

雷竹和拟南芥 *SOC1* 多聚体差异性分析

施 泉, 陈晓沛, 林新春, 徐永汉, 徐英武

(浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 浙江 临安 311300)

摘要: MADS-box 是一个超家族基因, 可通过形成多聚体复合物实现对花发育的调控。其中 SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1(SOC1)作为 MADS-box 家族的重要成员, 对花形成时间起决定作用。作为转录因子蛋白, SOC1 包含 MADS, I, K 和 C 4 个独特功能的结构域, 发挥功能的过程中, 其中 K 结构域能够调控同源或是异源蛋白多聚体的形成, I 结构域能够稳定转录因子结合 DNA 的作用。在单子叶植物雷竹 *Phyllostachys violascens* 和拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 中, 开花时间模式上存在明显差异, 前者开花时间不确定, 后者是确定的。尽管不能直接推断这种现象与 SOC1 形成植物不同复合物相关联, 但雷竹和拟南芥 SOC1 是否具有形成相同模式的复合物对于竹类植物开花时间的研究具有重要意义。以雷竹和拟南芥 SOC1 作为研究对象, 通过酵母双杂交实验, 重点分析 SOC1 在形成多聚体模式方面的差异性。结果表明: 拟南芥 SOC1 能形成同源二聚体, 并且可通过结构域是 I 和 K 区形成同源多聚体; 而雷竹 SOC1 不能形成多聚体, 但可以通过 K 结构域形成同源二聚体。因此, I 结构域可能是引起拟南芥和雷竹 SOC1 多聚体状态不同的一个原因, 这个结构域是否对开花定时起决定作用还有待进一步转基因功能验证。图 5 表 2 参 29

关键词: 植物学; MADS-box; *SOC1*; 雷竹; 拟南芥; 酵母双杂交; 多聚体状态; I 和 K 结构域

中图分类号: S718.3 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2016)02-0183-08

Oligomeric status of the *SOC1* gene from *Phyllostachys violascens* and *Arabidopsis thaliana*

SHI Quan, CHEN Xiaopei, LIN Xinchun, XU Yonghan, XU Yingwu

(The Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: MADS-box genes are a super family, which can form different polymers to mediate the development of floral primordia and floral organs. The important one of MADs-box genes, *SOC1* [suppressor of overexpression of cytochrome oxidase 1], determine the flowering time. The MADS-box transcription factor, SOC1 contains four different functions domains: MADS, I, K, and C. The K domain controls the homologous or heterologous protein polymer formation. The I domain could stabilize the MADS-box proteins binding the DNA. In order to control the floral development, MADS-box proteins can form different complex. Visible difference in floral timing is demonstrated in *Phyllostachys violascens* and *Arabidopsis thaliana*. *A. thaliana* is certain in floral timing while *Phyllostachys violascens* is not. Though we cannot compare the difference in floral timing with the difference in SOC1 complex formation, it is still interesting. MADS-box genes such as SOC1 containing four different functions: MADS, I, K and C, control floral timing. To determine whether SOC1's from different species demonstrated similar patterns in forming a complex, this study analyzed the differences of polymer for-

收稿日期: 2015-04-03; 修回日期: 2015-05-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31270715, 31000295); 浙江省林学一级重中之重学科开放基金资助项目(KF201304); 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)项目(2012CB723008); 浙江农林大学研究生创新基金资助项目(3122013240226)

作者简介: 施泉, 从事植物蛋白互作研究。E-mail: 702431524@qq.com。通信作者: 徐英武, 教授, 博士, 博士生导师, 从事蛋白和药物结构生物学等研究。E-mail: yxu@zafu.edu.cn

mation for SOC1 that originated from *Phyllostachys violascens* and *Arabidopsis thaliana* using a yeast two-hybrid assay. Results of the assay showed that the full-length AtSOC1 gene from *A. thaliana* formed strong homopolymers with the I and K domains being the main regions for formation of the interaction. However, the full-length SOC1 from *Phyllostachys violascens* (PvSOC1) did not form a homodimer. Thus, even though the K protein domain could form a homodimer, the presence of the I protein domain disrupted the dimer meaning the I domain could be a key factor in SOC1 polymer formation; the role of the I domain in floral timing should be verified with a plant transgene study. [Ch, 5 fig. 2 tab. 29 ref.]

Key words: botany; MADS-box; SOC1; *Phyllostachys violascens*; *Arabidopsis thaliana*; yeast two-hybrid; polymer; I and K protein domain

植物从营养生长向生殖生长的过程中,花的发育是一个重要的环节,由一系列外部环境和内部因子决定^[1-2]。大多数MADS-box基因参与花发育的不同阶段,相互之间可形成复杂的复合物并构成复杂的网络,控制花发育的整个过程^[2-4]。*SOC1*基因作为MADS-box家族中的一员,能够整合自主途径、春化途径、光周期途径和赤霉素途径中的信号分子,作用于下游特异性基因,进而调控花期^[2,5]。在光周期途径中,*SOC1*不仅受CO的调控,同时*SOC1*还反馈作用于CO。实验表明CO的过量表达能够促进下游基因*SOC1*的表达,此外功能缺失的*SOC1*可以通过CO转基因植株而提前开花^[6-9]。*SOC1*基因的活化同时受到开花素蛋白FT的调控,另外在调控开花时,FT和FD的共同作用可以提高*SOC1*基因的表达^[10-11]。*SOC1*编码的蛋白属于MIKC型转录因子,其结构域中MADS盒子能够与特异性的DNA结合形成复合物^[12-13],并且与其他蛋白相互作用调控靶基因的表达^[14]。*SOC1*的C末端属于保守的motif结构域^[14-15],且能够调整MADS结构域的相互作用,稳定或增强K结构域介导的相互作用^[16]。植物开花过程中,*SOC1*不仅能够与*AGL24*形成异源二聚体,整合开花信号来促进开花^[16-17],还能够作为赤霉素(GA)的靶基因调控开花^[1,18-19]。植物开花具有多样性特征,如木本植物雷竹 *Phyllostachys violascens*,开花时间不确定,通常零星开花,且开花类型复杂多样,花序为假花序,结实率低^[20]。草本植物拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 开花时间和形态具有确定性。雷竹和拟南芥开花时间特征明显不同,开花整合因子*SOC1*在这2种植物中均已被发现^[21],并且PvSOC1在雷竹开花过程中的作用做了初步研究。作为研究*SOC1*对开花时间多样性作用的开始,这里我们分析雷竹和拟南芥*SOC1*在多聚体形成方面是否存在差异。研究采用同源克隆的方法,分别获得成花开关基因PvSOC1^[21]和AtSOC1,同时构建2个基因全长的酵母双杂交载体,利用酵母双杂交方法,分析形成同源聚集状态的差异。通过构建不同结构域酵母双杂交载体,确定引起多聚体差异性对应的结构域。这一研究结果,对于理解*SOC1*基因在雷竹和拟南芥定时开花过程中的特异性作用,提供了一定的实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

研究所用材料来自于实验室大棚内的已开花雷竹和温室内栽植的哥伦比亚野生型拟南芥。AtSOC1在开花的野生型拟南芥花、茎、叶中均有表达^[4],故分别采取开花雷竹和拟南芥的茎、叶、花等不同组织,用液氮速冻保存,实验材料放置-80℃备用。

1.2 RNA的提取和cDNA的反转录

将不同组织部位的样品等比例混合,用液氮磨碎,根据总核糖核酸(RNA)提取法(Trizol法)提取植物组织混合样品RNA,以10.0 g·L⁻¹的琼脂糖凝胶电泳对RNA进行质量检测;采用PrimeScriptTM进行RNA的反转录,反转录的cDNA用于基因的克隆。

1.3 PvSOC1和AtSOC1的基因克隆

根据美国生物技术信息中心(NCBI)中已知的拟南芥AtSOC1序列和实验室得到的雷竹PvSOC1序列,设计引物(表1),聚合酶链式反应(PCR)反应扩增目的片段,反应体系:cDNA 2.0 μL, 10×PCR缓冲液3.0 μL,三磷酸碱基脱氧核苷酸(dNTPs)3.0 μL,上下游引物各1.5 μL,去离子水补足30.0 μL。琼脂糖凝胶电泳检测目的片段的扩增,胶回收目的片段,纯化后的产物连接到pMD-19(simple)载体上,转

入感受态细胞 DH5 α 蓝白斑筛选, PCR 验证, 提取质粒送往生物公司测序。

1.4 *PvSOC1* 和 *AtSOC1* 氨基酸序列分析

采用 BioEdit 软件对 *PvSOC1*-like 基因序列进行翻译, NCBI 中进行氨基酸序列对比, 结合 DANman 软件, 进行 *PvSOC1*-IKC(缺少 MADS 结构域部分)氨基酸序列同源性分析。

1.5 *PvSOC1* 和 *AtSOC1* 自激活活性检测

采用特异性引物(表 1), 构建 *SOC1* 酵母双杂交载体, 双酶切产物分别连入 pGADT7(AD-Active domain)和 pGBK7(BD-Binding domain)载体中去, 转入感受态细胞 DH5 α , 阳性单克隆提取质粒测序验证序列正确性, LiAc 转化法将 AD 和 BD 重组载体分别转入 Y187 和 AH109 感受态细胞中, 分别涂布在缺少亮氨酸和色氨酸(SD/-Leu 和 SD/-Trp)的培养基上, 30 °C 培养 3~5 d, 挑取单克隆活化培养进行菌液 PCR 验证, 阳性单克隆采用点滴法在含有 X-a-Gal 的缺陷培养皿上进行自激活活性检测, 其中 AD 和 BD 载体为阴性对照, P_cL 为阳性对照。30 °C 培养, 观察菌斑显色情况。

1.6 *PvSOC1* 和 *AtSOC1* 多聚体分析检测

经过验证的阳性单克隆菌液 AD-*PvSOC1*/At*SOC1* (或 BD-*PvSOC1*/At*SOC1*) 分别与 BD-*PvSOC1*/At*SOC1* (AD-*PvSOC1*/At*SOC1*), BD(AD)空载杂交, 分别吸取 10.0 μ L 的菌液, 600.0 μ L 的完全培养剂(YPDA)液体过夜培养, 100.0 μ L 培养液涂布在同时缺少亮氨酸和色氨酸(SD/-Leu-Trp)的培养皿上, 30 °C 培养 3~5 d, 挑取单克隆在液体培养基 SD/-Leu-Trp 中培养, 吸取 10.0 μ L 培养液, 点滴在含有 X-a-Gal 的 4 缺(SD/-Leu-Trp-Ade-His)固体培养皿上培养, 观察是否显色, 如果单克隆变蓝证明发生相互作用形成二聚体结构。

1.7 *PvSOC1* 和 *AtSOC1* 不同结构域载体的构建并转入酵母细胞

将 *PvSOC1* 和 *AtSOC1* 分成 M, I, K 和 C 4 个不同的结构域, 构建包括 M, MIK, KC 和 C 不同结构域的酵母双杂交载体, 设计引物(表 1), 纯化的 PCR 产物经双酶切后分别连入 AD 和 BD 载体中去, 转入 DH5 α , 菌液检测阳性克隆, 提取质粒。采用 LiAc 转化法, PEG3350/DMSO 制备感受态细胞。转入酵母宿主中去, 在相应的缺陷培养皿上培养, 挑取单克隆验证插入片段的大小。

1.8 结构域重组体自激活活性检测和多聚体分析

将不同结构域酵母双杂载体杂交培养, 在 SD/-Leu-Trp 培养皿上筛选杂合体, 并在含有 X-a-Gal 的 SD/-Leu-Trp 缺培养皿上进行显色反应。为进一步确定实验的结果, 将 SD/-Leu-Trp 缺培养皿上挑选出来的单克隆并在 SD/-Leu-Trp+X-a-Gal 培养皿上进行生长状态的培养, 观察酵母的生长状态。

2 结果与分析

2.1 *PvSOC1* 和 *AtSOC1* 目的片段的结构域分析

部分结构域同源性分析结果表明: 雷竹和其他 *SOC1* 基因序列存在差异性的部位主要集中在 I 和 C 结构域。不同的植物中 I 结构域差异性极大, 大约有 10~20 个氨基酸组成。另外, C 结构域氨基酸保守性较差, 多疏水氨基酸结构。I 和 C 结构域之间具有相对保守性的 K 结构域(图 1)。

2.2 全长 *PvSOC1* 和 *AtSOC1* 自激活和多聚体分析

实验结果分析可表明: 雷竹 *PvSOC1* 和拟南芥 *AtSOC1* 都不存在自激活活性(图 2A)。酵母双杂交多聚体分析结果表明: 雷竹 *PvSOC1* 蛋白自身不存在相互作用, 而 *AtSOC1* 易形成二聚体现象, 自身相互作用(图 2B 和图 2C)。

表 1 实验过程中所用的引物

Table 1 Primer sequences used in experiment

引物名称	引物序列(5'→3')
<i>AtSOC1</i> -100	GGAATTCCATATGGTGAGGGGCAAAACTCA
<i>AtSOC1</i> -200	GGAATTCCATATGGATCGAGTCAGCACCAA
<i>AtSOC1</i> -300	GGAATTCCATATGGATCTCATGAAAGCGA
<i>AtSOC1</i> -001	CGGGATCCTCAGCTGACTCGATCCTTAG
<i>AtSOC1</i> -002	CGGGATCCTCACCACTTTAGAGAGC
<i>AtSOC1</i> -003	CGGGATCCTCACTTTCTTGAAGAACAG
<i>PvSocM</i> -F	CGCGGATCCTAACGTCCTCGCGTATGT
<i>PvSocM</i> -R	CGCGGATCCTAACGTCCTCGCGTATG
<i>PvSocMIK</i> -R	CGCGGATCCTAACTTCCCCGTAAATC
<i>PvSocKC</i> -F	CCGGAATTCCGAAAGAAACTTGAAGCT
<i>PvSocKC</i> -R	CGCGGATCCTAACGATGGTTAGCCC
<i>PvSocC</i> -F	CCGGAATTCTGCAAGAACATCAGCTTACG
<i>PvSocC</i> -R	CGCGGATCCTAACGATGGTTAGCCCC

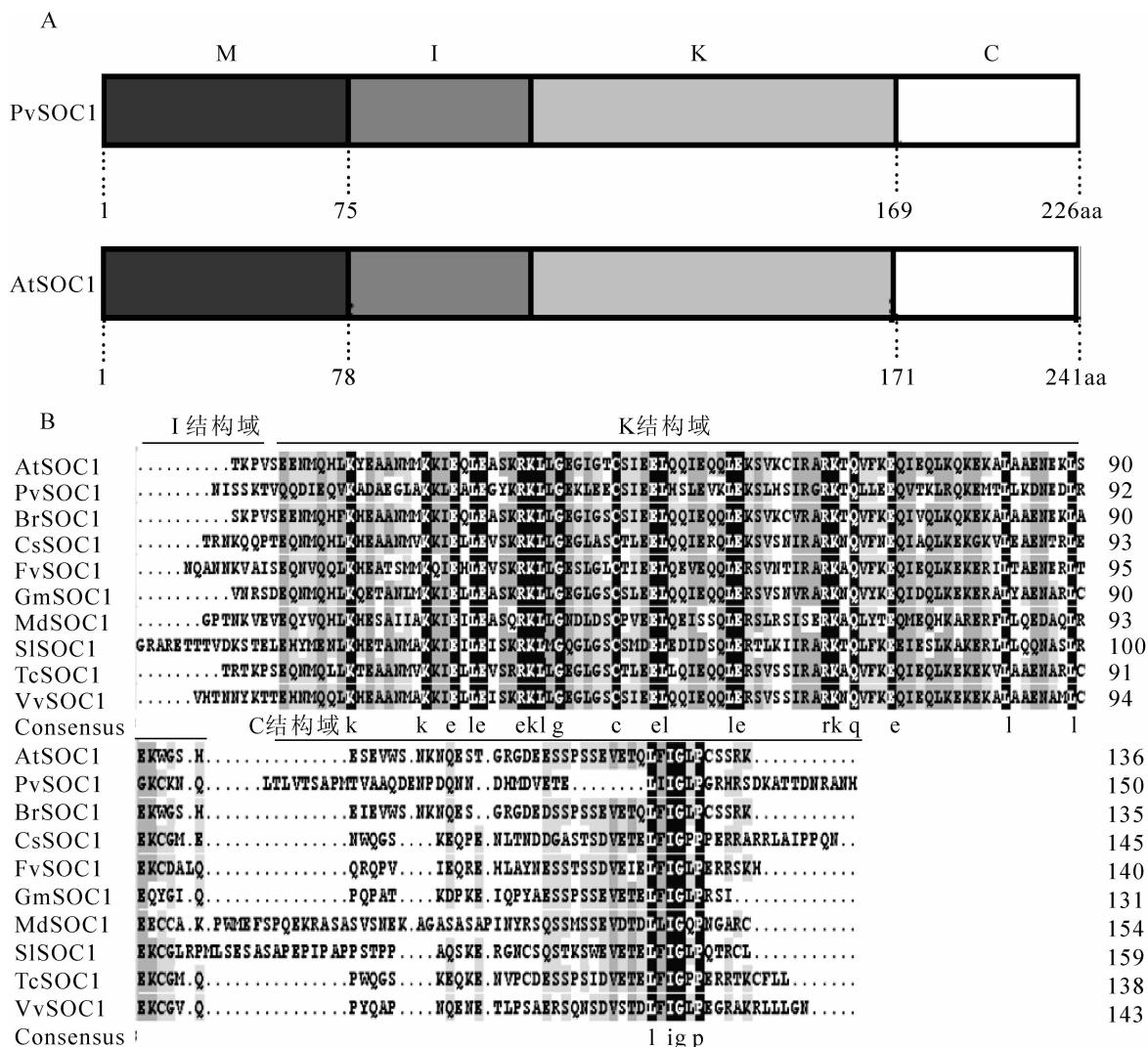


图 1 结构域示意图和不同植物 *SOC1* 局部氨基酸序列对比

Figure 1 Structural diagrams and amino acid sequence alignment

2.3 雷竹 PySOC1 不同结构域双杂交分析

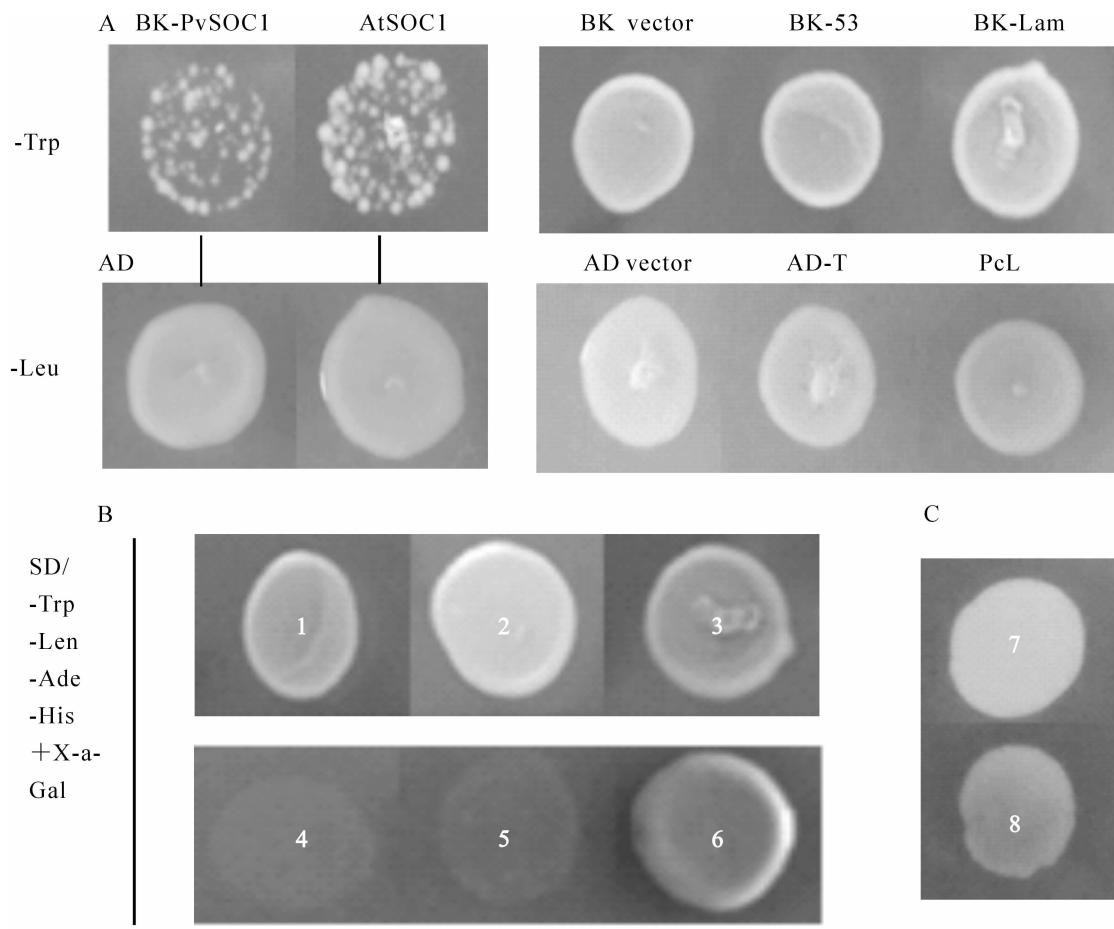
PvSOC1 基因不同结构域酵母双杂交实验可知：AD/BD-M/MIK/KC/C 不存在自激活活性现象(图 3B)，不同结构域双杂实验可知 *PvSOC1* 中的 KC 结构域存在二聚体现象，自身相互作用；M，MIK 和 C 结构域蛋白没有相互作用，图 3C 为阳性与阴性对照组(图 3)。

2.4 拟南芥 AtSOC1 不同结构域双杂交分析

AtSOC1 酵母双杂交不同结构域实验显示：结构域之间不存在自身活性现象(图 3A)；尽管实验中 AtSOC1 全长存在相互作用，能形成同源多聚体，但是单独的 M 和 C 结构域没有同样的多聚体现象发生；KC 结构域并没有发生相互作用，在有 I 存在的 MIK 结构域蛋白可以形成多聚体状态，发生相互作用(图 5)。

3 讨论

本研究以单子叶木本植物雷竹和双子叶草本植物拟南芥作为研究对象,针对 *PvSOC1* 和 *AtSOC1* 进行研究。拟南芥在开花的过程中, *AtSOC1* 起到主要的枢纽作用。*AtSOC1* 通过和自己形成不同的多聚体



A: 单缺培养皿酵母自激活检测, 其中阴性对照 BK/AD vector, BK-53, BK-Lam 和 AD-T; 阳性对照 Pcl。B: 酵母双杂交实验 SD/-Trp-Leu-Ade-His+X-a-Gal 显色反应。1. AD-PvSOC1 与 BK vector 双杂交; 2. BK-PvSOC1 与 AD vector 双杂交; 3. AD-PvSOC1 与 BK-PvSOC1 杂交; 4. AD-AtSOC1 与 BK vector 杂交; 5. BK-AtSOC1 与 AD vector 杂交; 6. AD-AtSOC1 与 BK-AtSOC1 杂交。C: 阴性对照组 7. 阴性对照组 AD-T 与 BK-53 杂交; 8. 阴性对照组 AD-T 与 BK-Lam 杂交。

图 2 PvSOC1 和 AtSOC1 自激活检测和酵母双杂交实验

Figure 2 Analysis of transcriptional activation and polymerization for PvSOC1 and AtSOC1

或者与其他 MADS-box 转录因子形成蛋白复合物来调节上下游基因的蛋白表达, 进而调控花期^[17, 22-23]。通过相关实验的证明, 揭示了 PvSOC1 和 AtSOC1 的多聚体存在差异性。拟南芥中, 酵母双杂交实验表明: AtSOC1 自身可发生相互作用, 形成同源二聚体, 这一结果与文献[24]报道的一致; 通过不同结构域双杂交实验进一步可知: C 末端缺失的 MIK 结构域也能形成同源二聚体, KC 结构域不能发生相互作用。由此判定, AtSOC1 主要功能部位的是 I 和 K 结构域。另外, 有研究发现 K 结构域在 MADS 转录因子蛋白中相对保守。K 结构域包括 3 个疏水性的 K1, K2 和 K3 结构域, 这些疏水性的氨基酸不仅仅能够协调自身同源二聚体的形成, 还能够促进一些开花基因异源二聚体的形成。比如 K 结构域中的某些疏水氨基酸可以促进 AP3 和 PI 异源二聚体的形成从而调节花器官的发育^[25]。同时 K 结构域在植物进化过程中也扮演着重要的角色。例如所有的 MADS 家族蛋白都能与特定的 DNA 相互结合形成同源或者异源二聚体^[26], 或者与其他非 MADS 家族中的蛋白形成三聚体。但是, K 结构域的疏水特异性, 更能够促进 MADS 家族内部成员形成各种各样复杂的高聚体, 调节植物内部生殖生长的需要^[27-28]。

对雷竹 PvSOC1 进行酵母双杂交实验, 实验发现: 尽管 PvSOC1 不易形成同源二聚体, 但是在 MADS 和 C 结构域同时缺失的情况下, KC 结构域可以形成同源二聚体, 结构域 K 是主要的作用部位。雷竹 PvSOC1 和拟南芥 AtSOC1 酵母双杂交实验进行对比(表 2), 结果发现: 引起 PvSOC1 和 AtSOC1 多聚体差异性的原因主要在于 I 结构域。I 结构域大约有 20~30 个氨基酸组成, 这些氨基酸相对的不保守, 但是有实验发现 I 结构域不仅能够帮助转录因子结合 DNA, 还能够起到促进自身二聚体形成的作用。

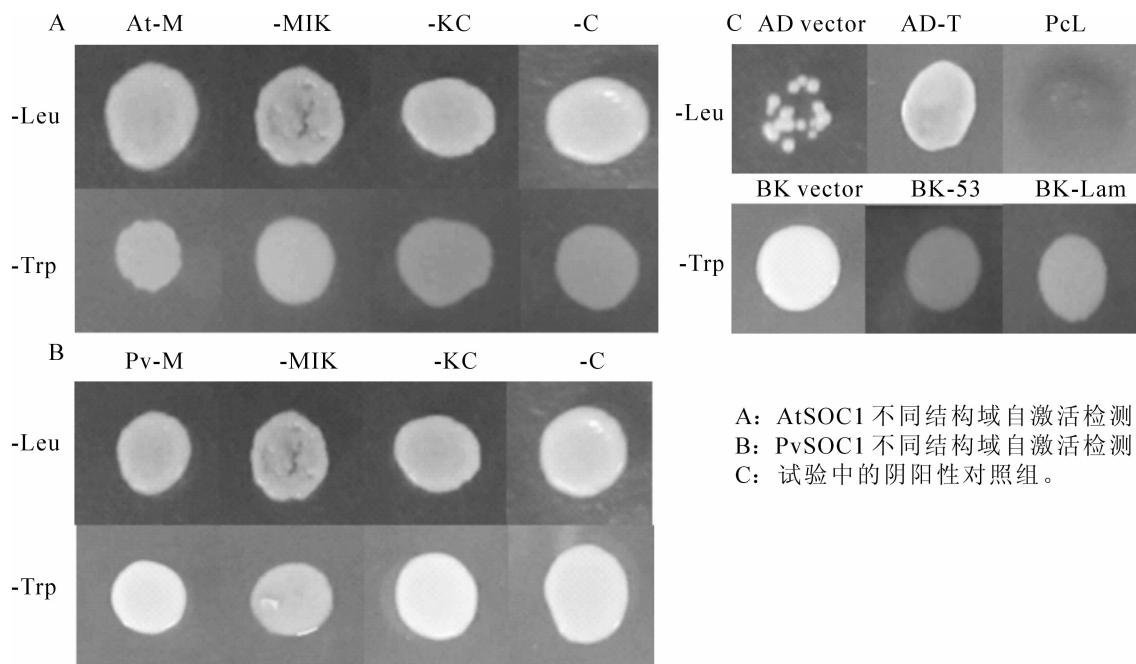


图3 PvSOC1 和 AtSOC1 不同结构域蛋白酵母转录激活检测

Figure 3 Yeast two hybrid system to detect the transcriptional activation among different domains in PvSOC1 and AtSOC1, respectively

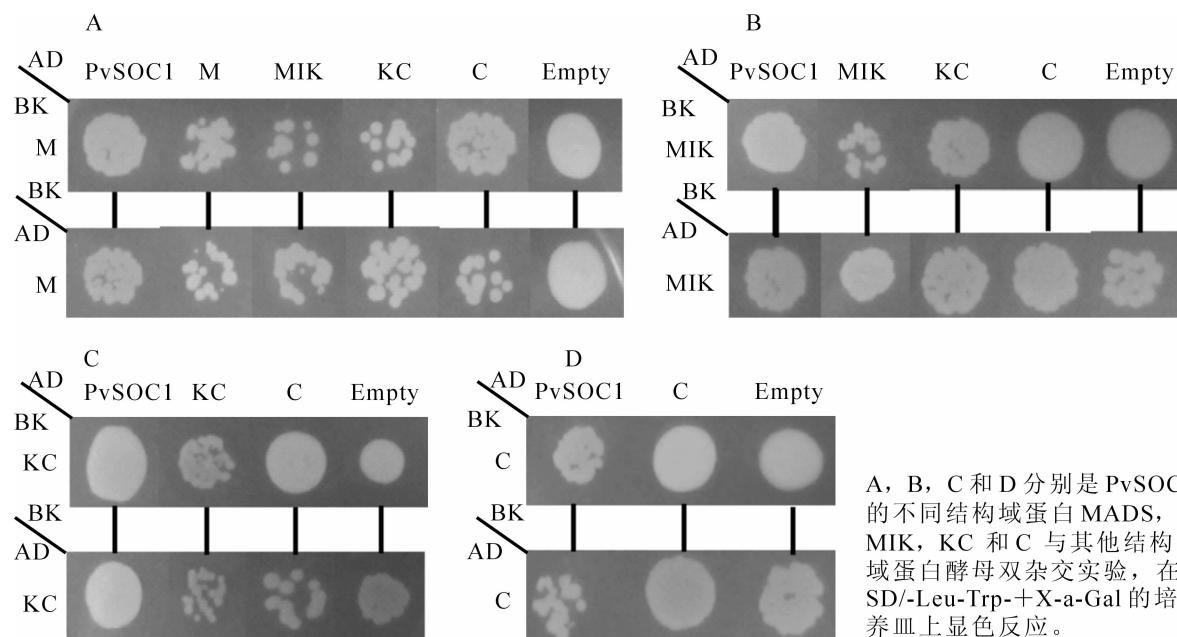


图4 PvSOC1 不同结构域蛋白酵母双杂交实验多聚体分析

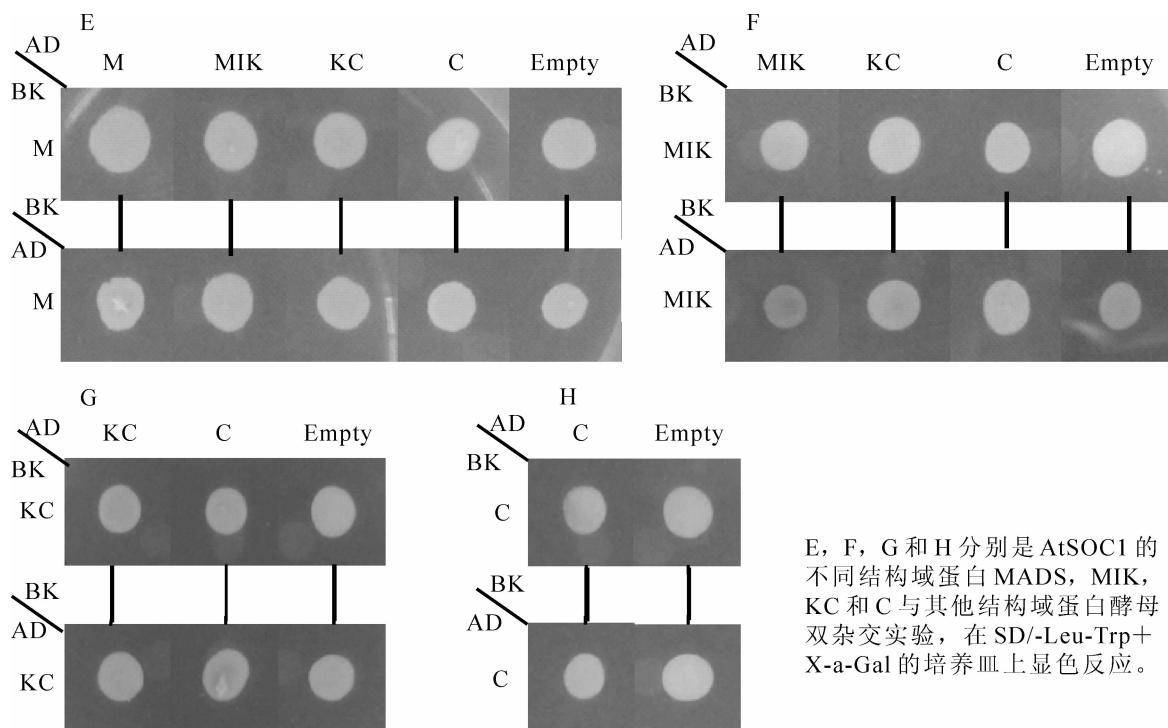
Figure 4 Yeast-two hybrid assays to analyze the domain polymerization in PvSOC1

表2 PvSOC1 和 AtSOC1 不同结构域双杂结果总结

Table 2 Summary of the yeast two hybrid

PvSOC1	M	MIK	KC	C	AtSOC1	M	MIK	KC	C
M	N	N	N	N	M	N	N	N	N
MIK	N	N	N	N	MIK	N	Y	N	N
KC	N	N	Y	N	KC	N	N	N	N
C	N	N	N	N	C	N	N	N	N

说明: PvSOC1 自身互作和 AtSOC1 自身互作结果没有列入表中。前者没有观察到二聚体形成; 后者观察到形成同源二聚体。



E, F, G 和 H 分别是 AtSOC1 的不同结构域蛋白 MADS, MIK, KC 和 C 与其他结构域蛋白酵母双杂交实验, 在 SD/-Leu-Trp+X-a-Gal 的培养皿上显色反应。

图 5 AtSOC1 不同结构域蛋白酵母双杂交实验多聚体分析

Figure 5 Yeast-two hybrid assays to analyze the domain polymerization in AtSOC1

用^[7, 22, 29]。氨基酸序列对比进一步表明, PvSOC1 和 AtSOC1 中的 I 序列差异性极大, 这种差异性有可能是 PvSOC1 和 AtSOC1 形成不同聚体状态的一个主要原因。尽管如此, 雷竹与拟南芥 SOC1 蛋白在形成多聚体模式上的差异性, 是否与 PvSOC1 在调控雷竹花期过程中的特异功能相关联, 尚需通过转基因功能实验进行验证。

4 参考文献

- [1] MOON J, SUH S S, LEE H, et al. The SOC1 MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2003, **35**(5): 613 – 623.
- [2] KIMURA Y, AOKI S, ANDO E, et al. A flowering integrator, SOC1, affects stomatal opening in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2015, **56**(4): 640 – 649.
- [3] MELZER R, THEIßEN G. MADS and more: transcription factors that shape the plant [J]. *Methods Mol Biol*, 2009, **754**: 3 – 18.
- [4] LEE H, SUH S S, PARK E, et al. The AGAMOUS-LIKE 20 MADS domain protein integrates floral inductive pathways in *Arabidopsis* [J]. *Genes & Dev*, 2000, **14**(18): 2366 – 2376.
- [5] 周佳平, 林新春, 徐英武. 拟南芥 *SEPALLATA3* 蛋白质原核表达与纯化 [J]. 浙江农林大学学报, 2014, **31**(1): 14 – 18.
ZHOU Jiaping, LIN Xinchun, XU Yingwu. *Arabidopsis thaliana SEPALLATA3* protein in a prokaryotic system [J]. *J Zhejiang A & F Univ*, 2014, **31**(1): 14 – 18.
- [6] SAMACH A, ONOUCHI H, GOLD S E, et al. Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of *Arabidopsis* [J]. *Science*, 2000, **288**(5471): 1613 – 1616.
- [7] SONG Guoqing, WALWORTH A, HILDEBRANDT B, et al. Constitutive expression of the K-domain of a *Vaccinium corymbosum* SOC1-like (*VcSOC1-K*) MADS-box gene is sufficient to promote flowering in tobacco [J]. *Plant Cell Rep*, **32**(11): 1819 – 1826.
- [8] KHAN M R, KHAN I U, ALI G M. MPF2-like MADS-box genes affecting expression of *SOC1* and *MAF1* are recruited to control flowering time [J]. *Mol Biotechnol*, 2013, **54**(1): 25 – 36.
- [9] WIGGE P A, KIM M C, JAEGER K E, et al. Integration of spatial and temporal information during floral induction in

- Arabidopsis* [J]. *Science*, 2005, **309**(5737): 1056 – 1059.
- [10] SOLOMON G L. A 6 1/2-pound device saves me tons of time [J]. *Med Econ*, 1992, **69**(21): 179 – 182.
- [11] SEARLE I, HE Yuehui, TURCK F, et al. The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis* [J]. *Gene & Dev*, 2006, **20**(7): 898 – 912.
- [12] 朱龙飞, 徐英武, 林新春. 绿竹花发育相关基因 *BoAP3* 的克隆与分析[J]. 浙江农林大学学报, 2013, **30**(6): 839 – 842.
- ZHU Longfei, XU Yingwu, LIN Xinchun. Cloning and analysis of the flowering-related gene, *BoAP3*, in *Bambusa oldhamii* [J]. *J Zhejiang A & F Univ*, 2013, **30**(6): 839 – 842.
- [13] POLLOCK R, TREISMAN R. Human SRF-related proteins: DNA-binding properties and potential regulatory targets [J]. *Genes Dev*, 1991, **5**(12a): 2327 – 2341.
- [14] DING Lihua, WANG Yanwen, YU Hao. Overexpression of *DOSOC1*, an ortholog of *Arabidopsis SOC1*, promotes flowering in the orchid *Dendrobium Chao Parya Smile* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2013, **54**(4): 595 – 608.
- [15] NAKAMURA T, SONG I J, FUKUDA T, et al. Characterization of *TrcMADS1* gene of *Trillium camtschatcense* (Trilliaceae) reveals functional evolution of the *SOC1/TM3-like* gene family [J]. *J Plant Res*, 2005, **118**(3): 229 – 234.
- [16] FAN Huaying, HU Yi, TUDOR M, et al. Specific interactions between the K domains of AG and AGLs, members of the MADS domain family of DNA binding proteins [J]. *Plant J*, 1997, **12**(5): 999 – 1010.
- [17] LEE J, OH M, PARK H, et al. SOC1 translocated to the nucleus by interaction with AGL24 directly regulates *LEAFY* [J]. *Plant J*, 2008, **55**(5): 832 – 843.
- [18] LIU Chang, CHEN Hongyan, ER H L, et al. Direct interaction of *AGL24* and *SOC1* integrates flowering signals in *Arabidopsis* [J]. *Development*, 2008, **135**(8): 1481 – 1491.
- [19] JUNG J H, JU Y, SEO P J, et al. The SOC1-SPL module integrates photoperiod and gibberellic acid signals to control flowering time in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2012, **69**(4): 577 – 588.
- [20] 林新春, 袁晓亮, 林绕, 等. 雷竹开花生物学特性研究[J]. 福建林学院学报, 2010, **30**(4): 333 – 337.
- LIN Xinchun, YUAN Xiaoliang, LIN Rao, et al. Studies on floral biology of *Phyllostachys violascens* [J]. *J Fujian Coll For*, 2010, **30**(4): 333 – 337.
- [21] 马腾飞, 林新春. 植物 *SOC1/AGL20* 基因研究进展[J]. 浙江农林大学学报, 2013, **30**(6): 930 – 937.
- MA Tengfei, LIN Xinchun. Advanced research on *SOC1/AGL20* genes in plants: a review [J]. *J Zhejiang A & F Univ*, 2013, **30**(6): 930 – 937.
- [22] SONG Guoqing, WALWORTH A, ZHAO Dongyan, et al. Constitutive expression of the K-domain of a *Vaccinium corymbosum* *SOC1*-like (*VcSOC1-K*) MADS-box gene is sufficient to promote flowering in tobacco [J]. *Plant Cell Rep*, 2013, **32**(11): 1819 – 1826.
- [23] MELZER S, LENZ F, GENNEN J, et al. Flowering-time genes modulate meristem determinacy and growth form in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Nat Genet*, 2008, **40**(12): 1489 – 1492.
- [24] LESEBERG C H, EISLER C L, WANG X, et al. Interaction study of MADS-domain proteins in tomato [J]. *J Exp Bot*, 2008, **59**(8): 2253 – 2265.
- [25] YANG Yingzhen, FANNING L, JACK T. The K domain mediates heterodimerization of the *Arabidopsis* floral organ identity proteins, *APETALA3* and *PISTILLATA* [J]. *Plant J*, 2003, **33**(1): 47 – 59.
- [26] BALLERINI E S, MOCKAITIS K, ARNOLD M L. Transcriptome sequencing and phylogenetic analysis of floral and leaf MIKC(C) MADS-box and R2R3 MYB transcription factors from the monocot *Iris fulva* [J]. *Gene*, 2013, **531**(2): 337 – 346.
- [27] KAUFMANN K, MELZER R, THEIßEN G. MIKC-type MADS-domain proteins: structural modularity, protein interactions and network evolution in land plants [J]. *Gene*, 2005, **347**(2): 183 – 198.
- [28] SEO E, LEE H, JEON J, et al. Crosstalk between cold response and flowering in *Arabidopsis* is mediated through the flowering-time gene *SOC1* and its upstream negative regulator *FLC* [J]. *Plant Cell Online*, 2009, **21**(10): 3185 – 3197.
- [29] MA H, YANOFSKY M F, MEYEROWITZ E M. *AGL1-AGL6*, an *Arabidopsis* gene family with similarity to floral homeotic and transcription factor gene [J]. *Genes & Dev*, 1991, **5**(3): 484 – 495.

马尾松水通道蛋白 *PmPIP1* 基因克隆及在干旱胁迫下的表达分析

蔡 琼^{1,2}, 丁贵杰^{1,2}, 文晓鹏³

(1. 贵州省森林资源与环境研究中心, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州大学林学院, 贵州 贵阳 550025; 3. 贵州大学贵州省农业生物工程重点实验室, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 克隆马尾松 *Pinus massoniana* 水通道蛋白(AQP), 并对其生物信息学与干旱胁迫表达模式进行分析。采用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)以及互补脱氧核糖核酸(cDNA)末端快速扩增(RACE)方法克隆马尾松水通道蛋白基因。采用实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)分析其在干旱胁迫下的响应模式。结果克隆到一个马尾松水通道蛋白基因, 命名为 *PmPIP1*(GenBank 登录号为 KF582038)。此基因 cDNA 全长序列为 1 301 bp, 包括 867 bp 的完整开放阅读框, 99 bp 的 5'末端非翻译区和 335 bp 的 3'末端非翻译区。编码 288 个氨基酸残基, 分子量为 30.86 kD, 等电点(pI)8.48。*PmPIP1* 与菠菜 *Spinacia oleracea* (2b5fA)水通道蛋白结构相似。*PmPIP1* 含有 6 个跨膜区, 具有膜内在蛋白(MIP)家族信号序列、高等植物高度保守序列 HINPAVTFG 和 2 个天门冬酰胺-脯氨酸-丙氨酸(NPA)保守肽段。*PmPIP1* 基因属质膜内在蛋白(PIPs)亚族, 与挪威云杉 *Picea abies* 水通道蛋白基因亲缘关系最近, 同源性达 95%。qRT-PCR 表明 *PmPIP1* 受干旱胁迫诱导表达。马尾松 *PmPIP1* 的克隆丰富了植物 AQP 基因的资料库, 同时推测 *PmPIP1* 基因可能参与了马尾松干旱胁迫过程。图 8 表 1 参 39

关键词: 植物学; 马尾松; 水通道蛋白; 克隆; 表达

中图分类号: S791.248 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2016)02-0191-10

Cloning of the *PmPIP1* gene from *Pinus massoniana* and its expression with drought stress

CAI Qiong^{1,2}, DING Guijie^{1,2}, WEN Xiaopeng³

(1. Institute of Forest Resources and Environment, Guiyang 550025, Guizhou, China; 2. College of Forestry, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China; 3. Guizhou Key Laboratory of Agricultural Bioengineering, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China)

Abstract: The aquaporin (AQP) gene plays an important role in plants adapting to abiotic stresses. To predict the AQP gene function and provide basal data for mechanism of *Pinus massoniana*'s drought resistance, the sequence characteristics of the AQP gene from *P. massoniana* were analyzed and its expression profiling was studied after drought-stress treatment. The AQP gene was cloned using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid-amplification of complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) ends (RACE). The expression of the AQP gene was then performed using quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR). The full-length cDNA of the AQP gene from *P. massoniana*, designated *PmPIP1* with a registered number in GenBank KF582038, was obtained. Results of the sequence analysis showed that the size

收稿日期: 2015-04-10; 修回日期: 2015-05-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31260183); “十二五”国家科技支撑计划项目(2015BAD09B0102); 国家高技术研究发展计划(“863”计划)项目(2011AA10020301); 贵州省重大专项(黔科合重大专项字[2012]6001号); 贵州省人才基地建设项目(黔人领发[2009]9号)

作者简介: 蔡琼, 从事林木栽培生理生态与分子生物学研究。E-mail: dukecq@sina.com。通信作者: 丁贵杰, 教授, 博士生导师, 从事森林培育和人工林稳定性等研究。E-mail: gjdinggzu@126.com

of *PmPIP1* was 1 301 bp, containing an 867 bp open reading frame that encoded 288 amino acid residues with 30.86 kDa molecular weight and an 8.48 isoelectric point, a 99 bp 5' terminal untranslated regions (UTR), and a 335 bp 3' terminal UTR. The *PmPIP1* 3D structure had a strong similarity to *Spinacia oleracea* (2b5fA). *PmPIP1* exhibited a typical structure with six transmembrane domains, and had the consensus sequence HIN-PAVTG of membrane intrinsic protein (MIP) family and two highly conserved peptides Asn-Pro-Ala (NPA). The evolutionary analysis revealed that *PmPIP1* shared a 95% identity with *Picea abies* and belonged to PIPs. The *PmPIP1* expression patterns with drought conditions showed that drought did induce *PmPIP1*. In conclusion, cloning of the *PmPIP1* gene from *P. massoniana* enriched the plant aquaporin gene database, and the qRT-PCR analysis indicated that the *PmPIP1* gene may be involved in the response related to drought stress. [Ch, 8 fig. 1 tab. 39 ref.]

Key words: botany; *Pinus massoniana*; aquaporin; cloning; expression

水通道蛋白(AQP)是指细胞膜上能选择性地高效转运水分子的膜转运蛋白^[1]。自1993年Maurel等^[2]从拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 中分离到第1个植物水孔蛋白 γ -TIP以来,已在细菌、古生菌、真菌、动物和植物等几乎所有生物中发现AQP^[3-5]。在植物中,拟南芥^[6]和水稻 *Oryza sativa*^[7-8]等AQP基因的研究较为清楚。根据水通道蛋白的亚细胞定位,结合序列同源性分为4种类型:质膜内在蛋白(PIP),液泡膜内在蛋白(TIP),类结瘤蛋白(NIP)及小碱性膜内蛋白(SIP)^[9-10]。AQP属跨膜通道的膜内在蛋白(MIP)家族,具有转运水、甘油、小分子溶质的功能,在植物应对水分不足的响应机制中起着重要作用^[11]。马尾松 *Pinus massoniana* 因适生能力强、速生、丰产、综合利用程度高等优良特性,成为中国南方最主要用材树种之一^[12]。以往关于马尾松林的研究主要集中在林木栽培技术^[13]、栽培机制^[14-15]、连栽生态系统变化^[16]、合理采伐年龄^[17]、人工林生长规律^[18]等方面,而对其分子生物学相关研究甚少^[19]。干旱是影响林木正常生长发育的一个最重要的逆境因子。克隆马尾松抗旱相关基因以及研究其表达调控,对揭示马尾松抗旱分子机制具有十分重要的意义。其中,水通道蛋白 PIPs 亚型基因在植物干旱分子调控机制中是一个重要的调控基因,其不仅受胁迫表达变化,而且转运活性受磷酸化调控^[20],参与非生物胁迫的响应。CUI等^[21]发现过表达 *VfPIP1* 的拟南芥增强了植株的抗旱能力。ZHOU等^[22]研究表明小麦 *Triticum aestivum* *TaAQ7*(PIP2)在聚乙二醇(PEG)处理后表达量上调,在番茄 *Solanum lycopersicum* 中过量表达同样增强了其抗旱性。目前,马尾松水通道蛋白 PIPs 基因克隆和功能分析至今未见研究报道。因此,对马尾松水通道蛋白 PIPs 基因进行克隆并分析其在干旱胁迫下的响应模式,为马尾松抗旱基因工程和遗传改良提供可资利用的基因资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选用高抗旱马尾松优良家系1年生幼苗为供试材料。植株平均高度为17.2 cm。培养容器为塑料盆(27 cm × 18 cm × 25 cm),按V(黄壤):V(河砂)=9:2混合构成。设对照(土壤相对含水量为70% ± 5%)和中度胁迫(土壤相对含水量为40% ± 5%)2个处理。每天通过称量法维持土壤相对含水量在试验设计的范围内。干旱胁迫实施0, 3, 5, 10, 15, 20, 25 d分根、茎、叶取试材,迅速彻底去除细土和其他杂物,液氮冷冻,保存于-80 °C,作为实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)的试验材料。

1.2 方法

1.2.1 总核糖核酸(RNA)的提取 参照Plant RNA Reagent与RNAPrep pure Plant Kit说明书进行。

1.2.2 目的基因克隆 根据美国生物技术信息中心(NCBI)数据库中已报道的AQP基因序列,设计简并引物M1与M2(表1),获得 *PmPIP1* 基因中间片段。聚合酶链式反应(PCR)反应体系(25.0 μL):模板1.0 μL,引物各1.0 μL,MasterMix 12.5 μL,重蒸水9.5 μL。PCR反应条件:预变性94 °C 3 min,变性94 °C 30 s,退火48.7 °C 30 s,延伸72 °C 1 min,35个循环,后延伸72 °C 10 min。在此片段基础上,设计5'-RACE特异性引物GSP1, GSP2和GSP3(表1),参照5'-RACE system for rapid amplification of cDNA ends说明,扩增目的基因5'端序列。设计3'-RACE特异性引物M3与M4(表1),参照3'-Full

RACE core set with prime ScriptTM RTase 说明, 扩增目的基因3'端序列。设计特异性引物M5与M6(表1), 验证*PmPIP1*基因互补脱氧核糖核酸(cDNA)全长序列。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下切下相应条带, 按照DNA Purification Kit试剂盒说明进行胶回收, 与pMD18-T Vector连接, 转化大肠埃希菌*Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞, 筛选阳性克隆子, 送至北京诺赛基因组研究中心有限公司进行测序。

表1 *PmPIP1*基因克隆及表达使用的引物Table 1 PCR primers used to the cloning and expression of *PmPIP1*

引物	引物序列5'→3'	作用
M1	GGNGGNCAAYATAAAYCCNGC	扩增保守片段
M2	GGNCCNACCCARAADATCCA	
GSP1	CTCCCAAGCACTGACA	
GSP2	CAGCCCCGGGCAGAGACAGA	5'-RACE扩增5'末端序列
GSP3	GCCAAGAACAGCCCAAAGGT	
M3	CATCACTGGAACTGGCATCAACCTG	3'-RACE扩增3'末端序列
M4	GCTGCCATCATCTACAACAAGTCTCG	
M5	ATGGAAGGAAAAGAAGAAGACG	全长cDNA扩增
M6	CTAGGAGCGAGTTGAAGGGAATG	
18S-F	TTAGGCCATGGAGGTTTGAG	扩增内标
18S-R	GAGTTGATGACACCGCGCTTA	
UBC-F	AGGATCATCAGGATTGGGT	
UBC-R	GATTATTTCATTGGCAGGC	
M7	TAACCCAGCAGTGACCTTT	检测 <i>PmPIP1</i>
M8	TCCCACAAATCTCACCCACCC	

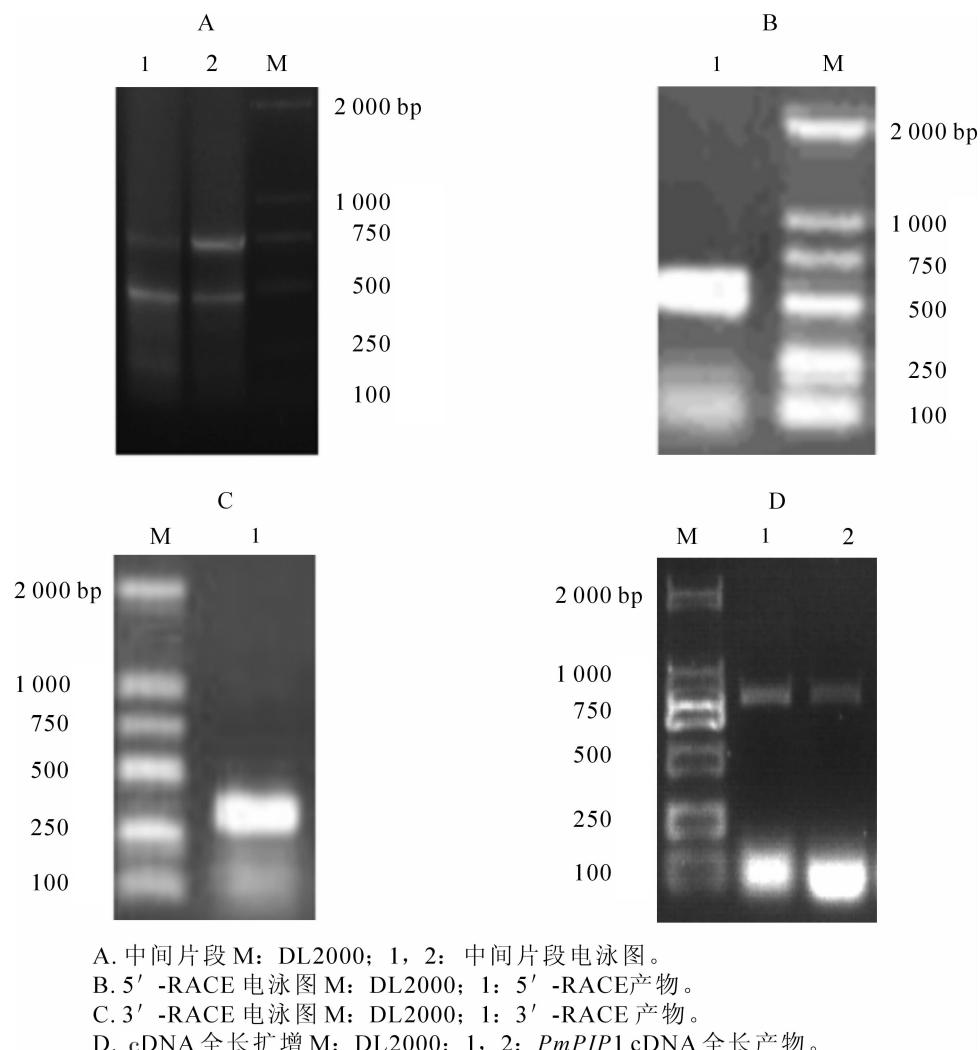
1.2.3 序列分析 测序结果采用DNAStar进行拼接, 并与美国国家生物技术信息中心(NCBI)数据库进行局部序列比对基本检索工具(BLAST)比对, 利用ProtScale Sever软件分析蛋白亲水/疏水性; 利用Ex-PASy ProtParam tool计算蛋白的等电点和分子量; 利用TMHMM预测跨膜区; 利用Signal P预测信号肽; 利用SWISS-MODEL预测三级结构; 利用DNAMAN软件进行蛋白质序列的多重比对并构建基因的系统进化树。

1.2.4 基因表达分析 设计特异引物M7和M8(表1)作为RT-qPCR引物, 马尾松18S和泛素(UBC)(表1)基因为内标基因, 进行RT-qPCR反应, 重复3次·反应⁻¹。PCR反应体系为2×荧光定量预混试剂增强版(super real premix plus)10.0 μL, 正、反向引物各为0.6 μL, cDNA模板0.5 μL, 重蒸水8.3 μL, 终体积20.0 μL。扩增程序95 °C 1 min, 95 °C 10 s, 60 °C 32 s, 共35个循环。基因相对表达量的计算采用2^{-ΔΔCT}法^[23]。采用SPSS16.0软件进行数据统计分析, 用方差分析(ANOVA)模块分析差异显著性。

2 结果与分析

2.1 马尾松*PmPIP1*基因cDNA全长的克隆

以cDNA为模板, 用简并引物进行PCR扩增, 获得1个458 bp的中间片段(图1A)。在此基础上, 进行5'端与3'端PCR扩增。结果显示: 5'-RACE在520 bp左右获得1条亮带(图1B), 3'-RACE在460 bp左右获得1条亮带(图1C)。PCR产物经回收、连接、转化、测序及拼接, 获得*PmPIP1*基因序列。为验证*PmPIP1*序列准确性, 进行基因全长PCR扩增, 在867 bp左右获得1条亮带, 大小与拼接得到的*PmPIP1*基因的完整开放阅读框大小一致(图1D)。阳性克隆经测序证实扩增序列与拼接结果一致。此基因已登录GenBank, 登录号为KF582038。对*PmPIP1*基因全长序列分析表明: 全长cDNA为1 301 bp, 含1个完整开放阅读框867 bp, 5'末端非翻译区99 bp, 3'末端非翻译区335 bp, 在100 bp处发现起始密码子ATG, 964 bp处发现终止密码子TAG, 编码288个氨基酸(图2)。利用NCBI的BLAST对*PmPIP1*进行蛋白保守区预测(图3), 结果显示: *PmPIP1*有1个MIP保守区。*PmPIP1*的氨基酸残基在MIP匹配区内与MIP蛋白保守区序列完全一致, 可以推测*PmPIP1*基因是水通道蛋白基因家族一员。



A. 中间片段 M: DL2000; 1, 2: 中间片段电泳图。
 B. 5' -RACE 电泳图 M: DL2000; 1: 5' -RACE 产物。
 C. 3' -RACE 电泳图 M: DL2000; 1: 3' -RACE 产物。
 D. cDNA 全长扩增 M: DL2000; 1, 2: *PmPIP1* cDNA 全长产物。

图 1 琼脂糖凝胶电泳结果
 Figure 1 Agarose gel electrophoresis results

2.2 生物信息学分析

ProtParam 分析表明 *PmPIP1* 蛋白分子量为 30.86 kD, 理论等电点为 8.48。此蛋白中相对含量比较多的氨基酸是甘氨酸 Gly(G) 和丙氨酸 Ala(A), 分别为 36 和 34 个; 蛋白质不稳定指数为 30.91, 属于稳定蛋白。经 Signal P 分析, 没有信号肽切割位点, 说明此蛋白为非分泌蛋白。ProtScale 表明此转运蛋白符合膜蛋白的特征, 具有较强的疏水性。Predictprotein 显示 *PmPIP1* 蛋白含有 1 个依赖于 cAMP and cGMP 蛋白激酶磷酸化位点、2 个蛋白激酶 C 磷酸化位点、3 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点和 10 个肉豆蔻酰化位点。蛋白激酶 C 在许多信号通路中的功能与膜结合密切相关, N-豆蔻酰化一般被认为是一个组成性的过程和一个永久性的修饰, 起开关作用^[24]。这些位点可能与 *PmPIP1* 调控关系密切。

运用 TMHMM Server 软件对 *PmPIP1* 进行跨膜区分析, 膜螺旋中氨基酸期望值高达 127.431 43, 且具有水通道蛋白典型的 6 个跨膜区(TM1~TM6), 由膜两侧的 5 个亲水环(Loop A, B, C, D, E)连接, A, C 和 E 环在细胞膜外, B, D 环及 N, C 末端都位于细胞膜内(图 4)。TM2 和 TM3 之间, TM5 与 TM6 之间, 各包含有 1 个天门冬酰胺-脯氨酸-丙氨酸 Asn-Pro-Ala(NPA)保守结构域, NPA 高度保守, 几乎所有的 MIP 均具有此结构域。*PmPIP1* 具有质膜水通道蛋白 C 环和 E 环的特征序列(GGGANXXXXGY 和 TGI/TNPARSL/FGAAI/VI/VF/YN)以及水通道形成有关的高度保守的 EXXXTXXF/L 单元, 这与已经证明具有水通道蛋白功能的 *AtPIP1* 功能区的氨基酸序列高度一致。N 末端 53 个氨基酸, C 末端 9 个氨基酸, 符合植物水通道蛋白 PIP1 亚家族成员的 N-端长、C-端短的特点, 因此, 推测 *PmPIP1* 基因属于 PIP1 亚家族成员。

将 *PmPIP1* 与已知的其他植物水通道蛋白进行氨基酸序列多重比对分析, 结果表明: *PmPIP1* 与挪威

1 TTGATCACACATTCTGATTCGACTTGGCTGCACTATTTGGCTTGTGACTGAGTTGAGACAGTCGAACTCTGGTTCTGGTCTTGTGAA
100 ATG GAA GGA AAA GAA GAA GAC GTT AAG CTC GGG GCG AAC AAG TAT TCC GAG AGG CAG CCG CTG GGG ACT GCG GCA
1 M E G K E E D V K L G A N K Y S E R Q P L G T A A
N端(1~53aa)

175 CAG ACG AGG GAA AAG GAT TAC AAG GAG CCG GGT CCC GCG CCA CTG TTC GAA CCC GGG GAG TTG GCG TCA TGG TCC
26 Q T R E K D Y K E P G P A P L F E P G E L A S W S
250 TTC TGG AGG GCG GGT ATT GCA GAG TTC ATG GCG ACT TTC TTG TTT CTT TAC ATC ACG ATC CTC ACG GTC ATG GGT
51 F W R A G I A E F M A T F L F L Y I T I L T V M G
TM1(54~76aa)

325 GTC AAG AGG GCC GAC AAT GTT TGC ACT GGA TCT GTT GGA ATT CAG GGG ATT GCA TGG GCC TTT GGG GGA ATG ATC
76 V K R A D N V C T G S V G I Q G I A W A F G G M I
A环(77~90aa)

400 TTC TGT CTC GTC TAT TGC ACA GCC GGT ATT TCA GGT GGT CAT ATT AAC CCA GCA GTG ACC TTT GGG CTG TTC TTG
101 F C L V Y C T A G I S G G H I N P A V T F G L F L
TM2(91~113aa) B环(114~133aa)

475 GCC AGA AAG CTG TCT CTG CCC CGG GCT GTG TTC TAC ATG ATA TGT CAG TGC TTG GGA GCC ATC TGT GGC GCT GGT
126 A R K L S L P R A V F Y M I C Q C L G A I C G A G
550 GTT GTG AAG GCC TTC ATG GAA GGC GAG TAC CAA GCG GAC GGT GGA GGT GCT AAC TCT GTG GCT CAT GGC TAC ACC
151 V V K G F M E G E Y Q A D G G G A N S V A H G Y T
TM3(134~156aa) C环(157~178aa)

625 AAG GGA GAT GGC TTG GGT GCT GAG ATT GTG GGA ACC TTC GTT CTG GTC TAC ACC GTT TTC TCT GCT ACC GAT GCC
176 K G D G L G A E I V G T F V L V Y T V F S A T D A
TM4(179~196aa) D环(197~208aa)

700 AAA CGA AGC GCC CGG GAT TCT CAC GTT CCT CTG CTA GCA CCA CTT CCA ATA GGG TTT GCA GTT TTT CTG GTT CAC
201 K R S A R D S H V P L L A P L P I G F A V F L V H
775 CTT GCC ACA ATT CCT ATC ACT GGA ACT GGC ATC AAC CCT GCC CGA AGC TCG GGA GCT GCC ATC ATC TAC AAC AAG
226 L A T I P I T G T G I N P A R S S G A A I I Y N K
TM5(209~231aa) E环(232~256aa)

850 TCT CGT GTT TGG GAT GAC CAT TGG ATT TTC TGG GTC GGT CCA TTC TTG GGC GCT GGC TTG GCA GCT ATT TAC CAC
251 S R V W D D H W I F W V G P F L G A G L A A I Y H
925 CAG ATG ATC ATT CGT GCC ATT CCC TTC AAA ACT CGC TCC TAG AAACAGCCCAGCCTAGCCCAGCATATTGGAGGGGGCTAAAG
276 Q M I I R A I P F K T R S *
TM6(257~279aa) C端(280~288aa)

1011 CTTAAAGCTGAGAGGCTGTTAACGATGTTATTGTCGACTGATAATGGTTACAGGATGGATGATATCCATATATTGTTAAAGTGTGATTAA
1111 GGGCAGCGGAAGCCTCTGGCAGATTCTGCTCTCGTGGGCTCAGGGAGTGTATTATCTCTGTTGAAATAATGGACTCTTGCCTGTTGCACTCAGT
1211 GGGCTGCTGTTAAATTCTGCTTATCTCTTTAAATGGAAGTTAGCCAGTGTGTTGAAAAA

下划线为跨膜区；虚线为质膜水通道蛋白家族的特征序列；方框部分为 NPA box；阴影部分表示环；终止密码子用“*”标注。

图 2 *PmPIP1* 基因核苷酸序列及推测的氨基酸序列

Figure 2. Nucleotide sequence and amino acid sequence of the *PmPIP1* gene.

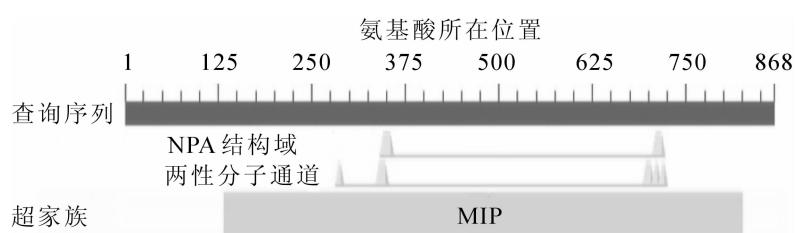
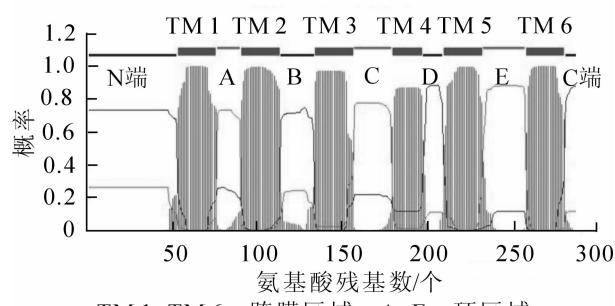


图 3 PmPIP1 核酸序列的保守结构域

Figure 3 Conserved domains of nucleic acid sequences of PmPIP1

云杉 *Picea abies* 具有极高的同源性, 可达 95%, 与拟南芥, 葡萄 *Vitis vinifera*, 陆地棉 *Gossypium hirsutum*, 无梗花栎 *Quercus petraea*, 野茶树 *Camellia sinensis*, 小果野芭蕉 *Musa acuminata*, 烟草 *Nicotiana tabacum*, 白花柽柳 *Tamarix albiflorum* 等植物的同源性达 83%~87% (图 5)。由此可以看出: 水通道蛋白基因家族编码蛋白氨基酸序列的保守性非常强, 不同植物的水通道蛋白序列具有高度的同源性。

将 PmPIP1 氨基酸序列与其他植物 AQP 基



TM 1~TM 6: 跨膜区域; A~E: 环区域。

图 4 PmPIP1 蛋白跨膜区的预测

Figure 4 Prediction model for transmembrane domain of PmPIP1 protein

拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	MEG KEE DVRLV GANKFP ERQPI GTSAQS . TDKD YKEPP PAPL FEP GELSSWS F YRAGI AEFIA TFLFL YI TVL	93
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	MEG KEE DVRLV GANKFS ERQPI GTAAQG . DDKD YKEPP PAPL FEP GELCSWS F YRAGI AEFIA TFLFL YI TVL	93
陆地棉花 <i>Gossypium hirsutum</i>	MEG KEE DVKL GANKFS ERQPI GTSAQS . TDKD YKEPP PAPL FEP GELKSWS F YRAGI AEFIA TFLFL YI TVL	92
无梗花栎 <i>Quercus petraea</i>	MEG KEE DVKV GANKYS ERQPLGTSQA . TDKD YKEPP PAPL FEP GELSSWS F YRAGI AEFIA TFLFL YI TLL	92
野茶树 <i>Camellia sinensis</i>	MEG KEE DVKL GANKFT ERQPI GTAAQI . TDKD YKEPP PAPL FEP GELKSWS F YRAGI AEFIA TFLFL YI TLL	92
小果野芭蕉 <i>Musa acuminata</i>	MEG KEE DVRL GANKFS ERQPI GTAAQI . SDKG YKEPP PAPL FEP GELTSWS F YRAGI AEFIA TFLFL YI TLL	92
烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	MAENKEE DVNL GANKYRE TQPLGTAACQT . ENKDWI EPEP PAPL FEP GELSSWS F YRAGI AEFIA TFLFL YI TLL	94
白花柽柳 <i>Tamarix albiflronum</i>	MEG KEE DVRL GANKFP ERQPI GTAAQTHEE KDWI EPEP PAPL FEP GELTSWS F YRAGI AEFIA TFLFL YI TLL	94
挪威云杉 <i>Picea abies</i>	MEG KEE DVRL GANKFS ERQPLGTAACQT . REKD YKEPG PAPL FEP GELASWS F YRAGI AEFIA TFLFL YI TLL	93
马尾松 <i>Pinus massoniana</i>	MEG KEE DVKL GANKYS ERQPLGTAACQT . REKD YKEPG PAPL FEP GELASWS F YRAGI AEFIA TFLFL YI TLL	93
Consensus	m keedv gank e qp gt aq k y paplfep el s wsf ragiaef aifl fly i	1
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	TVMGVKRAPNMC . SVGI QGIAWAFFGGM FALVYCTAGISGGHINPAVTFLGLFLARKLSSLTRAVFYIMMQCLG	165
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	TVMGVVRADS KCS . TVGI QGIAWAFFGGM FALVYCTAGISGGHINPAVTFLGLFLARKLSSLTRAVFYIMMQCLG	165
陆地棉花 <i>Gossypium hirsutum</i>	TVMGVSQSKTKCT . TVGI QGIAWAFFGGM FALVYCTAGISGGHINPAVTFLGLFLARKLSSLTRAVFYIMMQCLG	164
无梗花栎 <i>Quercus petraea</i>	TVMGVYKSTNKC . TVGI QGIAWAFFGGM FALVYCTAGISGGHINPAVTFLGLFLARKLSSLTRAVFYIIMMQCLG	164
野茶树 <i>Camellia sinensis</i>	TVMGVYRAPT KCA . TVGI QGIAWAFFGGM FALVYCTAGISGGHINPAVTFLGLFLARKLSSLTRAVFYIIMMQCLG	164
小果野芭蕉 <i>Musa acuminata</i>	TVMGVVKSNS KCS . TVGI QGIAWAFFGGM FALVYCTAGISGGHINPAVTFLGLFLARKLSSLTRALFYIMMQCLG	164
烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	TVMGVVKSNS KCS . TVGI QGIAWAFFGGM FALVYCTAGISGGHINPAVTFLGLFLARKLSSLTRALFYIMMQCLG	164
白花柽柳 <i>Tamarix albiflronum</i>	TVMGVKRS DSDS LCS . SVGI QGIAWAFFGGM FALVYCTAGISGGHINPAVTFLGLFLARKLSSLTRAVFYIMMQCLG	166
挪威云杉 <i>Picea abies</i>	TVMGVKRS DSDS MCK . SVGI QGIAWAFFGGM FALVYCTAGISGGHINPAVTFLGLFLARKLSSLTRALFYIMMQCLG	166
马尾松 <i>Pinus massoniana</i>	TVMGVKRS DDV CTGS . SVGI QGIAWAFFGGM FCLVYCTAGISGGHINPAVTFLGLFLARKLSSLTRAVFYIMCQCLG	166
Consensus	t v mg c v g i q g a w a f g g m f l v y c t a g i s g g h i n p a v t f g l l a r k l s l r a y q c l g	166
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	AI CGAGGVVKGF . QP TPY QTLGGGANVVAHGYIKGSGLGAEI I GTF VL VY T VFS AT DAKRS ARDS HVPI L API P	237
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	AI CGAGGVVKGF . EKGGRYNS LGGGANVVAHGYIKGDGLGAEI VGTFL VL VY T VFS AT DAKRN ARDS HVPI L API P	237
陆地棉花 <i>Gossypium hirsutum</i>	AI CGAGGVVKGF EGDS RYEMLGGGANVVAHGYIKGDGLGAEI I GTF VL VY T VFS AT DAKRN ARDS HVPI L API P	237
无梗花栎 <i>Quercus petraea</i>	AI CGAGGVVKGF . GP TF YEGNGGGANVVAHGYIKGDGLGAEI VGTFL VL VY T VFS AT DAKRN ARDS HVPI L API P	236
野茶树 <i>Camellia sinensis</i>	AI CGAGGVVKGF . QPSI YQANNGGANVVAHGYIKGDGLGAEI VGTFL VL VY T VFS AT DAKRN ARDS HVPI L API P	236
小果野芭蕉 <i>Musa acuminata</i>	AI CGAGGVVKGF . QKGLYESQNGGANVVAHGYIKGDGLGAEI VGTFL VL VY T VFS AT DAKRN ARDS HVPI L API P	236
烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	AI CGAGGVVKGF . MKGPY QRLGGGANVVAHGYIKGDGLGAEI I GTF VL VY T VFS AT DAKRN ARDS HVPI L API P	238
白花柽柳 <i>Tamarix albiflronum</i>	AI CGAGGVVKGF . MP II YQVQGGGGANEVAHGYIKGDGLGAEI VGTFL VL VY T VFS AT DAKRS ARDS HVPI L API P	238
挪威云杉 <i>Picea abies</i>	AI CGAGGVVKGF . MESE YEMDGGGANS VAHGYIKGDGLGAEI VGTFL VL VY T VFS AT DAKRS ARDS HVPM API P	238
马尾松 <i>Pinus massoniana</i>	AI CGAGGVVKGF . MEGEY QADGGGANS VAHGYIKGDGLGAEI VGTFL VL VY T VFS AT DAKRS ARDS HVPL API P	238
Consensus	a i c g a g v v k g y g g a n v g y t k g g i g g a e i g t f l v y t v f s a t d a k r a r d s h v p l a p l	238
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	IGF AVFLVHLATIPI TGTGI NPARESLGAAII YNKHDS WDDHWI FWVGPFI GAALAA LYHOI VI RAI PFKSKS	309
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	IGF AVFLVHLATIPI TGTGI NPARESLGAAII YNKHDAWDDHWI FWVGPFI GAALAA LYHOI VI RAI PFKSK	308
陆地棉花 <i>Gossypium hirsutum</i>	IGF AVFLVHLATIPI TGTGI NPARESLGAAII YNKHDAWDDHWI FWVGPFI GAALAA LYHOI VI RAI PFKKTRA	309
无梗花栎 <i>Quercus petraea</i>	IGF AVFLVHLATIPI TGTGI NPARESLGAAII YNKHDAWDDHWI FWVGPFI GAALAA LYHOI VI RAI PFKARD	308
野茶树 <i>Camellia sinensis</i>	IGF AVFLVHLATIPI TGTGI NPARESLGAAII FMRDHVWDDHWI FWVGPFI GAALAA LYHOI VI RAI PFKSRA	308
小果野芭蕉 <i>Musa acuminata</i>	IGF AVFLVHLATIPI TGTGI NPARESLGAAII YNKKHAWDDHWI FWVGPFI GAALAA LYHOI VI RAI PFKSRP	308
烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	IGF AVFLVHLATIPI TGTGI NPARESLGAAII YNKKHAWDDHWI FWVGPFI GAALAA LYHOI VI RAI PFKS	308
白花柽柳 <i>Tamarix albiflronum</i>	IGF AVFLVHLATIPI TGTGI NPARESLGAAII YNKSAAWDDHWI FWVGPFI GAALAA LYHOI VI RAI PFKSK	309
挪威云杉 <i>Picea abies</i>	IGF AVFLVHLATIPI TGTGI NPARESLGAAII YNKSAAWDDHWI FWVGPFI FLGAGLAAYHQMI RAI PFKTRS	310
马尾松 <i>Pinus massoniana</i>	IGF AVFLVHLATIPI TGTGI NPARESLGAAII YNKSARWDDHWI FWVGPFI FLGAGLAAYHQMI RAI PFKTRS	310
Consensus	i g f a v f l v h l a t i p i t g t g i n p a r s g a a i i n w d h w i f w v g p f g a a a y h q i r a i p f k	

AQP基因的来源和GenBank 登陆号:

拟南芥 NM_116268; 葡萄 DQ834694; 陆地棉花 DQ402075; 无梗花栎 JQ846271; 野茶树 KC008722; 小果野芭蕉 KC969669; 烟草 AF440271; 白花柽柳 DQ 660891; 挪威云杉 Z83830; 马尾松 KF582038。

图 5 PmPIP1 氨基酸序列与其他植物 AQP 基因的氨基酸序列多重比对

Figure 5 Multi-comparison in amino acid sequence of AQP gene between *Pinus massoniana* and other plant species

因进行系统进化树分析(图 6)。结果表明: PmPIP1 与挪威云杉亲缘关系最近, 而且明显可以看出 PmPIP1 与 PIPs 蛋白聚为一类, 与 NIPs, TIPs, SIPs 蛋白等进化距离较远(图 6)。因而推测 PmPIP1 在 PIPs 蛋白进化上是保守的。

经 SWISS-MODEL 模型, 采用自动搜索模式对 PmPIP1 氨基酸三级结构进行预测。结果显示: 模型残基从 44~278 bp, 三级结构预测的模板是菠菜 *Spinacia oleracea*(2b5fA), 序列同源性 77.872%。经 Rasmol 查看, 发现两者的结构十分相似(图 7)。

2.3 PmPIP1 基因在马尾松各组织中的表达及干旱胁迫下的表达分析

分别以马尾松根、茎和叶 cDNA 为模板, 进行 PmPIP1 基因的 RT-PCR 反应, 18S 作为内参基因, 结果如图 8A 所示。PmPIP1 在根、茎、叶中均有表达, 根中表达量最高, 其次是茎和叶。为明确干旱胁迫对 PmPIP1 基因表达的影响, 使用 qRT-PCR 技术研究马尾松根、茎和叶表达模式。在干旱胁迫下, 以 18S 为内参分析(图 8B), PmPIP1 基因在根、茎中表达水平基本逐步升高, 且在第 10 天表达程度最为强烈, 而后开始降低; 叶中表达量差异不大。以 UBC 为内参分析(图 8C), 在根、茎、叶中表达水平趋势基本与以 18S 为内参的结果基本一致。上述结果暗示, PmPIP1 基因的表达与干旱胁迫相关。

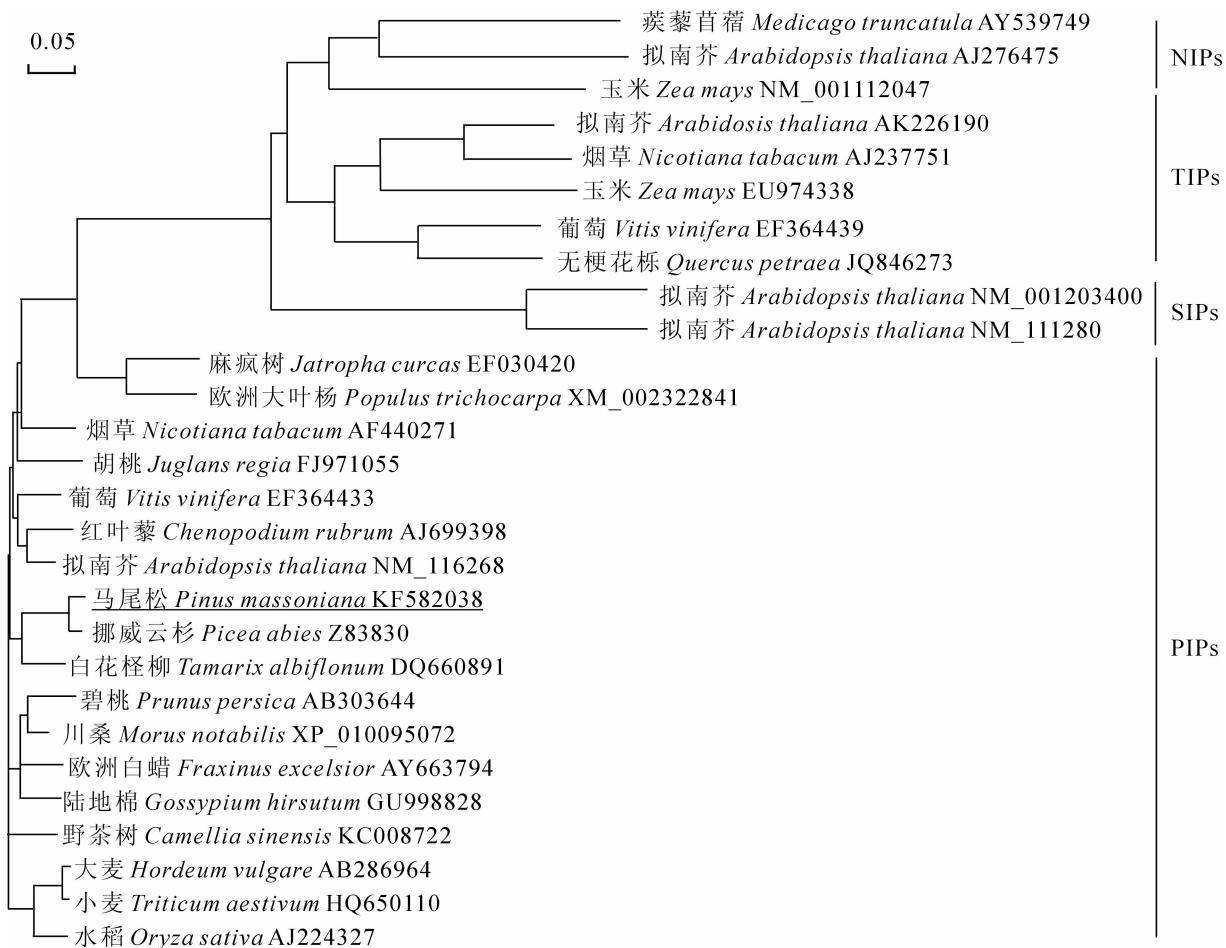


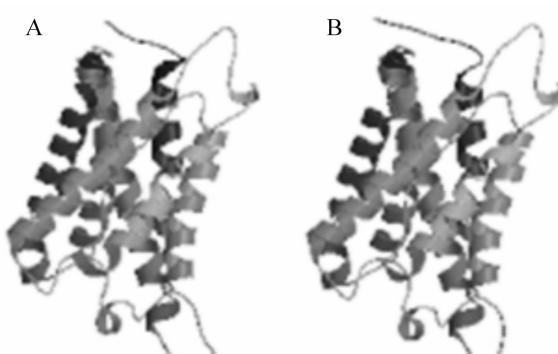
图 6 PmPIP1 蛋白的系统进化分析

Figure 6 Phylogenetic analysis of PmPIP1 and other plant species

3 讨论

马尾松是荒山造林的先锋树种, 同时也是一种非常重要的耐旱树种, 可能蕴含着丰富的抗逆基因资源。为了在分子水平上深入研究马尾松抗旱分子机制, 本研究对马尾松重要的耐旱相关基因-水通道蛋白基因开展了研究。

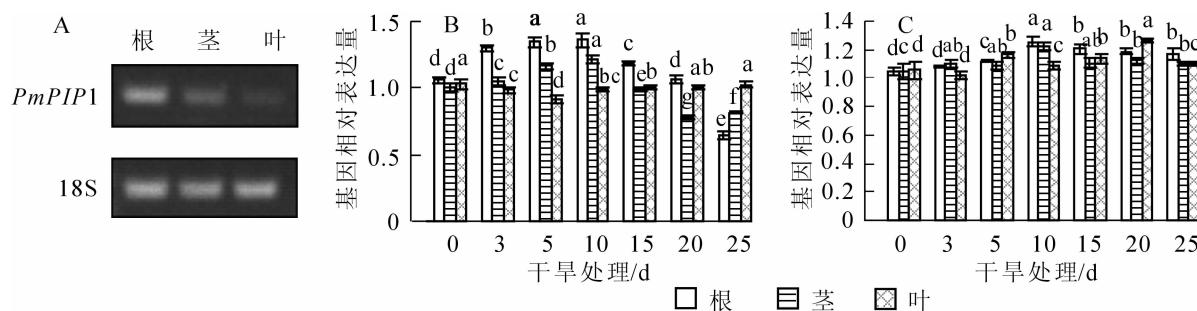
通过 RT-PCR 及表达序列标签(EST)序列拼接, 获得 *PmPIP1* 基因, 该基因具有 MIP 家族典型的保守氨基酸序列 HINPAVTG, 2 个 NPA 保守肽段, 6 个跨膜结构域, 较长的 N 端和较短的 C 端, 说明该蛋白属于水通道蛋白基因家族一员。聚类分析表明: *PmPIP1* 与挪威云杉同源关系达 95%, 与其他 8 种植物 AQP 基因同源性达 83%~87%。将 *PmPIP1* 与其他植物 AQP 基因构建系统进化树分析, 进一步推测 *PmPIP1* 属于质膜水通道蛋白 PIPs 亚家族, 与挪威云杉亲缘遗传距离最近。三级结构预测表明: *PmPIP1* 与已登陆的菠菜(2b5fA) AQP 三级结构极为相似。大量研究已表明, AQP 是调节水分在细胞间以及植物整个体内水分平衡分子基础^[25], 其中大约 70%~90% 的水分受到水通道蛋白基因的表达调控^[26]。*PmPIP1* 基因与 AQP 基因的相同保守性以及基本结构的相吻合意味着 *PmPIP1* 在功能上可能具



A: *PmPIP1* 蛋白三维结构图; B: 菠菜 *Spinacia oleracea* AQP(2b5fA) 蛋白三维结构图。

图 7 *PmPIP1* 蛋白三维结构预测与菠菜 AQP(2b5fA) 蛋白三维结构预测

Figure 7 The 3-dimensional prediction of the *PmPIP1* and the spinach aquaporin (2b5fA)



A: *PmPIP1* 基因组织表达分析; B: 以18S为内标 *PmPIP1* 基因的相对表达量分析; C: 以UBC为内标 *PmPIP1* 基因的相对表达量分析。小写字母表示不同时间条件下基因表达的差异显著性($P < 0.05$)。

图 8 *PmPIP1* 基因的相对表达量分析

Figure 8 Analysis of relative expression level of *PmPIP1*

有与其他物种非常相近的作用模式^[27-28]。

植物 AQP 的转运活性受磷酸化调控, 是细胞信号转导与水分运输调节的媒介, 磷酸化时水通道蛋白水运转活性增加, 直接就近参与原位的快速、直接、可逆的门控^[20,25], 促进上调水通道的活性^[29]。PmPIP1 蛋白包括 5 个色氨酸(Ser), 2 个苏氨酸(Thr)和 2 个酪氨酸(Tyr)。这些位点可能成为蛋白激酶磷酸化位点, 直接或间接参与 *PmPIP1* 对水分或其他物质运输的调节。

在研究植物抗旱分子机制的过程中, 从干旱诱导的基因中已分离出很多水通道蛋白基因^[30-31]。AQP 蛋白受环境条件和植物激素的调节, 有些组成型表达, 有些特异性表达, 参与根叶生长、有性繁殖及非生物胁迫等过程^[32-34], 表达方式也存在显著差异^[35]。Marc 等^[36]研究表明, *PIP1* 和 *PIP2* 基因在生殖器官中的表达水平不同, *PIP1* RNA 在柱头累积, *PIP1* 和 *PIP2* RNA 在花粉囊的几乎所有组织中多有表达。*JcPIP* 在植株的整个生长发育期都有表达, 在干旱胁迫下表达量增加^[32]。*PIP2* 在木榄树 *Bruguiera gymnorhiza* 根中表达量明显强于嫩茎和叶^[37]。本研究发现 *PmPIP1* 基因在马尾松的根、茎、叶中均有表达, 根中表达量最高, 茎次之, 叶最低。水通道蛋白在不同组织中的含量不同, 并随细胞生理状态和环境与刺激产生波动^[38]。*PmPIP1* 基因在干旱胁迫不同时期的表达特性分析显示, *PmPIP1* 在根、茎中表达水平首先呈上升趋势, 表明干旱初期随着时间延长, *PmPIP1* 受到水分亏缺的诱导, 表达量增加, 到第 10 天表达量达到最高值, 随后由于 *PmPIP1* 无法再适应干旱的加剧, 于是呈现下降趋势; 叶中表达量差异不大。推测 *PmPIP1* 基因的这种表达模式可能与植物在干旱胁迫下首先由根系从土壤中吸收水分, 再经木质部导管向上运输最后由叶片蒸腾散失的生理现象相关。

XU 等^[39]分离到 *MaPIP1;1* 基因, 并且在拟南芥中过表达 *MaPIP1;1* 增强了转基因植株的耐盐和渗透胁迫能力。因此将 *PmPIP1* 转入模式植物(拟南芥、烟草等)并验证是否能提高转基因植株抗旱能力需要进一步验证。本实验室目前正在从事转基因研究, 以期为该基因在植物中的进一步利用奠定基础。

4 参考文献

- [1] MAUREL C, VERDOUCQ L, LUU D T, et al. Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2008, **59**: 595 – 624.
- [2] MAUREL C, REIZER J, SCHROEDER J I, et al. The vacuolar membrane protein gamma-TIP creates water specific channels in *Xenopus oocytes* [J]. *EMBO J*, 1993, **12**(6): 2241 – 2247.
- [3] LUDEWIG U, DYNOWSKI M. Plant aquaporin selectivity: where transport assays, computer simulations and physiology meet [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2009, **66**(19): 3161 – 3175.
- [4] PIEŃKOWSKA, J R, KOSICKA E, WOJTKOWSKA M, et al. Molecular identification of first putative aquaporins in snails [J]. *J Membrane Biol*, 2014, **247**(3): 239 – 252.
- [5] 邹智, 王丹华, 莫业勇, 等. 橡胶死皮相关液泡型水通道蛋白基因 *TIP1* 的克隆与序列分析 [J]. 安徽农业科学, 2013, **41**(36): 13851 – 13854.
- ZOU Zhi, WANG Danhua, MO Yeyong, et al. Molecular cloning and sequence analysis of a tonoplast aquaporin gene *TIP1* associated with tapping panel dryness in *Hevea brasiliensis* [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2013, **41**(36): 13851 –

- 13854.
- [6] ALEXANDERSSON E, FRAYSSE L, SJÖVALL-LARSEN S, *et al*. Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins [J]. *Plant Mol Biol*, 2005, **59**(3): 469 – 484.
- [7] LIAN Hongli, YU Xin, YE Qin, *et al*. The role of aquaporin RWC3 in drought avoidance in rice [J]. *Plant Cell Physiol*, 2004, **45**(4): 481 – 489.
- [8] LI Guowei, PENG Yanhui, YU Xin, *et al*. Transport functions and expression analysis of vacuolar membrane aquaporins in response to various stresses in rice [J]. *J Plant Physiol*, 2008, **165**(18): 1879 – 1888.
- [9] JOHANSON U, KARLSSON M, JOHANSSON I, *et al*. The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic protein in plants [J]. *Plant Physiol*, 2001, **126**(4): 1358 – 1369.
- [10] CHAUMONT F, BARRIEU F, WOJCIK E, *et al*. Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize [J]. *Plant Physiol*, 2001, **125**(3): 1206 – 1215.
- [11] SUGA S, IMAGAWA S, MAESHIMA M. Specificity of the accumulation of mRNAs and proteins of the plasma membrane and tonoplast aquaporins in radish organs [J]. *Planta*, 2001, **212**(2): 294 – 304.
- [12] 丁贵杰, 周志春, 王章荣, 等. 马尾松纸浆用材林培育与利用 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2006: 111.
- [13] 谌红辉, 丁贵杰. 马尾松造林密度效应研究 [J]. 林业科学, 2004, **40**(1): 92 – 98.
- CHEN Honghui, DING Guijie. Study on planting density effects for Masson pine plantation [J]. *Sci Silv Sin*, 2004, **40**(1): 92 – 98.
- [14] 施积炎, 丁贵杰, 袁小凤. 不同家系马尾松苗木水分参数的研究 [J]. 林业科学, 2004, **40**(3): 51 – 55.
- SHI Jiyan, DING Guijie, YUAN Xiaofeng. Studies on water parameters in *Pinus massoniana* seedlings of different families [J]. *Sci Silv Sin*, 2004, **40**(3): 51 – 55.
- [15] 徐向华, 丁贵杰. 马尾松适应低磷胁迫的生理生化响应 [J]. 林业科学, 2006, **42**(9): 24 – 28.
- XU Xianghua, DING Guijie. Physiological and biochemical responses of *Pinus massoniana* to low phosphorus stress [J]. *Sci Silv Sin*, 2006, **42**(9): 24 – 28.
- [16] 何佩云, 丁贵杰, 谌红辉. 连栽马尾松人工林土壤肥力比较研究 [J]. 林业科学研究, 2011, **24**(3): 357 – 362.
- HE Peiyun, DING Guijie, CHEN Honghui. Comparison on soil fertilities of Masson pine plantations of different generations [J]. *For Res*, 2011, **24**(3): 357 – 362.
- [17] 丁贵杰. 马尾松人工纸浆材林采伐年龄初步研究 [J]. 林业科学, 2000, **36**(1): 15 – 20.
- DING Guijie. The preliminary study on optimum cutting age of pulpwood stand for Masson pine plantation [J]. *Sci Silv Sin*, 2000, **36**(1): 15 – 20.
- [18] 谌红辉, 丁贵杰, 温恒辉, 等. 造林密度对马尾松林分生长与效益的影响研究 [J]. 林业科学研究, 2011, **24**(4): 470 – 475.
- CHEN Honghui, DING Guijie, WEN Henghui, *et al*. Effects of planting density on growth and economic benefit of Masson pine plantation [J]. *For Res*, 2011, **24**(4): 470 – 475.
- [19] 王冰梅, 郭晋隆, 叶冰莹, 等. 马尾松银松素合酶基因启动子区的克隆及特征分析 [J]. 亚热带农业研究, 2008, **4**(4): 292 – 296.
- WANG Bingmei, GUO Jinlong, YE Bingying, *et al*. Molecular cloning and analysis of pinosylvin synthase gene promoter from *Pinus massoniana* [J]. *Subtrop Agric Res*, 2008, **4**(4): 292 – 296.
- [20] 李擎天, 赵宇, 周绮云, 等. 珠眉海棠水通道蛋白 *MzPIP1;1* 基因的克隆与表达分析 [J]. 中国农业大学学报, 2012, **17**(3): 63 – 68.
- LI Qingtian, ZHAO Yu, ZHOU Qiyun, *et al*. Cloning and expression analysis of *MzPIP1;1* gene from *Malus zumi* Mats [J]. *J China Agric Univ*, 2012, **17**(3): 63 – 68.
- [21] CUI Xianghuan, HAO Fushun, CHEN Hui, *et al*. Expression of the *Vicia faba* *VfPIP1* gene in *Arabidopsis thaliana* plants improves their drought resistance [J]. *J Plant Res*, 2008, **121**(2): 207 – 214.
- [22] ZHOU Shiyi, HU Wei, DENG Xiaomin, *et al*. Overexpression of the wheat aquaporin gene, *TaAQP7*, enhances drought tolerance in transgenic tobacco [J]. *PLoS One*, 2012, **7**(12): e52439. doi: 10.1371/journal.pone.0052439.
- [23] PFAFFL M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, **29**(9): 2002 – 2007.

- [24] 王垠, 刘关君, 阎秀峰, 等. 西伯利亚蓼 *PsPIP1* 基因的克隆及其在 NaHCO₃ 胁迫下的表达[J]. 遗传, 2008, **30**(12): 1621 – 1628.
WANG Yin, LIU Guanjun, YAN Xiufeng, et al. Cloning of *PsPIP1* gene from *Polygonum sibiricum* Laxm. and analysis of its expression in response to NaHCO₃ [J]. *Hereditas*, 2008, **30**(12): 1621 – 1628.
- [25] JOHANSSON I, KARLSSON M, JOHANSON U, et al. The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance [J]. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 2000, **1465**(1/2): 324 – 342.
- [26] HENZLER T, STEUDLE E. Reversible closing of water channels in charainternodes provides evidence for a composite transport mode of the plasma membrane [J]. *J Exp Bot*, 1995, **46**(2): 199 – 209.
- [27] 艾雪, 褚怀亮, 李雪芹, 等. 山核桃水通道蛋白 *CcPIP* 同源基因克隆与表达分析[J]. 福建林学院学报, 2009, **29**(3): 252 – 257.
AI Xue, CHU Huailiang, LI Xueqin, et al. The analysis of *Carya carthayensis* plasma membrane intrinsic protein gene *CcPIP* clone and expression [J]. *J Fujian Coll For*, 2009, **29**(3): 252 – 257.
- [28] 林江波, 王伟英, 邹晖, 等. 中国水仙水通道蛋白基因 cDNA 克隆、序列分析与表达[J]. 福建农业学报, 2011, **26**(3): 371 – 376.
LIN Jiangbo, WANG Weiyi, ZOU Hui, et al. Cloning, sequence analysis and expression of cDNA encoding aquaporin *NtPIP1* of *Narcissus tazetta* var. *chinensis* [J]. *Fujian J Agric Sci*, 2011, **26**(3): 371 – 376.
- [29] CHAUMONT F, MOSHELION M, DANIELS M J. Regulation of plant aquaporin activity[J]. *Biol Cell*, 2005, **97**(10): 749 – 764.
- [30] LI Liang, WANG Weiqi, HUANG Shan, et al. Cloning and function analysis of a plasma membrane intrinsic protein gene, *GmPIP* in soybean (*Glycine max* L. Merr) [J]. *Australian J Crop Sci*, 2014, **8**(5): 738 – 746.
- [31] MA Pengda, LIU Jingying. Isolation and characterization of a novel plasma membrane intrinsic protein gene, *LcPIP1*, in *Leymus chinensis* that enhances salt stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2012, **166**(2): 479 – 485.
- [32] 王云霄, 张颖, 江璐玎, 等. 麻疯树水通道蛋白新基因 *JcPIP* 干旱胁迫下的功能分析[J]. 热带亚热带植物学报, 2008, **16**(4): 289 – 295.
WANG Yunxiao, ZHANG Ying, JIANG Luding, et al. Cloning of a new aquaporin gene (*JcPIP*) from *Jatropha curcas* and analysis of its function under drought stress [J]. *J Trop & Subtrop Bot*, 2008, **16**(4): 289 – 295.
- [33] 张军锋, 邓西平, 慕小倩. 植物的水通道蛋白[J]. 植物生理学通讯, 2002, **38**(1): 88 – 91
ZHANG Junfeng, DENG Xiping, MU Xiaoqian. Plant aquaporin [J]. *Plant Physiol Commun*, 2002, **38**(1): 88 – 91.
- [34] 刘迪秋, 王继磊, 葛锋, 等. 植物水通道蛋白生理功能的研究进展[J]. 生物学杂志, 2009, **26**(5): 63 – 66.
LIU Diqu, WANG Jilei, GE Feng, et al. Advances in the physiological functions of plant aquaporins[J]. *J Biol*, 2009, **26**(5): 63 – 66.
- [35] 王为, 王长彪, 陈浩东, 等. 棉花水通道蛋白序列生物信息学初步分析[J]. 浙江农业学报, 2013, **25**(1): 14 – 20.
WANG Wei, WANG Changbiao, CHEN Haodong, et al. Preliminary bioinformatics analysis of aquaporin sequences available in cotton [J]. *Acta Agric Zhejiang*, 2013, **25**(1): 14 – 20.
- [36] BOTS M, FERON R, UEHLEIN N, et al. *PIP1* and *PIP2* aquaporins are differentially expressed during tobacco anther and stigm a development [J]. *J Exp Bot*, 2005, **56**(409): 113 – 121.
- [37] 祝艺懿, 韩渊怀, 李正国, 等. 红树林植物木榄水通道基因的克隆和表达[J]. 植物生理学通讯, 2007, **43**(3): 438 – 442.
ZHU Yiyi, HAN Yuanhuai, LI Zhengguo, et al. Cloning and expression of a new aquaporin gene from *Bruguiera gymnorhiza* (L.) Lam [J]. *Plant Physiol Comm*, 2007, **43**(3): 438 – 442.
- [38] 刘悦霞, 梁卫红, 张利娟. 水稻叶片中水通道蛋白基因 *OsAQP* 的表达分析[J]. 中国水稻科学, 2008, **22**(5): 545 – 547.
LIU Yuexia, LIANG Weihong, ZHANG Lijuan. Expression analysis on *OsAQP* gene in rice leaves [J]. *Chin J Rice Sci*, 2008, **22**(5): 545 – 547.
- [39] XU Yi, HU Wei, LIU Juhua, et al. A banana aquaporin gene, *MaPIP1;1*, is involved in tolerance to drought and salt stresses [J]. *BMC Plant Biol*, 2014, **14**(1): 59. doi:10.1186/1471-2229-14-59.

南方型紫花苜蓿根系盐胁迫应答转录因子鉴定与分析

马进, 郑钢, 裴翠明, 张振亚

(浙江农林大学 风景园林与建筑学院, 浙江 临安 311300)

摘要: 转录因子可以调节众多下游基因的表达, 在植物抗逆境中起重要的调节作用。为了解析转录因子在南方型紫花苜蓿适应盐胁迫环境的分子机制, 以南方型紫花苜蓿 *Medicago sativa* ‘Millennium’ 为材料, 以正常培养(WT_ck1)和氯化钠(盐)胁迫(WT_N1)条件下的2个样品根系进行转录组分析, 鉴定紫花苜蓿根系盐胁迫应答转录因子基因。同时, 随机挑选4个转录因子差异表达基因进行实时荧光定量qRT-PCR(3次重复), 验证转录组测序技术(RNA-Seq)结果的可靠性。结果表明: 紫花苜蓿根系在 250 mmol·L⁻¹ 氯化钠 胁迫下 72 h, 共检测到 31 907 个基因表达量发生了改变, 表达量差异达到2倍以上的基因共 2 758 个。其中, 隶属于 38 个转录因子家族 199 个转录因子在盐胁迫下差异表达, 上调表达 104 个, 下调表达 95 个。在各转录因子家族中, 盐胁迫应答基因数量最多的是 MYB 基因家族, 其后分别是 AP2-EREBP, bHLH, WRKY, NAC 和 GRAS 基因家族, 这暗示了紫花苜蓿根系对盐胁迫响应可能是多种转录因子家族共同参与的应答过程。qRT-PCR 分析表明: 4 个随机选择的基因在胁迫前后的表达特点与表达谱测序结果一致。此外, *MsERF-2b*, *MsbHLH*, *MsbZIP*, *MsGRAS*, *MsNAC*, *MsMGT-3a* 和 *MsWRKY* 等转录因子被选为与盐胁迫应答相关的候选转录因子。该研究结果为阐明植物对盐胁迫的应答机制提供了新的线索。图 3 表 3 参 36

关键词: 植物育种学; 南方型紫花苜蓿; 转录因子; 根转录; 盐胁迫

中图分类号: S722.3

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2016)02-0201-08

Identification and characterization of salt-responsive transcription factors in roots of southern type alfalfa

MA Jin, ZHENG Gang, PEI Cuiming, ZHANG Zhenya

(School of Landscape Architecture, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: Transcription factors (TFs), which can regulate downstream gene expression, play an important role in plant stress responses. In order to investigate the molecular mechanism of salt tolerance, the TFs of southern type alfalfa, in this study with 250 mmol·L⁻¹ NaCl stress, Illumina RNA-sequencing was performed to evaluate the expression spectrum of transcription factors in roots of the southern alfalfa cultivar “Millennium”. Then to verify the expression of four randomly selected genes, Quantitative Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) (three repeated) was used. Results showed 31 907 differentially expressed genes, 2 758 of which showed a difference of over two fold. Among these genes, 199 transcription factors belonging to 38 TF families were up-regulated and 95 were down-regulated. Genes from the MYB family were observed most, followed by AP2-EREBP, bHLH, WRKY, NAC, and GRAS. The qRT-PCR assay of four randomly selected genes confirmed the results of RNA-Seq analysis. In addition, candidate genes such as *MsERF-2b*, *MsbHLH*, *MsbZIP*, *MsC2H2*, *MsGRAS*, *MsNAC*, *MsMGT-3a*, and *MsWRKY* that may be involved in salt stress responses were identified. This study indicated that multiple TF families were involved in salt stress responses in the root of southern alfalfa types, and it provided new information for further study of the mechanism of a plant's response to salt stress. [Ch, 3 fig. 3 tab. 36 ref.]

收稿日期: 2015-04-25; 修回日期: 2015-07-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31272494); 浙江省自然科学基金资助项目(LY16C170003)

作者简介: 马进, 副教授, 博士, 从事植物逆境生理研究。E-mail: majinzjl@163.com

Key words: plant breeding; southern type alfalfa; transcription factor; root transcriptome; salt stress

土壤盐化是全球面临的最严峻的环境问题之一^[1]。植物盐胁迫实际上是一种综合胁迫，包括生理性干旱胁迫、渗透胁迫以及离子毒害胁迫，涉及到信号传递、多基因协同控制、蛋白质翻译与表达等一系列复杂的分子调控网络。发掘和鉴定与植物盐耐性相关重要基因，有助于了解植物盐分子机制，为培育耐盐植物新品种提供理论依据。紫花苜蓿 *Medicago sativa* 主要分布在温带地区，除了作为牧草外，也是一种很好的水土保持绿化植物。近年来，国外高秋眠级紫花苜蓿品种引进，率先解决了在南方的种植难题，但紫花苜蓿耐盐能力有限，限制了在南方盐碱地大面积种植。因此，发掘参与其盐逆境响应中耐盐功能基因，并分析其耐盐分子机制，有助于利用基因工程技术创制适合南方盐碱地种植紫花苜蓿新品种。植物受盐胁迫后，许多基因的表达量会发生明显的变化，其中部分差异表达基因在耐盐应激调控过程中发挥着重要作用。LUO 等^[2]利用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)方法，从紫花苜蓿中分离到受胁迫诱导表达的解旋酶基因 *MH1*，该基因可提高植物活性氧(ROS)的清除及渗透调节能力。MA 等^[3]从紫花苜蓿盐胁迫中成功克隆 1 个 *MsGME* 基因，该基因对抗坏血酸合成起着重要的作用。郭鹏等^[4]从紫花苜蓿盐胁迫中成功克隆出 1 个类受体蛋白激酶 *MsSIK1* 基因，过量表达该基因可提高拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 的抗盐性。李明娜等^[5]从紫花苜蓿成功克隆 *MsHB2* 基因，该基因可能通过 ABA 信号途径参与紫花苜蓿盐胁迫应激调控。蒺藜苜蓿 *Medicago truncatula* 作为豆科 Leguminosae 模式植物，与苜蓿亲缘关系很近，与四倍体苜蓿基因组具有很高的同源性。ZAHAF 等^[6]对蒺藜苜蓿盐胁迫下进行全基因组分析，为开展紫花苜蓿耐盐分子机制研究提供了重要信息，但紫花苜蓿为同源四倍体、异花授粉植物，其基因组非常复杂，仍然难以揭示紫花苜蓿耐盐的分子机制。转录因子是转录调控中的核心功能蛋白。植物胁迫反应过程中，众多的转录因子承上启下，调控一系列基因的表达，在植物逆境应答网络过程中发挥着不可或缺的关键性作用。鉴于转录因子在转录调控中的重要意义，在逆境胁迫应答中，转录因子及其下游调控靶基因的识别，已成为后基因组时代研究的热点之一。目前，采用高通量技术从转录组水平上鉴定和分析紫花苜蓿盐胁迫应答转录因子研究较少，本研究利用转录组测序技术(RNA-Seq)，对盐胁迫处理前后的南方型紫花苜蓿幼苗根系进行转录组测序，鉴定根系响应盐胁迫应答转录因子及表达特性，以期更深入地理解南方型紫花苜蓿对盐胁迫响应的分子机制，为进一步鉴定和克隆其重要的耐盐基因，提高南方型紫花苜蓿耐盐性状奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料及处理

选择耐盐性相对较强的高秋眠级南方型紫花苜蓿 *Medicago sativa* ‘Millennium’为材料^[7]，将种子先用体积分数为 75% 乙醇消毒 10 min，然后用灭菌水清洗 3 次，灭菌水中浸泡 2 h 于 20 ℃生长箱内发芽。7 d 后，挑选生长一致小苗转移至塑料盆装满基质[V(细沙):V(珍珠岩)=3:1]，每天浇霍格兰营养液。30 d 后加入 250 mmol·L⁻¹ 氯化钠至营养液中处理，选取胁迫处理 0 h 和 72 h 的紫花苜蓿地下部根系组织，混合样于液氮中保存备用。

1.2 RNA 的提取及检测

利用 TRNzol Reagent 试剂盒分别提取处理与对照组幼根 RNA，提取过程按试剂盒说明进行。生物学重复 3 次·处理⁻¹的 RNA 样品混合为 50 μL。所提取的 RNA 经电泳检测合格后送至深圳华大基因科技有限公司进一步确认质量后，将同一样本所提取的幼根 RNA 进行高通量测序。

1.3 Illumina 测序

将盐处理组与对照组总核糖核酸(RNA)由华大基因科技有限公司完成文库构建与测序，将构建好的文库进行其质量和产量检测。对质量检测合格后的文库采用 IlluminaHiSeqTM 2000 进行测序。将经碱基识别(base calling)测序产生的原始图像转化为原始序列数据(raw data)，继而转换为有效数据(clean data)。采用短 reads 比对软件 SOAPaligner/SOAP2 将有效数据分别与参考基因组蒺藜苜蓿进行比对。

1.4 差异基因的选择

测序后使用 RPKM(reads per kilo bases per million reads)法计算基因表达量，根据基因表达量(RP-

KM值)计算其在处理与对照中的差异表达倍数。差异表达倍数大于2倍以上(含2倍)的基因认定为差异表达基因。

1.5 荧光定量 RT-PCR

以分别提取的处理组与对照组根系RNA为材料,采用TaKaRa公司的PrimeScript RT reagent Kit With cDNA Eraser试剂盒反转录合成cDNA,作为实时荧光聚合酶链式反应(PCR)反应的模板。根据测序的基因测序结果随机挑取4个盐胁迫转录因子基因,用Primer Premier 5.0软件设计荧光定量PCR引物(表1)。以苜蓿GAPDH(GenBank登录号为MTR_4g131180)为内参,引物为5'-GTGGTGCAAGAAG-GTTGTTAT-3'和5'-CTGGGAATGATGTTGAAGGAAG-3'。各处理均做3次重复计算基因的相对表达量。

表1 验证DGE数据准确性的qRT-PCR引物

Table 1 Primers to detect the accuracy of DGE data by qRT-PCR

基因编号	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
cds5471	TTAGCTACGTGAATCGACCA	CTTCAGATTCAATCCGTCGGAA
cds21593	GTGAATCCGTATGGAGTCGT	TCCGGCGAACGAGAGATCGAG
cds53671	GATACAGGCGCGTCATTCAA	AGGGCAGCTCGATTGGCTCG
cds12115	GGGAACCTTGAAGGACCATT	ATTGCCAGGCCAAAGTTCAAG

2 结果与分析

2.1 测序质量分析

对测得的reads分析表明:对照样本(WT_ck1)和盐胁迫处理样本(WT_N1)raw reads去杂后获得的clean reads比例接近,说明cDNA文库构建和测序质量较高。由于受到遗传背景的差异和注释信息量的限制,对照样本clean reads中近52.25%可被参考基因组注释,47.75%的clean reads未能注释到对应的基因。盐胁迫处理样本(WT_N1)样本的reads注释情况同对照样本基本上相近(表2)。

表2 DGE样品测序数据统计结果

Table 2 Statistics of upgraded version of the DEG

reads概括	对照(WT_ck1)		处理(WT_N1)	
	测序数量	比例/%	测序数量	比例/%
总碱基对数	5 426 577 900	100.00	5 427 101 160	100.00
reads的净序列数	60 295 310	100.00	60 301 124	100.00
匹配上基因组的总reads数	31 503 017	52.25	30 538 130	50.64
完全匹配序列数	5 092 810	8.45	4 135 861	6.86
错配数小于并等于2的reads数	26 410 207	43.08	26 402 269	43.78
特异匹配的序列数	30 253 588	50.18	19 897 850	43.78
多位点匹配序列数	1 249 429	2.07	10 640 280	17.65
未匹配的总reads序列数	28 792 293	47.75	29 762 992	49.36

2.2 紫花苜蓿根系盐胁迫响应转录因子分析

将盐处理组与对照组总RNA,由华大基因科技有限公司完成文库构建与测序。以差异检验发现错误率FDR(false discovery rate, FDR)值≤0.001且差异倍数不低于2倍为差异表达基因(DEGs, differentially expressed genes)的选择标准,紫花苜蓿根系在250 mmol·L⁻¹氯化钠胁迫下72 h,共检测到31 907个基因表达量发生了改变,对照样本(WT_ck1)和盐胁迫处理样本(WT_N1)之间有2 758个基因表现为差异表达,其中1 338个DEGs在盐胁迫响应中表达上调,1 420个DEGs表达下调。此外,南方型紫花苜蓿根系盐响应下,共有隶属于38转录因子家族199个转录因子差异表达,占总差异表达基因的7.72%,其中上调表达104个,下调表达95个。

由图1可以看出:转录因子基因表达差异高度不均一,差异倍数基因表达量变化15倍以内,占差异表达转录因子基因总数的99.50%。其中,表达上(下)调1~2倍的基因占差异表达上(下)调基因总数的24.62%(25.26%),表达上(下)调2~5倍的基因占28.85%(52.63%),表达上(下)调5~10倍的基因

占1.92%(2.10%), 表达上(下)调10~15倍以上的基因占21.15%(20.00%), 表达上(下)调15倍以上的基因占0.96%(0.00%)。

从图2可以看出:紫花苜蓿根系响应盐胁迫下有38个转录因子家族的差异表达。MYB转录因子家族上调和下调数量最多。Alfin-like, C2C2-Dof, C2H2和SBP转录因子家族基因全部上调, DBP, HB和Tify转录因子家族基因全部下调。其他的转录因子家族基因如AP2-EREBP, bHLH, NAC, MADS, Trihelix和WRKY等转录因子家族成员基因既有转录水平上调的,也有转录水平下调的,这也表明了转录因子家族基因在盐响应中调控方式的复杂性。

2.3 紫花苜蓿根系响应盐胁迫诱导表达重要转录因子基因

转录因子在逆境胁迫下,可以激活或抑制下游基因的转录表达。目前已经证实bZIP, WRKY, AP2, NAC, bHLH, DREB, MYB和C2H2等转录因子家族的成员参与了植物对盐胁迫的应答反应。根据BLASTP结果对表达DEGs进行功能注释,发现多个盐胁迫标志性转录因子基因显著上调或下调表达(表3)。上调的基因如乙烯响应因子*MsERF-RAP2*(gi|357464931)和*MsERF-2b*(gi|357442393), bHLH转录因子*MsbHLH93*(gi|357466829), NAC转录因子*MsNAC*(gi|657395215, gi|657400593), WRKY转录因子*MsWRKY*(gi|657385964), MYB转录因子*MsMYB*(gi|657378081, gi|357476493)及Trihelix转录因子*MsMGT-3a*(gi|657378410)等。下调的基因如DREB转录因子(gi|357481745), bHLH转录因子*MsbHLH*(gi|657389916), C3H转录因子(gi|357446695), GRAS转录因子*MsGRAS*(gi|357454173, gi|657390120和gi|657400125), MYB转录因子*MsMYB*(gi|657404698, gi|657387760)及Trihelix转录因子*MsTFIIB*(gi|657378081)。

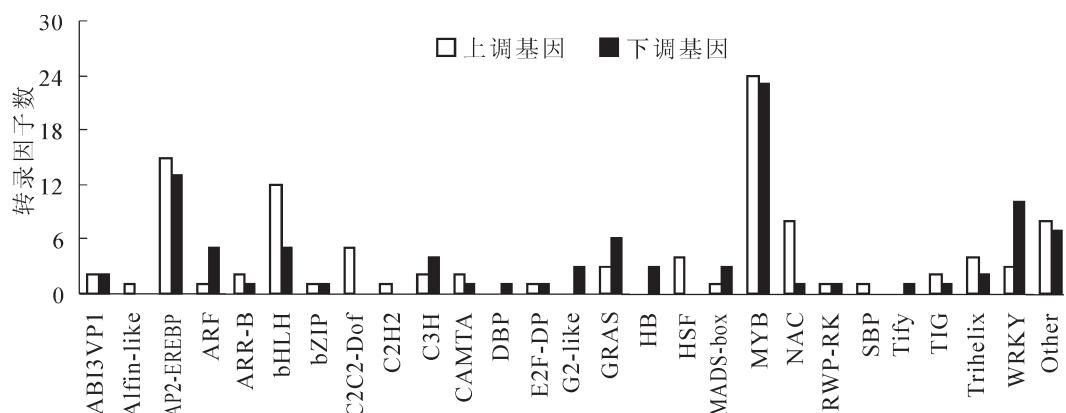


图2 紫花苜蓿根系响应盐胁迫转录因子家族分布

Figure 2 Distribution of transcription factor family in the root of alfalfa under control and salt stress

2.4 差异表达基因的qRT-PCR荧光定量验证

为了验证测序差异表达基因数据的可靠性,随机挑选4个差异表达基因,其中2个上调基因cds5471和cds21593,2个下调基因cds53671和cds12115,以苜蓿GAPDH(GenBank登录号为MTR_4g131180)为内参,进行qRT-PCR验证。结果表明:虽然4个基因在盐胁迫处理后发生不同程度的表达(图3),但胁迫诱导表达的变化趋势基本一致,说明 Illumina 测序获得的转录组数据的可靠性。

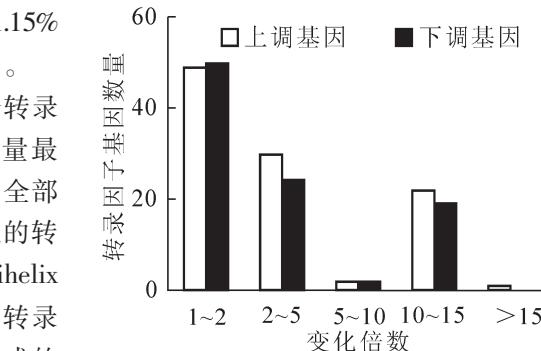


图1 紫花苜蓿根系响应盐胁迫转录因子差异基因倍数变化

Figure 1 Fold change of differentially expressed genes of transcription factor in the root of alfalfa under control and salt stress

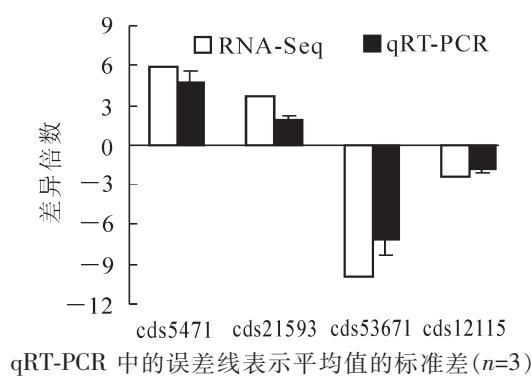


图3 DEGs qRT-PCR验证

Figure 3 Validation of DEGs data by qRT-PCR

表3 紫花苜蓿根系响应盐胁迫诱导表达重要转录因子

Table 3 Salt-stress induced key transcription factors in the root of alfalfa

基因名称	基因编号	NCBI登录号	差异倍数	基因注释
<i>MsAlfin-like</i>	cds22057	gil657396279	1.11	PHD finger and bromo-adjacent-like domain protein
<i>MsERF-RAP2</i>	cds20457	gil357464931	3.64	Ethylene-responsive transcription factor RAP2
<i>MsERF-2b</i>	cds5471	gil357442393	5.89	Ethylene responsive transcription factor 2b
<i>MsDREB-1F</i>	cds31163	gil357481745	-14.31	Dehydration-responsive element-binding protein 1F
<i>MsbHLH93</i>	cds21593	gil357466829	3.70	Transcription factor bHLH93
<i>MsCBF</i>	cds45469	gil357508401	11.08	Inducer of CBF expression
<i>MsbHLH</i>	cds54155	gil65737585	15.25	bHLH transcription factor
<i>MsNAI1</i>	cds45202	gil357507893	-13.34	Transcription factor NAI1
<i>MsbHLH</i>	cds27955	gil657389916	-12.53	Basic helix loop helix (bHLH) DNA-binding family protein
<i>MsbZIP</i>	cds36180	gil657385763	-13.13	bZIP transcription factor
<i>MsC2H2</i>	cds3915	gil657403499	2.33	C2H2 type zinc finger transcription factor family protein
<i>MsC3H</i>	cds50915	gil657373674	11.55	Zinc finger CCCH domain protein
<i>MsC3H</i>	cds8384	gil357446695	-11.27	Zinc finger CCCH domain-containing protein
<i>MsGRAS</i>	cds55904	gil657370728	2.81	GRAS family transcription regulator
<i>MsGRAS</i>	cds13651	gil357454173	-2.78	GRAS family transcription factor
<i>MsGRAS</i>	cds28255	gil657390120	-2.49	GRAS family transcription factor
<i>MsGRAS</i>	cds13654	gil657400125	-2.16	GRAS family transcription factor
<i>MsHSFA-2</i>	cds20955	gil357465753	2.74	Heat stress transcription factor A-2
<i>MsHSFA3</i>	cds46442	gil657379447	2.38	Heat shock transcription factor A3
<i>MsCDCP</i>	cds48048	gil657380445	11.36	Cell division control protein, putative
<i>MsMYB</i>	cds39174	gil657382166	-11.90	Myb-like transcription factor family protein
<i>MsMYB</i>	cds5693	gil657404680	-11.81	Myb transcription factor
<i>MsTFIIB</i>	cds43910	gil657378081	-9.92	Transcription factor tfiib component
<i>MsNAC</i>	cds20253	gil657395215	10.97	NAC domain class transcription factor
<i>MsNAC</i>	cds168	gil657400593	11.71	NAC transcription factor-like protein
<i>MsMGT-3a</i>	cds44315	gil657378410	3.88	Trihelix transcription factor GT-3a, putative
<i>MsWRKY</i>	cds36713	gil657385964	12.03	WRKY transcription factor
<i>MsWRKY</i>	cds8583	gil657396734	-13.35	WRKY transcription factor

3 讨论

在干旱、盐碱等逆境胁迫下, 植物可通过改变基因的表达, 调控不同代谢和信号转导途径, 从转录和翻译等不同水平上作出响应, 而转录因子可在逆境胁迫下, 激活或抑制下游基因的转录表达。目前, 已经证实 bZIP, WRKY, AP2/EREBP, C2H2, bHLH, DERB, MYB 和 NAC 等转录因子家族的成员参与了植物对盐胁迫的应答反应^[8]。本研究结果表明: 紫花苜蓿根系在 250 mmol·L⁻¹ 氯化钠胁迫 72 h 时后, 检测到表达量差异达到 2 倍以上的基因 2 758 个, 在差异表达基因中, 包含着 38 转录家族共 199 个转录因子基因差异表达, 其中上调转录因子 104 个, 下调转录因子 95 个。这也暗示着紫花苜蓿根系盐胁迫应答各类转录因子调控方式的复杂性。

AP2/EREBP 是一个大的转录因子家族, 包含 EREBP 和 AP2 等 2 个亚族^[9]。研究证实, AP2/EREBP 转录家族基因与植物逆境响应有关^[10]。本研究发现, 转录因子多数属于 ERFs 转录因子家族, ERFs 类转录因子可激活抗氧化基因的表达, 来减轻盐胁迫造成的氧化损伤^[11]。如过表达 *GmERF7* 和 *GmERF6* 可提高大豆 *Glycine max* 抗盐性和抗旱性。但也有研究报道: 过表达 *SiERF3* 可降低番茄 *Solanum lycopersicum* 对盐的耐受性^[12]。本研究发现: 28 个 AP2/EREBP 基因参与紫花苜蓿根系响应盐胁迫应答过程, 其中 15 个表达上调, 13 个表达下调。AP2/EREBP 基因在盐胁迫响应下呈现上调和下调现象, 表明其参与盐胁迫响应的调控方式不同。

NAC 转录家族因子在植物发育、逆境应答和衰老和次生壁合成等众多的生物学过程中发挥着重要

作用^[13-14]。研究证实, NAC 家族转录因子在逆境胁迫应答中存在着正负两种调控机制。过表达 *SNAC1* 能提高水稻 *Oryza sativa* 干旱、高盐的耐受性, 且可以同 *OsPP18* 的启动子结合共同调控其表达^[15]; 过表达 *AtNAC2* 可降低拟南芥转基因的耐盐性^[16]。本研究发现, 9 个 NAC 家族转录因子参与盐胁迫应答过程, 其中 8 个表达上调, 1 个表达下调。在 9 个 NAC 家族转录因子成员中, 其中 *gil657395215* 和 *gil657400593* 上调 10 倍以上, 这可能是紫花苜蓿根部参与盐胁迫应答重要调节因子。

作为植物特有的 WRKY 家族转录调控因子, 在植物抗逆过程中扮演着重要的角色。蒺藜苜蓿中已鉴定出 28 个成员^[17]。现已证实 WRKY 家族转录因子在逆境胁迫应答中存在着正负 2 种调控机制。过表达 *GhWRKY17* 可提高棉花 *Gossypium hirsutum* 对干旱、高盐的耐受性^[18], 但过表达 *OsWRKY45-1* 可降低水稻对高盐的耐受性^[19]。本研究发现: 13 个 WRKY 转录因子基因参与紫花苜蓿根系相应盐胁迫应答过程, 其中 10 个表达下调, 3 个表达上调, 这也暗示着 WRKY 转录因子参与植物的盐胁迫响应机制方式的复杂性。

碱性亮氨酸拉链(basic leucine zipper, bZIP)转录因子广泛分布于真核生物中, 并参与调控植物对干旱及盐胁迫的抗性。现已证实 bZIP 家族转录因子在逆境胁迫应答中存在着正负 2 种调控机制。过表达 *OsbZIP23* 可明显提高转基因水稻植株对干旱、高盐的耐受性^[20]。*GmbZIP44*, *GmbZIP62* 和 *GmbZIP78* 可作为负调控因子参与大豆调控对盐胁迫响应^[21]。李燕等^[22]成功将紫花苜蓿 *MsZIP* 基因转到烟草 *Nicotiana tabacum* 中, 为后期研究该基因在耐盐中的作用提供了材料。本研究检测到 2 个 bZIP 转录因子参与紫花苜蓿根系盐胁迫应答过程, 其中 1 个 bZIP 转录因子基因下调明显(*gil657385763*, 差异倍数为 -13.13), 推测这个 bZIP 转录因子可能作为负调控因子参与紫花苜蓿盐胁迫应答过程。

C2H2 型锌指蛋白植物中最重要的转录调节因子家族之一。如拟南芥有 176 个 C2H2 型锌指蛋白, 水稻有 189 个 C2H2 型锌指蛋白成员。研究表明: C2H2 型转录家族因子参与植物生长发育和非生物胁迫应答的多种细胞生化过程^[23]。CHEN 等^[24]研究发现 *ZPF179* 在水稻体内对盐胁迫应答中发挥重要作用。本研究发现, 1 个 C2H2 转录因子基因上调(*gil657403499*, 差异倍数为 2.33), 推测这个 C2H2 转录因子可能参与紫花苜蓿盐胁迫应答过程。bHLH 转录因子广泛存在于植物中, 在应对非生物胁迫应答中起到重要的调控作用。目前已在蒺藜苜蓿中发现 100 多个 bHLH 转录家族成员^[25]。研究发现: 蔓藜苜蓿对盐胁迫逆境同 bHLH 转录因子有关系^[26]。过表达 *OrbHLH001* 和 *bHLH92* 分别可增加水稻和拟南芥对高盐胁迫的耐受性^[27-28]。本研究发现, 17 个 bHLH 转录因子参与紫花苜蓿根系响应盐胁迫应答过程, 其中 12 个表达上调, 5 个表达下调。在差异表达 bHLH 转录因子中, *gil657395215* 和 *gil657400593* 上调达到 11 倍以上, 推测这 2 个 bHLH 转录因子可能是紫花苜蓿盐胁迫应答中重要潜在转录因子基因。

作为植物特有的 GRAS 蛋白家族转录调控因子, 已在拟南芥和水稻基因组中分别发现 GRAS 家族的基因成员 33 个和 57 个^[29]。研究表明: GRAS 家族的基因成员在植物抗逆性中发挥了关键作用^[30-31]。本研究中, 发现 9 个 GRAS 家族基因成员, 其中 3 个表达上调, 6 个表达下调, 表明其该类基因可能同紫花苜蓿根系的盐胁迫响应逆境调节有关。作为转录因子家族 Trihelix 一个小家族, 已经在拟南芥发现 30 个, 水稻有 31 个。已有证据表明, 小家族 Trihelix 转录因子在逆境胁迫响应中起着重要调控作用^[32-34]。本研究也发现 6 个 Trihelix 转录因子差异表达。热激转录因子(HSF)对提高植物逆境耐受力方面起着重要调控作用^[35-36]。本研究发现 4 个 HSF 转录因子全部上调表达, 暗示了 HSF 家族的转录因子同盐胁迫应答可能有一定的关联性。

在复杂的植物逆境胁迫应答网络中, 转录调控基因可以通过调控一系列与逆境相关的功能基因的表达, 从而明显提高植物对逆境的抵抗能力。本研究利用 RNA-Seq 技术鉴定出 199 个转录因子参与南方型紫花苜蓿根系盐胁迫应答过程, 但大多数转录因子在盐胁迫应答中发挥功能及其控制下游靶基因调控机制仍知之甚少, 还需要进一步深入的研究, 从而更深入揭示紫花苜蓿对盐胁迫的调控机制。

4 参考文献

- [1] 左照江, 张汝民, 高岩. 盐胁迫下植物细胞离子流变化的研究进展[J]. 浙江农林大学学报, 2014, 31(5): 805-811.
ZUO Zhaojiang, ZHANG Rumin, GAO Yan. Advances in plant cell ion flux with salt stress: a review [J]. *J Zhejiang*

- A & F Univ*, 2014, **31**(5): 805 – 811.
- [2] LUO Yan, LIU Yubo, DONG Yuxiu, *et al.* Expression of a putative alfalfa helicase increases tolerance to abiotic stress in *Arabidopsis* by enhancing the capacities for ROS scavenging and osmotic adjustment [J]. *J Plant Physiol*, 2009, **166**(4): 385 – 394.
- [3] MA Lichao, WANG Yanrong, LIU Wenxian, *et al.* Overexpression of an alfalfa GDP-mannose 3, 5-epimerase gene enhances acid, drought and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* by increasing ascorbate accumulation [J]. *Biotechnol Let*, 2014, **36**(11): 2331 – 2341.
- [4] 郭鹏, 邢鑫, 张万筠, 等. 紫花苜蓿盐诱导类受体蛋白激酶基因 *MsSIK1* 的克隆及功能分析[J]. 中国农业科学, 2014, **47**(23): 4573 – 4581.
- GUO Peng, XING Xing, ZHANG Wanjun, *et al.* Cloning and function analysis of a salt-stress-induced receptor like protein kinase gene *MsSIK1* from alfalfa [J]. *Sci Agric Sin*, 2014, **47**(23): 4573 – 4581.
- [5] 李明娜, 龙瑞才, 杨青川, 等. 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, 2014, **47**(4): 622 – 632.
- LI Mingna, LONG Ruicai, YANG Qingchuan, *et al.* Cloning and function analysis of a salt-stress-induced HD-Zip transcription factor *MsHB2* from alfalfa [J]. *Sci Agric Sin*, 2014, **47**(4): 622 – 632.
- [6] ZAHAF O, BLANCHET S, de ZÉLICOURT A, *et al.* Comparative transcriptomic analysis of salt adaptation in roots of contrasting *Medicago truncatula* genotypes [J]. *Mol Plant*, 2012, **5**(5): 1068 – 1081.
- [7] 马进, 郑钢, 蔡建国. 南方型紫花苜蓿基因型在组织培养条件下对 NaCl 的耐性[J]. 浙江农业学报, 2011, **23**(4): 782 – 786.
- MA Jin, ZHENG Gang, CAI Jianguo. NaCl tolerance of different genotypes of southern type of *Medicago sativa* under tissue culture [J]. *Acta Agric Zhejiang*, 2011, **23**(4): 782 – 786.
- [8] MILLER G A D, SUZUKI N, CIFTCI-YILMAZ S, *et al.* Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses [J]. *Plant Cell Environ*, 2010, **33**(4): 453 – 467.
- [9] 王庆灵, 刘文鑫, 赵嘉平. 山海关杨 *PdERF-18* 转录因子的表达特征分析[J]. 浙江农林大学学报, 2014, **31**(5): 716 – 723.
- WANG Qingling, LIU Wenxin, ZHAO Jiaping. Expression patterns for a *PdERF-18* response to different stresses in *Populus deltoides* ‘Shanhaiguan’ [J]. *J Zhejiang A & F Univ*, 2014, **31**(5): 716 – 723.
- [10] HUSSAIN S S, KAYANI M A, AMJAD M. Transcription factors as tools to engineer enhanced drought tolerance in plants [J]. *Biotechnol Prog*, 2011, **27**(2): 297 – 306.
- [11] ZHANG Zhijin, WANG Juan, ZHANG Rongxue, *et al.* The ethylene response factor *AtERF98* enhances tolerance to salt through the transcriptional activation of ascorbic acid synthesis in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2012, **71**: 273 – 287.
- [12] PAN I C, LI C W, SU R C, *et al.* Ectopic expression of an EAR motif deletion mutant of *SlERF3* enhances tolerance to salt stress and *Ralstonia solanacearum* in tomato [J]. *Planta*, 2010, **232**(5): 1075 – 1086.
- [13] PURANIK S, SAHU P P, SRIVASTAVA P S, *et al.* NAC proteins: regulation and role in stress tolerance [J]. *Trends Plant Sci*, 2012, **17**(6): 369 – 381.
- [14] NAKASHIMA K, TAKASAKI H, MIZOI J, *et al.* NAC transcription factors in plant abiotic stress responses [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, **1819**(2): 97 – 103.
- [15] YOU Jun, ZONG Wei, HU Honghong, *et al.* A stress-responsive *nacl*-regulated protein phosphatase gene rice protein phosphatase18 modulates drought and oxidative stress tolerance through abscisic acid-independent reactive oxygen species scavenging in rice [J]. *Plant Physiol*, 2014, **166**(4): 2100 – 2114.
- [16] BALAZADEH S, SIDDIQUI H, ALLU A D, *et al.* A gene regulatory network controlled by the NAC transcription factor ANAC092/AtNAC2/ORE1 during salt-promoted senescence [J]. *Plant J*, 2010, **62**(2): 250 – 264.
- [17] 江腾, 林勇祥, 刘雪, 等. 苜蓿全基因组 WRKY 转录因子基因的分析[J]. 草业学报, 2011, **20**(3): 211 – 218.
- JIANG Teng, LIN Yongxiang, LIU Xue, *et al.* Genome-wide analysis of the WRKY transcription factor family in *Medicago truncatula* [J]. *Acta Pratacultuae Sin*, 2011, **20**(3): 211 – 218.
- [18] YAN Huiru, JIA Haihong, CHEN Xiaobo, *et al.* The cotton WRKY transcription factor *GhWRKY17* functions in drought and salt stress in transgenic *Nicotiana benthamiana* through ABA signalling and the modulation of reactive

- oxygen species production [J]. *Plant Cell Physiol*, 2014, **55**(12): 2060 – 2076.
- [19] TAO Zeng, KOU Yanjun, LIU Hongbo, et al. *OsWRKY45* alleles play different roles in abscisic acid signalling and salt stress tolerance but similar roles in drought and cold tolerance in rice [J]. *J Exp Bot*, 2011, **62**(14): 4863 – 4874.
- [20] XIANG Yong, TANG Ning, DU Hao, et al. Characterization of *OsbZIP23* as a key player of the basic leucine zipper transcription factor family for conferring abscisic acid sensitivity and salinity and drought tolerance in rice [J]. *Plant Physiol*, 2008, **148**(4): 1938 – 1952.
- [21] LIAO Yong, ZOU Hongfeng, WANG Huiwen, et al. Soybean *GmMYB76*, *GmMYB92* and *GmMYB177* genes confer stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants [J]. *Cell Res*, 2008, **18**(10): 1047 – 1060.
- [22] 李燕, 康俊梅, 张铁军, 等. 紫花苜蓿 *MsZIP* 基因超表达载体的构建及烟草转化[J]. 草地学报, 2012, **20**(4): 735 – 740.
- LI Yan, KANG Junmei, ZHANG Tiejun, et al. Construction and transformation of super-expressing plasmid of *MsZIP* gene from *Medicago sativa* L. [J]. *Acta Agric Sin*, 2012, **20**(4): 735 – 740.
- [23] ZHANG Hong, LAN Ni, LIU Yanpei, et al. The C2H2-type zinc finger protein *ZFP182* is involved in abscisic acid-induced antioxidant defense in rice [J]. *J Integr Plant Biol*, 2012, **54**(7): 500 – 510.
- [24] SUN Shunjing, GUO Shuqiao, YANG Xia, et al. Functional analysis of a novel Cys2/His2-type zinc finger protein involved in salt tolerance in rice [J]. *J Exp Bot*, 2010, **61**(10): 2807 – 2818.
- [25] HE Ji, BENEDITO V A, WANG Mingyi, et al. The *Medicago truncatula* gene expression atlas web server [J]. *BMC Bioinform*, 2009, **10**(30): 441 – 449.
- [26] ZAHAF O, BLANCHET S, ZÉLICOURT A, et al. Comparative transcriptomic analysis of salt adaptation in roots of contrasting *Medicago truncatula* genotypes [J]. *Mol Plant*, 2012, **5**(5): 1068 – 1081.
- [27] CHEN Yuan, LI Fei, MA Yan, et al. Overexpression of *OrbHLH001*, a putative helix-loop-helix transcription factor, causes increased expression of *AKT1* and maintains ionic balance under salt stress in rice [J]. *J Plant Physiol*, 2013, **170**(1): 93 – 100.
- [28] JIANG Yuanqing, YANG Bo, DEYHOLOS M K. Functional characterization of the *Arabidopsis bHLH92* transcription factor in abiotic stress [J]. *Mol Genet Genom*, 2009, **282**(5): 503 – 516.
- [29] SIBYLLE H, OLDROYD G E D. GRAS-domain transcription factors that regulate plant development [J]. *Plant Signal Behav*, 2009, **4**(8): 698 – 700.
- [30] HOU Xingliang, LEE L Y C, XIA Kuaifei, et al. DELLA modulates jasmonate signaling via competitive binding to JAZs [J]. *Dev Cell*, 2010, **19**(6): 884 – 894.
- [31] SUN Xiaolin, JONES W T, RIKKERINK E H, et al. GRAS proteins: the versatile roles of intrinsically disordered proteins in plant signaling [J]. *Biochem J*, 2012, **442**(1): 1 – 12.
- [32] XIE Zongming, ZOU Hongfeng, LEI Gang, et al. Soybean trihelix transcription factors *GmGT-2A* and *GmGT-2B* improve plant tolerance to abiotic stresses in transgenic *Arabidopsis* [J]. *PLoS One*, 2009, **4**(9): e6898.
- [33] FANG Yujie, XIE Kabin, HOU Xin, et al. Systematic analysis of GT factor family of rice reveals a novel subfamily involved in stress responses [J]. *Mol Genet Genomics*, 2010, **283**(2): 157 – 169.
- [34] WANG Xiaohong, LI Qingtian, CHEN Haowei, et al. Trihelix transcription factor GT-4 mediates salt tolerance via interaction with TEM2 in *Arabidopsis* [J]. *BMC Plant Biol*, 2014, **14**(1): 1 – 14.
- [35] CHARNG Y Y, LIU H C, LIU N Y, et al. A heat-inducible transcription factor, *HsfA2*, is required for extension of acquired thermotolerance in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2007, **143**(1): 251 – 262.
- [36] AYAKO N, YUKINORI Y, ERIKO Y, et al. *Arabidopsis* heat shock transcription factor A2 as a key regulator in response to several types of environmental stress [J]. *Plant J*, 2006, **48**(4): 535 – 547.

氯霉素对毛竹幼苗色素质量分数及叶绿素荧光的影响

吴兴波, 陈登举, 马元丹, 高岩, 温国胜, 张汝民

(浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 浙江 临安 311300)

摘要: 为了探讨抗生素对植物生长的影响, 以3年生毛竹 *Phyllostachys edulis* 实生苗为材料, 用Yaxin-1161型非调制式叶绿素荧光仪和JIP-test数据分析方法, 研究了采用不同浓度氯霉素(CAP)对其叶片色素质量分数和叶绿素荧光特性的影响。结果表明: 氯霉素处理后, 毛竹幼苗叶片叶绿素a, 叶绿素b和总叶绿素质量分数显著降低($P<0.05$); 捕获的激子将电子传递到电子传递链中超过初级醌受体(QA)的其他电子受体的效率(ET_0/TR_0)。用于电子传递的量子产额(ET_0/ABS), 最大光化学效率(φ_{P0})和吸收光能为基础的性能指数(PIABS)均显著下降($P<0.05$), 表明氯霉素具有抑制毛竹幼苗光合性能的作用。图1表3参29

关键词: 植物学; 毛竹; 氯霉素; 色素; 叶绿素荧光

中图分类号: S718.4 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2016)02-0209-07

Chloromycetin effects on pigment content and chlorophyll fluorescence in *Phyllostachys edulis* seedlings

WU Xingbo, CHEN Dengju, MA Yuandan, GAO Yan, WEN Guosheng, ZHANG Rumin

(The Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A & F University, Lin'an, 311300, Zhejiang, China)

Abstract: To determine the effects of antibiotics on plant growth, three-year-old *Phyllostachys edulis* seedlings were used as experimental materials. Then pigment content and chlorophyll fluorescence with different concentrations of chloromycetin (CAP) were determined using a non-modulated chlorophyll fluorometer (Yaxin-1161) and the JIP-test data analysis method. Results showed that chlorophyll a, chlorophyll b, and total chlorophyll content of the leaves significantly decreased ($P<0.05$) with the CAP treatment. A significant decrease ($P<0.05$) was found with the probability that a trapped exciton moved an electron into the electron transport chain beyond Quinone A (QA) (ET_0/TR_0), with quantum yield for electron transport (ET_0/ABS), with maximum quantum yield for primary photochemistry (φ_{P0}), and with performance index on absorption basis (PIABS). This suggested that CAP suppressed leaf photosynthetic characteristics. [Ch, 1 fig. 3 tab. 29 ref.]

Key words: botany; *Phyllostachys edulis*; chloromycetin; pigment content; chlorophyll fluorescence

毛竹 *Phyllostachys edulis* 是集经济、生态和社会效益于一体的竹种之一。中国有毛竹林 270 万 hm², 占全国竹林总面积的 64.1%, 是中国南方重要的森林资源^[1]。目前, 关于毛竹的研究多集中在其快速生长的机制^[2]、施肥对其生长及光合生理的影响^[3-4]以及环境因子对其光合生理特性的影响^[1]等方面。近年来, 环境中抗生素的问题越来越引起人们的重视。医用和兽用抗生素的大量使用造成了抗生素在环境中广泛的暴露, 抗生素被有机体吸收的很少, 大部分又被有机体排放到自然环境中^[5]。研究表明: 一些抗

收稿日期: 2015-01-12; 修回日期: 2015-09-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31570686, 30972397, 31270497 和 31270756); 浙江农林大学科研发展基金资助项目(2010FR058)

作者简介: 吴兴波, 从事园林植物栽培与管理研究。E-mail: dongpinglinan@163.com。通信作者: 马元丹, 讲师, 博士, 从事植物生理生态学研究。E-mail: ruminzhang@sohu.com

生素对环境中的水藻和高等植物有显著的毒害作用^[6-7]。植物体内发出的叶绿素荧光信号包含了十分丰富的光合作用信息，并且其特性又极易随外界环境条件而变化^[8]，快速叶绿素荧光诱导动力学分析技术(JIP-test)可以根据植物体内发出的叶绿素荧光信号，方便、快速和无损伤地分析逆境胁迫下光系统Ⅱ(PSⅡ)的功能变化，包括反应中心、电子供体侧放氧复合体(OEC)和受体侧等的变化^[9-10]。本研究以3年生毛竹实生苗为研究对象，测定了氯霉素(CAP)处理后叶片色素质量分数和快速叶绿素荧光诱导曲线的变化，通过JIP-test研究了氯霉素对毛竹幼苗的伤害机制。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试材料为3年生毛竹实生苗，2012年5月中旬，选取株高1 m左右，生长良好，无病虫害的毛竹移入花盆(直径25 cm)中，放入日光温室中进行缓苗培养。氯霉素购自Sigma公司，用去离子水与无水乙醇溶解氯霉素，配成0.1 mol·L⁻¹的母液备用，试验所需浓度加去离子水稀释，最终溶液(含对照)中含有体积分数为0.1%无水乙醇和0.01%吐温-20。

1.2 氯霉素处理

待幼苗适应生长1个月后，选择长势良好的植株，于2012年6月置于人工气候箱：温度为光照25℃/黑暗20℃；光照条件为光照14 h/黑暗10 h(光照强度为800 μmol·m⁻²·s⁻¹)；相对湿度为(60±3)%，适应培养24 h。选取连体的3个枝条上的9片健康一致的叶片，叶片隔片选取，选取叶子3片·枝条⁻¹，1片置于10 mL 5 mmol·L⁻¹氯霉素^[6]的试管内，第2片置于10 mL 10 mmol·L⁻¹氯霉素的试管内，第3片置于含等量去离子水的试管内，作为对照(ck)。所选叶片浸在试验浓度的溶液中处理5 min^[11]，24 h后进行色素质量分数和快速叶绿素荧光诱导曲线的测定。

1.3 色素质量分数的测定

将0.2 g剪碎的毛竹叶片置于带盖的试管中，加5 mL体积分数为80%的丙酮，室温下遮光萃取至样品完全变白后，分别在470, 646和663 nm处测定其光密度值，按Lichtenthaler^[12]的方法计算叶绿素a，叶绿素b和类胡萝卜素质量分数。

1.4 快速叶绿素荧光诱导曲线的测定

采用非调制式叶绿素荧光仪(Yixin-1161型，雅欣理仪科技有限公司)进行快速叶绿素荧光诱导曲线的测定。测定前暗适应10 min，选取叶肉部分用3 000 μmol·m⁻²·s⁻¹饱和蓝闪光照射1 s，以10 μs(2 ms之前)和1 ms(2 ms之后)的间隔记录荧光信号，测得叶绿素荧光动力学参数。每片叶子分上中下3部分分别进行测定，做3次重复(3个枝条)，测得的快速叶绿素荧光诱导曲线采用JIP-test进行分析。

1.5 叶绿素荧光动力学参数分析

依照STRASSER等^[12]提出的能量流动模型，天线色素吸收的能量(ABS)其中一小部分主要以热能和荧光(F)的形式耗散掉，大部分则被反应中心(RC)所捕获(TR)，在反应中心激发能被转化为还原能，将初级醌受体(QA)还原为QA⁻，QA⁻又可以被重新氧化，从而产生电子传递(ET)用于固定二氧化碳或其他途径，以此为基础发展起来的数据处理就被称为JIP-test。根据JIP-test公式^[13-14]进行计算得到的部分参数见表1。

1.6 数据分析

采用OriginPro 8.0软件进行数据处理、方差分析和作图。

2 结果与分析

2.1 不同浓度的氯霉素处理后毛竹幼苗叶片色素质量分数的变化

从表2可以看出：氯霉素对毛竹叶片色素质量分数具有显著的影响($P<0.05$)，5 mmol·L⁻¹氯霉素处理24 h后，毛竹叶片类胡萝卜素质量分数与对照相比无显著差异，叶绿素a，叶绿素b和总叶绿素质量分数以及叶绿素a/b与对照相比分别降低了16.8%，7.5%，14.0%和9.1%。10 mmol·L⁻¹氯霉素处理后，叶绿素a，叶绿素b和总叶绿素质量分数以及叶绿素a/b分别比对照下降了27.5%，11.9%，22.9%和17.5%，类胡萝卜素下降了8.6%。

表1 快速叶绿素荧光诱导动力学曲线(OJIP)的参数

Table 1 Formulae and glossary of terms for the analysis of the fluorescence transient OJIP

参数缩写	描述
ABS/RC	单位反应中心吸收的能量
TR ₀ /RC	单位反应中心捕获的用于还原 QA 的能量
ET ₀ /RC	单位反应中心捕获的用于电子传递的能量
DI ₀ /RC	单位反应中心耗散掉的能量
TR ₀ /CS	单位受光面积捕获的用于还原 QA 的能量
ET ₀ /CS	单位受光面积捕获的用于电子传递的能量
DI ₀ /CS	单位受光面积耗散掉的能量
RC/CS	单位受光面积内反应中心的数量
ET ₀ /TR ₀	捕获的激子将电子传递到电子传递链中超过 QA 的其他电子受体的效率
ET ₀ /ABS	用于电子传递的量子产额
φ _{DO}	用于热耗散的量子比率
φ _{PO}	最大光化学效率
PIABS	以吸收光能为基础的性能指数
W _k	K 点的可变荧光占(F _J -F ₀)振幅的比例

表2 氯霉素处理后毛竹幼苗叶片色素质量分数的变化(平均值±标准误差)

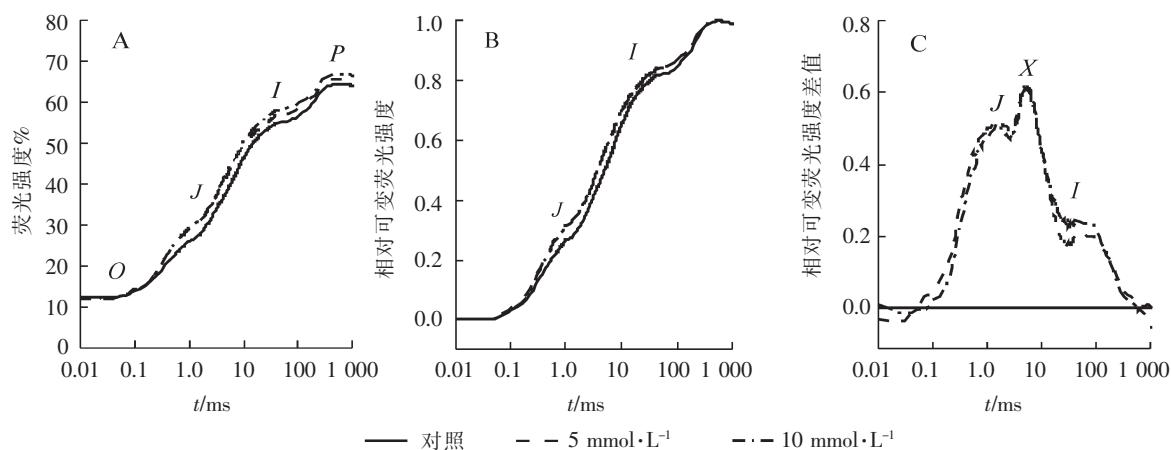
Table 2 Changes of pigment content in the seedling leaves of *Phyllostachys edulis* under CAP treatment (mean ± SE)

处理/(mmol·L ⁻¹)	叶绿素 a/(mg·g ⁻¹)	叶绿素 b/(mg·g ⁻¹)	总叶绿素/(mg·g ⁻¹)	类胡萝卜素/(mg·g ⁻¹)	叶绿素 a/b
对照	3.16 ± 0.27 aA	1.34 ± 0.06 aA	4.50 ± 0.38 aA	0.81 ± 0.05 aA	2.35 ± 0.09 aA
5	2.63 ± 0.13 bB	1.24 ± 0.04 bAB	3.87 ± 0.15 aB	0.79 ± 0.04 abA	2.12 ± 0.08 bB
10	2.29 ± 0.15 cC	1.18 ± 0.08 cB	3.47 ± 0.11 bC	0.74 ± 0.11 bA	1.94 ± 0.05 cB

说明: 小写字母不同表示 0.05 水平上的差异性($P<0.05$), 大写字母不同表示 0.01 水平上的差异性($P<0.01$)。

2.2 氯霉素处理对快速叶绿素 a 荧光诱导曲线的影响

毛竹幼苗叶片经过暗适应后转入饱和脉冲光照射, 叶绿素荧光迅速上升, 呈现典型的 OJIP 荧光诱导动力学曲线(图 1A)。氯霉素处理后, 叶片叶绿素荧光动力学曲线的 OJIP 四相荧光值均高于对照, 且随着氯霉素浓度的增大上升越明显; J 点和 I 点的相对可变荧光强度随着氯霉素浓度的增加而增加(图 1B)。为了更好地反映 O-J-I-P 曲线各相所代表植物所处的状态, 作了相对可变荧光强度差值($\Delta [(F_t-F_0)/(F_{100\text{ms}}-F_0)]$)的变化^[15](图 1C)。氯霉素处理后, 相对可变荧光强度出现了 2 个峰, 分别在 J 相(1.5 ms),



A. OJIP 荧光诱导曲线(9 次重复的平均值)。B. F_t 对 F_0 归一化后的 OJIP 荧光诱导曲线, F_t 表示 t 时的荧光强度。C. 相对可变荧光强度差值 $\Delta [(F_t-F_0)/(F_{100\text{ms}}-F_0)] = [(F_t-F_0)/(F_{100\text{ms}}-F_0)](\text{处理}) - [(F_t-F_0)/(F_{100\text{ms}}-F_0)](\text{对照})$, X 表示未知相。O, J, I, P 各点含义详见文献[9]。

图1 氯霉素处理后毛竹幼苗叶片叶绿素荧光诱导曲线的变化

Figure 1 Variations of chlorophyll fluorescence transients in seedling leaves of *Ph. edulis* under CAP treatment

未知(X)相(4.7 ms), 且 X 相对应的峰最大, J 相次之。 J 峰与 X 峰的峰值均随着氯霉素浓度的升高而升高。

2.3 氯霉素对毛竹幼苗比活性参数的影响

快速叶绿素荧光诱导动力学曲线还可以反映光合机构的比活性。比活性参数可以更深入地反映植物的光合器官对光能的利用, 比活性参数可以不同的基础表示^[9]。5 mmol·L⁻¹ 氯霉素处理后(表3), TR_0/CS 和 ET_0/CS 分别比对照下降了 5.4% 和 10.1%; DI_0/CS 比对照上升了 5.4%。 ABS/RC , TR_0/RC , ET_0/RC 和 DI_0/RC 分别比对照上升了 15.0%, 7.5%, 3.0% 和 20.7%。 RC/CS 比对照下降了 12.8%。不同基础的比活性参数和 RC/CS 的变化比率随着氯霉素浓度的增大而增大, 表明氯霉素浓度越高对比活性参数和单位面积的反应中心数量的影响就越大。

2.4 氯霉素对电子传递和光合作用性能参数的影响

ET_0/ABS 反映了光合机构电子传递的量子产额或光系统 II(PS II)实际光化学效率, 主要受 φ_{p0} 和 ET_0/TR_0 的影响。5 mmol·L⁻¹ 氯霉素处理后, φ_{p0} 和 ET_0/TR_0 分别比对照下降了 6.2%, 4.5%, PSII 的 ET_0/ABS 比对照下降了 10.7%, PI_{ABS} 比对照下降了 43.4%, 而 φ_{p0} 只下降了 6.2%, 且 φ_{p0} , ET_0/TR , ET_0/ABS 和 PI_{ABS} 的变化比率均随着氯霉素浓度的升高而增大。

表 3 氯霉素处理后毛竹幼苗叶片叶绿素荧光参数的变化(平均值±标准误差)

Table 3 Variations of chlorophyll fluorescence parameters in seedling leaves of *Phyllostachys edulis* under CAP treatment (mean ± SE)

参数缩写	不同处理叶绿素荧光参数值			变化比率/%	
	对照	5 mmol·L ⁻¹	10 mmol·L ⁻¹	5 mmol·L ⁻¹	10 mmol·L ⁻¹
ABS/RC	1.80 ± 0.08 aA	2.07 ± 0.04 bB	2.22 ± 0.05 cB	15.0	23.3
TR ₀ /RC	1.46 ± 0.05 aA	1.57 ± 0.01 bAB	1.65 ± 0.05 cB	7.5	13.0
ET ₀ /RC	1.00 ± 0.01 aA	1.03 ± 0.02 bA	1.05 ± 0.01 bA	3.0	5.0
DI ₀ /RC	0.33 ± 0.03 aA	0.40 ± 0.02 bB	0.43 ± 0.02 cC	20.7	31.4
TR ₀ /CS	58.32 ± 1.12 aA	55.18 ± 0.99 bA	53.44 ± 0.76 cA	5.4	8.4
ET ₀ /CS	37.87 ± 0.47 aA	34.03 ± 0.81 bB	32.81 ± 0.65 cB	10.1	13.4
DI ₀ /CS	12.41 ± 0.16 aA	13.08 ± 0.45 bA	13.48 ± 0.21 bA	5.4	8.6
RC/CS	37.87 ± 1.23 aA	33.04 ± 0.14 bB	31.25 ± 0.08 cB	12.8	17.5
φ_{p0}	0.81 ± 0.02 aA	0.76 ± 0.01 bA	0.74 ± 0.01 bA	6.2	8.6
ET ₀ /TR ₀	0.67 ± 0.02 aA	0.64 ± 0.02 bA	0.61 ± 0.01 cA	4.5	9.0
ET ₀ /ABS	0.56 ± 0.02 aA	0.50 ± 0.02 bB	0.47 ± 0.011 cB	10.7	16.1
PI _{ABS}	4.81 ± 0.24 aA	2.72 ± 0.06 bB	2.01 ± 0.025 cC	43.4	58.3
W_k	0.39 ± 0.01 a	0.39 ± 0.017 a	0.39 ± 0.037 a	1.3	1.8

说明: 小写字母不同表示 0.05 水平上的差异性($P < 0.05$), 大写字母不同表示 0.01 水平上的差异性($P < 0.01$)。

3 讨论

叶绿素作为光合作用中光能的吸收、传递和转化的载体, 在植物光合作用中起着关键性的作用。已有研究表明: 干旱^[16]和盐^[17]以及重金属^[18]等胁迫均会显著影响叶片叶绿素的含量。本研究结果表明: 氯霉素处理后, 毛竹幼苗叶片叶绿素 a, 叶绿素 b 和总叶绿素质量分数均显著降低, 并且处理浓度越高, 降低越明显(表2)。这可能有两方面的原因, 一方面可能是因为氯霉素可以抑制叶绿体内 70S 型核糖体蛋白的合成^[19], 从而抑制了叶绿素合成代谢关键酶的形成, 抑制了其合成代谢, 且氯霉素的浓度越高, 抑制程度越大; 另一方面可能是因为氯霉素与叶绿素发生反应而加速了叶绿素的降解。叶绿素 a/b 的显著下降, 表明氯霉素影响毛竹幼苗叶片聚光色素质量分数主要是破坏其反应中心色素, 从而影响其光合性能^[18]。

大量研究表明: OJIP 曲线的形状对一些胁迫如干旱^[20]、高温^[21]、机械损伤^[22]、强光^[23]以及化学药品^[15]等很敏感。5 mmol·L⁻¹ 氯霉素处理后, 快速荧光诱导曲线仍呈现典型的 OJIP, 且四相荧光值均升高, 这与氧化乐果的作用结果类似^[24]。 O 点的荧光值(F_0)说明植物光系统 I (PS I) 释放的荧光量, 可以理解为 PS I 的活性^[25], F_0 上升, 可能是氯霉素处理后 PS II 遭到破坏, PS II 和 PS I 间激发能的分配增

强,更多的激发能分配给PS I,促使PS I的活性增强^[26]。P点荧光即最大荧光 F_m 上升,表明有活性的反应中心关闭的数量上升,这与RC/CS的下降相矛盾。 F_m 归一化后呈下降趋势(图1B),这与RC/CS的下降相一致,表明归一化能够得到一些较为可靠的数据。 φ_{P0} 只反映PS II反应中心对吸收光能的捕获效率,它无法反映整个电子传递链特别是QA下游的电子传递链对氯霉素的响应;而光合性能指数(PI-ABS)不仅反映PS II反应中心对吸收光能的捕获效率,还反映了PS II有活性反应中心的数目以及电子在PS II和PS I之间的传递,所以PIABS可以更全面地反映整个光合电子传递链的变化^[9,13]。氯霉素处理后,PIABS的下降比率远大于 φ_{P0} (表3),表明PIABS的下降主要与PS II有活性反应中心的数目和电子在PS II和PS I之间的传递有关。氯霉素处理后,ET₀/TR₀显著下降影响到以后的电子传递,最终导致ETO/ABS下降^[14],表明PS II反应中心被破坏^[27],导致RC/CS显著下降。氯霉素处理后,ABS/RC,TR₀/RC,ET₀/RC和DI₀/RC显著上升(表3),表明有活性的反应中心会通过增加单位反应中心的光合性能和增加热耗散来保护和维持光合机构的正常运转来适应氯霉素胁迫^[25]。单位反应中心的性能比对照有所提升,而氯霉素仍然会造成TR₀/CS和ET₀/CS的下降,即单位面积的光能利用率降低,这可能是因为单位面积内RC/CS减少后,单位反应中心被迫接受更多的光能,反应中心数量减少导致的光合性能的下降幅度大于单位反应中心性能提升造成的光合性能上升幅度^[28],TR₀/CS₀和ET₀/CS₀呈显著下降。

研究表明:植物在遭受胁迫时电子传递链特定位点会受到抑制^[15]。氯霉素处理后, W_k 差异不显著,表明PS II的供体侧没有受到明显伤害^[29];归一化后J相荧光仍然上升,表明氯霉素处理造成PSII受体侧QA⁻的大量积累,QA之后QA到QB的电子传递链过程受到抑制^[15]。本研究还发现:J峰之后还存在1个X峰,并且X峰值高于J峰,这可能是因为QA后面的电子传递链除了QA到QB这个作用位点外,还存在1个氯霉素的作用位点,可能对PhQAQB的还原过程具有抑制作用^[15]。

综上所述,氯霉素一方面可能干扰了毛竹幼苗色素合成与降解的动态平衡,另一方面抑制了毛竹幼苗叶片的光合性能。氯霉素作用的主要位点可能在PS II的受体侧,并且随着氯霉素浓度升高,抑制作用越大。

4 参考文献

- [1] 施建敏,郭起荣,杨光耀.毛竹光合动态研究[J].林业科学,2005,18(5): 551-555.
SHI Jianmin, GUO Qirong, YANG Guangyao. Study on the photosynthetic dynamic variation of *Phyllostachys edulis* [J]. *For Res*, 2005, 18(5): 551-555.
- [2] 崔凯,何彩云,张建国,等.毛竹茎秆组织速生的时空发育特征[J].林业科学,2012,25(4): 425-431.
CUI Kai, HE Caiyun, ZHANG Jianguo, et al. Characteristics of temporal and spatial tissue development during the rapidly growing stage of moso bamboo culms [J]. *For Res*, 2012, 25(4): 425-431.
- [3] 梁玖华,黄河,潘斌,等.叶面施肥对实生毛竹苗鞭笋生长与萌发的影响[J].经济林研究,2004,22(4): 47-49.
LIANG Jiuhua, HUANG He, PAN Bin, et al. Influence of leaf fertilization on *Phyllostachys* shoot grown from seed [J]. *Nonwood For Res*, 2004, 22(4): 47-49.
- [4] 宋艳冬,金爱武,金晓春,等.施肥对毛竹叶片光合生理的影响[J].浙江林学院学报,2010,27(3): 334-339.
SONG Yandong, JIN Aiwu, JIN Xiaochun, et al. Physiology of leaf photosynthesis with fertilization in *Phyllostachys pubescens* [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2010, 27(3): 334-339.
- [5] 刘锋,陶然,应光国,等.抗生素的环境归宿与生态效应研究进展[J].生态学报,2010,30(16): 4503-4519.
LIU Feng, TAO Ran, YING Guangguo, et al. Advance in environmental fate and ecological effects of antibiotics [J]. *Acta Ecol Sin*, 2010, 30(16): 4503-4519.
- [6] ZHU Huaisong, CHEN Xi, PAN Xiangliang, et al. Effects of chloramphenicol on pigmentation, proline accumulation and chlorophyll fluorescence of maize (*Zea mays*) seedlings [J]. *Int J Agric Biol*, 2011, 13(5): 677-682.
- [7] 周文礼,王悠,肖慧,等.3种海洋微藻叶绿素a含量对抗生素胁迫的响应变化[J].中国海洋大学学报,2007,37(6): 957-960.
ZHOU Wenli, WANG You, XIAO Hui, et al. Response of chlorophyll a levels of different marine microalgae to antibiotic stress [J]. *Period Ocean Univ China*, 2007, 37(6): 957-960.

- [8] SAYED O H. Chlorophyll fluorescence as a tool in cereal crop research [J]. *Photosynthetica*, 2003, **41**(3): 321 – 330.
- [9] 李鹏民, 高辉远, STRASSER R J, 等. 快速叶绿素荧光诱导动力学分析在光合作用研究中的应用[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2005, **31**(6): 559 – 566.
- LI Pengmin, GAO Huiyuan, STRASSER R J, et al. Application of the fast chlorophyll fluorescence induction dynamics analysis in photosynthesis study [J]. *J Plant Physiol Mol Biol*, 2005, **31**(6): 559 – 566.
- [10] 任丽丽, 高辉远. 低温弱光胁迫对野生大豆和大豆栽培种光系统功能的影响[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2007, **33**(4): 333 – 340.
- REN Lili, GAO Huiyuan. Effects of chilling stress under weak light on functions of photosystems in leaves of wild soybean and cultivar soybean [J]. *J Plant Physiol Mol Biol*, 2007, **33**(4): 333 – 340.
- [11] GEISLER DA, JOHANSSON F I, SVENSSON Å S, et al. Antimycin a treatment decreases respiratory internal rotenone-insensitive NADH oxidation capacity in potato leaves [J]. *BMC Plant Biol*, 2004, **4**(1): 1 – 10.
- [12] LICHTENTHALER H K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes [J]. *Methods Enzymol*, 1987, **148**(1): 350 – 382.
- [13] STRASSER R J, GOVINDJEE A S. Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria [J]. *Photochem Photobiol*, 1995, **61**(1): 32 – 42.
- [14] STRASSER R J, SRIVASTAVA A, TSIMILLI-MICHAEL M. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples[G]//YUNUS M, PATHRE U, MOHANTY P. *Probing Photosynthesis: Mechanism, Regulation and Adaptation*. London: Taylor and Francis Press, 2000: 445 – 483.
- [15] STRASSER R J, SRIVASTAVA A, TSIMILLI-MICHAEL M. Analysis of the fluorescence transient [G]//PAPAGEO-GIOU G G. *Chlorophyll A Fluorescence: A Signature of Photosynthesis, Advances in Photosynthesis and Respiration*, vol 19. Dordrecht: Springer, 2004: 321 – 362.
- [16] 应叶青, 郭璟, 魏建芬, 等. 干旱胁迫对毛竹幼苗生理特性的影响[J]. 生态学杂志, 2011, **30**(2): 262 – 266.
- YING Yeqing, GUO Jing, WEI Jianfen, et al. Effects of drought stress on physiological characteristics of *Phyllostachys edulis* seedlings [J]. *Chin J Ecol*, 2011, **30**(2): 262 – 266.
- [17] 杨洋, 黄业伟, 罗淑萍, 等. NaCl 胁迫对毛竹幼苗叶绿素荧光特性及生理指标的影响[J]. 竹子研究汇刊, 2010, **29**(1): 29 – 32.
- YANG Yang, HUANG Yewei, LUO Shuping, et al. Effects of NaCl stress on chlorophyll fluorescence and physiological characteristics of moso bamboo seedlings [J]. *J Bamboo Res*, 2010, **29**(1): 29 – 32.
- [18] 衣艳君, 李芳柏, 刘家尧. 尖叶走灯藓(*Plagiomnium cuspidatum*)叶绿素荧光对复合重金属胁迫的响应[J]. 生态学报, 2008, **28**(11): 5437 – 5444.
- YI Yanjun, LI Fangbai, LIU Jiayao. Physiological response of chlorophyll fluorescence in moss *Plagiomnium cuspidatum* to mixture heavy metal solution [J]. *Acta Ecol Sin*, 2008, **28**(11): 5437 – 5444.
- [19] ELLIS R J, HARTLEY M R. Sites of synthesis of chloroplast proteins [J]. *Nature New Biol*, 1971, **233**(41): 193 – 196.
- [20] APPENROTH K J, STÖCKEL J, SRIVASTAVA A, et al. Multiple effects of chromate on the photosynthetic apparatus of *Spirodelia polyrhiza* as probed by OJIP chlorophyll a fluorescence measurements [J]. *Environ Poll*, 2001, **115**(1): 49 – 64.
- [21] 薛伟, 李向义, 林丽莎, 等. 短时间热胁迫对疏叶骆驼刺光系统(II)Rubisco 活性和活性氧化剂的影响[J]. 植物生态学报, 2011, **35**(4): 441 – 451.
- XUE Wei, LI Xiangyi, LIN Lisha, et al. Effects of short time heat stress on photosystem (II) rubisco activities and oxidative radicals in *Alhagi sparsifolia* [J]. *Chin J Plant Ecol*, 2011, **35**(4): 441 – 451.
- [22] 周帅, 林富平, 王玉魁, 等. 樟树幼苗机械损伤叶片对挥发性有机化合物及叶绿素荧光参数的影响[J]. 植物生态学报, 2012, **36**(7): 671 – 680.
- ZHOU Shuai, LIN Fuping, WANG Yukui, et al. Effects of mechanical damage of leaves on volatile organic compounds and chlorophyll fluorescence parameters in seedlings of *Cinnamomum camphora* [J]. *Chin J Plant Ecol*, 2012, **36**(7): 671 – 680.
- [23] MOISE N, MOYA I. Correlation between lifetime heterogeneity and kinetics heterogeneity during chlorophyll fluorescence induction in leaves: (1) mono-frequency phase and modulation analysis reveals a conformational change of a PS II pigment complex during the IP thermal phase [J]. *Bioch Biophys Acta*, 2004, **1657**(1): 33 – 46.

- [24] 李玮娟, 高志奎, 王梅, 等. 氧化乐果对不结球白菜光系统Ⅱ的毒理效应[J]. 应用生态学报, 2008, **19**(10): 2317 – 2321.
LI Weijuan, GAO Zhikui, WANG Mei, *et al.* Toxicological effects of omethoate on leaf photosystem Ⅱ of cole [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2008, **19**(10): 2317 – 2321.
- [25] 张谧, 王慧娟, 于长青. 超旱生植物沙冬青高温胁迫下的快速叶绿素荧光动力学特征[J]. 生态环境学报, 2009, **18**(6): 2272 – 2277.
ZHANG Mi, WANG Huijuan, YU Changqing. The examination of high temperature stress of *Ammopiptanthus monilicus* by chlorophyll fluorescence induction parameters [J]. *Ecol Environ Sci*, 2009, **18**(6): 2272 – 2277.
- [26] 朱新广, 张其德, 匡廷云. NaCl 胁迫对 PSⅡ光能利用和耗散的影响[J]. 生物物理学报, 1999, **15**(4): 787 – 791.
ZHU Xinguang, ZHANG Qide, KUANG Tingyun. Effects of NaCl stress on light utilization and dissipation of PS Ⅱ [J]. *Acta Biophys Sin*, 1999, **15**(4): 787 – 791.
- [27] LU Congming, VONSHAK A. Photoinhibition in outdoor *Spirulina platensis* cultures assessed by polyphasic chlorophyll fluorescence transients [J]. *J Appl Phycol*, 1999, **11**(4): 355 – 359.
- [28] 李耕, 高辉远, 赵斌, 等. 灌浆期干旱胁迫对玉米叶片光系统活性的影响[J]. 作物学报, 2009, **35**(10): 1916 – 1922.
LI Geng, GAO Huiyuan, ZHAO Bin, *et al.* Effects of drought stress on activity of photosystems in leaves of maize at grain filling stage [J]. *Acta Agron Sin*, 2009, **35**(10): 1916 – 1922.
- [29] STRASSER B J. Donor side capacity of photosystem Ⅱ probed by chlorophyll fluorescence transient [J]. *Photosynth Res*, 1997, **52**(2): 147 – 155.

天目山常绿落叶阔叶混交林生态系统水汽通量特征

牛晓栋¹, 江洪^{1,2}, 方成圆¹, 陈晓峰¹, 孙恒¹

(1. 浙江农林大学 浙江省森林生态系统碳循环与固碳减排重点实验室, 浙江 临安 311300; 2. 南京大学
国际地球系统科学研究所, 江苏 南京 210093)

摘要: 利用涡度相关技术研究了2013年7月至2014年6月浙江天目山常绿落叶阔叶混交林生态系统水汽通量变化特征, 结合气象要素的观测, 进一步分析了净辐射对水汽通量的影响。结果表明: 浙江天目山常绿落叶阔叶混交林生态系统全年水汽通量基本为正值, 各月水汽通量日变化趋势基本呈单峰型曲线, 7月水汽通量峰值最大($0.115 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), 1月最小($0.029 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)。四季的水汽通量平均日变化中, 峰值的大小为夏季>春季>秋季>冬季。生态系统全年蒸散量为721.25 mm, 在相近纬度的不同类型森林生态系统中处于较低水平, 全年蒸散量占降雨量的51.46%, 各月蒸散量均小于降雨量。生态系统全年净辐射为 $3305.65 \text{ MJ} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{a}^{-1}$ 。季节尺度上, 对生态系统水汽通量与净辐射进行回归分析, 显示四季的相关性都极显著。夏季相关系数(R^2)最大, 为0.500, 其次为春季(0.318), 秋季(0.232), 冬季最低(0.125)。图6表2参28

关键词: 森林生态学; 水汽通量; 涡度相关; 典型常绿落叶阔叶混交林; 净辐射; 天目山

中图分类号: S718.51 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2016)02-0216-09

Water vapor flux features of an evergreen and deciduous broadleaf mixed forest in Mount Tianmu area

NIU Xiaodong¹, JIANG Hong^{1,2}, FANG Chengyuan¹, CHEN Xiaofeng¹, SUN Heng¹

(1. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Carbon Cycling in Forest Ecosystems and Carbon Sequestration, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 2. International Institute for Earth System Science, Nanjing University, Nanjing 210093, Jiangsu, China)

Abstract: Evapotranspiration (ET) is an important component of ecosystem water and energy balances, and subtropical evergreen and deciduous broadleaf forests play an important role in regional water cycles and budgets. To enhance prediction of climate change impact on the terrestrial ecosystem an improved understanding of the water and energy fluxes between vegetation and the atmosphere is needed. In Mount Tianmu area of Zhejiang Province, a subtropical evergreen and deciduous broadleaf mixed forest observation tower was set up in December 2012 with a three dimensional ultrasonic anemometer, a $\text{H}_2\text{O}/\text{CO}_2$ infrared analyzer, and conventional meteorological instruments for measuring a multi-layer gradient of temperature and humidity, windspeed, and radiation. Based on data observed from July 2013 to June 2014, water vapor flux features of the ecosystem were analyzed, and the net radiation responses to water vapor flux were determined. Results showed that annual water vapor flux was positive with distinct diurnal and seasonal variations. The maximum monthly water vapor flux occurred in July with a maximum daily $0.115 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; the lowest was in January with a maximum of only

收稿日期: 2015-01-13; 修回日期: 2015-04-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(61190114, 41171324); 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(20110091110028); 科技部国家科技基础条件平台项目(2005DKA32300); 浙江省重点科技创新团队资助项目(2010R50030)

作者简介: 牛晓栋, 从事生态系统碳水通量及大气水汽稳定同位素观测研究。E-mail: 764854761@qq.com。通信作者: 江洪, 教授, 博士生导师, 从事全球变化生态、生态系统碳-氮-水循环等研究。E-mail: jianghong_china@hotmail.com

0.029 $\text{g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。The maximum quarterly water vapor flux occurred in summer, and the lowest was in January. The annual total ET was 721.25 mm (about 51.5% of the annual precipitation). The annual net radiation (R_n) for this ecosystem was 3 305.65 $\text{MJ} \cdot \text{m}^{-2}$. Also, R_n was the main driving force of ET and was a key factor in energy balance. Thus, water vapor flux being positive meant that the ecosystem was the source of water vapor. [Ch, 6 fig. 2 tab. 28 ref.]

Key words: forest ecology; water vapor flux; eddy covariance; typical evergreen and deciduous broadleaf mixed forest; net radiation; Mount Tianmu

水和水的循环对于生态系统具有特别重要的意义, 水的主要循环路线是从地球表面通过蒸散进入大气圈, 同时又不断地从大气圈通过降水而回到地球表面^[1]。水汽通量是生态系统水循环过程的重要特征参数, 同时又是潜热输送的载体, 是能量平衡的重要影响因子以及水量平衡中的组成部分^[2]。森林作为地球上最大的陆地生态系统, 在全球水循环和能量再分配中都发挥着重要作用^[3]。森林水汽通量主要指林下土壤表面蒸腾、植被蒸腾和树冠截留水分蒸腾 3 个部分的总和, 是森林植被水分状况的重要指标, 热量耗散的一种形式, 同时又是影响区域和全球气候的重要因素。目前, 涡度相关技术已在全球范围内广泛应用于陆地生态系统碳水通量和能量交换的观测, 并取得了很好的成效。该方法已经成为国际通量观测网(FLUXNET)的标准方法^[4-5]。中国陆地生态系统观测网络(ChinaFLUX)也已经利用该技术开展广泛观测^[6-9]。在中国不同类型森林生态系统中也建立了多个基于涡度相关技术的通量观测站^[10-14], 但是主要是开展碳通量和能量通量的观测, 对于水汽通量的研究较少, 对中国中亚热带地区典型常绿阔叶林的水汽交换特征的研究更鲜有报道^[15-16]。浙江天目山地处中国东南沿海丘陵山区中亚热带北缘, 北亚热带南缘, 其气候具有中亚热带向北亚热带过渡的特征。拥有典型的中亚热带森林生态系统^[17]。研究浙江天目山森林生态系统的水汽通量的特征对评价亚热带地区森林生态系统的水分循环和能量平衡具有重要意义。本研究以 2013 年 7 月到 2014 年 6 月的通量观测数据为依据, 初步分析了浙江天目山常绿落叶阔叶混交林生态系统的水汽通量的动态变化特征, 旨在为森林生态系统各个蒸散分量的分解研究奠定基础, 并为深入认识中国中亚热带地区典型常绿落叶阔叶混交林生态系统的水文和气象功能提供基础数据^[18]。

1 研究地区与研究方法

1.1 研究区概况

研究区位于浙江天目山森林生态系统国家定位观测研究站($30^{\circ}18'30''\text{--}30^{\circ}24'55''\text{N}$, $119^{\circ}24'47''\text{--}119^{\circ}28'27''\text{E}$), 面积为 4 284.0 hm^2 。主峰仙人顶, 海拔为 1 506 m, 其中林地面积为 4 261.1 hm^2 , 占 99.5%, 森林覆盖率 98.1%。林地面积中乔木林 3 711.3 hm^2 , 占 88.7%; 竹林面积 474.8 hm^2 , 占 11.3%。海拔 600 m 以下为红壤带, 600~1 200 m 为黄壤带, 1 200 m 以上为棕黄壤带。气候具有中亚热带向北亚热带过渡的特征, 受海洋暖湿气流的影响较深, 形成季风强盛, 四季分明, 气候温和, 雨水充沛, 光照适宜且复杂多变的森林生态气候。自山麓至山顶, 年平均气温为 14.8~8.8 °C, 最冷月平均气温 3.4~2.6 °C, 极端最低气温-13.1~20.2 °C, 最热月平均气温 28.1~19.9 °C, 极端最高气温 38.2~29.1 °C, 无霜期 235~209 d, 年雨日 159.2~183.1 d, 年雾日 64.1~255.3 d, 年降水量 1 390.0~1 870.0 mm, 年太阳辐射 4 460~3 270 $\text{MJ} \cdot \text{m}^{-2}$, 相对湿度 76%~81%。

常绿落叶阔叶混交林是天目山精华植被, 分布于海拔 850~1 140 m。常绿乔木主要有细叶青冈 *Cyclobalanopsis gracilis*, 石栎 *Lithocarpus glaber* 和交让木 *Daphniphyllum macropodum* 等, 落叶乔木有青钱柳 *Cyclocarya paliurus*, 化香 *Platycarya strobilacea*, 枫香 *Liquidambar formosana*, 天目木姜子 *Litsea auriculata* 和短柄枹 *Quercus glandulifera* 等。灌木有柃木 *Eurya japonica*, 簕竹 *Indocalamus tessellatus* 和马银花 *Rhododendron ovatum* 等。另外, 混有针叶林柳杉 *Cryptomeria fortunei* 林、金钱松 *Pseudolarix amabilis* 林及黄山松 *Pinus taiwanensis* 林等, 组成多种较复杂的森林类型。这些森林群落大多数处于较稳定状态, 达到了演替顶级^[21]。土壤为山地黄壤, 土层深度约 100 cm, pH 5~6, 枯枝落叶层厚达 10~20 cm。碳通量观测塔安装在研究区的一块常绿落叶阔叶混交林样地($30^{\circ}20'59''\text{N}$, $119^{\circ}26'13.2''\text{E}$)内, 海拔为 1 139 m, 坡度 6.6°左右, 坡向南偏西 16°, 主要乔木有小叶青冈 *Cyclobalanopsis myrsinifolia*, 交让木, 小叶白

辛树 *Pterostyrax corymbosus*, 短柄枹, 青钱柳, 天目槭 *Acer sinopurpurascens*, 秀丽槭 *Acer elegantulum*, 糙叶树 *Aphananthe aspera* 等, 林龄为 140 a, 郁闭度 0.7, 林分密度 3 125 株·hm⁻²。林分为复层结构, 分 3 层, 15 m 以上的乔木约占 3.2%, 第 2 层 8~14 m 的乔木约占 43.2%, 其余的乔木均在 8 m 以下。优势树种为小叶青冈、交让木和小叶白辛树等。

1.2 观测仪器

观测地建有 40 m 高的微气象观测塔, 开路涡度相关系统的探头安装在距地面 38 m 高度上, 由三维超声风速仪(CSAT3, Campbell Inc., 美国)和开路 CO₂/H₂O 分析仪(EC150)组成, 原始采样频率为 10 Hz, 利用数据采集器(CR3000, Campbell Inc., 美国)存储数据, 同时在线计算并存储 30 min 的二氧化碳通量(F_c), 摩擦风速(U_{star}), 潜热通量(L_E)和显热通量(H_s)等参数。常规气象观测系统, 由锦州阳光气象科技有限公司安装, 包括 7 层风速, 7 层大气温度和湿度。安装高度分别为 2, 7, 11, 17, 23, 30 和 38 m。土壤温度和湿度观测深度为 5, 50 和 100 cm。土壤热通量观测深度为 3 和 5 cm。另外, 有 2 个 SI-111 红外温度仪分别置于 2 和 23 m 高处, 用于采集地表和冠层温度。常规气象观测系统数据采集器隔 30 min 自动记录平均风速、环境温度、环境湿度、土壤温度、土壤湿度等常规气象信息。

1.3 研究方法

1.3.1 计算公式 水汽通量(E)通过实时测定的垂直风速与水汽浓度的协方差求得。公式为 $E = \rho w' q'$ 。其中: ρ 为干空气密度, q 为比湿脉动, w 为垂直风速; 横线表示一段时间内的平均值; 撇号表示脉动。并规定若气体由大气圈进入生态系统, 通量符号为负, 若气体由生态系统进入大气圈, 则通量符号为正^[2]。

1.3.2 数据处理 采用的数据为通量观测的 30 min 平均值。数据处理采用目前普遍采用的比较成熟的方法, 主要包括 2 次坐标旋转来矫正地形以及观测仪器的不水平, 并使垂直方向的风速平均值为 0, 水平方向的风速和主导风向一致, 且剔除由于恶劣天气(有降水)、湍流不充分等导致的不合理数据, 剔除后全年还有 64% 的有效值; 对于打雷、仪器故障等原因导致的缺失数据采取如下方法插补: 其中 ≤ 2 h 的用平均值来插补, 即用平均日变化法(mean diurnal variation, MDV)插补缺失的数据^[19], 对于缺失的数据采用相邻几天相同时刻的平均值来插补。此方法首先要确定平均时段的长度, 另有研究表明: 白天取 14 d, 夜间取 7 d 的平均时间长度所得结果的偏差是最小的^[20]; > 2 h 的用水汽通量与净辐射的方程插补。

2 结果与分析

2.1 常规气象因子变化

观测数据从 2013 年 7 月到 2014 年 6 月, 按 2014 年 1 月, 2014 年 2 月, 2014 年 3 月, 2014 年 4 月, 2014 年 5 月, 2014 年 6 月, 2013 年 7 月, 2013 年 8 月, 2013 年 9 月, 2013 年 10 月, 2013 年 11 月, 2013 年 12 月进行排列, 构成全年数据。由图 1 可以看出: 全年平均气温为 10.6 ℃。月平均气温最高值在 7 月, 为 23.3 ℃, 月平均空气温度最小值在 12 月, 为 -1.2 ℃。全年空气相对湿度平均值为 82.0%。空气相对湿度平均值最大月在 7 月, 值为 92.4%。空气相对湿度平均值最小月在 1 月, 值为 72.34%。

2.2 水汽通量月均日变化特征

通过对全部时间段缺失数据的插补计算, 得到了浙江天目山常绿落叶阔叶混交林生态系统全年逐日半小时的水汽通量数据, 按月将每天同时刻的水汽通量求平均值, 计算当月平均日变化, 结果如图 1 所示。

图 2 显示: 浙江天目山常绿落叶阔叶混交林生态系统全年水汽通量基本为正值, 即从森林向大气中释放, 是一个水汽源。各月水汽通量日变化趋势基本呈单峰型曲线, 1 月, 2 月, 7 月, 8 月单峰型明显, 其他月份除单峰外, 各有几个小峰。可能是因为冬夏季节每日温度变化比较稳定, 而春秋季节每日温度变化比较大, 规律性不强。大部分月份的中午时段会有 1 个明显下降的值, 如 2 月, 5 月, 6 月, 7

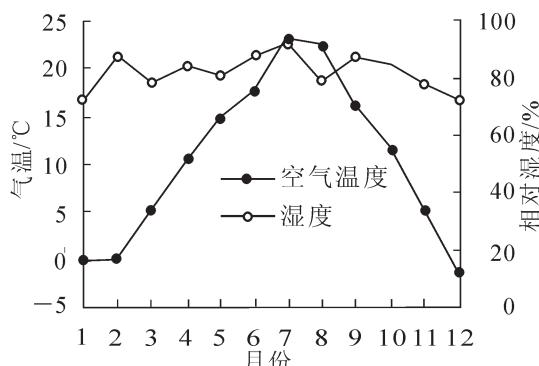


图 1 2013-07-2014-06 气象要素月变化

Figure 1 Monthly variation of meteorological elements
(2013-07-2014-06)

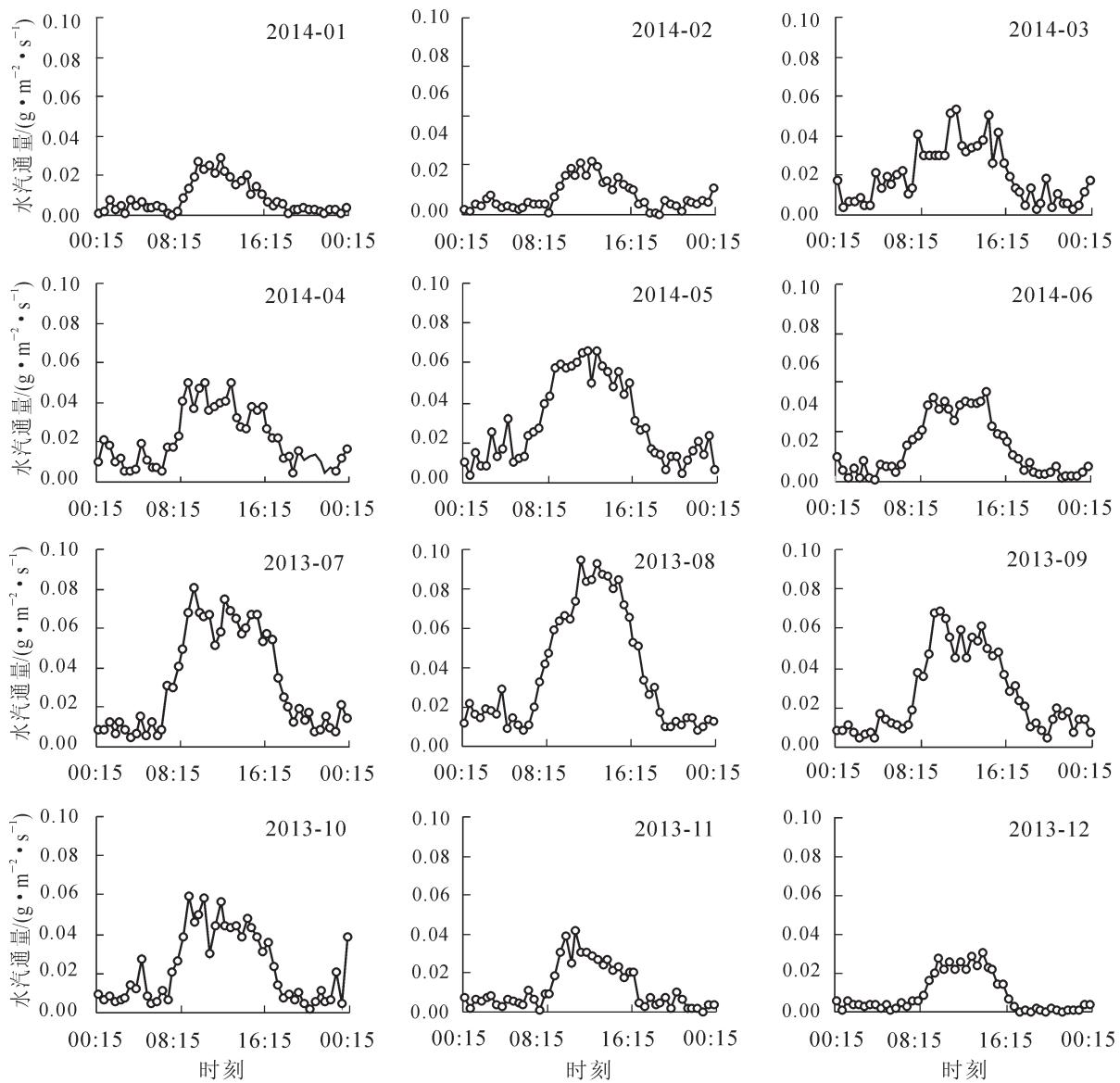


图2 2013-07–2014-06各月水汽通量平均日变化分布

Figure 2 Mean diurnal change distribution of monthly water vapor flux (2013-07–2014-06)

月,8月,10月,11月。这可能是因为中午时段温度为1 d中最高值,光照强度大,植物失水较多,导致叶片气孔关闭,蒸腾下降,而在森林生态系统中蒸散的主要形式是蒸腾^[21–22],因而水汽通量值在中午某一刻会出现突然的下降。各月的平均日变化一般为夜间较低,白天较高。这是因为夜间温度较低,光照强度也低,土壤蒸发和叶片蒸腾作用都较低,尤其在1月,11月,12月,夜间水汽通量值趋近于0。这是因为这3个月平均温度为全年最低,植物生理活动减弱,尤其是夜间更弱。而其他月份夜间温度较这3月高,植物生理活动也微弱进行,因而水汽通量值高于0,并有小峰出现。

全年各月水汽通量最大值为0.029~0.115 g·m⁻²·s⁻¹,各月差异明显。最大值出现在7月,最小值出现在1月。峰值出现时间一般在11:45–14:15时段,因为每天这一时段温度高,光照强度大,蒸腾作用明显,水汽通量值也最大。

全年水汽通量最小值为-0.000 43~0.007 90 g·m⁻²·s⁻¹,各月差异明显。最大值出现在8月,最小值出现在12月。基本出现在夜间或凌晨。11月,12月,1月,2月这4个月水汽通量最小值明显低于其余月份,是因为这段时间生态系统内不仅夜间温度低,而且植物大都处于很弱的生理活动期,叶片蒸腾几乎停止。

2.3 全年水汽通量季节变化特征

通过对全部时间段缺失数据的插补计算,得到浙江天目山常绿落叶阔叶混交林生态系统的全年逐日

半小时的水汽通量数据,按季节计算平均日变化。结果如图3所示。由图3可见:四季的水汽通量日变化趋势一致,夜间水汽通量值低,变化小,白天水汽通量值大,变化较大。一般从早晨6:15~8:15开始,水汽通量开始明显变大,到中午11:45~14:15水汽通量值达到1d中最大,而后开始明显下降,在17:45~19:15达到1d中最小值,而后开始趋于平缓。夏冬季节这种变化最为明显,白天有明显的峰值。春秋季节天气变化无常,白天水汽通量往往有几个小峰。四季的水汽通量值的平均日变化中,夜间水汽通量值相差不大。白天的通量值差异较大,具体表现为夏季>春季>秋季>冬季。这是因为夏季的温度较高,光照强烈,植物生理活动活跃,叶片蒸腾和土壤蒸发都为1a中最强,水汽通量值也最大,夏季白天水汽通量日变化值为0.021~0.082 g·m⁻²·s⁻¹,最大值出现在12:45,达到0.082 g·m⁻²·s⁻¹。

春季和秋季的平均温度相似,光照强度也差距不大,但是由于春季是1a中植物生长开始的时期,植物生理活动较强,叶片蒸腾作用较强,水汽通量值也较大。而秋季植物生长开始减缓,叶片蒸腾作用降低,水汽通量值和春季相比较小。其中春季白天水汽通量日变化值为0.019~0.064 g·m⁻²·s⁻¹,秋季白天水汽通量日变化值为0.024~0.052 g·m⁻²·s⁻¹。冬季温度为1a中最低,植物生长也几乎停止,叶片蒸腾作用极低,水汽通量值为全年最低,白天水汽通量日变化值为0.015~0.029 g·m⁻²·s⁻¹。

2.4 降水量与蒸散量

计算全年水汽通量总和可以得到微气象塔观测范围内蒸散情况。图4是逐月蒸散量和降水量对比图。

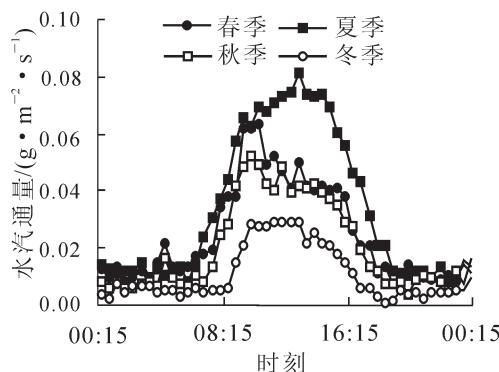


图3 2013-07-2014-06水汽通量各季节平均日变化特征

Figure 3 Mean diurnal change distribution of quarterly water vapor flux (2013-07-2014-06)

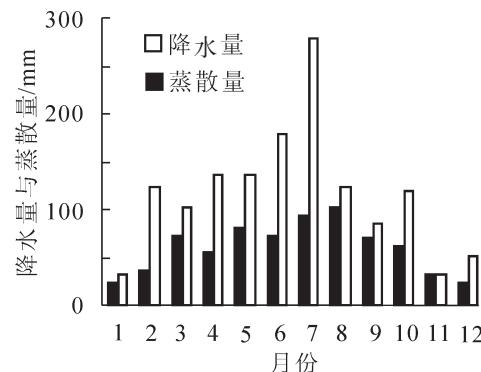


图4 蒸散量与降水量的季节变化

Figure 4 Seasonal variation of evapotranspiration and precipitation (2013-07-2014-06)

由图4可见:浙江天目山常绿落叶阔叶混交林生态系统蒸散量1a的季节变化大致呈单峰曲线,并且和气温的季节变化基本吻合(图1),8月蒸散量最高,为102.2 mm,1月最低,为23.2 mm。1a中降水量季节变化也大致呈单峰曲线,7月降水量最高,为279.5 mm,11月降水量最低,为31.9 mm。全年各月蒸散量均小于降水量。一般来讲,月降水量较大时,下月的蒸散量也会升高,这可能是因为降水量大,土壤含水量较高,蒸腾作用从土壤中吸水也较多,蒸散量也变大。

表1为生态系统各季节降水量、蒸散量以及占全年的比例。浙江天目山常绿落叶阔叶混交林生态系统观测期间年降水量为1401.7 mm,夏季降水量最大,为581.7 mm,占全年降水量41.47%,春季降水量次之,占比26.83%,和夏季相比差距较大,这是因为浙江地区夏季有梅雨期。秋季降水量占比

表1 各季度降水量与蒸散量及其占全年降水量与蒸散量的比例

Table 1 Contrast between evapotranspiration and precipitation at every quarter

季节	月份	降水量		蒸散量	
		降水量/mm	比例/%	蒸散量/mm	比例/%
春季	3月,4月,5月	376.1	26.83	207.8	28.82
夏季	6月,7月,8月	581.3	41.47	267.0	37.01
秋季	9月,10月,11月	237.4	16.94	162.8	22.57
冬季	12月,1月,2月	206.9	14.76	83.7	11.60
全年		1401.7		721.3	

16.94%，冬季降水量最低，仅占全年降水量的14.76%。蒸散量方面，研究地全年蒸散量为721.25 mm；夏季蒸散量最大，为267.0 mm，占比37.01%；春季次之，为207.8 mm，占比28.82%；秋季占比22.57%，冬季占比11.6%。生态系统全年蒸散量占全年降水量的51.46%，与WEI等^[23]指出的南方热带林蒸散耗水占降水量40%~50%接近。

表2是相近纬度的不同类型森林生态系统的年蒸散量，由于森林生态系统的气象因素年际差异较大，每年蒸散量也有一定差异。由表2可以看出，浙江天目山常绿落叶阔叶混交林生态系统年蒸散量仅高于广东鼎湖山常绿针阔混交林^[24]，浙江临安雷竹*Phyllostachys violascens*林^[26]，稍低于江西千烟洲人工针叶林^[24]，浙江安吉毛竹*Phyllostachys edulis*林^[16]，远低于西双版纳热带季雨林^[24]和湖南会同人工杉木*Cunninghamia lanceolata*林^[25]。

2.5 净辐射季节变化特征

通过对浙江天目山常绿落叶阔叶混交林全年净辐射的数据分析，选取各季节典型月份（1月、4月、7月和10月）的逐日逐半小时净辐射数据，得出净辐射的4个典型月平均日变化。结果如图5所示。

1, 4, 7, 10月净辐射的日变化呈单峰型，和水汽通量变化比较一致，净辐射夜间值比较低，曲线平缓，白天值变化大，值也比较大。一般从早晨6:15~8:15，净辐射值开始由负变正，即能量开始由大气进入生态系统，然后逐渐升高，到正午11:15~13:15，净辐射值达到最高值，然后开始下降，在17:15~18:45降为最低，趋于平缓。各月的净辐射值由正变负和由负变正的时间不一致，7月由负转正时间最早，由正转负时间最迟，1月则正好相反。这和水汽通量的变化比较一致，很多研究也表明水汽通量和净辐射之间具有很强的相关性^[28]。

2.6 净辐射与水汽通量的季节相关性

浙江天目山常绿落叶阔叶混交林生态系统全年净辐射为3 305.65 MJ·m⁻²·a⁻¹，季节尺度上水汽通量对净辐射的响应见图6。

通过对白天的净辐射与水汽通量进行拟合和相关性分析，可以看出4个季节的水汽通量和净辐射的相关性都达极显著。但是4个季节的相关性系数(R^2)差距较大，春夏秋冬四季的拟合的 R^2 值分别为0.318, 0.500, 0.232, 0.125。夏季最高，说明就单因子来讲，夏季净辐射对水汽通量影响也是很大，净辐射增大，温度升高，土壤蒸发变大，气孔导度变高，蒸腾作用强烈，水汽通量增加。冬季的净辐射与水汽通量的相关性最低，因为冬季植物生理活动减弱，温度也较低，土壤蒸发和蒸腾作用都较弱，净辐射对于蒸散的作用不是很明显。

3 结论

对浙江天目山常绿落叶阔叶混交林生态系统2013年7月至2014年6月水汽通量分布特征的观测结果表明：全年各月各时刻的水汽通量基本为正值，是一个水汽源。各月的平均日变化一般为夜间较低，白天较高。各月水汽通量日变化趋势基本呈单峰型曲线，1月, 2月, 7月, 8月单峰型明显，其他月份除单峰外，各有几个小峰。大部分月份的中午时段会有1个明显下降的值。全年各月水汽通量峰值最大值出现在7月，最小值出现在1月。

四季的水汽通量日变化趋势一致，夜间水汽通量值低，变化小，白天水汽通量值大，变化较大。一

表2 其他森林生态系统年蒸散量

Table 2 Annual ET in other forest ecosystems

站点	蒸散量/mm	森林类型	纬度
鼎湖山 ^[25]	641.20	常绿针阔混交林	23°17'N
西双版纳 ^[25]	1 369.40	热带季雨林	26°56'N
千烟洲 ^[25]	748.30	人工针叶林	26°75'N
会同 ^[26]	1 049.00	杉木 <i>Cunninghamia lanceolata</i> 林	26°50'N
安吉 ^[17]	744.73	毛竹 <i>Phyllostachys edulis</i> 林	30°28'N
临安 ^[27]	669.84	雷竹 <i>Phyllostachys violascens</i> 林	30.18°N
天目山	721.25	常绿落叶阔叶混交林	30°20'N

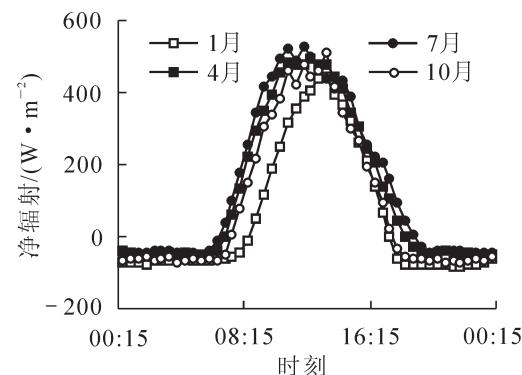


图5 净辐射的日均变化

Figure 5 Diurnal variation of mean value of net radiation

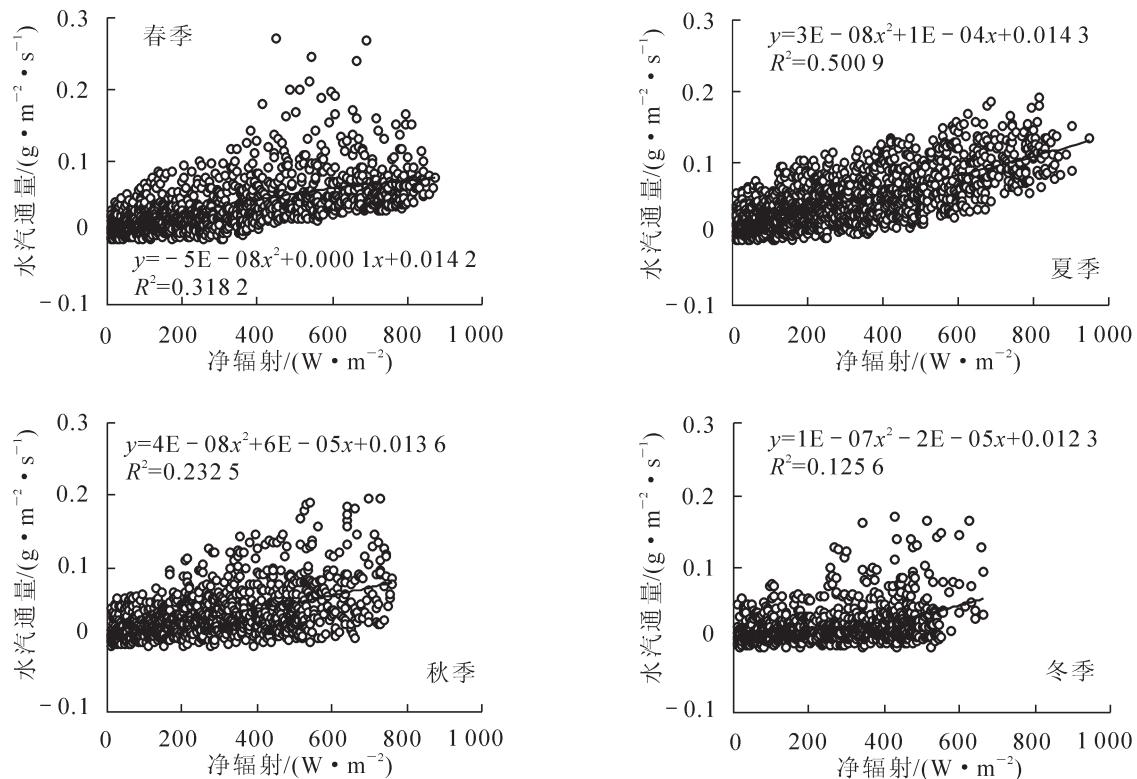


图6 各季度水汽通量对净辐射的拟合曲线

Figure 6 Quarterly response of water vapor flux to net radiation

般从早晨 6:15–8:15 开始,水汽通量开始明显变大,到中午 11:45–14:15 水汽通量值达到 1 d 中最大,而后开始明显下降,在 17:45–19:15 达到 1 d 中最小值,而后开始趋于平缓。四季的水汽通量平均日变化中,峰值的大小为夏季>春季>秋季>冬季。

浙江天目山常绿落叶阔叶混交林生态系统全年蒸散量为 721.3 mm,在相近纬度的不同类型森林生态系统中,仅高于广东鼎湖山常绿针阔混交林^[24],浙江临安雷竹林^[26],稍低于江西千烟洲人工针叶林^[24],浙江安吉毛竹林^[16],远低于西双版纳热带季雨林^[24]和湖南会同人工杉木林^[25]。全年降水量为 1 401.7 mm,全年蒸散量占降水量的 51.46%,与 WEI 等^[23]指出的南方热带林蒸散耗水占降水量 40%~50% 接近。

浙江天目山常绿落叶阔叶混交林生态系统全年净辐射为 3 305.65 MJ·m⁻²·a⁻¹,净辐射作为影响水汽通量的最主要因子,其大小直接影响了生态系统的水汽通量的大小,作为单因子对它与水汽通量拟合,表现出很好的相关性。

应用涡度相关技术对浙江天目山常绿落叶阔叶混交林生态系统的水汽通量变化特征的初步研究表明,与其他地区同类研究相比^[28],研究结果具有较好的代表性,然而本研究只用了 1 a 的观测数据,分析时间较短,深入了解天目山森林生态系统水分循环规律及其森林水文功能还需要长时间的观测及进一步的分析。

4 参考文献

- [1] 胡海英,包为民,瞿思敏,等.稳定性氢氧同位素在水体蒸发中的研究进展[J].水文,2007,27(3): 1–5.
HU Haiying, BAO Weimin, QU Simin, et al. Fractionation mechanism of stable hydrogen and oxygen isotope in water body evaporating [J]. *J China Hydrol*, 2007, 27(3): 1–5.
- [2] 李菊,刘允芬,杨晓光,等.千烟洲人工林水汽通量特征及其与环境因子的关系[J].生态学报,2006,26(8): 2449–2456.
LI Ju, LIU Yunfen, YANG Xiaoguang, et al. Studies on water vapor flux characteristic and the relationship with environment factors over a planted coniferous forest in Qianyanzhou station [J]. *Acta Ecol Sin*, 2006, 26(8): 2449–2456.
- [3] 张新建,袁凤辉,陈妮娜,等.长白山阔叶红松林能量平衡和蒸散[J].应用生态学报,2011,22(3): 607–613.
ZHANG Xinjian, YUAN Fenghui, CHEN Nina, et al. Energy balance and evapotranspiration in broad-leaved Korean

- pine forest in Changbai Mountain [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2011, **22**(3): 607 – 613.
- [4] MATSUMOTO K, OHTA T, NAKAI T, *et al*. Energy consumption and evapotranspiration at several boreal and temperate forests in the Far East [J]. *Agric For Meteorol*, 2008, **148**(12): 1978 – 1989.
- [5] KOSUGI Y, KATSUYAMA M. Evapotranspiration over a Japanese cypress forest (Ⅱ) comparison of the eddy covariance and water budget methods [J]. *J Hydrol*, 2007, **334**(3/4): 305 – 311.
- [6] 黄辉, 孟平, 张劲松, 等. 华北低丘山地人工林蒸散的季节变化及环境影响要素[J]. 生态学报, 2011, **31**(13): 3569 – 3580.
- HUANG Hui, MENG Ping, ZHANG Jingsong, *et al*. Seasonal variations and environmental control impacts of evapotranspiration in a hilly plantation in the mountain areas of North China [J]. *Acta Ecol Sin*, 2011, **31**(13): 3569 – 3580.
- [7] 黄昆, 王绍强, 王辉民, 等. 中亚热带人工针叶林生态系统碳通量拆分差异分析[J]. 生态学报, 2013, **33**(17): 5252 – 5265.
- HUANG Kun, WANG Shaoqiang, WANG Huimin, *et al*. An analysis of carbon flux partition differences of a mid-subtropical planted coniferous forest in southeastern China [J]. *Acta Ecol Sin*, 2013, **33**(17): 5252 – 5265.
- [8] 周丽艳, 贾丙瑞, 周广胜, 等. 中国北方针叶林生长季碳交换及其调控机制[J]. 应用生态学报, 2010, **21**(10): 2449 – 2456.
- ZHOU Liyan, JIA Bingrui, ZHOU Guangsheng, *et al*. Carbon exchange of Chinese boreal forest during its growth season and related regulation mechanisms [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2010, **21**(10): 2449 – 2456.
- [9] 王春林, 于贵瑞, 周国逸, 等. 鼎湖山常绿针阔叶混交林 CO₂ 通量估算[J]. 中国科学 D 辑: 地球科学, 2006, **36**(增刊1): 119 – 129.
- WANG Chunlin, YU Guirui, ZHOU Guoyi, *et al*. Evergreen broad-leaved mixed forest CO₂ fluxes in Dinghu Mountain [J]. *Sci China D Earth Sci*, 2006, **36**(supp1): 119 – 129.
- [10] 赵仲辉, 张利平, 康文星, 等. 湖南会同杉木人工林生态系统 CO₂ 通量特征[J]. 林业科学, 2012, **47**(11): 6 – 12.
- ZHAO Zhonghui, ZHANG Liping, KANG Wenxing, *et al*. Characteristics of CO₂ flux in a Chinese fir plantation ecosystem in Huitong County, Hunan Province [J]. *Sci Silv Sin*, 2012, **47**(11): 6 – 12.
- [11] 沈艳, 缪启龙, 刘允芬. 亚热带红壤丘陵人工混交林区 CO₂ 源汇及变化[J]. 生态学报, 2005, **25**(6): 1371 – 1375.
- SHEN Yan, MIU Qilong, LIU Yunfen. CO₂ source/sink and its variation of artificial mixed forest in subtropical red soil hilly area [J]. *Acta Ecol Sin*, 2005, **25**(6): 1371 – 1375.
- [12] 孙成, 江洪, 周国模, 等. 我国亚热带毛竹林 CO₂ 通量的变异特征[J]. 应用生态学报, 2013, **24**(10): 2717 – 2724.
- SUN Cheng, JIANG Hong, ZHOU Guomo, *et al*. Variation characteristics of CO₂ flux in *Phyllostachys edulis* forest ecosystem in subtropical region of China [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2013, **24**(10): 2717 – 2724.
- [13] 邱岭, 祖元刚, 王文杰, 等. 帽儿山地区落叶松人工林 CO₂ 通量特征及对林分碳收支的影响[J]. 应用生态学报, 2011, **22**(1): 1 – 8.
- QIU Ling, ZU Yuangang, WANG Wenjie, *et al*. CO₂ flux characteristics and their influence on the carbon budget of a larch plantation in Maoershan region of northeast China [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2011, **22**(1): 1 – 8.
- [14] 蒋琰, 胡海波, 张学仕, 等. 北亚热带次生栎林碳通量及其影响因子研究[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2011, **35**(3): 38 – 42.
- JIANG Dan, HU Haibo, ZHANG Xueshi, *et al*. The carbon flux and its environmental factors in a north subtropical secondary oak forest ecosystem [J]. *J Nanjing For Univ Nat Sci Ed*, 2011, **35**(3): 38 – 42.
- [15] 窦军霞, 张一平, 于贵瑞, 等. 西双版纳热带季节雨林水热通量[J]. 生态学报, 2007, **27**(8): 3099 – 3109.
- DOU Junxia, ZHANG Yiping, YU Guirui, *et al*. Inter-annual and seasonal variations of energy and water vapor fluxes above a tropical seasonal rain forest in Xishuangbanna, SW China [J]. *Acta Ecol Sin*, 2007, **27**(8): 3099 – 3109.
- [16] 刘玉莉, 江洪, 周国模, 等. 安吉毛竹林水汽通量变化特征及其与环境因子的关系[J]. 生态学报, 2014, **34**(17): 4900 – 4909.
- LIU Yuli, JIANG Hong, ZHOU Guomo, *et al*. Water vapor flux variation characteristic and the relationship with its environment factors in *Phyllostachys edulis* forest in Anji [J]. *Acta Ecol Sin*, 2014, **34**(17): 4900 – 4909.
- [17] 汤孟平, 周国模, 施拥军, 等. 天目山常绿阔叶林优势种群及其空间分布格局[J]. 植物生态学报, 2006, **30**(5):

- 743 – 752.
- TANG Mengping, ZHOU Guomo, SHI Yongjun, *et al.* Study of dominant plant populations and their spatial patterns in evergreen broadleaved forest in Tianmu Mountain, China [J]. *J Plant Ecol*, 2006, **30**(5): 743 – 752.
- [18] 牛晓栋, 江洪, 王帆. 天目山森林生态系统大气水汽稳定同位素组成的影响因素[J]. 浙江农林大学学报, 2015, **32**(3): 327 – 334.
- NIU Xiaodong, JIANG Hong, WANG Fan. Stable isotope composition for atmospheric water vapor in the forest ecosystem of Mount Tianmu [J]. *J Zhejiang A & F Univ*, 2015, **32**(3): 327 – 334.
- [19] 于贵瑞. 中国陆地生态系统碳通量观测技术及时空变化特征[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 174 – 175.
- [20] FALGE E, BALDOCCHI D, OLSON R, *et al.* Gap filling strategies for defensible annual sums of net ecosystem exchange [J]. *J Agric For Meteorol*, 2001, **107**(1): 43 – 69.
- [21] 郑秋红, 王兵. 稳定性同位素技术在森林生态系统碳水通量组分区分中的应用[J]. 林业科学, 2009, **22**(1): 109 – 114.
- ZHENG QiuHong, WANG Bing. Applications of stable isotope techniques to determine components of CO₂ and H₂O fluxes in forest ecosystems [J]. *For Res*, 2009, **22**(1): 109 – 114.
- [22] WILLIAMS D G, CABLE W, HULTINE K, *et al.* Evapotranspiration components determined by stable isotope, sap flow and eddy covariance techniques [J]. *Agric For Meteorol*, 2004, **125**(3/4): 241 – 258.
- [23] WEI Xiaohua, LIU Si, ZHOU Guoyi, *et al.* Hydrological processes in major types of Chinese forest [J]. *Hydrol Proc*, 2005, **19**(1): 63 – 75.
- [24] 于贵瑞, 王秋凤. 植物光合、蒸腾与水分利用的生理生态学[M]. 北京: 科学出版社, 2010: 351 – 357.
- [25] 赵梅芳, 项文化, 田大伦, 等. 基于3-PG模型的湖南会同杉木人工林蒸发散估算[J]. 湖南农业科学, 2008(3): 158 – 162.
- ZHAO Meifang, XIANG Wenhua, TIAN Dalun, *et al.* The evapotranspiration estimation of planted Chinese fir in Huitong of Hunan Province based on the 3-PG model [J]. *Hunan Agric Sci*, 2008(3): 158 – 162.
- [26] 蔺恩杰, 江洪, 陈云飞. 太湖源雷竹林水汽通量变化及其对净辐射的响应[J]. 浙江农林大学学报, 2013, **30**(3): 313 – 318.
- LIN Enjie, JIANG Hong, CHEN Yunfei. Water vapor flux variation and net radiation for a *Phyllostachys violascens* stand in Taihuyuan [J]. *J Zhejiang A & F Univ*, 2013, **30**(3): 313 – 318.
- [27] 吉喜斌, 康尔泗, 赵文智, 等. 黑河流域山前绿洲灌溉农田蒸散发模拟研究[J]. 冰川冻土, 2004, **26**(6): 713 – 719.
- JI Xibin, KANG Ersi, ZHAO Wenzhi, *et al.* Simulation of the evapotranspiration from irrigational farmlands in the oases of the Heihe River Basin [J]. *J Glaciol Geocryol*, 2004, **26**(6): 713 – 719.
- [28] 颜廷武, 邢兆凯, 尤文忠, 等. 辽宁冰砬山长白落叶松林能量平衡和蒸散的研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2009, **40**(4): 449 – 452.
- YAN Tingwu, XING Zhaobin, YOU Wenzhong, *et al.* Energy balance and evapotranspiration in *Larix olgensis* forest in Bingla Mountain of Liaoning Province [J]. *J Shenyang Agric Univ*, 2009, **40**(4): 449 – 452.

绿竹生态系统植硅体碳积累与分布特征

杨杰¹, 项婷婷¹, 姜培坤^{1,2}, 吴家森^{1,2}, 柯和佳³

(1. 浙江农林大学 环境与资源学院, 浙江 临安 311300; 2. 浙江农林大学 浙江省森林生态系统碳循环与固碳减排重点实验室, 浙江 临安 311300; 3. 浙江省苍南县林业局, 浙江 苍南 325800)

摘要: 植硅体封存的有机碳(phytolith-occluded organic carbon, PhytOC)已被证明在生物地球化学碳硅循环中具有重要的作用。为了解绿竹 *Dendrocalamopsis oldhami* 生态系统中植硅体碳的分布与积累特征, 于 2014 年 12 月在中心产区浙江省苍南县利用标准地调查方法, 采集了不同年龄(1~3 年生)、不同器官(叶、枝、秆)、凋落物和土壤样品, 分析了硅、植硅体、植硅体碳质量分数。结果表明: 绿竹地上部分硅、植硅体、植硅体碳质量分数大小表现均表现为凋落物>叶>枝>秆, 其中植硅体碳的质量分数分别为 4.28, 3.16, 0.28, 0.04 g·kg⁻¹, 植硅体碳总积累量为 22.64 kg·hm⁻², 大小顺序为叶(13.22 kg·hm⁻²)>凋落物(5.74 kg·hm⁻²)>枝(2.71 kg·hm⁻²)>秆(0.96 kg·hm⁻²); 林地土壤硅、植硅体、植硅体碳质量分数均随着土层厚度的增加而呈降低的趋势, 0~100 cm 土壤中植硅体碳储量为 1 302.60 kg·hm⁻²。绿竹植株体内植硅体质量分数与硅、植硅体碳质量分数之间的相关性达极显著($P<0.01$)或显著($P<0.05$)水平, 土壤植硅体碳质量分数与总有机碳质量分数之间也具有极显著($P<0.01$)相关性。图 4 表 3 参 33

关键词: 森林生态学; 绿竹; 植硅体; 植硅体碳; 分布特征

中图分类号: S718.5 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2016)02-0225-07

Phytolith-occluded organic carbon accumulation and distribution in a *Dendrocalamopsis oldhami* bamboo stand ecosystem

YANG Jie¹, XIANG Tingting¹, JIANG Peikun^{1,2}, WU Jiasen^{1,2}, KE Hejia³

(1. School of Environmental and Resource Sciences, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 2. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Carbon Cycling in Forest Ecosystems and Carbon Sequestration, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 3. Forest Enterprise of Cangnan County, Cangnan 325800, Zhejiang, China)

Abstract: Phytolith-occluded organic carbon (PhytOC) has been shown to have an important role in carbon-silicon biogeochemical cycling. To understand the characteristics of PhytOC accumulation, different organs (leaf, branch, and culm), litter, and soil samples were collected in different age stands of 1–3 year old *Dendrocalamopsis oldhami* bamboo ecosystems from Cangnan County, Zhejiang Province in December 2014. Then, silicon, phytoliths, and PhytOC were analyzed with a correlation analysis. Results of silicon, phytoliths, and PhytOC mass fraction showed that PhytOC content (in g·kg⁻¹) of aboveground litter was (4.28)>leaf (3.16)>branch (0.28)>stalk (0.04). The total accumulation of PhytOC was 22.64 kg·hm⁻² with an order (in kg·hm⁻²) of leaf (13.22)>litter (5.74)>branch (2.71)>stalk (0.96). Also, reserve stocks of PhytOC were 1 302.60 kg·hm⁻² in the 0–100 cm soil depth. A highly significant correlation ($P<0.01$, $R^2=0.96$) was found between silicon and phytolith concentration; a significant correlation ($P<0.05$, $R^2=0.62$) was revealed for phytolith and PhytOC concentration in plants; and a highly significant correlation ($P<0.01$, $R^2=0.80$) was shown with PhytOC content in soil.

收稿日期: 2015-04-09; 修回日期: 2015-05-26

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(LY13C160010); 国家自然科学基金资助项目(41471197); 浙江农林大学科研发展基金资助项目(2014FR052)

作者简介: 杨杰, 从事森林土壤质量与环境学研究。E-mail: jiey179@163.com。通信作者: 吴家森, 教授级高级工程师, 博士, 从事土壤质量及植物营养研究。E-mail: jswu@zafu.edu.cn。姜培坤, 教授, 博士生导师, 从事土壤与环境学等研究。E-mail: jiangpeikun@zafu.edu.cn

tOC and total organic carbon in soils. This results shows that the content of PhytOC depend on silicon and phytolith in plants, and related to total organic carbon in soils. [Ch, 4 fig. 3 tab. 33 ref.]

Key words: forest ecology; *Dendrocalamopsis oldhami*; phytolith; PhytOC; distribution

森林是陆地生态系统的主体, 全球通过森林固定的二氧化碳达 $700 \times 10^9 \text{ t} \cdot \text{a}^{-1}$ ^[1], 同时有高达 $2.4 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$ 的碳经凋落物分解后以有机质的形式进入土壤^[2], 土壤有机碳总量相当于植物碳库的3倍^[3-4]。由于土地利用方式的不确定性以及碳存储机制的复杂性和不断变化的环境条件, 绝大部分进入土壤的有机碳都不能够长期稳定存在^[5]。3 a后, 当初以有机质的形式进入土壤的碳将有80%以上再次回到大气中^[6]。植硅体碳是一种在植硅体形成过程中被无定型二氧化硅包裹着的稳定型有机碳, 随着植物体的凋落、腐烂而进入土壤中^[7], 由于受到外层具有高度抗风化能力的硅的保护, 能长期(数千年至万年)封存于土壤中, 被称为陆地土壤长期固碳的重要机制之一^[8]。已有研究表明: 竹林植硅体碳平均封存量远远高于黍 *Panicum miliaceum*, 草原, 湿地植物, 水稻 *Oryza sativa* 及小麦 *Triticum aestivum*^[9-13]。绿竹 *Dendrocalamopsis oldhami* 属竹亚科 *Bambusoideae* 丛生竹种, 主要分布于浙江、福建、台湾, 面积达 $2.0 \times 10^4 \text{ hm}^2$, 是优良的笋材两用竹种^[14-15]。前人对竹林植硅体碳的研究主要集中于通过叶片估测竹林的植硅体碳汇能力^[16-17], 很少涉及枝、秆、凋落物、土壤等整个生态系统。本研究以绿竹群落为对象, 对其地上部分叶、枝、秆、凋落物及土壤植硅体碳的测定, 以揭示了绿竹林植硅体碳的分布与积累规律, 为竹林植硅体碳汇研究与管理提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验地概况

实验地位于浙江省温州市苍南县, 是绿竹的中心产区, 中心地理位置 $27^{\circ} 30' \text{N}$, $120^{\circ} 23' \text{E}$, 属中亚热带海洋性季风气候区, 年平均气温为 18.0°C , 年均降水量 1670.1 mm , 无霜期 208.0 d 。海拔为 $150 \sim 200 \text{ m}$, 土壤为发育于凝灰岩的红壤土类, 土壤基本理化性质如表1所示。经营的主要措施是4-5月施肥 [$m(\text{氮肥}) : m(\text{磷肥}) : m(\text{钾肥}) = 15 : 15 : 15, 0.75 \text{ t} \cdot \text{hm}^{-2}$], 秋季砍去4年生老竹, 林分密度 $1.3 \text{ 万株} \cdot \text{hm}^{-2}$, 平均胸径 5.0 cm , 平均株高 7.7 m 。

表1 试验地土壤基本理化性质

Table 1 Basic physicochemical properties of soil in the experiment

土层/cm	土壤密度/(g·cm ⁻³)	pH值(H ₂ O)	有机碳/(g·kg ⁻¹)	碱解氮/(mg·kg ⁻¹)	有效磷/(mg·kg ⁻¹)	速效钾/(mg·kg ⁻¹)
0~10	1.23	5.1	20.23	266.6	11.2	40.2
10~30	1.27	5.3	10.94	128.9	1.9	25.9
30~60	1.27	5.5	8.81	87.8	0.6	20.4
60~100	1.31	6.0	7.56	115.2	0.5	17.7

1.2 试验设计与样品采集

2014年12月, 根据当地森林经营档案并在全面踏查的基础上, 分别在后垟村、池头村、望鹤村和南山边村选择林分类型、组成、结构、生长状况和立地条件等具有代表性的绿竹林分4块, 各建立面积为 $20 \text{ m} \times 20 \text{ m}$ 的标准地, 调查并采集样品。

对每块标准地内的竹子按不同年龄进行每株检尺, 计算出不同年龄竹子的平均胸径, 选取与平均胸径一致的竹子作为标准株, 砍伐不同年龄标准株各1株, 并测量其株高。将不同标准株分叶、枝、秆, 野外称出各器官鲜质量。枝、秆分上、中、下3个部位取样组成混合样品, 并各取 $500 \sim 1000 \text{ g}$ (准确称量)于样品袋中, 带回实验室分析^[18]。竹林地上部分生物量按林分中标准株生物量和各林分株数计算^[19]。

在每个标准样地四角及中心处位置分别选择 $1 \text{ m} \times 1 \text{ m}$ 的样方5个, 采集凋落物, 混合后称量, 取样 $500 \sim 1000 \text{ g}$ (准确称量)于样品袋中。

在标准地中选择有代表性地块3个, 挖取土壤剖面, 分别取0~10, 10~30, 30~60和60~100 cm土层土壤样品, 分别混合3个剖面中不同土层样品作为该标准地不同土层的混合样 1000 g 于样品袋中,

同时采集不同土层容重样。

1.3 分析方法

1.3.1 植物样品的分析 将野外采集的植物样品用去离子水洗净后, 在105 °C下杀青20 min, 再在70~80 °C下烘至恒量。将所有烘干后样品, 用高速粉碎机磨细后, 装袋保存备用。植硅体的提取采用微波消解法^[20], 之后用0.800 0 mol·L⁻¹的重铬酸钾溶液对植硅体进行检验, 确保表面有机物质完全被去除, 提取后的植硅体于65 °C的烘箱中烘干48 h, 称量。植硅体碳的测定采用碱溶分光光度法^[21], 在样品测定的同时加入土壤标准样(GBW07405)及植物标准样(GBW07602)对测定的准确性进行检验, 每个样品重复3次。

1.3.2 土壤样品的分析 土壤总硅的测定采用偏硼酸锂熔融-比色法^[22], 土壤植硅体的提取先采用微波消解法, 再用比重为2.35, 1.60 g·cm⁻³的溴化锌重液除去残余的土壤及杂质^[23]。土壤植硅体碳测定的方法与植物相同。土壤总有机碳采用重铬酸钾-硫酸外加热法; pH值用酸度计法[m(水):m(土)=2.5:1.0]^[24]。

1.4 数据分析

数据处理使用SPSS 18.0系统进行统计分析, 用Duncan新复极差法比较不同数据组间的差异, 显著性水平设定为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 绿竹地上部硅、植硅体、植硅体中有机碳和植硅体碳含量

从表2可知: 绿竹各部分中的硅质量分数大小为凋落物(76.92 g·kg⁻¹)>叶(62.23 g·kg⁻¹)>枝(26.07 g·kg⁻¹)>秆(5.57 g·kg⁻¹), 植硅体的质量分数的大小顺序也是凋落物(188.34 g·kg⁻¹)>叶(156.21 g·kg⁻¹)>枝(61.80 g·kg⁻¹)>秆(5.22 g·kg⁻¹), 它们之间的差异均达到显著。硅和植硅体的质量分数在不同年龄叶、枝中的差异不大, 而秆中则以1年生为最低, 而2年生达最高。

植硅体中有机碳质量分数大小总体变化趋势为: 秆(11.08%)>枝(2.88%)>凋落物(2.00%)>叶(1.96%), 其中秆显著高于其他3个部分。植硅体碳质量分数大小表现为凋落物(4.28 g·kg⁻¹)>叶(3.16 g·kg⁻¹)>枝(0.28 g·kg⁻¹)>秆(0.04 g·kg⁻¹), 其中凋落物、叶片中植硅体碳质量分数与枝、秆之间的差异达显著($P<0.05$)水平(表2)。

绿竹林地上部植硅体碳总储量为22.64 kg·hm⁻², 大小顺序为叶(13.22 kg·hm⁻²)>凋落物(5.74 kg·hm⁻²)>枝(2.71 kg·hm⁻²)>秆(0.96 kg·hm⁻²), 植硅体碳主要储存于叶片中(表2)。

表2 不同竹龄绿竹生物量、硅、植硅体、植硅体碳质量分数及植硅体碳储量

Table 2 Biomass, concentrations of silicon, phytolith, PhytOC, and PhytOC stock in different aged *Dendrocalamopsis oldhami* stands

器官	竹龄/a	生物量/(t·hm ⁻²)	总有机碳/(g·g ⁻¹)	硅/(g·kg ⁻¹)	植硅体/(g·kg ⁻¹)	植硅体中有机碳/%	植硅体碳/(g·kg ⁻¹)	植硅体封存有机碳储量/(kg·hm ⁻²)
叶	2	2.29 ± 1.92	0.43 ± 0.02	61.75 ± 6.57	159.11 ± 32.75	2.45 ± 1.41	4.09 ± 2.70	9.37 ± 6.13
	3	1.73 ± 0.79	0.43 ± 0.01	62.71 ± 8.42	153.31 ± 14.44	1.48 ± 0.36	2.23 ± 0.38	3.86 ± 0.55
	平均	3.16 bc*	0.43	62.23 b	156.21 b	1.96 b	3.16 a	
枝	2	5.10 ± 4.20	0.46 ± 0.02	22.87 ± 2.61	56.28 ± 13.83	3.97 ± 1.94	0.23 ± 0.14	1.17 ± 0.65
	3	4.67 ± 0.67	0.47 ± 0.01	29.26 ± 7.49	67.31 ± 19.21	1.79 ± 0.91	0.33 ± 0.30	1.54 ± 1.48
	平均	4.89 b	0.46	26.07 c	61.80 c	2.88 b	0.28 bc	
秆	1	8.97 ± 6.65	0.47 ± 0.01	2.80 ± 0.79	2.41 ± 0.95	11.57 ± 8.26	0.02 ± 0.02	0.18 ± 0.14
	2	11.85 ± 6.09	0.48 ± 0.01	7.09 ± 2.31	8.84 ± 7.67	10.19 ± 7.22	0.05 ± 0.04	0.59 ± 0.14
	3	9.56 ± 4.78	0.48 ± 0.02	6.81 ± 0.42	4.41 ± 1.21	11.49 ± 9.17	0.02 ± 0.02	0.19 ± 0.01
凋落物	平均	10.13 a	0.48	5.57 d	5.22 d	11.08 a	0.04 c	
	合计	1.34 ± 0.66 c	0.41 ± 0.05	76.92 ± 11.33 a	188.34 ± 29.47 a	2.00 ± 0.45 b	4.28 ± 1.05 a	5.73 ± 0.91
								22.64

说明: 每个数据表示4个重复的平均值±标准差; *不同小写字母表示不同器官之间的差异达到显著水平($P<0.05$)。

2.2 土壤中硅、植硅体、植硅体中有机碳和植硅体碳质量分数

随着土层深度的增加, 绿竹林地土壤硅质量分数逐渐减少(427.32~446.35 g·kg⁻¹), 但它们之间的

差异并不显著；土壤中植硅体质量分数也随之降低，其中0~10 cm土层中植硅体质量分数最高，显著高于其他土层，其他土层之间没有显著性($P>0.05$)差异(表3)。

随着土层深度的增加，植硅体中有机碳质量分数随之增加，其中0~10 cm土层植硅体中有机碳质量分数显著($P<0.05$)低于30~100 cm土层；而植硅体碳质量分数则呈现降低的趋势，0~10 cm土层中植硅体碳质量分数最高($0.18 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)，显著($P<0.05$)高于30~100 cm土层(表3)。

植硅体碳占总有机碳的比例为0.89%~1.19%，在不同土层间不具有显著性差异($P>0.05$)；绿竹林0~100 cm土壤中植硅体碳储量为 $1302.60 \text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ ，在土壤剖面中的分布比较均匀(表3)。

表3 绿竹林不同土层中植硅体、植硅体碳质量分数及植硅体碳储量

Table 3 Distribution of phytolith and PhytOC in different soil depths of *Dendrocalamopsis oldhami* forest

土层深度/cm	硅/(g·kg ⁻¹)	植硅体/(g·kg ⁻¹)	植硅体中有机碳/(g·kg ⁻¹)	植硅体碳/(g·kg ⁻¹)	植硅体碳/有机碳/%	植硅体封存有机碳储量/(kg·hm ⁻²)
0~10	440.42 ± 7.02 a	42.97 ± 19.46 a	4.89 ± 1.84 b	0.18 ± 0.05 a	0.89 ± 0.21 a	221.40 ± 61.50
10~30	446.35 ± 15.13 a	16.52 ± 9.20 b	8.53 ± 2.97 ab	0.12 ± 0.03 ab	1.10 ± 0.51 a	304.80 ± 76.20
30~60	428.25 ± 14.25 a	10.56 ± 8.10 b	9.86 ± 3.48 a	0.08 ± 0.03 b	1.01 ± 0.10 a	304.80 ± 114.30
60~100	427.32 ± 23.42 a	10.65 ± 8.02 b	10.17 ± 2.65 a	0.09 ± 0.05 b	1.19 ± 0.81 a	471.60 ± 262.00
合计	—	—	—	—	—	1302.60

说明：每个数据为4个重复的平均值±标准差；不同小写字母表示土层之间的差异达到显著水平($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 绿竹不同器官及凋落物中硅及植硅体的分布

植硅体是在植物细胞内形成的一种无定型硅包碳颗粒，主要形成于富集能力较强的禾本科Gramineae植物体内^[25~27]，由于植硅体的形成受到蒸腾作用的影响^[28]，所以在植物的不同器官内植硅体的含量会有明显的差异。芦苇 *Phragmites communis* 不同器官中植硅体的分布趋势为叶>鞘>根>茎，并且植硅体的分布趋势与植物体中硅的分布具有高度的一致性^[12]。本研究对绿竹叶、枝、秆及地面现存凋落物中硅及植硅体的质量分数进行分析，发现绿竹不同器官中硅及植硅体的分布同样具有高度的一致性，两者之间的相关性达极显著水平($R^2 = 0.96$, $P<0.01$, 图1)。绿竹不同器官硅及植硅体的质量分数均呈现出叶>枝>秆，且具有显著的差异性($P<0.05$ ，表2)。由于绿竹主要生长于中国南方水热条件较好的区域，且植株高大，蒸腾作用强烈，而蒸腾作用主要发生在叶片表面^[29]，进而增加了绿竹叶片中硅及植硅体的积累。

绿竹经营过程中，每年砍伐老竹留新竹，地面现存凋落物为每年叶片凋落积累的所形成，凋落物中硅及植硅体的质量分数远高于新鲜叶片中的质量分数，两者之间存在显著差异性($P<0.05$ ，表2)。这有可能是由于叶片凋落在地面以后受到腐蚀及分解作用^[12]，大部分的有机物质会在短时间内被土壤中的小型动物及微生物的消耗。在这一过程中，植硅体由于具有很强的抗腐蚀能力而保存了下来^[9]，导致凋落物中植硅体的含量不断升高。

3.2 绿竹生态系统植硅体碳的产生与影响因素

植物在吸收硅产生植硅体的过程中，有一小部分有机物质被封存于植硅体内。由于植硅体较强的抗分解能力^[30]，在植物体死亡、腐烂、降解之后，这部分有机物质最终可以很稳定地保存于土壤和沉积物中^[9]。因此，植物产生的植硅体及其封存有机碳在全球碳硅生物地球化学循环中具有重要的作用^[12]。绿竹叶片中较高的植硅体质量分数，直接导致植硅体碳质量分数远高于枝和秆，并且具有显著的差异性($P<0.05$ ，表2)。植物体中植硅体碳的质量分数不仅与植硅体之间存在关系，也受到植硅体中有机碳质量分数的影响^[27]。进一步对植硅体碳和植硅体及植硅体中有机碳的质量分数之间进行相关分析发现，植硅体碳质量分数与植硅体质量分数之间具有显著相关关系($R^2 = 0.62$, $P<0.05$, 图2)，而与植硅体中有机碳含量之间无显著相关关系($R^2 = 0.2$, $P>0.05$, 图3)，说明植物体内植硅体碳含量的高低主要受植硅体含量高低的控制。

由于植硅体碳主要存在于植物的叶片中^[31]，很多研究在涉及到植物生态系统植硅体碳储量估算时均

对枝、秆做忽略处理^[32-33]。本研究结果表明: 枝、秆中植硅体碳储量是叶片储量的27.80%, 虽然枝、秆中的植硅体质量分数较低, 但却有巨大的生物量。因此今后对植硅体碳汇估算时, 需增加对植物枝、秆中的植硅体碳的监测。

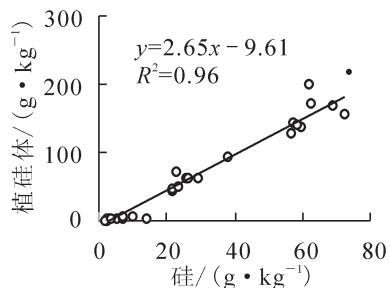


图1 绿竹器官中硅与植硅体质量分数之间的相关关系

Figure 1 Correlation between Si and phytolith contents in *Dendrocalamopsis oldhami* organs

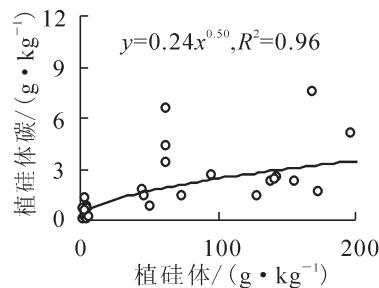


图2 绿竹器官中植硅体与植硅体碳质量分数的相关关系

Figure 2 Correlation between Si and phytolith contents in *Dendrocalamopsis oldhami* organs

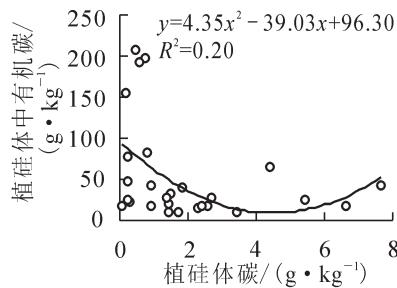


图3 绿竹器官中植硅体碳与植硅体中有机碳质量分数的相关关系

Figure 3 Correlation between PhytOC content and carbon content in phytolith in *Dendrocalamopsis oldhami* organs

3.3 绿竹生态系统土壤中植硅体碳的积累及影响因素

已有研究表明: 地球表面植被植硅体碳库是植物碳库重要的一部分^[2], 包括竹林、草原、湿地植物等五大植硅体碳库。无论植硅体碳形成于哪种地表植被中, 随着植物体的死亡、降解等过程最终都将回归于土壤中^[26]。

土壤中大部分的植硅体均由植物凋落物降解沉淀而来, 未完全降解的有机物质包裹着植硅体最初沉积在土壤表面(0~10 cm)。与前人研究结果相同^[12], 绿竹林地表层土壤植硅体及植硅体碳的质量分数远高于其他土层, 差异达显著水平($P<0.05$, 表3)。土壤中植硅体分布变化与自然界中碳硅自然归还有关, 因为土壤中的植硅体均来自于植物体, 在植硅体进入土壤的同时必定会伴随着一部分有机物质一同进入土壤^[12], 这就使得土壤总有机碳的质量分数与植硅体碳质量分数之间具有很好的相关性($R^2=0.80$, $P<0.01$, 图4)。同时随着土壤剖面深度的增加, 土壤总有机碳质量分数出现了明显的减少, 但植硅体碳占总有机碳的比例明显增加, 说明在土壤总有机碳降解的过程中, 由于受到植硅体碳的保护, 植硅体碳仍能够保持稳定地积累于土壤中^[27]。

由于绿竹林为笋材两用竹竹林, 植硅体碳的归还仅通过叶片凋落物及根鞭的形式进行, 而叶片中植硅体碳储量仅为 $13.22 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$, 假如每年绿竹生长的叶片全部凋落降解、归还于土壤中, 那么在不受外界环境因素影响、不发生植硅体迁移的情况下, 土壤中植硅体碳的积累通量也是很小的。

4 结论

绿竹地上部分硅、植硅体、植硅体碳质量分数大小表现均表现为凋落物>叶>枝>秆, 其中植硅体碳的质量分数分别为 4.28 , 3.16 , 0.28 , $0.04 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 植硅体碳总积累量为 $22.64 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$, 大小顺序叶($13.22 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$)>凋落物($5.74 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$)>枝($2.71 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$)>秆($0.96 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$); 植硅体中有机碳质量分数大小总体变化趋势为: 秆(11.08%)>枝(2.88%)>凋落物(2.00%)>叶(1.96%)。

林地土壤硅、植硅体、植硅体碳质量分数均随着土层厚度的增加而呈降低的趋势, 0~100 cm土壤中植硅体碳储量为 $1302.60 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$; 而植硅体中有机碳质量则随着土层厚度的加深而增加, 0~10 cm

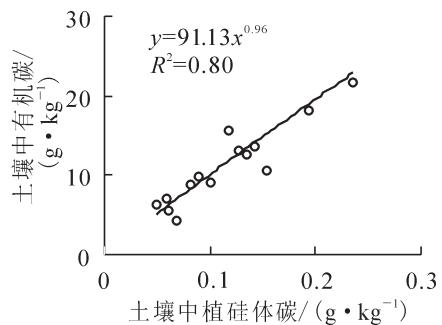


图4 绿竹林下土壤中植硅体碳与土壤总有机碳质量分数的相关关系

Figure 4 Correlation between PhytOC and TOC contents in soils of *Dendrocalamopsis oldhami* forest

土层植硅体中有机碳质量最低。

绿竹植株体内植硅体质量分数与硅、植硅体碳质量分数之间的相关性达极显著或显著水平($P<0.01$ 或 $P<0.05$)，植硅体碳质量分数与植硅体中有机碳质量分数之间的相关性不显著($P>0.05$)；土壤植硅体碳质量分数与总有机碳质量分数之间也具有极显著相关性($P<0.01$)。

5 参考文献

- [1] LAL R. Soil management and restoration for C sequestration to mitigate the accelerated greenhouse effect [J]. *Prog Environ Sci*, 1999, **1**(4): 307 – 326.
- [2] 孟赐福, 姜培坤, 徐秋芳, 等. 植物生态系统中的植硅体闭蓄有机碳及其在全球土壤碳汇中的重要作用[J]. 浙江农林大学学报, 2013, **30**(6): 921 – 929.
MENG Cifu, JIANG Peikun, XU Qiufang, et al. PhytOC in plant ecological system and its important roles in the global soil carbon sink [J]. *J Zhejiang A & F Univ*, 2013, **30**(6): 921 – 929.
- [3] LAL R. Soil carbon sequestration to mitigate climate change [J]. *Geoderma*, 2004, **123**(1): 1 – 22.
- [4] CHAN K Y, HEENAN D P, OATES A. Soil carbon fractions and relationship to soil quality under different tillage and stubble management [J]. *Soil Till Res*, 2002, **63**(3/4): 133 – 139.
- [5] LAL R. Soil erosion and the global carbon budget [J]. *Environ Int*, 2003, **29**(4): 437 – 450.
- [6] WATSON R T. *Land Use, Land-use Change, and Forestry: A Special Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.
- [7] PARR J F, SULLIVAN L A. Soil carbon sequestration in phytoliths [J]. *Soil Biol Biochem*, 2005, **37**(1): 117 – 124.
- [8] FISHKIS O, INGWERSSEN J, STRECK T. Phytolith transport in sandy sediment experiments and modeling [J]. *Geoderma*, 2009, **151**(3): 168 – 178.
- [9] PARR J, SULLIVAN L, CHEN Bihua, et al. Carbon bio-sequestration within the phytoliths of economic bamboo species [J]. *Global Change Biol*, 2010, **16**(10): 2661 – 2667.
- [10] PARR J F, SULLIVAN L A phytolith occluded carbon and silica variability in wheat cultivars [J]. *Plant Soil*, 2011, **342**(1/2): 165 – 171.
- [11] SONG Zhaoliang, LIU Hongyan, SI Yong, et al. The production of phytoliths in China's grasslands: implications to the biogeochemical sequestration of atmospheric CO₂ [J]. *Global Change Biol*, 2012, **18**(12): 3647 – 3653.
- [12] LI Zimin, SONG Zhaoliang, LI Beilei. The production and accumulation of phytolith-occluded carbon in Baiyangdian reed wetland of China [J]. *Appl Geochem*, 2013, **37**(10): 117 – 124.
- [13] LI Zimin, SONG Zhaoliang, PARR J F, et al. Occluded C in rice phytoliths implications to biogeochemical carbon sequestration [J]. *Plant Soil*, 2013, **370**(1/2): 615 – 623.
- [14] 张自斌, 周光益, 林亲众. 我国丛生竹研究进展与问题探讨[J]. 热带林业, 2007, **35**(2): 12 – 14.
ZHANG Zibin, ZHOU Guangyi, LIN Qinzhong. Research progress and some problems on cluster bamboo in China[J]. *Trop For*, 2007, **35**(2): 12 – 14.
- [15] 吴擢溪. 绿竹笋期叶片生理生化特性研究[J]. 林业科学, 2003, **39**(专刊1): 174 – 178.
WU Zhuoxi. Studies on the physiological and biochemical characteristics of leaves of *Dendrocalamopsis oldhami* during shoot growing [J]. *Sci Silv Sin*, 2003, **39**(supp 1): 174 – 178.
- [16] SONG Zhaoliang, LIU Hongyan, LI Beilei, et al. The production of phytolith-occluded carbon in China's forests implications to biogeochemical carbon sequestration [J]. *Global Change Biol*, 2013, **19**(9): 2907 – 2915.
- [17] LI Beilei, SONG Zhaoliang, LI Zimin, et al. Phylogenetic variation of phytolith carbon sequestration in bamboos [J]. *Sci Rep*, 2014, **4**(4): 4710. doi:10.1038/srep04710.
- [18] 王刚, 周本智, 李晓靖, 等. 吊丝单竹林生态系统碳储量及其垂直空间分配特征[J]. 热带亚热带植物学报, 2012, **20**(1): 72 – 77.
WANG Gang, ZHOU Benzhi, LI Xiaojing, et al. Carbon storage and vertical spatial distribution of *Dendrocalamopsis vario-striata* ecosystem [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2012, **20**(1): 72 – 77.
- [19] 张学元. 青海黄土丘陵区退耕还林地沙棘林生物量研究[J]. 林业调查规划, 2011, **36**(4): 25 – 27.
ZHANG Xueyuan. Biomass of *Hippophae rhamnoides* forest on converted land in Loess Hilly Plateau of Qinghai Province [J]. *For Invent Plann*, 2011, **36**(4): 25 – 27.

- [20] PARR J F, DOLIC V, LANCASTER G, *et al.* A microwave digestion method for the extraction of phytoliths from herbarium specimens [J]. *Rev Palaeobot Palynol*, 2001, **116**(3/4): 203 – 212.
- [21] 杨杰, 李永夫, 黄张婷, 等. 碱溶分光光度法测定植硅体碳含量[J]. 分析化学, 2014, **42**(9): 1389 – 1390.
YANG Jie, LI Yongfu, HUANG Zhangting, *et al.* Determination of phytolith-occluded carbon (PhytOC) content using alkali dissolution-spectrophotometry [J]. *Chin J Anal Chem*, 2014, **42**(9): 1389 – 1390.
- [22] PAN Genxing, LI Lianqing, ZHANG Xuhui, *et al.* Soil organic carbon storage of China and the sequestration dynamics in agricultural lands [J]. *Adv Earth Sci*, 2003, **18**(4): 609 – 618.
- [23] PARR J F. A comparison of heavy liquid floatation and microwave digestion techniques for the extraction of fossil phytoliths from sediments [J]. *Rev Palaeobot Palynol*, 2002, **120**(3/4): 315 – 336.
- [24] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000: 146 – 226.
- [25] LI Zimin, SONG Zhaoliang, JIANG Peikun. Biogeochemical sequestration of carbon within phytoliths of wetland plants: A case study of Xixi wetland, China [J]. *Chin Sci Bull*, 2013, **58**(20): 2480 – 2487.
- [26] HUANG Zhangting, LI Yongfu, JIANG Peikun, *et al.* Long-term intensive management increased carbon occluded in phytolith (PhytOC) in bamboo forest soils [J]. *Sci Rep*, 2014, **4**: 3602. doi:10.1038/srep03602.
- [27] ZUO Xinxin, LU Houyuan, GU Zhaoyan. Distribution of soil phytolith-occluded carbon in the Chinese Loess Plateau and its implications for silica-carbon cycles [J]. *Plant Soil*, 2014, **374**(1/2): 223 – 232.
- [28] 徐德克, 李泉, 吕厚远. 棕榈科植硅体形态分析及其环境意义[J]. 第四纪研究, 2005, **25**(6): 777 – 783.
XU Deke, LI Quan, LÜ Houyuan. Morphological analysis of phytoliths in palmae and its environmental significance [J]. *Quate Sci*, 2005, **25**(6): 777 – 783.
- [29] 李仁成. 竹叶及其植硅体类脂物的分类学意义及其季节性变化[D]. 武汉: 中国地质大学, 2010.
LI Rencheng. *Taxonomic Significance and Seasonal Variations of Lipid from Bamboo Leaf and Its Phytolith* [D]. Wuhan: China University of Geosciences, 2010.
- [30] FISHKIS O, INGWERSEN J, LAMERS M, *et al.* Phytolith transport in soil: a field study using fluorescent labelling [J]. *Geoderma*, 2010, **157**(1): 27 – 36.
- [31] LI Beilei, SONG Zhaoliang, WANG Hailong, *et al.* Lithological control on phytolith carbon sequestration in moso bamboo forests [J]. *Sci Rep*, 2014, **4**: 5262. doi: 10.1038/srep05262.
- [32] SONG Zhaoliang, WANG Hailong, STRONG P J, *et al.* Phytolith carbon sequestration in China's croplands [J]. *Eur J Agron*, 2014, **53**: 10 – 15.
- [33] SONG Zhaoliang, PARR J F, GUO Fengshan. Potential of global cropland phytolith carbon sink from optimization of cropping system and fertilization [J]. *PLoS One*, 2013, **8**(9): e747. doi: 10.1371/journal. pone. 0073747.

气候变化对元上都遗址区景观格局的影响

武录义¹, 岳永杰², 刘果厚¹, 高润宏², 苏志成³

(1. 内蒙古农业大学 生态环境学院, 内蒙古 呼和浩特 010019; 2. 内蒙古农业大学 林学院, 内蒙古 呼和浩特 010020; 3. 乌兰察布林业局国有林场和森林公园管理站, 内蒙古 乌兰察布 012000)

摘要: 为了研究气候变化对内蒙古元上都遗址区景观格局的影响, 运用小波分析、遥感技术等方法, 分析了1981–2010年元上都遗址区气候变化规律和1990年、2000年、2010年3个不同时期的景观格局动态。结果表明: 元上都遗址区近30 a年均气温呈上升趋势, 年际变率为 $0.065^{\circ}\text{C}\cdot\text{a}^{-1}$, 在30 a低频区和10 a中频区呈明显冷暖交替期。年降水量呈下降趋势, 但变化趋势不显著, 在25 a的低频区呈明显干旱期, 而10 a的中频区呈干湿交替, 受气候暖干化的影响仍将持续; 元上都遗址区草地景观优势度在降低, 景观结构变化较大。其中草地、水域、湿地与沼泽面积在减小, 而耕地、林地、居民点和沙地面积在增加, 沙地面积增幅显著, 20 a间年均增加 9.55 km^2 ; 近30 a来, 气候变化不是主导元上都遗址区景观格局变化的主要因素, 气候变化与沙地、草地面积相关性最大。而2000年后的区域开发和相关生态工程是导致遗址区景观稳定性降低的主要因素。图4表3参19

关键词: 景观生态学; 元上都遗址; 气候变化; 小波分析; 景观格局

中图分类号: P461; S718.5 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2016)02-0232-07

Climate changes affecting regional landscape patterns at Xanadu

WU Luyi¹, YUE Yongjie², LIU Guohou¹, GAO Runhong², SU Zhicheng³

(1. College of Ecology and Environmental Science, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010019, Inner Mongolia, China; 2. College of Forest Ecology Research, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010020, Inner Mongolia, China; 3. State Forest Farm and Forest Park Station of Forest Enterprise, Ulanqab 012000, Inner Mongolia, China)

Abstract: To study the effects of climate change on landscape patterns at sites in Xanadu, wavelet transformation and remote sensing were used to analyze the climate change rules from 1981–2010 for landscape pattern dynamics in three different periods: 1990, 2000, and 2010. Results showed that the annual temperature had a rising tendency over the nearly 30 years with an interannual variation of $0.065\cdot\text{a}^{-1}$ years. Zone temperature changes alternated between a low frequency of 30 years and high frequency of 10 years. Annual precipitation declined slightly with interannual variation of $0.07\text{mm}\cdot\text{a}^{-1}$. The low frequency of 25 years experienced drought; whereas, the low frequency of 10 years alternated between wet and dry. Dominance of the grass landscape declined on this site. Structural landscape changes included a decrease in grasslands, water areas, wetlands, and swamps; while farmland, woodland, residential places, and sandy areas increased. For instance, sandy areas increased 9.55 km^2 in nearly 20 years. Over this 30 year period, climate change was not the dominant factor that changed the landscape pattern; climate change associated with sandy and grassland areas were greatest. As regional development and relevant eco-engineering being the main factors contributing to reduce stability of these landscape sites. [Ch, 4 fig. 3 tab. 19 ref.]

Key words: landscape ecology; Xanadu; climate change; wavelet analysis; landscape pattern

收稿日期: 2015-04-27; 修回日期: 2015-06-20

基金项目: 国家环保公益性行业资助项目(201309040)

作者简介: 武录义, 从事森林生态学、风险评价等研究。E-mail: 565294510@qq.com。通信作者: 岳永杰, 副教授, 从事森林生态教学、水土保持研究。E-mail: wolongyue@126.com

全球气候不断变暖这一不争的事实且这种变化趋势将会持续。预计21世纪末,气温将上升1.1~6.4℃,降雨模式也发生改变^[1~3]。对全球生态系统的影响也在不断加剧。草地生态系统作为陆地生态系统的重要组成部分之一,在全球气候变化中的变化、响应与显著空间异质性正受到广泛关注^[4~6]。在气候变化影响下,中国大面积草地资源系统发生改变,引起草地生态系统功能下降^[7]。这种影响已威胁到区域生态安全和社会经济发展。而草原文化遗址区依托草地生态系统在全球气候变化中的响应与关系,国内外学者的关注相对较少^[8~11]。大多学者研究气候变化基于草地生态系统的草地生物量和载畜量的动态变化,或侧重于气候变化与区域的合理开发,对气候变化影响区域景观的研究更是鲜有报道^[11~13]。目前,由于草原文化遗址的开放性和界线模糊性,致使其正遭受着严重的威胁。特别是近年来,这些遗址和遗迹不断受到自然因素与人类活动的冲击。在全球气候变化导致的干旱区草地面积退化、生态功能降低的形势下,作为内蒙古蒙元文化繁荣的主要遗址^[14~16]的元上都遗址区的气候变化研究具有现实意义。为此,该研究以内蒙古元上都遗址为研究区域,研究了气候变化对其景观的影响,旨在提高草原文化遗址应对气候变化的能力并为草原文化遗址的保护提供理论依据。

1 研究区概况

元上都遗址区位于内蒙古正蓝旗金莲川草原五一牧场境内,遗址所在区域属中温带半干旱大陆性气候,多年平均气温为2.1℃,1月平均气温为-18.3℃,7月平均气温为18.7℃;≥10℃的积温为1 574~2 504℃;多年平均降水量为366.8 mm,主要集中在6~8月,占全年降水量的65%~70%;多年平均蒸发量为1 920.5 mm;无霜期104 d,多年平均风速为4.7 m·s⁻¹。地貌总体上呈南高北低趋势,海拔为1 200~1 300 m,土壤类型主要以温带干草原栗钙土为主,土壤厚度由南向北逐渐变薄^[9]。植被以多年生草本植物为主,形成以大针茅 *Stipa grandis* 和克氏针茅 *Stipa krylovii* 为建群种的群落。

2 数据来源与分析方法

2.1 气象资料与分析方法

研究区是以元上都遗址为中心,向周边扩展至农牧交错点与城镇建设用地,南北各20 km,东西各40 km,总面积为4 015 km²。研究区气象资料来源于内蒙古正蓝旗上都镇各气象监测站点,为1981~2010年逐日气象资料^[10],包括日平均气温、日降水量、日平均风速等。采用小波分析方法分析各气象要素的变化周期, *M*—*K* 突变检验方法检验各气象要素的突变点。小波分析^[11]既能够反映出信号在时频域上的总体特征,还能够提供局部变化信息,亦能检验其突变时间。

2.2 遥感资料与分析方法

以中国科学院遥感卫星地面接收站提供的研究区1990,2000,2010年遥感影像数据为遥感信息源,以该区域1:50 000地形图及土地利用二次普查数据为补充信息源,运用ArcGIS和景观格局分析软件,基于现场踏勘与实地调研的基础上^[5],通过目视解译方法,对3个不同时段的遥感影像进行合成处理、景观分类、制图与空间叠加对比。

2.3 数据处理

应用SPSS软件对各气象要素与不同景观类型面积进行相关分析。

3 结果与分析

3.1 元上都遗址区及其周边景观的气候变化特征

3.1.1 年均气温变化特征 由图1可知:气温整体呈上升趋势,30 a平均气温为2.53℃,年均最高气温为2007年的4.01℃,最低气温值为1985年的0.6℃,极差值为3.41℃。30 a平均气温的年际变率为0.065℃·a⁻¹,小波分析如图2。由图2可知:在低频区30 a,气温出现1个明显冷暖期,时间突变大致在20世纪90年代初;在中频区10 a的时间尺度上,气温经过了降—升的循环趋势,出现3个明显的冷暖交替期,气温在中低频区变化规律一致。2010年后将进入下一个10 a气温下降周期;在高频区3~5 a的时间尺度上,气温循环趋势出现8个明显暖冷期的周期。由作者之前数据分析可知, *M*—*K* 突变检验在显著性水平0.05的临界线之间,曲线在1993年附近存在1个突变点,说明元上都遗址区在1993年

经历了1次显著变暖过程。

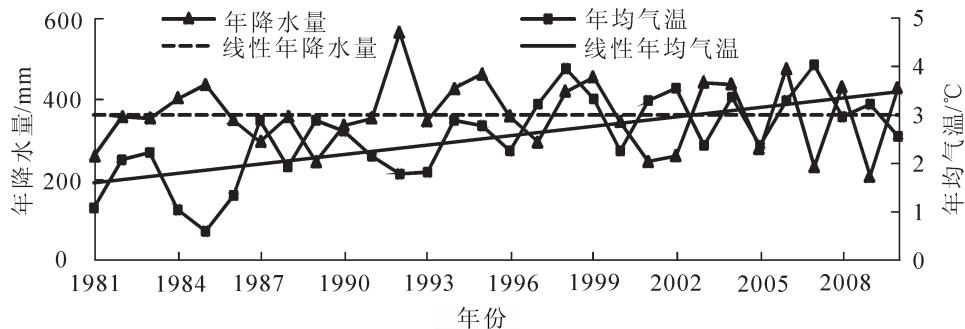


图1 研究区1981—2010年气温和降水量变化
Figure 1 Change of precipitation or temperature during 1981—2010

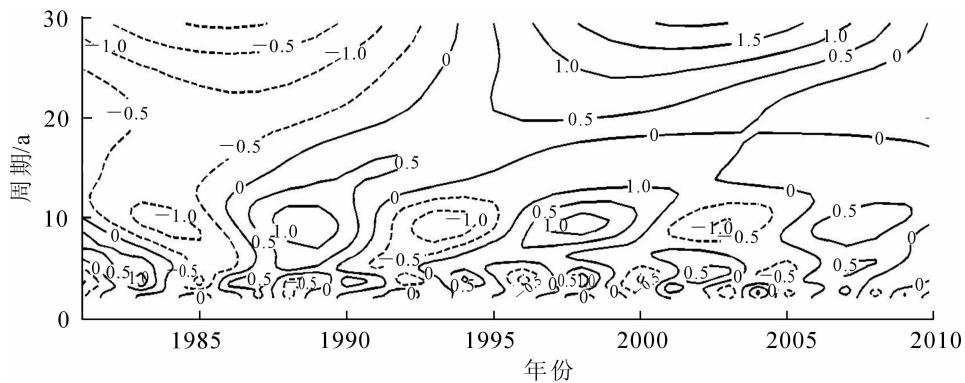


图2 研究区年均气温小波平面图
Figure 2 Average annual temperature of wavelet plan

3.1.2 降水量变化特征 由图1分析可知:降水量呈上升趋势,但是变化并不明显。30 a 平均降水量为359.7 mm。年最大降水量出现在1992年,其值为562.8 mm,最小降水量出现在2007年,其值为207.0 mm,极差值为355.8 mm。降水量年际变化为 $0.07 \text{ mm} \cdot \text{a}^{-1}$ 。小波分析如图3可知:低频区25 a 时间尺度上有2次明显干旱周期,即1985年和2002年前后;在1980—1995年,中频区10 a附近出现3次“干—湿—干”的交替期,而在1995年后以5 a周期振荡为主。在高频区5 a附近出现连续干湿交替期,但是在2005年后干湿交替不明显,2009年高、中频区都出现干旱情况,实际该年降雨量仅为207.0 mm。综合来看,2000年后研究区以干期为主。由作者之前M—K突变检验分析可得,统计量序列UF和UB曲线均在显著性水平0.05的临界线之间,在1989年和2009年附近存在2个明显的突变点,说明该突变年份年降水量显著减少。

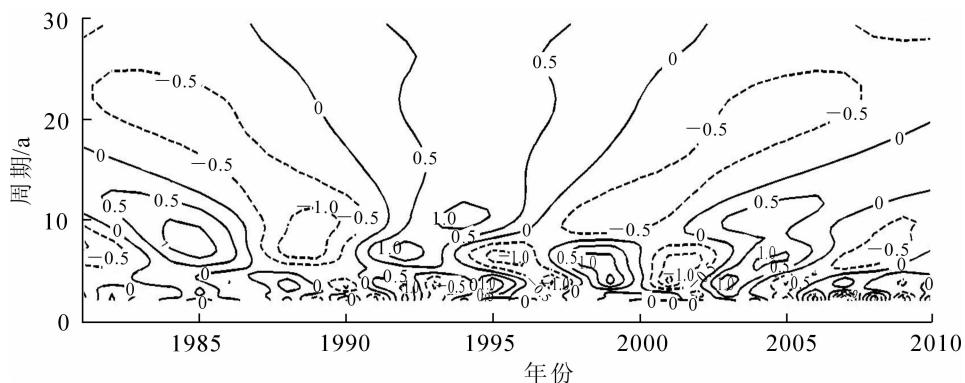


图3 研究区年降水量小波平面图
Figure 3 Annual precipitation of wavelet plan

3.2 景观格局变化

基于元上都遗址区区域开发规模、历史文化背景与上都河流域面积确定遥感区域界线, 即以元上都为中心, 向周边扩展至农牧交错点与城镇建设用地。总面积为4 015 km²。通过对1990, 2000, 2010年遥感影像, 以GB/T 21010-2007《土地利用现状分类》标准作为参考, 将元上都遗址区的景观类型分为10个Ⅰ级类, 分别为耕地、林地、高覆盖度草地、中覆盖度草地、低覆盖度草地、城镇与工矿用地、沙地、水域、沼泽与湿地、盐碱地^[5]。景观中草地和耕地面积最大, 耕地所占面积比例由1990年的14.26%增加到2000年的16.53%, 之后的2010年又减少了0.35%; 而草地所占比例由1990年的73.36%减少到2010年的67.10%; 于此相比, 沙地面积所占比例由1990年的5.14%增加到2010年的8.47%。

由图4, 表1和表2可以看出: 元上都遗址区区域景观面积变化草地景观总体呈缩减趋势, 减少19.2 km²·a⁻¹。其中草地转变为沙地与耕地的面积较大, 沙地面积增加9.55 km²·a⁻¹, 耕地面积增加6.7 km²·a⁻¹。而转化为林地、城镇与工矿用地、水域、盐碱地、裸地面积相对较小。这主要是由于研究区北部为浑善达克沙地, 每年向南扩展, 放牧导致草地沙化加剧, 而同时20世纪80年代末至90年代初区域大面积植树造林、农业大开发开垦种植农作物、城镇化进程的加快都是其诱导因素, 2000年以后沙地区域的人为治沙以及退林还草使其得到明显改善; 盐碱地在风蚀和强风力作用下, 表层土壤结皮破坏, 面积逐渐减少演变为新的沙地。而水域与沼泽与湿地面积由183 km²减少到181 km², 平均减少0.07 km²·a⁻¹, 遗址区正是由于坐落在上都河下游, 其面积的减少对遗址区的保护亦构成较大威胁。1990-2010年间, 研究区景观格局发生了较大变化, 斑块数量与斑块密度呈先减少后增加趋势, 表明遗址区区域斑块数渐趋稳定, 但是2000年后虽然斑块数增加, 斑块形状趋于复杂, 但草地景观斑块数趋于下降, 不及1990年, 景观破碎化程度在加剧, 景观多样性指数呈增加趋势, 表面研究区景观构成趋于复杂, 景观稳定性在下降。

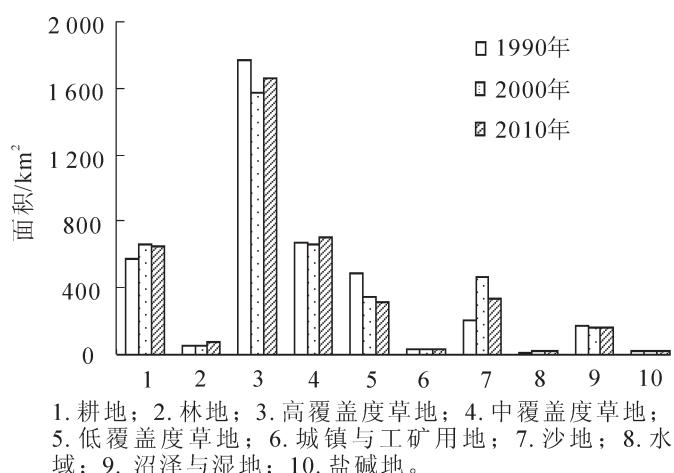


图4 1990, 2000, 2010年景观面积变化

Figure 4 Landscape area change of 1990, 2000 and 2010

表1 研究区1990-2010年草地景观转换分类面积

Table 1 Classification convert grassland landscape area in 1990-2010 years

年份	转换面积/ km ²							
	耕地	沙地	林地	裸地	盐碱地	城镇工矿用地	水域	沼泽与湿地
1990-2000	1.98	2.51	0.36	0.05	0.10	0.19	0.10	0.22
2000-2010	37.84	62.56	20.00	2.37	5.00	7.26	1.01	0.57
1990-2010	133.91	190.99	27.18	8.35	6.49	8.85	7.21	0.33

3.3 气候因子对研究区景观格局的影响

气温因子影响植被的生长、分布以及区域生态环境, 因此, 气温的变化对景观格局的斑块及分布具有重要影响。

由表3可知:研究区年均气温与盐碱地面积呈正相关关系,相关系数为0.992。即随着气温的升高盐碱地的面积呈增加趋势,在自然状态下,气温升高导致土壤蒸发量增加,加之20世纪90年代增温较大,气候暖化程度加剧,盐碱地面积呈扩大趋势;而其他景观类型均与气温呈负相关关系。沙地和耕地面积的减少与气温相关关系不大,主要是由于研究区在20世纪90年代人为治沙以及近10 a退耕还林、退耕还草原因导致的。从气温的年际变化来看,研究区目前处于暖干化期,而且这种暖期仍将继续,因此,未来几年,元上都遗址区区域盐碱地仍会扩大,而沼泽湿地与草地面积随着人为治理和保护作用下有所改善。

降水量反映了地区的干旱程度,对各景观类型的分布、植被生长、人类生存都具有重要影响^[17-18]。城镇工矿面积与降水量呈正相关关系(表3),相关系数为0.994。降水量的增加,城镇工矿面积在扩大,耕地、林地、沙地、裸地、盐碱地、水域面积也与降水量呈正相关关系,其中,20世纪70年代元上都遗址区区域耕地面积较少,80年代开始,大量草地、水域已被开垦,耕地面积达1.98 km²,随着近20 a降水量的增加,拓荒面积进一步扩大,波及整个元上都遗址区周边水域、林地,耕地面积直线上升,达到37.84 km²。直到近5 a降水量波动巨大,退耕还林与退耕还草的政策使耕地面积增加趋势有所缓减,相应草地面积增加明显^[19]。沼泽与湿地、高草面积是呈负相关关系,降水量增加导致沼泽与湿地面积的减少,其反常原因在于:①元上都遗址区位于正蓝旗上都镇西北20 km处,2003年遗址区上游上都河修建水库出现连年断流现象;②2005-2010年随着“一产”比例的降低,“二产”所占人均国民生产总值(GDP)比例由61.41%上升至80.37%,因此,区域经济的快速增长必然带动土地利用的增长,从而导致研究区降水量与沼泽湿地负相关。

从风速与各类型景观面积变化来看,风速与中覆盖度草地关系密切,具有显著性,呈正相关关系,相关系数为0.999。草原植被盖度较好,风蚀量较小,中覆盖度草地能有效减缓风蚀作用以及沙化速度。而风速与沙地呈负相关关系,其原因在于沙化土地大都为固定沙地,其植被覆盖度较高,抗风蚀力较强,风速的增加对沙地面积的减少作用较小。

综合以上分析,气温与耕地、沙地、水域面积负相关较大,与盐碱地面积正相关较大;而降水量与林地、裸地、城镇面积正相关较大,与沼泽湿地负相关较大;风速与中覆盖度草地面积正相关较大。

表3 研究区各景观类型面积与各气象要素的相关系数
Table 3 Correlation coefficients of the area of landscape type area and climate factors

景观类型	气温/℃	降水量/mm	平均风速/(m·s ⁻¹)
耕地	-0.796	0.455	-0.071
水域	-0.818	0.422	-0.108
沙地	-0.958	0.114	-0.417
沼泽与湿地	0.514	-0.754	-0.305
林地	0.049	0.992	0.782
高覆盖度草地	0.946	-0.153	0.381
裸地	-0.348	0.862	0.475
中覆盖度草地	0.624	0.879	0.999*
盐碱地	0.992	0.297	0.749
低覆盖度草地	0.580	-0.700	-0.229
城镇与工矿	-0.071	0.994	0.796

说明: *表示 $P < 0.05$ 。

4 讨论

1981-2010年,元上都遗址区区域气候经历了冷干—暖湿—冷干—暖干的演变过程,目前为暖干期,并在2015年前将继续维持这一暖干气候期。受气候暖干化的影响,研究区的草地植被破坏,土地

表2 研究区1990-2010年景观格局指数

Table 2 Landscape pattern indices in 1990-2010 years

年份	斑块数/块	多样性指数	斑块密度/(块·hm ⁻²)
1990	2 234	1.63	0.56
2000	2 217	1.72	0.55
2010	2 469	1.70	0.62

沙化、盐碱化面积不断扩大, 虽然近10 a的人为治沙和退耕还草, 土地沙化面积与耕地面积都有所减缓, 但是其扩大趋势仍将继续; 随着研究区林业工程的建设, 林地面积的剧增已经严重影响元上都遗址区区域景观格局, 而农牧业结构的调整与优化趋势势在必行, 其以草原文化为主的遗址区景观正遭受保护与开发的双重压力。

在气候暖干化的影响下, 人为破坏和区域开发促进和加快了研究区沙地的活化过程^[19]。20世纪90年代尽管降水量增加, 但是沙化面积比近10 a仍然增加了60.05 km², 2000年以后, 尽管研究区依然温度升高, 降水量减少, 但是在人为保护和治理下, 沙化面积得到控制, 草地面积则增加了108.18 km², 说明研究区生态环境治理得到有效控制, 人为治理抑制了土地沙化、盐碱化面积的扩大, 但是受气候变化影响, 草地植被退化程度依然严重。

目前, 随着气候暖干化的推移, 研究区水域面积不断缩小, 其上游闪电河的断流进一步加剧了湿地景观的萎缩, 原来大面积的湿地被分割成小的斑块。气候变化是导致研究区景观格局变化的内部驱动因素, 而随着研究区2000年后区域开发的不断加剧, 其对研究区景观格局的变化起着越来越显著的外部驱动因素。因此, 对于元上都遗址区的保护与开发要坚持“保护优先, 开发适度”的原则, 加强周边湿地与草地的保护, 抑制沙地、盐碱地的扩张。

5 结论

年均气温呈明显上升趋势, 于1986年显著增加, 且年平均最低气温的上升更为显著; 年均降水量略有增加, 1989年和2009年为突变显著年份。气候总体变化呈暖干化趋势。气候季节变化中夏季最低气温和夏季最高气温的升高是导致研究区气候暖化的原因。而夏季降水量的减少是导致该区降水量近30 a不显著的主要原因。

受气候暖干化的影响, 研究区的景观格局趋于多样化和破碎化。其景观斑块数由1990年的2 234块增加到2010年的2 469块。1990—2010年草地所占面积比例减少了6.26%, 耕地所占面积比例增加了2.27%, 沙地所占面积比例增加了3.33%, 其中土地沙化、盐碱化面积不断扩大, 沙地面积每年增加9.55 km², 耕地面积每年增加6.7 km²。草地面积减少和沙地面积增大这一趋势仍将持续。而水域、湿地面积在萎缩, 其面积由183 km²减少到181 km², 年均减少0.07 km²。这种变化趋势原因之一是由于气候的变暖和降水量在夏季的减少造成的。

研究区景观格局的破碎化和生境变迁内因是由于气候逐渐趋于暖干化, 外因是由于周边区域开发。闪电河上游修建水库导致流域断流, 20世纪90年代的过度放牧, 修建公路、铁路以及旅游开发等区域开发类型带来的生态环境变迁。

6 参考文献

- [1] IPCC. *Climate Change 2007-the Physical Science Basis: Worrинг Group I Contribution to the Fourth Assessment Report of the IPCC* [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2007: 996.
- [2] 《气候变化国家评估报告》编写委员会. 气候变化国家评估报告[M]. 北京: 科学出版社, 2007.
- [3] 陈隆勋, 朱文琴, 王文, 等. 中国近45 a来气候变化的研究[J]. 气象学报, 1998, **56**(3): 257–271.
CHEN Longxun, ZHU Wenqin, WANG Wen, et al. Studies of climate change in China in recent 45 years [J]. *Acta Meteorol Sin*, 1998, **56**(3): 257–271.
- [4] 王遵娅, 丁一汇, 何金海, 等. 近50 a来中国气候变化特征的再分析[J]. 气象学报, 2004, **62**(2): 228–236.
WANG Zunya, DING Yihui, HE Jinhai, et al. An updating analysis of the climate change in China in recent 50 years [J]. *Acta Meteorol Sin*, 2004, **62**(2): 228–236.
- [5] 甄江红, 银山, 刘果厚, 等. 草原文化遗址区景观格局变化及其生态风险评估: 以元上都为例[J]. 干旱区资源与环境, 2014, **28**(12): 159–165.
ZHENG Jianghong, YIN Shan, LIU Guohou, et al. Landscape pattern change and ecological risk assessment on the grassland culture relics area: a case of Yuanshangdu [J]. *J Arid Land Resour Environ*, 2014, **28**(12): 159–165.
- [6] 任国玉, 郭军, 徐铭志, 等. 近50 a中国地面气候变化基本特征[J]. 气象学报, 2005, **63**(6): 942–955.
REN Guoyu, GUO Jun, XU Mingzhi, et al. Climate changes of China's mainland over the past half century [J]. *Acta*

- Meteorol Sin*, 2005, **63**(6): 942 – 955.
- [7] 屠其璞, 邓自旺, 周晓兰. 中国近 117 a 年平均气温变化的区域特征研究[J]. 应用气象学报, 1999, **10**(增刊): 34 – 42.
- TU Qipu, DENG Zi旺, ZHOU Xiaolan. Study of regional characteristics on mean annual temperature variation of 117 years in China [J]. *Quart J Appl Meteorol*, 1999, **10**(supp): 34 – 42.
- [8] 张平. 大遗址周边区域开发强度控制研究[D]. 西安: 西北大学, 2014: 1 – 7.
- ZHANG Ping. *Development Intensity Control of the Great Site Surrounding Area* [D]. Xi'an: Northwest University, 2014: 1 – 7.
- [9] 李兴华, 韩芳, 张存厚, 等. 气候变化对内蒙古中东部沙地-湿地镶嵌景观的影响[J]. 应用生态学报, 2009, **20**(1): 105 – 112.
- LI Xinghua, HAN Fang, ZHANG Cunhou, et al. Influence of climate change on mosaic landscape of sand land-wetland in middle-east Inner Mongolia [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2009, **20**(1): 105 – 112.
- [10] 王涛, 哈斯格日勒, 布仁毕力格, 等. 正蓝旗辉煌 30 a[R]. 正蓝: 正蓝旗统计局, 2008: 10 – 417.
- [11] 沈姣姣, 寇小兰, 巨晓璇, 等. 西安市汛期降雨特征的多尺度分析及未来趋势预测[J]. 中国农学通报, 2015, **31**(2): 219 – 224.
- SHEN Jiaojiao, KOU Xiaolan, JU Xiaoxuan, et al. Analysis on the precipitation characteristics in multiple scales and prediction of future trend in flood season in Xi'an [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2015, **31**(2): 219 – 224.
- [12] 杜军. 西藏高原近 40 a 的气温变化[J]. 地理学报, 2001, **56**(6): 682 – 690.
- DU Jun. Change of temperature in Tibetan Plateau from 1961 to 2000 [J]. *Acta Geogr Sin*, 2001, **56**(6): 682 – 690.
- [13] 苏洁琼, 王烜. 气候变化对湿地景观格局的影响研究综述[J]. 环境科学与技术, 2012, **35**(4): 74 – 81.
- SU Jieqiong, WANG Xuan. Review on impacts of climate change on wetland landscape patterns [J]. *Environ Sci Technol*, 2012, **35**(4): 74 – 81.
- [14] 刘宏娟, 胡远满, 布仁仓, 等. 气候变化对大兴安岭北部沼泽景观格局的影响[J]. 水科学进展, 2009, **20**(1): 105 – 110.
- LIU Hongjuan, HU Yuanman, BU Renchang, et al. Impacts of climate changes on the landscape patterns of potential mire distributions in northern Great Khing'an Mountains [J]. *Adv Water Sci*, 2009, **20**(1): 105 – 110.
- [15] 肖锐, 王学雷, 杨小琴, 等. 基于 TM 影像的湿地格局变化空间分析: 以洪湖市为例[J]. 华中师范大学学报: 自然科学版, 2008, **42**(2): 295 – 298.
- XIAO Rui, WANG Xuelei, YANG Xiaoqin, et al. Spatial analysis of wetland changes based on the TM image: a case study in Honghu City [J]. *J Huazhong Norm Univ Nat Sci*, 2008, **42**(2): 295 – 298.
- [16] 白军红, 欧阳华, 杨志峰, 等. 湿地景观格局变化研究进展[J]. 地理科学进展, 2005, **24**(4): 36 – 45.
- BAI Junhong, OUYANG Hua, YANG Zhifeng, et al. Changes in wetland landscape patterns: a review [J]. *Prog Geogr*, 2005, **24**(4): 36 – 45.
- [17] 赵慧颖, 乌力吉, 郝文俊. 气候变化对呼伦湖湿地及其周边地区生态环境演变的影响[J]. 生态学报, 2008, **28**(3): 1064 – 1071.
- ZHAO Huiyin, Wuliji, HAO Wenjun. Influences of climate change to ecological and environmental evolvement in the Hulun Lake wetland and its surrounding area [J]. *Acta Ecol Sin*, 2008, **28**(3): 1064 – 1071.
- [18] 李金亚, 徐斌, 杨秀春, 等. 锡林郭勒盟草原沙化动态变化及驱动力分析: 以正蓝旗为例[J]. 地理研究, 2011, **30**(9): 1659 – 1681.
- LI Jinya, XU Bin, YANG Xiuchun, et al. Dynamic changes and driving force of grassland sandy desertification in Xilin Gol: a case study of Zhenglan Banner [J]. *Geogr Res*, 2011, **30**(9): 1659 – 1681.
- [19] 施建敏, 马克明, 赵景柱, 等. 三江平原残存湿地斑块特征及其对物种多样性的影响[J]. 生态学报, 2010, **30**(24): 6683 – 6690.
- SHI Jianmin, MA Keming, ZHAO Jingzhu, et al. The patch characteristics of wetland remnants in the Sanjiang Plain and its influence on plant species richness [J]. *Acta Ecol Sin*, 2010, **30**(24): 6683 – 6690.

湘南石漠化地区植物群落物种多样性

吴林世, 曹福祥, 彭继庆, 曹基武, 徐永福, 董旭杰, 胥 雯

(中南林业科技大学 生命科学与技术学院, 湖南长沙 410004)

摘要: 通过对湘南 21 个样地 ($5\ 000\ km^2$) 实地调查, 应用重要值计算多样性指数 Shannon-Wiener (H') 和 Simpson 指数 (D), Pielou 均匀度指数 (J_{sw}), 丰富度指数 (S) 等, 分析湘南植物群落多样性。结果表明: ① 维管束植物共有 63 科 131 属 173 种, 其中乔木 15 科 21 属 24 种, 青冈栎 *Cyclobalanopsis glauca*, 细叶青冈 *C. gracilis*, 苦槠 *Castanopsis sclerophylla* 等为乔木层优势种; 灌木层 34 科 60 属 74 种, 牡荆 *Vitex negundo* var. *cannabifolia*, 六月雪 *Serissa japonica* 与花竹 *Bambusa albo-lineata* 较多; 草本植物共 32 科 54 属 63 种, 多数为禾本科 Gramineae 植物; 层间植物共有 13 科 22 属 33 种, 龙须藤 *Bauhinia championii* 数量最多; ② α 多样性分析表明: 湘南石漠化地区物种丰富度低, 植物群落结构简单, 但群落多样性较高, Simpson 指数为 0.796 9~0.936 1, Shannon-Wiener 指数为 2.104 7~3.274 6, 群落物种个体分配较为均匀, 群落多样性较好。潜在石漠化乔木层群落物种组成最为丰富, 其 Simpson 指数也最高, 达到了 0.936 1, Shannon-Wiener 指数也高达 3.274 6; 从群落层次分析, 乔木大多数集中在潜在石漠化群落中, 轻度石漠化林地乔木仅有 6 株乔木, 其他群落样地中乔木几乎忽略, 可见石漠化地区是比较难以孕育高大乔木的, 这与石漠化区域土壤瘠薄、保水能力差、“上土下水”的双层结构有密切关联; ③ β 多样性分析说明不同程度石漠化群落之间环境差异性较大, Cody 指数分析表明: 由轻度石漠化向重度石漠化演替速度很快。极重度石漠化群落与其他群落的共有种最少, 随着石漠化程度增加, 不同等级石漠化群落间的相似性系数呈现减小的趋势; 不同程度石漠化群落区域间, Jaccard 指数差异较大, 最大为最小的 7.29 倍; 潜在石漠化到重度石漠化程度过程中 Cody 指数最大, 物种更替速度在持续增加, 到重度石漠化, 更替速度达到最大值。图 1 表 3 参 25

关键词: 森林生态学; 石漠化; 群落生态; α 多样性; β 多样性

中图分类号: S718.5 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2016)02-0239-08

Plant community and species diversity in rocky desert areas of Southern Hunan

WU Linshi, CAO Fuxiang, PENG Jiqing, CAO Jiwu, XU Yongfu, DONG Xujie, XU Wen

(College of Life Science and Technology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, Hunan, China)

Abstract: The diversity of plant species in 21 plots ($5\ 000\ km^2$) from Southern Hunan area was determined by calculating the indices of species diversity, richness, evenness, and dominance. Analysis included α and β diversity analyses with the Simpson (S), Shannon-Wiener (S_w), Cody (C), and Jaccard (J) Index. For rocky desert treatment and searching the regularities of growth and distribution of plant in rocky desert, applied with random quadrat sampling method and analysis by synthesis method. Results show there are overall presence of 63 families, 131 genera, and 173 species of vascular plants, 1) This included 15 families, 21 genera, and 24 species of trees; 34 families, 60 genera, and 74 species of shrubs; 32 families, 54 genera, and 63 species of herbs; 13 families, 22 genera, and 33 species of interlayer. 2) The α shows that rocky desert area with low species richness ($S = 0.796\ 9\sim0.936\ 1$, $S_w = 2.104\ 7\sim3.274\ 6$) and a simple community structure with indi-

收稿日期: 2015-04-21; 修回日期: 2015-06-26

基金项目: 国家林业公益性行业科研专项(201104016); 中南林业科技大学研究生创新基金资助项目(CX2014B31); 湖南省研究生创新基金资助项目(CX2014B344)

作者简介: 吴林世, 从事植物学研究。E-mail: 282678605@qq.com

vidual species having a relatively uniform distribution but a higher community diversity. Species composition for the tree layer was greatest in the potential rocky desert area ($S = 3.274$ 6 and $S_w = 0.936$ 1). At the community level, most of the trees were in the potential rocky desert. 3) The β showed that environmental differences between different sample plot. The C Index revealed that, from light to severe desert area has different numbers species, the similarity coefficient of different rocky desert spot decreased. The J Index of different level rocky shows the maximum is of 7.29 times to the minimum. Conclusion which plants species are suitable in rocky desertification areas, contain the expansion trend of rocky desertification, improve the environment. [Ch, 1 fig. 3 tab. 25 ref.]

Key words: forest ecology; rocky desert; ecological community; α diversity; β diversity

石漠化(rock desertification)是在喀斯特脆弱生态环境下,由于人类不合理的社会经济活动,造成的植被破坏、水土流失、岩石逐渐裸露,并导致土地总生产力衰退、土地利用率低、地表在视觉景观上呈现类似荒漠景观的演变过程^[1]。截至2005年底,湖南省石漠化土地总面积为12.96万km²,占国土总面积的1.35%^[2-4]。2008年以来,湖南省湘南地区乱砍滥伐现象日趋严重,森林植被破坏程度加剧,从而导致水土流失剧烈,石漠化侵蚀速度加快。为了遏制石漠化的扩张,众多研究人员参与石漠化的研究,石漠化地区植被状况是重点关注对象。杨成华等^[5]以探究石漠化地区植物种类为目的,对贵州石漠化地段105个样地的植被类型进行了详细调查,得到石漠化地区常见植物种类有70科110属345种;司彬等^[6]和YUAN等^[7]对喀斯特石漠化形成原因及植被恢复途径探讨,认为人为干预是喀斯特地区植被和土壤退化的结果;陆冠尧等^[8]运用面上调查和定位观测相结合的方法,发现伴随石漠化程度的加深,粤北石漠化土地的植物群落结构越来越趋于简单。随着研究的深入,部分学者将石漠化植物与土壤或其他因子结合分析,2010年向志勇^[9]和谢丽萍^[10]对石漠化不同植被恢复模式生物量结合营养元素分布进行了研究,并对邵阳县石漠化地区5种不同植被恢复模式下的生物量及营养元素分布格局进行了分析;2013年徐杰等^[11]对邵阳县石漠化5种植被恢复模式下的土壤有机碳特征进行了比较,这5种植被恢复模式下的土壤,有机碳含量以柰树 *Koelreuteria paniculata* 纯林最高;魏兴琥等^[12]对粤北石漠化过程土壤与植被变化及其相关性研究中发现石漠化从轻度向极重度发展的过程中,土层厚度、土壤覆盖度和土壤有机碳含量均呈显著下降的趋势;涂成龙等^[13]研究了黔中石漠化地区生态恢复过程中土壤养分变异特征,在石漠化地区土壤中有效氮、有效钾含量水平较高,而有效磷含量水平处于极低状态;且还有研究认为草本层在石漠化植被恢复前期对土壤有机碳密度影响较大^[14]。尽管许多学者从不同角度探讨了石漠化地区植被的生长与分布情况,却没有对不同程度石漠化立地类型中的植被变化趋势进行有效深究。鉴于此,本研究拟以湘南为研究区域,遏制石漠化扩张为目的,整理并分析石漠化从轻度到极重度的变化过程中植物类型及生长状况,对数据进行统计分析,探明湘南石漠化立地类型上植物生长分布规律,以期为以生态修复为主的石漠化治理技术提供科学合理的参考指导。

1 研究区域自然概况

湘南即湖南省南部地区,包括衡阳、郴州、永州等3个地级市,土地总面积为57 126 km²,约占湖南省土地总面积的27.0%,处于24°39'~27°28'N,110°32'~114°14'E。根据2010年“湖南石漠化综合治理规划评审稿”中记录,湘南的郴州和永州21个县市共有石漠化面积38.82万hm²,潜在石漠化面积18.01万hm²,占全省石漠化和潜在石漠化面积的26.2%和12.5%^[15]。湘南地区属中亚热带东部湿润季风气候区,同时又兼有向南亚热带过渡的特征,温、光、水资源丰富,常年无霜期为275~300 d,土壤类型以红壤和水稻土居多,年均温为15~18℃,年均降水量1 400~1 700 mm。据吴征镒对中国植物区系的区划,湘南植物区系属泛北极植物区中国—日本亚区的华东地区,有1 332种,分别隶属于677属175科,植被类型以常绿阔叶林或常绿落叶阔叶混交林为主,植物资源十分丰富^[16-17]。

2 研究方法

2.1 野外群落调查法

在湘南选取桂阳、江华、江永、双牌、新田等 5 个石漠化较为典型的县市按照《湖南省石漠化监测实施细则》相关要求做样地调查, 从植被总盖度、基岩裸露率、土层厚度及植被类型 4 个指标将石漠化等级划分为极重度石漠化、重度石漠化、中度石漠化、轻度石漠化和潜在石漠化常绿阔叶林样地 5 个等级^[18-19]。按照方精云在《植物群落清查的主要内容、方法和技术规范》建议共设置调查样地 15 个, 乔木层每个调查样地设 20 m × 20 m 的样方, 再分为 4 个 10 m × 10 m 小样方, 灌木层样地设置为 10 m × 10 m 的样方, 草本层样地设 1 m × 1 m 的样方, 每个样方利用全球定位系统(GPS)记录坐标和海拔高度。

植被调查: 胸径大于 2.5 cm 或者高度大于 2.0 m 的植株按乔木层统计, 每株统计名称、胸径、高度和冠幅; 胸径小于 2.5 cm 或者高度小于 2.0 m 的植株按照灌木统计, 每株统计名称、基径、高度; 草本植物统计名称、株数、平均高度和盖度。

2.2 内业处理方法

根据样地调查数据, 分析群落个体数及其组成成分的种群数量、相对多度和重要值等特征, 其中重要值采用 $I_v = (\text{相对密度} + \text{相对显著度} + \text{相对频度}) \times 100\%$ 来计算。采用丰富度指数(S), Shannon-Wiener 指数(H'), Simpson 指数(D)来测定植物群落的 α 多样性; 采用 Jaccard 指数(C_j), Sørensen 指数(C_s)和 Cody 指数测定植物群落的 β 多样性^[20-21]。

3 结果与分析

3.1 湘南石漠化地区物种组成与群落特征

实验调查以湘南 5 个典型的石漠化县市为基础, 每个县市做面积为 1 000 m² 的样地调查。数据汇总分析得出: 维管束植物共有 63 科 131 属 173 种, 其中乔木 15 科 21 属 24 种, 分别占总数的 23.81%, 16.03% 和 13.87%, 其中数量最多的为壳斗科 Fagaceae (3 属 5 种), 青冈栎 *Cyclobalanopsis glauca*, 细叶青冈 *C. gracilis*, 苦槠 *Castanopsis sclerophylla*, 桤木 *Quercus variabilis* 和白栎 *Quercus fabri*, 占乔木总数的 20.83%, 占群落总数的 4.76%; 灌木层 34 科 60 属 74 种, 分别占总数的 53.97%, 45.80% 和 42.77%, 数量较多的有马鞭草科 Verbenaceae 的牡荆 *Vitex negundo* var. *cannabifolia*, 茜草科 Rubiaceae 的六月雪 *Serissa japonica*, 禾本科 Gramineae 的花竹 *Bambusa albo-lineata* 等; 草本植物共 32 科 54 属 63 种, 分别占总数的 50.79%, 31.21% 和 36.42%, 种类最多的是禾本科(9 属 10 种), 其次是菊科 Compositae(3 属 7 种); 层间植物共有 13 科 22 属 33 种。中度石漠化和重度石漠化地区藤本植物占优势, 主要以龙须藤 *Bauhinia championii* 为主。根据《中国植被》对群落群从的定义, 可将湘南石漠化样地其划分为 5 个植物群从(表 1)。

对湘南石漠化地区乔木层植物汇总分析, 发现江永、江华和新田三县石漠化地区中的优势种都是细叶青冈, 重要值分别为 190.98, 133.94 和 120.69; 而桂阳、双牌却以青檀 *Pteroceltis tatarinowii* 和栓皮栎为优势种, 重要值为 83.04 与 163.32; 灌层植物分析, 竹叶花椒 *Zanthoxylum armatum*, 牡荆, 檵木 *Loropetalum chinense*, 火棘 *Pyracantha fortuneana* 和扁担杆 *Grewia biloba* 这 5 种植物是所有调查样地中的共有种, 且牡荆在灌层中都处优势地位, 可见牡荆是一种适宜应用于石漠化植被恢复的灌木树种; 对样地中的草层进行分析, 其中禾本科植物最多, 共有 10 种, 其次是菊科植物 7 种, 但优势种却为马鞭草科的兰香草 *Caryopteris incana*; 卷柏科 Selaginellaceae 的薄叶卷柏 *Selaginella delicatula*, 禾本科的丝茅 *Imperata koenigii*, 牛筋草 *Eleusine indica* 和野古草 *Arundinella anomala*, 没有一种菊科植物处于优势地位。出现这种情况可能与人为干扰有一定关联; 层间植物龙须藤占优势地位, 这与其自身特点有密不可分的关系。龙须藤具有喜光照, 较耐荫, 耐干旱瘠薄等特性, 且根系发达, 穿透力强, 这让它能够将根系深入地底, 吸收水分, 快速生长繁殖。

在群落调查发现的 173 种维管束植物, 其中含 10 种以上的科仅有 5 种, 依次有豆科 Leguminosae (11/15), 蔷薇科 Rosaceae (6/13), 禾本科 (10/11), 大戟科 Euphorbiaceae (8/10), 鼠李科 Rhamnaceae (5/10)。这 5 个科作为湘南石漠化植被组成的特征科, 其中蔷薇科和鼠李科是温带地区植物区系和植被

表1 湘南石漠化5个植物群丛种类表

Table 1 5 flora species lists in rocky desertification in Southern Hunan

地点	群落名称	生境特点	数量/株
桂阳	青檀+青冈栎-花竹-牡荆-芒群落 <i>Pteroceltis tatarinowii+C. glauca-Bambusa albo-lineata-Vitex negundo</i> var. <i>cannabifolia-Misanthus sinensis</i>	流峰镇, 东坡, 山顶, 裸岩率35%, 海拔300 m	乔36 灌679 草116 合831
江华	细叶青冈+苦槠-花竹-柞木-阔叶山麦冬-兰香草群落 <i>C. gracilis</i> + <i>Castanopsis sclerophyll-Bambusa albo-lineata-Xylosma racemosum-Liriope platyphylla-Caryopteris incana</i>	沱江镇德桥河村, 东坡, 山中部裸岩率50%, 海拔250 m	乔27 灌280 草82 合389
江永	细叶青冈+山槐-灯台树-牡荆-薄叶卷柏-石油菜群落 <i>C. gracilis</i> + <i>Albizia kalkora-Bothrocaryum controversum-Vitex negundo-Selaginella delicatula-Pilea cavaleriei</i>	潇浦镇, 东坡, 山腰, 裸岩率60%, 海拔350 m	乔21 灌287 草167 合481
双牌	栓皮栎+白栎-牡荆-櫟木-兰香草-白莲蒿群落 <i>Quercus variabilis</i> + <i>Quercus fabric-Vitex negundo-Loropetalum chinense-Caryopteris incana-Artemisia sacrorum</i>	理家坪乡, 南坡, 山中部, 裸岩率50%, 海拔250 m	乔16 灌310 草214 合540
新田	细叶青冈+圆叶乌柏-牡荆-细叶青冈(幼)-野菊花-竹叶草群落 <i>C. gracilis</i> + <i>Sapium rotundifolium-Vitex negundo-C. gracilis</i> (saplings)- <i>Dendranthema indicum-Oplismenus compositus</i>	石羊镇潭罗村, 东坡, 山中部, 裸岩率70%, 海拔280 m	乔21 灌267 草123 合411

组成的特征科, 豆科与禾本科也常出现在温带属植物群落中, 故温带性质的植物在该地区植物区系和植被组成中占主导地位。仅含1种、2种的科分别有32科和14科, 占了全部科数的73.02%, 可见较多的科含有较少的种, 说明湘南石漠化地区植物区系具有多样性和复杂性的特点。

3.2 湘南石漠化植物群落多样性特征分析

3.2.1 湘南石漠化植物群落 α 多样性分析 物种多样性指数高低是群落的结构特征的直接反应。湘南地区样地调查是按照石漠化程度等级不同而划分的, 调查样地记录数据包括潜在石漠化样地、轻度石漠化样地、中度石漠化样地、重度石漠化样地群落、极重度石漠化样地的草本层, 统计分析的湘南石漠化群落物种多样性指数如表2, 因为轻度石漠化乔木层群落中乔木物种与极重度石漠化草本层这2个物种太过稀少, 故没有将之列入群落表中。

表2 主要植物群落类型的物种多样性(以重要值计算)

Table 2 Species diversity on major plant community types (based on important value)

序号	石漠化类型	群落类型	丰富度指数(S)	Simpson多样性指数(D)	Shannon-Wiener多样性指数(H')	Pielou均匀度指数(J_{sw})	Simpson优势度指数(C)
1		潜在石漠化乔层群落	24	0.859 0	2.514 9	0.793 1	0.140 9
2	潜在石漠化	潜在石漠化灌层群落	50	0.936 1	3.274 6	0.837 1	0.063 9
3		潜在石漠化草层群落	33	0.935 1	3.066 2	0.876 9	0.064 9
4	轻度石漠化	轻度石漠化灌层群落	30	0.824 5	2.463 2	0.695 9	0.175 5
5		轻度石漠化草层群落	17	0.906 2	2.537 3	0.895 6	0.093 8
6	中度石漠化	中度石漠化灌层群落	26	0.796 9	2.366 8	0.645 9	0.203 0
7		中度石漠化草层群落	30	0.893 3	2.711 9	0.797 3	0.106 7
8	重度石漠化	重度石漠化灌层群落	25	0.865 5	2.104 7	0.765 2	0.134 5
9		重度石漠化草层群落	23	0.879 8	2.496 3	0.796 1	0.120 2

从群落类型分析, 发现湘南石漠化地区植物群落结构简单, 物种组成稀少, 其中物种丰富度超过 30 的仅有 5 个样地, 占总样地的 21.74%, 且丰富度都小于 35。

从群落多样性进行分析, Simpson 指数为 0.796 9~0.936 1, 几乎都大于 0.8。Shannon-Wiener 指数为 2.104 7~3.274 6, 这表明各群落中物种个体分配较为均匀, 群落多样性较好。Simpson 指数变化趋势与物种丰富度变化趋势相近, 说明石漠化地区物种组成的丰富度对群落多样性水平高低起着主要作用。潜在石漠化乔层群落物种组成最为丰富, 远远高于其他群落, 是因为该群落中青冈栎、细叶青冈等高大乔木较多, 为灌木的生长提供了良好的遮阴环境, 因而其 Simpson 指数也最高, 达到了 0.936 1。Shannon-Wiener 指数也位于前列, 为 3.274 6; 重度石漠化草本层群落及轻度石漠化群落草本层物种组成相对贫乏, 石漠化植被类型特征突出, 出现这种因素是因为石漠化地区土壤营养匮乏, 土层浅薄, 且地表温度较高, 故而重度石漠化草本层植物生长艰难, 导致丰富度低; 轻度石漠化草本层由于贴近村庄, 农家圈养的牛羊经过较多, 人为干扰严重, 导致其草本层物种仅有 17 种, 且 Simpson 指数很低(0.093 8), 可见形成石漠化地貌与人为活动有密切关联。

从群落层次分析, 乔木大多数集中在潜在石漠化乔木层群落中, 轻度石漠化群落仅有 6 株乔木(2 株柞木 *Xylosma racemosum*, 1 株乌柏 *Sapium sebiferum*, 1 株拐枣 *Hovenia acerba* var. *acerba*, 1 株朴树 *Celtis sinensis* 与 1 株细叶青冈, 且株高仅为 3.0~4.0 m, 其他群落样地中乔木几近忽略, 可见石漠化地区是比较难以孕育高大乔木的, 这与石漠化区域土壤瘠薄、保水能力差、“上土下水”的双层结构有密切关联。潜在石漠化乔木层物种丰富度为 24, 但 Simpson 多样性指数(0.859 0), Shannon-Wiener 多样性指数(2.514 9)及 Pielou 均匀度指数(0.793 1)都比较高, 可见潜在石漠化群落中乔木的分配比较均匀, 群落多样性好。石漠化样地灌木层群落物种丰富度及群落多样性都随着石漠化程度加深而下降, 由潜在石漠化下降到轻度石漠化时减幅最大, 随后下降速度减缓; 到重度石漠化样地时群落物种丰富度及多样性指数都到达最低值。调查样地中, 在江永县潇浦镇塘背村找到一个典型的极重度石漠化样地, 其样地内仅有 2 株灌木(牡荆、红背山麻杆 *Alchornea trewioides*), 另外还有零星的其他 5 种植物(半夏 *Pinellia ternata*, 鸡脚参 *Orthosiphon wulffenioides*, 苦苣苔 *Conandron ramondioides*, 石油菜 *Pilea cavaleriei*, 蕉草 *Carex siderosticta*), 土地荒凉, 植物存活率低, 恢复困难。草本层群落的变化趋势与灌层群落的变化趋势相似, 草本植物多为 1 年生植物, 植物根系较浅, 能够迅速吸收利用下雨时落到土壤中的水分, 迅速完成整个生活史。极重度石漠化地区草本稀少, 以匍匐或藤本植物为主, 植物种类比较单一, 仅有极耐旱的岩生植物存在, 如石油菜, 一种生长在石缝中的植物。可以预见, 若土地石漠化趋势未能得到有效的抑制, 将导致土地利用率大幅度减少, 群落多样性下降, 引起生态平衡失控, 形成不可逆的趋势, 从而导致生态危机。

3.2.2 湘南石漠化植物群落 β 多样性分析 β 多样性是对物种沿着环境梯度替代过程的一种度量, 可以理解为沿着某一环境梯度物种替代的程度或速率以及物种周转率等^[22]。通常 β 多样性被表示为群落间相似性指数或是同一地理区域内不同生境中生物物种的周转率, 不同生境间或某一生境梯度上不同地段间生物种类组成的相似性越低, β 生物多样性越高。

群落间物种多样性即为 β 多样性, 通常用于分析不同生境间生物多样性的梯度变化。 β 多样性可以直观地反应不同群落间物种组成的差异, Jaccard 指数和 Cody 指数分别可以从不同的角度反映物种多样性沿环境梯度的分布格局及变化规律^[23]。将湘南石漠化地区植被其所处生境按石漠化程度高低汇总归纳为 5 种生境。分别为 I: 潜在石漠化群落; II: 轻度石漠化群落; III: 中度石漠化群落; IV: 重度石漠化群落; V: 极重度石漠化群落。根据分析可以得到表 3 与图 1。

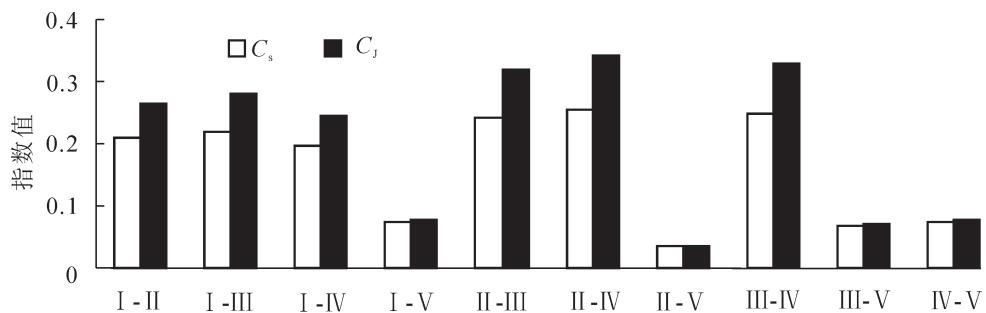
分析上述图表数据可得: ①由图 1 可以看出, 和极重度石漠化群落(V)相关的群落相似性指数(C_J 和 C_S)都处于最小值, 表明极重度石漠化群落与其他群落拥有的共有种都是最少的。Jaccard 指数 C_J 与 Sørensen 指数 C_S 最大的均为轻度石漠化群落(II)与重度石漠化群落(IV), 分别为

表 3 湘南不同石漠化程度群落间 Cody 指数半矩阵

Table 3 Different rock desertification community between Cody index

half matrix in Southern Hunan

生境类型	II	III	IV	V
I	40.5	40.0	41.5	40.5
II		26.5	24.0	26.5
III			25.5	26.0
IV				23.5

图1 不同程度石漠化群落间 β 多样性指数比较Figure 1 Comparison of β diversity indices among communities in each series

0.342 5与0.255 1, 可见这2组群落间环境差异性最大。潜在石漠化群落(I)与其他4个群落相似性系数进行分析,发现(C_j)最小的为极重度石漠化群落(V)的相似性系数,表明其与潜在石漠化群落共有物种数最少。轻度石漠化群落(II)与剩下的3种群落对比分析,其变化趋势同潜在石漠化群落与其他群落的相似性系数(C_j 和 C_s)的变化趋势十分类似,都是与极重度石漠化群落相比时差异性最大,表明随石漠化严重程度的增加,相似性系数呈现减小的趋势。②对研究中调查的湘南5个汇总群落而言,不同石漠化程度群落间的Jaccard指数大小排序:轻度—重度(0.255 1)>中度—重度(0.247 5)>轻度—中度(0.242 7)>潜在—中度(0.218 3)>潜在—轻度(0.208 6)>潜在—重度(0.197 1)>潜在—极重度(0.072 9)>重度—极重度(0.072 7)>中度—极重度(0.066 7)>轻度—极重度(0.035 0)。可见:首先,在不同程度石漠化群落区域间,其相差Jaccard指数差异较大,最大为最小的7.29倍,差异显著。其次,所有样地间其Jaccard指数均小于0.5,轻度石漠化群落与重度石漠化群落样地间存在的环境差异最大,表现经度差异为 $1^{\circ}49'15.91''$,纬度差异为 $0^{\circ}50'57.07''$,海拔高差为144 m,说明即使同在亚热带季风气候区,但不同程度石漠化间东西方向差异主要表现在Jaccard指数变化上;Jaccard指数最小的为轻度—极重度,两者的环境差异体现为经度差异为 $1^{\circ}10'09.76''$,纬度差异为 $0^{\circ}25'09''$,海拔高差仅为6 m。这一组数据可以反映出海拔的高低对Jaccard指数变化也产生了一定的影响,海拔高差越小,不同程度石漠化环境间差异越小;反之,环境间差异越大。Jaccard指数也越大,Cody系数也并没有随之变大,说明这几个群落间环境差异性大,具有较大的相异性,即 β 指数。③Cody指数测度分析:Cody指数是二元属性的相异性指数,其值越大,则表示群落的相似性越小,相异性越大。Cody指数侧重于物种的更替,潜在—重度的Cody指数最大,为41.5,可见在石漠化程度变化趋势过程中,物种更替速度在持续增加,到重度石漠化,更替速度达到最大值;重度—极重度这一过程Cody指数最小,仅为23.5,是由于石漠化恶劣到一定程度后,其群落内部物种数量已经十分稀少了,残留下来的都是耐干旱瘠薄的生存能力强的植物,继续恶化向极重度的过程中,能被群落自然剔除的物种已经很少了,故此阶段的更替速率反而出现了一个平缓下降的过程。

4 结论与讨论

湘南石漠化群落调查中共发现维管束植物63科131属173种,与贵州石漠化地段调查中发现70科110属345种相比^[7],虽然种数少了,但是科属数量还是比较接近的,且出现较多的科都同样多为蔷薇科、豆科、大戟科、禾本科等;出现较多的属也相似,多为蔷薇属*Rosa*,悬钩子属*Rubus*,栎属*Quercus*,青冈属*Cyclobalanopsis*等,种出现差异的原因可能是湘南地区随着时间变迁,石漠化程度更为严重,大多数物种都已经死亡或者被提前淘汰,从而导致了物种丰富度出现极大差异的原因;与贵州省紫云县石漠化地区34科61属72种植物相比^[24],湘南物种丰富度明显较多,这与湘南部分县市在石漠化地区施行封山育林,使当地植被得到了一定程度的恢复有关。人为干扰的加剧,导致乔木在轻度石漠化地区中存在的数量都较为稀少,若不加以人工保护,将使轻度石漠化迅速变为中度甚至重度石漠化地区,因此,湘南轻度石漠化恢复至常绿阔叶林或者防止目前石漠化土扩张,都必须及时开始。

湘南石漠化地区植物群落通过 α 多样性分析发现,除了潜在石漠化灌层群落物种丰富度较高外,其余的群落都未超过35,物种丰富低。总体来看, Simpson指数徘徊为0.796 9~0.936 1, Shannon-Wiener

指数为 2.104~7~3.274~6, 表明各群落中物种个体分配较为均匀, 群落多样性较好。Shannon-Wiener 指数在石漠化过程中都呈下降趋势, 与粤北溶岩地区石漠化变化情况比较^[25], 一个从 3.27 降至 2.10, 一个是从 1.98 降至 0.51, 下降幅度类似。这一结论说明目前石漠化地区适宜部分植物生长, 因此, 需要利用好这一特性, 多利用重要值处于前列的青冈栎、细叶青冈、榉树等乔木, 配合牡荆、花竹、六月雪等灌木合理种植, 做好苗期管理, 加强人工抚育, 并在土壤裸露, 土层瘠薄的地方培育一些兰香草、野菊花、芒等草本群落, 以防止水土流失, 多方向共同努力, 遏制石漠化的扩张速度。

通过 β 多样性分析得出结论: 湘南不同程度石漠化群落间环境差异性较大, 但在可能引起差异性的经度、纬度及海拔等因素中, 海拔高低的影响力排在第 1 位, 其次是经度, 最后是纬度。Cody 指数分析则说明了石漠化演替在由轻度石漠化到重度石漠化这一过程中速度特别快, 所以石漠化的治理最主要手段就是要先遏制石漠化的蔓延趋势, 然后同时保护好轻度石漠化及中度石漠化地区, 防止恶化。

在研究中发现, 对于植物演替的过程叙述过于简略, 不同植被在不同程度石漠化地区处于的生态位及生态功能没有深入研究, 且调查范围偏窄, 若能够将整个湖南省甚至全国的石漠化地区做一次摸底清查, 将最适宜恢复石漠化土地的植物分乔木、灌木、草本和藤本进行分层次筛选, 能够在很大程度上促进目前的石漠化恢复进程。

5 参考文献

- [1] 熊康宁, 黎平, 周忠发, 等. 喀斯特石漠化的遥感——GIS 典型研究: 以贵州省为例 [M]. 北京: 地质出版社, 2002.
- [2] 宋维峰. 我国石漠化现状及其防治综述 [J]. 中国水土保持科学, 2007, 5(5): 102~106.
SONG Weifeng. Review of the present situation and combating of rocky desertification in China [J]. *Sci Soil Water Conserv*, 2007, 5(5): 102~106.
- [3] 李梦先. 我国西南岩溶地区石漠化发展趋势 [J]. 中南林业调查规划, 2006, 25(3): 19~22.
LI Mengxian. Stone desertification status quo and its developing trend in southwest China karst area [J]. *Cent South For Inventory Plan*, 2006, 25(3): 19~22.
- [4] 周洁敏. 我国石漠化现状与防治对策 [J]. 林业资源管理, 2009(3): 13~16.
ZHOU Jiemin. The status and combating countermeasures of stony desertification in China [J]. *For Resour Manage*, 2009(3): 13~16.
- [5] 杨成华, 王进, 戴晓勇, 等. 贵州喀斯特石漠化地段的植被类型 [J]. 贵州林业技, 2007, 35(4): 7~12.
YANG Chenghua, WANG Jin, DAI Xiaoyong, et al. Study on the vegetation types in the rocky desertification areas in Guizhou [J]. *J Guizhou For Sci Technol*, 2007, 35(4): 7~12.
- [6] 司彬, 何丙辉, 姚小华, 等. 喀斯特石漠化形成原因及植被恢复途径探讨 [J]. 江西农业大学学报, 2006, 28(3): 392~396.
SI Bin, HE Binghui, YAO Xiaohua, et al. Analysis of causes of rocky desertification in karst areas and discussion on approaches to restoring vegetation [J]. *Acta Agric Univ Jiangxi*, 2006, 28(3): 392~396.
- [7] YUAN Daoxian. *Rock Desertification in the Subtropical Karst of South China* [M]. Berlin: Gerbuer Borntraeger, 1997.
- [8] 陆冠尧, 李森, 魏兴琥, 等. 粤北石漠化地区植被退化过程及其建模 [J]. 生态学杂志, 2013, 32(6): 1629~1635.
LU Guanyao, LI Sen, WEI Xinghu, et al. Vegetation degradation and its modeling in rock desertification area of northern Guangdong, South China [J]. *Chin J Ecol*, 2013, 32(6): 1629~1635.
- [9] 向志勇. 邵阳县石漠化区不同植被恢复模式生物量及营养元素分布 [D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2010.
XIANG Zhiyong. *Study on the Biomass and Nutrient Distribution of Different Patterns Vegetation Restoration Stand in Rocky Desertification Area in Shaoyang County* [D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology, 2010.
- [10] 谢丽萍. 石漠化过程中土壤—植被系统营养元素的协变关系: 以贵州花江峡谷查耳岩小流域为例 [D]. 贵阳: 中国科学院地球化学研究所, 2006.
XIE Liping. *The Nutrient Elements' Co-variances of Soil-vegetation System in the Process of Rocky Desertification: A Case Study of the Chaeryan Small Catchment of Huajiang Gorge Area, Guizhou* [D]. Guiyang: Chinese Academy of

- Sciences. Institute of Geochemistry, 2006.
- [11] 徐杰, 邓湘雯, 方晰, 等. 湘西南石漠化地区不同植被恢复模式的土壤有机碳研究[J]. 水土保持学报, 2012, **26**(6): 171 – 174, 179.
XU Jie, DENG Xiangwen, FANG Xi, *et al.* Soil organic carbon changes in different vegetation restoration types of rocky desertification in southwestern Hunan, China [J]. *J Soil Water Conserv*, 2012, **26**(6): 171 – 174, 179.
- [12] 魏兴琥, 李森, 罗红波, 等. 粤北石漠化过程土壤与植被变化及其相关性研究[J]. 地理科学, 2008, **28**(5): 662 – 666.
WEI Xinghu, LI Sen, LUO Hongbo, *et al.* Changes and correlation of soil and vegetation in process of rock desertification in northern Guangdong Province [J]. *Sci Geogr Sin*, 2008, **28**(5): 662 – 666.
- [13] 涂成龙, 林昌虎, 何腾兵, 等. 黔中石漠化地区生态恢复过程中土壤养分变异特征[J]. 水土保持通报, 2004, **24**(6): 22 – 25, 89.
TU Chenglong, LIN Changhu, HE Tengbing, *et al.* Soil nutrient variation features in rocky, desertified areas undergoing ecological restoration in central Guizhou Province [J]. *Bull Soil Water Conserv*, 2004, **24**(6): 22 – 25, 89.
- [14] STILL S N, MASSE D, NDOUR N Y B, *et al.* Does cropping modify the decomposition function and the diversity of the soil microbial community of tropical fallow soil [J]. *Appl Soil Ecol*, 2006, **31**(3): 211 – 219.
- [15] 向清成. 湘南农业比较优势与农业结构调整[J]. 衡阳师范学院学报: 社会科学版, 2002, **23**(2): 40 – 45.
XIANG Qingcheng. The relative superiority and structure adjustment of agriculture in southern Hunan [J]. *J Hengyang Norm Univ Soc Sci*, 2002, **23**(2): 40 – 45.
- [16] 许自成, 黎妍妍, 肖汉乾, 等. 湘南烟区生态因素与烤烟质量的综合评价[J]. 植物生态学报, 2008, **32**(1): 226 – 234.
XU Zicheng, LI Yanyan, XIAO Hanqian, *et al.* Evaluation of ecological factors and flue-cured tobacco quality in tobacco-growing areas in southern Hunan, China [J]. *J Plant Ecol*, 2008, **32**(1): 226 – 234.
- [17] 王勋俊. 湘南野生植物资源及其开发利用[J]. 衡阳师专学报: 自然科学版, 1996, **14**(6): 44 – 49.
WANG Xunjun. Wild plant resources and their exploitation in south Hunan [J]. *J Hengyang Teach Coll Nat Sci*, 1996, **14**(6): 44 – 49.
- [18] 李森, 董玉祥, 王金华. 土地石漠化概念与分级问题再探讨[J]. 中国岩溶, 2007, **26**(4): 279 – 284.
LI Sen, DONG Yuxiang, WANG Jinhua. Re-discussion on the concept and classification of rocky desertification [J]. *Carsol Sin*, 2007, **26**(4): 279 – 284.
- [19] 苏维词. 喀斯特土地石漠化类型划分及其生态治理模式探讨[J]. 中国土地科学, 2008, **22**(4): 32 – 37.
SU Weici. Types division of karst rocky desertification and a tentative survey of its ecological treatment mode [J]. *China Land Sci*, 2008, **22**(4): 32 – 37.
- [20] WOLDA H. Similarity indices sample size and diversity [J]. *Oecologia*, 1981, **50**(3): 296 – 302.
- [21] KEDDY P. *Wetland Ecology: Principles and Conservation* [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2010.
- [22] WHITTAKER R H. Evolution and measurement of species diversity [J]. *Taxon*, 1972, **21**(2/3): 213 – 251.
- [23] 邢福, 吕宪国, 倪红伟, 等. 三江平原沼泽湿地群落演替系列 β 多样性[J]. 应用生态学报, 2008, **19**(11): 2455 – 2459.
XING Fu, LÜ Xianguo, NI Hongwei, *et al.* β diversity of successional series in marsh communities of Sanjiang Plain [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2008, **19**(11): 2455 – 2459.
- [24] 张敏, 陈世容. 紫云县不同程度石漠化区域植物多样性研究[J]. 草原与草坪, 2015, **35**(1): 78 – 83.
ZHANG Min, CHEN Shirong. Study on the plant diversity of vegetation under different rocky desertification degrees in Ziyun County [J]. *Grassland Turf*, 2015, **35**(1): 78 – 83.
- [25] 罗红波, 魏兴琥, 李森, 等. 粤北岩溶山区土地石漠化过程的植被特征与多样性初步研究[J]. 水土保持研究, 2007, **14**(6): 335 – 339.
LUO Hongbo, WEI Xinghu, LI Sen, *et al.* Changes of bio-productivity and vegetation features in process of rocky desertification: a case study in karst mountainous area, north of Guangdong Province [J]. *Res Soil Water Conserv*, 2007, **14**(6): 335 – 339.

寒地城市生态园林树种组合的植物群落关联性分析

于波涛, 杨天琪, 李臣

(东北林业大学 经济管理学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要: 寒地城市因其气候的特殊性, 树种之间的关联性较为特殊。以黑龙江省为例, 调查常见园林树种的病虫害, 并对树种抗病虫害能力进行分析。运用 χ^2 统计量、联结系数分析树种种间关联性; 根据相同树种间的负密度制约效应, 对树种种内关联性进行研究; 结合树种的抗病力得出 3 组关联性较好的树种, 可作为生态园林的基础植物群落。在关联性研究的基础上, 对树种的最适多度进行研究, 得到 2 种具有明显优势的树种——白桦 *Betula platyphylla* 和水曲柳 *Fraxinus mandschurica*, 可作为黑龙江省生态园林的骨干树种。图 2 表 7 参 22

关键词: 园林学; 寒地城市; 生态园林; 树种关联; 最适多度; 黑龙江

中图分类号: S731.2 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2016)02-0247-10

Analysis on phytocoenosis association of tree species composition in ecological gardens of winter cities

YU Botao, YANG Tianqi, LI Chen

(School of Economics and Management, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China)

Abstract: Due to the unique climate in the winter cities, the association among tree species in these cities is special. Taking Heilongjiang province as an example, this paper surveyed the diseases and insect pests of common garden tree species, and analyzed the disease and insect pest-resistant ability of different tree species. In addition, it analyzed inter-specific association of tree species applying χ^2 statistical magnitude and association coefficient, and conducted research on intra-specific association of tree species as per negative density restriction effect on the same tree species; and obtained three groups of tree species with good association and strong resistance to disease, which can be used as the basic plant communities of ecological garden. On the basis of association research, it conducted research on the optimum abundance of tree species, and obtained two tree species with significant advantages—*Betula platyphylla* and *Fraxinus mandschurica*, which can be used as the dominant tree species of ecological garden. [Ch. 2 fig. 7 tab. 22 ref.]

Key words: landscape architecture; winter city; ecological garden; related species; optimal degrees; Heilongjiang Province

城市作为一个庞大的生态系统, 由社会、经济、自然等子系统有机构成, 具有开放性、脆弱性、依赖性等特征。在寒地城市中, 因其气温的特殊性, 生态环境变得尤为脆弱。在城市中生态园林是具有自净功能的重要组成部分, 在改善环境质量, 维护城市生态平衡、美化环境方面起着重要的作用^[1]。对于生态园林树种选择问题, 传统做法是依靠园林专家或有经验的园林工作者对树种进行定性选择, 而定量的对园林树种选择的方法很少运用。园林植物群落里的树种之间并不是孤立存在的, 而是与其他树种的相互作用, 相互影响中生长, 并表现为或有利或有害的种间关系。产生这种种间关系的原因一般有以下几点: ①相似(正联结)与不相似(负联结)的环境需要; ②一个树种为另一个树种的定居营造了合适条件

收稿日期: 2015-04-27; 修回日期: 2015-05-26

基金项目: 黑龙江省科学技术攻关项目(GC10C10101)

作者简介: 于波涛, 教授, 博士, 从事林业技术经济分析等研究。E-mail: hopebirdyu@126.com

或者前者对后者实施加压力迫使二者形成正联结；③2个树种在资源竞争中互相排斥(生态位重叠)造成两者负联结；④不同树种之间在根系中通过化学因素或者物理因素相互影响，也可能造成树种间正联结或负联结^[2-3]。近年来国内外有不少关于植物群落内部种间关联性的研究，李凌浩等^[4]应用变量分析法、方差分析法， χ^2 统计量等试验方法对长芒草草原生态群落的10种主要植物种间的关联和种群间的关联格局进行了详细研究，结果表明存在45个种间对，其中正相关的种对有6个，负相关的种对有5个，其余皆为不相关种对。刘健等^[5]对天然阔叶混交林进行了研究，检验了105个种间对，11个呈显著正关联，4个呈现显著负相关。刘仲健^[6]根据植物的生长指数，对园林绿化树种进行选择，并根据树种的作用将园林树种分为基调树种、骨干树种和一般树种。先前的研究一般是以森林中的树木作为研究的唯一对象，很少有研究园林树种之间的关联性，对于寒地园林树种的研究更是罕见。对园林树种构成威胁的病虫害的种类较为繁杂，重点研究侵染性病虫害对寒地园林树木的影响。

1 材料与方法

1.1 试验区概况

试验区位于黑龙江省尚志市帽儿山地区东北林业大学实验林场内。该地区属于长白山系支脉张广才岭西坡小岭余脉，为松嫩平原向张广才岭过渡的地山丘陵区。 $45^{\circ}14' \sim 45^{\circ}29'N$, $127^{\circ}29' \sim 127^{\circ}44'E$ 。总面积为 $26\ 291\text{ hm}^2$ ，其中林地面积 $20\ 383.1\text{ hm}^2$ ，非林地面积 944.3 hm^2 ，森林覆盖率为80%。该地区属于温带季风气候，具有明显的大陆性，四季分明，冬季长而寒冷，春季少雨，秋季气候干燥，夏季短而炎热。年平均气温为 2.8°C ，极端低温一般而言能达到 -40°C ，极端高温可达 35°C ，年均降水量为723.8 mm，主要集中于6-8月，年日照数为247.3 h，无霜期120~140 d^[7-8]。

1.2 研究方法

1.2.1 受害程度分析法 以黑龙江省为例，对哈尔滨市、伊春市、黑河市、牡丹江市的主要的园林树种所遭受的病虫害情况进行调查；采用抽样调查的试验方法，采集主要的病虫害信息及树木受害程度。所选取的试验地为黑龙江省森林植物园(哈尔滨)、梅花山国家森林公园(伊春市)、黑河森林公园、牡丹江人民公园。采取定点抽样的调查方法，根据园林中绿化区域的实际情况选取50~60株树木进行详细调查，并记录病虫害的寄主、为害树木的部位及为害程度。将它划分为4个等级(表1)。根据上述标准对园林常见树木进行详细调查。

表1 树木病虫害危害等级评价标准

Table 1 Evaluation standard on hazardrating of treediseases and insect pests

树木受害等级	受害表现
+	叶片危害率低于20%；杆茎部危害低于1/4周长
++	叶片危害率在20%~50%；干茎部危害在1/4~2/4周长之间
+++	叶片危害率在50%~70%之间，干茎部危害在2/4~3/4周长之间
++++	叶片受害率大于70%或者死亡，干茎危害大于3/4周长或者死亡

1.2.2 取样方法 2012年6月在帽儿山林场试验区建立 $100\text{ m} \times 100\text{ m}$ 的检测样地，将监测样地按照网格法划分成100个 $10\text{ m} \times 10\text{ m}$ 的样方，从中选择出具有群落代表性的样地45块并做好标记以备复查。对于样方中生长指数大于60的树种进行详细调查。记录树种的名称、种类、树高级别、胸径、健康等级，健康等级的划分条件^[9]见表2。参照上表并根据公式(1)计算每类植物的生长指数。

表2 树木健康等级评价标准

Table 2 Evaluation standard on tree health level

健康等级	植物表现
0	枝条干枯，整株濒死，甚至死亡，观赏价值丧失
1	生长态势衰弱，病虫害严重，树相残破，有碍观赏
2	生势较好，姿态一般，时有病虫害或风折，有一定观赏价值
3	姿态及生势良好，有少量病虫害，具有较大的观赏价值
4	姿势优美，生长态势较好，无病虫害，具有较强的抵挡自然灾害能力，相当高的观赏价值

$$\text{生长指数} = \frac{\sum \text{每级株数} \times \text{各该级代表数值}}{\text{总株数} \times \text{最高一级数}}。 \quad (1)$$

1.2.3 种间关联度计算方法 对树种种间关联性分析, 首先要根据树种在其样方内的存在与否的数据编制 2×2 联列表。表 3 内 a 为物种 A 和 B 存在的样方数; b 为物种 B 存在而 A 不存在的样方数; c 为 A 存在而 B 不存在的样方数; d 为 2 个物种都不存在的样方总数; N 为样方总数。基于 2×2 列表, 使用 χ^2 统计量检测物种间的关联性。公式为: $\chi^2 =$

$$\frac{n[|ad-bc|-n/2]^2}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)}。 \text{其中, } n \text{ 为调查的小样方的总数, } \chi^2 \text{ 近似服从自由度为 1 的 } \chi^2 \text{ 分布, 当 } \chi^2 < 3.84 \text{ 时, 相比较的两物种间相互独立; 当 } 3.84 \leq \chi^2 < 6.64 \text{ 时 2 个物种间存在一定的生态关联; 当 } \chi^2 \geq 6.64 \text{ 时, 物种间存在着显著的生态关联。} \chi^2 \text{ 不存在负值, 这一指标只能反映物种间的关联强度, 但是无法判定正负关联。判定正负关联的方式为: 当 } ad > bc \text{ 时, 物种间为正关联; 当 } ad < bc \text{ 时, 物种间为负关联}^{[10]}。 \text{为进一步测定物种间的关联度, 采用物种间联接系数 } A_c, A_c \text{ 的值域为 } [-1, 1]。 \text{若 } A_c \text{ 的值趋近于 1, 表明物种间具有较强的正关联; 若 } A_c \text{ 的值趋近于 } -1, \text{ 表明物种间具有较强的负关联; 若 } A_c \text{ 值为 } 0, \text{ 表明物种间完全独立}^{[11-14]}。 A_c \text{ 的计算公式为: 如 } ad > bc, A_c = \frac{ad-bc}{(a+b)(b+d)}; \text{如 } ad < bc, \text{且 } d \geq a, A_c = \frac{ad-bc}{(a+b)(a+c)}; \text{如 } ad < bc, \text{且 } d < a, A_c = \frac{ad-bc}{(d+b)(d+c)}。$$

1.2.4 物种重要值计算方法 在植物群落内物种重要值是衡量某个物种在群落中的作用和地位的综合数量指标, 进而确定群落的优势度与显著度。对于园林树木群落而言, 通过进行物种重要值进行分析, 可以确定出园林中的优势树种。在研究植物群落的重要值时, 常常将多度、优势度、频度、盖度作为度量植物群落重要值的指标^[15-17]。重要值(importance value, I_v)的计算公式为: 乔木群落重要值 $I_v = (\text{相对多度} + \text{相对优势度} + \text{相对频度})/3$; 灌木群落重要值 $I_v = (\text{相对多度} + \text{相对盖度} + \text{相对频度})/3$; 其中: 相对多度=(某植物的个体总数/同一生活型植物个体总数)×100%; 相对盖度=(某植物的盖度/全部植物的总盖度)100%; 相对优势度=(该种个体胸面积和/样方中全部个体面积总和)100%; 相对频度=(该种的频度/所有种的频度之和)100%。

2 结果与分析

2.1 寒地园林树种关联性的受害程度分析

通过对黑龙江省 4 地的园林树种受害情况的调查, 采集到为害园林树种的虫害 30 种, 其中鞘翅目 Coleoptera 类昆虫 10 种占 33%, 鳞翅目 Lepidoptera 类昆虫 13 占 43%, 其他类害虫 7 种占 17%。在这 30 种虫害中较为常见为害树种严重的有 5 种, 分别为 榆毒蛾 *Ivela ochropoda*, 四点象天牛 *Coleoptera*, 黄褐天幕毛虫 *Malacosoma neustria testacea*, 榆木蠹蛾 *Holcocerus vicarius*, 榆紫叶甲 *Ambrostoma quadri-impressum*。其中榆毒蛾、黄褐天幕毛虫、榆木蠹蛾为叶部害虫, 四象点天牛、榆紫叶甲为枝干部害虫。在调查的这 30 种虫害中, 叶部害虫较为普遍, 在调查全区均有分布, 总体发生率达到 36.4%。在园林中害虫大量取食树叶, 但是很少发现树木因虫害死亡现象。在食叶害虫中, 危害最大是黄褐天幕毛虫, 主要以蔷薇科 Rosaceae 植物为主要取食对象, 虫害大面积爆发时每株树上可见几十个网幕。枝干部害虫种类较少, 发生大面积灾害的几率较低, 但对园林树木的破坏严重, 能够造成树木的风折、肿瘤甚至是整株死亡。更为严重是目前在生产上还没有十分有效的控制办法。根部害虫较少, 虫子主要危害一些幼树。

本次试验采集到园林树木病害 12 种, 从树种的为害部位统计, 叶部病害 6 种, 枝干部病害 3 种, 根部病害 3 种。其中, 为害树种较为主要的病害有锈病、白粉病、煤污病、炭球菌病腐、根腐病、白腐病。对树种危害最为严重的为枝干部病害, 虽然其发病率仅为 3.6%, 一旦发病, 凭借其侵染力, 能够

表 3 2×2 列表Table 3 2×2 contingency table

项目	物种 B		总计	
	有	无		
物种 A	有	a	b	$a+b$
	无	c	d	$c+d$
总计		$a+c$	$b+d$	$N=a+b+c+d$

导致树木大面积的严重损害甚至死亡。

根据实验数据,分析得到黑龙江省主要树种的病虫害情况,见表4。通过对树种的病虫害的分析研究可知,在常见的17种树种中,抗性较好的树种有白桦 *Betula platyphlla*, 暴马丁香 *Syringa reticulata* var. *amurensis*, 早花忍冬 *Lonicera ruprechtiana*, 黄檗 *Phellodendron amurense*, 色木槭 *Acer mono*, 紫椴 *Tilia amurensis*, 易感病虫害的树种有柳树 *Salix*, 春榆 *Ulmus propinqua*, 榆树 *Ulmus laciniata*, 山杨 *Populus davidiana*。易感病树种对多种病虫害的抗性都较为薄弱,在寒地园林设计中应减少对易感病树种的应用,在种植期间应当重点关注,做到预防为主,及时防治。在虫害中对四点象天牛对树种具有较为普遍的影响,由于其属于枝干部害虫,防治较为困难,对树种的危害较为严重,在树种配置时应当将易感四点象天牛的树种分开种植。在病害中,对树木危害较为普遍和严重的是白粉病与根腐病。通过对树木之间的病虫害调查研究,得出较为满意的树种组合有:①黄檗,紫椴,早花忍冬,白桦;②水曲柳 *Fraxinus mandshurica*, 白桦,色木槭,落叶松 *Larix gmelinii*;③兴安茶藨 *Ribes pauciflorum*, 枫桦 *Betula costata*, 紫椴,色木槭。

表4 寒地园林常见树种病虫害发生情况调查

Table 4 Questionnaire for common garden tree pest in cold region

树种	虫害					病害					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
水曲柳 <i>Fraxinus mandshurica</i>		++		+			+				+
春榆 <i>Ulmus propinqua</i>	++	+		+	+						+
榆树 <i>Ulmus laciniata</i>	++	++		++	++		+	+	+		+
山杨 <i>Populus davidiana</i>	+						+	+	+	+	+
白桦 <i>Betula platyphlla</i>				+							+
暴马丁香 <i>Syringa reticulata</i> var. <i>amurensis</i>											
柳树 <i>Salix</i> sp.	+	+++	++	+			++	++			
兴安茶藨 <i>Ribes pauciflorum</i>											+
核桃揪 <i>Juglans mandshurica</i>		++					+				++
枫桦 <i>Betula costata</i>			+				+		+		
暖木条莢蒾 <i>Viburnum burejaeticum</i>											
早花忍冬 <i>Lonicera ruprechtiana</i>	+										
落叶松 <i>Larix gmelinii</i>						++					++
紫椴 <i>Tilia amurensis</i>									+		
蒙古栎 <i>Quercus mongolica</i>	+		++					+		+	
黄檗 <i>Phellodendron amurense</i>							+	+			+
色木槭 <i>Acer mono</i>											+

说明: 1. 榆毒蛾 *Ivela ochropoda*, 2. 四点象天牛 *Coleoptera*, 3. 黄褐天幕毛虫 *Malacosoma neustria testacea*, 4. 榆木蠹蛾 *Holcocerus vicarius*, 5. 榆紫叶甲 *Ambrostoma quadriimpressum*, 6. 锈病 *Gymnosporangium asiaticum*, 7. 白粉病 *Uncinula mandshurica*, 8. 煤污病 *Capnodium* spp., 9. 炭球菌病腐 *Daldinia concentrica*, 10. 根腐病 *Heterobasidion annosum*, 11. 白腐病 *Trametes abietis*。

2.2 寒地园林树种联结关系分析

根据对45块样地调查数据可知,在帽儿山试验林区内共有树种28种,其中乔木16种,灌木12种。乔木树种的平均高度18.0~20.0 m,覆盖率为60%,林下灌木的平均高度为3.5~4.0 m,覆盖率为75%。在试验区选取生长指数大于60的树种进行研究。

在试验区符合要求的乔木有11种,分别为:水曲柳,色木槭,黄波罗 *Phellodendron amurense*, 山杨,白桦,核桃揪 *Juglans mandshurica*,枫桦,春榆,紫椴,蒙古栎 *Quercus mongolica*,榆树;灌木9种分别为三裂绣线菊 *Spiraea trilobata*,暴马丁香,东北山梅花 *Philadelphus schrenkii*,灯笼果 *Ribes pauciflorum*,早花忍冬,卫矛 *Evonymus sacrosanta*,兴安茶藨,暖木条莢蒾,鼠李 *Rhamnus davurica*。树种的代码、频度,胸径、生长指数数据见表5。

表5 样地树种状况

Table 5 Status of the plant species in sampling plots

代码	种名	类别	频度/%	平均胸径/cm	生长指数
1	水曲柳 <i>Fraxinus mandshurica</i>	乔木	94.2	20.4	78.5
2	三裂绣线菊 <i>Spiraea trilobata</i>	灌木	90.7	8.5	75.0
3	色木槭 <i>Acer rmono</i>	乔木	90.2	10.3	76.0
4	黄檗 <i>Phellodendron amurense</i>	乔木	90.1	20.0	76.3
5	山杨 <i>Populus davidiana</i>	乔木	85.6	24.2	74.6
6	白桦 <i>Betula platyphilla</i>	乔木	82.5	14.1	79.5
7	暴马丁香 <i>Syringa reticulata</i> var. <i>amurensis</i>	灌木	80.7	5.3	75.0
8	东北山梅花 <i>Philadelphus schrenkii</i>	灌木	80.3	19.6	79.6
9	兴安茶藨 <i>Ribes pauciflorum</i>	灌木	74.9	10.6	75.2
10	核桃楸 <i>Juglans mandshurica</i>	乔木	72.2	22.9	68.3
11	枫桦 <i>Betula costata</i>	乔木	60.6	23.7	73.1
12	春榆 <i>Ulmus japonica</i>	乔木	55.3	12.6	75.0
13	早花忍冬 <i>Lonicera ruprechtiana</i>	灌木	45.6	9.2	73.6
14	卫矛 <i>Evonymus sacrosanta</i>	灌木	40.6	15.6	60.6
15	鸡树条荚蒾 <i>Viburnum sargentii</i>	灌木	40.5	10.6	75.0
16	紫椴 <i>Tilia amurensis</i>	乔木	20.3	20.0	78.0
17	蒙古栎 <i>Quercus mongolica</i>	乔木	20.3	23.6	68.4
18	暖木条荚蒾 <i>Viburnum burejaeticum</i>	灌木	19.6	9.8	65.3
19	榆树 <i>Ulmus laciniata</i>	乔木	10.1	23.5	72.6
20	鼠李 <i>Rhamnus davurica</i>	灌木	6.5	2.3	60.4

2.2.1 植物种群内树种的种间关联性 分别根据树种间 χ^2 检验的的数值和 A_c 值, 做出树种联结星座图和树种关联半矩阵图(图1)。除了卫矛种群与其他树种没有明显的关联外, 其余的 19 种树种之间都存在着一定的关联, 19 种树种之间有 28 个种对存在显著的关联, 其中显著正关联的要比显著负关联的种对多。白桦和水曲柳表现为极显著的正相关, 这有可能是由于两者作为混交林的先锋物种, 都具有较强的侵入性, 两者共同构成了混交林的初始群落群落的主要树种, 但随着其他树种的不断侵入和土壤种子库中原有群落树木种子的萌发, 它们的优势地位被替代, 但是两者之间还是保持着极显著的关联, 水曲柳与白桦具生态属性相近, 都喜光, 喜湿润土壤^[18]。白桦与暖木条荚蒾, 暖木条荚蒾与榆树之间同样存在着显著的正关联, 原因是它们喜光、耐荫。山杨与白桦、榆树与白桦之间存在着显著负关联, 主要原因是白桦喜湿润土壤, 而山杨与榆树则属于抗寒性较强的树种。灌木与乔木之间大致表现为弱负相关, 因为乔木的树高较高, 遮挡灌木。由图2可以看出: 在 20 个树种种群、190 个种对之间的联结强度 A_c 中, 正负关联的强度与数量大致相同, 其中有 45 个关正联的树种对, 40 个负关联的树种对; 显著正关联的树种($A_c \geq 0.2$)有 9 对, 占总对数的 4.7%; 显著负关联的树种($A_c \leq -0.2$)有 9 对总数的 4.7%。综合图1与图2的结果我们可以看出具有较好关联的树种组有: ①白桦、早花忍冬、紫椴、鸡树条荚蒾

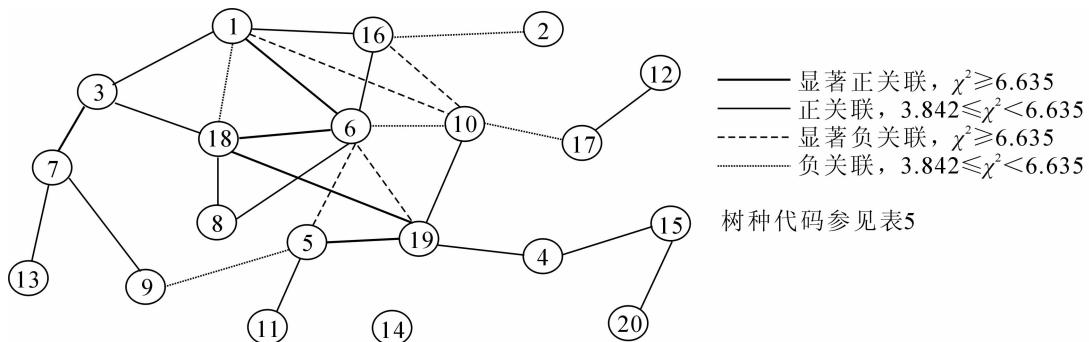


图1 树种种间关联星座图

Figure 1 Association constellations between various trees

Viburnum sargentii; ②榆树、暴马丁香、三裂绣线梅、卫矛; ③水曲柳、黄檗、白桦、兴安茶藨; ④色木槭、兴安茶藨、枫桦、鼠李。

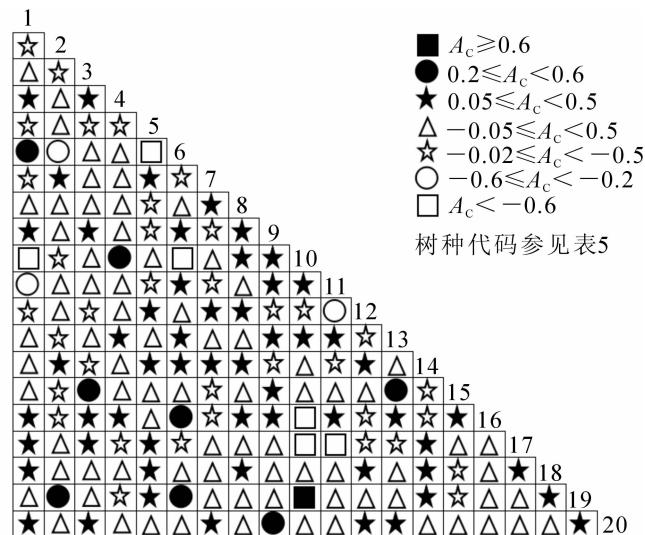


图2 树种种间关联半矩阵图

Figure 2 Semi-matrix graph of inter-specific association of tree species

根据上述的试验分析结论并结合寒地树种病虫害分析,可知两者的试验结论相近,在对于关联性较好的树种组合上具有明显的相似性。将上述实验的结论相结合得出4组较好的树种组合。①白桦、早花忍冬、紫椴、水曲柳、色木槭。白桦、紫椴、水曲柳、色木槭为落叶乔木,早花忍冬为落叶灌木,适宜生长在杂木林下并且具有较好的耐阴性,乔灌木的有机组合适宜生态系统的恢复。在病虫害方面上述5种树木没有相同的易感病虫害,这为树种在园林中的应用提供了生物学基础。在关联性试验中,白桦、早花忍冬、紫椴为较好的关联组合,水曲柳与白桦的具有较显著的正关联,色木槭与紫椴、水曲柳也存在正关联,关联度一般。这5种树木在关联性试验中树种之间并没有出现负关联现象。②水曲柳、白桦、兴安茶藨、暴马丁香、黄檗。水曲柳、白桦、暴马丁香属于落叶乔木,黄檗属于阔叶乔木、兴安茶藨属于落叶灌木。上述5种树木在病虫害试验方面,不存在相同的易感病虫害,有利于增强园林树种对病虫害的抵御能力,同时可以降低生态园林的管理维护成本。在关联度试验方面水曲柳与白桦、兴安茶藨、黄檗之间存在明显正相关;水曲柳与暴马丁香之间存在着负相关,究原因是两者都是大乔木,成株株高均超过10 m,不耐阴,喜光,两者的冠幅较大,竞争较为激烈,在栽植时加大两者的株间距即可解决这一负相关问题。③色木槭、兴安茶藨、枫桦、紫椴、早花忍冬。色木槭、枫桦、紫椴为落叶乔木,兴安茶藨、早花忍冬为落叶灌木。这5种树木在病虫害实验方面大致不相关,其中兴安茶藨与色木槭都受到根腐病的影响,但两者均是能够感染根腐病,根腐病对两者的影响不大,主要影响对树种的幼苗产生影响,在栽培初期对这两种树种稍加看护,能避免根腐病的发生。

2.2.2 植物群落内树种的种内关联性分析 相同树种之间的关联性(称之为种内关联性),是由于同种树种之间的资源竞争、有害生物的侵害等原因可能发生相互损害的行为,我们称这种行为为负密度制约效应^[19]。负密度制约机制主是在较小范围内降低附近群落中同种植物个体的成长率,同时提高同种个体死亡率,进而为其他植物的在其周围的生存提供了有利的条件,促进了物种间的共同生存^[20]。对于负密度制约效应的存在应当在园林应用时尤其注意,同种树种之间不适宜进行过分密植,植株之间应保持一定的间距或是保持适当的混交比例,从而避免此类效应的发生。通过生物学试验不难发现,许多树种对某一病害的抵抗力较为薄弱,在园林配植时应当尤为关注。榆树对病虫害的抵抗力较为薄弱,尤其是榆紫叶甲。榆紫叶甲成虫大量取食榆树的嫩芽和幼叶,具有较快的繁殖速度,一旦将榆树也全部吃完后将集体进入休眠状态,在榆树间具有极强的侵染力,在种植榆树时,同种树木间距应当加大,防止榆紫叶甲的大面积爆发,在树种关联性试验中发现生长态势较好的榆树之间的间距一般在5 m以上。分别统计树种易感病虫害,分析病虫害所具备的侵染力及影响范围,并据此得出得出同种树种之间适宜树种生长的

最小植株间距(表6)。

表6 树种最小植株间距

Table 6 Minimum spacing between plant species

代码	种名	株间距/(m×m)	代码	种名	株间距/(m×m)
1	水曲柳	1.5×2.0	11	枫桦	1.5×2.0
2	三裂绣线菊	2.0×2.0	12	春榆	2.0×3.0
3	色木槭	2.0×2.0	13	早花忍冬	1.5×1.5
4	黄檗	1.2×2.0	14	卫矛	1.5×2.0
5	山杨	3.0×3.0	15	鸡树条莢蒾	1.5×2.0
6	白桦	2.0×2.5	16	紫椴	2.5×3.0
7	暴马丁香	1.5×1.5	17	蒙古栎	2.5×3.0
8	东北山梅花	1.2×1.5	18	暖木条莢蒾	1.2×1.5
9	兴安茶藨	1.5×1.5	19	榆树	5.0×4.0
10	核桃楸	2.0×2.0	20	鼠李	1.5×1.5

2.3 植物群落的物种重要值分析

物种的多样性决定着生态系统的稳定性,植物群落中的优势树种决定着生态园林的恢复力,在树种关联性的基础上,将物种重要值引入到生态园林的研究中。为更好地研究群落各树种的重要值,使样本具有更好的代表性,将上述实验地划分为20 m×20 m的标准样方25个,对各样方中的树种情况进行统计分析。由表7可知:在25个标准样方中,白桦和水曲柳的重要值都排在前2位。这2种树种的个体数多、拥有较高的生物量、投影盖度较大、体积较大、生长寿命长、生存能力强、优势度较大,对整个帽儿山试验林场的植物群落环境与结构的形成具有主导作用。这表明试验样地的整体群落处于相对稳定的状态,并且整群落的建群种、优势种也是相对稳定。在每个样方群落内部都存在着显著的差异,除第1位和第2位的树种相对稳定外第3~5位的树种都是在不断变化。这表明在寒地城市的树种选择上应当优先考虑使用白桦与水曲柳,将二者作为寒地城市园林建设的骨干树种。

3 结论

树种的选择对于城市园林的发展至关重要,城市园林中树种的分布不仅受到自然因素的影响,还要受到社会因素的干扰^[21~22]。在自然条件下,树种自身的生长状况不仅仅与生长的地域环境有关而且还受到树种间相互作用的影响。对帽儿山试验林场的调查可知,生长指数在60以上的树种,已基本适应黑龙江省的气候条件,可将其作为发展寒地城市园林的骨干树种着重发展,生长指数处于50~60的树种,经过驯化也可以在寒地园林中种植,以增加城市园林树种的多样性和观赏性。

通过对黑龙江省常见的17种树种对病虫害的抗性进行分析,获得了3组较好的树种组合,综合经帽儿山树种关联性试验得出的4组树种组合,更为准确地得到较好的树种组合为:①白桦、早花忍冬、紫椴、水曲柳、色木槭;②水曲柳、白桦、兴安茶藨、暴马丁香;③色木槭、兴安茶藨、枫桦、紫椴、早花忍冬。这3组树种组合可以作为城市园林设计中的基调树种进行运用,在进行生态园林设计时作为参考。在树种配置方面,要保持生态群落内植物的最大正关联。根据上述树种组合形成基础植物群落,为增加物种多样性可进行植物群落内的交叉组合,在组合时要避免呈现显著负关联树种的出现。

通过对相同树种之间的关联性分析可知,相同树种之间存在负密度制约效应,同种树栽培时一定注意树间距,也就是要控制树种的密度,在一定的空间内种植合适的数量,以求生态效益的最大化。在树种关联度分析的基础上,通过对植物的重要值的研究确定了帽儿山地区的优势树种,水曲柳与白桦,可以将这2种树种作为寒地地区园林的骨干树种,这2种树种的适应性强对其他树种的影响多为正相关的关联。减少对榆树、春榆、杨柳易感病虫害的树种在寒地生态园林中的应用。

表7 试验样方中重要值前5位的树种

Table 7 Top-5 tree species with important value in experiment quadrat

样地	植物名	重要值	样地	植物名	重要值	样地	植物名	重要值
1	白桦	35.52	10	水曲柳	35.66	19	水曲柳	36.33
	山杨	19.44		白桦	31.28		白桦	30.25
	水曲柳	18.63		三裂绣线梅	30.67		色木槭	28.43
	榆树	12.25		胡桃楸	28.66		黄檗	26.58
	东北山梅花	10.21		山杨	25.43		核桃楸	24.36
2	白桦	36.33	11	白桦	34.36	20	水曲柳	31.25
	水曲柳	24.35		水曲柳	33.03		白桦	28.73
	黄檗	22.84		核桃楸	26.59		山杨	24.56
	山杨	15.74		暴马丁香	24.99		东北山梅花	23.19
	暖木条莢蒾	15.64		山杨	20.65		枫桦	19.81
3	水曲柳	33.75	12	水曲柳	36.25	21	水曲柳	33.49
	白桦	29.56		白桦	34.31		白桦	30.56
	山杨	26.32		黄檗	30.09		色木槭	27.63
	核桃楸	19.31		核桃楸	25.33		兴安茶藨	24.17
	色木槭	16.54		紫椴	21.95		春榆	19.86
4	水曲柳	35.46	13	白桦	32.39	22	水曲柳	29.83
	白桦	32.65		水曲柳	27.63		白桦	24.66
	暖木条莢蒾	28.36		山杨	24.33		核桃楸	20.63
	核桃楸	24.57		核桃楸	20.19		山杨	18.43
	黄檗	19.62		黄檗	18.54		色木槭	16.91
5	水曲柳	42.96	14	白桦	30.56	23	水曲柳	31.51
	白桦	35.4		水曲柳	28.86		白桦	29.13
	榆树	30.62		黄檗	26.31		色木槭	26.37
	暖木条莢蒾	25.63		色木槭	20.45		黄檗	24.13
	山杨	19.5		核桃楸	17.16		三裂绣线菊	22.16
6	水曲柳	36.32	15	水曲柳	32.88	24	白桦	34.59
	色木槭	30.96		白桦	30.69		水曲柳	32.13
	白桦	28.63		核桃楸	28.79		山杨	28.34
	山杨	24.19		色木槭	25.44		黄檗	22.17
	紫椴	19.56		暴马丁香	21.06		色木槭	20.19
7	白桦	32.67	16	白桦	37.56	25	水曲柳	35.48
	水曲柳	29.88		水曲柳	34.11		白桦	30.91
	榆树	24.63		色木槭	30.97		山杨	27.88
	核桃楸	19.56		胡桃楸	26.49		色木槭	23.18
	黄檗	17.36		榆树	21.59		核桃楸	19.55
8	水曲柳	36.98	17	水曲柳	31.55			
	白桦	31.36		色木槭	28.37			
	山杨	30.36		白桦	27.19			
	榆树	26.38		榆树	24.71			
	色木槭	19.56		蒙古栎	20.53			
9	白桦	35.56	18	水曲柳	29.55			
	水曲柳	32.39		白桦	25.86			
	山杨	24.36		山杨	20.63			
	黄檗	22.56		榆树	17.56			
	蒙古栎	19.64		紫椴	14.33			

4 参考文献

- [1] 王祥荣. 生态园林与城市环境保护[J]. 中国园林, 1998, **14**(2): 12 – 14.
WANG Xiangrong. Ecological landscape architecture and urban environmental protection [J]. *Chin Landsc Archit*, 1998, **14**(2): 12 – 14.
- [2] 周先叶, 王伯荪, 李鸣光, 等. 广东黑石顶自然保护区森林次生演替过程中群落的种间联结性分析[J]. 植物生态学报, 2000, **24**(3): 332 – 339.
ZHOU Xianye, WANG Bosun, LI Mingguang, et al. An analysis of interspecific associations in secondary succession forest communities in Heishiding Natural Reserve Guangdong Province [J]. *Acta Phytocen Sin*, 2000, **24**(3): 332 – 339.
- [3] 赵则海, 祖元刚, 杨逢建, 等. 东灵山辽东栎林木本植物种间联结取样技术的研究[J]. 植物生态学报, 2003, **27**(3): 396 – 403.
ZHAO Zehai, ZU Yuangang, YANG Fengjian, et al. Study on the sampling technique of interspecific association of ligneous plant in *Quercus liaotungensis* forest in Dongling Mountain [J]. *Acta Phytocen Sin*, 2003, **27**(3): 396 – 403.
- [4] 李凌浩, 史世斌. 长芒草草原群落种间关联与种群联合格局的初步研究[J]. 生态学杂志, 1994, **13**(3): 62 – 67.
LI Linghao, SHI Shibin. Preliminary study on inter specific association and combined population patterns of *Stipa bungeana* Steppe community [J]. *Chin J Ecol*, 1994, **13**(3): 62 – 67.
- [5] 刘健, 邓旺灶, 韦德煌, 等. 天然针阔混交林优势种群间联结关系[J]. 应用与环境生物学报, 1999, **5**(5): 468 – 472.
LIU Jian, DENG Wangzao, WEI Dehuang, et al. Interspecific association of the predominant species in a natural coniferous-broadleaved mixed forest [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 1999, **5**(5): 468 – 472.
- [6] 刘仲健. 深圳市园林绿化的植物配置和树种选择的分析[J]. 中国园林, 1992, **8**(1): 26 – 32.
LIU Zhongjian. Landscaping plants and trees chosen configuration analysis of Shenzhen [J]. *Chin Landsc Archit*, 1992, **8**(1): 26 – 32.
- [7] 李淑娟. 帽儿山地区森林景观动态过程及景观生态评价[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2004.
LI Shujuan. *Dynamic Processes of Forest Landscape and Evaluation of Forest Landscape Ecology in Maoershan Region* [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2004.
- [8] 闫明准. 帽儿山地区天然次生林单木生长模型的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2009.
YAN Mingzhun. *The Study on the Individual Tree Growth Models of the Natural Secondary Forest in Maoershan Forest Region* [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2009.
- [9] 王晓春, 徐强, 周晓峰, 等. 扬州城市绿地植物群落树种组合的选择[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2008, **32**(3): 74 – 78.
WANG Xiaochun, XU Qiang, ZHOU Xiaofeng, et al. Selection of tree species composition of urban green-space in Yangzhou City [J]. *J Nanjing For Univ Nat Sci Edi*, 2008, **32**(3): 74 – 78.
- [10] 奇凯, 张春雨, 侯继华, 等. 赤峰市沙地油松林草本植物多样性及种间关联动态[J]. 生态学报, 2010, **30**(18): 5106 – 5112.
QI Kai, ZHANG Chunyu, HOU Jihua, et al. Dynamics of species diversity and interspecific associations of herbaceous plants in a *Pinus tabulaeformis* forest on a sandy site in Chifeng, China [J]. *Acta Ecol Sin*, 2010, **30**(18): 5106 – 5112.
- [11] 杜楠楠, 刘常富. 沈阳树木园木本植物优势种间关联性研究[J]. 北方园艺, 2013(10): 53 – 57.
DU Nannan, LIU Changfu. Interspecific association research on the dominant species of woody plant in Shenyang arboretum [J]. *Northern Hortic*, 2013(10): 53 – 57.
- [12] 程瑞梅, 王瑞丽, 刘泽彬, 等. 三峡库区栲属群落主要乔木种群的种间联结性[J]. 林业科学, 2013, **49**(5): 36 – 42.
CHENG Ruimei, WANG Ruili, LIU Zebin, et al. Interconnection among species of dominant tree populations of *Casuarina* community in Three Gorges Reservoir Region [J]. *Sci Silv Sin*, 2013, **49**(5): 36 – 42.
- [13] 刘金福, 洪伟, 樊后保, 等. 天然格氏栲林乔木层种群间关联性研究[J]. 林业科学, 2001, **37**(4): 117 –

- 123.
- LIU Jinfu, HONG Wei, FAN Houbao, *et al.* Study on the inter specific association of species in the vegetation layer in *Castanopsis kawakamii* forest [J]. *Sci Silv Sin*, 2001, **37**(4): 117 – 123.
- [14] WARD J S, PARKER G R, FERRANDINO F J. Long term spatial dynamics in an old growth deciduous forest [J]. *For Ecol Manage*, 1996, **83**(3): 189 – 202.
- [15] 李雪梅, 程小琴. 生态位理论的发展及其在生态学各领域中的应用[J]. 北京林业大学学报, 2007, **29**(增刊2): 294 – 298.
- LI Xuemei, CHENG Xiaoqin. Development of niche theory and its application in each fields of ecology [J]. *J Beijing For Univ*, 2007, **29**(supp 2): 294 – 298.
- [16] JONATHAN S, MIKE D, DAVID G. Phylogeny and the niche structure of meadow plant Communities [J]. *J Ecol*, 2001, **89**(3): 428 – 435.
- [17] 刘常富, 何兴元, 陈玮, 等. 沈阳市建成区树种结构分析[J]. 沈阳农业大学学报, 2004, **35**(2): 116 – 121.
- LIU Changfu, HE Xingyuan, CHEN Wei, *et al.* Analysis of tree species structure in Shenyang Built-Up Area [J]. *J Shenyang Agric Univ*, 2004, **35**(2): 116 – 121.
- [18] 郭忠玲, 马元丹, 郑金萍, 等. 长白山落叶阔叶混交林的物种多样性、种群空间分布格局及种间关联性研究[J]. 应用生态学报, 2004, **15**(11): 2013 – 2018.
- GUO Zhongling, MA Yuandan, ZHENG Jinping, *et al.* Biodiversity of tree species, their populations spatial distribution pattern and interspecific association in mixed deciduous broadleaved forest in Chanebai Mountains [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2004, **15**(11): 2013 – 2018.
- [19] 徐建, 韦新良, 王敬, 等. 龙王山落叶阔叶林优势树种的种内种间竞争[J]. 浙江农林大学学报, 2014, **31**(6): 868 – 876.
- XU Jian, WEI Xinliang, WANG Jing, *et al.* Intraspecific and interspecific competition of dominant species in a deciduous, broadleaf forest of Longwang Mountain [J]. *J Zhejiang A & F Univ*, 2014, **31**(6): 868 – 876.
- [20] 王薇, 饶米德, 陈声文, 等. 负密度制约和生境过滤对古田山幼苗系统发育多样性时间变化的影响[J]. 科学通报, 2014, **59**(19): 1844 – 1850.
- WANG Wei, RAO Mide, CHEN Shengwen, *et al.* Effects of negative density dependence and habitat filtering on temporal variation in phylogenetic community structure of seedlings in a mid-subtropical forest [J]. *Chin Sci Bull*, 2014, **59**(19): 1844 – 1850.
- [21] 姚泽. 武威市城市园林绿化树种选择及适宜性评价[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2006.
- YAO Ze. *Suitability Evaluation and Selection of urban Landscaping Tree Species in Wuwei* [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2006.
- [22] 于波涛, 齐木村. 寒地城市功能性生态园林树种选择技术[J]. 浙江农林大学学报, 2015, **32**(5): 743 – 748.
- YU Botao, QI Mucun. Species selection for ecological garden trees in winter cities [J]. *J Zhejiang A & F Univ*, 2015, **32**(19): 743 – 748.

不同坡位柳杉人工林夏季土壤动物群落特征

肖玖金^{1,2}, 林宏贵³, 周 鑫¹, 尤 花¹, 李 云¹, 张 健²

(1. 四川农业大学 都江堰校区, 四川 都江堰 611830; 2. 四川农业大学 生态林业研究所, 四川 温江 611130; 3. 阿坝藏族羌族自治州 旅游经济研究所, 四川 汶川 623000)

摘要: 为研究柳杉 *Cryptomeria fortunei* 人工林不同坡位土壤动物群落结构特征, 采用手检法和干湿漏斗法在四川盆地西缘山地 3 个不同坡位(海拔分别为 1 088 m, 987 m 和 830 m)的柳杉人工林设置样地(分别为样地 I, 样地 II 和样地 III)进行土壤动物群落调查。结果显示: 试验所采集到的土壤动物平均密度为 3.46×10^4 只· m^{-2} , 隶属于 5 门 13 纲 94 类, 其中, 土壤动物密度和类群数均以样地 III 最高, 分别为 6.53×10^4 只· m^{-2} 和 66 类, 以样地 I 最低, 分别为 1.35×10^4 只· m^{-2} 和 38 类, 土壤动物密度和类群数呈现出随坡位高度增加而减少的趋势; 从垂直分布来看, 各土层土壤动物密度均随着坡位的上升而减少, 各样地有大于 43% 的土壤动物个体分布在 0~5 cm 土层(凋落物层除外), 有大于 72% 的土壤动物类群分布在凋落物层; 除 Simpson 优势度指数(C)外, 土壤动物多样性指数均以样地 III 最高, 同时, 各样地间土壤动物群落 Sorenson 相似性系数较 Morisita-Horn 相似性系数波动更大, 表明坡位对柳杉人工林下土壤动物群落各类群的相对数量影响较类群数的影响大。图 3 表 5 参 20

关键词: 土壤生物学; 柳杉人工林; 坡位; 土壤动物; 群落结构

中图分类号: S714.3 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2016)02-0257-08

Soil fauna community structure in *Cryptomeria fortunei* artificial stands at different slope elevations in summer

XIAO Jiujin^{1,2}, LIN Honggui³, ZHOU Xin¹, YOU Hua¹, LI Yun¹, ZHANG Jian²

(1. Dujiangyan Campus, Sichuan Agricultural University, Dujiangyan 611830, Sichuan, China; 2. Institute of Ecological Forestry, Sichuan Agricultural University, Wenjiang 611130, Sichuan, China; 3. Institute of Aba Tourism Economy, Wenchuan 623000, Sichuan, China)

Abstract: Soil fauna, an important component of soil ecosystems, plays an important role in decomposition of biological remains, affects soil properties, and enhances material recycling and energy conversion in the soil. Understanding the impacts of slope elevation on soil fauna is essential to achieve sustainable *Cryptomeria fortunei* artificial stand management and biodiversity conservation; therefore, an investigation on soil fauna was carried out in *Cryptomeria fortunei* plantations. Three sample plots were set at three slope elevations (Plot I - 1 088 m, Plot II - 987 m, and Plot III - 830 m). Macrofauna samples ($n=3$) were picked up by hand in each sampled slope with the area of 50 cm × 50 cm (0.25 m²). After recording the types of soil fauna, the samples were put into a container with alcohol and transported to laboratory for detailed classification to family level. Mesofauna was collected by steel core ($r = 5$ cm, $v = 100$ cm³) and stored in soil fauna sealing black bags. The collected samples then were transported to laboratory within 12 h and subsequently separated by Baermann method (for nematodes) and Tullgren method (for mesofauna) over a period of 48 h, respectively. All collected soil fauna were calculated and classified by microscope, and identified to the family level following *Pictorial Keys to Soil Animals of China*. Analysis was conducted using the following indexes: Sorenson, Morisita-Horn,

收稿日期: 2015-04-22; 修回日期: 2015-06-16

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目(31400457); 四川省教育厅资助项目(13ZA0258); 四川省景观与游憩研究中心资助项目(JGYQ2015012)

作者简介: 肖玖金, 副教授, 博士, 从事土壤生态学研究。E-mail: j.xiao@sicau.edu.cn

Shannon-Wiener, Pielou, Simpson, and Density-groups. Results showed a total of 94 soil fauna orders belonging to 5 phyla and 13 classes with an average density of 3.46×10^4 individuals· m^{-2} . The density and number of groups in Plot III at lower elevation are significant higher than that in the rest of two plots ($P < 0.05$), and there is no significant difference between the Plots I and II ($P > 0.05$). Compared to Plots I and II, the soil fauna density in litter layer and 10~15 cm soil layer of Plot III is significantly higher than that in Plots I and II ($P < 0.05$). The vertical study showed that more than 43% of the individuals was found in the 0~5 cm layer and more than 72% of the group number was found in the litter layer in each plot. Plot III had the highest soil fauna density for Phylum Nematoda, and Classes Insecta, Arachnida, and Diplura. The Sorenson and Morisita-Horn indexes showed that slope elevation had a stronger effect on soil fauna density than soil fauna group type. Also, the highest Shannon-Wiener, Pielou, and Density-groups indexes were found in Plot III at the lower elevation. Thus, slope elevation affected distribution and diversity of soil fauna in *Cryptomeria fortunei* plantations, and to reserve litter layer is the key to keep the soil fauna diversity. [Ch, 3 fig. 5 tab. 20 ref.]

Key words: soil biology; *Cryptomeria fortunei* plantations; slope; soil fauna; community structure

土壤动物作为森林生态系统中不可或缺的生物组分之一,不仅是森林土壤肥力的重要生物学指标,而且与森林土壤的形成、发育、演替以及森林生态系统的生物元素循环密切相关^[1],被认为是森林生态系统物质循环和能量流动的中心环节,是生态系统演化的重要驱动因子^[2]。坡位作为重要的地形因子,会影响土壤微环境、土壤理化性质、地上植被的生长以及地下碳输入等^[3],小尺度的坡位因子在一定程度上可重新分配土壤含水量、养分及温度^[4]。柳杉 *Cryptomeria fortunei* 作为川西地区重要的人工造林树种之一,因以其生长快,树干直,材质好而被广泛栽植,有关人工林栽植对土壤动物群落特征的研究已有报道^[5~8],但鲜见不同坡位下柳杉人工林土壤动物群落特征的研究,因此,本研究通过对不同坡位下柳杉人工林土壤动物群落特征进行研究,为柳杉人工林的可持续发展和管理提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 研究区自然概况

研究区位于成都平原与四川盆周西缘山地接合部的都江堰灵岩山($30^{\circ} 44' 54'' \sim 31^{\circ} 22' 09''$ N, $103^{\circ} 25' 42'' \sim 103^{\circ} 47' 00''$ E),属中亚热带温湿型气候,海拔为852~1 075 m,为浅切割低山地貌类型。年平均气温为15.2℃,年平均相对湿度81%,年平均降水量1 243.0 mm,年平均日照时数1 024.2 h,无霜期269.0 d。样地土壤为沙岩上发育的黄壤,质地为重壤质,pH 6.5~6.8。由于多雨,在淀积层与母质层之间有明显的潜育现象,土壤肥力中等,保肥保水性好^[7]。试验共选取3个不同坡位高度,其中,样地I海拔高度为1 088 m,样地II海拔为987 m,样地III海拔为830 m,所选样地柳杉种植于20世纪70年代,是在灌丛地上进行更新形成的。各样地自然环境条件见表1。

表1 样地自然环境条件

Table 1 Environmental condition of three positions on slope

样地	坡度/(°)	坡向/(°)	土壤类型	地理位置	海拔/m	主要植被
I	21	SE25	山地黄壤	$31^{\circ}01'36''$ N, $103^{\circ}36'42''$ E	1 088	钝叶柃 <i>Eurya obtusifolia</i> , 凤尾蕨 <i>Pteris multifida</i> , 老鸦糊 <i>Callicarpa giraldii</i> 等
II	15	SE65	山地黄壤	$31^{\circ}01'23''$ N, $103^{\circ}36'45''$ E	987	短柄枹栎 <i>Quercus serrata</i> , 钝叶柃木, 凤尾蕨等
III	18	SE45	山地黄壤	$31^{\circ}00'53''$ N, $103^{\circ}36'45''$ E	830	扁竹根 <i>Iris japonica</i> , 凤尾蕨, 薄叶鼠李 <i>Rhamnus leptophylla</i> , 蕊帽忍冬 <i>Lonicera pileata</i> 等

1.2 研究方法

于2013年8月中旬,在不同坡位选择具有代表性的柳杉人工林共设置3个样地。在各样地内,兼顾地形、坡位及坡度等因子,按“品”字形设置3个重复。野外大型手检的面积为 $50\text{ cm} \times 50\text{ cm}$ (0.25 m^2),分凋落物层、0~5 cm层、5~10 cm层、10~15 cm层,将大型土壤动物放入盛有质量分数为75%的乙醇容器中杀死,带回实验室在解剖镜(PXS-1040)下分类和计数;同时,在各样点挖土壤剖面,分0~5

cm层、5~10 cm层、10~15 cm层用环刀($r=5$ cm, $v=100$ cm³)由下往上顺次取土样,用尼龙网包裹好后及时带回实验室分别用Tullgren干漏斗和Baermann湿漏斗分离土样中的土壤动物。同时,在各样点收集10 cm×10 cm(0.01 m²)面积的凋落物带回实验室进行分离,重复3次。

实验主要采用《中国土壤动物检索图鉴》^[9]、《中国亚热带土壤动物》^[10]、《昆虫分类检索》^[11]和《幼虫分类学》^[12]等进行分类鉴定,鉴定计数至目、科等较高的分类阶元。

1.3 数据分析与处理

1.3.1 数据分析 群落多样性分析采用Shannon-Wiener多样性指数(H'),Simpson优势度指数(C),Pielou均匀性指数(J)和密度-类群指数(I_{DG})来描述土壤动物群落的特征;分别选用Sorensen和Morisita-Horn相似性系数对样地间群落结构特征的相似程度进行定性和定量描述^[13-14]。

1.3.2 土壤动物类群数量等级划分 在各类群数量等级划分中,个体数占总数10.0%以上者为优势类群,占总数1.0%~10.0%者为常见类群,占总数1.0%以下者为稀有类群。

1.3.3 数据的处理和分析 数据的处理和分析采用SPSS 19.0和Excel 2010进行。

2 结果与分析

2.1 土壤动物的类群及数量组成

本研究中所采集到的土壤动物平均密度为 3.46×10^4 只·m⁻²,隶属于5门13纲94类(表2),各坡位土壤动物密度和类群数均随着坡位增高而递减(图1)。大类群中,线虫纲Nematoda和昆虫纲Insecta为优势类群,其个体数分别占本次采集到土壤动物总数的72.49%和14.72%;蛛形纲Arachnida占9.31%,弹尾纲Collembola占1.19%,双尾纲Diplura占1.14%,其余8个纲仅占1.15%。其中,样地I

表2 不同坡位柳杉林土壤动物类群组成

Table 2 Composition of soil fauna community at the different altitudes in *Cryptomeria fortunei* artificial plantations

序号	类群	样地I		样地II		样地III	
		密度/(只·m ⁻²)	百分比/%	密度/(只·m ⁻²)	百分比/%	密度/(只·m ⁻²)	百分比/%
1	矮蒲螨科 Pygmephoridae	—	—	—	—	66.67	0.10
2	艾纳螺科 Enidae	—	—	1.33	0.01	—	—
3	奥甲螨科 Oppiidae	—	—	—	—	133.33	0.20
4	巴蜗牛科 Bradybaeniae	9.33	0.07	38.90	0.16	—	—
5	白蚁科 Termitidae	33.33	0.25	33.33	0.13	—	—
6	步甲科 Carabidae	267.97	1.98	33.33	0.13	36.00	0.06
7	蝉科 Cicadidae	4.00	0.03	5.33	0.02	68.00	0.10
8	赤螨科 Erythraeidae	—	—	—	—	4 666.67	7.14
9	刺蛾科 Eucleidae	—	—	—	—	33.33	0.05
10	大赤螨科 Angstidae	—	—	—	—	66.67	0.10
11	大翼甲螨科 Galumnidae	—	—	—	—	33.33	0.05
12	大蚓 Megadrile Oligochaetes	22.67	0.17	90.70	0.36	16.00	0.02
13	等翅目 Isoptera	—	—	—	—	2 000.00	3.06
14	地蜈蚣科 Geophilidae	—	—	—	—	1.33	0
15	地蛛科 Atypidae	1.33	0.01	—	—	—	—
16	粉蝶科 Pieridae	1.30	0.01	—	—	166.67	0.26
17	副铗虻科 Parajapygidae	4.00	0.03	1.33	0.01	368.00	0.56
18	管蓟马科 Phlaeothripinae	—	—	—	—	133.33	0.20
19	管网蛛科 Filistatidae	8.00	0.06	—	—	—	—
20	光盗蛛科 Liocranidae	—	—	—	—	1.33	0
21	胡蜂科 Vespidae	—	—	—	—	66.67	0.10
22	花皮蛛科 Scytodidae	—	—	—	—	33.33	0.05
23	笄涡虫科 Bipaliidae	—	—	1.33	0.01	—	—
24	坚齿螺科 Camaenidae	—	—	2.67	0.01	—	—

表2 (续)

Table 2 Continued

序号	类群	样地 I		样地 II		样地 III	
		密度/(只·m ⁻²)	百分比/%	密度/(只·m ⁻²)	百分比/%	密度/(只·m ⁻²)	百分比/%
25	金龟甲科 Scarabaeidae	1.30	0.01	1.33	0.01	—	—
26	巨蟹蛛科 Heteropodidae	—	—	4.00	0.02	106.67	0.16
27	康𧇧科 Campodeidae	134.60	0.99	6.67	0.03	466.67	0.71
28	懒甲螨群 nothroid mites	—	—	—	—	1 366.67	2.09
29	狼蛛科 Lycosidae	—	—	5.33	0.02	—	—
30	类石蛛科 Segestriidae	—	—	—	—	1.33	0
31	蝼蛄科 Gryllotalpidae	—	—	—	—	2.67	0
32	露尾甲科 Nitidulidae	1.33	0.01	—	—	—	—
33	卵形蛛科 Oonopidae	6.67	0.05	2.67	0.01	68.00	0.10
34	裸珠甲螨群 Gymnodamaeoid mites	—	—	—	—	233.33	0.36
35	马蜂科 Polistidae	—	—	2.67	0.01	—	—
36	皿蛛科 Linyphiidae	34.60	0.26	—	—	—	—
37	膜蝽科 Hebridae	—	—	—	—	66.67	0.10
38	沫蝉科 Cercopidae	34.60	0.26	—	—	1.33	0
39	木𧇧科 Kalotermitidae	—	—	—	—	66.67	0.10
40	拟步甲科 Tenebrionidae	—	—	—	—	66.67	0.10
41	拟平腹蛛科 Zodariidae	38.60	0.28	2.67	0.01	1.33	0
42	拟态蛛科 Mimetidae	—	—	1.33	0.01	—	—
43	瓢甲科 Coccoellidae	33.33	0.25	100.00	0.40	1.33	0
44	平腹蛛科 Gnaphosidae	—	—	1.33	0.01	1.33	0
45	奇蝽科 Enicocephalidae	—	—	1.33	0.01	—	—
46	球体蛛科 Theridiosomatidae	8.00	0.06	2.67	0.01	33.33	0.05
47	球蛛科 Theridiidae	33.30	0.25	—	—	—	—
48	弱蛛科 Leptonetidae	2.67	0.02	2.67	0.01	1.33	0
49	山躄科 Spirobolidae	—	—	1.33	0.01	—	—
50	石蜈蚣目 Lithomorpha	1.33	0.01	73.30	0.29	166.67	0.26
51	鼠妇科 Porcellionidae	—	—	—	—	72.00	0.11
52	双翅目 Diptera	—	—	—	—	666.67	1.02
53	缩头甲科 Chelonariidae	—	—	—	—	33.33	0.05
54	苔甲科 Scydmaenidae	—	—	—	—	4.00	0.01
55	跳虫科 Poduridae	12.00	0.09	102.70	0.41	24.00	0.04
56	瓦娄蜗牛科 Valloniidae	33.33	0.25	4.00	0.02	—	—
57	网蝽科 Tingidae	—	—	—	—	33.33	0.05
58	网蚊科 Blepharoceridae	33.33	0.25	—	—	1.33	0
59	微离螨科 Microdispidae	—	—	—	—	666.67	1.02
60	伪叶甲科 Lagriidae	—	—	—	—	66.67	0.10
61	蚊科 Culicidae	6.67	0.05	101.30	0.40	—	—
62	蜈蚣目 Scolopendromorpha	—	—	1.33	0.01	—	—
63	舞虻科 Empididae	—	—	—	—	400.00	0.61
64	线虫 Nemata	10 666.70	78.70	23 333.30	93.20	41 333.33	63.27
65	逍遙蛛科 Philodromidae	—	—	82.70	0.33	—	—
66	小赫甲螨科 Hermanniellidae	—	—	—	—	200.00	0.31
67	线蚓科 Enchytraeidae	156.00	1.15	144.00	0.58	168.00	0.26
68	蟹蛛科 Thomisidae	—	—	5.33	0.02	2.67	0
69	烟管螺科 Clausiliidae	1.30	0.01	13.33	0.05	—	—
70	叶蝉科 Cicadellidae	—	—	—	—	1.33	0

表2 (续)

Table 2 Continued

序号	类群	样地 I		样地 II		样地 III	
		密度/(只·m ⁻²)	百分比/%	密度/(只·m ⁻²)	百分比/%	密度/(只·m ⁻²)	百分比/%
71	叶蜂科 Tenthredinidae	—	—	1.33	0.01	—	—
72	叶甲科 Chrysomelidae	—	—	—	—	4.00	0.01
73	叶爪螨科 Penthaleidae	—	—	—	—	666.67	1.02
74	夜蛾科 Noctuidae	68.00	0.50	4.00	0.02	34.67	0.05
75	蚁甲科 Pselaphidae	—	—	—	—	33.33	0.05
76	蚁科 Formicidae	873.30	6.44	230.60	0.92	8 753.33	13.40
77	逸蛛科 Zoropsidae	—	—	—	—	5.33	0.01
78	隐翅甲科 Staphylinidae	66.70	0.49	400.00	1.60	—	—
79	隐颤螨科 Cryptognathidae	—	—	—	—	1 033.33	1.58
80	幽灵蛛科 Pholcidae	1.33	0.01	8.00	0.03	—	—
81	疣跳科 Neanuridae	113.30	0.84	6.67	0.03	102.67	0.16
82	原铗虻科 Projapygidae	—	—	1.33	0.01	200.00	0.31
83	圆颤蛛科 Corinnidae	2.67	0.02	—	—	—	—
84	圆跳科 Sminthuridae	800.00	5.90	66.67	0.27	—	—
85	缘蝽科 Coroidae	—	—	—	—	70.67	0.11
86	葬甲科 Silphidae	2.67	0.02	2.70	0.01	66.67	0.10
87	长角跳科 Entomobryidae	—	—	—	—	5.33	0.01
88	长角象甲科 Anthribidae	33.33	0.25	—	—	33.33	0.05
89	长头地蜈蚣科 Mecistocephalidae	—	—	1.33	0.01	—	—
90	真足螨科 Eupodifae	—	—	—	—	33.33	0.05
91	重嗜科 Amphientomidae	—	—	—	—	1.33	0
92	蠋蛾科 Pauropodidae	—	—	100.00	0.40	—	—
93	综合纲 Symphyla	1.33	0.01	5.33	0.02	66.67	0.10
94	钻头螺科 Subulinidae	—	—	1.33	0.01	1.33	0
合计		13 554.24		25 034.87		65 328.00	

说明: “—”表示无或未采集到。

柳杉人工林所采集到的土壤动物平均密度为 1.35×10^4 只·m⁻², 共 38 类, 优势类群仅线虫纲 1 类, 所占比例为 78.70%, 常见类群有步甲科、小蚓类、蚁科和圆跳科 4 类, 个体数所占比例分别为 1.98%, 1.15%, 6.44% 和 5.90%, 合计 15.47%, 其余 33 类为稀有类群, 所占比例合计为 5.83%。样地 II 柳杉人工林所采集的土壤动物平均密度为 2.50×10^4 只·m⁻², 共 46 类, 优势类群为线虫纲, 其所占比例为 93.20%, 常见类群 1 类, 占比例为 1.60%, 其余 44 类为稀有类群, 所占比例合计为 5.20%。

样地 III 柳杉人工林采集的土壤动物平均密度为 6.53×10^4 只·m⁻², 共 66 类, 优势类群有 2 类, 分别为线虫纲和蚁科, 所占比例分别为 63.27% 和 13.40%, 合计为 76.67%, 常见类群有赤螨科、等翅目、懒甲螨科、隐颤螨科、双翅目、叶爪螨科和微离螨科, 共 7 类, 所占比例分别为 7.14%, 3.06%, 2.09%, 1.58%, 1.02%, 1.02% 和 1.02%, 合计为 16.94%, 其余 57 类为稀有类群, 所占比例总计为 6.39%。

2.2 土壤动物不同土层垂直分布特征

不同坡位柳杉林土壤动物密度剖面分布特征显示(图 2): 除凋落物层外, 各土层土壤动物密度均随着坡位上升而减少。各坡位柳杉人工林样地均以 0~5 cm 土层土壤动物密度最高(受条件限制, 凋落物层

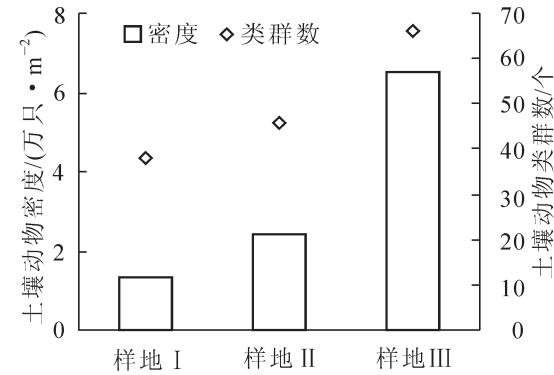


图 1 不同坡位柳杉林土壤动物数量和类群数
Figure 1 Number of soil fauna community and group at the different slopes in *Cryptomeria fortunei* plantations

未进行湿漏斗分离), 其中, 样地I, 样地II和样地III分别有65.05%, 63.21%和43.66%的土壤动物分布在0~5 cm; 样地I和样地II均以10~15 cm土层密度最低, 样地III以5~10 cm土层最低。差异性检验结果表明: 淀落物层和10~15 cm土层土壤动物密度均以样地III显著高于样地I和样地II ($P<0.05$)。不同坡位高度土壤动物类群数剖面分布特征表明(图3): 各坡位土壤动物类群数均随着土层加深而下降, 其中, 淀落物层和5~10 cm土层土壤动物类群数均以样地III最高, 0~5 cm土层和10~15 cm土层土壤动物类群数均以样地II最高; 其中, 样地I有81.58%的土壤动物类群在枯落物层有分布, 样地II和样地III分别为78.26%和72.73%。

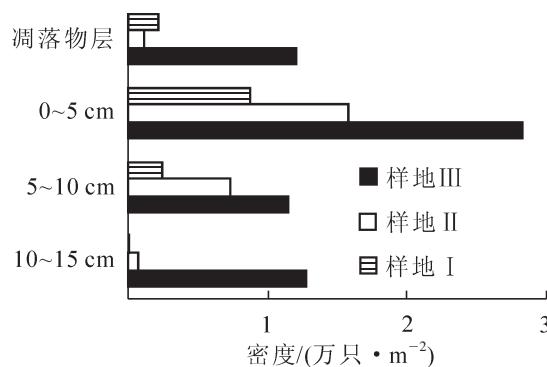


图2 不同坡位柳杉林土壤动物密度垂直分布

Figure 2 Average density of soil fauna in each layer

2.3 土壤动物主要类群密度特征

将所采集到的土壤动物分为线虫纲、昆虫纲、蛛形纲、弹尾纲、双尾纲和其余纲共6大类(表3), 可以看出, 除弹尾纲外, 其余5个纲均以样地III高于样地I和样地II。显著性分析表明, 线虫纲以样地III显著高于样地I ($P<0.05$), 昆虫纲和双尾纲以样地III显著高于样地I和样地II ($P<0.05$)。

2.4 土壤动物群落相似性

各样地间土壤动物群落相似性分析结果显示(表4): 样地间土壤动物群落Sorenson相似性系数较Morisita-Horn相似性系数波动更大, 表明不同坡位对柳杉林下土壤动物群落各类群的相对数量影响较大。样地III与样地I和样地II的Sorenson相似性系数均低于0.50, 表明该柳杉人工林土壤动物群落物种组成存在较大的坡位差异。其中, 样地I与样地II的Sorenson相似性系数为0.67, 计算值为0.50~0.75, 表明样地I和样地II之间为中等相似。样地III与样地I和样地II的Sorenson相似性系数均为0.43, 为0.25~0.50, 表明两者的相似性为中等不相似。各样地间的Morisita-Horn相似性系数均大于0.90, 表明坡位高度差异对柳杉人工林土壤动物群落各类群的相对数量影响较小。

2.5 土壤动物群落多样性特征

土壤动物群落多样性指数显示(表5): Shannon-Wiener多样性指数(H'), Pielou均匀性指数(J)和密度-类群指数(I_{DG})均以样地III最高。显著性检验表明: 样地III的 I_{DG} 指数均显著高于样地I和样地II ($P<0.05$), Simpson优势度指数(C)排序为样地II>样地I>样地III。样地II具有较大的群落优势度。

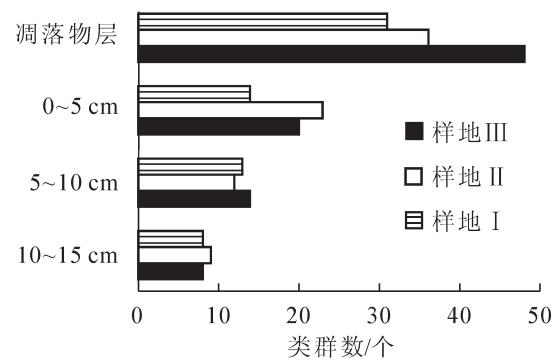


图3 不同坡位柳杉林土壤动物类群数垂直分布

Figure 3 Group number of soil fauna in each layer

表3 主要类群密度特征

Table 3 Average density of main taxon

纲	平均密度/(只·m⁻²)		
	样地I	样地II	样地III
线虫纲	10 666.70 a	23 333.30 ab	41 333.33 b
昆虫纲	1 461.17 a	917.27 a	12 913.33 b
蛛形纲	137.17 a	118.70 a	9 422.66 b
弹尾纲	925.30 a	176.03 b	132.00 b
双尾纲	138.60 a	9.33 a	1 034.67 b
其他纲	225.30 a	480.23 a	492.00 a
合计	13 328.94	24 554.63	64 836.00

说明: 同行数据后的不同小写字母表示在 $P<0.05$ 水平差异显著。

表4 不同坡位柳杉林土壤动物群落相似性

Table 4 Similarity indices of soil animal communities

样地	样地I	样地II	样地III
样地I		0.98	0.96
样地II	0.67		0.91
样地III	0.43	0.43	

说明: 对角线之上为Morisita-Horn相似性系数, 对角线之下为Sorenson相似性系数。

3 讨论

坡位能对土壤含水量、养分及温度等生态因子进行再分配, 3类土壤生态因子通常随着坡位的下降而逐渐增加^[15-16]。对柳杉人工林不同坡位土壤动物群落特征研究结果显示: 土壤动物密度和类群数均随着坡位高度上升而减少, 相关研究也有类似的研究结果^[4], 其中, 样地Ⅲ土壤动物密度显著高于样地Ⅰ和样地Ⅱ, 这主要是由于线虫密度在3个坡位土壤动物密度中均占有较大比例(样地Ⅰ到样地Ⅲ分别为78.7%, 93.2%和63.3%), 其密度的变化是导致各坡位土壤动物密度的差异的主要原因。本研究结果显示, 样地Ⅱ和样地Ⅲ的线虫密度分别是样地Ⅰ的2.2倍和3.9倍, 表明较高的土壤含水量、养分含量及温度能为线虫的繁殖提供良好条件。受实验条件限制, 各坡位凋落物层次土壤动物仅进行了干生漏斗分离, 因而未将占线虫等湿生土壤动物统计到凋落物层, 造成该层土壤动物群落特征出现较高类群数和较低密度的现象。相似性分析表明, 无论是Morisita-Horn相似性系数, 还是Sorenson相似性系数, 均以样地Ⅰ和样地Ⅱ间的最高, 表明样地Ⅰ和样地Ⅱ间土壤动物群落特征具有较高的相似性。土壤动物多样性指数中, Shannon-Wiener多样性指数(H')和Pielou均匀性指数(J)均以样地Ⅲ最高, 样地Ⅱ最低, 说明样地Ⅲ物种生态系统的结构更加稳定, 有利于其内的土壤动物生存, 也有利于该生态系统的良好维持^[17]; 而Simpson优势度指数(C)以样地Ⅱ最高, 样地Ⅲ最低, 这主要与样地Ⅱ的土壤动物个体数的93.2%为线虫, 土壤动物个体数主要集中在个别类群上, 而样地Ⅰ和样地Ⅲ则较为分散, 个体数比例最高的仍为线虫, 其比例分别为78.7%和63.27%, 说明群落中个体数越集中在少数类群上, 群落的优势度指数就越大; 反之, 越分散, 群落的优势度指数就越小^[18]。

本研究中, 样地Ⅰ的弹尾纲密度显著高于样地Ⅱ和样地Ⅲ, 这与土壤跳虫适应在低温湿润环境和有机质含量丰富的环境下生存有关^[19], 而以蜱螨目为主的蛛形纲则表现出相反的分布趋势, 即高坡位密度小于低坡位, 同时, 其类群数也呈现随坡位升高而减少的趋势。各样地间的Jaccard相似性指数研究表明, 蛛形纲中样地Ⅰ和样地Ⅱ最高, 共有度为0.313, 样地Ⅰ和样地Ⅲ最低, 共有度为0.138, 表明各样地间蛛形纲共有度以相邻的群落间最高, 这与相关研究结果一致^[20]。昆虫纲各样地间的共有度以样地Ⅰ和样地Ⅱ最高, 共有度为0.556, 以样地Ⅱ和样地Ⅲ最低, 共有度为0.167。

总体来看, 本研究区不同坡位柳杉人工林土壤动物群落结构特征对坡位的变化有较强响应, 但不同类群土壤动物对坡位变化的响应有一定差异, 这与不同土壤动物生活习性的差异有关。

4 参考文献

- [1] YANG Wanqin, WANG Kaiyun, SONG Guangyi, et al. Preliminary study on biological characteristics of degraded soil ecosystem in dry hot valley of the Jinsha River [J]. *Pedosphere*, 2002, **12**(4): 365–372.
- [2] 吴鹏飞, 杨大星. 若尔盖高寒草甸退化对中小型土壤动物群落的影响[J]. 生态学报, 2011, **31**(13): 3745–3757. WU Pengfei, YANG Daxing. Effect of habitat degradation on soil meso-and microfaunal communities in the Zoigê Alpine Meadow, Qinghai-Tibetan Plateau [J]. *Acta Ecol Sin*, 2011, **31**(13): 3745–3757.
- [3] 张地, 张育新, 曲来叶, 等. 坡位对东灵山辽东栎林土壤微生物量的影响[J]. 生态学报, 2012, **32**(20): 6412–6421. ZHANG Di, ZHANG Yuxin, QU Laiye, et al. Effects of slope position on soil microbial biomass of *Quercus liaotungensis* forest in Dongling Mountain [J]. *Acta Ecol Sin*, 2012, **32**(20): 6412–6421.
- [4] 赵瑜, 钟宇, 张健, 等. 不同坡位下巨桉人工林土壤动物群落特征[J]. 应用生态学报, 2010, **21**(9): 2367–2374. ZHAO Yu, ZHONG Yu, ZHANG Jian, et al. Community structure of soil fauna in *Eucalyptus grandis* plantations at different slope locations [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2010, **21**(9): 2367–2374.
- [5] 卢昌泰, 李云, 肖玖金, 等. 四川盆周西缘山地3种人工林土壤动物群落特征[J]. 应用与环境生物学报, 2013,

表5 不同坡位柳杉林土壤动物群落多样性指数

Table 5 Diversity indices of soil fauna in *Cryptomeria fortunei* plantations

样地	Shannon-Wiener多样性指数(H')	Pielou均匀性指数(J)	密度-类群指 数(I_{bc})	Simpson优势 度指数(C)
样地Ⅰ	0.99 ab	0.27 a	5.86 a	0.63 a
样地Ⅱ	0.43 a	0.11 a	8.66 a	0.87 a
样地Ⅲ	1.53 b	0.37 a	21.46 b	0.43 a

说明: 同列数据后的不同小写字母表示在 $P<0.05$ 水平差异有统计学意义。

- 19(4): 618 – 622.
- LU Changtai, LI Yun, XIAO Jiujin, et al. Characteristics of soil fauna community of three plantations in the Western Sichuan Basin Border of China [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2013, 19(4): 618 – 622.
- [6] 黄玉梅, 张健, 杨万勤. 巨桉人工林土壤动物群落结构群落特征[J]. 生态学报, 2006, 26(8): 2502 – 2509.
- HUANG Yumei, ZHANG Jian, YANG Waiqin, et al. The characteristics of soil animal community structure in *Eucalyptus grandis* plantation [J]. *Acta Ecol Sin*, 2006, 26(8): 2502 – 2509.
- [7] 黄玉梅, 张健, 杨万勤. 巨桉人工林中小型土壤动物类群分布规律[J]. 应用生态学报, 2006, 17(12): 2327 – 2331.
- HUANG Yumei, ZHANG Jian, YANG Waiqin. Distribution pattern of meso-micro soil fauna in *Eucalyptus grandis* plantation [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2006, 17(12): 2327 – 2331.
- [8] 廖崇惠, 陈茂乾. 热带人工林土壤动物群落的次生演替和发展过程探讨[J]. 应用生态学报, 1990, 1(1): 53 – 59.
- LIAO Chonghui, CHEN Maoqian. Secondary succession of soil animal community and its development process in tropical artificial forest [J]. *Chin J Appl Ecol*, 1990, 1(1): 53 – 59.
- [9] 尹文英. 中国土壤动物检索图鉴[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [10] 尹文英. 中国亚热带土壤动物[M]. 北京: 科学出版社, 1992.
- [11] 李鸿兴, 隋敬之, 周士秀, 等. 昆虫分类检索[M]. 北京: 农业出版社, 1987.
- [12] 钟觉民. 幼虫分类学[M]. 北京: 农业出版社, 1990.
- [13] 何先进, 吴鹏飞, 崔丽巍, 等. 坡度对农田土壤动物群落结构及多样性的影响[J]. 生态学报, 2012, 32(12): 3701 – 3713.
- HE Xianjin, WU Pengfei, CUI Liwei, et al. Effects of slope gradient on the community structures and diversities of soil fauna [J]. *Acta Ecol Sin*, 2012, 32(12): 3701 – 3713.
- [14] 张洪芝, 吴鹏飞, 杨大星, 等. 青藏东缘若尔盖高寒草甸中小型土壤动物群落特征及季节变化[J]. 生态学报, 2011, 31(15): 4385 – 4397.
- ZHANG Hongzhi, WU Pengfei, YANG Daxing, et al. Dynamics of soil meso-and microfauna communities in Zojie alpine meadows on the eastern edge of Qinghai-Tibet Plateau, China [J]. *Acta Ecol Sin*, 2011, 31(15): 4385 – 4397.
- [15] 高雪松, 邓良基, 张世熔. 不同利用方式与坡位土壤物理性质及养分特征分析[J]. 水土保持学报, 2005, 19(2): 53 – 56.
- GAO Xuesong, DENG Liangji, ZHANG Shirong. Soil physical properties and nutrient properties under different utilization styles and slope position [J]. *J Soil Water Conserv*, 2005, 19(2): 53 – 56.
- [16] 邱建, 马克明, 张育新. 北京东灵山不同坡位辽东栎 *Quercus liaotungensis* 叶属性的比较[J]. 生态学报, 2008, 28(1): 122 – 128.
- QI Jian, MA Keming, ZHANG Yuxin. Comparisonson leaf traits of *Quercus liaotungensis* Koidz. on differents lope positions in Dongling Mountain of Beijing [J]. *Acta Ecol Sin*, 2008, 28(1): 122 – 128.
- [17] 吾玛尔·阿布力孜, 阿布都如苏力·吐孙, 吴松林. 乌鲁木齐雅玛里克山土壤动物群落结构及其多样性研究[J]. 生命科学研究, 2013, 17(1): 47 – 56.
- ABLIZ Omar, TURSUN Abdurusul, WU Songlin. Investigation on the community structure and diversity of soil fauna at the different altitudes of Yamalik Mountain in Urumqi [J]. *Life Sci Res*, 2013, 17(1): 47 – 56.
- [18] 肖玖金, 黄晓丽, 卢昌泰, 等. 坡位对猕猴桃园土壤动物群落结构的影响[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2013, 39(4): 421 – 427.
- XIAO Jiujin, HUANG Xiaoli, LU Changtai, et al. Community structure of soil fauna in kiwi fruit plantation at different slope locations [J]. *J Zhejiang Univ Agric & Life Sci*, 2013, 39(4): 421 – 427.
- [19] 王宗英, 朱永恒, 路有成, 等. 九华山土壤跳虫的生态分布[J]. 生态学报, 2001, 21(7): 1142 – 1147.
- WANG Zongying, ZHU Yongheng, LU Youcheng, et al. The ecological distribution of soil collembola in Jiuhua Mountain [J]. *Acta Ecol Sin*, 2001, 21(7): 1142 – 1147.
- [20] 张恒明, 谷会岩, 王庆礼, 等. 辽宁老秃顶子北坡森林土壤蜱螨共有度的海拔梯度变化 [J]. 东北林业大学学报, 2009, 37(5): 51 – 53.
- ZHANG Hengming, GU Huiyan, WANG Qingli, et al. Co-occurrence of soil acarina faunal communities changing with altitude on the northern slope of Laotudingzi Nature Reserve, Liaoning Province [J]. *J Northeast For Univ*, 2009, 37(5): 51 – 53.

基于 GIS 和 RS 的东北地区东北虎生境适宜性评价

李亚藏^{1,2}, 冯仲科¹, 黄季夏¹, 杨柳¹

(1. 北京林业大学 精准林业北京市重点实验室, 北京 100083; 2. 安阳工学院, 河南 安阳 455000)

摘要: 以中国东北地区(含东北三省和内蒙古东北部)为研究区域, 依据稳定性、独立性、主导性和综合性原则, 从植被、地理环境、人为干扰等3个层面选取植被类型、植被覆盖度、海拔、坡度、坡向、水源、居民点、主要道路等为评价因子, 对中国东北虎 *Panthera tigris altaica* 生境进行适宜性评价。在地理信息系统(GIS)和遥感(RS)技术的支持下, 获取各评价因子的定量信息。采用层次分析法(AHP)确定各评价因子的权重, 并运用模糊数学模型对各单因子加权叠加, 得到东北虎生境适宜性综合评价分级图并计算各分区面积。结果表明: ①人为干扰和植被因素是影响东北虎分布的主要因素; ②将研究区域划分为东北虎最适宜分布区、次适宜分布区、一般适宜分布区和不适宜分布区, 分别占研究区域总面积的 21.97%, 16.83%, 22.02%, 39.18%。最适宜区和次适宜区面积总和达到 48.80%, 说明东北地区适宜东北虎生存的潜在生境面积总量较为可观。这为东北虎自然保护区的建立和人工饲养东北虎的放归计划提供决策依据。图 3 表 3 参 25

关键词: 动物学; 地理信息系统(GIS); 遥感(RS); 东北虎; 生境适宜性; 数学模型

中图分类号: S759.9; Q959.9 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2016)02-0265-07

Habitat suitability evaluation for Amur tigers in northeast China based on GIS and RS

LI Yacang^{1,2}, FENG Zhongke¹, HUANG Jixia¹, YANG Liu¹

(1. Institute of GIS, RS, and GPS, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2. Anyang Institute of Technology, Anyang 455000, Henan, China)

Abstract: This article researched the habitat suitability evaluation for Amur tigers in northeast China, which found the potential distribute area and provided decision-making for the establishment of Amur tiger nature reserve and the plan of getting back to nature of artificial breeding Amur tigers. The study area in northeast China included the three provinces of northeast China and the northeast region of Inner Mongolia. According to the principles of stability, independence, dominance, and comprehensiveness, the habitat suitability of Amur tigers in northeast China was assessed using the three aspects of vegetation, geographical environment, and human disturbance with vegetation type, vegetation coverage, elevation, gradient, slope direction, water source, residential areas, and main roads selected as evaluation variables. Data for each variable was collected quantitatively using geographic information systems (GIS) and remote sensing (RS). Then the Amur tiger habitat suitability evaluation classification figure was obtained using the Analytic Hierarchy Process (AHP) method to determine the weight of each evaluation factor, and using the fuzzy mathematical model for the single factor weighted superposition. Afterward, the partitioning of areas was conducted. Results showed that human disturbance and vegetation were the main factors affecting the Amur tiger distribution. The study area was classified as most appropriate (21.97%), second suitable (16.83%), generally appropriate (22.02%), and inappropriate

收稿日期: 2015-03-19; 修回日期: 2015-09-01

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAH34B01)

作者简介: 李亚藏, 副教授, 从事地理信息系统在资源环境上的应用研究。E-mail: liyacang@sohu.com。通信作者: 冯仲科, 教授, 博士生导师, 从事精准林业与 3S 技术研究。E-mail: fengzhongke@126.com

distribution areas (39.18%). Thus, the living space that could be appropriated for Amur tigers compared to the total potential habitat area in the Northeast China was considerable approximately 48.8%. [Ch, 3 fig. 3 tab. 25 ref.]

Key words: zoology; geographic information system (GIS); remote sensing (RS); Amur tiger; habitat suitability; mathematical model

东北虎 *Panthera tigris altaica* 是世界上现存的 5 个虎 *Panthera tigris* 亚种中体形最大者, 属世界濒危和区域旗舰物种^[1]。由于捕猎和栖息地环境的破坏, 中国境内的野生东北虎数量已不足 20 只^[2-3]。虽然近些年对中国对东北虎的保护做了大量工作, 但仍然存在栖息地破碎化、保护区面积不足、人类生产经营活动逐渐向林区发展及生态廊道不畅等问题, 严重限制了东北虎种群的恢复^[4]。另外, 随着人工饲养东北虎数量的逐渐增加^[5], 东北虎要放归何处就成了一个值得思考的问题。目前, 对东北虎的研究多集中在东北虎的生态行为学^[6-9]、种群分布^[2]、数量监测^[2, 10-11]及其猎物种群^[12-13]等方面, 而对东北虎如此广域生境筛选及其评价的研究较少。中国东北和俄罗斯远东东北虎分布区的猎物种群密度相对较低, 致使东北虎的家域面积较大, 据研究, 生活在该区 1 只成年雌虎需要的家域面积约为 488 km², 雄虎的领域面积约为 1 205 km²^[14]; 如果要保证种群的可持续繁衍大约需要 20 只左右成年雌虎, 这就意味着至少需要 8 000 km² 的连续的生境面积, 这也说明了生境研究的必要性^[15]。本研究从东北虎最基本的生境条件入手, 在掌握东北虎及其生境现状的基础上, 以中国东北地区包括黑龙江、吉林、辽宁三省和内蒙古东北部为研究区域, 分析影响东北虎分布的植被、地理环境和人为干扰三大因素, 评价和预测东北虎的适宜生境, 制定切实可行的规划措施, 以期为东北虎自然保护区的建立和放归工作提供参考依据。

1 研究区概况与数据来源

1.1 研究区概况

该研究区域为中国东北地区, 包括黑龙江、吉林、辽宁三省及内蒙古东部地区。地理坐标范围: 38°43'29"~53°41'52"N, 111°0'23"~135°53'50"E。全区面积为 157.67 万 hm²。东北地区自南向北跨中温带与寒温带, 属温带季风气候, 四季分明, 夏季温热多雨, 冬季寒冷干燥。自东南向西北, 年降水量自 1 000 mm 降至 300 mm 以下, 从湿润区、半湿润区过渡到半干旱区。该区东、南和北面被水域环绕, 西面为陆界, 内侧是大兴安岭和长白山系的高、中、低山及丘陵, 平均海拔为 1 000 m; 中部为低海拔的东北平原, 平均海拔约 200 m。东北地区森林覆盖率高, 森林植被以红松 *Pinus koraiensis*, 落叶松 *Larix olgensis*, 云杉 *Picea asperata*, 山杨 *Populus davidiana*, 白桦 *Betula platyphylla*, 黄檗 *Phellodendron amurense*, 水曲柳 *Fraxinus mandschurica*, 紫椴 *Tilia amurensis* 等树种为主。栖居的兽类有东北虎, 豹 *Panthera pardus*, 狗獾 *Nyctereutes procyonoides*, 黑熊 *Ursus thibetanus*, 紫貂 *Martes zibellina*, 水獭 *Lutra lutra*, 黄鼬 *Mustela sibirica* 等^[2]。

1.2 数据来源

1.2.1 遥感影像 遥感影像采用空间分辨率为 250 m 的 MODIS 中国区域归一化植被指数 (NDVI) 产品和空间分辨率为 30 m × 30 m 的美国陆地卫星 Landsat-5 遥感影像。NDVI 植被指数产品预处理包括: 反演、拼接、切割、投影转换、单位换算等步骤, 遥感影像处理在 ENVI 软件支持下实现, 过程包括辐射定标和大气校正、几何精校正及配准、图像镶嵌和裁剪、组合波段的选择与确定、图像增强处理等步骤。

1.2.2 植被图 收集《1:1 000 000 中国植被图集》^[16], 对其进行扫描, 以 ArcGIS 10.2 为平台, 进行矢量化数据和属性数据录入, 然后利用已有数据进行校正和配准。形成包括针叶林、阔叶林、灌丛、栽培植被、草原、草甸等类型的植被矢量图。

1.2.3 数字高程模型 (DEM) DEM 数据下载于中国科学院计算机网络信息中心地理空间数据云, 选用 GDEM 30 m 的产品。

1.2.4 东北各省矢量图 省市界、区县界、道路、河流等矢量图均来自国家 1:100 000 矢量数据集 (下载于中国国家基础地理信息中心)。

2 研究方法

基于遥感(RS)和地理信息系统(GIS)技术,在野外生态调查和收集图件资料以及相关文本资料^[17]的基础上,依据稳定性、独立性、主导性和综合性原则^[18]从植被、地理环境、人为干扰3个层面,选取植被类型、植被覆盖度、海拔、坡度、坡向、水源、居民点、道路8个因子作为生境适宜性评价因子。植被类型结合矢量化的1:1 000 000中国植被图,对Landsat-5遥感影像分类得到;植被覆盖度采用归一化植被指数NDVI来表现。海拔、坡度和坡向来自30 m空间分辨率的DEM影像数据;水源主要来自河流、湖泊矢量数据,河流级别包括5级及以上;居民点包括地级市和县级市;道路最小至省道。上述数据在地理信息系统软件ArcGIS 10.2的支持下,进行数据编辑,并将其转化为和国家1:100 000基础地形数据库一致的投影坐标系统得到评价所需的各评价因子信息。最后将不同的空间数据离散为90 m×90 m的栅格。再运用适宜性评价模型和GIS的空间分析功能分别计算出每个栅格的生境适宜性综合评价值,然后制定分级标准,最后得到东北地区东北虎生境适宜性分级图并计算各级面积。东北地区东北虎生境适宜性评价技术路线如图1所示。

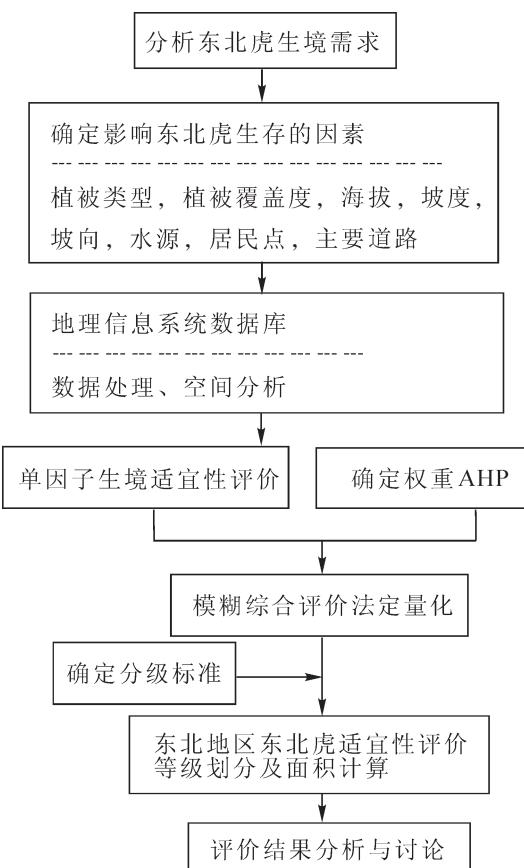


图1 东北地区东北虎生境适宜性评价技术路线
Figure 1 Technical route of Amur tigers habitat suitability evaluation

3 适宜性评价

3.1 单因子生境适宜性评价

依据东北虎生活对栖息地的要求,以及人类活动与自然环境的关系,并综合考虑前人的研究成果^[3,17,19-21],分析确定东北虎单因子生境适宜度的分级标准(表1),并得到各单因子适宜性评价分级图。

3.2 评价因子权重的确定

采用层次分析法确定权重^[22-23]。首先将指标分为目标层、准则层和方案层3个层次,建立层次结构(图2),通过专家对判断矩阵表的填写构建判断矩阵,求解矩阵,得到特征向量和最大特征根及最大特

表1 东北虎单因子生境适宜性分级标准

Table 1 Classification standard of Amur tigers habitat suitability based on single factor

适宜性等级	植被类型	植被覆盖度/%	海拔/m	坡度/(°)	坡向	水源/m	居民点/m	道路/m
最适宜	阔叶林	>80	400~1 000	5~15	E/SE/SW	<3 000	>10 000	>5 000
次适宜	针阔混交林	60~80	200~400/1 000~1 500	0~5	其他	3 000~5 000	10 000~5 000	5 000~3 000
一般适宜	针叶林和灌丛	40~60	<200/1 500~2 000	15~25		5 000~10 000	5 000~3 000	3 000~1 500
不适宜	农田、裸地、水体、居民地等	<40	>2 000	>25		>10 000	<3 000	<1 500

征向量,最后对指标进行一致性检验,结果为 $C_R=0.015\ 68<0.1$,具有满意的一致性。再参考文献[24]的方法计算出8个指标的组合权重值(表2)。

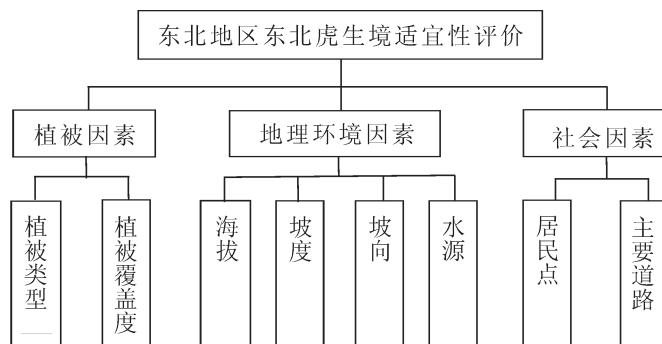


图2 东北地区东北虎生境适宜性综合评价指标体系

Figure 2 Evaluation index system of Amur tigers habitat suitability

表2 各评价因子权重值

Table 2 Weight of each evaluation factor

影响因素	权重	影响因素	权重	影响因素	权重
植被类型	0.101 25	坡度	0.031 99	道路	0.203 02
植被盖度	0.185 14	坡向	0.031 99	水源	0.061 49
海拔	0.045 23	居民点	0.339 89		

3.3 生境适宜性综合评价

3.3.1 评价模型的建立 应用适宜性评价的模糊数学模型进行综合评价值的计算。计算公式如下:

$$s_i = \sum_{k=1}^n w_k \times c_i(k) \quad (1)$$

式(1)中: i 为栅格编号; k 为评价因子编号; n 为评价因子总数; s_i 为第 i 个栅格的综合评价值; w_k 为第 k 个因素的权重; $c_i(k)$ 为第 i 个栅格的第 k 个评价因子适宜度评价。

3.3.2 单因子加权叠加获得综合适宜度 通过上面分析已经对各单因子适宜性进行了评价,并确定了各影响因子的权重。现根据适宜性为各评价因子赋值,以最适宜为标准赋值为1,次适宜、一般适宜和不适宜依次赋值为2,3和4。然后,根据层次分析法求得的权重按照式(1)进行加权求和得到各个栅格的综合评价值。经过加权叠加得到每个栅格的综合评分值范围为1.000 00~3.890 79,若该栅格的所有因子均在最适宜分布区,叠加后的值为最小值1.000 00,说明此处的环境最适宜东北虎生存;当各因子均在不适宜分布区,叠加后为最大值3.890 79;同理,各因子均为次适宜分布区,叠加后的总值是2;均在一般适宜分布区,叠加后的总值为2.968 01。但因为各因子的权重相差悬殊,居民点、道路、植被盖度和植被类型4个因子的权重总和为0.829 30。因此,为了更为准确地预测东北虎的最适宜分布区,本研究将分区的临界值做了适当调整。将3个权重最大的因子(居民点、道路和植被盖度)的最适宜分布区赋值与植被类型的次适宜分布区和其他4个因子的一般适宜分布区赋值的总和作为划分最适宜区和次适宜区的分界点(1.442 65);将权重最大的5个因子次适宜区赋值总和作为次适宜区与一般适宜区分界点

(1.781 58); 将权重最大的3个因子一般适宜区赋值的总和作为划分一般适宜区和不适宜区的分界点(2.184 15), 重新分类, 将研究区分类为最适宜分布区(1~1.442 65), 次适宜分布区(1.442 65~1.781 58), 一般适宜分布区(1.781 58~2.184 15)和不适宜分布区(2.184 15~3.890 79)。评价结果如图3所示。利用ArcGIS对4个适宜性等级的面积进行统计, 结果如表3所示。

4 结果与讨论

本研究采用层次分析法确定了各评价因子的权重, 认为居民点、道路和植被盖度所占权重最大; 其次为植被类型; 海拔、坡度、坡向和水源对东北虎的分布影响不大。由此可见, 人为干扰和植被因素是影响东北虎分布的主要因素, 这与前人的研究结果相一致^[1]。以后在进行有关东北虎研究和保护过程中要加强该方面的管理。本研究发现, 东北地区东北虎最适宜分布区主要分布于长白山脉、张广才岭、小兴安岭、千山山脉和大兴安岭的部分地区, 其面积为346 388.4 hm², 占研究区总面积的21.97%。该区植被类型丰富, 林分郁闭度高, 林分类型多以针、阔混交林或纯林为主体, 林内有丰富的食物分布, 另外该地区城镇密度小, 且靠近边境地区, 人为干扰小。次适宜区面积为265 464.8 hm², 占研究区面积的16.83%, 所占比例最小, 主要为最适宜区的一些缓冲区域。一般适宜区主要分布在研究区的西南部, 该区域居民点稀少, 影响东北虎分布的主要因素为植被因素, 其植被类型以灌草为主。不适宜区主要集中在中部和南部的东北平原, 该区域主要为城镇分布区, 人口密集, 植被覆盖度低, 植被类型主要以农田为主, 不适宜东北虎生存。张明海等^[25]研究认为, 已知的野生东北虎出现点主要分布在黑龙江东部及东南部, 吉林东部及东北部, 均在本研究评价结果范围内, 验证了评价结果的可靠性。

由于城镇过度扩张, 人工建设大量开发, 导致野生东北虎的栖息地遭到严重破坏, 这使得适宜东北虎生存的潜在生境(面积仅占21.97%)的破碎度较高, 即东北虎分布区岛屿化相当严重, 可能造成了东北虎近年来有向俄罗斯远东地区迁徙的趋势。因此, 对现有保护区的最适宜分布区建立生态廊道, 连接破碎化区域, 是当前保护区管理部分急需解决的首要问题。鉴于俄罗斯远东地区有较多东北虎出没, 建议将中国东北虎保护区与俄罗斯远东地区的保护区联合, 形成跨国界的保护区网络。同时, 中国东北地区要改变林业经营模式, 建立长期的生态环境监测体系。

由于受数据来源的限制, 本研究未能将影响东北虎分布的猎物因子纳入评价因子当中, 可能会对预测结果造成一定程度的偏差, 这将是我们今后的工作重点。另外, 在利用层次分析法和模糊评价模型进行评价过程中, 带有较强的主观性, 今后考虑能否结合实际情况进行其他评价方法的选择或模型的改进, 为野生东北虎的生存和繁衍以及人工饲养东北虎的放归计划提供更为科学的参考。

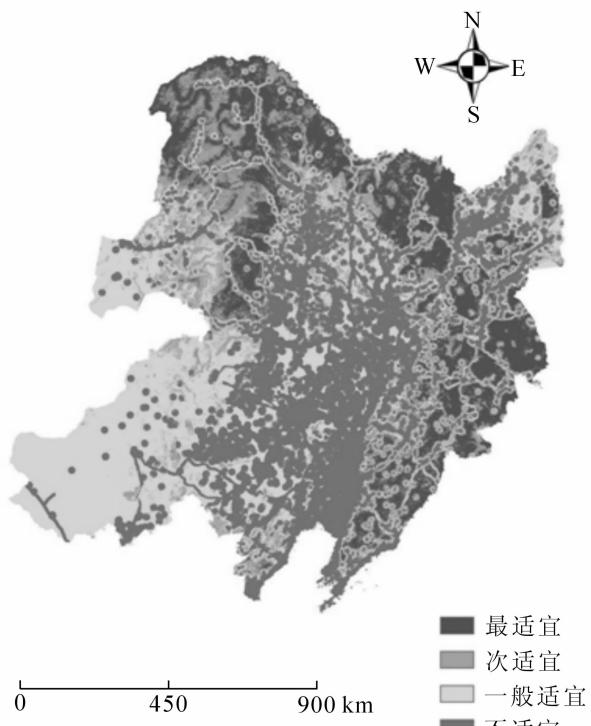


图3 东北地区东北虎生境适宜性综合评价分区

Figure 3 Comprehensive evaluation distribution of the Amur tigers habitat suitability

表3 东北地区东北虎生境适宜性综合评价分区
面积统计表

Table 3 The partition area of comprehensive evaluation of Amur tigers habitat suitability

适宜性等级	面积/hm ²	所占比例/%
最适宜	346 388.4	21.97
次适宜	265 464.8	16.83
一般适宜	347 176.0	22.02
不适宜	617 676.9	39.18

5 参考文献

- [1] 李钟汶, 邬建国, 寇晓军, 等. 东北虎分布区土地利用格局与动态[J]. 应用生态学报, 2000, **20**(3): 713 – 724.
LI Zhongwen, WU Jianguo, KOU Xiaojun, et al. Land use pattern and its dynamic changes in Amur tiger distribution region [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2009, **20**(3): 713 – 724.
- [2] 周绍春, 孙海义, 张明海, 等. 黑龙江省东北虎分布区域及其数量动态[J]. 兽类学报, 2008, **28**(2): 165 – 173.
ZHOU Shaochun, SUN Haiyi, ZHANG Minghai, et al. Regional distribution and population size fluctuation of wild Amur tiger (*Panthera tigris altaica*) in Heilongjiang Province [J]. *Acta Theriol Sin*, 2008, **28**(2): 165 – 173.
- [3] 曲艺, 栾晓峰. 基于最小费用距离模型的东北虎核心栖息地确定与空缺分析[J]. 生态学杂志, 2010, **29**(9): 1866 – 1874.
QU Yi, LUAN Xiaofeng. Core habitat identification and gap analysis for Amur tiger (*Panthera tigris altaica*) based on least-costdistance model [J]. *Chin J Ecol*, 2010, **29**(9): 1866 – 1874.
- [4] 李冰, 张恩迪, 张振华, 等. 吉林珲春自然保护区东北虎种群的初步监测[J]. 兽类学报, 2008, **28**(4): 333 – 341.
LI Bing, ZHANG Endi, ZHANG Zhenhua, et al. Prelmiinary monitoring of Amur tiger population in Jilin Hunchun National Nature Reserve [J]. *Acta Theriol Sin*, 2008, **28**(4): 333 – 341.
- [5] 郭玉荣, 刘颖, 许鲁, 等. 东北虎林园虎粪的资源化利用研究[J]. 野生动物学报, 2014, **35**(1): 15 – 18.
GUO Yurong, LIU Ying, XU Lu, et al. Resource value and utilization of tiger feces in Siberian Tiger Park [J]. *Chin J Wildlife*, 2014, **35**(1): 15 – 18.
- [6] 刘振生, 滕丽微, 李枫, 等. 笼养和半散放东北虎行为时间分配及活动规律差异的比较[J]. 生态学杂志, 2004, **23**(1): 20 – 23.
LIU Zhensheng, TENG Liwei, LI Feng, et al. Differences of time budget and activity rhythm of captive and semi-free Amur tiger(*Panthera tigris altaica*) [J]. *Chin J Ecol*, 2004, **23**(1): 20 – 23.
- [7] 滕丽微. 笼养条件下东北虎行为模式的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2001.
TENG Liwei. *A Study on the Behavioral Models of Amur Tiger in Captivity* [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2001.
- [8] KERLEY L L, GOODRICH J M, MIQUELLE D G, et al. Reproductive parameter of wild female Amur (Siberian) tigers (*Pantheratigs altaica*) [J]. *J Mammal*, 2003, **84**(1): 288 – 298.
- [9] GOODRICH J M. MIQUELLE D G. Transloation of problem Amur tigers *Panthera tigris altaica* to alleviate tiger-humanconflicts [J]. *Oryx*, 2005, **39**(4): 454 – 457.
- [10] 张常智, 张明海, 姜广顺. 中国野生东北虎数量监测方法有效性评估[J]. 生态学报, 2012, **32**(19): 5943 – 5952.
ZHANG Changzhi, ZHANG Minghai, JIANG Guangshun. Assessment of monitoring method for population abundance of Amur tiger in Northeast China [J]. *Acta Ecol Sin*, 2012, **32**(19): 5943 – 5952.
- [11] 朴正吉, 睢亚臣, 崔志刚, 等. 长白山自然保护区猫科动物种群数量变化及现状[J]. 动物学杂志, 2011, **46**(3): 78 – 84.
PIAO Zhengji, SUI Yachen, CUI Zhigang, et al. The history and current status of felid population in Changbai Mountain Nature Reserve [J]. *Chin J Zool*, 2011, **46**(3): 78 – 84.
- [12] 张常智, 张明海. 黑龙江省东完达山地区东北虎猎物种群现状及动态趋势[J]. 生态学报, 2011, **31**(21): 6481 – 6487.
ZHANG Changzhi, ZHANG Minghai. Population status and dynamic trends of Amur tiger's prey in Easter Wandashe Mountain, Heilongjiang Province [J]. *Acta Ecol Sin*, 2011, **31**(21): 6481 – 6487.
- [13] 周绍春, 张明海, 孙海义, 等. 黑龙江省完达山东部林区东北虎猎物生物量[J]. 生态学报, 2011, **31**(1): 145 – 153.
ZHOU Shaochun, ZHANG Minghai, SUN Haiyi, et al. Prey biomass of the Amur tiger (*Panthera tigris altaica*) in the eastern Wanda Mountains of Heilongjiang Province [J]. *Acta Ecol Sin*, 2011, **31**(1): 145 – 153.
- [14] 李颖. 振春地区基于东北虎生境选择的生态廊道研究[D]. 吉林: 延边大学, 2011.
LI Ying. *The Research on Ecology Corridor of Amur Tiger Based on Habitat Choice Research in Hunchun Area* [D].

- Jilin: Yanbian University, 2011.
- [15] 罗述金. 中国虎的概况[J]. 生物学通报, 2010, **45**(1): 1–5.
LUO Shujin. Tigers in China [J]. *Bull Biol.*, 2010, **45**(1): 1–5.
- [16] 中国科学院中国植被图编辑委员会. 1:1 000 000 中国植被图集[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [17] 周绍春. 东北虎及其猎物的种群大小、生境选择与评价研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2011.
ZHOU Shaochun. *Relationship Between Amur Tiger and Prey: Population Size, Habitat Selection and Evaluation in Eastern Wandashean Mountains of Heilongjiang Province* [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2011.
- [18] 周建飞, 曾光明, 黄国和, 等. 基于不确定性的城市扩展用地生态适宜性评价[J]. 生态学报, 2007, **27**(2): 774–783.
ZHOU Jianfei, ZENG Guangming, HUANG Guohe, et al. The ecological suitability evaluation on urban exoansion land based on uncertainties [J]. *Acta Ecol Sin*, 2007, **27**(2): 774–783.
- [19] 李振新. 中国长白山地区东北虎潜在栖息地研究[M]. 北京: 中国林业出版社, 2010.
- [20] 马天. 黑龙江省野生东北虎调查管理信息系统的研建[D]. 北京: 北京林业大学, 2013.
MA Tian. *Research and Construction of Investigation Information Management System of Panthera tigris altaica in Heilongjiang Province* [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2013.
- [21] 杜婧. 黑龙江省野生东北虎生境适宜度评价[D]. 北京: 北京林业大学, 2014.
DU Jing. *The Suitability Evaluation of the Wild Amur Tiger Habitat in Heilongjiang Province* [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2014.
- [22] 黄辉玲, 吴次芳, 张守忠. 黑龙江科技学院建筑黑龙江省土地整治规划效益分析与评价[J]. 农业工程学报, 2012, **28**(6): 240–246.
HUANG Huiling, WU Cifang, ZHANG Shouzhong. Benefits analysis and evaluation on land consolidation lanning in Heilongjiang province [J]. *Trans Chin Soc Agric Eng*, 2012, **28**(6): 240–246.
- [23] 向欣, 罗煜, 程红胜, 等. 基于层次分析法和模糊综合评价的沼气工程技术筛选[J]. 农业工程学报, 2014, **30**(18): 205–212.
XIANG Xin, LUO Yu, CHENG Hongsheng, et al. Biogas engineering technology screening based on analytic hierarchy process and fuzzy comprehensive evaluation[J]. *Trans Chin Soc Agric Eng*, 2014, **30**(18): 205–212.
- [24] 鲍艳, 胡振琪, 王建峰, 等. 层次分析法在土地开发中的适宜性评价[J]. 西安科技大学学报, 2005, **25**(2): 179–183.
BAO Yan, HU Zhenqi, WANG Jianfeng, et al. Analytical hierarchy process based on GIS assessment of suitability in land exploitation and consolidation [J]. *J Xi'an Univ Sci Technol*, 2005, **25**(2): 179–183.
- [25] 张明海, 马建章. 中国野生东北虎现状及其保护愿景展望[J]. 动物学杂志, 2010, **45**(1): 165–168.
ZHANG Minghai, MA Jianzhang. Current status and protection vision of wild northeast tiger in China [J]. *Chin J Zool*, 2010, **45**(1): 165–168.

国槐槐角种胚细胞悬浮培养的动力学研究

陈红贤, 于笑笑, 王晨阳, 张敏, 刘忠华

(北京林业大学 生物科学与技术学院, 北京 100083)

摘要: 对国槐 *Sophora japonica* 槐角种胚细胞悬浮培养的动力学进行研究, 在优化细胞接种量的基础上, 分析测定培养周期内不同培养阶段的槐角细胞生长和培养基中碳源、氮源、磷源的消耗, 以及细胞的鲜质量、干质量和黄酮产量的变化, 从而了解细胞生长、营养消耗与次生代谢产物积累的基本规律, 为建立结构化动力学模型奠定基础。结果表明: ①初始接种量为 $40.000 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 最利于细胞的培养; ②细胞的培养周期约为 27 d, 经过 27 d 的培养, 生物量和黄酮的产量达到最高, 分别为 $9.733 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $53.566 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 对细胞比生长速率和黄酮比合成速率进行分析, 得出黄酮的积累和细胞的生长为部分生长偶联型, 在 6~12 d 呈负相关, 12~33 d 呈正相关; ③基质中的碳源、氮源、磷源都是在 0~6 d 被迅速消耗, 到 12 d 时消耗量达到总量的 80.00% 以上。在氮源的吸收上, 铵态氮 (NH_4^+) 先于硝态氮 (NO_3^-) 的吸收。碳源、氮源、磷源的消耗与细胞生长和产物的积累密切相关。图 10 参 25

关键词: 植物学; 国槐槐角种胚; 悬浮细胞; 黄酮; 动力学; 基质营养物质

中图分类号: S718.3; Q942 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2016)02-0272-08

Kinetics of *Sophora japonica* embryo cells in a suspension culture system

CHEN Hongxian, YU Xiaoxiao, WANG Chenyang, ZHANG Min, LIU Zhonghua

(College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: Based on the established cell suspension culture system of *Sophora japonica* embryos, its kinetics was investigated. The suspension cell system of *S. japonica* embryos influenced by inoculum size was studied with analysis during cell culture of kinetic parameters, such as cell growth; consumption of C, N, and P; as well as changes in cell fresh weight, dry weight, and flavonoid production at various stages in the culture procedure. Results revealed that. (1) the preferable inoculum size for suspension cell proliferation was $40.000 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. (2) The cell suspension culture cycle lasted about 27 d with maximum biomass in dry weight reaching $9.733 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ and flavonoid production attaining $53.566 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Flavonoid production was semi-associated with cell growth of the *S. japonica* embryo being negatively related from 6–12 d and positively related from 12–33 d. (3) From 0–6 d sugar, N, and phosphate were absorbed quickly; after 12 d they were more than 80% absorbed. Also, NH_4^+ was utilized faster than NO_3^- . Thus, proliferation and flavonoid production of *S. japonica* embryo cells was closely related to the consumption of sugar, N, and phosphate. This research could provide references for the scale-up culture of *S. japonica* embryos cell by bioreactor. [Ch, 10 fig. 25 ref.]

Key words: botany; *Sophora japonica* embryo; suspension cell; flavonoids; kinetics; matrix nutrient

国槐 *Sophora japonica* 属于豆科 Leguminosae 槐属 *Sophora* 植物, 主要分布在中国北部。其果实即槐角, 槐角中含有大量黄酮类物质, 黄酮类化合物是一类在自然界广泛分布的多酚类物质, 又称为黄酮体、黄碱素和类黄酮^[1]。研究表明^[2-3], 黄酮类化合物具有清除自由基、抗氧化、抗突变、抗癌抗肿瘤、

收稿日期: 2015-05-11; 修回日期: 2015-06-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(J1103516); 北京林业大学理科生物学基地国家自然科学基金子项目(ZD008)

作者简介: 陈红贤, 从事药用植物及其次生代谢研究。E-mail: 965600690@qq.com。通信作者: 刘忠华, 副教授, 博士, 从事植物生长发育及系统进化研究。E-mail: liuzh6@bjfu.edu.cn

抗衰老、抗疲劳、抗菌抑菌和调节免疫、防治血管硬化、降血糖降血脂血清胆固醇等功能。另外,随着食品工业的发展与消费观念的改变,天然活性成分的保健食品成为现代人追逐的目标,其中黄酮类化合物以纯天然、高活性、见效快、作用广泛等特点日益受到人们的关注^[4]。目前,关于大豆异黄酮的研究报道较多,其相关食品和保健品也逐步投入市场,但其提取受大豆油脂和蛋白质的影响,工艺复杂,成本偏高;另一方面,槐角中富含黄酮类化合物,其质量分数大于200 g·kg⁻¹^[5],远远高于大豆中黄酮化合物的质量分数(约为525~986 mg·kg⁻¹^[6]),因此,用槐角代替大豆来生产黄酮化合物更有价值。槐角黄酮类化合物主要包括槐角苷、染料木素、染料木苷、槐属双苷等^[7-8],而槐角苷是槐角黄酮的主要成分,占总提取物的27.9%和总生药的2.2%^[9]。目前,获取这些具有极高药用价值的黄酮产物,通常是从槐角中直接提取,而槐角资源的缺乏限制了黄酮作为新型药剂的推广。植物细胞悬浮培养技术因为在人工条件下合成这些天然产物,解决了资源缺乏这一难题,对大规模商业化生产黄酮化合物具有重大的现实意义。利用该技术从国槐中获得黄酮化合物的研究国内外文献报道较少,因此,笔者对国槐的细胞培养技术进行了研究。经过前期的研究,本课题组已经成功诱导出槐角种胚愈伤组织,筛选出最佳固体和液体培养基,获得了稳定的悬浮细胞系,并检测出黄酮类化合物可以在愈伤组织中积累^[10]。愈伤组织中黄酮的积累与初始接种量、细胞生长、基质中营养物质的含量等因素存在密切关系,解析此关系将为细胞由摇瓶培养放大到生物反应器培养提供重要的技术参数和理论依据。生物反应器培养技术是细胞培养生产次级代谢产物,实现大规模工业化生产的关键技术之一^[11],因此,本研究在槐角种胚细胞悬浮培养过程中研究了细胞的生长、黄酮的合成以及主要营养物质的消耗,以便了解细胞在悬浮培养过程中的生长规律及动态变化,为提高黄酮的产量及细胞大规模培养提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

国槐槐角愈伤组织来自国槐种胚的诱导^[12],筛选生长快、分散性好的槐角愈伤组织,将其在B5固体培养基上继代5次以上,获得稳定的愈伤组织后将其转接到B5液体培养基中,在液体培养基中进行悬浮培养。通过不断选择获得分散性较好的细胞悬浮物,继代6次后转接到新的培养基中,建立稳定的悬浮细胞系。

1.2 培养条件

固体培养基为:B5 + 1.00 mg·L⁻¹ 2,4-D + 0.20 mg·L⁻¹ 6-BA,蔗糖质量分数为30%,琼脂质量分数为6%,灭菌前pH 6.60;液体培养基为B5 + 2.00 mg·L⁻¹ 2,4-D + 0.50 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.05 mg·L⁻¹ 萍乙酸(NAA),蔗糖质量分数为30%,灭菌前pH 6.17^[12-13]。培养基均以121 °C高压灭菌30 min。该悬浮体系在温度为25 °C,转速为110 r·min⁻¹的摇床上全程暗培养,25 d继代1次。

1.3 不同接种量对悬浮细胞的处理

将获得的分散性好且同步生长的细胞以20.00, 30.00, 40.00, 50.00, 60.00 g·L⁻¹作为初始接种量,接种到装液量为50.0 mL B5液体培养基的100.0 mL三角瓶中培养,26 d后收获,以收获时细胞的鲜质量,干质量和黄酮含量为依据,选择最佳接种量。

1.4 分析测定方法

1.4.1 细胞生物量和生长曲线的测定 以最佳接种量接种悬浮细胞到含50.0 mL B5液体培养基的100.0 mL三角瓶中,自接种之日起隔3 d测定1次细胞的生物量:取出摇瓶,用纱布过滤2次后收集细胞,滤液保存到干净的无菌瓶中备用。细胞用去离子水冲洗3次后用滤纸吸干至接种时的状态,测其鲜质量(g),然后将材料放入烘箱中70 °C恒温烘干10 h至恒量,测其干质量(g),重复3次·测定⁻¹,绘制细胞的生长曲线。

1.4.2 黄酮质量分数的测定 ①标准品的处理。黄酮类化合物质量分数的测定采用紫外分光光度法^[12],槐角苷为标准品,261.5 nm处测定吸光度D(λ),以吸光度为横坐标,槐角苷浓度为纵坐标绘制标准曲线,标准曲线方程为:y = 8.090 5x + 0.090 5(R²=0.998 9)。②样品吸光度的测定。将烘干后的愈伤组织研磨,过80目筛,备用。称取0.10 g粉末,加4.0 mL体积分数为70%乙醇,室温下超声提取40 min。提取后离心,取上清液稀释30倍后测定其在261.5 nm处的吸光度,重复3次·测定⁻¹。总黄酮的质量分

数 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}(x)$ 以槐角苷计, 计算公式如下: $x = 30cv/1000w$ 。黄酮的产量($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) = $20x \times \text{干质量}$ 。其中: c 为稀释后的提取液中槐角苷的质量浓度($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), v 为所提取槐角苷溶液的体积(mL), w 为精确称取的供试材料的质量(g), x 为计算出的黄酮的质量分数($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)。

1.4.3 生长速率和比生长速率的计算 生长速率是用来确定培养物或生物生长速度的量度。细胞培养过程中大多数细胞都有指数生长期, 在连续培养过程中指数生长期可能变成很长的时期。对于此类细胞培养, 可以用生长速率 $\gamma_x = dX/dt \approx \Delta X/\Delta t$ 表示单位时间细胞数量的增加; 用比生长速率 $\mu_x = 1/X \cdot dX/dt \approx 1/X \cdot \Delta X/\Delta t$ 表示单位质量的细胞在单位时间内所增加的细胞质量, 其中 X 是细胞量, t 是时间。细胞的生长速率可看做是绝对生长速度, 比生长速率可看成是相对生长速度。同理, 黄酮的合成速率为 $\gamma_p = dp/dt \approx \Delta p/\Delta t$ 和比合成速率为 $\mu_p = 1/X \cdot dp/dt \approx 1/X \cdot \Delta p/\Delta t$, 其中 X 是细胞量, p 是黄酮产量, t 是时间。细胞悬浮培养过程中产物积累和细胞生长之间的关系可表述为产物比合成速率和细胞比生长速率之间的关系: $\mu_p = \alpha\mu_x + \beta$, α 为与生长相关的产物生成系数, β 为与生长非相关的产物生成系数。

1.4.4 基质中营养物质的测定 收集摇瓶中的培养液, 碳源含量的测定采用蒽酮试剂法测定^[14]; 硝酸盐采用水杨酸比色法测定^[15]; 铵根离子采用水杨酸-次氯酸盐光度法测定; 磷酸根采用钼蓝比色法测定^[16]。

2 结果与分析

2.1 接种量对槐角细胞培养的影响

2.1.1 接种量对细胞生长鲜质量的影响 由图 1 可知: 在一定范围内, 随着细胞接种量的增加, 收获时细胞的鲜质量逐渐增加, 在接种量为 40.00, 50.00, 60.00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 收获时细胞鲜质量较大, 50.00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时最大为 4.68 g, 接种量为 60.00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 鲜质量开始下降。对其进行显著性分析发现接种量为 40.00, 50.00, 60.00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时细胞鲜质量显著大于接种量为 20.00, 30.00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 而 40.00, 50.00, 60.00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 之间差异并不显著。但是, 细胞鲜质量的增长倍数并没有随着接种量的增大而增加, 当接种量为 40.00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 细胞鲜质量增长倍数达到最大的 2.13 倍, 接种量为 50.00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 细胞鲜质量增长倍数也达到 1.87 倍。而当接种量为 60.00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 细胞鲜质量增长倍数反而下降, 为 1.49 倍。为了以较小的接种量获得较大的生物量, 使接种细胞达到最大的利用率, 40.00, 50.00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的接种量为最佳接种量。

2.1.2 接种量对细胞生长干质量的影响 分析图 2 可知: 在一定范围内, 随着细胞接种量的增加, 收获时细胞的干质量逐渐增加, 在接种量为 60.00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 收获时细胞干质量达到最大值, 为 0.28 g。然后, 对其干质量进行显著性分析, 发现当接种量为 50.00, 60.00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 其干质量显著高于接种量为 20.00, 30.00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; 接种量为 40.00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 干质量显著高于接种量为 20.00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; 但是接种量为 40.00, 50.00, 60.00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 其干质量无显著性差异。综合考虑, 为了使接种细胞达到最大的利用率, 40.00, 50.00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的接种量较好。

2.1.3 接种量对细胞黄酮质量分数的影响 由图 3 可以知道: 接种量不同, 最后的黄酮化合物质量分数不同, 接种量为 30.00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 黄酮化合物质量分数最高, 为 9.35 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。对它进行方差分析得出, 接种量为 20.00, 30.00, 40.00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 黄酮化合物质量分数较高, 无显著性差异; 而接种量为 50.00, 60.00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 黄酮质量分数降低, 且显著低于接种量为 20.00, 30.00, 40.00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。所以, 从黄酮质量分数来说, 接种量为 20.00, 30.00, 40.00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 较好。综合以上 3 个方面, 选择接种量为 40.00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 收获生物量和黄酮化合物质量分数都较高。

2.2 槐角细胞悬浮培养过程中细胞生长和黄酮积累的动力学分析

2.2.1 细胞生长曲线和黄酮化合物合成曲线 测定细胞的干质量和黄酮的产量, 绘制生长和合成曲线, 如图 4。槐角细胞悬浮培养的周期约为 27 d, 在 1 个培养周期内细胞分为延滞期、对数生长期、稳定期和衰亡期。0~6 d 这一阶段, 细胞处于延滞期, 生长缓慢, 原因可能是细胞在继代过程中转入新的培养液中时, 新培养基中的渗透压较高, 盐浓度也较高, 而悬浮细胞不能迅速适应, 所以此时次生代谢产物含量会比较高; 6~27 d 为细胞快速生长期, 细胞生长迅速, 27 d 细胞干质量达到最大 9.733 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; 27 d 以后, 细胞进入稳定期。稳定期较短, 很快进入衰亡期, 生物量逐渐下降, 细胞开始死亡。在 6~27 d 这个时期黄酮化合物的产量随着细胞干质量的增加也不断升高, 27 d 达到最大 53.566 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

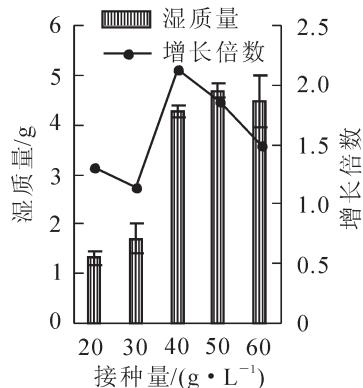


图1 不同接种量对细胞鲜质量的影响

Figure 1 Effect of different inoculum size on cell wet weight

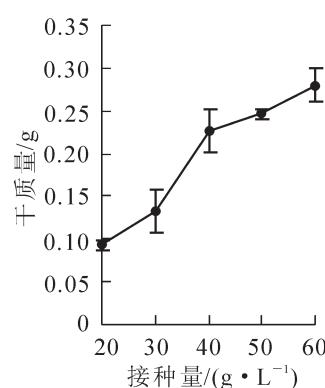


图2 不同接种量对细胞干质量的影响

Figure 2 Effect of different inoculum size on cell dry weight

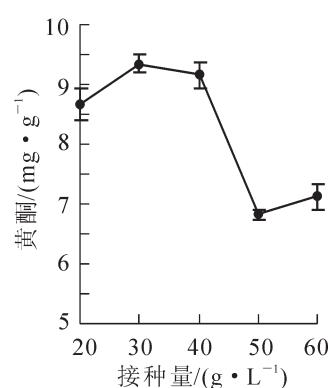


图3 不同接种量对黄酮质量分数的影响

Figure 3 Effect of different inoculum size on flavonoids content

2.2.2 细胞比生长速率和黄酮比合成速率 国槐槐角细胞悬浮培养过程中生长速率和比生长速率如图5所示。由图5可知:在1个培养周期内国槐槐角细胞的生长速率和比生长速率变化趋势相同,0~6 d细胞的生长速率和比生长速率较低;到对数生长期,生长速率和比生长速率有2个峰值,从第6天开始,生长速率和比生长速率迅速增加,12 d时达到第1个峰值,生长速率和比生长速率分别为 $0.356 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 和 0.067 d^{-1} ,然后在15 d生长速率和比生长速率有所下降,之后又开始逐渐上升,在24 d时上升到第2个高峰,生长速率和比生长速率分别为 $0.378 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 和 0.044 d^{-1} ,之后生长速率和比生长速率则迅速下降。

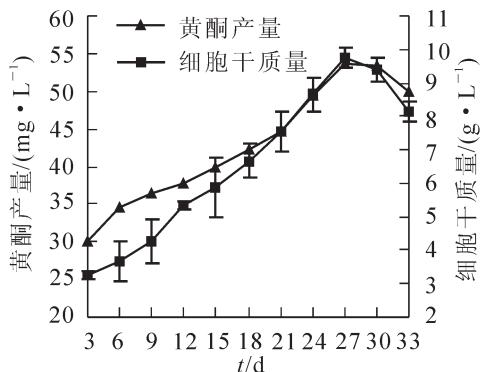


图4 细胞生长和黄酮化合物合成曲线

Figure 4 Growth curves of *Sophora japonica* embryo callus and flavonoids production

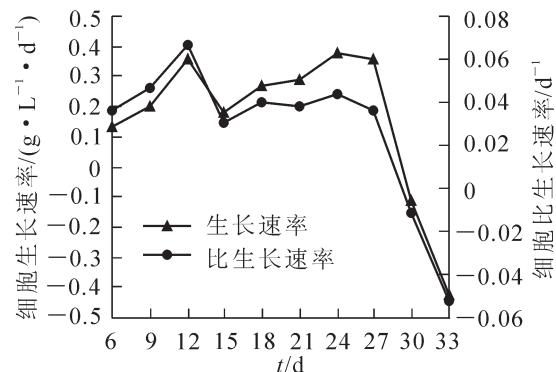


图5 细胞生长速率和比生长速率

Figure 5 Dynamic changes of cell growth rate and specific growth rate

国槐槐角细胞悬浮培养过程中黄酮的合成速率和比合成速率如图6所示。分析图6可知:黄酮化合物的合成速率与比合成速率的变化趋势与细胞生长规律不完全一致。在细胞生长较快的第6~12天,黄酮合成速率和比合成速率反而呈下降趋势,可能是因为细胞经过延缓期适应了培养基的环境,次生代谢产物生成减少甚至不合成。在细胞生长最快的第12天黄酮合成速率和比合成速率达到最低点,合成速率为 $0.358 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 和 $0.067 \times 10^{-3} \text{ d}^{-1}$ 。而在15 d之后黄酮合成速率和比合成速率和细胞生长规律比较相似,逐渐上升,可能是因为细胞迅速生长,基数增大,次生代谢产物合成逐渐增加,黄酮合成速率和比合成速率也逐渐增大,在24 d达到最高值,分别为 $1.662 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 和 $0.192 \times 10^{-3} \text{ d}^{-1}$,之后迅速下降。

2.2.3 细胞生长和黄酮化合物积累的关系 由图5和图6可知:细胞的比生长速率和黄酮化合物的比合成速率变化规律不完全相同,可以分为2个时期:第1个时期为6~12 d(图7a),第2个时期为12~33 d(图7b)。图7a表明:在6~12 d黄酮的比合成速率(μ_p)随着槐角细胞比生长速率(μ_x)的增加而减少,在此期间它们之间关系可以用以下公式表示: $\mu_p = -10.6330\mu_x + 0.7435$ ($R^2 = 0.7969$)。从式可知:黄酮的积

累和槐角细胞的生长呈负相关。图 7b 表明：在 12~33 d 黄酮的比合成速率(μ_p)随着槐角细胞比生长速率(μ_x)的增加而增加，在此期间它们之间关系可以用以下公式表示： $\mu_p=3.0323\mu_x+0.0221 (R^2=0.9508)$ 。从式可知：黄酮的积累和槐角细胞的生长呈正相关。

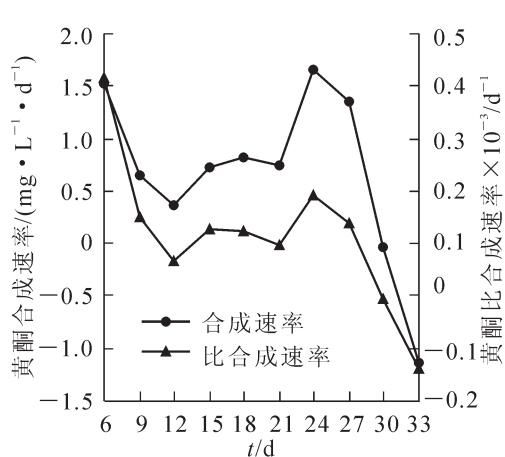


图 6 黄酮合成速率和比合成速率

Figure 6 Dynamic changes of flavonoids synthesis rate and specific synthesis rate

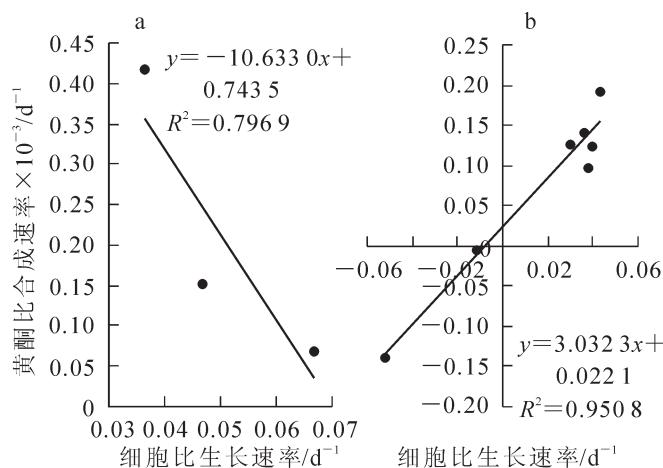


图 7 产物比合成速率和细胞比生长速率的关系

Figure 7 Relationship between flavonoids specific synthesis rate and cell specific growth rate of *Sophora japonica* embryo in suspension culture

2.3 槐角细胞悬浮培养过程中对营养物质消耗的动态变化

2.3.1 碳源的消耗 碳源在国槐槐角细胞悬浮培养过程中的动态变化如图 8 所示。在 0~6 d 消耗迅速，6 d 时已经消耗了总糖的 68.38%，为细胞快速增长做好了准备，12 d 时消耗达 80.00%，12 d 以后糖的消耗量减少，但质量浓度继续下降，细胞迅速生长。33 d 糖的质量浓度为 1.803 g·L⁻¹，整个过程共消耗了总糖的 93.00%。

2.3.2 氮源的消耗 槐角细胞悬浮培养液中的硝态氮和铵态氮质量浓度的动态变化如图 9 所示。铵态氮和硝态氮的消耗并不同步，在 0~6 d 铵态氮被迅速利用，6 d 已消耗 82.37%，而硝态氮消耗量较低，为 11.58%。6 d 之后铵态氮质量浓度较低时，硝态氮质量浓度迅速下降，12 d 时消耗达 95.77%，基质中的大部分氮源被消耗，而此时细胞生长速率达到第 1 个高峰，与氮源的消耗相符合，但是铵态氮的吸收先于硝态氮。12 d 之后铵态氮和硝态氮继续小幅下降，细胞不断生长。基质中硝态氮和铵态氮分别在 18 d 和 27 d 基本消耗殆尽，细胞生长达到最大值。因此，可以推断，氮素是影响国槐种胚细胞增殖的一个重要原因。

2.3.3 磷源的消耗 当把细胞接种到新的培养基后(图 10)，细胞开始大量吸收磷酸根离子。在迟滞期 0~6 d 内消耗了 80.78% 的磷，进入快速生长期以后，6~12 d 磷的消耗量还是较大，第 12 d 磷的消耗量达 92.96%，细胞生长速率也达到最大。之后磷消耗量逐渐减少，到 24 d 时磷已经被消耗殆尽，细胞生长速率开始下降，可见磷源的含量与细胞悬浮培养密切相关。

2.3.4 基质中营养物质的消耗与细胞生长、黄酮积累的关系 由图 8~10 可知：细胞对基质中的碳源、氮源、磷源的消耗过程大体相似。分析细胞培养过程中营养物质的动态变化与细胞生长和黄酮积累的关系发现：0~6 d，细胞迅速吸收营养物质，营养物质消耗量最大，质量浓度迅速下降，但是吸收的营养物质储存在细胞中为细胞快速增长做准备，所以细胞生长缓慢，同时处于此时期的细胞产生次生代谢产物，所以细胞的比生长速率较低而黄酮的比合成速率较高；6~12 d 这些营养物质浓度仍然下降较快，但幅度较前 6 d 小，到 12 d 基本消耗量都达到 80.00% 以上，延滞期营养物质的大量储存和细胞对基质中营养物质的继续吸收为细胞生长提供了充足的营养物质，所以 6~12 d 细胞迅速生长，比生长速率升高，在 12 d 达到一个高峰，同时由于营养物质充分，足够满足细胞快速增长，很少甚至不会产生次生代谢产物，所以 6~12 d 黄酮的比合成速率下降，在 12 d 时达到最低点；12~15 d 营养物质基本被消耗掉 80%，所以细胞对基质营养的吸收量迅速下降，这一变化可能会暂时破坏细胞生长的平衡，进而产生一些次生代谢产物，所以同 12 d 相比细胞比生长速率有所下降，黄酮比合成速率开始上升；15~24 d 在

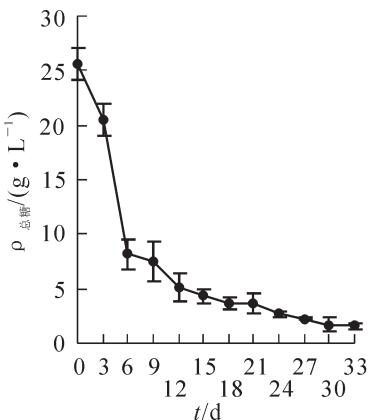


图8 培养过程中碳源的动态消耗变化

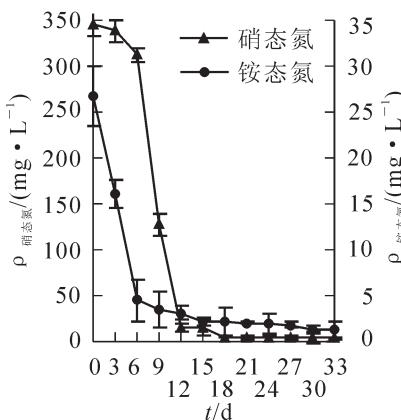


图9 培养过程中氮源的动态消耗变化

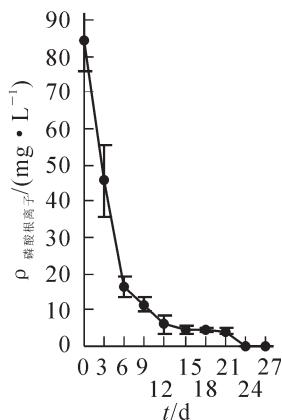


图10 培养过程中磷源的动态消耗变化

Figure 8 Change of sugar contents in the medium during the cell suspension culture cycle

Figure 9 Change of nitrogen contents in the medium during the cell suspension culture cycle

Figure 10 Change of phosphate contents in the medium during the cell suspension culture cycle

基质营养物质质量浓度较低的情况下细胞主要依靠自身存储的营养物质来供细胞生长，且自身存储的物质可以满足细胞的生长进而逐渐恢复稳定，所以细胞的比生长速率又开始继续上升，细胞数量迅速增加，但是在满足细胞生长的基础上细胞开始对营养物质有所竞争，加上上一阶段次生代谢产物的产生会诱导更多的产物合成，所以黄酮的比合成速率也继续上升，24 d 比生长速率和比合成速率同时达到最大，但是其细胞生长速率小于12 d 的第1个高峰，可能是因为营养物质不如12 d 充分；24 d 之后，基质中的营养物质基本被耗尽，细胞中储存的也被消耗殆尽，营养物质的严重缺乏导致了细胞的比生长速率和黄酮的比合成速率迅速下降。

3 结论与讨论

悬浮细胞分裂增殖前需要一个最低的临界密度，可能是因为：细胞分裂启动前，需要细胞内一种称为条件因子的物质达到一定的内源水平^[17]。可通过添加条件培养基或者增加细胞接种量来达到这个内源水平。细胞要维持分裂和生长，其内源代谢物质必须达到一定的阀值，在高密度细胞群和培养基营养充足的情况下，易于达到这个阀值^[18]。如果接种量太低，则细胞悬浮液质量浓度过低，使得细胞间的物质交换不充分，不利于细胞的生长；细胞悬浮液的质量浓度过高，使得细胞密度过高，单个细胞会因营养吸收不足而死亡，因此，对于细胞的悬浮培养，选择合适的接种量至关重要^[19]。将继代培养后同步化生长的悬浮细胞以不同接种量接种于新鲜液体培养基中，测定细胞生长和黄酮合成的情况可为大规模细胞培养的研究奠定基础。本研究得出槐角种胚细胞悬浮培养的最佳接种量为40.00 g·L⁻¹，过低或过高都不利于细胞的生长和次生代谢产物的积累。Sakano^[20]等曾报道过低接种量会严重抑制细胞的增殖，与本研究结果一致。

槐角细胞悬浮培养的周期约为27 d，在一个培养周期内细胞分为延滞期、快速生长期、稳定期和衰亡期。0~6 d 为延滞期，6~27 d 为快速生长期，27 d 以后，细胞进入稳定期，稳定期较短，此后很快进入衰亡期。经过27 d 的培养，生物量和黄酮的产量均达到最高。分析槐角细胞生长与黄酮积累的动力学关系，在6~12 d 黄酮的比生成速率(μ_p)随着槐角细胞比生长速率(μ_x)的增加而减少，黄酮的积累和槐角细胞的生长呈负相关；而在12~33 d 黄酮的比生成速率(μ_p)随着槐角细胞比生长速率(μ_x)的增加而增加，黄酮的积累和槐角细胞的生长呈正相关。因此，国槐槐角细胞生长和黄酮积累为部分生长偶联型。

悬浮培养过程中，细胞主要靠基质中的营养物质来满足自身的生长和产物的合成。其中碳源主要由蔗糖提供，在细胞培养中糖类具有重要作用，既为细胞生长提供能量，也为初级、次级代谢物合成提供碳支架，同时对渗透压的调节有重要作用^[11]；硝态氮和铵态氮是细胞生长代谢的主要氮来源，调节培养基中总氮浓度或改变铵态氮和硝态氮的比例都可显著影响细胞培养过程中细胞的生长和次生代谢物的合^[21~22]；磷源是植物细胞内重要的营养成分之一，参与核苷酸、脱氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸

(RNA)和蛋白质等的形成,它的消耗量可以从一个侧面反映出细胞的生长情况。因此,研究这几种营养物质在培养过程中的动态消耗有重要意义。在一个培养周期内,分析槐角细胞和黄酮的比生长速率与基质中主要营养成分的变化,对槐角细胞悬浮培养的生长状况进行较为全面的分析,发现营养成分的消耗与细胞增殖和产物积累的各个阶段是吻合的:0~6 d,细胞处在接种初期,而接种的细胞处于继代培养后期,细胞因营养不足而处于一种“饥饿”状态,因此,当细胞转入新的培养基以后,必将通过主动吸收和扩散等途径快速吸收营养物质^[23],所以这个时期,基质中的营养物质迅速下降;6~24 d,随着细胞的快速生长和黄酮的积累,基质中的营养物质基本被消耗;24 d之后,基质中营养物质不足,细胞的增殖和黄酮的合成速率也都开始下降。由此可以推断,培养液中营养成分的不足限制了细胞的细胞增长和产物积累,基质中碳源氮源磷源的含量与细胞增长和产物积累密切相关,而且铵态氮的吸收先于硝态氮。这与前人的研究^[24-25]:在植物细胞生产次生代谢物的过程中,细胞对培养液营养成分的消耗动态直接影响细胞的生长和次生代谢物的合成相一致。该结果为进一步提高槐角细胞中黄酮的产量提供了营养成分依据:可以在国槐种胚细胞培养过程中采用分批添加营养成分的方法来提高黄酮的产量,如在细胞培养的12 d添加蔗糖、硝酸盐,6 d时添加铵盐和磷酸盐,以补充培养基中的营养成分,保持黄酮化合物以较高的速率积累。

本研究结果为提高槐角种胚悬浮细胞中黄酮的积累和后续建立结构化动力模型提供了理论依据,同时为细胞由摇瓶培养放大到生物反应器培养提供了技术参数。

4 参考文献

- [1] PRATT D E, BIRAC P M. Source of antioxidant activity of soybeans and soy products [J]. *J Food Sci*, 1979, **44**(6): 1720 – 1722.
- [2] 唐浩国. 黄酮类化合物研究[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 1 – 15.
- [3] 龙春, 高志强, 陈凤鸣, 等. 黄酮类化合物的结构-抗氧化活性关系研究进展[J]. 重庆文理学院学报: 自然科学版, 2006, **5**(2): 13 – 17.
LONG Chun, GAO Zhiqiang, CHEN Fengming, et al. Advance in studies of the relationships between structure and antioxidant activity of flavonoids compounds [J]. *J Chongqing Univ Arts Sci Nat Sci Ed*, 2006, **5**(2): 13 – 17.
- [4] 溥丽华, 刘忠华, 魏振园, 等. 国槐槐角细胞培养生产类黄酮的研究进展[J]. 广东农业科学, 2012, **39**(2): 101 – 103.
PU Lihua, LIU Zhonghua, WEI Zhenyuan, et al. Research advances on production of flavonoids by fruits of *Sophora japonica* L. cell culture [J]. *Guangdong Agric Sci*, 2012, **39**(2): 101 – 103.
- [5] 丛艳波, 张永忠, 刘潇. 亚临界水提取槐角中总异黄酮的研究[J]. 中草药, 2010, **41**(5): 717 – 720.
CONG Yanbo, ZHANG Yongzhong, LIU Xiao. Study on total isoflavones from *Fructus sophorae* by subcritical water extraction [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2010, **41**(5): 717 – 720.
- [6] DEVI M K A, GONDI M, SAKTHIVELU G, et al. Functional attributes of soybean seeds and products, with reference to isoflavone content and antioxidant activity [J]. *Food Chem*, 2009, **114**(3): 771 – 776.
- [7] 唐于平, 楼凤昌, 马雯, 等. 槐果皮中的异黄酮甙类成分[J]. 中国药科大学学报, 2001, **32**(3): 187 – 189.
TANG Yuping, LOU Fengchang, MA Wen, et al. Isoflavonoid glycosides from the pericarps of *Sophora japonica* [J]. *J China Pharm Univ*, 2001, **32**(3): 187 – 189.
- [8] RAO C V, WANG C X, SIMI B, et al. Enhancement of experimental colon cancer by genistein [J]. *Cancer Res*, 1997, **57**(17): 3717 – 3722.
- [9] 肖怀, 陈泽乃, 陆阳, 等. HPLC 测定槐角中槐昔含量[J]. 大理学院学报, 2003, **2**(3): 11 – 13.
XIAO Huai, CHEN Zenai, LU Yang, et al. Determination of sophoricoside in *Fructus sophorae* by HPLC [J]. *J Dali Coll*, 2003, **2**(3): 11 – 13.
- [10] 溥丽华, 刘忠华, 魏振园, 等. 国槐种胚愈伤组织培养与异黄酮量的分析[J]. 中草药, 2013, **43**(14): 1984 – 1989.
PU Lihua, LIU Zhonghua, WEI Zhenyuan, et al. Callus culture of embryos in *Sophora japonica* and analysis on isoflavones content [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2013, **43**(14): 1984 – 1989.
- [11] 范桂枝, 翟俏丽, 于海娣, 等. 白桦细胞悬浮培养产三萜及其营养成分消耗的动态[J]. 林业科学, 2011, **47**

- (1): 62 – 67.
- FAN Guizhi, ZHAI Qiaoli, YU Haidi, et al. Kinetics of triterpenoid production and nutrient consumption in birch (*Betula platyphylla*) suspension cell [J]. *Sci Silv Sin*, 2011, **47**(1): 62 – 67.
- [12] 溥丽华. 国槐种胚细胞培养生产异黄酮物质研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2012.
- PU Lihua. *A Study on Production of Isoflavones by Embryos of Sophora japonica L. Cell* [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2012.
- [13] 魏振园, 汤若风, 王晋飞, 等. pH对槐角愈伤组织黄酮类化合物产量的影响[J]. 广西植物, 2013, **33**(2): 203 – 207.
- WEI Zhenyuan, TANG Ruofeng, WANG Jinfei, et al. Effects of pH value on yield of flavonoids in callus tissues of *Sophora japonica* fruits [J]. *Guishaia*, 2013, **33**(2): 203 – 207.
- [14] 赵昶灵, 李云, 陈中坚, 等. 花色苷的酶降解[J]. 热带亚热带植物学报, 2011, **19**(6): 576 – 584.
- ZHAO Changling, LI Yun, CHEN Zhongjian, et al. The enzymatic degradation of anthocyanins [J]. *J Trop & Subtrop Bot*, 2011, **19**(6): 576 – 584.
- [15] 谢红伟. 水杨酸比色法测定水中硝酸盐氮的含量[J]. 贵州农业科学, 1999, **27**(3): 40 – 41.
- XIE Hongwei. Determination of nitrogen content in nitrate by salicylic acid colorimetry in water [J]. *Guizhou Agric Sci*, 1999, **27**(3): 40 – 41.
- [16] KOMES D, ULRICH D, GANIC K K, et al. Study of phenolic and volatile composition of white wine during fermentation and a short time of storage [J]. *VITIS J Grap Res*, 2007, **46**(2): 77 – 84.
- [17] 陈继光, 上官新晨, 尹忠平, 等. 青钱柳悬浮细胞的培养及其基质消耗的规律[J]. 现代食品科技, 2014, **30**(1): 44 – 49.
- CHEN Jiguang, SHANGGUAN Xinchen, YIN Zhongping, et al. Establishment of the cell suspension culture system of *Cyclocarya paliurus* and matrix consumption laws [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2014, **30**(1): 44 – 49.
- [18] 李勇, 邢辉, 张金芳, 等. 桑树悬浮细胞生长规律及其生理特性的研究[J]. 蚕业科学, 2007, **33**(1): 91 – 94.
- LI Yong, XING Hui, ZHANG Jinfang, et al. Research on the growth regularity and physiological characteristics of mulberry suspension cells [J]. *Acta Ser Sin*, 2007, **33**(1): 91 – 94.
- [19] 张珏, 尹欢, 阮利霞, 等. 高生物产量川芎细胞悬浮培养条件优化[J]. 成都大学学报: 自然科学版, 2014, **33**(1): 10 – 13.
- ZHANG Jue, YIN Huan, RUAN Lixia, et al. Optimization of cell suspension culture conditions of *ligrusticum Chuanxiong* at high biomass yield [J]. *J Chengdu Univ Nat Sci Ed*, 2014, **33**(1): 10 – 13.
- [20] SAKANO K, MATSUMOTO M, YAZAKI Y, et al. Inorganic phosphate as a negative conditioning factor in plant cell culture [J]. *Plant Sci*, 1995, **107**(1): 117 – 124.
- [21] PANDA A K, MISHRA S, BISARIA V S. Alkaloid production by plant cell suspension cultures of *Holarrhena antidysenterica*: I. effect of major nutrients [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1992, **39**(10): 1043 – 1051.
- [22] MORENO P R H, van der HEIJDEN R, VERPOORTE R. Cell and tissue cultures of *Catharanthus roseus*: a literature survey [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1995, **42**(1): 1 – 25.
- [23] 郭志刚, 都军, 刘瑞芝. 紫杉细胞生长过程与营养物质消耗的动态研究[J]. 清华大学学报: 自然科学版, 2002, **42**(5): 599 – 602.
- GUO Zhigang, DU Jun, LIU Ruizhi. Kinetic investigation of *Taxus* cell growth and nutrient consumption [J]. *J Tsinghua Univ Sci Technol*, 2002, **42**(5): 599 – 602.
- [24] AZEVEDO H, DIAS A, TAVARES R M. Establishment and characterization of *Pinus pinaster* suspension cell cultures [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2008, **93**(1): 115 – 121.
- [25] 董诚明, 苏秀红, 王伟丽. 氮碳源对冬凌草再生植株生长及次生代谢产物的影响[J]. 西北植物学报, 2009, **29**(3): 494 – 498.
- DONG Chengming, SU Xiuhong, WANG Weili. Effects of sucrose concentration, nitrogen on the growth and main secondary metabolites accumulated of regeneration plant of *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 2009, **29**(3): 494 – 498.

绿化废弃物好氧堆肥和蚯蚓堆肥作为蔬菜育苗基质研究

龚小强, 李素艳, 李燕, 孙向阳

(北京林业大学林学院, 北京 100083)

摘要: 为减少泥炭的开采和提高绿化废弃物的再利用率, 探讨绿化废弃物好氧堆肥和蚯蚓堆肥替代泥炭作为蔬菜育苗基质的可行性, 将好氧堆肥、蚯蚓堆肥、泥炭按不同体积混配制成 6 种基质: 对照(泥炭), T_1 (好氧堆肥), T_2 (蚯蚓堆肥), $T_3[V(\text{好氧堆肥}):V(\text{泥炭})=1:1]$, $T_4[V(\text{蚯蚓堆肥}):V(\text{泥炭})=1:1]$, $T_5[V(\text{好氧堆肥}):V(\text{蚯蚓堆肥}):V(\text{泥炭})=1:1:1]$, 采用完全随机设计, 对 3 种不同耐盐性蔬菜甘蓝 *Brassica oleracea*(高耐盐性)、莴苣 *Lactuca sativa*(中耐盐性)、西葫芦 *Cucurbita pepo* var. *ovifera*(低耐盐性)进行育苗试验, 重复 10 次·处理⁻¹, 研究不同基质的理化性质及其对蔬菜幼苗生长影响, 并采用隶属函数评价各基质配方的优劣。结果表明: T_4 处理基质的理化性质的各项指标均在无土栽培基质的理想范围, 甘蓝、莴苣和西葫芦幼苗在其中的生长质量综合评价指数分别为 0.52, 0.52, 0.54 高于对照 0.33, 0.49, 0.49, 成本较对照降低了 41.56%, 可用作甘蓝、莴苣和西葫芦育苗代用基质。表 7 参 23

关键词: 园艺学; 绿化废弃物; 好氧堆肥; 蚯蚓堆肥; 栽培基质; 蔬菜育苗

中图分类号: S606; S317 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2016)02-0280-08

Compost and vermicompost from green wastes as substrates for vegetable seedlings cultivation

GONG Xiaoqiang, LI Suyan, LI Yan, SUN Xiangyang

(College of Forestry, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: To reduce the overuse of peat and to increase the recycling rate of green wastes for vegetable seedling cultivation, the feasibility of using green waste compost and vermicompost to replace peat as a growth media was evaluated. Six media were prepared by mixing green waste compost and vermicompost with peat at different rates by volume including ck (peat), T_1 (compost), T_2 (vermicompost), T_3 (compost + peat at 1:1 V/V), T_4 (vermicompost + peat at 1:1 V/V), T_5 (compost + vermicompost + peat at 1:1:1 V/V). Thereafter, three vegetable species with different salt tolerance: cabbage (most salt tolerance), lettuce (moderate salt tolerance), and zucchini (less salt tolerance) were germinated and grown in the six media. The physical and chemical properties of the different growing media were determined, and the growth of seedlings was also measured. The analysis method of subordinate function was used to evaluate the pros and cons of different growing media. All treatments were replicated ten times, in a completely randomized design. Results indicated that the physical and chemical properties of T_4 were all within adequate range for use as a containerized substrate in horticulture. The comprehensive evaluation index for seedlings of T_4 versus the control were higher with T_4 : cabbage (0.52 and 0.33), lettuce (0.52 and 0.49), and zucchini (0.54 and 0.49). Additionally, the cost with T_4 was 41.56% less. Therefore, this treatment could be used successfully as a medium replacing peat for production of cabbage, lettuce, and zucchini seedlings. [Ch, 7 tab. 23 ref.]

Key words: horticulture; green waste; compost; vermicompost; growing substrate; vegetable seedling cultivation

收稿日期: 2015-04-07; 修回日期: 2015-05-09

基金项目: 国家林业局林业科学技术推广项目([2012]39)

作者简介: 龚小强, 从事固体废弃物资源化再利用研究。E-mail: styybl@163.com。通信作者: 李素艳, 副教授, 博士, 从事农林废弃物再利用研究。E-mail: lisuyan@bjfu.edu.cn

随着世界各国设施农业的迅速发展,泥炭作为传统理想栽培基质,其用量也急剧增加^[1]。然而,泥炭是一种不可再生资源,并且其开采会对湿地生态环境造成严重破坏。目前,许多国家已明令禁止对泥炭进行开采,并转而寻求其他可替代泥炭的资源^[2-3]。有机固体废弃物因其来源广泛、产生量巨大,并且含有丰富的营养物质而备受关注。许多研究表明^[4-8],有机固体废弃物(例如城市污泥、牛粪、猪粪、蘑菇渣和厨余垃圾等)经过合理的好氧堆肥或蚯蚓堆肥处理后,可部分或完全替代泥炭作为栽培基质。近年来,中国城市绿化快速发展导致绿化废弃物产生量也急剧上升,进行好氧堆肥或蚯蚓堆肥处理后,产品用作栽培基质,不但可以实现绿化废弃物减量化、无害化、资源化处理,还可以减少栽培过程泥炭使用量,节约生产成本。张璐等^[9]研究表明,绿化废弃物经堆肥处理后,其产品可替代50%泥炭用于青苹果竹芋*Calathea rotundifolia* 'Fasciata'栽培。张强等^[10]研究表明,绿化废弃物经堆肥处理后,其产品以30%~50%比例混配于素土,对大花马齿苋*Purslane herb*,矮牵牛*Petunia hybrida*和彩叶草*Coleus blumei*等3种草花的生长具有显著促进作用。吴益锋^[11]研究表明,绿化废弃物经堆肥处理后,其产品添加80%替代泥炭用于一串红*Salvia splendens*栽培,其效果优于纯泥炭基质。目前,以绿化废弃物为原料的栽培基质研究多集中于花卉栽培,而针对蔬菜栽培的研究相对较少,并且,原料处理多局限于好氧堆肥技术,鲜见应用蚯蚓堆肥技术。因此,本研究拟将绿化废弃物通过好氧堆肥和蚯蚓堆肥2种技术处理后,将所得产品用于替代泥炭进行甘蓝*Brassica oleracea*,莴苣*Lactuca sativa*和西葫芦*Cucurbita pepo*等3种不同耐盐性蔬菜育苗栽培,通过基质理化性质和幼苗生长发育指标分析,以期筛选出适合蔬菜育苗且价格低廉的基质类型与配比,为绿化废弃物资源化利用探索新的途径。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试好氧堆肥制备:当季绿化废弃物(枯枝落叶、树枝修剪物和草坪修剪物等)取自朝阳园林绿化废弃物消纳中心,原材料粉碎至粒径1~2 cm,将100 kg材料采用条垛式(长2.0 m,宽1.5 m,高0.6 m)方式进行好氧发酵处理,堆肥初始将堆体的含水量调节至65%左右,添加尿素将碳/氮比调至25,7 d翻堆1次,堆肥整个过程保持含水量65%左右,堆肥60 d后,至各项指标显示达到腐熟,备用。

供试蚯蚓堆肥制备:上述原材料进行好氧堆肥(消除堆肥材料中不利于蚯蚓生长物质)20 d后好氧堆肥停止,将材料按2 kg分置于各个塑料反应容器(长40.5 cm,宽30.5 cm,高14.5 cm)中,并加入200 g风干牛粪(蚯蚓初期生长食物),调节材料水分至70%,之后每个反应容器加入20条太平2号蚯蚓(无生殖环)进行蚯蚓堆肥,整个处理过程定时补充水分,维持水分70%左右。蚯蚓堆肥时间至60 d后,筛选出蚯蚓和蚯蚓卵,所得蚯蚓堆肥备用。

供试泥炭:泥炭为荷兰丹麦进口的品氏泥炭,购于北林科技股份有限公司。

供试种子:试验以甘蓝、莴苣和西葫芦等3种不同耐盐性蔬菜种子为试验用种,其中甘蓝耐盐性最强,莴苣耐盐性中等,西葫芦耐盐性最弱,均由农业科学院蔬菜花卉研究所提供。

1.2 试验方案

本试验于2014年11月至2015年1月在北京林业大学北林科技股份有限公司温室进行。试验共设6各处理:对照ck(泥炭),T₁(好氧堆肥),T₂(蚯蚓堆肥),T₃[V(好氧堆肥):V(泥炭)=1:1],T₄[V(蚯蚓堆肥):V(泥炭)=1:1],T₅[V(好氧堆肥):V(蚯蚓堆肥):V(泥炭)=1:1:1],各基质理化性质见表1和表2。

基质混配之后分别装入140 mm×100 mm的塑料花盆中,分别将甘蓝、莴苣和西葫芦等3种蔬菜种子播入基质,10粒·盆⁻¹,重复10次·处理⁻¹。除栽培基质外,其他环境条件与栽培管理措施均保持一致,整个栽培过程无外加营养施入。播种60 d后,随机选出幼苗10株·处理⁻¹,植株取出洗净,测定不同处理植株株高、冠幅、叶片数、根长和茎直径,记录各处理幼苗的鲜质量。

1.3 测定项目及方法

基质容重、总孔隙度、持水空隙、通气孔隙特性的测定参照龚小强^[12]的方法:取风干基质加入200 mL环刀(W₀)中,记录质量W₁,浸泡24 h后记录质量W₂,自然沥干4 h记录质量W₃,最后在65 ℃下烘干至恒量,记录质量W₄,按下列公式计算:基质容重(g·cm⁻³)=(W₄-W₀)/200;总孔隙度(%)=[(W₂-W₄)×100%]/200;通气空隙(%)=[(W₂-W₃)×100%]/200;持水空隙=总孔隙度-通气空隙。

基质理化性质(电导率、pH值、全氮、全钾、全磷、阳离子交换量、腐殖酸、钠、钙、镁、铁、铜、锌、锰)参照鲍士旦^[13]的方法测定。

幼苗植株形态指标和生物量测定:幼苗洗净后用直尺测量幼苗株高、根长和冠幅;用游标卡尺测定茎直径(子叶下部2/3处);计算幼苗展开叶数(除子叶外);用精度0.01g电子天平称量洗净后的幼苗鲜质量。

植株综合评价应用模糊数学中的隶属函数值法^[14]。采用以下公式求各个指标的隶属函数值: $R(x_i) = (x_i - x_{\min}) / (x_{\max} - x_{\min})$ 。式中 x_i 为某一指标测定值, x_{\min} 和 x_{\max} 为所该指标的最小值和最大值, 将植株的不同指标的隶属函数值进行累加后求其平均值, 即为植株综合评价指数, 值越大, 说明植株生长越好。

1.4 数据处理方法

实验数据采用Microsoft Office Excel 2003和SPSS 18.0数据处理软件, 进行方差分析和多重比较。

2 结果与讨论

2.1 不同基质的理化性质分析

由表1可以看出:基质容重ck最小, T_3 和 T_4 次之, T_1 , T_2 和 T_5 较大, 其中 T_3 和 T_4 与ck差异不显著, T_1 , T_2 和 T_5 与ck差异显著, 可见绿化废弃物好氧堆肥和蚯蚓堆肥容重较高, 添加量的提高会增大基质容重。*de BODDT*等^[15]认为理想栽培基质最大容重应小于0.40 g·cm⁻³, 因此, T_1 ~ T_5 和ck基质容重均处于理想范围内。总孔隙度和通气孔隙变化趋势一致, 均为 T_2 最小, T_1 , T_4 和 T_5 次之, ck和 T_3 较大, 其中 T_2 与ck, T_3 差异显著, 与其余处理差异不显著, 可见绿化废弃物蚯蚓堆肥总孔隙度和通气孔隙均较小, 其添加会降低基质总孔隙和通气孔隙, 这与MENDOZA-HERNÁNDEZ等^[16]研究蚯蚓堆肥用作甜瓜*Cucumis melo*育苗基质结果一致。*de BODDT*等^[15]认为理想基质总孔隙度应大于85%, 而通气孔隙应为20%~30%。本试验中, 6个处理总孔隙度均在理想栽培基质范围内, 通气空隙 T_2 低于理想栽培基质要求, T_4 与理想范围接近, 其他处理均在理想范围内。 T_2 总孔隙度和通气孔隙均较小的原因可能是纯蚯蚓堆肥含有较多细小团聚颗粒引起。基质持水孔隙变化趋势为 T_2 最高, ck, T_1 , T_4 , T_5 次之, T_3 最低, 其中 T_2 与 T_3 间差异显著。连兆煌^[17]提出理想基质持水孔隙应大于60%, 可见6个处理持水孔隙均在理想范围内, 并且纯蚯蚓堆肥基质 T_2 保水性最好。蚯蚓堆肥保水性强的原因可能是其含有的大量腐殖质物质作用引起^[18]。

表1 不同基质的物理化学性质

Table 1 Physical and chemical properties of different growing media

处理	容重/(g·cm ⁻³)	总孔隙度/%	通气孔隙/%	持水孔隙/%	pH值	电导率/(mS·cm ⁻¹)	阳离子交换量/(cmol·kg ⁻¹)	腐殖酸/%
ck	0.11 d	90.04 a	22.60 a	67.44 ab	6.21 d	0.26 d	203.0 a	41.01 a
T_1	0.18 b	88.37 ab	20.79 ab	67.58 ab	8.44 a	1.65 b	110.11 e	18.09 d
T_2	0.23 a	85.52 b	11.52 b	73.99 a	8.28 b	2.25 a	113.37 de	22.74 cd
T_3	0.12 cd	91.14 a	25.91 a	65.22 b	7.91 bc	1.26 c	128.04 cd	28.13 bc
T_4	0.13 cd	88.71 ab	19.91 ab	68.80 ab	7.49 c	1.62 b	147.27 b	30.20 b
T_5	0.14 c	87.42 ab	21.47 ab	65.94 ab	7.88 bc	1.69 b	138.75 bc	24.08 c

说明:同列数据后不同小写英文字母表示处理间差异达5%显著水平。

不同处理基质的pH值差异明显, 其中 T_1 最高, T_2 , T_3 , T_4 和 T_5 次之, ck最低, 其中 T_1 ~ T_5 与ck差异显著。栽培基质pH值主要有2方面影响:一方面不同习性植物对pH值要求不同, 同时, 植物不同生长时期对pH值要求也不尽相同;另一方面, pH值影响养分的有效含量和形态。大量元素在pH值为6时有效性最大, 基质pH值过高, 铁离子 Fe^{2+} , 铜离子 Cu^{2+} , 锌离子 Zn^{2+} , 锰离子 Mn^{2+} 等易发生沉淀变为无效养分, 而pH值过低, 一些微量元素不仅有效性降低而且还会产生毒害作用^[19]。连兆煌^[17]提出理想基质pH值应在pH 6.0~7.5范围内为宜。可见, 除ck和 T_4 符合理想栽培基质pH值要求范围, 其余处理pH值均高于这一范围。好氧堆肥和蚯蚓堆肥基质pH值偏高原因可能是堆肥过程多余的有机氮未被微生物降解, 而多以铵盐的形式释放, 因而提高了堆肥产品的pH值^[20]。基质的电导率以 T_2 最高, T_1 , T_4 和 T_5 次之, 再次为 T_3 , ck最低, T_1 ~ T_5 与ck差异达显著。电导率是基质浸提液中可溶性盐

质量浓度指标, 可以反映基质当中可溶性养分总量, 电导率过高会构成渗透逆境, 导致植物盐害, 电导率过低则营养不足以维持植物正常生长。理想基质要求电导率应小于 $2.6 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ ^[21], 可见, 各栽培基质处理均位于理想水平内。 T_2 纯蚯蚓堆肥基质的电导率最高的原因可能是, 相比好氧堆肥, 蚯蚓堆肥过程中有机物质在微生物作用下降解释放出大量的可溶性矿质营养的同时, 蚯蚓也会消化有机物质并排出大量可溶性营养元素, 因此具有更高营养元素含量^[22]。

阳离子交换量(CEC)和腐殖酸含量反应了栽培基质的缓冲能力和保肥供肥能力, ck 的阳离子交换量和腐殖酸含量最高, T_3 , T_4 和 T_5 其次, 再次为 T_1 和 T_2 , 其中 ck 与 T_1 ~ T_5 差异显著。ck 显著高于其他处理基质, 表明 ck 具有较大的缓冲能力和持续稳定的供肥能力; T_1 和 T_2 的阳离子交换量和腐殖酸含量较低, 说明堆肥基质缓冲能力和保肥供肥能力较差, 但堆肥基质含有大量的营养元素可以弥补这一缺点。

2.2 不同基质营养元素质量分数分析

由表 2 可以看出: 各处理基质的营养元素质量分数有较大的差异。基质氮质量分数以 T_2 为最高, 其次为 T_5 , T_1 和 T_3 , 再次为 T_4 , ck 最低, ck 显著低于其他处理。磷和钾质量分数变化趋势相同, 均为 T_1 , T_2 和 T_5 的较高, T_3 和 T_4 次之, ck 最低, 3 组处理间差异显著。钠、钙、镁质量分数趋势相同, 均呈现 T_1 和 T_2 较高, T_3 , T_4 和 T_5 其次, ck 最低, 3 组处理间差异显著。基质中的铁质量分数为 T_1 和 T_2 较高, 其次为 T_5 , 再次为 T_3 和 T_4 , ck 最低, T_1 ~ T_5 均与 ck 差异显著。铜质量分数以 T_2 最高, 其次为 T_1 , 再次为 T_5 , T_3 和 T_4 , ck 最低, ck 显著低于其他处理。锌质量分数以 T_1 , T_2 , T_3 和 T_4 较高, 均显著高于 ck, T_5 较低, 与 ck 无显著差异。锰质量分数以 T_1 和 T_2 较高, 其次 T_5 , 再次为 T_4 和 T_3 , ck 最低, ck 显著低于其他处理。基质营养元素质量分数总体表现为 T_1 , T_2 和 T_5 较高, T_3 和 T_4 居中, ck 最低。可能原因是, 与泥炭相比好氧堆肥和蚯蚓堆肥产品本身具有较高的营养元素质量分数, 因此基质营养元素质量分数随着好氧堆肥和蚯蚓堆肥的添加比例提高而增加。

表 2 不同基质的大量和微量元素质量分数

Table 2 Macro and micronutrient contents of different growing media

处理	全氮/ ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	全磷/ ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	全钾/ ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	钠/ ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	钙/ ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	镁/ ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	铁/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	铜/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	锌/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	锰/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)
ck	8.11 c	0.44 c	1.39 c	0.43 c	59.95 c	2.66 c	996.50 d	19.07 d	65.69 b	42.19 d
T_1	14.72 ab	3.01 a	7.34 a	2.34 a	134.41 a	10.07 a	3 824.03 a	33.31 ab	236.61 a	244.82 a
T_2	16.44 a	3.01 a	7.75 a	2.49 a	131.95 a	10.35 a	3 720.83 a	35.76 a	229.49 a	247.05 a
T_3	14.64 ab	2.14 b	6.09 b	1.72 b	102.51 b	8.64 b	3 327.62 c	27.88 c	179.26 a	137.32 c
T_4	13.64 b	1.57 b	5.82 b	1.89 b	95.83 b	8.68 b	3 174.01 c	27.55 c	277.59 a	184.53 bc
T_5	15.47 ab	3.22 a	7.02 a	1.88 b	104.02 b	9.12 b	3 531.05 b	29.11 bc	172.62 ab	196.73 ab

说明: 同列数据后不同小写英文字母表示处理间差异达 5% 显著水平。

2.3 不同基质蔬菜幼苗生长分析

2.3.1 不同基质对甘蓝幼苗生长影响 由表 3 可见: 甘蓝幼苗株高表现为蚯蚓堆肥基质 T_2 , T_4 和 T_5 显著大于 ck, 好氧堆肥基质 T_1 和 T_3 与 ck 差异不显著。可能原因是, 蚯蚓堆肥相比好氧堆肥富含能促进植物生长的激素, 以及营养元素, 因而促进植物生长^[23]。甘蓝幼苗茎直径 T_3 和 T_5 显著高于 T_2 和 ck, T_1 , T_2 和 T_4 与 ck 差异不显著。可能原因是 T_3 和 T_5 基质总孔隙度和通气孔隙度较大, 因此基质疏松透气, 更有利于植株茎生长(表 1)。甘蓝叶片数 T_5 最高, 显著高于其他处理; T_4 次之, 显著高于 T_3 ; T_1 , T_2 和 T_3 与 ck 差异不显著。甘蓝冠幅 T_4 和 T_5 显著高于 T_1 , T_2 , T_3 和 ck; T_1 , T_2 , T_3 和 ck 之间差异不显著。 T_4 和 T_5 甘蓝叶片数和冠幅较对照提高, 可能因为基质含有较高的氮素等叶生长所需营养, 而且 pH 值相对其他处理较低(表 1), 营养元素有效性高, 从而更有利幼苗叶片的生长。甘蓝根长 T_1 , T_2 , T_3 , T_5 和 ck 差异不显著, T_4 显著低于其他处理。甘蓝鲜质量 T_4 和 T_5 显著高于 T_1 , T_2 , T_3 和 ck; T_1 , T_2 和 T_3 与 ck 差异不显著。表明蚯蚓堆肥添加 30%~50% 的基质有利于植株生物量的积累。这一结果与郑金伟等^[5]研究蚯蚓堆肥在添加 50% 时生菜 *Lactuca sativa* var. *ramosa* 生物量积累最大的结果相一致。可能原因是 T_4 和 T_5 处理中, 蚯蚓粪添加比例适中, 因而孔隙度和保水性等物理性质适宜, 后期营养供应充足, 有利于植株生物量的积累。

表3 不同基质对甘蓝幼苗生长影响

Table 3 Effect of different growing media on plant growth of cabbage seedlings

处理	株高/cm	茎直径/mm	叶片数/个	冠幅/cm ²	根长/cm	鲜质量/g
ck	13.30 d	1.10 b	4.10 bc	39.43 b	14.89 a	1.11 b
T ₁	13.44 d	1.20 ab	4.30 bc	39.23 b	15.33 a	0.87 b
T ₂	15.52 bc	1.08 b	4.40 bc	50.95 b	15.03 a	0.91 b
T ₃	14.57 cd	1.34 a	4.00 c	55.39 b	13.99 a	1.09 b
T ₄	18.81 a	1.25 ab	4.50 b	103.56 a	9.51 b	1.69 a
T ₅	17.07 ab	1.37 a	5.00 a	101.16 a	16.85 a	1.90 a

说明: 同列数据后不同小写英文字母表示处理间差异达5%显著水平。

2.3.2 不同基质对莴苣生长影响 由表4可以看出: 莴苣株高T₁最低, 显著低于其他处理; 其次是T₂, 显著低于T₃, T₄和T₅; T₃, T₄和T₅与ck无显著差异。莴苣茎直径、叶片数和冠幅均表现为T₁和T₂显著低于ck, T₃, T₄和T₅与ck差异不显著。各处理基质莴苣根长差异不显著。莴苣植株鲜质量T₁和T₂显著低于其他处理, T₃, T₄, T₅和ck之间差异不显著。T₃, T₄和T₅莴苣生长形态指标和生物量接近或高于ck, 而T₁和T₂则低于ck。可能原因是, 虽然T₁~T₅基质均提高了营养元素质量分数, 但莴苣是一种中等耐盐植物, 而T₁和T₂的电导率相对较高(表1), 进而影响莴苣的营养元素吸收, 不利于作物生长, 影响了植株生长发育和其生物量的积累。

表4 不同基质对莴苣幼苗生长影响

Table 4 Effect of different growing media on plant growth of lettuce seedlings

处理	株高/cm	茎直径/mm	叶片数/个	冠幅/cm ²	根长/cm	鲜质量/g
ck	16.13 ab	2.32 a	6.10 a	54.90 a	19.86 a	3.35 a
T ₁	10.48 c	1.55 b	5.10 b	26.82 c	16.49 a	1.45 b
T ₂	13.68 b	1.15 c	5.30 b	29.47 bc	15.70 a	1.27 b
T ₃	18.26 a	2.09 a	6.00 a	58.85 a	16.60 a	3.30 a
T ₄	18.87 a	2.28 a	6.30 a	55.00 a	17.46 a	4.09 a
T ₅	17.30 a	2.20 a	6.40 a	44.36 ab	20.07 a	3.42 a

说明: 同列数据后不同小写英文字母表示处理间差异达5%显著水平。

2.3.3 不同基质对西葫芦生长影响 由表5可以看出: 西葫芦株高T₂, T₄和T₅与ck差异不显著, T₁和T₃显著低于ck。西葫芦茎直径T₄显著高于ck, 其他处理与ck差异不显著。西葫芦叶片数T₃和T₄与ck差异不显著, 其他处理均显著低于ck。西葫芦冠幅T₂, T₄, T₅与ck差异不显著, T₁和T₃显著低于ck。各处理基质西葫芦生根长和鲜质量与ck均差异不显著。西葫芦生长形态指标和生物量T₄处理接近或高于ck, 而T₁, T₂, T₃和T₅处理基质均低于ck, 可能原因是T₄处理相对其他处理具有较低的pH值和电导率, 而且蚯蚓堆肥中含有较多微量元素和植物生理活性物质促进效应高于基质盐分较高的不利效应, 因此促进了其生长。

2.4 不同基质对甘蓝、莴苣和西葫芦的生长发育综合评价

在对苗株生长效果评价时, 仅通过单一指标比较并不能准确地反应各处理苗株的综合性状差异。本

表5 不同基质对西葫芦幼苗生长影响

Table 5 Effect of different growing media on plant growth of zucchini seedlings

处理	株高/cm	茎直径/mm	叶片数/个	冠幅/cm ²	根长/cm	鲜质量/g
ck	15.44 a	3.19 bc	3.80 ab	109.17 a	16.52 a	3.45 ab
T ₁	9.61 b	2.76 c	2.30 e	47.02 c	14.82 a	2.86 b
T ₂	14.11 a	3.14 bc	3.00 cd	86.97 abc	12.68 a	3.73 ab
T ₃	9.24 b	3.63 ab	3.50 bc	65.97 bc	13.55 a	3.14 b
T ₄	14.33 a	3.80 a	4.10 a	106.82 ab	14.43 a	4.35 a
T ₅	13.13 a	3.17 bc	2.90 d	91.55 ab	14.06 a	4.07 a

说明: 同列数据后不同小写英文字母表示处理间差异达5%显著水平。

研究采用模糊数学中隶属函数的方法, 求出6个主要指标(株高、茎直径、叶片数、冠幅、根长和生物量)的隶属函数值平均值, 进行综合评价。结果表明(表6): 甘蓝在T₁, T₂, T₃, T₄和T₅处理的综合评价指数分别为0.34, 0.37, 0.39, 0.52和0.61, 均高于ck(0.33)。莴苣在T₄处理的综合评价指数为0.52, 高于ck(0.49); T₃和T₅处理的综合评价指数分别为0.47和0.48, 接近于ck; T₃和T₅处理的综合评价指数分别为0.24和0.25, 均低于ck。西葫芦在T₄处理的综合评价指数为0.54, 高于ck(0.49), 而其他处理的综合评价指数均低于ck。综上可见, 甘蓝、莴苣和西葫芦的幼苗均在T₄处理中生长性状高于ck。因此, T₄处理基质可以作为甘蓝、莴苣和西葫芦的代用基质。

表6 不同基质对甘蓝、莴苣和西葫芦的生长发育综合评价

Table 6 Comprehensive evaluation on growth and development of cabbage, lettuce and zucchini in different substrates

植物	处理	株高	茎直径	叶片数	冠幅	根长	生物量	综合评价指数
甘蓝	ck	0.31	0.33	0.37	0.15	0.50	0.31	0.33
	T ₁	0.32	0.43	0.43	0.15	0.52	0.19	0.34
	T ₂	0.50	0.31	0.47	0.21	0.51	0.22	0.37
	T ₃	0.42	0.56	0.33	0.24	0.46	0.30	0.39
	T ₄	0.79	0.47	0.50	0.51	0.24	0.60	0.52
	T ₅	0.64	0.59	0.67	0.49	0.59	0.70	0.61
莴苣	ck	0.42	0.53	0.53	0.53	0.52	0.39	0.49
	T ₁	0.18	0.27	0.28	0.19	0.41	0.12	0.24
	T ₂	0.32	0.14	0.33	0.22	0.38	0.09	0.25
	T ₃	0.51	0.45	0.50	0.58	0.41	0.38	0.47
	T ₄	0.54	0.52	0.58	0.53	0.44	0.50	0.52
	T ₅	0.47	0.49	0.60	0.40	0.53	0.40	0.48
西葫芦	ck	0.54	0.50	0.70	0.53	0.27	0.39	0.49
	T ₁	0.19	0.38	0.33	0.19	0.20	0.25	0.26
	T ₂	0.46	0.49	0.50	0.41	0.12	0.46	0.41
	T ₃	0.17	0.62	0.63	0.30	0.15	0.32	0.37
	T ₄	0.47	0.67	0.78	0.51	0.19	0.61	0.54
	T ₅	0.40	0.50	0.48	0.43	0.17	0.54	0.42

2.5 筛选出的代用基质成本核算

基质成本按以下公式计算: $P=P_1 \times C_1 + P_2 \times C_2$ 。其中P为基质成本; P₁和P₂为基质各组分的单价; C₁和C₂为基质中各组分所占体积比例。基质成本具体核算如表7所示。可见, T₄处理基质成本比ck降低了41.56%, 表明T₄代用基质能在提高甘蓝、莴苣和西葫芦幼苗质量的前提下, 显著降低生产成本, 因此, 可以用作甘蓝、莴苣和西葫芦的育苗基质。

表7 筛选出的甘蓝、莴苣和西葫芦代用基质成本核算

Table 7 Cost of the selected ideal growing medium for cabbage, lettuce and zucchini

处理	基质组分材料	原材料成本/(元·t ⁻¹)	蚯蚓堆肥处理成本/(元·t ⁻¹)				处理后价格/(元·t ⁻¹)	处理后价格/(元·m ⁻³)	基质组分体积比例/%	基质总成本本/(元·m ⁻³)	基质成本占对照成本比例/%
			粉碎电 力费用	尿素 费用	蚯蚓 费用	人工 费用					
ck	泥炭	3 600.00	0	0	0	0	3 600.00	396.00	100.00	396.00	100.00
T ₄	泥炭	3 600.00	0	0	0	0	3 600.00	396.00	50.00	231.44	58.44
	绿化废弃物	120.00	4.00	20.00	120.00	50.00	314.00	72.22	50.00		

3 结论

好氧堆肥替代泥炭用作栽培基质具有良好的总孔隙和通气孔隙度, 而蚯蚓堆肥由于细小颗粒含量较多, 高比例添加对总孔隙和通气孔隙度有不利影响, 但添加50%时达到理想基质要求。蚯蚓堆肥基质相

对于好氧堆肥基质具有更高的持水孔隙，保水性较好。好氧堆肥和蚯蚓堆肥均能提高基质的营养元素含量，但较高pH值和电导率是其应用的限制因子，生产中建议采用添加硫磺等弱酸性物质或天然有机酸物质来降低基质pH值，并采取淋洗措施降低基质电导率。

对耐盐性高的甘蓝， $T_1 \sim T_5$ 处理均可以替代泥炭应用于栽培，中等耐盐的莴苣则 T_3 ， T_4 和 T_5 处理可以替代泥炭应用于栽培，对耐盐性低的西葫芦，仅 T_4 可以替代泥炭应用于栽培。5种替代基质中 T_4 处理即 $V(\text{蚯蚓堆肥}):V(\text{泥炭})=1:1$ ，对3种不同耐盐性蔬菜育苗均能促进幼苗生长，综合效果最好，相比对照成本降低41.56%，建议在蔬菜育苗生产中应用。

4 参考文献

- [1] 郭世荣. 固体栽培基质研究、开发现状及发展趋势[J]. 农业工程学报, 2005, 21(增刊2): 1-4.
GUO Shirong. Research progress, current exploitations and developing trends of solid cultivation medium [J]. *Trans Chin Soc Agric Eng*, 2005, 21(supp 2): 1-4.
- [2] CARMONA E, MORENO M T, AVILÉS M, et al. Use of grape marc compost as substrate for vegetable seedlings [J]. *Sci Hortic*, 2012, 137: 69-74.
- [3] MEDINA E, PAREDES C, PÉREZ-MURCIA M D, et al. Spent mushroom substrates as component of growing media for germination and growth of horticultural plants [J]. *Bioresour Technol*, 2009, 100(18): 4227-4232.
- [4] AVRAMIDOU P, EVANGELOU A, KOMILIS D. Use of municipal solid waste compost as a growth media for an energy plant (rapeseed) [J]. *J Environ Manage*, 2013, 121: 152-159.
- [5] 王旭艳, 林夏珍, 李琳, 等. 几种农林废弃物复合基质的理化特性及对浙江楠容器育苗的效果[J]. 浙江农林大学学报, 2013, 30(5): 674-680.
WANG Xuyan, LIN Xiazhen, LI Lin, et al. Physical and chemical properties of several kinds of agriculture and forestry waste composite matrix and their effect on container seedling of *Phoebe chekiangensis* [J]. *J Zhejiang A & F Univ*, 2013, 30(5): 674-680.
- [6] NADDAF O A, LIVIERATOS I, STAMATAKIS A, et al. Hydraulic characteristics of composted pig manure, perlite, and mixtures of them, and their impact on cucumber grown on bags [J]. *Sci Hortic*, 2011, 129(1): 135-141.
- [7] MARQUES E L S, MARTOS E T, SOUZA R J, et al. Spent mushroom compost as a substrate for the production of lettuce seedlings [J]. *J Agric Sci*, 2014, 6(7): 138.
- [8] GUPTA R, YADAV A, GARG V K. Influence of vermicompost application in potting media on growth and flowering of marigold crop [J]. *Int J Recycl Org Waste Agric*, 2014, 3(1): 1-7.
- [9] 张璐, 孙向阳, 田贊. 园林绿化废弃物堆肥用于青苹果竹芋栽培研究[J]. 北京林业大学学报, 2011, 33(5): 109-114.
ZHANG Lu, SUN Xiangyang, TIAN Yun. Application of green waste compost for *Calathea rotundifolia* 'Fasciata' cultivation [J]. *J Beijing For Univ*, 2011, 33(5): 109-114.
- [10] 张强, 孙向阳, 任忠秀, 等. 园林绿化废弃物堆肥用作花卉栽培基质的效果评价[J]. 中南林业科技大学学报, 2011, 31(9): 7-13.
ZHANG Qiang, SUN Xiangyang, REN Zhongxiu, et al. Effect evaluation of garden waste compost used as floriculture substrate [J]. *J Cent South Univ For Technol*, 2011, 31(9): 7-13.
- [11] 吴益锋. 园林废弃物介质栽培一串红试验[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(33): 12920-12922.
WU Yifeng. Test of using garden waste composting products to cultivate *Salvia splendens* Ker-Gawler [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2013, 41(33): 12920-12922.
- [12] 龚小强. 园林绿化废弃物堆肥产品改良及用作花卉栽培代用基质研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2013.
GONG Xiaoqiang. *Study on the Improvement of Green Waste Compost Products and the Products as the Peat Substitutes for the Planting of Flowers* [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2013: 11-12.
- [13] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 34-441.
- [14] 孙向丽, 张启翔. 菇渣和锯末作为丽格海棠栽培基质的研究[J]. 土壤通报, 2010, 41(1): 117-120.
SUN Xiangli, ZHANG Qixiang. Studies on mushroom residue and the sawdust for growing media of *Begonia × elatior* [J]. *Chin J Soil Sci*, 2010, 41(1): 117-120.

- [15] de BOODT M, VERDONCK O. The physical properties of the substrates in horticulture [J]. *ISHS Acta Hort* 26 III *Symp Peat Hort*, 1972. doi: 10.17660/ActaHortic. 1972. 26. 5.
- [16] MENDOZA-HERNÁNDEZ D, FORNES F, BELDA R M. Compost and vermicompost of horticultural waste as substrates for cutting rooting and growth of rosemary [J]. *Sci Hortic*, 2014, **178**(1): 192 – 202.
- [17] 连兆煌. 无土栽培技术与原理[M]. 北京: 中国农业出版社, 1994: 58 – 59.
- [18] 李扬, 乔玉辉, 莫晓辉, 等. 蚯蚓粪作为土壤重金属污染修复剂的潜力分析[J]. 农业环境科学学报, 2010, **29**(z1): 250 – 255.
LI Yang, QIAO Yuhui, MO Xiaohui, et al. Analysis for earthworm feces as one of potential repair agents of heavy metal contamination in soil [J]. *J Agro-Environ Sci*, 2010, **29**(supp 1): 250 – 255.
- [19] 聂艳丽, 周跃华, 李娅, 等. 甘蔗渣堆肥化处理及用作团花育苗基质的研究[J]. 农业环境科学学报, 2009, **28**(2): 380 – 387.
NIE Yanli, ZHOU Yuehua, LI Ya, et al. Sugar cane bagasse compost used as *Anthocephalus chinensis* nursing substrate [J]. *J Agro-Environ Sci*, 2009, **28**(2): 380 – 387.
- [20] VIG A P, SINGH J, WANI S H, et al. Vermicomposting of tannery sludge mixed with cattle dung into valuable manure using earthworm *Eisenia fetida* (Savigny) [J]. *Bioresour Technol*, 2011, **102**(17): 7941 – 7945.
- [21] 钟润昕, 邓良基, 高雪松, 等. 膨润土-菌废料复合材料基质栽培对蔬菜生长及产量的影响[J]. 农业现代化研究, 2014, **35**(4): 488 – 492.
ZHONG Runxin, DENG Liangji, GAO Xuesong, et al. The influence of composite substrate cultivation with bentonite-mushroom waste to vegetable growth and yield [J]. *Res Agric Mod*, 2014, **35**(4): 488 – 492.
- [22] GARG V K, GUPTA R. Optimization of cow dung spiked pre-consumer processing vegetable waste for vermicomposting using *Eisenia fetida* [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2011, **74**(1): 19 – 24.
- [23] MANH V H, WANG C H. Vermicompost as an important component in substrate: effects on seedling quality and growth of muskmelon (*Cucumis melo* L.) [J]. *APCBEE Procedia*, 2014, **8**: 32 – 40.

基于绿视率的城市绿道空间绿量可视性特征

赵 庆, 唐洪辉, 魏 丹, 钱万惠

(广东省林业科学研究院, 广东 广州 510520)

摘要: 为了解城市绿道植物空间绿量可视性特征, 通过构建绿视率计量方法, 以广东省立绿道1号线为例进行调查分析, 探索了基于绿视率的城市绿道空间绿量可视性特征。结果表明: ①省立绿道1号线沿线4个区域总的绿视率均值为31.06%, 其中天河区(38.19%)>海珠区(35.97%)>越秀区(26.76%)>荔湾区(26.67%)。②天河区绿道与荔湾区、越秀区绿道绿视率存在显著差异($P<0.05$), 表明天河区绿道空间绿量可视性优于荔湾区和越秀区; 虽然海珠区绿道绿视率较荔湾区和越秀区高, 但通过方差分析多重比较来看, 3个区的绿道绿视率没无显著差异($P>0.05$), 表明荔湾区、越秀区、海珠区绿道的空间绿量可视性较相似。③越秀区和天河区绿道绿视率较为集中地分布在24%~40%区间, 说明越秀区和天河区各自区域绿道内部的绿视率数值较为稳定, 其空间绿量可视性效果差异不大, 给人感觉一种持续、稳定的绿色空间; 而荔湾区和海珠区绿道绿视率的分散在10%~50%, 说明荔湾区和海珠区各自区域绿道内部的绿视率数值不稳定, 其空间绿量可视性效果差异较大, 给人一种间断、具有冲击力的绿色空间。基于绿视率的空间绿量可视性可用于评价城市森林建设的视觉效果。图4表4参21

关键词: 园林学; 绿道; 空间绿量; 植物景观; 绿视率; 可视性特征

中图分类号: S731.2 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2016)02-0288-07

Spatial visibility of green areas of urban greenway using the green appearance percentage

ZHAO Qing, TANG Honghui, WEI Dan, QIAN Wanhu

(Guangdong Academy of Forestry, Guangzhou 510520, Guangdong, China)

Abstract: To understand the spatial visibility of green areas of urban greenway in urban greenway, the green-appearance percent was used to determine and analyze green areas of greenway line 1. Through the photos took by Nikon D800, the green-appearance percent was calculated with Photoshop. Results indicated that 1) the average total green-appearance percent of greenway of four Guangzhou Districts was 31.9% with Tianhe (38.2%) > Yuexiu (36.0%) > Haizhu (26.8%) > Liwan (26.7%). 2) Using one-way ANOVA, the green-appearance percent of greenway in Tianhe District was significantly greater ($P < 0.05$) than Yuexiu and Liwan Districts. 3) The green-appearance percent of greenway in Yuexiu and Tianhe Districts was between 24.0% and 40.0%; Whereas, in Liwan and Haizhu Districts green areas were 10.0% to 50.0%. Thus, Yuexiu and Tianhe Districts were relatively stable providing a sustained, stable green space; but Liwan and Haizhu Districts were unstable with a discontinuous, sporadic green space. The green-appearance percent cloud be used to evaluate the visual impact of various planning and management on urban forests. [Ch, 4 fig. 4 tab. 21 ref.]

Key words: landscape architecture; greenway; green area; vegetative landscape; green appearance percent; spatial visibility

收稿日期: 2015-05-11; 修回日期: 2015-06-25

基金项目: 国家林业公益性行业科研专项(201404301)

作者简介: 赵庆, 工程师, 博士, 从事城市林业、风景园林等研究。E-mail: zhaoqingflzzq@qq.com

1 “绿化覆盖率”与“绿视率”

在城市发展过程中,绿道扮演着一个重要的角色,是对当前城市化进程给人在生理和心理上压力的一种回应^[1]。绿道在城市环境中以自然廊道的形式呈现,为人造空间增添了自然的气息,软化了由建筑构成的生硬空间。城市绿道的“绿”字表明了其功能的实现依赖于绿色植物,包括乔木、灌木以及地被植物等。绿色植物的功能主要包括景观功能、生态功能以及意向功能^[2]: ①景观功能主要是绿色植物对人的视觉作用; ②生态功能包括了绿色植物的生态作用; ③意向功能是指植物能够向人们传递一种精神上的意向。绿色植物的三大功能中,尤以景观功能对人的影响最为直接,作用于城市的方方面面: THAYER等^[3]研究发现:绿色植物的存在通常会提高城市景观的等级; SCHROEDER等^[4]和 BUHYOFF等^[5]研究表明:更倾向于将植物景观作为一个整体视图来评价居住区街道景观,同时 SCHROEDER^[6]也注意到场地的地表裸露程度与其景观吸引力的关系表现为强负相关; 众多城市景观评价的研究也表明人们更偏爱于具有大量植被的城市景观^[7]; AOKI^[8-9]在研究中发现,人们对不同类型景观的绿色植物视觉偏好是不同的,以街道景观为例,当绿色植物可见比例大于30%时,被证明是更受人们所欢迎的城市街道景观。通过以上研究推断,绿色植物的景观功能在城市绿道景观评价中起到相当大的作用。过去,我们对绿色植物生态方面的研究倾注了大量的研究,而在景观以及意向功能上的研究相当有限,其中一个重要的原因是绿色植物视觉景观定量研究的切入点以及方法的匮乏。以往关于绿色植物视觉景观的定量研究,大都是将其采用“绿化覆盖率”或“绿地率”这一量化指标来衡量^[10-13]。然而,这2个指标衡量的是二维平面层上的绿化状况^[14],它并不能表明被人直接视觉感受到的三维空间层面上的绿化状况^[12,15-16]。如图1所示,2块面积形状相同的场地,其“绿化覆盖率”或“绿地率”相同,但由于植物高度的不同,导致人在视觉上感受到这2块场地绿化状况的不同。“绿视率”(green appearance percentage)这一概念的出现为空间绿量可视性的定量研究提供了一种新的途径。“绿视率”这一理论于2002年由日本的野隆造教授提出,并被国际社会所认可^[14],用来表示绿色在人视野中所占的比例。“绿量”是指三维绿色生物量^[17],反映了城市绿化的空间结构量值^[18],具有重要的生态和景观意义^[19-20]。本研究使用“绿视率”指标来量化城市绿道空间绿量可视性:即在空间水平上,以人的视角所能捕获到的绿量为计量单位,通过探索基于“绿视率”的城市绿道空间绿量可视性计算方法,推动城市绿道的定量研究和规划设计水平。

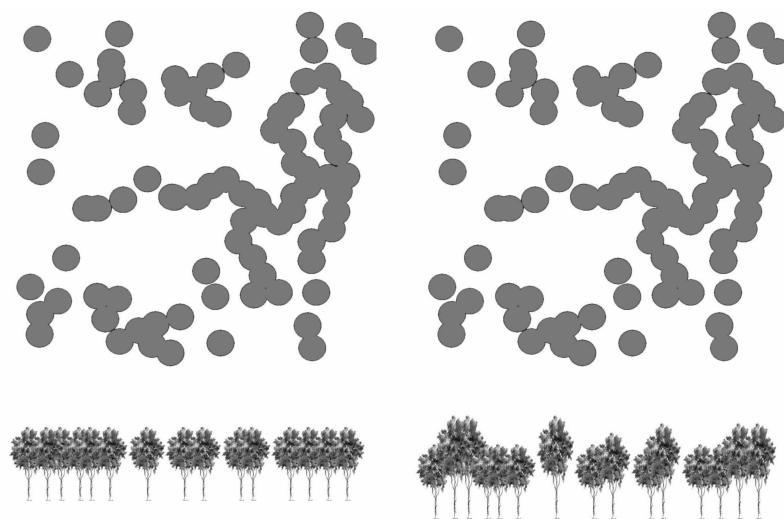


图1 二维平面和三维空间的视觉差异

Figure 1 Visual differences of two-dimensional plane and three-dimensional space

2 研究地点与方法

2.1 研究地点

本次研究地点为广州市中心城区(环城高速以内)的广东省立绿道1号线,总长度43.1 km,其中涉

及海珠区10.6 km, 越秀区7.6 km, 荔湾区18.6 km, 天河区6.3 km。

2.2 研究方法

城市绿道空间绿量可视性将通过“绿视率”指标来衡量。“绿视率”的计算方法及计算过程如下。

2.2.1 样本选择 在广州市中心城区街道图上将省立绿道1号线所经过的路段标出, 并用不同颜色区分行政区域(图2), 以便把各行政区作为研究区进行绿道空间绿量可视性比较研究。在每个研究区内, 将省立绿道1号线所在道路与其他道路的交叉点、景观节点(如驿站等)作为绿视率指标数据采集的样点, 原因有2点: ①道路交叉点以及景观节点为人停留时间较长的地点, 其空间绿量的高低直接影响人对该区域绿道的感受, 将其作为“绿视率”指标采集的样点符合客观实际。②道路交叉点以及景观节点便于地图选点以及实际样点定位。为了减少2个相邻研究区的交叉影响, 在采集样点数据时, 将排除研究区内靠近边界的样点。



图2 绿视率样点位置图(局部)

Figure 2 Sample locations of green appearance percentage (part)

2.2.2 数据采集规则 通过一定规则拍摄照片的方式, 获取样点空间绿量数据。本研究采用的照片拍摄设备统一为尼康D800数码单反相机, 镜头型号为尼康AF-S Nikkor 24~70 mm f/2.8G ED。尼康D800数码单反相机为全画幅数码单反相机, 搭配尼康AF-S Nikkor 24~70 mm f/2.8G ED镜头时, 将镜头焦距调整到24 mm, 其拍摄的视角范围无重叠度, 可以避免拍摄重叠而导致的绿视率重复计算。在采集每个样本的空间绿量数据时, 照片拍摄者必须站在每个样点(交叉口)的东南角(东南向边缘), 将镜头焦距始终固定为24 mm, 并以同一高度人的水平视角分别朝正东、正西、正南、正北等4个方向各拍摄1张照片, 在记录表中分别标志每张照片的编号以及拍摄方向, 以便内业处理。

2.2.3 绿视率计算 首先, 将拍摄的图片导入Adobe Photoshop CS5中, 打开Adobe Photoshop CS5的直方图, 在“源”选项栏中选择“整个图像”, 信息表的“像素”一栏所显示的“317400”为整幅图片的像素值; 其次, 新建图层并点中激活, 然后点击画笔工具, 配合Wacom新帝设计数位板, 将图片中的绿色植物所占据的部分手动覆盖颜色, Adobe Photoshop CS5的直方图, 在“源”选项栏中选择“选中的图层”, 信息表的“像素”一栏所显示的“83345”为绿色植物的总像素值(图3), 则该图片的绿视率为“选中的图层”像素值“83345”与“整个图像”像素值“317400”的比值即“26.30%”。通过以上4个步骤, 分别计算出各个样点4个方向所拍摄图片的绿视率, 而各个样点的绿视率为4个方向绿视率总和的算数平均值。

3 结果与分析

3.1 绿道绿视率数据采集与计算

本研究调查的广东省立绿道1号线(中心城区部分)经过4个行政区域, 搜集样本36个, 共拍摄图片144张, 各个样本的基础数据以及绿视率计算结果如表1所示。



图3 绿视率像素计算方法

Figure 3 Calculation method of green appearance percentage pixels

从计算结果分析:此次搜集的广东省立绿道1号线所有样本中绿视率最高点在天河区临江大道与员村南路交口附近,其绿视率为65.68%;所有样本绿视率最低点在荔湾区康王路和长寿路交口附近,其绿视率为6.37%;样本的绿视率集中在20.00%~40.00%区间,该范围绿视率样本占所有样本数的72.20%。

3.2 区域绿道绿视率差异分析

通过对4个区域36个样点进行均值分析,得出省立绿道1号线沿线绿视率荔湾区为26.67%,越秀区为26.76%,天河区为38.19%,海珠区为35.97%,4个区域总的绿视率均值为31.06%。结果表明:天河区和海珠区绿道沿线的空间绿量可视性在平均水平以上,而荔湾区和越秀区绿道沿线的空间绿量可视性在平均水平以下,其中天河区绿道沿线的空间绿量可视性最好(表2)。①这是因为荔湾区和越秀区为广州市的老城区,而省立绿道1号线经过该2个区域的建筑集中路段,因此,其整体绿视率较低,空间绿量可视性排名靠后;②海珠区同样作为广州老城区,由于绿道经过该区东面绿化集中区域,其整体绿视率较荔湾区和越秀区高;③天河区是广州市的新城区,天河区省立绿道1号线处于珠江景观带沿线,有较好的绿化基础,因此其绿视率最高。通过绿视率单因素方差分析得出4个区域间的绿视率显著性为0.05(表3),表明4个区域绿道沿线的绿视率有显著差异,说明省立绿道1号线空间绿量可视性存在区域不均衡的现象。

通过对4个区域绿道绿视率的多重比较分析发现(表4),天河区绿道与荔湾区、越秀区绿道绿视率存在显著差异($P<0.05$),表明天河区绿道空间绿量视性较荔湾区和越秀区有明显的提升;虽然海珠区绿道绿视率较荔湾区和越秀区高,但通过方差分析多重比较来看,3个区的绿道绿视率没无显著差异($P>0.05$),表明荔湾区、越秀区、海珠区绿道的空间绿量可视性较相似。

通过对绿道绿视率样本散点图分析发现(图4),4个不同区域样本绿视率的离散程度有明显不同。除了天河区样本27具有特殊性之外,越秀区和天河区绿道绿视率较为集中地分布在24.00%~40.00%,说明越秀区和天河区各自区域绿道内部的绿视率数值较为稳定,其空间绿量可视性效果差异不大,给人一种持续、稳定的绿色空间。样本27位于天河区临江大道与员村南路交叉口的公园内,省立绿道1号线穿过该公园,因此,该样本绿量不仅包含了绿道植物景观自身所提供的绿量,同时公园内丰富的

表1 广东省立绿道1号线绿视率一览

Table 1 List of green appearance percentage of Guangdong greenway line 1

序号	所属区域	小地名	像素值(总像素值: 1 269 600)				绿视率/%
			北	东	南	西	
1	荔湾区	中山八路 黄沙大道	85 617	122 528	14 722	33 993	20.23
2	荔湾区	中山八路 洋塘路	111 199	111 168	53 557	60 826	26.52
3	荔湾区	中山八路 华贵路	48 330	167 184	146 742	64 656	33.63
4	荔湾区	中山七路 康王中路	74 589	137 992	90 185	82 303	30.33
5	荔湾区	康王路 龙津东路	88 151	127 508	95 605	63 971	29.56
6	荔湾区	康王路 长寿路	12 834	8 484	8 019	51 596	6.37
7	荔湾区	康王路 六二三马路	46 639	126 296	137 919	18 894	25.97
8	荔湾区	康王路 和平路	88 069	26 693	99 451	47 252	20.59
9	荔湾区	桥中路 双桥路	143 657	48 427	40 509	160 568	30.97
10	荔湾区	花地河 醉观公园	163 960	138 662	132 441	72 777	40.00
11	荔湾区	百花路 洋花西路	166 832	120 554	180 074	73 897	42.64
12	荔湾区	增南路 龙溪大道	46 978	82 644	145 815	108 109	30.21
13	荔湾区	人民南路 西堤二马路	0	12 359	20 273	90 793	9.72
14	越秀区	沿江西路 新堤二横路	81 198	105 272	100 365	97 346	30.26
15	越秀区	沿江西路 解放南路	52 717	65 219	18 159	53 485	14.93
16	越秀区	沿江中路 侨光路	90 678	118 379	14 713	103 385	25.77
17	越秀区	沿江中路 天字码头	140 235	102 790	0	65 972	24.34
18	越秀区	沿江东二路 江湾大桥	55 216	67 714	101 156	101 566	25.65
19	越秀区	沿江东二路 东湖路	61 659	150 080	102 725	66 289	29.99
20	越秀区	大通路 烟雨路	93 657	106 125	99 938	84 968	30.30
21	越秀区	烟雨路 海山街	131 844	112 863	76 413	96 197	32.87
22	天河区	临江大道 华穗路	52 405	76 264	163 747	94 407	30.47
23	天河区	临江大道 猎德大道	42 671	120 069	178 661	152 343	38.89
24	天河区	临江大道 马场路	56 891	124 592	210 878	105 400	39.21
25	天河区	临江大道 中轴线	53 436	83 134	156 791	104 285	31.32
26	天河区	临江大道 平江路	75 231	97 870	151 767	195 969	41.02
27	天河区	临江大道 员村南路	171 513	206 628	268 240	187 512	65.68
28	天河区	临江大道 员村二横路	19 178	125 308	169 473	126 930	34.73
29	天河区	琶洲大桥 临江大道	85 617	122 528	14 722	33 993	24.17
30	海珠区	科韵路 新港东路	111 199	111 168	53 557	60 826	50.27
31	海珠区	新滘东路 科韵路	48 330	167 184	146 742	64 656	47.28
32	海珠区	外环东路 西五路	74 589	137 992	90 185	82 303	36.61
33	海珠区	小洲驿站	88 151	127 508	95 605	63 971	31.33
34	海珠区	闸口	12 834	8 484	8 019	51 596	47.50
35	海珠区	华州路	46 639	126 296	137 919	18 894	16.47
36	海珠区	内环西路 南三路	88 069	26 693	99 451	47 252	30.30

绿色植物增加了该样本周围的整体绿量；而荔湾区和海珠区绿道绿视率的分散在10.00%~50.00%区间，说明荔湾区和海珠区各自区域绿道内部的绿视率数值不稳定，其空间绿量可视性效果差异较大，给人一种间断、具有冲击力的绿色空间。

表2 绿视率均值分析

Table 2 Mean analysis of green appearance percentage

区域	均值	标准差	标准误	均值的95%置信区间	
				下限	上限
荔湾区	0.266 723	0.104 574 0	0.029 003 6	0.203 530	0.329 916
越秀区	0.267 638	0.056 133 0	0.019 846 0	0.220 709	0.314 566
天河区	0.381 863	0.124 244 4	0.043 927 0	0.277 992	0.485 733
海珠区	0.359 657	0.126 058 3	0.047 645 6	0.243 073	0.476 242
总数	0.310 583	0.113 886 2	0.018 981 0	0.272 050	0.349 117

4 讨论

在城市化日益加剧的环境下, 城市绿道植物景观从定性表面的审美要求, 逐渐趋向定量本质的方向发展, 采用一系列指标来量化评价其质量。本研究正是基于城市绿道景观的人性化需求日益增强的背景下, 提出以“绿视率”为基础的空间绿量可视性计算方法, 并通过广东省立绿道1号线的调查与分析, 得到不同区域之间以及同一区域内部空间绿量可视性的异同。从不同区域绿道空间绿量可视性的绝对数值来说, 天河区绿道>海珠区绿道>越秀区绿道>荔湾区绿道; 而从同一区域绿道内部空间绿量可视性的稳定程度来说, 越秀区绿道>天河区绿道>荔湾区绿道>海珠区绿道。

表3 绿视率单因素方差分析

Table 3 One-way ANOVA of green looking ratio

项目	平方和	自由度	均方	F值	显著性
区间	0.097	3	0.032	2.909	0.050
区内	0.357	32	0.011		
总数	0.454	35			

表4 区域绿道绿视率多重比较

Table 4 Multiple comparison of regional green appearance percentage

方法	(I)区域	(J)区域	均值差(I-J)	显著性	95% 置信区间	
					下限	上限
最小显著差法 (LSD)	荔湾区	越秀区	-0.000 914 4	0.985	-0.097 550	0.095 721
		天河区	-0.115 139 4*	0.021	-0.211 775	-0.018 504
		海珠区	-0.092 934 3	0.070	-0.193 753	0.007 884
	越秀区	荔湾区	0.000 914 4	0.985	-0.095 721	0.097 550
		天河区	-0.114 225 0*	0.038	-0.221 751	-0.006 699
		海珠区	-0.092 019 9	0.102	-0.203 320	0.019 280
	天河区	荔湾区	0.115 139 4*	0.021	0.018 504	0.211 775
		越秀区	0.114 225 0*	0.038	0.006 699	0.221 751
		海珠区	0.022 205 1	0.687	-0.089 095	0.133 505
	海珠区	荔湾区	0.092 934 3	0.070	-0.007 884	0.193 753
		越秀区	0.092 019 9	0.102	-0.019 280	0.203 320
		天河区	-0.022 205 1	0.687	-0.133 505	0.089 095

说明: * 表示均值差的显著性水平为 0.05。

在自然条件下, 绿化覆盖率高的区域, 通常其“绿视率”也趋于一个相对较高的数值, 这是因为当这个地区植被绝对数量越大, 这些绿色植物被人的视线所捕捉到的机会也越多。然而, 在城市环境中, 建筑、道路是绿道整体景观的组成部分, 会直接影响到人视野能捕捉到的绿量, 因此, 通过文中基于“绿视率”的空间绿量可视性计算方法计算 2 条绿化覆盖率相同的城市绿道, 其植物空间可视性通常并不一致。本研究所提出的基于绿视率的空间绿量可视性计算方法, 弥补了国内绿化指标只立足于平面的不足, 直接从人的视觉感受出发, 针对城市绿道植物景观的质量, 提供了一种可行的数量化评价手段^[21]。

5 参考文献

- [1] SEARNS R M. The evolution of greenways as an adaptive urban landscape form [J]. *Landsc Urban Plan*, 1995, 33(1/3): 65 – 80.
 [2] APPLEYARD D. Urban trees, urban forests: what do they mean? [C]//Proceeding of the National Urban Forestry Con-

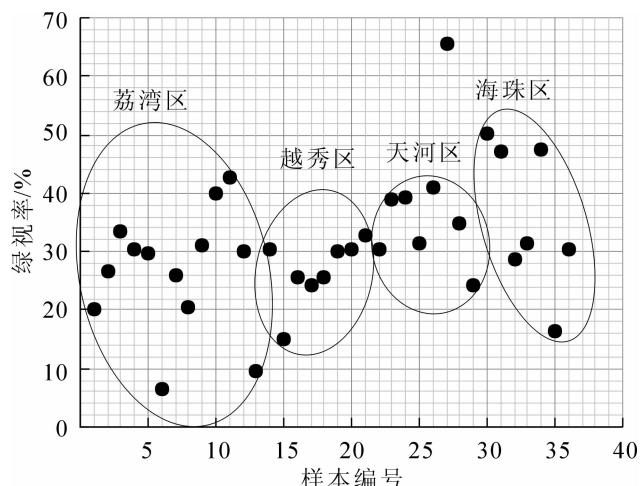


图4 区域绿道绿视率散点图

Figure 4 Green appearance percentage scatter plot of regional greenway

- ference. Syracuse: State University of New York College of Environmental Science and Forestry, 1978: 138 – 155.
- [3] THAYER R L Jr, ATWOOD B G. Plants, complexity and pleasure in urban and sub-urban environment [J]. *Environ Psychol Nonv Behav*, 1978, **3**(2): 67 – 76.
- [4] SCHROEDER H W, CANNON W N Jr. The esthetic contribution of trees to residential streets in Ohio towns [J]. *J Arboric*, 1983, **9**(9): 237 – 243.
- [5] BUHYOFF G J, GAUTHIER L J, WELLMAN J D. Predicting scenic quality for urban forests using vegetation measurements [J]. *For Sci*, 1984, **30**(1): 71 – 82.
- [6] SCHROEDER H W. Visual impact of hillside development: comparison of measurements derived from aerial and ground-level photographs [J]. *Landsc Urban Plan*, 1988, **15**(1): 119 – 126.
- [7] SMARDON R C. Perception and aesthetics of the urban environment: review of the role of vegetation [J]. *Landscape Urban Plan*, 1988, **15**(1): 85 – 106.
- [8] AOKI Y. Evaluation methods for landscapes with greenery [J]. *Landsc Res*, 1991, **16**(3): 3 – 6.
- [9] AOKI Y. Trends of researches on visual greenery since 1974 in Japan [J]. *Environ Inf Sci*, 2006, **34**(4): 46 – 49.
- [10] NOWAK D J. Notes: estimating leaf area and leaf biomass of open-grown deciduous urban trees [J]. *For Sci*, 1996, **42**(4): 504 – 507.
- [11] CCOTT K I, MCPHERSON E G, SIMPSON J R. Air pollutant uptake by Sacramento's urban forest [J]. *J Arboric*, 1998, **24**(4): 224 – 233.
- [12] 李房英, 黄浩, 陈丽静, 等. 福州市道路绿地的调查与分析[J]. 福建林学院学报, 2004, **24**(1): 50 – 53.
LI Fangying, HUANG Hao, CHEN Lijing, et al. Investigation and analysis of road-greenbelt in Fuzhou [J]. *J Fujian Coll For*, 2004, **24**(1): 50 – 53.
- [13] 李金路. 从统计上看我国城市绿地率和绿化覆盖率的数量差[J]. 中国园林, 1997, **13**(3): 17 – 18.
LI Jinlu. The quantity difference between urban green space and green coverage from a statistical perspective in China [J]. *Chin Landsc Archit*, 1997, **13**(3): 17 – 18.
- [14] 邓小军, 王洪刚. 绿化率, 绿地率, 绿视率[J]. 新建筑, 2002(6): 75 – 76.
DENG Xiaojun, WANG Honggang. Green ration, green space ratio, green looking ratio [J]. *New Architec*, 2002(6): 75 – 76.
- [15] ROWNTREE R A. Urban forest ecology: conceptual points of departure [J]. *J Arboric*, 1998, **24**(2): 62 – 71.
- [16] 田梦. 城市道路绿化模式与绿视率的关系探讨: 以重庆市为例[D]. 重庆: 西南大学, 2011.
TIAN Meng. *Research on the Relationship Between Green Model and Green Looking Ratio-Taking Chongqing as an Example* [D]. Chongqing: Southwest University, 2011.
- [17] 周坚华. 上海市绿化三维量调查及其对策研究[J]. 中国园林, 1997, **12**(6): 58 – 60.
ZHOU Jianhua. Investigation and countermeasure research on the three dimensional quantity of green in Shanghai City [J]. *Chin Landsc Archit*, 1997, **12**(6): 58 – 60.
- [18] 刘立民, 刘明. 绿量—城市绿化评估的新概念[J]. 中国园林, 2000, **16**(5): 32 – 34.
LIU Limin, LIU Ming. Green quantity—the new concept of urban green evaluation [J]. *Chin Landsc Archit*, 2000, **16**(5): 32 – 34.
- [19] 蒋跃辉. 合理、特色的城市道路绿化系统研究: 以厦门市市府大道绿化系统建构为例[J]. 规划师, 2002, **18**(6): 33 – 37.
JIANG Yuehui. Research on reasonable, characteristic green space system of urban road [J]. *Planners*, 2002, **18**(6): 33 – 37.
- [20] 陈自新, 苏雪痕, 刘少宗, 等. 北京城市园林绿化生态效益的研究[J]. 中国园林, 1998, **14**(1/6): 57 – 60, 51 – 54, 53 – 56, 46 – 49, 57 – 60, 53 – 56.
CHEN Zixin, SU Xueheng, LIU Shaozong, et al. The ecological effects and benefits of urban landscape in Beijing [J]. *Chin Landsc Archit*, 1998, **14**(1/6): 57 – 60, 51 – 54, 53 – 56, 46 – 49, 57 – 60, 53 – 56.
- [21] 吴立蕾, 王云. 城市道路绿视率及其影响因素: 以张家港市西城区道路绿地为例[J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2009, **27**(3): 267 – 271.
WU Lilei, WANG Yun. The green looking ratio of urban roads and its major factors: example as Zhangjiagang City [J]. *J Shanghai Jiaotong Univ Agric Sci*, 2009, **27**(3): 267 – 271.

竹材加工剩余物耐盐性高吸水保水材料的制备及性能

曹玲燕, 赵稳祥, 虞小莹, 董聪勇, 金贞福

(浙江农林大学 工程学院, 浙江 临安 311300)

摘要: 竹材加工剩余物是丰富的可再生资源, 且在培肥土壤、改善土壤微量元素等方面有积极作用。利用竹材加工剩余物制备高吸水保水材料, 不仅使天然资源得到有效利用, 还可以降低高吸水保水材料的成本, 增加材料的复合功能。利用竹材加工剩余物为原材料, 接枝丙烯酸、丙烯酰胺单体制备耐盐性高吸水性树脂。以过硫酸钾作为引发剂, 通过将单体丙烯酸(AA)在一定条件下接枝到竹纤维上的共聚反应合成吸水性树脂, 研究单体中和度、竹粉加入与否、引发剂用量、单体用量、碱液种类等对接枝共聚产物吸水树脂的吸水率的影响。碱液种类选取300.00 g·kg⁻¹ 氢氧化钠水溶液、丙烯酸中和度为60.0%, 引发剂用量为0.04 g, 引发剂与单体丙烯酸同时加入、单体丙烯酸的用量为8.0 mL时吸水率高, 达718.20 g·g⁻¹。图1表4参12

关键词: 木材科学与技术; 吸水树脂; 吸水率; 接枝共聚; 单体中和度

中图分类号: S781.9 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2016)02-0295-05

Super absorbent resin from grafting acrylic acid onto bamboo fiber

CAO Lingyan, ZHAO Wenxiang, YU Xiaoying, DONG Congyong, JIN Zhenfu

(School of Engineering, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: This study was conducted to determine the effects of the degree of neutralization with acrylic acid, the quantity of initiator and acrylic acid to use, whether bamboo fiber should be added or not, and the alkalinity of the water for a super absorbent resin. The super absorbent resin was produced by grafting acrylic acid onto bamboo fibers using potassium peroxodisulfate as an initiator. Results showed the optimum grafting conditions as the following: 60.0% monomer neutralization, 300.00 g·kg⁻¹ alkalinity from a sodium hydroxide solution, 0.04 g of potassium peroxodisulfate, and 8.0 mL acrylic acid. With optimum conditions the water absorption was about 718.20 g·g⁻¹. [Ch, 1 fig. 4 tab. 12 ref.]

Key words: wood science and technology; super absorbent resin; water absorption rate; graft copolymerization; degree of monomer neutralization

高吸水性树脂(super absorbent resin, 简称SAP)是20世纪50年代开始发展起来的含强亲水基团的水溶胀型新型功能高分子材料, 具有吸水容量大、吸水速度快、施压下不脱水、保水能力强的优点, 应用范围较广^[1-3]。按原料来源不同, SAP一般分为合成树脂系、淀粉接枝系和纤维素接枝系等三大类^[4-5]。纤维素接枝系因具有凝胶强度高、抗生物降解、耐盐性好、pH值易调节等优点, 再加上纤维素来源广泛, 有降低成本、环境友好、废弃物资源化利用的潜力^[5-7]。LEPOURTRE等^[8]最先在漂白的造纸浆粕上接枝聚丙烯腈制备出高吸水材料, 自此基于以纤维素为分子骨架, 通过与其他单体接枝共聚形成的一类高分子聚合物的研究开始引起世界的关注。马风国等^[9]将丙烯酸、丙烯酰胺单体接枝于羧甲基纤维素上制备高吸水树脂。研究了反应时间, 丙烯酸的中和度, 丙烯酸、丙烯酰胺、羧甲基纤维素的配比, 引发剂用量等对高吸水性树脂吸水率的影响, 确定了最佳制备条件。郑彤等^[10]将再生纸浆纤维素作为分子骨架,

收稿日期: 2015-05-20; 修回日期: 2015-08-25

基金项目: 浙江省新苗人才培养计划项目(2015R412006)

作者简介: 曹玲燕, 从事木材科学与工程研究。E-mail: 649369193@qq.com。通信作者: 金贞福, 教授, 博士, 从事木材科学与技术研究。E-mail: jinzhengfuzj@126.com

对接枝丙烯酸及其钠盐制备高吸水性树脂的方法进行了研究,得出了以过硫酸钾为引发剂,再生纸浆用量为22%,丙烯酸中和度为70%,反应16.0 h这一最佳工艺条件,从而制备出了吸水率高达1 050 g·g⁻¹的高吸水性树脂材料。美国、日本、欧洲国家的高吸水保水材料主要用于卫生领域,占市场份额的70%,而中国的高吸水保水材料主要应用于西北干旱区、土壤改良、储水和油田等方面^[1]。中国水资源利用率不高,浪费现象较为严重,因此,合理高效利用有限的水资源,实现节水型农业将是中国农业发展的一个必然趋势。竹材加工剩余物是丰富的可再生资源,含有可观的纤维素成分,其中的木质素、半纤维素等成分在培肥土壤、改善土壤微量元素等方面有积极作用。利用竹材加工剩余物制备高吸水保水材料,不仅使天然资源得到有效利用,还可以降低高吸水保水材料的成本,增加材料的复合功能。本试验利用竹材加工剩余物为原材料,接枝丙烯酸、丙烯酰胺单体制备耐盐性高吸水性树脂,研究了不同碱液种类、丙烯酸中和度、单体(丙烯酸、丙烯酰胺)用量、引发剂的用量对吸水率的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料及仪器

1.1.1 试验材料 竹粉(取自浙江省临安市板桥竹材加工厂),丙烯酸(AA,上海凌峰化学试剂有限公司),氢氧化钠(NaOH,江苏彤晟化学试剂有限公司),氢氧化钾(KOH,江苏彤晟化学试剂有限公司),氨水(NH₃·H₂O,江苏彤晟化学试剂有限公司),过硫酸钾(K₂S₂O₈,和光纯乐工业株式会社)。

1.1.2 试验仪器 植物粉碎机:FS180-4,天津市泰斯特仪器有限公司。筛子:40目,孔径0.45 mm,浙江上虞市水仙仪器有限公司。电子天平:BS 224S, d=0.1 mg,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司。电子天平:DT 1000,杭州惠创仪器设备有限公司。水浴锅:201D升降式恒温水油浴锅,电压:220 V,功率:1.5 kW,杭州惠创仪器设备有限公司。恒速搅拌器:上海申胜生物技术有限公司。恒温搅拌器:85-2型恒温磁力搅拌器,上海志威电器有限公司。干燥箱:WFO-710送风定温干燥箱,上海爱朗仪器有限公司。粉碎机:200.0 g手提式高速中药粉碎机,型号:DFT-200,深圳市鼎鑫宜设备有限公司。滤袋:用250目纱布压制自制而成。

1.2 试验方法

1.2.1 竹粉的准备 竹材加工剩余物用植物粉碎机粉碎,然后用40目的筛子筛选出所需竹粉,用尼龙袋保存,并排尽尼龙袋中的空气。

1.2.2 碱液的准备 试验分别需要30%的氢氧化钠(NaOH),300.0 g·kg⁻¹氢氧化钾(KOH),氨水(NH₃·H₂O)3种碱液,其中氨水是直接使用的,氢氧化钠和氢氧化钾分别配置成质量分数为300.0 g·kg⁻¹的水溶液。

1.2.3 生物质超强吸水树脂的合成 取1.0 g竹粉,50.0 mL纯净水装入三口圆底烧瓶,放置于85 °C的201D升降式恒温水油浴锅内,用恒速搅拌器搅拌,使其糊化,糊化时间为60 min,期间不间断地通入氮气,以排尽容器中的空气。待糊化后,冷却至50 °C,向反应容器中缓慢加入一定量的不同中和度的丙烯酸(一定量的丙烯酸与30%的碱液或25%的氨水中和所得)和0.04 g过硫酸钾引发剂,进行接枝共聚反应。待凝结后停止搅拌,但继续通入氮气约2 h,取出反应产物。将反应产物剪碎,在60 °C的干燥箱内干燥至恒量。用中药粉碎机粉碎,得淡黄色颗粒状高吸水树脂产品。聚合反应方程式引发剂:K₂S₂O₈→2SO₄²⁻+2K⁺,2 SO₄²⁻+H₂O→HSO₄⁻+OH。接枝共聚反应见图1。

1.3 高吸水树脂吸水率测定

准确称取干燥过的吸水树脂1.0 g,放入1.0 L烧杯,加入800.0 mL去离子水,使其充分吸水,呈胶冻状后用250目滤袋滤水,直到1 min内无水滴落,称量。

$$\text{吸水率}(\text{g} \cdot \text{g}^{-1}) = (\text{胶冻质量} - \text{干树脂质量}) / \text{干树脂质量}.$$

2 结果与分析

2.1 单体丙烯酸(AA)的中和度对吸水树脂吸水率的影响

中和度用来表示丙烯酸与碱液进行中和反应的程度。本实验采用300.0 g·kg⁻¹的氢氧化钠水溶液中和丙烯酸,配制50%,60%,70%,80%等4种中和度。在实验方法中说明的接枝共聚工艺条件下进行

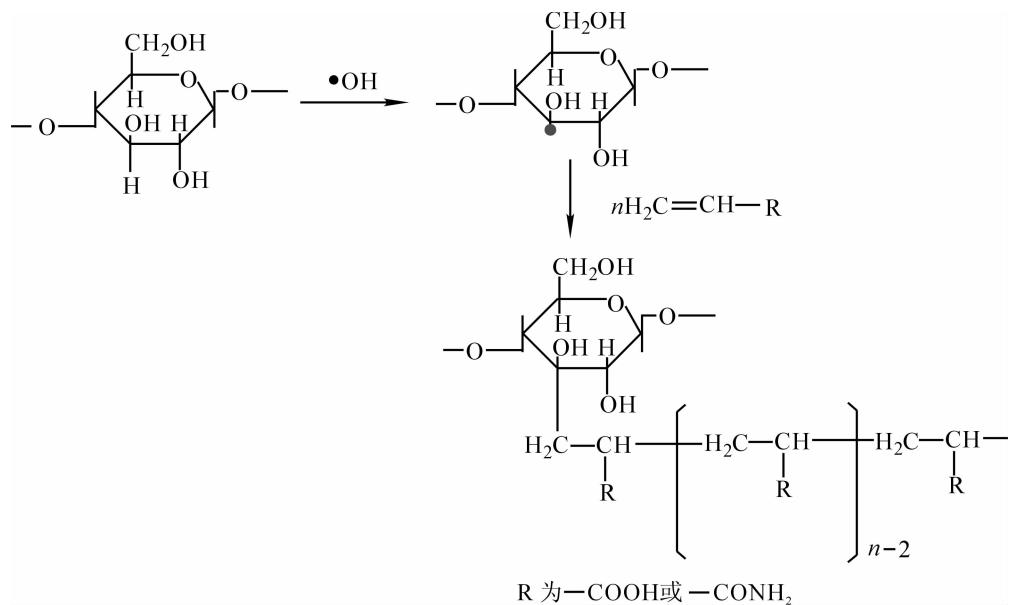


图 1 接枝共聚反应

Figure 1 Graft copolymerization reaction

反应, 得到吸水树脂, 其吸水率如表 1 所示。

单体丙烯酸中和度为 60% 时, 竹粉吸水树脂的吸水率到达最大值, 之后由于反应液中所含的 $-\text{COOH}$ 量逐渐减少, 使得竹粉吸水树脂的交联性逐渐变差, 树脂的吸水率也随之逐渐下降。当中和度过高, pH 值高, 易生成可溶性的聚丙烯酸碱金属盐, 溶液中余下 $-\text{COOH}$ 量则越少, 导致最终难以得到较好的交联结构产物, 而如果中和度过低, 则易爆聚, 反应也难以控制, 生成的产物的分子量偏低, 最终导致吸水率不高^[12]。

2.2 碱液种类对吸水树脂吸水率的影响

采用质量分数为 $300.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的氢氧化钠水溶液、 $300.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的氢氧化钾水溶液、 $250.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的氨水等 3 种碱性溶液中和单体丙烯酸, 中和度为 60%, 制备吸水树脂。 $300.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的氢氧化钠水溶液、 $300.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的氢氧化钾水溶液、 $250.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的氨水中和丙烯酸制备吸水树脂吸水率分别为 718.2, 657.3 和 $457.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

2.3 引发剂用量对吸水树脂吸水率的影响

吸水树脂的制备多数为自由基聚合反应, 它需要自由基的引发, 引发的方法有高能射线辐照、电子射线辐照、紫外线辐照和引发剂引发等, 其中引发剂引发的占大多数。引发剂是指一类受热易分解成自由基的化合物。采用 30% 氢氧化钠水溶液, 丙烯酸中和度为 60%, 引发剂分别为 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 g 条件下, 制备吸水树脂。

由表 2 可知: 吸水树脂的吸水率先随引发剂用量的增加而增高, 当达到一定值时, 增加引发剂的用量反而会降低树脂吸水率, 引发剂用量为 0.04 g 时吸水树脂吸水率最佳。引发剂用量小时,

表 1 单体丙烯酸中和度对吸水树脂吸水率的影响

Table 1 Effect of neutralization degree on water absorption of water absorbent resin

中和度/%	吸水率/(g·g ⁻¹)	中和度/%	吸水率/(g·g ⁻¹)
50	603.2	70	632.8
60	718.2	80	607.2

表 2 引发剂用量对吸水树脂吸水率的影响

Table 2 Effect of amount of initiator on water absorption of water absorbent resin

引发剂用量/(g·g ⁻¹)	吸水率/(g·g ⁻¹)	引发剂用量/(g·g ⁻¹)	吸水率/(g·g ⁻¹)
0.02	597.8	0.06	612.5
0.04	718.2	0.08	578.3

产生的自由基少, 竹纤维的纤维素、半纤维素、木质素上的反应活性点少, 不利于接枝共聚反应的发生, 吸水率低, 随着引发剂用量增加, 产生的自由基多, 在竹纤维上也产生较多的反应活性点, 有利于接枝共聚反应的发生, 吸水率提高。当引发剂的用量高于 $0.04 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ 时, 产生的自由基太多, 反应速度快, 容易爆聚, 反应不易控制, 吸水率降低。

2.4 单体丙烯酸的用量对吸水树脂吸水率的影响

丙烯酸中和度为60%，碱液种类为300.0 g·kg⁻¹的氢氧化钠水溶液，引发剂用量为0.04 g，引发剂与丙烯酸同时加入，只改变丙烯酸用量这一因素，分别设定其用量分别为4.0, 6.0, 8.0, 10.0 mL进行接枝共聚反应制得吸水树脂。由表3得：竹粉吸水树脂的吸水率随着单体丙烯酸用量的变化而出现升降，丙烯酸用量为8.0 mL时，竹粉吸水树脂的吸水率最高。

2.5 竹粉加入与否对吸水树脂吸水率的影响

采用300.0 g·kg⁻¹的氢氧化钠水溶液中和丙烯酸，配制50%，60%，70%，80%等4种中和度。采用0.04 g引发剂、单体丙烯酸8.0 mL的条件下不加入竹粉，制备吸水树脂(表4)，旨在比较与加入竹粉(表1)吸水性树脂的吸水率。由表1(加入竹粉)和表4(未加入竹粉)比较可知，加入竹粉的吸水树脂的吸水率高于未加入竹粉的吸水树脂的吸水率。

3 结论

以过硫酸钾(K₂S₂O₈)为引发剂，竹粉接枝丙烯酸制备吸水树脂。碱液种类选取300.0 g·kg⁻¹氢氧化钠水溶液，丙烯酸中和度为60%，引发剂用量为0.04 g，引发剂与单体丙烯酸同时加入，单体丙烯酸的用量为8.0 mL时吸水率高，达718.2 g·g⁻¹。

竹粉加入与否对于吸水树脂的吸水率有较大影响，加入竹粉可以有效地提高吸水树脂的吸水率，其吸水率为718.2 g·g⁻¹，相对于未添加竹粉的吸水树脂高。

4 参考文献

- [1] 吴季怀, 林建明, 魏月琳. 高吸水保水材料[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 174.
- [2] FANTA G F, RUSSEL R C. Syntheses of starch-grafted polyacrylonitrile polymers [J]. *J Appl Polym Sci*, 1969, **13**(10): 929 - 936.
- [3] 李敏, 王力, 蒋爱玲. 耐盐性高吸水性树脂的研究进展[J]. 广东化工, 2006, **33**(3): 68 - 70.
LI Min, WANG Li, JIANG Ailing. Progress of salt-tolerant super absorbent polymer [J]. *Guangdong Chem Ind*, 2006, **33**(3): 68 - 70.
- [4] 吴文娟, 倪志刚, 耿晶晶. 纤维素接枝改性制备高吸水性树脂的研究[J]. 中国造纸, 2006, **25**(12): 7 - 10.
WU Wenjuan, NI Zhigang, GENG Jingjing. Preparation of superabsorbent resin from cellulose by grafting copolymerization [J]. *China Pulp Paper*, 2006, **25**(12): 7 - 10.
- [5] 王丹, 宋湛谦, 商士斌. 羧甲基纤维素接枝两性高吸水树脂的制备工艺[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2007, **31**(2): 27 - 31.
WANG Dan, SONG Zhanqian, SHANG Shibin. Synthesis of amphoteric superabsorbent polymers modified by carboxymethyl cellulose [J]. *J Nanjing For Univ Nat Sci Ed*, 2007, **31**(2): 27 - 31.
- [6] 赵丽辉, 陈丽晶, 张荣明. 纤维素接枝型高吸水性树脂吸水保水性能研究[J]. 广东化工, 2007, **34**(3): 22 - 23.
ZHAO Lihui, CHEN Lijing, ZHANG Rongming. Study on the capacities of absorbing and holding water of the high absorbent resin by cellulose grafted [J]. *Guangdong Chem Ind*, 2007, **34**(3): 22 - 23.
- [7] 欧阳娜, 林松柏, 余娜. 纤维素系高吸水性树脂的制备及应用研究进展[J]. 化学工程与装备, 2006(4): 13 - 16.
OUYANG Na, LIN Songbai, YU Na. Review on the development and application of the super absorbent resin by

表3 单体丙烯酸用量对吸水树脂吸水率的影响

Table 3 Effect of monomer acrylic acid on the water absorption of water absorbent resin

单体(AA)用量/mL	吸水率/(g·g ⁻¹)	单体(AA)用量/mL	吸水率/(g·g ⁻¹)
4.0	572.6	8.0	718.2
6.0	623.6	10.0	654.7

表4 竹粉加入与否对吸水树脂吸水率的影响

Table 4 Effect of bamboo powder on the water absorption of water absorbent resin

中和度/%	吸水率/(g·g ⁻¹)	中和度/%	吸水率/(g·g ⁻¹)
50	513.3	70	530.4
60	613.4	80	509.4

- cellulose grafted [J]. *Chem Eng Equip*, 2006(4): 13 – 16.
- [8] LEPOUTRE P F, HUI S H, ROBERTS A A. The water absorbency of hydrolyzed polyacrylonitrile-grafted cellulose fibers [J]. *J Appl Polym Sci*, 1973, **17**(10): 3143 – 3156.
- [9] 马风国, 宋毅, 多英全, 等. 羧甲基纤维素与丙烯酸和丙烯酰胺共聚接枝研究[J]. 高分子材料科学与工程, 2003, **19**(1): 81 – 83.
MA Fengguo, SONG Yi, DUO Yingquan, *et al.* Acrylic acid and acrylamide graft on the sodium carboxymethyl cellulose [J]. *Polym Mater Sci Eng*, 2003, **19**(1): 81 – 83.
- [10] 郑彤, 王鹏, 张志谦, 等. 纤维素接枝丙烯酸制备高吸水树脂及树脂保水性能的研究[J]. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2002, **18**(2): 192 – 196.
ZHENG Tong, WANG Peng, ZHANG Zhiqian, *et al.* Preparing super-absorbent by grafting acrylic acid onto cellulose and study on performance of water holding of super-absorbent [J]. *J Harbin Univ Comm Nat Sci Ed*, 2002, **18**(2): 192 – 196.
- [11] 杨小晨. 高吸水性树脂的现状及发展方向[J]. 甘肃科技, 2005, **21**(10): 130 – 131.
YANG Xiaochen. Present situation and development trend of high water absorbing resin [J]. *Gansu Sci Technol*, 2005, **21**(10): 130 – 131.
- [12] 李建颖. 高吸水与高吸油性树脂[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 487.

高质量分数甲醛增强冷固型三聚氰胺-尿素-甲醛树酯性能

席雪冬, 雷洪, 杜官本, 吴志刚, 曹明, 廖晶晶

(西南林业大学 云南省木材胶黏剂及胶合制品重点实验室, 云南 昆明 650224)

摘要: 为探究高质量分数甲醛对共缩聚合成三聚氰胺-尿素-甲醛树酯(MUF)性能的影响, 以高质量分数甲醛(50%)为原料合成树脂(MUF-H), 在自制混合固化剂作用下, 通过常温(20 °C左右)冷压制备胶合木, 对比了高质量分数甲醛与普通甲醛合成树脂的物理力学性能, 并借助动态热机械性能(DMA), 红外光谱(FT-IR)和核磁共振(¹³C-NMR)等分析手段诠释两者间的差异。结果表明: 相对于以普通甲醛制备的MUF树脂, 以高质量分数甲醛替制备MUF-H树脂能有效提高树脂的固体含量和黏度, 缩短固化时间, 胶合木干状剪强度增幅为60%, 耐水性能和剥离率测试皆能满足相关国家标准; 动态热机械性能测试结果表明: 高质量分数甲醛制备MUF-H树脂能大幅度增强树脂的弹性模量; 核磁共振分析表明: 以高质量分数甲醛合成的MUF-H树脂具有较高含量的三聚氰胺与尿素共缩聚产物亚甲基醚键, 说明体系有较高的缩聚程度和交联度。图5表5参15

关键词: 林业工程; 高质量分数甲醛; 共缩聚合成三聚氰胺-尿素-甲醛; 常温固化; 物理力学性能

中图分类号: TQ433.4 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2016)02-0300-06

Cold-setting MUF resin adhesive prepared with concentrated fomaldehyde

XI Xuedong, LEI Hong, DU Guanben, WU Zhigang, CAO Ming, LIAO Jingjing

(Yunnan Provincial Key Laboratory of Wood Adhesives and Glued Products, Southwest Forestry University, Kunming 650224, Yunnan, China)

Abstract: To research the influence of high formaldehyde concentrations on synthetic copolycondensation of melamine urea-formaldehyde (MUF) resin performance, resins from a high formaldehyde concentration (MUF-H) of 50% and standard concentration (MUF) of 37% were compared. Then glulam was prepared at room temperature (20 °C) to test its physical and mechanical properties. Also, structural characteristics and thermal mechanical properties of resins were studied using ¹³C-NMR (nuclear magnetic resonance), Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy, and Dynamic Mechanical Analysis (DMA). Results showed that the high formaldehyde concentrations enhanced solid content and viscosity of the MUF-H adhesive, shortened curing time, and improved shear strength for 60%. The DMA test results revealed that the MUF-H resin also greatly enhanced the adhesive elastic modulus. Additionally, the ¹³C-NMR analysis indicated that the methylene and ether bonds of MUF-H resin were higher than MUF. Thus, the MUF-H system had a higher reaction rate and crosslinking degree which improved the mechanical properties of the resin. [Ch, 5 fig. 5 tab. 15 ref.]

Key words: forest engineering; high concentration of formaldehyde; MUF; room temperature curing; physical and mechanical properties

长期以来, 脲醛(UF)树脂以其良好的胶接性能和低廉的价格等优势, 占据着中国木材工业尤其是人造板工业用胶中的主导地位。但其耐水性差、甲醛释放高, 极大地限制了UF树脂的应用。近年来,

收稿日期: 2015-03-22; 修回日期: 2015-05-11

基金项目: 国家林业局引进国际先进农业科学技术计划(“948”计划)项目(2013-4-13); 国家林业公益性行业科研专项(201304505); 云南省中青年学术带头人后备人才(2011HB024)

作者简介: 席雪冬, 从事木材胶黏剂和木质复合材料研究。E-mail: xuedongjx@163.com。通信作者: 雷洪, 副教授, 博士, 从事木材胶黏剂和木质复合材料研究。E-mail: lfxgirl@163.com

相关专家学者为改善UF树脂综合性能、降低甲醛释放开展了大量研究工作，并取得喜人的成果^[1-5]。其中以三聚氰胺共聚改性合成三聚氰胺-尿素-甲醛(MUF)共缩聚树脂的改性方法最为常用^[6-7]。三聚氰胺能够与脲醛树脂中的亲水性基团发生反应，提高树脂的耐水性能；三聚氰胺呈碱性可以中和胶层中的酸，提高树脂的耐水解老化性能；三聚氰胺具有稳定的环状结构，提高树脂的水解活化能，在一定程度上防止和降低树脂的水解速度和热降解^[8-9]。高质量分数甲醛是指质量分数在42%以上的甲醛。在物质摩尔比相同的情况下，与传统的脱水UF相比，高质量分数甲醛制备脲醛预缩液(UFC)合成的UF具有固化反应活性高，固化时间短，游离甲醛含量低，板材综合性能好等优点^[10]。本研究分别以高质量分数甲醛(50%)和普通甲醛(37%)制备MUF树脂，旨在探究高质量分数甲醛对合成树脂的性能影响，并试从结构、机制上进行分析。

1 材料和方法

1.1 实验材料

尿素，分析纯，国药集团化学试剂有限公司；三聚氰胺，化学纯，国药集团化学试剂有限公司；甲醛，分析纯，质量分数37%，天津市致远化学试剂有限公司；高质量分数甲醛，甲醛质量分数50%，云南省新飞林人造板有限公司；甲酸，分析纯，天津市化学试剂工厂；氢氧化钠(NaOH)，分析纯，天津市化学试剂工厂；橡胶木，西双版纳沧江木业有限公司，含水率在15%以下，密度大于0.5 g·cm⁻³。

1.2 胶黏剂合成

研究中合成了2种MUF树脂，在同样的摩尔比及合成工艺条件下，一种以普通甲醛(37%)为原料合成，记为MUF，另一种以高质量分数甲醛为原料合成树脂，记为MUF-H。MUF合成工艺：在带有搅拌器的三口烧瓶中加入适量甲醛F(37%)，调pH9.2，升温至50℃，加第1次尿素(U₁)，第1次三聚氰胺(M₁)；升温至92℃，调节pH值至5.2~5.3，反应至一定程度，调节pH值至8.7~8.9，加第2次三聚氰胺(M₂)，保温反应至水混合性100%，立即调pH值至9.0，降温至45℃时，添加第2次尿素(U₂)，保温10 min后在pH8.0~8.5条件下放料保存。

MUF-H合成工艺：按甲醛质量分数计算，以高质量分数甲醛替代普通甲醛，其余合成工艺与MUF相同。

1.3 性能与表征

1.3.1 树脂的基本性能 参照GB/T 14074-2006《木材胶黏剂及其树脂检验方法》，测试树脂的基本性能，如固含量、黏度、固化时间、储存期等。

1.3.2 物理力学性能测试 按GB/T 26899-2011《结构用集成材》，测试胶合木耐水剥离率，测试方法见1.3.2.2；采用万能力学试验机进行胶层剪切强度测定(压缩速率5 mm·min⁻¹)。

1.3.2.1 剪切试件制作 参照国家标准，选取橡胶木边材按图1准备试样材料。胶合木采用常温加压方式制备，将30 mm×25 mm×10 mm规格的试片涂胶后于室温陈放10 min，之后放入压机加压固化。试样制备的具体工艺参数如下：涂胶量260 g·m⁻²(双面)，手工涂胶。胶合面积：25 mm×25 mm。固化剂及添加量：自制混合固化剂，添加量为胶黏剂固体含量的3%。压力为1.5 MPa。加压时间为1 h。养生时间为72 h。

1.3.2.2 剥离率试件制作 采用常温加压方式制备，将400 mm×150 mm×10 mm规格的板材双面涂胶后闭合于室温陈放10 min，之后放入压机加压固化，施胶量、压力及加压时间等参数同1.3.2.1。参照GB/T 26899-2011《结构用集成材》，分别进行冷水、沸水剥离实验，试件尺寸及制作参照标准进行。

1.3.3 核磁共振(¹³C-NMR)分析 仪器型号：Bruker Avance高分辨超导超频核磁共振仪。样品处理：用氘代二甲基亚砜(DMSO-d6)作为溶剂，取样品100 μm，溶剂300 μm注入核磁管中溶解摇匀。测定参数：脉冲序列zgig，内标为DMSO-d6，累加次数500~800次，测量谱宽39 062.5 Hz。定量分析参见文献[11]。

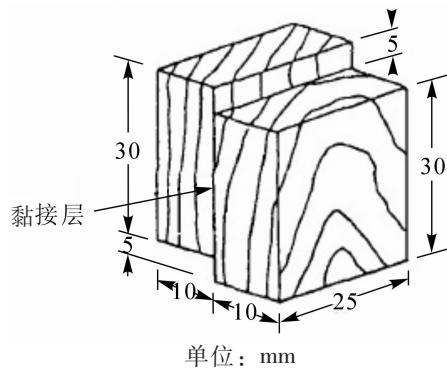


图1 试件胶合示意图

Figure 1 Bonding test picture of samples

1.3.4 红外光谱(FT-IR)分析 仪器: 美国瓦里安傅立叶变换红外光谱仪 Varian 1000; 测试条件: 溴化钾压片法, 扫描范围 400~4 000 cm^{-1} ; 扫描次数: 32 次。

1.3.5 动态热机械性能(DMA)分析 测试仪器: NETZSCH DMA-242; 分析软件: NETZSCH Proteus; 测试条件: 试验采用三点弯曲模式, 升温速率为 5 $\text{K}\cdot\text{min}^{-1}$, 温度范围为 40~280 $^{\circ}\text{C}$, 频率为 20 Hz, 动态力为 1.5 N; 试件规格: 50 mm \times 10 mm \times 3 mm, 杨木片, 涂胶量为 0.125 g。

2 结果与讨论

2.1 高质量分数甲醛对 MUF 树脂基本性能影响

表 1 是高质量分数甲醛制备 MUF 树脂与普通甲醛制备树脂的基本性能对比。①高质量分数甲醛较普通甲醛制备的 MUF 树脂, 其黏度和固含量显著提高, 且在可操作范围内, 更适于胶合木的生产操作; ②高质量分数甲醛较普通甲醛制备的 MUF 树脂, 其固化时间缩短, 有利于缩短胶合木固化时间, 提高生产效率; ③高质量分数甲醛较普通甲醛制备的 MUF 树脂, 其游离甲醛质量分数有所降低, 降幅为 30%。

表 1 高质量分数甲醛对树脂基本性能影响

Table 1 Influence of high concentration formaldehyde to the basic performances of resins

胶种	黏度/(mPa·s)	固化时间/s	固含量/%	游离甲醛/(g·kg ⁻¹)	存储期/d
MUF	50	89	54.1	2.9	>60
MUF-H	465	63	68.0	2.0	>60

2.2 高质量分数甲醛对 MUF 树脂物理力学性能影响

表 2 是高质量分数甲醛对胶合木剪切强度影响。从实验结果可以看出: ①以高质量分数甲醛为原料替代普通甲醛合成树脂能有效提高胶合木干状剪切强度, 增幅为 60%, 而对于胶合木的冷水湿强度及其沸水湿强度没有很明显的改善; ②就高质量分数甲醛制备 MUF-H 树脂而言, 相对于干强度其湿强度有大幅度的下降, 说明 MUF-H 树脂具有水不稳定, 更易发生水解而致使胶合强度降低, 但值的强调的是, 即便如此, 其湿强度仍能满足国家结构集成材标准要求。

表 2 高质量分数甲醛对胶合木剪切强度影响

Table 2 Influence of high concentration formaldehyde to glulam shear strength

胶种	干强度/MPa	木破率/%	24 h 冷水湿强度/ MPa	木破率/%	2 h 沸水强度/ MPa	木破率/%
MUF	5.12(1.29)	20	6.08(0.58)	100	5.93(0.34)	100
MUF-H	8.18(1.00)	70	5.90(0.35)	40	6.20(0.47)	90

说明: 表中括号内数字为实验数据标准差。

表 3 是对胶合木的冷水、沸水剥离试验。结果表明: 合成 MUF 树脂具有良好的耐水性能, 所制胶合木冷水剥离率和沸水剥离率都为 0。结合表 2 中数据分析可知, 尽管高质量分数甲醛合成的 MUF-H 树脂在水环境中易水解而使胶合强度下降, 但仍能确保胶合木的胶层不发生剥离; 而对比胶合木干状剪切强度和剥离剩余强度可看到: 部分经冷水或沸水处理后试样的剩余剪切强度甚至高于干状剪切强度, 说明本研究中所制胶黏剂尽管效果良好, 但仍未完全固化, 其性能还存在改进提升空间。

表 3 高质量分数甲醛对胶合木剥离率的影响

Table 3 Influence of high concentration formaldehyde to delamination rate

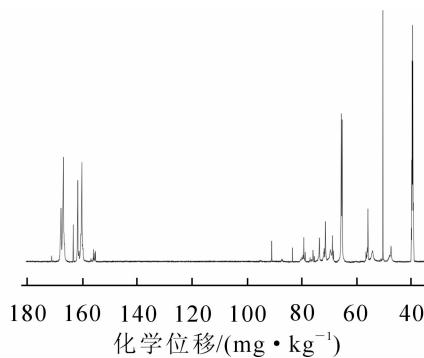
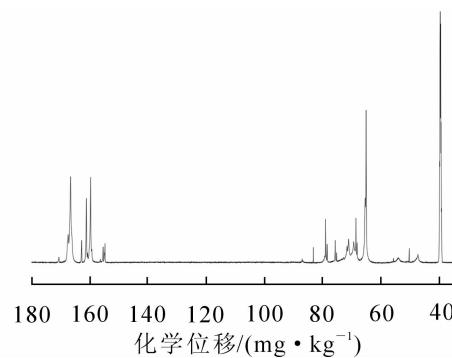
胶种	24 h 冷水剥离/%	剩余强度/ MPa	4 h 沸水剥离/%	剩余强度/ MPa
MUF	0	5.02(0.30)	0	7.86(0.98)
MUF-H	0	8.63(0.75)	0	8.22(1.20)

说明: 表中括号内数字为实验数据标准差。

2.3 核磁共振(¹³C-NMR)分析

根据不同化学位移处的积分面积, 核磁共振碳谱可对样品分析, 推算不同基团在样品中所占比例。图 2 和图 3 分别为以普通甲醛制备 MUF 的定量 ¹³C-NMR 谱图和高质量分数甲醛制备 MUF-H 的 ¹³C-NMR

谱图。以甲二醇($83 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)为基准峰, 对所有吸收峰进行积分, 并计算各类化学键积分值占总亚甲基积分值的百分含量, 参照相关文献^[12,14-15], 得归属峰和计量分析结果见表4。

图2 MUF的¹³C-NMR谱图Figure 2 ¹³C-NMR spectrum of sample MUF图3 MUF-H的¹³C-NMR谱图Figure 3 ¹³C-NMR spectrum of sample MUF-H

羟甲基为加成反应产物, 是树脂分子链增长、交联反应的基础。而亚甲基桥键和醚键的相对含量体现的是树脂的缩聚程度, 比例越高, 树脂缩聚程度越深, 树脂的强度越高。由表4可知: 以高质量分数甲醛合成的MUF-H树脂中羟甲基质量分数为58.44%, 亚甲基桥键8.73%, 亚甲基醚键32.01%, 其中三聚氰胺与尿素共缩聚产生的醚键9.97%, 缩聚程度达到40.74%。以普通甲醛合成的MUF中羟甲基含量为55.90%, 亚甲基桥键17.21%, 亚甲基醚键24.72%, 其中共缩聚产生的醚键13.61%, 缩聚程度达到41.93%。比较两者发现, MUF-H的醚键含量是桥键的近4倍, 而MUF的桥醚键含量比较接近, 说明甲醛质量分数高有利于醚键缩聚, 这是因为起始甲醛质量分数高有利于多羟甲基化平衡反应, 有利于缩聚成醚键。MUF-H的共缩聚产物含量较MUF低, 说明甲醛质量分数太高不利于共缩聚的发生, 可能原因是甲醛质量分数高使得三聚氰胺与尿素充分羟甲基化, 而共缩聚需要的活化能要比自缩聚高, 导致选择性的产生自缩聚产物。同时MUF-H的羟甲基含量较MUF高, 这有利于后期固化交联。

2.4 红外光谱(FT-IR)分析

2种三聚氰胺-尿素-甲醛树脂的红外分析图谱见图4。参照文献[13-15]对各吸收峰相应官能团归属

表4 MUF树脂¹³C-NMR定量分析结果Table 4 ¹³C-NMR quantitative analysis results of MUF resins

	树脂结构	化学位移/(mg·kg ⁻¹)	积分面积	
			MUF-H	MUF
三嗪环	=C—NH ₂	167.0~167.6		
	=C—NH(CH ₂)—	166.4~166.6		
	=C—N(CH ₂) ₂ —	165.4~166.5		
尿素	H ₂ N—CO—NH ₂	161.0~162.0		
	H ₂ N—CO—NH(CH ₂)—	159.2~159.8		
	(CH ₂)HN—CO—NH(CH ₂)—	158.0~158.6		
甲二醇(聚甲醛)	HOCH ₂ OCH ₃	89.0~90.0		
	HOCH ₂ OCH ₂ OH	86.2~86.3	0.82	2.17
	HOCH ₂ OH	82.4~82.5		
共缩聚	M—NH—CH ₂ —O—CH ₂ —N(CH ₂)—U	77.0~78.0	9.97	13.61
	M—N(CH ₂)—CH ₂ —O—CH ₂ —N(CH ₂)—U	74.0~75.0		
甲基醚	—NHCH ₂ OCH ₃	72.0~73.0		5.73
二亚甲基醚	—NHCH ₂ OCH ₂ (NH—/—OH)	67.0~70.0	22.04	11.11
羟甲基	M—NH—CH ₂ OH / U—NH—CH ₂ OH	63.0~65.0	58.44	55.90
亚甲基	—N(CH ₂)—CH ₂ —NH—	54.0~56.0	3.93	9.24
	—NH—CH ₂ —NH—	46.0~48.0	4.80	7.97
甲醇	CH ₃ OH / —CH ₂ OCH ₃	49.0~50.0		

表5。2种合成树脂工艺、原料配比均相同,而原材料中普通甲醛与高质量分数甲醛的差异,实质在于甲醛质量分数的差别,故 MUF-H 与 MUF 在红外图谱上形状相似,仅是一些峰的强弱差异,说明2种合成树脂在官能团上相同,仅是量上存在差异。

表5 MUF 树脂的红外谱峰归属

Table 5 FT-IR spectrum peaks belonging

σ/cm^{-1}	归属	σ/cm^{-1}	归属
3 300~3 500	N—H 及 O—H 伸缩振动	1 396	CH ₃ 面内弯曲振动
2 979	CH ₂ 伸缩振动	1 324	C—N 伸缩振动
2 364	C—N 三键伸缩振动	1 186	C—O 伸缩振动
1 675	羰基(C=O)伸缩振动	1 010	C—O—C 伸缩振动
1 577	N—H 弯曲振动		

2.5 动态热机械性能(DMA)分析

图5是2种合成树脂的动态热机械性能分析。曲线MUF表示以普通甲醛为原料制备树脂的DMA图,曲线MUF-H表示以高质量分数甲醛为原料制备树脂的DMA图。由图5分析可得知:①很显然,以高质量分数甲醛制备的MUF-H树脂的弹性模量较之普通甲醛制备树脂MUF有大幅度提高,反映在宏观上为MUF-H的力学性能较之MUF有很大幅度的增加,这与前面力学性能测试相吻合;②尽管2条曲线的初始固化温度没有太大差异,但通过两者从固化起始温度到达最大模量曲线斜率可以作为判别固化速率的依据,图谱中可以明显看出,固化反应速率为 $V_{\text{MUF-H}} > V_{\text{MUF}}$,与固化时间测试结果相吻合;③曲线MUF-H与MUF都随温度变化显现先增大再减小,再保持一段稳定之后开始丧失机械性能的规律,但值得注意的是,虽然MUF-H树脂的弹性模量峰值很大,但是随着温度的提高,弹性模量先急剧减小,降幅为40%,而MUF降幅不到10%。由此说明,高质量分数甲醛制备的三聚氰胺-尿素-甲醛树脂虽热稳定性差,但依然具有较高力学性能,这与耐沸水性能测试结果相吻合。④MUF-H树脂的模量达到峰值后会急剧降低,与¹³C-NMR分析中醚键量多结果相一致,因醚键不稳定会分解重排。

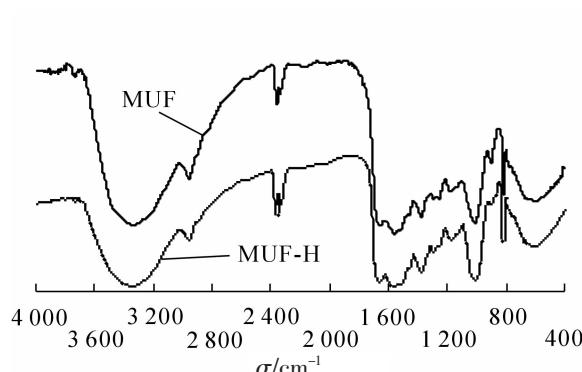


图4 2种 MUF 树脂的红外谱图

Figure 4 FT-IR spectra of two kinds MUF resins

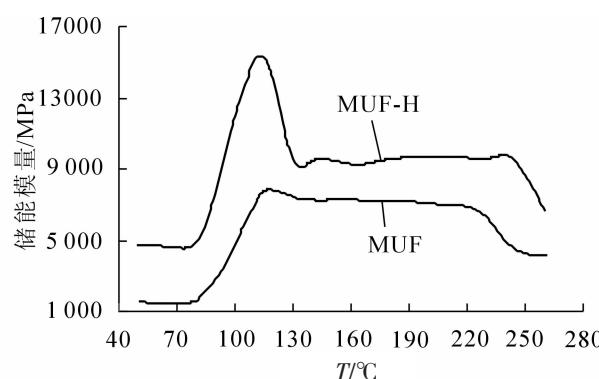


图5 合成树脂动态热机械性能曲线

Figure 5 DMA spectra of synthesis resins

3 结论

①采用高质量分数(50%)甲醛替代普通甲醛合成三聚氰胺-尿素-甲醛树脂能有效提高胶黏剂的固体含量、黏度,缩短固化时间,通过制备胶合木测试其胶合强度为8.18 MPa,相比普通甲醛增幅60%,耐水性能、剥离率测试皆能满足相关国家标准。②借助¹³C-NMR分析,可知高质量分数甲醛合成的MUF-H树脂的三聚氰胺与尿素共缩聚产物亚甲基醚键较MUF高,说明MUF-H体系的反应程度和交联度较高,从而解释了力学性能增加的原因。③通过DMA测试实验,得知高质量分数甲醛制备MUF-H树脂能大幅度增强胶的弹性模量,改善胶合产品的热力学性能;由随温度升高模量达到峰值的斜率可推测MUF-H树脂固化速率较MUF快;而当模量达到峰值后会有大幅度急剧降低,但仍较普通甲醛制备MUF树脂较好,与¹³C-NMR分析中MUF-H醚键量高的结果相吻合。

4 参考文献

- [1] 严顺英, 顾丽莉. 脲醛树脂的研究现状与研究前景[J]. 华工科技, 2005, 13(4): 50 – 54.
YAN Shunying, GU Lili. Present situation and research prospect of the urea-formaldehyde resin [J]. *Sci Technol Chem Ind*, 2005, 13(4): 50 – 54.
- [2] 薛东. 低游离甲醛脲醛树脂的研制[J]. 化学与粘合, 2003(6): 317 – 318.
XUE Dong. Preparation of UF resin with low formaldehyde content [J]. *Chem Adhes*, 2003(6): 317 – 318.
- [3] 俞丽珍, 孙才, 周健, 等. 脲醛树脂木材胶黏剂的改性研究[J]. 新型建筑材料, 2013, 40(1): 30 – 33.
YU Lizhen, SUN Cai, ZHOU Jian, et al. Study on modification of urea-formaldehyde resin adhesives for wood [J]. *New Build Mat*, 2013, 40(1): 30 – 33.
- [4] 沈新安, 郑苏. 环保型脲醛树脂胶黏膜剂的合成[J]. 中国胶黏剂, 2011, 20(4): 10 – 13.
SHEN Xin'an, ZHENG Su. Synthesis of environment-friendly urea-formaldehyde resin adhesive [J]. *China Adhes*, 2011, 20(4): 10 – 13.
- [5] 范捷. 脲醛树脂胶黏剂低毒性改性剂研究[J]. 绿色科技, 2013(6): 150 – 151.
FAN Jie. Study on low toxic urea-formaldehyde resin adhesives modifier [J]. *J Green Sci Technol*, 2013(6): 150 – 151.
- [6] 赵临五, 王春鹏. 脲醛树脂胶黏剂-制备、配方、分析与应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [7] 朱海龙, 吴玉章, 孙伟圣. 三聚氰胺脲醛树脂胶黏剂的合成[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2013, 37(1): 173 – 176.
ZHU Hailong, WU Yuzhang, SUN Weisheng. Synthesis of melamine-urea-formaldehyde resin adhesive [J]. *J Nanjing For Univ Nat Sci Ed*, 2013, 37(1): 173 – 176.
- [8] 闫文涛, 张永娟, 张雄, 等. 三聚氰胺尿醛树脂胶粘剂的改性[J]. 精细石油化工进展, 2008, 9(6): 29 – 32.
YAN Wentao, ZHANG Yongjuan, ZHANG Xiong, et al. Modification of melamine urea formaldehyde resin adhesive [J]. *Adv Fine Petrochem*, 2008, 9(6): 29 – 32.
- [9] 管仕龙, 李代华, 刘攀攀, 等. 尿素-三聚氰胺-甲醛复合树脂胶粘剂的研制[J]. 武汉工程大学学报, 2008, 30(4): 12 – 14.
GUAN Shilong, LI Daihua, LIU Panpan, et al. Synthesis of urea-formaldehyde/melamine-formaldehyde composite resin adhesive [J]. *J Wuhan Inst Technol*, 2008, 30(4): 12 – 14.
- [10] 李建章, 沈丹, 雷得定. 高浓度甲醛与 UFC: 人造板工业用脲醛树脂原料的发展方向[J]. 林产工业, 2007, 34(1): 48 – 51.
LI Jianzhang, SHEN Dan, LEI Deding. High concentration formalin and UFC: The trend in the development of UF resin for wood-based panel [J]. *China For Prod Ind*, 2007, 34(1): 48 – 51.
- [11] 郭晓申, 王辉, 杜官本, 等. 碱性反应阶段摩尔比对脲醛树脂最终结构影响的 ^{13}C -NMR 研究[J]. 中国胶黏剂, 2014, 26(2): 122 – 126.
GUO Xiaoshen, WANG Hui, DU Guanben, et al. ^{13}C -NMR study of the effect of molar ratio at alkaline reaction stage on the final structure of UF resin [J]. *China Adhes*, 2014, 26(2): 122 – 126.
- [12] MERCER A T, PIZZI A. ^{13}C -NMR analysis method for MUF and MF resin strength and formaldehyde emission from wood particleboard. (II) MF resins [J]. *J Appl Polym Sci*, 1996, 61(10): 1687 – 1695.
- [13] 杜官本, 雷洪, 方群. PMUF 共缩聚树脂制备过程中分子结构变化特征的研究[J]. 北京林业大学学报, 2006, 28(6): 132 – 136.
DU Guanben, LEI Hong, FANG Qun. Structure change of a PMUF co-condensed resin during its preparation [J]. *J Beijing For Univ*, 2006, 28(6): 132 – 136.
- [14] 金立维, 王春鹏, 储富详, 等. E1 级 MDF 用三聚氰胺改性脲醛树脂的定量 ^{13}C -NMR 结构研究[J]. 林产工业, 2006, 33(6): 38 – 41.
JIN Liwei, WANG Chunpeng, CHU Fuxiang, et al. The Quantitative ^{13}C -NMR Analysis of melamine-modified UF resin for E1 type MDF [J]. *China For Prod Ind*, 2006, 33(6): 38 – 41.
- [15] 赵临五, 王春鹏, 施娟娟, 等. 3 种三聚氰胺改性脲醛树脂胶结构与性能关系的研究[J]. 林产工业, 2011, 38(1): 16 – 20.
ZHAO Linwu, WANG Chunpeng, SHI Juanjuan, et al. Study on relations between structure and properties of three kinds of melamine-modified UF resins [J]. *China For Prod Ind*, 2011, 38(1): 16 – 20.

基于局部二值拟合模型的板材表面节子与虫眼的图像分割

白雪冰, 许景涛, 郭景秋, 陈凯

(东北林业大学 机电工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要: 为了更好地对板材表面的节子和虫眼进行快速有效的分割, 对局部二值拟合(local binary fitting, LBF)模型进行了深入研究, 从而提出一个改进的 LBF 模型, 即在 LBF 模型的基础上, 添加一个新的水平集线性正则化项, 与此同时引入一个以高斯函数为核函数的局部二值拟合能量。改进算法能够克服 LBF 模型的分割缺点, 使得分割过程对初始轮廓的大小和位置不敏感, 同时增强算法的抗噪性, 能够分割出灰度不均匀的图像。经实验验证, 该算法可以比较完整地提取出单一目标和多目标的板材节子和虫眼的图像, 以及对应得出与缺陷图像相对应的水平集演化图像。图 21 表 1 参 15

关键词: 木材科学与技术; 板材表面缺陷; 板材图像分割; LBF 模型; 水平集

中图分类号: TP391.41; S781.1 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2016)02-0306-09

Segmentation of wood surface knots and wormholes based on an improved LBF Model

BAI Xuebing, XU Jingtao, GUO Jingqiu, CHEN Kai

(College of Machinery Electricity, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China)

Abstract: To make wood surface defect segmentation faster and more effective, research was conducted to put forward an improved LBF (local binary fitting) Model with image segmentation based on the Chan-Vese (CV) Model. The improved LBF Model added a new level set formulation with a linear regularization term, and at the same time formed a Gaussian function as the kernel function with two local values for fitting energy. Results showed that the improved algorithm could overcome the segmentation shortcomings in the LBF Model. Also, the segmentation process was not sensitive to the size or the position of the initial contour. However, the anti noise of the algorithm was enhanced, and the image could be segmented in non-uniform gray. The experiment showed that the algorithm completely extracted the wood surface defect images with single and multi objectives, and level set evolution corresponding to the defect image could be obtained. [Ch, 21 fig. 1 tab. 15 ref.]

Key words: wood science and technology; wood surface defects; wood image segmentation; LBF model; level set

20 世纪 90 年代, 德国应用超声波技术得到木材超声波图像, 通过对图像分析来检测木材缺陷。美国等发达国家研制了超声波木材检测仪, 该方法可以快速简便地检测出木材缺陷, 但需要借助中间均匀介质(如水或油等), 难以实现连续性检测^[1]。法国已研制出微波木材检测仪, 但检测结果受到木材含水率高低影响较大, 该方法的适用范围和精确度还需要不断提高。加拿大、澳大利亚等国家将 X 射线扫描技术应用到木材检测中, 该方法对木材常见缺陷检测较为有效, 但是检测设备不但造价高而且防护措施比较苛刻^[1-2]。中国的木材缺陷检测技术主要还是以人工检测为主, 在生产过程中由于劳动强度较大, 个人检测经验和主观认知不同, 检测效率和准确率都较低, 难以实现自动化要求。近年来, 几何活动轮廓模型得到国内外学者的广泛关注, 成为图像分割的主流方法之一^[3-4]。其中, 几何活动轮廓模型基于

收稿日期: 2015-04-20; 修回日期: 2015-09-16

基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目(C201208)

作者简介: 白雪冰, 教授, 从事图像处理与模式识别研究。E-mail: xumou2010@163.com

曲线演化和水平集的方法备受瞩目, 即水平集函数在一个偏微分方程的控制下进行演化^[5], 直到零水平集演化到图像的目标边缘为止, 从而得到目标轮廓^[6]。CV(chan-vese)模型是一个基于区域的几何活动轮廓模型^[7], 由于CV模型不能分割灰度不均匀图像^[8], 因此, LI等^[9]于2008年提出了RSF(region-scalable fitting)模型, 又称局部二值拟合(local binary fitting, LBF)模型。该模型把CV模型的全局二值拟合能量泛函改为以高斯函数为核函数的可变区域拟合能量定义的能量泛函^[10], 从而较好地克服了CV模型的缺点, 能够分割出灰度不均匀图像^[11]。LBF模型以考虑局部均值信息为主要分割方式, 对于边界灰度较弱的图像分割困难, 演化速度较慢, 分割时依赖于演化曲线以及初始轮廓的位置, 而且受噪声影响较大。为了克服LBF模型的缺点, 本研究在LBF基础上添加一个新的水平集线性正则化项, 同时提出了一个新的核函数与LBF模型相结合的算法对板材表面缺陷进行分割, 从而使得该算法不仅能够分割灰度不均匀的图像, 而且对初始轮廓的大小和位置不敏感, 同时增强模型的抗噪性^[12]。

1 LBF模型介绍

1.1 LBF模型水平集改进模型

LBF模型是基于一种可变区域的能量泛函模型, 设 $\Omega \subset R^2$ 为整个图像的空域, $I: \Omega \rightarrow R$ 映射为灰度级图像, 针对图像空域 Ω 中的一点 x 和初始轮廓曲线 c 。LBF模型能量定义为:

$$\varepsilon_x^{\text{Fit}}(c, f_1(x)) = \sum_{i=1}^2 \lambda_i \int_{\Omega} K(x-y) |I(y) - f_i(x)|^2 dy。 \quad (1)$$

式(1)中: K 为核函数, 用于控制 x 的邻域 $O_x = \{y | |y-x| \leq r\}$; r 为领域半径; $\Omega_1 = \text{in}(c)$, $\Omega_2 = \text{out}(c)$, 分别为对应邻域的背景和目标邻域; $f_1(x)$ 和 $f_2(x)$ 为图像在点 x 处的2个局部拟合值; λ_1 , λ_2 为内外能量差的权重项, 且均为正数。其相应的水平集表达式为:

$$\varepsilon_x^{\text{Fit}}(c, f_1(x), f_2(x)) = \sum_{i=1}^2 \lambda_i \int_{\Omega} K(x-y) |I(y) - f_i(x)|^2 M_i(\phi) dy。 \quad (2)$$

式(2)中: $x \in \Omega$, ϕ 为水平集函数, λ_1 , λ_2 为内外能量差的权重项, $M_1(\phi)$, $H_\varepsilon(\phi)$, $M_2(\phi) = 1 - H_\varepsilon(\phi)$, $H_\varepsilon(x)$ 是Heaviside函数, 当且仅当曲线位于目标的边界时, 式(1)取得极小值即LBF能量取得极小值。其中:

$$H_\varepsilon(x) = \frac{1}{2} \left[1 + \frac{2}{\pi} \arctan \left(\frac{x}{\varepsilon} \right) \right]; \quad (3)$$

$$f_1(x) = \frac{K_\sigma(x) \times [H_\varepsilon(\phi(x)) I(x)]}{K_\sigma(x) \times H_\varepsilon(\phi(x))}; \quad (4)$$

$$f_2(x) = \frac{K_\sigma(x) \times [H_\varepsilon(\phi(x)) I(x)]}{K_\sigma(x) \times [1 - H_\varepsilon(\phi(x))]}。 \quad (5)$$

式(3)~(5)中: $K_\sigma(x)$ 为 $\sigma > 0$ 的高斯函数, 对于每个水平集函数 ϕ , 根据式(4)和式(5), 可知 $f_1(x)$ 和 $f_2(x)$ 为图像在点 x 局部邻域的加权灰度平均值(邻域大小由高斯函数的方差 σ 决定)。将当前点 x 延伸到整个图像区域, 同时为了确保水平集函数 ϕ 演化的稳定性, 增加曲线长度项 $L(x)$ 以及距离保证项^[13]。从而得出总能量函数:

$$\varepsilon(\phi, f_1(x), f_2(x)) = \int \varepsilon_x^{\text{Fit}}(\phi, f_1(x), f_2(x)) dx + v(L) + \mu(P)。 \quad (6)$$

式(6)中: $L(x) = \int \delta(\phi) |\nabla \phi| dx$ 为长度项; $P(x) = \int \frac{1}{2} (|\nabla \phi(x)| - 1)^2 dx$ 为距离保证项; v 和 μ 为长度权重且均为非负常量。

根据变分法和梯度下降法, 对式(6)可得能量泛函梯度下降流的水平集演化的偏微分方程式为:

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} = \mu (\nabla^2 \phi - \text{div}(\frac{\nabla \phi}{|\nabla \phi|})) + v \delta_\varepsilon(\phi) \text{div}(\frac{\nabla \phi}{|\nabla \phi|}) - \delta_\varepsilon(\phi) (\lambda_1 d_1 - \lambda_2 d_2)。 \quad (7)$$

式(7)中: ∇^2 为拉普拉斯算子; $\text{div}(\frac{\nabla \phi}{|\nabla \phi|})$ 为散度算子; $\delta_\varepsilon(x)$ 是Dirac函数。

$$\delta_\varepsilon(x) = H_\varepsilon'(x) = \frac{1}{\pi} \frac{\varepsilon}{\varepsilon^2 + x^2}; \quad (8)$$

$$d_1 = \iint_{\Omega} K_\sigma(y-x) |I(x, y) - f_1(x, y)|^2 dx dy; \quad (9)$$

$$d_2 = \iint_{\Omega} K_\sigma(y-x) |I(x, y) - f_2(x, y)|^2 dx dy. \quad (10)$$

式(8)~(10)中: f_1, f_2 分别近似于当前点 x 邻域中位于演化曲线内部和外部区域的灰度均值, 且利用点 x 扩展到整个图像区域内各个像素点的灰度值与 f_1 和 f_2 相差的大小来驱使演化曲线运动。分割弱边界图像时, 水平集演化方程式(7)中的 d_1 和 d_2 将会趋近于 0, 使得能量方程达到最小值, 导致曲线演化停止, 分割结束^[13]。

1.2 LBF 模型的高斯核函数改进模型

LBF 模型拟合的灰度值区域的范围由引入的非负核函数的参数大小来确定。根据高斯核函数的局部化特性, 距离 x 越近的点对于该点能量的贡献越大, 当距离大于时, 对点能量的影响几乎为 0^[14]。所以, 引入高斯核函数对于 LBF 模型的不均匀的灰度信息创造了条件^[15]。根据式(1)可知 0 水平集局部拟合能量方程, 其中高斯核函数通常表达式为:

$$K_\sigma(u) = \frac{1}{2(\pi)^{n/2}\sigma^n} e^{-|u|^2/2\sigma^2} (\sigma > 0). \quad (11)$$

当 $|u|$ 增加时, $K_\sigma(u)$ 减小并趋近于 0, 并具有“ 3σ 性”, 即 $|u| \geq 3\sigma$ 时, $K_\sigma(u) \approx 0$ 。且其二阶导数为:

$$K_\sigma''(u) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} (u^2 - \sigma^2) e^{-u^2/2\sigma^2}。在 u=\sigma 处变号, 即点 u=\sigma 且存在拐点, 从而忽略了与中心 x 点距离超过 3\sigma 的点 y。结合高斯函数的特性可知, 高斯函数是导致水平集演化速度慢的原因。因此, 选择如下函数为核函数代替高斯函数:$$

$$K_p(u) = \frac{1}{1+u^p}, p \in (0, 1], u \geq 0. \quad (12)$$

要求 $p \in (0, 1]$, 是因为 $p > 1$ 时, $K_p(u)$ 具有与高斯函数相似的图形特征——存在拐点 $x=((p-1)/(p+1))^{1/p}$ 下降快。综上所述, 将方程(6)与方程(7)中的 K_σ 用替代 K_p , 得到改进的 LBF 模型的演化方程如下:

$$\begin{aligned} \frac{\partial \phi}{\partial t} = & \mu (\nabla^2 \phi - \operatorname{div}(\frac{\nabla \phi}{|\nabla \phi|})) + \nu \delta_\varepsilon(\phi) \operatorname{div}(\frac{\nabla \phi}{|\nabla \phi|}) - \delta_\varepsilon(\phi) (\lambda_1 \iint_{\Omega} K_p(y-x) |I(x, y) - f_1(x, y)|^2 dx dy - \\ & \lambda_2 \iint_{\Omega} K_p(y-x) |I(x, y) - f_2(x, y)|^2 dx dy). \end{aligned} \quad (13)$$

LBF 模型利用局部图像信息, 而没有考虑图像的局部方差信息和全局方差信息, 因此用该核函数代替高斯函数, 对 LBF 模型进行了改进, 可以对不均匀图像有更好的分割效果, 并且加快了 LBF 模型的演化速度^[11]。

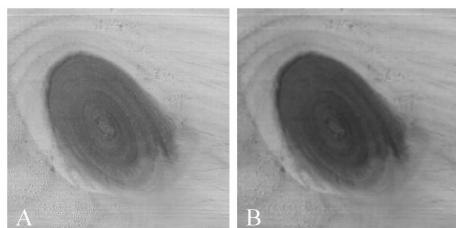
2 试验结果与分析

根据国家板材标准 GB/T 4823-1995《锯材缺陷》, 板材表面缺陷图像一般有虫眼、活节和死节。实验过程中使用的图像为具有单个活节、虫眼、死节板材缺陷图像和具有多个活节、虫眼、死节的板材缺陷图像, 且使用的图像均为灰度分布不均匀图像。LBF 模型分割过程中每次的迭代任务就是完成局部特征值 $f_1(x)$ 和 $f_2(x)$ 以及水平集函数的更新, 根据检测 0 水平集变化来确定迭代是否收敛。简而言之, 当连续 n 次 0 水平集的变化均小于 2 个像素时(实验中 n 取 5 次), 则迭代收敛。实验算法的参数若无特别说明均设置为: 权重系数 $\lambda_1=1.0$, $\lambda_2=1.5$; 正则化参数 $\varepsilon=1.0$; 时间步长为 $\Delta_t=0.1$; 长度权值 $\mu=1.0$; 核函数的方差根据不同缺陷图像而定。

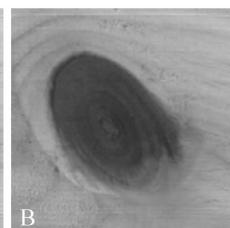
2.1 单个目标的分割实验结果

2.1.1 单个活节分割结果 图 1 为单个活节实验样本的原图和灰度图。从活节的灰度图可得出: 活节灰度值与周围正常板材组织灰度值的像素差距较小, 且边缘模糊不太清晰。图 2 为本研究算法对单个活节进行分割的过程, 算法核函数的方差设置为 $\sigma=5.0$ 。其中图 2A 迭代次数为 50 次, 分割时间为 5.366 4 s;

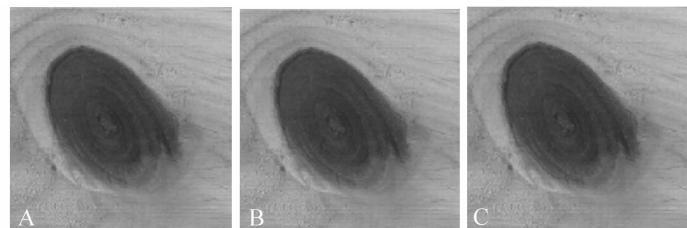
图2B迭代次数为80次,分割时间为8.673 7 s;图2C迭代次数为100次,分割时间为10.592 5 s。图3为本研究算法对单个活节分割过程产生的水平集演化图像,其中,图3A迭代次数为50次,图3B迭代次数为80次,图3C迭代次数为100次。



A原图



B灰度图



A迭代50次, 5.366 4 s; B迭代80次, 8.673 7 s; C迭代100次, 10.592 5 s

图1 活节原图与灰度图

Figure 1 An original image and gray image of the slipknot

图2 活节分割过程

Figure 2 Segmentation process of the slipknot

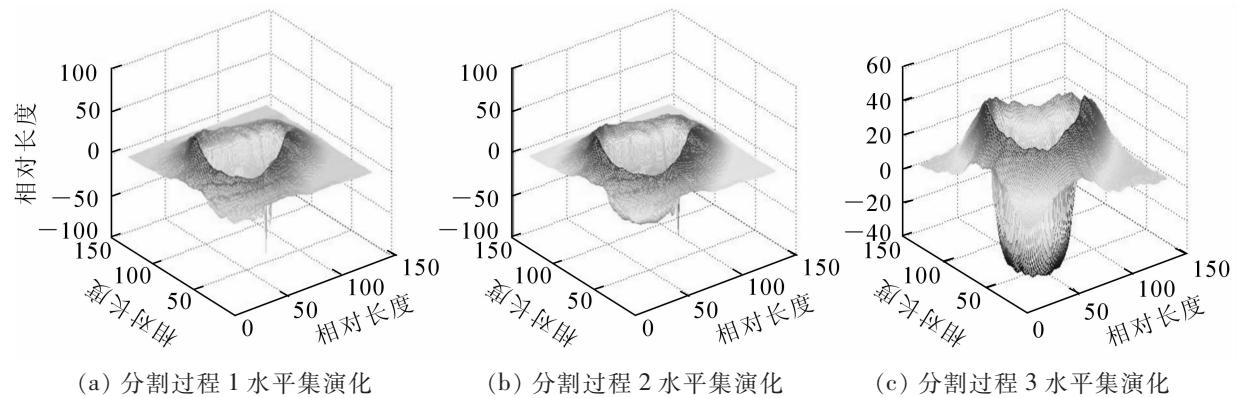
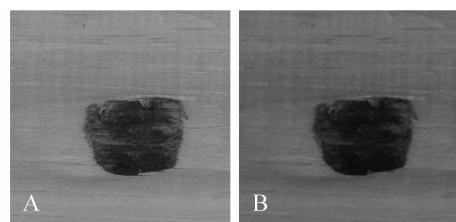


图3 活节分割过程水平集演化

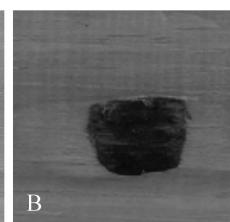
Figure 3 Level set evolution of segmentation process of the slipknot

2.1.2 单个虫眼分割结果 图4为单个虫眼实验样本的原图和灰度图。从虫眼的灰度图可得出虫眼的灰度值与周围正常板材组织灰度值的像素差距较大,且灰度分布不均匀。图5为对单个虫眼进行分割的过程,算法核函数的方差设置为 $\sigma=3.5$ 。其中图5A迭代次数为50次,分割时间为2.558 4 s;图5B迭代次数为80次,分割时间为5.912 4 s;图5C迭代次数为100次,分割时间为8.439 7 s。图6为本研究算法对单个活节分割过程产生的水平集演化图像,其中,图6A迭代次数为50次,图6B)迭代次数为80次,图6C迭代次数为100次。

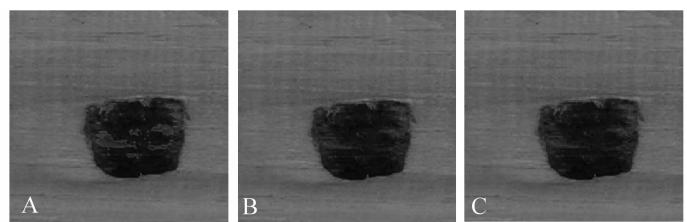
2.1.3 单个死节分割结果 图7单个死节实验样本的原图和灰度图。图8为对单个死节进行分割的过程,算法核函数的方差设置为 $\sigma=3.5$ 。其中图8A迭代次数为50次,分割时间为13.915 3 s;图8B迭代次数为100次,分割时间为27.534 2 s;图8C迭代次数为150次,分割时间为41.652 3 s。图9为对单个活节分割过程产生的水平集演化图像,其中,图9A迭代次数为50次,图9B迭代次数为100次,图9C迭代次数为150次。



A原图



B灰度图



A迭代50次, 2.558 4 s; B迭代80次, 5.912 4 s; C迭代100次, 8.439 8 s

图4 虫眼原图与灰度图

Figure 4 An original image and gray image of the wormhole

图5 虫眼分割过程

Figure 5 Segmentation process of the wormhole

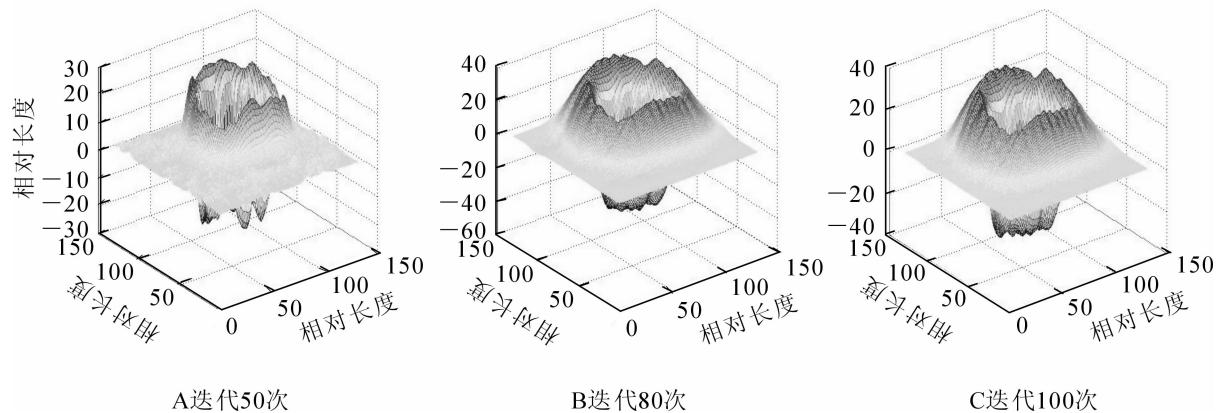


图 6 虫眼分割过程水平集演化

Figure 6 Level set evolution of segmentation process of the wormhole

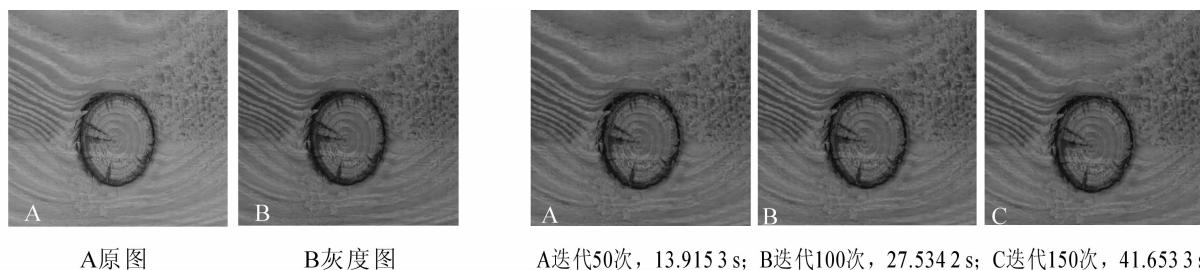


图 7

B灰度图

A迭代50次, 13.9153 s; B迭代100次, 27.5342 s; C迭代150次, 41.6533 s

图 8 死节分割过程

Figure 7 An original image and gray image of the encased knot

Figure 8 Segmentation process of the encased knot

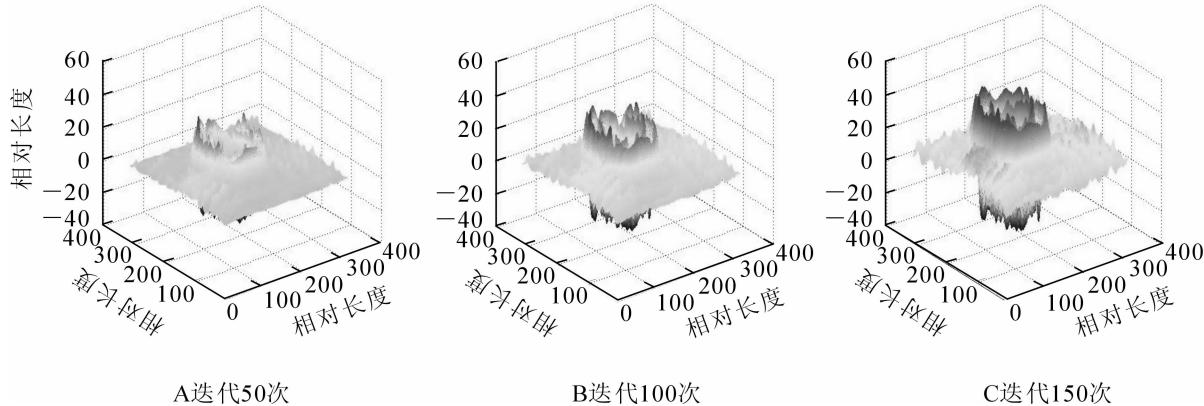


图9 死节分割过程水平集演化

Figure 9 Level set evolution of segmentation process of the encased knot

2.2 多个目标的分割实验结果

2.2.1 多个活节分割结果 图 1

过程，算法核函数的方差设置为 $\sigma=3.5$ 。其中图 11A 迭代次数为 30 次，分割时间为 6.130 8 s；图 11B 迭

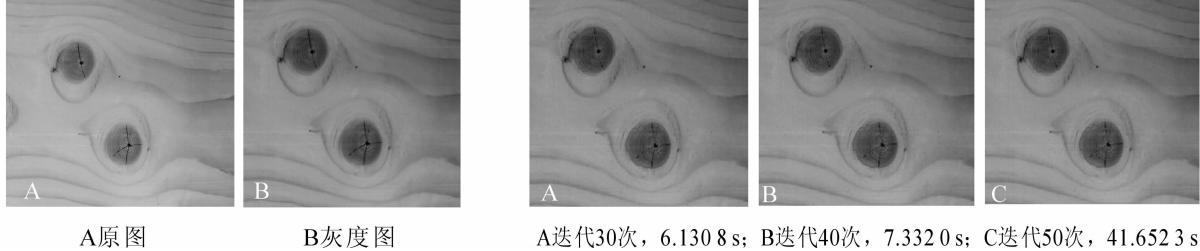


图 10 多活节原图与灰度图

图 11 多活节分割过程

Figure 10 An original image and gray image of the slipknots

Figure 11 Segmentation process of the slipknots

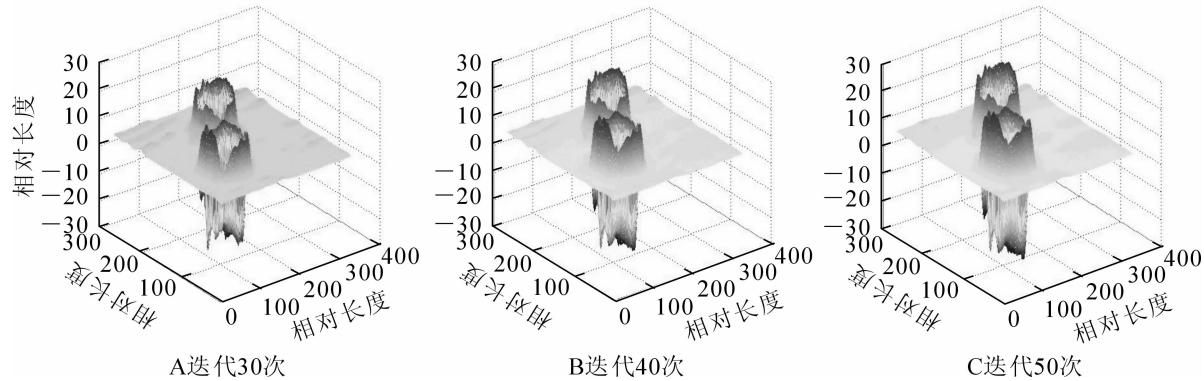


图 12 多活节分割过程水平集曲线

Figure 12 Level set evolution of segmentation process of the slipknots

代次数为 40 次, 分割时间为 7.332 0 s; 图 11C 迭代次数为 50 次, 分割时间为 41.652 3 s。图 12 为对多个活节分割过程产生的水平集演化图像, 其中, 图 12A 迭代次数为 30 次, 图 12B 迭代次数为 40 次, 图 12C 迭代次数为 50 次。

2.2.2 多个虫眼分割结果 图 13 为多个虫眼实验样本的原图和灰度图。图 14 为对多个虫眼进行分割的过程, 算法核函数的方差设置为 $\sigma=5.5$ 。其中图 14A 迭代次数为 20 次, 分割时间为 7.035 6 s; 图 14B 迭代次数为 30 次, 分割时间为 10.374 1 s; 图 14C 迭代次数为 40 次, 分割时间为 13.816 9 s。图 15 为对多个虫眼分割过程产生的水平集演化图像, 其中, 图 15A 迭代次数为 20 次, 图 15B 迭代次数为 30 次, 图 15C 迭代次数为 40 次。

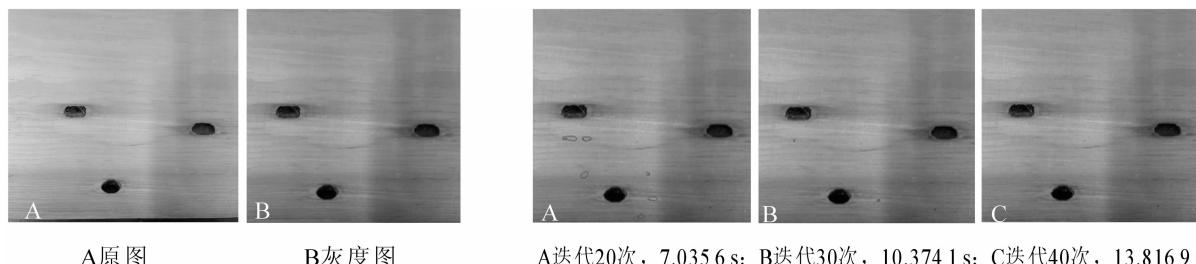


图 13 多虫眼原图与灰度图

Figure 13 An original image and gray image of the wormholes

A迭代20次, 7.035 6 s; B迭代30次, 10.374 1 s; C迭代40次, 13.816 9 s

图 14 多虫眼分割过程

Figure 14 Segmentation process of the wormholes

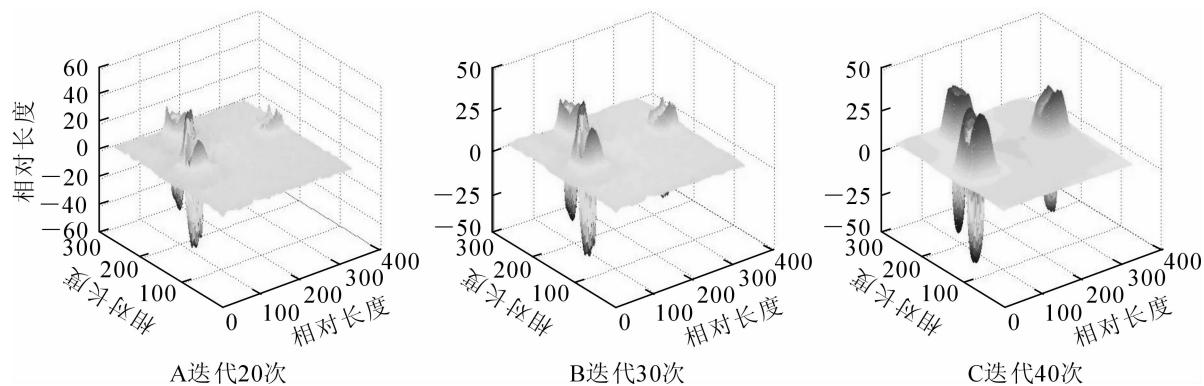
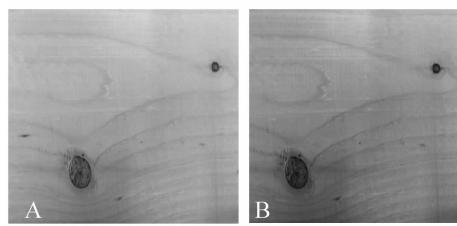


图 15 多虫眼分割过程水平集演化

Figure 15 Level set evolution of segmentation process of the wormholes

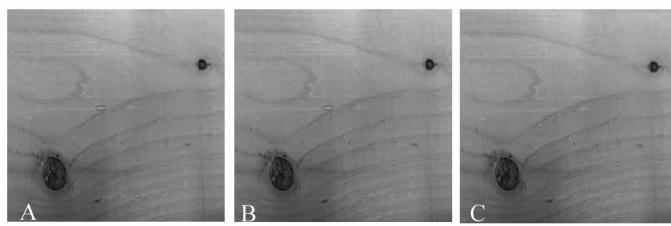
2.2.3 多个死节分割结果 图 16 所为多个死节实验样本的原图和灰度图。图 17 为对多个死节进行分割的过程, 算法核函数的方差设置为 $\sigma=5.5$ 。其中图 17A 迭代次数为 20 次, 分割时间为 3.198 0 s; 图 17B 迭代次数为 30 次, 分割时间为 5.070 0 s; 图 17C 迭代次数为 40 次, 分割时间为 13.816 9 s。图 18 为对多个死节分割过程产生的水平集演化图像, 其中: 图 18A 迭代次数为 20 次, 图 18B 迭代次数为 30

次, 图 18C 迭代次数为 40 次。



A原图

B灰度图



A迭代20次, 3.1980 s; B迭代30次, 5.0700 s; C迭代40次, 13.8169 s

图 16 多死节原图与灰度图

Figure 16 An original image and gray image of the encased knots

Figure 17 Segmentation process of the encased knots

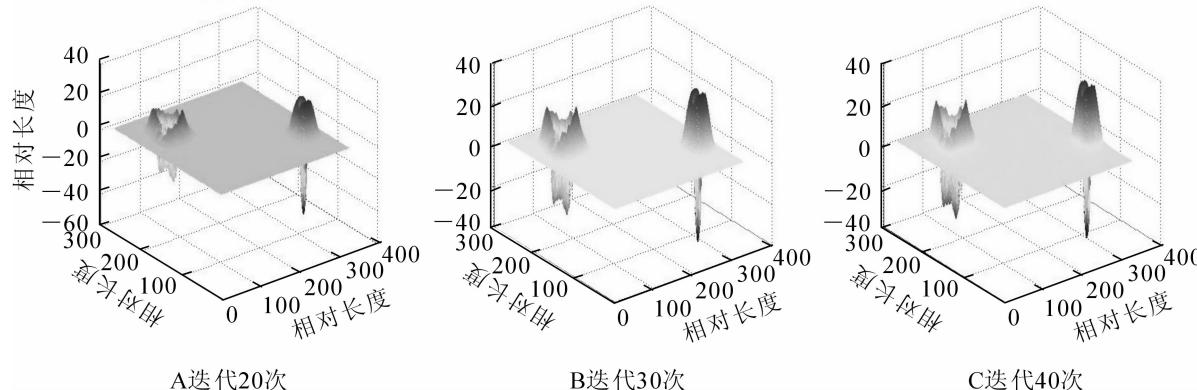


图 18 多死节分割过程水平集演化

Figure 18 Level set evolution of segmentation process of the encased knots

2.3 复杂背景下改进 LBF 模型的板材表面节子和虫眼的图像分割

为了验证改进 LBF 模型算法对板材表面缺陷分割的实用性以及检测 1.0 m 长板材内的节子和虫眼个数, 因而对复杂背景的 1.0 m 长整块板材的图像进行研究, 原图像如图 19 所示, 分割结果如图 20 所示, 分割结果对应的水平集演化如图 21 所示。观察最终分割结果图可知改进 LBF 模型算法能够将缺陷从整个复杂背景下有效地分割出来, 不受到形状、位置、面积大小等限制, 同时也不受到木材自身纹理的干扰, 分割轮廓线能够快速地收敛到缺陷边界, 整个分割过程曲线演化平滑, 分割结果比较理想。迭代次数分别为 300 次、470 次、400 次。运行时间分别为 57.5170 s, 63.5230 s, 56.7720 s。

2.4 实验分析

本研究实验结果表明: 改进的 LBF 模型能够分割出灰度不均一的图像, 同时能比较完整地提取出单一目标和多目标的板材表面缺陷图像。通过实验得出改进模型的分割结果并不完全依赖于演化曲线的大小与轮廓的初始位置, 而且避免了水平集函数在实验过程中出现震荡现象, 从而降低了数值计算的误差。基本克服了噪声对实验结果的影响, 得出与缺陷图像相对应的较稳定的水平集演化图像。该算法对比于其他分割方法, 分割的迭代次数较少, 分割的速度较快, 分割结果也更加完整。表 1 为板材表面缺陷系统分割结果。

3 结论

研究表明: 采用改进的 LBF 算法对 3 种板材表面缺陷的分割效果都很理想。通过对单一目标与多个目标分割时间的比较, 得出该算法对多个目标的分割速度更快。相对于活节与虫眼的分割, 该算法对

表 1 板材表面缺陷系统分割结果

Table 1 Segmentation results of wood surface defect system

实验对象	分割迭代次数/次	分割时间/s
单个活节缺陷图像	100	10.5925
单个虫眼缺陷图像	80	5.9124
单个死节缺陷图像	150	41.6523
多个活节缺陷图像	50	9.1105
多个虫眼缺陷图像	40	9.1105
多个死节缺陷图像	30	5.0700



A迭代300次, 51.517 0 s; B迭代470次, 63.523 0 s; C迭代400次, 56.772 0 s。

图19 复杂背景下整块板材表面原图像

Figure 19 Original images of wood surface under complex background



A迭代300次, 51.517 0 s; B迭代470次, 63.523 0 s; C迭代400次, 56.772 0 s。

图20 整块板材的分割结果

Figure 20 Segmentation results of block plate

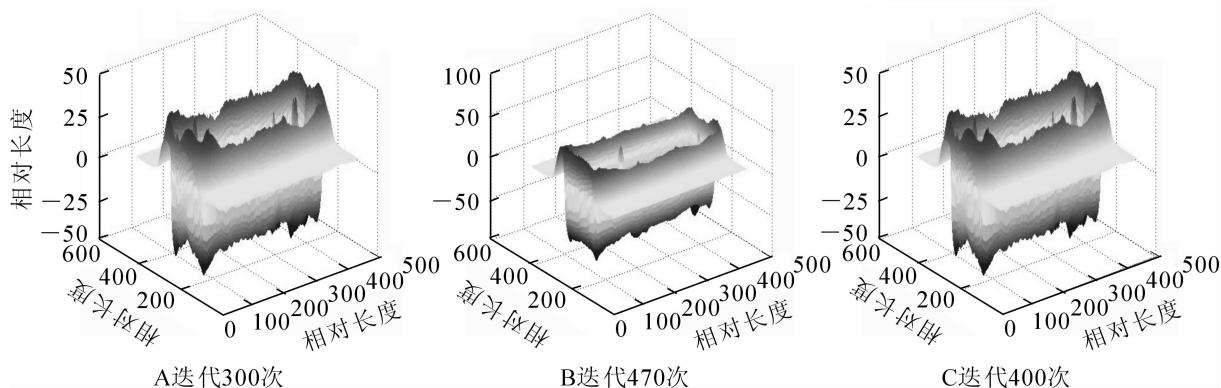


图21 分割结果对应的水平集演化

Figure 21 Level set evolution of segmentation results

死节的分割时间较长,但是分割时间控制在 50.000 0 s 内。通过实验得出本研究改进的 LBF 模型可以通过选择恰当的实验参数,对板材表面缺陷的图像进行有效分割,获得比较完整的闭合分割曲线轮廓。不仅可以进行单个目标的分割,还可以进行多个目标的分割,而且对初始轮廓的大小和位置不敏感,抗噪性较强,分割速度快,分割效果好。根据对复杂背景下的整块板材图像的分割,可以清楚地得出改进 LBF 模型算法能够将缺陷从整个复杂背景下有效地分割出来,而且不受形状、位置和面积大小的限制,并且能比较准确的检测出单位面积内板材表面节子和虫眼的个数。

4 参考文献

- [1] 王林. 基于 Gabor 变换的木材表面缺陷识别方法的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2010.
WANG Lin. Research on Recognition Method of Wood Surface Defects Based on Gabor Transformation [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2010.
- [2] WANG J, BIERNACKI J M, LAM F. Nondestructive evaluation of veneer quality using acoustic wave measurements [J]. *Wood Sci Technol*, 2001, 34(6): 505 × 516.
- [3] 张芹, 侯德文. 一种结合区域梯度的自适应 CV 模型[J]. 计算机应用与软件, 2014, 31(3): 214 – 216.
ZHANG Qin, HOU Dewen. An adaptive CV model combining regional gradient [J]. *Comput Appl Software*, 2014, 31

- (3): 214 – 216.
- [4] DU Xiaojun, BUI T D. A new model for image segmentation [J]. *IEEE Sign Proc Lett*, 2008, **15**: 182 – 185.
- [5] 何瑞英. 含边缘信息的 C-V 模型[J]. 计算机工程与应用, 2012, **48**(18): 181 – 186.
HE Ruiying. C-V model with edge information [J]. *Comput Eng Appl*, 2012, **48**(18): 181 – 186.
- [6] 张少华. 结合全局与局部信息的活动轮廓模型研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2011.
ZHANG Shaohua. *Study on Active Contours Integrating Global and Local Information* [D]. Chongqing: Chongqing University, 2011.
- [7] 原野, 何传江. LBF 活动轮廓模型的改进[J]. 计算机工程与应用, 2009, **45**(15): 177 – 179.
YUAN Ye, HE Chuanjiang. Improvement of LBF active contours model [J]. *Comput Eng Appl*, 2009, **45**(15): 177 – 179.
- [8] 潘改, 高立群, 赵爽. 基于局部熵的主动轮廓模型[J]. 中国图像图形学报, 2013, **18**(1): 78 – 85.
PAN Gai, GAO Liquan, ZHAO Shuang. Active contour model driven by local entropy energy [J]. *J Image Graph*, 2013, **18**(1): 78 – 85.
- [9] LI Chunming, KAO C Y, GORE J C, et al. Implicit active contours driven by local binary fitting energy [C]//*Proc. of IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition*. Minnesota:[s. n.]. 2007: 1 – 7.
- [10] 吴永飞, 何传江, 陈强. 基于 CV 和 LBF 模型结合的图像分割算法研究与实现[J]. 计算机应用与软件, 2013, **30**(7): 98 – 100.
WU Yongfei, HE Chuanjiang, CHEN Qiang. Research and implementation of image segmentation algorithm based on CV and LBF model [J]. *Comput Appl Software*, 2013, **30**(7): 98 – 100.
- [11] 张少华. 带线性正则化项的 RSF 模型[J]. 计算机工程与应用, 2011, **47**(24): 160 – 163.
ZHANG Shaohua. RSF model with linear regularization item [J]. *Comput Engi Appl*, 2011, **47**(24): 160 – 162.
- [12] 代双语, 王智峰, 张学东. 结合局部与全局信息的主动轮廓模型[J]. 辽宁科技大学学报, 2013, **36**(2): 145 – 150.
DAI Shuangyu, WANG Zhifeng, ZHANG Xuedong. Active contour model by combining with local and global information [J]. *J Univ Sci Technol Liaoning*, 2013, **36**(2): 145 – 150.
- [13] 王顺凤. 基于改进的 LBF 模型的图像分割[J]. 计算机应用与软件, 2011, **28**(2): 25 – 27.
WANG Shunfeng. Image segmentation based on improved LBF model [J]. *Comput Appl Software*, 2011, **28**(2): 25 – 27.
- [14] 刘学. 基于特征的彩色图像配准技术研究[D]. 长沙: 国防科学技术大学, 2010.
LIU Xue. *Study on Colored Image Registration Based on Feature* [D]. Changsha: National Defense Science and Technology University, 2010.
- [15] 徐海勇, 陈军刚. 一种新的基于局部区域的活动轮廓模型[J]. 湖南理工学院学报: 自然科学版, 2012, **25**(1): 42 – 45.
XU Haiyong, CHEN Jungang. An ovel local region-based active contours model [J]. *Hunan Inst Sci Technol Nat Sci*, 2012, **25**(1): 42 – 45.

新型硅基固载材料的制备及固定化酶性能

傅小萍, 姚珊珊, 王莹, 郭明

(浙江农林大学 理学院, 浙江 临安 311300)

摘要: 利用溶胶-凝胶原理, 以正硅酸乙酯(TEOS)为原料, 3-缩水甘油醚氧丙基三甲氧基硅烷(KH-560)为偶联剂, 在酸性条件下发生缩合反应制备新型基质材料, 通过红外光谱(FT-IR), 固体核磁共振波谱(CP/MAS ^{13}C NMR)和X射线衍射(XRD)对基质载体进行结构表征。通过交联-包埋固定化法制备新型纤维素固载酶, 分析研究了固载酶及游离酶酶解不同微观尺度纤维素基质的酶学性能。结果表明: 固载酶进行酶促反应的最优pH 4.0, 最优温度为60℃, 表明固载酶的热稳定性优于游离酶; 测得固载酶的米氏常数与游离酶无显著差异; 固定化纤维素酶的重复使用性和储存稳定性较游离酶均有较大改善。有关研究可为制备性能优良的固载酶提供一定借鉴。图9表2参20

关键词: 纤维素酶; 交联-包埋; 固定化; 催化性能

中图分类号: TQ352.2; S7-05 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2016)02-0315-07

Preparation and performance of novel immobilized cellulase

FU Xiaoping, YAO Shanshan, WANG Ying, GUO Ming

(School of Sciences, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: A novel carrier was synthesized by condensation reaction with an acid catalytic action using tetraethyl orthosilicate and KH-560 as the silica resource and coupling reagent, respectively. The composition and structure of the carrier were characterized by infrared absorption spectroscopy, ^{13}C nuclear magnetic resonance, and X-ray diffractometry. The novel immobilized cellulase was prepared by the crosslinking-embedding immobilized method. The enzymatic characteristics of the immobilized cellulase were tested and compared with that of free cellulase. Experimental results showed that the immobilized cellulase maintained higher activity in the broader ranges of pH and temperature. The Michaelis constant (K_m) of immobilized cellulase ($1.58 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) is similar as the free cellulase ($1.40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). Thus, immobilized cellulase could have a stronger affinity, reusability, and storage stability; and could provide a reference for preparing immobilized enzymes to perform better. [Ch, 9 fig. 2 tab. 20 ref.]

Key words: cellulase; crosslinking and embedding; immobilized; catalytic property

酶是一类具有高效催化能力的生物活性物质, 生命活动中许多复杂而有规律的物质和能量变化均离不开酶的催化作用。其中, 纤维素酶是一类能够将纤维素降解为葡萄糖的多组分酶系的总称, 现已确定的主要组分为内切型葡聚糖苷酶、外切型葡萄糖苷酶和纤维二糖酶, 它们协同作用, 最终水解产物为葡萄糖。纤维素酶主要来源于细菌和放线菌等微生物, 原生动物、软体动物, 昆虫和植物的一些组织也能产生纤维素酶^[1]。纤维素类物质是地球上产量巨大却又未得到充分利用的可再生资源。地球上植物光合作用可产生大于100亿 $\text{t} \cdot \text{a}^{-1}$ 的植物干物质, 其中一半以上是纤维素和半纤维素, 合理利用纤维素可为社会的可持续发展做出贡献^[2]。由于纤维素的充分利用与纤维素酶息息相关, 使纤维素酶在生活中的许多领域都有广泛的应用, 如织物整理^[3]、蔬菜汁加工^[4]、废纸脱墨^[5]等, 可创造巨大的经济效益和社会

收稿日期: 2014-04-20; 修回日期: 2015-06-29

基金项目: 浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划资助项目(2014R412026, 201111030107)

作者简介: 傅小萍, 从事生物质材料研究。E-mail: 1940468653@qq.com。通信作者: 郭明, 教授, 博士, 从事生物质材料研究。E-mail: guoming@zafu.edu.cn

效益,但游离纤维素酶不易与底物分离,存在重复利用性和储藏稳定性差等缺点,大大增加了生产成本,因此,采用新技术新方法对纤维素酶进行改性十分重要。其中人们为了提高纤维素酶的重复利用性和储藏稳定性,常常制成各种固定化纤维素酶。酶的固定化是用物理或化学方法处理水溶性酶,使之不溶于水或固定于固相载体的一种技术,极大地拓宽了酶的应用范围,成为当前研究的热点领域。固载材料的制备是获得性能优越的固载酶的一个关键步骤。为了克服酶对热、酸、碱等因素的不稳定性,提高酶的催化活性,人们对酶的固定化进行了广泛深入的研究,制备出许多新的固定化材料^[6-8]。相比较而言,无机载体比有机载体更耐生物降解,有更高的热稳定性且价格更低。本工作在前人研究的基础上,分析比较现有固载材料和方法^[9-10],通过正硅酸乙酯(TEOS)的酸性水解产物和偶联剂3-缩水甘油醚氧丙基三甲氧基硅烷(KH-560)的缩合反应合成新型基质载体,并用红外光谱分析固体核磁谱(¹³C NMR)分析和X-射线衍射分析对基质载体进行结构表征;通过交联-包埋方法^[11-12]制备新型纤维素固载酶,测定固载酶不同微观尺度纤维素基质的酶学性能。实验结果表明,所制备的纤维素固载酶除保持了酶的高效、专一、温和及活性可调控等催化特性外,热稳定性也有较大幅度提高,并且具有易分离回收、可重复使用、储存稳定性好等诸多优点,对实现纤维素酶的高效利用具有较好的借鉴意义。

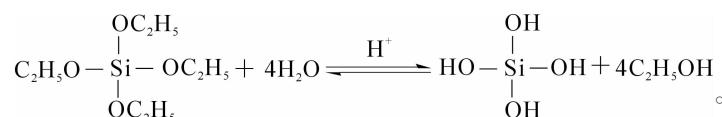
1 实验部分

1.1 试剂与仪器

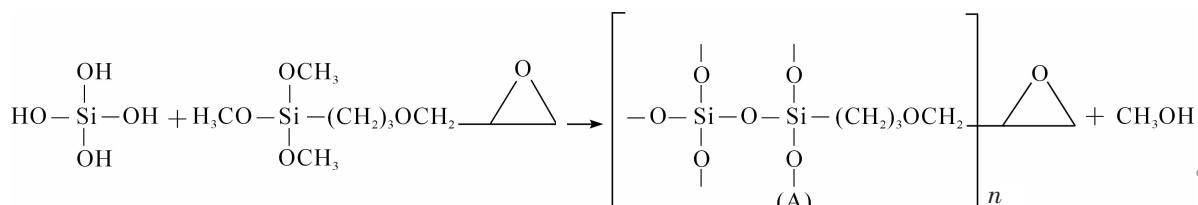
正硅酸乙酯(CP化学纯,≥28.0%,江苏强盛功能化学股份有限公司);乙醇(AR分析纯,≥99.7%,国药集团化学试剂有限公司);乙酸(AR分析纯,≥99.5%,永华化学科技有限公司);3-缩水甘油醚氧丙基三甲氧基硅烷(97.0%,上海晶纯生化科技股份有限公司);羧甲基纤维素钠(CP化学纯,国药集团化学试剂有限公司);纳米纤维素溶液(湿)质量分数为0.6%,实验室自制);纤维素酶(16.67×10^{-5} kat·g⁻¹,上海晶纯生化科技股份有限公司);3,5-二硝基水杨酸(CP化学纯,≥98.0%,国药集团化学试剂有限公司);氢氧化钠(AR分析纯,≥96.0%,西陇化工股份有限公司);酒石酸钾钠(AR分析纯,≥99.0%,天津市永大化学试剂有限公司);苯酚(AR分析纯,天津市永大化学试剂有限公司);无水硫酸钠(AR分析纯,99.0%,浙江三鹰化学试剂有限公司);实验用水为双蒸水。集热式恒温加热磁力搅拌器(DF-101S型,中国巩义市予华仪器有限责任公司);电热恒温鼓风干燥箱(DHG-9123A型,中国上海一恒科学仪器有限公司);循环水式多用真空泵(SHZ-C型,中国巩义市予华仪器有限责任公司);Zeta电位及粒度分析仪(90Plus Zeta型,美国Brookhaven公司);傅里叶变换红外光谱仪(IR Prestige-21型,日本Shimadzu公司);X-射线衍射仪(XRD-6000型,日本Shimadzu公司);核磁共振波谱仪(AVANCE II 400MHz型,瑞士Bruker公司);紫外可见分光光度计(T6系列型,中国北京普析通用仪器有限责任公司)。

1.2 硅基质载体材料的合成^[13-15]

25.0 mL正硅酸乙酯(TEOS)溶解在50.0 mL乙醇中,40℃恒温加热搅拌5 min,加入50.0 mL水继续搅拌10 min,加入乙酸调节酸碱度至pH 2~3,升温至80℃,搅拌1 h;加入5.0 mL偶联剂3-缩水甘油醚氧丙基三甲氧基硅烷(KH-560),搅拌4 h;烘箱100℃烘15 h至干燥;用水淋洗基质载体数次,再用乙醇淋洗数次,然后烘箱70℃烘4 h至完全干燥,得到白色固体颗粒,再用研钵研磨,得到白色粉末状环氧化二氧化硅基质载体。基质载体合成的方程式如下:



以乙醇为溶剂,在乙酸催化作用下,使正硅酸乙酯(TEOS)水解,得到水解产物。



以 KH-560 为偶联剂, 与前述步骤中得到的水解产物进行缩合反应, 制备含高活性基团的环氧化二氧化硅基质载体, 该基质载体为稳定固体状凝胶。

1.3 环氧化二氧化硅基质载体的结构表征

红外光谱(FT-IR)分析: 采用傅里叶变换红外光谱仪, 溴化钾(KBr)压片制样, 扫描波数范围为 4 000~500 cm^{-1} 。

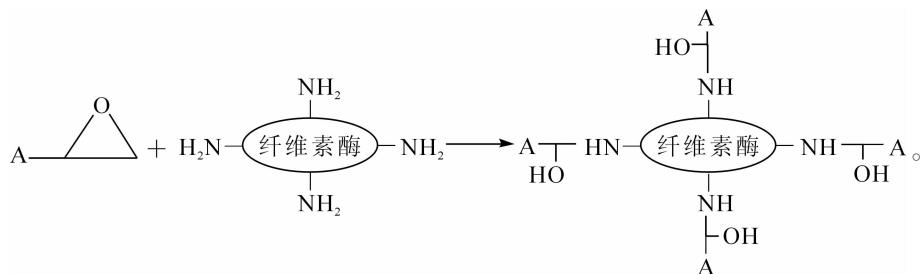
^{13}C NMR 固体核磁谱分析: 采用核磁共振波谱仪测定产物的固体核磁 CP/MAS ^{13}C NMR 谱, 观测频率 75.0 MHz, 魔角自旋速度 3.8 MHz, 分辨率 4.88 Hz; 内参考物: 氨基乙酸。

X-射线衍射分析: 采用 X-射线衍射仪分析样品结晶度。扫描方式: 定性, 步进扫描; 扫描速度: $10^\circ \cdot \text{min}^{-1}$; 扫描范围为 2θ : 10° ~ 50° ; 步长: 0.02° ; 电压/电流: 35 kV/30 mA; Cu^{2+} 靶。

1.4 纤维素固载酶的制备

准确称取 1.5 g 环氧化二氧化硅基质载体, 加入 25.0 mL pH 5.0 的 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 纤维素酶的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液, 室温下浸渍 2 h, 过滤, 获得固载酶, 用 pH 5.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液淋洗固载酶数次, 除去固载酶表面的游离酶。

固定化酶制备过程如下:



高温烘干凝胶并淋洗, 再次烘干研磨后为白色粉末状。取基质载体与纤维素酶溶液反应, 环氧化二氧化硅基质载体上的环氧基与纤维素酶上的氨基发生共价键联, 实现纤维素酶的固定。

1.5 纳米纤维溶液制备

根据文献[16], 按照 $m(\text{纳米纤维}) : m(\text{溶剂}) = 1:50$, 将纳米纤维溶解在 $9.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硫氰酸锂(LiSCN)溶液中, 搅拌溶解过滤, 去离子水透析 3 d 后, 再将所得溶液配制成质量分数为 0.6% 的纳米纤维溶液。

1.6 纳米纤维溶液表征

Zeta 电位和粒度分析, Zeta 电位是表征颗粒分散系稳定性的重要指标^[17], 因此, 纳米纤维溶液的 Zeta 电位也是表征纳米纤维能否在溶液中稳定存在及粒径大小的重要指标。将所得质量分数为 0.6% 纳米纤维溶液配成 $0.06 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 水溶液, 采用 90 Plus Zeta 型 Zeta 电位及粒度分析仪测试样品的粒径及 Zeta 电位。

1.7 酶学性能测定

1.7.1 pH 值和温度对纤维素酶活性的影响 取 0.5 g 固载酶和游离酶在 40 °C, pH 3.0~8.0 条件下, 分别与 2.0 mL $6.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的羧甲基纤维素钠(CMC)溶液和纳米纤维素(NCC)溶液进行酶促反应, 反应 20 min, 采用滤纸酶活(FPA)测定酶活^[18], 考察 pH 值对酶活性的影响。将固载酶和游离酶在 40~80 °C 温度范围内和 pH 5.0 条件下, 分别与 2.0 mL $6.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ CMC 溶液和 NCC 溶液进行酶促反应, 反应 20 min, 测定酶活, 考察温度对酶活性的影响。

1.7.2 纤维素酶的重复利用性和储藏稳定性的测定 将纤维素固载酶和纤维素游离酶分别与 2.0 mL $6.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ CMC 溶液和 NCC 溶液在 40 °C, pH 5.0 的条件下, 反应 20 min, 重复反应 6 次, 测定酶活, 考察酶的重复利用性。将纤维素固载酶和纤维素游离酶储存在 4 °C 冰箱内, 隔 7 d 取定量 0.5 g 的固定化酶和游离酶在 40 °C, pH 5.0 条件下, 分别与 2.0 mL $6.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 羧甲基纤维素钠(CMC)溶液和纳米纤维素(NCC)进行酶促反应, 测定酶活, 考察酶的储藏稳定性。

1.7.3 纤维素酶的米氏常数的测定 将固载酶与纤维素游离酶分别与 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CMC 溶液和 NCC 溶液进行反应, 20 min 后, 分别在之后的第 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20 min 条件下测定酶活, 以反应速率的倒数对底物浓度的倒数作图, 经线性拟合得出米氏方程和米氏常数 K_m 值^[19]。

2 实验结果与讨论

2.1 新型固载材料的表征

基质载体的红外光谱(FT-IR)分析结果如图1所示。由图1可见：中间产物二氧化硅和基质载体在3 650 cm⁻¹处都有一OH的特征吸收峰；在1 110和1 100 cm⁻¹处出现的特征吸收峰较宽，是由Si—O和C—O键特征吸收峰的重叠造成的；在798和800 cm⁻¹处为环氧基的特征吸收峰；在2 940 cm⁻¹处，中间产物无—CH₂—的特征吸收峰，基质载体有该特征吸收峰，说明中间产物二氧化硅和偶联剂KH-560实现了共价键联，从对IR的分析，可以初步判断基质载体合成成功。

基质载体的¹³C NMR固体核磁谱分析结果如图2所示。由图2可知：在0~50 mg·L⁻¹间存在强度约为1:2:1的¹³C信号峰，说明合成的基质载体含有R—CH₂—R结构，在50~80 mg·L⁻¹存在¹³C信号峰，说明了基质载体中C—O的存在，与目标基质载体环氧化二氧化硅结构相符，说明基质载体合成成功。

基质载体的X-射线衍射(XRD)分析结果如图3所示。

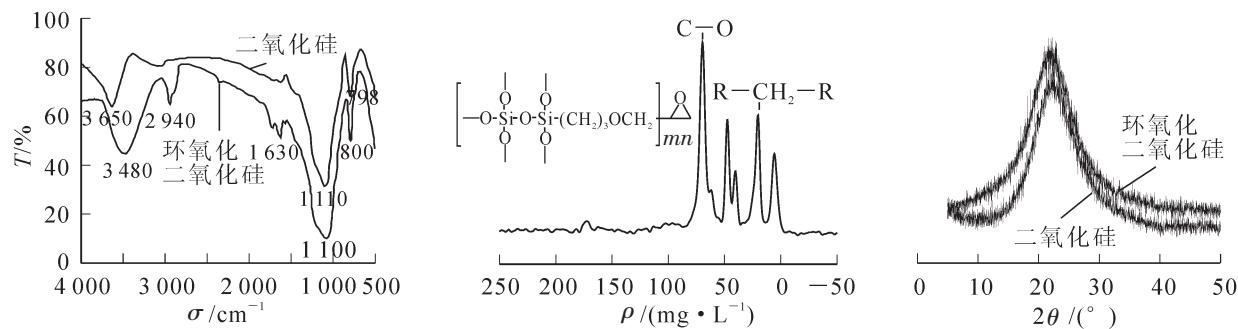


图1 中间产物二氧化硅和基质载体的IR谱

Figure 1 IR spectra of the intermediate and the carrier

图2 基质载体的CP/MAS ¹³C-NMR谱

Figure 2 CP / MAS ¹³C-NMR spectroscopy of intermediates and the carrier

图3 中间产物及基质载体的X-射线衍射图谱

Figure 3 X-ray diffraction spectra of intermediates and the carrier

由图3数据，结晶度按式(1)计算，数据列于表1。

$$X_c = S_c / (k \times S_c + S_a) \quad (1)$$

式(1)中：X_c为结晶度，S_c为X-射线衍射图谱中结晶区部分面积，k为校正因子，S_a为X-射线衍射图谱中非结晶区部分面积。

由图3可知：缩合反应前后峰的形状没有发生太大变化，中间产物的结晶度为46.30%，基质载体的结晶度43.54%，仅略有减小，说明偶联剂KH-560的加入对中间产物二氧化硅试样的结构并无太大影响。综合分析表明，成功合成获得了新型硅基载体材料。

2.2 固载酶及游离酶酶解不同微观尺度下的纤维素基质性能

2.2.1 自制纳米纤维粒径的测定 自制纳米纤维素粒子数量与粒径的分布关系如图4所示。由图4可知：纳米纤维素的粒径分布在105 nm取得最大值，纳米纤维素的平均粒径接近纳米尺寸，粒径较小。

2.2.2 Zeta电位的测定 一般文献认为^[20]，对于非纳米粒子，Zeta电位绝对值在30 mV以上的稳定性较好，但是由于纳米粒子的粒径较小，单个粒子表面提供电荷的官能团的数量较少，可能会引起所测得的Zeta电位绝对值偏低。本工作由Zeta电位仪测得所制备的纳米纤维素的Zeta电位为-29.72 mV，可认为稳定性较好。

2.2.3 固定化酶最适pH值的范围 将纤维素固载酶和游离酶在pH 3.0~8.0的范围内与分别与CMC溶液和NCC溶液反应，测定固载酶和游离酶的活性，结果见图5。由图5可知：无论底物是CMC溶液，还是NCC溶液，固载酶的最适pH值都为pH 4.0，游离酶的最适pH值都为pH 5.0。CMC与2种形态酶的反应程度都较NCC高，可能原因为自制纳米纤维溶液溶质粒径虽达到纳米级要求，但是颗粒大小

表1 基质载体的结晶度

样品	K值	扫描范围/(°)	结晶度/%
二氧化硅	0.10	10~50	46.30
环氧化二氧化硅	0.10	10~50	43.54

不均匀,因此,底物为CMC时的酶促反应效果较底物为NCC时好。

2.2.4 固定化酶最适温度的范围 将纤维素固载酶和游离酶在40~80℃的范围内和pH 5.0的条件下,分别与CMC溶液和NCC溶液反应,测定固载酶和游离酶的活性,结果如图6所示。由图6可知:无论底物是CMC溶液,还是NCC溶液,固载酶的最适温度都为60℃,游离酶的最适温度都为50℃,说明固载酶较游离酶有更好的热稳定性。这是因为纤维素固载酶的接枝长链对纤维素酶具有一定的包埋作用,使固载酶的刚性增加,必须升高温度增加柔性,才能和底物分子结合。

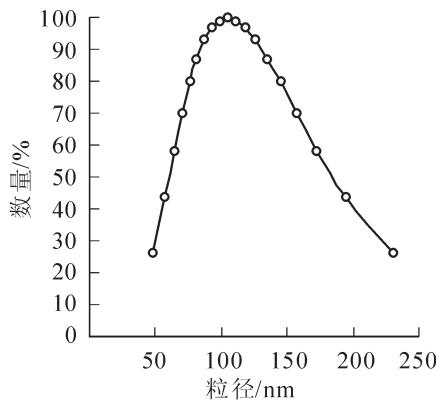


图4 数量-粒径分布关系图

Figure 4 Graph of relationship between number and the particle size distribution

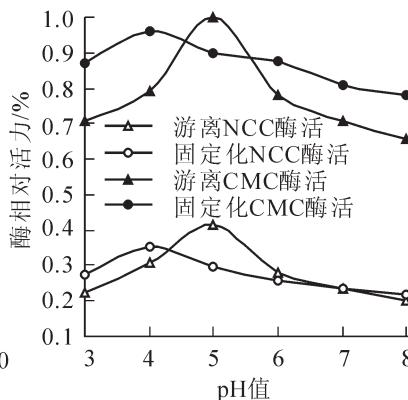


图5 pH对酶活性的影响

Figure 5 Effect of pH value on the enzymatic activity

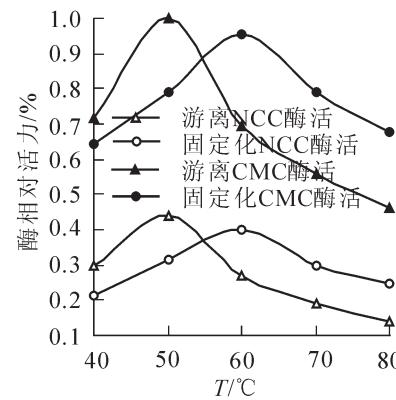


图6 温度对酶活性的影响

Figure 6 Effect of temperature on the enzymatic activity

2.2.5 固定化酶的重复使用性 将固载酶和游离酶在pH 5.0和40℃条件下与CMC溶液与NCC溶液反应,测定固载酶和游离酶的活性。重新装入底物溶液,再次反应后测定酶活性,如此反复操作6次,结果见图7。由图7可知:经过6次反应后,固载酶对于底物CMC溶液的酶活性高于NCC溶液,表明固载酶对于CMC溶液有更好的重复利用性。酶活性逐步下降的可能原因为底物逐步进入基质载体的孔道,与固载酶发生作用或部分以游离形态被束缚在基质载体中的酶随反应进行逐步与基质载体脱离从而与底物发生作用,使得酶不断被消耗数量减少,表现为活性降低。

2.2.6 纤维素酶的储藏稳定性 将固载酶和游离酶储存于4℃的冰箱内,隔7 d,测定1次酶活,连测28 d,结果见图8。由图8可知:28 d后,无论底物是CMC溶液,还是NCC溶液,固载酶的酶活性都高于游离酶,说明固载酶较游离酶有更好的储藏稳定性。这是因为酶与基质载体结合生成固载酶以后结构更加稳定,抵抗外界环境对酶活的影响。

2.2.7 纤维素酶米氏常数的测定 在温度、pH值及酶浓度恒定的条件下,底物浓度对酶促反应速度有很大的影响。底物浓度很低时,酶促反应的速度随底物浓度的增加迅速增加,随反应底物浓度继续增加,反应速度的增加开始减慢,当底物浓度增加到一定值时,反应速度达到最大极限。底物浓度[S]与酶反应速率v间的定量关系由米氏方程给出:

$$v = \frac{V \times [S]}{K_m + [S]} \quad (2)$$

式(2)中:v为反应初速率,V为最大反应速率,[S]为底物浓度,K_m为米氏常数,K_m值等于酶促反应速度达到最大反应速度一半时所对应的底物浓度。K_m是酶的特性常数之一,它包含着酶与底物结合和解离的性质,不同的酶K_m值不同,同一种酶与不同底物反应K_m值也不同。K_m值可近似地反映酶与底物的亲和力大小:K_m值大,表明亲和力小;K_m值小,表明亲和力大。米氏方程两边同时取倒数,得到:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V} \quad (3)$$

用酶反应速率的倒数对底物浓度的倒数作图,经线性拟合,结果列于图9和表2。结果表明:固载酶与CMC溶液和NCC溶液作用的米氏常数分别为1.58 g·L⁻¹和2.36 g·L⁻¹;游离酶与CMC溶液和NCC溶液作用的米氏常数分别为1.40 g·L⁻¹和2.12 g·L⁻¹,表明固载酶与底物的亲和力较游离酶有所减小,可能原

因为固载酶由于基质载体的阻碍作用,减少了酶与底物的接触面积,使得相较游离酶亲和力有所减小。2种形态的纤维素酶对CMC的亲和力比对NCC的亲和力强,可能原因为自制纳米纤维溶液溶质粒径虽达到纳米级要求,但由于NCC颗粒大小的不均匀性,使得较底物为CMC时酶促效果稍差,表现为亲和力有所减小。

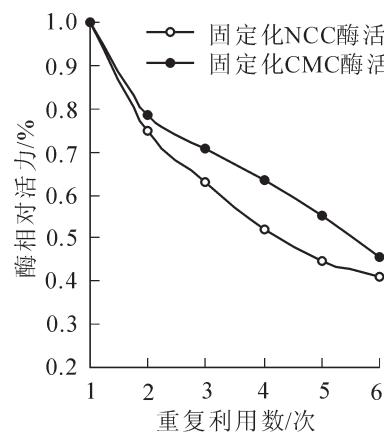


图7 酶的重复利用性

Figure 7 Reusability of cellulase

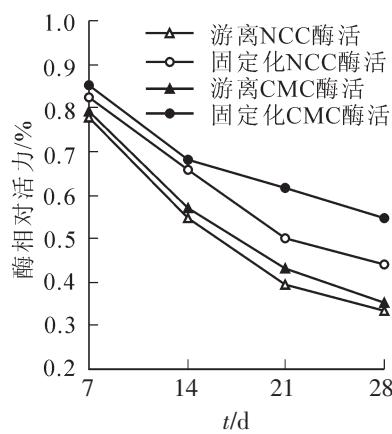


图8 酶的储藏稳定性

Figure 8 Storage stability of cellulase

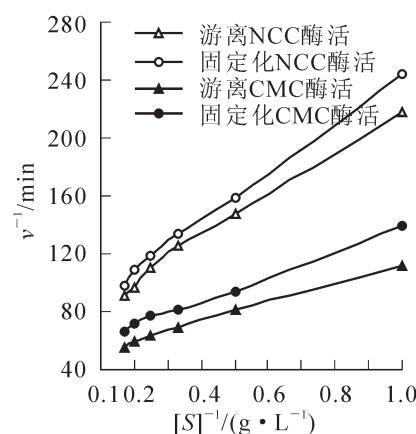


图9 Lieweaver-Burk曲线

Figure 9 Lieweaver-Burk curves

3 结论

自制纤维素溶液的粒径分布在105 nm左右,接近纳米纤维素级别;Zeta电位为-29.72 mV,说明纳米纤维素溶液稳定性较好。将所制备的纤维素固载酶的酶学性能与纤维素游离酶相比较的结果表明:无论底物是羧甲基纤维素钠,还是纳米纤维素,此固载酶进行酶促反应的最优pH值都为pH 4.0左右,最优温度都为60 °C,比游离酶提高10 °C,表明固载酶的热稳定性优于游离酶。此外,固载酶的重复利用性和储藏稳定性与游离酶相比都有较大的提高。测得固载酶的米氏常数比游离酶稍大,表明其与底物的亲和力与游离酶相比有所减小。

4 参考文献

- [1] DONG Zeyuan, ZHU Junyan, LUO Quan, et al. Understanding enzyme catalysis by means of supramolecular artificial enzymes [J]. *Sci China Chem*, 2013, **56**(8): 1067 – 1074.
- [2] CARPITA N C. Update on mechanisms of plant cell wall biosynthesis: how plants make cellulose and other (1,4)- β -D-glycans [J]. *Plant Physiol*, 2011, **155**(1): 171 – 184.
- [3] 周秀梅, 夏黎明. 纤维素酶在织物整理中的应用[J]. 纺织学报, 2004, **25**(3): 114 – 115.
ZHOU Xiumei, XIA Liming. The application of cellulase in bio-finishing of cellulosic fabrics [J]. *J Text Res*, 2004, **25**(3): 114 – 115.
- [4] 任大明, 陈祖洁. 纤维素酶在蔬菜汁加工中的应用研究[J]. 沈阳农业大学学报, 1994, **25**(1): 79 – 82.
REN Daming, CHEN Zujie. The application of cellulase in vegetable juice processing [J]. *J Shenyang Agric Univ*, 1994, **25**(1): 79 – 82.
- [5] 汪顺才, 肖宝清, 张强. 纤维素酶在废纸脱墨中的应用[J]. 中国矿山工程, 2005, **34**(2): 38 – 41.
WANG Shuncai, XIAO Baoqing, ZHANG Qiang. Application of cellulase in waste paper deinking [J]. *China Mine Eng*, 2005, **34**(2): 38 – 41.
- [6] 李存存, 张光亚. 酶定向固定化方法及应用的研究进展[J]. 化工进展, 2013, **32**(10): 2467 – 2474.
LI Cuncun, ZHANG Guangya. Research progress of site-specific immobilization of enzymes and application [J]. *Chem Ind Eng Progr*, 2013, **32**(10): 2467 – 2474.

表2 游离酶与固定化酶的米氏常数

Table 2 K_m value of free and immobilized cellulose

酶(底物)	方程	R^2	$K_m/(g \cdot L^{-1})$
固定化纤维素酶(NCC)	$y=171.92x+72.959$	0.994 9	2.36
游离纤维素酶(NCC)	$y=149.05x+70.360$	0.993 1	2.12
固定化纤维素酶(CMC)	$y=84.726x+53.662$	0.997 1	1.58
游离纤维素酶(CMC)	$y=65.577x+46.693$	0.993 6	1.40

- [7] 闵丹丹, 何文, 杜晓永, 等. 酶固定化无机载体材料的研究进展[J]. 山东陶瓷, 2011, **34**(5): 11–16.
MIN Dandan, HE Wen, DU Xiaoyong, et al. Research progress of inorganic materials used as enzyme immobilization carrier [J]. *Shandong Ceram.*, 2011, **34**(5): 11–16.
- [8] 张蕾蕾, 王固宁, 朱遂一, 等. 酶固化技术最新研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2011, **11**(22): 4386–4397.
ZHANG Leilei, WANG Guning, ZHU Suiyi, et al. Recent advancement of enzyme immobilized technology [J]. *Progr Mod Biomed*, 2011, **11**(22): 4386–4397.
- [9] 崔少伟, 唐正华, 葛建芳. 正硅酸乙酯溶胶-凝胶制备壳聚糖-SiO₂杂化材料[J]. 中北大学学报, 2012, **33**(3): 313–319.
CUI Shaowei, TANG Zhenghua, GE Jianfang. Preparation of chitosan-SiO₂ hybrid composite material via tetraethyl loxy silane sol-gel process [J]. *J North Univ China*, 2012, **33**(3): 313–319.
- [10] 廖明霞, 李晔, 杨惠, 等. 包埋生物分子的SiO₂载体材料的研究进展[J]. 有机硅材料, 2009, **23**(4): 265–268.
LIAO Mingxia, LI Ye, YANG Hui, et al. Research on SiO₂ carrier for entrapment of biomolecules [J]. *Silicone Mat*, 2009, **23**(4): 265–268.
- [11] 厉瑾, 宋锡瑾, 徐佳音, 等. 蛋白质的单分子包埋[J]. 化学通报, 2011, **74**(1): 10–15.
LI Jin, SONG Xijin, XU Jiayin, et al. The encapsulation of single protein [J]. *Chem Rep*, 2011, **74**(1): 10–15.
- [12] 孙玉英, 张继泉. 吸附交联法和包埋法固定化混合酶研究[J]. 淮海工学院学报: 自然科学版, 2013, **22**(3): 82–88.
SUN Yuying, ZHANG Jiquan. Comparative study of crude enzyme immobilization by cross-linking and entrapment methods [J]. *J Huaihai Inst Technol Nat Sci Ed*, 2013, **22**(3): 82–88.
- [13] 陈奎, 李伯耿, 曾光明. 有机硅氧烷水解、缩聚的影响因素研究[J]. 化工新型材料, 2010, **38**(1): 110–111.
CHEN Kui, LI Bogeng, ZENG Guangming. Influence factors of hydrolysis and condensation of organic silicon oxygen alkyl [J]. *New Chem Mat*, 2010, **38**(1): 110–111.
- [14] 李峰, 李红强, 赖学军, 等. γ -巯丙基三甲氧基硅烷对纳米二氧化硅表面接枝改性的研究[J]. 无机盐工业, 2014, **46**(4): 33–36.
LI Feng, LI Hongqiang, LAI Xuejun, et al. Surface grafting modification of nano-sized silica with 3-mercaptopropyl trimethoxysilane [J]. *Inorganic Chem Ind*, 2014, **46**(4): 33–36.
- [15] 雷鸣, 王艳, 赵昊, 等. C型硅胶与偶联剂KH-560键合反应初探[J]. 化工进展, 2012, **31**(6): 1263–1273.
LEI Ming, WANG Yan, ZHAO Hao. Study on the reaction of type C silica gel and KH-560 coupling agent [J]. *Chem Ind Eng Progr*, 2012, **31**(6): 1263–1273.
- [16] 王晓磊, 戴卫国, 何建新, 等. 桑蚕丝素水溶液静电纺纳米纤维的制备[J]. 材料科学与工程学报, 2012, **30**(2): 287–290.
WANG Xiaolei, DAI Weiguo, HE Jianxin, et al. Electrospun nanofibers from TSF aqueous solution [J]. *J Mat Sci & Eng*, 2012, **30**(2): 287–290.
- [17] MURDOCH C, REEVES K J, HEARNDEN V, et al. Internalization and biodistribution of polymersomes into oral squamous cell carcinoma cells in vitro and in vivo [J]. *Nanomedicine*, 2010, **5**(7): 1025–1036.
- [18] 张瑞萍. 纤维素酶活力测定方法[J]. 印染, 2002, **28**(8): 38–40.
ZHANG Ruiping. Activity determination of cellulose [J]. *Dye Finish*, 2002, **28**(8): 38–40.
- [19] GUAN Zhengjun, LUO Qian, CHEN Xi, et al. Saline soil enzyme activities of four plant communities in Sangong River basin of Xinjiang, China [J]. *J Arid Land*, 2014, **6**(2): 164–173.
- [20] ROBINSON K L, de PAZ-BÁÑEZ M V, WANG X S, et al. Synthesis of well-defined, semibranched, hydrophilic-hydrophobic block copolymers using atom transfer radical polymerization [J]. *Macromolecules*, 2001, **34**(17): 5799–5805.

基于近红外光谱与随机青蛙算法的褐变板栗识别

郑 剑^{1,2}, 周 竹^{3,4,5}, 仲山民^{1,2}, 曾松伟^{3,4,5}

(1. 浙江农林大学 农业与食品科学学院, 浙江 临安 311300; 2. 浙江农林大学 浙江省农产品品质改良技术研究重点实验室, 浙江 临安 311300; 3. 浙江农林大学 信息工程学院, 浙江 临安 311300; 4. 浙江农林大学 浙江省林业智能监测与信息技术研究重点实验室, 浙江 临安 311300; 5. 浙江农林大学 智慧农林业研究中心, 浙江 临安 311300)

摘要: 为了实现板栗 *Castanea mollissima* 的快速自动分选, 研究了基于近红外光谱技术的褐变板栗无损检测方法。首先采用 Antaris II 傅里叶变换近红外光谱仪获取 70 个正常板栗和 110 个褐变板栗的近红外光谱(1 000.00~2 500.00 nm), 比较了不同光谱预处理方法对褐变板栗识别的影响, 随后采用一种新的变量选择方法即随机青蛙算法(Random Frog)提取与板栗褐变相关的特征波长变量, 最后基于特征波长建立和比较了褐变板栗识别的偏最小二乘-线性判别分析模型(PLS-LDA)和最小二乘-支持向量机(LS-SVM)模型。结果显示: 经标准正态变量变换(SNV)预处理和随机青蛙算法优选的 23 个特征波长所建 LS-SVM 模型的性能最优, 该模型对测试集的敏感性、特异性和识别正确率分别为 0.92, 1.00 和 95.00%。随机青蛙算法可以有效筛选重要的特征变量, 不仅能简化模型, 而且可以提高识别准确率和识别速度。图 4 表 3 参 22

关键词: 经济林学; 近红外光谱; 褐变; 随机青蛙算法; 最小二乘-支持向量机; 偏最小二乘-线性判别分析; 板栗
中图分类号: S123; S664.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2016)02-0322-08

Chestnut browning detected with near-infrared spectroscopy and a random-frog algorithm

ZHENG Jian^{1,2}, ZHOU Zhu^{3,4,5}, ZHONG Shanmin^{1,2}, ZENG Songwei^{3,4,5}

(1. School of Agriculture and Food Science, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 2. The Key Laboratory for Quality Improvement of Agricultural Products of Zhejiang Province, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 3. School of Information Engineering, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 4. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Forestry Intelligent Monitoring and Information Technology, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 5. Research Center for Smart Agriculture and Forestry, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: To develop a calibration model for rapid, accurate and nondestructive detection of chestnut browning with peeled chestnut *Castanea mollissima* by using near infrared spectroscopy technology. Seventy normal chestnuts and 110 browning chestnuts were prepared, and their diffuse reflectance spectrums were collected in the wavelength range from 1 000.00 to 2 500.00 nm. Spectral pretreatment methods, including standard normal variate (SNV), multiplication scattering correction (MSC), first derivative (FD), second derivative (SD), and detrend, were used and compared first. Then random-frog algorithm was applied to select effective wavelengths (EWs) from the SNV pretreated spectrum. Afterward, a partial least squares-linear discriminant analysis (PLS-LDA) and a least squares-support vector machine (LS-SVM) model were established to classify the browning

收稿日期: 2015-04-16; 修回日期: 2015-09-07

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(Y3110450, LQ13F050006); 浙江农林大学科研发展基金资助项目(2008FR053, 2012FR085); 浙江省木本粮油产业科技创新团队项目(2011R50030-2)

作者简介: 郑剑, 讲师, 博士研究生, 从事农产品储藏加工与品质检测研究。E-mail: zhengjian622@126.com。

通信作者: 周竹, 讲师, 博士, 从事智能化检测与控制技术研究。E-mail: zhouchu@zafu.edu.cn

chestnuts based on EWs, and the results were compared based on sensitivity, specificity and accuracy. For the validation set, the sensitivity, specificity and accuracy obtained by EWs-LS-SVM were 0.92, 1.00 and 95.00%, respectively. The results were better than those of full-PLS-LDA model, full-LS-SVM model and EWs-PLS-LDA model. Also, the random-frog algorithm effectively selected important wavelengths and simplified the discrimination model improving precision and recognition speed. The overall results demonstrate that random-frog algorithm is a powerful tool to select the efficient variables, and EWs-LS-SVM is excellent for the spectral calibration. [Ch, 4 fig. 3 tab. 22 ref.]

Key words: cash forestry; NIR spectroscopy; browning; random-frog algorithm; least squares-support vector machines; partial least squares-linear discriminant analysis; chestnut

板栗 *Castanea mollissima* 味道香甜, 营养丰富, 是良好的营养保健品。然而, 板栗在储藏和加工过程中常常会发生果肉褐变, 严重影响产品的品质、风味和营养成分, 降低了产品的经济价值。因此, 快速准确检测褐变板栗对于板栗的储藏与深加工具有重要的意义。近红外光谱技术(NIRS)可利用近红外光谱区域(780~2 500 nm)的全谱或部分波段光谱对被测物进行定量或定性分析。因其快速、无损等优点, 在肉类^[1-2]、果蔬^[3-6]等农产品品质检测中得到了广泛的研究。在板栗品质检测方面, 周竹等^[7-9]、Moscetti 等^[10-11]研究了带壳霉变、虫害板栗的近红外光谱定性检测方法; 刘洁等^[12-13]、傅谊等^[14]建立了板栗中水分、蛋白质等含量的近红外光谱模型。以上研究为板栗褐变的近红外光谱检测奠定了基础。然而, 近红外光谱通常包含 1 000.00~2 000.00 nm 多个波长点的光谱数据, 利用全波段数据建模分析时, 光谱中的大量冗余信息会使建模计算工作量大, 时间花费长。此外, 由于变量间的强相关性, 并非所有波长都能提供有用信息。周竹等^[7-8]前期采用傅里叶变换、主成分分析等方法提取少数特征量建立了霉变板栗识别模型, 但傅里叶系数、主成分得分均难以直观表征正常、褐变板栗光谱。已有的研究表明: 对波长变量进行优选, 一方面可以剔除不相关变量, 在简化模型的同时, 还可提高模型的预测精度以及稳健性^[15]; 另一方面可以根据获取的特征波长设计便携式在线检测仪器, 从而有效降低成本。本研究提出采用近红外光谱技术检测褐变板栗, 拟采用一种最新的变量提取算法——随机青蛙算法(Random-Frog, RF)寻找区分褐变板栗与正常板栗的有效光谱波长, 并采用线性建模方法偏最小二乘-线性判别分析(partial least squares-linear discriminant analysis, PLS-LDA)和非线性判别方法最小二乘-支持向量机(least squares-support vector machine, LS-SVM)建立褐变板栗识别模型, 且与全波段所建模型进行比较, 以期确定最优的板栗褐变检测方法与模型, 为褐变板栗的快速准确识别提供方法与技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试板栗品种为浙江省主栽品种毛板红, 产自浙江省丽水市, 购于农贸批发市场。剔除虫害板栗, 选取大小均匀的板栗仁, 将其标号放置在 4~6 °C 冷库中 2 个月, 随后取出在室温下放置 10 d, 至部分板栗仁内部出现不同程度的褐变, 选取供实验板栗仁 180 个。

1.2 试验仪器

采用 Antaris II 傅里叶变换近红外光谱仪(Thermo Scientific Co., 美国)对板栗果仁进行光谱采集。该仪器使用 InGaAs 检测器, 内置参比背景, 光源为 25 W 卤素灯(仪器标配)。通过漫反射式积分球附件进行光谱采集。光谱扫描范围设置为 1 000.00~2 500.00 nm, 扫描次数为 32 次, 分辨率为 8.0 cm⁻¹。选择栗仁平整的面作为光谱采集面^[8,11], 平面中心以及 4 个方位上等距的区域作为光谱采样点。采集 5 个·样本⁻¹ 标记部位的光谱, 并将其平均光谱作为该样品的原始光谱。

1.3 栗仁褐变评价

光谱采集完成后, 在平行采集面 8.0 mm 的位置切开板栗, 以判断是否褐变及褐变程度。将板栗剖面置于 A4 打印纸上, 采用 Canon 5D3 数码相机(分辨率 5 184 × 3 456)对被切剖面拍照, 拍照时使剖面正对镜头。图片通过 ENVI 4.7(Research System Inc., 美国)选择感兴趣区域进行处理, 计算褐变面积比(褐变面积占整个剖面面积的比例)。

1.4 特征波段选择方法

采用随机青蛙算法(random-frog)进行特征波长选择。随机青蛙算法是一种最新的变量选择方法,由LI等^[16]提出并用于疾病的基因表达数据分析。该方法是一种类似于可逆跳转马尔科夫链蒙特卡洛(reversible jump Markov chain Monte Carlo, RJMCMC)的算法,通过在模型空间中模拟一条服从稳态分布的马尔科夫链,来计算每个变量的被选概率,从而用于评价变量的重要性^[16]。本研究中,将随机青蛙算法与PLS-LDA算法相结合,探寻褐变板栗识别的特征波段,其具体步骤为^[17]: 1) 初始化参数: n 为迭代次数,设为 10 000; q 为初始变量集 v_0 的变量个数,为 1~1 557 任意数,默认值为 2; θ 为正态分布方差控制因子,默认值为 0.3; ω 为比例因子,用于控制候选变量个数,默认值为 3; η 是否接受建模结果差于 v_0 的新变量集 V^* 的概率上界,默认值为 0.1。2) 随机选择包含 q 个变量的初始变量集合为 v_0 ,并定义包含所有 1 557 个变量的集合为 v 。3) 从均值为 q ,标准偏差为 θ_q 的正态分布中产生随机数并就近圆整为 q^* ,分情况构造一个含有 q^* 个变量的候选变量子集 v^* : ①若 $q^*=q$,则 $v^*=v$; ②若 $q^*<q$,先用变量集 v_0 建立 PLS-LDA 模型,得到各变量回归系数,然后将回归系数绝对值最小的 $q-q^*$ 个变量从 v_0 中去掉,则剩余的 q^* 个变量构成 v^* ; ③若 $q^*>q$,先从 $v-v_0$ 中随机选择 $\omega(q^*-q)$ 个变量,构成新变量集 t ,然后将 t 与 v_0 组合建立 PLS-LDA 模型,得到每个变量的回归系数,随后将回归系数绝对值最大的 q^* 个变量挑选出来构成 v^* 。4) v^* 确定后,要决定是否接受 v^* 。分别计算用 v_0 和 v^* 建立 PLS-LDA 模型的预测误差,记为 e_0 和 e^* 。若 $e^*\leq e_0$,接受 v^* 并令 $v_1=v^*$; 否则,以 $\eta E_{v_0} / E_{v^*}$ 的概率接受 v^* 且令 $v_1=v^*$ 。用 v_1 代替 v_0 ,返回 2) 进行下一次迭代,直到完成 n 次迭代。5) n 次迭代后,得到 n 个变量子集。变量 i 的被选频次记为 n_i ,依公式计算该变量的选择概率 P_i :

$$P_i = n_i / n。 \quad (1)$$

式(1)中: $i=1, 2, \dots, 1 557$ 。变量对模型越重要,其被选概率越大,因此,可将所有变量的被选概率排序,选出概率较大的一些变量作为特征波长。

1.5 建模方法

采用 PLS-LDA 和 LSSVM 建立栗仁褐变识别模型。PLS-LDA 是偏最小二乘法与线性判别分析方法的有效结合,该方法先利用 PLS 算法对光谱矩阵和类别属性进行分解,得到光谱矩阵的得分向量,然后将得分向量与类别属性做线性判别分析,建立判别模型^[18]。如利用 n 个 PLS 得分向量建立 PLS-LDA 模型,则其判别方程为:

$$\alpha_1 s_1 + \alpha_2 s_2 + \alpha_3 s_3 + \dots + \alpha_n s_n = c。 \quad (2)$$

式(2)中: $s=[s_1, s_2, \dots, s_n]$ 为 PLS 得分向量, $\alpha_1, \alpha_2, \dots, \alpha_n$ 是判别系数, c 为常数。

在 PLS-LDA 建模过程中,采用蒙特卡洛交互检验^[19]来确定最优主成分数。蒙特卡洛交互检验的取样比率为 0.75,模拟次数为 2 000。LS-SVM 是对经典支持向量机(SVM)的一种改进,该方法采用最小二乘线性系统作为损失函数,以求解一组线性方程代替经典 SVM 中较为复杂的 2 次规划问题,从而降低了计算复杂性,具有学习速度快,泛化性好等特点^[20]。该方法用非线性映射将输入参数映射到高维特征空间,在此空间构造最优决策函数,并基于结构风险最小化原则确定决策函数参数^[21]。该方法中的核函数是高维特征空间的内积,只要满足 Mercer 条件的函数均可作为核函数,其常用的 4 个核函数中,径向基核函数(RBF)应用最广泛,故该文采用 RBF 核函数作为 LS-SVM 分类器的核函数,并以留一交叉验证法结合网格搜索(grid search)策略来确定惩罚因子 c 以及 RBF 核函数参数 g 。

1.6 模型评价

模型的评价指标为敏感性、特异性、预测总正确率。其定义如式(3)~式(5)所示。

$$\text{敏感性} = t_p / (t_p + f_n); \quad (3)$$

$$\text{特异性} = t_n / (t_n + f_p); \quad (4)$$

$$\text{总正确率} (\%) = (t_p + t_n) \times 100\% / (t_p + t_n + f_p + f_n)。 \quad (5)$$

式(3)~式(5)中: t_p, t_n, f_p, f_n 分别表示真阳性、真阴性、假阳性和假阴性。试验中规定阳性和阴性分别代表褐变板栗和正常板栗。敏感性、特异性以及总正确率越高,说明所建模型性能越好。

所有程序均在 Matlab 2010a (The MathWorks Inc., 美国)上运行实现。

2 结果与分析

2.1 栗仁褐变的评价结果

试验共使用板栗样本180个。表1给出了试样的形态学参数。从表1中可以看出:试样的各项形态学指标均在正常的分布范围内,具有一定的代表性。通过切割观察,最终确认110个样本褐变,褐变面积比例范围为0.16%~49.43%。图1为典型样本的剖面图。图2为110个褐变样本的褐变程度分布。从图1和图2中可以看出:试验中包含了不同褐变程度的样本且褐变程度范围较广,因此,试样的光谱数据具有很强的代表性。将所有褐变样本依据褐变面积比梯度以2:1比例进行划分,而正常栗仁样本则以2:1比例随机划分,最终组成校正集的正常、褐变样本数分别为47个和73个,组成测试集的正常、褐变样本数分别为23个和37个。

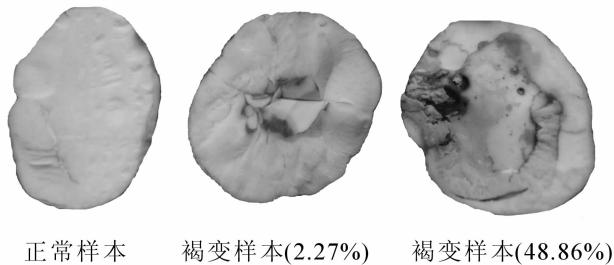


图1 板栗样本

Figure 1 Chestnut samples

2.2 栗仁的光谱分析

图3为正常栗仁和不同程度褐变栗仁的原始光谱。从图3中可以看出:栗仁光谱在1 200.00, 1 450.00和1 940.00 nm处均有明显的吸收峰,在1 780.00 nm处略有波峰。在栗仁谱图中,1 200.00 nm左右区域为甲基和亚甲基中C—H键二级倍频的特征吸收谱带,1 450.00 nm附近区域包含了水分和糖分中O—H基团伸缩振动的一级倍频信息,1 940.00 nm为水分中O—H键伸缩振动和弯曲振动的组合频带特征谱带,1 780.00 nm则分别反映了糖分中C—H键的一级倍频和蛋白质中N—H键的组合频信息^[22]。从图3中还可以看出:不同褐变程度的板栗的原始光谱图趋势基本相似,没有太大的差别,即随着褐变程度的增加,吸收峰高没有呈现出规律性的变化,难以从图谱的表面提取褐变果仁的特征指纹。因此,需要进一步结合化学计量学方法对光谱进行分析处理,以便建立板栗果仁褐变的鉴别模型。

2.3 光谱预处理方法的确定

受仪器、样品以及光谱采集环境等因素的影响,近红外光谱中常出现噪声、谱图基线漂移和平移等现象,为了消除上述因素的影响,应对原始光谱(none)进行预处理。采用标准正态变量变换(SNV),去

表1 样本的形态学参数描述

Table 1 Morphological properties of the samples

属性	质量/g	长径/mm	短径/mm	厚/mm
范围	9.12~23.77	18.00~36.00	15.50~26.70	13.40~24.50
均值	15.86	28.30	21.32	18.20
标准差	3.34	2.93	2.30	1.78

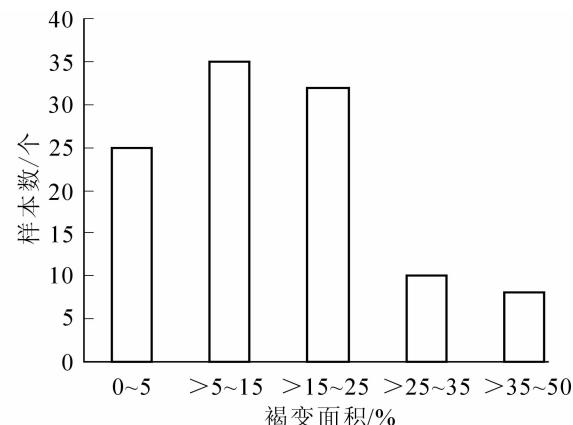


图2 栗仁褐变样本的褐变程度分布图

Figure 2 Histogram of brown chestnut in various degrees

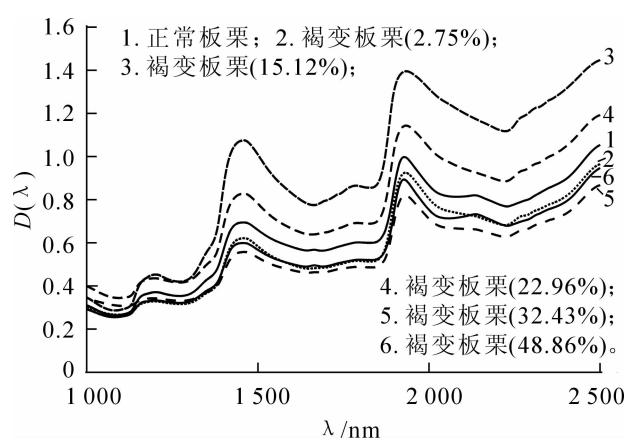


图3 栗仁原始光谱

Figure 3 Spectra of peeled chestnut

趋势变换(detrend)，一阶导数(FD)，二阶导数(SD)，多元散射校正(MSC)等方法对原始光谱进行预处理并采用PLS-LDA建立判别模型，结果如表2所示。由表2可知：SNV预处理建立的PLS-LDA模型最优，该模型对校正集、测试集的敏感性分别为0.90以及0.92，均明显高于一阶导数、二阶导数，多元散射校正等光谱预处理方法的模型；对校正集的特异性均为1.00，也高于一阶导数、二阶导数，多元散射校正等光谱预处理方法的模型；对校正集、测试集样本识别的准确率分别为94.13%和95.00%，高于其他几种光谱预处理方法。这表明SNV预处理有利于减弱因受仪器、样品以及光谱采集环境等因素引起的噪声干扰，可以增强模型的预测能力和稳健性。因此，在下文均采用SNV处理后的光谱进行分析。

表2 不同光谱预处理下全波段PLS-LDA模型的结果

Table 2 Classification results based on PLS-LDA with different preprocessing methods and full wavelengths

预处理方法	因子数	校正集			测试集		
		敏感性	特异性	正确率/%	敏感性	特异性	正确率/%
none	16	0.89	1.00	93.33	0.89	1.00	93.33
MSC	6	0.85	0.98	90.00	0.86	1.00	91.67
SNV	16	0.90	1.00	94.17	0.92	1.00	95.00
FD	6	0.86	0.98	90.83	0.86	1.00	91.67
SD	4	0.88	0.98	91.67	0.89	1.00	93.33
detrend	15	0.89	1.00	93.33	0.89	1.00	93.33

2.4 特征波长的选择

采用随机青蛙算法(random-frog)对全波段光谱进行特征变量选择。由于随机青蛙算法是基于蒙特卡洛(MC)思想，每次运行的结果略有差异。为了减少随机因素的影响，需多次运行，并对结果进行统计。该研究共运行随机青蛙算法100次，以100次运行结果的平均值作为最终特征波长选择的依据，其结果如图4所示。由图4可知：大部分变量的被选择概率都比较小，只有小部分变量的概率比较大。将所有变量的被选概率进行排序，以0.1为阈值，选择出概率最大的前23个变量作为特征波长，依次为1 078.06, 1 028.45, 1 029.68, 1 081.21, 1 077.61, 1 183.90, 1 029.27, 1 020.36, 1 080.76, 1 145.20, 1 183.36, 1 124.34, 1 119.97, 1 032.96, 1 121.42, 1 032.96, 1 098.62, 1 028.05, 1 162.66, 1 120.94, 1 145.71和1 182.82 nm，如图3所示。在1 020.00~1 200.00 nm波段范围内，1 020.00 nm附近为蛋白质中N—H键伸缩振动的一级倍频带，1 030.00, 1 060.00 nm附近为胺类中N—H键伸缩振动的二级倍频带，1 080.00 nm为芳香烃中C—H, C—C键伸缩振动的一级倍频带，1 143.00

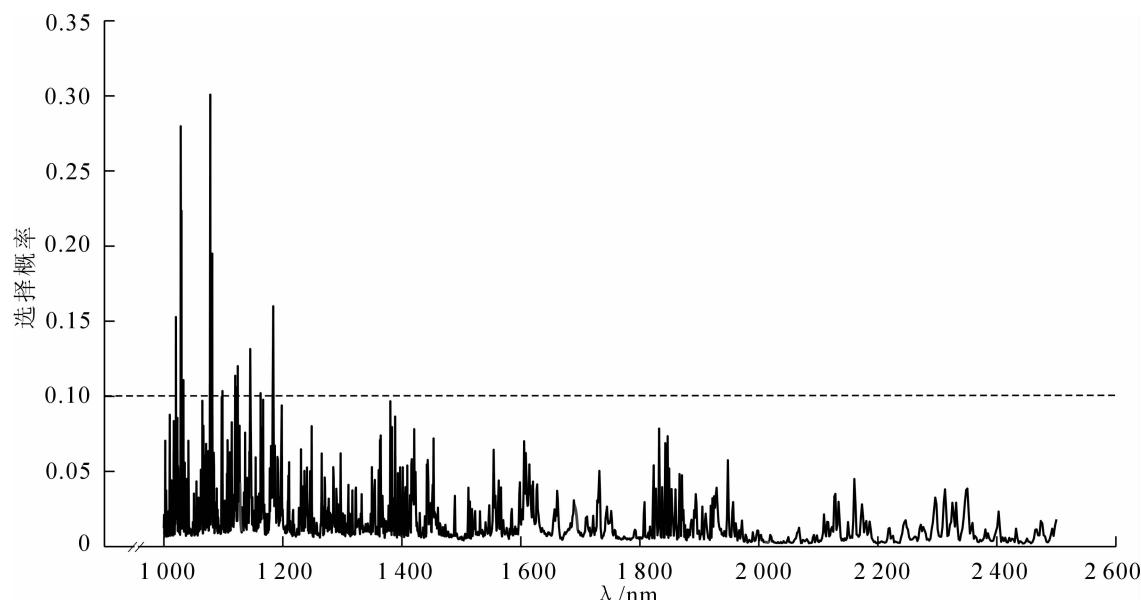


图4 100次随机青蛙算法的平均概率

Figure 4 Selection probability of each wavelength averaged over 100 runs of random-frog algorithm

nm 为芳烃中 C—H 键伸缩振动的二级倍频带, 1 152.00, 1 195.00 nm 为甲基中 C—H 键伸缩振动的二级倍频带^[22]。与板栗果仁褐变直接相关的物质主要是有机物酚、酸、醌、蛋白质、氨基酸等。这些物质都与 C—H 键、N—H 键以及 O—H 键相关。因此, 所选特征波长可以反映板栗果仁褐变特性。从图 3 中还可以看出: 所选特征波段避开了水分的强吸收峰, 减少了水分因素对栗仁褐变识别的干扰。

2.5 模型的建立与比较

将得到的 23 个特征波长(effective wavelengths, EWs)下的光谱数据作为输入, 分别采用 PLS-LDA 以及 LS-SVM 建立褐变板栗的识别模型。表 3 给出了采用 23 个特征波长的光谱数据所建模型的结果。为了突出特征波长所建模型的优越性, 表 3 还给出了采用全波段(full wavelengths, FWs)光谱所建模型的结果。从表 3 中可以看出: 23 个特征波长数据所建 EWs-PLS-LDA 模型对校正集的敏感性(0.92)高于 FWs-PLS-LDA 模型的同类指标(0.90), 但特异性(0.98)低于 FWs-PLS-LDA 模型的同类指标(1.00), 识别正确率相同, 均为 94.17%; 当模型用于测试集数据时, EWs-PLS-LDA 模型的敏感性(0.89)低于 FWs-PLS-LDA 模型的同类指标(0.92), 识别正确率也降低为 93.33%。FWs-PLS-LDA 模型使用 1 557 个变量, 模型的主因子数为 16, 远多于特征波段模型的 23 个变量和 9 个主因子数, 模型较为复杂。23 个特征波长数据所建 EWs-LS-SVM 模型, 无论是校正集还是测试集, 其敏感性(0.92/0.92), 特异性(1.00/1.00), 识别正确率(95.00%/95.00%)均高于 FWs-LS-SVM 模型的同类指标。该模型与 FWs-PLS-LDA 模型相比, 对校正集的预测结果更优。相比于 EWs-PLS-LDA 模型, EWs-LS-SVM 模型结果略优, 原因可能是 PLS-LDA 只能处理栗仁光谱中的线性相关关系, 而 LS-SVM 则可以利用低维数据中的非线性特性, 从而获得较优的预测结果。

表 3 不同建模方法的结果

Table 3 Results for different methods

建模方法	因子数	校正集				测试集			
		敏感性	特异性	正确率/%	建模时间/s	敏感性	特异性	正确率/%	预测时间/ms
FWs-LS-LDA	16	0.90	1.00	94.17	67.53	0.92	1.00	95.00	18.08
FWs-LS-SVM		0.90	0.98	93.33	9.73×10^{-3}	0.89	0.96	91.67	25.06
EWs-PLS-LDA	9	0.92	0.98	94.17	15.21	0.89	1.00	93.33	9.78
EWs-LS-SVM		0.92	1.00	95.00	3.09×10^{-3}	0.92	1.00	95.00	9.55

表 3 还给出了不同建模方法建模和预测所用时间(模型建立环境: inter (R) core (TM) i5-3210 CPU@2.5 GHz RAM 4.00 GB Windows 7 旗舰版 64 Bit)。从表 3 中可以看出: 不管是 PLS-LDA 方法还是 LS-SVM 方法, 采用 23 个特征波长建模时间以及预测时间都要短于全波段模型的相应时间, 其中, 23 个波段光谱数据所建 EWs-LS-SVM 模型时间、预测时间最短, 仅为 3.09 和 9.55 ms。综上所述, 通过随机青蛙算法进行特征波长选择, 并且采用 LS-SVM 建立褐变板栗的识别模型, 不仅降低了模型的复杂度, 而且提高了识别准确率和识别速度。

上述结果表明: 应用近红外光谱技术结合化学计量学方法可以快速准确的对褐变板栗进行识别, 为板栗储藏、深加工等环节中板栗品质的快速无损检测提供了重要的参考, 可进一步研究不同品种, 不同产地等条件下的板栗样本, 从而提高模型的稳定性和适用性, 以便在实际应用中取得满意的结果。

3 结论

采用近红外光谱技术对褐变板栗栗仁进行快速无损检测。确定最优的光谱预处理方法为标准正态变量变换(SNV), 运用随机青蛙算法提取代表光谱有效信息的 23 个特征波长, 并作为输入变量建立褐变栗仁识别 PLS-LDA 和 LS-SVM 模型。23 个特征波长所建 LS-SVM 模型性能最优, 校正集和测试集的敏感性、特异性和识别正确率相同, 分别为 0.92, 1.00 和 95.00%。研究结果表明: 采用随机青蛙算法提取特征波长并采用非线性的 LS-SVM 方法建立栗仁褐变检测模型是可行的, 不仅能简化模型, 提高识别速度, 而且能够提高识别准确率。

4 参考文献

- [1] 黄涛, 李小昱, 彭毅, 等. 基于近红外光谱的淡水鱼新鲜度在线检测方法研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2014, **34**(10): 2732 – 2736.
HUANG Tao, LI Xiaoyu, PENG Yi, et al. Freshwater fish freshness on-line detection method based on near-infrared spectroscopy [J]. *Spectrosc Spectral Anal*, 2014, **34**(10): 2732 – 2736.
- [2] 汤修映, 牛力钊, 徐杨, 等. 基于可见/近红外光谱技术的牛肉含水率无损检测[J]. 农业工程学报, 2013, **29**(11): 248 – 254.
TANG Xiuying, NIU Lizhao, XU Yang, et al. Nondestructive determination of water content in beef using visible/near-infrared spectroscopy [J]. *Trans Chin Soc Agric Eng*, 2013, **29**(11): 248 – 254.
- [3] LI Guanghui, REN Yamei, REN Xiaolin, et al. Non-destructive measurement of fracturability and chewiness of apple by FT-NIRS [J]. *J Food Sci Tech*, 2015, **52**(1): 258 – 266.
- [4] LIU Cong, YANG S X, DENG Lie. Determination of internal qualities of Newhall navel oranges based on NIR spectroscopy using machine learning [J]. *J Food Eng*, 2015, **161**: 16 – 23.
- [5] RADY A M, GUYER D E. Evaluation of sugar content in potatoes using NIR reflectance and wavelength selection techniques [J]. *Postharv Biol Technol*, 2015, **103**: 17 – 26.
- [6] 介邓飞, 谢丽娟, 饶秀勤, 等. 近红外光谱变量筛选提高西瓜糖度预测模型精度[J]. 农业工程学报, 2013, **29**(12): 264 – 270.
JIE Dengfei, XIE Lijuan, RAO Xiuqin, et al. Improving accuracy of prediction model for soluble solids content of watermelon by variable selection based on near-infrared spectroscopy [J]. *Trans Chin Soc Agric Eng*, 2013, **29**(12): 264 – 270.
- [7] 周竹, 李小昱, 李培武, 等. 基于 GA-LSSVM 和近红外傅里叶变换的霉变板栗识别[J]. 农业工程学报, 2011, **27**(3): 331 – 335.
ZHOU Zhu, LI Xiaoyu, LI Peiwei, et al. Near-infrared spectral detection of moldy chestnut based on GA-LSSVM and FFT [J]. *Trans Chin Soc Agric Eng*, 2009, **25**(8): 131 – 135.
- [8] 周竹, 刘洁, 李小昱, 等. 霉变板栗的近红外光谱和神经网络方法判别[J]. 农业机械学报, 2009, **40**(增刊1): 109 – 112.
ZHOU Zhu, LIU Jie, LI Xiaoyu, et al. Discrimination of moldy Chinese chestnut based on artificial neural network and near infrared spectra [J]. *Trans Chin Soc Agric Mach*, 2009, **40**(supp 1): 109 – 112.
- [9] LIU Jie, LI Xiaoyu, LI Peiwei, et al. Nondestructive detection of moldy chestnut based on near infrared spectroscopy [J]. *Afr J Agric Res*, 2010, **5**(23): 3213 – 3218.
- [10] MOSCETTI R, HAFF R P, SARANWONG S, et al. Nondestructive detection of insect infested chestnuts based on NIR Spectroscopy [J]. *Postharvest Biol Technol*, 2014, **87**: 88 – 94.
- [11] MOSCETTI R, MONARCA D, CECCHINI M, et al. Detection of mold-damaged chestnuts by near-infrared spectroscopy [J]. *Postharvest Biol Technol*, 2014, **93**: 83 – 90.
- [12] 刘洁, 李小昱, 李培武, 等. 基于近红外光谱的板栗水分检测方法[J]. 农业工程学报, 2010, **26**(2): 338 – 341.
LIU Jie, LI Xiaoyu, LI Peiwei, et al. Determination of moisture in chestnuts using near infrared spectroscopy [J]. *Trans Chin Soc Agric Eng*, 2010, **26**(2): 338 – 341.
- [13] LIU Jie, LI Xiaoyu, WANG Wei, et al. Measurement of protein content in chestnuts using near infrared spectroscopy [J]. *J Chem Pharm Res*, 2014, **6**(6): 938 – 941.
- [14] 傅谊, 张拥军, 陈华才, 等. 基于偏最小二乘法的板栗近红外光谱分析模型的建立[J]. 食品科技, 2012, **37**(5): 42 – 45.
FU Yi, ZHANG Yongjun, CHEN Huacai, et al. Establishment of NIR models for components determination in fresh chestnut [J]. *Food Sci Technol*, 2012, **37**(5): 42 – 45.
- [15] 褚小立, 袁洪福, 陆婉珍. 近红外分析中光谱预处理及波长选择方法进展与应用[J]. 化学进展, 2004, **16**(4): 528 – 542.
CHU Xiaoli, YUAN Hongfu, LU Wanzhen. Progress and application of spectral data pretreatment and wavelength se-

- lection methods in NIR analytical technique [J]. *Progr Chem*, 2004, **16**(4): 528 – 542.
- [16] LI Hongdong, XU Qingsong, LIANG Yizeng, *et al.* Random Frog: An efficient reversible jump Markov Chain Monte Carlo-like approach for variable selection with applications to gene selection and disease classification [J]. *Anal Chim Acta*, 2012, **740**: 20 – 26.
- [17] 李洪东. 广义灰色分析体系建模的基本问题及其模型集群分析研究[D]. 长沙: 中南大学, 2012.
LI Hongdong. *Fundamental Problems of Generalized Grey Analytical Systems and Their Research of Model Population Analysis* [D]. Changsha: Central South University, 2012.
- [18] 周竹, 李小昱, 高海龙, 等. 漫反射和透射光谱检测马铃薯黑心病的比较[J]. 农业工程学报, 2012, **28**(11): 237 – 242.
ZHOU Zhu, LI Xiaoyu, GAO Hailong, *et al.* Comparison of diffuse reflection and transmission mode of visible/near infrared spectroscopy for detecting black heart of potato [J]. *Trans Chin Soc Agric Eng*, 2012, **28**(11): 237 – 242.
- [19] LI Hongdong, LIANG Yizeng, XU Qingsong, *et al.* Model population analysis for variable selection [J]. *J Chemometr*, 2010, **24**(7/8): 418 – 423.
- [20] SUYKENS J A K, de BRABANTER J, LUKAS L, *et al.* Weighted least squares support vector machines: robustness and sparse approximation [J]. *Neurocomputing*, 2002, **48**(1/4): 85 – 105.
- [21] 顾燕萍, 赵文杰, 吴占松. 最小二乘支持向量机的算法研究[J]. 清华大学学报: 自然科学版, 2010, **50**(7): 1063 – 1066.
GU Yanping, ZHAO Wenjie, WU Zhansong. Least squares support vector machine algorithm [J]. *J Tsinghua Univ Sci & Tech*, 2010, **50**(7): 1063 – 1066.
- [22] 严衍禄. 近红外光谱分析基础与应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005: 31 – 39.

竹子栽培文献计量分析与可视化图谱分析

王学勤

(浙江农林大学 图书馆, 浙江 临安 311300)

摘要:采用文献计量学方法,对Web of Science核心版收录的1980-2014年间发表的竹子栽培研究的文献进行了全面的统计分析,通过Citespace II软件,从文献共被引的角度对文献作者聚类、研究机构聚类、关键词共现等作可视化图谱分析。分析结果表明:①中国、印度、日本和美国是竹子栽培研究的主要国家,中国在该领域研究具有绝对的优势和地位;②中国科学院、浙江农林大学、中国林业科学研究院等单位为竹子栽培研究发文量最多的几个机构,其中以中国科学院的国际合作度和影响力最大,这些机构走在了国际竹子栽培研究的前列;③学者多从竹子组织培养、快速繁殖、植株再生、体外开花、基因与克隆、生长模式与因素等方面展开研究;④竹子基因组序列、系统发育、基因鉴定等代表着竹子栽培研究的新的热点和方向。图7表6参7

关键词:竹;栽培;计量分析;知识图谱;可视化分析;研究热点;研究前沿

中图分类号: S795.1 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2016)02-0330-10

Bibliometric analysis and visualization map analysis of bamboo cultivation literature

WANG Xueqin

(Library, Zhejiang A & F University, 311300 Lin'an, Zhejiang, China)

Abstract: Literature on bamboo cultivation from the Web of Science core edition between 1980 and 2014 was analyzed with bibliometric methods. The CiteSpace II software was used to conduct a visualization map analysis of authors clustering, research institutions clustering and keywords co-occurrence from the document co-citation perspective. The results indicate that: (1)China, India, Japan and the United States of America are the main nations researching bamboo cultivation; China has the absolute advantage and holds a dominating position in this field. (2)Chinese Academy of Science, Zhejiang A & F University and Chinese Academy of Forestry are the institutions with the most outputs in bamboo cultivation research, Chinese Academy of Science has the most extensive international cooperation and influence; these institutions are taking an international leading position in studying bamboo cultivation. (3)Most scholars conduct research on tissue-culture, micropropagation, plant regeneration, in-vitro flowering, somatic embryogenesis, gene and cloning, growth pattern and factors. (4)Genome sequence, phylogenetic, identification of gene are the new focus and direction for the future research. [Ch, 7 fig. 6 tab. 7 ref.]

Key words: bamboo; cultivation; bibliometric analysis; mapping knowledge domain; visualization analysis; research focus; research front

竹子是重要的森林资源之一,具有生长快、产量高、用途广、一次造林可以永续利用等特性,不仅具有重要的经济价值,而且具有良好的生态功能,在人类经济生活和生存环境中起着重要的作用。随着中国现代化林业建设的发展和退耕还林政策的实施,竹子的栽培和利用越来越受到人们的关注和青

收稿日期: 2014-11-14; 修回日期: 2015-09-17

基金项目: 浙江省科技文献共建共享平台资助项目(2014E60002-3)

作者简介: 王学勤, 研究馆员, 从事信息咨询和情报分析研究。E-mail: wxqla@zafu.edu.cn

睐^[1]。对竹子组织培育、育种和栽培研究的投入也日益加大, 相关领域研究也取得了较大进展, 从而促进了竹子这一宝贵资源的开发和利用。为了从全球视野把握竹子栽培研究的状况和趋势, 为科研人员的科学的研究提供可靠信息支持和决策参考, 本研究采用文献计量学方法, 结合 Citespace II 的共被引分析和词频分析功能, 对 Web of Science 核心版收录的 1980–2014 年间发表的关于竹子栽培研究的文献进行了详尽的计量统计分析, 从文献共被引的角度, 通过 Citespace II 软件的可视化分析, 形象地展示了国际上有关竹子栽培的代表人物、代表机构和研究热点。

1 数据来源

检索美国 Thomson Reuters 公司 Web of Science 核心集数据库平台中 Science Citation Index Expanded (SCI-E)。为了查准、查全竹子栽培的文献, 全面查询各种竹子的学名, 以及关于栽培的所有检索词, 制定检索式: (“Bambusa” or “Bambusoideae” or “Phyllostachys*” or “bambusoides” or “bamboo*” or “Nandina domestica” or “Dendrocalamus latiflorus” or “Dendrocalamus barbatus” or “Acidosasa edulis” or “Pleioblastus amarus” or “Qiongzhuea tamidinoda” or “Pseudosasa longiligula” or “Dianthus fragrans” or “Oligostachyun lubricum” or “Dendrocalamopsis oldhami” or “Dictyophora duplicata” or “Arundinaria fortunei” or “Lingnania wenhouensis” or “Podocarpus fleuryi” or “Pseudosasa amabilis (McCleure) Keng f” or “B. textiles”) and (cultivation or cultivating or culture or plant* or grow* or breed* or foster* or propagation or Micropropagation or Reproduction or flower* or proliferation or gene* or genome*), 限定在题名字段, 年代为数据库的数据回溯年代(1980–2014 年), 检索时间为 2014 年 12 月 12 日, 执行检索后获得文献 531 篇, 再把检索结果限定在林业、植物、农学、农业多样性、园艺、遗传育种等 6 个学科, 论文类型限定为 article, proceedings, meeting abstract, 再次精炼后共得文献记录 233 条。这 233 篇文献中仍含少量不相关文献, 在分析过程中被排除在外。另外, 本研究在对国家和机构的统计分析时不包括中国台湾。

2 统计与分析

2.1 论文年度分布分析

竹子栽培研究 233 篇文献中 1995 年以前只占极少数。图 1 展现了 1995–2014 年论文产出的分布情况, 图 2 展现了这些文献每年的被引用情况。

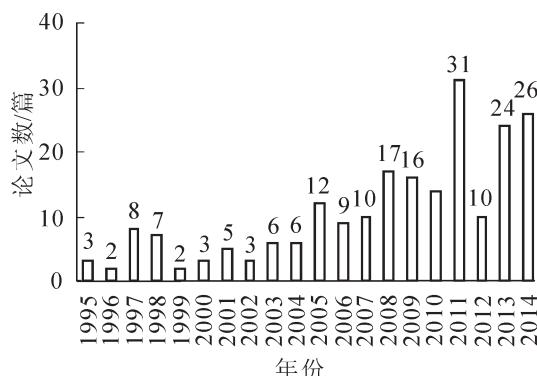


图 1 1995–2014 年竹子栽培研究论文产出量分布

Figure 1 Distribution of bamboo cultivation papers during 1995–2014

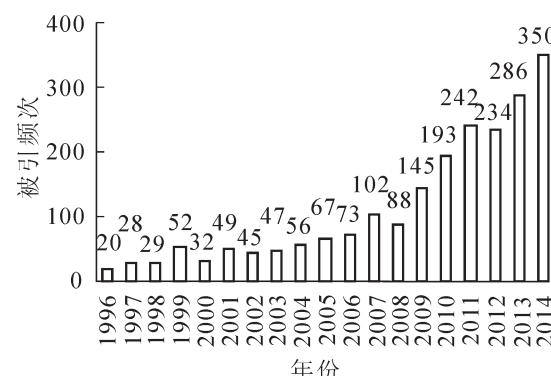


图 2 1996–2014 竹子栽培研究论文的被引用情况

Figure 2 Cited number of bamboo cultivation papers during 1996–2014

从图 1 和图 2 可看出: 2008 年以后有一定增长, 但 2010 年和 2012 年分别有 2 个低谷, 2011 年又有 1 个增长峰值, 论文的产出量不稳定。从图 2 的被引用情况看, 除 2008 年外, 基本呈现稳步增加的态势, 且在 2009 年后有个较大幅度的增长, 233 篇文献共被用 1 760 次(除去自引), 篇均被引用次数为 7.55。虽然发文量增长不明显, 但论文的关注度却持续提高。

2.2 发文的国家和机构分布

一个研究机构的论文产出量、产出的时间覆盖范围以及被引用情况, 能反映该机构在特定领域的科

研究实力、持续研究的能力以及整体研究水平。研究这些情况有助于科研人员了解竞争对手的状况，也便于寻找合作伙伴。图3显示了233篇文献的国家分布，表1列出了论文产出超过4篇的研究机构。

表1 竹子栽培文献主要产出研究机构(按论文产出数量排名)

Table 1 Main institutions of bamboo cultivation output (more than 4 papers published)

机构名称	研究时间跨度	论文记录数/篇
中国科学院 Chinese Academy of Sciences (中国)	2001-2013	22
浙江农林大学 Zhejiang A & F University (中国)	2002-2013	19
中国林业科学研究院 Chinese Academy of Forestry (中国)	2008-2014	16
东京大学 Tokyo University (日本)	1990-2014	10
印度科学与工业研究理事会 Council of Scientific Industrial Research India (印度)	1990-2014	10
浙江大学 Zhejiang University (中国)	1998-2011	9
国际竹藤中心 International Center Bamboo Battan (中国)	2008-2013	6
北海道大学 Hokkaido University (日本)	1996-2011	6
斯里兰卡基础科学研究院 Institute Fundamental Studies (斯里兰卡)	1997-2007	5
查尔斯达尔文大学 Charles Darwin University (澳大利亚)	2003-2013	5
阿根廷全国研究委员会 Consejo Nacional De Investigaciones Cientificas Y Tecnicas Conicet (阿根廷)	2007-2014	5
德里大学 University of Delhi (印度)	1985-2013	4
新加坡博特花园 Singapore Bot Gardens (新加坡)	2000-2013	4
贝拿勒斯印度教大学 Banaras Hindu University (印度)	1999-2005	4
日本林产品研究所 Forestry Forest Products Research Institute Japan (日本)	2009-2014	4

从图3可看出：中国(占27%)，印度(占21%)，日本(占14%)和美国(占11%)是竹子栽培研究主要产出国家，这些国家也是竹子分布的主要国家，尤其是中国在国际上明显占据了主导地位。从表1看到：浙江农林大学、中国林业科学研究院、东京大学、印度科学与工业研究理事会、浙江大学等单位的论文产出量居前。

论文的篇均被引频次能从一定角度反映研究机构发文的水平和质量。图4显示了发文量超过4篇的机构的篇均被引频次(排除自引)。

从图4可看出：贝拿勒斯印度教大学、日本北海道大学、印度德里大学、印度科学与工业研究理事会、东京大学、斯里兰卡基础科学研究院的论文篇均被引频次居前。从中国的情况看，中国科学院、浙江农林大学、中国林业科学研究院和浙江大学等4家单位的论文产出量位居前。按篇均被引频次从高到低分别是中科院(9.82次·篇⁻¹)、浙江大学(6.78次·篇⁻¹)、中国林业科学研究院(6.31次·篇⁻¹)、浙江农林大学(4.28次·篇⁻¹)。中国林业科学研究院的论文产出时间最短(2008-2014年)，但篇均被引频次不

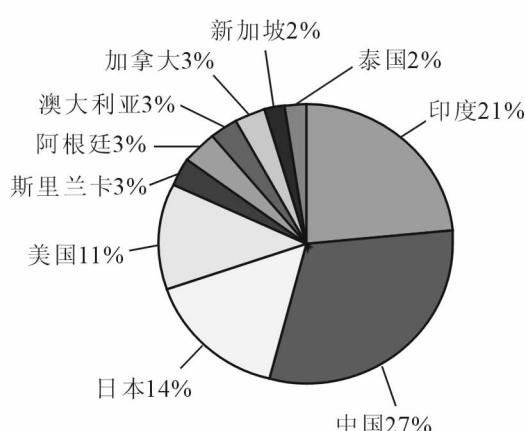


图3 竹子栽培文献产出国别分布

Figure 3 Nation distribution of bamboo cultivation papers

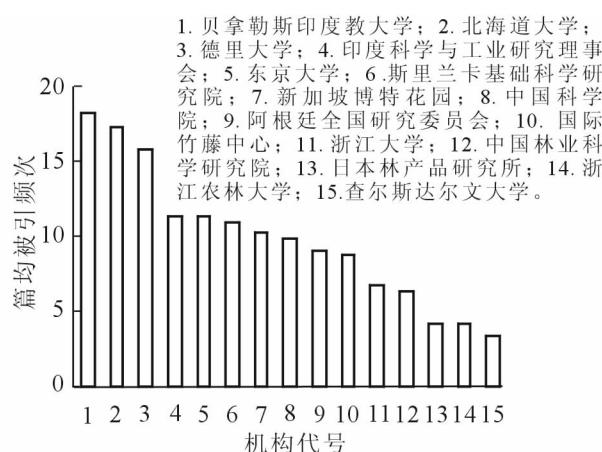


图4 发文超过4篇的机构篇均被引频次

Figure 4 Average citations per paper of each institutions (more than 4 papers)

表2 载文量超过4篇的期刊分布及其影响因子

Table 2 Main journals of bamboo cultivation research (more than 4 papers published)

期刊名	载文数量/篇	影响因子	《期刊引用报告》(JCR)学科分区
<i>Plant Cell Reports</i>	11	2.936	Plant Sciences (Q1)
<i>Forest Ecology and Management</i>	9	2.667	Forestry (Q1)
<i>Plant Cell Tissue and Organ Culture</i>	9	2.612	Plant Science (Q1)
<i>In Vitro Cellular Developmental Biology Plant</i>	8	1.162	Cell Biology (Q4) Developmental Biology (Q4)
<i>Journal of Plant Research</i>	7	2.507	Plant Sciences (Q2)
<i>Botanical Review</i>	7	2.208	Plant Sciences (Q2)
<i>Botanical Bulletin of Academia Sinica</i>	6	0.720(2006年后该刊未被收录)	Plant Sciences (Q3)
<i>Hortscience</i>	5	0.855	Horticulture (Q2)
<i>Plant Systematics and Evolution</i>	5	1.154	Evolutionary Biology (Q4) Plant Sciences (Q3)
<i>Annals of Botany</i>	5	3.295	Plant Sciences (Q1)
<i>Scientia Horticulturae</i>	4	1.504	Horticulture (Q2)
<i>Plant Species Biology</i>	4	1.327	Ecology (Q3) Plant Sciences (Q3)
<i>Journal of Tropical Forest Science</i>	4	0.667	Forestry (Q3)
<i>Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology</i>	4	0.810	Biochemistry & Molecular Biology (Q4)
<i>Scientia Horticulturae</i>	4	1.504	Horticulture (Q2)
<i>Molecular Phylogenetics and Evolution</i>	4	4.018	Biochemistry & Molecular Biology (Q2)
<i>Journal of Tropical Forest Science</i>	4	0.667	Forestry (Q3)
<i>BMC Plant Biology</i>	4	3.942	Plant Sciences (Q1)

低，其研究成果不仅新且质量高，浙江大学2011年以后未见竹子栽培方面的研究。中国科学院、中国林业科学研究院、浙江农林大学这3家单位研究持续性较好。

2.3 来源出版物分析

233篇论共刊载在100种期刊上，平均每种期刊载文2.33篇，其中载文超过4篇的期刊有18种。表2按载文量多少顺序列出了载文超过4篇的期刊，及它们的影响因子和《期刊引证报告》(JCR)分区。

从表2可看出：载文量最多的前3种期刊，其影响因子均在2.5以上，且都处于相应学科的Q1区。*Plant Cell Reports*, *Forest Ecology and Management*, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*这3种期刊是刊载竹子栽培研究的主要期刊。影响因子值最高的几种期刊是*Molecular Phylogenetics and Evolution* (4.018), *BMC Plant Biology* (3.942), *Annals of Botany* (3.295)。这些期刊既是研究人员应重点关注的，也是投稿首选期刊。曾被SCI收录的期刊*Botanical Bulletin of Academia Sinica* 2005年后被SCI踢除后就没有了影响因子，低影响因子的期刊都会面临被踢的可能。

2.4 作者分析

一般把某研究领域发文量较多的作者称为活跃作者群和核心作者群，他们对该领域的研究与发展起着关键作用的领军人物。了解这些作者的研究领域及活跃时间对科研人员跟踪成果、把握研究方向和寻找合作伙伴都有一定帮助。表3列出了竹子栽培研究发文量超过5篇的作者，包括他们的研究方向、论文数量及篇均被引次数。

从表3可见：竹子栽培研究的高产作者主要集中在中国。这些研究者不仅产出量大，且论文的篇均被引频次也较高。中国的高产作者研究内容主要集中在基因序列、遗传和系统发育，且研究时间上基本持续到最近2 a，论文的篇均被引频次都较高，说明研究成果不仅具有持续性和新颖性，而且质量也较高。篇均被引频次最高且近2 a仍在研究的几位高产作者是中国的PENG Zhenhua, LI Dezhu, GAO Zhimin。这些作者是研究人员重点跟踪的对象，代表着竹子栽培研究的前沿性方向。

2.5 论文学术影响力分析

一般来说，论文的被引次数反映了论文在国际上的影响力以及论文在同行中引起的关注程度，因

表3 竹子栽培研究发文量超过5篇的作者分布

Table 3 Main authors of bamboo cultivation (more than 5 papers published)

作者	研究时期	机构	主要研究方向	论文记录数/篇	篇均被引用次数/篇
LI Dezhu(中国)	2001-2013	中国科学院	基因序列、系统发育、遗传	9	14.44
YANG Hanqi(中国)	2007-2014	中国林业科学研究院	组织培育、基因、遗传育种	8	7.38
SAXENA S(印度)	90年代初-2011	TATA 能源研究所 Resoures Institute (印度)	TATA Energy 体外繁殖、芽繁殖及克隆	6	14.17
RAMANAYAKE S M S D (斯里兰卡)	1997-2007	斯里兰卡基础科学研究院	竹株繁殖和开花	6	12.17
PENG Zhenhua(中国)	2008-2013	中国科学院	基因序列、系统发育	5	17.5
FRANKLIN D C(澳大利亚)	2008-2013	查尔斯达尔文大学	基因、开花	5	4.4
GAO Zhimin(中国)	2010-2013	国际竹藤中心	基因与分子鉴定	5	12.8

此,衡量科研成果学术影响力的一个重要指标就是论文的被引用情况。论文被引次数越高,说明该论文受到的关注越多、利用率越高,其学术价值和影响力也就越大。表4列出了总被引用次数超过35次的9篇论文。

从表4可看出:被引次数最多的一篇文献是美国学者 Veblent 于1982年发表的题名为 *Growth-patterns of Chusquea bamboos in the understory of Chilean Nothofagus forests and their influences in forest dynamics* 一文《智利假山毛榉 Nothofagus 林中 Chusquea 竹的生长模式及其森林动力学影响》,该文被引用次数达95次,奠定了竹子栽培的基础,具有里程碑意义。在这10篇重要文献中,3篇是关于植株繁殖和开花;3篇是关于竹子生长模式与因素(动力学、物理学特征);2篇是关于木本竹基因与系统发育的,除了2篇基因与系统发育的文献较新外,其他大多发表于2005年前,表明这些研究领域具备了较好的研究基础,引起了学术界广泛的关注。

文献近年被引用情况能反映出该领域的研究趋势与前沿。表5列出了近4a被引用频次较高(超过16次)的11篇文献。从表5可看出:近4a被引用次数最高的前7篇文章也是表4所列的高被引文献。近4a被引用次数最多的是由爱尔兰作者 SUNGKAEW 等于2009年发表的 *Non-monophyly of the woody bamboos (Bambuseae; Poaceae): a multi-gene region phylogenetic analysis of Bambusoideae s.s.*《非单系木本竹(竹亚科):一个竹亚科的多基因系统发育分析》。该文提取60多种代表所有竹亚科植物及相关非竹亚科为样本,通过5个叶绿体DNA区域, *trnL* 基因内含子, *trnL-F* 间隔区, *ATPB-rbcL* 基因间隔, *rps16* 内含子,和 *matK* 基因的综合分析,进行了一般的竹子,特别是木本类竹的系统发育及它们之间亲缘关系的研究^[2]。该文既是高被引论文,近几年又持续高度受到关注,也表明竹子培育遗传育种与基因亲缘关系的研究是近年的一个热点。近4a被引用频次排第2位和第3位的2篇文章都是关于竹子基因组研究。第4,5,6篇于80年代与90年代间发表的关于竹子生长模式与动力学和物理学特征的文献,奠定了竹子生长研究的基础。这3篇同时又一直持续被他人引用,说明该竹子生长模式与动力学等研究是一个持续性研究热点。另外,10篇文献中5篇是关于基因组鉴定、测序和系统发育的,其他还有基因克隆、土壤与竹子生长产量、竹林与土壤二氧化碳释放等。这些研究领域也是竹子栽培的最新研究热点和方向。10篇文献中,中国和印度各占了3篇,美国有2篇,爱尔兰、意大利各1篇,也从一定程度上反映出近年来竹子栽培的前沿性研究主要集中在这些国家。国内中国科学院有2篇,浙江农林大学有1篇,中国科学院的 PENG Zhenhua 于2010年和2013年发表的关于竹子基因组研究的2篇文章分别列近4a被引用频次排第2位和第3位,尤其是2013年发表的题名为 *The draft genome of the fast-growing non-timber forest species moso bamboo (Phyllostachys heterocycla)*《毛竹 *Phyllostachys heterocycla* 快速生长的基因组草图》一文,2013年和2014年的被引用次数高达7次和13次,是所有文献中当年和次年被引用次数最高的,也是近2a被引用次数最高的,代表了竹子研究的最新方向和前沿。另外还有2篇近4a被引用次数并列排第4位的是关于竹子生长动力学的文献也需要引起特别注意,一篇是美国科罗拉多州大学的 VEBLENT 于1982年发表的题名为 *Growth-patterns of chusquea bamboos in the understory of Chilean*

表4 被引用次数排名前10位的论文

Table 4 Top 10 articles of bamboo cultivation papers being cited

排名	作者	第一作者机构	题名	发表期刊	被引次数/次
1	VEBLENT T T	科罗拉多大学 University of Colorado (美国)	Growth-patterns of chusquea bamboos in the understorey of Chilean Nothofagus forests and their influences in forest dynamics	Bulletin of Ulletin of the Torrey Botanical Club, 1982, 109(4): 474 – 487.	96
2	YAMAMOTO S, NISHIMURA N, MATSUI K	冈山大学 Okayama University(日本)	Natural disturbance and tree species coexistence in an old-growth beech-Dwarf bamboo forest, southwestern Japan	Journal of Vegetation Science, 1995, 6(6): 875 – 886.	60
3	SUNGKAEWS, STAPLETON C, MA, SALAMIN N 等	都柏林大学 University of Dublin Trinity(爱尔兰)	Non-monophyly of the woody bamboos (Bambuseae; Poaceae): a multi-gene region phylogenetic analysis of Bambusoideae s. s.	Journal of Plant Research, 2009, 122(1): 95 – 108.	44
4	SINGH A N, SINGH J S	贝拿勒斯印度教大学	Biomass, net primary production and impact of bamboo plantation on soil redevelopment in a dry tropical region	Forest Ecology and Management, 1999, 119(1/3): 195 – 207.	40
5	ZHANG Yunjie, MA Pengfei, LI Dezhu	中国科学院	High-throughput sequencing of six bamboo chloroplast genomes: phylogenetic implications for temperate woody bamboos (Poaceae: Bambusoideae)	Plos One, 2011, 6(5): e20596	38
6	ROUT G P	区域植物资源中心 Regional Plant Resource Centre(印度)	Somatic embryogenesis and in-vitro flowering of 3 species of bamboo	Plant Cell Reports, 1994, 13 (12): 683–686.	37
7	CHAMBERS S M, HEUCH J H R, PIRRIE A	阿伯丁大学 University of Aberdeen, (英国)	Micropagation and invitro flowering of the bamboo dendrocalamus-hamiltonii munro	Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1991, 27(1): 45 – 48.	37
8	LEE A W C, BA X S, PERALTA P N	克莱蒙森大学 Clemson University(美国)	Selected physical and mechanical-properties of giant timber bamboo grown in south-carolina	Forest Products Journal, 1994, 44(9): 40 – 46.	36
9	TAYLOR A H, HUANG, J Y, ZHOU S Q	宾夕法尼亚州立大学 Penn State University (美国)	Canopy tree development and undergrowth bamboo dynamics in old-growth Abies-Betula forests in Southwestern China: a 12-year study	Forest Ecology and Management, 2004, 200(1/3): 347 – 360.	36

Nothofagus forests and their influences in forest dynamics《智利的假山毛榉林中 *Chusquea* 竹的生长模式及其森林动力学影响》。该文也是总被引用次数最高的文献；另一篇是美国宾夕法尼亚州立大学的 Taylor 等于 2004 年发表的题名为 *Canopy tree development and undergrowth bamboo dynamics in old-growth Abies-Betula forests in Southwestern China: a 12-year study*《在中国西南原始桦冷杉林的冠层树生长和灌木丛竹的动力学：12 年的研究》。该文也是表 4 所列的高被引论文，这 2 篇竹子生长模式与动力学研究的代表性文献一直持续受到关注，对竹子生长研究具有较高的参考价值，也表明竹子的生长模式与机理研究是个经久不衰的研究热点。还有一篇值得关注的文献是浙江农林大学刘娟等于 2011 年发表的题名为 *Seasonal soil CO₂ efflux dynamics after land use change from a natural forest to Moso bamboo plantations in subtropical China*《天然毛竹林种植在中国亚热带后产生土地利用变化后的季节性土壤二氧化碳释放动力学研究》。该文 2013 年被引用 6 次，2014 年被引用 10 次。这篇文章不是直接关于竹子栽培技术或方法的，是关于竹子栽培带来土壤二氧化碳释放的，在研究内容上有较多的学科交叉，代表着竹子栽培的另一个前沿性方向。其他几篇近年被引用较多的文献也大都关于基因组、基因测序、克隆、系统发育、竹子生长模式与特性、竹子生长产量与土壤的关系等。综上所述，竹子基因与系统发育、基因组、克隆、竹子

表5 2011—2014年被引次数最高(超过15次)的文献

Table 5 Top 10 papers cited more than 15 during 2011–2014

作者	第一作者机构	题名	发表期刊	各年被引用情况/次			
				2011	2012	2013	2014
1 SUNGKAEW S, STAPLETON C M A, SALAMIN N 等	都柏林大学	Non-monophyly of the woody bamboos (Bambuseae; Poaceae): a multi-gene region phylogenetic analysis of Bambusoideae s. s.	<i>Journal of Plant Research</i> , 2009, 122 (1): 95–108.	3	7	12	12
2 PENG Zhenhua, LU Tingting, LI Lubin 等	中国科学院	Genome-wide characterization of the biggest grass, bamboo, based on 10,608 putative full-length cDNA sequences	<i>BMC Plant Biology</i> , 2010, 10. doi: 10.1186/1471-2229-10-116	6	7	6	8
3 PENG Zhenhua, LU Ying, LI Lubin 等	中国科学院	The draft genome of the fast-growing non-timber forest species moso bamboo (<i>Phyllostachys heterocycla</i>)	<i>Nature Genetics</i> , 2013, 45 (4): 456–461.	0	0	7	13
4 VEBLEN T T	科罗拉多大学	Growth-patterns of chusquea bamboos in the understory of Chilean <i>Nothofagus</i> forests and their influences in forest dynamics	<i>Bulletin of the Torrey Botanical Club</i> , 1982, 109 (4): 474–487.	3	6	3	8
5 TAYLOR A H, HUANG J Y, ZHOU S Q	宾夕法尼亚州立大学	Canopy tree development and undergrowth bamboo dynamics in old-growth <i>Abies-Betula</i> forests in Southwestern China: a 12-year study	<i>Forest Ecology and Management</i> , 2004, 200 (1/3): 347–360.	8	5	3	4
6 LEE A W C, BAI X S, PERALTA P N	克莱蒙森大学	Selected physical and mechanical-properties of giant timber bamboo grown in south-Carolina	<i>Forest Products Journal</i> , 1994, 44 (9): 40–46.	1	4	6	8
7 DAS M, BHAT-TACHARYA S, PAL A	Bose 研究所 Bose Institute (印度)	Generation and characterization of SCARs by cloning and sequencing of RAPD products: a strategy for species-specific marker development in bamboo	<i>Annals of Botany</i> , 2005, 95 (5): 835–841.	3	4	7	2
8 SINGH A N, SINGH J S	贝拿勒斯印度教大学	Biomass, net primary production and impact of bamboo plantation on soil redevelopment in a dry tropical region	<i>Forest Biology and Management</i> , 1999, 119 (1/3): 195–207.	8	5	1	4
9 GRATANI L, CRESCENTE M F, VARONE L	罗马大学 University of Roma(意大利)	Growth pattern and photosynthetic activity of different bamboo species growing in the Botanical Garden of Rome	<i>Flora</i> , 2008, 203 (1): 77–84.	5	3	6	3
10 LIU Juan, JIANG Peikun, WANG Hailong, ZHOU Guomo 等	浙江农林大学	Seasonal soil CO ₂ efflux dynamics after land use change from a natural forest to Moso bamboo plantations in subtropical China	<i>Forest Ecology and Management</i> , 2011, 262 (6): 1131–1137.	6		10	

生长模式与因素、竹子生长与土壤碳汇等领域是竹子生长与栽培研究具有代表性的研究热点。

3 竹子栽培知识图谱分析

知识图谱(mapping knowledge domain)是显示知识发展进程与结构关系的一系列各种不同的图形。具体来说,它是把应用数学、图形学、信息科学等学科的理论和方法与计量学引文分析、共现分析等方法结合,用可视化的图谱形象地展示学科的核心结构、发展历史、前沿领域以及整体知识架构的多学科融合的一种研究方法^[3]。知识图谱对发现和解释科学文献中潜在的隐藏的规律和演化路径发挥了重要作用。

用。本研究采用美国德雷塞尔大学(Drexel University)著名信息可视化专家、华人学者陈超美(CHEN Chaomei)博士开发的基于JAVA平台的 CiteSpace II 信息可视化应用软件作为本研究的可视化工具^[4]，以 Web of Science 核心版数据库检索出的 1980–2014 年关于竹子栽培的 233 篇文献为样本，运用 CiteSpace II 软件，从文献的共被引关系角度，提供了竹子栽培研究的作者聚簇、研究机构、和关键词共现的可视化图谱。

3.1 文献作者聚簇分析

通过文献作者聚簇分析，可以了解文献作者通过共被引关系形成的聚类网络图谱，一个类簇代表研究方向相近的一群作者以及他们的关联度。在 CiteSpace II 软件界面，网络节点选择 author，主题词来源选择文献标题(title)，摘要(abstract)，关键词(descriptor)和标志符(identifiers)，算法选择路径搜索(pathfinder)算法，数据抽取对象为 top 50，设置 Time Scaling 的值为 1，运行 CiteSpace II 软件后形成了代表竹子栽培研究不同领域的很多个作者聚类簇，簇团越大，表明进行相关研究的作者越多，是个研究热点，图 5 节选了最大的的几个类簇。簇团中节点的大小反映了某作者发表 SCI 文献的多少，发文最多的作者即该领域的领军人物，各节点之间的连线反映了作者之间的关联性。通过作者聚类图谱可以帮助科研人员了解与自己研究方向相近的研究群体以及他们之间的关联度。

从图 5 可知：较大的簇团有以中国科学院的 LI Dezhu 和中国林业科学研究院的 YANG Hanqi 引领的基因、遗传和系统发育为研究方向的作者群；以中国国际竹藤组织的 GAO Zhimin 引领的竹子基因与分子鉴定为研究方向的作者群。这几个作者群簇团较大，连线多，表明了这些研究领域聚集的研究人员较多，文献近年产生的交叉关联较多。

3.2 国家和研究机构分析

CiteSpace 可将各国(不包括中国台湾)发表的论文数量及时间以年轮的大小和颜色深浅直观展示出来。网络节点选择 Country 与 Institution，其他选项不变，运行 CiteSpace II 软件，得到图 6 所示的有关竹子栽培研究的国家和机构图谱。其中，圆形节点代表国家，处于直线分支上的小节点代表机构^[5]。



图 5 竹子栽培研究的作者聚类图谱

Figure 5 Author cluster map of bamboo cultivation

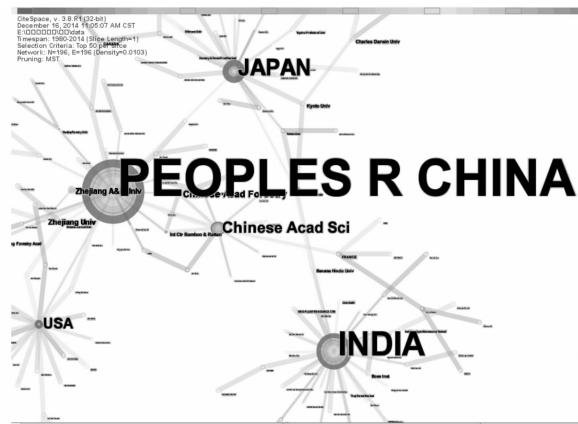


图 6 竹子栽培研究的国家和机构图谱

Figure 6 Countries and institutions cluster map about bamboo cultivation

图 6 展示的结果与图 3 显示的基于 Web of Science 中文献分析结果一致。中国、印度、日本和美国是竹子栽培研究的主要国家。点的中心性是一个用以量化点在网络中地位重要性的图论概念，中心性值越大，表明节点位置越重要^[6]，国家或机构的中心性值大小反映了该国或该机构在世界范围内的合作度，从而显现其影响力和地位。在整个网络中，中国的节点中心性值最大，为 0.82，表现为从该节点引出的连线最多，表明相当多的国家及机构都直接或间接地与中国有合作关系。其他依次为日本(中心性值为 0.72)，印度(中心性值为 0.47)，美国(中心性值为 0.35)，法国(0.09)，阿根廷(中心性值 0.05)。从机构看，中心性值最大的是北海道大学(0.43)，其次为中国科学院(0.16)，东京大学(0.06)，查尔斯达尔文大学(0.05)，浙江大学(0.03)，中国林业科学研究院(0.02)。从国家和机构的发文量和中心性值

可以看出，中国的发文量最大，中心性值居第1位，显示出中国竹子栽培研究在世界的绝对实力和地位；机构的中心性值最大的是北海道大学，虽然发文量不高，但中心性值高说明它与世界各国的合作非常广泛。

3.3 关键词共现分析

研究热点是指在某一时间段内有内在联系的, 数量相对较多的一组论文所探讨的科学问题或专题。Citespace II 把具有关联的共被引文献中的关键词进行词频统计, 展现关键词共现网络图谱, 以确定基于文献计量学视角的热点研究领域。选择 Note Type 为“Key word”, 其他设置不变, 运行 Citespace II, 得到图 7 所示的国际竹子栽培研究研究热点关键词共现的网络图谱。图 7 中各关键词节点年轮状同心圆颜色的深浅反映了节点在不同时间段出现的情况, 同心圆的大小反映了节点在所出现年代的数量多少, 各节点间连线的粗细反映了节点之间关联性的大小^[7]。表 6 列出了共现频次排在前 28 位的关键词。

从图 7 看出：除 bamboo 外，同心圆较大的几个关键词是 micropropagation, regeneration, poaceae, evolution, plants, dynamics propagation 和 diversity，且同心圆的颜色较深，各节点间连线也较粗，表明这几个关键词在 90 年代末期开始产生关联，且产生的关联较多，集焦了 20 世纪 90 年代末期后的竹子栽培的研究热点。表 6 列出了关键词共现频次超过 7 的前 29 个关键词。

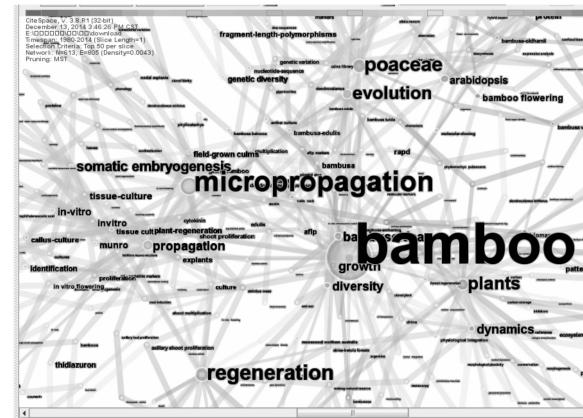


图 7 竹子栽培研究关键词共现图

Figure 7 Keyword co-occurrence map of bamboo cultivation

表 6 出现频次超过 7 的前 29 个关键词

Table 6 Top 29 key words of bamboo cultivation research (frequency ≥ 7)

关键词	出现频次/次	关键词	出现频次/次	关键词	出现频次/次
bambo, bambusa	62	propagation 繁殖	11	micropropagation 快速繁殖	27
rice 水稻	10	regeneration 再生	20	gbssi gene Gbssi 基因	9
Poaceae 禾本科	19	bamboo flowering 竹子开花	8	<i>Arabidopsis</i> \ <i>Arabidopsis thaliana</i> 拟南芥	18
munro 蒙罗竹	8	in-vitro 体外	17	tissue-culture 组织培养	8
evolution 进化	17	protein 蛋白质	7	plants 植物	17
field-grown culms 田间生长的茎	7	expression 表达	15	gene 基因	7
somatic embryogenesis 体细胞胚胎发育	13	identification 认证	7	growth 生长	12
forest 森林	7	Bambusoideae 竹亚科	12	plant-regeneration 植株再生	7
dynamics 动力学	12	genetic diversity 遗传多样性	7	propagation 繁殖	11
<i>Bambusa oldhamii</i> 绿竹	7	diversity 多样性	11		

竹子栽培研究的热点关键词主要有快速繁殖、再生、禾本科(竹)、体外(植株)、种植、体细胞胚胎发育、基因、生长、竹亚科、动力学、繁殖、组织培养、多样性等,涉及竹子种类主要有禾本科、竹亚科、蒙罗竹和绿竹。这些关键词出现的年代大都在90年代,2011年以后有一些新的关键词出现,但词频大都只有1次,还没有形成明显的研究热点,就不再列举了。

4 结论与建议

通过上述文献分析结果,得出以下结论和建议:①竹子栽培文献的产出量,除了2011年发文有明显增长外,其余年份增长不明显,表现得不均衡,但从论文的被引用次数看,2009年后增长较明显,表明2009年以后竹子栽培研究在全球范围内越来越受到关注和重视。②从论文产生量看,从事竹子栽培研

究的主要国家有中国、印度、日本和美国，浙江农林大学、中国林业科学研究院、东京大学、印度科学与工业研究理事会和浙江大学等为主要研究机构，贝拿勒斯印度教大学、日本北海道大学、印度德里大学、印度科学与工业研究理事会、东京大学等机构的影响力较大。从知识图谱的中心性值看，日本北海道大学的国际合度较好，在国际竹子栽培研究中起着引领和主导作用。中国科学院、浙江农林大学、中国林业科学研究院、浙江大学这4家机构论文产出量居前，前3家机构研究的持续性较好。浙江农林大学论文产出量较高，研究持续性好，但篇均被引频次较低，主要原因是国内与国际合作度都较低，今后要加强国内外合作，扩大论文的影响力，在研究方向上也需跟国际热点和趋势接轨。③刊载竹子栽培研究论文的影响因子最高的期刊有6种，分别是 *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *BMC Plant Biology*, *Annals of Botany*, *Plant Cell Reports*, *Forest Ecology and Management*, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*。前3种期刊的期刊影响因子较高(超过3.0)，后3种期刊发文量较高(超过8篇)。很多高被引论文、最近4 a 的高被引论文发表在这几种期刊上，这几种期刊是研究人员应该重点关注，也是投稿首选的期刊。④从高被引论文分析结果得出，竹子生长模式与动力学、物理学与力学特性、系统发育、植株再生、快速繁殖、体外开花、体细胞胚胎发育、基因组等研究领域是具有较好的研究基础，引起了学者广泛关注。从近4 a 的高被引文献分析结果得出，竹子生长的相关因素(动力学、生态学、环境、土壤等)、基因组与系统发育、基因克隆等领域为持续性研究热点；竹子基因组序列、系统发育、基因鉴定、竹子生长与土壤汇碳等代表着竹子栽培研究的新趋势和方向。

5 参考文献

- [1] 陈光才, 马乃训. 竹子遗传育种研究进展[J]. 林业科学, 2005, **18**(6): 749 – 754.
CHEN Guangcai, MA Naixun. Advances in studies on genetics and breeding of bamboos [J]. *For Res*, 2005, **18**(6): 749 – 754.
- [2] SUNGKAEW S, STAPLETON C M A, SALAMIN, N, et al. Non-monophyly of the woody bamboos (Bambuseae; Poaceae): a multi-gene region phylogenetic analysis of Bambusoideae s.s [J], *J Plant Res*, **122**(1): 95 – 108.
- [3] 李运景. 基于引文分析可视化的知识图谱构建研究[M]. 南京: 东南大学出版社, 2009: 1 – 2.
- [4] 洪海娟, 万跃华. 数字鸿沟研究演进路径与前沿热点的知识图谱分析[J]. 情报科学, 2014, **32**(4): 54 – 58.
HONG Haijuan, WANG Yuehua. Knowledge mapping analysis of the evolution path and frontiers and focus of the digital divide research [J]. *Info Sci*, 2014, **32**(4): 54 – 58
- [5] 赵蓉英, 王菊. 图书馆学知识图谱分析[J]. 中国图书馆学报, 2011, **37**(2): 40 – 50.
ZHAO Rongying, WANG Ju. Knowledge mapping analysis of library science [J]. *J Lib Sci China*, 2011, **37**(2): 40 – 50.
- [6] 张哲, 沈月琴, 龙飞, 等. 森林碳汇研究的知识图谱分析[J]. 浙江农林大学学报, 2013, **30**(4): 567 – 577.
ZHANG Zhe, SHEN Yueqin, LONG Fei, et al. Knowledge mapping of research on forest Carbon sinks [J]. *J Zhejiang A & F Univ*, 2013, **30**(4): 567 – 577.
- [7] 严若谷, 周素红, 闫小培. 西方城市更新研究的知识图谱演化[J]. 人文地理, 2011, **122**(6): 83 – 88.
YAN Ruogu, ZHOU Suhong, YAN Xiaopei. The evolution of knowledge map of update research in western city [J]. *Human Geogr*, 2011, **122**(6): 83 – 88.

桂花花芽分化和花开放研究进展

王英, 张超, 付建新, 赵宏波

(浙江农林大学 风景园林与建筑学院, 浙江 临安 311300)

摘要: 桂花 *Osmanthus fragrans* 是中国最重要的观赏植物之一。桂花的花芽分化和花开放对环境条件要求各不相同, 使得这 2 个生物过程相对独立。综述了桂花花芽分化和花开放的相关研究进展, 并在此基础上, 结合笔者多年来在相关方面的研究结果, 总结了不同类型、性别品种的花芽分化和花开放的环境条件, 分析相关机制和原因, 以期为桂花后期相关研究提供参考。秋桂花芽分化在夏季高温季节进行, 相对低温能显著促进分化, 四季桂秋季开花的成花机制同于秋桂, 而其他季节开花则由不同机制控制; 花芽分化完成后花的开放需要感受足够的相对低温, 不同品种对气温的敏感性不同, 造成品种间花期不同。表 2 参 31

关键词: 植物学; 桂花; 花芽分化; 花开放; 环境因子; 综述

中图分类号: Q945.4; S718.3 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2016)02-0340-08

Progresses on flower bud differentiation and flower opening in *Osmanthus fragrans*

WANG Ying, ZHANG Chao, FU Jianxin, ZHAO Hongbo

(School of Landscape Architecture, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: *Osmanthus fragrans* is one of the most important ornamental plants in China. Due to the difference in the requirement to the conditions of environmental factors between flower differentiation and flower opening, these two processes are relatively independent in this species. Combining the previous references on flower bud differentiation and flower opening with our researches, we summarize the progresses on flower bud differentiation and flower opening and their environmental factors, and then simultaneously analyze the corresponding mechanism, hoping to provide an overview and useful information for approaching researches. Flower bud differentiation of one-blossom genotypes (at autumn) of *O. fragrans* is finished under relatively high-temperature at summer, and the relative low-temperature treatment can promote this process. The flower differentiation of autumn-blossom in multi-blossom genotypes is similar with the one-blossom ones, however the mechanism of other-season blossom is obviously different. Flowers open only after the receptivity of a certain amount of chilling at autumn. The sensitivity difference to chilling requirement among different genotypes leads to the variation of flowering time. [Ch, 2 tab. 31 ref.]

Key words: botany; *Osmanthus fragrans*; flower bud differentiation; flowers opening; environmental conditions; review

桂花 *Osmanthus fragrans* 是中国十大传统名花之一, 是集绿化、美化和香化为一体的园林树种, 在中国有悠久的栽培历史, 深受人们喜爱。目前, 桂花在中国秦岭—淮河流域以南地区广为栽培, 形成了浙江杭州、江苏苏州、湖北咸宁、四川成都和广西桂林五大桂花产区, 并在全国 26 个城市确定为市花。

收稿日期: 2015-05-05; 修回日期: 2015-06-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31101571, 31400598); 浙江省自然科学基金资助项目(Y3100332, LQ16C160003); 浙江农林大学科研发展基金人才启动项目(2014FR072)

作者简介: 王英, 从事园林植物种质资源研究。E-mail: 864833497@qq.com。通信作者: 赵宏波, 教授, 博士, 从事观赏植物遗传育种和植物繁殖生态研究。E-mail: zhaohb@zafu.edu.cn

在不同地区, 桂花在当地气候、地理等环境因子的塑造下, 加上人为的定向选育, 形成了丰富多样的品种。根据开花习性分为秋桂和四季桂2类, 秋桂类又可根据花色分为金桂(Luteus group, 黄色至金黄色系, RHS CC 1~8), 银桂(Albus group, 黄白至黄色系, RHS CC 9~20)和丹桂(Aurantiacus group, 橙色至橙红色系, RHS CC 21~25)品种群, 各品种群下品种众多, 品种间的观赏特性各具特色^[1-2]。关于桂花花芽分化和开花前的环境条件等问题已有较多报道。万先云^[3]、王彩云等^[4]、杨秀莲等^[5]、刘海龙等^[6]、李瑾等^[7]、朱倩^[8]、XU等^[9]等对不同品种桂花的花芽分化过程进行了研究, 基本明确了花芽分化和发育过程。桂花在花芽分化完成之后, 花的开放需要特殊的环境条件, 因此, 造成其花期在同一地区不同年份波动较大, 难以预测。关于花开放的环境条件有一定的报道, 通过对不同年份桂花花期记录和气象数据综合分析, 初步得出相对低温是控制桂花展花的决定因子^[10-13]。为了更好地总结和归纳桂花花芽分化的基本规律和花开放的基本条件, 为今后桂花的花期调控、开花机制和种质创新奠定基础, 本文综述了与开花密切相关的花芽分化和花开放方面的研究进展。

1 桂花花芽分化

植物开花的先决条件是花芽分化, 它是一个极其复杂的生理生化和形态分化的过程^[14]。花芽分化是指成花过程中的花原基的分化和花器官(萼片、花瓣、雄蕊、雌蕊)的形成这2个形态分化时期。花芽分化的时期一般是根据各部分原基的出现来划分的, 其分化速率反映了植物本身的节律和特性^[15]。通过对桂花花芽分化过程的研究, 明确其分化特点, 有助于有效控制开花期。最早对桂花花芽分化进行报道的是万先云^[3]。此后, 不同研究者对不同品种群的不同品种的花芽分化进行了大量的研究(表1)^[4-9, 16]。

表1 桂花不同品种花芽分化进程

Table 1 Flower bud differentiation process of different cultivars in *Osmanthus fragrans*

品种	分化期						总时间	参考文献
	苞片(总苞)	花序	小花	(顶花)花萼	(顶花)花瓣	雄蕊		
金桂	6月24日 -7月1日	7月1-8日	7月8日	7月15日		7月15日- 8月5日	7月29日- 8月19日	近3个月
厚瓣金桂	4月中旬-5月初	6月下旬	7月初	7月中上旬	7月中下旬	7月下旬-8月 下旬	8月底	4个月
多芽金桂	6月底	6月底至 7月初	7月初	7月中旬	7月26日	8月上旬	8月中旬	近3个月
小叶苏桂	6月底	7月上旬		7月中旬	7月下旬	8月中下旬		3个月
籽银桂	5月中旬		7月初-中 旬			8月上-下 旬	8月中旬- 10月上旬	6个多月
晚籽银桂	6月底	6月底-7月初	7月初	7月中旬	7月26日	8月上旬	8月中旬	近3个月
早银桂	6月底	6月底-7月初		7月上旬	7月中旬	8月初	8月中下旬	3个月
丹桂	5月中旬		7月初-中 旬			8月上-下 旬	8月中旬- 10月上旬	6个多月
天香台阁	5月15-27日		7月初		7月中旬	8月初	8月中下旬	月5个月
雄性品种	6月15-22日	6月23日- 7月6日	6月27-30日	6月28-7月 12日	7月6日-8月 7日	7月15日- 9月3日		近3个月
两性品种	6月19-26日	6月27日- 7月15日	7月14-17日	7月16-30日	7月20日- 8月19日	7月26日- 9月6日		近3个月

1.1 花芽分化时期及其持续时间

有关桂花花芽分化时期的划分, 不同报道基本相同, 但花芽分化起始和持续的时间有所不同。大部分研究者认为桂花的花芽分化时期应分为7个时期即苞片(总苞)分化期、花序分化期、小花分化期、顶

花花萼分化期、花瓣分化期、雄蕊分化期和雌蕊分化期(表1)^[4-7]。从分化进程来看,具有慢—快—慢的特点,苞片分化时间最长,花序、小花、花萼至花瓣分化较快,而后期雄蕊和雌蕊(或退化雌蕊)的发育较慢^[4,16]。

不同品种花芽分化所需时间不同报道也有所不同。万先云^[3]对金桂一品种的花芽分化过程研究后认为,其分化始于6月下旬,7月初形成花序原基,7月中上旬形成花萼原基及花冠原基,7月中旬至8月初形成雌蕊原基,7月下旬至8月中旬形成心皮原基。而‘厚瓣金桂’从4月中旬开始至8月底完成,历时4个月^[4];‘晚籽银桂’的花芽分化从6月下旬开始苞片分化,至9月初雌蕊形成历时近3个月^[5]。李瑾等^[7]认为桂花4月中旬开始进入分化初始期,9月下旬结束,历时6个多月。曹际云^[16]对不同品种群6个品种花芽分化研究后,认为桂花于5月初开始进入苞片分化期,9月中旬结束,历时约5个月。XU等^[9]研究认为无论雄花还是两性花花芽分化从6月上中旬开始,至8月底到9月初结束,均需要持续近3个月;且两性株花的发育总要滞后于雄株。

聚伞花序中不同小花分化进程不同,侧花发育均明显滞后于顶花^[5-6,9]。在同一个花序中,顶花先分化,但分化时间较长,侧花约晚1周分化,但分化较快;叠生芽中位置较上者分化早,需时长,较下者分化晚,但需时短;因此,最终到9月初同一花序内的不同发育进程基本一致,不同位置的花朵几乎同时开放^[4]。

尽管不同地区、不同品种的花芽分化存在一定的差异,但是比较不同品种的花芽分化特性与叶芽和花芽的发育特性,笔者认为苞片分化为花芽和叶芽所共有,且苞片的出现远早于内部的阶段转变,因此此时期不宜作为桂花的花芽分化时期之一。因此,桂花的花芽分化应始于苞片内顶端分生组织细胞的浓缩和分裂而伴随着的花序原基出现,即在杭州地区大部分品种从6月上旬开始进入花芽分化,至8月底到9月初完成,历时近3个月。

1.2 秋桂和四季桂花芽分化的异同

四季桂因其1a能开多次花且花序具有总梗而区别于秋桂。关于四季桂的花芽分化报道较少,李瑾^[17]和曹际云^[16]报道了四季桂秋季花的花芽分化过程,而关于其他季节的花芽分化仅见于朱倩等^[8]的相关报道。四季桂在不同的开花季节中,秋季(与秋桂同期)的开花特性和其他季节的开花特性明显不同;秋季的花芽分化和开花特性与秋桂基本一致^[16-17],在叶腋处形成花芽,从6月初进入花芽分化,至9月完成^[8],形成的花序亦无总梗;而其他季节的花芽分化和开花特性明显不同,在枝顶或靠近枝顶的叶腋形成花芽,且花序具有总梗。

四季桂‘天香台阁’除了秋季花期外,还能在冬、春和夏季多次开花,夏季的花花径大,花中藏叶、花中有花^[18]。其在秋季花期除了有与秋桂类相同的普通花芽外(为单芽单花序),还包含一类单芽多花序的特殊花芽,使得这一品种的开花量明显多于其他相关品种,这2类花芽的分化过程与秋桂相近,均是在春梢封梢后,逐渐从营养生长转向生殖生长,进入花芽分化,在叶腋处形成花芽,最终在9月下旬完成花芽分化;而夏季形成开放的叶状花是在当年生春梢封梢后,在其顶端快速抽生出的新枝条上形成的,花芽随着枝条的生长而迅速分化,并逐渐开放,整个过程不超过1个月。由于新的枝条会不断的形成,所以叶状花会从6月陆续开放直至8月^[8]。因此,夏季形成的花芽及其开花过程与秋季明显不同,应是由不同的花芽分化机制分别控制。

1.3 不同品种的花芽分化

不同品种花芽分化在形态上差异不明显,但在时间上变化很大,因此才会出现桂花的早开花和晚开花^[16]。不同品种的发育进程存在一定的差异:‘早银桂’品种约在6月底完成苞片分化,接着进入花序分化,花序分化历时较短,集中在6月底到7月初,7月上旬完成顶花花萼分化,7月中旬完成顶花花瓣分化,8月初雄蕊开始分化,8月中旬雄蕊的花药形成,8月中下旬雌蕊开始发育;‘小叶苏桂’的花序分化相对较慢,6月底完成苞片分化,而花序分化则在7月上旬后完成,7月中旬和下旬分别完成顶花花萼和花瓣的分化,8月上旬至中旬侧花花萼及花瓣分化完成,8月中下旬顶花雄蕊原基首先发育,顶花雄蕊发育期间各侧花并无明显变化,其侧花的雄蕊发育明显滞后于顶花^[6]。笔者经过多年实际观察,认为不同品种花芽分化进程略有不同主要是由于品种自身营养积累状况和对温度的敏感性不同造成,但所有品种均能在9月中旬前完成花芽分化,因此造成不同品种花期的早晚并不是由于花芽分化的

快慢, 而是不同品种对温度的敏感性不同造成。

1.4 不同性别的花芽分化

桂花具有特殊的性系统——雄全异株, 即雄性与两性异株^[19]。通过比较雄性和两性植株花芽分化后, 发现雄蕊的发育在两性品种和雄性品种之间基本没有区别, 都能形成正常的花粉囊和成熟的花粉粒, 但雌蕊的发育存在明显的差别。

可育的‘籽银桂’心皮原基出现时就是1个突起, 而后继续发育成完整的雌蕊即正常的柱头、花柱和子房; 而不育的‘丹桂’雌蕊心皮原基出现时是2个突起, 且是分离的, 而后继续发育也不愈合, 形成2片叶状体, 没有柱头、花柱和子房的存在^[7]。能育的‘晚籽银桂’雌蕊原基出现时是愈合在一起的1个突起, 而后继续发育成完整的雌蕊; 而‘多芽金桂’的雌蕊原基是分离的2个突起, 继续发育成2片完全分离的叶状体, 开花后可见发育不全的柱头^[5]。曹际云^[16]研究了四大品种群6个品种, 发现在雄蕊的发育过程中, 6个品种间没有区别, 雌蕊的发育存在明显的差异: 可育的‘籽金桂’‘籽银桂’和‘四季桂’心皮原基出现时就是一个突起, 而后继续发育成完整的雌蕊; 而不育的‘普通金桂’‘早银桂’和‘硬叶丹桂’雌蕊心皮原基出现时是2个突起, 是分离的, 而后继续发育也不愈合, 形成2片叶状体, 没有柱头、花柱和子房的存在。XU等^[9]通过比较不同性别的品种的花芽分化后, 认为2种性别的桂花最重要的差异在于心皮分化晚期, 分化前期无论两性还是雄性均从雄蕊内两侧逐渐形成2个分离的心皮原基, 随着分化逐渐进行, 两性花的2个分离的心皮逐渐融合形成正常的雌蕊; 而雄性花的2个分离的心皮不随发育的进行而融合, 最终只形成2个苞片状的组织以及1个空腔。

1.5 花芽分化与气温的关系

花芽分化与气温有密切关系。有研究发现, 在蝴蝶兰花芽分化过程中进行低温诱导可以促进其体内一系列的生理生化变化, 从而为花芽分化提供物质和能量^[20]。低温不仅能够诱导植物的成花转变, 促进植物由营养生长转向生殖生长, 同时还会诱导花芽分化过程中一系列的生理生化过程, 促进植物的花芽分化。桂花在其当年生春稍封稍后随即进入花芽分化阶段, 随着逐渐分化于9月初基本完成, 在这一过程中外界环境温度逐渐升高并较长一段时间维持在较高的水平。刘海龙等^[6]认为: 高温对‘小叶苏桂’的雌、雄蕊分化有明显的抑制作用, ‘小叶苏桂’的侧花雄蕊、雌蕊的分化与发育可能在较低温时才启动并快速完成; 而‘早银桂’的侧花在较高的气温条件时就已经开始分化和发育。我们研究发现, 相对低温(低于当时的环境温度)能大大促进桂花‘堰虹桂’和‘玉玲珑’的花芽分化, 且这种促进作用会随着花芽分化程度增加逐渐增强。因此, 桂花花芽分化对环境温度并无特殊的要求, 但相对低温能显著促进花芽分化进程。

2 桂花花开放及其所需的环境条件

2.1 花开放进程

桂花的花是其最重要的观赏器官, 桂花自然花期为9~10月, 花期短, 一般为5~8 d, 花朵寿命也较短^[21~22]; 单株的开花同步性强, 部分品种有分批开放的现象^[23]; 不同品种却不尽相同, 花期常有早晚之别; 四季桂更与秋桂不同, 有多季开花的特性, 然在同一批次开放的花朵中, 所有花的发育和开放进程基本一致。杨康民等^[24]将桂花整体开花过程分为以下10个时期: 花芽萌发期、圆珠期、顶壳期、铃梗期、香眼期、初花期、盛花初期、盛花期、盛花末期和花谢期。而单花开花至衰老大致分为5个时期: ①铃梗期: 花未开放, 呈花蕾状态, 花白色或浅黄色; ②初花期: 花微开放, 花色变深, 有香味溢出; ③盛花期: 花开放至最大, 花色最深, 呈金黄色, 花香最浓; ④盛花末期: 花瓣开始褪色, 出现褐色斑点, 花药已经裂开, 香味逐渐消失, 花大量开始脱落; ⑤萎蔫期: 花瓣萎蔫焦枯, 花色完全变褐^[22]。笔者在前人的基础上, 根据多年的观察统计及相关时期划分难易程度以及持续时间, 认为将整体开花进程分为以下7个时期较为合理, 即圆珠期、顶壳期、铃梗期、香眼期、初花期、盛花期和衰老期; 而杨康明等^[24]提到的花芽萌发期、盛花初期、盛花末期, 由于与其他邻近时期难以界定, 故舍去。相关时期花芽发育过程的描述在杨康民等^[24]和李瑾^[17]的基础上, 作一定的调整; 但由于受温度的影响较为敏感, 不同时期可能存在交叉或持续时间较短, 因而不同时期划定的临界值在不同条件下应根据实际情况做适当调整。①圆珠期: 芽体外侧的2片鳞芽开裂度加大, 芽体成球形或椭球形, 其数量占花芽总量

50%以上。圆珠期是桂花开花的明显先兆,花前大概半个月时间。②顶壳期:圆珠花芽继续生长增大,两侧鳞片先后散落;逐渐可见每个小花表层包被的黄褐色膜质苞片,但此时小花花梗未明显延长;当全树30%以上的花芽顶壳出现花蕾时称之为顶壳期。花前约1周时间。③铃梗期:聚伞花序开始分散延伸,小花花梗明显变长,梗色由青变黄;膜质苞片大量散落到地面,但小花顶端未见开口,相关花芽的比例达到30%以上。花前3~5 d。④香眼期:聚伞花序的每朵小花彼此开始分离,花冠外形发育完全,小花顶端开始出现开口,但仍成包裹状态未完全张开,相关状态花芽的比例达到30%以上。观察对象为花芽内的顶花。花前约1 d。⑤初花期:花约15%开放(花张开程度超过一半),大部分处于半闭合状态,花色较淡,香气浓郁。观察对象为花芽内的顶花。⑥盛花期:50%以上花完全开放。⑦衰老期:花全部开放,花色转淡,香味顿减,大部分花的花药褐化、萎蔫,雄性品种花冠裂片和花梗开始脱落。

2.2 花开放的环境条件

曹际云^[16]认为不同品种的花芽分化进程在时间上的差异,造成早开花和晚开花。而实际上,桂花花开放是一个较为特殊的过程,花芽分化和花开放相对独立,花芽分化完成后花的开放需要特殊的环境条件。前人的相关研究表明,气温、相对湿度、日照等环境因子对桂花的花期有明显影响(表2)^[10-12];在这些气象条件下,气温是影响桂花开花的主导因子,水分对桂花开花也极为重要^[12]。杨康民等^[24]早在1986年就提出桂花花期及其历时长短,均与花前的气象条件特别是温湿度密切相关。姜纪红等^[10]认为桂花开花与气温最为相关,气温指标主要是平均气温和最低气温。李军等^[11]认为桂花开花与温度和湿度最为相关,气温指标主要是最低气温和平均气温,湿度指标主要是相对湿度,初花期需要一定的低温积累。郝日明等^[12]运用主成分分析法研究了影响南京地区桂花秋季开花的主要气候因子,认为桂花开花期与开花前周平均最低气温有较大关系,开花前4周的周平均最低温度持续走低有利于开花,尤其是开花前1周的周平均最低气温持续在18.0 °C以下时,桂花进入盛花期,剧烈的气温波动不利于开花;同时,开花前适宜的降水增加了空气相对湿度,能促进开花,降水量过大则延迟开花。吴炫柯等^[13]利用柳州市近10 a(1995~2005年)的9月上、中、下旬的平均气温、降水量、降雨日数、平均最低气温、平均相对湿度以及桂花盛花期的物候资料,采用逐步回归法分析各气象因子对桂花花期的影响,认为影响桂花盛花期的主要气象因子是9月中旬平均气温、9月中旬平均最低气温和9月上旬平均最低气温。张凌云等^[25]通过分析1997~2007年广西融安县的气象数据和桂花物候期观测资料,认为桂花小花花蕾出现期与9~10月冷空气活动密切相关,22.0 °C是花蕾出现的界限温度。王玉勤等^[26]、董立格等^[27]则认为启动低温及启动低温之后的温度是影响桂花开花的2个最主要因素,开花前5~7 d的最低气温为开花的启动低温。

总之,桂花开花前的气象条件特别是气温和相对湿度对桂花的开花有着十分重要的影响,掌握好气象条件能够帮助我们对桂花的花期做出及时又准确的预测。

2.3 不同品种花开放对气温的敏感性

花芽分化完成后,且发育到某种程度之后,日最低气温降至启动低温是进入花期的关键,表现为圆珠期花芽迅速膨大,进入顶壳期;顶壳期之后,对低温要求不严格^[27]。不同品种桂花花芽分化以及花发育的起止时间不同,对气温的敏感度不同即启动低温不同,因此其花期出现时间不同^[27]。而四季桂秋季的花芽分化完成后,与秋桂一样也需要获得足够的冷量之后才能开放,而其他季节的花芽随着生长即能开放,因此,决定开花的因子主要是花前的营养积累。

姜纪红等^[10]发现杭州地区早秋桂类品种与晚秋桂类品种开花的气象指标存在着一定的差异,其中前者的指标为开花前10 d平均气温低于26.0 °C,且最低气温小于24.0 °C,后者为开花前10 d的平均气温低于23.0 °C,且最低气温小于20.0 °C。王玉勤等^[26]认为上海地区‘早银桂’开花启动低温一般在19.0~21.0 °C,‘晚银桂’通常在17.0~19.0 °C。在苏州地区,‘晚银桂’和‘早银桂’初花期存在显著的相关,平均初花期‘晚银桂’比‘早银桂’迟15 d;‘早银桂’初花的气候指标为日最低气温10 d滑动平均稳定23.0 °C,同时日最低气温<22.0 °C,满足这指标之后3~12 d早银桂初花,或当日最低气温10 d滑动平均稳定在23.0~25.5 °C,同时日平均相对湿度88%连续在3 d(包括3 d)以上,在这日期之后的12 d内早银桂初花;‘晚银桂’初花的气候指标为当日最低气温9 d滑动平均稳定20.0 °C,同时日最低气温<19.5 °C,满足这指标后4~12 d‘晚银桂’初花,或当日最低气温9 d滑动平均稳定在20.0~21.5

℃, 同时日平均相对湿度88%连续在3 d(包括3 d)以上, 在这日期之后的6 d内晚银桂初花^[11]。董立格等^[27]发现‘早银桂’由圆珠期进入顶壳期前1~2 d启动低温 ≥ 24.4 ℃, ‘早籽银桂’、‘雄黄桂’启动低温 ≥ 20.1 ℃, ‘晚银桂’‘金球桂’‘金狮桂’启动低温 ≥ 20.1 ℃。

综上所述, 秋桂类品种和四季桂类品种秋季在花芽分化完成后花的开放需要特殊的环境条件, 其中花前一段时间的相对低温是必要因子, 同时这一低温需要维持一段时间才能发挥作用, 这一现象我们已经在一些品种上利用人工处理加以验证。这一时期的相对湿度是否是必要条件则需要进一步研究加以证实。同时, 不同品种由于对温度的敏感程度不同, 对相对低温的临界温度及其持续时间亦有所不同。

表2 不同地区桂花花期与温、湿度的关系

Table 2 Relationship of flowering time of *Osmanthus fragrans* with temperature and humidity in different geographic regions

地区	观测年份	品种	气象条件	历时/d	参考文献
浙江杭州	1991~2000	早秋桂	平均气温26.0 ℃, 最低气温低于24.0 ℃	10	[10]
浙江杭州	1991~2000	晚秋桂	平均气温23.0 ℃, 最低气温低于20.0 ℃	10	[10]
江苏南京	2000~2005	桂花	平均最低气温 <8.0 ℃	7	[12]
江苏苏州	1956~1984	早银桂	花前10 d平均气温 ≤ 23.0 ℃, 且最低气温 <22.0 ℃	3~12	[11]
	1999~2003		花前10天平均气温为23.0~25.5 ℃, 且平均相对湿度88%以上持续3 d以上	12	
江苏苏州	1956~1984	晚银桂	花前9 d平均气温 ≤ 20.0 ℃, 且最低气温 <19.5 ℃	4~12	[11]
	1999~2003		花前9天平均气温20.0~21.5 ℃, 且平均相对湿度88%以上持续3 d以上	6	
广西融安	1997~2007	—	初次寒露风, 界限气温22.0 ℃, 降水	2~8	[25]
上海	2004~2009	早银桂	启动低温及之后气温19.0~21.0 ℃		[26]
上海	2004~2009	晚银桂	启动低温及之后气温17.0~19.0 ℃		[26]
四川温江	1970~2009	早桂	平均气温 <27.0 ℃, 且最低气温 <24.0 ℃, 累计降水量 ≥ 64.7 mm, 雨日 >6 d	10	[28]
四川温江	1970~2009	晚桂	平均气温 <23.0 ℃, 且最低气温 <20.0 ℃, 累计降水量 ≥ 41.6 mm, 雨日 >5 d	10	[28]

3 结论

桂花的花芽分化基本过程可以分为花序分化期、小花分化期、花萼分化期、花瓣分化期、雄蕊分化期和雌蕊(退化雌蕊)分化期等6个时期。四季桂具有多次开花的现象, 秋季(与秋桂同期)的花芽分化和开花特性与其他季节的开花特性明显不同, 秋季的花芽分化和开花特性与秋桂基本一致。在杭州地区, 大部分秋桂品种从6月上旬开始进入花芽分化, 至8月底到9月初完成, 历时近3个月。不同品种花芽分化进程略有不同主要是由于品种自身营养积累状况和对气温的敏感性不同造成; 花芽分化对气温、相对湿度等环境条件没有特殊要求, 但相对低温能显著促进花芽分化。不同性别的品种花芽分化存在一定的差异, 主要表现在雌蕊(退化雌蕊)的分化和发育上: 无论是雄性品种还是两性品种, 分化前期即从花序分化期到雄蕊分化期均表现为两性状态, 且之间无显著差异, 雌蕊分化期才表现出显著的不同。

桂花完成花芽分化后, 花的开放需要有合适的温度条件。其中, 相对低温及其持续的时间是花开放的必要条件, 相对湿度对花的开放也有一定的影响。不同品种对气温的敏感性不同造成花期的早晚。花芽在感受足够的相对低温后逐渐开放, 整体开花进程可分为圆珠期、顶壳期、铃梗期、香眼期、初花期、盛花期和衰老期等7个时期。

植物的成花转变和花开放及其调控机制一直以来都是研究的重点和热点^[29~31]。桂花的花芽分化和花开放既有其物种自身的特殊性, 也有常绿木本植物的普遍性; 同时, 其种下变异丰富, 拥有不同类型的品种, 也即拥有不同的花芽分化和花开放机制。因此, 深入研究不同类型品种的花芽分化和花开放及其调控机制以及与环境因子的关系, 不仅有助于了解该物种的一些重要生物学现象以及后期的应用, 也将对热带起源温度分布种开花的适应性进化提供参考。

4 参考文献

- [1] 向其柏, 刘玉莲. 中国桂花品种图志[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 2008.
- [2] 杨康民. 中国桂花[M]. 北京: 中国林业出版社, 2011.

- [3] 万云先. 桂花花芽分化的研究[J]. 华中农业大学学报, 1988, 7(4): 364 – 366.
WANG Yunxian. A preliminary observation on the flower bud differentiation of *Osmanthus fragrans* [J]. *J Huazhong Agric Univ*, 1988, 7(4): 364 – 366.
- [4] 王彩云, 高莉萍, 鲁涤非, 等. ‘厚瓣金桂’桂花花芽形态分化的研究[J]. 园艺学报, 2002, 29(1): 52 – 56.
WANG Caiyun, GAO Liping, LU Difei, et al. A study on morphological differentiation of flower bud of *Osmanthus fragrans* ‘Houban Jingui’ [J]. *Acta Hortic Sin*, 2002, 29(1): 52 – 56.
- [5] 杨秀莲, 向其柏. ‘晚籽银桂’和‘多芽金桂’花芽的形态分化[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2007, 31(5): 105 – 108.
YANG Xiulian, XIANG Qibai. Morphological differentiation of flower bud of *Osmanthus fragrans* ‘Wanzi Yingui’ and ‘Duoya Jingui’ [J]. *J Nanjing For Univ Nat Sci Ed*, 2007, 31(5): 105 – 108.
- [6] 刘海龙, 宗敏, 宣子灿, 等. ‘早银桂’与‘小叶苏桂’桂花花芽形态分化的比较[J]. 园艺学报, 2007, 34(6): 1559 – 1562.
LIU Hailong, ZONG Min, XUAN Zican, et al. Morphological differentiation of flower bud of *Osmanthus fragrans* ‘Zao Yingui’ and ‘Xiaoye Sugui’ [J]. *Acta Hortic Sin*, 2007, 34(6): 1559 – 1562.
- [7] 李瑾, 董美芳, 尚富德. ‘丹桂’和‘籽银桂’花芽分化的研究[J]. 植物学通报, 2007, 24(5): 620 – 623.
LI Jin, DONG Meifang, SHANG Fude. Study on the flower bud differentiation of *Osmanthus fragrans* ‘Dangui’ and *O. fragrans* ‘Ziyingui’ [J]. *Chin Bull Bot*, 2007, 24(5): 620 – 623.
- [8] 朱倩, 董美芳, 袁王俊, 等. ‘天香台阁’桂花花芽分化及其台阁形成过程的观察[J]. 园艺学报, 2012, 39(2): 315 – 322.
ZHU Qian, DONG Meifang, YUAN Wangjun, et al. Studies on flower bud differentiation and leaflike proliferate-flower bud of *Osmanthus fragrans* ‘Tianxiang Taige’ [J]. *Acta Hortic Sin*, 2012, 39(2): 315 – 322.
- [9] 徐一春, 周利华, 余少青, 等. 雄蕊和雌蕊的分化与发育对桂花雄蕊化的影响[J]. 植物学报, 2014, 300: 843 – 849.
XU Yichun, ZHOU Lihua, HU Shaoqing, et al. The differentiation and development of pistils of hermaphrodites and pistillodes of males in androecious *Osmanthus fragrans* L. and implications for the evolution to androecy [J]. *Plant Syst Evol*, 2014, 300: 843 – 849.
- [10] 姜纪红, 朱明, 楼茂园, 等. 桂花开花与花前气象条件的关系[J]. 浙江农业科学, 2002(5): 225 – 227.
JIANG Jihong, ZHU Ming, LOU Maoyuan, et al. Relationship of climatic indices and blooming of *Osmanthus fragrans* [J]. *J Zhejiang Agric Sci*, 2002(5): 225 – 227.
- [11] 李军, 杨秋珍, 杨康民. 银桂初花物候期的气候条件[J]. 植物生态学报, 2006, 30(3): 421 – 425.
LI Jun, YANG Qiuzhen, YANG Kangmin. Climatic indices for initial flowering in *Osmanthus fragrans* [J]. *J Plant Ecol*, 2006, 30(3): 421 – 425.
- [12] 郝日明, 张璐, 张明媚, 等. 影响南京地区桂花秋季开花期变化的关键气候因子研究[J]. 植物资源与环境学报, 2006, 15(3): 31 – 34.
HAO Rimeng, ZHANG Lu, ZHANG Mingjuan, et al. Study on key climate factors influencing blooming of *Osmanthus fragrans* at autumn in Nanjing [J]. *J Plant Resour Environ*, 2006, 15(3): 31 – 34.
- [13] 吴炫柯, 段毅强, 李家文, 等. 桂花盛花期预报方法初探[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(27): 8482, 8484.
WU Xuanke, DUAN Yiqiang, LI Jiawen, et al. Preliminary research on the prediction of *Osmanthus fragrans* full flowering stage [J]. *J Anhui Agri Sci*, 2007, 35(27): 8482, 8484.
- [14] 鄢爱玲, 李建安, 刘儒, 等. 高等植物花芽分化机理研究进展[J]. 经济林研究, 2010, 28(2): 131 – 136.
GAO Ailing, LI Jian'an, LIU Ru, et al. Advances in research on flower bud differentiation mechanism in higher plants [J]. *Nonwood For Res*, 2010, 28(2): 131 – 136.
- [15] 吴莉英, 唐前瑞, 尹恒, 等. 观赏植物花芽分化研究进展[J]. 生物技术通讯, 2007, 18(6): 1064 – 1067.
WU Liying, TANG Qianrui, YIN Heng, et al. Flower bud differentiation mechanism of ornamental plants [J]. *Lett Biotechnol*, 2007, 18(6): 1064 – 1067.
- [16] 曹际云. 桂花不同栽培变种的成花条件及花器官发育的形态解剖学研究[D]. 济南: 山东大学, 2008.
CAO Jiyun. *The Study on the Qualification of Floral Formation and Development of Floral Organs of Osmathus fragrans* [D]. Jinan: Shandong University, 2008.
- [17] 李瑾. 桂花花芽分化的研究[D]. 开封: 河南大学, 2007.
LI Jing. *Study on the Flower Bud Differentiation of *Osmanthus fragrans* Lour.* [D]. Kaifeng: Henan University, 2007.

- [18] 鲍志贤, 陈世强, 杨康民. 桂花新品种‘天香台阁’. 园艺学报, 2002, **29**(4): 400.
BAO Zhixian, CHEN Shiqiang, YANG Kangmin. A new cultivar of sweet *Osmanthus fragrans* ‘Tianxiang Taige’ [J]. *Acta Hortic Sin*, 2002, **29**(4): 400.
- [19] 郝日明, 赵宏波, 王金虎, 等. 野生桂花繁育系统的观察和研究[J]. 植物资源与环境学报, 2011, **20**(1): 17 – 24.
HAO Riming, ZHAO Hongbo, WANG Jinhu, et al. Observation and study on breeding system of wild *Osmanthus fragrans* [J]. *J Plant Resour Environ*, 2011, **20**(1): 17 – 24.
- [20] 刘晓荣, 王碧青, 朱根发, 等. 高山低温诱导蝴蝶兰花芽分化过程中的生理变化[J]. 中国农学通报, 2006, **22**(4): 310 – 313.
LIU Xiaorong, WANG Biqing, ZHU Genfa, et al. Changes of physiology during the cool temperature inducement on bud differentiation of *Phalaenopsis orchid* [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2006, **22**(4): 310 – 313.
- [21] 程正渭. 桂花花瓣衰老过程的生理生化及细胞学初步研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2003.
CHENG Zhengwei. *Study on the Physiological, Biochemical and Cytology Change during Petal Senescence of Osmanthus fragrans* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural Universtiy, 2003.
- [22] 周媛. 桂花花瓣衰老过程中细胞程序性死亡特征与机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
ZHOU Yuan. *Researches on Characters and Mechanism of Programmed Cell Death (PCD) during the Petal Senescence in Osmanthus fragrans* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural Universtiy, 2008.
- [23] 张洪伟. 桂花传粉生物学研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2013.
ZHANG Hongwei. *Pollination Biology of Osmanthus fragrans Lour.* [D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2013.
- [24] 杨康民, 朱文江, 蒋永明, 等. 桂花开花物候期的划分及其采收期的调查研究[J]. 园艺学报, 1986, **13**(4): 271 – 275.
YANG Kangmin, ZHU Wenjiang, JIANG Yongming, et al. Observations on the blooming phenology and the time of harvesting of the flower of *Osmanthus fragrans* [J]. *Acta Hortic Sin*, 1986, **13**(4): 271 – 275.
- [25] 张凌云, 夏小曼. 融安县桂花花期特征及其与秋季低温关系初探[J]. 气象研究与应用, 2009, **30**(增刊1): 126 – 127.
ZHANG Lingyun, XIA Xiaoman. Relationship of low temperature in autumn and blooming characteristics of *Osmanthus fragrans* [J]. *J Meteorol Res Appl*, **30**(supp 1): 126 – 127.
- [26] 王玉勤, 胡永红. 上海地区桂花花期与气候因子研究[G]//张启翔. 中国观赏园艺研究进展 2011. 北京: 中国林业出版社, 2011: 768 – 771.
WANG Yuqin, HU Yonghong. Study of temperature influence on blooming of *Osmanthus fragrans* in Shanghai [G]// ZHANG Qixiang. *Advances in Orrnamantal Horticulture of China* 2011. Beijing: Chinese Forestry Press, 2011: 768 – 771.
- [27] 董立格, 王贤荣, 丁雨龙. 桂花花期物候研究[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2014, **38**(增刊): 51 – 56.
DONG Lige, WANG Xianrong, DING Yulong. Study on the *Osmanthus fragrans* blooming season phenology [J]. *J Nanjing For Univ Nat Sci Ed*, 2014, **38**(supp): 51 – 56.
- [28] 荣韧. 温江桂花开花的气象条件分析及栽培技术防御措施[J]. 宁夏农林科技, 2012, **53**(12): 248 – 250.
RONG Ren. Analysis on meteorological condition of *Osmanthus fragrans*, cultivation technology and defensive measures in Wenjiang [J]. *Ningxia J Agric For Sci Technol*, 2012, **53**(12): 248 – 250.
- [29] NAGPAL P, ELLIS C M, WEBER H, et al. Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation [J]. *Development*, 2005, **132**: 4107 – 4118.
- [30] WANG Renhou, FARRONA S, VINCENT C, et al. *PEP1* regulates perennial flowering in *Arabis alpina* [J]. *Nature*, 2009, **459**(7245): 423 – 427.
- [31] ZHOU Chuanmiao, ZHANG Tianqi, WANG Xi, et al. Molecular basis of age-dependent vernalization in *Cardamine flexuosa* [J]. *Science*, 2013, **340**(6136): 1097 – 1100.

小麦粒重形成的分子调控机制研究综述

魏 玮¹, 郭嘉莲¹, 万琳涛², 徐林峰³, 丁明全¹, 周 伟¹

(1. 浙江农林大学 农业与食品科学学院/浙江省农产品品质改良技术研究重点实验室, 浙江 临安 311300; 2. 浙江省开化县农作物技术推广站, 浙江 开化 324300; 3. 浙江勿忘农种业科学研究院有限公司, 浙江 杭州 310020)

摘要: 粒重是小麦 *Triticum aestivum* 产量构成的三大要素之一, 是由多基因控制的数量性状, 极易受环境因素的影响。国内外学者围绕粒重形成的遗传特征和分子调控机制进行了大量研究, 也取得了一些研究进展。如何高效地利用前人的研究成果进行不断创新以提高小麦单产是育种工作者重要的研究课题。围绕小麦粒重形成的构成要素、遗传特征、QTLs(quantitative trait loci, QTLs)遗传定位、籽粒质量形成候选基因的克隆与分子调控机制解析等方面的研究展开综述; 同时总结了以往研究过程中存在的问题, 并结合自身研究对研究前景进行分析后指出: 为了从分子水平上全面阐明小麦粒重形成的调控机制, 后续研究首先应在小麦粒重形成的关键时期对籽粒激素的变化特征进行全面分析; 其次要利用全基因组关联分析和高通量测序技术进一步开发与性状密切相关联的 SNP 标记 (single nucleotide polymorphism, SNP); 最后结合作物群体进行表型与 SNP 分析技术为基础的基因型关联性分析, 对粒重形成候选主效基因进行精细定位、图位克隆和功能解析。表 1 参 52

关键词: 作物遗传育种; 小麦; 粒重; 产量; 分子调控; 综述

中图分类号: S512.1 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2016)02-0348-09

Research progress on molecular regulation mechanism of grain weight formation in wheat

WEI Wei¹, GUO Jialian¹, WAN Lintao², XU Linfeng³, DING Mingquan¹, ZHOU Wei¹

(1. The Key Laboratory for Quality Improvement of Agricultural Products of Zhejiang Province, School of Agriculture and Food Science, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 2. The Crop Technical Extension Station of Kaihua County, Kaihua 324300, Zhejiang, China; 3. Zhejiang Wuwangnong Seeds Science Research Institute Co., Ltd., Hangzhou 310020, Zhejiang, China)

Abstract: Grain weight (GW), a quantitative trait determined by several genes, is one of three key wheat yield components and is sensitive to environmental variation. Researchers at home and abroad have done many studies on the genetic traits and molecular regulation mechanism of GW formation, and have made some research progress. How to make innovations to improve unit yield of wheat based on the existing research is an important work for the researchers. In this study, the latest research progresses on components, genetic traits, genetic mapping of QTLs (quantitative trait loci, QTLs), candidate gene cloning and molecular regulation of GW in wheat were reviewed, and then the problems of existing research and the future research direction involved in our recent research were also sorted out and discussed. In order to get a comprehensive knowledge about the molecular mechanism on the production of GW, researchers should pay more attention to three key items. First-

收稿日期: 2015-06-11; 修回日期: 2015-08-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31201208); 2014 年度浙江省科技创新活动计划(新苗人才计划)项目 (2014R412048); 浙江省旱粮农业新品种选育重大科技专项(2012C12902-2-6); 浙江省科技创新团队项目(2011R50026-23); 浙江农林大学人才启动基金项目(2012FR028, 2010FK040)

作者简介: 魏玮, 从事植物分子遗传研究。E-mail: 1187374847@qq.com。通信作者: 周伟, 副教授, 博士, 从事植物分子遗传与种质资源创新研究。E-mail: zhouwei19810501@163.com

ly, the variation of hormone in the development of GW should be concerned and measured. Secondly, GWAS (genome-wide association study, GWAS) together with high throughput sequencing should be adopted to exploit SNP (single nucleotide polymorphism, SNP) markets conferring to some special agricultural trait. Finally, the candidate gene should be mapped based on SNP marker-assisted selection in the mapping population, and then the candidate genes should be cloned and their function in the regulatory network involved in the formation of GW should be covered. This work will provide a good reference for further research. [Ch, 1 tab. 52 ref.]

Key words: crop genetics and breeding; wheat; grain weight; yield; molecular regulation; review

小麦 *Triticum aestivum* 是重要的粮食作物。有效穗数、穗粒数以及粒重是小麦产量构成的三要素。在产量构成三要素中穗粒数的增加建立在小麦穗数减少的基础上。小麦粒重的增加是相对独立的；在产量三要素中粒重的遗传力最大，受环境的影响效应也最小^[1-6]。因此，在穗数和穗粒数稳定的前提下，粒重的增加对小麦产量的提高有重要的作用。目前，围绕小麦粒重形成的外因(包括光照、温度、水分、二氧化碳和养分)和内因(包括生理生化机制和基因调控网络解析)开展了大量的研究，也取得一些进展。但由于普通栽培小麦是六倍体，与其他大农作物如玉米 *Zea mays*，水稻 *Oryza sativa* 等二倍体作物相比，遗传相对比较复杂。因此，小麦粒重形成的分子调控机制研究相对滞后。本文从粒重的构成要素及遗传特征、粒重数量性状遗传位点(quantitative trait loci, QTLs)的遗传定位和基因克隆以及粒重形成的分子调控网络解析等方面开展综述，为科研人员的深入研究提供参考。

1 小麦粒重的构成要素及其遗传特征

小麦粒重是受多基因控制的数量性状，由粒长、粒宽、粒厚等基本要素构成^[2-3]。利用不同的分析群体对构成粒重的 3 个基本要素与粒重的关联性进行了分析发现，小麦粒长、粒宽均与粒重都具有极显著的正相关关系，相关性大小依次为粒宽>粒厚>粒长^[3-6]。除此之外，研究人员对籽粒体积与粒重的关联性进行了分析。王瑞霞等^[1]研究发现，相比于粒长、粒宽和粒厚，籽粒体积与小麦粒重相关性最高，这与 BRESEGHELLO 等^[7]的研究结果相一致。可见，粒长、粒宽、粒厚、粒体积等都是粒重的重要构成要素。

2 小麦粒重 QTLs 的定位分析

2.1 QTLs 定位的群体

建立小麦粒重及其他性状基因的遗传连锁图谱，首先要构建合适的作图群体。目前，用于小麦基因遗传定位常用的作图群体包括两大类。第 1 类为暂时性群体，如 F_2 群体、 $F_{2,3}$ 群体、回交(back cross, BC)及三交群体；第 2 类为永久性群体，如重组自交系(recombinant inbred line, RIL)，加倍单倍体(doubled haploid, DH)及近等基因系(near isogenic lines, NILs)。针对不同的研究目标，研究人员使用不同的作图群体来对目标 QTLs 进行遗传定位。由于作图群体的差异以及影响粒重形成的因素太多，使得 QTLs 定位结果的可比性比较差。目前，已明确报道的与粒重形成相关的 QTLs 广泛分布在小麦的 21 条染色体上^[2,4,7-20]。以色列 Weizmann 科学院 FELDMAN 教授的实验室花了近 6 a 时间培育了 2 套分别以普通小麦品种 Bethlehem (BL) 和中国春(Chinese Spring, CS) 为背景的野生 2 粒小麦染色体臂置换系(chromosome arm substitution lines, CASLs)。创建时每个 CASL 都用对应的双端体与野生 2 粒小麦进行杂交，然后用对应的双端体经过 6~7 次回交，最后自交 1 次，每个世代结合细胞遗传学鉴定选育而成。每个 CASL 将野生 2 粒小麦单个染色体臂分别引入到同一栽培小麦的遗传背景中，这样可以对单个野生 2 粒小麦染色体臂上的基因进行独立研究，而避免其他染色体臂上基因的干扰，从而达到对某一数量性状进行独立研究的目的。利用该套材料与受体亲本(CS 和 BL)杂交所创建的 F_2 群体比采用 2 个遗传背景差异很大的父母本杂交所创建的 F_2 群体基因位点纯合率要高得多，但比不上 NILs，因而基因定位结果的准确性介于普通 F_2 群体和 NILs 之间。而利用此套材料所创建的小片段重组导入系(recombination substitution lines, RSLs)需要用相应的 CASL 与双端体(ditelosomic, DT)进行 1 次杂交和 2 次回交，期间结合分子标记对相应的染色体片段进行筛选，然后再自交 3 次 RSLs 才能完全创建完成。因而 RSLs 相应

的数量性状基因位点的纯合率可以和 NILs 相提并论, 而 RSLs 创建的难度要比 NILs 容易一些。作者实验室利用此套 CASLs 所创建的 F_2 和 RSLs 已成功发现和定位了一个新的白粉病抗性基因到 2B 短臂上, 并证实光周期基因 *Ppd-B1* 是 2BS 染色体臂上唯一的迟熟候选主效基因(论文待发表), 证实利用此套 CASLs 材料所创建的作图群体对目标基因进行遗传定位的可靠性很高。目前, 作者实验室正在利用此套 CASLs 所创建的 F_2 和 RSLs 精细定位在 3A, 7BS 和 4AL 染色体臂上且与小麦抽穗相关的主效 QTLs。

2.2 QTLs 定位及互作效应

现阶段研究粒重基因的主要方法是 QTL 作图和关联性分析。在小麦产量构成的三要素中, 粒重的遗传相对稳定且主要受遗传因子的控制; 其遗传特性表现为加性效应, 包括基因与基因的加性效应和基因与环境的加性效应, 其遗传力为 59%~80%。千粒重是衡量粒重的重要指标。目前, 国内外研究者围绕粒重的构成要素包括粒长、粒宽和粒厚以及千粒重的 QTLs 定位工作展开了广泛的研究。利用不同的作图群体对粒重各构成要素的 QTLs 进行遗传定位发现, 小麦 3 个基因组(A, B 和 D)的 21 条染色体上均分布着与粒重及其构成要素相关的 QTLs(表 1)。BRESEGHELLO 等^[7]和 GEGAS 等^[5]研究小麦粒重各构成要素之间的关系时指出, 控制小麦粒长和粒宽的遗传因子相对独立, 分别由不同的主效 QTL 控制^[5,7]。GEGAS 等^[5]和宿振起^[21]研究粒形(粒长/粒宽)和千粒重的遗传相关性后发现, 粒形与千粒重无显著的相关性, 表明粒形和千粒重受独立的遗传体系所控制。因此, 小麦粒重的主要构成要素遗传机制

表 1 粒长、粒宽和千粒重 QTLs 的遗传定位

Table 1 Genetic location of QTLs involved in grain length, grain width and thousand kernel weight

性状	亲本组合	QTLs	定位染色体	参考文献
千粒重	Renan × Récital	9	1D, 2B, 2D, 3A, 5B, 6A, 6D, 7A, 7D	[23]
	CS × SQ1	11	1BL, 3DL, 4A, 4BL, 4DL, 5AL, 5B, 5DL, 6BL, 7BS	[10]
	Rye Selection111 × CS	3	1A, 2B, 7A	[11]
	AK Karma × 87E3-S2B1	6	2B, 2D, 3B, 4B, 4D, 6A	[12]
	Trident × Molineux	3	6A, 6D, 7D	[13]
	Rye Selection × CS	10	1A, 1D, 2B, 2D, 4B, 5B, 6B	[14]
	MN98550 × MN99394	4	7A, 5B, 2A, 6B	[15]
	Chuan3505 × Shannong483	4	1D, 2A, 5D, 6A	[16]
	旱选 10 × 鲁麦 14(DHLs)	5	2DL, 3AS, 3DL, 6BL	[22]
	Ning7840 × Clark	7	1B, 4B, 5A, 6A, 7A	[4]
	Heshangmai × Yu8679	10	1A, 1B, 2A, 2D, 3B, 4A, 4D, 5A, 6D, 7D	[17]
	Seri M82 × Babax	6	1B, 1D, 4D, 6D, 6B	[18]
	RAC875 × Kukri	6	1D, 3D, 5B, 7A, 7D, 6A	[19]
	Drysdale × Gladius	7	2B, 2D, 3B, 4A, 6A	[20]
粒长	硬粒 × 软粒	5	1B, 2B, 2D, 3B 和 7B	[2]
	W7984 × Opata85	2	5B, 5D	[7]
	AC Reed × Grandin	1	4B	[7]
	Chuan3505 × Shannong483	5	1A, 1B, 2B, 4A, 4B	[4]
	旱选 10 × 鲁麦 14(DHLs)	3	1B, 7B, 6B	[22]
	Heshangmai × Yu8679	1	2A	[17]
	Rye Selection × CS	6	1A, 2B, 2D, 5A, 5B, 5D	[14]
	Drysdale × Gladius	2	2B, 6B	[20]
粒宽	硬粒 × 软粒	5	1A, 2A, 2B, 2DL, 5DL	[2]
	W7984 × Opata85	1	1B	[7]
	Chuan3505 × Shannong483	3	2A, 5D, 6A	[4]
	旱选 10 × 鲁麦 14(DHLs)	3	2B, 2DL	[22]
	Heshangmai × Yu8679	16	1A, 1B, 2A, 2B, 3A, 3B, 5A, 5B, 5D, 6D	[17]
	Rye Selection × CS	9	1D, 2B, 2D, 4B, 5B, 5D	[14]
	Drysdale × Gladius	5	2B, 2D, 3B, 6A	[20]

和互作效应机制的解析对主效基因的克隆与开发利用将具有重要指导意义。

粒重是由多基因控制的数量性状。定位分析研究表明小麦粒重 QTLs 的遗传定位极易受环境的影响; 基因与环境的互作会导致 QTLs 在不同环境条件下表现很不稳定, 使它在一些环境中能够检测到而在另外一种环境下又检测不到^[21-23]。钱雪娅等^[8]研究发现: 小麦产量性状的遗传不仅受基因遗传效应所控制, 还受上位效应、加性效应(包括基因之间以及基因与环境之间的加性效应)的影响。因此, 在不同环境条件下对粒重各构成要素的 QTLs 进行遗传定位综合分析能够更好地分析主效 QTLs 之间的上位性、加性和互作效应, 从而更加全面地分析粒重 QTLs 的遗传特征及其效应因子之间的作用特征。

3 小麦粒重形成的分子调控机制

3.1 小麦粒重形成相关基因的克隆与功能解析

六倍体的普通小麦相比于二倍体的水稻、玉米等作物遗传相对比较复杂; 因而目前在普通小麦中与粒重形成密切关联且被克隆并对功能进行完全解析的基因报道并不是很多。而在模式植物水稻中此类研究进展相对较快, 这为小麦粒重形成分子调控途径机制解析提供了重要的参考。

目前, 小麦粒重形成相关基因的克隆与功能解析主要围绕两大类基因展开。一类是淀粉合成代谢相关的基因; 另一类是籽粒细胞发育和分化相关的基因。腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶(AGPP), 可溶性淀粉合成酶(SSS)和淀粉分支酶(SEB)是 3 个最早被证实控制籽粒淀粉的生物合成, 且是与小麦粒重形成密切相关联的关键酶基因^[24]。曹颖妮等^[25]对小麦灌浆期淀粉积累及酶活性变化研究表明, AGPP, SSS 和 SEB 的酶活性最大峰值出现在小麦开花后 20~25 d, 且 AGPP 和 SSS 活性大小与直链淀粉含量呈正比, SEB 活性大小与支链淀粉含量呈正比。蔗糖合酶基因(sucrose synthase, SUS)是另一被证实能在淀粉合成过程中起重要作用的关键基因。JIANG 等^[26]克隆了普通小麦第 2 连锁群上的蔗糖合酶基因 *TaSUS2*, 根据 *TaSUS2-2B* 位点上等位基因间的差异(Hap-H 和 Hap-L)开发了 1 个共显性标记, 关联分析发现 Hap-H 与千粒重密切相关, 推测其为小麦粒重形成的重要候选基因。腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶(ADP-glucose pyrophosphorylase, AGPP)是控制植物体内蔗糖和淀粉合成的关键限速酶, 催化葡萄糖-1-磷酸和 ATP 形成淀粉合成的直接底物。AGPP 是由大小亚基组成的异源四聚体, 其中 β 小亚基是催化亚基。已证实 *AGPP* 基因能调节胚乳细胞淀粉的合成; 过表达 *AGPP* 基因的转基因水稻的籽粒饱满, 千粒重显著增加。目前, 已在普通小麦中克隆了 *AGPP* 各亚基的 cDNA, 其中 β 小亚基编码的基因定位于染色体 7A, 7B 和 7D 上, 是一个单拷贝的基因位点。研究表明: 开花后 20~25 d 小麦籽粒中 *AGPP* 酶活性最高, 而胚乳中 *AGPP* 酶活性增强可以提高其淀粉含量^[27]。

在小麦籽粒细胞发育和分化相关基因的功能研究中, 常成等^[6]结合水稻 *GS3*(glutamine synthetase II, *GS3*)基因序列和小麦及其近缘种属 EST 序列, 拼接形成了小麦 *GS3* 基因; 其编码的氨基酸序列和水稻相似性很高, 特别是基因的保守区域。利用万县百麦子和京 411 构建的小麦 RILs 对 *GS3* 基因与籽粒大小和粒重的关系进行连锁分析发现, *GS3* 与小麦籽粒长度、宽度、粒厚及粒重等性状的相关性都达到显著水平。在水稻中已证实 *GS3* 主要通过调控籽粒纵向细胞的数量而影响粒长和粒重^[28]。推测小麦的 *TaGS3* 基因的功能可能与水稻的具有相似的作用机制。

SU 等^[29]利用同源克隆技术在小麦中克隆得到了 *TaGW2*(grain weight II, *GW2*)基因, 将该基因定位于小麦染色体第六同源群上; 并在 *TaGW2-6A* 基因的启动子区域发现了 2 个 SNP 位点。研究发现: 其中 1 个 SNP 位点与籽粒的粒宽和粒重有显著的关联性, 推测 *TaGW2* 基因启动子区域的突变可能会影响基因的表达进而对小麦粒重的形成产生影响。杨子博^[30]通过对克隆的中国春和兰考大粒小麦 *TaGW2* 等位基因进行序列比对发现, 兰考大粒小麦突变体的 *TaGW2* 基因在 977 bp 处有 1 个 T 碱基的插入使该基因翻译提前终止; 对 *TaGW2* 基因编码的氨基酸序列的一级结构预测发现, 其氨基酸残基 61~103 区域有 1 个 GW 蛋白典型的结构域, 它可使 *TaGW2* 基因具有泛素连接酶的功能。水稻中的 *GW2* 基因调控粒宽的机制为 *GW2* 通过编码 1 种 E3 泛素连接酶参与泛素介导的蛋白降解, 负向调控水稻籽粒颖壳细胞的数目而降低粒宽^[28]。推测 *TaGW2* 基因在小麦中的功能可能与水稻 *GW2* 基因所起的功能相似, 对小麦粒重的发育起负向调控作用。MA 等^[31]从普通小麦中克隆了细胞壁转化酶 *TaCWI*(cell wall bound invertase, *CWI*) 基因。此基因全长 3 676 bp, 含有 7 个外显子和 6 个内含子以及 1 个 1 767 bp 的开放读码框。根

据TaCWI-A1位点的等位变异TaCWI-A1a和TaCWI-A1b开发了1对互补显性标记CWI22和CWI21。通过对2组中国冬小麦主栽品种和2组中国农家品种的检测,CWI22扩增的402 bp条带与高千粒重密切相关,而CWI21所扩增的404 bp条带与低千粒重密切相关。细胞壁结合转化酶(cell wall bound invertase, CWI)主要存在与细胞壁上或是在细胞间质中,对碳水化合物的转运中发挥着重要作用。在玉米中,CWI活性降低的突变体在早期籽粒形成阶段籽粒生长明显受到抑制,成熟时粒重只有正常籽粒的1/5^[32];CWI缺失的突变体胚乳发育不良,胚乳细胞数目和大小均降低^[33]。小麦TaCWI基因调控粒重形成的分子机制研究有待于更进一步地完善。

3.2 小麦粒重形成的激素代谢及信号途径

植物内源激素主要包括生长素(indole-3-acetic acid, IAA),赤霉素(gibberellic acid, GA),细胞分裂素(cytokinin, CTK),脱落酸(abscisic Acid, ABA),乙烯(ethyne, ETH),异戊烯基腺苷(iso-propyl alcohol, iPA)等。内源激素在植物生长发育过程中发挥着重要的调控作用。研究表明:谷物籽粒灌浆速率和粒重大小主要由籽粒(库)激素的平衡和调节所控制^[34]。小麦籽粒的形态建成和灌浆均存在内源激素的参与,在籽粒胚发育、淀粉合成关键酶、储藏蛋白的表达、植株衰老、碳/氮代谢等过程中激素平衡对小麦籽粒产量和品质的提高起重要的调节作用^[35]。

IAA是影响小麦籽粒内溶物的重要激素。试验表明:内源IAA可以调控籽粒内溶物的转化效率;IAA对光合产物向籽粒的输入及其在籽粒中的转化都有明显的促进作用。研究表明:内源激素IAA的浓度同淀粉积累速度呈正相关关系;IAA通过调控蛋白酶的活性,加速蔗糖的分解速度从而增加小麦籽粒淀粉的积累^[36]。赤霉素(GA)可促进小麦结实,在小麦灌浆期喷施赤霉素可以明显增加穗粒数,进而提高产量。WHEELER等^[35]指出,在籽粒发育过程中内源IAA与GA的浓度随籽粒的发育而不断升高,与粒重的增长密切相关^[20]。推测在小麦籽粒发育过程中GA和IAA起协同作用共同参与籽粒干物质的积累,从而促进粒重的形成。CTK通过调节胚乳细胞的分裂以及数目而影响小麦粒重。研究表明:受精后不久小麦CTK活性明显提高;在籽粒发育的初期CTK通过调节胚乳细胞储存能力从而影响籽粒灌浆及粒重。王丰等^[36]研究表明:在高温情况下胚乳灌浆期ABA含量增加,使得胚乳细胞的灌浆速率明显加快。在小麦籽粒灌浆前期,内源ABA的含量对籽粒灌浆速度表现为促进作用,后期则起抑制作用^[37]。外施ABA增加籽粒灌浆的速率,但是却缩短籽粒灌浆期的时间^[38]。刘霞等^[39]和高松洁等^[40]对小麦灌浆期内源激素的变化研究发现,籽粒中GA3/ABA协同起作用能显著加快籽粒灌浆速度。研究发现:在小麦胚乳细胞分化的前期细胞内的iPA和ABA含量较高。较高的iPA水平一定程度上可以促进胚乳细胞的分化,从而增加籽粒的体积^[23]。籽粒发育中期,伴随着灌浆速率的迅速升高,籽粒内iPA水平降低,同时GA,ABA和IAA的水平升高,由此可见GA,ABA,IAA和iPA在籽粒灌浆过程中起协同作用促进小麦籽粒灌浆^[23]。乙烯是种子和果实成熟阶段释放的一种催熟剂,往往在植物生殖生长的后期大量释放而促进果实或是种子的成熟。研究发现:在小麦灌浆初期施加外源乙烯合成抑制剂能显著增加粒重^[41],可能与籽粒中的蔗糖合成酶和淀粉合成相关酶活性的提高有关^[42-43]。喷施乙烯可促进籽粒早灌浆,维持较长的灌浆高峰,但是籽粒灌浆速率减慢,粒重降低。乙烯的快速释放可以使 α -淀粉酶合成基因在营养器官中过量表达,从而使淀粉在储藏器官中的合成和积累量下降^[44]。

4 存在问题与展望

目前,涉及小麦粒重形成分子调控关键基因的研究较少,缺乏本质性的认识。虽然通过QTL分析技术定位了一些控制籽重的位点,但很少进行克隆和功能的验证;对籽重形成的完整遗传机制并不清楚,关键调控基因还未见报道。基于此,可采取以下3条有效的途径加快小麦粒重形成分子调控机制的解析研究:①结合已公布的小麦遗传连锁图谱信息,利用全基因组关联分析(genome-wide association study, GWAS)技术进一步开发与性状密切相关的单核苷酸多态性标记(single nucleotide polymorphism, SNP);结合作图群体进行表型与基因型的关联性分析,确定粒重形成候选主效基因,并进行克隆和功能解析。GWAS是一种基于连锁不平衡来识别分子标记之间或候选基因与性状之间关系的方法,已被广泛应用到植物遗传学和育种相关的重要性状研究中。目前,利用GWAS分析技术已在水稻中挖掘了与谷粒长度和宽度、顶端颜色、果皮颜色、淀粉酶含量、凝胶化温度等性状密切相关的SNP位点^[45];

在玉米中多个与生育酚和 α -生育酚含量相关联的SNP位点也被挖掘出来^[46]。利用GWAS分析技术已在小麦中挖掘出多个与抽穗期、植株高度、淀粉和蛋白质含量、耐铝和抗锈蚀性等性状密切相关联的SNP位点,显示出此项技术在遗传定位目标候选基因以及分子辅助育种上的独特优势^[47-48]。目前,关于小麦粒重形成关键基因的克隆与功能解析的研究报道甚少。因此,利用GWAS技术进一步挖掘与小麦粒重形成密切相关联的SNP标记,利用作图群体分析标记与表型变异的关联度,从而定位和克隆目标基因并加以利用可作为小麦粒重候选主效基因挖掘的主要手段。②结合高通量测序技术包括转录组RNA测序和蛋白组测序技术,通过分析近等基因系和亲本之间、渐渗系和亲本之间、高代回交个体和亲本之间显著差异表达的基因和蛋白,结合生物信息学分析预测小麦粒重形成候选基因,探讨小麦粒重形成的分子调控机制。高通量转录组RNA和蛋白组测序技术可以在没有完整基因组序列的前提下,研究所有mRNA转录本和蛋白的丰度信息,发掘新的转录本和多肽,且可以得到定量更准确,分析更可靠、重复性更高及检测范围更广的结果^[49]。目前,已在水稻^[50]、拟南芥^[51]等模式植物中运用此项技术,通过分析转基因和非转基因单株之间、突变体和野生型单株之间显著差异表达的基因,挖掘目标基因以及目标基因的上下游调节基因的成功案例。因此,灵活运用高通量测序技术全面解析小麦粒重形成的分子调控机制是另一研究策略。③单子叶小麦粒重的发育与胚乳生长程度密切相关;粒重的大小同其3个主要构成要素的发育以及它们之间的协调发育都有密切的联系^[52]。目前,植物粒重形成分子调控机制研究主要围绕模式植物如拟南芥^[52]、水稻^[21]展开,而小麦粒重形成完整激素和分子调控机制的研究相对滞后。因此,在研究工作中只有从小麦粒重形成过程中的形态建成、灌浆、蜡黄、脱水等关键时期对其激素和分子调控机制进行分阶段解析,才能从整体上阐明小麦粒重形成的分子调控机制。

5 参考文献

- [1] 王瑞霞, 张秀英, 伍玲, 等. 不同生态环境下冬小麦籽粒大小相关性状的QTL分析[J]. 中国农业科学, 2009, **42**(2): 398–407.
WANG Ruixia, ZHANG Xiuying, WU Ling, et al. QTL analysis of grain size and related traits in winter wheat under different ecological environments [J]. *Sci Agric Sin*, 2009, **42**(2): 398–407.
- [2] CAMPBELL K G, BERGMEM C J, GUALBERTO D G, et al. Quantitative trait loci associated with kernel traits in a soft×hard wheat cross [J]. *Crop Sci*, 1999, **39**(6): 1184–1195.
- [3] DHOLAKIA B B, AMMIRAJU J S S, SINGH H, et al. Molecular marker analysis of kernel size and shape in bread wheat [J]. *Plant Breed*, 2003, **122**(5): 392–395.
- [4] SUN Xianyin, WU Ke, ZHAO Yan, et al. QTL analysis of kernel shape and weight using recombinant inbred lines in wheat [J]. *Sci Agric Sin*, 2009, **165**(3): 615–624.
- [5] GEGAS V C, NAZARI A, GRIFFITHS S, et al. A genetic framework for grain size and shape variation in wheat [J]. *Plant Cell*, 2010, **22**(4): 1046–1056.
- [6] 常成, 张海萍, 张秀英, 等. 小麦PEBP-like基因等位变异与籽粒大小, 粒重关系研究[J]. 分子植物育种, 2009, **7**(1): 23–37.
CHANG Cheng, ZHANG Haiping, ZHANG Xiuying, et al. Study on relationship between allelic variation in PEBP-like gene and grain size and weight in common wheat [J]. *Mol Plant Breed*, 2009, **7**(1): 23–37.
- [7] BRESEGHELLO F, SORRELLS M E. QTL analysis of kernel size and shape in two hexaploid wheat mapping population wheat [J]. *Field Crop Res*, 2007, **101**(2): 172–179.
- [8] 钱雪娅. 不同水分条件下小麦重要农艺性状的遗传分析及QTL定位[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2009: 5–10.
QIAN Xueya. *Genetic Dissection of Quantitative Loci for Important Agronomic Traits in Wheat under Two Water Regimes* [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2009: 5–10.
- [9] QUARRIE S A, STEED A, CALESTANI C, et al. A high-density genetic map of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) from the cross Chinese Spring × SQ1 and its use to compare QTLs for grain yield across 110 arrangements of environments [J]. *Theor Appl Genet*, 2005, **110**(5): 865–880.
- [10] KUMAR N, KULWAL P L, GAUR A, et al. QTL analysis for grain weight in common wheat [J]. *Euphytica*, 2006, **151**(2): 135–144.

- [11] HUANG Xueqin, CLOUTIER S, LYCAR L, *et al.* Molecular detection of QTLs for agronomic and quality traits in a doubled haploid population derived from two Canadian wheats (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 2006, **113**(4): 753 – 766.
- [12] KUCHEL H, WILLIAMS K, LANGRIDGE P, *et al.* Genetic dissection of grain yield in bread wheat: II QTL-by-environment interaction [J]. *Theor Appl Genet*, 2007, **115**(7): 1015 – 1027.
- [13] RAMYA P, CHAUBAL A, KULKARNI K, *et al.* QTL mapping of 1000-kernel weight, kernel length, and kernel width in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *J Appl Genet*, 2010, **51**(4): 421 – 429.
- [14] TSILO T J, HARELAND G A, SIMSEK S, *et al.* Genome mapping of kernel characteristics in hard red spring wheat breeding lines [J]. *Theor Appl Genet*, 2010, **121**(4): 717 – 730.
- [15] SUN Xiaochun, Felix Marza, MA Hongxiang, *et al.* Mapping quantitative trait loci for quality factors in an inter-class cross of US and Chinese wheat [J]. *Theor Appl Genet*, 2010, **120**(5): 1041 – 1051.
- [16] WANG Ruiying, HAI Lin, ZHANG Xiuying, *et al.* QTL mapping for grain filling rate and yield-related traits in RILs of the Chinese winter wheat population Heshangmai3 × Yu8679 [J]. *Theor Appl Genet*, 2009, **118**(2): 313 – 325.
- [17] MEINTYRE C L, MATHEWS K L, RATTEY A, *et al.* Molecular detection of genomic regions associated with grain yield and yield-related components in an elite bread wheat cross evaluated under irrigated and rainfed conditions [J]. *Theor Appl Genet*, 2010, **120**(3): 527 – 541.
- [18] DION B, ALI I, MATTEW R, *et al.* Genetic dissection of grain yield and physical grain quality in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) under water-limited environments [J]. *Theor Appl Genet*, 2012, **125**(2): 255 – 271.
- [19] MAPHOSA L, LANGRIDGE P, TAYLOR H, *et al.* Genetic control of grain yield and grain physical characteristics in a bread wheat population grown under a range of environmental conditions [J]. *Theor Appl Genet*, 2014, **127**(7): 1607 – 1624.
- [20] QIN Lin, HAO Chenyang, HOU Jian, *et al.* Homologous haplotypes, expression, genetic effects and geographic distribution of the wheat yield gene *TaGW2* [J]. *BMC Plant Biol*, 2014, **14**(1): 107. doi:10.1186/1471-2229-14-107.
- [21] 宿振起. 小麦粒重基因 *TaGW2* 的克隆, 标记的开发及功能验证[D]. 北京: 中国农业科学院, 2010: 6 – 11.
SU Zhenqi. *Identification and Development of a Functional Marker of TaGW2 Associated with Grain Weight in Wheat (Triticum aestivum L.)* [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2010: 6 – 11.
- [22] SCHUSSLER J R, BRENNER M L, BRUN W A. Relationship of endogenous abscisic acid to sucrose level and seed growth rate of soybeans [J]. *Plant Physiol*, 1991, **96**(4): 1308 – 1313.
- [23] 王瑞英, 于振文, 潘庆民, 等. 小麦籽粒发育过程中激素含量变化[J]. 作物学报, 1999, **25**(2): 227 – 231.
WANG Ruiying, YU Zhenwen, PAN Qingmin, *et al.* Changes of endogenous plant hormone contents during grain development in wheat [J]. *Acta Agron Sin*, 1999, **25**(2): 227 – 231.
- [24] SCHAFFER A A, PETREIKOV M. Sucrose-to-starch metabolism in tomato fruit undergoing transient starch accumulation [J]. *Plant Physiol*, 1997, **113**(3): 739 – 746.
- [25] 曹颖妮, 胡卫国, 王根平, 等. 糯性和非糯性小麦灌浆期胚乳直/支链淀粉积累及其相关酶活性研究[J]. 西北植物学报, 2010, **30**(10): 1995 – 2001.
CAO Yingni, HU Weiguo, WANG Genping, *et al.* Dynamic changes of starch accumulation and enzymes relating to starch biosynthesis of kernel during grain filling in waxy and non-waxy winter wheat [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 2010, **30**(10): 1995 – 2001.
- [26] JIANG Qiyan, HOU Jian, HAO Chenyang, *et al.* The wheat (*T. aestivum*) sucrose synthase 2 gene (*TaSus2*) active in endosperm development is associated with yield traits [J]. *Funct Integr Genom*, 2011, **11**(1): 49 – 61.
- [27] SMIDANSKY E, MARTIN J, HANNAH C, *et al.* Seed yield and plant biomass increases in rice are conferred by deregulation of endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase [J]. *Planta*, 2003, **216**(4): 656 – 664.
- [28] SONG Xianjun, HUANG Wei, SHI Mei, *et al.* A QTL for rice grain width and weight encodes a previously unknown RING-type E3 ubiquitin ligase [J]. *Nat Gen*, 2007, **39**(5): 623 – 630.
- [29] SU Zhenqi, HAO Chenyang, WANG Lanfeng, *et al.* Identification and development of a functional marker of *TaGW2* associated with kernel weight in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 2011, **122**(1): 211 – 223.
- [30] 杨子博. 小麦粒重基因 *TaGW2* 的克隆、原核表达及分子标记的开发[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012: 7

- 11.
- YANG Zibo. Cloning, *Pokaryotic Expression and Marker Development for TaGW2, a Gene Linked to Wheat Kernel Weight* [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2012: 7 - 11.
- [31] MA Dongyun, YAN Jun, HE Zhonghu, *et al.* Characterization of a cell wall invertase gene TaCwi-A1 on common wheat chromosome 2A and development of functional markers [J]. *Mol Breed*, 2012, **29**(1): 43 - 52.
- [32] MILLER M E, CHOURAY P S. The maize invertase-deficient miniature-1 seed mutation is associated with aberrant pedicel and endosperm development [J]. *Plant Cell*, 1992, **4**(3): 297 - 305.
- [33] CHENG Wanhsing, TALIERCIO E W, CHOURAY P S. The miniature1 seed locus of maize encodes a cell wall invertase required for normal development of endosperm and maternal cells in the pedicel [J]. *Plant Cell*, 1996, **8**(6): 971 - 983.
- [34] 杨建昌, 王志琴, 朱庆森, 等. ABA 与 GA 对水稻籽粒灌浆的调控[J]. 作物学报, 1999, **25**(3): 341 - 347.
- YANG Jianchang, WANG Zhiqin, ZHU Qingsen, *et al.* Regulation of ABA and GA to the grain filling of rice [J]. *Acta Agron Sin*, 1999, **25**(3): 341 - 347.
- [35] HESS J, CARMAN J G, BANOWETZ G M. Hormones in wheat kernels during embryony [J]. *J Plant Physiol*, 2002, **159**(4): 379 - 386.
- [36] 刘仲齐, 吴兆苏, 俞世蓉. 吲哚乙酸和脱落酸对小麦籽粒淀粉积累的影响[J]. 南京农业大学学报, 1992, **15**(1): 7 - 12.
- LIU Zhongqi, WU Zhaosu, YU Shirong. Effects of IAA and ABA on starch accumulation in wheat grain [J]. *J Nanjing Agric Univ*, 1992, **15**(1): 7 - 12.
- [37] 柏新付, 蔡永萍, 聂凡. 脱落酸与稻麦籽粒灌浆的关系[J]. 植物生理学通讯, 1989, **23**(3): 40 - 41.
- BAI Xinfu, CAI Yongping, NIE Fan. Relationship between abscisic acid and grain filling of rice and wheat [J]. *Plant Physiol Commun*, 1989, **23**(3): 40 - 41.
- [38] 李睿, 兰盛银, 徐珍秀. 外源激素对小麦胚乳程序性细胞死亡和子粒灌浆的影响[J]. 湖北农业科学, 2004, **26**(2): 26 - 30.
- LI Rui, LAN Shengyin, XU Zhenxiu. The effect of exogenous hormones on the programmed cell death of endosperm and the grain filling in wheat [J]. *Hubei Agric Sci*, 2004, **26**(2): 26 - 30.
- [39] 刘霞, 穆春华, 尹燕枰, 等. 花后高温, 弱光及其双重胁迫对小麦籽粒内源激素含量与增重进程的影响[J]. 作物学报, 2007, **33**(4): 677 - 681.
- LIU Xia, MU Chunhua, YIN Yanping, *et al.* Effects of high temperature and shading stress after anthesis on endogenous hormone contents and filling process in wheat grain [J]. *Acta Agron Sin*, 2007, **33**(4): 667 - 668.
- [40] 高松洁, 王文静, 夏国军, 等. 小麦大粒品种内源 GA3 及 ABA 含量的变化规律[J]. 河南农业大学学报, 2000, **34**(3): 213 - 219.
- GAO Songjie, WANG Wenjing, XIA Guojun, *et al.* The changing rules of content of inner GA3, ABA in big kernel wheat variety [J]. *J Henan Agric Univ*, 2000, **34**(3): 213 - 219.
- [41] 许振柱, 于振文, 亓新华, 等. 土壤干旱对冬小麦旗叶乙烯释放, 多胺积累和细胞质膜的影响[J]. 植物生理学报, 1995, **21**(3): 295 - 301.
- XU Zhenzhu, YU Zhenwen, QI Xinhua, *et al.* Effect of soil drought on ethylene evolution, polyamine accumulation and cell membrane in flag leaf of winter wheat [J]. *Acta Phytophysiol Sin*, 1995, **21**(3): 295 - 301.
- [42] MOHAPATRA P K, NAIK P K, PATEL R. Ethylene inhibitors improve dry matter partitioning and development of late flowering spikelets on rice panicles [J]. *Aust J Plant Physiol*, 2000, **27**(4): 311 - 323.
- [43] NAIK P K, MOHAPATRA P K. Ethylene inhibitors enhanced sucrose synthase activity and promoted grain filling of basal rice kernels [J]. *Aust J Plant Physiol*, 2000, **27**(11): 997 - 1008.
- [44] ROOK F, CORKE F, CARD R, *et al.* Impaired sucrose-induction mutants reveal the modulation of sugar-induced starch biosynthetic gene expression by abscisic acid signaling [J]. *Plant J*, 2001, **26**(4): 421 - 433.
- [45] HUANG Xuehui, WEI Xinghua, SANG Tao, *et al.* Genome-wide association studies of 14 agronomic traits in rice landraces [J]. *Nat Genet*, 2010, **42**(11): 961 - 967.
- [46] LI Qing, YANG Xiaohong, XU Shutu, *et al.* Genome-wide association studies identified three independent polymorphisms associated with α -tocopherol content in maize kernels [J]. *PLoS ONE*, 2012, **7**(5): e36807. doi: 10.1371/journal.pone.0036807

- journal.pone.0036807.
- [47] RAMAN H, STODART B, RYAN PR, *et al.* Genome-wide association analyses of common wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm identifies multiple loci for aluminum resistance [J]. *Genome*, 2010, **53**(11): 957 – 966.
- [48] YU Longxi , MORGOUNOV A, WANYERA R, *et al.* Identification of Ug99 stem rust resistance loci in winter wheat germplasm using genome-wide association analysis [J]. *Theor Appl Genet*, 2012, **125**(4): 749 – 758.
- [49] WANG Zhong, GERSTEIN M, SNYDER M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics [J]. *Nat Rev Genet*, 2009, **10**(1): 57 – 63.
- [50] GAO Yi, XU Hong , SHEN Yanyue, *et al.* Transcriptomic analysis of rice (*Oryza sativa*) endosperm using the RNA-Seq technique [J]. *Plant Mol Biol*, 2013, **81**(4/5): 363 – 378.
- [51] NIEDERHUTH C E, PATHARKAR O R, WALKER J C. Transcriptional profiling of the *Arabidopsis* abscission mutant *hah* by RNA-Seq [J]. *BMC Genomics*, 2013, **14**(1): 37. doi: 10.1186/1471-2164-14-37.
- [52] SUNDARESAN V. Control of seed size in plants [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2005, **102**(50): 17887 – 17888.

《浙江农林大学学报》获 2014 年度 “中国科技论文在线优秀期刊”一等奖

从教育部教技发中心函[2015]162号文获悉,《浙江农林大学学报》获2014年度“中国科技论文在线优秀期刊”一等奖。

为了更好地贯彻落实十八大提出的创新驱动发展战略,促进科技期刊健康发展,提高科技期刊的质量,推动科技期刊的数字化建设,提高期刊刊载论文的引用率,扩大期刊的影响力,促进论文免费共享,建设良好的科研环境,使科技期刊更好地为科研和科研工作者服务,教育部科技发展中心对截至2014年12月31日已收录在“中国科技论文在线”“科技期刊”栏目的教育部主管的期刊,经过严格的评审,评选出“中国科技论文在线优秀期刊”一等奖111项,二等奖183项;评选出“中国科技论文在线科技期刊优秀组织单位”64个。《浙江农林大学学报》荣获一等奖。

《浙江农林大学学报》坚持阵地和质量意识,始终以促进文化繁荣,引领学术进步,推进技术创新,构建社会和谐为己任,在互联网+的新形势下,奋力前行,不断超越,综合质量和学术声誉不断提高。2015年以来,《浙江农林大学学报》连续第7次入选《中文核心期刊要目总览》(2014版)、入选RCCSE中国核心学术期刊和中国科学引文数据库核心库等。

《浙江农林大学学报》将再接再厉,创新、协调、绿色、开放、共享,贯彻“绿水青山就是金山银山”重要思想,坚持立德树人,更好地为社会、经济、科技和学校发展服务。

吴伟根

猪圆环病毒 2 型实时荧光定量 PCR 检测方法的建立

于 静, 劳秀杰, 陈彦永, 何小江, 代 兵, 赵阿勇, 王晓杜, 宋厚辉

(浙江农林大学 动物科技学院, 浙江 临安 311300)

摘要: 猪圆环病毒 2 型(porcine circovirus 2, PCV2), 是感染猪 *Sus scrofa domestica* 的一种单链 DNA 病毒。建立一种快速、灵敏的检测方法, 对于 PCV2 感染猪的筛选和疾病预防非常重要。根据 PCV2 *ORF2* 基因保守区, 设计了荧光定量聚合酶链式反应(PCR)引物, 利用 SYBR Green 作为荧光染料建立了一种定量检测 PCV2 的 PCR 方法。结果表明: 该方法具有灵敏度高、特异性强和重复性好的优点, 每微升的最低检测限低至 10^1 拷贝 DNA。利用该方法对 34 份 PCV2 阳性临床样本进行检测, 检测符合率为 100%, 明显高于普通 PCR 方法的 50.0%。因此, 本研究建立的 PCV2 实时荧光定量 PCR 检测方法为该疾病的预防和控制提供一种有效的检测工具。图 4 表 4 参 26

关键词: 动物学; 猪; 猪圆环病毒 2 型; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: S852.3 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2016)02-0357-07

A real-time PCR method for detection of porcine circovirus 2

YU Jing, LAO Xiujie, CHEN Yanyong, HE Xiaojiang, DAI Bing, ZHAO Ayong, WANG Xiaodu, SONG Houhui

(School of Animal Science and Technology, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: To develop an accurate and rapid detection method for disease screening and prevention with porcine circovirus type 2 (PCV2), a single-strand DNA virus that infects pigs, primers targeted to the *ORF2* fragment of the PCV2 conserved region were designed. A real time polymerase chain reaction (PCR) method was developed using SYBR Green as a fluorescent dye and serial dilutions of *ORF2* recombinant plasmid to construct a standard curve for an absolute quantification. Results showed that the detection limit was obtained with 10^1 copy DNA per microliter. This method exhibited 1 000 times higher sensitivity than conventional PCR, only specific identification of PCV2, and better repeatability with the less than 2% variation coefficient of intra- or inter-assay experiments. A total of 34 PCV2 positive clinical samples were confirmed using this real time PCR method, demonstrating 100% agreement in comparison with the conventional PCR having only 50% agreement. This real time PCR method could provide a valuable tool for PCV2 prevention and control. [Ch, 4 fig. 4 tab. 26 ref.]

Key words: zoology; porcine; porcine circovirus 2; real-time PCR

猪圆环病毒2(porcine circovirus 2, PCV2), 是最小的 DNA 病毒, 断奶仔猪 *Sus scrofa domestica* 多系统衰竭综合征(postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)的主要病原, 成为严重阻碍养猪业发展的主要病原之一^[1-3]。国内外针对 PCV2 致病机制、诊断方法以及疫苗研制等方面开展了大量的研究^[1, 4]。然而, PCV2 依然阻碍着养猪业的发展, 主要原因可能是其临床发病与亚临床感染猪群中病毒量的不同, 检测过程容易造成漏检, 导致错误诊断。因此, 发展一种高灵敏度、快速检测 PCV2 的方法尤为重要。

收稿日期: 2015-04-19; 修回日期: 2015-06-22

基金项目: 浙江省科学技术公益项目(2014C32061); 浙江农林大学人才启动项目(2011FR025, 2013FR077); 浙江省自然科学基金资助项目(LQ14C010007); 浙江农林大学大学生科技创新训练计划项目(201301017); 浙江农林大学面上基金项目(2013FK001)

作者简介: 于静, 讲师, 博士, 从事畜禽遗传与疾病控制研究。E-mail: yujing_2009@163.com。通信作者: 宋厚辉, 研究员, 博士, 从事动物疫病防控和公共卫生研究。E-mail: songhh@zafu.edu.cn

猪圆环病毒(PCV)分为PCV1和PCV2等2种基因型,它们基因组结构相似,均含有ORF1和ORF2等2个主要的开放阅读框。ORF1是引起PCV1和PCV2抗原交叉反应的主要原因,其变异很小,同源性高达85%;而ORF2基因是PCV2的重要抗原基因,编码病毒衣壳蛋白(Cap蛋白)^[5],其变异较大,在两型PCV之间不存在抗原交叉反应,被视为PCV1和PCV2的特异性鉴别抗原^[6-8],并在临床检测中取得了良好的效果。基于ORF2的较大变异,可以设计特异性引物对PCV的2个基因型进行鉴定,已成为PCR方法鉴定PCV2的重要靶基因^[9]。基于ORF2的这些优势,本研究也选择ORF2作为鉴定引物设计的首选基因。聚合酶链式反应(PCR)方法简单、方便、快速、敏感,在疾病检测中广泛应用,但其高假阳性和易污染的缺点依然存在。PCV2的抗体检测,敏感性和特异性都比较好,但是价格昂贵,技术要求较高。像多重PCR、巢式PCR等技术,虽然也可以达到很高的灵敏度,但是却不能定量。实时荧光定量PCR方法,不仅操作简便、敏感性高、重复性好、省时和可定量分析等优点,是病毒检测的重要方法。因此,本试验利用实时荧光定量PCR技术构建快速、灵敏检测PCV2的方法,以适应实验室和临床中对PCV2的实时定量检测。

1 材料与方法

1.1 材料和临床病料

PCV2,猪蓝耳病毒(PRRSV, leylstad virus),猪细小病毒(porcine parvovirus, PPV)和猪瘟病毒(CSFV, hogcholera virus)等菌株由浙江农林大学动物预防医学与公共卫生实验室保存。19份病灶样品采自杭州国茂生态农业科技开发有限公司(简称:国茂),11份阳性病料和4份阴性对照由杭州检疫中心(杭州国正检测技术有限公司,简称:国正)惠赠。

1.2 引物设计与合成

ORF2是PCV2的主要免疫原基因,也是主要用于PCR鉴别的基因^[9]。根据GenBank公布的PCV2 ORF2基因序列,应用Primer 5.0软件设计ORF2基因全长克隆、普通PCR以及实时荧光定量PCR引物,并通过BLAST对其特异性进行分析。引物由上海生工生物工程公司合成,引物序列详见表1。

表1 实验中所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物类型	引物名称	引物序列(5'→3')	产物大小/bp
ORF2 克隆引物	ORF2-F	ATGACGTATCCAAGGAGGCCGTAC	702
	ORF2-R	TTAAGGGTTAAGTGGGGGTCTTAAG	
实时荧光定量引物	qP1	GAGCAGGGCCAGAATTCAACC	149
	qP2	AACASCCGCCTCTCCCCCAC	

1.3 阳性质粒的制备与稀释

将扩增的ORF2片段与pZERO-blunt载体连接,转化大肠埃希菌*Escherichia coli* DH5 α ,提取重组质粒,并进行测序。用紫外分光光度计测定重组质粒的吸光度 $D(260)$ 和 $D(280)$,计算出重组质粒的拷贝数,用EASY Dilution试剂将阳性重组质粒稀释到 10^{10} 拷贝· μ L $^{-1}$,再进行10倍梯度稀释,以 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 拷贝· μ L $^{-1}$ 9个拷贝数梯度作为标准模板,−20℃冻存备用。质粒质量浓度($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)= $D(260)$ ×50($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)/1 000×准模板稀释倍数。

拷贝数计算公式:拷贝数(拷贝· μ L $^{-1}$)=质粒浓度($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)×阿弗加德罗常数/重组质粒分子量。

1.4 实时荧光定量反应条件

实时荧光定量PCR反应采用20 μ L体系,其组分如下:SYBR[®] Premix Ex *Taq* GC(2 \times)10 μ L, qP1($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)0.4 μ L, qP2($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)0.4 μ L, ROX Reference Dye II(50 \times)0.4 μ L, 双蒸水7.8 μ L, 模板1 μ L。PCR扩增条件:95℃预变性30 s,按95℃10 s,60℃20 s,72℃30 s,进行40个循环。

1.5 标准曲线的建立

以重组质粒为标准品,进行10倍梯度稀释,取 10^8 ~ 10^0 拷贝· μ L $^{-1}$ 质粒为模板,用优化的实时荧光定量PCR体系及程序进行检测,同时设空白对照,每个标准品及空白对照均为3个平行重复。以起始

模板拷贝数为 x 轴, 循环阈值(C_t)值为 y 轴做回归曲线, 建立 PCV2 实时荧光定量 PCR 检测的标准曲线。

1.6 实时荧光定量 PCR 方法的重复性分析

对不同比例的标准品 DNA 10^4 , 10^3 和 10^2 拷贝· μL^{-1} 进行批间和批内重复性试验。样本有 3 个平行重复(批内重复), 分别进行 3 次重复(批间重复)。对所得 C_t 值的平均值、标准差和变异系数进行分析。

1.7 敏感性和特异性分析

敏感性分析: 以不同梯度标准品为模板, 分析最低检出限, 比较常规 PCR 与实时荧光定量 PCR 的敏感性差别。特异性分析: 用所建立的实时荧光定量 PCR 方法对已知阳性样品猪圆环病毒2(PCV2), 猪细小病毒(PPV), 猪瘟病毒(CSFV)和猪蓝耳病毒(PPRSV)病毒 DNA(或 cDNA)进行检测, 确定该方法的特异性。

1.8 临床样本的检测

对采集的 34 份临床样品进行检测。用试剂盒提取 DNA, 用上述建立的方法进行检测。

2 结果与分析

2.1 标准质粒的制备

以 PCV2 DNA 为模板, *ORF2* 全长引物 *ORF2-F* 与 *ORF2-R* 进行 PCR 扩增, 目的片段大小为 702 bp, 连接到 pZERO-blunt 载体上, 并用载体上的酶切位点进行双酶切, 出现载体片段和目的基因片段大小与预期一致, 表明重组质粒构建正确(图 1)。测序结果与目的片段序列也完全一致。抽提重组质粒, 并梯度稀释为 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 拷贝· μL^{-1} 9 个比例的质粒为标准模板。

2.2 实时荧光定量 PCR 标准曲线的建立

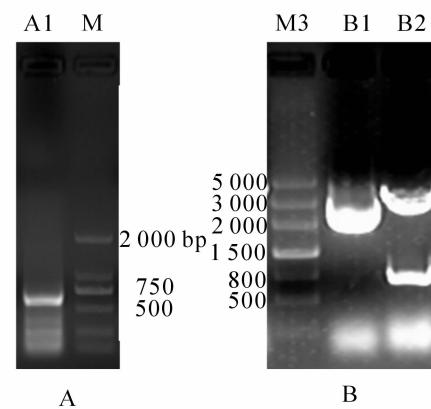
以梯度稀释重组质粒为模板进行标准曲线的制作。根据 PCV2 扩增动力学曲线, 系统自动生成标准曲线, 拷贝数(x)与循环阈值(C_t)之间的线性关系曲线表达式(图 2C)为: $C_t = -3.38 \times \lg x + 35.98$, 其斜率为 -3.38, 相关系数(R^2)为 1, 表明该标准曲线的线性度较好; PCR 的扩增效率为 97.6%, 且表明实时荧光定量 PCR 最低检测线为 10^1 拷贝· μL^{-1} 。扩增曲线平滑(图 2A), 每个样品之间间隔均匀, 阳性样品 C_t 值均在 33 以下, 阴性对照样品没有扩增, 最低检出限为 10^1 , 因此, 可以认为 C_t 值为 33 时是阴性样品和阳性样品的临界值, 即 $C_t \leq 33$ 可判为阳性, $C_t > 33$ 判为阴性。溶解曲线分析可以反映扩增产物的正确性, 是否有非特异性以及荧光信号是否由引物二聚体造成。本实验溶解曲线(图 2B)特征峰单一, T_m 值(解链温度)在 86 °C 左右, 表明是特异扩增。由此可以证明本研究建立的实时荧光定量 PCR 检测 PCV2 方法完全可信, 可用于后续实验分析。

2.3 实时荧光定量 PCR 方法的重复性分析

实验重复性是方法稳定性的标志。为了验证本研究建立的实时荧光定量 PCR 的重复性, 我们以不同比例的标准品 DNA 10^4 , 10^3 和 10^2 拷贝· μL^{-1} 进行批间重复性试验, 3 份模板的 3 次批内(表 2)和批间(表 3)重复检测的 C_t 值误差均不到 0.5, 变异系数均小于 2%, 结果表明该方法具有较高的重复性。

2.4 特异性分析

PCR 扩增易出现假阳性, 会造成误检, 给生产带来负面效应。因此, 我们对本研究建立的实时荧光定量 PCR 方法特异性进行分析, 结果表明(图 3): 经实时荧光定量 PCR 检测, 只有 PCV2 在 C_t 为 18 左右出现特异性扩增曲线, 而检测的猪细小病毒(PPV), 猪瘟病毒(CSFV), 猪蓝耳病毒(PPRSV)等样品 C_t 值均大于 33 或无扩增, 被判定为阴性。以上结果证明: 本研究建立的实时荧光定量 PCR 检测 PCV2 的方法特异性高, 可以用于后续临床样品分析。



A. *ORF2* 基因克隆(A1是*ORF2*片段, M为DL2000); B. 重组质粒验证(M3为标记物III, B1为重组质粒, B2为重组质粒消化验证)

图 1 *ORF2* 基因克隆和重组质粒验证

Figure 1 Clone of *ORF2* and verification of recombinant plasmid

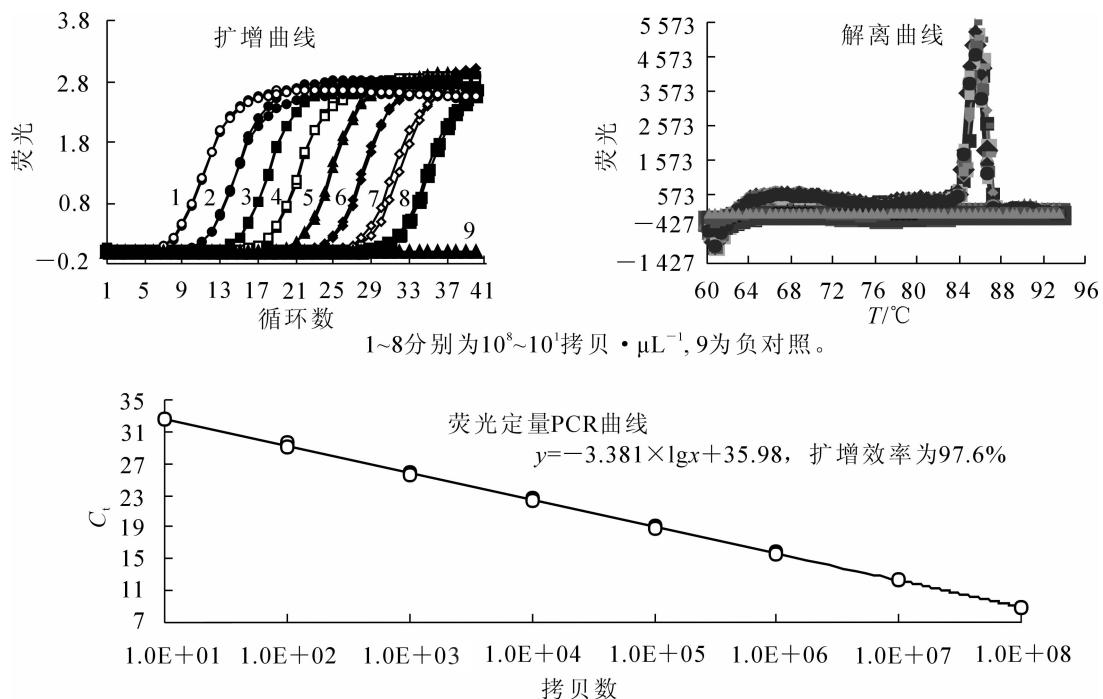


图2 实时荧光定量PCR标准曲线的建立

Figure 2 Development of standard curve of real-time PCR method

表2 实时荧光定量PCR方法的批内重复性实验结果

Table 2 Repetitive experimental results of intra-assay of real-time PCR method

拷贝数	重复1	重复2	重复3	平均值	标准差	变异系数/%
10 ²	29.72	29.63	28.95	29.43	0.42	1.43
10 ³	26.03	25.93	25.70	25.89	0.17	0.65
10 ⁴	22.63	22.54	22.35	22.51	0.14	0.64

表3 实时荧光定量PCR方法的批间重复性实验结果

Table 3 Repetitive experimental results inter-assay of real-time PCR method

拷贝数	重复1	重复2	重复3	平均值	标准差	变异系数/%
10 ²	22.93	22.60	22.41	22.65	0.26	1.16
10 ³	26.49	25.99	25.76	26.08	0.37	1.43
10 ⁴	29.92	29.69	29.02	29.54	0.47	1.58

2.5 敏感性分析

敏感性对评价检测方法的灵敏性非常重要,因此,我们分析了普通PCR和实时荧光定量PCR这2种方法的敏感性。结果发现:普通PCR有扩增条带的模板浓度为 10^4 拷贝· μL^{-1} ,而实时荧光定量PCR方法在模板比例为 10^1 拷贝· μL^{-1} (图4)时有扩增,也就表明实时荧光定量PCR检测PCV2的敏感性比普通PCR的敏感性高1 000倍。以上结果表明:本研究建立的实时荧光定量PCR检测PCV2的方法敏感性高。

2.6 临床样本的检测

临床样品检测是技术推广的前提。本研究从杭州周围猪场采集的34份样品,其中阳性病灶样品30份,阴性样品4份,通过检测发现普通PCR检测方法符合率为50.0%,实时荧光定量PCR检测符合率为100%(表4),且带病样品的拷贝数为 10^1 ~ 10^4 拷贝· μL^{-1} 。以上结果表明:本研究建立的实时荧光定量PCR检测PCV2方法比普通PCR方法灵敏度高,能完全适合猪场疾病的检测,且能够定量分析样品的病毒量。

3 讨论

Ⅱ型猪圆环病毒可以引起断奶仔猪多系统衰竭综合征(PMWS),育肥猪皮炎与肾病综合征(PDNS),增生性坏死性肺炎(PNP),猪呼吸道综合征,怀孕母猪的繁殖障碍、新生仔猪的先天性震颤(CT)和新生仔猪腹泻病等疾病^[2, 10-14]。中国很多地方猪养殖场PCV2阳性率高达100%,仔猪死亡率高达30%。目

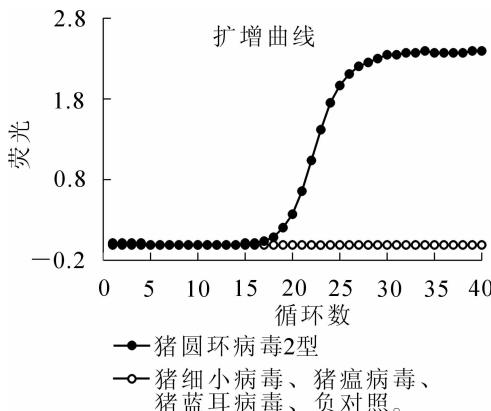


图3 特异性实验结果

Figure 3 Result of specific analysis

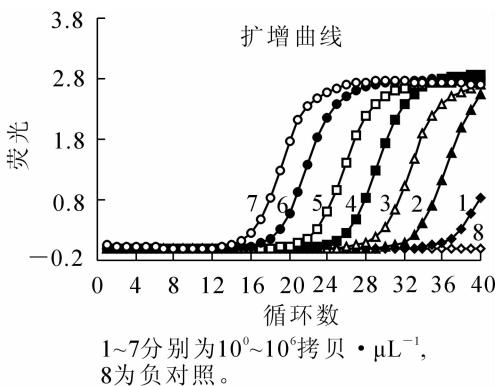


图4 敏感性实验结果

Figure 4 Results of sensitivity analysis

表4 临床样品检测结果

Table 4 Analysis of clinical samples

样品来源	阳性样品	阴性样品	普通PCR		实时荧光定量PCR	
			阳性数(阴性)	符合率/%	阳性数(阴性)	符合率/%
国茂	19	0	7(12)	36.8	19(0)	100
国正	11	4	6(9)	66.7	11(4)	100
总计	30	4	13(21)	50.0	30(4)	100

前, 对PCV2引起疾病的诊断标准、致病机理以及对病毒本身的防治研究还不清晰^[15]。PCV2引起疾病的预防主要通过注射疫苗, 但是免疫效果不理想。

PCV2引起疾病的诊断主要采用临床症状、病理剖解和实验室诊断等, 这些方法诊断结果准确, 但耗时长、工作量大, 实际生产中难以推广应用^[16]。此外, 这些方法对亚临床感染猪的诊断经常会遭遇困难。为了解决这些问题, 实验室开展了血清中和实验、ELISA、胶体金试纸和PCR等方法用于检测PCV2^[17-21]。研究发现, 猪圆环病毒2-dCap-ELISA抗体检测试剂盒在检测PCV2中具有成本低、不需要特殊仪器且能满足基层需要的优点^[18], 但是操作过程比较繁琐, 中间环节可能会带来污染。而琼脂扩散试验和圆环病毒抗体胶体金试纸条检测PCV2的方法, 虽然特异性、稳定性、符合率等都很高^[17], 但是依然存在较高假阳性问题。近年来, 实时荧光定量PCR方法在疾病检测方面的应用, 进一步提高了检测的灵敏度, 缩短了检测时间。

本研究根据PCV2 ORF2基因设计实时荧光定量PCR引物。ORF2编码病毒的核衣壳蛋白(Cap), 该蛋白可引起感染猪产生高含量的抗体, 且在2个血清型(PCV1和PCV2)之间无交叉反应性, 是检测病毒抗体水平的良好抗原^[22]。因此, ORF2也成为PCR鉴别PCV2的重要基因^[9]。郭慧娟等^[23]根据ORF2设计TaqMan实时荧光定量PCR引物, 建立了PCV2检测方法, 其灵敏度高达到 4.53×10^2 拷贝· μL^{-1} , 而曹伟伟等^[16]TaqMan实时荧光定量PCR方法的最低检测限度为5.06拷贝· μL^{-1} 。而SYBR Green I Real-time PCR检测方法的灵敏度基本在10~100拷贝· μL^{-1} , 比普通PCR检测方法检测灵敏度提高100~1 000倍^[24-25]。

本研究建立的实时荧光定量PCR检测PCV2的方法能够对处于亚临床状态猪进行检测, 可以为该病的治疗抢得宝贵时间。本研究建立的实时荧光定量PCR方法与普通PCR相比, 灵敏度提高了1 000倍, 和已报道实时荧光定量PCR^[16, 23, 25-26]检测PCV2的灵敏度相似。总体来说, 实时荧光定量PCR方法检测费用较高, 所需仪器和操作环境要求较高。但是, 本研究建立的实时荧光定量PCR检测PCV2的方法重复性和特异性高, 不会造成错诊, 会大大减少因病毒蔓延导致的猪场经济损失。此外, 本研究建立的实时荧光定量PCR还可以对PCV2进行准确定量, 对感病猪的早期诊断和猪场分类防治管理提供了重要的依据。

4 参考文献

- [1] GRAU-ROMA L, FRAILE L, SEGALES J. Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2 [J]. *Vet J*, 2011, **187**(1): 23 – 32.
- [2] ALLAN G M, ELLIS J A. Porcine circoviruses: a review [J]. *J Vet Diagn Invest*, 2000, **12**(1): 3 – 14.
- [3] 陈溥言, 华修国. 断奶仔猪多系统消耗综合征[J]. 畜牧与兽医, 2002, **34**(7): 33 – 35.
- CHEN Puyan, HUA Xiuguo. Postweaning multisystemic wasting syndrome [J]. *Anim Husb & Vet Med*, 2002, **34**(7): 33 – 35.
- [4] 田晓婷, 李宝玉, 柳纪省. 猪圆环病毒的分子生物学与检测方法的研究现状[J]. 中国农学通报, 2012, **28**(14): 66 – 72.
- TIAN Xiaoting, LI Baoyu, LIU Jixing. A review for the molecular biology characteristics and molecular diagnosis methods of porcine circovirus [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2012, **28**(14): 66 – 72.
- [5] NAWAGITGUL P, MOROZOV I, BOLIN S R, et al. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein [J]. *J Gen Virol*, 2000, **81**(9): 2281 – 2287.
- [6] BLANCHARD P, MAHE D, CARIOLET R, et al. An ORF2 protein-based ELISA for porcine circovirus type 2 antibodies in post-weaning multisystemic wasting syndrome [J]. *Vet Microbiol*, 2003, **94**(3): 183 – 194.
- [7] 陈陆, 杨霞, 王江辉, 等. 猪圆环病毒 2 型(PCV2)河南分离株进化分析及 ORF2 基因的表达[J]. 农业生物技术学报, 2009, **17**(4): 561 – 566.
- CHEN Lu, YANG Xia, WANG Jianghui, et al. Phylogenetic analysis of porcine circovirus 2 (PVC2) isolated from Henan province and expression of the *ORF2* gene in *Escherichia coli* [J]. *J Agric Biotechnol*, 2009, **17**(4): 561 – 566.
- [8] 王子馨, 李坤, 刘金朋, 等. PCV2 *ORF2* 基因与猪 *IL-18* 基因共表达 DNA 疫苗的免疫原性[J]. 中国兽医学报, 2013, **33**(4): 532 – 537.
- WANG Zixin, LI Kun, LIU Jinpeng, et al. Enhancement of DNA vaccine potency against PCV2 by coexpression of PCV2 *ORF2* and *IL-18* genes [J]. *Chin J Vet Sci*, 2013, **33**(4): 532 – 537.
- [9] CHEUNG A K. Transcriptional analysis of porcine circovirus type 2 [J]. *Virology*, 2003, **305**(1): 168 – 180.
- [10] BRUNBORG I M, FOSSUM C, LIUM B, et al. Dynamics of serum antibodies to and load of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs in three finishing herds, affected or not by postweaning multisystemic wasting syndrome [J]. *Acta Vet Scand*, 2010, **52**: 22 – 31.
- [11] GUO Longjun, LU Yuehua, WEI Yanwu, et al. Porcine circovirus type 2 (PCV2): genetic variation and newly emerging genotypes in China [J]. *Virol J*, 2010, **7**(1): 273 – 285.
- [12] KURTZ S, GRAU-ROMA L, CORTEY M, et al. Pigs naturally exposed to porcine circovirus type 2 (PCV2) generate antibody responses capable to neutralise PCV2 isolates of different genotypes and geographic origins [J]. *Vet Res*, 2014, **45**: 29 – 38.
- [13] OPRIESSNIG T, MENG Xiangjin, HALBUR P G. Porcine circovirus type 2-associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies [J]. *J Vet Diagn Invest*, 2007, **19**(6): 591 – 615.
- [14] XIAO C T, HALBUR P G, OPRIESSNIG T. Global molecular genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) sequences confirms the presence of four main PCV2 genotypes and reveals a rapid increase of PCV2d [J]. *J Gen Virol*, 2015, **96**: 1830 – 1841.
- [15] STEINER E, BALMELLI C, GERBER H, et al. Cellular adaptive immune response against porcine circovirus type 2 in subclinically infected pigs [J]. *BMC Vet Res*, 2009, **5**(1): 45 – 57.
- [16] 曹伟伟, 郭抗抗, 许信刚, 等. 猪圆环病毒 II 型 *TaqMan* 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2013, **41**(1): 13 – 18.
- CAO Weiwei, GUO Kangkang, XU Xingang, et al. Establishment and application of *Taq Man* real-time fluorescent quantitative PCR for detecting porcine circovirus type II [J]. *J Northwest A & F Univ Nat Sci Ed*, 2013, **41**(1): 13 – 18.
- [17] 苗丽娟, 刘玉茹, 李静姬, 等. II 型猪圆环病毒 Cap 蛋白琼脂扩散试验检测方法的建立[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2013, **46**(9): 105 – 106.

- MIAO Lijuan, LIU Yuru, LI Jingji, *et al.* Establishment of Cap protein agar diffusion assay for detection of porcine circovirus type II [J]. *Heilongjiang Animal Sci Vet Med*, 2013, **46**(9): 105 – 106.
- [18] 赵玉龙, 焦玉兰, 郁宏伟, 等. 一种猪圆环病毒Ⅱ型ELISA抗体检测试剂盒的临床应用[J]. 中国兽药杂志, 2011, **45**(3): 31 – 34.
- ZHAO Yulong, JIAO Yulan, YU Hongwei, *et al.* Clinical applications of antibody detection ELISA kit for porcine circovirus type 2 [J]. *Chin J Vet Drug*, 2011, **45**(3): 31 – 34.
- [19] 岳丰雄, 崔尚金, 冉多良, 等. PCV2, PPV, PRV 和 PRRSV 多重PCR检测方法的建立及初步应用[J]. 中国兽医科学, 2008, **38**(8): 691 – 696.
- YUE Fengxiong, CUI Shangjin, RAN Duoliang, *et al.* Establishment and application of a multiplex PCR assay for simultaneous detection of PCV2, PPV, PRV and PRRSV [J]. *Chin Vet Sci*, 2008, **38**(8): 691 – 696.
- [20] YUE Fengxiong, CUI Shangjin, ZHANG Chaofan, *et al.* A multiplex PCR for rapid and simultaneous detection of porcine circovirus type 2, porcine parvovirus, porcine pseudorabies virus, and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in clinical specimens [J]. *Viru Gen*, 2009, **38**(3): 392 – 397.
- [21] LIU Changming, IHARA T, NUNOYA T, *et al.* Development of an ELISA based on the baculovirus-expressed capsid protein of porcine circovirus type 2 as antigen [J]. *J Vet Med Sci*, 2004, **66**(3): 237 – 242.
- [22] 郭官鹏, 刘畅, 陈龙彪, 等. 猪圆环病毒2型ORF2基因截断表达及ELISA抗体检测方法的初步建立[J]. 中国兽医学报, 2014, **34**(7): 1059 – 1064.
- GUO Guanpeng, LIU Chang, CHEN Longbiao, *et al.* Development of an indirecr ELISA based on prokaryotic expression of truncated ORF2 gene of porcine circovirus type 2 [J]. *Chin J Vet Sci*, 2014, **34**(7): 1059 – 1064.
- [23] 郭慧娟, 李秀丽, 张国伟, 等. 猪圆环病毒2型TaqMan荧光定量PCR检测方法的建立[J]. 中国畜牧兽医, 2014, **41**(5): 39 – 45.
- GUO Huijuan, LI Xiuli, ZHANG Guowei, *et al.* Establishment of Taq-Man real-time PCR for detection of porcine circovirus type II [J]. *China Anim Husb & Vet Med*, 2014, **41**(5): 39 – 45.
- [24] 张福良, 宋长绪, 杨鸣琦, 等. 猪圆环病毒2型荧光定量PCR检测方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2006, **26**(3): 248 – 250.
- ZHANG Fuliang, SONG Changxu, YANG Mingqi, *et al.* Development of fluorescent quantitative PCR assay for PCV2 detection [J]. *Chin J Vet Sci*, 2006, **26**(3): 248 – 250.
- [25] 李鹏, 郭军庆, 金前跃, 等. 猪圆环病毒2型荧光定量PCR检测方法的建立[J]. 华北农学报, 2014, **29**(2): 66 – 70.
- LI Peng, GUO Junqing, JIN Qianyue, *et al.* Rapid detection of porcine circovirus type 2 using a SYBR Green I real-time PCR [J]. *Acta Agric Boreal-Sin*, 2014, **29**(2): 66 – 70.
- [26] 董林, 王艳萍, 魏凤, 等. 猪圆环病毒2型SYBR Green I实时荧光定量PCR检测方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2013, **43**(10): 1073 – 1078.
- DONG Lin, WANG Yanping, WEI Feng, *et al.* Development and application of a SYBR Green I real-time fluorescent quantitative PCR method for detection of type 2 porcine circovirus [J]. *Chin J Vet Sci*, 2013, **43**(10): 1073 – 1078.

实时荧光定量 PCR 定量检测山核桃干腐病病菌 潜伏侵染量方法的建立

朱致翔, 时浩杰, 雷飞斌, 张传清

(浙江农林大学 农业与食品科学学院, 浙江 临安 311300)

摘要: 由茶糜子葡萄座腔菌 *Botryosphaeria dothidea* 引起的山核桃 *Carya cathayensis* 干腐病是山核桃栽培过程中的主要病害, 该病菌表现明显的“潜伏侵染”特性。研究山核桃树体中干腐病菌的定量检测技术对山核桃干腐病的预测预报及科学防治具有重要的指导意义。根据茶糜子葡萄座腔菌的 *EF1 α* 基因设计特异性引物, 通过普通聚合酶链式反应(PCR)和实时荧光定量 PCR(real-time PCR)扩增发现引物 EFRT-F1/R1 对山核桃干腐病病菌的特异性及扩增效率较高, 可稳定扩增出 230 bp 的目标条带。应用此特异性引物建立的实时荧光定量 PCR 干腐病病菌检测方法能够定量检测出山核桃植株样品中的病菌含量, 灵敏度要比普通 PCR 高 100 倍。图 6 参 8

关键词: 森林保护学; 山核桃干腐病; 实时荧光定量 PCR; 特异性引物; 基因组 DNA

中图分类号: S718.83 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2016)02-0364-05

Quantifying *Botryosphaeria dothidea* infection causing canker disease on *Carya cathayensis* using real-time PCR

ZHU Zhixiang, SHI Haojie, LEI Feibin, ZHANG Chuanqing

(School of Agricultural and Food Science, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: Canker disease caused by *Botryosphaeria dothidea* is the most important disease that threaten the production of Chinese hickory and has the significant characteristics of “latent infection”. Therefore, the development of a quantitative detection technique of *B. dothidea* in hickory plants is the prerequisite for its forecasting and scientific management. In this study, specific primers were respectively designed based on the conserved regions of *EF1 α* gene of *B. dothidea*. Results of both real-time PCR and common PCR showed that the specificity and sensitivity of EFRT-F1/R1 was good primer pair. A band of 230 bp could be stably amplified by the primers EFRT-F1/R1. Further study displayed that this real-time PCR technique is more sensitive (more than 100 fold) than the common one. Our molecular detection technique will provide scientific basis for forecast, and management of hickory canker disease. [Ch, 6 fig. 8 ref.]

Key words: forest protection; comker disease; real-time PCR; specific primers; genome DNA

山核桃 *Carya cathayensis* 又名核桃楸、胡桃楸, 胡桃科 Juglandaceae 山核桃属 *Carya* 植物。山核桃的果实种仁极富营养价值和口感, 深受消费者喜爱, 具有很高的经济价值。山核桃干腐病是山核桃在栽培生产过程中一种常见的病害, 染病植株产量会明显下降, 严重时可造成植株死亡, 影响农户收益^[1]。山核桃干腐病菌 *Botryosphaeria dothidea* 属于囊菌纲 Ascomycetes 葡萄座腔菌科 Botryosphaeriaceae 葡萄座腔菌属 *Botryosphaeria*^[2]。葡萄座腔菌属的特性多为子座散生, 内含多个子囊壳, 壳壁黑褐色, 子囊壳呈球形或近球形, 顶端具乳头状突起, 孔口外露; 子囊黑褐色倒棒状, 内含 8 个子囊孢子。子囊孢子梭

收稿日期: 2015-04-03; 修回日期: 2015-05-31

基金项目: 国家林业局公益性行业科研专项(201304403)

作者简介: 朱致翔, 从事植物病害治理研究。E-mail: zhuzhixiang@189.cn。通信作者: 张传清, 教授, 从事杀菌剂与植物病害治理研究。E-mail: cqzhang@zafu.edu.cn

形, 无色透明, 单胞, 椭圆形, 双列, 大小(16.8~26.4) $\mu\text{m} \times$ (7.0~10.0) μm 。山核桃干腐病的发病期为每年的3月下旬至11月下旬, 以菌丝体在病组织周围越冬, 具有明显的潜伏侵染特性^[3]。干腐病菌全年存在于树体内, 而明显症状需要等到4~5月才能表现出来, 如果等出现症状时才开始进行防治, 有可能达不到预期效果。实现山核桃干腐病的早期、准确、快捷地定量测定对山核桃干腐病病害的预测预报和防治有极其重要的意义。利用实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time flurescent quantitative PCR)技术可以对DNA目的片段进行实时检测, 在PCR体系中添加特定的荧光结合物质或者荧光探针, 受体荧光染料发射出的荧光信号强度与DNA产量成正比, 通过检测荧光信号的变化来监测PCR反应过程, 从而达到定量目的^[4~5]。通过实时荧光定量PCR技术可在病害的潜伏期准确确定病害的发生程度, 以便做好防治措施, 从而减轻危害, 提高经济效益。潘娟娟等^[6]运用实时荧光定量PCR对小麦条锈菌 *Puccinia striiformis* 进行了检测, 其检测效果令人满意。本研究拟建立的实时荧光定量PCR检测方法能够用于监测山核桃树体内潜伏侵染期内的含菌量, 对于做好早期预防, 指导病害的适时防治具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

所用菌系为山核桃干腐病菌, 均于2014年8月4日采集自浙江省临安市湍口镇的山核桃林, 并经过多次培养、纯化得到。

1.2 山核桃干腐病病菌DNA与无病山核桃植株及所有微生物总基因组DNA的提取

使用生工生物工程(上海)有限公司生产的真菌基因组DNA快速抽提试剂盒提取干腐病菌DNA(提取方法参照试剂盒使用说明书), 并使用该公司生产的Ezup柱式基因组DNA抽提试剂盒(植物)提取无病山核桃植株及所有微生物总基因组DNA(提取方法参照试剂盒使用说明书)。其中提取无病山核桃植株及所有微生物总基因组DNA时, 所有样品均随机取于5~10年生的山核桃植株主干未发病处树皮, 具体见1.7。所有DNA样品置于-20℃保存备用。

1.3 山核桃干腐病病菌特异性引物的设计

参考葡萄座腔菌 *EF1 α* (GenBank: HM176506.1, elongation factor 1 alpha (EF))基因的序列, 使用Beacon Designer7软件各设计山核桃干腐病病菌特异性引物: EFRT-F1(5'>TTTGCCTTATCACTCTCT<3')和EFRT-R1(5'>TACTTGAAGGAACCCTTG<3'), 引物由杭州擎科梓熙生物技术有限公司合成。设计的引物能够精确区分葡萄座腔菌与引起山核桃病害的其他病原物。

1.4 引物特异性检测

应用特异性引物对山核桃干腐病菌DNA和无病山核桃植株及所有微生物总基因组DNA进行普通PCR扩增和实时荧光定量PCR扩增, 测定引物特异性。

普通PCR反应体系为: 25.0 μL , 其中2×PCR缓冲液12.5 μL (生工生物), 上述合成的引物各1.0 μL , 灭菌蒸馏水10.0 μL , 模板0.5 μL 。反应程序为: 95℃5 min; 94℃30 s, 56℃30 s, 72℃30 s; 30个循环; 72℃延伸5 min。PCR产物经质量浓度为1.5%琼脂糖凝胶电泳(140 V, 14 min), 经过溴化乙锭(EB)染色后, 用天能2200凝胶成像系统成像。

实时荧光定量PCR反应体系为: 25.0 μL , 其中, SYBR 12.5 μL (TAKARA, Premix EX *Taq*TM II), 引物各1.0 μL , 模板为2.0 μL , 灭菌蒸馏水8.5 μL 。反应程序为: 95℃5 min; 95℃5 s, 56℃30 s, 72℃25 s; 40个循环; 65℃延伸5 s。通过溶解曲线判断是否有唯一的产物峰。

1.5 引物灵敏度检测

将制备的山核桃干腐病菌DNA稀释为100 000.0, 10 000.0, 1 000.0, 100.0, 10.0, 1.0, 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 等不同的质量浓度梯度, 用该引物进行普通PCR扩增与实时荧光定量PCR扩增, 测定该引物的灵敏度(反应体系和条件同1.4所述)。

1.6 特异性引物的实时荧光定量PCR标准曲线的绘制

将山核桃干腐病菌DNA用EASY Dilution(TAKARA)定量后梯度稀释(同1.5所述), 用特异性引物使用CFX96TM real-time PCR Detection System(Bio-Rad)进行实时荧光定量PCR扩增, 重复3次, 用Excel软件生成标准曲线。

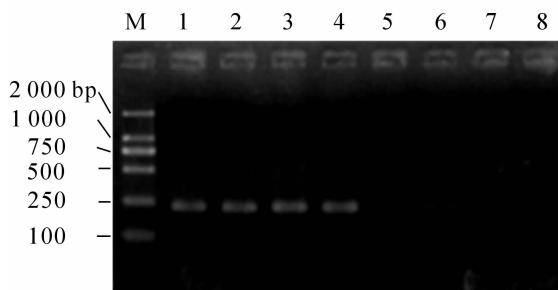
1.7 实时荧光定量 PCR 定量检测山核桃样品中的病原菌含量

于2014年10月6日正浙江省临安市湍口镇采集山核桃样品6份,其中发病部位样品3份,无病健康样品3份,提取总基因组DNA(总量为100.0 μ L),进行实时荧光定量PCR检测其中山核桃干腐病病菌的含量。DNA提取方法参照Ezup柱式基因组DNA抽提试剂盒(植物)说明书。

2 结果与分析

2.1 山核桃干腐病病菌特异性引物的测定

应用引物EFRT-F1/R1分别以山核桃干腐病病菌DNA和无病山核桃植株及所有病原物总DNA为模板进行PCR扩增,结果表明:应用该引物能够扩增出以山核桃干腐病病菌DNA为模板的目标条带,而以山核桃健康无病植株及所有微生物总基因组DNA为模板的均未扩增出目标条带(图1)。实时荧光定量PCR扩增结果同样表明:该对引物对山核桃干腐病菌只有唯一的产物吸收峰(图2)。因此该引物相对于山核桃干腐病病菌具有特异性,可用于后续试验。



M为DL, 2 000 DNA marker(TAKARA); 1~4组为山核桃干腐病病菌EF1 α 基因的DNA条带; 5~8组为以无病山核植株及所有微生物总基因组DNA为模板的EF1 α 基因条带。

图1 引物EFRT-F1/R1对山核桃干腐病病菌的特异性电泳图谱

Figure 1 Specificity of the selected primer pair EFRT-F1/R1 to *Botryosphaeria dothidea*

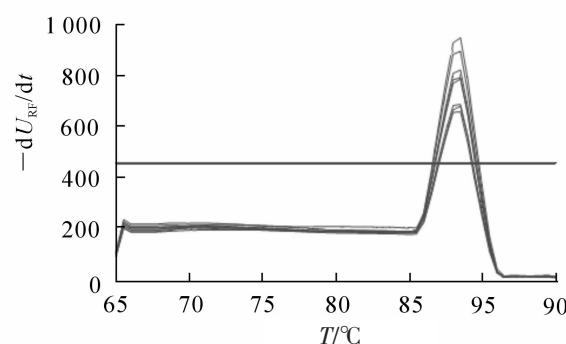


图2 应用引物EFRT-F1/R1对山核桃干腐病病菌实时荧光定量PCR扩增的溶解曲线

Figure 2 Melting curves of real-time PCR amplification of *Botryosphaeria dothidea* based on primer pair EFRT-F1/R1

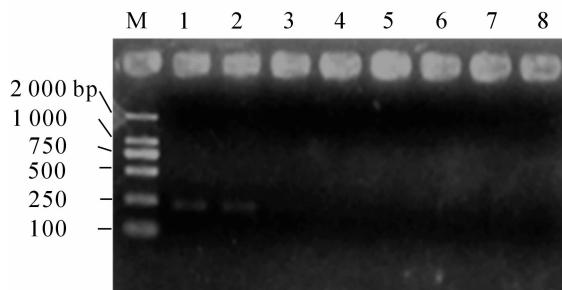
2.2 引物在常规PCR及实时荧光定量PCR下的灵敏度测定

利用梯度稀释的山核桃干腐病病菌DNA对特异性引物分别做普通PCR与实时荧光定量PCR的灵敏度测定。普通PCR电泳结果显示到第2条,所对应的模板浓度为10 000.0 μ g·L⁻¹,表明在普通PCR条件下,应用该引物最低可以检测到10 000.0 μ g·L⁻¹的病原菌DNA量(图3)。在实时荧光定量PCR条件下,应用该引物对不同浓度梯度的模板DNA进行检测,重复3次,发现第1~4条的 c_q 值呈线性关系,所对应的模板DNA质量浓度分别为100 000.0, 10 000.0, 1 000.0, 100.0 μ g·L⁻¹,自第5条起无线性关系,因此可确定在普通实时荧光定量PCR条件下,应用该引物最低可以检测到100.0 μ g·L⁻¹的病原菌DNA(图4)。运用实时荧光定量PCR的检测灵敏度是普通PCR的100倍。

2.3 实时荧光定量PCR定量检测山核桃样品中的菌量

2.3.1 标准曲线 将山核桃干腐病病菌DNA用EASY Dilution梯度稀释后(同1.5所述),用引物EFRT-F1/R1扩增建立标准曲线(图5)。线性方程为 $y=-3.2620x+27.106$ ($R^2=0.9970$),其中 y 为 c_q 值, x 为山核桃干腐病菌DNA质量浓度常用对数(lg)值。

2.3.2 山核桃样品中病原菌的实时荧光定量PCR定量测定 应用特异性引物EFRT-F1/R1以1.7的样品DNA为模板进行实时荧光定量PCR检测,结果显示:样品1,样品2和样品3的山核桃干腐病病菌含量是可以检测出的,由回归曲线可算得,样品1中病菌质量分数为2 493.5 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$,样品2中病菌质量分数为587.2 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$,样品1中病菌质量分数为744.1 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 。



M为DL 2000 DNA Marker; 1~7组分别为100 000.0, 10 000.0, 1 000.0, 100.0, 10.0, 1.0, 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; 第8组为空白模板。

图3 运用普通PCR探测引物EFRT-F1/R1的灵敏度

Figure 3 Sensitivity of PCR detection using primer pair EFRT-F1/R1

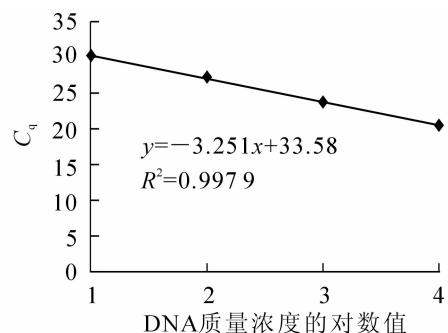


图5 质量浓度从100.0~100 000.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的10倍稀释液的回归曲线

Figure 5 Standard curve developed by using 10-fold dilutions of DNA of 100.0~100 000.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

3 讨论

INDERBITZIN等^[7]对常见的葡萄座腔菌科7种病原真菌进行了研究,比较了ITS, EF1 α , GPD, His, Hsp, Tublin, Combened基因片段的可变序列。结果表明:它们的EF1 α 基因片段的可变序列的比例相对较高。EF1 α 是葡萄座腔菌属真菌常见的保守基因,由于该基因片段在同属真菌中可变序列比例相对较高,因此同属不同种的真菌的EF1 α 基因片段差异较大,根据EF1 α 基因设计的引物更具特异性。本研究以此为参照,根据EF1 α 基因设计出特异性引物。山核桃主要病害有干腐病、枝枯病、膏药病等,本研究所设计的引物可以扩增出山核桃干腐病病菌的目的基因片段,以区别其他病原物。

目前,实时荧光定量PCR技术已经非常成熟,能够有效地应用于病原菌等微生物的检测,并且灵敏度非常高^[8]。应用实时荧光定量PCR对小麦条锈病病菌DNA进行定量检测,其灵敏度约为100.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,比普通PCR高出100倍^[6]。本研究对比了普通PCR和实时荧光定量PCR的扩增结果可得后者的扩增灵敏度比普通PCR高100倍。普通PCR在电泳过程中受外界干扰较大,进而导致低的扩增产物在凝胶成像仪中无法成像,灵敏度相对较低。

山核桃干腐病是山核桃生产中重要的病害,具有明显的潜伏侵染特性。因此,山核桃干腐病的早期监测和病菌的定量分析具有重要意义。本研究运用上述建立的方法对多个山核桃样品进行检测,再通过标准曲线的线性回归方程可以准确计算出这些样品中的病原菌含量,并且,制定了山核桃干腐病的经济阈值,对农业生产和化学农药合理使用的意义也十分重大。

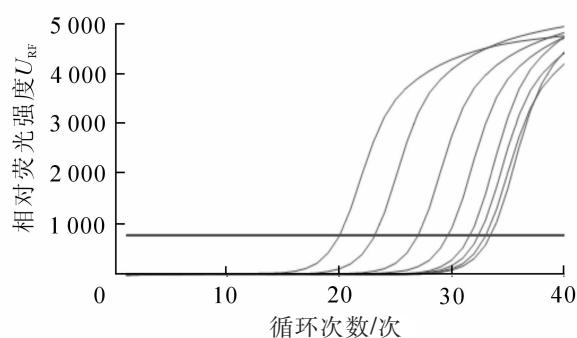


图4 运用实时荧光定量PCR探测引物EFRT-F1/R1的灵敏度

Figure 4 Sensitivity of real-time PCR detection using primer pair EFRT-F1/R1

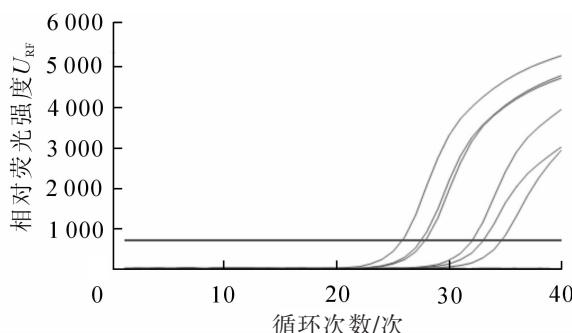


图6 运用实时荧光定量PCR检测样品的 c_q 值

Figure 6 Detection of sample c_q by using real-time PCR

4 参考文献

- [1] 郑宏兵, 杜庆龙, 丁之恩. 山核桃溃疡病与营养元素的关系[J]. 经济林研究, 2007, **25**(3): 19 – 23.
ZHENG Hongbing, SHU Qinglong, DING Zhien. Relationship between nutrient elements in bark and canker of *Carya cathayensis* [J]. *Nonwood For Res*, 2007, **25**(3): 19 – 23.
- [2] ZHANG Chuangqing, XU Bingchao. First report of canker on Chinese hickory (*Carya cathayensis*) caused by *Botryosphaeria dothidea* in China [J]. *Plant Dis*, 2011, **95**(10): 1319.
- [3] 杨淑贞, 丁立忠, 楼君芳, 等. 山核桃干腐病发生发展规律及防治技术[J]. 浙江林学院学报, 2009, **26**(2): 228 – 232.
YANG Shuzhen, DING Lizhong, LOU Junfang, et al. Occurrence regularity of *Carya cathayensis* canker disease and its control [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2009, **26**(2): 228 – 232.
- [4] 郑亚明. 小麦叶片中潜伏侵染白粉菌的 Real-time PCR 检测技术的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2010.
ZHENG Yaming. *Detection of Latent Infection of Wheat Leaves Caused by Blumeria graminis f. sp. tritici Using Real-time PCR* [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2010.
- [5] 王华, 刘斌. PCR 技术在食品微生物检测中的应用[J]. 生物技术通报, 2010(2): 63 – 67.
WANG Hua, LIU Bin. Latest application of PCR technology in food microorganism inspection [J]. *Biotechnol Bull*, 2010(2): 63 – 67.
- [6] 潘娟娟, 骆勇, 黄冲, 等. 应用 real-time PCR 定量检测小麦条锈菌潜伏侵染量方法的建立[J]. 植物病理学报, 2010, **40**(5): 504 – 510.
PAN Juanjuan, LUO Yong, HUANG Chong, et al. Quantification of latent infections of wheat stripe rust by using real-time PCR [J]. *Acta Phytopathol Sin*, 2010, **40**(5): 504 – 510.
- [7] INDERBITZIN P, BOSTOCK R M, TROUILLAS F P, et al. A six locus phylogeny reveals high species diversity in Botryosphaeriaceae from California Almond [J]. *Mycologia*, 2010, **102**(6): 1350 – 1368.
- [8] 闫佳会, 骆勇, 潘娟娟, 等. 应用 real-time PCR 定量检测田间小麦条锈菌潜伏侵染的研究[J]. 植物病理学报, 2011, **41**(6): 618 – 625.
YAN Jiahui, LUO Yong, PAN Juanjuan, et al. Quantification of latent infection of wheat stripe rust in the fields using real-time PCR [J]. *Acta Phytopathol Sin*, 2011, **41**(6): 618 – 625.