

• 综 述 •

## 红树植物秋茄分子生物学研究进展

杜照奎<sup>1,2,3</sup>, 陈河<sup>4</sup>, 李钧敏<sup>1,2,3</sup>

- 1 浙江省植物进化生态学与保护重点实验室, 浙江 台州 318000
- 2 台州学院生态研究所, 浙江 台州 318000
- 3 台州学院 生命科学学院, 浙江 台州 318000
- 4 海南东寨港国家级自然保护区管理局, 海南 海口 571129

杜照奎, 陈河, 李钧敏. 红树植物秋茄分子生物学研究进展. 生物工程学报, 2017, 33(2): 196–204.

Du ZK, Chen H, Li JM. Advances in molecular biological studies of the mangrove *Kandelia obovata* Sheue, Liu & Yong. Chin J Biotech, Chin J Biotech, 2017, 33(2): 196–204.

**摘 要:** 秋茄 *Kandelia obovata* Sheue, Liu & Yong 是分布于热带、亚热带海岸带与河口潮间带的常绿红树植物, 在海岸生态系统中具有重要的功能和价值。文中综述了近年来国内外关于秋茄分子生物学方面的研究进展, 主要包括基于分子标记的秋茄亲缘地理关系与遗传多样性研究, 基于双向电泳技术的蛋白质组学研究, 以及逆境胁迫响应基因的克隆与功能验证研究; 最后还结合当前研究现状展望了秋茄分子生物学未来研究工作的方向。

**关键词:** 秋茄, 分子标记, 盐胁迫, 蛋白质组, 基因克隆

**Received:** July 18, 2016; **Accepted:** November 14, 2016

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 31270461), Opening Project of Zhejiang Provincial Key Laboratory of Plant Evolutionary Ecology and Conservation (No. EEC2014-05), Project of Taizhou Science and Technology Bureau (No. 1403KY03).

**Corresponding author:** Junmin Li. Tel: +86-576-85137178; E-mail: lijm@tzc.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31270461), 浙江省植物进化生态学与保护重点实验室开放课题 (No. EEC2014-05), 台州市科技局项目 (No. 1403KY03) 资助。

网络出版时间: 2016-12-01

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20161201.1617.001.html>

# Advances in molecular biological studies of the mangrove *Kandelia obovata* Sheue, Liu & Yong

Zhaokui Du<sup>1,2,3</sup>, He Chen<sup>4</sup>, and Junmin Li<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Zhejiang Provincial Key Laboratory of Plant Evolutionary Ecology and Conservation, Taizhou 318000, Zhejiang, China

<sup>2</sup> Institute of Ecology, Taizhou University, Taizhou 318000, Zhejiang, China

<sup>3</sup> School of Life Sciences, Taizhou University, Taizhou 318000, Zhejiang, China

<sup>4</sup> Administration Bureau of Dongzhai Harbor National Nature Reserve, Haikou 571129, Hainan, China

**Abstract:** *Kandelia obovata* Sheue, Liu & Yong, a mangrove species which distributed in tropical, subtropical coastal and estuarine intertidal, has important ecological functions in coastal ecosystems. Here, we reviewed several aspects of the recent research progress in molecular biological studies of *K. obovata*. We focused the phylogeography and genetic diversity of this species by several types of molecular markers, proteome analyses based on two-dimensional electrophoresis platform accomplished for this species, and functional genes isolated under non-biotic stress environment. Finally, based on the current research progress, we proposed some orientations for future molecular biological research on *K. obovata*.

**Keywords:** *Kandelia obovata*, molecular marker, salt stress, proteome, gene cloning

红树植物是分布于热带、亚热带海岸带与河口潮间带的常绿灌木或乔木，当其树干被砍断或者树皮被擦伤后，体内富含的单宁酸等酚类物质被氧化，呈现红色，故称红树<sup>[1]</sup>。秋茄隶属红树科 (Rhizophoraceae) 秋茄属 (*Kandelia*) 红树植物，常绿灌木或小乔木；侧枝的气生根向下生成支柱根，叶片长椭圆形，交互对生，中脉明显；花白色，具短梗，2–5 朵排列成二歧聚伞花序；果卵形，萼裂片宿存；胎生。Sheue 等<sup>[2]</sup>根据叶、叶脉、萼片、花粉和胚轴等形态特征将其划分为 2 个不同的品种，即秋茄 *Kandelia obovata* 和秋茄 *K. candel*。

大多数红树对低温敏感，降温、不定期的寒冷或霜冻对其生长和分布有着重要影响，而秋茄是红树植物中抗寒能力最强的树种<sup>[3]</sup>。作为独特的海岸生态系统，红树林在防风减灾、促淤保滩、固岸护堤和净化海水等方面具有重要

的生态功能和价值<sup>[4]</sup>。近年来，秋茄由于其生态幅广<sup>[3,5]</sup>、耐盐<sup>[6-7]</sup>、耐寒<sup>[8-9]</sup>、富集重金属<sup>[10-11]</sup>和降解有机物<sup>[12-13]</sup>等优良特性，吸引着越来越多研究者的关注。国内外学者已对秋茄开展了大量研究，但主要集中在生理学和生态学等领域。

随着分子生物学的迅猛发展，简单重复序列 (Simple sequence repeat, SSR)、随机扩增多态性 DNA (Random amplification polymorphic DNA, RAPD)、简单重复序列区间 (Inter-simple sequence repeat, ISSR)、抑制性消减杂交 (Suppression subtractive hybridization, SSH)、cDNA 末端快速克隆技术 (Rapid-amplification of cDNA ends, RACE) 和蛋白质组学 (Proteomics) 等分子生物学技术逐步运用到秋茄的研究中，并取得了丰富的研究成果，不仅可为秋茄资源保护策略的制定提供依据，还可为阐明秋茄逆境胁迫耐受的分子机理奠定基

础。文中综述了近年来国内外有关秋茄亲缘地理关系与遗传多样性分析、蛋白质组学和功能基因发掘等方面的研究进展,并对该物种未来分子生物学研究的方向进行了展望。

## 1 亲缘地理关系与遗传多样性

Chiang 等<sup>[14]</sup>基于叶绿体和线粒体 DNA 序列分析了东亚秋茄种群间的亲缘地理关系,发现叶绿体 DNA (cpDNA) *atpB-rbcL* 基因间隔区、*trnL-trnF* 基因间隔区和线粒体 DNA (mtDNA) 内转录间隔区 (ITS) 序列一致表明不同种群来源的秋茄聚为两类,其中泰国 Ranong 种群与马来西亚 Bako 种群聚在一起;而中国钦州、北海、湛江、海口和厦门等地的种群聚在一起,这与 Sheue 等<sup>[2]</sup>研究结果相吻合。从系统发育分析结果来看,Ranong 种群与 Bako 种群相关性高,且与中国种群没有检测到相关性,表明 Bako 种群可能起源于印度洋沿岸。

此外,采用其他分子标记的方法研究秋茄种群的遗传多样性也有较多文献报道。Chen 等<sup>[15]</sup>采用 ISSR 技术分析中国东南沿海 7 个秋茄种群的遗传多样性,结果显示种群间的遗传分化系数 ( $G_{ST}$ ) 为 0.5548,即 55.48% 的变异存在于种群间,44.52% 的变异存在于种群内,这表明 *K. obovata* 种群间的遗传分化程度相对较高;且种群遗传多样性基本上呈现出南方种群高于北方的态势。阮宇等<sup>[16]</sup>通过 SSR 分子标记方法检测了中国东南沿海北部(福鼎和宁德)与南部(漳州和深圳)秋茄种群的遗传多样性,遗传多样性指数  $He$  值分别为  $0.648 \pm 0.054$  和  $0.811 \pm 0.036$ ,结果同样表明大陆东南沿海南方种群的遗传多样性高于北方。

在全新世的地层中,长江三角洲多处发现

了红树植物的花粉<sup>[17]</sup>,表明在全新世时期,温暖的气候促使海平面上升,我国长江三角洲大部分地区被海水淹没,红树林可能自然分布至浙江省杭州湾和江苏省太湖地区。

有研究表明,大陆东南沿海南部地区可能是亚洲红树植物分布地区的多样性中心之一<sup>[18]</sup>。向北流动的黑潮及其分支洋流可能是秋茄种群扩散的助力<sup>[17]</sup>,秋茄繁殖体在它们的推动下从东南沿澎湖海底峡谷向北扩散至杭州湾和长江三角洲。

而在气候寒冷的冰期,南方地区成为秋茄的避难所,其自然分布可能会缩至福建北部。秋茄北向拓殖的过程中,会经历空间奠基者效应和种群瓶颈效应,因而,种群中某些基因常常会在拓殖过程中丢失,这可能是北部种群的遗传多样性比南方避难所种群要低的原因之一。

## 2 蛋白质组学

近年来,秋茄蛋白质组学研究进展较快,促进了人们从分子层面认识秋茄防御逆境胁迫的机理。

重金属镉 (Cd) 通过岩石风化和人类活动进入水体,是对植物有毒的主要环境污染物之一,秋茄分布于河口和海湾,其生长与生存可能遭受着 Cd 胁迫。Weng 等<sup>[19]</sup>分析了 Cd 胁迫下秋茄根的蛋白质组变化,结果表明短期 Cd 处理下,共有 53 个蛋白质表达上调或下调。约一半的上调蛋白参与氧化还原反应,包括抗氧化酶类、谷胱甘肽合成所需酶类、三羧酸循环所需酶类,以及用于产生 ATP、NADH 和 NADPH 的磷酸戊糖途径所需酶类。这些结果表明提高抗氧化反应是秋茄应对 Cd 导致的氧化胁迫的重要方式。

温度是影响红树林分布范围的主要限制因素,高纬度地区由于低温严重影响红树的成活与生长。为在分子水平上深入研究秋茄幼苗的低温应答机制,马小伟<sup>[20]</sup>对一年生秋茄幼苗在 4 °C 低温条件下进行了 48、96 和 144 h 不同时间的胁迫处理,利用蛋白质组学技术探讨北移红树植物秋茄幼苗对低温的适应机理。结果表明,与光合作用、信号转导相关蛋白和防卫蛋白等均表现为上调,而与糖异生、能量与物质代谢相关蛋白表达量随低温胁迫时间延长下调。

盐胁迫是一个重要的非生物胁迫因子,在世界的许多地区限制着植物的成活与生长。秋茄由于其耐盐性被视为生态适应性的模式木本植物<sup>[21]</sup>,较多的研究关注秋茄耐受盐胁迫的机理。Wang 等<sup>[22]</sup>将四叶龄秋茄苗于 150 (对照)、300、450 和 600 mmol/L 氯化钠中培养 3 d,从秋茄幼苗的叶中提取总蛋白,双向电泳检测到超过 900 个蛋白质点,表达丰度的差异两倍以上蛋白质点 53 个,其中 48 个由 MALDI-TOF-TOF/MS 技术所鉴定。结果表明,秋茄可以通过上调涉及光合作用、呼吸和能量代谢,Na<sup>+</sup>区隔化、蛋白质折叠与包装和信号转导的蛋白质,从而可以耐受浓度高达 450 mmol/L 氯化钠胁迫。

叶绿体是绿色植物通过光合作用把光能转化成化学能的重要场所,通过光反应和暗反应两个阶段的酶促反应发生作用。当受到盐胁迫时,蛋白的结构和功能遭到破坏,导致叶绿体能量吸收和传递的能力降低。因此,为了适应高盐环境,光合作用机构必须有效地发挥作用,基于这种思路,研究者们通过固定盐胁迫时间或盐胁迫浓度两种方式考察秋茄光合作用的

适应机制。四叶全展秋茄苗在 0 (对照)、200、400 和 600 mmol/L NaCl 中处理 3 d 后,叶绿体蛋白质组学分析结果显示:在 400 和 600 mmol/L NaCl 胁迫下,秋茄通过上调表达组分蛋白来维持光反应水平;暗反应在 400 mmol/L NaCl 下维持不变,但在 600 mmol/L NaCl 时下降,表明暗反应更容易受到高浓度盐胁迫的伤害<sup>[21]</sup>。

而四叶全展秋茄苗于 500 mmol/L 氯化钠中处理 0 (对照)、3 和 6 d 后,Wang 等<sup>[23]</sup>发现秋茄可耐受 500 mmol/L 氯化钠胁迫时间为 3 d,叶绿体蛋白质组学分析结果表明:其主要通过维持正常或高效光合电子传递效率和尽量减少对卡尔文循环系统的破坏得以实现;同时,叶绿体中活性氧清除、氮同化、蛋白质降解和分子伴侣功能也是秋茄耐盐的重要原因。总之,盐胁迫下叶绿体蛋白质组学研究提供了秋茄响应盐胁迫光合作用适应性机制的重要信息,这些发现有助于对木本盐生植物盐适应机理的理解。

### 3 功能基因研究

#### 3.1 与盐胁迫相关的基因

对盐胁迫下生长的红树基因表达模式的识别将有助于揭示其耐盐的分子机制。Huang 等<sup>[24]</sup>通过代表性差异分析方法 (Representational difference analysis, RDA) 从不同浓度 NaCl 处理过的秋茄中分离出 10 条差异 cDNA。盐胁迫条件下,下调表达的 5 个基因中,2 个编码亲环素 (Cyclophilin),另外 3 个分别编码液泡膜内在蛋白 (Tonoplast intrinsic proteins, TIP)、早期光诱导蛋白和 60S 核糖体蛋白。秋茄亲环素基因 (*KcCYPI*, GenBank 登录号: AY150052) cDNA 全长约为 0.9 kb,含有一个 519 个核苷酸的完整开放阅读框 (Open reading frame, ORF),

编码 172 个氨基酸, 等电点为 8.57, 分子量 18.2 kDa。42–49 位氨基酸残基为推测的 ATP/GTP 结合位点 A 基序 (P-loop), 48–54 位氨基酸残基是插入的 7 个氨基酸残基。Northern 分析表明: 高盐抑制 *KcCYP1* 基因的表达<sup>[25]</sup>。

秋茄液泡膜内在蛋白 (TIP) 基因 (GenBank 登录号: AF521135) cDNA 全长为 1 099 bp, 含有一个 759 bp 的 ORF, 编码 252 个氨基酸, 等电点为 5.77, 分子量为 26.3 kDa。该氨基酸序列含有 6 个跨膜区和 2 个高度保守的 Asparagine-Proline-Alanine (NPA) 基序。Northern 分析表明高盐抑制该基因在红树 3 个种中的表达, 这种下调表达可能降低液泡膜水分渗透, 有利于盐胁迫下细胞的保水<sup>[26]</sup>。将秋茄液泡膜水通道蛋白 *KcTIP1* 基因转化烟草后, 阳性植株在盐胁迫下的根、茎、叶鲜质量, 叶片净光合速率, 叶片组织  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  积累和根尖  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  内流幅度均高于野生型烟草。表明 *KcTIP1* 具有与其他水通道蛋白类似的蛋白结构和酶学功能, *KcTIP1* 基因过表达可以提高转基因烟草的抗盐能力<sup>[27]</sup>。

脱水应答蛋白基因 (Responsive to desiccation 22, *RD22*) 是非常重要的植物抗逆性基因。秋茄 *KcRD22* 基因的 ORF 长 1 128 bp, 编码 1 个等电点为 9.07、分子量为 39.8 kDa、由 375 个氨基酸组成的蛋白。100 mmol/L NaCl 处理显著降低了野生型烟草的净光合速率, 但对 *RD22* 阳性转基因植株叶片的光合作用的影响较小。盐浓度达到 200 mmol/L 时, 转基因植株及野生型烟草净光合速率都明显降低; 但盐胁迫解除后, 转基因烟草光合作用的恢复情况明显好于野生型烟草, 说明 *KcRD22* 的过表达提高了烟草的抗盐性<sup>[28]</sup>。

基因转录调节是植物对非生物胁迫适应机制的一个重要方面, 转录调节因子在胁迫信号转导途径中调节下游基因的表达, 在建立植物对胁迫适应性过程中起到重要作用。乙烯应答因子 (Ethylene-responsive factors, ERF) 是植物特有的一类转录因子, 在植物的逆境胁迫应答中起着重要的调控作用。秋茄 *KcERF* (GenBank 登录号 GU593721) 完整 ORF 共 873 bp, 编码 290 个氨基酸, 有一个典型的 AP2 结构域。*KcERF* 亚细胞定位在细胞核中, 其编码蛋白在酵母中有转录激活活性。此外, 过表达 *KcERF* 基因烟草受到高盐胁迫后的株高和叶面积、含水量、MDA 含量、可溶性糖含量和电导率均表现出对盐的耐受作用, 暗示可以为转基因耐盐棉花和牧草的培育提供新的基因来源<sup>[29]</sup>。

锌指蛋白是功能多样的转录调节因子蛋白家族, 家族成员在植物响应非生物胁迫方面具有重要作用。在烟草中过表达秋茄  $\text{C}_2\text{H}_2$  型锌指蛋白编码基因 *KcZFP*, 结果显示转基因株系的耐盐性明显提高, 其净光合速率受盐胁迫的影响小于野生型植株, 光合系统在一定程度上得到了保护, 且脯氨酸水平远高于野生型植株。研究结果说明 *KcZFP* 作为转录调节因子参与了植物的渗透调节, 对植物的耐盐性具有重要作用<sup>[30]</sup>。

$\text{Na}^+$  在植物叶片中的累积会提高  $\text{H}_2\text{O}_2$  的水平, 从而对植物造成伤害。亚细胞定位分析揭示, 秋茄 Cu/Zn SOD 编码基因 (*KcCSD*) 位于叶绿体中。转基因烟草结果表明, *KcCSD* 过表达株系比野生型耐受  $\text{Na}^+$  的能力更强<sup>[31]</sup>。100 mmol/L NaCl 处理显著降低野生型烟草叶绿素含量、最大叶绿素荧光, 以及光系统 II 的光化学效率, 叶绿体中产生大量的  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 而转

*KcCSD* 基因烟草从 24 h 到第 7 天, SOD 活性持续增加, 过氧化氢酶 (CAT) 酶活性也增加了, 表明转 *KcCSD* 烟草则可通过上调抗氧化酶的表达减少  $\text{Na}^+$  对叶绿体的伤害。

硫氧还蛋白 (Trxs) 是一类小分子蛋白, 具有保守功能区域 (WCXPC), 可以通过半胱氨酸 (Cys) 的二硫键的形成以及断裂, 从而具有氧化还原的作用。研究表明, 过表达 *KcTrxf* 的转基因烟草耐盐性增强, 其原因是一方面通过提高 CAT 以及抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 的活性来清除  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 另一方面通过调节抗坏血酸-谷胱甘肽 (AsA-GSH) 循环中的关键酶单脱氧抗坏血酸还原酶 (MDAR) 以及谷胱甘肽还原酶 (GR) 的活性来增加还原型谷胱甘肽水平; 同时, 还增加了叶片中非蛋白巯基的含量, 进而清除活性氧, 减少盐害引起氧化胁迫<sup>[32]</sup>。

### 3.2 与代谢相关的基因

三萜类化合物 (Triterpenoids) 是一类重要的植物次生代谢产物, 广泛分布于植物界中, 有抗菌和抗虫害等作用。三萜类化合物由 2,3-氧化鲨烯经环氧角鲨烯环化酶 (Oxidosqualene cyclases, OSCs) 催化后环化形成。Basyuni 等<sup>[33]</sup> 根据已知 OSCs 中的保守序列设计简并引物, 从秋茄的幼根中克隆得到多功能三萜合酶基因 (*KcMS*)。 *KcMS* 的 ORF 由 2 286 bp 构成, 编码 761 个氨基酸。将 *KcMS* 构建在表达载体 pYES2 中, 转化羊毛甾醇合酶缺陷型酵母, GC-MS 分析表明, 转化子积累羽扇豆醇、 $\beta$ -香树脂醇和  $\alpha$ -香树脂醇的混合物 (2 : 1 : 1), 这表明 *KcMS* 具有编码多种三萜类化合物的功能。

植物甾醇也是由 2,3-氧化鲨烯环在环阿屯醇合成酶 (Cycloartenol synthase, CAS) 催化下转变而来的。Basyuni 等<sup>[34]</sup> 通过 RACE 技术克隆

得到秋茄 CAS 基因 (*KcCAS*), 结果显示 *KcCAS* 基因 ORF 包含 2 277 bp, 编码 758 个氨基酸, 与百脉根 *Lotus japonicus* 同源性高达 82%。将该基因转入羊毛固醇合酶 (Lanosterol synthase) 缺陷性酿酒酵母菌株 GIL77 中, GC-MS 分析转基因酵母中累积环阿屯醇, 表明 *KcCAS* 具有环阿屯醇合成酶的活性。

将秋茄置于 0.5%、1%、1.5%、2% 和 3% 的人工海水中培养, 其根和叶中三萜类化合物的含量随着盐度升高均显著增加, 同时定量 PCR 结果显示: *KcMS* 基因的表达也与盐度显著正相关; 而甾醇类物质则与盐度没有明显的线性关系, *KcCAS* 基因的表达也不受盐浓度的调控。表明有助于秋茄对盐度适应的物质是三萜化合物而不是甾醇类物质<sup>[35]</sup>。

### 3.3 与重金属胁迫相关的基因

金属硫蛋白 (Metallothionein) 是一类低分子量、富含半胱氨酸的蛋白质, 它们通过半胱氨酸残基上的巯基与重金属结合形成无毒或低毒的络合物。Zhang 等<sup>[36]</sup> 通过 RACE 技术从秋茄中克隆到一个 II 型金属硫蛋白基因 *KMT*, 其 ORF 包含 240 bp, 编码 79 个氨基酸, 中间有 Cys-Cys、Cys-X-Cys 和 Cys-X-X-Cys 结构。将 *KMT* 基因转入蛋白酶缺陷型的大肠杆菌菌株 BL21 (DE3) 后, 重组菌能在 1 000  $\mu\text{mol/L}$  的 Zn、120  $\mu\text{mol/L}$  的 Hg 和 2 000  $\mu\text{mol/L}$  的 Cd 环境中生长, 这些结果暗示着秋茄可能通过 *KMT* 基因编码产物吸附重金属, 从而减轻海洋环境中的重金属污染。

### 3.4 与低温胁迫相关的基因

低温是严重限制红树生产力和分布的主要非生物胁迫因素, 而红树林耐受低温的分子机制仍然知之甚少。对低温胁迫基因的功能分析

将有利于理解红树植物低温适应的分子机理。Fei 等<sup>[37]</sup>通过抑制性消减杂交 (Suppression subtractive hybridization, SSH) 技术确定秋茄冷胁迫相关的潜在基因。对文库 670 个克隆中 334 个冷相关的表达序列标签 (ESTs) 进行测序, 其中 143 个 cDNA 根据 NCBI Blast 被分成 10 个组, 如新陈代谢、能量、细胞救援和防御、转录和光合作用等。从文库中选择两个基因 (水通道蛋白基因和锌家族蛋白基因) 进一步通过定量实时 PCR 进行分析, 结果表明, 这两个基因在冷胁迫下转录水平均上调, 与消减 cDNA 文库结果吻合。

热休克蛋白 70 (HSP70) 是 HSP 家庭中的重要成员, 在植物各种应激保护中发挥着作用。Fei 等<sup>[38]</sup>通过 RACE 技术克隆得到秋茄 *HSP70* 基因 (*KoHSP70*), 其 ORF 由 1 959 bp 核苷酸构成。荧光定量 PCR 结果显示, *KoHsp70* 的表达起初维持在一定水平, 冷胁迫 48 h 表达量显著上升, 168 h 到达最高水平。结果表明, *KoHsp70* 基因的表达可被诱导且在秋茄低温胁迫的保护反应中发挥作用。

#### 4 小结与展望

秋茄是生活在热带、亚热带潮间海岸带的重要植物, 其特殊的生境使之成为人们研究木本植物对盐、重金属和水淹耐受机理的重要材料。尽管关于秋茄分子生物学的研究逐年增加, 并取得了一定的成果, 但是不得不承认该研究起步较晚, 与杨树、苹果、桃、桑树和麻疯树等许多木本植物相比较为落后, 秋茄的基因组和转录组测序等工作也尚未见报道, 目前较多的工作集中在盐胁迫下蛋白质组和基因克隆的研究, 而功能基因克隆也多限于表达模式分析和原核表达阶段, 对于转基因功能验证方面的工作开展相对较少。秋茄为耐寒性最强的红树

植物, 是海防造林重要的树种, 因而颇受人们的青睐。秋茄已成功引种至浙江省温州和台州海岸带多年, 然而, 由于冬季低温胁迫诱发的越冬困难使得继续北引难度增大许多, 关于生理生态学的研究已有较多报道, 但其深层次的机理仍然不明, 笔者克隆到秋茄与低温胁迫相关的转录因子 *CBF/DREB* 基因, 并实现其在原核生物中的表达, 下一步拟通过凝胶阻滞实验探索其与顺式作用原件的结合特性, 旨在揭示秋茄低温适应的分子机理。研究秋茄低温适应的分子机制, 并通过基因工程技术对其进行改造, 培育低温适应能力更强的品系, 扩大秋茄种群规模, 使其向纬度更高的地区种植, 具有重要的理论和现实意义。

#### REFERENCES

- [1] Lin YM, Xiang P, Lin P. Studies on tannins of mangroves—a review. *Mar Sci*, 2005, 29(3): 59–63 (in Chinese).  
林益明, 向平, 林鹏. 红树林单宁的研究进展. *海洋科学*, 2005, 29(3): 59–63.
- [2] Sheue CR, Liu HY, Yong JWH. *Kandelia obovata* (Rhizophoraceae), a new mangrove species from Eastern Asia. *Taxon*, 2003, 52(2): 287–294.
- [3] Chen LZ, Wang WQ, Zhang YH, et al. Damage to mangroves from extreme cold in early 2008 in southern China. *Chin J Plant Ecol*, 2010, 34(2): 186–194 (in Chinese).  
陈鹭真, 王文卿, 张宜辉, 等. 2008 年南方低温对我国红树植物的破坏作用. *植物生态学报*, 2010, 34(2): 186–194.
- [4] Das S, Crépin AS. Mangroves can provide protection against wind damage during storms. *Estuar Coast Shelf Sci*, 2013, 134: 98–107.
- [5] Zhao P, Han WD. Genetic diversity of fifteen *Kandelia candel* populations distributed in southeast coast of China by using SRAP. *Genom Appl Biol*, 2009, 28(6): 1151–1156 (in Chinese).  
赵鹏, 韩维栋. 中国东南沿海 15 个秋茄种群遗传

- 多样性的 SRAP 分析. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(6): 1151–1156.
- [6] Li NY, Chen SL, Zhou XY, et al. Effect of NaCl on photosynthesis, salt accumulation and ion compartmentation in two mangrove species, *Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorhiza*. *Aquat Bot*, 2008, 88(4): 303–310.
- [7] Zhu Z, Pei ZM, Zheng HL. Effect of salinity on osmotic adjustment characteristics of *Kandelia candel*. *Russ J Plant Physiol*, 2011, 58(2): 226–232.
- [8] Zheng CF, Liu WC, Qiu JB, et al. Comparison of physiological characteristics of *Kandelia obovata* at different ages in winter in the northernmost mangrove transplanted area of China. *Acta Ecol Sin*, 2013, 33(3): 132–138.
- [9] Kao WY, Shih CN, Tsai TT. Sensitivity to chilling temperatures and distribution differ in the mangrove species *Kandelia candel* and *Avicennia marina*. *Tree Physiol*, 2004, 24(7): 859–864.
- [10] Weng BS, Huang Y, Liu JC, et al. Alleviated toxicity of cadmium by the rhizosphere of *Kandelia obovata* (S., L.) Yong. *Bull Environ Contam Tox*, 2014, 93(5): 603–610.
- [11] Weng BS, Xie XY, Weiss DJ, et al. *Kandelia obovata* (S., L.) Yong tolerance mechanisms to cadmium: subcellular distribution, chemical forms and thiol pools. *Mar Pollut Bull*, 2012, 64(11): 2453–2460.
- [12] Lu HL, Zhang Y, Liu BB, et al. Rhizodegradation gradients of phenanthrene and pyrene in sediment of mangrove (*Kandelia candel* (L.) Druce). *J Hazard Mater*, 2011, 196: 263–269.
- [13] Fang Y, Yan CL, Du JN, et al. Rhizosphere remediation of phenanthrene-contaminated sediment by *Kandelia candel* (L.) Druce. *J Agro-Environ Sci*, 2011, 30(6): 1160–1165 (in Chinese).  
方宇, 严重玲, 杜静娜, 等. 红树植物秋茄对菲污染沉积物的根际修复研究. *农业环境科学学报*, 2011, 30(6): 1160–1165.
- [14] Chiang TY, Chiang YC, Chen YJ, et al. Phylogeography of *Kandelia candel* in East Asiatic mangroves based on nucleotide variation of chloroplast and mitochondrial DNAs. *Mol Ecol*, 2001, 10(11): 2697–2710.
- [15] Chen SB, Ding WY, Qiu JB, et al. The genetic diversity of the mangrove *Kandelia obovata* in china revealed by ISSR analysis. *Pakistan J Bot*, 2010, 42(6): 3755–3764.
- [16] Ruan Y, Lü J, Li JQ, et al. *Kandelia obovata* colonization route along Taiwan strait inferred by approximate Bayesian computation. *Acta Ecol Sin*, 2015, 35(13): 4304–4313 (in Chinese).  
阮宇, 吕佳, 李俊清, 等. 利用近似贝氏计算推断台湾海峡沿岸秋茄种群的拓殖路线. *生态学报*, 2015, 35(13): 4304–4313.
- [17] Zhang YL, Zhang MB, Wang KF, et al. Significance of mangrove pollen in research of marine geology. *J Tongji Univ: Nat Sci Ed*, 2001, 29(11): 1317–1321 (in Chinese).  
张玉兰, 张敏斌, 王开发, 等. 红树植物花粉在海洋地质研究中的意义. *同济大学学报: 自然科学版*, 2001, 29(11): 1317–1321.
- [18] Liao PC, Hwang SY, Huang S, et al. Contrasting demographic patterns of *Ceriops tagal* (Rhizophoraceae) populations in the South China Sea. *Aust J Bot*, 2011, 59(6): 523.
- [19] Weng ZX, Wang LX, Tan FL, et al. Proteomic and physiological analyses reveal detoxification and antioxidation induced by Cd stress in *Kandelia candel* roots. *Trees*, 2013, 27(3): 583–595.
- [20] Ma XW. The study about the physiological and biochemical adaptive mechanism and proteomics of Northeast transplanted *Kandelia Obovata*. Wenzhou: Wenzhou Medical University, 2013 (in Chinese).  
马小伟. 北移红树植物秋茄生理生态适应机制及蛋白质组学研究. 温州: 温州医学院, 2013.
- [21] Wang LX, Liang WY, Xing JH, et al. Dynamics of chloroplast proteome in salt-stressed Mangrove *Kandelia candel* (L.) druce. *J Proteome Res*, 2013, 12(11): 5124–5136.
- [22] Wang LX, Liu X, Liang M, et al. Proteomic analysis of salt-responsive proteins in the leaves of mangrove *Kandelia candel* during short-term stress. *PLoS ONE*, 2014, 9(1): e83141.
- [23] Wang LX, Pan DZ, Li J, et al. Proteomic analysis of changes in the *Kandelia candel* chloroplast proteins reveals pathways associated with salt tolerance. *Plant Sci*, 2015, 231: 159–172.
- [24] Huang W, Fang XD, Li GY, et al. Cloning and expression analysis of salt responsive gene from *Kandelia candel*. *Biol Plantarum*, 2003, 47(4): 501–507.



- [25] Huang W, Lin QF, Li GY, et al. Identification and expression analysis of the cyclophilin gene in *Kandelia candel* under stress of salt. *Acta Biol Exp Sin*, 2003, 36(3): 209–214 (in Chinese).  
黄薇, 林栖凤, 李冠一, 等. 红树植物秋茄中受盐胁迫抑制的 cyclophilin 基因的鉴定与表达分析. *实验生物学报*, 2003, 36(3): 209–214.
- [26] Huang W, Fang XD, Lin QF, et al. Identification and expression analysis of a full-length cDNA encoding a *Kandelia candel* tonoplast intrinsic protein. *Chin J Biotech*, 2003, 19(2): 147–152 (in Chinese).  
黄薇, 方孝东, 林栖凤, 等. 红树植物秋茄中液泡膜内在蛋白(TIP)全长 cDNA 的克隆和表达分析. *生物工程学报*, 2003, 19(2): 147–152.
- [27] Lu YJ, Han YS, Li NY, et al. Molecular cloning and salt-tolerance of gene *KcTIP1* from *Kandelia candel*. *J Northwest AF Univ: Nat Sci Ed*, 2013, 41(7): 162–171 (in Chinese).  
鲁彦君, 韩彦莎, 李妮亚, 等. 秋茄 *KcTIP1* 基因克隆及其对植物耐盐性作用的研究. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2013, 41(7): 162–171.
- [28] Huang XX, Hou PC, Ding MQ, et al. Cloning and functional analysis of *KcRD22* gene of *Kandelia candel*. *Genom Appl Biol*, 2011, 30(4): 273–280 (in Chinese).  
黄旭新, 侯佩臣, 丁明全, 等. 秋茄 *KcRD22* 基因的克隆与功能分析. *基因组学与应用生物学*, 2011, 30(4): 273–280.
- [29] Liu BX, Zhao YM, Pang JF, et al. Cloning and function analysis of *KcERF* from *Kandelia obovata*. *Pratac Sci*, 2013, 30(11): 1740–1748 (in Chinese).  
刘博欣, 赵杨敏, 庞俊峰, 等. 秋茄 ERF 抗逆转录因子的克隆及其功能分析. *草业科学*, 2013, 30(11): 1740–1748.
- [30] Yu R, Hu Y, Huang XX, et al. Overexpression of *Kandelia candel* C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zinc-finger protein gene *KcZFP* enhanced salinity tolerance in tobacco plants. *Genom Appl Biol*, 2013, 32(2): 149–158 (in Chinese).  
于瑞, 胡月, 黄旭新, 等. 过表达秋茄 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 型锌指蛋白基因 *KcZFP* 提高烟草耐盐性. *基因组学与应用生物学*, 2013, 32(2): 149–158.
- [31] Jing X, Hou P, Lu Y, et al. Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase from mangrove *Kandelia candel* in tobacco enhances salinity tolerance by the reduction of reactive oxygen species in chloroplast. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 23.
- [32] Jing XS, Sun YL, Xiang M, et al. Overexpression of *KcTrxf* in tobacco enhances salt tolerance through the regulation of ROS homeostasis under NaCl stress. *J Beijing Forest Univ*, 2015, 37(6): 17–26 (in Chinese).  
荆晓妹, 孙苑玲, 向敏, 等. 秋茄硫氧还蛋白调控活性氧平衡增强烟草耐盐机制研究. *北京林业大学学报*, 2015, 37(6): 17–26.
- [33] Basyuni M, Oku H, Inafuku M, et al. Molecular cloning and functional expression of a multifunctional triterpene synthase cDNA from a mangrove species *Kandelia candel* (L.) druce. *Phytochemistry*, 2006, 67(23): 2517–2524.
- [34] Basyuni M, Oku H, Tsujimoto E, et al. Cloning and functional expression of cycloartenol synthases from mangrove species *Rhizophora stylosa* Griff. and *Kandelia candel* (L.) druce. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007, 71(7): 1788–1792.
- [35] Basyuni M, Baba S, Kinjo Y, et al. Salt-dependent increase in triterpenoids is reversible upon transfer to fresh water in mangrove plants *Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorrhiza*. *J Plant Physiol*, 2012, 169(18): 1903–1908.
- [36] Zhang FQ, Wang YS, Sun CC, et al. A novel metallothionein gene from a mangrove plant *Kandelia candel*. *Ecotoxicology*, 2012, 21(6): 1633–1641.
- [37] Fei J, Wang YS, Jiang ZY, et al. Identification of cold tolerance genes from leaves of mangrove plant *Kandelia obovata* by suppression subtractive hybridization. *Ecotoxicology*, 2015, 24(7/8): 1686–1696.
- [38] Fei J, Wang YS, Zhou Q, et al. Cloning and expression analysis of HSP70 gene from mangrove plant *Kandelia obovata* under cold stress. *Ecotoxicology*, 2015, 24(7/8): 1677–1685.

(本文责编 郝丽芳)