



项目批准号	31901999
申请代码	C150103
归口管理部门	
依托单位代码	40071208B1370-2502



3 1901999 1007281

# 国家自然科学基金委员会 资助项目计划书

资助类别：青年科学基金项目

亚类说明：

附注说明：

项目名称：4CL基因调控柑橘类黄酮生物合成的机制研究

直接费用：24万元 执行年限：2020.01-2022.12

负责人：申晚霞

通讯地址：重庆市北碚区歇马镇柑桔村15号中国农业科学院柑桔研究所

邮政编码：400712 电 话：023-68349027

电子邮件：shenwanxia@cric.cn

依托单位：中国农业科学院柑桔研究所

联系人：谭志友 电 话：023-68349708

填表日期：2019年08月29日

国家自然科学基金委员会制



## 国家自然科学基金委员会资助项目计划书填报说明

- 一、项目负责人收到《关于国家自然科学基金资助项目批准及有关事项的通知》（以下简称《批准通知》）后，请认真阅读本填报说明，参照国家自然科学基金相关项目管理办法及《国家自然科学基金资助项目资金管理办法》（请查阅国家自然科学基金委员会官方网站首页“政策法规”栏目），按《批准通知》的要求认真填写和提交《国家自然科学基金委员会资助项目计划书》（以下简称《计划书》）。
- 二、填写《计划书》时要求科学严谨、实事求是、表述清晰、准确。《计划书》经国家自然科学基金委员会相关项目管理部门审核批准后，将作为项目研究计划执行和检查、验收的依据。
- 三、《计划书》各部分填写要求如下：
  - （一）简表：由系统自动生成。
  - （二）摘要及关键词：各类获资助项目都必须填写中、英文摘要及关键词。
  - （三）项目组主要成员：计划书中列出姓名的项目组主要成员由系统自动生成，与申请书原成员保持一致，不可随意调整。如果批准通知中“项目评审意见及修改意见表”中“对研究方案的修改意见”栏目有调整项目组成员相关要求的，待项目开始执行后，按照项目成员变更程序另行办理。
  - （四）资金预算表：根据批准资助的直接费用，按照《国家自然科学基金项目预算表编制说明》填报资金预算表和预算说明书。国家重大科研仪器研制项目、重大项目还应按照预算评审后批复的直接费用各科目金额填报资金预算表、预算说明书及相应的预算明细表。
  - （五）正文：
    1. 面上项目、青年科学基金项目、地区科学基金项目：如果《批准通知》中没有修改要求的，只需选择“研究内容和研究目标按照申请书执行”即可；如果《批准通知》中“项目评审意见及修改意见表”中“对研究方案的修改意见”栏目明确要求调整研究期限和研究内容等的，须选择“根据研究方案修改意见更改”并填报相关修改内容。
    2. 重点项目、重点国际（地区）合作研究项目、重大项目、国家重大科研仪器研制项目：须选择“根据研究方案修改意见更改”，根据《批准通知》的要求填写研究（研制）内容，不得自行降低、更改研究目标（或仪器研制的技术性能与主要技术指标以及验收技术指标）或缩减研究（研制）内容。此外，还要突出以下几点：
      - （1）研究的难点和在实施过程中可能遇到的问题（或仪器研制风险），拟采用的研究（研制）方案和技术路线；
      - （2）项目主要参与者分工，合作研究单位之间的关系与分工，重大项目还需说明课题之间的关联；
      - （3）详细的年度研究（研制）计划。



3. 国家杰出青年科学基金、优秀青年科学基金和海外及港澳学者合作研究基金项目：须选择“根据研究方案修改意见更改”，按下列提纲撰写：
  - (1) 研究方向；
  - (2) 结合国内外研究现状，说明研究工作的学术思想和科学意义（限两个页面）；
  - (3) 研究内容、研究方案及预期目标（限两个页面）；
  - (4) 年度研究计划；
  - (5) 研究队伍的组成情况。
4. 国家自然科学基金基础科学中心项目：须选择“根据研究方案修改意见更改”，应当根据评审委员会和现场考察专家组的意见和建议，进一步完善并细化研究计划，作为评估和验收的依据。按下列提纲撰写：
  - (1) 五年拟开展的研究工作（包括主要研究方向、关键科学问题与研究内容）；
  - (2) 研究方案（包括骨干成员之间的分工及合作方式、学科交叉融合研究计划等）；
  - (3) 年度研究计划；
  - (4) 五年预期目标和可能取得的重大突破等；
  - (5) 研究队伍的组成情况。
5. 对于其他类型项目，参照面上项目的方式进行选择和填写。



简表

申请者信息	姓 名	申晚霞	性 别	女	出生年月	1982年11月	民 族	汉族
	学 位	博士			职称	助理研究员		
	是否在站博士后	否			电子邮件	shenwanxia@cric.cn		
	电 话	023-68349027			个人网页			
	工 作 单 位	中国农业科学院柑桔研究所						
	所 在 院 系 所	品种资源及育种研究室						
依托单位信息	名 称	中国农业科学院柑桔研究所					代码	40071208B1370
	联 系 人	谭志友			电子邮件	tanzhiyou@sina.com		
	电 话	023-68349708			网站地址	www.cric.cn		
合作单位信息	单 位 名 称							
项目基本信息	项 目 名 称	4CL基因调控柑橘类黄酮生物合成的机制研究						
	资 助 类 别	青年科学基金项目				亚 类 说 明		
	附 注 说 明							
	申 请 代 码	C150103:果树分子生物学				C150102:果树种质资源与遗传育种学		
	基 地 类 别							
	执 行 年 限	2020.01-2022.12						
	直 接 费 用	24万元						



## 项目摘要

### 中文摘要:

柑橘是全世界最重要的水果植物, 含有多种成分的黄酮类化合物, 是膳食和药用类黄酮的重要来源。目前对柑橘类黄酮生物合成的遗传调控机制尚缺乏研究, 无法对类黄酮的含量进行定向遗传改良。4CL基因家族编码的4-香豆酸:辅酶A连接酶是苯丙烷代谢途径的两个重要分支——类黄酮和木质素生物合成上游的关键限速酶。已有研究表明, 类黄酮和木质素的生物合成存在明显的竞争关系。本课题组在前期的研究中明确了柑橘有三个4CL家族基因, 其中Ci4CL2是控制类黄酮生物合成的重要基因。在此基础上, 本项目将通过对4CL基因的启动子结构特征、基因差异表达和分离群体GWAS等分析挖掘调控4CL基因的重要转录调控因子, 通过转基因对表达调控模式进行验证。并对基因及转录因子的时空表达规律及其与类黄酮、木质素生物合成的关系进行分析, 揭示两个生物合成途径之间的竞争机制, 阐明通过调控4CL基因的表达对类黄酮的含量进行遗传改良的机理。

### Abstract:

Citrus is one of the most important plants for fresh fruit and processing. It contains a large varieties of flavonoids and is a major source of dietary and medicinal flavonoids. Improvement of flavonoids content in citrus possess the great potential to increase the economic value of citrus industry. 4CL gene family encodes the enzyme of 4-Coumarate:Coenzyme A Ligase, a key enzyme to form the common substrate  $p$ -coumaroyl CoA at diverging point of phenylpropanoid pathway for the two branches of flavonoids and lignin biosynthetic pathways. The published reports indicated that the competition exists between the biosynthesis of flavonoids and lignin. The expression of 4CL genes is influenced by genetic background, the development of the plant and environmental factors. Our previous study identified there are three members of 4CL genes in the citrus. The class II gene Ci4CL2 is responsible for the flavonoids biosynthesis.

In this project, the characteristics of the promoters of 4CL genes will be analyzed to understand the regulation of the gene expression. The transcriptome sequencing and GWAS analysis of segregation population resequencing will be carried out to identify the transcription factors (TF) regulating the expression of 4CL genes. The various citrus germplasm and tissue types, and peels in fruit maturation period will be used to study the temporal and spatial expression profiles of the three 4CL genes and TFs, and the co-relationships with flavonoids and lignin contents. The silence and over expression of candidate TFs by gene transformation will be conducted to validate the TF and study the mechanisms controlling the expression of the 4CL genes. The yeast one-hybrid will be used to detect the interaction of TFs and 4CL genes. The study will unveil the mechanisms of 4CL on biosynthesis of flavonoids and the interaction between the biosynthesis of flavonoids and lignin. This will provide a solution to improve flavonoids production in citrus through adjusting the phenylpropanoid metabolic flux between flavonoids and lignin biosynthesis by genetic manipulation of 4CL gene expression. The results of the study will be the important information for further study the genetic mechanisms of the flavonoids biosynthesis.

**关键词(用分号分开):** 柑橘; 次生代谢产物; 转录调控; 功能物质; 基因功能

**Keywords(用分号分开):** Citrus; Secondary metabolites; Transcription regulation; Functional component; Gene function



项目组主要成员

编号	姓名	出生年月	性别	职称	学位	单位名称	电话	证件号码	项目分工	每年工作时间 (月)	
1	申晚霞	1982. 11	女	助理研究员	博士	中国农业科学院柑桔研究所	023-68349027	430923198211241147	项目负责人	8	
总人数			高级		中级		初级		博士后	博士生	硕士生



## 国家自然科学基金项目直接费用预算表（定额补助）

项目批准号：31901999

项目负责人：申晚霞

金额单位：万元

序号	科目名称	金额
1	项目直接费用合计	24.0000
2	1、设备费	0.0000
3	(1)设备购置费	0.00
4	(2)设备试制费	0.0000
5	(3)设备升级改造与租赁费	0.00
6	2、材料费	14.1000
7	3、测试化验加工费	2.5000
8	4、燃料动力费	1.2000
9	5、差旅/会议/国际合作与交流费	1.2000
10	6、出版/文献/信息传播/知识产权事务费	2.4000
11	7、劳务费	2.6000
12	8、专家咨询费	0.0000
13	9、其他支出	0.0000



## 预算说明书（定额补助）

（请按《国家自然科学基金项目资金预算表编制说明》中的要求，对各项支出的主要用途和测算理由及合作研究外拨资金、单价≥10万元的设备费等内容进行详细说明，可根据需要另加附页。）

无超过 10 万元的设备购置

1、申请直接经费总计 24.00 万元，预算说明如下：

主要包括：生物信息学分析费、测序分析、载体构建，HPLC 分析等；实验室水电气等；田间试验，国内外学术交流等；版面费、印刷费、专利申请、文献资料收集等费；研究生及临聘人员劳务费等费用。

（1）设备费，无固定资产设备购置计划。

（2）材料费共计 14.10 万元。主要包括：实验过程中所需的试剂、耗材及转基因材料管理等费用

①原材料/试剂/药品购置费 13.20 万元。

- **RNA 抽提试剂盒**，[20 个烟草沉默表达基因株系 + 2 个烟草沉默表达载体负对照株系 + 20 个柑橘沉默表达基因株系 + 2 个柑橘沉默表达载体负对照株系 + 20 个烟草超表达基因株系 + 2 个烟草超表达载体负对照株系 + 20 个柑橘超表达基因株系 + 2 个柑橘超表达载体负对照株系 + 5 个不同组织部位样品 + 果实不同发育时期样品 8 个 × 3 个柑橘种质 + 20 份柑橘种质幼嫩叶片] × 3 次重复 = 411 次，即（100 次/试剂盒）5 个 × 1000 元/个 = 0.50 万元
- **反转录试剂**：（100 次/试剂盒）5 个 × 3000 元/个 = 1.50 万元
- **载体 pGEM-T easy 载体试剂盒** 10 个 × 700 元/个 = 0.70 万元
- **SYBR green 检测** 5 个（20ul 反应 × 2000 次）× 0.40 万元/个 = 2.00 万元
- **3'-RACE 试剂盒**，1 个 × 0.20 万元/个 = 0.20 万元
- **5'-RACE 试剂盒**，1 个 × 0.40 万元/个 = 0.40 万元
- **高保真 Taq 酶**：4 个 × 500 元/个 = 0.20 万元
- **琼脂糖（100g，进口）** 10 瓶 × 250 元/瓶 = 0.25 万元
- **50×TAE（500ml）缓冲液**，10 瓶 × 180 元/瓶 = 0.18 万元
- **HPLC 检测样品** 共计（22 × 4 + 5 + 8 × 3 + 20）个 × 3 次重复 × 约 100 元/





个 = 4.11 万元（包括样品提取、色谱柱、分析瓶、滤膜、HPLC 级甲醇及黄酮类标准品等）

- 其他如 DNA 抽提试剂盒、Taq 酶、连接酶、胶回收试剂盒、DNAMarker、感受态、植物表达载体、遗传转化所需各类抗生素、实验耗材等共计 3.16 万元。

②其他 0.90 万元，3 年，平均每年 0.30 万元。主要用于柑橘等转基因材料的管理（包括营养土、栽培盆及温室使用等）费用。

（3）测试化验加工费 2.5 万元。

- PCR 产物、重组质粒测序：1000 测序反应（拟定） $\times$ 25 元/样 = 2.50 万元

（4）燃料动力费 1.20 万元，3 年，平均每年 0.40 万元。主要用于实验室各种仪器设备等运行过程中产生的水、电、气、燃料消耗等费用。

（5）差旅/会议/国际合作与交流费 1.20 万元。

- 差旅费 1.20 万元，3 年，平均每年 0.40 万元。主要用于国内学术交流等产生的费用（0.20 万元/人次，3 年共计 6 人次），会议和差旅支出标准严格按照国家有关规定执行。

- 会议费无。

- 国际合作与交流费：无预算

（6）出版/文献/信息传播/知识产权事务费 2.40 万元。

两篇国内核心期刊文章，即  $2 \text{ 篇} \times 0.40 \text{ 万元/篇} = 0.8 \text{ 万元}$ ；1 篇 SCI 论文， $1 \text{ 篇} \times 1.00 \text{ 万元/篇} = 1.00 \text{ 万元}$ ；1 个专利，0.60 万元。合计 2.40 万元。

（7）劳务费共计 2.60 万元

项目组可保证有 2 名硕士研究生主要从事该项目的研究工作。每年工作 10 个月，每月硕士研究生劳务费 800 元，3 年劳务费共计 2.40 万元。及其他临时聘用人员的劳务费用共计 2.60 万元。

（8）专家咨询费无预算。

（9）其他支出无。



(10) 无合作单位外拨经费。

项目负责人签字：

科研部门公章：

财务部门公章：



## 报告正文

研究内容和研究目标按照申请书执行。



## 国家自然科学基金资助项目签批审核表

<p>我接受国家自然科学基金的资助，将按照申请书、项目批准意见和计划书负责实施本项目（批准号：31901999），严格遵守国家自然科学基金委员会关于资助项目管理、财务等各项规定，切实保证研究工作时间，认真开展研究工作，按时报送有关材料，及时报告重大情况变动，对资助项目发表的论著和取得的研究成果按规定进行标注。</p> <p>项目负责人（签章）： 年 月 日</p>		<p>我单位同意承担上述国家自然科学基金项目，将保证项目负责人及其研究队伍的稳定和研究项目实施所需的条件，严格遵守国家自然科学基金委员会有关资助项目管理、财务等各项规定，并督促实施。</p> <p>依托单位（公章） 年 月 日</p>						
本栏目由基金委填写	<p>科学处审查意见：</p>							
	<p>建议年度拨款计划（本栏目为自动生成，单位：万元）：</p>							
	年度	总额	第一年	第二年	第三年	第四年	第五年	
	金额							
本栏目主要用于重大项目等	<p>科学部审查意见：</p> <p>负责人（签章）： 年 月 日</p>							
	<p>相关局室审核意见：</p> <p>负责人（签章）： 年 月 日</p>							
		<p>委领导审批意见：</p> <p>委领导（签章）： 年 月 日</p>						