

硫化氢对白桦悬浮细胞中 IAA·ABA 和次生代谢物累积的影响

叶子诺, 翟明霞, 周文洋, 肖婉莹, 詹亚光, 范桂枝* (东北林业大学生命科学学院, 黑龙江哈尔滨 150040)

摘要 [目的]探究硫化氢(H_2S)对白桦悬浮细胞中吲哚乙酸(IAA)、脱落酸(ABA)以及多酚和三萜等次生代谢物累积的影响。[方法]采用酶联免疫吸附法、实时荧光定量 PCR 和比色法等分析 IAA 和 ABA 含量及其关键酶基因表达水平、黄酮和三萜等次生代谢物含量。[结果] H_2S 供体硫氢化钠(NaHS)处理对白桦悬浮细胞中 IAA、ABA 的累积存在浓度和时间效应,其中 1.0 mmol/L H_2S 供体 NaHS 处理 12 h 时 ABA 含量达最高值,比对照增加了 196.46%,而 IAA 含量在 0.1 mmol/L H_2S 供体 NaHS 处理 3 h 时达最高值,比对照增加了 5.55%。ABA 或 H_2S 处理后白桦悬浮细胞中次生代谢产物积累呈增加趋势,而 IAA 处理则相反。1.0 mmol/L H_2S 供体 NaHS 与不同浓度的 IAA 和 ABA 分别处理白桦悬浮细胞 24 h 后,不同程度地提高了白桦悬浮细胞中多酚、黄酮、三萜含量。其中,1.0 mmol/L ABA 与 NaHS 共同处理后白桦悬浮细胞中多酚、黄酮、三萜含量均达到最大值,分别比 NaHS 单独处理增加了 17.89%、14.74% 和 8.87%。[结论] H_2S 处理促进白桦悬浮细胞中 IAA、ABA 和次生代谢物的累积, H_2S 与 IAA 或 ABA 共同处理可进一步促进次生代谢产物的累积。

关键词 H_2S ; 白桦; IAA; ABA; 次生代谢产物

中图分类号 S792.153 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)17-0117-05

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2021.17.032



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

The Effect of H_2S on the Accumulation of Indoleacetic Acid (IAA), Abscisic Acid (ABA) and Secondary Metabolites in Birch Suspension Cells

YE Zi-nuo, ZHAI Ming-xia, ZHOU Wen-yang et al (College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040)

Abstract [Objective]The purpose of this study was to clarify the effect of hydrogen sulfide (H_2S) on the accumulation of indoleacetic acid (IAA), abscisic acid (ABA) and secondary metabolites in birch (*Betula platyphylla* Suk.) suspension cultures. [Method]The colorimetric method, real-time quantitative PCR and enzyme-linked immunosorbent assay were used to analyze the contents of flavones, polyphenols, triterpenes, IAA and ABA, and the gene expression level of IAA and ABA-related key enzyme. [Result]The results showed the concentration and time effects of H_2S donor sodium sulfide (NaHS) on the accumulation of IAA and ABA in the birch suspension cells. Among the cells, the highest level of ABA was at 1.0 mmol/L H_2S donor NaHS after 12 h treatment, with increasing rates of 196.46% compared to the control. And the highest level of IAA was at 0.1 mmol/L H_2S donor NaHS after 3 h treatment, with increasing rates of 5.55% compared to the control. The accumulation of secondary metabolites in the birch suspension cells showed an increasing trend after ABA or H_2S treatment, while the opposite was observed after IAA treatment. Treatment on birch suspension cell with 1.0 mmol/L H_2S donor NaHS and different concentrations of IAA and ABA for 24 h increased the polyphenols, flavones and triterpenes levels, respectively. Polyphenols, flavonoids and triterpenes reached maximum levels after combined treatment with 1.0 mmol/L ABA and NaHS; the levels increased by 17.89%, 14.74% and 8.87%, compared to NaHS treatment, respectively. [Conclusion] H_2S treatment induced the synthesis of IAA and ABA and the accumulation of secondary metabolites in the birch suspension cells. Co-treatment with H_2S and IAA or ABA respectively, could further promote the accumulation of secondary metabolites.

Key words H_2S ; *Betula platyphylla* Suk.; IAA; ABA; Secondary metabolites

白桦(*Betula platyphylla* Suk.)为桦木科(Betulaceae)桦木属(*Betulinn*)的落叶乔木,适应性强,在我国分布范围广^[1]。白桦富含三萜类、黄酮类、多酚类等次生代谢物,其中白桦酯醇和白桦酯酸等三萜物质是白桦的代表性次生代谢物,具有抗菌、抗病毒、提高机体免疫力、抗肿瘤等多重功能^[2-4]。为了安全并可持续地利用白桦次生代谢物资源,笔者前期利用组织培养技术建立了白桦悬浮细胞培养体系,并证实白桦悬浮细胞中含有白桦酯醇、白桦酯酸和齐墩果酸等三萜物质、多酚和黄酮等次生代谢物。同时发现,外源添加腐胺、一氧化氮、水杨酸、茉莉酸以及硫化氢(H_2S)等诱导子可以显著地促进白桦悬浮细胞中黄酮、白桦酯醇等次生代谢产物的累积^[5]。

H_2S 作为继一氧化氮与一氧化碳之后的新兴气体信号分子^[6],在调节植物生长发育、延缓植物衰老等多种植物生

理活动中发挥着重要作用。同时有研究证明,外源的 H_2S 处理可以促进多种次生代谢产物的合成^[7-9],但其机制却鲜见报道。有研究证明,植物体内 H_2S 信号与吲哚乙酸(IAA)及脱落酸(ABA)之间存在着相互作用; H_2S 供体 NaHS 可以促进 IAA 缺陷型黄瓜的不定根生长,同时通过抑制 IAA 转运也可以逆转 NaHS 诱导的不定根生长^[10]; H_2S 介入 ABA 的信号转导引发保卫细胞的气孔关闭,同时外源的 ABA 处理可以明显提高植物内 H_2S 含量^[11]。由此推测, H_2S 引起的白桦次生代谢产物累积可能与 IAA 和 ABA 相关。为此,笔者以初期发现的促进白桦悬浮细胞中多酚、三萜等次生代谢产物累积的诱导子 H_2S 为研究对象,分析 H_2S 对白桦悬浮细胞中 IAA 和 ABA 累积的影响,探究 H_2S 与 IAA、ABA 共同处理对白桦悬浮细胞内次生代谢产物累积的影响,以期为解决植物培养物中次生代谢物的低产问题提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 白桦悬浮细胞来自白桦组培苗茎段诱导的愈伤组织,白桦组培苗来自东北林业大学白桦强化种子园 5~7 年生嫁接优树(接穗 30 年生)的腋芽。将白桦悬浮细胞接种于

基金项目 东北林业大学大学生创新创业训练计划项目(2019102-25504);黑龙江省自然科学基金(C2016005)。

作者简介 叶子诺(1999—),女,浙江衢州人,研究方向:植物细胞工程。*通信作者,教授,博士,从事植物细胞工程研究。

收稿日期 2020-11-11;修回日期 2021-01-04

附加 0.1 mg/L 6-BA+0.01 mg/L TDZ, 1 g/L 酸水解酪蛋白, 20 g/L 蔗糖的 B5 液体培养基中, pH 为 5.5~6.0。100 mL 摇瓶内加入 50 mL 培养液, 每瓶接种 6 g 白桦悬浮细胞, 每隔 7 d 继代 1 次, 培养温度为 25~27 °C, 光照时间 16 h/d, 光照强度为 2 000 lx, 摇床转速为 130 r/min。

1.2 方法

1.2.1 外源 H₂S 和 IAA、ABA 处理。将 H₂S 供体硫氢化钠 (NaHS) 溶液加入到培养 8 d 的白桦悬浮细胞培养体系中, 使其最终浓度分别为 0.1、0.5、1.0、5.0 mmol/L, 对照 (CK) 中加入等体积的无菌水, 处理 3、6、12、24、48、96 h 后分别取样, 每处理 3 次重复。

H₂S 分别与 IAA、ABA 共处理: 将 IAA、ABA、NaHS+IAA、NaHS+ABA 溶液分别加入到培养 8 d 的白桦悬浮细胞培养体系中, 使 NaHS 终浓度为 1.0 mmol/L, IAA 及 ABA 终浓度分别为 0.1、0.5、1.0、5.0 mmol/L, 对照 (CK) 中加入等体积无菌水, 处理 24 h 后取样。

1.2.2 次生代谢产物的测定。

1.2.2.1 三萜含量的测定。采用比色法, 取 200 μL 样品于 5 mL 试管中, 置于 70 °C 水浴蒸干, 加入 200 μL 新配的 5% 香草醛冰醋酸溶液, 再加入 800 μL 高氯酸混匀, 置于 70 °C 水浴 15 min 后冷却至室温。用乙酸乙酯定容至 4 mL, 利用分光光度计测定 551 nm 处吸光值。对照组加入 200 μL 乙酸乙酯, 以白桦酯醇作为标准品制作标准曲线, 得到回归方程为 $y = 45.030x + 0.041$ ($R^2 = 0.995$), 线性范围为 0.004~0.024 mg/mL。

1.2.2.2 黄酮含量的测定。采用比色法, 以硼酸-乙酸钠络

合试剂 (硼酸 0.8%, 乙酸钠 1.0%, 均为 M/V) 为显色剂, 吸取 2 mL 提取液于 10 mL 离心管中, 再加入 2 mL 络合试剂, 混匀后于 384 nm 处测定吸光值。以试剂空白为对照, 利用芦丁为标准品得到回归方程 $y = 2.541x - 0.030$ ($R^2 = 0.993$), 线性范围为 0.058~0.348 mg/mL。

1.2.2.3 多酚含量的测定。采用比色法, 取 5 mL 提取液, 加入 4% 现配的香草醛-甲醇溶液, 再加 1.5 mL 浓盐酸, 用甲醇定容至 10 mL, 混匀后于 500 nm 处测定吸光值。以试剂空白为对照, 用没食子作为标品, 得回归方程 $y = 100.700x + 0.014$ ($R^2 = 0.998$), 线性范围 0.001~0.006 mg/mL。

1.2.3 IAA 及 ABA 含量的测定。采用间接酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assays, ELISA) 测定, ELISA 试剂盒购自中国农业大学作物化学控制中心。按试剂盒操作说明在 490 nm 处测定 OD 值, 各样品测定 3 次。以 IAA 为标品, 回归方程 $y = -0.2549x - 0.1986$ ($R^2 = 0.9953$); 以 ABA 为标品, 回归方程 $y = -0.6438x + 2.7246$ ($R^2 = 0.9884$)。

1.2.4 IAA 和 ABA 合成关键基因的表达量检测。取新鲜的白桦悬浮细胞经 Takara 公司的 MiniBEST Universal RNA 提取试剂盒提取得到总 RNA。测定浓度后, 利用 Oligo dt (18) 和 M-MLV 逆转录酶 (Takara) 反转录合成 cDNA (Takara, code No. 2641A) 后进行普通 PCR 电泳验证 cDNA 与引物质量。通过实时荧光定量 PCR 测定 IAA 调控基因 *GH3.5A*、*GH3.5B*、*GH3.9A* 和 ABA 合成基因 *NCED4*、*ZEP6* 的表达情况: 以白桦微管蛋白基因 *TU* (tubulin) 为内标参照基因, 反应体系总计 20 μL, 循环 40 次, 具体操作参照说明书。相关引物序列见表 1, 目的基因的相对表达量用公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行计算。

表 1 白桦 IAA 与 ABA 相关基因的引物序列

Table 1 Primer sequences of IAA and ABA genes in *Betula platyphylla*

| 基因名称 Gene name | 序列号 Serial number | 引物序列 (5'→3') Primer sequence (5'→3') | |
|-------------------|----------------------|---|--------------------------|
| <i>BpTU</i> | FG060376 | F:TCAACCGCCTTGCTCTCAGG | R:TGGCTCGAATGCACTGTTGG |
| <i>BpNCED4</i> | HO112160 | F:ATGGCGGAGTTGTTCTAGTC | R:TAGGGATGACAACATTTGTTTC |
| <i>BpZEP6</i> | HO112168 | F:GAACTGCTACAACATAATGTC | R:CATCCCTAATATCAGTGCAC |
| <i>BpGH3.5A</i> | HO112182 | F:GAACTGCTACAACATAATGTC | R:CATCCCTAATATCAGTGCAC |
| <i>BpGH3.5B</i> | HO112187 | F:AGTCTCTACCGGTATAGGC | R:GGATTGTCAACATGCGCTAG |
| <i>BpGH3.9A</i> | HO112183 | F:GATCAACTTCATGGATCTA | R:TAGATTTGATGCACCTAGGC |

1.2.5 数据处理与作图。使用 Excel 2016 进行数据整理, 用 SPSS 19.0 (SPSS Inc., Chicago) 软件和 Duncan's 的方法进行单因素方差分析 (ANOVA) 及数据的差异性检测。

2 结果与分析

2.1 H₂S 处理对白桦悬浮细胞中 IAA 含量及其调控关键酶

基因表达的影响 将 0.1、0.5、1.0 和 5.0 mmol/L H₂S 供体 NaHS 分别加入到培养 8 d 的白桦悬浮细胞培养体系中, 处理 3~96 h, 分别于 3、6、12、24、48、96 h 取样测定 IAA 含量, 结果见图 1。从图 1 可见, IAA 含量随着处理时间的增加而降低。处理时间相同时, NaHS 处理浓度越大, IAA 含量越低, 但 0.1 mmol/L H₂S 供体 NaHS 处理时细胞中 IAA 含量比 CK 高。其中, 0.1 mmol/L H₂S 供体 NaHS 处理 3 h 时 IAA 含量达到最高, 较 CK 增加了 5.55%; 5.0 mmol/L H₂S 供体 NaHS

处理 96 h 时 IAA 含量最低, 比 CK 降低了 73.95%。

进一步利用荧光定量 PCR 技术测定 IAA 调控基因 *GH3* 的相对表达量, 结果见图 2~4。除 5.0 mmol/L H₂S 供体 NaHS 处理 *GH3.5B* 基因表达水平呈下降趋势以外, *GH3.5A*、*GH3.5B* 和 *GH3.9A* 对 NaHS 的响应基本相同, 即随着处理时间增加, 基因表达量都呈先上升后下降趋势。其中, 5.0 mmol/L H₂S 供体 NaHS 处理 6 h 时 *GH3.5A* 基因表达水平达到最高, 比 CK 增加了 374.17%; 5.0 mmol/L H₂S 供体 NaHS 处理 24 h 时 *GH3.5A* 基因表达水平降到最低, 比 CK 减少了 89.44%。1.0 mmol/L H₂S 供体 NaHS 处理 24 h 时 *GH3.5B* 基因表达水平最高, 比 CK 增加了 306.57%。5.0 mmol/L H₂S 供体 NaHS 处理 96 h 时 *GH3.5B* 基因表达水平最低, 比 CK 降低了 80.08%。1.0 mmol/L H₂S 供体

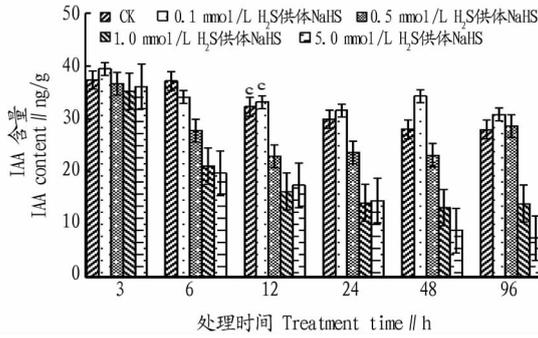


图 1 H₂S 处理对白桦悬浮细胞中 IAA 含量的影响

Fig. 1 Effect of H₂S on IAA content in suspension cells of *Betula platyphylla*

NaHS 处理 24 h 时 *GH3. 9A* 基因表达水平最高, 比 CK 增加了 508. 98%; 5. 0 mmol/L H₂S 供体 NaHS 处理 96 h 时 *GH3. 9A* 基因表达水平最低, 比 CK 降低了 93. 17%。

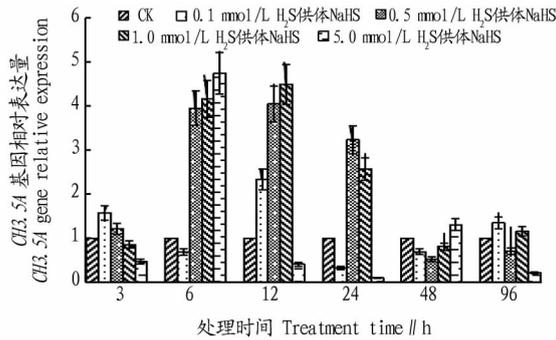


图 2 H₂S 处理对白桦悬浮细胞中 IAA 调控关键酶基因 (*GH3. 5A*) 表达的影响

Fig. 2 Effect of H₂S on the expression of key IAA regulatory genes (*GH3. 5A*) in suspension cells of *Betula platyphylla*

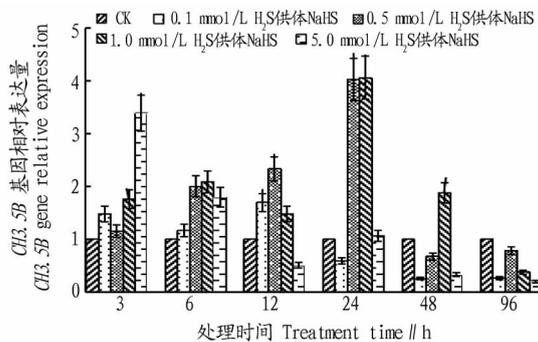


图 3 H₂S 处理对白桦悬浮细胞中 IAA 调控关键酶基因 (*GH3. 5B*) 表达的影响

Fig. 3 Effect of H₂S on the expression of key IAA regulatory genes (*GH3. 5B*) in suspension cells of *Betula platyphylla*

2.2 H₂S 处理对白桦悬浮细胞中 ABA 累积和 ABA 调控关键基因表达的影响 从图 5 可见, ABA 含量随着 NaHS 处理浓度和处理时间的增加呈先升高后降低趋势, 且浓度越高, 峰值出现越早。其中, 1. 0 mmol/L H₂S 供体 NaHS 处理 12 h 时 ABA 含量最高, 比 CK 增加了 196. 46%; 1. 0 mmol/L H₂S 供体 NaHS 处理 3 h 时 ABA 含量最低, 比 CK 降低了 15. 26%。

进一步利用荧光定量 PCR 技术测定 ABA 调控基因的相

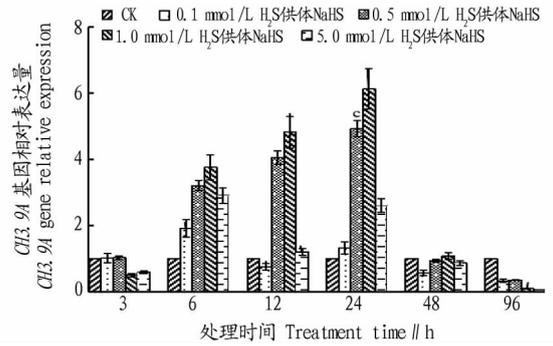


图 4 H₂S 处理对白桦悬浮细胞中 IAA 调控关键酶基因 (*GH3. 9A*) 表达的影响

Fig. 4 Effect of H₂S on the expression of key IAA regulatory genes (*GH3. 9A*) in suspension cells of *Betula platyphylla*

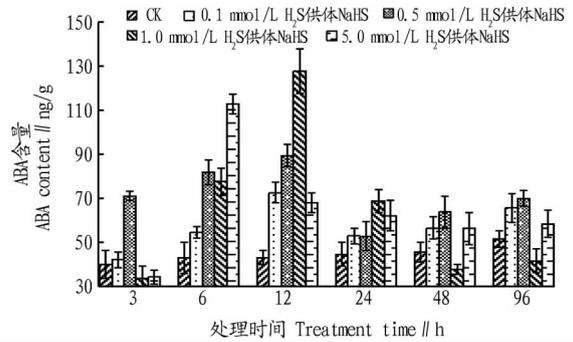


图 5 H₂S 处理对白桦悬浮细胞中 ABA 含量的影响

Fig. 5 Effect of H₂S on ABA content in suspension cells of *Betula platyphylla*

对表达量, 结果见图 6、7。除 5. 0 mmol/L NaHS 处理 *NCED4* 基因表达水平呈下降趋势以外, *NCED4* 和 *ZEP6* 对 NaHS 的响应基本相同, 呈先上升后下降趋势。其中, 1. 0 mmol/L H₂S 供体 NaHS 处理 6 h 时 *NCED4* 基因表达水平最高, 比 CK 增加了 540. 72%, 0. 5 mmol/L H₂S 供体 NaHS 处理 48 h 时 *NCED4* 基因表达水平最低, 比 CK 降低了 92. 13%; 1. 0 mmol/L H₂S 供体 NaHS 处理 24 h 时 *ZEP6* 基因表达水平最高, 比 CK 增加了 253. 18%, 0. 5 mmol/L H₂S 供体 NaHS 处理 96 h 时 *ZEP6* 基因表达水平最低, 比 CK 降低了 76. 61%。

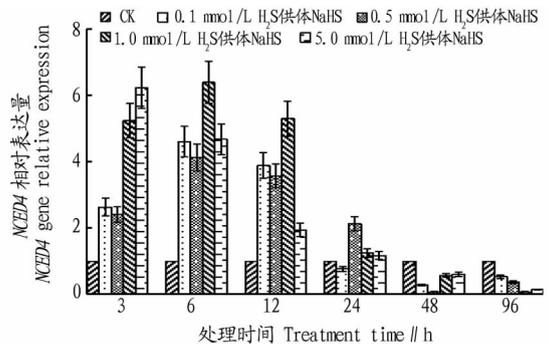


图 6 H₂S 处理对白桦悬浮细胞中 ABA 调控关键酶基因 (*NCED4*) 表达的影响

Fig. 6 Effect of H₂S on the expression of ABA synthesis genes (*NCED4*) in suspension cells of *Betula platyphylla*

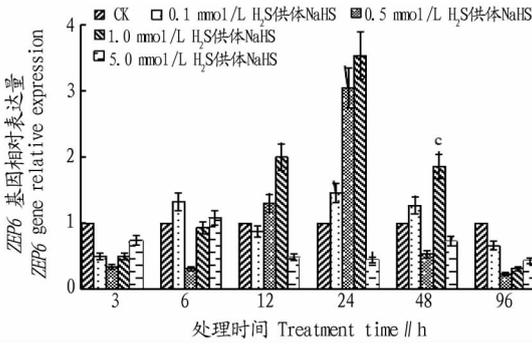


图7 H₂S处理对白桦悬浮细胞中ABA调控关键酶基因(ZEP6)表达的影响

Fig.7 Effect of H₂S on the expression of ABA synthesis genes (ZEP6) in suspension cells of *Betula platyphylla*

2.3 H₂S与激素(IAA和ABA)处理对白桦悬浮细胞中细胞产量和次生代谢物累积的影响 前人研究发现,1.0 mmol/L H₂S供体NaHS处理24 h后白桦悬浮细胞中三萜和多酚等次生代谢产物积累最高^[5]。为此,该研究选用1.0 mmol/L H₂S供体NaHS与不同浓度IAA、ABA共处理白桦悬浮细胞,分析NaHS与IAA或ABA共同处理对白桦次生

代谢物积累的影响,结果见表2。由表2可知,经1.0 mmol/L H₂S供体NaHS处理24 h后,白桦悬浮细胞中多酚、黄酮和三萜含量分别比CK提高了38.74%、33.85%和47.64%。0.1、0.5、1.0和5.0 mmol/L ABA处理可增加白桦悬浮细胞中的多酚、黄酮和三萜含量,增幅在2.18%~29.88%;0.1、0.5、1.0和5.0 mmol/L IAA处理降低白桦悬浮细胞中的多酚、黄酮和三萜含量,降幅在2.65%~21.09%。NaHS与不同浓度的IAA、ABA分别处理后不同程度地提高了白桦悬浮细胞中多酚、黄酮和三萜含量,其中0.1 mmol/L IAA+1.0 mmol/L NaHS共同处理黄酮、三萜含量达到最大值,分别比0.1 mmol/L IAA处理增加了33.98%和12.50%;0.5 mmol/L IAA+1.0 mmol/L NaHS共同处理多酚含量达到最大值,比0.1 mmol/L IAA处理增加了67.81%。1.0 mmol/L ABA+1.0 mmol/L NaHS处理多酚、黄酮和三萜含量达到最大值,分别比1.0 mmol/L ABA单独处理增加了34.23%、18.25%和34.76%,比1.0 mmol/L H₂S供体NaHS处理增加了17.89%、14.74%和8.87%。由上述结果可知,在经NaHS处理的白桦悬浮培养体系中添加适当浓度的外源IAA或ABA可进一步促进其次生代谢物的积累。

表2 硫化氢与激素(IAA和ABA)处理对白桦悬浮细胞次生代谢物累积的影响

Table 2 Effect of hydrogen sulfide and hormone(IAA and ABA) treatment on accumulation of secondary metabolites in suspension cells of *Betula platyphylla*

| 激素种类 Types of hormones | 处理方法 Treatment method | 干重 Dry weight g/L | 多酚含量 Polyphenol content mg/g | 黄酮含量 Flavonoid content mg/g | 三萜含量 Triterpene content mg/g |
|---------------------------|-------------------------------------|-------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| | CK | 9.608±0.198 | 1.918±0.050 | 0.907±0.024 | 0.275±0.015 |
| | 1.0 mmol/L H ₂ S 供体 NaHS | 9.328±0.221 | 2.661±0.054 | 1.214±0.018 | 0.406±0.040 |
| IAA | 0.1 mmol/L IAA | 9.783±0.176 | 1.801±0.056 | 0.883±0.029 | 0.264±0.009 |
| | 0.5 mmol/L IAA | 10.633±0.110 | 1.718±0.054 | 0.873±0.011 | 0.243±0.006 |
| | 1.0 mmol/L IAA | 11.142±0.126 | 1.681±0.071 | 0.846±0.016 | 0.238±0.009 |
| | 5.0 mmol/L IAA | 9.984±0.170 | 1.692±0.540 | 0.784±0.014 | 0.217±0.013 |
| | 0.1 mmol/L IAA+1.0 mmol/L NaHS | 9.732±0.087 | 2.721±0.086 | 1.183±0.030 | 0.297±0.016 |
| | 0.5 mmol/L IAA +1.0 mmol/L NaHS | 10.271±0.127 | 2.883±0.144 | 1.179±0.050 | 0.286±0.010 |
| | 1.0 mmol/L IAA +1.0 mmol/L NaHS | 11.730±0.191 | 2.488±0.124 | 1.034±0.040 | 0.263±0.008 |
| | 5.0 mmol/L IAA +1.0 mmol/L NaHS | 9.379±0.181 | 2.132±0.075 | 0.974±0.039 | 0.258±0.009 |
| ABA | 0.1 mmol/L ABA | 9.599±0.110 | 1.983±0.109 | 0.954±0.035 | 0.281±0.012 |
| | 0.5 mmol/L ABA | 9.328±0.149 | 2.276±0.083 | 1.072±0.121 | 0.293±0.010 |
| | 1.0 mmol/L ABA | 8.843±0.815 | 2.337±0.158 | 1.178±0.052 | 0.328±0.008 |
| | 5.0 mmol/L ABA | 8.237±0.835 | 2.031±0.103 | 1.036±0.023 | 0.307±0.010 |
| | 0.1 mmol/L ABA +1.0 mmol/L NaHS | 10.399±0.148 | 2.839±0.082 | 1.248±0.038 | 0.413±0.009 |
| | 0.5 mmol/L ABA +1.0 mmol/L NaHS | 9.748±0.167 | 2.934±0.106 | 1.378±0.034 | 0.429±0.010 |
| | 1.0 mmol/L ABA +1.0 mmol/L NaHS | 9.433±0.186 | 3.137±0.094 | 1.393±0.039 | 0.442±0.009 |
| | 5.0 mmol/L ABA +1.0 mmol/L NaHS | 9.186±0.127 | 2.764±0.067 | 1.179±0.043 | 0.438±0.010 |

3 讨论

(1) IAA是发现最早的一类天然植物激素,在植物的组织分化、器官发育、向性表现与成熟衰老等方面发挥着重要作用^[12-14]。研究表明,拟南芥H₂S信号与IAA之间存在相互作用,IAA参与外源H₂S介导的拟南芥主根发育抑制过程^[15],同时外源H₂S通过影响IAA转运蛋白的表达减少IAA在拟南芥根尖的分布^[16]。而白桦悬浮体系中H₂S对IAA的影响是否与拟南芥报道相同尚未明确。文献报道

*GH3*基因是植物生长素初期响应基因家族之一^[17],同时有研究证明,桦树*GH3.5*^[18]、*GH3.6*、*GH3.9*和*GH3.3*基因参与调节IAA含量,其表达量与IAA含量呈负相关^[17]。为此,该研究分析了H₂S对白桦悬浮体系中IAA含量和*GH3*调控基因转录水平的影响,发现低浓度NaHS处理促进IAA的合成,但在NaHS浓度为0.5 mmol/L及以上时IAA含量持续降低,其中5 mmol/L NaHS处理96 h时IAA含量最低,仅为CK的26.05%。而*GH3.5A*、*GH3.5B*、*GH3.9A*3个*GH3*基因的转

录水平在 H₂S 处理 6~48 h 时呈增加趋势,其中 1.0 mmol/L H₂S 处理 24 h 时 *GH3.5A*、*GH3.5B* 和 *GH3.9A* 表达量最高,分别比对照提高了 126.84%、257.96% 和 436.17%。由此推测,外源 H₂S 处理后介导白桦悬浮细胞中 *GH3* 家族蛋白合成并与细胞内 IAA 结合,氨基化使 IAA 失活^[19],导致 IAA 含量降低。

(2) ABA 参与植物生长和发育的各个过程,在营养生长、芽休眠、气孔运动以及应答盐、低温、渗透胁迫等方面发挥着多重作用^[20-24]。研究表明,蚕豆内 H₂S 参与 ABA 的信号转导,同时 ABA 处理可以提高 H₂S 含量^[11]。而白桦悬浮体系中 H₂S 对 ABA 的影响是否与蚕豆报道相同尚未明确。有文献报道玉米黄质环氧酶(ZEP)、醛氧化酶(AAO)和 9-顺-环氧类双加氧酶(NCEDs)在 ABA 间接途径合成中发挥主要调节作用^[25],同时也有研究证明,白桦 ZEP 和 NCEDs 是 ABA 合成途径中的关键酶及主要控制节点^[26]。为此,该研究分析了 H₂S 对白桦悬浮体系中 ABA 含量和 *ZEP6* 及 *NCED4* 调控基因转录水平的影响,结果表明,NaHS 处理后,细胞内 ABA 的含量先升高后下降,并且峰值集中在 6~12 h。其中 1.0 mmol/L H₂S 供体 NaHS 处理 12 h 时 ABA 含量达到最高值,较对照增加了 196.46%,而在 96 h 时下降到对照的 80.86%。而 *NCED4* 和 *ZEP6* 基因转录水平分别在 H₂S 处理 3~12 h 和 12~48 h 时呈增加趋势,1.0 mmol/L H₂S 供体 NaHS 处理 12 h 分别比对照增加了 431.00% 和 99.49%。由此推测,*NCED4* 是 H₂S 处理诱导 ABA 合成增加的主要基因,外源 H₂S 通过上调白桦悬浮细胞中 *NCED4* 的转录水平进而诱导 ABA 合成增加,与李丹丹等^[27] 研究得出的 NaHS 通过上调黄瓜幼苗叶片的 *NCED* 活性以促进 ABA 合成的结果一致。

(3) H₂S 在植物抗逆中具有不可或缺的作用,外源 H₂S 处理可以激活植物细胞防御机制,促进植物细胞内多种次生代谢产物积累^[7-9],同样该研究在初期也发现,H₂S 处理可以促进桑黄和白桦悬浮体系中次生代谢物的累积^[5],但其促进机制尚未明确。大量研究表明,H₂S 在植物体内通过与一氧化氮(NO)、IAA、ABA、乙烯(ETH)等信号分子发生相互作用,从而协助植物对抗逆境,以利于其生长发育。陆健敏等^[28] 研究发现,H₂S 与 ETH 发生交互作用从而加速了大豆种子的萌发;在蚕豆中,H₂S 与 ABA 共同作用调节其气孔的闭合,并且这种闭合是 ABA 依赖性的^[11];于立旭等^[29] 用 H₂S 处理黄瓜,发现了黄瓜不定根的生长,同时 IAA 含量也有短暂提高。因此,对植物生长发育起到重要作用的植物激素 IAA、ABA 可能介导 H₂S 在植物细胞内引起次生代谢物的合成。为此,该研究进一步对比分析了 H₂S、IAA、ABA、H₂S 与 ABA 和 H₂S 与 IAA 对白桦次生代谢物累积的影响。研究发现,H₂S 处理不同程度地提高了白桦悬浮细胞中的多酚、黄酮、三萜含量,分别比对照提高了 38.74%、33.85% 和 47.64%,0.1~5.0 mmol/L ABA 处理也增加了白桦悬浮细胞中的多酚、黄酮和三萜含量,增幅在 2.18%~29.88%,而 0.1~5.0 mmol/L IAA 处理降低了白桦悬浮细胞中多酚、黄酮和三萜含量,降幅在 2.65%~21.09%。但是,0.1 mmol/L

IAA 与 NaHS 共同处理后白桦悬浮细胞中黄酮、三萜含量达到最大值,分别比 IAA 单独处理增加了 33.98% 和 12.50%,0.5 mmol/L IAA 与 NaHS 共同处理后白桦悬浮细胞中多酚含量达到最大值,比 IAA 单独处理增加了 67.81%。同样,1.0 mmol/L ABA 与 NaHS 共同处理后白桦悬浮细胞中多酚、黄酮和三萜含量上升至最大值,分别比 NaHS 单独处理增加了 17.89%、14.74% 和 8.87%。由上述结果可知,H₂S 与 IAA 或 ABA 互作处理可进一步促进白桦悬浮细胞中次生代谢物的积累,但其机制还需进一步利用基因工程等技术进行研究。

(4) 综上所述,外源 H₂S 处理促进了白桦悬浮细胞培养体系中 ABA 的合成,抑制了 IAA 的合成,进而对多酚、黄酮和三萜等的积累分别起到促进或抑制作用,同时 H₂S 与 IAA 或 ABA 互作可进一步促进次生代谢物合成。

参考文献

- [1] 杨洋. 白桦 *BpTCP7* 基因的功能研究[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2016.
- [2] 傅增辉,金艳,林再红,等. 白桦脂醇对慢性应激抑郁模型大鼠行为及神经营养因子表达的影响[J]. 解剖学杂志,2020,43(3):200-205.
- [3] 段晓玲,王海英,杨国亭,等. 白桦叶精油的抑菌和抗氧化活性成分分析[J]. 安徽农业科学,2014,42(33):11746-11748,11777.
- [4] 王跃华,刘益丽,马良良,等. TTC-脱氢酶还原法测定滇重楼细胞活力优化条件筛选[J]. 成都大学学报(自然科学版),2011,30(1):1-3.
- [5] 周文洋. H₂S 诱导白桦悬浮细胞中次生代谢物累积的激素生理机制的初步研究[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2015.
- [6] 金竹萍,乔增杰,张丽萍,等. 硫化氢通过抑制镉离子内流降低拟南芥体内的镉毒性[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2020,36(1):61-70.
- [7] ZHANG H, HU L Y, HU K D, et al. Hydrogen sulfide promotes wheat seed germination and alleviates oxidative damage against copper stress[J]. Journal of integrative plant biology, 2008, 50(12):1518-1529.
- [8] LISIAK M, SRIVASTAVA N, TEKLIĆ T, et al. A novel hydrogen sulfide donor causes stomatal opening and reduces nitric oxide accumulation[J]. Plant physiology and biochemistry, 2010, 48(12):931-935.
- [9] WANG Y Q, LI L, CUI W T, et al. Hydrogen sulfide enhances alfalfa (*Medicago sativa*) tolerance against salinity during seed germination by nitric oxide pathway[J]. Plant and soil, 2012, 351(1/2):107-119.
- [10] 汪伟,张伟,朱丽琴,等. 植物硫化氢生理效应及机制研究进展[J]. 中国农学通报,2013,29(31):78-82.
- [11] 刘菁,侯智慧,赵方贵,等. H₂S 介导 ABA 诱导蚕豆气孔运动的生理机制研究[J]. 西北植物学报,2011,31(2):298-304.
- [12] SCARPELLA E, MARCOS D, FRIML J, et al. Control of leaf vascular patterning by polar auxin transport[J]. Genes & development, 2006, 20(8):1015-1027.
- [13] 金敏,张倩,陶书田,等. IAA 及其运输载体 PIN 对库尔勒香梨萼片脱落与宿存影响的研究[J]. 现代农业科技,2020(8):46-49.
- [14] KERR I D, BENNETT M J. New insight into the biochemical mechanisms regulating auxin transport in plants[J]. The biochemical journal, 2007, 401(3):613-622.
- [15] 罗琼. H₂S 影响拟南芥根系发育的生理及分子调控机制[D]. 西宁:青海师范大学,2016.
- [16] JIA H L, HU Y F, FAN T T, et al. Hydrogen sulfide modulates actin-dependent auxin transport via regulating ABPs results in changing of root development in *Arabidopsis*[J]. Scientific reports, 2015, 5(1):707-735.
- [17] 孙涛,柴团耀,张玉秀. 拟南芥 *GH3* 基因家族启动子序列分析[J]. 中国科学院研究生院学报,2010,27(6):847-852.
- [18] YANG G, CHEN S, WANG S, et al. BpGH3.5, an early auxin-response gene, regulates root elongation in *Betula platyphylla* × *Betula pendula*[J]. Plant cell, tissue and organ culture, 2015, 120(1):239-250.
- [19] ZHANG R S, WANG Y C, WANG C, et al. Time-course analysis of levels of indole-3-acetic acid and expression of auxin-responsive *GH3* genes in *Betula platyphylla*[J]. Plant molecular biology reporter, 2011, 29(4):898-905.
- [20] 李红,李波,杨墨. 外源 ABA 对苏打盐碱胁迫的紫花苜蓿内源激素含量的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医,2020(6):103-106,111.



图 11 稻香田野剖透图

Fig. 11 Daoxiang field cut through



图 12 稻香田野效果图

Fig. 12 Daoxiang field effect picture

3 小结

中国古代农田是祖先们辛勤劳动的结晶,凝聚着深厚而灿烂的农耕文明,对当代农田景观设计规划有着重要的指导意义。在农业方面,传统农田可以适应并改造原有地形,增加农作物收成;在生态方面,可以调节区域微气候,形成以农田为核心的良性循环生态系统;在经济方面,可以减轻农民们的工作负担,提升经济效益。将农田景观引入到旅游综合体的设计中时,最基本的出发点是因地制宜,结合场地原貌选择合适的农田类型。农田景观作为旅游综合体的重要组成部分,对其设计必须注重观赏、生态、经济和活动的统一协调发展,力求全方位、多维度地统筹规划。

参考文献

- [1] 吕明伟,孙雪,张媛. 休闲农业规划设计与开发[M]. 北京:中国建筑工业出版社,2010:5.
- [2] 蔡宁,王莹,尚丹,等. 乡村振兴背景下田园综合体发展路径选择[J]. 安徽农业科学,2020,48(20):253-254.
- [3] 周心琴,陈丽,张小林. 近年我国乡村景观研究进展[J]. 地理与地理信息科学,2005,21(2):77-81.
- [4] 王俊英,宇振荣. 北京农田景观建设[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,2012.
- [5] 王菁. 城市边缘区农田景观设计研究[D]. 合肥:合肥工业大学,2007.
- [6] 赵崔莉,刘新卫. 近半个世纪以来中国古代圩田研究综述[J]. 古今农业,2003(3):58-69.
- [7] 何勇强. 论唐宋时期圩田的三种形态:以太湖流域的圩田为中心[J]. 浙江学刊,2003(2):105-112.
- [8] 侯晓蕾,郭巍. 圩田景观研究形态、功能及影响探讨[J]. 风景园林,2015(6):123-128.
- [9] 高新颖. 浙江省丘陵地区农田生产性景观规划与营造:以临安市指南村高山梯田项目为例[D]. 杭州:浙江农林大学,2018.
- [10] 方美清. 农田景观设计构想研究[D]. 株洲:湖南工业大学,2013.
- [11] 张建民. 圩田考论[J]. 中国史研究,2019(4):167-175.
- [12] 郭春华. 明清时期长江中下游地区的土地利用[J]. 南京农业大学学报(社会科学版),2002,2(2):63-70.
- [13] 李奕成,朱南燕,李子杰,等. 中国传统画水论与造园理水实践比照研究[J]. 西南大学学报(自然科学版),2019,41(1):130-136.

(上接第 121 页)

- [21] 郭文雅,赵京献,郭伟珍. 脱落酸(ABA)生物学作用研究进展[J]. 中国农学通报,2014,30(21):205-210.
- [22] SEO M, KOSHIBA T. Complex regulation of ABA biosynthesis in plants[J]. Trends in plant science,2002,7(1):41-48.
- [23] 姚侠妹,偶春,张源丽,等. 脱落酸对盐胁迫下香椿幼苗离子吸收和光合作用的影响[J]. 东北林业大学学报,2020,48(8):27-32.
- [24] WASILEWSKA A, VLAD F, SIRICHANDRA C, et al. An update on abscisic acid signaling in plants and more...[J]. Molecular plant,2008,1(2):198-217.
- [25] 朱攀攀,刘长英,赵爱春,等. 桑树脱落酸生物合成相关基因的鉴定及

转录表达分析[J]. 中国农业科学,2015,48(5):1011-1022.

- [26] ZHANG R S, YANG C P, WANG C, et al. Time-course analyses of abscisic acid level and the expression of genes involved in abscisic acid biosynthesis in the leaves of *Betula platyphylla* [J]. Molecular biology reports,2012,39(3):2505-2513.
- [27] 李丹丹,张晓伟,刘丰娇,等. H₂S 与 ABA 缓解低温胁迫对黄瓜幼苗氧化损伤的交互效应[J]. 园艺学报,2018,45(12):2395-2406.
- [28] 陆健敏,沈芮同,李忠光. 硫化氢和乙烯交互作用对大豆种子萌发的影响[J]. 种子,2018,37(1):88-90.
- [29] 于立旭,尚宏芹,张存家,等. 外源硫化氢对镉胁迫下黄瓜胚轴和胚根生理生化特性的影响[J]. 园艺学报,2011,38(11):2131-2139.