

拟南芥蛋白激酶基因 *BIN2* 的原核表达纯化及其酶活性分析

刘欣^{1,2}, 张双喜^{1,2}, 刘丹^{1,2}, 王晓峰^{1,2}, 陈少林^{1,2*}

(1. 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨陵 712100; 2. 西北农林科技大学 旱区生物质能研究中心, 陕西 杨陵 712100)

摘要: 为了研究蛋白激酶 BIN2 (BR-insensitive-2) 的底物及其在 BR 信号通路中的作用机制, 通过 One Step Cloning 方法将 *BIN2* 基因克隆至 SUMO 表达载体, 利用 SUMO 标签促进目的蛋白表达和折叠的特性, 对 BIN2 蛋白进行原核表达和纯化, 进而检测 BIN2 的激酶活性。结果表明, 纯化得到的 BIN2 具有自身磷酸化活性, 并测得其酶活大小和动力学曲线。为进一步研究 BIN2 蛋白的作用机制提供了基础材料。

关键词: BIN2; SUMO; 原核表达; 激酶活性

中图分类号: S718.46 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-7461(2017)03-0108-05

Expression, Purification and Characterization of *Arabidopsis* BIN2

LIU Xin^{1,2}, ZHANG Shuang-xi^{1,2}, LIU Dan^{1,2}, WANG Xiao-feng^{1,2}, CHEN Shao-lin^{1,2*}

(1. College of Life Science, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. Biomass Energy Center for Arid and Semi-arid Lands, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In order to study the target substrates of protein kinase BIN2 and its roles in the BR signaling pathway, we cloned *BIN2* gene into the SUMO expression vector by one step cloning method. BIN2 was expressed and purified as a SUMO fusion protein, which facilitated folding and stabilization of heterologously expressed BIN2. Further activity analysis showed that purified BIN2 was functional and got auto-phosphorylated *in vitro*. In this study, the enzyme activity and kinetics curve of BIN2 were acquired as well. This laid a foundation for further analysis of the function and targets of BIN2.

Key words: BIN2; SUMO; prokaryotic expression; activity assay

油菜素甾醇 (brassinosteroids, BR) 是一类植物中普遍存在的内源激素, 参与调控开花、衰老和光形态建成, 促进细胞伸长和木质部分化, 提高对逆境胁迫的抵抗, 增加生物产量^[1]。在信号传导过程中, BR 首先结合到膜受体激酶 BRI1 (BR-insensitive-1) 的胞外结构域上, 将胞外信号转化为胞内信号, 再通过 BIN2 激酶以及 BZR1 (brassinazole resistant 1) 家族转录因子等, 实现 BR 对植物生长发育的调节^[2]。

BIN2 基因编码一种胞质丝氨酸/苏氨酸激酶。它的催化功能域与哺乳动物的糖元合成酶激酶 3 (glycogen synthase kinase 3, GSK3) 以及果蝇的

SHAGGY 有 70% 的同源性^[1]。*BIN2* 也被命名为 DWF12 或 UCU1。*BIN2* 的发现来自于通过遗传筛选得到的 BR 不敏感突变体 *BIN2-1*^[3]。*BIN2-1* 呈现 BR 缺失突变体的表型, 显示出多种生长发育过程的缺陷, 包括种子萌发率降低、植株矮化、开花推迟和育性下降以及对 ABA 的敏感性和对逆境的抵抗能力增加等性状^[3-6]。

BR 与其他信号通路相互作用, 共同调控植物的生长发育^[2]。*BIN2* 参与整合 ABA、生长素等不同信号通路, 调控植物生长发育的不同过程^[4,7]。例如, *BIN2* 通过磷酸化 ARF2 (auxin response factor 2), 阻遏其结合 DNA, 调控生长素的信号传

收稿日期: 2017-02-05 修回日期: 2017-04-06

基金项目: 西北农林科技大学引进人才启动项目 (Z111021314)。

作者简介: 刘欣, 女, 在读硕士, 研究方向: 植物细胞壁。E-mail: 631433209@qq.com

* 通信作者: 陈少林, 男, 教授, 研究方向: 植物细胞壁。E-mail: slc1916@icloud.com

导^[8];通过磷酸化 SnRK2. 2(SNF1-related protein kinase 2. 2)和 SnRK2. 3(SNF1-related protein kinase 2. 3),促进其激酶活性,增强 ABA 信号传导^[9]。*BIN2* 还通过磷酸化 EGL3(enhancer of glabra 3)和 TTG(transparent testa glabra)促进根毛的生长^[10],通过磷酸化 PIF4(phytochrome interacting factor 4)调控下胚轴的伸长生长^[11],以及通过磷酸化 MKK4(mitogen-activated protein kinase kinase 4)参与调控气孔发育^[12]。而 BR 以及其他信号通路如何调节 *BIN2* 的活性及其稳定性尚不清楚,*BIN2* 激酶的其他底物尚待进一步挖掘以系统阐明 *BIN2* 调控生长发育的分子机制。*BIN2* 的酪氨酸 Y200 残基的去磷酸化参与调节 *BIN2* 活性,但 *BIN2* 的其他磷酸化位点的调控功能仍待阐明^[13-14]。

通过异源表达和纯化 *BIN2*,结合激酶活性分析和磷酸化蛋白组学分析等,有助于进一步挖掘 *BIN2* 的底物及其作用机制。SUMO 标签蛋白是泛素化多肽链超家族中的一员,作为重组蛋白表达的融合标签和分子伴侣,不仅可以提高融合蛋白的表达,而且还能抗蛋白酶水解、提高重组蛋白的可溶性、促进靶蛋白精确折叠等^[15]。本研究拟构建 *BIN2* 基因与 SUMO 标签的融合表达载体,用于 *BIN2* 蛋白的体外原核表达和纯化,检测了所得 *BIN2* 蛋白的激酶活性,为研究 *BIN2* 的互作底物以及进一步探索其在 BR 信号传导通路中的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)野生型(*Col-0*, WT)购自拟南芥生物资源中心(*Arabidopsis* Biological Resource Center);感受态细胞 *Escherichia coli* DH5 α 购自康为公公司;感受态细胞 BL21 以及 RNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、TaKaRa 反转录试剂盒等购自全式金生物技术有限公司;pSUMO 表达载体(带有 His 标签)为本实验室改造;PhantaTM Super-Fidelity DNA Polymerase 和 ClonExpressTM II One Step Cloning Kit 购自诺唯赞公司;Phos-TaqTM 和 EnzyChromTM Kinase Assay Kit (EKIN-400) 购自宝柏公司。

1.2 方法

1.2.1 表达载体构建 总 RNA 提取选用培养 7 d 的拟南芥 *Col-0* 幼苗。*BIN2* 基因的 PCR 扩增的上游引物为 5'-CGCGAACAGATTGGAGGATC-CATGGCTGATGATAAGGAGATGCCTG-3',下游引物为 5'-GATTACCTATCTAGACTGCAGT-TAAGTTCCAGATTGATTCAAGAAG-3'。分别

在上游和下游引物中引入了 *Bam*H I 和 *Pst* I 酶切位点。目的片段与载体的连接选用 Vazyme ClonExpressTM II One Step Cloning Kit。连接产物转化入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,在含有 Amp 抗性的 LB 固体培养基上筛选,挑取单克隆对其进行菌落 PCR 检测以及测序分析。将序列正确的重组质粒转入大肠杆菌 BL21 表达菌株。

1.2.2 蛋白表达 将表达菌株接种到含 100 mg · L⁻¹ Amp 的 LB 液体培养基中,37℃、200 r · min⁻¹ 摇菌(3~4 h)培养至对数期,加入 IPTG (终浓度 0.5 mmol · L⁻¹),15℃ 诱导 24 h;8 000 r · min⁻¹、4℃ 离心 5 min,弃上清液,用 A 液悬浮菌体,A 液成分 Na₂HPO₄ · 12H₂O (20 mmol · L⁻¹)、NaCl (0.5 mol · L⁻¹)、咪唑 (10 mmol · L⁻¹)、pH8.0;在冰上对菌液进行超声破碎(超声 5 s,间隔 5 s),至菌液透明;14 000 r · min⁻¹、4℃ 离心 3 min,取上清进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.3 蛋白纯化 选用 Ni 柱(Ni SepharoseTM 6 Fast Flow)对总蛋白进行纯化,用 A 液(同 1.2.2)平衡 Ni 柱 10 min;将破碎得到的蛋白粗提物上样,用 A 液洗去柱子里的杂质,用 B 液洗脱目的蛋白,B 液成分 Na₂HPO₄ · 2H₂O (20 mmol · L⁻¹)、NaCl (0.5 mol · L⁻¹)、咪唑 (10 mmol · L⁻¹)、pH8.0,每次 1 mL,洗 6 次,按照洗脱的先后顺序对其进行编号,作为样品 1、2、3、4、5、6;测量蛋白样品的浓度后,进行 SDS-PAGE 检测。

1.2.4 目的蛋白检测 SDS-PAGE 按照 12%分离胶 10 mL、浓缩胶 3 mL 进行配制。分别吸取 IPTG 诱导后的总蛋白裂解液、上清液、纯化样品等各 20 μ L 上样,浓缩胶 80 V 运行 30 min,分离胶 120 V 运行 90 min,考马斯亮蓝 R-250 染色 30 min,室温脱色。

1.2.5 PhosTaq 检测 参照 Phos-TaqTM说明书配制 Phos-Taq SDS-PAGE。上样量为 5~10 μ g · 孔⁻¹,恒流条件下电泳(30 mA · gel⁻¹),至溴酚蓝到分离胶底部为止,考马斯亮蓝 R-250 染色,脱色三次,凝胶拍照。

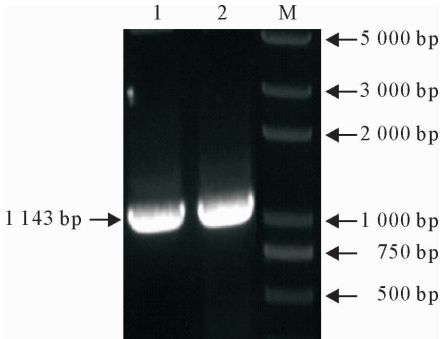
1.2.6 *BIN2* 蛋白活性测定 配制每孔反应液实验组 *BIN2* (1 μ L, 浓度 1.02 mg · mL⁻¹)、ATP (4 μ L)、Assay Buffer 共计 40 μ L,对照组 PBS 缓冲液 (1 μ L)、ATP (4 μ L)、Assay Buffer 共计 40 μ L,加入 96 孔板,各 3 个重复。按照 EnzyChromTM Kinase Assay Kit (EKIN-400)说明书制作 ADP 标准曲线。分别测定反应时间为 15、30 min 与 45 min,1、2、4、8、12 h 与 4 h 的荧光强度, λ_{exc} = 530 nm、 λ_{em} = 590 nm,绘制 ADP 生成量随反应时间增加的变

化曲线。选取反应时间为 30 min 时的荧光强度根据公式计算出激酶活性,激酶活性 = $(\Delta F \times 40 \mu\text{L}) / (\text{斜率} \times t \times \text{Vol})(\text{U} \cdot \text{L}^{-1})$, $\Delta F = (\text{BIN2 荧光强度} - \text{对照组荧光强度})$,斜率为 ADP 标准曲线的斜率, t 为反应时间 30 min, Vol 为单孔中加入 BIN2 的体积($1 \mu\text{L}$)。

2 结果与分析

2.1 目的基因 PCR 扩增与重组载体鉴定

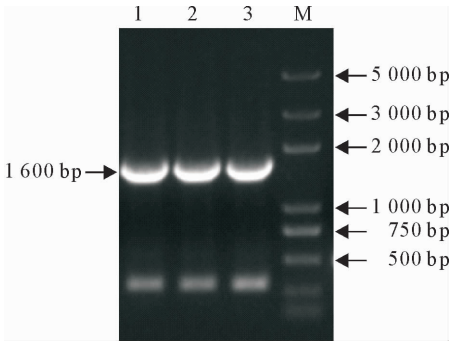
以拟南芥 cDNA 为模板,通过 PCR 反应,扩增 BIN2 基因,所得片段大小与 BIN2 基因本身的大小相符($1\,143 \text{ bp}$)(图 1)。菌落 PCR 检测泳道 1、2、3 鉴定为阳性克隆,重组载体含有的 BIN2 片段约 $1\,600 \text{ bp}$ (图 2),测序结果正确。



注:1,2. BIN2 基因 CDS 全长扩增结果;M. DNA Marker。

图 1 BIN2 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 Amplification of BIN2 gene by PCR



注:1,2,3. 重组载体 BIN2 基因的菌落 PCR 鉴定;M. DNA Marker。

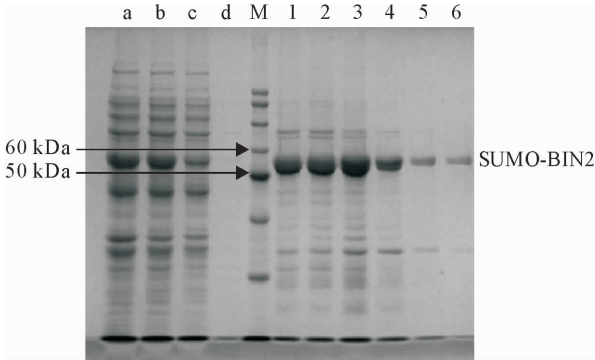
图 2 重组载体 pSUMO-BIN2 菌落 PCR 检测分析

Fig. 2 Analysis of pSUMO-BIN2 recombinant plasmid by colony PCR

2.2 蛋白诱导与纯化

通过 IPTG 诱导 BIN2 蛋白表达, 15°C 、 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 24 h。泳道 a、b、c、d 分别是经 IPTG 诱导后的细胞裂解液、上清液、上样流出液、杂蛋白洗脱液。SUMO 标签的融合表达能够有效提高 BIN2 蛋白的溶解性。泳道 1、2、3、4、5、6 分别为利用洗脱液 6 次洗脱后的蛋白样品。目的蛋白 SUMO-BIN2

的预测大小约 53 kDa ,与实测大小相符。纯化后的杂蛋白显著减少(图 3)。



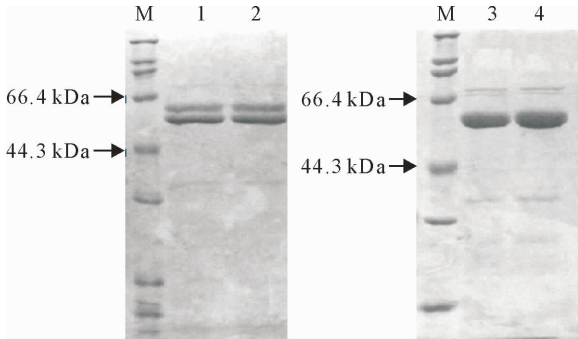
注:a. IPTG 诱导的细胞裂解液;b. 离心后的上清液;c. 蛋白上样流出液;d. 杂蛋白洗脱液;M. protein marker;1,2,3,4,5,6 分别为洗脱后的蛋白样品。

图 3 BIN2 蛋白表达和纯化产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of expressed and purified recombinant BIN2

2.3 Phos-Taq 分析

Phos-TaqTM 是一种能与磷酸离子特异性结合的功能性分子,磷酸化蛋白的磷酸基团与 Phos-TaqTM 的二价金属离子相结合,可以改变蛋白质在电泳过程中的迁移速度,因而可以用于分离和分析蛋白磷酸化状态的变化。结果表明,纯化后的 BIN2 蛋白经 Phos-Taq SDS-PAGE 检测,呈现出 2 条带(图 4,泳道 1 和 2),而经普通 SDS-PAGE 检测的 BIN2 样品在特定位置(53 kDa)仅出现 1 条带(图 4,泳道 3 和 4)。所得的异源表达和纯化的 BIN2 蛋白具有自身磷酸化的活性。



注:M. protein marker;1,2. Phos-Taq SDS-PAGE 检测的 BIN2 蛋白;3,4. 普通 SDS-PAGE 检测的 BIN2 蛋白。

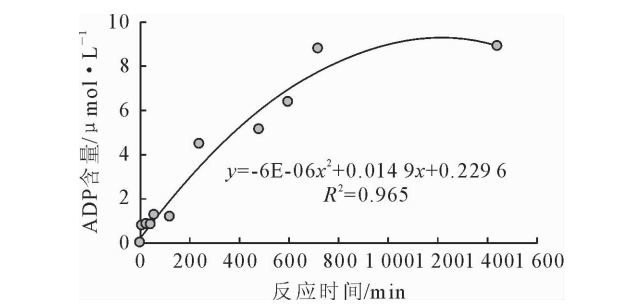
图 4 BIN2 的自身磷酸化分析

Fig. 4 Phos-Taq analysis of autophosphorylation of purified recombinant BIN2

2.4 BIN2 活性分析

利用激酶活性检测试剂盒进一步分析重组 BIN2 的激酶活性。ADP 标准曲线的斜率为 $3\,216.6$, $t = 30 \text{ min}$ 时,根据 1.2.6 中的公式计算

BIN2 样品(浓度 $1.02\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)的激酶活性为 $1.129\text{ 3 U}\cdot\text{L}^{-1}$ 。不同反应时间所测得的 ADP 生成量反映了 *BIN2* 的自身磷酸化的反应动力学,激酶反应 12 h 后,不再有新的 ADP 生成,说明通过自身磷酸化,*BIN2* 的磷酸化状态趋于稳定(图 5)。



注:各散点分别代表反应时间为 15 min、30 min、45 min、1 h、2 h、4 h、8 h、12 h、24 h 的 ADP 含量。

图 5 *BIN2* 自身磷酸化的动力学分析

Fig. 5 Kinetic analysis of autophosphorylation of purified recombinant *BIN2*

3 结论与讨论

在 BRs 信号传导通路中,*BIN2* 通过磷酸化其下游的底物参与调控植物的生长发育。系统探索 *BIN2* 的功能,有赖于利用异源表达和纯化的 *BIN2* 蛋白,结合酶学分析以及磷酸化蛋白组学分析等技术方法,进一步发掘其底物,研究其作用机制。异源表达和纯化 *BIN2* 的问题主要包括蛋白的折叠以及稳定性等。本研究通过利用 SUMO 标签,实现了 *BIN2* 的高效异源表达和纯化。

激酶的自身磷酸化是激酶调控自身活性的最普遍方式之一。*BIN2* 通过在其 Y200 位点的自身磷酸化,调节其激酶活性^[13-14]。Y200 位点的自身磷酸化激活 *BIN2*,使 *BIN2* 能够磷酸化其底物 *BES1/BZR1*。*BSU1*(*BRI1* suppressor 1)则可以使 *BIN2* 的 Y200 位点去磷酸化,使 *BIN2* 失去活性,从而解除 *BIN2* 对 *BES1/BZR1* 的抑制作用,表明 *BIN2* 的自身磷酸化对于调节其自身活性和功能具有重要作用。但是,除 Y200 位点外,*BIN2* 的其他磷酸化位点的功能尚不清楚。本研究表明,异源表达和纯化的 SUMO-*BIN2* 融合蛋白具有自身磷酸化的激酶活性,为进一步探索 *BIN2* 的自身磷酸化位点及其功能,发掘 *BIN2* 激酶的底物,探索 *BIN2* 在 BR 信号传导通路中的分子机制奠定了重要基础。

参考文献:

[1] 王凤茹,王志勇.油菜素内酯信号转导的研究进展[J].华北农学报,2008,23(Suppl. 2):29-39.
[2] 王斐,何伟,同海芳.油菜素甾醇信号转导的调控机制[J].植物

生理学报,2013,49(12):1309-1318.
WANG F, HE W, YAN H F. Regulation mechanism of brassinosteroids signal transduction[J]. Plant Physiology Communications, 2013, 49(12): 1309-1318. (in Chinese)
[3] LI J, NAM K H, VAFEADOS D, et al. *BIN2*, a new brassinosteroid-insensitive locus in *Arabidopsis* [J]. Plant physiology, 2001, 127(1): 14-22.
[4] SAIDI Y, HEARN T J, COATES J C. Function and evolution of 'green' GSK3/Shaggy-like kinases[J]. Trends in Plant Science, 2012, 17(1): 39-46.
[5] ZHANG S, CAI Z, WANG X. The primary signaling outputs of brassinosteroids are regulated by abscisic acid signaling[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009, 106(11): 4543-4548.
[6] YE Q, ZHU W, LI L, et al. Brassinosteroids control male fertility by regulating the expression of key genes involved in *Arabidopsis* anther and pollen development[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010, 107(13): 6100-6105.
[7] YOUN J H, KIM T W. Functional insights of plant GSK3-like kinases: multi-taskers in diverse cellular signal transduction pathways[J]. Molecular plant, 2015, 8(4): 552-565.
[8] VERT G, WALCHER C L, CHORY J, et al. Integration of auxin and brassinosteroid pathways by auxin response factor 2 [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008, 105(28): 9829-9834.
[9] CAI Z, LIU J, WANG H, et al. GSK3-like kinases positively modulate abscisic acid signaling through phosphorylating subgroup III SnRK2s in *Arabidopsis* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014, 111(26): 9651-9656.
[10] CHENG Y, ZHU W, CHEN Y, et al. Brassinosteroids control root epidermal cell fate via direct regulation of a MYB-bHLH-WD40 complex by GSK3-like kinases [J]. Elife, 2014 (3): e02525: 1-17.
[11] BERNARDO-GARCÍA S, DE LUCAS M, MARTÍNEZ C, et al. BR-dependent phosphorylation modulates PIF4 transcriptional activity and shapes diurnal hypocotyl growth[J]. Genes & Development, 2014, 28(15): 1681-1694.
[12] KIM T W, MICHNIEWICZ M, BERGMANN D C, et al. Brassinosteroid regulates stomatal development by GSK3-mediated inhibition of a MAPK pathway[J]. Nature, 2012, 482(7385): 419-422.
[13] KIM T W, GUAN S, SUN Y, et al. Brassinosteroid signal transduction from cell-surface receptor kinases to nuclear transcription factors[J]. Nature Cell Biology, 2009, 11(10): 1254-1260.
[14] PENG P, YAN Z, ZHU Y, et al. Regulation of the *Arabidopsis* GSK3-like kinase brassinosteroid-insensitive 2 through proteasome-mediated protein degradation [J]. Molecular Plant, 2008, 1(2): 338-346.
[15] 元燕红,邹竹荣,邹华英,等. SUMO 基因的内在原核启动子活性及其在大肠杆菌蛋白表达系统中的应用[J]. 生物工程学报, 2011, 27(6): 952-962.
QI Y H, ZOU Z R, ZOU H Y, et al. Intrinsic prokaryotic promoter activity of SUMO gene and its applications in the protein expression system of *Escherichia coli* [J]. Chinese Journal

of Biotechnology,2011,27(6):952-962. (in Chinese)

[16] 李凯荣,韩刚. 天然油菜素内酯促进柠条和紫穗槐种子发芽及下胚轴伸长效应[J]. 西北林学院学报,2003,18(4):17-20.
LI K R,HAN G. Effects of natural brassinolide on germination and hypocotyl elongation of *Caragana microphylla* and *Amopha fruticosa* seeds[J]. Journal of Northwest Forestry University,2003,18(4):17-20. (in Chinese)

[17] 李凯荣,韩刚,王红红,等. 天然油菜素内酯对侧柏苗木抗旱性的影响[J]. 西北林学院学报,2004,19(4):9-11.
LI K R,HAN G,WANG H H,*et al.* Effect of natural brassinolide on drought resistance of *Platycladus orientalis* seedlings[J]. Journal of Northwest Forestry University,2004,19(4):9-11. (in Chinese)

[18] 李元元,曹清河. 油菜素内酯参与调控植物生长发育与抗逆性的机制及其育种应用研究[J]. 中国农业科技导报,2015(2):25-32.
LI Y Y,CAO Q H. Mechanism of brassinosteroid involved in regulating plant development, stress resistance and its application in breeding [J]. Journal of Agricultural Science and Technology,2015(2):25-32. (in Chinese)

[19] 王玲爽,衣春生,李思楠,等. 大豆再生相关基因 *GmBIN2* 的克隆及生物信息学分析[J]. 基因组学与应用生物学,2016,35(2):414-419.
WANG L S,YI C S,LI S N,*et al.* Cloning and bioinformatics analysis of regeneration related gene *GmBIN2* in soybean[J]. Genomics and Applied Biology,2016,35(2):414-419. (in Chinese)

[20] TANG W,KIM T W,OSSES-PRIETO J A,*et al.* BSKs mediate signal transduction from the receptor kinase BRI1 in *Arabidopsis*[J]. Science,2008,321(5888):557-560.

[21] NAM K H,LI J. The *Arabidopsis* transthyretin-like protein is a potential substrate of brassinosteroid-insensitive 1[J]. The Plant Cell,2004,16(9):2406-2417.

[22] LI J,NAM K H. Regulation of brassinosteroid signaling by a GSK3/SHAGGY-like kinase[J]. Science,2002,295(5558):1299-1301.

[23] TONG H,XIAO Y,LIU D,*et al.* Brassinosteroid regulates cell elongation by modulating gibberellin metabolism in rice [J]. The Plant Cell,2014,26(11):4376-4393.

(上接第 77 页)

[5] 李鹏,李占斌,赵忠. 根系调查取样点数确定方法的研究[J]. 水土保持研究,2003,10(1):146-149.
LI P,LI Z B,ZHAO Z. Study of the method for determining sampling number for root investigation[J]. Research of Soil and Water Conservation,2003,10(1):146-149. (in Chinese)

[6] 林明春. 闽粤栲人工林生物量研究[J]. 林业科技开发,2014,28(6):34-37.

[7] 洪宜聪. 杉木闽粤栲混交林分特征与水土保持功能研究[J]. 江苏林业科技,2016,43(5):18-24.

[8] 郑路,卢立华. 我国森林地表凋落物现存量及养分特征[J]. 西北林学院学报,2012,27(1):63-69.
ZHENG L,LU L H. Standing crop and nutrient characteristics of forest floor litter in China[J]. Journal of Northwest Forestry University,2012,27(1):63-69. (in Chinese)

[9] 杨玉盛,林鹏,郭剑芬,等. 格氏栲天然林与人工林凋落物数量、养分归还及凋落叶分解[J]. 生态学报,2003,23(7):1278-1289.
YANG Y S,LIN B,GUO J F,*et al.* Litter production nutrient return and leaf-litter decomposition in natural and monoculture plantation forests of *Castanopsis kawakamii* in subtropical China[J]. Acta Ecologica Sinica,2003,23(7):1278-1289. (in Chinese)

[10] 曾锋,邱治军,许秀玉. 森林凋落物分解研究进展[J]. 生态环境学报,2010,19(1):239-243.
ZENG F,QIU Z J,XU X Y. Review on forest litter decomposition[J]. Ecology and Environmental Sciences,2010,19(1):239-243. (in Chinese)

[11] 赵亮生,闫文德,项文化,等. 不同年龄阶段杉木人工林枯落物层水文特征[J]. 西北林学院学报,2013,28(4):1-5.
ZHAO L S,YAN W D,XIANG W H,*et al.* Litter reserves and water-holding capacity of fir plantations with different stand ages [J]. Journal of Northwest Forestry University,2013,28(4):1-5. (in Chinese)

[12] 郭剑芬,杨玉盛,陈光水,等. 森林凋落物分解研究进展[J]. 林业科学,2006,42(4):93-100.
GUO J F,YANG Y S,CHEN G S,*et al.* A review on litter decomposition in forest ecosystem[J]. Scientia Silvae Sinicae,2006,42(4):93-100. (in Chinese)

[13] 李志安,邹碧,丁永桢,等. 森林凋落物分解重要影响因素及其研究进展[J]. 生态学杂志,2004,23(6):77-83.

[14] 魏重和. 坡位对杉木×闽粤栲混交林和杉木纯林养分积累的影响[J]. 福建林业科技,2011,38(4):46-50.

[15] 杨柳林. 福建樟湖 35 年生楠木人工林水源涵养功能研究[J]. 福建林业科技,2005,32(3):51-54.

[16] 李俊清. 森林生态学[M]. 北京:高等教育出版社,2006:100-110.

[17] 孟楚,周君璞,郑小贤. 福建将乐林场栲类次生林健康评价研究[J]. 西北林学院学报,2015,30(4):198-203.
MENG C,ZHOU J P,ZHENG X X. Health assessment of *Castanopsis* secondary forest in Jiangle Forest Farm of Fujian [J]. Journal of Northwest Forestry University,2015,30(2):198-203. (in Chinese)