

DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-3142. 2013. 05. 014

韩立敏, 化文平, 王喆之. 菘蓝铁型超氧化物歧化酶基因 *IiFeSOD* 的克隆与胁迫表达 [J]. 广西植物, 2013, 33 (5): 663—668

Han LM, Hua WP, Wang ZZ, et al. Clone and stress expression analysis of iron superoxide dismutase from *Isatis indigotica* [J]. *Guihaia*, 2013, 33 (5): 663—668

## 菘蓝铁型超氧化物歧化酶基因 *IiFeSOD* 的克隆与胁迫表达分析

韩立敏<sup>1,2</sup>, 化文平<sup>1,2</sup>, 王喆之<sup>1\*</sup>

(1. 陕西师范大学 生命科学学院, 药用资源与天然药物化学教育部重点实验室, 西北濒危药材资源  
开发国家工程实验室, 西安 710062; 2. 陕西学前师范学院, 西安 710062)

**摘要:** 超氧化物歧化酶 (SOD) 是生物体内超氧阴离子自由基的清除剂, 可有效地防止它们对生物体的损害。从菘蓝中经 RT-PCR 方法扩增得到 SOD 基因, 命名为 *IiFeSOD*, 其全长 882 bp, 包含一个 834 bp 的 ORF, 编码 277 个氨基酸, 分析其编码的蛋白质序列显示其属于铁型超氧化物歧化酶, 具有线粒体导肽, 定位于线粒体中。实时荧光定量 PCR 技术分析结果表明, *IiFeSOD* 在菘蓝各个组织中均有表达, 但表达量高低不同, 在叶中表达最高、茎次之、根中最低; 该基因受盐胁迫的诱导, 随着盐胁迫强度的加强基因表达量迅速升高而后下降。同时 SOD 酶活性在盐胁迫处理下表现出类似的变化规律。说明 SOD 的大量积累与植物的耐逆性密切相关。

**关键词:** 菘蓝; SOD; 盐胁迫; 表达分析; 酶活性分析

中图分类号: Q945 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142 (2013) 05-0663-06

## Clone and stress expression analysis of iron superoxide dismutase from *Isatis indigotica*

HAN Li-Min<sup>1,2</sup>, HUA Wen-Ping<sup>1,2</sup>, WANG Zhe-Zhi<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Medicinal Resources and Natural Pharmaceutical Chemistry, Ministry of Education, National Engineering Laboratory for Resource Developing of Endangered Chinese Crude Drugs in Northwest of China, College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China; 2. Shaanxi Xueqian Normal University, Xi'an 710062, China)

**Abstract:** Superoxide dismutase is a scavenger of superoxide anion free radical in vivo. They can effectively prevent reactive oxygen species damage to organism. An iron superoxide dismutase gene was isolated from *Isatis indigotica*, and was named as *IiFeSOD*. The full-length cDNA of *IiFeSOD* contained a 834 bp open reading frame (ORF) and encoded 277 amino acids, which might locate in mitochondria. Real-time PCR analysis showed that *IiFeSOD* had the highest expression in leaves, then in stems, and the least in roots. The expression level of *IiFeSOD* could be induced by NaCl. Levels of *IiFeSOD* transcripts could increase at three days after salt stress. However, the expression of *IiFeSOD* first increased and then decreased after salt stress at 100 mmol/L. Activity of SOD was also induced by NaCl and showed the analogous change rule with gene expression. Studies showed that massive accumulation of SOD was closely related with the stress tolerance of plants.

收稿日期: 2013-02-28 修回日期: 2013-05-17

基金项目: 国家自然科学基金 (31200221); 陕西学前师范学院自然科学基金 (2012KJ020)

作者简介: 韩立敏 (1981-), 女, 河北邯郸人, 在读博士, 讲师, 主要从事植物生物技术方面的研究, (E-mail) hdd\_1981\_\_@163.com。

\* 通讯作者: 王喆之, 博士, 教授, 主要从事植物分子生物学、天然产物研究与开发利用研究, (E-mail) zzwang@snnu.edu.cn。

**Key words:** *Isatis indigotica*; iron superoxide dismutase; salt stress; expression analysis; activity analysis

菘蓝 (*Isatis indigotica*) 常用的十字花科药用植物, 在我国南北各地广为栽培, 其根和叶均可入药, 干燥根入药称板蓝根, 干燥叶入药称为大青叶。具有清热、解毒、凉血、利咽等功效, 被广泛应用于流行性感、流行性腮腺炎、流行性乙型肝炎等症的治疗。菘蓝对环境的适应能力很强, 这与其对各种逆境胁迫的耐受能力密切相关。

植物在生长的过程中, 会受到如干旱、盐碱、冷害等各种环境的胁迫, 这些逆境将导致植物体内产生大量的活性氧 (reactive oxygen species, ROS), ROS 通过破坏核酸, 氧化蛋白来影响细胞的功能, 从而影响植物的正常生长 (奚俊辉等, 2010)。超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 是体内氧自由基清除反应系统中的关键酶类, 催化超氧负离子转变为  $O_2$  和  $H_2O_2$ , 植物细胞主要含有 3 种类型的 SOD: CuZnSOD, MnSOD 和 FeSOD (Mallik *et al.*, 2011)。

FeSOD 是抗氧化代谢途径中关键酶之一, 在植物抗逆反应中起着重要作用, FeSOD 转基因的烟草或紫花苜蓿植株都较对照植株表现出更强的抗逆性 (Van *et al.*, 1996; Mckersie *et al.*, 2000)。FeSOD 基因现已从马铃薯 (武新娟等, 2009)、烟草 (Kurepa *et al.*, 1997)、水稻 (Kaminaka *et al.*, 1999) 和萝卜 (Soon *et al.*, 2006) 等植物中克隆得到。对菘蓝 FeSOD 基因 (*IiFeSOD*) 的克隆和胁迫表达分析研究有助于从分子水平揭示菘蓝对环境的适应机理, 以及抗氧化抗逆的生理机制, 并为利用基因工程技术改良菘蓝提供理论依据和基因资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

将购自于济南绿禾种业有限公司的菘蓝种子播种于花盆中, 定期浇水, 温室中进行培养。当幼苗长至 2~3 cm 时移栽至新的花盆中, 每个花盆 6 棵幼苗。待生长至 2 个月时, 进行 NaCl 胁迫处理, 每 18 株菘蓝为一组样品, 分别以 0、50、100、200 mmol/L 的 NaCl 溶液进行处理 72 h, 取样后, 迅速液氮速冻并于 -80 °C 保存。

大肠杆菌 DH5 $\alpha$  为本实验室保存, pMD18-T 载体购自 TAKARA。

### 1.2 菘蓝超氧化物歧化酶基因的基因克隆

分离提取菘蓝样品总 RNA [提取方法参照 BIOZOL 总 RNA 提取试剂盒 (Cat # BSC51S1) 说明书], 反转录成 cDNA (参考购自 Fermentas 公司的 RevertAid First Strand cDNA Synthesis 试剂盒说明书), PCR 扩增, 依据实验室已构建的菘蓝 cDNA 文库中 EST 拼接序列, 用 PrimerPremier 5.0 设计引物, *IiFeSOD-S* (5'-TTCTCAAGTTACAGGGCC-3') 和 *IiFeSOD-R* (5'-AGGGCTCAAGATGCTAAT-3') 由上海生工合成。采用 20  $\mu$ L 的 PCR 反应体系, 其中: 3  $\mu$ L cDNA; 1  $\mu$ L Primer3' (10  $\mu$ mol/L); 1  $\mu$ L Primer5' (10  $\mu$ mol/L); 10  $\mu$ L 2  $\times$  Master Mix, 加 ddH $_2$ O 补至 20  $\mu$ L。PCR 扩增条件为 94 °C 10 min; (94 °C 30 s; 48 °C 40 s; 72 °C 70 s)  $\times$  30 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保温。110 V 电泳检测, 回收目的片段 (参照购自于安徽优晶生物工程有限公司的 U-gene H. Q. Q. 凝胶回收试剂盒 II 说明书), 连接至 pMD18-T 载体, 转入大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中, 筛选阳性菌落, 菌落 PCR 检测, 测序。

### 1.3 生物信息学分析

用 DNASTar 软件和 <http://www.cbs.dtu.dk/>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; <http://www.ebi.ac.uk/>; <http://cn.expasy.org/> 等网站提供的各类生物信息学软件进行分析。查找开放读码框 (ORF)、翻译核苷酸序列、分析氨基酸序列的组成与理化性质分析利用 DNASTar 软件; 用 Blast 工具完成核苷酸和氨基酸序列的同源性比对分析; 蛋白跨膜结构域和亚细胞定位的分析用在线工具 TMHMM、TargetP 1.1 Server; 用 Swiss-model 服务器进行蛋白质的三维结构预测。

### 1.4 菘蓝超氧化物歧化酶基因的定量分析

分别提取自然生长状态下的幼苗的根、茎、叶总 RNA, 反转录获得 cDNA, 用于 *IiFeSOD* 不同组织表达分析。提取同胁迫处理条件下的菘蓝全株总 RNA 反转录得 cDNA, 以未处理的做对照, 用于菘蓝超氧化物歧化酶基因 (*IiFeSOD*) 在盐胁迫条件下表达情况的分析。采用荧光实时定量 PCR 技术对转录产物进行扩增, 以菘蓝肌动蛋白基因 (*Iiactin*) 作为内参。

定量分析时扩增 *IiFeSOD* 片段的上游引物: 5'-

TGTTTCTGGTGTATCACAGCGGG-3', 下游引物: 5'-TGTGCCTACGATTTGCTTGTTCAG-3'; 扩增内参 *Iiactin* 的上游引物: 5'-ATTGTCTTGGACTCTG-GAGATGGTGT-3', 下游引物: 5'-CGGCTGTGGT-GGTGAATGAGTAA-3'。反应体系为 20  $\mu$ L, 反应条件为 94  $^{\circ}$ C 4 min, (94  $^{\circ}$ C 30 s; 60  $^{\circ}$ C 30 s; 72  $^{\circ}$ C 40 s)  $\times$ 40 个循环。

### 1. 5 菘蓝超氧化物歧化酶的提取及其酶活性测定

称取新鲜材料 1 g, 于研钵中研磨, 使组织破碎, 加入 3 倍体积的 0.05 mol/L、pH 为 7.8 的磷酸缓冲溶液, 5 000 r/min 离心 15 min, 弃沉淀, 得提取液。提取液加入 0.25 倍体积的氯仿-乙醇混合溶剂搅拌 15 min, 5 000 r/min 离心 15 min, 去杂蛋白, 得粗酶液。粗酶液加入等体积的冷丙酮, 搅拌 15 min, 5 000 r/min 离心 15 min。得沉淀 SOD。将沉淀溶于 1 mL 0.05 mol/L、pH 为 7.8 的磷酸缓冲溶液中, 于 55  $^{\circ}$ C 热处理 15 min, 离心, 弃沉淀, 得到 SOD 酶液。测定酶活 (按照南京建成生物 SOD 检测试剂盒说明书操作)。

## 2 研究结果

### 2.1 *IiFeSOD* 的克隆及其序列特征分析

利用反转录的 cDNA 作为模板进行 PCR 扩增, 得到一条长度为 882 个核苷酸的扩增产物 (图 1), 核苷酸序列及其推导的氨基酸序列如图 2 所示, ORF 包含 834 个核苷酸编码 277 个氨基酸, 氨基酸组成中含量最多的是 Glu (9.7%)、Leu (9.4%), 分子量为 31 647.3, 理论等电点为 4.76, 菘蓝 FeSOD 稳定性相对较高。通过同源性比对分析, 其氨基酸序列与拟南芥、番茄、小盐芥等的 FeSOD 蛋白相似度达 95% 以上, 存在保守区域 HWGKHH、FNNA、WNHEFF、FGSGW、WEHAYY。用 Blast-conserved Domains Search (Marchler-Bauer *et al.*, 2013) 分析菘蓝 SOD 氨基酸序列功能结构域的结果 (图 3) 表明: 菘蓝超氧化物歧化酶 (IiSOD) 包含 FeSOD 结构域, 属于 Fe 超氧化物歧化酶蛋白家族。利用 TargetP 1.1 Server 在线工具分析菘蓝 SOD 的亚细胞定位, 推测菘蓝 *IiFeSOD* 可能定位于线粒体中 (分值为 0.8, 可靠等级为 2), 跨膜结构预测菘蓝铁型 SOD (IiFeSOD) 没有跨膜区域。利用 MitoProt II-v1.101 在线工具 (<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>) 预测 N 端的 19 个氨基酸即

MQWKRNVKRRFSRKVAVS 是线粒体导肽, 引导肽链进入线粒体中 (Manuel *et al.*, 1996)。

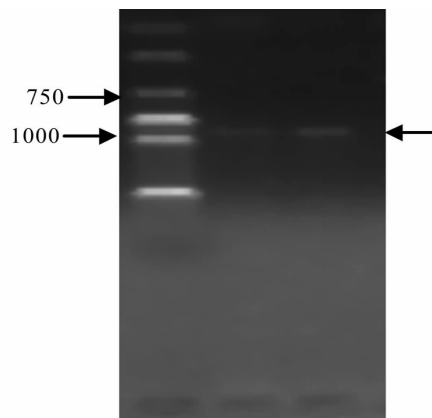


图 1 *IiFeSOD* 全长 cDNA 序列扩增  
Fig. 1 Amplification products of *IiFeSOD* whole cDNA sequence

用 Swiss-model 进行同源建模预测, 构建 IiFeSOD 蛋白的高级结构模型 (图 4), 结果表明 IiFeSOD 蛋白质主要包含  $\alpha$  螺旋和  $\beta$  折叠片, 另外还有无规则卷曲及转角结构。

### 2.2 *IiFeSOD* 基因的器官表达分析与诱导表达

*IiFeSOD* 在菘蓝的根、茎、叶中均有表达, 但表达量有差异, 叶片中表达量最高, 茎次之, 根中最低 (图 5), 仅有少量表达, 这与银杏铁型 SOD (*GbFeSOD*) 在不同组织中的表达情况相似 (李琳玲等, 2009); 用不同浓度 (0、50、100、200 mmol/L) 的 NaCl 处理菘蓝, 定量分析结果 (图 6) 表明, *IiFeSOD* 的表达受 NaCl 诱导, *IiFeSOD* 随着 NaCl 浓度的提高在整个植株体内的表达量先升高后下降, 浓度为 50 mmol/L 时, 表达量最高, 是对照的 3.5 倍, NaCl 溶液浓度为 100 mmol/L 时, 基因表达量稍有下降, NaCl 溶液浓度为 200 mmol/L 时, 基因表达量下降显著但仍比对照菘蓝植株体内的表达量要高 2 倍。

### 2.3 盐胁迫处理下菘蓝体内超氧化物歧化酶活性的变化

SOD 活性测定结果表明, 盐胁迫条件下菘蓝超氧化物歧化酶活性大大提高, 是对照的 3~5 倍, 且随着盐浓度的提高, 菘蓝体内 SOD 活性增强, 而后具下降趋势, 但仍比对照高 (图 7), 研究结果表明菘蓝铁型超氧化物歧化酶是诱导酶 (Stepien *et al.*, 2005)。在盐胁迫条件下, 植物机体内会产生大量的活性氧和自由基, 植物通过调整体内基因的表达提高 SOD 酶活性, 有利于活性氧的清除, 保护菘蓝免

```

1      TTCTCAAGTTACAGGGCCAAACCGGCGAATGCAATGGAAAAGAAACGTAAGAGACGA
      M Q W K R N V K R R
59     TTCTCGAGAAAGGTGGCTGTTTCTGGTGTATACAGCGGGATTTGAGCTCAAGCCTCCT
      F S R K V A V S G V I T A G F E L K P P
119    CCATATCCTCTTGATGCTCTGGAACCGCATATGAGCCGGGAAACTCTTGACTATCACTGG
      P Y P L D A L E P H M S R E T L D Y H W
179    GGCAAGCATCACAAAACCTTACGTAGAGAACCTGAACAAGCAAATCGTAGGCACAGATCTA
      G K H H K T Y V E N L N K Q I V G T D L
239    GATGGATTGCTCACTGGAAGAGTTGTGCTTCTCATACAACAAAGGCAATATGCTTCCT
      D G L S L E E V V L L S Y N K G N M L P
299    GCGTTCAACAACGCCGCACAGGCATGGAACCACGAGTTCTTCTGGGAGTCTATCAAACCC
      A F N N A A Q A W N H E F F W E S I K P
359    GGAGGTGGAGGAAAGCCAAGTGGAGATCTCCTCAGGCTGATAGAGAGAGATTTCCGGGTCT
      G G G G K P S G D L L R L I E R D F G S
419    TTCGATGACTTTTTAGAAAAGTTTCAAGGCAGCTGCAGCCTCCAACCTTTGGTTCCGGTTGG
      F D D F L E S F K A A A A S N F G S G W
479    ACTTGGCTTGCATACAAGGCAAATAGACTTGACGTTGCAAATGCCGTAATCCGCTTCCA
      T W L A Y K A N R L D V A N A V N P L P
539    AAAGAGGAAGACAAGAAGCTTGTGATAGTAAAACTCCAATGCAGTAAATCCACTCGTA
      K E E D K K L V I V K T P N A V N P L V
599    TGGGACTATTCTCCACTTCTCACCATTGATACATGGGAGCACGCTTACTATCTGGATTTT
      W D Y S P L L T I D T W E H A Y Y L D F
659    GAGAACCGAAGAGCTGAGTACATAAACATATTCATGGAAAAGCTTGTGTCATGGGAAACA
      E N R R A E Y I N I F M E K L V S W E T
719    GTAAGCACAAGGCTAGAATCTGCAATGGCTCGAGCAGCTCAAAGAGAACAAGAAGGAACA
      V S T R L E S A M A R A A Q R E Q E G T
779    GATGCAGAAGATGAAGAAAATCCAGATGATGAAGAGCCAGAGGTTTACTTAGATAGTGAT
      D A E D E E N P D D E E P E V Y L D S D
839    ATTGATGTATCTGAGGTTGACTAAACATTAGCATCTTGAGCCCT
      I D V S E V D

```

图 2 *IiFeSOD* 核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *IiFeSOD*

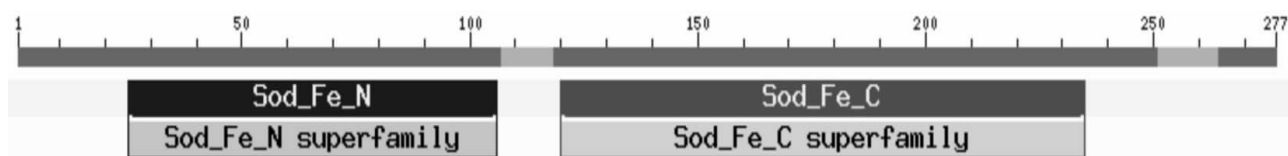


图 3 菘蓝 FeSOD 氨基酸序列功能结构域分析

Fig. 3 Functional domain analysis of *IiFeSOD* amino acid sequence from *Isatis indigotica*

受氧化损伤, 增强菘蓝对不良环境的抵抗能力。

### 3 结论与讨论

植物 FeSOD 多为环境诱导表达型, 表达量高低受到光、激素、温度等环境因子的影响 (Aaron *et al.*, 2012), 本研究获得了一条菘蓝铁型超氧化物歧化酶基因的全长, 编码 277 个氨基酸。该基因是环境诱导表达型, 受盐胁迫诱导, 盐胁迫引起了 *IiFeSOD* 表达量的迅速升高, 菘蓝体内积累了大

量的铁型 SOD 来清除盐胁迫条件下所产生的活性氧, 从而减少氧化胁迫伤害, 提高菘蓝对环境的适应能力 (Mmallik *et al.*, 2011)。

不同植物 FeSOD 蛋白的亚细胞定位不同, 且编码基因的组织表达特性有差异。Kwon *et al.* (2003) 研究萝卜 SOD 的表达发现, *FeSOD* 在萝卜肉质根中基本不表达。但是 Kaminaka *et al.* (1999) 研究发现, 在水稻中 *FeSOD* 在所有组织都有大量表达。该研究中, *IiFeSOD* 在菘蓝的根、茎、叶中均有表达, 叶中表达量最高, 根中表达量最低。GbFeSOD 可能主要定位于叶绿体中, 所以

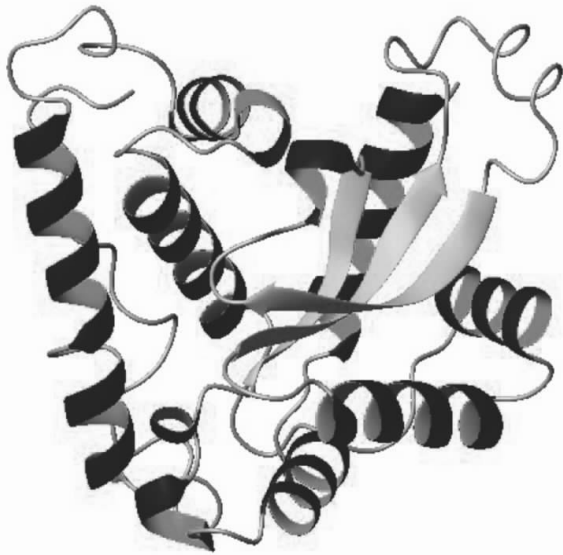


图 4 菘蓝 FeSOD 蛋白的 Swiss-model 同源建模分析  
Fig. 4 Homologous modeling analysis of IiFeSOD protein Swiss-model

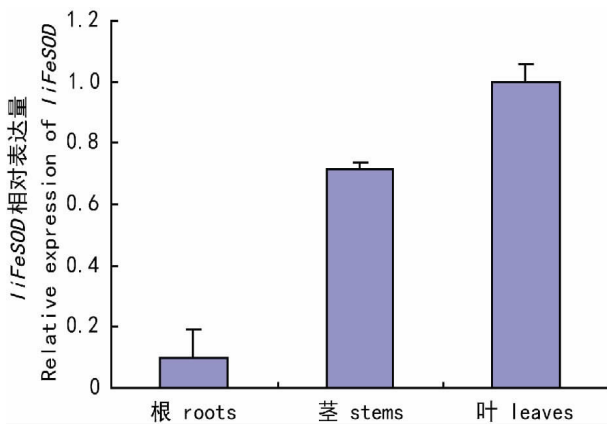


图 5 菘蓝 *IiFeSOD* 的组织表达分析  
Fig. 5 Expression analysis of *IiFeSOD* in different tissues

在银杏含有叶绿体等器官组织中会有较高表达量 (李琳玲, 等 2009), *IiFeSOD* 虽然在叶中表达量最高, 但通过生物信息软件预测其却定位在线粒体中, 并具备线粒体导肽, 不具跨膜结构, 说明其可能定位于线粒体基质中发挥作用, 对其是否定位于线粒体, 在线粒体中发挥活性氧清除作用还有待进一步研究。

正常情况下, 植物体内产生的活性氧处于较低水平, 不会对植物产生伤害。而在胁迫状态下, 活性氧代谢平衡被打破, ROS 增多, 会使蛋白质、叶绿体等发生降解, 活性氧中的羟自由基能直接启动膜脂过氧化的自由基链式反应。盐胁迫下植物体内 ROS 的积累是导致盐害的主要原因之一, 植物

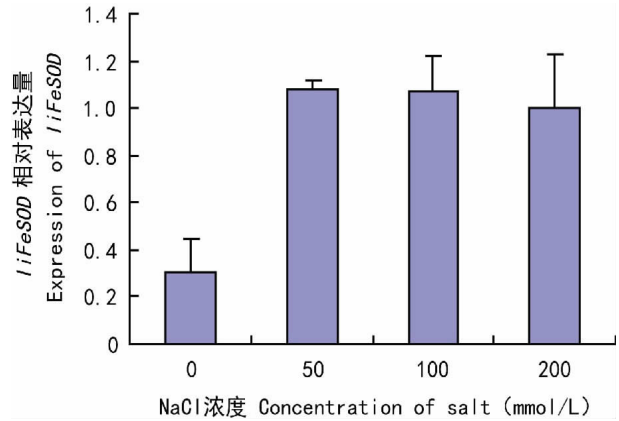


图 6 菘蓝 *IiFeSOD* 在盐胁迫条件下的表达分析  
Fig. 6 Expression analysis of *IiFeSOD* under salt stress condition

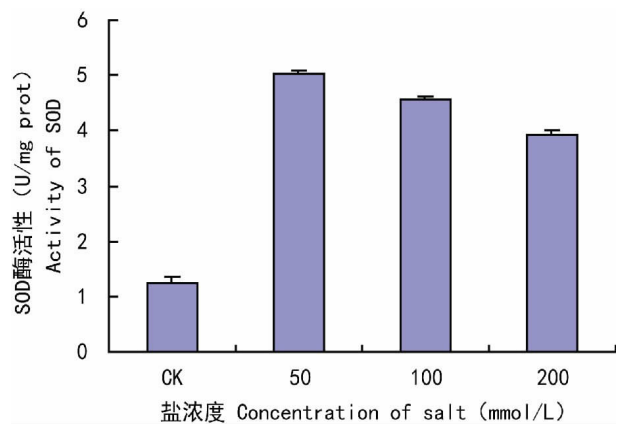


图 7 盐胁迫处理条件下的菘蓝体内 SOD 酶活性  
Fig. 7 Activity analysis of SOD from *Isatis indigotica* under salt stress

对胁迫的响应之一就是保护酶活性的变化 (Alsche *et al.*, 2002)。本研究也表明, NaCl 可引起菘蓝中 SOD 活性的提高, 但不同浓度的 NaCl 溶液对菘蓝 SOD 活性有着不同的影响。在轻度盐胁迫下, *IiFeSOD* 基因表达量升高, SOD 活性上升, 这可能是菘蓝在抗盐机理方面对盐胁迫的一种适应性表现, 但在高浓度胁迫下, 超过了其自身的忍耐程度, 导致 SOD 活性下降, 不能有效地清除氧, 从而启动膜脂过氧化作用, 可能是盐胁迫对菘蓝造成伤害的重要原因之一。

参考文献:

Aaron CA, Miriam GM, Laura P, *et al.* 2012. Two Fe-superoxide dismutase families respond differently to stress and senescence in legumes [J]. *J Plant Physiol*, **169** (13): 1 253–1 260  
 Alsche R G, Erturk N, Heath LS. 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants [J]. *J*

- Exp Bot*, **53** (372): 1 331—1 341
- Dou JH (窦俊辉), Yu SX (喻树迅), Fan SL (范术丽), *et al.* 2010. SOD and Plant stress resistance (SOD与植物胁迫抗性) [J]. *Mol Plant Breed* (分子植物育种), **8** (2): 359—364
- Kaminaka H, Morita S, Tokumoto OM. 1999. Molecular cloning and characterization of a cDNA for an iron-superoxide dismutase in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, **63** (2): 302—308
- Kurepa J, Herouart D, Van MM. 1997. Differential expression of CuZn- and Fe-superoxide dismutase genes of tobacco during development, oxidative stress, and hormonal treatments [J]. *Plant Cell Physiol*, **38** (4): 463—470
- Kwon SI, An CS. 2003. Cloning and expression of mitochondrial Mn-SOD from the small radish (*Raphanus sativus* L.) [J]. *Mol Cells*, **16** (2): 194—200
- Li LL (李琳玲), Cheng H (程华), Xu F (许锋), *et al.* 2009. Molecular cloning, characterization and expression of iron superoxide dismutase gene from *Ginkgo biloba* (银杏铁型超氧化物歧化酶基因的克隆与表达) [J]. *J Fruit Sci* (果树学报), **26** (6): 840—846
- Manuel GC, Pierre V. 1996. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences [J]. *Eur J Biochem*, **241** (3): 779—786
- Marchler BA, Zheng C, Chitsaz F, *et al.* 2013. CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure [J]. *Nucleic Acids Res*, **41** (1): 348—52
- Mckersie BD, Murnaghan J, Jones KS. 2000. Iron-superoxide dismutase expression in transgenic alfalfa increases winter survival without a detectable increase in photosynthetic oxidative stress tolerance [J]. *Plant Physiol*, **122** (4): 1 427—1 438
- Mallik S, Nayak M, Sahu BB, *et al.* 2011. Response of antioxidant enzymes to high NaCl concentration in different salt-tolerant plants [J]. *Biol Plant*, **55** (1): 191—195
- Soon IK, Chung SA. 2006. Differential expression of two SOD (superoxide dismutase) genes from small radish (*Haphanus sativus* L. var. *sativus*) [J]. *J Plant Biol*, **49** (6): 477—483
- Stepien P, Klobus G. 2005. Antioxidant defense in the leaves of C3 and C4 plants under salinity stress [J]. *Physiol Plant*, **125**: 31—40
- Van CW, Caoia K, Van MM. 1996. Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts [J]. *Plant Physiol*, **112** (4): 1 703—1 714
- Wu XJ (武新娟), Wei QR (魏峭嵘), Shi Y (石瑛), *et al.* 2009. Cloning and sequence analysis of *Fe-SOD* from potato (马铃薯抗逆基因 *Fe-SOD* 的克隆与序列分析) [J]. *J Northeast Agric Univ* (东北农业大学学报), **40** (4): 17—20

~~~~~  
 ( 上接第 716 页 Continue from page 716 )

- Wattel-Koekkoek EJW, Buurman P. 2004. Mean residence time of kaolinite and smectite-bound organic matter in Mozambiquan soils [J]. *Soil Sci Soc Am J*, **68**: 154—161
- Xie ZB, Zhu JG, Liu G, *et al.* 2007. Soil organic carbon stocks in China and changes from 1980s to 2000s [J]. *Glob Change Biol*, **13**: 1 989—2 007
- Yang YH, Mohammad A, Feng J, *et al.* 2007. Storage, patterns and environmental controls of soil organic carbon in China [J]. *Biogeochemistry*, **84**: 131—141
- Yang YH, Fang JY, Ma WH, *et al.* 2010. Soil carbon stock and its changes in northern China's grasslands from 1980s to 2000s [J]. *Glob Change Biol*, **16**: 3 036—3 047
- Yang YH, Fang JY, Smith P, *et al.* 2009. Changes in topsoil carbon stock in the Tibetan grasslands between the 1980s and 2004 [J]. *Glob Change Biol*, **15**: 2 723—2 729
- Yang YH, Fang JY, Tang YH, *et al.* 2008. Storage, patterns and controls of soil organic carbon in the Tibetan grasslands [J]. *Glob Change Biol*, **14**: 1 592—1 599
- Yu DS, Zhang ZQ, Yang H, *et al.* 2011. Effect of soil sampling density on detected spatial variability of soil organic carbon in a red soil region of China [J]. *Pedosphere*, **21**: 207—213
- Zhang YQ, Tang YH, Jiang J, *et al.* 2007. Characterizing the dynamics of soil organic carbon in grasslands on the Qinghai-Tibetan Plateau [J]. *Sci Chin Ser D*, **50**: 113—120
- Zhong HP (钟华平), Fan JW (樊江文), Yu GR (于贵瑞), *et al.* 2005. The research progress of carbon storage in grassland ecosystem (草地生态系统碳蓄积的研究进展) [J]. *Prat Sci* (草业科学), **22**: 4—11
- Zhou J, Chafetz HS. 2010. Pedogenic carbonates in Texas: stable-isotope distributions and their Implications for reconstructing region-wide paleoenvironments [J]. *J Sed Res*, **80**: 137—150
- Zhou L (周莉), Li BG (李保国), Zhou GS (周广胜). 2005. Advances in controlling factors of soil organic carbon (土壤有机碳的主导影响因子及其研究进展) [J]. *Adv Earth Sci* (地球科学进展), **20**: 99—105
- Zhuang Q, He J, Lu Y, *et al.* 2010. Carbon dynamics of terrestrial ecosystems on the Tibetan Plateau during the 20th century: an analysis with a process-based biogeochemical model [J]. *Glob Ecol Biogeogr*, **19**: 649—662