油茶隐花色素基因 CoCRY1 的克隆及功能研究

任爽爽,隽乐梅,柳 倩,李建安,阎晋东

(中南林业科技大学林学院/经济林培育与保护教育部重点实验室/经济林育种与栽培国家林业和 草原局重点实验室/岳麓山实验室经济林品种创制中心,长沙410004)

摘要:油茶(Camellia oleifera Abe.) 是我国重要木本油料树种,具有重要的经济价值和社会效益。隐花色素(Cryptochrome)是植物蓝光受体之一,参与植物开花调控、光形态建成等生长发育过程。本研究从油茶华硕中克隆到CoCRYI基因,通过生物信息学分析发现,其CDS序列长度为2262 bp,编码的蛋白质序列包含684个氨基酸,蛋白分子式为C3454H5281N971O1027S18,分子量77.42 kDa,是一种不稳定的疏水蛋白,进一步分析表明其蛋白序列包含3个结构域,分别为DNA_photolyase、FAD_binding_7和Cryptochrome_C,可证明CoCRY1蛋白属于隐花色素家族。同源序列及系统发育树分析发现CoCRY1蛋白与茶树(Camellia sinensis)CsCRY1序列相似性最高。组织表达分析显示,CoCRY1的表达量在茎中最高,在花中最低。通过农杆菌转化得到CoCRYI基因异源表达的拟南芥(Arabidopsis thaliana)植株,并且从DNA水平及RNA水平鉴定到阳性植株,对CoCRYI异源表达的拟南芥进行表型分析发现,CoCRYI基因的过量表达导致拟南芥提前开花,并对下胚轴伸长具有光特异性的抑制作用。本研究通过生物信息学、定量分析及异源表达发现,油茶CoCRYI基因在油茶开花等生物学过程中具有重要作用。

关键词:隐花色素;油茶;开花;下胚轴

Cloning and Functional Study of Cryptochrome Gene *CoCRY1* from *Camellia oleifera* Abe.

REN Shuangshuang, JUAN Lemei, LIU Qian, LI Jianan, YAN Jindong

(College of Forestry, Central South University of Forestry and Technology / Key Laboratory of Cultivation and Protection for Non-Wood Forest Trees of Ministry of Education / Key Laboratory of Breeding and Cultivation of Non-Wood Forest, National Forestry and Grassl and Administration / Yuelu Mountain Laboratory Non-Wood Forests Variety Innovation Center, Changsha 410004)

Abstract: *Camellia oleifera* Abe. is an important woody oil tree in China, which has important economic and social benefits. Cryptochrome is one of the blue light receptors in plants, which is involved in the growth and development of plants such as flowering regulation and photomorphogenesis. In this study, *CoCRY1* gene was cloned from *C. oleifera* 'Huashuo'. Bioinformatics analysis showed that CDS sequence length of *CoCRY1* was 2262 bp encoding for 684 amino acids, the molecular formula of the CoCRY1 protein was C₃₄₅₄H₅₂₈₁N₉₇₁O₁₀₂₇S₁₈, and the molecular weight was 77.42 kDa, further analysis showed that this protein sequence contained three domains, namely DNA_photolyase, FAD_binding_7 and Cryptochrome_C, which proved that CoCRY1 protein belongs to cryptochrome family. Homologous sequence and phylogenetic tree analysis showed that CoCRY1 protein had the highest similarity with the homologous sequence of tea tree (*Camellia sinensis*). Tissue

收稿日期: 2023-09-25 修回日期: 2023-10-24 网络出版日期: 2023-11-15

URL: https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230925002

第一作者研究方向为经济林栽培与利用,E-mail:rss1127@outlook.com

通信作者:李建安,研究方向为经济林栽培育种,E-mail:lja0731@126.com

阎晋东,研究方向为油茶开花分子机制研究,E-mail:yjd0731@outlook.com

Foundation projects: National Natural Science Foundation of China (32371930); China Postdoctoral Science Foundation (2021M702653); Natural Science Foundation for Youth of Hunan Province (2023JJ41041); Research Foundation of Education Bureau of Hunan Province (22B0281); Changsha Natural Science Foundation (kq2202281)

expression analysis showed that the transcripts of *CoCRY1* were the highest in stem and the lowest in flower. *Arabidopsis thaliana* plants with heterogenous expression of *CoCRY1* gene were obtained by *Agrobacterium* transformation, and transgenic plants were identified from DNA and RNA level. Phenotypic analysis of transgenic *Arabidopsis* showed that overexpression of *CoCRY1* gene induced early flowering under long day londition and had photospectific inhibitory effect on hypocotyl elongation. Through bioinformatics, quantitative analysis and heterologous expression, it was found that *CoCRY1* gene plays an important role in the biological process of *C.oleifera* flowering.

Key words: cryptochrome; Camellia oleifera Abe.; flowering; hypocotyl

蓝光是植物可利用光中最重要的组成,对植物的生长发育和有机物质合成有重要影响。研究发现蓝光可参与植株的光反应和成花转变,但对不同的植物效果存在差异,多种植物在蓝光条件下的茎节间和下胚轴伸长受到抑制^[12],而矮牵牛杂交品种碧冬茄(Petunia × hybrida)的茎在蓝光下的伸长率相对红光反而有所提高^[3];蓝光可促进拟南芥(Arabidopsis thaliana)在长日照条件下开花,对现代月季(Rosa × hybrida)的开花无明显影响,但兼性日照植物仙客来(Cyclamen persicum Mill.)在蓝光下表现出开花延迟^[45],这些结果进一步验证了蓝光在植物形态建成和开花调控过程中的关键作用。此外,蓝光还参与植物的气孔运动、叶绿体运动,增加植株的光合速率及干物质累积,有助于植物在强光转换为弱光环境下的适应性转变^[6]。

隐花色素(CRY, cryptochrome)是一种黄素类 蛋白的蓝紫光受体,其N端由大约500个氨基酸构 成,与光裂解酶高度同源,可非共价结合光捕获因 子叶酸(MTHF,5,10-methyltetrahydrofolate)和光催 化因子黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD, flavin adenine dinucleotide)两个生色团,C端序列组成及长度在不 同物种中差异明显,存在一个保守但不连续的DAS (DQXVP-acidic-STAESSS)基序。该蛋白广泛存在 于真核生物和原核生物之中[7-9],植物中存在两类隐 花色素蛋白: CRYs 和 DASH ((Drosophila, Arabidopsis, Synechocystis, Human) -type cryptochromes, CRY-DASH),其中CRYs类蛋白不 具备光裂解酶活性,是蓝光调控途径的关键组分, 参与调控植物的去黄化、气孔运动、开花时间及生 物钟调控等过程^[10-12],CRY-DASH蛋白只有N端,在 植物中发挥的功能尚不明确,有研究表明其可以直 接与 DNA 和 RNA 结合并以光依赖性方式修复 UV 损伤的DNA^[13-14]。CRYs蛋白又可分类为CRY1和 CRY2两大成员组成,通常认为CRY1是参与依赖蓝 光调控的光形态发生过程的主导因子,CRY2则主 要参与光周期调控开花时间,研究表明二者在开花 调控中发挥的功能存在冗余^[11]。目前已报道不同 植物中的CRY1功能均表现出了光依赖性的抑制下 胚轴伸长,对植物生长表现出抑制效果,但在开花 方面,CRY1在不同物种中的表现差异较大,在拟南 芥中,AtCRY1参与蓝光下抑制下胚轴伸长,花色素 苷的累积,cry1突变体在各种光照条件下均出现开 花延迟的现象^[12];水稻(Oryza sativa)中研究表明 OsCRY1s在蓝光下参与抑制胚芽鞘和叶片生长,并 介导水稻的去黄化反应^[15-16];在甜高粱(Sorghum bicolor)中对两种 CRY1 基因 SbCRY1a 和 SbCRY1b 研究时发现,拟南芥中过表达两种基因后,转基因 拟南芥表现出对脱落酸高度敏感,且 SbCRY1b 过表 达可以促进拟南芥开花^[17-19],目前尚未有研究报道 对这些差异进行解释。

油茶(Camellia oleifera Abe.)是一种木本油料 树种,果实具有较高的综合利用价值,其种子经榨 取后得到的茶油,不仅不饱和脂肪酸含量高达 90%,还富含角鲨烯、维生素、黄酮等活性物质,具有 一定的食疗效果;榨取茶油后剩余的油茶籽粕和果 壳,可用于提取多糖、茶皂素、蛋白质等化工生产和 制药的原料,是一种拥有广泛应用前景的经济树 种^[2021]。目前有关油茶隐花色素的功能尚未有报 道,为了解隐花色素在油茶植株中发挥的具体功 能,本研究通过分离油茶 CoCRYI 基因的编码序列 (CDS, coding sequence)区域,对其编码蛋白质的理 化性质和结构进行分析预测,同时对其在油茶不同 部位的表达及过表达拟南芥株系的表型进行分析, 为探究油茶隐花色素的功能及光调控油茶发育的 分子机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 油茶总RNA的提取材料取自油 茶华硕茎段诱导的无菌苗,选择直径1 cm以上的嫩 绿叶片。组织表达分析的样品在2022年7月采集, 取长沙市望城区栽植的5年生华硕油茶树的根、茎、 叶、花、果实样品,置于液氮中带回中南林业科技大 学林学院实验室,贮存在-80℃冰箱中。试验所需 野生型拟南芥(Col-0)和转基因拟南芥种植在 23℃,16 h/8 h(光照/黑暗)光照条件的培养室中, 待野生型拟南芥生长至花序长度为10~15cm时,即 可用于拟南芥转化。

1.1.2 试验试剂 本研究中提取油茶总RNA所用的EZ-10 DNAaway RNA小量提取试剂盒和PCR产物回收所用的SanPrep柱式DNA 胶回收试剂盒及大肠杆菌质粒提取所用的SanPrep柱式质粒DNA小量抽提试剂盒均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。反转录 cDNA的HiScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit、普通PCR的Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 和 2×Rapid Taq Master Mix、同源重组连接的ClonExpress II One Step Cloning Kit 试剂以及荧光定量 qRT-PCR的ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 均购自南京诺唯 赞生物科技股份有限公司。大肠杆菌DH5α感受态购自北京擎科生物科技有限公司,农杆菌AGL0感受态为本实验室自制。

1.2 试验方法

1.2.1 油茶 CoCRY1 基因的克隆 在液氮中将油茶 无菌苗的叶片研磨成粉后,利用 EZ-10 DNAaway RNA小量提取试剂盒提取油茶总 RNA,再用

HiScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit将RNA 逆转 录合成 cDNA, 最后将 RNA 和 cDNA 保存至-80 ℃ 冰箱备用。在软件 Primer Premier 5 中设计 CoCRY1 的上下游引物(表1),以油茶叶片cDNA为模板,通 过 PCR (反应体系为2 × Phanta Max Buffer 25 μL, dNTP Mix 1 μL,上下游引物各2 μL,模板 DNA 2 μL, Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 1 µL, ddH₂O 17 μL。程序为95 ℃预变性3 min;95 ℃变性 15 s, 58 ℃退火 15 s, 72 ℃延伸 2 min, 循环数 35; 72 ℃彻底延伸 5 min, 保存 4 ℃) 克隆 *CoCRYI* 的 CDS片段并通过凝胶电泳对产物检测后,纯化PCR 产物并连接到 pCAMBIA 2300-GFP 过表达载体 上,将构建好的载体转化到大肠杆菌 DH5α 感受 态后,涂布在含有50 mg/L 卡那霉素的LB平板 上,37 ℃过夜培养,挑取边缘清晰的白色菌斑在 新平板上划线培养,利用 CoCRYI 的上下游引物 对各菌斑进行 PCR 检测(反应体系为 2×Rapid Taq Master Mix 10 µL,上下游引物各 0.5 µL, ddH₂O 8 μL, 菌落1个, 程序同上), 将凝胶电泳结果为单 一条带的菌株摇菌后送至北京擎科生物科技有限 公司测序。将测序结果同 CoCRYI 的 CDS 序列在 DNAMAN 6.0.40 上进行比对,确认分离出的基因 片段序列正确后,提取阳性大肠杆菌菌液的质粒 即pCAMBIA 2300-GFP-CoCRY1, 贮存在-20 ℃冰 箱中备用。

y
y

引物名称	引物序列(5'→3')	用途	
Primer name	Primer sequence $(5' \rightarrow 3')$	Use	
CoCRY-2300GFP-F	GGTACCCGGGGATCCATGTCAGGAGGTGGGTGTAGC	克隆	
CoCRY-2300GFP-R	TCCTCTAGAGGATCCTACAGCAGAGCTACAAATATGGTAC		
CoCRY-qPCR-F	TCGGAGAATCCGAGGCATTG	qRT-PCR	
CoCRY-qPCR-R	TTCGTTGGCACTTCAGCTCT		
CoGAPDH-F	CTACTGGAGTTTTCACCGA	油茶qRT-PCR内参基因	
CoGAPDH-R	TAAGACCCTCAACAATGCC		
CoCRY-trans-F	GAAGATGCCTCTGCCGACA	转基因拟南芥鉴定	
CoCRY-trans-R	CCTCAAGGAGAGTAGAGACAGTATC		
AtACTIN 2-trans-F	CACTGTGCCAATCTACGAGGGT		
AtACTIN 2-trans-R	CCTGCCTCATCATACTCGGC		
AtACTIN 2-qPCR-F	CACTGTGCCAATCTACGAGGGT	拟南芥qRT-PCR内参基因	
AtACTIN 2-qPCR-R	CACAAACGAGGGCTGGAACAAG		

1.2.2 *CoCRY1* 基因生物信息分析 将CDS 区的核 苷酸序列翻译为蛋白序列,利用在线网站pfam (http://pfam.xfam.org/)分析编码蛋白的结构域,进一步确认分离出的基因属于*CRYs*家族。通过在线 工具 ExPASy (https://www.expasy.org/)、SOPMA (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl? page=npsa_sopma.html)和 MEME (https://meme-suite.org/meme/index.html)对 CoCRY1 蛋白的理化 性质、二级、三级结构及 motif 基序进行分析预测,通过在线网站 NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov)检索 CRY 同源蛋白序列,并利用 DNAMAN 6.0.40和 MEGA 11进行多重序列比对和系统发育 树构建,构建方法采用 ML 最大似然法(Maximal likelihood)。

1.2.3 组织表达分析 根据 *CoCRY1* 的 CDS 序列, 设计特异性荧光定量引物(表1)。利用液氮将 油茶不同部位的样品研磨成粉,根据1.2.1 的方 法提取 RNA 并合成 cDNA,内参基因选择 *CoGAPDH*,利用 Bio-Rad CFX96 实时荧光定量 PCR 仪进行 qRT-PCR。反应体系为 2×ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 5 μ L,上下游引 物各 0.5 μ L,模板 cDNA 4 μ L。程序为95 ℃预变 性 5 min,95 ℃变性 30 s,58 ℃退火 30 s,72 ℃延 伸 30 s,循环数 45,采用 2^{-ΔΔCt}法(Livak法)对检测 结果进行分析。

1.2.4 *CoCRY1*转化拟南芥植株的筛选与鉴定 将构建好的 pCAMBIA 2300-*GFP-CoCRY1* 过表达载体转化农杆菌 AGL0 感受态,利用浸花法^[22]转化野生型拟南芥(Col-0)。将收获的 T₀代种子播种

在含有 50 mg/L 卡那霉素的 1/2 MS 固体培养基 平板上进行筛选,22 ℃,全光照培养,将具有抗 性的植株转移至花盆中,在22 ℃,16 h/8 h(光 照/黑暗)的温室中继续培养至10片叶时,选取 Col-0和抗性植株的叶片提取 DNA,利用 PCR (引物见表1)对转基因拟南芥植株进行鉴定, 对凝胶电泳结果为单一条带的拟南芥植株进行 CoCRYI 表达量检测,收取过表达 CoCRYI 株系的 种子,即为T₁代。选取3个表型相近的株系,分别 命名为 35S-CoCRYI-1、35S-CoCRYI-2 和 35S-CoCRY1-3,收集其T,代纯合株系种子,将Col-0和 T。代种子播撒在同一1/2 MS 固体平板上, 春化4 d, 在黑暗和弱光(10 μ mol/(m²·s¹))条件下各放置 一个平板,培养5d后拍照并统计下胚轴长度。 在长日照条件的温室中同时种植T₂代植株和Col-0, 培养至开花,分别记录其开花时间和莲座叶数, 待所有拟南芥植株开花后,拍照记录。

2 结果与分析

2.1 油茶 CoCRY1 的 CDS 分离及编码蛋白结构域

对从油茶 cDNA 中克隆获得 CoCRYI 的 CDS 片段进行凝胶电泳检测,结果与预期大小一致 (图 1A),测序结果表明其 CDS 区长 2262 bp,共编 码 684 个氨基酸,其蛋白序列包含 3 个结构域(图 1B),分别为 DNA_photolyase、FAD_binding_7 和 Cryptochrome_C,表明该蛋白 N 端不仅与光裂解酶 同源,还存在 FAD 结合区域,同时其 C 端存在隐花 色素蛋白结构域,因而 CoCRY1 蛋白属于隐花色素 家族。



2.2 油茶CoCRY1蛋白的理化性质分析

对 *CoCRYI* 基因编码蛋白进行分析,结果表明:该蛋白分子式为C₃₄₅₄H₅₂₈₁N₉₇₁O₁₀₂₇S₁₈,分子量 77.42 kDa,理论等电点5.54,亲水性-0.458(图2A), 不稳定指数51.76,是一种不稳定的疏水蛋白;二级 结构分析表明该蛋白质4种二级结构无规则卷曲、 α-螺旋、延伸链和β转角的占比分别为43.13%、 41.52%、10.23%和5.12%,三级结构模型(图2B)结 果与二级结构(图2C)的预测基本一致。



2.3 油茶 CoCRY1 蛋白的同源性分析及系统发育 树构建

将油茶的 CoCRY1 蛋白序列同茶树(Camellia sinensis)、葡萄(Vitis vinifera)、番茄(Solanum lycopersicum)、龙眼(Dimocarpus longan)、杨梅 (Morella rubra)、大豆(Glycine max)的 CRY1 蛋白 序列进行多重序列比对(图 3A),结果表明6种蛋 白在 DNA_photolyase、FAD_binding_7 两个结构域 的序列差异较小,而Cryptochrome_C区域除DAS 基序外,序列组成变化大,相似程度极低。对25个 物种的40条CRYs蛋白序列进行系统发育树构建 (图3B),结果表明CoCRY1同茶树CsCRY1蛋白处 于同一分支,二者亲缘关系较近,且motif基序集中在 蛋白序列N端,同多重序列比对的结果一致,表明C 端是CRYs蛋白在进化过程中主要的遗传变异来源, 这一结果同其他物种中的CRY1s蛋白的特征一致。



序列(bp)Sequence

A:多重序列比对,Cs:茶树,Vv:葡萄,SI:番茄,DI:龙眼,Mr:杨梅,Gm:大豆,图中黑色线条区域代表保守结构域DNA_photolyase、 FAD_binding_7、Cryptochrome_C,红色线条区域代表DAS基序;B:系统发育树构建及motif基序分析,Ah:落花生,Ao:石刁柏, At:拟南芥,Bd:二穗短柄草,Bn:欧洲油菜,Br:白菜,Ca:小粒咖啡,Cb:荠,Cc:木豆,Cs:茶,DI:龙眼,Gm:大豆,Gs:野大豆, Hs:木槿,Hv:大麦,Mr:杨梅,Mt:穴芭蕉,Os:水稻(日本组),Pf:紫苏,Sb:高粱,Si:芝麻,SI:番茄,Vu:豇豆,Vv:葡萄,Zm:玉米
A: Multiple sequence alignment, Cs: *Camellia sinensis*, Vv: *Vitis vinifera*, SI: *Solanum lycopersicum*, DI: *Dimocarpus longan*, Mr: *Myrica rubra*, Gm: *Glycine max*, in the figure, the black line regions represent the conserved domains DNA_photolyase, FAD_binding_7 and Cryptochrome_C, and the red line regions represent the DAS motif; B: Phylogenetic tree construction and motif analysis, Ah: *Arachis hypogaea*, Ao: *Asparagus officinalis*, At: *Arabidopsis thaliana*, Bd: *Brachypodium distachyon*, Bn: *Brassica napus*, Br: *Brassica rapa* subsp. *Pekinensis*, Ca: *Coffea arabica*, Cb: *Capsella bursa-pastoris*, Cc: *Cajanus cajan*, Cs: *Camellia sinensis*, DI: *Dimocarpus longan*, Gm: *Glycine max*, Gs: *Glycine soja*, Hs: *Hibiscus syriacus*, Hv: *Hordeum vulgare* subsp. *Vulgare*, Mr: *Morella rubra*, Mt: *Musa troglodytarum*, Os: *Oryza sativa* Japonica Group, Pf: *Perilla frutescens* var. *frutescens*, Sb: *Sorghum bicolor*, Si: *Sesamum indicum*, SI: *Solanum lycopersicum*, Vu: *Vigna unguiculata*, Vv: *Vitis vinifera*, Zm: Zea mays

Fig.3 Multiple sequence alignment and phylogenetic analysis of CoCRY1

2.4 油茶 CoCRY1 的组织表达特异性分析

为探究 CoCRYI 基因在油茶不同器官的表达情况,以油茶的根、茎、叶、花、果实和种子的 cDNA 为模板,利用 qRT-PCR 对 CoCRYI 基因在油茶不同器 官的表达量进行分析,结果表明(图4),CoCRYI 在 油茶各组织的表达量存在较大差异,在茎中的表达 量最高,花中最低。



2.5 油茶 CoCRY1 转化拟南芥植株鉴定及其表型 观察

为探究CoCRYI基因的功能,利用浸花法转化

得到过表达 CoCRYI 基因的拟南芥植株 35S-CoCRYI-1、35S-CoCRYI-2和 35S-CoCRYI-3,鉴定 结果如图 5A所示,Col-0中未扩增出条带,阳性株 系可以扩增出单一且大小一致的条带。利用 qRT-PCR对 CoCRYI 转基因植株进行表达量分析 (图 5B),结果表明3个株系的 CoCRYI 的表达量显 著增加,可用于后续表型分析。

将 Col-0 和 3 个转基因株系 35S-CoCRYI-1、 35S-CoCRY1-2 和 35S-CoCRY1-3 同在长日照下培 养,观察各株系的开花情况(图6A、B),结果表明, CoCRYI 过表达株系的开花时间和莲座叶数目均 与Col-0株系存在显著差异,相对于Col-0,3个株 系的开花时间分别提前 3.88 d、3.08 d、3.9 d, 莲 座叶数目分别减少2.3、2.8、2.5片,表明过表达 CoCRYI 的拟南芥植株开花时间提前。各株系 拟南芥下胚轴的伸长情况观测结果显示(图6C、 D),黑暗条件下,转基因株系和野生型拟南芥的 下胚轴长度无明显差别;弱光下,转基因株系的 下胚轴长度明显短于野生型拟南芥,长度分别减 少1.46 mm、1.40 mm、1.26 mm,即光照条件下,过 表达 CoCRYI 基因的拟南芥植株的下胚轴生长 受到抑制。因此,过表达 CoCRYI 基因能够促进 拟南芥开花,并对下胚轴伸长具有光特异性的抑 制作用。



图5 转基因拟南芥鉴定

Fig.5 Identification of transgenic Arabidopsis



A: 拟南芥开花图; B: 开花时间统计分析; C: 在黑暗或弱光下生长5d后拟南芥下胚轴; D: 下胚轴长度统计分析, ns、*分别表示在P<0.05水平上无显著差异和存在显著差异

A: Flowering of Arabidopsis; B: Statistical analysis of flowering time; C: Hypocotyl of Arabidopsis grew under dark or weak light for 5 days; D: Statistical analysis of hypocotyl length, ns and * respectively represent no significant differences and significant differences at the P < 0.05图6 转基因拟南芥表型观测



讨论 3

隐花色素蛋白是最早被发现的一类蓝紫光受 体,目前在多种动植物中的CRY1蛋白均已被鉴定。 研究表明,CRYs类蛋白存在两大结构域,N端的 PHR (Photolyase-homologous region)结构域和C端 的CCE (C-terminal extension)结构域,前者与光裂解 酶高度同源但不具备其光活性,进化保守[23-24],该区域 可结合两个生色团,是负责光感应的功能区;后者在 各物种的同源性较低,序列组成和长度相对多变,仅 存在一个保守的DAS基序,CCE结构域对CRYs蛋白 的构象及分子间的相互作用影响较大[25-26]。本研究从 油茶中克隆到 CoCRYI 的 CDS 片段, 全长 2262 bp, 编 码684个氨基酸,蛋白序列包含的DNA photolyase、

FAD binding 7和Cryptochrome C结构域符合隐花 色素家族的特征,进一步的多重序列比对和motif基 序分析发现油茶和茶树的CRY1s蛋白序列相似度 为88.26%,且在系统进化树上处于一个分支,二者 亲缘关系最近,推测油茶CoCRY1与其他物种报道 的功能相似,可能对油茶的光形态建成有较大影 响。此外,研究结果表明 CoCRYI 在油茶茎中表达 量最高,花中最低,与先前报道的CsCRYI在茶树的 根部的表达量最高^[27]、CRYIs在马铃薯和玉米的叶 片中表达量最高[28-29]的结果存在较大差异,说明 CRY1在植物中发挥的主要功能可能因物种不同存 在差异。

CRY1 在拟南芥、甜高粱、苹果(Malus pumila Mill.)、百合(Lilium×formolongi)等物种中的功能及

调控过程已有较多报道,研究表明,拟南芥中CRY1 是幼苗发生光形态建成的主要蓝光受体,其在蓝光 抑制下胚轴伸长及花青素合成中的功能已通过hv4 突变体(CRYI 基因受损)植株的研究得到支持, CRY2则是开花的主导因子,但二者的缺失均会缓 解蓝光对下胚轴的抑制情况,表明二者发挥的功能 存在冗余^[30]。有关CRY1对光形态建成调控机制主 要有两种途径,一是CRY1可以直接结合E3泛素连 接酶 CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1)并抑制其活性,从而维持包括开花正调控 因子 CONSTANS (CO)、转录因子 ELONGATED HYPOCOTYL 5(HY5)等蛋白丰度,进而调控光信 号介导的形态建成或开花过程,二是CRY1还可以 直接结合光敏色素作用因子 PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4 (PIF4)调节生长素的 合成过程,间接影响下胚轴伸长、热形态建成及遮 荫反应等^[31-34]。此外,最新研究表明,CRY1还可 以通过影响植物激素信号传导途径来影响植物生 长,在小麦(Triticum aestivum)和拟南芥中,CRY1 被证实可以与赤霉素受体 GID1 和 DELLAs 蛋白 相互作用,负调控赤霉素信号传导过程,从而抑制 下胚轴生长,且TaCRYIa过表达可以降低小麦的 株高和胚芽鞘生长[35-36],这些结果同本研究中 CoCRY1 光依赖性抑制下胚轴伸长具有一致性, 可以为后续研究CoCRY1对油茶的光形态调控提 供依据。

当前已报道的物种中的 CRY1s 对开花进程的 影响存在较大差异,在短日照条件下,拟南芥 cryl 突变体在短日照条件下的开花时间延迟甚至晚于 野生型拟南芥,而过表达AtCRY1则会导致拟南芥 的开花时间提前^[37],研究表明AtCRY1蛋白可以通 过CCE结构域与SPA1相互作用,使COP1与SPA1 分离来抑制 COP1 的 E3 泛素连接酶活性,维持 CO 的表达水平,从而促进拟南芥开花;在苹果中, MdCRYI 虽可以促进开花但效果不明显^[38]; 甜高粱 SbCRY1b转化拟南芥后则只在长日照下表现出早 花现象,短日照不受影响,这一点和百合LfCRYI 的研究结果一致^[17-18, 32]。本研究中, CoCRYI 同样 可以使长日照条件下的转基因拟南芥开花提前, 由此可以推断, CRYIs 在植物开花调控过程中可 能受到多种因素的影响,虽然过量表达后可以促 进转基因拟南芥开花,但对油茶来说,CoCRYI是 否可以影响油茶开花进程仍需进一步验证。

参考文献

 [1] 刘玉兵,陈海燕,王军伟,黄科,李洁,刘明月.LED红蓝光 质调控辣椒幼苗生长的光合机制研究.河南农业科学, 2021,50(7):145-153
 Liu Y B, Chen H Y, Wang J W, Huang K, Li J, Liu M Y.

Photosynthetic regulation mechanism of red and blue LED light quality on growth of pepper seedlings. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2021, 50(7): 145-153

- [2] 屈成,刘芬,陈光辉,王悦.LED红蓝光质对水稻幼苗生长及生理特性的影响.核农学报,2020,34(9):2095-2102
 Qu C, Liu F, Chen G H, Wang Y. Effects of LED red and blue light ratio on growth and physiological characteristics of rice seedlings. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2020, 34 (9): 2095-2102
- [3] Gautam P, Terfa M T, Olsen J E, Torre S. Red and blue light effects on morphology and flowering of *Petunia×hybrida*. Scientia Horticulturae, 2015, 184: 171-178
- [4] Heo J W, Lee C W, Murthy H N, Paek K Y. Influence of light quality and photoperiod on flowering of *Cyclamen persicum* Mill. cv. 'Dixie White'. Plant Growth Regulation, 2003, 40: 7-10
- [5] Terfa M T, Solhaug K A, Gislerød H R, Olsen J E, Torre S. A high proportion of blue light increases the photosynthesis capacity and leaf formation rate of *Rosa×hybrida* but does not affect time to flower opening. Physiologia Plantarum, 2013, 148(1): 146-159
- [6] 龚洪恩,吴鹏飞,姚小华,龙伟,王开良.LED光质对油茶苗
 生理生化特性的影响.甘肃农业大学学报,2018,53(5):
 52-57

Gong H E, Wu P F, Yao X H, Long W, Wang K L. Effects of LED light on the physiological and biochemical characteristics of *Camellia oleifera* seedlings. Journal of Gansu Agricultural University, 2018, 53(5): 52-57

- [7] 朱春利,张桂荣,蔡爱军,杜金友.植物隐花色素结构与功能研究进展.基因组学与应用生物学,2009,28(1):174-178 Zhu C L, Zhang G R, Cai A J, Du J Y. Advances in the structure and function of cryptochrome in plant. Genomics and Applied Biology, 2009, 28(1):174-178
- [8] Ahmad M, Cashmore A R. HY4 gene of A. thaliana encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. Nature, 1993, 366: 162-166
- [9] 左泽乘. 拟南芥蓝光受体与 SPA1 蛋白相互作用和功能的生化分析. 长沙: 湖南大学, 2011
 Zuo Z C. Biochemistry analysis of blue light receptor interaction with SPA1 and the mechanism in *Arabidopsis*. Changsha: Hunan University, 2011
- [10] Klar T, Pokorny R, Moldt J, Batschauer A, Essen L O. Cryptochrome 3 from Arabidopsis thaliana: Structural and functional analysis of its complex with afolate light antenna. Journal of Molecular Biology, 2007, 366(3): 954-964
- [11] Wang Q, Lin C. Mechanisms of cryptochrome-mediated photoresponses in plants. Annual Review of Plant Biology,

2020, 71(1): 103-129

- Lin C, Ahmad M, Cashmore A R. *Arabidopsis* cryptochrome 1 is a soluble protein mediating blue light-dependent regulation of plant growth and development. The Plant Journal, 1996, 10 (5): 893-902
- Brudler R, Hitomi K, Daiyasu H, Toh H, Kucho K I, Ishiura M, Kanehisa M, Roberts V A, Todo T, Tainer J A, Getzoff E D. Identification of a new cryptochrome class: Structure, function, and evolution. Molecular Cell, 2003, 11(1): 59-67
- [14] Yu X, Liu H, Klejnot J, Lin C. The cryptochrome blue light receptors. Arabidopsis Book, 2010, 8: e0135
- [15] Hirose F, Shinomura T, Tanabata T, Shimada H, Takano M. Involvement of rice cryptochromes in de-etiolation responses and flowering. Plant and Cell Physiology, 2006, 47 (7): 915-925
- [16] 李毓, 庄伟建, 庄春红, 王乃元, 戴飞. 干扰隐花色素 Cry1a 与 Cry1b 基因的表达对水稻若干农艺性状的影响. 福建农林 大学学报:自然科学版, 2012, 41(2):153-158
 Li Y, Zhuang W J, Zhuang C H, Wang N Y, Dai F. Effects of interfering the expression of cryptochrome Cry1a/Cry1b genes on several rice agronomic traits. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University: Natural Science Edition, 2012, 41 (2): 153-158
- [17] Zhou T, Meng L, Ma Y, Liu Q, Zhang Y, Yang Z M, Yang D, Bian M. Overexpression of sweet sorghum cryptochrome 1a confers hypersensitivity to blue light, abscisic acid and salinity in Arabidopsis. Plant Cell Reports, 2018, 37: 251-264
- [18] Zhou T, Zhou L, Ma Y, Gao J, Li W, Piao M, Zeng B, Yang Z M, Bian M. Cryptochrome 1b from sweet sorghum regulates photoperiodic flowering, photomorphogenesis, and ABA response in transgenic *Arabidopsis thaliana*. Plant Molecular Biology Reporter, 2018, 36: 13-22
- [19] 周婷婷.甜高粱隐花色素CRYPTOCHROME1a和 CRYPTOCHROME1b的功能、信号转导机制及胁迫响应分析.长春:吉林大学,2017 Zhou T T. Function, signaling mechanism and stress response

of the CRYPTOCHROME 1a and CRYPTOCHROME 1b in sweet sorghum. Changchun: Jilin University, 2017

- [20] 向婷婷,孔庆博,郑倩,丁春邦,冯士令,周莉君,陈涛.野生油茶资源与引进品种的经济性状及脂肪酸组成对比分析. 中国粮油学报,2022,37(8):253-260
 Xiang T T, Kong Q B, Zheng Q, Ding C B, Feng S L, Zhou L J, Chen T. Comparative analysis of economic characters and fatty acid composition between wild *Camellia Oleifera* resources and introduced varieties. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2022, 37(8): 253-260
- [21] 陈素传,季琳琳,姚小华,张文胜,韩文妍,殷刘彪.油茶品 种果实主要经济性状和营养成分的差异分析.经济林研究, 2022,40(2):1-9
 Chen S C, Ji L L, Yao X H, Zhang W S, Han W Y, Yin L B. Variation analysis on the main economic characters and nutrients of fruit from *Camellia oleifera* varieties. Non-wood

Forest Research, 2022, 40(2): 1-9

- [22] Zhang X, Henriques R, Lin S S, Niu Q W, Chua N H. Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. Nature Protocols, 2006, 1 (2), 641-646
- [23] Wang W, Mao Z, Guo T, Kou S, Yang H Q. The involvement of the *N*-terminal PHR domain of *Arabidopsis* cryptochromes in mediating light signaling. aBIOTECH, 2021, 2 (2) : 146-155
- [24] Liu H, Liu B, Zhao C, Pepper M, Lin C. The action mechanisms of plant cryptochromes. Trends in Plant Science, 2011, 16(12): 684-691
- [25] Hong S H, Kim H J, Ryu J S, Choi H, Jeong S, Shin J, Choi G, Nam H G. CRY1 inhibits COP1-mediated degradation of BIT1, a MYB transcription factor, to activate blue lightdependent gene expression in Arabidopsis. The Plant Journal, 2008, 55(3): 361-371
- [26] Palayam M, Ganapathy J, Guercio A, Tal L, Deck S, Shabek N. Structural insights into photoactivation of plant Cryptochrome-2. Communications Biology, 2020, 4, 28
- [27] 唐千惠,王佳欣,孙康,曾亮,吴致君.茶树隐花色素基因 CsCRY1和CsCRY2的克隆及表达模式分析.植物资源与环境 学报,2020,29(6):11-22
 Tang Q H, Wang J X, Sun K, Zeng L, Wu Z J. Cloning of cryptochrome gene CsCRY1 and CsCRY2 in Camellia sinensis and analysis on expression pattern. Journal of Plant Resources and Environment, 2020, 29(6): 11-22
- [28] 甘晓燕, 吴英英, 张丽, 巩檑, 石磊, 陈虞超, 聂峰杰, 刘 璇, 宋玉霞. 马铃薯隐花色素基因克隆及表达分析. 分子植 物育种, 2019, 17(9): 2785-2790
 Gan X Y, Wu Y Y, Zhang L, Gong L, Shi L, Chen Y C, Nie F J, Liu X, Song Y X. Cloning and expression analysis of cryptochrome gene in potato. Molecular Plant Breeding, 2019, 17(9): 2785-2790
- [29] 闫蕾,杨宗举,苏亮,肖阳,郭林,宋梅芳,孙蕾,孟凡华, 白建荣,杨建平.2个玉米 ZmCRYIa 基因的克隆及其响应光 质处理的表达模式.作物学报,2016,42(9):1298-1308
 Yan L, Yang Z J, Su L, Xiao Y, Guo L, Song M F, Sun L, Meng F H, Bai J R, Yang J P. Molecular cloning of two maize (Zea mays) CRYIa genes and their expression patterns of in response to different light treatments. Acta Agronomica Sinica, 2016, 42(9): 1298-1308
- [30] Mockler T C, Guo H W, Yang H Y, Duong H, Lin C T. Antagonistic actions of *Arabidopsis* cryptochromes and phytochrome B in the regulation of floral induction. Development, 1999, 126 (10): 2073-2082
- Zhai H, Xiong L, Li H, Lyu X, Yang G, Zhao T, Liu J, Liu B. Cryptochrome 1 inhibits shoot branching by repressing the self-activated transciption loop of PIF4 in *Arabidopsis*. Plant Communications, 2020, 1(3): 100042
- [32] Li Y Y, Mao K, Zhao C, Zhang R F, Zhao X Y, Zhang H L, Shu H R, Zhao Y J. Molecular cloning of *cryptochrome 1* from

apple and its functional characterization in Arabidopsis. Plant Physiology and Biochemistry, 2013, 67: 169-177

- [33] Wu X M, Wei X R, Li Z, Jia G X, Chen J R, Chen H X, Cao F X, Zheng S X, Li J H, Li Y F. Molecular cloning of *cryptochrome 1* from *Lilium×formolongi* and the characterization of its photoperiodic flowering function in *Arabidopsis*. Plant Science, 2022, 316: 111164
- [34] Mao Z, Wei X, Li L, Xu P, Zhang J, Wang W, Guo T, Kou S, Wang W, Miao L, Cao X, Zhao J, Yang G, Zhang S, Lian H, Yang H Q. Arabidopsis cryptochrome 1 controls photomorphogenesis through regulation of H2A.Z deposition. Plant Cell, 2021, 33(6): 1961-1979
- [35] Zhong M, Zeng B, Tang D, Yang J, Qu L, Yan J, Wang X, Li X, Liu X, Zhao X. The blue light receptor CRY1 interacts with GID1 and DELLA proteins to repress GA signaling during

photomorphogenesis in *Arabidopsis*. Molecular Plant, 2021, 14(8): 1328-1342

- [36] Yan B, Yang Z, He G, Jing Y, Dong H, Ju L, Zhang Y, Zhu Y, Zhou Y, Sun J. The blue light receptor CRY1 interacts with GID1 and DELLA proteins to repress gibberellin signaling and plant growth. Plant Communications, 2021, 2(6): 100245
- [37] Exner V, Alexandre C, Rosenfeldt G, Alfarano P, Nater M, Caflisch A, Gruissem W, Batschauer A, Hennig L. A gain-offunction mutation of Arabidopsis cryptochromel promotes flowering. Plant Physiology, 2010, 154(4): 1633-1645
- [38] Li Y Y, Mao K, Zhao C, Zhang R F, Zhao X Y, Zhang H L, Shu H R, Hao Y J. Molecular cloning of *cryptochrome* 1 from apple and its functional characterization in Arabidopsis. Plant Physiology and Biochemistry, 2013, 67: 169-177