



项目批准号	31902084
申请代码	C1505
归口管理部门	
依托单位代码	40071508A1021-1936



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：转录因子CsSHN3提高采后柑橘果实耐冷性的分子机制

直接费用：25万元 执行年限：2020.01-2022.12

负责人：何义仲

通讯地址：重庆市北碚区歇马镇柑桔村15号

邮政编码：400712 电 话：02368349725

电子邮件：heyizhong@cric.cn

依托单位：西南大学

联系人：谢珍 电 话：02368254200

填表日期：2019年09月01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	何义仲	性 别	男	出生年月	1986年03月	民 族	汉族
	学 位	博士			职称	讲师		
	是否在站博士后	否			电子邮件	heyizhong@cric.cn		
	电 话	02368349725			个人网页			
	工 作 单 位	西南大学						
	所 在 院 系 所	柑桔研究所						
依托单位信息	名 称	西南大学					代码	40071508A1021
	联 系 人	谢珍			电子邮件	xiezhensw@swu.edu.cn		
	电 话	02368254200			网站地址	http://www.swu.edu.cn/		
合作单位信息	单 位 名 称							
项目基本信息	项 目 名 称	转录因子CsSHN3提高采后柑橘果实耐冷性的分子机制						
	资 助 类 别	青年科学基金项目				亚 类 说 明		
	附 注 说 明							
	申 请 代 码	C1505:园艺作物采后生物学						
	基 地 类 别							
	执 行 年 限	2020.01-2022.12						
	直 接 费 用	25万元						



项目摘要

中文摘要:

柑橘是我国南方最重要的水果，为实现鲜食果实周年供给的目标，全程冷链贮运已成为柑橘产业的现实需求，如何提高果实对低温的耐受性是迫切需要解决的科学问题。前期对纽荷尔脐橙芽变材料‘赣南1号’和‘龙回红’田间观察和贮藏试验发现，‘赣南1号’果实耐冷性降低，而‘龙回红’果实耐冷性升高；基于上述果实耐冷性差异，转录组测序分析，筛选到一个与蜡质调控相关且显著响应低温信号的转录因子CsSHN3。由此推测，柑橘果实在低温胁迫下可能通过诱导蜡质合成提高果实耐冷性。为证实此推测，本项目拟在山金柑中超量和抑制表达CsSHN3、通过病毒诱导的基因沉默（VIGS）技术沉默‘龙回红’果实CsSHN3验证其功能，测定转基因果实蜡质、激素等耐冷相关指标；利用酵母双杂交、免疫共沉淀和双分子荧光互补技术筛选CsSHN3互作且响应低温的蛋白，以期阐明CsSHN3调控果实耐冷性的分子机理，为优化柑橘冷链技术提供理论依据。

Abstract:

Citrus fruit is one of the most important fresh fruits in south China, and a whole cold chain logistics process is required for its year-round supply. Improving cold tolerance of citrus fruit is an urgent issue to be addressed in citrus postharvest production. Previous studies showed that two bud mutants ‘Gannan No.1’ and ‘Long Huihong’ respectively exhibited lower and higher cold tolerance under orchard or postharvest-storage conditions, compared with original cultivar ‘Newhall’ navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck). To analyze the mechanism for the differences in cold tolerance among ‘Newhall’ navel orange, ‘Long Huihong’ and ‘Gannan No.1’, the analysis of transcriptome data was carried out. The results showed the wax related transcription factor CsSHN3, which significantly responded to cold signal. Based on the results, we speculated whether the cold stress regulated fruit surface wax synthesis contributed to the cold tolerance of citrus fruit. To verify it, this project aims to analyze the cold tolerance function of CsSHN3 in citrus fruit, by suppressing or overexpressing CsSHN3 in a short-lived mountain kumquat, and silencing CsSHN3 in ‘Long Huihong’ fruit by virus-induced gene silencing (VIGS) technology, and measure the cold tolerance parameters such as wax and hormone of transgenic fruit. Additionally, yeast two-hybrid, Co-Immunoprecipitation (Co-IP) and bimolecular fluorescence complementation (BiFC) methods will be adopted to further confirm the interacting and cold-response proteins of CsSHN3, and clarify the influence and regulation mechanism of this gene in cold tolerance during postharvest storage. The results may be of important theoretical significance for cold chain technology in citrus production.

关键词(用分号分开): 果实; 蜡质; 耐冷性; 贮藏保鲜; 互作调控

Keywords(用分号分开): fruit; wax; cold tolerance; storage and preservation; interaction and regulation



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	何义仲	1986.03	男	讲师	博士	西南大学	02368349725	510922198603204955	项目负责人	10	
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：31902084

项目负责人：何义仲

金额单位：万元

序号	科目名称	金额
1	项目直接费用合计	25.0000
2	1、设备费	0.0000
3	(1)设备购置费	0.0000
4	(2)设备试制费	0.0000
5	(3)设备升级改造与租赁费	0.0000
6	2、材料费	12.7000
7	3、测试化验加工费	7.7000
8	4、燃料动力费	0.0000
9	5、差旅/会议/国际合作与交流费	1.6000
10	6、出版/文献/信息传播/知识产权事务费	1.5000
11	7、劳务费	1.5000
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）

（请按照《国家自然科学基金项目预算表编制说明》等的有关要求，对各项支出的主要用途和测算理由，以及合作研究外拨资金、单价 ≥ 10 万元的设备费等内容进行必要说明。）

1、设备费：无

2、材料费：12.70万元

本项目主要预算试验材料、分子克隆、遗传转化、组织培养、免疫共沉淀等药品或耗材，如下：

（1）果实材料费：0.60万

主要用于购买试验材料柑橘果实等。

（2）分子克隆试剂：7.10万元

这部分经费主要用于购买试剂盒（胶回收、质粒提取、DNA提取、RNA提取、蛋白提取和RNA反转录试剂盒）、琼脂糖、Tag酶、内切酶、重组酶、克隆载体等。用于基因扩增的高保真酶和传统Taq DNA聚合酶（TaKaRa）各8支，计1.10万元。用于PCR产物回收、载体构建的胶回收试剂盒4个，大量质粒提取试剂盒1个（用于亚细胞定位），小量质粒提取试剂盒4个，克隆载体试剂盒3个，计0.90万元。工具酶类包括内切酶3支，连接酶1支，BP反应和LR反应重组酶各1支，计0.80万。DNA、RNA和蛋白提取试剂盒各2盒，酵母转化试剂盒2盒，双荧光素酶检测试剂盒2盒，反转录试剂盒（Fermentas）3盒、荧光定量96孔PCR板2盒和封板膜2袋、SYBR Green PCR mix试剂盒（ABI，5 mL装）3个，计2.90万元。免疫共沉淀相关IP级别抗体，计1.00万元。此外，感受态（农杆菌和大肠杆菌）共25支、DNA marker 2支、电泳琼脂糖8瓶，计0.40万元。

（3）实验室常用化学药品：2.70万元

该部分经费用于购买化合物提取、组织培养、遗传转化所需的化学药品。常规消耗品液氮、普通和高纯氮气、工业酒精约100 L，计0.50万元；用于组织培养的琼脂粉20瓶、蔗糖50瓶、甘油2瓶等，计0.60万元；用于大肠杆菌培养和遗传转化所需的抗生素，潮霉素和壮观霉素各2瓶、卡那霉素4瓶、乙酰丁香酮2瓶等，计0.45万元。物质提取的化学试剂，乙醇25瓶、异丙醇5瓶、氯仿30瓶、吡啶3瓶、甲醇2瓶、EDTA 1瓶、苯酚5瓶、Trisbase2瓶、衍生化试剂BSTFA 4瓶、角质解聚用BF3-MeOH 1瓶等，计1.15万元。

（4）实验室常用耗材和用具：2.30万元

该部分经费用于购买常用耗材主要包括分子实验所需塑料制品（不同型号离心管、吸头）共120包，RNase-free的塑料离心管、进口塑料离心管（蛋白和DNA提取）和吸头30包，计0.90万元；用于代谢物提取和测定耗材，如液体进样针2支（800元/支），色谱柱1支（5000元/支），注射器和滤膜3箱，计0.80万元；用于组织培养的玻璃器皿和常规分子实验所需的塑料制品如组织培养所需的三角瓶400个，酵母和农杆菌培养所需的培养皿400个，计0.60万元。

3、测试费：7.70万元

该部分经费用于引物合成、测序、质谱测定和电镜观察等。

（1）引物合成：约90条，计0.30万元；单克隆测序：单价20元/次，测260次，计0.52万元。

（2）代谢物测定：总计153个样品，质谱测定200元/样品，计3.06万元。具体如下：蜡质测定（山金柑材料3种类型，分别测定3个系，2个组织（叶片和果实），3个生物学重复；脐橙果实2种类型，3个生物学重复，共计60个样品）；角质测定（山金柑材料果实3种类型，分别测定3个系，3个生物学重复；脐橙果实2种类型，3个生物学重复，共计33个样品）；激素测定（山金柑材料3种类型，分别测定3个系，2个组织（叶和果实），3个生物学重复；脐橙果实2种类型，3个生物学重复，共计60个样品）。

（3）扫描电镜：5种类型转基因材料，3个株系，2个组织，总计30个样，计0.6万元；激光共聚焦显微镜进行亚细胞定位分析：0.22万元。

（4）酵母双杂交文库构建及分析：2.00万元；免疫共沉淀技术的蛋白纯化和质谱鉴定：1.00万元。

4、燃料动力费：0万元

5、差旅/会议/国际合作与交流费：1.60万元

项目执行期间拟参加相关会议学术会议4人次，每人0.40万元（会议注册费、食宿和交通费用）共计1.60万元。

6、出版/文献/信息传播/知识产权事务费：1.50万元

论文修改、文献查阅、图书购买、资料复印等0.30万元，国内外论文版面费1.20万元，合计1.50万元。

7、劳务费：1.50万元

硕士研究生劳务费200元/月 $\times 25$ 个月 $\times 3$ 人。

8、专家咨询费：0万元

9、其他支出：0万元

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：31902084），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>						