ACKERMAN JD, TREMBLAY RL, et al., 2018. Determinants of orchid species diversity in world islands [J]. *New Phytol*, 217(1): 12–15.
- TRIANSTIS KA, GUILHAUMON F, WHITTAKER RJ, 2012. The island species-area relationship: biology and statistics [J]. *J Biogeogr*, 39: 215–231.
- TRIANSTIS KA, MYLONAS M, LIKA K, et al., 2003. A model for the species-area-habitat relationship [J]. *J Biogeogr* 30, 19–27.
- TSIFTIS S, 2020. The complex effect of heterogeneity and isolation in determining alpha and beta orchid diversity on islands in the Aegean archipelago [J]. *Syst Biodivers*, 18(3): 281–294.
- WANG MZ, BI HJ, JIN S, et al., 2019. Effects of stand density on understory species diversity and soil physicochemical properties of a *Cupressus funebris* plantation in Yunding Mountain [J]. *Acta Ecol Sin*, 39(3): 981–988. [王媚臻, 毕浩杰, 金锁, 等, 2019. 林分密度对云顶山柏木人工林下物种多样性和土壤理化性质的影响 [J]. *生态学报*, 39(3): 981–988.]
- YU WG, 2014. Study on situation and development strategies of industrialization of orchid resources in Hainan [D]. Haikou: Hainan University: 19–20. [余文刚, 2014. 海南兰花资源及其产业化发展策略研究 [D]. 海口: 海南大学: 19–20.]
- ZHAI JW, PENG DH, DENG CY, et al., 2016. Comparison on floristic characteristics of Orchidaceae on Taiwan Island and Hainan Island [J]. *J Plant Resour Environ*, 25(4): 87–95. [翟俊文, 彭东辉, 邓传远, 等, 2016. 台湾岛和海南岛兰科植物区系特征比较 [J]. *植物资源与环境学报*, 25(4): 87–95.]
- ZHANG SB, CHEN WY, HUANG JL, et al., 2015. Orchid species richness along elevational and environmental gradients in Yunnan, China [J]. *PLoS ONE*, 10(11): e0142621.
- ZHONG YF, WU HZ, SONG XQ, et al., 2014. Species Diversity and the relationship with habitat community characteristics of *Impatiens hainanensis*, endemic to Hainan Island [J]. *Chin J Trop Crops*, 35(2): 355–361. [钟云芳, 武华周, 宋希强, 等, 2014. 海南凤仙花生境地物种多样性及其与环境关系研究 [J]. *热带作物学报*, 35(2): 355–361.]

(责任编辑 李 莉)

附表 海南主要陆域自然保护地兰科植物名录

Attached table List of orchid in main land nature reserves in Hainan

种 Species	特有性 Endemic	IUCN 濒危等级 IUCN endangered category	生活型 Life type	LM	BW	JF	YG	WZ	DL
拟兰 <i>Apostasia odorata</i>	—	LC	T	1	—	—	1	—	1
卷萼兜兰 <i>Paphiopedilum appletonianum</i>	—	EN	T/L	1	1	1	1	—	—
红花斑叶兰 <i>Goodyera grandis</i>	—	NT	T	—	1	—	—	—	—
绿花斑叶兰 <i>G. viridiflora</i>	—	LC	T/L	—	1	—	—	1	1
高斑叶兰 <i>G. procera</i>	—	LC	T/L	—	1	1	1	1	1
绒叶斑叶兰 <i>G. velutina</i>	—	LC	T/L	1	1	1	—	1	1
歌绿斑叶兰 <i>G. seikoomontana</i>	—	VU	T/L	1	—	—	—	—	—
烟色斑叶兰 <i>G. fumata</i>	—	NT	T	—	—	—	—	1	—
血叶兰 <i>Ludisia discolor</i>	—	LC	T/L	1	1	1	1	1	1
中华叉柱兰 <i>Cheirostylis chinensis</i>	—	LC	T/L	1	1	—	1	—	—
云南叉柱兰 <i>C. yunnanensis</i>	—	LC	T/L	—	1	—	—	—	—
雉尾叉柱兰 <i>C. cochinchinensis</i>	—	EN	T/L	—	—	—	—	—	1
细小叉柱兰 <i>C. pusilla</i>	—	NT	T/L	1	—	—	—	—	—
和社叉柱兰 <i>C. tortilacinia</i>	—	NE	T/L	—	1	—	1	1	—
斜瓣翻唇兰 <i>Hetaeria obliqua</i>	Ⅱ	LC	T	—	1	1	1	1	1
滇南翻唇兰 <i>H. rubens</i>	—	LC	T	1	—	—	—	1	—
四腺翻唇兰 <i>H. biloba</i>	—	LC	T	—	—	—	—	1	—
小片菱兰 <i>Rhomboda abbreviate</i>	—	LC	T/L	—	1	—	—	1	—
黄花线柱兰 <i>Zeuxine flava</i>	—	LC	T	—	—	—	—	—	1
宽叶线柱兰 <i>Z. affinis</i>	—	LC	T/L	—	—	—	—	1	—
白花线柱兰 <i>Z. parvifolia</i>	—	LC	T/L	1	—	—	1	1	—
金线兰 <i>Anoectochilus roxburghii</i>	—	EN	T/L	1	1	1	1	1	1
海南金线兰 <i>A. hainanensis</i>	Ⅰ	LC	T/L	—	1	1	1	1	—
隐柱兰 <i>Cryptostylis arachnites</i>	—	LC	T	1	—	1	—	1	1
小舌唇兰 <i>Platanthera minor</i>	—	LC	T	—	1	1	—	1	1
长须阔蕊兰 <i>Peristylus calcaratus</i>	—	LC	T	—	1	1	—	—	—
橙黄玉凤花 <i>Habenaria rhodocheila</i>	—	LC	T/L	1	1	1	1	—	—
南方玉凤花 <i>H. malintana</i>	—	LC	T/L	—	—	1	—	—	—
毛萼玉凤花 <i>H. ciliolaris</i>	Ⅲ	LC	T/L	—	1	—	1	—	—
无叶兰 <i>Aphyllorchis montana</i>	—	LC	T	—	—	1	—	—	—
短穗竹茎兰 <i>Tropidia curculigoides</i>	—	NT	T	—	1	1	1	1	1
竹茎兰 <i>T. nipponica</i>	—	NT	T	—	1	—	1	—	1
阔叶竹茎兰 <i>T. angulosa</i>	—	NT	T	—	1	—	1	—	—
白点天麻 <i>Gastrodia punctata</i>	Ⅱ	NE	T	—	1	—	—	—	—
兰屿芋兰 <i>Nervilia lanyuensis</i>	—	CR	T	—	1	—	—	1	—
竹叶兰 <i>Arundina graminifolia</i>	—	LC	T/L	1	1	1	1	—	1
流苏贝母兰 <i>Coelogyne fimbriata</i>	—	LC	E/L	1	1	1	1	1	1
石仙桃 <i>Pholidota chinensis</i>	—	LC	E/L	1	1	1	1	1	1
云南石仙桃 <i>P. yunnanensis</i>	—	NT	E/L	—	1	—	—	—	—
莫氏曲唇兰 <i>Panisea moi</i>	Ⅰ	DD	E	1	—	—	—	—	—
曲唇兰 <i>P. tricallosa</i>	—	LC	E	—	—	—	1	—	1

续附表									
种 Species	特有性 Endemic	IUCN 濒危等级 IUCN endangered category	生活型 Life type	LM	BW	JF	YG	WZ	DL
石斛 <i>Dendrobium nobile</i>	—	VU	E/L	—	1	1	1	—	1
美花石斛 <i>D. loddigesii</i>	—	VU	E/L	—	1	—	1	—	—
聚石斛 <i>Dendrobium lindleyi</i>	—	LC	E	—	1	—	1	—	—
钩状石斛 <i>D. aduncum</i>	—	VU	E/L	1	1	1	1	1	1
海南石斛 <i>D. hainanense</i>	I	VU	E/L	1	1	1	1	1	1
黑毛石斛 <i>D. williamsonii</i>	—	EN	E/L	1	1	1	1	1	1
叠鞘石斛 <i>D. denneanum</i>	—	VU	E	—	1	—	—	1	—
厚唇兰 <i>D. mariae</i>	—	VU	E/L	1	1	—	—	1	—
华石斛 <i>D. sinense</i>	—	EN	E	1	1	1	—	1	1
剑叶石斛 <i>D. acinaciforme</i>	—	VU	E/L	1	1	1	1	—	1
流苏金石斛 <i>D. fimbriata</i>	—	LC	E/L	1	1	1	1	1	1
狭叶金石斛 <i>D. angustifolia</i>	—	VU	E	1	1	1	1	1	1
密花石斛 <i>D. densiflorum</i>	—	VU	E/L	1	1	1	1	1	1
重唇石斛 <i>D. hercoglossum</i>	—	NT	E/L	1	1	1	1	1	1
竹枝石斛 <i>D. salaccense</i>	—	VU	E/L	1	1	—	1	1	1
束花石斛 <i>D. chrysanthum</i>	—	VU	E/L	—	—	—	1	—	—
蕨叶卷瓣兰 <i>Bulbophyllum retusiusculum</i>	—	LC	E/L	1	1	1	1	1	1
直唇卷瓣兰 <i>B. delitescens</i>	—	VU	E/L	—	1	1	1	1	1
虎斑卷瓣兰 <i>B. retusiusculum</i> var. <i>tigridum</i>	—	EN	E/L	1	1	1	1	1	1
芳香石豆兰 <i>B. ambrosia</i>	—	LC	E/L	1	1	1	1	1	1
赤唇石豆兰 <i>B. affine</i>	—	LC	E/L	—	1	1	1	1	1
戟唇石豆兰 <i>B. hastatum</i>	—	LC	E/L	1	1	1	1	—	1
乐东石豆兰 <i>B. ledungense</i>	I	DD	E/L	1	1	1	1	—	1
匍生石豆兰 <i>B. reptans</i>	—	LC	E/L	1	1	—	—	1	—
齿瓣石豆兰 <i>B. levinei</i>	—	LC	E	1	1	—	1	1	1
密花石豆兰 <i>B. odoratissimum</i>	—	LC	E/L	1	1	1	1	1	1
广东石豆兰 <i>B. kwangtungense</i>	Ⅲ	LC	E	1	—	—	1	1	—
匙萼卷瓣兰 <i>B. spathulatum</i>	—	VU	E/L	—	1	1	1	1	1
窄苞石豆兰 <i>B. rufinum</i>	—	VU	E	—	1	1	—	—	—
南方卷瓣兰 <i>B. lepidum</i>	—	DD	E/L	1	—	1	1	1	1
五指山石豆兰 <i>B. wuzhishanense</i>	I	VU	E	—	—	—	—	1	—
双叶卷瓣兰 <i>B. wallichii</i>	—	VU	E	—	—	—	—	1	—
斑唇卷瓣兰 <i>B. pectenveners</i>	—	LC	E	1	—	—	—	—	1
紫纹卷瓣兰 <i>B. melanoglossum</i>	—	NT	E	—	—	—	—	—	1
莲花卷瓣兰 <i>B. hirundinis</i>	—	NT	E	1	—	—	—	—	—
小巧羊耳蒜 <i>Liparis delicatula</i>	—	LC	E/L	—	1	1	1	—	—
镰翅羊耳蒜 <i>L. bootanensis</i>	—	LC	E/L	—	1	1	1	1	1
丛生羊耳蒜 <i>L. cespitosa</i>	—	LC	E/L	1	1	1	1	1	1
扇唇羊耳蒜 <i>L. stricklandiana</i>	—	LC	E/L	1	1	1	1	1	1
大花羊耳蒜 <i>L. distans</i>	—	LC	T/L	—	—	1	—	—	—
保亭羊耳蒜 <i>L. bautingensis</i>	I	VU	E/L	—	—	1	—	—	1
长茎羊耳蒜 <i>L. viridiflora</i>	—	LC	E/L	—	1	1	1	1	1

续附表

种 Species	特有性 Endemic	IUCN 濒危等级 IUCN endangered category	生活型 Life type	LM	BW	JF	YG	WZ	DL
紫花羊耳蒜 <i>L. nigra</i>	—	VU	T/L	1	—	—	—	—	—
黄花羊耳蒜 <i>L. luteola</i>	Ⅱ	VU	E/L	—	—	1	—	1	1
浅裂沼兰 <i>Malaxis acuminata</i>	—	LC	T/L	—	1	1	1	1	—
二脊沼兰 <i>M. finetii</i>	Ⅱ	EN	T/L	—	1	1	—	1	—
美叶沼兰 <i>M. calophylla</i>	—	LC	T/L	1	—	—	1	1	—
无耳沼兰 <i>Dienia ophrydis</i>	—	LC	T	1	—	1	1	—	—
长苞鸢尾兰 <i>Oberonia longibracteata</i>	Ⅱ	NT	E/L	1	1	—	1	—	1
短耳鸢尾兰 <i>O. falconeri</i>	—	LC	E	—	—	1	—	—	—
长裂鸢尾兰 <i>O. anthropophora</i>	Ⅱ	LC	E	1	—	—	—	—	—
鸢尾兰 <i>O. iridifolia</i>	—	LC	E	—	—	1	—	1	1
密苞鸢尾兰 <i>O. variabilis</i>	—	LC	E	—	—	—	—	—	1
红唇鸢尾兰 <i>O. rufilabris</i>	—	EN	E	—	—	—	1	—	—
莎叶兰 <i>Cymbidium cyperifolium</i>	—	VU	T	—	1	—	—	—	1
冬凤兰 <i>C. dayanum</i>	—	VU	E	1	1	1	1	1	1
多花兰 <i>C. floribundum</i>	—	VU	E/L	1	1	1	1	1	1
寒兰 <i>C. kanran</i>	—	VU	T	1	1	—	1	1	1
秋墨兰 <i>C. haematodes</i>	—	NE	T	—	1	—	1	1	—
珍珠矮 <i>C. nanulum</i>	—	EN	T	—	1	—	—	—	—
美花兰 <i>C. insigne</i>	Ⅱ	CR	T/L	1	1	—	1	1	—
墨兰 <i>C. sinense</i>	—	VU	T	1	1	1	1	1	—
硬叶兰 <i>C. mannii</i>	—	NT	E	—	—	1	1	—	—
兔耳兰 <i>C. lancifolium</i>	—	LC	T	1	1	1	1	1	1
独占春 <i>C. eburneum</i>	—	EN	E/L	1	1	—	—	1	1
纹瓣兰 <i>C. aloifolium</i>	—	NT	E	—	—	—	1	—	—
椰香兰 <i>C. atropurpureum</i>	Ⅱ	LC	E	—	—	—	1	1	—
黎氏兰 <i>C. lii</i>	I	CR	E	1	—	—	—	—	—
建兰 <i>C. ensifolium</i>	—	VU	T	1	—	1	—	1	—
贵州地宝兰 <i>Geodorum eulophioides</i>	—	LC	T	—	1	—	—	—	—
多花地宝兰 <i>G. recurvum</i>	—	LC	T	—	1	—	1	—	—
禾叶兰 <i>Agrostophyllum callosum</i>	—	NT	E/L	—	1	1	—	1	1
美丽云叶兰 <i>Nephelaphyllum pulchrum</i>	Ⅱ	DD	T/L	—	—	1	1	1	1
云叶兰 <i>N. tenuiflorum</i>	—	VU	T/L	—	1	1	—	1	1
卵叶带唇兰 <i>Tainia ovifolia</i>	—	CR	T/L	—	1	—	—	—	—
南方带唇兰 <i>T. ruybarrettoi</i>	—	EN	T	—	—	1	—	1	—
带唇兰 <i>T. dunnii</i>	—	NT	T	—	1	1	1	1	—
阔叶带唇兰 <i>T. latifolia</i>	—	VU	T	—	—	—	1	1	—
心叶带唇兰 <i>T. cordifolia</i>	—	EN	T	—	—	1	—	—	—
绿花安兰 <i>Ania penangiana</i>	—	NT	T/L	—	1	—	1	1	—
香港安兰 <i>A. hongkongensis</i>	—	NT	T/L	1	1	1	1	—	—
黄兰 <i>Cephalantheropsis gracilis</i>	—	NT	T	1	1	—	—	1	1
黄花鹤顶兰 <i>Phaius flavus</i>	—	LC	T/L	—	1	—	—	—	—
海南鹤顶兰 <i>P. hainanensis</i>	I	CR	T/L	1	—	—	—	1	1

续附表

种 Species	特有性 Endemic	IUCN 濒危等级 IUCN endangered category	生活型 Life type	LM	BW	JF	YG	WZ	DL
鹤顶兰 <i>P. tankervilleae</i>	—	LC	T/L	—	1	—	—	—	—
三褶虾脊兰 <i>Calanthe triplicata</i>	—	LC	T/L	1	1	—	1	1	—
泽泻虾脊兰 <i>C. alismaefolia</i>	—	LC	T/L	—	1	—	1	—	—
狭叶虾脊兰 <i>C. angustifolia</i>	—	NT	T	—	—	—	—	1	1
南方虾脊兰 <i>C. lyroglossa</i>	—	LC	T	—	1	—	—	1	1
二列叶虾脊兰 <i>C. speciosa</i>	—	LC	T/L	1	1	1	1	1	1
中华坛花兰 <i>Acanthephippium sinense</i>	—	EN	T	—	—	—	—	—1	
坛花兰 <i>A. sylhetense</i>	—	VU	T	1	—	—	—	—	—
吻兰 <i>Collabium chinense</i>	—	LC	T	—	—	1	1	1	—
金唇兰 <i>Chrysoglossum ornatum</i>	—	LC	T/L	—	—	—	1	—	—
半柱毛兰 <i>Eria corneri</i>	—	LC	E/L	1	1	1	1	1	—
香港毛兰 <i>E. gagnepainii</i>	—	LC	T/L	1	1	1	1	1	1
足茎毛兰 <i>E. coronaria</i>	—	LC	T/L	—	1	—	1	—	—
钟兰 <i>Campanulorchis thao</i>	—	LC	E/L	1	1	1	1	1	1
菱唇蛤兰 <i>Conchidium rhomboidale</i>	—	NT	E/L	—	1	1	—	1	1
蛤兰 <i>C. pusillum</i>	—	LC	E/L	—	—	1	—	1	1
指叶拟毛兰 <i>Mycaranthes pannea</i>	—	NT	E/L	1	1	1	1	1	1
绒兰 <i>Dendrolirium tomentosum</i>	—	VU	E/L	—	1	1	1	—	—
白绵绒兰 <i>D. lasiopetalum</i>	—	VU	E/L	—	1	1	1	1	1
长苞苹兰 <i>Pinalia obvia</i>	—	VU	E/L	—	1	—	1	1	1
粗茎苹兰 <i>P. amica</i>	—	LC	E/L	1	1	—	1	1	—
拟石斛 <i>Oxystophyllum changjiangense</i>	I	EN	E/L	1	1	1	1	1	1
管叶牛角兰 <i>Ceratostylis subulata</i>	—	VU	E	1	1	1	1	1	1
集束牛角兰 <i>C. hainanensis</i>	I	VU	E/L	1	1	1	1	1	1
玫瑰宿苞兰 <i>Cryptochilus roseus</i>	—	LC	E/L	1	1	1	1	1	1
小花牛齿兰 <i>Appendicula micrantha</i>	—	LC	E/L	1	1	—	—	1	1
牛齿兰 <i>A. cornuta</i>	—	LC	E/L	1	1	1	1	1	1
矮柱兰 <i>Thelasis pygmaea</i>	—	LC	E/L	1	1	—	1	1	1
馥兰 <i>Phreatia formosana</i>	—	VU	E	1	—	—	1	1	1
扁根带叶兰 <i>Taeniophyllum complanatum</i>	—	DD	E	—	—	—	1	—	1
兜唇带叶兰 <i>T. pusillum</i>	—	LC	E	—	—	1	—	—	—
小囊兰 <i>Micropera poilanei</i>	II	NT	E/L	—	—	1	1	—	—
蛇舌兰 <i>Diploprora championii</i>	—	LC	E/L	1	—	1	1	1	1
窄果脆兰 <i>Acampe ochracea</i>	—	NT	E/L	—	—	1	1	—	—
多花脆兰 <i>A. rigida</i>	—	LC	E/L	—	1	1	1	1	—
火焰兰 <i>Renanthera coccinea</i>	—	EN	E/L	1	1	1	1	—	—
匙唇兰 <i>Schoenorchis gemmata</i>	—	LC	E	1	1	1	1	1	1
虾尾兰 <i>Parapteroceras elobe</i>	—	NT	E	—	1	1	—	1	1
勐海隔距兰 <i>Cleisostoma menghaiense</i>	—	VU	E	—	1	1	1	—	—
金塔隔距兰 <i>C. filiforme</i>	—	LC	E	—	1	—	1	1	—
大序隔距兰 <i>C. paniculatum</i>	—	LC	E/L	1	1	1	1	1	1
毛柱隔距兰 <i>C. simondii</i> var. <i>guangdongense</i>		NE	E/L	1	1	—	—	—	1

续附表									
种 Species	特有性 Endemic	IUCN 濒危等级 IUCN endangered category	生活型 Life type	LM	BW	JF	YG	WZ	DL
红花隔距兰 <i>C. williamsonii</i>	—	LC	E	1	1	—	1	1	1
尖喙隔距兰 <i>C. rostratum</i>	—	LC	E/L	1	1	1	1	1	1
美花隔距兰 <i>C. birmanicum</i>	—	LC	E/L	1	1	1	1	1	1
短茎隔距兰 <i>C. parishii</i>	—	LC	E	1	1	1	1	1	1
短序隔距兰 <i>C. striatum</i>	—	VU	E/L	1	1	—	1	1	1
花蜘蛛兰 <i>Esmeralda clarkei</i>	—	VU	E/L	1	1	1	1	1	1
窄唇蜘蛛兰 <i>Arachnis labrosa</i>	—	LC	E/L	1	1	1	1	1	1
海台白点兰 <i>T. annamense</i>	—	NT	E	1	1	—	1	1	1
台湾白点兰 <i>T. formosanum</i>	—	LC	E/L	—	—	1	—	1	1
白点兰 <i>Thrixspermum centipeda</i>	—	LC	E/L	1	1	1	1	1	—
琴唇万代兰 <i>Vanda concolor</i>	—	VU	E/L	—	1	1	1	1	—
纯色万代兰 <i>V. subconcolor</i>	—	EN	E/L	1	1	1	1	1	1
矮万代兰 <i>V. pumila</i>	—	VU	E	—	1	1	1	—	—
海南钻喙兰 <i>Rhynchostylis gigantea</i>	Ⅱ	EN	E	—	1	—	1	—	—
三色槌柱兰 <i>Robiquetia insectifera</i>	Ⅱ	DD	E	—	—	1	—	—	—
槌柱兰 <i>R. dentifera</i>	—	EN	E	—	—	1	—	—	—
大叶寄树兰 <i>R. spatulata</i>	Ⅱ	LC	E/L	1	1	1	1	1	1
寄树兰 <i>R. succisa</i>	—	LC	E	1	1	—	1	1	—
大尖囊蝴蝶兰 <i>Phalaenopsis deliciosa</i>	Ⅱ	VU	E/L	1	1	1	1	1	—
五唇兰 <i>P. pulcherrima</i>	Ⅱ	NE	T/L	—	1	1	—	—	—
海南蝴蝶兰 <i>P. hainanensis</i>	—	CR	E	—	1	—	—	—	—
钗子股 <i>Luisia morsei</i>	—	LC	E/L	—	1	1	1	—	—
无茎盆距兰 <i>Gastrochilus obliquus</i>	—	VU	E	—	1	1	—	—	1
镰叶盆距兰 <i>G. acinacifolius</i>	Ⅰ	VU	E	1	1	1	1	1	1
凹唇槽舌兰 <i>Holcoglossum kimballianum</i>	—	EN	E	1	—	—	—	—	—
火炬兰 <i>Grosourdia appendiculata</i>	Ⅱ	VU	E	—	1	1	—	1	—

注：Ⅰ. 海南特有种；Ⅱ. 中国仅海南有分布；Ⅲ. 中国特有种。**EX.** 绝灭；**EW.** 野外灭绝；**CR.** 极危；**EN.** 濒危；**VU.** 易危；**NT.** 近危；**LC.** 低危；**DD.** 数据缺乏；**NE.** 未评估。**T.** 地生；**T/L.** 地生或石生；**E.** 附生；**E/L.** 附生或石生。数字“1”代表本次调查中,此种在该保护地有分布。表中的兰科植物命名和系统发育顺序均参考金效华等人(2019)编写的《中国野生兰科植物原色图鉴》。

Note: Ⅰ. Endemic species in Hainan; Ⅱ. Only distributed in Hainan in China; Ⅲ. Endemic species in China. **EX.** Extinct; **EW.** Extinct in the wild; **CR.** Critically endangered; **EN.** Endangered; **VU.** Vulnerable; **NT.** Near threatened; **LC.** Low concern; **DD.** Data deficient; **NE.** Not evaluated. **T.** Terrestrial; **T/L.** Terrestrial or lithophytic; **E.** Epiphytic; **E/L.** Epiphytic or lithophytic. The number “1” represents that this type of protection is distributed in this reserve. The naming and phylogenetic sequence of orchid in the table refer to the *Atlas of Native Orchids in China* compiled by JIN Xiaohua et al. (2019).

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202104046

史卫东. 利用 F-MSAP 分析菜心表观遗传多样性 [J]. 广西植物, 2022, 42(8): 1357–1366。

SHI WD. Epigenetic diversity of Chinese flowering cabbage revealed by F-MSAP [J]. Guihaia, 2022, 42(8): 1357–1366.



利用 F-MSAP 分析菜心表观遗传多样性

史卫东*

(广西壮族农业科学院蔬菜研究所, 南宁 530007)

摘要: 菜心杂交除了引起 DNA 序列变化,还可能引起不依赖于 DNA 序列的表观遗传变化,为揭示菜心表观遗传多样性形成机理,该文利用 F-MSAP 检测 49 份菜心的 DNA 甲基化水平和模式变化。结果表明:(1) F-MSAP 检测效率较高,菜心 DNA 甲基化多态性较高,杂交可以提高 DNA 甲基化多态性。(2) 菜心表观遗传多样性较低,均质化严重,大部分遗传变异来源于种内,自交增加自交系的表观遗传差异,杂交增加杂种的表观遗传差异。(3) 49 份菜心的 DNA 甲基化水平较高,以全甲基化模式为主,自交降低 DNA 甲基化水平,杂交通过 DNA 甲基化模式变化增加自交系杂种的 DNA 甲基化水平。(4) 49 份菜心分成五类,聚类分析和主成分分析结果基本一致,杂种倾向于按照母本亲缘关系分类。该研究利用 F-MSAP 检测菜心表观遗传多样性,提高了菜心的鉴定效率和准确性,为进一步开展杂交育种提供了理论基础和技术支持。

关键词: 菜心, 自交, 杂交, 表观遗传多样性, F-MSAP, DNA 甲基化

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2022)08-1357-10

Epigenetic diversity of Chinese flowering cabbage revealed by F-MSAP

SHI Weidong*

(Vegetable Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China)

Abstract: In addition to DNA sequence changes, the hybridization Chinese flowering cabbage may also cause epigenetic changes that are independent of DNA sequence. In order to reveal the formation mechanism of epigenetic diversity in Chinese flowering cabbage, the changes on the level and pattern of DNA methylation of 49 Chinese flowering cabbages were tested by F-MSAP. The results were as follows: (1) The detection efficiency of F-MSAP was high, the DNA methylation polymorphism of Chinese flowering cabbage was high, and hybridization could improve the DNA methylation polymorphism. (2) The epigenetic diversity of cabbages was low, the homogenization was serious, and most of the genetic variation was originated from within the species. Selfing increased the epigenetic differences between inbred

收稿日期: 2022-03-17

基金项目: 国家自然科学基金(31360481); 广西农业科学院基本科研业务专项(2015YT71, 2021YT108) [Supported by National Natural Science Foundation of China (31360481); Basic Research Project of Guangxi Academy of Agricultural Sciences (2015YT71, 2021YT108)].

第一作者: 史卫东(1969-), 博士, 研究员, 主要从事蔬菜遗传育种及分子生物学研究工作, (E-mail) shiwd800@126.com。

*通信作者

parents, hybridization increased the epigenetic difference of hybrids. (3) The DNA methylation level of 49 Chinese flowering cabbages was relatively high, the pattern was mainly full methylation. Selfing decreased the DNA methylation level, and hybridization increased the DNA methylation level of inbred hybrids through the change of DNA methylation pattern. (4) The 49 Chinese flowering cabbages were divided into five categories. The results of cluster analysis and principal component analysis were basically consistent. Hybrids tended to be classified according to female parent genetic relationship. This study improves the identification efficiency and accuracy through the analysis of epigenetic diversity of Chinese flowering cabbage, and provides theoretical basis and technical support for further cross-breeding.

Key words: Chinese flowering cabbage, selfing, hybridization, epigenetic diversity, F-MSAP, DNA methylation

菜心是起源于中国南方的十字花科蔬菜,复种指数高,种植面积大,品种繁多。菜心种质资源狭窄,开展种质创新及鉴定对品种选育很重要。目前,基因组分子标记广泛应用于菜心遗传多样性分析,ISSR、SCoT 和 AFLP 分析表明菜心遗传多样性较低(孙雪梅等,2010;Shi et al., 2011;史卫东等,2015),AFLP 和 SCoT 分析表明菜心遗传变异主要来源于种内(Shi et al., 2011;史卫东等,2015)。菜心分子标记分类与传统分类的一致性和差异性并存,SRAP 多态性的聚类分析结果与基于表型特征的分类结果基本一致(李桂花等,2012),SCoT 标记的分类结果与熟期分类结果比较一致(史卫东等,2015),但分子标记聚类分析与表型分类也存在不一致的情况(孙雪梅等,2010;李桂花等,2012),说明菜心除了具有 DNA 序列变化之外,还具有不依赖于 DNA 序列的表观遗传变化,这种表观遗传变化并不能被基因组标记检测出来,因此,有必要开展菜心表观遗传多样性的研究,以提高鉴定效率和准确性。

DNA 甲基化不改变 DNA 序列的遗传修饰,在减数分裂和有丝分裂阶段可以稳定遗传(Kakutani et al., 1999),因而成为植物最重要的表观遗传标记。DNA 甲基化可以发生在所有序列环境中,包括对称的 CG 和 CHG 序列以及非对称的 CHH 序列(Chan et al., 2005),检测 CG 序列的甲基化状态常用甲基化敏感扩增多态性(methylation-sensitive amplification polymorphism, MSAP),MSAP 技术以其简单可靠及费用较低等优点,已广泛应用于拟南芥、甘蓝、芥蓝和油菜等十字花科植物的 DNA 甲基化分析(Cervera et al., 2002;陆光远等, 2005;Salmon et al., 2008;史卫东等,2012;Zhang et al., 2013),基于荧光标记引物扩增的 F-MSAP 也已应用于辣椒、鸡和牡蛎等动植物的 DNA 甲基

化分析(徐青等,2005;姜群等,2014;徐小万等, 2021)。

本研究旨在通过检测 49 份菜心的 DNA 甲基化水平和模式变化,揭示菜心表观遗传多样性形成的机理,为进一步提高杂交育种鉴定准确性和效率提供了理论基础和技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

49 份菜心为广西壮族自治区农业科学院蔬菜研究所收集和创制的品种资源和自交系,包括 7 份自交系亲本(1 号、2 号、3 号、5 号、6 号、7 号、14 号),8 份双自交系杂种(21 号、24 号、26 号、31 号、34 号、36 号、47 号、48 号),17 份单自交系杂种(15 号、18 号、19 号、20 号、22 号、23 号、25 号、29 号、30 号、32 号、33 号、35 号、37 号、39 号、43 号、44 号、49 号),7 份商品种(4 号、8 号、9 号、10 号、11 号、12 号、13 号),10 份商品种杂种(16 号、17 号、27 号、28 号、38 号、40 号、41 号、42 号、45 号、46 号),共计 14 份品种和 35 份杂种。田间试验于 2014 年在广西壮族自治区农业科学院里建科学研究基地进行,每份资源小区面积 5 m²,采收期随机选取 5 株,调查记载形态指标,取嫩叶混合冻存于-20 ℃。

1.2 方法

基因组 DNA 的提取:采用 CTAB 法提取基因组总 DNA。F-MSAP: Taq DNA 聚合酶、缓冲液、dNTP 和荧光引物均由北京鼎国昌盛生物技术有限公司提供。酶切连接一步法反应体系: DNA(50 ng · μL⁻¹) 4 μL, Adapter 1 μL, EcoR I / Msp I 或 EcoR I / Hpa II 2 μL, 10 X Reaction buffer 2.5 μL, 10 mmol · L⁻¹ ATP 2.5 μL, T4 Ligase 1 μL, H₂O 7 μL。分别用 EcoR I / Msp I 组合、EcoR I /

Hpa II 组合对同一基因组 DNA 酶切,混匀后离心数秒,37 ℃ 保温 5 h,8 ℃ 保温 4 h,4 ℃ 过夜。预选扩增反应:反应体系 25 μL 为 DNA 2 μL、预扩增引物 1 μL、dNTPs 0.5 μL、10 X PCR buffer 2.5 μL、Taq 酶 0.5 μL、ddH₂O 18.5 μL。离心数秒,反应条件:94 ℃ 2 min;94 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,30 个循环;72 ℃ 80 s,72 ℃ 5 min;4 ℃。选择性扩增反应:预选扩增产物1:20 稀释后作为选扩增模板。反应体系 25 μL;DNA 2 μL,10 X PCR buffer 2.5 μL,dNTP 0.5 μL,EcoR I 引物 1 μL,Hpa II/Msp I 引物 1 μL,Taq 酶 0.5 μL,ddH₂O 17.5 μL。反应条件:94 ℃ 30 s,65 ℃ 30 s,72 ℃ 80 s;每轮循环温度递减 0.7 ℃,12 个循环;94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72℃ 80 s,23 个循环;72 ℃ 10 min,4 ℃。接头及引物序列见表 1。

数据读取及统计分析:将选择性扩增产物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,使用 ABI377 测序仪检测,通过 GENESCAN 软件分析,按照“无带为 0,有

带为 1”记录数据矩阵。利用软件 Excel 2007 计算甲基化多态性比例和甲基化类型,将 DNA 甲基化模式分为四种类型:I 型为 Hpa II 和 Msp I 双酶切的(1,1),表示 CCGG 位点未甲基化;II 型为Hpa II 酶切,Msp I 不能酶切的(1,0),表示 CCGG 位点 C 外侧半甲基化;III 型为 Hpa II 不能酶切,Msp I 酶切的(0,1),表示 CCGG 位点内侧 C 全甲基化;IV 型为 Hpa II 和 Msp I 都不能酶切的(0,0),表示抑制全甲基化 CCGG 位点酶切,也可能是突变位点。利用软件 POPGENE 1.32 进行表观遗传多样性分析,统计多态性位点百分率(P%)、Nei’s 基因多样性指数、Shannon 多样性指数、Nei’s 遗传距离、遗传相似系数和基因流等。利用软件 MEGA 4.0 按照 UPGMA 方法进行聚类分析。利用软件 GenAlEx 6.41 进行主成分分析和 AMOVA 分析。引物多态信息量 (polymorphism information content, PIC),公式为 $PIC = 1 - \sum f_i^2$,式中 f_i 表示第 i 个基因型频率。

表 1 MSAP 扩增接头和引物序列 (HM: Hpa II/Msp I)

Table 1 Adaptors and primer sequences used for MSAP amplifications (HM: Hpa II/Msp I)

接头序列 Adaptor sequence		选扩增引物 Selective amplification primer	
EcoR I-adapter I	CTCGTAGACTGCGTACC	E1	GACTGCGTACCAATTCAAC
EcoR I-adapter II	AATTGCTACGCAGTC	E2	GACTGCGTACCAATTCAAG
Hpa II/Msp I-adapter I	GATCATGAGTCCTGCT	E4	GACTGCGTACCAATTCAC T
Hpa II/Msp I-adapeter II	CGAGCAGGACTCATGA	E5	GACTGCGTACCAATTCACG
预选扩增引物 Pre-selective amplification primers		E7	GACTGCGTACCAATTCATC
EcoR I + A	GACTGCGTACCAATTCA	H1	ATCATGAGTCCTGCTCGGT CG
Hpa II/Msp I + 0	GACTGCGTACCAATTCA	H2	ATCATGAGTCCTGCTCGGT TA
		H3	ATCATGAGTCCTGCTCGGT GA

2 结果与分析

2.1 DNA 甲基化多态性分析

利用 8 对条带清晰和多态性较好的引物进行 49 份菜心的 F-MSAP 扩增,一共扩增出 1 728 条带,其中多态性条带 1 479 条,多态性比例为 86%。8 对引物的多态性条带分别为 196、186、200、173、188、200、200、178 条,平均为 190 条,多态性比例为 88%,PIC 值分别为 0.230 4、0.201 2、0.247 8、

0.237 3、0.244 7、0.241 8、0.234 0、0.224 6,均值为 0.232 7,多态性位点的 PIC 值均位于 0~0.5 之间。按照总平均、自交系、品种和杂种进行分类分析,49 份菜心、7 份自交系亲本、8 份双自交系杂种、17 份单自交系杂种、7 份商品种、10 份商品种杂种的平均多态性分别为 68.15%、65.33%、68.55%、67.25%、69.54%、70.09%,表明 F-MSAP 检测效率较高,菜心 DNA 甲基化多态性较高,商品种的 DNA 甲基化多态性比自交系及其杂种高,杂种的 DNA 甲基化多态性比亲本高,杂交可以提高 DNA 甲基化多态性。

2.2 表观遗传多样性分析

遗传多样性分析显示,49 份菜心的平均表观观察等位基因数、有效等位基因数、Shannon 多样性指数、期望杂合度分别为 1.702 0、1.201 0、0.142 7、0.241 0,7 份自交系亲本分别为 1.668 0、1.190 0、0.135 4、0.228 9,8 份双自交系杂种分别为 1.682 9、1.188 9、0.135 4、0.230 1,17 份单自交系杂种分别为 1.707 5、1.212 0、0.148 7、0.249 1,7 份商品种分别为 1.729 5、1.202 0、0.143 5、0.243 4,10 份商品种杂种分别为 1.712 1、1.200 0、0.143 4、0.243 2。结果显示,双自交系杂种的 Shannon 多样性指数和期望杂合度分别等于和大于自交系亲本,单自交系杂种两者均大于自交系亲本,商品种与商品种杂种两者变化很小,表明菜心表观遗传多样性较低,自交系杂种的表观遗传多样性比亲本高,单自交系杂种的表观遗传多样性比双自交系杂种高,杂交能够增加自交系杂种的表观遗传差异。49 份菜心、7 份自交系亲本、8 份双自交系杂种、17 份单自交系杂种、7 份商品种、10 份商品种杂种的表观遗传距离分别为 0.009 4、0.009 5、0.009 4、0.009 4、0.008 6 和 0.009 6,结果显示,自交系亲本之间的表观遗传距离大于自交系杂种和商品种,单、双自交系杂种之间相同,但均小于商品种,商品种杂种大于商品种,表明自交增加自交系亲本的表观遗传距离,杂交增加商品种杂种的表观遗传距离。AMOVA 分析表明,表观遗传变异主要来源于种内(96%),种间较少(4%)($P=0.036$)。基因流为 8.681 5,大于 1,表明菜心均质化严重,遗传分化受到抑制,大部分遗传变异来源于种内,只有少量的遗传变异存在于种间。

2.3 DNA 甲基化分析

由表 2 可知,DNA 甲基化水平分析显示的 49 份菜心、7 份自交系亲本、8 份双自交系杂种、17 份单自交系杂种、7 份商品种、10 份商品种杂种的甲基化率分别为 68.14%、65.26%、68.99%、67.39%、69.86%、69.29%。DNA 甲基化模式分析显示的未甲基化率分别为 31.86%、34.74%、31.01%、32.61%、30.14%、30.71%,半甲基化率分别为 33.18%、32.54%、37.80%、31.09%、33.01%、33.67%,全甲基化率分别为 34.96%、32.72%、31.20%、36.30%、36.85%、35.62%。结果显示,49 份菜心的 DNA 甲基化水平较高,全甲基化水平高

于未甲基化和半甲基化,以全甲基化模式为主,自交系杂种的 DNA 甲基化水平比亲本高,其中 7 份自交系未甲基化水平升高导致甲基化水平降低,8 份双自交系杂种去甲基化水平升高,17 份单自交系杂种全甲基化升高造成甲基化水平升高,7 份商品种和 10 份商品种杂种的 DNA 甲基化水平和模式变化很小,表明自交能够降低 DNA 甲基化水平,杂交通过 DNA 甲基化模式变化增加了自交系杂种的 DNA 甲基化水平。

2.4 聚类分析

如图 1 所示,利用 UPGMA 聚类分析方法,约在 Nei's 遗传距离 0.42 处将 49 份菜心分成五类。第一类 7 份包括 1 号、16 号、18 号、19 号、20 号、21 号和 22 号,其中 1 号是 19 号、20 号、21 号、22 号的母本,‘特青 60 天粗条菜心’是 16 号、18 号的母本。第二类 2 份包括 38 号和 44 号,‘绿宝 701’分别是 38 号的父本和 44 号的母本。第三类 14 份包括 2 号、5 号、6 号、8 号、9 号、10 号、11 号、15 号、23 号、35 号、36 号、39 号、46 号和 47 号,其中 2 号是 23 号的母本,6 号是 35 号、36 号的母本,‘桂柳十月柳叶菜心’是 15 号和 47 号的父本。第四类 11 份包括 12 号、14 号、17 号、24 号、37 号、40 号、41 号、42 号、43 号、45 号和 48 号,其中‘绿宝 701’是 41 号、42 号、43 号和 45 号的母本,‘绿宝 701’是 17 号、40 号和 37 号的父本,14 号是 48 号的母本。第五类 15 份包括 3 号、4 号、7 号、13 号、25 号、26 号、27 号、28 号、29 号、30 号、31 号、32 号、33 号、34 号和 49 号,其中 3 号是 25 号、26 号的母本,4 号是 27 号的母本,5 号是 29 号、30 号、31 号、32 号、33 号和 34 号的母本,‘绿宝 701’是 28 号、33 号和 49 号的父本。

14 个品种分散在各类中,35 份杂种倾向于按照母本亲缘关系分类,表明杂种更多地遗传了母本的 DNA 甲基化状态,母本 DNA 甲基化对杂种表观遗传多样性具有较大影响。

2.5 主成分分析

利用 GenAlEx 6.41 软件包中的 PCA 模块进行主成分分析(图 2),结果显示 49 份菜心明显分为 I、II、III、IV 和 V 五组,五组分布与聚类分析的五类结果基本一致,表明 F-MSAP 检测效率很高,准确性也很高。第一和第二主坐标的贡献率分别为 19.44% 和 11.81%,可解释 31.25% 的表观遗传变异。

表 2 49 份菜心的表观遗传多样性以及 DNA 甲基化模式和水平

Table 2 Epigenetic diversity and DNA methylation pattern and level in 49 Chinese flowering cabbages

编号 Code /类型 Type	品种/亲本/杂种 Variety/Parent/Hybrid	I 型 Type I	II 型 Type II	III 型 Type III	总带数 Total number of bands	甲基化 总带数 Total number of methylation bands	甲基化敏感 扩增多态性 MSAP (%)
1	‘澳洲 008 全年油绿甜菜心’ ‘Australia 008’	201	175	162	538	337	62.64
2	‘澳洲超级 608’ ‘Australia 608’	110	126	112	348	238	68.39
3	‘香港 45 天油青甜菜心’ ‘Hong Kong 45 Days’	110	140	162	412	302	73.30
4	‘油青 12 号早菜心’ ‘youqing No.12’	144	127	142	413	269	65.13
5	‘新西兰黄叶四九菜心’ ‘New Zealand sjiu’	112	77	132	321	209	65.11
6	‘名优 308 超冠甜菜心王’ ‘mingyou 308 sweet’	91	105	75	271	180	66.42
7	‘澳洲菜心’ ‘Australia’	145	90	105	340	195	57.35
8	‘菜兴利国际新一代碧绿油菜心 49’ ‘caixingli sjiu’	115	113	118	346	231	66.76
9	‘三九油青甜早菜心’ ‘sanjiu youqing’	145	123	130	398	253	63.57
10	‘811 甜菜心’ ‘811 sweet’	135	175	175	485	350	72.16
11	‘油青四九甜菜心’ ‘youqing sjiu’	60	150	226	436	376	86.24
12	‘油青甜菜心 50 天’ ‘youqing 50’	111	179	190	480	369	76.88
13	‘柳尖叶 35 天甜菜心’ ‘liujianye 35’	194	123	124	441	247	56.01
14	‘桂柳十月柳叶菜心’ ‘Gui Liu October’	179	175	145	499	320	64.13
15	‘东莞 45 天油青菜心’×‘桂柳十月柳叶菜心’ ‘Dong Guan 45 Days’×‘Gui Liu October’	36	32	67	135	99	73.33
16	‘特青 60 天粗条菜心’×‘四九-19 号菜心’ ‘teqing 60 Days’×‘sjiu-19’	163	203	197	563	400	71.05
17	‘特青 60 天粗条菜心’×‘绿宝 701’ ‘teqing 60 Days’×‘lvbao 701’	121	149	132	402	281	69.90
18	‘特青 60 天粗条菜心’×‘桂柳十月柳叶菜心’ ‘teqing 60 Days’×‘Gui Liu October’	176	179	220	575	399	69.39
19	‘澳洲 008 全年油绿甜菜心’×‘东莞 45 天油青菜心’ ‘Australia 008’×‘Dong Guan 45 Days’	184	212	193	589	405	68.76
20	‘澳洲 008 全年油绿甜菜心’×‘四九-19 号菜心’ ‘Australia 008’×‘sjiu-19’	180	176	180	536	356	66.42
21	澳洲 008 全年油绿甜菜心×‘新西兰黄叶四九菜心’ ‘Australia 008’×‘New Zealand sjiu’	165	197	201	563	398	70.69
22	‘澳洲 008 全年油绿甜菜心’×‘绿宝 701’ ‘Australia 008’×‘lvbao 701’	169	156	208	533	364	68.29
23	‘澳洲超级 608’×‘东莞 45 天油青菜心’ ‘Australia 608’×‘Dong Guan 45 Days’	117	71	88	276	159	57.61
24	‘澳洲超级 608’×‘新西兰黄叶四九菜心’ ‘Australia 608’×‘New Zealand sjiu’	180	186	141	507	327	64.50
25	‘香港 45 天油青甜菜心’×‘东莞 45 天油青菜心’ ‘Hong Kong 45 Days’×‘Dong Guan 45 Days’	133	152	183	468	335	71.58

续表 2

编号 Code /类型 Type	品种/亲本/杂种 Variety/Parent/Hybrid	I 型 Type I	II 型 Type II	III 型 Type III	总带数 Total number of bands	甲基化 总带数 Total number of methylation bands	甲基化敏感 扩增多态性 MSAP (%)
26	‘香港 45 天油青甜菜心’ × ‘新西兰黄叶四九菜心’ ‘Hong Kong 45 Days’ × ‘New Zealand sjiu’	114	177	170	461	347	75.27
27	‘油青 12 号早菜心’ × ‘东莞 45 天油青菜心’ ‘youqing No.12’ × ‘Dong Guan 45 Days’	96	120	171	387	291	75.19
28	‘四九-19 号菜心 × ‘绿宝 701’ ‘sjiu-19’ × ‘lvbao 701’	140	147	184	471	331	70.28
29	‘新西兰黄叶四九菜心’ × ‘东莞 45 天油青菜心’ ‘New Zealand sjiu’ × ‘Dong Guan 45 Days’	136	139	194	469	333	71.00
30	‘新西兰黄叶四九菜心’ × ‘特青 60 天粗条菜心’ ‘New Zealand sjiu’ × ‘teqing 60 Days’	131	172	151	454	323	71.15
31	‘新西兰黄叶四九菜心’ × ‘名优 308 超冠甜菜心王’ ‘New Zealand sjiu’ × ‘mingyou 308 sweet’	161	127	145	433	272	62.82
32	‘新西兰黄叶四九菜心’ × ‘快大 28 天油青甜菜心’ ‘New Zealand sjiu’ × ‘kuaida 28 Days’	162	137	157	456	294	64.47
33	‘新西兰黄叶四九菜心’ × ‘绿宝 701’ ‘New Zealand sjiu’ × ‘lvbao 701’	133	126	126	385	252	65.45
34	‘新西兰黄叶四九菜心’ × ‘桂柳十月柳叶菜心’ ‘New Zealand Sjiu’ × ‘Gui Liu October’	81	155	101	337	256	75.96
35	‘名优 308 超冠甜菜心王’ × ‘东莞 45 天油青菜心’ ‘mingyou 308 sweet’ × ‘Dong Guan 45 Days’	91	100	79	270	179	66.30
36	‘名优 308 超冠甜菜心王’ × ‘新西兰黄叶四九菜心’ ‘mingyou 308 sweet’ × ‘New Zealand sjiu’	71	73	60	204	133	65.20
37	‘名优 308 超冠甜菜心王’ × ‘绿宝 701’ ‘mingyou 308 sweet’ × ‘lvbao 701’	168	138	189	495	327	66.06
38	‘澳洲 50 短柄粗条菜心’ × ‘绿宝 701’ ‘Australia 50 Days’ × ‘lvbao 701’	214	150	166	530	316	59.62
39	‘快大 28 天油青甜菜心’ × ‘新西兰黄叶四九菜心’ ‘kuaida 28 Days’ × ‘New Zealand sjiu’	82	95	184	361	279	77.29
40	‘快大 28 天油青甜菜心’ × ‘绿宝 701’ ‘kuaida 28 Days’ × ‘lvbao 701’	147	139	191	477	330	69.18
41	‘绿宝 701’ × ‘东莞 45 天油青菜心’ ‘lvbao 701’ × ‘Dong Guan 45 Days’	135	204	138	477	342	71.70
42	‘绿宝 701’ × ‘特青 60 天粗条菜心’ ‘lvbao 701’ × ‘teqing 60 Days’	149	155	102	406	257	63.30
43	‘绿宝 701’ × ‘澳洲 008 全年油绿甜菜心’ ‘lvbao 701’ × ‘Australia 008’	132	149	186	467	335	71.73
44	‘绿宝 701’ × ‘名优 308 超冠甜菜心王’ ‘lvbao 701’ × ‘mingyou 308 sweet’	192	142	206	540	348	64.44
45	‘绿宝 701’ × ‘澳洲 50 短柄粗条菜心’ ‘lvbao 701’ × ‘Australia 50 Days’	150	123	158	431	281	65.20
46	‘绿宝 701’ × ‘快大 28 天油青甜菜心’ ‘lvbao 701’ × ‘Kuaida 28 Days’	33	83	36	152	119	78.29
47	‘澳洲菜心’ × ‘桂柳十月柳叶菜心’ ‘Australia’ × ‘Gui Liu October’	72	81	46	199	127	63.82
48	‘桂柳十月柳叶菜心’ × ‘新西兰黄叶四九菜心’ ‘Gui Liu October’ × ‘New Zealand sjiu’	147	212	133	492	345	70.12
49	‘桂柳十月柳叶菜心’ × ‘绿宝 701’ ‘Gui Liu October’ × ‘lvbao 701’	153	105	125	383	230	60.05
49 份菜心 49 Chinese flowering cabbages	平均带数 Average number of bands	134	140	147	421	287	—
	总带数 Total number of bands	6 566	6 840	7 206	20 612	14 046	—

续表 2

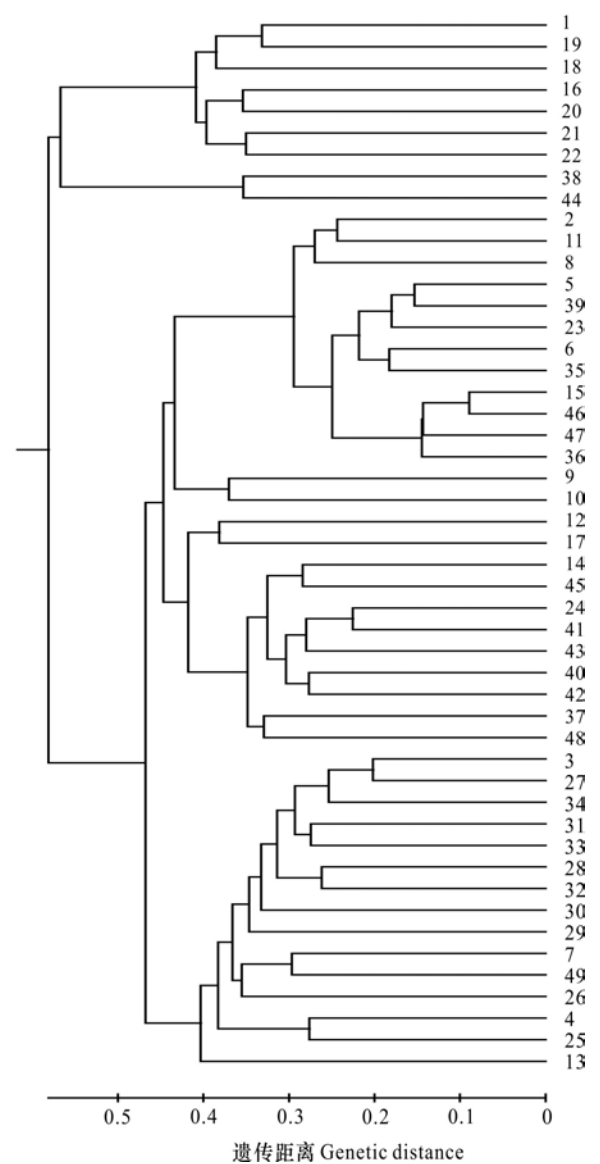
编号 Code /类型 Type	品种/亲本/杂种 Variety/Parent/Hybrid	I 型 Type I	II 型 Type II	III 型 Type III	总带数 Total number of bands	甲基化 总带数 Total number of methylation bands	甲基化敏感 扩增多态性 MSAP (%)
7 份自交系亲本 Seven inbred parents	甲基化百分率 Percentage of methylation (%)	31.86	33.18	34.96	—	68.14	68.15
	平均带数 Average number of bands	135	127	128	390	254	—
	总带数 Total number of bands	948	888	893	2 729	1 781	—
8 份双自交系杂种 Eight double inbred hybrids	甲基化百分率 Percentage of methylation (%)	34.74	32.54	32.72	—	65.26	65.33
	平均带数 Average number of bands	124	151	125	400	276	—
	总带数 Total number of bands	991	1 208	997	3 196	2 205	—
17 份单自交系杂种 17 single inbred hybrids	甲基化百分率 Percentage of methylation (%)	31.01	37.80	31.20	—	68.99	68.55
	平均带数 Average number of bands	143	137	160	439	296	—
	总带数 Total number of bands	2 293	2 186	2 552	7 031	4 738	—
7 份商品种 Seven commercial varieties	甲基化百分率 Percentage of methylation (%)	32.61	31.09	36.30	—	67.39	67.25
	平均带数 Average number of bands	129	141	158	428	299	—
	总带数 Total number of bands	904	990	1 105	2 999	2 095	—
10 份商品种杂种 Ten commercial hybrids	甲基化百分率 Percentage of methylation (%)	30.14	33.01	36.85	—	69.86	69.54
	平均带数 Average number of bands	130	143	151	423	293	—
	总带数 Total number of bands	1 430	1 568	1 659	4 657	3 227	—
	甲基化百分率 Percentage of methylation (%)	30.71	33.67	35.62	—	69.29	70.09

3 讨论与结论

3.1 DNA 甲基化多态性分析

经典的 MSAP 利用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 DNA 甲基化多态性,F-MSAP 则是利用荧光标记引物结合毛细管电泳检测,因此检测效率和灵敏度得以较大提高,徐青等(2005)利用 F-MSAP 检测发现鸡 F₁ 代的甲基化多态模式约有 95% 来自亲本,变异的甲基化位点约 5%,姜群等(2014)发现 F-MSAP 检测牡蛎的效率是 MSAP 的 2 倍以上,多态性检测率提升了 9%。F-MSAP 不足之处是只能识别基因组的 CCGG 位点,不能检测 CHG 序列以

及非对称的 CHH 序列,实际的甲基化水平有所低估(McClelland et al., 1994; Salmon et al., 2008),另外 MSAP 基于 AFLP 技术开发,检测的多态性片段大小有所限制。与十字花科亲缘植物相比,49 份菜心的 DNA 甲基化多态性较高,高于拟南芥(24%~34%)、白菜幼苗茎尖(30.42%)、甘蓝(53.3%~60.7%)、油菜种子(15.7%)、芥蓝(47%)、甘蓝型油菜基因渗入系(33.4%~39.8%)的 DNA 甲基化多态性(Cervera et al., 2002; Li et al., 2002; 陆光远等,2005; Salmon et al., 2008; 史卫东等,2012; Zhang et al., 2013),也高于菜心 ISSR(56.31%)、SRAP(40.2%)、SCoT(36%)的基因组多态性(孙雪梅等,2010; 李桂花等,2012; 史



具体编号见表 2。下同。
See Table 2 for specific numbers. The same below.

图 1 基于遗传距离的 49 份菜心的 UPGMA 聚类图
Fig. 1 UPGMA dendrogram of 49 Chinese flowering cabbages based on Nei's genetic distance

卫东等,2015)。与菜心 AFLP 和 SCoT 分析相比, F-MSAP 进一步提高了鉴定效率和准确性(Shi et al., 2011; 史卫东等, 2015), 主成分分析也比较一致, 表明 F-MSAP 可以作为一种检测菜心 DNA 甲基化的有效方法, 极大地提高菜心 DNA 甲基化的检测效率和灵敏度。

3.2 表观遗传多样性分析

Shannon 多样性指数是评价种内和种间遗传

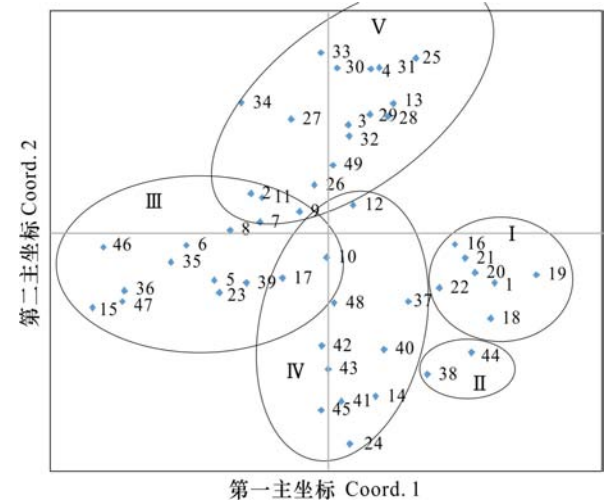


图 2 49 份菜心主成分分析
Fig. 2 Principal coordinates analyses(PcoA) of 49 Chinese flowering cabbages

多样性水平的指标, 其值越大表示遗传多样性越高, 49 份菜心的表观 Shannon 多样性指数 (0.142 7) 小于基因组 ISSR (0. 229)、AFLP (0.472) 和 SCoT(0.217) 的 Shannon 多样性指数 (孙雪梅等, 2010; Shi et al., 2011; 史卫东等, 2015), 表观遗传距离(0.009 4) 小于 ISSR(0.029~0.344)、AFLP(0. 112)、SCoT(0.428) 等基因组标记的遗传距离 (孙雪梅等, 2010; Shi et al., 2011; 史卫东等, 2015), 据此推测菜心表观遗传多样性较低且低于基因组遗传多样性, 与芥蓝的表观遗传多样性水平较低的结果相一致(史卫东等, 2012), 与西瓜、水稻和辣椒的基因组甲基化多样性高于遗传多样性的结果不同 (Nimmakayala et al., 2011; 彭海等, 2014; 徐小万等, 2021), 这可能与不同的比较方法有关, 也可能与不同物种之间表观遗传多样性和基因组遗传多样性存在较大的差异有关。本研究还发现菜心自交系亲本的表观遗传距离大于商品种, 表明自交增加了表观遗传多样性水平, 丰富了遗传背景, 商品种表观遗传多样性最低, 但商品种杂交增加了表观遗传多样性。

3.3 DNA 甲基化分析

研究表明在不同生态型拟南芥上 35%~43% 的 CCGG 位点为 DNA 甲基化敏感位置, 而在同一生态型内则高度保守(Cervera et al., 2002), 甘蓝品种或品系具有更多的甲基化片段(Salmon et al.,

2008), 甘蓝型油菜基因渗入系呈现高频率的高甲基化 (Zhang et al., 2013)。本研究菜心自交系亲本、自交系杂种、商品种和商品种杂种的未甲基化、半甲基化和全甲基化比例各占 1/3 以上, 但全甲基化在商品种较高, 表明菜心以全甲基化模式为主, 菜心与拟南芥、甘蓝具有相似的甲基化变化, 这是否是十字花科植物的普遍现象, 还有待研究。

菜心自交系的 DNA 甲基化水平降低, 与大白菜自交系的 DNA 甲基化水平降低相一致 (Liu et al., 2018), 从甲基化组角度说明菜心与大白菜亲缘关系较近, 因而具有相似的表观遗传变化。拟南芥杂种的甲基化模式变化经常发生在亲本之间的差异甲基化区域 (Greaves et al., 2012), 亲本之间的甲基化差异可能是亲本和杂种之间甲基化差异的主要原因 (Shen et al., 2012)。菜心单自交系杂种和双自交系杂种的甲基化水平都比亲本高, 与拟南芥 C24/Landsberg F₁ 杂种的甲基化水平增加相一致 (Greaves et al., 2012), 但两个杂种的 DNA 甲基化模式变化有所不同, 因此造成亲本自交系和商品种的 DNA 甲基化差异。菜心自交系随着不断自交纯合, 基因组杂合性减低, 表现为 DNA 甲基化水平降低和未甲基化水平升高, 菜心商品种为开放授粉种子, 基因组杂合性较高, 表现为全甲基化水平较高。据此推测菜心单自交系杂种的全甲基化水平较高可能是由于自交系与商品种杂交造成的, 与拟南芥正反交 F₁ 中一个亲本等位基因的甲基化水平改变为另一个亲本甲基化水平有相似之处 (Greaves et al., 2012)。菜心双自交系杂种表现为高水平的去甲基化, 与小麦黑麦远缘杂交后代的半甲基化水平极显著高于双亲本的半甲基化水平有相似之处 (朱朝阳等, 2018)。DNA 去甲基化的功能和机制是生物学倍受争议的研究领域, 活跃的 DNA 去甲基化对修剪基因组的甲基化模式很重要, 甲基化和去甲基化的动态调控对于保持植物表观基因组的可塑性也很重要 (Zhu et al., 2007)。菜心亲本差异、自交或杂交引起后代 DNA 甲基化模式和水平变化, 表明菜心基因组可塑性可能很强, 表观遗传多样性形成机理还有待深入研究。

3.4 杂交对表观遗传多样性的影响

表型与分子标记都可以检测菜心亲缘关系, 但两者的鉴定结果并不十分相符, 可能的原因包

括品种资源的遗传背景比较复杂, 基因组分子标记优化不足或不适合, 以及不能检测出表观遗传变化等。本研究 49 份菜心的聚类结果清晰可靠, 14 份菜心品种呈现较大的表观遗传变化, 其中 7 份自交系亲本分散在各类中, 与自交增加了表观遗传距离相一致, 说明自交增加了自交系亲本的表观遗传差异。研究表明拟南芥互交杂种具有完全相同的遗传构成, 杂交后母本和父本基因组可能不会平等地影响杂种 DNA 甲基化的变化, 杂种的甲基化重塑可能有利于杂种优势 (Shen et al., 2012)。本研究 35 份自交系杂种和商品种杂种分布在各类中, 倾向于按照母本亲缘关系分类, 与杂交稻甲基化状态与母本较近的结果相同 (彭海等, 2014), 与拟南芥不同基因型的甲基化多态性不相关, 亲缘关系紧密的拟南芥并不归为一类的结果不同 (Cervera et al., 2002), 与拟南芥的基因甲基化与亲缘关系聚类分析结果不相关的结果不同 (Matthew et al., 2007), 菜心母本亲缘关系可能对杂种表观遗传多样性具有较大影响, 因此在利用不同菜心亲本配组时, 要注重对母本的选择, 依据母本亲缘关系对杂种后代分类可能会起到事半功倍的效果, 对菜心种质资源研究和育种具有极其重要的指导意义。

综上所述, 通过 F-MSAP 检测菜心 DNA 甲基化变化, 揭示了菜心表观遗传多样性形成机理, 分析和预测了杂种后代的表观遗传差异, 提高了鉴定效率和准确性, 为进一步开展杂交育种提供了理论基础和技术支持。

参考文献:

- CERVERA MT, RUIZ-GARCÍA L, MARTÍNEZ-ZAPATER J, et al., 2002. Analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* based on methylation-sensitive AFLP markers [J]. *Mol Genet Genom*, 268: 543–552.
- CHAN WL, HENDERSON IR, JACOBSEN SE, et al., 2005. Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Nat Rev Genet*, 6(5): 351–360.
- GREAVES IK, GROSZMANN M, HUA Y, et al., 2012. Trans chromosomal methylation in *Arabidopsis* hybrids [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109(9): 3570–3575.
- JIANG Q, YU H, KONG LF, et al., 2014. Analysis of DNA methylation in different tissues of the pacific oyster (*Crassostrea gigas*) with the fluorescence-labeled methylation-sensitive amplified polymorphism (F-MSAP)

- [J]. Chin Fish Sci, 21(4): 676–683. [姜群, 于红, 孔令锋, 等, 2014. 太平洋牡蛎不同组织甲基化的分析 [J]. 中国水产科学, 21(4): 676–683.]
- KAKUTANI T, MUNAKATA K, RICHARDS EJ, et al., 1999. Meiotically and mitotically stable inheritance of DNA hypomethylation induced by *ddml* mutation of *Arabidopsis thaliana* [J]. Genetics, 151(2): 831–838.
- LI GH, CHEN HC, ZHANG Y, et al., 2012. Genetic diversity of *Brassica parachinensis* germplasm revealed by SRAP analysis [J]. Chin Agric Sci Bull, 28(4): 110–114. [李桂花, 陈汉才, 张艳, 等, 2012. 菜心种质资源遗传多样性的 SRAP 分析 [J]. 中国农学通报, 28(4): 110–114.]
- LI ML, WANG QM, ZHU ZJ, et al., 2002. Studies on the changes of DNA methylation level, GA content and protein in non-heading Chinese cabbage during vernalization [J]. Acta Horti Sin, 29(4): 353–357. [李梅兰, 汪俏梅, 朱祝军, 等, 2002. 春化对白菜 DNA 甲基化、GA 含量及蛋白质的影响 [J]. 园艺学报, 29(4): 353–357.]
- LIU Y, XU C, TANG XB, et al., 2018. Genomic methylation and transcriptomic profiling provides insights into heading depression in inbred *Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis* [J]. Gene, 665:119–126.
- LU GY, WU XM, CHEN BY, et al., 2005. Analysis on genomic DNA methylation modification of seed germination *Brassica* by methylation-sensitive amplification polymorphism [J]. Chin Sci Bull, 50(24): 2750–2756. [陆光远, 伍晓明, 陈碧云, 等, 2005. 油菜种子萌发过程中 DNA 甲基化的 MSAP 分析 [J]. 科学通报, 50(24): 2750–2756.]
- MCCLELLAND M, NELSON M, RASCHKE E, et al., 1994. Effect of site-specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases [J]. Nucl Acids Res, 22(17): 3640–3659.
- NIMMAKAYALA P, VAJJA G, GIST RA, et al., 2011. Effect of DNA methylation on molecular diversity of watermelon heirlooms and stability of methylation specific polymorphisms across the genealogies [J]. Euphytica, 177(1): 79–89.
- PENG H, JIANG GH, ZHANG J, et al., 2014. DNA methylation polymorphism and stability in Chinese indica hybrid rice [J]. Sci Sin Vit, 44(1): 45–53. [彭海, 江光怀, 张静, 等, 2014. 中国杂交籼稻 DNA 甲基化多样性与遗传稳定性 [J]. 中国科学: 生命科学, 44(1): 45–53.]
- SALMON A, CLOTAULT J, JENCZEWSKI E, et al., 2008. *Brassica oleracea* displays a high level of DNA methylation polymorphism [J]. Plant Sci, 174(1): 61–70.
- SHEN HS, HE H, LI JG, et al., 2012. Genome-wide analysis of DNA methylation and gene changes in two *Arabidopsis* ecotypes and their reciprocal hybrids [J]. Plant Cell, 24(3): 875–892.
- SHI WD, HUANG RK, ZHOU SM, et al., 2011. Genetic diversity of 30 Cai-xins (*Brassica rapa* var. *parachinensis*) evaluated based on AFLP molecular data [J]. Mol Plant Breed, 2(7): 41–47.
- SHI WD, HUANG RK, CHEN ZD, et al., 2012. The epigenetic genetic diversity of 18 Chinese kales analyzed by msap when initiated flowering [J]. Genom Appl Biol, 31(5): 505–512. [史卫东, 黄如葵, 陈振东, 等, 2012. 利用 MSAP 分析 18 个芥蓝齐口期的表观遗传多样性 [J]. 基因组学与应用生物学, 31(5): 505–512.]
- SHI WD, JU XX, ZHANG L, et al., 2015. Analysis on genetic diversity of chinese flowering cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *utilis* Tsen et Le) germplasms based on SCoT markers [J]. J S Agric, 46(8): 1350–1355. [史卫东, 据茜茜, 张力, 等, 2015. 菜心种质资源遗传多样性的 SCoT 分析 [J]. 南方农业学报, 46(8): 1350–1355.]
- SUN XM, QIAO AM, SUN M, et al., 2010. ISSR analysis of genetic diversity of 27 flowering Chinese cabbage [J]. J SW Norm Univ (Nat Sci Ed), 35(1): 119–123. [孙雪梅, 乔爱民, 孙敏, 等, 2010. 27 个菜心品种遗传多样性的分析 [J]. 西南师范大学学报 (自然科学版), 35(1): 119–123.]
- MATTHEW WV, MILOS T, ZACHARY L, et al., 2007. Epigenetic natural variation in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plos Biol, 5(7): 1617–1629.
- XU Q, SUN DX, ZHANG Y, et al., 2005. F-MSAP: A practical system to detect methylation in chicken genome [J]. Chin Sci Bull, 50(17): 1874–1878. [徐青, 孙东晓, 张沅, 等, 2005. 一种检测鸡基因组甲基化的新方法: F-MSAP [J]. 科学通报, 50(17): 1874–1878.]
- XU XW, XIA BB, WU ZM, et al., 2021. Surveying DNA epigenetic diversity in the foreign hot pepper germplasms [J]. Hubei Agric Sci, 60(6): 76–81. [徐小万, 夏碧波, 吴智明, 等, 2021. 国外引进辣椒 DNA 表观遗传多样性分析 [J]. 湖北农业科学, 60(6): 76–81.]
- ZHU CY, LI T, GAO Y, et al., 2018. DNA methylation-sensitive amplification polymorphism analysis of distant hybrid progeny between wheat and rye [J]. Mol Plant Breed, 16(3): 859–864. [朱朝阳, 李桐, 高玉, 等, 2018. 小麦与黑麦远缘杂交后代 DNA 甲基化敏感扩增多态性分析 [J]. 分子植物育种, 16(3): 859–864.]
- ZHU JH, KAPOOR A, SRIDHAR VV, et al., 2007. The DNA glycosylase/lyase ROS1 functions in pruning DNA methylation patterns in *Arabidopsis* [J]. Curr Biol, 17(1): 54–59.
- ZHANG XL, GE XH, SHAO YJ, et al., 2013. Genomic change, retrotransposon mobilization and extensive cytosine methylation alteration in *Brassica napus* introgressions from two intertribal hybridizations [J]. PLoS ONE, 8(2): 1–10.

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202008054

罗群凤, 冯源恒, 吴东山, 等. 基于 SSR 标记的大明松天然群体遗传多样性分析 [J]. 广西植物, 2022, 42(8): 1367–1373.
LUO QF, FENG YH, WU DS, et al. Genetic diversity of *Pinus taiwanensis* var. *damingshanensis* natural populations by SSR markers [J]. Guihaia, 2022, 42(8): 1367–1373.



基于 SSR 标记的大明松天然群体遗传多样性分析

罗群凤, 冯源恒, 吴东山, 杨章旗*

(广西壮族自治区林业科学研究院, 国家林业局马尾松工程技术研究中心, 广西马尾松工程技术研究中心, 南宁 530002)

摘要: 大明松是广西和贵州特有的高山松类, 具有很高的经济价值和生态价值, 其自然种群长期没有得到充分的保护和利用, 不利于该树种长期稳定发展。为了合理保护和开发利用大明松天然遗传资源, 该文利用 12 个 SSR 分子标记对大明松 3 个天然群体进行遗传多样性研究, 分析其群体间的遗传分化和基因流, 为该物种的保护策略提供参考。研究结果表明: (1) 12 对引物共检测到 37 个等位基因, 多态位点百分率为 100%。每个位点平均观察等位基因数 (N_a) 为 3.08, 平均有效等位基因数 (N_e) 为 1.68, 不同位点间有效等位基因数差异较大; 每个位点平均观察杂合度 (H_o) 为 0.35, 平均期望杂合度 (H_e) 为 0.40, 平均多态信息含量 (PIC) 为 0.31。 (2) 3 个群体的 Shannon's 多样性指数变化范围为 0.48~0.65, Nei's 基因多样度的变化范围为 0.27~0.39, 与其他近缘种松类相比遗传多样性偏低。群体平均观察杂合度为 0.40, 平均期望杂合度为 0.33, 平均有效等位基因数为 1.58。群体间基因分化系数 (G_{st}) 为 0.10, 群体间的遗传分化水平较低, 大部分变异均存在群体内。群体间的基因流 (N_m) 为 2.74, 说明大明松群体间的基因交流比较充分。该研究可为大明松生物多样性保护提供重要参考依据, 为科学利用大明松资源打下基础。

关键词: 大明松, 天然群体, 遗传多样性, 遗传分化, SSR 分子标记

中图分类号: Q347 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2022)08-1367-07

Genetic diversity of *Pinus taiwanensis* var. *damingshanensis* natural populations by SSR markers

LUO Qunfeng, FENG Yuanheng, WU Dongshan, YANG Zhangqi*

(1. Guangxi Institute of Forestry Science, Masson Pine Engineering Technology Research Center of SFA (State Forestry Administration), Masson Pine Engineering Technology Research Center of Guangxi, Nanning 530002, China)

Abstract: *Pinus taiwanensis* var. *damingshanensis* is a kind of endemic alpine pine of Guangxi and Guizhou, which has high economic and ecological values. Its natural population has not been fully protected and utilized for a long time,

收稿日期: 2021-02-09

基金项目: 院士后备专项/广西科技基地和人才专项(桂科 AD19254004); 广西八桂学者专项(2019A26); 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科能 1598025-43) [Supported by Academician Reserve Project/Guangxi Science and Technology Project (GuikeAD19254004); Special Fund for Bagui Scholar of Guangxi (2019A26); Guangxi Scientific Research and Technology Development Project (GuikeNENG1598025-43)].

第一作者: 罗群凤(1987-), 硕士, 工程师, 主要从事林木遗传育种研究, (E-mail) lqf20060388@163.com。

通信作者: 杨章旗, 博士, 教授级高级工程师, 主要从事林木遗传育种研究, (E-mail) yangzhangqi@163.com。

which is not conducive to long-term stable development of this species. In order to rationally protect and exploit the natural genetic resources of *P. taiwanensis* var. *damingshanensis*, 12 SSR markers were used to study the genetic diversity of three natural populations of *P. taiwanensis* var. *damingshanensis*, and to analyze the genetic differentiation and gene flow among populations, so as to provide reference for the protection strategy of this species. The results were as follows: (1) A total of 37 alleles were detected by 12 pairs of primers, and the percentage of polymorphic loci was 100%. For every site, the average number of observed alleles (N_a) was 3.08, and the average number of effective alleles (N_e) was 1.68. The number of effective alleles varied greatly among different loci. The average observed heterozygosity (H_o) was 0.35, the average expected heterozygosity (H_e) was 0.40, and the average polymorphism information content (PIC) was 0.31 for every site. (2) The Shannon's information index of the three populations ranged from 0.48 to 0.65, and the Nei's gene diversity ranged from 0.27 to 0.39. Compared with other related species of pines, the genetic diversity was low. For each population, the average observed heterozygosity was 0.40, and the average expected heterozygosity was 0.33, the average number of effective alleles was 1.58. The genetic differentiation coefficient (G_{st}) among populations was 0.10. Most of the variation existed in the population and the genetic differentiation level among populations was low. The range of gene flow (N_m) was 2.74, indicating that gene exchange between populations is sufficient of *P. taiwanensis* var. *damingshanensis*. This study can provide an important reference for the protection of biodiversity, and lay a foundation for the scientific utilization of *P. taiwanensis* var. *damingshanensis*.

Key words: *Pinus taiwanensis* var. *damingshanensis*, natural population, genetic diversity, genetic differentiation, SSR molecular marker

大明松(*Pinus taiwanensis* var. *damingshanensis*)为松科(Pinaceae)松属(*Pinus*)植物,因1974年首次在广西大明山发现而得名,1975年由中国裸子植物分类学家郑万钧、傅立国等鉴定并发表于《植物分类学报》(郑万钧等,1975)。它是黄山松(*Pinus taiwanensis*)在我国西南分布区的一个变种(中国科学院中国植物志编辑委员会,1978;梁盛业,1994),它们之间的区别在于大明松叶内兼有中生与边生树脂道,而黄山松只有中生树脂道(樊国盛和薛纪如,1993)。大明松主要分布于广西、贵州海拔1 000 m以上的高山,自南向北分别是广西的大明山、大瑶山、银竹老山以及贵州的雷公山、云台山、梵净山、大沙河等地,总体呈不连续点状分布。大明松喜光,适应凉爽、空气湿度较大的高山气候,在土层深厚、排水良好的酸性土及向阳山坡生长良好,耐瘠薄,但生长迟缓。大明松材质坚实,富含树脂,可制作家具、器具、板材等,也可作建筑、矿柱及木纤维工业原料等,为西南高海拔地区重要的用材造林树种,且其树形姿态优美,亦是重要的景观树种。

由于长期被人们忽视,大明松没有被系统地利用与保护,种群分布状况、遗传多样性水平、自然更新能力都缺乏系统、针对性的调查与研究。目前,对大明松的研究报道很少,仅贾婕等(2019)

通过比较研究大明松、马尾松、细叶云南松、拉雅松的种实性状,分析了这4种松树的繁育对策及交配系统状况;冯源恒等(2019)对广西和贵州的大明松种质资源进行调查,摸清了黔桂两省(区)大明松种质资源的分布特征,但没有对其群体遗传多样性水平进行分析与评价。因此,亟须对现存的大明松天然群体遗传资源进行多样性研究。

遗传多样性是生物群体长期进化的产物,是其生存适应和发展的前提。遗传多样性越高,遗传变异越丰富,对环境变化的适应能力就越强。因此,对其进行研究有助于生物群体的保护与利用。目前,遗传标记是研究遗传多样性最常用的手段,其中SSR(simple sequence repeat)标记是多态性最高,也是应用最广泛的遗传标记之一。周海兰等(2021)用23对SSR多态性引物对收集的54份油梨种质材料进行PCR扩增,分析了这些种质资源的遗传多样性和亲缘关系;臧明月等(2021)利用SSR分子标记对白栎天然居群进行遗传多样性分析,为其种质资源的合理开发与保护提供指导;陈罡等(2020)利用10对新开发的蒙古栎特异的核SSR分子标记,分析了辽宁省境内分布蒙古栎天然群体的遗传多样性水平;陈林杨等(2020)利用SSR分子标记技术对取自不同地方的35份柚种质资源进行遗传多样性分析,为柚资源

的保护、品种鉴定及遗传改良提供借鉴与依据。

鉴于此,本文利用 SSR 分子标记对大明松天然群体开展遗传多样性研究,分析其多样性水平及遗传分化情况,将有力加强对稀有树种的保护力度,促进生物多样性保护与生态环境建设,为科学利用稀有松类资源打下坚实基础。因此,研究我国黔桂地区大明松天然群体遗传多样性具有重要理论和意义。

1 材料与方法

1.1 材料

实验材料包括 3 个天然群体,分别为广西大明山群体、贵州梵净山群体、贵州大沙河群体(表 1)。其中,大明山群体(DM)取自广西大明山国家级自然保护区仙人台(108°25′54″—108°25′58″ E、23°30′12″—23°30′13″ N),属南亚热带湿润山地

季风气候。无霜期 292~312 d,日照时间长,光热充足。夏湿冬干,干冷同期,湿热同季,气候垂直变化明显(冯源恒等,2019)。

梵净山群体(FJ)取自贵州梵净山国家级自然保护区棉絮岭(108°39′46″—108°39′52″ E、27°54′45″—27°54′46″ N),属中亚热带湿润山地季风气候。无霜期 270~278 d,相对湿度平均达 80%(冯源恒等,2019)。

大沙河群体(DS)取自贵州大沙河国家级自然保护区甑子岩(107°35′04″—107°35′09″ E、29°08′13″—29°08′22″ N),属北亚热带湿润季风气候。大沙河地形北高南低,最高海拔 1 939.9 m,最低海拔 560 m,平均海拔 1 400 m,相对湿度 88%(冯源恒等,2019)。

每个群体按照株距 30 m,采集 30 株以上样本。因大明山群体空间较小,仅采集到 26 株。将采集的针叶装入离心管,填充硅胶进行干燥处理,便于保存。

表 1 大明松群体样本信息

Table 1 Population sample information of *Pinus taiwanensis* var. *damingshanensis*

群体名称 Group name	采样地点 Sampling location	采样数目 Sampling number	平均胸径 Average DBH (cm)	平均树高 Average height (m)	年均气温 Mean annual temperature (℃)	年降水量 Mean annual rainfall (mm)
DM	广西大明山 Guangxi Daming Mountain	26	18.46	6.10	12.4~19.7	2 630
FJ	贵州梵净山 Guizhou Fanjing Mountain	35	21.47	6.21	13.1~14.7	1 100~2 600
DS	贵州大沙河 Guizhou Dashahe	33	23.35	12.96	8.0~16.4	1 200~1 360

注: **DM**. 大明山群体; **FJ**. 梵净山群体; **DS**. 大沙河群体。下同。
Note: **DM**. Daming Mountain group; **FJ**. Fanjing Mountain group; **DS**. Dashahe group. The same below.

1.2 方法

1.2.1 大明松 DNA 提取方法 采用改良的 CTAB 裂解—硅珠吸附法(Doyle & Doyle, 1990)提取大明松针叶 DNA 并纯化,通过琼脂糖凝胶电泳(1% 浓度)抽样检测样本 DNA 质量,采用紫外分光光度计测定各样本 DNA 浓度,稀释至统一浓度后置于-20℃环境保存备用。

1.2.2 大明松 SSR 引物来源及 PCR 反应条件 研究所使用的 SSR 引物是根据马尾松基因组 DNA 测序所得序列设计开发获得(冯源恒等,2016),并使用 8 个大明松 DNA 样品进行引物筛选,选取主带清晰且有多态性的引物 12 对,用于本实验的群体遗传多样性研究。引物设计由上海捷瑞基因技

术有限公司合成,Taq 酶、dNTPs 等也购自该公司。

PCR 反应体系为 10 μL: 10 mmol · L⁻¹ pH 8.0Tris-HCl, 50 mmol · L⁻¹ KCl, 2.5 mmol · L⁻¹ Mg²⁺, 0.2 mmol · L⁻¹ dNTPs, 2.5 pmol 引物, 0.08 U Taq 聚合酶, 10~20 ng DNA。扩增反应程序: 94℃ 4 min; 94℃ 15 s, 55~60℃ 15 s, 72℃ 30 s, 25 cycles; 72℃ 延伸 20 min 结束 PCR 反应(冯源恒等,2016)。

将 PCR 扩增产物进行 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,并银染检测,实验方法参照杨章旗等(2014)方法进行。

1.2.3 遗传多样性分析 SSR 条带判读参照杨章旗等(2014)方法进行。获得 SSR 分型数据后,采用

POPGENE32 软件 (Yeh et al., 1997) 计算 12 个位点的下列遗传多样性参数: 多态位点百分率 (percentage of polymorphic loci, PPL); 多态信息含量 (polymorphic information content, PIC); 观察等位基因数 (number of observed alleles, N_a); 有效等位基因数 (number of effective alleles, N_e) (Hartl et al., 1989); Shannon's 信息指数 (Shannon's information index, I) (Shannon et al., 1949); 观察杂合度 (observed heterozygosity, H_o); 期望杂合度 (expected heterozygosity, H_e) (Nei et al., 1973); Nei's 基因多样性 (h)。并基于上述参数进一步计算大明松群体的固定指数 (F)、基因分化系数 (G_{st}) 和基因流 (N_m) 及遗传距离 (genetic distance, GD)。

2 结果与分析

2.1 基于种间通用性的大明松 SSR 引物筛选

根据引物筛选结果获得用于大明松遗传多样性检测的 SSR 引物 12 对。比较这 12 对引物在大明松和马尾松 (冯源恒等, 2016) 群体间的观察等位基因数可知, 大明松有 6 对引物的等位基因数比马尾松少, 有 3 对引物与马尾松相同, 只有 3 对引物的等位基因数比马尾松多, 平均观察等位基因数大明松、马尾松分别为 3.08 和 3.50, 说明马尾松在这些位点上具有更为丰富的遗传变异 (表 2)。

2.2 大明松天然群体遗传多样性分析

由表 3 可知, 12 对引物在 3 个群体 94 个样本中共检测到等位基因 37 个, 多态位点百分率为 100%。12 个 SSR 位点平均观察等位基因数为 3.08, 有效等位基因数在 1.16 ~ 2.87 之间, 平均为 1.68, 不同位点间有效等位基因数差异较大。观察杂合度的值范围在 0.14 ~ 0.66 之间, 平均为 0.35; 期望杂合度的值在 0.12 ~ 0.92 之间, 平均为 0.40, 不同位点的杂合度也存在较大差异。12 个 SSR 位点 Shannon's 信息指数平均为 0.62, Nei's 基因多样性平均为 0.35。多态信息含量的值在 0.13 ~ 0.58 之间, 平均为 0.31, 最高为 PF695 位点, 最低为 PF464 位点。

由表 4 可知, 分别统计 3 个大明松群体的遗传多样性参数, 比较群体间遗传多样性水平。3 个群体的观察等位基因数高到低排序为大沙河群体 > 梵净山群体 > 大明山群体。而 3 个群体的有效等位基因数、期望杂合度、Shannon's 信息指数与

Nei's 基因多样性由高到低排序均为大沙河群体 > 大明山群体 > 梵净山群体。说明大沙河群体遗传多样性最为丰富, 其次为大明山群体, 梵净山群体最低。

2.3 大明松群体遗传结构与基因流分析

大明松群体的种群平均近交系数 (F_{it}) 为 -0.16, 复合种群平均近交系数 (F_{is}) 为 -0.26, 说明大明松群体偏离哈迪-温伯格平衡, 表现出杂合子过剩现象。大明松群体有亲缘关系种群间的平均近交系数 (F_{st}) 为 0.08, 群体间不存在明显的遗传分化。基于 F_{st} 值计算大明松群体间基因流 (gene flow, N_m), N_m 值在不同位点的变化范围为 0.43 ~ 31.68, 平均为 2.74, 可知大明松 3 个群体间的基因交流比较充分。

通过分析大明松群体的遗传分化情况可知 (表 5), 大明松群体内的遗传多样性占 87.64%, 群体间遗传多样性占 12.36%; 由基因多样性计算出的群体间的基因分化系数为 0.10, 而群体内基因多样性比值为 0.90。这表明, 大明松群体间的遗传分化水平较低, 大部分变异均存在群体内。

2.4 大明松天然群体遗传距离分析

大明松天然群体间遗传距离 (genetic distance, GD < 0.077 0) 偏小, 且大明山和大沙河群体遗传距离相对较近 (GD = 0.026 9); 群体遗传一致度 (genetic identity, GI > 0.925 9) 较高 (表 6)。

3 讨论与结论

3.1 大明松总体遗传多样性评价

基于 12 个位点 37 个等位基因的遗传多样性结果显示, 大明松天然群体观察等位基因数在 2.33 ~ 2.83 之间, 平均为 2.61; 观察杂合度和期望杂合度分别介于 0.32 ~ 0.49、0.28 ~ 0.40, 平均分别为 0.40 和 0.33; Shannon's 信息指数为 0.54, Nei's 基因多样性为 0.32。而 Al-Rabab'ah 和 Williams (2002) 研究火炬松 (*Pinus taeda*) 的观察等位基因数、观察杂合度、期望杂合度分别为 7.75、0.52、0.65, Mehes 等 (2009) 研究白松 (*Pinus monticola*) 时的这三个值分别为 6.50、0.72、0.81, Karhu 等 (2006) 研究辐射松 (*Pinus radiata*) 的观察等位基因数、观察杂合度分别为 8.19 和 0.73。与以上同属植物相比较, 大明松群体各项指数都较低, 遗传多样性水平偏低 (表 7)。

表 2 大明松与马尾松等位基因数比较

Table 2	Comparison of allelic number between <i>Pinus taiwanensis</i> var. <i>damingshanensis</i> and <i>P. massoniana</i>											
树种 Species	PJ247	PF402	PF408	PF463	PF464	PF569	PF615	PF648	PF653	PF695	PF727	PF764
大明松 <i>Pinus taiwanensis</i> var. <i>damingshanensis</i>	2.00	4.00	3.00	4.00	3.00	3.00	2.00	3.00	2.00	4.00	4.00	3.00
马尾松 <i>P. massoniana</i>	3.00	5.00	5.00	4.00	2.00	3.00	4.00	2.00	3.00	5.00	3.00	3.00

表 3 大明松天然群体的遗传多样性参数

扩增位点 Amplified locus	观察等位基因数 <i>N_a</i>	有效等位 基因数 <i>N_e</i>	Shannon's 信息指数 <i>I</i>	观察杂合度 <i>H_o</i>	期望杂合度 <i>H_e</i>	Nei's 基因多样性 <i>h</i>	多态信息 含量 PIC
PJ247	2.00	1.26	0.36	0.21	0.12	0.20	0.18
PF402	4.00	1.43	0.61	0.30	0.28	0.30	0.28
PF408	3.00	1.68	0.66	0.41	0.54	0.40	0.34
PF463	4.00	1.28	0.48	0.22	0.24	0.22	0.21
PF464	3.00	1.16	0.31	0.14	0.12	0.14	0.13
PF569	3.00	1.26	0.42	0.21	0.23	0.21	0.19
PF615	2.00	1.69	0.60	0.41	0.57	0.41	0.32
PF648	3.00	1.18	0.33	0.16	0.17	0.15	0.15
PF653	2.00	1.78	0.63	0.44	0.51	0.44	0.34
PF695	4.00	2.87	1.12	0.66	0.52	0.65	0.58
PF727	4.00	1.96	0.90	0.49	0.64	0.49	0.44
PF764	3.00	2.57	1.00	0.62	0.92	0.61	0.53
平均值 Mean	3.08	1.68	0.62	0.35	0.40	0.35	0.31

表 4 大明松天然群体间遗传多样性比较

Table 4	Comparison of genetic diversities among natural populations of <i>Pinus taiwanensis</i> var. <i>damingshanensis</i>					
群体名称 Group name	观察等位 基因数 <i>N_a</i>	有效等位 基因数 <i>N_e</i>	Shannon's 信息指数 <i>I</i>	观察杂合度 <i>H_o</i>	期望杂合度 <i>H_e</i>	Nei's 基因多样性 <i>h</i>
DM	2.33	1.57	0.49	0.40	0.30	0.29
FJ	2.67	1.47	0.48	0.32	0.28	0.27
DS	2.83	1.70	0.65	0.49	0.40	0.39
平均值 Mean	2.61	1.58	0.54	0.40	0.33	0.32

另外,欧洲云杉(*Picea abies*)杂合度为 0.79 (Pfeiffer et al., 1997),黄杉(*Pseudotsuga menziesii*)杂合度为 0.67(Amarasinghe et al., 2002),欧洲栓皮栎(*Quercus suber*)杂合度为 0.65(Hornero et al., 2001)。与以上不同属树种比较,大明松群体杂合

度指数也较低。一方面,这可能与大明松片段化的地理分布特点有关。本次调查的 3 个大明松群体规模均较小,分布范围也相对狭小,不同群体间地理间隔大。因而其遗传变异水平低于火炬松、辐射松等种群规模且大面积连续分布的松类。另一方面,本研究采用的 SSR 引物是从马尾松基因组中开发的,种间通用性较好的分子标记其所在序列往往较为保守,从而导致标记的多态性较低。

3.2 大明松群体遗传结构特征

研究中发现大明松群体内的遗传变异(87.64%)远远大于群体间的遗传变异(12.36%),群体间的遗传分化水平偏低,大部分变异均存在于群体内。群体间的基因流平均为 2.74,表明 3 个大明松群体之间基因交流比较充分。由于松树属于风媒传粉,花粉具有很强的远距离散播能力,因此,远距离地理隔离虽然对大明松群体间的基

表 5 大明松群体遗传分化

Table 5 Genetic differentiation of *Pinus taiwanensis* var. *damingshanensis*

指标 Index	Shannon's 信息指数 <i>I</i>	指标 Index	Nei's 多样性指数 <i>h</i>
群体内遗传多样性 <i>Hpop</i>	0.54	群体内的基因多样性 <i>Hs</i>	0.32
群体总的遗传多样性 <i>Hsp</i>	0.62	群体总的基因多样性 <i>Ht</i>	0.35
群体内遗传多样性所占比值 <i>Hpop/Hsp</i>	0.88	群体内基因多样性所占比值 <i>Hs/Ht</i>	0.90
群体间遗传多样性所占比值 (<i>Hsp-Hpop</i>)/ <i>Hsp</i>	0.12	遗传分化系数 <i>Gst</i>	0.10

表 6 群体间的 Nei's 遗传距离和遗传一致度

Table 6 Nei's genetic distance and genetic identity between populations

群体名称 Group name	DM	FJ	DS
DM	—	0.925 9	0.973 5
FJ	0.077 0	—	0.928 4
DS	0.026 9	0.074 3	—

注: Nei's 遗传距离(下三角)、遗传一致度(上三角)。
Note: Nei's genetic distance (below diagonal) and genetic identity (above diagonal).

表 7 松属树种间遗传多样性参数比较

Table 7 Comparison of genetic diversity parameters among *Pinus* species

树种 Species	观察等位基因数 <i>Na</i>	观察杂合度 <i>Ho</i>	期望杂合度 <i>He</i>
大明松 <i>P. taiwanensis</i> var. <i>damingshanensis</i>	2.61	0.40	0.33
火炬松 <i>P. taeda</i>	7.75	0.52	0.65
白松 <i>P. monticola</i>	6.50	0.72	0.81
辐射松 <i>P. radiata</i>	8.19	0.73	—

因交流具有一定的限制作用,但还未导致群体间明显的遗传分化。许玉兰等(2016)对云南松天然群体遗传多样性研究及武文斌等(2018)对油松群体遗传多样性研究时也得出近似结论。由此推论,大明松不同群体间的表型多样性差异在很大程度上是因环境差异而形成,在遗传水平还未发生明显分化。因此,大明松种质资源的选择、收集及保存策略,应以在各群体内选择、保存具有优良性状的单株为主。

研究中还发现大明松群体的观测杂合度大于期望杂合度,表现出杂合子过剩的现象,说明大明松群体可能发生过外来基因的迁入或渐渗。大明松与黄山松一样,都和马尾松是垂直方向的替代种(冯源恒等,2019)。而黄山松与马尾松间存在基因渐渗现象(罗世家等,2001;翟大才等,2018),因此,大明松极有可能与本区域内马尾松发生基因渐渗。

参考文献:

AL-RABAB'AH MA, WILLIAMS CG, 2002. Population dynamics of *Pinus taeda* L. based on nuclear microsatellites [J]. For Ecol Manag, 163(1-3): 263-271.

AMARASINGHE V, CARLSON JE, 2002. The development of microsatellite DNA markers for genetic analysis in Douglas-fir [J]. Can J For Res, 32(11): 1904-1915.

CHEN G, BU PT, YU SH, et al., 2020. Study on genetic diversity of natural *Quercus mongolica* populations in Liaoning province revealed by SSR Markers [J]. J Shenyang Agric Univ, 51(6): 727-733. [陈罡, 卜鹏图, 于世河, 等, 2020. 基于 SSR 标记的辽宁蒙古栎天然群体遗传多样性研究 [J]. 沈阳农业大学学报, 51(6): 727-733.]

CHEN LY, LIU P, DONG RJ, 2020. Genetic diversity analysis of *Pomelo* resources based on SSR molecular markers [J]. SW Chin J Agric Sci, 33(11): 2432-2438. [陈林杨, 刘萍, 董蓉娇, 等, 2020. 基于 SSR 分子标记的柚资源遗传多样性分析 [J]. 西南农业学报, 33(11): 2432-2438.]

DOYLE JJ, DOYLE JL, 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue [J]. Focus, 12(1): 13-15.

Editorial Committee of Flora Reipublicae Popularis Sinicae, Chinese Academy of Sciences, 1978. Flora Reipublicae Popularis Sinicae; Vol. 7 [M]. Beijing: Science Press. [中国科学院中国植物志编辑委员会, 1978. 中国植物志: 第 7 卷 [M]. 北京: 科学出版社.]

FAN GS, XIE JR, 1993. Distributional characteristics of *Pinus*

- L. in southeast Yunnan [J]. *Guihaia*, 13 (4): 349–354. [樊国盛, 薛纪如, 1993. 云南东南部松属植物分布的特点 [J]. *广西植物*, 13(4): 349–354.]
- FENG YH, WU DS, YANG ZQ, et al., 2019. Investigation of germplasm resources in four distribution areas of *Pinus taiwanensis* var. *damingshanensis* [J]. *Guangxi For Sci*, 48(2): 179–182. [冯源恒, 吴东山, 杨章旗, 等, 2019. 大明松 4 个分布区种质资源调查 [J]. *广西林业科学*, 48(2): 179–182.]
- FENG YH, YANG ZQ, LI HG, et al., 2016. A study on changes of genetic diversity for nearly 50 years in superior provenances of *Pinus massoniana* in Guangxi [J]. *J Nanjing For Univ (Nat Sci Ed)*, 40(5): 41–46. [冯源恒, 杨章旗, 李火根, 等, 2016. 不同时期广西马尾松优良种源的遗传多样性变化趋势 [J]. *南京林业大学学报 (自然科学版)*, 40(5): 41–46.]
- HARTL DL, CLARK AG, 1989. Principles of population genetics [M]. 2nd ed. Sunderland: Sinauer Associates.
- HORNERO J, GALLEGO FJ, MARTINEZ I, et al., 2001. Testing the conservation of *Quercus* spp. *microsatellites* in the cork oak, *Q. suber* L [J]. *Sil Gen*, 50(3–4): 162–167.
- JIA J, FENG YH, YANG ZQ, 2019. Analysis of cone and seed traits of four pines in Guangxi and Guizhou [J]. *Guangxi For Sci*, 48(3): 281–284. [贾婕, 冯源恒, 杨章旗, 2019. 黔桂地区 4 种松类种实性状分析 [J]. *广西林业科学*, 48(3): 281–284.]
- KARHU A, VOGL C, MORAN GF, et al., 2006. Analysis of microsatellite variation in *Pinus radiata* reveals effects of genetic drift but no recent bottlenecks [J]. *Evol Biol*, 19(1): 167–175.
- LIANG SY, 1994. World pine list [J]. *Guangxi For Sci*, 23(3): 137–143. [梁盛业, 1994. 世界松树名录 [J]. *广西林业科学*, 23(3): 137–143.]
- LUO SJ, ZHOU HY, LIANG SW, 2001. Study on the introgressive hybridization between *Pinus hwangshanensis* and *P. massoniana* [J]. *Sci Silv Sin*, 37(6): 118–122. [罗世家, 邹惠渝, 梁师文, 2001. 黄山松与马尾松基因渐渗的研究 [J]. *林业科学*, 37(6): 118–122.]
- MEHES M, NKONGOLO KK, MICHAEL P, 2009. Assessing genetic diversity and structure of fragmented populations of eastern white pine (*Pinus strobus*) and western white pine (*P. monticola*) for conservation management [J]. *J Plant Ecol*, 2(3): 143–151.
- NEI M, 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 70(12): 3321–3323.
- PFEIFFER A, OLIVIERI AM, MORGANTE M, 1997. Identification and characterization of microsatellite in Norway spruce (*Picea abies* K.) [J]. *Genome*, 40(4): 411–419.
- SHANNON CE, WEAVER W, 1949. The mathematical theory of communication [M]. Urbana: University of Illinois Press.
- WU WB, HE KK, DI H, et al., 2018. Genetic structure and geographic system of geographical population of *Pinus tabulaeformis* mountain range based on SSR in Shanxi Province of northern China [J]. *J Beijing For Univ*, 40(10): 51–59. [武文斌, 贺快快, 狄皓, 等, 2018. 基于 SSR 标记的山西省油松山脉地理种群遗传结构与地理系统 [J]. *北京林业大学学报*, 40(10): 51–59.]
- XU YL, CAI NH, CHEN S, et al., 2016. Relationships between the genetic diversity of *Pinus yunnanensis* Franch. natural populations and ecological factors [J]. *Chin J Ecol*, 35(7): 1767–1775. [许玉兰, 蔡年辉, 陈诗, 等, 2016. 云南松天然群体遗传变异与生态因子的相关性 [J]. *生态学杂志*, 35(7): 1767–1775.]
- YANG ZQ, FENG YH, WU DS, 2014. Analysis of genetic diversity of *Pinus yunnanensis* var. *tenuifolia* nature populations by SSR marker [J]. *Guihaia*, 34(1): 10–14. [杨章旗, 冯源恒, 吴东山, 2014. 细叶云南松天然种群林遗传多样性的 SSR 分析 [J]. *广西植物*, 34(1): 10–14.]
- YEH FC, YANG RC, BOYLE TB, et al., 1997. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis [CP]. Canada: Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta.
- ZANG MY, LI X, FANG YM, 2021. Genetic diversity analysis among natural populations of *Quercus fabri* based on SSR markers [J]. *J Nanjing For Univ (Nat Sci Ed)*, 45(1): 63–69. [臧明月, 李璇, 方炎明, 2021. 基于 SSR 标记的白栎天然居群遗传多样性分析 [J]. *南京林业大学学报 (自然科学版)*, 45(1): 63–69.]
- ZHAI DC, XUAN L, ZHOU Q, et al., 2018. Genetic introgression of *Pinus massoniana* and *Pinus taiwanensis* in Huangshan area based on SSR primers [J]. *Mol Plant Breed*, 16(14): 4614–4622. [翟大才, 宣磊, 周琦, 等, 2018. 黄山地区马尾松和黄山松基于 SSR 标记的基因渐渗研究 [J]. *分子植物育种*, 16(14): 4614–4622.]
- ZHENG WJ, FU LG, CHENG JR, 1975. Gymnosperms of China [J]. *J Syst Evol*, 13(4): 56–123. [郑万钧, 傅立国, 诚静容, 1975. 中国裸子植物 [J]. *植物分类学报*, 13(4): 56–123.]
- ZHOU HL, LI SP, LI MF, et al., 2021. Analysis of genetic diversity of avocado (*Pesca americana* Mill.) germplasms with SSR molecular marker [J]. *S Chin Fruits*, 50(1): 31–37. [周海兰, 李绍鹏, 李茂富, 等, 2021. 基于 SSR 分子标记的油梨种质遗传多样性分析 [J]. *中国南方果树*, 50(1): 31–37.]

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202101019

安琪, 冯源恒, 杨章旗, 等. 香合欢 EST-SSR 标记开发及种间通用性研究 [J]. 广西植物, 2022, 42(8): 1374–1382.

AN Q, FENG YH, YANG ZQ, et al. EST-SSR marker development and interspecific generality of *Albizia odoratissima* [J].

Guihaia, 2022, 42(8): 1374–1382.



香合欢 EST-SSR 标记开发及种间通用性研究

安琪¹, 冯源恒², 杨章旗^{2*}, 胡拉²(1. 广西师范大学 生命科学学院, 广西 桂林 541006; 2. 广西壮族自治区林业科学研究院
广西马尾松工程技术研究中心, 南宁 530002)

摘要: 香合欢是我国南方特有的珍贵用材树种。为了对其种质资源开展群体遗传学研究, 该研究根据香合欢转录组测序结果设计开发 EST-SSR 引物, 并在黄豆树、南洋楹、黑木相思、格木等近缘树种中进行通用性分析。结果表明: (1) 所开发的 243 对引物有 171 对能够成功扩增出目的条带, 在香合欢、黄豆树、南洋楹、黑木相思、格木中的有效扩增率分别为 63.79%、33.75%、45.68%、41.56%、14.81%; 多态性比率分别为 23.87%、12.20%、9.01%、3.96%、2.78%; 5 个物种间均通用的引物有 18 对。(2) 通过验证共获得香合欢 SSR 多态性标记 37 个, 黄豆树和南洋楹多态性标记均为 10 个, 黑木相思多态性标记 4 个, 格木多态性标记 1 个。(3) 所开发的香合欢 EST-SSR 标记, 可以满足开展香合欢群体遗传学相关研究的需要, 并在黄豆树、南洋楹等近缘树种中具有较好的通用性和研究实用性。综上所述, EST-SSR 标记可在香合欢、黄豆树、南洋楹、黑木相思、格木等树种的种质资源遗传多样性评价、育种材料指纹图谱构建、群体交配系统分析等方面提供可靠的研究工具, 对香合欢种质资源的保护和利用具有重要意义。

关键词: 香合欢, EST-SSR, 分子标记, 通用性, 多态性**中图分类号:** Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2022)08-1374-09

EST-SSR marker development and interspecific generality of *Albizia odoratissima*

AN Qi¹, FENG Yuanheng², YANG Zhangqi^{2*}, HU La²

(1. College of Life Sciences, Guangxi Normal University, Guilin 541006, Guangxi, China; 2. Guangxi Autonomous Region Forestry Research Institute, Masson Pine Engineering Technology Research Center of Guangxi, Nanning 530002, China)

Abstract: *Albizia odoratissima* is a unique rare timber tree specie in South China. In order to carry out group genetics research on its germplasm resources, this study designed and developed EST-SSR markers of *A. odoratissima* based on the transcriptome sequencing results. In addition, *A. procera*, *A. falcata*, *Acacia melanoxylon*, *Erythrophloeum fordii* and other related species were selected for analysis of interspecific generality. The results were as follows: (1) Among

收稿日期: 2021-04-07**基金项目:** 广西科技基地和人才专项 (桂科 AD19254004); 广西八桂学者专项 (2019A26) [Supported by Guangxi Science and Technology Base and Special Fund for Talents(AD19254004); Special Fund for Bagui Scholars of Guangxi (2019A26)].**第一作者:** 安琪 (1994-), 硕士研究生, 研究方向为生物化学与分子生物学, (E-mail) 1920683430@qq.com。**通信作者:** 杨章旗, 博士, 教授级高级工程师, 研究方向为林木遗传育种, (E-mail) yangzhangqi@163.com。

the 243 pairs of developed primers, 171 pairs could be successfully amplified to the target bands, and the effective amplification rates in *Albizia odoratissima*, *A. procera*, *A. falcataria*, *Acacia melanoxylon* and *Erythrophloeum fordii* were 63.79%, 33.75%, 45.68%, 41.56% and 14.81%, respectively, and the polymorphism ratios in them were 23.87%, 12.20%, 9.01%, 3.96% and 2.78%, respectively. There were 18 pairs of primers commonly used among *Albizia odoratissima*, *A. procera*, *A. falcataria*, *Acacia melanoxylon* and *Erythrophloeum fordii*. (2) There were 37 SSR polymorphism markers of *Albizia odoratissima* were obtained, ten polymorphism markers of *A. procera* and *A. falcataria*, four polymorphism markers of *Acacia melanoxylon*, and there was one polymorphism mark of *Erythrophloeum fordii*. (3) The developed EST-SSR markers can meet the needs of population genetic studies of *Albizia odoratissima*, and have good transferability and practicability in *A. procera* and *A. falcataria* and other related tree species. In conclusion, EST-SSR markers can provide a reliable research tool for genetic diversity evaluation of germplasm resources, fingerprint construction of breeding materials, and population mating system analysis of *Albizia odoratissima*, *A. procera*, *A. falcataria*, *Acacia melanoxylon* and *Erythrophloeum fordii*. It is of great significance for the protection and utilization of *Albizia odoratissima* germplasm resource.

Key words: *Albizia odoratissima*, EST-SSR, molecular marker, transferability, polymorphism

遗传多样性作为保护生物学的核心内容之一,是生物经长期进化的产物。群体遗传多样性研究对于评价一个群体对环境变化的适应能力,揭示该物种生物多样性和生态系统功能的维持机制及受威胁因素,对该物种种质资源有效保护相关策略的制定至关重要(孟艺宏等,2020)。香合欢(*Albizia odoratissima*)为豆科(Leguminosae)含羞草亚科(Mimosaceae)合欢属(*Albizia* Durazz)常绿大乔木,在我国福建、广东、广西、贵州、云南、四川、海南等省(区)均有分布(韦铄星等,2020)。香合欢具有生长迅速、出材率高、天然更新能力强等优点,是具有巨大发展潜力的高价值造林树种。此外,香合欢还具有极高的药用价值。以根入药,可用于治疗风湿关节痛、跌打损伤、创伤出血、疮癣、失眠等症状(蔡永敏,1996;蒋升湧,2003)。香合欢作为高经济价值树种,虽然自20世纪90年代起吸引了不少学者的目光,但大多集中在群落组成特征、药用价值探讨、培育栽培技术等方面,有关该树种种质资源的群体遗传学却研究较少,并缺乏可用的分子标记。

除香合欢外,合欢属及其近缘树种中有许多优质的用材树种,如合欢属的黄豆树(*Albizia procera*)、金合欢属(*Acacia*)的黑木相思(*Acacia melanoxylon*)、南洋楹属(*Falcataria*)的南洋楹(*Falcataria falcata*)、格木属(*Erythrophloeum*)的格木(*Erythrophloeum fordii*)。对这些树种的相关研究同样集中在栽培技术、群落组成和分布特征、药用价值研究等方面,而群体遗传学方面却十分薄弱。

目前,仅金合欢属公开发表过82对SSR引物,而合欢属、南洋楹属、格木属尚未有相关SSR引物的报道,从而限制了对各树种分子遗传方向的深入研究。若想开展各树种遗传多样性评价、比较基因组学、基因表达图谱的构建等分子遗传方面的研究,适宜分子标记的开发势在必行。简单重复序列(simple sequence repeats, SSR)指由1~6个核苷酸为重复单元串联组成的长达几十个核苷酸的重复序列,也叫微卫星标记(microsatellite)(Tautz, 1989),因其数量丰富、遍布真核生物整个基因组、多态性高、重复性好、共显性遗传、特异性强等优点而被广泛应用于物种遗传多样性、遗传连锁图谱的构建、基因定位和分子标记辅助育种等研究(Powell et al., 1996)。按其来源可分为基因组SSR(G-SSR)和表达序列标签SSR(EST-SSR)两类。其中,G-SSR标记基于基因组序列,其开发过程繁复、成本高、效率低;EST-SSR是基于表达序列标签开发微卫星的一种新型分子标记,除具有G-SSR标记的优点外,还具有序列保守性较高、在植物物种之间通用性的优点(张利达和唐克轩, 2010;王丹丹和杨东霞, 2017;Preethi et al., 2020)。鉴于此,本文基于香合欢转录组测序结果开发相关分子标记。

近年来,众多研究表明,SSR引物在物种及其近缘物种间,甚至在该物种与某些远缘物种间均具有一定的通用性(钟敏等,2012)。张燕梅等(2020)发现剑麻EST-SSR引物在龙舌兰属、丝兰属和中美麻属中的通用性分别为68%、52%和

52%。张勇等(2019)发现 66.67% 的桃 EST-SSR 引物在蔷薇科物种中扩增出多态性。方书生等(2018)发现棉花 SSR 标记在红麻中的通用性为 53.5%。可见,在近缘物种间探讨 EST-SSR 引物的通用性有效且可行。本研究基于香合欢转录组测序结果设计开发 EST-SSR 引物,对其在香合欢、黄豆树、黑木相思、南洋楹、格木中的通用性进行研究,将现有引物转移到黄豆树、黑木相思、南洋楹、格木等近缘树种上,既可有效节约引物开发成本,提高引物的利用效率,也可为香合欢、黄豆树、黑木相思、南洋楹、格木及其他一些近缘物种的种质资源保护、遗传多样性等相关研究提供可靠分子标记。

1 材料与方法

1.1 材料

选取 30 份香合欢种质作为香合欢引物多态性研究的材料。另外,选取香合欢、黄豆树、黑木相思、南洋楹、格木种质资源各 4 份,作为引物通用性研究的材料(表 1)。其中,格木和黑木相思材料均采自南宁市林业科学研究所,4 份香合欢材料分别为广西百色市田东县地方种、广西百色市西林县地方种、海南省尖峰岭地方种、海南省霸王岭地方种,4 份南洋楹材料中 2 份采自广东省林科院树木园、2 份采自广西壮族自治区林业科学研究院,4 份黄豆树材料采自广西壮族自治区林业科学研究院。格木、黑木相思、黄豆树材料由于取样地距离较近且取材较方便,因此采样后立即放入采样箱中,随后将样品放入-80 ℃冰箱进行保存;而香合欢和南洋楹材料因为取样地距离较远且取材较难,所以采集新鲜样品后立即放入硅胶中干燥保存。

1.2 SSR 标记开发

对香合欢叶子进行转录组测序,根据测序结果,使用 Novofinder 软件对香合欢转录组 38 107 条 Unigene 中的 SSR 位点进行搜索,筛选的标准是三至五核苷酸重复基元的次数为 5 次或大于 5 次,序列长度的范围为 18 ~ 26 bp。引物均由广州艾基生物技术有限公司合成。

1.3 DNA 提取

植物基因组 DNA 的提取是使用液氮将香合欢及其近缘物种的叶片研磨成粉末状,采用 Ezup 柱式植物基因组 DNA 抽提试剂盒提取 DNA,使用微

表 1 50 份供试材料的种质信息
Table 1 Germplasm information of 50 tested materials

编号 No.	供试材料 Tested material	种质来源地 Germplasm source
1-30	香合欢 <i>Albizia odoratissima</i>	广西百色隆林县 Longlin County, Baise, Guangxi
31-34	黄豆树 <i>A. procera</i>	广西壮族自治区林业科学研究院 Guangxi Autonomy Region Forestry Research Institute
35-38	格木 <i>Erythrophleum fordii</i>	南宁市林业科学研究所 Nanning Forestry Research Institute
39	香合欢 <i>Albizia odoratissima</i>	广西百色田东县 Tiandong County, Baise, Guangxi
40	香合欢 <i>A. odoratissima</i>	广西百色西林县 Xilin County, Baise, Guangxi
41	香合欢 <i>A. odoratissima</i>	海南尖峰岭 Jianfengling, Hainan
42	香合欢 <i>A. odoratissima</i>	海南霸王岭 Bawangling, Hainan
43-44	南洋楹 <i>Falcataria falcata</i>	广东林科院树木园 Tree Garden of Guangdong Academy of Forestry
45-46	南洋楹 <i>F. falcata</i>	广西壮族自治区林业科学研究院 Guangxi Autonomous Region Forestry Research Institute
47-50	黑木相思 <i>Acacia melanoxylon</i>	南宁市林业科学研究所 Nanning Forestry Research Institute

量分光光度计对提取好的 DNA 的浓度进行检测,置于-20 ℃冰箱保存。

1.4 PCR 扩增

PCR 扩增反应总体积 10 μL,含 1 μL DNA(60 ng · μL⁻¹),0.2 μL dNTPs,上下游引物各 0.25 μL,1 μL 的 10 × PCR Buffer,0.1 μL 的 Taq DNA Polymerase(5 U · μL⁻¹),7.2 μL 的 ddH₂O,扩增反应在 PCR 仪上进行。扩增程序为 94 ℃预变性 4 min,94 ℃变性 15 s,58 ℃复变性 15 s,72 ℃延伸 30 s,25 个循环;72 ℃延伸 20 min,12 ℃保存。

1.5 扩增产物的检测

用 8%的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离扩增产物,在 240 V 恒压下电泳(一般为 50~55 min),可根据溴酚蓝指示剂的位置调整电泳时间。首先,将凝胶用 dd H₂O 清洗 2 次后,在固定液中固定 10 min,随后取出凝胶用蒸馏水清洗 2 次,每次清洗 2 min;然后,将凝胶放入 0.15% AgNO₃溶液中染色 6~7 min,用 dd H₂O 清洗 2 次,每次 2 min,随后将凝胶放入显影液中至条带清晰,用 dd H₂O 清洗 2 次后读带并拍照。

1.6 数据统计与处理

用人工读带的方法读取条带,同一引物扩增产物中用 A,B,C,⋯按条带长度从大到小进行编号,利用 Popgene 1.32 软件计算 30 份样品的遗传多样性指数。

计算所用 SSR 引物的 *PIC* (polymorphism information content)(杨国忠等,2004)。计算公式如下:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - \sum_{j=1}^{n-1} \sum 2P_i P_j^2 \tag{1}$$

式中: *PIC* 为多态信息含量; *P_i* 和 *P_j* 分别为第 *i* 个和 *j* 个等位基因频率; *n* 为等位基因数。

引物的有效扩增率为能够有效扩增的引物的数量与引物总数量的比值。

2 结果与分析

2.1 香合欢转录组中 SSR 重复单元类型

通过对香合欢 9 个样本进行 RNA 转录组测序获得 33 335 个 SSR 位点,对 SSR 的重复基元类型进行统计,发现主要有单核苷酸和二至六核苷酸等 6 种重复基元类型(表 2)。其中,单核苷酸重复类型占 SSR 位点总数的 64.73%,二核苷酸重复类型占 SSR 位点总数的 20.64%,三核苷酸重复类型占 SSR 位点总数的 12.30%,四至六核苷酸重复类型分别占 SSR 位点总数的 1.62%、0.28%、0.42%。

表 2 香合欢转录组中 SSR 重复单元的分布特征
Table 2 Distribution of the SSR repeat motifs in *Albizia odoratissima* transcriptome

核苷酸重复类型 Type of nucleotide repeat	SSR 数量 Number of SSR	所占比例 Percentage (%)	主要重复基元 (数目) Main repeat motif (number)
单核苷酸 Mononucleotide	21 578	64.73	T/A(9 726) A/T(9 652)
二核苷酸 Dinucleotide	6 882	20.64	AT/AT(1 168) TA/TA(987) AG/CT(855)
三核苷酸 Trinucleotide	4 099	12.30	AAT/ATT(199) GAA/TTC(188) TTC/GAA(174)
四核苷酸 Tetranucleotide	541	1.62	AAAT/ATTT(54) TTTA/TAAA(49)
五核苷酸 Pentanucleotide	95	0.28	AAAAT/ATTTT(8) AAAAG/CTTTT(8)
六核苷酸 Hexanucleotide	141	0.42	GCCACC/GGTGGC(2) TGCCGC/GCGGCA(2)
总计 Total	33 335		

从表 2 可以看出,在单核苷酸重复类型中 T/A (45.07%)最多, A/T(44.73%)稍次之;二核苷酸重复类型中出现频率最高的为 AT(16.97%),其次是 TA(14.34%)和 AG/CT(12.42%);三核苷酸重复类型中 AAT/ATT(4.85%)出现的频率最高, GAA/TTC(4.59%)和 TTC/GAA(4.24%)稍次之;四核苷酸重复类型中 AAAT/ATTT(9.98%)出现的频率最高,其次为 TTTA/TAAA(9.06%)。核苷酸重复类型一共有 399 种,除去单核苷酸重复类型的四种,二核苷酸重复类型、三核苷酸重复类型、四核苷酸重复类型、五核苷酸重复类型、六核苷酸重复类型分别有 12、60、123、65、135 种。

SSR 的重复次数在 5~68 之间(表 3)。其中, 5~11 次重复最多,占 SSR 位点总数的 54.95%; 12~18 次重复排在第二位,占 SSR 位点总数的 34.48%;19~25 次重复占 SSR 位点总数的 7.74%;

重复次数高于 25 数量较少,仅占总位点数量的 2.83%。在所有重复次数中,10 次重复最多有 5 792(17.38%)个,其次为 11 次重复和 6 次重复, 分别有 3 441 个(10.32%)和 2 926 个(8.78%)。

2.2 香合欢 EST-SSR 引物的有效性

从表 4 可以看出,在 243 对香合欢 EST-SSR 引物中,有 155 对能够在香合欢中有效扩增。并且,不同核心重复类型的 EST-SSR 引物的有效扩增率有所不同,其中三核苷酸重复类型引物的扩增成功率(为 66.34%)高于五核苷酸重复类型(为 64.71%)和四核苷酸重复类型(为 61.11%)的 EST-SSR 引物。

2.3 SSR 标记多态性信息

243 对引物中,有 37 对能够在香合欢中扩增出多态性条带,多态性比率为 23.87%。筛选出 10 对条带清晰、重复性好、多态性高的引物,对 30 份

表 3 SSR 重复次数
Table 3 SSR repetition times

项目 Item	5~11 次 5-11 times	12~18 次 12-18 times	19~25 次 19-25 times	>25 次 >25 times
数量 Number	18 317	11 493	2 581	944
所占比例 Percentage (%)	54.95	34.48	7.74	2.83

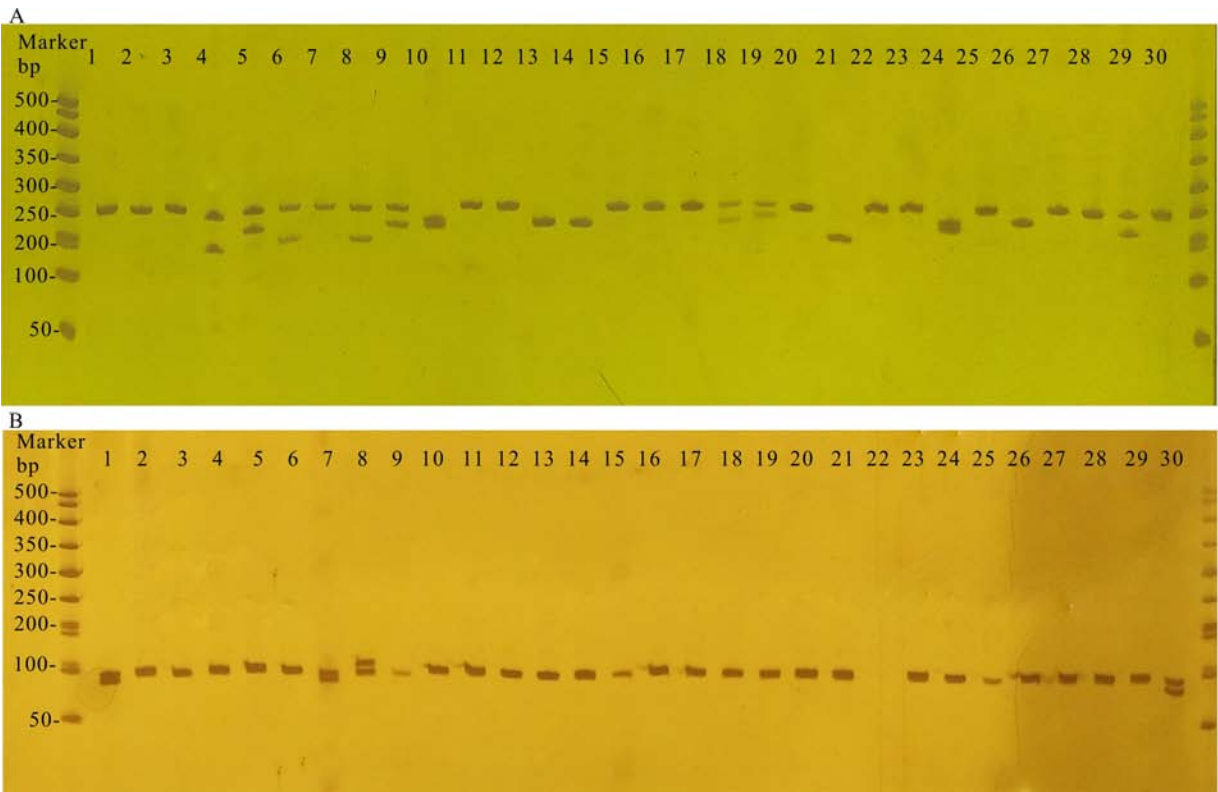
香合欢种质进行鉴定,结果表明 10 对引物共扩增出 26 条条带(图 1),平均每对引物扩增出 2.6 条。使用 Popgene 1.32 软件分析 10 对引物的多样性指数(表 5),其有效等位基因数的范围为 1.149 7~2.455 7,平均值为 1.816 4;Nei's 基因多样性指数(H)的范围为 0.130 2~0.592 8,平均值为 0.420 9;Shannon 指数(I)的范围为 0.289 7~0.984 0,平均值为 0.677 1;根据 Botstein 等(1980)首次提出的

表 4 香合欢 EST-SSR 引物在 5 个树种中的扩增结果
Table 4 Amplification results of EST-SSR primers of *Albizia odoratissima* in five tree species

SSR 核心类型 Core motif of SSR	引物数目 Number of primers	有效引物数目 Number of effective primers				
		香合欢 <i>Albizia odoratissima</i>	黄豆树 <i>A. procera</i>	南洋楹 <i>A. falcataria</i>	黑木相思 <i>Acacia melanoxylon</i>	格木 <i>Erythrophleum fordii</i>
三核苷酸 Trinucleotide	101(72)	67	35	43	45	16
四核苷酸 Tetranucleotide	108(76)	66	35	48	45	13
五核苷酸 Pentanucleotide	34(23)	22	13	18	12	7
总计 Total	243	155	83	109	102	36

表 5 10 对引物多态性信息
Table 5 Information on polymorphism of 10 pairs of primers

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	Nei's 基因多样性指数 Nei's gene diversity index (H)	Shannon 指数 Shannon index (I)	有效等位基因数 Effective number of allele (N_e)	多态信息含量 Polymorphism information content (PIC)
AO-39	F:TAAGAAAAGGCAAGGCATCG R:TTATAGCGTGAGAGTGGGGG	0.592 8	0.984 0	2.455 7	0.518 4
AO-53	F:AGGAGGAGGAGGCCGTTGTAT R:TTCAGCTCAGCCCTGATTTT	0.486 1	0.824 0	1.945 9	0.423 4
AO-62	F:TGCCTCACACTACACGCTTC R:GCGTTGCTTGAGGACTAAGG	0.312 8	0.583 8	1.455 1	0.285 6
AO-75	F:ATGCATGAGGAATGGAGGAG R:CCTCTCCTTATGCCTTTCCC	0.515 0	0.823 7	2.061 9	0.424 4
AO-130	F:AGCTCTAAAAGCAGGTGGCA R:GCCTGTGTCATCATCGCTTA	0.130 2	0.289 7	1.149 7	0.124 9
AO-133	F:AGGATTAAGCAAAGCGCTGA R:CGGAGTTGGCAGTGGATATT	0.231 1	0.392 7	1.300 6	0.204 4
AO-166	F:AGCCTGGAGCTGTACAGGAA R:CGAACATGAACCACAGATGG	0.436 2	0.627 9	1.773 8	0.341 1
AO-184	F:TGGGGGAACAGTGCTTATGT R:TCTCTGTTCTCATTCGTCG	0.517 8	0.872 0	2.073 7	0.451 3
AO-188	F:ATGCAGTTGCAATCAATCA R:TTTGGAATTGGGGATTACA	0.487 2	0.680 3	1.950 1	0.368 5
AO-199	F:TCATCAATGTGCTTCCCAA R:AGCTCAAGCAGCTCAGGAAC	0.499 4	0.692 6	1.997 8	0.374 7
平均值 Mean		0.420 9	0.677 1	1.816 4	0.351 7



1–30. 供试的 30 份香合欢材料。
1–30. 30 tested materials.

图 1 利用引物 AO-53 (A) 和 AO-62 (B) 对 30 份香合欢种质扩增条带图

Fig. 1 Amplification bands of 30 *Albizia odoratissima* germplasms using primers AO-53 (A) and AO-62 (B)

$PIC>0.5$ 时,引物具有高度多态性; $0.5<PIC<0.25$ 时,引物具有中度多态性; $PIC<0.25$ 时,引物具有低度多态性。10 对引物 PIC 值的范围为 0.124 9~0.518 4,平均值为 0.351 7,除 AO-130 和 AO-133 为低度多态性引物外,其他均属于中高度多态性引物,表明所筛选引物可以用于香合欢种质遗传多样性分析和指纹图谱构建。

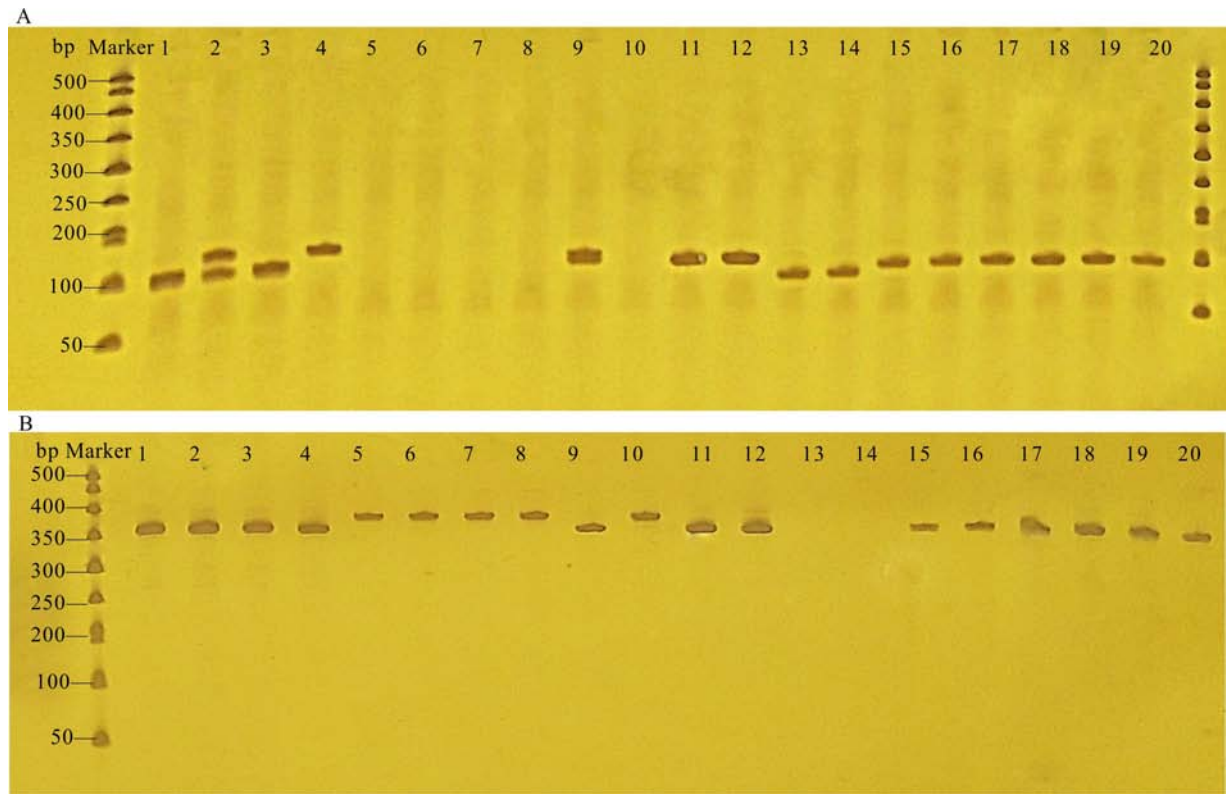
2.4 香合欢 EST-SSR 引物的通用性分析

由表 4 可知,在成功扩增的 171 对引物中,三核苷酸重复类型在黄豆树、南洋楹、黑木相思、格木中的有效扩增率分别为 34.65%、42.57%、44.55%、15.84%;四核苷酸重复类型在黄豆树、南洋楹、黑木相思、格木中的有效扩增率分别为 32.41%、44.44%、41.67%、12.04%;五核苷酸重复类型在黄豆树、南洋楹、黑木相思、格木中的有效扩增率分别为 38.24%、52.94%、35.29%、20.59%。此外,五个树种均通用的引物有 18 对,香合欢、黄

豆树、黑木相思、格木特异性标记分别有 26 对、8 对、5 对和 1 对,未发现南洋楹特异性标记。

有 10 对能够在黄豆树中扩增出多态性条带,多态性比率为 12.20%,有 10 对能够在南洋楹中扩增出多态性条带,多态性比率为 9.01%,有 4 对能够在黑木相思中扩增出多态性条带,多态性比率为 3.96%,有 1 对能够在格木中扩增出多态性条带,多态性比率为 2.78%。有 2 对引物能够在 3 个以上树种中扩增出多态性条带。部分引物在各树种的扩增结果见图 2。

香合欢 EST-SSR 引物在香合欢及其他树种的通用性比率三核苷酸重复类型引物平均为 71.29%,四核苷酸重复类型引物平均为 70.37%,五核苷酸重复类型引物平均为 67.65%。可见,不同核心重复类型的香合欢 EST-SSR 引物的通用性有所不同,三核苷酸重复类型 EST-SSR 引物的通用性比率高于四核苷酸重复类型引物和五核苷酸重复类型引物。



1-4. 黄豆树; 5-8. 格木; 9-12. 香合欢; 13-16. 南洋楹; 17-20. 黑木相思。
1-4. *Albizia procera*; 5-8. *Erythrophleum fordii*; 9-12. *Albizia odoratissima*; 13-16. *Falcataria falcata*; 17-20. *Acacia melanoxylon*.

图 2 引物 AO-63 (A) 和引物 AO-196 (B) 在不同树种的扩增条带图
Fig. 2 Amplification bands of primers AO-63 (A) and AO-196 (B) in different tree species

3 讨论与结论

3.1 香合欢 EST-SSR 引物的通用性

在植物中三核苷酸重复类型的 EST-SSR 引物的通用性比率高于其他核心单元重复类型的引物 (Chen et al., 2005; Li et al., 2008 文明富等, 2011;)。本研究中,三核苷酸重复类型的香合欢 EST-SSR 引物通用性比率(为 71.29%) 高于四核苷酸重复类型(为 70.37%)和五核苷酸重复类型引物(为 67.65%),表明在香合欢中,三核苷酸重复类型 EST-SSR 引物的通用性也最高。

本研究对所设计的 243 对香合欢 EST-SSR 引物进行通用性筛选,发现有效扩增率为 70.37%,这与 Gao 等 (2003), 祁雅等 (2004) 和魏利斌等 (2008) 研究指出的,所设计 EST-SSR 引物的有效扩增率应在 60%~90%之间相吻合。其原因可能有以下几个方面:一是实验中所用引物均根据二

代测序结果所得,二代测序在拼接过程中可能会存在一些错误,导致引物设计不合理,因而不能有效扩增;二是根据转录组测序结果设计和筛选 EST-SSR 引物时,可能会出现所设计引物 GC 含量过高,形成二聚体或发卡结构等情况,从而影响聚合酶链式反应使引物不能扩增出有效的目的片段 (钟敏等,2012)。

本研究发现成功扩增出目的条带的 171 对引物中,有 26 对引物在其他 4 种树种中不具备通用性,这与钟敏等 (2012) 发现有 216 对引物仅在绿豆种中能够有效扩增的结果相似,其原因可能是这些 EST-SSR 位点为香合欢特有,这些香合欢特异性引物可为香合欢野生种或是近缘物种的分类和鉴别研究提供参考。

SSR 引物的通用性与近缘分类群之间微卫星侧翼序列的保守性和进化过程中微卫星的稳定性息息相关。基因组编码区序列的保守性高于非编码区,EST-SSR 来源于编码区序列,与功能基因相

关, 由于 EST-SSR 序列保守性较基因组 SSR 高, 因此 EST-SSR 较基因组 SSR 的通用性高, 且一般遗传距离越近的物种间引物的通用性越高 (Liewlaksaneeyanawin et al., 2004; 泖香香等, 2011; 文明富等, 2011)。李春和孙晔 (2012) 发现 124 对中国板栗多态性 EST-SSR 引物在栲树中通用性和多态性分别为 42.7% 和 56.6%。Feng 等 (2014) 发现 318 对马尾松 SSR 引物分别有 15 对、10 对和 10 对在湿地松、加勒比松、云南松中扩增出了多态性条带。徐杨等 (2016) 通过研究发现云南松 EST-SSR 引物在细叶云南松、马尾松、高山松、油松等近缘物种中具有较高的通用性。本研究中香合欢 EST-SSR 引物在各树种的通用性比率香合欢 (63.79%) > 南洋楹 (45.68%) > 黑木相思 (41.56%) > 黄豆树 (33.75%) > 格木 (14.81%)。其原因可能是黄豆树、南洋楹和黑木相思同属于含羞草亚科 (Mimosaceae) 植物, 而格木为苏木亚科 (Caesalpinioidae) 植物, 黄豆树、南洋楹和黑木相思与香合欢之间的亲缘关系较格木更近, 因而同源序列更多, 扩增成功率相对更高。但是, 在南洋楹和黑木相思中的通用性比率高于黄豆树, 在一定程度上预示着香合欢与南洋楹、黑木相思的转录组信息更为近似, 这与分类学上的亲缘关系远近并不完全一致, 此种表型分类学与基因组学上的亲缘差异值得进一步深入探讨。由于本研究所设计引物数量有限, 并未包含香合欢全部 EST-SSR 序列, 可能会对引物通用性结果造成一定影响。为准确验证引物间的通用性规律, 得到更加科学客观的结论, 还需做大量研究, 今后可在本研究的基础上采用更多引物在同种、同科、同属植物中进行广泛测试。

3.2 香合欢 EST-SSR 引物的多态性

一般来说, EST-SSR 引物的多态信息含量的值会因物种、供试材料数量以及标记数目的变化而有所不同 (魏利斌等, 2008)。本研究发现, 在香合欢中扩增出多态性条带的引物有 37 对 (23.87%), 选用 30 份香合欢种质对 10 对多态性高、重复性好的 SSR 引物的多态性进行分析, 平均每对引物扩增出多态性条带 2.6 条, 仅引物 AO-130 和 AO-133 为低度多态性引物。其原因可能与本研究所用 30 份香合欢种质均为广西百色市隆林县地方种, 材料间遗传背景差异较小且材料数量较少有关。在未来的工作中要加强对不同的地域、类型的香合

欢种质的搜集和利用。此外, 在黄豆树、南洋楹、黑木相思和格木中扩增出多态性条带的引物分别有 10 对 (12.20%)、10 对 (9.01%)、4 对 (3.96%)、1 对 (2.78%)。本研究可基本满足香合欢、黄豆树、南洋楹的种质资源遗传多样性等研究需要, 若想进一步分析香合欢引物在黑木相思和格木的多态性, 可进一步增加筛选引物所用材料的数量, 且最好选择不同省份或是不同国家来源的野生群体等差异较大的材料。

目前, 对于香合欢、黄豆树、南洋楹、黑木相思、格木等豆科高经济价值、生态效益树种的基因信息的了解和研究还很缺乏, 本研究获得的通用性引物将继续深入开展香合欢遗传多样性与种质资源保护等研究提供帮助, 也将进一步促进香合欢的一些近缘物种甚至一些远缘物种尤其是黄豆树、南洋楹、黑木相思、格木 4 个树种的种质资源的收集、保护、鉴定、遗传多样性分析等研究的开展。

参考文献:

- BOTSTEIN D, WHITE RL, SKOLNICK M, et al., 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. *Am J Hum Genet*, 32 (3): 314–331.
- CAI YM, 1996. Dictionary of Chinese medicine names [M]. Beijing: China Traditional Chinese Medicine Press: 246. [蔡永敏, 1996. 中药药名辞典 [M]. 北京: 中国中医药出版社: 246.]
- CHEN HM, LI LZ, WEI XY, et al., 2005. Development, chromosome location and genetic mapping of EST-SSR markers in wheat [J]. *Chin Sci Bull*, 50(20): 74–82.
- FANG SS, XIE XF, QI JM, et al., 2018. Universality of simple sequence repeat (SSR) markers from cotton (*Gossypium hirsutum*) to kenaf (*Hibiscus cannabinus*) [J]. *Chin J Trop Crops*, 39 (7): 1373–1382. [方书生, 谢雄峰, 祁建民, 等, 2018. 棉花 SSR 标记在红麻中的通用性 [J]. 热带作物学报, 39(7): 1373–1382.]
- FU XX, ZHAO H, WANG Y, 2011. Species identification and genetic relationship assessment of *Pinus* (Sect. *Pinus*) related species based on morphological and molecular markers [J]. *Sci Silv Sin*, 47 (10): 51–58. [泖香香, 赵虎, 王玉, 2011. 松属近缘种形态和分子鉴定及其亲缘关系探讨 [J]. 林业科学, 47(10): 51–58.]
- FENG YH, YANG ZQ, WANG J, et al., 2014. Development and characterization of SSR markers from *Pinus massoniana* and their transferability to *P. elliotii*, *P. caribaea* and

- P. yunnanensis* [J]. Genet Mol Res, 13(1): 1508–1513.
- JIANG SY, 2003. Research on tropical agricultural development in Guangxi [M]. Beijing: China Price Press; 241–243. [蒋升湧, 2003. 广西热带农业发展研究 [M]. 北京: 中国物价出版社; 241–243.]
- LIEWLAKSANEYANAWIN C, RITLAND CE, EL-KASSABY YA, et al., 2004. Single-copy, species-transferable microsatellite markers developed from loblolly pine ESTs [J]. Theor Appl Genet, 109(2): 361–369.
- LI C, SUN Y, 2012. Transferability analysis of EST-SSR markers of *Castanea mollissima* to *Castanopsis fargesii* [J]. Guihaia, 32(3): 293–297. [李春, 孙晔, 2012. 中国板栗 EST-SSR 分子标记在栲树中的通用性分析 [J]. 广西植物, 32(3): 293–297.]
- LI LZ, WANG JJ, GUO Y, et al., 2008. Development of SSR markers from ESTs of gramineous species and their chromosome location on wheat [J]. Prog Nat Sci, 18: 1485–1490.
- GAO LF, TANG JF, LI HW, et al., 2003. Analysis of microsatellites in major crops assessed by computational and experimental approaches [J]. Mol Breed, 12(3): 245–261.
- MENG YH, XU GB, LU MZ, et al., 2020. Population genetic structure and demographic history of *Disanthus cercidifolius* var. *longipes* [J]. Sci Silv Sin, 56(7): 55–62. [孟艺宏, 徐刚标, 卢孟柱, 等, 2020. 长柄双花木种群遗传结构及种群历史 [J]. 林业科学, 56(7): 55–62.]
- POWELL W, MACHRAY GC, PROVAN J, 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats [J]. Trends Plant Sci, 1(7): 215–222.
- PREETHI P, RAHMAN S, NAGANEESWARAN S, et al., 2020. Development of EST-SSR markers for genetic diversity analysis in coconut (*Cocos nucifera* L.) [J]. Mol Biol Rep, 47(12): 9385–9397.
- SOOK J, ALBERT A, CHRISTOPHER J, et al., 2005. Frequency, type, distribution and annotation of simple sequence repeats in Rosaceae ESTs [J]. Funct Integr Genom, 5(3): 136–143.
- TAUTZ D, 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers [J]. Nucl Acids Res, 17(16): 6463–6471.
- WEI SX, LIANG RL, LIN JY, et al., 2020. Geographical distribution and community characteristics of *Albizia odoratissima* in China [J]. Guangxi For Sci, 49(1): 71–75. [韦铄星, 梁瑞龙, 林建勇, 等, 2020. 香合欢在中国的地理分布和群落特征 [J]. 广西林业科学, 49(1): 71–75.]
- WANG DD, YANG DX, 2017. Development and transferability of EST-SSR primers in *Actinidia arguta* [J]. J NW For Univ, 32(4): 147–152. [王丹丹, 杨东霞, 2017. 软枣猕猴桃 EST-SSR 引物开发及通用性研究 [J]. 西北林学院学报, 32(4): 147–152.]
- WEN MF, CHEN X, WANG HY, et al., 2011. Transferability analysis of cassava EST-SSR and genomic-SSR markers in jatropha and rubber tree [J]. Acta Agron Sin, 37(1): 74–78. [文明富, 陈新, 王海燕, 等, 2011. 木薯基因组 SSR 和 EST-SSR 在麻疯树和橡胶树中的通用性分析 [J]. 作物学报, 37(1): 74–78.]
- WEI LB, ZHANG HY, ZHENG YZ, et al., 2008. Development and utilization of EST-derived microsatellites in sesame (*Sesamum indicum* L.) [J]. Acta Agron Sin, 34(12): 2077–2084. [魏利斌, 张海洋, 郑永战, 等, 2008. 芝麻 EST-SSR 标记的开发和初步研究 [J]. 作物学报, 34(12): 2077–2084.]
- XU Y, DENG LL, ZHOU L, et al., 2016. The transferability analysis of microsatellite markers from expressed sequence tags of *Pinus yunnanensis* to its close related species [J]. J SW For Univ (Nat Sci Ed), 36(1): 16–20. [徐杨, 邓丽丽, 周丽, 等, 2016. 云南松 EST-SSR 引物在其近缘种中通用性的研究 [J]. 西南林业大学学报, 36(1): 16–20.]
- XIN Y, CUI HR, ZHANG ML, et al., 2005. Development of EST(ex-pressed sequence tags) marker in Chinese cabbage and its transferability to rapeseed [J]. Hereditas, 27(3): 410–416. [忻雅, 崔海瑞, 张明龙, 等, 2005. 白菜的 EST 标记及其对油菜的通用性 [J]. 遗传, 27(3): 410–416.]
- YANG GZ, ZHANG JB, ZHAO YM, et al., 2004. Study on polymorphism of 8 microsatellite markers in glassland red cattle crossed population [J]. Grass Feeding Livest, 124(3): 23–27. [杨国忠, 张嘉保, 赵玉民, 等, 2004. 8 种微卫星 DNA 标记在草原红牛杂交群体中多态性的研究 [J]. 草食家畜, 124(3): 23–27.]
- ZHANG LD, TANG KX, 2010. Development of plant EST-SSR markers and its application [J]. Genom and Appl Biol, 29(3): 534–541. [张利达, 唐克轩, 2010. 植物 EST-SSR 标记开发及其应用 [J]. 基因组学与应用生物学, 29(3): 534–541.]
- ZHONG M, CHENG XZ, WANG LX, et al., 2012. Transferability of mungbean genomic-SSR markers in other *Vigna* species [J]. Acta Agron Sin, 38(2): 223–230. [钟敏, 程须珍, 王丽侠, 等, 2012. 绿豆基因组 SSR 引物在豇豆属作物中的通用性 [J]. 作物学报, 38(2): 223–230.]
- ZHANG YM, LI JF, LU ZW, et al., 2021. Transferability analysis of sisal EST-SSR markers in *Yucca* and *Furcraea* vent [J]. Chin J Trop Crop, 42(7): 1824–1830. [张燕梅, 李俊峰, 鹿志伟, 等, 2021. 剑麻 EST-SSR 在丝兰麻和中美麻中的通用性分析 [J]. 热带作物学报, 42(7): 1824–1830.]
- ZHANG Y, WANG QM, YE YY, et al., 2019. Development and transferability analysis of EST-SSR primers in peach [J]. Mol Plant Breed, 17(7): 2264–2269. [张勇, 王清明, 叶宇芸, 等, 2019. 桃 EST-SSR 引物的开发及通用性分析 [J]. 分子植物育种, 17(7): 2264–2269.]



DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202005047

牟少华, 李娟, 李雪平, 等. 四个竹秆变异毛竹变型的全基因组序列分析 [J]. 广西植物, 2022, 42(8): 1383–1393.
MU SH, LI J, LI XP, et al. Genomic sequence analysis of four culm variants of Moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) on culm [J]. Guihaia, 2022, 42(8): 1383–1393.

四个竹秆变异毛竹变型的全基因组序列分析

牟少华*, 李娟, 李雪平, 高健

(国际竹藤中心 竹藤科学与技术重点实验室, 北京 100102)

摘要: 毛竹是我国重要的经济竹种,在长期栽培适应过程中产生了丰富的变异。为揭示毛竹竹秆变异变型的全基因组突变类型,以黄皮毛竹、金丝毛竹、绿皮花毛竹和花毛竹 4 个毛竹变型为实验材料,采用高通量重测序技术获得全基因组序列,进行单核苷多态性(SNP)、小片段插入缺失(InDel)和结构变异(SV)检测和注释,并将变异基因进行功能注释。结果表明:花毛竹基因组检测得到的基因变异数最多,为 12 555 个;金丝毛竹样品变异位点数最少,为 11 923 个;4 个样品都有 7 000 多个变异基因得到功能注释。GO 注释分类包括细胞组件、分子功能和生物过程三个基因功能分类体系的 56 个功能组。在细胞组件方面,叶绿素合成相关基因有 2 431 个;在生物过程方面,参与类胡萝卜素合成过程的基因有 75 个,参与花青素合成过程中的调控以及紫外光下组织中花青素积累的相关基因有 80 个。COG 分类表明参与复制、重组和修复的基因数为 369 个,信号转导机制的基因数为 291 个,转录的相关基因为 222 个。通过 KEGG 数据库系统地分析变异基因参与的黄酮类、类胡萝卜素等物质代谢合成途径。深入研究这些差异基因的调控途径,从 DNA 水平上解释竹秆的变异机制,可为深入研究毛竹种内丰富的多态性和遗传变异提供数据支持,阐释不同变异类型的基因家族、功能基因等遗传基础。

关键词: 毛竹, 变型, 全基因组重测序, 基因注释

中图分类号: Q943 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2022)08-1383-11

Genomic sequence analysis of four culm variants of Moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) on culm

MU Shaohua*, LI Juan, LI Xueping, GAO Jian

(Key Laboratory of Bamboo and Rattan Science and Technology, International Center for Bamboo and Rattan, Beijing 100102, China)

Abstract: As an important and economic bamboo species in China, Moso bamboo has performed lots of variations with long-term cultivation conditions. For an overall understanding of the whole genome of four representative culm variations, *Phyllostachys edulis* f. *holochrysa*, *P. edulis* f. *gracilis*, *P. edulis* f. *nabeshimana* and *P. edulis* f. *huamozhu*, re-sequencing was used for high-throughput sequencing to detect its variations by molecular data. The single nucleotide

收稿日期: 2021-01-14

基金项目: 国家林草局“948”项目(2015-4-13);国际竹藤中心基本科研业务费项目(1632016003) [Supported by Project ‘948’ of National Forestry and Grass Administration (2015-4-13); Basic Scientific Research Project of ICBR (1632016003)].

第一作者: 牟少华(1976-), 博士, 副研究员, 主要从事竹类植物种质资源与遗传多样性研究, (E-mail) mush@icbr.ac.cn.

*通信作者

polymorphism (SNP), insertion-deletion (InDel) and structure variation (SV) were detected and annotated, and the mutant genes were compared with the functional databases. The results were as follows: *Phyllostachys edulis* f. *gracilis* had the lowest number of mutation sites, that was 11 923, and *P. edulis* f. *huamozhu* had the highest number 12 555, of which more than 7 000 mutant genes were annotated. GO annotation classification included 56 functional groups of three functional classification systems: cellular component, molecular function and biological processes. In terms of cell components, there were 2 431 genes related to chlorophyll synthesis. In terms of biological processes, there were 75 genes involved in the synthesis of carotenoids and 80 ones involved in the regulation of anthocyanin synthesis and anthocyanin accumulation in tissues under ultraviolet light. COG classification showed that 369 genes involved in replication, recombination and repair, 291 ones in signal transduction mechanism, and 222 ones in transcription. The metabolic pathways of flavonoids, carotenoids and other substances involved in the mutant genes were analyzed by KEGG database. In-depth study of the regulatory pathways and interpretation of the variation mechanism on culm from the DNA level, can provide a data basis for further exploration of the rich polymorphism and genetic variation of Moso bamboo, and elucidate the genetic basis of gene family and functional genes of different variation types.

Key words: Moso bamboo (*Phyllostachys edulis*), variant, whole genome re-sequencing, gene annotation

毛竹 (*Phyllostachys edulis*) 是我国独有的传统经济竹种(江泽慧, 2002), 分布范围较广, 现有毛竹变型 20 多种(马乃训等, 2014)。毛竹变型在形态上表现出丰富的多态性, 尤其是秆色性状方面差异表现显著, 例如花毛竹秆为黄色, 有宽窄不等的绿色纵条纹; 而绿皮花毛竹秆为绿色, 但节间有淡黄色细纵条纹。秆色的变异大大丰富了园林观赏种类, 提高了园林观赏价值。毛竹竹秆性状的遗传变异是遗传育种工作关注的重点。

目前, 高通量测序技术可以分析一个物种的基因组的全貌, 已经在谷子 (Bai et al., 2013; 贾小平等, 2019)、水稻 (Takagi et al., 2013)、大豆 (Qi et al., 2014; Zhou et al., 2015; 张彦威等, 2016)、黄秋葵 (张少平等, 2017)、厚朴 (尹彦棚等, 2020)、菜豆 (Jeremy et al., 2010) 和番茄 (Lin et al., 2014) 等植物上得到了广泛应用。

近年来, 随着分子生物学和组学技术的发展, 毛竹全基因组序列获得公布 (Peng et al., 2013), 一些与毛竹性状相关的基因家族, 如 *AP2/ERF* (Wu et al., 2015)、*SAUR* (Bai et al., 2016)、*AQP* (Sun et al., 2016)、*SBP-like* (Pan et al., 2016)、*HD-Zip* (Chen et al., 2017)、*Hsp* (Xie et al., 2019)、*CO-Like* (Liu et al., 2016) 等已进行鉴定和功能验证, 但是在基因组层面上的研究较少, 特别是毛竹变型秆色相关的研究薄弱, 仅对黄槽毛竹和黄皮花毛竹两个毛竹变型基因组序列变异进行初步探索 (牟少华等, 2020), 这在一定程度上限制了毛竹遗传育种的应用发展。从基因水平上揭

示毛竹的变异程度, 是分析毛竹变型形态差异产生原因的重要手段之一。因此, 开展毛竹变型基因组研究, 揭示毛竹变型全基因组突变类型, 探究黄酮类和硝酸还原酶等代谢途径相关基因, 对解析毛竹丰富的遗传多样性以及性状相关的遗传变异具有重要意义。

本研究以黄皮毛竹等 4 个有代表性的竹秆变异毛竹变型为研究对象, 毛竹全基因组作为参考基因组, 采用高通量测序技术, 构建全基因组数据库, 并利用生物信息学的方法对获得的核酸序列组装, 检测并注释其单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNP)、结构变异 (structural variation, SV) 和小片段插入缺失 (insertion and deletion, InDel) 等, 注释变异基因功能, 积累基因组序列数据, 以便为从全基因组水平上深入地分析毛竹的遗传变异, 为遗传育种提供遗传基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料选自国际竹藤中心安徽太平试验中心种质资源圃。选取 4 个毛竹变型 (表 1) 适量新鲜幼嫩的叶片, 经液氮罐中速冻后, 放入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存备用。

1.2 方法

1.2.1 基因组测序 毛竹变型叶片 DNA 提取 (Zidani et al., 2005) 后, 经过打断、损伤修复及连接接头、PCR 富集、文库质量检测, 建成测序文库,

表 1 四个毛竹变型样品简表
Table 1 Brief introduction of four
variant samples of Moso bamboo

编号 ID	变型 Variant	拉丁名 Latin name	形态特征 Morphological characteristics
R01	黄皮毛竹	<i>Phyllostachys edulis</i> <i>f. holochrysa</i>	秆和枝金黄色 Culms and branches golden yellow
R02	金丝毛竹	<i>P. edulis f. gracilis</i>	竹株小, 秆壁较厚, 基 部的节间较长 Height short, culm walls thick, basal internodes longer
R03	绿皮花毛竹	<i>P. edulis f.</i> <i>nabeshimana</i>	秆绿色, 但节间有淡黄 色细纵条纹 Culms green, internodes with light yellow strips
R04	花毛竹	<i>P. edulis</i> <i>f. huamozhu</i>	秆黄色, 有宽窄不等的 绿色纵条纹 Culms yellow with green strips

在 Illumina HiSeq 2500 测序平台上运行获得原始数据, 将数据过滤后得到高质量数据。

1.2.2 比对统计 使用 BWA 软件 (Li & Durbin, 2009) 将测序数据比对定位到已测序的毛竹基因组的位置, 统计测序深度和基因组覆盖度等信息。

1.2.3 检测 SNP、InDel 和 SV 使用 Picard 软件 (Gordon et al., 2012) 去重复和 GATK 软件 (McKenna et al., 2010) 预处理后, 检测 SNP 和 InDel 变异。使用 BreakDancer 软件 (Chen et al., 2009) 检测 SV 变异, 具体方法参照牟少华等 (2020)。

1.2.4 注释 SNP、InDel 和 SV 运用 SnpEff 软件 (Cingolani et al., 2012) 注释 SNP、InDel 和 SV, 具体方法参照牟少华等 (2020)。

1.2.5 注释功能基因 运用 BLAST 软件, 对筛选得到的功能可能变异基因的基因序列与 GO (Ashburner et al., 2000)、COG (Tatusov et al., 2000) 和 KEGG (Minoru et al., 2004) 三大功能数据库, 进行 BLAST 比对, 得到基因注释。

2 结果与分析

2.1 与毛竹基因组比对

4 个竹种通过高通量测序得到测序数据。金丝毛竹样品 (R02) 过滤后的 Clean Reads 最少, 为

82 276 884 bp; 花毛竹样品 (R04) 的 Clean Reads 最多, 为 112 054 728 bp。定位到毛竹参考基因组的占有 Clean Reads 数的百分比在 99.45% 以上, 双端均定位到毛竹参考基因组上并且距离符合测序片段的长度分布的占有 Clean Reads 数的百分比在 88% 左右, 说明参考基因组选择合适, 且相关实验过程不存在污染, 测序 Reads 的比对率会高于 70%。另外, 比对率的 4 个毛竹变型与毛竹参考基因组亲缘关系较近、基因组组装质量高, 而且 Reads 测序质量高。4 个样品平均覆盖深度均在 10× 左右 (表 2)。

2.2 SNP 的检测与注释

2.2.1 SNP 检测 4 个毛竹样品检测后获得 SNP 位点统计表 (表 3)。其中, 花毛竹样品 (R04) 的 SNP 数量最多, 为 1 691 715; 绿皮花毛竹样品 (R03) 的 SNP 数量最少, 为 1 534 648。4 个样品中, 转换类型 (transition, Ti) SNP 数量与颠换类型 (transversion, Tv) SNP 数量的比值 Ti/Tv 在 3.05~3.10 之间, 说明这些毛竹变型转换比颠换更容易发生。杂合类型 (heterozygosity, Het) SNP 数量为纯合类型 (homozygosity, Homo) SNP 数量的 10 倍左右, 杂合比率为 88.53%~92.01%。其中, 花毛竹样品 (R04) 杂合比率最高, 为 92.01%, 说明其杂合程度最高。绿皮花毛竹样品 (R03) 杂合比率最低, 为 88.53%。

根据 4 个毛竹样品与参考基因组的比对结果, 汇总样品间 SNP 的统计结果见表 4, 表中各数值为对应的横纵两样品之间的 SNP 数。从表中可以看出, 金丝毛竹 (R02) 与绿皮花毛竹样品 (R03) 间的 SNP 数最多。

2.2.2 SNP 注释 对 4 个样品 SNP 进行注释, 获得其变异位点发生的区域或类型 (图 1)。4 个毛竹变型发生在编码区 (coding sequence, CDS) 区域内的 SNP 数量占比均为 2% 左右, 其中同义突变占 48% 左右, 非同义突变占 51% 左右。非同义突变率与同义突变率的比值大于 1, 预示着有正向选择效应。

2.3 InDel 检测与注释

2.3.1 InDel 检测 对 4 个毛竹变型 InDel 进行统计 (表 5), 可以发现 4 个样品全基因组范围检测出的 InDel 总数范围为 271 648~292 253, 其中插入类型的突变总数略低于缺失突变总数; 编码区检测出的 InDel 总数为 4 711~4 877, 其中插入突变总数为缺失突变的 67% 左右。各样品中, 全基因

表 2 四个样品数据产出统计表
Table 2 Output statistics among four samples

编号 ID	过滤后的 Clean Reads (bp)	定位比 Mapped (%)	双端定位比 Properly mapped (%)	覆盖深度 Ave_depth	覆盖度 Cov_ratio_1X (%)	覆盖度 Cov_ratio_5X (%)	覆盖度 Cov_ratio_10X (%)
R01	103 490 495	99.6	88.91	11	97.02	80.74	55.11
R02	82 276 884	99.45	88.03	9	97.22	78.74	46.89
R03	83 316 245	99.50	87.92	9	95.40	71.64	44.06
R04	112 054 728	99.49	89.21	13	97.25	85.40	64.55

表 3 四个样品 SNP 位点统计表
Table 3 SNP loci statistics in four samples

编号 ID	SNP	转换 Transition (Ti)	颠换 Transversion (Tv)	转换/颠换 Ti/Tv	杂合 Het	纯合 Homo	杂合比率 Het-ratio (%)
R01	1 628 624	1 227 674	400 950	3.06	1 476 422	152 202	90.65
R02	1 601 748	1 207 308	394 440	3.06	1 444 235	157 513	90.16
R03	1 534 648	1 161 232	373 416	3.10	1 358 770	175 878	88.53
R04	1 691 715	1 274 890	416 825	3.05	1 556 713	135 002	92.01

表 4 四个样品间的 SNP 统计表

Table 4 Summary of SNPs detected between four samples

编号 ID	R01	R02	R03	R04
R01	0			
R02	598 973	0		
R03	608 671	616 986	0	
R04	558 357	587 035	604 473	0

组范围内纯合突变数约为杂合突变数的 2 倍,编码区纯合突变数略低于杂合突变数。

对 4 个样品各区域的 InDel 长度进行统计发现,编码区存在较多的+1、-1、+ 3、-3 类型突变,而基因组范围存在较多的+1、-1、+ 2、-2 类型突变。其中,数值代表 InDel 的长度(10 bp 以内);大于 0 为插入;小于 0 为缺失。

将 4 个样品的 InDel 进行两两比较,统计结果见表 6。表中各数值为对应的横纵两样品之间的 InDel 数。

2.3.2 InDel 注释 对比毛竹参考基因组的基因、CDS 位置等信息,注释各样品 InDel 位点的发生位置以及是否为移码突变等,具体注释结果如图 2

所示。4 个毛竹变型发生在编码区的 InDel 数量均在 1.7%左右。移码突变的 InDel 有可能会引起基因功能的改变。

2.4 SV 检测与注释

2.4.1 SV 检测 检测 4 个样品与参考基因组间的插入(insertion, INS)、缺失(deletion, DEL)、反转(inversion, INV)、染色体内部易位(intra-chromosome translocation, ITX)、染色体间易位(inter-chromosomal translocation, CTX),得到的各类型 SV 数量统计见表 7。其中,4 个毛竹变型都表现为缺失类型的 SV 数量最多,其次为染色体内部易位类型。

2.4.2 SV 注释 检测 4 个样品 SV 发生位置信息,并对缺失、插入和反转 3 种类型的结构变异进行注释。结果表明,4 个毛竹变型在各区域分布的 SV 总体情况一致,注释到的变异基因数目以基因间区的缺失类型最多,其次为基因间区的插入类型(表 8)。

2.5 变异基因功能注释与分析

2.5.1 变异基因挖掘 分别统计 4 个样品的非同义突变的 SNP 以及 CDS 区发生 InDel 和 SV 的基因(表 9),寻找可能存在功能变异的基因。在 4 个毛竹样品中,花毛竹(R04)基因组存在 12 555 个基

表 5 四个样品 InDel 统计表

Table 5 Summary of InDels detected in four samples

编号 ID	编码区 CDS					基因组 Genome				
	插入 Insertion	缺失 Deletion	杂合 Het	纯合 Homo	总数 Total	插入 Insertion	缺失 Deletion	杂合 Het	纯合 Homo	总数 Total
R01	2 991	1 727	2 546	2 172	4 718	139 538	143 229	94 439	188 328	282 767
R02	3 007	1 729	2 568	2 168	4 736	139 023	142 221	94 810	186 434	281 244
R03	2 996	1 715	2 572	2 139	4 711	134 641	137 007	96 117	175 531	271 648
R04	3 071	1 806	2 553	2 324	4 877	144 687	147 566	92 976	199 277	292 253

表 6 毛竹变型间的 InDel 统计表

Table 6 Summary of InDels detected between variants of Moso bamboo

编号 ID	R01	R02	R03	R04
R01	0			
R02	86 523	0		
R03	87 700	88 813	0	
R04	80 450	83 204	86 660	0

因变异,其中,非同义突变 SNP 基因为 5 563 个, InDel 基因为 4 006 个,SV 突变的基因为 2 986 个,差异基因总数和 SV 突变基因数最多。在 3 类变异基因中,非同义突变 SNP 基因数最多,InDel 基因数量次之,SV 突变的基因最少。

2.5.2 变异基因的功能注释 黄皮毛竹、金丝毛竹、绿皮花毛竹和花毛竹注释到数据库中的变异基因数分别为 7 575、7 538、7 476 和 7 728。变异基因 GO 分类统计结果图(图 3)中,显示出在 3 大基因功能分类体系(分子功能、细胞组件和生物过程)的 56 个分类内容中所对应的基因数和基因占比。其中,在细胞组件分类中,与叶绿素合成相关的基因有 2 431 个;在生物过程分类中,参与类胡萝卜素合成过程的基因有 75 个;在分子功能分类中,与花青素合成调控以及紫外光下组织中花青素积累的相关基因有 80 个。4 个毛竹变型在相应的基因功能中的变异基因数目有差异,例如:花毛竹有 21 个与类胡萝卜素合成相关的基因;绿皮花毛竹有 17 个相关基因;而黄皮毛竹有 18 个相关基因,基因数量和种类的差异,可能引起相应的功能变化。深入研究叶绿素、类胡萝卜素和花青素合成相关基因以及这些差异基因的调控途径,有利于从 DNA 水平上解释秆色的变异。

变异基因 COG 注释分类图(图 4)直观显示出 COG 功能分类条目上分别对应的频率,其中涉及到功能注释、转录、复制重组修复和信号转导机制的对应数值高。获得的功能注释基因为 1 630 个,参与复制、重组和修复的基因数为 369 个,信号转导机制的基因数为 291 个,转录的相关基因为 222 个。

KEGG 数据库系统地分析 4 个毛竹变型的基因产物在生物学过程中的功能。以黄皮毛竹(R01)的缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成通路为例(图 5),注释到 57 个基因参与该通路,其中 23 个变异基因。整个通路涉及不同的酶连接一系列生化反应形成,其中,框内的数字代表 enzyme 的号码,红色的框代表通路相关变异基因。

3 讨论

全基因组重测序可以在已知植物的基因组序列基础上,对其不同品种的基因组序列进行测序,从而找出个体与该物种间的差异性(Ley et al., 2008)。随着毛竹全基因组序列的公开发表(Peng et al., 2013),研究毛竹不同变种或变型基因组序列差异成为可能。全基因组重测序可以检测个体的全部基因组序列,扫描出一些与该个体生长性状密切相关的变异位点(宋志芳等,2017)。毛竹的地下茎中单轴散生,其不同变异类型也都是散生竹。在毛竹自身的遗传基因漂移,以及长期的栽培措施和自然环境变迁等因素的影响下,毛竹种内产生了很多遗传变异,产生各种独特的结构形态,表现出丰富的园林观赏性状。其中,黄皮毛竹、花毛竹、绿皮花毛竹在竹秆颜色方面表现出不同程度的变异,使其具有更高的园林观赏价值。

表 7 四个样品 SV 数量统计

Table 7 Quantity statistics of SVs detected in four samples

编号 ID	总数 Total	插入 Insertion	缺失 Deletion	反转 Inversion	染色体内部易位 Internal chromosomal translocation	染色体间易位 Translocation between chromosomes	其他 Other
R01	83 901	17 212	33 078	2 346	4 853	26 262	150
R02	77 275	15 183	32 946	1 499	4 735	22 789	123
R03	80 479	18 020	31 706	2 000	4 676	23 947	130
R04	89 754	19 541	34 613	1 166	5 133	29 142	159

表 8 四个毛竹变型 SV 注释结果统计表

Table 8 SV annotations in four variants of Moso bamboo

编号 ID	外显子区 Exon			内含子区 Intron			基因间区 Intergenic		
	缺失 Deletion	插入 Insertion	反转 Inversion	缺失 Deletion	插入 Insertion	反转 Inversion	缺失 Deletion	插入 Insertion	反转 Inversion
R01	2 258	837	237	961	389	66	29 859	15 986	2 043
R02	2 129	707	176	990	333	42	29 827	14 143	1 281
R03	2 114	953	205	942	427	44	28 650	16 640	1 751
R04	2 303	968	193	984	437	30	31 326	18 136	943

表 9 四个毛竹变型的变异基因统计表

Table 9 Summary of mutant genes in
four variants of Moso bamboo

编号 ID	非同义突变 SNP 基因 Gene with non- synonymous SNP	插入缺失 基因 Gene with InDel	SV 基因 Gene with SV	总数 Total
R01	5 405	3 905	2 903	12 213
R02	5 344	3 920	2 659	11 923
R03	5 313	3 899	2 870	12 082
R04	5 563	4 006	2 986	12 555

对 4 个毛竹变异类型全基因组重测序,初步统计分析了其基因组数据,与毛竹参考基因组进行比对,检测其 SNP、InDel 和 SV。SNP 类型的变异分为转换和颠换两种,4 个毛竹样品的转换/颠换(Ti/Tv)的比值均约等于 3,说明转换类型比颠换类型更容易发生。SNP 杂合比例约为 90%,说明样品有很高的杂合度,即同源染色体上 SNP 位点含不同类型的碱基比例高。InDel 位点数同样

能反映不同样品与毛竹基因组之间的差异,并且编码区的 InDel 会引起移码突变,影响基因功能。SV 中缺失、插入、反转、易位 4 种类型的数量,反映出基因组水平上大片段的缺失、插入、倒置、易位等序列差异。通过生物信息学分析,比较不同秆色的变异类型在全基因组水平上的结构差异,并进行差异注释,从而为毛竹选育提供遗传基础,也为重要基因的功能研究提供有利依据。

颜色变异是植物中较常见的表型变异,其中关于水稻、拟南芥、菊花等多种植物均有叶色变异的报道。据不完全统计,水稻叶绿体含量基因超过 140 个(赵绍路等,2018)。竹子中的色素分为 3 大类:叶绿素、花青素和类胡萝卜素。通过功能数据库比对,对 4 个毛竹变型的变异基因,进行基因功能注释和分析。GO 数据库注释聚类反映了毛竹变型在不同功能组分类中基因数目和基因产物的属性,其中与秆色变异有关的叶绿素、类胡萝卜素和花青素等色素合成相关基因作为重点关注对象进行分析。COG 数据库注释了基因产物的直系同源分类,不同分类对应的基因数目差别很大,反映了不同条件下的生理或者代谢偏好等。KEGG

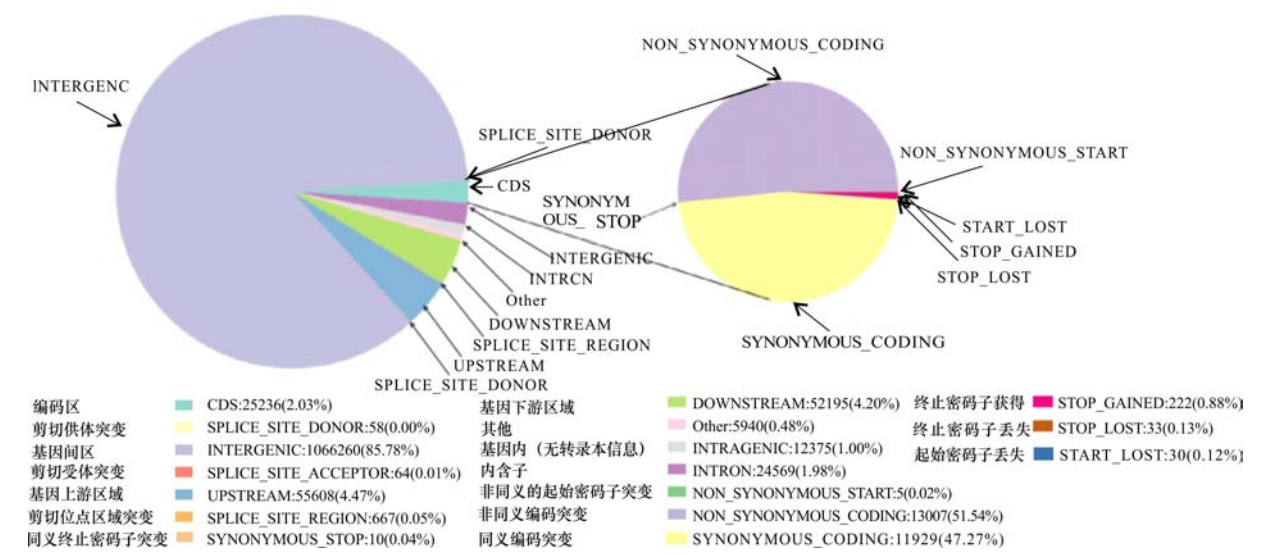


图 1 黄皮毛竹(R01)的 SNP 注释图

Fig. 1 SNP annotations pie of *Phyllostachys edulis* f. *holochrysa* (R01)

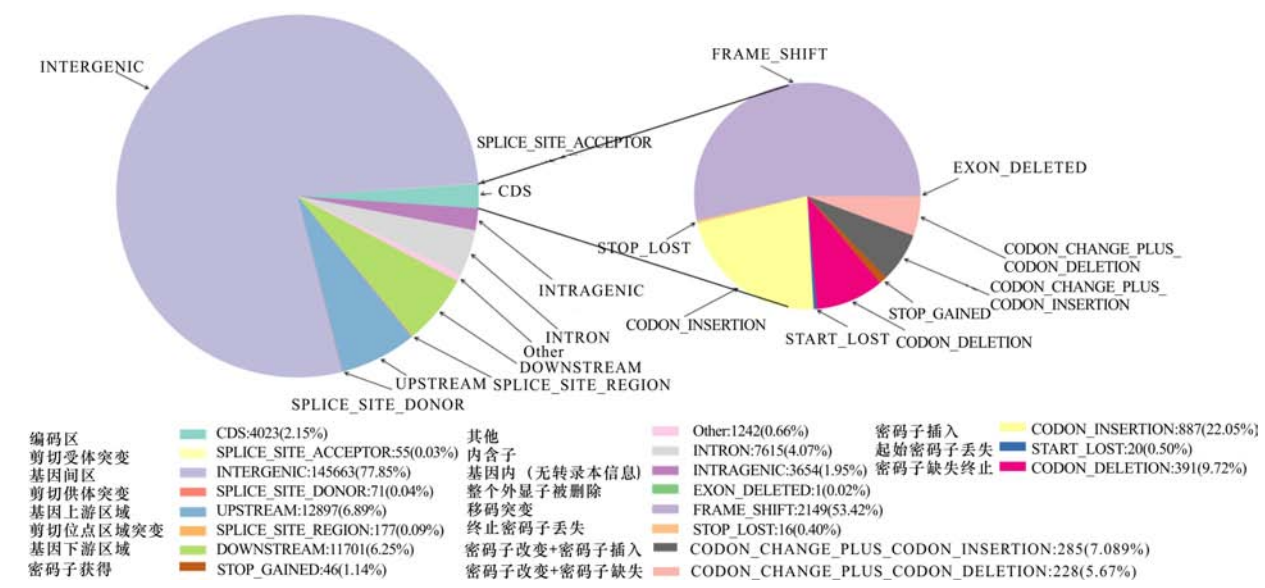


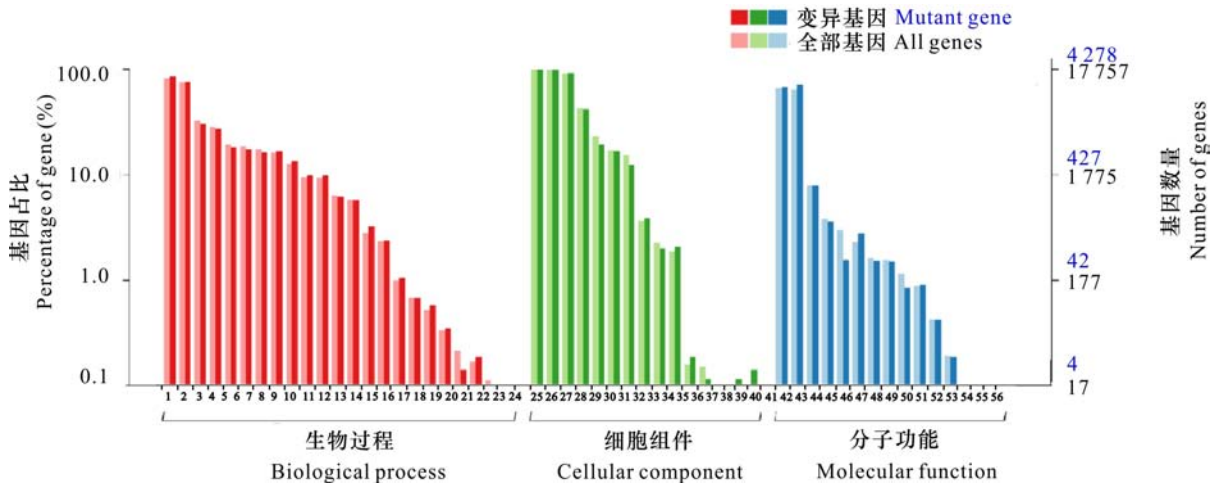
图 2 黄皮毛竹(R01) InDel 注释图

Fig. 2 InDel annotations pie of *Phyllostachys edulis* f. *holochrysa* (R01)

数据库将基因和多种酶形成通路,有氨基酸生物合成、类胡萝卜素生物合成、类黄酮生物合成、萜类化合物的生物合成、植物激素信号转导、参与吡啶和叶绿素代谢等显著富集。其中,叶绿体、类胡萝卜素和花青素等色素合成相关通路,是与秆颜色相关的主要代谢通路。

结合不同秆色毛竹变型的生物学和生理学特性,研究全基因组序列色素合成相关基因,有助于

从基因水平上解析其秆色变异原因。有研究表明,毛竹不同变异类型在叶绿素含量、 β 胡萝卜素含量等生理指标中存在显著性差异(陈建华等,2011),株型较大的花毛竹生理指标值比较小型的龟甲竹、绿槽毛竹大(晏育存,2011)。毛竹变型ISSR和AFLP分子标记分析表明,变型间的遗传变异程度较小(阮晓赛,2008)。在参考黄槽毛竹和黄皮花毛竹两个秆色变异毛竹变型的研究结果



横坐标为 GO 的分类内容,纵坐标的左侧为基因数占比,右侧为基因数量。1. 代谢过程; 2. 细胞过程; 3. 对刺激的反应; 4. 生物调节; 5. 定位; 6. 定位确立; 7. 细胞组成或生物形成; 8. 分化过程; 9. 多细胞生物过程; 10. 繁殖; 11. 生殖过程; 12. 信号; 13. 多组织过程; 14. 生长; 15. 免疫系统过程; 16. 死亡; 17. 细胞增殖; 18. 生物粘附; 19. 节律过程; 20. 病毒繁殖; 21. 色素沉着; 22. 运动; 23. 细胞死亡; 24. 碳利用; 25. 细胞部分; 26. 细胞; 27. 细胞器; 28. 膜; 29. 细胞器部分; 30. 膜部分; 31. 高分子复合物; 32. 细胞外区域; 33. 膜内腔; 34. 细胞连接; 35. 细胞外基质; 36. 类核; 37. 病毒粒子; 38. 细胞外基质部分; 39. 细胞外区部分; 40. 病毒粒子部分; 41. 绑定; 42. 催化活性; 43. 运输活动; 44. 核酸结合转录因子活性; 45. 结构分子活性; 46. 电子载体活性; 47. 酶调节活性; 48. 活动分子传感器; 49. 抗氧化活性; 50. 受体活性; 51. 蛋白结合转录因子活性; 52. 营养库活性; 53. 翻译调节活性; 54. 金属伴侣活性; 55. 蛋白质标记; 56. 通道调节活性。

Abscissa is GO classification, the left side of the ordinate is the percentage of genes, and the right side is the number of genes. 1. Metabolic process; 2. Cellular process; 3. Response to stimulus; 4. Biological regulation; 5. Localization; 6. Establishment of localization; 7. Cellular component organization or biogenesis; 8. Developmental process; 9. Multicellular organismal process; 10. Reproduction; 11. Reproductive process; 12. Signaling; 13. Multi-organism process; 14. Growth; 15. Immune system process; 16. Death; 17. Cell proliferation; 18. Biological adhesion; 19. Rhythmic process; 20. Viral reproduction; 21. Pigmentation; 22. Locomotion; 23. Cell killing; 24. Carbon utilization; 25. Cell part; 26. Cell; 27. Organelle; 28. Membrane; 29. Organelle part; 30. Membrane part; 31. Macromolecular complex; 32. Extracellular region; 33. Membrane-enclosed lumen; 34. Cell junction; 35. Extracellular matrix; 36. Nucleoid; 37. Virion; 38. Extracellular matrix part; 39. Extracellular region part; 40. Virion part; 41. Binding; 42. Catalytic activity; 43. Transporter activity; 44. Nucleic acid binding transcription factor activity; 45. Structural molecule activity; 46. Electron carrier activity; 47. Enzyme regulator activity; 48. Molecular transducer activity; 49. Antioxidant activity; 50. Receptor activity; 51. Protein binding transcription factor activity; 52. Nutrient reservoir activity; 53. Translation regulator activity; 54. Metallochaperone activity; 55. protein tag; 56. Channel regulator activity.

图 3 黄皮毛竹 (R01) 变异基因的 GO 注释分类图

Fig. 3 Classification of *Phyllostachys edulis* f. *holochrysa* (R01) mutant genes compared with GO database by BLAST

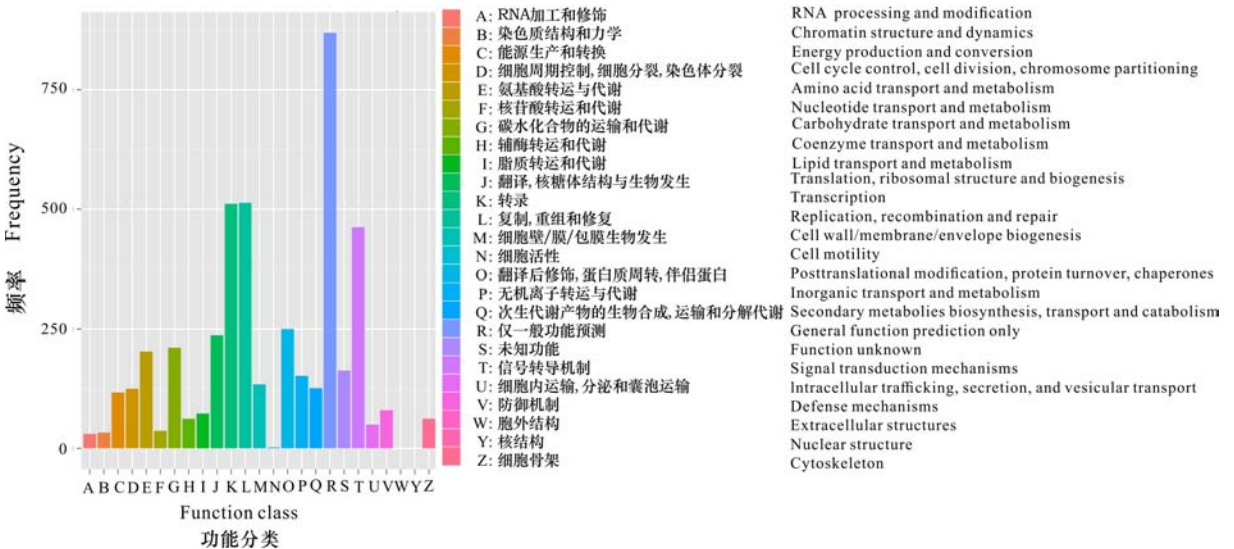


图 4 黄皮毛竹 (R01) 变异基因的 COG 注释分类图

Fig. 4 Classification of *Phyllostachys edulis* f. *holochrysa* (R01) mutant genes compared with COG database

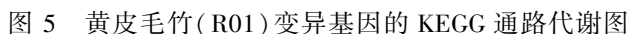


Fig. 5 Pathway of *Phyllostachys edulis* f. *holochrysa* (R01) mutant genes compared with KEGG database by BLAST

4 结论

采用第二代高通量重测序技术,对4个毛竹变型材料进行全基因组重测序研究,对其单核苷多态性、小片段插入缺失和结构变异进行分析和注释,筛选可能发生功能变异的基因。将变异基因与GO、COG、KEGG等功能数据库进行比对,每样品都有7 000多个变异基因得到功能注释。GO注释分类包括细胞组件、分子功能和生物过程3个基因功能分类体系的56个功能组,在细胞组件分类中,叶绿素合成相关基因有2 431个;在生物过程

分类中,参与类胡萝卜素合成过程的基因有 75 个;在分子功能分类中,参与花青素合成调控以及紫外光下组织中花青素积累的相关基因有 80 个。COG 分类表明参与复制、重组和修复的基因数为 369 个,信号转导机制的基因数为 291 个,转录的相关基因为 222 个。通过 KEGG 数据库系统地分析变异基因参与的黄酮类、类胡萝卜素等物质代谢合成途径。后续数据的深入分析将解析不同变异类型的基因家族和基因功能,初步阐释不同竹秆变异毛竹变型的分子遗传基础。

参考文献:

ASHBURNER M, BALL C, BLAKE J, et al., 2000. Gene Ontology: tool for the unification of biology [J]. *Nat Genet*, (25):25-29.

BAI H, CAO YH, QUAN JZ, et al., 2013. Identifying the genome-wide sequence variations and developing new molecular markers for genetics research by resequencing a landrace cultivar of foxtail millet [J]. *PLoS One*, 8(9): 274-275.

BAI QS, HOU D, LI L, et al., 2016. Genome-wide analysis and expression characteristics of smallauxin-up RNA (SAUR) genes in Moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) [J]. *Genome*, 60(4): 325-336.

CHEN DM, CHEN Z, WU M, et al., 2017. Genome-wide identification and expression analysis of the HD-Zip gene family in Moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) [J]. *J Plant Growth Regul*, 36(2): 323-337.

CHEN JH, YAN CY, WANG YM, et al., 2011. Physiological characteristics of 6 different variation type bamboo's leaves [J]. *J Centr S Univ For Technol*, 31(4):70-73. [陈建华, 晏存育, 王艳梅, 等, 2011. 6 种不同变异类型毛竹叶片的生理特性研究 [J]. 中南林业科技大学学报, 31(4): 70-73.]

CHEN K, WALLIS JW, MCLELLAN L, et al., 2009. BreakDancer: an algorithm for high-resolution mapping of genomic structural variation [J]. *Nat Meth*, 6(9): 677-681.

CINGOLANI P, PLATTS A, WANG LL, et al., 2012. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3 [J]. *Fly*, 6(2): 80-92.

GORDON PMK, DIMNIK L, LAMONT R, et al., 2012. Optimizing genotype quality metrics for individual exomes and cohort analysis [J]. *BMC Proc*, 6: 21-22.

JEREMY S, CANNON SB, JESSICA S, et al., 2010. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean [J]. *Nature*, 463(7278): 178-183.

JIA XP, ZHANG B, QUAN JZ, et al., 2019. Genome-wide association analysis of plant height in foxtail millet under different photoperiod conditions [J]. *Acta Agric Boreal-Sin*, 34(4): 16-23. [贾小平, 张博, 全建章, 等, 2019. 不同光周期条件下谷子株高的全基因组关联分析 [J]. 华北农学报, 34(4): 16-23.]

JIANG ZH, 2002. Bamboo and rattan in the world [M]. Shenyang: Liaoning Science and Technology Press: 3-5. [江泽慧, 2002. 世界竹藤 [M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社: 3-5.]

LEY TJ, MARDIS ER, DING L, et al., 2008. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome [J]. *Nature*, 456(7218): 66-72.

LI H, DURBIN R, 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform [J]. *Bioinformatics*, 25(14): 1754-1760.

LIN T, ZHU GT, ZHANG JH, et al., 2014. Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding [J]. *Nat Genet*, 46(11): 1220-1226.

LIU J, CHENG ZC, GAO J, 2019. Expression analysis and regulation network identification of the *CONSTANS-Like* gene family in Moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) under photoperiod treatments [J]. *DNA Cell Biol*, 6: 17-18.

MA NX, LAI GH, ZHANG PX, et al., 2014. The genus *Phyllostachys* in China [M]. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Press: 92-107. [马乃训, 赖广辉, 张培新, 等, 2014. 中国刚竹属 [M]. 杭州: 浙江科学技术出版社: 92-107.]

MCKENNA A, HANNA M, BANKS E, et al., 2010. The genome analysis toolkit: A map reduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data [J]. *Genom Res*, 20(9): 1297-1303.

MINORU K, SUSUMU G, SHUICHI K, et al., 2004. The KEGG resource for deciphering the genome [J]. *Nucl Acid Res*, 32(22): 277-280.

MU SH, LI XP, LI J, et al., 2020. Analysis on the culm shape and color variation of 4 Moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) variants by whole genome re-sequencing [J]. *Huabei Acta Agric Boreal-Sin*, 35(4): 1-8. [牟少华, 李雪平, 李娟, 等, 2020. 全基因组重测序分析 4 个毛竹变型的秆形和秆色变异 [J]. 华北农学报, 35(4): 1-8.]

PAN F, WANG Y, LIU HL, et al., 2017. Genome-wide identification and expression analysis of *SBP*-like transcription factor genes in Moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) [J]. *BMC Genom*, 18(1): 486-489.

PENG ZH, LU Y, LI LB, et al., 2013. The draft genome of the fast-growing non-timber forest species Moso bamboo (*Phyllostachys heterocycla*) [J]. *Nat Genet*, 45(4): 456-461.

QI X, LI MW, XIE M, et al., 2014. Identification of a novel salt tolerance gene in wild soybean by whole-genome sequencing [J]. *Nat Comm*, 5: 4340-4342.

SONG ZF, LU CL, CAO HZ, 2017. Research progress on whole

- genome resequencing in animal breeding [J]. Anim Husb Vet Med, 49(11): 145–148 [宋志芳, 芦春莲, 曹洪战, 2017. 全基因组重测序及其在动物育种的研究进展 [J]. 畜牧与兽医, 49(11): 145–148.]
- SUN HY, LI LC, LOU YF, et al., 2016. Genome-wide identification and characterization of aquaporin gene family in Moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) [J]. Mol Biol Rep, 43(5): 437–441.
- TAKAGI H, ABE A, YOSHIDA K, et al., 2013. QTL-seq: rapid mapping of quantitative trait loci in rice by whole genome resequencing of DNA from two bulked populations [J]. Plant J, 74(1): 174–183.
- TATUSOV RL, GALPERIN MY, NATALE DA, et al., 2000. The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution [J]. Nucl Acid Res, 28(1): 33–36.
- WU HL, LV H, LI L, et al., 2015. Genome-wide analysis of the AP2/ERF transcription factors family and the expression patterns of DREB genes in Moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) [J]. PLoS ONE, 10(5): e0126657.
- XIE LH, LI XY, HOU D, et al., 2019. Genome-wide analysis and expression profiling of the heat shock factor gene family in *Phyllostachys edulis* during development and in response to abiotic stresses [J]. Forests, 10(2): 100–105.
- YAN CY, 2011. Different variation type's bamboo with bamboo biology physiology characteristic [D]. Changsha: Central South University of Forestry & Technology: 39–43. [晏育存, 2011. 毛竹不同变异类型的生物学与生理学特性研究 [D]. 长沙: 中南林业科技大学: 39–43.]
- YIN YP, DING QJ, LUO JW, et al., 2021. Genomic sequencing analysis of *Magonolia officinalis* based on Pacbio's third-generation sequencing technology [J]. Guihaia, 41(8): 1251–1262. [尹彦棚, 丁乔娇, 罗加伟, 等, 2021. 基于 Pacbio 第三代测序技术的厚朴基因组测序分析 [J]. 广西植物, 41(8): 1251–1262.]
- YUAN XS, 2008. Genetic variations of *Phyllostachys edulis* provenance and cultivars by ISSR and AFLP [D]. Hangzhou: Zhejiang Forestry College: 30–31. [阮晓赛, 2008. 毛竹种源及栽培变种遗传变异的 AFLP 和 ISSR 分析 [D]. 杭州: 浙江林学院: 30–31.]
- ZHANG SP, QIU SL, ZHENG YY, et al., 2017. The purple *Abelmoschus esculentus* transcriptome as a source for gene sequence information [J]. J Nucl Agric Sci, 15(4): 643–653. [张少平, 邱珊莲, 郑云云, 等, 2017. 紫色黄秋葵转录组功能基因测序及分析 [J]. 核农学报, 15(4): 643–653.]
- ZHANG YW, LI W, ZHANG LF, et al., 2016. Genome-wide variations of soybean cultivar Qihuang 34 by whole genome resequencing [J]. Chin J Oil Crop Sci, 38(2): 150–158. [张彦威, 李伟, 张礼凤, 等, 2016. 基于重测序的大豆新品种齐黄 34 的全基因组变异挖掘 [J]. 中国油料作物学报, 38(2): 150–158.]
- ZHAO SL, LIU K, WAN BJ, et al., 2018. Advances in research on rice leaf color mutants [J]. Barley Cereal Sci, 35(6): 1–6. [赵绍路, 刘凯, 宛柏杰, 等, 2018. 水稻叶色突变研究进展 [J]. 大麦与谷类科学, 35(6): 1–6.]
- ZHOU ZK, JIANG Y, WANG Z, et al., 2015. Resequencing 302 wild and cultivated accessions identifies genes related to domestication and improvement in soybean [J]. Nat Biotechnol, 33(4): 408–414.
- ZIDANI S, FERCHICHI A, CHAIEB M, 2005. Genomic DNA extraction method from pearl millet (*Pennisetum glaucum*) leaves [J]. Afr J Biotechnol, 4(8): 862–866.

(责任编辑 李 莉)

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202009020

张敏, 尹彦棚, 周罗静, 等. 三种厚朴叶绿体基因组的比较研究 [J]. 广西植物, 2022, 42(8): 1394–1401.

ZHANG M, YIN YP, ZHOU LJ, et al. Comparative study on chloroplast genomes of three *Magnolia* species [J]. *Guihaia*, 2022, 42(8): 1394–1401.



三种厚朴叶绿体基因组的比较研究

张 敏¹, 尹彦棚¹, 周罗静¹, 任 波¹, 王 丽², 时小东³, 侯飞侠¹, 彭 成¹, 高继海^{1*}

(1. 成都中医药大学 药学院 西南特色中药资源国家重点实验室, 成都 611137;

2. 四川省林业科学研究院, 成都 610065; 3. 成都大学, 成都 610106)

摘 要: 为了深入发掘日本厚朴、厚朴、凹叶厚朴叶绿体基因组差异, 筛选厚朴优良性状候选基因, 开展三种厚朴的分子遗传研究, 该文利用 Illumina HiSeq 高通量测序平台首次对日本厚朴叶绿体进行测序、组装, 并与已有的厚朴、凹叶厚朴叶绿体基因组共同注释, 获得三个物种叶绿体基因图谱, 筛选出三个基因组中的差异基因, 又与同科中 11 个亲缘物种进行叶绿体基因组比对, 构建 NJ 遗传树。结果表明: (1) 日本厚朴叶绿体基因组的 Clean Reads 为 19 791 019, Q30 为 91.33%, 组装后基因组全长 160 051 bp, GC 含量为 39.2%, 含 tRNA 37 个, rRNA 8 个。(2) 比对分析发现三种厚朴具有相似的 IR、LSC 和 SSC 结构, 以及 GC 含量和 tRNA 数量, 但编码基因种类和数量、内含子和外显子的数量和结构等存在差异。(3) 日本厚朴的功能基因数目较厚朴、凹叶厚朴分别多 6 个和 4 个, 主要分布于 LSC 区和 IR 区, 涉及核糖体大亚基、核糖体小亚基和未知功能基因类群。(4) 系统发育分析结果进一步显示日本厚朴与凹叶厚朴亲缘关系较近, 其次是厚朴。该研究表明日本厚朴具有更丰富的叶绿体基因组结构、组成和变异特征, 是其适应高纬度地区弱光、低温环境的分子机制, 这为厚朴类优良品种的分子选育提供有力的指导。

关键词: 厚朴, 凹叶厚朴, 日本厚朴, 叶绿体基因组, 系统发育树

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2022)08-1394-08

Comparative study on chloroplast genomes of three *Magnolia* species

ZHANG Min¹, YIN Yanpeng¹, ZHOU Luoqing¹, REN Bo¹, WANG Li²,

SHI Xiaodong³, HOU Feixia¹, PENG Cheng¹, GAO Jihai^{1*}

(1. Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of Distinctive Chinese Medicine Resources in Southwest China, Chengdu 611137, China; 2. Sichuan Academy of Forestry Sciences, Chengdu 610065, China; 3. Chengdu University, Chengdu 610106, China)

收稿日期: 2021-05-20

基金项目: “杏林学者”学科人才提升计划 (QNXZ2018017, QNXZ2019001); 四川省首批中医药学科建设重点项目 (药用植物学, 川中医药函 [2020] 84 号); 西南特色中药资源基因组学创新平台 (2020ZYD058) [Supported by “Xinglin Scholar” Discipline Talents Promotion Program (QNXZ2018017, QNXZ2019001); The First Key Project of Traditional Chinese Medicine Discipline Construction in Sichuan Province (Medicinal Botany, Sichuan Medical Han [2020] No. 84); Genomics Innovation Platform of Chinese Medicine Resources with Southwestern Characteristics (2020ZYD058)]。

第一作者: 张敏 (2002-), 主要从事中药资源与开发、种质资源研究, (E-mail) 515638246@qq.com。

通信作者: 高继海, 博士, 副教授, 主要从事中药资源与开发、种质资源研究, (E-mail) gaojihai@cdutcm.edu.cn。

Abstract: In order to investigate the good genes, cultivate the main superior cultivars and discover phylogenetic relationships of *Magnolia officinalis*, *M. officinalis* subsp. *biloba* and *M. hypoleuca*, we compared the differences among the cp (chloroplast) genomes of three *Magnolia* species and performed a phylogenetic tree of 14 species. Illumina HiSeq platform was used to sequence and assemble the cp genome of *M. hypoleuca*. Then the cp genomes of three *Magnolia* species were annotated by online platform and performed with three *Magnolia* species cp gene cycles. Moreover, the cp genomes of other 11 *Magnolia* species were downloaded from the NCBI database and phylogenetic tree of 14 all species cp genomes was constructed based on NJ method. The results were as follows: (1) Clean Reads of *M. hypoleuca* were 19 791 019, and Q30 was 91.33%. The total length of cp genome of *M. hypoleuca* was 160 051 bp, its GC content was 39.2%, including 37 tRNA and 8 rRNA. (2) Compared with the cp genome structures of three *Magnolia* species, three *Magnolia* species were found to have similar IR, LSC and SSC structures, GC content and tRNA number, but there were differences in the type and number of coding genes, the number and structure of introns and exons. (3) There were six and four more functional gene numbers of *M. hypoleuca* than the other two *Magnolia* species, respectively, which indicated that it had stronger viability, and the differential functional genes of three *Magnolia* species were mainly located in LSC region and IR region, involving large ribosomal subunits, small ribosomal subunits and unknown functional genes groups. (4) Based on NJ phylogenetic tree, *M. hypoleuca* was closely related to *M. officinalis* subsp. *biloba*, next to *M. officinalis*. In this study, *M. hypoleuca* has more abundant cp genome structure, composition and variation characteristics, which is the molecular mechanism of its adaptation to low light and low temperature environment in high latitude area. And it will also provide strong guidance for molecular breeding of excellent *Magnolia* varieties.

Key words: *Magnolia officinalis*, *Magnolia officinalis* subsp. *biloba*, *Magnolia hypoleuca*, chloroplast genome, phylogenetic tree

厚朴 (*Magnolia officinalis*)、凹叶厚朴 (*M. officinalis* subsp. *biloba*) 及日本厚朴 (*M. hypoleuca*) 均为木兰科药材两用经济林阔叶树种, 广泛分布于韩国、日本和中国等地区, 具有水土保持、绿化、美化环境和药用等多种应用价值 (彭梦婕, 2020)。目前三种厚朴的相关研究主要集中在化学成分、临床应用及资源调查等方面 (胥爱丽等, 2021)。然而, 日本厚朴非我国原产资源, 生长于相对低温环境中, 具备许多优于另两者的生物学性状, 如其耐寒能力相比于其他木兰属植物更强 (Kwon & Oh, 2015), 生长速度和成熟率都比同类植物更快, 尤其是在生长幼期, 以每年 60~90 cm 的速度成长 (Oguchi et al., 2017), 是解析和培育厚朴类物种优良性状的理想材料。然而, 日本厚朴的分子遗传学研究资料匮乏, 且三种厚朴的生长速度和抗寒能力差异的形成原因缺乏分子生物学机制研究, 进而影响了厚朴类优良品种的选育。

叶绿体是植物细胞中必不可少的细胞器, 在光合作用、固碳以及氨基酸的合成中起到重要作用, 其全基因组包含大量遗传信息, 结构高度保守, 被广泛应用于植物分子进化及系统发育研究, 并在药

用植物的遗传转化、基因工程和分子选育等方面发挥着重要作用 (赵祺等, 2021)。目前, 厚朴和凹叶厚朴已有叶绿体基因组报道, 而具有更多生物特性的日本厚朴却缺乏叶绿体基因组的研究。鉴于此, 本研究利用 Illumina HiSeq 高通量测序技术, 对日本厚朴进行了叶绿体基因组测序, 与既有的厚朴、凹叶厚朴叶绿体基因组比对, 筛选出了诸多差异的核苷酸序列, 破译三种厚朴之间的亲缘关系, 找出三种厚朴具有更强生长发育能力和耐寒性等功能的相关基因, 在一定程度上为以更强的生长速度和抗寒能力为优良性状的目标物种提供了依据。

1 材料与方法

1.1 材料及预处理

日本厚朴新鲜、幼嫩、健康的叶片于 2019 年 10 月 10 日采自四川省成都市温江区成都中医药大学药用植物园 (30°42' E, 103°49' N), 经国家中药种质资源库专家高继海副教授鉴定所有样品均来源于木兰科木兰亚属日本厚朴 (*Magnolia hypoleuca*)。三种厚朴的命名参考于中国植物物种

信息数据库 (<http://db.kib.ac.cn/>)。叶片使用无菌水擦拭干净,迅速冻存备用。凭证标本(馆藏序列号为 ZYC190910)保存于成都中医药大学中药传统文化博物馆。

叶绿体提取步骤如下:新鲜叶片于液氮中研磨后悬于一定量 A 液 ($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris, $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, $1.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Vc, 1.5% PVP, pH 3.6) 中,4 层纱布过滤,4 ℃ 下 200 g 离心 20 min ,取上清,加入常温缓冲液 B ($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris, $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, $1.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Vc, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT, 0.1% 牛血清蛋白 BSA, pH 8.0),常温静置,4 ℃ 下 $2\,000 \text{ g}$ 离心 10 min ,弃上清,叶绿体沉淀于 4 ℃ 保存备用。

1.2 叶绿体基因组提取和测序

针对叶绿体材料,采用改良的 CTAB 法 (Matthes et al., 2020) 分离提取 DNA。DNA 经检测合格后,先用超声波机械打断,再进行片段纯化、末端修复、3'端加 A、连接测序接头,进行 PCR 扩增形成测序文库,最后使用高通量测序平台 Illumina HiSeq PE150 进行测序。测序得到的原始测序序列 (Raw Reads),里面含有带接头的、低质量的 Reads,为了保证信息分析质量,对 Raw Reads 进行过滤、质控,得到 Clean Reads,用于后续信息分析。数据过滤的主要步骤如下:(1)去除带接头的 Reads;(2)过滤 N 含量超过 10% 的 Reads;(3)去除质量值低于 10 的碱基超过 50% 的 Reads。对过滤后的高质量数据随机抽取 2 000 条 Reads 数据,通过 BLAST 软件比对 NT 库检测样品是否受到污染。

1.3 叶绿体基因组的组装和注释

原始序列上传于国家生物信息中心数据库 (序列号 PRJCA004348)。先利用 Galaxy 在线平台 (<https://usegalaxy.org>) 对日本厚朴叶绿体基因组测序结果进行组装 (Yan et al., 2015),且下载厚朴 (*M. officinalis*, NC_020316) 和凹叶厚朴 (*M. officinalis* subsp. *biloba*, JN867581) 的叶绿体基因组 FASTA 文件,合并后作为日本厚朴的参考基因文件。再通过 CPGAVAS2 在线平台 (<http://www.herbalgenomics.org/cpgavas2>) 完成厚朴、凹叶厚朴、日本厚朴叶绿体基因组的注释。

1.4 聚类分析

除厚朴、凹叶厚朴外,又于 NCBI 数据库中下载荷花玉兰 (*Magnolia grandiflora*, JN867584)、星

花玉兰 (*Yulania stellata*, NC_039941)、望春玉兰 (*Y. biondii*, KY085894)、武当玉兰 (*Y. sprengeri*, JX280401)、玉灯玉兰 (*Y. denudata* 'Lamp', JN227740)、宝华玉兰 (*Y. zenii*, MH607378)、紫玉兰 (*Y. liliiflora*, JX280397)、天女木兰 (*Oyama sieboldii*, NC_041435)、云南拟单性木兰 (*Parakmeria yunnanensis*, KF753638)、鹅掌楸 (*Liriodendron chinense*, NC_030504)、北美鹅掌楸 (*L. tulipifera*, NC_008326) 共 11 种木兰科植物的叶绿体基因组数据,其中包括 2 种鹅掌楸属植物和其他 9 种木兰科植物。利用 MEGA X 软件,基于邻接法 (NJ 法) 构建日本厚朴在内的 14 种木兰科植物的系统发育树,观察并分析它们之间的亲缘关系 (Yan et al., 2015)。

2 结果与分析

2.1 叶绿体基因组信息

通过 Illumina HiSeq 高通量测序平台测序共获得日本厚朴叶绿体 19 816 708 条原始数据,移除接头和低质量的 Reads,共获得 Clean Reads 19 791 019 条, Q30 为 91.33%。通过在线组装发现日本厚朴全长 160 051 bp,符合目前已知的木兰类植物叶绿体基因组大小范围 (159 429~160 183 bp),厚朴叶绿体拥有目前已知木兰类植物的最大基因组 (160 183 bp),而凹叶厚朴的叶绿体基因组为 160 099 bp。

三种厚朴叶绿体基因均具有典型的四分区域结构,其中 LSC 分别为 88 210 bp (厚朴)、88 145 bp (凹叶厚朴) 和 88 156 bp (日本厚朴),SSC 分别为 18 843、18 832 和 18 771 bp,2 段反向互补重复的 IR 区 (IRA 和 IRB) 分别为 26 565、26 566 和 26 562 bp。三种厚朴 IR、LSC 和 SSC 区域的 GC 值存在一定的差异,其中 GC 含量最高的区域都为 IR 区,分别为 43.2%、43.1% 和 43.2%,LSC 区次之,均为 37.9%,而 SSC 区域的 GC 值最小,仅分别为 34.2%、34.3% 和 34.3%。与其他物种叶绿体基因组相似的是,三种厚朴的 *ycf1* 也跨越了 SSC 和 IRA 区,其中位于 IRA 区域长度均为 1 279 bp,厚朴、凹叶厚朴位于 SSC 区域长度为 4 311 bp,比日本厚朴长 51 bp。除此之外,日本厚朴特有的 *ycf1* 基因还跨越了 SSC 和 IRB 区,其序列长度分别为 29、1 279 bp。

通过基因组结构比较,发现三种厚朴叶绿体

的 rRNA 和 tRNA 数量相同(表 1)。在基因数量方面,凹叶厚朴相比厚朴多 2 个单拷贝基因,而两者又较日本厚朴分别少了 4 个和 6 个。在编码区数量方面,凹叶厚朴与厚朴相比多 2 个编码区,而日本厚朴数量最多,比前两者分别多 8 个和 10 个。这揭示了厚朴与凹叶厚朴的叶绿体基因组可能存在较小的结构和功能差异,而日本厚朴的叶绿体基因组结构和功能可能较其他两者更为丰富。

表 1 三种厚朴叶绿体基因基本信息
Table 1 Basic chloroplast genes information of three *Magnolia* species

名称 Name	全长 Overall length (bp)	GC 含量 GC content (%)	单拷贝基因总数 Total number of single copy genes	编码区 Coding region	rRNA	tRNA
厚朴 <i>M. officinalis</i>	160 183	39.2	126	82	8	37
凹叶厚朴 <i>M. officinalis</i> subsp. <i>biloba</i>	160 099	39.2	128	84	8	37
日本厚朴 <i>M. hypoleuca</i>	160 051	39.2	132	92	8	37

2.2 叶绿体内含子、外显子比较

对三种厚朴的叶绿体基因组注释文件进行分析,发现在近百个木兰类叶绿体基因组编码基因中,19 个存在内含子、外显子的差异而 3 个基因的内含子、外显子数量和长度完全一致(表 2)。在这 19 个差异片段中,厚朴与凹叶厚朴的差异主要表现在 11 个,其中 9 个片段的差异区在 I 类内含子(In I,核苷酸数量差异在 20 以内),2 个在 II 类内含子(In II,核苷酸数量差异在 2 以内),还有 1 个差异片段存在 II 类外显子(*rpl2^b*的 EP II,40 bp,此区域也为厚朴、凹叶厚朴叶绿体基因组差异最大的区域)。相较于前两个厚朴物种,日本厚朴存在更多差异,尤其是 *trnI-GAU* 基因的 I 类内含子比前两者多 920 个核苷酸,甚至还多了三种全表达的功能基因(*rps22^t*、*ycf1^{s-b}*和 *ycf15^{a,b}*)(表 2),这些结果再次显示厚朴与凹叶厚朴的叶绿体基因组之间的差异较小,而日本厚朴的叶绿体基因组在结构和功能方面较其他两者更为丰富。

在三种厚朴叶绿体的 2 个 *rps12* 基因中,一个正常含有 3 个外显子,而另一个缺失了 I 类外显子,无法正常表达,可能为假基因。植物叶绿体基因普遍具有保守性与突变性(转移或损失等)并存的现象,其转录涉及到复杂的反向剪接等过程,本研究发现三种厚朴中 *rps12* 的几个外显子为反向排列,且为非顺序式。核糖体小亚基基因的假基因转化在物种进化过程中起到重要作用(Liu et al., 2020),因此 *rps12* 核苷酸序列的差异可为厚

朴类亲缘关系研究提供重要参考。三种厚朴叶绿体差异最大的 *ycf3* 基因,其差异区域数达 4 个(I 类、II 类内含子和 I 类、III 类外显子),日本厚朴的 I 类外显子增加了 102 个核苷酸。此外,与木兰类植物的叶绿体基因组条形码 *trnK-UUU*、*trnL* 等相似,本研究针对三种厚朴的比较分析发现 *trnI-GAU*、*rps16*、*rpoC1*、*clpP*、*ndhA*、*rpl2* 等基因的变异位点率、信息位点率较高,也具备开发为少数木兰植物鉴定条形码的潜力。

2.3 叶绿体功能基因比较

在叶绿体四大类基因组成中,厚朴含有光合作用相关基因 46 个、基因表达相关基因 69 个、其他基因 6 个及未知功能基因 5 个。凹叶厚朴的基因表达相关基因多 2 个(*rps3* 和 *rps15*)。而日本厚朴相比于前两者,存在 6 个差异基因,主要集中于基因表达相关基因及未知功能基因,即 *rps3*、*rps15*、*ycf1*、*ycf15^{a,b}* 及 *rpl22*(表 3),部分参与多肽形成(Pszczółkowska et al., 2020)功能外,其他基因的作用还存在一定争论,如 *ycf15* 基因在龙葵属(*Amborella*)、萍蓬草属(*Nuphar*)、单子叶和蔷薇类等原始被子植物中是无功能的,甚至在八角属(*Illicium*)、菖蒲属(*Acorus*)、金鱼藻属(*Ceratophyllum*)、毛茛属(*Ranunculus*)等植物的进化过程中已经完全丢失了(Shi et al., 2013),而木兰属(*Magnolia*)和胡椒属(*Piper*)植物基本保留了这类基因。

综合本文内含子与外显子、功能基因的结构分析结果,三种厚朴叶绿体基因组的差异主要分

表 2 三种厚朴叶绿体基因组内含子、外显子比较

Table 2 Comparison of introns and exons of three *Magnolia* species chloroplast genomes

基因 Gene	厚朴 <i>M. officinalis</i>					凹叶厚朴 <i>M. officinalis</i> subsp. <i>biloba</i>					日本厚朴 <i>M. hypoleuca</i>				
	Ep I	In I	Ep II	In II	Ep III	EP I	In I	Ep II	In II	Ep III	Ep I	In I	Ep II	In II	Ep III
<i>trnK-UUU</i>	37	2 498	35	—	—	37	2 492	35	—	—	37	2 493	35	—	—
<i>rps16</i>	42	824	246	—	—	42	824	246	—	—	40	823	221	—	—
<i>atpF</i>	145	709	410	—	—	145	707	410	—	—	144	709	411	—	—
<i>rpoC1</i>	432	740	1 614	—	—	432	734	1 614	—	—	432	734	1 614	—	—
<i>ycf3</i>	124	733	232	729	151	124	734	232	727	151	226	732	232	727	153
<i>trnL-UAA</i>	35	491	50	—	—	35	491	50	—	—	35	491	50	—	—
<i>trnV-UAC</i>	39	584	37	—	—	39	585	37	—	—	39	584	37	—	—
<i>rpl2^b</i>	391	661	431	—	—	391	661	391	—	—	397	661	431	—	—
<i>rps12^b</i>	114	536	232	—	26	114	526	232	—	26	114	536	232	—	26
<i>clpP</i>	71	786	291	629	246	71	781	291	628	246	71	781	291	628	246
<i>petB</i>	6	784	642	—	—	6	784	642	—	—	6	792	642	—	—
<i>petD^L</i>	8	701	475	—	—	8	701	475	—	—	8	701	475	—	—
<i>rpl16</i>	9	969	399	—	—	9	969	399	—	—	9	969	399	—	—
<i>ndhB^b</i>	775	700	758	—	—	775	700	758	—	—	776	700	755	—	—
<i>trnI-GAU^a</i>	42	937	35	—	—	42	936	35	—	—	42	936	35	—	—
<i>trnA-UGC^b</i>	38	800	35	—	—	38	800	35	—	—	38	799	35	—	—
<i>ndhA</i>	553	1 082	539	—	—	553	1 102	539	—	—	552	1 103	540	—	—
<i>trnA-UGC^a</i>	38	800	35	—	—	38	800	35	—	—	38	799	35	—	—
<i>trnI-GAU^b</i>	36	16	36	—	—	36	16	36	—	—	42	936	35	—	—
<i>ndhB^a</i>	775	700	758	—	—	775	700	758	—	—	776	700	755	—	—
<i>rpl2^a</i>	391	661	431	—	—	391	661	431	—	—	397	661	431	—	—
<i>trnG-UC/</i> <i>trnG-GCC</i>	24	770	48	—	—	24	767	48	—	—	23	768	47	—	—

注: *trn*. 转运 RNA; *atp*. ATP 合成酶; *rps*. 核糖体小亚基; *rpo*. RNA 聚合酶; *ycf*. 开放阅读框; *clp*. 酪蛋白水解蛋白酶; *pet*. 多肽; *ndh*. NADH 脱氢酶; *rpl*. 核糖体大亚基; **Ep**. 外显子; **In**. 内含子; *a*. IRA 区; *b*. IRB 区; *L*. LSC 区。下同。

Note: *trn*. Transfer RNA; *atp*. ATP synthase; *rps*. Small ribosomal subunit; *rpo*. RNA polymerase; *ycf*. Open reading frame; *clp*. Caseinolytic protease; *pet*. Polypeptide; *ndh*. NADH dehydrogenase; *rpl*. Large ribosomal subunit; **Ep**. Exon; **In**. Intron; *a*. IRA region; *b*. IRB region; *L*. LSC region. The same below.

布于 LSC 区和 IR 区,涉及核糖体大亚基、核糖体小亚基和未知功能基因类群,尤其是诸多未知功能的基因,而木兰属中这类疑似非功能基因的结构特征、变异原因,以及与适生环境差异的关联性,有待进一步深入研究。

2.4 部分木兰科植物的亲缘关系

由图 1 可知,在 14 种近缘物种叶绿体基因组构建的 NJ 发育树(节点支持率均在 75%以上)中,鹅掌楸属和其他属是木兰科中的两个独立的谱系,这与之前报道的结果一致(陈凯,2019)。在其他属的 2 个次级类群中,三种厚朴、天女木兰、荷花玉兰聚类在一起,其中日本厚朴与凹叶厚朴亲缘关系最为密切,其次是厚朴。其他属中另外一个次级类群包括云南拟单性木兰、玉灯玉兰、紫玉兰、武当玉兰、望春玉兰、星花玉兰、宝华玉兰,它们与三种厚朴亲缘关系由近及远。

3 讨论与结论

本研究使用全基因组测序来组装和比较三种厚朴的叶绿体基因组,以此来推测三种厚朴之间多种生物学性状差异的形成原因。低温环境下,植物最先受到抑制的生理代谢过程是光合作用,低温能显著降低光合效率、CO₂同化作用和光系统 II 活性,从而影响植物的正常生长发育(王璐等,2020)。通过三种厚朴叶绿体的功能基因比较,发现日本厚朴 *psbC* 基因在数量上较另两者增加了一个,这可能缘于 *psbC* 基因的自我复制。*psbC* 和 *psbD* 是光合系统 II 的关键基因,例如小麦成熟叶绿体 *psbC* 蛋白的合成发生于含 *psbD* 序列的转录本上,形成 *psbD-psbC* 复合物,它们的转录水平受到光诱导,通过增强光合系统 II 亚基的合成和维

表 3 三种厚朴叶绿体的功能基因比较

Table 3 Comparison of chloroplast functional genes of three *Magnolia* species

基因功能 Gene function	基因种类 Gene type	日本厚朴 <i>M. hypoleuca</i>	厚朴 <i>M. officinalis</i>	凹叶厚朴 <i>M. officinalis</i> subsp. <i>biloba</i>
光合作用 Photosynthesis	ATP 合酶亚基 ATP synthase subunit	<i>atpA</i> , <i>atpB</i> , <i>atpE</i> , <i>atpF</i> , <i>atpH</i> , <i>atpI</i>	<i>atpA</i> , <i>atpB</i> , <i>atpE</i> , <i>atpF</i> , <i>atpH</i> , <i>atpI</i>	<i>atpA</i> , <i>atpB</i> , <i>atpE</i> , <i>atpF</i> , <i>atpH</i> , <i>atpI</i>
	光合系统I亚基 Photosynthetic system I subunit	<i>psaA</i> , <i>psaB</i> , <i>psaC</i> , <i>psaI</i> , <i>psaJ</i>	<i>psaA</i> , <i>psaB</i> , <i>psaC</i> , <i>psaI</i> , <i>psaJ</i>	<i>psaA</i> , <i>psaB</i> , <i>psaC</i> , <i>psaI</i> , <i>psaJ</i>
	光合系统II亚基 Photosynthetic system II subunit	<i>psbA</i> , <i>psbB</i> , <i>psbC^L</i> , <i>psbC^L</i> , <i>psbD</i> , <i>psbE</i> , <i>psbF</i> , <i>psbI</i> , <i>psbJ</i> , <i>psbK</i> , <i>psbL</i> , <i>psbM</i> , <i>psbT</i> , <i>psbZ</i> , <i>psbH</i>	<i>psbA</i> , <i>psbB</i> , <i>psbC^L</i> , <i>psbD</i> , <i>psbE</i> , <i>psbF</i> , <i>psbI</i> , <i>psbJ</i> , <i>psbK</i> , <i>psbL</i> , <i>psbM</i> , <i>psbN</i> , <i>psbT</i> , <i>psbZ</i> , <i>psbH</i>	<i>psbA</i> , <i>psbB</i> , <i>psbC^L</i> , <i>psbD</i> , <i>psbE</i> , <i>psbF</i> , <i>psbI</i> , <i>psbJ</i> , <i>psbK</i> , <i>psbL</i> , <i>psbM</i> , <i>psbN</i> , <i>psbT</i> , <i>psbZ</i> , <i>psbH</i>
基因表达 Gene expression	NADH 脱氢酶亚基 NADH dehydrogenase subunit	<i>ndhA</i> , <i>ndhB^a</i> , <i>ndhB^b</i> , <i>ndhC</i> , <i>ndhD</i> , <i>ndhE</i> , <i>ndhF</i> , <i>ndhG</i> , <i>ndhH</i> , <i>ndhI</i> , <i>ndhJ</i> , <i>ndhK^L</i> , <i>ndhK^L</i>	<i>ndhA</i> , <i>ndhB^a</i> , <i>ndhB^b</i> , <i>ndhC</i> , <i>ndhD</i> , <i>ndhE</i> , <i>ndhF</i> , <i>ndhG</i> , <i>ndhH</i> , <i>ndhI</i> , <i>ndhJ</i> , <i>ndhK</i>	<i>ndhA</i> , <i>ndhB^a</i> , <i>ndhB^b</i> , <i>ndhC</i> , <i>ndhD</i> , <i>ndhE</i> , <i>ndhF</i> , <i>ndhG</i> , <i>ndhH</i> , <i>ndhI</i> , <i>ndhJ</i> , <i>ndhK</i>
	细胞色素 b/f 复合体 Cytochrome b/f complex	<i>petA</i> , <i>petB</i> , <i>petD^L</i> , <i>petD^L</i> , <i>petG</i> , <i>petL</i> , <i>petN</i>	<i>petA</i> , <i>petB</i> , <i>petD^L</i> , <i>petG</i> , <i>petL</i> , <i>petN</i>	<i>petA</i> , <i>petB</i> , <i>petD^L</i> , <i>petG</i> , <i>petL</i> , <i>petN</i>
	二磷酸核酮糖羧化酶亚基 Ribulose diphosphate carboxylase subunit	<i>rbcL</i>	<i>rbcL</i>	<i>rbcL</i>
	核糖体大亚基 Large ribosomal subunit	<i>rpl14</i> , <i>rpl16</i> , <i>rpl2^a</i> , <i>rpl2^b</i> , <i>rpl20</i> , <i>rpl23^a</i> , <i>rpl23^b</i> , <i>rpl32</i> , <i>rpl33</i> , <i>rpl36</i>	<i>rpl14</i> , <i>rpl16</i> , <i>rpl2^a</i> , <i>rpl2^b</i> , <i>rpl20</i> , <i>rpl23^a</i> , <i>rpl23^b</i> , <i>rpl32</i> , <i>rpl33</i> , <i>rpl36</i>	<i>rpl14</i> , <i>rpl16</i> , <i>rpl2^a</i> , <i>rpl2^b</i> , <i>rpl20</i> , <i>rpl23^a</i> , <i>rpl23^b</i> , <i>rpl32</i> , <i>rpl33</i> , <i>rpl36</i>
	核糖体小亚基 Small ribosomal subunit	<i>rps11</i> , <i>rps12^a</i> , <i>rps12^b</i> , <i>rps12^L</i> , <i>rps14</i> , <i>rps15</i> , <i>rps16</i> , <i>rps18</i> , <i>rps19</i> , <i>rps2</i> , <i>rps3</i> , <i>rps4</i> , <i>rps7^a</i> , <i>rps7^b</i> , <i>rps8</i>	<i>rps11</i> , <i>rps12^a</i> , <i>rps12^b</i> , <i>rps14</i> , <i>rps16</i> , <i>rps18</i> , <i>rps19</i> , <i>rps2</i> , <i>rps4</i> , <i>rps7^a</i> , <i>rps7^b</i> , <i>rps8</i>	<i>rps11</i> , <i>rps12^a</i> , <i>rps12^b</i> , <i>rps14</i> , <i>rps15</i> , <i>rps16</i> , <i>rps18</i> , <i>rps19</i> , <i>rps2</i> , <i>rps3</i> , <i>rps4</i> , <i>rps7^a</i> , <i>rps7^b</i> , <i>rps8</i>
	依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶亚基 DNA-dependent RNA polymerase subunit	<i>rpoA</i> , <i>rpoB</i> , <i>rpoC1</i> , <i>rpoC2^L</i> , <i>rpoC2^L</i>	<i>rpoA</i> , <i>rpoB</i> , <i>rpoC1</i> , <i>rpoC2</i>	<i>rpoA</i> , <i>rpoB</i> , <i>rpoC1</i> , <i>rpoC2</i>
	核糖体 RNA Ribosomal RNAs	<i>rrn16^a</i> , <i>rrn23^a</i> , <i>rrn4.5^a</i> , <i>rrn5^a</i> , <i>rrn5^b</i> , <i>rrn23^b</i> , <i>rrn16^b</i> , <i>rrn4.5^b</i>	<i>rrn16^a</i> , <i>rrn23^a</i> , <i>rrn23^a</i> , <i>rrn4.5^a</i> , <i>rrn5^a</i> , <i>rrn5^b</i> , <i>rrn23^b</i> , <i>rrn23^b</i> , <i>rrn16^b</i> , <i>rrn4.5^b</i>	<i>rrn5^b</i> , <i>rrn23^b</i> , <i>rrn23^b</i> , <i>rrn16^b</i> , <i>rrn4.5^b</i> , <i>rrn16^a</i> , <i>rrn23^a</i> , <i>rrn23^a</i> , <i>rrn4.5^a</i> , <i>rrn5^a</i> ,
	其他基因 Other genes			
	乙酰辅酶 A 羧化酶亚基 Acetyl-CoA carboxylase subunit	<i>accD</i>	<i>accD</i>	<i>accD</i>
	C 型细胞色素合成酶 C-type cytochrome synthase	<i>ccsA</i>	<i>ccsA</i>	<i>ccsA</i>
	膜蛋白 Membrane protein	<i>cemA</i>	<i>cemA</i>	<i>cemA</i>
	蛋白酶 Protease	<i>clpP</i>	<i>clpP</i>	<i>clpP</i>
	翻译起始因子 Translation initiation factor	<i>infA</i>	<i>infA</i>	<i>infA</i>
	成熟酶 Mature enzyme	<i>matK</i>	<i>matK</i>	<i>matK</i>
	未知功能基因 Unknown functional gene	<i>ycf1^{s-a}</i> , <i>ycf1^{s-b}</i> , <i>ycf2^a</i> , <i>ycf2^b</i> , <i>ycf3</i> , <i>ycf4</i> , <i>ycf15^a</i> , <i>ycf15^b</i>	<i>ycf1^{s-a}</i> , <i>ycf2^a</i> , <i>ycf2^b</i> , <i>ycf3</i> , <i>ycf4</i>	<i>ycf1^{s-a}</i> , <i>ycf2^a</i> , <i>ycf2^b</i> , <i>ycf3</i> , <i>ycf4</i>

注：*psa*. 光合器；*psb*. 光合系统II蛋白；*rrn*. 核糖体 RNA；*acc*. 乙酰辅酶 A 羧化酶；*rbc*. 二磷酸核酮糖羧化酶；*ccs*. C 型细胞色素合成基因；*cem*. 叶绿体包膜蛋白；*inf*. 翻译起始因子；*mat*. 成熟酶基因；*a*. IRA 区；*b*. IRB 区；*s-a*. 横跨 SSR 区和 IRA 区；*s-b*. 横跨 SSR 区和 IRB 区。

Note: *psa*. Photosynthetic apparatus; *psb*. Photosystem II protein; *rrn*. Ribosomal RNA; *acc*. Acetyl-CoA carboxylase; *rbc*. Ribulose diphosphate carboxylase; *ccs*. C-type cytochrome synthesis gene; *cem*. Chloroplast envelope membrane protein; *inf*. Translation initiation factor; *mat*. Mature enzyme gene; *a*. IRA region; *b*. IRB region; *s-a*. Across the SSR and IRA regions; *s-b*. Across the SSR and IRB regions.

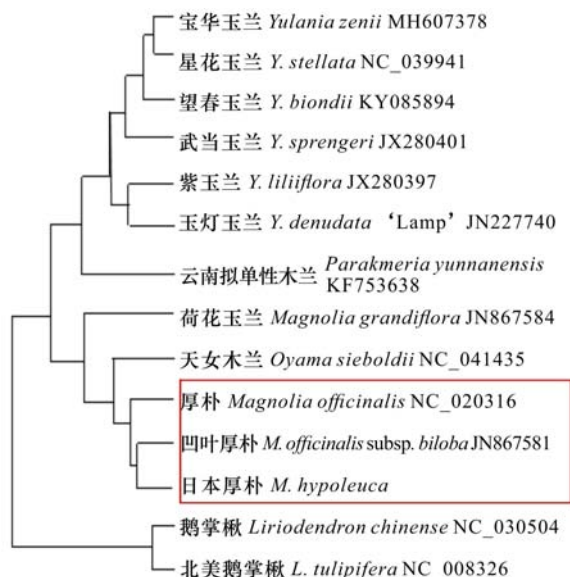


图 1 部分木兰科物种系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of partial Magnoliaceae plants

持能力,提高叶绿体的合成速度 (Gamble et al., 1988; Gamble & Mullet, 1989),从而提高叶绿体的光合作用强度,进而加快植物的生长发育。此外,*psbD-psbC* 基因协同转录的 mRNAs 可以翻译产生 D2 和 CP43 蛋白,与反应中心 D1、CP47、放氧复合体蛋白及捕光复合体 II 等蛋白,共同参与叶绿体光合系统 II 的光合电子传递,在强光条件下维持光合系统 II 的功能 (庄焜扬, 2020)。*psbD-psbC* 复合体直接参与光合系统 II 亚基的形成,在生长旺盛和存在颜色差异的叶片中发挥着保护光合系统、减少强光伤害的作用 (Adachi et al., 2012),这在花叶矢竹叶等光合系统 II 中 *psbD* 基因的研究中也得到证实 (许冰清等, 2015)。因此,日本厚朴叶绿体增加的 *psbC* 基因表明其具备合成更多 *psbD-psbC* 复合体与 D2 蛋白的潜力,这可能是日本厚朴生长速度更快、适应较北纬度地区低温和强光胁迫环境的原因之一。

在高变异位点率的功能基因中,*rpl22* 为日本厚朴中特有,其位于 LSC 区,属于基因表达相关功能基因,可用于物种鉴定 (Feng et al., 2019)。此外,本研究发现三种厚朴的差异基因主要分布于 *rpl22* 所属的基因簇中,它们组成 *rpl23* 操纵子的大转录单元,翻译为核糖体大蛋白亚基。本研究发现,此操纵子在三种厚朴中存在显著的结构差异:*rpl23-rpl2-rps19-rpl22* (日本厚朴)-*rps3* (凹叶厚朴、

日本厚朴)-*rpl16-rpl14-rps8-infA-rpl36-rps11-rpoA*。通过三个物种的亲缘关系可知,凹叶厚朴、日本厚朴与厚朴分化的过程中,该操纵子 *rps19-rpl16* 之间原有的核苷酸空隙逐次被 *rps3*、*rpl22* 基因填充,同时造成操纵子中多个功能基因的内含子、外显子核苷酸发生了增减 (减少为主),功能蛋白的数量和活性也发生了改变。植物叶绿体除了光合作用外,还部分参与氨基酸、核苷酸、脂类和淀粉等各类成分的生物合成,支撑起该植物的生物学性状 (Namgung et al., 2021),日本厚朴具备更丰富的核糖体基因簇,这无疑形成了其更丰富的生物学特性。

tRNA 作为核酸信息水平和蛋白质功能水平的适配器,在蛋白质翻译中起着核心作用,其结构修饰影响植物体的温度适应能力 (Lorenz et al., 2017)。本研究发现日本厚朴 tRNA-ALA 比其他两种厚朴多 3 个,具有快速转运和积累丙氨酸的潜力,而游离态的丙氨酸能抵抗多种外界环境刺激 (Mustroph et al., 2014),如寒冷因子。除了数量因素外,三种厚朴叶绿体中 tRNA 对应的氨基酸种类也不同。日本厚朴为本属植物中分布较为北端 (如千岛群岛) 的物种,其生境中弱光和低温信号交叉影响着植物的生长发育,在这种光温胁迫条件下,tRNA 可能一方面积累更多的游离丙氨酸,另一方面降低正常蛋白质翻译速率,将正常蛋白质合成转向应激反应蛋白质的合成 (冯德江等, 2002),最终使得植株具备更强的耐寒性,这又为厚朴优良品种的分子筛选和培育提出了参考。

参考文献:

- ADACHI Y, KURODA H, YUKAWA Y, et al., 2011. Translation of partially overlapping *psbD-psbC* mRNAs in chloroplasts: the role of 5'-processing and translational coupling [J]. Nucl Acid Res, 40(7): 3152-3158.
- CHEN K, 2019. Study on the structural variation of chloroplast genome in Magnoliaceae and screening of hypervariable genes [D]. Hangzhou: Zhejiang A & F University: 7-15. [陈凯, 2019. 木兰科植物叶绿体基因组结构变异研究及高变基因的筛选 [D]. 杭州: 浙江农林大学: 7-15.]
- FENG DJ, LIU X, LI XG, et al., 2002. Relationship between tRNA abundance and gene expression [J]. Chin J Biol Eng, 6: 4-8. [冯德江, 刘翔, 李旭刚, 等, 2002. tRNA 丰度与基因表达的关系 [J]. 中国生物工程杂志, 6: 4-8.]
- FENG Z, ZHANG L, WU YY, et al., 2019. The *Rpf84* gene,

- encoding a ribosomal large subunit protein, RPL22, regulates symbiotic nodulation in *Robinia pseudoacacia* [J]. *Planta*, 250(6): 1897–1910.
- GAMBLE PE, SEXTON TB, MULLET JE, 1988. Light-dependent changes in *psbD* and *psbC* transcripts of barley chloroplasts: accumulation of two transcripts maintains *psbD* and *psbC* translation capability in mature chloroplasts [J]. *EMBO J*, 7(5): 1289–1297.
- GAMBLE PE, MULLET JE, 1989. Blue light regulates the accumulation of two *psbD-psbC* transcripts in barley chloroplasts [J]. *EMBO J*, 8(10): 2785–2794.
- KWON OJ, OH CH, 2015. Naturalization of landscaping woody plant, *Magnolia obovata* potentially invasive species [J]. *J Mt. Sci*, 12(1): 30–38.
- LIU SS, WANG Z, WANG H, et al., 2020. Patterns and rates of plastid *rps12* gene evolution inferred in a phylogenetic context using plastomic data of ferns [J]. *Sci Rep*, 10(1): 9394.
- LORENZ C, LUNSE CE, MORL M, 2017. tRNA modifications: Impact on structure and thermal adaptation [J]. *Biomolecules*, 7(2): 35. Doi:10.3390/biom7020035.
- MATTHES N, WESTPHAL K, HALDEMANN C, et al., 2020. Validation of a modified CTAB method for DNA extraction from protein-rich maize feedstuffs [J]. *J Consum Prot Food Saf*, 15(4): 331–340.
- MUSTROPH A, BARDING GA, KAISER KA, et al., 2014. Characterization of distinct root and shoot responses to low-oxygen stress in *Arabidopsis* with a focus on primary C and N-metabolism [J]. *Plant cell Environ*, 37(10): 2366–2380.
- NAMGUNG J, DO HDK, KIM C, et al., 2021. Complete chloroplast genomes shed light on phylogenetic relationships, divergence time, and biogeography of *Allioideae* (Amaryllidaceae) [J]. *Sci Rep*, 11(1): 3262.
- OGUCHI R, HIURA T, HIKOSAKA K, 2017. The effect of interspecific variation in photosynthetic plasticity on 4-year growth rate and 8-year survival of understorey tree seedlings in response to gap formations in a cool-temperate deciduous forest [J]. *Tree Physiol*, 37(8): 1113–1127.
- PENG MJ, 2020. Resources and genetic analysis of *Magnolia* in Baotianmanshan District of Nanzhao [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University: 2–40. [彭梦婕, 2020. 南召境内宝天曼山区木兰属植物资源概况及遗传分析 [D]. 郑州: 河南农业大学: 2–40.]
- PSZCZOLKOWSKA A, ANDROSIUK P, JASTRZEBSKI JP, et al., 2020. *rps3* as a candidate mitochondrial gene for the molecular identification of species from the *Colletotrichum acutatum* species complex [J]. *Genes (Basel)*, 11(5): 552.
- SHI C, LIU Y, HUANG H, et al., 2013. Contradiction between plastid gene transcription and function due to complex post transcriptional splicing: an exemplary study of *ycf15* function and evolution in angiosperms [J]. *PLoS ONE*, 8(3): e59620.
- WANG L, LI YL, XIONG H, et al., 2020. Effects of temperature stress on leaf structure and photosynthetic characteristics of *Castanea henryi* seedlings [J]. *J Jiangxi Agric*, 42(4): 692–699. [王璐, 李艳丽, 熊欢, 等, 2020. 温度胁迫对锥栗幼苗叶片结构及光合特性的影响 [J]. 江西农业大学学报, 42(4): 692–699.]
- XU AL, XIAO GL, BI XL, et al., 2021. Rapid analysis of chemical constituents of *Magnolia officinalis* Wenzhong decoction [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharm*, 32(2): 252–258. [胥爱丽, 肖观林, 毕晓黎, 等, 2021. 厚朴温中汤化学成分快速分析 [J]. 中药新药与临床药理, 32(2): 252–258.]
- XU BQ, AN MM, JIANG KY, et al., 2015. Cloning and functional analysis of the chloroplast *psbD* gene of *Phyllostachys japonicus* [J]. *J Zhejiang A & F Univ*, 32(4): 557–565. [许冰清, 安苗苗, 姜可以, 等, 2015. 花叶矢竹叶叶绿体 *psbD* 基因的克隆与功能分析 [J]. 浙江农林大学学报, 32(4): 557–565.]
- YAN A, LAI XJ, LI XD, et al., 2015. Analyses of the complete genome and gene expression of chloroplast of sweet potato [J]. *PLoS ONE*, 10(4): 1–25.
- ZHAO Q, YU JX, QIN YW, et al., 2021. Assembly and sequence analysis of chloroplast genomes in rapeseed based on high-throughput sequencing [J]. *Chin Trad Herbal Med*, 52(6): 1744–1750. [赵祺, 余佳兴, 秦宇雯, 等, 2021. 基于高通量测序的菜叶肾叶绿体基因组的组装及序列分析 [J]. 中草药, 52(6): 1744–1750.]
- ZHUANG KY, 2020. The WHIRLY1 protein in tomato WHIRLY1 is a bilocentric protein and a bilocentric protein under temperature stress [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University: 6–20. [庄焜扬, 2020. 温度胁迫下番茄叶绿体与细胞核双定位 WHIRLY1 蛋白的功能分析 [D]. 泰安: 山东农业大学: 6–20.]

(责任编辑 周翠鸣)

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202102030

魏灵敏, 温少莹, 马际凯, 等. 北美鹅掌楸 *LtAGO1* 基因的克隆、表达及其启动子分析 [J]. 广西植物, 2022, 42(8): 1402–1416.

WEI LM, WEN SY, MA JK, et al. Cloning, expression and promoter analysis of *LtAGO1* from *Liriodendron tulipifera* [J]. *Guihaia*, 2022, 42(8): 1402–1416.



北美鹅掌楸 *LtAGO1* 基因的克隆、表达及其启动子分析

魏灵敏, 温少莹, 马际凯, 夏 辉, 李嘉昱, 吴栩佳, 李火根*

(南京林业大学 林木遗传与生物技术教育部重点实验室, 南京林业大学 南方现代林业创新中心, 南京 210037)

摘 要: 为深入探究叶原基分化成叶器官的形态建成机制, 该研究以北美鹅掌楸为材料, 采用 RT-PCR 和 RACE 克隆技术获得 *LtAGO1* 的 cDNA 全长和启动子序列并预测其功能, 通过 RT-qPCR 分析 *LtAGO1* 在鹅掌楸属中的组织表达模式。同时, 经抗性筛选和 DNA 鉴定获得 *ProAGO1* :: GUS 的转基因拟南芥株系, 并进一步对 T2 代阳性植株进行表型和 GUS 组织化学染色分析。结果表明: (1) *LtAGO1* 基因包含 3 300 bp 的开放阅读框, 编码 1 100 个氨基酸, 分子量为 122.14 kD, 理论等电点 (pI) 为 9.36。 (2) 氨基酸序列分析显示 *LtAGO1* 含 Gly-rich-AGO1 和 Piwi 两个典型的 AGO 基因结构域, 同源性分析显示 *LtAGO1* 蛋白与沉水樟 AGO1 蛋白 (RWR84608.1) 亲缘关系最近。 (3) 组织表达特异性分析显示 *LtAGO1* 在北美鹅掌楸不同组织间的相对表达量为雄蕊>花芽>花瓣>花萼>叶片>雌蕊>叶芽>茎, *LtAGO1* 在北美鹅掌楸叶片不同发育阶段的相对表达量为叶芽萌动期>幼叶期>衰老期>成熟期, AGO1 在鹅掌楸属叶缘的表达量高于叶片的其他部位且北美鹅掌楸叶凹陷部位的表达量高于叶尖部位。 (4) 获得叶中-侧轴向和基-顶轴向的极性缺失、叶缘锯齿、重瓣花型的转化株系, GUS 组织染色显示 *ProAGO1* 启动 GUS 基因在叶芽顶端稳定表达且在新分化的叶柄上表达较强, 在成熟期的茎、叶、花和果的维管束中均特异表达。 *LtAGO1* 启动子的 GUS 活性强度为叶顶芽>花>维管束, 这与实时定量 PCR 结果相一致。综上认为, *LtAGO1* 基因在顶端分生组织特异表达且受到多种途径的调控而参与到叶和花器官的发育进程中。该研究结果为进一步了解北美鹅掌楸 *LtAGO1* 基因的基本功能及其调控叶形发育机制提供了理论基础。

关键词: 北美鹅掌楸, AGO1, 叶极性, GUS, 组织表达

中图分类号: Q943.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2022)08-1402-15

Cloning, expression and promoter analysis of *LtAGO1* from *Liriodendron tulipifera*

WEI Lingmin, WEN Shaoying, MA Jikai, XIA Hui, LI Jiayu, WU Xujia, LI Huogen*

(Key Laboratory of Forest Genetic & Biotechnology of Ministry of Education, Co-Innovation Center for Sustainable Forestry in Southern China, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

收稿日期: 2021-05-23

基金项目: 国家自然科学基金(31770718) [Supported by National Natural Science Foundation of China(31770718)]。

第一作者: 魏灵敏(1991-), 博士研究生, 主要从事森林遗传学研究, (E-mail) lmwei2019@njfu.edu.cn。

*通信作者: 李火根, 教授, 博士研究生导师, 主要从事森林遗传学研究, (E-mail) hgli@njfu.edu.cn。

Abstract: To study the morphogenesis mechanism of leaf primordium differentiation, we used *Liriodendron tulipifera* to clone 2 001 bp upstream region of *LtAGO1* CDS as the promoter by RT-PCR and RACE technology and predicted its function, and we also used real-time PCR to investigate expression patterns in *Liriodendron*, obtained the transgenic *Arabidopsis thaliana* of *ProAGO1*::GUS by resistance screening and DNA identification, and then monitored phenotype and GUS histochemical staining. The results were as follows: (1) The *LtAGO1* gene included an open reading frame for 3 300 bp, encoding 1 100 amino acid, the molecular weight was 122.14 kD and theoretical isoelectric point (pI) was 9.36. (2) Amino acid sequence analysis showed that *LtAGO1* consisted of Gly-rich-AGO1 and Piwi conserved domains of AGO family. Phylogenetic trees revealed that *LtAGO1* was closed to *Cinnamomum micranthum* (RWR84608.1) in evolutionary relationship. (3) The specific tissue expression analysis demonstrated that the expression order was stamen>floral bud>petal>calyx>leaf>pistil>leaf bud>stem among tissues, the expression order was leaf bud sprouting stage>young leaf stage>senescence stage>mature stage among stages, it was highly expressed in the leaf margin of *Liriodendron* L., and *LtAGO1* gene expression in leaf tooth sinus was higher than that in leaf tooth tip of *Liriodendron tulipifera*. (4) The transgenic strains leaf polarity of the medio-lateral and proximo-distal axis were absent with serrated leaf margin and double petal flower. It was found that GUS staining was stably detected at the tip of leaf bud of transgenic seedlings, and higher GUS activity was observed at newly differentiated petioles. *ProAGO1* promoter drove *GUS* gene to accumulate specifically in the vascular bundle of *Arabidopsis thaliana* leaf, flower, pod and stem, and GUS activity intensity order was leaf tip bud>flower>vascular bundle among tissues, which was in accordance with the real-time PCR results. Therefore, the *LtAGO1* gene is predominantly expressed in apical meristem and is regulated by various pathways during the development of leaf and flower. The results provide a theoretical basis for further functional research of the *LtAGO1* gene in *Liriodendron tulipifera* and regulation mechanism of leaf shape development.

Key words: *Liriodendron tulipifera*, *AGO1*, leaf polarity, GUS, tissue expression

叶是高等植物进行光合作用和蒸腾作用的主要器官,叶原基起源于茎顶端分生组织 (shoot apical meristem, SAM) 的周边区。在控制细胞由分裂转入生长的形态建成过程中,叶原基发生了极性分化 (Bowman & Eshed, 2000)。AGO1 基因的突变将会影响叶原基分化及器官极性的选择等一系列发育进程 (Wu et al., 2009; Liu & Nonomura, 2016)。王永益 (2019) 通过点突变能获得拟南芥针状叶的 *ago1-27* 突变体和卷曲芽状复叶的 *ago1-38* 突变体。李素芬等 (2014) 对 *AtAGO1* 超表达得到了叶缘呈锯齿状的拟南芥。在模式植物水稻和玉米中,采用敲除、过表达 AGO1 基因及互补缺陷突变体的方法,初步明确 AGO1 基因的缺失会降低水稻的结实率和花粉育性,而 AGO1 基因的过表达能使叶片正面卷曲、株高降低 (徐东东, 2014; Li et al., 2019)。番茄 *SlmiR168* 靶向调控 *SLAGO1a* 基因的表达,增强了番茄对低钾胁迫的抗性 (Liu et al., 2020); 拟南芥 *ago1-27* 比野生型对淹水更敏感,且在低氧条件下和 AGO4 共同调控该胁迫信号的传递 (Elena et al., 2020)。姚晓华等 (2021) 发现,青稞 *HvtAGO1* 编码的蛋白在抗条纹病的调控通路中发挥重要作用。

近期研究发现,AGO1 是通过诱导茉莉酸 (JA) 信号通路中相关基因的产生并激活 JA 反应来响应胁迫 (Liu et al., 2018)。可见,AGO1 通过多种途径参与植物抗逆的响应及调节过程。此外,AGO1d 参与小麦花药和花粉粒的发育 (冯楠, 2018), 拟南芥根分生组织需要 AGO1 的活性来维持细胞的增殖 (Adrien et al., 2019)。AGO1 基因在植物器官极性选择、分生组织分化、花器官发育和胁迫响应等多方面起重要调控作用。

北美鹅掌楸与鹅掌楸都是以叶形奇特、干型优美为特色的具有观赏价值的园林树种,其叶片具有三裂和五裂的形态差异,是研究观叶树种叶形多样性及品种改良的理想材料。近年来,杨颖等 (2014) 证实北美鹅掌楸中有 9 个 *LtNAC* 基因参与叶片的衰老进程。Ma 等 (2018, 2019) 探明鹅掌楸从叶原基分化成叶片 4 个阶段的形态发育过程,从转录组中筛选验证 10 条与叶发育相关的差异基因,发现 *LcKNOX6* 基因可使拟南芥叶序紊乱、叶片深裂及不育。然而,目前对于北美鹅掌楸奇特叶形的形成机制仍不清楚,AGO1 基因是否参与了叶形发育的调控进程,与北美鹅掌楸叶芽和花

芽孕育的关系也尚未明确。

高等植物的生长发育过程受基因的表达量控制,基因的转录水平受包含顺式作用元件的启动子影响(Dey et al.,2015)。拟南芥 *AtADR* 和 *AtAIF* 启动子可调控花和花药的发育(Shih et al.,2014; Dai et al.,2019),表明启动子在影响植物的性状和调控方式上发挥重要作用。本研究采用 RACE 克隆技术获得北美鹅掌楸 *LtAGO1* 基因的全长 cDNA,并对其进行生物信息学预测及组织差异表达分析,初步了解该基因功能,并重点关注 *LtAGO1* 基因启动子序列的分析和组织表达特异性,旨在为 *LtAGO1* 基因启动子对相关基因的调控机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 不同组织的取样 在南京林业大学的鹅掌楸种源试验林中,选取物候期基本一致的北美鹅掌楸(美国南卡罗来纳州种源)和鹅掌楸(中国武夷山种源)作为供试材料。2018年4月,分别采集长势良好的3个株系幼嫩叶片的3个部位(叶缘、叶基部和叶中部),具体参考沈宗根等(2003)的方法。同时,采集北美鹅掌楸同一时期的8个组织样品(叶片、茎、雄蕊、雌蕊、花芽、花萼、叶芽和花瓣)。2018年3—8月期间,分别采集北美鹅掌楸叶芽萌动期、幼叶期、叶成熟期和叶衰老期的叶片,具体参考肖怀娟(2014)的方法。可将其划分为7个部分,即a、c和e为叶缘凸出部分,b和d为叶缘凹陷部分,f为叶柄,g为叶中间部分。据前期的物候观察发现,在7月,北美鹅掌楸叶片的形态变异最大。因此,本研究于2018年7月采集北美鹅掌楸不同大小的叶片,用消毒的剪刀分离样品至1g,具体参考李四游(2015)的方法。所有样品重复取样3次,置于-80℃超低温冰箱中保存,用于提取RNA。

1.1.2 生化试剂 植物总RNA提取试剂盒购自天根(TIANGEN)生物公司,PrimeScript™ RT Master Mix(Perfect Real Time)反转录试剂盒、3'-Full RACE Core Set with PrimeScript™ RTase 试剂盒、SMARTer® RACE 5'/3' Kit 反转录试剂盒、PrimeSTAR® Max DNA Polymerase 高保真酶、DL 2 000 DNA marker 和 SYBR Premix Ex Taq 酶均购自

Takara 公司,核酸染料 Gel Stain、Easy Pure Quick Gel Extraction Kit 凝胶回收试剂盒和 Blunt 载体均购自北京金式金生物技术有限公司,ClonExpress® Ultra One Step Cloning Kit 重组酶购自诺唯赞生物公司,大肠杆菌(*Escherichia coli*) T1 与农杆菌(*Agrobacterium*) GV3101 购自上海唯地生物公司,过表达载体 PBI121-GUS 由本实验室提供,引物合成由南京金斯瑞公司完成,其编号及序列见表1。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的克隆 根据北美鹅掌楸(*L. tulipifera*)转录组数据库(<http://ancangio.uga.edu/content/liriodendron-tulipifera>),筛选出注释名为 *AGO1* 基因的 EST 序列,通过 Oligo 7 软件设计 PCR 扩增引物,以北美鹅掌楸叶芽的 cDNA、3'-RACE 和 5'-RACE 为模板,扩增 *LtAGO1* 基因的3个目的片段。PCR 体系为 50 μL,扩增程序:98℃ 3 min;98℃ 10 s,58℃ 30 s,72℃ 1 min,共35个循环;72℃ 彻底延伸 5 min。将目的片段连接至 Blunt 载体后转化大肠杆菌 T1 感受态细胞,挑菌送测。利用 DNAMAN 软件拼接后获得全长 cDNA 序列,使用 NCBI ORF Finder 在线软件(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)预测开放阅读框并设计引物,验证基因克隆的正确性。依据验证成功的 *AGO1* 基因 CDS 序列,查找其上游启动子序列。该启动子序列信息来自鹅掌楸(庐山种源) NJFU-Lchi-2.0 基因组测序结果(Chen et al.,2019),利用同源克隆法设计验证引物,引物序列见表1。使用改良 CTAB 法(马明等,2007)提取采样组织的 DNA,以此为模板扩增出约 2 000 bp 的启动子序列并测序确认。

1.2.2 *LtAGO1* 基因的生物信息学分析 使用 NCBI conserved domain 在线软件(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>)预测 *LtAGO1* 蛋白的保守结构域。使用 ExPASy 中的 ProtParam 工具(<https://web.expasy.org/protparam/>)在线分析蛋白质理化性质,使用 SOPMA 在线软件(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)和 Phyre2 在线软件(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>)分别预测蛋白质二、三级结构,使用 SignalP 5.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测蛋白是否含信号肽,使用 PSORT 在线软件(<https://wolfpsort.hgc.jp/>)预测蛋白亚细胞的定位

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名称 Primer name	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	用途 Application
LtAGO1-F	CGTGCTGGTGGAGGATATCA	中间片段扩增 Fragment amplification
LtAGO1-R	AGCACTGGGAGTTGTAACAG	
LtAGO1-3Outer	CTGCTCTCAAGGACAATGTGAA	3'RACE
LtAGO1-3Inner	ACTCTTTGCTGGACTTCTGCTATCCTGATG	
LtAGO1-5Outer	GTGCAGCTCGGGATCAGACGGCCTATGAGA	5'RACE
LtAGO1-5Inner	TGACACCACTGGAATGTTGA	
LtAGO1-qRT-F	AGGGCCAATTTTATCAGGTC	荧光定量 Fluorescent quantitative
LtAGO1-qRT-R	TCAACAGAATAGCGATCCGAA	
LcActin97-F	TTCCCGTTCAGCAGTGCTCGTG	内参 Reference
LcActin97-R	GTCGCACAACCTGGTATCG	
Hind III-F	CACTCATTAGGCACCCCAGG	鉴定 Testing
GUS-R	ATCCAGACTGAATGCCAC	
LtAGO1-QC-F	ATGGTGAGAAAGAGGAGAA	开放阅读框扩增 ORF amplification
LtAGO1-QC-R	TCAGCAGTAGAACATCACC	
LtAGO1-Pro-F	ATACCCAGCAGATAACGAA	启动子克隆 Promoter cloning
LtAGO1-Pro-R	GATTACTCTCGCTTAGTCA	
proLtAGO1-GUS-F	GACCATGATTACGCCAAGCTTATACCCAGCAGATAACGAA	载体构建 Vector construction
proLtAGO1-GUS-R	ACCACCCGGGGATCCTCTAGAGATTACTCTCGCTTAGTCA	

情况。在 NCBI 数据库 BLASTx 中查找同源序列，使用 Clustal X 软件分析 LtAGO1 蛋白同源性和 MEGA 7 软件构建 Neighbor-Joining 系统进化树。使用 PlantCARE 数据库 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html>) 对克隆得到的启动子序列进行顺式作用元件分析。

1.2.3 *LtAGO1* 基因的表达分析 使用植物总 RNA 提取试剂盒分别提取鹅掌楸属不同发育时期的叶片及不同组织的总 RNA, 并反转录合成 cDNA 的第一链, 稀释 20 倍后作为 RT-qPCR 模板。通过 Oligo 7 软件设计荧光定量 PCR 引物, 参考本实验室鹅掌楸内参基因 *Actin97* (Tu et al., 2019) 进行实时定量 qPCR 反应, 引物序列见表 1。反应体系为 20 μ L, 分别为 SYBR Premix Ex Taq II 10 μ L, 上下游引物各 0.4 μ L (5 μ mol $\cdot$ L⁻¹), ROX Reference Dye or Dye II 0.4 μ L, 模板 (100 ng) 2 μ L, RNAase-free ddH₂O 6.8 μ L。扩增程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 34 s, 40 个循环。试验进行 3 次生物学重复, 用 2^{- $\Delta\Delta$ ct} 法 (Livak et al., 2001)

计算并分析基因的相对表达量。

1.2.4 构建载体及转化、筛选 使用 *Xba*I 和 *Hind* III 酶分别酶切超表达载体 PBI121 质粒, 经电泳跑胶确定目标产物后切胶, 并回收目的片段 *ProAGO1*。利用诺唯赞同源重组酶将带酶切位点的 PCR 目的产物构建到酶切后的表达载体 PBI121 上, 并转入大肠杆菌中扩增, 获得 GUS 表达载体 PBI121-*ProAGO1*-GUS。将经 PCR、酶切及测序后鉴定正确的 GUS 表达载体质粒转进农杆菌 GV3101, 并通过花序浸染法 (Clough & Bent, 1998) 转染到野生型拟南芥中。将收种得到的 T0 代拟南芥种子播种在含有 50 mg $\cdot$ L⁻¹ 卡那霉素 (Kanamycin) 的 1/2MS 培养基上, 筛选出具有抗卡那霉素的转基因植株, 利用启动子测序引物对 T1 代拟南芥叶片的 DNA 进行 PCR 鉴定, 以野生型植株为阴性对照。将符合预期结果的转基因植株继代筛选至 T2 代, 用于 GUS 染色分析。

1.2.5 转基因拟南芥植株表型观察 转基因株系和野生型拟南芥的种子先后经 75% 酒精、10% 次

氯酸钠消毒和 3 次无菌水洗涤,之后播种在 1/2MS 培养基(pH=5.8)中,4 ℃ 春化 2 d 后,置于温度为 25 ℃、光周期为 16 h 光照/8 h 黑暗、光照强度为 5 000 lx 的人工光照培养箱内。光照培养 10 d 后,测量拟南芥幼苗根长并记录,5 次重复。

1.2.6 转基因拟南芥植株 GUS 组织化学染色 参照 Solarbio 公司即用型 GUS 试剂盒说明书,分别选取在 1/2MS 培养基上生长 4、6、9、12、16、20、25 d 等不同时期及不同组织的转 *ProAGO1::GUS* 的 T2 代拟南芥转化株,按 Jefferson(1987)的方法放到染色液中染色,37 ℃ 过夜孵育,75%酒精洗涤脱色 5~6 次后在体视显微镜下拍照。以 GV3101 空菌株浸染野生型拟南芥为阴性对照,35S::GUS 空载体浸染的拟南芥为阳性对照。

2 结果与分析

2.1 *LtAGO1* 基因全长 cDNA 的获得

从北美鹅掌楸叶芽中获得 *AGO1* 中间片段长度为 3 592 bp,利用 RACE 克隆获得长度为 440 bp 和 636 bp 的 5'端和 3'端序列(图 2:A),经拼接得到 4 258 bp 的 cDNA 全长序列。经 ORF finder 预测到 5' -UTR 序列长度为 78 bp,3' -UTR 序列长度为 880 bp,含 13 个 polyA,ORF 长度为 3 300 bp,共编码 1 100 个氨基酸。对 ORF 两端设计引物扩增并测序验证,结果显示开放阅读框序列长度大小与拼接序列一致,且无变异位点。蛋白结构分析得到该蛋白包含 2 个保守结构域,即 Gly-rich-AGO1 和 Piwi。其中,Piwi 结构域位于 AGO1 的 C 端,含有 RNA 5' 端结合位点和对 mRNA 有切割作用的活性位点(图 2:B)。以上结果验证了所得 cDNA 序列的正确性,故将该基因命名为 *LtAGO1*。

2.2 *LtAGO1* 蛋白二级、三级结构和功能预测

图 2:C 显示,该蛋白由延伸链(extended strand)、 α 螺旋(h)、 β 转角(t)和无规则卷曲(c)组成,其中无规则卷曲最多,占 52.14%;此外,占氨基酸序列较多的是 α 螺旋(28.57%)和延伸链(13.83%), β 转角最少(5.46%)。为深入了解蛋白结构,对 *LtAGO1* 预测并模拟蛋白三级结构(图 2:D),结果显示 *LtAGO1* 蛋白结构与 AGO2 蛋白最为相似,且置信度达 100%。利用 SignalP 5.0 Server 预测得到 D 值(信号肽均值与 Y-max 的平均值)较小(0.0016),推测该基因编码的蛋白不

含信号肽,为非分泌蛋白。对 *LtAGO1* 蛋白亚细胞定位的预测结果显示,*LtAGO1* 蛋白位于微体、细胞核、细胞质和细胞膜的分值分别为 0.3、0.3、0.1 和 0,说明该蛋白可能定位于细胞核和微体中。

2.3 *LtAGO1* 蛋白同源性比对及进化树分析

将 *LtAGO1* 编码的氨基酸序列与 NCBI 数据库中的序列比对发现,与沉水樟(*Cinnamomum micranthum*)、海枣(*Phoenix dactylifera*)和小果野蕉(*Musa acuminata*)等的 AGO1 蛋白同源,且相似性较高(72.97%~76.33%)。经多序列比对发现 *LtAGO1* 蛋白与其他物种 AGO1 同源蛋白总体表现为 C 端较保守,N 端保守性较差,且同源序列中均存在一个保守的 Piwi 结构域(图 3)。*LtAGO1* 蛋白与不同种类植物 AGO1 蛋白序列一致性较高,说明该基因在植物进化过程中比较保守。通过与其他物种 AGO1 同源蛋白比对及构建的进化树发现,北美鹅掌楸与樟科的沉水樟 AGO1 蛋白(RWR84608.1)聚在一起,亲缘关系最近,与海枣(XP_008812792.1)、小果野蕉(XP_009386429.1)的亲缘关系较近,与麻风树(XP_012079244.1)和橡胶树(XP_021670505.1)的亲缘关系相对较远(图 4)。

2.4 *LtAGO1* 的时空表达差异分析

利用 RT-qPCR 检测分析 *LtAGO1* 在北美鹅掌楸 8 个组织中的表达量,结果如图 5:A 所示,*LtAGO1* 在北美鹅掌楸所有的组织中均有表达,但表达量存在一定差异。其中,雄蕊和花芽的相对表达量较高,显著高于其他组织,其次是花瓣,在花萼、花芽、叶片、叶芽和雌蕊中的表达量较低,*LtAGO1* 在北美鹅掌楸不同组织间的相对表达量为雄蕊>花芽>花瓣>花萼>叶片>雌蕊>叶芽>茎。该基因在花器官中特异表达,推测 *LtAGO1* 可能在花器官发育过程中发挥着重要作用。

对叶基部、叶中部和叶缘进行 RT-qPCR 检测,结果如图 5:B 所示,在北美鹅掌楸中,*AGO1* 的相对表达量为叶缘>叶中部>叶基部;在鹅掌楸中,*AGO1* 的相对表达量为叶缘>叶基部>叶中部。由此可见,*AGO1* 主要在鹅掌楸和北美鹅掌楸叶片中的叶缘部位表达,且该基因在鹅掌楸叶片所有部位的相对表达量均高于北美鹅掌楸的相对表达量,尤其是鹅掌楸叶中部和叶基部的表达量是北美鹅掌楸的 4.5~7.5 倍,说明 *AGO1* 在两个种间叶片的空间分布上存在差异。

对叶芽萌动期(时期1和时期2)、幼叶期(时期3)、成熟期(时期4至时期6)和衰老期(时期7)的叶片进行 RT-qPCR 检测,结果如图 5:C 所示:在叶芽萌动期至展叶期,*LtAGO1* 的表达量随着叶芽的逐渐膨大而降低;在生长期,*LtAGO1* 的表达量与叶片大小呈负相关的关系,且在叶面积最大时达到最低值;当叶片进入衰老期,*LtAGO1* 的表达量比生长后期的表达量高,但比展叶期的低,且在叶原基形成的过程中,*LtAGO1* 的表达量远高于叶成熟期的表达量。*LtAGO1* 在北美鹅掌楸叶片不同发育阶段的相对表达量为叶芽萌动期>幼叶期>衰老期>成熟期,说明 *LtAGO1* 在北美鹅掌楸分生组织生长较旺盛的时期表达。

对叶缘凸出部分(即叶尖,a,c和e)和凹陷部分(b和d)进行 RT-qPCR 检测,结果如图 5:D 所示,*LtAGO1* 在叶柄的相对表达量远高于其他部位的表达量,相较而言,该基因在凹陷部位(b)的相对表达量高于凸出部位(c),此外在其他部位基本不表达。因此,*LtAGO1* 在北美鹅掌楸叶片中的相对表达量为叶柄>叶凹陷>叶尖,说明 *LtAGO1* 可能在叶柄的形成中起着重要作用。

2.5 *LtAGO1* 蛋白共表达网络

LtAGO1 蛋白共表达网络显示(图 6),*AGO1* 不仅与逆境应激响应基因 *DCLs*、*RDR6* 和 *SGS3* 发生互作,还与介导 miRNA 叶极性分化的 *HEN1* 和 *HYL1* 基因发生互作。据报道,长度 20~24 nt 的小 RNA(sRNA)能响应多种逆境胁迫(Chen et al., 2002; Zhang et al., 2008),其 sRNA 的产生主要依赖 *DCL*、*AGO* 和 *RDR* 基因家族所编码的蛋白(Saito & Siomi, 2010)。*SGS3* 与 *RDR6* 协同作用能将单链 RNA 转录为 dsRNA,诱导产生转录后基因沉默,降低病原菌的危害(Yoshikawa et al., 2013)。此外,*RDR6* 还与 *AGO7*、*SGS3* 和 *DCL4* 共同调控 trans-acting siRNA 通路,其下游靶基因是参与叶形远轴化的生长素响应因子(Peragine et al., 2004)。在烟草中,*NbDCL1* 的沉默导致植株矮小,叶片畸形。*HYL1* 通过介导 miRNA 来调节 *HD-ZIP III* 基因的表达,从而维持叶的平展发育(Yu et al., 2005)。*HEN1* 最早被发现和花器官发育相关(Chen et al., 2002),拟南芥中绝大部分 miRNA 均受到 *HEN1* 的调控(Yu et al., 2006),和 *DCL1-3* 一样,*HEN1* 既能调控发育,又能参与 ABA 信号通路的调控(Park et al., 2002)。*AGO1* 与这

些基因相互作用,协同发挥抗逆及发育的调控作用。

2.6 *LtAGO1* 启动子克隆、表达载体的构建及鉴定

以北美鹅掌楸基因组 DNA 为模板进行 RT-PCR 扩增,将扩增产物进行测序,得到 2 001 bp 的 *LtAGO1* 启动子序列(图 7:A)。将启动子扩增产物 *ProAGO1* 连接到植物表达载体 PBI121 上(图 7:D),连接产物经菌落 PCR 发现,大肠杆菌 PCR 扩增产物大小为 2 000 bp 左右,与阳性对照条带大小相一致(图 7:B),检测后的测序结果与数据库序列一致。经双酶切电泳后的结果(图 7:C)显示,重组的质粒被酶切成两条条带,一条大小为 12 758 bp 的条带,另一条几乎与 *ProAGO1* 大小一致的序列条带,说明 *LtAGO1* 启动子成功构建到 PBI121 表达载体中。

2.7 *LtAGO1* 启动子顺式作用元件分析

利用 PlantCARE 软件对 *LtAGO1* 启动子序列进行分析,结果如表 2 所示,*LtAGO1* 启动子中含有 RNA 聚合酶 II 起始转录所必需的 CAAT-box、TATA-box 元件和较多的光响应元件(如 Box 4、G-box、GT1-motif 和 MYB 等),此外还包含与防御相关的响应元件(如防御与应激元件 TC-rich repeats,茉莉酸甲酯响应调节元件 CGTCA/TGACG-motif,水杨酸响应元件 TCA-element,ABA 响应元件 MYC,冷胁迫相关元件 as-1,厌氧诱导调控元件 ARE)和生长调控相关元件(如分生组织表达调控元件 CCGTCC-box、玉米醇溶蛋白代谢调控元件 O₂-site)。

2.8 转基因植株的检测及表型观察

经 PCR 检测后,共获得 *ProAGO1*::GUS 转基因阳性植株 11 株(图 8:C)。收种并播下 T2 代转基因植株,发现野生型的根长为(1.5±0.2)cm,转基因的根长为(0.5±0.2)cm,且须根和主根一样发达(图 8:D),叶面积较野生型小,第二对真叶的顶端出现凹形缺刻和白化。30 d 时,鉴别出两种表型的株系,主要特征如下:植株矮小(图 8:F),抽薹较晚,且出现不育的重瓣花,大部分莲座叶表面积较野生型小(图 8:E)。其中,株系 1 有 1 片向中-侧轴方向延伸生长的叶片,叶基部狭窄,叶形呈扇形,其他叶片表面积是野生型的一半,且呈叶基歪斜、叶柄弯曲、中-侧轴向和基-顶轴向的不对称发育。株系 2 的莲座叶数量较野生型少 2 片,叶形缺刻程度较株系 1 更深,其中有 1 片叶的叶面积

表 2 *LtAGO1* 启动子中的顺式作用元件预测

Table 2 The cis-acting elements in promoter sequence of *LtAGO1*

顺式作用元件 Cis-acting element	核心序列 Core sequence	数量 Number	功能 Function
A-box	CCGTCC	5	顺式调控元件 Cis-acting regulatory element
ABRE	GCAACGTGTC	8	ABA 响应元件 ABA-responsive element
ARE	AAACCA	5	厌氧诱导调控元件 Regulatory element for anaerobic induction
AT-rich	ATAGAAATCAA	1	富含 AT 的结合位点 AT-rich binding sites
Box 4	ATTAAT	2	光响应元件 Light responsive element
Box II	TCCGTGTACCA	1	顺式调控元件 Cis-acting regulatory element
CAAT-box	CAAT/CAAAAT	22	启动子和增强子区常见顺式作用元件 Common cis-actiing elements in promoter and enhancer regions
CCGTCC-box	CCGTCC	5	分生组织表达调控元件 Regulatory element related to meristem expression
CGTCA-motif	CGTCA	6	茉莉酸甲酯响应调节元件 MeJA responsive regulatory element
G-box	CACGTT	12	光响应元件 Light-responsive element
GT1-motif	GCTTAAT	1	光响应元件 Light-responsive element
MYB	AACCTAA	1	光响应的 MYB 结合位点 MYB binding sites involved in light response
MYC	CATGTG	1	ABA 响应元件 ABA-responsive element
O ₂ -site	GATGACATGG	1	参与玉米醇溶蛋白代谢调节的顺式调节因子 Cis-acting regulatory factors involved in regulation of zeinmetabolism
TATA-box	TATA	25	转录起始元件 Transcription initiation element
TC-rich repeats	ATTCTCTAAC	1	参与防御和胁迫响应的元件 Element involved in defense and stress responsiveness
TCA-element	CATGCATG	1	参与水杨酸反应的顺式作用元件 Cis-acting element involved in salicylic acid responsiveness
TGACG-motif	TGACG	6	茉莉酸甲酯响应调节元件 MeJA-responsive regulatory element
as-1	TGACG	6	冷胁迫相关元件 Element involved in chilling stress

是其他叶片的 5~10 倍,叶基楔形,叶顶端凹陷呈心形,其他叶基歪斜,叶的主要生长方向由基部至顶端方向延伸生长,叶形态呈线形或条状发育,叶柄较短。推测 *LtAGO1* 启动子从叶原基分化期就开始影响拟南芥的叶片在中-侧轴及基-顶轴两个方向上发生程度各异的极性分化,且随着时间而加深变异的程度,最终使叶缘缺刻的表型得以维持。

2.9 *LtAGO1* 启动子活性分析

图 9 显示,由 *LtAGO1* 启动子控制的 *GUS* 基因在植株发育过程中呈阶段性表达。在萌发后的第 4 天和第 6 天,幼苗的 *GUS* 活性不表达(图 9:B1-B2);在叶芽分化期(第 9 天至第 25 天),*LtAGO1* 启动子驱动 *GUS* 在叶芽顶端稳定表达,且在新分化的叶柄上启动活性最强(图 9:B3-B7)。在生殖生长阶段,其主叶脉、叶缘锯齿尖、果柄、花萼及雌蕊等部位表达,说明 *LtAGO1* 在成熟的花、果荚、

叶和茎的维管束中均表达(图 9:B8-B11)。因此,*LtAGO1* 启动子的 *GUS* 活性强度为叶顶芽>花器官>维管束,属于分生组织特异性启动子。

3 讨论与结论

本研究克隆得到北美鹅掌楸 *LtAGO1* 基因,通过生物信息学分析发现 *LtAGO1* 和其他物种 *AGO1* 的相似性很高,亚细胞定位于细胞核,这些信息与李红英等(2018)在胡杨中的研究结果相吻合。组织特异性分析发现,*LtAGO1* 在叶原基分化期的表达量明显高于成熟期和衰老期,且在幼叶的叶缘部位高含量表达,而在成熟叶中只在叶柄表达;*ZmAGO1a* 在玉米的幼叶及吐丝期的雌穗中表达量最高(徐东东,2014),且在玉米新生叶中的表达量高于老叶(许鑫等,2014)。在北美鹅掌楸生殖生长过程中,*LtAGO1* 在雄蕊的表达量最高,其次是花

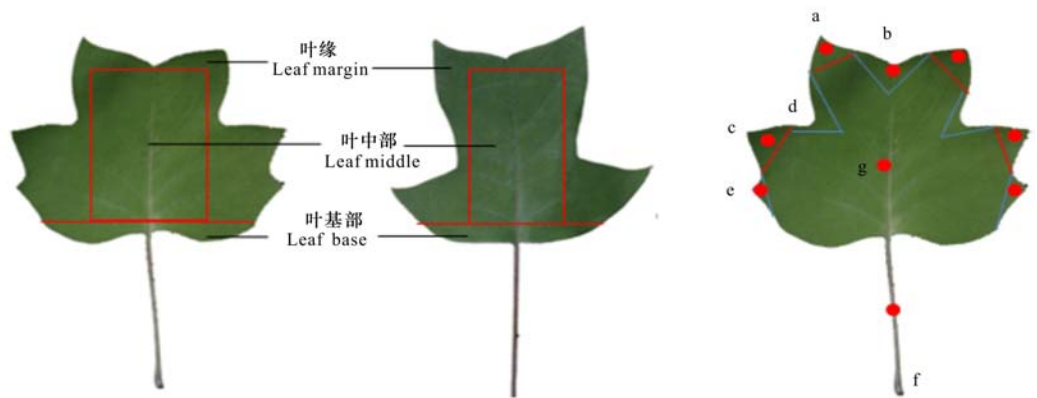
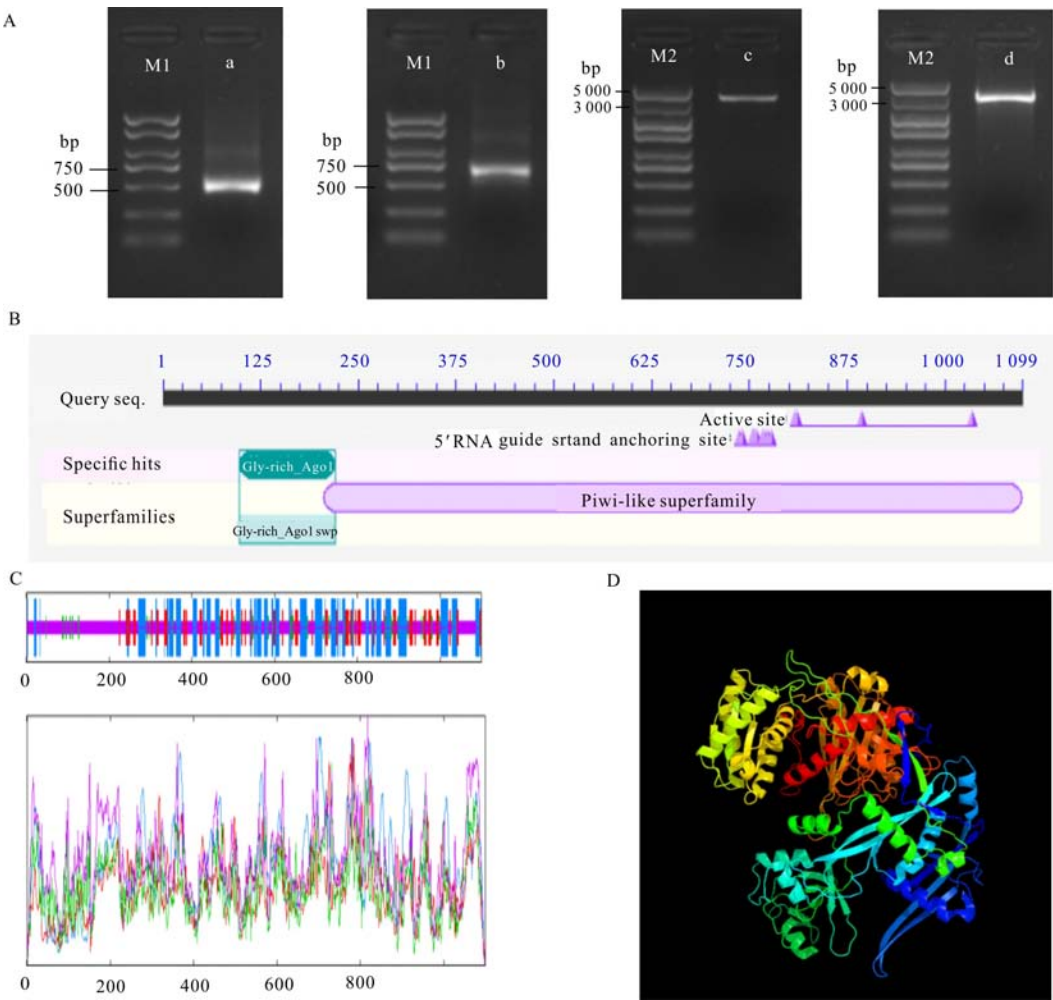


图 1 北美鹅掌楸和鹅掌楸的叶片和采样部位
Fig. 1 Leaves and sampling parts of *Liriodendron chinense* and *L. tulipifera*



A. a. 5'-RACE; b. 3'-RACE; c. 中间片段; d. 开放阅读框; M1. Maker 2 000; M2. Maker 5 000; B. 保守结构域; C. 二级结构; D. 三级结构。
A. a. 5'-RACE segment; b. 3'-RACE segment; c. Middle segment; d. Open reading frame(ORF) fragment; M1. Maker 2 000; M2 . Maker 5 000; B. Conserved domain; C. Secondary structure; D. Tertiary structure.

图 2 *LtAGO1* 的克隆与结构分析
Fig. 2 Cloning and structure analysis of *LtAGO1* proteins

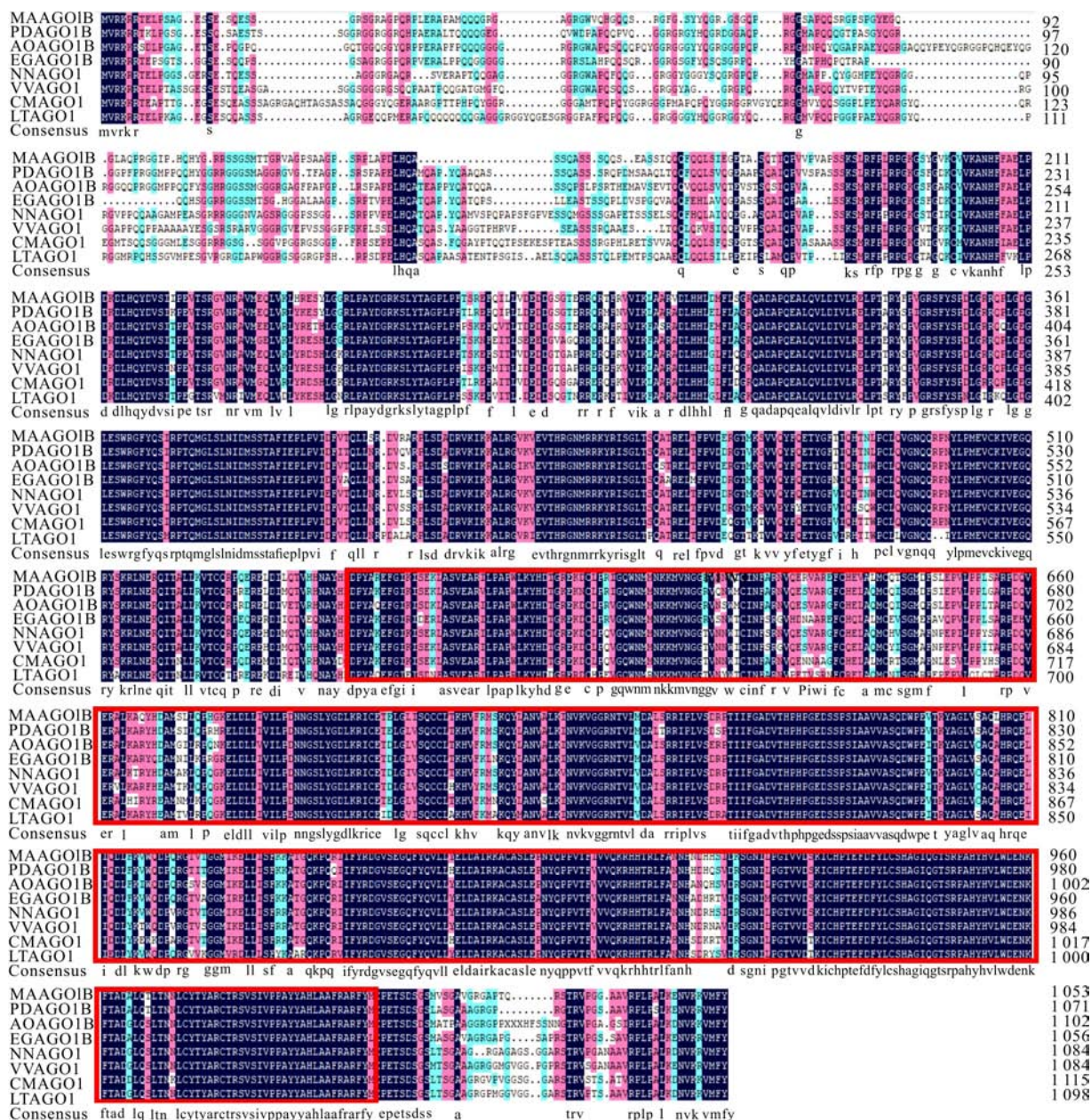


图3 LiAGO1 蛋白同源性分析

Fig. 3 Homology analysis of LiAGO1 protein

芽,与龙眼(杨曼曼,2015)、苹果(鹿游等,2013)的组织特异性研究结果类似,说明 *AGO1* 在幼苗期参与叶原基的分化,而在生殖期普遍存在于细胞分裂生长较旺盛的花器官中。

启动子是基因转录的调控中心,本研究预测到 *LiAGO1* 基因启动子上含有多个光响应、激素诱导、分生组织表达及多个非生物胁迫响应元件,进一步研究发现 *ProAGO1* 能成功启动 GUS 表达,其

表达具有时空特异性:GUS 在幼苗期的顶端分生组织表达,随着顶端逐渐分化出新的叶片,该启动子仅在新分化的叶柄处表达,后期在成熟的花、果荚、叶和茎的维管束中表达。Vaucheret 等(2006)对转 *ProAGO1::GUS* 的拟南芥分析发现,*AGO1* 在整个发育过程中表达,尤其在分生组织和维管束组织中的表达丰度最高。这说明 *AGO1* 的表达不仅在顶端分生组织,也在侧生分生组织中的其他

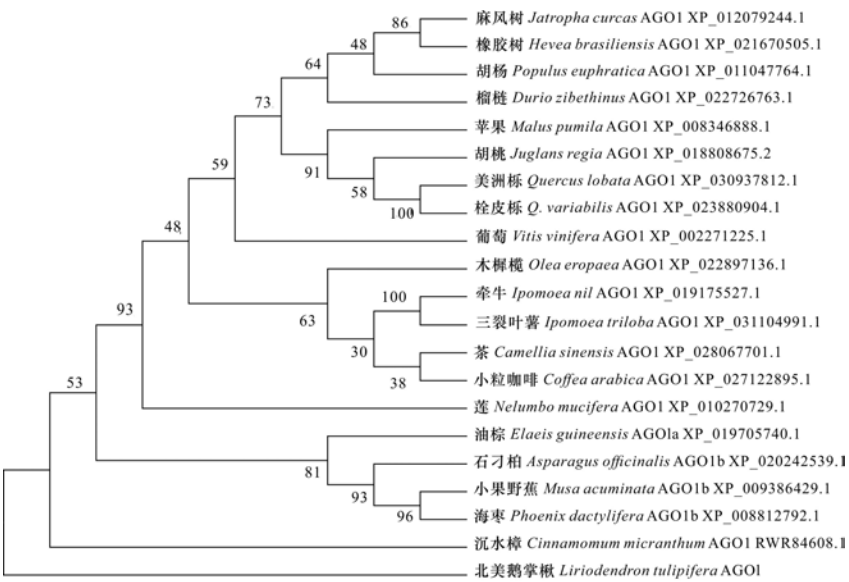
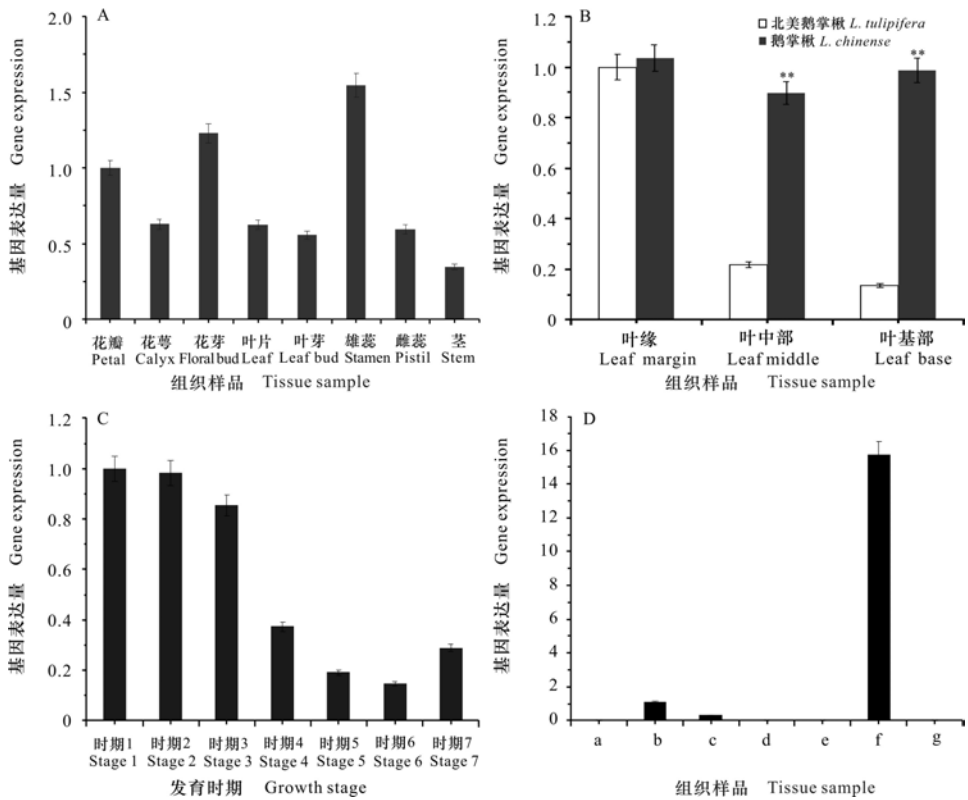


图 4 LtAGO1 蛋白系统进化分析
Fig. 4 Homology and phylogenetic analysis of LtAGO1 protein



A. *AGO1* 在北美鹅掌楸不同组织中的表达; B. *AGO1* 在鹅掌楸属不同组织中的表达; C. *AGO1* 在北美鹅掌楸不同发育时期叶中的表达; D. *AGO1* 在北美鹅掌楸叶不同部位中的表达。**表示差异极显著 ($P<0.01$)。
A. *AGO1* gene expressions of different tissues in *L. tulipifera*; B. *AGO1* gene expressions of different tissues in *Liriodendron*; C. *AGO1* gene expressions of different times of leaf in *L. tulipifera*; D. *AGO1* gene expressions of different parts of leaf in *L. tulipifera*. ** means extremely significant differences ($P<0.01$).

图 5 *AGO1* 基因在鹅掌楸属不同组织中的表达模式
Fig. 5 Expression patterns of *AGO1* gene in different tissues of *Liriodendron L.*

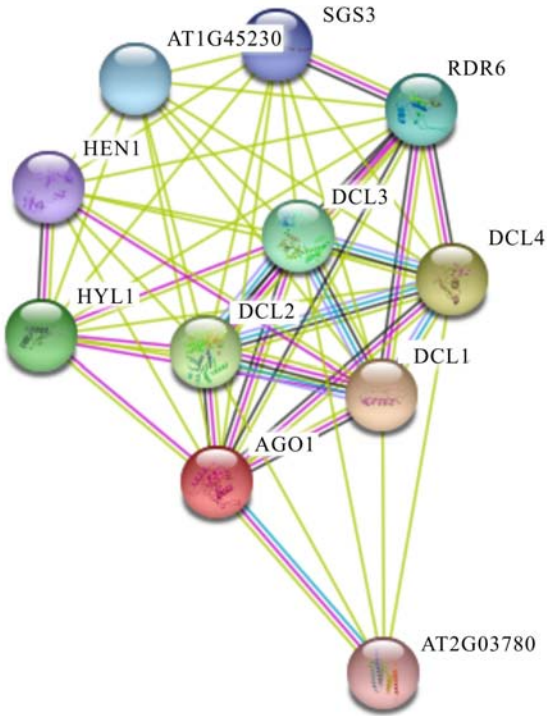


图 6 *LtAGO1* 蛋白共表达网络
Fig. 6 Co-expression network of *LtAGO1* protein

部位,但目前有关相应的表达机理还未见报道。

叶极性分化是原基细胞感受极性分化信号并作出相应反应的过程,而沿着近-远轴、基-顶轴和中-侧轴 3 个极性方向分化的过程又决定了叶形态的建成过程 (Du et al., 2018)。本研究通过转 *ProAGO1::GUS* 表达载体得到叶柄弯曲、叶中-侧轴向和基-顶轴向极性丧失的拟南芥株系。在番茄中下调 *SLAGO1* 的表达,会导致远轴面出现与近轴面相同的毛状体,且叶片小叶柄出现发育缺陷 (Wang et al., 2015)。此外, *LtAGO1* 启动子的表达能促使拟南芥在发育过程中发生异位分生组织的活动,致使拟南芥叶基楔形、叶顶端缺刻呈心形。在对 *AGO1* 功能缺失突变体的其他研究中,发现 *AGO1* 的缺失会促使植物体的叶卷曲、植株矮化及结实率下降 (Wu et al., 2009; Liu & Nonomura, 2016), Kidner 等 (2005) 对过表达 *AGO1* 和双突变的拟南芥分析发现, *AGO1* 是通过激活 *STM* 基因调节干细胞功能从而影响叶的极性效应。由此可知, *AGO1* 基因的缺失和过表达都会不同程度地影响叶极性的丧失,推测 *AGO1* 可能是通过两种不同的调控途径参与到叶的形态建成中。目前,对这

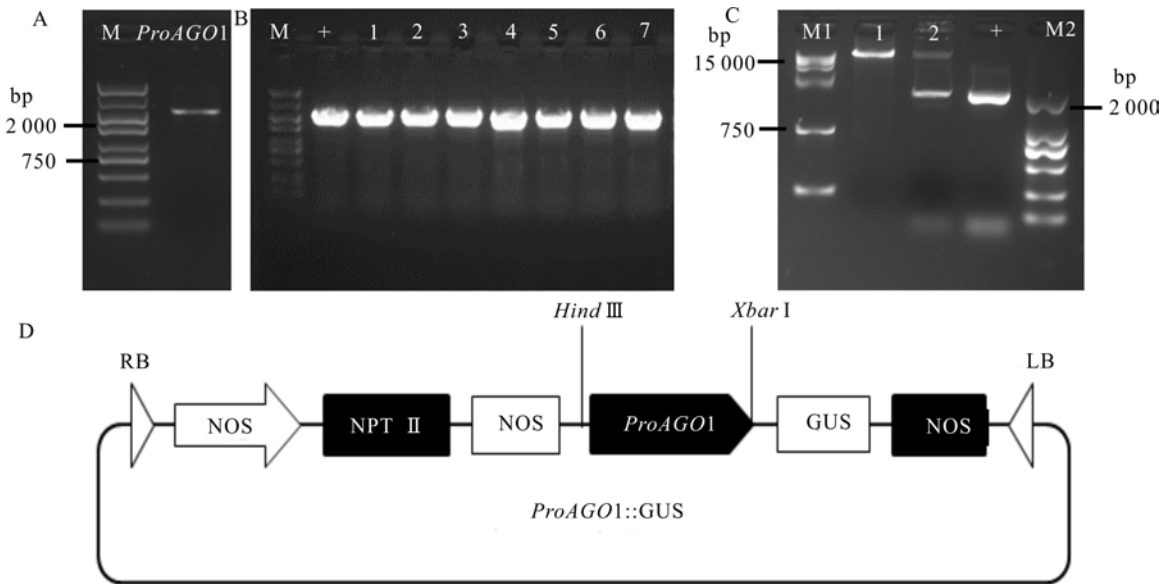
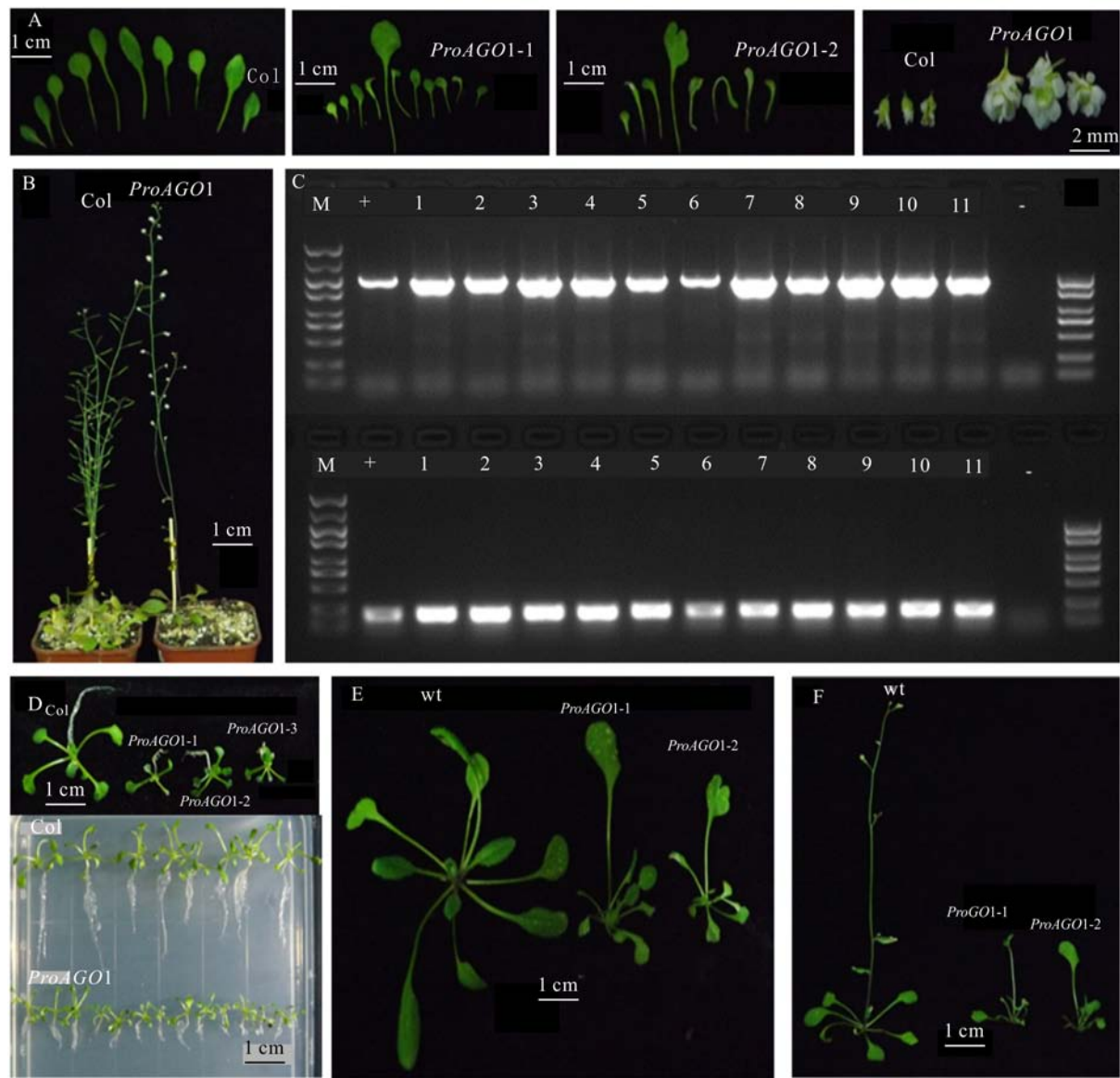


图 7 *LtAGO1* 启动子的克隆及载体构建
Fig. 7 Cloning and vector construction of *LtAGO1* promoter



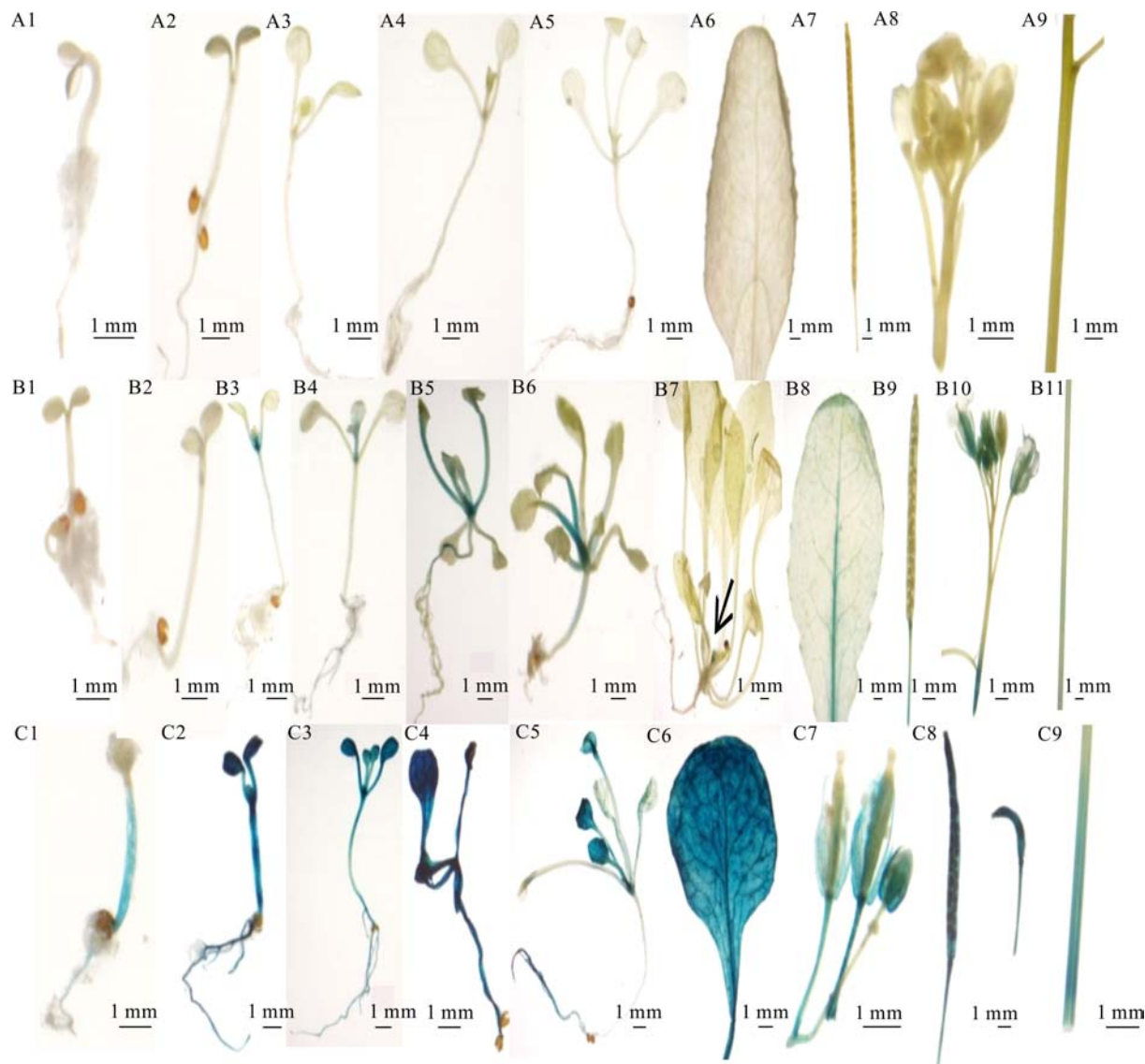
A. 拟南芥叶片和花的表型; B. 拟南芥花不育的表型; C. M 为 DL 5 000 DNA 分子标准量; +. *LtAGO1* 启动子序列; 1-11. 转 *ProAGO1::GUS* 拟南芥植株; -. 阴性对照; D. 拟南芥幼苗根的发育; E. 拟南芥莲座叶的发育; F. 拟南芥花的发育。
A. Leaf and flower phenotypes of *A. thaliana* ; B. Phenotype of floral sterility in *A. thaliana*; C. M. DNA marker DL 5 000; +. *LtAGO1* promoter sequence; 1-11. Transgenic *ProAGO1::GUS* in *A. thaliana* plants; -. Negative control; D. Root development of *A. thaliana* seedlings; E. Development of rosette leaf in *A. thaliana* ; F. Flower development in *A. thaliana*.

图 8 转 *ProAGO1::GUS* 拟南芥植株的 PCR 鉴定和表型观察

Fig. 8 PCR identification and phenotype of transgenic *ProAGO1::GUS Arabidopsis thaliana* plants

一分子机制的研究普遍认为,叶原基和叶发育的过程皆需要 *STM* 处于激活状态,且 *KNOX I* 家族其他基因处于沉默状态。Yang 等(2006)发现 *AGO1* 是通过正向调控 *STM* 和抑制 *KNOX I* 的表达而决定叶片和花瓣近-远轴的发生。Arunika 等(2004)研究认为,叶片的形态建成(如叶中孔洞的形成、

叶缘的裂痕)均与关键部位的细胞发生程序性死亡(PCD)相关,而 Zhang 等(2009)的研究也证实正向卷曲叶片的发生是因为背面叶肉细胞的程序性死亡。那么,*AGO1* 是否也是通过调控细胞的分化方向和速度而影响叶形的多样性,且该基因如何响应叶原基分化的起始信号,其具体调控机制



A1–A9. 生长 4、6、9、12、16、45 d 的野生型植株；**B1–B11.** 生长 4、6、9、12、16、20、25、45 d 的转 *ProAGO1::GUS* 植株；**C1–C9.** 生长 4、6、9、12、16、45 d 的转 *35S::GUS* 植株。
A1–A9. Wild *A. thaliana* seedlings of 4, 6, 9, 12, 16, 45-day-old; **B1–B11.** Transgenic *ProAGO1::GUS A. thaliana* seedlings of 4, 6, 9, 12, 16, 20, 25, 45-day-old; **C1–C9.** Transgenic *35S::GUS A. thaliana* seedlings of 4, 6, 9, 12, 16, 45-day-old .

图 9 转基因拟南芥组织 GUS 染色分析

Fig. 9 Promoter-GUS assay of transgenic *Arabidopsis thaliana* in different parts

有待进一步研究。在生殖发育方面,该研究的表达株系抽薹较晚,花大而重瓣且不育,这一现象与 Li 等 (2019) 的研究结果相吻合。究其原因,可能是花器官由顶端分生组织分化形成,*AGO1* 在顶端分生组织中持续而稳定的表达,从而能参与到叶与花器官的形态建成中。但是,两者之间有无相关的基因共同被 *AGO1* 所调控,还有待于进一步研究。

本研究以北美鹅掌楸为研究对象,首次分析了 *LtAGO1* 在不同组织部位的时空表达谱,明确了其启动子在拟南芥分生组织中的表达模式,初步探索了 *LtAGO1* 对北美鹅掌楸叶形发育的调控作用。下一步我们将会构造 *LtAGO1* 超表达载体转化杨树,并将 *LtAGO1* 与叶形发育的关键成员 *KNOX I* 家族基因进行蛋白互作研究。本研究结果将为进一步分析 *AGO1* 基因在木本植物生长发育

过程中的作用提供理论参考,也为促进观叶树种的叶形态遗传改良研究提供良好的实践意义。

参考文献:

- ADRIEN T, PATRICIA B, MARIE-CLAIRE C, et al., 2019. Cell cycle-dependent regulation and function of *ARGONAUTE1* in plants [J]. *Plant Cell*, 31(8): 1734–1750.
- ARUNIKA HL, GUNAWARDENA AN, JONE S, et al., 2004. Programmed cell death pemodels lace plant leaf shape during development [J]. *Plant Cell*, 16(1): 60–73.
- BOWMAN JL, ESHED Y, 2000. Formation and maintenance of the shoot apical meristem [J]. *Trends Plant Sci*, 5(3): 110–115.
- CHEN JH, HAO ZD, GUANG XM, et al., 2019. *Liriodendron* genome sheds light on angiosperm phylogeny and species-pair differentiation [J]. *Nat Plants*, 5(1): 18–25.
- CHEN XM, LIU J, CHENG YL, et al., 2002. *HEN1* functions pleiotropically in *Arabidopsis* development and acts in C function in the flower [J]. *Development*, 129(5): 1085–1094.
- CLOUGH SJ, BENT AF, 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 16(6): 735–743.
- DAI SY, HSU WH, YANG CH, 2019. The gene *ANTHER DEHISCENCE REPRESSOR*(*ADR*) controls male fertility by suppressing the ROS accumulation and anther cell wall thickening in *Arabidopsis* [J]. *Sci Rep*, 9(5112): 4635–4648.
- DEY N, SARKAR S, ACHARYA S, et al., 2015. Synthetic promoters in planta [J]. *Planta*, 242(5): 1077–1094.
- DU F, GUAN CM, JIAO YL, 2018. Molecular mechanisms of leaf morphogenesis [J]. *Mol Plant*, 11(9): 1117–1134.
- ELENA L, FEDERICO B, MARIA JL, et al., 2020. *ARGONAUTE1* and *ARGONAUTE4* regulate gene expression and hypoxia tolerance [J]. *Plant Physiol*, 182(1): 287–300.
- Feng N, 2018. Transcriptome and miRNA analyses of young inflorescences in wheat(*Triticum aestivum* L.) [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences: 57–63. [冯楠, 2018. 小麦幼穗发育的转录组和 miRNA 调控网络分析 [D]. 北京: 中国农业科学院: 57–63.]
- JEFFERSON RA, 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 5(4): 387–405.
- KIDNER CA, MARTIENSSEN RA, 2005. The role of *ARGONAUTE1*(*AGO1*) in meristem formation and identity [J]. *Dev Biol*, 280(2): 504–517.
- LI HY, YANG X, WANG SB, 2018. Cloning and subcellular localization of *ARGONAUTE1* gene from *Populus euphratica* [J]. *J Henan Univ Sci Technol (Nat Sci Ed)*, 39(5): 68–73. [李红英, 杨雪, 王少博, 2018. 胡杨 *ARGONAUTE1* 基因克隆与亚细胞定位 [J]. 河南科技大学学报(自然科学版), 39(5): 68–73.]
- LI SF, ZAO Y, JI LS, 2014. Influences of *AGO1* to the development of the *Arabidopsis* leaves with the serration margin [J]. *J Hebei For Univ*, 35(1): 51–57. [李素芬, 赵燕, 冀芦沙, 2014. *AGO1* 基因对影响拟南芥叶边缘锯齿状发育的影响 [J]. 河北科技大学学报, 35(1): 51–57.]
- LI SY, 2015. Gibberellin impact on lotus plant height and cloning and expression analysis of its related genes [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University: 25–34. [李四游, 2015. 赤霉素对莲株型影响及其相关基因克隆与时空表达分析 [D]. 武汉: 华中农业大学: 25–34.]
- LI YH, YANG YQ, LIU Y, et al., 2019. Overexpression of *OsAGO1b* induces adaxially rolled leaves by affecting leaf abaxial sclerenchy matous cell development in rice [J]. *Rice*, 12(1): 60.
- LIU C, XIN Y, XU L, et al., 2018. *Arabidopsis ARGONAUTE1* binds chromatin to promote gene transcription in response to hormones and stresses [J]. *Dev Cell*, 44(3): 348–361.
- LIU H, NONOMURA KI, 2016. A wide reprogramming of histone H3 modifications during male meiosis I in rice is dependent on the Argonaute protein MEL1 [J]. *J Cell Sci*, 129(19): 3553–3561.
- LIU X, TAN CC, CHENG X, et al., 2020. *miR168* targets *Argonaute1A* mediated miRNAs regulation pathways in response to potassium deficiency stress in tomato [J]. *BMC Plant Biol*, 20(1): 477.
- LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2[−](Delta Delta C(T)) method [J]. *Methods*, 25(4): 402–408.
- LU Y, MA C, MENG D, et al., 2013. Clone and expression of *AGO1* gene and development-related miRNA in apple (Golden Delicious) [J]. *J Chin Agric Univ*, 18(5): 69–76. [鹿游, 马超, 孟冬, 等, 2013. 苹果‘金冠’ *AGO1* 基因克隆及与发育相关 miRNA 表达分析 [J]. 中国农业大学学报, 18(5): 69–76.]
- MA JK, MEI GG, LIU HH, et al., 2019. Overexpression of a Novel *LcKNOX* transcription factor from *Liriodendron chinense* induces lobed leaves in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Forests*, 11(1): 33.
- MA JK, WEI LM, LI JY, et al., 2018. The analysis of genes and phytohormone metabolic pathways associated with leaf shape development in *Liriodendron chinense* via de novo transcriptome sequencing [J]. *Genes*, 9(12): 577.
- MA M, GUO KQ, GUO QR, 2007. Studies on genomic DNA extraction of forest species with improved CTAB method [J]. *Biotechnology*, 17(3): 36–38. [马明, 杨克强, 郭起荣, 2007. 改良 CTAB 法提取林木树种基因组 DNA 的研究 [J]. 生物技术, 17(3): 36–38.]

- PARK W, LI JJ, SONG RT, et al., 2002. CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Curr Biol*, 12(17): 1484–1495.
- PERAGINE A, YOSHIKAWA M, WU G, et al., 2004. SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis* [J]. *Genes Dev*, 18(19): 2368–2379.
- SAITO K, SIOMI MC, 2010. Small RNA-mediated quiescence of transposable elements in animals [J]. *Dev Cell*, 19(5): 687–697.
- SHEN ZG, YU D, HU ZH, et al., 2003. Comparative and the correlative studies on the structure and the content of anthraquinones in 3 *Aloe* leaves [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 23(7): 1148–1153. [沈宗根, 郁达, 胡正海, 等, 2003. 芦荟属 3 种植物不同叶龄、不同部位叶内蒽醌类物质含量及其变化的研究 [J]. 西北植物学报, 23(7): 1148–1153.]
- SHIH CF, HSU WH, PENG YJ, et al., 2014. The NAC-like gene AIF acts as a repressor that controls anther dehiscence by regulating genes in the jasmonate biosynthesis pathway in *Arabidopsis* [J]. *J Exp Bot*, 65(2): 621–639.
- TU ZH, HAO ZY, ZHONG WP, et al., 2019. Identification of suitable reference genes for RT-qPCR assays in *Liriodendron chinense* (Hemsl.) sarg [J]. *Forests*, 10(5): 441–457.
- VAUCHERET H, 2006. Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations [J]. *Genes Dev*, 20(7): 759–771.
- WANG T, LI R, WEN LW, et al., 2015. Functional analysis and RNA sequencing indicate the regulatory role of Argonaute1 in tomato compound leaf development [J]. *PLoS ONE*, 10(10): e140756.
- WANG YY, 2019. New function of AGO1 in *arabidopsis* small RNA pathway [D]. Shenzhen: Shenzhen University: 38–53. [王永益, 2019. 拟南芥 AGO1 在小 RNA 通路中的新功能研究 [D]. 深圳: 深圳大学: 38–53.]
- WU L, ZHANG QQ, ZHOU HY, et al., 2009. Rice microRNA effector complexes and targets [J]. *Plant Cell*, 21(11): 3421–3435.
- XIAO HJ, 2014. Cloning and functional analysis of leaf senescence ce-related genes in *Capsicum annuum* L. [D]. Yangling: Northwest A & F University: 43–76. [肖怀娟, 2014. 辣椒叶片衰老相关基因的克隆与功能分析 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学: 43–76.]
- XU DD, 2014. Cloning and functional identification of maize AGO1a gene [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences: 27–39. [徐东东, 2014. 玉米 AGO1a 基因分离与功能鉴定 [D]. 北京: 中国农业科学院: 27–39.]
- XU X, LI DD, LI SJ, et al., 2014. Clone and expression analysis of AGO genes from *Zea mays* L. [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 34(3): 449–453. [许鑫, 李丹丹, 李双江, 等, 2014. 玉米 AGO 基因的克隆与表达分析 [J]. 西北植物学报, 34(3): 449–453.]
- YANG L, HUANG WH, WANG H, et al., 2006. Characterizations of a hypomorphic argonaute mutant reveal novel AGO1 functions in *Arabidopsis* lateral organ development [J]. *Plant Mol Biol*, 61(1/2): 63–78.
- YANG MM, 2015. The study of cloning and expression analysis of AGO gene from embryogenic callus in *Dimocarpus longan* Lour. [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University: 56–64. [杨曼曼, 2015. 龙眼胚性愈伤组织 AGO 基因克隆与表达分析 [D]. 福州: 福建农林大学: 56–64.]
- YANG Y, XU M, LUO QF, et al., 2014. De novo transcriptome analysis of *Liriodendron chinense* petals and leaves by Illumina sequencing [J]. *Gene*, 534(2): 155–162.
- YAO XH, WANG Y, AN LK, et al., 2021. Identification and expression analysis of *HvtAGO1* gene in response to barley leaf stipe in Tibetan hullless barley [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 41(1): 20–28. [姚晓华, 王越, 安立昆, 等, 2021. 青稞 *HvtAGO1* 基因的克隆及其在条纹病胁迫下的表达 [J]. 西北植物学报, 41(1): 20–28.]
- YOSHIKAWA M, IKI T, TSUTSUI Y, et al., 2013. 3' fragment of miR173-programmed RISC-cleaved RNA is protected from degradation in a complex with RISC and SGS3 [J]. *Pnas*, 110(10): 4117–4122.
- YU BJ, CHEN X, EBRIGHT YW, et al., 2006. HEN1 recognizes 21–24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2'OH of the 3' terminal nucleotide [J]. *Nucl Acid Res*, 34(2): 667–675.
- YU B, YANG ZY, LI JJ, et al., 2005. Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis [J]. *Science*, 307(5711): 932–935.
- ZHANG GH, XU Q, ZHU XD, et al., 2009. SHALLOT-LIKE1 is a KANADI transcription factor that modulates rice leaf rolling by regulating leaf abxial cell development [J]. *Plant Cell*, 21(3): 719–735.
- ZHANG JF, YUAN LJ, SHAO Y, et al., 2008. The disturbance of small RNA pathways enhanced abscisic acid response and multiple stress responses in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell Environ*, 31(4): 562–574.

(责任编辑 蒋巧媛)

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202012045



王卓为, 戴梦怡, 程少禹, 等. 紫玉兰‘红元宝’*MI3GT1* 基因的克隆及表达分析 [J]. 广西植物, 2022, 42(8): 1417–1425.
WANG ZW, DAI MY, CHENG SY, et al. Cloning and expression analysis of *MI3GT1* in *Magnolia liliflora* ‘Hongyuanbao’ [J].
Guihaia, 2022, 42(8): 1417–1425.

紫玉兰‘红元宝’*MI3GT1* 基因的克隆及表达分析

王卓为¹, 戴梦怡¹, 程少禹¹, 王小德¹, 王亚玲², 申亚梅¹, 张超^{1*}

(1. 浙江省园林植物种质创新与利用重点实验室/南方园林植物种质创新与利用国家林业和草原局重点实验室/
浙江农林大学 风景园林与建筑学院, 杭州 311300; 2. 西安植物园, 西安 710061)

摘要: UDP-类黄酮 3-O-葡萄糖基转移酶(3GT)是花青素生物合成途径的重要催化酶之一。为研究其在紫玉兰花青素苷合成途径中的作用,该文以紫玉兰品种‘红元宝’(*Magnolia liliflora* ‘Hongyuanbao’)为材料,根据转录组测序获得的 3GT 序列设计引物,利用 RT-PCR 技术克隆花青素苷生物合成途径中的结构基因 *MI3GT1*,并对其进行生物信息学和表达模式分析。结果表明:(1)*MI3GT1* 基因的 cDNA 序列长度为 1 863 bp,其中最长开放阅读框(ORF)为 1 374 bp,编码一条 457 aa 的肽链,相对分子质量为 49.37 kDa,理论等电点(pI)为 6.04。(2)氨基酸序列比对显示其具备典型的植物次生产物糖基转移酶信号序列(PSPG box)。(3)系统发育分析结果表明,*MI3GT1* 蛋白与小苍兰、矮牵牛、番薯等物种的 3GT 蛋白聚在一支。(4)qRT-PCR 结果显示 *MI3GT1* 基因的表达具有时空特异性,在花中的表达量最高,在嫩叶和老叶中有少量表达,而在根和茎中几乎不表达;随着花的发育,*MI3GT1* 基因的表达量呈现先降低后升高的趋势,并在盛花期达到最高。上述结果表明,*MI3GT1* 可能参与类黄酮 3-O 的糖基化修饰,本研究结果将为木兰属植物花色育种研究奠定基础。

关键词: 紫玉兰, 花色, 糖基转移酶, 基因克隆, 表达分析

中图分类号: Q943 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2022)08-1417-09

Cloning and expression analysis of *MI3GT1* in *Magnolia liliflora* ‘Hongyuanbao’

WANG Zhuowei¹, DAI Mengyi¹, CHENG Shaoyu¹, WANG Xiaode¹, WANG Yaling²,
SHEN Yamei¹, ZHANG Chao^{1*}

(1. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Germplasm Innovation and Utilization for Garden Plants/Key Laboratory of National Forestry and
Grassland Administration on Germplasm Innovation and Utilization for Southern Garden Plants/College of Landscape Architecture,
Zhejiang A & F University, Hangzhou 311300, China; 2. Xi'an Botanical Garden, Xi'an 710061, China)

Abstract: UDP-flavonoid 3-O-glucosyltransferase (3GT) is one of the important catalytic enzymes in the anthocyanin biosynthesis pathway. To study the function of 3GT in anthocyanin biosynthesis of *Magnolia liliflora*, *M. liliflora*

收稿日期: 2021-06-19

基金项目: 浙江省“十三五”林木育种专项(2016C02056-1);浙江省重点研发项目(2019C02023) [Supported by Special Project of Forest Breeding in Zhejiang Province during the 13th Five-Year Plan(2016C02056-1); Zhejiang Province Key Research and Development Projects(2019C02023)]。

第一作者: 王卓为(1996-), 硕士研究生, 主要从事园林植物遗传育种与种质创新研究, (E-mail) 1076529339@qq.com。

*通信作者: 张超, 博士, 副教授, 主要从事观赏植物分子生物学研究, (E-mail) zhangc@zafu.edu.cn。

‘Hongyuanbao’ was employed as materials. Primers were designed based on the 3GT sequence obtained from the transcriptome database of *M. liliflora* ‘Hongyuanbao’, and the structural gene *MI3GT1* in anthocyanin biosynthesis pathway was cloned by RT-PCR (reverse transcription-PCR), and its bioinformatics and expression pattern were analyzed. The results were as follows: (1) The cDNA sequence length of *MI3GT1* was 1 863 bp, and the open reading frame was 1 374 bp, encoding 457 amino acid residues. The relative molecular weight of *MI3GT1* was 49.37 kDa, and its isoelectric point was 6.04. (2) The deduced amino acid sequence of *MI3GT1* contains a conserved plant secondary product glycosyltransferase signature sequence (PSPG box). (3) Results of the phylogenetic analysis showed that *MI3GT1* protein was closely relative to 3GT proteins from *Freesia hybrida*, *Petunia × hybrida*, and *Ipomoea batatas*. (4) Results of fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) revealed that *MI3GT1* has spatio-temporal specificity, with the highest expression level in flowers, the lower expression level in young leaves and old leaves, and little expression in roots and stems; With the development of flowers, the expression level of *MI3GT1* gene decreased first, then increased, and showed the highest expression level at the fully-flowering period. These results suggest that *MI3GT1* may be involved in flavonoid 3-O-glycosylation. This study will lay a foundation for the flower and color breeding of *Magnolia* plants.

Key words: *Magnolia liliflora*, flower color, glycosyltransferase, gene cloning, expression analysis

花色是观赏植物重要的品质性状之一,花青素苷 (anthocyanin) 是由花青素苷元 (anthocyanidin) 和糖组成的糖苷,是影响花色的一类重要色素物质 (戴思兰和洪艳, 2016)。目前,关于花青素的生物合成途径的研究已经比较深入。图 1 显示花青素生物合成通路上的 3 条主链产生矢车菊素 (cyanidin)、天竺葵素 (pelargonidin) 以及飞燕草素 (delphinidin), 矢车菊素甲基化生成芍药色素 (peonidin), 矮牵牛色素 (petunidin) 和锦葵色素 (malvidin) 则由飞燕草素不同程度的甲基化而来,共同构成了自然界中 6 种主要花色素 (朱丽娟等, 2012)。对花青素苷元进行糖基化修饰,可形成稳定的花青素苷并对呈色具有重要作用 (招雪晴等, 2017)。

在植物花色形成过程中,UDP-类黄酮 3-O-葡萄糖基转移酶 (UDP-flavonoid 3-O-glucosyltransferase, 3GT) 通常作用于花青素苷合成途径的最后一步,能够催化 UDP-葡萄糖中的糖分子转移到花色素的 C3 羟基位点上,将花青素转化生成该通路上第一个稳定的花青素苷 (Sui et al., 2011)。花青素在自然条件下性质不稳定,易通过糖苷键与糖形成花青素苷 (Nakatsuka et al., 2008),构成花青素苷的单糖主要有葡萄糖、鼠李糖、半乳糖、木糖和阿拉伯糖 (庄维兵等, 2018)。从化学的角度来看,糖的结合增加了花青素苷的稳定性和水溶性,花青素最常在 C3 位发生 O-糖基化,其次是 C5 位的糖基化,糖基化使花青素很容易从细胞质的生产部位转移到液泡 (Nakatsuka et al., 2008),从而使颜色稍微向红色转变 (Tanaka et al., 2008)。由此可见,糖基化对花色

的形成起到关键作用。

第一个被发现可以催化花青素 C3 羟基糖基化的酶是玉米 (*Zea mays*) Bronze-1 (X13500),由于花青素的积累较少, Bronze 突变体呈现出苍白的色粒 (Dooner & Nelson, 1977; Larson & Coe, 1977)。迄今为止, 3GT 基因已经在矮牵牛 (*Petunia hybrida*) (Jonsson et al., 1984)、三花龙胆 (*Gentiana triflora*) (Tanaka et al., 1996)、荷兰鸢尾 (*Iris hollandica*) (Yoshihara et al., 2005)、小苍兰 (*Freesia hybrida*) (Sui et al., 2011)、滇牡丹 (*Paeonia delavayi*) (王毅等, 2017)、葡萄风信子 (*Muscari armeniacum*) (杜灵娟等, 2017) 等观赏植物中克隆得到。在大多数植物中, 3GT 的表达常常与花青素的积累正相关,如 *Fh3GT* 和 *MdUFGT*,然而在有的植物中,如 *Ze3GT*,其表达并不呈现正相关的趋势 (Ban et al., 2009; Sui et al., 2011; Hu et al., 2016; Qian et al., 2021)。*PeUFGT3* 在蝴蝶兰 (*Phalaenopsis equestris*) 红色形成中起着重要作用,抑制 *PeUFGT3* 的表达导致花青素含量的显著下降 (Chen et al., 2011)。舒庆艳等 (2018) 利用 VIGS 技术沉默紫斑牡丹 (*Paeonia suffruticosa*) *PsUF3GT* 基因, 3G 型糖苷和 3G5G 型糖苷都有不同程度的降低。由此可见, 3GT 基因在植物花色形成中具有重要作用。

紫玉兰 ‘红元宝’ (*Magnolia liliflora* ‘Hongyuanbao’) 为木兰科 (Magnoliaceae) 木兰属 (*Magnolia*) 的多年生落叶灌木,是紫玉兰 (*Magnolia liliflora*) 的栽培品种,该品种花色深于紫玉兰。课题

组前期研究显示,紫玉兰和紫玉兰‘红元宝’花被片中均含有 4 种在 C3 位芸香糖苷修饰的花青素苷,即矢车菊素 3-O-芸香糖苷-5-O-葡萄糖苷(Cy3Ru5G)、矢车菊素 3-O-芸香糖苷(Cy3Ru)、芍药素 3-O-芸香糖苷-5-O-葡萄糖苷(Pn3Ru5G)、芍药素 3-O-芸香糖苷(Pn3Ru) (Wang et al., 2019)。花青素的 C3 位芸香糖苷化修饰分两步完成,首先在 3GT 作用下 C3 位发生 O-葡萄糖基化,随后鼠李糖转移酶(3-O-rhamnosyltransferase, 3RT)才可以转移 O-鼠李糖苷与 O-葡萄糖苷相连形成芸香糖苷基团(Yamazaki et al., 2002)。由此推测紫玉兰‘红元宝’花色形成过程中,3GT 基因对 4 种花青素苷的合成具有重要作用。为进一步揭示其功能,本研究基于转录组数据,筛选出 3GT 基因,并对其进行克隆和表达分析,研究结果为木兰属植物花色形成机理研究提供重要依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

紫玉兰‘红元宝’十年生实生苗种植于浙江农林大学平山试验基地(119°42′54.67″E、30°15′50.09″N),选择生长健壮且无病虫害的植株,于 2019 年 4 月采取花蕾期(bud period)(S1)、露色期(dew color period)(S2)、初花期(initial flowering period)(S3)、半花期(half-flowering period)(S4)、盛花期(fully-flowering period)(S5)5 个时期的最外轮花瓣(图 2),锡纸包裹,液氮速冻固样。由于紫玉兰‘红元宝’为花叶同放,同时采集根、茎、老叶、嫩叶等组织部位的样品,保存于-80℃冰箱,用于 RNA 提取和荧光定量分析。

1.2 总 RNA 的提取、检测与 cDNA 的合成

使用诺禾致源 UltraClean Polysaccharide and phenol Plant RNA Purification Kit (DNA free) RNA 提取试剂盒(NHUC002S),提取紫玉兰‘红元宝’S1~S5 时期花瓣和根、茎、老叶、嫩叶等组织部位的总 RNA。使用 PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) (TaKaRa code: RR036A) 进行反转录反应。反转录后得到的 cDNA 保存在-20℃冰箱备用。

1.3 *MI3GT1* 基因克隆

利用本课题组前期构建的紫玉兰‘红元宝’花瓣转录组数据库(结果未发表),以 anthocyanidin/flavonoid 3-O-glucosyltransferase 为检索词,对注释到

Nr(non-redundant protein database)数据库的基因注释进行筛选,对得到的序列 CL3388.Contig1 进一步通过 NCBI 的 BLAST 功能(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行 blast 比对。在开放阅读框(open reading frame, ORF)框的两侧使用 Prime Prime 5.0 软件设计引物(表 1),引物由杭州有康生物技术有限公司合成。将紫玉兰‘红元宝’花发育的 S1~S5 共 5 个时期的 cDNA 等量混匀,稀释 10 倍作为模板,进行 RT-PCR 扩增。20 μL PCR 反应体系如下:上下游引物(10 μmol·L⁻¹)各 1 μL, cDNA 模板 1 μL, Premix Taq 10 μL, ddH₂O 7 μL。反应程序:95℃预变性 5 min 后运行 35 个循环(95℃变性 30 s, 59.6℃ 30 s, 72℃ 2 min); 72℃ 10 min, 10℃ 5 min。PCR 反应结束后,通过 1%(w/v)琼脂糖凝胶电泳分离目的片段。切胶后,使用 TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0 (TaKaRa code: No.9762)试剂盒按照使用说明书进行胶回收。回收后,取适量的回收产物连接至 pMD™18-T Vector (TaKaRa code: No.6011)。连接产物转化大肠杆菌 *Escherichia coil* DH5α Competent Cells (TaKaRa code: No. 9057),蓝白斑筛选后挑单克隆进行菌落 PCR 鉴定,条带正确的送至杭州有康生物技术有限公司进行 DNA 测序。

表 1 紫玉兰‘红元宝’*MI3GT1* 基因克隆及实时荧光定量引物

Table 1 Primers for cloning and real-time quantitative PCR of *MI3GT1* in *Magnolia liliflora* ‘Hongyuanbao’

引物名称 Primer name	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	用途 Function
<i>MI3GT1</i> -F	TACCCCAAACCCCATCCCACC	扩增 ORF
<i>MI3GT1</i> -R	CTTCTTCCGCTTCTTGCCCAT	To amplify ORF
<i>MI3GT1</i> -qPCR-F	GACCGCTTCGCCACAAA	实时荧光定量
<i>MI3GT1</i> -qPCR-R	CAATCCCTCCCTCGCCTTCT	Real-time quantitative PCR
<i>MbTEF</i> -F	AGGTTGAGAATGGTGAGACTGT	扩增内参基因
<i>MbTEF</i> -R	TCACGCACGGAATCATTACATT	To amplify reference gene

1.4 *MI3GT1* 基因的生物信息学分析

使用 SnapGene 4.1.8 软件去除载体序列,获得目的基因序列;使用 DANMAN 7.0 软件将核苷酸序列翻译成蛋白质序列;利用 NCBI 提供的 ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)分

析序列的编码区;利用 CDD 蛋白保守结构域数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 分析蛋白的保守域;利用 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 在线软件对紫玉兰‘红元宝’MI3GT1 蛋白序列的分子量、等电点、不稳定系数、脂肪指数和亲疏水性等理化性质进行预测;利用 protscale 在线网站分析该蛋白质的亲/疏水性 (<https://web.expasy.org/protscale/>);利用 SOPMA 在线软件 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl) 预测 MI3GT1 蛋白序列的二级结构;利用 SWISS-MODEL 在线网站 (swissmodel.expasy.org) 预测 MI3GT1 蛋白的三级结构;使用 DNAMAN 7.0 软件进行多序列比对,并使用 MEGA 6.0 软件构建系统发育进化树,系统发育进化树的构建在序列比对后,采用邻接法建树 (neighbor-joining, NJ), bootstrap 重复 1 000 次获得分支可信度。

1.5 MI3GT1 在花开放的不同时期与组织的表达分析

使用 Light Cycler 480 II (Roche) 实时定量 PCR 仪进行基因表达相对定量分析。反应体系:模板 2 μL , 上下游引物各 0.8 μL , 荧光染料 BCG Qpcr Master Mix (2 $\times$) 10 μL 和 6.4 μL ddH₂O。通过两步法进行 qRT-PCR, 扩增程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s 后运行 40 个循环 (95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s), 然后再运行 (95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s)。对反转录得到的 cDNA 分别进行 5 倍数梯度稀释, 以 *MbTEF* 为内参基因 (王宁杭等, 2019), 每个样品设置 3 个生物学重复。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目的基因的相对表达量。使用 SigmaPlot 14.0 软件进行数据分析和绘图。

2 结果与分析

2.1 MI3GT1 基因克隆及序列分析

紫玉兰‘红元宝’的 RT-PCR 结果显示, 扩增产物长 1 863 bp (图 3), 将测序得到的序列通与转录组序列 CL3388.Contig1 进行比对, 核苷酸序列相似性为 99.84%。利用 NCBI 的 ORF finder 分析发现其最长开放阅读框 1 374 bp, 编码 457 个氨基酸, 推导的氨基酸序列与转录组序列相似性为 100%。将该基因命名为 MI3GT1, 在 GenBank 登录号为 MW454862。

通过 NCBI 的 CDD 蛋白保守结构域数据库, 对紫玉兰‘红元宝’MI3GT1 蛋白保守区进行预测, 结

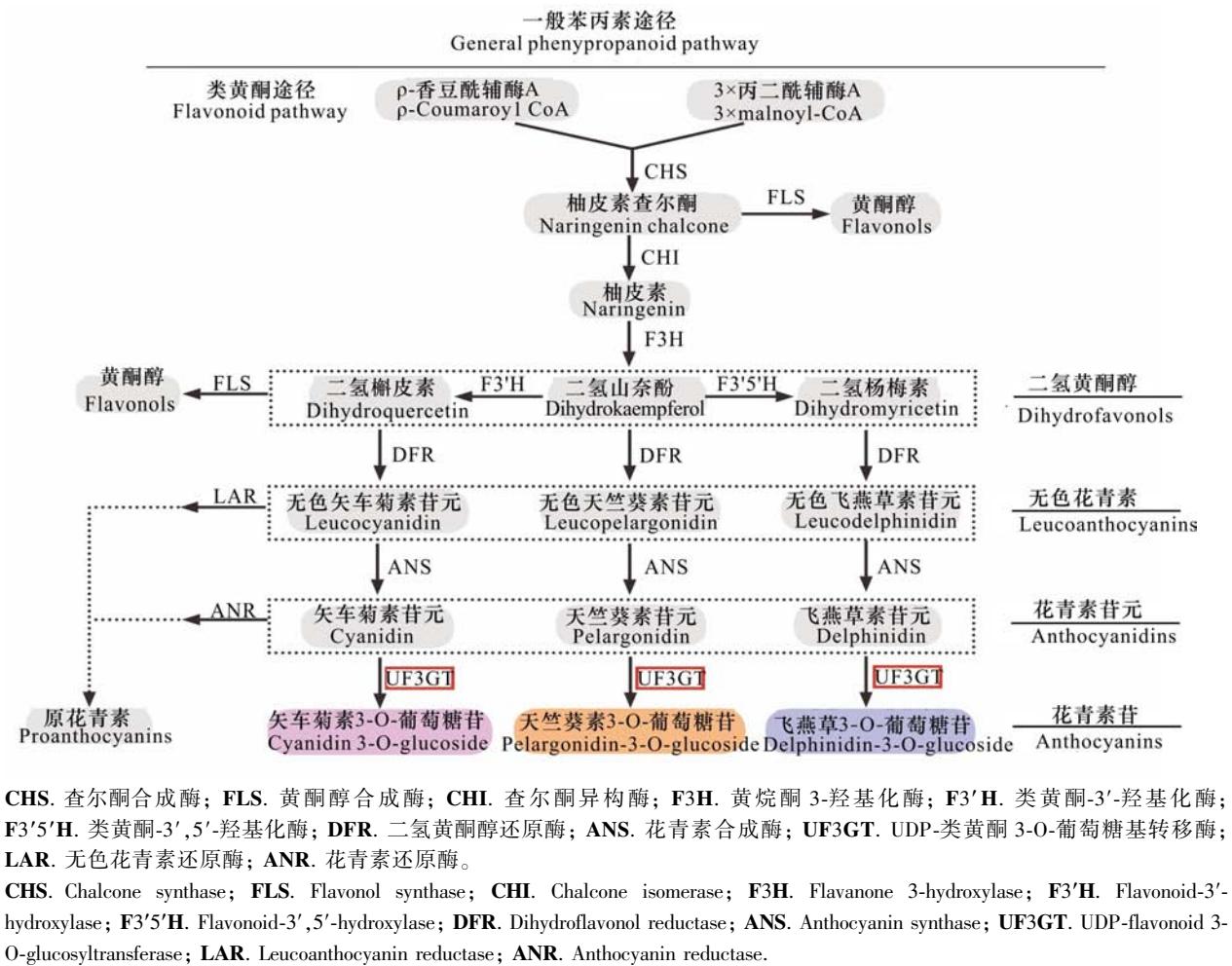
果表明, MI3GT1 具备尿嘧啶二磷酸-糖基转移酶结构域 (PLN02670), UDP-葡萄糖醛基/葡萄糖基转移酶保守域 (UDPGT), 表明 MI3GT1 属于糖基转移酶超家族, 具有 GT1_Gtf-like 结构域, 表明其属于植物界中最大的家族 1 糖基转移酶 (GT1s)。按照蛋白质的三维折叠模式, 糖基转移酶可以大致划分为 GT-A、GT-B 和 GT-C 三大类 (Coutinho et al., 2003), 预测结果显示, MI3GT1 为 GT-B 类的糖基转移酶。

利用 NCBI 的在线 Blastp 功能, 将 MI3GT1 的氨基酸序列与其他植物的氨基酸序列进行在线比对, 结果表明, MI3GT1 与沉水樟 (*Cinnamomum micranthum*) 3GT 的相似性最高, 达 60.35%, 与荷花 (*Nelumbo nucifera*)、杨梅 (*Morella rubra*)、海枣 (*Phoenix dactylifera*)、美洲葡萄 (*Vitis labrusca*)、蓖麻 (*Ricinus communis*) 等物种 3GT 的相似性较高, 为 49.00%~54.27%。

使用 DNAMAN 7.0 软件将 MI3GT1 推导的氨基酸序列与其他物种已发表的 3GT 氨基酸序列进行多序列比对。图 4 结果显示, MI3GT1 与拟南芥、苹果、玉米、矮牵牛、葡萄、三花龙胆 3GT 蛋白的相似性分别为 46.20%、44.20%、41.60%、38.40%、47.20%、41.80%, 且 MI3GT1 与其他 3GT 蛋白类似, 其 C 端具备典型的由 44 个氨基酸组成的保守序列, 即植物次生产物糖基转移酶信号序列 (PSPG box), 表明 MI3GT1 具备植物糖基转移酶特征, 可能参与次生代谢产物的糖基化修饰。MI3GT1 的 PSPG 基序为 WAPQTMVLGHVALGAFVTHCGWNSVMESITAGVPMICRPFFGDQ, 已有的研究表明, 糖供体特异性部分由 PSPG 盒中的最后氨基酸残基确定, 当为 Q 时使用葡萄糖作为糖供体, 当为 H 时则使用半乳糖 (Kubo et al., 2004), MI3GT1 的 PSPG 基序最后一个残基为 Q, 表明 MI3GT 可能属于 UDP-类黄酮糖基转移酶, 使用 UDP-葡萄糖作为糖供体。

2.2 MI3GT1 基因的生物信息学分析

通过 ProtParam 在线软件分析 MI3GT1 氨基酸的理化性质, 结果表明: MI3GT1 编码 457 个氨基酸, 分子式为 C₂₂₁₆H₃₄₅₇N₆₀₁O₆₃₈S₂₀, 相对分子质量为 49.37 kDa, 理论等电点 (pI) 为 6.04, 小于 7, 说明其为酸性蛋白; 其中带负电荷氨基酸残基 (Asp + Glu) 数为 50, 带正电荷氨基酸残基 (Arg + Lys) 数为 45, 丙氨酸含量最多, 占 10.9%, 酪氨酸含量最少, 占 0.9%; 该蛋白不稳定系数为 40.71,



CHS. 查尔酮合成酶；**FLS.** 黄酮醇合成酶；**CHI.** 查尔酮异构酶；**F3H.** 黄烷酮 3-羟基化酶；**F3'H.** 类黄酮-3'-羟基化酶；**F3'5'H.** 类黄酮-3',5'-羟基化酶；**DFR.** 二氢黄酮醇还原酶；**ANS.** 花青素合成酶；**UF3GT.** UDP-类黄酮 3-O-葡萄糖基转移酶；**LAR.** 无色花青素还原酶；**ANR.** 花青素还原酶。

CHS. Chalcone synthase；**FLS.** Flavonol synthase；**CHI.** Chalcone isomerase；**F3H.** Flavanone 3-hydroxylase；**F3'H.** Flavonoid-3'-hydroxylase；**F3'5'H.** Flavonoid-3',5'-hydroxylase；**DFR.** Dihydroflavonol reductase；**ANS.** Anthocyanin synthase；**UF3GT.** UDP-flavonoid 3-O-glucosyltransferase；**LAR.** Leucoanthocyanin reductase；**ANR.** Anthocyanin reductase。

图 1 花青素生物合成途径

Fig. 1 The biosynthetic pathway of anthocyanin(Petroni & Tonelli, 2011; Liu et al., 2018)

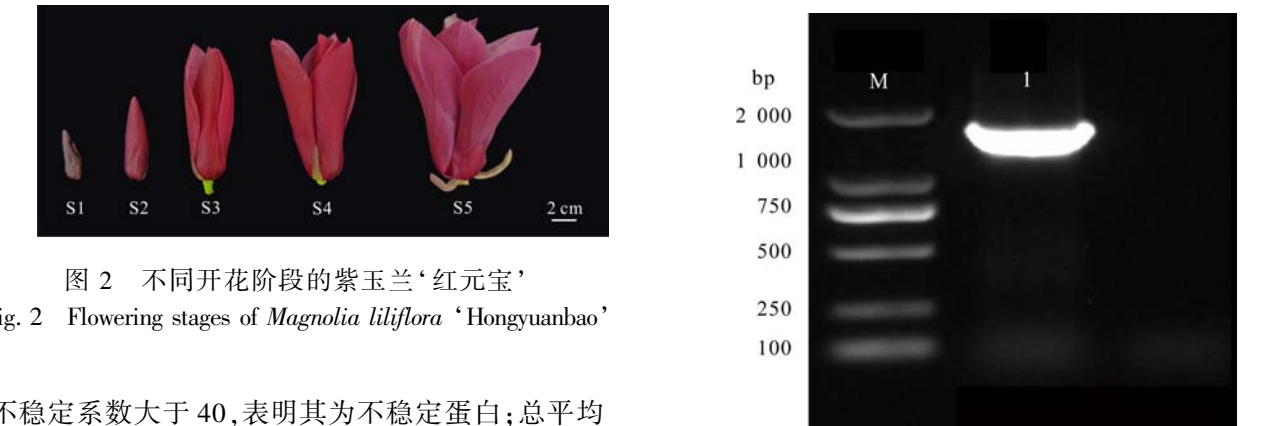


图 2 不同开花阶段的紫玉兰‘红元宝’

Fig. 2 Flowering stages of *Magnolia liliflora* ‘Hongyuanbao’

不稳定系数大于 40,表明其为不稳定蛋白;总平均亲水性的负值表示亲水性,正值表示疏水性,且正值越大表示疏水性越强,*MI3GT1* 总平均亲水性为 0.090,说明该蛋白是疏水性蛋白。

通过 SOPMA 在线网站对紫玉兰‘红元宝’*3GT1* 蛋白的二级结构预测 (图 5), 结构表明 *MI3GT1* 蛋

M. DL2000 DNA Marker; 1. *MI3GT1*。

图 3 紫玉兰‘红元宝’*MI3GT1* 基因克隆

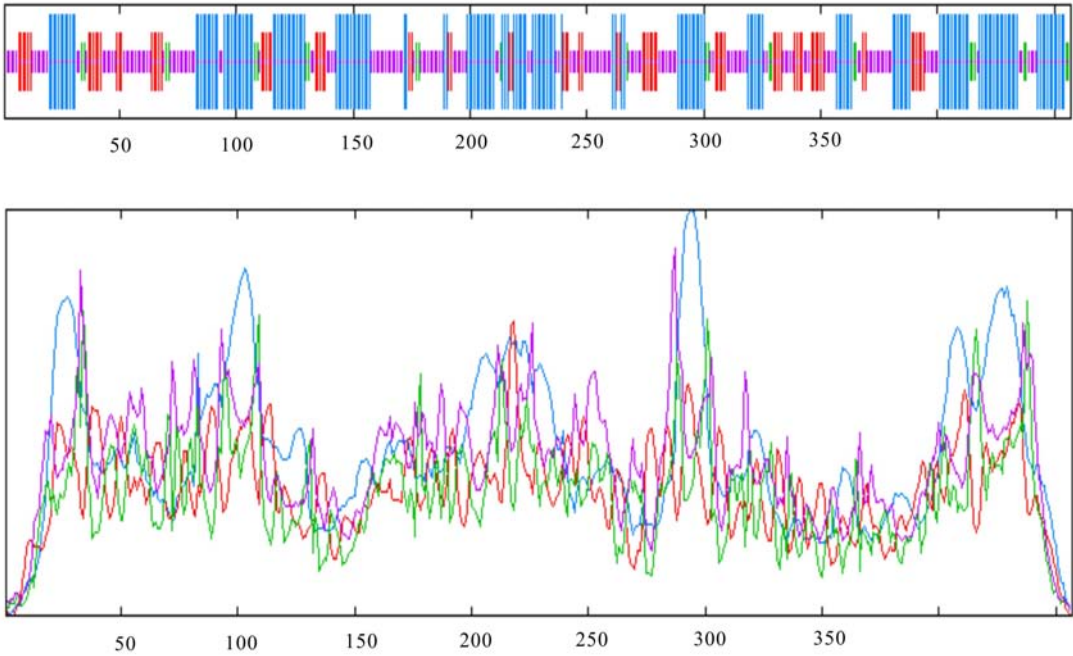
Fig. 3 Gene cloning of *MI3GT1* from *Magnolia liliflora* ‘Hongyuanbao’

拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> (NP197207.1)	MTKSPETRESIAVLAFFPGTHAALLTVTRRLASASP.....STVFSFENACSNSSLSFGDE.....ACRPANRVYTIAGVPEG	80
苹果 <i>Malus domestica</i> (AF117267.1)	MAAPLPETIEPSSINGPHLAAYNREAVVAVFPPTSHASALLETVRRRLATALP.....NTLFSFPTSSKSSLSFSSNSI.....TNAPNRYVTEVADGVPEG	95
玉米 <i>Zea mays</i> (AY167672.1)	MAPADGESSPPPEAVVAVFPSSSHAAVLLSIARAAAAAAPSGATLSFLSSASSLACLRKASASAGHGLPCNRFVVEVDPGAPAA	86
矮牵牛 <i>Petunia × hybrida</i> (AB027454.1)	NTTSCLEALLAAPPSSSHAAELLTLVCRSPFLPS.....ETIIFSHFNSSGNSISFSEG.....SKPINKVYINVDGVET	73
葡萄 <i>Vitis vinifera</i> (BAB41024.1)	NSQTITTNVLAAPPSSSHAAELLAVVRRRAAAP.....HAFVSFSPSSGNSASIFHES.....HTNQNKSTLISDGVPEG	76
三花龙胆 <i>Gentiana triflora</i> (D85186.1)	NSPVSEVLAAPPSSSHAAELLTLVNRRAAAP.....ETIIFSFSSSSITTI FSPINL.....ISIGSKYAVVDGSPG	74
M13GT1	SFAPKKPEVLAFFPGTHAALLTVTRRLAANAA.....EASFSFSSPSNGSLSSIFAA.....SAPLPSLKIYDVSVEG	76
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> (NP197207.1)	YVFSGRPCALTEFLCAPENFRREIAKAETEVTGTVLGLMDVFFVFAADATEINASTAFVAGANSLSAALLTEITIGV.....KEVGERMEETI	177
苹果 <i>Malus domestica</i> (AF117267.1)	YVFGKPCEDILENMAPENIRRLDASVAIDKCIQSILITDAFFVGVHLADELCVPTVTFVISCLESISVEVHTEITIGT.....CGITGRENELI	192
玉米 <i>Zea mays</i> (AY167672.1)	EESVVPVRCGLFEMAEACGVKAWLEAARAAAGCARVTCVQVDFVWPAADAAASACAPVVPVTVASCALLAEIRLALREIVG.....DQAANRVDEPL	183
矮牵牛 <i>Petunia × hybrida</i> (AB027454.1)	NCNKPVGLEATKLEICATPINFVKVKEAEETGVKFSQIFSDAFVSVYLAKEINVPVAFVTAASCSLSVLYGDFIRS.....NCETSL	161
葡萄 <i>Vitis vinifera</i> (BAB41024.1)	YVAGRPCEILEFNRAPEFRQGVAAVATGTPVPSGLVADFFVFAADAAEAGVALLPFTACPNLSLSTEVDEIIEKIGV.....SGICGRETELL	173
三花龙胆 <i>Gentiana triflora</i> (D85186.1)	VVFSQNPPEILEFNMAPINFKAAKKAEVETGVNISOLLDAFFVFAADFSEKICVPTVTVTAASCSLCLEVYDEISRFAE.....FEIAEKAETI	171
M13GT1	VYVLPGRPCEDILEFNTPCNKEALETVKEMGV.....EVTVLITDSEVFSGCI.....AERGVPVTVTVSGACSIAAPELTERKLTGTCTVLATRRREPL	174
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> (NP197207.1)	GV.....ISGAEIKRVKLTPEGVFCNLESVFSKALHQLGLALPR.....PAAVFINSEPELEPTLTNNRSRFRK.....YENIFGLLSSTLCCQLVC.....EPHCG	267
苹果 <i>Malus domestica</i> (AF117267.1)	VEKNVNICLSNVRIKDAEGVICNLESVLSGALLQGRLLPR.....PAAVFINSEPELEPTLTNNRSKRVN.....LNNGFNVASPLPLP.....PSLAC	284
玉米 <i>Zea mays</i> (AY167672.1)	IS.....HPGLA.....SVYRVDPEGVSGDFVYVILLVHNGCCPRPSAAVALNPGLCPPTVTAALAEI LPNCPVPPHLLLAIEDCAITAAPAPHCG	278
矮牵牛 <i>Petunia × hybrida</i> (AB027454.1)	N.....IPGFSSTLTISNPPFVAENLPLPMSLYNNALNHK.....AAAVVINSPELEPTLTNKEVKVLCQVYNNCPVLPQTPSPKKVLA.....CEERG	253
葡萄 <i>Vitis vinifera</i> (BAB41024.1)	NF.....IPGAS.....KVRFRDCEGIFVCNLSLFSRLHRCGVLPK.....AAAVFINSEPELEPTLTNKEKSLKT.....YENIFGNLITP.....PPVVP.....NTTIC	261
三花龙胆 <i>Gentiana triflora</i> (D85186.1)	DF.....IPGSLAISFSDFPELIMEDSCSITLTHLHGLKHK.....AAVAVNSPELEPTLTINHLSTNQLNINLNCCTLSSSI P.....PELNEC	259
M13GT1	DF.....VFGFS.....GLRVCDPEGIFVCNLSLFSRLHRAEESAR.....PAAVALNTEDECTSTLTLEKSKFRS.....CLAVGFLSLMSPLPCET.....LAHAC	262
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> (NP197207.1)	LAWKEKRS.....GSVAISFGVNTTPPECLAAIAEGLESSKVPFVSKEKSLVOLPKGLKRTRE.....CGIYVVAPOVELKHEATCFVYHGGVSVL	363
苹果 <i>Malus domestica</i> (AF117267.1)	LSWLEKQCAPSSVAISFGVNTTPPECLAAIAEGLESSKVPFVSKEKSLVOLPKGLKRTRE.....CGIYVVAPOVELKHEATCFVYHGGVSVL	383
玉米 <i>Zea mays</i> (AY167672.1)	LAWGRQPAR.....CAVNSFGVNTTPPECLAAIAEGLESSKVPFVSKEKSLVOLPKGLKRTRE.....CGIYVVAPOVELKHEATCFVYHGGVSVL	376
矮牵牛 <i>Petunia × hybrida</i> (AB027454.1)	IQWKEKRP.....ESVNSFGVNTTPPECLAAIAEGLESSKVPFVSKEKSLVOLPKGLKRTRE.....CGIYVVAPOVELKHEATCFVYHGGVSVL	349
葡萄 <i>Vitis vinifera</i> (BAB41024.1)	IQWKEKRP.....TSVNSFGVNTTPPECLAAIAEGLESSKVPFVSKEKSLVOLPKGLKRTRE.....CGIYVVAPOVELKHEATCFVYHGGVSVL	357
三花龙胆 <i>Gentiana triflora</i> (D85186.1)	LAWCTQKE.....SNVNSFGVNTTPPECLAAIAEGLESSKVPFVSKEKSLVOLPKGLKRTRE.....CGIYVVAPOVELKHEATCFVYHGGVSVL	355
M13GT1	LAWCFRAHPKASNAVSECTVNTTPPECLAAIAEGLESSKVPFVSKEKSLVOLPKGLKRTRE.....CGIYVVAPOVELKHEATCFVYHGGVSVL	360
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> (NP197207.1)	ESVSGGVNIPRPFFCDQRLNRAVVEVEIGTIIINGVFKDGEKLEKLVCEIGKKMKNAKKELAYEASSRSESENRCKLEAVNII.....	460
苹果 <i>Malus domestica</i> (AF117267.1)	ETIAGRVNIPRPFFCDQRLNRAVVEVEIGTIIINGVFKDGEKLEKLVCEIGKKMKNAKKELAYEASSRSESENRCKLEAVNII.....	482
玉米 <i>Zea mays</i> (AY167672.1)	EGVSSGVNIPRPFFCDQRLNRAVVEVEIGTIIINGVFKDGEKLEKLVCEIGKKMKNAKKELAYEASSRSESENRCKLEAVNII.....	471
矮牵牛 <i>Petunia × hybrida</i> (AB027454.1)	EGISCGGVNIPRPFFCDQRLNRAVVEVEIGTIIINGVFKDGEKLEKLVCEIGKKMKNAKKELAYEASSRSESENRCKLEAVNII.....	448
葡萄 <i>Vitis vinifera</i> (BAB41024.1)	ESVAGGVNIPRPFFCDQRLNRAVVEVEIGTIIINGVFKDGEKLEKLVCEIGKKMKNAKKELAYEASSRSESENRCKLEAVNII.....	456
三花龙胆 <i>Gentiana triflora</i> (D85186.1)	ESI FCRVNIIPRPFFCDQRLNRAVVEVEIGTIIINGVFKDGEKLEKLVCEIGKKMKNAKKELAYEASSRSESENRCKLEAVNII.....	453
M13GT1	ESI TAEVNIIPRPFFCDQRLNRAVVEVEIGTIIINGVFKDGEKLEKLVCEIGKKMKNAKKELAYEASSRSESENRCKLEAVNII.....	457

黑色阴影和其他阴影框分别表示相同和相似的氨基酸,下划线表示 PSPC 保守基序。
Black shaded and other shaded boxes show identical and similar amino acids, respectively, and the underline indicates the PSPC conservative motif.

图 4 推导的 M13GT1 氨基酸序列与其他物种 3GT 氨基酸序列对比

Fig. 4 Multiple alignment of deduced M13GT1 amino acid sequences and 3GT amino acid sequences from other plants



蓝线. α -螺旋; 紫线. 无规则卷曲; 红线. 延伸链; 绿线. β -转角。
Blue line. α -helix; Purple line. Random coil; Red line. Extended strand; Green line. β -turn.

图 5 M13GT1 蛋白二级结构预测结果

Fig. 5 Results of M13GT1 protein secondary structure prediction

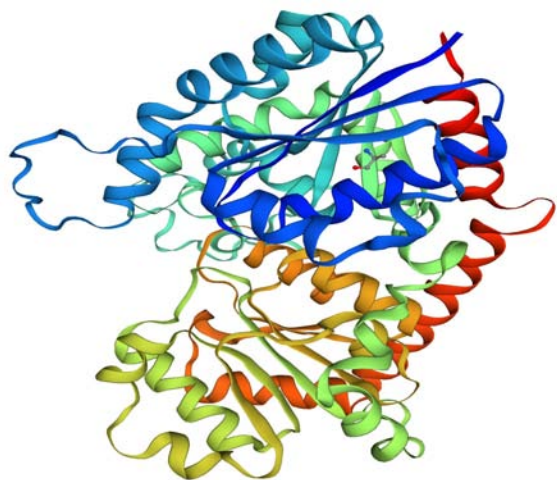


图 6 *MI3GT1* 蛋白三级结构预测结果

Fig. 6 Results of *MI3GT1* protein tertiary structure prediction

白中 α -螺旋 (39.39%) 和无规则卷曲 (38.29%) 含量最多,而延伸链和 β -转角含量分别为 16.85% 和 5.47%。将 *MI3GT1* 序列提交到 SWISS-MODEL 在线网站预测编码蛋白质的三维结构,3D 预测结果显示 (图 6),QMEAN 分值在 -4~0 之间,越接近于 0,表明待测蛋白与模板蛋白的匹配度越好,可信度越高,*MI3GT1* 的 QMEAN 分值为 -0.88,表明 *MI3GT1* 与模板蛋白 UDP-葡萄糖类黄酮 3-O 糖基转移酶 (2c1x.1.A) 匹配度较好,相似性较高,达 52.67%,推测其可能为类黄酮 3-O 糖基转移酶;GMQE 可信度评分为 0.83,介于 0~1 之间,且较接近 1,说明以上述蛋白模板构建的模型质量较好;*MI3GT1* 具备 GT-B 家族典型的 Rossmann 折叠结构域,表明其为 GT-B 家族成员,这也与 CDD 的预测结果一致。

2.3 *MI3GT1* 氨基酸序列系统发育分析

将紫玉兰‘红元宝’*MI3GT1* 与其他植物中已报道的参与类黄酮途径的糖基转移酶共同构建系统发育进化树,图 7 结果显示,GTs 分为 5GTs、7GTs、3GTs 进化分支,*MI3GT1* 与小苍兰 *Fh3GT1* 亲缘关系较近聚为一支,属于 3GTs 进化大支,该分支还有葡萄 *Vv3GT*、草莓 *Fa3GT*、矮牵牛 *Ph3GT*、番薯 *Ib3GT*,且与其他类黄酮糖基转移酶 5GTs、7GTs 的亲缘关系较远,表明其可能与 *Fh3GT1* 功能类似,属于 3GT 糖基转移酶家族成员,参与类黄酮 3-O 的糖基化。

2.4 *MI3GT1* 基因在花开放的不同时期与不同组织中的表达分析

以紫玉兰‘红元宝’花开放不同时期 (S1~S5) 以及老叶、嫩叶、根、茎等组织部位的 cDNA 为模板,探究 *MI3GT1* 基因在紫玉兰‘红元宝’中的表达模式 (图 8)。结果表明,随着花的开放进程,*MI3GT1* 基因的表达量呈现先降低后升高的趋势,其表达量在盛花期 (S5) 达到峰值。各组织部位的荧光定量结果显示,*MI3GT1* 基因具有组织特异性,在花中的表达量最高,在老叶和嫩叶中有少量表达,而在根和茎中几乎不表达,且其在花朵开放的各个时期中的表达量均高于其他组织部位。

3 讨论与结论

本文克隆得到紫玉兰‘红元宝’*MI3GT1* 基因,生物信息分析发现 *MI3GT1* 序列具有植物次生产物糖基转移酶信号序列——PSPG box,推测其可能参与次生代谢产物的糖基化修饰。GTs 根据其催化位点的不同,可分为 3-O-糖基转移酶 (3GTs)、5-O-糖基转移酶 (5GTs)、7-O-糖基转移酶 (7GTs) (王应丽等,2014)。系统发育树聚类结果显示 *MI3GT1* 和小苍兰 *Fh3GT1* 亲缘关系较近,聚为一支,进一步表明其可能和 *Fh3GT1* 功能类似,具有参与类黄酮 3-O 的糖基化修饰的功能 (Sun et al., 2016)。

有研究表明,3GT 具有花器官组织特异表达模式 (王毅等,2017)。滇牡丹 (王毅等,2017) 和葡萄风信子 (杜灵娟等,2017) 中 3GT 基因在花青素苷大量积累的组织中高表达,而在少量积累和无花青素苷的组织中,3GT 表达量极低甚至不表达。与前人研究结果一致,在本研究中,*MI3GT1* 基因在花中大量表达,而在其他营养器官组织中几乎不表达或者表达量很低,表明 *MI3GT1* 可能参与花青素苷的生物合成。

3GT 参与小苍兰和葡萄风信子花瓣中花青素苷的生物合成,其表达量往往与花瓣中花青素苷的积累呈正相关 (Sui et al., 2011; 梁沛雯等,2019)。但是 *MI3GT1* 基因表达模式与小苍兰和葡萄风信子不同,其表达量随着花的开放呈现先下降后上升的趋势,这可能与不同植物花瓣中花青素苷的糖苷类型不同有关。葡萄风信子花瓣中花青素苷糖苷类型均为葡萄糖苷 (梁沛雯等,2019),因此葡萄风信子花青素苷的积累与 3GT 基因表达

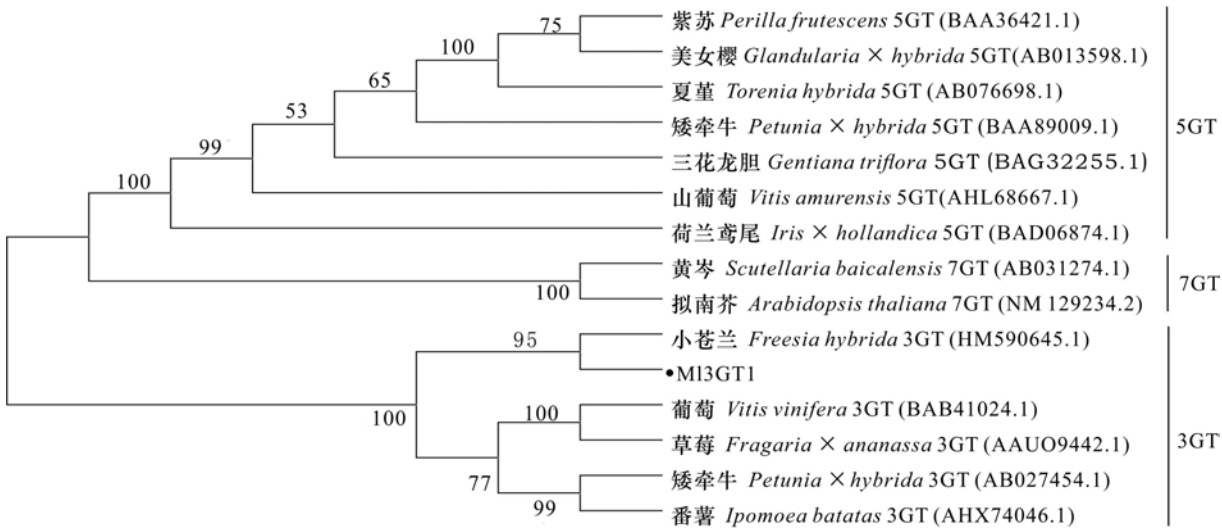


图 7 MI3GT1 蛋白与其他植物的 GT 蛋白的系统进化树

Fig. 7 Molecular phylogenetic tree of MI3GT1 protein and GT proteins from other plants

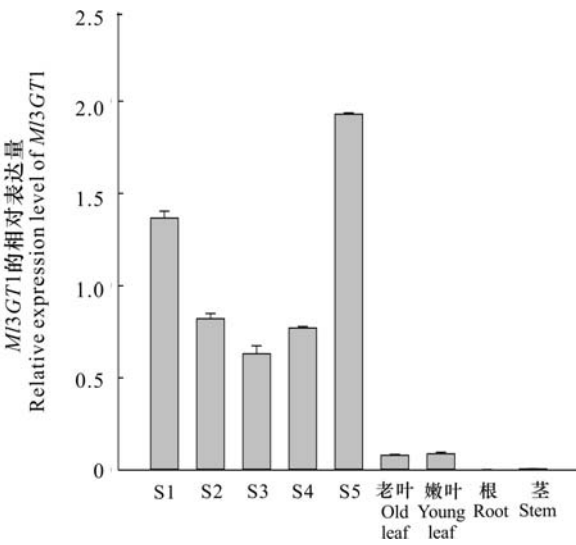


图 8 MI3GT1 在紫玉兰‘红元宝’花开放的不同时期以及组织部位的表达分析

Fig. 8 Expression analysis of MI3GT1 in different flowering periods and tissue parts of *Magnolia liliflora* ‘Hongyuanbao’

成不仅受 3GT 基因的调控,同时还与 3RT 基因的表达有关。由此表明 MI3GT1 参与调控紫玉兰‘红元宝’的花青素苷的生物合成,但是该基因不是紫玉兰‘红元宝’花青素苷生物合成的限速酶基因。

参考文献:

BAN Y, KONDO S, UBI BE, et al., 2009. UDP-sugar biosynthetic pathway: Contribution to cyanidin 3-galactoside biosynthesis in apple skin [J]. *Planta*, 230(5): 871–881.

CHEN WH, HSU CY, CHENG HY, et al., 2011. Downregulation of putative UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase gene alters flower coloring in *Phalaenopsis* [J]. *Plant Cell Rep*, 30(6): 1007–1017.

COUTINHO PM, DELEURY E, DAVIES GJ, et al., 2003. An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases [J]. *J Mol Biol*, 328(2): 307–317.

DAI SL, HONG Y, 2016. Molecular breeding for flower colors modification on ornamental plants based on the mechanism of anthocyanins biosynthesis and coloration [J]. *Sci Agric Sin*, 49(3): 529–542. [戴思兰, 洪艳, 2016. 基于花青素苷合成和呈色机理的观赏植物花色改良分子育种 [J]. *中国农业科学*, 49(3): 529–542.]

DOONER HK, NELSON OE, 1977. Genetic control of UDPglucose: Flavonol 3-O-glucosyltransferase in the endosperm of maize [J]. *Biochem Genet*, 15 (5–6): 509–519.

DU LJ, CHENG KL, LIU YL, 2017. Cloning and expression analysis of anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase gene in grape hyacinth [J]. *Pratacul Sci*, 34(11): 2235–2244. [杜

量紧密相关。在紫玉兰‘红元宝’花瓣中,4 种花青素苷 C3 位均发生芸香糖基化修饰,其中 Pn3Ru 含量最高(约占总花青素苷含量的 71%)(Wang et al., 2019)。由于花青素的 C3 位芸香糖苷化修饰依次由 3GT 和 3RT 催化完成(Yamazaki et al., 2002),紫玉兰‘红元宝’芸香糖苷型花青素苷的合

- 灵娟, 陈凯利, 刘雅莉, 2017. 葡萄风信子花青素 3-O-葡萄糖基转移酶基因的克隆及其表达分析 [J]. 草业科学, 34(11): 2235–2244.]
- HU ML, LU ZL, GUO J, et al., 2016. Cloning and characterization of the cDNA and promoter of UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase gene from a purple-fleshed sweet potato [J]. S Afr J Bot, 106: 211–220.
- JONSSON LMV, AARSMAN MEG, BASTIAANNET J, et al., 1984. Common identity of UDP-glucose: anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase and UDP-glucose: flavonol 3-O-glucosyltransferase in flowers of *Petunia hybrida* [J]. Zeitschrift Für Naturforschung C, 39(6): 559–567.
- KUBO A, ARAI Y, NAGASHIMA S, et al., 2004. Alteration of sugar donor specificities of plant glycosyltransferases by a single point mutation [J]. Arch Biochem Biophys, 429(2): 198–203.
- LARSON RL, COE EH, 1977. Gene-dependent flavonoid glucosyltransferase in maize [J]. Biochem Genet, 15(1–2): 153–156.
- LIANG PW, LOU Q, LIU YL, 2019. Cloning and expression analysis of *MaGT1* gene from *Muscari ameniicum* [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 39(6): 1001–1008. [梁沛雯, 娄倩, 刘雅莉, 2019. 葡萄风信子 *MaGT1* 基因的克隆及其表达分析 [J]. 西北植物学报, 39(6): 1001–1008.]
- LIU Y, TIKUNOV YM, SCHOUTEN R, et al., 2018. Anthocyanin biosynthesis and degradation mechanisms in *Solanaceous* vegetables: A review [J]. Front Chem, 6: 52.
- NAKATSUKA T, SATO K, TAKAHASHI H, et al., 2008. Cloning and characterization of the UDP-glucose: Anthocyanin 5-O-glucosyltransferase gene from blue-flowered gentian [J]. J Exp Bot, 59(6): 1241–1252.
- PETRONI K, TONELLI C, 2011. Recent advances on the regulation of anthocyanin synthesis in reproductive organs [J]. Plant Sci, 181(3): 219–229.
- QIAN JY, LAI WH, JIANG LL, et al., 2021. Association between differential gene expression and anthocyanin biosynthesis underlying the diverse array of petal colors in *Zinnia elegans* [J]. Sci Hort, 277: 109809.
- SHU QY, ZHU J, MEN SQ, et al., 2018. Establishing virus induced gene silencing (VIGS) system in tree peony using *PsUFGT* genes [J]. Acta Hort Sin, 45(1): 168–176. [舒庆艳, 朱瑾, 门思琦, 等, 2018. 基于牡丹类黄酮糖基转移酶基因建立 VIGS 技术体系 [J]. 园艺学报, 45(1): 168–176.]
- SUI X, GAO X, AO M, et al., 2011. cDNA cloning and characterization of UDP-glucose: anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase in *Freesia hybrida* [J]. Plant Cell Rep, 30(7): 1209–1218.
- SUN W, LIANG LJ, MENG XY, et al., 2016. Biochemical and molecular characterization of a flavonoid 3-O-glucosyltransferase responsible for anthocyanins and flavonols biosynthesis in *Freesia hybrida* [J]. Front Plant Sci, 7: 410.
- TANAKA Y, SASAKI N, OHMIYA A, 2008. Biosynthesis of plant pigments: Anthocyanins, betalains and carotenoids [J]. The Plant J, 54(4): 733–749.
- TANAKA Y, YONEKURA K, FUKUCHI-MIZUTANI M, et al., 1996. Molecular and biochemical characterization of three anthocyanin synthetic enzymes from *Gentiana triflora* [J]. Plant Cell Physiol, 37(5): 711–716.
- WANG NH, LU DY, CHANG PJ, et al., 2019. Selection of reference genes for qRT-PCR analysis *Magnolia biondii* [J]. Mol Plant Breed, 17(11): 3674–3680. [王宁杭, 陆丹迎, 常鹏杰, 等, 2019. 望春玉兰实时定量 PCR 分析中内参基因的筛选 [J]. 分子植物育种, 17(11): 3674–3680.]
- WANG NH, ZHANG C, BIAN SN, et al., 2019. Flavonoid components of different color *Magnolia* flowers and their relationship to cultivar selections [J]. HortScience, 54(3): 404–408.
- WANG Y, ZHAO N, YUAN XL, et al., 2017. Identification and expression analysis of a flavonoid 3-O-glucosyltransferase gene in *Paeonia delavayi* [J]. Genomics Appl Biol, 36(4): 1556–1562. [王毅, 赵能, 原晓龙, 等, 2017. 滇牡丹类黄酮 3-O-葡萄糖基转移酶基因的鉴定及表达分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 36(4): 1556–1562.]
- WANG YL, HUANG WJ, WANG Y, 2014. Cloning and expression analysis of the *EsUF3GT* gene in *Epimedium sagittatum* (Sieb. and Zucc.) Maxim [J]. J Plant Sci, 32(6): 602–611. [王应丽, 黄文俊, 王瑛, 2014. 箭叶淫羊藿 *EsUF3GT* 基因的克隆及表达分析 [J]. 植物科学学报, 32(6): 602–611.]
- YAMAZAKI M, YAMAGISHI E, GONG Z, et al., 2002. Two flavonoid glucosyltransferases from *Petunia hybrida*: molecular cloning, biochemical properties and developmentally regulated expression [J]. Plant Mol Biol, 48(4): 401–411.
- YOSHIHARA N, IMAYAMA T, FUKUCHI-MIZUTANI M, et al., 2005. cDNA cloning and characterization of UDP-glucose: anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase in *Iris hollandica* [J]. Plant Sci, 169(3): 496–501.
- ZHAO XQ, LI B, YUAN ZH, 2017. Cloning and expression analysis of *PgUFGT* gene from *Punica granaum* L. [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 37(4): 646–653. [招雪晴, 李勃, 苑兆和, 2017. 石榴 *PgUFGT* 基因克隆及表达分析 [J]. 西北植物学报, 37(4): 646–653.]
- ZHU LJ, ZHAO YM, YANG QS, 2012. Formation and influencing factors of flower and color of garden plants (A review) [J]. Jiangsu Agric Sci, 40(7): 142–145. [朱丽娟, 赵亚敏, 杨秋生, 2012. 园林植物花色的生成及影响因素(综述) [J]. 江苏农业科学, 40(7): 142–145.]
- ZHUANG WB, LIU TY, SU XC, et al., 2018. The molecular regulation mechanism of anthocyanin biosynthesis and coloration in plants [J]. Plant Physiol J, 54(11): 1630–1644. [庄维兵, 刘天宇, 束晓春, 等, 2018. 植物体内花青素苷生物合成及呈色的分子调控机制 [J]. 植物生理学报, 54(11): 1630–1644.]

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202012011

郭松, 梁湘兰, 黄青青, 等. 紫九牛叶绿体基因组密码子偏好性分析 [J]. 广西植物, 2022, 42(8): 1426–1432.

GUO S, LIANG XL, HUANG QQ, et al. Codon usage bias in the chloroplast genome of *Ventilago leiocarpa* [J]. Guihaia, 2022, 42(8): 1426–1432.

紫九牛叶绿体基因组密码子偏好性分析

郭松^{1,2}, 梁湘兰¹, 黄青青¹, 卢祥^{1,2}, 严其伟^{1,2}, 张鹏^{1,2}, 覃逸明^{1,2*}(1. 广西科技师范学院 食品与生化工程学院, 广西 来宾 546199; 2. 广西科技师范学院
特色瑶药资源研究与开发重点实验室, 广西 来宾 546199)

摘要: 为确定瑶药紫九牛叶绿体基因组密码子的使用模式及其成因, 该研究以紫九牛叶绿体基因组 50 条蛋白质编码序列为研究对象, 利用 Codon W 1.4.2 和在线软件 CUSP 和 Chips 分析其密码子偏好性。结果表明: (1) RSCU>1 的密码子有 29 个, 其中有 28 个以 A/U 结尾, 说明叶绿体基因组的同义密码子中偏好以 A/U 结尾。 (2) 紫九牛叶绿体基因组密码子的 GC 含量 $GC_1(47.38\%) > GC_2(39.81\%) > GC_3(29.60\%)$, ENC 值大于 45 的有 40 个, 说明紫九牛叶绿体基因组存在较弱的偏性。 (3) 中性绘图分析和 ENC-plot 分析说明了紫九牛叶绿体基因组密码子的偏好性既受到选择的作用, 又受到突变因素的影响。 (4) 通过构建的高低基因表达库最终确定了 15 个最优密码子, 分别为 UUG、AUU、GUU、GUA、UCU、CCU、ACU、ACA、GCU、CAA、AAC、GAA、UGU、CGU 和 GGU。该研究为紫九牛叶绿体基因组的确定以及遗传多样性分析提供了依据。

关键词: 紫九牛, 叶绿体基因组, 密码子, 偏好性分析, 最优密码子**中图分类号:** Q75 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2022)08-1426-07

Codon usage bias in the chloroplast genome of *Ventilago leiocarpa*

GUO Song^{1,2}, LIANG Xianglan¹, HUANG Qingqing¹, LU Xiang^{1,2},
YAN Qiwei^{1,2}, ZHANG Peng^{1,2}, QIN Yiming^{1,2*}

(1. College of Food and Biochemical Engineering, Guangxi Science & Technology Normal University, Laibin 546119, Guangxi, China; 2. Key Laboratory for Research and Development of Characteristic Yao Medicine Resources, Guangxi Science & Technology Normal University, Laibin 546119, Guangxi, China)

Abstract: To determine the codon usage pattern of chloroplast genome of *Ventilago leiocarpa*, a total of 50 selected protein-coding sequences were analyzed using Codon W 1.4.2 and online softwares of CUSP and Chips. The results were as follows: (1) There were 29 codons with RSCU > 1, and 28 of them ended with A/U, indicating that synonymous codons in chloroplast genome tend to end with A/U. (2) GC content of codon in chloroplast genome of *V. leiocarpa* was

收稿日期: 2020-02-27**基金项目:** 广西科技师范学院高层次人才启动经费(GXKS2020GKY009); 广西科技师范学院特色瑶药资源研究与开发校级重点实验室经费(KJ5CSH000005) [Supported by Start-Up Fund for High-Level Talents of Guangxi Science & Technology Normal University (GXKS2020GKY009); Fund of Key Laboratory for Research and Development of Characteristic Yao Medicine Resources of Guangxi Science & Technology Normal University (KJ5CSH000005)]。**第一作者:** 郭松(1987-), 博士, 助理研究员, 研究方向为分子生药学, (E-mail) guosong0804@163.com。**通信作者:** 覃逸明, 博士, 教授, 研究方向为民族医药资源开发, (E-mail) 510079473@qq.com。

$GC_1(47.38\%) > GC_2(39.81\%) > GC_3(29.60\%)$, and there were 40 with ENC value greater than 45, which indicates that there is weak bias in chloroplast genome of *V. leiocarpa*. (3) Neutral mapping analysis and ENC-plot analysis demonstrated that the codon preference of chloroplast genome of *V. leiocarpa* was affected by both selection and mutation factors. (4) Through the constructed high and low gene expression libraries, 15 optimal codons were finally determined, which were UUG, AUU, GUU, GUA, UCU, CCU, ACU, ACA, GCU, CAA, AAC, GAA, UGU, CGU and GGU. The present study took some basis for the determination of chloroplast genome and genetic diversity analysis of *V. leiocarpa*.

Key words: *Ventilago leiocarpa*, chloroplast genome, codon, usage bias analysis, optimal codons

密码子是联结生物体内遗传物质和蛋白质翻译的纽带(谢平,2017;柳燕杰等,2020),在生物体内起着重要作用。20 种常见氨基酸,除了蛋氨酸(methionine, Met)和色氨酸(tryptophane, Trp)具有单一密码子外,其余氨基酸均由 2~6 个同义密码子编码(胡晓艳等,2019)。同义密码子的使用具有非均一性的特点(梁菲菲,2010)。某一物种或者某一基因倾向使用一种或者使用几种特定的同义密码子的现象称为密码子的使用偏好性(codon usage bias, CUB)(吴宪明等,2007)。密码子偏好性是生物长期进化过程中所形成,不同物种间密码子使用的偏好性不同(赵森等,2020)。随着高通量测序技术的发展,目前已经有多种药用植物叶绿体基因组完成了密码子偏好性的分析,对于探索物种进化及提高外源基因的表达水平起到了推动作用。

紫九牛为传统老班瑶药“虎牛钻风”中的“牛”类药物,来源于鼠李科属植物翼核果(*Ventilago leiocarpa*)的根和茎,别名血风藤、铁牛入石、红穿破石、青筋藤、牛参等。瑶医认为紫九牛具有养血祛风、舒筋活络、固肾益精等功效(覃讯云等,2001),民间常用其治疗慢性肝炎、肝风化、风湿筋骨疼痛、风湿性关节炎、腰肌劳损等疾病(林明琛等,2020)。现代医药学研究表明,紫九牛中富含翼核果醌和大黄素等活性化合物(应百平等,1988;王雪芬等,1993),具有抗菌、止咳、抗肿瘤等活性(Wang et al., 2008; 梁冰等,2012; Hu et al., 2020)。作为一种经典瑶药,已经开始被广泛应用于多种疾病的开发治疗,但是对于紫九牛叶绿体基因组密码子偏好性的分析,尚未有研究。

本文利用 Codon W 1.4.2、在线软件 CUSP 和 Chips、R 语言等软件和程序,对紫九牛叶绿体基因组的密码子进行分析,研究其密码子的偏好性以及偏好性形成的因素,并确立最优密码子,为紫九牛叶绿体基因组基因的改良,目标基因的优化提供依据。

1 材料与方法

1.1 叶绿体基因组序列的获得

紫九牛叶绿体基因组序列信息由本实验室测序获得,已上传 NCBI 数据库(GenBank 登录号为 MT974496),共有 91 条可以编码蛋白质的基因序列(coding DNA sequence, CDS)。选择其中长度大于 300 bp 的蛋白质编码序列为分析样本,最终得到 50 条 CDS 用于后续的分析。

1.2 分析方法

1.2.1 密码子偏好性相关参数分析 使用软件 Codon W 1.4.2 计算紫九牛叶绿体基因组同义密码子的相对使用度(relative synonymous codon usage, RSCU)。根据 RSCU 分析的结果:当 RSCU = 1 时,该密码子不存在偏性(吴妙丽等,2019;梁晓静等,2020);当 RSCU>1 时,同义密码子中偏好使用该密码子,并将该密码子确定为高频密码子(林涛等,2002),反之亦然。使用在线软件 Chips 可以分析各 CDS 的有效密码子数(effective number of codons, ENC),ENC 值可以反映密码子偏倚性的强弱,其取值范围为 20 到 61,当 ENC 值为 20 时,同义密码子完全处于偏倚状态,当 ENC 值为 61 时,则表明同义密码子没有偏倚(赵森等,2020);ENC 值从大到小偏倚性由弱变强,通常 ENC 值 45 作为区分偏倚性强弱的标准(吴宪明等,2007)。通过在线软件 CUSP,分析各 CDS 的 GC 含量,分别用 GC_1 、 GC_2 、 GC_3 来表示密码子第一、第二、第三位的 G/C 含量,用 GC_{all} 来表示三个密码子的平均 GC 含量。

1.2.2 影响密码子偏好性的因素 使用软件 SPSS 19.0 对各 CDS 中不同位置的 GC,即 GC_1 、 GC_2 、 GC_3 、 GC_{all} ,以及密码子数目(N)和 ENC 进行相关性分析,判断各参数之间的相关性,进而判断密码子偏好性受到的因素影响。通过中性绘图,分析 GC_1 和 GC_2 的平均值 GC_{12} 和 GC_3 的相关性。将各 CDS 同义

密码子的第三位碱基 GC (用 GC_{3s} 表示) 和 ENC 利用 R 语言作 ENC-plot 分析,标准曲线方程为 $ENC = 2 + GC_{3s} + \{29/[GC_{3s}^2 + (1 - GC_{3s})^2]\}$ (罗洪等,2015)。并利用标准方程求出 $ENC_{期望}$, 根据 $ENC_{比值} = (ENC_{实际} - ENC_{期望})/ENC_{期望}$, 根据数据分析 50 个基因中 ENC 的期望值与实际值的相差程度。

1.2.3 最优密码子的确定 以 ENC 为基准,从两端各选 10% 的基因,即两端各选 5 条 CDS,以 ENC 值较小的 5 条 CDS 确定为高基因表达库,ENC 数值较大的 5 条 CDS 确定为低基因表达库,将从两端筛选出来的两个高低基因库的基因序列分别整合到两个 fasta 文件中,通过软件 Codon W 1.4.2 来分析其 RSCU 值,以得到高低基因库的 $\Delta RSCU$,将

$\Delta RSCU \geq 0.08$ 的密码子确定为高表达的优越密码子(林涛等,2002)。若一密码子既符合高表达优越密码子的条件,又符合高频密码子的条件,则将该密码子确定为最优密码子(刘慧等,2017)。

2 结果与分析

2.1 偏性

2.1.1 RSCU 分析 通过软件 Codon W 1.4.2 分析了紫九牛叶绿体基因组 50 条 CDS 中的各同义密码子的相对频率,结果如表 1 所示。各同义密码子中 $RSCU > 1$ 的有 29 个,其中以 A/U 结尾的有 28 个,说明了紫九牛叶绿体基因偏好以 A/U 结尾。

表 1 紫九牛叶绿体基因组中各氨基酸的 RSCU 分析
Table 1 RSCU analysis of amino acids in chloroplast genomes of *Ventilago leiocarpa*

氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	数目 Number	RSCU	氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	数目 Number	RSCU
苯丙氨酸 Phe	<u>UUU</u>	692	1.32	酪氨酸 Tyr	<u>UAU</u>	555	1.58
	UUC	360	0.68		UAC	148	0.42
	UUA	624	1.89	组氨酸 His	<u>CAU</u>	347	1.46
亮氨酸 Leu	<u>UUG</u>	428	1.29		CAC	128	0.54
	<u>CUU</u>	426	1.29		<u>CAA</u>	513	1.54
	CUC	110	0.33	谷氨酰胺 Gln	CAG	155	0.46
	CUA	262	0.79		<u>AAU</u>	640	1.50
异亮氨酸 Ile	CUG	135	0.41		AAC	212	0.50
	<u>AUU</u>	785	1.47	赖氨酸 Lys	<u>AAA</u>	674	1.53
	AUC	313	0.59		AAG	208	0.47
	AUA	501	0.94	天冬氨酸 Asp	<u>GAU</u>	615	1.61
缬氨酸 Val	<u>GUU</u>	400	1.50		GAC	149	0.39
	GUC	105	0.39	谷氨酸 Glu	<u>GAA</u>	748	1.50
	GUA	412	1.54		GAG	248	0.50
	GUG	150	0.56	半胱氨酸 Cys	<u>UGU</u>	156	1.49
甘氨酸 Gly	<u>GGU</u>	471	1.35		UGC	53	0.51
	GGC	157	0.45	精氨酸 Arg	<u>CGU</u>	259	1.37
	<u>GGA</u>	509	1.46		CGC	90	0.47
	GGG	258	0.74		<u>CGA</u>	261	1.38
脯氨酸 Pro	<u>CCU</u>	300	1.49		CGC	96	0.51
	CCC	173	0.86	丝氨酸 Ser	AGA	318	1.68
	CCA	212	1.06		AGG	113	0.60
	CCG	118	0.59		<u>UCU</u>	376	1.63
苏氨酸 Thr	<u>ACU</u>	386	1.62		UCC	218	0.95
	ACC	185	0.78		<u>UCA</u>	255	1.11
	<u>ACA</u>	275	1.15		UCG	152	0.66
	ACG	107	0.45		<u>AGU</u>	277	1.20
丙氨酸 Ala	GCU	495	1.80		AGC	105	0.46
	GCC	180	0.66				
	<u>GCA</u>	280	1.02				
	GCG	144	0.52				

注: 下划线表示高频密码子。
Note: Underscores indicate high frequency codons.

2.1.2 GC 含量及 ENC 分析 通过在线软件 CUSP 和 Chips 分析了紫九牛各 CDS 不同位置的 GC 含

量,结果如表 2 所示。可以看出 GC 平均含量: $GC_1 (47.38\%) > GC_2 (39.81\%) > GC_3 (29.60\%)$, GC_1 含

量最高,GC₃含量最低,不同位置的 GC 含量存在较大差异。而此处 ENC 值的范围为 37.350 ~ 55.547,平均值为 48.227,其中 ENC 值大于 45 的有 40 个,小于 45 的仅有 10 个,进一步说明了紫九牛叶绿体基因组密码子具有较弱的偏好性。

2.2 影响偏性的因素

2.2.1 相关性分析及中性绘图分析 利用软件 SPSS 19.0 对 50 条 CDS 序列密码子不同位置的 GC、密码子数量 N 以及 ENC 值进行相关性分析,结果如表 3 所示。GC₃与 GC₁、GC₂没有显著相关性,而与 GC_{all}、N 以及 ENC 呈显著相关性,三位碱基的组成存在差异,初步说明了紫九牛叶绿体基因受到选择作用的影响。ENC 与 GC₂、GC₃达到显著相关的水平,说明了紫九牛叶绿体基因的后两位密码子的碱基会影响密码子的使用偏好性。

以 GC₁和 GC₂的平均值 GC₁₂为纵坐标,GC₃为横坐标进行中性绘图分析,结果如图 1 所示。结果表明,相关系数 $r=0.131$,相关性不显著,密码子偏好性主要受到选择的影响。

2.2.2 ENC-plot 分析 由图 2 可知,紫九牛叶绿体基因主要分布于标准曲线附近,密码子偏好性主要受到突变的影响。通过表 4 分析可知,密码子基因组限在-0.05~0.05 附近的基因占 52%,组限在其以外的占 48%。

2.3 最优密码子的确定

利用软件 Codon W 1.4.2 来计算高低基因库中各同义密码子的 RCSU 值,进而得到 Δ RSCU,结果如表 5 所示。由表 5 可知, Δ RSCU ≥ 0.08 的密码子有 22 个,其中大于 0.3 的有 14 个,大于 0.5 的有 5 个。由表 1 可知,RSCU >1 的密码子有 29 个。将两者共有的密码子确定为最优密码子,最终得到密码子 15 个,分别为 GAA、UUG、AUU、GUU、CAA、AAC、GCU、UCU、CCU、ACU、ACA、UGU、GUA、CGU 和 GGU,其中有 14 个以 A/U 结尾。

3 讨论与结论

在紫九牛叶绿体基因组的 RSCU 分析中,由于 TAG、TAA 和 TGA 为叶绿体通用密码子表 64 种密码子中的终止密码子,不编码任何氨基酸,而 ATG 是蛋氨酸唯一密码子,TGG 是色氨酸唯一密码子,没有偏性,在 RSCU 分析中被剔除(柳燕杰等, 2020)。剩下的 59 种密码子中,RSCU >1 的有 29 个,RSCU <1 的有 30 个,约各占一半,且并未发现

表 2 紫九牛叶绿体基因组 50 条 CDS 序列
密码子不同位置的 GC 含量
Table 2 GC contents in different positions of codons in
chloroplast genomes 50 CDS of *Ventilago leiocarpa*

基因 Gene	GC ₁ (%)	GC ₂ (%)	GC ₃ (%)	GC _{all} (%)	ENC
<i>psbA</i>	50.00	43.22	33.33	42.18	41.155
<i>matK</i>	40.12	32.29	28.57	33.66	50.742
<i>atpA</i>	54.55	40.12	28.06	40.91	47.737
<i>atpF</i>	46.49	36.22	33.51	38.74	46.572
<i>atpI</i>	48.79	35.89	27.42	37.37	46.612
<i>rps2</i>	45.15	42.62	29.11	38.96	50.849
<i>rpoC2</i>	45.87	36.67	30.07	37.54	51.036
<i>rpoC1</i>	50.44	37.68	29.03	39.05	50.450
<i>rpoB</i>	50.14	38.10	28.20	38.81	48.141
<i>psbD</i>	52.26	43.22	33.90	43.13	46.036
<i>psbC</i>	54.22	46.2	35.02	45.15	48.004
<i>rps14</i>	42.57	48.51	33.66	41.58	41.025
<i>psaB</i>	48.57	43.27	31.70	41.18	48.626
<i>psaA</i>	52.46	43.41	32.36	42.74	50.628
<i>ycf3</i>	46.75	38.46	31.36	38.86	55.264
<i>rps4</i>	50.99	38.12	24.75	37.95	45.816
<i>ndhJ</i>	49.69	37.74	31.45	39.62	50.063
<i>ndhK</i>	44.44	48.00	28.44	40.30	50.354
<i>ndhC</i>	47.93	33.88	29.75	37.19	46.128
<i>atpE</i>	50.75	39.55	36.57	42.29	55.547
<i>atpB</i>	56.71	41.68	30.26	42.89	49.402
<i>rbcL</i>	58.40	43.70	31.93	44.68	48.430
<i>accD</i>	40.97	38.25	28.93	36.05	47.673
<i>ycf4</i>	44.32	42.16	33.51	40.00	52.791
<i>cemA</i>	37.83	28.70	30.87	32.46	52.141
<i>petA</i>	54.83	36.14	33.96	41.64	55.232
<i>rps18</i>	34.31	42.16	26.47	34.31	37.588
<i>rpl20</i>	38.98	44.07	25.42	36.16	50.369
<i>clpP</i>	57.65	37.24	31.12	42.01	53.614
<i>psbB</i>	54.81	46.17	31.04	44.01	46.883
<i>petB</i>	47.69	41.20	30.56	39.81	45.058
<i>petD</i>	50.93	39.13	30.43	40.17	46.101
<i>rpoA</i>	47.09	31.19	29.36	35.88	51.679
<i>rps11</i>	51.80	56.83	25.18	44.60	47.925
<i>rps8</i>	39.26	36.30	27.41	34.32	40.873
<i>rpl14</i>	56.10	38.21	24.39	39.57	43.646
<i>rpl16</i>	49.26	54.41	25.74	43.14	37.350
<i>rps3</i>	47.47	33.64	22.58	34.56	49.960
<i>rpl22</i>	44.96	35.66	29.46	36.69	44.319
<i>rpl2</i>	51.64	48.36	32.36	44.12	54.348
<i>ycf2</i>	41.78	34.00	36.89	37.56	53.387
<i>ndhB</i>	41.49	38.75	31.31	37.18	47.742
<i>rps7</i>	52.56	44.87	24.36	40.60	42.966
<i>ndhF</i>	38.27	36.13	26.13	33.51	46.876
<i>ccsA</i>	34.26	38.27	29.63	34.05	53.450
<i>ndhE</i>	39.22	34.31	26.47	33.33	51.374
<i>ndhG</i>	42.94	33.90	27.68	34.84	47.895
<i>ndhI</i>	44.79	37.42	25.77	35.99	44.053
<i>ndhA</i>	45.08	38.25	23.77	35.70	43.907
<i>ndhH</i>	51.27	36.29	30.96	39.51	53.532
平均值 Average	47.38	39.81	29.60	38.93	48.227

注: GC₁、GC₂、GC₃分别表示密码子第一、第二和第三位碱基 GC 含量; GC_{all}表示密码子总 GC 含量。
Notes: GC₁, GC₂, GC₃ mean GC values of the first, second, third position of codons, respectively; GC_{all} means total GC value of each gene.

表 3 密码子各位置 GC 含量、数量 N 及 ENC 值相关性分析

Table 3 Correlation analyses of GC content, number (N) and ENC on chloroplast genomes of *Ventilago leiocarpa*

	GC ₁	GC ₂	GC ₃	GC _{all}	N
GC ₂	0.306*				
GC ₃	0.187	0.018			
GC	0.807**	0.720**	0.444**		
N	-0.017	-0.166	0.313*	0.003	
ENC	0.089	-0.299*	0.400**	0.022	0.252

注: **表示在 0.01 水平上极显著相关; *表示在 0.05 水平上显著相关。

Note: ** means significant differences at the 0.01 level; * means significant differences at the 0.05 level.

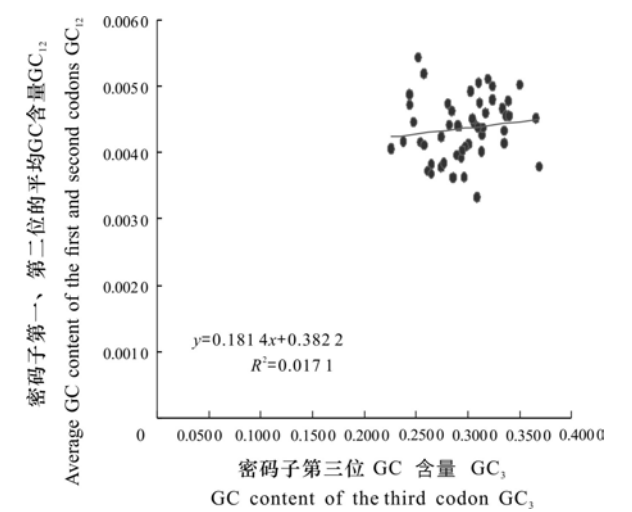


图 1 紫九牛叶绿体基因中性绘图分析
Fig. 1 Neutrality plot analysis of chloroplast genes of *Ventilago leiocarpa*

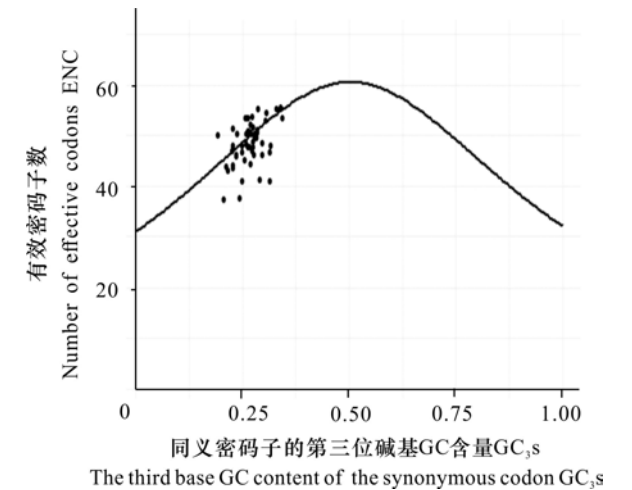


图 2 紫九牛叶绿体基因组的 ENC-plot 分析
Fig. 2 ENC-plot analysis of chloroplast genomes of *Ventilago leiocarpa*

表 4 ENC 比值频数分布

Table 4 Number distribution of ENC ratio

组限 Class boundary	中值 Class middle value	频数 Number	频率 Frequency
-0.15 ~ -0.05	-0.1	7	0.14
-0.05 ~ 0.05	0	26	0.52
0.05 ~ 0.15	0.1	10	0.20
0.15 ~ 0.25	0.2	7	0.14

RSCU>2 的密码子,初步说明了紫九牛的密码子存在较弱的偏好性。而且,在 50 个基因中,表示密码子偏倚程度的 ENC 值小于 45 的仅有 10 个,ENC 的平均值为 48.277,大于 45,这进一步说明紫九牛密码子的偏好性较弱。29 个 RSCU>1 的密码子当中,有 28 个密码子以 A/U 结尾,这与已经发表的大多数物种例如美国红栎(*Fraxinus pennsylvanica*) (柳燕杰等,2020)、云南蓝果树(*Nyssa yunnanensis*) (原晓龙等,2020)、蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*) (杨国锋等,2015)等叶绿体密码子偏好性较弱且偏好以 A/U 结尾的结果一致。

密码子是生物体内联结核酸和蛋白质的钥匙,而密码子的使用频率在不同植物和基因中存在差异,这种密码子偏好性是物种在长期进化和对环境的适应过程中形成的(赵洋等,2016)。密码子的偏好性是多个因素共同作用的结果,中性选择影响和方向突变影响是两个主要因素,关于二者在密码子偏好性形成中的作用大小是当下关于密码子偏好性研究所关注的热点。生物在进化过程中形成稳定的密码子偏好性,即相对固定的密码子使用模式,其中 GC 含量是生物基因组中碱基组成的一个重要指标(杨国锋等,2015),在基因组的演变中具有重要意义。方向性突变的强弱可以通过 GC 含量判断,尤其是密码子的第三位碱基。由于密码子第三位受到的选择压力比前两位小,故 GC₃常常被用来衡量密码子偏好性的指标(柳燕杰等,2020)。紫九牛叶绿体基因组中 GC₃与 GC₁,GC₂没有显著相关性,说明偏好性受到选择的影响,这与已经报道了的美国红栎(*Fraxinus pennsylvanica*) (柳燕杰等,2020)、黄芩(*Scutellaria baicalensis*) (王文斌等,2018)、普通油茶(*Camellia oleifera*) (王鹏良等,2018)、樟树(*Cinnamomum camphora*) (秦政等,2018)的叶绿体特征相同。而 ENC-plot 分析中,密码子大部分都位于标准曲线附近,只有少量基因的 ENC 值离标准曲线较远,表

表 5 紫九牛叶绿体基因组最优密码子分析
Table 5 Analysis of optimal codons in chloroplast
genomes of *Ventilago leiocarpa*

氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	高表达基因 High expressed gene		低表达基因 Low expressed gene		Δ RSCU	氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	高表达基因 High expressed gene		低表达基因 Low expressed gene		Δ RSCU
		数目 Number	RSCU	数目 Number	RSCU				数目 Number	RSCU	数目 Number	RSCU	
Phe	UUU	17	0.85	23	1.48	−0.63	Ala	GCU***	33	2.44	28	1.32	1.12
	UUC***	23	1.15	8	0.52	0.63		GCC	4	0.30	18	0.85	−0.55
Leu	UUA	19	1.65	26	1.75	−0.10		GCA	13	0.94	24	1.13	−0.19
	UUG***	18	1.57	15	1.01	0.56		GCG	4	0.30	15	0.71	−0.41
	CUU	16	1.39	24	1.62	−0.23	Tyr	UAU	19	1.58	33	1.61	−0.03
	CUC	0	0	6	0.40	−0.40		UAC	5	0.42	8	0.39	0.03
	CUA***	13	1.13	7	0.47	0.66	His	CAU	11	1.22	13	1.44	−0.22
	CUG	3	0.26	11	0.74	−0.48		CAC*	7	0.78	5	0.56	0.22
Ile	AUU**	39	1.56	42	1.26	0.30	Gln	CAA**	17	1.70	29	1.32	0.38
	AUC	13	0.52	22	0.66	−0.14		CAG	3	0.30	15	0.68	−0.38
	AUA	23	0.92	36	1.08	−0.16	Asn	AAU	26	1.21	43	1.48	−0.27
	GUU**	19	1.95	28	1.56	0.39		AAC*	17	0.79	15	0.52	0.27
Val	GUC	3	0.31	6	0.33	−0.02	Lys	AAA*	34	1.70	44	1.47	0.23
	GUA**	16	1.64	27	1.50	0.14		AAG	6	0.30	16	0.53	−0.23
	GUG	1	0.10	11	0.61	−0.51	Asp	GAU	10	1.11	35	1.56	−0.45
	UCU**	21	1.88	12	1.26	0.62		GAC**	8	0.89	10	0.44	0.45
Ser	UCC	10	0.90	9	0.95	−0.05	Glu	GAA*	33	1.53	45	1.30	0.23
	UCA	4	0.36	6	0.63	−0.27		GAG	10	0.47	24	0.70	−0.23
	AGU	13	1.16	14	1.47	−0.31	Cys	UGU**	5	1.67	6	1.33	0.34
	AGC*	10	0.90	6	0.63	0.27		UGC	1	0.33	3	0.67	−0.34
	UCG	9	0.81	10	1.05	−0.24	Arg	CGU**	19	1.39	13	1.04	0.35
	CCU*	16	1.78	24	1.57	0.21		CGC	7	0.51	6	0.48	0.03
Pro	CCC	8	0.89	18	1.18	−0.29		CGA	20	1.46	19	1.52	−0.06
	CCA	7	0.78	16	1.05	−0.27		CGG	5	0.37	6	0.48	−0.11
	CCG**	5	0.56	3	0.20	0.36		AGA	24	1.76	23	1.84	−0.08
	ACU**	16	1.49	14	1.12	0.37		AGG	7	0.51	8	0.64	−0.13
Thr	ACC	13	1.21	17	1.36	−0.15	Gly	GGU*	36	2.25	30	1.30	0.95
	ACA*	14	1.30	14	1.12	0.18		GGC	4	0.25	12	0.52	−0.27
	ACG	0	0	5	0.40	−0.40		GGA	20	1.25	33	1.43	−0.18
								GGG	4	0.25	17	0.74	−0.49

注: *表示 Δ RSCU ≥ 0.08 ; **表示 Δ RSCU ≥ 0.3 ; ***表示 Δ RSCU ≥ 0.5 。
Note: * means Δ RSCU ≥ 0.08 ; ** means Δ RSCU ≥ 0.3 ; *** means Δ RSCU ≥ 0.5 .

明密码子偏好性还受到突变作用的影响,与蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)(杨国锋等,2015)相类似。

我们此次将 RSCU>1 且 Δ RSCU ≥ 0.08 的密码子确定为最优密码子,得到 15 个最优密码子为 GAA、UUG、AUU、GUU、CAA、AAC、GCU、UCU、CCU、ACU、ACA、UGU、GUA、CGU 和 GGU。其中,以 A/U 结尾有 14 个,这与上述中的紫九牛叶绿体基因组密码子偏好以 A/U 结尾的结论一致。

在紫九牛叶绿体基因工程的外源基因载体设计时选用以 A/U 结尾的最优密码子可以提高外源基因的表达效率。紫九牛叶绿体基因组偏好性的研究以及最优密码子的确立,为优化目标基因,通

过基因工程来改良紫九牛的性状提供了科学的依据。同时,对于物种的进化,以及提高外源基因表达水平具有重大意义。

参考文献:

HU XX, HUANG ZF, LU GS, et al., 2020. Interaction of emodin and its derivative frangulin-a with bovine serum albumin and calf thymus Dna [J]. J Appl Spectrosc, 87 (1): 46-53.
HU XY, XU YQ, HAN YZ, et al., 2019. Codon usage bias analysis of the chloroplast genome of *Ziziphus jujuba* var. *spinosa* [J]. J For Environ Sic, 39(6): 621-628. [胡

- 晓艳, 许艳秋, 韩有志, 等, 2019. 酸枣叶绿体基因组密码子使用偏好性分析 [J]. 森林与环境学报, 39(6): 621-628.]
- LIANG B, QIN LF, LAI MX, et al., 2012. HPLC determination of emodin in root or stem of *Ventilago leiocarpa* [J]. Guid Trad Chin Med Pharm, 18(6): 68-69. [梁冰, 覃兰芳, 赖茂祥, 等, 2012. HPLC 法测定广西壮药血风藤中大黄素的含量 [J]. 中医药导报, 18(6): 68-69.]
- LIANG FF, 2010. Influencing factors of codon bias and its research significance [J]. Anim Husb Feed Sci, 31(1): 118-119. [梁菲菲, 2010. 密码子偏性的影响因素及研究意义 [J]. 畜牧与饲料科学, 31(1): 118-119.]
- LIANG XJ, ZHU CS, LI KX, et al., 2021. Genes codon bias of transcriptome in *Cinnamomum camphora* [J]. Guihaia, 41(12): 2077-2083. [梁晓静, 朱昌叁, 李开祥, 等, 2021. 香樟转录组基因密码子偏好性分析 [J]. 广西植物, 41(12): 2077-2083.]
- LIN MC, WANG SM, SHEN SG, et al., 2020. Research progress on Yao medicine resource [J]. World Chin Med, 15(11): 1565-1570. [林明琛, 王少敏, 沈水桂, 等, 2020. 瑶药资源研究进展 [J]. 世界中医药, 15(11): 1565-1570.]
- LIN T, NI ZH, SHEN MS, et al., 2002. High-frequency codon analysis and its application in codon analysis of tobacco [J]. J Xiamen Univ (Nat Sci Ed), 41(5): 551-554. [林涛, 倪志华, 沈明山, 等, 2002. 高频密码子分析法及其在烟草密码子分析中的应用 [J]. 厦门大学学报(自然科学版), 41(5): 551-554.]
- LIU H, WANG MX, YUE WJ, et al., 2017. Analysis of codon usage in the chloroplast genome of broomcorn millet (*Panicum miliaceum* L.) [J]. Plant Sci J, 35(3): 362-371. [刘慧, 王梦醒, 岳文杰, 等, 2017. 糜子叶绿体基因组密码子使用偏性的分析 [J]. 植物科学学报, 35(3): 362-371.]
- LIU YJ, TIAN XP, LI Q, 2020. Analysis of codon bias in chloroplast genome of *Fraxinus pennsylvanica* [J]. Jiangsu J Agric Sic, 48(15): 83-88. [柳燕杰, 田旭平, 李倩, 2020. 美国红栲叶绿体基因组密码子偏好性分析 [J]. 江苏农业科学, 48(15): 83-88.]
- LUO H, HU SS, WU Q, et al., 2015. Analysis of buckwheat chloroplast gene codon bias [J]. Genom Appl Biol, 34(11): 2457-2464. [罗洪, 胡莎莎, 吴琦, 等, 2015. 甜荞叶绿体基因密码子偏爱性分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 34(11): 2457-2464.]
- QIN XY, LI T, 2001. Zong Guoqv Mbiauh Ei Hoqc [M]. Beijing: Ethnic Publishing House. [覃迅云, 李彤, 2001. 中国瑶医学 [M]. 北京: 民族出版社.]
- QIN Z, ZHENG YJ, GUI LJ, et al., 2018. Codon usage bias analysis of chloroplast genome of camphora tree (*Cinnamomum camphora*) [J]. Guihaia, 38(10): 1346-1355. [秦政, 郑永杰, 桂丽静, 等, 2018. 樟树叶叶绿体基因组密码子偏好性分析 [J]. 广西植物, 38(10): 1346-1355.]
- WANG LL, ZUO JP, MA L, et al., 2008. Two new xanthone glycosides from *Ventilago leiocarpa* Benth [J]. Nat Prod Comm, 3(5): 795-798.
- WANG PL, YANG LP, WU HY, et al., 2018. Codon preference of chloroplast genome in *Camellia oleifera* [J]. Guihaia, 38(2): 135-144. [王鹏良, 杨利平, 吴红英, 等, 2018. 普通油茶叶绿体基因组密码子偏好性分析 [J]. 广西植物, 38(2): 135-144.]
- WANG WB, YU H, QIU XP, 2018. Analysis of repeat sequence and codon bias of chloroplast genome in *Scutellaria baicalensis* [J]. Mol Plant Breed, 16(8): 2445-2452. [王文斌, 于欢, 邱相坡, 2018. 黄芩叶绿体基因组重复序列及密码子偏好性分析 [J]. 分子植物育种, 16(8): 2445-2452.]
- WANG XF, LU WJ, CHEN JY, et al., 1993. Studies on the chemical constituents of *Ventilago leiocarpa* Benth [J]. Acta Pharm Sin, 28(2): 122-125. [王雪芬, 卢文杰, 陈家源, 等, 1993. 翼核果化学成分的研究 [J]. 药学报, 28(2): 122-125.]
- WU ML, CHEN SP, CHEN H, 2019. Codon preference of chloroplast genome of *Bambusoideae* [J]. J For Environ Sic, 39(1): 9-14. [吴妙丽, 陈世品, 陈辉, 2019. 竹亚科叶绿体基因组的密码子使用偏性分析 [J]. 森林与环境学报, 39(1): 9-14.]
- WU XM, WU SF, REN DM, et al., 2007. The analysis method and progress in the study of codon bias [J]. Hereditas, 29(4): 402-426. [吴宪明, 吴松峰, 任大明, 等, 2007. 密码子偏性的分析方法及相关研究进展 [J]. 遗传, 29(4): 420-426.]
- XIE P, 2017. The origin of genetic codes: from energy transformation to informatization [J]. Biodivers Sic, 25(1): 94-106. [谢平, 2017. 遗传密码子的起源——从能量转化到信息化 [J]. 生物多样性, 25(1): 94-106.]
- YANG GF, SU KL, ZHAO YR, et al., 2015. Analysis of codon usage in the chloroplast genome of *Medicago truncatula* [J]. Acta Pratac Sin, 24(12): 171-179. [杨国锋, 苏昆龙, 赵怡然, 等, 2015. 蒺藜苜蓿叶绿体密码子偏好性分析 [J]. 草业学报, 24(12): 171-179.]
- YING BP, HAN J, LI GW, et al., 1988. Study on anthraquinones of *Ventilago leiocarpa* [J]. Acta Pharm Sin, 23(2): 126-129. [应百平, 韩玖, 利国威, 等, 1988. 翼核果中蒽醌的研究 [J]. 药学报, 23(2): 126-129.]
- YUAN XL, KANG HM, WANG Y, 2020. Codon usage bias analysis of chloroplast genome in *Nyssa yunnanensis* [J]. J NW For Univ, 35(4): 26-31. [原晓龙, 康洪梅, 王毅, 2020. 云南蓝果树叶绿体基因组密码子偏好性分析 [J]. 西北林学院学报, 35(4): 26-31.]
- ZHAO S, DENG LH, CHEN F, 2020. Analysis on codon usage preference of FERONIA genes in different plants [J]. Jiangsu J Agric Sci, 36(5): 1073-1081. [赵森, 邓力华, 陈芬, 2020. 不同植物 FERONIA 基因密码子使用偏好性分析 [J]. 江苏农业学报, 36(5): 1073-1081.]
- ZHAO S, DENG LH, CHEN F, 2020. Codon usage bias of chloroplast genome in *Kandelia obovata* [J]. J For Environ Sic, 40(5): 534-541. [赵森, 邓力华, 陈芬, 2020. 秋茄叶绿体基因组密码子使用偏好性分析 [J]. 森林与环境学报, 40(5): 534-541.]
- ZHAO Y, LIU Z, YANG PD, et al., 2016. Codon bias analysis method and research on codon bias in *Camellia sinensis* [J]. J Tea Comm, 43(2): 3-7. [赵洋, 刘振, 杨培迪, 等, 2016. 密码子偏性分析方法及茶树中密码子偏性研究进展 [J]. 茶叶通讯, 43(2): 3-7.]

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202008042

张红梅, 王旺田, 张芮, 等. 葡萄 *CBF4* 基因生物信息学及其对低温和硅酸钾响应分析 [J]. 广西植物, 2022, 42(8): 1433–1440.

ZHANG HM, WANG WT, ZHANG R, et al. Bioinformatics of grape *CBF4* gene and its response to low temperature and potassium silicate [J]. *Guihaia*, 2022, 42(8): 1433–1440.



葡萄 *CBF4* 基因生物信息学及其对低温和硅酸钾响应分析

张红梅, 王旺田*, 张 芮, 杨 科, 王宝强, 王翠玲

(甘肃农业大学 生命科学技术学院, 甘肃省干旱生境作物学重点实验室, 兰州 730070)

摘 要: 为探究葡萄 *CBF4* 基因的结构和表达特征, 该研究以葡萄为材料, 对葡萄 *CBF4* 基因进行生物信息学及低温和硅酸钾响应分析。结果表明: (1) *CBF4* 蛋白定位在细胞核, 有 5 个磷酸化位点和 14 个糖基化位点, 无信号肽, 是一个亲水的、脂溶性较差的膜外蛋白。二级结构以无规则卷曲为主, 比例为 56.88%。该蛋白包含一个 AP2/EREBP 结构域。(2) *CBF4* 蛋白的多序列和系统进化分析表明酿酒葡萄与美洲葡萄的同源性最高, 亲缘关系最近。(3) 荧光定量 PCR 分析显示, 低温胁迫后 *CBF4* 基因在葡萄叶片中表达水平上调, 说明 *CBF4* 基因可能参与了葡萄叶片低温胁迫的响应。低温条件下, 施加硅酸钾 *CBF4* 基因表达具有差异性, 说明该基因在不同的葡萄组织中对硅酸钾的响应机制可能不同。以上结果为进一步研究葡萄 *CBF4* 基因的功能和机理奠定了基础。

关键词: 葡萄, *CBF4* 基因, 低温胁迫, 生物信息学, qRT-PCR

中图分类号: Q943 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2022)08-1433-08

Bioinformatics of grape *CBF4* gene and its response to low temperature and potassium silicate

ZHANG Hongmei, WANG Wangtian*, ZHANG Rui, YANG Ke,
WANG Baoqiang, WANG Cuiling

(College of Life Science and Technology, Gansu Agricultural University, Key Laboratory
of Crop Science in Arid Habitats, Lanzhou 730070, China)

Abstract: In order to explore the structure and expression characteristics of *CBF4* gene from grapes, the study analyzed the grape *CBF4* gene from the aspects of bioinformatics and low temperature and potassium silicate response. The results

收稿日期: 2020-12-20

基金项目: 甘肃省农牧厅生物技术专项 (GNSW-2014-12); 国家自然科学基金 (31560552, 51569002); 甘肃省自然科学基金 (17JR5RA151) [Supported by Biotechnology Special Project of Gansu Provincial Department of Agriculture and Animal Husbandry (GNSW-2014-12); National Natural Science Foundation of China (31560552, 51569002); Gansu Provincial Natural Science Foundation (17JR5RA151)]。

第一作者: 张红梅 (1994-), 硕士研究生, 主要研究方向为植物逆境生理, (E-mail) 2440644680@qq.com。

* 通信作者: 王旺田, 博士, 副教授, 主要从事植物逆境生理研究, (E-mail) wtwang@gsau.edu.cn。

were as follows: (1) *CBF4* protein was located in the nucleus, there were 5 phosphorylation sites and 14 glycation sites, without signal peptide. It was a hydrophilic, a poor lipid solubility and an extra-cellular protein. The secondary structure was dominated by random coil, with a ratio of 56.88%. The protein contained an AP2/EREBP domain. (2) The multiple sequence alignment and phylogenetic analysis of *CBF4* protein showed that wine grapes and American grapes had the highest homology and the closest genetic relationship. (3) Quantitative real-time PCR analysis indicated that the expression level of *CBF4* gene in grape leaves was up-regulated after low temperature stress, indicating that *CBF4* gene may be involved in the response of grape leaves to low temperature stress. Under low temperature conditions, the *CBF4* gene expression was different when potassium silicate was applied, indicating that the response mechanism of this gene to potassium silicate may be different in different grape tissues. These results lay a foundation for further study on the function and mechanism of *CBF4* gene in grapes.

Key words: grape, *CBF4* gene, low temperature stress, bioinformatics, qRT-PCR

葡萄是世界最古老的落叶果树之一,各地均有栽培,已成为重要的果树经济作物,种植面积和产量居世界首位,是我国的重要果树。中国北方的葡萄由于低温冻害使得产量减少,造成巨大的经济损失。因此,研究葡萄的低温响应机理,提高葡萄对低温的适应性是十分必要的。

作为 AP2/EREBP 转录因子群的一个亚科, *DREB/CBF* 基因在对非生物胁迫的耐受性中发挥核心作用,植物在低温胁迫下表现出 *CBF* 依赖的应答通路。*CBF* 能够与启动子中的核心片段 (CCGAC) 相结合从而调控该基因的转录水平 (Haake, 2002)。研究表明拟南芥 *CBF1*、*CBF2* 和 *CBF3* 都位于 IV 染色体上,且紧密分布于短臂 72.8 cM 处,它们编码与 AP2/ERF 家族密切相关的转录因子,这些转录因子与 *CBF* 调控基因启动子中存在的 CRT/DRE DNA 调控元件结合。*CBF2* 基因能够负调控 *CBF1* 和 *CBF3*,从而调控下游 COR 等抗寒基因的表达式来提高植物抗寒性 (Novillo et al., 2004; 吕胜男等,2011;董亚茹等,2017)。而 *CBF4* 则位于拟南芥的 V 号染色体上,是唯一已知的 *CBF* 基因参与脱落酸 (ABA) 依赖的信号通路 (沙丽娜,2009)。这些研究成果说明 *CBF* 转录因子对植物的抗寒、抗旱和抗盐碱等胁迫过程发挥着重要作用。研究表明,硅 (Si) 可以提高水稻 (任学坤等,2007)、小麦 (郑世英等,2015)、高粱 (刘朋等,2014) 等植物的抗逆性,施加外源硅能够提高低温胁迫下葡萄叶片渗透调节物质含量,促进蔗糖转运速率,缓解活性氧积累,增强耐寒性 (郑凯翔等,2019)。

目前,国内 *CBF* 基因主要集中于拟南芥 (Michael et al., 2010)、大豆 (Kidokoro et al.,

2014)、玉米 (Zhang et al., 2010)、番茄 (Yuasa et al., 2014) 等植物的研究,对葡萄中 *CBF* 基因的抗寒作用等方面研究较少,尤其对 *CBF4* 在外源硅与低温协同作用下的表达未见报道。本研究对 *CBF4* 基因编码的蛋白进行全面的生物信息学分析,对葡萄幼苗进行低温和硅酸钾处理,并对 *CBF4* 基因进行实时荧光定量分析,以期为 *CBF4* 基因的表达特性及其功能研究奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 序列来源

利用 NCBI 数据库获取酿酒葡萄基因 *CBF4* (GenBank: DQ497624.1)。

1.2 蛋白质结构预测

1.2.1 一级结构 通过 ExPASy 进行氨基酸残基的数目和组成以及蛋白质的一级结构在线分析。

1.2.2 二级结构 利用 SOPMA 进行二级结构的预测;利用 ProtScale 预测蛋白的亲疏水性;利用 TMHMM Server v.2.0 预测蛋白的跨膜结构;利用 SignalP 4.0 预测蛋白的信号肽。

1.2.3 磷酸化位点和糖基化位点预测 分别使用 KinasePhos 和 NetOGlyc 4.0 预测蛋白的磷酸化和糖基化位点。

1.2.4 *CBF4* 蛋白的细胞定位 使用 PSORT Prediction 预测蛋白的细胞定位。

1.2.5 结构域预测 使用 NCBI 中的 CDD 数据库对蛋白的结构域进行分析。

1.2.6 三级结构 通过 SWISSMODEL 对葡萄 *CBF4* 基因编码蛋白的三维结构进行同源建模。

1.3 同源性比对及系统进化树构建

通过 NCBI 在线比对,找出与该蛋白同源性较高的其他植物的氨基酸序列,再利用 MEGA X 软件进行系统进化树的构建。

1.4 低温胁迫对葡萄组织 CBF4 基因的荧光定量 PCR 分析

以酿酒葡萄试管苗贝达为试验材料,当植株长至 5 片叶时,选取长势一致的幼苗炼苗 3 d 后移入装有 1/2 强度 Haogland 营养液的水培盆(10 cm × 10 cm × 9 cm),用泡沫板固定,在人工气候培养箱中培养(温度 25 ℃;湿度 60%;光照强度 5 000 lx) 60 d,营养液每 2 d 更换 1 次。外源硅处理一周后,按实验设计分别进行常温(25 ℃)及室内模拟低温(5 ℃)处理,各处理过程持续光照,对照为不加硅酸钾的葡萄水培苗,且其他条件相同。低温处理 3 h 和 9 h 后分别取各组幼苗的中部幼嫩叶片和根部,提取 RNA,反转录得到 cDNA,以葡萄管家基因 ubiquitin (AY684131.1) 为内参基因对葡萄叶片和根部的 CBF4 基因表达水平进行分析,根据 TAKARA SYBR GREEN 试剂盒说明书进行 qRT-PCR 反应液的配制,在定量 PCR 仪器上进行试验,所有试样重复 3 次,qRT-PCR 生成的数据由定量分析软件读取,采用 2^{-ΔΔCT} 法对所得数据进行分析。根据基因序列设计引物,得到引物序列如下:CBF4(正向:5'-AACTGGGTATGCGAGGTAAG-3',反向:5'-TTCTGAA TGTCTTGGCG-3'),退火温度为 60 ℃;ubiquitin(正向:5'-GGCTTGGGAGATGGGAAAC-3',反向:5'-TCCTACAATACCACCAAACATAGCA-3'),退火温度为 60 ℃。

1.5 数据处理

采用 Origin 9 和 SPSS 22.0 软件进行数据处理和分析,运用 Duncan 双因素方差分析每个处理之间的差异显著性(α=0.05)。

2 结果与分析

2.1 蛋白质结构分析

2.1.1 一级结构 对 CBF4 蛋白的理化性质分析得到葡萄 CBF4 蛋白的分子式为 C₁₀₄₅H₁₆₃₁N₃₁₁O₃₂₆S₁₄;相对分子量为 24.22 kD;理论等电点(pI)为 5.42;不稳定系数为 51.89,总平均亲水性为-0.621,表明该蛋白为不稳定的亲水性蛋白;脂肪系数为 61.83,表明脂溶性比较差;正电荷残基数(Arg+Lys)和负电

荷残基数(Asp+Glu)分别为 27 和 34。

由表 1 可知,葡萄 CBF4 蛋白的 20 种氨基酸中,丙氨酸(Ala)含量最多(11.0%),其次为精氨酸(Arg)(8.7%)与天冬氨酸(Asp)(8.3%),氨基酸含量最小的是谷氨酸胺(Gln)(0.9%)。其中极性氨基酸占 56.9%,非极性氨基酸占 43.1%。

表 1 CBF4 蛋白氨基酸组成分析
Table 1 Analysis of amino acid compositions of CBF4 protein

氨基酸组成 Amino acid composition	百分比 Percentage (%)	氨基酸组成 Amino acid composition	百分比 Percentage (%)
丙氨酸 Ala (A)	11.0	缬氨酸 Val (V)	6.4
精氨酸 Arg (R)	8.7	酪氨酸 Tyr (Y)	1.8
天冬酰胺 Asn (N)	4.1	色氨酸 Trp (W)	2.3
天冬氨酸 Asp (D)	8.3	苏氨酸 Thr (T)	3.7
半胱氨酸 Cys (C)	1.4	丝氨酸 Ser (S)	7.3
谷氨酰胺 Gln (Q)	0.9	脯氨酸 Pro (P)	7.3
谷氨酸 Glu (E)	7.3	苯丙氨酸 Phe (F)	2.8
甘氨酸 Gly (G)	6.9	甲硫氨酸 Met (M)	5.0
组氨酸 His (H)	2.8	赖氨酸 Lys (K)	3.7
异亮氨酸 Ile (I)	1.4	亮氨酸 Leu (L)	6.9

2.1.2 二级结构 蛋白二级结构预测(图 1),该蛋白二级结构主要是无规则卷曲,其次是α-螺旋,其中所占比例分别为 56.88%和 27.52%,延伸链占比为 13.76%,β-转角占比最小(1.83%)。

通过 ProtScale 分析 CBF4 蛋白质亲/疏水性(图 2),预测结果说明整条多肽链没有明显的疏水区域。跨膜域的预测结果(图 3)显示,CBF4 蛋白是一个膜外蛋白,没有发现跨膜螺旋区域,这与没有明显疏水区域的预测结果一致。利用 SignalP 4.0 在线工具预测分析信号肽,对于 CBF4 蛋白,总结分析得到预测的目的蛋白中不存在信号肽(图 4)。

2.1.3 磷酸化位点和糖基化位点预测 分别通过 KinasePhos 和 NetOGlyc 4.0 预测葡萄 CBF4 蛋白的磷酸化和糖基化位点,表明该蛋白含有 5 个磷酸化位点(图 5)和 14 个糖基化位点。

2.1.4 CBF4 蛋白的细胞定位 通过 PSORT Prediction 预测葡萄 CBF4 蛋白的细胞定位, 结构显示该蛋白定位在细胞核内, 因此可以推断葡萄 CBF4 基因主要在细胞核内发挥生物学作用。

2.1.5 结构域预测 应用 NCBI 中的 CDD 数据库预测葡萄 CBF4 蛋白的保守结构域, 预测结果(图 6)显示葡萄 CBF4 蛋白的氨基酸序列的第 57 位至第 115 位为 AP2 超家族结构域, 在进化上非常保守, 该结构域对蛋白功能的发挥非常重要。

2.1.6 三级结构预测 通过同源建模方法构建葡萄 CBF4 基因蛋白的三级结构(图 7), 结果显示该蛋白三级结构主要由 α -螺旋和无规则卷曲折叠形成, 其预测结果和二级结构相一致。

2.2 CBF4 蛋白进化树构建及多序列比对分析

将葡萄 CBF4 基因的序列与同一物种及其他相近物种的序列进行比对分析(图 8), 结果显示酿酒葡萄与美洲葡萄同源性最高, 为 99.62%, 与洋蓐、短脚草、爬山虎、猕猴桃、白桦、花生、茶花、赤藓和咖啡同源性分别为 99.64%、92.78%、93.31%、85.71%、81.55%、81.23%、80.13%、78.51% 和 75.49%。

葡萄 CBF4 基因与 13 种同物种和相近物种同源序列的系统进化树如图 9 所示, 酿酒葡萄与美洲葡萄的关系最密切, 其次是河岸葡萄、山葡萄、沙地葡萄、洋蓐、爬山虎、短脚草, 与猕猴桃、茶花、白桦、花生、赤藓、咖啡关系较远, 遗传距离也随之增加。

2.3 葡萄 CBF4 基因在低温胁迫下的表达

葡萄水培苗经低温胁迫处理后, CBF4 基因的表达结果显示, 低温胁迫下葡萄叶片 CBF4 基因随低温处理时间延长相对表达水平显著上调, 低温胁迫 3 h 和 9 h 的上调幅度分别为对照的 1.209 倍、13.812 倍; 施加外源硅后常温条件下 CBF4 基因表达水平上调但差异不显著, 低温条件下 CBF4 基因表达水平下调(图 10:A)。在相同处理时间内, 低温胁迫相对常温比较, 葡萄根部相对表达水平下调, 3 h 和 9 h 的下调幅度分别为对照的 0.573 倍和 0.422 倍, 在常温及低温条件下, 施硅处理较对照, CBF4 基因表达均上调(图 10:B)。

3 讨论与结论

植物受到逆境胁迫会使植物在生长发育、形态建成、物质和能量代谢等方面发生一系列的变化。相比于传统育种, 利用生物信息学能够快速

准确地探索植物抗逆基因资源, 克隆相关基因并且利用相关基因提高植物抗逆性(贾翠翠, 2015)。酿酒葡萄的种植会受到冷冻、干旱和高盐的限制, 低于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的温度会对葡萄树造成不可逆转的损害, 影响许多葡萄栽培种的产量, 降低种植者收入, 若将相关抗性基因克隆并转入酿酒葡萄中, 则可以显著提高酿酒葡萄的产量。目前, 对于 CBF 转录因子的研究较为深入和广泛, 该转录因子在植物非生物胁迫方面发挥着重要作用(Feng et al., 2011; Novillo et al., 2012)。研究发现 AtCBF1 基因在马铃薯中表达, 能够增强马铃薯的抗寒性(Pino et al., 2008)。将欧洲越桔中的 CBF1 基因在拟南芥中表达可增强其抗寒性(Oakenfull et al., 2013)。综上所述, CBF 基因参与了植物体低温胁迫的响应, 这与本研究结果保持一致。

通过分析可知, 葡萄 CBF4 蛋白氨基酸组成中极性氨基酸占 56.9%, 非极性氨基酸占 43.1%, CBF4 蛋白无信号肽, 是一个不稳定的、亲水的、脂溶性较差的膜外蛋白, 与极性氨基酸所占比例一致。采用 SOPMA 及 SWISS-MODEL 分别预测 CBF4 蛋白二级结构和三级结构, 表明该蛋白主要结构单元是无规则卷曲, 其次是 α -螺旋, 其中所占比例分别为 56.88% 和 27.52%, 该结果为研究 CBF4 基因及其编码产物的结构和功能提供了更多的信息。CBF4 蛋白的多序列和系统进化分析表明, 酿酒葡萄与美洲葡萄的同源性最高、亲缘关系最近, 这种同源性一方面体现出各物种间亲缘关系的远近, 另一方面也表明多个不同物种的 CBF4 基因编码产物在结构特征中比较稳定, 保守性较高。通过对葡萄 CBF4 蛋白的结构域分析得到, 葡萄 CBF4 包含一个 AP2/EREBP 结构域, 属于 AP2 型 DNA 保守结合大家族中的 CBF/DREB 家族, 具有该家族典型的特征, 含有 YRG 元件和 WLG 基序, 具有高度保守性, 该结构域对编码蛋白功能发挥着极其重要的作用, 可调节植物抵御低温和干旱相关基因的表达, 推测 CBF4 基因与植物逆境胁迫可能密切相关(韩志萍等, 2006; 邵文靖等, 2020), 这说明 CBF4 在葡萄的抗逆性中有着非常重要的作用, 具有深入研究的价值。

低温能够诱导大多数植物体内的 CBF 基因表达, 如山葡萄在寒冷、盐度、脱落酸和水杨酸处理下, CBF4 转录本积累增加(Dong et al., 2013)。在葡萄树中, CBF4 基因通常通过冷处理诱导, 低温

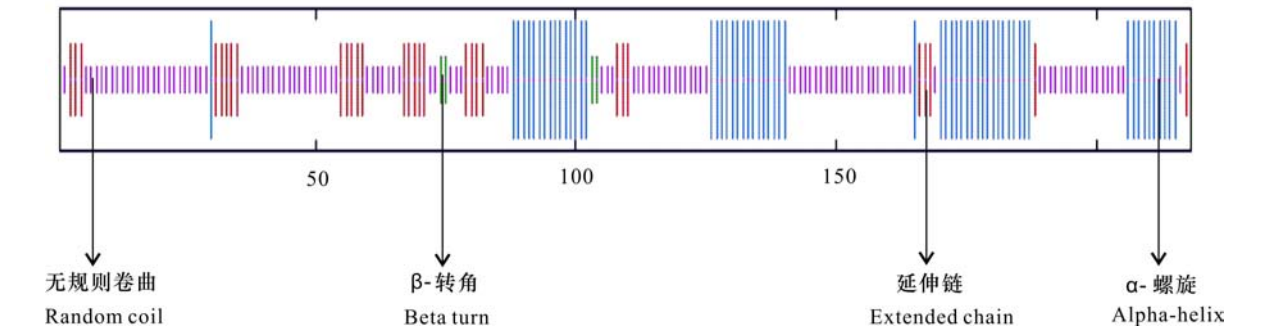


图 1 *CBF4* 基因编码蛋白二级结构预测结果

Fig. 1 Prediction results of secondary structure of *CBF4* gene encoded protein

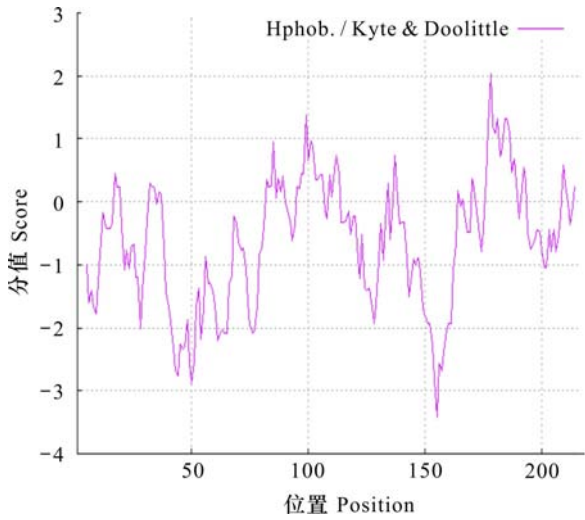


图 2 *CBF4* 蛋白亲疏水性分析

Fig. 2 Analysis of affinity and hydrophobicity of *CBF4* protein

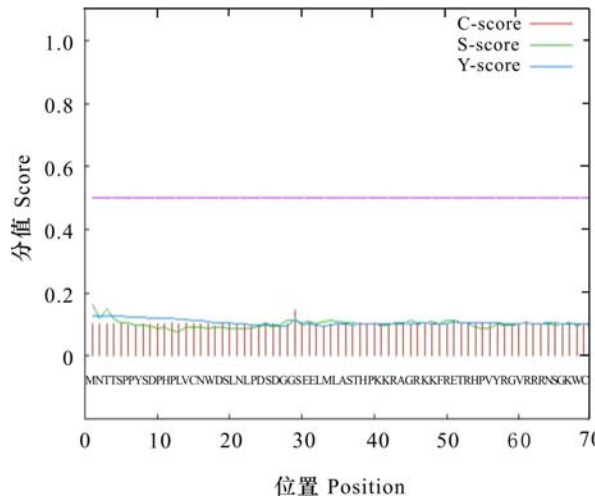


图 4 *CBF4* 蛋白信号肽结果

Fig. 4 Results of *CBF4* protein signal peptides

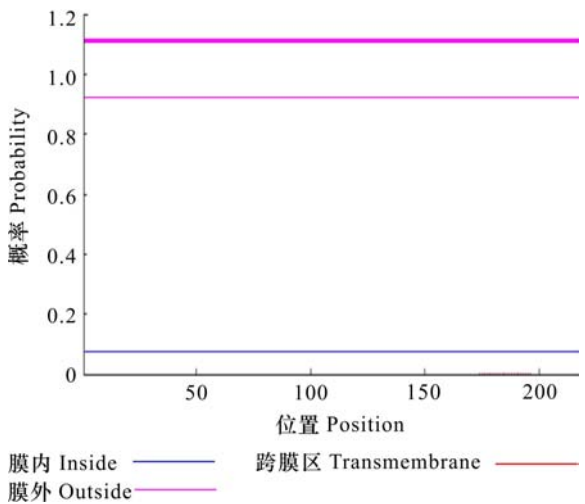


图 3 *CBF4* 蛋白质跨膜区结果

Fig. 3 Results of *CBF4* protein transmembrane region



图 5 磷酸化位点预测结果

Fig. 5 Results of phosphorylation site prediction

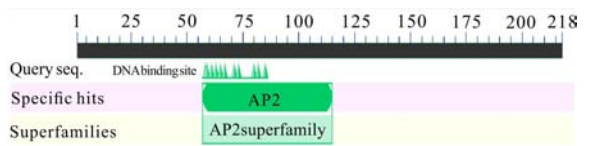


图 6 结构域预测结果

Fig. 6 Results of domain prediction

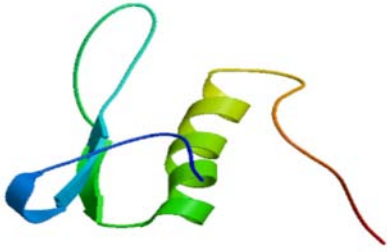


图 7 蛋白三级结构的预测

Fig. 7 Prediction of tertiary structure of protein

条件下葡萄 *CBF4* 转录水平相对快速地增加,并且可以在叶片中保持很多天 (Xiao et al., 2010)。本研究分析表明,发现 *CBF4* 基因低温胁迫 3 h 和 9 h 在葡萄叶片中表达水平显著上调,可能是因为 *CBF* 转录激活因子与 CRT/DRE 调控元件特异性结合,激活启动子中目的基因表达,说明 *CBF4* 基因可能参与了葡萄叶片响应外界冷胁迫的信号途径,因此推测出 *CBF4* 基因可能参与了葡萄叶片低温胁迫的响应。低温条件下施加硅酸钾,在葡萄

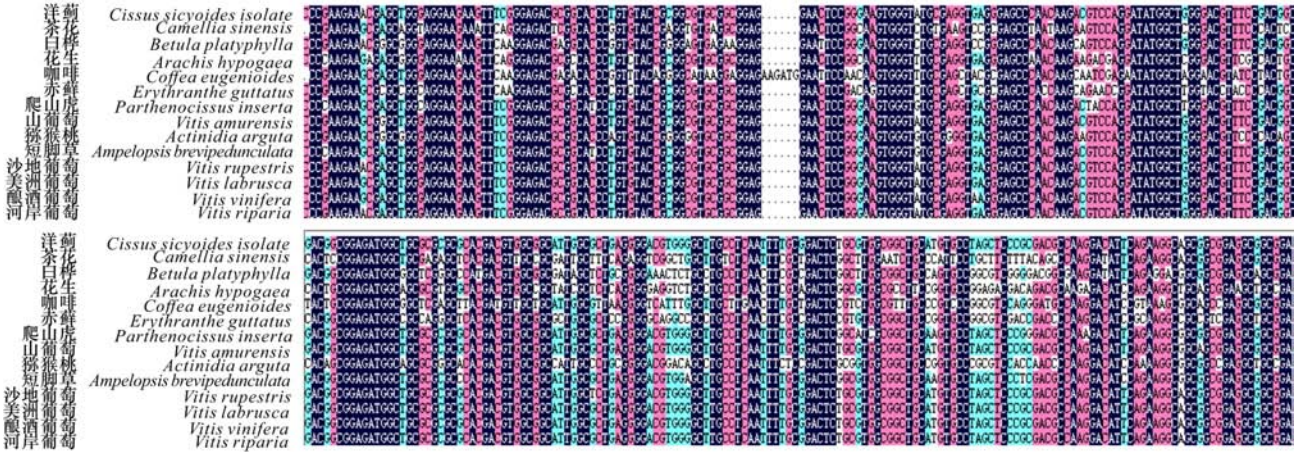


图 8 多序列比对结果

Fig. 8 Results of multiple sequence alignment

叶片中的表达下调,而在葡萄根部表达上调,可能是因为葡萄根部对低温和硅酸钾交互作用比较敏感,揭示了该基因在不同的葡萄组织中对硅酸钾的响应机制可能不同。目前,应对低温伤害的方法中使用外源物质提高作物抗性更为简单,并且效果显著,为了防止葡萄受到低温伤害,应该在根部追施硅肥,本研究进一步为施用外源硅提高葡萄抗寒性提供理论依据。

本研究对 *CBF4* 基因编码的蛋白进行全面的生物信息学及低温和硅酸钾响应分析,结果显示低温胁迫后 *CBF4* 基因在葡萄叶片中表达水平上调,说明 *CBF4* 基因可能参与了葡萄叶片低温胁迫的响应。低温条件下施加硅酸钾后,*CBF4* 基因在不同的葡萄组织中对硅酸钾的响应不同,说明该基因表达具有组织特异性。本研究对深入了解 *CBF4* 基因在葡萄非生物逆境胁迫中的功能,分析 *CBF4* 蛋白对植物抗逆的分子机制,以及深入探究外源硅对葡萄抗寒调节机理,为甘肃乃至北方酿酒葡萄抗寒栽培提供理论基础和实践指导。

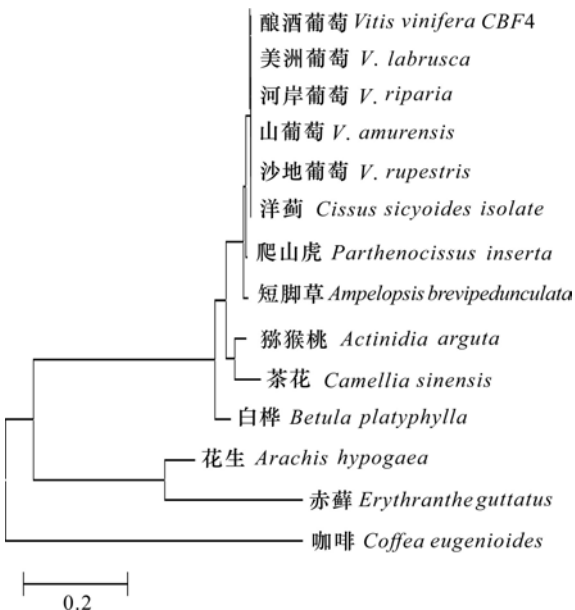
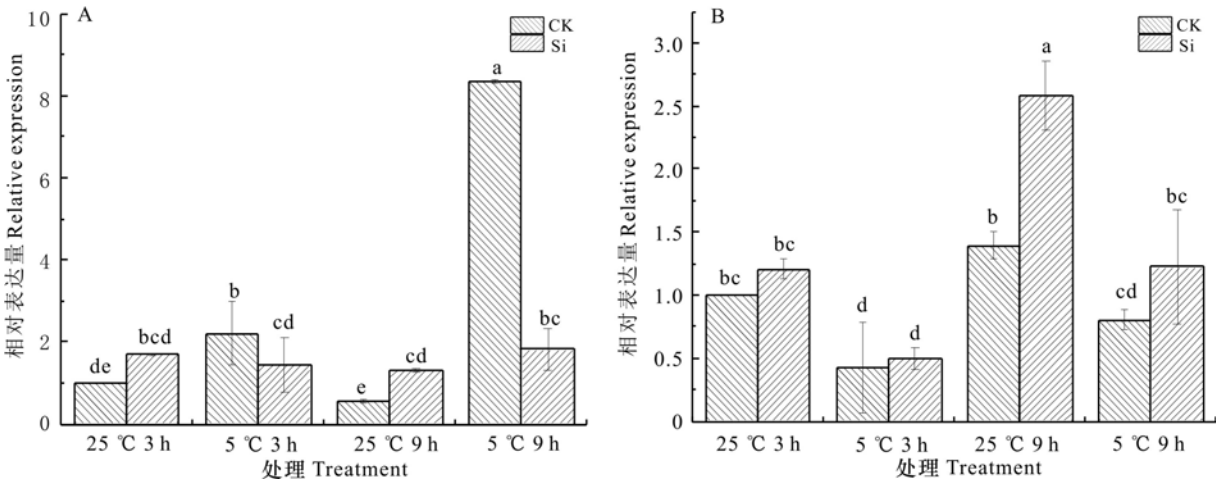


图 9 系统进化树构建结果

Fig. 9 Results of system evolution tree construction



A. 叶片；B. 根部。不同小写字母代表差异显著 ($P<0.05$)。
A. Leaves; B. Roots. Different small letters indicate significant differences ($P<0.05$).

图 10 *CBF4* 基因在低温胁迫下的表达分析
Fig. 10 Expression analysis of *CBF4* gene under low temperature stress

参考文献：

DONG C, ZHANG M, YU ZY, et al., 2013. Isolation and expression analysis of *CBF4* from *Vitis amurens* associated with stress [J]. *Agric Sci*, 4(5): 224–229.

DONG YR, WANG YM, WANG XY, 2017. Advances on plant resistance of DREB/CBF transcription factor [J]. *Shandong Agric Sci*, 49 (10): 139–142. [董亚茹, 王应民, 王向誉, 2017. DREB/CBF 转录因子植物抗逆性研究进展 [J]. *山东农业科学*, 49(10): 139–142.]

FENG Q, KAZUO S, KAZUKO YS, et al., 2011. Achievements and challenges in understanding plant abiotic stress responses and tolerance [J]. *Plant Cell Physiol*, 52(9): 1569–1582.

HAAKE V, 2002. Transcription factor *CBF4* is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 130(2): 639–648.

HAN ZP, AN LJ, HOU HS, 2006. The structure and function of AP2/EREBP transcription factors [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 22 (2): 33–38. [韩志萍, 安利佳, 侯和胜, 2006. AP2/EREBP 转录因子的结构与功能 [J]. *中国农学通报*, 22(2): 33–38.]

JIA CC, 2015. Isolation of *LeGGPS* and *LeGS* genes from *Lycium barbarum* and functional analysis of the genes for abiotic stress tolerance [D]. Tianjin: Tianjin University. [贾翠翠, 2015. 枸杞 *LeGGPS* 和 *LeGS* 基因的克隆及抗逆功能分析 [D]. 天津: 天津大学.]

KIDOKORO S, WATANABE K, OHORI T, et al., 2014. Soybean DREB1/CBF-type transcription factors function in heat and drought as well as cold stress-responsive gene expression [J]. *Plant J*, 81(3): 505–518.

LIU P, YIN LN, WANG SW, et al., 2014. The effect and mechanism of silicon on sorghum seedlings growth under cadmium stress [J]. *Res Soil Water Conserv*, 21(6): 329–333. [刘朋, 殷俐娜, 王仕稳, 等, 2014. 镉胁迫下硅对高粱生长的影响及其作用机制 [J]. *水土保持研究*, 21(6): 329–333.]

LÜ SN, SHENG JP, ZHAO DY, et al., 2011. Advances of plant cold-resistance pathway regulated by *CBF* gene [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 31 (6): 1275–1281. [吕胜男, 生吉萍, 赵丹莹, 等, 2011. *CBF* 基因调控植物抗冷途径的研究进展 [J]. *西北植物学报*, 31(6): 1275–1281.]

MICHAEL F, SARAH J, ERIC J, 2010. Role of the *Arabidopsis* *CBF* transcriptional activators in cold acclimation [J]. *Plant Physiol*, 112: 171–175.

NOVILLO F, JOAQUIN M, MARTA RF, et al., 2012. Genetic analysis reveals a complex regulatory network modulating *CBF* gene expression and *Arabidopsis* response to abiotic stress [J]. *J Exp Bot*, 63(1): 293–304.

NOVILLO F, JOSE M, ECKER JR, et al., 2004. CBF2/DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(11): 85–90.

OAKENFULL RJ, ROBERT B, KNIGHT MR, et al., 2013. A c-repeat binding factor transcriptional activator (CBF/

- DREB1) from European bilberry (*Vaccinium myrtillus*) induces freezing tolerance when expressed in *Arabidopsis thaliana* [J]. PLoS ONE, 8(1): e54119.
- PINO MT, SKINNER JS, ZORAN J, et al., 2008. Ectopic *AtCBF1* over-expression enhances freezing tolerance and induces cold acclimation-associated physiological modifications in potato [J]. Plant Cell Environ, 31: 393–406.
- REN XK, HU YF, ZHANG HY, et al., 2007. Research on the physiological effect of biological silicon fertilizer on cold regions rice [J]. Chin Agric Sci Bull, 23(3): 284–288. [任学坤, 胡远富, 张合豫, 等, 2007. 寒地水稻对生物硅肥的生理效应 [J]. 中国农学通报, 23(3): 284–288.]
- SHA LN, 2009. Study on tobacco transformation of *CBF4* transcription factor and stress tolerance [D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural University. [沙丽娜, 2009. *CBF4* 转录因子的烟草转化和抗逆性研究 [D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学.]
- SHAO WJ, AO TGBY, LANG ML, 2020. Research advances on the mechanism of AP2/ERF transcriptional factors in response to abiotic stresses in plants [J]. Mol Plant Breed, 18(15): 4981–4988. [邵文靖, 敖特根白音, 郎明林, 2020. AP2/ERF 转录因子对植物非生物胁迫的应答机制研究进展 [J]. 分子植物育种, 18(15): 4981–4988.]
- XIAO H, TATTERSALL EAR, SIDDIQUA MK, et al., 2010. *CBF4* is a unique member of the *CBF* transcription factor family of *Vitis vinifera* and *Vitis riparia* [J]. Plant Cell Environ, 31(1): 1–10.
- YUASA T, NAKAMURA J, ISHIBASHI Y, et al., 2014. Tomato inducer of *CBF* expression 1 (*SLICE1*) is involved in cold and salt stress signaling [J]. Am J Exp Agric, 4(7): 785–796.
- ZHANG SJ, LI N, GAO F, et al., 2010. Over-expression of *TsCBF1* gene confers improved drought tolerance in transgenic maize [J]. Mol Breed, 26(3): 455–465.
- ZHENG KX, WANG WT, LIU WY, et al., 2020. Exogenous silicon regulated the physiological characteristics of grapes responses to low temperature stress [J]. Mol Plant Breed, 18(3): 1013–1019. [郑凯翔, 王旺田, 刘文瑜, 等, 2020. 外源硅调控葡萄生理特性对低温胁迫的响应 [J]. 分子植物育种, 18(3): 1013–1019.]
- ZHENG SY, ZHENG F, XU J, et al., 2015. Effect of silicon on the biomass and photosynthetic characteristics of wheat seedlings under NaCl stress [J]. J Triticeae Crops, 35(1): 111–115. [郑世英, 郑芳, 徐建, 等, 2015. 外源硅对 NaCl 胁迫下小麦幼苗生长及光合特性的影响 [J]. 麦类作物学报, 35(1): 111–115.]

(责任编辑 周翠鸣)

声 明

本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》、中国期刊网、万方数据、维普网-《中文科技期刊数据库》(OA)、超星数据网等数据库,并已与中国知网(CNKI)等签订在线数字预发表合作协议。所投稿的论文录用发表后,本刊向作者一次性支付稿酬,所支付的稿酬已包含上述数据库的版权转让费等。

作者向本刊提交文章发表的行为即视为同意本刊上述声明,并同意将本稿件的版权(包括但不限于纸质印刷版、光盘版、网络版、数字化等各种介质形式出版、复制和发行的权利)在全世界范围内转让给本刊编辑部,本刊编辑部可以授权第三方使用。如不同意上述声明,请在来稿(投稿)时明确声明。

《广西植物》投稿须知

1 投稿步骤及要求

- 1.1 作者投稿时请登录《广西植物》官方网站 (<http://www.guihaia-journal.com>)，进入“作者中心”，按照要求投稿及查询稿件状态。作者首次投稿时请先注册，然后根据提示项进行相关操作。
- 1.2 投稿时：请详细填写文章全部作者信息；作者联系方式若有变动，请及时告知编辑部；可提出要求回避的同行专家，也可推荐非作者单位的相关专业的审稿专家(博士、高级职称)。
- 1.3 所投稿件，不能有涉及意识形态等政治方面的内容，不能有学术不端行为。
- 1.4 作者在投稿3个月后未收到本刊处理信息时，可向本刊编辑部发送邮件声明撤稿，经编辑部同意后即可自行改投他刊。来稿文责自负，请勿一稿两（多）投。
- 1.5 稿件经评审录用后，请作者从官网“下载中心”下载“版权转让协议书”和“作者声明”，按照编辑要求完成后续流程。
- 1.6 文稿内容应包括中英文的题名、作者姓名、作者单位、摘要、关键词，以及中图分类号、文献标识码、正文、参考文献等。文稿首页下方应含有第一作者（姓名、出生年、职称、学位、从事研究领域或研究方向、邮箱等）和通信作者（姓名、职称、学位、从事研究领域或研究方向、邮箱等，没有通信作者的可不写）的信息，以及基金类别（基金名称、项目编号）等注释。
- 1.7 投稿前请慎重确定中英文题名、作者姓名、人数和排序以及单位名称和顺序，同时请慎重确定基金项目数量、编号和顺序（要求先国家基金后省部级基金）。稿件录用之后，请作者务必按相关修改意见和要求仔细修改论文，如果修改稿达到出刊标准，会在中国知网网络首发，请务必保证修改稿的篇名、作者、作者机构、基金项目等信息不再改动。
- 1.8 中文题名应突出文章创新之处，一般不超过20个汉字；中文摘要应注意准确性、独立性、非评价性、连贯性和可读性，以第三人称撰写，为400~600个汉字；中文文章要求长英文摘要（450~550个英文词），全英文文章（一般不再发全英文文章）要求长中文摘要等中文信息；关键词应准确反映文章主要内容，能被准确检索，为5~8个。
- 1.9 文末参考文献，可以在本刊官网 (<http://www.guihaia-journal.com>) “下载中心”下载模板。

2 版权转让声明

- 2.1 本刊已加入《中国学术期刊（光盘版）》、中国期刊网、万方数据、维普网-《中文科技期刊数据库》、超星数据网等，并已签订CNKI优先数字出版和录用定稿网络首发等合作协议。本刊所支付的稿酬已包含上述数据库的稿酬。作者向本刊提交文章发表的行为即视为同意本刊上述声明并同意将本稿件的出版权(包括但不限于纸质印刷版、光盘版、网络版等各种介质形式出版、复制和发行的权利)转让给本刊编辑部，本刊编辑部可以授权第三方使用。如不同意上述声明，请在来稿（投稿）时明确声明。
- 2.2 本刊视第一作者和通信作者为所投论文的责任作者，责任作者须保证所投论文的所有作者都看过并同意稿件的内容以及稿件上的署名及其排序，并都同意将所投论文的出版权(包括但不限于纸质印刷版、光盘版、网络版等各种介质形式出版、复制和发行的权利)转让给本刊编辑部，都同意授权第三方使用。

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.bookan.com.cn>)、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8期 2022年8月

GUIHAIA

Monthly, Started in 1981
Vol. 42 No. 8 Aug. 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

