

ISSN 1000-0933

CN 11-2031/Q

生态学报

Acta Ecologica Sinica



第33卷 第6期 Vol.33 No.6 2013

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 (SHENTAI XUEBAO)

第33卷 第6期 2013年3月 (半月刊)

目 次

专论与综述

基于遥感技术的森林健康研究综述 高广磊,信忠保,丁国栋,等 (1675)

Agent 农业土地变化模型研究进展 余强毅,吴文斌,杨鹏,等 (1690)

个体与基础生态

辽东湾北部近海沙蚕的动态分布 王彬,秦宇博,董婧,等 (1701)

口虾蛄 proPO 基因全长 cDNA 的克隆与组织表达 刘海映,刘连为,姜玉声,等 (1713)

中缅树鼩头骨及下白齿几何形态与环境的关系 朱万龙,贾婷,黄春梅,等 (1721)

亚热带 3 种树种凋落叶厚度对其分解速率及酶活性的影响 季晓燕,江洪,洪江华,等 (1731)

浙北地区常见绿化树种光合固碳特征 张娇,施拥军,朱月清,等 (1740)

两种高质牧草不同生育期光合生理日变化及光响应特征 郭春燕,李晋川,岳建英,等 (1751)

基于 WOFOST 作物生长模型的冬小麦干旱影响评估技术 张建平,赵艳霞,王春乙,等 (1762)

基于线粒体 DNA 控制区的斑翅草螽不同地理种群遗传分化研究 周志军,尚娜,刘静,等 (1770)

圈养尖吻蝮雌体大小、窝卵数和卵大小之间的关系 胡明行,谭群英,杨道德 (1778)

应用寄生蜂和不育雄虫防控田间橘小实蝇 郑思宁,黄居昌,叶光禄,等 (1784)

青蒿素对外生菌根真菌化感效应 李倩,袁玲,王明霞,等 (1791)

种群、群落和生态系统

海湾生态系统健康评价方法构建及在大亚湾的应用 李纯厚,林琳,徐珊楠,等 (1798)

上升流和水团对浙江中部近海浮游动物生态类群分布的影响 孙鲁峰,柯昶,徐兆礼,等 (1811)

半干旱区生态恢复关键生态系统识别——以内蒙古自治区和林县为例
彭羽,高英,冯金朝,等 (1822)

太岳山油松人工林土壤呼吸对强降雨的响应 金冠一,赵秀海,康峰峰,等 (1832)

重庆酸雨区马尾松林凋落物特征及对干旱胁迫的响应 王轶浩,王彦辉,于澎涛,等 (1842)

景观、区域和全球生态

城市典型水域景观的热环境效应 岳文泽,徐丽华 (1852)

外来树种桉树引种的景观生态安全格局 赵筱青,和春兰 (1860)

基于耕地生态足迹的重庆市耕地生态承载力供需平衡研究 施开放,刁承泰,孙秀锋,等 (1872)

大气 CO₂ 浓度升高对稻田根际土壤甲烷氧化细菌丰度的影响 严陈,许静,钟文辉,等 (1881)

资源与产业生态

基于可变模糊识别模型的海水环境质量评价 柯丽娜,王权明,孙新国,等 (1889)

亚热带养殖海湾皱纹海鞘生物沉积的现场研究 闫家国,齐占会,田梓杨,等 (1900)

黄土高原典型苹果园地深层土壤氮磷钾养分含量与分布特征 张丽娜,李军,范鹏,等 (1907)

- 旱作农田不同耕作土壤呼吸及其对水热因子的响应 张丁辰, 蔡典雄, 代快, 等 (1916)
商洛低山丘陵区农林复合生态系统中大豆与丹参的光合生理特性 彭晓邦, 张硕新 (1926)
外源油菜素内酯对镉胁迫下菊芋幼苗光合作用及镉富集的调控效应 高会玲, 刘金隆, 郑青松, 等 (1935)
基于侧柏液流的测定对 Granier 原始公式系数进行校正 刘庆新, 孟平, 张劲松, 等 (1944)

研究简报

- 湿地自然保护区保护价值评价方法 孙锐, 崔国发, 雷霆, 等 (1952)
干热河谷印楝和大叶相思人工林根系生物量及其分布特征 高成杰, 唐国勇, 李昆, 等 (1964)
海滨沙滩单叶蔓荆对沙埋的生理响应特征 周瑞莲, 王进, 杨淑琴, 等 (1973)
宁夏贺兰山、六盘山典型森林类型土壤主要肥力特征 姜林, 耿增超, 张雯, 等 (1982)

学术争鸣

- 小兴安岭十种典型森林群落凋落物生物量及其动态变化 侯玲玲, 毛子军, 孙涛, 等 (1994)
中国生态学学会 2013 年学术年会征稿通知 (2002)
第七届现代生态学讲座、第四届国际青年生态学者论坛通知 (I)
中、美生态学会联合招聘国际期刊主编 (i)

期刊基本参数: CN 11-2031/Q * 1981 * m * 16 * 328 * zh * P * ¥ 90.00 * 1510 * 34 * 2013-03



封面图说:亭亭玉立的白桦树——白桦为落叶乔木, 可高达 25m, 胸径 50cm。其树冠呈卵圆形, 树皮白色, 纸状分层剥离; 叶三角状、卵形或菱状卵形; 花单性, 雌雄同株。白桦树喜光, 耐严寒, 对土壤适应性强, 喜酸性土, 沼泽地、干燥阳坡及湿润阴坡都能生长。常与红松、落叶松、山杨、蒙古栎混生。白桦的天然更新好, 生长较快, 萌芽强, 在人为的采伐迹地或火灾、风灾等自然损毁的迹地里, 往往由白桦首先进入, 为先锋树种, 而形成白桦次生林。白桦分布甚广, 我国大、小兴安岭及长白山均有成片纯林, 在华北平原和黄土高原山区、西南山地亦为阔叶落叶林及针叶阔叶混交林中的常见树种。

彩图及图说提供: 陈建伟教授 北京林业大学 E-mail: cites.chenjw@163.com

DOI: 10.5846/stxb201207150997

刘海映, 刘连为, 姜玉声, 隋宥珍, 陈雷. 口虾蛄 proPO 基因全长 cDNA 的克隆与组织表达. 生态学报, 2013, 33(6): 1713-1720.
Liu H Y, Liu L W, Jiang Y S, Sui Y Z, Chen L. Full length cDNA cloning and tissue expression of prophenoloxidase from *Oratosquilla oratoria*. Acta Ecologica Sinica, 2013, 33(6): 1713-1720.

口虾蛄 proPO 基因全长 cDNA 的克隆与组织表达

刘海映^{1,*}, 刘连为¹, 姜玉声², 隋宥珍², 陈雷¹

(1. 大连海洋大学辽宁省海洋牧场工程技术研究中心, 大连 116023;
2. 大连海洋大学 农业部海洋水产增养殖学与生物技术重点开放实验室, 大连 116023)

摘要: 口虾蛄是海湾底拖网渔业中具有重要经济价值的种类, 分布广泛。其自然资源日渐衰退, 人工育苗技术获得成功后, 口虾蛄养殖过程中病害问题及其防治应引起足够的重视。为此, 拟通过分子生物学手段研究口虾蛄免疫系统的核心酶——酚氧化酶(PO)的分子结构及该基因的组织表达, 从而在分子水平上深入探究其免疫机理。采用反转录 PCR(RT-PCR)与 cDNA 末端快速克隆(RACE)技术从口虾蛄血细胞中克隆了酚氧化酶原(*O-proPO*)基因, cDNA 全长为 2436bp, 其中开放阅读框为 2142bp, 编码 713 个氨基酸。预测分子量为 82446Da, 等电点(pI)为 8.78。该基因与 Genbank 上登录的斑节对虾、凡纳滨对虾、罗氏沼虾、短沟对虾、日本对虾 proPO 基因序列具有较高的同源性, 分别为 82%、76%、76%、72%、70%。序列分析表明 *O-proPO* 为 proPO 家族中的一个成员, 其氨基酸序列中含有多个免疫调节作用位点。系统进化分析显示 *O-proPO* 与十足目种类的 proPO 为同一分支的 2 个亚群, 而后于丰年虫的 proPO 形成一分支。*O-proPO* 基因表达具有组织特异性, 在血淋巴和肠中表达, 但在血淋巴中表达量明显高于肠。

关键词: 口虾蛄; 酚氧化酶原; 分子克隆; 表达分析

Full length cDNA cloning and tissue expression of prophenoloxidase from *Oratosquilla oratoria*

LIU Haiying^{1,*}, LIU Lianwei¹, JIANG Yusheng², SUI Youzhen², CHEN Lei¹

1 Center of Marine Ranching Engineering Science Research of Liaoning Province, Dalian Ocean University; Dalian 116023, China

2 Key Laboratory of North Mariculture, Ministry of Agriculture, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China

Abstract: Prophenoloxidase (proPO) is the terminal component of the proPO activating system, a defense and recognition system in crustaceans and insects. It can be activated to generate the active enzyme phenoloxidase (PO) by a proteinase cascade and some additional factors. PO can oxidize phenols to quinones that can then polymerize non-enzymatically to melanin. Recently, molecular biology studies of proPO, such as gene expression, structure analysis, and real time expression, have made great progress. However, these studies focused mainly on shrimps and crabs. To better understand the phylogenetic relations and characteristics of the proPOs gene among crustaceans, it is necessary to study crustaceans other than shrimp and crab. *Oratosquilla oratoria* belongs to order Stomatopoda in phylum Crustacea. *O. oratoria* is found on muddy bottoms in the coastal waters of Russia, China, Korea, Japan, Vietnam, and Australia and is exploited commercially in many regions. Its natural resources have degraded by degrees since fishing intensification increased and the ecological environment of inshore areas deteriorated. Artificial breeding of *O. oratoria* is now practiced successfully. However, just as the sustainability and development of shrimp aquaculture is increasingly threatened by significant

基金项目:国家海洋公益性行业科研专项经费项目(200905019); 辽宁省科学技术计划项目(2008203002); 辽宁省自然科学基金项目项(20052138)

收稿日期:2012-07-15; 修订日期:2013-01-21

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: hyliu@dlou.edu.cn

ecological and pathological problems, it is likely that *O. oratoria* aquaculture will develop similar severe issues. To boost the healthy development of *O. oratoria* aquaculture, much more attention should be paid to the PO enzyme which plays an important part in the immune system of crustaceans. Research on the molecular structure and tissue expression of the proPO gene may give us a more thorough understanding of the immunologic mechanisms in *O. oratoria*. In this paper, the cDNA of the *O. oratoria* proPO (*O*-proPO) gene was cloned using reverse transcription PCR (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE). The full length cDNA of *O*-proPO consisted of 2, 436 base pairs (bp) with a 2, 142 bp open reading frame (ORF), which can encode a 713 amino acid protein with a predicted molecular mass of 82, 446 Daltons and an estimated pI of 8.78. The nucleotide sequence of *O*-proPO showed 82%, 76%, 76%, 72%, 70% and the deduced amino acid sequence of *O*-proPO showed 51%, 51%, 48%, 51%, and 50% homology with the corresponding sequences from *Penaeus monodon*, *Litopenaeus vannamei*, *Macrobrachium rosenbergii*, *Penaeus semisulcatus* and *Marsupenaeus japonicas* respectively. Sequence analysis indicated that three tandem hemocyanin domains (hemocyanin-N domains, hemocyanin-C domains and hemocyanin-M domains) were present in the *O*-proPO amino acid sequence, confirming that *O*-proPO is a member of the proPO family. The hemocyanin-M domains contained two conserved copper-binding sites surrounded by six histidine residues that are highly conserved in other crustacean species. Five polyadenylation signal sites were identified in the nucleotide sequence of *O*-proPO, suggesting that multiple shearing may occur at the 3' end. This phenomenon has rarely been reported in crustaceans. Several immune modulatory sites were also detected in the amino acid sequence of *O*-proPO; they include a putative cleavage site for zymogen activation by the proPO-activating enzyme (ppA), five predicted N-linked glycosylation sites and an α_2 -macroglobulin site, all of which might play a critical role in the immunologic process. The sequence of the α_2 -macroglobulin site, ACGWPQHV, was found to be conserved when the *O*-proPO amino acid sequence was compared with proPO in other crustacean species. Phylogenetic analysis revealed that *O*-proPO and proPO of decapod species formed two subgroups on the same branch of the tree. These subgroups then clustered with proPO from *Artemia franciscana*. This finding is consistent with the taxonomic status of these species. Tissue expression of the proPO gene was carried out in antenna, eyestalk, ovarian, intestine, muscle and hemolymph of *O. oratoria* by semi-quantitative RT-PCR analysis. ProPO expression was detected in hemolymph and intestine, with the higher expression level in hemolymph.

Key Words: *Oratosquilla oratoria*; prophenoloxidase; molecular cloning; expression analysis

随着对虾养殖过程中的生态和病害问题日益严重,对虾养殖业的可持续发展引起了广大学者的关注^[1-2],国内外围绕甲壳动物免疫机制开展了大量的研究^[3-8]。在甲壳动物的识别与防御系统中,酚氧化酶(phenoloxidase, PO)作为核心酶起到关键性作用,它一般以无活性的酶原形式—酚氧化酶原(prophenoloxidase, proPO)存在^[9-17]。目前,越来越多的甲壳动物proPO基因被克隆,它们的分子结构及组织表达等方面也被深入地研究^[18-24]。然而,这些研究工作多以十足目中的虾蟹类为研究对象,proPO基因在甲壳动物中的进化关系至今尚不清楚。因此,有必要对十足目以外种类的proPO基因特性进行研究,为探明这一重要免疫相关基因的功能演化提供依据。

口虾蛄(*Oratosquilla oratoria*)广泛分布于俄罗斯、中国、日本、韩国、越南与澳大利亚近海,并且在许多海域被商业性开发^[25]。由于捕捞强度的增大与近海生态环境的破坏,口虾蛄自然资源日渐衰退,有关其增养殖技术的研究及资源保护与合理利用等备受关注^[26-27]。人工育苗技术获得成功后^[28-30],口虾蛄养殖过程中病害问题及其防治将显得尤为突出,从分子水平上深入探究其免疫机理具有深远的意义。为此,本文采用反转录PCR(RT-PCR)与cDNA末端快速克隆(RACE)技术克隆了口虾蛄proPO(*O*-proPO)基因全长cDNA(GenBank登录号:HQ588346),对该基因及其编码的氨基酸序列进行了结构分析,并探讨该基因在不同组织中的表达情况,以期为口虾蛄养殖的疾病防控提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

口虾蛄购自大连市黑石礁水产品市场,体长为 13.5—16.0 cm,于实验室循环水槽内暂养一周后抽取血淋巴。RNA simple Total RNA Kit 购自天根生化科技有限公司。M-MLV reverse transcriptase、Taq DNA polymerase、*Hind* III、*Bam*H I、DL2000 Marker、pMD19-T vector 购自宝生物工程(大连)有限公司。DNA 回收和质粒回收使用爱思进生物技术有限公司的 AxyPrep™ DNA Gel Extraction Kit 和 AxyPrep™ Plasmid Miniprep Kit。SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 为 Clontech 公司产品。大肠杆菌 DH5α 菌株购自上海生物工程技术有限公司。其它试剂均为国产分析纯。

1.2 总 RNA 提取与 cDNA 合成

血淋巴的抽取参考文献^[9],用 RNA simple Total RNA Kit 提取血细胞总 RNA。1% 的琼脂糖凝胶电泳检测所提取口虾蛄总 RNA 的质量,M-MLV reverse transcriptase 将 mRNA 反转录成 cDNA。

1.3 O-proPO 基因 cDNA 片段的克隆

以合成的血细胞 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增引物为:UPhF,5'-CACCACTGGCACTGGCA-3';UPhRr,5'-TACCCGAAGGGCAAGCTAGC-3'。PCR 反应条件:94 ℃ 预变性 2 min;94 ℃ 变性 30 s,56 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 90 s,35 个循环;72 ℃ 最后延伸 2 min。PCR 产物经过 1% 琼脂糖凝胶电泳分离,切胶纯化目的片段,然后连接至 pMD19-T 载体并转化到 *E. coli* DH5α 菌株中。PCR 筛选阳性克隆,检测后测序。

1.4 O-proPO 基因 cDNA 全长扩增

根据已获得的 O-proPO 基因 cDNA 片段设计 3'RACE 特异性引物 UPhRf 和 5'RACE 特异性引物 UPh5c,接头引物分别为 AU 和 NUP(引物序列见表 1)。3'RACE PCR 反应条件:94 ℃ 预变性 2 min;94 ℃ 变性 30 s,56 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,35 个循环;72 ℃ 最后延伸 2 min。5'RACE PCR 反应条件:94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 变性 45 s,55 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 2 min,35 个循环;72 ℃ 最后延伸 4 min。对所有序列进行拼接,获得 cDNA 全长。

1.5 序列分析

采用 BLAST 程序对 O-proPO 基因 cDNA 序列进行比对分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)。使用 Primer Premier version 5.0 软件进行引物设计及 cDNA 蛋白翻译,对推导出的氨基酸序列使用 ProtParam 软件(<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>)进行蛋白质理化特性预测,Smart 软件预测功能域。采用 MEGA version 5.0 软件对预计的 O-proPO 氨基酸序列进行分子进化分析,通过 Neighbor-joining(NJ)方法构建系统进化树。

1.6 不同组织 proPO 基因的表达分析

利用半定量 RT-PCR 技术,检测 O-proPO 基因在血细胞、肌肉、肠、卵巢、眼柄及触角中的表达情况。目的基因扩增引物 UPhF 和 UPhRr 如前所述,内标基因 β-actin 扩增引物为 Actinf 和 Actinr(引物序列见表 1),每个组织设 3 个平行组。PCR 反应条件:94 ℃ 预变性 2 min;94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 60 s,72 ℃ 延伸 30 s,28 个循环;72 ℃ 最后延伸 2 min。

表 1 试验中所用引物及其序列

Table 1 primers used in this experiment

引物名称 Name of primers	序列 Sequences	引物名称 Name of primers	序列 Sequences
UPhRr	5'-TACCCGAAGGGCAAGCTAGC-3'	UPh5c	5'-CGGGGTCAAATCCGACGACAACG-3'
NUP	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGACT-3'	AU	5'-GCCACGGTCGACTAGTAC-3'
Actinf	5'-CGATATGGAGAAGATCTGGCAT-3'	Actinr	5'-AGCTTCTCCTTGATGTCACC-3'

2 结果

2.1 O-proPO 基因 cDNA 特征及其蛋白结构预测

经拼接的 *O-proPO* cDNA 全长为 2436bp, 包含一个 2142bp 开放阅读框(ORF), 编码 713 个氨基酸(图 1)。*O-proPO* 分子量为 82446Da, 等电点(*pI*)为 8.78。序列分析表明, *O-proPO* 为 proPO 家族中的一个成员, 该蛋白含有 3 个串联血蓝蛋白结构域: hemocyanin-N 结构域(残基 42 位—142 位)、hemocyanin-M(残基 144 位—421 位)结构域与 hemocyanin-C 结构域(残基 427 位—686 位), 它们被认为是 proPO 的功能结构域^[31](图 2)。其中, hemocyanin-M 结构域中存在铜离子结合位点 A(CuA)和 B(CuB)。6 个组氨酸在 2 个铜结合位点中的位置:210、214、238 为 A 位点, 372、376 和 412 为 B 位点。多序列比对表明, 第 46(Arg)—47(Ser)位氨基酸之间的肽键很可能是酚氧化酶活化时被切割的位点。*O-proPO* 含有 5 个 N-糖基化位点与 1 个 α_2 巨球蛋白位点(ACGWPQHV)。

图 1 口虾蛄酚氧化酶原基因 cDNA 及推测的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide sequence of proPO cDNA from *Oratosquilla oratoria* and its deduced amino acid sequence

方框分别表示起始密码子(ATG)、 α_2 巨球蛋白位点(ACGWPQHV)、终止密码子(TGA)、多聚a信号肽链序列(aataaa)；划线标记区域为3个血蓝蛋白结构域，加粗字体表示铜离子结合位点内的6个组氨酸残基；三角形所示位置为酚氧化酶激活酶水解位点；灰色部分为N-糖基化位点

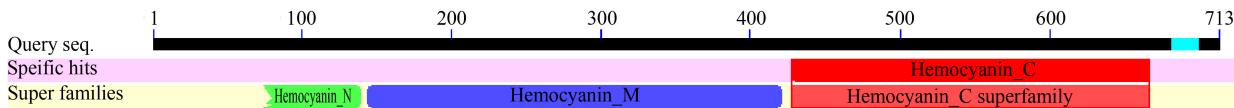


图2 口虾蛄酚氧化酶原中的3个串联血蓝蛋白结构域位置

Fig. 2 Distribution of three tandem hemocyanin domains of proPO from *Oratosquilla oratoria*

2.2 proPO 同源序列及系统进化分析

O-proPO 基因序列与 Genbank 登录的斑节对虾(*Penaeus monodon*, AF099741.1)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*, EU373096.1)、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*, DQ182596.1)、短沟对虾(*Penaeus semisulcatus*, AF521949.1)、日本对虾(*Marsupenaeus japonicus*, AB073223.1)具有较高同源性, 分别为 82%、76%、76%、

72%、70%。推测的 *O*-proPO 氨基酸序列与这些物种的同源性分别为 51% (AAM77689)、51% (AAW51360)、48% (ABA60740)、51% (AAM77690)、50% (BAB83773)。对它们的 proPO 2 个铜结合位点内氨基酸序列进行比较(图 3),可以看出铜结合位点内的 6 个组氨酸及相邻氨基酸序列高度保守。为了检验物种 proPO 基因的

<i>O. oratoria</i>	YGINAHHWHW	HI VFP AE I E I	A LHRDRKGEL	FYYMHQQMMA	RY
<i>P. monodon</i>	YGINVHHWHW	HL IYP PAMG F	DRDRKGEL	FYYMHQ QVIA	RY
<i>P. semisulcatus</i>	YGINVHHWHW	HL IYP PAMG I	DRDRKGEL	F FYMHQ QVI A	RY
<i>L. vannamei</i>	YGINVHHWHW	HL IYP PGMGV	DRDRKGEL	FYYMHQ Q I IA	RY
<i>M. japonicas</i>	YGLSVHHWHW	HL IYPVGMGV	DRDRKGEL	FYYMHQ Q LIA	RY
<i>M. rosenbergii</i>	YGIN SHHWHW	HLVFPVE MDI	RRDRK GEI	FYYMHQ QMLA	RY
	*	*		*	
<i>O. oratoria</i>	DMHNFGHVLL	ALAHDPGVH	REEMGVMGDS	GTAMRDPVFY	RWHRY ID
<i>P. monodon</i>	D LHNRGHDI L	AFS HDPDNAH	KEEMGV VGDL	GT S LRDPVFF	R LHKLVD
<i>P. semisulcatus</i>	D LHNRGHDI L	AFS HDPDNAH	KEEMGV VGDL	GT S LRDPVFF	L LHKLVD
<i>L. vannamei</i>	D LHNI GHDI L	AFS HDPDNAH	KEEMGV VGDL	GT S LRDPVFF	R LHKLVD
<i>M. japonicas</i>	S LHFN GHDI L	AFS HDPDNAH	KEEMGV I GDV	G I SVKDPAFY	R LHKLVD
<i>M. rosenbergii</i>	DLHFN AHVLI	S FS HDPFAH	R EEVGA I GDP	AT SMRDPTFY	R LHKFVD
	*	*		*	

图 3 口虾蛄及其他甲壳动物 proPO 铜结合位点内推测的氨基酸序列同源性比较

Fig. 3 Alignments of two copper binding sites of proPOs of *Oratosquilla oratoria* and other crustacean

阴影部分表示 6 个物种 proPO 的保守区域,星号标记的部分为 6 个组氨酸残基

进化关系,17 种甲壳动物 proPO 氨基酸序列被用于 NJ 聚类分析。图 4 显示,所分析的甲壳动物 proPO 存在 2 个分支,分支 1 包含 *O*-proPO 与十足目种类的 proPO,分支 2 为无甲目类——丰年虫 (*Artemia franciscana*) 的 proPO。

2.3 ProPO 的组织表达分析

以 β -actin 基因片段作为内参,采用 RT-PCR 技术研究了 *O*-proPO 基因在各组织中的表达情况(图 5)。结果表明, *O*-proPO 基因在各组织中表达差异较大,其在血淋巴和肠中表达,而且在血淋巴中表达显著。在触角、眼柄、卵巢、肌肉中不表达。

3 讨论

采用 RT-PCR 和 RACE 技术从口虾蛄血淋巴中获得了 *O*-proPO 基因 cDNA 全长,该基因及其编码的氨基酸序列与其它甲壳动物具有较高的同源性。*O*-proPO 基因含 5 个多聚 a 加尾信号,表明该基因 3'端有多种剪切可能,这在甲壳动物中非常少见^[32]。该蛋白含有 3 个串联血蓝蛋白结构域,存在铜离子结合位点 A 和 B,表明 *O*-proPO 为 proPO 家族中的一个成员。在 *O*-proPO 的氨基酸序列上,发现了一个酚氧化酶激活酶的水解位点。当病原菌进入宿主后,酚氧化酶激活酶会切断此位点使酶原生成有活性的酚氧化酶^[33]。而 N-糖基化位点是糖基化过程中调控蛋白质在组织和细胞中的定位、

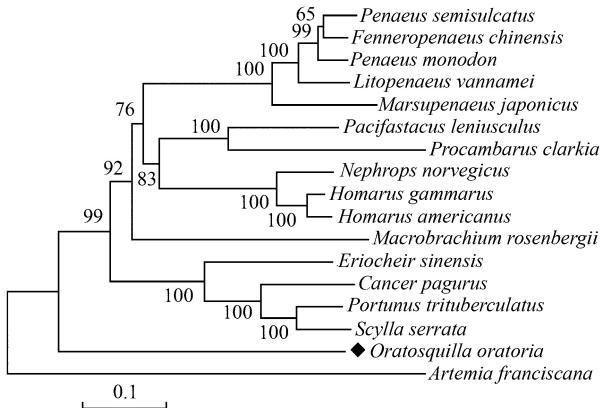


图 4 基于口虾蛄与其它甲壳动物 proPO 预测氨基酸序列构建的系统发生树

Fig. 4 NJ Phylogenetic tree based on deduced proPO amino acids of *Oratosquilla oratoria* and other crustacean

Penaeus monodon (AAM77689. 1), *Penaeus semisulcatus* (AAM77690. 1), *Litopenaeus vannamei* (AAW51360. 1), *Marsupenaeus japonicus* (BAB83773. 1), *Macrobrachium rosenbergii* (ABA60740. 1), *Eriocheir sinensis* (ABS19633. 1), *Homarus gammarus* (CAE46724. 1), *Fenneropenaeus chinensis* (ABV60265. 1), *Nephrops norvegicus* (CCE46011. 1), *Portunus trituberculatus* (ACI46633. 1), *Homarus americanus* (AAT73697. 1), *Cancer pagurus* (CBW54878. 1), *Scylla serrata* (ABD90511. 1), *Artemia franciscana* (CAO98768. 1), *Procamburus clarkia* (ABR12412. 1), *Pacifastacus leniusculus* (ABW16859. 1)

功能与活性的重要分子结构^[34]。在氨基酸序列同源性比较的其它物种中,除了凡纳滨对虾的 proPO 中含有 5 个 N-糖基化位点,其它物种含有该位点个数均小于 5。*O-proPO α₂* 巨球蛋白位点氨基酸序列为 ACGWPQHV, 斑节对虾、凡纳滨对虾、日本对虾和短沟对虾的 α₂ 巨球蛋白位点氨基酸序列为 GCGWPQHM, 而罗氏沼虾则为 GCGWPRHM。可见,该位点内氨基酸序列非常保守。α₂ 巨球蛋白为酚氧化酶原激活系统中的蛋白酶抑制剂,与该位点结合后可部分抑制酚氧化酶激酶的作用^[35]。

系统进化分析表明 *O-proPO* 与十足目种类的 proPO 为同一分支的 2 个亚群,而后于丰年虫的 proPO 形成一分支。由图 4 可知,十足目种类的 proPO 又分为游泳亚目和爬行亚目 2 个分支,游泳亚目种类的 proPO 分为 2 个亚群:对虾科(*P. semisulcatus*, *F. chinensis*, *P. monodon*, *L. vannamei*, *M. japonicus*)、螯虾科(*P. clarkia*, *P. leniusculus*)、海螯虾科(*N. norvegicus*, *H. gammarus*, *H. americanus*)的 proPO 属于一个亚群,长臂虾科(*M. rosenbergii*)的 proPO 属于另一个亚群,这些物种 proPO 基因的进化关系与它们的分类地位一致。随着甲壳动物其它物种 proPO 基因的分子结构陆续被报道,该基因在甲壳类动物中的进化关系将越来越明了。

O-proPO 基因的表达具有组织特异性,在血淋巴和肠中表达,而且在血淋巴中表达显著。其它虾蟹类的 proPO mRNA 分布:凡纳滨对虾与斑节对虾的 proPO mRNA 是在血细胞中合成而不在肝胰腺中合成^[36-37];克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)proPO 基因在血淋巴、肝胰腺、卵巢和精巢中转录水平较高,在肌肉、表皮和鳃中有较弱表达,而在肠和胃中几乎无表达^[38];锯缘青蟹(*Scylla serrata*)proPO 基因在血细胞中显著表达,在心脏、眼柄、鳃、肌肉、卵巢、肝胰腺、胃、肠中不表达^[39];而中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)proPO mRNA 转录及 PO 酶活力在肝胰腺、鳃、性腺、肌肉、心脏、眼睛和血细胞中都被检测到,特别在肝胰腺中检测到高水平^[40]。由此可见,这些种类的 proPO 基因均在血细胞中表达。甲壳动物细胞免疫是依靠血细胞来完成的,3 种不同类型的血细胞,即透明细胞、半颗粒细胞和颗粒细胞,分别参与不同的机体防御反应^[41]。此种组织表达特性可能与 proPO 在机体生命活动过程中的功能有关,在较高等的无脊椎动物如节肢动物中,PO 具有多种功能。它不仅参与黑色素形成、角质的硬化和伤口愈合,而且在宿主的防御反应中还作为非自身识别系统发挥功能^[41]。因此,深入研究 PO 在口虾蛄免疫系统中的作用机理有助于促进口虾蛄养殖的健康发展。

References:

- [1] Bachère E. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture*, 2000, 191(1/3) : 3-11.
- [2] Roch P. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture*, 1999, 172(1/2) : 125-145.
- [3] Huang H Y, Li S J, Wang G Z. Studies on the crustacean phenoloxidase activity and its application. *Marine Science Bulletin*, 2000, 19(3) : 79-84.
- [4] Meng F L, Zhang Y Z, Kong J, Ma G R. The research review of prophenoloxidase activating system in crustacean. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 1999, 30(1) : 110-115.
- [5] Liu C H, Yeh S T, Cheng S Y, Chen J C. The immune response of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio* infection in relation with the moult cycle. *Fish and Shellfish Immunology*, 2004, 16(2) : 151-161.
- [6] Cheng W, Juang F M, Li J T, Lin M C, Liu C H, Chen J C. The immune response of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its susceptibility to *Lactococcus garvieae* in relation to the moult stage. *Aquaculture*, 2003, 218(1/4) : 33-45.
- [7] Perazzolo L M, Barracco M A. The prophenoloxidase activation system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors. *Developmental and Comparative Immunology*, 1997, 21(5) : 385-395.

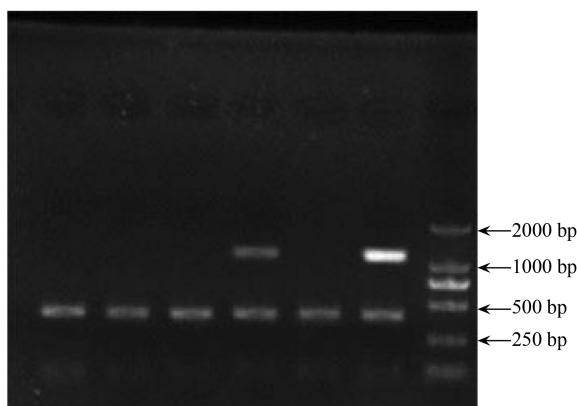


图 5 口虾蛄 proPO 基因的组织表达特异性 RT-PCR 分析

Fig. 5 Semi-quantitative RT-PCR analysis of proPO gene in different tissues of *Oratosquilla oratoria*

- [8] Hernández-López J, Gollas-Galván T, Vargas-Albores F. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). Comparative Biochemistry and Physiology, 1996, 113(1) : 61-66.
- [9] Söderhäll K, Cerenius L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. Current Opinion Immunology, 1998, 10(1) : 23-28.
- [10] Cerenius L, Söderhäll K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. Immunological Reviews, 2004, 198(1) : 116-126.
- [11] Pan L Q, Xie P, Yue F, Sun X H. Haemocyte phagocytosis, exocytosis and their signal transduction in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) induced by lipopolysaccharide and dopamine. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(5) : 726-732.
- [12] Liu K. Comparative study on phenoloxidase activity in hemocytes derived from *Litopenaeus vannamei* and *Macrobrachium rosenbergii*. Journal of Hydroecology, 2009, 2(4) : 103-107.
- [13] Fan T J, Yu M M, Yang L L, Shi Z P, Sun W J, Cong R S, Yang X X, Jiang J G. Effects of four kinds of immuno stimulants on phenoloxidase and hemocytes of crab *Charybdis japonica*. Periodical of Ocean University of China: Natural Sciences, 2009, 39(3) : 421-428.
- [14] Pang Q X, Pang S X, Zhao B S. Progress in phenoloxidase and its prophenoloxidase(II)—immunological character, cellular localization and its function. Progress in Modern Biomedicine, 2008, 8(7) : 1385-1388.
- [15] Amparyup P, Charoensapsri W, Tassanakajon A. Two prophenoloxidases are important for the survival of *Vibrio harveyi* challenged shrimp *Penaeus monodon*. Developmental and Comparative Immunology, 1999, 33(2) : 247-256.
- [16] Ai H S, Huang Y C, Li S D, Weng S P, Yu X Q, He J G. Characterization of a prophenoloxidase from hemocytes of the shrimp *Litopenaeus vannamei* that is down-regulated by white spot syndrome virus. Fish and Shellfish Immunology, 2008, 25(1/2) : 28-39.
- [17] Wang R, Lee S Y, Cerenius L, Söderhäll K. Properties of the prophenoloxidase activating anzyme of the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. European Journal of Biochemistry, 2001, 268(4) : 895-902.
- [18] Sun J, Wang B J, Li X H, Sun S J, Liu M, Jiang K Y, Wang L. The full length cDNA cloning and expression profile of prophenoloxidase of *Fenneropenaeus chinensis*. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(1) : 56-66.
- [19] Ye X, Zheng Q M, Bai J J, Lao H H, Jian Q, Luo J R. cDNA cloning and sequence analysis of prophenoloxidase in *Penaeus semisulcatus* and *Penaeus monodon*. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 2003, 34(5) : 533-539.
- [20] Li Y H, Zheng F L, Chen H Q, Wang H Z, Wang L Q, Xu D P. Cloning and sequence analysis of prophenoloxidase from haemocytes of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. Agricultural Sciences in China, 2009, 8(3) : 369-379.
- [21] Gao H W, Li F H, Dong B, Zhang Q L, Xiang J H. Molecular cloning and characterisation of prophenoloxidase (ProPO) cDNA from *Fenneropenaeus chinensis* and its transcription injected by *Vibrio anguillarum*. Molecular Biology Reports, 2008, 36(5) : 1159-1166.
- [22] Liu C H, Tseng D Y, Lai C Y, Cheng W, Kuo C M. Molecular cloning and characterisation of prophenoloxidase cDNA from haemocytes of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, and its transcription in relation with the moult stage. Fish and Shellfish Immunology, 2006, 21(1) : 60-69.
- [23] Lu K Y, Huang Y T, Lee H H, Sung H H. Cloning the prophenoloxidase cDNA and monitoring the expression of proPO mRNA in prawns (*Mobacrachium rosenbergii*) stimulated in vivo by CpG oligodeoxynucleotides. Fish and Shellfish Immunology, 2006, 20(3) : 274-284.
- [24] Aspún A, Huang T S, Cerenius L, Söderhäll K. cDNA cloning of prophenoloxidase from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* and its activation. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995, 92(4) : 939-943.
- [25] Kodama K, Oyama M, Lee J H, Akaba Y, Tajima Y, Shimizu T, Shiraishi, Toshihiro H. Interannual variation in quantitative relationships among egg production and densities of larvae and juveniles of the Japanese mantis shrimp *Oratosquilla oratoria* in Tokyo Bay, Japan. Fishery Science, 2009, 75(4) : 875-886.
- [26] Hamano T, Matsuura S. Egg size, duration of incubation, and larval development of the Japanese mantis shrimp in the laboratory. Nippon Suisan Gakkaishi, 1987, 53(1) : 23-39.
- [27] Kodama K, Shimizu T, Yamakawa T, Aoki I. Changes in reproductive patterns in relation to decline in stock abundance of the Japanese mantis shrimp *Oratosquilla oratoria* in Tokyo Bay. Fishery Science, 2006, 72(3) : 568-577.
- [28] Wang B, Zhang X L, Sun P X. On biological characters and artificial seedling-rearing techniques of mantis shrimp (*Oratosquilla oratoria*). Journal of Oceanography of Huanghai and Bohai Seas, 1998, 16(2) : 64-73.
- [29] Sun P X, Zhang X L, Tang Y T, Wang X Z, Yu D G. A technical study of artificial breeding of *Oratosquilla oratoria*. Journal of Oceanography of Huanghai and Bohai Seas, 2000, 18(2) : 41-46.
- [30] Yan B L, Xu G C, Li S H, Li D Y. The factory breeding techniques of *Oratosquilla oratoria*. Journal of Huaihai Institute of Technology: Natural Sciences, 2004, 13(1) : 50-52.
- [31] Pan L Q, Jin C X. A review on hemocyanins of crustacean. Journal of Fisheries of China, 2008, 32(3) : 483-490.
- [32] Li Y H. Cloning and Sequence Analysing of Full Length Prophenoloxidase cDNA in Red Swamp Crayfish. *Procambarus Clarkia* [D]. Hefei:

- Anhui Agricultural University, 2007.
- [33] Gai Y C. The cDNA Library Construction, EST (Expressed Sequence Tag) Analysis and Prophenoloxidase System Genes of Chinese Mitten Crab *Eriocheir Sinensis* [D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2009.
- [34] Zhou L, Gu J X. N-glycosylation sites analysis and nonconsensus N-glycosylated sequences. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2011, 23(6): 605-611.
- [35] Gao H W. Research on Novel Detection Methods for Pathogen and Phenoloxidase Pathway Genes in *Fenneropenaeus Penaeus chinensis* [D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2008.
- [36] Lai C Y, Cheng W, Kuo C M. Molecular cloning and characterisation of prophenoloxidase from haemocytes of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish and Shellfish Immunology, 2005, 18(5): 417-430.
- [37] Sritunyalucksana K, Cerenius L, Söderhäll K. Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Developmental and Comparative Immunology, 1999, 23(3): 179-186.
- [38] Li Y H, Wang Y J, Yang K L, Chen Y, She L. Expression profile of proPO mRNA in red swamp crayfish, *Procambarus clarkia*. Journal of Anhui Agricultural University, 2011, 38(3): 358-362.
- [39] Ko C F, Chiou T T, Vaseeharan B, Lu J K, Chen J C. Cloning and characterisation of a prophenoloxidase from the haemocytes of mud crab *Syrella serrata*. Developmental and Comparative Immunology, 2007, 31(1): 12-22.
- [40] Gai Y C, Zhao J M, Song L S, Li C H, Zheng P L, Qiu L M, Ni D J. A prophenoloxidase from the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*: gene cloning, expression and activity analysis. Fish and Shellfish Immunology, 2008, 24(2): 156-167.
- [41] Li G R, Zhang S C, Li H Y, Wang C L. Advance on the study of phenoloxidase I—properties, functions, distribution and change during embryonic stage. Marine Sciences, 2003, 27(4): 4-8.

参考文献:

- [3] 黄辉洋, 李少菁, 王桂忠. 甲壳动物酚氧化酶活力及其在养殖中的应用. 海洋通报, 2000, 19(3): 79-84.
- [4] 孟凡伦, 张玉臻, 孔健, 马桂荣. 甲壳动物中的酚氧化酶原激活系统研究评价. 海洋与湖沼, 1999, 30(1): 110-115.
- [11] 潘鲁青, 谢鹏, 岳峰, 孙晓华. 脂多糖、多巴胺与蛋白激酶抑制剂联合作用对凡纳滨对虾血细胞吞噬率、胞吐酚氧化酶活力的影响. 水产学报, 2010, 34(5): 726-732.
- [12] 刘凯. 南美白对虾和罗氏沼虾血细胞中酚氧化酶活力的比较. 水生态学杂志, 2009, 2(4): 103-107.
- [13] 樊廷俊, 于苗苗, 杨玲玲, 史振平, 孙文杰, 丛日山, 杨秀霞, 姜国建. 四种免疫促进剂对日本蟳酚氧化酶和血细胞的影响. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2009, 39(3): 421-428.
- [14] 庞秋香, 庞书香, 赵博生. 酚氧化酶及其酶原的生化特性与分子生物学研究进展(Ⅱ)——免疫学特性、细胞定位及其功能. 现代生物医学进展, 2008, 8(7): 1385-1388.
- [18] 孙杰, 王宝杰, 李晓华, 孙姝娟, 刘梅, 蒋克勇, 王雷. 中国明对虾酚氧化酶原基因 cDNA 的克隆与表达特征. 水产学报, 2010, 34(1): 56-66.
- [19] 叶星, 郑清梅, 白俊杰, 劳海华, 简清, 罗建仁. 短沟对虾和斑节对虾酚氧化酶原基因的克隆和序列分析. 海洋与湖沼, 2003, 34(5): 533-539.
- [28] 王波, 张锡烈, 孙丕喜. 口虾蛄的生物学特征及其人工苗种生产技术. 黄渤海海洋, 1998, 16(2): 64-73.
- [29] 孙丕喜, 张锡烈, 汤庭耀, 王兴章, 于大国. 口虾蛄 (*Oratosquilla oratoria*) 人工育苗技术研究. 黄渤海海洋, 2000, 18(2): 41-46.
- [30] 阎斌伦, 徐国成, 李士虎, 李丁月. 虾蛄工厂化育苗生产技术研究. 淮海工学院学报: (自然科学版), 2004, 13(1): 50-52.
- [31] 潘鲁青, 金彩霞. 甲壳动物血蓝蛋白研究进展. 水产学报, 2008, 32(3): 483-490.
- [32] 李艳和. 克氏螯虾酚氧化酶原全长 cDNA 的克隆与序列分析 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2007.
- [33] 盖云超. 中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) cDNA 文库的构建、EST 分析及其酚氧化酶系统关键因子的研究 [D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2009.
- [34] 周蕾, 顾建新. N-糖基化位点鉴定方法和非经典 N-糖基化序列. 生命科学, 2011, 23(6): 605-611.
- [35] 高宏伟. 中国明对虾病原检测新方法及酚氧化酶通路相关基因的研究 [D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2008.
- [38] 李艳和, 王永杰, 杨克礼, 陈宇, 余磊. 克氏原螯虾酚氧化酶原 mRNA 组织分布特性研究. 安徽农业大学学报, 2011, 38(3): 358-362.
- [41] 李国荣, 张士瑾, 李红岩, 王昌留. 酚氧化酶研究概况 I——特性、功能、分布和在胚胎发育中的变化. 海洋科学, 2003, 27(4): 4-8.

ACTA ECOLOGICA SINICA Vol. 33 ,No. 6 March ,2013(Semimonthly)
CONTENTS

Review and Monograph

- Forest health studies based on remote sensing: a review GAO Guanglei, XIN Zhongbao, DING Guodong, et al (1675)
Progress of agent-based agricultural land change modeling: a review YU Qiangyi,WU Wenbin,YANG Peng,et al (1690)

Autecology & Fundamentals

- Dynamic distribution of *Nemopilema nomurai* in inshore waters of the northern Liaodong Bay, Bohai Sea
..... WANG Bin,QIN Yubo, DONG Jing, et al (1701)
Full length cDNA cloning and tissue expression of prophenoloxidase from *Oratosquilla oratoria*
..... LIU Haiying, LIU Lianwei, JIANG Yusheng, et al (1713)
Morphometrics investigation of the skulls, mandibles and molar in *Tupaia belangeri* from Yunnan, Guizhou, Guangxi
..... ZHU Wanlong, JIA Ting, HUANG Chunmei, et al (1721)
Effects of litter thickness on leaf litter decomposition and enzyme activity of three trees in the subtropical forests
..... JI Xiaoyan,JIANG Hong,HONG Jianghua,et al (1731)
The photosynthetic carbon fixation characteristics of common tree species in northern Zhejiang
..... ZHANG Jiao,SHI Yongjun,ZHU Yueqing,et al (1740)
Diurnal changes in the photosynthetic characteristics of two high yield and high quality grasses during different stages of growth
and their response to changes in light intensity GUO Chunyan, LI Jinchuan, YUE Jianying, et al (1751)
Evaluation technology on drought disaster to yields of winter wheat based on WOFOST crop growth model
..... ZHANG Jianping, ZHAO Yanxia,WANG Chunyi, et al (1762)
Genetic diversity of *Conocephalus maculatus* of different geographic populations based on mitochondrial DNA control region analysis
..... ZHOU Zhijun, SHANG Na, LIU Jing, et al (1770)
Relationships among female body size, clutch size, and egg size in captive *Deinagkistrodon acutus*
..... HU Minghang, TAN Qunying, YANG Daode (1778)
The field control of *Bactrocera dorsalis* (Hendel) with parasitoid and sterile male
..... ZHENG Sining, HUANG Juchang, YE Guanglu, et al (1784)
Allelopathic effects of artemisinin on ectomycorrhizal fungi LI Qian, YUAN Ling, WANG Mingxia, et al (1791)

Population, Community and Ecosystem

- Establishment of integrated methodology for bay ecosystem health assessment and its application in Daya Bay
..... LI Chunhou, LIN Lin, XU Shannan, et al (1798)
The influence of upwelling and water mass on the ecological group distribution of zooplankton in Zhejiang coastal waters
..... SUN Lufeng, KE Chang,XU Zhaoli,et al (1811)
Identification of key ecosystem for ecological restoration in semi-arid areas: a case study in Helin County, Inner Mongolia
..... PENG Yu, GAO Ying, FENG Jinzhao, et al (1822)
The great rainfall effect on soil respiration of *Pinus tabulaeformis* plantation in Taiyue Mountain
..... JIN Guanyi, ZHAO Xiuhai, KANG Fengfeng, et al (1832)
The litter-fall characteristics and their response to drought stress in the Masson pins forests damaged by acid rain at Chongqing,
China WANG Yihao, WANG Yanhui, YU Pengtao, et al (1842)

Landscape, Regional and Global Ecology

- Thermal environment effect of urban water landscape YUE Wenze, XU Lihua (1852)
Landscape ecological security pattern associated with the introduction of exotic tree species *Eucalyptus*
..... ZHAO Xiaoqing, HE Chunlan (1860)
Ecological balance between supply and demand in Chongqing City based on cultivated land ecological footprint method
..... SHI Kaifang,DIAO Chengtai,SUN Xiufeng,et al (1872)
Effect of elevated CO₂ on methanotrophs in the rhizosphere of rice plant YAN Chen, XU Jing,ZHONG Wenhui,et al (1881)

Resource and Industrial Ecology

- The seawater environment quality evaluation research base on variable fuzzy pattern recognition model KE Lina, WANG Quanming, SUN Xinguo, et al (1889)
- An *in situ* study on biodeposition of ascidian (*Styela plicata*) in a subtropical aquaculture bay, southern China YAN Jiaguo, QI Zanhui, TIAN Ziyang, et al (1900)
- Distribution of soil NPK nutrient content in deep soil profile of typical apple orchards on the Loess Plateau ZHANG Lina, LI Jun, FAN Peng, et al (1907)
- Soil respiration and its responses to soil moisture and temperature under different tillage systems in dryland maize fields ZHANG Dingchen, CAI Dianxiong, DAI Kuai, et al (1916)
- Photosynthetic characteristics of soybean and salvia in an agroforestry system in the Hilly Region, Shangluo, China PENG Xiaobang, ZHANG Shuoxin (1926)
- Regulation of exogenous brassinosteroid on growth and photosynthesis of *Helianthus tuberosus* seedlings and cadmium biological enrichment under cadmium stress GAO Huiling, LIU Jinlong, ZHENG Qingsong, et al (1935)
- Calibration coefficients of Granier original formula based on sap flow of *Platycladus orientalis* LIU Qingxin, MENG Ping, ZHANG Jinsong, et al (1944)

Research Notes

- An evaluation index system classifying the conservation value of wetland nature reserves based on AHP SUN Rui, CUI Guofa, LEI Ting, et al (1952)
- Root biomass and its distribution of *Azadirachta indica* and *Acacia auriculiformis* plantations in the Dry-hot Valley GAO Chengjie, TANG Guoyong, LI Kun, et al (1964)
- Physiological response of *Vitex trifolia* to sand burial in the sand coast ZHOU Ruilian, WANG Jin, YANG Shuqin, et al (1973)
- Soil fertility under different forest types in the Helan and Liupan Mountain ranges of Ningxia Province JIANG Lin, GENG Zengchao, ZHANG Wen, et al (1982)

Opinions

- Dynamic of litterfall in ten typical community types of Xiaoxing'an Mountain, China HOU Lingling, MAO Zijun, SUN Tao, et al (1994)

《生态学报》2013 年征订启事

《生态学报》是由中国科学技术协会主管,中国生态学学会、中国科学院生态环境研究中心主办的生态学高级专业学术期刊,创刊于1981年,报道生态学领域前沿理论和原始创新性研究成果。坚持“百花齐放,百家争鸣”的方针,依靠和团结广大生态学科研工作者,探索自然奥秘,为生态学基础理论研究搭建交流平台,促进生态学研究深入发展,为我国培养和造就生态学科研人才和知识创新服务、为国民经济建设和发展服务。

《生态学报》主要报道生态学及各分支学科的重要基础理论和应用研究的原始创新性科研成果。特别欢迎能反映现代生态学发展方向的优秀综述性文章;研究简报;生态学新理论、新方法、新技术介绍;新书评价和学术、科研动态及开放实验室介绍等。

《生态学报》为半月刊,大16开本,300页,国内定价90元/册,全年定价2160元。

国内邮发代号:82-7,国外邮发代号:M670

标准刊号:ISSN 1000-0933 CN 11-2031/Q

全国各地邮局均可订阅,也可直接与编辑部联系购买。欢迎广大科技工作者、科研单位、高等院校、图书馆等订阅。

通讯地址:100085 北京海淀区双清路18号 电 话:(010)62941099; 62843362

E-mail: shengtaixuebao@rcees.ac.cn 网 址: www.ecologica.cn

编辑部主任 孔红梅 执行编辑 刘天星 段 靖

生 态 学 报

(SHENTAI XUEBAO)

(半月刊 1981年3月创刊)

第33卷 第6期 (2013年3月)

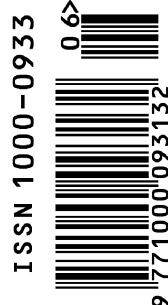
ACTA ECOLOGICA SINICA

(Semimonthly, Started in 1981)

Vol. 33 No. 6 (March, 2013)

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
主 编	王如松
主 管	中国科学技术协会
主 办	中国生态学学会 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
出 版	科 学 出 版 社 地址:北京东黄城根北街16号 邮政编码:100717
印 刷	北京北林印刷厂
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
订 购	全国各地邮局
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
广 告 经 营	京海工商广字第8013号
许 可 证	

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
Editor-in-chief	WANG Rusong
Supervised by	China Association for Science and Technology
Sponsored by	Ecological Society of China Research Center for Eco-environmental Sciences, CAS Add:18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China
Published by	Science Press Add:16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China
Printed by	Beijing Bei Lin Printing House, Beijing 100083, China
Distributed by	Science Press Add:16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China Tel:(010)64034563 E-mail:journal@cspg.net
Domestic	All Local Post Offices in China
Foreign	China International Book Trading Corporation Add:P. O. Box 399 Beijing 100044, China



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 90.00 元