

ISSN 1000-0933
CN 11-2031/Q

生态学报

Acta Ecologica Sinica



第31卷 第18期 Vol.31 No.18 **2011**

中国生态学学会
中国科学院生态环境研究中心
科学出版社

主办
出版



中国科学院科学出版基金资助出版

生态学报

(SHENGTAI XUEBAO)

第 31 卷 第 18 期 2011 年 9 月 (半月刊)

目 次

高寒矮嵩草草甸冬季 CO ₂ 释放特征	吴 琴, 胡启武, 曹广民, 等 (5107)
开垦对绿洲农田碳氮累积及其与作物产量关系的影响	黄彩变, 曾凡江, 雷加强, 等 (5113)
施氮对几种草地植物生物量及其分配的影响	祁 瑜, 黄永梅, 王 艳, 等 (5121)
浙江天台山甜槠种群遗传结构的时空自相关分析	祁彩虹, 金则新, 李钧敏 (5130)
大兴安岭林区不同植被对冻土地温的影响	常晓丽, 金会军, 于少鹏, 等 (5138)
樟子松树轮不同组分的稳定碳同位素分析	商志远, 王 建, 崔明星, 等 (5148)
内蒙古不同类型草地叶面积指数遥感估算	柳艺博, 居为民, 朱高龙, 等 (5159)
杭州西湖北里湖荷叶枯落物分解及其对水环境的影响	史 绮, 焦 锋, 陈 莹, 等 (5171)
火干扰对小兴安岭落叶松-苔草沼泽温室气体排放的影响	于丽丽, 牟长城, 顾 韩, 等 (5180)
黄河中游连伯滩湿地景观格局变化	郭东罡, 上官铁梁, 白中科, 等 (5192)
黄土区次生植被恢复对土壤有机碳官能团的影响	李 婷, 赵世伟, 张 扬, 等 (5199)
我国东北土壤有机碳、无机碳含量与土壤理化性质的相关性	祖元刚, 李 冉, 王文杰, 等 (5207)
黄土旱塬裸地土壤呼吸特征及其影响因子	高会议, 郭胜利, 刘文兆 (5217)
宁南山区典型植物根际与非根际土壤微生物功能多样性	安韶山, 李国辉, 陈利顶 (5225)
岩溶山区和石漠化区表土孢粉组合的差异性——以重庆市南川区为例	郝秀东, 欧阳绪红, 谢世友 (5235)
夏蜡梅及其主要伴生种叶的灰分含量和热值	金则新, 李钧敏, 马金娥 (5246)
苏柳 172 和垂柳对 Cu ²⁺ 的吸收特性及有机酸影响	陈彩虹, 刘治昆, 陈光才, 等 (5255)
导入 <i>TaNHX2</i> 基因提高了转基因普那菊苣的耐盐性	张丽君, 程林梅, 杜建中, 等 (5264)
空气湿度与土壤水分胁迫对紫花苜蓿叶表皮蜡质特性的影响	郭彦军, 倪 郁, 郭芸江, 等 (5273)
黄土高原旱塬区土壤贮水量对冬小麦产量的影响	邓振镛, 张 强, 王 强, 等 (5281)
咸阳地区近年苹果林地土壤含水量动态变化	赵景波, 周 旗, 陈宝群, 等 (5291)
苗药大果木姜子挥发油成分变化及其地理分布	张小波, 周 涛, 郭兰萍, 等 (5299)
环境因子对小球藻生长的影响及高产油培养条件的优化	丁彦聪, 高 群, 刘家尧, 等 (5307)
不同基质对北草蜥和中国石龙子运动表现的影响	林植华, 樊晓丽, 雷焕宗, 等 (5316)
安徽沿江浅水湖泊越冬水鸟群落的集团结构	陈锦云, 周立志 (5323)
黑胸散白蚁肠道共生锐滴虫目鞭毛虫的多样性分析与原位杂交鉴定	陈 文, 石 玉, 彭建新, 等 (5332)
基于熵权的珠江三角洲自然保护区综合评价	张林英, 徐颂军 (5341)
专论与综述	
中小尺度生态用地规划方法	荣冰凌, 李 栋, 谢映霞 (5351)
土地利用变化对土壤有机碳的影响研究进展	陈 朝, 吕昌河, 范 兰, 等 (5358)
海洋浮游植物与生物碳汇	孙 军 (5372)
多年冻土退化对湿地甲烷排放的影响研究进展	孙晓新, 宋长春, 王宪伟, 等 (5379)
生源要素有效性及生物因子对湿地土壤碳矿化的影响	张林海, 曾从盛, 仝 川 (5387)
生态网络分析方法研究综述	李中才, 徐俊艳, 吴昌友, 等 (5396)
研究简报	
不同群落中米氏冰草和羊草的年龄结构动态	金晓明, 艾 琳, 刘及东, 等 (5406)
主题分辨率对 NDVI 空间格局的影响	黄彩霞, 李小梅, 沙晋明 (5414)

期刊基本参数: CN 11-2031/Q * 1981 * m * 16 * 314 * zh * P * ¥ 70.00 * 1510 * 35 * 2011-09



封面图说: 在树上嬉戏的大熊猫——大熊猫是中国的国宝, 自然分布狭窄, 数量极少, 世界上仅分布在中国的四川、陕西、甘肃三省的部分地区, 属第四纪冰川孑遗物种, 异常珍贵。被列为中国国家一级重点保护野生动物名录, 濒危野生动植物种国际贸易公约绝对保护的 CITES 附录一物种名录。瞧, 够得上“功夫熊猫”吧。

彩图提供: 陈建伟教授 国家林业局 E-mail: cites.chenjw@163.com

张丽君,程林梅,杜建中,郝曜山,王亦学,李贵全,孙毅. 导入 *TaNHX2* 基因提高了转基因普那菊苣的耐盐性. 生态学报, 2011, 31 (18): 5264-5272.
Zhang L J, Cheng L M, Du J Z, Hao Y S, Wang Y X, Li G Q, Sun Y. Introduction of *TaNHX2* gene enhanced salt tolerance of transgenic puna chicory plants. Acta Ecologica Sinica, 2011, 31 (18): 5264-5272.

导入 *TaNHX2* 基因提高了转基因普那菊苣的耐盐性

张丽君^{1,2}, 程林梅², 杜建中², 郝曜山², 王亦学², 李贵全^{1,*}, 孙毅^{1,2,*}

(1. 山西农业大学, 太谷 030081; 2. 山西省农业科学院生物技术研究中心, 太原 030031)

摘要:我国部分地区土地盐碱化的日益严重,对作物的生长和生态环境产生了显著影响,因此通过植物基因工程手段培育耐盐碱的转基因作物品种对改善作物的生存能力和生态环境,提高作物产量具有重要的意义。采用农杆菌介导法将来自小麦 (*Triticum aestivum* Linn) 的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的基因 (vacuolar Na^+/H^+ exchanger or antiporter, 简称 NHX、NHE 或 NHA), 对普那菊苣 (*Cichorium intybus* L. cv. Puna) 植株进行了遗传转化。经抗生素筛选以及针对 *TaNHX2* 基因的 PCR 检测和 Southern 杂交分析,证明获得了 28 株转 *TaNHX2* 基因的普那菊苣植株。用不同浓度 NaCl 溶液对普那菊苣野生型和 T_0 代种子、愈伤组织和幼苗生长情况胁迫的研究,结果表明:转 *TaNHX2* 基因普那菊苣植株表现出一定的抗性,比野生型明显提高。在 300 mmol/L NaCl 胁迫下转基因植株种子的出芽率、外植体出愈率和分化率是野生型植株的 2—4 倍,而 500 mmol/L NaCl 浓度为野生型和转基因外植体能否生长的临界点。在此临界值下野生型外植体或不能形成愈伤组织、或幼苗不能正常生根、或已生根幼苗不能正常成长,而转基因外植体可以继续形成愈伤组织并正常生根生长。同时对 500 mmol/L NaCl 胁迫下野生型和转基因普那菊苣幼苗其体内丙二醛含量 (MDA)、过氧化氢酶 (POD) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 活性进行测定,结果表明 转基因植株比野生型植株的 MDA 含量降低了 1—3 倍,POD 活性提高了 1—3 倍,SOD 活性提高了 2—3 倍,分析发现普那菊苣的耐盐性与其体内的丙二醛含量 (MDA)、过氧化氢酶 (POD) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 活性密切相关。

关键词: 普那菊苣; *TaNHX2*; 转基因; 耐盐性

Introduction of *TaNHX2* gene enhanced salt tolerance of transgenic puna chicory plants

ZHANG Lijun^{1,2}, CHENG Linmei², DU Jianzhong², HAO Yaoshan², WANG Yixue², LI Guiquan^{1,*}, SUN Yi^{1,2,*}

1 Shanxi Agriculture University Taiyu 030081, China

2 Biotechnology Research Center, Shanxi Academy of Agricultural Sciences Taiyuan 030031, China

Abstract: The growing severity of land salinization and alkalization in some areas of China has resulted in adverse impacts on crop production and agriculture-ecological environment. Soil salinity is one of the major limiting factors affecting crop growth, development and yield in arid and semiarid regions of China. Therefore, breeding for saline and alkaline tolerant crop varieties through genetic engineering approaches is of great significance for improving the crop survivability in saline and alkaline conditions and ecological environment, as well as for enhancing crop production. With the development of molecular biology and genetic transformation technology, numerous genes related to saline and alkaline tolerances have been found and cloned. Introduction of these genes into various plants has achieved rapid improvement of their tolerances saline and alkaline conditions. *Cichorium intybus* L. cv. Puna. belonging to Asteraceae family is commonly known as witloof chicory and widely distributed in northern, and central China. In this study, a wheat (*Triticum aestivum* Linn) vacuolar Na^+/H^+ exchanger gene (*TaNHX2*), in connection with plant salt tolerance, was introduced into puna chicory using *Agrobacterium*-mediated transformation approach. Puna chicory leaf segments were precultured for 2—3 days before being

基金项目:国家转基因生物新品种培育重大专项 (2009ZX08003-017B); 山西省农科院攻关项目 (Ygg0912)

收稿日期: 2011-03-30; **修订日期:** 2011-07-11

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: li-gui-quan@126.com; sunyi692003@yahoo.com.cn

co-cultivated with the *Agrobacterium* strain, pBin438-TaNHX, which containing the target gene₂. Transformed buds were selected on the MS medium containing kanamycin (80mg/L) and Cefalexin (1000mg/L), and 28 putative transgenic lines were obtained and used for further molecular and biological assay. Analysis of the transgenic plants was performed by using PCR and Southern blot hybridization, which proved that the wheat vacuolar Na^+/H^+ exchanger gene was successfully integrated into puna chicory genome. Effects of NaCl concentration on growth of wild type and T_0 seed germination, callus induction and seedling growth were investigated. The results indicated that transgenic puna chicory explants tolerated certain concentrations of NaCl up to 500 mmol/L, which was much higher than that of the wild type. Under 300 mmol/L NaCl stress, the transgenic seeds germinating rate, callus induction rate and bud regeneration rate were 2—4 times higher than the wide type. NaCl concentration of 500 mmol/L was the maximum amount for the survival of wide type puna chicory plantlets, under which transgenic explants could form calli, buds, and roots, and grow normally but the wild type explants could not. We also measured the contents of malonaldehyde (MDA), and activities of peroxidase (POD) and superoxide dismutase (SOD) in transgenic puna chicory seedlings and its wild counterpart. Under the stress of 500 mmol/L NaCl the MDA content was decreased by 1—3 times, superoxide dismutase (SOD) activity was increased by 2—3 times and peroxidase (POD) activity was increased by 1—3 times compared with those in wide type plants. The decrease of MDA content in transgenic puna chicory seedlings was negatively correlated and the increases of the enzyme activities in them were positively correlated with their tolerance to NaCl. Above all, we can make a conclusion that salt-tolerant transgenic puna chicory plants, could be obtained by introducing wheat vacuolar Na^+/H^+ exchanger gene into by plant engineering approaches.

Key Words: Puna chicory; *TaNHX2*; genetic transformation; salt tolerance

土壤盐碱化是影响生态环境和农业生产的重要问题。我国西北地区自然条件恶劣,生态环境脆弱,干旱少雨,土壤盐碱化严重,许多地方年降雨量不足 300mm,属于干旱、半干旱区域。近几十年来,更是由于过度放牧、不合理开垦、滥采滥伐等原因,造成我国 3 亿 hm^2 草地中有 0.8 亿 hm^2 草地严重盐碱化、沙化、退化,使原本就脆弱的生态环境遭到毁灭性的破坏,严重制约我国畜牧业的发展,影响人民生活水平的提高。改善西部生态环境的重点是恢复林草植被,防止水土流失,加快加强生态环境保护和建设。目前西北地区可利用的优良牧草品种较少,品种更新慢是牧草生产存在的主要问题之一。如何开垦和利用这些盐碱化土壤,并在短期内培育出适合于我国西北部地区栽培的抗干旱、耐盐碱的牧草新品种,是当前农业生产中的亟需解决的重要问题。随着分子遗传学和植物转基因技术的快速发展,通过基因工程手段将外源优良基因导入栽培作物品种中,可以打破物种之间杂交不亲和的界限,具有高效性和针对性,可弥补常规育种技术的不足,缩短育种周期。因此利用基因工程育种技术可加速选育出优质、抗逆的转基因牧草新品种,满足我国西北地区生态建设和畜牧业生产的需求。

高等植物 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白存在于质膜和液泡膜上,分别称为 P 型和 V 型;分别利用 P 型 H^+ -ATPase 和 V 型 H^+ -ATPase 及 V 型 H^+ -PPase 建立的跨膜质子梯度作为驱动力,驱动 Na^+ 运出细胞或区域化在液泡^[1-2],特别是在高盐生境下维持细胞质 Na^+ 稳态和 Na^+/K^+ 相对稳定,减少 Na^+ 对胞质中细胞器的毒害;同时,区隔化在液泡中的 Na^+ 降低了细胞的渗透势,促使细胞从外界胁迫环境中吸水以继续维持渗透平衡^[3],因此具有增强植物适应盐胁迫的功能。

普那菊苣 (*Cichorium intybus* L. cv. Puna) 为菊科 (*Asteraceae*) 菊苣属 (*Cichorium*) 双子叶植物。普那菊苣是一种营养丰富的牧草,同时具有药用和食用价值。其干物质中富含蛋白、矿物质元素、氨基酸、微量元素等,更重要的是含有一些生物化学成分:马栗树皮素、马栗树皮甙、野葛苣甙、山葛苣素和山葛苣苦素等特殊成分,是其他牧草植物所不具有的。药理和化学成分研究表明普那菊苣中的这些物质具有防治黄疸性肝炎、心血管疾病和骨质疏松症等功效^[4]。普那菊苣在我国分布较广,主要集中在西北、华中、华北、东北地区。这些地区都

比较干旱,且盐碱地面积较大,对普那菊苣产量的提高有一定限制。因此通过基因工程手段提高普那菊苣的耐旱、耐盐能力具有较大的应用价值。目前国内对由农杆菌介导的普那菊苣遗传转化报道甚少,本研究试图通过农杆菌介导法将来自小麦 (*Triticum aestivum* Linn) 的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白 *TaNHX2* 基因转入普那菊苣中^[5];同时研究外源基因的转化对普那菊苣耐盐性的影响,为普那菊苣在盐碱地区的栽培奠定基础。

1 材料和方法

1.1 植物材料及供体质粒

供试材料为普那菊苣二倍体 ($2n=2x=18$),种子由山西农科院畜牧兽医研究所提供。小麦 *TaNHX2* 基因载体由中国科学院遗传发育研究所 803 组陈受宜研究员提供,质粒名称为 pBin438-*TaNHX2*;启动子:CaMV35S,终止子:Nos。农杆菌菌株是 LBA4404,标记基因为卡那霉素 (Km),筛选基因为 Km 和利福平 (rif),质粒图谱见 (图 1)。

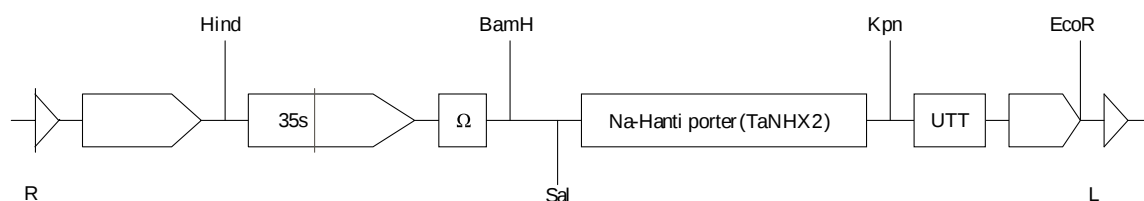


图 1 质粒 pBin438-*TaNHX2* 构建图谱

Fig. 1 The map of pBin438-*TaNHX2* expression vector used in the study

1.2 农杆菌介导法转化普那菊苣及再生苗的获得

将普那菊苣的无菌苗叶片切块在 MS 固体培养基上预培养 2—3d,并将普那菊苣叶片切块浸泡在对数生长期农杆菌 (OD_{600} 约为 0.4—0.6),继而在含 0.2 mg/L IBA 和 2.0 mg/L 6-BA 的 MS 固体培养基上共培养 2d,然后转入含 0.2mg/L IBA、2.0mg/L 6-BA、60mg/L Km 和 1000mg/L 头孢霉素 (cef) 的 MS 固体筛选培养基上培养,待不定芽长至 1cm 时,转移到含 80mg/L Km 素和 1000mg/L cef 的 MS 培养基上生根。

1.3 Km 抗性植株的 PCR 分析和 Southern 杂交分析

取野生型及转基因处理后再生的 Km 抗性苗叶片,采用 CTAB 法^[6]提取总 DNA,以 Primer 1: 5'-atgggtaccagtggtggc-3'; Primer 2: 5'-taaacactccaaggaaggtg-3',为引物,提取的 DNA 为模板,采用 95℃ 预变性 2min,95℃ 变性 30s,56℃ 退火 50s,72℃ 延伸 50s,30 个循环后,于 72℃ 延伸 10 min,产物片段长度为 700 bp。

为进一步证实 PCR 扩增结果的可靠性,提取未转化植株和 PCR 阳性植株叶片总 DNA 进行 Southern 杂交,以含有外源基因的质粒 DNA 为阳性对照。以限制性内切酶 *Hind* III 酶切 20μg 总 DNA,37℃ 温浴过夜。以地高辛 (Digoxigenin (DIG)-dUTP) 标记的 *TaNHX2* 基因片段为探针,杂交温度为 68℃,过夜。以 CSPD (4-methoxy-spiro {1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo [3.3.1.1] decan}-4-yl } phenyl phosphate (CSPD) 为发光底物。具体操作根据 Southern 试剂盒 (The Dig DNA Labeling and Detection 试剂盒) 操作手册进行,CSPD 购于 Boehringer Mannheim Co. Ltd, Germany。探针制备方法如下:

扩增体系 buffer 2μl; dNTP (地高辛标记) 4μl; p1 0.8μl; p2 0.8μl; Taq (2u/uL) 1μl; ddH₂O 10.4; template (质粒 DNA) 1μl。

扩增程序 94℃ 5min; 94℃ 30s; 56℃ 50s; 72℃ 50s; 72℃ 10min; 30cycles。

1.4 普那菊苣盐胁迫处理方法

转基因植株的耐盐性按下述指标进行分类:1 级高抗叶片表现为深绿色,植株生长正常;2 级抗性植株生长正常,叶色绿色,叶尖稍有卷曲;3 级中抗植株生长缓慢,叶色淡绿色,叶片卷曲;4 级不抗生长停滞,叶色发黄,叶片萎蔫直致死亡。用 400mmol/L 的 NaCl 对 28 株转基因植株和 28 野生型植株进行耐盐性等级分析,并在后续的耐盐实验中所选用转基因植株均为高抗的转基因株系。

将野生型和转基因 T_0 代的种子用 75% 酒精浸泡 1—2min, 0.1% 的升汞浸泡 10min, 经蒸馏水冲洗数次后用滤纸吸干, 挑选健康而饱满的种子置于铺有 2 层定性滤纸的培养皿(直径为 10cm)中, 分别滴加处理液至饱和, 每皿 50 粒, 重复 3 组。实验设置 5 个 NaCl 处理梯度: 0 (CK)、100、300、500、700、900mmol/L, 恒温培养箱中培养(25℃, 12h 光照, 12h 黑暗), 每天更换处理液以保持处理浓度不变。从处理的第 3 天开始, 每天 10:00—10:30 记录每个培养皿中的发芽种子数。

选取未转化苗和已鉴定含有 *TaNHX2* 基因的 5 个 T_0 代转基因株系, 分别做以下处理:

① 诱导得到其愈伤组织(愈伤组织编号与其外植体转基因株系编号相同)每组处理 20 块, 设 3 组重复, 观察愈伤组织和芽的分化状态;

② 取 1cm 左右的芽尖组织(芽尖组织编号与其外植体转基因株系编号相同)每组处理 5 个, 设 3 组重复, 观察叶片的生长情况和是否能够生根及其生长状态

③ 已生根 20d 左右的植株(与其外植体转基因株系编号相同)每组处理 5 个, 设 3 组重复, 观察叶片和根的生长情况

它们分别在 100、300、500、700、900mmol/L NaCl 的 MS 固体培养基上光照培养(25℃, 12h 光照, 12h 黑暗) 30d, 以正常 MS 培养基为对照。

取 1cm 左右的芽尖组织(每个株系做 20 个重复), 在 500mmol/L NaCl 的 MS 固体培养基上光照培养(25℃, 12h 光照, 12h 黑暗)。20d 后测定各株系的根长, 根重和鲜重。

选取在实验室抗性试验中表现较好的 T_0 代转 *TaNHX2* 基因 5 个株系的阳性植株幼苗扩繁, 将在 MS 培养基中生长 2d 的幼苗移栽至直径 10cm、高 10cm 的塑料营养钵中, 蛭石作基质, 培养 30d 左右, 然后移栽至花盆当中, 2 周后进行旱胁迫处理。实验设 5 个处理, NaCl 浓度为 100、300、500、700、900mmol/L 以蒸馏水为对照。每组处理 20 株, 设 5 组重复, 光照培养 30d, 观察植株的生长情况。

1.5 生理指标的测定

转基因植株与野生型植株选取同一苗龄的组培苗, 用 NaCl 浓度为 500mmol/L 处理 24h 后, 观察其抗性表现, 并对其 SOD 活性、POD 活性以及 MDA 含量进行测定^[7]。

1.6 统计分析

试验数据采用 Excel 2003 及用 DPS 软件进行方差分析, 显著水平 0.05。

2 结果与分析

2.1 转 *TaNHX2* 基因植株的获得和鉴定

利用农杆菌介导法转入普那菊苣, 经转化处理的外植体在筛选培养基上经过 2 周左右的分化培养, 普那菊苣的外植体边缘开始出现抗性再生芽, 培养约 1 个月后, 许多外植体无法再生, 或产生的再生芽在随后的培养中白化死亡。将经 60mg/L Km 筛选而再生成的抗性芽长至 0.5—1.0cm 时接种在含有 80 mg/L Km 的生根培养基上培养, 1 周后即可观察到白苗的产生。

用目的基因 *TaNHX2* 的特异引物对卡那筛选阳性的普那菊苣植株 DNA 进行 PCR 检测, 共有 28 株扩增出预期大小(700 bp)的片段, 野生型植株没有扩增出该片段(图 2), 初步证明 *TaNHX2* 基因已成功地转入普那菊苣。

为明确外源 *TaNHX2* 基因在普那菊苣基因组中的整合拷贝数, 对部分 PCR 鉴定阳性植株的总 DNA 酶切产物进行电泳转膜, 以标记的 *TaNHX2* 基因探针与其进行 Southern 杂交。结果发现 1 株有 2 条杂交带, 3 株各有 1 条杂交带, 1 株有 3 条杂交带, 野生型植株无杂交信号, 表明外源基因已整合到普那菊苣基因组的 DNA 中, 且外源基因多以单拷贝形式插入(图 3)。

2.2 普那菊苣 NaCl 胁迫下的生长

实验结果显示, 用 400mmol/L 的 NaCl 对 28 株转基因植株和 28 野生型植株进行抗盐性分析, 28 株转基因植株中有 23 株表现为高抗, 3 株表现为抗性, 2 株表现为中抗; 而野生型植株 3 株表现为中抗和 25 株表现

为不抗。

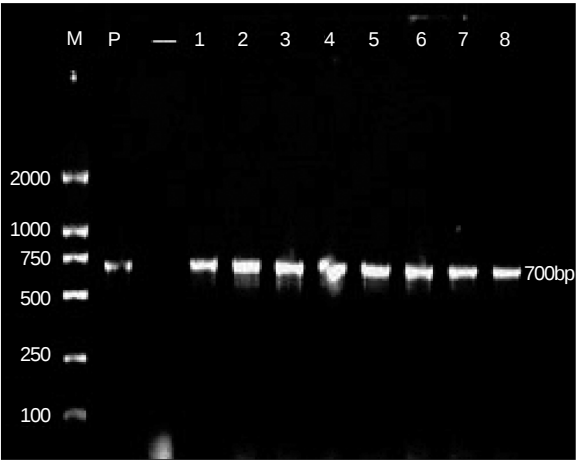


图2 转化植株的PCR检测

Fig. 2 Detection of transgenic plants by PCR

M:DL2000 maker;P:阳性对照,-:阴性对照;1—8:转基因植株

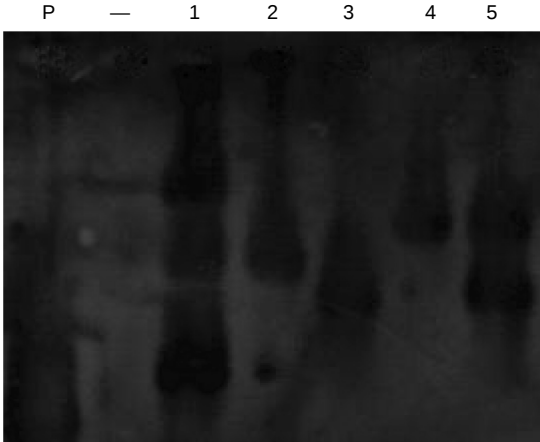


图3 转基因植株的Southern blot鉴定

Fig 3 Southern blot hybridization of transgenic plant DNA

P:阳性对照;-:阴性对照;1—5:转基因植株

低浓度处理($\text{NaCl} < 300 \text{ mmol/L}$)对种子萌发、愈伤组织形成的抑制相对较弱(表1),其发芽率、出愈率和分化芽数下降相对比较缓和,处理间的发芽率、出愈率和分化芽数差异不显著;随着处理浓度的升高,当 $500 \text{ mmol/L} \geq \text{NaCl} \geq 300 \text{ mmol/L}$ 时,野生型和转基因 T_0 代的种子、外植体受抑制程度增强,其发芽率下降幅度增大,到 500 mmol/L 时,野生型种子发芽率基本降为0;野生型外植体不能形成愈伤组织并且叶片呈现淡黄色,随着 NaCl ($900 \text{ mmol/L} \geq \text{NaCl} > 500 \text{ mmol/L}$)浓度的继续增加,野生型外植体变黄并死亡,转基因外植体可以继续形成愈伤组织。当 NaCl 浓度增加到 900 mmol/L 时,转基因外植体仍然可以形成愈伤组织,但是已经不能形成芽点。

表1 不同NaCl浓度组合对出芽率、愈伤诱导和芽分化的影响

Table 1 Effects of NaCl on the induction of callus and bud differentiation

	NaCl 浓度 The concentration of NaCl solution / (mmol/L)	种子出芽数 No. of buds	愈伤组织数 No. of callus	分化芽数 No. of seedlings
野生型	100	$26.52 \pm 1.66 \text{ b}$	$14.52 \pm 1.97 \text{ a}$	$21.71 \pm 2.52 \text{ b}$
Wide type	300	$3.09 \pm 2.21 \text{ c}$	$7.57 \pm 1.67 \text{ b}$	$13.97 \pm 1.13 \text{ c}$
	500	$0 \pm 0 \text{ d}$	$1.73 \pm 0.98 \text{ cd}$	$2.06 \pm 0.74 \text{ de}$
	700	$0 \pm 0 \text{ d}$	$0 \pm 0 \text{ d}$	$0 \pm 0 \text{ e}$
	900	$0 \pm 0 \text{ d}$	$0 \pm 0 \text{ d}$	$0 \pm 0 \text{ e}$
转基因	100	$33.43 \pm 3.21 \text{ a}$	$16.13 \pm 2.67 \text{ a}$	$29.69 \pm 2.64 \text{ a}$
	300	$12.54 \pm 4.89 \text{ b}$	$13.60 \pm 2.67 \text{ a}$	$24.10 \pm 2.74 \text{ b}$
	500	$5.51 \pm 0.98 \text{ c}$	$6.33 \pm 1.96 \text{ b}$	$11.97 \pm 3.49 \text{ c}$
	700	$0 \pm 0 \text{ d}$	$4.03 \pm 1.71 \text{ bc}$	$6.46 \pm 1.71 \text{ d}$
	900	$0 \pm 0 \text{ d}$	$1.65 \pm 0.91 \text{ cd}$	$3.66 \pm 1.54 \text{ de}$

同一列中右侧字母字母不同表示差异显著($P < 0.05$)

NaCl 胁迫下普那菊苣幼苗表现如下: $\text{NaCl} \leq 300 \text{ mmol/L}$ 时,野生型幼苗叶片由平展伸直、墨绿色渐变为萎蔫、淡绿色,可以正常生根生长,生长成发达的根系;当 $500 \text{ mmol/L} \geq \text{NaCl} > 300 \text{ mmol/L}$ 时,野生型幼苗叶片呈现黄绿色,卷曲,变形,不能正常生根;而转基因普那菊苣植株的叶片面积在盐胁迫下虽然也有一定程度的缩小渐变为细窄形,但是仍然能够较为正常地生长,叶片也依然浓绿,且能够正常生根,生长成发达的根系。

在此浓度下野生型幼苗叶子根据统计分析结果可以看出,转基因外植体的耐盐性显著高于野生型外植体($P < 0.05$)。当 $700\text{mmol/L} \geq \text{NaCl} > 500\text{mmol/L}$ 时,野生型幼苗叶片枯黄、死亡;转基因幼苗叶片生长速度减慢,叶片颜色开始变淡,生根缓慢;当 $900\text{mmol/L} \geq \text{NaCl} > 700\text{mmol/L}$ 时,转基因幼苗叶片变黄、卷曲、变形,颜色变为淡黄绿色,根系不能正常生长。在对 5 个转基因普那菊苣株系幼苗的观察中发现,它们对 NaCl 浓度的耐受力也存在着一些微小的差异,可能与外源基因的拷贝数和插入位点有一定的关系。综述所述, 500mmol/L 的 NaCl 是野生型幼苗可以承受的最大浓度, 900mmol/L 的 NaCl 是转基因幼苗可以承受的最大浓度。NaCl 胁迫下普那菊苣生根幼苗与未生根幼苗结果相似,

对含有 *TaNHX2* 基因的普那菊苣 T_0 代转基因阳性植株盆栽作 NaCl 处理,结果与实验室相结果一致。低浓度处理($\text{NaCl} \leq 300\text{mmol/L}$)时,对植株的抑制相对较弱,当 NaCl 浓度升至 500mmol/L 时,转基因的 20 株幼苗全部可以存活,胁迫解除后可正常生长;野生型植株则大部分死亡;继续增加 NaCl 浓度时,转基因幼苗也开始出现死亡。

在正常 MS 培养基上,转基因普那菊苣生长状况要略为优于野生型,表现在叶片颜色更为浓绿,根、茎也更加粗壮一些。而在 500mmol/L 的 NaCl 胁迫条件下,转基因普那菊苣根长在 $1.32\text{—}4.89\text{cm}$ 范围内,平均 3.01cm ;根重在 $2.56\text{—}8.1\text{g}$ 范围内,平均 4.56g ;而野生型平均根长 0.2cm ,平均根重 0.07g 。叶片的生长差异也很明显,转基因普那菊苣光合面积是野生型的几倍,而野生型的光合面积很小(图 4)。表明 500mmol/L 的 NaCl 胁迫条件下,受体野生型的生长受到明显的抑制,而转基因普那菊苣的耐盐性得到明显改善,在高盐培养基上能够良好生长。

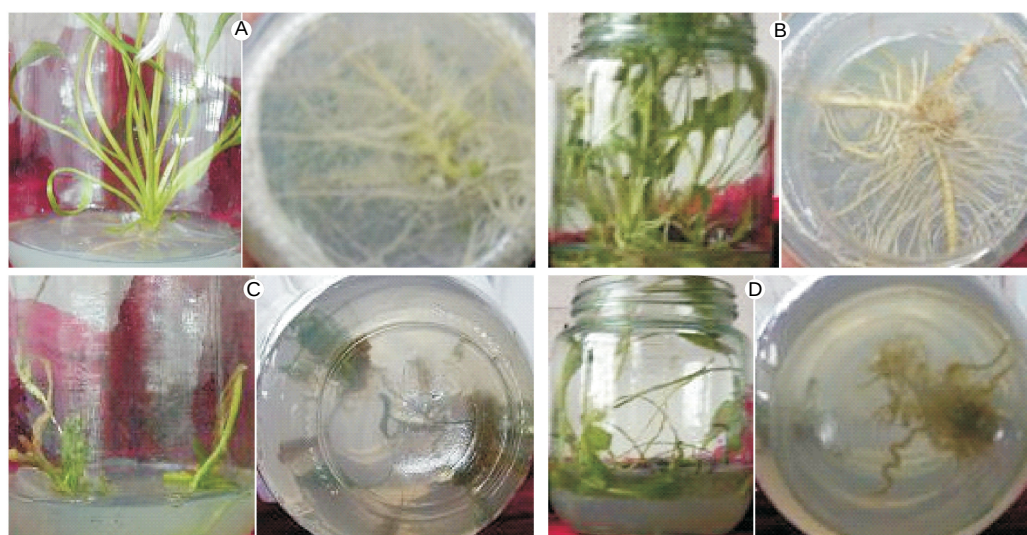


图 4 转 *TaNHX2* 基因普那菊苣的耐盐性鉴定

Fig. 4 NaCl tolerance assay of *TaNHX2* transgenic puna chicory plants

A: 野生型在正常 MS 培养基上生长 20 d; B: 转基因普那菊苣在正常 MS 培养基上生长 20 d; C: 野生型对照在含有 500mmol/L NaCl MS 培养基上生长 20 d; D: 转基因普那菊苣在含有 500mmol/L NaCl MS 培养基上生长 20 d

2.3 NaCl 对普那菊苣组培苗 SOD、POD 活性和 MDA 含量的影响

在含 500mmol/L NaCl 的 MS 固体培养基上光照培养 2h, 转基因普那菊苣的 SOD 酶活性在 $33.11\text{—}41.99\text{U/g}$ 鲜重范围内,平均酶活性为 36.90U/g 鲜重;野生型普那菊苣的 SOD 酶活性为 15.07U/g 鲜重,是转基因普那菊苣酶活性的 $1/2$ (表 2)。在盐胁迫处理下,转基因普那菊苣的 SOD 活性明显高于野生型,有利于保护细胞内的蛋白和膜系统免受氧化胁迫的伤害,增强普那菊苣在高盐环境下的适应能力。

POD 是植物体内保护酶的一种,它能分解植物体内过多的过氧化物^[8]。在 500mmol/L NaCl 处理下,转基因普那菊苣的 POD 酶活性在 $47.25\text{—}79.54\text{U/g}$ 鲜重范围内,平均酶活性为 66.80U/g 鲜重;野生型普那菊苣的 POD 酶活性为 29.40U/g 鲜重,是转基因普那菊苣酶活性的 $1/2$ (表 2)。

MDA 是植物器官膜脂过氧化作用的最终产物^[9],是膜系统受伤害的重要标志之一,积累越多表明组织的保护能力越弱,细胞膜遭受破坏越严重。本试验中,在含 500mmol/L NaCl 浓度时,MDA 的含量明显的低于野生型(表 2),其原因可能是由于转基因株系中 *TaNHX2* 基因表达的增强提高了转基因植株在逆境胁迫下的生长适应能力。

表 2 盐胁迫对普那菊苣 SOD、POD 酶活性和 MDA 的影响

Table 2 Effects of NaCl stress on the SOD, POD activity, and MDA in the transgenic puna chicory plants

株系 Line	SOD/(U/g 鲜重)	POD/(U/g 鲜重)	MDA/(μ mol/g 鲜重)
WT	15.07 $\pm$ 4.9 c	29.41 $\pm$ 4.1 d	28.44 $\pm$ 0.9 a
9	33.11 $\pm$ 3.2 b	47.24 $\pm$ 3.3 c	15.16 $\pm$ 1.1 b
11	38.17 $\pm$ 2.9 ab	69.86 $\pm$ 2.1 ab	9.76 $\pm$ 2.1 bc
13	33.63 $\pm$ 2.1 ab	63.88 $\pm$ 2.9 b	11.36 $\pm$ 1.7 bc
21	37.59 $\pm$ 3.6 ab	71.51 $\pm$ 2.3 ab	10.29 $\pm$ 1.9 bc
24	41.99 $\pm$ 2.7 a	79.54 $\pm$ 1.9 a	9.39 $\pm$ 2.4 c

同一列中右侧字母字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

3 讨论

长期以来,人们普遍认为植物耐盐性是一个复杂的,由多个基因控制的质量性状,单一基因的作用不能有效提高作物的耐盐性。然而 Aspe 等在拟南芥体内过量表达 *atnhx1* 基因,发现转基因植株的液泡 Na^+/H^+ 交换率比野生型高的多,且液泡中 Na^+ 含量也较高。用含 200mmol/L NaCl 的盐水浇灌,转基因植株能够完成整个生命周期,并没有表现出明显的生长缺陷^[3],表现出明确的抗盐性提高。番茄中过量表达 *atnhx1* 基因的转基因植物能够在 200mmol/L 的 NaCl 浓度下正常生长、开花、结实,而对果实品质没有明显影响, Na^+ 也没有在果实中大量积累^[10]。上述研究表明用单一的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因转化番茄^[10]、油菜^[11]、玉米^[12]、小麦^[13] 和马铃薯^[14] 等植物,超量表达外源液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因能够显著提高受体植物的耐盐性。这些工作预示着人们有可能通过向目标植物导入 1 个或少数几个基因就能得到新的耐盐植物种质资源。*TaNHX2* 的表达与逆境密切相关,可以一方面降低过多 Na^+ 对细胞质的毒害,另一方面又可将 Na^+ 作为一种有益的渗透调节剂来降低细胞的渗透势,从而使植物能更好地适应盐渍生境。

本实验结果显示,NaCl 浓度在 300mmol/L 时普那菊苣种子的发芽率能保持正常水平,随着浓度的升高而迅速下降,NaCl 处理后,普那菊苣种子的萌发和出苗均晚于野生型,说明盐胁迫下影响种子的萌发和幼苗的生长。除发芽期外,幼苗期也是植物对盐胁迫最敏感的时期^[15]。因此,幼苗期的耐盐性可以在很大程度上反映出该品种在其他时期的耐盐性,对转 *TaNHX2* 基因普那菊苣植株在组织培养和盆栽条件下进行胁迫实验显示,NaCl 胁迫下不但可以降低普那菊苣愈伤组织的出愈率和出芽率,而且对普那菊苣幼苗的生长发育以及根长等都产生影响。在碱胁迫下,普那菊苣的上述指标都产生了变化,不同指标变化趋势不同,且不同株系间存在着一些微小的差异。本实验表明,在逆境胁迫和非逆境胁迫下转基因植株的生长状态均优越于野生型;在逆境胁迫下转基因普那菊苣的出愈率、出芽率、叶片和根茎都优于野生型,且植株死亡率小;野生型普那菊苣的叶片和根部褐化都较为严重。其中,死亡率、叶片和根长都与 NaCl 浓度呈现一定的变化关系,即与 NaCl 浓度高度相关,这说明盐胁迫对它们的影响显著。在对转基因普那菊苣株系胁迫实验中观察到,不同株系间存在着一定的差异。

植物在高盐胁迫环境下会发生一系列的生理生化变化。其伴随产生的氧化胁迫对细胞的伤害是影响植物生长的重要原因之一^[16-17]。正常生长条件下产生的活性氧 (ROS) 能够被体内活性氧清除系统的各种酶 (SOD、POD、CAT 等) 及时清除,不会对细胞造成伤害。但盐、干旱或病害胁迫会诱导细胞内迅速产生大量活性氧,活性氧的累积可使细胞膜脂不饱和脂肪酸过氧化,破坏生物膜整体流动性、通透性和完整性,导致细胞膜透性增大、细胞液外渗,甚至导致细胞内膜系统的破坏及诱发细胞凋亡。SOD 是避免细胞免受氧化胁迫的关键酶,其活性直接影响到活性氧的生成和代谢^[16-18]。同时,SOD 还能减少活性氧对叶绿体的破坏,提高

植物的耐盐性^[18]。本研究中,在 500mmol/LNaCl 胁迫下,转 *TaNHX2* 基因普那菊苣的 SOD、POD 酶活性几乎为野生型的两倍,从而能有效地减弱氧化胁迫带来的伤害。本研究将 *TaNHX2* 基因转入普那菊苣中,提高了转基因植株在盐胁迫下的 SOD、POD 活性,及其根长、根重和净增鲜重,表明转基因普那菊苣植株的耐盐性明显增强,说明在盐胁迫下,这些转基因植株内发生的生理代谢变化可以降低逆境对普那菊苣植株的伤害,提高保护酶的活性,从而增强植株对环境的抗逆性。植物体在逆境胁迫下保护酶的作用,可能是通过它们之间相互协调且保持一个稳定的平衡态所进行的^[19]。从上述的研究结果可以看出,Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白增强了植物的渗透调节能力,使普那菊苣对盐碱环境具有较强的耐受力,令其在高盐胁迫下能够较好地生长。

4 结论

导入小麦 *TaNHX2* 基因提高了转基因普那菊苣的耐盐性和在盐胁迫环境下的 SOD 酶活性和 POD 酶活性含量。耐盐性与 SOD、POD 的活性密切相关。

References:

- [1] Chen L H, Zhang B, Xu Z Q. Genetic transformation of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) with *AtNHX1* gene and regeneration of salt-tolerant transgenic plants. Chinese Journal of Biotechnology, 2007, 23 (1): 51-60.
- [2] Chen G P, Wang H Z, Shi N N, Chen S Y. Na⁺/H⁺ antiporter and its relationship with plant salt tolerance. China Biotechnology, 2006, 26 (5): 101-106.
- [3] Apse M P, Aharon G S, Snedden W A, Blumwald E. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. Science, 1999, 285 (5431): 256-1258.
- [4] Bais H P, Ravishankar G A. *Cichorium intybus* L-cultivation, processing, utility, value addition and biotechnology, with an emphasis on current and future prospects. Journal of Science of Food and Agriculture, 2001, 81 (5): 467-484.
- [5] Yu J N, Huang J, Wang Z N, Zhang J S, Chen S Y. An Na⁺/H⁺ antiporter gene from wheat plays an important role in stress tolerance. Journal of Biosciences, 2007, 32 (6): 1153-1161.
- [6] Wang G L, Fang H J. Plant Gene Engineering. 2nd ed. Beijing: Science Press. 2002: 742-744.
- [7] Qiao F L. Determination of Plant Physiology Experiments Technique. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press. 2002: 101-102, 168-170.
- [8] Sun G R, Guo Y, Yan X F. Effect of Na₂CO₃ stress on defensive enzymes system of *Puccinellia tenuiflora* seedlings. Acta Agraria Sinica, 2001, 9 (1): 34-38.
- [9] Wang J L, Wang Y, Zhao T H, Cao Y Liu, Y L, Duan M. Effects of ozone on AsA-GSH cycle in soybean leaves. Acta Ecologica Sinica, 2011, 31 (8): 2068-2075.
- [10] Zhang H X, Blumwald E. Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. Nature Biotechnology, 2001, 19 (8): 765-768.
- [11] Zhang H X, Hodson J N, Williams J P, Blumwald E. Engineering salt-tolerant *Brassica* plant; characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increase vacuolar sodium accumulation. Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98 (22): 12832-12836.
- [12] Yin X Y, Yang A F, Zhang K W, Zhang J R. Production and analysis of transgenic maize with improved salt tolerance by the introduction of *AtNHX1* gene. Journal of Integrative Plant Biology, 2004, 46 (7): 854-867.
- [13] Xue Z Y, Zhi D Y, Xue G P, Zhang H, Zhao Y X, Xia G M. Enhanced salt tolerance wheat (*Triticum aestivum* L.) expressing a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene with improved grain yields in saline soils in the field and a reduced level of leaf Na⁺. Plant Science, 2004, 167 (4): 849-859.
- [14] Ruan S L, Xue Q Z. Germination characteristics of seeds under salt stress and physiological basis of salt-tolerance of seedlings in hybrid rice. Chinese Journal of Rice Science, 2002, 16 (3): 281-284.
- [15] Chen Y Y, Wang S M, Chen Y M. The effect of saline condition on the germination and its recovery of pasture species. Acta Prataculturae Sinica, 1999, 8 (3): 54-60.
- [16] Wang R G, Chen S L, Ma H Y, Liu L Y, Li H, Weng H J, Hao Z Y, Yang S. Genotypic differences in antioxidative stress and salt tolerance of three poplars under salt stress. Frontiers of Forestry in China, 2006, 1 (1): 82-88.
- [17] Wang F D, Yi Y J, Wang H Q, Wang X C, Liu J Y. Enhanced drought and photooxidation tolerance of transgenic tobacco plants overexpressing pea catalase in chloroplasts. Acta Ecologica Sinica, 2011, 31 (4): 1058-1063.
- [18] Sairam R K, Srivastava G C, Agarwal S, Meena R C. Differences in antioxidant activity in response to salinity stress in tolerant and susceptible wheat

genotypes, *Biologia Plantarum*, 2005, 49(1): 85-91.

- [19] Li M, Wang G X. Effect of drought stress on activities of cell defense enzymes and lipid peroxidation in *glycyrrhiza uralensis* seedlings. *Acta Ecologica Sinica*, 2002, 22(4): 503-507.

参考文献:

- [1] 陈利红, 张波, 徐子勤. *AtNHX1* 基因对荞麦的遗传转化及抗盐再生植株的获得. *生物工程学报*, 2007 (1): 51-60.
- [2] 陈观平, 王慧中, 施农农, 陈受宜. Na^+/H^+ 逆向转运蛋白与植物耐盐性关系研究进展. *中国生物工程杂志*, 2006, 26(5): 101-106.
- [6] 王关林, 方宏筠. *植物基因工程* (第二版). 北京: 科学出版社, 2002: 742-744.
- [7] 乔富廉. *植物生理学实验分析测定技术*. 北京: 中国农业科技出版社, 2002: 101-102, 168-170.
- [8] 孙国荣, 关盼, 阎秀峰. 盐胁迫对星星草幼苗保护酶系统的影响. *草地学报*, 2001, 9(1): 34-38.
- [9] 王俊力, 王岩, 赵天宏, 曹莹, 刘玉莲, 段萌. 臭氧胁迫对大豆叶片抗坏血酸-谷胱甘肽循环的影响. *生态学报*, 2011, 31(8): 2068-2075.
- [12] 尹小燕, 杨爱芳, 张可炜, 张举仁. 转 *AtNHX1* 基因玉米的产生及其耐盐性分析. *植物学报* (英文版), 2004, 46(7): 854-867.
- [14] 阮松林, 薛庆中. 盐胁迫条件下杂交水稻种子发芽特性和幼苗耐盐生理基础. *中国水稻科学*, 2002, 16(3): 281-284.
- [15] 沈禹颖, 王锁民, 陈亚明. 盐胁迫对牧草种子萌发及其恢复的影响. *草业学报*, 1999, 8(3): 54-60.
- [17] 王凤德, 衣艳君, 王海庆, 王学臣, 刘家尧. 豌豆过氧化氢酶在烟草叶绿体中的过量表达提高了植物的抗逆性. *生态学报*, 2011, 31(4): 1058-1063.
- [19] 李明, 王根轩. 干旱胁迫对甘草幼苗保护酶活性及脂质过氧化作用的影响. *生态学报*, 2002, 22(4): 503-507.

CONTENTS

CO ₂ emission from an alpine <i>Kobresia humilis</i> meadow in winters	WU Qin, HU Qiwu, CAO Guangmin, et al (5107)
Effect of cultivation on soil organic carbon and total nitrogen accumulation in Cele oasis croplands and their relation to crop yield	HUANG Caibian, ZENG Fanjiang, LEI Jiaqiang, et al (5113)
Biomass and its allocation of four grassland species under different nitrogen levels	QI Yu, HUANG Yongmei, WANG Yan, et al (5121)
Small-scale spatial patterns of genetic structure in <i>Castanopsis eyrei</i> populations based on autocorrelation analysis in the Tiantai Mountain of Zhejiang Province	QI Caihong, JIN Zexin, LI Junmin (5130)
Influence of vegetation on frozen ground temperatures the forested area in the Da Xing'anling Mountains, Northeastern China	CHANG Xiaoli, JIN Huijun, YU Shaopeng, et al (5138)
Analysis of stable carbon isotopes in different components of tree rings of <i>Pinus sylvestris</i> var. <i>mongolica</i>	SHANG Zhiyuan, WANG Jian, CUI Mingxing, et al (5148)
Retrieval of leaf area index for different grasslands in Inner Mongolia prairie using remote sensing data	LIU Yibo, JU Weimin, ZHU Gaolong, et al (5159)
Decomposition of lotus leaf litter and its effect on the aquatic environment of the Beili Lake in the Hangzhou West Lake	SHI Qi, JIAO Feng, CHEN Ying, et al (5171)
Effects of fire disturbance on greenhouse gas emission from <i>Larix gmelinii</i> - <i>Carex schmidtii</i> forested wetlands in XiaoXing'an Mountains, Northeast China	YU Lili, MU Changcheng, GU Han, et al (5180)
Wetland landscape transition pattern of Lianbo Beach along the Middle Yellow River	GUO Donggang, SHANGGUAN Tieliang, BAI Zhongke, et al (5192)
Effect of revegetation on functional groups of soil organic carbon on the Loess Plateau	LI Ting, ZHAO Shiwei, ZHANG Yang, et al (5199)
Soil organic and inorganic carbon contents in relation to soil physicochemical properties in northeastern China	ZU Yuangang, LI Ran, WANG Wenjie, et al (5207)
Characteristics of soil respiration in fallow and its influencing factors at arid-highland of Loess Plateau	GAO Huiyi, GUO Shengli, LIU Wenzhao (5217)
Soil microbial functional diversity between rhizosphere and non- rhizosphere of typical plants in the hilly area of southern Nixia	AN Shaoshan, LI Guohui, CHEN Liding (5225)
Differences in the surface palynomorph assemblages on a karst mountain and rocky desertification areas: a case in Nanchuan District, Chongqing	HAO Xiudong, OUYANG Xuhong, XIE Shiyu (5235)
Ash content and caloric value in the leaves of <i>Sinocalycanthus chinensis</i> and its accompanying species	JIN Zexin, LI Junmin, MA Jine (5246)
Uptake kinetic characteristics of Cu ²⁺ by <i>Salix jiangsuensis</i> CL J-172 and <i>Salix babylonica</i> Linn and the influence of organic acids	CHEN Caihong, LIU Zhikun, CHEN Guangcai, et al (5255)
Introduction of <i>TaNHX2</i> gene enhanced salt tolerance of transgenic puna chicory plants	ZHANG Lijun, CHENG Linmei, DU Jianzhong, et al (5264)
Effects of air humidity and soil water deficit on characteristics of leaf cuticular waxes in alfalfa (<i>Medicago sativa</i>)	GUO Yanjun, NI Yu, GUO Yunjiang, et al (5273)
Influence of water storage capacity on yield of winter wheat in dry farming area in the Loess Plateau	DENG Zhenyong, ZHANG Qiang, WANG Qiang, et al (5281)
Research of dynamic variation of moisture in apple orchard soil in the area of Xianyang in recent years	ZHAO Jingbo, ZHOU Qi, CHEN Baoqun, et al (5291)
Volatile oil contents correlate with geographical distribution patterns of the miao ethnic herb <i>Fructus Cinnamomi</i>	ZHANG Xiaobo, ZHOU Tao, GUO Lanping, et al (5299)
Effect of environmental factors on growth of <i>Chlorella</i> sp. and optimization of culture conditions for high oil production	DING Yancong, GAO Qun, LIU Jiayao, et al (5307)
The effects of substrates on locomotor performance of two sympatric lizards, <i>Takydromus septentrionalis</i> and <i>Plestiodon chinensis</i>	LIN Zhihua, FAN Xiaoli, LEI Huanzong, et al (5316)
Guild structure of wintering waterbird assemblages in shallow lakes along Yangtze River in Anhui Province, China	CHEN Jinyun, ZHOU Lizhi (5323)
Phylogenetic diversity analysis and <i>in situ</i> hybridization of symbiotic Oxymonad flagellates in the hindgut of <i>Reticulitermes chinensis</i> Snyder	CHEN Wen, SHI Yu, PENG Jianxin, et al (5332)
An entropy weight approach on the comprehensive evaluation of the Pearl River Delta Nature Reserve	ZHANG Linying, XU Songjun (5341)
Review and Monograph	
On planning method of mesoscale and microscale ecological land	RONG Bingling, LI Dong, XIE Yingxia (5351)
Effects of land use change on soil organic carbon: a review	CHEN Zhao, LÜ Changhe, FAN Lan, et al (5358)
Marine phytoplankton and biological carbon sink	SUN Jun (5372)
Effect of permafrost degradation on methane emission in wetlands: a review	SUN Xiaoxin, SONG Changchun, WANG Xianwei, et al (5379)
A review on the effects of biogenic elements and biological factors on wetland soil carbon mineralization	ZHANG Linhai, ZENG Congsheng, TONG Chuan (5387)
A review of studies using ecological network analysis	LI Zhongcai, Xu Junyan, WU Changyou, et al (5396)
Scientific Note	
Dynamics of age structures on <i>Agropyron michnoi</i> and <i>Leymus chinensis</i> in different communities	JIN Xiaoming, AI Lin, LIU Jidong, et al (5406)
The impact of thematic resolution on NDVI spatial pattern	HUANG Caixia, LI Xiaomei, SHA Jinming (5414)

2009 年度生物学科总被引频次和影响因子前 10 名期刊★

(源于 2010 年版 CSTPCD 数据库)

排序 Order	期刊 Journal	总被引频次 Total citation	排序 Order	期刊 Journal	影响因子 Impact factor
1	生态学报	11764	1	生态学报	1.812
2	应用生态学报	9430	2	植物生态学报	1.771
3	植物生态学报	4384	3	应用生态学报	1.733
4	西北植物学报	4177	4	生物多样性	1.553
5	生态学杂志	4048	5	生态学杂志	1.396
6	植物生理学通讯	3362	6	西北植物学报	0.986
7	JOURNAL OF INTEGRATIVE PLANT BIOLOGY	3327	7	兽类学报	0.894
8	MOLECULAR PLANT	1788	8	CELL RESEARCH	0.873
9	水生生物学报	1773	9	植物学报	0.841
10	遗传学报	1667	10	植物研究	0.809

★《生态学报》2009 年在核心版的 1964 种科技期刊排序中总被引频次 11764 次,全国排名第 1;影响因子 1.812,全国排名第 14;第 1—9 届连续 9 年入围中国百种杰出学术期刊;中国精品科技期刊

编辑部主任 孔红梅

执行编辑 刘天星 段 靖

生 态 学 报
(SHENGTAI XUEBAO)
(半月刊 1981 年 3 月创刊)
第 31 卷 第 18 期 (2011 年 9 月)

ACTA ECOLOGICA SINICA
(Semimonthly, Started in 1981)
Vol. 31 No. 18 2011

编 辑	《生态学报》编辑部 地址:北京海淀区双清路 18 号 邮政编码:100085 电话:(010)62941099 www.ecologica.cn shengtaixuebao@rcees.ac.cn	Edited by	Editorial board of ACTA ECOLOGICA SINICA Add:18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China Tel:(010)62941099 www.ecologica.cn Shengtaixuebao@rcees.ac.cn
主 编	冯宗炜	Editor-in-chief	FENG Zong-Wei
主 管	中国科学技术协会	Supervised by	China Association for Science and Technology
主 办	中国生态学会 中国科学院生态环境研究中心 地址:北京海淀区双清路 18 号 邮政编码:100085	Sponsored by	Ecological Society of China Research Center for Eco-environmental Sciences, CAS Add:18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China
出 版	科 学 出 版 社 地址:北京东黄城根北街 16 号 邮政编码:100717	Published by	Science Press Add:16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China
印 刷	北京北林印刷厂	Printed by	Beijing Bei Lin Printing House, Beijing 100083, China
发 行	科 学 出 版 社 地址:东黄城根北街 16 号 邮政编码:100717 电话:(010)64034563 E-mail:journal@cspg.net	Distributed by	Science Press Add:16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China Tel:(010)64034563 E-mail:journal@cspg.net
订 购	全国各地邮局	Domestic	All Local Post Offices in China
国外发行	中国国际图书贸易总公司 地址:北京 399 信箱 邮政编码:100044	Foreign	China International Book Trading Corporation Add:P. O. Box 399 Beijing 100044, China
广告经营 许 可 证	京海工商广字第 8013 号		



ISSN 1000-0933
CN 11-2031/Q

国内外公开发行

国内邮发代号 82-7

国外发行代号 M670

定价 70.00 元