

ISSN 1000-0933
CN 11-2031/Q

生态学报

Acta Ecologica Sinica



第33卷 第5期 Vol.33 No.5 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5期 2013年3月 (半月刊)

目 次

前沿理论与学科综述

- 氮沉降对森林土壤有机质和凋落物分解的影响及其微生物学机制 王晶苑, 张心昱, 温学发, 等 (1337)
工业大麻对重金属污染土壤的治理研究进展 梁淑敏, 许艳萍, 陈 裕, 等 (1347)
最佳管理措施评估方法研究进展 孟凡德, 耿润哲, 欧 洋, 等 (1357)
灌木年轮学研究进展 芦晓明, 梁尔源 (1367)

个体与基础生态

- 华北落叶松夜间树干液流特征及生长季补水格局 王艳兵, 德永军, 熊 伟, 等 (1375)
土壤干旱胁迫对沙棘叶片光合作用和抗氧化酶活性的影响 裴 斌, 张光灿, 张淑勇, 等 (1386)
湖北石首麋鹿昼间活动时间分配 杨道德, 李竹云, 李鹏飞, 等 (1397)
三种杀虫剂亚致死浓度对川硬皮肿腿蜂繁殖和搜寻行为的影响 杨 桦, 杨 伟, 杨春平, 等 (1405)

种群、群落和生态系统

- 三沙湾浮游动物生态类群演替特征 徐佳奕, 徐兆礼 (1413)
滇西北高原纳帕海湿地湖滨带优势植物生物量及其凋落物分解 郭绪虎, 肖德荣, 田 昆, 等 (1425)
安徽新安江干流滩涂湿地草本植物区系及物种多样性 杨文斌, 刘 坤, 周守标 (1433)
湿地芦苇根结合好气细菌群落时空分布及其与水质因子的关系 熊 薇, 郭逍宇, 赵 霖 (1443)
三种温带树种叶片呼吸的时间动态及其影响因子 王兆国, 王传宽 (1456)
不同土壤水分条件下杨树人工林水分利用效率对环境因子的响应 周 洁, 张志强, 孙 阁, 等 (1465)
不同生态区域沙地建群种油蒿的钙组分特征 薛苹苹, 高玉葆, 何兴东 (1475)
藏北高寒草甸植物群落对土壤线虫群落功能结构的影响 薛会英, 胡 锋, 罗大庆 (1482)
铜尾矿废弃地土壤动物多样性特征 朱永恒, 沈 非, 余 健, 等 (1495)
环丙沙星对土壤微生物量碳和土壤微生物群落碳代谢多样性的影响 马 驿, 彭金菊, 王 芸, 等 (1506)
基于生态水位约束的下辽河平原地下水生态需水量估算 孙才志, 高 翳, 朱正如 (1513)

景观、区域和全球生态

- 佛山市高明区生态安全格局和建设用地扩展预案 苏泳娴, 张虹鸥, 陈修治, 等 (1524)
不同护坡草本植物的根系特征及对土壤渗透性的影响 李建兴, 何丙辉, 谌 芸 (1535)
京沪穗三地近十年夜间热力景观格局演变对比研究 孟 丹, 王明玉, 李小娟, 等 (1545)
窟野河流域河川基流量变化趋势及其驱动因素 雷泳南, 张晓萍, 张建军, 等 (1559)
模拟氮沉降条件下木荷幼苗光合特性、生物量与 C、N、P 分配格局 李明月, 王 健, 王振兴, 等 (1569)
铁炉渣施加对稻田甲烷产生、氧化与排放的影响 王维奇, 李鹏飞, 曾从盛, 等 (1578)

资源与产业生态

- 食用黑粉菌侵染对茭白植株抗氧化系统和叶绿素荧光的影响 闫 宁, 王晓清, 王志丹, 等 (1584)

- 佛手低温胁迫相关基因的差异表达 陈文荣,叶杰君,李永强,等 (1594)
美洲棘薺马对不同蔬菜寄主的偏好性 朱亮,石宝才,官亚军,等 (1607)
茉莉酸对棉花单宁含量和抗虫相关酶活性的诱导效应 杨世勇,王蒙蒙,谢建春 (1615)
造纸废水灌溉对毛白杨苗木生长及养分状况的影响 王烨,席本野,崔向东,等 (1626)
基于数据包络分析的江苏省水资源利用效率 赵晨,王远,谷学明,等 (1636)

研究简报

- 太岳山不同郁闭度油松人工林降水分配特征 周彬,韩海荣,康峰峰,等 (1645)
基于 TM 卫星影像数据的北京市植被变化及其原因分析 贾宝全 (1654)
薇甘菊萎焉病毒感染对薇甘菊光合特性和 4 种酶活性的影响 王瑞龙,潘婉文,杨娇瑜,等 (1667)
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 * 338 * zh * P * ¥ 90.00 * 1510 * 34 * 2013-03



封面图说:美丽的油松松枝——油松又称红皮松、短叶松。树高可达 30m,胸径达 1m。其树皮下部灰褐色,裂成不规则鳞块;针叶 2 针一束,暗绿色,较粗硬;球果卵形或卵圆形,长 4—7cm,有短柄,与枝几乎成直角。油松适应性强,根系发达,树姿雄伟,枝叶繁茂,有良好的保持水土和美化环境的功能,是中国北方广大地区最主要的造林树种之一,在华北地区无论是山区或平原到处可见,人工林很多,一般情况下在山区生长最好。在山区生长的油松,多在阴坡、半阴坡,土壤湿润和较肥沃的地方。

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/stxb201209031241

陈文荣,叶杰君,李永强,张真真,曹诣斌,郭卫东.佛手低温胁迫相关基因的差异表达.生态学报,2013,33(5):1594-1606.
Chen W R, Ye J J, Li Y Q, Zhang Z Z, Cao Y B, Guo W D. Analysis of cold-regulated gene expression of the Fingered Citron (*Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle). Acta Ecologica Sinica, 2013, 33(5): 1594-1606.

佛手低温胁迫相关基因的差异表达

陈文荣,叶杰君,李永强,张真真,曹诣斌,郭卫东*

(浙江师范大学化学与生命科学学院,金华 321004)

摘要:佛手(*Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle)是药用及观赏价值都很高的经济植物,但它对低温反应敏感,容易发生冻害现象。因此,了解其冷敏感机制对提高抗寒性起着重要的作用。以佛手为试材, -4℃ 低温处理24 h后,采用mRNA差异显示技术(DDRT-PCR)和半定量RT-PCR技术,分析和鉴定与冷敏感相关的差异表达基因。DDRT结果获得差异片段121个,经生物信息学分析,差异表达序列中有33条为功能已知序列,88条为未知序列(其中5条具有开放性阅读框);半定量结果获得34个阳性基因片段,其中上调基因片段29个,下调基因片段5个。除了3个基因功能未知外,其余基因主要涉及植物防御/应激反应,细胞壁的修饰,信号转导,代谢,氨基酸转运,氧化损伤,转录和蛋白质的合成,其中与植物防御/应激反应和光合作用有关的基因可能是造成佛手寒敏感的主要原因。

关键词:佛手;低温胁迫;差异显示;半定量 RT-PCR

Analysis of cold-regulated gene expression of the Fingered Citron (*Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle)

CHEN Wenrong, YE Jiejun, LI Yongqiang, ZHANG Zhenzhen, CAO Yibin, GUO Weidong*

College of Chemistry and Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China

Abstract: Low temperature is one of the most common environmental stresses causing severe economic losses of most crops. Plants adaption to low temperature is mediated by differential gene expression, Investigation of the transcriptome profiling stressed by low temperature is important to unveil the mechanism of plant adaption to the stress. Multiple mechanisms are involved this process including differential expression of dehydrins and antifreeze proteins, chaperones and detoxification enzymes, as well as variations of biosynthetic enzymes producing the low molecular weight compounds. Regulatory proteins such as transcription factors, protein kinases and phospholipases are known to be differentially regulated under cold stress. However, few literatures were available on gene express correlated with cold-sensitivity in fingered citron.

Fingered citron (*Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle) has high values due to its medicinal properties and ornamental potential. However, high sensitivity of fingered citron to low temperature resulted in significant reduction of its production. Fingered citron's maximum freezing tolerance, considered as the semilethal temperatures (LT_{50}), is -4°C, and 24 h was considered as a critical period for cold stress. It is thus important to understand possible mechanisms involved in cold sensitivity of this plants species, as to promote its tolerance of cold stress.

In the present study, the mRNA differential display reverse transcriptase polymerase chain reaction (DDRT-PCR) was used to analyze gene expression patterns involved in the cold sensitivity of Fingered Citrons. The plants were subjected to low temperature (-4°C) for 24 h, and alterations of gene expression patterns were analyzed. One hundred and twenty-one

基金项目:浙江省自然科学基金(Y307472);浙江省科技计划项目(2008C22002)

收稿日期:2012-09-03; 修订日期:2013-01-21

*通讯作者 Corresponding author. E-mail: gwd@zjnu. cn

putative differentially expressed DNA fragments were cloned, sequenced, and analyzed. Thirty-eight genes with changed transcript levels were left after the exclusion of repeated sequences, 33 of which are genes of known functions and 5 unknown through BLAST analyses. Expression analysis by semiquantitative RT-PCR (sqRT-PCR) showed that twenty-nine genes were up-regulated and five genes were down-regulated under cold stress. No significant variation of remaining four genes were observed, and considered to be false positives.

Among the 34 differentially expressed fragments, eight genes were related to plant defense/stress responses, including hepicidin-like precursor, DNA-damage-repair/toleration protein (DRT), 26S proteasome regulatory subunit, Retrotransposon-like protein, Avirulence protein (Avr), Ac-like transposase protein, Rhodanese domain protein and β -1, 3-glucanase; Eight of nine metabolism-related genes are photosynthesis-related genes includes Abl interactor-like protein-2、3, cytochrome f, P700, plastocyanin-like protein, γ -type carbonic anhydrase protein, ATP synthase CF0 subunit I, Chlorophyllase-1 and phototropins; and 17 other genes are associated with cell wall modification, signal transduction, metabolism, amino acid transport, oxidative damage, transcription and protein synthesis. These data provide a new insight into molecular mechanisms underlying cold regulation of plant defense/stress responses and photosynthesis in Fingered Citrons, which is important to improve the cold tolerance of the citrus species.

Key Words: fingered citrons; cold stress; differential display; semi-quantitative RT-PCR

低温是影响经济作物产量和品质的主要环境因素之一。植物经低温胁迫后,植物脯氨酸、甜菜碱和可溶性糖等兼容渗透剂大量积累,从而改变了原有的细胞壁结构以及脂质膜和碳水化合物的组成^[1]。同时,低温胁迫能够诱导植物体内某些基因的表达,这些基因的表达蛋白可能直接参与低温胁迫的应答或者间接调控其他靶基因的表达^[2]。Weiser^[3]早在1970年就提出植物抗寒性诱导过程中基因表达改变的观点,指出多年生木本植物的低温适应性可能需要两个条件,即特异基因的转录激活和在最大抗寒过程中新蛋白质的低温诱导合成。陈香波等^[4]列表总结了从拟南芥、黑麦、欧洲油菜、大麦、菠菜、小麦、苜蓿、马铃薯等鉴定分离出与植物抗寒性有关的低温诱导基因62个,并指出这些基因的功能与抗冰冻脱水、膜脂相变、低温下酶活性以及“抗冻活性”有关。

柑橘属(*Citrus*)植物的果实是世界第一大水果类别,我国的柑橘产量位居世界第一。柑橘属植物是亚热带植物,性喜温暖,对低温反应敏感,所以温度是影响柑橘属植物产量和品质的一个重要气候因素。佛手(*Citrus medica* var. *sarcodactylis* Swingle)是芸香科柑橘属香橼的变种,其果型奇特,具有较高的观赏和药用价值,也是中国特色的物种。但是由于佛手抗寒性差,植株半致死温度为-4℃左右^[5],低温冻害后其品质和产量均会受到影响。研究表明,低温胁迫下佛手的ERF6基因^[6]和GRAS基因^[7]的表达量发生明显的变化,低温对两种基因的表达均有诱导作用。由于抗寒性差的原因,佛手的栽培地局限在亚热带北缘以南地区,这很大程度的限制了佛手在我国北方广大地区的栽培、种植和佛手产业的发展。

目前,对寒敏感柑橘类植物的研究很少^[8],对佛手等寒敏感柑橘类植物对低温应答的分子途径、低温诱导特异基因的表达变化情况和引起寒敏感的分子机理少有报道。本文以浙江金华地区佛手主栽品种青皮佛手为试材,采用mRNA差异显示技术获得佛手低温胁迫前后差异表达的cDNA片段,BLAST确定其功能后,采用半定量PCR技术确定这些基因在佛手低温胁迫前后的表达量变化情况,从而获得寒敏感佛手低温胁迫相关基因,分析低温应答分子机制。通过本研究为佛手寒敏感基因的获得和寒敏感机制的研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

选取长势一致的2年生青皮佛手(*C. medica* cv. *Qingpi*)盆栽苗,采自浙江师范大学佛手实验基地——浙江锦林佛手有限公司。在人工气候室进行预培养及抗寒锻炼,温度设置参照刘祖祺等的方法,预培养温度为20(黑夜)/28(白天)℃,光照每天14 h,光照强度100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,湿度75%,定期浇水;预培养3周后在2

d时间内将温度缓慢降至4℃进行冷锻炼7d。

1.2 低温处理

随机选取3盆青皮佛手盆栽苗移入冷库,处理条件为温度-4℃,光照14 h,湿度75%,温度控制精度为±0.1℃,处理时间为24 h。取完整、无病虫害的自当年生春夏梢顶向下数第5—11叶位的7张叶片用于后续实验。

1.3 DDRT-PCR分析

1.3.1 DDRT-PCR引物及内参引物的设计

mRNA差异显示分析引物按Genhunter Corporation RNA imageTM Kit序列进行设计,引物序列见表1。引物由上海invitrogen合成。

表1 锚定引物、随机引物及内参引物列表

Table 1 List of anchored, random and actin primers

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequences
锚定引物 Anchored primers	H-T ₁₁ G AAGCTTTTTTTTTTG
	H-T ₁₁ A AAGCTTTTTTTTTTA
	H-T ₁₁ C AAGCTTTTTTTTTTC
随机引物 Random primers	H-AP1 AAGCTTGATTGCC
	H-AP2 AAGCTTCGACTCT
	H-AP3 AAGCTTGTCAG
	H-AP4 AAGCTTCTCAACG
	H-AP5 AAGCTTAGTAGGC
	H-AP6 AAGCTTGACCAT
	H-AP7 AAGCTTAACGAGG
	H-AP8 AAGCTTTACCGC
内参引物 Actin primers	sense TGCCATCCACGCCGTCTATCT
	anti-sense ATCACGACCAGCCAAGTCCAAA

1.3.2 总RNA提取及mRNA纯化

采用Trizol试剂盒(invitrogen)提取叶片总RNA,DNAase消化去除基因组DNA,并采用OligotexTM-d(T)₃₀<Super>mRNA纯化试剂盒(TaKaRa)对提取的总RNA进行mRNA纯化。

1.3.3 cDNA第一链合成

纯化得到的mRNA应用3种锚定引物(H-T₁₁G,H-T₁₁C,H-T₁₁A)参照invitrogen的SuperscriptTM III Reverse Transcriptase进行mRNA反转录得到cDNA。

1.3.4 DDRT-PCR扩增

将3'锚定引物3条,5'随机引物8条,共24对引物组合,分别进行PCR扩增。扩增体系和程序主要参考Liang等1992年提供的方法,略加更改。25 μL反应体系中含10×PCR Buffer(Mg²⁺ Plus)2.5 μL,dNTP(2.5mmol/L each)2 μL,锚定引物(20 μmol/L)和随机引物(20 μmol/L)各2.0 μL,TAKARA Taq(5 U/μL)0.2 μL以及2 μLcDNA模板溶液,加无菌纯水补充总体积至25 μL。PCR反应程序为94℃预变性5 min,然后进行94℃变性30 s,40℃退火2 min,72℃延伸1 min的循环反应,共40个循环,最后于72℃下延伸5 min,4℃保存。

1.3.5 差异片段的分离及回收

采用8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离差异片段,银染显色。从银染结果中选取差异表达的条带进行回收,选取的标准是,处理和对照条带同一高度上有无差异和明显的表达量差异。聚丙烯酰胺凝胶回收使用BioFlux的Biospin聚丙烯酰胺凝胶DNA回收试剂盒进行。

1.3.6 差异片段的重扩及回收

直接取回收的差异片段2 μL作为模板,选择对应的引物组合,进行二次扩增,PCR的体系与程序与上文

中相同。重扩后 1% 的琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下检测重扩后的条带是否与回收的条带片段大小相同,如是同一条带进行琼脂样凝胶的回收。琼脂糖凝胶回收用的试剂盒是上海生工生产的 UNIQ-10 DNA 胶回收试剂盒(SK1131)回收和纯化目的片段。

1.4 差异片段的克隆

采用氯化钙 2 次重悬法制备 JM109 感受态细胞,回收的差异片段与 pMD18-T Simple Vector(TaKaRa)16 °C 进行连接,连接产物转入 JM109 感受态细胞,菌液涂平板后挑取单菌斑培养,做菌液 PCR 检测对重组子进行阳性鉴定,反应体系和程序和生成目的片段的 PCR 反应一致。

1.5 阳性转化重组子的测序和序列的生物信息学分析

阳性克隆子的测序工作由上海英骏生物工程技术服务有限公司(Invitrogen, China)商业化完成,采用通用引物 M13F/M13R 组合起始测序。序列对比在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 网站上,进行 BLASTx 和 BLASTn 分析。

1.6 半定量 RT-PCR 鉴定目的基因表达量差异

1.6.1 引物设计

β -actin 引物参考 Genbank 中已发表的序列,设计兼并引物,在佛手 cDNA 中扩增出目的片段后,克隆、测序,再设计特异引物,设计的佛手特异引物序列为: Sense: TGCCATCCACGCCGTTCTATCT, Antisense: ATCACGACCAGCCAAGTCCAAA, 引物均采用 primer primer5 设计,由上海生物工程有限公司合成。

1.6.2 半定量 RT-PCR 反应条件的确定

以 cDNA 为模板,目的基因引物对和 β -actin 在异管同台 PCR 中进行反应,设置不同的循环数,22、24、26、28、30、32、34、36 个循环数,确定合适的条件,保证扩增均处于线性期。PCR 反应程序参数为 94 °C 预变性 5 min,然后进行 94 °C 变性 30 s,50—60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s 的循环反应,循环数为 22—36 个,最后于 72 °C 下延伸 5 min,4 °C 保存。

1.6.3 PCR 产物的检测

PCR 扩增产物在含溴化乙锭的 2.0% 琼脂糖凝胶中电泳,电泳结果在紫外灯下用 Bio-red 公司成像系统自带 Quantity One 软件进行扫描成像和光密度分析。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的提取与检测结果

提取的总 RNA 经 DNA 酶消化后在全波长酶标仪(Thermo)上测定 OD260/OD280,结果比值均在 1.8—2.0 之间,说明 RNA 样品的纯度较好。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳测定总 RNA 完整性,电泳结果显示,28S、18S 条带清晰,无降解,说明总 RNA 完整性好,可以用于后续实验。

2.2 mRNA 差异显示结果

以青皮佛手对照和处理组叶片总 RNA 为模板,分别用 3 种锚定引物进行逆转录反应,得到 6 种 cDNA;再以这 6 种 cDNA 为模板,3 种锚定引物与 8 种随机引物组合进行 PCR 扩增。对相同引物组合扩增得到的对照组和处理组的 PCR 产物进行差异比较。在 mRNA 差异显示过程中,聚丙烯酰胺凝胶上 24 对引物组合在佛手 mRNA 中共扩增出 3000 多条 cDNA 序列。图 1 为其中 7 组引物对扩增出的佛手对照和处理 cDNA 片段。



图 1 DDRT-PCR 的差显结果图

Fig. 1 Example of DDRT-PCR results. cDNAs were amplified from two separately isolated total RNAs by primer combination of HT₁₁C and H-AP2—HAP8

引物为 HT₁₁C 与 H-AP2—HAP8 的组合,C 代表对照,T 代表处理,图中箭头 1 是下调片段,箭头 2 是上调片段

通过 DDRT-PCR, 比较对照组和处理组扩增结果, 121 条差异表达的 cDNA 片段被成功克隆和测序。经生物信息学分析, 差异表达序列中有 33 条为功能已知序列, 88 条为未知序列(其中 5 条具有开放性阅读框)。

2.3 半定量 RT-PCR 分析结果

将上述的 33 条已知差异表达序列及 5 条具有开放性阅读框的未知序列进行半定量 RT-PCR 分析, 以进一步确定低温胁迫前后这些差异表达片段表达量的变化。差异片段进行 RT-PCR 的引物序列、退火温度及 PCR 反应循环数见表 2。

表 2 DDRT 的产物进行半定量 RT-PCR 验证时各产物对应的引物序列、退火温度和循环数

Table 2 Oligo nucleotide primer sequences, PCR conditions and cycle numbers for the confirmation of differential display (DD) products with quantitative relative reverse transcription (RT)-PCR

差异产物 DD product	正向特异引物序列 Forward primer(5'-3')	反向特异引物序列 Reverse primer(5'-3')	PCR 退火温度 PCR annealing temperatuer/°C	循环数 Cycle numbers
β-actin	TGCCATCCACGGCGTCTATCT	ATCACGACCAGCCAAGTCCAAA	55	30
1-C1	AAGGTTGATTGCCCTACATTG	CATAGCGGTCCCGTCCC	55	28
2-G2	GATTCCGGCCTATTCTGTG	TTTCGCAGTTCTCGTCTTC	55	36
2-C7	ACAACCTAAACCTTCGGG	GTGCCCTCCACTTCAATAA	50	28
3-G1	GATTGCCACACTCCACAT	GACCCAAACACCAACACAT	55	30
3-G15	CCCCCTTGCTTGCAACCTG	CAACATTCTGTCAACGCTCCG	60	32
3-G24	GCTGAAGAGTTGAGAAAGAAC	AAGACATTGAAAAATAAGAAGAAAAA	50	36
3-G17	GTTGACTGCTTGCTCTCCCG	CTTCCTCTGTCCCTCCCTGGT	55	34
3-G19	AGCGAACATTGAAACCCCGAT	GCAGCAATGCCAGCAACACA	55	32
4-G23	TTTGGCAGAACAGTTACAC	ATCTTCCCAGTTGACATCCT	50	36
5-C2	TGAGGACATCAAGTGGAGACA	AAGGCAGTTCAAGAAGAACG	55	34
5-C4	GATTGCCGAAATAAGAAGGATG	AATGAAGTGGAAAGAATAAGGAG	55	32
5-C15	AAAACATCATTGGAGGAACC	TGAAGAAACAAAGATTGAAACATA	50	30
6-C1	TTTGGTTACTTCTTCTGTCTGT	GGCGTTCCGTCCCTCTT	55	30
6-C24	TGTGATTGAAATGCGACG	TTACCGTTCTTCTCCACGA	55	30
6-C22	TACCAAATCTTCCCCTT	TGAAATAGAAGATAACCCCTGATAG	50	36
6-C19	GACCAGGATACATTGATAGGAAGC	CAAGCAACCAGGGAAAGACA	55	32
6-A5-1	ACATAAACTCACCACAGAACGA	AGAGGATAGAACACTGTGATAACC	55	30
7-3-29	GATAATCTGAGCACAAACACCGC	CACACGAATACCGAATAATACAACG	55	36
7-6-33-1	ACCAATCTCTAACGCACTGC	TGCTCAAACATCACACAACC	55	36
7-6-5	TGTTTTTATTGCGGACTTT	ACAAACAACATCATAAATCCAAT	50	36
7-6-15	ATTGAAAAAACAAAGAAGGGGG	AGCACAAAACATACGAAAGGCC	55	36
8-3-10	GAAAGCATAAAATAAAACTGTGTG	TCCCCAACGGGCTCAT	55	36
8-3-11	GCTTCGGTCAGGCAGGAG	AAAACCTAGGCATCATCATAACAAA	55	34
8-3-13	ACGGTCCTGGAGAGACTTATG	CCAATGAGATGAGGCAAACA	55	28
8-3-17	GGCAGAGGAAAAGAACGAAAA	CGGGTCAGACCTTAAGGTAGTG	55	28
8-6-39-1	CTTATTCCGAGTGTCTCTGTTT	GTCCGACGACCTTATTGTATC	55	34
7-6-42	GGGGTGTGTGCTCTTATTAT	AGTTCTCCCTCTATTGCTTTG	50	34
8-3-32	TACTTGATTGATAATAACTAACTT	ATGTATGCTTGGTCGCC	55	36
4-29-3	CGTCAGTAACATACACAAGCA	CAAAAAATAAAAGAGGGCATA	55	36
2-G8	TTTCGGTCCTATTCTGTG	CTTTCGCAGTTGTTCTGCTTT	55	36
6-C30	GAGGCAACACATTAGCATTT	TGTCTACCACTTAGGAGGAGGG	55	30
8-4-11-3	GTCAGGCAATCCAGCAAC	TTCAAAACTCAGCGACAAGG	50	32
8-6-43	GTAGTGGCTGGTAGGA	TAAGGGGCAAAGGAACAT	55	34
9-4-18-3	ACATTGTTGTTGGTTTTTG	AACTGACTTTGACCAGCATTCT	50	34
9-4-20-3	AACATTGCCAGCGAACG	CGAGGTCTGTAGTGGTGC	50	36
9-4-4-2	AAGAAACAAAGACTGAAACATA	TGGAGGAACCACAGAAATAATA	50	30
G22	TTTGGAGAGGGTAAAAAGGGT	GCAATAGGAAAGTAGCAGTGT	50	36
5-C7	CGAGAAGAGAGGAGCCGTG	GGAGGATAGATGGGGCGATT	55	30

为了提高半定量 RT-PCR 的准确性, 每个差异片段做不同模板来源重复, PCR 板内重复和不同批次 PCR

重复,只有这3个重复表达趋势一致的差异片段才被视为阳性。每一批次的PCR反应都带有内参 β -actin,并在同一块琼脂糖凝胶上成像,只有同块胶上的 β -actin表达量一致的,才记做1个重复,这样可以尽可能的减少凝胶成像上所带来的假阳性。

根据半定量RT-PCR分析鉴定,38个差异片段中有4个是假阳性片段,34个阳性片段。在通过鉴定的阳性片段中,有29个差异片段低温胁迫前后表达量上调,其表达量变化见图2;有5个差异片段低温胁迫前后表达量下调,其表达量变化见图3。

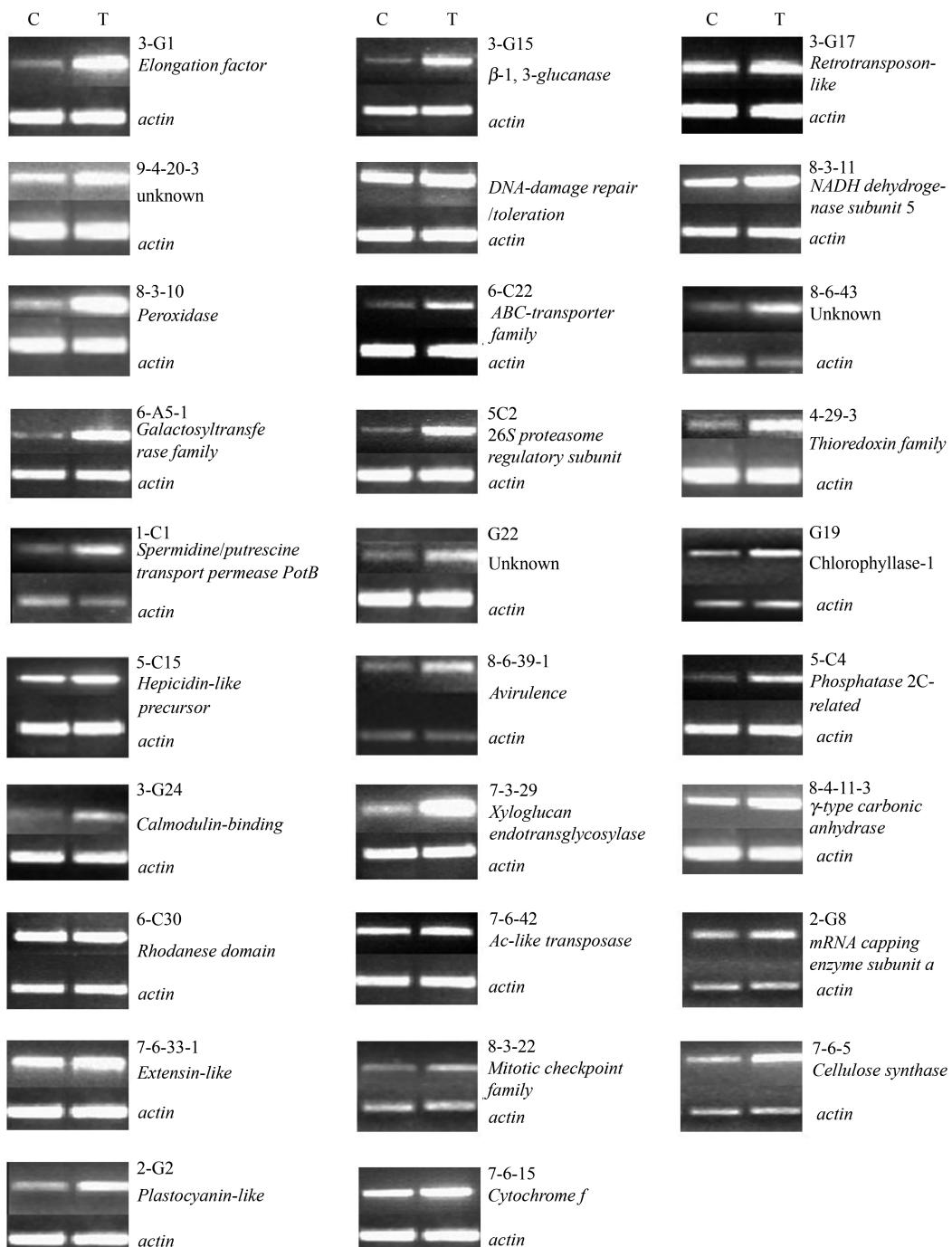


图2 29个上调基因经过半定量RT-PCR分析后的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 29 up regulated genes' agarose gel electrophoresis patterns using semi-quantification

C-对照,T-低温处理,actin为内参

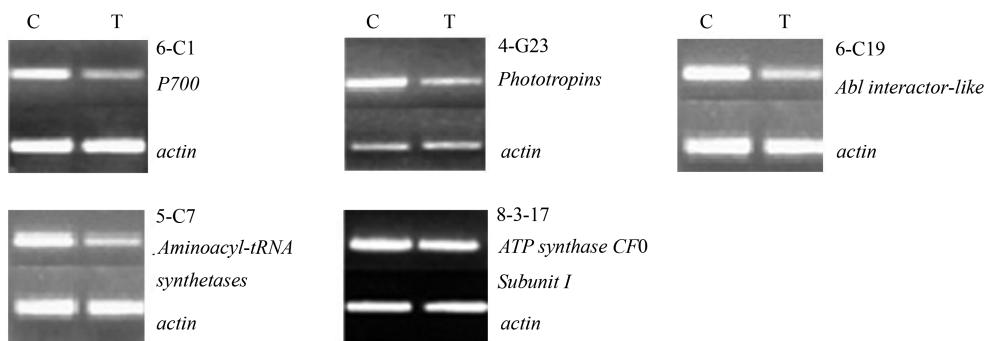


图3 5个下调基因经过半定量RT-PCR分析后的琼脂糖凝胶电泳图

Fig.3 5 down regulated genes' agarose gel electrophoresis patterns using semi-quantification RT-PCR

C-对照,T-低温处理,actin为内参

将这34个阳性差异片段根据其对应的功能和寒胁迫的关系进行分类,可分为植物逆境应答、新陈代谢、细胞壁重建、信号转导、氧化应激、转录调节、蛋白、脂肪和糖合成和转运、未知功能蛋白,共8类,其对应功能、分类情况和序列信息见表3。

表3 DD产物对应功能列表

Table 3 The functions of isolated DD products list

DD Product	长度 Length/bp	引物 Primers	表达水平 (与 actin 比值) Expression level	功能 Funcion	E
植物逆境应答 plant defence/stress responses					
5-C15	290	T ₁₁ C+AP4	2.79±0.115	铁吸收基因前体 hepcidin-like precursor	8×10 ⁻⁴
8-3-13	324	T ₁₁ C+AP4	7.47±0.058	DNA损伤修复蛋白(DRT) DNA-damage-repair/toleration protein(DRT)	2×10 ⁻¹¹
5-C2	372	T ₁₁ C+AP1	11.27±0.306	26S蛋白酶体亚基 26S proteasome regulatory subunit	7×10 ⁻³²
3-G17	411	T ₁₁ G+AP4	2.93±0.153	逆转座子蛋白 Retrotransposon-like protein	4.1
8-6-39-1	376	T ₁₁ A+AP7	4.27±0.208	病原无毒蛋白(Avr) Avirulence protein(Avr)	3.2
7-6-42	188	T ₁₁ A+AP7	2.66±0.125	Ac转座酶蛋白 Ac-like transposase protein	8×10 ⁻⁷
6-C30	320	T ₁₁ C+AP8	2.2±0.265	硫氰酸酶蛋白 Rhodanese domain protein	7×10 ⁻⁸
3-G15	645	T ₁₁ G+AP4	8.33±0.404	β-1,3葡聚糖酶 β-1,3-glucanase	2×10 ⁻⁸³
新陈代谢 Metabolism					
6-C19	318	T ₁₁ C+AP5	0.084±0.005	叶绿体中的类囊体蛋白 Abl2、Abl3 Ablinteractor-like protein-2,3	0.38
7-6-15	530	T ₁₁ A+AP3	3.63±0.351	细胞色素 f cytochrome f	5×10 ⁻¹⁹
6-C1	265	T ₁₁ C+AP1	0.133±0.006	P700	3×10 ⁻⁷
2-G2	459	T ₁₁ G+AP3	7.37±0.322	质体蓝素蛋白 plastocyanin-like protein	3×10 ⁻¹⁵
8-4-11-3	413	T ₁₁ A+AP3	8.7±0.3	γ碳酸酐酶蛋白 γ-type carbonic anhydrase protein	9×10 ⁻²¹
8-3-17	320	T ₁₁ C+AP5	0.203±0.011	ATP合酶 CFO 的亚基 I ATP synthase CFO subunit I	3×10 ⁻¹⁷

续表

DD Product	长度 Length/bp	引物 Primers	表达水平 (与 actin 比值) Expression level	功能 Funcion	E
G19	720	T ₁₁ G+AP5	4.47±0.252	叶绿素酶 1 Chlorophyllase-1	9×10 ⁻⁴⁸
4-G23	847	T ₁₁ G+AP6	0.163±0.008	向光素 phototropins	3×10 ⁻⁷⁴
8-3-11	270	T ₁₁ C+AP3	5.77±0.208	NADH 脱氢酶亚单位 5 NADH dehydrogenase subunit 5	7.0
细胞壁重建 Cell wall modification					
7-6-33-1	376	T ₁₁ A+AP6	4.37±0.569	伸展蛋白 extensin-like protein	1.1
7-6-5	180	T ₁₁ A+AP1	6.5±0.5	纤维素合酶蛋白 cellulose synthase protein	9.0
7-3-29	419	T ₁₁ C+AP8	15.3±0.3	葡聚糖转葡萄糖苷酶(XET) xyloglucan endotransglycosylase	5×10 ⁻¹⁴
信号转导 Signal transduction					
5-C4	270	T ₁₁ C+AP1	6.67±0.862	蛋白磷酸酯酶 2C phosphatase 2C-related protein	0.015
3-G24	308	T ₁₁ G+AP6	4.97±0.416	钙调素结合蛋白 calmodulin-binding protein	3×10 ⁻⁸
转录调节 Transcription					
8-3-32	231	T ₁₁ C+AP8	3.08±0.225	细胞周期检查点蛋白 mitotic checkpoint family protein	5.6
2-G8	458	T ₁₁ G+AP7	3.8±0.458	鸟苷戴帽酶 α 亚基 mRNA capping enzyme subunit α	5.6
抗氧化性 Oxidative resistance					
8-3-10	175	T ₁₁ C+AP3	14.97±0.351	过氧化物酶 peroxidase	1×10 ⁻⁵⁹
8-4-29-3	370	T ₁₁ A+AP8	8.37±0.153	硫氧还原酶蛋白 thioredoxin family protein	1×10 ⁻¹⁶
蛋白、脂肪和糖合成和转运 Protein, fat and carbohydrate synthesis and transduction					
3-G1	653	T ₁₁ G+AP1	13.40±0.173	延伸因子 elongation factor protein	3×10 ⁻⁴²
6-C22	211	T ₁₁ C+AP6	6.37±0.231	ABC 转运体蛋白 ABC transporter family protein	4×10 ⁻¹³
5-C7	243	T ₁₁ C+AP2	0.087±0.004	氨酰 tRNA 合成酶 Aminoacyl-tRNAsynthetases	2×10 ⁻⁹⁹
1-C1	217	T ₁₁ C+AP1	6.10±0.265	亚精胺/腐胺转运系统通透酶 potB spermidine/putrescine transport system permease PotB	9.0
6-A5-1	376	T ₁₁ A+AP7	12.30±0.173	半乳糖转移酶 galactosyltransferase family protein	3.2
未知功能 Unknown function					
8-6-43	199	T ₁₁ A+AP7	5.53±0.208	未知 unknown function	
9-4-20-3	191	T ₁₁ A+AP2	6.10±0.265	未知 unknown function	
G22	270	T ₁₁ G+AP5	5.27±0.058	未知 unknown function	

3 讨论

低温胁迫容易引起植物光合、呼吸作用关键基因的表达下调,同时植物生长停滞以保证代谢所需的碳水化合物及能量;植物抗冷机制还包括细胞物理结构(质膜组成和细胞骨架)的适应性发变、胞内渗透保护物质

(脯氨酸、甜菜碱和可溶性糖)大量积累^[1]、抗氧化剂的合成水平上升;使植物恢复物质与能量代谢平衡。植物对冷胁迫的应答过程中发生的一系列生理、生化变化,是复杂的内在分子机制调控的结果,涉及大量的基因在表达模式、转录水平及转录后修饰方式等方面发生变化,但不同植物对低温胁迫的应答机制也存在着一定的差异^[2]。揭示植物在逆境下所表现出的复杂的基因表达变化情况,对于正确解答植物对逆境的应答机制有非常重要的科学意义。

相对于枳等耐寒的柑桔属植物,佛手对低温胁迫较敏感,-4℃低温处理后,嫩叶出现萎蔫等典型症状^[5]。本研究通过 mRNA 差异显示技术筛选和半定量 RT-PCR 技术验证,获得了 34 个阳性差异 cDNA 片段。这 34 个佛手低温胁迫相关基因,根据其功能的归属大致可分为以下几类:8 个与植物组织抵御相关基因、9 个与光合作用或其他代谢相关基因、3 个细胞壁代谢相关基因、5 个与蛋白、脂肪和糖合成和转运相关基因、2 个与信号转导相关基因、2 个与抗氧化相关基因、2 个与转录调节相关基因和 3 个功能未知基因。以下探讨其中一部分关键基因的功能和应答机理。

3.1 光合作用相关基因

低温使得生物膜结构发生显著变化,进而导致植物体内新陈代谢的有序性被打破,特别是光合作用受到影响。植物叶绿体的类囊体膜在光下催化 ADP 形成 ATP 的反应,有两种类型:循环式光合磷酸化(cyclic photophosphorylation)和非循环式光合磷酸化。在 34 个佛手低温胁迫相关基因中,有 4 个基因对应蛋白功能与循环式光合磷酸化的光合链相关:6-C19(类囊体蛋白 ALB2、ALB3, Ablinteractor-like protein-2、3)、6-C1(P700)、2-G2(质体蓝素蛋白, plastocyanin-like protein)、7-6-15(细胞色素 f, cytochrome f)。半定量 PCR 结果表明,佛手的 *Ablinteractor-like* 和 *P700*,在低温胁迫后表达量明显下调;*plastocyanin-like* 和 *cytochrome f* 表达量略微上调。这些基因在低温胁迫后表达量的变化,说明佛手在低温逆境中其循环式光合磷酸化途径受到了影响,进而影响到佛手的光合作用,这可能是低温造成佛手光合能力下降的原因之一。

除此之外,在佛手低温胁迫下获得的光合相关基因片段还有 8-4-11-3、G19、8-3-17、8-3-17、4-G23 分别同源于 γ 碳酸酐酶(γ-type carbonic anhydrase protein)、叶绿素酶 1(Chlorophyllase-1)、ATP 合酶 CFO 亚基 I(ATP synthase CFO subunit I)及向光素(phototropins)基因。其中 γ 碳酸酐酶和叶绿素酶对应的片段在低温胁迫后表达量增加。碳酸酐酶被认为在逆境条件下参与了光合速率的调节,Downton 和 Slatyer^[9]认为在干旱或高温条件下光合速率的变化与碳酸酐酶活性的变化有一定的相关性。叶绿素酶 1 的作用是降解叶绿素,低温胁迫能使原有的叶绿素受到破坏而降解,本研究中佛手叶绿素酶 1 基因表达量的增加,可能是用于水解低温下受破坏的佛手叶绿素。ATP 合酶 CFO 亚基 I 和向光素对应的佛手差异片段在低温胁迫后表达量减少,魏家绵等^[10]研究表明,叶绿体中的 ATP 合酶亚基 I 可以通过与亚基 II - CF1 亚基 8 的交联会引起光合磷酸化的抑制。向光素能够结合黄素单核苷酸(FMN)进行自动磷酸化作用,它介导植物向光性运动、叶绿体移动与气孔开放等反应,在蓝光信号传导反应中它启动生长素载体的运动和诱导 Ca²⁺的流动,从而调节植物细胞代谢相关反应。

植物体代谢的重新调整,是植物增加抗性的主要机理之一^[11],而佛手的低温引起的差异片段中有 8 个基因与光合作用有关,这就说明了在低温胁迫下佛手的光合作用受到了很大的影响,从而影响到了佛手的正常代谢。

3.2 植物逆境应答相关基因

低温胁迫会导致多种基因的应激上调,以应对突如其来的冷害,增加植物对寒冷的抵御能力。在佛手低温胁迫获得的差异片段中,有 8 个与植物逆境应答有关,这些片段经 BLAST 比对后与拟南芥等植物逆境胁迫下表达的、有功能注释的基因同源,且这些片段在低温胁迫后均上调。植物通过诱导表达或上调表达一系列基因,在植物逆境应答中降解异常蛋白、修复损伤蛋白、运输有毒物质、维持细胞平衡,从而增加植物对胁迫环境的抵御能力。

8-3-13 高度同源于拟南芥在辐射和化学试剂诱导下产生的 DNA 损伤修复蛋白 DRT^[12]基因,DRT 能与胁

迫后受到损伤的 DNA 结合,从而起到对损伤 DNA 的保护作用^[13]。本研究中,佛手 DRT 的表达量在低温下明显增加,有利于修复低温胁迫造成的 DNA 损伤,减轻对植株生长、代谢的影响。

环境胁迫下,植物会启动蛋白降解以维持细胞的正常功能^[14]。5-C2 高度同源于拟南芥 26S 蛋白酶体亚基(26S proteasome regulatory subunit)的基因。26S 蛋白酶体被认为在依赖 ATP 的非溶酶体降解途径中起着重要作用^[15],它不仅能破坏不稳定的调节蛋白,而且还能降解长命的组成性表达蛋白;另外,它能快速消除因突变或多种环境胁迫(如高温、氧化胁迫和重金属)造成的结构不正常的蛋白质,部分介导生物的抗逆性^[16-17],因此它在逆境下对维持细胞的生存能力似乎是不可缺少的。佛手低温胁迫后 5-C2 的表达量明显上调,过量的 26S 蛋白酶体将对佛手由于低温胁迫产生的一些不正常的蛋白质进行降解,以提高其对低温的抵御能力。

硫氰酸酶(Rhodanese domain protein)能使有毒的氰化物转变为无毒的硫氰酸盐,具有使植物组织解毒的功能^[18]。而在佛手低温胁迫后明显上调的 6-C30 高度同源于拟南芥逆境中高表达的 Rhodanese domain。植物在低温胁迫下容易积累有毒的中间物质,硫氰酸酶能够减少其中氰化物对植株造成的伤害。

8-6-39-1 同源于拟南芥缺铁激发的病原无毒蛋白(Avirulence protein, Avr)基因,此基因的作用机制是与抗性基因 R(Resistance gene, 简称 R 基因)相互识别、结合而作用从而增加植物对胁迫环境的适应性。具体作用机制是 R 基因的受体蛋白识别特定的 avr 基因产物,从而激发含有蛋白激酶的信号传递,诱导植物抗性表达^[19]。

转座酶(Ac-like transposase protein)和逆转座子蛋白(Retrotransposon-like protein)都被认为和植物的胁迫抗性有一定关系,7-6-42 同源于拟南芥的 Ac-like transposase,3-G17 同源于水稻的 Retrotransposon-like,它们在佛手低温胁迫后表达量都明显增加。转座酶与抗病基因核糖体蛋白 S5(RPS5)有一定关系^[20],而逆转座子蛋白与水稻^[21]、小麦^[22]、玉米^[23]和烟草^[24]抵御冷害逆境有关,表明佛手在逆转座子基因功能性上与其它作物在这个方面具有一定的共性。

植物受病原物侵染时常产生一些发病相关蛋白(Pathogenesis-related Proteins,简称 PR 蛋白)进行抵御,β-1,3-葡聚糖酶(β-1,3-glucanase)即是其中之一^[25]。3-G15 98% 同源于受乙烯胁迫的甜橙中分离鉴定的 β-1,3-glucanase^[26],同时 81% 同源于受寒冷胁迫诱导的“Fortune”柑橘(克莱门氏小柑橘 x 酸桔)中分离鉴定的 β-1,3-glucanase^[27]。β-1,3-glucanase 在佛手低温胁迫后表达量明显增加,它的增加能加速 β-1,3-葡聚糖的水解^[28],水解的寡糖产物被认为是植物防御反应的重要激发子。

3.3 细胞壁代谢相关基因

佛手低温胁迫下获得的差异片段中,有 3 个片段的功能与细胞壁组分和细胞壁代谢相关,它们通过增厚细胞壁、调整细胞壁的成分,从而增加佛手对低温的耐受能力,其对应功能是:纤维素合酶(Cellulose synthase protein)、伸展蛋白(Extensin-like protein)、葡聚糖转葡萄糖苷酶(Xyloglucanendotransglycosylase, XET)。

纤维素和伸展蛋白是植物细胞壁的主要组成成分,7-6-5 和 7-6-33-1 高度同源于拟南芥的 Cellulose synthase 和 Extensin-like,这 2 个基因在佛手低温胁迫后表达量的都增加。可以被认为是在受到低温胁迫时,佛手通过加强细胞壁合成能力,加厚细胞壁来抵御低温对它的伤害,同时提高其抵御寒冷的能力^[29]。同时佛手的伸展蛋白基因 100% 同源于香橼在病毒胁迫下获得 cDNA 片段^[30],此片段在病毒胁迫后香橼中也是上调表达,伸展蛋白的积累量与细胞经胁迫后受到的伤害程度呈正相关^[31],这也在一定程度上证明了佛手抗寒性低在-4℃的低温下细胞已经受到伤害^[32]。

7-3-29 与拟南芥的 Xyloglucanendotransglycosylase 高度同源,XET 能够改变植物细胞壁主要成分,因此在形态学发生和组织形成过程中起着至关重要的作用^[33]。拟南芥中存在着 XET 基因家族,其中 TCH4 能够迅速的对低温进行反应,通过增加 TCH4 的表达量调整植物细胞壁的成分、细胞大小、形状,从而增加对低温的抗性。

3.4 抗氧化性相关基因

细胞的抗氧化能力与植物的抗寒性呈正相关的。植物遭遇低温胁迫或经历低温锻炼其实都是经历一个

氧化胁迫的过程。低温下由于植物对 O₂ 的利用能力降低,多余的 O₂ 能在代谢过程中被转化成对植物有毒害作用的活性氧。故过剩的 O₂ 对需 O₂ 生物有潜在毒性,必须通过植物抗氧化系统及时清除。

8-3-10 同源于过氧化物酶(POD)基因,并在佛手低温胁迫后基因表达量增加。这说明低温对 POD 有一定诱导作用,而低温诱导产生的 POD 一定程度缓解了植物氧化性伤害;但随氧化程度的加重,植物细胞受到伤害加重甚至死亡,这些抗氧化酶合成的量也将逐渐降低并最终失活。

硫氧还蛋白(Thioredoxin family protein)在维持细胞氧化还原平衡上起着重要作用^[34],8-4-29-3 同源于拟南芥的 *thioredoxin family*。硫氧还蛋白 M1 型基因 AtTRX m1 与生物环境胁迫有一定的相关性,尤其在逆境胁迫引起的氧化胁迫中,蛋白质中半胱氨酸残基易被活性氧氧化,在蛋白质分子内或分子间形成较稳定的二硫键(—S—S—),这些被氧化半胱氨酸残基能为 TRX 系统还原,从而恢复其功能,除此之外,Trx 还直接或间接调控植物抗氧化保护酶系统的活性^[35],因此,本研究中 TRX 的上调表达能够增强植物对逆境的耐受力。

3.5 其他重要功能基因

6-C22 高度同源于拟南芥的 ATP-binding 转运体(ABC)基因,从半定量结果来看,佛手的 ABC 转运体基因在低温胁迫后表达量明显上调。Moussatova 等^[36]认为 ABC 转运体是一种整合的膜蛋白,可以在有 ATP 的前提下把细胞所产生的毒素和抗生素转运出细胞外^[37-38]。而从植物适应胁迫环境是一个需要 ATP 的过程来推测,循环电子传递或叶绿体呼吸电子传递可能会提供额外的 ATP 以适应低温胁迫下一些耗能的反应^[39-40]。低温胁迫下 ABC 转运体的表达量增加,佛手可供给的 ATP 的增加,从而对低温胁迫下的佛手起保护作用。

1-C1 同源于亚精胺/腐胺转运通透酶 potB 基因,在低温胁迫后表达量增加。多胺广泛存在于生物细胞中,是一类低分子脂肪含氮物,多胺与植物的抗逆性关系密切,包括水分胁迫、温度胁迫和盐胁迫。在逆境胁迫下,植物细胞内多胺含量及合成酶的活性显著上升,所以用于转运多胺的通透酶的量也将上升,以提高对增加的亚精胺和腐胺的转运能力^[41]。

综上所述,佛手受低温胁迫时有一个复杂的生理和分子调控下的抵抗机制。低温胁迫下,有大量相关基因表达或差异表达,根据基因功能分析,其中与植物逆境应答和光合作用有关的基因的下调表达可能是造成佛手寒敏感的主要原因。要找到佛手寒敏感机制的关键基因及信号传导机制还有待于更深入和广泛的研究。

References:

- [1] Zhang C K, Lang P, Dane F, Ebel R C, Singh N K, Locy R D, Dozier W A. Cold acclimation induced genes of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata*). *Plant Cell Reports*, 2005, 23(10/11): 764-769.
- [2] Hughes M A, Dunn M A. The molecular biology of plant acclimation to low temperature. *Journal of Experimental Botany*, 1996, 47(3): 291-305.
- [3] Weiser C J. Cold resistance and injury in woody plants. *Science*, 1970, 169(3952): 1269-1278.
- [4] Chen X B, Zhang A P, Yao Q H. Advances in researches on Gene engineering of plant for cold resistance. *Biotechnology Information*, 2001, (4): 14-20.
- [5] Guo W D, Zhang Z Z, Jiang X W, Chen M G, Zheng J S, Chen W R. Semilethal temperature of Fingered Citron (*Citrus medica* var. *sarcodactylis* Swingle) under low temperature stress and evaluation on their Cold Resistance. *Acta Horticulturae Sinica*, 2009, 36(1): 81-86.
- [6] Cao Y B, Shi R, Chen W R, Guo W D. Comparative analysis of expression changes of ethylene response factor 6 (ERF6) in Fingered Citron and Trifoliolate Orange under cold stress. *Acta Horticulturae Sinica*, 2011, 38(10): 1873-1882.
- [7] Shi R, Cao Y B, Chen W R, Guo W D. On cDNA cloning and expression analysis of GRAS gene in Fingered Citron. *Journal of Zhejiang Normal University: Natural Sciences*, 2011, 34(4): 446-451.
- [8] Sanchez-Ballesta M T, Lafuente M T, Zacarias L, Granell A. Involvement of phenylalanine ammonia-lyase in the response of Fortune mandarin fruits to cold temperature. *Physiologia Plantarum*, 2000, 108(4): 382-389.
- [9] Downton J, Slatyer R O. Temperature dependence of photosynthesis in cotton. *Plant Physiology*, 1972, 50(4): 518-522.
- [10] Shi X B, Wei J M, Shen Y G. Insights into the subunit interactions of the chloroplast ATP synthase. *Chinese Science Bulletin*, 2002, 47(1): 58-62.
- [11] Cheeseman J M. Mechanisms of salinity tolerance in plants. *Plant Physiology*, 1998, 87(3): 547-550.
- [12] Pang Q, Hays J B, Rajagopal I, Schaefer T S. Selection of *Arabidopsis* cDNAs that partially correct phenotypes of *Escherichia coli* DNA-damage-

- sensitive mutants and analysis of two plant cDNAs that appear to express UV-specific dark repair activities. *Plant Molecular Biology*, 1993, 22(3) : 411-426.
- [13] Lloyd R G. Conjugational recombination in resolvase-deficient ruvC mutants of *Escherichia coli* K-12 depends on recG. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(17) : 5414-5418.
- [14] Breusing N, Grune T. Regulation of proteasome-mediated protein degradation during oxidative stress and aging. *Biological Chemistry*, 2008, 389(3) : 203-209.
- [15] Fu H, Girod P A, Doelling J H, van Nocker S, Hochstrasser M, Finley D, Vierstra R D. Structure and functional analysis of the 26S proteasome subunits from plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1999, 26(7) : 137-146.
- [16] Lommel L, Chen L, Madura K. The 26S proteasome negatively regulates the level of overall genomic nucleotide excision repair. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(24) : 4839-4845.
- [17] Peng Z H, Staub J M, Serino G. The cellular level of PR500, a protein complex related to the 19S regulatory particle of the proteasome, is regulated in response to stresses in plants. *Molecular Biology of the Cell*, 2001, 12(2) : 383-392.
- [18] Picton R, Eggo M C, Merrill G A, Langman M J S, Singh S. Mucosal protection against sulphide: importance of the enzyme rhodanese. *Gut*, 2002, 50(2) : 201-205.
- [19] Lamb C J, Zhang D P. A ligand-receptor mechanism in plant-pathogen recognition. *Science*, 1996, 274(5295) : 2038-2039.
- [20] Holt B F, Belkhadir Y, Dangl J L. Antagonistic control of disease resistance protein stability in the plant immune system. *Science*, 2005, 309(5736) : 929-932.
- [21] Zhang S, Gu Y Q, Singh J, Coleman-Derr D, Brar D S, Jiang N, Lemaux P G. New insights into *Oryza* genome evolution: high gene colinearity and differential retrotransposon amplification. *Plant Molecular Biology*, 2007, 64(5) : 589-600.
- [22] Ansari K I, Walter S, Brennan J M, Lemmens M, Kessans S, McGahern A, Egan D, Doohan F M. Retrotransposon and gene activation in wheat in response to mycotoxigenic and non-mycotoxigenic-associated *Fusarium* stress. *Theoretical and Applied Genetics*, 2007, 114(5) : 927-937.
- [23] Steward N, Ito M, Yamaguchi Y, Koizumi N, Sano H. Periodic DNA methylation in maize nucleosomes and demethylation by environmental stress. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(40) : 37741-37746.
- [24] Mihiri C, Morel J B, Vermhettes S, Casacuberta J M, Lucas H, Grandbastien M A. The promoter of the tobacco Tnt1 retrotransposon is induced by wounding and by abiotic stress. *Plant Molecular Biology*, 1997, 33(2) : 257-266.
- [25] Thimmapuram J, Korban S S. Characterization and expression of β -1, 3-glucanase genes in peach. *Molecular Genetics and Genomics*, 2001, 265(3) : 469-479.
- [26] McCollum T G, Doostdar H, Burkhardt M D, Neidz R P, Mayer R T, McDonald R E. Biochemical and molecular characterization of a β -1, 3-endoglucanase from Valencia Orange Callus. *HortScience*, 1996, 31(4) : 614-614.
- [27] Sanchez-Ballesta M T, Gosálvez M J, Rodrigo M J, Granell A, Zacarias L, Lafuente M T. Characterization of a β -1, 3-glucanase from citrus fruit as related to chilling-induced injury and ethylene production. *Postharvest Biology and Technology*, 2006, 40(2) : 133-140.
- [28] Domingo C, Conejero V, Vera P. Genes encoding acidic and basic class III β -1, 3-glucanases are expressed in tomato plants upon viroid infection. *Plant Molecular Biology*, 1994, 24(5) : 725-732.
- [29] Nogueira F T S, De Rosa V E Jr, Menossi M, Ulian E C, Arruda P. RNA expression profiles and data mining of sugarcane response to low temperature. *Plant Physiology*, 2003, 132(4) : 1811-1824.
- [30] Tessitori M, Maria G, Capasso C, Catara G, Rizza S, de Luca V, Catara A, Capasso A, Carginale V. Differential display analysis of gene expression in Etrog citron leaves infected by *Citrus viroid III*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 2007, 1769(4) : 228-235.
- [31] Ding B L, Tan H H, Zhu S Q. Advances on research of the relationship between stresses and plant cell wall. *Journal of Guangxi Academy of Sciences*, 2001, 17(2) : 87-90.
- [32] Weiser R L, Wallner S J, Waddell J W. Cell wall and extensin mRNA changes during cold acclimation of pea seedlings. *Plant Physiology*, 1990, 93(3) : 1021-1026.
- [33] Purugganan M M, Braam J, Fry S C. The *Arabidopsis* TCH₄ xyloglucan endotransglycosylase (Substrate specificity, pH optimum, and cold tolerance). *Plant Physiology*, 1997, 115(1) : 181-190.
- [34] Borutova R, Faix S, Placha I, Gresáková L, Cobanova K, Leng L. Effects of deoxynivalenol and zearalenone on oxidative stress and blood phagocytic activity in broilers. *Archives of Animal Nutrition*, 2008, 62(4) : 303-312.
- [35] Cavalca L, Guerrieri N, Colombo M, Pagani S, Andreoni V. Enzymatic and genetic profiles in environmental strains grown on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2007, 91(4) : 315-325.
- [36] Moussatova A, Kandt C, O'Mara M L, Tielemans D P. ATP-binding cassette transporters in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*,

2008, 1778(9):1757-1771.

- [37] Hannivoort R A, Dunning S, Vander B S, Schroyen B, Woudenberg J, Oakley F, Buist-Homan M, van den Heuvel F A, Geukens A, Roskams T, Faber K N, Moshage H. Multidrug resistance-associated proteins are crucial for the viability of activated rat hepatic stellate cells. *Hepatology*, 2008, 48(2): 624-634.
- [38] Lu H, Klaassen C. Gender differences in mRNA expression of ATP-binding cassette efflux and bile acid transporters in kidney, liver, and intestine of 5/6 nephrectomized rats. *Drug Metabolism and Disposition*, 2008, 36(1): 16-23.
- [39] Locher K P. Structure and mechanism of ABC transporters. *Current Opinion in Structural Biology*, 2004, 14(4): 426-431.
- [40] Toyoda Y, Hagiya Y, Adachi T, Hoshijima K, Kuo M T, Ishikawa T. MRP class of human ATP binding cassette (ABC) transporters: historical background and new research directions. *Xenobiotica*, 2008, 38(7/8): 833-842.
- [41] Wu S G, Ren X P. The relationship between Plant polyamine and several adverse stress. *Journal of Shangqiu Vocational and Technical College*, 2005, 4(2): 58-59.

参考文献:

- [4] 陈香波, 张爱平, 姚泉洪. 植物抗寒基因工程研究进展. *生物技术通报*, 2001, (4): 14-20.
- [5] 郭卫东, 张真真, 蒋小韦, 陈民管, 郑建树, 陈文荣. 低温胁迫下佛手半致死温度测定和抗寒性分析. *园艺学报*, 2009, 36(1): 81-86.
- [6] 曹诣斌, 石瑞, 陈文荣, 郭卫东. 低温胁迫下佛手和枳乙烯应答因子6(ERF6)表达变化的比较分析. *园艺学报*, 2011, 38(10): 1873-1882.
- [7] 石瑞, 曹诣斌, 陈文荣, 郭卫东. 佛手GRAS基因的克隆及表达分析. *浙江师范大学学报: 自然科学版*, 2011, 34(4): 446-451.
- [10] 石晓冰, 魏家绵, 沈允钢. 叶绿体ATP合酶CF₁与CF₀亚基间的相互作用. *科学通报*, 2001, 46(18): 1550-1554.
- [31] 丁宝莲, 谈宏鹤, 朱素琴. 胁迫与植物细胞壁关系研究进展. *广西科学院学报*, 2001, 17(2): 87-90.
- [41] 吴诗光, 任雪平. 植物多胺与几种逆境胁迫的关系. *商丘职业技术学院学报*, 2005, 4(2): 58-59.

ACTA ECOLOGICA SINICA Vol. 33 ,No. 5 March ,2013(Semimonthly)
CONTENTS

Frontiers and Comprehensive Review

- The effect of nitrogen deposition on forest soil organic matter and litter decomposition and the microbial mechanism WANG Jingyuan, ZHANG Xinyu, WEN Xuefa, et al (1337)
Advances and the effects of industrial hemp for the cleanup of heavy metal pollution LIANG Shumin, XU Yanping, CHEN Yu, et al (1347)
A review for evaluating the effectiveness of BMPs to mitigate non-point source pollution from agriculture MENG Fande, GENG Runzhe, OU Yang, et al (1357)
Progresses in dendrochronology of shrubs LU Xiaoming, LIANG Eryuan (1367)

Autecology & Fundamentals

- The characteristics of nocturnal sap flow and stem water recharge pattern in growing season for a *Larix principis-rupprechtii* plantation WANG Yanbing, DE Yongjun, XIONG Wei, et al (1375)
Effects of soil drought stress on photosynthetic characteristics and antioxidant enzyme activities in *Hippophae rhamnoides* Linn. seedlings PEI Bin, ZHANG Guangcan, ZHANG Shuyong, et al (1386)
Diurnal activity time budget of Père David's deer in Hubei Shishou Milu National Nature Reserve, China YANG Daode, LI Zhuyun, LI Pengfei, et al (1397)
Sublethal effects of three insecticides on the reproduction and host searching behaviors of *Sclerodermus sichuanensis* Xiao (Hymenoptera: Bethyidae) YANG Hua, YANG Wei, YANG Chunping, et al (1405)

Population, Community and Ecosystem

- Seasonal succession of zooplankton in Sansha Bay, Fujian XU Jiayi, XU Zhaoli (1413)
Biomass production and litter decomposition of lakeshore plants in Napahai wetland, Northwestern Yunnan Plateau, China GUO Xuhu, XIAO Derong, TIAN Kun, et al (1425)
The flora and species diversity of herbaceous seed plants in wetlands along the Xin'anjiang River from Anhui YANG Wenbin, LIU Kun, ZHOU Shoubiao (1433)
Spatial-temporal variation of root-associated aerobic bacterial communities of *phragmites australis* and the linkage of water quality factors in constructed wetland XIONG Wei, GUO Xiaoyu, ZHAO Fei (1443)
Temporal dynamics and influencing factors of leaf respiration for three temperate tree species WANG Zhaoguo, WANG Chuankuan (1456)
Environmental controls on water use efficiency of a poplar plantation under different soil water conditions ZHOU Jie, ZHANG Zhiqiang, SUN Ge, et al (1465)
An analysis of calcium components of *Artemisia ordosica* plant on sandy lands in different ecological regions XUE Pingping, GAO Yubao, HE Xingdong (1475)
Effects of alpine meadow plant communities on soil nematode functional structure in Northern Tibet, China XUE Huiying, HU Feng, LUO Daqing (1482)
Soil fauna diversity of abandoned land in a copper mine tailing area ZHU Yongheng, SHEN Fei, YU Jian, et al (1495)
Effects of ciprofloxacin on microbial biomass carbon and carbon metabolism diversity of soil microbial communities MA Yi, PENG Jinju, WANG Yun, et al (1506)
Estimation of ecological water demands based on ecological water table limitations in the lower reaches of the Liaohe River Plain, China SUN Caizhi, GAO Ying, ZHU Zhengru (1513)

Landscape, Regional and Global Ecology

- The ecological security patterns and construction land expansion simulation in Gaoming SU Yongxian, ZHANG Hong'ou, CHEN Xiuzhi, et al (1524)
Root features of typical herb plants for hillslope protection and their effects on soil infiltration LI Jianxing, HE Binghui, CHEN Yun (1535)

- The dynamic change of the thermal environment landscape patterns in Beijing, Shanghai and Guangzhou in the recent past decade ...
..... MENG Dan, WANG Mingyu, LI Xiaojuan, et al (1545)
- Change trends and driving factors of base flow in Kuye River Catchment
..... LEI Yongnan, ZHANG Xiaoping, ZHANG Jianjun, et al (1559)
- Photosynthetic characteristics, biomass allocation, C, N and P distribution of *Schima superba* seedlings in response to simulated
nitrogen deposition LI Mingyue, WANG Jian, WANG Zhenxing, et al (1569)
- Effect of iron slag adding on methane production, oxidation and emission in paddy fields
..... WANG Weiqi, LI Pengfei, ZENG Congsheng, et al (1578)
- Resource and Industrial Ecology**
- Antioxidative system and chlorophyll fluorescence of *Zizania latifolia* Turcz. plants are affected by *Ustilago esculenta* infection
..... YAN Ning, WANG Xiaoqing, WANG Zhidan, et al (1584)
- Analysis of cold-regulated gene expression of the Fingered Citron (*Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle)
..... CHEN Wenrong, YE Jiejun, LI Yongqiang, et al (1594)
- Hosts preference of *Echinothrips americanus* Morgan for different vegetables ... ZHU Liang, SHI Baocai, GONG Yajun, et al (1607)
- Induction effects of jasmonic acid on tannin content and defense-related enzyme activities in conventional cotton plants
..... YANG Shiyong, WANG Mengmeng, XIE Jianchun (1615)
- Effects of irrigation with paper mill effluent on growth and nutrient status of *Populus tomentosa* seedlings
..... WANG Ye, XI Benye, CUI Xiangdong, et al (1626)
- Water use efficiency of Jiangsu Province based on the data envelopment analysis approach
..... ZHAO Chen, WANG Yuan, GU Xueming, et al (1636)
- Research Notes**
- Characteristics of precipitation distribution in *Pinus tabulaeformis* plantations under different canopy coverage in Taiyue Mountain
..... ZHOU Bin, HAN Hairong, KANG Fengfeng, et al (1645)
- Driving factor analysis on the vegetation changes derived from the Landsat TM images in Beijing JIA Baoqun (1654)
- Effects of *Mikania micrantha* wilt virus infection on photosynthesis and the activities of four enzymes in *Mikania micrantha* H. B. K.
..... WANG Rui long, PAN Wanwen, YANG Jiaoyu, et al (1667)

《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5期 (2013年3月)

ACTA ECOLOGICA SINICA

(Semimonthly, Started in 1981)

Vol. 33 No. 5 (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