

不同倍性菘蓝对干旱胁迫的耐受能力 及保护性酶的响应机制

孙 强, 王丽艳, 荆瑞勇, 郭永霞, 殷奎德

(黑龙江八一农垦大学, 黑龙江 大庆 163319)

摘 要: 为了比较不同倍性菘蓝对干旱胁迫的耐受能力及其体内保护性酶的响应机制, 在 MS 培养基中加入不同浓度的甘露醇模拟干旱胁迫处理, 观测不同倍性菘蓝种子的萌发和幼苗生长状况, 测定幼苗中丙二醛及脯氨酸含量, 同时对其地上部分保护性酶 SOD、POD 和 CAT 进行测定。种子萌发、幼苗生长以及丙二醛和脯氨酸含量的测定结果均表明, 四倍体菘蓝较二倍体菘蓝对干旱胁迫的耐受能力强。对其体内保护性酶的研究结果表明, 随着甘露醇浓度的增加二倍体和四倍体菘蓝中 SOD、POD 和 CAT 三种保护性酶均呈现先增加后降低的趋势, 各甘露醇浓度下四倍体中的 SOD、POD 和 CAT 三种保护性酶活性均高于二倍体, 说明在干旱胁迫下四倍体菘蓝对活性氧的清除能力高于二倍体菘蓝, 部分解释了四倍体菘蓝较二倍体菘蓝对干旱胁迫的耐受能力强。

关键词: 二倍体; 四倍体; 菘蓝; 干旱胁迫; 保护性酶

中图分类号: S567. 239

文献标识码: A

文章编号: 1005-3409(2013)06-0048-06

Tolerant Capacity of Drought Stress and Response Mechanism of Protective Enzyme of Different Ploidy *Isatis indigotica*

SUN Qiang, WANG Li-yan, JING Rui-yong, GUO Yong-xia, YIN Kui-de

(Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319, China)

Abstract: To compare tolerant capacity to drought stress of *Isatis indigotica* with different ploidy and response mechanism of protective enzyme in vivo, different concentration mannitol was added into MS medium to imitate salt stress. For diploid and tetraploid of *Isatis indigotica*, germination of seed and seedling growth condition were investigated, and malondialdehyde, proline contents in seedling and protective enzyme in overground part including SOD, POD and CAT were measured. The results showed that tolerant stress of tetraploid of *Isatis indigotica* was better than that of diploid by germination, seedling growth and malondialdehyde and proline contents. The results showed that SOD, POD and CAT activities of tetraploid and diploid appeared the trend of increase-decrease with increase of concentration of mannitol by protective enzyme. SOD, POD and CAT activities of tetraploid were higher than those of diploid under different concentrations of mannitol. The results mentioned above showed that the ability of removing active oxygen for tetraploid was higher than that of diploid under salt stress, which can partly explain that tolerant ability to salt stress of tetraploid was higher than that of diploid.

Key words: diploid; tetraploid; *Isatis indigotica*; drought stress; protective enzyme

菘蓝(*Isatis indigotica* Fort.)为十字花科菘蓝属二年生草本植物,以干燥根及叶入药,分别称为板蓝根和大青叶,为常用中药材^[1]。目前报道的菘蓝栽培品种主要有二倍体和四倍体两种倍性,有研究报道四倍体较二倍体中靛蓝、靛玉红、总氨基酸的含量均

有明显提高^[2],四倍体菘蓝根中游离氨基酸和水解氨基酸的含量均高于二倍体^[3];二倍体菘蓝较同源四倍体具有中等偏高的遗传差异性^[4];四倍体菘蓝体内超氧化物歧化酶的活性比二倍体的高^[5]。在水分胁迫方面有对菘蓝生长发育和有效成分积累方面的研

收稿日期:2013-03-28

修回日期:2013-05-03

资助项目:黑龙江省自然科学基金项目(QC2012C049)

作者简介:孙强(1969—),男,博士研究生,副教授,主要从事植物生理及植物保护方面的研究。E-mail:byndsq@163.com

通信作者:殷奎德(1964—),男,黑龙江虎林人,教授,博士生导师,主要从事生物技术方面的研究工作。E-mail:yinkuide@sohu.com

究^[6],有对苧蓝幼苗生长和生理特性影响方面的研究^[7],但其主要针对的是二倍体。有关二倍体和四倍体对于干旱耐受能力的比较研究目前还未见报道。

干旱是限制植物基因表达、生长发育和产量的重要生态环境因素,对植物的危害在所有非生物胁迫中占居首位^[8-9],因此,当前世界各国均对于旱下植物的生长状况给予了极大的关注。本试验以在 MS 培养基中加入不同浓度的甘露醇模拟干旱胁迫,研究不同干旱程度对不同倍性苧蓝种子萌发、幼苗生长和植物体内丙二醛、脯氨酸含量的变化来比较不同倍性苧蓝对于干旱胁迫的耐受能力,通过对比其体内保护性酶超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)活性变化来揭示其内在机理,为深入了解不同倍性苧蓝的生长与生境的关系及其抗旱机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为二倍体和四倍体苧蓝,购于亳州市春秋药材种业有限公司。

1.2 干旱胁迫处理方法

采用在 MS 培养基中加入不同浓度的甘露醇模拟干旱胁迫^[10]。MS 培养基中附加 30 g/L 蔗糖、8 g/L 植物琼脂,pH 值为 5.7,分别附加浓度为 0,50,100,150,200,250,300,350,400 mmol/L 的甘露醇进行干旱胁迫处理,以不加甘露醇作为对照。

将二倍体和四倍体苧蓝种子去除种皮后用 75% 的乙醇处理 5 min,再用 0.1% 的升汞处理 10 min,最后用无菌水冲洗 4~5 遍,然后接种于上述不同处理的培养基中,每瓶 20 粒,每 5 瓶计为一个处理,每个处理重复 10 次,每个处理接种总计为 50 瓶,置于温度为(25±2)℃的组织培养室中进行培养,前三天进行暗培养,然后于光强 1 500~2 000 lx,每日光照时数 14 h 的光照下培养,培养 7 d,每天统计发芽率。培养到第 10 d 时进行相关指标测定。

1.3 测定项目

1.3.1 发芽率和发芽势

种子发芽率=种子正常发芽粒数/供试种子数×100%;

种子发芽势=种子第 4 d 正常发芽粒数/供试种子粒数×100%。

1.3.2 根长、芽长、根重和芽重的测定 当种子接入培养基 10 d 后,大部分已有真叶抽出,小心取出幼苗,用蒸馏水洗去残留的培养基,用一个透明的硬塑料板将幼苗压平展,与带刻度的标准直尺同时拍照。

每个处理分别取 20 株幼苗进行拍照,然后用 Image J 软件进行分析^[11]。拍完照片后,立刻将幼苗用解剖刀切成芽和根两部分,分别测定鲜重^[12]。

1.3.3 丙二醛和脯氨酸含量的测定 将种子接种到培养基中 10 d 后,取出幼苗测定植株茎叶中的丙二醛和脯氨酸的含量:丙二醛含量测定采用硫代巴比妥酸(TBA)比色法^[13];脯氨酸含量的测定采用磺基水杨酸比色法^[13]。

1.3.4 保护性酶 SOD、POD、CAT 活性测定 SOD 采用氮蓝四唑(NBT)法进行测定^[13];POD 采用愈创木酚法,以每分钟内 A470 变化 0.01 为 1 个酶活性单位(U)^[13];CAT 的活性测定采用紫外吸收法进行测定,以每分钟内 A240 下降 0.1 的酶量为 1 个酶活性单位(U)^[14]。

1.4 统计分析

利用 Excel 和 SPSS 13.0 进行数据的统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同干旱胁迫处理下不同倍性苧蓝的发芽率和发芽势

随着甘露醇浓度的增加,二倍体和四倍体苧蓝发芽率均呈下降趋势,随着发芽时间的增长差异逐渐减小(图 1)。当甘露醇浓度为 0~200 mmol/L 时第 1 天种子发芽率随着浓度的增加而降低,浓度大于 200 mmol/L 时,种子在第 1 天均不能发芽。从二倍体和四倍体的差异来看,二倍体苧蓝在甘露醇浓度为 0,50 mmol/L 时第 7 天的发芽率达 90% 以上,分别为 98% 和 100%,当甘露醇浓度为 100,150,200 mmol/L 时发芽其发芽率均达 80% 以上,分别为 89%、86% 和 83%,而当甘露醇浓度大于 250 mmol/L 时发芽率迅速下降为 60% 左右,当甘露醇浓度达到 400 mmol/L 时,发芽率降低到 50% 以下。四倍体苧蓝在甘露醇浓度为 0,50,100,150 mmol/L 时第 7 天的发芽率均达 90% 以上,分别为 100%、99%、95% 和 92%,当甘露醇浓度为 200,250 mmol/L 时发芽其发芽率均达 80% 以上,分别为 89% 和 82%,而当甘露醇浓度大于 300 mmol/L 时发芽率迅速下降为 60% 左右,当甘露醇浓度达到 400 mmol/L 时,发芽率降低到 50% 以下。由此可分析得出当甘露醇浓度为 100~250 mmol/L 时对两种倍性苧蓝的发芽率影响有差异,四倍体的发芽率要高于二倍体,对二倍体的影响要大于四倍体,而高于或低于此范围时的影响是相同的。因此可以得出,相对低浓度的甘露醇(100~250 mmol/L)胁迫下四倍体苧蓝对于干旱胁迫的耐受性要高于二倍体苧蓝。

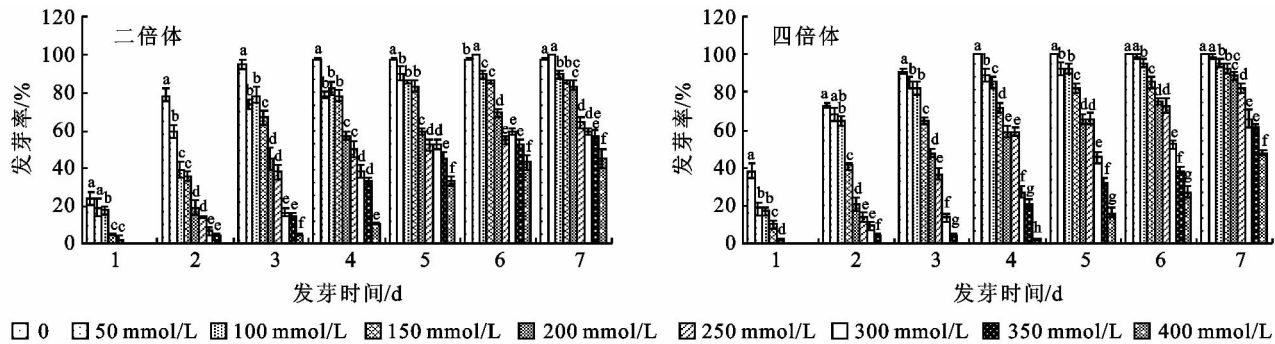


图 1 不同浓度甘露醇处理对菘蓝发芽率的影响

注:有相同字母代表差异不显著,无相同字母代表差异显著, $P < 0.05$ 。

根据统计得到的发芽率,计算得到不同倍性菘蓝的发芽势,结果如图 2 所示。从总体趋势来看,二倍体和四倍体菘蓝的发芽势随着甘露醇浓度的增加均呈现逐渐下降的趋势。在甘露醇浓度为 0~250 mmol/L(150 mmol/L 除外),四倍体的发芽势均高于二倍体,尤其是甘露醇浓度为 250 mmol/L 时,四倍体远高于二倍体。而大于 300 mmol/L 时,二倍体反而大于四倍体。

2.2 干旱胁迫处理下不同倍性菘蓝的根长、芽长、根重、芽重

不同浓度甘露醇培养基培养 10 d 后组培苗的根长、芽长、根重、芽重统计结果如图 3 所示。由于当甘露醇浓度大于 250 mmol/L 时,在种子接种 10 天后,

仅有芽发出而未能形成植株,个别形成植株但生长不正常,因此未对此部分进行统计分析。

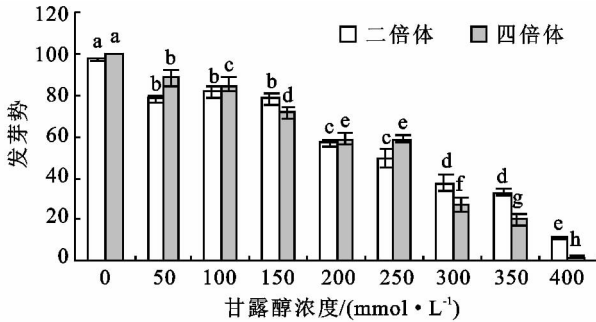


图 2 不同浓度甘露醇处理下菘蓝的发芽势

注:同一倍性不同浓度之间有相同字母代表差异不显著,无相同字母代表差异显著, $P < 0.05$,下同。

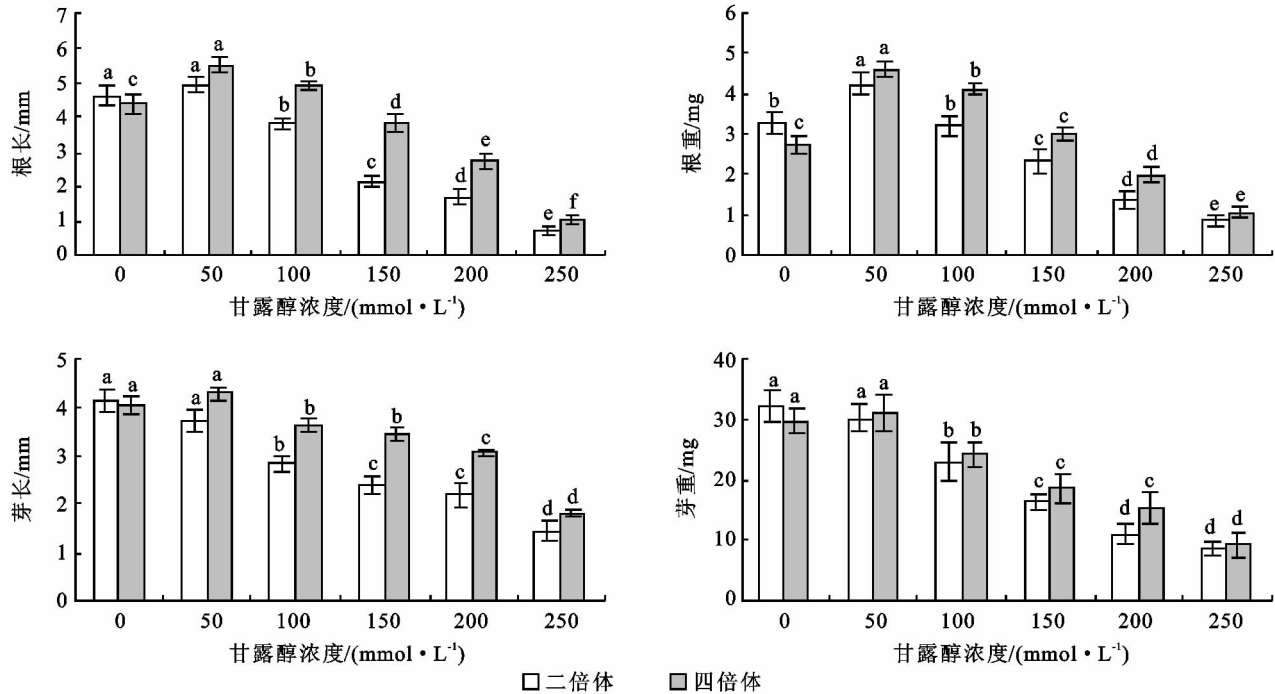


图 3 不同浓度甘露醇处理对菘蓝根长、芽长、根重、芽重的影响

二倍体和四倍体菘蓝根长和根重均随着甘露醇浓度的增加呈现先增加后降低的趋势。两种倍性菘蓝的根长和根重均为甘露醇 50 mmol/L 时最高,二倍体根长与对照无显著性差异,而根重与对照差异显

著,与其它各浓度之间均存在显著性差异。而四倍体根长和根重与其它所有浓度均有显著性差异,并且甘露醇浓度为 50,100 mmol/L 时的根长均高于对照。

四倍体菘蓝芽长和芽重随着甘露醇浓度的增加

而呈现先稍有增加后降低的趋势,当甘露醇为 50 mmol/L 时芽长和芽重最高,但从方差分析可以看出与对照无显著性差异,而二倍体菘蓝随着甘露醇浓度的增加呈现逐渐降低的趋势,从方差分析可以看出甘露醇 50 mmol/L 时与对照无显著性差异,与其它浓度之间存在显著性差异。

二倍体对照的根长、芽长、根重、芽重均高于四倍体对照,而随着甘露醇的加入四倍体的又均高于二倍体。这说明干旱胁迫对二倍体植株生长情况的影响较四倍体的大,四倍体较二倍体对于干旱胁迫的耐受能力强。

2.3 不同干旱胁迫处理下不同倍性菘蓝的丙二醛和脯氨酸含量

不同浓度甘露醇处理下不同倍性菘蓝中丙二醛含量的测定结果如图 4 所示。二倍体和四倍体菘蓝随着甘露醇浓度的增加,丙二醛含量呈现逐渐增加的趋势。从方差分析可以看出,二倍体菘蓝甘露醇浓度为 50 mmol/L 时丙二醛含量与对照差异不显著,与其它各浓度之间差异达显著水平。四倍体菘蓝甘露醇浓度为 50,100 mmol/L 时与对照之间丙二醛含量

差异均不显著,说明二倍体甘露醇浓度为 50 mmol/L 时,四倍体甘露醇浓度达 100 mmol/L 时,膜系统基本没有受到损伤,随着甘露醇浓度的增加,膜系统受损程度加重。二倍体菘蓝丙二醛含量各浓度均高于四倍体菘蓝,甘露醇浓度为 250 mmol/L 时丙二醛含量达最大值,此时二倍体丙二醛含量较对照增加了 2.89 倍,四倍体增加了 2.37 倍。说明随着甘露醇浓度的增加四倍体菘蓝的膜系统受损伤程度低于二倍体菘蓝。这在一定程度上说明四倍体菘蓝较二倍体菘蓝对于干旱胁迫的耐受能力强。

从图中 4 可以看出,随着甘露醇浓度的增加,二倍体和四倍体菘蓝脯氨酸含量均呈逐渐增加的趋势。从方差分析可以看出甘露醇浓度为 50 mmol/L 时,脯氨酸含量与对照之间差异不显著,与其它各甘露醇浓度之间脯氨酸含量差异均达到显著性水平。四倍体各浓度下脯氨酸含量均较二倍体高,随着甘露醇浓度的增加四倍体较二倍体增加明显,二倍体最大值是对照的 4.38 倍,四倍体最大值是对照的 5.23 倍。这在一定程度上说明四倍体菘蓝较二倍体菘蓝对于干旱胁迫的耐受能力更强。

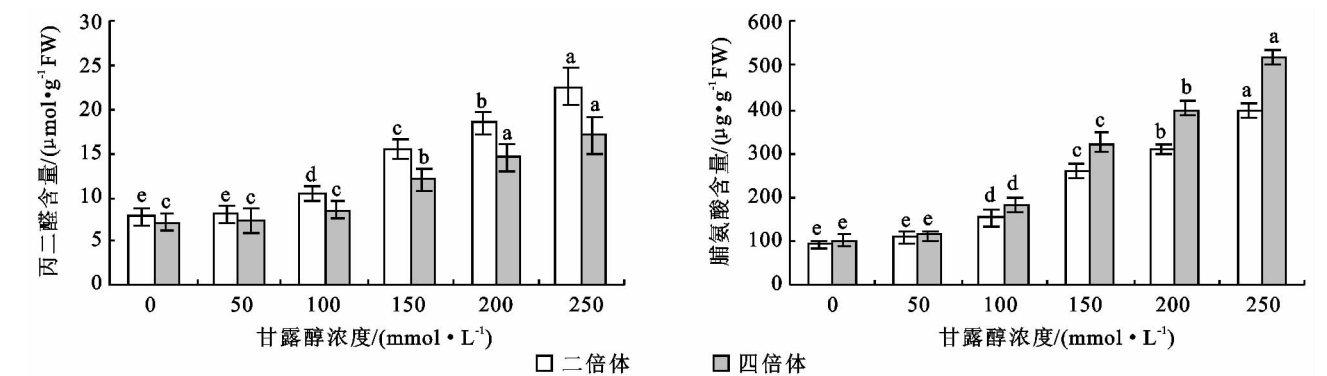


图 4 不同浓度甘露醇处理对菘蓝丙二醛和脯氨酸含量的影响

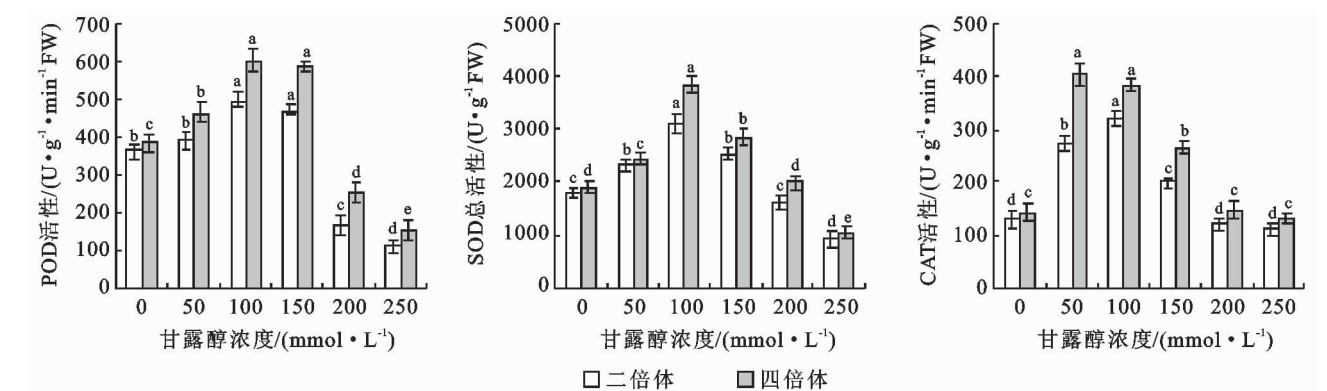


图 5 不同浓度甘露醇处理对菘蓝 SOD、POD、CAT 活性的影响

2.4 不同干旱胁迫处理下不同倍性菘蓝的保护性酶 SOD、POD、CAT 活性

不同浓度甘露醇处理下不同倍性菘蓝中保护性酶活性的测定结果如图 5 所示,随着甘露醇浓度的增

加,二倍体和四倍体菘蓝中 SOD、POD 和 CAT 三种保护性酶均呈现先增加后降低的趋势。其中 SOD 和 POD 均在甘露醇浓度为 100 mmol/L 时体内酶活性最大,并且二倍体和四倍体相同。而 CAT 的变化二

倍体和四倍体稍有差异,二倍体表现为甘露醇浓度为 100 mmol/L 时体内酶活性最大,而四倍体则是甘露醇浓度为 50 mmol/L 时体内酶活性最大。当甘露醇浓度从 0 增加到 250 mmol/L 时,四倍体的 SOD、POD 和 CAT 三种保护性酶活性均高于二倍体。这说明在干旱胁迫下四倍体菰蓝对活性氧的清除能力要高于二倍体菰蓝。这也部分解释了四倍体菰蓝较二倍体菰蓝对于干旱胁迫的耐受能力强。

3 结论与讨论

种子萌发是植物体生活史中重要的阶段,直接影响到植物体后期的生长发育和形态建成,从而会间接影响产量的形成,因此种子能够迅速整齐的萌发,是获得高产、稳产的基础^[15]。水分是种子萌发的必要条件,本试验中随着甘露醇浓度即胁迫程度的增加,二倍体的发芽率在甘露醇浓度为 50 mmol/L 时达到最高,之后随着甘露醇浓度的增加,发芽率呈逐渐下降的趋势。四倍体菰蓝的发芽率、二倍体和四倍体菰蓝的发芽势均随着甘露醇浓度的增加呈现逐渐下降的趋势,这一结果与部分研究者的结果一致:宋军生等^[16]利用 PEG-6000 模拟干旱来研究不同干旱胁迫对板蓝根种子萌发的影响,其发芽率、发芽势和发芽指数均随着 PEG-6000 浓度的增加呈现逐渐下降的趋势。张聃等^[17]采用聚乙二醇高渗溶液人工模拟水分胁迫来研究湿地松种子萌发时的发芽率、发芽势和发芽指数,结果发现这三者均随着聚乙二醇浓度的增加呈现逐渐下降的趋势;朱慧等^[18]研究发现 PEG-6000 胁迫处理五爪金龙种子萌发的发芽率和发芽指数均随着 PEG-6000 浓度的增加呈现逐渐下降的趋势;朱教君等^[19]的研究表明,聚乙二醇胁迫处理沙地樟子松种子萌发时的发芽率、发芽势和发芽指数均随着聚乙二醇浓度的增加呈现逐渐下降的趋势。本研究结果显示,相对低浓度的甘露醇(100~250 mmol/L)胁迫下,四倍体菰蓝对于干旱胁迫的耐受性要高于二倍体菰蓝。

丙二醛是膜脂氧化的最终产物,是膜系统受伤害的重要标志之一,其含量可以表示膜脂过氧化作用的程度^[20],可间接反映植物组织抗氧化能力的大小,因而用于鉴定植物的抗旱性^[21]。二倍体和四倍体菰蓝随着甘露醇浓度的增加,丙二醛含量呈现逐渐增加的趋势,膜系统受损程度越发加重,四倍体菰蓝丙二醛最大值较对照的增加量低于二倍体,这在一定程度上说明四倍体菰蓝较二倍体菰蓝对于干旱的耐受能力强。

脯氨酸是植物体内蛋白质的重要组成部分,当植物受到外界环境胁迫时,植物体内游离脯氨酸积累含

量增加,在植物的渗透调节中起重要作用。即使在含水量很低的细胞内,脯氨酸溶液仍能提供足够的自由水以维持正常的生命活动。植物体内游离脯氨酸含量在一定程度上反映了植物体内的水分情况,因而可以作为植物缺水情况的参考性生理指标^[22]。二倍体和四倍体菰蓝随着甘露醇浓度的增加,脯氨酸含量呈逐渐增加的趋势。四倍体各浓度下脯氨酸含量均较二倍体高,随着甘露醇浓度的增加四倍体较二倍体增加明显,说明四倍体菰蓝较二倍体菰蓝能耐受更强的干旱胁迫。

干旱是一种重要的非生物胁迫因子,它能使植物细胞膜脂受到伤害,同时也干扰植物细胞中活性氧的产生与清除之间的平衡,从而导致植物细胞遭受氧化胁迫。在正常条件下,植物组织细胞中产生的活性氧与清除系统保持平衡,当外界环境胁迫长期作用于植物后,产生的活性氧超出了清除系统的清除能力时,就会引起组织内活性氧积累而产生氧化伤害^[23],植物体为保护自身免受氧化伤害而形成一套相应的抗氧化保护系统,如 SOD、POD、CAT 等^[24]。本试验中随着甘露醇浓度的增加二倍体和四倍体菰蓝中 SOD、POD 和 CAT 三种保护性酶均呈现先增加后降低的趋势。酶活性之所以降低是因为在一定干旱胁迫范围内,通过增加酶活性来提高适应干旱胁迫的能力,但当胁迫超出其忍耐范围,保护酶活性则会下降,这与范苏鲁等^[25]对大丽花的研究结果一致。当甘露醇浓度从 0 增加到 250 mmol/L 时,四倍体的 SOD、POD 和 CAT 三种保护性酶活性均高于二倍体。这说明在干旱胁迫下四倍体菰蓝对活性氧的清除能力要高于二倍体菰蓝。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010.
- [2] 乔传卓,戴富宝,崔熙,等. 两种倍性水平菰蓝的生药学研究[J]. 中草药,1995,26(8):423-428.
- [3] 陈桂平,客绍英. 二倍体及四倍体菰蓝氨基酸含量的测定分析[J]. 中药材,2011,34(4):506-508.
- [4] 段英姿. 菰蓝二倍体及其同源四倍体遗传差异的 ISSR 分析[J]. 西北植物学报,2012,32(8):1534-4538.
- [5] 陈玉芹,聂姬泽,客绍英,等. 不同倍性菰蓝超氧化物歧化酶的活性变化[J]. 唐山师范学院学报,2008,30(2):44-47.
- [6] 谭勇,梁宗锁,董娟娥,等. 水分胁迫对菰蓝生长发育和有效成分积累的影响[J]. 中国中药杂志,2008,33(1):19-22.
- [7] 王竹承,梁宗锁,丁永华. 水分胁迫对菰蓝幼苗生长和生理特性的影响[J]. 西北农业学报,2010,19(12):98-103.

- [8] Francois C, Genevieve C, Jean-christophe B. Molecular and physiological response to water deficit in drought-tolerant and drought-sensitive lines of sunflower [J]. *Plant Physiol*, 1998, 116(1): 319-328.
- [9] 陈善福, 舒庆尧. 植物耐干旱胁迫的生物学机理及其基因工程研究进展[J]. *植物学通报*, 1999, 16(5): 555-560.
- [10] 王飞飞, 李勇, 王学东. 拟南芥 AT2G14260 基因功能及其表达特异性[J]. *作物学报*, 2011, 37(11): 1984-1990.
- [11] Verslues P E, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, et al. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status[J]. *The Plant Journal*, 2006, 45(4): 523-539.
- [12] Turk M A, Shatnawi M K, Tawaha A M. Inhibitory effects of aqueous extracts of black mustard on germination and growth of alfalfa [J]. *Weed Biology and Management*, 2003, 3(1): 37-40.
- [13] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [14] 高俊凤. 植物生理学实验技术[M]. 西安: 世界图书出版公司, 2000.
- [15] Levitt J. Response of plants to environmental stress [M]. New York: Academic Press, 1980.
- [16] 宋军生, 王芳, 鱼小军. PEG 胁迫对板蓝根种子萌发和幼苗生长的影响[J]. *种子*, 2011, 30(11): 11-14.
- [17] 张聃, 曹昀, 郑林. 湿地松种子萌发对模拟水分胁迫的响应[J]. *水土保持研究*, 2011, 18(1): 188-191.
- [18] 朱慧, 马瑞君, 吴双桃, 等. 干旱胁迫对五爪金龙种子萌发与幼苗生长的影响[J]. *西北植物学报*, 2009, 29(2): 344-349.
- [19] 朱教君, 李智辉, 康宏樟, 等. 聚乙二醇模拟水分胁迫对沙地樟子松种子萌发影响研究[J]. *应用生态学报*, 2005, 16(5): 801-804.
- [20] 梁新华, 史大刚. 干旱胁迫对光果甘草幼苗根系 MDA 含量及保护酶 POD、CAT 活性的影响[J]. *干旱地区农业研究*, 2006, 24(3): 108-110.
- [21] 刘晓东, 高春红, 王玲. 两种锦带花品种对于干旱胁迫的生理响应[J]. *东北林业大学学报*, 2012, 40(9): 22-24.
- [22] 俞建妹, 唐树生, 王凌晖. 水分胁迫对桂花幼苗生长及生理特性的影响[J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(4): 2107-2109.
- [23] 孙麇, 易自力, 蒋建雄, 等. 转 NAS 基因冷季型草坪草的生长及抗旱性研究[J]. *生物技术通报*, 2008(4): 122-129.
- [24] Sergi M B, Lenonor A. Drought-induced changes in the redox state of alpha-tocopherol, ascorbate and the diterpene carnosic acid in chloroplasts of labiatae species differing in carnosic acid contents[J]. *Plant Physiology*, 2003, 131(4): 1816-1825.
- [25] 范苏鲁, 苑兆和, 冯立娟, 等. 干旱胁迫对大丽花生理生化指标的影响[J]. *应用生态学报*, 2011, 22(3): 651-657.

(上接第 31 页)

- [35] Behera N, Sahani U. Soil microbial biomass and activity in response to Eucalyptus plantation and natural regeneration on tropical soil [J]. *Forest Ecology and Management*, 2003, 174(1/3): 1-11.
- [36] Araujo A S F, Silva E F L, Nunes L, et al. The effect of converting tropical native savanna to eucalyptus grandis forest on soil microbial biomass[J]. *Land Degradation & Development*, 2010, 21(6): 540-545.
- [37] Agnelli A, Ugolini F C, Corti G, et al. Microbial biomass-C and basal respiration of fine earth and highly altered rock fragments of two forest soils[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2001, 33(4/5): 613-620.
- [38] Ruiz-Jaen M C, Aide T M. Restoration success: How is it being measured[J]. *Restoration Ecology*, 2005, 13(3): 569-577.
- [39] Muys B, Lust N. Inventory of the Earthworm Communities and the State of Litter Decomposition in the Forests of Flanders, Belgium, and Its Implications for Forest Management [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1992, 24(12): 1677-1681.
- [40] Menyailo O V, Hungate B A, Zech W. The effect of single tree species on soil microbial activities related to C and N cycling in the Siberian artificial afforestation experiment-Tree species and soil microbial activities [J]. *Plant and Soil*, 2002, 242(2): 183-196.
- [41] Grayston S, Prescott C. Microbial communities in forest floors under four tree species in coastal British Columbia[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2005, 37(6): 1157-1167.
- [42] Smolander A, Kitunen V. Comparison of tree species effects on microbial C and N transformations and dissolved organic matter properties in the organic layer of boreal forests[J]. *Applied Soil Ecology*, 2011, 49: 224-233.
- [43] Bais H P, Weir T L, Perry L G, et al. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2006, 57: 233-266.