

项目编号: SWU 119072

**西南大学**  
**博士基金（含引进人才计划）项目**  
**计划任务书**

资助类别:	博士基金/引进人才计划项目
项目名称:	基于稀有芽变材料发掘柑橘耐冷转录因子 <i>CsSHN3</i> 及其功能解析
申请 者:	何义仲
单 位:	柑桔研究所
联系电话:	15527726127
起止年月:	2020 年 1 月 至 2021 年 12 月
填报日期:	2019 年 9 月 20 日

西南大学科学技术处制

2019.7

## 填表说明

1. 填写任务书之前请认真阅读西南大学科研管理办法的有关规定（见相关文件）和申报通知的要求。
2. 请勿随意更改表格内容和格式。
3. “学科及代码”请查阅相关材料中的代码表。
4. “研究性质”请根据项目的特点填写“基础研究”、“应用基础”或“应用研究”。
5. 请注意经费预算表的单位是万元。
6. 限制字数的部分请务必遵守限制要求。
7. 您需要填写《西南大学博士基金(含引进人才计划)项目计划任务书》并提交纸质(一式两份)材料，并在西南大学科研信息平台“校级项目立项”中录入相关信息。
8. 任务书中需要签字或盖章的地方有以下几处，请勿遗漏：
  - A.项目组成员
  - B.申请人承诺
  - C.学院（所、中心）审查意见
  - D.人事处审查意见
9. 若有其他疑问请致电 68254200、68254913  
电子邮件：xiezhen@swu.edu.cn

## 基本信息

申请者信息	姓名	何义仲	性别	男	出生年月	1986 年 03 月
	学位	博士	职称	讲师	研究领域	果实生理品质形成与调控
	电话	023-68349725			手机（必填）	15527726127
	Email	heyizhong@cric.cn				
	单位	柑桔研究所				

项目基本信息	项目名称	基于稀有芽变材料发掘柑橘耐冷转录因子 CsSHN3 及其功能解析				
	学科及代码	果树学		2104010	研究性质	应用基础
	国民行业代码					
	起止时间	2020 年 1 月 至 2021 年 12 月			申请金额	10 万元

项目摘要	项目研究意义(限 100 字)	柑橘是我国南方最重要的水果，为配合实现鲜食果实周年供给的目标，全程冷链贮藏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。前期的研究发现柑橘果实耐冷性与果面蜡质密切相关，但是低温胁迫诱导果面蜡质合成影响果实耐冷性的机制尚不清楚。
	主要研究内容(限 200 字)	在田间观察和贮藏试验中，与原品种纽荷尔脐橙相比较，其芽变品种‘赣南 1 号’果实耐冷性降低，而其另一例芽变品种‘龙回红’实耐冷性增强；RNA-seq 数据挖掘到响应低温信号的转录因子 CsSHN3 可能调控烷烃合成影响‘龙回红’和‘赣南 1 号’果实耐冷性。以此为基础，本项目拟将甜橙 CsSHN3 稳定转化拟南芥和山金柑材料验证其生物学功能，测定转基因植株的耐冷相关生理、生化指标及基因表达；利用 CHIP-seq、EMSA 和双荧光素酶等技术筛选 CsSHN3 下游靶基因。
	预期目标和成果(限 100 字)	本项目以期阐明 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。同时，本项目以第一作者发表我校为第一署名单位的 A1 类学术论文至少 1 篇，或 A2 类学术论文至少 2 篇。
关键词（最多 5 个，用分号隔开）		柑橘果实；耐冷性；蜡质；贮藏保鲜；调控机制

## 项目组主要成员

编号	姓名	工号/学号	出生年月	性别	职称	学位	所在单位	联系电话	项目分工	每年工作时间(月)	签字
1	何义仲	20180780	1986年03月	男	讲师	博士	西南大学	15527726127	项目负责人	7	何义仲
2	凌丽俐	20072002	1977年11月	女	副研究员	博士	西南大学	13638374336	家族成员序列分析和亚细胞定位	4	凌丽俐
3	张晓勇	11201741100 3741	1991年11月	男	研究生	学士	西南大学	15826245020	CsSHN3 调控的靶基因的筛选	6	张晓勇
4	王敏	11201841100 2256	1995年11月	女	研究生	学士	西南大学	18826073748	遗传转化	8	王敏
5	刘敏竹	11201841100 2247	1996年03月	女	研究生	学士	西南大学	13048371031	低温处理和激素处理蜡质组分的测定	4	刘敏竹
6											
7											
8											

总人数	高级	中级	初级	博士后	博士生	硕士生
5	1	1				3

## 项目总经费预算

<b>预算编制说明：</b> 在填报本表之前，请认真阅读西南大学科研经费相关管理办法。		
<b>预算支出内容</b>		
<b>资金用途</b>	<b>金额 (万元)</b>	<b>计算根据及理由</b>
设备费	0	
购置设备费		
试制设备费		
设备改造与租赁费		
材料费	4.5	购买实验材料、试剂和耗材
测试化验加工费	2	用于蛋白纯化、抗体制备
差旅费/会议费/国际合作交流费	1.3	用于试验样品采集、生物信息学和凝胶迁移实验培训
出版/文献/信息传播/知识产权事务费	1.2	用于论文发表版面费
劳务费	1.0	用于学生和工人的劳务费用支出
专家咨询费	0	
合    计	10.0	

## 博士基金（含引进人才计划）项目年度预算表

（请勿跨年，按照自然年度预算）

拨款期次	拨款时间	预算金额（万元）	占总金额比例（%）
1	2019 年 1 月— 2019 年 12 月	5	50
2	2020 年 1 月— 2020 年 12 月	5	50
3	年 1 月— 年 12 月		
4	年 1 月— 年 12 月		



## 任务书正文

*编写提纲（请申请人参照以下提纲撰写，要求内容翔实、层次分明、格式清晰、字体大小适中、标题突出。斜体字部分在撰写后删除，使版面简洁、易于阅读。）*

### 一、立项依据与研究内容：

1、项目的立项依据（研究意义、国内外研究现状及分析，附主要参考文献目录。）（*基础研究需结合科学研究发展趋势来论述科学意义；应用研究需结合国民经济和社会发展中迫切需要解决的关键科技问题来论述其应用前景。*）

#### 1.1 研究意义

柑橘是我国南方重要的果树作物，长期以来我国柑橘品种结构单一，且柑橘果实采摘周期短等特点，贮藏保鲜已成为调控果实市场供应和价格的重要手段。柑橘果实对低温较敏感，留树贮藏越冬或长时间冷藏均可能导致柑橘果实产生冷害症状，失去商品价值（王日葵，2010；Tajvar et al., 2011）。果面蜡质层是果实与外界环境互作的最外围屏障，柑橘、番茄和葡萄等果实脱去果面蜡质易遭受低温伤害、贮藏寿命缩短；采用人工打蜡能够有效提高果实耐冷性（程运江，2011；Porat et al., 2005）。以上结果表明果面蜡质的生物学特性与果实耐冷性密切相关。因此，深入解析柑橘果实蜡质生物学特性尤其在响应低温信号的分子机理，有助于揭示果实耐冷机制并寻找防治果实低温伤害的有效措施，是实现果实绿色、优质和高效贮藏保鲜的重要前提。

蜡质是位于植物表皮细胞最外层连续的疏水膜，在感受并转导低温信号方面有着重要的作用。自然蜡质层变异或人工涂蜡处理影响果实表面透性、抗氧化系统乃至激素信号，改变对低温信号应答机制；低温信号同样能够诱导植株或果实蜡质相关基因表达、蜡质组分和晶体结构改变，增强自身耐冷性（刘润生，2014；Yu et al., 2014；Hao et al., 2017；Singh et al., 2018）。前人研究证实，AP2/EREBP家族转录因子直接或间接调控果实蜡质合成相关基因表达，有效增加蜡质成分的积累。大量转录因子参与低温信号应答机制，但是调控蜡质合成的转录因子是否响应低温胁迫信号调节果实耐冷性的研究还未报道。

发掘优良耐寒性状的柑橘种质，是开展柑橘果实耐冷性基础生物学研究的重要前提，同时符合现代农业发展的需求（邓秀新，2005）。1999年江西赣南脐橙主产区遭遇低温胁迫后陆续发掘两例芽变材料，多年的田间观察、果实贮藏试验及

全基因组重测序分析，证实两者是纽荷尔脐橙的芽变，并完成了新品种登记（登记号：No.CNA20131106.2 和No.CNA20130122.4），命名为‘龙回红’和‘赣南1号’（袁高鹏，2017；He et al., 2018）。同原品种纽荷尔脐橙的田间性状相比，‘龙回红’变异株的叶片浓绿反卷，留树果实耐冷性强；‘赣南1号’变异株叶形正常、留树果实耐冷性相对较低。经过采后贮藏（温度0-5℃和相对湿度80%-90%）试验进一步表明，原品种纽荷尔脐橙果实耐低温能力显著强于‘赣南1号’果实，而显著低于‘龙回红’果实。本项目结合稀有‘赣南1号’、‘龙回红’及其原品种纽荷尔脐橙的遗传背景差异小为契机，以果实耐冷性为研究对象，分析RNA-seq数据，挖掘到转录因子CsSHN3且响应低温胁迫，系统验证其生物学功能并确定靶基因，解析CsSHN3提高柑橘果实耐冷性的分子机制，对促进我国柑橘贮藏保鲜产业的节本增效具有重要意义。

## 1.2 国内外研究现状及分析

低温伤害限制柑橘植株的生长、发育和种植范围，柑橘果实较植株耐冷性更差，柠檬、葡萄柚和甜橙类果实遭遇 9℃、10℃和 2℃低温环境可能发生冷害；四川、重庆和湖南柑橘主产区留树的晚熟柑橘在 2017 年和 2018 年越冬期间遭遇寒潮，部分橘园果实受害率达到 90% 以上，开展柑橘果实耐冷性的分子机理研究显得愈发重要与迫切。柑橘为多年生木本果树、遗传背景复杂和生长环境不可控制等因素严重限制了果实耐冷性的研究。

### 1.2.1 果实耐冷性的生物学基础研究进展

近年来，大多研究集中于化学和物理方式诱导果实的耐冷性，其理论基础也被逐渐揭示。适宜浓度的过氧化氢、外源激素包括乙烯、脱落酸、水杨酸和茉莉酸甲酯处理番茄、黄瓜、香蕉和柑橘果实后，在低温贮藏中果实的丙二醛含量、细胞膜电解质渗出率和脯氨酸含量降低，超氧化物歧化酶和  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性升高，在一定程度上增强了果实耐冷性（单伟，2016；Mustafa et al., 2018；Rehman et al., 2018）。同时，气调贮藏、热激处理和打蜡处理有效的减轻香蕉、荔枝和柑橘果实冷害症状（Wu et al., 2014；Mendieta et al., 2016；Zhang et al., 2017）。

目前，果实低温应答分子调控机制尚处于研究起步阶段。部分转录因子被证明参与低温信号响应转导通路，其中以 CBFs/DREB（C-repeat-binding factors/dehydration-responsive element-binding factor）-CRT/DRE（C-repeat/dehydration response element）-COR（cold-regulated genes）调节级联

反应信号通路起着关键作用。Chinnusamy 等（2004）报道 *CBF3/DREB1A* 和 *CBF/2DREB1C* 受转录因子 *ICE1* (*inducer of CBF expression*) 正向调节。陆旺金教授研究团队从香蕉果实分离 *MaICE*、*MaCBF*、*MaMYC2*、*MaNAC1* 和 *MabHLH* 等响应冷胁迫的转录因子，*MaMYC2* 和 *MabHLH* 通过调节 *MaICE1* 来参与调控 MeJA 诱导的耐冷性（Peng et al., 2013）；*MaJAZ3* 与 *MaERF10* 协同抑制 JA 合成相关基因表达，调控 MeJA 诱导果实耐冷性；*MaNAC1* 直接调控 *MaICE1* 和 *MaCBF1* 影响果实的耐冷性（Shan et al., 2014）。在低温胁迫下，拟南芥 *AtMYB96*（Lee and Seo, 2015）以及园艺作物苹果 *MdMYB88* 和 *MdMYB124*（Xie et al., 2018）、枳壳 *PtrbHLH*（Huang et al., 2013）和甜橙 *CsbHLH18*（Geng and Liu, 2018）形成了复杂的调控机制影响植物形态结构、蜡质厚度增强耐冷性。

蜡质层对低温胁迫起着物理屏障，也能感知、转导和转录调控低温信号的等复杂阶段（Yu et al., 2014；Singh et al., 2018）。柑橘作为多年生木本果树，生长周期长和高度杂合、遗传转化困难等客观因素（Zhang et al., 2019），且蜡质合成途径高度复杂，果面蜡质是如何响应低温信号、传递内源激素等信号分子、调节逆境响应都需要更深层次认识（Knight et al., 2012；Theocharis et al., 2012）。

### 1.2.2 果实蜡质参与耐低温机制的研究进展

植物蜡质研究主要集中在营养器官，如叶片和茎，而针对果实蜡质研究较少，尤其是木本果树（Lara et al., 2015）。目前，番茄（Adato et al., 2009；Shi et al., 2014）、苹果（Lashbrooke et al., 2015；Legay et al., 2016）和蓝莓（Chu et al., 2018）等园艺作物蜡质的研究已经开展，针对柑橘果实蜡质合成与调控研究相对较慢。

脂肪族类物质是植物蜡质的重要组分，以  $C_{16}$  和  $C_{18}$  脂肪酸为前体，需经过延伸过程、伯醇途径或脱羧途径、跨过细胞膜、运输到细胞壁外而形成（Li-Beisson et al., 2010）。在脂肪酸合成酶体系包括酮酰辅酶 A 合成酶（KCS，限速酶）、酮酰辅酶 A 还原酶（KCR）、羟酰辅酶 A 脱水酶（HCD）和烯酰辅酶 A 还原酶（ECR）等（Samuels et al., 2008）。延伸形成的  $C_{20}$ - $C_{34}$  超长链脂肪酰辅酶 A 通过酰基还原途径也叫伯醇途径，通过脂肪酸还原酶（FARs）作用下直接还原为偶数碳链的伯醇，随后被蜡质合成酶（WS）催化形成蜡酯（Li et al., 2008）；另外，超长链脂肪酰辅酶 A 也可以通过蜡质脱羧途径，由酰基辅酶 A 还原酶（CER3）、醛脱羧酶（CER1）和中链烷烃羟化酶（MAH）等催化形成烷烃、醛、仲醇和仲酮等组分（Lara et al., 2015）。柑橘果实蜡质组分因品种和器官不同而存在显著差



异，紧皮类柑橘果实如纽荷尔脐橙果实表面覆盖着较大片状蜡质晶体，组分以醛为主，还存在三萜类物质如软木三萜酮（Liu et al., 2015; Wang et al., 2016）；宽皮类柑橘果实如温州蜜柑则以烷烃为主（Wang et al., 2014）。

果面蜡质是果实外观结构的重要组成，蜡质组分差异导致果实对冷胁迫伤害程度各不相同（Lara et al., 2015）。番茄和柑橘果实经过人工脱蜡处理导致异味物质积累，柑橘和葡萄蜡质缺失突变体果实冷害发生率严重，葡萄和柑橘果实蜡质组分含量与冷害呈显著相关。同时在低温贮藏中，葡萄柚果实蜡质中的角鲨烯、 $C_{23}$ - $C_{25}$ 烷烃以及醛类物质升高，其中角鲨烯含量与果实冷害发生率呈显著负相关；苹果*MdWRI1*和蜡质相关基因被低温诱导上调表达，烷烃和超长链脂肪酸升高；在低温胁迫下，*cer3*、*cer1*、*cer20*和 *kcs1*拟南芥突变体的烷烃含量和蜡质总量显著上升，野生型拟南芥和盐芥*CER1*、*CER3* 和*CER4*上调表达（Yu et al., 2014）。前期工作发现，2-5℃低温诱导脐橙果实*CER1*表达量显著升高，*CER3*在贮藏60d也被低温诱导表达。上述结果表明，植株可能通过脱羧途径增加烷类物质的生物合成来响应低温胁迫信号。刘勇教授研究团队和程运江教授研究团队针对柑橘果实角质层突变体的研究表明，AP2/EREBP转录因子参与柑橘果实蜡质合成且与贮藏性能密切相关（Liu et al., 2015; He et al., 2018），但尚缺乏直接的实验证据，具体的调控机制以及响应低温胁迫也有待深入研究。

### 1.2.3 AP2/EREBP 转录因子调控果面蜡质合成并影响果实性能的研究进展

ERF转录因子是AP2/EREBP亚家族，参与调控拟南芥和水稻、番茄和苹果蜡质层等形态建成以及胁迫应答反应。在拟南芥和水稻中，ERF家族转录因子*WIN1/SHN1*、*SHN2*和*SHN3*正向调控蜡质形成，响应干旱和盐胁迫（Lee and Suh et al., 2013）。超表达*WIN1*拟南芥的蜡质合成基因*LACS2*、*CER2*和*KCSI*等显著上调，蜡质含量比野生型高4.5倍（Broun et al., 2004）；*AtSHN3*激活*AtWIN1*和*AtSHN2*启动子，*AtWIN1*与*AtSHN2*能激活对方启动子，协同调控角质层形成（Aharoni et al., 2004）。水稻*OsWR1*与*AtWIN1*相似度高，超表达*OsWR1*上调*OsLACS1*和*OsFAE1*，蜡质增多、抗旱性增强；水稻WIN/SHN家族还有3个同源基因（*OsWR2-4*），*OsWR2*调控NAC和MYB转录因子，参与水稻蜡质等合成（Ambavaram et al., 2011; Wang et al., 2012）。ERF转录因子可负调控角质层合成，拟南芥*AtNFX1-LIKE2* 调节脱落酸和活性氧，影响角质层等形态建成；拟南芥*AtNFXL2*结合与*AtSHN1*、*AtSHN2*、*AtSHN3*和*AtBDG1*启动子，负调控蜡质和角

质形成；水稻*OsDEWAX*受黑暗诱导，负调控蜡质合成基因*OsCER1*和 *OsLACS2*（Lisso et al., 2012； Go et al., 2014）。

此外，AP2/EREBP的亚家族成员WRINKLED（*WRI1-WRI4*）中，*WRI1*在角果中表达量最高，参与种子三酰甘油合成；*WRI2*、*WRI3*和*WRI4*调控花的角质合成影响果实发育（To et al., 2012）。番茄果实抑制ERF家族成员*SISHN3*及其调控的*Slcyp86a69*的表达，果实蜡质严重缺乏和表皮结构改变，贮藏期间失水率和腐烂率提高（Shi et al., 2013）；在番茄中超表达*SISHN1*，果面蜡质显著增加，果实失水显著被抑制且抗病性提高（Aharoni et al., 2014）。此外，苹果通过遗传群体证实*MdSHN3*调控果实角质层形成，抑制果面黄褐色斑，延长果实贮藏期（Lashbrooke et al., 2015）。柑橘属于多年生木本作物，遗传转化平台局限，其果实蜡质研究集中在蜡质组分鉴定和候选基因筛选上，针对柑橘果实蜡质相关基因的功能以及对逆境信号响应和果实性能影响的研究还未报道。

### 1.3 结合国民经济和社会发展中迫切需要解决的关键科技问题来论述其应用前景

低温胁迫是柑橘产业生产的限制因子，‘龙回红’在柑橘生产中具有较大推广价值。果实响应低温胁迫方式多样，在形态上、生理生化和信号转导等不同层次彼此独立、相互交叉介导果实的耐冷性。大量研究关注于果实诱导耐冷性生理生化机制，缺乏低温信号响应、转导分子机制的研究。挖掘耐低温柑橘资源是一种研究木本果树耐冷性的有效途径，对揭示柑橘果实响应低温的生物学基础具有重要意义。本项目采用人工控制环境温度既可以避免了田间环境的不可控制的因素，更能为柑橘冷库的改良提供参数。转录因子 EFR 家族已被报道参与调控番茄和苹果蜡质合成与干旱逆境的响应，但是柑橘果面蜡质与低温响应这一特殊生物学过程，至今未见报道。项目申请人前期从稀少的柑橘芽变材料出发，对比分析‘赣南1号’、‘龙回红’和原品种纽荷尔脐橙果实的耐冷表型和转录水平差异；利用低温诱导处理以及分析发育期基因趋势，筛选到调控柑橘果实耐冷性的关键候选基因 *CsSHN3*。本项目拟在此研究基础上，分析转录因子 *CsSHN3* 启动子感知温度元件，同时分析蜡质合成通路的基因、特异性蜡质组分是否受温度梯度诱导表达；通过在拟南芥和山金柑超量表达 *CsSHN3*，同时干涉山金柑果实 *SHN3* 验证 *CsSHN3* 生物学功能；CHIP-seq、EMSA 和双荧光素酶等技术筛选 *CsSHN3* 下游靶基因，旨在揭示 *CsSHN3* 基因响应低温胁迫调控柑橘果实耐冷性的分子机

理，为制定减少柑橘果实冷害发生措施提供科学依据。

## 1.4 主要参考文献目录

1. 程运江. 园艺产品贮藏运销学. 中国农业出版社, 2011
2. 邓秀新. 世界柑橘品种改良的进展. 园艺学报, 2005, 32, 1140-1146
3. 刘润生. 纽荷尔脐橙 (*Citrus sinensis* Osbeck 'Newhall') 蜡质突变株系的生物学评价. [硕士学位论文]. 华中农业大学, 2014
4. 王日葵, 周炼, 陈婷, 刘涛. 制冷贮藏温度对锦橙的影响. 农产品加工 学刊, 2010, 3: 8-10
5. 单伟. NAC 类转录因子调控香蕉果实诱导耐冷性及成熟的机制分析. [博士学位论文]. 华南农业大学, 2016
6. Adato A, Mandel T, Mintzoron S, Venger I, Levy D, Yativ M, Dom ínguez E, Wang Z, De Vos RC, Jetter R. Fruit-surface flavonoid accumulation in tomato is controlled by a SIMYB12-regulated transcriptional network. *PLoS Genet*, 2009, 5: e1000777
7. Aharoni A, Dixit S, Jetter R, Thoenes E, Van AG, Pereira A. The SHINE clade of AP2 domain transcription factors activates wax biosynthesis, alters cuticle properties, and confers drought tolerance when overexpressed in Arabidopsis. *Plant Cell*, 2004, 16: 2463–2480
8. Ambavaram MMR, Krishnan A, Trijatmiko KR, Pereira A. Coordinated activation of cellulose and repression of lignin biosynthesis pathways in rice. *Plant Physiol*, 2011, 155: 916–931
9. Broun P, Poindexter P, Osborne E, Jiang CZ, Riechmann JL. *WIN1*, a transcriptional activator of epidermal wax accumulation in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 4706–4711
10. Geng J, Liu JH, 2018. The transcription factor CsbHLH18 of sweet orange functions in modulation of cold tolerance and homeostasis of reactive oxygen species by regulating the antioxidant gene. *J Exp Bot*, 162: 2677–2692
11. Hao S, Ma Y, Zhao S, Ji Q, Zhang K, Yang M, Yao Y. McWRI1, a transcription factor of the AP2/SHEN family, regulates the biosynthesis of the cuticular waxes on the apple fruit surface under low temperature. *Plos One*, 2017, 12(10):e0186996
12. He YZ, Han JW, Liu RS, Ding YD, Wang JQ, Sun L, Yang XM, Zeng YL, Wen WW, Xu J, Zhang HM, Xiang Y, Chen ZX, Gu ZL, Chen H, Tang HQ, Deng XX, Cheng YJ. Integrated transcriptomic and metabolomic analyses of a wax deficient citrus mutant exhibiting jasmonic acid-mediated defense against fungal pathogens. *Hortic Res*, 2018, 5(1):43
13. Huang XS, Wang W, Zhang Q, Liu JH. A basic Helix-Loop-Helix transcription factor PtrbHLH of *Poncirus trifoliata* confers cold tolerance and modulates POD-mediated scavenging of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Plant Physiol*, 2013, 162: 1178–1194

14. Lara I, Belge B, Goulao LF. A focus on the biosynthesis and composition of cuticle in fruits. *J Agric Food Chem*, 2015, 63: 4005–4019
15. Lashbrooke J, Aharoni A, Costa F. Genome investigation suggests *MdSHN3*, an APETALA2-domain transcription factor gene, to be a positive regulator of apple fruit cuticle formation and an inhibitor of russet development. *J Exp Bot*, 2015, 66: 6579
16. Lee HG, Seo PJ. The MYB96-HHP module integrates cold and abscisic acid signaling to activate the CBF-COR pathway in Arabidopsis. *Plant J*, 2015, 82 (6):962-977
17. Lee SB, Suh MC. Recent advances in cuticular wax biosynthesis and its regulation in Arabidopsis. *Mol Plant*, 2013, 6: 246–249
18. Li-Beisson Y, Shorrosh B, Beisson F, Andersson MX, Arondel V, Bates PD, Baud S, Bird D, Debono A, Durrett TP. Acyl-lipid metabolism. *Arabidopsis Book*, 2010, 8: e0133
19. Lisso J, Schröder F, Schippers JH, Müssig C. *NFXL2* modifies cuticle properties in Arabidopsis. *Plant Signal Behav*, 2012, 7: 551–555
20. Liu D, Yang L, Zheng Q, Wang Y, Wang M, Zhuang X, Wu Q, Liu C, Liu S, Liu Y. Analysis of cuticular wax constituents and genes that contribute to the formation of 'glossy Newhall', a spontaneous bud mutant from the wild-type 'Newhall' navel orange. *Plant Mol. Biol*, 2015, 88: 573–590
21. Porat R, Weiss B, Cohen L, Daus A, Biton A. Effects of polyethylene wax content and composition on taste, quality, and emission of off-flavor volatiles in 'Mor' mandarins. *Postharvest Biol Technol*, 2005, 38: 262–268
22. Shan W, Kuang J, Lu WJ, Chen JY. Banana fruit NAC transcription factor MaNAC1 is a direct target of Ma ICE1 and involved in cold stress through interacting with Ma CBF1. *Plant Cell Environment*, 2014, 37(9):2116–2127.
23. Tajvar Y, Ghazvini RF, Hamidoghli Y, Sajedi RH. Antioxidant changes of Thomson navel orange (*Citrus sinensis*) on three rootstocks under low temperature stress. *Horticulture*, 2011, 52: 576–580
24. Wang JQ, Hao H, Liu R, Ma Q, Xu J, Chen F, Cheng Y, Deng X. Comparative analysis of surface wax in mature fruits between Satsuma mandarin (*Citrus unshiu*) and 'Newhall' navel orange (*Citrus sinensis*) from the perspective of crystal morphology, chemical composition and key gene expression. *Food Chem*, 2014, 153: 177–185
25. Wang JQ, Li S, Li X, He Y, Luo T, Sheng L, Luo Y, Zeng Y, Xu J, Deng X. Regulation of cuticle formation during fruit development and ripening in 'Newhall' navel orange ( *Citrus sinensis* Osbeck) revealed by transcriptomic and metabolomic profiling. *Plant Science*, 2016, 243: 131–144
26. Wang Y, Wan L, Zhang L, Zhang Z, Zhang H, Quan R, Zhou S, Huang R. An ethylene

response factor OsWR1 responsive to drought stress transcriptionally activates wax synthesis related genes and increases wax production in rice. *Plant Mol. Biol.*, 2012, 78: 275-288

27. Xie Y, Chen P, Yan Y, Bao C, Li X, Wang L, Shen X, Li H, Liu X, Niu C. An atypical R2R3 MYB transcription factor increases cold hardiness by CBF-dependent and CBF-independent pathways in apple. *New Phytol.*, 2018, 218: 201–218

28. Yu N, Song C, Wang XQ. Investigation on response mechanism of epicuticular wax on *Arabidopsis thaliana* under cold stress. *Sci Agric Sin.*, 2014, 47: 252–261

29. Yun Z, Gao H, Liu P, Liu S, Luo T, Jin S, Xu Q, Xu J, Cheng Y, Deng X. Comparative proteomic and metabolomic profiling of citrus fruit with enhancement of disease resistance by postharvest heat treatment. *BMC Plant Biol.*, 2013, 13: 1–16

30. Singh S, Das S, Geeta R. Role of cuticular wax in adaptation to abiotic stress: a molecular perspective. In: Zargar S, Zargar M. (eds). *Abiotic Stress-Mediated Sensing and Signaling in Plants: An Omics Perspective*, 2018, 155–182

## 2、项目的研究内容、研究目标, 以及拟解决的关键问题。

### 2.1 研究内容

本项目拟以‘赣南1号’、‘龙回红’和原品种纽荷尔脐橙为研究对象, 围绕两方面展开内容: 通过解析转录因子 *CsSHN3* 在温度梯度的基因表达, 确立与低温响应的相关性; 验证转录因子 *CsSHN3* 的生物学功能以及下游靶基因, 开展如下研究。

#### 2.1.1 *CsSHN3* 基因和表达分析

(1) 利用实时定量 PCR 法验证 *CsSHN3* 在‘赣南1号’、‘龙回红’和其纽荷尔脐橙果实发育期和低温处理的表达模式, 分析其与果面蜡质组分变化的相关性;

(2) 根据柑橘基因组信息 (<http://citrus.hzau.cn>), 对候选基因 *CsSHN* 家族进行序列克隆和同源性分析。

#### 2.1.2 柑橘 *CsSHN3* 的生物学功能分析

(1) 构建超量表达载体将在拟南芥中 *CsSHN3* 超量表达; 在此基础上, 构建含、不含 FLAG 标签的超量表达载体和干涉载体转化山金柑, 获得阳性植株并 Western blot 检测其蛋白表达量;

(2) 并将获得植株或成熟果实进行低温处理, 测定蜡质等代谢物含量、低

温响应的生理生化指标以及相关基因表达，以验证 *CsSHN3* 的生物学功能。

### 2.1.3 柑橘 *CsSHN3* 调控的靶基因确定及其在柑橘果实低温响应中的调控路径解析

（1）构建带青色荧光蛋白（CFP）标签的 *CsSHN3* 超量表达载体 PM999，转化温州蜜柑愈伤组织原生质体，通过激光共聚焦显微镜观察确定其亚细胞定位；

（2）提取超量表达 *CsSHN3* 山金柑的总 DNA，利用 ChIP-Seq 技术（染色质免疫共沉淀-高通量测序）富集和鉴定与 *CsSHN3* 蛋白特异结合的 DNA 片段，筛选和确定其靶基因，通过 Real-Time PCR 和 Western-blot 分析候选基因表达（上调/下调），并采用 EMSA 和双荧光素酶报告技术，验证候选靶基因，从而系统阐明甜橙 *CsSHN3* 参与响应低温的分子机制。

## 2.2 研究目标

（1）明确‘赣南 1 号’、‘龙回红’和其组荷尔脐橙果实在低温贮藏过程中耐冷性差异的生物学基础，寻找防治果实低温伤害的有效措施；

（2）解析转录因子 *CsSHN3* 的生物学功能，明确 *CsSHN3* 下游的靶基因，阐明该转录因子调控贮藏柑橘果实低温响应的作用机制，找到蜡质烷烃参与低温响应以及提高果实耐冷性的分子证据。

## 2.3 拟解决的关键问题

本研究拟解决的关键问题可归纳为以下几个方面：

（1）关注柑橘果实耐冷性状，发掘果实耐冷性的基因并筛选到关键基因 *CsSHN3*，拟在拟南芥中 *CsSHN3* 超量表达，和在山金柑中超量和干涉 *CsSHN3* 基因，鉴定在低温条件下的表型和分析相关代谢物，揭示 *CsSHN3* 提高果实耐冷性的分子机制；

（2）通过 ChIP-Seq 技术、EMSA 和双荧光素酶报告技术筛选并确定 *CsSHN3* 靶基因，通过 Real-Time PCR 和 Western-blot 分析候选基因表达（上调/下调），从而系统阐明甜橙 *CsSHN3* 参与响应低温的分子机制，寻找防治果实低温伤害的有效措施。

## 3、拟采取的研究方案及可行性分析。（包括有关方法、技术路线、实验手段、关键技术等说明）



### 3.1 技术路线（注：虚线框内代表前期研究基础）



### 3.2 研究方法和实验手段

#### 3.2.1 *CsSHN3* 转基因载体构建及功能验证

（1）*CsSHN3* 基因序列克隆。以‘赣南 1 号’、‘龙回红’以及纽荷尔脐橙成熟果实 cDNA 为模板，参考甜橙基因组（<http://citrus.hzau.edu.cn/orange>）序列信息设计引物，克隆其基因全长序列并分析差异；

（2）*CsSHN3* 亚细胞定位分析。参考何义仲博士学位论文（2018），将目的片段构建到 PM999。亚细胞定位具体步骤参照杨威硕士学位论文（2016）的方法，采用 PEG- $\text{Ca}^{2+}$ 介导温州蜜柑愈伤（龙剑梅博士馈赠）原生质体转化方法，将目的载体质粒 PM999-*CsSHN3* 与 Mark 蛋白共转入原生质体进行共定位，在激光共聚焦显微镜下（TCS SP2, Leica, Germany）观察荧光并进行拍照；

（3）山金柑遗传转化。山金柑童期较短，转基因植株 16 个月即可获得果实，

是柑橘非常理想的转基因体系。利用农杆菌转化体系对山金柑进行遗传转化，在获得 *CsSHN3* 超表达和抑制表达的阳性芽后，将其从母体切下转移至生根培养基上诱导生根或进行试管嫁接，之后移入温室管理；以转空载体植株（*CsSHN3* 正常表达）作对照。

### 3.2.2 *CsSHN3* 转基因材料表型和相关指标测定

（1）评价转基因材料的耐冷性，参照何义仲等（2014）的方法。分析 *CsSHN3* 超表达和野生型拟南芥，超表达、抑制表达和空载转化获得山金柑植株的耐低温性能（冷害发生率、细胞膜损伤指数、激素、蜡质组分）；

（2）总蜡提取及分析参照 He 等（2018）的方法。用游标卡尺测定果实横纵径，计算果实表面积（ $x$ ），根据  $y=0.7764x+28107$  校正纽荷尔脐橙表面积（ $y$ ）。选取 8 个果实清水洗净，晾干。取 250 mL 的氯仿，加入内标（正二十四烷，5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ）100  $\mu\text{L}$ ，每个果实浸泡 2 min，重复 2 次。收集浸泡液，加入等量的无水硫酸钠，3 层滤纸过滤。用氮气吹干仪在 40℃ 下吹干氯仿后，备用。随后样品衍生化和气相色谱-质谱联（GC-MS）测定条件、物质鉴定均参照 Wang 等（2016）的方法；

（3）果实生物膜稳定性分析参照 Huang 等（2013）和何义仲博士学位论文（2018）的方法，选取 4 个果实取约 1.5 g 汁胞立刻用双蒸水浸泡 15 min。随后倒掉双蒸水，向中加入 15 mL 双蒸水、10% 和 30% PEG 6000 黑暗处理 16 h。将组织中 PEG 溶液过滤后，加入 15 mL 双蒸水立刻测定渗透液电势（ $\text{ECi}$ ）。震荡 4 h 立即测定渗透液电势（ $\text{ECf}$ ），100 °C 煮沸 30 min 测定电势（ $\text{ECt}$ ）；细胞膜损伤指数计算按照  $\text{Id} = (\text{Rs}-\text{Rc}) / (1-\text{Rc}) \times 100\%$ ， $\text{Rs}$  和  $\text{Rc}$  分别代表清水或 PEG 处理  $(\text{ECf}-\text{ECi}) / (\text{ECt}-\text{ECi})$  (Flint et al 1967)，3 次生物学重复。

### 3.2.3 *CsSHN3* 基因的转录调控分析

（1）ChIP-seq 技术寻找与转录因子结合的靶基因。ChIP 是目前唯一能在活体内研究蛋白质与 DNA 互作的方法，能够找到转录因子与基因转录调控区域结合位点。将经过阳性验证的超量基因山金柑，抽提总 DNA；利用 EpiQuik plant ChIP kits 进行 ChIP 反应后，利用 Illumina Genome Analyzer 对目的 DNA 片段进行深度测序；参考柑橘甜橙基因组数据库（<http://citrus.hzau.edu.cn/orange/>），筛选并得到与 *CsSHN3* 结合的下游靶基因；

（2）EMSA（electrophoretic mobility shift）实验参照 Zhu 等（2017）的方

法,对 ChIP-seq 得到候选基因进行原核表达、纯化、探针设计与标记及后续 EMSA 相关实验;

(3) 双荧光素酶报告体系检测转录激活强度。将以上候选基因连接至效应子载体,将目标结合片段(来自 *CsSHN3*)连接至报告载体,转入水稻原生质体中,室温黑暗条件下孵育 15min 后,用 Promega 公司的 Dual-Luciferase Reporter Assay System 测定荧光素酶活力 (fLUC/rLUC)。具体实验步骤参照 Zhu 等 (2017) 的方法。

### 3.3 可行性分析

#### 3.3.1 前期研究依据充分,目标基因功能初步明晰,研究目的明确

申请人前期利用柑橘稀有芽变材料,通过生理生化指标分析,利用转录组数据筛选到影响柑橘果实耐冷性的关键转录因子*CsSHN3*。*CsSHN3*的基因表达量在耐冷性强‘龙回红’果实显著升高,而在耐冷性弱‘赣南1号’果实显著降低;*CsSHN3*基因表达量受低温诱导升高,同时在发育和低温贮藏过程,其与蜡质合成相关基因*CER1*和*CER3*以及低温响应信号通路*CBF1*、*COR15*等基因趋势一致。因此,本研究着重研究转录因子*CsSHN3*在柑橘的生物学功能,并筛选调控靶基因,进而揭示其调控柑橘蜡质来低温响应过程的分子机理,研究目的明确。

#### 3.3.2 研究技术平台成熟完善

申请人所在团队长期从事柑橘生物学研究,建立了成熟的实验技术体系,如基因克隆、Real-time PCR 分析、瞬时表达系统等,为本研究中*CsSHN3*的克隆及基因特征分析提供支撑。团队已建立成熟的原核表达、蛋白纯化、凝胶迁移实验 (EMSA) 和双荧光素酶报告检测转录活性等技术,为研究筛选调控*CsSHN3*的下游靶基因以及互作验证提供技术支撑。代谢物测定方面,本单位承担农业部农业残留和品质检测平台,已经拥有气相色谱-质谱联用仪 (GC-MS)、液相质谱联用仪 (LC-MS) 设备和生理生化指标测定所需的全部仪器,且有专业的技术人员。因此,可以为本项目的顺利完成提供技术保障。

#### 3.3.3 实验室工作条件和人员可确保项目顺利完成

本项目依托的西南大学柑桔研究所、‘国家柑桔工程技术研究中心’、‘国家柑桔品种改良中心’及‘农业部西南果树实验站’具备完成本实验的仪器设备和条件。项目成员可熟练操作GC-MS、LC-MS进行数据分析,测定蜡质、类黄酮和氨基酸等物质;具有良好的分子生物学背景,负责基因克隆、表达分析和

遗传转化；另外，项目参与者长期开展柑橘果实品质生理、生化分析与分子生物学的科研能力，具有丰富的理论知识。项目组成员年龄结构合理，分工明确，可确保本项目的顺利实施。综上所述，本项目科学问题明确，材料稀有且性状突出，拥有前期的工作积累和技术基础，研究思路、拟采用的技术较成熟，工作条件完善。因此，本项目切实可行。

#### 4、本项目的特色与创新之处。

##### 4.1 本研究材料创新、研究有延续性，着眼点新颖

目前柑橘果实耐冷性的机理研究主要集中在生理和生化指标等方面，缺乏分子层面的系统性研究。AP2/EREBP 转录因子家族 *WIN1* 已被报道参与调节果实蜡质的形成，但是甜橙 *WIN* 转录因子是否参与了柑橘果实耐冷性的这一生物学过程，至今未见报道。申请人前期从稀少的柑橘芽变材料出发，对比分析‘赣南1号’、‘龙回红’和其纽荷尔脐橙果实的表型、基因组和转录水平差异，筛选到了候选基因；将上述候选基因在果实发育贮藏、低温诱导处理表达分析模式，与低温响应信号通路 *CBF1* 和 *COR15* 进行共表达分析，筛选到调控柑橘果实候选基因 *CsSHN3*。基于此结果，本项目通过亚细胞定位、遗传转化等工作验证 *CsSHN3* 的生物学功能；通过 CHIP-seq、酵母单杂交、EMSA、双荧光素酶报告检测筛选其下游结构基因。这些结果将在明晰 *CsSHN3* 在调控低温响应、提高柑橘果实耐冷性的机理，寻找新的耐冷途径，以及为柑橘贮藏保鲜研究领域带来新的认识。因此，本研究具有材料创新，研究连贯性和新颖性。

##### 4.2 本研究具有实践应用价值

贮藏保鲜已成为调控果实市场供应和价格的重要手段，但是低温伤害是柑橘贮藏保鲜产业发展的限制因子，‘龙回红’的耐冷性显著升高在生产中具有较大推广价值。大量的研究都从果实诱导耐冷的相关生理生化层面出发，果实低温响应机制的不明确制约了人们对耐冷性的进一步认识、是寻找防治果实采后低温伤害的有效措施的阻碍。寻找不同类型的耐低温的柑橘种质不仅为揭示柑橘果实低温响应提供了生物学基础，为果实耐冷性的分子机理提供珍贵材料。这些研究结果可为制定有效减少柑橘冷害发生措施提供科学依据。因此，在柑橘果实采后商品化处理中具有重要的应用价值。

#### 5、年度研究计划、预期研究结果及成果提供形式。

## 5.1 年度研究计划

本项目执行时间为 2020 年 1 月 1 日-2021 年 12 月 31 日，共 2 年。

### 2020.01-2020.12

（1）*CsSHN3* 全长序列克隆并同源分析，构建其超表达、抑制表达和亚细胞定位载体；

（2）亚细胞定位载体转化温州蜜柑愈伤组织原生质体，在激光共聚焦显微镜下观察荧光并确立亚细胞定位；

（3）*CsSHN3* 受温度梯度诱导表达模式；在低温条件下，*CsSHN3* 基因表达与果面蜡质积累趋势相关性；

（4）完成 *CsSHN3* 超量转入拟南芥植株，低温处理并测定细胞膜完整性和蜡质变化等生理生化指标；

（5）超表达和干涉转化山金柑植株，并进行阳性筛选。

### 2021.01-2021.12

（1）分析超表达和干涉 *CsSHN3* 山金柑植株在低温环境下耐冷性性状，以及 *CsSHN3* 基因表达和蛋白含量，测定蜡质和其他生理指标；

（2）超表达 *CsSHN3* 山金柑的 DNA 提取及 ChIP-Seq 筛选，获得与 *CsSHN3* 结合的 DNA 片段；

（3）EMSA 验证候选靶基因以及测定其转录和蛋白水平表达，明确 *CsSHN3* 的靶基因；

（4）参加本项目相关会议 1 次，与本研究领域国内外专家交流 1-2 次。

（5）总结项目结果，完成总结报告，撰写研究论文。

## 5.2 预期研究结果

（1）揭示甜橙转录因子 *CsSHN3* 的生物学功能并下游的靶基因，以期阐明 *CsSHN3* 调控果实耐冷性的分子机理；

（2）发表 SCI 论文 1-2 篇；培养本科生、研究生各 1 名。

## 二、研究基础与工作条件

### 1、工作基础（与本项目相关的工作积累和已取得的研究工作成绩）

#### 1.1 与本项目相关的工作积累

项目申请人前期开展了柑橘果面蜡质、生物膜及贮藏温度调控柑橘果实贮藏

性能等研究，熟练应用 GC-MS 和 LC-MS 等仪器测定果实蜡质、激素和抗性代谢物，应用多组学手段（转录、代谢和基因组）构建柑橘果实代谢网络。通过分析柑橘贮藏库的环境因子对纽荷尔脐橙果实品质和贮藏性能的影响，揭示了环境温度对果实品质维持重要性，同时掌握了纽荷尔脐橙果实贮藏耐受温度范围和贮藏时间，结果发表于《中国农业科学》。以‘赣南 1 号’为材料，连续多年观察‘赣南 1 号’果实的采后贮藏性状，发现细胞膜组分和抗氧化能力维持果实贮藏品质，该内容发表在《Food Chemistry》。此外，项目申请人揭示了柑橘果面蜡质结构的改变可能诱导补偿机制的建立，提高果实的生物响应，该研究结果发表在《Horticulture Research》，并申请发明专利 1 项。

此外，申请人通过‘赣南 1 号’材料，挖掘蜡质合成相关基因，重点开展甜橙 *CsCER3* 及其互作蛋白参与蜡质烷烃合成并影响果实性能的研究。利用原生质体瞬时转化体系确立 *CsCER3* 和 *CsCER1* 基因定位均内质网（图 1A）；利用膜蛋白酵母双杂交系统和 BiFC 手段验证了 *CsCER3* 和 *CsCER1* 蛋白的互作关系（图 1C，D）；利用吕世友研究员课题组的酵母和拟南芥转化体系验证，初步揭示 *CsCER3* 与 *CsCER1* 共同参与柑橘蜡质醛类和烷烃类合成（图 1B 和 E）。

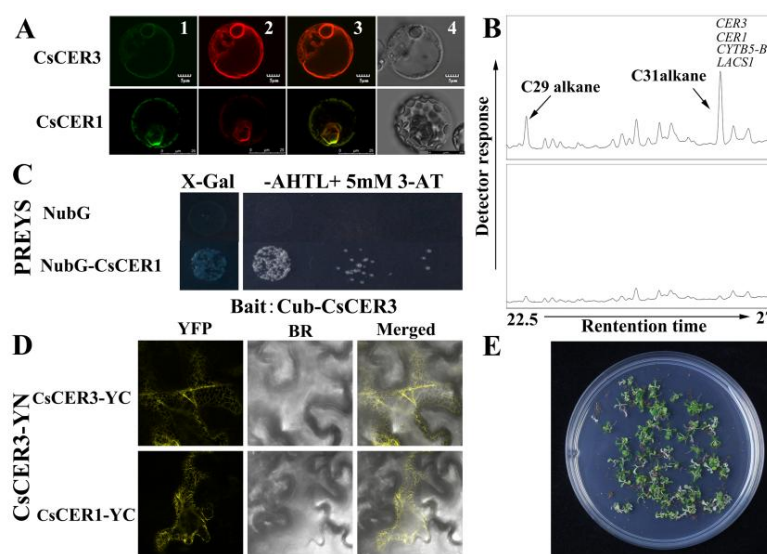


图 1 柑橘果实 *CsCER3* 与 *CsCER1* 功能初步分析（何义仲和杨贤鹏，未发表）。

(A) *CsCER3* 和 *CsCER1-1* (愈伤组织)、*CsCER1-3* (拟南芥叶片) 基因亚细胞定位: (1) 为 GFP::CER3 与 CER1 所发出的绿色荧光; (2) RFP::pBI221 发出红色荧光; (3) 为 1 和 2 的重叠显色图; (4) 为明场图。(B) *CsCER3* 与 *CsCER1* 酵母体系的建立; (C) *CsCER3* 与 *CsCER1* 家族在酵母蛋白互作分析; (D) BiFC 分析 *CsCER3* 与 *CsCER1* 家族: *CsCER3*-YN (YFP-N 端) 与 *CsCER1-1*-YC, *CsCER1-3*-YC 或 YFP-N 端 (YC) 共转入烟草叶片。BR 为明场图; Merged 为 YFP 和 明场的重叠显色图; (E) 转化拟南芥及其阳性鉴定的工作。



更为重要的是，通过以上试验确立了‘赣南 1 号’果实不耐低温贮藏的性状和获得了‘赣南 1 号’和原品种纽荷尔脐橙果实的转录组、代谢组和基因组的基础数据。同时，项目成员在前期发掘了耐冷‘龙回红’芽变材料，分析田间性状和果实品质，研究结果发表在《果树学报》为后续研究提供了重要参考依据。此外，项目申请人在博士在读期间还参加了国家自然科学基金面上项目 2 项。因此，这些知识、技术和经验的积累为本项目研究的开展烷烃在低温响应提供了工作思路和坚实的基础。

## 1.2 本项目已取得的研究基础

### 1.2.1 实验数据和材料基础

项目申请人通过田间和采后贮藏性状发现，‘赣南 1 号’果实易发生低温伤害，同时现课题组发掘的纽荷尔脐橙耐冷性品种‘龙回红’；通过遗传学分析鉴定‘赣南 1 号’和‘龙回红’均是纽荷尔脐橙芽变品种。通过严格低温贮藏（温度 2-5℃，相对湿度 80%-90%）处理，对比分析‘赣南 1 号’、‘龙回红’及其纽荷尔脐橙果实耐冷性指标，确立其表型的准确性。为研究柑橘果实耐冷性机制，提供了珍贵材料和可靠的数据支撑。

### 1.2.2 前期研究基础

#### （1）‘龙回红’和‘赣南 1 号’发掘及遗传鉴定

利用重测序手段分析‘龙回红’、‘赣南 1 号’与原品种纽荷尔脐橙的遗传学背景差异（图 2A）。以甜橙基因组为参考基因组，分析三者基因水平的 Single

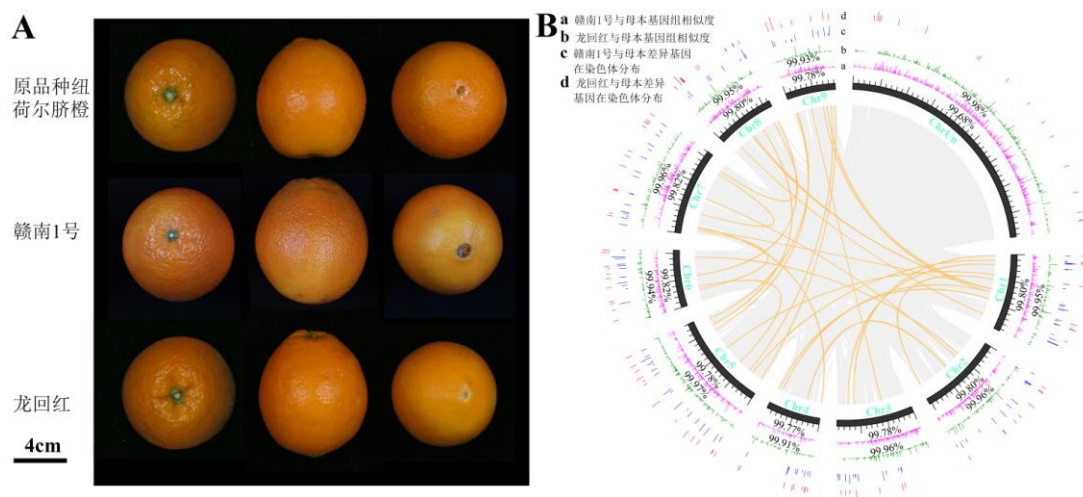


图 2 ‘龙回红’和‘赣南 1 号’果实表型和遗传分析（何义仲，未发表）。

（A）‘赣南 1 号’和‘龙回红’果实与普通纽荷尔果实表型；（B）‘赣南 1 号’和‘龙回红’果实与普通纽荷尔果实的基因水平的相似性。

nucleotide polymorphisms (SNPs) 和 insertions-deletions (InDels) 位点数发现，与原品种纽荷尔脐橙比较，‘龙回红’和‘赣南1号’果实在各染色体的基因变异位点数量和比例相似，在全基因水平上相似度分别为 99.84% 和 99.78%（图 2B），该结果表明两者均来自于纽荷尔脐橙自然芽变株系。

### （2）‘龙回红’和‘赣南1号’果实耐冷性差异表型确立

与原品种纽荷尔脐橙比较，留树‘赣南1号’果实对低温较敏感；‘龙回红’留树果实能够抵御轻度霜冻天气。我们进一步将采摘后果实放置在温度（2-5℃）和相对湿度（80%-90%）贮藏，‘赣南1号’果实贮藏100 d和125 d的冷害发生率分别为10.5%和58.9%，显著高于原品种纽荷尔脐橙（图3 A和B）。为了更好分析‘龙回红’脐橙的耐冷性，用极限温度（0-2℃）和相对湿度（80%-90%）处理果实75d发现，‘龙回红’果实冷害发生率（10.6%）显著低于原品种纽荷尔脐橙果实（32.67%）（图3 C和D）。综上所述，两种柑橘芽变材料遗传背景差异小，果实对低温响应差异大，为研究多年生木本果树柑橘果实的耐冷性分子机制提供重要材料。

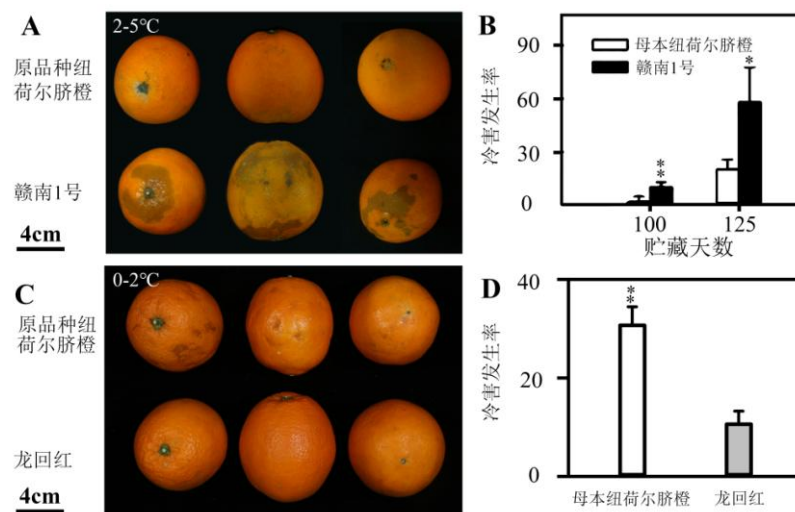


图 3 ‘龙回红’和‘赣南1号’果实低温贮藏的表型（刘润生，2010；何义仲，未发表）。

（A）和（B）‘赣南1号’与原品种纽荷尔果实在 2-5℃贮藏的表型和冷害发生率；（C）和（D）‘龙回红’果实与原品种纽荷尔果实表型和冷害发生率。

### （3）甜橙果实响应低温的关键基因筛选

为了揭示两对材料耐冷性差异的生物学基础，我们对‘赣南1号’、‘龙回红’及其纽荷尔脐橙进行 RNA-seq 数据分析。‘赣南1号’和原品种纽荷尔脐橙果实转录数据已在线发表，存在显著性上调和下调差异基因数分别为 560 和 416；基

于柑橘全基因代谢网结果表明，‘赣南 1 号’果实超长链脂肪酸延伸和蜡质生物合成受阻（He et al., 2018）。‘龙回红’和原品种纽荷尔脐橙果实的转录数据未公开，其中上调和下调基因分别为 53 和 46。我们利用维恩图分析并发现，28 个基因在‘赣南 1 号’与‘龙回红’均显著差异，其中 15 个基因在‘赣南 1 号’与‘龙回红’表达呈相反趋势。参考甜橙基因组注释，在 15 个基因中，有 2 个未知功能基因，剩余 13 个基因都与逆境响应有关，其中 2 个转录因子和 1 个结构基因可能与角质层合成相关（图 4 A）。在此基础上，与原品种纽荷尔脐橙相比，

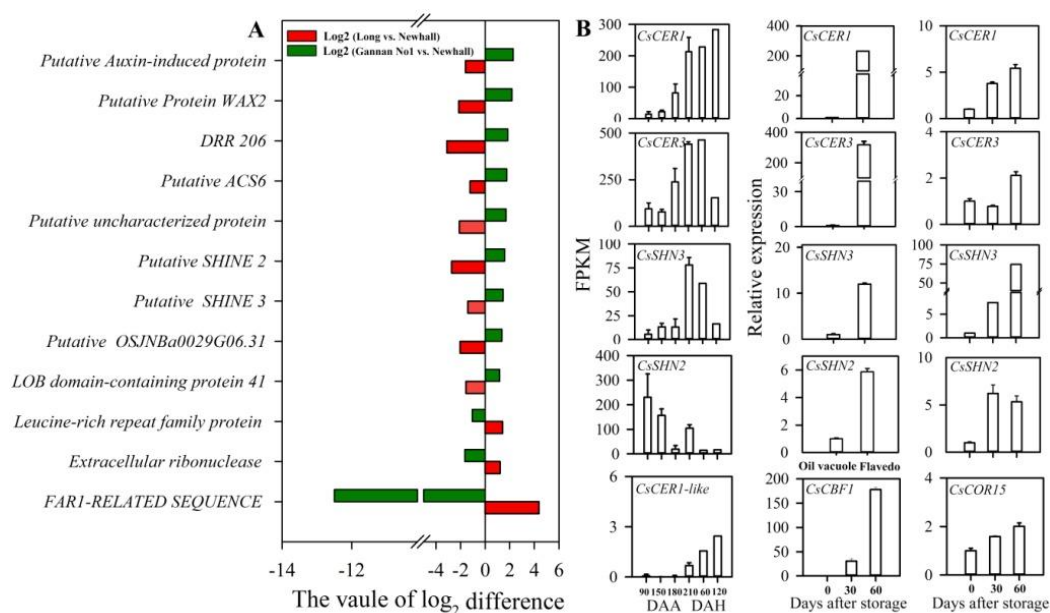


图 4 纽荷尔脐橙果实耐冷相关基因筛选（何义仲，未发表）。

（A）对比分析‘赣南 1 号’和‘龙回红’果实与纽荷尔脐橙转录水平差异的基因；（B）柑橘果实角质膜相关基因在发育期、通风贮藏和低温处理的表达量。植物病害抗性响应蛋白，DRR；花后天数，DAA；采收后天数，DAH。

‘龙回红’烷烃合成相关基因 *CsCER3* 和 *CsCER1-like* 表达量都显著升高，而 *CsFATB*、*CsKCS* 家族、*CsLCAS* 家族的基因表达无显著性差异或略高。以上结果表明，‘赣南 1 号’和‘龙回红’果实耐冷性差异可能与蜡质中烷烃合成相关。

为了进一步筛选到耐冷性差异的关键基因，分别选取发育期、采后贮藏果实以及低温贮藏（温度为 2-5℃，相对湿度为 80%-90%）果实（纵切面厚度为 20μm-30 μm 组织，包含角质层、表皮细胞和薄壁细胞）用于基因表达分析。在发育过程，*CsCER3*、*CsCER1* 家族和 *CsSHN3* 表达量不断上调，另一个候选 AP2/ERF 家族转录因子表达量却逐渐降低；*CsSHN3* 与 *CsCER3*、*CsCER1* 相关系数分别为 0.91 和 0.85（图 4 B）。与油胞的组织相比较，*CsSHN3*、*CsCER3* 和 *CsCER1* 在表皮细胞表达量高 11.5、319.15 和 231.69 倍（图 4 B）。同时在低温贮

藏中, *CsSHN3*、*CsCER1* 和 *CsCER3* 受低温信号显著上调, 其中 *CsSHN3* 与对照相比上调了 80 多倍, 显著高于通风贮藏果实表达量(图 4 B)。*CsSHN3* 与 *CsCBF1* 和 *CsCOR15* 表达趋势一致, 暗示 *CsSHN3* 可能参与果实耐冷性。结合时空特性、低温诱导和同源性分析, 推测 *CsSHN3* 可能调控 *CsCER3* 和 *CsCER1*, 进而在‘赣南 1 号’和‘龙回红’耐冷性差异的起着关键作用。前期芽变材料发掘、组学数据挖掘和相关蜡质工作的开展, 为研究转录因子 *CsSHN3* 在柑橘果实的耐冷性作用提供了技术手段和研究方向。利用遗传转化体系和转录调控等手段揭示 *CsSHN3* 生物学功能, 找到 *CsSHN3* 下游的靶蛋白, 阐明其调控柑橘蜡质合成提高果实耐冷性的分子机制。因此, 该研究内容与我们后期工作紧密的结合, 为后续做好铺垫。

## 2、工作条件 (包括已具备的实验条件, 尚缺少的实验条件和拟解决的途径。)

项目申请人所在课题组依托西南大学柑桔研究所(中国农业科学院柑桔研究所), 拥有国家柑桔品种改良中心和国家柑桔工程技术研究中心等研究平台, 是该实验室的固定研究人员。申请人长期从事柑橘果实生理品质研究, 熟练掌握 GC-MS 检测果实代谢物(蜡质和激素)和大数据处理等生物信息学手段, 挖掘相关基因并功能研究; 应用分子生物学手段如基因亚细胞定位、互作和遗传转化重点研究‘赣南 1 号’与原品种纽荷尔脐橙果实贮藏差异性状。目前, 实验室具有开展相关研究良好的软件和科学氛围, 拥有进行生理、生化分析与分子生物学研究的良好硬件条件。实验室具有不同类型柑橘种质资源和配有温室和人工生长室等相应设备和维护和管理人员。同时, 该实验室配备有 Vc750 超声波细胞破碎仪和液相色谱仪等代谢组学分析仪器; CFX connect 型 Real-Time PCR 仪、Beckman 冷冻高速离心机和 Labconco 超纯水系统等分子生物学仪器。以上软硬条件和人员配置能够满足本项目的研究需要, 也不需要购进大型仪器。申请人硕/博在华中农业大学邓秀新院士所领衔的柑橘课题组进行学习, 该项目符合柑橘课题组的研究方向。因此, 在实施过程中, 华中农业大学柑橘课题组为本项目的实施提供坚强的技术和平台支持。

## 3、申请人简历 (包括申请者和项目组主要成员的学历和研究工作简历, 近期已发表与本项目有关的主要论著目录和获得学术奖励情况及在本项目中承担的任务。)

### 3.1 项目负责人：何义仲简历

#### 3.1.1 教育经历（大学本科开始，按时间倒序排序；攻读学位和阶段导师姓名）：

1.2010/9–2018/7，华中农业大学，果树学，博士研究生学位，导师：程运江

2.2006/9–2010/7，四川农业大学，果树学，学士学位，导师：廖明安

#### 3.1.2 科研与学术工作经历

2018/7-至今，西南大学，柑桔研究所，讲师

#### 3.1.3 主要学术业绩

(1) **Yizhong He\***, Jingwen Han, Runsheng Liu, Yuduan Ding, Jinqiu Wang, Li Sun, Xiaoming Yang, Yunliu Zeng, Weiwei Wen, Juan Xu, Hongming Zhang, Xiang Yan, Zhaoxing Chen, Zuliang Gu, Hong Chen, Huanqing Tang, Xiuxin Deng, Cheng Yunjiang<sup>#</sup>. Integrated transcriptomic and metabolomic analyses of a wax deficient citrus mutant exhibiting jasmonic acid-mediated defense against fungal pathogens, *Horticulture Research*, 2018, 5(1): 43-324. (期刊论文)

(2) **Yizhong He\***, Zhuoran Li\*, Fengquan Tan, Hai Liu, Man Zhu, Hongbin Yang, Guanglin Bi, Haoliang Wan, Jinqiu Wang, Rangwei Xu, Weiwei Wen, Yunliu Zeng, Juan Xu, Wenwu Guo, Shaowu Xue, Yunjiang Cheng<sup>#</sup>, Xiuxin Deng. Fatty acid metabolic flux and lipid peroxidation homeostasis maintain the biomembrane stability to improve citrus fruit storage performance, *Food Chemistry*, 2019, 292, 314-324. (期刊论文)

(3) Jinqiu Wang\*, Li Sun, Li Xie, **Yizhong He**, Tao Luo, Ling Sheng, Yunjiang Cheng<sup>#</sup>. Regulation of cuticle formation during fruit development and ripening in ‘Newhall’ navel orange (*Citrus sinensis* osbeck) revealed by transcriptomic and metabolomics profiling, *Plant Science*, 2016, 243, 131-144. (期刊论文)

(4) 何义仲\*, 陈兆星, 刘润生, 方贻文, 古祖亮, 严翔, 陈红, 张洪铭, 唐焕庆, 程运江<sup>#</sup>, 不同贮藏方式对赣南纽荷尔脐橙果实品质的影响, 中国农业科学, 2014, 47(4): 736-748. (期刊论文)

(5) 王金秋\*, 何义仲, 徐坤洋, 罗怿, 盛玲, 罗焘, 刘欢, 程运江<sup>#</sup>, 三种类型柑橘成熟果实表面蜡质的生物特性分析, 中国农业科学, 2016,



49(10):1936-1945. (期刊论文)

(6) 孙力\*, 丁毓端, **何义仲**, 陈玲玲, 程运江<sup>#</sup>, 果实贮藏寿命生物标记的筛选, 中国农业科学, 2016, 49(4): 1346-1359. (期刊论文)

(7) 程运江, **何义仲**, 毕光林, 朱晨桥, 徐让伟, 一种提高柑橘中天然蜡质的方法及其应用, 中国, 201810842582.6. (发明专利)

(8) 程运江, 张立, 孙晓华, **何义仲**, 邓秀新, 一种水果保鲜果蜡配方及制备方法和应用, 中国, ZL 2012 1 0580857.6. (发明专利)

(9) 程运江, 孙力, **何义仲**, 丁毓端, 一种与柑橘果实贮藏寿命相关的分子标记引物及应用, 中国, ZL 2015 1 0185393.2. (发明专利)

### 3.2 主要学术骨干, 凌丽俐简历

#### 3.2.1 教育经历（大学本科开始, 按时间倒序排序; 攻读学位和阶段导师姓名）

(1) 2004.9-2007.6, 四川大学, 植物学, 博士, 导师: 林宏辉

(2) 2000.9-2003.6, 四川大学, 植物学, 硕士, 导师: 付华龙

(3) 1996.9-2000.6, 四川大学, 生态学, 学士, 导师: 廖爱民

#### 3.2.2 科研与学术工作经历

2007.7-至今, 西南大学柑桔研究所, 栽培与生理研究室, 副研究员

#### 3.2.3 主要学术业绩

(1) Tao Han\*, Vitaliy Vaganov, Shixiu Cao, Qiang Li, **Lili Ling**<sup>#</sup>, Xiaoyao Cheng, Lingling Peng, Congzhi Zhang, Alexey, N Yakovlev, Yang Zhong, Mingjing Tu. Improving "color rendering" of LED lighting for the growth of lettuce, *Scientific Reports*, 2017, 7(1):45940-45944.

(2) Xingzheng Fu\*, Xue Zhou, Fei Xing, **Lili Ling**, Li Cao, Changpin Chun, Mark G M Aarts, Liangzhi Peng<sup>#</sup>, Genome-wide identification, cloning and functional analysis of the Zinc/iron-regulated transporter-like protein (ZIP) gene family in trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.) , *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 580-588.

(3) Xingzheng Fu\*, Yahua Tong \*, Xue Zhou, **Lili Ling**, Changpin Chun, Li Cao, Ming Zeng, Liangzhi Peng<sup>#</sup>, Genome-wide identification of sweet orange (*Citrus sinensis*) metal tolerance proteins and analysis of their expression patterns under zinc, manganese, copper, and cadmium toxicity, *Gene*, 2017, 629: 1-8.



(4) Xingzheng Fu\*, Fei Xing, Li Cao, Changpin Chun, **Lili Ling**, Cailun Jiang, Liangzhi Peng<sup>#</sup>, Effects of foliar application of various zinc fertilizers with organosilicone on correcting citrus zinc deficiency, *Hortscience*, 2016, 51(4): 422-426.

(5) 易晓瞳\*, 张超博, 李有芳, 彭良志, 陈东奎, 邓崇岭, 付行政, 淳长品, 陈香玲, 刘升球, 陈传武, 李果果, 黄其椿, **凌丽俐**<sup>#</sup>. 广西产区柑桔叶片大中量元素营养丰缺状况研究. 果树学报, 2019, 36(2), 153-162. (期刊论文)

(6) 李思静\*, 易晓瞳, 李有芳, 王君秀, **凌丽俐**<sup>#</sup>, 彭良志. 不同LED光质对枳壳幼苗生长发育的影响, 光谱学与光谱分析, 2018, 38(3): 708-714. (期刊论文)

(7) **凌丽俐**\*, 黄翼, 彭良志<sup>#</sup>, 吴玉婷, 江才伦, 曹立, 淳长品, 镁缺乏和过量胁迫对纽荷尔脐橙叶绿素荧光特性的影响, 生态学报, 2014, 1 (07): 1672-1680

(8) **凌丽俐**\*, 彭良志<sup>#</sup>, 淳长品, 曹立, 江才伦, 雷霆, 赣南纽荷尔脐橙叶片黄化与营养元素丰缺的相关性, 中国农业科学, 2010, 8 (17): 3602-3607

(9) **凌丽俐**, 彭良志, 淳长品, **曹立**, 江才伦, 付行政, 一种用于缺镁诱导纽荷尔脐橙叶脉爆裂的方法, 2018. 10. 26, 中国, ZL201510681686. X (发明专利)

(10) 淳长品, 彭良志, 曹立, **凌丽俐**, 江才伦, 付行政, 一种红壤区脐橙专用肥及其精准变量施肥方法, 2015. 12. 23, 中国, ZL201310460799. 8 (发明专利)

(11) 付行政, 彭良志, 曹立, **凌丽俐**, 淳长品, 江才伦, 一种柑橘叶面锌肥及其制备方法和使用方法, 2015. 05. 20, 中国, ZL201310124991. X (发明专利)

(12) **凌丽俐** (6/11), 晚熟柑橘落果枯水的形成机制及综合防控技术创新与产业化应用, 重庆市人民政府, 科技进步奖, 省部一等奖, 2018. 7

(13) **凌丽俐** (9/9), 柑橘营养失衡机制及矫治技术创新与应用, 重庆市人民政府, 科技进步奖, 省部二等奖, 2015. 6

#### 4、承担科研项目情况 (申请者和项目组主要成员正在承担的科研项目情况, 要注明项目的名称和编号、经费来源、起止年月、负责的内容等。)

(1) 国家自然科学基金面上项目, 31772261, 纽荷尔脐橙突变体‘赣南 1 号’果实表面脂质组和 CsHD-ZIP 转录因子功能分析, 2018.01-2021.12, 65 万元,

在研，参与；

（2）国家自然科学基金面上项目，31572176，GABA 支路调控采后柑橘果实有机酸代谢的机理，2016.01-2019.12，70 万元，在研，参与；

（3）国家自然科学基金面上项目，20873999，基于 *PtIRT1* 基因被转录调控的机制解析枳易缺锌缺铁的原因，2018.01-2021.12，60 万元，在研，参与；

（4）国家重点研发计划课题，2017YFD0202006，西南柑橘化肥农药减施增效技术集成研究与示范，2017/07-2020/12，942 万元，在研，参与；

（5）重庆市社会民生科技创新专项，cstc2016shmszx80004，重庆三峡库区坡地柑橘园氮磷肥减施增效技术研究与示范，2016/06-2019/06，20 万元，已结题，主持；

（6）国家自然科学基金青年项目，31301742，柑橘缺锌响应基因的挖掘及其在缺锌诊断上的应用研究，2014/01-2016/12，25 万元，已结题，参与；

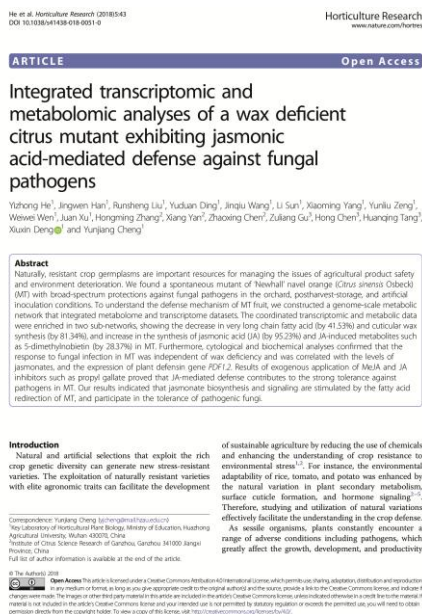
（7）国家自然科学基金青年项目，31201587，缺镁组荷尔脐橙叶脉肿胀的发生机制，2013/01-2015/12，23 万元，已结题，主持。

### 三、经费预算说明（要求对经费的特殊使用情况进行详尽说明，没有则不填）

无

### 四、其他附件清单（附件材料复印后随纸质《申请书》一并上交）

#### 1) 项目申请人已发表论文





中华人民共和国国家知识产权局

专利局

专利局

证书号第 1253167 号

发明专利证书

发明名称：一种水果保鲜剂配制方法及制备方法和应用

发明人：程运江; 张立; 孙晓华; 何文祥; 李秀莲

专利号：ZL 2012 1 0580857.6

专利申请日：2012 年 12 月 27 日

专利权人：华中农业大学

授权公告日：2013 年 10 月 30 日

本说明经过本局依照中华人民共和国专利法进行审查，决定授予专利权，颁发本证书并在专利登记簿上予以登记，专利权自授权公告之日起生效。

本专利的专利权期限为二十年，自申请日起算。专利权人应当依照专利法及其实施细则规定缴纳年费。本专利的年费应当在每年 12 月 27 日前缴纳。未按规定缴纳年费的，专利权自应当缴纳年费期满之日起终止。

专利证书记载专利权登记的法律状况，专利权的转移、质押、无效、终止、恢复和专利权的姓名或名称、国籍、地址变更等事项记载在专利登记簿上。

局长 田力普

2013年10月30日

第 1 页 (共 2 页)

(19) 中华人民共和国国家知识产权局

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 107006514 A

(43) 申请公布日 2017.08.04

(21) 申请号 2017.0306645.1

A102 7/06(2006.01)

(22) 申请日 2017.05.04

(71) 申请人 华中农业大学

地址 430000 湖北省武汉市洪山区狮子山街1号

(72) 发明人 程远江 许让伟 廖勤 曾云流  
邓秀新 万浩流 张明飞 何义仲

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569

代理人 王加贵

(51) Int. Cl.

A01N 57/20(2006.01)

A01N 37/42(2006.01)

A01N 43/16(2006.01)

A01P 3/00(2006.01)

A01D 13/00(2006.01)

权利要求书11页 说明书14页 附图12页

(54) 发明名称

一种防治柑橘溃疡病的组合物及其方法

(57) 摘要

本发明提供了一种防治柑橘溃疡病实现的组合物,包括以下组分:50~300毫克/升乙稀利,5~40毫克/升脱落酸,1~5克/升低分子单糖,本发明通过乙稀利结合ABA和低分子单糖组合配方降低柑橘果实溃疡病的发病率,效果明显,本发明首次将上述试剂组合应用于柑橘溃疡病的防治处理中,有效提高植株应用后对柑橘溃疡病的防治效果,本发明在应用前需,因此,本发明用乙稀利、脱落酸、低分子单糖药物组合物配方降低柑橘果实溃疡病的方法,值得推广。

处理组	对照 (%)	ABA (%)	乙稀利 (%)	低糖 (%)
对照	100	100	100	100
ABA	~85	~85	~85	~85
乙稀利	~85	~85	~85	~85
低糖	~85	~85	~85	~85
乙稀利+ABA	~85	~85	~85	~85
乙稀利+低糖	~85	~85	~85	~85
乙稀利+ABA+低糖	~85	~85	~85	~85
乙稀利+ABA+低糖+低糖	~85	~85	~85	~85

对照 乙稀利 ABA 低糖

CN 107006514 A



**申请者承诺：**

我已认真阅读有关规定。我保证任务书内容的真实性，并承诺切实履行项目负责人职责，严格遵守有关规定，认真开展工作，按时报送有关材料并提交不低于规定验收标准的研究成果。若填报失实和违反规定，本人将承担全部责任。

签字：何仲

日期：2019.9.20

**学院（所、中心）审查意见：**

已按有关规定对申请人资格和任务书内容进行了审核。我单位保证对研究实施所需的人力、物力和工作时间等条件给予保障，督促项目负责人认真开展研究工作，及时报送有关材料。

负责人（签字）：何仲

单位公章

日期：2019.9.20

**人事处审查意见：**

同意申请，资助金额拾万元整。

经办人：杨毅

负责人（签字）：杨毅

日期：2019.9.23

**科技处审查意见：**

负责人（签字）：黄承志

日期：