



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

动植物 AIA



第42卷 第11期 Vol. 42 No. 11 2022年11月 Nov. 2022





<sup>广西壮族自治区</sup>广西植物研究所 广西植物学会 主办

Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and Chinese Academy of Sciences Guangxi Society of Botany



 斜 学 虫 族 社 Science Press 出版



http://www.guihaia-journal.com

# 《广西植物》再次入选《科技期刊世界影响力指数 (WJCI)报告》(2022版)

මේ දේශයා දේශයා දේශයා දේශයා දේශයා දේශයා



科技期刊世界影响力指数(WJCI)报告(2022)

收录证书

SC

This is certificate for

to be indexed in

World Journal Clout Index(WJCI) Report of Scientific and Technological Periodicals(2022)



项目联合研发单位 Project research units: 中国科学技术信息研究所Institute of Scientific and Technical Information of China 《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司 Chinese Academic Journal(CD Edition) Electronic Publishing House Co.ltd 清华大学图书馆 Library of Tsinghua University 万方数据有限公司 Wanfang Data Co.Ltd 中国高校科技期刊研究会 Society of China University Journals

中国科学技术期刊编辑学会 China Editology Society of Science Periodicals

ち きっち さっち きょうち さっち さっち ひょう さっち さっち

# 厂西植物 GUANGXI ZHIWU

2022 年 11 月 第 42 卷 第 11 期 (月刊)

#### 目 次

### 重要植物专题:水稻、甘蔗、香蕉

水稻 OsZAT12 基因响应非生物胁迫和植物激素的研究 ……… 陈言博,陈宗新,夏快飞,张明永,王亚琴(1797) 环境变化对水稻 osfh1 突变体成蛋白家族表达的影响 …………………………………………………………… ………… 李 斌,李明玉,杜志烨,汪开顺,肖 凯,王 鑫,石 杨,姬红丽,陈 稷,黄 进(1811) ......石 杨,汪梦婷,靳雨璠,于 月,张 旭,李家豪,姜 南,李 斌,陈 稷,黄 进(1822) 大粒香水稻叶绿体基因组特征分析 ………… 吴朝昕, 刘雪薇, 李祖军, 龙武华, 宫彦龙, 朱速松(1830) 甘蔗耐寒相关 miRNA 的生物信息学分析及其靶基因预测 ……………………………………………………… 朱 鹏锦. 宋奇琦,谭秦亮,程 琴,李佳慧,庞新华,周全光,吕 平,欧克纬,卢业飞,农泽梅,唐桓伟,龙盛风(1840) 保护地蔗田对土壤优先流与根系生物量及产量品质的影响 …………………………………………… 黄俞铭, 罗维钢, 胡钧铭,韦翔华,黄嘉琪,陈仕林,蒙炎成,俞月凤,李婷婷,张俊辉,周慧蓉,黄忠华,韦本辉,陈 渊(1854) 甘蔗茎叶的化学成分及抗氧化活性研究 ……………………………………………… 娄红波, 王先宏, 何丽莲, 李富生(1875) 甘蔗叶乙酸乙酯部位化学成分研究 ………… 谢安然,韦 玮,郝二伟,谢金玲,邓家刚,侯小涛(1884) 香蕉苗期氮素亏缺与补偿对植株生长和根系形态的影响 ……………………………………………………… ......赵明,武鹏,何海旺,龙芳,莫天利,黄相,邹瑜(1892) 韭菜化感物质草莓酸对香蕉枯萎病菌的影响 …………………………………………………………………………… ...... 滕秋梅,杨晓东,何成新,徐广平,黄玉清,张德楠,孙英杰,牟海飞,韦绍龙,周龙武(1901) 施硒对三个香蕉品种植株生长、生理及果实品质的影响 ……………………………………………………………………… 矮化香蕉及其野生型 GA3ox 基因的结构特点和表达分析 …… 林佳琦, 李燕培, 肖世祥, 冯 斗, 禤维言(1921)

### 生理与生态

箭叶淫羊藿种子的休眠类型与萌发研究 ……… 吉浴芳, 宋松泉, 田向荣, 高家东, 戴嘉兴, 刘 军(1939) 水杉凋落物水浸提液对其种子萌发和生长的化感作用 …………………………………………………………… ...... 徐来仙,姚 兰,周大寨,郭秋菊,朱 江,邓 楚,艾 鑫,夏煜轩(1949) ……………………………柳心怡,农 宇,黄建祥,李素丽,李良香,程夕冉,王学礼,李正文,李志刚(1959) 氮、磷、钾肥对绣球'花手鞠'容器苗生长及养分状况的影响 ………………………………………………………… ..... 汪雪影、胡永红,张宪权,秦 俊,刘群录(1971) 综述 木兰科植物组织培养技术研究进展……………………………………………………… 宦智群,徐小蓉,耿兴敏,唐 明(1980) 责任编辑 蒋巧媛 李 莉 周翠鸣 李 莉 蒋巧媛 邓斯丽 责任校对 周翠鸣 王登惠 英文编辑/校对 周翠鸣 李 莉 邓斯丽 蒋巧媛 王登惠 封面/版式设计 李 莉 蒋巧媛 周翠鸣 邓斯丽 王登惠 期刊基本参数: CN 45-1134/Q\*1981\*m\*A4\*198\*zh+en\*P\*¥45.00\*1200\*19\*2022-11

封面说明:绣球属(Hydrangea L.)植物花序硕大,具有极高的观赏和药用价值。我国是该属植物的分布中心,种质资源丰富。其中的大叶绣球(Hydrangea macrophylla)和圆锥绣球(H. paniculata)开发最为充分。2021年绣球花产业国家创新联盟成立大会召开,为绣球花产业创新体系建设,实现中国绣球属植物资源在新品种和新技术上的重要突破奠定基础。大叶绣球自然花期为5月至7月,其 3 球花厂並创新体系建设、实现中国务球阀植物贡源任制而种种和教尔工的重要关键莫定差础。入叶务球目然化朔入5万至7万,共 1 3 花色丰富,花型多样,花色可调,品种众多,可作绿化、盆栽、鲜切花,也可制作干花,在园林景观营造和观赏园艺方面应用广泛。'花 <u>4</u> 曹鞘'(H. macrophylla 'Hanatemari')是大叶绣球中的优良品种,其耐光、耐高温能力较强,园林绿化中应用广泛,是研究栽培、观赏 <u>4</u> 性以及后期推广应用的绝佳材料。 **照片示:**几个大叶绣球品种。1. 绣球'花手鞠';2. 绣球'完美玛丽斯';3. 绣球'三原八重';4. 绣球'狐狸'。照片由张宪权、汪雪影提供。相关内容 详见本期正文 1971~1979 汪雪影等的文章。

# **GUIHAIA**

# Nov. 2022 Vol. 42 No. 11 ( Monthly)

# **CONTENTS**

### Special Subject: Important Plants — Rice, Sugarcane, Banana

OsZAT12 gene responses to abiotic stresses and phytohormones in rice (Oryza sativa) ..... ..... CHEN Yanbo, CHEN Zongxin, XIA Kuaifei, ZHANG Mingyong, WANG Yaqin(1797) Environment change effects on the expression level of *Formins* in rice osfh1 mutant LI Bin, LI Mingyu, DU Zhiye, WANG Kaishun, XIAO Kai, WANG Xin, SHI Yang, JI Hongli, CHEN Ji, HUANG Jin(1811) Cloning and expression analysis of OsMBF1c gene in rice SHI Yang, WANG Menging, JIN Yufan, YU Yue, ZHANG Xu, LI Jiahao, JIANG Nan, LI Bin, CHEN Ji, HUANG Jin(1822) Analysis of chloroplast genome of rice Dalixiang Bioinformatics analysis of microRNAs and prediction of target genes associated with cold tolerance in sugarcane ...... ZHŬ Pengjin, SONG Qiqi, TAN Qinliang, CHENG Qin, LI Jiahui, PANG Xinhua, ZHOU Quanguang, LÜ Ping, OU Kewei, LU Yefei, NONG Zemei, TANG Huanwei, LONG Shengfeng(1840) Effects of protected sugarcane field on soil preferential flow and root biomass and yield quality of sugarcane ..... ..... HUANG Yuming, LUO Weigang, HU Junming, WEI Xianghua, HUANG Jiaqi, CHEN Shilin, MENG Yancheng, YU Yuefeng, LI Tingting, ZHANG Junhui, ZHOU Huirong, HUANG Zhonghua, WEI Benhui, CHEN Yuan(1854) Identification and bioinformatics analysis of ScNRAMP gene family in sugarcane ..... ..... LIU Ying, YIN Ze, JIANG Yaolan, ZHOU Dinggang(1865) Chemical constituents and antioxidant activities from the stems and leaves of Saccharum officinarum ..... ..... LOU Hongbo, WANG Xianhong, HE Lilian, LI Fusheng(1875) Chemical constituents from ethyl acetate extract in Saccharum officinarum leaves ..... ..... XIE Anran, WEI Wei, HAO Erwei, XIE Jinling, DENG Jiagang, HOU Xiaotao(1884) Effects of nitrogen deficiency and compensation of nitrogen nutrient on banana growth and root morphology ..... Effects of allelochemical strawberry acid from Allium tuberosum on Fusarium oxysporum f. sp. cubense ..... TENG Qiumei, YANG Xiaodong, HE Chengxin, XU Guangping, HUANG Yuqing, ZHANG Denan, SUN Yingjie, MOU Haifei, WEI Shaolong, ZHOU Longwu(1901) Effects of selenium application on plant growth, physiology and fruit quality of three banana varieties ..... LIU Jieyun, TIAN Qinglan, HUANG Weihua, WU Yanyan, PENG Jiayu, ZHANG Yingjun, XIE Rulin, WEI Shaolong, MOU Haifei, WEI Di(1913) Structural characteristics and expression analysis of GA3ox gene in dwarf and wild type bananas ..... LIN Jiaqi, LI Yanpei, XIAO Shixiang, FENG Dou, XUAN Weiyan(1921)

### **Physiology and Ecology**

Effects of nitrogen, phosphorus and potassium on growth and nutrient status of potted Hydrangea macrophylla 'Hanatemari' ...... WANG Xueying, HU Yonghong, ZHANG Xianquan, QIN Jun, LIU Qunlu(1971)

#### Review

Advances in tissue culture techniques of Magnoliaceae						
	HUAN Zhiq	un, XU	Xiaorong,	GENG Xingmin,	TANG Ming(	1980)

**Cover images**: Several varieties of *Hydrangea macrophylla*. **1**. *H. macrophylla* 'Hanatemari'; **2**. *H. macrophylla* 'Mariesii Perfecta'; **3**. *H. macrophylla* Ser. forma normalis Hara 'Mihara-yae'; **4**. *H. macrophylla* 'Zorro'. Cover images are provided by ZHANG Xianquan and WANG Xueying. For detail, please see the text by WANG Xueying et al. on page 1971–1979.

	2
1	3
	4

广步植物 Guihaia Nov. 2022, 42(11): 1797-1810

http://www.guihaia-journal.com

#### DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202104031

陈言博,陈宗新,夏快飞,等.水稻 OsZAT12 基因响应非生物胁迫和植物激素的研究 [J]. 广西植物, 2022, 42(11): 1797-1810.

CHEN YB, CHEN ZX, XIA KF, et al. OsZAT12 gene responses to abiotic stresses and phytohormones in rice (Oryza sativa) [J]. Guihaia, 2022, 42(11): 1797-1810.

# 水稻 OsZAT12 基因响应非生物胁迫和植物激素的研究

陈言博1,陈宗新1,夏快飞2,张明永2,王亚琴1\*

(1. 华南师范大学 生命科学学院, 广州 510631; 2. 中国科学院华南植物园, 广州 510650)

摘 要: C2H2 锌指蛋白是真核生物体内一类重要的转录因子,在植物生长发育和应对非生物胁迫方面具 有重要作用。实验室前期克隆了水稻 C2H2 锌指蛋白 OsZAT12,该基因在水稻根中特异表达,定位于细胞 核,异源过表达 OsZAT12 的拟南芥植株矮小。为进一步研究 OsZAT12 在水稻中的功能,该文分析了 OsZAT12的启动子元件和转录活性,并采用 qRT-PCR 技术分析 OsZAT12 在非生物胁迫和植物激素处理下 的响应模式。结果表明:(1)OsZAT12 含有2个典型的C2H2 锌指结构域和1个EAR motif,具有转录抑制活 性,该基因的启动子中含有与非生物胁迫和植物激素相关的元件。(2)对野生型水稻进行非生物胁迫和激 素处理发现,低温胁迫(4℃)和激素脱落酸(ABA)处理显著下调 OsZAT12 的表达;而渗透胁迫(20% PEG 6000)、激素油菜素甾醇(BR)或吲哚-3-乙酸(IAA)处理则显著上调 OsZAT12 的表达,这说明 OsZAT12 介导 了水稻应对多种非生物胁迫和激素的变化。(3)利用含 35S 启动子的过表达载体和 CRISPR/Cas9 基因编 辑技术分别得到纯合的 OsZAT12 过表达植株和 OsZAT12 敲除植株。(4) 对过表达 OsZAT12 的水稻表型观 察发现,相比于野生型, OsZAT12 过表达植株在分蘖期、抽穗期和成熟期这 3 个时期的株高均显著降低; OsZAT12 敲除植株的株高与野生型虽无明显差异,但每株穗数和结实率均显著低于野生型,这说明 OsZAT12影响了水稻株型、穗型及结实率等农艺性状的建成。(5)实验进一步表明,过表达 OsZAT12降低了 水稻对外源 ABA 的敏感性,而 OsZAT12 敲除植株则相反。因此推测, OsZAT12 对植株生长发育的影响可能 与该基因响应多种非生物胁迫和激素信号的调控有关,该研究结果为将来利用 OsZAT12 进行水稻耐逆稳产 分子设计育种提供了依据。

关键词:水稻,C2H2 锌指蛋白,OsZAT12,非生物胁迫,脱落酸 中图分类号:Q943 文献标识码:A 文章编号:1000-3142(2022)11-1797-14

# OsZAT12 gene responses to abiotic stresses and phytohormones in rice (Oryza sativa)

CHEN Yanbo<sup>1</sup>, CHEN Zongxin<sup>1</sup>, XIA Kuaifei<sup>2</sup>, ZHANG Mingyong<sup>2</sup>, WANG Yaqin<sup>1\*</sup>

收稿日期: 2021-08-26

基金项目: 广东省自然科学基金团队项目(2017A030312004); 广东省应用型科技研究专项(2015B020231009) [Supported by Guangdong Provincial Natural Science Foundation Team Project (2017A030312004); Guangdong Provincial Applied Science and Technology Research Special Project (2015B020231009) ]。

第一作者:陈言博(1989-),博士,研究方向为植物分子生物学,(E-mail)chenyanbo1221@163.com。

<sup>\*</sup>通信作者:王亚琴,博士,教授,研究方向为植物生长发育,(E-mail)wangyaqin@m.scnu.edu.cn。

### ( 1. School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China; 2. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China )

Abstract: C2H2 zinc finger proteins are an important category of transcription factors in eukaryotes, which play important roles in plant growth and development and in response to abiotic stresses. OsZAT12, a C2H2 zinc finger protein in rice, which cloned in our previous study, was only expressed in rice roots and was localized in the nucleus. Overexpressing OsZAT12 in Arabidopsis thaliana exhibited dwarf phenotype. To further investigate the function of OsZAT12 in rice, qRT-PCR was used to analyze the response patterns of OsZAT12 under abiotic stresses and phytohormones treatment. The results were as follows: (1) OsZAT12 contained two typical C2H2 zinc finger domains and one EAR motif, and has transcriptional repressive activity. The promoter of the OsZAT12 contained elements related to abiotic stresses and phytohormones. (2) The results of abiotic stresses and phytohormones treatment in rice also revealed that low temperature stress (4 °C) and phytohormone abscisic acid (ABA) treatment significantly downregulated OsZAT12 expression, while osmotic stress (20% PEG 6 000), phytohormone brassinosteroid (BR) or indole-3-acetic acid (IAA) treatment significantly up-regulated the expression of OsZAT12. These results showed that OsZAT12 involved in the changes in response to abiotic stresses and phytohormones in rice. (3) Homozygous OsZAT12 overexpression plants and OsZAT12 knockout plants were obtained using overexpression vector with 35S promoter and CRISPR/Cas9 gene editing technology, respectively. (4) Observation of the phenotype of OsZAT12 overexpression rice showed that compared with the wild type, the plant height of OsZAT12 overexpression plants was significantly shorter at tillering stage, heading stage and maturity stage. The plant height of OsZAT12 knockout plants did not change significantly compared with the wild type, while the panicle number and seed-setting rate of them were significantly lower than those of the wild type. These results indicated that OsZAT12 affected the establishment of agronomic traits such as rice plant type, panicle type and seed-setting rate. (5) The results in this study further showed that overexpression of OsZAT12 reduced the sensitivity of rice to exogenous ABA, while the opposite phenotype was observed in OsZAT12 knockout plants. Therefore, it is speculated that the effect of OsZAT12 on plant growth and development may be related to the regulation of this gene in response to abiotic stresses and hormonal signals, and this study provides an experimental basis of using OsZAT12 for molecular design breeding of stress-tolerant and stable yield in rice.

Key words: rice (Oryza sativa), C2H2 zinc finger protein, OsZAT12, abiotic stresses, ABA

锌指蛋白是真核生物体内一类被广泛研究的 转录因子家族,根据半胱氨酸(C)和组氨酸(H)残 基的数目和位置可将其分为 C2H2、C2HC、C2C2、 C2C2C2C2 等类型(Laity et al., 2001)。C2H2 型 锌指蛋白是锌指蛋白中最常见的一类,在许多代 谢途径以及植物的生长发育和非生物胁迫反应中 起着至关重要的作用(Ballerini et al., 2020; Yin et al., 2020; Rodas et al., 2021; Zhang et al., 2021)。目前,在水稻和拟南芥中已经发现分别有 189 个和 176 个 C2H2 型锌指蛋白,该类蛋白的锌 指结构域具有 CX<sub>2-4</sub>CX<sub>3</sub>FX<sub>5</sub>LX<sub>2</sub>HX<sub>3-5</sub>H(C 为半胱 氨酸,F为苯丙氨酸,H为组氨酸,L为亮氨酸,X 为任意氨基酸)特征序列(Englbrecht et al., 2004; Agarwal et al., 2007)。根据锌指结构域的数目、序 列和排列方式,拟南芥 176 个 C2H2 型锌指蛋白可 分为 Set A、Set B和 Set C,其中包含多个且离散的 锌指结构域的一类归为 Set C(Pabo et al., 2001;

Englbrecht et al., 2004; Ciftci-Yilmaz & Mittler, 2008)。根据锌指特征序列中 2 个组氨酸之间的 氨基酸数目,Set C 可进一步分为 C1、C2 和 C3,C1 家族可进一步细分为 C1-1i、C1-2i、C1-3i、C1-4i 和 C1-5i(Englbrecht et al., 2004)。有关 C1 家族的研 究主要集中在 C1-1i 和 C1-2i 亚家族(Englbrecht et al., 2004; Ciftci-Yilmaz & Mittler, 2008)。

双子叶植物拟南芥 C2H2 型锌指蛋白的 C1-2i 亚家族包括 ZAT5~7、ZAT10~12、ZAT18 和 AZF1~3等,该亚家族含有2个锌指结构,锌指特 征序列中2个组氨酸之间的氨基酸数目为3个,大 部分成员具有核定位信号及 EAR motif(ethyleneresponsive element binding factor-associated amphiphilic repression motif),主要参与各种生物和非生物胁迫 响应(Lippuner et al., 1996; Meissner et al., 1997; Englbrecht et al., 2004; Sakamoto et al., 2004; Mittler et al., 2006; Liu et al., 2013; Shi et al., 11 期

2014; Yin et al., 2017)。在拟南芥中, AtAZF2 对 盐和干旱胁迫处理均响应强烈,而 AtAZF1 和 AtAZF3 的表达对非生物胁迫(盐、干旱和冷)的响 应较弱,只有 AtAZF2 能够被 ABA(abscisic acid)诱 导,这可能是由于AtAZF2 启动子中含有 ABA 响应 元件(Sakamoto et al., 2004)。过表达 AtZAT18 可 以提高拟南芥的耐旱性, 而突变 AtZAT18 则导致 植物对干旱胁迫的耐受性降低(Yin et al., 2017)。 组成型过表达AtZAT10的转基因拟南芥生长受到 抑制,并对干旱、盐、高温和渗透胁迫的耐受性增 强,同时提高了 ROS 稳态相关基因,如 AtAPX1 和 AtAPX2 的转录(Sakamoto et al., 2004; Mittler et al., 2006)。有趣的是, AtZAT10 基因敲除植株和 RNAi干涉植株也表现出对盐和渗透胁迫的耐受 性增加,但调控机制目前尚不清楚(Mittler et al., 2006)。除拟南芥外,其他双子叶植物中也有关于 C2H2转录因子的报道。豌豆 St(Stipules reduced) 基因通过影响细胞分裂和细胞扩展调控豌豆托叶 的大小(Moreau et al., 2018)。番茄基因 H(hair) 编码 C2H2 型锌指蛋白,过表达该基因后叶片毛状 体数量显著增加(Chang et al., 2018)。苜蓿 MtSUP(SUPERMAN)是C2H2 锌指蛋白,主要在分 生组织、雄蕊、心皮边缘等部位表达,在苜蓿中将 该基因突变后影响花器官的数量和形态及果实发 育 (Rodas et al., 2021)。

禾本科植物结缕草中的 ZjZFN1 基因,编码 C2H2型锌指蛋白,其表达受盐胁迫、冷和 ABA 诱 导,在拟南芥中异源过表达 ZjZFN1 发现,该基因 通过影响活性氧的积累及盐胁迫响应基因的转 录,提高拟南芥对盐胁迫的抗性(Teng et al., 2018)。干旱胁迫诱导小麦 TaZFP1B 的表达,而 过表达 TaZFP1B 的小麦对干旱胁迫的抗性显著 增加(Cheuk et al., 2020)。水稻中关于 C2H2 锌 指蛋白有一些文献报道,如 ZFP182、ZFP36、 ZFP179、ZFP245 和 ZFP252 等。过表达 ZFP182 能提高植物对盐胁迫的耐受性(Zhang et al., 2012)。过表达 ZFP36 能够提高抗氧化酶的活 性,并增强水稻对干旱胁迫和氧化胁迫的耐受性; 相反,ZFP36的 RNAi 干涉植株中抗氧化酶活性较 低,对干旱胁迫和氧化胁迫更敏感(Zhang et al., 2014)。过表达 ZFP179 能够提高水稻的耐盐性, 并且转基因幼苗对外源 ABA 更加敏感(Sun et al., 2010)。过表达 ZFP252 的植株对盐和干旱胁迫的

耐受性增加,在盐和干旱胁迫处理下,过表达 ZFP252 植株中 OsDREB1A、OsP5CS 和 OsProT 等非 生物胁迫相关基因的表达量高于野生型和 ZFP252 沉默株系,说明 OsDREB1A、OsP5CS 和 OsProT 可能 是 ZFP252 的下游基因(Xu et al., 2008)。

OsZAT12 属于 C2H2 锌指蛋白的 C1-2i 亚家 族,该类基因在许多代谢途径以及植物的生长发 育和非生物胁迫反应中起着至关重要的作用 (Ballerini et al., 2020; Yin et al., 2020; Zhang et al., 2021; Rodas et al., 2021),本实验室前期(陈 宗新等,2019) 克隆了 OsZAT12 基因,该基因在水 稻根中特异表达,定位于细胞核,异源过表达 OsZAT12 拟南芥植株矮小,根生长受到抑制。水 稻为重要的粮食作物,生物/非生物胁迫、植物激 素等均影响植株发育和形态建成,进而影响产量。 然而,作为在植物生长发育和非生物胁迫中可能 起着重要作用的 OsZAT12,在水稻生长发育及非生 物胁迫中的作用尚不清楚。因此,本文分析了 OsZAT12的启动子元件和转录活性,并采用 qRT-PCR 技术分析 OsZAT12 在非生物胁迫和植物激素 处理下的响应模式,以期为进一步研究 OsZAT12 参与不同非生物胁迫应答的分子机制和参与 ABA 信号转导途径的调控奠定基础。

# 1 材料与方法

### 1.1 材料

粳稻"中花 11"(WT),实验室自存。双元载体 pCAMBIA1301来自本实验室,CRISPR编辑相关载体 pYLCRISPR/Cas9Pubi-H、pYLgRNA-OsU6a/LacZ、pYLgRNA-OsU6a、pYLgRNA-OsU3/LacZ、pYLsgRNA-OsU3 由华南农业大学刘耀光实验室惠赠,大肠杆菌 DH5a 感受态菌种和根癌农杆菌 EHA105 感受态菌种由本实验室保存。

### 1.2 OsZAT12 及其同源基因的保守结构域分析

在 NCBI 和 TAIR 数据库中查找拟南芥和水稻 中的 C1-2i 亚家族成员,并导出这些基因的氨基酸 序列。利用软件 ClusatlX 1.83 进行多重序列比对, 使用软件 DNAMAN 6.0 输出图片。本研究中,进行 多重 序列比对的基因为 *AtAZF1*(At5g67450)、 *AtAZF2*(At3g19580)、*AtAZF3*(At5g43170)、*AtZAT5* (At2g28200)、*AtZAT6*(At5g04340)、*AtZAT7* (At3g46090)、*AtZAT10*(At1g27730)、*AtZAT11*  (At2g37430)、AtZAT12 (At5g59820)、AtZAT18 (At3g53600)、OsZFP252 (AAO46041.1)、OsZFP245 (AAQ95583)、OsZFP182 (NP001051718.1)、OsZFP179 (AAL76091.1)、OsZFP36 (AAP51130.1)。

### 1.3 OsZAT12 转录活性分析

双荧光素酶报告系统是萤火虫荧光素酶 (firefly luciferase,LUC)检测系统和海肾荧光素酶 (renilla luciferase,REN)检测系统的组合,常用来 分析转录因子的转录活性。本研究使用拟南芥原 生质体瞬时表达系统进行双荧光素酶实验,其中 拟南芥原生质体的提取参考 Wu 等(2009)的方 法,双荧光素酶活性的检测根据 Promega 公司 Dual-Luciferase Reporter Assay System 试剂盒 (Cat. No. E1910)中的说明书操作,并通过计算 LUC/REN 的比值分析 OsZAT12 的转录激活/抑制 活性。

### 1.4 OsZAT12 启动子分析

以水稻 OsZAT12 基因的起始密码子(ATG)上 游2 000 bp 作为研究对象,利用在线启动子分析工 具 PLACE(http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/)和 PlantCARE(http://bioinformatics.psb.ugent.be/ webtools/plantcare/html/),对 OsZAT12 的启动子序 列进行调控元件的预测和分析。

### 1.5 OsZAT12 基因在非生物胁迫和植物激素处理 下的表达分析

1.5.1 水稻种子消毒及幼苗水培方法 水稻种子去 壳后放入 50 mL 离心管中,加 75%乙醇表面消毒 1 min,用 2.5%次氯酸钠消毒 50 min,无菌水漂洗 5 次,将种子置于 1/2 MS 固体培养基中培养。将以上 培养 5 d 的无菌苗移至 96 孔 PCR 塑料板(剪去管 底)进行水培(16 h 光照/8 h 黑暗,白天 28 ℃/夜晚 24 ℃),水稻营养液配方参照"国际水稻研究所水稻 营养液"配制,5~6 d 换一次水培液。

1.5.2 非生物胁迫处理方法 取苗龄 14 d 的水稻 幼苗为材料进行非生物胁迫处理。具体如下:低 温胁迫,将水稻幼苗放置于 4 ℃光照培养箱(16 h 光照/8 h 黑暗)中;渗透胁迫,将水稻幼苗置于含 有 20% PEG(polyethylene glycol)6 000的水稻营养 液中;氧化胁迫,将水稻幼苗置于含有 20 µmol・ L<sup>-1</sup>甲基紫精(methyl viologen, MV)的水稻营养液 中;盐胁迫处理,将水稻幼苗置于含有 100 mmol・ L<sup>-1</sup> NaCl 的水稻营养液中。分别收取处理 0、0.5、 1、3、6、12、24、48 h 的整株幼苗,未处理材料同时 取样作为对照组,所有样品于液氮速冻后-80 ℃ 保存备用。除低温处理外,其他胁迫处理均在植 物培养室(16 h 光照/8 h 黑暗,白天 28 ℃/夜晚 24 ℃)进行。

1.5.3 植物激素处理方法 取苗龄 14 d 的水稻幼 苗作为材料,进行植物激素处理。在培养液中分 别添加 100 µmol · L<sup>-1</sup>脱落酸 (abscisic acid, ABA),1 µmol · L<sup>-1</sup> 2, 4-表芸苔素内酯 (2,4epibrassinolide, 2,4-eBL),1 µmol · L<sup>-1</sup>吲哚-3-乙 酸 (indole-3-acetic acid, IAA),处理 0、1、24、48 h 后取材 (取整株幼苗),未处理材料同时取样作为 对照组,所有样品于液氮速冻后-80 ℃保存。激 素处理的材料均放在植物培养室(16 h 光照/8 h 黑暗,白天 28 ℃/夜晚 24 ℃)。

1.5.4 水稻 RNA 的提取及 cDNA 第一条链的合成 RNA 提取根据华越洋超快型植物 RNA 提取试剂盒(Cat. No. 0416-50)的说明书进行。参照 Toyobo 反转录试剂盒(Cat. No. FSQ-301)说明书进行 cDNA 第一条链的合成。

1.5.5 *OsZAT*12 基因的 qRT-PCR (quantitative realtime PCR)检测 本研究中的 qRT-PCR 采用 SYBR 染料法 (GenStar 2 × RealStar Green Fast Mixture, Cat. No. A301-10)。以水稻 *eEF*-1a 基因为内参 (qPCR-eEF-1a-F: 5'-GCACGCTCTTCTTGCTTTC-3'; qPCR-eEF-1a-R: 5'-AGGGAATCTTGTCAGGGTTG-3'), 采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算(Livak & Schmittgen, 2001) *OsZAT*12 基因的相对表达量(qPCR-OsZAT12-F: 5'-GACCTGAACCATCCACCCTG-3'; qPCR-OsZAT12-R: 5'-CGGTATCCAAGAACTGGTGGAA-3')。

# 1.6 OsZAT12 基因过表达载体和 CRISPR/Cas9 载体构建

由于 OsZAT12 在水稻根中特异表达(陈宗新 等,2019),因此以野生型水稻根的 cDNA 为模板,利 用引物 OsZAT12-F: 5'-CG<u>GGATCC</u>ATGAAGAGGTT TGCA-3'(酶切位点 BamHI), OsZAT12-R: 5'-AA<u>CTGCAG</u>CTAGTAGCCGACGCA-3'(酶切位点 PstI)扩增 OsZAT12 基因,利用双酶切法构建到 pCAMBIA1301 载体上,得到过表达载体 pCAMBIA1301::35S::OsZAT12。

利用华南农业大学刘耀光实验室设计的网站 CRISPR-GE(http://skl.scau.edu.cn/)设计 OsZAT12 敲除靶点。为提高敲除效率,采用双靶点载体的策 略,以 OsZAT12 基因设计 2 个靶点,其中靶点 5'- CATGAGGCGCCACCGCGCCA-3'以 U6 为启动子,靶 点 5'-TGCGACGACATGAGCATCAG-3'以 U3 为启动 子,具体载体构建参考 Ma 等(2015)的方法。

## 1.7 OsZAT12 基因遗传转化水稻及转基因植株鉴定

将 1.6 中构建好的重组载体(过表达载体和 CRISPR/Cas9 载体)转化至根癌农杆菌 EHA105 感受态细胞中。采用农杆菌介导的遗传转化法将 重组载体转进水稻愈伤组织中,具体参考李美茹 和李洪清(2003)、王亚琴等(2011)的方法。

转基因植株的鉴定采用 PCR 方法。剪取 T<sub>1</sub>代 幼苗约 2 cm 长的叶片,利用 TPS 溶液(100 mmol · L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 8.0; 10 mmol · L<sup>-1</sup> EDTA-Na<sub>2</sub>, pH 8.0; 1 mol · L<sup>-1</sup> KCl)提取 DNA。过表达 *OsZAT*12 的转基因植株利用抗性筛选标记基因 *HptII* (hygromycin phosphotransferase II) 设计引物 Hyg-F: 5'-GATGTTGGCGACCTCGTATT-3', Hyg-R: 5'-TCGTTATGTTTATCGGCACCTTCT-3', U DNA 为模 板进行 PCR 扩增检测。CRISPR 植株采用引物 CRISPR-F: 5'-TCAGACAACAGAGAGGTTGGT-3'和 CRISPR-R: 5'-TAGTAGCCGACGCAGTCAAC-3'扩增 *OsZAT*12包括靶位点在内的片段,经测序后检测突 变位点。

### 1.8 转基因水稻幼苗对外源 ABA 的敏感性分析

取野生型、过表达 *OsZAT*12 和敲除 *OsZAT*12 植 株的种子,经表面消毒后播种于含不同浓度 ABA (0、1、5、10 μmol · L<sup>-1</sup>)的 1/2 MS 培养基上,每个株 系在不同 ABA 浓度培养基上播种 30 粒种子,在植 物培养室(16 h 光照/8 h 黑暗,白天 28 ℃/夜晚 24 ℃)培养 10 d 后拍照并统计株高和根长。

### 1.9 数据分析

所有实验均进行 3 次生物学重复,每次重复中 每个样品设置 3 个技术重复。数据统计为平均值± 标准偏差。利用软件 SPSS Statistics 中的单因素方 差分析进行数据的显著性分析(\*P<0.05;\*\*P< 0.01)。

2 结果与分析

### 2.1 转录因子 OsZAT12 保守结构域的分析

OsZAT12(Os05g0114400) 基因编码区全长 597 bp,该基因不含内含子,编码 198 个氨基酸(陈宗新 等,2019)。为进一步研究 OsZAT12 蛋白结构域的 保守性及其序列特点,对拟南芥和水稻 C1-2i 亚家 族中的部分成员进行多重序列比对,结果如图 1 所 示,OsZAT12 的结构域与拟南芥和水稻中的同源蛋 白一致,均含有 2 个包含 QALGGH 保守序列的锌指 结构 域 以 及 1 个 EAR motif (ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression motif)。蛋白 C 末端的 EAR motif 通常被认为具有 抑制活性(Meissner & Michael, 1997; Englbrecht et al., 2004; Ciftci-Yilmaz & Mittler, 2008)。以上结 果说明,OsZAT12 是一个典型的 C2H2 型锌指蛋 白,属于 C1-2i 亚家族,可能具有转录抑制活性。

## 2.2 转录因子 OsZAT12 的转录活性分析

采用双荧光素酶报告系统检测 OsZAT12 的转录活性,将 OsZAT12 与包含 GAL4 DNA 结合结构域(GAL4 DNA binding domain, GALBD)的效应载体融合(图 2:A),同时与携带荧光素酶基因的报告载体共同转化拟南芥原生质体,检测对照组和实验组的萤火虫荧光素酶活性和海肾荧光素酶活性并计算相对 LUC/REN 比值。实验组的相对LUC/REN 比值显著低于对照组(图 2:B),说明转录因子 OsZAT12 具有转录抑制活性。

### 2.3 OsZAT12 启动子的序列分析

以水稻 OsZAT12 基因的起始密码子(ATG)上 游 2 000 bp 为研究对象,使用启动子在线分析网 站对 OsZAT12 启动子进行调控元件预测,结果显 示,OsZAT12 启动子上调控元件非常丰富,除了基 本的核心启动子元件(TATA box 和 CAAT box 元 件)以外,该段序列中还具有非生物胁迫和激素相 关的顺式作用元件。其中,与非生物胁迫相关的 有 2 个 MYB 转录因子结合元件;与激素相关的元 件包括 3 个 GA 响应元件、3 个 ABA 响应元件、2 个 Auxin 响应元件和 1 个 JA 响应元件等(图 3)。 由此推测,OsZAT12 基因的表达可能受非生物胁 迫因子和多种激素的调节。

### 2.4 非生物胁迫处理下 OsZAT12 的表达分析

拟南芥 ZAT12 在活性氧以及非生物胁迫信号 传导中起着重要作用(Davletova et al., 2005)。水 稻 OsZAT12 启动子中含有非生物胁迫相关的元件 (图 3),推测其可能响应非生物胁迫。因此,进一 步检测了水稻幼苗在低温(4 ℃)、渗透胁迫(20% PEG 6 000)、氧化胁迫(20  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> MV)和盐胁 迫(100 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl)处理下 OsZAT12 的表达。 如图 4:A 所示,低温处理 48 h 内,OsZAT12 的表达 均呈下调趋势,其中在处理 12 h 时,OsZAT12 的表



EAR元件 EAR motif

黑色部分表示相似性=100%,粉色部分表示相似性在75%~100%之间(不包括100%),蓝色部分表示相似性在50%~75%之间 (不包括75%),黄色部分表示相似性在33%~50%之间(不包括50%),白色部分表示相似性低于33%。

Black parts indicate similarities = 100%, pink parts indicate similarities between 75% and 100% (excluding 100%), blue parts indicate similarities between 50% and 75% (excluding 75%), yellow parts indicate similarities between 33% and 50% (excluding 50%), the white parts indicate similarities <33\%.

图 1 水稻和拟南芥部分 C2H2 型锌指蛋白氨基酸序列的多重比对

Fig. 1 Multiple alignment of amino acid sequences of partial C2H2 zinc finger proteins in Oryza sativa and Arabidopsis thaliana

达量降到最低,之后略微上调。在渗透胁迫处理下, OsZAT12表达量呈先下降后上升的趋势,从3h上升一直到48h, OsZAT12的表达量达到未处理

时的 2 倍左右(图 4:B)。而在 20  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> MV 和 100 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 的处理下, *OsZAT*12 的表达 量随时间变化未出现明显的上调或下调趋势(图

131

140

104

142

PTNTSITSGN

RIKPPTVISTTA

....SLYGGG

KP.....RT

ALGG



A. 双荧光素酶实验载体构建示意图,其中 CALBE 是 CAL4 结合元件,GALBD 是 GAL4 DNA 结合结构域,35S mini 启动 子是只含 46 bp 的 35S 启动子; B. 双荧光素酶报告系统检 测 OsZAT12 的转录活性,报告载体和效应空载体作为对照 组,报告载体和连有 OsZAT12 的效应载体作为实验组,实 验结果为 3 次生物学重复的平均值±标准偏差。对照组的 LUC/REN 比值设为 1,\*\*表示与对照组相比达到显著水 平(P<0.01)。

**A.** Schematic structures of plasmids used in dual-luciferase assay, GALBE is GAL4 binding element, GALBD is GAL4 DNA binding domain, and 35S mini promoter indicates that 35S promoter only contains 46 bp; **B.** Dual luciferase reporter system detects the transcriptional activity of OsZAT12, the reporter and effector vectors serve as control group, the reporter vectors and the effector vector with OsZAT12 are used as the experimental group, values are  $\bar{x} \pm s$  from three biological replicates. The LUC/REN ratio of control group is defined as 1, \*\* indicates significant difference compared with control group (P<0.01).

#### 图 2 OsZAT12 的转录活性分析

Fig. 2 Transcriptional activity analysis of OsZAT12

4:C,D)。以上结果表明, OsZAT12 基因的表达响 应多种非生物胁迫,并随胁迫时间的延长其表达 量出现不同的变化趋势。

### 2.5 不同植物激素处理下 OsZAT12 的表达分析

植物激素作为植物内源信号分子,在植物生 长发育过程中具有重要作用。OsZAT12的启动子 中含有多个激素相关元件(图3),推测其可能响 应激素水平的变化。植物激素处理实验结果表 明,外施 ABA 显著下调 OsZAT12的表达。处理1 h 时 OsZAT12的表达量迅速下降,在24 h 降到最 低,约为对照的1/10,48 h 时略有升高(图5:A)。 相反,外施1 μmol·L<sup>-1</sup>的2,4-eBL,在1 h 时 OsZAT12 表达开始上调,一直持续到48 h 且达到 最高,为对照的 12 倍(图 5:B)。此外, IAA 处理 也能上调 OsZAT12 的表达,其表达量在 24 h 达到 最高,一直持续到 48 h(图 5:C)。以上结果表明, OsZAT12 对不同植物激素的响应各异,可能参与 不同植物激素信号对水稻生长发育的调控。

### 2.6 OsZAT12 转基因植株的获得

2.6.1 OsZAT12 敲除植株的筛选 使用特异检测引物(CRISPR-F和 CRISPR-R)先对 OsZAT12 敲除植株的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,再对得到的单一PCR 片段产物进行测序,结果得到了 3 个敲除OsZAT12 的纯合株系,其中 oszat12-12-3 和 oszat12-8-15 株系均为单碱基插入,而 oszat12-10-10 株系则是缺失一段序列(图 6)。

2.6.2 OsZAT12 过表达植株的表达量检测 获得 4 个过表达 OsZAT12 纯合株系,并分别命名为 OE8、 OE3、OE9 和 OE5。qRT-PCR 结果(图 7)显示,与 野生型相比,过表达株系 OE8、OE3 和 OE5 的表达 量显著提高,OE9 的表达量虽有所提高但与野生 型无显著差异。因此,本研究选取 OE8 和 OE3 用 于后续研究。

### 2.7 OsZAT12 转基因水稻对 ABA 的敏感性分析

ABA 作为胁迫激素,是植物响应生物/非生物 胁迫的重要调控因子(Chen et al., 2020; Bharath et al., 2021)。OsZAT12 启动子序列中包含 3 个 ABA 响应元件(图 3),并且 ABA 有抑制 OsZAT12 表达的作用(图 5:A)。在获得过表达 OsZAT12 和 敲除 OsZAT12 的植株后,进一步检测其对 ABA 的 敏感性,结果表明,ABA 抑制了野生型和 OsZAT12 超表达幼苗的生长,并随着 ABA 浓度的升高抑制 程度越大,而 OsZAT12 过表达株系的株高、根长都 显著高于野生型(图 8)。OsZAT12 敲除植株的株 高在5 μmol · L<sup>-1</sup> ABA 处理下显著低于野生型;在 低浓度 ABA(1 μmol · L<sup>-1</sup>)处理下,其根长显著高 于野生型:但在较高浓度 ABA(10 μmol · L<sup>-1</sup>)处 理下,根长与野生型无显著差异(图 8)。以上结 果表明,过表达 OsZAT12 会降低水稻对 ABA 的敏 感性,而敲除 OsZAT12 则在合适的 ABA 浓度下才 会增强水稻对 ABA 的敏感性。

### 2.8 OsZAT12 转基因植株农艺性状的观察与统计

农艺性状的统计分析结果表明,在分蘖期、抽 穗期、成熟期这3个时期中,OsZAT12过表达水稻 的株高均显著低于野生型,而OsZAT12敲除植株 则与野生型没有显著差异(图9:A,B,D,F);根长





**A.** Expression level of OsZAT12 under 4 °C treatment; **B.** Expression level of OsZAT12 under 20% PEG treatment; **C.** Expression level of OsZAT12 under 20  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> MV treatment; **D.** Expression level of OsZAT12 under 100 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> NaCl treatment. The relative expression level of 0 h after each treatment is defined as 1, the same below. \* indicates significant differences compared with 0 h (P<0.05).

图 4 不同非生物胁迫下 OsZAT12 的表达水平 Fig. 4 Expression levels of OsZAT12 under different abiotic stresses

和分蘖数这 2 个指标,无论是 OsZAT12 过表达还 是敲除植株,均与野生型无显著差异(图 9:C,E, G)。OsZAT12 敲除植株的每株穗数和结实率均显 著低于野生型, 而 OsZAT12 过表达株系与野生型



A. *OsZAT*12 在 100 μmol ・L<sup>-1</sup> ABA 处理下的表达量分析; B. *OsZAT*12 在 1 μmol ・L<sup>-1</sup> 24-eBL 处理下的表达量分析; C. *OsZAT*12 在 1 μmol ・L<sup>-1</sup> IAA 处理下的表达量分析。\* 和 \*\* 表示与 0 h 相比达到显著水平(\**P*<0.05, \*\**P*<0.01)。 A. Expression level of *OsZAT*12 under 100 μmol ・L<sup>-1</sup> ABA treatment; B. Expression level of *OsZAT*12 under 1 μmol ・L<sup>-1</sup> 24-eBL treatment; C. Expression level of *OsZAT*12 under 1 μmol ・L<sup>-1</sup> IAA treatment. \* and \*\* indicate significant differences compared with the 0 h (\**P*<0.05, \*\**P*<0.01).

图 5 不同植物激素处理下 OsZAT12 的表达水平 Fig. 5 Expression levels of OsZAT12 under different phytohormones treatments





则无显著差异(图 9:H,I)。以上结果表明, OsZAT12影响水稻的株高、每株穗数和结实率。

3 讨论与结论

锌指蛋白是真核生物体内一类重要的转录调 控因子家族,其中 C2H2 型锌指蛋白是最常见的一类(Takatsuji, 1999)。C2H2 型锌指蛋白通常包含 1~6个锌指结构域,并在锌指结构的 α-螺旋中含 有 QALGGH 保守序列(Sakamoto et al., 2000; Englbrecht et al., 2004; Ciftci-Yilmaz & Mittler, 2008; Wang et al., 2019)。本研究发现,水稻 OsZAT12 具有 2 个典型的 C2H2 锌指结构和 1 个 EAR motif,并与拟南芥 ZAT12 有较高的同源性,说 明 OsZAT12 属于水稻 C2H2 锌指蛋白家族成员。大多数含有 EAR motif 的锌指蛋白都表现出转录

抑制活性(Ohta et al., 2001),如矮牵牛 ZPT2-3 的 瞬时表达分析表明其起着阻遏物的作用(Sugano et al., 2003),而含有 EAR motif like 的拟南芥 ZAT12,在响应冷胁迫时可能作为 AtCBF 转录因子 的抑制子起作用(Vogel et al., 2005)。本研究结 果表明,水稻 OsZAT12 蛋白具有转录抑制活性,是 一个有功能的转录抑制因子。

植物 C2H2 型锌指蛋白作为一类重要的转录 因子,是目前研究较为深入的一类锌指蛋白。该 类转录因子在植物生长发育和响应非生物胁迫中 具有重要调控作用(Sakamoto et al., 2004; Davletova et al., 2005; Mittler et al., 2006; Rossel et al., 2007; Xie et al., 2012; Shi et al., 2014; Chen et al., 2016; Yin et al., 2017; Ballerini et al., 2020; Yin et al., 2020; Zhang et al., 2021; Rodas et al., 2021)。油菜 BnLATE(LATE FLOWERING)通过限制油菜角果



WT 中 *OsZAT*12 基因的相对表达量设为 1。 \* 表示与 WT 相比达到显著水平(*P*<0.05)。 Relative expression level of *OsZAT*12 in WT is defined as 1. \* indicates significant differences compared with WT (*P*<0.05).



中木质素的聚合减少角果的破裂(Tao et al., 2017)。水稻 NSG1 基因编码 C2H2 型锌指蛋白, 与拟南芥 SUP (SUPERMAN)、JAG (JAGGED)和 NUB(NUBBIN)及水稻 SL1(STAMENLESS1)的功 能类似,参与调控水稻花发育(Dinneny et al., 2004; Ohno et al., 2004; Xiao et al., 2009; Zhuang et al., 2020)。组成型过表达 AtZAT10 的转基因拟 南芥表现为生长阻滞 (Sakamoto et al., 2004; Mittler et al., 2006)。本实验室前期研究(陈宗新 等,2019)发现,异源过表达 OsZAT12 拟南芥植株 矮小,根生长受到抑制。与异源转化 OsZAT12 的 拟南芥表型相似,该研究也发现过表达 OsZAT12 水稻植株在分蘖期、抽穗期和成熟期的株高均显 著降低。该类表型都类似于拟南芥或水稻等植株 遭遇胁迫后或过表达胁迫相关转录因子如 DREB1 植株的表型(Kasuga et al., 1999), 说明 OsZAT12 可能为胁迫相关基因。

植物对非生物胁迫的耐受性,主要依赖于激活植物体内与胁迫相关的分子调控网络,包括信号刺激的应答、激素信号转导途径、诱导信号通路基因的表达等(Dansana et al., 2014; Lima et al., 2015)。冷胁迫会对植物造成损伤,严重时可使植物死亡(Wang et al., 2017)。C2H2 锌指蛋白可通过直接调控下游冷胁迫相关基因来增强植物的抗寒能力(Han et al., 2020)。番茄 *SlCZFP*1 基因通过诱导 *COR*(cold-regulated)或冷响应相关基因的

组成型表达,增强转基因拟南芥和水稻的耐寒性 (Zhang et al., 2011)。大豆 *GmZF*1 通过结合 COR6.6 启动子区并上调该基因的表达,调节转基 因拟南芥对冷胁迫的抗性(Yu et al., 2014)。在 香蕉中,过表达 MaC2H2-2 和 MaC2H2-3 显著抑制 MaICE1(inducer of CBF expression, 冷信号传导途 径的一个关键组成部分)的转录。因此, MaC2H2s 可能通过抑制 MaICE1 的转录来增强香蕉的抗寒 性(Han & Fu, 2019)。低温处理上调拟南芥 ZAT12 的表达(Davletova et al., 2005),过表达该 基因则下调 CBF(C-repeat/DRE Binding Factor)基 因的表达,表明 ZAT12 负调控拟南芥对冷胁迫的 适应(Vogel et al., 2005)。本研究表明,4 ℃下调 OsZAT12的表达,说明 ZAT12 在拟南芥和水稻中 对低温胁迫的响应模式不同,暗示两者的功能可 能不同。许多非生物胁迫(如盐、冷和干旱),可诱 发植物产生渗透胁迫(Han et al., 2020)。渗透胁 迫导致植物生理干旱、离子失衡、氧化损伤和生长 抑制 (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2006)。 拟南芥 ZAT10 在渗透胁迫处理后表达显著上调, 尤其是在叶片中;过表达 ZAT10 拟南芥和 zat10 突 变体均表现出对渗透胁迫的耐受性增强(Mittler et al., 2006)。在拟南芥中,ZAT10 被认为是渗透胁 迫的正调控因子并受 MAP 激酶的调控(Nguyen et al., 2016)。杨树中鉴定出 16 个 C1-2i 亚家族成 员,其中6个成员参与了渗透胁迫(Gourcilleau et al., 2011)。在拟南芥中异源过表达大豆 GmZAT4, 该基因可通过 ABA 途径提高拟南芥对 20% PEG 6 000的耐受性(Sun et al., 2019)。在水稻中, 20% PEG 6 000处理后 RZF71 的表达显著上调, 表明该基因在渗透胁迫反应中发挥重要作用(Guo et al., 2007)。与拟南芥 ZAT10 和水稻 RZF71 的 表达模式不同,本研究发现,在 20% PEG 6 000的 渗透胁迫处理过程中, OsZAT12 的表达先下降, 随 后逐渐转变为上调趋势。综合以上结果表明, OsZAT12 的表达受到非生物胁迫(如低温或渗透 胁迫)的调控,因此推测 OsZAT12 参与了水稻响应 非生物胁迫的过程。

本研究对水稻 OsZAT12 启动子分析发现其中 含有激素相关元件, OsZAT12 的表达在 2,4-eBL、 IAA 处理后上调, 推测 OsZAT12 参与了不同激素 信号途径。ABA 是植物非生物胁迫中一个重要的 调控因子,由于其广泛在干旱、寒冷、高温、盐胁迫



OsZAT12转基因水稻在不同浓度外源 ABA 处理下的表型(A)、株高(B)和根长(C),标尺=2 cm。OE8、OE3为 OsZAT12 过表 达植株; oszat12-10-10为 OsZAT12 敲除植株。\*和\*\*表示与WT 相比达到显著水平(\*P < 0.05, \*\*P < 0.01), n=30。下同。 Phenotype (A), shoot length (B) and root length (C) of OsZAT12 transgenic rice under different concentrations of exogenous ABA treatment, scale bar=2 cm. OE8 and OE3 are OsZAT12 overexpression plants; oszat12-12-3, oszat12-10-10 and oszat12-8-15 are OsZAT12 knockout plants. \* and \*\* indicate significant differences compared with WT (\*P < 0.05, \*\*P<0.01), n=30. The same below.



和水涝等逆境中具有重要作用,因此被称为胁迫 激素(Chen et al., 2020; Bharath et al., 2021)。水 稻 C1-2i 亚家族成员的 ZFP179, ABA 处理 3 h 后 其表达上调,随后下调,至24 h 时达到最高(Sun et al., 2010), 而本研究却发现, ABA显著下调 OsZAT12的表达,说明两者在ABA 信号传导途径 中的功能可能存在不同。过表达 ZFP179 基因的 水稻幼苗表现增加对 ABA 的敏感性(Sun et al., 2010),而本研究则发现过表达 OsZAT12 降低了水 稻对 ABA 处理的敏感性。过表达 OsZAT12 水稻 幼苗和过表达 ZFP179 水稻幼苗对外源 ABA 敏感 性的差异可能与这两个基因对 ABA 的响应模式不 同有关。此外, OsZAT12 敲除植株的株高只有在5 µmol · L<sup>-1</sup> ABA 处理下显著低于野生型;在正常条 件及低浓度 ABA(1 μmol · L<sup>-1</sup>)处理下,根长显著 高于野生型;在较高浓度 ABA(10 µmol · L<sup>-1</sup>)处 理下,根长与野生型无显著差异。我们推测,敲除 OsZAT12 后可能会降低植株内源 ABA 含量,只有 在外施合适浓度的 ABA 时, 敲除 OsZAT12 植株才 会表现出对 ABA 的敏感性增强,这与 osbglu33 水 稻突变体及过表达 ZmWRKY114 的水稻植株对外 源 ABA 的响应方式相似(Ren et al., 2019; Bo et al., 2020)。结合 OsZAT12 对非生物胁迫(低温胁 迫和渗透胁迫)及胁迫激素 ABA 的响应模式,推 测 OsZAT12 参与调节非生物胁迫及激素信号途 径,进而影响了水稻株型的发育,并在水稻穗型及 结实中具有重要调控作用。本文进一步深入研究 了 OsZAT12 参与植物不同非生物胁迫应答的分子 机制和 ABA 信号转导途径的调控,将为利用 OsZAT12 进行水稻耐逆稳产分子设计育种提供实 验依据。

### 参考文献:

- BALLERINI ES, MIN Y, EDWARDS MB, et al., 2020. *POPOVICH*, encoding a C2H2 zinc-finger transcription factor, plays a central role in the development of a key innovation, floral nectar spurs, in *Aquilegia* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 117(36): 22552-22560.
- BHARATH P, GAHIR S, RAGHAVENDRA AS, 2021. Abscisic acid-induced stomatal closure: an important



A. OsZAT12 转基因水稻分蘖期、抽穗期和成熟期的表型,标尺=5 cm; B-C. OsZAT12 转基因水稻分蘖期的株高和根长; D-E. OsZAT12 转基因水稻抽穗期的株高和分蘖数; F-I. OsZAT12 转基因水稻成熟期的株高、分蘖数、每株穗数和结实率。OE8 和 OE3 为 OsZAT12 过表达植株; oszat12-12-3、oszat12-10-10 和 oszat12-8-15 为 OsZAT12 敲除植株。

A. Phenotype of OsZAT12 transgenic rice at tillering stage, heading stage and maturity stage, scale bar = 5 cm; B-C. Plant height and root length of OsZAT12 transgenic rice at tillering stage; D-E. Plant height and and tiller number of OsZAT12 transgenic rice at heading stage; F-I. Plant height, tiller number, panicle number per plant and seed-setting rate of OsZAT12 transgenic rice at maturity stage. OE8 and OE3 are OsZAT12 overexpression plants; oszat12-12-3, oszat12-10-10 and oszat12-8-15 are OsZAT12 knockout plants.

图 9 野生型和 OsZAT12 转基因水稻的农艺性状 Fig. 9 Agronomic traits of wide type and OsZAT12 transgenic rice

component of plant defense against abiotic and biotic stress [J]. Front Plant Sci, 12: 615114.

BO C, CHEN H, LUO G, et al., 2020. Maize WRKY114 gene negatively regulates salt-stress tolerance in transgenic rice 11 期

[J]. Plant Cell Rep, 39(1): 135-148.

- CHANG J, YU T, YANG Q, et al., 2018. Hair, encoding a single C2H2 zinc-finger protein, regulates multicellular trichome formation in tomato [J]. Plant J, 96(1): 90-102.
- CHEN J, YANG L, YAN X, et al., 2016. Zinc-finger transcription factor ZAT6 positively regulates cadmium tolerance through the glutathione-dependent pathway in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 171(1): 707-719.
- CHEN ZX, CHEN JF, WANG YQ, 2019. A preliminary study of OsZAT12 with C2H2-type zinc finger transforming *Arabidopsis* [J]. JS Chin Norm Univ (Nat Sci Ed), 51(1): 63-68. [陈宗新,陈俊飞,王亚琴, 2019. 水稻 C2H2 型锌 指蛋白 OsZAT12 转化拟南芥功能的初步研究 [J]. 华南 师范大学学报(自然科学版), 51(1): 63-68.]
- CHEN K, GAO J, SUN S, et al., 2020. BONZAI proteins control global osmotic stress responses in plants [J]. Curr Biol, 30(24): 4815-4825.
- CHEUK A, OUELLET F, HOUDE M, 2020. The barley stripe mosaic virus expression system reveals the wheat C2H2 zinc finger protein TaZFP1B as a key regulator of drought tolerance [J]. BMC Plant Biol, 20(1): 144.
- CIFTCI-YILMAZ S, MITTLER R, 2008. The zinc finger network of plants [J]. Cell Mol Life Sci, 65 (7/8): 1150-1160.
- DANSANA PK, KOTHARI KS, VIJ S, et al., 2014. OsiSAP1 overexpression improves water-deficit stress tolerance in transgenic rice by affecting expression of endogenous stressrelated genes [J]. Plant Cell Rep, 33(9): 1425-1440.
- DAVLETOVA S, SCHLAUCH K, COUTU J, et al., 2005. The zinc-finger protein Zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 139(2): 847–856.
- DINNENY JR, YADEGARI R, FISCHER RL, et al., 2004. The role of JAGGED in shaping lateral organs [J]. Development, 131(5): 1101–1110.
- ENGLBRECHT CC, SCHOOF H, BÖHM S, 2004. Conservation, diversification and expansion of C2H2 zinc finger proteins in the *Arabidopsis thaliana* genome [J]. BMC Genom, 5(1): 39.
- GOURCILLEAU D, LENNE C, ARMENISE C, et al., 2011. Phylogenetic study of plant Q-type C2H2 zinc finger proteins and expression analysis of poplar genes in response to osmotic, cold and mechanical stresses [J]. DNA Res, 18(2): 77–92.
- GUO SQ, HUANG J, JIANG Y, et al., 2007. Cloning and characterization of *RZF*71 encoding a C2H2-type zinc finger protein from rice [J]. Hereditas, 29(5): 607-613.
- HAN G, LU C, GUO J, et al., 2020. C2H2 zinc finger proteins: master regulators of abiotic stress responses in plants [J]. Front Plant Sci, 11: 115.
- HAN YC, FU CC, 2019. Cold-inducible MaC2H2s are associated with cold stress response of banana fruit via regulating MaICE1 [J]. Plant Cell Rep, 38(5): 673-680.
- KASUGA M, LIU Q, MIURA S, et al., 1999. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor [J]. Nat Biotechnol, 17(3): 287–291.
- LAITY JH, LEE BM, WRIGHT PE, 2001. Zinc finger proteins: New insights into structural and functional diversity

[J]. Curr Opin Struct Biol, 11(1): 39–46.

- LI MR, LI HQ, 2003. A simple and highly efficient *Agrobacterium*-mediated rice transformation system [J]. Acta Biol Exp Sin, 36(4): 290-294. [李美茹,李洪清, 2003. 简单高效的根癌农杆菌介导的水稻基因转化方法 [J]. 实验生物学报, 36(4): 290-294.]
- LIMA JM, NATH M, DOKKU P, et al., 2015. Physiological, anatomical and transcriptional alterations in a rice mutant leading to enhanced water stress tolerance [J]. AoB Plants, 7: plv023.
- LIPPUNER V, CYERT MS, GASSER CS, 1996. Two classes of plant cDNA clones differentially complement yeast calcineurin mutants and increase salt tolerance of wild-type yeast [J]. J Biol Chem, 271(22): 12859–12866.
- LIU XM, NGUYEN XC, KIM KE, et al., 2013. Phosphorylation of the zinc finger transcriptional regulator ZAT6 by MPK6 regulates *Arabidopsis* seed germination under salt and osmotic stress [J]. Biochem Biophys Res Comm, 430(3): 1054–1059.
- LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method [J]. Methods, 25(4): 402–408.
- MA XL, ZHANG QY, ZHU QL, et al., 2015. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants [J]. Mol Plant, 8(8): 1274-1284.
- MEISSNER R, MICHAEL AJ, 1997. Isolation and characterisation of a diverse family of *Arabidopsis* two and three-fingered C2H2 zinc finger protein genes and cDNAs [J]. Plant Mol Biol, 33(4): 615–624.
- MITTLER R, KIM Y, SONG L, et al., 2006. Gain-and loss-offunction mutations in Zat10 enhance the tolerance of plants to abiotic stress [J]. FEBS Lett, 580(28/29): 6537–6542.
- MOREAU C, HOFER JM, ELÉOUËT M, et al., 2018. Identification of *Stipules reduced*, a leaf morphology gene in pea (*Pisum sativum*) [J]. New Phytol, 220(1): 288–299.
- NGUYEN XC, KIM SH, HUSSAIN S, et al., 2016. A positive transcription factor in osmotic stress tolerance, ZAT10, is regulated by MAP kinases in *Arabidopsis* [J]. J Plant Biol, 59: 55-61.
- OHNO CK, REDDY GV, HEISLER MG, et al., 2004. The *Arabidopsis JAGGED* gene encodes a zinc finger protein that promotes leaf tissue development [J]. Development, 131(5): 1111-1122.
- OHTA M, MATSUI K, HIRATSU K, et al., 2001. Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression [J]. Plant Cell, 13(8): 1959–1968.
- PABO CO, PEISACH E, GRANT RA, 2001. Design and selection of novel Cys2His2 zinc finger proteins [J]. Ann Rev Biochem, 70: 313-340.
- REN R, LI D, ZHEN C, et al., 2019. Specific roles of Os4BGlu10, Os6BGlu24, and Os9BGlu33 in seed germination, root elongation, and drought tolerance in rice [J]. Planta, 249(6): 1851–1861.
- RODAS AL, ROQUE E, HAMZA R, et al., 2021. MtSUPERMAN plays a key role in compound inflorescence and flower development in *Medicago truncatula* [J]. Plant J, 105(3): 816-830.

- ROSSEL JB, WILSON PB, HUSSAIN D, et al., 2007. Systemic and intracellular responses to photooxidative stress in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 19(12): 4091–4110.
- SAKAMOTO H, ARAKI T, MESHI T, et al., 2000. Expression of a subset of the *Arabidopsis* Cys2/His2-type zinc-finger protein gene family under water stress [J]. Gene, 248(1/ 2): 23-32.
- SAKAMOTO H, MARUYAMA K, SAKUMA Y, et al., 2004. Arabidopsis Cys2/His2-type zinc-finger proteins function as transcription repressors under drought, cold, and high-salinity stress conditions [J]. Plant Physiol, 136(1): 2734-2746.
- SHI H, WANG X, YE T, et al., 2014. The Cysteine2/ Histidine2-type transcription factor ZINC FINGER OF ARABIDOPSIS THALIANA 6 modulates biotic and abiotic stress responses by activating salicylic acid-related genes and C-REPEAT-BINDING FACTOR genes in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 165(3): 1367–1379.
- SUGANO S, KAMINAKA H, RYBKA Z, et al., 2003. Stressresponsive zinc finger gene ZPT2-3 plays a role in drought tolerance in petunia [J]. Plant J, 36(6): 830-841.
- SUN SJ, GUO SQ, XIA Y, et al., 2010. Functional analysis of a novel Cys2/His2-type zinc finger protein involved in salt tolerance in rice [J]. J Exp Bot, 61(10): 2807-2818.
- SUN ZX, LIU RH, GUO B, et al., 2019. Ectopic expression of GmZAT4, a putative C2H2-type zinc finger protein, enhances PEG and NaCl stress tolerances in Arabidopsis thaliana [J]. 3 Biotech, 9(5): 166.
- TAKATSUJI H, 1999. Zinc-finger proteins: the classical zinc finger emerges in contemporary plant science [J]. Plant Mol Biol, 39(6): 1073-1078.
- TAO Z, HUANG Y, ZHANG L, et al., 2017. BnLATE, a Cys2/His2-type zinc-finger protein, enhances silique shattering resistance by negatively regulating lignin accumulation in the silique walls of *Brassica napus* [J]. PLoS ONE, 12(1): e0168046.
- TENG K, TAN P, GUO W, et al., 2018. Heterologous expression of a novel Zoysia japonica C(2)H(2) zinc finger gene, ZjZFN1, improved salt tolerance in Arabidopsis [J]. Front Plant Sci, 9: 1159.
- VERMA V, RAVINDRAN P, KUMAR PP, 2016. Plant hormone-mediated regulation of stress responses [J]. BMC Plant Biol, 16: 86.
- VERSLUES PE, 2016. ABA and cytokinins: challenge and opportunity for plant stress research [J]. Plant Mol Biol, 91(6): 629-640.
- VOGEL JT, ZARKA DG, VAN BUSKIRK HA, et al., 2005. Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of *Arabidopsis* [J]. Plant J, 41(2): 195-211.
- WANG J, ZHANG Q, CUI F, et al., 2017. Genome-wide analysis of gene expression provides new insights into cold responses in *Thellungiella salsuginea* [J]. Front Plant Sci, 8: 713.
- WANG K, DING Y, CAI C, et al., 2019. The role of C2H2 zinc finger proteins in plant responses to abiotic stresses [J]. Physiol Plant, 165(4): 690-700.
- WANG YQ, CHEN XY, YANG CW, 2011. Transformation of

pleiotropic gene *CPR5* from *Arabidopsis* into Zhonghua 11 (*Oryza sativa* L. subsp. *japonica*) [J]. Acta Sci Nat Univ Sunyatseni, 50(4): 84-90. [王亚琴,陈兴瑶,阳成伟, 2011. 拟南芥多效性基因 *CPR5* 转化水稻中花 11 的研究 [J]. 中山大学学报(自然科学版), 50(4): 84-90.]

- WU FH, SHEN SC, LEE LY, et al., 2009. Tape-Arabidopsis Sandwich-a simpler Arabidopsis protoplast isolation method [J]. Plant Methods, 5: 16.
- XIAO H, TANG J, LI Y, et al., 2009. STAMENLESS 1, encoding a single C2H2 zinc finger protein, regulates floral organ identity in rice [J]. Plant J, 59(5): 789–801.
- XIE YJ, MAO Y, LAI DW, et al., 2012. H<sub>2</sub> enhances *Arabidopsis* salt tolerance by manipulating ZAT10/12mediated antioxidant defence and controlling sodium exclusion [J]. PLoS ONE, 7(11): e49800.
- XU DQ, HUANG J, GUO SQ, et al., 2008. Overexpression of a TFIIIA-type zinc finger protein gene ZFP252 enhances drought and salt tolerance in rice (Oryza sativa L.) [J]. FEBS Lett, 582(7): 1037-1043.
- YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K, 2006. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses [J]. Ann Rev Plant Biol, 57: 781–803.
- YIN J, WANG L, ZHAO J, et al., 2020. Genome-wide characterization of the C2H2 zinc-finger genes in *Cucumis* sativus and functional analyses of four *CsZFPs* in response to stresses [J]. BMC Plant Biol, 20(1): 359.
- YIN M, WANG Y, ZHANG L, et al., 2017. The Arabidopsis Cys2/His2 zinc finger transcription factor ZAT18 is a positive regulator of plant tolerance to drought stress [J]. J Exp Bot, 68(11): 2991–3005.
- YU GH, JIANG LL, MA XF, et al., 2014. A soybean C2H2type zinc finger gene *GmZF*1 enhanced cold tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. PLoS ONE, 9(10): e109399.
- ZHANG H, LIU Y, WEN F, et al., 2014. A novel rice C2H2type zinc finger protein, ZFP36, is a key player involved in abscisic acid-induced antioxidant defence and oxidative stress tolerance in rice [J]. J Exp Bot, 65(20): 5795-5809.
- ZHANG H, NI L, LIU Y, et al., 2012. The C2H2-type zinc finger protein ZFP182 is involved in abscisic acid-induced antioxidant defense in rice [J]. J Integr Plant Biol, 54(7): 500-510.
- ZHANG S, LIU J, ZHONG G, et al., 2021. Genome-wide identification and expression patterns of the C2H2-zinc finger gene family related to stress responses and catechins accumulation in *Camellia sinensis* [L.] O. Kuntze [J]. Int J Mol Sci, 22(8): 4197.
- ZHANG X, GUO X, LEI C, et al., 2011. Overexpression of SlCZFP1, a novel TFIIIA-type zinc finger protein from tomato, confers enhanced cold tolerance in transgenic Arabidopsis and rice [J]. Plant Mol Biol Rep, 29: 185-196.
- ZHUANG H, WANG HL, ZHANG T, et al., 2020. NONSTOP GLUMES1 encodes a C2H2 zinc finger protein that regulates spikelet development in rice [J]. Plant Cell, 32 (2): 392-413.

广步植物 Guihaia Nov. 2022, 42(11): 1811-1821

#### DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202110029

李斌, 李明玉, 杜志烨, 等. 环境变化对水稻 osfh1 突变体成蛋白家族表达的影响 [J]. 广西植物, 2022, 42(11): 1811-1821. LI B, LI MY, DU ZY, et al. Environment change effects on the expression level of *Formins* in rice osfh1 mutant [J]. Guihaia, **回** 2022, 42(11): 1811-1821.

环境变化对水稻 osfh1 突变体成蛋白家族表达的影响

李 斌<sup>1</sup>,李明玉<sup>1</sup>,杜志烨<sup>1</sup>,汪开顺<sup>1</sup>,肖 凯<sup>1</sup>,王 鑫<sup>1</sup>, 石 杨<sup>1</sup>,姬红丽<sup>2</sup>,陈 稷<sup>3</sup>,黄 进<sup>1\*</sup>

(1. 成都理工大学 生态环境学院,成都 610059; 2.四川省农业科学院 植物保护研究所, 成都 610066; 3.四川农业大学 农学院,成都 611130)

摘 要:水稻成蛋白基因成员 OsFH1 在水稻根毛的生长发育中起着关键作用,这一过程受到环境因素的调控,当前的研究对环境因素如何与 OsFH1 互作调控水稻根毛的机制尚未阐明。为探索水稻成蛋白成员是否在环境因素介导的 osfh1 突变体根毛表型恢复中发挥作用,该研究使用 1/2 MS 液体培养液与 1/2 MS 固体培养基处理 osfh1 突变体,通过 qRT-PCR 技术分析成蛋白家族成员表达量,并对成蛋白家族进行生物信息学分析。结果表明:(1)与野生型相比,在液培中 osfh1 突变体主根根毛缺失,地上部分较短,侧根数量增加,在固体培养中 osfh1 突变体根毛缺失表型得到恢复。(2)与野生型相比,当 osfh1 突变体从液培到固培环境时,OsFH16 表达量下降,OsFH17 表达量上升,并且差异显著。(3) OsFH1、OsFH16 (OsFH17 都是第一类成蛋白亚家族成员,都具有生长素、赤霉素以及厌氧等与环境胁迫相关顺式作用元件,并且预测到 OsFH1、OsFH16和 OsFH17定位于质膜行使功能。(4) OsFHs 在不同组织的表达模式分析表明,OsFH1 在根部表达 米平较高,而 OsFH16 (OsFH17 在根部表达量相对较低。综上认为,由于 OsFH16 (OsFH17 可能参与环境因素与 osfh1 共同改变根毛表型这一过程。该研究结果为解析环境与 osfh1 基因共同调控水稻根毛发育机制奠定了 一定理论基础,为探索植物成蛋白基因功能提出了新方向。

关键词:成蛋白, OsFH1, 根毛, qRT-PCR, 水稻, 生物信息分析 中图分类号: Q943 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2022)11-1811-11

# Environment change effects on the expression level of *Formins* in rice *osfh*1 mutant

LI Bin<sup>1</sup>, LI Mingyu<sup>1</sup>, DU Zhiye<sup>1</sup>, WANG Kaishun<sup>1</sup>, XIAO Kai<sup>1</sup>, WANG Xin<sup>1</sup>, SHI Yang<sup>1</sup>, JI Hongli<sup>2</sup>, CHEN Ji<sup>3</sup>, HUANG Jin<sup>1\*</sup>

( 1. College of Ecology and Environment, Chengdu University of Technology, Chengdu 610059, China; 2. Institute of Plant Protection, Sichuan Academy of Agricultural sciences, Chengdu 610066, China; 3. College of Agronomy, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China )

http://www.guihaia-journal.com



收稿日期: 2022-03-28

基金项目:国家自然科学基金(31870383);四川省青年科技基金(2017JQ0004)[Supported by National Natural Science Foundation of China(31870383); Fund of Sichuan Youth Science and Technology (2017JQ0004)]。

第一作者:李斌(1994-),硕士研究生,研究方向为分子遗传,(E-mail)libin@stu.cdut.edu.cn。

<sup>\*</sup>通信作者:黄进,博士,研究员,研究方向为分子遗传,(E-mail)huangjin18@ cdut.edu.cn。

Abstract: Oryza sativa formin homology 1 (OsFH1) plays a crucial role in rice root-hair growth and development, and the short root-hair phenotype of osfh1 was changed by environmental factors. However, the mechanism of how environmental factors interact with OsFH1 to regulate rice root-hair phenotype is still unknown. To determine whether OsFHs function in the process of osfh1 mutant root-hair phenotype recovery. The expression of OsFHs was analyzed by qRT-PCR in the osfh1 mutant treated under 1/2 MS liquid culture and 1/2 MS solid culture. Furthermore, qRT-PCR results were compared with bioinformatics analysis results. The results were as follows: (1) When compared with the wild type, osfh1 primary root showed a no root-hair. The osfh1 mutant showed a shorter shoot and more lateral roots. However, the no root-hair phenotype of osfh1 recovered under 1/2 MS solid culture treatment. (2) The expression of OsFH16 decreased and the expression of OsFH17 increased in the osfh1 mutant from liquid culture treatment to solid culture treatment with significant differences. (3) OsFH1, OsFH16 and OsFH17 all belonged to the Type II subfamily, and all had cis-acting elements related to environmental stress, such as auxin, gibberellin, and anaerobic. OsFH1, OsFH16, and OsFH17 may be located in the plasma membrane to perform functions. (4) Analysis of the tissue-specific expression pattern of OsFHs showed that OsFH1 was highly expressed in the roots, while OsFH16 and OsFH17 were lowly expressed in the roots. In conclusion, this study suggests that OsFH1, OsFH16, OsFH17 have conservative structures and similar regulatory modes, and all three may function on the cell plasma membrane, therefore, OsFH16, OsFH17 may be involved in the process that environmental factors and osfh1 together alter the root-hair phenotype. Overall, this study lays a theoretical foundation for the mechanism research of environmental factors and osfh1 gene coregulation of rice root-hair development and proposes a new direction for exploring the function of plant formin genes. Key words: formin, OsFH1, root-hair, qRT-PCR, rice, bioinformatic analysis

成蛋白(formin)是动植物细胞形态变化的关 键调控因子 (Shimada et al., 2004; Xu et al., 2004)。微生物和动物成蛋白的结构通常包括 FH1 (formin homology 1) FH2 (formin homology 2) FH3 (formin homology 3), GBD (GTPase binding domain) DID (diaphanous inhibitory domain) DAD (diaphanous auto-regulatory domain)等(Janni et al., 1998; Peter & Magdalena, 2013)。其中, FH2 蛋白 结构域是成蛋白行使功能的关键结构域,也是确 定蛋白是否为成蛋白的主要依据(Janni et al., 1998; Peter & Magdalena, 2013)。在动植物中的 研究表明,成蛋白通过聚合肌动蛋白单体影响微 丝微管、细胞骨架的动态调控,从而调控动细胞分 裂以及细胞的极性生长(Shimada et al., 2004; Xu et al., 2004)。近年来的研究表明,当酿酒酵母 Bnip1 和 Bud6 基因共同突变时,酵母对高温敏感; 而当 Bnip1 单突变时,会降低酵母氮源利用率和对 过氧化氢敏感性(Graziano et al., 2013; Juanes & Piatti, 2016)。这些结果表明成蛋白不仅参与细 胞正常的生长发育以及其形态的变化,也有可能 参与酵母抵抗外界环境胁迫。

成蛋白通过介导肌动蛋白调控细胞形态,如 小立碗藓Ⅱ类成蛋白突变后,细胞肌动蛋白结构 以及细胞极性生长被破坏,导致其无法伸长生长 (Luis & Magdalena, 2012)。拟南芥 AtFH8 的过表 达促进根毛细胞的伸长生长,而其突变体却则抑 制了根毛的发育(Yi et al., 2005; Pei et al., 2012)。水稻 OsFH5 促使 G-actin 单体或 Actin/ Profilin 配合物形成的肌动蛋白聚合成核,调控植 物形态变化(Yang et al., 2011)。此外, OsFH15 还 参与调控水稻籽粒的生长发育(Sun et al., 2017)。 植物的生长发育同时受到遗传因素和外界环境的 共同调控,如课题组前期研究中发现,水稻成蛋白 基因 OsFH1 可能通过调控极性生长参与水稻根毛 伸长调控。在不同的培养条件下(固体培养基表 面或者水培), OsFH1 的突变体有不同的表型, 在 固体培养基的表面,即使在 OsFH1 基因缺失的情 况下,突变体也可长出正常的根毛 (Huang et al., 2013)。由此可知,某种未知的环境因素可能通过 某个信号通路可弥补 OsFH1 的缺陷造成的根毛极 性生长,即水稻成蛋白基因 OsFH1 与环境因素共 同调控水稻根毛的极性生长。在这个过程中,外 界环境是通过改变哪些基因或者信号通路补偿 OsFH1 基因的缺失以实现水稻根毛的正常生长仍 有待探索和验证。结构相似的蛋白之间可能存在 功能代偿情况,一个基因功能丧失导致植物或动

物生长发育出现的缺陷被其他基因弥补一部分, 如莱氏野村菌过氧化氢酶超家族基因 NrCat1 和 NrCat4,单独敲除一个基因会引起另一个基因表达 上调,代偿其功能缺失,而当两个基因同时突变则 影响莱氏野村菌的抗逆性(苏宇, 2018)。植物通 过其肽配体 CLAVATA3 (CLV3) 及其受体蛋白激 酶 CLAVATA1 (CLV1) 构成高度保守的负反馈信 号通路维持其干细胞稳态(Cara et al., 2016)。在 拟南芥中,当 CLV1 缺失后,其旁系同源物 BARELY ANY MERISTEM (BAM) 表达量增加以 补偿 CLV1 的丢失造成的表型缺陷 (Diss et al., 2014; Nimchuk et al., 2015)。Fatima 等(2004)以 及课题组未发表数据表明,水稻成蛋白家族共有 17个成员,并且大部分成员的结构保守性很高,即 它们在功能上可能也具有较高的相似性。因此, 为探究在固体培养条件下,osfh1 突变体根毛生长 的恢复是否有可能是由其他水稻成蛋白基因表达 产生的代偿作用来实现的,本研究在 1/2 MS 固体 培养(固培)和1/2 MS 液体培养基(液培)条件下, 分别处理水稻 osfh1 突变体,并以野生型植株作为 对照,对成蛋白家族成员的表达量进行分析。此 外,通过对水稻成蛋白基因家族进行生物信息学 分析,预测水稻成蛋白家族成员可能的功能,对潜 在的代偿基因功能进行进一步探索。

1 材料与方法

### 1.1 材料

所采用的植物材料为水稻 T-DNA 插入突变体 osfh1(PFG-1A-08638)及对应的野生型水稻。

### 1.2 材料处理

首先,使用 0.1%咪鲜胺浸泡消毒 osfh1 突变体 和野生型水稻种子 8 h,在无光条件下进行萌芽 36 h(37 °C);挑选萌芽成功种子培养 5 d 后取样,条 件为 26 °C 恒温,16 h 光照 8 h 无光循环处理。然 后,使用 70%乙醇对去皮的 osfh1 突变体以及野生 型种子进行消毒,每次消毒 1 min,重复 2 次。最 后,将消毒后的种子加入 2%有效次氯酸钠于摇床 上消毒 30 min(37 °C,60 r · min<sup>-1</sup>)后进行清洗;将 消毒完成后的种子置于 1/2 MS (Murashige and Smoking culture medium)培养基中培养 5 d 后取 样,条件为 26 °C 恒温,16 h 光照 8 h 无光循环 处理。

### 1.3 根毛表型观察

利用 Nikon 显微镜和 Imaging View 显微成像 系统拍摄,采用 Image J 测量根毛数据,利用 Microsoft Office Excel 进行数据计算和数理统计等。 1.4 生物信息分析

通过 TAIR (https://www.arabidopsis.org/) 获取 拟南芥 AtFHs 蛋白序列,使用 EnsemblPlant 数据库 (http://plants.ensembl.org/index.html)下载水稻蛋 白组序列。以拟南芥 AtFHs 作为参考序列使用 TBtools v1.089 在水稻基因组中比对鉴定水稻成蛋 白基因家族。通过 MEGA.7 的 ClustalW 算法比对氨 基酸水平的保守性,并通过邻接法构建系统进化 树,Bootstrap 值设为1000。成蛋白结构域以及其功 能通过 NCBI CDD 进行分析 (https://www.ncbi. nlm.nih.gov/Structure/ bwrpsb/bwrpsb.cgi)。成蛋白 基序的保守性通过 MEME-Suit 进行分析(https:// meme-suite. org/meme/)。通过 Rice Genome Annotation Project (http://rice.plantbiology.msu.edu/ index.shtml)获得成蛋白基因家族上游序列,通过 PlantCARE ( http://bioinformatics. psb. ugent. be/ webtools/plantcare/html/)网站分析启动子顺式作用 元件。在 MultiLoc2(http://abi.inf.uni-tuebingen.de/ Services/MultiLoc2)网站上传水稻成蛋白 Loc number 预测水稻成蛋白亚细胞表达; 通过 The Rice Annotation Project (RAP) (https://rapdb.dna.affrc. go.jp/)数据库获取水稻成蛋白染色体、氨基酸残基 分子量、蛋白分子量、等电点、蛋白亲水性等相关信 息; 通过 RiceXPro 数据库 (https://ricexpro.dna. affrc.go.jp/)获得水稻成蛋白组织表达(根、种子、 叶、地上部分、花药、穗、雌蕊、愈伤组织)数据;制图 均采用 TBtools 软件。

### 1.5 基因表达分析

采用艾德莱生物技术有限公司 EASYspin plus 植物 RNA 提取试剂盒提取固培以及液培处理的 野生型和 osfh1 突变体根系组织总 RNA。分别取1 µg 的根系组织的总 RNA,通过 Thermo 反转录试 剂盒合成第1链 cDNA,并稀释 20 倍备用。本实 验室引物全部为自行设计并交由擎科生物科技有 限公司进行引物合成(表1)。qRT-PCR 扩增在德 国耶拿 qTOWER3G 上进行,以不同处理的根部组 织逆转录的 cDNA 为模板,利用水稻成蛋白的特异 引物对成蛋白进行扩增;并以 Ubiquitin 作为内参 基因,正向引物为 5'-ATCACGCYGGAGGTGGAGT- 3',反向引物为5'-AGGCCTTCTGGTTGTAGACG-3'。扩增的总反应体系为10  $\mu$ L,其中含有2× SYBR Green 5  $\mu$ L、2.5  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>正向引物1  $\mu$ L、 2.5  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>反向引物1  $\mu$ L、模板 cDNA 3  $\mu$ L,设 3 次重复。扩增基因的反应循环数为40个,PCR 条件:95℃下预变性2 min,95℃下变性15 s,55 ℃下退火15 s,72℃下延伸20 s。通过 qPCR soft 4.0 软件对数据进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 水稻 osfh1 突变体表型

以水稻 osfh1 突变体以及野生型植株进行固培 和液培处理观察水稻主根根毛表型发现, osfh1 突变 体地上部分长度比野生型短, 并且在固体培养处理 后野生型和突变体都有一定伸长(图 1: A-B)。 osfh1 突变体主根较野生型长, 且在固体培养处理后 野生型和 osfh1 突变体主根根长都有一定增加(图 1:C-D)。osfh1 突变体主根在 1/2 MS 液体培养条 件下无根毛, 当突变体在 1/2 MS 固体培养基上生长 时, 主根根毛表型得到一定恢复且差异显著(图 1: E-F)。这表明 OsFH1 基因参与水稻生长发育的调 控, 在主根根毛的生长发育中具有关键作用, 并且 osfh1 突变体在不同环境下表型发生改变表明环境 因素通过与 OsFH1 基因的突变共同作用改变水稻 主根根毛表型。此外, 液培处理下的 osfh1 侧根数量 和长度均有增加。

# 2.2 qRT-PCR 分析不同环境下野生型和 osfh1 突 变体成蛋白家族基因成员表达量变化

研究认为,结构高度相似的蛋白可能行使类 似的功能,而同一家族成员结构功能往往类似(苏 宇,2018;Nimchuk et al.,2015)。因此,成蛋白家 族其他成员很可能在不同环境因素处理下 osfh1 根毛表型恢复的过程中行使一定功能。鉴于此, 本研究使用 qRT-PCR 技术对固培液培处理下的 野生型以及 osfh1 突变体根部的成蛋白家族成员 基因表达进行分析。

从图 2 可以看出,当培养条件由液培到固培中时, osfh1 突变体中的 OsFH3、OsFH5、OsFH8、 OsFH10、OsFH11、OsFH13、OsFH17 表达量上调, OsFH1、OsFH2、OsFH4、OsFH12、OsFH14、OsFH16 表达量下调,而 OsFH6、OsFH7、OsFH9 表达量无变 化。其中,OsFH16 在突变体中表达量大幅度下调,

表 1	水稻成蛋白家族 qRT-PCR 引物设计
Table 1	qRT-PCR primer design of OsFHs in rice

基因名称 Gene name	序 基因 ID Gene ID	引物方向 Primer direction	引物序列 Primer sequence
OsFH1	Os01g0897700	Primer-F	CCCAATGATGCCACAGTTG
		Primer-R	TCAAGGTGATGATGCTGAAG
OsFH2	Os04g0461800	Primer-F	CGCACCGAAACAGCAGAGCAG
		Primer-R	TCGATCATCTTCTCGTCCAGCC
OsFH3	Os10g0119300	Primer-F	TCCAAACTGAGAGTGTTTGC
		Primer-R	CTTGTTGTTTCTAGCTCGAG
OsFH4	Os10g0347800	Primer-F	GACCTTAGTAAAGATGGCTC
		Primer-R	CATTCTGTTCCCTGTCCTC
OsFH5	Os07g0596300	Primer-F	CGCTCTTCCGCAAATTCTTCC
		Primer-R	AGTAATCCCTGTACTCATCCTC
OsFH6	Os08g0280200	Primer-F	TCTGTCAAAGTTTCAAGTGCCG
		Primer-R	GGGATGGAAATGATGAAAGGTC
OsFH7	Os02g0794900	Primer-F	TCAAGAAACCGCCCGATGG
		Primer-R	CTGCAACACCTCTTATGTGG
OsFH8	Os03g0204100	Primer-F	CAACAACGGGAGCACGTCAATGCG
		Primer-R	TGGCGATGTTCTGCGCCTTCTTGG
OsFH9	Os08g0431200	Primer-F	GCATTCCCAAGGATGGAGGT
		Primer-R	CTTCAATTCAGTGCAAGCTCC
OsFH10	Os02g0161100	Primer-F	CGCCATCTTTCTTCTGGACCAG
		Primer-R	TTCCGTGGAATGACTCGATAAC
OsFH11	Os07g0545500	Primer-F	GCCTCATCTCTGTGCAGCTC
		Primer-R	CCAATCCACACTTGACCCATG
OsFH12	Os04g0245000	Primer-F	CTGGTTTCAGGCTTGTTCTCCC
		Primer-R	GCCAACCGCCTTTCTCACAATG
OsFH13	Os07g0588200	Primer-F	TTGCCTTCGAGAGAGTGGATG
		Primer-R	TCGGATGATCTCTTTAACCACG
OsFH14	Os05g0104000	Primer-F	AGGGAGGTGTGCTTACTGG
		Primer-R	TAAGCTCTTCCTCATTGGTG
OsFH15	Os09g0517600	Primer-F	TGCAACCAGGAGAACAAGGTG
		Primer-R	CGCAAATGGTATCGCAAGCAC
OsFH16	Os02g0739100	Primer-F	GCAGGCAATCGGATGAATGC
		Primer-R	ATGGACCCTGACTTGTGGAG
OsFH17	Os04g0100300	Primer-F	CGCCATTCAAGAAGTCGCC
		Primer-R	TTTGGATTGGCAGTAACTTTGT

调,并且与野生型中 OsFH16 和 OsFH17 的表达趋势相反,因此 OsFH16、OsFH17 极有可能参与环境表明其可能受到 OsFH1 的调控;而 OsFH17 大幅度上与 osfh1 突变体互作改变根毛表型这一过程。

通过比较固培环境与液培环境处理下 osfh1 和野生型根部的 OsFHs 表达量,进一步分析了不 同环境处理下 OsFHs 表达趋势,结果见图 3。从图 3 可以看出,从水培到固培中野生型以及 osfh1 体 内 OsFH3、OsFH5、OsFH7、OsFH10、OsFH11、 OsFH13、OsFH15 表达趋势一致都呈上升趋势,



A. 野生型和 osfh1 突变体地上部分的表型; B. 野生型和 osfh1 突变体地上部分长度柱形图; C. 野生型和 osfh1 突变体根部的表型; D. 野生型和 osfh1 突变体主根长度柱形图; E. 野生型和 osfh1 突变体主根根毛的表型; F. 野生型和 osfh1 突变体主根根毛长度柱形图; E. 野生型和 osfh1 突变体主根根毛长度柱形图。LC. 1/2MS 液体培养; SC. 1/2MS 固体培养(P<0.05)。下同。

**A.** Phenotypes of the aerial parts of wild type and *osfh*1 mutants; **B.** Length bar graphs of aerial parts of wild type and *osfh*1 mutants; **C.** Phenotypes of wild type and *osfh*1 mutant roots; **D.** Bar graph of wild type and *osfh*1 mutant taproot lengths; **E.** Phenotypes of taproot root-hairs of wild type and *osfh*1 mutants; **F.** Length bar graphs wild type and *osfh*1 mutant taproot root hair lengths; **LC.** 1/2MS liquid culture; **SC.** 1/2MS solid culture (*P*<0.05). The same below.

图 1 水稻野生型和 osfh1 突变体在不同处理下表型差异 Fig. 1 Phenotypic difference of wild-type rice and osfh1 mutants under different treatments

*OsFH*12、*OsFH*14、*OsFH*16都呈下降趋势,而 *OsFH*1、 *OsFH*2、*OsFH*4、*OsFH*8、*OsFH*9、*OsFH*17表达趋势相 反。其中, osfh1 突变体中 OsFH10、OsFH15 表达量 虽然大幅度增加, 但其表达量趋势与野生型一致,



A-Q分别是野生型和 osfh1 根部 OsFHs 家族的表达量。小写字母表示不同处理下野生型和 osfh1 之间差异显著性(P<0.05)。下同。

A-Q are the expression levels of wild-type and *osfh1* root *OsFHs* respectively. lowercases indicate the significant differences between wild-type and *osfh1* under different treatments (*P*< 0.05). The same below.

图 2 不同处理下 *osfh*1 突变体与野生型 *OsFHs* 基因家族表量变化 Fig. 2 *OsFHs* expression changes between WT and *osfh*1 under different treatments

并且表达量低于野生型。野生型中 OsFH16 表达量 无变化,但在 osfh1 突变体中大幅度下降。野生型和 突变体中 OsFH17 表达趋势相反, osfh1 中 OsFH17 表达急剧上升, 并且差异显著。



相对变化率为 osfh1 和野生型根部 OsFHs 家族在 1/2 MS 固体培养(SC)处理下的表达量比上 1/2 MS 液体培养(LC)处理下的表达量的比值。

Relative change rate is the OsFHs expressions of the osfh1 mutant and wild-type root under 1/2 MS solid culture treatment (SC) compared to those under 1/2 MS liquid culture treatment (LC).

- 图 3 1/2 MS 固培和 1/2 MS 液培处理下 OsFHs 相对表达量分析(osfh1 与野生型相比较)
- Fig. 3 Relative expression analysis of *OsFHs* under 1/2 MS solid and 1/2 MS liquid treatments (compared with the expression level in wild type)

### 2.3 水稻成蛋白生物信息分析

qRT-PCR分析表明不同环境处理 osfh1 突变体导致其体内成蛋白基因家族 OsFH16、OsFH17 表达量 被改变。基于代偿理论,我们认为 OsFH16、OsFH17可能参与不同环境因素处理下 osfh1 表型恢复过程。通过生物信息学对水稻成蛋 白的结构、功能可能受到的调控以及 OsFH16 和 OsFH17 是否可能参与根毛生长发育的调控和水 稻成蛋白家族可能的功能进行了分析。

2.3.1 水稻成蛋白结构域预测、序列比对与进化分析 蛋白可能行使的功能与其蛋白的结构密切相关,因此基于课题组未发表数据鉴定的 17 个水稻 成蛋白家族成员,分析其可能的功能,利用生物信息技术对水稻中成蛋白保守蛋白结构域以及基序 进行了比较分析(图 4)。本研究结果表明,水稻 成蛋白家族成员高度保守,且都具有 FH2 关键结 构域,与 Fatima 等(2004)关于拟南芥以及早先水 稻相关成蛋白的研究结果一致。水稻成蛋白可分 为两个亚家族,即第一类亚家族(OsFH1、OsFH2、OsFH4、OsFH8、OsFH9、OsFH10、OsFH11、OsFH13、OsFH14、OsFH15、OsFH16、OsFH17)和第二类亚家



A. OsFHs 家族系统进化树和保守基序分析; B. OsFHs 家族蛋白分析。

A. OsFHs family phylogenetic tree and conservative motif analysis; B. OsFHs family conservative protein analysis.

图 4 水稻成蛋白进化树、保守蛋白结构域以及保守基序分析 Fig. 4 Phylogenetic, conserved motif and protein domains analysis of OsFHs in rice



图 5 水稻成蛋白顺式作用元件预测 Fig. 5 *Cis*-acting elements predicted in the promoter regions of *OsFHs* 

族(OsFH3、OsFH5、OsFH6、OsFH7、OsFH12)。在 水稻第二类亚家族中,OsFH12还存在于植物领域 中未阐明的结构域 PTEN。此外,通过蛋白序列同 源性分析也表明水稻成蛋白的 FH2 结构域在氨基 酸水平上是保守的。与 OsFH1 亲缘关系最近的是 OsFH15,而 OsFH17 与 OsFH16 与 OsFH1 亲缘关 系较远。但是,保守基序分析结果显示,水稻成蛋 白第一类亚家族基序保守性较高,表明第一类亚 家族成员的功能可能类似,因此为了进一步分析 水稻成蛋白可能存在的功能,本研究对其顺式作 用元件以及亚细胞定位进行分析。

2.3.2 水稻成蛋白顺式作用元件以及亚细胞定位 分析 顺式作用元件分析表明成蛋白家族成员上 游存在多个响应激素以及胁迫调控相关的元件 (图5)。这些成蛋白成员中除 OsFH17 以外,其他 水稻成蛋白都可能受到茉莉酸调控,而除了 OsFH3,OsFH5和 OsFH6 以外其他水稻成蛋白成 员都有厌氧调控相关的顺式作用元件。此外 OsFH1、OsFH4、OsFH5、OsFH6、OsFH8、OsFH10、 OsFH1、OsFH4、OsFH5、OsFH6、OsFH8、OsFH10、 OsFH1、OsFH3、OsFH15都具有干旱响应元件。 OsFH1、OsFH8、OsFH9、OsFH11、OsFH13、OsFH15、 OsFH16、OsFH17都具有生长素调控相关原件,表 明其可能参与生长素相关调控。

其中,OsFH16、OsFH17、OsFH1都具有厌氧相关的顺式作用元件、赤霉素调控相关顺式作用元件以及生长素调控相关顺式作用元件。而研究表明水

稻根毛生长发育受到生长素以及赤霉素调控 (Maekawa et al., 2009; Wang et al., 2017)。在本实 验中固培、水培环境变化也包括氧气含量的变化, 但当前并无相关研究。因此,环境变化改变根毛表 型可能是通过生长素以及赤霉素相关信号通路调 控,而养分含量也可能作为环境因素参与调控。

亚细胞定位表明 OsFH1、OsFH4、OsFH6、 OsFH7、OsFH9 定位于细胞液中,OsFH2 定位于胞 外,而 OsFH4、OsFH5、OsFH6 定位于质体,并且 OsFH4 可能在细胞核内起着一定作用。此外, OsFH8、OsFH11、OsFH12、OsFH13、OsFH14、 OsFH15、OsFH16、OsFH17 都定位于质膜,表明大 部分水稻成蛋白可能在质膜上行使功能。并且 OsFH6 定位于过氧化物酶体,OsFH13 定位于液 泡,OsFH3 定位于线粒体表明这些水稻成蛋白可 能参与这些细胞器的形成。OsFH10、OsFH13 定位 于高尔基体,OsFH14、OsFH15 定位于内质网表明 其可能参与蛋白的分泌与转运(表 2)。而 OsFH1 和 OsFH16、OsFH17 之间定位的差异,表明 OsFH1

2.3.3 水稻组织成蛋白表达水平分析 基因在植物不同部位的表达差异可能决定了其参与的功能,通常在某个部位高表达的基因会参与特定部位的生长发育,以及对胁迫进行响应。通过RiceXPro数据库(https://ricexpro.dna.affrc.go.jp/)获取水稻成蛋白家族在不同部位表达量数据,进

### 表 2 水稻成蛋白信息

Table 2Information of rice formin proteins

		蛋白质特	性 Protein pro	perties			定位预测 Location predictor
基因名称 Gene name	基因 ID Gene ID	染色体 Chromosome	氨基酸残基 Amino acid residues	分子量 Molecular weight	等电点 Isoelectric point	分子重量 Molecular weight	预测网站 : Winner Takes All Prediction website : Winner Takes All
OsFH1	Os01g0897700	1	244	27 081.3	6.726 29	-0.291 803	胞质溶胶 Cytosol
OsFH2	Os04g0461800	4	833	88 904.1	8.593 54	-0.359 064	胞外 Extracellular
OsFH3	Os10g0119300	10	417	46 634.6	8.682 83	-0.330 695	线粒体 Mitochondrion
OsFH4	Os10g0347800	10	855	93 421.6	11.598 5	-0.561 754	质体、细胞质、细胞核 Plastid, cytosol, nucleus
OsFH5	Os07g0596300	7	741	78 254.2	10.525 1	-0.657 355	质体 Plastid
OsFH6	Os08g0280200	8	481	56 441.6	7.850 69	0.008 731 81	质体、细胞质、过氧化物酶体 Plastid, cytosol, peroxisome
OsFH7	Os02g0794900	2	1 379	150 528	6.311 74	-0.376 795	细胞质 Cytosol
OsFH8	Os03g0204100	3	892	95 349	9.553 66	-0.512 444	质膜 Plasma membrane
OsFH9	Os08g0431200	8	520	58 251.9	6.419 62	-0.549 615	细胞质 Cytosol
OsFH10	Os02g0161100	2	881	96 468.4	5.799 26	-0.366 969	高尔基体 Golgi
OsFH11	Os07g0545500	7	929	100 995	8.042 58	-0.374 919	质膜 Plasma membrane
OsFH12	Os04g0245000	4	1 270	137 947	5.141 94	-0.386 772	质膜 Plasma membrane
OsFH13	Os07g0588200	7	774	83 814.9	8.723 01	-0.447 416	液泡、质膜、高尔基体 Vacuole, plasma membrane, Golgi
OsFH14	Os05g0104000	5	830	90 226.7	8.429 25	-0.413 855	质膜、内质网 Plasma membrane, endoplasmic reticulum
OsFH15	Os09g0517600	9	788	84 584.9	8.805 02	-0.337 183	质膜、内质网 Plasma membrane, endoplasmic reticulum
OsFH16	Os02g0739100	2	409	41 765.2	11.392 3	-0.576 528	质膜 Plasma membrane
OsFH17	Os04g0100300	4	823	86 801.9	9.293 19	-0.472 539	质膜 Plasma membrane

一步探索水稻成蛋白家族成员可能具有的功能。

水稻成蛋白组织表达分析表明,OsFH7 在水 稻根部高表达,OsFH13、OsFH10、OsFH2、OsFH4、 OsFH8、OsFH11、OsFH16、OsFH1、OsFH5 在水稻根 部均有表达,而 OsFH14、OsFH6、OsFH3 在根部有 表达,但表达量较低,表明这些成蛋白家族成员可 能在根部具有一定作用。水稻 OsFH1 在根部的表 达也与 osfh1 突变体表型相吻合,但根部 OsFH17 表达量较低(图 6)。

# 3 讨论与结论

水稻根毛作为一种根部表皮细胞的特异化结构,参与水稻获取外界养分、微生物互作、土壤固定等关键生理过程(李斌等,2020)。Salazar-Henao等(2016)研究认为水稻根毛的伸长是通过根部表皮细胞的极性生长往外延伸,但对于其如何进行极性生长过程尚不清楚。成蛋白作为细胞极性生长的

۲.



Fig. 6 Expression pattern of OsFHs in rice

关键蛋白,在动植物中都有一定研究,如 AtFH3、 AtFH5 调控拟南芥花粉管极性生长(Liu et al., 2018; Lan et al., 2018)。拟南芥 AtFH8 介导植株根 毛形态发育(Pei et al., 2012)。水稻相关研究表 明,osfh1 突变体根毛无法进行伸长,说明 OsFH1 参 与根毛的极性过程(Huang et al., 2013)。此外, OsFH1 突变体的根毛表型缺陷在不同环境的处理下 得到一定程度恢复,表明环境因素参与了 osfh1 介导 的根毛生长发育。基于这一结论结合相关研究中 所得到的结构高度相似的基因之间可能存在代偿 作用的观点,探究水稻成蛋白家族是否能够在 osfh1 突变情况下取代其作用,从而促进根毛的生长(Diss et al., 2014; Nimchuk et al., 2015)。

qRT-PCR 分析结果显示水稻成蛋白中 OsFH16、OsFH17在1/2MS固培以及1/2MS液培 处理下中表达量差异显著,表明OsFH16、OsFH17 可能参与不同环境处理改变osfh1突变体根毛表 型的调控。OsFH16、OsFH17都和OsFH1一样属 于第一类成蛋白家族成员。亚细胞定位表明 OsFH16、OsFH17都定位于细胞质膜,与相关研究 一致,即酵母成蛋白定位于细胞极性生长位点,促 进物质传输,并且通过聚合肌动蛋白促进细胞极 性生长(Billault & Martin, 2019; Cifrova et al., 2020)。并且拟南芥研究也证实了这一点,如 AtFH5 通过定位在细胞膜极性生长点介导囊泡运 输物质(Liu et al., 2018)。在本研究中, OsFH16、 OsFH17 基因上游都具有植物激素、厌氧、缺氧相 关顺式作用元件,结合酵母研究表明成蛋白可能 参与抵抗温度胁迫,响应过氧化氢等结果,表明 OsFH16、OsFH17 极有可能可能受到环境的调控从 而代偿 osfh1 突变导致的水稻根毛无法伸长。此 外,对 OsFH16、OsFH17 表达趋势进行分析发现 OsFH17 从液培到固培表达量急剧增加,表明其可 能在环境处理改变 osfh1 突变体根毛表型的调控 中具有更重要的作用,但对于其具体功能还需进 一步探索。

在对水稻成蛋白的结构分析时发现水稻第二 类成蛋白 OsFH12 与其他成员不同,只有一个 PTEN 结构域。PTEN 是在人类癌症调控的关键基 因,PTEN 主要通过去磷酸化参与细胞调控,并且 通过结合膜磷脂定位于细胞质膜(van Gpac et al., 2012)。OsFH12 蛋白具有的 PTEN 结构域表明其 可能通过该结构定位在细胞膜行使功能,并且该 结果与亚细胞分析结果一致。因此, OsFH12 极有 可能在细胞质膜上行使功能。结合 OsFH12 的组 织表达数据, OsFH12 极有可能参与花药的生长发 育。此外,本研究发现 1/2 MS 液培处理下的 osfh1 突变体中侧根数量以及长度多于野生型,表明 OsFH1可能参与侧根的起始。拟南芥研究也表明 其侧根的起始依赖于细胞骨架以及肌动蛋白介导 的中柱鞘细胞不对称细胞分裂,从而形成侧根原 基促使侧根生长(Barro et al., 2019; Fernandez et al., 2020)。成蛋白主要功能是调控肌动蛋白以 及细胞骨架,因此水稻 OsFH1 也可能通过调控细 胞骨架和肌动蛋白促进水稻侧根起始。

目前,关于水稻成蛋白在水稻根毛发育过程 中行使功能的研究较少,并且对于不同环境通过 调控哪些基因促进 osfh1 突变体恢复表型也尚未 阐明。本研究通过分析不同环境处理下 osfh1 突 变体成蛋白基因家族的表达量、利用生物信息手 段对水稻成蛋白基因家族成员进行系统性分析, 结果表明在固体表面培养时,环境变化可能通过 OsFH16、OsFH17 等基因的改变以补偿 OsFH1 基 因的缺陷,进而确保植物可产生正常的根毛。但 是,该论断仍需要利用突变体,过表达体及遗传学 方法的进一步验证。

### 参考文献:

- BARRO AV, STÖCKLE D, THELLMANN M, et al., 2019. Cytoskeleton dynamics are necessary for early events of lateral root initiation in Arabidopsis [J]. Curr Biol, 29(15): 2443.
- BILLAULT CI, MARTIN SG, 2019. Capping protein insulates Arp2/3-assembled actin patches from formins [J]. Curr Biol, 29(19): 3165.
- CARA LS, SEAN RJ, ZACHARY LN, 2016. Ready, aim, shoot: stem cell regulation of the shoot apical meristem [J]. Curr Opin Plant Biol, 29: 163-168.
- CHANG L, YI Z, HAIYUN R, 2018. Actin polymerization mediated by AtFH5 directs the polarity establishment and vesicle trafficking for pollen germination in Arabidopsis [J]. Mol Plant, 11(11): 1389–1399.
- CIFROVÁ P, OULEHOVÁ D, KOLLÁROVÁ E, et al., 2020. Division of labor between two actin nucleators - the formin FH1 and the ARP2/3 complex - in Arabidopsis epidermal cell morphogenesis [J]. Front Plant Sci, 11: 148.
- DISS G, ASCENCIO D, DELUNA A, et al., 2014. Molecular mechanisms of paralogous compensation and the robustness of cellular networks [J]. J Exp Zool Part B, 322(7): 488-499.
- FATIMA C, MARIAN N, DENISA P, et al., 2004. Formin homology 2 domains occur in multiple contexts in angiosperms [J]. BMC, 5(1): 44.
- FERNANDEZ AI, VANGHELUWE N, XU K, et al., 2020. GOLVEN peptide signalling through RGI receptors and MPK6 restricts asymmetric cell division during lateral root initiation [J]. Nat Plants, 6(5): 533.
- GRAZIANO BR, JONASSON EM, PULLEN JG, et al., 2013. Ligand-induced activation of a formin-NPF pair leads to collaborative actin nucleation [J]. J Cell Biol, 201(4): 595-611.
- HUANG J, CHUL MK, XUAN YH, et al., 2013. Formin homology 1 (OsFH1) regulates root-hair elongation in rice (*Oryza sativa*) [J]. Planta, 237(5): 1227–1239.
- JANNI P, OLAF N, RICHARD E, et al., 1998. FH3, a domain found in formins, targets the fission yeast formin Fus1 to the projection tip during conjugation [J]. J Cell Biol, 141(5): 1217-1228.
- JUANES MA, PIATTI S, 2016. Control of formin distribution and actin cable assembly by the E3 ubiquitin ligases Dma1 and Dma2 [J]. Genetics, 204(1): 205-220.
- LAN YX, LIU XN, FU Y, et al., 2018. Arabidopsis class I formins control membrane-originated actin polymerization at pollen tube tips [J]. PLoS Genet, 14(11): e1007789.
- LI B, HUANG J, WANG L, et al., 2020. The role of environmental stress and related plant hormones in the development of rice root hairs [J]. Chin J Rice Sci, 34(4): 287-299.「李斌, 黄进, 王丽, 等. 2020. 环境胁迫及相关 植物激素在水稻根毛发育过程中的作用[J]. 中国水稻科

学,34(4):287-299.]

- LIU C, ZHANG Y, REN HY, 2018. Actin polymerization mediated by AtFH5 directs the polarity establishment and vesicle trafficking for pollen germination in Arabidopsis [J]. Mol Plant, 11(11): 1389–1399.
- LUIS V, MAGDALENA B, 2012. Physcomitrella patens : a model for tip cell growth and differentiation [J]. Curr Opin Plant Biol, 15(6): 625-631.
- MAEKAWA T, MAEKAWA YM, TAKEDA N, et al., 2009. Gibberellin controls the nodulation signaling pathway in Lotus japonicus [J]. Plant J, 58(2): 183-194.
- NIMCHUK ZL, ZHOU Y, TARR PT, et al., 2015. Plant stem cell maintenance by transcriptional cross-regulation of related receptor kinases [J]. Development, 142(6): 1043-1049.
- PEI WK, DU F, ZHANG Y, et al., 2012. Control of the actin cytoskeleton in root hair development [J]. Plant Sci, 187: 10-18.
- PETER ACVG, MAGDALENA B, 2013. Plant formins: membrane anchors for actin polymerization [J]. Trends Cell Biol, 23(5): 227-233.
- SALAZAR-HENAO JE, VELEZ-BERMUDEZ IC, SCHMIDT W, 2016. The regulation and plasticity of root hair patterning and morphogenesis [J]. Development, 143 (11): 1848-1858.
- SHIMADA A, NYITRAI M, VETTER IR, et al., 2004. The core FH2 domain of diaphanous-related formins is an elongated actin binding protein that inhibits polymerization [J]. Mol Cell, 13(4): 511-522.
- SU Y, 2018. Construction of an efficient gene disruption method for Nomuraea rileyi and functional study of three genes related to reactive [D]. Chongqing: Chongqing University: 153. 「苏宇, 2018. 莱氏野村菌高效基因敲除体系的建立 和三个活性氧代谢相关基因功能的研究[D]. 重庆: 重庆 大学:153.]
- SUN TT, LI SW, REN HY, 2017. OsFH15, a class I formin, interacts with microfilaments and microtubules to regulate grain size via affecting cell expansion in rice [J]. Sci Rep, 7(1):6538.
- VAN GISBERGEN PAC, LI M, WU SZ, et al., 2012. Class II formin targeting to the cell cortex by binding PI(3, 5) P(2)is essential for polarized growth [J]. J Cell Biol, 198(2): 235 - 250.
- WANG T, LI CX, WU ZH, et al., 2017. Abscisic acid regulates auxin homeostasis in rice root tips to promote root hair elongation [J]. Front Plant Sci. 8: 1121.
- XU YW, JAMES BM, ISABELLE S, et al., 2004. Crystal structures of a Formin Homology-2 domain reveal a tethered dimer architecture [J]. Cell, 116(5): 711-723.
- YANG WB, REN SL, ZHANG XM, et al., 2011. BENT UPPERMOST INTERNODE1 encodes the class II formin FH5 crucial for actin organization and rice development [J]. Plant Cell, 23(2): 661–680.
- YI KX, GUO CQ, CHEN D, et al., 2005. Cloning and functional characterization of a formin-like protein (AtFH8) from Arabidopsis [J]. Plant Physiol, 138(2): 1071-1082.

(责任编辑 李 莉) 广步植物 Guihaia Nov. 2022, 42(11): 1822-1829

#### DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202108006

石杨, 汪梦婷, 靳雨璠, 等. 水稻 *OsMBF1c* 基因的克隆及表达分析 [J]. 广西植物, 2022, 42(11): 1822-1829. SHI Y, WANG MT, JIN YF, et al. Cloning and expression analysis of *OsMBF1c* gene in rice [J]. Guihaia, 2022, 42(11): 1822-1829.



http://www.guihaia-journal.com

# 水稻 OsMBF1c 基因的克隆及表达分析

石 杨<sup>1</sup>, 汪梦婷<sup>1</sup>, 靳雨璠<sup>1</sup>, 于 月<sup>1</sup>, 张 旭<sup>1</sup>, 李家豪<sup>1</sup>, 姜 南<sup>1</sup>, 李 斌<sup>1</sup>, 陈 稷<sup>2</sup>, 黄 进<sup>1\*</sup>

(1. 成都理工大学 生态环境学院, 成都 610059; 2. 四川农业大学 农学院, 成都 611130)

**摘**要:多蛋白桥联因子1(multi protein bridging factor 1, MBF1)在植物应对逆境胁迫中起着重要的作用, 而对于水稻中 MBF1 是否参与重金属胁迫响应机制目前尚未见相关报道。为了揭示水稻 MBF1 家族与重金 属胁迫的相关性及其潜在作用机制,该研究利用 PCR 技术克隆水稻 OsMBF1c 基因的全长编码序列,通过生 物信息学对基因功能进行分析和预测,并通过实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)分析其在镉(Cd)胁迫下的表 达特征。结果表明:(1) OsMBF1c 的全长编码序列为 468 bp,共编码 155 个氨基酸,相对分子量为 16.154 kDa。(2) OsMBF1c 与大麦 TdMBF1a.1 亲缘关系最近,具有光、厌氧等环境因子诱导相关的顺式调节元件。 (3) 重金属 Cd 可诱导 OsMBF1c 表达且在时间上和组织中的表达水平具有特异性,100 µmol·L<sup>-1</sup> Cd 处理 1 h 后,地上部分 OsMBF1c 表达量明显上调,为对照组的 7 倍;100 µmol·L<sup>-1</sup> Cd 胁迫处理 6 h 后,根部 OsMBF1c 表 达量上调为对照组的 3 倍。该研究结果进一步完善了非生物胁迫下 MBF1 家族的生物学功能研究。 关键词:水稻, OsMBF1c, 基因克隆,表达分析, 镉 中图分类号: Q943 文献标识码:A 文章编号: 1000-3142(2022)11-1822-08

# Cloning and expression analysis of OsMBF1c gene in rice

SHI Yang<sup>1</sup>, WANG Mengting<sup>1</sup>, JIN Yufan<sup>1</sup>, YU Yue<sup>1</sup>, ZHANG Xu<sup>1</sup>, LI Jiahao<sup>1</sup>, JIANG Nan<sup>1</sup>, LI Bin<sup>1</sup>, CHEN Ji<sup>2</sup>, HUANG Jin<sup>1\*</sup>

( 1. College of Ecology and Environment, Chengdu University of Technology, Chengdu 610059, China;
2. College of Agronomy, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China )

**Abstract**: Multi protein bridging factor 1 (MBF1) plays an important role in plant stress resistance. However, there is no report about the specific functional mechanism of MBF1 in rice under heavy metal stress. The purpose of this study was to shed light on the correlation and potential mechanism between MBF1 family and heavy metal stress in rice. In this article, the full length coding sequence of *OsMBF1c* was cloned by PCR, the function of *OsMBF1c* was predicted by bioinformatics analysis, and the expression characteristics of *OsMBF1c* under Cd treatment was analyzed by RT-qPCR. The results were as follows; (1) The full length of *OsMBF1c* was 468 bp, which encoded 155 amino acids with

收稿日期: 2021-11-27

基金项目:国家自然科学基金(31870383) [Supported by National Natural Science Foundation of China (31870383)]。

第一作者: 石杨(1997-),硕士,研究方向为水稻重金属响应基因的功能分析,(E-mail)738565564@qq.com。

<sup>\*</sup>通信作者: 黄进,博士,研究员,主要从事水稻吸收、转运重金属相关基因的调控机制研究,(E-mail)huangjin18@ cdut.edu.cn。

the relative molecular weight of 16.154 kDa. (2) OsMBF1c was closely related to TdMBF1a.1, and cis-acting elements analysis showed that OsMBF1c was regulated by environmental factors such as light and anaerobic. (3) Gene expression analysis indicated that OsMBF1c was induced by Cd, and the expression level of OsMBF1c varied with different time or different tissues. After treated with 100 µmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> Cd, the expression level of OsMBF1c in shoots at 1 h was remarkably up-regulated, which was seven times that of the control group, and the expression level in roots at 6 h was up-regulated to three times that of the control group. In conclusion, this study further refines the biological functions of MBF1 family under abiotic stress.

Key words: rice, OsMBF1c, gene cloning, expression analysis, cadmium

近年来,随着人类工业化进程的加快,干旱、盐 碱化和重金属污染问题对农作物的威胁日趋严重, 其中重金属污染问题尤为突出。镉(Cd)作为一种 重金属,因其具有高毒性,即使在土壤中以较低浓 度存在,也会对农作物产生极强的毒性,进而影响 农作物的生长发育(Toppi & Gabbrielli, 1999;金枫 等,2010)。水稻(Oryza sativa)作为我国重要的粮 食作物,其生长发育受到土壤中 Cd 的严重危害 (Zheng et al., 2021)。因此,如何改善重金属对水 稻生长发育的影响并解决籽粒中的重金属积累问 题,对未来培育耐 Cd 水稻品种以及保障粮食生产 安全均具有重要意义。目前,水稻应对重金属胁迫 的转录调控机制的研究较为广泛,相关转录因子、 转录调节因子等因对抗胁迫功能基因的表达起着 重要调节作用,而一直成为研究热点。多蛋白桥联 因子1(multi protein bridging factor 1, MBF1)是植物 处于生物及非生物胁迫应答过程中起重要作用的 转录调节因子之一(Wang et al., 2017)。MBF1 蛋 白主要由 N 端"MBF1"结构域和 C 端"α-螺旋-β-转 角-α-螺旋"结构域组成,可通过桥联转录激活因子 和TBP(TATA-Binding Protein)调控多种信号转导 途径并激活多种防御因子,最终提高植物在逆境胁 迫下的耐受性 (Millership et al., 2004; Jaimes-Miranda & Chávez Montes, 2020)。 拟南芥 (Arabidopsis thaliana)、小麦(Triticum aestivum)、菊花 (Chrysanthemum morifolium)中 MBF1 基因家族可参 与调控植物应对热、氧化和干旱等胁迫反应(Suzuki et al., 2005; Pamela et al., 2010; Zhao et al., 2019) o 然而, MBF1 是否参与植物应对重金属胁迫通路, 以 及是否可能缓解植物因重金属而引起氧化损伤等 的相关研究却少见报道。此外,对 MBF1 的研究也 仅仅局限于拟南芥、小麦等物种,在水稻中潜在的 功能和作用机制的研究则较少,而水稻作为我国重 要的粮食作物之一,研究其抗逆机理显得尤为重要。

本研究对水稻中的 MBF1 基因家族进行了生物信息学分析,并以水稻为材料,利用 PCR 方法克隆得到了 OsMBF1c(LOC\_Os06g39240)基因的全长编码区(coding sequence, CDS)。在此基础上,采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)方法对 Cd 处理下不同水稻组织中 OsMBF1c 的相对表达量进行分析。旨在探究以下问题:(1)水稻 MBF1 蛋白家族亲缘进化关系、理化性质以及结构特征;(2)水稻 MBF1 基因家族成员在 Cd 胁迫下的表达变化情况;(3)水稻 MBF1 在缓解 Cd 危害过程中的潜在功能。本研究结果将为耐镉水稻品种的培育提供潜在的基因资源,同时为进一步解析该基因在水稻中应对重金属胁迫的调控机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

水稻种子于4 °C 保存。选健康种子放入适量 无菌水中,30 °C 催芽 48 h。将发芽种子置于 1/2 MS 液体培养基中,30 °C 温室进行光照 16 h/黑暗 8 h 交替培养,5 d 后选取同一生长阶段的幼苗进 行 CdCl<sub>2</sub>(100  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>)胁迫处理,经时间梯度 (1、6、12 h)处理后采集地上部分和根部,并将其 立即用液氮进行速冻,置于-80 °C冰箱保存备用。

### 1.2 OsMBF1c 基因克隆

1.2.1 总 RNA 提取和 cDNA 第一链合成 将 CdCl<sub>2</sub> 处理的水稻组织参照 Aidlab 公司的 EASYspin Plus 植物 RNA 快速提取试剂盒的说明书进行总 RNA 的提取。提取成功后,取 1 000 ng RNA,参照 ThermoFisher 公司 Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒说明书进 行反转录合成 cDNA 第一链。

1.2.2 OsMBF1c 基因的克隆和测序 根据水稻 OsMBF1c 基因的 CDS 序列设计引物 OsMBF1c-F/ OsMBF1c-R(表1)。以水稻 cDNA 为模板,使用擎 科生物科技有限公司的金牌 Mix 酶对 OsMBF1c 基 因的 CDS 序列进行 PCR 扩增。利用胶回收试剂 盒对 PCR 产物进行胶回收后,利用 Vazyme 公司的 ClonExpress II One Step Cloning Kit 试剂盒连入 pGADT7 载体,并转化至大肠杆菌 DH5α 菌株。挑 取阳性克隆培养后,使用天根生化科技公司的质 粒小提试剂盒提取重组质粒并进行酶切验证,送 往擎科生物科技有限公司(成都)进行测序。

表 1	基因克隆和表达检测引	十物
1X I	金白九度伯农之位的人	1 72

Table 1	Primers use	d fo	r gene	cloning	and
	expressio	n ar	alysis		

引物 Primer	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')	长度 Length (bp)
OsMBF1c-F	CATACAATCAACTCCAAGCTTAT GCCGACGGGGGAGGTTGAGCG	43
OsMBF1c-R	TGGCGAAGAAGTCCAAAGCTTT CACTTGGCGCCGGCGGGGCGCG	43
OsMBF1c-qF	ACATCACGCAGGACTGGGAG	20
OsMBF1c-qR	TCCGTCGACTCGTCCAGCTT	20
OsMBF1a-qF	GCCGCCAAGAAGGATGAGA	19
<i>OsMBF1a-</i> qR	CCTTGTTTGTTCCAGGCGTT	20
Ubiquitin-F	ATCACGCTGGAGGTGGAGT	19
Ubiquitin-R	AGGCCTTCTGGTTGTAGACG	20

### 1.3 生物信息学分析

从 EnsemblPlants 数 据 库 (http://plants. ensembl.org/info/data/ftp/index.html)获得水稻、大麦 (Hordeum vulgare)、二粒小麦(Triticum dicocoides)、 高粱(Sorghum bicolor)、玉米(Zea mays)的整个基因 组以及 gff3 注释文件,使用 TBtools 软件将整个基因 组序列翻译为蛋白序列。利用 OsMBF1c 的氨基酸 序列在 Pfam(http://pfam.xfam.org/)网站中对其编 码蛋白的结构域进行分析,目的基因编码蛋白中含 有与非生物胁迫相关的 MBF1 结构域,先通过 Pfam 网站得到其 HMM 结构模型,再通过 TBtools 软件的 Simple HMM Search 功能对水稻、二粒小麦、大麦、高 粱和玉米的蛋白序列进行分析,筛选确定所选物种 中的 MBF1 基因家族成员。

利用在线 ProtParam 工具(https://web. expasy.org/protscale/)对 OsMBF1c 的基本理化性 质进行预测和分析;利用 SCOPMA 工具(https:// npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\_automat.pl? page=/ NPSA/npsa\_sopma.html)对蛋白质二级结构进行预测;利用水稻 OsMBF1c 基因编号在 Rice Genome Annotation Project 网站 (http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml)获得启动子序列;通过 The PlantCARE 网站(http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/)分析启动子顺式作用 元件,采用 TBtools 软件制图。

利用在线 Multalin 软件(http://multalin. toulouse.inra.fr/multalin/)对其编码的氨基酸序列进 行比对;利用 MEGA 7.0 软件中 Neighbor-joining 法 构建系统进化树;通过 The MEME Suite 网站 (https://meme-suite.org/meme/index.html)对其同源 蛋白进行 motif 分析,利用 TBtools 中的 Visualize Motif Pattern 功能对多序列的 motif 元件进行分析与美化。 用 STRING 数据库(https://string-db.org/cgi/input. pl),对水稻 OsMBF1c 蛋白的相互作用进行预测。

### 1.4 OsMBF1c 基因表达分析

以稀释 20 倍的 Cd 处理水稻的 cDNA 为模板。 采用德国耶拿分析仪器股份公司(Analytikjena) qTOWER<sup>3</sup>G 实时荧光定量基因扩增仪检测 *OsMBF1c、OsMBF1a* 基因的表达量。反应试剂采用 Aidlab 的2×Sybr Green qPCR Mix。扩增体系为cDNA 3  $\mu$ L、SYBR Green 5  $\mu$ L、引物(2.5  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>)各 1  $\mu$ L。反应程序:95 ℃预变性 2 min; 95 ℃变性 15 s, 55 ℃复性 15 s, 72 ℃延伸 20 s, 72 ℃后延伸 3 min, 40 个循环。以水稻 *Ubiquitin* 作为内参基因。每个 样品均设置 3 次重复,以 2<sup>-ΔΔC1</sup>方法分析定量数据。

### 1.5 数据统计分析

使用 Graphpad 软件对不同处理 Cd 浓度、不同 处理时间、不同组织的数据进行差异显著性分析。

### 2 结果与分析

### 2.1 水稻 OsMBF1c 基因结构分析及 CDS 全长克隆

利用 Rice Genome Annotation Project (http:// rice.plantbiology.msu.edu/)查询得知,基因 OsMBF1c 位于水稻全基因组的第六号染色体上,OsMBF1c 基 因 CDS 长度为 468 bp(图 1:A)。基于水稻 cDNA 文库,使用 OsMBF1c-F/OsMBF1c-R 引物扩增 OsMBF1c 基因 CDS 片段,获得大小约为 468 bp 的 目的基因,其共编码 155 个氨基酸。用 1.5%琼脂糖 凝胶电泳检测获得的 PCR 产物,条带大小(图 1:B) 与基因组数据库结果一致。



A. OsMBF1c 基因结构分析; B. OsMBF1c CDS 扩增产物; M. DL2 000 标记; L. OsMBF1c 基因 CDS 扩增产物。 A. Structure analysis of OsMBF1c gene; B. OsMBF1c CDS amplification product; M. DL2 000 Marker; L. CDS amplification product of OsMBF1c gene.

图 1 OsMBF1c 基因结构分析及 CDS 全长扩增产物 Fig. 1 Gene structure analysis of OsMBF1c and amplification product of OsMBF1c CDS

### 2.2 水稻 OsMBF1c 基因的生物信息学分析

使用 ProtParam 工具预测分析 OsMBF1c 蛋白的 基本理化性质。结果显示, OsMBF1c 蛋白含有 155 个氨基酸, 分子式为  $C_{698}$  H<sub>1184</sub> N<sub>224</sub> O<sub>209</sub> S<sub>3</sub>, 分子量为 16.154 kDa, 理论等电点(PI)为 10.67, 表明此蛋白 质呈碱性; 蛋白质不稳定性指数 37.59, 表现为稳定 蛋白; 进一步在 Expasy 网站上利用 ProtScale 软件对 OsMBF1c 蛋白亲/疏水性进行分析, 结果显示, OsMBF1c 蛋白多肽链的第 24 位分值最低, 为 -2.111; 第 126 位分值最高, 为 1.856, 同时 OsMBF1c 亲水区域大于疏水区域, 属于亲水性蛋白(图 2: A); 二级结构预测发现(图 2: B), 在 OsMBF1c 氨基 酸组成中, 以无规则卷曲为主, 占 46.45%, 其次为  $\alpha$ -螺旋, 占 45.16%, β 转角占比最少, 为 4.52%。

### 2.3 水稻 OsMBF1c 基因启动子顺式作用元件分析

通过 TBtools 对 OsMBF1c 顺式作用元件进行 可视化分析,结果如图 3 所示。OsMBF1c 的启动 子序列中含有参与调节厌氧感应的顺式作用元件 ARE、GC-motif、光响应元件 G-box、乙烯响应元件 ERE 等。这些顺式作用元件可能在水稻应对不同 非生物胁迫响应机制中对启动子的调控发挥重要 作用,其启动子中基序的存在说明该基因有可能 参与不同类型非生物胁迫的应对机制。

### 2.4 水稻 OsMBF1c 多重序列比对和同源性分析

将 OsMBF1c 氨基酸序列与水稻、大麦、小麦、 高粱和玉米等 5 种禾本科常见物种中同源基因的 氨基酸序列进行同源性分析 (图 4)。 结果显示



A. 疏水性区域预测; B. 二级结构预测。蓝色. α-螺旋; 红色. 延伸链; 绿色. β-转角; 紫色. 无规则卷曲。
A. Hydrophobic region prediction; B. Secondary structure prediction. Blue. α-helix; Red. Extended chain; Green. β-corner; Purple. Random coil.







TdMBF1a.1	MAGICPURDOWEPIVVRKKAONAADKKDEKAVNAARRSGAEUDTTKKYNAGTNKAAS
HuMBEL 2	MACTOPI PODKED TUUDED ADVIA ADVE DE VAUNAADD SCAPTD TTEEVANACTORA A
R-MORTL	
TUMPS ID	MAGIOPIRDWEPVVVRRAPIAAARDERAVNAARSSAELEINAANNAAR
ZmEDRF1.2	MAGIGPI RODWEPVVVRKKAPTA AAKKIDEKAVNAARRSGAEII ETMEKYNAGMOKAAS
SbMBF1c	MAGIGPIRODWEPVVVRKKAPTAAAKRDEKAVNAARMAGAELETMKKYNAGTNKAAS
OsMBF1a	MAGTOPI RODWEPUVVREKAPITA ALKKOPKA VNA ARRSGARTETMEKVNA GITNKA A S
a lengt	······································
ZmMHF1a	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
ZmEDRF1.3	MAG IGPI VQDWEPVVVPNMAPTA SAMRDENAVIAARHACAEIDTMKKXXAGXXXAA
TdMBF1a.2	MSRTGPIIAD WEPVVVREELENAAAKKDEKAVNAARRAGVDID IA KEHNAGTNKAAF
TAMBELC 1	NOT COME CALL TO OWP DUUL DE ANDRY AND THE ARAUNOAL DT CADUE TUDE A A CITURNA
I GROPINE IC.I	RETURNOVAL AND THE PARTE AND LED ARAT NONE TO RETE TO READ TO BAR
HVMBE 1.1	MPTGRRSSINTTEOWEPVVLKRAKTARAD LASARAVNOALKTGAPVETVRKAAROTEKKA
TdMBF1c.2	MPTGRMSGNITDOWEPVVLRRAKPKAADLESAKAVNQALRTGAPVETVRKVAAGTNKKA1
OsMBF1c	MPTGRLSGNUTODWEPVVLRBITKEKAADLESTRAVNOAMRTGAPVETVRKAAACITN., KI
2mPD#/	METCOLOCULTOBREDUUL DETVENA SELVECKAUNGAL BOCAAUPTUDVCALCHNNULCS
SHERIC I	RETO BEAMAT TO WEET TERRITE FRANCERS SHAT REAL SOMATE TAR AN ONTAR A
ZMEDRF1.1	MPTGRESSMITTEDWEPYYERRIRERAD DESSRAYNOADRSSMAYETYRRSAAOMERHSA
ZmMBF1c.1	MPTGRLSGINITODWEPVVLRRITKOKA ADLKISSKAVNOALKSGAAVETVRKISAAGMMKHST
SbMBF1a	MPTGRLSGNITODWEPVVLRRTREKA ADLKSAKAVNOALKSGAAVETVRKSAAGTNKHFJ
T-MBF1a 1	SCT CINT YELD DITTENT SH
a carable a la . a	
HVMBF1.2	SGTSLNTKRLDDDTENLSH
ZmMBF1b	SGTSLNTKRLDDDTENLALHMIITVYESDVKSVHPLQRVGACFTMVIASAFIYDAGVGD
ZmEDRF1.2	SGTSLNTKRLDDDTENLAH
ChMDE1.	COTOL NEW DED DED TONIAU
SDRBFIC	SGISLAIKKLUDUIERLAAH
OsMBF1a	SGISLNIKRLDDDIESLAH
ZmMBF1a	MIIIIITNSASSRLMLD
ZmEDRE1 3	COTSI NTERT DODDTENTAL
TelMBE1 - 0	CTTCINTVICTDOCTONIAU
TUMBELA.2	
TOMBELC.1	AAAYAAPARKLDEMIEPAGL
HvMBF1.1	A A A VIA A P AIRK LD EMTEPIAGL
TdMBF1c.2	AAAVAAPARKLDEMTEPAGR
OsMOF1.	A A C A A D A D Y T S D O T D D A C I
Varibe AC	
ZMERTC	- AVAPARKLDETTEPAAV
ZmEDRF1.1	AVAPARKLDETTEPAAV
ZmMBF1c.1	TVAPARKLDETTEPAAV
ChMDE1.	OT THADADYT DETTEDIAL
SDMDe 1a	at I MALANCE DETICE ANY TO THE T
the state of the second s	and and a second
TdMBF1a.1	RVS SDIKKNEN OARDEKKTOAOLAOMINERPOVIQEYESCKAIPNNOIISELERALGA
TdMBF1a.1 HvMBF1.2	RVS SELEKNEM OAR LERKMTOACTAOMENERIEOVICEYES GRALENNIOT LERLERALGA RVS SELEKNEM OAR LERKMTOACTAOMENERIEOVICEYES GRALENNIOT LERLERALGA
TdMBF1a.1 HvMBF1.2	RVS SIDLEIKNUM OAR UD KKMT OA OLA OM IN BEIPOVIOEVES GKALDNINGT IG KLERALGA RVS SIDLEKKNUM OAR UD KKMT OA OLA OM IN BEIPOVIOEVES GKALDNINGT IG KLERALGA NA DE SIDLEKKNUM OAR UD KKMT OA OLA OM IN BEIPOVIOEVES GKALDNINGT IG KLERALGA
TdMBF1a.1 HvMBF1.2 ZmMBF1b	RVS SDLEKNUM OARUDR KMTOAOUA OMINERPOVIOEYES GKALPNHOT IG KLERALGA RVS SDLEKNUM OARUDR KMTOAOUA OMINERPOVIOEYES GKALPNHOT IG KLERALGA RVP SDLEKNUM OARUDR KUTOAOUA OMINERPOVIOEYES GP SPNIOQIIG KLERALGA
TdMBF1a.1 HvMBF1.2 ZmMBF1b ZmEDRF1.2	RVS SIDLERNIDMOARLDRIKMTOACOMA OMINERIPOVIOEYES GKALDMINOTIGRILERALGA RVS SIDLERNIDMOARLDRIKMTOACOAOMINERIPOVIOEYES GKALDMINOTIGRILERALGA RVP SIDLERNIDMOARLDRIKTTOACTAOMINERIPOVIOEYES GKALDMINOTIGRILERALGA RVP SIDLERNIDMOARLDRIKLTOACTAOMINERIPOVIOEYES GKALDMIOTIGRILERALGAT
TdMBF1a.1 HvMBF1.2 ZmMBF1b ZmEDRF1.2 SbMBF1c	RVS SDLEKKNIM OARLDRKMTOAOLAOMINEKPOVIOEYES GKALEMNHOTTIG KLERALGA RVS SDLEKKNIM OARLDRKMTOAOLAOMINEKPOVIOEYES GKALEMNOLI (GKLERALGA RVP SDLEKKNIM OARLDRKLTOAOLAOMINEKPOVIOEYES GKALEMNOOI I GKLERALGA RVP SDLEKKNIM OARLDRKLTOAOLAOMINEKPOVIOEYES GKALEMNOOI I GKLERALGA RVP SDLEKKNIM OARLDRKKTOAOLAOMINEKPOVIOEYES GKALEMNOOI I GKLERALGA
TdMBF1a.1 HvMBF1.2 ZmMBF1b ZmEDRF1.2 SbMBF1c OsMBF1a	RVS SIDIFICNED OARLOR KMTOAOON OM NE HPAVIOEYES SKALDNEO(TIGKIERALGA RVS SIDLKKNEM OARLOR KMTOAOAON OM NE HPAVIOEYES SKALDNEO(TIGKIERALGA RVP SIDLKKNEM OARLOR KLTOAON OM NE HPAVIOEYES SKALDNEO(TIGKIERALGT RVP SIDLKKNEM OARLOR KLTOAON OM NE HPAVIOEYES SKALDNEO(TIGKIERALGT RVP SIDLKKNEM OARLOR KLTOAON OM NE HPAVIOEYES SKALDNEO(TIGKIERALGT RVP SIDLKKNEM OARLOR KLTOAON NE HPAVIOEYES SKALDNEO(TIGKIERALGT
TdMBF1a.1 HvMBF1.2 ZmMBF1b ZmEDRF1.2 SbMBF1c OsMBF1a ZmMBF1a	RVS SIDLERNIM OARLDRIKMTOAOLAOMINERIPOVIOEYES GKALENNIOTTGRIERALGA RVS SIDLERNIM OARLDRIKMTOAOLAOMINERIPOVIOEYES GKALENNIOTTGRIERALGA RVP SIDLERNIM OARLDRIKTOAOLAOMINERIPOVIOEYES GKALENNOOTIGRIERALGAT RVP SIDLERNIM OARLDRIKLTOAOLAOMINERIPOVIOEYES GKALENNOOTIGRIERALGAT RVP SIDLERNIM OARLDRIKLTOAOLAOMINERIPOVIOEYES GKALENNOOTIGRIERALGAT RVP SIDLERNIM OARLDRIKLTOAOLAOMINERIPOVIOEYES GKALENNOOTIGRIERALGAT
TdMBF1a.1 HvMBF1.2 ZmMBF1b ZmEDRF1.2 SbMBF1c OsMBF1a ZmMBF1a	RVS SDLKKNUM OARUDRKMTOA OLA OMINEKPOVIOEYES GKALENNOUTIG LERALGA RVS SDLKKNUM OARUDRKMTOA OLA OMINEKPOVIOEYES GKALENNOUTIG LERALGA RVP SDLKKNUM OARUDRKUTOA OLA OMINEKPOVIOEYES GKALENNOUTIG LERALGA RVP SDLKKNUM OARUDRKUTOA OLA OMINEKPOVIOEYES GKALENOUTIG LERALGA RVP SDLKKNUM OARUDRKMTOA OLA OMINEKPOVIOEYES GKALENOUTIG LERALGA RVP SDLKKNUM OARUDRKMTOA OLA OMINEKPOVIOEYES GKALENOUTIG LERALGA RVP SDLKKNUM OARUDRKMTOA OLA OMINEKPOVIOEYES GKALENOUTIG LERALGA
TdMBF1a.1 HvMBF1.2 ZmMBF1b ZmEDRF1.2 SbMBF1c OsMBF1a ZmMBF1a ZmEDRF1.3	RVS SIDLERNUM OAR LDR KMTOA OLA OM INE KIP OVI DEVES GKALENNIOTIG KLERALGA RVS SIDLERNUM OAR LDR KMTOA OLA OM INE KIP OVI DEVES GKALENNIOTIG KLERALGA RVP SIDLERNUM OAR LDR KMTOA OLA OM INE KIP OVI DEVES GKALENNIOTIG KLERALGA RVP SIDLERNUM OAR LDR KLTOA OLA OM INE KIP OVI DEVES GKALENNOOTIG KLERALGAT RVP SIDLERNUM OAR LDR KLTOA OLA OM INE KIP OVI DEVES GKALENNOOTIG KLERALGAT RVP SIDLERNUM OAR LDR KLTOA OLA OM INE KIP OVI DEVES GKALENNOOTIG KLERALGAT RVP SIDLERNUM OAR LDR KHTOA OLA OM INE KIP OVI DEVES GKALENNOOTIG KLERALGAT RVP SIDLERNUM OAR LDR KHTOA OLA OM INE KIP OVI DEVES GKALENNOOTIG KLERALGAT RVP SIDLERNUM OAR LDR KHTOA OLA OM INE KIP OVI DEVES GKALENNOOTIG KLERALGAT RVP SIDLERNUM OAR LDR KHTOA OLA OM INE KIP OVI DEVES GKALENNOOTIG KLERALGAT RVP SIDLERNUM OAR LDR KLTOA OLA OM INE KIP OVI DEVES GKALENNOOTIG KLERALGAT
TdMBF1a.1 HvMBF1.2 ZmMBF1b ZmEDRF1.2 SbMBF1c OsMBF1a ZmEDRF1.3 TdMBF1a.2	RVS SDLKKNUM OARLDRKMTOAOLAOMINEKPOVIOEYES GKALENNOUTIG KLERALGA RVS SDLKKNUM OARLDRKTOAOLAOMINEKPOVIOEYES GKALENNOUTIG KLERALGA RVP SDLKKNUM OARLDRKLTOAOLAOMINEKPOVIOEYES GKALENNOUTIG KLERALGA RVP SDLKKNUM OARLDRKLTOAOLAOMINEKPOVIOEYES GKALENNOUTIG KLERALGA RVP SDLKKNUM OARLDRKKTOAOLAOMINEKPOVIOEYES GKALENNOUTIG KLERALGA RVP SDLKKNUM OARLDRKTOAOLAOMINEKPOVIOEYES GKALENNOUTIG KLERALGA
TdMBF1a.1 HvMBF1.2 ZmMBF1b ZmEDRF1.2 SbMBF1c OsMBF1a ZmEDRF1.3 TdMBF1a.2 TdMBF1c.1	RVS SDIRKNUM OAR LDR KMTOA OLA OMINE HPOVIOEYES GAALDNHOUT IG KLERALGA RVS SDIKKNUM OAR LDR KMTOA OLA OMINE HPOVIOEYES GAALDNHOUT IG KLERALGA RVP SDIKKNUM OAR LDR KMTOA OLA OMINE HPOVIOEYES GAALDNOOT IG KLERALGAT RVP SDIKKNUM OAR LDR KUTOA OLA OMINE HPOVIOEYES GAALDNOOT IG KLERALGAT RVP SDIKKNUM OAR LDR KUTOA OLA OMINE HPOVIOEYES GAALDNOOT IG KLERALGAT RVP SDIKKNUM OAR LDR KUTOA OLA OMINE HPOVIOEYES GAALDNOOT IG KLERALGAT RVP SDIKKNUM OAR LDR KUTOA OLA OMINE HPOVIOEYES GAALDNOOT IG KLERALGAT RVP SDIKKNUM OAR LDR KUTOA OLA OMINE HPOVIOEYES GAALDNOOT IG KLERALGAT RVP SDIKKNUM OAR LDR KUTOA OLA OMINE HPOVIOEYES GAALDNOOT IS LERALGAT RVP SDIKKNUM OAR LDR KUTOA OLA OMINE HPOVIOEYES GAALDNOOT IS LERALGAT RVP SDIKKNUM OAR LDR KUTOA OLA OMINE HPOVIOEYES GAALDNOOT IS LERALGAT RVP SDIKKNUM OAR LDR KUTOA OLA OMINE HPOVIOEYES GAALDNOOT IS LERALGAT RVP SDIKKNUM OAR LDR KUTOA OLA OMINE HPOVIOEYES GAALDNOOT IS LERALGAT RVP SDIKKNUM OAR LDR KUTOA OLA OMINE HPOVIOEYES GAALDNOOT IS LERALGAT RVP SDIKKNUM OAR LDR KUTOA OLA OMINE HPOVIOEYES GAALDNOOT IS SLERALGAT
TdMBF1a.1 HvMBF1.2 ZmMBF1b ZmEDRF1.2 SbMBF1c OsMBF1a ZmMBF1a ZmEDRF1.3 TdMBF1a.2 TdMBF1c.1 HvMBF1.1	RVS SIDLERNIM OARLIDERNT OA OLA OMINERIP OVI DEVES GRATENNIOTT GRIERALGA RVS SIDLERNIM OARLIDERNT OA OLA OMINERIP OVI DEVES GRATENNIOTT GRIERALGA RVP SIDLERNIM OARLIDERNT OA OLA OMINERIP OVI DEVES GRATENNIOTT GRIERALGA RVP SIDLERNIM OARLIDERT OA OLA OMINERIP OVI DEVES GRATENNOOTI GRIERALGAT RVP SIDLERNIM OARLIDERT OA OLA OMINERIP OVI DEVES GRATENOOTI GRIERALGAT RVP SIDLERNIM OARLIDERNT OA OLA OMINERIP OVI DEVES GRATENOOTI GRIERALGAT RVP SIDLERNIM OARLIDERNT OA OLA OMINERIP OVI DEVES GRATENOOTI GRIERALGAT RVP SIDLERNIM OARLIDERNT OA OLA OMINERIP OVI DEVES GRATENOOTI GRIERALGAT RVP SIDLERNIM OARLIDERNT OA OLA OMINERIP OVI DEVES GRATENOOTI GRIERALGAT RVP SIDLERNIM OARLIDERNT OA OLA OMINERIP OVI DEVES GRATENOOTI GRIERALGAT RVP SIDLERNIM OARLIDERNT OA OLA OMINERIP OVI DEVES GRATENOOTI SILERALGAT RVP SIDLERNIM OARLIDERNT OA OLA OMINERIP OVI DEVES GRATENOOTI SILERALGAT RVP SIDLERNIM OARLIDERNT OA OLA OLA OMINERIP OVI DEVES GRATENOOTI SILERALGAT RVP SIDLERNIM OARLIDERNT OA OLA OLA OLA BERDEVI DEVES GRATENOOTI SILERALGAT
TdMBF1a.1 HvMBF1.2 ZmMBF1b ZmEDRF1.2 SbMBF1c OsMBF1a ZmMBF1a ZmEDRF1.3 TdMBF1a.2 TdMBF1c.1 HvMBF1.1 2	RV S SD L KKNLM O AR LDR KMT O'A O'A O'M IN B KP O'T I DEVES SKALD MHOT TG KLERAD GA RV S SD L KKNLM O'AR LDR KMT O'A O'A O'M IN B KP O'T I DEVES SKALD MHOT TG KLERAD GA RV P SD L KKNLM O'AR LDR KMT O'A O'A O'M IN B KP O'T I DEVES SKALD MHOT TG KLERAD GA RV P SD L KKNLM O'AR LDR KLT O'A O'A O'M IN B KP O'T I DEVES SKALD MOOT TG KLERAD GA RV P SD L KKNLM O'AR LDR KHT O'A O'A O'M IN B KP O'T I DEVES SKALD MOOT TG KLERAD GA RV P SD L KKNLM O'AR LDR KHT O'A O'A O'M IN B KP O'T I DEVES SKALD MOOT TG KLERAD GA RV P SD L KKNLM O'AR LDR KHT O'A O'A O'M IN B KP O'T I DEVES SKALD MOOT TG KLERAD GA RV P SD L KKNLM O'AR LDR KHT O'A O'A O'M IN B KP O'T I DEVES SKALD MOOT TG KLERAD GA RV P SD L KKNLM O'AR LDR KLT O'A O'A O'M IN B KP O'T I DEVES SKALD MOOT TS KLERAD GA RV P SD L KKNLM O'AR LDR KLT O'A O'A O'M IN B KP O'T I DEVES SKALD MOOT TS KLERAD GA RV P SD L KKNLM O'AR LDR KLT O'A O'A O'M IN B KP O'T I DEVES SKALD MOOT TS KLERAD GA RV P SD L KKNLM O'AR LDR KLT O'A O'A O'M IN B KP O'T I DEVES SKALD MOOT TS KLERAD GA RV P SD L KKNLM O'AR LDR KLT O'A O'A O'M IN B KP O'T I DEVES SKALD MOOT TS KLERAD GA RV P SD L KKNLM O'AR LDR KLT O'A O'A O'M IN B KP O'T I DEVES SKALD MOOT TS KLERAD GA RV G GD V'RAATIO KAR VAR GWS O'A E LA KR'N B BIA'O'T O'DEVES SKALD WOO'A V LA D'B BAA'G T RV G GD V'RAATIO KAR VAR GWS O'A E LA KR'N B BIA'O'T O'DEVES SKALD WOO'A V LA D'B BAA'G T RV G GD V'RAATIO KAR VAR GWS O'A E LA KR'N B BIA'O'T O'DEVES SKALD B VO'A V LA D'B BAA'G T RV G GD V'RAATIO KAR VAR GWS O'A E LA KR'N B BIA'O'T O'DEVES SKALD B VO'A'V LA SKERAD B V'
TdMBF1a.1 HvMBF1.2 ZmMBF1b ZmEDRF1.2 SbMBF1c OsMBF1a ZmMBF1a ZmEDRF1.3 TdMBF1a.2 TdMBF1c.1 HvMBF1.1 TdMBF1c.2 CalMF1c.2	RVS SDLKKNLMOARLDR KMTOAOLAOMINEKPOVIOEYES GKALEMHOTTG KLERALGA RVS SDLKKNLMOARLDR KMTOAOLAOMINEKPOVIOEYES GKALEMHOTTG KLERALGA RVP SDLKKNLMOARLDR KMTOAOLAOMINEKPOVIOEYES GKALEMHOTTG KLERALGA RVP SDLKKNLMOARLDR KMTOAOLAOMINEKPOVIOEYES GKALEMOOTIG CLERALGA RVP SDLKKNLMOARLDR KMTOAOLAOMINEKPOVIOEYES GKALEMOOTIG CLERALGA RVP SDLKKNLMOARLDR KMTOAOLAOMINEKPOVIOEYES GKALEMOOTIG CLERALGA RVP SDLKKNLMOARLDR KMTOAOLAOMINE KPOVIOEYES GKALEMOOTIG CLERALGA RVP SDLKKNLMOARLDR KLTOAOLAOMINE KPOVIOEYES GKALEMOOTIG CLERALGA RVP SDLKKNLMOARLDR KLTOAOLAOMINE KPOVIOEYES GKALEMOOTIG CLERALGA RVP SDLKKNLMOARLDR KLTOAOLAOMINE KPOVIOEYES GKALEMOOTIG CLERALGA RVP SDLKKNLMOAR CLAGACAAOLA KRINEKPOVIOEYES GKALEMOOTIG CLERALGA RVP SDLKKNLMOARTDR KLTOAOLAOMINE KPOVIOEYES GKALEMOOTIG CLERALGA RVP SDLKKNCMG ARVANGWS OAELAK KRINEKPOVIOEYES GKALEMOOTIG CLERALGA GT
TdMBF1a.1 HvMBF1b ZmEDRF1b ZmEDRF1.2 SbMBF1a ZmMBF1a ZmEDRF1.3 TdMBF1a.2 TdMBF1c.1 HvMBF1.1 TdMBF1c.2 OsMBF1c	RVS SID LEKNILMOARLIDIK KMITOAO UA OMINE KIPOVIO EYES SIKAL DINHOITI GILERA JGA RVS SID LEKNILMOARLIDIK KMITOAO UA OMINE KIPOVIO EYES SIKAL DINHOITI GILERA JGA RVP SID LKKNILMOARLIDIK KITOAO UA OMINE KIPOVIO EYES SIKAL DINHOITI GILERA JGA RVP SID LKKNILMOARLIDIK KITOAO UA OMINE KIPOVIO EYES SIKAL DINHOITI GILERA JGA RVP SID LKKNILMOARLIDIK KITOAO UA OMINE KIPOVIO EYES SIKAL DINHOITI GILERA JGA RVP SID LKKNILMOARLIDIK KITOAO UA OMINE KIPOVIO EYES SIKAL DINHOITI GILERA JGA RVP SID LKKNILMOARLIDIK KITOAO UA OMINE KIPOVIO EYES SIKAL DINHOITI GILERA JGA RVP SID LKKNILMOARLIDIK KITOAO UA OMINE KIPOVIO EYES SIKAL DINHOITI SILERA JGA RVP SID LKKNILMOARLIDIK KITOAO UA OMINE KIPOVIO EYES SIKAL DINHOITI SILERA JGA RVP SID LKKNILMOARLIDIK KITOAO UA OMINE KIPOVIO EYES SIKAL DINHOITI SILERA JGA RVP SID LKKNILMOARLIDIK KITOAO UA OMINE KIPOVIO EYES SIKAL DINHOITI SILERA JGA RVP SID LKKNILMOARLIDIK KITOAO UA OMINE KIPOVIO EYES SIKAL DINHOOITI SILERA JGA RVP SID LKKNILMOARLIDIK KITOAO UA OMINE KIPOVIO EYES SIKAL DINHOOITI SI SILERA JGA RVP SID LKKNILMOARLIDIK KITOAO UA OMINE KIPOVIO EYES SIKAL DINHOOITI SI DI RA JERA JGA RVP SID LKKNILMOARLIDIK KITOAO UA OMINE KIPOVIO EYES SIKAL DINHOOITI SI DI RA JERA JGA RVF GGIV PIAAJIOK ARVAN GWISOAE LA KRINE RA OVIO EYES SIKAL DINOOITI SI DI RA JERA JGA RVF GGIV PIAAJIOK ARVAN GWISOAE LA KRINE RA OVIO EYES SIKAL DIVOAVI LA MERA JE V RVF GALVINA AN OKARVAN GWISOAE LA KRINE RA OVIO EYES SIKAL DIVOAVI LA MERA JE V RVF GALVINA AN OKARVAN GWISOAE LA KRINE RA OVIO EYES SIKAL DIVOAVI LA MERA JE V RVF GALV PIAAJIOK ARVAN GWISOAE LA KRINE RA OVIO EYES SIKAL DIVOAVI VIA LA MERA JE V
TdMBF1a.1 HvMBF1.2 ZmMBF1b ZmEDRF1.2 SbMBF1c OsMBF1a ZmEDRF1.3 TdMBF1a.2 TdMBF1c.1 HvMBF1c.1 HvMBF1c.1 CdMBF1c.2 OsMBF1c CsMBF1c	RVS SIDLERNIM OARLDE KMTOAO DA OMINERIPOVIO EYES SIA U DHIOTIG KLERALGA RVS SIDLERNIM OARLDE KMTOAO DA OMINERIPOVIO EYES SIA U DHIOTIG KLERALGA RVP SIDLERNIM OARLDE KMTOAO DA OMINERIPOVIO EYES SIA U DHIOTIG KLERALGA RVP SIDLERNIM OARLDE KLTOAO DA OMINERIPOVIO EYES SIA U DHIOTIG KLERALGAT RVP SIDLERNIM OARLDE KLTOAO DA OMINERIPOVIO EYES SIA U DHIOTIG KLERALGAT RVP SIDLERNIM OARLDE KLTOAO DA OMINERIPOVIO EYES SIA U DHIOTIG KLERALGAT RVP SIDLERNIM OARLDE KLTOAO DA OMINERIPOVIO EYES SIA U DHIOTIG KLERALGAT RVP SIDLERNIM OARLDE KLTOAO DA OMINERIPOVIO EYES SIA U DHIOTIG KLERALGAT RVP SIDLERNIM OARLDE KLTOAO DA OMINERIPOVIO EYES SIA U DHIOTIG KLERALGAT RVP SIDLERNIM OARLDE KLTOAO DA OMINERIPOVIO EYES SIA U DHIOTIS KLERALGAT RVP SIDLERNIM OARLDE KLTOAO DA OMINERIPOVIO EYES SIA U DHIOTIS KLERALGAT RVP SIDLERNIM OARLDE KLTOAO DA OMINERIPOVIO EYES SIA U DHIOTIS KLERALGAT RVP SIDLERNIM OAR KUS SIA EA KRINERIAO VO EYES SIA U DHIOTIS KLERALGAT RVP SIDLERNIM OAR VARGE SIA EA KRINERIAOVIO EYES SIA U DHIOTIS KLERALGAT RVP SIDLERNAL OKAR VARGE SIA EA KRINERIAOVIO EYES SIA U DHIOTIS KLERALE V RVG GIDVRAAJOKAR VARGE SIA EA KRINERIAOVIO EYES SIA U DHIOTILAR ERALE V RVG GIDVRAAJOKAR VARGE SIA EA KRINERIAOVIO EYES SIA V DHIOTILAR ERALE V RVG GIDVRAAJOKAR VARGE SIA EA KRINERIAOVIO EYES SIA V DHIOTILAR ERALE V RVG GIDVRAAJOKAR VARGE SIA EA KRINERIAOVIO EYES SIA V DHIOTILAR ERALE V RVG GIDVRAAJOKAR VARGE SIA EA KRINERIAOVIO EYES SIA V DHIOTILAR ERALE V RVG GIDVRAAJOKAR VARGE SIA EA KRINERIAOVIO EYES SIA V DHIOTILAR ERALE V RVG GIDVRAAJOKAR VARGE SIA EA KRINERIAOVIO EYES SIA V DHIOTILAR ERALE V RVG GIDVRAAJOKAR VARGE SIA EA KRINERIAOVIO EYES SIA V DHIOTILAR ERALE V RVG GIDVRAAJOKAR VARGE SIA EA KRINERIAOVIO EYES SIA V DHIOTIAN ERALE V RVG AREVRICALOKAR VARGE SIA EA KRINERIAOVIO EYES SIA V DHIOTIAN ERALE V RVG AREVRICALOKAR VARGE SIA EA KRINERIAOVIO EYES SIA V DHIOTIAN ERALE V
TdMBF1a.1 HvMBF1b ZmEDRF1b ZmEDRF1.2 SbMBF1a ZmEDRF1a ZmEDRF1.3 TdMBF1a.2 TdMBF1a.1 HvMBF1c.1 HvMBF1c.1 MBF1c.2 OsMBF1c ZmERTC ZmERTC ZmERF1.1	RVS SIDLERNILMOARLIDIK KMTOAOOLA OMINE HIP AVI DEVESSIONA UD HIDDITIG THERALGA RVS SIDLERNILMOARLIDIK KMTOAOOLA OMINE HIP AVI DEVESSIONA UD HIDDITIG THERALGA RVP SIDLERNILMOARLIDIK KMTOAOOLA OMINE HIP AVI DEVESSIONA UD HIDDITIG THERALGA RVP SIDLERNILMOARLIDIK KHTOAOOLA OMINE HIP AVI DEVESSIONA UD HIDDITIG THERALGA RVP SIDLERNILMOARLIDIK KHTOAOOLA OMINE HIP AVI DEVESSIONA UD HIDDITIG THERALGA RVP SIDLERNILMOARLIDIK KHTOAOOLA OMINE HIP AVI DEVESSIONA UD HIDDITIG THERALGA RVP SIDLERNILMOARLIDIK KHTOAOOLA OMINE HIP AVI DEVESSIONA UD HIDDITIG THERALGA RVP SIDLERNILMOARLIDIK KHTOAOOLA OMINE HIP AVI DEVESSIONA UD HIDDITIS THERALGA RVP SIDLERNILMOARLIDIK KHTOAOLA OMINE HIP AVI DEVESSIONA UD HIDDITIS THERALGA RVP SIDLERNILMOARLIDIK KHTOAOLA OMINE HIP AVI DEVESSIONA UD HIDDITIS THERALGA RVP SIDLERNILMOARLIDIK KHTOAOLA OMINE HIP AVI DEVESSIONA UD HIDDITIS THERALGA RVP SIDLERNILMOARLIDIK KHTOAOLA OMINE HIP AVI DEVESSIONA UD HIDDITIS THERALGA RVP SIDLERNILMOARLIDIK KHTOAOLA OLA OMINE HIP AVI DEVESSIONA UD HIDDITIS THERALGA RVP SIDLERNILMOARLIDIK KHTOAOLA OLA OMINE HIP AVI DEVESSIONA UD HIDDITIS THERALGA RVP SIDLERNILMOARLIDIK KHTOAOLA OLA OMINE HIP AVI DEVESSIONA UD HIDITIS THERALGA RVP SIDLERNILMOARLIDIK KHTOAOLA OLA OLA DI HIP SIDLEVESSIONA UD HIDITIS THERALGA RVP SIDLERNILMOARLIDIK KHTOAOLA OLA OLA DI HIP SIDLEVESSIONA UD VICAVILA SHERALGA RVP SIDLERNILMOARLIDIK KHTOAOLA OLA DI HIP SIDLEVESSIONA UD VICAVILA SHERALGA RVP SIDLERNILMOARLIDIK KHTOAOLA OLA DI HIP SIDLEVESSIONA UD VICAVILA SHERALGA RVP SIDLERNILMOARLIDIK ARVANGKISOA HIP KING HAAOVIN DEVESSIONA VID VICAVILA SHERALGA RVP SIDLERNI AND KARVANGKISOA HIP KING HAAOVIN DEVESSIONA VID VICAVILA SHERALE VI RVF GARV VRAANI OKARVANGKISOA HIP KING HAAOVIN DEVESSIONA VID VICAVILA SHERALE VI RVF GARV VRAANI OKARVANGKISOA HIP KING HAAOVIN DEVESSIONA VID VICAVILA SHERALE VI RVA VEVRAANI OKARVANGKISOA HIP KING HAAOVIN DEVESSIONA VID VICAVILA SHERALE VI
TdMBF1a.1 HvMBF1b ZmEDRF1b ZmEDRF1.2 SbMBF1c OsMBF1a ZmEDRF1.3 TdMBF1a.2 TdMBF1c.1 HvMBF1c.1 HvMBF1c.1 TdMBF1c.2 OsMBF1c ZmERTC ZmERTC ZmERT1.1 ZmMBF1c.1	RVS SID LKKNILM OAR LDR KMT OA OLA OM IN BKP OVI DEVES SKALD MHOT TG KLERAD GA RVS SID LKKNILM OAR LDR KMT OA OLA OM IN BKP OVI DEVES SKALD MHOT TG KLERAD GA RVP SID LKKNILM OAR LDR KMT OA OLA OM IN BKP OVI DEVES SKALD MHOT TG KLERAD GT RVP SID LKKNILM OAR LDR KLT OA OLA OM IN BKP OVI DEVES SKALD NOOT TG KLERAD GT RVP SID LKKNILM OAR LDR KHT OA OLA OM IN BKP OVI DEVES SKALD NOOT TG KLERAD GT RVP SID LKKNILM OAR LDR KHT OA OLA OM IN BKP OVI DEVES SKALD NOOT TG KLERAD GT RVP SID LKKNILM OAR LDR KHT OA OLA OM IN BKP OVI DEVES SKALD NOOT TG KLERAD GT RVP SID LKKNILM OAR LDR KHT OA OLA OM IN BKP OVI DEVES SKALD NOOT TG KLERAD GT RVP SID LKKNILM OAR LDR KHT OA OLA OM IN BKP OVI DEVES SKALD NOOT TG KLERAD GT RVP SID LKKNILM OAR LDR KLT OA OLA OM IN BKP OVI DEVES SKALD NOOT TG KLERAD GT RVP SID LKKNILM OAR LDR KLT OA OLA OM IN BKP OVI DEVES SKALD NOOT TG KLERAD GT RVP SID LKKNILM OAR LDR KLT OA OLA OM IN BKP OVI DEVES SKALD NOOT TG KLERAD GT RVP SID LKKNILM OAR LDR KLT OA OLA OM IN BKP OVI DEVES SKALD NOOT TG KLERAD GT RVP SID LKKNILM OAR LDR KLT OA OLA OM IN BKP OVI DEVES SKALD NOOT TG KLERAD GT RVP SID LKKNILM OAR LDR KLT OA OLA OM IN BKP OVI DEVES SKALD NOOT TG KLERAD GT RVP SID LKKNILM OAR LDR KLT OA OLA OM IN BKP OVI DEVES SKALD NOOT TG KLERAD GT RVP SID LKKNILM OAR VAN GWS OAE LA KRIND HA OVI DEVES SKALD NOOT TA SKERAD E V RVG GB VRAAT OK AR VAN GWS OAE LA KRIND HA OVI DEVES SKALD VOOL VLA UAR BERAD E V RVG VRAAT OK AR VAN GWS OAE LA KRIND BLA OVI DEVES SKALD VOOL VLA UAR BERAD E V RVG VRAAT OK AR VAN GWS OAE LA KRIND BLA OVI DEVES SKALD VOOL VLA UAR BERAD E V RVG VRAAT OK AR VAN GWS OAE LA KRIND BLA OVI DEVES SKALD VOOL VLA UAR BERADE V RVG VRAAT OK AR VAN GWS OAE LA KRIND BLA OVI DEVES SKALD VOOL VLA UAR BERADE V RVG VRAAT OK AR VAN GWS OAE LA KRIND BLA OVI DEVES SKALD VOOL VLA UAR BERADE V RVA VEVRIAAT OK AR VAN GWS OAE LA KRIND BLA OVI DEVES SKALD VOOL VLA UAR BERADE V RVA VEVRIAAT OK AR VAN GWS OAE LA KRIND BLA OVI DEVES SKALD VOOL VLA UAR BERADE V
TdMBF1a.1 HvMBF1.2 ZmMBF1b ZmEDRF1.2 SbMBF1a ZmEDRF1.3 TdMBF1a.2 TdMBF1c.1 HvMBF1.1 TdMBF1c.2 OsMBF1c ZmERFC ZmEDRF1.1 ZmMBF1c.1	RVS SIDLERNIDMOARIDE KMTOAO OLAO MINERIPOVIO EYES CIALE MINOTIG LIERALGA RVS SIDLERNIMOARIDE KMTOAO OLAO MINERIPOVIO EYES CIALE MINOTIG LIERALGA RVP SIDLERNIMOARIDE KLTOAO OLAO MINERIPOVIO EYES CIALE MINOTIG LIERALGA RVP SIDLERNIMOARIDE KLTOAO OLAO MINERIPOVIO EYES CIALE NOOTIG LIERALGA RVP SIDLERNIMOARIDE KLTOAO OLAO MINERIPOVIO EYES CIALE NOOTI IS LERALGA RVP SIDLERNIMOARIDE KLTOAO OLAO MINERIPOVIO EYES CIALE NOOTI IS LERALGA RVP SIDLERNIMOARIDE KLTOAO OLAO MINERIPOVIO EYES CIALE NOOTI IS LERALGA RVP SIDLERNIMOARIDE KLTOAO OLAO KINERIPOVIO EYES CIALE NOOTI IS LERALGA RVP SIDLERNIMOARIDE KLTOAO OLAO LINERIPOVIO EYES CIALE NOOTI IS LERALGA RVG GIDVRIAAI OKARVANG GUS OAELAK RINERIAOVO OEYES CIALE NOOTI IS LERALGEV RVG GIDVRIAAI OKARVANG GUS OAELAK RINERAOVO OEYES CIALE NOOVOAVILA SHERALEV RVG GIDVRIAAI OKARVANG GUS OAELAK RINERIAOVO OEYES CIALE VOOLAVILA SHERALEV RVG VOOLVIAAI OKARVANG GUS OAELAK RINERIAOVO OEYES CIALE VOOLAVILA SHERALEV RVA VEVERIAAI OKARVANG GUS OAELAK RINERIAOVO OEYES CIALE VOOLAVILA SHERALEV RVA VEVERIAAI OKARVANG GUS OAELAK RINERIAOVO OEYES CIALE VOOLAVILA SHERALEV RVA VEVERIAAI OKARVANG GUS OAELAK RINERIAOVO OEYES CIALE VOOLAVILA SHERALEV RVA VEVERIAAI OKARVANG GUS OAELAK RINERIAOVO OEYES CIALEVIS CIALE VOOLAVILA SHERALEV RVA VEVERIAAI OKARVANG GUS OAELAK RINERIAOVO OEYES CIALE VOOLAVILA SHERALEV RVA VEVERIAAI OKARVANG GUS OAELAK RINERIAOVO OEYES CIALE AND COAVILA SHERALEV RVA VEVERIAAI OKARVANG GUS OAELAK RINERIA EVER SHAO VOOLEYES CIALE PAO AO VIA VIA SHERALEV RVA VEVERIAAI OKARVANG GUS OAELAK RINERIAOVO OEYES CIALE AND COAVILA SHERALEV
TdMBF1a.1 HvMBF1b ZmEDRF1b ZmEDRF1c OsMBF1a ZmEDRF1a ZmEDRF1a TdMBF1a.2 TdMBF1c.1 HvMBF1c.1 HvMBF1c.2 OsMBF1c ZmERTC ZmERTC ZmERTC.1 SbMBF1a	RVS SIDIFIC NUM OARLID KATTOAOTAO MINERIPOVIO EYES CALE DANNOT TO CLERADGA RVS SIDIFIC NUM OARLID KATTOAOTAO MINERIPOVIO EYES CALE DANNOT TO CLERADGA RVP SIDIFIC NUM OARLID KATTOAOTAO MINERIPOVIO EYES CALE DANOT TO CLERADGA RVP SIDIFIC NUM OARLID KATTOAOTAO MINERIPOVIO EYES CALE DANOT TO CLERADGA RVP SIDIFIC NUM OARLID KATTOAOTAO MINERIPOVIO EYES CALE DANOT TO CLERADGA RVP SIDIFIC NUM OARLID KATTOAOTAO MINERIPOVIO EYES CALE DANOT TO CLERADGA RVP SIDIFIC NUM OARLID KATTOAOTAO MINERIPOVIO EYES CALE DANOT TO CLERADGAT RVP SIDIFIC NUM OARLID KATTOAOTAO MINERIPOVIO EYES CALE DANOT TO CLERADGAT RVP SIDIFIC NUM OARLID KATTOAOTAO MINERIPOVIO EYES CALE DANOT TO CLERADGAT RVP SIDIFIC NUM OARLID KATTOAOTAO MINERIPOVIO EYES CALE DANOT TO CLERADGAT RVP SIDIFIC NUM OARLID KATTOAOTAO MINERIPOVIO EYES CALE DANOT TO CLERADGAT RVP SIDIFIC NUM OARLID KATTOAOTAO TAO MINERIPOVIO EYES CALE DANOT TO CLERADGAT RVP SIDIFIC NUM OARLID KATTOAOTAO TAO MINERIPOVIO EYES CALE DANOT TO CLERADGAT RVP SIDIFIC NUM OARLID KATTOAOTAO TAO TAO TAO TAO TAO TAO TAO TA
TdMBF1a.1 HvMBF1.2 ZmMBF1b ZmEDRF1.2 SbMBF1c OsMBF1a ZmEDRF1.3 TdMBF1a.2 TdMBF1c.1 HvMBF1.1 TdMBF1c.2 OsMBF1c ZmEDRF1.1 ZmEDRF1.1 SbMBF1a	RVS SDIFKINIM OAR LDR KMT OA OLA OMINE KIP OVI DEVES GAAL DINHOT IG KLERALGA RVS SDIFKINIM OAR LDR KMT OA OLA OMINE KIP OVI DEVES GAALDINHOT IG KLERALGA RVP SDIFKINIM OAR LDR KMT OA OLA OMINE KIP OVI DEVES GAALDINOOT IG KLERALGAT RVP SDIFKINIM OAR LDR KLT OA OLA OMINE KIP OVI DEVES GAALDINOOT IG KLERALGAT RVP SDIFKINIM OAR LDR KMT OA OLA OMINE KIP OVI DEVES GAALDINOOT IG KLERALGAT RVP SDIFKINIM OAR LDR KMT OA OLA OMINE KIP OVI DEVES GAALDINOOT IG KLERALGAT RVP SDIFKINIM OAR LDR KMT OA OLA OMINE KIP OVI DEVES GAALDINOOT IG KLERALGAT RVP SDIFKINIM OAR LDR KMT OA OLA OMINE KIP OVI DEVES GAALDINOOT IG KLERALGAT RVP SDIFKINIM OAR LDR KMT OA OLA OMINE KIP OVI DEVES GAALDINOOT IS SLERALGAT RVP SDIFKINIM OAR LDR KMT OA OLA OMINE KIP OVI DEVES GAALDINOOT IS SLERALGAT RVP SDIFKINIM OAR LDR KMT OA OLA OMINE KIP OVI DEVES GAALDINOOT IS SLERALGAT RVP SDIFKINIM OAR LDR KLT OA OLA OMINE KIP OVI DEVES GAALDINOOT IS SLERALGAT RVP SDIFKINIM OAR LDR KLT OA OLA OMINE KIP OVI DEVES GAALDINOOT IS SLERALGAT RVP SDIFKINIM OAR VANGAN OAR LAK KINE KIP OVI DEVES GAALDINOOT IS SLERALGAT RVP SDIFKINIM OAR VANGWS OAF LAK KINE KIP OVI DEVES GAALDINOOT IS SLERALGAT RVF GDV RAALO KAR VANGWS OAF LAK KINE KIP OVI DEVES GAALDINOOT IS SLERALE V RVG GDV RAALO KAR VANGWS OAF LAK KINE KIP OVI DEVES GAALDINOOT VOAV LA SKERALE V RVG GDV RAALO KAR VANGWS OAF LAK KINE KIP OVI DEVES GAALDINOOT VOAV LA SKERALE V RVA VEV RAALO KAR VANGWS OAF LAK KINE KIP OVI DEVES GAALDINOOT VOAV LA SKERALE V RVA VEV RAALO KAR VANGWS OAF LAK KINE KIP OVI DEVES GAALDINOOT VANGWALA SKERALE V RVA VEV RAALO KAR VANGWS OAF LAK KINE KAOV OEVES SAALDINOOT VANGWALA SKERALE V RVA VEV RAALO KAR VANGWS OAF LAK KINE KAOV OEVES SAALDAN VOAV LA SKERALE V RVA VEV RAALO KAR VANGWS OAF LAK KINE KAOV OEVES SAALDAN VANGWALA SKERALE V RVA VEV RAALO KAR VANGWS OAF LAK KINE KAOV OEVES SAALDAN VANGWALA SKERALE V RVA VEV RAALO KAR VANGWS OAF LAK KINE KAOV OEVES SAALDAN ANDAN VLA SKERALE V RVA VEV RAALO KAR VANGWS OAF LAK KINE KAOV OEVES SAALDAN ANDAN VLA SKERALE V
TdMBF1a.1 HvMBF1b ZmEDRF1b ZmEDRF1.2 SbMBF1c OsMBF1a ZmEDRF1.3 TdMBF1a.2 TdMBF1c.1 HvMBF1.1 TdMBF1c.2 OsMBF1c ZmEDRF1.1 ZmEDRF1.1 SbMBF1a.1	RVS SDLRKNILM OARLDR KMT OA OLA OMINERPOVIOEYES CATENHOUT IG LERALGA RVS SDLRKNILM OARLDR KMT OA OLA OMINERPOVIOEYES CATENHOUT IG LERALGA RVP SDLKKNILM OARLDR KHT OA OLA OMINERPOVIOEYES CATENHOUT IG LERALGA RVP SDLKKNILM OARLDR KLT OA OLA OMINERPOVIOEYES CATENHOUT IG LERALGAT RVP SDLKKNILM OARLDR KLT OA OLA OMINERPOVIOEYES CATENHOUT IG LERALGAT RVP SDLKKNILM OARLDR KLT OA OLA OMINERPOVIOEYES CATENHOOT IG LERALGAT RVP SDLKKNILM OARLDR KLT OA OLA OMINERPOVIOEYES CATENHOOT IG LERALGAT RVP SDLKKNILM OARLDR KLT OA OLA OMINERPOVIOEYES CATENHOOT IG LERALGAT RVP SDLKKNILM OARLDR KLT OA OLA OMINERPOVIOEYES CATENHOOT IS LERALGAT RVP SDLKKNILM OARLDR KLT OA OLA OMINERPOVIOEYES CATENHOOT IS LERALGAT RVP SDLKKNILM OARLDR KLT OA OLA OMINERPOVIOEYES CATENHOOT IS LERALGAT RVP SDLKKNILM OARLDR KLT OA OLA OMINERPOVIOEYES CATENDOOT IS LERALGAT RVP SDLKKNILM OARLDR KLT OA OLA OMINERPOVIOEYES CATENNOOT IS LERALGAT RVP SDLKKNILM OARLDR KLT OA OLA OMINERPOVIOEYES CATENNOOT IS LERALGAT RVF GDV RAAI OKARVAR GWS OAELAKRINERA OV OEYES CATEN VOOL VLA VLA MERALE V RVG GDV RAAI OKARVAR GWS OAELAKRINERA OV OEYES CAN VEVOAVLAR MERALE V RVG GDV RAAI OKARVAR GWS OAELAKRINERA OV OEYES CAN VEVOAVLAR MERALE V RVG AEV ROAI OKARVAR GWS OAELAKRINERA OV OEYES CAN VEVOAVLAR MERALE V RVG AEV ROAI OKARVAR GWS OAELAKRINERA OV OEYES CAN VEVOAVLAR MERALE V RVG AEV RAAI OKARVAR GWS OAELAKRINERA OV OEYES CAN VEVOAVLAR MERALE V RVA VEVRAAI OKARVAR GWS OAELAKRINERA OV OEYES CAN VEVOAVLAR MERALE V RVA VEVRAAI OKARVAR GWS OAELAKRINERA OV OEYES CAN VEVOAVLAR MERALE V RVA VEVRAAI OKARVAR GWS OAELAKRINERA OV OEYES CAN VEVOAVLAR MERALE V RVA VEVRAAI OKARVAR GWS OAELAKRINERA OV OEYES CAN VEVOAVLAR MERALE V RVA VEVRAAI OKARVAR GWS OAELAKRINERA OV OEYES CAN PAOAVLAR MERALE V RVA VEVRAAI OKARVAR GWS OAELAR RINERA OV OEYES CAN PAOAVLAR MERALE V RVA VEVRAAI OKARVAR GWS OAELAR RINERA OV OEYES CAN PAOAVLAR MERALE V RVA VEVRAAI OKARVAR GWS OAELAR RINERA OV OEYES CAN PAOAVLAR MERALE V RVA VEVRAAI OKARVAR GWS OAELAR RINERA OV OEYES CAN PAOAVLAR MERALE V
TdMBF1a.1 HvMBF1.2 ZmMBF1b ZmEDRF1.2 SbMBF1c OsMBF1a ZmEDRF1.3 TdMBF1a.2 TdMBF1c.1 HvMBF1.1 TdMBF1c.1 HvMBF1c.1 ZmERTC ZmERTC ZmERTC1 ZmERT1.1 ZmMBF1a.1 HvMBF1.2	RVS SDIFKINIM OAR LDR KMT OA OLA OMINE KPOVIOEYES (KALEMINOT IG KLERALGA RVS SDIFKINIM OAR LDR KMT OA OLA OMINE KPOVIOEYES (KALEMINOT IG KLERALGA RVS SDIFKINIM OAR LDR KMT OA OLA OMINE KPOVIOEYES (KALEMINOT IG KLERALGAT RVP SDIFKINIM OAR LDR KIT OA OLA OMINE KPOVIOEYES (KALEMINOT IG KLERALGAT RVP SDIFKINIM OAR LDR KHT OA OLA OMINE KPOVIOEYES (KALEMIOT IG KLERALGAT RVP SDIFKINIM OAR LDR KHT OA OLA OMINE KPOVIOEYES (KALEMIOT IG KLERALGAT RVP SDIFKINIM OAR LDR KHT OA OLA OMINE KPOVIOEYES (KALEMIOT IG KLERALGAT RVP SDIFKINIM OAR LDR KHT OA OLA OMINE KPOVIOEYES (KALEMIOT IG KLERALGAT RVP SDIFKINIM OAR LDR KHT OA OLA OMINE KPOVIOEYES (KALEMIOT IG KLERALGAT RVP SDIFKINIM OAR LDR KHT OA OLA OMINE KPOVIOEYES (KALEMIOT IG KLERALGAT RVP SDIFKINIM OAR LDR KHT OA OLA OMINE KPOVIOEYES (KALEMIOT IS KLERALGAT RVP SDIFKINIM OAR LDR KHT OA OLA OMINE KPOVIOEYES (KALEMIOT IS KLERALGAT RVP SDIFKINIM OAR LDR KHT OA OLA OMINE KPOVIOEYES (KALEMIOT IS KLERALGAT RVP SDIFKINIM OAR LDR KIT OA OLA OMINE KPOVIOEYES (KALEMIOT IS KLERALGAT RVP SDIFKINIM OAR VAN GWS OAFLAK RISERAV VOEYES (KALEMIOT IS KLERALGAT RVP GDV RAAJOK AR VAN GWS OAFLAK RISERAV VOEYES (KALEMIOT IS KLERALE V RVG GDV RAAJOK AR VAN GWS OAFLAK RISERAV VOEYES (KALEMIOT IS VOAVLAR BERALE V RVG GDV RAAJOK AR VAN GWS OAFLAK RISERAV VOEYES (KALEMIOT IS VOAVLAR BERALE V RVA VEVRAAJOK AR VAN GWS OAFLAK RISERAOV VOEYES (KALEMIOT IA SERALE V RVA VEVRAAJOK AR VAN GWS OAFLAK RISERAOV VOEYES (KALEMIOAVLAR BERALE V RVA VEVRAAJOK AR VAN GWS OAFLAK RISERAOV VOEYES (KALEMIOAVLAR BERALE V RVA VEVRAAJOK AR VAN GWS OAFLAK RISERAOV VOEYES (KALEMIOAVLAR BERALE V RVA VEVRAAJOK AR VAN GWS OAFLAK RISERAOV VOEYES (KALEMIOAVLAR BERALE V RVA VEVRAAJOK AR VAN GWS OAFLAK RISERAOV VOEYES (KALEMIOAVLAR BERALE V RVA VEVRAAJOK AR VAN GWS OAFLAK RISERAOV VOEYES (KALEMIOAVLAR BERALE V RVA VEVRAAJOK AR VAN GWS OAFLAK RISERAOV VOEYES (KALEMIOAVLAR BERALE V RVA VEVRAAJOK AR VAN GWS OAFLAK RISERAOV VOEYES (KALEMIOAVLAR BERALE V RVA VEVRAAJOK AR VAN GWS OAFLAK RISERAOV VOEYES (KALEMIOAVLAR BERALE V RVA VEVRAAJOK A
TdMBF1a.1 HvMBF1b ZmEDRF1b ZmEDRF1.2 SbMBF1c OsMBF1a ZmEDRF1.3 TdMBF1a.2 TdMBF1c.1 HvMBF1.1 TdMBF1c.2 OsMBF1c ZmEDRF1.1 ZmMBF1c.1 SbMBF1a TdMBF1a.1 HvMBF1.2 ZmMBF1b	RVS SID LEKNILM OARLDR KMT OA OLA OMINE HPOVIOEYES GALEMHOT IG LERALGA RVS SID LEKNILM OARLDR KMT OA OLA OMINE HPOVIOEYES GALEMHOT IG LERALGA RVP SID LEKNILM OARLDR KMT OA OLA OMINE HPOVIOEYES GALEMNOT IG LERALGA RVP SID LEKNILM OARLDR KLT OA OLA OMINE HPOVIOEYES GALEMOT IG LERALGAT RVP SID LEKNILM OARLDR KLT OA OLA OMINE HPOVIOEYES GALEMOT IG LERALGAT RVP SID LEKNILM OARLDR KLT OA OLA OMINE HPOVIOEYES GALEMOT IG LERALGAT RVP SID LEKNILM OARLDR KLT OA OLA OMINE HPOVIOEYES GALEMOT IG LERALGAT RVP SID LEKNILM OARLDR KLT OA OLA OMINE HPOVIOEYES GALEMOT IG LERALGAT RVP SID LEKNILM OARLDR KLT OA OLA OMINE HPOVIOEYES GALEMOT IG LERALGAT RVP SID LEKNILM OARLDR KLT OA OLA OMINE HPOVIOEYES GALEMOT IG LERALGAT RVP SID LEKNILM OARLDR KLT OA OLA OMINE HPOVIOEYES GALEMOT IG LERALGAT RVP SID LEKNILM OARLDR KLT OA OLA OMINE HPOVIOEYES GALEMOT IG LERALGAT RVP SID LEKNILM OARLDR KLT OA OLA OMINE HPOVIOEYES GALEMOT IG LERALGAT RVP SID LEKNILM OARLDR KLT OA OLA OMINE HPOVIOEYES GALEMOT IG LERALGAT RVF GID VRIAAJOK AR VIA GWIS OAELA KRINE HA OVOEYES GALEMOT IS NOOL IS LERALGAT RVF GID VRIAAJOK AR VIA GWIS OAELA KRINE RA OVOEYES GALVE VOIA VLA MERALE V RVG GID VRIAAJOK AR VIA GWIS OAELA KRINE RA OVOEYES GALVE VOIA VLA MERALE V RVG GID VRIAAJOK AR VIA GWIS OAELA KRINE RA OVOEYES GALVE VOIA VLA MERALE V RVG AVEVRIAAJOK AR VIA GWIS OAELA KRINE RA OVOEYES GALVE VOIA VLA MERALE V RVA VEVRIAAJOK AR VIA GWIS OAELA KRINE RA OVOEYES GALVE AND AVIA SKERALE V RVA VEVRIAAJOK AR VIA GWIS OAELA KRINE RA OVOEYES GALVE AND AVIA SKERALE V RVA VEVRIAAJOK AR VIA GWIS OAELA KRINE RA OVOEYES GALVE AND AVIA SKERALE V RVA VEVRIAAJOK AR VIA GWIS OAELA KRINE RA OVOEYES GALVE AND AVIA SKERALE V RVA VEVRIAAJOK AR VIA GWIS OAELA KRINE RA OVOEYES GALVE AND AVIA SKERALE V RVA VEVRIAAJOK AR VIA GWIS OAELA KRINE RA OVOEYES GALA BAOAVIA LA MERALE V RVA VEVRIAAJOK AR VIA GWIS OAELA KRINE RA OVOEYES GALVE AND AA VLA SKERALE V RVA VEVRIAAJOK AR VIA GWIS OAELA KRINE RA OVOEYES GALA BAOAVILA SKERALE V RVA VEVRIAAJOK AR VIA GWIS OAELA KRINE RA OVOEYES GALVA AND AA VLA A
TdMBF1a.1 HvMBF1b ZmEDRF1b ZmEDRF1c OsMBF1a ZmEDRF1.3 TdMBF1a.2 TdMBF1c.1 HvMBF1c.1 HvMBF1c.1 SbMBF1c ZmERTC ZmERTC1 SbMBF1a TdMBF1a.1 HvMBF1.2 ZmMBF1b ZmEDRF1 2	RVS SDIFKINDO OR LDE KMTON OF OM OMINE KPOVIOEYES (KALEDNHOTIG LERAIGA RVS SDIFKINDO OR LDE KMTON OLA OMINE KPOVIOEYES (KALEDNHOTIG LERAIGA RVS SDIFKINDO RLDE KMTON OLA OMINE KPOVIOEYES (KALEDNHOTIG LERAIGA RVP SDIFKINDO RLDE KUTON OLA OMINE KPOVIOEYES (KALEDNOOTIG LERAIGA RVP SDIFKINDO RATOK LTON OLA OMINE KPOVIOEYES (KALEDNOOTIG LERAIGA RVP SDIFKINDO RATOK LTON OLA OMINE KPOVIOEYES (KALEDNOOTIG LERAIGA RVP SDIFKINDO RATOK LTON OLA OMINE KPOVIOEYES (KALEDNOOTIG LERAIGA RVP GOVINA ALIOKARVAR GWSONE LA KRINE RAVVOEYES (KALEDNOOTIG LERAIGA RVP GOVINA ALIOKARVAR GWSONE LA KRINE RAVVOEYES (KALEDNOOTIA LA MERAIE V RVG GOVIRA ALIOKARVAR GWSONE LA KRINE RAVVOEYES (KALEDNOVICA VLA MERAIE V RVA VEVRIA ALIOKARVAR GWSONE LA KRINE RAVVOEYES (KALEDA VEVOAVLA MERAIE V RVA VEVRIA ALIOKARVAR GWSONE LA KRINE RAVVOEYES (KALEDA VEVOAVLA MERAIE V RVA VEVRIA ALIOKARVAR GWSONE LA KRINE RAVOVOEYES (KALEDA VEVOAVLA MERAIE V RVA VEVRIA ALIOKARVAR GWSONE LA KRINE RAVVOEYES (KALEDA VEVOAVLA MERAIE V RVA VEVRIA ALIOKARVAR GWSONE LA KRINE RAVVOEYES (KALEDA VEVAAVLA MERAIE V RVA VEVRIA ALIOKARVAR GWSONE LA KRINE RAVVOEYES (KALEDA VEVAAVLA MERAIE V RVA VEVRIA ALIOKARVAR GWSONE LA KRINE RAVVOEYES (KALEDA VEVAA ALEANE RA LE V RVA VEVRIA ALIOKARVAR GWSONE LA KRINE RA VVOEYES (KALEDA VEVAA ALEANE RA LE V RVA VEVRIA ALIOKAR
TdMBF1a.1 HvMBF1b ZmEDRF1b ZmEDRF1c SbMBF1c ZmEDRF1a ZmMBF1a ZmEDRF1.3 TdMBF1c.1 HvMBF1c.1 HvMBF1c.2 OsMBF1c ZmEDRF1.1 ZmMBF1c.1 SbMBF1a TdMBF1c.1 SbMBF1a TdMBF1c.2	RV S SD L KKNILM QAR LDR KMT GA GLA GMI NE KPOVI O EYES GAALD NHOT I GELERALGA RV S SD L KKNILM GAR LDR KMT GA GLA GMI NE KPOVI O EYES GAALD NHOT I GELERALGA RV P SD L KKNILM GAR LDR KMT GA GLA OM I NE KPOVI O EYES GAALD NGOI I GELERALGA RV P SD L KKNILM GAR LDR KHT GA GLA OM I NE KPOVI O EYES GAALD NGOI I GELERALGA RV P SD L KKNILM GAR LDR KHT GA GLA OM I NE KPOVI O EYES GAALD NGOI I GELERALGA RV P SD L KKNILM GAR LDR KHT GA GLA OM I NE KPOVI O EYES GAALD NGOI I GELERALGA RV P SD L KKNILM GAR LDR KHT GA GLA OM I NE KPOVI O EYES GAALD NGOI I GELERALGA RV P SD L KKNILM GAR LDR KHT GA GLA OM I NE KPOVI O EYES GAALD NGOI I GELERALGA RV P SD L KKNILM GAR LDR KHT GA GLA OM I NE KPOVI O EYES GAALD NGOI I GELERALGA RV P SD L KKNILM GAR LDR KLT GA GLA OM I NE KPOVI O EYES GAALD NGOI I I SELERALGA RV P SD L KKNILM GAR LDR KLT GA GA GA GAALA AN GA
TdMBF1a.1 HvMBF1b ZmEDRF1b ZmEDRF1c OsMBF1a ZmEDRF1.3 TdMBF1a.2 TdMBF1c.1 HvMBF1c.1 HvMBF1c.2 OsMBF1c ZmERTC ZmERTC1 SbMBF1a TdMBF1a.1 HvMBF1.2 ZmMBF1b ZmEDRF1.2 SbMBF1c	RV S SD L KKNLM OAR LDE KMT OA OLA OM IN BKP OVI DEVES GAALD NHOT I GELERALGA RV S SD L KKNLM OAR LDE KMT OA OLA OM IN BKP OVI DEVES GAALD NHOT I GELERALGA RV S SD L KKNLM OAR LDE KMT OA OLA OM IN BKP OVI DEVES GAALD NOOT I GELERALGAT RV P SD L KKNLM OAR LDE KMT OA OLA OM IN BKP OVI DEVES GAALD NOOT I GELERALGAT RV P SD L KKNLM OAR LDE KMT OA OLA OM IN BKP OVI DEVES GAALD NOOT I GELERALGAT RV P SD L KKNLM OAR LDE KMT OA OLA OM IN BKP OVI DEVES GAALD NOOT I GELERALGAT RV P SD L KKNLM OAR LDE KMT OA OLA OM IN BKP OVI DEVES GAALD NOOT I GELERALGAT RV P SD L KKNLM OAR LDE KMT OA OLA OM IN BKP OVI DEVES GAALD NOOT I GELERALGAT RV P SD L KKNLM OAR LDE KLT OA OLA OM IN BKP OVI DEVES GAALD NOOT I GELERALGAT RV P SD L KKNLM OAR LDE KLT OA OLA OM IN BKP OVI DEVES GAALD NOOT I GELERALGAT RV P SD L KKNLM OAR LDE KLT OA OLA OM IN BKP OVI DEVES GAALD NOOT I GELERALGAT RV P SD L KKNLM OAR LDE KLT OA OLA OM IN BKP OVI DEVES GAALD NOOT I GELERALGAT RV P SD L KKNLM OAR LDE KLT OA OLA OM IN BKP OVI DEVES GAALD NOOT I GELERALGAT RV G GD VRAAI OKARVAN GWS OAE LA KRIN BHA OVI DEVES GAALD VOOL VLA DE NOOT I SELERALGAT RV G GD VRAAI OKARVAN GWS OAE LA KRIN BHA OVI DEVES GAALD VOAV LA SMERALE V RV G GEV VRAAI OKARVAN GWS OAE LA KRIN BHA OVI DEVES GAALD VOAV LA SMERALE V RV G GEV VRAAI OKARVAN GWS OAE LA KRIN BHA OVI DEVES GAALD VOAV LA SMERALE V RV A VEV RAAI OKARVAN GWS OAE LA KRIN BHA OVI DEVES GAALD VOAV LA SMERALE V RV A VEV RAAI OKARVAN GWS OAE LA KRIN BHA OVI DEVES GAALD PAOAV LA SMERALE V RVA VEV RAAI OKARVAN GWS OAE LA KRIN BHA OVI DEVES GAALD PAOAV LA SMERALE V RVA VEV RAAI OKARVAN GWS OAE LA KRIN BHA OVI DEVES GAALD PAOAV LA SMERALE V RVA VEV RAAI OKARVAN GWS OAE LA KRIN BHA OVI DEVES GAALD PAOAV LA SMERALE V RVA VEV RAAI OKARVAN GWS OAE LA KRIN BHA OVI DEVES GAALD PAOAV LA SMERALE V RVA VEV RAAI OKARVAN GWS OAE LA KRIN BHA OVI DEVES GAALD A DAAV LA SMERALE V RVA VEV RAAI OKARVAN GWS OAE LA KRIN BHA OVI DEVES GAALD A DAAV LA SMERALE V RVA AE VRAAI OKARVAN GWS OAE LA KRIN BHA OVI DEVES GAALD A DAAV LA SMERALE V RVA VEV RAAI OK
TdMBF1a.1 HvMBF1b ZmEDRF1b ZmEDRF1.2 SbMBF1a ZmEDRF1a.2 TdMBF1a.2 TdMBF1a.1 HvMBF1c.1 HvMBF1c.1 HvMBF1c.2 CsMBF1c ZmEDRF1.1 ZmMBF1c.1 SbMBF1a.1 HvMBF1a.1 HvMBF1b ZmEDRF1.2 SbMBF1a	RV S SD L KKNLM QARLDA KMT GA GLA QMINE KPOVI O EVES GALEDNHOTT GELERALGA RV S SD L KKNLM QARLDA KMT GA GLA QMINE KPOVI O EVES GALEDNHOTT GELERALGA RV S SD L KKNLM QARLDA KLT GA GLA QMINE KPOVI O EVES GALEDNOOT I GELERALGAT RV S SD L KKNLM QARLDA KLT GA GLA QMINE KPOVI O EVES GALEN QOT I GELERALGAT RV S SD L KKNLM QARLDA KLT GA GLA QMINE KPOVI O EVES GALEN QOT I GELERALGAT RV S SD L KKNLM QARLDA KLT GA GLA QMINE KPOVI O EVES GALEN QOT I GELERALGAT RV S SD L KKNLM QARLDA KLT GA GLA QMINE KPOVI O EVES GALEN QOT I GELERALGAT RV S SD L KKNLM QARLDA KLT GA GLA QMINE KPOVI O EVES GALEN QUOT I SILERALGAT RV S SD L KKNLM QARLDA KLT GA GLA QMINE KPOVI O EVES GALEN QUOT I SILERALGAT RV S SD L KKNLM QARLDA KLT GA GLA QMINE KPOVI O EVES GALEN QUOT I SILERALGAT RV S SD L KKNLM QARLDA KLT GA GLA QMINE KPOVI O EVES GALEN QUOT I SILERALGAT RV GGD V RAAT QAR TAK KLT GA GLA QMINE KPOVI O EVES GALEN QUOT I SILERALGAT RV GGD V RAAT QAR VAN GWS GAELA KRIN SHAQV V O EVES GALEN QUOT I SILERALGAT RV GGD V RAAT QAR VAN GWS GAELA KRIN SHAQV V O EVES GALEN QUOT I SILERALGAT RV G GD V RAAT QAR VAN GWS GAELA KRIN SHAQV V O EVES GALEN QUOT I SILERALGAT RV G GD V RAAT QAR VAN GWS GAELA KRIN SHAQV V O EVES GALEN QUOA VLA SHERALE V RV G GD V RAAT QAR VAN GWS GAELA KRIN SHAQV V O EVES GAN D V QAV LA SHERALE V RV G GD V RAAT QAR VAN GWS GAELA KRIN SHAQV V O EVES GAN D V QAV LA SHERALE V RV A VEV RAAT QAR VAN GWS GAELA KRIN SHAQV V O EVES GAN D A QAVLA SHERALE V RVA VEV RAAT QAR VAN GWS GAELA KRIN SHAQV V O EVES SAN D V QAVLA SHERALE V RVA VEV RAAT QAR VAN GWS GAELA KRIN SHAQV V O EVES SAN D A QAVLA SHERALE V RVA VEV RAAT QAR VAN GWS GAELA KRIN SHAQV V O EVES SAN D A QAVLA SHERALE V RVA VEV RAAT QAR VAN GWS GAELA KRIN SHAQV V O EVES SAN D A QAVLA SHERALE V RVA VEV RAAT QAR VAN GWS GAELA KRIN SHAQV V O EVES SAN D A QAVLA SHERALE V RVA VEV RAAT QAR VAN GWS GAELA KRIN SHAQV V O EVES SAN D A QAVLA SHERALE V RVA KEV RAAT QAR AN VAN GWS GAELA KRIN SHAQV V O EVES SAN D A QAVLA SHERALE V LR SKK LR SKK LR SKK LR SKK LR SKK LR SKK
TdMBF1a.1 HvMBF1b ZmEDRF1b ZmEDRF1c OsMBF1a ZmEDRF1.3 TdMBF1a.2 TdMBF1c.1 HvMBF1c.1 HvMBF1c.2 OsMBF1c ZmEDRF1.1 ZmMBF1c.1 SbMBF1a TdMBF1a.1 HvMBF1.2 ZmMBF1b ZmEDRF1.2 SbMBF1c OsMBF1a	RVS SDIFKENIM OARLDR KMTOA OFA OMINE KPOVIOEYES GALENHOTIG ELERALGA RVS SDIFKENIM OARLDR KMTOA OLA OMINE KPOVIOEYES GALENNOOTIG ELERALGA RVP SDIFKENIM OARLDR KHTOA OLA OMINE KPOVIOEYES GALENNOOTIG ELERALGA RVP SDIFKENIM OARLDR KITOA OLA OMINE KPOVIOEYES GALENNOOTIS ELERALGA RVP SDIFKENIM OARLDR KITOA OLA OMINE KPOVIOEYES GALEN DNOOTIS ELERALGA RVP SDIFKENIM OARLDR KITOA OLA OMINE KPOVIOEYES GALEN DNOOTIS ELERALGA RVP SDIFKENIM OARLDR KITOA OLA OMINE KPOVIOEYES GALEN DNOOTIS ELERALGA RVP GEVRAAI OKARVANG GASOAELA KRINE BAA OVIOEYES GALEN DNOOTIS ELERALGA RVF GEVRAAI OKARVANG GASOAELA KRISERAA OVIOEYES GALEN DNOOTIS ERALE V RVF GEVRAAI OKARVANG GASOAELA KRISERAA OVIOEYES GAN DAOAVILA SHERALE V RVF A VEVRAAI OKARVANG GASOAELA KRISERAA OVIOEYES GAN DAOAVILA SHERALE V RVF A VEVRAAI OKARVANG GASOAELA KRISERA OVIOEYES GAN DAOAVILA SHERALE V RVF A VEVRAAI OKARVANG GASOAELA KRISERA OVIOEYES GAN DAOAVILA SHERALE V RVF A VEVRAAI OKARVANG GASOAELA KRISERA OVIOEYES GAN DAOAVILA SHERA LE V RVF A AEVRAAI OKARVANG GASOAELA KRISERA OVIOEYES GAN DAOAVILA SHERA LE V RVF A AEVRAAI OKARVANG GASOAELA KRISERA OVIOEYES GAN DAOAVILA SHERA LE V RVF A AEVRAAI OKARVANG GASOAELA KRISERA OVIOEYES GAN DAOAVILA SHERA LE V RVF A AEVRAAI OKARVANG GASOAELA KRISERA OVIOEYES GAN DAOAVILA SHERA LE V RVF A AEVRAAI OKARVANG GASOAELA KRISERA OVIOEYES GAN DAOAVILA SHERA LE V LR GKK LR GKK LR GKK
TdMBF1a.1 HvMBF1b ZmEDRF1b ZmEDRF1.2 SbMBF1a ZmEDRF1.3 TdMBF1a.2 TdMBF1a.2 TdMBF1c.1 HvMBF1c.1 HvMBF1c.1 ZmEDRF1.1 ZmMBF1c.1 SbMBF1a TdMBF1a.1 HvMBF1a.1 HvMBF1b ZmEDRF1.2 SbMBF1b ZmEDRF1a.2 SbMBF1a ZmMBF1a	RV S SD L KKNLM QAR LDR KMT GA GLA OM IN B KP OVI DEVES GAL DNHQT I G LERAL GA RV S SD L KKNLM GAR LDR KMT GA GLA OM IN B KP OVI DEVES GAL DNHQT I G LERAL GA RV P SD L KKNLM GAR LDR KLT GA GLA OM IN B KP OVI DEVES GAN DNGQT I G LERAL GA RV P SD L KKNLM GAR LDR KLT GA GLA OM IN B KP OVI DEVES GAN DNGQT I G LERAL GA RV P SD L KKNLM GAR LDR KLT GA GLA OM IN B KP OVI DEVES GAN DNGQT I G LERAL GA RV P SD L KKNLM GAR LDR KLT GA GLA OM IN B KP OVI DEVES GAN DNGQT I G LERAL GA RV P SD L KKNLM GAR LDR KLT GA GLA OM IN B KP OVI DEVES GAN DNGQT I G LERAL GA RV P SD L KKNLM GAR LDR KLT GA GLA OM IN B KP OVI DEVES GAN DNGQT I G LERAL GA RV P SD L KKNLM GAR LDR KLT GA GLA OM IN B KP OVI DEVES GAN DNGQT I S SLERAL GA RV P SD L KKNLM GAR LDR KLT GA GLA OM IN B KP OVI DEVES GAN DNGQT I S SLERAL GA RV P SD L KKNLM GAR LDR KLT GA GLA OM IN B KP OVI DEVES GAN DNGQT I S SLERAL GA RV G GD V RAAL GAR TDR KLT GA GLA OM IN B KP OVI DEVES GAN DNGQT I S SLERAL GA RV G GD V RAAL GAR TDR KLT GA GAS GAE LA KRIN B RAOV OEVES GAN DNGGT I S RLERAL GA RV G GD V RAAL GAR VAN GMS GAE LA KRIN BRAOV OEVES GAN DV GAV LA SMERAL E V RV G GD V RAAL GAR VAN GMS GAE LA KRIN BRAOV OEVES GAN DV GAV LA SMERAL E V RV G GD V RAAL GAR VAN GMS GAE LA KRIN BRAOV OEVES GAN DV GAV LA SMERAL E V RV G GAE V RGAL GAR VAN GMS GAE LA KRIN BRAOV OEVES GAN DV GAV LA SMERAL E V RV A VEV RAAL GAR VAN GMS GAE LA KRIN BRAOV OEVES GAN DA GAV LA SMERAL E V RVA VEV RAAL GAR VAN GMS GAE LA KRIN BRAOV OEVES GAN DA GAV LA SMERAL E V RVA VEV RAAL GAR VAN GMS GAE LA KRIN BRAOV OEVES GAN DA GAV LA SMERAL E V RVA VEV RAAL GAAL GAR VAN GMS GAE LA KRIN BRAOV OEVES GAN DA GAV LA SMERAL E V RVA VEV RAAL GAAL GAR VAN GMS GAE LA KRIN BRAOV OEVES GAN DA GAV LA SMERAL E V RVA VEV RAAL GAAL GAR VAN GMS GAE LA KRIN BRAOV OEVES GAN DA GAV LA SMERAL E V LR S KK LR S KK LR S KK LR S KK LR G KK
TdMBF1a.1 HvMBF1b ZmEDRF1b ZmEDRF1c OsMBF1a ZmEDRF1.3 TdMBF1a.2 TdMBF1c.1 HvMBF1c.1 HvMBF1c.1 ComBF1c.2 ComBF1c ZmEDRF1.1 ZmMBF1a.1 HvMBF1a.1 HvMBF1a.1 HvMBF1a.2 ZmMBF1a ZmEDRF1.2 SbMBF1a ZmEDRF1.2 SbMBF1a ZmEDRF1.3 ZmMBF1a	RV S SD L KKNLM QAR LD KKMT QA QLA QMINE KP QVI DEVES GAL DNHQT I GELERAL GA RV S SD L KKNLM QAR LD KKT QA QLA QMINE KP QVI DEVES GAL DNHQT I GELERAL GA RV P SD L KKNLM QAR LD KKLT QA QLA QMINE KP QVI DEVES GAL DNQQT I GELERAL GA RV P SD L KKNLM QAR LD KKLT QA QLA QMINE KP QVI DEVES GAL DNQQT I GELERAL GA RV P SD L KKNLM QAR LD KKT QA QLA QMINE KP QVI DEVES GAL DNQQT I GELERAL GA RV P SD L KKNLM QAR LD KKT QA QLA QMINE KP QVI DEVES GAL DNQQT I GELERAL GA RV P SD L KKNLM QAR LD KKT QA QLA QMINE KP QVI DEVES GAL DNQQT I GELERAL GA RV P SD L KKNLM QAR LD KKT QA QLA QMINE KP QVI DEVES GAL DNQQT I GELERAL GA RV P SD L KKNLM QAR LD KKT QA QLA QMINE KP QVI DEVES GAL DNQQT I SELERAL GA RV P SD L KKNLM QAR LD KLT QA QLA QMINE KP QVI DEVES GAL DNQQT I SELERAL GA RV P SD L KKNLM QAR LD KLT QA QLA QMINE KP QVI DEVES GAL DNQQT I SELERAL GA RV P SD L KKNLM QAR LD KLT QA QLA QMINE KP QVI DEVES GAL DNQQT I SELERAL GA RV G GD VRAAI QAR TD KLT QA QLA QMINE KP QVI DEVES GAL DNQQT I SELERAL GA RV G GD VRAAI QAR VAR GWS QAE LA KRYN BRAQV OEVES GAL V DVQAVLA SERAL E V RV G GD VRAAI QAR VAR GWS QAE LA KRYN BRAQV OEVES GAL V DVQAVLA SERAL E V RV G GD VRAAI QAR VAR GWS QAE LA KRYN BRAQV OEVES GAL V DVQAVLA SERAL E V RVA VEVRAAI QAR VAR GWS QAE LA KRISERAQV OEVES GAL VD VOAVLA SERAL E V RVA VEVRAAI QAR VAR GWS QAE LA KRISERAQV OEVES GAL VD VOAVLA SERAL E V RVA VEVRAAI QAR VAR GWS QAE LA KRISERAQV OEVES GAL ADA VLA SERAL E V RVA VEVRAAI QAR VAR GWS QAE LA KRISERAQV OEVES GAL DA QAVLA SERAL E V RVA VEVRAAI QAR VAR GWS QAE LA KRISERAQV OEVES GAL PAQAVLA SERAL E V RVA VEVRAAI QAR VAR GWS QAE LA KRISERA QV VOEVES GAL ADA VLA SERAL E V RVA VEVRAAI QAR VAR GWS QAE LA KRISERA QV VOEVES GAL ADA VLA SERAL E V LR G KK LR GKK LR GKK LR GKK LR GKK LR GKK LR GKK LR GKK LR QL I AFLRVCVPEH H I
TdMBF1a.1 HvMBF1b ZmEDRF1b ZmEDRF1.2 SbMBF1a ZmEDRF1.3 TdMBF1a.2 TdMBF1a.2 TdMBF1c.1 HvMBF1c.1 HvMBF1c.1 ZmEDRF1.1 ZmEDRF1.1 ZmMBF1c.1 SbMBF1a.1 HvMBF1b ZmEDRF1.2 SbMBF1a ZmMBF1a ZmMBF1a ZmMBF1a.2	RVS SDIFKNIM OARLORKMTOA OLA OMINEKPOVIOEYES (A. DNHOLTG LERALGA RVS SDIFKNIM OARLORKTOA OLA OMINEKPOVIOEYES (A. DNHOLTG LERALGA RVS SDIFKNIM OARLORKITOA OLA OMINEKPOVIOEYES (A. DNHOLTG LERALGA RVP SDIFKNIM OARLORKITOA OLA OMINEKPOVIOEYES (A. DNOOLIG LERALGA RVP SDIFKNIM OARLORKITOA OLA OMINEKPOVIOEYES (A. DNOOLIS LERALGA RVP SDIFKSIM OARTOR VANGWS OAFLA KRINERA VVIOEYES (A. DNOOLIS LERALGA RVP SDIFKSIM OARTOR VANGWS OAFLA KRINERA VVIOEYES (A. DVOOLVIA VIA SERALEV RVG GDVRAAJOKARVANGWS OAFLA KRINERA VVIOEYES (A. DVOOLVIA VIA SERALEV RVG GDVRAAJOKARVANGWS OAFLA KRINERA VVIOEYES (A. DVOOLVIA VIA SERALEV RVG GDVRAAJOKARVANGWS OAFLA KRINERA VVIOEYES (A. DVOOLVIA VIA SERALEV RVG VAALOVIA SI OKARVANGWS OAFLA KRINERA VVIOEYES (A. DVOOLVIA VIA SERALEV RVG VAALOVIA SI OKARVANGWS OAFLA KRINERA OVVIOEYES (A. DVOAVIA SERALEV RVA VEVRAAJOKARVANGWS OAFLA KRINERA OVVIOEYES (A. DAOAVIA SERALEV RVA VEVRAAJOKARVARGARVANGWS OAFLA KRINERA OVVIOEYES (A. DAOAVIA SERALEV RVA VEVRAAJOKARVARGARVARGNS OAFLA KRINERA OVVIOEYES (A. DAOAVIA SERALEV RVA VEVRAAJOKARJOKARVARGNS OA
TdMBF1a.1 HvMBF1b ZmEDRF1b ZmEDRF1c OsMBF1a ZmMBF1a ZmEDRF1.3 TdMBF1a.2 TdMBF1c.1 HvMBF1.1 TdMBF1c.2 OsMBF1c ZmEDRF1.1 ZmEDRF1.1 ZmMBF1a.1 HvMBF1a.2 TdMBF1a.1 HvMBF1a.2 ZmMBF1a TdMBF1a.1 HvMBF1.2 ZmMBF1a ZmEDRF1.3 TdMBF1a.2 TdMBF1a.2 TdMBF1a.2 TdMBF1c.1	RVS SDIFKINDO QARIDA KATOA QA QA QA QA DA QA QA DA QA DA QA DA QA QA QA DA QA QA DA QA QA QA QA DA QA QA QA QA DA QA QA QA DA QA QA QA DA QA QA QA DA QA QA QA QA DA QA QA QA QA QA QA DA QA
TdMBF1a.1 HvMBF1.2 ZmMBF1b ZmEDRF1.2 SbMBF1c OsMBF1a ZmEDRF1.3 TdMBF1a.2 TdMBF1c.1 HvMBF1c.1 HvMBF1c.1 SbMBF1c ZmEDRF1.1 ZmMBF1c.1 SbMBF1a TdMBF1a.1 HvMBF1.2 ZmMBF1b ZmEDRF1.2 SbMBF1c OsMBF1c ZmEDRF1.3 TdMBF1a.2 TdMBF1c.1 HvMBF1c.1 HvMBF1.3	RVSSDIFKNIM OARLERKMTOA OF OM OMINERPOVIOEYES (A. DNHOTIG LERADGA RVSSDIKKNIM OARLERKMTOA OLA OMINERPOVIOEYES (A. DNHOTIG LERADGA RVSDIKKNIM OARLERKTTOA OLA OMINERPOVIOEYES (A. DNHOTIG LERADGA RVSDIKKNIM OARLERKTTOA OLA OMINERPOVIOEYES (A. DNHOTIG LERADGA RVSDIKKNIM OARLERKTTOA OLA OMINERPOVIOEYES (A. DNOOIIG LERADGA RVSDIKKNIM OARLERKTTOA OLA OMINERPOVIOEYES (A. DNOOIIG LERADGA RVSDIKKNIM OARLERKTTOA OLA OMINERPOVIOEYES (A. DNOOIIG LERADGA RVSDIKKNIM OARLERKTOA OLA OMINERPOVIOEYES (A. DNOOIIG LERADGA RVSDIKKSIM OARTOKITOA OLA OMINERPOVIOEYES (A. DNOOIIG LERADGA RVSDIKKSIM OARTOKITOA OLA OMINERPOVIOEYES (A. DNOOIIG LERADGA RVSOLVENAAJOKARVAA GWSOAELA KRINERA VVOEYES (A. DVOOIVA VIA MERADEV RVSOLVEVEAAJOKARVAA GWSOAELA KRINERA VVOEYES (A. DVOAVIA MERADEV RVSOLVEVEAAJOKARVAA GWSOAELA KRINERA VVOEYES (A. DVOAVIA MERADEV RVSAVEVEAAJOKARVAA GWSOAELA KRINERA VVOEYES (A. DVOAVIA MERADEV RVA VEVEAAJOKARVAA GWSOAELA KRINERA VVOEYES (A. DAOAVIA MERADEV RVA VEVEAAJOKARVA
TdMBF1a.1 HvMBF1b ZmEDRF1b ZmEDRF1c OsMBF1a ZmEDRF1.3 TdMBF1a.2 TdMBF1c.1 HvMBF1.1 TdMBF1c.2 OsMBF1c ZmEDRF1.1 ZmMBF1c.1 SbMBF1a TdMBF1a.1 HvMBF1.2 ZmEDRF1.3 TdMBF1a.2 TdMBF1a.1 HvMBF1.2 ZmEDRF1.3 TdMBF1a.2 TdMBF1a.2 TdMBF1a.2 TdMBF1a.2 TdMBF1c.1 HvMBF1.1 TdMBF1c.1	RVS SDIFKINDMOARLDR KMTOACOM (NEW POVICEYES GALENNOCTIGELERANGA RVS SDIFKINDMOARLDR KMTOACOACMINER POVICEYES GALENNOCTIGELERANGA RVP SDIFKINDMOARLDR KHTOACA ON MINERPOVICEYES GALENNOCTIGELERANGA RVP SDIFKINDMOARLDR KHTOACA ON A MINERPOVICEYES GALENNOCTIGELERANGA RVP SDIFKINDMOARLDR KLTOACA ON A MINERPOVICEYES GALENNOCTIGELERANGA RVP SDIFKINDMOARLDR KLTOACA ON A MINERPOVICEYES GALENNOCTISE LERANGA RVP GDVRAAJOK AVANGWSOAFFAKRIN BRACVVCEYES GALENNOCTISE LERANGA RVF GDVRAAJOK AVANGWSOAFFAKRIN BRACVVCEYES GALENNOCTISE LERANGA RVF GDVRAAJOK AVANGWSOAFFAKRIN BRACVVCEYES GALEN VOAVLAR BERAFEY RVF GDVRAAJOK AVANGWSOAFFAKRIN BRACVVCEYES GALEN VOAVLAR BERAFEY RVF GDVRAAJOK AVANGWSOAFFAKRIN BRACVVCEYES GALEN VOAVLAR BERAFEY RVF VEVRAAJOK ARVANGWSOAFFAKRIN BRACVVCEYES GALEN VOAVLAR BERAFEY RVF A VEVRAAJOK ARVANGWSOAFFAKRIN BRACVVCEYES GALEN AVANGAVLAR BERAFEY RVF A VEVRAAJOK ARVANGWSOAFFAKRIN BRACVVCEYES GALEN AVANGAVLAR BERAFEY RVF A VEVRAAJOK ARVANGWSOAFFAKRIN BRACVVCEYES GALEN AVANGAVLAR BERAFEY RVF A VEVRAAJOK ARVANGWSOAFFAR RIN BRACVVCEYES GALEN AVANGAVLAR BERAFEY RVF A SEKK LR GKK LR GAFAFFACT
TdMBF1a.1 HvMBF1.2 ZmMBF1b ZmEDRF1.2 SbMBF1c OsMBF1a ZmEDRF1.3 TdMBF1a.2 TdMBF1c.1 HvMBF1c.1 HvMBF1c.2 OsMBF1c ZmERTC ZmERTC ZmERTC.1 SbMBF1a TdMBF1a.1 HvMBF1.2 ZmMBF1b ZmEDRF1.3 TdMBF1a.2 TdMBF1a.2 TdMBF1a.2 TdMBF1c.1 HvMBF1.3 TdMBF1a.2	RVS SDIFKNIM OARLORKMTOA OAR AGA OMINE KPOVIOEYES (ALE NHOTIG LERADGA RVS SDIFKNIM OARLORKTOA OLA OMINE KPOVIOEYES (ALE NHOTIG LERADGA RVP SDIFKNIM OARLORKITOA OLA OMINE KPOVIOEYES (ALE NATEGA RVP GOVIAAIOKARVANGKSOAFLA KRINE HA OVIOEYES (ALE NATEGA RVP GOVIAAIOKARVANGKSOAFLA KRINE HA OVIOEYES (ALE VOAVIA KARMERATEV RVG GOVIAAIOKARVANGKSOAFLA KRINE HA OVIOEYES (ALV PVOAVIA KARMERATEV RVG AEVEAAIOKARVANGKSOAFLA KRINE HA OVIOEYES (ALV PVOAVIA KARMERATEV RVA VEVRAAIOKARVANGKSOAFLA KRINE HA OVIOEYES (ALPA OAVIA KARMERATEV RVA VEVRAAIOKARVANGKSOAFLA KRINE HA OVIOEYES (ALPA OAVIA KARMERATEV RVA VEVRAAIOKARVANGKSOAFLA KRINE HA OVIOEYES (ALPA OAVIA KARMERATEV RVA AEVRAAIOKARVANGKSOAFLA KRINE HA OVIOEYES (ALPA OAVIA KARMERATEV RVA VEVRAAIOKARVANGKSOAFLA KRINE HA OVIOEYES (ALPA OAVIA KARMERATEV RVA AEVRAAIOKARVANGKSOAFLA KRINE HA OVIOEYES (ALPA OAVIA KARMERATEV RVA AEVRAAIOKARVAR
TdMBF1a.1 HvMBF1.2 ZmMBF1b ZmEDRF1.2 SbMBF1c SbMBF1a ZmMBF1a.2 TdMBF1a.2 TdMBF1c.1 HvMBF1.1 TdMBF1c.2 OsMBF1c ZmEDRF1.1 ZmMBF1c.1 SbMBF1a TdMBF1c.1 HvMBF1.2 ZmMBF1b ZmEDRF1.3 TdMBF1a.2 TdMBF1a.2 TdMBF1c.1 HvMBF1.2 SbMBF1c ZmEDRF1.3 TdMBF1a.2 TdMBF1a.2 TdMBF1c.2 OsMBF1c.2 SbMBF1c.2 SbMBF1c.2 SbMBF1c.2	RVS SDIFKNIM OARLORKMTOACOM ONINE KPOVIOEYES (A. DNHOLTIG LERADGA RVS SDIFKNIM OARLORKMTOACAAOMINE KPOVIOEYES (A. DNHOLTIG LERADGA RVP SDIFKNIM OARLORKTOACAAOMINE KPOVIOEYES (A. DNHOLTIG LERADGA RVP SDIFKNIM OARLORKTOACAAOMINE KPOVIOEYES (A. DNOOLTIG LERADGA RVP SDIFKNIM OARLORKTOACAAOMINE KPOVIOEYES (A. DNOOLTIS LERADGA RVP SDIFKNIM OARLORKTOACAAOMINE KPOVIOEYES (A. DNOOLTIS LERADGA RVP SDIFKNIM OARLORKTOACAAOMINE KPOVIOEYES (A. DNOOLTIS LERADGA RVP GDV RAAJOKAR VANGWSOAELAKRIN SRAOV OEYES (A. DNOOLTIS LERADGA RVG GDV RAAJOKAR VANGWSOAELAKRIN SRAOV OEYES (A. DVOAVLA VIA SHERADE V RVG GDV RAAJOKAR VANGWSOAELAKRIN SRAOV OEYES (A. DVOAVLA SHERADE V RVG GDV RAAJOKAR VANGWSOAELAKRIN SRAOV OEYES (A. DVOAVLA SHERADE V RVG AEVERAAJOKAR VANGWSOAELAKRIN SHAOV OEYES (A. DVOAVLA SHERADE V RVA VEVRAAJOKAR VANGWSOAELAKRIN SHAOV OEYES (A. DAOAVLA SHERADE V RVA VEVRAAJOKAR VANGWSOAELAKRIN SHAOV VOEYES (A. DAOAVLA SHERADE V RVA VEVRAAJOKAR VANGWSOAELAKRIN SHAOV VOEYES (A. NEAOAVLA SHERADE V LRGKK LRGKA CAPAPAGTK LRGKK LRGKK LRGKA CAPAPAGTK LRGKA VGAPAPAGTK LRGKK LRGKA CAPAP
TdMBF1a.1 HvMBF1.2 ZmMBF1b ZmEDRF1.2 SbMBF1c OsMBF1a ZmEDRF1.3 TdMBF1a.2 TdMBF1c.1 HvMBF1c.1 TdMBF1c.2 OsMBF1c ZmEDRF1.1 ZmMBF1c.1 SbMBF1a TdMBF1a.1 HvMBF1.2 ZmMDF1a ZmEDRF1.3 TdMBF1a.2 SbMBF1c OsMBF1a ZmEDRF1.3 TdMBF1a.2 ZmMDF1a.2 ZmMDF1a.2 ZmMDF1a.2 ZmMDF1a.2 ZmMDF1a.2 ZmMDF1a.2 ZmMDF1a.2 ZmMDF1a.2 TdMBF1c.1 HvMBF1.1 TdMBF1c.2 OsMBF1c	RV S SD L K KNIM QAR LD K KMT QA QA QA QA QA MINE KP QVI DEVES GAALD NHQT I G LERANG GA RV S SD L KKNIM QAR LD KKT QA QA QA MINE KP QVI DEVES GAALD NHQT I G LERANG GA RV P SD L KKNIM QAR LD KKIT QA QA QA MINE KP QVI DEVES GAALD NQQI I G LERANG GA RV P SD L KKNIM QAR LD KKIT QA QA QA MINE KP QVI DEVES GAALD NQQI I G LERANG GA RV P SD L KKNIM QAR LD KKIT QA QA QA MINE KP QVI DEVES GAALD NQQI I G LERANG GA RV P SD L KKNIM QAR LD KKIT QA QA QA MINE KP QVI DEVES GAALD NQQI I G LERANG GA RV P SD L KKNIM QAR LD KKIT QA QA QA MINE KP QVI DEVES GAALD NQQI I G LERANG GA RV P SD L KKNIM QAR LD KKIT QA QA QA MINE KP QVI DEVES GAALD NQQI I S LERANG GA RV P SD L KKNIM QAR LD KKIT QA QA QA MINE KP QVI DEVES GAALD NQQI I S LERANG GA RV P SD L KKNIM QAR LD KKIT QA QA QA MINE KP QVI DEVES GAALD NQQI I S LERANG GA RV P SD L KKNIM QAR LD KKIT QA QA QA MINE KP QVI DEVES GAALD NQQI I S LERANG GA RV G GD VRAAI Q KAR VAN GW SOAE LA KRINE RA QVI DEVES GAALD NQQI I S GI LERANG GA RV G GD VRAAI Q KAR VAN GW SOAE LA KRINE RA QVI DEVES GAALD VQAVIA KARERALE V RV G GD VRAAI Q KAR VAN GW SOAE LA KRINE RA QVI DEVES GAALD VQAVIA KARERALE V RV G GEV VRAAI Q KAR VAN GW SOAE LA KRINE RA QVI DEVES GAALD VQAVIA KARERALE V RV A VEV RAAI Q KAR VAN GW SOAE LA KRISE RA QVI DEVES GAALD VQAVIA SHERALE V RV A VEV RAAI Q KAR VAN GW SOAE LA KRISE RA QVI DEVES GAALD VQAVIA SHERALE V RV A VEV RAAI Q KAR VAN GW SOAE LA KRISE RA QVI DEVES GAALD A VIA SHERALE V RV A VEV RAAI Q KAR VAN GW SOAE LA KRISE RA QVI DEVES GAALD A QAVIA SHERALE V RV A VEV RAAI Q KAR VAN GW SOAE LA KRISE RA QVI DEVES GAALD A QAVIA KARERALE V RV A VEV RAAI Q KAR VAN GW SOAE LA KRISE RA QVI DEVES GAALD A QAVIA KARERALE V RV A VEV RAAI Q KAR VAN GW SOAE LA KRISE RA QVI DEVES GAALD A QAVIA KARERALE V RV A VEV RAAI Q KAR VAN GW SOAE LA KRISE RA QVI DEVES GAALD A QAVIA KARERALE V LR GKK. LR GKK. LR GKK. LR GKK. LR GKK. LR GKK. LR G KK U GAPAPA GTK. LR G KAV GAPAPA GTK. LR G KAV GAPAPA GTK. LR G KAV GAPAPA GTK. LR G KAV GAPAPA GAK . LR G KAV GAPAPA GK K. LR G KAV GAPAPA GK K. LR G KAV
TdMBF1a.1 HvMBF1.2 ZmMBF1b ZmEDRF1.2 SbMBF1c OsMBF1a ZmEDRF1.3 TdMBF1a.2 TdMBF1c.1 HvMBF1.1 TdMBF1c.1 SbMBF1c ZmEDRF1.1 ZmMBF1c.1 SbMBF1a TdMBF1c.1 SbMBF1a TdMBF1c.2 SbMBF1a ZmMBF1b ZmEDRF1.3 TdMBF1a.2 TdMBF1a.2 TdMBF1b ZmEDRF1.3 TdMBF1a.2 TdMBF1a.2 TdMBF1c.1 NMBF1.1 TdMBF1c.1 SbMBF1c.2 OsMBF1c.2 SbMBF1c.2 SbMBF1c.2 TdMBF1c.1	RV S SDIFKNIM OARLORKMTOAO OLA OMINERPOVIOEYES (ALE DAROTTO ELERADGA RV S SDIFKNIM OARLORKMTOAO OLA OMINERPOVIOEYES (ALE DAROTTO ELERADGA RV S SDIFKNIM OARLORKTOAO OLA OMINERPOVIOEYES (ALE DAROTTO ELERADGA RV P SDIFKNIM OARLORKTOAO OLA OMINERPOVIOEYES (ALE DAROTTO ELERADGA RV G GDV RAATOKATOKATOA OLA OLA OLA OLA DERPOVIOEYES (ALE DAROTTO ELERADGA RV G GDV RAATOKARVAAGAS OAELA KRINERPOVIOEYES (ALE DAROTTO ELERADGA RV G GDV RAATOKARVAAGAS OAELA KRINERPOVIOEYES (ALE DAROTTO ELERADGA RV G GDV RAATOKARVAAGAS OAELA KRINERPOVIOEYES (ALE DAROTTO ELERADEV RV G GDV RAATOKARVAAGAS OAELA KRINERAOV VOEYES (ALE DAVOTA VIA VIA SERALEV RV G GDV RAATOKARVAAGAS OAELA KRINERAOV VOEYES (ALE DAVOTA VIA SERALEV RV A VEVRAATOKARVAAGAS OAELA KRINERAOV VOEYES (ALE DAVOTA VIA SERALEV RV A VEVRAATOKARVAAGAS OAELA KRINERAOV VOEYES (ALE DAVOTA VIA SERALEV RV A VEVRAATOKARVAAGAS OAELA KRINERAOV VOEYES (ALE DAVOTA VIA SERALEV RV A VEVRAATOKARVAAGAS OAELA KRINERAOV VOEYES (ALE DAVOTA VIA SERALEV RV A VEVRAATOKARVAAGAS OAELA KRINERAOV VOEYES (ALE DAVOTA VIA SERALEV RV A VEVRAATOKARVAAGAS OAELA KRINERAOV VOEYES (ALE DAVOTA VIA SERALEV RV A VEVRAATOKARVAAGAS OAELA KRINERAOV VOEYES (ALE DAVOTA VIA SERALEV RV A VEVRAATOKARVAAGAS OAELA KRINERAOV VOEYES (ALE DAVOTA VIA SERALEV LR SKK LR G V G APAPAGTK LR SKK LR G V G APAPAGTK LR SKK LR SKK LL LL S
TdMBF1a.1 HvMBF1b ZmEDRF1b ZmEDRF1c OsMBF1a ZmEDRF1.3 TdMBF1a.2 TdMBF1c.1 HvMBF1c.1 HvMBF1c.1 SbMBF1c.2 OsMBF1c ZmEDRF1.1 ZmMBF1c.1 SbMBF1a TdMBF1a.1 HvMBF1.2 ZmMBF1a ZmEDRF1.3 TdMBF1a.2 SbMBF1a ZmEDRF1.3 TdMBF1a.2 TdMBF1a.2 TdMBF1c.1 HvMBF1.2 ZmMBF1c CSMBF1c ZmEDRF1.3 TdMBF1c.1 HvMBF1.1 TdMBF1c.2 OsMBF1c ZmEDRF1.2 ZmEDRF1.2	RVS SDIFKENIM OARLOR KMTOA OLA OMINER POVIOEYES CATENHOTIG LERALGA RVS SDIFKENIM OARLOR KMTOA OLA OMINER POVIOEYES CATENHOTIG LERALGA RVP SDIFKENIM OARLOR KLTOA OLA OMINER POVIOEYES CATENHOTIG LERALGA RVP SDIFKENIM OARLOR KLTOA OLA OMINER POVIOEYES CATENNOOTIG LERALGA RVP SDIFKENIM OARLOR KLTOA OLA OMINER POVIOEYES CATENNOOTIG LERALGA RVP SDIFKENIM OARLOR KUTOA OLA OMINER POVIOEYES CATENNOOTIG LERALGA RVP SDIFKENIM OARLOR KUTOA OLA OMINER POVIOEYES CATENNOOTIG LERALGA RVP SDIFKENIM OARLOR KUTOA OLA OMINER POVIOEYES CATENNOOTIS STERALGA RVP SDIFKENIM OARLOR KUTTA OLA OLA OMINER POVIOEYES CATENNOOTIS STERALGA RVP COD VRAATOR ARVAR GWSOAFLAK RINERA VVOEYES CATEN VOOL VLA STERALE V RVG GED VRAATOR ARVAR GWSOAFLAK RISERA OVOEYES CATEN VOOL VLA STERALE V RVG GED VRAATOR ARVAR GWSOAFLAK RISERA OVOEYES CATEN VOOL VLA STERALE V RVG AVEVRAATOR ARVAR GWSOAFLAK RISERA OVOEYES CATEN VOOL VLA STERALE V RVG VEVRAATOR ARVAR GWSOAFLAK RISERA OVOEYES CATEN VOOL VLA STERALE V RVA VEVRAATOR ARVAR GWSOAFLAK RISERA OVOEYES CATEN VOOL VLA STERALE V RVA VEVRAATOR ARVAR GWSOAFLAK RISERA OVVOEYES CATEN VOOL VLA STERALE V RVA VEVRAATOR ARVAR GWSOAFLAK RISERA OVVOEYES CATENALGAVLA STERALE V RVA VEVRAATOR ARVAR GREAK T LR GKK LR GKK UGAPAPA FAGTK T LR GKGVGAPLAAFGK T LR GKGVGAPLAAFK
TdMBF1a.1 HvMBF1b ZmEDRF1b ZmEDRF1a ZmMBF1b ZmEDRF1a2 TdMBF1a2 TdMBF1a.2 TdMBF1c.1 HvMBF1c.1 TdMBF1c.2 OsMBF1c ZmEDRF1.1 ZmMDF1a.1 HvMBF1c.1 SbMBF1a TdMBF1a.1 HvMBF1b ZmEDRF1.2 ZmMBF1b ZmEDRF1.3 TdMBF1a.2 TdMBF1c.2 OsMBF1c ZmEDRF1.3 TdMBF1c.2 OsMBF1c ZmEDRF1.3 TdMBF1c.2 OsMBF1c ZmEDRF1.1 ZmMDF1c.2 MBF1c.2 SbMBF1c.2 SbMBF1c.2 SmEDRF1.1 ZmEDRF1.1 ZmEDRF1.1	RVS SDIFKNIM OARIDERKMTOACHAOMINERPOVIOEYES (ALEDNHOLTEGIERALGA RVS SDIFKNIM OARIDEKKTOACHAOMINERPOVIOEYES (ALEDNHOLTEGIERALGA RVS SDIFKNIM OARIDEKKTOACHAOMINERPOVIOEYES (ALEDNOCTEGIERALGA RVS SDIFKNIM OARIDEKKTOACHAOMINERPOVIOEYES (ALEDNOCTEGIERALGA RVF SDIFKNIM OARIDEKTTOACHAOMINERPOVIOEYES (ALEDNOCTEGIERALGA RVF SDIFKNIM OARIDEKTTOACHAOMINERPOVIOEYES (ALEDNOCTEGIERALGA RVF SDIFKNIM OARIDEKTTOACHAOMINERPOVIOEYES (ALEDNOCTEGIERALGA RVF GDV RAATOKARVAAGMSOAFIA KAIN SKAOVVOEYES (ALEDNOCTEGIERALGA RVF GDV RAATOKARVAAGMSOAFIA KRIN BRAVVOEYES (ALEDNOCTEGIERALGA RVF GDV RAATOKARVAAGMSOAFIA KRIN BRAVVOEYES (ALEDNOCTEGIERALGA RVF GDV RAATOKARVAAGMSOAFIA KRIN BRAVVOEYES (ALEDNOCTEGIERALE RVF GDV RAATOKARVAAGMSOAFIA KRIN BRAVVOEYES (ALEDNOCTEGIERALE RVF GDV RAATOKARVAAGMSOAFIA KRIN BRAVVOEYES (ALEDNOCAVIA KRIN BRATEV RVA VEVRAATOKARVAAGMSOAFIA KRIN BRAVVOEYES (ALEDNOCAVIA KRIN BRATEV RVA VEVRAATOKARVAAGMSOAFIA KRIN BRAVVOEYES (ALEDNOAVIA KRIN BRATEV RVA VEVRAATOKARVAAGMSOAFIA KRIN BRAVVOEYES (ALEDNOAVIA KRIN BRATEV RVA VEVRAATOKARVAAGMSOAFIA KRIN BRAVVOEYES (ALEDNOAVIA KRIN BRATEV RVA VEVRAATOKARVAAGMSOAFIA KRIN BRAVVOEYES (ALEANA BAOAVIA KRIN BRATEV RVA VEVRAATOKARVAAGMSOAFIA KRIN BRAVVOEYES (ALEANA BAOAVIA KRIN BRATEV RVA VEVRAATOKARVAAG KRIN BRAVVOEYES (ALEANA BAOAVIA KRIN BRATEV RVA VEVRAATOKARVAAG KRIN BRAVVOEYES (ALEANA BAOAVIA KRIN BRATEV RVA AEVRAATOKARVAAGAATOKARVAAGASOAFIA KRIN BRAVVOEYES (ALEANA BAOAVIA KRIN BRATEV RVA AEVRAATOKARVAAGAATOKARVAAGAK LR GKK LR GKK LR GKK LR GKK LR GKK LR GKK LR GKK CAPAPAGTK LR GKK LR GKG CAPAPAAGTK LR GKG VGAPAPAAGTK LR GKAVGAPAPAAGTK LR GKG VGAPAPAAGTK LR GKG V

TdMBF1a.1. 二粒小麦(GenBank 登录号 XP\_037478698.1); TdMBF1a.2. 二粒小麦(GenBank 登录号 XP\_037404793.1); TdMBF1c.1. 二粒小麦(GenBank 登录号 XP\_037463264.1); TdMBF1c.2. 二粒小麦(GenBank 登录号 XP\_037462899.1); HvMBF1.2. 大麦(GenBank 登录号 KAE8794675.1); HvMBF1.1. 大麦(GenBank 登录号 KAE8808916.1); OsMBF1a. 水稻 (GenBank 登录号 XP\_015650143.1); OsMBF1c. 水稻(GenBank 登录号 XP\_015641831.1); SbMBF1a. 高粱(GenBank 登录号 XP\_002445392.1); SbMBF1c. 高粱(GenBank 登录号 XP\_002438624.1); ZmMBF1a. 玉米(GenBank 登录号 ONM04923.1); ZmMBF1b. 玉米(GenBank 登录号 PWZ27846.1); ZmEDRF1.1. 玉米(GenBank 登录号 ACG42768.1); ZmEDRF1.2. 玉米 (GenBank 登录号 ACG33346.1); ZmEDRF1.3. 玉米(GenBank 登录号 ACG29466.1); ZmMBF1c.1. 玉米(GenBank 登录号 PWZ06559.1); ZmMBF1c.2. 玉米(GenBank 登录号 PWZ06222.1); 黑星. 保守位点。

TdMBF1a.1. Triticum dicocoides (XP\_037478698.1); TdMBF1a.2. Triticum dicocoides (XP\_037404793.1); TdMBF1c.1. Triticum dicocoides (XP\_037462899.1); TdMBF1a.2. Triticum dicocoides (XP\_037462899.1); TdMBF1c.2. Triticum dicocoides (XP\_037462899.1); HvMBF1.2. Hordeum vulgare (KAE8794675.1); HvMBF1.1. Hordeum vulgare (KAE8808916.1); OsMBF1a. Oryza sativa, Accession No. is XP\_015650143.1); OsMBF1c. Oryza sativa (XP\_015641831.1); SbMBF1a. Sorghum bicolor (XP\_002445392.1); SbMBF1c. Sorghum bicolor (XP\_002438624.1); ZmMBF1a. Zea mays (ONM04923.1); ZmMBF1b. Zea mays (PWZ27846.1); ZmEDRF1.1. Zea mays (ACG42768.1); ZmEDRF1.2. Zea mays (ACG33346.1); ZmEDRF1.3. Zea mays (ACG29466.1); ZmMBF1c. Zea mays (PWZ06559.1); ZmMBF1c.2. Zea mays (PWZ06222.1). Black Star. Conservative site.

图 4 OsMBF1c 氨基酸序列及其他植物同源序列间多重比较

Fig. 4 Multiple comparisons between OsMBF1c amino acid sequence and other plant homologous sequences

OsMBF1c 与这些植物的 MBF1 氨基酸序列同源性 介于 41.29%~98.59%之间。其中,水稻 OsMBF1c 与二粒小麦 TdMBF1a.1 的同源性最高,而与玉米 ZmEDRF 1.1 的同源性最低。为进一步了解 OsMBF1c 与其他植物的 MBF1 蛋白之间的进化关 系,利用 MEGA 7.0 的 Neighbor-Joining 方法构建系 统进化树(图 5)进行分析,结果显示 OsMBF1c 与 二粒小麦 TdMBF1c.1、TdMBF1c.2、大麦 HvMBF1.1 的亲缘关系最近,该结果与基因同源性比对结果 相一致。



图 5 水稻与其他物种 OsMBF1c 的系统发育树 Fig. 5 Phylogenetic tree of OsMBF1c in rice and other species

### 2.5 MBF1 同源蛋白保守基序分析

利用 MEME 对 17 条不同物种中 MBF1 蛋白 进行了保守基序分析(图 6),共鉴定获得 10 个保 守基序(motif)。除 ZmMBF1a 外,其他同源蛋白的 motif 分布相对均匀,其分布数量与位置也基本相 同,且在 MBF1 的同源蛋白中均存在 motif 1 与 motif 2,这说明此蛋白质在进化过程中具有高度保 守性,进而推断 OsMBF1c 可能与其他物种中的 MBF1 具有相同的功能特性。

### 2.6 水稻 MBF1 基因家族表达特性分析

分析了 OsMBF1a、OsMBF1c 在水稻进行 100 µmol·L<sup>-1</sup>Cd处理下的表达情况。结果显示,在100 µmol·L<sup>-1</sup>Cd处理下,地上部分 OsMBF1a、OsMBF1c基因的表达水平均表现为上调,其中 OsMBF1c在1 h达最高点,约为对照组(0 h)的7倍;随后呈下降 趋势,处理6h的基因相对表达量约为对照组的5.5 倍,处理12h的基因相对表达量变为对照组的3.5 倍(图7:A); OsMBF1a基因表达量在6h达最高 点,约为对照组(0 h)的4.2倍,而在12h时基因表



图 6 水稻 OsMBF1c 蛋白的保守基序分析

Fig. 6 Conserved motif analysis of rice OsMBF1c protein



A. 水稻 OsMBF1c 基因的表达分析; B. 水稻 OsMBF1a 基因的表达分析; \*\*. 与对照差异显著(P<0.01); \*\*\*. 与对 照差异极显著(P<0.001)。下同。

**A.** OsMBF1c gene expression analysis of rice; **B.** OsMBF1a gene expression analysis of rice; \*\*. Significant difference compared with control (P < 0.01); \*\*\*. Extremely significant difference compared with control (P < 0.001). The same below.

图 7 100 μmol · L<sup>-1</sup> Cd 胁迫水稻地上部分中 OsMBF1c、OsMBF1a 基因的相对表达量变化 Fig. 7 Relative gene expression changes of OsMBF1c and OsMBF1a from the shoot of rice treated under 100 μmol · L<sup>-1</sup> Cd stress

达量呈下降趋势,约为对照组(0h)的 0.2 倍(图 7: B);根部 OsMBF1a、OsMBF1c 基因的相对表达量较 地上部分变化幅度较小,而与对照相比,个别处理 时间呈显著性差异。结果还显示,100 µmol·L<sup>-1</sup>Cd 处理下,根部 OsMBF1c 基因在 6h 达最高点,约为 对照(0h)的 3 倍(图 8:A),根部 OsMBF1a 基因在 12h 达最高点,约为对照(0h)的 4.4 倍(图 8:B)。

### 2.7 OsMBF1c 蛋白互作网络分析

利用 STRING 数据库构建了水稻 OsMBF1c 蛋白的蛋白互作网络图(图 9)。结果显示,OsMBF1c 蛋白与 OsRRM、HSFA6A 和 HSFA6B 具有较强的



**A**. 水稻 *OsMBF1c* 基因的表达分析。**B**. 水稻 *OsMBF1a* 基因的表达分析。

**A.** OsMBF1c gene expression analysis of rice; **B.** OsMBF1a gene expression analysis of rice.

- 图 8 100 μmol · L<sup>-1</sup> Cd 胁迫水稻根部中 OsMBF1c、 OsMBF1a 基因的相对表达量变化
- Fig. 8 Relative gene expression changes of OsMBF1c and OsMBF1a from the root of rice treated under 100 μmol • L<sup>-1</sup> Cd stress

相关性,其中 HSFA6A、HSFA6B 在植物应对高温、 干旱和重金属等多种非生物胁迫过程中起着重要 作用。通过预测与 OsMBF1c 蛋白互作的靶蛋白, 将更加有助于深入探究水稻 OsMBF1c 蛋白的功能 和调控机理。



图 9 水稻中 OsMBF1c 蛋白相互作用网络 Fig. 9 Protein interaction network of OsMBF1c in rice

# 3 讨论与结论

水稻在生长发育过程中可能会受到盐、低温、 干旱、重金属等各种逆境胁迫,其中重金属所产生 的危害严重制约着水稻产量和品质。水稻在长期 进化过程中,逐渐形成了一套复杂的网络调控机 制,以应对重金属逆境胁迫(董蔚等,2018)。 MBF1蛋白作为转录共激活因子,参与植物中各种 发育过程和非生物胁迫反应(Jaimes-Miranda & Chávez Montes, 2020)。植物中 MBF1 研究较多的 是模式植物拟南芥,在拟南芥中具有3个 MBF1 基 因,即 AtMBF1a、AtMBF1b 和 AtMBF1c,其中 AtMBF1a、AtMBF1c 可增强拟南芥对热、渗透和盐 等非生物胁迫的耐受性(Suzuki et al., 2005;Kim et al., 2007)。Zhang 等(2019)研究表明,水稻中 存在2个 MBF1 家族基因,即 OsMBF1a、 OsMBF1c,这与该文利用生物信息技术筛选出的结 果一致,而对该家族基因在重金属胁迫下的功能 研究却较少。OsMBF1c 的基因结构中含有1个外 显子,与拟南芥 AtMBF1c 相同。而 OsMBF1c 的同 源基因 OsMBF1a 包含 4 个外显子,也与拟南芥 AtMBF1a、AtMBF1b 的外显子数相同(Tsuda & Yamazaki, 2004)。本研究结果进一步表明 MBF1 在不同植物物种间进化具有保守性,但在同一物 种内的 MBF1a/b 与 MBF1c 却有较大差异。该现 象表明植物在进化压力的选择下,就 MBF1 基因 家族整体而言保持了较强的保守性,但该家族成 员之间这种保守的差异却暗示着 MBF1c 可能与 MBF1a/b分别具有不同的生物学功能。此外,对 水稻 OsMBF1c 基因启动子顺式作用元件分析表 明,该基因启动子中包括激素、低温等逆境应激元 件,由此可推测水稻在重金属胁迫下,该基因可能 发挥防御和应激作用。此外,系统进化树结果显 示, OsMBF1a、OsMBF1c 分别与大麦 HvMBF1.2、 HvMBF1.1 亲缘关系较近。目前,虽无 HvMBF1.1、 HvMBF1.2 基因功能的相关报道,但在 Lai 等 (2020)研究发现,大麦中的 MBF1 可能受脱落酸 影响,并激活参与降低 ROS 含量的基因。由于重 金属胁迫可使植物产生 ROS,因此水稻 MBF1 蛋白 是否与大麦 MBF1 蛋白家族具有相似功能,通过降 低水稻 ROS 含量来提高水稻重金属耐受性仍需进 一步探究。

前人在研究拟南芥、大麦草(Hordeum brevisubulatum)等植物中MBF1应对非生物胁迫中 的作用时发现,MBF1基因的表达模式与其功能有 明显的相关性。例如,Zhang等(2020)研究发现, 经350 mmol·L<sup>-1</sup>NaCl处理6h后的大麦草中 HbMBF1a基因相对表达量有明显上调,经过表达 HbMBF1a基因的拟南芥也同时呈现出较强的耐盐 性。本研究发现,Cd胁迫可以显著诱导水稻各器 官中OsMBF1c、OsMBF1a基因的上调表达,并在水
稻根部和地上部分中对胁迫的响应模式不同,该 结果与 Zhang 等(2020)对盐胁迫下 HbMBF1a 表 达情况相类似。同时,通过对比地上和地下部分 的表达模式发现,在不同 Cd 处理时间表达情况呈 细微差异,在地上部分组织中,OsMBF1c 普遍呈上 调趋势,而 OsMBF1a 在 Cd 胁迫处理 12 h 后表达 量却显著降低;在根部,OsMBF1c 在 6 h 表达达到 最高、而 OsMBF1a 在 12 h 达到最高,推测 OsMBF1c 可能参与水稻早期地上组织应对重金属 胁迫的调控机制,而 OsMBF1a 更多地参与水稻后 期根部 Cd 解毒机制。

目前,尚未有研究证明 MBF1 蛋白通过何种分子机制对非生物胁迫做出反应,进而调节应激反应。但是,可以推测的是 MBF1 作为转录辅因子,当细胞从非应激状态到应激状态,较为灵活的 N端结构域可与不同的胁迫应答基因结合,从而一起参与调控植物的应激反应(Millership et al., 2004)。本研究蛋白互作预测显示,OsMBF1c 蛋白与 OsRRM、HSFA6A 和 HSFA6B 等蛋白的相关性较强,这些蛋白在植物干旱、热激和盐等胁迫方面 有着重要意义(Norbert et al., 2021)。在水稻中, OsMBF1c 是否可与这些蛋白共同调控重金属应激 反应以及通过何种分子机制对重金属应激做出反 应等问题仍需进一步探究。

## 参考文献:

- DONG W, WU PX, YANG N, et al., 2018. Cloning and expression analysis of WRKY transcription factor involved in salinity stress in alfalfa [J]. Plant Physiol J, 54(9): 1481–1489. [董蔚, 邬培祥, 杨宁, 等, 2018. 紫花苜蓿盐胁迫 响应 WRKY 转录因子的克隆及表达特征分析 [J]. 植物 生理学报, 54(9): 1481–1489.]
- JIN F, WANG C, LIN HJ, et al., 2010. Heavy metal-transport proteins in plants: A review [J]. J Appl Ecol, 21(7): 1875– 1882. [金枫, 王翠, 林海建, 等, 2010. 植物重金属转运蛋 白研究进展 [J]. 应用生态学报, 21(7): 1875–1882.]
- JAIMES-MIRANDA F, CHÁVEZ MONTES RA, 2020. The plant MBF1 protein family: a bridge between stress and transcription [J]. J Exp Bot, 71(6): 1782-1791.
- KIM MJ, LIM GH, KIM ES, et al., 2007. Abiotic and biotic stress tolerance in *Arabidopsis* overexpressing the *Multiprotein bridging factor* 1a (*MBF*1a) transcriptional coactivator gene [J]. Biochem Biophys Res Commun, 354(2); 440–446.

- LAI Y, ZHANG D, WANG J, et al., 2020. Integrative transcriptomic and proteomic analyses of molecular mechanism responding to salt stress during seed germination in *Hulless barley* [J]. Int J Mol Sci, 21(1): 359.
- MILLERSHIP JJ, WAGHELA P, CAI XM, et al., 2004. Differential expression and interaction of transcription coactivator *MBF*1 with TATA-binding protein (TBP) in the apicomplexan *Cryptosporidium parvum* [J]. Microbiol, 150(5): 1207–1213.
- NORBERT A, ALADÁR P, LÁSZLÓ S, 2021. Diversity of plant heat shock factors: regulation, interactions, and functions [J]. J Exp Bot, 72(5): 1558–1575.
- PAMELA AD, VERÓNICA GA, KENICHI T, et al., 2010. The analysis of an *Arabidopsis* triple knock-down mutant reveals functions for *MBF*1 genes under oxidative stress conditions [J]. J Plant Physiol, 167(3): 194–200.
- ZHENG SW, LIU SB, FENG JH, et al., 2021. Overexpression of a stress response membrane protein gene OsSMP1 enhances rice tolerance to salt, cold and heavy metal stress [J]. Environ Exp Bot, 182: 104327.
- SUZUKI N, RIZHSKY L, LIANG HJ, et al., 2005. Enhanced tolerance to environmental stress in transgenic plants expressing the transcriptional coactivator multiprotein bridging factor 1c [J]. Plant Physiol, 139(3): 1313-1322.
- TOPPI LS, GABBRIELLI R, 1999. Response to cadmium in higher plants [J]. Environ Exp Bot, 41(2): 105-130.
- TSUDA K, YAMAZAKI KI, 2004. Structure and expression analysis of three subtypes of *Arabidopsis MBF*1 genes [J]. BBA-Gene Struct Express, 1680(1): 1–10.
- WANG YY, WEI XL, HUANG JP, et al., 2017. Modification and functional adaptation of the *MBF1* gene family in the lichenized fungus *Endocarpon pusillum* under environmental stress [J]. Sci Rep, 7(1): 16333.
- ZHAO Q, HE L, WANG B, et al., 2019. Overexpression of a multiprotein bridging factor 1 gene DgMBF1 improves the salinity tolerance of Chrysanthemum [J]. Int J Mol Sci, 20(10): 2453.
- ZHANG X, XU ZX, CHEN LC, et al., 2019. Comprehensive analysis of multiprotein bridging factor 1 family genes and *SlMBF1c* negatively regulate the resistance to *Botrytis cinerea* in tomato [J]. BMC Plant Biol, 19(1): 437.
- ZHANG L, WANG Y, ZHANG Q, et al., 2020. Overexpression of *HbMBF1a*, encoding multiprotein bridging factor 1 from the halophyte *Hordeum brevisubulatum*, confers salinity tolerance and ABA insensitivity to transgenic *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Mol Biol, 102(1/2): 1-17.

(责任编辑 蒋巧媛)

广步植物 Guihaia Nov. 2022, 42(11): 1830-1839

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202105024

吴朝昕, 刘雪薇, 李祖军, 等. 大粒香水稻叶绿体基因组特征分析 [J]. 广西植物, 2022, 42(11): 1830-1839. WU CX, LIU XW, LI ZJ, et al. Analysis of chloroplast genome of rice Dalixiang [J]. Guihaia, 2022, 42(11): 1830-1839.



http://www.guihaia-journal.com

# 大粒香水稻叶绿体基因组特征分析

吴朝昕,刘雪薇\*,李祖军,龙武华,宫彦龙,朱速松

(贵州省农业科学院水稻研究所,贵阳 550006)

摘 要:大粒香作为贵州重要的优质稻资源,推广种植面积大,并且在乡村振兴过程中为社会带来了较高的 经济效益。然而,目前对大粒香基因组学的理论研究报道较少。为揭示大粒香水稻叶绿体基因组(cpDNA)特 征及系统发育关系,该研究对大粒香叶绿体进行测序,并分析其基因组特征。结果表明:(1)大粒香水稻 cpDNA 全长 134 563 bp,包括 1 个大单拷贝区(LSC,80 864 bp)、1 个小单拷贝区(SSC,12 347 bp)和 2 个反向 重复序列区(IR<sub>s</sub>,20 676 bp)。(2)注释到 129 个基因,可分为蛋白编码、tRNA 和 rRNA 三类基因,数量分别为 85 个、36 个和 8 个。(3)密码子偏好分析显示,大粒香 cpDNA 密码子偏好 A 碱基或 U(T)碱基,亮氨酸密码子 使用了1 944次,使用次数最多;半胱氨酸的密码子仅使用 198 次,使用次数最少。(4)检测到 129 个 SSR,其中 有 95 个单核苷酸重复且大部分 SSR 序列由 A/T 碱基组成。(5)系统发育分析结果显示,大粒香与热带粳稻 亲缘关系最近,聚为一类。该研究结果揭示了大粒香叶绿体基因组信息,并确定了大粒香系统发育所属分支。 关键词:水稻,大粒香,叶绿体基因,SSR,系统发育分析

中图分类号: Q943 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2022)11-1830-10

# Analysis of chloroplast genome of rice Dalixiang

WU Chaoxin, LIU Xuewei\*, LI Zujun, LONG Wuhua, GONG Yanlong, ZHU Susong

( Guizhou Rice Research Institute, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550006, China )

**Abstract**: As an important high-quality rice resource in Guizhou Province, Dalixiang has a large planting area, and has brought higher economic benefits to society in the process of rural revitalization. However, there are few theoretical researches on the genomics of Dalixiang. In order to reveal the characteristics and phylogenetic relationships of chloroplast genome of rice Dalixiang, the chloroplasts of Dalixiang were sequenced and their genomic characteristics were analyzed. The results were as follows: (1) The chloroplast genome of Dalixiang was 134 563 bp, including LSC(80 864 bp), SSC(12 347 bp) and two IR<sub>s</sub>(20 676 bp). (2) There were 129 genes annotated in the chloroplast genome of

收稿日期: 2022-03-21

基金项目: 黔农科院青年基金([2018]101号); 贵州省科技基础项目(黔科合基础[2020]1Y101); 黔农科院引导项目[2018]03号; 黔科合支撑项目([2019]2304号); 黔科中引地项目([2019]4001); 黔科合平台人才项目([2017]5719); 黔科合基础(ZK[2021] 124)[Supported by Youth Fund of Guizhou Academy of Agricultural Sciences([2018]101); Project of Guizhou Science and Technology (QianKeHeJiChu[2020]1Y101); Project of Guizhou Academy of Agricultural Sciences([2018]03); Project of Guizhou Science and Technology Cooperation [2019]2304; Central Guided by Guizhou Science and Technology Cooperation([2019]4001); Platform Talent of Guizhou Science and Technology Cooperation ([2017]5719); Project of Guizhou Science and Technology (QianKeHeJiChu-ZK[2021]124])]。

第一作者:吴朝昕(1995-),硕士,主要从事水稻分子育种研究,(E-mail)wuchaoxin1995@163.com。

<sup>\*</sup>通信作者:刘雪薇,硕士,主要从事水稻分子育种,(E-mail)627605375@qq.com。

Dalixiang, which could be divided into protein coding, tRNA and rRNA, with 85, 36 and 8 genes respectively. (3) Codon bias analysis of Dalixiang showed that leucine was most frequently used (1 944 times) and that of cysteine was used least frequently (198 times), and most codons ended in A/U(T). (4) The total number of SSR loci in the cpDNA of Dalixiang was 129, ninety-five of which were mononucleotide and most of SSR were composed of nucleobase A/T. (5) Phylogenetic analysis showed the closest affiliation relationship between Dalixiang and Tropical Japonica, and these two were clustered into one group. This study reveals the characteristic information of Dalixiang chloroplast genome, and identifies the phylogenetic status of Dalixiang.

Key words: rice, Dalixiang, chloroplast genome, SSR, phylogenetic analysis

叶绿体是植物获取能量的重要细胞器,具有独 立于核基因组的遗传体系。因为其基因序列保守, 基因结构重排事件远低于核基因组,结构简单,一 般为母系遗传,所以被用来揭示物种的进化与亲缘 关系(李绪英等,2011;Li et al., 2018; Zhang et al., 2018; Jeon & Kim, 2019;朱斌等, 2021)。由于发达 的测序科技使不少生物实现了叶绿体基因组 (cpDNA)测序,因此 NCBI 中收录的叶绿体基因逐 渐增多,利用叶绿体基因研究亲缘关系的报道也不 断增多。在水稻中, Fan 等(2020)利用 cpDNA 分析 了 33 个稻属物种的亲缘关系,结果显示 Oryza sativa voucherHSAGSDYD1802 与 O. sativa cultivar TN1、 O. sativa cultivar RP Bio-226 和 O. sativa cultivar IR8 的亲缘关系最近。Fang 等(2017) 通过分析 cpDNA 探讨了根茎野生稻与其他 13 个稻属物种的亲缘关 系,结果显示与根茎野生稻关系较近的是药用野生 稻且属于 CC 基因类型。在其他物种中,张慧等 (2018)利用 cpDNA 分析了益母草及其他 16 个物种 的亲缘关系,研究结果很好地解决了野芝麻亚科的 进化关系。郑祎等(2020)用大花君子兰叶绿体基 因序列与10个百合科、5个兰科、4个鸢尾科及5个 石蒜科共24个物种的叶绿体基因组序列进行系统 发育分析,研究结果支持大花君子兰属于石蒜科, 并使用其中23个物种叶绿体基因组中 ycf2 进行亲 缘关系分析发现,叶绿体基因组中 ycf2 可以代替叶 绿体基因组全长进行亲缘关系分析。

大粒香是贵州省水稻研究所选育,具有稻米 粒大且香的特点,并且大粒香在乡村振兴过程中 为社会带来了较高的经济效益(蒋志谦,2008;罗 仁发等,2012)。目前,对大粒香基因组学、品质形 成等理论研究的文献报道不多。基于大粒香在贵 州优质稻发展过程中的重要性,为进一步从基因 组水平认识和改良大粒香,本研究以大粒香 DNA 为材料进行测序,构建大粒香 cpDNA 图谱,分析密码子的使用和重复序列,并分析其亲缘关系,拟解决大粒香叶绿体基因组以下问题:(1)大粒香 cpDNA 的基本特征大小;(2)大粒香 cpDNA 密码子偏好情况;(3)大粒香 cpDNA 系统发育所属分支。

## 1 材料与方法

#### 1.1 材料

以大粒香为材料,2019年冬季种植于海南三 亚师部农场基地,2020年2月选取无病虫害、长势 良好的水稻叶片,冲洗、擦干液氮速冻暂存,用干 冰保存寄回贵州,置于-80℃保存,用于提取大粒 香 DNA。

#### 1.2 方法

1.2.1 大粒香 DNA 提取及测序 使用 TIANGEN 植物 DNA 试剂盒提取大粒香总 DNA,测序公司检测 合格后,构建文库,进行测序。

1.2.2 cpDNA 序列组装与注释 将原始数据,除去 有污染、低质量的片段,使用 SPAdes 软件拼接后 组装。使用 CPGAVAS2 进行 基因注释,利用 OGDRAW 绘制大粒香的 cpDNA 图谱。

1.2.3 密码子使用分析 使用 CodonW 进行密码子 使用分析。

1.2.4 重复序列分析 使用 Vmatch 完成大粒香 cpDNA 的长重复序列的查找。大粒香 cpDNA 的 SSR 筛选则使用 MISA 软件,该软件的检测参数: 单核苷酸大于 8 时被检测;二核苷酸和三核苷酸 大于 4 时被检测。

1.2.5 系统进化分析 为探究大粒香与其他稻属物种的亲缘关系,从 NCBI 中下载了 12 个稻属物种和 2 种禾本科近源物种的 cpDNA(绿竹和高粱),使用 RaxML 软件构建系统发育树。



图 1 大粒香叶绿体基因组图谱 Fig. 1 Gene map of Dalixiang chloroplast genome

## 2 结果与分析

#### 2.1 大粒香 cpDNA 序列特征

大粒香 cpDNA 全长为 134 563 bp,分为 3 个 区:大单拷贝区(large single copy, LSC)(80 864 bp),GC 含量为 37.09%;小单拷贝区(small single copy,SSC)(12 347 bp),GC 含量为 33.37%;反向 重复序列区(inverted repeats, IR<sub>s</sub>)(20 676 bp),GC 含量为 44.41%。在大粒香 cpDNA 中注释 129 个 基因(表 1),可分为三类,即蛋白编码基因、tRNA 基因和 rRNA 基因,其数量分别为 85、36 和 8。其 基因功能主要为与自身复制能力有关、与光合作 用有关、与其他基因和与未知功能有关 4 种。在 蛋白编码基因中, rps 基因的数量最多有 16 个, 而 cemA、infA、ccsA、rbcL、matK、accD、clpP 等基因数量 仅有 1 个。其中,有 20 个基因出现在 IR 重复区 内,分别为 ndhB、ycf1、rps12、rps7、rps15、rps9、rpl2、 rpl23 8 个蛋白编码基因, rrn23S、rrn4.5S、rrn16S、 rrn5S 4 个核糖体 RNA, trnN-GUU、trnH-GUG、

#### 表 1 大粒香 cpDNA 注释基因列表

Table 1 List of genes found in Dalixiang cpDNA

功能	基因类别	基因名称							
Function	Gene category	Gene name							
光合作用	光系统 I Photosystem I	psaC, psaI, psaB, psaJ, psaA							
Photosynthesis	光系统Ⅱ Photosystem Ⅱ	psbL, psbD, psbN, psbB, psbT, psbH, psbE, psbA, psbI, psbK, psbJ, psbC psbM, psbZ, psbF							
	细胞色素 b/f 复合体 Cytochrome b/f complex	petA, $petB$ , $petD$ , $petN$ , $petG$							
	ATP 合酶 ATP synthase	atpI, atpE, atpA, atpH, atpB, atpF							
	NADH 脱氢酶 NADH dehydrogenase	ndhB*, ndhD, ndhE, ndhI, ndhF, ndhH, ndhG, ndhC, ndhK, ndhA, ndhJ							
	核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶大亚基 RubisCO large subunit	rbcL							
自我复制	RNA 聚合酶 RNA polymerase	rpoC1, rpoC2, rpoA, rpoB							
Self replication	核糖蛋白小亚基 SSU	rps2, rps3, rps16, rps11, rps4, rps19*, rps18, rps14, rps8,							
	Ribosomal protein small subunit	rps7*, rps15*, rps12*							
	核糖蛋白人亚基 LSU Bibosomal protein large subunit	rpl20, rpl32, rpl36, rpl22, rpl23*, rpl16, rpl2*, rpl14, rpl33							
	转运 RNA Transfer RNAs	trnQ-UUG,trnV-UAC, trnN-GUU*, trnC-GCA, trnH-GUG*,trnT-UGU,trnA- UGC*, trnR-UCU,trnL-CAA*, trnP-UGG, trnL-UAG, trnK-UUU,trnW-CCA, trnG-GCC, trnT-CGU*, trnV-GAC*, trnL-UAA, trnT-GGU, trnS-GCU, trnD- GUC, trnE-UUC, trnS-UGA, trnR-ACG*, trnF-GAA,trnY-GUA, trnS-GGA, trnS-CGA,trnM-CAU*							
	核糖体 RNA Ribosomal RNAs	rrn23S*, rrn4.5S*, rrn16S*, rrn5S*							
其他基因	成熟酶 matK gene	matK							
Other genes	起始因子	infA							
	Initiation factor 合成 C 型细胞色素的基因 C-type cytochrom synthesis gene	ccsA							
	乙酰辅酶 A 羧化酶 Subunit of Acetyl-CoA-carboxylase	accD							
	被膜蛋白 Envelop membrane protein	cemA							
	蛋白酶 Protease	clpP							
未知功能 Unknown function	保守假定阅读框 Conserved hypothetical reading frame	ycf1*, ycf3, ycf4							

注: \* 表示该基因位于反向重复区内。

Note: \* indicates the genes are located in the inverted repeats.

#### 表 2 大粒香 cpDNA 含有内含子的基因

Table 2 Genes with introns in cpDNA of Dalixiang

基因名称 Gene name	外显子 I Exon I	内含子 I Intron I	外显子Ⅱ Exon Ⅱ	内含子 Ⅱ Intron Ⅱ	外显子Ⅲ Exon Ⅲ
rpl2(x2)	393	661	427		
rps16	212	811	44		
rpl16	401	1 060	8		
trnT-CGU(x2)	31	929	58		
trnA-UGC(x2)	36	812	35		
trnS-CGA	61	662	30		
trnK-UUU	35	2 488	37		
trnV-UAC	52	929	31		
trnL-UAA	35	540	50		
ndhB(x2)	776	710	758		
ndhA	541	986	549		
atpF	159	814	406		
ycf3	155	728	229	743	123

*trnA-UGC*、*trnL-CAA*、*trnT-CGU*、*trnV-GAC*、*trnR-ACG*、 *trnM-CAU* 8 个转运 RNA(表 1)。统计结果显示, 大粒香 cpDNA 中有内含子的基因共 17 个,其中 *ycf*3 有 2 个,剩余 16 个基因只有 1 个。*trnK-UUU* 的内含子碱基数最多,而 *trnL-UAA* 的最少(表 2)。

#### 2.2 大粒香 cpDNA 密码子使用分析

在大粒香 cpDNA 密码子中,亮氨酸密码子使 用了1944次,为最多;半胱氨酸的密码子仅使用 198次,为最少。在编码大粒香 cpDNA 的密码子 中有30个密码子偏好性>1,其中以A 结尾的有 12个,以U(T)结尾的有16个,这表明大粒香 cpDNA 密码子偏好 A/U(T)碱基,这种情况常出 现在杜梨、益母草等多种高等植物中(张慧等, 2018;李泳潭等,2020;郑祎等,2020)(表3)。

名称 Name	密码子 Codon	次数 Number	密码子偏好性 RSCU	名称 Name	密码子 Codon	次数 Number	密码子偏好性 RSCU
异亮氨酸	AUU	730	1.51	缬氨酸	GUU	400	1.56
Isoleucine	AUC	286	0.59	Valine	GUC	115	0.45
	AUA	435	0.90		GUA	376	1.46
苏氨酸	ACU	402	1.71		GUG	136	0.53
Threonine	ACC	179	0.76	丙氨酸	GCU	489	1.74
	ACA	249	1.06	Alanine	GCC	162	0.58
	ACG	108	0.46		GCA	331	1.18
赖氨酸	AAA	638	1.47		GCG	142	0.51
Lysine	AAG	231	0.53	天冬氨酸 Aspartic acid	GAU	508	1.56
天冬酰胺 Asparagine	AAU	515	1.45	天冬氨酸 Aspartic acid	GAC	143	0.44
	AAC	193	0.55	谷氨酸	GAA	697	1.47
丝氨酸	UCU	331	1.56		GAG	249	0.53
Serine	UCC	254	1.20	甘氨酸	GGU	415	1.26
	UCA	223	1.05	Glycine	GGC	138	0.42
	UCG	110	0.52		GGA	514	1.56
	AGU	266	1.25		GGG	249	0.76
	AGC	88	0.42	组氨酸	CAU	299	1.50
精氨酸	CGU	243	1.36	Histidine	CAC	101	0.50
Arginine	CGC	100	0.56	谷氨酰胺	CAA	476	1.51
	CGA	231	1.29	Glutamine	CAG	153	0.49
	CGG	85	0.48	半胱氨酸	UGU	150	1.52
	AGA	304	1.70	Cysteine	UGC	48	0.48
	AGG	108	0.61	苯丙氨酸	UUU	646	1.29
甲硫氨酸	AUG	423	1.00	Phenylalanine	UUC	355	0.71
Methionine	UUA	657	2.03	色氨酸 Tryptophan	UGG	329	1.00
	UUG	350	1.08	酪氨酸 Tyrosine	UAU	510	1.56
亮氨酸	CUU	423	1.31		UAC	142	0.44
Leucine	CUC	133	0.41	脯氨酸	CCU	301	1.59
	CUA	272	0.84	Proline	CCC	167	0.88
	CUG	109	0.34		CCA	202	1.07
					CCG	88	0.46

#### 表 3 大粒香 cpDNA 密码子使用

#### 2.3 大粒香 cpDNA 长重复序列和 SSR 分析

在大粒香 cpDNA 中检测到 19 个长重复序列, 包含了8个正向重复,长度范围为30~52 bp,以及 11个回文重复,其长度范围为 30~127 bp。最长 的 127 bp 的重复序列位于 rps19-psbK 的基因间隔 区内,而含有最多长重复序列的区间为 racL-accD。 区域位置分布显示,绝大多数分布在基因间隔区

### 内(表4)。

在大粒香 cpDNA 的 129 个 SSR 位点中有 95 个单核苷酸重复,并且 70.07%的 SSR 由 A 或 T 组 成,表明SSR 位点有使用 A/T 碱基的偏好。同时, 研究表明 SSR 位点在大粒香 cpDNA 上分布不均, 在LSC区、SSC区以及IR。区分别分布了95个、18 个和16个SSR位点(表5)。

## 表 4 大粒香 cpDNA 的重复序列

Table 4 cpDNA repeat sequence of Dalixiang

序号 No.	大小 Size (bp)	类型 Type	位置 Position	区域 Location
1	52	正向 Forward	56 044	IGS(rbcL-accD)
2	35	正向 Forward	130 388	IGS(ndhB-trnL-CAA)
3	32	正向 Forward	55 946	IGS(racL-accD)
4	43	正向 Forward	12 917	IGS(trn G-GCC-trn T-GGU)
5	46	正向 Forward	63 122	IGS(petA-petG)
6	38	正向 Forward	56 005	IGS(rbcL-accD)
7	35	正向 Forward	84 954	IGS(trn <i>H-GUG</i> -trn <i>V-GAC</i> )
8	30	正向 Forward	86 451	IGS(trn <i>H-GUG</i> -trn <i>V-GAC</i> )
9	35	回文 Palindromic	85 004	IGS(trn <i>H-GUG</i> -trn <i>V-GAC</i> )
10	35	回文 Palindromic	84 954	IGS(trn <i>H-GUG</i> -trn <i>V-GAC</i> )
11	30	回文 Palindromic	128 946	Intron $( ndh B )$
12	46	回文 Palindromic	63 122	IGS(petA-petG)
13	30	回文 Palindromic	86 451	IGS(trn <i>H-GUG</i> -trn <i>V-GAC</i> )
14	32	回文 Palindromic	55 946	IGS(racL-accD)
15	38	回文 Palindromic	56 005	IGS(racL-accD)
16	52	回文 Palindromic	56 044	IGS(racL-accD)
17	127	回文 Palindromic	0	IGS(rps19-psbK)
18	30	回文 Palindromic	66 243	GCR (rps18)
19	32	回文 Palindromic	57 152	IGS(accD-psal)

注: Intron. 内含子; IGS. 基因间隔区; GCR. 基因编码区。 Note: Intron. Intron; GIS. Gene intergenic spacer; GCR. Gene coding region.

### 2.4 大粒香 cpDNA 系统发育分析

将大粒香与粳稻、籼稻、野生稻及2个外类物种等共15个 cpDNA 序列构建发育树。发育树分析表明,15个物种可分为三类,即第一类为 Bambusa oldhamii,第二类为 Sorghum bicolor,第三 类为13个稻属物种组成。在第三类群中又可分 为4个小类群,其中3种野生稻(0. australiensis 300316、0. meridionalis、0. ruifipogon)各为一类,其 余10种栽培稻为一类。在栽培稻类群中,粳稻与 籼稻分别处于不同进化分支。并且,大粒香水稻 与粳稻 Tropical Japonica 在同一分支,表明两者的 进化关系比其他水稻品种近(图2)。

## 3 讨论与结论

本研究测得大粒香 cpDNA 全长为 134 563 bp,GC 含量为 39%,LSC 为 80 864 bp,SSC 为 12 347 bp, IR 为 20 676 bp, 并注释到 129 个基因, 与已报道的禾本科数据相符(李裕华等,2020)。 前人通过比对不同禾本科植物 cpDNA 序列表明, 虽然叶绿体基因保守程度较高,但一些基因在进 化过程中仍然出现退化缺失现象(唐萍等,2011; 付涛等,2016)。本研究将大粒香 cpDNA 与 Wang 等(2016)报道的热带粳稻叶绿体基因组进行比对 结果显示,虽然二者在细胞色素 b/f 复合体相关基 因、光系统Ⅰ、Ⅱ相关基因、核糖体蛋白大和小亚 基相关基因、tRNA 和未知功能基因等基因差异较 少,但在大粒香叶绿体基因中不存在 lhbA 基因。 lhbA 基因是和光合作用过程中光系统 Ⅱ 有关的基 因,在热带粳稻中存在 lhbA 基因,并且在喜好温暖 的禾本科植物毛竹中同样也存在 lhbA 基因(Yao et al., 2016),这可能是热带粳稻为适应热带光温 生长环境中逐渐进化而得。

SSR 位点可被用于辅助育种和遗传连锁作图 等方面的研究,而 cpDNA 具有序列保守、结构稳 定、易测序等优点,有助于解决类群间的遗传多样 性(Powell et al., 1995; Pugh et al., 2004; Song et al., 2019)。本研究结果表明,大粒香 cpDNA 的 SSR 位点对 A/U(T)碱基有着明显偏好,这与前人 研究结论相一致(张慧等,2018;李泳潭等,2020; 郑祎等,2020;王一麾等,2021;吴朝昕等,2021)。 此外,大粒香 cpDNA 的密码子也偏好 A/U(T)碱 基,这种密码子使用情况也存在于其他物种中 (Shinozaki et al., 1986; Ohyama et al., 1988;郑祎 等,2020;朱斌等,2021;吴朝昕等,2021)。大粒香 cpDNA 编码蛋白质的密码子和 SSR 位点都偏好 A 碱基或者 U(T)碱基,可能是造成大粒香 cpDNA 总 A/U(T)含量大于总 GC 含量的原因。根据 Niu 等(2007)的研究报道,因为 A/T 核苷酸含有 7 个 氦原子,比G/C核苷酸少一个,所以富含A/T核

广 西 植 物

表 5 大粒香 cpDNA 中的简单重复序列

			Table 5	SSR in the	cpDN.	A of Dali	xiang		
序号 No.	重复类型 Repetition of type	简单重复序列 SSR	大小 Size (bp)	位置 Location	序号 No.	重复类型 Repetition of type	」 简单重复序列 SSR	大小 Size (bp)	位置 Location
1	с	(AA) <sub>5</sub> (A) <sub>11</sub>	11	LSC	44	с	(TT) <sub>4</sub> (T) <sub>8</sub>	8	LSC
2	с	(A) <sub>8</sub> (AA) <sub>4</sub>	8	LSC	45	с	(AA) <sub>4</sub> (A) <sub>8</sub>	8	LSC
3	p2	(AG) <sub>5</sub>	10	LSC	46	с	(A) <sub>9</sub> (AA) <sub>4</sub>	8	LSC
4	с	$(A)_{10}(AA)_5$	10	LSC	47	с	(TT) <sub>4</sub> (T) <sub>8</sub>	8	LSC
5	p4	$(TAAA)_4$	16	LSC	48	с	(T) <sub>8</sub> (TT) <sub>4</sub>	8	LSC
6	с	$(A)_{8}(AA)_{4}$	8	LSC	49	p2	( TA ) <sub>4</sub>	8	LSC
7	с	$(A)_{8}(AA)_{4}$	8	LSC	50	p2	(AT) <sub>4</sub>	8	LSC
8	с	(A) <sub>9</sub> (AA) <sub>4</sub>	8	LSC	51	с	$(TT)_{5}(T)_{10}$	10	LSC
9	с	$(AA)_4(A)_8$	8	LSC	52	с	$(AA)_{4}(A)_{9}$	9	LSC
10	с	$(TT)_4(T)_8$	8	LSC	53	с	$(AA)_{4}(A)_{8}$	8	LSC
11	с	$(A)_{8}(AA)_{4}$	8	LSC	54	p2	$(AG)_4$	8	LSC
12	p2	(AG) <sub>4</sub>	8	LSC	55	с	$(TTTT)_{3}(TTT)_{4}(TT)_{6}(T)_{1}$	<sub>2</sub> 12	LSC
13	p2	$(GA)_4$	8	LSC	56	с	(C) <sub>8</sub> (CC) <sub>4</sub>	8	LSC
14	с	$(TT)_{4}(T)_{9}$	9	LSC	57	p4	(GTAG) <sub>4</sub>	16	LSC
15	p4	$(CTTT)_3$	12	LSC	58	с	$(AA)_4(A)_8$	8	LSC
16	с	$(AA)_{4}(A)_{8}$	8	LSC	59	с	$(TT)_{4}(T)_{8}$	8	LSC
17	с	(TT)4(T)8	8	LSC	60	p4	$(AATA)_3$	12	LSC
18	с	$(AA)_{4}(A)_{8}$	8	LSC	61	с	(T) <sub>9</sub> (TT) <sub>4</sub>	8	LSC
19	р6	$(TTTCTA)_3$	18	LSC	62	с	(TT) <sub>4</sub> (T) <sub>9</sub>	9	LSC
20	р6	(ATAGAA) <sub>3</sub>	18	LSC	63	с	(A) <sub>9</sub> (AA) <sub>4</sub>	8	LSC
21	с	$(AA)_{4}(A)_{8}$	8	LSC	64	с	$(AA)_4(A)_8$	8	LSC
22	с	$(AA)_{4}(A)_{9}$	9	LSC	65	с	$(TT)_{4}(T)_{8}$	8	LSC
23	p2	(AT) <sub>5</sub>	10	LSC	66	с	$(AA)_4(A)_8$	8	LSC
24	p2	( AT) <sub>4</sub>	8	LSC	67	с	$(AA)_4(A)_8$	8	LSC
25	с	$(TT)_{4}(T)_{8}$	8	LSC	68	с	$(TT)_{4}(T)_{8}$	8	LSC
26	с	$(A)_{8}(AA)_{4}$	8	LSC	69	с	$(AA)_4(A)_8$	8	LSC
27	с	$(AA)_{4}(A)_{8}$	8	LSC	70	с	$(AA)_4(A)_8$	8	LSC
28	с	$(AA)_4(A)_8$	8	LSC	71	с	$(A)_{8}(AA)_{4}$	8	LSC
29	с	$(A)_{11}(AA)_{5}$	10	LSC	72	с	$(TT)_{4}(T)_{8}$	8	LSC
30	с	$(A)_{8}(AA)_{4}$	8	LSC	73	с	$(T)_{10}(TT)_{5}$	10	LSC
31	p2	$(AT)_4$	8	LSC	74	р2	(TA) <sub>4</sub>	8	LSC
32	p2	$(AT)_4$	8	LSC	75	р2	(TA) <sub>4</sub>	8	LSC
33	с	$(TT)_{4}(T)_{8}$	8	LSC	76	p4	(AGAA) <sub>3</sub>	12	LSC
34	с	$(T)_{8}(TT)_{4}$	8	LSC	77	с	$(TT)_{4}(T)_{8}$	8	LSC
35	с	$(T)_{8}(TT)_{4}$	8	LSC	78	с	$(A)_{9}(AA)_{4}$	8	LSC
36	с	$(AA)_{4}(A)_{8}$	8	LSC	79	p4	$(TTTA)_3$	12	LSC
37	с	$(AA)_{4}(A)_{8}$	8	LSC	80	с	$(AA)_{4}(A)_{8}$	8	LSC
38	с	$(A)_{9}(AA)_{4}$	8	LSC	81	с	$(T)_{10}(TT)_{5}$	10	LSC
39	с	$(TT)_{4}(T)_{9}$	9	LSC	82	с	$(A)_{10}(AA)_{5}$	10	LSC
40	p2	(CT) <sub>5</sub>	10	LSC	83	с	$(T)_{10}(TT)_{5}$	10	LSC
41	с	$(TT)_{4}(T)_{8}$	8	LSC	84	с	$(T)_{8}(TT)_{4}$	8	LSC
42	с	$(TT)_{4}(T)_{9}$	9	LSC	85	с	(T) <sub>8</sub> (TT) <sub>4</sub>	8	$IR_{B}$
43	с	$(T)_{8}(TT)_{4}$	8	LSC	86	с	(T) <sub>9</sub> (TT) <sub>4</sub>	8	LSC

吴朝昕等: 大粒香水稻叶绿体基因组特征分析

				(	衣う				
序号 No.	重复类型 Repetition of type	简单重复序列 SSR	大小 Size (bp)	位置 Location	序号 No.	重复类型 Repetition of type	简单重复序列 SSR	大小 Size (bp)	位置 Location
87	с	(T) <sub>9</sub> (TT) <sub>4</sub>	8	LSC	109	р3	( TAT ) <sub>4</sub>	12	SSC
88	с	(T) <sub>8</sub> (TT) <sub>4</sub>	8	LSC	110	с	$(T)_{9}(TT)_{4}$	8	SSC
89	с	$(TT)_{4}(T)_{8}$	8	LSC	111	p2	(TC) <sub>5</sub>	10	SSC
90	р3	$(TCT)_4$	12	LSC	112	с	(A) <sub>8</sub> (AA) <sub>4</sub>	8	SSC
91	с	(T) <sub>11</sub> (TT) <sub>5</sub>	10	LSC	113	с	$(AA)_4(A)_8$	8	SSC
92	с	(T) <sub>8</sub> (TT) <sub>4</sub>	8	LSC	114	с	(CC)4(C)9	9	$IR_{A}$
93	с	$(A)_{8}(AA)_{4}$	8	LSC	115	с	$(G)_{8}(GG)_{4}$	8	$IR_{A}$
94	p2	(AG) <sub>4</sub>	8	LSC	116	p2	( CT ) <sub>4</sub>	8	$IR_{A}$
95	с	$(TT)_{5}(T)_{10}$	10	LSC	117	p2	$(GA)_4$	8	$IR_{A}$
96	с	$(TT)_{4}(T)_{8}$	8	SSC	118	p4	(AACG) <sub>3</sub>	12	$IR_{\Lambda}$
97	с	$(A)_{8}(AA)_{4}$	8	SSC	119	с	$(AA)_{4}(A)_{8}$	8	$IR_{A}$
98	с	(TT) <sub>4</sub> (T) <sub>9</sub>	9	SSC	120	с	(TTTT) <sub>4</sub> (T) <sub>17</sub> (TTTTTT) (TTT) <sub>5</sub> (TT) <sub>8</sub>	<sup>3</sup> 16	LSC
99	с	$(A)_{8}(AA)_{4}$	8	SSC	121	p4	(TCGT) <sub>3</sub>	12	$IR_{B}$
100	с	$(A)_{8}(AA)_{4}$	8	SSC	122	p2	(TC) <sub>4</sub>	8	$IR_{B}$
101	с	$(A)_{8}(AA)_{4}$	8	SSC	123	p2	(AG) <sub>4</sub>	8	$IR_{B}$
102	с	$(A)_{8}(AA)_{4}$	8	SSC	124	с	$(C)_{8}(CC)_{4}$	8	$IR_{B}$
103	с	$(AA)_4(A)_8$	8	SSC	125	с	$(G)_{9}(GG)_{4}$	8	$IR_{B}$
104	p4	$(AACA)_3$	12	SSC	126	с	$(A)_{10}(AA)_5$	10	$IR_{B}$
105	с	$(A)_{8}(AA)_{4}$	8	SSC	127	p2	( CT) <sub>4</sub>	8	$IR_{B}$
106	p4	$(AATA)_3$	12	SSC	128	с	$(TT)_{4}(T)_{8}$	8	$IR_{B}$
107	с	(CC) <sub>4</sub> (C) <sub>8</sub>	8	SSC	129	с	$(AA)_{4}(A)_{8}$	8	$IR_{B}$
108	с	$(A)_{8}(AA)_{4}$	8	SSC					

注: c. 单碱基; p2. 2 碱基单元; p3. 3 碱基单元; P4. 4 碱基单元; P6. 6 碱基单元; LSC. 大单拷贝区; SSC. 小单拷贝区; IR<sub>A</sub>. 反向重复序列区 A; IR<sub>B</sub>. 反向重复序列区 B。

Note: c. Mononucleotide; p2. Dinucleotide; p3. Trinucleotide; P4. Tetranucleotide; P6. Hexanucleotide; LSC. Large single copy; SSC. Small single copy;  $IR_A$ . Inverted repeat region A;  $IR_B$ . Inverted repeat region B.





苷酸耗能更少,有利于 cpDNA 的复制。这可能是 大粒香 cpDNA 富含 A/U(T)的原因。

系统发育基因组学是利用分子数据来研究生物间发育关系的。由于 cpDNA 具有序列保守、结构稳定、易测序等优点,因此基于 cpDNA 进行的系统发育研究得到了很好的发展(Eisen,1998; Eisen & Hanawalt,1999; Delsuc et al., 2005)。本研究对优质稻大粒香 cpDNA 测序数据进行了系统发育分析,研究结果表明大粒香与热带粳稻聚为一类;粳稻与籼稻不为一类,这一结果与林张翔等(2014)的研究结果相同,支持了 Huang 等(2012)的籼粳稻起源假说。

综上所述,本研究所获得的大粒香的 cpDNA 大小、结构、基因数量、重复序列、密码子偏好、系 统发育树等特征信息,为进一步研究大粒香的系 统进化和育种研究提供了理论依据。

## 参考文献:

- DELSUC F, BRINKMANN H, PHILIPPE H, 2005. Phylogenomics and the reconstruction of the tree of life  $\lceil J \rceil$ . Nat Rev Genet, 6(5): 61-375.
- EISEN JA, 1998. Phylogenomics: improving functional predictions for uncharacterized genes by evolutionary analysis [J]. Genom Res, 8(3): 163–167.
- EISEN JA, HANAWALT PC, 1999. A phylogenomic study of DNA repair genes, proteins, and processes [J]. Mutat Res-DNA Repair, 435(3): 171–213.
- FAN J, ZHU WY, LI ZF, et al., 2020. Chloroplast genome sequence of a yellow colored rice (*Oryza sativa* L.): insight into the genome structure and phylogeny [J]. Mitochondrial DNA Part B, 5(3): 3650–3652.
- FU T, WANG ZL, QIAN PX, et al., 2016. The latest research progress and application of the DNA barcode in higher plants [J]. J Nucl Agric Sci, 30(5): 887-896. [付涛, 王志龙, 钱萍仙, 等, 2016. 高等植物 DNA 条形码最新研究进展 及其应用 [J]. 核农学报, 30(5): 887-896.]
- HUANG XH, KURATA N, WEI XH, et al., 2012. A map of rice genome variation reveals the origin of cultivated rice [J]. Nature, 490(7421): 497-501.
- JEON JH, KIM SC, 2019. Comparative analysis of the complete chloroplast genome sequences of three closely related east-Asian wild roses (*Rosa* sect. synstylae Rosaceae) [J]. Genes, 10 (1): 1–14.
- JIANG ZQ, 2008. Breeding and application of Dalixiang, a new quality rice line [J]. Guizhou Agric Sci, 36(5): 12-

13. [蒋志谦, 2008. 优质水稻新品系大粒香的选育及应用 [J]. 贵州农业科学, 36(5): 12-13.]

- LI XY, XIAO BG, GAO YL, et al., 2011. Analysis of SSR loci in chloroplast and mitochondrial genomes of tobacco [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 31 (12): 2399 – 2405. [李绪英,肖炳光,高玉龙,等, 2011. 烟草叶绿体 基因组和线粒体基因组 SSR 位点分析 [J]. 西北植物学 报, 31(12): 2399-2405.]
- LI YH, REN YK, ZHAO XH, et al., 2020. Research progress on chloroplast genome of major gramineous crops [J]. Biotechnol Bull, 36(11): 112-121. [李裕华, 任永康, 赵 兴华, 等, 2020. 禾本科主要农作物叶绿体基因组研究进 展[J]. 生物技术通报, 36(11): 112-121.]
- LI YT, ZHANG J, HUANG YL, et al., 2020. Analysis of chloroplast genome of *Pyrus betulaefolia* [J]. Acta Hortic Sin, 47(6): 1021-1032. [李泳潭, 张军, 黄亚丽, 等, 2020. 杜梨叶绿体基因组分析 [J]. 园艺学报, 47(6): 1021-1032.]
- LI YT, ZHANG J, LI LF, et al., 2018. Structural and comparative analysis of the complete chloroplast genome of *Pyrus hopeiensis* — "wild plants with a tiny population" and three other *Pyrus* species [J]. Int J Mol Sci, 19(3262): 1–19.
- LIN ZX, WANG YY, FU F, et al., 2014. Complete chloroplast genome of Dongxiang wild rice and its application in phylogenetic analysis [J]. J Zhejiang Univ (Agric & Life Sci), 40(4): 397-403. [林张翔, 王营营, 付菲, 等, 2014. 东乡野生稻叶绿体基因组拼接及系统进化分析 [J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 40(4): 397-403.]
- LIU F, ZHAO Y, LUO DJ, et al., 2017. The complete chloroplast genome sequence of *Oryza rhizomatis* (Poaceae)
  [J]. Mitochondrial DNA Part B, 2(2): 467–468.
- LUO RF, LUO J, MEI YX, et al., 2012. The purification, rejuvenation and application of good quality rice Dalixiang of maogong brand [J]. Seed, 31(9): 131-132. [罗仁发, 罗 节, 梅映雪, 等, 2012. 茅贡牌优质稻大粒香提纯复壮及 应用 [J]. 种子, 31(9): 131-132.]
- NIU ZT, XUE QY, WANG H, et al., 2017. Mutational biases and GC-biased gene conversion affect GC content in the plastomes of *Dendrobium* genus [J]. Int J Mol Sci, 18(11): 2307-2321.
- OHYAMA K, FUKUZAWA H, KOHCHI T, et al., 1988. Structure and organization of *Marchantia polymorpha* chloroplast genome: I. Cloning and gene identification [J]. J Mol Biol, 203(2): 281-298.
- POWELL W, MORGANTE M, MCDEVITT R, et al., 1995. Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes: applications to the population genetics

of pines [J]. Proc Natl Acad Sci, 92(17): 7759-7763.

- PUGH T, FOUET O, RISTERUCCI AM, et al., 2004. A new cacao linkage map based on codominant markers: development and integration of 201 new microsatellite markers [J]. Theor Appl Genet, 108(6): 1151–1161.
- SHINOZAKI K, OHME M, TANAKA M, et al., 1986. The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression [J]. Embo J, 5(9): 2043-2049.
- SONG Y, CHEN Y, LV JZ, et al., 2019. Comparative chloroplast genomes of sorghum species: Sequence divergence and phylogenetic relationships [J]. Biomed Res Int, 11(5046958): 1–11.
- TANG P, RUAN QY, PENG C, 2011. Phylogeny in structure alterations of poaceae cpDNA [J]. Chin Agric Sci Bull, 27(30): 171-176. [唐萍, 阮秋燕, 彭程, 2011. 禾本科植物叶绿体基因组结构的系统进化研究 [J]. 中国农学通报, 27(30): 171-176.]
- WANG S, GAO LZ, 2016. Complete chloroplast genome sequence and annotation of the tropical japonica group of asian cultivated rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Genome Ann, 4(1): 1–2.
- WANG YH, XIE YF, ZHANG ZX, et al., 2022. The complete chloroplast genome of *Sloanea sinensis* and the systematic status of Elaeocarpaceae [J]. Guihaia, 42(1): 39-48. [王一麾,谢宜飞,张志翔,等, 2022. 猴欢喜叶绿体全基因 组及杜英科系统地位分析 [J]. 广西植物 42(1): 39-48.]
- WU CX, XU HF, LIU XW, et al., 2021. Analysis of chloroplast genome of 'Goudang 3' [J/OL]. Mol Plant Breed: 1-29 [2022-03-30]. http://kns.cnki.net/kcms/

detail/46.1068.S.20220118.1548.006.html. [吴朝昕, 徐海峰, 刘雪薇,等, 2021. '苟当 3 号'水稻叶绿体基因组特 征分析 [J/OL]. 分子植物育种: 1-29 [2022-03-30]. http://kns. cnki. net/kcms/detail/46. 1068. S. 20220118. 1548.006.html.]

- YAO X, TAN YH, LIU YY, et al., 2016. Chloroplast genome structure in *Ilex* (Aquifoliaceae) [J]. Sci Rep, 6(1): 1-10.
- ZHANG H, HE SB, KONG FD, et al., 2018. Sequence of chloroplast genome and the phyletic evolution within *Leonurus* [J]. Inf Trad Chin Med, 35(4): 21-27. [张慧, 何帅兵, 孔繁德, 等, 2018. 益母草叶绿体基因组序列与 系统进化位置分析 [J]. 中医药信息, 35(4): 21-27.]
- ZHANG X, RONG C, QIN L, et al., 2018. Complete chloroplast genome sequence of *Malus hupehensis*: genome structure, comparative analysis, and phylogenetic relationships [J]. Molecules, 23(2917): 1–17.
- ZHENG Y, ZHANG H, WANG QM, et al., 2020. Complete chloroplast genome sequence of *Cliviaminiata* and its characteristics [J]. Acta Hortic Sin, 47 (12): 2439 – 2450. [郑祎,张卉,王钦美,等, 2020. 大花君子兰叶绿 体基因组及其特征 [J]. 园艺学报, 47(12): 2439–2450.]
- ZHU B, GAN CC, WANG HC, 2021. Characteristics of the complete chloroplast genome of *Dendrobium thyrsiflorum* and its phylogenetic relationship analysis [J]. Biotechnol Bull, 37(5): 38-47. [朱斌, 甘晨晨, 王洪程, 2021. 球花石斛 (*Dendrobium thyrsiflorum*)叶绿体基因组特征及亲缘关系 解析 [J]. 生物技术通报, 37(5): 38-47.]

(责任编辑 李 莉)

#### DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202101060

朱鹏锦, 宋奇琦, 谭秦亮, 等. 甘蔗耐寒相关 miRNA 的生物信息学分析及其靶基因预测 [J]. 广西植物, 2022, 42(11): 1840-1853.

ZHU PJ, SONG QQ, TAN QL, et al. Bioinformatics analysis of microRNAs and prediction of target genes associated with cold tolerance in sugarcane [J]. Guihaia, 2022, 42(11): 1840–1853.

# 甘蔗耐寒相关 miRNA 的生物信息学分析及其靶基因预测

朱鹏锦,宋奇琦,谭秦亮,程 琴,李佳慧,庞新华,周全光, 吕 平,欧克纬,卢业飞,农泽梅,唐桓伟,龙盛风\*

(广西壮族自治区亚热带作物研究所,南宁 530001)

摘 要:为了解不同基因型甘蔗(Saccharum officinarum)响应低温胁迫的分子机制,该研究以低温胁迫4℃ 处理 24 h 后的 3 个不同耐寒性甘蔗品种的叶片为材料进行 Illumina HiSeqTM 2000 高通量测序,构建了 18 个低温胁迫前后 sRNA 文库。结果表明:(1)共获得分属于 84 个家族的 322 个已知 miRNA 及预测得到 110 个新 miRNA,并在已知 miRNA 中筛选出 100 个差异表达 miRNA(61 个上调,39 个下调),新 miRNA 中筛选出 37 个差异表达 miRNA(15 个上调,22 个下调)。(2)利用 psRNATarget,TargetFinder,Tapirhybrid 软件对 所获得的差异表达 miRNA 进行靶基因预测,得到1 844个靶基因并进行 GO 分析揭示其主要功能类别,即分子功能、细胞组分与生物过程。(3)为验证高通量测序数据的可靠性,筛选 14 个 miRNA 及其靶基因进行 qRT-PCR 验证,结果显示这些 miRNA 均被检测发现且大多表达结果与测序结果一致。(4)鉴定出部分差异 表达 miRNA 的靶基因,这些基因参与植物生长、发育及低温胁迫反应。综上认为,耐寒型甘蔗体内 miRNA 直接或间接作用靶基因实现表达调控相关代谢途径,对其重要农艺性状均起着关键的调控作用。 关键词:甘蔗,低温胁迫,耐寒性,miRNA,生物信息学

中图分类号: Q943 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2022)11-1840-14

# Bioinformatics analysis of microRNAs and prediction of target genes associated with cold tolerance in sugarcane

ZHU Pengjin, SONG Qiqi, TAN Qinliang, CHENG Qin, LI Jiahui, PANG Xinhua, ZHOU Quanguang, LÜ Ping, OU Kewei, LU Yefei, NONG Zemei, TANG Huanwei, LONG Shengfeng\*

( Guangxi Subtropical Crops Research Institute, Nanning 530001, China )

\*通信作者: 龙盛风,副研究员,主要从事作物栽培育种研究,(E-mail)15077136500@163.com。

收稿日期: 2021-08-30

基金项目: 广西自然科学基金(2017GXNSFBA198054); 广西创新驱动发展专项(桂科 AA17202042-5); 广西农业科学院基本科 研业务专项(桂农科 2021YT151) [Supported by Natural Science Foundation of Guangxi(2017GXNSFBA198054); Special Project of Guangxi Innovation-driven Development Special Project of (Guike AA17202042-5); Basic Scientific Research Project of Guangxi Academy of Agricultural Sciences (Guinongke 2021YT151)]。

**第一作者:**朱鹏锦(1983-),硕士,高级农艺师,主要从事作物生理生态学研究,(E-mail)zhupengjin04@163.com。

Abstract: In order to identify the molecular mechanisms of different sugarcane (*Saccharum officinarum*) responding to cold stress, the leaves of different sugarcane genotypes with different cold tolerance treated at 4  $^{\circ}$ C for 24 h were sampled as the materials for high-through transcriptome sequencing with Illumina HiSeqTM 2000, and 18 sRNA libraries before and after cold stress were constructed. The results were as follows: (1) A total of 322 known miRNAs of 84 families were discovered, and 110 new miRNAs were predicted. Among the known miRNAs, 100 differentially expressed miRNAs were screened out (61 up-regulated, 39 down-regulated), and 37 differentially expressed miRNAs (15 up-regulated, 22 down-regulated) were screened out from the new miRNAs. (2) A total of 1 844 target genes were predicted by using psRNATarget, TargetFinder and Tapirhybrid software. Three main functional categories of these target genes were revealed via the functional analysis of gene ontology, namely molecular function, cellular component and biological process. (3) In order to verify the reliability of high-throughput sequencing data, 14 miRNAs and their target genes were consistent with the sequencing results. (4) Some miRNA target genes were identified, which involved in plant growth, development and cold stress responses. All the above results indicate that miRNA in cold tolerant sugarcane directly or indirectly regulates the expression of target genes to realize the expression regulation of related metabolic pathways, and plays a key role in regulating the important agronomic traits.

Key words: sugarcane, cold stress, cold tolerance, miRNAs, bioinformatics

miRNA 是一类含有 20~24 个碱基的小分子 内源性非编码 RNA,具有高度的保守性、时序性和 组织特异性(Ambros, 2004)。miRNA 主要在转录 后水平上通过介导靶基因 mRNA 的切割或抑制翻 译来调节基因的表达,在生物体代谢过程中起到 多种调控作用,如参与调控植物器官的形态建成 (Sunkar et al., 2012)、生长发育(Thiebaut, et al., 2012)、激素分泌、信号转导以及对外界环境胁迫 (Xiong & Zhu, 2003)的响应等过程。在拟南芥和 水稻响应低温的研究中发现, miR-167、miR-169、 miR-319 和 miR-171 等 miRNA 家族在低温响应具 有重要的生物学作用(Wang et al., 2010),其中 miR-169的靶基因为低温诱导的重要基因 CBF (Sunkar et al., 2007);还在水稻响应低温胁迫的 研究中证明, miRNA-319 和 miRNA-171 的靶基因 属于 MYB 类的转录因子,两者的表达量互为消长 关系,进而说明 miRNA 在水稻耐低温途径中所起 的调控作用(Lü et al., 2010)。因此,准确高效分 离和鉴定 miRNA 及其靶基因并分析它们的功能, 更精确地掌握 miRNA 在植物抗逆胁迫过程中的调 控机制,是目前植物 miRNA 研究领域的重要内容。

甘蔗是热带、亚热带地区重要的糖料作物,低 温是限制其扩大种植区域和实现高产稳产的重要 因素之一(吴棉国等,2010)。出现的偶发性大范 围冰冻雨雪或严重的霜冻天气会导致我国甘蔗主 产区遭受巨大的经济损失(何燕等,2009; 匡昭敏 等,2009);广西地理环境特殊,冬季持续低温以 及春季"倒春寒"形成的阴雨霜冻频发导致大面积 甘蔗受到冷害,具体表现在甘蔗叶片枯萎、茎杆坏 死以致蔗糖含量、甘蔗产量下降(李杨瑞等, 2011)。古丽等(2011)采集甘蔗主产市县40多年 的气象数据,结合甘蔗种植面积、甘蔗产量和蔗糖 产量等指标进行分析发现,低温霜冻灾害是影响 甘蔗种植、甘蔗生产和蔗糖产量的主要环境因子。 因此,了解甘蔗的耐低温调控机制是培育耐寒性 强或适合我国热带北缘气候的甘蔗品种的前提。

本研究在观察不同甘蔗品种的田间农艺性状 和模拟低温胁迫的生理生化研究基础上,筛选出 抗寒能力较强的甘蔗品种作为材料,利用高通量 测序技术及生物信息学方法,获得与甘蔗响应低 温胁迫相关的 miRNA,分析 miRNA 的差异表达情 况,明确 miRNA 与靶基因的作用关系,并对预测所 得的靶基因进行基因本体(gene ontology, GO)分 析,挖掘低温胁迫应答基因,为选育耐寒性强的优 良甘蔗新品种提供理论依据和技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

以广西壮族自治区农业科学院甘蔗研究所选 育的'桂糖 28 号'(GT28)、广西蔗区主栽品种'新 台糖 22 号'(ROC22)和广西壮族自治区亚热带作 物研究所新选育的'桂热2号'(GR2)为材料。

### 1.2 方法

1.2.1 实验设计与管理 选择无病虫害、蔗茎大小 均匀的种茎切成单芽段,用清水冲洗种茎、干布擦 洗干净;用 50%多菌灵可湿性粉剂1 000倍液浸 12 h 消毒;用蒸馏水浸洗种茎 1 min 后,再用蒸馏水 浸洗拧干的棉布将种茎包好并做好标记;用橡皮 筋扎好放进温度为 25 ℃的恒温箱催芽。当种茎 萌芽并长出幼根时,将其移植到装有营养土的塑 料盆并做好标记。每盆 1 段种茎,盆高 17.5 cm, 盆宽 16 cm。育苗期间,每株施用完全营养液 2 次,每次 10 mL。当幼苗两叶一心时,选择长势、大 小均一的幼苗进行低温处理。低温胁迫处理温度 为4 ℃,光照强度为 5 000 lx,处理 24 h;对照 (CK)温度为 28 ℃,光照强度为5 000 lx。

1.2.2 RNA 提取及 Illumina 测序 采集低温处理和 对照样本的叶片,及时用 TRNzol Reagent 试剂盒(天 根生化科技有限公司,北京)提取并检测 RNA。将 低温胁迫处理组与对照样本组提取获得的高质量 RNA 送往华大基因科技有限公司(深圳)进行文库 构建,每处理3个重复。采用 Illumina HiSeqTM 2000平台对质量合格的 RNA 文库进行测序(Ali et al., 2008)。通过去接头、去低质量、去污染等过程 完成数据处理获得干净序列后,使用 Bowtie 2 软件 按照 MiRbase > pirnabank > snoRNA(human/plant) > Rfam > other sRNA 的优先级顺序将小 RNA (sRNA)遍历注释获得未注释 RNA 片段。

1.2.3 已知 miRNA 的鉴定及新 miRNA 预测 用 miRDeep 2 软件对所得的未注释 sRNA 序列与参 考基因组 [割手密(Saccharum spontaneum)基因 组]进行序列比对分析 (Maurits et al., 2015),鉴 定出已知的甘蔗耐寒相关 miRNA;将过滤获得的 未比对序列比对参考序列,通过碱基数目延伸、miRNA 结构预测方法获得新的 miRNA。

1.2.4 差异表达 miRNA 的鉴定 对耐寒型甘蔗样 品的已知 miRNA 的读数进行分析,判断低温胁迫 前后不同耐寒型甘蔗样品中 miRNA 的差异表达, 以 log 2(FoldChange) l ≥1, P<0.05 为筛选标准, 获得低温胁迫前后差异表达 miRNA。

1.2.5 miRNA 純基因预测 用 psRNATarget(Wu et al., 2012)、TargetFinder (Fahlgren & Carrington, 2010)和 Tapirhybrid(Peer, 2010)软件进行差异表达 miRNA 的靶基因预测,并在 GO 数据库对预测

靶基因进行同源性搜索,确定其参与的信号传导 及生物代谢途径。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 验证 选取 14 个差异表达 miRNA 及其靶基因, 先用 Premier 5.0 设计其成熟 miRNA 特异正向引物、通用反向引物(表 4), 再用 LightCycler<sup>®</sup> 480 Instrument II 进行 RT-PCR 扩增, 设阴性对照(不添加 cDNA 模板)以监控可能的污染。以甘蔗 GAPDH 为内参基因, 每个样品均设置 3 次重复, 采用 2<sup>-ΔΔCi</sup>法计算基因相对表达。

2结果与分析

#### 2.1 高通量测序数据分析

选择3个耐寒性不同甘蔗品种的幼苗进行低 温胁迫,每个品种的对照(CK)和低温处理(T)3 个重复,分别取叶片共18个样本进行高通量测 序,构建低温胁迫前后 sRNA 文库;对原始测序数 据进行3'端去接头、Trim低质量、片段大小选择等 质控处理,获取高质量 clean read 序列(表1)。从 表1可以看出,在GR2的CK和T叶片中分别挖 掘出 24 310 558、23 925 673条测序数据,最终处 理分别得到 21 343 194、21 576 594 条,高质量 clean read 序列分别占总序列的87.83%、90.25%, 且所构建的文库与参考基因组进行比对,其 CK 和 T分别有 86.71% 与 84.32% 的序列与参考基因组 匹配; GT28 的 CK 和 T 叶片中分别挖掘出 23 915 244、23 528 103 条测序数据,最终处理分 别得到 22 045 186、21 481 129 条,高质量 clean read 序列分别占总序列的 92.18% 与 91.28%, 所构 建的文库与参考基因组进行比对,其CK和T分别 有71.75%与84.10%的序列与参考基因组匹配; ROCC22 的 CK 和 T 叶片中分别挖掘出 27 069 867、23 631 208条测序数据,最终处理分别 得到 21 007 371、20 640 357 条,高质量 clean read 序列占总序列的 79.50% 与 87.35%, 所构建的文库 与参考基因组进行比对,其CK和T分别有92.62% 与 85.67% 的序列与参考基因组匹配(表1)。

sRNA 长度与不同功能有关,其中 21~22 nt 的 主要与 mRNA 切割和转录后基因沉默相关,24 nt 的 主要与 RNA 导向的 DNA 甲基化和转录基因沉默相 关。对 total clean reads 进行统计发现,sRNA 主要集 中在 21~24 nt 之间,但不同抗寒能力的材料之间有 一定差异,且不同长度的测序频率不同(图1)。

			1 0		1		
库 Library	处理 Treatment	样本编号 Sample ID	总序列 Total reads	干净序列 Clean read	干净序列比 Percentage of clean read (%)	匹配基因组 Matched genome	匹配比例 Matched percentage (%)
GR2	СК	GR2_1	24 864 865	21 017 789	84.53	17 335 491	82.48
	СК	GR2_2	23 889 311	21 068 679	88.19	17 556 964	83.33
	СК	GR2_3	24 177 497	21 943 114	90.76	20 697 208	94.32
		均值 Mean	24 310 558	21 343 194	87.83	18 529 887	86.71
	Т	GR2_1	23 612 049	22 167 436	93.88	17 332 696	78.19
	Т	GR2_2	23 331 030	21 905 886	93.89	17 569 575	80.20
	Т	GR2_3	23 294 402	21 590 060	92.68	18 360 373	85.04
		均值 Mean	23 925 673	21 576 594	90.25	18 197 456	84.32
GT28	СК	GT28_1	23 077 345	21 109 698	91.47	15 898 066	75.31
	СК	GT28_2	24 699 470	22 556 661	91.32	14 254 489	63.19
	СК	GT28_3	23 968 917	22 469 199	93.74	17 247 280	76.76
		均值 Mean	23 915 244	22 045 186	92.18	15 799 945	71.75
	Т	GT28_1	23 421 689	21 192 257	90.48	16 796 178	79.26
	Т	GT28_2	23 271 839	20 918 101	89.89	18 640 603	89.11
	Т	GT28_3	23 890 781	22 333 031	93.48	18 743 809	83.93
		均值 Mean	23 528 103	21 481 129	91.28	18 060 196	84.10
ROC22	СК	ROC22_1	23 475 518	20 335 619	86.62	17 536 453	86.24
	СК	ROC22_2	32 786 885	20 072 677	61.22	19 292 598	96.11
	СК	ROC22_3	24 947 198	22 613 819	90.65	21 598 010	95.51
		均值 Mean	27 069 867	21 007 371	79.50	19 475 687	92.62
	Т	ROC22_1	24 211 511	21 189 727	87.52	18 402 946	86.85
	Т	ROC22_2	23 491 833	20 043 323	85.32	17 201 360	85.82
	Т	ROC22_3	23 190 281	20 688 022	89.21	17 448 123	84.34
		均值 Mean	23 631 208	20 640 357	87.35	17 684 143	85.67

表 1 样品测序数据统计 Table 1 Sequencing data statistics of samples

根据基因表达量进一步对每个样品进行 Pearson 相关系数计算,并将这些系数以热图的形 式反映出来(图 2)。从 Pearson 相关系数可以看 出,同一品种相同处理的重复样品间相关性较高 (0.667~0.990),表明所有样品的表达量基本保持 一致,说明其符合样本重复性实验标准,可以满足 后续的差异表达分析。

## 2.2 已知 miRNA 分析及新 miRNA 预测

用 AASRA 软件将核苷酸序列比对到参考基因 组及 miRBase 数据库,鉴定得到分属于 84 个已知 miRNA 家族的 322 个 miRNA,其中对照组的 297 个 miRNA 分属于 69 个家族,低温处理组的 305 个 miRNA 分属于 74 个家族,这些家族中拥有最多家 族成员数量的为 miR169(32 个),其次分别为 miR166、miR171、miR167、miR156、miR396(图3)。 根据成熟植物 miRNA 序列的高度保守型及 miRNA 前体拥有标志性发夹结构的特性,利用同 源搜寻比对的方法在割手密 miRBase 数据库中进 行搜索,对具有同源性的 miRNA 序列进行提取,选 取其中表达量最高的作为甘蔗响应低温的保守 miRNA 的候选者,最终得到甘蔗响应低温的 110 个新 miRNA。

### 2.3 差异表达 miRNA 分析

通过比较对照组与低温处理组 miRNA 的表达 量变化情况,可以判断低温胁迫下抗寒能力不同 的甘蔗品种 miRNA 的差异表达情况。在差异表达 miRNA 检测过程中,以 log 2(FC) l≥2, P<0.05 作为筛选标准,低温胁迫时差异表达 miRNA 如表 2 所示,包括 100 个已知 miRNA (61 个上调,39 个 下调),37 个新 miRNA (15 个上调,22 个下调)。





呈下调趋势的 miRNA 家族包括 miR8175、 miR5564、miR444、miR166 在内的 21 个家族,呈上 调趋势的 miRNA 家族包括 miR156、miR169、 miR172、miR393、miR397、miR408 等 10 个家族。 这些具有差异性表达的 miRNA 在甘蔗响应低温胁 迫情况下可能发挥特定的功能。

### 2.4 miRNA 作用靶基因预测与分析

根据筛选差异表达的 miRNA 与对应物种的基 因序列信息,使用 psRNATarget、TargetFinder 和 Tapurhybrid 软件进行靶基因预测,结果见图 4。3 种预测方法共预测了 1 844 个相同的潜在靶基因, 其中 1 696 个属于已知 miRNA 靶基因,148 个属于 新 miRNA 靶基因。为进一步分析预测所得靶基因 的潜在生物学功能,对预测所得的靶基因进行 GO 分析,共鉴定出甘蔗响应低温胁迫 miRNA 靶基因: 在生物过程(biological process)有 13 个功能亚类, 在细胞组分(cellular component)有 11 个功能亚 类,在分子功能(molecular function)有 7 个功能亚 类(图 4)。在生物过程类别中,预测靶基因的主 要生物学功能富集于细胞过程和代谢过程;在细 胞组分类别中,预测靶基因生物学功能主要富集 于细胞、细胞器和生物膜;在分子功能类别中,预 测靶基因生物学功能主要富集于结合和催化活性 及转运活性。大多靶基因功能均与这些结合功能 及其他相近的结合功能相关。大多 miRNA 通过直 接或间接介导靶基因的表达调控相关代谢途径响 应低温胁迫,这些 miRNA 所调控的靶基因对甘蔗 的耐寒性起关键的调控作用(表 3)。

#### 2.6 qRT-PCR 验证

利用 qRT-PCR 技术对测序所得到的 miRNA 及靶基因的差异丰度进行验证,miRNA 及其靶基 因的引物序列如表4所示。在对照组与低温处理 组中共筛选出 14 个差异表达的 miRNA 及其靶基 因,并对它们进行 gRT-PCR 验证,包括 miR156、 miR160g\_1\_miR167d\_miR169\_a-3p\_3\_miR171b-3p\_3\_ miR172d-5p\_4\_miR393-3p\_1\_miR396b\_miR397a\_3\_ miR398b, miR399k\_1, miR408d, novel\_mir36, novel\_ mir89(图5)。根据表4和图5的结果,除 novelmiR36 外,选择的其余 13 个 miRNA 在 qRT-PCR 实验中的表达模式与高通量测序检测到的表达模 式一致(图 5:A),这表明大部分高通量测序结果 均能被荧光定量 PCR 技术所验证,此次研究数据 为真实可信的。所筛选的 14 个 miRNA,除 novelmiR36 外,其余 13 个 miRNA 均与其靶基因呈负调 控关系(图5:B),证明 miRNA 通常以负调控或沉 默靶基因的方式来调控植物的生长、发育及对环 境的应激反应。

## 3 讨论与结论

甘蔗热带种原产热带地区,喜温,现代甘蔗栽 培品种以热带种的种质为主体。作为广西传统的 主导产业,而低温不仅是限制其扩大种植区域和 实现高产稳产的重要因素之一,还影响蔗农收益 和糖业稳定发展(苏永秀等,2006)。为了解甘蔗 响应低温的内在分子机制,挖掘其与耐寒相关的 miRNA 及相关靶基因,本研究对不同基因型甘蔗 进行低温胁迫处理,通过高通量测序技术及生物 信息学方法,系统分析不同抗寒能力的甘蔗对低 温胁迫的响应。

通过高通量测序技术及生物信息学分析发现,sRNA主要集中在 21~24 nt 之间,不同抗寒能力的材料之间有一定差异且不同长度的测序频率不同。sRNA 在不同物种间的长度分布会有所区

### 表 2 甘蔗响应低温差异表达 miRNA

Table 2 Differential expressions of miRNAs in sugarcane responding to low temperature

序号 No.	家族 Family	miRNA 编号 miRNA ID	对照表达量 Expression (CK)	处理表达量 Expression(T)	log 2 (FC)	P值 P value	趋势 Trend
1		miR156	28 73/	948 957	5.045	0.000.35	上调 Un
1	miR156c-3p_2	12,607	112 513	3 158	0.000.15	0.000 55	上调 Up 上调 Un
	miB156e-3n	122.352	13 266	-3 205	0.000 11		工调 Down
	miR156f-5p	31 991	201 084	2 652	0.001 10		上调 Un
	miR156k-3n	126 664	51 112	-1 309	0.021.58		工 <sup>调</sup> Op
2	miR159	miB159a 1	1 369 123	620 576	-1 142	0.021.27	下调 Down
2	miR159a 4	78 216	15 693	-2 317	0.000.02	0.021 27	下调 Down
	$miR159a_4$	241 182	8 208 194	5.089	0.000 02		上调 Un
3	miB160	miR160	332 983	43 613 722	7 033	0.000.00	上调 Up
5	miR160a_3n_3	68 014	366 331	2 429	0.006.62	0.000 00	上调 Up
	miR160a $3p_3$	32,520	421 032	2.429	0.000 02		上词 Up 上调 Up
	miR160a-3p_4	206 117	421.932	1 751	0.000 00		上词 Up 上调 Up
	miR1606-5p	1280.060	441 538	1.731	0.010 93		工师 Up 下週 Down
	miR160r-5p	185 534	24 856	-1.043	0.000 39		下调 Down 下调 Down
4	mix100g_1	185.554	24.830	-2.900	2.284	0.000.46	F)周 U.
4	mik162	miR162-5p	231.769	2 258.160	3.284	0.000 46	上 炯 Up 丁 畑 D
E	mik162a-3p	739.997	28.331	-4.707	0.001 //	0.000.21	下
3	miR104	mik164b-3p_2	5.405	51.477	3.252	0.000 21	上
	miR164c-3p_2	4.473	186.499	5.382	0.000 00		上调 Up
6	miR1041-3p	0.604	12.768	4.403	0.008 64	0.000.00	上 炯 Up 丁 畑 D
6	miR166	miR166a	365.383	109.611	-1./3/	0.000 00	下
	miR166a-5p_1	35.859	164.403	2.197	0.021 08		上调 Up
	miR166d-5p_2	661.392	5 668.546	3.099	0.000 13		上调 Up
	miR166h-3p_1	6019.722	2 694.272	-1.160	0.010 14		下调 Down
	miR166k-3p	1021.709	469.918	-1.121	0.004 79		▶ 墹 Down
	miR166m_1	596.293	124.197	-2.263	0.000 02		卜 墹 Down
	miR166m_2	204.395	7.433	-4.781	0.000 46		ト
7	miR167	miR167a-5p	654.093	176.527	-1.890	0.000 20	下调 Down
	miR167d	5402.076	57 907.162	3.422	0.000 14		上调 Up
	miR167d_1	790.952	21.143	-5.207	0.000 00		下调 Down
	miR167d-3p_5	4.235	37.787	3.157	0.003 92		上调 Up
	miR167g-3p	4.047	21.062	2.380	0.003 16		上调 Up
8	miR168	miR168a-3p_2	7 498.058	36 233.268	2.273	0.000 03	上调 Up
9	miR169	miR169a-3p_3	1.682	36.573	4.443	0.000 74	上调 Up
	miR169c-3p_1	10.808	65.672	2.603	0.000 17		上调 Up
	miR169c-3p_5	25.511	579.499	4.506	0.000 00		上调 Up
	miR169d-3p_3	357.242	4 618.614	3.692	0.000 28		上调 Up
	miR169d-5p_1	65.463	1 079.187	4.043	0.001 27		上调 Up
	$miR169e_2$	20.181	2.225	-3.181	0.003 14		下调 Down
	$miR169e_3$	3.082	26.689	3.114	0.004 26		上调 Up
	miR169e-3p_1	58.233	241.058	2.049	0.010 57		上调 Up
	miR169h_2	7.341	93.031	3.664	0.006 36		上调 Up
	miR169k-5p	161.245	727.733	2.174	0.001 56		上调 Up
	miR169m	3.793	76.157	4.328	0.000 14		上调 Up
	miR169m-5p	1.199	18.117	3.917	0.002 27		上调 Up
	miR169r-3p	3.887	78.355	4.333	0.000 04		上调 Up
	miR169r-5p	2.751	68.185	4.631	0.000 00		上调 Up

			约	卖表 2				
序号 No.	家族 Family	miRNA 编号 miRNA ID	对照表达量 Expression (CK)	处理表达量 Expression(T)	log 2 (FC)	P值 P value	趋势 Trend	
10	miR171	miR171a_3	65.519	23.729	-1.465	0.017 88	下调 Down	
	miR171a-3p	15.331	4.377	-1.808	0.020 04		下调 Down	
	miR171b-3p_3	137.790	170 3.706	3.628	0.003 49		上调 Up	
	$miR171e-5p_1$	9.596	43.006	2.164	0.006 55		上调 Up	
	miR171f	8.261	0.281	-4.879	0.001 25		下调 Down	
	miR171i_1	2228.766	818.757	-1.445	0.000 02		下调 Down	
11	miR172	miR172a_2	12.532	1.849	-2.761	0.010 41	下调 Down	
	$miR172b-5p_3$	346.643	2 763.508	2.995	0.001 70		上调 Up	
	miR172d-5p_4	105.771	523.500	2.307	0.013 72		上调 Up	
12	miR2118	miR2118a_2	26.740	4.574	-2.548	0.001 31	下调 Down	
	miR2118b	5339.363	2 097.461	-1.348	0.014 70		下调 Down	
	miR2118d	96.120	402.856	2.067	0.000 81		上调 Up	
	miR2118f_1	90.692	521.181	2.523	0.006 67		上调 Up	
	miR2118g	66.283	5.469	-3.599	0.000 01		下调 Down	
	miR2118p	498.943	1827.679	1.873	0.012 49		上调 Up	
13	miR390	miR390-3p_2	2.069	15.562	2.911	0.004 43	上调 Up	
14	miR393	miR393-3p_1	53.725	698.525	3.701	0.000 01	上调 Up	
	miR393a_3	107.640	542.872	2.334	0.000 34		上调 Up	
15	miR395	miR395h-5p	2.586	30.738	3.571	0.008 14	上调 Up	
16	miR396	miR396a-3p_4	1.601	25.432	3.989	0.003 31	上调 Up	
	miR396a-5p	180.860	17.171	-3.397	0.000 51		下调 Down	
	miR396b 13.610		271.022	4.316	0.000 00		上调 Up	
	miR396b-3p_1	6.136	73.003	3.573	0.000 46		上调 Up	
	miR396b-3p_3	35.226	177.642	2.334	0.000 78		上调 Up	
	miR396b-5p	183.564	51.783	-1.826	0.000 80		下调 Down	
	miR396e-3p_1	182.946	44.050	-2.054	0.010 03		下调 Down	
	miR396g	138.206	55.367	-1.320	0.010 45	0.010 45		
	miR396h	7.617	1.352	-2.495	0.012 08		下调 Down	
17	miR397	miR397-3p_3	215.647	2 637.398	3.612	0.001 77	上调 Up	
	miR397a_3	27.767	336.211	3.598	0.001 87		上调 Up	
18	miR398	miR398a-3p_2	11.259	119.098	3.403	0.005 51	上调 Up	
	miR398b	20.516	1 608.552	6.293	0.000 03		上调 Up	
19	miR399	miR399_1	16.048	1.571	-3.353	0.003 10	下调 Down	
	miR399b-5p_1	14.959	76.405	2.353	0.010 00		上调 Up	
	miR399e-5p	79.589	295.499	1.893	0.002 30		上调 Up	
	miR399k_1	35.366	154.991	2.132	0.000 73		上调 Up	
20	miR408	miR408-3p_1	951.933	11 195.030	3.556	0.020 29	上调 Up	
	miR408-5p_9	6.759	599.555	6.471	0.000 00		上调 Up	
	$miR408b_1$	16.628	467.667	4.814	0.000 39		上调 Up	
	miR408d	116.205	2 306.584	4.311	0.000 71		上调 Up	
21	miR444	miR444b.2	9 466.966	2 269.188	-2.061	0.001 85	下调 Down	
22	miR4995	miR4995	297.645	71.203	-2.064	0.018 57	下调 Down	
23	miR5139	miR5139	43.723	7.385	-2.566	0.010 29	下调 Down	
24	miR529	miR529-3p	42.770	5.191	-3.042	0.000 55	下调 Down	
25	miR530	miR530a_2	24.562	4.006	-2.616	0.017 36	下调 Down	
26	miR5505	miR5505	13.384	0.482	-4.795	0.000 04	下调 Down	
27	miR5523	miR5523	9.527	0.604	-3.979	0.002 70	下调 Down	

11 期

	续表 2												
序号 No.	家族 Family	miRNA 编号 miRNA ID	对照表达量 Expression (CK)	处理表达量 Expression(T)	log 2 (FC)	P值 P value	趋势 Trend						
28	miR5564	miR5564c-5p	2 057.141	274.385	-2.906	0.000 00	下调 Down						
29	miR5568	miR5568c-3p	2.390	23.041	3.269	0.003 51	上调 Up						
30	miR6218	miR6218-5p	4.570	20.811	2.187	0.008 34	上调 Up						
31	miR6221	miR6221-5p	50.052	12.539	-1.997	0.009 55	下调 Down						
32	miR6223	miR6223-5p	14.898	249.912	4.068	0.000 00	上调 Up						
33	miR6224	miR6234a-3p	0.548	7.645	3.801	0.004 88	上调 Up						
34	miR8175	miR8175	707.142	270.620	-1.386	0.007 87	下调 Down						
35	n_mir104	novel_mir104	6 160.659	415.650	-3.890	0.000 05	下调 Down						
36	n_mir106	novel_mir106	47.411	1 153.668	4.605	0.000 02	上调 Up						
37	n_mir107	novel_mir107	9.744	171.505	4.138	0.000 24	上调 Up						
38	n_mir108	novel_mir108	891.184	72.596	-3.618	0.000 09	下调 Down						
39	n_mir109	novel_mir109	16.716	194.103	3.538	0.001 33	上调 Up						
40	n_mir11	novel_mir11	660.280	3 258.241	2.303	0.003 16	上调 Up						
41	n_mir110	novel_mir110	27.128	0.344	-6.302	0.000 01	下调 Down						
42	n_mir15	novel_mir15	17.837	0.338	-5.724	0.000 08	下调 Down						
43	n_mir17	novel_mir17	11.582	0.296	-5.288	0.000 33	下调 Down						
44	n_mir20	novel_mir20	0.748	142.501	7.573	0.000 00	上调 Up						
45	n_mir23	novel_mir23	23.022	0.352	-6.032	0.000 02	下调 Down						
46	n_mir24	novel_mir24	248.551	74.516	-1.738	0.012 12	下调 Down						
47	n_mir25	novel_mir25	241.891	788.583	1.705	0.003 72	上调 Up						
48	n_mir26	novel_mir26	148.771	43.014	-1.790	0.001 28	下调 Down						
49	n_mir27	novel_mir27	11.000	0.643	-4.096	0.008 96	下调 Down						
50	n_mir29	novel_mir29	2 044.588	335.897	-2.606	0.000 34	下调 Down						
51	n_mir3	novel_mir3	12.479	0.790	-3.982	0.001 83	下调 Down						
52	n_mir34	novel_mir34	0.545	20.981	5.267	0.000 89	上调 Up						
53	n_mir36	novel_mir36	37.565	0.505	-6.218	0.000 01	下调 Down						
54	n_mir37	novel_mir37	20.896	662.275	4.986	0.000 00	上调 Up						
55	n_mir42	novel_mir42	1 022.840	358.059	-1.514	0.005 06	下调 Down						
56	n_mir47	novel_mir47	13.512	0.680	-4.313	0.013 92	下调 Down						
57	n_mir51	novel_mir51	0.535	121.564	7.828	0.000 00	上调 Up						
58	n_mir53	novel_mir53	577.260	169.427	-1.769	0.009 58	下调 Down						
59	n_mir58	novel_mir58	68.047	926.881	3.768	0.006 66	上调 Up						
60	n_mir61	novel_mir61	1 912.408	432.242	-2.145	0.000 00	下调 Down						
61	n_mir62	novel_mir62	180.637	63.979	-1.497	0.020 85	下调 Down						
62	n_mir64	novel_mir64	7.505	0.474	-3.984	0.024 09	下调 Down						
63	n_mir65	novel_mir65	0.618	37.647	5.929	0.000 00	上调 Up						
64	n_mir72	novel_mir72	0.828	260.425	8.296	0.000 00	上调 Up						
65	n_mir75	novel_mir75	186.658	37.721	-2.307	0.001 83	下调 Down						
66	n_mir82	novel_mir82	190.143	854.423	2.168	0.011 08	上调 Up						
67	n_mir84	novel_mir84	12.396	0.662	-4.227	0.006 72	下调 Down						
68	n_mir86	novel_mir86	0.439	11.476	4.709	0.003 54	上调 Up						
69	n_mir89	novel_mir89	5.958	0.419	-3.828	0.021 37	下调 Down						
70	n_mir95	novel_mir95	294.205	33.471	-3.136	0.008 67	下调 Down						
71	n_mir96	novel_mir96	0.862	51.926	5.912	0.000 16	上调 Up						

别,如拟南芥(Pasquinelli et al., 2000)、小麦 (Meng et al., 2013)、棉花(Sripathi et al., 2014)的 sRNA长度最多分布在 24 nt,杨树(李明娜等, 2014)、大豆(Turner et al., 2012)和番茄(Pilcher

## 表 3 响应低温的部分甘蔗 miRNA 及其靶基因

Table 3 Some miRNAs and their target genes in sugarcane responding to low temperature

miRNA 编号 miRNA ID	表达趋势 Expression trend	靶基因编号 Target gene ID	期望值 Expectation	功能描述 Functional description
miR156	下调 Down	Sspon.03G0000360-3C	3.0	鳞状类启动子结合蛋白 13 Squamosa promoter-binding-like protein 13
miR160g_1	下调 Down	Sspon.01G0019580-1A	2.0	生长素响应因子 22 Auxin response factor 22
		Sspon.04G0008020-4D	3.0	生长素响应因子 8 Auxin response factor 8
		Sspon.01G0032360-1A	3.0	前番茄红素异构酶 1,叶绿体 Prolycopene isomerase 1, chloroplastid
miR167d	上调 Up	Sspon.01G0032360-2D	3.0	类胡萝卜素异构酶 1 同型 X1 Carotenoid isomerase 1 isoform X1
miR169a-3p_3	上调 Up	Sspon.01G0004210-1A	2.5	转录因子 Y 亚基 A-7 异构体 X1 Nuclear transcription factor Y subunit A-7 isoform X1
		Sspon.01G0040290-2D	2.5	转录因子 Y 亚基 A-4 Nuclear transcription factor Y subunit A-4
		Sspon.02G0034130-2C	2.5	转录因子 Y 亚基 A-3 Nuclear transcription factor Y subunit A-3
miR171b-3p_3	上调 Up	Sspon.01G0000260-3P	3.0	稻草人相似蛋白 6 Scarecrow-like protein 6
		Sspon.04G0006810-1A	3.0	稻草人相似蛋白 27 Scarecrow-like protein 27
miR172d-5p_4	上调 Up	Sspon.02G0011120-1A	3.5	转录因子 bHLH49 Transcription factor bHLH49-like
		Sspon.03G0021730-1A	3.5	mRNA 前体加工蛋白 40A Pre-mRNA-processing protein 40A
		Sspon.04G0008430-4D	3.5	微管相关/结合蛋白 Microtubule-associated protein futsch
		Sspon.07G0023470-1B	3.0	DUF1682 家族蛋白 DUF1682 family protein
miR2118d	上调 Up	Sspon.01G0014780-1A	3.0	酪蛋白激酶 II 亚基 β-4 Putative casein kinase II subunit beta-4
miR393-3p_1	上调 Up	Sspon.05G0020400-1P	3.0	α-L-阿拉伯糖苷酶 1 Alpha-L-arabinofuranosidase 1
miR396b	上调 Up	Sspon.04G0022140-2C	3.0	光合系统 II 放氧增强蛋白 2 Photosystem II oxygen-evolving enhancer protein 2
miR397a_3	上调 Up	Sspon.01G0027900-2C	3.0	衰老特定的半胱氨酸蛋白酶 SAG39 Senescence-specific cysteine protease SAG39
		Sspon.04G0017800-3D	3.0	浓缩素-2 复合物亚基 D3 Condensin-2 complex subunit D3
miR398b	上调 Up	Sspon.03G0028270-2P	3.0	硒结合蛋白 1 Selenium-binding protein 1
miR399k_1	上调 Up	Sspon.07G0021800-1B	3.5	泛素结合酶 E2 23 Probable ubiquitin-conjugating enzyme E2 23
miR408d	上调 Up	Sspon.01G0047030-3D	3.5	类质体蓝素前体 Chemocyanin precursor
		Sspon.07G0017290-2B	3.0	小亚基核糖体 S23 Small subunit ribosomal protein S23
miR5140	下调 Down	Sspon.03G0002860-2B	3.5	核糖核酸酶 II,叶绿体/线粒体异构体 X1 Ribonuclease II, chloroplastid/mitochondrial isoform X1
		Sspon.07G0015510-1A	3.0	转位子 Transposon protein, putative, unclassified
miR530a_2	下调 Down	Sspon.02G0012470-1A	3.5	凋亡前期丝氨酸蛋白酶 NMA111 Pro-apoptotic serine protease NMA111
		Sspon.05G0000530-2D	3.5	含酰基辅酶 A 结合域的蛋白质 1 Acyl-CoA-binding domain-containing protein 1
miR5523	下调 Down	Sspon.02G0001670-3D	3.5	泛素羧基端水解酶 Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase
miR5564c-5p	下调 Down	Sspon.06G0002720-3D	3.0	3'-5'-核糖核酸外切酶家组蛋白 3'-5'-exoribonuclease family protein
miR5568c-3p	上调 Up	Sspon.01G0013100-1A	3.0	海藻糖酶异构体 X1 Probable trehalase isoform X1
		Sspon.01G0014700-3C	3.0	丙二酰辅酶 A 酰基载体蛋白转酰酶 Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase
		Sspon.01G0033120-1A	2.5	5-羟脯氨酸酶 5-Oxoprolinase
		Sspon.01G0033150-1P	3.5	内质网相关的降解蛋白 Derlin-2.2
		Sspon.03G0010210-1P	3.0	线粒体苹果酸脱氢酶 2 Malate dehydrogenase 2 mitochondrial
		Sspon.04G0006870-1A	3.5	海藻糖磷酸酶 1 Probable trehalose-phosphate phosphatase 1
miR6218-5p	上调 Up	Sspon.01G0003280-1A	3.5	ABC 转运蛋白 G 家族成员 22 同型 X2 ABC transporter G family member 22 isoform X2
		Sspon.02G0047980-1C	3.5	60S 核糖体蛋白 L36a 60S ribosomal protein L36a, partial
miR6234a-3p	上调 Up	Sspon.07G0037700-1D	3.0	过氧化物酶体生成蛋白-14 Peroxin-14
novel_mir23	下调 Down	Sspon.01G0023790-2P	3.5	生长素响应蛋白 Auxin-responsive protein IAA30
		Sspon.01G0039360-1P	3.5	DNA 解旋酶 INO80 DNA helicase INO80
		Sspon.02G0004350-3D	3.5	液泡膜蛋白 KMS1 Vacuole membrane protein KMS1
		Sspon.02G0014140-3D	2.0	E3 泛素蛋白连接酶 AIP2 E3 ubiquitin-protein ligase AIP2
		Sspon.02G0014480-3C	2.0	胚乳碱性亮氨酸拉链转录激活因子 5 Opaque endosperm 5
novel_mir36	下调 Down	Sspon.04G0017230-1A	2.5	鳞状类启动子结合蛋白 4 Squamosa promoter-binding-like protein 4
		Sspon.07G0022740-1B	3.5	50S 核糖体蛋白 L33 50S ribosomal protein L33
novel_mir90	下调 Down	Sspon.08G0003790-2B	2.5	水解 O- 和 S-糖基复合物 Hydrolyse O- and S-glycosyl compounds

80022.13-	0.949	0.944	0.948	0.818	0.884	0.818	0.882	0.729	0.932	0.721	0.786	0.673	0.801	0.793	0.764	0.824	0.798	Î.	
ROC22_72-	0.763	0.768	0.751	0.958	0,791	0.786	0.902	0.888	0.757	0.688	0,782	0.551	0.776	0.666	0.676	0.990		0.798	
ROCELTI -	0.792	0.779	0.775	0.952	0.817	0.813	0.918	0.905	0.798	0.912	0.815	0.593	0.779	0.685	0.707	ä	0.990	0.824	
POCA_013 -	0.730	0.719	0.826	0.690	0.814	0.826	0.732	0.710	0.734	0.722	0.918	0.911	0.667	0.910		0.707	0.676	0.764	
R0C22_CH2-	0.779	0.747	0.890	0.693	0.743	0.749	0.710	0.708	0.788	0.694	0.828	0.877	0.918	÷	0.910	0.685	0.666	0.793	
POC22 OKI -	0.740	0.868	0.723	0.833	0.779	0.734	0.819	0.594	0.651	0.576	0.711	0.867	a l	0.826	0.667	0.779	0.776	0.801	
GT28-T3-	0.672	0.589	0.757	0.525	0.640	0.635	0.620	0.658	0.716	0.718	0.827	đ	0.835	0.877	0.911	0.593	0.551	0.673	
GT28-T2-	0.756	0.742	0.832	0.799	0.829	0.871	0.748	0:835	0.746	0.846	1	0.827	0.711	0.828	0.918	0.815	0.782	0.786	
0128.11-	0.718	0.620	0.725	0.822	0.726	0.734	0.797	0.940	0.769	ŧ	0.846	0.718	0.576	0.694	0.722	0.912	0.888	0.721	Pearson value
6728-013-	0.933	0.839	0.915	0.736	0.852	0.781	0.879	0.769	l d	0.769	0.746	0.716	0.651	0.788	0.734	0.798	0.757	0.932	0.7 0.6 0.5
6128_042-	0.731	0.638	0.741	0.848	0.736	0.755	0.805	т,	0.769	0.940	0.835	0.658	0.594	0.708	0.710	0.905	0,888	0.729	
6728-CK1 -	0.862	0.835	0.812	0.867	0.884	0.786	Ŧ	0.805	0.879	0.797	0.748	0.620	0.819	0.710	0.732	0.918	0.902	0.882	
GR2_73-	0.786	0.788	0.809	0.825	0.919	1	0.786	0.755	0.781	0.734	0.871	0.635	0.734	0.749	0.826	0.813	0.786	0.818	
GR2 12-	0.863	0.834	0.841	0.814	1	0.919	0.884	0.736	0.852	0.726	0.829	0.640	0.779	0.743	0.814	0.817	0.791	0.884	
GR2.11-	0.781	0.829	0.773	÷	0.814	0.825	0.867	0.848	0.736	0.822	0.799	0.525	0.833	0.693	0.690	0.952	0.958	0.818	
GR2_CK3 -	0.921	0.904	Ŧ	0.773	0.841	0.809	0.812	0.741	0.915	0.725	0.832	0.757	0.723	0.890	0.826	0.775	0.751	0.948	
GR2_CK2-	0.912	н	0.904	0.829	0.834	0.788	0.835	0.638	0.839	0.620	0.742	0.589	0.868	0.747	0.719	0.779	0.768	0.944	
GP2_OK1 -	Ť	0.912	0.921	0.781	0.863	0.786	0.862	0.731	0.933	0.718	0.756	0.672	0.740	0.779	0.730	0.792	0.763	0.949	
G	e on or	2.0H2 OF	ne ora	R2.TI	3P2.12	SPE TS OT	28 CHI OT	a ck2 of	28.000 0	128.TI 0	128.72 0	128.73 POC	2. OKI ROC	a ora poo	Q OKS RO	C22.TI PO	CR2.T2 PO	02.73	

*X*、*Y* 轴均代表每个样品。颜色代表相关性系数,颜色越蓝代表相关性越高,颜色越浅代表相关性越低。 *X* and *Y* axes represent each sample. Color represents the correlation coefficient, the bluer the color, the higher the correlation, and the lighter the color, the lower the correlation.



et al., 2007)的 sRNA 长度最多分布在 21 nt,这些 结果与本研究结果高度相似。本研究通过生物信 息学手段共挖掘 137 个 miRNA 在低温胁迫前后进 行差异性表达,其中 100 个已知 miRNA (61 个上 调,39 个下调),37 个新 miRNA(15 个上调,22 个 下调)。在低温胁迫下植物通过调节 miRNA 的表 达水平,进而调节对应靶基因的表达,从而引起相 关代谢与信号转导途径的变化来实现对逆境的响 应,其信号转导途径主要包括胞外信号途径、胞内 第二信使、转录因子以及功能基因等。Wu和 Poethig (2006)的研究发现,低温胁迫导致 miR156 下调而其靶基因表达量增加,进而调控拟南芥营和



1850

养期延长、生长代谢变缓,以应对不良环境,这与本研究低温胁迫后miR156下调的结果一致。王丽丽等(2017)在拟南芥、小麦和水稻研究中发现miR160响应低温胁迫。而本研究中,在低温胁迫后miR160g\_1表达下调,靶基因表达受抑制且作用于生长素信号通路从而在抵抗低温中发挥作用。Pourcel等(2005)研究表明miR397的靶基因与漆酶有关,与细胞壁木质素的合成、抗病、对环境的适应过程密切相关。而本研究发现,低温胁迫后甘蔗叶片miR397a\_3呈上调表达,其靶基因与抗坏血酸氧化酶(L-ascorbate oxidase)有关,可能参与调控抗坏血酸氧化酶的表达而增强低温响应能力。Li 等(2014)研究旱芹miRNA 对低温胁迫的响应发现,miR160、miR164、miR394、miR395、



1. 细胞过程; 2. 代谢过程; 3.生物调节; 4. 发育过程; 5. 定位; 6. 响应刺激; 7. 多细胞有机体过程; 8. 繁殖; 9. 繁殖过程; 10. 信号传导; 11. 细胞成分组织或生物发生; 12. 多有机体过程; 13. 生长; 14. 细胞; 15. 细胞器; 16. 细胞膜; 17. 细胞膜部分; 18. 蛋白复合体; 19. 细胞器部分; 20. 细胞连接; 21. 共质体; 22. 膜包管腔; 23. 超分子复合体; 24. 胞外区; 25. 结合; 26. 转录因子活性; 27. 催化活性; 28. 转运活性; 29. 结构分子活性; 30. 分子功能因子; 31. 抗氧化活性.

Cellular process; 2. Metabolic process; 3. Biological regulation; 4. Developmental process; 5. Localization; 6. Response to stimulus; 7. Multicellular organismal process; 8. Reproduction; 9. Reproductive process; 10. Signaling; 11. Cellular component organization or biogenesis;
 Multi-organism process; 13. Growth; 14. Cell; 15. Organelle; 16. Membrane; 17. Membrane part; 18. Protein-containing complex;
 Organelle part; 20. Cell junction; 21. Symplast; 22. Membrane-enclosed lumen; 23. Supramolecular complex; 24. Extracellular region;
 Ending; 26. Transcription regulator activity; 27. Catalytic activity; 28. Transporter activity; 29. Structural molecule activity; 30. Molecular function regulator; 31. Antioxidant activity.

图 4 差异表达 miRNA 靶基因的 GO 功能分析

Fig. 4 GO function analysis of miRNAs target genes for differentially expressed

miR408 具有表达差异。Sunkar 和 Zhu (2004)在 研究分析拟南芥响应胁迫 miRNA 中,发现一些 miRNA 能被多种胁迫因素诱导,如 miR393 受到低 温、干旱、高盐的诱导表达。Gupta 等(2014)研究 小麦 miRNA 对低温胁迫、盐胁迫、渗透胁迫的响应 发现,在盐胁迫和低温胁迫下,miR168、miR397 均 表达下调,而 miR172 表达上调;miR393 在渗透和 盐胁迫下表达量上升,在低温胁迫下表达量下降。 Sun 等(2015)研究发现,在低温胁迫下对葡萄的 miR169的表达量上调,但在拟南芥、扁桃中研究 发现 miR169的表达量下调。结合前人的研究结 果,本研究认为特定 miRNA 对低温胁迫的响应可 能因植物种类、同一植物的不同基因型、不同的组 织类型、胁迫的时间等而有所差异。

Table 4         Design of qRT-PCR primer for miRNAs and target genes						
miRNA 编号 miRNA ID		靶基因编号 Target gene ID	引物 Primer			
	الال Primer		正向引物 (5'-3') Forward primer (5'-3')	反向引物 (5'-3') Reverse primer (5'-3')		
miR156	CGCTGACAGAAGAGAGTGAGCAC	Sspon.03G0000360-3C	GGCACAACTGAGAGCACACCTT	ACTACATTGGATGGCAGCACCT		
miR160g_1	TATATGCCTGGCTCCTTGTATGCCA	Sspon.01G0019580-1A	GGAGCACCTTCGTCAACCACAA	ATGCACTCCATGCCACCACAG		
miR167d	TGAAGCTGCCAGCATGATCTGG	Sspon.01G0032360-2D	CCAGGATGCTTGCTTGAGTACC	TGACACCAACTGCTCGACCATT		
miR169a-3p_3	CCATAGCCAAGGATGACTTGCCG	Sspon.01G0004210-1A	ACGAGCGAAGCAAAGCAAGGT	AGAGCAAGTCAGCGAGGAAGGA		
miR171b-3p_3	CTTGAGCCGTGCCAATATCACG	Sspon.01G0000260-3P	TGGATCATTGGCGGCGAGGA	CAGGAAGTTGGGCGTGTGGA		
miR172d-5p_4	GCGCAGCACCATCAAGATTCAC	Sspon.02G0011120-1A	GATGGTGCTGGTGTCGTTCTGA	CCTCCTCTACCTTCGGCTTCAC		
miR393-3p_1	CCGCAGTGCAATCCCTTTGGAATT	Sspon.05G0020400-1P	GCTTCGCCTCCTGCTTCTTCT	TCCACCATCCGATACCTCCTCT		
miR396b	CGCGTTCCACAGCTTTCTTGAACT	Sspon.04G0022140-2C	AGGGTTACACGATTCCGCTTGA	CGCCTTCTGCTCTGCCACAT		
miR397a_3	CGTCATTGAGTGCAGCGTTGATG	Sspon.04G0017800-3D	CCGCCAATAAGGTCGTCGTCAC	GGTACGCCTTGTGCAGCTTCTC		
miR398b	TATATAGGGGCGGACTGGGAACAC	Sspon.03G0028270-2P	CGCCGCTTCCTGATCTTACCTT	CGACATACACACGACCTGACCT		
miR399k_1	TGCCAAAGGAAATTTGCCCCG	Sspon.07G0021800-1B	TGGAGGAATTGGAGCCGTTGGA	AGAGCCGAGCACCGAAGAAGAG		
miR408d	TGCACTGCCTCTTCCCTGG	Sspon.07G0017290-2B	GATGCCGTTAGGGTCAGGACAA	AGCACAGCGGTTCCAACACAA		
novel_mir36	GCGATTGACAGAAGAGAGTGAGCAC	Sspon.08G0015870-2B	TCGCTTGGATCGTTGAGAATTG	ACATAGGCTGCTGCTAGTACC		
novel_mir89	TCGACTCCCACTGTGGTCG	Sspon.08G0003790-2B	TCGGCGTCCCTGGTGTTCAA	CAGAGCGTGAAGGTGTCGTTCC		





A. miRNA qRT-PCR 检验; B. 靶基因 qRT-PCR 检验。 A. Results of miRNA qRT-PCR; B. Results of target genes.



本研究利用 psRNATarget、TargetFinder 及 Tapirhybrid 三种分析方式预测靶基因,对预测所得 的靶基因进行 GO 分析发现,在生物过程类别中预 测靶基因的主要生物学功能富集于细胞过程和代 谢过程;在细胞组分类别中预测靶基因生物学功 能主要富集于细胞、细胞器和生物膜;在分子功能

1851

类别中预测靶基因生物学功能主要富集于结合和 催化活性及转运活性。在逆境胁迫条件下植物通 过调节 miRNA 的表达水平,进而调节对应靶基因 的表达,从而引起相关代谢与信号转导途径的变 化来实现对逆境的响应。因此,进一步对参与调 控植物激素信号传导、光合色素合成、抗氧化酶系 统、泛素介导蛋白水解、淀粉与蔗糖代谢等通路的 靶基因进行 qRT-PCR 验证。本研究发现, miR156 靶向调控 SBP 转录因子, 低温胁迫前后, miR156 下调表达,负向调控 SBP 转录因子,使甘蔗生长代 谢变缓而耐寒能力增强。梅琳(2007)研究冬小麦 发现,低温胁迫下 miR160 的靶基因 ARF17 在过表 达 miR160f 拟南芥植株中表达量明显下降。在拟 南芥、水稻、玉米研究中证明 miR160、miR167 的靶 基因是 ARF(Auxin Response Factors), 主要通过调 控生长素信号通路应对逆境。而本研究也发现甘 蔗在低温胁迫后 miR160g\_1 上调表达且其作用于 转录因子 ARF。张译云等(2012)研究发现毛白杨 在低温胁迫下 miR169ac 表达下调,对其靶基因转 录因子 NAC 负向调控。党春艳(2013)在研究高 山离子芥低温胁迫响应中发现,miR169a 在冷胁迫 下无显著表达,而 miR169 在冷胁迫下表达下调, 表明 miR169 家族之间响应低温存在差异。本研 究中,miR169 a-3p\_3 在低温胁迫后表达上调,作 用于细胞核转录因子使其表达下调,推测 miR169 a-3p\_3 与调控甘蔗低温耐受能力密切相关。

此外,本研究通过生物信息学挖掘甘蔗响应 低温的 miRNA,不仅参与抗氧化酶系统、植物激素 信号传导、遗传信息等,而且参与类胡萝卜素代 谢、卟啉与叶绿素代谢、淀粉与蔗糖代谢途径相关 基因的表达。有研究表明叶绿体内的类胡萝卜素 既可作为吸收光能的辅助色素将能量传递给叶绿 素 a,又可在持续胁迫条件下将过剩光能安全耗散 而保护光合机构(Liu et al., 2004; Holt et al., 2005)。我们前期的研究也发现,低温胁迫时甘蔗 能够通过增加光合机构过剩激发能的耗散和调整 其叶片光合色素含量与构成进行有效的光能利用 和分配。本研究对部分差异表达 miRNA 及其靶基 因进行 qRT-PCR 检验发现,参与类胡萝卜素代谢 的 miR167d 对靶基因具有负向调控作用。因此, 后续我们将对低温条件下参与光合生理过程的 miRNA 分子调控机制进行深入研究,为抗寒育种 提供重要理论依据和实验基础。

#### 参考文献:

- AMBROS V, 2004. The function of animal MicroRNAs [J]. Nature, 431: 350-355.
- BONNET E, HE Y, BILLIAU K, et al., 2010. TAPIR, a web server for the prediction of plant microRNA targets, including target mimics [J]. Bioinformatics, 26: 1566–1568.
- DANG CY, 2013. Expression analysis of chilling-stress regulated miRNAs and their targets in *Chorispora bungeana* [J]. Lanzhou: Lanzhou University. [党春艳, 2013. 高山离子芥 低温胁迫调控的 miRNAs 及其靶基因的表达分析 [D]. 兰州: 兰州大学.]
- DEMMIG-ADAMS B, ADAMS WW, 1996. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis [J]. Trends Plant Sci, 1: 21-26.
- EVERS M, HUTTNER M, DUECK A, et al., 2015. miRA: adaptable novel miRNA identification in plants using small RNA sequencing data [J]. BMC Bioinf, 16: 370.
- FAHLGREN N, CARRINGTON JC, 2010. miRNA target prediction in plants [J]. Meth Mol B, 592: 51–57.
- FRIEDLANDER MR, CHEN W, ADAMIDI C, et al., 2008. Discovering microRNAs from deep sequencing data using miRDeep [J]. Nat Biotechnol, 26: 407–415.
- GU L, HUANG ZG, LI WB, et al., 2011. Analysis on climatic factors affecting sugarcane meteorological yield in Nanning area during 1980 2007 [J]. J S Agric, 42(5): 492 495. [古丽, 黄智刚, 李文宝, 等, 2011. 1980—2007 年 南宁蔗区甘蔗气象产量变化及影响因子分析 [J]. 南方 农业学报, 42(5): 492-495.]
- GUO T, LI GL, WEI Q, et al., 2011. The function of plant MicroRNA [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 31(11): 2237-2254. [郭韬, 李广林, 魏强, 等, 2011. 植物 MicroRNA 功能的研究进展 [J]. 西北植物学报, 31(11): 2347-2254.]
- GUPTA O, MEENA N, SHARMA I, et al., 2014. Differential regulation of microRNAs in response to osmotic, salt and cold stresses in wheat [J]. Mol Biol Rep, 41: 4623-4629.
- HE Y, TAN ZK, DING MH, et al., 2009. Infrequent disaster of the cold and freezing disaster and its impacts on sugarcane production in Guangxi [J]. J Catastrophol, 24(1): 68-72. [何燕, 谭宗琨, 丁美花, 等, 2009. 2008 年罕见低温 冻害对广西甘蔗及蔗糖业的影响 [J]. 灾害学, 24(1): 68-72.]
- HOLT NE, ZIGMANTAS D, VALKUNAS L, et al., 2005. Carotenoid cation formation and the regulation of photosynthetic light harvesting [J]. Science, 307: 433–436.
- KUANG ZM, LI Q, RAO YM, et al., 2009. Application of EOS/MODIS data to monitoring sugarcane cold damage [J]. J Appl Meteorol Sci, 20(3): 360-364. [匡昭敏, 李强, 尧永梅, 等. 2009. EOS/MODIS 数据在甘蔗寒害监测 评估中的应用 [J]. 应用气象学报, 20(3): 360-364.]
- LI MN, LONG RC, YANG QC, et al., 2014. Cloning and function analysis of a salt-stress-induced HD-Zip

transcription factor MsHB2 from Alfalfa [J]. Plant Physiol J, 47(4): 622-632. [李明娜, 龙瑞才, 杨青川, 等, 2014. 紫花苜蓿盐诱导 HD-Zip 类转录因子 MsHB2 的克隆及功能分析 [J]. 中国农业科学, 47(4): 622-632.]

- LI MY, WANG F, XU ZS, et al., 2014. High throughput sequencing of two celery varieties small RNAs identifies microRNAs involved in temperature stress response [J]. BMC Genom, 15: 242.
- LI YR, FANG FX, WU JM, et al., 2011. Survey of frost and cold damage on sugarcane production in Guangxi in 2010/2011 milling season and countermeasures [J]. J S Agric, 42 (1): 37-42. [李杨瑞, 方锋学, 吴建明, 等, 2011. 2010/2011 榨季广西甘蔗生产冻害调查及防御对策 [J]. 南方 农业学报, 42(1): 37-42.]
- LIU YH, LIU ZZ, LUO LJ, et al., 2007. Plant miRNA and its potential role in plant developmental process and environmental stress responses [J]. Plant Physiol J, 43(5): 987-992. [刘运华, 刘灶长, 罗利军, 2007. 植物 miRNA 及其在植物发育进程和环境胁迫响应中的潜在功能 [J]. 植物生理学报, 43(5): 987-992.]
- LIU ZF, YAN HC, WANG KB, et al., 2004. Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2. 72 Å resolution [J]. Nature, 428 (6980): 287-292.
- LÜ DK, BAI X, LI Y, et al., 2010. Profiling of cold-stressresponsive miRNAs in rice by microarrays [J]. Gene, 459: 39–47.
- MEI L, 2016. Cloning four kinds of miRNAs and analysis of expression pattern with cold related in *Triticum aestivum* L. [D]. Harbin: Northeast Agricultural University. [梅琳, 2016. 冬小麦抗寒相关 4 种 miRNAs 的克隆及表达特征 分析 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学.]
- MENG F, LIU H, WANG K, et al., 2013. Developmentassociated microRNAs in grains of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. BMC Plant Biol, 13: 140.
- MORTAZAVI A, WILLIAMS BA, MCCUE K, et al., 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq [J]. Nat Methods, 5: 621–628.
- PASQUINELLI AE, REINHART BJ, SLACK F, et al., 2000. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA [J]. Nature, 408(6808): 86–89.
- PILCHER RLR, MOXON S, PAKSERESHT N, et al., 2007. Identification of novel small RNAs in tomato (*Solanum lycopersicum*) [J]. Planta, 226: 709-717.
- POURCEL L, ROUTABOUL JM, KERHOAS L, et al., 2005. Transparent TESTA10 encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in *Arabidopsis* seed coat [J]. Plant Cell, 17: 2966–2980.
- SRIPATHI, VR, CHOI Y, CHAN AP, et al., 2014. Small RNA transcriptome profiles of four cotton species, Gossypium hirsutum, G. herbaceum, G. arboreum and G. raimondii [C]. San Diego: International Plant and Animal Genome Conference XXII.

- SU YX, LI Z, SUN H, 2006. Climate division of sugarcane planting based on GIS in Guangxi [J]. Chin J Agrometeorol, 27(3):987-992. 苏永秀, 李政, 孙涵, 2006. 基于 GIS 的 广西甘蔗种植气候区划 [J]. 中国农业气象, 27(3): 252-255.
- SUN XM, FAN GT, SU LY, et al., 2015. Identification of cold-inducible microRNAs in grapevine [J]. Front Plant Sci, 6: 595.
- SUNKAR R, CHINNUSAMY V, ZHU JH, et al., 2007. Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation [J]. Trends Plant Sci, 12: 301–309.
- SUNKAR R, LI YF, JAGADEESWARAN G, 2012. Functions of microRNAs in plant stress responses [J]. Trends Plant Sci, 17: 196–203.
- SUNKAR R, ZHU JK, 2004. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis [J]. Plant Cell, 16: 2001–2019.
- THIEBAUT F, ROJAS CA, ALMEIDA KL, et al., 2012. Regulation of miR319 during cold stress in sugarcane [J]. Plant Cell Environ, 35: 502-512.
- TURNER M, YU O, SUBRAMANIAN S, 2012. Genome organization and characteristics of soybean microRNAs [J]. BMC Genom, 13: 169.
- WANG LL, ZHAO TL, GE JT, et al., 2017. Application prospects of plant cold-stress-responsive miRNAs in cold resistance research of plants [J]. Acta Agric Shanghai, 33 (6): 129-134. [王丽丽,赵统利, 葛金涛, 等, 2017. 植 物低温胁迫响应 miRNAs 在植物抗寒研究中的应用前景 [J]. 上海农业学报, 33(6): 129-134.]
- WANG XS, TONG YA, WANG SH, 2010. Rapid and accurate detection of plant miRNAs by liquid northern hybridization [J]. Int J Mol Sci, 11: 3138–3148.
- WU G, POETHIG RS, 2006. Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target SPL3 [J]. Development, 133: 3539–3547.
- WU HJ, MA YK, TONG C, et al., 2012. PsRobot: a webbased plant small RNA meta-analysis toolbox [J]. Nucl Acid Res, 40: 22–28.
- WU MG, LIN YQ, ZHANG H, 2010. Research status and prospect on industrial standard of sugarcane in China [J]. Subtrop Agric Res, 6: 209-212. [吴棉国, 林彦铨, 张华, 2010. 我国甘蔗产业标准研究现状与展望 [J]. 亚 热带农业研究, 6: 209-212.]
- XIONG L, ZHU JK, 2003. Regulation of abscisic acid biosynthesis [J]. Plant Physiol, 133: 29–36.
- ZHANG YY, REN YY, CHEN L, et al., 2017. Differential expression analysis of 12 MicroRNAs under cold stress in *Populus tomentosa* [J]. Chin Agric Sci Bull, 28(7): 1-7. [张译云, 任媛媛, 陈磊, 等. 2012, 毛白杨 12 种 microRNAs 的低温胁迫差异表达分析 [J]. 中国农学通 报, 28(7): 1-7.]

(责任编辑 蒋巧媛)

#### DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202008003

黄俞铭,罗维钢,胡钧铭,等.保护地蔗田对土壤优先流与根系生物量及产量品质的影响 [J]. 广西植物,2022, 142(11):1854-1864. HUANG YM, LUO WG, HU JM, et al. Effects of protected sugarcane field on soil preferential flow and root biomass and yield

quality of sugarcane [J]. Guihaia, 2022, 42(11): 1854–1864.



# 保护地蔗田对土壤优先流与根系生物量及产量品质的影响

黄俞铭<sup>1,2</sup>,罗维钢<sup>3</sup>,胡钧铭<sup>2</sup>\*,韦翔华<sup>1</sup>,黄嘉琪<sup>1,2</sup>,陈仕林<sup>1,2</sup>,蒙炎成<sup>2</sup>, 俞月凤<sup>2</sup>,李婷婷<sup>2</sup>,张俊辉<sup>2</sup>,周慧蓉<sup>2</sup>,黄忠华<sup>3</sup>,韦本辉<sup>4</sup>,陈 渊<sup>4</sup>

**摘**要:为探明保护性耕作对蔗田土壤及甘蔗生长的影响,该研究设置2种耕作方式(常规耕作、粉垄耕 作)与2种施肥水平(减量施肥20%、常规施肥),并于甘蔗苗期后在甘蔗行间近根部覆盖豆科秸秆,以第二 年宿根蔗为研究对象,采用染色示踪法测定秸秆覆盖下蔗田土壤优先流特征,同时测定分析甘蔗株高、茎 围、地下根系生物量、产量及品质等重要农艺性状。结果表明:(1)粉垄耕作方式下蔗田土壤优先流发生速 度快且活跃,添加秸秆覆盖降低了土壤优先流发生程度,增加了土壤水分在10~25 cm 土层的横向运移能 力,在一定程度上提高了土壤蓄水能力。(2)粉垄保护性耕作在秸秆覆盖下提高了甘蔗根系生物量和产量, 秸秆覆盖下粉垄免耕宿根蔗根系生物量提高了8.97%~25.54%,并且减量施肥处理中秸秆覆盖宿根蔗伸长 期地下根系生物量显著高于无秸秆覆盖,秸秆覆盖下甘蔗株高提高了4.2%~13.1%;在减量施肥处理中,粉 垄耕作添加秸秆覆盖甘蔗产量提高了16.27%,并且添加秸秆覆盖较常规施肥中无秸秆覆盖,产量提高了 5.95%。(3)粉垄保护性耕作利于提高甘蔗品质,对比无秸秆覆盖处理,粉垄耕作下秸秆覆盖后显著提高了 甘蔗蔗汁视纯度,并且宿根蔗纤维分、蔗汁锤度、转光度和蔗糖分均有提升。综上认为,免耕秸秆覆盖可作 为粉垄红壤坡耕地蔗田保护性生产调控方式。

关键词:保护性耕作,秸秆覆盖,土壤优先流,甘蔗根系,粉垄耕作 中图分类号:0945 文献标识码:A 文章编号:1000-3142(2022)11-1854-11

# Effects of protected sugarcane field on soil preferential flow and root biomass and yield quality of sugarcane

<sup>(1.</sup> 广西大学农学院,南宁 530004; 2. 广西壮族自治区农业科学院农业资源与环境研究所,南宁 530007;
3. 南宁市灌溉试验站,南宁 530001; 4. 广西壮族自治区农业科学院经济作物研究所,南宁 530073)

收稿日期: 2021-03-28

基金项目:国家自然科学基金(41661074);广西"新世纪十百千人才工程"专项(2018221);广西创新驱动重大专项(桂科 AA17204037-3);广西农业科学院创新团队项目(桂农科 2018YT08,桂农科 2021YT040) [Supported by National Natural Science Foundation of China(41661074); Special Fund for Guangxi "New Century Ten Hundred Thousand Talent Project" (2018221); Innovation of Guangxi Driven Project(AA17204037-3); Innovation Team Project of Guangxi Academy of Agricultural Sciences(2018YT08, 2021YT040)]。 第一作者:黄俞铭(1995-),硕士研究生,研究方向为农业资源管理与利用,(E-mail) 562866447@qq.com。

<sup>\*</sup>通信作者:胡钧铭,博士,研究员,研究方向为农业有机资源利用与生境调控及逆境生态,(E-mail)jmhu06@126.com。

# HUANG Yuming<sup>1,2</sup>, LUO Weigang<sup>3</sup>, HU Junming<sup>2\*</sup>, WEI Xianghua<sup>1</sup>, HUANG Jiaqi<sup>1,2</sup> CHEN Shilin<sup>1,2</sup>, MENG Yancheng<sup>2</sup>, YU Yuefeng<sup>2</sup>, LI Tingting<sup>2</sup>, ZHANG Junhui<sup>2</sup>, ZHOU Huirong<sup>2</sup>, HUANG Zhonghua<sup>3</sup>, WEI Benhui<sup>4</sup>, CHEN Yuan<sup>4</sup>

( 1. Agricultural College, Guangxi University, Nanning 530004; 2. Agricultural Resource and Environment Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007; 3. Nanning Irrigation Experiment Station, Nanning 530001;
 4. Cash Crop Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530073 )

Abstract: In order to investigate the effects of conservation tillage on the soil and sugarcane growth in sugarcane field, the study set up two farming methods (conventional farming, smash ridging) and two fertilization levels (reduced fertilization by 20%, conventional fertilization), and covered leguminous straw near the roots between sugarcane rows after the sugarcane seedling stage, taking the second-year stubble cane as the object. The dyeing tracer method was used to determine the characteristics of preferential flow in the sugarcane field under straw mulching, and the study also determined and analyzed sugarcane plant height, stem circumference, underground root biomass, yield and quality and other important agronomic characteristics. The results were as follows: (1) The soil preferential flow in the sugarcane field under the smash ridging was fast and active. The addition of straw mulch reduced the degree of soil preferential flow, increased the lateral transport capacity of soil moisture in the 10-25 cm soil layer, and improved the soil water storage capacity to a certain extent. (2) Conservation tillage of smash ridging under straw mulching improved the root biomass and yield of sugarcane. The root biomass of no-tillage stubble cane under straw mulching increased by 8.97%-25.54%. Compared without straw mulching, the biomass of the underground root system during the elongation period of the straw mulching stubble cane increased by 4.2%-13.1% under the reduced fertilization treatment; In the weight loss treatment, the sugarcane yield increased by 16.27% under adding straw mulch and smash ridging coupling, and compared with conventional fertilization without straw mulching, the yield increased by 5.95% under adding straw mulching. (3) Smash ridging conservation tillage was beneficial to improve the quality of sugarcane. Compared with the treatment without straw mulching, the straw mulching under smash ridging tillage significantly improved the apparent purity of sugarcane juice, and the fiber, brix, pol and sucrose content were all improved. In summary, no-tillage straw mulching can be used as a protective production regulation method for sugarcane fields in smash ridging red soil slope farmland.

Key words: conservation tillage, straw mulching, soil preferential flow, sugarcane root system, smash ridging

坡耕地是南方红壤旱地重要耕地类型之一, 土壤质地经长期自然演化形成酸、瘦、粘等典型特征(赵其国等,2013)。受化肥集约化农业生产影 响,耕地板结、耕层浅薄、地力下降越发严重,同时 受亚热带季节性降雨影响,造成裸露坡耕地水土 流失,坡耕地土壤环境退化已影响到耕地质量和 农作物生产(金慧芳等,2018)。因此,稳定提升坡 耕地土壤质量和农业生产力具有重要意义。

土壤优先流是土壤水和溶质通过土壤大孔隙 等向土壤深层快速运移的非均匀流动现象(王伟 等,2010),优先流的发生使溶质随水分快速向土 壤深层入渗,造成水肥流失(盛丰等,2016),同时 也是土壤侵蚀与水土流失等自然灾害的诱发因子 之一(吕刚等,2018),陈晓冰等(2019)对不同作 物田间优先流比较研究发现,玉米地优先流发育 程度最高。保护性耕作作为一项农业可持续生产 技术,通过免少耕或地表覆盖等措施减少土壤侵 蚀,其中秸秆覆盖是一种典型的保护性耕作生产 措施,已在水稻、小麦、大豆、烤烟等不同作物生产 上得到应用(Liu et al.,2012;董云云等,2020;吕凯 和吴伯志,2020),可以增加地表糙度,减少地面径 流形成,降低雨水对表层土壤的冲刷和侵蚀 (Jordán et al.,2010;郭强等,2019)。

耕地保护是实现我国社会经济可持续发展的

一项基本国策,高质量的耕地对我国农业生产极为 重要,土壤利用必须坚持与土壤保护同步(赵其国 等,2006)。随着城市化进程的加快,人们对耕地土 壤的侵占以及对糖品质需求的不断提升,保护并提 升坡耕地土壤质量,对稳定甘蔗生产具有重要的经 济价值和生态价值。近年来,粉垄耕作被广泛用于 甘蔗生产,粉垄耕作将土壤垂直旋磨粉碎,打破土 壤犁底层,实现土壤定向扰动,改变土壤结构、水分 分布,进而影响土壤肥力和甘蔗生长。有关粉垄耕 作后茬免耕保护地蔗田土壤结构及土壤侵蚀的影 响有待深入研究。

甘蔗是我国南方红壤旱地与坡耕地的重要糖 料经济作物(Jonathan et al., 2005)。 蔗叶还田有 利于保持土壤水分和温度,促进甘蔗萌芽、分蘖及 发株,增强甘蔗抗倒伏能力(周林等,2004),但受 蔗叶表面蜡质保护层影响,土壤自然腐解困难,影 响耕作生产。豆科绿肥和豆科作物秸秆易于腐 解,便于直接覆盖还田,是一种较为理想覆盖型保 护耕作生产方式(胡钧铭等,2018)。本研究通过 保护并优化坡耕地土壤结构,在粉垄发源地南宁, 试验地为典型坡耕地,依靠自然降雨作为灌溉条 件,以连续秸秆覆盖第2年免耕宿耕蔗田及甘蔗 为对象,开展秸秆覆盖对粉垄免耕宿耕蔗田土壤 优先流影响特征的研究,探明秸秆覆盖对粉垄雨 养甘蔗株高、茎围、生物量及糖品质的影响,以期 为高产高糖双高甘蔗以及保护地蔗田土壤结构优 化提供科学依据。

1 研究区概况与研究方法

#### 1.1 研究区概况

试验于 2018—2019 年在南宁市隆安县那桐镇 (107°21′— 108°6′E, 22°51′—23°21′N)进行, 试验地为典型坡耕地(坡度 8°~10°)雨养甘蔗 区,土壤质地为红壤黏粒土壤,土壤 pH 4.2,年均 降雨量为1 400 mm,有机质为 19.9 g・kg<sup>-1</sup>,全氮 为 1.33 g・kg<sup>-1</sup>,全磷为 0.555 g・kg<sup>-1</sup>,全钾为 9.98 g・kg<sup>-1</sup>,速效钾为 77.7 mg・kg<sup>-1</sup>。田间数据为第 2 年宿根保护地蔗田,采集时间为 2019 年 3 月 25 日 (苗期)、5 月 15 日(分蘖期)、8 月 20 日(伸长期) 和 12 月 5 日(成熟期)。

#### 1.2 试验设计和田间管理

采用随机区组设计,设粉垄耕作(SR)与常规 耕作(CT)2种耕作模式,粉垄耕作利用螺旋型垂 直钻头横向切割土壤,打破土壤犁底层,耕作深度 为40~50 cm,一次性完成自然悬浮成垄。常规耕 作采用常规耕作措施,耕作深度为15~20 cm。2 种耕作方式中,同时设置常规施肥和减量20%2 种施肥方式。常规施肥,即采用三元复合肥(氮: 磷:钾为16:16:16)2250 kg·hm<sup>-2</sup>,分2次施 用,其中前期底肥占70%,后期大培土追施占 30%。减量 20% 施肥, 即采用三元复合肥(氮: 磷:钾为16:16:16)1 800 kg·hm<sup>-2</sup>,分2次施 用,其中前期底肥占70%,后期大培土追施占 30%。2种施肥方式中,设置秸秆覆盖和无秸秆覆 盖处理,宿根蔗苗期将大豆秸秆按2 252 kg · hm<sup>-2</sup> 覆盖在甘蔗行间近根部 30 cm,大豆秸秆干基含 N 1.630%、P 0.170%、K 1.857%。试验共设 8 个处 理,3次重复,每小区面积87.75 m<sup>2</sup>。大豆秸秆田 间腐解特性以及 2018—2019 年降雨量如图 1 所 示,各处理具体设置见表1。试验供试甘蔗品种为 桂糖 42 号,采用双芽蔗种,沿种植方向按"品"字 型摆种,每公顷下种量为6万个双芽苗。田间管 理按广西双高甘蔗生产进行。

#### 1.3 测定项目和方法

1.3.1 土壤优先流测定 在每个处理小区内选取 一处土壤优先流观测点,将土壤表面枯枝落叶层 缓慢清除,并垂直砸入长、宽均为 50 cm,高 40 cm 的金属框,砸入深度为20 cm。选择前5 d 内无降 雨发生的样地,避免土壤含水量差异影响优先流 的观测。样地预处理后,配置浓度为5g·L<sup>-1</sup>的亚 甲基蓝溶液 10 L,以 200 mL · min<sup>-1</sup>的速度将溶液 均匀喷洒于样方内,为防止降雨影响,溶液喷洒结 束后将一层薄膜覆于金属样方,24 h 后将薄膜掀 开,对染色区域进行挖掘,垂直于种植方向每10 cm 纵向垂直挖掘4个40 cm × 50 cm 的土壤剖面. 剖面修整完毕后用数码相机进行拍摄。拍摄图像 使用 Photoshop CS6 软件处理,将染色区域变为黑 色,未染色区域变为白色。将处理后的黑白图像 导入 Image Pro Plus 6.0 软件中进行图像分析计 数,将图像转换为0(黑色像素)和255(白色像素) 组成的二值数据矩阵,并将其导入 Excel 中,计算 同一行中黑色像素个数占总数的百分比,即为土壤剖面染色面积比。

1.3.2 甘蔗农艺性状及糖品质测定 在试验第2年 保护地甘蔗各个生长发育期(苗期、分蘖期、伸长 期、成熟期)测定甘蔗株高、茎围,2019年9月15日 和12月1日取样测量各处理甘蔗的地上生物量、地 下生物量,2019年12月6日砍收甘蔗,测产量、甘 蔗蔗糖分、甘蔗纤维分、蔗汁锤度、蔗汁视纯度。



Fig. 1 Decomposition characteristics of soybean straw dry matter and rainfall in 2018-2019

耕作方式	减量施用	巴 20%	常规施肥			
	Reducing fe	ertilization	Conventional			
	by 20	0%	fertilization			
Tillage style	无秸秆覆盖	秸秆覆盖	无秸秆覆盖	秸秆覆盖		
	No straw	Straw	No straw	Straw		
	cover	cover	cover	cover		
常规耕作 Conventional tillage (CT)	CT1-1	CT1-2	CT2-1	CT2-2		
粉垄耕作 Smash ridging (SR)	SR1-1	SR1-2	SR2-1	SR2-2		

表 1 试验处理设置 Table 1 Description of different treatments

#### 1.4 数据分析和处理

应用 IBM SPSS Statistics 19.0 软件分析,用 LSD 法进行多重比较,差异显著性水平为 P<0.05, 采用 Microsoft Excel 2007 制图。

2 结果与分析

#### 2.1 秸秆覆盖对粉垄保护地蔗田土壤优先流的影响

由于每个处理均有4个土壤染色剖面,总计 32个土壤染色剖面,因此选择各个处理中1个比 较具有代表性的剖面进行展示。由图2可知,常 规耕作蔗田土壤染色主要集中在表层 0~20 cm 深 度范围内,粉垄耕作蔗田土壤垂直剖面染色深度 均大于 20 cm,说明粉垄耕作提高了深层土壤的水 分入渗能力。常规耕作下,垂直剖面染色区域连 片横向分布,染色面积达 80%以上,说明常规耕作 蔗田土壤水分入渗形式主要以基质流为主。粉垄 耕作下 20~50 cm 土层范围内的剖面染色呈零星 分布,染色部分呈树枝分布形态,说明粉垄耕作蔗 田土壤基质流和优先流伴随发生。

由图 2 可知,减量施肥处理中,常规耕作下秸 秆覆盖蔗田土壤染色面积大于无秸秆覆盖,说明 常规耕作下减量施肥处理后添加秸秆覆盖能提高 土壤水分入渗能力。粉垄耕作下秸秆覆盖蔗田土 壤染色深度小于无秸秆覆盖,并且秸秆覆盖蔗田土 壤染色区域以大面积块状为主,染色区域比 较集中,说明粉垄耕作下减量施肥处理后添加秸 秆覆盖在一定程度上限制了土壤优先流的发生, 使蔗田土壤水分集中在 10~20 cm 土层范围进行 横向运移。

由图 2 可知,常规施肥处理中,常规耕作下秸 秆覆盖蔗田土壤染色面积小于无秸秆覆盖,并且 染色区域集中于一侧,而无秸秆覆盖蔗田土壤 0~ 10 cm 土层范围染色区域分布较均匀,连通性较











好,说明常规施肥处理中,秸秆覆盖后会在一定程 度上堵塞蔗田土壤表层孔隙,影响水分下渗。粉 垄耕作下秸秆覆盖蔗田土壤染色面积大于无秸秆 覆盖,并且10~25 cm 土层范围内出现大面积均匀 染色,呈现左右连通性较高的入渗通道,水分先横 向运移再以优先流形式向下入渗,说明常规施肥 处理中,秸秆覆盖后增加了蔗田耕层土壤的孔隙 度,有利于水分向下运移,增强土壤的储水能力。

分析并对比各处理土壤剖面染色面积(图3), 粉垄耕作方式下,无秸秆覆盖处理土壤染色面积 11 期

1859

比随土壤深度的增加而减少,其中减量施肥处理 和常规施肥处理土壤深度大于7 cm 后染色面积比 降低至 40% 及以下,并且 10 cm 土层以下减量施 肥处理土壤染色面积比大于常规施肥处理。粉垄 耕作下添加秸秆覆盖后土壤剖面染色面积比随土 层深度的增加,总体呈现先减少后增加再减少的 趋势,其中10~20 cm 土层染色面积比增加,并且 减量施肥处理中添加秸秆覆盖后土壤剖面染色深 度减少。常规耕作方式下,无秸秆覆盖处理0~8 cm 土层范围内,土壤染色面积比随土层深度的增 加呈增减反复趋势,总体面积比在80%以上,说明 土壤 0~8 cm 范围内的土壤水分以基质流的形式 发生入渗,在10 cm 土层深度染色面积比迅速减 少,并且在16~20 cm 土层范围内土壤染色停止。 常规耕作下添加秸秆覆盖后土壤基质流深度虽降 低,但随着土层深度增加,土壤剖面染色面积比减 少趋势较为缓慢,对比同一处理中无秸秆覆盖,同 一土层深度中秸秆覆盖后土壤染色面积比大于无 秸秆覆盖,间接反映了水分在土壤中横向运移活 动得到增强。

基质流深度间接反映了土壤优先流的发生速 度。由图3可知,与常规耕作相比,粉垄耕作下土 壤基质流深度减少,土壤优先流发生较快,并且土 壤剖面染色深度较深,说明粉垄耕作提高了土壤 渗透率,水分向深层土壤运移。在粉垄耕作下,对 比无秸秆覆盖,添加秸秆覆盖后土壤剖面染色面 积比减少趋势较平缓,同一土层染色面积比较大, 结合上文对土壤优先流垂直分布图像的分析,说 明秸秆覆盖提高了土壤水分横向运移能力。

## 2.2 秸秆覆盖对粉垄保护地甘蔗地下根系生物量 的影响

由表2可知,粉垄耕作下,同一处理中,秸秆 覆盖甘蔗伸长期与成熟期地上生物量与无秸秆覆 盖无明显差异。粉垄耕作下甘蔗伸长期、成熟期 地上生物量均大于同一处理常规耕作,分别提高 了4.22%~41.55%、0.66%~37.55%。常规耕作 下,各处理甘蔗伸长期地上生物量由高到低依次 为CT1-2(2.086 kg)、CT2-2(1.872 kg)、CT1-1 (1.838 kg)、CT2-1(1.656 kg),秸秆覆盖较无秸秆 覆盖,地上生物量增加了13.04%~13.49%;各处 理甘蔗成熟期地上生物量由高到低依次为CT1-2 (2.591 kg)、CT2-2(2.304 kg)、CT2-1(2.034 kg)、 CT1-1(1.835 kg),秸秆覆盖较无秸秆覆盖,地上生 物量增加了13.27%~41.20%,说明常规耕作下秸 秆覆盖有利于促进甘蔗地上生物量增加。

由表2可知,同一处理中,粉垄耕作下甘蔗伸 长期的地下根系生物量均高于常规耕作,并且秸 秆覆盖甘蔗伸长期地下根系生物量均高于同一处 理中无秸秆覆盖,常规耕作下秸秆覆盖较无秸秆 覆盖甘蔗伸长期地下根系生物量增加了 2.17%~ 18.18%,粉垄耕作下秸秆覆盖较无秸秆覆盖甘蔗 伸长期地下根系生物量增加了 2.07%~25.54%, 其中减量施肥处理添加秸秆覆盖显著提高了甘蔗 伸长期地下根系生物量,说明秸秆覆盖有利于促 进甘蔗伸长期根系生长。甘蔗成熟期时,粉垄耕 作下甘蔗地下根系生物量高于常规耕作且差异显 著,其中常规施肥处理中,粉垄耕作下添加秸秆覆 盖甘蔗地下根系生物量显著高于常规耕作。同一 处理中,秸秆覆盖伸长期至成熟期甘蔗根系占比 分别增加了-5.29%、45.90%、-0.83%、17.17%,无 秸秆覆盖伸长期至成熟期甘蔗根系占比分别增加 了 31.07%、35.39%、28.44%、17.97%。 综上可知, 甘蔗根系的生长受土壤温度和土壤湿度的影响较 大,秸秆覆盖为甘蔗根部提供了湿润的微环境,在 一定程度上使甘蔗提前进入成熟期,根系吸收的 养分主要供给甘蔗地上部。

## 2.3 秸秆覆盖对粉垄保护地甘蔗主要农艺性状及 产量的影响

由图 4 可知,同一处理中,甘蔗苗期和分蘖期 的株高基本一致,且秸秆覆盖后的甘蔗株高与无 秸秆覆盖的甘蔗株高无显著差异。同一处理中, 粉垄耕作下甘蔗伸长期株高均高于常规耕作,粉 垄耕作下甘蔗伸长期株高由高到低依次为 SR2-1 (231.4 cm)、SR2-2(228.0 cm)、SR1-1(219.8 cm)、 SR1-2(217.0 cm),对比同一处理中常规耕作增加 12.7%~34.7%。常规耕作下,甘蔗伸长期株高由 高到低依次为 CT1-2(192.6 cm)、CT1-1(187.6 cm)、CT2-2(178.2 cm)、CT2-1(171.8 cm),秸秆覆 盖甘蔗伸长期株高比无秸秆覆盖增加了 2.7%~ 3.7%。同一处理中,除常规耕作下常规施肥处理 (CT2)外,各处理中秸秆覆盖甘蔗成熟期株高均高 于无秸秆覆盖,株高增加了 4.2%~13.1%,其中常

#### 42 卷

#### 表 2 甘蔗伸长期、成熟期地下和地上生物量

Table 2 Underground and aboveground biomasses of sugarcane during elongation and mature stages

	甘蔗伸长期 Sugarcane elongation stage			甘蔗成熟期 Sugarcane maturity stage				
区组 Deal with	地上生物量 Aboveground biomass (kg)	地下根系 生物量 Root biomass (kg)	总生物量 Total biomass (kg)	根系占比 Root ratio (%)	地上生物量 Aboveground biomass (kg)	地下根系 生物量 Root biomass (kg)	总生物量 Total biomass (kg)	根系占比 Root ratio (%)
SR1-1	2.208ab	0.184bc	2.392	7.69	2.524ab	0.283a	2.807	10.08
SR1-2	2.174b	0.231a	2.405	9.60	2.608ab	0.261ab	2.869	9.10
SR2-1	2.344a	0.145c	2.489	5.83	2.721a	0.233bc	2.954	7.89
SR2-2	2.234ab	0.158c	2.392	6.61	2.548ab	0.254ab	2.802	9.06
CT1-1	1.838c	0.176bc	2.014	8.74	1.835d	0.232bc	2.067	11.22
CT1-2	2.086b	0.208ab	2.294	9.07	2.591ab	0.256ab	2.847	8.99
CT2-1	1.656c	0.138c	1.794	7.69	2.034cd	0.203c	2.237	9.07
CT2-2	1.872c	0.152c	2.024	7.51	2.304bc	0.206c	2.510	8.21

注:同列不同小写字母表示不同处理间差异显著(P<0.05)。下同。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant differences between different treatments (P < 0.05). The same below.



不同小写字母表示不同处理间差异显著(P<0.05)。 下同。

Different lowercase letters indicate significant differences between different treatments( P < 0.05). The same below.



规耕作下减量施肥处理秸秆覆盖(CT1-2)比无秸秆覆盖(CT1-1)增加了13.1%,达到显著性差异水平(P<0.05),说明秸秆覆盖有利于甘蔗株高的增长。

由图 5 可知,各处理甘蔗苗期茎围基本一致。 同一处理中,粉垄耕作下甘蔗分蘖期茎围均明显





高于常规耕作,并且秸秆覆盖后的甘蔗茎围与无 秸秆覆盖的甘蔗茎围无显著差异。甘蔗伸长期和 成熟期中,各处理间甘蔗茎围无显著差异,说明秸 秆覆盖对甘蔗茎围增粗无影响。

甘蔗单茎重是甘蔗产量的重要指标之一。由表3可知,同一处理中,粉垄耕作较常规耕作,甘蔗单茎重提高了1.79%~50.33%,其中常规施肥处理中,粉垄耕作下甘蔗单茎重显著大于常规耕作,有效茎数增加了2.44%~20.51%,甘蔗产量增

11 期

表 3

Table 3         Sugarcane yield under different treatments						
处理 Deal with	单茎重 Single stem weight (kg)	密度 Density (plant・ m <sup>-2</sup> )	有效 茎数 Millable stalks (plant・ m <sup>-2</sup> )	理论 产量 Thretical yield (t・ hm <sup>-2</sup> )	实际 产量 Actual yield (t・ hm <sup>-2</sup> )	
SR1-1	$2.07{\pm}0.08{\rm bc}$	6.2	3.9	80.73	98.95	
SR1-2	$2.27{\pm}0.05{\rm ab}$	5.7	4.2	114.24	115.05	
SR2-1	$2.30 \pm 0.03 a$	6.8	4.7	108.10	108.59	
SR2-2	2.30±0.05a	6.3	4.1	94.30	106.99	
CT1-1	$2.00{\pm}0.03{\rm cd}$	5.2	3.5	70.00	67.26	
CT1-2	$2.23{\pm}0.11{ m ab}$	4.8	3.7	82.51	98.33	
CT2-1	$1.83{\pm}0.08{\rm d}$	5.6	3.9	71.37	70.11	
CT2-2	$1.53 \pm 0.07 \mathrm{e}$	5.1	4.1	62.73	68.97	

不同处理下甘蔗产量

加了 6.83%~55.13%。粉垄耕作下甘蔗每公顷实 际产量由高到低依次为 SR1-2(115.05 t)、SR2-1 (108.59 t)、SR2-2(106.99 t)、SR1-1(98.95 t),减 量施肥处理中,秸秆覆盖较无秸秆覆盖,甘蔗产量 提高了16.27%。粉垄耕作下,减量施肥处理较常 规施肥处理,甘蔗产量降低了9.74%且达到显著 差异水平。而减量施肥处理中添加秸秆覆盖较常 规施肥中无秸秆覆盖,产量提高了5.95%。常规耕 作下,减量施肥处理中,秸秆覆盖较无秸秆覆盖, 甘蔗产量提高了46.19%,说明减量施肥处理下添 加秸秆覆盖能够达到增产的效果。

#### 2.4 秸秆覆盖对粉垄保护地甘蔗品质的影响

甘蔗的糖品质主要从蔗汁视纯度、纤维分、蔗 汁锤度和商业糖分(commercial cane sugar, CCS)等 方面体现。由表4可知,各个处理的甘蔗视纯度 在 84.12%~88.55%之间,与常规耕作相比,粉垄 耕作下甘蔗蔗汁视纯度提高了 0.1%~3.7%,其中 减量施肥处理和常规施肥处理中添加秸秆覆盖 后,粉垄耕作下蔗汁视纯度显著高于常规耕作,并 且同一处理中秸秆覆盖较无秸秆覆盖蔗汁视纯度 提高了 0.7%~4.3%。甘蔗纤维分在 14.11%~ 14.99%之间,与常规耕作相比,粉垄耕作下甘蔗纤 维分提高了 0.8%~5.0%,并且同一处理中秸秆覆 盖较无秸秆覆盖甘蔗纤维分提高了1.1%~3.3%。 蔗汁锤度在 22.27%~23.87%之间,与常规耕作相 比,粉垄耕作下蔗汁锤度提高了 3.6%~6.1%,并 且同一处理中秸秆覆盖较无秸秆覆盖蔗汁锤度提 高了 0.4% ~ 3.3%, 各处理间 蔗汁锤度差异不显 著。转光度在 20.02%~21.41%之间,同一处理中 秸秆覆盖较无秸秆覆盖转光度提高了 0.8%~ 2.7%, 蔗汁蔗糖分在20.77%~22.62%之间, 同一 处理中秸秆覆盖较无秸秆覆盖转光度提高了 3.0%~6.5%。说明粉垄耕作和秸秆覆盖均对提高 甘蔗糖品质有促进作用。

#### 讨论与结论 3

### 3.1 保护地蔗田对土壤优先流的影响

土壤染色示踪法反映了不同处理田间土壤水 分的入渗形式,通过对染色形态图像进行分析,揭 示不同耕作下秸秆覆盖后坡耕地土壤优先流分布 特征(van Schaik, 2009)。陈晓冰等(2019)利用染 色示踪法发现, 蔗田土壤优先流程度与土壤垂直联 通孔隙数量有关。本研究发现,粉垄耕作下土壤优 先流程度大于常规耕作,可能是因为粉垄耕作深度 大于常规耕作,螺旋型垂直钻头将 0~50 cm 土壤旋 磨细碎,有效降低了土壤容重,增加了总孔隙度,从 而提高了土壤水分入渗能力,这与李轶冰等(2013) 研究结果一致。白永会等(2017)研究发现,秸秆覆 盖在增加土壤入渗速率的同时,减少了降雨对表土 冲击造成的侵蚀和结皮率。而本研究发现,常规耕 作方式下添加秸秆覆盖影响了土壤基质流深度,土 壤优先流发生较快,在一定程度上提高了土壤水分 入渗能力。本研究还发现,粉垄耕作下,减量施肥 处理中添加秸秆覆盖后土壤垂直剖面染色深度减 少,10~20 cm 土层范围染色面积增大,限制深层土 壤优先流发生的同时,增加土壤水分横向运移能 力,提高了土壤保水、保肥能力,而常规施肥处理中 添加秸秆覆盖后深层土壤优先流发生程度和分化 程度较高,存在水肥流失风险,可能是因为不同的 施肥方式下土壤孔隙发育程度不同,秸秆腐解后在 一定程度上影响了土壤大孔隙,从而削弱土壤优先 流程度,这与汪金舫等(2009)、王珍和冯浩(2009) 研究结果一致。

#### 3.2 保护地蔗田对甘蔗根系生物量及产量的影响

秸秆覆盖粉垄免耕保护地耕作促进了甘蔗根 系生长,增加了地下和地上的生物量。甘蔗株高 和茎围是决定甘蔗产量的主要构成因素 (刘鲁峰

表 4

不同处理下甘蔗成熟期糖的品质

	Table 4 Sugar qua	ality of sugarcai	ne at mature stage i	under differen	t treatments	
区组 Deal with	蔗汁视纯度 Purity (%)	纤维分 Fiber (%)	蔗汁锤度 Brix (%)	转光度 Pol (%)	商业糖分 CCS (%)	蔗汁蔗糖分 Sucrose (%)
SR1-1	$85.70 \pm 0.27 \mathrm{bc}$	14.41	23.10±0.21a	20.18	14.71	20.91
SR1-2	88.55±0.52a	14.89	23.87±0.90a	20.72	15.20	21.51
SR2-1	$84.21{\pm}0.60{\rm c}$	14.71	23.63±0.22a	21.21	15.18	21.24
SR2-2	$87.87{\pm}1.06{\rm ab}$	14.99	23.73±0.41a	21.41	15.43	22.62
CT1-1	84.96±1.11c	14.29	22.30±0.59a	20.02	14.57	20.77
CT1-2	$85.59{\pm}0.77{\rm bc}$	14.53	22.80±0.15a	20.17	14.69	21.68
CT2-1	84.12±1.13c	14.11	22.27±0.58a	20.21	14.35	21.10
CT2-2	$84.74{\pm}0.67{\rm c}$	14.27	22.87±0.71a	20.55	14.53	21.74

等,2020),汪金舫等(2009)研究表明秸秆还田能 改善土壤物理性状,降低土壤容重,增加总孔隙度 和毛管孔隙度,改善土壤肥力。本研究结果表明, 粉垄耕作较常规耕作,甘蔗株高增加了12.67%~ 34.69%,甘蔗产量增加了 6.83%~55.13%,其中减 量施肥处理中,粉垄耕作添加秸秆覆盖甘蔗产量 提高了 16.27%, 且添加秸秆覆盖较常规施肥中无 秸秆覆盖,产量提高了5.95%,常规耕作添加秸秆 覆盖甘蔗产量提高了 46.19%。本研究还发现,粉 垄耕作下秸秆覆盖较无秸秆覆盖甘蔗伸长期地下 根系生物量增加了 8.97%~25.54%。这可能因为 添加秸秆覆盖后避免降雨对土壤表层的直接冲刷 而造成土壤结构被破坏,减少了水土流失(刘红梅 等,2020;张统帅等,2020),同时秸秆腐解提高了 土壤有机质含量,为甘蔗根系发育提供了良好的 土壤微环境(李卓等,2009),甘蔗根系发达有利于 提高了水肥利用率,从而促进甘蔗生长提高产量。 本研究中,秸秆覆盖成熟期甘蔗根系占比增加最 高达37.24%,无秸秆覆盖成熟期甘蔗根系占比增 加最高达 35.39%,可能是因为秸秆覆盖改善了甘 蔗根际土壤水、肥、气、热状况,提高根系活性,促 进伸长期根系生长,并在甘蔗成熟期根系吸收的 水分和养分主要供给地上部生长发育。而无秸秆 覆盖,土壤表层水分自然蒸发较多,在一定程度上 造成干旱,由于根系的向地性和向水性(李鸿博 等,2019),因此根系向深层土壤生长以吸收土壤 深层的水分(赵丽萍等,2019)。

#### 3.3 保护地蔗田对甘蔗糖品质的影响

影响甘蔗糖分及品质形成因素有多种,其中 自然降雨对甘蔗糖分的影响较大(陈迪文等, 2020)。甘蔗糖品质主要从蔗汁视纯度、纤维分、 蔗汁锤度和商业糖分等方面体现(陈月桂等, 2007)。本研究中,粉垄耕作和秸秆覆盖均能有效 提高甘蔗品质,其中同一耕作方式下,秸秆覆盖较 无秸秆覆盖,甘蔗纤维分提高了1.1%~3.3%,蔗 汁锤度提高了 0.4%~3.3%,转光度提高了 0.8%~ 2.7%, 蔗汁蔗糖分提高了 3.0%~6.5%, 说明粉垄 耕作下宿根蔗在秸秆覆盖有利于糖分积累,提高 甘蔗糖品质,这可能因为免耕宿根蔗在秸秆覆盖 条件下利于蓄水保墒,根系快发优势明显利于甘 蔗生长和糖分累积(姚全等,2007),同时秸秆覆盖 不仅保持了地表土壤湿度,而且对降雨形成的地 表径流有拦截作用,延长水分下渗时间,有利于自 然降水资源利用,提高了甘蔗蔗糖累积效率。

粉垄耕作方式下秸秆覆盖降低深层土壤优先 流发生,提高深层土壤水分横向运移能力,利于 10~25 cm 土层蓄水,促进甘蔗根系生长,提高甘 蔗根系对水肥的利用率,从而增加甘蔗产量和提 高糖品质。免耕秸秆覆盖可作为粉垄红壤坡耕地 蔗田一种重要的保护性生产调控方式。

### 参考文献:

CHEN XB, YAN L, LI ZD, et al., 2019. Tillage pattern effects

on characteristics of soil preferential flow in sugarcane fields in the karst region [J]. Soils, 51(4):786-794. [陈晓冰, 严磊, 李振东, 等, 2019. 耕作方式对岩溶区甘蔗地土壤 优先流特征的影响 [J]. 土壤, 51(4):786-794.]

- CHEN YG, HUANG ZR, AN YX, et al., 2007. Analysis of main quality character indexes of sugarcane [J]. Guangdong Agric Sci, 34(9): 13-16. [陈月桂, 黄振瑞, 安玉兴, 等, 2007. 甘蔗主要品质性状指标分析 [J]. 广东农业科学, 34(9): 13-16.]
- CHEN DW, WU GF, ZHOU WL, et al., 2020. Research progresses of sugar regulation factors and sugar-increasing application in sugarcane [J]. Sugarcane Canesugar, (3): 43-51. [陈迪文, 吴庚福, 周文灵, 等, 2020. 甘蔗糖分调 控因素 与增糖应用研究现状 [J]. 甘蔗糖业, (3): 43-51.]
- DONG YY, WANG F, HAN JQ, et al., 2020. Effects of plastic film and straw mulching on soil moisture and soybean yield in dryland farmland [J]. Res Soil Water Conserv, 27(3): 364-371. [董云云, 王飞, 韩剑桥, 等, 2020. 地膜和秸秆 覆盖对旱地农田土壤水分和大豆产量的影响 [J]. 水土 保持研究, 27(3): 364-371.]
- GUO Q, MO YW, TANG LQ, et al., 2019. Effects of sugarcane bagasse mulching and reduced fertilization on agronomic characters and quality of sugarcane [J]. Guangxi Sugarcane Ind, (3): 31-35. [郭强, 莫勇武, 唐利球, 等, 2019. 蔗渣还田和减量施肥对甘蔗农艺性状和品质的影 响 [J]. 广西糖业, (3): 31-35.]
- HU JM, HUANG ZH, LUO WG, et al., 2018. Effects of microsprinkler irrigation on soil water and nitrogen and yield under banana-mung bean intercropping [J]. Guihaia, 38(6): 710-718. [胡钧铭,黄忠华,罗维钢,等, 2018. 蕉肥间作下微喷灌对蕉园土壤水氮动态及香蕉产量的影响[J]. 广西植物, 38(6): 710-718.]
- FOLEY JA, DEFRIES R, ASNER GP, et al., 2005. Global consequences of land use [J]. Science, 309 (5734): 570-574.
- JORDÁN A, ZAVALA LM, GIL J, 2010. Effects of mulching on soil physical properties and runoff under semi-arid conditions in southern Spain [J]. Catena, 81(1): 77–85.
- JIN HF, SHI DM, CHEN ZF, et al., 2018. Evaluation indicators of cultivated layer soil quality for red soil slope farmland based on cluster and PCA analysis [J]. Trans Chin Soc Agric Eng, 34(7): 155-164. [金慧芳, 史东梅, 陈正发, 等, 2018. 基 于聚类及 PCA 分析的红壤坡耕地耕层土壤质量评价指标 [J]. 农业工程学报, 34(7): 155-164.]
- LÜ G, FU XY, LI YX, et al., 2018. Soil preferential flow characteristics under different land utilization styles in the

reclaimed dump of Haizhou surface coal mine [J]. J Nat Resour, 33(1): 37-51. [吕刚,傅昕阳,李叶鑫,等, 2018. 海州露天煤矿复垦排土场不同土地利用土壤优先 流特征研究 [J]. 自然资源学报, 33(1): 37-51.]

- LÜ K, WU BZ, 2020. Effects of straw mulching on nutrient loss from red soil and quality of flue-cured tobacco in sloping land [J]. Soils, 52(2): 320-326. [吕凯, 吴伯志, 2020. 秸秆覆盖对坡地红壤养分流失及烤烟质量的影响 [J]. 土壤, 52(2): 320-326.]
- LIU LF, DI YN, XIE LY, et al., 2020. Effects of different fertilizer treatments on yield traits, sugar content and benefit of sugarcane [J]. Chin Agric Sci Bull, 36(19): 25-31.
  [刘鲁峰, 狄义宁, 谢林艳, 等, 2020. 不同肥料处理对甘蔗产量性状、糖分及效益的影响 [J]. 中国农学通报, 36(19): 25-31.]
- LI HB, CAI WJ, XIE YT, et al., 2019. Physiological responses of new sugarcane lines to drought stress and evaluation of their drought resistances [J]. J S Chin Agric Univ, 40(6): 51-58. [李鸿博, 蔡伟俊, 谢雨彤, 等, 2019. 甘蔗新品系 对干旱胁迫的生理响应及抗旱性评价 [J]. 华南农业大 学学报, 40(6): 51-58.]
- LI YB, PANG HC, YANG X, et al., 2013. Effects of deep vertically rotary tillage on soil water and water use efficiency in Northern China's Huang-Huai-Hai Region [J]. Acta Ecol Sin, 33(23): 7478-7486. [李轶冰, 逢焕成, 杨雪, 等, 2013. 粉垄耕作对黄淮海北部土壤水分及其利用效率的 影响 [J]. 生态学报, 33(23): 7478-7486.]
- LIU HM, LI RY, GAO JJ, et al., 2020. Research progress on the effects of conservation tillage on soil aggregates and microbiological characteristics [J]. Ecol Environ Sci, 29(6): 1277-1284. [刘红梅,李睿颖,高晶晶,等, 2020. 保护性耕作对土壤团聚体及微生物学特性的影响 研究进展[J]. 生态环境学报, 29(6): 1277-1284.]
- LI Z, WU PT, FENG H, et al., 2009. Effects of soil clay particle content on soil infiltration capacity by simulated experiments [J]. Agric Res Arid Areas, 27(3): 71-77. [李卓, 吴普特, 冯浩, 等, 2009. 不同粘粒含量土壤水分 入渗能力模拟试验研究 [J]. 干旱地区农业研究, 27(3): 71-77.]
- LIU Y, TAO Y, WAN KY, et al., 2012. Runoff and nutrient losses in *Citrus* orchards on sloping land subjected to different surface mulching practices in the Danjiangkou Reservoir area of China [J]. Agric Water Manag, 110: 34-40.
- SHENG F, ZHANG LY, WU D, 2016. Review on research theories and observation techniques for preferential flow in unsaturated soil [J]. Trans Chin Soc Agric Eng, 32(6): 1-

10. [盛丰, 张利勇, 吴丹, 2016. 土壤优先流模型理论与 观测技术的研究进展 [J]. 农业工程学报, 32(6): 1-10.]

- VAN SCHAIK NLMBV, 2009. Spatial variability of infiltration patterns related to site characteristics in a semi-arid watershed [J]. Catena, 78(1): 36-47.
- WANG W, ZHANG HJ, CHENG JH, et al., 2010. Macropore characteristics and its relationships with the preferential flow in broadleaved forest soils of Simian Mountains [J]. Chin J Appl Ecol, 21(5): 1217–1223. [王伟,张洪江,程金花, 等, 2010. 四面山阔叶林土壤大孔隙特征与优先流的关系 [J]. 应用生态学报, 21(5): 1217–1223.]
- WANG JF, LIU YJ, LI BY, 2006. Effects of returning crop straw into Vertisol on the physical and chemical properties and availability of manganese, zinc, copper [J]. Chin J Eco-Agric, 14(3): 49-51. [汪金舫, 刘月娟, 李本银, 2006. 秸秆还田对砂姜黑土理化性质与锰、锌、铜有效性 的影响 [J]. 中国生态农业学报, 14(3): 49-51.]
- WANG Z, FENG H, 2009. Study on the influence of different straw-returning manners on soil structure and characters of soil water evaporation [J]. J Soil Water Conserv, 23(6): 224-228. [王珍, 冯浩, 2009. 秸秆不同还田方式对土壤 结构及土壤蒸发特性的影响 [J]. 水土保持学报, 23(6): 224-228.]
- YAO Q, FANG MZ, LUO CY, et al., 2007. Drought in autumn and winter having an influence on accumulating of cane sugar [J]. Guangxi Sugarcane Canesugar, (2): 23-27. [姚全, 方苗朱, 罗春毅, 等, 2007. 秋冬季干旱对甘蔗蔗糖分积 累的影响 [J]. 广西蔗糖, (2): 23-27.]

ZHAO QG, ZHOU SL, WU SH, et al., 2006. Cultivated land

resources and strategies for its sustainable utilization and protection in China [J]. Acta Pedol Sin, 43(4): 662-672. [赵其国,周生路,吴绍华,等,2006.中国耕地资源 变化及其可持续利用与保护对策 [J]. 土壤学报,43(4): 662-672.]

- ZHAO QG, HUANG GQ, MA YQ, 2013. The problems in red soil ecosystem in southern of China and its countermeasures [J]. Acta Ecol Sin, 33(24): 7615-7622. [赵其国, 黄国 勤, 马艳芹, 2013. 中国南方红壤生态系统面临的问题及 对策 [J]. 生态学报, 33(24): 7615-7622.]
- ZHOU L, GUO SY, CAI MY, 2004. Bio-industrial applications of sugarcane bagasse [J]. Sugar Crop China, 26(2): 40-42. [周林, 郭祀远, 蔡妙颜, 2004. 蔗渣的生物利用 [J]. 中国糖料, 26(2): 40-42.]
- ZHANG TS, YAN LJ, LI G, et al., 2020. Effects of no tillage and straw mulching on soil nitrogen, water content and yield of spring wheat in dryland farming area [J]. Acta Agric Zhejiang, 32(8): 1329-1341. [张统帅, 闫丽娟, 李广, 等, 2020. 免耕和秸秆覆盖对旱作区土壤氮素、水分和春 小麦产量的影响[J]. 浙江农业学报, 32(8): 1329-1341.]
- ZHAO LP, LIU JY, ZHAO PF, et al., 2019. The impact of water stress on the growth of roots and above-ground parts in sugarcane [J]. J Hunan Agric Univ (Nat Sci Ed), 45(1): 10-15. [赵丽萍, 刘家勇, 赵培方, 等, 2019. 水分胁迫对 甘蔗根系及地上部生长的影响 [J]. 湖南农业大学学报 (自然科学版), 45(1): 10-15.]

(责任编辑 蒋巧媛)
广步植物 Guihaia Nov. 2022, 42(11): 1865-1874

http://www.guihaia-journal.com

#### DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202104005

刘营, 尹泽, 江姚兰, 等. 甘蔗 *ScNRAMP* 基因家族的鉴定与生物信息学分析 [J]. 广西植物, 2022, 42(11): 1865–1874. LIU Y, YIN Z, JIANG YL, et al. Identification and bioinformatics analysis of *ScNRAMP* gene family in sugarcane [J]. Guihaia, 2022, 42(11): 1865–1874.



# 甘蔗 ScNRAMP 基因家族的鉴定与生物信息学分析

刘 营<sup>1,2</sup>, 尹 泽<sup>1,2</sup>, 江姚兰<sup>1,2</sup>, 周定港<sup>1,2,3\*</sup>

 (1. 湖南科技大学生命科学学院,湖南湘潭411201;2. 经济作物遗传改良与综合利用湖南省重点实验室,湖南 湘潭411201;3. 福建农林大学农业农村部福建甘蔗生物学与遗传育种重点实验室,福州350002)

**摘** 要:NRAMP蛋白(natural resistance-associated macrophage proteins)家族在植物响应重金属胁迫时具有 重要作用,能够转运 Fe<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>和 Cd<sup>2+</sup>等重金属离子。为探究甘蔗 ScNRAMP 基因家族的特征,该文基 于甘蔗割手密基因组鉴定了 ScNRAMP 基因家族,并进行了理化特性、基因结构、顺式作用元件、保守基序、 结构域和进化关系等分析。结果表明:甘蔗 ScNRAMP 基因家族含有 29 个成员,不均匀分布在 19 条染色体 上;编码蛋白均为不稳定蛋白,无信号肽,亚细胞均定位在质膜上;各成员保守基序有 6~10 个不等,跨膜数 有 6~12 个不等,二级结构主要构成元件为α-螺旋和无规则卷曲;顺式作用元件分析表明甘蔗 ScNRAMP 基 因家族可能通过激素代谢参与逆境胁迫和生长发育等生物过程;利用割手密的 RNA-seq 转录组表达数据进 行的组织特异性分析发现,ScNRAMP 在甘蔗不同发育阶段的叶和茎中具有时空表达特性;进化树分析将甘 蔗 ScNRAMP 家族成员分为 3 个亚家族(I、II 和 III)。该研究在全基因组水平上系统地鉴定了现代栽培甘蔗 祖先种之一割手密 NRAMP 基因家族,为进一步了解甘蔗 NRAMP 基因家族提供了基础,也为后续甘蔗重金 属研究提供了重要候选基因。

关键词:甘蔗,割手密,*ScNRAMP*,基因家族,重金属胁迫 中图分类号:0943 文献标识码:A 文章编号:1000-3142(2022)11-1865-10

# Identification and bioinformatics analysis of ScNRAMP gene family in sugarcane

LIU Ying<sup>1,2</sup>, YIN Ze<sup>1,2</sup>, JIANG Yaolan<sup>1,2</sup>, ZHOU Dinggang<sup>1,2,3\*</sup>

( 1. School of Life Sciences, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan 411201, Hunan, China; 2. Hunan Key Laboratory of Economic Crops Genetic Improvement and Integrated Utilization, Xiangtan 411201, Hunan, China; 3. Key Laboratory of Sugarcane Biology and Genetic Breeding, Ministry of Agriculture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China )

收稿日期: 2021-06-29

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金(31701491);湖南省自然科学基金(2019JJ50176);福建农林大学农业部福建甘蔗生物学与遗传育种重点实验室/国家甘蔗工程中心开放课题(2017.6.2)[Supported by National Natural Science Foundation of China (31701491); Natural Science Foundation of Hunan Province (2019JJ50176); Key Laboratory of Sugarcane Biology and Genetic Breeding Ministry of Agriculture / Open Fund of National Engineering Research Center for Sugarcane, Fujian Agriculture and Forestry University (2017.6.2)]。

第一作者:刘营(1998-),硕士研究生,研究方向为经济作物遗传育种与栽培,(E-mail)ly1071457534@163.com。

<sup>\*</sup>通信作者:周定港,博士,副教授,研究方向为植物遗传育种及抗逆改良,(E-mail)dgzhoucn@hnust.edu.cn。

Abstract: NRAMP (natural resistance-associated macrophage proteins), which can transport metal ions such as  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  and  $Cd^{2+}$ , plays an essential role in response to heavy metal stress in plant. To better understand the characteristics of the *ScNRAMP* gene family, bioinformatics methods were employed to identify and comprehensively analyze *ScNRAMP* gene family which includes protein physicochemical properties, gene structure, *cis*-acting elements, conserved motif, domain and evolutionary relationships. The results were as follows: A total of 29 *ScNRAMP* genes were identified in the *Saccharum spontaneum* genome; These 29 genes were unevenly distributed on 19 chromosomes, and contained 6 to 10 conserved motifs; The encoded proteins were all unstable proteins with no signal peptides and the subcellular locations were all on the plasma membrane; The number of membranes ranged from 6 to 12, and the secondary structure was composed of  $\alpha$ -helix and random coils as the main components; Moreover, *cis*-acting elements analysis suggested that *ScNRAMP* may be involved in regulation of stress and development by involving in phytohormone metabolism; The tissue-specific analysis based on RNA-seq transcriptomics expression data of *Saccharum spontaneum*, showed that spatiotemporal expression of 29 *ScNRAMP* genes in the leaves and stems of sugarcane at different development stages; Phylogenetic analysis showed that the 29 *ScNRAMP* gene family and provide significant candidate genes that respond to the stress of heavy metals in sugarcane for further study.

Key words: sugarcane, Saccharum spontaneum, ScNRAMP, gene family, heavy metal stress

甘蔗(Saccharum spp.)是重要的一年生或多年 生糖料作物,属于单子叶植物纲 (Monocotyledoneae)禾本科(Poaceae)甘蔗属 (Saccharum L.)(Irvine, 1999)。甘蔗是一种高光 合效率的C4植物,具有生物量大、CO<sub>2</sub>补偿点低、 耐干旱、适应性广和产量高等特点(方静平等, 2014)。甘蔗是异源多倍体,其倍性水平从5×到 16×不等,其基因组大小约为10Gb(陈如凯, 2011)。现代栽培甘蔗是世界上最重要的食糖来 源,占全世界食糖总量的80%(Liu et al., 2020)。

NRAMP 转运体在离子稳态的维持,尤其是在 二价金属离子的转运上发挥着重要作用,并且该蛋 白家族在进化过程中高度保守(Nevo & Nelson, 2006)。哺乳动物 NRAMP 基因的氨基酸序列与酵 母、水稻和果蝇 NRAMP 基因的氨基酸序列相似性 分别为 46%、58% 和 73% (Belouchi et al., 1995)。 在植物吸收重金属的过程中,NRAMP 蛋白等膜转 运蛋白发挥着重要作用(Cellier et al., 1995)。 Mäser 等(2001) 对拟南芥的 6 个 NRAMP 基因进行 克隆和系统进化分析发现,6个家族成员被分为2 个亚家族,其中 AtNRAMP1 和 AtNRAMP6 位于第一 亚家族,AtNRAMP2 至 AtNRAMP5 属于第二亚家族。 AtNRAMP1 蛋白是模式生物拟南芥中的主要高亲和 性锰转运蛋白,定位于质膜,其功能是将重金属转 运至细胞质(Cailliatte et al., 2010)。Pottier 等 (2015)研究发现诱导表达 AtNRAMP4 的酵母株突 变会导致其镉和锌的吸收下降,而对于铁的吸收量 没有改变,此研究提示人为诱导 NRAMP 转运蛋白 的突变可用于降低动植物对 Cd 的吸收和转运。不同植物的 NRAMP 家族成员具有组织表达特异性,如 AtNRAMP1 在根中高表达 (Castaings et al., 2016),而 AtNRAMP2 则主要在根表皮和根尖区域表达(Gao et al., 2018); OsNRAMP1 在营养生长阶段的根部以及在生殖生长期时的叶片和茎中均为高表达(Takahashi et al., 2011)。

甘蔗是重要的经济作物,与其他植物一样也 面临着重金属污染问题。重金属对于植物的生长 起着十分重要的作用,一些二价重金属离子如 Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>和 Mn<sup>2+</sup>等是植物生长必需的微量元素, 而有些重金属如 Cd<sup>2+</sup>和 Pb<sup>2+</sup>等的过度吸收则会造 成植物的重金属毒害甚至影响产量(Rosa-Santos et al., 2020)。植物 NRAMP 蛋白的功能研究在拟南 芥(Thomine et al., 2000)、水稻(Luo et al., 2018)、土豆(Tian et al., 2021)、大豆(Qin et al., 2017)和油菜(Meng et al., 2017)等植物中虽有广 泛报道,但关于甘蔗 NRAMP 蛋白的研究目前还没 有报道。本研究基于甘蔗割手密种的全基因组序 列,利用生物信息学的方法筛选甘蔗 ScNRAMP 基 因家族成员,并对其进行进化树构建、染色体定 位、基因结构分析和蛋白特性分析等,以期为后续 该基因家族的研究提供参考。

# 1 材料与方法

### 1.1 材料

AtNRAMP 基因家族的蛋白序列来源于拟南芥

11 期

TAIR 数据库,甘蔗全基因组和基因注释文件来源 于 http://www.life.illinois.edu/ming/downloads/ Spontaneum\_genome/(Zhang et al., 2018)。

### 1.2 方法

1.2.1 甘蔗 ScNRAMP 基因家族的鉴定 以拟南芥 NRAMP 蛋白序列作为种子序列,在 TBtools(版本 号为 v1.0971, Chen et al., 2020)进行第一次 Blastp,在 NCBI 进行第二次 Blastp;结合 SMART (http://smart.embl-heidelbreg.de/)对候选基因的 氨基酸序列结构域进行鉴定,手动剔除不含 NRAMP 保守结构域的序列,保留下的即为甘蔗 ScNRAMP 基因家族成员。

1.2.2 编码蛋白理化特性 利用 ExPASy 在线软件 (https://us. expasy. org/tools/protparam. html/) 对 *ScNRAMP* 基因家族编码蛋白的等电点、分子量、序 列长度、总平均疏水性、不稳定系数和脂溶指数等 理化性质进行分析预测;利用 SignalP v4.1(http:// www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/) 和 CELLO v2.5(http://cello.life.nctu.edu.tw/)分别对 29 条蛋 白序列进行信号肽预测和亚细胞定位分析。

1.2.3 蛋白二级结构和跨膜结构的分析 利用 SOPMA(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\_ automat.pl? page =/NPSA/npsa\_sopma.html)分析 NRAMP蛋白的二级结构,利用TMHMM Server v2.0(http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/) 分析该蛋白家族的跨膜结构。

1.2.4 甘蔗 ScNRAMP 基因保守基序、结构域及基因结构的分析 首先,利用 MEME(https://memesuite. org/meme/)和 NCBI-CDD (https://www. ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi)检测甘蔗 ScNRAMP 家族基因中所存在相似度较高的基序 (motif)和保守结构域(domain);然后,利用基因组 注释文件,获得家族成员内含子及外显子分布情 况;最后,利用 TBtools 软件对其进行可视化分析。

1.2.5 甘蔗 ScNRAMP 基因家族顺式作用元件的分析 提取 ScNRAMP 基因上游 3 000 bp 序列作为甘蔗 NRAMP 基因的启动子;利用 PlantCARE(http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/)对启动子区域顺式作用元件进行分析。

1.2.6 甘蔗 ScNRAMP 基因的染色体定位 运用 TBtools 软件,结合甘蔗基因组注释文件和家族成员 IDlist,将结果可视化。

1.2.7 甘蔗 ScNRAMP 家族进化树的构建 使用本 地软件 MEGAX 完成多序列比对并采用邻接法 (neighbor joining)构建系统进化树,其中校验参数 (bootstrap)设置为1000次,其余均设置为默认参 数;利用在线 Evolview 软件(https://evolgenius. info//evolview-v2/#login)对进化树进行绘制编辑。 1.2.8 甘蔗 ScNRAMP 基因的表达分析 利用割手 密的 RNA-seq 转录组表达数据进行甘蔗 ScNRAMP 基因的表达分析。割手密的转录组 RNA-seq 表达 谱下载自割手密基因组数据库(Li et al., 2020)。 筛选得到 ScNRAMP 基因家族成员在不同时期不 同组织中的表达量(FPKM 值),并用 TBtools 进行 聚类,绘制热图。

# 2 结果与分析

### 2.1 甘蔗 NRAMP 蛋白的理化特性

从甘蔗割手密基因组中共鉴定到 29 个甘蔗 ScNRAMP 基因家族成员,其一级结构和理化性质如 表1所示。甘蔗 ScNRAMP 基因家族成员的氨基酸 总数在 334~1 272 个之间,氨基酸长度平均为 563, 分子量维持在 55 000 Da 左右;等电点跨度较大,在 4.77~9.43 之间;家族成员的不稳定系数大部分低 于 40%,只有 7 个成员不稳定系数在 40%~48%之 间;家族成员平均亲水系数在 0.015~0.949 之间;29 个甘蔗 ScNRAMP 蛋白均无信号肽,亚细胞定位分 析表明成员均定位在质膜上。

### 2.2 蛋白二级结构和跨膜结构分析

甘蔗 NRAMP 蛋白二级结构和跨膜结构分析 如表 2 所示。ScNRAMP 基因家族的二级结构主要 由 α-螺旋、无规则卷曲、延伸链和 β-转角组成,其 中 α-螺旋比例最高,为 36.71% ~ 64.32%,β-转角 所占比例最小,为 1.62% ~ 5.06%;蛋白家族的二 级结构较为整齐,除在 Sspon.03G0024310-2B 和 Sspon.03G0024310-1A 中所占比例是无规则卷曲> α-螺旋>延伸链>β-转角外,其余家族成员均为 α-螺旋>无规则卷曲>延伸链>β-转角;29 个甘蔗 NRAMP 家族成员均有跨膜结构,其数量为 6~12 个不等。这表明甘蔗 NRAMP 蛋白为跨膜蛋白,可 能与其转运重金属离子的功能相适应。

# 2.3 甘蔗 ScNRAMP 基因保守基序、结构域及基因 结构分析

对甘蔗 ScNRAMP 基因的保守基序、结构域及 基因结构分析如图 1 所示。通过对保守基序分析 发现 motif 1 基序高度保守,在割手密 29 个 NARAMP 家族成员中均存在;个别家族成员存在

#### 表 1 甘蔗 NRAMP 蛋白理化特性

Table 1 Physicochemical properties of sugarcane NRAMP proteins

蛋白 ID Protein ID	氨基酸数目 Number of amino acid	分子量 Molecular weight (Da)	等电点 pI	不稳定系数 Instability index	脂肪系数 Aliphatic index	亲水性的平均值 GRAVY	亚细胞定位 Subcellular localization
Sspon. 02G0029680-2B	547	59 123.60	4.85	31.77	111.35	0.459	质膜 Plasma membrane
Sspon. 01G0005860-2B	516	56 346.08	5.74	34.63	113.99	0.541	质膜 plasma membrane
Sspon.02G0029690-2D	588	64 938.64	9.08	41.70	107.04	0.270	质膜 Plasma membrane
Sspon. 02G0029680-3C	536	57 978.41	4.83	33.99	113.26	0.472	质膜 Plasma membrane
Sspon.02G0029690-1A	538	58 034.37	4.85	35.55	111.78	0.468	质膜 Plasma membrane
Sspon. 01G0005860-1P	551	60 825.41	6.28	36.08	111.38	0.464	质膜 Plasma membrane
Sspon.02G0029680-4D	498	53 799.21	4.77	35.72	105.48	0.388	质膜 Plasma membrane
Sspon.01G0005860-1A	507	55 478.08	6.17	33.79	112.76	0.525	质膜 Plasma membrane
Sspon.02G0029680-1A	462	51 417.00	9.59	40.15	103.81	0.147	质膜 Plasma membrane
Sspon. 08G0003780-3C	516	55 708.21	8.03	33.01	119.05	0.572	质膜 Plasma membrane
Sspon.02G0021270-1A	548	59 625.14	6.83	38.01	118.87	0.563	质膜 Plasma membrane
Sspon. 04G0018970-2B	603	65 379.86	9.05	40.05	108.56	0.483	质膜 Plasma membrane
Sspon.02G0021260-1A	546	58 757.48	6.59	38.89	124.14	0.721	质膜 Plasma membrane
Sspon.08G0003780-1A	490	53 180.59	8.93	31.98	119.96	0.578	质膜 Plasma membrane
Sspon.08G0003780-4D	488	52 797.32	9.34	33.67	120.86	0.631	质膜 Plasma membrane
Sspon.04G0018970-3C	485	52 442.10	8.83	33.01	120.06	0.755	质膜 Plasma membrane
Sspon. 02G0021260-2C	514	55 179.28	6.26	37.66	125.97	0.748	质膜 Plasma membrane
Sspon.04G0018970-1A	504	54 945.09	9.43	38.69	116.11	0.612	质膜 Plasma membrane
Sspon.04G0018970-4D	688	73 842.91	9.38	47.12	98.30	0.267	质膜 Plasma membrane
Sspon. 02G0021270-2C	450	49 093.10	8.07	34.03	124.80	0.696	质膜 Plasma membrane
Sspon. 08G0003780-2B	494	53 497.17	9.19	36.45	124.51	0.646	质膜 Plasma membrane
Sspon.05G0038800-1D	435	46 989.04	6.93	34.97	108.80	0.530	质膜 Plasma membrane
Sspon. 03G0024310-3C	717	77 854.58	5.02	37.10	103.07	0.334	质膜 Plasma membrane
Sspon. 03G0024310-2B	1 272	138 326.42	5.90	46.56	92.56	0.029	质膜 Plasma membrane
Sspon.02G0057810-1D	308	33 144.69	7.70	41.30	137.40	0.949	质膜 Plasma membrane
Sspon.03G0024310-1A	1 267	138 008.88	5.97	46.07	92.38	0.015	质膜 Plasma membrane
Sspon. 01G0025840-2B	456	49 749.03	6.40	31.01	125.68	0.812	质膜 Plasma membrane
Sspon.01G0061080-1D	458	50 027.17	6.05	32.71	124.48	0.742	质膜 Plasma membrane
Sspon.01G0025840-1A	334	36 374.03	6.78	30.42	122.54	0.734	质膜 Plasma membrane

2个 motif 9,如 Sspon.02G002160-2C、Sspon.02G0057810-1D、Sspon.02G002160-1A 和 Sspon.02G0021270-1A 等;大 部分家族成员中有 9个保守基序,而成员 Sspon. 02G0029680-1A、Sspon.05G0038800-1D 和 Sspon. 02G0057180-1D 中最少,仅有 6个保守基序(图 1, 表 3)。保守基序的差异可能暗示该基因家族成员 之间在功能上存在差异。

通过对基因结构分析发现 ScNRAMP 基因家 族全都含有内含子,并且内含子数目差异较大(为 2~11 个不等);部分基因成员在 5'末端和 3'末端 不含非翻译区(untranslated region, UTR)。

通过对保守结构域分析发现,除Sspon. 02G0057810-1D、Sspon. 05G0038800-1D、Sspon. 01G0025840-2B、Sspon.01G0061080-1D和Sspon.01G0025840-1A这5位 成员的保守结构域为 Nramp superfamily 外,其余 24 位家族成员的结构域均为 Nramp。

### 2.4 甘蔗 ScNRAMP 基因家族顺式作用元件分析

ScNRAMP 基因起始密码子上游 3 000 bp 启动 子区域顺式作用元件分析结果如图 2 所示。在 ScNRAMP 基因启动子上含有与生长发育有关的作 用元件,即 CAT-box(分生组织调控元件)、RYelement(种子特异调控元件);与激素响应相关的 顺式作用元件,即 ABRE(脱落酸响应元件)、 TGACG-motif(茉莉酸响应元件)、TCA-element(水 杨酸响应元件)、TGA-element(生长素响应元件) 和 TATC-box/P-box(赤霉素响应元件);与非生物 胁迫相关的作用元件,即 TC-rich(防御和应激响应 元件)、MBS(干旱响应元件)、LTR(低温响应元



A. ScNRAMP 基因的保守基序(motif)分布,10个 motif 用不同颜色的方框表示; B. ScNRAMP 基因保守结构域(domain)分布;
C. ScNRAMP 基因内含子和外显子分布。绿色方框表示外显子;黑色线条表示内含子;黄色框表示基因的上下游区域。
A. Distributions of conserved motifs in ScNRAMP genes, ten putative motifs are indicated in different colored boxes; B. Distributions of domains in ScNRAMP genes; C. Exon and intron organizations of ScNRAMP genes. Green boxes represent exons; Black lines represent introns; The upstream and downstream regions of ScNRAMP genes are indicated in yellow boxes.





图 2 甘蔗 ScNRAMP 基因启动子区域顺式作用元件预测结果 Fig. 2 Prediction result of *cis*-acting elements in the promoters of sugarcane ScNRAMP genes



图 3 甘蔗 *ScNRAMP* 基因在染色体上的位置 Fig. 3 Positions of sugarcane *ScNRAMP* genes on chromosomes

件)、GT1-motif/G-box、MRE 和 I-box(光响应元件) 和 ARE(厌氧反应元件);与蛋白相关元件,即 MBSI 和 MYBHv1(MYB 转录因子结合位点)及 O2-site(玉 米醇溶蛋白代谢调节)。进一步分析发现,G-box、 MRE、TGACG-motif、ABRE 等元件存在于所有成员。 以上结果表明, ScNRAMP 基因家族很有可能通过 TC-rich motif 和 MRE motif 等元件参与甘蔗的激素 代谢,进而影响其对重金属胁迫的响应。

### 2.5 甘蔗 ScNRAMP 基因的染色体定位

染色体定位结果如图 3 所示。甘蔗 ScNRAMP 基因的 29 个家族成员不均地分布在 19 条染色体 上;染色体 Chr2A 上有 4 个基因,染色体 Chr1B、染 色体 Chr2C 和染色体 Chr2D 上各有 3 个基因,染 色体 Chr1A 上有 2 个基因,其余 14 条染色体上各 含有 1 个基因。

### 2.6 甘蔗 ScNRAMP 家族的系统发育树

为了解甘蔗割手密和其他禾本科植物 NRAMP 基因家族的进化关系,构建了水稻、拟南芥、割手 密、玉米和高粱 5 个物种 NRAMP 家族成员的进化 树(图4)。由图4可知,进化树有3个分支,分为3 个亚家族。亚家族 I 中,甘蔗 ScNRAMP 有 14 位成

员 (Sspon. 05G0038800-1D、Sspon. 04G0018970-3C、Sspon. 04G0018970-1A Sspon. 04G0018970-2B Sspon. 04G0018970-4D Sspon. 02G0021260-1A Sspon. 02G0021260-2C Sspon. 02G0057810-1D Sspon. 02G0021270-1A Sspon. 02G0021270-2C Sspon. 08G0003780-2B Sspon. 08G0003780-1A Sspon. 08G0003780-3C和 Sspon.08G0003780-4D), 与高粱 14 位 成员、玉米15位成员、拟南芥2位成员和水稻4位 成员聚为一支。亚家族Ⅱ中,甘蔗 ScNRAMP 有 9 位成员(Sspon. 01G0005860-2B、Sspon. 01G0005860-1A Sspon. 02G0029680-2B Sspon. 02G0029680-1A Sspon. 02G0029680-3C Sspon. 02G0029680-4D Sspon. 02G0029690-1A、Sspon. 02G0029690-2D 和 Sspon.01G0005860-1P), 与高粱3位成员、玉米5位 成员、拟南芥4位成员和水稻2位成员聚为一支。 亚家族Ⅲ中,甘蔗 ScNRAMP 有 6 位成员(Sspon. 03G0024310-3C Sspon. 03G0024310-2B Sspon. 03G0024310-1A, Sspon. 01G0025840-2B, Sspon. 01G0061080-1D 和 Sspon.01G0025840-1A), 与高粱 5位成员和玉米7位成员聚为一支,并且在此分枝 上没有拟南芥和水稻的家族成员。水稻、拟南芥、 高粱、玉米和甘蔗 NRAMP 家族成员之间均有同源





Black asterisks represent sugarcane ScNRAMP; Green boxes represent corn ZmNRAMP; Yellow circles represent rice OsNRAMP; Red triangles represent Arabidopsis AtNRAMP; Pink ticks represent sorghum SbNRAMP.



基因,相比之下玉米与甘蔗的 NRAMP 基因家族成员之间亲缘关系更近。

### 2.7 甘蔗 ScNRAMP 基因组织表达

为了解甘蔗 ScNRAMP 基因家族成员的功能 与时空表达模式,本文以公开发表的割手密基因 表达数据分析了 ScNRAMP 基因在不同组织和不 同发育时期的表达情况(图5)。图5结果显示,甘 蔗 ScNRAMP 基因的表达呈现组织特异性。其中, Sspon. 04G0018970-2B、Sspon. 04G0018970-4D、 Sspon.04G0018970-1A、Sspon.04G0018970-3C 等基 因在茎成熟期(M-s-3、6、9)表达量较高,在前成熟 期和发芽期表达量较低; Sspon. 03G0024310-3C、 Sspon. 03G0024310-2B、Sspon. 03G0024310-1A、 Sspon. 01G0025840-2B和 Sspon. 01G0061080-1D 5 个成员在发育期叶中的表达量高于前成熟期和成 熟期。另外, 29个家族成员中仅有1个成员 Sspon.05G0038800-1D的表达量 FPKM 值为0,表 明其在各发育时期和组织部位均未表达。

3 讨论与结论

本研究对甘蔗 ScNRAMP 基因家族成员进行理



S. 实生苗期; P. 成熟前期; M. 成熟期; s. 茎; l. 叶; 3. 甘蔗茎第3节; 6. 甘蔗茎第6节; 9. 甘蔗茎第9节。
S. Seedling stage; P. Early maturity stage; M. Mature stage; s. Steam; l. Leaf; 3. Section 3 of sugarcane stem; 6. Section 6 of sugarcane stem;
9. Section 9 of sugarcane stem.



化特性分析发现,不同的 NRAMP 蛋白序列有较大的差异,氨基酸长度为 334~1 272 aa,等电点跨度较大(4.77~9.43),表明其编码蛋白能适应不同的酸碱环境。本研究中,甘蔗 NRAMP 蛋白不稳定系数均小于 40%,表明其稳定性较好;蛋白的平均亲水系数介于 0.015~0.949 之间,表明其是一类相对疏水的蛋白;29 个家族成员分布在 19 条染色体上,染色体 Chr2A 上最多,有 4 个家族成员;割手密 NRAMP 蛋白所有成员均有 6~12 个跨膜结构域,均分布在质膜上,可能与其具有转运重金属离子的功能相适应。基因结构分析显示,所有家族成员均具有内含子。

甘蔗割手密基因组中共鉴定出 29 个 ScNRAMP 基因,与水稻(6 个成员)和拟南芥(6 个成员)相比, ScNRAMP 基因家族成员的数量明显要多,推测可能 与甘蔗是多倍体且基因组庞大有关,尤其是甘蔗作 为多倍体植物,其在多倍化进程中的全基因组复制 促进了甘蔗基因组含量的提高及其基因家族的扩 张,这与相关研究茄科植物高度变异的基因家族在 全基因组复制和基因的串联重复引起基因组的含 量增加和基因家族扩张的观点一致(Mäser et al., 2001;Zhang et al., 2018;Tian et al., 2021;Wang et al., 2021)。拟南芥和水稻的基因组大小分别为 125 Mb 和 466 Mb,而甘蔗割手密的基因组大小则 达到了 3.36 Gb。此外,拟南芥和水稻均为二倍体,甘蔗为八倍体,而测序的甘蔗品种割手密 AP85-441 则是甘蔗八倍体 SES208 单花粉培育得到的整倍体 (四倍体),理论上现代甘蔗栽培种(多为异源八倍 体且为非整倍体)具有的 ScNRAMP 家族成员应多 于 29 个(陈如凯, 2011; Zhang et al., 2018)。

基因结构和基序组成的分析,可为基因家族的 进化关系提供重要依据(Boudet et al., 2001)。对 ScNRAMP 基因结构分析发现的同一亚家族的大多 数基因在外显子、基序或非翻译区具有类似的结构 特征,这一现象与其他物种的 NRAMP 蛋白家族相 似(Belouchi et al., 1997; Lanquar et al., 2005),如 AtNRAMP3 和 AtNRAMP4 的基因结构相似,并且对 Fe<sup>2+</sup>都有极高运输能力(Lanquar et al., 2005); OsNramp1、OsNramp2 和 OsNramp3 序列的相似性为 64%~75%(Belouchi et al., 1997),推测甘蔗 NRAMP 表 2

# 表 3 甘蔗 ScNRAMP 基因保守基序 logo

甘蔗 NRAMP 蛋白二级结构组成 Table 3 Conservative motif logo of sugarcane ScNRAMP genes

## 及跨膜结构预测结果

Table 2 Secondary structure composition and transmembrane structure prediction of sugarcane NRAMP proteins

蛋白 ID Protein ID	α-螺旋 α-helix (%)	延伸链 Exten- ded chain (%)	β-转角 β-turn (%)	无规则 卷曲 Random coil (%)	跨膜 结构数 Number of transmem brane
Sspon.02G0029680-2B	57.22	11.15	3.66	27.97	11
Sspon. 01G0005860-2B	57.56	10.08	3.10	29.26	10
Sspon.02G0029690-2D	53.57	12.59	3.06	30.78	11
Sspon.02G0029680-3C	57.65	11.38	2.99	27.99	11
Sspon.02G0029690-1A	58.55	11.15	3.90	26.39	11
$Sspon. 01G0005860{\text -}1P$	57.99	11.90	3.35	26.77	8
Sspon. 02G0029680‐4D	53.61	13.45	3.41	29.52	9
Sspon.01G0005860-1A	57.40	11.05	2.17	29.39	10
Sspon.02G0029680-1A	58.01	13.85	3.03	25.11	6
Sspon.08G0003780-3C	52.91	13.95	3.10	30.04	10
Sspon.02G0021270-1A	53.47	12.23	3.10	31.20	11
Sspon. 04G0018970‐2B	53.90	12.77	3.65	29.28	10
Sspon.02G0021260-1A	55.31	15.38	2.75	26.56	11
Sspon.08G0003780-1A	54.69	11.84	3.06	30.41	10
Sspon.08G0003780-4D	51.43	13.52	4.52	30.53	10
Sspon. 04G0018970-3C	64.32	9.28	2.89	23.51	11
$Sspon. 02G0021260\hbox{-}2C$	55.84	15.95	5.06	23.15	10
Sspon.04G0018970-1A	61.11	12.90	2.18	23.81	9
Sspon. 04G0018970‐4D	43.31	11.92	4.36	40.41	9
Sspon. 02G0021270‐2C	54.00	15.33	4.67	26.00	9
Sspon.08G0003780-2B	48.58	15.79	1.62	34.01	10
$Sspon. 05G0038800{\text{-}1D}$	46.44	18.16	4.37	31.03	7
$Sspon.03G0024310\hbox{-}3C$	47.56	13.95	2.65	35.84	12
Sspon. 03G0024310‐2B	36.71	12.34	2.83	48.11	11
Sspon. 02G0057810‐1D	53.90	20.78	3.57	21.75	8
Sspon.03G0024310-1A	36.78	12.63	2.92	47.67	11
Sspon.01G0025840-2B	54.17	17.11	3.07	25.66	9
Sspon.01G0061080-1D	53.06	18.78	3.28	24.89	8
Sspon.01G0025840-1A	55.09	19.76	4.19	20.96	6

蛋白同一亚家族的成员在功能上可能相似。通过 对甘蔗割手密、水稻、高粱、玉米4种单子叶植物和 拟南芥1种双子叶植物的系统进化分析,可将29个 ScNRAMP 家族成员分为3个亚家族。在亚家族Ⅲ 中,进化树分支上只有高粱(5位成员)、玉米(7位 成员)和割手密(6位成员)的家族成员,没有水稻 和拟南芥的成员,推测甘蔗割手密 NRAMP 亚家族 Ⅲ中的这6位成员可能存在着与水稻和拟南芥的 NRAMP 蛋白家族不一样的特殊功能,而这个亚家 族的特殊功能在高粱和玉米中却可能存在。

植物启动子作为植物功能基因表达调控的最

基序 Motif	E值 Evalue	长度 Length (bp)	序列标志 Sequence logo
motif 1	6.2e-594	38	TAGAIN FRANKINAL BALVA
motif 2	3.5e-447	29	ABH OYXTOKILAE+OB-EYB-284848LV
motif 3	3.7e-453	34	ALSOALOLU ALUP NERL SALVESRILLOSX
motif 4	4.2e-481	50	- server a support the support
motif 5	3.6e-464	40	Nother Traditional and Million and Vertillog
motif 6	42e-399	41	ALTERNISTE FALLER SENTENSET
motif 7	9.4e-306	34	REARIZED ESTATE VEFTING AT THE STATE
motif 8	3.8e-229	21	YK MAKEV & GUEY KLSG
motif 9	2.2e-206	21	- StyveYaLLAsCossTITe
motif 10	2.5e-129	22	SULVINT PLATER VENUE

重要顺式元件之一,启动子分析有助于阐明基因 表达的调控和响应机制。通过对启动子区域的顺 式作用元件分析,可以得到植物关于响应特定生 物胁迫或非生物胁迫的重要元件,并由此推测甘 蔗割手密种可能通过光响应因子、激素响应元件 和抗逆响应因子(TC-rich motif)等元件间的相互 作用形成复杂的代谢调控网络来响应和应对重金 属胁迫。这与水稻 NRAMP 基因受到 JA、ABA 等 激素的调控来应对病原菌侵染、外界防御信号和 金属离子,从而参与植物的防御反应一致(Zhou et al., 2004)。在对甘蔗 ScNRAMP 基因上游 3 000 bp 区域研究发现,成员中大部分均含有茉莉酸响 应元件(TGACG-motif)和生长素响应元件(TGAelement),推断该基因家族在进化过程中可能具有 与植物生长和逆境胁迫相关的功能。甘蔗 ScNRAMP 基因的表达具有组织特异性,甘蔗 ScNRAMP 基因主要在特定组织和器官中表达, Sspon. 01G0025840-2B 和 Sspon. 01G0061080-1D 2 位成员在种子发芽期的叶和茎中的表达量明显高 于其他时期。对各时期和各组织高表达的基因分 析发现,家族成员均具有 MBS、ABRE 和 TCAelement 等与激素响应相关的作用元件,推测其参

与激素代谢过程进而影响甘蔗对重金属胁迫的 响应。

目前,NRAMP 基因家族在菜豆(lshida et al., 2018)、大豆(Qin et al., 2017)和甘蓝型油菜(Meng et al., 2017)等经济作物上已被广泛研究。由于甘蔗作为重要的糖料作物和能源作物,关系着我国乃至世界人民的食糖安全,因此降低重金属胁迫对甘蔗产量及含糖量的影响,了解 ScNRAMP等基因家族转运重金属离子的分子机制尤其必要。本文通过对甘蔗割手密中 29 个 ScNRAMP 基因家族成员的全基因组分析,有利于阐明甘蔗 ScNRAMP 基因家族的功能,并为甘蔗的分子育种尤其是应对重金属胁迫的研究提供了重要的候选基因。

### 参考文献:

- BELOUCHI A, CELLIER M, KWAN T, et al., 1995. The macrophage-specific membrane protein Nramp controlling natural resistance to infections in mice has homologues expressed in the root system of plants [J]. Plant Mol Biol, 29: 1181-1196.
- BELOUCHI A, KWAN T, GROS P, 1997. Cloning and characterization of the *OsNramp* family from *Oryza sativa*, a new family of membrane proteins possibly implicated in the transport of metal ions [J]. Plant Mol Biol, 33: 1085–1092.
- BOUDET N, AUBOURG S, KREIS M, et al., 2001. Evolution of intron/exon stucture of *DEAD* helicase family genes in *Arabidopsis*, *Caenorhabditit* and *Drosophila* [J]. Genome Res, 11(12): 2101–2114.
- CAILLIATTE R, SCHIKORA A, BRIAT JF, et al., 2010. High-affinity manganese uptake by the metal transporter *NRAMP*1 is essential for *Arabidopsis* growth in low manganese conditions [J]. Plant Cell, 22(3): 904-917.
- CASTAINGS L, CAQUOT A, LOUBET, et al., 2016. The high-affinity metal transporters *NRAMP*1 and *IRT*1 team up to take up to iron under sufficient metal provision [J]. Sci Rep, 6: 37222.
- CELLIER M, PRIVÉ G, BELOUCHI A, et al., 1995. Nramp defines a family of membrane proteins [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 92(22): 10089–10093.
- CHEN CJ, CHEN H, ZHANG Y, et al., 2020. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. Mol Plant, 13(8): 1194–1202.
- CHEN RK, 2011. Modern sugarcane genetic breeding [M]. Beijing: China Agricultural Press. [陈如凯, 2011. 现代甘 蔗遗传育种 [M]. 北京:中国农业出版社.]
- FANG JP, 2014. A review of *Saccharum* origin and its evolutionary relationship with related genera [J]. Chin J Trop Crops, 35(4): 816-822. [方静平, 2014. 甘蔗属起源 及其与近缘属进化关系研究进展 [J]. 热带作物学报, 35(4): 816-822.]
- IRVINE JE, 1999. Saccharum species as horticultural classes [J]. Theor Appl Genet, 98: 186–194.
- ISHIDA JK, CALDAS DG, OLIVEIRA LR, et al., 2018. Genome-wide characterization of the *NRAMP* gene family in *Phaseolus vulgaris* provides insights into functional implications during common bean development [J]. Genet

Mol Biol, 41(4): 820-833.

- LANQUAR V, LELIÈVRE F, BOLTE S, et al., 2005. Mobilization of vacuolar iron by *AtNRAMP3* and *AtNRAMP4* is essential for seed germination on low iron [J]. EMBO J, 24(23): 4041–4051.
- LI PT, CHAI Z, LIN PP, et al., 2020. Genome-wide identification and expression analysis of AP2/ERF transcription factors in sugarcane (*Saccharum spontaneum* L.) [J]. BMC Genomics, 21(1): 685.
- LIU XL, YIN Z, LIU Y, et al., 2020. The complete mitochondrial genome of sugarcane (*Saccharum* spp.) variety FN15 [J]. Mitochondrial DNA Part B, 5(3); 2163-2165.
- LUO BB, CHEN JG, ZHU LL, et al., 2018. Overexpression of a high-affinity nitrate transporter *OsNRT2*. 1 increases yield and manganese accumulation in rice under alternating wet and dry condition [J]. Front Plant Sci, 9: 1192.
- MÄSER P, THOMINE S, SCHROEDER JI, et al., 2001. Phylogenetic relationships within cation transporter families of Arabidopsis [J]. Plant Physiol, 126(4): 1646–1667.
- MENG JG, ZHANG XD, TAN K, et al., 2017. Genome-wide identification of Cd-responsive NRAMP transporter genes and analyzing expression of NRAMP1 mediated by miR167 in Brassica napus [J]. Biometals, 30(6): 917–931.
- NEVO Y, NELSON N, 2006. The NRAMP family of metal-ion transporters [J]. Biochim Biophys Acta, 1763(7): 609–620.
- POTTIER M, OOMEN R, PICCO C, et al., 2015. Identification of mutations allowing natural resistance associated macrophage proteins (NRAMP) to discriminate against cadmium [J]. Plant J, 83(4): 625-637.
- QIN L, HAN PP, CHEN LY, et al., 2017. Genome-wide identification and expression analysis of *NRAMP* family genes in Soybean (*Glycine max* L.) [J]. Front Plant Sci, 8(3): 1436–1454.
- ROSA-SANTOS TM, SILVA RG, KUMARP, et al., 2020. Molecular mechanisms underlying sugarcane response to aluminum stress by RNA-Seq [J]. Int J Mol Sci, 21(21): 7934.
- TAKAHASHI R, ISHIMARU Y, NAKANISHI H, et al., 2011. Role of the iron transporter *OsNRAMP*1 in cadmium uptake and accumulation in rice [J]. Plant Signal Behav, 6(11): 1813–1816.
- THOMINE S, WANG R, WARD JM, et al., 2000. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to *Nramp* genes [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 97(9): 4991-4996.
- TIAN WJ, HE GD, QIN LJ, et al., 2021. Genome-wide analysis of the NRAMP gene family in potato (Solanum tuberosum): Identification, expression analysis and response to five heavy metals stress [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 208: 111661.
- WANG P, MOORE BM, PANCHY NL, et al., 2018. Factors influencing gene family size variation among related species in a plant family, Solanaceae [J]. Genome Biol Evol, 10(10): 2596-2613.
- ZHANG JS, ZHANG XT, TANG HB, et al., 2018. Alleledefined genome of the autopolyploid sugarcane Saccharum spontaneum L.[J]. Nat Genet, 50(12): 1565–1573.
- ZHOU XJ, YANG YN, 2004. Differential expression of rice *Nramp* genes in response to pathogen infection, defense siganl molecules and metal ions [J]. Mol Plant Pathol, 65(5): 235-243.

(责任编辑 李 莉)

#### DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202201044

娄红波, 王先宏, 何丽莲, 等. 甘蔗茎叶的化学成分及抗氧化活性研究 [J]. 广西植物, 2022, 42(11): 1875-1883. LOU HB, WANG XH, HE LL, et al. Chemical constituents and antioxidant activities from the stems and leaves of *Saccharum officinarum* [J]. Guihaia, 2022, 42(11): 1875-1883.



# 甘蔗茎叶的化学成分及抗氧化活性研究

娄红波, 王先宏, 何丽莲, 李富生\*

(云南农业大学农学与生物技术学院,昆明 650201)

摘 要:为研究甘蔗(Saccharum officinarum)茎叶的化学成分及抗氧化活性,该文对甘蔗茎叶以甲醇提取, 提取物采用柱色谱(SiO<sub>2</sub>、Sephadex LH-20、Rp-18)进行分离纯化,根据质谱和核磁共振技术鉴定所得化合物的结构,并通过 DPPH 法测定化合物的清除自由基能力。结果表明:(1)从甘蔗茎叶部位共分离鉴定 22 个化合物,分别为对羟基苯甲醛(1)、对甲氧基桂皮酸(2)、4-甲氧基苯甲醛(3)、香草醛(4)、4-羟基肉桂 酸甲酯(5)、对羟基苯甲酸(6)、(2-羟基苯基)(苯基)甲酮(7)、对甲基苯甲酸(8)、咖啡酸甲酯(9)、乌 头酸A(10)、乌头酸E(11)、5-O-二甲氧基肉桂酰基奎尼酸(12)、槲皮素(13)、槲皮素-3-O-α-L-阿拉 伯糖苷(14)、槲皮素-3-O-β-D-吡喃半乳糖苷(15)、硫代二丙酸双十八烷基酯(16)、α-conidendrin (17)、rel-(2α,3β)-7-O-methylcedrusin(18)、3-O-阿魏酰奎宁酸甲酯(19)、木犀草素(20)、(55,68)-5,6dihydro-3,8,10-trihydroxy-5-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-6-hydroxymethyl-2,4-dimethoxy-7H-benzo[c] xanthen-7-one)(21)和5-O-阿魏酰奎宁酸甲酯(22),其中化合物2-3、7-11、14-19、21-22为首次从该植 物中分离得到。(2)通过DPPH法对含量大的15个化合物(1-9、11-16)进行自由基清除能力的筛选,其 中化合物12(5-O-二甲氧基肉桂酰基奎尼酸)显示了较好的抗氧化活性(IC<sub>50</sub>值为49.58 μg・mL<sup>-1</sup>)。该 研究结果丰富了甘蔗抗氧化活性物质基础,为其进一步开发利用提供了科学依据。 关键词:化学成分,甘蔗,茎叶,抗氧化,活性

### 中图分类号: Q946 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2022)11-1875-09

# Chemical constituents and antioxidant activities from the stems and leaves of *Saccharum officinarum*

LOU Hongbo, WANG Xianhong, HE Lilian, LI Fusheng \*

( College of Agriculture and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China )

**Abstract**: To study the chemical constituents and antioxidant activities from the stems and leaves of *Saccharum* officinarum. Twenty-two compounds were isolated and purified from the MeOH part of the stems and leaves of *S.* officinarum by means of various column chromatographic techniques, including  $SiO_2$ , Sephadex LH-20 and Rp-18 silica gel. Their structures were identified by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance; The DPPH method was used

收稿日期: 2022-05-09

基金项目: 国家自然科学基金(31560417, 31960451); 云南农业大学 ESI 学科提升计划项目(2019YNAUESIMS01) [Supported by National Natural Science Foundation of China (31560417, 31960451); ESI Discipline Improvement Program of Yunnan Agricultural University (2019YNAUESIMS01)]。

第一作者: 娄红波(1982-),博士研究生,主要从事甘蔗资源研究与利用,(E-mail)2455978189@qq.com。

<sup>\*</sup>通信作者:李富生,教授,博士研究生导师,主要从事甘蔗资源研究与利用,(E-mail)lfs810@ sina.com。

to determine the free radical scavenging abilities of the components from *S. officinarum*. The results were as follows: (1) The compounds were identified as *p*-hydroxybenzaldehyde (1), *p*-methoxy-cinnamic acid (2), 4-methoxybenzaldehyde (3), vanillin (4), 4-hydroxy-cinnamic acid methylester (5), *p*-hydroxybenzoic acid (6), (2-Hydroxyphenyl) (phenyl) methanone (7), *p*-methylbenzoic acid (8), caffeic acid methyl ester (9), aconitate A (10), aconitate E (11), 5-0-dimethoxycinnamoylquinic acid (12), quercetin (13), quercetin-3-0- $\alpha$ -L-arabinoside (14), quercetin-3-0- $\beta$ -D-galactopyranoside (15), didodecyl thiodipropionate (propionic acid, 3,3-sulfinyl di-1,1'-didodecyl ester) (16),  $\alpha$ -conidendrin (17), rel-(2 $\alpha$ , 3 $\beta$ )-7-0-methylcedrusin (18), 3-0-Ferulylquinic acid methyl ester (19), luteolin (20), (5S, 6S)-5, 6-dihydro-3, 8, 10-trihydroxy-5-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-6-hydroxymethyl-2, 4-dimethoxy-7H-benzo [c]xanthen-7-one) (21), 5-0-Ferulylquinic acid methyl ester (22). Compounds 2-3, 7-11, 14-19, 21-22 were isolated from this plant for the first time. (2) Determination of free radical scavenging abilities of 15 compounds (1-9, 11-16) were selected by DPPH method. Compound 12 (5-0-dimethoxycinnamoylquinic acid) had great antioxidant activity (IC<sub>50</sub> value was 49.58 µg · mL<sup>-1</sup>). This study enrich the material basis of antioxidant activity of *S. officinarum*, which provides a scientific basis for the further development of *S. officinarum*.

甘蔗(Saccharum officinarum)系禾本科 (Gramineae)甘蔗属(Saccharum)植物,分布于温 带及亚热带地区,全球有100多个国家种植甘蔗。 我国甘蔗资源丰富,集中种植于广西、云南、福建 等地(中国科学院中国植物志编辑委员会,2014), 是我国发展糖业最重要的生产原料。甘蔗榨糖 后,留下的叶和渣为农业副产物,产量较大,占总 量的40%,仅少量被用于加工为动物饲料和酵母 (魏纪湖等,2016),而大部分被蔗农就地焚烧,从 而造成资源浪费且严重污染环境。当前,我国糖 业健康稳定发展,甘蔗副产物越来越多,如何高效 利用甘蔗资源一直成为社会讨论的热点和重点。

《中药大辞典》记载甘蔗味甘、性凉,具有清 热、生津、解酒等功效(江苏新医学院,2006)。民 间用甘蔗治疗膀胱结石、肾结石和淋病,取得了良 好效果。甘蔗汁具有清热生津、消痰镇咳、治呃止 呕等功能。当前研究表明甘蔗叶的化学成分主要 为糖类、黄酮类、酚类、多糖等(冯思敏,2017;侯 小涛,2014),具有抗氧化、抗肿瘤、降血糖、抗炎等 多种生物活性(江恒等,2012;桂意云等,2012;何 雪梅等,2015),但其中的化合物单体活性成分报 道却较少。为进一步揭示甘蔗的活性成分,更好 地开发利用甘蔗副产物的药用部位,本研究以甲 醇提取甘蔗茎叶部位进行系统的化学成分研究, 从乙酸乙酯萃取部位分离得到 22 个化合物(图 1),其中 2-3、7-11、14-19、21-22 为首次从该植 物茎叶部位分离得到,化合物 12 为前期(娄红波 等,2021) 分离到的已知化合物。采用 DPPH 法 对量大的 15 个化合物 (1-9、11-16) 进行自由基 清除能力的筛选,化合物 12 (5-0-二甲氧基肉桂 酰基奎尼酸)显示了较好的抗氧化活性(IC<sub>50</sub>值为 49.58 μg・mL<sup>-1</sup>),研究结果可为后续的活性研究 及资源开发利用提供物质基础。

# 1 仪器与材料

JP-03OS 超声波仪器(中国深圳钰洁清洗设 备公司)、HC-2500Y304 粉碎机(中国武义海纳电 器公司)、VG-autospec 3000 型质谱仪(英国 msicromass 公司)、Bruker avance-600 MHz 核磁共 振仪(瑞士 bruker 公司)、OSB-2100 旋转蒸发仪 (中国上海爱朗仪器有限公司)、Rp-18 反向硅胶 和凝胶 Sephadex LH-20(中国上海伊卡生物技术 有限公司);SiO<sub>2</sub>(200~300 目)和硅胶板 GF<sub>254</sub>(中 国青岛海洋化工公司);常规试剂(甲醇、丙酮、乙 酸乙酯、石油醚等)为国产分析纯,纯净水。

甘蔗茎叶于 2018 年 8 月采自云南省省级甘蔗 昆明种质资源圃 (云南农业大学校园内,海拔 1 950 m),经云南农业大学李富生教授鉴定为甘 蔗(Saccharum officinarum)。

# 2 实验方法

### 2.1 提取与分离

取干燥的甘蔗茎、叶 80 kg,粉碎,甲醇浸泡 1 d,回流提取,回收甲醇至浸膏状。浸膏先用水溶 解,继用 5% HCl 调 pH 为 3~4,乙酸乙酯连续萃取 3 次,回收溶剂,获得甘蔗粗提物 500 g。粗提物采 用硅胶柱色谱,以 CHCl<sub>3</sub> - CH<sub>3</sub> OH - 冰 醋酸 (10:0.1:0.02~10:3.5:0.02)进行梯度洗脱,



Fig. 1 Chemical structures of compounds 1–22

合并色点相同部分共得 8 个馏份 (Fr.1-8)。Fr.1 硅胶柱色谱经石油醚-乙酸乙酯-冰醋酸 (5: 0.5~1.2:0.02) 梯度洗脱,得 3 个馏分 (Fr.1-A, 1-B, 1-C)。Fr.1-A 经硅胶柱色谱用石油醚-丙 酮-冰醋酸 (5:0.5:0.02) 和 Sephadex LH-20 (CHCl<sub>3</sub>-MeOH 1:1) 进行反复纯化,得到化合物 1 (0.43 g)、2 (0.58 g)、3 (0.33 g)、4 (0.19 g)、5 (0.38 g)。Fr.1-B 反复过硅胶柱色谱 CHCl<sub>3</sub>-MeOH-冰醋酸 (10:0.1:0.01) 分离,以 Sephadex LH-20 (CHCl<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH 1:1) 反复纯化, 得化合物 6 (0.32 g)、7 (0.87 g)。Fr.1-C 经硅胶 柱色谱 CHCl<sub>3</sub>-MeOH-冰醋酸 (10:0.1:0.02) 梯度洗脱,用 Rp-18 硅胶甲醇-水体系 (5:95~ 90:10)分离纯化,得到化合物8(0.29g)、9(0.20g)、10(0.05g)、11(0.33g)。Fr.4 经硅胶 柱色谱CHCl<sub>3</sub>-MeOH-冰醋酸(10:0.3:0.02) 反复分离纯化,得到化合物12(0.38g)。Fr.6 经 柱色谱Rp-18 硅胶甲醇-水系统(5:95~80:20) 梯度洗脱,用 Sephadex LH-20(CHCl<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH 1: 1)反复纯化,得到化合物13(0.19g)、14(0.24 g)、15(0.22g)。Fr.7 经硅胶柱色谱以石油醚-乙 酸乙酯-冰醋酸(5:5.0:0.02)梯度洗脱,得3 个馏分(Fr.7-A,7-B,7-C)。Fr.7-A 经柱色谱 Sephadex LH-20(CHCl<sub>3</sub>-MeOH 1:1)分离,以 Rp-18 硅胶甲醇-水体系(30:70~70:20)梯度 洗脱,得到化合物16(0.17g)、17(0.025g)。 Fr.7-B 经硅胶柱色谱用 CHCl<sub>3</sub>-MeOH-冰醋酸 (10:0.8:0.02)洗脱,反复过柱色谱 Sephadex LH-20 (CHCl<sub>3</sub>-MeOH 1:1),得化合物 **18** (0.057 g)、**19** (0.076 g)、**20** (0.055 g)。Fr.7-C 经柱色 谱以 Rp-18 硅胶甲醇-水体系 (30:70~80:20) 梯度洗脱,进行反复硅胶柱层析等色谱技术分离 纯化,得到化合物 **21** (0.04 g)、**22** (0.068 g)。

2.2 采用 DPPH 法测定化合物清除自由基的能力

高含量的15个化合物(1-9、11-16),分别用 无水乙醇稀释至所需浓度,DPPH用无水乙醇配成 0.2 mmol·L<sup>-1</sup>的溶液备用。分别将100 µL各浓度 测试化合物溶液(1 000、500、250、125、62.5、 31.25、15.625 µg·mL<sup>-1</sup>)和100 µL DPPH溶液加 入到96孔板中,轻轻混匀,室温下避光静置反应 30 min 后于517 nm 波长测定其吸光度 As,同时测 定100 µL DPPH溶液与100 µL 无水乙醇混合后 的吸光度 Ab,以及 200 µL 无水乙醇的吸光度值 Aref。按以下公式计算各化合物对 DPPH 自由基 的清除率,并用 Origin 软件计算 IC<sub>50</sub>值。

 $I(\%) = [(As - Aref) - (Ab - Aref)]/(Ab - Aref) \times 100\%_{\circ}$ 

式中:*I* 表示 DPPH 自由基清除率;*As* 表示测试 样本和 DPPH 混合溶液 OD 值;*Ab* 表示 DPPH 和无 水乙醇混合溶液 OD 值;*Aref* 表示无水乙醇 OD 值。

3 结果与分析

#### 3.1 结构鉴定

化合物 1 白色粉末。ESI-MS *m/z*: 123.1 [M+H]<sup>+</sup>,分子式为 C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 9.75 (1H, s, H-4), 7.75 (2H, s, H-2,6), 6.91 (2H, m, H-3, 5); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 192.8 (C-6), 165.2 (C-4), 133.4 (C-1), 130.3 (C-2, 6), 116.9 (C-3, 5)。以上数据与文献 (李小辉等, 2022) 基本一致, 故鉴定为对羟基苯甲醛 (*p*-hydroxybenzaldehyde)。

化合物 2 白色针状物质。ESI-MS m/z: 179.2 [M+H]<sup>+</sup>,分子式为  $C_{10}H_{10}O_{30}$ <sup>-</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.57 (1H, d, J = 15.1 Hz, H-7), 7.41 (2H, dd, J = 6.1, 1.7 Hz, H-2, 6), 6.78 (2H, dd, J = 6.5, 1.7 Hz, H-3, 5), 6.28 (1H, d, J = 15.3 Hz, H-8), 3.73 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 169.7 (-COOH), 161.2 (C-4), 146.5 (C-7), 131.1 (C-2, 6), 127.1 (C-1), 116.8 (C-3, 5), 114.9 (C-8), 51.9(-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献(周媛媛
 等,2020)基本一致,故鉴定为对甲氧基桂皮酸
 (*p*-methoxy-cinnamic acid)。

化合物 **3** 白色块状。ESI-MS *m/z*: 135.0 [M-H]<sup>-</sup>,分子式为 C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 9.75 (1H, s, H-4), 7.75 (2H, s, H-2,6), 6.91 (2H, m, H-3, 5); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 192.8 (C-1), 165.2 (C-4), 133.2 (C-2, 6), 115.9 (C-3, 5)。以上数据与文献 (黄青兰等, 2017) 基本一致,故鉴定为4-甲氧 基苯甲醛 (4-methoxybenzaldehyde)。

化合物 4 白色粉末。ESI-MS m/z: 151.2 [M-H]<sup>-</sup>,分子式为 C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 9.71 (1H, s, -CHO), 7.42 (1H, dd, J = 8.6, 1.3 Hz, H-6), 7.41 (1H, d, J = 1.5 Hz, H-2), 6.92 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-5), 6.90 (1H, brs, -OH), 3.87 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 192.8 (-CHO), 155.4 (C-4), 149.9 (C-3), 130.3 (C-1), 128.1 (C-6), 116.4 (C-2), 111.2 (C-5), 56.4 (-OCH<sub>3</sub>)。以上 数据与文献 (吴美婷等, 2021) 基本一致, 故鉴定 为香草醛 (vanillin)。

化合物 5 白色粉末。ESI-MS m/z: 177.2 [M-H]<sup>-</sup>,分子式为 C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.60 (1H, d, J = 16.2 Hz, H-3), 7.58 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-5, 9), 6.79 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-6, 8), 6.78 (1H, d, J = 15.8 Hz, H-2), 3.29 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 169.7 (C-9), 161.3 (C-4), 146.5 (C-7), 133.6 (C-2), 131.1 (C-6), 127.1 (C-1), 116.8 (C-3'), 116.8 (C-5'), 114.9 (C-8), 51.9 (-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献 (El-kader et al., 2020) 基本一致,故鉴定为 4-羟基肉桂酸甲 酯 (4-hydroxy-cinnamic acid methylester)。

化合物 6 白色块状物质。ESI-MS m/z: 137.1 [M-H]<sup>-</sup>,分子式为 C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 7.85 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-2, 6), 6.79 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-3, 5); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 170.1 (C-7), 163.3 (C-4), 132.9 (C-2, 6), 122.7 (C-1), 116.0 (C-3, 5)。以上数据与文献 (任刚等, 2020) 基本一致, 故鉴定为对羟基苯甲酸 (*p*-hydroxybenzoic acid)。

化合物7 白色粉末。ESI-MS *m/z*: 197.2 [M-H]<sup>-</sup>,分子式为C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub><sup>-1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)δ: 9.76 (1H, s, H-6), 7.78 (2H, d, J = 7.8 Hz, H-3, 5), 7.75 (2H, m, H-2', 6'), 6.91~7.23 (3H, t, J = 7.2 Hz, H-3', 4', 5'), 6.89 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-2), 6.37 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-4'); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 192.8 (C-7), 165.2 (C-6), 158.8 (C-1'), 133.4 (C-3', 5'), 130.4 (C-2, 4), 129.0 (C-1), 116.9 (C-3, 5), 116.8 (C-1), 115.8 (C-4'), 104.8 (C-2', 6')。以上数据与文献 (Ang et al., 2014) 基本一致,故鉴定为 (2-羟基苯基)(苯基) 甲酮 [(2-Hydroxyphenyl)(phenyl) methanone]。

化合物 8 白色结晶物质。ESI-MS *m/z*: 135.2 [M-H]<sup>-</sup>,分子式为 C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub><sup>-1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 7.25 (2H, br.s, H-2', 6'), 6.67 (1H, s, H-3), 6.49 (1H, s, H-6), 6.32 (1H, s, H-8), 3.97 (6H, s, 2CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 192.8 (-COOH), 166.1 (C-1), 133.5 (C-3, 5), 128.7 (C-4), 116.9 (C-2, 6), 30.8 (-CH<sub>3</sub>)。以上数据与文献 (钱群刚 等, 2019) 基本一致,故鉴定为对甲基苯甲酸 (*p*methylbenzoic acid)。

化合物 **9** 淡黄色块状。ESI-MS *m/z*: 195.2 [M+H]<sup>+</sup>,分子式为  $C_{10}H_{10}O_{40}$ <sup>-1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.52 (1H, d, *J* = 17.1 Hz, H-7), 7.03 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-2), 6.89 (1H, dd, *J* = 8.7, 2.1 Hz, H-6), 6.81 (1H, d, *J* = 8.3 Hz, H-5), 6.27 (1H, d, *J* = 16.5 Hz, H-8), 3.88 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub> OD)  $\delta$ : 169.9 (C-9), 149.6 (C-4), 146.5 (C-3), 146.1 (C-7), 127.9 (C-6), 127.3 (C-1), 116.6 (C-8), 115.2 (C-5), 115.0 (C-2), 53.7 (-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献 (Hori et al., 2021) 基本一致, 故鉴定为咖啡酸甲酯 (caffeic acid methyl ester)。

化合物 **10** 白色粉末。ESI-MS *m/z*: 187.1 [M-H]<sup>-</sup>,分子式为 C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub><sup>-1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 6.91 (1H, s, H-4), 3.84 (2H, s, H-2), 3.71 (3H, s, 1-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 172.5 (C-1), 168.9 (C-6), 168.3 (C-5), 141.2 (C-3), 130.7 (C-4), 52.5 (1-OCH<sub>3</sub>), 33.6 (C-2)。以上数据与文献 (Xu et al., 2017) 基本一致,故鉴定为乌头酸 A (aconitate A)。

化合物 **11** 白色粉末物质。ESI-MS *m/z*: 225.0 [M+Na]<sup>+</sup>,分子式为C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub><sup>-1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 6.93 (1H, s, H-4), 3.82 (2H, s, H-2), 3.78 (3H, s, 1-OCH<sub>3</sub>), 3.67 (3H, s, 5OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 172.5 (C-1), 168.8 (C-6), 167.3 (C-5), 142.1 (C-3), 129.3 (C-4), 52.6 (5-OCH<sub>3</sub>), 52.4 (1-OCH<sub>3</sub>), 33.6 (C-2)。以上数据与文献 (Xu et al., 2017) 基本一致,故鉴定为乌头酸 E (aconitate E)。

化合物 12 白色固体。ESI-MS *m/z*: 381.1 [M-H]<sup>-</sup>,经硅胶板 TLC 与其对照品对照,以氯仿-甲醇-冰醋酸 (8:1.5:0.02, Rf=0.5)、石油醚-乙 酸乙酯-冰醋酸 (6:4:0.02, Rf=0.55)和石油醚-丙酮-冰醋酸 (7:3:0.02: Rf=0.6)为展开剂,经 硫酸乙醇溶液显色,105 ℃至斑点清晰,结果在与对 照品相应位置上显示相同颜色斑点。故鉴定该化 合物为 5-0-二甲氧基肉桂酰基奎尼酸 (5-0dimethoxycinnamoylquinic acid) (娄红波等,2021)。

化合物 13 黄色块状物质。ESI-MS m/z: 303.2 [M+H]<sup>+</sup>,分子式为 C<sub>15</sub> H<sub>10</sub> O<sub>7</sub>。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.78 (2H, d, J = 2.2 Hz, H-2'), 7.59 (1H, dd, J = 8.4, 2.1, Hz, H-6'), 6.85 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-5'), 6.31 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-8), 6.22 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6);<sup>13</sup> C-NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 177.2 (C-4), 165.1 (C-7), 161.4 (C-5), 155.3 (C-9), 146.9 (C-4'), 146.7 (C-2), 144.7 (C-3'), 136.7 (C-3), 121.6 (C-1'), 118.7 (C-6'), 115.6 (C-5'), 115.3 (C-2'), 98.3 (C-6), 94.1 (C-8)。以 上数据与文献 (闫建昆等, 2021) 基本一致, 故鉴 定为槲皮素 (quercetin)。

化合物 14 黄色块状。ESI-MS m/z: 433.4 「M-H]<sup>-</sup>,分子式为 C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>O<sub>110</sub><sup>1</sup>H-NMR (600 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 8.68 (2H, d, J = 2.1 Hz, H-2'), 8.12 (1H, d, J = 8.4, 1.8 Hz, H-6'), 7.41 (1H, d,J = 8.2, H-5', 6.92 (1H, d, J = 1.8, H-8), 6.75 (1H, d, J = 1.6 Hz, H-6), 5.60 (1H, d, J = 7.1)Hz, H-1"); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 177.9 (C-4), 163.6 (C-7), 161.5 (C-5), 156.9 (C-9), 156.5 (C-2), 148.7 (C-4'), 147.0 (C-3'), 135.1 (C-3), 121.3 (C-1'), 116.9 (C-5'), 116.5 (C-2'), 106.3 (C-10), 102.0 (C-1"), 99.5 (C-6), 94.3 (C-8), 74.3 (C-3"), 72.2 (C-2"), 69.0 (C-4"), 67.1 (C-5")。以上数据与文献 (韩荣欣等, 2020) 基本一致,故鉴定为槲皮素-3-O-α-L-阿拉 伯糖苷 (quercetin-3-0-α-L-arabinoside)。

化合物 15 淡黄色块状。ESI-MS *m/z*: 463.4 [M-H]<sup>-</sup>, 分子式为 C<sub>21</sub> H<sub>20</sub> O<sub>12</sub>。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 8.43 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-

2'), 8.10 (1H, dd, J = 8.2, 2.1 Hz, H-6'), 7.22 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-5'), 6.67 (1H, d, J = 2.3Hz, H-8), 6.64 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-6), 6.13 (1H, d, J = 7.9 Hz, H-1"), <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 178.7 (C-4), 166.4 (C-7), 162.9 (C-5), 157.9 (C-9), 157.5 (C-2), 150.6 (C-4'), 146.5 (C-3'), 135.3 (C-3), 122.6 (C-1'), 122.2 (C-6'), 117.6 (C-2'), 116.0 (C-5'), 105.5 (C-10), 105.1 (C-1"), 99.7 (C-6), 94.5 (C-8), 77.9 (C-5"), 75.3 (C-3"), 73.1 (C-2"), 69.4 (C-4"), 62.6 (C-6")。以上数据与文献 (李孟等, 2019) 基 本一致,故鉴定为槲皮素-3-O- $\beta$ -D-吡喃半乳糖苷 (quercetin-3-O- $\beta$ -D-galactopyranoside)。

透明针状物质。ESI-MS m/z: 化合物 16 531.5 [M+H]<sup>+</sup>, 分子式为 C<sub>30</sub> H<sub>58</sub> O<sub>5</sub> S<sub>0</sub><sup>-1</sup> H-NMR  $(600 \text{ MHz}, \text{CD}_3\text{OD}) \delta_1 4.12 (2\text{H}, \text{t}, J = 7.1 \text{ Hz},$ H-1", 1""), 3.08 (1H, m, H-2'), 2.93 (1H, m, H-2), 2.83 (2H, m, H-3, 3'), 0.87 (2H, tt,  $J = 7.7, 5.6 \text{ Hz}, \text{H-}12'', 12'''); {}^{13}\text{C-NMR}$  (150) MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 171.3 (C-1, 1'), 65.5 (C-1", 1<sup>""</sup>), 47.2 (C-2, 2'), 27.1 (C-3, 3'), 31.9 (C-11", 11""), 29.7 (C-10", 10""), 29.6 (C-9", 9""), 29.5 (C-8", 8""), 29.4 (C-7", 7""), 29.3 (C-6", 6<sup>'''</sup>), 29.2 (C-5<sup>''</sup>, 5<sup>'''</sup>), 28.5 (C-4<sup>''</sup>, 4<sup>'''</sup>), 25.9 (C-3", 3""), 22.7 (C-2", 2""), 14.1 (C-12", 12<sup>'''</sup>)。以上数据与文献 (Malak et al., 2013) 基本 一致, 故鉴定为硫代二丙酸双十八烷基酯 [ didodecyl thiodipropionate ( propionic acid, 3, 3sulfinyl di-1, 1'-didodecyl ester)

化合物 17 白色粉末。ESI-MS m/z: 357.3 [M+H]<sup>+</sup>, 分子式为 C<sub>20</sub> H<sub>20</sub> O<sub>6</sub>。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.28 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-2'), 6.99 (1H, d, J = 2.1Hz, H-5'), 6.78 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-2), 6.75 (1H, dd, J = 1.8, 8.4 Hz, H-6), 6.72 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-5), 3.86 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>), 3.65 (3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>), 2.65 (2H, t, J = 7.5 Hz, H-7'); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 178.7 (C-9'), 148.5 (C-3), 147.3 (C-3'), 146.2 (C-4), 145.9 (C-4'), 136.7 (C-1), 133.6 (C-6'), 127.6 (C-1'), 123.2 (C-6), 117.6 (C-5'), 115.9 (C-5), 114.1 (C-2), 112.9 (C-2'), 72.7 (C-9), 56.4 (4-OCH<sub>3</sub>), 56.3 (4'-OCH<sub>3</sub>), 50.2 (C-8'), 47.0 (C-7), 41.6 (C-8), 30.7 (C-7')。以上数据与文献 (Fedorova et al., 2016) 基本一致,故鉴定为 α-conidendrin。

化合物 18 无色固体物质。ESI-MS m/z: 361.4 「M+H]<sup>+</sup>, 分子式为 C<sub>20</sub> H<sub>24</sub> O<sub>6</sub>。<sup>1</sup>H-NMR  $(600 \text{ MHz}, \text{CD}_3\text{OD}) \delta: 6.99 (1\text{H}, \text{d}, J = 1.8 \text{ Hz},$ H-2'), 6.87 (1H, dd, J = 1.8, 8.3 Hz, H-6'), 6.77 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-5'), 6.71 (1H, s, H-6), 6.70 (1H, brs, H-4), 5.47 (1H, d, J =6.6 Hz, H-2), 3.88 (3H, s, 7-OCH<sub>3</sub>), 3.83/3.74 (2H, m, H-3a/3a'), 3.66 (3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>), 3.58 (2H, t, J = 6.5 Hz, H-5c), 3.49 (1H, dt)J = 6.4, 6.3 Hz, H-3, 2.65 (2H, t, J = 7.5 Hz, H-5a), 1.80 (2H, tt, J = 6.6, 7.7 Hz, H-5b);  $^{13}$ C-NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 149.0 (C-3'), 147.4 (C-4'), 147.4 (C-7a), 145.1 (C-7), 136.9 (C-5), 134.8 (C-1'), 129.8 (C-4a), 119.7 (C-6'), 117.9 (C-4), 116.1 (C-5'), 114.0 (C-6), 110.5 (C-2'), 89.0 (C-2), 64.9 (C-3a/a'), 62.2 (C-5c), 56.7 (7-OCH<sub>3</sub>), 56.3 (3'-OCH<sub>3</sub>), 55.4 (C-3), 35.8 (C-5b), 32.9 (C-5a)。以上数据与 文献 (Jia et al., 2017) 基本一致, 故鉴定为 rel- $(2\alpha, 3\beta)$  -7-*O*-methylcedrusin<sub>o</sub>

化合物 19 白色粉末。ESI-MS m/z: 383.2 「M+H]<sup>+</sup>, 分子式为 C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>O<sub>9</sub>。1H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.55 (1H, d, J = 15.8 Hz, H-7), 7.28 (1H, d, J = 1.3 Hz, H-2), 7.12 (1H, dd, J = 1.4, 8.1 Hz, H-6), 6.76 (1H, d, J =8.2 Hz, H-5, 6.43 (1 H, d, J = 15.8 Hz, H-8), 5.15 (1H, m, H-3'), 3.84 (4H, s, 3-OCH<sub>3</sub>, H-4'), 3.60 (1H, m, H-5'), 3.55 (3H, s,  $COOCH_3$ ), 2.05 (1H, dd, J = 4.2, 12.6 Hz, H-2' b), 2.04 (1H, dd, J = 5.3, 13.5 Hz, H-6'b), 1.87 (1H, dd, J = 1.5, 12.6 Hz, H-2'a), 1.83 (1H, dd, J = 2.6, 13.4 Hz, H-6'a); <sup>13</sup> C-NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 174.2 (CO), 166.1 (C-9), 149.1 (C-4), 147.9 (C-3), 144.5 (C-7), 125.7 (C-1), 123.0 (C-6), 115.5 (C-5), 115.3 (C-8), 110.9 (C-2), 72.6 (C-1'), 70.3 (C-3'), 70.0 (C-4'), 67.8 (C-5'), 55.7 (3-OCH<sub>3</sub>), 51.5 (COOCH<sub>3</sub>), 39.1 (C-6'), 34.8 (C-2')。以上数 据与文献 (闫彦等,2017) 基本一致,故鉴定为 3-0-阿魏酰奎宁酸甲酯 (3-0-Ferulylquinic acid methyl ester) °

化合物 **20** 黄色粉末。ESI-MS m/z: 285.1 [M-H]<sup>-</sup>,分子式为  $C_{15}H_{10}O_{60}$  <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 12. 23 (1H, s, 5-OH), 7.42 (1H, dd, J = 8.6, 0.8 Hz, H-6'), 7.40 (1H, d, J =

1881

1.0 Hz, H-2'), 6.96 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-3'), 6.60 (1H, s, H-3), 6.52 (1H, d, J = 0.8 Hz, H-8), 6.20 (1H, d, J = 0.8 Hz, H-6); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 183.8 (C-4), 166.4 (C-7), 166.1 (C-2), 163.2 (C-9), 159.4 (C-5), 151.2 (C-4'), 147.1 (C-3'), 123.1 (C-1'), 120.3 (C-3), 116.8 (C-5'), 114.1 (C-6'), 105.3 (C-2'), 103.8 (C-10), 100.1 (C-6), 95.0 (C-8)。以上数据与文献 (Cao et al., 2021) 基本— 致,故鉴定为木犀草素 (luteolin)。

黄色无定型粉末。ESI-MS m/z: 化合物 21 509.3 [M+H]<sup>+</sup>,分子式为 C<sub>27</sub>H<sub>24</sub>O<sub>10</sub><sup>-1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 7.48 (1H, s, H-6'), 6.70 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-15), 6.55 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-18), 6. 44(1H, d, J = 2.2 Hz, H-8), 6.33 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-19), 6.18 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-6), 3.56 (3H, s, 16-OCH<sub>3</sub>), 3.50 (1H, m, H-12), 3.24 (1H, m, H-11b), 4.82 (1H, s, H-13), 4.05 (3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>), 3.72 (3H, s, 5'-OCH<sub>3</sub>), 3.61 (1H, m, H-11a), 3.20 (1H, m, H-11b)  $_{\circ}$  <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 182.0 (C-4), 165.7 (C-7), 163.3 (C-5), 160.8 (C-2), 158.7 (C-9), 149.7 (C-5'), 148.9 (C-16), 147.7 (C-3'), 146.0 (C-17), 145.5 (C-4'), 136.6 (C-14), 128.8 (C-2'), 120.8 (C-19), 119.1 (C-1'), 115.9 (C-18), 112.4 (C-15), 112.0 (C-3), 105.3 (C-10), 103.8 (C-6'), 100.0 (C-6), 94.9 (C-8), 62.8 (C-11), 60.9 (3'-OCH<sub>3</sub>), 56.9 (5'-OCH<sub>3</sub>), 56.3 (16-OCH<sub>3</sub>), 42.3 (C-12), 37.8 (C-13)。以上数据与文 献(肖宗雨等,2020)基本一致,故鉴定为(5S, 6S)-5, 6-dihydro-3, 8, 10-trihydroxy-5-(4-hydroxy-3methoxyphenyl )-6-hydroxymethyl-2, 4-dimethoxy-7Hbenzo [c] xanthen-7-one)  $_{\circ}$ 

化合物 **22** 白色粉末。ESI-MS *m/z*: 381.4 [M-H]<sup>-</sup>,分子式为  $C_{18}H_{22}O_{90}$  <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 9.59 (1H, brs, 7'-OH), 7.50 (1H, d, *J* = 15.6 Hz, H-3'), 7.27 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, H-5'), 7.01 (1H, dd, *J* = 8.2, 1.6 Hz, H-9'), 6.81 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-8'), 6.40 (1H, d, *J* = 15.6 Hz, H-2'), 5.49 (1H, brs, 1-OH), 5.13 (1H, dt, *J* = 9.2, 3.8 Hz, H-5), 4.91 (1H, brs, 4-OH), 4.83 (1H, brs, 3-OH), 3.85 (1H, overlapped, H-3), 3.84 (3H, s, 6'-OCH<sub>3</sub>), 3.68 (1H, m, H-4), 3.55 (3H, s, 7-OCH<sub>3</sub>), 2.05 (1H, dd, *J* = 12.7, 3.9 Hz, H-6b), 1.95 (1H, dd, *J* = 13.0, 5.9 Hz, H-2b), 1.86 (1H, dd, J = 12.3, 9.6 Hz, H-6a), 1.84 (1H, dd, J = 13.3, 3.1 Hz, H-2a);<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ:176.5 (C-7), 168.9 (C-1'), 150.4 (C-7'), 149.4 (C-6'), 146.8 (C-3'), 127.9 (C-4'), 124.1 (C-9'), 116.5 (C-8'), 116.1 (C-2'), 111.7 (C-5'), 75.3 (C-1), 73.9 (C-4), 72.7 (C-5), 68.6 (C-3), 56.4 (6'-OCH<sub>3</sub>), 52.9 (7-OCH<sub>3</sub>), 40.8 (C-2), 36.4 (C-6)。以上数据与文献 (李胜峰等, 2020) 基本一致,故鉴定为 5-*O*-阿魏酰 奎宁酸甲酯 (5-*O*-Ferulylquinic acid methyl ester)。 **3.2 DPPH 法测定化合物清除自由基能力的结果** 

由表 1 可知, 所测 15 个化合物中, 仅化合物 12 表现出较好的抗氧化活性, IC<sub>50</sub>值为 49.58 μg・ mL<sup>-1</sup>。其他化合物未显示抗氧化活性, IC<sub>50</sub>值> 1 000 μg・mL<sup>-1</sup>。

表 1 DPPH 法测定 15 个化合物的自由基清除能力 Table 1 Determination of free radical scavenging

					-
abilities	of 15	compounds	bv I	<b>PPH</b>	method

化合物 Compound	DPPH 自由基清除率 DPPH radical scavenging rate (%)	$\frac{\text{IC}_{50}}{(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})}$
1	4.48	>1 000
2	2.86	>1 000
3	1.52	>1 000
4	-3.68	>1 000
5	3.63	>1 000
6	2.00	>1 000
7	-5.97	>1 000
8	1.92	>1 000
9	1.23	>1 000
11	-0.98	>1 000
12	-78.43	49.58
13	1.92	>1 000
14	1.66	>1 000
15	1.56	>1 000
16	3.02	>1 000

# 4 讨论与结论

开展农作物废弃物的再利用既是解决当前中 药资源短缺的途径之一,也是实现中药资源的可 持续发展的战略(邓家刚,2010)。甘蔗作为药食

两用的植物,产量巨大,主要用于榨糖,而榨糖过 程产生的副产物渣和叶主要作为废物丢弃或焚烧 处理。如何科学合理地实现废物再利用,是目前 待解决的主要问题之一,而从化学成分的角度出 发也许是主要方法之一。基于此,本文对甘蔗渣 和叶进行了系统的化学成分研究,从甲醇提取物 中共分离鉴定 22 个化合物,结构类型涉及黄酮 类、酚酸类、酯类、木质素、苯丙素类等,其中5个 为黄酮类、6个为酚酸类,揭示了黄酮类及酚酸类 物质为甘蔗渣和叶的主要成分,基本阐明了其化 学成分谱。黄酮类及酚酸类成分往往具有显著的 生物活性,如灯盏花富含黄酮成分,以此开发的灯 盏花素片和注射液临床用于治疗心脑血管疾病 (张雪冰,2020);柳树皮富含酚酸成分水杨酸,以 此开发的水杨酸乳膏临床用于治疗脂溢性皮炎、 银屑病等(胡杏林等,2021)。本研究为获取黄酮 类和酚酸类成分提供了一条途径,同时为甘蔗渣 和叶的开发利用奠定了一定的化学基础。

分离鉴定的化合物中,化合物4(香草醛)为 主要高含量的核心成分。香草醛为一种重要的香 味物质,在医药领域应用广泛。常作为药物合成 的原料,如用于合成治疗腹泻黄连素、治疗高血压 的药物 L-甲基多巴制剂(商品名 Aldomet)、治疗 上呼吸道感染和防治性病菌株传播的甲氧基氨基 吡啶及治疗心脏病的药物罂粟碱等(杨晓慧等, 2010)。全球对香草醛需求量较大,约为1.2万t, 市场供不应求。目前,香草醛的获取除来自植物 外,尚有采用木质素为前体物进行化学合成。甘 蔗中富含香草醛且资源丰富,生产成本相对较低, 可考虑作为获取香草醛的原料,是变废为宝的一 条优质途径。

自由基是导致多种疾病产生的根源,如何消除自由基,增强抗氧化能力,从植物中寻找安全有效的抗氧化物质成为当前的研究热点。魏纪湖等(2016)研究表明黄酮类和酚酸类物质,具有抗氧化、抗炎、降血脂、降血糖、抗细胞增殖等多种生理活性,被认为是潜在的外源性抗氧剂原料。为了挖掘相关活性成分,本研究采用 DPPH 法测定甘蔗中 15 个高含量化合物 (1-9、11-16)的清除自由基能力,结果表明化合物 12 具有较好的抗氧化活性。除了优良抗氧化活性以外,化合物 12 还具有相对高的含量,通过进一步加深其抗氧化活性研究,并对其进行科学分析和评价,化合物 12 可能成为潜在的抗氧化活性前景分子,为废弃物甘蔗渣和叶的深度开发提供了化学和药理基础。

### 参考文献:

- ANG WJ, LO LC, LAM YL, et al., 2014. Expedient carbonylation of aryl halides in aqueous or neat condition [J]. Tetrahedron, 70(45): 8545-8558.
- CAO Y, ZANG YC, CHENG ZG, et al., 2021. Chemical constituents from *Artemisia rupestris* and their neuraminidase inhibitory activity [J]. Nat Prod Res, 35 (11): 1775-1782.
- DENG JG, 2010. Strategic significance and basic ideas of medicinal research on crop waste [J]. Guangxi Trad Chin Med, 33(1): 1-3. [邓家刚, 2010. 农作物废弃物药用研 究的战略意义与基本思路 [J]. 广西中医药, 33(1): 1-3.]
- EL-KADER AMA, MAHMOUD BK, HAJJAR D, et al., 2020. Antiproliferative activity of new pentacyclic triterpene and a saponin from *Gladiolus segetum* Ker-Gawl corms supported by molecular docking study [J]. RSC Adv, 10(38): 22730-22741.
- Editorial Committee of Flora of China, Chinese Academy of Sciences, 2004. Saccharum officinarum [M]//Flora Reipublicae Popularis Sinicae. Beijing: Science Press: 41-42. [中国科学院中国植物志编辑委员会, 2004. 甘蔗 [M]//中国植物志. 北京: 科学出版社: 41-42.]
- FEDOROVA TE, FEDOROV SV, BAKIN VA, 2016. Oligolignans in the wood of *Picea obovata* Ledeb. [J]. Russ J Bloorg Chem, 42(7): 712–715.
- FENG SM, 2017. Research on phytochemicals composition, bioactivities and related mechnisms of phytosterols in sugarcane [D]. Hangzhou: Zhejiang University. [冯思敏, 2017. 甘蔗中植物化学素组成及其中甾醇功能活性和相 关机理的研究 [D]. 杭州:浙江大学.]
- GUI YY, XIAN W, LIANG Q, et al., 2012. Extraction and antioxidant activity of ploysaccharide from sugarcane leaves [J]. SW Chin J Agric Sci, 25(4): 1218-1221. [桂意云, 贤武, 梁强, 等, 2012. 甘蔗叶片多糖的提取及体外抗氧化作用 [J]. 西南农业学报, 25(4): 1218-1221.]
- HAN RX, ZHANG HY, ZHAO DQ, et al., 2020. Study on flavonoids and their biological activities in *Filipendula palmata* (Pall.) Maxim. [J]. Lishizhen Med Mat Med Res. 31(5): 1106-1110. [韩荣欣, 张红印,赵大庆,等, 2020. 蚊子草中黄酮类成分及其生物活性研究 [J]. 时珍国医国药, 31(5): 1106-1110.]
- HE XM, SUN J, LI L, et al., 2015. Antioxidant and antitumor activities of polyphenol compounds from sugarcane top [J]. Sci Technol Food Ind, 36(23): 243-247. [何雪梅, 孙健, 李丽, 等, 2015. 蔗梢多酚类化合物抗氧化与抗肿 瘤活性研究 [J]. 食品工业科技, 36(23): 243-247.]
- HORI K, WATANABE T, DEVKOTA HP, 2021. Phenolic acid derivatives, flavonoids and other bioactive compounds from the leaves of *Cardiocrinum cordatum* (Thunb.) Makino (Liliaceae) [J]. Plants, 10(2): 1–7.
- HOU XT, 2014. Research on chemical constituents and pharmacodynamics of sugarcane leaves [ D ]. Nanning:

Guangxi Medical University. [侯小涛, 2014. 甘蔗叶化学 成分及药效学研究 [D]. 南宁: 广西医科大学.]

- HUANG QL, TAN ZQ, WU LY, et al., 2017. Research for the t-BuOK-catalyzed synthesis of aromatic aldehydes and ketone from arylmethyl azides [J]. Organic Chem, 37(1):97-102. [黄青兰,谭志强,吴禄勇,等, 2017. 叔丁醇钾催化 芳甲基叠氮化合物合成芳醛和芳酮的反应研究 [J]. 有 机化学, 37(1):97-102.]
- HU XL, CHENG X, WANG YL, et al., 2021. Clinical study of salicylic acidanti-dandruffhari lotion in treating scalp seborrhoeic dermatitis [J]. J Dis Monit Control Aug, 15(4): 258–261. [胡杏林,程茜,王媛丽,等, 2021. 水 杨酸去屑护发露治疗头皮脂溢性皮炎临床疗效研究 [J]. 疾病监测与控制, 15(4): 258–261.]
- Jiangsu New Medical College, 2006. A Dictionary of the Traditional Chinese Medicine: Vol. I [M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers. [江苏新医学 院, 2006. 中药大辞典: 上册 [M]. 上海: 上海科学技术 出版社.]
- JIA LL, NA L, LONG C, et al., 2017. New neo-lignan from Acanthopanax senticosus with protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity [J]. Arch Pharm Res, 40 (11): 1265-1270.
- JIANG H, SU JP, FANG FX, et al., 2012. Extraction and isolation of polysaccharide from sugarcane leaves and its antitumor effect *in vitro* [J]. J Clin Ration Drug Use, 5(15): 28-29. [江恒, 苏纪平, 方锋学, 等, 2012. 甘蔗 叶多糖的提取分离及体外杭肿瘤作用研究 [J]. 临床合 理用药杂志, 5(15): 28-29.]
- LI M, ZENG MN, FENG WS, et al., 2019. Chemical constituents from the seeds of *Lepidium apetalum* [J]. Chin Trad Pat Med, 41(1): 105-110. [李孟, 曾梦楠, 冯卫生, 等, 2019. 北葶苈子化学成分的研究 [J]. 中成药, 41(1): 105-110.]
- LI SF, LIU H, LI ZL, et al., 2020. A new sesquiterpene glycoside from kiwifruit of soft jujube [J]. Chin Trad Herb Drugs, 51(2): 299-305. [李胜峰, 刘宏, 李占林, 等, 2020. 软枣猕猴桃果实中 1 个新的降倍半萜苷类化合物 [J]. 中草药, 51(2): 299-305.]
- LI XH, YUAN MR, DONG X, et al., 2022. Chemical composition of Zhejiang *Ophiopogon japonicus* [J]. Chin Trad Herb Drugs, 53(2): 347-353. [李小辉, 袁名睿, 董汛, 等, 2022. 浙麦冬的化学成分研究 [J]. 中草药, 53(2): 347-353.]
- LOU HB, WANG XH, LI FS, et al., 2021. Chemical constituents from the stems and leaves of *Saccharum officinarum* [J]. Chin Trad Pat Med, 43(8): 2086 2091. [娄红波, 王先宏, 李富生, 等, 2021. 甘蔗茎叶化 学成分的研究 [J]. 中成药, 43(8): 2086–2091.]
- MALAK LG, BISHAY DW, ROSS SA, et al., 2013. New anthraquinone derivatives from *Geosmithia lavendula* [J]. Nat Prod Comm, 8(2): 191–194.
- QIAN QG, CAI L, ZHOU XJ, et al., 2019. Chemical constituents from *Carpesium abrotanoides* [J]. Chin Trad Pat

Med, 43(11): 2671-2675. [钱群刚, 蔡亮, 周小江, 等, 2019. 天名精化学成分的研究 [J]. 中成药, 43(11): 2671-2675.]

- REN G, CHEN YT, CHEN YL, et al., 2020. Phytochemical investigation of leaves of *Dendrobium officinale* [J]. Chin Trad Herb Drugs, 51(14): 3637-3644. [任刚,陈优婷, 陈云龙,等, 2020. 铁皮石斛叶的化学成分研究 [J]. 中 草药, 51(14): 3637-3644.]
- XIAO ZY, LIU Y, KUANG HX, et al., 2020. Chemical constituents of flavonoids from the aerial parts of *Bupleurum chinense* [J]. J Chin Med Mat, 43(11): 2679-2683. [肖宗 雨, 刘艳, 匡海学, 等, 2020. 黄酮类化学成分研究 [J]. 中药材, 43(11): 2679-2683.]
- WEI JH, LAN C, TIAN L, 2016. Analysis and evaluation of medicinal value and comprehensive utilization of sugarcane leaves [J]. Popular Sci Technol, 18(6): 84-86. [魏纪湖, 蓝崇,田林, 2016. 甘蔗叶的药用价值评价与综合利用浅 析 [J]. 大众科技, 18(6): 84-86.]
- WU MT, LIU SY, ZHOU SQ, et al., 2021. Chemical constituents from the leaves of *Cinnamonum camphora* var. *linaloolifera* and their anti-inflammatory activities [J]. Chin J Mat Med, 46(14): 3592–3598. [吴美婷, 刘 诗瑶, 邹双全, 等, 2021. 芳樟叶的化学成分及其抗炎活 性研究 [J]. 中国中药杂志, 46(14): 3592–3598.]
- XU XL, YANG HJ, PAUL V, et al., 2017. Chemical diversity from a chinese marine red alga, *Symphyocladia latiuscula* [J]. Mar Drugs, 15(12): 374.
- YAN JK, ZHANG XY, QIU F, et al., 2021. Study on flavonoids from leaves of *Eucomma ulmodss* [J]. Mod Chin Med, 23(4): 599-604. [闫建昆,张翔宇,邱峰,等, 2021. 杜仲叶中黄酮类化学成分研究 [J]. 中国现代中 药, 23(4): 599-604.]
- YAN Y, ZHAO J, SONG XB, et al., 2017. Study on the chemical constituents of *Scorzonera mongolica* Maxim.
  [J]. Tianjin Univ Trad Chin Med, 36(6): 470-473. [闫 彦, 赵 静, 宋新波, 等, 2017. 蒙药蒙古鸦葱化学成分的 研究 [J]. 天津中医药大学学报, 36(6): 470-473.]
- YANG XH, ZHOU YH, ZHANG M, et al., 2010. Research progress in preparation of vanillin from lignin [J]. J Cell Sci Technol, 18(4): 49-54. [杨晓慧,周永红,张猛,等, 2010. 木质素制备香草醛的研究进展 [J]. 纤维素科学与 技术, 18(4): 49-54.]
- ZHANG XB, 2020. Effect of breviscapine injection combined with clopidogrel bisulfate tablets on cerebral infarction [J]. Henan Med Res, 29(29): 5493-5495. [张雪冰, 2020. 灯盏花素注射液联合硫酸氢氯吡格雷片治疗脑梗 死的效果[J]. 河南医学研究, 29(29): 5493-5495.]
- ZHOU YY, GAO HR, YANG BY, et al., 2020. Chemical constituents from *Atractylodes japonica* [J]. Chin Trad Pat Med, 42(10): 2640-2643. [周媛媛, 高蕙蕊, 杨炳友, 等, 2020. 关苍术化学成分的研究 [J]. 中成药, 42(10): 2640-2643.]

(责任编辑 周翠鸣)

广步植物 Guihaia Nov. 2022, 42(11): 1884-1891

#### DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202104040

谢安然, 韦玮, 郝二伟, 等. 甘蔗叶乙酸乙酯部位化学成分研究 [J]. 广西植物, 2022, 42(11): 1884-1891. XIE AR, WEI W, HAO EW, et al. Chemical constituents from ethyl acetate extract in *Saccharum officinarum* leaves [J] Guihaia, 2022, 42(11): 1884-1891.



http://www.guihaia-journal.com

# 甘蔗叶乙酸乙酯部位化学成分研究

谢安然<sup>1,2,3</sup>,韦 玮<sup>1,2</sup>,郝二伟<sup>1,2</sup>,谢金玲<sup>1,2</sup>,邓家刚<sup>1,2</sup>,侯小涛<sup>1,2,3</sup>\*

(1. 广西中医药大学 广西中药药效研究重点实验室, 南宁 530200; 2. 广西农作物废弃物功能成分研究 协同创新中心, 南宁 530200; 3. 广西中医药大学 药学院, 南宁 530200)

**摘 要:**甘蔗是糖类加工产业主要的经济作物,甘蔗叶作为广西特色瑶药,在广西民间及瑶族地区具有悠久的药用历史。该课题组前期发现甘蔗叶乙酸乙酯部位具有抗肿瘤活性,为进一步明确其乙酸乙酯部位的化学成分,该文采用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 柱色谱、制备型高效液相色谱等多种分离纯化的方法对甘蔗叶乙酸乙酯部位进行研究。结果表明:从甘蔗叶乙酸乙酯萃取部位分离且鉴定了 20 个化合物,分别为原儿茶醛(1)、3,4-二羟基-苯甲酸甲酯(2)、3,4-二羟基苯甲酸(3)、3-羟基-4-甲氧基苯甲酸(4)、对羟基苯甲酸(5)、对羟基苯甲酸(6)、对羟基肉桂酸(7)、丁香酸(8)、3,5-二甲氧基对苯二酚(9)、1-hydroxy-benzoyl-4-*O*-α-L-rhamnopyranoside(10)、对羟基苯甲酸-β-D-吡喃葡萄糖酯苷(11)、槲皮素(12)、小麦黄素(13)、异柽柳素(14)、异鼠李素(15)、5,3',4'-三羟基-7-甲氧基二氢黄酮(16)、7-*O*-甲基圣草酚(17)、[(*E*)-4-(1*S*,3*R*,4*R*)-1-hydroxy-4,5,5-trimethyl-7-oxabicyclo [4.1.0]heptan-1-yl]but-1-en-3-one(18)、blumenol A(19)和胸腺嘧啶脱氧核苷(20)。其中,化合物 1-4、6、9-11、13-16、18 和 20 均为首次从甘蔗叶中分离得到。该研究结果为日后甘蔗叶乙酸乙酯部分的进一步开发提供了依据

关键词:甘蔗叶,乙酸乙酯部位,化学成分,结构鉴定,黄酮,酚酸 中图分类号:0946 文献标识码:A 文章编号:1000-3142(2022)11-1884-08

# Chemical constituents from ethyl acetate extract in *Saccharum officinarum* leaves

XIE Anran<sup>1,2,3</sup>, WEI Wei<sup>1,2</sup>, HAO Erwei<sup>1,2</sup>, XIE Jinling<sup>1,2</sup>, DENG Jiagang<sup>1,2</sup>, HOU Xiaotao<sup>1,2,3 \*</sup>

收稿日期: 2021-07-17

基金项目:国家自然科学基金(82060762);2020年农作物废弃物功能成分研究协同创新中心项目(CICAR2020);中国科学院科技服务网络计划(STS计划)项目(KFJ-STS-QYZD-200);"广西中医药大学 2019年自治区级硕士研究生科研"创新项目(YCSW2019170);广西中医药大学教育发展基金(DXS19042)[Supported by National Natural Science Foundation of China(82060762); Collaborative Innovation Center for Research on Functional Ingredients of Agricultural Residues (CICAR2020); Project Science and Technology Service Network Initiative (STS plan)(KFJ-STS-QYZD-200); Innovation Project of Guangxi Graduate Education of Guangxi University of Chinese Medicine in 2019 (YCSW2019170); Education Development Fund of Guangxi University of Chinese Medicine (DXS19042)]。

第一作者:谢安然(1994-),硕士研究生,研究方向为中药活性成分及质量控制,(E-mail)594879739@qq.com。

<sup>\*</sup>通信作者: 侯小涛,博士,教授,研究方向为中药活性成分与质量控制,(E-mail)xthou@126.com。

( 1. Guangxi Key Laboratory of Efficacy Study on Chinese Materia Medica, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China;
2. Guangxi Collaborative Innovation Center of Study on Functional Ingredients of Agricultural Residues, Nanning 530200, China;
3. Faculty of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China )

Abstract: Saccharum officinarum is the main cash crop in sugar processing industry, and its leaves are characteristic Yao medicine in Guangxi with a long history. Our recent study showed that its ethyl acetate extract was partly responsible for its *in vitro* anti-tumor activity. In order to clarify the chemical constituents of this part, the modern separation and purification techniques, such as silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography, and semi-preparative high-performance liquid chromatography were used to identify the structures of the isolates by their physicochemical properties and modern spectral analysis. The results were as follows: Twenty compounds were all isolated and identified as 3, 4-dihydroxybenzaldehyde (1), methyl 3, 4-dihydroxy-benzoate (2), 3, 4-dihydroxy-benzoic acid (3), 3-hydroxy-4-methoxybenzoic acid (4), *p*-hydroxy-benzoic acid (5), *p*-hydroxybenzyl aldehyde (6), *p*-hydroxy-cinnamic acid (7), syringic acid (8), 3, 5-dihydroxy-hydroquinone (9), 1-hydroxy-benzoyl-4-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside(10), *p*-hydroxy-benzoyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (11), quercetin (12), tricin (13), tamarixetin (14), isorhamnetin (15), 5, 3', 4'-trihydroxy-7-methoxy-flavanone (16), 7-O-Methyleriodictyol (17), [(*E*)-4-(1*S*, 3*R*,4*R*)-1-hydroxy-4,5,5-trimethyl-7-oxabicyclo [4.1.0] heptan-1-yl] but-1-en-3-o-ne (18), blumenol A (19) and thymidine (20), respectively. Compounds 1-4, 6, 9-11, 13-16, 18 and 20 were isolated and identified from this plant for the first time. The results provide some basis for its further development.

Key words: Saccharum officinarum leaves, ethyl acetate extract, chemical constituents, structure identification, flavonoids, phenolic acid

甘蔗(Saccharum officinarum)为禾本科黍亚科 草本植物,主产于热带和亚热带地区,全世界有一 百多个国家出产甘蔗,其中产量最高的是巴西、印 度和中国。在我国,甘蔗主要分布于江西、湖南、 福建、广东、广西、四川和云南等地,是糖类加工产 业的主要经济作物。同时,甘蔗产业是广西主要 农业支柱产业,甘蔗种植面积连续多年稳居全国 第一,蔗糖总产量占全国总产量在 60%以上。甘 蔗叶为甘蔗的叶,是甘蔗收获和加工过程中的主 要废弃物和副产物,一般处理方法为就地焚烧或 直接丢弃在田埂和河道中,造成了严重的资源浪 费和环境污染。随着甘蔗种植规模的不断扩大, 如何对甘蔗叶进行有效的资源回收再利用是近年 来亟须解决的问题。

甘蔗叶在广西民间及瑶族地区具有悠久的药 用历史,在瑶医药记载中,甘蔗叶主要用于治疗盗 汗、消渴症以及汗证。但是,甘蔗叶现多用于饲料 加工或粉碎还田,药用价值有待进一步开发。近 年来的研究发现,甘蔗叶中主要含有有糖、多糖、 苷类、黄酮类和酚类等成分(Jian et al., 2014;何耀 涛等,2016;潘王芸等,2019;张金玲等,2019)。药 理活性研究表明,甘蔗叶具有抑菌、降血糖、抗炎 等作用(侯小涛等,2011;Borsen et al., 2011;江 恒,2012;侯小涛等,2013;韦玮等,2018)。

为了深入研究甘蔗叶的化学成分,本研究运 用传统分离技术对甘蔗叶化学成分进行分离,并 采用现代谱学方法及比对文献数据进行结构鉴 定,从甘蔗叶70%乙醇提取物的乙酸乙酯萃取部 位分离得到20个化合物(图1),包括酚酸、黄酮、 倍半萜、生物碱类化合物。其中,化合物1-4、6、 9-11、13-16、18和20均为首次从甘蔗叶中分离 鉴定得到。

### 1 仪器与材料

### 1.1 药材

甘蔗叶于 2019 年 12 月采自广西南宁市武鸣 甘蔗种植区。经广西中医药大学韦松基教授鉴定 为禾本科植物甘蔗(Saccharum officinarum)的叶。 标本(20191225-1)存放于广西中医药大学广西中 药药效重点实验室。

### 1.2 仪器和试剂

1252 型半制备高效液相色谱仪(Pre-HPLC, 美国 Waters 公司);Q-Tof MicroTM 型质谱仪(美国 Waters 公司);Inova-600 型超导核磁共振波谱仪 (美国 Varian 公司);2695 型高效液相色谱仪(美 国 Waters 公司);SB25-12D 超声波清洗机(宁波新 芝生物科技股份有限公司);UPK-I-10T 优普系列 超纯水器(四川优普超纯科技有限公司);SHZ-III 型循环水真空泵(上海亚荣生化仪器厂);柱层析 硅胶(100~200 目、200~300 目,青岛海洋化工 厂);柱色谱用硅胶(200~300 目)及薄层色谱用 GF254 硅胶预制板(青岛海洋化工厂);Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶(瑞典 Amer-sham Pharmacia 公 司);00G-4252-P0-AX 制备色谱柱(250 mm×21.2 mm,5 μm,美国 Phenomenex 公司);Xseiect HSS T3 分析型色谱柱[4.6 mm×250 mm,5 μm,沃特世科 技(上海)有限公司];分析纯溶剂(成都市科龙化 工试剂厂);色谱级溶剂(德国 Merck 公司);质谱 级溶剂(美国 Thermo 公司)。

### 1.3 提取和分离

干燥甘蔗叶药材(10 kg)粗粉,先用10 倍量的 70%乙醇回流提取3次,合并提取液,减压浓缩得 浸膏(1 135 g),蒸馏水充分分散;再依次用3倍体 积的石油醚、乙酸乙酯、正丁醇进行萃取。减压回 收溶剂,分别得到石油醚部位浸膏、乙酸乙酯部位 浸膏、正丁醇部位浸膏和水层部位浸膏。

将乙酸乙酯部位浸膏(125.8g)过硅胶柱色谱 分离,以石油醚-乙酸乙酯(50:1~0:1)和乙酸 乙酯-甲醇(50:1~0:1)梯度洗脱,得到7个流 分(Fr. 1~Fr. 7)。其中, Fr. 2 经硅胶柱色谱, 以石 油醚-乙酸乙酯(20:1~0:1)梯度洗脱,得到5 个亚组分(Fr. 2-1~Fr. 2-5)。Fr. 2-2 经 Sephadex LH-20 柱色谱分离,用氯仿-甲醇(1:1)反复洗 脱,得到化合物1(4.1 mg)、2(6.1 mg)、4(11.6 mg)、9(15.0 mg); Fr. 2-4 经 pre-HPLC 以 20% 甲 醇分离纯化,得到化合物 18(9.2 mg); Fr. 2-5 经 pre-HPLC 以 30% 甲醇分离纯化,得到化合物 5 (6.0 mg)、7 (11.0 mg); Fr. 2-6 经 pre-HPLC 以 10%甲醇分离纯化,得到化合物 12 (2.2 mg)、13 (5.3 mg)、14(4.3 mg); Fr. 2-9 经 Sephadex LH-20 柱色谱(二氯甲烷-甲醇,1:1)反复纯化得到化合 物16(4.3 mg)。Fr. 3 经 Sephadex LH-20 柱色谱 分离,用氯仿-甲醇(1:1)反复洗脱,得到12个亚 组分(Fr. 3-1~Fr. 3-12)。其中, Fr. 3-11 经 pre-HPLC 以 35% 乙腈分离纯化, 得到化合物 15(3.0 mg)。Fr. 4 经中压色谱分离凝胶 (middle chromatography isolated gel, MCI)柱色谱以甲醇-水 (50:1~0:1)梯度洗脱,得到5个亚组分(Fr.41~Fr. 4-5)。其中, Fr. 4-1 经 pre-HPLC 以 20%甲 醇分离纯化,制备得到化合物 3(4.8 mg)、8(6.7 mg); Fr. 4-2 经 pre-HPLC 以 10%甲醇分离纯化, 得到化合物 19(3.7 mg)、20(7.4 mg); Fr. 4-5 经 Sephadex LH-20 柱色谱用氯仿-甲醇(1:1)反复 洗脱,得到化合物 17(5.0 mg)。Fr. 6 经硅胶柱色 谱以石油醚-乙酸乙酯(50:1~0:1)梯度洗脱, 得到 10 个不同极性的亚组分(Fr. 6 -1~Fr. 6-10)。 其中, Fr. 6-2 经 Sephadex LH-20 柱色谱用氯仿-甲 醇(1:1)反复洗脱,得到化合物 6(5.1 mg); Fr. 6-5 经 pre-HPLC 以 80%甲醇分离纯化,得到化合物 10(13.6 mg)、11(8.1 mg)。

# 2 结构鉴定

化合物 1 黄色针状结晶(甲醇)。HR-ESI-MS *m/z*: 137.024 4 [M-H]<sup>-</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)δ: 9.68(1H, s, H-7), 7.26(1H, dd, *J*=8.1, 1.8 Hz, H-6), 7.22(1H, d, *J*=1.8 Hz, H-2), 6.89(1H, d, *J*=8.1 Hz, H-5); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)δ: 191.0(C-7), 152.6(C-4), 146.0(C-3), 128.6(C-1), 124.6(C-6), 115.5(C-5), 114.2(C-2)。以上数据与文献(王 文祥等, 2013)报道一致,故鉴定化合物 1 为原儿 茶醛(3,4-dihydroxybenzaldehyde)。

化合物 2 黄色粉末(甲醇)。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 7.43(2H, s, H-2, 6), 6.83 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5), 3.73(3H, s, 7-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 167.5 (C-7), 151.0(C-4), 147.2(C-3), 125.9(C-1), 123.4(C-6), 115.0(C-5), 112.7(C-2), 55.5 (OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献(赵明等,2020)报道一 致,故鉴定化合物 2 为 3, 4-二羟基-苯甲酸甲酯 (methyl 3, 4-dihydroxybenzoate)。

化合物 **3** 白色粉末(甲醇)。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 7.31(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-2), 7.26(1H, dd, *J*=8.2, 2.0 Hz, H-6), 6.76 (1H, d, *J*=8.2 Hz, H-5); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 115.2(C-6), 116.6(C-5), 121.9 (C-1), 144.9(C-3), 150.0(C-4), 167.5 (COOH)。以上数据与文献(夏明文等, 2010)报 道一致,故鉴定化合物 **3** 为 3, 4-二羟基苯甲酸 (3,4-dihydroxybenzoic acid)。



图 1 化合物 1-20 的结构 Fig. 1 Chemical structures of compounds 1-20

化合物 4 白色粉末(甲醇)。HR-ESI-MS *m/z*:167.034 5 [M-H]<sup>-</sup>。<sup>1</sup> H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 7.40(1H, dd, *J*=8.4, 2.0 Hz, H-6), 7.35(1H, s, H-2), 6.97(1H, d, *J*=8.4 Hz, H-5), 3.81(3H, s, 4-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 167.5(7-COOH), 151.4(C-4), 146.8(C-3), 129.7(C-6), 121.5(C-1), 116.1(C-2), 111.3(C-5), 55.6(4-OCH<sub>3</sub>)。以上 数据与文献(邹欢等, 2017)报道一致,故鉴定化合 物 4 为 3-羟基-4-甲氧基苯甲酸(3-hydroxy-4methoxybenzoic acid)。

化合物 5 无色针状晶体(甲醇)。HR-ESI-MS *m/z*: 137.024 2 [M-H]<sup>-</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 7.88(2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-2, 6), 6.81(2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-3, 5); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 170.2(COOH), 160.7(C-4), 133.0(C-2, 6), 122.9(C-1), 116.0(C-3, 5)。以 上数据与文献(向丽敏等, 2020)报道一致,故鉴定 化合物 5 为对羟基苯甲酸(*p*-hydroxy-benzoic acid)。

化合物 6 白色粉末(甲醇)。HR-ESI-MS m/z: 121.029 5 [M-H]<sup>-</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 9.76(1H, s, CHO), 7.77(2H, d, J= 8.4 Hz, H-2, 6), 6.91(2H, d, J=8.4 Hz, H-3, 5); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub> OD) δ: 192.8 (CHO), 165.2(C-4), 133.4(C-2, 6), 130.3(C-1), 116.9(C-3, 5)。以上数据与文献(龚韦凡等, 2017)报道一致,故鉴定化合物 6 为对羟基苯甲醛 (*p*-hydroxybenzyl aldehyde)。

化合物 7 无色针状晶体(甲醇)。HR-ESI-MS *m/z*: 137.024 4 [M-H]<sup>-</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD), δ: 7.59(1H, d, *J* = 15.9 Hz, H-7), 7.43(2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-2, 6), 6.79(2H, d, *J* = 8.3 Hz, H-3, 5), 6.27(1H, d, *J* = 15.9 Hz, H-8); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD), δ: 171.0(C-9), 161.2(C-4), 146.6(C-7), 131.2(C-2, 6), 127.2(C-1), 116.8(C-3, 5), 115.6(C-8)。以上 数据与文献(肖春荣, 2019)报道一致,故鉴定化合 物 7 为对羟基肉桂酸(*p*-hydroxy-cinnamic acid)。

化合物 8 白色针状晶体(甲醇)。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ: 9.19(1H, s, OH) 7.19 (2H, s, H-2、6), 3.79(6H, s, OCH3 × 2); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 167.5 (-COOH), 147.4(C-4), 140.01(C-3, C-5), 120.8(C-1), 106.8(C-2, C-6), 56.0(2-OCH3, 6-OCH3)。以上数据与文献(陈丽等, 2020)报道一 致,故鉴定化合物 8 为丁香酸(syringic acid)。

化合物 9 白色粉末(甲醇)。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)δ: 7.20(2H, s, H-2, 6), 3.8(6H, s, OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)δ: 167.4

(C-1),147.4(C-3,5),140.1(C-4),106.8(C-2,6),
56.0(OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献(韦玮等,2018)报道
一致,故鉴定化合物9为3,5-二甲氧基对苯二酚(3,5-dihydroxy-hydroquinone)。

化合物 **10** 白色粉末(甲醇)。HR-ESI-MS m/z: 283.081 4 [M-H]<sup>-</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 7.89(2H, d, J=8.8 Hz, H-2, 6), 7.11(2H, d, J=8.8 Hz, H-3, 5), 5.48(1H, d, J=1.8 Hz, H-1'), 3.84 (1H, m, H-2'), 3.64 (1H, dd, J=9.3, 3.2 Hz, H-3'), 3.39 (1H, m, H-5'), 3.29 (1H, t, J=9.3 Hz, H-4'), 1.09 (3H, d, J=6.2 Hz, H-6'),; <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 167.0(C-7), 159.6(C-1), 131.3 (C-3, 5), 124.2(C-4), 116.0(C-2, 6), 98.2(C-1'), 71.7(C-2'), 70.4(C-4'), 70.1(C-3'), 69.8 (C-5'), 17.9(C-6')。以上数据与文献(李艳茸 等,2014)报道一致,故鉴定化合物 **10** 为1-hydroxybenzoyl-4-O-α-L-rhamnopyranoside。

化合物 **11** 无色针状晶体(甲醇)。HR-ESI-MS m/z: 299.076 7 [M-H]<sup>-</sup>.<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ ) δ: 7.88(2H, d, J=8.8 Hz, H-2, 6), 7.09(2H, d, J=8.8 Hz, H-3, 5), 4.98(1H, d, J=7.4 Hz, H-1'); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, DMSO- $d_6$ ) δ: 60.6(C-6'), 69.6(C-4'), 73.2(C-2'), 76.5(C-5'), 77.1(C-3'), 99.8(C-1'), 115.8(C-3,5), 124.2(C-1), 131.2(C-2,6), 160.8(C-4), 167.0(C-7)。以上数据与文献(杨 晨悦和王晓玲,2018)报道一致,故鉴定化合物 **11** 为对羟基苯甲酸- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖酯苷(phydroxy-benzoyl- $\beta$ -D-glucopyranoside)。

化合物 **12** 黄色粉末(甲醇)。<sup>1</sup>H-NMR(600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)δ: 7.86(1H, d, *J*=2.1 Hz, H-2'), 7.52(1H, dd, *J*=8.0, 2.0 Hz, H-6'), 6.89(1H, d, *J*=8.0 Hz, H-5'), 6.49(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-8), 6.20(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-6); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)δ: 176.8(C-4), 165.8(C-7), 160.8(C-5), 157.8(C-9), 147.2(C-2), 146.4(C-4'), 145.7(C-3'), 136.8(C-3), 122.6 (C-1'), 121.3(C-6'), 115.7(C-2'), 117.2(C-5')。以上数据与文献(满兴战等, 2019)报道一 致,故鉴定化合物 **12**为槲皮素(quercetin)。

化合物 **13** 黄针晶体(丙酮)。HR-ESI-MS *m*/*z*: 329.064 7 [M-H]<sup>-</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz,

DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 7.32 (2H, s, H-2', 6'), 6.97(1H, s, H-3), 6.54(1H, s, H-8), 6.19(1H, s, H-6), 3.88(6H, s, 3', 5'-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 181.8(C-4), 164.6(C-7), 163.6 (C-2), 161.4(C-9), 157.4(C-5), 148.2(C-3', 5'), 139.9(C-4'), 120.4(C-1'), 104.4(C-2', 6'), 103.4(C-3), 99.0(C-6), 94.3(C-8), 56.4 (3', 5'-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献(邹忠杰和龚梦 鹃,2010)报道—致,故鉴定化合物 **13** 为小麦黄素 (tricin)。

化合物 14 黄针晶体(丙酮)。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 7.76(1H, d, J=8.5 Hz, H-6'), 7.74(1H, d, J=2.0 Hz, H-2'), 7.06(1H, d, J= 8.5 Hz, H-5'), 6.40(1H, d, J=2.0 Hz, H-8), 6.19(1H, d, J=2.0 Hz, H-6), 3.93(3H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub> OD) δ: 177.5(C-4), 165.7(C-7), 162.6(C-5), 158.3 (C-9), 150.7(C-4'), 147.4(C-3'), 137.7(C-3), 121.5(C-1'), 115.7(C-5', 6'), 112.2(C-2'), 104.6(C-10), 99.3(C-6), 94.4(C-8), 56.4(C-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献(邓安珺等, 2008)报道 一致,故鉴定化合物 14 为异柽柳素(tamarixetin)。

化合物 **15** 黄色粉末(甲醇)。HR-ESI-MS *m/z*: 315.049 3 [M-H]<sup>-</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 7.66(1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-2'), 7.64(dd, *J* = 8.7, 2.2 Hz, H-6'), 7.07(1H, d, *J* = 8.6 Hz, H-5'), 6.41 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-8), 6.18(1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6), 3.83(3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 55.6(3'-OCH<sub>3</sub>), 93.4(C-8), 98.2(C-6), 103.0 (C-10), 111.8(C-2'), 114.6(C-5'), 119.7(C-1'), 123.4(C-6'), 136.2(C-3), 146.2(C-2), 146.3(C-3'), 149.3(C-4'), 156.2(C-9), 160.7 (C-5), 164.0(C-7), 175.9(C-4)。以上数据与文 献(周北斗等, 2018)报道一致,故鉴定化合物 **15** 为异鼠李素(isorhamnetin)。

化合物 **16** 白色粉末(甲醇)。HR-ESI-MS m/z: 301.069 7 [M-H]<sup>-</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 6.74 - 6.87(3H, m, H-2', 5', 6'), 6.74(d, *J*=2.1 Hz, 2H), 6.07(2H, m, H-6, 8), 5.41(1H, dd, *J*=12.6, 3.0 Hz, H-2), 3.78(3H, s, 7-OCH<sub>3</sub>), 3.23(2H, m, H-3); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 197.0 (C-4), 167.4(C-7), 163.2(C-5), 162.8(C-9), 145.8(C-4'), 145.2 (C-3'), 129.3(C-1'), 118.0(C-6'), 115.3(C-5'), 114.4(C-2'), 102.6(C-10), 94.6(C-6), 93.8(C-8), 78.7(C-2), 55.9(7-OCH<sub>3</sub>), 42.1(C-3)。以上数据与文献(赵东保等,2005)报道一致, 故鉴定化合物 16 为 5, 3', 4'-三羟基-7-甲氧基 二氢黄酮(5, 3', 4'-rihydroxy-7-methoxyflavanone)。

化合物 17 黄色粉末(甲醇)。HR-ESI-MS m/z: 299.054 0 [M-H]<sup>-</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ ) δ: 7.46(1H, d, J = 2.0 Hz, H-2'), 7.44(1H, dd, J = 8.0, 2.0 Hz, H-6'), 6.88(1H, d, J = 8.3 Hz, H-5'), 6.72(2H, s, H-3, 8), 6.37 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6), 3.87(3H, s, 7'-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, DMSO- $d_6$ ) δ: 181.8 (C-4), 165.1(C-2), 164.3(C-7), 161.2(C-5), 157.2(C-9), 150.3(C-4'), 145.9(C-3'), 121.1 (C-1'), 119.2(C-6'), 116.0(C-5'), 113.4(C-2'), 104.7(C-10), 102.9(C-3), 98.0(C-6), 92.6(C-8), 56.1(7'-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献 (张幸国和田景奎,2006)报道一致,故鉴定化合物 17为7-O-甲基圣草酚(7-O-Methyleroidictyol)。

化合物 18 浅棕色油性物质(甲醇)。HR-ESI-MS m/z: 223.132 5  $[M-H]^{-1}$  H-NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 6.97(1H, d, J = 15.8 Hz, H-1'), 6.27(1H, d, J=15.8 Hz, H-2'), 5.86(1H, s, H-2), 2.63(1H, d, J = 17.0 Hz, H-6), 2.26(3H, s, H-4'), 2.16(1H, d, J=17.0 Hz, H-6), 1.80(3H, d, J=1.4 Hz, H-7), 0.96(3H, d, J=25.1 Hz, H-8), 0.92(3H, s, H-9); <sup>13</sup>C-NMR(150 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 198.2 (C-3'), 197.0 (C-1), 161.7(C-3), 147.2(C-1'), 130.5(C-2'), 126.6 (C-2), 78.1 (C-4), 41.2  $(C-5)_{\circ}$  27.2 (C-4'), 24.2(C-9), 49.3(C-6), 23.2(C-8), 18.6(C-7)<sub>o</sub> 以上数据与文献(Yi et al., 2012)报道一致,故鉴 定化合物 18 为[(E)-4-(1S, 3R, 4R)-1-hydroxy-4, 5,5-trimethyl-7-oxabicyclo [4.1.0] heptan-1-yl] but- $1\text{-en-}3\text{-}o\text{-}ne_{\circ}$ 

化合物 **19** 无色油性物质(甲醇)。HR-ESI-MS *m/z*: 269.118 2 [M+HCOO]<sup>-</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 5.77(1H, s, H-4), 5.67(1H, m, H-7), 5.65(1H, m, H-8), 4.98(1H, m, H-9), 2.35(1H, d, *J*=16.7 Hz, H-2α), 2.07~2.01(1H, m, H-2β), 1.79(3H, d, *J*=1.4 Hz, H-13), 1.10 (3H, d, *J*=6.4 Hz, H-10), 0.92(3H, s, H-12), 0.90(3H, s, H-11); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, DMSO*d*<sub>6</sub>) δ: 19.0(C-13), 23.1(C-11), 24.0(C-12), 24.1 (C-10), 41.0(C-1), 49.4(C-2), 66.1(C-9), 125.5 (C-4), 127.9(C-8), 135.9(C-7), 197.4(C-3)。以 上数据与文献(曾金祥等, 2017)报道一致,故鉴定 化合物 **19** 为 blumenol A。

化合物 **20** 无色油性物质(甲醇)。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 7.81(1H, s, H-6), 6.27 (1H, t, *J*=6.8 Hz, H-1'), 4.39(1H, m, H-4'), 3.89(1H, m, H-3'), 3.79(1H, m, H-5α), 3.72 (1H, m, H-5β), 2.26 ~ 2.15(2H, m, H-2'), 1.87(3H, s, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 12.4(CH<sub>3</sub>), 41.2(C-2'), 62.8(C-5'), 72.2 (C-3'), 86.2(C-2'), 88.8(C-1'), 111.5(C-5), 138.2(C-6), 152.4(C-2), 166.4(C-4)。以上数 据与文献(杨顺丽等, 2003)报道一致,故鉴定化合 物 **20** 为胸腺嘧啶脱氧核苷(thymidine)。

### 3 讨论

本研究从甘蔗叶中共分离得到 20 个化合物, 包括 11 个酚酸类化合物、6 个黄酮类化合物、2 个 倍半萜化合物和 1 个生物碱类化合物。化合物 1-4、6、9-11、13-16、18 和 20 均为首次从甘蔗叶中 分离得到。

前期研究显示,甘蔗叶具有抗炎作用(侯小涛 等,2013)。其中,化合物1原儿茶醛具有抑制炎 症作用(Zhou et al., 2005);化合物 6 对羟基苯甲 醛可促进神经的修复,其作用机制与促进内皮细 胞释放神经营养因子 VEGF-A 和 BDNF 有关(杨媛 等,2019);化合物 12 槲皮素具有抗炎作用,能够 抑制 NF-κB 的活化,继而抑制细胞因子和其他促 炎因子的释放(Guazelli et al., 2018);化合物 15 异鼠李素具有抗炎等作用(Lee & Kim, 2018),可 通过减轻氧化应激,缓解对游离脂肪酸对 L-02 细 胞诱导的脂质沉积。核因子 NF-E2 相关因子 2 通 路在此过程中发挥了重要作用(周健等,2021)。 甘蔗叶提取物具有体外抗肿瘤作用,乙酸乙酯提 取物是其中最主要的活性部位(邓家刚等,2010)。 倍半萜类化合物具有抗肿瘤活性(付佳等,2019)。 本研究分离到的成分中亦包含倍半萜类成分,但

它们是否为甘蔗叶的抗肿瘤活性成分,尚需后续进一步研究加以验证。本文对甘蔗叶乙酸乙酯部位的化学成分进行了研究,本研究结果丰富了甘蔗叶化学成分的结构类型,为今后甘蔗叶资源回收再利用及药用价值的开发提供了科学依据。

### 参考文献:

- BORSEN W, PINDER D, SHECHING W, et al., 2011. Effects of the aqueous extract of sugarcane leaves on antimutation and nitric oxide generation [J]. Food chem, 124 (2): 495-500.
- CHEN L, KANG M, DENG XK, et al., 2020. Study on the chemical constituents from *Curculigo orchioides* [J]. J Sichuan Univ Med Sci, 57(3): 591–595. [陈丽, 康敏, 邓 小宽, 等, 2020. 仙茅化学成分的研究[J]. 四川大学学报 (自然科学版), 57(3): 591–595.]
- DENG AJ, QING HL, 2008. Studies on chemical constituents of fruits of *Bridelia tomentosa* [J]. Chin J Chin Mat Med, 33(2):158-160. [邓安珺, 秦海林, 2008.土蜜树果实化 学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 33(2):158-160.]
- DENG JG, GUO HW, HOU XT, et al., 2010. Experimental study on the antitumor effects of extracts from leaves of *Saccharum officinatum in vitro* [J]. Liaoning J Trad Chin Med, 37(1): 32-34. [邓家刚, 郭宏伟, 侯小涛, 等, 2010. 甘蔗叶提取物的体外抗肿瘤活性研究[J]. 辽宁中 医杂志, 37(1): 32-34.]
- FU J, LI FH, LI CK, et al., 2019. Reviews on natural monocyclic sesquiterpenoids and their bioactivities [J]. Chin J Chin Mat Med,44(17): 3672-3683. [付佳,李锋华,李 常康,等, 2019. 天然来源单环倍半萜类化合物的结构及 其药理活性研究进展[J]. 中国中药杂志,44(17): 3672-3683.]
- GONG WF, ZOU DJ, GAO RX, et al., 2017. Chemical constituents from roots of *Smilax riparia* [J]. Chin Med Mat, 40(7): 1595-1599. [龚韦凡, 邹大江, 高瑞锡, 等, 2017. 牛尾菜根茎的化学成分研究 [J]. 中药材, 40(7): 1595-1599.]
- GUAZELLI C, STAURENGOFERRARI L, ZARPELON AC, et al., 2018. Quercetin attenuates zymosan-induced arthritis in mice [J]. Biomed Pharmacoth, 102: 175–184.
- HE YT, DENG JG, ZHAO CC, et al., 2016. Research progress of chemical components and pharmacological activities in leaves of *Saccharum officinatum* [J]. Asia-Pac Trad Med, 12(8): 49-51. [何耀涛, 邓家刚, 赵超超, 等, 2016. 甘 蔗叶化学成分及药理作用研究进展[J]. 亚太传统医药, 12(8): 49-51.]
- HOU XT, DENG JG, LI AY, et al., 2011. Study on hypoglycemia activity of the different extracts in leaves of *Saccharum officinatum* [J]. W Chin J Pharm Sci, 26(5):

451-453. [侯小涛, 邓家刚, 李爱媛, 等, 2011. 甘蔗叶不 同提取物对 3 种糖尿病模型的降血糖作用[J]. 华西药学 杂志, 26(5): 451-453.]

- HOU XT, DENG JG, MA JF, et al., 2010. Effect of extracts from leaves of *Saccharum officinatum* on antibacterial *in vitro* [J]. W Chin J Pharm Sci, 25(2): 161–163. [侯小涛, 邓 家刚, 马建凤, 等, 2010. 甘蔗叶提取物的体外抑菌作用 研究[J]. 华西药学杂志, 25(2): 161–163.]
- HOU XT, MA LN, DENG JG, et al., 2013. Extracting total flavonoids from leaves of *Saccharum officinarum* and antiinflammatory evaluation [J]. Chin Trad Patent Med, 35(9): 2047–2050. [侯小涛,马丽娜,邓家刚,等, 2013. 甘蔗叶 总黄酮提取工艺及抗炎活性的研究[J]. 中成药, 35(9): 2047–2050.]
- JIAN S, XUE MH, MOU MZ, et al., 2014. Antioxidant and nitrite-scavenging capacities of phenolic compounds from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) tops [J]. Molecules, 19(9): 13147-13160.
- JIANG H, SHU JP, FANG XF, et al., 2012. Study on extraction and isolation of polysaccharide from leaves of *Saccharum officinarum* and its antitumor effect *in vitro* [J]. Clin Ration Drug Use, 5(15): 28-29. [江恒,苏纪平, 方锋学,等, 2012. 甘蔗叶多糖的提取分离及体外抗肿瘤作用研究[J]. 临床合理用药杂志, 5(15): 28-29. ]
- LEE MS, KIM Y, 2018. Effects of isorhamnetin on adipocyte mito chondrial biogenesis and AMPK activation [J]. Molecules, 23(8): E1853.
- LI YR, LI C, WANG ZM, et al., 2014. Chemical constituents from whole plants of *Aconitum tanguticum*(Ⅲ)[J]. Chin J Chin Mat Med, 39(7): 1163-1167. [李艳茸, 李春, 王智 民, 等, 2014. 藏药甘青乌头化学成分研究(Ⅲ)[J]. 中国 中药杂志, 39(7): 1163-1167.]
- MAN XZ, ZHOU F, TAN Y, et al., 2019. Chemical constituents from *Euscaphis japonica* [J]. Chin Trad Herb Drugs, 50(24): 5924-5929. [满兴战,周峰,谭洋,等, 2019. 福建野鸦椿化学成分的研究[J]. 中草药, 50(24): 5924-5929.]
- PAN WY, DENG JG, HOU XT, et al., 2019. Chemical constituents of agricultural residues producing from 4 kinds of gramineous crops and their pharmacological effect [J]. Chin J Exp Trad Med Form, 25(10): 214-225. [潘王芸, 邓家 刚, 侯小涛, 等, 2019. 四种禾本科农作物的废弃物化学 成分及药理作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 25(10): 214-225.]
- QI F , SUN JH , YAN JQ , et al., 2018. Anti-inflammatory effects of isorhamnetin on LPS-stimulated human gingival fibroblasts by activating Nrf2 signaling pathway [J]. Microb Pathog, 120:37-41.
- WANG WX, 2013. Chemical constituents in anti-hepatic fibrosis fraction of *Salvia miltiorrhiza* [J]. Nat Prod Res Dev, 25(6): 789-791. [王文祥, 2013. 丹参抗肝纤维化 有效部位化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发,

25(6): 789-791.]

- WEI W, DENG JG, HAO EW, et al., 2018. Chemical constituents from ethyl acetate extract of leaves of *Saccharum officinarum* [J]. Chin J Exp Trad Med Form, 24(21): 51– 55. [韦玮, 邓家刚, 郝二伟, 等, 2018. 甘蔗叶乙酸乙酯 萃取部位化学成分分离鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志, 24(21): 51–55.]
- XIA MW, TAN JJ, YANG L, et al., 2010. Studies on chemcial constituents in *Patrinia scabiosaefolia* [J]. Chin Trad Herb Drugs, 41(10): 1612–1615. [夏明文, 谭菁菁, 杨琳, 等, 2010. 黄花败酱化学成分研究 [J]. 中草药, 41(10): 1612–1615.]
- XIANG LM, LI J, LIU JX, et al., 2020. Study on the chemical constituents from the ethyl acetate fraction of *Syzygium jambos* [J]. J Guangdong Pharm Univ, 36(3): 334-337. [向丽敏, 李洁, 刘嘉鑫, 等, 2020. 蒲桃壳乙酸乙酯 部位化学成分研究 [J]. 广东药科大学学报, 36(3): 334-337.]
- XIAO CR, 2019. Studies on chemical constituents of *Turpinia montana* and *Vitex rotundifolia* [D]. Nanchang: Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine: 146. [肖春荣, 2019. 中药山香圆和蔓荆子化学成分研究 [D]. 南昌: 江西中医药大学: 146]
- YANG CY, WANG XL, 2018. Phenolic constituents from the barks of *Broussonetia papyrifera* [J]. Chin Med Mat, 41(1): 111-114. [杨晨悦, 王晓玲, 2018. 构树皮中的酚性化合 物研究[J]. 中药材, 41(1): 111-114.]
- YANG SL, LIU XK, 2003. Nucleosides from Smilacina atropurpurea [J]. Chin J Nat Med, 1(4): 4-6. [杨顺丽, 刘锡葵, 2003. 竹叶菜中的核苷类化学成分[J]. 中国天 然药物, 1(4): 4-6.]
- YANG Y, DAI R, ZHANG BL, et al., 2019. Repair effect of P-Hydroxybenzaldehyde on cerebral ischemia reperfusion injury model rats [J]. Chin Pharm, 28(12):11-14. [杨媛, 代蓉,张冰琳,等, 2019. 对羟基苯甲醛对模型大鼠脑缺 血再灌注损伤修复作用研究[J]. 中国药业, 28(12): 1-14.]
- YI T, WEI J, CHENG YY, et al., 2012. Two new compounds from *Senecio cannabifolius* [J]. Nat Prod Lett, 14: 826-830.]
- ZENG JX, XU BB, BI Y, et al., 2017. Chemical constitutes from *Plantaginis semen* (II) [J]. Chin J Exp Trad Med Form,23(4): 81-84. [曾金祥,许兵兵,毕莹,等, 2017. 车前子化学成分研究(II)[J]. 中国实验方剂学杂 志,23(4): 81-84.]
- ZHANG JL, DENG JG, LIU BM, et al., 2019. Isolation, identification and determination of flavonoids in the leaves of

Saccharum officinarum [J]. Food Res Dev, 40(22): 164-170. [张金玲, 邓家刚, 刘布鸣, 等, 2019. 甘蔗叶中黄酮 类化合物的分离鉴定及含量测定[J]. 食品研究与开发, 40(22): 164-170.]

- ZHANG XG, TIAN JK, 2006. Studies on chemical constituents of *Ranunculus ternatus*(Ⅲ) [J]. Chin Pharm J, 41(19): 1460-1461. [张幸国, 田景奎, 2006. 猫爪草化学成分的 研究(Ⅲ)[J]. 中国药学杂志, 41(19): 1460-1461.]
- ZHAO DB, YANG YX, ZHANG W, et al., 2005. Studies on flavonoids from herb of Artemisia ordosica [J]. Chin J Chin Mat Med, 30(18): 1430-1432. [赵东保,杨玉霞,张卫, 等, 2005. 黑沙蒿黄酮类化学成分研究[J]. 中国中药杂 志, 30(18): 1430-1432.]
- ZHAO M, XU YH, WILAN TY, et al., 2020. Chemical constituents of ethyl acetate extracts of *Empetrum nigrum* var. *japonicum* [J]. Chin Trad Herb Drugs, 51(13): 3399– 3405. [赵明, 徐阳宏, 乌兰托娅, 等, 2020. 东北岩高兰 醋酸乙酯萃取物化学成分研究[J]. 中草药, 51(13): 3399–3405.]
- ZHOU BD, ZHANG XL, NIU HY, et al., 2018. Chemical constituents from stems and leaves of *Psychotria serpens*[J]. Chin J Chin Mat Med, 43(24): 4878-4883. [周北斗, 张项林, 牛海渊, 等, 2018. 蔓九节枝叶中化学成分研究
  [J]. 中国中药杂志, 43(24): 4878-4883.]
- ZHOU J, DU F, KANG BW, et al., 2021. Isorhamnetin alleviates free fatty acids-induced lipid accumulation via reducing oxidative stress in hepatocytes [J]. Centr S Pharm, 19(3):376-381. [周健, 杜凤, 康秉文, 等, 2021. 异鼠李 素通过减轻氧化应激改善游离脂肪酸诱导肝细胞脂质沉 积[J]. 中南药学, 19(3): 376-381.]
- ZHOU Z, LIU Y, MIAO AD, et al., 2005. Protocatechnic aldehyde suppresses TNF-α-induced ICAM-1 and VCAMlexpression in human umbilical vein endothelial cells [J]. Eur J Pharmacol, 513(1-2): 1-8.
- ZHOU ZJ, GONG MG, 2010. Studies on the chemical constituents from *Euphorbia latifolia* [J]. J Guangdong Pharm Univ, 26(2): 138 – 140. [邹忠杰, 龚梦鹃, 2010. 宽叶大戟化学成分的研究[J]. 广东药学院学报, 26(2): 138–140.]
- ZOU H, ZHANG B, YAO CF, et al., 2017. Chemical constituents from the seeds of *Hydnocarpus anthelmintica* [J]. Chin Med Mat, 40(3): 592-595. [邹欢,张宝,姚成 芬,等, 2017. 大风子的化学成分研究[J]. 中药材, 40(3): 592-595.]

(责任编辑 李 莉)

广步植物 Guihaia Nov. 2022, 42(11): 1892-1900

赵明, 武鹏, 何海旺, 等. 香蕉苗期氮素亏缺与补偿对植株生长和根系形态的影响 [J]. 广西植物, 2022, 42(11): 1892-1900.

ZHAO M, WU P, HE HW, et al. Effects of nitrogen deficiency and compensation of nitrogen nutrient on banana growth and root morphology [J]. Guihaia, 2022, 42(11): 1892-1900.

# 香蕉苗期氮素亏缺与补偿对植株生长 和根系形态的影响

赵 明,武 鹏,何海旺,龙 芳,莫天利,黄 相,邹 瑜\*

(广西壮族自治区农业科学院 生物技术研究所,南宁 530007)

摘 要:为探究氮素亏缺及亏缺后补偿供氮对蕉苗生长及其根系形态特征的影响,该研究以主要栽培品种基因组类型(AAA型和ABB型)的香蕉品种为材料,通过石英砂基质培养结合氮素亏缺与补偿处理,分析其株高、叶长、叶宽、新增绿叶数、地上部和根系的鲜重和干物质质量、根长和根表面积及根体积等指标的变化。结果表明:(1)亏缺30d,香蕉苗呈现明显的缺氮表型症状,株高、叶长、叶宽及新增绿叶数均显著降低,根系干物质积累增加,品种I、II根系干物质分别提高 64.71%、87.50%,根冠比增加,总根表面积分别增加 4.38%、11.85%,体积分别增加 71.78%、66.55%。(2)亏缺 68d,干物质积累受到明显抑制,品种I、II全株干物质质量降低 33.74%、42.04%,根系干物质质量与常规处理无显著差异,根系形态参数变化趋势与轻度亏缺一致。(3)亏缺后补偿供氮,缺氮症状消失,植株生长指标恢复正常水平;品种I、II根系干物质质量显著增加 51.22%、52.38%,根冠比显著高于常规处理,根系趋向正常形态生长,并且总根体积分别增加 61.80%、45.92%;轻度氮素亏缺后适时补偿供氮,缺氮蕉苗可恢复正常生长,根系干物质质量及体积显著高于常规处理且幼苗的长势更好。综上认为,生产中可以综合利用亏缺胁迫后补偿供氮的方式来培育香蕉苗,以利于其在田间栽培的生长。

关键词: 氮素, 亏缺, 补偿效应, 香蕉, 根系形态 中图分类号: Q945.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2022)11-1892-09

# Effects of nitrogen deficiency and compensation of nitrogen nutrient on banana growth and root morphology

ZHAO Ming, WU Peng, HE Haiwang, LONG Fang, MO Tianli, HUANG Xiang, ZOU Yu\*

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

第一作者:赵明(1985-),硕士,副研究员,主要从事香蕉资源与育种研究,(E-mail)zhaoming@gxaas.net。

\*通信作者: 邹瑜,研究员,主要从事香蕉资源与育种研究,(E-mail)zy@gxaas.net。



收稿日期: 2021-07-20

基金项目:国家现代农业产业技术体系项目(CARS-31);广西自然科学基金(2021GXNSFBA075045, 2022GXNSFAA035543);广 西科技重大专项(桂科 AA22068090) [Supported by National Modern Agricultural Industry Technology System (CARS-31); Guangxi Natural Science Foundation (2021GXNSFBA075045, 2022GXNSFAA035543); Guangxi Science and Technology Key Project (Guike AA22068090)]。

Abstract: In order to explore the effects of nitrogen (N) deficiency and compensation of nitrogen (N) nutrient on growth and root morphology of banana. In this experiment, two main cultivated variety genome types (AAA and ABB) were used as materials, plant height, leaf length, leaf width, number of new green leaves, fresh weight and dry matter mass of shoot and roots, root length, root surface area and root volume were studied by using quartz sand matrix culture combined with N deficiency and compensation treatment. The results were as follows: (1) The plant height, leaf length, leaf width and number of new green leaves decreased significantly, after 30 d N deficiency of varieties I and II, dry matter mass of roots increased by 64.71% and 87.50%, and root-shoot ratio increased, total root surface area and volume increased by 4.38% and 11.85%, 71.78% and 66.55%, respectively. (2) After 68 d N deficiency of varieties I and II, dry matter mass of the whole plant decreased by 33.74% and 42.04%, and there was no significant differences between the deficiency treatment and the conventional treatment. The change trend of root morphological parameters was consistent with that of mild deficiency. (3) After the deficiency, N supply was compensated, the symptom of N deficiency disappeared, and the plant growth indexes returned to normal level. The dry matter mass of the varieties I and II increased by 51.22% and 52.38%, and the root-shoot ratio was significantly higher than that of the conventional treatments. Roots tended to grow in normal shape, and total root volume increased by 61.80% and 45.92%, respectively. The dry matter mass and volume of roots increased significantly than the conventional treatments and the plant growth vigor was better when the N compensation was timely after mild N deficiency. To sum up, the method of deficiency compensation can be comprehensively used in the production to promote the growth of banana seedlings in the field.

Key words: nitrogen (N), deficiency, compensation effect, banana, root morphology

香蕉是全球贸易量及消费量最大的鲜果,在 我国农业经济发展中起到重要作用(胡从九, 2020)。香蕉生产中大多延用过量偏施氮肥的传 统耕作模式,因此造成大量的肥料浪费(颜晓元, 2018)、蕉园土壤酸化、养分含量下降(Guo et al., 2010; Wu et al., 2018), 并引发严重的环境污染问 题(Ju et al., 2009)。樊小林(2007)研究表明,香 蕉的氮素吸收量约为 108 g · plant<sup>-1</sup>, 而我国香蕉 的施氮量已达 440~580 g·plant<sup>-1</sup>,远大于其氮素 吸收量(曹明等,2012)。广西蕉园由于常年的施 肥不当,造成土壤酸性强(pH<5.5),有机质及碱 解氮含量低(<20 和<100 mg・kg<sup>-1</sup>),土壤肥力瘦 瘠问题严重(魏守兴等,2012)。氮肥利用率普遍 偏低,增氮不增产(Ju et al., 2009),氮素成为蕉园 土壤养分最重要的限制因子之一(杨苞梅等, 2008),对氮素的动态管理始终是农业生产中首要 的措施。因此,如何减少氮肥的投入量、提高氮肥 有效利用率、降低环境污染风险是香蕉产业健康 发展亟须解决的科学问题。

补偿效应是阈值内的胁迫压力后作物在生理 水平和结构上产生的利于生长发育和产量形成的 能力(赵明等,2006),是自然界普遍存在的一种生 物现象(Acevedo et al., 1971)。国内外研究者已对 玉米、大豆、小麦等粮食作物的氮素亏缺补偿效应 进行了较为深入的研究(翟丙年和李生秀,2005;褚 丽丽和张忠学,2010;汤国平等,2017),但对香蕉这 一优良草本果树的氮素亏缺补偿效应进行系统探 讨的报道却鲜见。香蕉植株高大,追肥次数多(郭 春铭等,2017),生产中某一生长阶段错过氮肥施 入,后期补氮的养分管理措施屡见不鲜,缺氮香蕉 苗在补施氮肥后表型性状可恢复正常(刘芳等, 2019),然而,长时间的氮素亏缺势必造成生长受 限。因此,需要研究适度氮素亏缺后补偿供氮对植 株生长和根系形态特征的影响。因此,本研究以栽 培品种中最重要的两种基因组类型(AAA 型普通香 蕉和 ABB 型粉蕉)的香蕉为材料,开展苗期石英砂 基质培养试验,研究氮素亏缺与补偿条件下香蕉苗 生长、干物质质量、根系形态的变化,以期揭示氮素 亏缺后恢复供氮对香蕉苗的补偿生长效应,为生产 上利用香蕉品种自身调节和补偿机制,发挥氮高效 利用潜力,合理施氮提供理论依据。

# 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验在广西壮族自治区农业科学院防虫网室 进行。供试品种 I 为 AAA 型普通香蕉'宝岛蕉', 品种 Ⅱ 为 ABB 型粉蕉'育粉 6 号',选取长势均匀 一致,5叶1心期组培苗为试验材料,育苗容器为带托盘塑料黑杯(15 cm×12 cm×10 cm)。石英砂 经1%稀盐酸浸泡淋洗,后水洗到中性,高温烘干, 装杯作为栽培基质。

### 1.2 试验方法

试验共设常规、亏缺和补偿3组处理。常规处 理浇 Hoagland 完全营养液;亏缺处理浇缺氮营养 液;补偿处理先浇缺氮营养液,当植株表现轻度氮 素亏缺(叶片有比较明显的黄化现象)后再浇完全 营养液,营养液配方如表1所示。试验每隔7d浇 200 mL营养液,其他条件按常规统一管理,每处理 30 株,重复3次。每天观察记录植株表型特征,当 亏缺处理达到轻度氮素亏缺时期,同时采集常规 和亏缺处理的蕉苗全株样品;当补偿处理亏缺症 状基本消失时,采集常规、亏缺和补偿处理的蕉苗 全株样品。

轻度氮素亏缺时期的采样时间为处理后 30 d,补偿处理采样时间为处理后 68 d。

		浓度 Concentra	tion (mg $\cdot$ L <sup>-1</sup> )	
项目 Item	分子式 <sup>—</sup> Molecular formula	完全营养液 Complete nutrient solution	缺氮营养液 N deficiency nutrient solution	
大量元素	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	616.18	616.18	
Macro-element	$\mathrm{KH}_2\mathrm{PO}_4$	272.18	272.18	
	KNO3	505.55	_	
	KCl	—	372.80	
(	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	1 180.75	—	
	$CaCl_2$	—	555.00	
微量元素	$MnSO_4 \cdot H_2O$	1.14	1.14	
Micro-element	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.08	0.08	
	$\rm ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.22	0.22	
	$H_3BO_3$	2.86	2.86	
	$\rm H_2 MoO_4$	0.09	0.09	
	EDTA • FeNa	8.42	8.42	

### 表 1 营养液配方 Table 1 Nutrient solution formula

#### 1.3 样品测定

两次样品采集后,各处理筛选生长较一致的 蕉苗5株,重复3次,测量株高、倒数第1片完全展 开叶长、叶宽和新增绿叶数等植株生长情况指标, 地上部和根系分开收获,称量地上部和根系的鲜重后烘干至恒质量,测量干物质质量,并计算根冠比。根系烘干前,采用 LA2400 植物根系扫描仪及WinRHIZO软件测定、分析总根和各级根系的根长、根表面积及根体积,按直径<2.0 mm、2.0~4.5 mm、>4.5 mm标准划分细根、中根、粗根。

#### 1.4 数据处理

采用软件 Excel 2010 和 SPSS 16.0 对试验数 据进行统计分析和作图,以 Duncan's 新复极差法 进行多重比较。

# 2 结果与分析

### 2.1 氮素亏缺和亏缺后补偿供氮对香蕉苗生长的影响

亏缺处理 10 d 后,品种 I 的个别植株首先开 始出现初期缺氮表型症状,植株下部老叶颜色转 淡,呈浅绿或黄绿色,随着缺氮程度的加深,黄化 逐渐扩展蔓延到中上部叶片,品种 II 的植株氮素 亏缺表型症状出现时期较品种 I 推迟 5~7 d,表现 出更强的耐受低氮胁迫能力。氮素亏缺处理使蕉 苗生长受限,与常规处理植株相比亏缺处理表现 矮小瘦弱。轻度氮素亏缺时期各处理植株生长情 况结果如表 2 所示,缺氮香蕉植株高度均显著低 于常规处理,品种 I、II 株高分别比常规处理降低 25.40%、10.60%;新抽生叶片明显变小,叶长分别 比常规处理短 17.55%、17.23%,叶宽分别比常规 处理窄 14.85%、29.01%;叶片抽生速度较常规处 理减慢,新增绿叶数比常规处理减少 0.6~0.7 片。

补偿处理 38 d 后,各处理植株生长情况结果 如表 3 所示,补偿处理香蕉植株生长均恢复正常 水平,株高、叶长、叶宽以及新增绿叶数与常规处 理无显著差异。此时,亏缺处理植株表现中至重 度缺氮症状,株高增长缓慢,生长几乎停滞,品种 I、II 亏缺处理株高分别比常规处理显著降低 40.87%、29.20%;新抽生叶片长分别比常规处理 短 34.68%、34.45%,叶宽分别比常规处理减少 2.60%、43.81%;新增绿叶数约比常规处理减少 2.50 片,并且老叶快速枯萎死亡。

# 2.2 氮素亏缺和亏缺后补偿供氮对香蕉苗干物质 质量的影响

轻度氮素亏缺造成的植株缺氮表型症状显而 易见,但并未对植株干物质的积累造成严重的影 响,结果见表4。轻度氮素亏缺时期,品种Ⅰ、Ⅱ氮 表 2 轻度氮素亏缺时期蕉苗生长

	Table 2         Growth of banana seedlings at mild N deficiency stage							
品种 Variety	处理 Treatment	株高 Plant height (cm)	叶长 Leaf length (cm)	叶宽 Leaf width (cm)	新增绿叶数 Number of new green leaves			
Ι	常规 Conventional	10.20±0.31a	13.22±0.42a	5.59±0.21a	5.00±0.40a			
	亏缺 Deficiecy	$7.61 \pm 0.22 \mathrm{b}$	$10.90 \pm 0.31 \mathrm{b}$	$4.76{\pm}0.34{\rm b}$	$4.33 \pm 0.34 \mathrm{b}$			
Ш	常規 Conventional	10.85±0.23a	16.31±0.21a	5.48±0.23a	4.90±0.31a			
	亏缺 Deficiecy	$9.70\pm0.42\mathrm{b}$	$13.50\pm0.35\mathrm{b}$	$3.89 \pm 0.31 \mathrm{b}$	$4.20\pm0.21\mathrm{b}$			

注:同列数字后的不同小写字母表示在 0.05 水平上显著差异。下同。

Note: Different small letters in the same column indicate significant differences at 0.05 level. The same below.

品种 Variety	处理 Treatment	株高 Plant height ( cm)	叶长 Leaf length (cm)	叶宽 Leaf width (cm)	新增绿叶数 Number of new green leaves
I	常规 Conventional	20.60±0.25a	26.70±0.40a	11.29±0.18a	5.10±0.15a
	亏缺 Deficiecy	$12.18 \pm 0.22 b$	$17.44 \pm 0.34 \mathrm{b}$	$7.61 \pm 0.25 \mathrm{b}$	$2.63 \pm 0.14 \mathrm{b}$
	补偿 Compensation	20.70±0.30a	25.61±0.21a	11.02±0.24a	$5.00 \pm 0.20$ a
П	常规 Conventional	21.92±0.23a	32.95±0.21a	11.07±0.25a	5.08±0.13a
	亏缺 Deficiecy	$15.52 \pm 0.20 \mathrm{b}$	$21.60{\pm}0.35\mathrm{b}$	$6.22\pm0.14\mathrm{b}$	$2.53 \pm 0.30 \mathrm{b}$
	补偿 Compensation	22.02±0.31a	31.58±0.25a	10.78±0.22a	5.02±0.14a

表 3 氮素亏缺后补偿供氮蕉苗生长

Table 3 Growth of N compensation banana seedlings after N deficiency

素亏缺处理植株地上部和全株的平均干物质质量 与常规处理均无显著性差异;根系的干物质积累 得到明显的促进,各亏缺处理植株根系干物质质 量显著高于常规处理,分别提高 64.71%、87.50%; 根冠比显著高于常规处理,分别提高 89.66%、 100.00%,根系的干物质积累可能是植株补偿生长 的关键;品种 II 亏缺处理植株根系干物质积累量 及增幅均比品种 I 高,可能是其更耐受低氮胁迫 能力的原因。氮素亏缺处理显著抑制了植株对水 分的吸收能力,植株含水量显著低于常规处理,品 种 I、II 地上部含水量比常规处理分别降低 1.81%、3.81%,全株含水量比常规处理分别降低 1.71%、2.76%,因此,植株含水量降低是枯萎和瘦 弱等缺氮表型症状的主要原因。

处理 68 d,各处理干物质积累情况结果如表 5 所示。亏缺处理植株干物质积累受到明显抑制, 品种 I、II 亏缺处理植株干物质质量较常规处理显 著降低,地上部干物质质量降低 44.26%、51.65%, 全株的干物质质量降低 33.74%、42.04%,氮素亏 缺对根系干物质积累的促进作用不再明显,根系 干物质质量与常规处理无显著差异,但亏缺处理 植株根冠比仍显著高于常规处理,并且与补偿处 理无显著差异。氮素亏缺持续抑制植株对水分的 吸收,各亏缺处理植株地上部、根系和全株的含水 量均显著低于常规处理。此时,各氮素亏缺后补 偿供氮处理植株干物质迅速积累,品种 I、II补偿 处理植株干物质质量均较亏缺处理显著增加,地 上部干物质质量增加 80.88%、104.55%,根系干物 质质量增加 55.0%、81.13%,全株的干物质质量增 加 71.30%、94.37%,与常规处理相比,根系干物质 质量显著增加 51.22%、52.38%,根冠比显著高于 常规处理。植株含水量较亏缺处理显著增加,地 上部含水量增加 1.53%、2.85%,根系含水量增加 1.78%、2.32%,全株含水量增加 1.64%、2.60%,并 且与常规处理差异不显著。

# 2.3 氮素亏缺和亏缺后补偿供氮对香蕉苗根系形态的影响

各处理香蕉苗根系形态调查结果由图 1 和图 2 可知,品种 I、II 常规处理蕉苗根系<2 mm 的细 根根长比例为 90.66%、90.08%,香蕉苗的根系明 显以细根为主。轻度氮素亏缺时期,缺氮显著抑

#### 表 4 轻度氮素亏缺时期香蕉苗干物质质量和含水量

Table 4 Dry matter mass and water content of banana seedlings at mild N deficiency stage

品种 女	处理	직 Average dry	Z均干物质质量 matter mass(g	• plant <sup>-1</sup> )	含水量 lant <sup>-1</sup> ) Content of water (%)			
Variety	Treatment	地上部 Shoot	根系 Root	全株 Plant	地上部 Shoot	根系 Root	全株 Plant	ratio
Ι	常规 Conventional	0.59±0.02a	$0.17 \pm 0.01 \mathrm{b}$	0.76±0.04a	92.41±0.08a	92.39±0.12a	92.39±0.15a	0.29b
	亏缺 Deficiecy	0.51±0.03a	$0.28 \pm 0.02a$	$0.79 \pm 0.04$ a	$90.84{\pm}0.11\mathrm{b}$	$90.58{\pm}0.19{\rm b}$	$90.68{\pm}0.12\mathrm{b}$	0.55a
Ш	常规 Conventional	$0.78 \pm 0.04$ a	$0.24{\pm}0.04{\rm b}$	$1.02 \pm 0.04$ a	92.12±0.12a	93.74±0.10a	92.70±0.11a	0.31b
	亏缺 Deficiecy	0.73±0.03a	0.45±0.03a	1.18±0.02a	$90.10{\pm}0.10{\rm b}$	$89.93{\pm}0.16\mathrm{b}$	$89.94{\pm}0.12\mathrm{b}$	0.62a

表 5 氮素亏缺后补偿供氮香蕉苗干物质质量和含水量

Table 5 Dry matter mass and water content of N compensation banana seedlings after N deficiency

品种 Variety	处理 - Treatment	平均干物质质量 Average dry matter mass (g)			含水量 Content of water (%)			根冠比
		地上部 Shoot	根系 Root	全株 Plant	地上部 Shoot	根系 Root	全株 Plant	ratio
Ι	常规 Conventional	1.22±0.08a	$0.41{\pm}0.02{\rm b}$	1.63±0.10a	92.22±0.13a	93.94±0.08a	93.72±0.12a	0.34b
	亏缺 Deficiecy	$0.68{\pm}0.03{\rm b}$	$0.40{\pm}0.02{\rm b}$	$1.08{\pm}0.07{\rm b}$	$90.50{\pm}0.30{\rm b}$	$90.43{\pm}0.07{\rm b}$	$90.48{\pm}0.16\mathrm{b}$	0.59a
	补偿 Compensation	1.23±0.08a	0.62±0.03a	1.85±0.11a	92.03±0.14a	92.21±0.15a	92.12±0.23a	0.50a
Ш	常规 Conventional	1.82±0.08a	$0.63{\pm}0.05{\rm b}$	2.45±0.12a	92.91±0.22a	92.27±0.31a	92.36±0.11a	0.35b
	亏缺 Deficiecy	$0.88{\pm}0.04{\rm b}$	$0.53{\pm}0.03{\rm b}$	1.42±0.08a	$89.73{\pm}0.30\mathrm{b}$	$90.08{\pm}0.16\mathrm{b}$	$89.85{\pm}0.12\mathrm{b}$	0.60a
	补偿 Compensation	1.80±0.10a	0.96±0.03a	2.76±0.15a	92.58±0.12a	92.40±0.17a	92.45±0.16a	0.53a

制了香蕉苗细根根长的增加,总根根长显著降低, 品种 I、II 细根根长分别比常规处理降低29.32%、 13.68%,总根根长分别降低 18.91%、13.12%。缺 氮未抑制蕉苗直径>2 mm 的中根和粗根根长的增 加,品种 I 中根、粗根根长甚至比常规处理显著增 加,品种 II 中根、粗根根长略低于常规处理,差异 不显著。缺氮促进了根系表面积的增加,品种 I、 II 粗根表面积分别比常规处理显著增加 61.20%、 326.49%,总根表面积分别比常规处理显著增加 61.20%、 326.49%,总根表面积分别比常规处理显著增加 61.20%、 326.49%,总根表面积分别比常规处理增加 11.20%、 326.49%,总根表面积分别比常规处理增加 71.73%、90.83%,粗 根体积分别比常规处理增加 71.78%、66.55%。可 见,缺氮显著促进了根系的增粗,根系的表面积以 及体积的增加,是香蕉苗在氮素亏缺条件下增加 干物质积累,实现氮素高效吸收的根系形态基础。

各处理香蕉苗根系形态调查结果由图 3 和图 4 可知,各补偿处理植株根系恢复生长,表现出一 定的补偿效应。品种 I、II 补偿处理细根、中根及 总根根长均较亏缺处理显著增加,其中总根长分 别增加 71.06%、70.54%,且中根、粗根根长与常规 处理差异不显著,但细根及总根根长仍显著低于 常规处理;补偿处理中根、粗根及总根表面积较亏 缺处理及常规处理略高,处理间差异不显著;中 根、粗根及总根体积较常规处理显著增加,其中总 根体积分别增加 61.80%、45.92%,并且细根、粗根 及总根体积与亏缺处理间差异不显著。此时,氮 素亏缺处理植株根系生长受到明显影响,细根、中 根及总根长显著降低,品种 I、II 总根长分别比常



不同小写字母表示同一直径不同处理间在 0.05 水平上差 异显著。下同。

Different small letters indicate significant differences between treatments of the same diameter at 0.05 level. The same below.

图 1 轻度氮素亏缺时期香蕉苗根系形态(品种 I) Fig. 1 Roots morphology of banana seedlings at mild N deficiency stage (Variety I)

规处理降低48.17%、40.50%,降幅较轻度缺氮时 期下降29.26%、27.38%;根系表面积参数与常规 处理差异不显著;中根、粗根及总根体积仍显著增加,总根体积分别比常规处理增加61.23%、 47.20%,增幅较轻度缺氮时期分别下降10.55%、 19.35%。以上结果说明,不同缺氮程度对蕉苗根



图 2 轻度氮素亏缺时期香蕉苗根系形态(品种Ⅱ) Fig. 2 Root morphology of banana seedlings at mild N deficiency stage (Variety Ⅱ)

系形态的影响趋势一致,影响大小与缺氮持续时间相关。

# 3 讨论与结论

氮素是植物生长发育所必需的营养要素,供 氮水平显著影响植株的生长发育,香蕉在氮素亏 缺条件下,细胞的分裂和伸长受抑制,植株出现矮 小、叶数减少、叶色变淡、新叶变小等缺氮症状。





氮素亏缺抑制香蕉地上部和根系生长,干物质质 量积累下降,根冠比增加(Lizarazo et al., 2013)。 本研究氮素亏缺处理后,各品种均出现不同程度 的缺氮症状,株高、叶长、叶宽及新增绿叶数均显 著降低,其中粉蕉品种'育粉6号'缺氮症状出现 时间较普通香蕉推迟,具有更强的耐受低氮能力, 这与 ABB 型粉蕉品种自身的氮素吸收和利用能力 有关。本研究发现,轻度氮素亏缺对干物质的积 累抑制作用不明显,地上部和全株的平均干物质





质量与常规处理均无显著差异;而根系的干物质 积累得到明显促进,各亏缺处理植株根系干物质 质量显著高于常规处理,根冠比增加,这可能是植 株为了适应氮素亏缺,通过协调根系与地上部生 长和干物质积累,产生了一种对氮素需求的补偿 效应,与何亮珍和蒋元利(2017)研究结果一致。 氮素亏缺处理香蕉苗地上部、根系以及全株含水 量均显著降低,说明氮素吸收与水分吸收耦合,缺 氮直接影响了根系对水分的吸收能力,缺氮表型 症状与植株含水量的降低直接相关。随着氮胁迫 时间延长,亏缺处理植株缺氮症状逐渐明显,干物 11 期

质积累受到明显抑制,地上部干物质质量显著降低,氮素亏缺对根系干物质累积的促进作用已不再明显,根系干物质与常规处理无显著差异,氮素 亏缺持续抑制植株对水分的吸收。轻度氮素亏缺 后补偿供氮,各补偿处理植株生长趋向正常,氮素 亏缺表型症状消失,干物质迅速累积,植株干物质 质量均较亏缺处理显著增加,且根系干物质质量 及根冠比显著高于常规处理,植株含水量与常规 处理差异不显著,与施晟璐等(2015)的研究结果 有类似之处,复氮处理使菘蓝幼苗的植株高度、根 系鲜重、叶片鲜重及干重显著增加。de Boer等 (2016)研究也表明黑麦草氮肥施用时期推迟3d, 可显著提高产量。

作物对水分和养分的吸收利用与根系的形态 特征密切相关,直接影响作物生长发育和产量形 成(田中伟等,2015)。施肥不仅能够改善土壤肥 力状况,还对根系在耕层中的延伸生长和空间分 布起促进作用。氮素亏缺不但影响根系干物质积 累,而且改变了根系形态特征。氮亏缺胁迫下光 合物质被用来构建发达的根系,促进更多的氮素 吸收以及干物质的形成与积累(李文娆等,2017)。 乔海涛等(2009)研究认为氮素亏缺后根系总长、 总表面积和总体积增加,而曾秀成等(2010)研究 表明氮素亏缺后根系总长、总表面积显著降低。 王准等(2020)研究表明低氮处理下根系干物质质 量增加,根系形态特征无显著变化。土壤环境中 氮素的盈亏首先影响植物的根系,武永军等 (2012)研究表明玉米氮素亏缺处理根系活力明显 下降,恢复正常供氮后,根系活力仍无法恢复正常 水平。本研究中,轻度氮素亏缺显著抑制了香蕉 苗细根根长的增加,总根根长显著降低,显著促进 了香蕉苗根系的增粗,根系的表面积以及体积的 增加。适时的补偿供氮处理后,各补偿处理中根、 粗根及总根表面积及体积均较亏缺处理及常规处 理略高。香蕉幼苗期生物量在整个生育期中相对 少,需氮素不多,虽然氮素亏缺胁迫使根系的长度 下降,但是,根系通过表面积以及体积的增加以获 得更多的养分和水分吸收,可能正是香蕉苗在逆 境下为了满足生存的需要寻找氮源,通过自我调 节功能所表现出的补偿生长效果。但是,长时间 氮素亏缺势必影响生长。伴随生长发育,生长量 不断积累增大,氮素亏缺胁迫严重程度加重,自我 调节能力范围超限,补偿生长效应难以表现。氮

素亏缺胁迫对根系形态特征的影响与胁迫持续时间(阈值)和作物品种根系生长发育特性有关,并 且一定的时间积累是生长补偿效应的前提。因此,有关氮素亏缺与补偿对根系形态的研究结果 不尽相同。

综上所述,生产中可以综合考虑合理利用补 偿效应,虽然采用轻度氮素亏缺胁迫后恢复供氮 的方式来培育香蕉苗,有利于其在田间栽培的生 长,但必须特别注意氮素亏缺时期、亏缺程度和亏 缺强度的控制。今后还将进一步开展香蕉各个生 育阶段氮素亏缺与补偿效应研究,探明氮素亏缺 敏感期、需求关键期及补偿有效期,为生产上利用 香蕉品种自身调节和补偿机制,发挥氮素高效利 用潜力,减肥增效提供理论依据。

### 参考文献:

- ACEVEDO E, HSIAO TC, HENDERSON DW, 1971. Immediate and subsequent growth responses of maize leaves to changes in water status [J]. Plant Physiol, 48(5): 631-636.
- CAO M, SONG YY, FAN XL, 2012. Effects of content of controlled release nitrogen and potassium on banana yield and NPK fertilizer use efficiency [J]. J NW A & F Univ (Nat Sci Ed), 40(11): 35-41. [曹明, 宋媛媛, 樊小林, 2012. 控释氮钾比例对香蕉产量及氮磷钾肥料利用率的 影响 [J]. 西北农林科技大学学报, 40(11): 35-41.]
- CHU LL, ZHANG ZX, 2010. Effects of nitrogen nutrition and water stress on compensation effect of the yield of soybean [J]. Acta Ecol Sin, 30(10): 2665-2670. [褚丽丽, 张忠 学, 2010. 氮素营养与水分胁迫对大豆产量补偿效应的影响 [J]. 生态学报, 30(10): 2665-2670.]
- DE BOER, DERU JGC, HOEKSTRA NJ, et al., 2016. Strategic timing of nitrogen fertilization to increase root biomass and nitrogen-use efficiency of *Lolium perenne* L. [J]. Plant Soil, 407(1/2): 81-90.
- FAN XL, 2007. Banana nutrition and fertilization [M]. Beijing: China Agricultural Press: 58 – 79. [樊小林, 2007. 香蕉营养与施肥 [M]. 北京:中国农业出版社: 58-79.]
- GUO CM, LIU WJ, FAN XL, 2017. Effect of alkaline slow release nitrogen fertilizer on soil pH and nitrogen use efficiency of banana [J]. J Plant Nutr Fert, 23(1): 128-136. [郭春铭, 刘卫军, 樊小林, 2017. 碱性长效缓释氮 肥对蕉园土壤 pH 和香蕉氮肥利用效率的影响 [J]. 植物 营养与肥料学报, 23(1): 128-136.]
- GUO JH, LIU XJ, ZHANG Y, et al., 2010. Significant acidification in major chinese croplands [J]. Science, 327(5968); 1008–1010.

- HE LZ, JIANG YL, 2017. Effects of nitrogen deficiency on the growth and physiology of leaf-vegetable sweet potato [J]. Hunan Agric Sci, (3): 20 22. [何亮珍, 蒋元利, 2017. 缺氮对叶用甘薯生长及生理的影响 [J]. 湖南农业 科学, (3): 20-22.]
- HU CJ, 2020. Analysis on the change and trend of banana market in the world [J]. Trop Agric Chin, (6): 39-41. [胡从九, 2020. 浅析世界香蕉市场变化及趋势 [J]. 中国热带农业, (6): 39-41.]
- JU XT, XING GX, CHEN XP, et al., 2009. Reducing environmental risk by improving N management in intensive Chinese agricultural systems [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 106(9): 3041–3046.
- LI WR, FAN YL, FENG SZ, et al., 2017. Effect of coupling of water and nitrogen on shoot and root growth and water use efficiency of cotton seedlings [J]. J Henan Agric Sci, 46(9): 18-24. [李文娆, 范雨龙, 冯士珍, 等, 2017. 水 氮耦合对棉花幼苗根冠生长和水分利用效率的影响 [J]. 河南农业科学, 46(9): 18-24.]
- LIU F, LIN LH, ZHANG LD, et al., 2019. Effects of N deficiency and resupply of N nutrient on banana growth and root morphological parameters [J]. J Fruit Sci, 36(1): 67– 75. [刘芳, 林李华, 张立丹, 等, 2019. 缺氮和恢复供氮 对香蕉苗生长和根系形态参数的影响 [J]. 果树学报, 36(1): 67–75.]
- LIZARAZO MÁ, HERNÁNDEZ CA, FISCHER G, et al., 2013.Response of the banana passion fruit (*Passiflora tripartite* var. *mollissima*) to different levels of nitrogen, potassium and magnesium [J]. Agr Colom, 31(2): 184–194.
- SHI SL, YE BZ, ZHANG RZ, et al., 2015. Effect of N deficiency and N recovery on growth and nitrogen metabolism of *Isatis indigotica* seedlings [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 35(3): 523-529. [施晟璐, 叶冰竹, 张润枝, 等, 2015. 缺氮和复氮对菘蓝幼苗生长及氮代谢的影响 [J]. 西北植物学报, 35(3): 523-529.]
- QIAO HT, YANG HQ, SHEN WB, et al., 2009. Effect of nitrogen-deficient and iron-deficient on root architecture of young seedlings of *Malus hupehensis*(Pamp)Rehd [J]. Acta Hortic Sin, 36(3): 321-326. [乔海涛,杨洪强,申为宝, 等, 2009. 缺氮和缺铁对平邑甜茶幼苗根系构型的影响 [J]. 园艺学报, 36(3): 321-326.]
- TANG GP, XIONG QQ, ZHONG L, et al., 2017. Primary research on the formation and its physiological mechanism of nitrogen deficiency compensatory effects in double season early rice [J]. J Nucl Agric Sci, 31(8): 1585–1593. [汤国 平,熊强强,钟蕾,等, 2017. 双季早稻氮素亏缺补偿效 应的形成及其生理机制初探 [J]. 核农学报, 31(8): 1585–1593.]
- TIAN ZW, FAN YH, YIN M, et al., 2015. Genetic improvement of root growth and its relationship with grain yield of wheat cultivars in the Middle-Lower Yangtze river [J]. Acta Agr Sin, 41(4): 613-622. [田中伟, 樊永惠,

殷美,等,2015. 长江中下游小麦品种根系改良特征及其 与产量的关系 [J]. 作物学报,41(4):613-622.]

- WANG Z, ZHANG HH, DONG Q, et al., 2020. Screening and verification of low nitrogen tolerant and nitrogen sensitive cotton germplasm [J]. Cotton Sci, 32(6): 538-551. [王 准,张恒恒,董强,等, 2020. 棉花耐低氮和氮敏感种质 筛选及验证 [J]. 棉花学报, 32(6): 538-551.]
- WEI SX, XIE ZS, LI ZY, et al., 2012. Soil fertility investigation and evaluation for banana gardens in Guangxi [J]. Chin J Trop Crops, 33(8): 1371–1377. [魏守兴, 谢 子四, 李志阳, 等, 2012. 广西主要蕉园土壤肥力调查及 评价 [J]. 热带作物学报, 33(8): 1371–1377.]
- WU HJ, WANG S, GAO LM, et al., 2018. Nutrient-derived environmental impacts in Chinese agriculture during 1978– 2015 [J]. J Environ Manag, 217(5): 762–774.
- WU YJ, SHEN YF, YAN QF, et al., 2012. Effect of N deficiency and N recovery treatment on root growth, root activity, content of NO<sub>3</sub>-N and aminoacid [J]. Acta Agric Boreal-Occident Sin, 21(12): 61-64. [武永军, 沈玉芳, 颜秦峰, 等, 2012. 缺氮复氮处理对玉米根系生长、根系 活力、硝态氮及氨基酸含量的影响 [J]. 西北农业学报, 21(12): 61-64.]
- YAN XY, XIA LL, TI CP, 2018. The strategy of nitrogen application for both crop yield and environment [J]. Bull Chin Acad Sci, 33(2): 177-183. [颜晓元,夏龙龙, 遆超 普, 2018. 面向作物产量和环境双赢的氮肥施用策略 [J]. 中国科学院院刊, 33(2): 177-183.]
- YANG BM, YAO LX, LI GL, et al., 2008. Evaluation on characteristics of nutrient absorption of soils in banana plantation in Guangdong Province [J]. Chin J Soil Sci, 39(6): 1315-1320. [杨苞梅,姚丽贤,李国良,等, 2008. 广东省香蕉主产区蕉园土壤养分的吸附特性研究 [J]. 土壤通报, 39(6): 1315-1320.]
- ZENG XC, WANG WM, LUO MN, et al., 2010. Effects of different element deficiencies on soybean growth and root morphology [J]. J Plant Nutr Fert, 16(4): 1032-1036. [曾 秀成, 王文明, 罗敏娜, 等, 2010. 缺素培养对大豆营养 生长和根系形态的影响 [J]. 植物营养与肥料学报, 16(4): 1032-1036.]
- ZHAI BN, LI SX, 2005. Response to nitrogen deficiency and compensation on growth and yield of winter wheat [J]. J Plant Nutr Fert, 21(3): 308-313. [翟丙年,李生秀, 2005. 氮素对冬小麦生长发育及产量的亏缺和补偿效应 [J]. 植物营养与肥料学报, 21(3): 308-313.]
- ZHAO M, LI JG, ZHANG B, et al., 2006. The compensatory mechanism in exploring crop production potential [J]. Acta Agr Sin, 32(10): 1566-1569. [赵明, 李建国, 张宾, 等, 2006. 论作物高产挖潜的补偿机制 [J]. 作物学报, 32(10): 1566-1569.]

(责任编辑 周翠鸣)
#### DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202012013

滕秋梅,杨晓东,何成新,等. 韭菜化感物质草莓酸对香蕉枯萎病菌的影响 [J]. 广西植物, 2022, 42(11): 1901-1912. TENG QM, YANG XD, HE CX, et al. Effects of allelochemical strawberry acid from *Allium tuberosum* on *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* [J]. Guihaia, 2022, 42(11): 1901-1912.



### 韭菜化感物质草莓酸对香蕉枯萎病菌的影响

滕秋梅<sup>1</sup>,杨晓东<sup>2</sup>,何成新<sup>1</sup>,徐广平<sup>1,3</sup>,黄玉清<sup>4</sup>,张德楠<sup>1</sup>, 孙英杰<sup>1</sup>,牟海飞<sup>5</sup>,韦绍龙<sup>5</sup>,周龙武<sup>1\*</sup>

(1. 广西喀斯特植物保育与恢复生态学重点实验室, 广西壮族自治区 广西植物研究所, 广西 桂林 541006; 2. 汕尾市陆河县

陆河中学, 广东 汕尾 516700; 3. 中国地质科学院岩溶地质研究所, 自然资源部/广西岩溶动力学重点实验室,

广西 桂林 541004; 4. 南宁师范大学, 广西北部湾环境演变与资源利用教育部重点实验室,

南宁 530001; 5. 广西壮族自治区农业科学院 生物技术研究所, 南宁 530007)

摘 要:香蕉枯萎病主要由尖孢镰刀菌 4 号生理小种(Fusarium oxysporum f. sp. cubense, Foc4)引起的一种土 传病害,严重威胁香蕉产业的可持续发展。为寻求一种经济有效且环保的防治措施,以韭菜化感物质的衍 生物草莓酸(strawberry acid, SA)为材料,通过平板和盆栽实验,研究了 SA 对 Foc4 的菌丝生长、香蕉枯萎病 病情指数、土壤微生物数量、土壤酶活性的影响。结果表明:(1)随着 SA 浓度的增加, Foc4 的菌落生长直径 显著减小,第5天时菌落直径在SA浓度为300、450 μL・L<sup>-1</sup>时比150 μL・L<sup>-1</sup>分别减小了49.15%、70.89%; 液体培养条件下 SA 浓度为 600 μL·L<sup>-1</sup>时 Foc4 的分生孢子数量显著低于对照处理(相差 470 多倍);pH 为 5 时 SA 对 Foc4 的抑制效果显著比 pH 为 7 和 9 时好。(2) 随实验处理时间的延长, 添加 SA 后香蕉幼苗的 病情指数显著低于对照。(3)土壤细菌、真菌数量和微生物总量在 SA 为 600 μL·L<sup>-1</sup>时均为最高;Foc4 数量 随 SA 浓度升高而降低,在1 200 μL·L<sup>-1</sup>时显著降低。(4)各土壤酶在浓度(300~600 μL·L<sup>-1</sup>)SA 处理时 活性较高;1200 µL·L<sup>-1</sup>时显著降低,过氧化氢酶和多酚氧化酶较对照分别降低了41.88%、54.82%。(5)相 关性分析得出,土壤微生物总量与细菌、真菌数量极显著正相关;土壤真菌与放线菌显著负相关;土壤细菌、 真菌和放线菌数量均与蔗糖酶、多酚氧化酶显著正相关;蔗糖酶与脲酶、过氧化氢酶与多酚氧化酶均显著正 相关。综上认为,添加 SA 浓度为 600 μL·L<sup>-</sup>能较好地抑制 Foc4 的菌丝生长且能提高其抑制率,病情指数 明显降低,有利于改善香蕉的生长环境。该研究结果为有效利用 SA 防治香蕉枯萎病提供了科学依据。 关键词: 草莓酸, 化感物质, 香蕉枯萎病, 尖孢镰刀菌 4 号生理小种, 土壤微生物数量, 土壤酶活性 中图分类号: Q945.8 文献标识码:A 文章编号:1000-3142(2022)11-1901-12

收稿日期: 2021-08-19

基金项目: 广西科技重大专项(桂科 AA18118028);国家自然科学基金(31760162,41361057);广西自然科学基金 (2020GXNSFBA297048,2018GXNSFAA050069);广西岩溶动力学重大科技创新基地开放课题(KDL & Guangxi202004);广西植物 研究所基本业务费项目(桂植业 17012,21009,21010);广西喀斯特植物保育与恢复生态学重点实验室基金(19-185-7,19-50-6); 广西植物研究所学科发展基金(桂植发 001,006) [Supported by Science and Technology Major Program of Guangxi (AA18118028); National Natural Science Foundation of China (31760162,41361057); Natural Science Foundation of Guangxi (2020GXNSFBA297048, 2018GXNSFAA050069); Guangxi Major Science and Technology Innovation Base on Karst Dynamics (KDL & Guangxi202004); Basic Business Fee Project of Guangxi Institute of Botany (17012,21009,21010); Fund of Guangxi Key Laboratory of Plant Conservation and Restoration Ecology in Karst Terrain(19-185-7,19-50-6); Construction Fund for Subjects of Guangxi Institute of Botany (001,006)]。 **第一作者:**滕秋梅(1991-),硕士,助理研究员,主要从事土壤生态学和环境修复研究,(E-mail)1037014105@qq.com。

<sup>\*</sup>通信作者: 周龙武,硕士,助理研究员,主要从事土壤微生物与生态学的研究,(E-mail)785989184@qq.com。

# Effects of allelochemical strawberry acid from Allium tuberosum on Fusarium oxysporum f. sp. cubense

## TENG Qiumei<sup>1</sup>, YANG Xiaodong<sup>2</sup>, HE Chengxin<sup>1</sup>, XU Guangping<sup>1,3</sup>, HUANG Yuqing<sup>4</sup>, ZHANG Denan<sup>1</sup>, SUN Yingjie<sup>1</sup>, MOU Haifei<sup>5</sup>, WEI Shaolong<sup>5</sup>, ZHOU Longwu<sup>1\*</sup>

(1. Guangxi Key Laboratory of Plant Conservationand Restoration Ecology in Karst Terrain, Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, Guangxi, China; 2. Luhe middle school of Luhe County, Shanwei 516700, Guangdong, China; 3. Key Laboratory of Karst Dynamics, MNR & GZAR, Institute of Karst Geology, CAGS, Guilin 541004,

Guangxi, China; 4. Key Laboratory of Environment Change and Resources Use in Beibu Gulf, Nanning Normal University, Nanning

530001, China; 5. Biotechnology Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China )

Abstract: Banana Fusarium oxysporum f. sp. cubense is a soil-borne disease, which seriously threatens the sustainable development of banana industry. In order to seek an economic, effective and environmental protection measures, plate and pot experiments were carried out by using allelochemical strawberry acid (SA) to investigate the effects on hypha growth, disease severity index of banana wilt, soil microorganism quantity and soil enzyme activity. The results were as follows: (1) With the increase of SA concentration, the colony growth diameter of Foc4 decreased significantly, which decreased by 49.15% and 70.89% when SA concentrations were 300  $\mu$ L  $\cdot$  L<sup>-1</sup> and 450  $\mu$ L  $\cdot$  L<sup>-1</sup> compared with 150  $\mu$ L  $\cdot$  $L^{-1}$ , respectively, on the fifth day. The number of spores were significantly lower than that of the control treatment (more than 470 times) when SA concentration was 600  $\mu$ L · L<sup>-1</sup> under liquid medium condition. SA had a better inhibitory effect on Foc4 at pH 5 and was significantly better than that at pH 7 and pH 9. (2) As time going, the disease severity index of banana seedlings was significantly lower than that of the control after adding SA. (3) The numbers of soil bacteria, fungi and the total amount of microorganisms were all the highest when SA was 600  $\mu$ L · L<sup>-1</sup>; The number of Foc4 decreased with the increase of SA concentration, and significantly decreased when SA concentration was 1 200  $\mu L \cdot L^{-1}$ . (4) The soil enzyme activity was higher when SA concentration was 600  $\mu L \cdot L^{-1}$ , and was significantly decreased when SA concentration was 1 200  $\mu$ L · L<sup>-1</sup>, the activity of catalase and polyphenol oxidase were lower by 41.88% and 54.82% compared with the control, respectively. (5) Correlation analysis showed that the total amount of soil microorganisms was extremely significantly positively correlated with the numbers of bacteria and fungi. Soil fungi was significantly negatively correlated with actinomycetes. The numbers of soil bacteria, fungi and actinomycetes were all significantly positively correlated with invertase and polyphenol oxidase. Invertase and urease, catalase and polyphenol oxidase were all significantly positively correlated. In general, adding SA at a concentration of 600  $\mu$ L  $\cdot$  L<sup>-1</sup> can better inhibit the hypha growth of Foc4, increase its inhibition rate, and significantly reduce the disease severity index. Meanwhile, it can improve the growth environment of bananas. This study provides an academic reference for the effective use of SA to control banana wilt.

Key words: strawberry acid, allelochemical, banana wilt, Foc4, soil microbial quantity, soil enzyme activity

香蕉(Musa nana)是世界产量第二大的水果, 也是消费量最大的水果之一,目前香蕉枯萎病给 全球香蕉产业带来了较大威胁。香蕉枯萎病又称 巴拿马病,其病原菌主要由尖孢镰刀菌古巴专化 型 4 号生理小种(Fusarium oxysporum f. sp. cubense,Foc4)侵染引起,是一种土传病害(Ploetz, 2015)。香蕉枯萎病主要发生在非洲、南美洲和澳 大利亚以及我国东南沿海各省等香蕉主产区,生 产中尚未有高效的防控措施。目前,防控香蕉枯萎病比较有效的措施是培育抗病品种以及轮作和 套种等(孙雪丽等,2018)。近年来的研究发现,利 用植物间的化感作用可以有效防控由真菌侵染等 引起的土传病害,且对生态环境不会造成二次污 染(Gomes et al.,2017),如西芹的挥发物通过化感 作用能有效抑制黄瓜枯萎病(陈磊等,2012),蚕豆 和小麦间种对蚕豆枯萎病有抑制作用(杨智仙等, 2014),番茄-分蘖洋葱伴生栽培能显著控制灰霉病的发生(吴瑕等,2015)。上述研究成果说明利用化感作用防治病害的发生切实可行,但有关化感作用抗性机理的研究不多(高晓敏等,2014)。

香蕉枯萎病初侵染主要来源于病株残体和带 菌土壤,由于 Foc4 的厚垣孢子可在土壤中存活数十 年,所以抑制土壤中 Foc4 的孢子萌发和菌丝生长可 能是限制 Foc4 在香蕉根系生长和减少香蕉枯萎病 发生的有效措施。前人研究发现,韭菜(Allium tuberosum) (柳红娟等, 2015)、番茄 (Solanum lycopersicum) (刘范等, 2018)、竹荪 (Dictyophora indusiata) (范田娜等, 2019)、木薯 (Manihot esculenta)(廉法卓等,2019)等提取物(含有化感物 质)能够抑制 Foc4 菌丝生长且可降低香蕉枯萎病的 发生,但这些研究仅从某个方面(如抑制菌丝生长) 进行了研究,缺乏较系统的研究。为探明化感作用 防控香蕉枯萎病的作用机制,本研究在前期韭菜挥 发物防治香蕉枯萎病的基础上,选择韭菜代谢产物 2-甲基-2-戊烯醛的衍生物草莓酸(strawberry acid, SA)化感物质(Zhang et al., 2013),通过SA 与Foc4 的互作实验,系统地研究化感物质 SA 对 Foc4 菌丝 生长、香蕉枯萎病病情指数以及对香蕉土壤微生物 数量和土壤酶活性的影响,以期为香蕉枯萎病的防 治提供理论参考。

1 材料与方法

#### 1.1 供试材料

香蕉幼苗为桂蕉 1 号(AAA),由广西壮族自治 区农业科学院生物技术研究所提供;Foc4 为前期实 验室筛选和保存的菌株;供试的 SA(分子式为  $C_6H_{10}O_2$ ,无色透明液体,含量 99%)购自长沙凯美 香精香料有限公司;红壤土、营养土和泥炭土按照 体积1:2:2的比例混合后作为供试土壤。土壤理 化性质:有机质 23.51 g·kg<sup>-1</sup>,全氮 1.12 g·kg<sup>-1</sup>,全 磷 0.66 g·kg<sup>-1</sup>,全钾 15.94 g·kg<sup>-1</sup>,速效氮 179.14 mg·kg<sup>-1</sup>,速效磷 21.48 mg·kg<sup>-1</sup>,速效钾 176.39 mg·kg<sup>-1</sup>,pH 6.44。

#### 1.2 方法

1.2.1 SA 对 Foc4 菌丝生长的影响 配置 SA 母液:用移液枪吸取 1 mL 纯的 SA 溶液至容量瓶,用 灭菌水定容到 100 mL,该溶液中的 SA 浓度为 10 mL · L<sup>-1</sup>。先用移液枪分别吸取该浓度 SA 溶液 0、 1.2、2.4、3.6、4.8 mL 于 5 mL 灭菌的离心管中,再 分别加入一定量的灭菌水使其总体积为 5 mL,混 匀后分别加到 75 mL PDA 培养基中(温度降低至 50 ℃左右时),使其充分混匀后配成含有 SA 浓度 为 0、150、300、450、600 µL · L<sup>-1</sup>(分别记为 CK、A、 B、C、D)的培养基。分装到培养皿,冷却凝固后接 种一块直径为 0.5 cm 的 Foc4 菌饼,置于 28 ℃的 培养箱中培养 7 d,每天测量每个平板上 Foc4 菌落 直径,用以评价 SA 对 Foc4 菌丝的生长抑制情况, 每个处理设置 5 个重复。参考漆艳香等(2007)的 计算公式:

菌落扩展直径(cm)=菌落直径平均值-0.5;

菌丝生长抑制率(%)=(对照组菌落直径-处 理组菌落直径)/对照组菌落直径×100。

1.2.2 液体培养条件下 SA 对 Foc4 菌丝重量和分 生孢子产量的影响 用打孔器在培养一周后的 Foc4 平板上打取直径为 0.5 cm 的 Foc4 菌饼,放入 150 mL 的 PDA 培养基(马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 18 g,水 1 000 mL),每瓶加入 9 mL SA,使 每瓶培养基中含 SA 的浓度为 600 μL · L<sup>-1</sup>,不加 SA 的培养基作为对照处理,每个处理 5 次重复。 在 28 ℃、140 r · min<sup>-1</sup>条件下振荡培养,培养 7 d 后过滤,收集菌丝和滤液,用血球计数板计算 Foc4 的分生孢子产量。

1.2.3 不同 pH 条件下 SA 对 Foc4 菌丝生长的影响 分别用 2 moL · L<sup>-1</sup>的 HCl 和 NaOH 溶液将 PDA 培养基的 pH 调成 5、7、9,分别加入不同浓度 SA 使培养基中的 SA 浓度分别为 0、300、600 μL · L<sup>-1</sup>,后面步骤同 1.2.1。

1.2.4 香蕉枯萎病病情指数的变化 先在 250 mL 的三角瓶中加入 100 mL 的 Czapek 培养基,再加入 5 个直径为 0.5 cm 的 Foc4 菌块, 28 ℃、140 r・ min<sup>-1</sup>下振荡培养, 12 d 后过滤菌丝, 滤液经 8 000 r・min<sup>-1</sup>离心 20 min 后,取上清液无菌过滤, 滤液 即为粗毒素滤液。以添加 SA(SA 终浓度为 600 µL・L<sup>-1</sup>)的粗毒素滤液为处理组,并以未添加 SA 的粗毒素滤液为对照。参考漆艳香等(2007)的方 法,将香蕉幼苗去除根主轴下部 2/3 和须根, 放入 装有 30 mL 粗毒素滤液的培养瓶中, 香蕉苗基部 有 2 cm 浸入液体中,每个瓶子放置 1 株,每个处理 5 个重复,室温下培养。每隔 24 h 观察 1 次处理 的香蕉症状, 调查其发病情况。参考许文耀等 (2004)的方法,将病情级别划分为 6 个等级:0 级,无表现任何症状;1级,叶片出现失水状,轻微 萎蔫,顶端4片叶中有1~2片叶开始变褐;3级, 叶片萎蔫明显,顶端4片叶中有3~4片叶开始变 褐;5级,叶片呈现暗绿色或暗褐色萎蔫;7级,部 分叶片枯死;9级,全株枯死。香蕉枯萎病的计算 公式病情指数:

病情指数 =  $\Sigma$ (各级病株数 × 各级代表值)/ (总株数 × 最高级代表值) × 100%。

1.2.5 土壤微生物数量及土壤酶活性的变化特 征 实验于人工气候箱中进行。Foc4 培养 2 周 后,用移液枪吸取无菌水反复吹打菌落,用灭菌后 的玻璃涂布棒刮取 Foc4 的孢子到无菌水中,过滤 后,利用微型旋涡混合仪,使孢子悬液振荡均匀, 用血球计数板,统计菌液的孢子含量,无菌水稀释 后使孢子悬液浓度约为10<sup>6</sup> cfu·mL<sup>-1</sup>。香蕉苗(展 叶期,有5片叶)种植于装有1.25 kg 自然土(无枯 萎病原菌)的小花盆中,香蕉枯萎病病原菌采用灌 根接菌法。实验设计有4个处理,分别为CK、A、 B、C。每个处理均先加入 50 mL Foc4 菌液,再加 入 100 mL 浓度分别为 0、300、600、1 200 µL・L<sup>-1</sup> 的 SA 溶液,其中 CK 的 0 μL・L<sup>-1</sup>以无菌水代替。 施加 SA 的处理每隔 4 d 加 1 次。每个处理 10 盆 香蕉苗,接菌半个月后采集对照及各处理的土壤 并检测其土壤微生物数量、Foc4 数量变化和土壤 酶活性。

土壤细菌、真菌和放线菌的数量通过稀释平 板计数法(许光辉和郑洪元,1986)测定,采用的培 养基分别为牛肉膏蛋白胨、改良高氏1号(苯酚 500 mg·L<sup>-1</sup>)和马丁(Martin)孟加拉红-链霉素 (链霉素 30 mg·L<sup>-1</sup>)。计算方法(细菌 10<sup>6</sup>个·g<sup>-1</sup> 干土,真菌 10<sup>4</sup>个·g<sup>-1</sup>干土,放线菌 10<sup>3</sup>个·g<sup>-1</sup>干 土):每克样品的菌数=同一稀释度几次重复的菌 落平均数×稀释倍数。Foc4 数量的测定参考 Smith 等(2008)的方法,采用 Komada 改良培养基,即培 养基成分为 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g、Fe-Na-EDTA 0.01 g、 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g、L-天门冬酰胺 2 g、D-半乳糖 15 g、灭菌水1L;抗生素类为二硝基苯 1 g、牛胆 盐 0.5 g、四硼酸钠 1 g、硫酸链霉素 0.3 g。培养基 调节 pH 至(3.8±0.2)。以 cfu·g<sup>-1</sup>干土表示。

土壤脲酶、蔗糖酶、酸性磷酸酶、蛋白酶、过氧 化氢酶、多酚氧化酶活性的测定分别用苯酚钠比 色法、3,5-二硝基水杨酸比色法、磷酸苯二钠比色 法、茚三酮比色法、高锰酸钾滴定法、碘量滴定法 (关松荫,1986)。

#### 1.3 数据分析

使用 Excel 2016 软件进行统计分析;用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA),并用最小显著差数法(least significant difference,LSD)进行差异显著性检验(显著性水平 设定为 $\alpha$ <0.05,极显著水平设定为 $\alpha$ <0.01),采用 皮尔森(Pearson)法进行相关性分析。

#### 2 结果与分析

#### 2.1 不同培养浓度下 SA 对 Foc4 菌丝生长的影响

0(CK)、150、300、450、600 μL·L<sup>-1</sup>的 SA 在平 板上处理7d 的结果如图1和表1所示。经CK、 A、B和C处理后,随着时间的延长,同一浓度培养 下Foc4的菌落直径均显著增加(P < 0.05),第5 天相比第3天分别增加了41.43%、48.20%、 58.36%、57.14%;在同一培养时间,随着 SA 浓度 的增加,Foc4菌落直径则显著减小(P < 0.05),第 5天时,B、C比A分别减少了49.15%、70.89%。 经D处理后,Foc4菌落直径随着时间的增加均没 有变化,说明该 SA 浓度对香蕉枯萎病病原菌的菌 落具有显著抑制效果。

#### 2.2 不同培养时间下 SA 对 Foc4 的抑制作用

由图 2 可知,随着 SA 处理浓度的升高,抑制 作用越大;第 3 天时,B、C、D 处理的抑制率比 A 处 理分别提高了 49.21%、55.47%、57.29%,且彼此 间的差异均显著(*P* < 0.05);第 1 天至第 7 天,SA 浓度为 D 时,抑制率始终达 100%。另外,随着培 养时间延长,SA 对 Foc4 的抑制作用随之减弱,且 呈现 SA 浓度越小抑制率降低越快的趋势,第 7 天 时,浓度为 A、B、C 处理的抑制率比第 4 天分别下 降了 62.22%、32.41%、23.15%。结果表明,SA 对 Foc4 的抑菌效果随着培养时间延长而减弱。

## 2.3 液体培养条件下, SA 对 Foc4 菌丝和孢子产量的影响

由表 2 可知,液体培养条件下添加浓度为 600 μL·L<sup>-1</sup>的 SA 后,Foc4 孢子数量显著低于 CK 处理 (相差 470 多倍),菌丝干重仅为 0.008 g,说明产 生的菌丝和孢子极少,表明添加 SA 显著抑制了菌 丝干重增加和减少了培养基中孢子数量。



CK 为对照, 未添加 SA; A、B、C、D 代表 SA 浓度分别为 150、300、450、600 μL·L<sup>-1</sup>。下同。 CK is the control without SA; A, B, C and D represent SA concentrations of 150, 300, 450, 600 μL·L<sup>-1</sup>, respectively. The same below.

图 1 不同浓度 SA 对 Foc4 菌落生长的影响 (7 d)

Fig. 1 Effects of different concentrations of SA on colony growth of Foc4 (7 d)

#### 表 1 添加不同浓度 SA 后 Foc4 菌落生长的变化

Table 1Changes of Foc4 colony growth after<br/>adding different concentrations of SA

处理	菌落直径 Colony diameter (cm)						
Treatment	3 d	5 d	7 d				
СК	4.41±0.17a	7.53±0.06a	9.01±0.62a				
А	$2.74{\pm}0.39\mathrm{b}$	$5.29{\pm}0.43{\rm b}$	$7.81{\pm}0.35{\rm b}$				
В	$1.12\pm0.14c$	$2.69{\pm}0.15{\rm c}$	$4.64{\pm}0.39{\rm c}$				
С	$0.66{\pm}0.01{\rm d}$	$1.54{\pm}0.09{\rm d}$	$3.13 \pm 0.12 \mathrm{d}$				
D	$0.50{\pm}0{\rm d}$	$0.50\pm0e$	$0.50\pm0e$				

注:不同小写字母表示各处理在 0.05 水平差异显著。下同。 Note: Different small letters indicate significant differences among treatments at 0.05 level. The same below.

#### 表 2 SA 对 Foc4 孢子数量和菌丝干重的影响

Table 2Effects of SA on spore numberand hypha dry weight of Foc4

处理 Treatment	孢子数量 Number of spores (cfu・mL <sup>-1</sup> )	菌丝干重 Dry weight of hypha (g)		
СК	$(7.58 \pm 1.03) \times 10^{7} a$	0.300±0.03a		
SA	$(1.6\pm0.29)\times10^{5}{ m b}$	$0.008 \pm 0.00013 \mathrm{b}$		

#### 2.4 不同 pH 条件下 SA 对 Foc4 菌丝生长的影响

由图 3 可知,当浓度为 300 μL · L<sup>-1</sup>、pH 为 5 时,SA 对 Foc4 菌丝的抑制作用最大,随着 pH 增 加,抑制率显著下降,pH 为 9 时的抑菌率较 pH 为 5 时低 52.68%;当 SA 浓度为 600 μL · L<sup>-1</sup>、pH 为 5 时的抑制率也是最高(100%)。可见,pH 不同,SA 对 Foc4 菌丝的抑菌率有差异,且偏酸性环境下 (pH 为 5)的抑制作用更强。



不同小写字母表示各处理在 0.05 水平差异显著。下同。 Different small letters indicate significant differences among treatments at 0.05 level. The same below.

图 2 添加不同浓度 SA 后 Foc4 抑制率随时间的变化 Fig. 2 Changes of the inhibition rate of Foc4 with time after adding different concentrations of SA

#### 2.5 SA 对香蕉幼苗枯萎病病情指数的影响

随着时间的延长,香蕉苗发病程度越来越严重(图4:A),病情指数逐渐增加(图4:B)。粗毒素处理48h时,CK的香蕉幼苗叶片出现萎蔫,而添加SA的叶片表现正常(不萎蔫),病情指数相比CK降低了60%;处理96h时,CK植株呈现严重萎蔫,植株部分叶片有些枯死,其病情趋向严重,添加SA的病情指数显著低于CK;处理96h和120h较CK分别降低了41.67%、40.00%,说明添加SA在很大程度上降低了香蕉苗枯萎病的发病程度。



图 3 不同 pH 梯度下添加 SA 后 Foc4 抑制率的变化 Fig. 3 Changes of the inhibition rate of Foc4 after adding SA under different pH conditions

#### 2.6 SA 对土壤微生物数量的影响

不同类型微生物数量随 SA 浓度的变化表现有 差异性(图5:H、I、J、K、L)。微生物总量(图5:H) 在SA浓度为A和B时显著升高,C处理显著低于 CK、A、B处理。细菌数量(图5:I)的表现规律与微 生物总量相似,与 CK 相比,细菌数量在 SA 浓度为 A 时显著升高, B 浓度达最大值(与 CK 相比增幅为 20.67%),C浓度显著降低,不同浓度间的差异均显 著(P<0.05)。真菌数量(图 5:J)在 A 浓度时降低 且与 CK 无显著差异, B 浓度显著升高并达最大值 (增幅为19.34%),C浓度显著低于其他浓度,不同 浓度间的差异均显著(P<0.05)。放线菌数量(图 5:K)则为 A 浓度时显著升高(相比 CK 增幅为 42.58%),B、C浓度降低且均显著低于CK。总体而 言,细菌、真菌和放线菌的数量在 C 浓度处理时均 显著低于 CK,这表明高浓度的 SA 对土壤微生物有 抑制作用,显著降低了土壤微生物的数量。





SA 施到 Foc4-香蕉-土壤系统的结果表明, Foc4 数量(图 5:L)随 SA 浓度的增加而降低,当浓 度达到 C(1 200 μL・L<sup>-1</sup>)时,Foc4 的数量显著低 于 CK(降低了 26.75%),说明 SA 能抑制 Foc4 数 量的增加,且高浓度的抑制作用更显著。

#### 2.7 SA 对土壤酶活性的影响

添加 SA 后,土壤酶活性差异明显(图 6:M、N、 O、P、Q、R)。土壤脲酶、蔗糖酶、酸性磷酸酶和蛋白 酶活性的变化特征一致,在 A、B 处理均趋于增大, 特别是在 B 处理时均显著提高(*P*<0.05),较 CK 分 别提高了 18.52%、36.20%、28.57%、14.29%, C 处理 时均显著降低。而在 A 处理时土壤过氧化氢酶和 多酚氧化酶活性也是趋于增大,但在 B 处理时均趋 于减小, C 处理时均显著降低; 与 CK 相比 C 处理的 降幅分别为 41.88%、54.82%(P<0.05)。总体上, 土壤 酶活性随 SA 浓度的变化呈现"低促进高抑制"现象。

#### 2.8 土壤微生物数量与土壤酶活性的相关性分析

在接有 Foc4 的条件下,添加 SA 后香蕉土壤 微生物数量和土壤酶活性之间存在一定的相关性 (表3)。土壤微生物总量与细菌、真菌数量极显







著正相关(P<0.01),与蔗糖酶、酸性磷酸酶、多酚 氧化酶显著正相关(P<0.05)。土壤细菌数量与蔗 糖酶、酸性磷酸酶、多酚氧化酶显著正相关(P< 0.05),土壤真菌与放线菌显著负相关(P<0.05), 与蔗糖酶、多酚氧化酶活性显著正相关(P<0.05); 土壤放线菌与蔗糖酶、蛋白酶、多酚氧化酶活性呈 显著正相关(P<0.05)。蔗糖酶与脲酶显著正相关 (P<0.05),与酸性磷酸酶、多酚氧化酶均显著负相 关(P<0.05);过氧化氢酶与多酚氧化酶显著负相 关(P<0.05)。这说明土壤微生物数量和土壤酶活 性互相影响,同时受土壤微生物区系的双重调节。 Foc4 的数量与细菌、放线菌、微生物总量具有显著 的正相关关系,而与其他 6 种酶和真菌的相关性 均不显著。

#### 3 讨论与结论

在水稻根系分泌物中,提取的化感物质对西 瓜枯萎病菌的孢子形成和萌发有抑制作用(Ren et al.,2016),2,4-二叔丁基苯酚显著抑制了番茄叶 霉病菌的孢子萌发和菌丝生长(周宝利等,2013)。 本研究与上述研究结果类似。以前期实验中从韭 菜浸提液分离出的化感物质 2-甲基-2-戊烯醛的 衍生物——SA 为材料(Zhang et al.,2013),本研究 结果表明,SA 显著抑制了 Foc4 菌丝的生长。相对 于对照,添加 SA 显著抑制了 Foc4 菌丝生长、减小 了 Foc4 的菌落直径以及降低了孢子数量,说明 SA 对 Foc4 菌丝的生长具有一定的化感效应,SA 可能



图 6 称加尔阿依度 SA 向上集时值性的响应 Fig. 6 Responses of soil enzyme activities after adding different concentrations of SA

会通过抑制 Foc4 菌丝的生长以及抑制孢子数量的 增加,从而降低香蕉枯萎病的发生或蔓延。本研 究结果与 Zhang 等(2013)和黄永红等(2011)的实 验结果一致,进一步证明韭菜化感物质对香蕉枯 萎病的发生有一定的抑制效果。SA 对 Foc4 菌丝 具有一定的化感作用,主要原因可能是韭菜属于 葱属植物,其提取物中含有硫化合物对 Foc4 具有 抑制作用(杨静美等,2014;Gao et al.,2020)。

化感物质对病原菌的生长具有一定的抑制作 用,所有化感物质的抑制作用几乎都与其浓度有 关(Kravchenko et al.,2003)。不同浓度 SA 对 Foc4 的抑制情况有所差异,Foc4 菌落生长直径随着 SA 浓度的增加显著减小,抑制率随之升高,液体培养 条件下 SA 浓度为 600 μL・L<sup>-1</sup>的孢子数量显著低 于对照,说明 SA 与培养基混合后浓度在 600 μL・ L<sup>-1</sup>及以上时对 Foc4 抑制效果最佳,而在小于此浓 度条件下,随着实验时间的持续,SA 对 Foc4 的抑 制效果则趋于减弱。此结果一方面与病原菌 Foc4 本身的生物学特性有关,SA 达不到抑制 Foc4 的临 界浓度时,会对低浓度 SA 产生抗性。这说明一定 浓度的韭菜粗提液能抑制 Foc4 菌丝生长和孢子数 量增加,从而提高抑制率。这可能是草莓酸有效 防控香蕉枯萎病的主要机制。

另外,林妃等(2010)的研究表明,pH为5时 最适合 Foc4 的菌丝生长,在 pH 6~7 时菌丝生长 最快。本研究得出,不同 pH 条件下,SA 对 Foc4 菌丝的抑制作用有差异,当 pH 为5 时抑制率显著 大于 pH 为7 和9,说明 pH 为5 时(即酸性环境 下)SA 对 Foc4 菌丝的抑制作用可能更好。在实际 农田中,香蕉连作会引起土壤向偏酸性发展,也说 明 Foc4 趋向于生长在偏酸环境。通过添加外源化 感物质 SA 来抑制香蕉枯萎病的发生,且 SA 还是 在最适合 Foc4 菌丝生长的条件下发挥较好的作 用,这在香蕉枯萎病防治上具有良好的应用前景。 本研究不足的是,对菌丝生长所设置的 SA 最终浓度只到 600 µL·L<sup>-1</sup>,结合后面的实验结果,应当在 600 µL·L<sup>-1</sup>后加大最大浓度;只分析了 SA 对 Foc4 菌落和菌丝以及孢子数量影响的结果,应增加孢子萌发实验结果的分析,以使得研究内容更全面; SA 是韭菜挥发物中的衍生物,在环境中易挥发 (Zhang et al.,2013),这就导致 SA 对 Foc4 的实验 结果可能会随着时间的变化而改变。为了提高 SA 的有效性,在今后的生产实践中可以提高 SA 微胶 囊化等技术,更有利于香蕉枯萎病的防控。

土壤微生物数量与土传病害的发生和防控具 有紧密的联系(廖咏梅等,2020)。袁秀梅等 (2016)研究发现,蚕豆根系化感物显著影响土壤 微生物数量和种群结构变化。本研究结果表明, 在接有 Foc4 的条件下,与未添加化感物质 SA 相 比,添加 SA 后香蕉苗土壤细菌、真菌和放线菌的 数量发生显著变化,说明化感物 SA 对香蕉土壤微 生物区系具有化感效应。SA浓度不同,对不同种 土壤微生物的数量影响有差异。其中,放线菌仅 在 300 μL·L<sup>-1</sup>处理时显著升高,其他处理时显著 低于对照,而细菌和真菌均在 600 µL·L<sup>-1</sup>处理时 显著升高,1 200 µL·L<sup>-1</sup>处理时显著降低。另外, Foc4 的数量随 SA 浓度的升高呈降低的趋势。此 结果与杨阳等(2013)的研究结果类似,其研究表 明分蘖洋葱根系化感物增加了黄瓜土壤细菌和放 线菌的数量,降低了尖镰孢菌的数量;韩春梅等 (2010)也得出类似的结论。本研究中,可能是 SA 进入土壤后,对某些微生物具有趋化作用,可能会 增加一些有益菌群的数量,减少有害菌群的数量, 同时打破土壤微生物区系的平衡,削弱或消除有 益菌群和有害菌群的拮抗作用,从而影响植物或 植物与微生物的互作,这可能是减缓香蕉枯萎病 发生的原因之一,与 Zhou 等(2012)结论相一致。 因此,进一步研究不同浓度 SA 对香蕉土壤生物地 球化学元素性质所造成的影响,将有助于进一步 深入探讨 SA 化感作用的机理。

SA 对土壤酶活性存在一定的影响,与土壤微 生物数量相似,添加不同浓度 SA,香蕉土壤酶活性 随 SA 浓度的增加而增加,达到一定浓度后下降, 表现出"低促高抑"的现象。与本研究结果相似, 刘苹等(2013)的研究指出,花生所生长的土壤酶 活性在低含量脂肪酸处理时增加,高含量脂肪酸 处理时显著降低。而与韩春梅等(2010)、Chen 等 (2009)研究结果有所不同,其指出土壤酶活性随 香草醛等化感物质含量的增加而增强。不同研究 结果有差异,一方面可能是所研究的化感物质和 植物不同;另一方面可能是土壤微生物是土壤酶 的主要来源之一,其数量的变化可能会影响土壤 酶活性的改变。本研究中,当 SA 浓度为 1 200 μL·L<sup>1</sup>处理时,土壤细菌、真菌和放线菌的数量均 显著降低,这与该浓度下土壤酶活性显著较低相 一致,且相关性分析得出,土壤细菌、真菌和放线 菌数量均与蔗糖酶、多酚氧化酶等显著正相关,此 研究结果与韩春梅等(2012)相似。因此,本研究 中化感物质 SA 对香蕉土壤的微生物和酶活性均 表现出浓度效应的差异性,对香蕉生长的影响可 能是直接作用和间接作用的综合表现。

化感物质与抗病特性存在相关性。大葱根系 分泌物能提高土壤微生物的多样性,对枯萎病菌 的萌发有明显的抑制作用(时伟等,2014)。李蕾 等(2009)的研究表明,除1%浓度处理外,其余浓 度的西芹鲜根乙醇浸提液对黄瓜枯萎病菌均有显 著或极显著的化感抑制作用。茄子黄萎病抗病性 与根际土壤中放线菌数量,与土壤多酚氧化酶、过 氧化氢酶、脲酶、蛋白酶活性正相关(周宝利等, 2013)。与前人的研究结果略有不同,本研究中 Foc4 数量随 SA 浓度的升高呈降低的趋势,到 1 200 μL·L<sup>-1</sup>时显著降低,可见该浓度 SA 对 Foc4 具有显著抑制效果;相关性分析表明,添加 SA 后 土壤 Foc4 数量与细菌、放线菌、微生物总量具有显 著相关性,与土壤酶和真菌的相关性未达到显著 水平。土壤微生物是土壤酶的主要来源(关松荫, 1986),土壤微生物数量的改变是香蕉枯萎病发病 后的重要特征(邓晓等,2011)。而香蕉枯萎病是 由 Foc4 侵染香蕉维管束引起的系统性病害.因为 Foc4 土壤种群密度与病害危害程度呈正相关(吴 小燕等,2013),所以 Foc4 数量的减少在很大程度 上说明香蕉枯萎病的发病率在降低,表明化感物 质 SA 在一定程度上对香蕉枯萎病具有抑制作用。 另外,本研究在平板实验中,当 SA 浓度为 600 μL·L<sup>-1</sup>时对 Foc4 的菌丝生长具有显著的抑制效 果,而在盆栽实验中,与对照相比,当用该浓度处 理时,土壤微生物总量、细菌、真菌数量也显著升 高,而 Foc4 的数量无显著差异,当 SA 浓度为1 200  $\mu L \cdot L^{-1}$ 时, Foc4的数量显著降低。可见, SA 对 Foc4 的影响因基质不同而有差异。可能是当 SA

#### 表 3 土壤微生物数量与土壤酶活性的相关性分析

Table 3 Correlation analysis of soil microorganism quantities and soil enzyme activities

项目 Item	细菌 Bacteria Ac	放线菌 ctinomyces	真菌 Fungi	微生物总量 Total of microbes	Foc4	脲酶 Urease	蔗糖酶 Invertase	酸性 磷酸酶 Acid phosphatase	蛋白酶 Proteinase	过氧化 氢酶 Catalase	多酚 氧化酶 Polyphenol oxidase
细菌 Bacteria	1										
放线菌 Actinomyces	0.134	1									
真菌 Fungi	0.968	-0.034*	1								
微生物总量 Total of microbes	1.000**	0.926	0.968*	** 1							
Foc4	0.847*	0.307*	0.884	0.846*	1						
脲酶 Urease	0.908	0.412	0.888	0.907	0.974	1					
蔗糖酶 Invertase	0.989*	0.195*	0.972*	* 0.989*	0.916	0.957*	1				
酸性磷酸酶 Acid phosphatase	0.985*	0.236	0.911	0.985*	0.791	0.887	-0.964	* 1			
蛋白酶 Proteinase	0.782	0.695*	0.693	0.778	0.868	0.939	0.835	0.810	1		
过氧化氢酶 Catalase	0.164	0.886	0.107	0.161	0.539	0.544	0.281	0.195	0.733	1	
多酚氧化酶 Polyphenolo xidase	0.199*	0.942*	0.099*	* 0.887*	0.507	0.545	-0.293	* 0.244	0.762	-0.990	* 1

注·\* P<0.05. \*\* P<0.01。

Note: \* *P*<0.05, \*\* *P*<0.01.

进入土壤后,其影响着土壤微生物组分,潜在地影 响着植物以及植物和微生物的相互作用(韩春梅 等,2012);因为培养基和土壤是两个不同的基质, 所以 SA 发挥显著效果所需要的量一般会有不同。 本研究先在培养基上找出 SA 发挥作用的最适浓 度,再应用于土壤(同时选择了最适浓度的 0.5 倍 和 2 倍一起实验),进一步探索施用 SA 对土壤生 态环境的影响。本研究结果发现,600 μL·L<sup>-1</sup>以 上高浓度时,SA 对 Foc4 的菌丝生长和数量具有一 定的抑制作用,且对土壤微生物和酶活性也产生 了影响,但培养基上得出的 SA 对 Foc4 影响的最 适浓度与在土壤中的不完全一致。因此,SA 对 Foc4 在大田实验下的最佳表现还需进一步开展 研究。

综上所述,韭菜挥发性物质 SA 能有效地抑制 香蕉枯萎病病原菌的生长,抵御病原菌侵染寄主, 且被施用后容易降解,对环境危害小,为人们开发 杀菌剂提供了新思路。该物质对 Foc4 病原菌有 显著的抑制作用,改善了香蕉土壤生态系统环境, 可以为农药领域提供一种高效且无毒的天然源杀 菌剂。为了能够在生产上大面积推广使用 SA 技 术防控香蕉枯萎病,SA 对土壤生物活性起重要调 控作用的最适浓度及其分子作用机理等需要进一 步的研究。

在纯培养条件和有植物存在的条件下,SA 对 Foc4 均具有化感效应,说明化感物质 SA 在香蕉枯 萎病病害的防治上具有一定的应用潜力。SA 浓 度的增加对 Foc4 菌丝的生长抑制作用随之增加, 偏酸性条件下 SA 对 Foc4 的抑制效果更好,添加 SA 后显著降低了香蕉幼苗的病情指数。600 μL・ L<sup>-1</sup>及以上浓度的 SA 对 Foc4 的菌丝生长具有良好 的抑制效果,SA 浓度达到 1 200 μL・L<sup>-1</sup>时,土壤 中 Foc4 的数量显著降低,土壤微生物数量的增加 和酶活性的提高也被显著抑制了。由于土壤环境 是十分复杂的缓冲系统,且 SA 容易挥发、在土壤 中的半衰期短,因此同样浓度抑制 Foc4 的效果在 室内培养基纯培养的条件下比实际土壤中的作用 效果要显著。 致谢 感谢广西特聘专家 Azim Mallik 对本研 究实验设计的悉心指导!

#### 参考文献:

- CHEN L, LI L, XIANG PY, et al., 2012. Allelopathy of parsley volatiles on *Fusarium oxysporium* f. sp. *cucumeris* [J]. Chin J Ecol, 31(4): 877-881. [陈磊, 李蕾, 项鹏 宇, 等, 2012. 西芹挥发物对黄瓜枯萎病菌的化感作用 [J]. 生态学杂志, 31(4): 877-881.]
- CHEN SL, ZHOU BL, WANG RH, et al., 2009. Effects of grafted eggplants on allelopathy of cinnamic acid and vanillin in root exudates [J]. J Appl Hortic, 11(2): 119–122.
- DENG X, LI QF, HOU XW, et al., 2011. The ecological characteristics of culturable microbes isolated from infected soil by *Fusarium* wilt of banana [J]. Chin J Trop Crop, 32 (2): 283-288. [邓晓, 李勤奋, 侯宪文, 等, 2011. 香蕉 枯萎病区土壤可培养微生物生态特征 [J]. 热带作物学 报, 32(2): 283-288.]
- FAN TN, SUN XL, HAO XY, et al., 2019. Inhibitory effect of tomato crude extracts on banana *Fusarium* wilt pathogen FocTR4 [J]. Subtrop Agric Res, 15(1): 52–57. [范田娜, 孙 雪丽, 郝向阳, 等, 2019. 番茄粗提物对香蕉枯萎病菌 Foc4 的抑制效果 [J]. 亚热带农业研究, 15(1): 52–57.]
- GAO XM, LI K, MA ZL, et al., 2020. Cucumber *Fusarium* wilt resistance induced by intercropping with celery differs from that induced by the cucumber genotype and is related to sulfur-containing allelochemicals [J]. Sci Hortic, 271: 109475.
- GAO XM, WANG JG, MA LG, et al., 2014. Research advances on the mechanism of pathogenesis and allelopathy of *Fusarium oxysporium* [J]. Microbiol Chin, 41 (10): 2143-2148. [高晓敏, 王琚钢, 马立国, 等, 2014. 尖孢镰 刀菌致病机理和化感作用研究进展 [J]. 微生物学通报, 41(10): 2143-2148.]
- GOMES MP, GARCIA QS, BARRETO LC, et al., 2017. Allelopathy: An overview from micro- to macroscopic organisms, from cells to environments, and the perspectives in a climate-changing world [J]. Biologia, 72 (2): 113–129.
- GUAN SY, 1986. Soil enzymes and their research methods [M]. Beijing: Agricultural Press: 211-213. [关松荫, 1986. 土壤酶及其研究方法 [M]. 北京:农业出版社: 211-213.]
- HAN CM, LI CL, YE SP, et al., 2012. Effects of ginger aqueous extract on soil enzyme activity, microbial community structure and soil nutrient content in the rhizosphere soil of ginger seedlings [J]. Acta Ecol Sin, 32(2): 489-498. [韩 春梅,李春龙,叶少平,等, 2010. 生姜水浸液对生姜幼 苗根际土壤酶活性、微生物群落结构及土壤养分的影响 [J]. 生态学报, 32(2): 489-498.]
- HUANG YH, WEI YR, ZUO CW, et al., 2011. Effect of Chinese leek on *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* growth and

*Fusarium* wilt incidence in banana [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 31(9): 1840-1845. [黄永红,魏岳荣, 左存武,等, 2011. 韭菜对香蕉枯萎病菌生长及香蕉枯萎病发生的抑制作用 [J]. 西北植物学报, 31(9): 1840-1845.]

- KOMADA H, 1975. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil [J]. Rev Plant Prot Res, 8: 114-124.
- KRAVCHENKO LV, AZAROVA TS, LEONOVA-ERKO EI, 2003. Root exudates of tomato plants and their effect on the growth and antifungal activity of Pseudomonas strains [J]. Microbiology, 7: 37–41.]
- LI L, HAN Y, YUN XF, 2009. Researches of allelopathy of the ethanol extract of the root of parsley on *Fusarium oxysporium* f. sp. *cucumeris* [J]. J Inn Mongolia Agric Univ (Nat Sci Ed), 30(4): 42-46. [李蕾, 韩燕, 云兴福, 2009. 西芹鲜 根乙醇浸提液对黄瓜枯萎病菌化感作用的研究 [J]. 内 蒙古农业大学学报(自然科学版), 30(4): 42-46.]
- LIAN FZ, XUE RR, LIN XH, et al., 2019. Inhibitory effects of aqueous leachates and volatiles from *Allium tuberosum* and *Ageratum conyzoides* on *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* [J]. J S Chin Agric Univ, 40(4): 40-46. [廉法卓, 薛蓉 蓉, 林娴慧, 等, 2019. 韭菜和胜红蓟水浸提液和挥发物 对香蕉枯萎病菌的抑制作用 [J]. 华南农业大学学报, 40(4): 40-46.]
- LIAO YM, HUANG YTJ, ZOU CW, et al., 2020. Analysis of fungi diversity in root zone soil of banana plants [J]. Guihaia, 40(1): 99-107. [廖咏梅, 黄元腾吉, 邹承武, 等, 2020. 香蕉植株根区土壤的真菌多样性分析 [J]. 广 西植物, 40(1): 99-107.]
- LIN F, GAO J, ZENG T, et al., 2010. Isolation and identification of banana vasicular wilt in Hainan Province and determination of biological characteristics of strains Focr1 and Focr4 [J]. Genom and Appl Biol, 29(2): 314– 321. [林妃, 高剑, 曾涛, 等, 2010. 海南省香蕉枯萎病病 原菌的分离鉴定及 1 号、4 号小种的生物学特性 [J]. 基 因组学与应用生物学, 29(2): 314–321.]
- LIU F, LIU JP, XIANG LL, et al., 2018. Inhibitory effect of bamboo fungus crude extracts on banana Fusarium wilt pathogen [J]. J Fujian Agric Sci, 33(11): 47-51. [刘范, 刘嘉鹏, 项蕾蕾, 等, 2018. 竹荪粗提物对香蕉枯萎病菌 FocTR4 的 抑制效果 [J]. 福建农业学报, 33(11): 47-51.
- LIU HJ, HUANG J, LIU ZF, et al., 2015. Allelopathic effects of extracts from cassava organ on *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in banana [J]. Guangdong Agric Sci, 42(6): 66-69. [柳红娟, 黄洁, 刘子凡, 等, 2015. 木薯器官浸提 液对香蕉尖孢镰刀菌的化感作用 [J]. 广东农业科学, 42(6): 66-69.]
- LIU P, ZHAO HJ, ZHONG ZW, et al., 2013. The effects of three root exudated fatty acids on peanut (*Arachis hypogaea* L.) growth and soil enzymes activities [J]. Acta Ecol Sin, 33(11): 3332-3339. [刘苹,赵海军,仲子文,等, 2013. 三种根系分泌脂肪酸对花生生长和土壤酶活性的影响 [J]. 生态学报, 33(11): 3332-3339.]

- PLOETZ RC, 2015. Management of Fusarium wilt of banana: A review with special reference to tropical race 4 [J]. Crop Prot, 73: 7-15.
- QI YX, ZHANG X, PU JJ, et al., 2007. Inactivation effect of 10 compounds on *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and its toxin [J]. J Fruit Sci, 25(1): 78-82. [漆艳香, 张欣, 蒲 金基, 等, 2007. 10 种化合物对香蕉枯萎病菌的抑菌作用 及对毒素钝化的效果 [J]. 果树学报, 25(1): 78-82.]
- REN LX, HUO HW, ZHANG F, et al., 1986. The components of rice and watermelon root exudates and their effects on pathogenic fungus and watermelon defense [J]. Plant Sig Behav, 60: 1187357–1187359.
- SHI W, SHEN TR, WEI M, et al., 2014. Effects of rotation with welsh onion on microbial diversity in rhizosphere soil of cucumber in greenhouse [J]. Shandong Agric Sci, 7: 72-77. [时伟, 申太荣, 魏珉, 等. 大葱轮作对温室黄瓜根际 土壤微生物多样性的影响 [J]. 山东农业科学, 7: 72-77.]
- SMITHL J, SMITH MK, TREE D, et al., 2008. Development of a small-plant bioassay to assess banana grown from tissue culture for consistent infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* [J]. AUS Plant Pathol, 37(2): 171-179.
- SUN XL, HAO XY, WANG TC, et al., 2018. Researches on the control and disease resistance breeding of Banana Fusarium Wilt Disease [J]. J Fruit Sci, 35(7): 870-879. [孙雪丽, 郝向阳, 王天池, 等, 2018. 香蕉枯萎病防 控和抗病育种研究进展[J]. 果树学报, 35(7): 870-879.]
- WU X, WU FZ, ZHOU XG, 2015. Effect of intercropping with tillered onion on mineral nutrient uptake and gray mold disease occurrence of tomato [J]. Plant Nutr Fert Sci, 21 (3): 734-742. [吴瑕, 吴凤芝, 周新刚, 2015. 分蘖洋葱 伴生对番茄矿质养分吸收及灰霉病发生的影响 [J]. 植物营养与肥料学报, 21(3): 734-742.]
- WU XY, LIU WB, YANG TY, 2013. The correlation of the disease severity of banana *Fusarium* wilt and the population density of the pathogen in soil [J]. Chin J Trop Crop, 34 (9): 1761-1769. [吴小燕, 刘文波, 杨廷雅, 等. 香蕉枯萎病危害程度与土壤病菌种群密度的相关性分析 [J]. 热带作物学报, 34(9): 1761-1769.]
- XU GH, ZHENG HY, 1986. Handbook of soil microbiological analysis methods [M]. Beijing: Agricultural Press: 249. [许光辉,郑洪元, 1986. 土壤微生物分析方法手册 [M]. 北京:农业出版社: 249.]
- XU WY, WU XH, LIN CH, 2004. The toxicity of thecrude toxin of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and its model

[J]. Chin J Trop Crop, 25(4): 25-29. [许文耀, 兀旭辉, 林成辉, 2004. 香蕉枯萎病菌粗毒素的毒性及其模型 [J]. 热带作物学报, 25(4): 25-29.]

- YANG JM, WANG Q, WU HM, et al., 2014. Toxicity of sulfocompounds in *Alliums* on *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and compound microencapsulation [J]. J Fruit Sci, 30(6): 1040 - 1046. [杨静美,王强,伍惠媚,等, 2014. 葱属植物中的含硫化合物对香蕉枯萎病菌的毒力 测定及微胶囊化 [J]. 果树学报, 30(6): 1040-1046.]
- YANG Y, LIU SW, PAN K, et al., 2013. Effects of Chinese onion's root exudates on cucumber seedlings growth and rhizosphere soil microorganisms [J]. Chin J Appl Ecol, 24 (4):1109-1117. [杨阳, 刘守伟, 潘凯, 等, 2013. 分蘖 洋葱根系分泌物对黄瓜幼苗生长及根际土壤微生物的影 响 [J]. 应用生态学报, 24(4):1109-1117.]
- YANG ZX, TANG L, ZHENG Y, et al., 2014. Effects of different wheat cultivars intercropped with faba bean on faba bean Fusarium wilt, root exudates and rhizosphere microbial community functional diversity [J]. Plant Nutr Fert Sci, 3: 570-579. [杨智仙, 汤利, 郑毅, 等, 2014. 不同品种小麦 与蚕豆间作对蚕豆枯萎病发生、根系分泌物和根际微生 物群落功能多样性的影响 [J]. 植物营养与肥料学报, 3: 570-579.]
- YUAN XM, GENG SN, ZHENG MY, et al., 2016. Effects of faba bean (*Vicia faba* L.) root exudate on soil available nutrients and microbial population in different purple soils [J]. Chin J Eco-Agric, 24(7): 910-917. [袁秀梅, 耿赛 男, 郑梦圆, 等, 2016. 蚕豆根分泌物对紫色土有效养分 及微生物数量的影响 [J]. 中国生态农业学报, 24(7): 910-917.]
- ZHANG H, MALLIK A, ZENG RS, 2013. Control of Panama disease of banana by rotating and intercropping with Chinese chive (*Allium tuberosum* Rottler): Role of plant volatiles [J]. J Chem Ecol, 39(2): 243-252.
- ZHOU BL, LI N, LIU SS, et al., 2013. Effects of 2, 4-di-tertbutylphenol on tomato leaf mould and seedling growth [J]. Chin J Ecol, 32(5): 1203-1207. [周宝利, 李娜, 刘 双双, 等, 2013. 2, 4-二叔丁基苯酚对番茄叶霉病及幼苗 生长的影响 [J]. 生态学杂志, 32(5): 1203-1207.]
- ZHOU XG, YU GB, WU FZ, 2012. Responses of soil microbial communities in the rhizosphere of cucumber (*Cucumis sativus* L.) to exogenously applied hydroxybenzoic acid [J]. J Chem Ecol, 38 (8): 975–983.

(责任编辑 蒋巧媛)

刘洁云,田青兰,黄伟华,等.施硒对三个香蕉品种植株生长、生理及果实品质的影响 [J]. 广西植物,2022,42(11): 1913-1920.

LIU JY, TIAN QL, HUANG WH, et al. Effects of selenium application on plant growth, physiology and fruit quality of three banana varieties [J]. Guihaia, 2022, 42(11): 1913–1920.

### 施硒对三个香蕉品种植株生长、生理及果实品质的影响

刘洁云<sup>1</sup>,田青兰<sup>1</sup>,黄伟华<sup>1</sup>,吴艳艳<sup>1</sup>,彭嘉宇<sup>2</sup>,张英俊<sup>1</sup>, 谢如林<sup>2</sup>,韦绍龙<sup>3</sup>,牟海飞<sup>1\*</sup>,韦 弟<sup>1</sup>

 (1. 广西壮族自治区农业科学院 生物技术研究所,南宁 530007;2. 广西壮族自治区农业科学院 农业资源与环境研究所,南宁 530007;3. 广西壮族自治区农业科学院,南宁 530007)

摘 要:该文以'南天黄''中蕉9号''红香蕉'三个香蕉品种为材料,研究土壤淋施硒酸钠溶液对香蕉植株 生长、果实产量和品质,以及叶片 MDA、脯氨酸、硒含量的影响。结果表明:(1)每株 0.25、0.50 g 施硒处理能显 著促进三个香蕉品种株高的增长,对'南天黄''红香蕉'基茎围的增长促进作用显著,对'中蕉9号'基茎围 促进作用不显著。(2)施硒对植株营养生长过程中叶片 MDA 含量的影响较小,仅在部分时间段 MDA 含量显 著升高或降低;每株 0.25、0.50 g 的硒酸钠处理能显著降低三个香蕉品种叶片中脯氨酸含量。施硒对香蕉叶片 中硒含量具有显著影响,施硒浓度越高,叶片中硒含量也越高。(3)施硒能显著提高各香蕉品种单株产量,对 '中蕉9号''红香蕉'单果重促进作用显著,对'南天黄'单果重促进作用不显著;每株 0.25 g 施硒处理,'中 蕉9号'的单株产量为 24.38 kg、单果重为 165.86 g,分别比对照高出了 12.80%、14.69%。(4)土施适宜浓度的 硒酸钠能提高香蕉果实中维生素 C、钾含量,'南天黄''中蕉9号''红香蕉'三个香蕉品种施硒后维生素 C 含量最高可达 12.7、13.9、10.6 mg·100g<sup>-1</sup>,比对照分别提高了 12.72%、18.84%、29.39%;钾含量最高可达 349、 279、397 mg·100g<sup>-1</sup>,比对照分别提高 29.62%、33.28%、47.77%。(5)硒处理浓度越高,果实中硒含量也越高; 对照处理的香蕉果实硒含量未达到富硒标准,每株经 0.25、0.50 g 硒酸钠处理后三个香蕉品种的果实硒含量 均达到富硒标准。综上认为,土壤淋施硒酸钠溶液能提高香蕉果实中的硒含量,促进香蕉植株生长、提升果实 品质,且对降低叶片中 MDA 和脯氨酸含量具有一定影响,但对不同香蕉品种的影响效果存在差异,该研究结 果为富硒香蕉的生产栽培提供了理论依据。

关键词:香蕉,硒,生长指标,生理特性,果实品质 中图分类号:Q945.14 文献标识码:A 文章编号:1000-3142(2022)11-1913-08

## Effects of selenium application on plant growth, physiology and fruit quality of three banana varieties

收稿日期: 2021-06-29

http://www.guihaia-journal.com



基金项目: 广西科技重大专项(桂科 AA18118028, 桂科 AA18118028-4); 广西香蕉创新团队栽培岗位专家项目(nycytxgxcxtd-16-02); 广西农业科学院稳定资助科研团队项目(桂农科 2021YT089) [Supported by Major Science and Technology Projects of Guangxi (Guike AA18118028, Guike AA18118028-4); Cultivation Post Expert Project of Guangxi Banana Innovation Team (nycytxgxcxtd-16-02); Scientific Research Team Project with Stable Funding of Guangxi Academy of Agricultural Sciences (Guinongke 2021YT089)]。

第一作者:刘洁云(1988-),女,硕士,助理研究员,研究方向为热带果树栽培与遗传育种,(E-mail)1064776742@qq.com。

<sup>\*</sup>通信作者:牟海飞,研究员,研究方向为热带、亚热带特色作物种质资源收集评价及开发利用,(E-mail)haifei5052@126.com。

 ( 1. Biotechnology Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China; 2. Agricultural Resource and Environment Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China; 3. Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China )

Abstract: In this study, three banana varieties, 'Nantianhuang' 'Zhongjiao 9' and 'Hongxiangjiao' were studied as experimental materials to study the effects of sodium selenate solution on the plant growth, yield, fruit quality, contents of MDA, proline and selenium. The results were as follows: (1) The application of 0.25 and 0.50 g  $\cdot$  plant<sup>-1</sup> sodium selenate could significantly increase plant height of three banana varieties and the growth of basal stem circumference of 'Nantianhuang' and 'Hongxiangjiao', but not 'Zhongjiao 9'. (2) The application of selenium had little effect on MDA content in leaves during vegetative growth, and MDA content increased or decreased significantly only in part time. The proline content in leaves of the three banana varieties were significantly reduced at 0.25 and 0.50 g  $\cdot$  plant<sup>-1</sup> sodium selenate. Selenium had a significant effect on selenium content in leaves. The higher selenium concentration, the higher the selenium content in leaves. (3) The application of selenium could significantly increase the yield of banana and the single fruit weight of 'Zhongjiao 9' and 'Hongxiangjiao'. The yield per plant and single fruit weight of 'Zhongjiao 9' at 0.25 g · plant<sup>-1</sup> sodium selenate were 24.38 kg and 165.86 g, which were 12.80% and 14.69% higher than those of the check (CK). The suitable concentration of sodium selenite could effectively increase the content of vitamin C and potassium in fruits. (4) The highest vitamin C contents of 'Nantianhuang' 'Zhongjiao 9' and 'Hongxiangjiao' were 12.7, 13.9 and 10.6 mg • 100g<sup>-1</sup>, which were 12.72%, 18.84% and 29.39% higher than CK. And the highest contents of potassium were 349, 279 and 397 mg • 100g<sup>-1</sup>, which were 29.62%, 33.28% and 47.77% higher than CK. (5) The higher the concentration of selenium treatment, the higher the content of selenium in fruits. The selenium content of fruits in CK did not reach the standard of selenium enrichment. The three banana varieties reached the standard of selenium enrichment after treatment with 0.25 and 0.50 g • plant<sup>-1</sup> sodium selenate. In conclusion, the application of sodium selenate solution in soil can increase the content of selenium in banana fruits, promote the plant growth, improve fruit quality of banana, and decrease the content of MDA and proline in leaves. However, there are differences in the effects of various banana varieties. These findings will provide a theoretical basis for the production and cultivation of selenium enriched banana.

Key words: banana, selenium, growth index, physiological property, fruit quality

硒是一种矿物质微量营养素,具有独特的物 理和化学性质(Broadley et al., 2006)。1957 年硒 首次被认对人类健康存在影响,此时距其被发现 已近一个世纪。目前,硒已被确认是人和动物必 需的微量元素,适量补硒可预防因缺乏维生素 E 而引起的肝坏死、心血管疾病、肌肉紊乱疾病、癌 症等(Cobo-Angel et al., 2014)。硒酸盐是心血管 系统中一种重要的抗氧化剂(Zhang et al., 2019)。 2019年,欧盟动物饲料添加剂和产品(FEEDAP) 研究小组对硒酸钠作为反刍动物营养饲料添加剂 的安全性和有效性进行了评估,确认硒酸钠是一 种能满足动物需求的有效硒源(Bampidis et al., 2019)。植物硒被认为是人体硒摄入的主要来源 (Rayman, 2008)。硒也是一种对植物生长有益的 微量元素。适量的硒有助于促进植物叶绿素合 成、增强新陈代谢、提高光合效率及对矿质元素的 转运与积累等(赵巍,2011; Khaliq et al., 2015)。 通常将土壤中的硒划分为元素态硒、硒酸盐和亚 硒酸盐、金属硒化物、有机结合态和小分子有机硒 化物(赵中秋等,2003)。硒酸盐易溶于水,不被土 壤粘粒吸附,很容易淋滤和迁移,是植物的主要可 利用态硒(陈松灿等,2014)。

香蕉营养价值丰富,具有多种生理功能(唐健, 2015)。其产量和贸易量在全球居首位,是全球十 大主食之一(Dita et al., 2018)。目前,有关施硒对 香蕉的生长和生理等方面的影响研究甚少。张远 飞等(2018)研究4种含硒肥料叶面喷施对香蕉的 影响,结果表明喷施硒肥后香蕉产量及果实硒含量 均有一定程度增加。但是,缺乏施硒对香蕉植株生 理及果实营养成分影响的相关研究。本研究通过 土壤淋施硒酸钠溶液,研究施硒对三个香蕉品种株 高、基茎围、果实营养和硒含量的影响,以及植株叶 片中丙二醛(malondialdehyde, MDA)、脯氨酸和硒 含量的动态变化。旨在对比土壤施硒对不同香蕉 品种影响的差异,筛选适宜的施硒浓度,以期为富 硒香蕉的生产栽培提供理论依据。

1 材料与方法

#### 1.1 材料

试验于 2018 年 10 月至 2020 年 4 月在广西壮 族自治区农业科学院科学研究基地进行。土壤基 本理化性状:pH 值 6.70,有机质 22.8 g・kg<sup>-1</sup>,全氮 2.42 g・kg<sup>-1</sup>,全磷 0.975 g・kg<sup>-1</sup>,全钾 2.33 g・kg<sup>-1</sup>, 水解性氮 113 mg・kg<sup>-1</sup>,有效磷 21.9 mg・kg<sup>-1</sup>,速效 钾 226 mg・kg<sup>-1</sup>,全硒 0.380 mg・kg<sup>-1</sup>。供试香蕉品 种为'南天黄''中蕉 9 号''红香蕉'。

#### 1.2 方法

采用两因素试验设计,A因素为施硒酸钠的4 个水平,即0(CK)、0.25、0.50、0.75g・株<sup>-1</sup>,B因 素为三个香蕉品种。每个处理6株,3次重复。 '南天黄'4个处理依次编号为 N1、N2、N3、N4; '中蕉9号'4个处理依次编号为Z1、Z2、Z3、Z4; '红香蕉'4 个处理依次编号为 H1、H2、H3、H4。 试验用香蕉苗为8~9叶龄组培营养杯苗,2018年 10月12日筛选生长较一致的健壮植株种植于基 地,行距 200 cm,株距 300 cm,每公顷种植1 665 株。2019年5月6日在香蕉植株营养生长旺盛期 进行施硒处理,将硒酸钠(Na,SeO₄,纯度≥98%) 溶于1L水中,一次性均匀淋在植株根周,对照为 淋1L清水。采用随机区组试验设计,设保护行。 各处理水肥及病虫害等统一管理,每公顷施有机 肥10 500 kg、钾肥 810 kg, 按氮肥(N):磷肥 (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>):钾肥(K<sub>2</sub>O)=1:0.5:2施用。

2019年5月6日于施硒前(0d)和施硒后30、 60、90、120、150d分别测量株高、基茎围,取从上 往下数第3片完全展开叶片的中部检测 MDA、脯 氨酸和全硒含量;2019年10月各品种陆续进入抽 蕾期,每个果穗留7梳。2020年2—4月在香蕉果 实达到七成熟时采收,测量单株产量、单果重,取 第3梳果实催熟后检测果肉可溶性糖、总酸、维生 素C、蛋白质、钾、全硒含量。每个处理选择长势均 匀的3株测量,3次重复。 株高、单株产量、单果重参照黄秉智等(2006) 的方法测量;基茎围采用软尺测量植株基部与土 壤交界处的周长;MDA、脯氨酸参照郝建军等 (2006)的方法检测;叶片、果实全硒含量及果实营 养指标委托广西益普检测技术有限公司参照相关 标准检测,即全硒含量参照 GB 5009.93—2017、可 溶性糖含量参照 NY/T 2742—2015、总酸含量参照 SB/T 10203—1994、维生素 C 含量参照 GB 5009.86—2016、蛋白质含量参照 GB 5009.5— 2016、钾含量参照 GB 5009.91—2017。

#### 1.3 数据处理

利用 Excel 2007 软件进行统计分析,用 SPSS 19.0 软件进行多重比较检验差异显著性。

#### 2 结果与分析

#### 2.1 施硒对三个香蕉品种株高的影响

如图1所示,随着施硒量的增加三个香蕉品种 株高呈现先增高后降低的趋势。对'南天黄'用 N2、N3 处理 60 d 后株高显著高于 N1,处理 150 d 时株高分别为 263.62、260.82 cm, 比对照处理提高 3.99%、2.89%; N4 处理 90~120 d 时株高显著低 于 N1,处理 150 d 时株高与 N1 差异不显著。对 '中蕉9号'用Z2处理60d后株高显著高于Z1, 处理 150 d 株高为 286.28 cm, 比对照处理提高 2.71%;Z3 处理 30 d 后株高显著高于 Z1,处理 150 d 株高为 288.74 cm, 比对照处理提高 3.59%; Z4 处理株高与 Z1 差异不显著。对'红香蕉'用 H2、 H3 处理 30 d 后株高显著高于 H1,处理 150 d 株高 分别为 359.61、363.50 cm, 比对照处理提高 2.55%、3.66%; H4 处理 60 d 时株高显著低于 H1, 之后与 H1 差异不显著。可见,每株土施 0.25、 0.50 g的硒酸钠能显著促进'南天黄''中蕉 9 号''红香蕉'三个香蕉品种株高的增长。

#### 2.2 施硒对三个香蕉品种基茎围的影响

如图 2 所示,对'南天黄'用 N2、N3 处理 60 d 后基茎围显著高于 N1,处理 150 d 基茎围分别为 87.96、88.77 cm,比对照处理提高 6.30%、7.28%;N4 基茎围与 N1 差异不显著。对'中蕉 9 号'用 Z3 处 理 30~90 d 基茎围显著高于 Z1,处理 120 d 后与 Z1 差异不显著;Z2、Z4 基茎围与 Z1 差异不显著。对 '红香蕉'用 H3 处理 90、150 d 基茎围显著高于 H1, 处理 150 d 基茎围为 100.66 cm,比对照处理提高 广



同一组柱形图上的不同小写字母表示差异显著 (P < 0.05), 无字母或出现相同字母表示差异不显著。下同。 Different lowercase letters in the same group of the bar charts indicate significant differences (P < 0.05). No letter or the same letter indicates no significant differences. The same below.







4.62%;H2、H4 基茎围与 H1 差异不显著。可见,每 株土施 0.25、0.50 g 的硒酸钠能显著促进'南天黄' 基茎围的增长,每株土施 0.50 g 的硒酸钠能显著促 进'红香蕉'基茎围的增长,而本试验中的施硒处理 对'中蕉 9 号'基茎围的促进作用不明显。

## 2.3 不同施硒处理对三个香蕉品种叶片中 MDA 含量的影响

如图 3 所示,对'南天黄'用 N2 处理叶片中 MDA 含量在处理 30 d 时显著高于 N1,120 d 时显著 低于 N1,其他时间段与 N1 差异不显著;N3 处理 30 d 时,MDA 含量显著高于 N1,90~120 d 时显著低于 N1;N4 处理 30 d 时,MDA 含量显著高于 N1;各处 理其他时间段与 N1 差异不显著。对'中蕉 9 号'用 Z2、Z3 处理各时间段叶片中 MDA 含量与 Z1 差异不 显著;Z4 处理 90 d时, MDA 含量显著高于 Z1,其他 时间段与 Z1 差异不显著。对'红香蕉'用 H3 处理 60~90 d时,叶片中 MDA 含量显著低于 H1,其他时 间段 MDA 含量与 H1 差异不显著;H2、H4 处理与 H1 的 MDA 含量差异不显著。可见,施硒对三个香 蕉品种营养生长阶段叶片中 MDA 含量产生影响, 适宜浓度的硒酸钠在部分营养生长阶段对降低'南 天黄''红香蕉'叶片中 MDA 含量具有一定效果。 2.4 不同施硒处理对三个香蕉品种叶片中脯氨酸

#### 含量的影响

如图 4 所示,对'南天黄'用 N2 处理 60~120 d 时,叶片中脯氨酸含量显著低于 N1,其他时间段 与 N1 差异不显著;N4 处理 30 d 时,脯氨酸含量显 著高于 N1,处理 150 d 时显著低于 N1。对'中蕉 9 号'施硒后各时间段叶片中脯氨酸含量均低于对 照,Z2 处理 30~150 d 时脯氨酸含量显著低于 Z1; Z3 处理 30~120 d 时脯氨酸含量显著低于 Z1; Z3 处理 30~120 d 时脯氨酸含量显著低于 Z1。对 '红香蕉'用 H2 处理 30~90 d 时,脯氨酸含量显 著低于 H1;H3 处理 30~120 d 时,脯氨酸含量显 著低于 H1;处理 150 d 时各施硒处理与对照差异 不显著。可见,施硒对降低三个香蕉品种叶片中 脯氨酸含量具有明显效果,'南天黄''中蕉 9 号' 以每株 0.25 g 的硒酸钠处理效果最佳,'红香蕉'

#### 2.5 不同施硒处理对三个香蕉品种叶片中硒含量 的影响

如图 5 所示,施硒后三个香蕉品种叶片中硒含 量显著增加,施硒浓度越高硒含量越高,同一香蕉 品种相同时间段各处理间差异显著。三个香蕉品 种各处理营养生长过程中叶片硒含量的变化趋势 一致,处理 30 d 时硒含量增加到最高值,处理 60~ 90 d 时下降趋势较大,之后趋于平缓。'中蕉 9 号'各施硒处理各时间段叶片中的硒含量均小于 '南天黄'和'红香蕉'。可见,本试验中施硒能提 高三个香蕉品种叶片中的硒含量。

#### 2.6 施硒对三个香蕉品种产量的影响

如图 6 所示,对'南天黄'用 N2 处理单株产量 显著高于 N1,为 21.49 kg,比对照处理提高8.34%; '南天黄'各施硒处理单果重与对照差异不显著。 Z2 处理单株产量显著高于 Z1,为 24.38 kg,比对照 处理提高 12.80%;对'中蕉 9 号'用 Z2 处理单果





重显著高于 Z1,为 165.86 g,比对照处理提高 14.69%。'红香蕉'各施硒处理的单株产量和单 果重均显著高于 H1,其中 H4 的单株产量和单果 重最高,分别为 12.78 kg、122.20 g,比对照处理提 高 12.12%、18.64%。可见,适量施硒对三个香蕉 品种单株产量的增加具有显著的促进作用,对'中 蕉 9 号''红香蕉'单果重的促进作用明显。

#### 2.7 施硒对三个香蕉品种果实品质的影响

如表1所示,'南天黄'各施硒处理果实中可





溶性糖含量均显著高于 N1;维生素 C 含量与钾含量的变化趋势一致, N2 处理显著高于 N1 及其他施硒处理, N3 处理显著高于 N1;施硒后香蕉果实维生素 C、钾含量最高可达 12.7、349 mg · 100g<sup>-1</sup>,比对照处理分别提高 12.72%、29.62%。对'中蕉 9号'用 Z3 处理果实中维生素 C 含量显著高于 Z1 (为 13.9 mg · 100g<sup>-1</sup>),比对照处理提高18.84%,Z2、Z4 处理与 Z1 差异不显著;Z3、Z4 处理果实中钾含量显著高于 Z1,Z3 处理钾含量为 279 mg · 100g<sup>-1</sup>,比对照处理后提高 33.28%。对'红香蕉'



图 5 不同施硒处理对三个香蕉品种叶片中硒含量的影响 Fig. 5 Effects of selenium application on Se content in leaves of three banana varieties

用 H4 处理后果实中可溶性糖含量显著低于 H1, H2、H3 处理与 H1 差异不显著;维生素 C含量经 H3 处理后显著高于对照和其他施硒处理(为 10.6 mg · 100g<sup>-1</sup>),比对照处理提高 29.39%,H2 处理显 著高于 H1;各施硒处理果实中的钾含量均显著高 于 H1,施硒浓度越高钾含量也越高,H4 处理钾含 量达 397 mg · 100g<sup>-1</sup>,比对照处理提高 47.77%。 三个香蕉品种果实中的硒含量随施硒浓度增加而 增加,各施硒处理均显著高于对照。可见,土施适 宜浓度的硒酸钠能有效提高三个香蕉品种果实中 维生素 C、钾、硒的含量,对'南天黄'香蕉果实中 可溶性糖含量的增加具有明显促进作用。

#### 3 讨论与结论

#### 3.1 施硒对香蕉植株生长的影响

适量浓度的硒能够促进植物生长发育,硒浓 度过高对植物生长具有抑制作用(Guerrero et al., 2014)。土施硒酸钠对作物生长的促进作用 在冬小麦、小白菜上均有报道(付冬冬等,2011; 李伟等,2018)。香蕉作为大型草本植物,植株生 长健壮有利于抗倒伏及后期产量的形成。本研 究中,每株土施 0.25、0.50 g 的硒酸钠对'南天 黄''中蕉9号''红香蕉'三个香蕉品种的株高 增长促进作用显著,但促进作用起始时间存在差 异。施硒对三个香蕉品种基茎围的影响存在差 异,土施适量的硒对'南天黄''红香蕉'基茎围 增长的促进作用显著,对'中蕉9号'基茎围的促 进作用不显著。杜少平等(2020)研究表明适量 的外源硒肥可促进西瓜对矿质元素的吸收,进而 促进西瓜产量和品质的形成。本研究中,土施适 量的硒酸钠能显著促进三个香蕉品种产量的形 成,'南天黄''中蕉9号'每株施硒均在0.25g 时产量最高,'红香蕉'各施硒处理产量差异不显 著。施硒对'南天黄'单果重影响不显著,对'中 蕉9号''红香蕉'单果重的影响趋势与产量相 似。这说明适量施硒能有效促进香蕉植株生长 健壮,提高果实产量。

#### 3.2 施硒对香蕉叶片中生理指标的影响

植物处于逆境条件下或在器官衰老时,会发 生质膜过氧化作用,产生的 MDA 会对生物膜造成 严重损伤, MDA 积累过多会降低抗衰老能力和植 物抗逆性。逆境胁迫或早衰会使植物体内脯氨酸 积累增多,可以通过脯氨酸反映植物的氧化衰老 状况。刘群龙等(2014)研究表明喷施低浓度的亚 硒酸钠可降低梨树叶片 MDA 和脯氨酸的含量。 本研究中,土施硒酸钠对'南天黄''红香蕉'叶片 MDA 含量存在一定影响,在植株生长过程中的部 分时间段每株 0.50 g 硒处理叶片中 MDA 含量显 著降低,施硒对'中蕉9号'叶片中 MDA 含量影响 不显著。土施适量浓度的硒酸钠对降低三个香蕉 品种叶片中脯氨酸含量均具有明显效果,每株 0.25 g的硒酸钠处理在'中蕉9号'的整个营养生 长期叶片脯氨酸含量显著降低,其他两个香蕉品 种则只在部分生长阶段脯氨酸含量显著降低。





图 6 施硒对三个香蕉品种产量的影响

Fig. 6 Effects of selenium application on yield of three banana varieties

表 1	施硒对三个香蕉品种果实品质的影响	词

Table 1 Effects of selenium application on fruit quality of three banana varieties

处理 Treatment	可溶性糖 Soluble sugar (%)	总酸 Total acid (g・100g <sup>-1</sup> )	维生素 C VC (mg・100g <sup>-1</sup> )	蛋白质 Protein(g・100g <sup>-1</sup> )	钾 K (mg・100g <sup>-1</sup> )	硒 Se (μg・kg <sup>-1</sup> )
N1	$17.0\pm0.7\mathrm{b}$	0.287±0.031	11.3±0.6c	1.15±0.11	$269 \pm 17c$	$2.80{\pm}0.44\mathrm{d}$
N2	18.5±0.4a	$0.237 \pm 0.023$	12.7±0.6a	$1.08 \pm 0.06$	349±23a	$34.0 \pm 9.9 \mathrm{c}$
N3	18.5±0.6a	$0.267 \pm 0.040$	$12.0\pm0.5b$	$1.24 \pm 0.09$	$317 \pm 11b$	$64.7{\pm}10.0{\rm b}$
N4	18.8±0.5a	$0.260 \pm 0.020$	$11.4 \pm 0.5 \mathrm{bc}$	$1.17 \pm 0.10$	$247 \pm 16c$	108±13a
Z1	18.0±0.3	$0.333 \pm 0.023$	$11.7\pm0.5\mathrm{b}$	$1.33 \pm 0.10$	$209{\pm}13\mathrm{b}$	$5.60{\pm}1.15{\rm d}$
Z2	$18.4 \pm 0.7$	$0.397 \pm 0.053$	$12.1 \pm 0.6 b$	$1.33 \pm 0.04$	$218 \pm 9b$	$34.0\pm6.2c$
Z3	18.2±0.9	$0.360 \pm 0.036$	13.9±0.5a	$1.36 \pm 0.09$	279±16a	$76.0{\pm}9.2{\rm b}$
Z4	$17.5 \pm 0.2$	$0.337 \pm 0.025$	$12.3 \pm 0.5 b$	$1.31 \pm 0.04$	272±14a	103±15a
H1	19.8±0.8a	$0.147 \pm 0.012$	8.2±0.7c	$1.63 \pm 0.09$	$269 \pm 17 \mathrm{c}$	$5.97 \pm 0.51 \mathrm{c}$
H2	20.5±0.8a	$0.150 \pm 0.010$	9.7±0.6ab	$1.64 \pm 0.04$	$350 \pm 12b$	$30.0\pm7.9c$
H3	20.2±0.5a	$0.140 \pm 0.017$	10.6±0.4a	$1.56 \pm 0.05$	389±11a	$73.0 \pm 5.3 \mathrm{b}$
H4	$18.2 \pm 0.6 \mathrm{b}$	$0.137 \pm 0.006$	$8.9{\pm}0.3{\rm bc}$	$1.47 \pm 0.12$	397±7a	$160\pm26a$

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著(P<0.05),无字母或出现相同字母则表示差异不显著。

Note: Different lowercase letters after the same column data indicate significant differences (P < 0.05), while no letters or the same letters indicate insignificant differences.

#### 3.3 施硒对香蕉果实品质的影响

施硒对果树果实营养成分的积累具有一定的 促进作用,这可能与硒参与植物体内的生理生化 代谢有关。印宁等(2020)研究叶面施硒对三个葡 萄品种果实品质的影响,认为施硒能显著提高各 品种葡萄果实的综合品质,显著提高可溶性糖、可 溶性蛋白、可溶性固形物含量,显著降低有机酸; 戚霄晨等(2019)研究认为施硒能显著提高樱桃果 实维生素 C 含量,降低可滴定酸含量,对可溶性固 形物影响不显著;而本研究认为,施硒能显著提高 三个香蕉品种果实中维生素 C 和钾含量,显著提 高'南天黄'果实中可溶性糖含量。施硒后三个香 蕉品种果实中总酸和蛋白质含量变化不显著。硒 与矿质元素间存在交互作用,张世博(2020)研究 认为外源 Se 通过双重协同作用促进芽菜 Zn 的吸 收,且对土壤中不同形态钾素含量及果实中钾含 量存在影响;本研究认为,适宜的硒浓度能促进香 蕉果实钾元素的吸收。

#### 3.4 施硒对香蕉叶片及果实硒累积的影响

施硒能显著提高香蕉叶片和果实中的硒含量,施硒浓度越高,叶片和果实中硒含量也越高。 三个香蕉品种植株进入生殖生长期后,施硒处理 叶片硒含量最低为 0.47 mg·kg<sup>-1</sup>,最高为 2.63 mg·kg<sup>-1</sup>,均显著高于对照处理的硒含量。根据 DB45/T 1061—2014,富硒水果适宜硒含量为 10~ 100 μg·kg<sup>-1</sup>,不施硒时香蕉果实中的硒含量未达 到富硒标准,每株土施 0.25、0.50 g 的硒酸钠处理 三个香蕉品种果实中硒含量均达到富硒标准,每 株土施 0.75 g 的硒酸钠处理三个香蕉品种果实中 硒含量均超出富硒标准的上限。因此,在实际生 产过程中,应注意硒的施用量,从而避免出现果实 中硒过量的情况。

#### 参考文献:

- BAMPIDIS V, AZIMONTI G, BASTOS MDL, et al., 2019. Safety and efficacy of sodium selenate as feed additive for ruminants [J]. EFSA J, 17(7): 5788.
- BROADLEY MR, WHITE PJ, BRYSON RJ, et al., 2006. Biofortification of UK food crops with selenium [J]. Proc Nutr Soc, 65(2): 169–181.
- CHEN SC, SUN GX, CHEN Z, et al., 2014. Progresses on selenium metabolism and interaction with heavy metals in higher plants [J]. Plant Physiol J, 50(5): 612-624. [陈松 灿, 孙国新, 陈正, 等, 2014. 植物硒生理及与重金属交 互的研究进展 [J]. 植物生理学报, 50(5): 612-624.]
- COBO-ANGEL C, WICHTEL JJ, CEBALLOS-MARQUEZ A, 2014. Selenium in milk and human health [J]. Anim Front, 4(2): 38-43.
- DITA M, BARQUERO M, HECK D, et al., 2018. Fusarium wilt of banana: Current knowledge on epidemiology and research needs toward sustainable disease management [J]. Front Plant Sci, 9: 1468.
- DU SP, MA ZM, XUE L, 2020. Effect of spraying with selenium fertilizer on yield, quality and nutrient absorption of watermelon in gravel-mulched field [J]. J Fruit Sci, 37 (5): 705-713. [杜少平, 马忠明, 薛亮, 2020. 喷施硒肥 对砂田西瓜产量、品质及养分吸收的影响 [J]. 果树学 报, 37(5): 705-713.]
- FU DD, WANG SS, LIANG DL, et al., 2011. Effects of exogenetic selenite and selenate on the growth and physiological metabolism of winter wheat [J]. J Agro-Environ Sci, 30(8): 1500-1507. [付冬冬, 王松山, 梁东 丽,等, 2011. 不同价态外源硒对冬小麦生长及生理代谢 的影响 [J]. 农业环境科学学报, 30(8): 1500-1507.]
- GUERRERO B, LLUGANY M, PALACIOS O, et al., 2014. Dual effects of different selenium species on wheat [J]. Plant Physiol Biochem, 83: 300-307.
- HAO JJ, KANG ZL, YU Y, et al., 2006. Experimental techniques in plant physiology [M]. Beijing: Chemical Industry Press: 159-176. [郝建军,康宗利,于洋,等, 2006. 植物生理学实验技术 [M]. 北京: 化学工业出版 社: 159-176.]
- HUANG BZ, 2006. Description specification and data standard of banana germplasm resources [M]. Beijing: China Agriculture Press: 71-90. [黄秉智, 2006. 香蕉种质资源 描述规范和数据标准 [M]. 北京:中国农业出版社: 71-90.]
- KHALIQ A, ASLAM F, MATLOOB A, et al., 2015. Seed priming with selenium: Consequences for emergence,

seedling growth, and biochemical attributes of rice [J]. Biol Trace Elem Res, 166(2): 236–244.

- LI W, FAN J, YE XJ, et al., 2018. Effects of selenium with different valences on growth of *Brassica chinensis* and selenium species in soil [J]. J Hubei Inst Nation (Nat Sci Ed), 36(1): 18-21. [李伟, 樊俊, 叶小江, 等, 2018. 不同价态硒对小白菜生长及土壤硒形态的影响 [J]. 湖北 民族学院学报(自然科学版), 36(1): 18-21.]
- LIU QL, NING CJ, HAO YY, et al., 2014. Effects of exogenous selenium on leaf senescence and photo-assimilates in pear leaves during the senescing period [J]. J Soil Water Conserv, 28(6): 314-318. [刘群龙, 宁婵娟, 郝燕燕, 等, 2014. 外源硒对梨树叶片衰老和光合同化物积累的影 响 [J]. 水土保持学报, 28(6): 314-318.]
- QI XC, JIAN ZH, ZHANG Q, et al., 2019. Effects of foliar application of selenium on selenium and heavy metal contents and fruit quality in sweet cherry [J]. J Fruit Sci, 36(6): 748-754. [戚霄晨, 简在海,张琦,等, 2019. 叶面喷施硒 对甜樱桃硒和重金属含量及果实品质的影响 [J]. 果树 学报, 36(6): 748-754.]
- RAYMAN MP, 2008. Food-chain selenium and human health: emphasis on intake [J]. Brit J Nutr, 100(2): 254-268.
- TANG J, 2015. Studies on the preparation, safety, defectation function and weight loss of banana resistance starch [D]. Guangzhou: South China Agricultural University: 104-108. [唐健, 2015. 香蕉抗性淀粉制备、安全性及通便和 减肥功能研究 [D]. 广州: 华南农业大学: 104-108.]
- YIN N, MU L, LIANG YL, et al., 2020. Effects of foliar selenium fertilizer on fruit yield, quality and selenium content of three varieties of *Vitis vinifera* [J]. Chin J Appl Ecol, 31(3): 953-958. [印宁,穆兰,梁银丽,等, 2020. 叶面喷施硒肥对 3 个葡萄品种果实产量、品质和硒 含量的影响 [J]. 应用生态学报, 31(3): 953-958.]
- ZHANG SB, 2020. Enrichments and interactions of Zn, Co and Se during the soybean germination [D]. Guangzhou: South China University of Technology: 12-42. [张世博, 2020. 黄 豆发芽过程中 Zn、Co 和 Se 的富集及交互作用 [D]. 广 州: 华南理工大学: 12-42.]
- ZHANG SQ, XU JL, HE ZS, et al., 2019. Sodium selenate ameliorates cardiac injury developed from high-fat diet in mice through regulation of autophagy activity [J]. Sci Rep, 9(9): 917–925.
- ZHANG YF, QIN YH, HE MJ, et al., 2018. Preliminary study on the effect of yield and selenium content of banana by foliar spraying with different selenium fertilizers [J]. J Guangxi Agric, 33(6): 4-6. [张远飞, 覃杨华, 何明菊, 等, 2018. 不同含硒肥料叶面喷施对香蕉产量和硒含量的影 响初报 [J]. 广西农学报, 33(6): 4-6.]
- ZHAO W, 2011. Preliminary explanation of the mechanism about stimulation of selenium in rice seed germination [D]. Luoyang, Henan: Henan University of Science and Technology: 29-57. [赵巍, 2011. 硒促进水稻种子萌发的 生理机制初探 [D]. 河南洛阳: 河南科技大学: 29-57.]
- ZHAO ZQ, ZHENG HL, ZHANG CG, 2003. Advances in the studies on selenium in soil and selenium biological effect [J]. Chin J Ecol, 22(1): 22-25. [赵中秋, 郑海雷, 张春 光, 2003. 土壤硒及其与植物硒营养的关系 [J]. 生态学 杂志, 22(1): 22-25.]

(责任编辑 蒋巧媛)

广步植物 Guihaia Nov. 2022, 42(11): 1921-1928

http://www.guihaia-journal.com

#### DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202109075

林佳琦,李燕培,肖世祥,等.矮化香蕉及其野生型 GA3ox 基因的结构特点和表达分析 [J]. 广西植物, 2022, 42(11): 1921-1928.

LIN JQ, LI YP, XIAO SX, et al. Structural characteristics and expression analysis of *GA3ox* gene in dwarf and wild type bananas [J]. Guihaia, 2022, 42(11): 1921–1928.

### 矮化香蕉及其野生型 GA3ox 基因的结构特点和表达分析

林佳琦,李燕培,肖世祥,冯 斗,禤维言\*

(广西大学农学院,南宁 530005)

摘 要:香蕉的矮化突变是香蕉无性繁殖后代最常见的表型变异之一,但其变异的分子调控机理目前尚未研究清楚;而内源赤霉素是影响植物株高的重要激素之一,GA3-氧化酶是赤霉素生物合成后期的关键酶。为探究 GA3-氧化酶编码基因对香蕉矮化的分子调控机理,该研究以威廉斯 B6 矮化突变体及其野生型亲本为材料,通过 RT-PCR 技术克隆得到矮化香蕉及其野生型亲本 GA3ox 基因的全长 cDNA 序列,并对其推测的氨基酸序列进行比对分析,同时利用 qRT-PCR 技术对 GA3ox 基因在不同组织中的表达水平差异进行分析。结果表明:(1)矮化香蕉 GA3ox-A 和野生型香蕉 GA3ox-G 的 ORF 长度均为 864 bp,均编码 287 个氨基酸,经序列比对分析发现两条氨基酸序列之间存在 5 个位点的差异,从而产生具有不同性质的蛋白质。(2)氨基酸序列同源性分析表明,矮化香蕉 GA3ox 的氨基酸序列与油棕、海枣、椰子的同源性最高。(3) qRT-PCR 显示,GA3ox 基因在矮化香蕉叶片和茎秆中的表达水平整体上低于野生型,其中 GA3ox 在野生型茎秆中的表达水平是矮化植株的 2.2~32 倍。综上推测,GA3ox 基因可能对香蕉茎杆的矮化变异具有重要的调控作用。该研究结果为揭示香蕉矮化突变的分子机制与筛选优良矮化香蕉株系奠定了基础。

关键词:香蕉,矮化变异,GA3-氧化酶,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)11-1921-08

## Structural characteristics and expression analysis of GA3ox gene in dwarf and wild type bananas

LIN Jiaqi, LI Yanpei, XIAO Shixiang, FENG Dou, XUAN Weiyan\*

( College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530005, China )

**Abstract**: Dwarf mutation is one of the most common phenotypic variations in bananas reproduce asexually, but its variation regulation mechanism has not been studied clearly. Endogenous gibberellin is one of the important hormones affecting plant height, and GA3-oxidase is the key enzyme in the late biosynthesis of gibberellin. In order to investigate

收稿日期: 2022-03-01

**基金项目:**财政部和农业农村部:国家现代农业产业技术体系项目(CARS-31);广西创新驱动发展专项(桂科 AA18118028-8); 广西农业厅项目(201401) [Supported by China Agriculture Research System of MOF and MARA(CARS-31); Guangxi Innovation Driven Development Project (Guike AA18118028-8); Guangxi Department of Agriculture Project (201401)]。

第一作者:林佳琦(1997-),硕士研究生,研究方向为植物基因工程与种质资源利用,(E-mail)1255614565@qq.com。

<sup>&</sup>quot;通信作者: 禤维言,博士,副教授,主要从事作物栽培生理与植物基因工程方面的研究,(E-mail)xuanwy@gxu.edu.cn。

the molecular regulation mechanism of GA3-oxidase encoding gene on banana dwarfing, the full-length cDNA sequences of *GA3ox* gene from Williams B6 dwarfing mutant and its wild type parent were cloned by RT-PCR, and their presumed amino acid sequence were compared and analyzed. Meanwhile, the expression level of the *GA3ox* gene in different tissues of dwarf banana and its wild type were analyzed by qRT-PCR. The results were as follows: (1) The ORF lengths of the dwarf banana *GA3ox-A* and the wild type *GA3ox-G* were both 864 bp, and are all encoded with 287 amino acids. The comparison of the two amino acid sequences showed that there were five differences, which resulted in proteins with different properties. (2) Amino acid sequence homology analysis showed that the amino acid sequences of dwarf banana *GA3ox* had the highest homology with oil palm, date palm and coconut. (3) The qRT-PCR showed that the expression levels of *GA3ox* in dwarf banana leaves and stems were lower than those of wild type. The expression level of *GA3ox* in wild type stems was 2.2 to 32 times as high as that in dwarf plants. Therefore, these results illustrate that *GA3ox* gene may play an important role in regulating the dwarfing variation of banana stem.

Key words: banana, dwarf variation, GA3-oxidase, gene cloning, expression analysis

香蕉是芭蕉科的高大草本植物,主要分布于 热带和亚热带地区。香蕉产业是种植地区和国家 的重要经济来源之一(Singh et al., 2016),在我国 华南地区香蕉产业是仅次于柑橘的第二大重要水 果产业。在生产过程中,尤其是在沿海地区,由于 香蕉植株高大、冠幅重、抗风性能差,遭遇台风或 热带风暴危害时容易出现严重的倒伏现象,使香 蕉产业遭受重大损失(舒海燕等,2016)。株高是 影响作物抗倒伏和丰产性能的重要农艺性状,作 物越高、冠幅越大其抗倒伏性能越差(张瑞茂等, 2019)。因此,筛选和创制优良的矮化新品种和新 种质是当前育种的重要目标。然而,目前由于香 蕉的栽培品种和野生资源多数是三倍体或四倍 体,高度不育,很难通过杂交技术改良矮化其株高 性状。但是,通过转基因或基因编辑技术可以改 良或创制矮化的香蕉新品系或新种质(崔霞和张 率斌,2017;王福军和赵开军,2018;李树磊等, 2020);而采用转基因或基因编辑技术途径进行香 蕉株高矮化方面的分子育种,首先必须研究清楚 香蕉株高生长调控的机制和挖掘与香蕉矮化相关 的关键调控基因。

植物的株高生长主要受内源激素影响,其中 赤霉素(gibberellin,GA)是植物生长发育过程中对 株高伸长生长影响最大的激素(杨益善等,2015; 范业赓等,2019)。目前,已鉴定的赤霉素有136 种,其中具有生物活性的赤霉素有GA1、GA3、 GA4、GA7(Hedden & Thomas, 2012)。这些具有 生物活性的赤霉素在植物生长发育各个阶段都发 挥着重要作用,如叶片伸展、茎的伸长、果实发育

等(Hu et al., 2018)。许多植物的株高受赤霉素 (GAs)生物合成和代谢过程中相关酶基因的调 控,如古巴焦磷酸合成酶基因(copay diphospate synthase, CPS)、内根-贝壳杉烯合成酶基因 (kaurene synthase, KS)、内根-贝壳杉烯氧化酶基 因(kaurene oxidase, KO)、GA3 氧化酶基因(GA3 oxidation enzyme, GA3ox)和 GA2 氧化酶基因(GA2 oxidation enzyme, GA2ox) 等 (Hedden & Pnillips, 2000; Yamaguchi, 2008)。目前,大多数赤霉素合 成途径的关键酶基因在多种植物中已被研究和鉴 定,如在拟南芥(Helliwel et al., 1998)、玉米(Chen et al., 2014)、水稻(Ashikari et al., 2002; Sasaki et al., 2002)和豌豆(Ait-Ali et al., 1997; Davidson et al., 2004)等植物中都发现了许多由于赤霉素合 成途径中代谢酶基因的变异导致矮化表型的相关 植株。因此,赤霉素生物合成途径关键酶基因的 研究在植物矮化机制中十分重要。

GA3-氧化酶(GA3ox)是活性赤霉素代谢途径 中最后步骤的关键酶,是由多基因家族编码的双 加氧酶,其功能是介导一个 3β-羟基基团到 GA9 和 GA20上,将无生物活性的 GA9 和 GA20 催化形 成具有生物活性的 GA1、GA4 和 GAs(Yamaguchi, 2008;陈晶晶等,2014a)。若 GA3ox 基因发生突 变,使植物不能合成具有活性的赤霉素,植物株高 生长受到抑制,从而导致矮化表型出现。此外,在 许多矮化突变体中发现植物株高性状与 GA3ox 基 因的表达水平密切相关,当 GA3ox 基因的表达水 平受抑制时,植株会出现矮化性状(Roumeliotis et al., 2013)。因此,研究 GA3ox 基因结构变化及其 11 期

表达特点与香蕉茎杆矮化的关系是揭示香蕉矮化 变异分子机制的重要内容,对于挖掘调控香蕉株 高关键基因及其应用具有重要的研究意义。在矮 化变异的香蕉突变体苗期,其假茎 GA1 和 GA3 含 量显著低于野生型亲本,并且外源 GA3 和吲哚-3-乙酸(indole-3-acetic, IAA)能使其株高恢复到野生 型高度(陈晶晶等, 2014b)。但是,香蕉的矮化变 异是否与 GA3ox 基因的结构和表达水平改变有 关,目前尚未见有研究报道。

本研究以威廉斯 B6 矮化突变体及其野生型 亲本为材料,通过 RT-PCR 技术克隆得到矮化香蕉 及其野生型亲本 GA3ox 基因的全长 cDNA 序列,并 利用 qRT-PCR 技术对 GA3ox 基因在不同组织中的 表达差异进行分析。拟探讨以下问题:(1)矮化香 蕉和野生型香蕉 GA3ox 蛋白同源性、理化性质分 析;(2)矮化香蕉和野生型香蕉 GA3ox 氨基酸序列 的结构差异分析;(3) GA3ox 基因在矮化香蕉及野 生型香蕉不同组织中的表达水平差异分析。本研 究结果旨在为揭示香蕉矮化突变的分子机制与筛 选优良矮化香蕉株系奠定基础。

1 材料与方法

#### 1.1 材料

以威廉斯 B6 矮化突变体及其野生型亲本为试 验材料,均采自于广西大学农学院农科基地温网 室。选取长势一致、无病虫害的矮化突变体及其亲 本香蕉树各2株,分别采集香蕉生长发育前期嫩叶、 假茎样品用于基因克隆及表达分析。所有材料采 集后立即放入液氮中冻存,-80℃冰箱保存备用。

#### 1.2 方法

1.2.1 *GA3ox* 基因克隆与测序 采用 TIANGEN 多 糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒,提取香蕉幼嫩叶 片中的总 RNA。按照 M-MuLV 第一链 cDNA 合成 试剂盒说明书将完整度较好、纯度较高的 RNA 反 转成 cDNA 第一链,以 cDNA 为模板,根据 NCBI上 发表的 *Musa acuminata* subsp. *malaccensis* 的 *GA3ox* 编码基因的 ORF(XM\_009398371.2)设计 1 对特 异 引 物,此 引 物 序 列 为 GA3ox-F: 5'-ATGAATCCCAATCCAACGAC-3', GA3ox-R: 5'-TTAACAACAAATCCCTTCG-3'。采用高保真 taq 酶 进行 RT-PCR 扩增,PCR 反应程序:95 ℃ 3 min;95 ℃ 15 s,55 ℃ 15 s,72 ℃ 5 min,35 个循环;72 ℃ 延伸10 min,4 ℃保存。扩增产物经1%琼脂糖凝 胶电泳检测正确后,使用 SanPrep 柱式 DNA 胶回 收试剂盒将目的片段回收纯化,将回收产物与 PUCI-Blunt 克隆载体相连接后,送至上海生工生 物公司测序。

1.2.2 GA3ox 基因表达分析 利用 qRT-PCR 分析 GA3ox 基因在矮化突变体及野生型香蕉不同组织 中的表达模式。分别采集矮化香蕉和野生型香蕉 第10片、第15片、第20片、第25片叶龄期嫩叶及 对应时期的假茎,液氮速冻后提取 RNA;利用 PrimeScript<sup>™</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser 将 RNA转化为 cDNA,并根据克隆得到的矮化 香蕉和野生型香蕉的 GA3ox 全长 cDNA 序列设计 特 异 性 引 物, 此引物序列为 GA3ox-qF: 5'-CTGGATCACGCCCTCAAGCTC-3'和 GA3ox-qR:5'-TCAACTGCAACACGGCGGACA-3′, 扩增片段长度 为 203 bp;以香蕉 Actin 作为内参基因,在 GenBank 登录号为 AB022041, 引物序列为 Actin-F: 5'-GCCATACAGTGCCAATCTACGAGG-3' 和 Actin-R: 5'-ATGTCACGAACAATTTCCCGCTCA-3'. 扩增片 段长度为157 bp,进行基因的表达定量分析。采 用 2XUniversal SYBR GreenFast qPCR Mix 染料说 明书进行操作, qRT-PCR 流程第一步为 95 ℃ 3 min;第二步为95 ℃ 5 s,60 ℃ 34 s,40 个循环;第 三步熔解曲线的绘制为95 ℃ 15 s.60 ℃ 1 min.95 ℃ 15 s。每个反应重复 3 次,结果采用 2<sup>-△△CT</sup>方法 计算基因的相对表达量。

1.2.3 序列分析 利用 NCBI 数据库的 Blastp 进行 GA3ox 氨基酸序列相似性分析;通过 ExPASy 在线 软件(https://web.expasy.org/protparam)对 GA3ox 蛋白的分子质量、等电点、蛋白质稳定性等理化性 质进行分析和预测;利用 SignalP(http://www. cbs.dtu.dk/services/SignalP)和 TMHMM Server V.2.0(http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM) 分析 GA3ox 氨基酸序列的跨膜结构和信号肽。

2 结果与分析

#### 2.1 香蕉矮化突变体与野生型 GA3ox 基因的序列 比对分析

以矮化香蕉和野生型香蕉嫩叶的 cDNA 为模板,利用 primer 5.0 软件设计 GA3ox 基因的特异性引物进行 PCR 扩增。扩增产物通过 1% 琼脂糖凝

胶电泳进行检测,得到两条 1 000 bp 左右的特异 性条带(图 1),测序后这 2 个靶序列的全长均为 1 096 bp,将获得矮化突变体 GA3ox 基因命名为 GA3ox-A、野生型香蕉 GA3ox 基因命名为 GA3ox-G。 通过测序得到 GA3ox-A 和 GA3ox-G 的全长序列均 为 1 096 bp, GA3ox-A 和 GA3ox-G 的 ORF 均为 864 bp,5'-UTR 均为 232 bp,均编码 287 个氨基酸。



M. DL5000 Maker; A. GA3ox-A; B. GA3ox-G<sub>o</sub>

图 1 矮化香蕉与野生型香蕉 GA3ox 基因 PCR 扩增产物 Fig. 1 PCR amplification products of the GA3ox gene from dwarf banana and wild type banana

对 GA3ox-A 和 GA3ox-G 的氨基酸序列比对分 析结果显示,两条氨基酸序列之间的同一性高达 98.26%,存在5个位点的差异,分别位于第29位、 第38位、第84位、第196位和第259位(图2)。 2.2 香蕉矮化突变体与野生型 GA3ox 蛋白质理化 性质及保守结构域分析

矮化突变体与野生型香蕉 GA3ox 氨基酸序列 的理化性质分析结果显示, GA3ox-A 和 GA3ox-G 分子式分别为  $C_{1338}H_{2152}N_{402}O_{395}S_{17}$ 和  $C_{1332}H_{2150}N_{402}O_{397}S_{16}$ , 蛋白分子量分别为 30 735.28 Da 和 30 661.14 Da, 理论等电点均为 9.78。其中, GA3ox-A 和 GA3ox-G 蛋白负电荷的残基总数(Asp+Glu)均 为 20 个, 正电荷的残基总数(Arg+Lys)均为 32 个; GA3ox-A 和 GA3ox-G 蛋白的不稳定指数分别 为 67.46 和 68.79, 均属于不稳定蛋白; 脂肪指数 分别为 76.90 和 78.61; 亲水平均系数分别为-0.240 和-0.236。根据 NCBI 在线软件对编码蛋白 的结构域分析发现, GA3ox-G 和 GA3ox-A 具有 2-酮戊二酸依赖性的双加氧酶与  $Fe^{2+}$ 结合的保守结 构域, 与其他植物的 GA3ox 蛋白相同。

#### 2.3 香蕉矮化突变体与野生型 GA3ox 蛋白质磷酸 位点及其高级结构预测分析

蛋白磷酸位点分析结果显示, GA3ox-A 和GA3ox-G蛋白均含有丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸3种氨基酸磷酸化位点, GA3ox-A和GA3ox-G分别含有丝氨酸22个和24个, 苏氨酸7个和8个, 酪氨酸2个和4个。跨膜结构分析显示GA3ox-A和GA3ox-G氨基酸序列的期望值分别为0.03729和0.02898, 均无跨膜区域。

利用 SOPMA 在线软件对 GA3ox-A 和 GA3ox-G 蛋白的二级结构的预测分析结果显示, GA3ox-G 蛋白含有4种构象,包括28.57%的α-螺旋、16.38%的延伸链、3.48%的β-转角和51.57%的无规则卷曲(图3); GA3ox-A 蛋白含有4种构象,分别为26.13%的α-螺旋、17.42%的延伸链、3.48%的β-转角和52.96%的无规则卷曲(图4)。

#### 2.4 香蕉矮化突变体与野生型 GA3ox 氨基酸序列 同源性比对分析

利用 NCBI 中的 Blastp 分析矮化突变体与野 生型香蕉 GA3ox 蛋白的氨基酸序列,同时与其他 物种的氨基酸序列同源性比对结果发现,矮化香 蕉 GA3ox 的 氨 基 酸 序 列 与 油 棕 (XP\_ 010915137.1)、海枣(XP\_008811603.3)、椰子 (ARI45601.1)的同源性最高,序列同源性分别为 62.5%、62.5%和61.5%。经序列比对发现,香蕉矮 化突变体及其野生型亲本 GA3ox 的氨基酸序列在 N 末端比油棕、海枣和椰子 3 种植物的 GA3ox 少 了 63 个氨基酸,C 末端少了 7 个氨基酸(图 5)。

#### 2.5 香蕉矮化突变体与野生型 GA3ox 基因的表达 模式分析

利用 qRT-PCR 技术研究 *CA3ox* 基因在矮化突 变体及野生型香蕉茎秆生长的不同叶龄期的表达 情况。由图 6 可知, *CA3ox* 基因在矮化突变体及野 生型香蕉不同叶龄期的叶片中表达水平不同。在 第 10 叶和第 15 叶龄期 *CA3ox* 在野生型香蕉叶片 中的相对表达量均高于矮化香蕉,但在第 20 叶和 第 25 叶叶龄期时野生型香蕉叶片中的相对表达 量均显著低于矮化香蕉。在野生型香蕉叶片中, *CA3ox* 在第 15 叶叶龄期表达水平最高,其次是第 10 叶叶龄期,而在第 20 叶和第 25 叶叶龄期时表 达水平较低,第 10 叶和第 15 叶叶龄期的表达水平 极显著高于第 20 叶和第 25 叶叶龄期,而在第 20 叶和第 25 叶叶龄期中的表达差异不显著;在矮化

GA3ox-A	MASARTCWSGSSPRRAASSRSPWTRSLRPARPTASPAWVSLASPASSPSSCGPRASPSPAPLWITPSSSGRMPIPPASGDVMO	84
GA3ox-G	MASARTCWSGSSPRRAASSRSPWTRSLRR <mark>S</mark> ARPTASPA <mark>T</mark> VSLASPASSPSSCGPRASPSPAPLWITPSSSGRMPIPPASGDVMQ	84
Consensus	${\tt masartcwsgssprraassrspwtrslrr}$ arptaspa vslaspasspsscgpraspspaplwitpsssgrmpippasgdvmq	
GA3ox-A	EYSDEMKQVAGRVVRIMLISMGLTPEEMKRAEEGTRVDQLSAVLQLNSYPPCPDPNRAMGLAAHTDSSLVTLLFQSGTSGLQLL	168
GA3ox-G	<u>P</u> YSDEMKÇVAGRVVRIMILSMGLTPEEMKRAEEGTRVDÇLSAVLÇINSYPPCPDFNRAMGLAAHTCSSLVTLIFÇSGTSGLÇLL	168
Consensus	$ys {\tt demk} qvagrvvrlmlls {\tt mgltpeemk} raeegtrvdqls avlqlnsyppcpdpnramglaahtdsslvtllfqsgtsglqll$	
GA3ox-A	RRQDQHGPARWVTVPPRPGALIVLAGDI <mark>F</mark> QIITNGRYKSVAHRAVVNRNHHRVSVAYICGPPPHHKLSPVGKPASPAPCLAYRA	252
GA3ox-G	RRÇDÇHGPARWVTVPPREGALIVLAGDI <mark>L</mark> ÇILTNGRYKSVAHRAVVNRNHHRVSVAYICGPPEHHKLSPVGKEASFAPCLAYRA	252
Consensus	${\tt rrqdqhgparwvtvpprpgalivlagdl\ qiltngryksvahravvnrnhhrvsvayicgppphklspvgkpaspapclayra}$	
GA3ox-A	VSWADYI <mark>C</mark> IKAEIFDKALASIMVAEDSRGDEGIC	286
GA3ox-G	VSWACYL <mark>A</mark> LKAELFDKALASIMVAEDSRGDEGIC	286
Consensus	vswadyl lkaelfdkalasimvaedsrgdegic	

图 2 矮化香蕉与野生型香蕉 GA3ox 氨基酸序列比对分析

Fig. 2 Comparison and analysis of GA3ox amino acid sequence from dwarf banana and wild type banana



**红色**. 延伸链; **蓝色**. α-螺旋; **紫色**. 无规则卷曲; **绿色**. β-转角。下同。

Red. Extended chain; Blue.  $\alpha\text{-helix};$  Purple. Random coil; Green.  $\beta\text{-turn}.$  The same below.

图 3 GA3ox-G 蛋白二级结构预测 Fig. 3 Secondary structure prediction of GA3ox-G protein





突变体中, GA3ox 在第 15 叶和第 25 叶叶龄期时表 达水平显著或极显著高于第 10 叶和第 20 叶叶龄 期时的表达水平, 而在第 10 叶和第 20 叶叶龄期之 间的表达差异不显著。

在香蕉假茎中, GA3 ox 基因在矮化突变体及野 生型香蕉不同叶龄期的表达水平不同。在野生型 香蕉茎秆中, GA3 ox 在第 20 叶叶龄期时表达水平 最高, 第 25 叶叶龄期是其次, 在第 10 叶和第 15 叶 叶龄期中的相对表达量次之, 并且在第 20 叶叶龄 期的表达水平显著或极显著高于其他叶龄期; 在 矮化突变体中, GA3 ox 在第 25 叶叶龄期表达水平 最高,第20叶叶龄期是其次,在第20叶和第25叶 叶龄期时表达水平显著或极显著高于第10叶和 第15叶叶龄期时的表达水平,而在第10叶和第 15叶叶龄期之间的表达差异不显著。同时,GA3ox 在矮化植株茎秆中的表达量均显著或极显著低于 野生型,其中在第10叶叶龄期时野生型茎秆中 GA3ox 的表达量是矮化型的32倍,在第15叶叶龄 期野生型茎秆中 GA3ox 的表达水平是矮化型的7 倍,在第20叶叶龄期时野生型植株茎杆中 GA3ox 的表达水平达最高,其表达水平是矮化型的2.2 倍(图7)。



黑色阴影和其他阴影框分别表示相同和相似氨基酸。

Black shaded and other shaded boxes show identical and similar amino acids.

图 5 矮化香蕉和野生型香蕉 GA3ox 与其他植物同源蛋白的序列比对分析 Fig. 5 Sequence comparison and analysis of dwarf banana and wild type banana GA3ox with other plants homologous proteins

#### 3 讨论与结论

赤霉素是影响植物生长发育的重要植物激素 之一,植物体内活性赤霉素含量的减少会导致植 物矮化,GA3-氧化酶(GA3ox)是赤霉素生物合成 途径中的关键酶,GA3ox 的重要功能是将无生物 活性的 GA9 和 GA20 催化形成具有生物活性的 GA1 和 GA4(Yamaguchi,2008)。目前,已在拟南 芥(Helliwell et al., 1998)、水稻(Sasaki et al., 2002)、豌豆(Reinecke et al., 2013)等植株中鉴定 得到 GA3-氧化酶对植物茎秆的矮化具有重要的调 控作用。为进一步探究 GA3ox 对香蕉矮化的分子 调控机制,本研究克隆得到矮化香蕉及野生型香 蕉的 GA3ox 的全长 cDNA 序列并对其氨基酸序列 进行生物信息学分析。结果表明, GA3ox-A 和 GA3ox-G 蛋白均属于不稳定蛋白,具有亲水性,并 且 GA3ox-A 和 GA3ox-G 蛋白的二级结构均具有 4 种构象,蛋白磷酸位点分析显示 GA3ox-A 和 GA3ox-G 蛋白均含有丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸 3 种氨基酸磷酸化位点,本研究结果与水稻(殷小林 等,2019)、甘蔗(闫海锋等,2020)的 GA3ox 蛋白 分析结果一致。氨基酸同源比对分析发现,矮化 香蕉及其野生型 GA3ox 的氨基酸序列与油棕、海 枣、椰子的同源性最高。

在水稻(李金华等,2007)、马铃薯(Roumeliotis



小写和大写字母分别表示 0.01 和 0.05 水平的显著 性差异。下同。

Lowercase and uppercase letters indicate significant differences at the 0.01 and 0.05 levels. The same below.









et al., 2013)、紫花苜蓿(Dalmadi et al., 2008)和 西瓜(Sun et al., 2020)等作物中研究发现,当 GA3ox 基因发生突变时会导致其编码产物的功能 缺失,植物体内 GA1和 GA4 含量降低,导致植株 表现出矮化表型。在水稻矮化突变体 d18 中由于 OsGA3ox2 基因第 2 个外显子中的一个鸟嘌呤(G) 的缺失改变了阅读框,导致 OsGA3ox2 功能的缺 失,使得植株表现出矮化特性(李金华等,2007); 在马铃薯中由于 StGA3ox2 基因的突变,造成植株 节间变短(Roumeliotis et al., 2013),从而产生矮 化表型;紫花苜蓿矮化突变体由于 MsGA3ox 氨基 酸序列发生突变,损害 MsGA3ox 的功能并导致植 株矮化(Dalmadi et al., 2008);在西瓜中由于 GA3ox 功能的缺失阻断了 GA4 的合成,导致植物 赤霉素含量降低,植株表现出矮化性状(Sun et al., 2020)。本研究对威廉斯 B6 矮化突变体及其 野生型亲本 GA3ox 的 cDNA 序列的比对分析发现, 矮化突变体的 GA3ox 和野生型 GA3ox 的 cds 长度 相同,但其编码产物的氨基酸序列中存在 5 个位 点的差异。因此,推测 GA3ox 结构差异可能是引 起香蕉茎秆矮化变异重要的因素。

GA3ox 基因的表达异常对植物株高发育有较 大的影响,目前已在马铃薯(Roumeliotis et al., 2013)、山核桃(魏广利等, 2021)和豌豆(Reinecke et al., 2013)等作物中发现, GA3ox 表达量的变化 影响了植物株高性状。在马铃薯中,由于 StGA3ox2的表达下调,因此突变体植株表现出矮 小、节间较短等表型(Roumeliotis et al., 2013);在 山核桃中,过量表达 CcGA3ox 基因使得植株变高 (魏广利等,2021);豌豆 PsGA3ox1 的过量表达导 致 GA1 含量增加,从而促进了豌豆节间的伸长 (Reinecke et al., 2013)。本研究发现, GA3ox 在香 蕉矮化突变体茎秆中的表达水平显著低于野生 型,这与马铃薯、豌豆、山核桃等植物的表达模式 相似,说明 GA3ox 基因的表达量会影响植物株高, 当 GA3ox 表达量下调时植株表现出节间缩短和矮 化等表型。

综上所述,推测矮化香蕉表型的变异原因可 能是 GA3ox 的序列发生突变导致其编码产物 GA3ox 的功能发生改变;或是其表达水平降低导 致 GA3ox 的酶活性功能降低,使香蕉的内源 GA1/ GA4 含量下降,从而影响了茎秆和其他器官的伸 长生长。这表明 GA3ox 基因的突变和表达水平的 变化对于香蕉茎秆的矮化变异可能具有重要的调 控作用。但是,GA3ox 的突变和表达水平降低是否 引起香蕉茎秆矮化变异,还需要进一步验证 GA3ox 基因的功能来确定。

#### 参考文献:

- AIT-ALI T, SWAIN SM, REID JB, et al., 1997. The LS locus of pea encodes the gibberellin biosynthesis enzyme ent-kaurene synthase A [J]. Plant J, 11(3): 443-454.
- ASHIKARI M, SASAKI A, UEGUCHI-TANAKA M, et al.,

2002. Loss-of-function of a rice gibberellin biosynthetic gene, GA20 oxidase (GA20ox-2) led to the rice 'Green Revolution' [J]. Breed Sci, 52: 143–150.

- CHEN JJ, HU YL, HU HG, et al., 2014a. Research advances on dwarfing genes in plants [J]. Guangdong Agric Sci, 41 (15):126-132. [陈晶晶, 胡玉林, 胡会刚, 等, 2014a. 植 物矮化相关基因的研究进展 [J]. 广东农业科学, 41(15):126-132.]
- CHEN JJ, HU YL, PANG ZC, et al., 2014b. Preliminary investigation on dwarfing mechanism in a banana dwarf mutant [J]. Chin J Trop Crops, 35(11): 2144-2150. [陈晶晶, 胡玉林, 庞振才, 等, 2014b. 威廉斯香蕉矮化突变体 矮化原因初探 [J]. 热带作物学报, 35(11): 2144-2150.]
- CHEN Y, HOU M, LIU L, et al., 2014. The maize dwarf1 encodes a gibberellin 3-oxidase and is dual localized to the nucleus and cytosol [J]. Plant Physiol, 166(4): 2028.
- CUI X, ZHANG SB, 2017. The utilization and prospect of genome editing in horticultural crops [J]. Acta Hortic Sin, 44(9): 1787-1795. [崔霞,张率斌, 2017. 基因编辑技术 及其在园艺作物中的应用和展望 [J]. 园艺学报, 44(9): 1787-1795.]
- DALMADI A, KALO P, JAKAB J, et al., 2008. Dwarf plants of diploid *Medicago sativa* carry a mutation in the gibberellin 3-beta-hydroxylase gene [J]. Plant Cell Rep, 27 (8): 1271-1279.
- DAVIDSON SE, SMITH JJ, HELLIWELL CA, et al., 2004. The pea gene *LH* encodes *ent*-kaurene oxidase [J]. Plant Physiol, 134(3): 1123-1134.
- FAN YG, QIU LH, HUANG X, et al., 2019. Expression analysis of key genes in gibberellin biosynthesis and related phytohormonal dynamics during sugarcane internode elongation [J]. Chin Bull Bot, 54(4): 486-496. [范业赓, 丘立杭, 黄杏, 等, 2019. 甘蔗节间伸长过程赤霉素生物 合成关键基因的表达及相关植物激素动态变化 [J]. 植物 学报, 54(4): 486-496.]
- HEDDEN P, PHILLIPS AL, 2000. Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes [J]. Trends Plant Sci, 5(12): 523-530.
- HEDDEN P, THOMAS SG, 2012. Gibberellin biosynthesis and its regulation [J]. Biochem J, 444(1): 11–25.
- HELLIWELL CA, SHELDON CC, OLIVE MR, et al., 1998. Cloning of the arabidopsis ent-kaurene oxidase gene GA3 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 95(15): 9019-9024.
- HU J, ISRAELI A, ORI N, et al., 2018. The interaction between della and arf/iaa mediates crosstalk between gibberellin and auxin signaling to control fruit initiation in tomato [J]. Plant Cell, 30(8): 1710–1728.
- LI JH, WANG F, LIAO YL, et al., 2007. Research progresses on the dwarfness and its related genes in rice [J]. Hybridoma, 22(3): 1-5. [李金华, 王丰, 廖亦龙, 等, 2007. 水稻矮生性及其相关基因的研究进展 [J]. 杂交水 稻, 22(3): 1-5.]
- LI SL, ZHENG HY, WANG L, 2020. Application and prospect of gene editing technology in crop breeding [J]. Biotechnol Bull, 36 (11): 209 221. [李树磊, 郑红艳, 王磊, 2020. 基因编辑技术在作物育种中的应用与展望 [J]. 生物技术通报, 36(11): 209–221.]

- ROUMELIOTIS E, KLOOSTERMAN B, OORTWIJN M, et al., 2013. Down regulation of *StGA3ox* genes in potato results in altered GA content and affect plant and tuber growth characteristics [J]. J Plant Physiol, 170(14): 1228–1234.
- SASAKI A, ASHIKARI M, UEGUCHI-TANAKA M, et al., 2002. Green revolution: a mutant gibberellin-synthesis gene in rice [J]. Nature, 416(6882): 701-702.
- SHU HY, SUN W, WANG Z, et al., 2016. The possible analysis for breeding banana varieties with high resistance [J]. Mol Plant Breed, 14(12): 3511-3515. [舒海燕, 孙 威, 王展, 等, 2016. 香蕉抗风育种的可行性分析 [J]. 分 子植物育种, 14(12): 3511-3515.]
- SINGH B, SINGH JP, KAUR A, et al., 2016. Bioactive compounds in banana and their associated health benefits — a review [J]. Food Chem, 206: 1–11.
- SUN YY, ZHANG HQ, FAN M, et al., 2020. A mutation in the intron splice acceptor site of a *GA3ox* gene confers dwarf architecture in watermelon (*Citrullus lanatus* L.) [J]. Sci Rep, 10(1): 14915.
- WANG FJ, ZHAO KJ, 2018. Progress and challenge of crop genetic improvement via genome editing [J]. Sci Agric Sin, 51(1): 1-16. [王福军,赵开军, 2018. 基因组编辑技术应用于作物遗传改良的进展与挑战 [J]. 中国农业科学, 51(1): 1-16.]
- WEI GL, LIANG B, ZHANG JQ, et al., 2021. Cloning and functional analysis of *CcGA3ox* gene from hickory (*Carya cathayensis*) [J]. J Fruit Sci, 38(1): 13-28. [魏广利,梁 璧,张佳琦,等, 2021. 山核桃赤霉素氧化酶基因 *CcGA3ox* 的克隆和功能分析 [J]. 果树学报, 38(1): 13-28.]
- YAMAGUCHI S, 2008. Gibberellin metabolism and its regulation [J]. Ann Rev Plant Biol, 59: 225–251.
- YAN HF, CHEN RF, QIU LH, et al., 2020. Molecular cloning and expression analysis of gibberellin synthesis gene *ScGA3ox* in sugarcane [J]. Plant Physiol J, 56(10): 2121-2131. [闫 海锋,陈荣发,丘立杭,等, 2020. 甘蔗赤霉素合成基因 *ScGA3ox* 的克隆和表达分析 [J]. 植物生理学报, 56(10): 2121-2131.]
- YANG YS, XIA JH, TIAN JW, et al., 2015. Effects of spraying stage of gibberellin acid 3 on the internode elongation and heading related traits of PTGMS lines in rice [J]. Res Agric Mod, 36(6): 1099-1104. [杨益善,夏俊 辉,田继微,等, 2015. 赤霉素喷施时期对水稻光温敏核 不育系节间伸长和抽穗相关性状的影响 [J]. 农业现代化 研究, 36(6): 1099-1104.]
- YIN XL, ZHANG C, WANG YC, et al., 2019. Bioinformatics analysis of the homologous gene of gibberellin 3β-hydroxylase gene (*OsGA3ox1*) in rice [J]. Mol Plant Breed, 17(4): 1054–1060. [殷小林,张超,王有成,等, 2019. 水稻赤霉 素 3β 羟化酶基因(*OsGA3ox1*) 同源基因的生物信息学分 析 [J]. 分子植物育种, 17(4): 1054–1060.]
- ZHANG RM, LI C, CHEN DL, et al., 2019. Breeding of short stem, erect plant type DW871 in *Brassica napus* L. [J]. Seed, 38(2): 116-120. [张瑞茂, 李超, 陈大伦, 等, 2019. 甘蓝型油菜矮杆直立株型材料 DW871 的选育 [J]. 种子, 38(2): 116-120.]

(责任编辑 李 莉)

广西植物 **Guihaia** Nov. 2022, **42**(11): 1929–1938

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202205018

王世雄,何跃军,王文颖.基于功能性状的外来植物入侵预测模型框架构建 [J]. 广西植物, 2022, 42(11): 1929-1938. WANG SX, HE YJ, WANG WY. Construction of model framework for invasion prediction of alien plants based on functional traits [J]. Guihaia, 2022, 42(11): 1929–1938.



王世雄<sup>1,2</sup>\*. 何跃军<sup>1</sup>. 王文颖<sup>2</sup>

(1. 贵州大学林学院,森林生态研究中心,贵阳 550025;2. 青海师范大学 生命科学学院,高原科学与可持续发展研究院,西宁 810008)

摘 要:预测外来植物的潜在入侵性已成为生物多样性保护研究的重要内容,外来植物与乡土物种间的亲 缘关系是预测外来植物能否成功入侵的一个重要途径。然而,达尔文归化难题却预测了两种截然不同的结 果(即达尔文归化假说和预适应假说)。该研究解析了达尔文归化难题的内涵,提出了基于功能性状的外来 植物与乡土群落间的相似性关系应该是进行外来植物入侵预测的重要切入点,而功能性状的种间分化与种 内变异可能是外来植物成功入侵的两种不同生态策略。在此基础上,该研究还通过物种功能性状的多维超 体积构建了外来植物与乡土群落间的相似性,提出了基于这种相似性的外来植物入侵预测的研究框架和基 本流程。该模型框架的建立有助于理解外来植物的入侵机制,对外来植物的潜在入侵性预测提供了理论依 据。当然,要实现外来植物能否成功入侵的准确预测,不仅依赖于功能性状的选择,还要考虑入侵的生境依 赖性、空间尺度的重要性以及乡土群落的可入侵性等,未来的研究重点是通过控制实验对该模型进行验证 和进一步完善。

关键词: 生物拮抗, 达尔文归化难题, 功能相似性, 亲缘关系, 性状可塑性 文章编号: 1000-3142(2022)11-1929-10 中图分类号: 0948.15 文献标识码:A

## Construction of model framework for invasion prediction of alien plants based on functional traits

WANG Shixiong<sup>1,2\*</sup>, HE Yuejun<sup>1</sup>, WANG Wenying<sup>2</sup>

( 1. Research Center for Forest Ecology, College of Forestry, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. College of Life Sciences, Qinghai Normal University, Academy of Plateau Science and Sustainability, Xining 810008, China)

Abstract: Predicting the potential invasiveness of alien plants is important for biodiversity conservation study. The phylogenetic relationship between alien plants and native species is usually used to predict invasion, however, Darwin's





收稿日期: 2022-08-29

基金项目:国家自然科学基金(32160267);贵州省科技计划项目(黔科合基础 [2019]1060);贵州省教育厅青年科技人才成长项 目(黔教合 KY 字 [2018]098);贵州大学引进人才科研项目(贵大人基合字 [2017]38 号);青海师范大学中青年科研基金 (2019zr011) [Supported by National Natural Science Foundation of China (32160267); Guizhou Provincial Science and Technology Project ([2019]1060); Youth Science and Technology Talent Growth Project of Guizhou Provincial Department of Education (KY[2018]098); Project of Introducing Talents of Discipline to Guizhou University ([2017]38); Youth Foundation of Qinghai Normal University (2019zr011)]. 第一作者:王世雄(1985-),博士,副教授,主要从事物种多样性保护与恢复生态学研究,(E-mail)wangshix812@163.com。

<sup>\*</sup>通信作者

naturalization conundrum predicts two completely different results (i.e. Darwin's naturalization hypothesis and Darwin's preadaptation hypothesis). In this study, we analyzed the connotation of Darwin's naturalization conundrum and suggested that the base of invasion prediction should be changed from a pairwise phylogenetic relationship between alien plants and native plants to the functional similarity between alien plants and native communities. The interspecific differentiation and intraspecific variation of functional traits may be different but not contradictory strategies of alien plants to achieve successful invasion. On this basis, this study constructed the functional similarity between alien plants and native communities through the multidimensional hypervolume of traits and putted forward the research framework and basic flow for invasion prediction based on the similarity. This construction of mechanism model framework helps understand the invasion mechanism and provides practical guidance for potential invasion prediction of alien plants. However, to accurate prediction of alien plants not only depends on the selection of functional traits, but also on the invasive habitat independence, the importance of spatial scales, and even the invasiveness of native communities. Future research is necessary to verify and improve the model through control experiments.

Key words: biotic resistance, Darwin's naturalization conundrum, functional similarity, phylogenetic relationship, trait plasticity

全球生态系统正经历着前所未有的生物多样 性变化,外来物种的入侵是重要的驱动力之一 (Hulme, 2012; Simberloff et al., 2013; 杨继和李 博,2017; Munro et al., 2019)。预测外来植物的潜 在入侵性已成为生物多样性保护的重要研究内容 (Mack et al., 2000; 郑珊珊等, 2018)。生物拮抗 (biotic resistance)是决定外来植物能否成功入侵的 重要机制,即乡土物种对外来物种表现的竞争效应 (Conti et al., 2018), 是广泛存在的对潜在入侵者的 一个重要自然屏障。外来物种必须突破生物拮抗, 才有可能成功入侵(Nereu et al., 2018)。在所有其 他条件相同的情况下,较大的生物拮抗将意味着较 低的入侵成功率。达尔文就曾注意到外来植物与 乡土物种间的亲缘关系对外来植物成功入侵的重 要作用,并提出了达尔文归化假说(Darwin's naturalization hypothesis, DNH)和预适应假说 (Darwin's preadaptation hypothesis, DPH) (Darwin, 1859)。随着谱系生态学的发展,这两个假说逐渐 成为描述外来植物和乡土物种间的亲缘关系与外 来植物能否成功入侵的重要理论依据(Strauss et al., 2006; 王坤等, 2009; Castro et al., 2014), 这为 外来植物的入侵预测提供了研究思路。

1 达尔文归化难题

达尔文归化假说(DNH)认为,在含有同属乡 土物种较多的地方,外来植物不太容易建立自我 维持的可持续种群(Daehler, 2001)。这是因为较 近的亲缘关系将表现为较大的物种相似性 (Burns & Strauss, 2011),意味着存在剧烈的种间 竞争、共同的天敌以及相似的病原菌。种间竞争 与物种相似性紧密相关,物种间的相似性越高,生 态位越相似,竞争排斥越强烈,物种共存的难度越 大。限制相似性假说(limiting similarity hypothesis) 认为,共存物种间存在限制相似性以避免激烈的 种间竞争(Macarthur & Levins, 1967)。换句话说, 共存于同一个生态系统的植物性状应该趋异(trait divergence),拥有与乡土群落不同性状的外来植物 将具有较大的入侵潜力,即生态位分化假说(niche differentiation hypothesis) (Lambdon et al., 2008) 同时,达尔文意识到,外来植物在含有较多同属乡 土物种的生境中成功入侵也是可能的。特定生境 中的关键环境因素决定着哪些物种可以生长、繁 殖、扩散,即什么样的生境适合什么样的外来植物 入侵,这被称之为生境过滤假说(habitat filtering hypothesis)(Kraft et al., 2015)。相近的亲缘关系 意味着相似的生态需求,使外来植物对当地环境 反而因有更好的适应性而有利于成功入侵 (Proches et al., 2008),即预适应假说(DPH)。例 如,我国和北美、热带美洲的经纬度、温度等气候 因子都比较类似,因此我国北方已分布的入侵植 物起源于北美的物种也占比较大,而长江以南地 区已分布的入侵植物起源于热带美洲的物种占比 较大。近20年来,学者们对这两个对立的假说进 行了很多实证研究,但得到了很不一致的结果 (Jones et al., 2013; Li et al., 2014; Qian &

Sandel, 2017)。因此,达尔文归化假说和预适应 假说被合称为达尔文归化难题(Darwin's naturalization conundrum)(Diez et al., 2008; Park et al., 2020)。由于达尔文的观点是基于物种的 系统发育相关性与决定物种共存的功能性状相似 性有关这样一个假设,因此亲缘关系可以作为性 状相似性的代理,潜在地提供尚未量化的性状信 息。然而,也有研究发现,亲缘关系密切相关的物 种在影响物种入侵性的关键性状上存在显著差异 (Funk & Vitousek, 2007),从功能性状的角度理解 生物抗性可能是一个更有前景的方法(Yannelli et al., 2017)。

2 功能性状的重要性

功能性状决定了物种个体的存活、生长和繁殖(Adler et al., 2014),以及物种间相互作用的强度和标志(Kunstler et al., 2016)。越来越多的证据表明,解决物种与物种以及物种与环境间相互作用的方法是利用物种的功能性状,而不是依赖于它们的分类学特性(Violle et al., 2007; Levine, 2016; Pérez-Ramos et al., 2019)。Yannelli 等(2017)研究表明,亲缘关系较近物种的优势性状在抵御外来物种的入侵中发挥了最重要的作用。然而,功能性状如何影响物种共存以及决定外来植物入侵,目前知之甚少。建立功能性状与外来植物间的关系可预测外来植物的入侵,为外来植物的入侵防治提供理论依据。

物种的功能性状一方面保持了进化上的保守性,另一方面表现为可塑性。功能性状的种间分化(interspecific differentiation)和种内变异(intraspecific variation)是物种实现对群落环境适应以及对种间竞争响应的重要生态策略。

#### 2.1 功能性状的种间分化

外来植物对乡土群落的入侵过程就是乡土群 落被外来植物入侵干扰后的群落构建过程,外来 植物的入侵必然伴随着有限资源的争夺。因此, 物种间的生态位分化是外来植物实现成功入侵的 一般前提。植物的种间性状分化在一定程度上能 够反映其生态位分化,导致植物在群落内的适合 度差异,进而促进外来植物的成功入侵。物种间 的生态分化可体现为与其资源获取和利用策略相 关的功能性状分化(Wright et al., 2004)。同时, 与资源策略相关的功能性状之间应存在协调性, 以优化植物的资源获取和利用效率(Reich et al., 2003; Aubin et al., 2016)。

#### 2.2 功能性状的种内变异

性状的种内变异是群落构建的重要贡献者 (唐青青等,2016; He et al., 2018)。同一物种的 不同个体间存在明显的功能性状变异,即性状可 塑性(trait plasticity),这种变异可以有效避免或者 缓冲种内竞争,是物种生存策略的权衡,具有十分 重要的进化和生态学意义(Mackay et al., 2009)。 此外,性状可塑性使植物能够应对环境异质性,并 可能在更广泛的环境下生存(Palma et al., 2021)。 性状可塑性也可能使外来植物和乡土物种的生态 位重叠最小化,从而提高外来植物成功入侵的概 率(Bennett et al., 2016)。将性状的种内变异引入 外来植物入侵中,不仅可以极大提高物种入侵机 制检测的灵敏度(Jung et al., 2010; Paine et al., 2011),而且可以有效揭示物种入侵机制(Albert et al., 2011; Clark et al., 2011)。有研究表明,在资 源有限的环境中,性状可塑性能够提高外来植物 对资源的获取能力及利用效率,加速外来植物的 生长和繁殖,从而增强其种群竞争能力(Leicht-Young et al., 2007; Funk, 2008)。与乡土植物相 比,入侵植物常常具有较大的性状可塑性 (Daehler, 2003; Mozdzer et al., 2012; 潘玉梅等, 2017),约有 50%入侵植物的入侵能力与其性状可 塑性相关(Ren & Zhang, 2009; 刘建等, 2010; 郑 欣颖和薛立,2018)。然而,群落生态学家似乎更 重视性状的种间分化,却忽视了种内变异的重要 性,而性状的种间分化与种内变异是外来植物适 应异质生境和实现成功入侵的两种不同生态策略 (Helsen et al., 2020)。因此,在入侵生态学中,真 正值得关注的不仅仅是性状的种间分化或者种内 变异的绝对大小,而是二者的相对重要性及其权 衡关系。

#### 3 外来植物入侵预测的理论基础

达尔文归化难题通过功能性状的引入就可以 描述为如下两个不同的假说。其一,亲缘关系相 近的一些物种集合,它们占据相同或相似生态位、 资源利用方式相同或相近,物种间存在着强烈竞 争,在含有相似功能性状的群落中,被引入的外来 植物建立自我维持的野生种群的可能性将减少 (Daehler, 2001),即达尔文归化假说。其二,外来 植物和乡土物种具有相似的功能性状特征,对资 源需求基本一致(Hooper & Vitousek, 1997; Naeem et al., 2000; Symstad, 2000; Dukes, 2001; Young et al., 2009),使其对当地环境有着更好的适应性 而有利于成功归化或者入侵,即预适应假说 (Daehler, 2001; Diez et al., 2008)。达尔文归化 假说强调的是物种间的相互作用,而预适应假说 强调的是物种对生境的共同需求(Skóra et al., 2015),外来植物能否成功入侵依赖于生境需求与 种间互作的权衡,而这种权衡关系又依赖于外来 植物与乡土群落间的相似性。

近年来,基于物种间关系的入侵研究取得了一 些重要的成果,但这些研究主要集中在外来植物与 乡土物种二者间的亲缘关系方面(Carmona et al., 2019; van Klink et al., 2019; Dong et al., 2020),并 且基于控制实验的研究结果是否与自然条件下的 结论一致仍是一个悬而未决的问题。自然界中的 物种关系并不是简单的两两间的物种关系,而是外 来植物与乡土群落所有物种间的一对多的关系。 同时,一对多的种间关系并不等于两两间物种关系 的平均。不同的乡土群落意味着不同的物种多样 性、不同的功能群组成、不同的物种多度格局等,这 些不同决定了外来植物的入侵预测必须从群落水 平上整体考虑。因此,研究外来植物和乡土物种亲 缘相似性与入侵结果间的关系,应该从外来植物与 乡土物种二者间的亲缘关系转变为外来植物与乡 土群落间的相似性关系(Skóra et al., 2015)。通过 构建外来植物与乡土群落间的相似性关系来进行 外来植物入侵预测,该法从整体上考虑外来植物与 乡土群落间的关系,排除了特定种间关系(如乡土 群落中的优势物种)对入侵的主导性,这使得预测 结果更加准确和全面。

为了评价外来植物与乡土群落间的相似性, 应该引入基于功能性状的功能相似性指数 (functional similarity index, FSI)。根据外来植物 与乡土群落间的相似性,理论上有两种理想的关 系模式(Skóra et al., 2015),即指数模式和对数模 式(图1)。指数模式表示的外来植物与乡土群落 间的相似性较大,即外来植物与绝大多数乡土物 种功能性状相似,在该模式下,如果外来植物成功 入侵,其可能是因为达尔文预适应假说(DPH),而 入侵失败则可能是由于达尔文归化假说(DNH); 对数模式表示的外来植物与乡土群落间的相似性 较小,即外来植物与绝大多数乡土物种功能性状 不相似,在该模式下,如果外来植物成功入侵可能 是因为达尔文归化假说(DNH),而入侵失败则可 能是由于预适应假说(DPH)。

建立基于功能性状的入侵植物与乡土群落间 的相似性,不仅可以有效预测外来植物能否成功 入侵,而且可以通过群落功能性状的变化揭示外 来植物入侵机制。对数模式下的成功入侵,种间 互作是主要作用,反映在物种性状上可能表现为 种间分化的主导性,生态位空缺或者生态位分化 是外来植物成功入侵的可能机制(Lambdon et al., 2008; Dong et al., 2020);指数模式下的成功入 侵,反映了物种间的共同生境需求,在该模式下要 实现成功入侵,性状的种内变异应该是主要贡献 者。在性状趋同的前提下,性状的种内变异能够 提高外来植物对资源的获取能力及利用效率,加 速外来植物的生长和繁殖,从而增强其种群竞争 能力,内禀优势应该是外来植物成功入侵的可能 机制(Sax & Brown, 2000; Leicht-Young et al., 2007; Funk, 2008).

#### 4 外来植物入侵预测的流程

具体来说,建立基于功能性状的外来植物入 侵预测,大体上需要以下3个基本过程(图2):一 是功能性状的测定与筛选;二是基于功能性状计 算外来植物与乡土群落间的相似性;三是基于功 能性状种间分化和种内变异的分解探究外来植物 的可能入侵机制。

#### 4.1 功能性状的测定与筛选

有研究表明,并不是所有的性状都适合用来 预测特定的生态功能,性状的选择必须基于其作 用于特定生态功能下的潜在机制。"合理的性状 选择—考虑性状种间分化和种内变异—功能多样 性指数的选择—功能性状与生态功能的尺度匹 配"是提高物种功能性状对生态功能的尺度匹 配"是提高物种功能性状对生态功能预测的有效 手段(Liu et al., 2021)。某些性状的大量测量和 广泛的研究并不意味着它们在外来植物入侵中发 挥重要作用,可能仅仅是因为它们更易测量。外 来植物具有不同的入侵方式,并依赖于不同的性 状组合。例如,一些性状 (如种子质量)对入侵的



DNH 表示达尔文归化假说; DPH 表示达尔文预适应假说。下同。引自参考文献(Skóra et al., 2015),有修改。 DNH indicates Darwin's naturalization hypothesis; DPH indicates Darwin's preadaptation hypothesis. The same below. Figure modified from the reference (Skóra et al., 2015).

> 基于功能性状的外来植物与乡土群落间相似性及其入侵结果 图 1

Fig. 1 Chart of similarity between alien plants and native communities based on functional traits and its invasive results



基于功能性状的外来植物入侵预测流程示意图 图 2 Fig. 2 Flow chart of invasion prediction of alien plants based on functional traits

不同阶段表现了促进、阻碍或没有显著影响的复 杂作用(Palma et al., 2021)。因此,功能性状的选 择和筛选成为了外来植物预测的重要基础。今 后,物候特征、植物发育阶段、共存植物生长的异 步性以及一些难以测量的"硬"性状都应引起生态 学家的足够重视(Liu et al., 2021)。

#### 4.2 外来植物与乡土群落间的相似性分析

目前,外来植物与乡土群落间的功能相似性 构建主要有两种思路:一种是基于外来植物与乡 土群落中每一物种的相似性而形成的相似性等级 谱;另一种是基于超体积生态位的 n 维性状空间 及其超体积质心之间的距离大小。由于基于性状 的生态位差异是多维的,外来植物和乡土群落间 的相似性或者差异性应该同时跨越多个性状进行 探索(Geange et al., 2011; Blonder et al., 2014; Bittebiere et al., 2019)。因此,本研究推荐使用第 二种方法进行外来植物与乡土群落间的相似性 评价。

Hutchinson 的n 维超体积概念将生态位解释 为几何形状,为跨生态学和进化学的不同领域的 研究提供了基础(Hutchinson, 1957)。这些形状 可以被解释为生态位、生态或进化策略空间或群 落结构的代表。该方法通过评估表征一组物种所 占据的功能性状的超体积来量化生态位空间,同 时,性状超体积算法可以度量共享相同功能空间 的超体积比例以及每个物种的特异性体积分数。 因此,n 维性状超体积能够预测物种间沿着环境梯 度生态位转移的群落内产生的功能冗余(重叠), 并且能推断相关生态过程,如竞争排斥和生态位 分化(de la Riva et al., 2018)。目前,性状超体积 概念的应用范围不断扩大,有越来越多的统计方 法可用来进行运算。例如,基于多元核密度估计 的方法(Mouillot et al., 2005; Mason et al., 2008; Blonder et al., 2014)构建性状超体积结构来评估 外来植物入侵过程中的多维生态位重叠,并表现 出了很好的效果和优势。

功能性状超体积构建后,可以通过计算多维 性状空间中超体积质心之间的欧氏距离、每个超 体积的唯一体积分数以及超体积结构之间的 Jaccard 相似性来评估每个数据集的超体积结构之 间的功能相似性(functional similarity)和生态位重 叠情况。其中,Jaccard 相似性定义为两个超体积 结构交集的体积除以两个超体积结构并集的 体积。

#### 4.3 功能性状的种间分化与种内变异分解

为了评估性状的种间分化和种内变异对功能 性状空间的相对贡献可以通过性状变异分解的方 式来实现(Lepš et al., 2011),目前已有诸如"cati" 等多个 R 语言的软件包可以轻松实现(Taudiere & Violle, 2016)。其基本过程如下:首先,计算包含 样方间种内变异和物种周转的性状总变异 $T_1$ 。 $T_1$ 既包括不同样方(或环境)中的物种周转,也包括 不同样方(或环境)中同一物种的性状值的种内变 异。然后,固定所有样方中同一物种的性状值,计 算一次性状变异 $T_2$ 。因为去除了同一物种的种内 变异,所以 $T_2$ 只包括由样方间物种周转所引起的 性状变异。最后,通过计算 $T_1$ 和 $T_2$ 之差可以估计 种内性状变异 $T_3$ 的相对大小。计算公式如下:

$$T_{1} = \sum_{i=1}^{S} p_{i} \times x_{i\_habitat} ;$$
  

$$T_{2} = \sum_{i=1}^{S} p_{i} \times x_{i} ;$$
  

$$T_{3} = T_{1} - T_{2} \circ$$

式中: *p<sub>i</sub>*为第*i*个物种的比例; *x<sub>i</sub>*为固定了所 有样方中第*i*个物种的性状平均值; *x<sub>i</sub>*<sub>*habitat*</sub>为第*i* 个物种在不同生境中的特定性状值; *S*为群落中的 物种总数。

#### 5 研究展望

功能性状超体积的引入为建立外来植物与乡 土群落间的相似性奠定了重要基础,同时,性状的 种间分化和种内变异的分解也为揭示外来植物入 侵机制提供可能途径。尽管这些均是进行外来植 物入侵预测的重要基础,但是,这些美好的前景也 面临着一些挑战。

#### 5.1 入侵的生境依赖性

尽管功能性状在物种入侵中扮演了十分重要的作用,但是外来植物要能成功入侵,首先要突破区域环境的限制。生境条件不仅影响外来植物的入侵过程,而且影响乡土物种的组成(Richardson & Pyšek, 2012; Pearson et al., 2018)。环境过滤将导致性状和功能相似的物种被筛选进入相近的生态位,使群落内各物种的性状趋同(Bazzaz, 1991; Lavorel & Garnier, 2002)。相反,竞争排斥会使得生态位相似的物种无法共存于同一环境,而群落内物种的亲缘关系则较远,表现为各物种的性状趋异发散(Webb et al., 2002; Ackerly & Cornwell, 2007)。环境过滤和生物拮抗共同作用决定了入侵植物性状特征的分布格局。一般来说,环境中主要资源(如光照、水分等)梯度决定了物种功能性状的分布范围(Fargione & Tilman, 2005; Kraft

et al., 2015), 而生物拮抗决定了物种性状变异的 方向和程度。外来植物的入侵过程就是环境过 滤、种间竞争和种内性状变异耦合作用的结果。 例如,对北非干旱带的研究表明,在资源极端限制 的环境中,外来植物和乡土物种在性状上相似,这 支持了达尔文预适应假说(DPH)。然而,在资源 相对丰富的环境中,外来植物和乡土植物在性状 上不相似,外来植物表现出更具入侵性的性状(更 高的比叶面积、地上生物量和高度),这为达尔文 归化假说(DNH)提供了支持(El-Barougy et al., 2020)。在对中欧温带地区的6种不同生境类型 中的入侵研究表明,外来物种在植物群落中成功 建立的主要决定因素是环境过滤。然而,已建立 的外来植物如果想要成为入侵物种,就必须有足 够的差异性来占据新的生态位空间,即性状空间 的边缘(Divíšek et al., 2018)。因此,进一步了解 环境条件如何决定植物群落的功能结构和生态位 超体积以及检验不同环境梯度上的外来植物入侵 过程是十分必要的。综上认为,基于功能性状的 预测模型应该充分考虑生境条件的重要性。

#### 5.2 空间尺度的重要性

越来越多的研究表明,达尔文的两个对立的 假说并不一定是相互排斥的(Carboni et al., 2013; Park et al., 2020)。相反,在不同环境或空间尺度 下,每种假说都可以正确地预测生物入侵的结果。 例如,Meta分析发现,引进的外来物种在局域尺度 上与乡土物种的亲缘关系更密切,但在更大的区 域尺度上与乡土物种的亲缘关系则不那么密切 (Li et al., 2016)。在小空间尺度(如地块或生境 尺度)上,近缘物种的相互排斥格局可能更加严重 (Swenson et al., 2007)。在更大的空间尺度上,由 于广泛的共同环境偏好和较少的种间竞争,近缘 物种更有可能共存(Proches et al., 2008)。美国 植物区系的研究表明,随着空间尺度的增大,环境 过滤特性超过竞争特征的概率增大,达尔文的两 个对立假说在不同的空间尺度上得到了合理解释  $(Park et al., 2020)_{\circ}$ 

#### 5.3 乡土群落的可入侵性

外来植物能否最后成功入侵,不仅取决于其 与乡土群落的相似性或差异性,同时还依赖于乡 土群落的可入侵性。从功能性状的角度看,物种 丰富的群落表现出不同的功能性状和获取资源的 策略,这往往会导致较高的功能多样性。相应地, 物种较少的群落可能意味着生态位的空余,一些 建立早、生长快的外来植物可能通过快速抢占资 源产生优先效应,从而抑制生长缓慢的乡土物种 在群落中的聚集。同时,物种多样性对生物拮抗 的影响可以进一步划分为选择效应和互补效应 (Loreau, 1998; Loreau & Hector, 2001)。选择效 应是指具有特定性状的物种优势将决定多样性效 应的情况,而互补效应描述的是物种之间的资源 分配或物种间的积极相互作用对多样性效应贡献 最大的情况(Loreau & Hector, 2001)。有研究表 明,空生态位抢占(优先效应)和生态位分化(多样 性效应)均是芦苇(*Phragmites australis*)成功入侵 的潜在机制(Byun et al., 2013)。因此,结合外来 植物的功能性状以及乡土群落的可入侵性可能在 外来植物入侵预测方面提供新的见解。

本研究解析了达尔文归化难题的内涵,从物 种功能性状的保守性、种间分化及其种内变异进 行了分析,提出功能性状的种间分化与种内变异 是外来植物实现成功入侵的两种不同生态策略。 在此基础上,本研究通过物种功能性状的多维超 体积构建了外来植物和乡土群落间的相似性,提 出了基于这种相似性的外来植物入侵预测的研究 框架和基本流程。该模型框架对理解外来植物的 入侵机制提供了理论依据,对外来植物的入侵预 测提供了实践指导。当然,要实现外来植物成功 入侵的准确预测,不仅依赖于功能性状的选择和 测定,还要重点考虑入侵的生境依赖性、空间尺度 的重要性以及乡土群落的可入侵性等,未来的研 究重点是通过控制实验对该机制模型进行验证和 进一步完善。

#### 参考文献:

- ACKERLY DD, CORNWELL WK, 2007. A trait-based approach to community assembly: partitioning of species trait values into within- and among-community components [J]. Ecol Lett, 10(2): 135-145.
- ADLER PB, SALGUERO-GÓMEZ R, COMPAGNONI A, et al., 2014. Functional traits explain variation in plant life history strategies [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 111(2): 740-745.
- ALBERT CH, GRASSEIN F, SCHURR FM, et al., 2011. When and how should intraspecific variability be considered in trait-based plant ecology? [J]. Perspect Plant Ecol Evol Syst, 13(3): 217-225.

- AUBIN I, MUNSON AD, CARDOU F, et al., 2016. Traits to stay, traits to move: a review of functional traits to assess sensitivity and adaptive capacity of temperate and boreal trees to climate change [J]. Environ Rev, 24 (2): 164-186.
- BAZZAZ FA, 1991. Habitat selection in plants [J]. Am Nat, 137: S116-S130.
- BENNETT JA, RIIBAK K, TAMME R, et al., 2016. The reciprocal relationship between competition and intraspecific trait variation [J]. J Ecol, 104(5): 1410–1420.
- BITTEBIERE AK, SAIZ H, MONY C, 2019. New insights from multidimensional trait space responses to competition in two clonal plant species [J]. Funct Ecol, 33(2): 297–307.
- BLONDER B, LAMANNA C, VIOLLE C, et al., 2014. The ndimensional hypervolume [J]. Glob Ecol Biogeogr, 23(5): 595-609.
- BURNS JH, STRAUSS SY, 2011. More closely related species are more ecologically similar in an experimental test [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 108(13): 5302–5307.
- BYUN C, BLOIS SD, BRISSON J, 2013. Plant functional group identity and diversity determine biotic resistance to invasion by an exotic grass [J]. J Ecol, 101(1): 128-139.
- CARBONI M, MÜNKEMÜLLER T, GALLIEN L, et al., 2013. Darwin's naturalization hypothesis: scale matters in coastal plant communities [J]. Ecography, 36(5): 560–568.
- CARMONA CP, DE BELLO F, AZCÁRATE FM, et al., 2019. Trait hierarchies and intraspecific variability drive competitive interactions in Mediterranean annual plants [J]. J Ecol, 107(5): 2078–2089.
- CASTRO SA, ESCOBEDO VM, ARANDA J, et al., 2014. Evaluating Darwin's naturalization hypothesis in experimental plant assemblages: phylogenetic relationships do not determine colonization success [J]. PLoS ONE, 9(8): e105535.
- CLARK JS, BELL DM, HERSH MH, et al., 2011. Individualscale variation, species-scale differences: inference needed to understand diversity [J]. Ecol Lett, 14(12): 1273-1287.
- CONTI L, BLOCK S, PAREPA M, et al., 2018. Functional trait differences and trait plasticity mediate biotic resistance to potential plant invaders [J]. J Ecol, 106(4): 1607–1620.
- DAEHLER CC, 2001. Darwin's naturalization hypothesis revisited [J]. Am Nat, 158(3): 324-330.
- DAEHLER CC, 2003. Performance comparisons of cooccurring native and alien invasive plants: implications for conservation and restoration [J]. Ann Rev Ecol Evol Syst, 34(1): 183-211.
- DARWIN C, 1859. On the origin of species [M]. London: John Murray Press.
- DE LA RIVA EG, VIOLLE C, PÉREZ-RAMOS IM, et al., 2018. A multidimensional functional trait approach reveals the imprint of environmental stress in Mediterranean woody communities [J]. Ecosystems, 21(2): 248-262.

- DIEZ JM, SULLIVAN JJ, HULME PE, et al., 2008. Darwin's naturalization conundrum: dissecting taxonomic patterns of species invasions [J]. Ecol Lett, 11(7); 674-681.
- DIVÍŠEK J, CHYTRÝ M, BECKAGE B, et al., 2018. Similarity of introduced plant species to native ones facilitates naturalization, but differences enhance invasion success [J]. Nat Commun, 9(1): 4631.
- DONG K, XU YJ, HAO G, et al., 2020. Both vacant niches and competition-trait hierarchy are useful for explaining the invasion of *Caragana microphylla* into the semi-arid grassland [J]. Plant Soil, 448(1-2): 253-263.
- DUKES JS, 2001. Biodiversity and invasibility in grassland microcosms [J]. Oecologia, 126(4): 563-568.
- EL-BAROUGY RF, ELGAMAL I, ROHR RP, et al., 2020. Functional similarity and dissimilarity facilitate alien plant invasiveness along biotic and abiotic gradients in an arid protected area [J]. Biol Invasions, 22 (6): 1997–2016.
- FARGIONE J, TILMAN D, 2005. Niche differences in phenology and rooting depth promote coexistence with a dominant C4 bunchgrass [J]. Oecologia, 143 (4): 598-606.
- FUNK JL, 2008. Differences in plasticity between invasive and native plants from a low resource environment [J]. J Ecol, 96(6): 1162-1173.
- FUNK JL, VITOUSEK PM, 2007. Resource-use efficiency and plant invasion in low-resource systems [J]. Nature, 446(7139): 1079–1081.
- GEANGE SW, PLEDGER S, BURNS KC, et al., 2011. A unified analysis of niche overlap incorporating data of different types [J]. Methods Ecol Evol, 2(2): 175-184.
- HE D, CHEN YF, ZHAO KN, et al., 2018. Intra- and interspecific trait variations reveal functional relationships between specific leaf area and soil niche within a subtropical forest [J]. Ann Bot, 121(6): 1173–1182.
- HELSEN K, VAN CLEEMPUT E, BASSI L, et al., 2020. Inter- and intraspecific trait variation shape multidimensional trait overlap between two plant invaders and the invaded communities [J]. Oikos, 129(5): 677–688.
- HOOPER DU, VITOUSEK PM, 1997. The effects of plant composition and diversity on ecosystem processes [J]. Science, 277(5330): 1302-1305.
- HULME PE, 2012. Weed risk assessment: a way forward or a waste of time? [J]. J Appl Ecol, 49 (1): 10-19.
- HUTCHINSON GE, 1957. Concluding remarks: cold spring harbor symposia [J]. Bull Math Biol, 53: 193-213.
- JONES EI, NUISMER SL, GOMULKIEWICZ R, 2013. Revisiting Darwin's conundrum reveals a twist on the relationship between phylogenetic distance and invasibility [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 110(51): 20627–20632.
- JUNG V, VIOLLE C, MONDY C, et al., 2010. Intraspecific variability and trait-based community assembly [J]. J Ecol,
11 期

98(5): 1134-1140.

- KRAFT NJB, ADLER PB, GODOY O, et al., 2015. Community assembly, coexistence and the environmental filtering metaphor [J]. Funct Ecol, 29(5): 592-599.
- KRAFT NJB, GODOY O, LEVINE JM, 2015. Plant functional traits and the multidimensional nature of species coexistence [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 112(3): 797-802.
- KUNSTLER G, FALSTER D, COOMES DA, et al., 2016. Plant functional traits have globally consistent effects on competition [J]. Nature, 529(7585): 204–207.
- LAMBDON PW, PYŠEK P, BASNOU C, et al., 2008. Alien flora of Europe: species diversity, temporal trends, geographical patterns and research needs [J]. Preslia, 80(2): 101-149.
- LAVOREL S, GARNIER E, 2002. Predicting changes in community composition and ecosystem functioning from plant traits: revisiting the Holy Grail [J]. Funct Ecol, 16(5): 545-556.
- LEICHT-YOUNG SA, SILANDER JA, LATIMER AM, 2007. Comparative performance of invasive and native *Celastrus* species across environmental gradients [J]. Oecologia, 154(2): 273–282.
- LEPŠ J, BELLO FD, ŠMILAUER P, et al., 2011. Community trait response to environment: disentangling species turnover vs intraspecific trait variability effects [J]. Ecography, 34(5): 856-863.
- LEVINE JM, 2016. A trail map for trait-based studies [J]. Nature, 529(7585): 163-164.
- LI SP, GUO T, CADOTTE MW, et al., 2014. Contrasting effects of phylogenetic relatedness on plant invader success in experimental grassland communities [J]. J Appl Ecol, 52(1): 89-99.
- LI SP, TAN JQ, LIU MQ, et al., 2016. Different effects of invader-native phylogenetic relatedness on invasion success and impact: a meta-analysis of Darwin's naturalization hypothesis [J]. Proc Royal Soc Biol Sci, 283(1838); 20160663.
- LIU CC, LI Y, YAN P, et al., 2021. How to improve the predictions of plant functional traits on ecosystem functioning? [J]. Front Plant Sci, 12: 622260.
- LIU J, LI JM, YU H, et al., 2010. The relationship between functional traits and invasiveness of alien plants [J]. Biodivers Sci, 18(6): 569-576. [刘建, 李钧敏, 余华, 等, 2010. 植物功能性状与外来植物入侵 [J]. 生物多样 性, 18(6): 569-576.]
- LOREAU M, 1998. Separating sampling and other effects in biodiversity experiments [J]. Oikos, 82(3): 600-602.
- LOREAU M, HECTOR A, 2001. Partitioning selection and complementarity in biodiversity experiments [J]. Nature, 412(6842): 72–76.
- MACARTHUR R, LEVINS R, 1967. The limiting similarity, convergence, and divergence of coexisting species [J]. Am

Nat, 101(921): 377-385.

- MACK RN, SIMBERLOFF D, LONSDALE WM, et al., 2000. Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences, and control [J]. Ecol Appl, 10(3): 689–710.
- MACKAY TFC, STONE EA, AYROLES JF, 2009. The genetics of quantitative traits: challenges and prospects [J]. Nat Rev Genet, 10: 565–577.
- MASON NWH, LANOISELÉE C, MOUILLOT D, et al., 2008. Does niche overlap control relative abundance in French lacustrine fish communities? A new method incorporating functional traits [J]. J Anim Ecol, 77(4): 661-669.
- MOUILLOT D, STUBBS W, FAURE M, et al., 2005. Niche overlap estimates based on quantitative functional traits: a new family of non-parametric indices [J]. Oecologia, 145(3): 345-353.
- MOZDZER TJ, MEGONIGAL JP, 2012. Jack-and-master trait responses to elevated CO<sub>2</sub> and N: a comparison of native and introduced *Phragmites australis* [J]. PLoS ONE, 7(10): e42794.
- MUNRO D, STEER J, LINKLATER W, 2019. On allegations of invasive species denialism [J]. Conserv Biol, 33(4): 797-802.
- NAEEM S, KNOPS JMH, TILMAN D, et al., 2000. Plant diversity increases resistance to invasion in the absence of covarying extrinsic factors [J]. Oikos, 91(1): 97–108.
- NEREU M, HELENO RH, LOPEZ-NÚÑEZ F, et al., 2018. Effects of native biodiversity on grape loss of four castes: Testing the biotic resistance hypothesis [J]. Web Ecol, 18(1): 15-27.
- PÉREZ-RAMOS IM, MATÍAS L, GÓMEZ-APARICIO L, et al., 2019. Functional traits and phenotypic plasticity modulate species coexistence across contrasting climatic conditions [J]. Nat Commun, 10: 2555.
- PAINE CET, BARALOTO C, CHAVE J, et al., 2011. Functional traits of individual trees reveal ecological constraints on community assembly in tropical rain forests [J]. Oikos, 120(5): 720–727.
- PALMA E, VESK PA, WHITE M, et al., 2021. Plant functional traits reflect different dimensions of species invasiveness [J]. Ecology, 102(5): e03317.
- PAN YM, TANG SC, WEI CQ, et al., 2017. Comparison of growth, photosynthesis and phenotypic plasticity between invasive and native *Bidens* species under different light and water conditions [J]. Biodivers Sci, 25(12): 1257–1266. [潘 玉梅, 唐赛春, 韦春强, 等, 2017. 不同光照和水分条件下 鬼针草属入侵种与本地种生长、光合特征及表型可塑性的 比较 [J]. 生物多样性, 25(12): 1257–1266.]
- PARK DS, FENG X, MAITNER BS, et al., 2020. Darwin's naturalization conundrum can be explained by spatial scale [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 117(20): 10904–10910.
- PEARSON DE, ORTEGA YK, EREN Ö, et al., 2018.

Community assembly theory as a framework for biological invasions [J]. Trends Ecol Evol, 33(5): 313-325.

- PROCHEŞ Ş, WILSON JRU, RICHARDSON DM, et al., 2008. Searching for phylogenetic pattern in biological invasions [J]. Glob Ecol Biogeogr, 17(1): 5-10.
- QIAN H, SANDEL B, 2017. Phylogenetic relatedness of native and exotic plants along climate gradients in California, USA [J]. Divers Distrib, 23(11): 1323-1333.
- REICH PB, WRIGHT IJ, CAVENDER-BARES J, et al., 2003. The evolution of plant functional variation: traits, spectra, and strategies [J]. Int J Plant Sci, 164(S3): S143-S164.
- REN MX, ZHANG QG, 2009. The relative generality of plant invasion mechanisms and predicting future invasive plants [J]. Weed Res, 49(5): 449-460.
- RICHARDSON DM, PYŠEK P, 2012. Naturalization of introduced plants: ecological drivers of biogeographical patterns [J]. New Phytol, 196(2): 383-396.
- SAX DF, BROWN JH, 2000. The paradox of invasion [J]. Glob Ecol Biogeogr, 9(5): 363-371.
- SIMBERLOFF D, MARTIN JL, GENOVESI P, et al., 2013. Impacts of biological invasions: what's what and the way forward [J]. Trends Ecol Evol, 28(1): 58-66.
- SKÓRA F, ABILHOA V, PADIAL AA, et al., 2015. Darwin's hypotheses to explain colonization trends: evidence from a quasi-natural experiment and a new conceptual model [J]. Divers Distrib, 21(5): 583–594.
- STRAUSS SY, WEBB CO, SALAMIN N, 2006. Exotic taxa less related to native species are more invasive [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 103(15): 5841-5845.
- SWENSON NG, ENQUIST BJ, THOMPSON J, et al., 2007. The influence of spatial and size scale on phylogenetic relatedness in tropical forest communities [J]. Ecology, 88(7): 1770-1780.
- SYMSTAD AJ, 2000. A test of the effects of functional group richness and composition on grassland invasibility [J]. Ecology, 81(1): 99–109.
- TANG QQ, HUANG YT, DING Y, et al., 2016. Interspecific and intraspecific variation in functional traits of subtropical evergreen and deciduous broad-leaved mixed forests [J]. Biodivers Sci, 24(3): 262-270. [唐青青, 黄永涛, 丁易, 等, 2016. 亚热带常绿落叶阔叶混交林植物功能性状的种间和种内变异 [J]. 生物多样性, 24(3): 262-270.]
- TAUDIERE A, VIOLLE C, 2016. cati: an R package using functional traits to detect and quantify multi-level community

assembly processes [J]. Ecography, 39(7): 699–708.

- VAN KLINK R, LEPŠ J, VERMEULEN R, et al., 2019. Functional differences stabilize beetle communities by weakening interspecific temporal synchrony [J]. Ecology, 100(8): e02748.
- VIOLLE C, NAVAS ML, VILE D, et al., 2007. Let the concept of trait be functional [J]. Oikos, 116 (5): 882-892.
- WANG K, YANG J, CHEN JK, 2009. The applications of congeneric comparisons in plant invasion ecology [J]. Biodivers Sci, 17(4): 353-361. [王坤,杨继,陈家宽, 2009. 近缘种比较研究在植物入侵生态学中的应用 [J]. 生物多样性, 17(4): 353-361.]
- WEBB CO, ACKERLY DD, MCPEEK MA, et al., 2002. Phylogenies and community ecology [J]. Ann Rev Ecol Syst, 33(1): 475-505.
- WRIGHT IJ, REICH PB, WESTOBY M, et al., 2004. The worldwide leaf economics spectrum [J]. Nature, 428(6985): 821–827.
- YANG J, LI B, 2017. New perspectives and techniques are needed to advance invasion science [J]. Biodivers Sci, 25(12):1255-1256. [杨继, 李博, 2017. 入侵科学的发展需 要新视角和新技术 [J]. 生物多样性, 25(12):1255-1256.]
- YANNELLI FA, KOCH C, JESCHKE JM, et al., 2017. Limiting similarity and Darwin's naturalization hypothesis: understanding the drivers of biotic resistance against invasive plant species [J]. Oecologia, 183(3): 775–784.
- YOUNG SL, BARNEY JN, KYSER GB, et al., 2009. Functionally similar species confer greater resistance to invasion: Implications for grassland restoration [J]. Restor Ecol, 17(6): 884–892.
- ZHENG SS, CHEN XB, XU WN, et al., 2018. Effects of exotic-native species relationship on naturalization and invasion of exotic plant species [J]. Chin J Plant Ecol, 42(10): 990-999. [郑珊珊,陈旭波,许微楠,等, 2018. 外来种-本地种亲缘关系对外来植物归化和入侵的 影响 [J]. 植物生态学报, 42(10): 990-999.]
- ZHENG XY, XUE L, 2018. Research progress about phenotypic plasticity of exotic invasive species *Bidens pilosa* and a congeneic native species *B. biternate* [J]. Chin J Ecol, 37(2):580-587. [郑欣颖,薛立,2018. 入侵植物三叶鬼 针草与近缘本地种金盏银盘的可塑性研究进展 [J]. 生 态学杂志,37(2):580-587.]

(责任编辑 周翠鸣)

广步植物 Guihaia Nov. 2022, 42(11): 1939-1948

#### DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202201063

吉浴芳, 宋松泉, 田向荣, 等. 箭叶淫羊藿种子的休眠类型与萌发研究 [J]. 广西植物, 2022, 42(11): 1939-1948. JI YF, SONG SQ, TIAN XR, et al. Dormancy type and germination of *Epimedium sagittatum* seeds [J]. Guihaia, 2022, 42(11): 1939-1948.



http://www.guihaia-journal.com

# 箭叶淫羊藿种子的休眠类型与萌发研究

吉浴芳<sup>1,2</sup>, 宋松泉<sup>3</sup>, 田向荣<sup>1</sup>, 高家东<sup>2</sup>, 戴嘉兴<sup>2</sup>, 刘 军<sup>2\*</sup>

(1. 吉首大学 生物资源与环境科学学院, 湖南 吉首 416000; 2. 广东省农业科学院农业生物基因研究中心, 广东省农作物种质资源保护与利用重点实验室, 广州 510640; 3. 中国科学院植物研究所, 北京 100093)

**摘 要:**箭叶淫羊藿具有重要的药用价值和较大的市场需求,但其种子休眠和萌发特性目前仍不够清楚,严 重影响了其产业化育苗与栽培。为探明其种子的休眠类型及释放休眠和促进休眠的最适方法,该文以箭叶 淫羊藿的成熟种子为材料,研究种子对水分的吸收、种子的脱水耐性,以及温度、层积和植物激素对种子休 眠与萌发的影响。结果表明:(1)箭叶淫羊藿种子不具有物理休眠,而具耐脱水性。(2)在4~25℃和黑暗 条件下,种子萌发率为零,具有休眠特性。(3)胚与种子的比值非常小,4℃和10℃及变温层积能显著地促 进胚的生长发育以及增加种子的萌发速率和萌发率。(4)赤霉素和氟啶酮显著增加种子的萌发速率和萌发 率。综上认为,箭叶淫羊藿种子的休眠类型为形态生理休眠(MPD),释放休眠和促进萌发的最适方法是先 将种子在10℃中层积30d,再置于4℃环境中让其萌发。该研究结果为箭叶淫羊藿的产业化育苗提供了 参考。

**关键词:**脱水耐性,箭叶淫羊藿种子,萌发,形态生理休眠,层积 **中图分类号:** Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2022)11-1939-10

# Dormancy type and germination of *Epimedium sagittatum* seeds

JI Yufang<sup>1,2</sup>, SONG Songquan<sup>3</sup>, TIAN Xiangrong<sup>1</sup>, GAO Jiadong<sup>2</sup>, DAI Jiaxing<sup>2</sup>, LIU Jun<sup>2\*</sup>

( 1. College of Biology and Environmental Sciences, Jishou University, Jishou 416000, Hunan, China; 2. Agro-biological Gene Research Center, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangdong Provincial Key Laboratory for Crop Germplasm Resources Preservation and Utilization, Guangzhou 510640, China; 3. Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

**Abstract**: *Epimedium sagittatum* plants have an important medicinal value and a huge market demand, but the characteristics on dormancy and germination of their seeds are still unclear, which seriously affects its industrial seedling production and cultivation. In order to verify the type of seed dormancy and the optimal way to release and promote

收稿日期: 2022-07-27

**基金项目:**国家自然科学基金(31871716);广东省农作物种质资源保存与利用重点实验室项目(2020B121201008)[Supported by National Natural Science Foundation of China (31871716); Guangdong Provincial Key Laboratory Project of Crop Germplasm Resources Preservation and Utilization (2020B121201008)]。

第一作者: 吉浴芳 (1997-), 硕士研究生, 主要从事种子生物学研究, (E-mail)710211436@qq.com。

<sup>\*</sup>通信作者:刘军,研究员,主要从事种质资源保存和创新利用研究,(E-mail)liujun@gdaas.cn。

dormacy, using the mature seeds of *E. sagittatum* as experimental materials, we investigated the water uptake and the desiccation tolerance of seeds, as well as the effects of temperature, stratification and phytohormone on seed dormancy and germination. The results were as follows: (1) *E. sagittatum* seeds had no physical dormancy but had desiccation tolerance. (2) The germination percentage of seeds was zero at 4-25 °C and darkness, and these seeds had dormancy characteristics. (3) The embryo/seed ratio was very small, as well as embryo growth and development and seed germination rate and germination percentage were increased by stratification at 4 °C, 10 °C percentage rate and fluctuating temperature stratification. (4) Gibberellin and fluridone significantly increased the germination rate and germination percentage of seeds. In sum, all the above results indicate that the dormancy type of *E. sagittatum* seeds is morphophysiological dormancy, and the optimal method to release dormancy and promote germination is to stratify the seeds at 10 °C for 30 d and then transfer to the environment of 4 °C. This study provides the reference for industrial culturing seedlings of *E. sagittatum*.

Key words: desiccation tolerance, Epimedium sagittatum seed, germination, morphophysiological dormancy, stratification

种子休眠是活种子在适宜环境条件下暂时不 能萌发的一种机制,对种子植物的生存和繁衍起 到关键作用(Gao & Ayele, 2014)。种子休眠是植 物对环境适应的一个重要表现(Donohue et al., 2010; Huang et al., 2010)。高水平的种子休眠会 延迟萌发和萌发不整齐,从而导致生长季节的长 度缩短和生长不一致;相反,低水平的休眠可能引 起种子在有利的生长季节开始之前萌发,存在幼 苗死亡的风险(Donohue et al., 2010),从而降低 作物的产量和质量。

休眠是一个复杂的性状,主要由遗传和环境 因素决定,植物物种之间存在种子休眠的多样性 和普遍性(Baskin & Baskin, 2014)。种子休眠可 分为生理休眠 (physiological dormancy, PD)、形态 休眠 (morphological dormancy, MD)、形态生理休 眠 (morphophysiological dormancy, MPD)、物理休 眠 (physical dormancy) 和组合休眠 (combinational dormancy) (Baskin & Baskin, 2004, 2014; Iwasaki et al., 2022)。PD存在于具有充分发育和成熟胚 的种子中,主要是由种子组分中抑制剂的存在和 植物生长物质的缺乏所引起的 (Chen et al., 2010)。PD 是最普遍的休眠形式,可分为深度、中 度和浅生理休眠,广泛存在于裸子植物和所有主 要被子植物中 (Baskin & Baskin, 2004, 2014; Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006)。 MD 的种 子胚小(未发育完全),但已分化,种子的萌发不 需要释放休眠的预处理,但需要较长时间让胚生 长至足够体积,之后萌发。MPD 的种子具有未发 育完全和生理休眠的胚,其种子萌发需要释放休 眠的预处理。MPD 的种子胚的生长/胚根突破种 皮需要的时间比 MD 的种子长得多。

植物激素脱落酸 (abscisic acid, ABA) 和赤霉 素 (gibberellin, GA) 参与种子休眠和萌发的控制 (Weitbrecht et al., 2011; Iwasaki et al., 2022) Dong 等 (2012) 发现, 氟啶酮 (fluridone, Flu, ABA 生物合成的抑制剂)和 GA3显著降低莴苣种子萌发 的热休眠, 而烯唑醇 (diniconazole, ABA 分解代谢 酶 ABA 8'-羟化酶的抑制剂) 和多效唑 (paclobutrazol, GA 生物合成途径的抑制剂) 增加莴 苣种子萌发的热休眠。在降低莴苣种子萌发的热 休眠中,多效唑具有明显拮抗氟啶酮的作用,而氟 啶酮具有显著增加 GA<sub>3</sub>的作用。特别是 ABA 和 GA 水平之间的平衡及其各自的信号通路在诱导和维 持休眠以及促进萌发的调控中起重要作用 (Finkelstein et al., 2008; Graeber et al., 2012; 宋松 泉等, 2020a, b)。此外,种子休眠还被一些环境因 素释放,如后熟、变温、冷/暖层积、交替光照等,具 体取决于物种 (Baskin & Baskin, 2004, 2014; Black et al., 2006; Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006)

淫羊藿属(Epimedium L.) 植物为小檗科 (Berberidaceae)多年生草本植物,该属植物约55 种,我国有45种,其中淫羊藿(Epimedium brevicornum)、箭叶淫羊藿(E. sagittatum)、柔毛淫羊 藿(E. pubescens)、朝鲜淫羊藿(E. koreanum)和巫 山淫羊藿(E. wushanense)为《中华人民共和国药 典》所收载(国家药典委员会,2020)。淫羊藿为常 用中药,最早记载于《神农本草经》,具有补肾壮阳、 祛风除湿之功效;在临床上,淫羊藿常被用于治疗 骨质疏松、更年期综合征、乳房肿块、高血压、冠心 病等;另外,淫羊藿还具有增强免疫力、抗衰老、抗 肿瘤、抗艾滋病等作用。淫羊藿含有多种生理活性 很强的成分,主要包括黄酮类化合物、生物碱、多 糖、木脂素和一些必需的微量元素(Kang et al., 2012;李聪聪等,2020)。长期以来,种子萌发困 难,淫羊藿的栽培大多采用挖取野生植株进行分蔸 种植,但其繁殖系数低,并对野生资源造成了严重 破坏。近年来,随着市场需求的大量增加,淫羊藿 野生资源的蕴藏量逐年锐减,濒临枯竭。因此,利 用种子进行种苗繁育已成为淫羊藿产业化栽培中 亟须解决的关键问题。

淫羊藿属植物在果实成熟时,种胚发育不完 全,需要经过一段时间的冷层积或冷暖层积才能 萌发,具有明显的休眠现象(樊家乙等,2010;付 长珍等, 2012; 田向荣等, 2015; 苏贺等, 2016; Rhie & Lee, 2020)。GA, 处理促进巫山淫羊藿 (苏贺等, 2016) 和朝鲜淫羊藿 (Rhie & Lee, 2020)种胚的生长,氟啶酮处理能显著增加巫山 淫羊藿种子的萌发率(苏贺等,2016)。田向荣等 (2015)利用常规萌发试验以及直接测量和石蜡 制片技术初步研究了箭叶淫羊藿种子的萌发特 性。目前,箭叶淫羊藿种子的休眠和萌发特性仍 不够清楚。本文以成熟的箭叶淫羊藿种子为材 料,研究了种子对水分的吸收、种子的脱水耐性以 及温度、层积和植物激素对种子萌发的影响,试图 探明箭叶淫羊藿种子的休眠类型及其释放休眠和 促进萌发的适宜方法,为产业化育苗提供参考。

1 材料与方法

### 1.1 材料

箭叶淫羊藿 (*Epimedium sagittatum*)的成熟果 实于 2020 年 6 月采自张家界八大公山 (110°07′ E、 29°77′ N,海拔 1 302 m),年平均温度小于 9.9 ℃,最 冷月为 1 月,平均温度 3.5~4.3 ℃,最热月为 7 月, 平均温度 26.3~28 ℃;年均降雨量2 300 mm,春夏 季 (4—6 月)降雨最多,约占 48%。将收集后的果 实置于(25±3)℃和(50±5)%相对湿度下自然干燥, 待种子从果荚中脱落后,干燥种子含水量到(9.7± 0.49)%,一部分种子用于耐脱水性分析,另一部分 种子在 4 ℃中贮藏备用。

玉米'郑单 958' (Zea ways 'Zhengdan 958')

和水稻'日本晴'(Oryza sativa 'japonica')种子 由广东省农业科学院农业生物基因中心种质资源 实验室提供。

#### 1.2 耐脱水性分析

将含水量为9.7%的种子置于筛网中;将筛网 置于盛有干燥硅胶的干燥器中,分别脱水0、2、4、 8、12、24、36h后,一部分种子用于测定含水量,另 一部分种子则在4℃下层积60d后在10℃和黑 暗条件下萌发。

#### 1.3 含水量测定

种子含水量的测定参照国际种子检验协会的 方法(International Seed Testing Association, 1999), 以鲜重的百分比表示。

#### 1.4 种子对水分的吸收

箭叶淫羊藿种子、玉米种子和水稻种子分别 播种在垫有两层滤纸的培养皿中,加入7mL蒸馏 水,于25℃和黑暗中分别吸胀不同时间后测定种 子的含水量。种子的含水量用鲜重百分比来 表示。

#### 1.5 层积处理

层积基质为珍珠岩。首先,将珍珠岩在自来 水中除去粉尘,121 ℃中灭菌 30 min,冷却后装入 自封袋中并加入适量的无菌水,室温下放置 20 min后,用吸管将多余的水吸掉。其次,将含水量 为9.7%的箭叶淫羊藿种子与湿润的珍珠岩(V/ V=1:10)在自封袋中充分混合,然后,分别在4、 10、(4+10)、(10+4)、(4+10+4) ℃和黑暗条件下 层积。最后,层积不同的时间组合后,取样。一部 分种子利用 OLYMPUS (SZ61)体式显微镜观察胚 的形态变化,拍照、计算胚/种子(embryo/seed, E/ S)的比例(胚的长度/种子的长度);另一部分种 子做萌发试验,测定种子的萌发速率和萌发率。

### 1.6 种子萌发

经不同处理的种子用 0.1% (V/V) NaClO 灭 菌 15 min 后,播种在垫有两层滤纸的培养皿中,加 入 6 mL 蒸馏水或不同浓度的植物激素 GA<sub>3</sub>或氟啶 酮,之后在注明温度和黑暗的条件下萌发。以胚 根突破种皮 2 mm 作为萌发的标准。

#### 1.7 统计分析

所有数据均使用 SPSS 20.0 软件的单因素方 差分析模型 (one-way ANOVA model)进行分析, 平均数差异的显著性利用 Student-Newman-Keuls (S-N-K)检验确定(P=0.05)。

# 2 结果与分析

#### 2.1 种子对水分的吸收

为了解种子是否具有物理休眠,将收获的新 鲜箭叶淫羊藿、玉米和水稻种子在 25 ℃和黑暗中 分别吸胀 0~72 h。我们观察到,箭叶淫羊藿种子 具有 2 个阶段的水分吸收,即阶段 I (0~4 h)的 快速吸水和阶段 II (4~72 h)的缓慢吸水直到平台 期。在阶段 I,种子的含水量从 9.7%增加到 52%;在阶段 II,种子的含水量从 52%增加到 56.7%。玉米和水稻种子的吸水过程可分为 3 个 阶段,即阶段 I 的快速吸水和阶段 II 的缓慢吸水 以及阶段 III种子萌发后的迅速吸水 (图 1:A)。

在吸胀的 72 h内,未观察到箭叶淫羊藿种子 萌发;相反,玉米和水稻种子随着吸水量的增加逐 渐萌发。玉米和水稻种子达到 10% 萌发率的时间 分别为 22 h和 33 h,达到 50% 萌发率的时间分别 为 34 h和 42 h。当吸胀 72 h时,玉米和水稻种子 的萌发率分别达到 97%和 93% (图 1:B)。

#### 2.2 脱水对种子萌发的影响

为研究箭叶淫羊藿种子的耐脱水性,将含水 量为9.7%(鲜重为基础)的箭叶淫羊藿种子置于 干燥硅胶表面在不同的时间进一步脱水。脱水初 期,种子的含水量下降较快,之后缓慢下降。如脱 水2h时,种子的含水量下降了18.9%;从脱水8h 至脱水12h,含水量仅下降了4.2%(图2:A)。

脱水4h和8h,当含水量从9.7%下降到7.3% 和5.7%时,种子(经4℃层积60d后)的萌发率增加;随着进一步脱水,种子的萌发率稍微下降,但仍高于对照,与对照没有显著性差异(图2:B)。脱水后,种子的萌发速率加快,如未经脱水的种子在萌发处理后155d时开始萌发,而经过脱水的种子在萌发处理后105d时开始萌发(未表明数据)。

#### 2.3 温度对种子萌发的影响

为发现箭叶淫羊藿种子的适宜萌发温度,将 采集的新鲜干燥种子分别在4、10、15、20、25℃和 黑暗条件下吸胀 30 d,其萌发率为零(未表明数 据)。但是,在4℃和10℃的条件下,种子分别在 吸胀的115 d和145 d开始萌发,随着吸胀时间的 增加,种子的萌发率也增加;当吸胀240 d时,种子 的萌发率分别为55%和44%(图3:A)。而在15、 20、25℃的条件下,到吸胀的240 d,种子的萌发率 分别为 2%、0 和 0。种子在 4 ℃和 10 ℃的条件下 能够部分萌发,在 4 ℃下的萌发速率和萌发率明 显高于 10 ℃ (图 3:A)。

为进一步找到种子的适宜萌发温度,将在 10 ℃层积 60 d 后转移到 4 ℃中层积 30 d 的种子置 于不同温度和黑暗条件下萌发。结果发现,在 4、 10、15、20、25 ℃下,种子的萌发率分别为 88%、 85%、3%、2%和 0,适宜的萌发温度为 4 ℃和 10 ℃。在萌发初期,种子在 10 ℃中的萌发速率稍微 高于 4 ℃,但随着萌发时间的增加,在 4 ℃下的萌 发速率和萌发率都高于 10 ℃ (图 3:B)。

#### 2.4 层积处理对胚生长和种子萌发的影响

2.4.1 层积对胚生长的促进作用 箭叶淫羊藿种子 从果荚脱落时,种子中胚的体积较小,呈球形胚, E/ S 比值仅为 0.07 (图 4:A,B)。随着在 4 ℃和 10 ℃ 中层积时间的增加,胚逐渐从球形胚发育到心形 胚、鱼 雷 形 胚 和 成 熟 胚, 胚 的 体 积 也 不 断 增 加(图 4)。

当种子在4℃中层积时,胚在层积0~60 d 时生 长缓慢(E/S 比值较小),到层积 60 d 时,E/S 比值 为 0.09;在层积的 61~90 d 里胚逐渐生长,到层积 90 d 时 E/S 比值为 0.14;在层积 90 d 后胚迅速生 长,到层积 165 d 时 E/S 比值为 0.88 (图 4:C)。

当种子在 10 ℃中层积时, 胚的生长逐渐增 大; 到层积 165 d时, 其 E/S 比值为 0.8 (图 4:D)。 我们观察到, 在 10 ℃中层积的种子, 其 E/S 比值 显著大于在 4 ℃中层积的种子, 如种子在 10 ℃中 层积 60 d的 E/S 比值 (0.24) 比在 4 ℃中层积相 同时间的比值(0.09) 增加了 167% (图 4:D)。

当种子在 4 ℃中层积 30 d 后转移到 10 ℃中层 积时,胚的生长速率比一直在 4 ℃中层积生长更快。 例如,从 4 ℃中层积 30 d 后转到 10 ℃中继续层积 60 d 的种子,其 E/S 比值 (0.25) 比在 4 ℃中层积 90 d 的种子 (0.144) 增加了约 74%;在 4 ℃中层积 60 d 后转移到 10 ℃中层积的种子其 E/S 比值在层 积初期与一直在 4 ℃中层积的种子类似,随着在 10 ℃中层积时间的延长,其 E/S 比值有所增加 (图 4: C)。种子在 10 ℃中层积 30 d 或 60 d 后转移到 4 ℃中层积时,其 E/S 比值均显著大于一直在 10 ℃ 中层积种子的 E/S 比值。例如,种子一直在 10 ℃ 中层积种子的 E/S 比值为 0.4;在 10 ℃中层积 30 d 后转移到 4 ℃中层积 60 d,其 E/S 比值为0.83; 在 10 ℃中层积 60 d 后转移到 4 ℃中层积 30 d,其



干种子在 25 ℃和黑暗中吸胀不同时间后,种子的含水量和萌发率被测定。胚根伸出种皮 2 mm 作为种子完成萌发的标准。所有的数值均为 100 粒种子重复 3 次的平均值±标准误。

Water content and germination of seeds were determined after dry seeds were imbibed at 25 °C and darkness for different time. A radicle length of 2 mm was used as the criterion for germination completion. All values were  $\bar{x}\pm s_{\tau}$  of three replicates for 100 seeds each.

图 1 箭叶淫羊藿、玉米和水稻种子的含水量(A) 与萌发率(B)

Fig. 1 Water content (A) and germination percentage (B) of Epimedium sagittatum, Zea mays and Oryza sativa seeds



**a**. 含水量的变化; **b**. 萌发率的变化。种子在干燥硅胶表面被分别脱水不同的时间后,测定种子的含水量和萌发率。脱水后的种子先 在 4 ℃下层积 60 d,然后在 10 ℃和黑暗条件下萌发 72 d。胚根伸出种皮 2 mm 作为种子完成萌发的标准,所有的数据为 50 粒种子 4 次 重复的平均值 ± 标准误。下同。条形图上相同的大写字母表示不同处理之间没有显著性差异(S-N-K, P=0.05)。 **a**. Change of water content; **b**. Change of germination percentage. Water content and germination percentage of seeds were determined after seeds were dehydrated at surface of dry silica gel for different time. Dehydrated seeds were first stratified at 4 ℃ for 60 d, and then germinated at 10 ℃ and darkness for 72 d. A radicle length of 2 mm was used as the criterion for completion of germination. All values are  $\bar{x}\pm s_{\pi}$  of four replicates of 50 seeds each. The same below. The same uppercase letters above bars represent no significant differences among

different treatments (S-N-K, P = 0.05).



E/S比值为 0.67 (图 4:D)。
种子在 4 ℃层积 30 d 和 10 ℃层积 90 d 后转
移到 4 ℃中层积,或在 4 ℃层积 60 d 和 10 ℃层积

60 d 后转移到 4 ℃中层积, 胚的生长 (E/S) 都表 现出相同的趋势; 而在层积 75~135 d 时, 前者的 生长比后者稍微快些, 在 136~165 d 时, 二者的生



A. 采集的新鲜干燥种子; B. 10 ℃层积 60 d 后转移到 4℃层积 30 d 的种子。

A. Freshly-collected dry seeds; B. Seeds stratified at 10 °C for 60 d and transfered to 4 °C for 30 d.



Fig. 3 Effects of temperature on germination of Epimedium sagittatum seeds





The freshly-collected dry seeds were stratified in different temperature combinations for an indicated time, and the embryo size was then observed, measured, and photographed by stereomicroscope, and the E/S ratio was calculated. **A**, **B**. Morphological change of embryo during stratification at 4  $^{\circ}$ C and 10  $^{\circ}$ C, respectively; **C**-**E**. Change of E/S ratio during stratification at different temperature combinations. The arrow in the figure indicates the time point of temperature change. All values are  $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$  of three replicates of 10 seeds each.

#### 图 4 不同层积处理对箭叶淫羊藿胚生长 (胚/种子, E/S) 的影响

Fig. 4 Effects of different stratification treatments on embryo growth (embryo/seed, E/S) of Epimedium sagittatum seeds



A. 种子在4℃中分别层积 30 d 和 60 d, 之后在 10 ℃和黑暗条件下萌发; B. 种子在 10 ℃中分别层积 30 d 和 60 d, 之后在4 ℃ 和黑暗条件下萌发; C. 种子在4℃中层积 30 d 后转移到 10 ℃中继续层积 90 d, 或在4℃中层积 60 d 后转移到 10 ℃中继续层积 60 d, 之后在4℃和黑暗条件下萌发。图中箭头表示种子开始萌发的时间点。胚根伸出种皮 2 mm 作为种子完成萌发的标准。所有的数据为 50 粒种子 4 次重复的平均值±标准误。下同。

**A.** Seeds were stratified at 4 °C for 30 and 60 d, respectively, and then germinated at 10 °C and darkness; **B.** Seeds were stratified at 10 °C for 30 and 60 d, respectively, and then germinated at 4 °C and darkness; **C.** Seeds are stratified at 4 °C for 30 d and transfered 10 °C for 90 d or at 4 °C for 60 d and at 10 °C for 60 d, and then germinated at 4 °C and darkness. The arrow in the figure indicates the time point at which the seed begins to germinate. A radicle length of 2 mm was used as the criterion for completion of germination. All values are  $\bar{x}\pm s_{\tau}$  of four replicates of 50 seeds each. The same below.





种子在 10 ℃和黑暗中层积 120 d,之后在不同浓度的  $GA_3(A)$ 、Flu(B) 和  $GA_3$  + Flu 组合 (C) 以及 4 ℃和黑暗中萌发 60 d。 Seeds were stratified at 10 ℃ and darkness for 120 d, and then germinated in different concentrations of  $GA_3(A)$ , Flu(B) and  $GA_3$  + Flu combinations (C) as well as at 4 ℃ and darkness for 60 d.

图 6 植物激素赤霉素 (GA<sub>3</sub>) 和氟啶酮 (Flu) 对淫羊藿种子萌发的影响 Fig. 6 Effects of phytohormone gibberellin (GA<sub>3</sub>) and fluridone (Flu) on germination of *Epimedium sagittatum* seeds

长没有明显差异;到层积 165 d 时,二者的 E/S 比 值均大于 0.8 (图 4:E)。

2.4.2 层积对种子萌发的促进作用 种子在4℃中 分别层积 30 d 或 60 d 后,置于 10℃和黑暗中萌 发,随着层积时间的延长,种子的萌发速率和萌发 率显著增加(图5:A)。种子在 10℃中层积 30 d 或 60 d 后,置于4℃和黑暗中萌发,种子的萌发速 率和萌发率也显著增加,在 10℃中层积 30 d 和 60 d 的作用效果类似(图5:B)。

种子在 10 ℃中层积 30 d 或 60 d 后在 4 ℃中

的萌发速率和萌发率远比在 4 ℃中层积 30 d 或 60 d 后在 10 ℃ 中萌发的种子高得多 (图 5:A,B)。例 如,4 ℃中层积 30 d 和 60 d 的种子在 10 ℃中的最 初萌发时间分别为 125 d 和 90 d,在萌发 150 d 时的 萌发率分别为 22.5%和 67%;在 10 ℃中层积 30 d 和 60 d 的种子在 4 ℃中的最初萌发时间均为 45 d, 在萌发 150 d 时的萌发率分别为 93%和 96%。在4 ℃中层积 60 d 的种子在 10 ℃中萌发率达到 50%的时间为 135 d,而在 10 ℃中层积 30 d 的种子在 4 ℃中 萌发率达到 50%的时间仅为 60 d(图 5:A,B)。

两种变温层积 (4 ℃层积 30 d + 10 ℃层积 90 d 或 4 ℃层积 60 d + 10 ℃层积 60 d)都能显著增加种子在 4 ℃中的萌发速率和萌发率,萌发率达到 50%的时间均为 70 d (图 5:C);与在 10 ℃中层积 30 d 或 60 d 后在 4 ℃中萌发的种子比较,种子的萌发速率和萌发率稍微降低,但比在 4 ℃中层积 30 d 或 60 d 后在 10 ℃中萌发的种子高得多 (图 5)。

## 2.5 赤霉素和氟啶酮对种子萌发的促进作用

为了解箭叶淫羊藿种子萌发对植物激素 GA<sub>3</sub>和 氟啶酮的响应,种子先在 10 ℃和黑暗中层积 120 d, 使胚发育成熟,再在不同浓度的 GA<sub>3</sub>、氟啶酮和 GA<sub>3</sub>+ 氟啶酮中萌发。结果表明,1、10 µmol·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>对 种子的萌发没有作用,100~10 000 µmol·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>对 明显地促进种子萌发,10 000 µmol·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>的促 进作用明显低于1 000 µmol·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>,以及种子的 萌发率仍然低于 70% (图 6:A)。5~500 µmol· L<sup>-1</sup>氟啶酮显著地促进种子萌发,其萌发率都高于 90%,均比对照增加 46%及以上(图 6:B)。在添 加 10、100 µmol·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>的同时,分别添加 10 µmol·L<sup>-1</sup>或 100 µmol·L<sup>-1</sup>的氟啶酮,种子的萌发 速率(未表明数据)和萌发率都比单独添加相同 浓度的 GA<sub>3</sub>高得多,萌发率约为 95%(图 6:C)。

## 3 讨论

#### 3.1 箭叶淫羊藿种子对水分的吸收

种子萌发随着水分吸收开始,当胚根突破种皮 萌发结束 (Bewley et al., 2013)。箭叶淫羊藿种子 的水分吸收具有快速吸水(阶段])和缓慢吸水 (阶段Ⅱ)两个阶段,缺乏吸水的第Ⅲ阶段。在阶段 I,种子的含水量迅速增加到 52%,表明箭叶淫羊 藿种子的种皮是透水的,不具有物理休眠。阶段 I 的水分吸收是由衬质势 (matrix potential) 驱动的, 因为干种子的水势非常低 (Obroucheva & Antipova, 1997)。阶段 II 的缓慢吸水直到 72 h (甚至更长,未 表明数据)是水分吸收的滞后期。以上结果与巫山 淫羊藿种子的水分吸收类似 (樊家乙等, 2010)。 阶段Ⅲ的水分吸收是由种子萌发引起的;在吸胀的 72 h 内,箭叶淫羊藿种子的萌发率为零,没能观察 到水分吸收的第Ⅲ阶段。在25℃下,玉米和水稻种 子的水分吸收具有阶段Ⅰ的快速吸水,阶段Ⅱ的短 暂缓慢吸水以及阶段Ⅲ的迅速吸水。玉米和水稻 种子的萌发率随着吸水逐渐增加,分别在吸胀后的 34 h和42 h达到50%萌发率。

### 3.2 脱水对种子萌发的影响

成熟脱水是正常性种子 (orthodox seed) 发育 的末端事件,在植物种子 (质)资源保存中起关键 作用 (宋松泉等, 2022)。箭叶淫羊藿种子的含水 量从 9.7%下降至 4.6%,种子经 4 ℃层积 60 d 后的 萌发率仍然为 56.3%,表明种子具有耐脱水性。值 得注意的是,种子萌发率低于 60%,不是由于种子 被脱水伤害,而是在 4℃层积 60 d 未能完全解除种 子的休眠特性。本研究结果为淫羊藿属植物种子 的干燥及其种质资源的长期保存提供了耐脱水的 依据。

#### 3.3 温度对种子萌发的影响

温度既是影响种子萌发最重要的环境因素之 一,也决定种子萌发的能力和速率,并打破种子的 初生和/或次生休眠(Brándel 2004; Baskin & Baskin, 2014)。箭叶淫羊藿种子分别在4、10、15、 20、25 ℃和黑暗条件下吸胀 30 d,其萌发率为零, 表明种子具有休眠特性。然而,在4 ℃和 10 ℃的 条件下,种子分别在吸胀 115 d 和 145 d 时开始萌 发;到吸胀 240 d 时,种子的萌发率分别为 55%和 44%;在 15、20、25 ℃的条件下,到吸胀 240 d 时, 种子的萌发率分别为 2%、0 和 0。这表明箭叶淫 羊藿种子具有深休眠特性,温度显著影响种子的 萌发,以及 4~10 ℃可能是箭叶淫羊藿种子萌发的 适宜温度。苏贺等(2016)的研究结果表明,巫山 淫羊藿种子只能在低温(4 ℃)中萌发,不能在变 温(10 ℃/20 ℃)中萌发。

在 10 ℃层积 60 d 后转移到 4 ℃ 中层积 30 d 的种子,在 4、10、15、20、25 ℃下的萌发率分别为 88%、85%、3%、2%和 0,表明种子的适宜萌发温度 为 4~10 ℃。

### 3.4 层积处理对胚生长和种子萌发的影响

Graeber 等(2012)提出,休眠是一种数量性 状,其深度随着发育进程而变化。初生休眠是种子 在成熟过程中形成的,在生理成熟时达到最高水 平;在随后的干藏(后熟)或层积过程中,种子的休 眠深度逐渐降低(Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006;Holdsworth et al., 2008)。箭叶淫羊藿种子脱 落时,种子中胚的体积较小(E/S比值为0.07);随 着种子在4、10℃中层积时间的增加,胚逐渐从球形 胚发育到心形胚、鱼雷形胚和成熟胚(E/S比值大 于 0.8);这表明箭叶淫羊藿种子具有形态休眠,在 4、10 ℃层积过程中,胚能够逐渐生长发育。田向荣 等 (2015)观察到类似的结果,研究发现箭叶淫羊 藿种子的胚未分化,停留在球形胚阶段,在后熟过 程中,胚的结构逐步发育,形成子叶胚。朝鲜淫羊 藿 (王晶等,2013)和巫山淫羊藿 (樊家乙等, 2010)种子也具有类似的特性,需要经过一定时间 的层积才能促进胚的生长。这些结果与朝鲜淫羊 藿在田间条件下胚的生长、萌发和出苗的物候一 致。朝鲜淫羊藿种子的胚未发育,在田间条件下在 6—9月初,胚很少生长,但从 9月下旬至 11月胚迅 速生长,到 12月初胚已完成生长,胚的长度比初始 长度增加了 16倍;种子在次年 3月萌发,萌发率达 84.4% (Rhie & Lee, 2020)。

当种子在4℃中层积 30 d 后转移到 10℃中 层积时,胚的生长速率比一直在4℃中层积生长 更快;在 10℃中层积的种子,其 E/S 比值显著大 于在4℃中层积的种子。这表明 10℃层积有利 于胚的生长发育。此外,当种子在 10℃中层积 30 d 或 60 d 后转移到 4℃中层积时,其 E/S 比值均 显著大于一直在 10℃中层积种子的 E/S 比值,表 明胚和/或胚乳中可能存在某些生长抑制物质,在 4℃中层积比在 10℃中层积更有利于这些生长抑 制物质的释放和胚的生长。本研究结果表明,变 温层积有利于箭叶淫羊藿种胚的生长发育。Rhie 和 Lee (2020)发现,当朝鲜淫羊藿种子在 20℃或 15℃的恒温下培养时,胚几乎不生长。

在10℃萌发条件下,箭叶淫羊藿种子的萌发速 率和萌发率随着在4℃中层积时间的延长而显著增 加。同样,在4℃萌发条件下,箭叶淫羊藿种子的萌 发速率和萌发率也随着在10℃中层积时间的延长 而显著增加;而在10℃中层积 30 d 或 60 d 后在4 ℃中的种子萌发速率和萌发率却远远高于在4℃中 层积 30 d 或 60 d 后在10℃中萌发的种子。这些 萌发结果与层积温度对 E/S 比值的影响类似。付 长珍等(2012)报道,拟巫山淫羊藿种子在15℃中 处理1~7个月后转移到4℃中,胚的生长和种子萌 发率显著增加,但随着15℃处理时间的延长,种子 的萌发率增加,而种子的萌发速率下降。

4 ℃层积 30 d + 10 ℃层积 90 d 或 4 ℃层积 60 d + 10 ℃层积 60 d 的变温层积都能显著增加 种子在 4 ℃中的萌发速率和萌发率,这与变温层 积对 E/S 比值的影响类似。

#### 3.5 赤霉素和氟啶酮对种子萌发的促进作用

ABA 是休眠诱导与维持的正调控因子,是种 子萌发的负调控因子;而 GA, 能释放休眠, 促进萌 发和拮抗 ABA 的效应, 它们的水平和信号转导在 种子休眠释放和萌发中起重要作用 (Hauvermale et al., 2012; 宋松泉等, 2020a, b; Iwasaki et al., 2022)。对于在 10 ℃ 和黑暗中层积 120 d 的 (胚 成熟)箭叶淫羊藿种子,1、10 μmol・L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>对种 子的萌发没有作用,100~10 000 µmol L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>明显 地促进种子萌发,但种子的萌发率仍然低于70%。 这表明 GA, 能部分促进种子的萌发。5~500 μmol·L<sup>-1</sup>氟啶酮显著促进种子的萌发,其萌发率 均大于 90%; 对于种子的萌发, 10 µmol · L<sup>-1</sup>或 100 μmol·L<sup>-1</sup>的氟啶酮对 GA<sub>3</sub>有加成作用。苏贺等 (2016)利用变温(10 ℃/20 ℃)层积 90 d 的巫 山淫羊藿种子作为材料,研究了氟啶酮和赤霉素 对巫山淫羊藿种子休眠解除的影响,发现氟啶酮 的作用较强,赤霉素的作用较弱,并且氟啶酮可以 促进在变温中不能萌发的种子萌发。Rhie 和 Lee (2020) 观察到, GA, 处理能增加朝鲜淫羊藿种子 胚的生长,但对种子萌发的促进作用较小,萌发率 低于10%。这些结果都表明, ABA 在抑制箭叶淫 羊藿种子萌发中可能具有重要作用。

## 4 结论

箭叶淫羊藿种子的种皮透水,不具有物理休眠;种子具有耐脱水性,能在低含水量和低温的条件下贮藏;在4~25 ℃和黑暗条件下,种子的萌发 率为零;E/S 比值非常小,4、10 ℃和变温层积能显 著促进胚的发育以及增加种子的萌发速率和萌发 率;GA<sub>3</sub>和氟啶酮能显著增加种子的萌发速率和萌发 凌率。根据 Baskin 和 Baskin (2004, 2014)、Finch-Savage 和 Leubner-Metzger (2006)的观点,本研究 认为,箭叶淫羊藿种子的休眠类型为 MPD,释放休 眠和促进萌发的最适方法是将种子先在 10 ℃中 层积 30 d,再置于4 ℃的环境中让其萌发。

### 参考文献:

- BASKIN JM, BASKIN CC, 2004. A classification system for seed dormancy [J]. Seed Sci Res, 14(1): 1–16.
- BASKIN CC, BASKIN JM, 2014. Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination

[M]. 2nd ed. San Diego: Academic Press.

- BEWLEY JD, BRADFORD KJ, HILHORST HWM, et al., 2013. Seeds: physiology of development, germination and dormancy [M]. 3rd ed. New York: Springer.
- BLACK M, BEWLEY JD, HALMER P, 2006. The encyclopedia of seeds: sciences, technology and uses [M]. Oxfordshire: CAB International: 203-213.
- BRÁNDEL M, 2004. The role of temperature in the regulation of dormancy and germination of two related summer-annual mudflat species [J]. Aquat Bot, 79(1): 15-32.
- CHEN F, MARTIN RC, SONG SQ, et al., 2010. Seed development and germination [M]//TRIGIANO RN, GRAY DJ. Plant tissue culture: development and biotechnology. Boca Raton, FL: CRC Press: 127–140.
- DONG TT, TONG JH, XIAO LT, et al., 2012. Nitrate, abscisic acid and gibberellin interactions on the thermoinhibition of lettuce seed germination [J]. Plant Growth Regul, 66(2): 191–202.
- DONOHUE K, DE CASAS RR, BURGHARDT L, et al., 2010. Germination, post-germination adaptation, and species ecological ranges [J]. Ann Rev Ecol Evol Syst, 41(1): 293–319.
- FAN JY, GUO QS, LIU ZY, et al., 2010. Dormancy characteristics and breaking method of seeds from *Epimedium wushanense* [J]. Chin J Chin Mat Med, 35(24): 3242-3245. [樊家乙, 郭巧生, 刘作易, 等, 2010. 巫山淫羊藿 种子休眠特性及破眠方法研究 [J]. 中国中药杂志, 35(24): 3242-3245.]
- FINCH-SAVAGE WE, LEUBNER-METZGER G, 2006. Seed dormancy and the control of germination [J]. New Phytol, 171(3): 501-523.
- FINKELSTEIN R, REEVES W, ARIIZUMI T, et al., 2008. Molecular aspects of seed dormancy [J]. Ann Rev Plant Biol, 59(1): 387–415.
- FU CZ, WANG XC, YANG XB, et al., 2012. Preliminary study on seed dormancy characteristics of *Epimedium pseudowushanense* [J]. Chin Agric Sci Bull, 28(18): 76-80. [付长珍, 王新村, 杨相波, 等, 2012. 拟巫山淫羊藿 种子休眠特性的初步研究 [J]. 中国农学通报, 28(18): 76-80.]
- GAO F, AYELE BT, 2014. Functional genomics of seed dormancy in wheat: Advances and prospects [J]. Front Plant Sci, 5: 1–11.
- GRAEBER K, NAKABAYASHI K, MIATTON E, et al., 2012. Molecular mechanisms of seed dormancy [J]. Plant Cell Environ, 35(10): 1769–1786.
- HAUVERMALE AL, ARIIZUMI T, STEBER CM, 2012. Gibberellin signaling: A theme and variations on DELLA repression [J]. Plant Physiol, 160(1): 83-92.
- HOLDSWORTH MJ, BENTSINK L, SOPPE WJJ, 2008. Molecular networks regulating Arabidopsis seed maturation, after-ripening, dormancy and germination [J]. New Phytol, 179(1): 33-54.
- HUANG X, SCHMITT J, DORN L, et al., 2010. The earliest stages of adaptation in an experimental plant population: strong selection on QTLs for seed dormancy [J]. Mol Ecol, 19(7): 1335-1351.
- International Seed Testing Association, 1999. International rules for seed testing [J]. Seed Sci Technol, 27: 47–50.
- IWASAKI M, PENFIELD S, LOPEZ-MOLINA L, 2022. Parental and environmental control of seed dormancy in

Arabidopsis thaliana [J]. Ann Rev Plant Biol, 73: 355–378.

- KANG SH, JEONG SJ, KIM SH, et al., 2012. Icariside II induces apoptosis in U937 acute myeloid leukemia cells: role of inactivation of STAT3-related signaling [J]. PLoS ONE, 7(4): e28706.
- LI CC, ZHAO P, QIN YQ, et al., 2020. Research progress on pharmacological activity of Yinyanghuo (*Epimedium*) [J]. Acta Chin Med, 35(4): 781-786. [李聪聪, 赵鹏, 秦燕勤, 等, 2020. 淫羊藿苷的药理活性研究进展 [J]. 中医学报, 35(4): 781-786.]
- National Pharmacopoeia Committee, 2020. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol. I [M]. 2020 ed. Beijing: China Medical Science and Technology Press: 340-342. [国 家药典委员会, 2020. 中华人民共和国药典: 一部 [M]. 2020版. 北京: 中国医药科技出版社: 340-342.]
- OBROUCHEVA NV, ANTIPOVA OV, 1997. Physiology of the initiation of seed germination [J]. Russ J Plant Physiol, 44: 250–264.
- RHIE YH, LEE SY, 2020. Seed dormancy and germination of *Epimedium koreanum* Nakai [J]. Sci Hortic, 272: 109600.
- SONG SQ, LIU J, HUANG H, et al., 2020a. Gibberellin metabolism and signaling and its molecular mechanism in regulating seed germination and dormancy [J]. Sci Sin Vit, 50(6): 599-615. [宋松泉, 刘军, 黄荟, 等, 2020a. 赤霉素代谢与信号转导及其调控种子萌发与休眠的分子机制 [J]. 中国科学, 50(6): 599-615.]
- SONG SQ, LIU J, TANG CF, et al., 2022. Research progress on the molecular mechanism of seed desiccation tolerance [J]. Sci Agric Sin, 55(6): 1047-1063. [ 宋松泉, 刘军, 唐翠芳, 等, 2022. 种子脱水耐性的分子机制研究进展 [J]. 中国农业科学, 55(6): 1047-1063.]
- SONG SQ, LIU J, XU HH, et al., 2020b. ABA metabolism and signaling and their molecular mechanism regulating seed dormancy and germination [J]. Sci Agric Sin, 53(5): 857-873. [宋松泉, 刘军, 徐恒恒, 等, 2020b. 脱落酸代谢与 信号传递及其调控种子休眠与萌发的分子机制 [J]. 中 国农业科学, 53(5): 857-873.]
- SU H, WANG Y, YANG Y, et al., 2016. Effects of fluridone, gibberellin acid and germination temperature on dormancybreaking for *Epimedium wushanense* [J]. Chin J Chin Mat Med, 41 (14): 2625 - 2632. [苏贺, 王月,杨阳,等, 2016. 氟啶酮、赤霉素和发芽温度对巫山淫羊藿种子休眠 解除的影响 [J]. 中国中药杂志, 41(14): 2625-2632.]
- TIAN XR, ZHANG MY, LONG H, et al., 2015. Morphological and anatomy studies on after-ripening seeds of *Epimedium sagittatum* Maxim [J]. Seed, 34(3): 36-38. [田向荣, 张明月, 龙华, 等, 2015. 箭叶淫羊藿 (*Epimedium sagittatum* Maxim)种子后熟作用的形态解剖研究 [J]. 种子, 34(3): 36-38.]
- WANG J, LIU PP, HE LH, et al., 2013. Factors influencing seed germination of *Epimedium koreanum* Nakai [J]. J Shenyang Pharm Univ, 30(10): 807-811. [王晶, 刘蓬蓬, 何立华, 等, 2013. 朝鲜淫羊藿种子萌发的影响因子 [J]. 沈阳药科大学学报, 30(10): 807-811.]
- WEITBRECHT K, MÜLLER K, LEUBNER-METZGER G, 2011. First off the mark: early seed germination [J]. J Exp Bot, 62(10): 3289-3309.

(责任编辑 李 莉)

广步植物 Guihaia Nov. 2022, 42(11): 1949-1958

#### DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202104032

徐来仙,姚兰,周大寨,等.水杉凋落物水浸提液对其种子萌发和生长的化感作用 [J]. 广西植物, 2022, 42(11): 1949-1958.

XU LX, YAO L, ZHOU DZ, et al. Allelopathy of aqueous extract from *Metasequoia glyptostroboides* litter on its seed germination and growth [J]. Guihaia, 2022, 42(11): 1949–1958.

# 水杉凋落物水浸提液对其种子萌发和生长的化感作用

徐来仙,姚 兰\*,周大寨,郭秋菊,朱 江,邓 楚,艾 鑫,夏煜轩

(湖北民族大学林学园艺学院,湖北恩施445000)

摘 要:为探究水杉凋落物的化感作用是否是影响其天然更新的障碍因素,该文设置了 8 种水杉新鲜凋落 物和自然凋落物水浸提液浓度 200、100、50、20、10、5、2、1 g・L<sup>-1</sup>和 CK,分析不同类型不同浓度凋落物水浸 提液对水杉种子萌发和生长的化感作用的影响。结果表明:(1)水杉新鲜凋落物水浸提液对水杉种子发芽 率和发芽势影响不显著(P>0.05),对发芽指数有显著影响(P<0.05),1、100、200 g・L<sup>-1</sup>显著抑制种子发芽; 水杉自然凋落物水浸提液对水杉种子萌发 3 个指标影响均不显著(P>0.05),而浓度为 5、10、50、200 g・L<sup>-1</sup> 时则有抑制效应。(2)水杉种子芽长、胚轴和主根长度均在不同浓度的新鲜和自然水杉凋落物水浸提液间 差异显著(P<0.05),并随着水浸提液浓度的增加(≥10 g・L<sup>-1</sup>)而逐渐降低,尤其是 50~200 g・L<sup>-1</sup>范围内抑 制作用显著增强。(3)新鲜和自然水杉凋落物水浸提液对自身种子萌发后生长的抑制作用相较于对种子萌 发强,并且新鲜凋落物的化感效应抑制强度大于自然凋落物。(4)在种子萌发和生长指标中,主根长度对化 感物质反应最敏感。(5)水杉种子的芽长生长动态变化符合"S"型生长曲线(R<sup>2</sup>≥0.988)。总之,水杉凋落 物对自身种子萌发和生长具有一定的化感抑制效应,影响其种群天然更新,建议在水杉种群管理中,适当清 理林下凋落物,以促进水杉种群的天然更新。

关键词:水杉,凋落物,天然更新,化感作用,自毒作用,水浸提 中图分类号: Q945.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2022)11-1949-10

# Allelopathy of aqueous extract from *Metasequoia* glyptostroboides litter on its seed germination and growth

XU Laixian, YAO Lan<sup>\*</sup>, ZHOU Dazhai, GUO Qiuju, ZHU Jiang, DENG Chu, AI Xin, XIA Yuxuan

(School of Forestry and Horticulture, Hubei Minzu University, Enshi 445000, Hubei, China)

第一作者: 徐来仙(1996-),硕士研究生,主要从事森林生态与生物多样性保护理论与技术研究,(E-mail)2660185541@qq.com。

\*通信作者:姚兰,博士,副教授,主要从事森林生态与生物多样性保护理论与技术研究,(E-mail)hbmyyl@163.com。





收稿日期: 2021-07-25

基金项目:湖北省自然科学基金(2019CFB229);湖北民族大学大学生创新创业训练计划项目(X202010517276);2020年湖北民族大学林学学科研究生创新项目[Supported by Hubei Natural Science Foundation (2019CFB229); Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students of Hubei Minzu University(X202010517276); Postgraduate Innovation Project of Forestry of Hubei Minzu University in 2020]。

Abstract: To explore whether the allelopathy of Metasequoia glyptostroboides litter is an obstacle to its natural regeneration, eight concentrations (200, 100, 50, 20, 10, 5, 2, 1 g · L<sup>-1</sup> and CK) of aqueous extracts from fresh and natural litter of M. glyptostroboides were set to analyze the allelopathic effects of aqueous extracts of different types and concentrations on seed germination and growth of M. glyptostroboides. The results were as follows: (1) The aqueous extract of the fresh M. glyptostroboides litter had no significant effects on seed germination rate and germination energy (P>0.05), but had significant effects on germination index (P<0.05), and seed germination was significantly inhibited by 1, 100, 200 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup> treatments. The effects of aqueous extracts of the natural *M. glyptostroboides* litter on three indexes of seed germination were not significant (P > 0.05), but the inhibitory effect was reflected in 5, 10, 50, 200 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup>. (2) The shoot length, hypocotyl length and main root length of M. glyptostroboides seeds were significantly different between different concentrations of fresh and natural litter aqueous extracts (P<0.05), and decreased gradually with the increase of aqueous extract concentrations ( $\geq 10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), especially in the range from 50 to 200 g  $\cdot \text{L}^{-1}$ . (3) Compared with seed germination, the aqueous extracts of fresh and natural M. glyptostroboides litters had stronger inhibitory effect on the growth of seeds after germination, and the allelopathic effect of fresh litter was stronger than that of natural litter. (4) The main root length was the most sensitive to allelochemicals among seeds germination and growth indexes. (5) The dynamic change of shoot length growth of M. glyptostroboides seeds accords with the "S" type growth curve ( $R^2 \ge$ 0.988). In summary, the litter of M. glyptostroboides has a certain allelopathic inhibitory effect on its own seed germination and growth, which affects the natural regeneration of its population. It is suggested that the litter under the forest should be properly cleaned to promote the natural renewal of the M. glyptostroboides population in the management of M. glyptostroboides populations.

Key words: Metasequoia glyptostroboides, litter, natural regeneration, allelopathy, autotoxicity, aqueous extract

化感物质主要是通过植物分解、根际分泌、雨水淋溶和挥发等方式释放到环境中的水溶性物质(Rice, 1984; Kimura et al., 2015),其中凋落物是林木化感物质的重要来源之一,其在分解过程中释放内含物质或转化为次生物,从而对种子萌发和幼苗生长产生影响,进而成为林木天然更新障碍的关键因素之一(Caviers et al., 2007; Muturi et al., 2017; Aguilera et al., 2017)。凋落物化感作用的浓度效应主要表现为对植物种子发芽及幼苗生长的"低促高抑"双重效应(李登武等, 2010; 庄正等, 2017),或随浓度升高而抑制增强的"抑制效应",从而导致其天然更新出现障碍(张珊珊等, 2016; 郭晓燕等, 2019)。不同部位、分解阶段凋落物也具有不同的化感效应(Fernandez et al., 2006; Huang et al., 2019)。

水杉(Metasequoia glyptostroboides)为柏科 (Cupressaceae)水杉属(Metasequoia)孑遗植物,是 植物界的"活化石",为中国特有,属国家 I级保护 树种。现存水杉原生母树仅分布于湖北省利川 市、湖南省龙山县和重庆市石柱县之间狭窄的三 角区域内,仅存5696株。水杉原生母树周边林下 及利川市小河水杉母树管理站、利川市林业科学 研究所人工营造的 35~42 a 生水杉无性系种子园 中,均很难发现有天然更新的水杉幼苗及幼树存 在(林勇等,2017)。这一现象引起学术界对水杉 天然更新障碍及更新繁育的极大关注。许多专家 学者从水杉生长环境与干扰(胡先骕和郑万钧, 1948;林勇等,2017;陈俊等,2020)、种群与遗传结 构(黄小等,2020;刘小红,2020)、交配与扩散格局 (陈文文,2016)等方面进行了探索,另外也从水杉 更新繁育方面进行了大量研究,如水杉原生母树 个体及种子种源差异(吴漫玲等,2020)、温度(辛 霞等,2004)、光照(郭秋菊等,2018)、水分(Fan et al.,2020)、硒元素(郭秋菊等,2018)、整地覆土 (李淑娴等,2012)等对水杉种子萌发的影响。但 是,目前水杉天然更新困难的机制仍不完全明确。

通过对水杉母树主要分布区调查发现,水杉 林下有大量凋落物,仅偶见1~2株水杉幼苗。木 本植物种群的天然更新是在自然力作用下,新个 体不断产生而使种群得以繁衍和扩大的重要方 式,而种子萌发和早期成苗阶段是植物天然更新 最关键的两个阶段,这两阶段又受林下凋落物产 生化感作用的影响(Aliskan et al., 2015),并且化 感效应在不同阶段随着释放的化感成分变化而变 化(Fernandez et al., 2008)。水杉母树周围累积的 凋落物所产生的化感作用是否会成为水杉天然更 新障碍的因素,为此,本研究针对不同类型水杉母 树凋落物设置不同浓度的水浸提液对水杉种子进 行萌发试验,以探究水杉凋落物化感作用对水杉 种子萌发与生长的影响,为进一步查明水杉天然 更新困难障碍提供科学依据。

1 材料与方法

### 1.1 种子和凋落物的收集与处理

试验所用水杉种子为 2020 年 11 月从水杉原 生母树1 076号(树龄 118 a,树高 31 m,胸径 87.6 cm,生长地理位置为 108°35′45.1″ E、30°07′20.5″ N,海拔 1 114 m)采集。种子含水量为 9.78%± 1.13%,千粒重为(2.57±0.17) g。

为保证收集凋落物的代表性,在湖北省利川 市林业科学研究所水杉种子园内按东南西北中五 个方向分 30 个区域随机布设凋落物收集框采集。 2020 年 10 月末,采集水杉母树上自然脱落的当季 凋落物为新鲜凋落物,即尚未进入分解过程,包括 叶、枝、果、皮等混合物;2020 年 11 月末,收集水杉 林内地表的凋落物为自然凋落物,包括未分解层、 半分解层和全分解层枝叶果皮等的混合物。所有 采集回来的凋落物通过室温风干后,分别进行相 应处理。

## 1.2 方法

1.2.1 凋落物水浸提液制备 首先,将新鲜凋落物 和自然凋落物分别风干、粉碎(过100目筛),以蒸 馏水为溶剂,按料液比1:5加入蒸馏水,于室温 条件下振荡48h;然后,10000r・min<sup>-1</sup>离心10 min,其上清液即为200g・L<sup>-1</sup>的母液,分别为新鲜 凋落物浸提液(标记为FL)、自然凋落物浸提液 (标记为NL);最后,均放入冰箱-18℃中保存。

1.2.2 种子萌发和生长试验 对 FL、NL 均设置 8 种浓度:200、100、50、20、10、5、2、1 g·L<sup>-1</sup>,以蒸馏 水为对照(CK),共 17 个处理,每处理 3 次重复。 取籽粒饱满的水杉种子均匀排列于铺有 2 层滤纸 的培养皿( $\Phi$  9 cm,使用前于 180 ℃消毒 2 h)中, 每皿 50 粒,分别加入 4 mL 相应浸提液,置 20 ℃ (参考国家气象科学数据中心利川市四、五月的平 均气温,为 20 ℃)全黑暗(辛霞等,2004;郭秋菊 等,2018)的 SPX-30085H-II 生化培养箱,每 3 d 更 换滤纸并添加 4 mL 的对应处理液以保证浸提液 浓度。自水杉种子置床开始,每隔 24 h 观察记录 发芽情况,以胚根出现为萌发标志。待种子发芽 后在每个试验单元随机抽取 10 粒种子测量芽长, 记录测量直至所有种子发芽完成,约 20 d 后测定 其胚轴(子叶着生点到主根的一段距离)长度和主 根(由胚根发育而成的根)长度(强胜,2005)。根 据发芽情况计算种子发芽率、发芽势和发芽指数, 根据种子发芽以及芽、根的生长情况计算化感效 应敏感指数(allelopathy sensitivity index,*RI*)和化 感综合效应指数(Synthetical effect of allelopathy index,*SE*),其计算公式如下。

(1) 发芽率: 
$$G_r = \frac{G_a}{G_l} \times 100\%_{\circ}$$

式中: $G_a$ 为正常发芽的种子数; $G_i$ 为供试种子数。

(2) 发芽势:
$$G_e = \frac{G_{\text{max}}}{G_e} \times 100\%_{\circ}$$

式中: $G_{max}$ 为发芽数最多日的发芽种子数; $G_t$ 为供试种子数。

(3) 发芽指数:
$$G_i = \sum \frac{G_p}{G_d}$$
。

式中: $G_p$ 为与 $G_a$ 相对应的每天发芽种子数; $G_a$ 为发芽天数。

(4) 化感效应敏感指数(RI)(Williamson & Richardson, 1988):

$$RI = 1 - \frac{C}{T} (T \ge C) \stackrel{\text{def}}{=} RI = \frac{C}{T} - 1 (T < C)_{\text{def}}$$

式中:*C* 为对照值;*T* 为处理值;*RI*>0 为促进, *RI*<0 为抑制,*RI* 绝对值的大小与作用强度一致。

(5) 化感综合效应指数(SE)反映化感效应的 强弱,是指同一处理下对同一受体各测试项目 RI 的算术平均值,即

*SE*=(发芽率 *RI*+发芽势 *RI*+发芽指数 *RI*+芽 长 *RI*+胚轴 *RI*+主根 *RI*)/6。

1.2.3 数据处理 对不同浓度 FL、NL 处理下水杉 种子 萌 发 和 生 长 进 行 方 差 分 析 及 多 重 比 较 (Duncan);使用 SPSS 18.0 软件对不同处理下水杉 种子芽长的生长变化进行 Logistic 模型拟合和计 算生长参数(杨志玲等,2011;吴漫玲等,2020),即 最大线性生长速率(maximum linear growth rate, *MGR*,即连日生长量最大时的生长速率)、线性生 长速率(linear growth rate,*LGR*,即线性生长期内的 Logistic 模型拟合方程:

$$y = \frac{k}{1 + e^{a - bt}};$$
  

$$MGR = v_{max} = \frac{1}{4}bk; LGR = \frac{2}{9}bk; TLG = \frac{k}{\sqrt{3}} \circ$$

式中: y 为芽长累计生长量; k 表示拟合芽长的生长极限值; t 为生长时间; a 和 b 为待定系数。

# 2 结果与分析

#### 2.1 凋落物浸提液对水杉种子萌发的影响

由图1可知,不同类型的凋落物浸提液处理后 水杉种子萌发指标呈现一定差异性。不同浓度FL 对种子发芽指数有显著影响(P<0.05),对发芽率 和发芽势则影响不显著(P>0.05)。FL 处理后,种 子发芽率、发芽势和发芽指数随着浓度升高呈现 波动变化且均在50g·L<sup>-1</sup>处理时最高;而在1g· L<sup>-1</sup>处理时发芽率和发芽指数显著比CK分别减少 36.842%、32.677%。不同浓度NL 对发芽率、发芽 势和发芽指数影响不显著(P>0.05),在1g·L<sup>-1</sup>处 理下,发芽率、发芽势与发芽指数均高于CK,其中 发芽势(36%)显著比10g·L<sup>-1</sup>高2.349倍。总体 来看,在FL浓度为50g·L<sup>-1</sup>时对水杉种子萌发有 一定促进作用,而在1、100、200g·L<sup>-1</sup>时则有一定 抑制作用;NL处理下,当浓度为1g·L<sup>-1</sup>时显示一 定促进作用,而5、10、200g·L<sup>-1</sup>则抑制种子萌发。

## 2.2 凋落物浸提液对水杉种子生长的影响

2.2.1 凋落物浸提液对3个种子生长指标的影响 由图2可知,不同浓度FL对芽长、胚轴长和主根长 影响极显著(P<0.01),并且所有经过FL处理的种 子生长的3个指标值均小于CK。当浓度高于10 g・L<sup>-1</sup>时,随着浓度的升高,各指标值下降程度越 大;当低于此浓度时,3个种子生长指标值呈现波动 变化。不同浓度NL对芽长和主根长有极显著影响 (P<0.01),对胚轴长影响显著(P<0.05),并且这3 个种子生长指标均在CK处理时为最大值(45.000、 11.767、28.867 mm),其次为10g・L<sup>-1</sup>,并且浓度高 于10g・L<sup>-1</sup>时,各生长指标值随浓度升高逐步降 低;在1~5g・L<sup>-1</sup>范围内,芽长和胚轴长呈现逐渐降 低的趋势,主根长则表现为先降低再升高,这表明



同一类型调落物的不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。下同。

Different lowercase letters of the same type of litter indicate significant differences (P < 0.05). The same below.

- 图 1 水杉凋落物浸提液对自身种子萌发的影响
- Fig. 1 Influence of *Metasequoia glyptostroboides* litter extract on its own seed germination

随着浸提液浓度的增加,种子生长表现出一定的浓度梯度抑制作用。经过 FL 和 NL 处理后,不同类型 不同浓度的凋落物浸提液均对水杉种子萌发后的 生长呈现出一定的抑制作用,当浓度高于 20 g·L<sup>-1</sup> 时,其抑制程度尤为显著。



11 期

图 2 水杉凋落物浸提液对自身种子生长的影响 Fig. 2 Influence of *Metasequoia glyptostroboides* litter extract on its own seed growth

2.2.2 凋落物浸提液对芽生长进程的影响 水杉 种子的芽长在试验期间的生长表现为开始较为缓 慢,之后较迅速,达到一定值后,又趋于缓慢,直至 生长停止。可见,芽长的生长变化符合"S"型生长 曲线特点,故采用 Logistic 模型拟合。由表 1 可 知,FL 和 NL处理下种子芽长 Logistic 拟合方程的 决定系数为 0.988~0.998,均达到了极显著相关水 平。随着 2 种凋落物浸提液浓度的增加,芽长的 生长曲线越平缓, 芽长进入线性生长期的时间越 晚(图3)。当浸提液浓度达到100、200g·L<sup>1</sup>时, FL处理下芽长的生长曲线明显低于NL处理下的 生长曲线, 说明高浓度下FL对芽长生长进程的抑 制作用更明显。由表2可知, FL和NL处理后, 水 杉种子芽长 MGR和LGR均随着浓度的增加逐渐 下降, 1~5g·L<sup>1</sup>时高于CK, 而当浓度增加到50 g·L<sup>1</sup>及以上时, MGR和LGR均小于CK; TLG均小 于CK, 除2、5g·L<sup>1</sup>处理外, 其余处理均随着浓度 的增加而逐渐降低; 线性生长量占总生长量的百 分率为55.263%~64.683%。

#### 2.3 凋落物浸提液对水杉的化感效应评价

由表 3 可知,FL 处理后,种子萌发指标的化感 效应敏感指数(*RI*)在 1~5 g·L<sup>-1</sup>和 100~200 g· L<sup>-1</sup>处理时为负数,即表现为抑制作用,其中 1 g· L<sup>-1</sup>对种子发芽率和发芽势的抑制最强,200 g·L<sup>-1</sup> 对发芽指数抑制最强,而 10~50 g·L<sup>-1</sup>有不显著的 促进作用。NL 在 1、2 g·L<sup>-1</sup>浓度处理时,种子萌 发指标的 *RI*为正值,即有一定促进作用,在此之 后,随着浓度的升高,表现为无显著促进作用和抑 制作用。FL 和 NL 处理对水杉种子芽长、胚轴长 和主根长均有抑制作用,在浓度  $\geq$  10 g·L<sup>-1</sup>时,浓 度越高抑制作用越强,同时对主根长的抑制作用 高于胚轴长和芽长。

为综合分析凋落物浸提液对水杉种子萌发和 生长的化感效应,进行化感效应综合指数(SE)计 算,结果见表 3。FL 各浓度均抑制种子萌发和生 长(-0.001~0.562),抑制作用表现为 1~10 g·L<sup>-1</sup> 范围内逐渐下降,10~50 g·L<sup>-1</sup>则为先上升再下降 的趋势,100~200 g·L<sup>-1</sup>抑制最强;NL 对水杉种子 萌发和生长的影响为"低促高抑"的双重效应,1 g·L<sup>-1</sup>时为一定促进作用(0.044),浓度高于 1 g·L<sup>-1</sup>时为抑制作用,并且浓度越高抑制越强。 综合来看,FL 对水杉种子萌发和生长的抑制强度 大于 NL,并且不同浓度呈现出不同的抑制效果。

# 3 讨论与结论

种子萌发是植物生活史的重要阶段,并且显 著地受到凋落物的化感效应影响,从而影响种群 的建立和更新(刘芳黎等,2017)。本研究证实水 杉凋落物对水杉种子的萌发与生长有一定程度的 抑制作用,说明水杉母树凋落物对该种群的天然

### 表 1 不同浓度凋落物浸提液处理水杉种子芽长生长曲线方程的拟合参数

Table 1 Fitting parameters of shoot length growth curves equation of Metasequoia glyptostroboides

seeds treated with different concentrations of litter extract

	河田远冰南		打	以合方程参数 Logist	ic equation paramete	r	
类型 Type	夜旋被旅度 Extract concentration (g・L <sup>-1</sup> )	生长极限值 Growth limitation value (k)	待定系数 Undetermined coefficient (a)	待定系数 Undetermined coefficient (b)	决定系数 Determination coefficient (R <sup>2</sup> )	检验值 Test value (F)	P值 P value
FL	1	42.849	7.529	0.656	0.996	4 233.826	0.000
	2	38.887	7.913	0.702	0.997	13 792.179	0.000
	5	42.665	7.496	0.639	0.994	2 588.208	0.000
	10	40.442	7.424	0.641	0.997	5 013.820	0.000
	20	38.380	7.810	0.659	0.995	2 987.653	0.000
	50	34.630	6.399	0.507	0.992	1 763.241	0.000
	100	31.294	6.457	0.423	0.993	1 622.249	0.000
	200	25.026	7.276	0.482	0.994	1 693.297	0.000
NL	1	41.409	7.642	0.672	0.996	3 982.635	0.000
	2	39.903	7.443	0.642	0.996	3 640.507	0.000
	5	41.356	7.939	0.664	0.998	6 931.014	0.000
	10	38.893	7.212	0.628	0.993	2 344.793	0.000
	20	38.096	7.107	0.597	0.994	2 663.327	0.000
	50	34.848	7.012	0.537	0.988	1 112.769	0.000
	100	28.808	7.433	0.586	0.995	2 910.335	0.000
	200	26.066	6.970	0.504	0.993	1 769.117	0.000
СК		44.883	6.571	0.563	0.996	4 380.008	0.000



图 3 不同浓度凋落物浸提液对水杉种子芽长生长曲线的影响

Fig. 3 Effects of different concentrations of litter extracts on shoot length growth curves of Metasequoia glyptostroboides seeds

## 表 2 不同浓度凋落物浸提液处理水杉种子

芽长的生长参数

 Table 2
 Growth parameters of shoot length of

 Metasequoia glyptostroboides seeds treated with
 different concentrations of litter extracts

类型 Type	浸提液浓度 Extract concen- tration (g・L <sup>-1</sup> )	<sup>€</sup> 最大线性 生长速率 <i>MGR</i> (mm・d <sup>-1</sup> )	线性生长 速率 <i>LGR</i> (mm・d <sup>-1</sup> )	线性 生长量 <i>TLG</i> (mm)	线性生长量 占总线性生长量 的百分率 Ratio of linear growth to total linear growth (%)
FL	1	7.027	6.246	24.739	57.801
	2	6.825	6.066	22.451	58.114
	5	6.816	6.058	24.633	58.280
	10	6.481	5.761	23.349	57.795
	20	6.323	5.621	22.159	57.856
	50	4.389	3.902	19.994	58.927
	100	3.309	2.942	18.068	64.683
	200	3.016	2.681	14.449	61.051
NL	1	6.957	6.184	23.907	58.826
	2	6.404	5.693	23.038	58.423
	5	6.865	6.102	23.877	60.499
	10	6.106	5.428	22.455	55.263
	20	5.686	5.054	21.995	58.705
	50	4.678	4.159	20.120	56.149
	100	4.220	3.751	16.632	58.154
	200	3.284	2.919	15.049	61.342
СК		6.317	5.615	25.913	57.584

更新存在一定化感效应。新鲜凋落物浸提液在极 低浓度 $(1 g \cdot L^{-1})$ 时阻碍种子发芽,这与 Macias (1995)的研究一致,可能是新鲜凋落物中含有萘 类、酯类、醇类等化感物质,干扰种子内部物质的 代谢,抑制细胞分裂、伸长及膜渗透性等,进而阻 碍种子萌发,因此表现出低浓度对种子萌发具有 强烈抑制作用。但是,究竟是哪种化感物质起作 用还有待进一步研究。高浓度(100、200 g·L<sup>-1</sup>) 处理的新鲜凋落物浸提液对水杉种子萌发和生长 均有一定抑制作用,这与晋梦然等(2020)研究格 氏栲(Castanopsis kawakami)未分解层浸提液在高 浓度时抑制杉木(Cunninghamia lanceolata)种子发 芽的结果一致。出现这种现象的原因是,随着化 感物质在高浓度下积累到一定程度,会导致细胞 器受到破坏(Mahdavikia et al., 2017),从而影响植 物对水分和矿物质吸收利用,致使种子萌发和生

长受到限制。水杉自然凋落物浸提液对水杉种子 发芽率、发芽势和发芽指数影响不显著,除了浓度 为1g·L<sup>-1</sup>时呈现一定的促进作用外,其余均为抑 制作用,并且在试验中发现高浓度的自然凋落物 浸提液会延迟种子萌发。Garnett等(2004)研究发 现新泽西州刚松、美洲越橘(Gaylussacia bacatta)和 美国白栎(Quercus alba)3种主要树种的凋落物均 对新泽西州刚松的种子发芽无影响,这主要是因 为自然凋落物受土壤中微生物、风化、淋溶等作用 的影响,导致其化感物质活性有一定降低(Araniti et al., 2016),化感作用也随之减弱。

幼苗阶段在植物整个生活史中至关重要,而 芽是从种子到早期幼苗建成的最初阶段,其会受 到众多因素的影响(蔺吉祥等,2011)。水杉新鲜 和自然凋落物浸提液均抑制芽长、胚轴长和主根 长,尤其是浓度高于 20 g·L<sup>-1</sup>时极不利于种子萌 发后的生长,这与毛红椿(Toona ciliata var. pubescens) 调落叶水浸液对毛红椿幼苗生长抑制作 用相同(郭晓燕等,2019)。植物凋落物释放的化 感物质能够破坏内根组织、抑制根毛形成 (Aguilera et al., 2017),降低对水分和营养物质的 吸收,阻碍有机物质的迅速积累,从而导致水杉种 子生长受到明显抑制,最终影响水杉幼苗在种群 中的存活力和竞争能力,这在一定程度上阻碍了 水杉种群天然更新。本研究发现,水杉凋落物浸 提液浓度对主根长的抑制作用高于胚轴长和芽长 的抑制作用,这也进一步证实了 Chon 等(2002)的 研究结果,即苜蓿(Medicago sativa)根系比种子萌 发率和胚轴长对化感自毒物质的反应更敏感。由 于种子发芽后由主根直接向外界汲取生长所需能 量,因此根是最先受到影响且影响程度比其他部 分更加显著(张志忠等,2013)。

"S"型生长曲线描述某一种群受空间约束的 生长过程(卢恩双等,2002),本研究发现,水杉种 子芽长的生长动态变化也符合"S"型生长曲线(*R*<sup>2</sup> ≥0.988),并且低浓度(≤20g・L<sup>-1</sup>)凋落物浸提 液在一定程度上促进芽的生长速率,而中高浓度 则抑制芽的生长。这是由凋落物化感作用的浓度 依赖性造成的,低浓度作用下诱导植物产生耐受 蛋白、采取快速生长等方式以应对不良环境,当浓 度超过植物自我调节能力的阈值时,其受到的化 感抑制作用更明显(Craine & Dybzinski, 2013)。

#### 表 3 水杉凋落物浸提液对自身种子萌发和生长的化感效应敏感指数和化感综合效应指数的影响

 Table 3
 Allelopathy sensitivity index and synthetical effect of allelopathy index of Metasequoia glyptostroboides

 litter extracts on its own seed germination and growth

类型 Type	浸提液浓度 Extract concentration (g・L <sup>-1</sup> )	发芽率 <i>RI</i> 值 <i>RI</i> value of germination rate	发芽势 <i>RI</i> 值 <i>RI</i> value of germination energy	发芽指数 <i>RI</i> 值 <i>RI</i> value of germination index	芽长 <i>RI</i> 值 <i>RI</i> value of shoot length	胚轴 <i>RI</i> 值 <i>RI</i> value of hypocotyl	主根 <i>RI</i> 值 <i>RI</i> value of main root	化感综合 效应指数 <i>SE</i>	平均 Average
FL	1	-0.436	-0.414	-0.268	-0.051	-0.071	-0.057	-0.216	-0.224
	2	-0.261	-0.212	-0.108	-0.165	-0.191	-0.257	-0.199	
	5	-0.055	-0.061	-0.003	-0.065	-0.036	-0.125	-0.057	
	10	0.093	0.002	0.128	-0.114	-0.104	-0.009	-0.001	
	20	-0.231	0.002	-0.104	-0.175	-0.130	-0.298	-0.156	
	50	0.192	0.172	0.157	-0.326	-0.269	-0.583	-0.110	
	100	-0.014	-0.171	-0.226	-0.611	-0.605	-1.338	-0.494	
	200	-0.014	-0.029	-0.370	-0.901	-0.892	-1.166	-0.562	
NL	1	0.124	0.371	0.196	-0.107	-0.083	-0.239	0.044	-0.217
	2	0.109	0.211	0.141	-0.141	-0.113	-0.313	-0.018	
	5	-0.077	-0.257	-0.067	-0.140	-0.156	-0.193	-0.148	
	10	-0.077	-0.476	-0.030	-0.107	-0.040	-0.189	-0.153	
	20	0.024	0.172	0.088	-0.201	-0.128	-0.401	-0.074	
	50	0.006	-0.061	-0.044	-0.256	-0.121	-1.193	-0.278	
	100	0.152	0.130	0.080	-0.573	-0.338	-1.943	-0.415	
	200	0.006	0.030	-0.108	-0.834	-0.498	-2.756	-0.694	

此外, 芽长在试验生长周期内的线性生长量占总 生长量的百分率在55%以上, 进一步证实无论是 在何种条件下线性生长期都是水杉生长过程中的 关键时期(吴漫玲等, 2020)。

化感效应敏感指数是衡量化感作用强度的重 要指标,本研究发现新鲜和自然凋落物浸提液对 种子萌发后生长的影响大于对种子萌发的影响。 一方面是因为芽与化感物质直接接触,且接触的 时间最长,化感抑制作用表现明显;另一方面,由 于种子拥有种皮、种翅等保护作用,导致其对化感 作用的响应有一定程度的滞后(Devaney et al., 2018)。不同类型不同浓度的凋落物浸提液对林 木种子萌发和生长的影响不同,化感综合效应指 数显示水杉新鲜凋落物浸提液对水杉种子萌发和 生长的抑制强度大于自然凋落物浸提液,这与郭 晓燕等(2018)和刘芳黎等(2017)的研究结果一 致,均表明新鲜凋落物抑制作用大于自然凋落物, 出现这种现象可能是凋落物在不同分解阶段产生 的化感物质种类或含量不同,从而造成化感效应 的差异化。本研究所有结果是在室内实验条件下 得出,存在一定局限性,需要结合田间试验进一步 探讨、验证水杉凋落物对水杉天然萌发与更新的 影响机制。此外,天然更新受到复杂自然环境(温 度、光照、水分、凋落物等)、人为因素(采种、干扰 等)和物种自身特性(种子活力、种源、繁殖特性、 遗传种群结构等)等多因素影响,如何有效促进水 杉天然更新还需进一步综合研究。

种子萌发和早期生长是天然更新的重要阶段,本研究发现水杉新鲜和自然凋落物水浸提液 均对自身种子萌发和生长产生了化感作用,并且 总体表现为一定的抑制作用,验证了水杉凋落物 的化感作用是影响水杉天然更新的障碍因素之 一。由于水杉每年落叶时间刚好在球果成熟前 后,因此今后在水杉母树保护与繁育管理中,建议 在种子雨高峰期前适当清理水杉凋落物,以避免 化感物质富积,为种子萌发和幼苗生长提供适宜 环境,从而促进水杉种群天然更新。

### 参考文献:

AGUILERA N, GUEDES LM, BECERRA J, et al., 2017. Is autotoxicity responsible for inhibition growth of new conspecific seedlings under the canopy of the invasive Acacia dealbata Link? [J]. Gayana Bot, 74(1): 1–14.

- ALISKAN IK, TERZI I, 2015. Allelopathic effects of walnut leaf extracts and juglone on seed germination and seedling growth [J]. J Hortic Sci, 76(4): 436–440.
- ARANITI F, GULLÌ T, MARRELLI M, et al., 2016. Artemisia arborescens L. leaf litter: phytotoxic activity and phytochemical characterization [J]. Acta Physiol Plant, 38(5): 128.
- CAVIERES LA, CHAXÓN P, PEÑALOZ A, et al., 2007. Leaf litter of Kageneckia angustifolia D. Don (Rosaceae) inhibits seed germination in sclerophyllous montane woodlands of central Chile [J]. Plant Ecol, 190(1): 13–22.
- CHEN J, YAO L, AI XR, et al., 2020. Adaptive strategies of functional traits of *Metasequoia glyptostroboides* parent trees to changing habitats [J]. Biodivers Sci, 28(3): 296-302. [陈俊,姚兰,艾训儒,等, 2020. 基于功能性状的水 杉原生母树种群生境适应策略[J]. 生物多样性, 28(3): 296-302.]
- CHEN WW, 2016. Mating system and dispersal patterns of the natural populations of *Metasequoia glyptostroboides* [D]. Shanghai: East China Normal University. [陈文文, 2016. 水杉(*Metasequoia glyptostroboides*)自然种群交配系 统和扩散格局研究 [D]. 上海: 华东师范大学.]
- CHON SU, CHOI SK, JUNG S, et al., 2002. Effects of alfalfa leaf extracts and phenolic allelochemicals on early seedling growth and root morphology of alfalfa and barnyard grass [J]. Crop Prot, 21 (10): 1077-1082.
- CRAINE JM, DYBZINSKI R, 2013. Mechanisms of plant competition for nutrients, water and light [J]. Funct Ecol, 27(4): 833-840.
- DEVANEY JL, WHELAN PM, JANSEN MAK, 2018. Conspecific negative density dependence in a long-lived conifer, yew *Taxus baccata* L. [J]. Eur J For Res, 137(1): 69-78.
- FAN YK, WANG L, SU T, et al., 2020. Spring drought as a possible cause for disappearance of native *Metasequoia* in Yunnan Province, China: Evidence from seed germination and seedling growth [J]. Glob Ecol Conserv, 22: 1–10.
- FERNANDEZ C, LELONG B, VILA B, et al., 2006. Potential allelopathic effect of *Pinus halepensis* in the secondary succession: an experimental approach [J]. Chemoecology, 16(2): 97-105.
- FERNANDEZ C, VOIRIOT S, MÉVY JP, et al., 2008. Regeneration failure of *Pinus halepensis*, mill: the role of autotoxicity and some abiotic environmental parameters [J]. For Ecol Manag, 255(7): 2928–2936.
- GARNET E, JONSSON LM, DIGHTON J, et al., 2004. Control of pitch pine seed germination and initial growth exerted by

leaf litters and polyphenolic compounds [J]. Biol Fert Soils, 40(6): 421-426.

- GUO QJ, WANG ZM, DENG ZZ, 2018. Influences of different sodium selenite concentrations on seed germination of *Metasequoia glyptostroboides* [J]. Guihaia, 38(10): 1319– 1325. [郭秋菊, 王志鸣, 邓桢珍, 2018. 不同浓度亚硒酸 钠溶液对水杉种子萌发的影响 [J]. 广西植物, 38(10): 1319–1325.]
- GUO XY, TAO GF, ZHANG L, et al., 2019. Autotoxicity of aqueous extracts from *Toona ciliata* var. *pubescens* leaf litter [J]. J Nucl Agric Sci, 33(12): 2499-2508. [郭晓燕, 陶 国峰, 张露, 等, 2019. 毛红椿凋落叶水浸液自毒作用研 究 [J]. 核农学报, 33(12): 2499-2508.]
- GUO XY, WEN T, ZHANG L, et al., 2018. Allelopathy and chemical composition of decomposing products from leaf litter of *Toona ciliata* var. *pubescens* [J]. Sci Silv Sin, 54(6): 24–32. [郭晓燕, 温婷, 张露, 等, 2018. 毛红椿落叶腐解 物的化感作用及成分 [J]. 林业科学, 54(6): 24–32.]
- HUANG X, CHEN J, LIU J, et al., 2019. Autotoxicity hinders the natural regeneration of *Cinnamomum migao* H. W. Li in Southwest China [J]. Forests, 919(10): 1–17.
- HUANG X, ZHU J, YAO L, et al., 2020. Structure and spatial distribution pattern of a native *Metasequoia glyptostroboides* population in Hubei [J]. Biodivers Sci, 28 (4): 463 473. [黄小, 朱江, 姚兰, 等, 2020. 水杉原生种群结构及 空间分布格局 [J]. 生物多样性, 28(4): 463-473.]
- HU XS, ZHENG WJ, 1948. On the new family Metasequoiaceae and on *Metasequoia glyptostroboide*, living species of the genus *Metasequoia* found in Szechuan and Hupen [R]. Static Report, 1: 153-161. [胡先骕, 郑万钧, 1948. 水杉新科 及生存之水杉新种 [R]. 静生汇报, 1: 153-161.]
- JIN MR, WANG Z, LI MJ, et al., 2020. Effects of litter extracts from *Castanopsis kawakamii* natural forest on seed germination and radicle growth of Chinese fir [J]. J Beijing For Univ, 42(4): 51–59. [晋梦然, 王哲, 李梦佳, 等, 2020. 格氏栲天然林凋落物浸提液对杉木种子萌发和胚 根生长的影响 [J]. 北京林业大学学报, 42(4): 51–59.]
- KIMURA F, SATO M, KATO-NOGUCHI H, 2015. Allelopathy of pine litter: Delivery of allelopathic substances into forest floor [J]. J Plant Biol, 58(1): 61–67.
- LI DW, WANG DM, YAO WX, 2010. Autotoxicity of *Pinus tabulaeformis* and its ecology significance [J]. Sci Silv Sin, 46(11):174-178. [李登武, 王冬梅, 姚文旭, 2010. 油松的自毒作用及其生态学意义 [J]. 林业科学, 46(11):174-178.]
- LIN JX, ZHANG ZJ, LI XY, et al., 2011. Study on growth and physiological adaptability of *Leymus chinesis* in the early seedlings stage under salt and alkali environments [J]. Chin J Grassl, 33(6): 64-69. [蔺吉祥, 张兆军, 李晓宇, 等,

2011. 羊草早期幼苗在盐、碱生境下生长与生理适应性的 研究 [J]. 中国草地学报, 33(6): 64-69.]

- LIN Y, AI XR, YAO L, et al., 2017. Population structure and dynamics of *Metasequoia glyptostroboides* parent trees [J]. Chin J Ecol, 36(6): 1531–1538. [林勇, 艾训儒, 姚 兰,等, 2017. 水杉原生母树种群结构与动态 [J]. 生态 学杂志, 36(6): 1531–1538.]
- LI SX, YAO YL, DAI XG, et al., 2012. Effects of environmental conditions and covering soil after sowing on seedling emergence rate of *Metasequoia glyptostroboides* [J]. J Centr S Univ For Technol, 32(2): 26-30. [李淑娴, 姚亚莉, 戴晓港, 等, 2012. 环境条件和播后覆土对水杉 种子出苗率的影响 [J]. 中南林业科技大学学报, 32(2): 26-30.]
- LIU FL, ZHANG Y, WU FQ, et al., 2017. Effect of autotoxicity and litter allelopathy on seed germination of *Rhododendron protistum* var. *giganteum*, a plant species with extremely small populations in China [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 37(6): 1189-1195. [刘芳黎, 张越, 吴富 勤, 等, 2017. 自毒和森林凋落物化感作用对极小种群野 生植物大树杜鹃种子萌发的影响 [J]. 西北植物学报, 37(6): 1189-1195.]
- LIU XH, 2020. Analysis on long non-coding RNAs in Metasequoia glyptostroboides [J]. Mol Plant Breed, 18(3): 853-857. [刘小红, 2020. 水杉长链非编码 RNA 分析 [J]. 分子植物育种, 18(3): 853-857.]
- LU ES, GUO MC, SONG SD, et al., 2002. A kind of nonautonomous logistic growth curve and its application [J]. J NW A & F Univ (Nat Sci Ed), 30(4): 127-129. [卢恩双, 郭满才, 宋世德, 等, 2002. 一类非自治的 Logistic 生长曲线及其应用 [J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 30(4): 127-129.]
- MACIAS FA, 1995. Allelopathy in the search for natural herbicide model [J]. ACS Symp Ser Am Chem Soc, 582: 310–329.
- MAHDAVIKIA F, SAHARKHIZ MJ, KARAMI A, 2017. Defensive response of radish seedlings to the oxidative stress arising from phenolic compounds in the extract of peppermint (*Mentha* × *piperita* L.) [J]. Sci Hortic, 214: 133–140.
- MUTURI GM, POORTER L, BALA P, et al., 2017. Unleached Prosopis litter inhibits germination but leached stimulates seedling growth of dry woodland species [J]. J Arid Environ, 138(1): 44-50.

- QIANG S, 2005. Botany [M]. 2nd ed. Beijing: Higher Education Press: 49-58. [强胜, 2005. 植物学 [M]. 2版. 北京:高等教育出版社: 49-58.]
- RICE L, 1984. Allelopathy [M]. 2nd ed. Oklahoma: Academic Press: 1–50.
- WILLIAMSON GB, RICHARDSON D, 1988. Bioassays for allelopathy: Measuring treatment responses with independent controls [J]. J Chem Ecol, 14(1): 181–187.
- WU ML, YAO L, AI XR, et al., 2020. The reproductive characteristics of core germplasm in a native *Metasequoia glyptostroboides* population [J]. Biodivers Sci, 28(3): 303–313. [吴漫玲, 姚兰, 艾训儒, 等, 2020. 水杉原生种群核 心种质资源的繁殖特性 [J]. 生物多样性, 28(3): 303–313.]
- XIN X, JING XM, SUN HM, et al., 2004. Ecophysiological characteristics of seed germination of the relict plant *Metasequoia glyptostroboides* [J]. Biodivers Sci, 12(6): 572-577. [辛霞,景新明,孙红梅,等, 2004. 孑遗植物水 杉种子萌发的生理生态特性研究 [J]. 生物多样性, 12(6): 572-577.]
- YANG ZL, YANG X, TAN ZF, et al., 2011. Simulating growth model of different *Magnolia officinalis* provenances at seedling stage [J]. J NW A & F Univ (Nat Sci Ed), 39(4): 60-68. [杨志玲,杨旭,谭梓峰,等, 2011. 厚朴 不同种源苗期生长模型的拟合 [J]. 西北农林科技大学 学报(自然科学版), 39(4): 60-68.]
- ZHANG SS, XIANG ZY, KANG HM, et al., 2016. Effects of Nyssa yunnanensis litter on its nature regeneration [J]. J NE For Univ, 44(1): 6-10. [张珊珊, 向振勇, 康洪梅, 等, 2016. 云南蓝果树凋落物对其天然更新的影响 [J]. 东北 林业大学学报, 44(1): 6-10.]
- ZHANG ZZ, SUN ZH, CHEN WH, et al., 2013. Allelopathic effects of organic acid allelochemicals on melon [J]. Acta Ecol Sin, 33(15): 4591-4598. [张志忠, 孙志浩, 陈文 辉,等, 2013. 有机酸类化感物质对甜瓜的化感效应 [J]. 生态学报, 33(15): 4591-4598.]
- ZHUANG Z, LI YJ, LIU QQ, et al., 2017. Effects of Chinese fir litter extracts on the seed germination and seedlings [J]. J For Environ, 37(1): 29–33. [庄正,李艳娟, 刘青 青,等, 2017. 凋落物浸提液对杉木种子萌发及幼苗的影 响[J]. 森林与环境学报, 37(1): 29–33.]

(责任编辑 周翠鸣)

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202112004

柳心怡, 农宇, 黄建祥, 等. Cr<sup>6+</sup>对人工湿地薏苡光合特性和微量元素吸收的影响 [J]. 广西植物, 2022, 42(11): 1959-1970.

LIU XY, NONG Y, HUANG JX, et al. Effects of Cr<sup>6+</sup> on photosynthetic characteristics and trace element absorption of *Coix lacryma-jobi* in constructed wetland [J]. Guihaia, 2022, 42(11): 1959–1970.

# Cr<sup>6+</sup>对人工湿地薏苡光合特性和微量元素吸收的影响

柳心怡,农 宇,黄建祥,李素丽,李良香,程夕冉,王学礼,李正文,李志刚\*

(广西大学农学院,南宁 530005)

**摘** 要:为深入了解 Cr<sup>6+</sup>胁迫对人工湿地植物薏苡光合特性和微量元素吸收的影响,该文通过构筑微型垂 直流薏苡(*Coix lacryma-jobi*)人工湿地,采用 1/2 Hoagland's 营养液配制的含 0、5、20、40 mg・L<sup>-1</sup> Cr<sup>6+</sup>废水为 灌溉用水,研究铬胁迫对人工湿地植物生长、光合特性、抗氧化酶活性和微量元素吸收等的影响。结果表明:(1)低浓度(5 mg・L<sup>-1</sup>)Cr<sup>6+</sup>对薏苡的株高、茎粗和分蘖影响不显著,高浓度(20、40 mg・L<sup>-1</sup>)Cr<sup>6+</sup>则显著 抑制薏苡的生长。(2)低浓度 Cr<sup>6+</sup>处理下,薏苡叶片净光合速率( $P_n$ )、气孔导度( $G_n$ )和蒸腾速率( $T_r$ )有不 同程度的提高,提高幅度分别为 6.8% ~54.8%、13.0% ~40.3% 和 9.1% ~36.4%。高浓度 Cr<sup>6+</sup>处理下,叶片  $P_n$ 、 $G_s$ 、 $T_r$ 等指标显著下降,但叶片胞间 CO<sub>2</sub>浓度( $C_i$ )则显著提高。(3)薏苡叶片超氧化物歧化酶(SOD)和 过氧化物酶(POD)活性均随着处理时间的延长而提高;低浓度 Cr<sup>6+</sup>处理下,薏苡叶片 SOD 活性与对照差异 不大,高浓度 Cr<sup>6+</sup>处理下,SOD 活性受到显著抑制。薏苡叶片 POD 活性和丙二醛(MDA)含量均随 Cr<sup>6+</sup>处理 浓度的提高而提高。(4)高浓度 Cr<sup>6+</sup>处理显著抑制根系、茎、叶对 Cu、Fe、Mn和 Zn 的吸收。(5)5、20 mg・L<sup>-1</sup> Cr<sup>6+</sup>处理下,人工湿地对 Cr<sup>6+</sup>去除率最高可达 99%,40 mg・L<sup>-1</sup> Cr<sup>6+</sup>处理下最高则为 86%。综上认为,Cr<sup>6+</sup> 胁迫导致 Fe、Mn、Zn 和 Cu 等元素吸收量显著下降,光合受阻,抗氧化系统受损,植物生长受到抑制,最终导致人工湿地处理含 Cr<sup>6+</sup>废水的能力下降。

关键词: 铬, 人工湿地, 光合作用, 微量元素, 抗氧化酶 中图分类号: Q948 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2022)11-1959-12

# Effects of Cr<sup>6+</sup> on photosynthetic characteristics and trace element absorption of *Coix lacryma-jobi* in constructed wetland

LIU Xinyi, NONG Yu, HUANG Jianxiang, LI Suli, LI Liangxiang, CHENG Xiran, WANG Xueli, LI Zhengwen, LI Zhigang<sup>\*</sup>

( College of Agricultural, Guangxi University, Nanning 530003, China )

收稿日期: 2022-03-17

基金项目:国家自然科学基金(21167002,41867023); 广西自然科学基金(2018GXNSFAA281214) [Supported by National Natural Science Foundation of China (21167002, 41867023); Natural Science Foundation of Guangxi (2018GXNSFAA281214)]。

第一作者:柳心怡(1997-),硕士研究生,主要从事作物环境生态研究,(E-mail)929252184@qq.com。

<sup>\*</sup>通信作者:李志刚,教授,主要从事植物逆境生理生态研究,(E-mail)lizhigangnn@163.com。

Abstract: In order to understand the effects of Cr<sup>6+</sup> stress on the photosynthetic characteristics and trace element absorption of Coix lacryma-jobi, we investigated the effects of Cr stress on the growth, photosynthetic characteristics, antioxidant enzyme activity and microelement absorption of C. lacryma-jobi by constructing a miniature vertical flow C. lacryma-jobi artificial wetland with 1/2 Hoagland's nutrient solution containing 0, 5, 20, 40 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> Cr<sup>6+</sup> wastewater as irrigation water. The results were as follows: (1) Low concentration (5 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) of Cr<sup>6+</sup> had no significant effects on plant height, stem thickness and tillering of C. lacryma-jobi, while high concentrations (20, 40 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) of Cr<sup>6+</sup> significantly inhibited the growth of C. lacryma-jobi. (2) Net photosynthetic rate  $(P_n)$ , stomatal conductance  $(G_n)$  and transpiration rate ( $T_{c}$ ) of C. lacryma-jobi leaves were increased to different degrees under low Cr<sup>6+</sup> treatment, with the increases ranging from 6.8% to 54.8%, from 13.0% to 40.3% and from 9.1% to 36.4%, respectively. Under the high concentration of  $Cr^{6+}$  treatment, the  $P_n$ ,  $G_s$  and  $T_r$  of leaves decreased significantly, but the intercellular  $CO_2$ concentration ( $C_i$ ) increased significantly. (3) Both superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD) activities of C. lacryma-jobi leaves increased with increasing treatment time; SOD activity of C. lacryma-jobi leaves did not significantly differ from the control under low Cr6+ treatment, and was significantly inhibited under high Cr6+ treatment. The POD activity and malondialdehyde (MDA) content of C. lacryma-jobi leaves increased with the increase of Cr<sup>6+</sup>treatment concentration. (4) The absorption of Cu, Fe, Mn and Zn by roots, stems and leaves was significantly inhibited by high concentration of  $Cr^{6+}$  treatment. (5) The removal rate of  $Cr^{6+}$  by the artificial wetland was up to 99% under 5 and 20 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> Cr<sup>6+</sup> treatments, and 86% under 40 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> Cr<sup>6+</sup> treatment. All the results indicate that Cr<sup>6+</sup> stress leads to a significant decrease in the absorption of Fe, Mn, Zn and Cu, hinders photosynthesis, impairs antioxidant systems and inhibits plant growth, which ultimately leads to a decrease in the ability of the artificial wetland to treat Cr<sup>6+</sup> containing wastewater.

Key words: chromium (Cr), constructed wetland, photosynthesis, trace element, antioxidative enzyme

铬能够通过食物链途径进入植物、动物和人的体内,并进行积累,且极易对生态环境和人体健康造成伤害(Wenzel et al.,2003;Rajkumar et al.,2009;樊霆等,2013)。铬(Cr)在环境中的常见价态有 Cr(Ⅲ)和 Cr(Ⅵ),其中,Cr(Ⅲ)毒性较低,是人体必需的微量元素之一;而 Cr(Ⅵ)通常以铬酸盐或重铬酸盐离子的形式与氧结合,其强氧化性、高水溶性和膜渗透性使得极低浓度的 Cr(Ⅵ)也具有高毒性(王爱云等,2012;Alahmad et al.,2019)。铬广泛应用于电镀业和染料业等行业,这些行业工厂排放的废水是铬污染传播的重要途径,并会导致耕地污染。因此,加强含铬废水治理和达标排放是避免耕地铬污染和保护有限耕地资源的重要手段。

前人研究发现,运用化学固化法、化学稳定化 法、化学还原法、离子交换法和微生物还原法等技 术可以去除污水中铬,但这些技术存在成本较高、 操作复杂和不适于低浓度 Cr(Ⅵ)污染水体处理 (伍清新等,2014;田小利和李倩,2017)等问题。 人工湿地是植物-微生物联合修复的一种修复模 式,因其成本低、耗能少和具有一定的生态效益的 特点,被认为是处理重金属污染修复的有效途径 (Rivastava et al., 2009; Zhuang et al., 2019; Xu et al.,2020)。人工湿地对含铬污水具有较好的净化 效果, 李志刚等(2010)研究发现, 薏苡(Coix lacryma-jobi)人工湿地能够高效去除生活污水中低 浓度 Cr<sup>6+</sup>(<10 mg · L<sup>-1</sup>),且植物表现出相对较高 的耐受性,而高浓度 Cr<sup>6+</sup>(30 mg·L<sup>-1</sup>)胁迫则对薏 苡的生长有显著的抑制作用。光合作用强弱是衡 量植物生长状态的重要指标,铬含量过高会导致 植物叶绿素分解,净光合速率(net photosynthetic rate,  $P_n$ )、气孔导度(stomatal conductance,  $G_s$ )、蒸 腾速率(transpiration rate,  $T_{i}$ )和胞间 CO,浓度 (intercelluar CO, concentration, C<sub>i</sub>)等光合生理指标 下降,最终导致植物的生长受到显著抑制 (Choudhury et al., 2012; 邵云等, 2012)。其中, 植 物光合速率的下降可能导致光合电子传递过程中 电子传递给 O,分子,活性氧含量增加,从而引起膜 脂过氧化,丙二醛(malondialdehyde, MDA)在体内 过量积累,使得植物体的各类代谢活动受到严重 阻碍甚至失调(杨雯一,2021)。植物可通过提高 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和过

氧化物酶(peroxidase, POD)等抗氧化酶的活性来 抵御重金属的毒害作用(钟旻依等,2019)。此外, 植物体内产生的可溶性蛋白等渗透调节物质亦可 缓解重金属胁迫(吕冬梅等,2021)。但是,有关铬 胁迫条件下垂直流人工湿地植物光合参数、抗氧 化酶活性的变化特征的研究并不多见。

植物光合能力的大小与矿质养分的吸收关系 极为密切,Cu、Zn、Fe 和 Mn 等微量元素与光合作 用关系极为密切,重金属胁迫对植物的养分吸收 和代谢产生重要影响,如Ali等(2012)研究发现铬 胁迫抑制大麦对 Fe、Mn、Cu 和 Zn 的吸收。肖家昶 等(2021)研究发现在铝胁迫下,西瓜叶片钾、钙和 镁元素积累,而钾、钙和镁元素与植物叶片光合和 抗逆等功能密切相关。因为 Fe、Zn、Mn 和 Cu 都是 植物正常生长和代谢所必需的微量营养元素,也 是某些酶的活化剂,在植物的光合作用、呼吸作用 等方面的氧化还原过程中具有非常重要的作用 (徐根娣等,2015),所以随着这些元素吸收量的减 少,将会直接导致植物光合能力的下降和生物量 的减少等问题。迄今为止,有关 Cr<sup>6+</sup>胁迫对植物吸 收营养元素的影响的研究仍鲜见报道。因此,了 解 Cr<sup>6+</sup>胁迫下植物的养分元素变化对于深入了解 人工湿地植物响应铬胁迫机制具有重要的实际 意义。

本研究拟采用构建模拟垂直流薏苡人工湿地 的方法,以含不同浓度 Cr<sup>6+</sup>的铬废水(利用 1/2 Hoagland's 营养液配制)作为人工湿地灌溉用水, 拟探讨以下问题:(1)不同浓度 Cr<sup>6+</sup>对人工湿地中 薏苡吸收微量元素的影响;(2)不同浓度 Cr<sup>6+</sup>人工 湿地中薏苡生长、光合特性和人工湿地对 Cr<sup>6+</sup>去除 的关系。本研究结果可为实际人工湿地运作提供 一定的理论依据,并为今后人工湿地修复含重金 属污水提供参考价值和指导。

1 材料与方法

#### 1.1 试验设计

本试验于 2020 年的 5—8 月在广西大学农学 院科研基地网室(108°17′14″E,22°50′17″N)内 进行。当地年平均气温为 22.0 ℃,属亚热带季风 气候,年均降雨量为 1 300~2 000 mm。

薏苡是禾本科(Poaceae)、薏苡属(Coix)植物。 薏苡为我国东南部常见栽培或野生植物,生于温 暖潮湿的边地和山谷溪沟。薏苡是湿生性植物, 适应性强,对土壤要求不严,可以在富营养化的水 体中生长,根系发达,具有修复受污染水体能力 (高冲,2008)。因此,本试验以薏苡为人工湿地植 物,试验材料来自广西大学农学院试验基地。参 考李志刚等(2010)的方法构建微型垂直流人工湿 地系统,选取上、下口直径和高度分别为71、45、61 cm 的塑料桶,于桶内从下至上依次装填高度约10 cm 的鹅卵石(直径2~5 cm),铺垫40 cm 厚的细 沙层,在距桶底约10 cm 处安装水龙头作为出水 口。每个桶内种植6株株高20 cm 且长势均匀的 薏苡苗。在1/2 Hoagland's 营养液中添加K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 以获得含0(对照,CK)、5、20、40 mg·L<sup>-1</sup>浓度 Cr<sup>6+</sup> 的污水,不同浓度每个处理重复3次。

Cr<sup>6+</sup>处理前 20 d,用 1/2 Hoagland's 营养液灌溉人工湿地。5月 14 日开始进行不同浓度 Cr<sup>6+</sup>处理,参考李志刚等(2018)的方法,采取间歇式进水方式,进水后停留 3 d,然后落干 4 d。每 7 d 为一个周期,直至当年 8 月 30 日试验结束。

#### 1.2 样品采集

分别于 Cr<sup>6+</sup>处理后 10、30、60、100 d 进行样品 采集。取出植株并将根、茎和叶洗净拭干,一部分 叶片鲜样用于逆境生理指标的测定;另一部分把 根、茎和叶分开,放入烘箱 105 ℃杀青 30 min,70 ℃烘至恒重后粉碎,最后过 60 目筛后装样保存 待测。

## 1.3 测定方法

1.3.1 逆境生理指标的测定 叶片 SOD 活性采用 苏州科铭试剂盒测定; POD 活性测定参照李合生 (2000),采用愈创木酚动力学扫描法; MDA 含量 测定参照刘大林等(2015),采用硫代巴比妥酸比 色法。

1.3.2 光合生理指标的测定 分别于 Cr<sup>6+</sup>处理后的 第 10、第 30、第 60 和第 100 天的上午 9:00— 11:30使用 LI-6400XTR 光合作用测定仪(生产厂 家:LI-COR,产地:美国),选择第一片展开叶(叶片 基部出现叶环时即为展开叶),测定薏苡叶片的净 光合速率、气孔导度、蒸腾速率和胞间 CO<sub>2</sub>浓度指 标。测定期间光照强度为(480±10)μmol·m<sup>-2</sup>, 光照 时间 为(16±0.5) h,相对湿度保持在 60%~70%。

1.3.3 微量元素铬、铁、铜、锰和锌含量的测定 将 植株的根、茎和叶分别冲洗干净后,将根系浸泡于 浓度为 20 mmol · L<sup>-1</sup>的 Na<sub>2</sub>-EDTA 溶液中 30 min, 然后用超纯水冲洗干净,以除去吸附在根表面的 铬。将根、茎和叶样品烘干后粉碎过 100 目筛。 参照王爱云等(2012)的方法,用浓硝酸与高氯酸 按4:1(*V*/*V*=4:1)的方法进行消煮,并用电感耦 合等离子发射体发射光谱仪(型号:ICP-5000,生 产厂家:北京聚光科技有限公司,产地:中国)测定 各组分中的 Cr、Fe、Cu、Mn 和 Zn 元素含量。

1.3.4 农艺形状测定 分别于 Cr<sup>6+</sup>处理后第 10、第 30、第 60 和第 100 天,测量薏苡茎粗、株高(从基 部至顶部第一个可见叶环)和分蘖数。

1.3.5 水中 Cr<sup>6+</sup>含量测定 参照苏长青(2016)的 方法,使用二苯碳酰二肼分光光度法测定出水中 Cr<sup>6+</sup>含量。其中所用比色管均用 10%稀硝酸浸泡 16 h 以上,以防止试管内壁吸附 Cr<sup>6+</sup>。

#### 1.4 统计分析

采用软件 Microsoft Excel 2010 进行数据处理 和计算,数据分析软件 DPS 9.50 进行统计分析, Duncan's 法进行显著性检验(*P*<0.05)。平均数 据以"平均数 ± 标准差"表示。

2 结果与分析

#### 2.1 不同浓度 Cr<sup>6+</sup>对薏苡农艺性状的影响

由表 1 可知,各处理的薏苡株高随着  $Cr^{6+}$ 处理 时间的延长呈现出提高的趋势,高浓度的  $Cr^{6+}$ 胁迫 (20~40 mg·L<sup>-1</sup>)抑制薏苡植株生长。处理过程 中 5 mg·L<sup>-1</sup>  $Cr^{6+}$ 处理的薏苡株高与 CK 相比差异 不显著,而 20 mg·L<sup>-1</sup>和 40 mg·L<sup>-1</sup>  $Cr^{6+}$ 处理均显 著抑制薏苡的株高,表明  $Cr^{6+}$ 对薏苡的抑制随  $Cr^{6+}$ 浓度的增加而显著增强。

不同铬浓度下薏苡茎粗变化不明显,与 CK 差 异不显著。分蘖数随 Cr<sup>6+</sup>浓度的增加而减少。5 mg·L<sup>-1</sup> Cr<sup>6+</sup>处理可促进薏苡分蘖,20 mg·L<sup>-1</sup>和 40 mg·L<sup>-1</sup> Cr<sup>6+</sup>处理均抑制薏苡分蘖,40 mg·L<sup>-1</sup> Cr<sup>6+</sup>处理与 CK 相比分蘖数差异显著。

#### 2.2 不同处理下薏苡叶片光合作用的变化

由表 2 可知, 薏苡叶片的  $P_n$ 和  $T_r$ 随  $Cr^{6+}$ 处理 时间的延长而呈先升后降的趋势,  $Cr^{6+}$ 处理 5 d,  $P_n$ 和  $T_r$ 值最高; 5 mg · L<sup>-1</sup>  $Cr^{6+}$ 处理下,  $P_n$ 和  $T_r$ 均显 著大于 CK,  $Cr^{6+}$ 处理 30 d,  $P_n$ 和  $T_r$ 达到最高, 分别 比 CK 高 1.1 和 1.4 倍, 随后逐渐下降; 不同  $Cr^{6+}$ 处 理浓度相比较,5 mg·L<sup>-1</sup> Cr<sup>6+</sup>处理下, $P_n$ 和  $T_r$ 值最高,而 20、40 mg·L<sup>-1</sup>Cr<sup>6+</sup>处理下, $P_n$ 和  $T_r$ 均显著小于 CK,浓度越高, $P_n$ 和  $T_r$ 值越低,分别比对照低 6.1%~66.4%和 28.2%~55.9%。

随处理时间的延长,CK的 $G_s$ 呈无规律变化。 5 mg·L<sup>-1</sup>Cr<sup>6+</sup>处理下,叶片 $G_s$ 大于CK,提高幅度 在 16.7%~26.7%之间,而高浓度的Cr<sup>6+</sup>胁迫(20~ 40 mg·L<sup>-1</sup>)下,除Cr<sup>6+</sup>处理10d时 $G_s$ 大于对照外, 20 mg·L<sup>-1</sup>Cr<sup>6+</sup>处理 $G_s$ 与CK差别不大,而40 mg· L<sup>-1</sup>Cr<sup>6+</sup>处理 $G_s$ 值则显著低于CK,降低幅度在 27.2%~60%之间;与对照相比,5 mg·L<sup>-1</sup>Cr<sup>6+</sup>处理 叶片 $C_i$ 与CK差异不大,其余处理叶片 $C_i$ 均显著 大于CK,并随着Cr<sup>6+</sup>处理浓度的提高而提高。

## 2.3 不同处理下薏苡叶片逆境生理指标变化

2.3.1 不同处理下薏苡叶片 SOD 活性的变化 由 图 1 可知,薏苡叶片的 SOD 活性在 87.9~155.4 U・g<sup>-1</sup>之间。随 Cr<sup>6+</sup>处理时间的延长,薏苡叶片 SOD 活性呈上升的趋势。5 mg·L<sup>-1</sup> Cr<sup>6+</sup>处理叶片 SOD 大于 CK;20 mg·L<sup>-1</sup> Cr<sup>6+</sup>处理薏苡叶片 SOD 活性与 CK 差异不显著;而 40 mg·L<sup>-1</sup> Cr<sup>6+</sup>随着处 理时间的延长,表现出先升后降的趋势。

2.3.2 不同处理下薏苡叶片 POD 活性的变化 由 图 2 可知,薏苡叶片的 POD 活性在1 194.8 ~ 3 562.4 U·g<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>之间,随 Cr<sup>6+</sup>处理时间的延 长和浓度的提高而提高。在 5、20 mg·L<sup>-1</sup> Cr<sup>6+</sup>处 理前期 30 d内, POD 活性与 CK 差异不显著,但随 Cr<sup>6+</sup>处理时间的延长, Cr<sup>6+</sup>对叶片 POD 活性有显著 的促进作用, Cr<sup>6+</sup>处理 60~100 d,与 CK 相比, 5、20 mg·L<sup>-1</sup> Cr<sup>6+</sup>处理 叶片 POD 活性分别提高了 27.8%~36.3%和 36.9%~39.4%。40 mg·L<sup>-1</sup>Cr<sup>6+</sup> 处理下,在 Cr<sup>6+</sup>处理初期(10 d),叶片 POD 活性与 CK 差异不显著,但 Cr<sup>6+</sup>处理 30 d 后,叶片 POD 活 性显著大于其他浓度处理,提高了 29.5%~40.6% 和 26.6%~31.3%。

2.3.3 不同浓度 Cr<sup>6+</sup> 对薏苡叶片 MDA 含量的影响 由图 3 可知,薏苡叶片 MDA 含量在 9.12~ 48.83 μmol·g<sup>-1</sup>之间。随 Cr<sup>6+</sup>处理时间的延长,叶 片 MDA 含量呈先升后降的趋势, Cr<sup>6+</sup>处理 30 d 时,各处理 MDA 含量达到最高值, 30 d 后呈下降 趋势。5 mg·L<sup>-1</sup> Cr<sup>6+</sup>处理下,叶片 MDA 含量与 CK 相比差异不显著, 而 20、40 mg·L<sup>-1</sup> Cr<sup>6+</sup>处理叶片 MDA 的含量则显著大于 CK 及 5 mg·L<sup>-1</sup> Cr<sup>6+</sup>处理

## 表 1 不同浓度 Cr<sup>↔</sup>处理下薏苡株高、茎粗和分蘖数变化

Table 1 Changes of plant height, stem diameter and tiller number of Coix lacryma-jobi

treated with different concentrations of Cr<sup>6+</sup>

处理时间 Treatment time (d)	铬处理 Cr <sup>6+</sup> treatment (mg・L <sup>-1</sup> )	株高 Plant height (cm)	株高抑制率 Plant height inhibition ratio (%)	茎粗 Stem diameter (cm)	分蘖数 Tiller number
10	0	87.4±4.04a	_	1.25±0.06ab	18±0.63a
	5	88.4±6.54a	—	1.28±0.04a	18±0.89a
	20	$72.8 \pm 7.66 \mathrm{b}$	16.7	$1.17{\pm}0.08{\rm bc}$	$5\pm0.75\mathrm{b}$
	40	$66.6 \pm 7.50 \mathrm{b}$	23.8	$1.24 \pm 0.05 \mathrm{ab}$	$4\pm0.52b$
30	0	120.33±10.23a	_	1.28±0.19a	51±3.45a
	5	124.17±10.34a	—	1.25±0.10a	39±1.38a
	20	$109.83 \pm 11.48 \mathrm{b}$	8.7	1.18±0.13a	$16{\pm}1.97{\rm b}$
	40	74.67±16.55c	37.9	1.21±0.11a	$7 \pm 1.17 \mathrm{b}$
60	0	178.20±25.97a	—	1.27±0.12a	54±2.53a
	5	194.40±15.79a	—	1.29±0.09a	44±2.16a
	20	168.00±23.19a	5.7	1.19±0.12a	39±2.26a
	40	$108.60{\pm}9.29{\rm b}$	39.1	1.19±0.07a	$14{\pm}1.97{\rm b}$
100	0	222.67±15.56a	—	1.37±0.21a	62±2.66a
	5	232.83±16.18a	—	1.35±0.06a	63±2.59a
	20	$184.33 \pm 26.93 \mathrm{b}$	17.2	1.27±0.11a	60±2.90a
	40	132.00±23.25c	40.7	1.25±0.10a	$14 \pm 1.86 \mathrm{b}$

注:抑制率(%)=(对照处理的株高-铬处理的株高)/对照处理的株高×100。表中数据为平均值±标准差,同列中不同小写字母 表示显著差异(P<0.05)。

Note: Inhibition rate (%) = (plant height of control treatment-plant height of chromium treatment)/plant height of control treatment × 100. Data in the table are  $\bar{x}\pm s$ , different lowercase letters in the same column indicate significant differences (P<0.05).

的。叶片 MDA 含量随 Cr<sup>6+</sup>浓度增大呈上升。随处 理时间的延长,不同浓度 Cr<sup>6+</sup>处理叶片 MDA 含量 差异逐渐缩小。

## 2.4 不同浓度 Cr<sup>6+</sup>对薏苡吸收微量元素及铬的 影响

由表 3 可知,薏苡植株根、茎、叶的 Fe 含量分 别在 450.36~1 996.30 mg · kg<sup>-1</sup>、39.37~172.44 mg · kg<sup>-1</sup>和 198.33~382.81 mg · kg<sup>-1</sup>之间,不同部 位 Fe 含量大小依次为根>叶>茎。处理 30 d 时,5 mg · L<sup>-1</sup> Cr<sup>6+</sup>处理根、茎、叶 Fe 含量均比处理 10 d 时有不同程度的增加,增加幅度为 7.8%~29.2%, 其中茎中 Fe 含量增加幅度最大,根次之,最低为 叶,而 20、40 mg · L<sup>-1</sup> Cr<sup>6+</sup>处理下,根、茎、叶中 Fe 含量均呈下降趋势,下降幅度最大的为 20 mg · L<sup>-1</sup> Cr<sup>6+</sup>处理的根,下降幅度为 24.6%;不同 Cr<sup>6+</sup>处理 浓度相比较,除 5 mg · L<sup>-1</sup> Cr<sup>6+</sup>处理与 CK 差异不显 著外,其他浓度 Cr<sup>6+</sup>处理均显著降低了根系对 Fe 的吸收,与 CK 相比,降幅最大的为 40 mg · L<sup>-1</sup> Cr<sup>6+</sup>

#### 处理,降幅为47.5%。

薏苡根系的 Mn 含量最高,其次是茎,最低的 是叶(表4)。除 CK 和 5 mg · L<sup>-1</sup>Cr<sup>6+</sup>处理 30 d 的 茎 Mn 含量大于 10 d 处理外,随着处理时间的延 长,其他各 Cr<sup>6+</sup>处理下,薏苡根、茎、叶对 Mn 含量 的吸收皆呈显著下降趋势。与 CK 相比,在 20、40 mg · L<sup>-1</sup> Cr<sup>6+</sup>处理下,薏苡根系对于 Mn 的含量显著 下降,下降幅度分别在 4.4% ~ 10.6% 和 20.0% ~ 42.6%之间。整个处理过程中,Cr<sup>6+</sup>处理 10、40、60 d 薏苡叶片的 Mn 含量随 Cr<sup>6+</sup>浓度升高而显著 降低。

由表 5 可知,薏苡植株体内积累的 Zn 含量均 随处理时间的延长而呈下降的趋势,不同部位 Zn 含量大小依次为根>叶>茎。茎 Zn 含量随铬处理 浓度的提高而显著下降外,根和叶片 Zn 含量的变 化没有一致的规律。

薏苡植株根、茎和叶的 Cu 含量分别在 4.69~ 15.83 mg·kg<sup>-1</sup>、 2.12~5.23 mg·kg<sup>-1</sup>、 2.89~5.29

处理时间 Treatment time	铬处理 Cr <sup>6+</sup> treatment	净光合速率 <i>P<sub>n</sub></i>	蒸腾速率 <i>T</i> ,	气孔导度 <i>G</i> 。	胞间 CO <sub>2</sub> 浓度 C <sub>i</sub>
(d)	$(mg \cdot L^{-1})$	$(\mu mol \cdot m^2 \cdot s^1)$	$( \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} )$	$( \text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} )$	$( \mu mol \cdot mol^{-1} )$
10	0	$12.87{\pm}0.81\mathrm{b}$	$1.85{\pm}0.14\mathrm{b}$	$0.17 \pm 0.03 \mathrm{c}$	$241.92 \pm 15.77c$
	5	16.95±1.39a	2.25±0.13a	$0.20{\pm}0.01{\rm b}$	232.31±11.65c
	20	$8.80{\pm}1.39{\rm c}$	$1.50\pm0.08c$	0.23±0.03a	299.60±33.64b
	40	$4.57{\pm}0.98{\rm d}$	$1.23 \pm 0.07 \mathrm{c}$	0.23±0.02a	$347.97 \pm 15.29 \mathrm{b}$
30	0	$18.89{\pm}0.84\mathrm{b}$	$2.33 \pm 0.26 \mathrm{b}$	0.11±0.01a	$185.82 \pm 17.30 \mathrm{b}$
	5	22.71±0.44a	3.27±0.15a	0.12±0.01a	194.21±11.28al
	20	$14.60 \pm 0.59 c$	$2.38{\pm}0.12\mathrm{b}$	0.11±0.15a	244.90±22.12a
	40	$9.30{\pm}0.55{\rm d}$	$1.68 \pm 0.17 \mathrm{c}$	$0.06 \pm 0.01 \mathrm{b}$	244.78±9.01a
60	0	$14.32 \pm 2.35b$	$2.95{\pm}0.36\mathrm{b}$	$0.11 \pm 0.01 \mathrm{b}$	157.82±15.78b
	5	20.17±1.26a	$3.88 \pm 0.24a$	0.15±0.01a	$127.54 \pm 6.97 \mathrm{b}$
	20	$13.93{\pm}0.93{\rm b}$	$2.83 \pm 0.16 \mathrm{b}$	$0.10{\pm}0.01{\rm b}$	$151.57 \pm 9.72 \mathrm{b}$
	40	$8.14 \pm 0.95 c$	$2.24\pm0.15c$	$0.08{\pm}0.01{\rm b}$	214.78±11.04a
100	0	12.04±2.10ab	1.77±0.19a	0.05±0.01a	108.07±5.08a
	5	$15.09 \pm 1.22a$	2.00±0.13a	0.06±0.01a	104.08±14.36al
	20	$11.30 \pm 0.69 \mathrm{b}$	$1.27 \pm 0.05 \mathrm{b}$	$0.04 \pm 0.01 \mathrm{b}$	129.34±11.19a
	40	4.05±0.11c	$0.78 \pm 0.08 c$	0.02±0.01c	138.36±7.67a

表 2 不同浓度 Cr<sup>6+</sup>处理下薏苡叶片净光合速率、气孔导度、胞间 CO<sub>2</sub>浓度和蒸腾速率的变化

Table 2 Changes of  $P_n$ ,  $G_s$ ,  $T_r$  and  $C_i$  in the leaves of Coix lacryma-jobi treated with different concentrations of  $Cr^{6+}$ 

注:表中数据为平均值±标准差,同列中不同小写字母表示相同天数不同处理间差异显著性(P<0.05)。下同。

Notes: Data in the table are  $\bar{x} \pm s$ , different lowercase letters in the same column indicate significant differences among different treatments on the same number of days (*P*<0.05). The same below.



不同字母表示相同天数不同处理间差异显著性(P<0.05)。 下同。

Different letters indicate significant differences between different treatments for the same number of days (P < 0.05). The same below.

#### 图 1 不同浓度 Cr<sup>6+</sup>处理下薏苡叶片 超氧化物歧化酶(SOD)活性变化

Fig. 1 Changes of SOD activities in the leaves of *Coix lacryma-jobi* treated with different concentrations of Cr<sup>6+</sup>

mg·kg<sup>-1</sup>之间,薏苡植株体内的 Cu 含量最高是根, 其次是叶,最低是茎。薏苡植株体内积累的 Cu 含







量均随处理时间的延长而呈下降趋势(表6)。

由表7可知,薏苡植株内积累的铬含量大小依次为根>叶>茎。薏苡根系铬的含量随 Cr<sup>6+</sup>处理浓度的提高而增加,处理 10 d 和 100 d,高浓度的Cr<sup>6+</sup>胁迫(20~40 mg·L<sup>-1</sup>)对薏苡根系的铬含量影







响差异不显著,其他时期表现均为显著。在整个 Cr<sup>6+</sup>处理过程中,40 mg·L<sup>-1</sup>Cr<sup>6+</sup>处理薏苡茎对于 铬的吸收呈现出先升后降的趋势。处理 30 d前, 40 mg·L<sup>-1</sup>Cr<sup>6+</sup>薏苡叶片对铬含量的吸收呈上升 趋势,与10 d相比增加了 35.1%;而 30 d促进作用 却不明显,表现为下降的趋势,处理 100 d与 30 d 相比薏苡叶片对铬含量的吸收下降了 26.6%。

## 2.5 不同处理下出水 Cr<sup>6+</sup>含量变化

由图 4 可知,5、20 mg · L<sup>-1</sup> Cr<sup>6+</sup>处理下湿地出 水 Cr<sup>6+</sup>含量极低,去除率最高可达 99%,随铬处理 时间的延长,两种人工湿地对 Cr<sup>6+</sup>的去除率下降, 但在处理后期去除率最低也高达 89%。而 40 mg · L<sup>-1</sup> Cr<sup>6+</sup>处理对 Cr<sup>6+</sup>的去除率与 5、20 mg · L<sup>-1</sup> Cr<sup>6+</sup>处理相比差异显著且去除效果不明显,其在 30 d 时达到最高,为 86%,30 d 后表现为下降趋势。

## 3 讨论

前人研究发现,低浓度铬胁迫可促进西兰花 生长,而高浓度铬胁迫则会产生抑制作用(徐芬 芬,2014)。本研究亦发现,低浓度 5 mg · L<sup>-1</sup> Cr<sup>6+</sup> 处理提高了薏苡株高;20 mg · L<sup>-1</sup>以上浓度 Cr<sup>6+</sup>处 理则对薏苡株高有抑制作用,随 Cr<sup>6+</sup>浓度提高,抑 制效果明显,但 Cr<sup>6+</sup>处理对薏苡的茎粗影响不大。 薏苡总分蘖数随 Cr<sup>6+</sup>处理浓度增加而减少,40 mg · L<sup>-1</sup> Cr<sup>6+</sup>抑制作用显著。

光合作用是绿色植物最基本和最重要的生命

活动过程,光合速率、气孔导度、胞间 CO,浓度等是 衡量光合作用强度的重要指标。有研究表明,适 量的铬可提高植物叶片叶绿素含量,提高植物光 合能力,促进植物生长(Bonet et al., 1991; 欧阳峥 嵘等,2010);而过量的铬胁迫会则造成植物藻细 胞线粒体损伤,叶绿体破坏,使得植物的光合效率 和呼吸作用降低,从而抑制植物生长,严重时甚至 还会导致植物死亡(Lu et al., 2013;杨国远等, 2014;王碧霞等,2016)。光合作用的限制酶主要 受到 CO,浓度的调控,而气孔导度受到 CO,的影响 (姚佳等,2015)。在本研究中,薏苡叶片G随铬处 理时间的延长而下降,表明铬胁迫会引起叶片含 水量降低,从而促使气孔关闭,导致 C;下降,进而 引起光合速率降低。本研究发现,低浓度的5  $mg \cdot L^{-1} Cr^{6+}$ 处理促进薏苡叶片  $P_n$ 和  $T_r$ 的提高, 而 高浓度40 mg·L<sup>-1</sup> Cr<sup>6+</sup>处理则表现出抑制作用,植 物生长的表现与光合参数的变化一致,表明高浓 度 Cr<sup>6+</sup>胁迫可能是通过抑制薏苡的光合作用,引导 光合机构受损、光化学活性降低,从而产生明显的 光抑制,最终导致植物生长受到抑制。

重金属对植物的毒害机理之一是干扰植物对 养分的吸收,破坏植物体内的养分平衡(董钻和谢 甫练,1996)。Fe、Mn、Zn和Cu是植物体内参与代 谢作用的酶类辅基或激化酶活性的活化剂,参加 代谢氧化还原过程,影响着植物呼吸作用、光合作 用的过程。同时,还能提高作物对逆境和病害的 抗性(陈永林,2016)。本研究发现,高浓度的 Cr<sup>6+</sup> 胁迫(20~40 mg·L<sup>-1</sup>)显著抑制薏苡根、茎和叶对 Fe、Mn 和 Zn 的吸收,而且抑制效果随着处理时间 的延长而增加。铬胁迫干扰了植物对营养元素的 吸收与运输,其原因可能是大量的活性离子在根 尖细胞壁与质膜表面的阴离子之间相互作用,改 变了其质膜结构以及膜电位,从而使得离子转运 体的活性发生了变化,而在土壤中溶出的不同形 态活性铬也降低了多价阳离子在根皮层细胞质外 体的负载量,从而影响吸收;此外,也有可能是铬 离子与金属阳离子竞争阳离子结合位点,使得其 他营养元素的结合位点减少,从而抑制 Fe、Mn、Zn 等营养元素的吸收。高浓度铬胁迫使植物清除氧 自由基和光合能力下降,造成植物氧化损伤,从而 导致运输至根系光合产物量下降,根系因得不到 足量的物质和能量供应,使其根系吸收元素能力 下降,进而导致植物的代谢紊乱(徐根娣等,2015)。

#### 表 3 不同浓度 Cr<sup>6+</sup>处理对薏苡根、茎、叶铁含量的影响(单位: mg・kg<sup>-1</sup>)

Table 3 Effects of different concentrations of Cr6+ treatments on Fe contents in root,

stem and leaf of *Coix lacryma-jobi* (Unit:  $mg \cdot kg^{-1}$ )

植株部位	铬处理		处理时间 Trea	tment time (d)	d)			
Plant part	$( \text{mg} \cdot \text{L}^{-1} )$	10	30	60	100			
根	0	1 996.30±35.77a	1 066.90±31.55b	529.11±2.02a	521.76±0.69a			
Root	5	$1 473.71 \pm 8.78 \mathrm{b}$	1 669.25±24.23a	$519.35{\pm}1.77\mathrm{b}$	$492.16 \pm 1.49c$			
	20	$1 190.22 \pm 22.34 c$	$897.64{\pm}4.40{\rm c}$	$494.82{\pm}1.90{\rm c}$	$502.71{\pm}1.26\mathrm{b}$			
	40	$1 \ 012.38 \pm 21.06 d$	$902.88{\pm}10.23{\rm c}$	474.32±2.51 d	$450.36{\pm}0.38\mathrm{d}$			
茎	0	$140.23 \pm 14.49 \mathrm{b}$	172.44±4.54a	103.95±2.30a	54.38±2.96a			
Stem	5	$130.65{\pm}2.21{\rm bc}$	168.75±1.20a	$91.98{\pm}5.29\mathrm{b}$	$44.77 \pm 1.65 \mathrm{b}$			
	20	$112.67 \pm 14.63 \mathrm{c}$	$118.11 \pm 2.00 \mathrm{b}$	82.34±2.71c	$41.30{\pm}3.58\mathrm{b}$			
	40	$122.25{\pm}12.50\mathrm{b}$	$103.14 \pm 3.14$ b	$87.89{\pm}2.32{\rm bc}$	$39.37 \pm 2.58 \mathrm{c}$			
叶	0	313.17±3.18a	$215.33 \pm 7.06e$	$202.03{\pm}17.08{\rm ab}$	284.61±2.47a			
Leaf	5	$271.93 \pm 2.74 b$	$293.04 \pm 3.46 \mathrm{b}$	$198.61{\pm}5.55\mathrm{b}$	$235.65{\pm}6.20\mathrm{b}$			
	20	$235.63{\pm}9.59{\rm c}$	$238.60{\pm}0.33\mathrm{d}$	218.53±3.75a	$215.62{\pm}9.30{\rm c}$			
	40	301.68±13.70a	382.81±14.23a	$198.33{\pm}1.01\mathrm{b}$	$224.47{\pm}2.18\mathrm{bc}$			

#### 表 4 不同浓度 Cr<sup>6+</sup>处理对薏苡根、茎、叶锰含量的影响(单位: mg・kg<sup>-1</sup>)

Table 4Effects of different concentrations of  $Cr^{6+}$  treatments on Mn contents in root,<br/>stem and leaf of *Coix lacryma-jobi* (Unit: mg · kg<sup>-1</sup>)

植株部位	格处理		处理时间 Trea	tment time (d)	
Plant part	$(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	10	30	60	100
根	0	432.59±11.34b	241.97±6.80a	147.42±7.88ab	154.26±3.47a
Root	5	450.92±12.84a	248.10±6.19a	156.02±5.15a	$131.30 \pm 4.92 \mathrm{b}$
	20	$148.46 \pm 1.78 c$	$141.91 \pm 4.51 \mathrm{b}$	$126.82{\pm}1.49{\rm c}$	$112.41 \pm 11.10 \mathrm{b}$
	40	$122.97 \pm 1.95 d$	$139.86{\pm}10.20{\rm b}$	$111.87 \pm 3.12b$	$64.25{\pm}6.02{\rm c}$
茎	0	$137.17{\pm}4.24\mathrm{b}$	$161.60{\pm}2.57\mathrm{b}$	$141.91{\pm}6.92\mathrm{b}$	$97.43 \pm 3.91 \mathrm{b}$
Stem	5	151.84±1.52a	175.36±0.64a	161.53±4.41a	121.04±4.43a
	20	$84.07{\pm}0.60{\rm c}$	$82.85 \pm 3.22c$	$90.81{\pm}4.24{\rm c}$	$107.80 {\pm} 10.43 {\rm b}$
	40	$86.65{\pm}1.85{\rm c}$	$51.19{\pm}1.54\mathrm{d}$	$41.71 \pm 2.76 d$	$39.47{\pm}0.82{\rm c}$
叶	0	$94.44 \pm 4.75 a$	$38.30 \pm 0.93$ c	82.44±3.50a	$39.56{\pm}1.79\mathrm{b}$
Leaf	5	$80.53{\pm}1.61{\rm b}$	$47.04{\pm}1.80\mathrm{b}$	$69.27{\pm}2.92\mathrm{b}$	47.86±2.20a
	20	$57.61 \pm 3.76$ d	$23.17{\pm}0.23\mathrm{d}$	$38.72 \pm 0.60c$	29.38±2.28c
	40	$41.07 \pm 0.79 e$	$24.01{\pm}1.95{\rm d}$	$13.83{\pm}1.44\mathrm{d}$	$18.65{\pm}0.51\mathrm{d}$

Fe、Mn 和 Zn 是植物正常生命活动所必需的微量 元素,在植物体内参与调控叶绿素合成,调节植物 体内 CO<sub>2</sub>的供应和基质中的 pH,从而影响到植物 的光合作用和氧化还原反应等重要生理过程(杜 新民和张永清,2008)。过量的 Cr<sup>6+</sup>导致 Fe、Mn 和 Zn 吸收量的下降,可能导致薏苡光合速率和抗氧 化系统对活性氧的调节能力下降,最终使得薏苡 的生长受到抑制。

在重金属胁迫下,植物细胞内氧化还原平衡 被破坏,从而导致植株中活性氧含量明显增加,影 响了整个活性氧清除系统对活性氧的清除能力, 导致整个生理生化过程紊乱,从而进一步加重氧

## 表 5 不同浓度 Cr<sup>6+</sup>处理对薏苡根、茎、叶锌含量的影响(单位: mg·kg<sup>-1</sup>)

Table 5 Effects of different concentrations of  $Cr^{6+}$  treatments on Zn contents in root,

stem and leaf of *Coix lacryma-jobi* (Unit:  $mg \cdot kg^{-1}$ )

植株部位	铬处理		处理时间 Trea	处理时间 Treatment time (d)		
Plant part	$(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	10	30	60	100	
根	0	34.20±4.70a	18.07±0.38b	11.09±0.86c	11.86±0.18a	
Root	5	$29.85{\pm}1.04{\rm b}$	25.33±3.46a	$12.55{\pm}0.18\mathrm{b}$	11.70±0.93a	
	20	$25.58{\pm}0.55{\rm c}$	$14.12 \pm 0.90 \mathrm{c}$	$12.00{\pm}0.72{\rm bc}$	$10.29{\pm}0.27{\rm b}$	
	40	$29.71{\pm}0.65\mathrm{b}$	$16.47{\pm}0.32{\rm bc}$	$11.26 \pm 0.33 c$	$9.71 \pm 2.56 b$	
茎	0	$13.65{\pm}0.46{\rm b}$	13.01±0.88a	11.24±0.88a	11.67±1.35a	
Stem	5	$12.59{\pm}0.86\mathrm{b}$	$11.82 \pm 0.48 \mathrm{b}$	$8.88{\pm}0.69{\rm b}$	$7.09{\pm}0.99{\rm b}$	
	20	9.16±0.60c	$8.10{\pm}0.08\rm{d}$	$6.78 \pm 1.01 \mathrm{c}$	$5.87{\pm}0.95{\rm b}$	
	40	$12.42{\pm}1.98\mathrm{b}$	$9.63 \pm 0.30c$	$6.12 \pm 0.34 \mathrm{c}$	$5.78 \pm 0.51 \mathrm{b}$	
叶	0	$13.59 \pm 0.47 \mathrm{c}$	$18.08{\pm}0.08{\rm c}$	$14.86{\pm}1.29{\rm b}$	13.06±0.02a	
Leaf	5	$13.52 \pm 0.13$ c	$19.24{\pm}1.20{\rm c}$	17.54±0.72a	$12.29{\pm}0.76\mathrm{b}$	
	20	$17.15{\pm}1.69{\rm b}$	$20.86{\pm}0.43{\rm b}$	$15.39{\pm}1.39{\rm b}$	$9.27 \pm 0.76 \mathrm{b}$	
	40	$16.67 \pm 0.33$ b	26.25±1.70a	17.08±1.31a	8.97±1.37c	

#### 表 6 不同浓度 Cr<sup>6+</sup>处理对薏苡根、茎、叶铜含量的影响(单位: mg・kg<sup>-1</sup>)

Table 6 Effects of different concentrations of  $Cr^{6+}$  treatments on Cu contents in root, stem and leaf of *Coix lacryma-jobi* (Unit: mg · kg<sup>-1</sup>)

植株部位	铬处理		处理时间 Treat	tment time (d)	
Plant part	$( \operatorname{mg} \cdot \operatorname{L}^{-1} )$	10	30	60	100
根	0	15.80±0.48a	$7.97 \pm 0.10 \mathrm{b}$	6.71±0.08a	6.16±0.09a
Root	5	15.83±0.30a	11.63±0.61a	$5.90 \pm 0.20c$	$5.69{\pm}0.29{\rm b}$
	20	$9.28{\pm}0.09{\rm d}$	$7.40 \pm 0.11 e$	$5.46{\pm}0.06{\rm d}$	$5.19{\pm}0.30{\rm b}$
	40	$8.92 \pm 0.30$ c	$7.62{\pm}0.14\mathrm{d}$	$5.44{\pm}0.18{\rm d}$	$4.69{\pm}0.07{\rm c}$
茎	0	$5.23 \pm 0.91 \mathrm{b}$	$5.01{\pm}0.13\mathrm{b}$	4.36±0.15a	4.02±0.20a
Stem	5	$4.53{\pm}0.07{\rm bc}$	$3.60{\pm}0.07{\rm c}$	$3.41 \pm 0.13 \mathrm{b}$	$3.24 \pm 0.05 \mathrm{b}$
	20	$3.58 \pm 0.77 \mathrm{c}$	$3.02 \pm 0.20$ cd	$2.40\pm0.24c$	$2.12\pm0.16c$
	40	$3.58 \pm 0.16c$	$2.86{\pm}0.06{\rm d}$	$2.70\pm0.03c$	$2.36 \pm 0.22 \mathrm{b}$
叶	0	$5.29 \pm 0.32 \mathrm{c}$	$5.01 \pm 0.09 a$	$4.59{\pm}0.04{\rm b}$	5.32±0.21a
Leaf	5	$5.13 \pm 0.19 c$	4.99±0.17a	4.80±0.02a	$4.94 \pm 0.09a$
	20	$5.04{\pm}0.44{\rm d}$	$4.94 \pm 0.34a$	$4.44 \pm 0.17 c$	$4.34\pm0.23\mathrm{b}$
	40	$5.01{\pm}0.13\mathrm{b}$	$4.25 \pm 0.09 \mathrm{b}$	$3.64 \pm 0.12 \mathrm{d}$	2.89±0.21c

化损伤,影响植物生长(周希琴和莫灿坤,2003)。 在本研究中的 Cr<sup>6+</sup>处理下,薏苡叶片 MDA 含量随 铬浓度的增大和时间的延长而呈现先升后降的趋 势,叶片 MDA 含量提高,说明 Cr<sup>6+</sup>胁迫下细胞膜 脂过氧化水平高,膜结构受损伤程度加深,植物的 抗逆性减弱(陈晶等,2017)。SOD 和 POD 是植物 体内重要的抗氧化酶,协助植物清除氧自由基,抵抗氧化胁迫(曾凡荣,2010)。本研究发现,在5mg·L<sup>-1</sup>Cr<sup>6+</sup>处理下,薏苡叶片 SOD 和 POD 活性显著增强,有利清除氧自由基,减少叶片中 MDA 的积累,从而提高薏苡抵抗铬胁迫能力;而 40 mg·L<sup>-1</sup>Cr<sup>6+</sup>高浓度铬胁迫对薏苡造成了严重的氧化胁

#### 表 7 不同浓度 Cr<sup>6+</sup>处理对薏苡根、茎、叶总铬含量的影响(单位: mg・kg<sup>-1</sup>)

Table 7 Effects of different concentrations of Cr<sup>6+</sup> treatments on Cr contents in root,

stem	and	leaf	of	Coix	lacryma-jobi	(Unit:	mg•	kg <sup>-1</sup>	)
------	-----	------	----	------	--------------	--------	-----	------------------	---

植株部位	铬处理		处理时间 Trea	处理时间 Treatment time (d)			
Plant part	$(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	10	30	60	100		
根	5	$577.77 \pm 90.32 \mathrm{b}$	660.80±39.37d	428.34±55.82c	649.52±42.45b		
Root	20	$637.92{\pm}109.96{\rm b}$	$1\ 105.87 \pm 4.03 c$	$884.95{\pm}87.51\mathrm{b}$	990.05±11.72a		
	40	$692.05 \pm 34.41 \mathrm{b}$	$1 839.52 \pm 101.21 \mathrm{b}$	1 399.37±66.59a	1 050.36±52.31a		
茎	5	$51.73 \pm 2.33c$	$74.75{\pm}4.25\mathrm{d}$	$86.08{\pm}5.80{\rm b}$	$148.07 \pm 13.07 c$		
Stem	20	$73.15 \pm 9.60c$	$91.07{\pm}3.46{\rm c}$	$98.28{\pm}8.58\mathrm{b}$	$163.63{\pm}8.68{\rm b}$		
	40	$139.54 \pm 4.35 \mathrm{b}$	$233.16{\pm}6.63{\rm b}$	204.88±14.13a	182.66±5.24a		
叶	5	$66.19 \pm 17.16c$	$101.21 \pm 17.25 c$	$93.42 \pm 9.25 \mathrm{b}$	$110.15 \pm 23.73 \mathrm{b}$		
Leaf	20	$115.49{\pm}28.44{\rm bc}$	$108.56 \pm 3.22 c$	$105.78 \pm 4.77 \mathrm{b}$	$164.27 \pm 16.49 \mathrm{b}$		
	40	$155.89 \pm 44.85 \mathrm{ab}$	$240.29 \pm 32.91 \mathrm{b}$	202.23±30.93a	176.40±13.13a		





迫,脂质过氧化程度增强,已超出了薏苡 SOD 和 POD 清除氧自由基抵抗氧化胁迫的能力,尽管此 时 SOD 仍具有较高活性,但可能由于活性氧生成 量过多,SOD 来不及清除,从而使 MDA 生成量提 高,因此 40 mg · L<sup>-1</sup> Cr<sup>6+</sup>胁迫下薏苡的抗逆性降 低,使其生长受到抑制。这一结果与汤茜等 (2018)和朱秀红等(2017)的研究结果一致。说 明 Cr<sup>6+</sup>胁迫影响了植株的抗氧化系统,并且植株对 外源抗氧化胁迫迅速做出了反应。

人工湿地对污水中 Cr( VI)的去除与基质的吸附、植物吸收和微生物的活动密切相关,而植物的活动直接影响到人工湿地氧化还原条件、有机质

分配和微生物活动,从而影响到人工湿地对 Cr (VI)去除,人工湿地植物的生长状况与其对重金 属的去除能力有密切的关系(Vymazal & Brezinova,2016)。本研究中,低浓度 Cr<sup>6+</sup>胁迫下, 人工湿地出水所含 Cr<sup>6+</sup>含量较低,对 Cr<sup>6+</sup>去除能力 较强,可能是低浓度 Cr<sup>6+</sup>胁迫下薏苡人工湿地能够 维持相对较好的长势,对 Cr<sup>6+</sup>去除率较高的重要 原因。

## 4 结论

综上所述,本研究发现高浓度 Cr<sup>6+</sup>铬胁迫下, 薏苡植株体内的 Fe、Mn、Zn 和 Cu 等与光合和抗氧 化等生理功能密切相关的微量元素吸收量大幅度 下降,导致薏苡光合速率下降,抗氧化系统受损, 从而使薏苡的生长受到抑制,最终导致人工湿地 处理含 Cr<sup>6+</sup>废水的能力下降。但是,低浓度 Cr<sup>6+</sup>胁 迫下的薏苡人工湿地能够维持相对较好的长势, 且人工湿地对 Cr<sup>6+</sup>去除效率较高。

### 参考文献:

- ALAHMAD W, VARANUSUPAKUL P, KANETA T, et al., 2019. Chromium speciation using paper-based analytical devices by direct determination and with electromembrane microextraction [J]. Anal Chim Acta, 1085: 98–106.
- ALI S, CAI SG, ZENG FR, et al., 2012. Effect of salinity and hexavalent chromium stresses on uptake and accumulation of

mineral elements in barley genotypes differing in salt tolerance [J]. J Plant Nutr Soil Sci, 35(6): 827-839.

- BONET A, POSCHENRIEDER C, BARCELO J, 1991. Chromium III-iron interaction in Fe-deficient and Fesufficient bean plants. I. Growth and nutrient content [J]. J Plant Nutr Soil Sci, 14(4): 403-414.
- CHEN J, MU Y, CHEN M, et al., 2017. Response of physiology and biochemistry of *Rhus chinensis* to heavy metal chromium stress [J]. Ecol Sci, 36(2): 26-31. [陈晶, 穆 燕,陈明,等, 2017. 盐肤木对重金属铬胁迫的生理生化 反应研究 [J]. 生态科学, 36(2): 26-31.]
- CHEN YL, 2016. Absorption kinetics and mechanism of Cr (Ⅵ) and Cr (Ⅲ) in maize seedlings and their responses to seedling growth and nutrient absorption [D]. Yangzhou: Yangzhou University. [陈永林, 2016. 玉米幼苗 Cr(Ⅵ)和 Cr(Ⅲ)的吸收动力学特征与机理及幼苗生长、养分吸收 的反应 [D]. 扬州:扬州大学.]
- CHOUDHURY S, PANDA SK, 2012. Toxic effects, oxidative stress and ultrastructural changes in moss *Taxithelium nepalense* (Schwaegr.) Broth. under chromium and lead phytotoxicity [J]. Water Air Soil Poll, 167: 73–90.
- DU XM, ZHANG YQ, 2008. Effects of zinc on photosynthesis and the activities of protective enzymes of Chinese cabbage in calcareous cinnamon soil [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 28(6): 1203-1207. [杜新民,张永清, 2008. 施锌对石灰 性褐土上小白菜光合作用及保护酶活性的影响 [J]. 西 北植物学报, 28(6): 1203-1207.]
- DONG Z, XIE FL, 1996. Studies on dynamics and models of N, P, K absorption in soybeans [J]. Acta Agron Sin, 22(1): 89-95. [董钻,谢甫练, 1996. 大豆氮憐钟吸收动态及模 式的研究 [J]. 作物学报, 22(1): 89-95.]
- FAN T, YE WL, CHEN HY, et al., 2013. Review on contamination and remediation technology of heavy metal in agricultural soil [J]. Ecol Environ Sci, 22(10): 1727-1736. [樊霆, 叶文玲, 陈海燕, 等, 2013. 农田土壤重金 属污染状况及修复技术研究 [J]. 生态环境学报, 22(10): 1727-1736.]
- GAO C, 2008. Uptake and removal of nitrogen and phosphorus from entrophic water by *Coix Lachrymajobi* L. and the influencing factors [D]. Nanjing: Zhejiang University. [高 冲, 2008. 薏苡对富营养化水体中氮磷的吸收去除效应及 其影响因子研究 [D]. 南京:浙江大学.]
- LI HS, 2000. Principles and techniques of plant physiological and biochemical experiments [M]. Beijing: Higher Education Press: 140-183. [李合生, 2000. 植物生理生化 实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社: 140-183.]
- LIU DL, YANG JQ, LIU ZM, et al., 2015. Effects of cadmium and lead stress on physiological characters of *Poa pratensis* seedings [J]. Pratac Sci, 32(2): 224-230. [刘大林, 杨俊 俏, 刘兆明, 等, 2015. 镉、铅胁迫对草地早熟禾幼苗生理 的影响 [J]. 草业科学, 32(2): 224-230.]

- LI ZG, HUANG HL, LI SL, et al., 2010. Effects of chromium on purification of domestic wastewater and its accumulation in constructed wetlands [J]. J Agro-Environ Sci, 29(7): 1362-1368. [李志刚,黄海连,李素丽,等, 2010. 铬对人 工湿地净化生活污水的影响及铬积累规律 [J]. 农业环 境科学学报, 29(7): 1362-1368.]
- LI ZG, YANG Y, AN RC, et al., 2018. Accumulation and distribution of chromium in *Coix lacryma-jobi* in constructed wetland treated with domestic sewage [J]. Guihaia, 38(6): 681-686. [李志刚,杨幽,安芮辰,等, 2018. 铬污染人工 湿地薏米对铬的积累和分布 [J]. 广西植物, 38(6): 681-686.]
- LÜ DM, ZHU GL, WANGY, et al., 2021. Growth, physiological, and heavy metal accumulation traits at seedling stage under heavy metal stress in castor (*Ricinus communis* L.) [J]. Acta Agron Sin, 47(4): 728-737. [吕 冬梅, 朱广龙, 王玥, 等, 2021. 苗期重金属胁迫下蓖麻 生长、生理和重金属积累效应 [J]. 作物学报, 47(4): 728-737.]
- LU WZ, CHEN LZ, WANG WQ, et al., 2013. Effects of sea level rise on mangrove *Avicennia* population growth, colonization and establishment: evidence from a field survey and greenhouse manipulation experiment [J]. Acta Oecol, 49: 83-91.
- OUYANG ZR, WEN XB, GENG YH, et al., 2010. The effects of light intensities, temperatures, pH and salinities on photosynthesis of *Chlorella* [J]. J Wuhan Bot Res, 28(1): 49-55. [欧阳峥嵘, 温小斌, 耿亚红, 等, 2010. 光照强度、温度、pH、盐度对小球藻(*Chlorella*)光合作用的影响[J]. 武汉植物学研究, 28(1): 49-55.]
- RAJKUMAR M, PRASAD MNV, FREITAS H, et al., 2009. Biotechnological applications of serpentine bacteria for phytoremediation of heavy metals [J]. Crit Rev Biotechnol, 29(2): 120-130.
- SHAO Y, LIU HJ, HU YJ, et al., 2012. Effects of soil textures on morphology and photosynthetic characteristics of flag leaves of wheat during filling stage in chromium polluted soils [J]. J Tritic Crops, 32(6): 1150-1155. [邵云, 刘会娟, 胡永娟,等, 2012. 土壤质地对铬胁迫下小麦灌浆期形态 与旗叶光合特性的影响 [J]. 麦类作物学报, 32(6): 1150-1155.]
- SRIVASTAVA D, TIWARI M, DUTTR P, et al., 2021. Chromium stress in plants: toxicity, tolerance and phytoremediation [J]. Sustianability, 13(9): 4629–4629.
- SU CQ, 2016. Microbial reduction of Cr (Ⅵ) in chromium pollution and soil and stability of Cr (Ⅲ) [D]. Changsha: Zhongnan University. [苏长青, 2016. 铬污染及土壤中 Cr (Ⅵ)的微生物还原及 Cr(Ⅲ)的稳定性研究 [D]. 长沙: 中南大学.]
- TANG Q, ZHU SX, ZHAO B, et al., 2018. Physiological and biochemical responses of *Thalia dealbata* of wetland plants to Cr stress [J]. Sci Technol Eng, 18(35): 108-115. [汤茜,

朱四喜,赵斌,等,2018. 湿地植物再力花对铬胁迫的生 理生化响应 [J]. 科学技术与工程,18(35):108-115.]

- TIAN XL, LI Q, et al., 2017. Remediation methods of soil contaminated by chromium [J]. Guangdong Chem Ind, 44 (10): 149-150. [田小利, 李倩, 2017. 铬污染土壤的修 复途径 [J]. 广东化工, 44(10): 149-150.]
- VYMAZAL J, BREZINOVA T, 2016. Accumulation of heavy metals in aboveground biomass of *Phragmites australis* in horizontal flow constructed wetlands for wastewater treatment: A review [J]. Chem Eng J, 290: 232–242.
- WANG AY, HUANG SS, ZHONG GF, et al., 2012. Effect of Cr (VI) stress on growth of three herbaceous plants and their Cr uptake [J]. Environ Sci, 33(6): 2028-2037. [王爱云, 黄姗姗, 钟国锋, 等, 2012. 铬胁迫对 3 种草本植物生长 及铬积累的影响 [J]. 环境科学, 33(6): 2028-2037.]
- WANG BX, XIAO J, FENG X, et al., 2016. Effects of chromium stress on physiological and ecophysiological characteristics of male and female plants of *Humulus scandens* [J]. Acta Pratac Sin, 25(7): 131–139. [王碧霞,肖娟, 冯旭,等, 2016. 铬胁迫对葎草雌雄植株光合生理特性的 不同影响 [J]. 草业学报, 25(7): 131–139.]
- WENZEL WW, UNTERBRUNNER R, SOEEER P, et al., 2003. Chelate-assisted phytoextraction using canola (*Brassica napus* L.) in outdoors pot and lysismeter experiments [J]. Plant Soil, 249(1): 83–96.
- WU QX, LIU J, YOU SH, et al., 2014. Decontamination mechanism of Cr (VI) polluted water in constructed wetland planted with *Leersia hexandra* Swartz [J]. Acta Sci Circumst, 34(9): 2306-2312. [伍清新, 刘杰, 游少鸿, 等, 2014. 李氏禾湿地系统净化 Cr (VI) 污染水体的机理 研究 [J]. 环境科学学报, 34(9): 2306-2312.]
- XIAO JC, ZHENG KM, MA JY, et al., 2021. Effects of exogenous NO on growth and physiological characteristics of watermelon seedlings under aluminum stress [J]. J Agro-Environ Sci, 40(5): 1-12. [肖家昶,郑开敏,马俊英, 等, 2021. 外源 NO 对铝胁迫下西瓜幼苗生长及生理特性 的影响 [J]. 农业环境科学学报, 40(5): 1-12.]
- XU FF, 2014. Effect of Si on the growth and physiological characters of *Broccoli* seedlings under the chromium stress [J]. J Jilin Agric Sci, 39(6): 55-57. [徐芬芬, 2014. 铬 胁迫下施硅对西兰花生长和生理特性的影响 [J]. 吉林 农业科学, 39(6): 55-57.]
- XU GD, GE SF, ZHANG Y, et al., 2015. Effcet of salicylic acid on growth and nutrient uptake in hydroponic tobacco under Cu stress [J]. Acta Agron Sin, 41(6): 956-962. [徐 根娣, 葛淑芳, 章艺, 等, 2015. 外源水杨酸对 Cu 胁迫下 水培烟草生长及营养元素吸收利用的影响 [J]. 作物学 报, 41(6): 956-962.]
- XU J, LIU XW, HUANG JL, et al., 2020. The contributions

and mechanisms of iron-microbes-biochar in constructed wetlands for nitrate removal from low carbon/nitrogen ratio wastewater [J]. RSC Advances, 10: 23212–23220.

- YANG GY, WANG LL, LEI XQ, et al., 2014. Effects of lead and chromium on the growth, photosynthetic performance, and antioxidant activity of *Scenedesmus obliquus* [J]. Acta Sci Circumst, 34(6): 1606–1614. [杨国远,万凌琳, 雷学 青,等, 2014. 重金属铅、铬胁迫对斜生栅藻的生长、光合 性能及抗氧化系统的影响 [J]. 环境科学学报, 34(6): 1606–1614.]
- YANG WY, 2021. A review of the effects of different stresses on antioxidant enzyme systems in various plants [J]. Chem Enterpr Manag, (1): 92–93. [杨雯一, 2021. 不同胁迫对 各种植物体内抗氧化酶系统的影响综述 [J]. 化工管理, (1): 92–93.]
- YAO J, LIU XB, CUI X, et al., 2015. Effects of NaCl stress on substances linked to osmotic adjustment and on photosynthetic physiology of *Melilotoides ruthenicain* the seedling stage [J]. Acta Pratac Sin, 24(5): 91–99. [姚佳, 刘信宝, 崔鑫, 等, 2015. 不同 NaCl 胁迫对苗期扁蓿豆渗 透调节物质及光合生理的影响 [J]. 草业学报, 24(5): 91–99. ]
- ZENG FR, 2010. Physiological and molecular mechanisms of chromium stress and tolerance in rice [D]. Hangzhou: Zhejiang University. [曾凡荣, 2010. 水稻铬毒害和耐性的 生理与分子机理研究 [D]. 杭州:浙江大学.]
- ZHONG MY, ZHANG XQ, YANG XY, et al., 2019. Recent advances in plant response to chromium stress [J]. Pratac Sci, 36(8): 1962–1975. [钟旻依, 张新全, 杨昕颖, 等, 2019. 植物对重金属铬胁迫响应机制的研究进展 [J]. 草 业科学, 36(8): 1962–1975.]
- ZHOU XQ, MO CK, 2003. The plant heavy metal coercion and its antioxidation system [J]. J Xinjiang Edu Inst, 19(2): 103-108. [周希琴, 莫灿坤, 2003. 植物重金属胁迫及其 抗氧化系统 [J]. 新疆教育学院学报, 19(2): 103-108.]
- ZHUANG LL, YANG T, ZHANG J, et al., 2019. The configuration, purification effect and mechanism of intensified constructed wetland for wastewater treatment from the aspect of nitrogen removal: a review [J]. Bioresour Technol, 293: 122086.
- ZHU XH, HOU GD, RU GX, et al., 2017. Accumulation and antioxidant properties of chromium stress in *Pennisetum alopecuroides* [J]. J Henan Agric Univ, 51(3): 330 – 334. [朱秀红, 侯国栋, 茹广欣, 等, 2017. 狼尾草对铬的 积累及其抗氧化特性研究 [J]. 河南农业大学学报, 51(3): 330-334.]

(责任编辑 李 莉)

#### DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202103068

汪雪影, 胡永红, 张宪权, 等. 氮、磷、钾肥对绣球'花手鞠'容器苗生长及养分状况的影响 [J]. 广西植物, 2022, 42(11): 1971-1979.

WANG XY, HU YH, ZHANG XQ, et al. Effects of nitrogen, phosphorus and potassium on growth and nutrient status of potted Hydrangea macrophylla 'Hanatemari' [J]. Guihaia, 2022, 42(11): 1971–1979.

# 氦、磷、钾肥对绣球'花手鞠'容器苗 生长及养分状况的影响

汪雪影1, 胡永红2,3, 张宪权2,3, 秦 俊2,3\*, 刘群录1\*

(1. 上海交通大学 设计学院,上海 200240; 2. 上海辰山植物园,上海 201602;3. 上海城市树木生态应用工程技术研究中心,上海 200020)

**摘 要:**为指导绣球容器苗的合理施肥,该研究以两年生盆栽绣球'花手鞠'(*Hydrangea macrophylla* 'Hanatemari')为材料,利用"3414"平衡施肥设计,研究了氮(N)、磷(P)、钾(K)三种肥料的4个水平(N、K<sub>2</sub>O:0、4、8、12g·plant<sup>-1</sup>;P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:0、1.5、3.0、4.5g·plant<sup>-1</sup>)对'花手鞠'生长及植物养分状况的影响,并利用临界浓度法确定适宜的施肥量,为绣球容器苗的科学施肥提供依据。结果表明:(1)在氮(N)肥处理中,'花手鞠'苗高、蓬径、植物生长指数(PGI)、地上部分及全株生物量均随施肥量升高呈上升趋势,当施肥量超过"2"水平时,这些指标升高不再显著,或略有下降。(2)低水平磷(P)肥(P1)和低水平钾(K)肥(K1)有利于绣球'花手鞠'生物量的积累。(3)绣球'花手鞠'叶片和茎中的养分含量均随 N、P、K 施肥量的增加而升高,而根系中 K 含量随 K 肥水平的升高变化不显著,与对照无显著差异。(4)根据临界浓度法确定绣球'花手鞠'叶片中 N 和 P 的适宜范围分别为 35.31~46.64 g·kg<sup>-1</sup>和 1.88~2.28 g·kg<sup>-1</sup>。综合考虑养分含量、植物生长指标及生产成本,盆栽绣球 N、P、K 肥适宜的用量为 N2(8 g N·plant<sup>-1</sup>)、P1(1.5 g P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>·plant<sup>-1</sup>)和 K1(4 g K<sub>2</sub>O·plant<sup>-1</sup>)。

关键词:绣球'花手鞠', 氮磷钾, "3414"平衡施肥, 生长, 养分含量 中图分类号: Q945.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2022)11-1971-09

# Effects of nitrogen, phosphorus and potassium on growth and nutrient status of potted *Hydrangea macrophylla* 'Hanatemari'

WANG Xueying<sup>1</sup>, HU Yonghong<sup>2,3</sup>, ZHANG Xianquan<sup>2,3</sup>, QIN Jun<sup>2,3\*</sup>, LIU Qunlu<sup>1\*</sup>

 ( 1. School of Design, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China; 2. Shanghai Chenshan Botanical Garden, Shanghai 201602, China; 3. Shanghai Engineering Research Center of Urban Tree Ecology and Applications, Shanghai 200020, China )

收稿日期: 2021-10-20

基金项目:上海市绿化和市容管理局 2019 年科学技术攻关项目(G192402) [Supported by Science and Technology Research Project of Shanghai Greening and City Appearance Administration in 2019 (G192402)]。

第一作者: 汪雪影(1997-),硕士研究生,主要从事风景园林植物研究,(E-mail)xueying\_wangwsn97@ alumni.sjtu.edu.cn。

<sup>\*</sup> 通信作者:刘群录,博士,副教授,主要从事风景园林植物研究,(E-mail)liuql@sjtu.edu.cn;秦俊,博士,教授级高级工程师,主要从 事园林植物应用研究,(E-mail)qinjun03@126.com。

Abstract: In order to guide the rational fertilization of potted Hydrangea macrophylla, the effects of nitrogen (N), phosphorus (P) and potassium (K) at four levels (N, K, O: 0, 4, 8, 12 g  $\cdot$  plant<sup>-1</sup>; P, O<sub>5</sub>: 0, 1.5, 3.0, 4.5 g  $\cdot$ plan<sup>-1</sup>) on growth and nutrient status of two-vear-old potted *H. macrophylla* 'Hanatemari' were investigated by the balanced fertilization design of "3414" method. The optimal fertilization dosage was determined by critical concentration method to provide evidence for rational fertilization of potted 'Hanatemari'. The results were as follows: (1) N fertilization treatments, all of the seedling height, canopy diameter, plant growth index (PGI), aboveground and whole plant biomasses of 'Hanatemari' increased with the increasing of N fertilization dosage, while these parameters did not change significantly or slightly decreased as the N fertilization dosage exceeded Level 2. (2) Low-level fertilization treatments of P (P1) and K (K1) were beneficial to the biomass accumulation of 'Hanatemari'. (3) The nutrient contents in leaves and stems of H. macrophylla 'Hanatemari' increased with the increasing of N, P and K fertilization dosages. However, the contents of K in roots did not change significantly with the increasing of K fertilization levels, and there were no significant differences from the control. (4) According to the critical concentration method, the suitable contents of N in H. macrophylla 'Hanatemari' leaves ranged from 35.31 to 46.64 g · kg<sup>-1</sup>, and P ranged from 1.88 to 2.28 g · kg<sup>-1</sup>. Considering nutrient content, PGI and production cost, the optimal fertilization dosages of N, P and K for *H. macrophylla* 'Hanatemari' are N2 (8 g N  $\cdot$  plant<sup>-1</sup>), P1 (1.5 g P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>  $\cdot$  plant<sup>-1</sup>) and K1 (4 g K<sub>2</sub>O  $\cdot$  plant<sup>-1</sup>), respectively.

Key words: *Hydrangea macrophylla* 'Hanatemari', nitrogen, phosphorous and potassium, "3414" balanced fertilization, growth, nutrient content

绣球(Hydrangea macrophylla)为绣球花科 (Hydrangeaceae)绣球属(Hydrangea)落叶灌木,其 花色丰富、花序硕大,是大众所喜爱的一种观赏植 物(赵冰,2016;陈有民,2017;Alexander,2017)。 为满足市场对盆栽绣球苗的需求,加速优质种苗 的生产,合理施肥是一项重要的生产措施。

施肥是改变植物体内养分含量和生长发育的 有效措施(张文君,2012)。其中,氮(nitrogen,N)、 磷(phosphorus, P)、钾(potassium, K)是园林植物生 长发育中的三大必需营养元素 (Katsuya et al., 2017)。三种肥料的合理配施可以促进植物生长发 育及植株抗病能力,进而提高园林植物的观赏和经 济价值(王华荣和马文婷,2012)。朱报著等(2020) 对杜鹃红山茶(Camellia azalea)苗期元素进行了诊 断,发现杜鹃红山茶对 N 肥和 K 肥的反应比对 P 肥 更为敏感。刘晨等(2019)对微型月季(Rosa chinensis minima)的研究结果表明,在不同肥料模式 处理下其营养元素含量、生长指标等显著提高,观 赏品质也有所提升。在切花菊'秦怀玉莲' (Chrysanthemum morifolium 'Qinhuaiyulian')研究 中,不同水平的 N、P、K 处理中 N2P1K2 和 N3P2K1 是适宜的处理,切花菊的生长品质和养分有效利用 率都较好(方馨妍等,2020)。因此,肥料的合理用 量与配施可直接影响植物生长和养分含量等指标,

提高园林植物观赏和经济价值,有利于园林植物的 栽培养护,而不合理的肥料用量会抑制生长。

近年来,与绣球相关的研究多集中在花色相 关基因的表达分析(陈旦旦等,2020;薛超,2020)、 新品种快速繁殖(郭超,2015)、铝胁迫(李叶华等, 2020)、切花保鲜(杨景雅等,2018)等方面。施肥 的相关研究主要集中在商品肥料对切花品质的影 响(王培等,2019);N肥对绣球生长和养分吸收的 影响(Bi et al., 2008; Li et al., 2019);缓释 P 肥 对绣球生长的影响(Shreckhise et al., 2019);%和 K水平及交互作用对切花绣球生长和开花影响的 田间实验(Thaneshwari & Gupta, 2017)。而定量 研究 N、P、K 三种肥料的施肥效应,特别是盆栽绣 球的养分研究还相对欠缺,这一定程度上制约了 绣球规模化生产和应用。

"3414"施肥试验设计已经广泛应用于农作物的施肥研究中,在园林植物中也开始有所应用(张 文君等,2009;金冬雪等,2021)。此试验设计可进 行单因素和多因素肥料效应分析,确定植物 N、P、 K 肥的适宜用量。本研究的材料为'花手鞠' (*Hydrangea macrophylla* 'Hanatemari'),是引自日 本的优良品种,在实践中有较多应用。该品种具 有重瓣、花序直立、不易倒伏的优良性状(陆文佳, 2018),还具有较强的抗性(潘月等,2021;凌瑞等,
11 期

**表 1** Table 1

2021)。本研究采用"3414"试验设计,研究 N、P、 K 肥对盆栽绣球生长和养分浓度的影响,探究施 肥与植株生长和各器官养分浓度的关系,确定绣 球代表品种'花手鞠'最适的 N、P、K 肥施用水平, 旨在为盆栽条件下绣球养分管理及 N、P、K 精准 配方施肥提供科学依据。

1 材料与方法

#### 1.1 材料

本次施肥试验于 2020 年 3 月至 8 月在上海辰 山植物园隔离苗圃内(121°48′E,31°22′N)展开, 场地位于上海市西南部的松江区,属于亚热带季 风气候,年均气温 18.5 ℃,试验期间苗圃的温度范 围为 8~36 ℃。

供试材料为'花手鞠'(Hydrangea macrophylla 'Hanatemari')两年生苗,购于杭州画境种业公司。 栽植容器的上口直径 26 cm,下口直径 20 cm,高度 26 cm, 基质填充深度 20 cm。盆栽基质为田园 土:草炭:珍珠岩 = 3:6:1(体积比)(李向林) 等,2004)。基质的基本理化性质为 pH 6.68,全 N 30.03 mg · kg<sup>-1</sup>、全 P 8.31 mg · kg<sup>-1</sup>、全 K 654.07 mg · kg<sup>-1</sup>、碱解 N 13.93 mg · kg<sup>-1</sup>、速效 P 1.36 mg·kg<sup>-1</sup>、速效 K 14.99 mg·kg<sup>-1</sup>。试验所用 N 肥 为尿素(含 N 46.6%), P 肥为过磷酸钙(含 P,O, 14.5%), K肥为硫酸钾(含K, 054.1%), 购于国药 集团,均为化学分析纯。根据植物的生长节律和 肥料的物理性质,N肥和K肥分7次,溶于水后施 入,施肥间隔约为15 d。P 肥分3次,固体施入,其 中第一次作为基肥施入总 P 肥量的 50%,后两次 分别在初花期和盛花期,各施入25%。为了防止 雨水等其他环境因素造成的肥料流失等问题,盆 栽苗底部配有托盘,全部置于四周通风的透明塑 料棚下,覆以50%遮荫率的遮荫网。

#### 1.2 试验方法

1.2.1 试验设计 采用"3414"肥料试验设计,N、 P、K 3 个因素,每个因素有"0、1、2、3"4 个水平,共 计 14 个处理(表 1)。其中,"2"水平是试验预设 的最佳施肥量,"1"水平为"2"水平的一半,"3"水 平为"2"水平的 1.5 倍(王圣瑞等,2002)。采用随 机区组设计,每个处理设置 3 个重复,每个重复 10 株苗,共计 420 株。具体每个施肥处理的试验设 计和肥料用量见表 1。

and fertilization dosages									
编号 Code	处理 Treatment_	肥料水平 Fertilization level			施肥量 Fertilizing amount (g・plant <sup>-1</sup> )				
		Ν	$P_2O_5$	K <sub>2</sub> 0	Ν	$P_2O_5$	K <sub>2</sub> 0		
T1	N0P0K0	0	0	0	0	0	0		
T2	N0P2K2	0	2	2	0	3	8		
Т3	N1P2K2	1	2	2	4	3	8		
T4	N2P0K2	2	0	2	8	0	8		
Т5	N2P1K2	2	1	2	8	1.5	8		
T6	N2P2K2	2	2	2	8	3	8		
T7	N2P3K2	2	3	2	8	4.5	8		
T8	N2P2K0	2	2	0	8	3	0		
Т9	N2P2K1	2	2	1	8	3	4		
T10	N2P2K3	2	2	3	8	3	12		
T11	N3P2K2	3	2	2	12	3	8		
T12	N1P1K2	1	1	2	4	1.5	8		
T13	N1P2K1	1	2	1	4	3	4		
T14	N2P1K1	2	1	1	8	1.5	4		

"3414"施肥试验设计与肥料用量

"3414" fertilizing experimental design

1.2.2 生长指标的测定及计算 苗木的高和蓬径 于最后一次施肥半个月(8月4日)后进行测定。 测定蓬径时选择两个垂直方向,其中一个为最宽 的方向,求其平均值。

每个处理取生长良好的植株6株,共取样84 株,进行叶、茎、根生物量的测定。

地上部分生物量=叶生物量+茎生物量;

植物生长指数(plant growth index, PGI)=(株高+蓬径1+蓬径2)/3;

根冠比=地下部分生物量/地上部分生物量。 1.2.3 养分含量测量 将烘干后的根、茎、叶干样 分别研磨,过 100 目筛,称取 0.2 g。浓硫酸消解, 用凯式定氮仪测定植物样品中的 N 含量(Kjeltec 8100,FOSS 公司,丹麦)。用浓硝酸消解过滤后, 采用原子吸收光谱仪(PE 公司,美国)对植物叶、 茎、根中的全 P、全 K 进行测定。

#### 1.3 数据分析

采用 Excel 2019 对原始数据进行初步整理;运用 SPSS 25.0 进行单因素方差分析(ANOVA),并进行 Duncan 多重比较及 Person 相关性分析。采用 Origin Pro 8.5 绘图。

根据植株生物量和叶片 N、P、K 含量拟合一元

二次方程,并进行显著性检验。计算 95% 最大植 株生物量对应的各器官养分含量,应用临界浓度 法确定'花手鞠'推荐施肥量范围(李毓琦等, 2021)。

2 结果与分析

#### 2.1 施肥对'花手鞠'苗木生长的影响

由表2可知,N肥处理的株高随施肥量增加呈 递增趋势,均显著高于对照处理(P<0.05),并在 N3 水平取得最大值,但与 N1 和 N2 处理差异不显 著(P>0.05)。随着施肥量的增加,蓬径和 PGI 呈 先升高后降低的趋势。除 N0 处理外,其他 N 肥处 理均能显著提高植株蓬径和 PGI(P<0.05),并在 N2水平达到最大值,分别比对照高 87.04% 和 86.03%。N肥的施用显著提高了'花手鞠'地上部 分和整株生物量(P<0.05),且均在N3处理取得 最大值,"2""3"水平间差异不显著(P>0.05)。随 着 N 肥用量的增加,根冠比呈递减趋势,除 N0 处 理根冠比显著高于对照外(P<0.05),其他处理根 冠比均显著低于对照处理(P<0.05),说明施用 N 肥使养分更多地向地上部分分配,从而增加地上 部分生物量,但在一定 N 肥用量的范围内(NO~ N2),根系生物量并未显著增加(P>0.05),从而导 致根冠比下降。

随着 P 肥用量的增加,植株苗高、PGI、地上部 分生物量及植株生物量均呈先上升后下降的趋势,且均在 P1 水平取得最大值,较对照分别高 117.65%、102.86%、218.26%和 143.60%。与对照 相比,P 肥处理的根冠比显著降低(P<0.05);而在 各含 P 处理间无显著差异(P>0.05)。说明 P 肥 用量不是影响'花手鞠'养分分配的关键因素。

不同 K 肥用量对株高、蓬径、PGI、根冠比均无显著影响(P>0.05)。说明在试验条件下, K 肥用量不是影响'花手鞠'生长的一个重要因素。

#### 2.2 施肥对'花手鞠'叶、茎、根养分含量的影响

2.2.1 施肥对'花手鞠'叶片养分含量的影响 由 图 1 可知,随着 N、P、K 肥用量的增加,'花手鞠' 叶中相应的养分含量随之增加,均在"3"水平取得 最大值。与"0"水平相比,N3 处理的叶片 N 含量 提高了 361.51%,P3 处理的 P 含量提高了 123.47%,K3 处理的 K 含量提高了 258.19%。方 差分析结果表明,除"0"水平外,其他水平施肥处 理的叶片养分含量均显著高于对照(P<0.05)。叶 片 P 和 K 含量在"2"和"3"水平时差异不显著(P> 0.05),而叶片 N 含量在各水平间均有显著差异。 2.2.2 施肥对'花手鞠'茎养分含量的影响 '花手 鞠'茎中营养元素含量如图 2 所示。随着肥料用 量的增加,茎中相应元素的含量呈递增趋势。茎 中 N、P 含量在"2""3"水平间差异不显著(P> 0.05)。茎中 N、P、K 含量的最大值分别为 27.33、 3.77、22.62 g·kg<sup>-1</sup>,与对照相比分别提高了 468.08%、315.2%和 104.40%。

2.2.3 施肥对'花手翰'根养分含量的影响 由图 3 可知,根中N含量在NO处理与对照处理间无显著 差异(P>0.05),其他N肥处理则显著高于对照 (P<0.05),N2 与N3处理间无显著差异(P> 0.05)。根中P含量随P肥用量增加呈上升趋势, 在P2处理达到最高值,P2和P3处理间无显著差 异(P>0.05),但均显著高于对照(P<0.05)。K0~ K3处理的根K含量均低于对照,K肥的用量变化 对根系K含量无显著影响(P>0.05)。

#### 2.3'花手鞠'适宜施肥量的确定

利用'花手鞠'叶片中 N、P、K 含量与生物量 及 PGI 绘制散点图,并拟合养分指标与生物量和 PGI的一元二次方程(图4)。由图4和表3可知, 方程和显著性检验结果综合判断,六个方程中叶 片 N 含量与植株生物量及 PGI、P 含量与植株生物 量的模型拟合成功,适合作为确定适宜施肥量范 围的依据。以这两条养分含量与生物量抛物线上 最大生物量的95%对应的叶片养分含量作为最适 含量范围和临界值,得出'花手鞠'苗木叶片 N、P 含量的临界值分别为 35.31、1.88 g·kg<sup>-1</sup>, N 和 P 的最适含量范围分别为 35.31~46.64 g·kg<sup>-1</sup>和 1.88~2.28 g·kg<sup>-1</sup>。根据叶片 N、P 含量推断绣球 '花手鞠'的最适施 N 量范围为 N2~N3(8~12g N·plant<sup>-1</sup>)、适宜 P 肥用量为 P1(1.5 g P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>・ plant<sup>-1</sup>)。K肥相关方程拟合的曲线关系均不显著 (P>0.05),故无法确定 K 肥的用量范围,本试验 中设计的 K 肥用量均未达到抑制生长植株生长的 程度。

## 3 讨论

N 是叶绿素和核酸等的植物体内重要物质的 组成成分,对植物的生长发育具有重要作用。绣球 11 期

## 表 2 不同水平氮、磷、钾施肥处理间绣球'花手鞠'生长比较

Table 2 Comparisons of different growth performances of Hydrangea macrophylla

'Hanatemari' under different fertilization levels of N, P and K

		-14-67	植物生长指数 <sup>一</sup> PGI	生			
处理 Treatment	苗局 Seedling height (cm)	逢佺 Canopy diameter (cm)		地上部分 Above ground	地下部分 Under ground	总计 Total	根冠比 Root/Shoot
T1(CK)	22.67±2.19c	41.17±0.33c	35.00±0.51c	35.59±2.33c	15.12±1.09a	$50.72 \pm 3.21 \mathrm{b}$	$0.43 \pm 0.02 \mathrm{b}$
T2(N0)	$32.00{\pm}1.53\mathrm{b}$	$43.83 \pm 1.86c$	$39.89 \pm 1.25 \mathrm{c}$	$25.4 \pm 1.65 \mathrm{c}$	14.83±1.96a	$40.23{\pm}3.59{\rm b}$	$0.58 \pm 0.04 a$
T3(N1)	41.33±0.88a	$66.17{\pm}1.09\mathrm{b}$	$57.89{\pm}0.87\mathrm{b}$	$86.44{\pm}4.69{\rm b}$	18.73±1.62a	105.17±6.29a	$0.22 \pm 0.01 \mathrm{c}$
T6(N2)	41.33±1.20a	77.00±4.31a	65.11±3.07a	$99.71{\pm}5.53{\rm ab}$	$13.08 \pm 3.06 \mathrm{ab}$	112.79±7.62a	$0.13{\pm}0.03{\rm cd}$
T11(N3)	42.67±0.33a	75.00±3.62a	64.22±2.31a	$105.47 \pm 5.94a$	$8.09{\pm}1.94{\rm b}$	113.55±5.94a	$0.08{\pm}0.02{\rm d}$
T1(CK)	$22.67{\pm}2.19{\rm c}$	$41.17{\pm}0.33\mathrm{b}$	$35.00{\pm}0.51{\rm b}$	$35.59 \pm 2.33$ c	15.12±1.09a	$50.72 \pm 3.21 \mathrm{c}$	$0.43 \pm 0.02a$
T4(P0)	$39.00{\pm}2.08{\rm b}$	78.83±2.03a	65.56±2.02a	$92.77{\pm}1.31\mathrm{b}$	$8.60{\pm}1.89{\rm b}$	$101.37{\pm}2.26\mathrm{b}$	$0.09{\pm}0.02{\rm b}$
T5(P1)	49.33±1.45a	81.83±2.19a	71.00±2.22a	113.26±3.35a	$10.29 \pm 0.68 \mathrm{ab}$	123.55±3.76a	$0.09{\pm}0.01{\rm b}$
T6(P2)	$41.33{\pm}1.20\mathrm{b}$	77.00±4.31a	65.11±3.07a	$99.71{\pm}5.53\mathrm{b}$	$13.08 \pm 3.06 \mathrm{ab}$	$112.79 \pm 7.62 ab$	$0.13{\pm}0.03{\rm b}$
T7(P3)	$41.33{\pm}2.40\mathrm{b}$	77.33±5.95a	65.33±4.70a	$89.69 \pm 4.12 \mathrm{b}$	$11.78 \pm 1.48 \mathrm{ab}$	$101.47 \pm 2.65 \mathrm{b}$	$0.13{\pm}0.02{\rm b}$
T1(CK)	$22.67{\pm}2.19\mathrm{b}$	$41.17{\pm}0.33\mathrm{b}$	$35.00{\pm}0.51{\rm b}$	$35.60{\pm}2.33\mathrm{d}$	15.12±1.09a	$50.72{\pm}3.21\mathrm{d}$	$0.43 \pm 0.02a$
T8(K0)	41.33±1.86a	$75.00 \pm 2.02a$	$63.78 \pm 1.74a$	$90.30 \pm 2.36$ c	12.93±1.30a	$103.23 {\pm} 1.08 {\rm c}$	$0.14{\pm}0.02{\rm b}$
T9(K1)	38.67±2.03a	$76.50 \pm 2.75 a$	63.89±2.50a	124.53±3.14a	12.29±0.62a	136.82±2.57a	$0.10{\pm}0.01{\rm b}$
T6(K2)	41.33±1.20a	77.00±4.31a	65.11±3.07a	$99.71{\pm}5.53{\rm bc}$	13.08±3.06a	$112.79{\pm}7.62{\rm bc}$	$0.13{\pm}0.03{\rm b}$
T10(K3)	45.67±3.48a	84.17±3.67a	71.33±3.53a	112.46±9.05ab	13.09±0.80a	125.55±9.85ab	$0.12 \pm 0.01 \mathrm{b}$

注:同列不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。

Note: Different lowercase letters within the same column indicate significant differences (P < 0.05).



处理间不同小写字母表示差异显著(P<0.05);误差线根据标准误绘制。下同。 Different lowercase letters indicate significant differences between different treatments(P<0.05); Error bars represent standard errors. The same below.

图 1 施肥处理下绣球'花手鞠'叶片养分含量 Fig. 1 Nutrient contents of *Hydrangea macrophylla* 'Hanatemari' leaves under different fertilization treatments

分枝数量多、生长旺盛,决定了其对 N 的需求量大 (Thaneshwari & Gupta, 2017)。在本研究中, N 肥 显著促进了'花手鞠'的生长。在一定 N 肥用量范 围内,株高和 PGI 等生长指标随 N 肥用量的增加呈 递增趋势。N2 和 N3 处理生长指标间差异不显著, 即当N肥用量从每株8g增加至每株12g时,对 '花手鞠'的促生长作用不再显著。绣球'梅里特至 尊'的施肥试验中也有相似的结果,各生长指标值 在高N肥处理中显著优于低N肥处理,但15、20 mmol·L<sup>-1</sup>用量下 PGI和干重等差异不显著(Li et



图 2 施肥处理下绣球'花手鞠'茎养分含量

Fig. 2 Nutrient contents of Hydrangea macrophylla 'Hanatemari' stems under different fertilization treatments



图 3 施肥处理下绣球'花手鞠'根养分含量

Fig. 3 Nutrient contents of Hydrangea macrophylla 'Hanatemari' roots under different fertilization treatments

al., 2019)。此类结果在杜鹃花(*Rhododendron* 'Cannon's Double')中也有报道(Bi et al., 2007)。

P是核酸、能量物质、辅酶等的重要组成成分, 可以促进蛋白质和纤维素等的合成,是促进植物 生长发育的"品质元素"。在本研究中,P肥对绣 球'花手鞠'的株高和全株生物量有显著促进作 用,均在 P1 处理达到最大值;而 P 肥仅对灯盏花 株高有显著影响,对植株鲜重影响不显著(赵峥 等,2005);对空气凤梨 P 肥仅增加了叶面积(王姗 等,2014),说明不同植物对 P 肥有不同的响应。

K参与蛋白质的合成、蛋白质和碳水化合物的 代谢,也参与快速细胞分裂和分化。K肥施用对 绣球生长具有显著促进作用,全株生物量在低水 平 K 处理(K1)中取得最大值。Thaneshwari和 Gupta(2017)也发现适量的 K 肥可促进绣球的生 长。陈洪国(2009)在桂花的施肥研究中发现,K 肥的过量使用会影响其他养分吸收,进而使得养 分平衡失调,影响开花品质。因此,在施用足量 N 肥的同时,要适量配施 K 肥和 P 肥。

养分含量是评价植物生长的重要指标

(Graciano et al., 2006;Oliet et al., 2009)。叶片能 明显反映养分供应情况,在营养诊断中叶片的营 养状况是最重要的量化指标(唐菁等,2005)。'花 手鞠'叶片 N 含量随施肥水平升高而显著增加。 P、K 处理叶片中的相应元素含量在"2""3"水平 间差异不显著,说明"2"水平的 P、K 施肥量可满 足'花手鞠'对 P、K 的需求。

本研究中,当 N 肥用量超过"2"水平后,再增加 N 肥用量,养分浓度升高,生物量不再显著增加;随着 P 肥用量增加,养分含量递增,但生物量在超过 P1 处理后产生极显著下降,K 肥与 P 肥有相似的规律,也在 K1 处理处出现生物量的转折点。这可用 Timmer(1997)提出的稳态营养模型理论进行解释。在"贫养期"(dificiency),植物的生物量和体内的养分积累量均随施肥增加而增加,逐渐达到"养分充足"(sufficiency)状态。此后,持续提供养分,生物量增加不再显著,进入平台期,而植物体内养分浓度持续升高。此时植物进入"奢养消耗"(luxury consumption)阶段,在此阶段植株积累了充足的营养,可提高植物的抗逆能力



Fig. 4  $\,$  Quadratic relationships between biomass and PGI and N, P, K contents of leaves

in Hydrangea macrophylla 'Hanatemari' seedlings

表 3	绣球'花手鞠'	'叶片 N、P、K	含量与生物量及	PGI 的回归方程
-----	---------	-----------	---------	-----------

Table 3	Regressive equations between biomass or PGI an	nd N	N, P,	K	contents	of	leaves
	in Hydrangea macrophylla 'Hanatemari	' s	eedling	$\mathbf{gs}$			

因变量 Dependent variable	自变量 Independent variable	回归方程 (n=12) Regressive equation (n=12)	R值 R value	显著性 Significance
生物量	Ν	$Y_1 = -0.046N^2 + 4.293N + 18.319$	0.959	<i>P</i> <0.01
Biomass $(Y_1)$	Р	$Y_1 = -38.827P^2 + 177.154P - 80.009$	0.752	<i>P</i> <0.01
	K	$Y_1 = -0.046K^2 + 4.293K + 18.319$	0.403	P>0.05
植物生长指数	N	$Y_2 = -0.025N^2 + 2.030P + 23.456$	0.915	<i>P</i> <0.01
PGI $(Y_2)$	Р	$Y_2 = -13.600P^2 + 66.108P - 9.202$	0.506	P<0.05
	Κ	$Y_2 = -0.004K^2 + 0.974K + 39.941$	0.415	<i>P</i> >0.05

及移栽成活率。继续提供养分,则会造成养分过 多,产生"养分毒害"。

## 4 结论

根据施肥对盆栽绣球生长的影响进行模型拟合,并结合肥料经济效益和环保因素考虑,两年生'花手鞠'盆栽苗的 N、P、K 肥适用量分别确定为 N2(8 g N · plant<sup>-1</sup>)、P1(1.5 g P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> · plant<sup>-1</sup>)和 K1 (4 g K<sub>2</sub>O · plant<sup>-1</sup>)。

## 参考文献:

- ALEXANDER L, 2017. Production of triploid Hydrangea macrophylla via unreduced gamete breeding [J]. Hortic Sci, 52(2): 221-224.
- BI GH, SCAGEL CF, FUCHIGAMI LH, et al., 2007. Rate of nitrogen application during the growing season alters the response of container-grown rhododendron and azalea to foliar application of urea in the Autumn [J]. J Hortic Sci Biotechnol, 82(5): 753-763.
- BI GH, SCAGEL CF, HARKESS R, 2008. Rate of nitrogen fertigation during vegetative growth and spray applications of urea in the fall alters growth and flowering of florists' hydrangeas [J]. Hortic Sci, 43(2): 472-477.
- CHEN DD, LI M, PENG JQ, et al., 2020. Association between *HmDFR* gene expression and flower color of *Hydrangea macrophylla* [J]. Plant Physiol J, 56(7): 1641–1649. [陈 旦旦, 李萌, 彭继庆, 等, 2018. *HmDFR* 基因表达与绣球 花花色的关联分析 [J]. 植物生理学报, 56(7): 1641–1649.]
- CHEN HG, 2009. Effects of different fertilization treatments on the growth, flower production and photosynthesis of *Osmanthus fragrans* Lour. [J]. Acta Hortic Sin, 36(6): 843-848. [陈洪国, 2009. 氮磷钾肥处理对桂花生长、花量 及光合作用的影响 [J]. 园艺学报, 36(6): 843-848.]
- CHEN YM, 2017. Garden dendrology [M]. Beijing: China Forestry Press: 495-496. [陈有民, 2017. 园林树木学 [M]. 北京:中国林业出版社: 495-496.]
- FANG XY, ZHOU Y, WANG Y, et al., 2020. Effects of different nitrogen, phosphorus and potassium application amounts on the growth, nutrient absorption and distribution of chrysanthemum [J]. J Nanjing Agric Univ, 43 (6): 1015-1023. [方馨妍,周杨,汪燕,等, 2020. 不同氮、磷、 钾用量对菊花生长及养分吸收和分配的影响 [J]. 南京 农业大学学报, 43(6): 1015-1023.]
- GRACIANO C, GOYA F, FRANGI JL, et al., 2006. Fertilization with phosphorus increases soil nitrogen absorption in young plants of *Eucalyptus grandis* [J]. For

Ecol Manag, 236(2): 202-210.

- GUO C, 2015. The research of rapid propagation technology of six newly introduced varieties of hydrangeas [D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology. [郭超, 2015. 6 种绣球花新引进品种的快繁技术研究 [D]. 长沙:中南林业科技大学.]
- JIN DX, SUN D, FAN HJ, et al., 2021. Comprehensive evaluation of the main characters of the biennial *Platycodon* grandiflorum based on "3414" fertilization scheme [J]. Soil Fert Sci Chin, 4(2): 156-161. [金冬雪, 孙迪, 樊桓均, 等, 2021. 基于"3414"施肥方案的二年生桔梗主要性状的 综合评价 [J]. 中国土壤与肥料, 4(2): 156-161.]
- KATSUYA N, MOTOMU E, MITSUTOMO A, et al., 2017. SODIUM POTASSIUM ROOT DEFECTIVE1 regulates FLOWERING LOCUS T expression via microRNA156-SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE3 module in response to potassium conditions [J]. Plant Cell Physiol, 59(2): 404-413.
- LI XL, YUAN QF, PENG YJ, et al., 2004. Summary of cultivation technology experiment of *Hydrangea macrophyua* [J]. SW Hortic, 32(6): 19-23. [李向林, 袁启凤, 彭玉 基, 等, 2004. 八仙花的栽培技术试验总结 [J]. 西南园 艺, 32(6): 19-23.]
- LI T, BI GH, HARKESS RL, et al., 2019. Nitrogen fertilization and irrigation frequency affect hydrangea growth and nutrient uptake in two container types [J]. Hortic Sci, 54(1): 167–174.
- LI YH, CHEN S, ZHAO B, et al., 2020. Effect of aluminum stress on growth and physiological characteristics of *Hydrangea* tissue culture seedlings [J]. J Zhejiang Agric For Univ, 37(6): 1064–1070. [李叶华, 陈爽, 赵冰, 2020. 铝 胁迫对绣球组培苗生长及生理特性的影响 [J]. 浙江农 林大学学报, 37(6): 1064–1070.]
- LI YQ, LIU XJ, XU DP, et al., 2021. Growth and foliar nutrition of *Dalbergia odorifera* seedlings under exponential fertilization [J]. J Trop Crops, 42(2): 481–487. [李毓琦, 刘小金, 徐大平, 等, 2021. 不同施肥量对降香黄檀苗木 生长和叶片养分状况的影响 [J]. 热带作物学报, 42(2): 481–487.]
- LIN R, DAI ZW, DAI XY, et al., 2021. Evaluation of heat tolerance and screening the index for the assessment of heat tolerance in cultivars of *Hydrangea* [J]. Chin J Trop Crops, 42(8): 2209-2218. [凌瑞, 戴中武, 代晓雨, 等, 2021. 8 个绣球品种耐热性综合评价与耐热指标筛选 [J]. 热带 作物学报, 42(8): 2209-2218.]
- LIU C, ZHANG NN, HENG Y, et al., 2019. Effects of different fertilization patterns on the growth and flowering of *Rosa chinensis minima* [J]. Tianjin Agric Sci, 25(11): 47–52. [刘晨,张宁宁, 衡燕, 等, 2019. 不同施肥模式对微型月季生长和开花的影响 [J]. 天津农业科学, 25(11): 47–52.]
- LU WJ, 2018. The ever-changing hydrangea Hydrangea

macrophylla 'Hanatemari' [J]. Flower, (19): 22-23. [陆 文佳, 2018. 百变绣球——'花手鞠' [J]. 花卉, (19): 22-23.]

- OLIET JA, TEJADA M, SALIFU KF, et al., 2009.
  Performance and nutrient dynamics of holm oak (*Quercus ilex* L.) seedlings in relation to nursery nutrient loading and post-transplant fertility [J]. Eur J For Res, 128(3): 253-263.
- PAN Y, ZHANG XQ, YE K, et al., 2021. Physiological responses of ten *Hydrangea macrophylla* cultivars to shading and evaluation of strong light tolerance [J]. J Fujian Agric For Univ(Nat Sci Ed), 50(1): 36-48. [潘月, 张宪权, 叶康, 等, 2021. 不同八仙花品种对遮阴和强光处理的生理 响应与评价 [J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 50(1): 36-48.]
- SHRECKHISE JH, OWEN JS, NIEMIERA AX, 2018. Response of *Hydrangea macrophylla* and *Ilex crenata* cultivars to low-phosphorus controlled-release fertilizers [J]. Sci Hortic, 246: 578–588.
- TANG J, YANG CD, KANG HM, 2005. Advances in methods of nutrition diagnosis for plants world forestry research [J]. World For Res, 4(6): 45-48. [唐菁, 杨承栋, 康红 梅, 2005. 植物营养诊断方法研究进展 [J]. 世界林业研 究, 4(6): 45-48.]
- THANESHWARI DB, GUPTA YC, 2017. Effect of different doses of nitrogen and potassium on growth and flowering of hydrangea (*Hydrangea macrophylla* Thunb.) [J]. Ecol Environ Conserv, 23(February Suppl.): S108–S299.
- TIMMER VR, 1997. Exponential nutrient loading: a new fertilization technique to improve seedling performance on competitive sites [J]. New For, 13(1): 279-299.
- WANG HR, MA WT, 2012. Effects of different combination ratios of N, P and K fertilizer on growth and resistance of powdery mildew of cut rose [J]. Ningxia J Agric For Sci Technol, 53(9): 49-51. [王华荣, 马文婷, 2012. 氮磷钾 配比施肥对切花月季生长及抗白粉病的影响 [J]. 宁夏 农林科技, 53(9): 49-51.]
- WANG P, ZHANG L, HAO Y, 2019. The study of quick-acting water-soluble fertilizer for hydrangea cut flower [J]. Hortic Seed, 39(4): 30-35. [王培,张黎,郝杨, 2019. 八仙花 速效水溶性肥料应用试验研究 [J]. 园艺与种苗, 39(4): 30-35.]
- WANG S, BAO HP, WANG QZ, et al., 2014. Effects of N, P, K proportion on vegetative growth and florescence of *Tillandsia stricta* [J]. Chin Agric Sci Bull, 30(16): 221-225. [王姗, 鲍华鹏, 王全智, 等, 2014. N, P, K 对铁兰属植物 *Tillandsia stricta* 生长与开花的影响 [J]. 中国农

学通报, 30(16): 221-225.]

- WANG SR, CHEN XP, GAO XZ, et al., 2002. Study on simulation of "3414" fertilizer experiments [J]. J Plant Nutr Fert, 4(8): 409-413. [王圣瑞,陈新平,高祥照,等, 2002. "3414"肥料试验模型拟合的探讨 [J]. 植物营养与 肥料学报, 4(8): 409-413.]
- XUE C, 2020. Gene cloning of foundation study of flower color related transcription factor *HymMYB2* in *Hydrangea macrophylla* [D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology. [薛超, 2020. 绣球花花色相关转 录因子 *HymMYB2* 的克隆及功能研究 [D]. 长沙: 中南林 业科技大学.]
- YANG JY, ZHAO YJ, ZHANG J, et al., 2020. Study on the technology of postharvest preservation of cut flower of *Hydrangea kuhnert* [J]. Heilongjiang Agric Sci, (2): 61-71. [杨景雅, 赵艳娟, 张静, 等, 2020. 绣球切花采后保 鲜技术的研究 [J]. 黑龙江农业科学, (2): 61-71.]
- ZHAO B, 2016. Chinese hydrangea [M]. Beijing: China Forestry Press: 26. [赵冰, 2016. 中国八仙花 [M]. 北京: 中国林业出版社: 26.]
- ZHANG WJ, LU JW, JIANG ZP, et al., 2009. Effects of N, P, K fertilizer application and recommendation for *Petunia hybrida* Vilm. in pot experiments [J]. Plant Nutr Fert, 15(5): 1147-1153. [张文君, 鲁剑巍, 蒋志平, 等, 2009. 盆栽矮牵牛氮、磷、钾肥效应及推荐用量研究 [J]. 植物营养与肥料学报, 15(5): 1147-1153.]
- ZHANG WJ, 2012. Mineral nutrition of *Perunia hybrida* Vilm.: growth, blooming and fertilizer recommendation [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University: 3-5. [张文君, 2012. 矿质营养对矮牵牛生长开花的影响与推荐施肥研 究[D]. 武汉: 华中农业大学: 3-5.]
- ZHAO Z, GONG S, DUAN CL, et al., 2005. Effects of different N, P and K levels on growth and photosynthetic pigment contents of *Erigeron breviscapus* [J]. J Yunnan Agric Univ, 20(5): 676-679. [赵峥, 龚苏, 段承俐, 等, 2005. 氮、磷、钾对灯盏花生长发育及光合色素含量的影 响 [J]. 云南农业大学学报, 20(5): 676-679.]
- ZHU BZ, YANG HX, PAN W, et al., 2020. The DRIS nutrient diagnosis analysis of N, P, K in *Camellia azalea* under different fertilization proportions [J]. Subtrop Plant Sci, 49(1): 21-26. [朱报著,杨会肖,潘文,等, 2020. 不同 施肥处理杜鹃红山茶 N, P, K 元素的 DRIS 营养诊断 [J]. 亚热带植物科学, 49(1): 21-26.]

(责任编辑 周翠鸣)

广步植物 Guihaia Nov. 2022, 42(11): 1980-1993

#### DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202101048

宦智群,徐小蓉,耿兴敏,等.木兰科植物组织培养技术研究进展 [J]. 广西植物, 2022, 42(11): 1980-1993. HUAN ZQ, XU XR, GENG XM, et al. Advances in tissue culture techniques of Magnoliaceae [J]. Guihaia, 2022, 42(11): 1980-1993.



http://www.guihaia-journal.com

## 木兰科植物组织培养技术研究进展

宦智群1,徐小蓉2,耿兴敏1\*,唐 明2

(1. 南京林业大学风景园林学院,南京 210037; 2. 贵州师范大学生命科学学院,贵阳 550001)

**摘** 要:我国木兰科(Magnoliaceae)植物栽培历史悠久且种类丰富,具有很高的科研价值、观赏价值、生态价 值与经济价值。但是,生境的破坏和自身繁殖能力的限制,使木兰科许多种的生存受到威胁。由于传统繁 殖方式繁殖效率低下,而组织培养技术是推进木兰科种质资源保存及开发利用的有效途径,因此组织培养 技术可以应用于濒危资源保护、育种和无性系苗木的商业化生产。木兰科植物的组织培养中无菌短枝扦插 途径研究较多,体系已相对完善,一些种类的木兰科植物可以通过此途径得到生根苗;而关于器官发生途径 的研究相对较少,愈伤组织诱导困难及不定芽分化困难的问题仍没有得到有效解决,并且体细胞胚发生途 径在国内鲜有研究。该文从无菌短枝扦插、器官发生、体细胞胚发生等不同再生途径出发,分析了外植体类 型、培养基类型、生长调节剂浓度、培养条件等方面对离体生长的影响,归纳了组培过程中生根困难与褐化 等技术问题与解决措施,展望了木兰科植物组织培养技术未来的研究方向,以期为木兰科植物的组培快繁 技术研究提供理论依据和技术参考。

关键词:木兰科,组织培养,生根,褐化,无菌短枝扦插 中图分类号:Q943.1 文献标识码:A 文章编号:1000-3142(2022)11-1980-14

## Advances in tissue culture techniques of Magnoliaceae

HUAN Zhiqun<sup>1</sup>, XU Xiaorong<sup>2</sup>, GENG Xingmin<sup>1\*</sup>, TANG Ming<sup>2</sup>

( 1. College of Landscape Architecture, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China;
2. College of Life Sciences, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China )

**Abstract**: Magnoliaceae plants in China have a long history of cultivation and rich species of Magnoliaceae plants have high scientific, ornamental, ecological and economic values. However, the existence of many Magnoliaceae plants is threatened due to the limited self-reproductive capacity and habitat destruction. The traditional propagation method is inefficient. Tissue culture technology promotes the conservation and utilization of Magnoliaceae plants. It can be applied in the conservation of endangered resources, breeding and commercial production of clonal seedlings. There are many

收稿日期: 2021-08-12

基金项目: 贵州省科技支撑项目([2020]4Y028); 黔科合重大专项([2019]3001-5); 江苏省高校品牌专业建设项目 (PPZY2015A063)[Supported by Guizhou Science and Technology Support Project([2020]4Y028); Key Project of Guizhou Science and Technology Cooperation([2019]3001-5); Brand Specialty Construction Project of Universities in Jiangsu Province(PPZY2015A063)]。 第一作者: 宦智群(1996-),硕士研究生,研究方向为木兰科植物组织培养,(E-mail)2942235855@qq.com。

<sup>\*</sup>通信作者: 耿兴敏,博士,教授,研究方向为园林植物种质创新与生理生化,(E-mail)xmgeng76@163.com。

#### 宦智群等:木兰科植物组织培养技术研究进展

studies on the *in vitro* shoot propagation, and the system is relatively perfect. Some studies can achieve rooting seedlings through this way. However, there are few studies on organogenesis, and the problems of callus induction and adventitious bud differentiation have not been solved effectively. Also, there are few studies on the somatic embryogenesis in China. This paper reviewed the research on different regeneration ways of Magnoliaceae plants such as *in vitro* shoot propagation, organogenesis and somatic embryogenesis. The influences of explant selection, medium selection, growth regulator concentration and culture conditions on *in vitro* growth of Magnoliaceae plants were analyzed. Meanwhile, the paper summarized the problems and the solutions of rooting and browning, and prospected the future research directions. It will provide theoretical basis and technical reference for rapid propagation of Magnoliaceae plants. **Key words**; Magnoliaceae, tissue culture, rooting, browning, *in vitro* shoot propagation

木兰科(Magnoliaceae)植物作为多心皮类植 物的典型代表,是探索被子植物起源与发展演化 的关键材料,科学研究价值极高;该科植物大多为 春季观花木本,树形优美,叶、果、花均具较高的园 林观赏价值(杨成华等,2017),常应用于工矿、居 住区、道路、庭院绿化和公园绿地等方面(宋怀芬 和刘会萍,2014);它们可以作为工业用材、药材和 香料树种(孔焱焱,2018),具有较高的经济价值。 由于对木兰科分类系统和亲缘关系的认知分歧, 其类群概念至今尚未统一,分类系统众多,目前国 内普遍被大家接受且应用最多的是刘玉壶(1997) 系统,因此本文也采用该分类系统。据不同分类 系统统计,世界木兰科种类数目为240~300种; 《中国植物志》(2004)中记载中国有木兰科植物 11 属 107 种,《中国木兰》(2004) 记载 11 属 178 种, Flora of China (2008) 记载 12 属 112 种。我国 木兰科的物种丰富度中心在云南、贵州、广西、湖 南、广东等地,物种丰度由东南、西南地区向北、东 北和西北逐渐减少。

虽然我国的木兰科植物种类丰富,但野生资源匮乏与繁殖困难,严重限制了木兰科植物的推 广栽培,导致其在园林中应用的种类十分有限(谭 秀梅等,2018)。木兰科中许多植物自然结实率低 (向光锋等,2019),并且人类活动破坏了原有生 境,野生资源保存情况不容乐观。据《中国植物红 皮书》(1991)记载,木兰科中被列为国家重点保护 的珍稀濒危植物有 39 种之多,是被子植物中受到 严重威胁种类最多的科;据《中国生物多样性红色 名录·高等植物卷》(2013)记载,木兰科植物中存 在易危(VU)40 种、濒危(EN)27 种、极危(CR)9 种、近危(NT)6 种、地区灭绝(RE)1 种。木兰科 植物的有性繁殖存在发芽率低、种源欠缺的问题, 常规无性繁殖中嫁接繁殖不适合工厂化育苗,扦 插繁殖生根困难(王欢等,2013;张果等,2016)。

组织培养技术是木兰科植物资源保育及开发 的有效途径,可通过组织器官离体保存保育植物 种质资源,也可通过工厂化育苗为园林绿化提供 大量苗木以减少对野生资源的需求。虽然我国木 兰科植物的部分树种在建立优良再生体系方面取 得了一定的进展,但研究种类有限,鲜有应用于工 厂化生产实践,并且组培过程中存在褐化、生根困 难、愈伤组织再分化困难等技术问题。本文对木 兰科植物不同再生途径的相关研究进行了论述, 总结组培过程中普遍存在的褐化、生根困难等技 术难题与解决措施,以期为木兰科植物高效的再 生体系建立提供理论基础。

## 1 无菌短枝扦插途径

木本植物组织培养有无菌短枝扦插、器官发 生、体细胞胚发生等再生途径。国内木兰科植物 的组织培养中无菌短枝扦插途径研究较多。虽然 木兰属(Magnolia)和含笑属(Michelia)的部分种类 已经建立了完整的再生体系,但种类有限,增殖系 数低、褐化及生根困难等技术难题仍未得到解决; 其他如木莲属(Manglietia)、拟单性木兰属 (Parakmeria)等仅见个别种有研究,且大多处于初 步探索阶段。

#### 1.1 无菌体系的建立

外植体的选择、取材时间、处理方式、消毒方 式是影响无菌体系建立的几个关键因素。

木兰科植物的无菌短枝扦插一般选取茎尖、 带腋芽的幼嫩茎段、顶芽或侧芽作为外植体(表 1)。由于新生组织内含有的病菌以及酚类物质比 在自然环境生长时间较长的植物材料少,因此选取靠近枝条顶端的芽和茎段,这些部位污染率和 褐化率相对低,存活率相对高(Maria, 2012;唐军 荣等,2014)。

外植体的取材时间极大程度地影响着组培苗的污染率、褐化率与启动率,需综合考虑三者来确定取材时期。一般来说,木兰科植物夏季(7-8月)取材的外植体褐化严重(黄树军等,2013),休眠期(12月至翌年1月)取材的外植体污染率、褐化率相对较低(都婷等,2013;Maria,2012),而春季蕾期阶段(5月)采集的初代外植体形态发生能力强,启动率较高(Konopkova et al., 2020)。

外植体处理方式不同会影响启动培养的结果。由于托叶会阻碍嫩芽的营养吸收,外层鳞片 影响灭菌效果,因此消毒前去除外层鳞片,消毒后 去除托叶的顶芽外植体的启动速度、启动率、顶芽 长势均好于对照(唐军荣等,2014)。此外,宁阳等 (2015)研究表明切掉叶柄的茎段外植体较之叶柄 已自然掉落的茎段,腋芽萌发受到抑制且更易 褐化。

芽、茎段外植体的消毒均以 0.1% HgCl<sub>2</sub>为佳, 灭菌时间要根据外植体的采集时间、幼嫩程度来 确定,休眠期取材的外植体消毒时间应高于生长 期取材的,幼嫩的外植体消毒时间应低于成熟的 (都婷等,2013)。对于灭菌困难的种类,污染严重 的可以鉴定其相关内生细菌,筛选适宜种类和浓 度的抑菌剂添加至培养基中。

#### 1.2 启动培养

基础培养基、生长调节剂是影响启动培养的 关键因素。从表1可以看出,MS培养基是木兰科 植物芽和茎段启动培养的常用基础培养基。6-BA 的用量对芽的诱导及生长的影响极大,外植体的 启动速度往往随 6-BA浓度的增加而增加(都婷 等,2013),最佳 6-BA浓度取决于培养基中蔗糖与 氮盐的比例,6-BA、蔗糖和氮盐水平不适合会导致 褐化(Wojtania et al., 2015)。6-BA的适宜浓度一 般为 0.5~2 mg·L<sup>-1</sup>,并与少量的 NAA(0.05~0.2 mg·L<sup>-1</sup>)、IBA(0.05~0.2 mg·L<sup>-1</sup>)等生长素配合 使用(表 1)。启动培养中,一些种类可能存在腋 芽活性较低的现象, {% 加 6-BA 不足以使芽生 长,此时需要加入适量的赤霉素(GA<sub>3</sub>)(0.1~2 mg·L<sup>-1</sup>)来打破休眠,并刺激芽的生长(Wojtania et al., 2019; Cui et al., 2019), 其作用效果依赖于 MS 培养基中的蔗糖与氮盐的比例(Wojtania et al., 2015)。

#### 1.3 增殖培养

基础培养基、生长调节剂同样是影响增殖培养的关键因素。MS培养基是最广泛用于木兰科植物增殖培养的基本培养基(表1)。但是,不同木兰种和品种的增殖阶段对基本培养基组成的要求是基因特异性的(Konopkova et al., 2020)。Sokolov等(2014)研究表明常用于葡萄离体繁殖的VM培养基与常用于核桃、白蜡、榆树等离体繁殖的DKW培养基能提高一些种类的增殖速率和芽的整体质量,与MS具有相似的作用,在木兰科植物的增殖阶段具有应用前景。

目前,最适合木兰科植物增殖培养的细胞分 裂素是 6-BA, 对多种木兰及栽培品种腋芽增殖效 果显著(Parris et al., 2012; Sokolov et al., 2014), 其最佳浓度因基因型的不同而不同,范围为0.25~ 5 mg · L<sup>-1</sup>(Wojtania et al., 2015)。但是, 6-BA 会 导致某些木兰组培材料玻璃化,降低芽的质量,并 抑制生根。MT(meta-Topolin)是一种与 6-BA 结构 相似的细胞分裂素,可以减少木兰品种'Ann'玻璃 化苗的产生(Parris et al., 2012)。此外,苯基脲类 细胞分裂素 CPPU 是 6-BA 生物活性的 10~100 倍 且价格低廉,在其他植物的组培中被广泛用于促 进侧芽分化与植株生长(孙晓波等,2020),在木兰 科植物中尚未见应用,可考虑与 MT、低剂量的纳 米碳(冯璐等,2017)等作为 6-BA 的替代品,应用 于木兰科植物的增殖培养。增殖培养期间,组培 苗易褐化,需要注意的是在后期应适当降低 6-BA 的浓度(Konopkova et al., 2020)且及时转瓶(周丽 华等,2002)。

木兰科植物外植体的增殖能力具有基因型特 异性(Sokolov et al., 2014),不同基因型的木兰科 植物的增殖分化难易程度不一,在同样的培养基 与生长调节剂条件下,二乔玉兰(Mognolia× sallangiana)的增殖率明显高于白玉兰(M. denudata)和紫玉兰(M. liliflora)(李艳等,2005), 而星花木兰(M. stellata)腋芽的增殖率高于二乔木 兰(Maria, 2012)。

#### 1.4 生根培养

在木兰科植物的生根培养过程中,常通过降 低无机盐浓度和调整基本培养基组成来促进生 根,无机盐含量只需为增殖培养时的一半,即可满 足生根培养所需养分(邓演文等,2018)。1/2MS 培养基是目前大多数木兰科植物选择的生根培养 基。外植体的生根潜力可能受基础培养基组成的 影响较小(Sokolov et al., 2014),白玉兰在 1/2MS 培养基以及 1/4MS 培养基中都能生根,两者的生 根率和生根数差别不大(孟雪,2005)。

生长调节剂在根原基形成与生长中起关键作 用,多数木兰科植物需添加生长素才会有较高的生 根率,IBA 是最常用于木兰科植物生根培养的生长 素(表1),不同浓度的 IBA 能够调节产生根系数量 与长度(Kamenicka et al., 2000)。木兰离体生根明 显依赖于 IBA 和蔗糖水平,且这两种水平在不同基因 型之间是不同的,玉兰品种'Elizabeth''Burgundy' 'Spectrum'在含有 6 mg·L<sup>-1</sup> IBA 和 30 g·L<sup>-1</sup>蔗糖的 1/2MS 培养基上生根效果最好(Wojtania et al., 2019)。对于生根困难的种类,则通过改善生根培 养的条件和改变生根的方式等技术措施来促进生 根(具体方法于文章 5.2 部分详述)。

#### 1.5 培养条件

光照、温度和 pH 值等培养条件是影响木兰科 植物形态发生的重要因素,在木兰科组织培养中 所选择的蔗糖浓度、pH、培养温度、光照强度和光 照时间相差不大,分别是蔗糖 20~40 g・L<sup>-1</sup>、pH 5.6~6.7(木兰科植物偏好碱性土壤)、培养温度 23~28 ℃、光照强度 1 000~3 000 lx、光照时间 10~16 h・d<sup>-1</sup>。

相关培养条件在不同培养阶段与不同基因型 的植物中有所差异,有时需要具体探讨。例如,蔗 糖是木本植物组织培养中最常用的碳源(Wojtania et al., 2019), 而 Kamenicka 等(1998)发现果糖、 甘露糖和木糖是二乔玉兰芽增殖最有效的碳源. 其次是蔗糖。培养基中常用的铁源是硫酸亚铁 (FeSO<sub>4</sub>), 而 Sokolov 等(2015) 研究表明螯合铁 NaFeEDTA 和 Fe(III) AC 比非螯合铁 FeSO4・7H2O 更合适作为广玉兰(M. grandiflora)和二乔玉兰增 殖和生根培养基中的铁源。不同光质可能通过影 响相应光受体的活性进而影响激素水平,从而影 响植物的生长发育。由于红光可以促进地上部分 生长,蓝光、远红光则可以促进地下部分生长(任 桂萍等,2016),因此可以考虑在启动和增殖阶段 使用红光,在生根阶段使用蓝光和远红光来促进 组培苗的生长。

## 2 器官发生途径

木兰科植物器官发生途径的研究目前仍只限 于木兰属和含笑属的少量种类,愈伤组织诱导困 难及其不定芽分化困难的问题仍没有得到有效解 决。木兰科植物的器官发生途径除个别通过叶片 直接分化得到不定芽外(李艳等,2005),大多通过 间接器官再生途径,先由外植体形成愈伤组织,再 由愈伤组织分化为不定芽。

#### 2.1 愈伤组织诱导

木兰科植物可以通过营养器官(顶芽、茎段、 叶片、叶柄)和繁殖器官(花托、花瓣、花药)等诱导 出愈伤组织(表 2)。外植体来源不同,愈伤组织 的诱导率也会不同。一般来说,顶芽和茎段较易 诱导出愈伤组织,且愈伤组织生长状态较好。厚 朴(*M. officinalis* subsp. *officinalis*)不同取材部位的 愈伤组织诱导率为茎段>顶芽>叶片(谢燕燕等, 2017);凹叶厚朴(*M. officinalis* subsp. *biloba*)外植 体脱分化形成愈伤组织的能力大小为顶芽及茎段 >雌蕊>花被>雄蕊>托叶>叶柄(刘叶蔓等,2008)。

适宜的基本培养基对愈伤组织分化起着关键 作用。MS培养基和B5培养基最常用于木兰科植物的愈伤组织诱导(表2)。实验证明,MS培养基 适合大多数木兰科植物的多种外植体的愈伤组织 诱导。但是,对于个别种类,如厚朴、凹叶厚朴的 芽、茎段,以及黄兰含笑(*Michelia champaca*)的叶 柄等外植体,MS培养基中NH<sub>4</sub><sup>+</sup>浓度较高,可能会 对愈伤组织造成毒害,不利于其分化生长,B5培 养基更加适合其愈伤组织诱导(黄树军等,2013; Shukla, 2014;谢燕燕等,2017)。

不同生长调节剂处理对愈伤组织的诱导率存 在明显差异,并且诱导出愈伤组织的形态、生长状 态和色泽等随生长调节剂种类及其配比的不同而 不同(何培琦等,2010)。2,4-D(1~5 mg·L<sup>-1</sup>)和 6-BA(1~5 mg·L<sup>-1</sup>)是木兰科植物愈伤组织诱导 中常用的细胞分裂素(表 2)。适宜浓度的 2,4-D 或 6-BA 诱导愈伤组织所需时间短且愈伤组织生 长良好(黄树军等,2013;Shukla,2014)。6-BA 与 2,4-D 或 KT 同时使用能提高诱导率和愈伤组织 的质量。罗在柒等(2010)对紫玉兰的不同外植体 进行愈伤组织诱导,从诱导率和增殖系数来看, 2,4-D 4 mg·L<sup>-1</sup>+6-BA 1 mg·L<sup>-1</sup>的组合下诱导效

## 表 1 木兰科植物组织培养中无菌短枝扦插途径

Table 1 In vitro shoot propagation in tissue culture of Magnoliaceae plants

种及品种 Species and cultivar	外植体 Explant	培养阶段 Culture stage	培养基 Medium (mg・L <sup>-1</sup> )	培养结果 Result	参考文献 Reference
木兰属 Magnolia					
白玉兰 M. denudata	休眠芽 Dormant bud	I (P R T	MS+6-BA 0.5+NAA 0.05 1/2MS+IBA 0.2 腐熟土:细河沙(Rotten soil:Fine river sand)=3:1	RR 80% TR 90%	孟雪,2005
紫玉兰 M. liliflora	带芽茎段 Stem with bud	I , P R	MS+6-BA 1+NAA 0.1 MS+NAA 2+6-BA 0.1 暗培养 ( Dark culture)20 d 后转入 1/2MS	PC 1.53 RR 35%	陆秀君等,2009
紫玉兰 M. liliflora	顶芽、腋芽 Terminal bud, axillary bud	I P R T	MS+6-BA 0.1~1 +KT 0.1~1 MS+6-BA 2 + IAA 0.1 1/2MS+IBA 2 + NAA 0.2 河沙 River sand	PC 4.02 RR 90% TR 85%	周丽华等,2002
天女木兰 M. sieboldii	幼嫩茎段 Juvenile stem	I , P R T	B5+6-BA 0.5+IBA 0.3 1/4MS+IBA 1+NAA 0.5 苔藓:蛭石( Moss:Vermiculite) = 1:1	IR 72% RR 70% TR 85%	杜凤国等,2006
星花木兰 M. stellata	顶芽 Terminal bud	I P R	LS+6-BA 0.7+NAA 1+GA <sub>3</sub> 0.1+ ASA 5+Vitamin MS+6-BA 0.5+Miller vitamin 1/2MS+LS vitamin+GA <sub>3</sub> 0.1+IBA 4	PC 10.7 RR 90%	Maria, 2012
二乔玉兰 Magnolia × soulangiana	腋芽 Axillary bud	I , P R T	S+IBA 0.07+NAA 0.03 1/2MS+IBA 0.02~0.1 沙:泥炭(Sand: Peat)=2:1	RR 96.2% TR 90%	Kamenicka 等, 2000
红花山玉兰 M. delavayi	茎尖、茎段 Shoot tip, stem	I P	MS+6-BA 2+IAA 0.01+KT 1 MS+6-BA 0.5 +NAA 0.01	获得不定芽 Obtaining adventitious buds	王奇等,2009
广玉兰 M. grandiflora	幼嫩茎段 Juvenile stem	I P R T	1/2MS+ZT 3 +NAA 0.2 1/2MS+6-BA 1 +NAA 0.1 1/2MS+IBA 0.5 泥炭:珍珠岩 (Peat:Perlite)=3:1	IR 92% PC 3 TR 100%	王水燕等,2017
厚朴 M. officinalis	腋芽 Axillary bud	I , P R	1/2MS+6-BA 1+NAA 0.5 1/2MS+NAA 1	RR 65%	金丽丽和 张丽萍, 2018
含笑属 Michelia					
峨眉含笑 M. wilsonii	顶芽 Terminal bud	I P R	MS+6-BA 1+NAA 0.2 MS+6-BA 0.3+NAA 0.3 1/2MS+ NAA 0.5+ IBA 0.5	RR 78%	闵炜和 陈志萍, 2007
醉香含笑 M. macclurei	茎段、茎尖 Stem, shoot tip	I P R T	1/3MS+6-BA 0.2+NAA 0.02 1/3MS+6-BA 0.3+NAA 0.2 1/3MS+AC 300 1/4MS+IBA 2+NAA 3 沙:椰糠:泥炭土(Sand: Coconut bran: Peat)=2:2:1	RR 93.2% TR 97.6%	李雪等,2005
乐昌含笑 M. chapensis	带芽茎段 Stem with bud	I , P R	MS+6-BA 1+IBA 0.1 1/2MS+6-BA 0.4+IBA 0.6+NAA 0.8	RR 50%	吴月燕等,2007
紫花含笑 M. crassipes	带芽茎段 Stem with bud	I , P R T	MS+6-BA 0.5+IBA 0.1 1/2MS+ NAA 3+6-BA 0.1 暗培养(Dark culture) 15 d,后转入 1/2MS 泥炭:珍珠岩:砻糠灰(Peat:Perlite: Rice chaff ash)=3:2:1	PC 3.5 RR 33% TR 85%	朱碧华等,2009

			续表1		
种及品种 Species and cultivar	外植体 Explant	培养阶段 Culture stage	培养基 Medium (mg・L <sup>-1</sup> )	培养结果 Result	参考文献 Reference
云南含笑 M. ynnnanensis	冬芽 Winter bud	I P 壮苗 Strong seedling	MS+6-BA 0.5~2+NAA 0.1~0.3 MS+6-BA 2+NAA 0.1 MS+6-BA 1 +NAA 0.3	PC 3.2	都婷等,2013
石碌含笑 M. shiluensis	茎段 Stem	Ι	1/2MS+6-BA 1+NAA 0.1	IR 79.6%	郑珂媛,2017
木莲属 Manglietia					
华木莲 M. decidua	带芽茎段 Stem with bud	Ι	MS+6-BA 1.5+IBA 0.1~0.2	芽难以诱导 Buds are difficult to induce	尤润等,2019
灰木莲 M. glauca	带芽茎段 Stem with bud	I P R	MS+6-BA 0.5+NAA 0.1 MS+6-BA 0.3+NAA 0.05+KT 1 1/2MS+NAA 2	IR 89.3% PC 2.7 RR 58.3%	乔梦吉,2013
单性木兰属 Kmeria					
单性木兰 K. septentrionalis	带芽茎段 Stem with bud	Ι	MS+6-BA 2+KT 2+2,4-D 0.5	IR 70%	杨梅等,2017
拟单性木兰属 Parakn	neria				
云南拟单性木兰 P. yunnanensis	带芽茎段 Stem with bud	I P	MS+6-BA 0.5 +2, 4-D 0.1 + KT 0.5 1/2 MS+6-BA 0.5 +NAA 0.1 + GA <sub>3</sub> 0.1	获得不定芽 Obtaining adventitious buds	甘露等,2010
云南拟单性木兰 P. yunnanensis	茎尖、带芽茎段 Shoot tip, stem with bud	I P R T	MS+6-BA 2 +IAA 0.01+KT 1 MS+6-BA 0.5+NAA 0.01 1/2MS+NAA 0.5+IBA 3 蛭石 Vermiculite	RR 80% TR 80%	陈芳等,2005
乐东拟单性木兰 P. lotungensis	带芽茎段 Stem with bud	Ι	MS+6-BA 0.2+IBA 0.05	获得不定芽 Obtaining adventitious buds	宁阳等,2015
品种 Cultivar					
' Ann '	腋芽 Axillary bud	I , P R	MS+6-BA 0.09 1/2MS+IBA 0.1+AC 1 000	PC 3.2 RR 16%	Parris 等, 2012
' Vulcan'	带芽茎段 Stem with bud	I P R	MS+6-BA 1 MS+6-BA 0.5 MS+IBA 6	RR 91.3% TR 87.5%	Kim 等, 2020

注:培养阶段 I、P、R、T 分别为启动、增殖、生根、移栽的英文缩写;相对应的培养结果 IR、PC、RR、TR 分别为诱导率、增殖系数、 生根率、移栽成活率的英文缩写。

Note: Culture stages I, P, R and T are the abbreviations of initiation, proliferation, rooting and transplanting, respectively; the corresponding results IR, PC, RR and TR are the induction rate, proliferation coefficient, rooting rate and transplanting survival rate, respectively.

果比较理想;而墨西哥大叶木兰(Magnolia dealbata)叶片外植体在MS+2,4-D 1.5 mg·L<sup>-1</sup>+KT 1.5 mg·L<sup>-1</sup>的培养基上,获得绿色、致密的愈伤组织(Domínguez et al., 2010)。

在培养条件的选择中,暗培养比光培养更有 利于一些木兰科植物的愈伤组织的形成和生长。 暗培养下的日本厚朴(*M. obovata*)顶芽外植体比 光培养先诱导出愈伤组织,且在相同时间内,愈伤 组织鲜重增长量大于光培养(付晓云等,2009)。 黑暗环境中厚朴顶芽外植体的愈伤组织诱导率比 光照条件下高且产生的愈伤组织形态结构较好, 可能是光照有利于多酚类物质的积累,多酚类物 质和酚氧化酶产生的化学反应产生有害的醌类物 质,从而导致外植体死亡(何培琦等,2010)。

#### 2.2 愈伤组织的再分化

木兰科植物的愈伤组织再分化较困难(表2), 很多外植体诱导出的愈伤组织质地松软或褐化严 重,最终未能分化成芽。木兰科植物愈伤组织能 否分化出芽器官,与所用的基本培养基有关。吴 月燕和袁东明(2001)比较了 MS、MS'、1/2MS、GS 培养基对乐昌含笑(*Michelia chapensis*)叶片愈伤组 织再分化的影响,结果表明 MS'培养基是愈伤组 织再分化的最佳培养基。

愈伤组织的再分化受细胞分裂素与生长素的 浓度与配比影响。GA<sub>3</sub>是促使愈伤组织分化为芽 的有效途径,常与分裂素 6-BA、2,4-D、KT 等配合 使用。在 MS+6-BA 0.6 mg · L<sup>-1</sup>+GA<sub>3</sub> 0.5 mg · L<sup>-1</sup> 培养基上,天女木兰(*Magnolia sieboldii*)嫩茎愈伤 组织成功分化成芽(孙铭鸿等,2012);在 MS'+6-BA 1mg · L<sup>-1</sup>+ GA<sub>3</sub> 2 mg · L<sup>-1</sup>培养基上,乐昌含笑 叶片愈伤组织再分化成芽的比率最高(吴月燕和 袁东明,2001)。

未来对于木兰科植物愈伤组织再分化困难的 问题,应当探索更多用于诱导愈伤组织的外植体 种类,同时致力于抑制愈伤组织的褐化,确保得到 的愈伤组织颜色良好,质地紧密;此外,还应进一 步探索基本培养基与生长调节剂对愈伤组织分化 的影响。

#### 3 体细胞胚培养

国内对体细胞胚诱导培养的相关研究较少, 仅有杂交鹅掌楸(*Liriodendron×sinoamericanum*)的 体细胞胚培养的研究见于报道。陈金慧(2003)以 杂交鹅掌楸幼胚为外植体,以蔗糖为渗透剂提高 渗透压,在MS+1~4 mg・L<sup>-1</sup>培养基上有效诱导出 体细胞胚。体胚发生初期添加 0.1 mg・L<sup>-1</sup>的磺肽 素(PSK)可以提高未成熟胚的脱分化率并能有效 改善培养细胞的状态;0.5 mg・L<sup>-1</sup>的 PSK 能够促 进胚性愈伤组织的形成和增殖(陈金慧等,2013)。 1 μmol・L<sup>-1</sup>的茉莉酸甲酯(MeJA)可以提高杂交 鹅掌楸的体胚发生率和成熟率、降低畸形胚发生 率,2 mg・L<sup>-1</sup> ABA 能够增强 MeJA 的上述效应(成 铁龙等,2017)。

国外对木兰科中木兰属植物胚状体的培养研 究相对较多。幼胚是木兰科植物适宜的体胚发生 外植体,弗吉尼亚木兰(Magnolia virginiana)、福来 氏木兰(M. fraseri)、尖头木兰(M. acuminata)、金 字塔玉兰(M. pyramata)和北美大叶木兰(M. macrophylla)、墨西哥大叶木兰、日本厚朴、黄兰含 笑(Michelia champaca)都通过未成熟种子成功诱 导出体细胞胚(Merkle & Wiecko, 1990; Merkle & Watson, 1993, 1994; Rosas et al., 2006; Kim et al., 2007; Armiyanti, 2012; Park et al., 2012; Cortazar et al., 2020)。

基因型、培养基和发育时期等是影响体细胞 胚发生的关键因素。体细胞胚诱导培养一般选择 在添加一定浓度 2,4-D(0.01~1 mg·L<sup>-1</sup>)的 WPM 培养基上进行(Armiyanti, 2012; Cortazar et al., 2020)。有机附加物是木兰科体胚诱导所必需的 营养物质,酪蛋白水解物、谷氨酰胺常被添加至诱 导培养基中。未成熟种子最佳采集时间为花后 3~4周;培养基中添加蔗糖比添加葡萄糖更利于 体细胞胚的形成,蔗糖的最适添加量为 3%(Kim et al., 2007)。

成功诱导出的体细胞胚往往转移到无激素的 培养基上继续萌发成苗,黄兰含笑体细胞胚在 MS 培养基上萌发率为 34%(Armiyanti, 2012),日本 厚朴体细胞胚在 1/2MS 培养基上萌发率在 80%以 上,并形成正常的初生叶和根(Park et al., 2012)。

体细胞胚培养存在的问题是体胚诱导率和分 化成苗率都很低,并且成功诱导出的体细胞胚中 还有相当一部分是不能发育成苗的畸形胚(Merkle & Wiecko, 1990; Merkle & Watson, 1993, 1994; Kim et al., 2007),在今后的研究中还需进一步 探索。

## 4 胚培养

木兰科植物的胚培养大多是幼胚培养。由于 带种皮的种胚消毒不易彻底,因此接种前必须剥 去种皮。幼胚灭菌时,相较于带外种皮与中种皮 的种子,只带内种皮的种子污染率更低(徐石等, 2008)。0.1% HgCl<sub>2</sub>消毒醉香含笑(*M. macclurei*) 种胚 6~9 min,能获得 60%~65%无菌且可萌发的 外植体(刘英, 2021)。天女木兰种子采用 75%酒 精 30 s+NaClO 10 min 灭菌效果最佳,存活率达 48%(于新杰,2016)。

在基本培养基的选择方面,B5 培养基较为适 宜,其含有幼胚生长所需的 Ca<sup>2+</sup>、K<sup>+</sup>等大量元素和 微量元素(杜凤国等,2006;于新杰,2016)。在植 物生长调节剂的选择方面,6-BA 显著影响芽的增 殖,6-BA 和 NAA 较 ZT、KT、IBA、2,4-D、IAA 更适 合白玉兰幼胚离体培养中的增殖培养。天女木兰

## 宦智群等:木兰科植物组织培养技术研究进展

#### 表 2 木兰科植物组织培养中器官发生途径

Table 2 Organogenesis in tissue culture of Magnoliaceae plants

种及品种 Species and cultivar	外植体 Explant	培养阶段 Culture stage	培养基 Medium (mg・L <sup>.1</sup> )	培养结果 Result	参考文献 Reference
木兰属 Magnolia					
天女木兰 M. sieboldii	嫩茎 Juvenile stem	C B R	MS+ZT 0.4+2,4-D 2.5 MS+GA <sub>3</sub> 0.5+BA 0.6 1/3MS+IBA 0.6+0.8 DA-6 0.5+NAA 0.5	IR 78% DR 64% RR 78%	孙铭鸿等,2012
广玉兰 M. grandiflora	叶芽 Vegetative bud	С	MS+2,4-D 4.5 + NAA 3+ 6-BA 1.2 + AC 800	IR 100%	谭泽芳等,2003
广玉兰 M. grandiflora	花托、叶芽 Torus, vegetative bud	C	MS+2,4-D 4+6-BA 1+NAA 4	IR 100%	王琪等,2001
凹叶厚朴 M. officinalis subsp. biloba	茎段 Stem	С	B5+2,4-D 2+6-BA 1	IR 91.7%	谢燕燕等,2017
厚朴 M. officinalis	嫩茎 Juvenile stem	С	B5+6-BA 3+2,4-D 3	IR 70.7%	黄树军等,2013
墨西哥大叶木兰 M. dealbata	嫩叶 Young leaf	C B R	MS+2,4-D 1.5+KT 1.5 MS+TDZ 1.5+AC 250 MS+IAA 0.5	IR 95%	Domínguez 等, 2010
紫玉兰 M. liliflora	幼嫩花瓣 Tender petal	С	MS+6-BA1+NAA 0.5	IR 31.1%	赵松峰,2009
白玉兰 M. denudata	花药 Anther	С	MS+6-BA 1+NAA 3	得到愈伤组织 Obtaining callus	李桂荣等,2013
含笑属 Michelia					
深山含笑 M. maudiae	上下胚轴 Epicotyl, hypocotyl	C B R T	MS+2,4-D 2+BA 3+NAA 0.2 MS+BA 2+NAA 0.2 1/2MS+NAA 0.5 塑料泡沫:椰糠:河沙(Plastic foam: Coconut bran: River sand)=2:2:1	IR 95% DR 40% TR 92%	曾宋君等,2000
乐昌含笑 M. chapensis	嫩叶 Young leaf	C B	1/2MS+NAA 0.5 MS+GA <sub>3</sub> 2+6-BA 1+IAA 0.1	IR 96.7% DR 71%	吴月燕和 袁东明,2001
乐昌含笑 M. chapensis	茎段 Stem	С	MS+6-BA 1.5+NAA 0.5+PVP 250	IR 50%	陈卫军等,2005
云南含笑 M. yunnanensis	嫩叶 Young leaf	С	MS+6-BA 1+NAA 0.1	IR 60%	刘芳等,2011
黄兰含笑 M. champaca	叶轴 Rachis	С	1/2MS+2,4-D 0~1.1+6-BA 0.02~0.2	得到愈伤组织 Obtaining callus	Lai & Lee, 1994
黄兰含笑 M. champaca	叶柄 Petiole	С	B5+2,4-D 8	IR 38%	Shukla, 2014
黄兰含笑 M. champaca	腋芽 Axillary bud	С	MS+IAA 0.1+2,4-D 0.1	得到愈伤组织 Obtaining callus	Abdelmageed 等, 2012
木莲属 Manglietia					
华木莲 M. decidua	叶 Leaf	С	MS+6-BA 1.5+IBA 0.15	IR 38%	尤润等,2019

注:培养阶段 C、B、R、T 分别为愈伤诱导、芽分化、生根、移栽的英文缩写;相对应的培养结果 IR、DR、RR、TR 分别为诱导率、分化率、生根率、移栽成活率的英文缩写。

Note: Culture stages C, B, R and T are the abbreviations of callus induction, bud differentiation, rooting and transplanting, respectively; the corresponding results IR, DR, RR and TR are the induction rate, differentiation rate, rooting rate and transplanting survival rate, respectively.

幼胚离体培养的最适增殖培养基是 B5+6-BA 2 mg · L<sup>-1</sup>+NAA 0.04 mg · L<sup>-1</sup>+IBA 0.5 mg · L<sup>-1</sup>+AC 1 g · L<sup>-1</sup>,增殖系数超过 3.6(陆秀君等,2008)。适

合凹叶厚朴增殖的培养基为 MS+6-BA 2.5 mg · L<sup>-1</sup> +NAA 0.5 mg · L<sup>-1</sup>,增殖系数可达 6.2(马英姿等, 2014)。由于木兰科植物种子中酚类物质含量较 多且易出现褐化,因此在培养基中往往加入 AC (陆秀君等,2008)或 4~8 g·L<sup>-1</sup>的聚乙烯吡咯烷 酮(PVP)来抑制其褐化(刘英,2021)。

由于木兰科植物成熟种子休眠期较长,休眠 延长了种子的萌发进程,因此直接利用木兰科植 物成熟种子启动离体培养的研究相对较少。目前 仅见的报道是 Sokolov 等(2014)对广玉兰和二乔 玉兰的研究,具体的做法是先对种子层积处理 30 d和 90 d后再进行离体培养,其种子萌发培养基 为 MS+6-BA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>,萌发植株生长良好,层 积处理后的种子在离体条件下的发芽率和成活率 均好于直接播种。

## 5 技术难点

#### 5.1 褐化

褐化在木兰科植物的组培过程中普遍存在, 外植体的褐化影响了多种木兰科植物芽的萌发、 愈伤组织的增殖与分化(刘均利和马明东,2007; 刘叶蔓等,2008),导致组培效率不高,从而限制了 组培苗大规模的生产(周丽艳等,2008;王欢等, 2012)。对于木兰科植物易褐化的问题,前人通过 外植体类型选择、采条季节选择、外植体预处理方 式、添加抗氧化剂、暗培养等多种方法加以抑制, 并取得了较好的效果。

(1)外植体类型选择:由于不同外植体中多酚 氧化酶(PPO)与酚类物质各异,因此选择低 PPO 活性或低酚类含量的外植体可有效降低褐化程 度,如天女木兰的侧芽作为外植体,褐化程度较之 其他部位要低(徐石等,2008;王欢等,2012)。

(2)采条季节选择:植物在不同季节的代谢活动有强弱,PPO的活性有所不同,如白玉兰外植体在春、冬两季取材 PPO 活性较低且褐化率较低(周丽艳等,2008;王欢等,2012)。

(3)外植体的预处理方式:接种前的预处理包括浸泡外植体与低温预处理,如在清水中浸泡12h以上(王奇等,2009)、在1g·L<sup>-1</sup>维生素 C(VC)或 PVP 溶液中浸泡 4~6h(王欢等,2012;王倩颖等,2017)、4℃低温预处理 5~7d(朱碧华等,2009)、8℃低温暗培养4d(刘均利和马明东,2007)都可以有效减轻褐化。

(4)暗培养:黑暗环境可以抑制 PPO 的活性, 培养初期一定时间的暗培养可以降低褐化率(周 丽艳等,2008;王欢等,2012)。

(5)培养基类型:培养基中 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>浓度过高可 能会导致褐化,如相较于高浓度 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>的 MS 培养 基,B5 培养基降低了天女木兰外植体的褐化率 (王欢等,2012)。

(6) 植物生长调节剂: 6-BA、KT 等细胞分裂素 既能促进酚类化合物的合成,又能刺激 PPO 的活 性。6-BA 对二乔玉兰的芽中酚类物质的产生具有 调节作用,随着 6-BA 浓度的升高(0.2~1 mg·L<sup>-1</sup>), 酚类物质含量呈上升趋势(Wojtania et al., 2015)。

(7)添加抗氧化剂、吸附剂:向培养基中添加 适宜浓度的抗氧化剂[如柠檬酸(CA)、VC、硝酸银 (AgNO<sub>3</sub>)]或吸附剂(如 PVP、AC)能有效抑制褐 化。CA 通过降低 POD 活性或结合培养基中的金 属离子抑制 PPO 的活性,防止酶促褐变;AgNO,通 过降低 MS 培养基中易引起酚类物质产生的 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 来抑制褐变,而AC、PVP则是通过吸附外植体产 生的醌类物质来抑制褐变。适宜的抗褐化剂因基 因型与外植体种类的不同而异(王倩颖等,2017), 如 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、CA 对白玉兰外植体的抑褐效果好于 PVP、VC(周丽艳等,2008),而 PVP、VC 对天女木 兰外植体抗褐化效果却更好(王欢等,2012;高红 兵等,2017)。景宁木兰(Magnolia sinostellata)叶 片最佳抗褐化剂为 AgNO3, 而带芽茎段和根部的 最优抗褐化剂为 CA(王倩颖等,2017)。由于过高 浓度的 PVP 和 AC 会抑制芽的增殖和根的形成 (Parris et al., 2012),因此需要探索抗褐化剂的适 宜浓度。一般 VC 使用的最适浓度为 500 mg · L<sup>-1</sup>, PVP 最适浓度为1000~1500 mg · L<sup>-1</sup>, CA 最 适浓度为 300 mg · L<sup>-1</sup>(高红兵等, 2017), AC 浓度 以 0.5% 为佳(曾宋君等, 2000; 陆秀君等, 2008)。

目前,木兰科植物组培的褐化问题主要通过 在培养基中添加抗褐化剂来抑制,除了上述提到 的抗褐化剂外,抗氧化剂一类中的植酸、L-半胱氨 酸、甘露醇、血清白蛋白等未见应用于木兰科植物 的组培,可在未来的实验中尝试。此外,螯合剂乙 二胺四乙酸二钠(EDTA)可替代蛋白质与多酚氧 化酶类进行螯合,减少酚的氧化作用;PAL抑制剂 2-氨 基 茚 满-2-膦 酸 (2-aminoindane-2-phosphonic acid,AIP)可以通过抑制苯丙氨酸生物合成来减少 褐变(Jones & Saxena, 2013);表没食子儿茶素没 食子酸酯(EGCG)可以通过抑制 PPO 以抑制褐变 (Saeleaw et al., 2017);高剂量的纳米碳可以防止 褐化现象(冯璐等,2017)。这些不同抗褐化剂对 褐化的抑制效果,都将成为未来研究的内容。

### 5.2 生根困难

木本植物组织培养普遍存在生根困难问题, 如紫花含笑(*Michelia crassipes*)组培苗生根率仅有 33%(朱碧华等,2009),紫玉兰带芽茎段组培苗生 根率仅有 35%(陆秀君等,2009),玉兰品种'Ann' 的生根率只有 16%(Parris et al., 2012),而有些种 类甚至无法生根,只能进行到增殖培养阶段(郑珂 媛,2017;杨梅等,2017;尤润等,2019)。

基因型、树种产地、培养条件等都可能是影响 生根的因素,前人通过改善生根培养的条件、改变 生根的方式等技术措施来促进生根。调节培养基 中的生长调节剂种类和浓度等可以促进生根,如 对难以生根的木兰品种'黄鸟'可以通过降低其生 根培养基中的蔗糖浓度(20g·L<sup>-1</sup>)来促进有效生 根(Wojtania et al., 2019);添加低浓度的 AC 可优 化生根效果(陈金慧和施季森,2002; Parris et al., 2012);添加适宜的生根剂如新型植物活性剂DA-6 有利于天女木兰组培苗生根(孙铭鸿等,2012)。 对生根类型为诱导生根型的一些木兰科植物如紫 花含笑(宋晓琛等,2014),可以适当调整培养基成 分,诱导出愈伤组织,从而促进其不定根的形成。 改变生根方式,如试管外生根、浸泡生根法是提高 生根率的途径,郭治友等(2008)利用试管外生根 将杂交鹅掌楸组培苗的生根率提高至83.3%。此 外,间歇浸没式培养系统是近年来发展起来的一 种植物组织培养系统,较之传统的固体培养,具有 培养周期短、增殖率高、自动化程度高、培养通量 大等特点(张杰等,2020),利用此系统或可促进 生根。

6 研究展望

在我国木兰科植物的组织培养研究中,无菌 短枝扦插途径的再生体系已相对完善,从灭菌到 启动、增殖、生根的培养基与生长调节剂的选择虽 有大量研究,但研究的植物种类有限。顶芽、茎段 相较于其他外植体易于获得且诱导率高,无菌短 枝扦插途径作为木兰科植物组织培养的主要再生 途径,应考虑将更多具有优良特性的野生种质资 源纳入研究范围。

器官发生途径、体细胞胚发生途径研究相对

尚浅,器官发生途径中选择的外植体类型有限,其 他植物中最常用于诱导愈伤组织的叶片却因为褐 化而难以诱导愈伤,并且仅有极少的种类能诱导 愈伤组织再分化为芽。体细胞胚发生途径在国内 鲜有研究,并且存在体胚诱导率和分化成苗率低 的问题。此外,木兰科植物组培中普遍存在褐化 与生根困难的技术难题,目前尚未从根源上得到 解决,这也限制了组培苗的大批量繁殖。

针对上述问题,未来木兰科植物的组织培养 需围绕以下几个方面重点展开研究。(1)全面探 索木兰科不同植物种类的组织培养,特别是木兰 属、含笑属以外的种类,通过组培的技术手段,保 存更多珍稀濒危的野生种质资源:对于已经建立 再生体系的品种,可进一步优化再生培养条件,提 高再生效率,以备工厂化育苗之需。(2)探索更多 种类的外植体的离体再生,尝试雄蕊、雌蕊、花被、 花柱、花托、子房、叶柄、根等不常见的外植体种 类。(3)针对增殖系数普遍较低的问题,可以通过 研究增殖期间内源激素的变化来确定适宜的外源 激素浓度与配比,并考虑环境因子如温度和光照 对增殖的影响。(4)对于褐化问题,除探讨外植体 类型与取材时期、预处理方式、不同种类的抗氧化 剂、吸附剂对于褐化的抑制效果外,应结合酚类物 质、PPO 等相关酶的活性测定,鉴定褐化反应的底 物,并研究组培褐化的分子调控机制,进一步揭示 褐化机理,从而通过改变相关基因的表达从根源 上减少褐化。(5)对于生根困难问题,可以通过改 善生根培养的条件、改变生根的方式和添加适宜 的生根剂来促进生根,并对生根的组培苗生理生 化指标进行分析,在此基础上进行解剖学观察,判 断生根类型、研究生根机理。(6)体细胞胚胎培养 作为再生途径之一,可以克服生根困难的问题,但 在国内却鲜有研究,应作为未来探索的重点。

在组培技术的应用方面,木兰科植物中珍稀 濒危的种类众多,少数种如景宁木兰(Magnolia sinostellata)、华木莲(Manglietia decidua)等的组织 培养虽有初步研究(王倩颖等,2017;尤润等, 2019),以及结合液滴玻璃化技术低温保存 'Ashei'木兰(Magnolia macrophylla var. ashei)离 体茎尖的例子(Folgado & Panis, 2019),但木兰科 更多的濒危物种的种质资源有待利用组培技术保 存。木兰科中一些种类如厚朴和凹叶厚朴等具有 重要的药用价值,其组织培养和高产细胞系的建 立能够为批量生产中药材原料药和厚朴酚类药物 奠定基础。此外,组培技术还是基因工程技术的 基础,将在木兰科植物基因功能验证、品种改良及 优良新品种选育等方面发挥更大作用。

### 参考文献:

- ABDELMAGEED AHA, FARIDAH QZ, JULIA AA, et al., 2012. Callus induction and plant regeneration of *Michelia champaca* (Magnoliaceae): A multipurpose tree [J]. J Med Plant Res, 6(17): 3338-3344.
- ARMIYANTI, 2012. Establishment of plant regeneration of Michelia champaca L. through cell suspension culture technique [J]. J Med Plant Res, 6(8): 1394-1402.
- CHEN F, CHEN Q, CHEN J, 2005. Tissue culture of *Parakmeria yunnanensis* [J]. Plant Physiol Commun, 41 (4): 494. [陈芳, 陈强, 陈娟, 2005. 云南拟单性木兰的 组织培养 [J]. 植物生理学通讯, 41(4): 494.]
- CHEN JH, 2003. Studies on the somatic embryogenesis of Liriodendron × sinoamericanum [D]. Nanjing: Nanning Forestry University. [陈金慧, 2003. 杂交鹅掌楸体细胞胚 胎发生研究 [D]. 南京:南京林业大学.]
- CHEN JH, SHI JS, 2002. Rooting and transplant techniques tissue culture of *Liriodendron chinense* [J]. Chin For Sci Technol, 16(5): 21-22. [陈金慧, 施季森, 2002. 鹅掌楸 组培苗的生根及移栽技术 [J]. 林业科技开发, 16(5): 21-22.]
- CHEN JH, ZHANG YJ, WU YY, et al., 2013. Effects of phytosulfokine on the somatic embryogenesis of *Liriodendron* hybrids (*L. chinense* × *L. tulipifera*) [J]. Sci Silv Sin, 49(2): 33-38. [陈金慧,张艳娟,吴亚云,等, 2013. 植物磺肽素在杂交鹅掌楸体胚发生中的作用 [J]. 林业科学, 49(2): 33-38.]
- CHEN WJ, GONG XS, WANG LB, 2005. Preliminary study on propagation techniques in *Michelia chapensis* [J]. Non-wood For Res, 23(4): 62-64. [陈卫军, 龚洵胜, 王利宝, 2005. 乐昌含笑繁殖初探 [J]. 经济林研究, 23(4): 62-64.]
- CHENG TL, MENG Y, CHEN JH, et al., 2017. Effects of methyl jasmonic acid on somatic embryogenesis of *Liriodendron* hybrid [J]. J Nanjing For Univ, 41(6): 41-46. [成铁龙, 孟岩, 陈金慧, 等, 2017. 茉莉酸甲酯对 杂交鹅掌楸体胚发育的影响 [J]. 南京林业大学学报, 41(6): 41-46.]
- CORTAZAR CA, ROSASMM, OYAMA K, et al., 2020. Induction of somatic embryogenesis and evaluation of genetic stability in regenerated plants of *Magnolia dealbata* [J]. Biol Plant, 64(48): 224–233.
- CUI YY, DENG YW, ZHENG KY, et al., 2019. An efficient micropropagation protocol for an endangered ornamental tree species (*Magnolia sirindhorniae* Noot. & Chalermglin) and assessment of genetic uniformity through DNA markers [J]. Sci Rep, 9(1): 9634.

- DENG YW, LIN JY, WU QN, et al., 2018. Overview in tissue culture of *Magnolia* [J]. For Environ Sci, 34 (5): 118-124. [邓演文, 林洁莹, 吴乔娜, 等, 2018. 木兰属植物组织培养技术研究综述 [J]. 林业与环境科学, 34(5): 118-124.]
- DOMÍNGUEZ F, CHÁVEZ M, GARDUÑO-RAMÍREZ ML, et al., 2010. Honokiol and magnolol production by *in vitro* micropropagated plants of *Magnolia dealbata*, an endangered endemic Mexican species [J]. Nat Prod Commun, 5(2): 235–240.
- DU FG, DIAO SQ, WANG H, et al., 2006. Tissue culture of *Magnolia sieboldii* K. Koch [J]. J NE For Univ, 34(2): 42-43. [杜凤国, 刁绍起, 王欢, 等, 2006. 天女木兰的组 织培养 [J]. 东北林业大学学报, 34(2): 42-43.]
- DU T, SHANG Y, YANG H, et al., 2013. The studies on technologies for quick propogation and callus induction of *Michelia yunnanensis* [J]. J Yuannan Agric Univ, 28(4): 530-535. [都婷, 商雨, 杨辉, 等, 2013. 云南含笑组织培 养快繁技术及愈伤组织诱导研究 [J]. 云南农业大学学 报, 28(4): 530-535.]
- FENG L, WANG YG, WEN YY, et al., 2017. Effects of nano carbon on the growth and differentiation of several plants *in vitro* culture [J]. Biotechnol Bull, 33(4): 164-168. [冯 璐, 王玉国, 温银元,等, 2017. 纳米碳对离体培养条件 下几种植物生长及分化的影响 [J]. 生物技术通报, 33(4): 164-168.]
- FOLGADO R, PANIS B, 2019. Cryopreservation of Ashe magnolia shoot tips by droplet-vitrification [J]. Acta Hortic, 1234: 233-240.
- FU XY, LI H, YU GY, et al., 2009. Callus induction of Magnolia obovata [J]. J NW For Univ, 24(1): 71-73. [付 晓云,李慧,于光艳,等, 2009. 日本厚朴愈伤组织诱导 的研究 [J]. 西北林学院学报, 24(1): 71-73.]
- GAN L, LI K, WANG XQ, et al., 2010. Tissue culture of *Parakmeria yunnanensis* Hu [J]. J Guangxi Agric Sci, 41(3): 210-212. [甘露, 李凯, 王小青, 等, 2010. 云南 拟单性木兰组织培养初步研究 [J]. 广西农业科学, 41(3): 210-212.]
- GAO HB, DU FG, WANG H, 2017. Effects of browning inhibitors on bud explants browning and phenolic acids oxidation of *Magnolia sieboldii* K. Koch [J]. For Sci Res, 30(3): 525-532. [高红兵, 杜凤国, 王欢, 2017. 抗褐化 剂对天女木兰芽外植体褐化与酚酸氧化的影响 [J]. 林 业科学研究, 30(3): 525-532.]
- GUO ZY, XIAO GX, LONG YX, et al., 2008. Tissue culture and *in vitro* rapid propagation of the rare plant *Liriodendron chinense* [J]. Pract For Technol, (4): 42-43. [郭治友,肖 国学,龙应霞,等, 2008. 珍稀植物鹅掌楸组织培养与离 体快繁技术 [J]. 林业实用技术, (4): 42-43.]
- HE PQ, FANG XP, YI Y, 2010. Optimization of induction condition for callus of *Magnolia officinalis* [J]. Guizhou Agric Sci, 38(7): 20-21. [何培琦, 方小平, 乙引, 2010. 厚朴愈伤组织诱导条件的优化 [J]. 贵州农业科 学, 38(7): 20-21.]
- HUANG SJ, YANG Y, CHE Z, et al., 2013. Study on the

callus initiation culture of *Magnolia* shoots [J]. J Agric, 3(8): 41-46. [黄树军,杨阳,车志,等, 2013. 厚朴苗愈 伤组织启动培养研究 [J]. 农学学报, 3(8): 41-46.]

- JIN LL, ZHANG LP, 2018. Studies on tissue culture of stem sections in *Magnolia officinalis* var. *pubescens* [J]. For By-Prod Special Chin, (5): 24–25. [金丽丽, 张丽萍, 2018. 厚 朴茎段的组织培养 [J]. 中国林副特产, (5): 24–25.]
- JONES AM, SAXENA PK, 2013. Inhibition of phenylpropanoid biosynthesis in Artemisia annua L.: A novel approach to reduce oxidative browning in plant tissue culture [J]. PLoS ONE, 8 (10): e76802.
- KAMENICKA A, 1998. Influence of selected carbohydrates on rhizogenesis of shoots saucer *Magnolia in vitro* [J]. Acta Physiol Plant, 20(4): 425-429.
- KAMENICKA A, LANAKOVA M, 2000. Effect of medium composition and type of vessel closure on axillary shoot production of *Magnolia in vitro* [J]. Acta Physiol Plant, 22(2): 129-134.
- KIM TD, KIM JA, LEE NN, et al., 2020. Multiple shoot induction and plant regeneration from axillary buds of *Magnolia* 'Vulcan' [J]. J Plant Biotechnol, 47 (1): 40-45.
- KIM YW, PARK SY, PARK IS, et al., 2007. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature seeds of *Magnolia obovata* Thunberg [J]. Plant Biotechnol Rep, 1(4): 237-242.
- KONG YY, 2018. Evaluation of Magnoliaceae plant resources and construction of magnolia garden in Hainan Island [D]. Haikou: Hainan University. [孔焱焱, 2018. 海南岛 木兰科植物资源评价与木兰园的建设 [D]. 海口: 海南 大学.]
- KONOPKOVA J, KOUTOVA D, FERUS P, 2020. Genotypespecific requirements for *in vitro* culture initiation and multiplication of *Magnolia* taxa [J]. Folia Oecol, 47(1): 34-44.
- LAI YC, LEE WC, 1994. The initiation of callus culture of Michelia champaca for essential oil production [J]. Biotechnol Lett, 16(1): 85-88.
- LI GR, LIU YB, LIU WJ, 2013. Study on the callus and embryoid induction of anther of *Magnolia denudata* [J]. N Hortic, (3): 99-101. [李桂荣,刘玉博,刘婉君, 2013. 白玉兰花药愈伤组织以及胚状体诱导的研究 [J]. 北方园艺, (3): 99-101.]
- LI X, WANG SF, JIANG XH, 2005. Tissue culture and plantlet regeneration of *Michelia macclurei* Dandy [J]. Plant Physiol Commun, 41(6): 783. [李雪, 王淑芬, 蒋雄辉, 2005. 醉香含笑的组织培养与植株再生 [J]. 植物生理学 通讯, 41(6): 783.]
- LI Y, WANG Q, LI HY, et al., 2005. Tissue culture of 3 species of *Magnolia* L. [J]. Plant Physiol Commun, 41(5): 633. [李艳, 王青, 李洪艳, 等, 2005. 3 种玉兰的组织培养 [J]. 植物生理学通讯, 41(5): 633.]
- LIU F, HUANG YL, ZHU YZ, et al., 2011. Rapid propagation technique of tissue culture of *Michelia yunnanensis* [J]. Yunnan Agric Sci Technol, (2): 12-13. [刘芳, 黄玉玲,

朱跃珍,等,2011. 云南含笑组织培养快繁技术 [J]. 云南农业科技,(2):12-13.]

- LIU JL, MA MD, 2007. Study on browning of endangered *Manglietiastrum sinicum* in tissue culture [J]. J Zhejiang For Sci Technol, 27(1): 20-23. [刘均利, 马明东, 2007. 华 盖木组织培养中褐化控制研究 [J]. 浙江林业科技, 27(1): 20-23.]
- LIU Y, 2021. Tissue culture via seed embryo for *Michelia macclurei* [J]. Bull Bot Res, 41(1): 79-88. [刘英, 2021. 火力楠种胚组培快繁研究 [J]. 植物研究, 41(1): 79-88.]
- LIU YH, ZHOU RZ, ZENG QW, 1997. Ex situ conservation of Magnoliaceae including its rare and endangered species [J]. J Trop Subtrop Bot, 5(2): 1–12. [刘玉壶,周仁章, 曾庆文, 1997. 木兰科植物及其珍稀濒危种类的迁地保护 [J]. 热带亚热带植物学报, 5(2): 1–12.]
- LU XJ, DONG Y, JIN YR, et al., 2009. Tissue culture of *Magnolia liliflora* Desr. [J]. N Hortic, (11): 189-191.
  [陆秀君,董阳,金亚荣,等, 2009. 紫玉兰的组织培养 [J]. 北方园艺, (11): 189-191.]
- LU XJ, XU S, LI TL, et al., 2008. Embryo culture and rapid propagation of *Magnolia sieboldii* [J]. J NE For Univ, 36(3): 5-7. [陆秀君, 徐石, 李天来, 等, 2008. 天女木 兰幼胚离体培养及组织快繁 [J]. 东北林业大学学报, 36(3): 5-7.]
- LUO ZQ, LIU L, ZHOU DG, 2010. Experimental research on callus induction and embryoid body formation of *Magnolia liliflora* Desr. [J]. Mod Agric Sci Technol, (20): 221. [罗 在柒, 刘兰,周大刚, 2010. 紫玉兰愈伤组织的诱导及胚 状体获得试验研究 [J]. 现代农业科技, (20): 221.]
- MA YZ, XU H, WANG ZY, et al., 2014. Establishment of rapid propagation system of *Magnolia officinalis* subsp. *biloba* [J]. Chin Trad Herb Drugs, 45(12): 1769-1774. [马英 姿, 许欢, 王志毅, 等, 2014. 凹叶厚朴快繁技术体系的 建立 [J]. 中草药, 45(12): 1769-1774.]
- MARIA R, 2012. Comparative study on the *in vitro* multiplication potential of *Magnolia stellata* and *Magnolia* × *soulangiana* species [J]. J Hortic For, 16(2): 39-44.
- MENG X, 2005. Tissue culture and rapid propagation of *Magnolia denudata* [J]. Plant Physiol Commun, 41(3): 339. [孟雪, 2005. 白玉兰的组织培养和快速繁殖 [J]. 植物生理学通讯, 41(3): 339.]
- MERKLE SA, WATSON BA, 1993. Regeneration of big-leaf Magnolia by somatic embryogenesis [J]. HortScience, 28(6): 672-673.
- MERKLE SA, WATSON BA, 1994. Ex vitro conversion of pyramid Magnolia somatic embryos [J]. HortScience, 29(10): 1186-1188.
- MERKLE SA, WIECKO AT, 1990. Somatic embryogenesis in three *Magnolia* species [J]. J Am Soc Hortic Sci, 115(5): 858-860.
- MIN W, CHEN ZP, 2007. Plantlet regeneration of Michelia wilsonii Finet et Gagnep. in vitro [J]. Plant Physiol Commun, 43(3): 519-520. [闵炜, 陈志萍, 2007. 峨眉含 笑试管培养再生植株 [J]. 植物生理学通讯, 43(3):

519-520.]

- NING Y, JIN XL, CHEN J, et al., 2015. Study on axillary bud induction of stem segments of *Parakmeria lotungensis*[J]. Contemp Hortic, (3): 3-4. [宁阳, 金晓玲, 陈洁, 等, 2015. 乐东拟单性木兰茎段腋芽诱导研究 [J]. 现代 园艺, (3): 3-4.]
- PARK IS, KOISO M, MORIMOTO S, et al., 2012. Plant regeneration by somatic embryogenesis from mature seeds of *Magnolia obovata* [J]. J Wood, 58(1): 64-68.
- PARRIS JK, TOUCHELL DH, RANNEY TG, et al., 2012. Basal salt composition, cytokinins, and phenolic binding agents influence *in vitro* growth and *ex vitro* establishment of *Magnolia* 'Ann' [J]. HortScience, 47 (11): 1625–1629.
- QIAO MJ, 2013. Tissue culture of rare species *Manglietia glauca* in Guangxi [J]. J S Agric, 44(6): 989-993. [乔梦 吉, 2013. 广西优良珍贵树种灰木莲的组织培养 [J]. 南 方农业学报, 44(6): 989-993.]
- REN GP, WANG XJ, ZHU GF, 2016. Effect of LED in different light qualities on growth of *Phalaenopsis plantletse* [J]. Bull Bot, 51(1): 81-88. [任桂萍, 王小菁, 朱根发, 2016. 不同光质的 LED 对蝴蝶兰组织培养增殖及生根的 影响 [J]. 植物学报, 51(1): 81-88.]
- ROSAS M, JIMÉNEZ-RODRÍGUEZ Á, CHÁVEZ-AVILA VM, 2006. Somatic embryogenesis and organogenesis in *Magnolia dealbata* Zucc. (Magnoliaceae), an endangered, endemic Mexican species [J]. HortScience, 41(5): 1325–1329.
- SAELEAW T, BENJAKUL S, SIMPSON BK, 2017. Effect of catechin and its derivatives on inhibition of polyphenoloxidase and melanosis of Pacific white shrimp [J]. J Food Sci Technol, 54 (5); 1-10.
- SHUKLA S, 2014. Callus induction of *Michelia champaca* L. through petiole — an aromatic tree of high economic value [J]. Int J Enhanc Res Sci Technol Eng, 3(1): 438-442.
- SOKOLOV RS, ATANASSOVA BY, IAKIMOVA ET, 2014. Physiological response of *in vitro* cultured *Magnolia* sp. to nutrient medium composition [J]. J Hortic Res, 22(1): 49-61.
- SOKOLOV RS, ATANASSOVA BY, IAKIMOVA ET, 2015. Influence of iron sources in the nutrient medium on *in vitro* shoot multiplication and rooting of *Magnolia* and cherry plum [J]. J Hortic Res, 23(2): 27–38.
- SONG HF, LIU HP, 2014. Plant resources and utilization of Magnoliaceae [J]. Agric Technol, 34(7): 107. [宋怀芬, 刘会萍, 2014. 木兰科植物资源及其利用 [J]. 农业与技术, 34(7): 107.]
- SONG XC, CHENG QQ, DAI XY, et al., 2014. Rooting mechanism research of tissue culture based on micro-anatomy in *Michelia crassipes* [J]. Jiangxi For Sci Technol, 42(3): 1-4. [宋晓琛, 程强强, 戴小英, 等, 2014. 紫花含笑组培 苗生根解剖机理研究 [J]. 江西林业科技, 42(3): 1-4.]
- SUN MH, AN N, ZHOU Q, et al., 2012. Study on callus induction and establishment of regeneration system for *Magnolia sieboldii* [J]. Chin Hortic Abs, 28(4): 6-8. [孙 铭鸿, 安娜, 周清, 等, 2012. 天女木兰嫩茎愈伤组织诱

导及再生体系建立研究 [J]. 中国园艺文摘, 28(4): 6-8.]

- SUN XB, SU JL, CHEN SS, et al., 2020. Plantlet regeneration from leaves of tissue culture seedlings of *Hydrangea macrophylla* 'Endless Summer' [J]. Chin Agric Sci Bull, 36(16): 67-72. [孙晓波,苏家乐,陈双双,等, 2020. 大 花绣球'无尽夏'组培苗叶片再生植株的研究 [J]. 中国 农学通报, 36(16): 67-72.]
- TAN XM, LIU M, WAN ZZ, et al., 2018. Native plant resources of Magnoliaceae in Yunnan and their application in landscape architecture [J]. Contemp Hortic, (7): 119– 120. [谭秀梅, 刘敏, 万珠珠, 等, 2018. 云南木兰科 (Magnoliaceae)乡土植物资源及其园林应用现状 [J]. 现 代园艺, (7): 119–120.]
- TAN ZF, HONG YH, HU C, 2003. In vitro culture of Magnolia grandiflora [J]. J Hunan Agric Univ, 29(6): 478-481.
  [谭泽芳, 洪亚辉, 胡超, 2003. 广玉兰的离体培养研究 [J]. 湖南农业大学学报, 29(6): 478-481.]
- TANG JR, GAO Z, LIU TY, et al., 2014. Selection and disinfection methods of explants of *Magnolia delavayi* in tissue culture [J]. Guizhou Agric Sci, 42(11): 42-45. [唐 军荣,高柱,刘腾云,等, 2014. 红花山玉兰组织培养外 植体的选择及其消毒方法 [J]. 贵州农业科学, 42(11): 42-45.]
- WANG H, DU FG, ZHANG ZX, 2012. Study on browning controlling of *Magnolia sieboldii* in tissue culture [J]. Hubei Agric Sci, 51 (14): 3107–3109. [王欢, 杜凤国, 张志翔, 2012. 天女木兰组织培养的抗褐化研究 [J]. 湖北农业科 学, 51 (14): 3107–3109.]
- WANG H, DU Y, WANG ZM, et al., 2013. Propagation techniques of softwood cutting of *Magnolia sieboldii* [J]. For Sci Technol, 38(4): 45-47. [王欢, 杜悦, 王子明, 等, 2013. 天女木兰嫩枝扦插繁殖技术 [J]. 林业科技, 38(4): 45-47.]
- WANG Q, WANG ZZ, LI YL, 2001. Study on tissue culture of *Magnolia grandiflora* L. [J]. NW Pharm J, 16(1): 11-13. [王琪, 王喆之, 李映丽, 2001. 荷花玉兰组织培养的研究 [J]. 西北药学杂志, 16(1): 11-13.]
- WANG Q, DENG LL, WANG L, 2009. Study on tissue culture of *Magnolia delavayi* var. *rubra* (*f. rubra*) [J]. Shandong For Sci Technol, 39(1): 33-34. [王奇, 邓莉兰, 王丽, 2009. 红花山玉兰组织培养研究 [J]. 山东林业科技, 39(1): 33-34.]
- WANG QY, TANG JN, LIU ZG, et al., 2017. Explant selecting and anti-browning of *Magnolia sinostellata* in tissue culture [J]. Guihaia, 37(9): 1088-1095. [王倩颖, 唐佳 妮, 刘志高, 等, 2017. 景宁木兰组织培养外植体选择与 抗褐化研究 [J]. 广西植物, 37(9): 1088-1095.]
- WANG SY, LU JM, ZHU TH, 2017. In vitro culture of young stem segments of dwarf Magnolia grandiflora [J]. Shanghai Agric Sci Technol, (1): 76-77. [王水燕, 陆锦明, 朱天 华, 等, 2017. 小叶矮生型广玉兰嫩茎段离体培养方法 [J]. 上海农业科技, (1): 76-77.]
- WOJTANIA A, SKRZYPEK E, MARASEK-CIOLAKOWSKA A, 2019. Soluble sugar, starch and phenolic status during

rooting of easy- and difficult-to-root magnolia cultivars [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 136: 499-510.

- WOJTANIA A, SKRZYPEK E, GABRYSZEWSKA E, 2015. Effect of cytokinin, sucrose and nitrogen salts concentrations on the growth and development and phenolics content in *Magnolia× soulangiana* 'Coates' shoots *in vitro* [J]. Acta Sci Pol-Hortic Cultus, 14(3): 51–62.
- WU YY, LIU XL, WANG CS, 2007. Root induction during tissue culture of *Michelia chapensis* Dandy [J]. Acta Hortic Sin, 34(4): 991-994. [吴月燕, 刘秀莲, 汪财生, 2007. 乐昌含笑组织培养过程中根的诱导 [J]. 园艺学报, 34(4): 991-994.]
- WU YY, YUAN DM, 2001. Study on the induction and differentiation conditions of bud and callus *in vitro* culture of *Michelia chapensis* Dandy [C]//Proceedings of the Ninth Annual Meeting of Zhejiang Horticultural Society. Ningbo: Zhejiang Horticultural Society: 219-223. [吴月燕, 袁东明, 2001. 乐昌含笑离体培养中芽和愈伤组织诱导与分化 条件的研究 [C]//浙江省园艺学会第九届年会论文集. 宁波:浙江省园艺学会: 219-223.]
- XIANG GF, YAN LH, JIANG LY, et al., 2019. Morphological and germination characteristics of *Parakmeria lotungensis* seeds from different provenances [J]. Chin Agric Sci Bull, 35(11): 61-64. [向光锋, 颜立红, 蒋利媛, 等, 2019. 不 同种源地乐东拟单性木兰种子的形态特征及萌发特性研 究 [J]. 中国农学通报, 35(11): 61-64.]
- XIE YY, WEI M, XIE DJ, et al., 2017. Study on the preparation of callus of *Magnolia officinalis* using on cell suspension culture [J]. J Hunan Univ Chin Med, 37(4): 365-368. [谢燕燕, 卫梅, 谢德金, 等, 2017. 凹叶厚朴用 于细胞悬浮培养的愈伤组织的制备研究 [J]. 湖南中医 药大学学报, 37(4): 365-368.]
- XU S, LU XJ, LI TL, 2008. Studies on tissue culture of Magnolia sieboldii to get bacteria-free explants [J]. J NW For Univ, 22(3): 127-129. [徐石,陆秀君,李天来, 2008. 天女木兰组织培养中有效获得无菌外植体的研究 [J]. 西北林学院学报, 22(3): 127-129.]
- YANG CH, DENG LX, ZHOU JW, 2017. Study on the resources and ornamental characteristics of the native Magnoliaceaes in Guizhou Province [J]. Guizhou For Sci Technol, 45(4): 19-23. [杨成华,邓伦秀,周家维, 2017. 贵州原生木兰科植物资源与观赏特性研究 [J]. 贵 州林业科技, 45(4): 19-23.]
- YANG M, LIU C, XIANG MD, et al., 2017. Explant initiation culture of endangered plant *Magnolia monocytogenes*[J]. Contemp Hortic, (7): 3-4. [杨梅, 刘畅, 向梦迪, 等, 2017. 濒危植物单性木兰外植体启动培养 [J]. 现代 园艺, (7): 3-4.]
- YOU R, WANG LL, CAO LY, et al., 2019. Preliminary study on stem segment tissue culture of *Manglietia decidua* [J]. Contemp Hortic, (17): 3-5. [尤润, 王玲玲, 曹璐

瑶,等,2019.华木莲茎段组织培养初探 [J].现代园艺,(17):3-5.]

- YU XJ, 2016. Preliminary study on establishment of *Magnolia sieboldip*'s gentic transformation regeneration system [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University. [于新杰, 2016. 天女木兰遗传转化再生体系建立初步探究 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学.]
- ZENG SJ, PENG XM, ZENG QW, 2000. Tissue culture and rapid propagation of *Michella maudlae* [J]. J Trop Subtrop Bot, 8(3): 264 – 268. [曾宋君,彭晓明,曾庆文, 2000. 深山含笑的组织培养和快速繁殖 [J]. 热带亚热带 植物学报, 8(3): 264–268.]
- ZHANG G, ZHU ZR, HAN TS, et al., 2016. Study on preservation technology of *Parakmeria lotungensis* antique tree germplasm resource [J]. Seed, 35(2):55-58. [张果, 朱忠荣, 韩堂松, 等, 2016. 乐东拟单性木兰(*Parakmeria lotungensis*)古树种质资源保存技术研究 [J]. 种子, 35(2):55-58.]
- ZHANG J, HU YH, ZHANG BH, et al., 2020. Micropropagation of *Dendrobium nobile* seedlings using temporary immersion bioreactor system [J]. J Agric Sci Technol, 22(10): 181-187. [张杰, 胡燕花, 张本厚, 等, 2020. 利用间歇浸没式植物生物反应器培养金钗石斛种 苗[J]. 中国农业科技导报, 22(10): 181-187.]
- ZHAO SF, 2009. Influence of different hormone combination on the petal callus induction of *Lily magnolia* [J]. Heilongjiang Agric Sci, (2): 12–13. [赵松峰, 2009. 不同激素组合对 辛夷花瓣愈伤组织诱导的影响 [J]. 黑龙江农业科学, (2): 12–13.]
- ZHENG KY, 2017. Preliminary study on tissue culture of Manglietia lucida B. L. Chen et S. C. Yang etc. several species Magnolia [D]. Guangzhou: South China Agricultural University. [郑珂媛, 2017. 亮叶木莲等珍稀木兰科植物 组织培养技术研究 [D]. 广州: 华南农业大学.]
- ZHOU LH, XU CY, ZENG L, et al., 2002. *Magnolia liliflora* Desr. tissue foster generation [J]. Econ For Res, 20(4): 37-38. [周丽华, 许冲勇, 曾雷, 等, 2002. 紫玉兰组织培 养繁殖研究 [J]. 经济林研究, 20(4): 37-38.]
- ZHOU LL, GUO ZQ, QIN ZY, et al., 2008. Browning control during tissue culture of *Magnolia denudata* Desr. [J]. J Hebei Norm Univ Sci Technol, 22(4): 19-22. [周丽艳, 郭振清, 秦子禹, 等, 2008. 白玉兰组织培养中的褐化控 制 [J]. 河北科技师范学院学报, 22(4): 19-22.]
- ZHU BH, HUANG BX, HUANG WC, et al., 2009. Study on tissue culture technique for *Michelia crassipes* Law [J]. J Anhui Agric Sci, 37(29): 14024-14027. [朱碧华, 黄宝 祥, 黄文超, 等, 2009. 紫花含笑的组织培养技术研究 [J]. 安徽农业科学, 37(29): 14024-14027.]

(责任编辑 蒋巧媛)



生物安全问题是人类文明发展到一定阶段的产物。随着生产水平的提高和人口的不断增加,大规模传染病 及人类因争夺土地和资源而爆发的各种战争,使得与生物安全有关的事件越来越多,影响越来越大,特别是在经 济全球化和生物技术快速发展的今天,生物安全已成为一个涉及政治、军事、经济、科技、文化和社会等诸多领域 的世界性安全与发展的基本问题,受到各国政府的空前关注和高度重视。

广义生物安全学是研究生物技术快速发展以及公共健康和生态系统免受危险生物因子及相关因素侵害的一 门学科,其内容涵盖现代生物技术研发及应用的安全性、生物多样性保护、实验室生物安全、流行病防控、环境与 生态安全,以及与生物科技相关的军事安全等诸多方面。该书主要介绍广义生物安全学的基本理论、技术原理、 研究概况及风险防范措施。全书共9章,内容包括实验室生物安全,转基因生物的安全性,食品安全与风险防控, 大规模流行病、生物恐怖及生物战,生物学及生态安全中的生物伦理,土壤、大气和水环境的生物安全性,农资产 品、重金属及新型污染物与生物安全,生物多样性的安全性,地质环境过程与生物安全等国际社会普遍关注的重 大生物安全问题。本书内容包含大量社会热点和前沿科学问题,有助于各类读者拓宽视野,增强对广义生物安全 学的认识和关注,提高系统分析和解决复杂问题的能力。每章均附有思考题、主要参考文献、拓展阅读和知识扩 展网址。该书内容不仅适合高等院校生物学、生态学、农学、林学、医学、环境科学、海洋科学和公共安全等专业的 高年级本科生和研究生,以及从事生物技术、环境工程、生态治理、生物保护、流行病防护等相关专业的技术人员 使用,也可作为普通大学生和各类企事业单位管理人员了解生物安全知识的通识读本。

由南京师范大学连宾教授担任主编,国内九所高校14名一线教师参加编写的《广义生物安全学》,已由科学出版社于2022年9月正式出版发行(责任编辑:刘畅、韩书云/责任校对:严娜;页数:312;字数:518400;定价:89元。ISBN 978-7-03-073035-0)。

科学出版社官网上订购网址:https://www.ecsponline.com/goods.php? id=217521



《广西植物》入选首批"林草科技重点期刊"



# 《广西植物》首次入选西牛奖"精品中文科技期刊"



# 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》一中文核心期刊
- ☆ 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一思博网(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11 期 2022年11月

# **GUIHAIA**

Monthly, Started in 1981

Vol. 42 No. 11 Nov. 2022

Sponsored by Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang

Supervised by Guangxi Academy of Sciences

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 西植物学 r 슺 名誉主编: 马克平 编:李先琨 主 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 XX 址: http://www.guihaia-journal.com 出版单位:斜 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:斜学出版社 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)

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) LLLi 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©
 国内外公开发行

●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●
 ●

