

茶树隐花色素基因 *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 的 克隆及表达模式分析

唐千惠^{a,b}, 王佳欣^{a,b}, 孙康^{a,b,c}, 曾亮^{a,b,c}, 吴致君^{a,b,c,①}

(西南大学: a. 食品科学学院, b. 食品科学与工程国家级实验教学示范中心, c. 茶叶研究所, 重庆 400715)

摘要: 通过同源比对茶树 [*Camellia sinensis* (Linn.) Kuntze] 基因组和转录组数据, 获得 2 个茶树隐花色素 (CRY) 基因。利用 PCR 克隆技术, 从茶树品种‘福鼎大白茶’ (‘Fuding Dabaicha’) 中克隆得到这 2 个隐花色素基因, 分别命名为 *CsCRY1* 和 *CsCRY2*。采用生物信息学方法, 对茶树 *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 基因编码蛋白的结构域、系统进化关系、二级结构和 PHR 结构域的三级结构进行分析, 对 *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 基因的启动子顺式作用元件及其功能进行了预测分析。结果显示: 茶树 *CsCRY1* 基因开放阅读框长度为 2 055 bp, 编码 684 个氨基酸; *CsCRY2* 基因开放阅读框长度为 1 944 bp, 编码 647 个氨基酸; *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 蛋白均在 N 端含有保守的 PHR 结构域, 在 C 端含有保守的 CCE 结构域, 这 2 个结构域在拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.] 中具有传导蓝光信号的功能。系统进化分析结果显示: *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 蛋白属于 Plant CRY 类隐花色素, 其进化树分支距离与同目 (杜鹃花目) 植物滇山茶 (*Camellia reticulata* Lindl.) 和中华猕猴桃 (*Actinidia chinensis* Planch.) 较近, 与单子叶植物距离较远。*CsCRY1* 和 *CsCRY2* 基因的启动子顺式作用元件与光照和激素条件密切相关。实时荧光定量 PCR 分析结果显示: 茶树根中 *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 基因的相对表达水平最高, 其后依次为叶、花、茎; 蓝光能显著诱导 *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 基因上调表达; 0.1 mmol · L⁻¹ 脱落酸 (ABA) 以及 1.0 mmol · L⁻¹ 吲哚乙酸 (IAA)、茉莉酸甲酯 (MeJA) 和赤霉素 (GA₃) 均能刺激 *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 基因上调表达。研究结果显示: 茶树 *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 基因可能在组织发育、蓝光信号传导和激素调控中发挥重要作用。

关键词: 茶树; 隐花色素; *CsCRY1* 基因; *CsCRY2* 基因; 表达模式

中图分类号: Q785; S571.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2020)06-0011-12

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2020.06.02

Cloning of cryptochrome gene *CsCRY1* and *CsCRY2* in *Camellia sinensis* and analysis on expression pattern TANG Qianhui^{a,b}, WANG Jiabin^{a,b}, SUN Kang^{a,b,c}, ZENG Liang^{a,b,c}, WU Zhijun^{a,b,c,①} (Southwest University: a. College of Food Science, b. National Demonstration Center for Experimental Food Science and Technology Education, c. Tea Research Institute, Chongqing 400715, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2020, 29(6): 11-22

Abstract: Two cryptochrome (CRY) genes in *Camellia sinensis* (Linn.) Kuntze were obtained by homologous comparison with genome and transcriptome datums of *C. sinensis*. These two cryptochrome genes, named *CsCRY1* and *CsCRY2*, were cloned from *C. sinensis* ‘Fuding Dabaicha’ by using PCR cloning technology. Domain, phylogenetic relationship, secondary structure, and tertiary structure of PHR domain of proteins encoded by *CsCRY1* and *CsCRY2* genes in *C. sinensis* were analyzed by using bioinformatic method, and predictive analysis on *cis*-acting elements and their functions of promoters of *CsCRY1* and *CsCRY2* genes was carried. The results show that the open reading frame of *CsCRY1* gene in *C. sinensis* is 2 055 bp in length, which encodes 684 amino acids, and that of *CsCRY2* gene is 1 944 bp in length, does 647 amino acids. There is a conserved PHR domain and a conserved CCE domain at

收稿日期: 2020-05-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31800586); 安徽农业大学茶树生物学与资源利用国家重点实验室开放基金项目 (SKLTOF20190122)

作者简介: 唐千惠 (1999—), 女, 四川乐山人, 本科, 主要从事茶树生理与分子生物学方面的研究。

①通信作者 E-mail: wzj547@swu.edu.cn

N-terminal and C-terminal of CsCRY1 and CsCRY2 proteins, respectively, which have a function of transmitting blue light signals in *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh. The phylogenetic analysis result shows that CsCRY1 and CsCRY2 proteins belong to the cryptochrome of Plant CRY type, and their branch distances in phylogenetic tree are close to the same order (Ericales) plants of *Camellia reticulata* Lindl. and *Actinidia chinensis* Planch., but are far from monocots. The cis-acting elements of promoters of CsCRY1 and CsCRY2 genes are closely related to light and hormone conditions. The result of real-time fluorescence quantitative PCR analysis shows that relative expression levels of CsCRY1 and CsCRY2 genes are the highest in roots of *C. sinensis*, followed by leaves, flowers, and stems; blue light can significantly induce up-regulated expression of CsCRY1 and CsCRY2 genes; $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ abscisic acid (ABA), and $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ indole acetic acid (IAA), gibberellin (GA_3), and methyl jasmonate (MeJA) can stimulate up-regulated expression of CsCRY1 and CsCRY2 genes. It is suggested that CsCRY1 and CsCRY2 genes in *C. sinensis* may play important roles in tissue development, blue light signal transduction, and hormone regulation.

Key words: *Camellia sinensis* (Linn.) Kuntze; cryptochrome; CsCRY1 gene; CsCRY2 gene; expression pattern

茶树[*Camellia sinensis* (Linn.) Kuntze]隶属于山茶科(Theaceae)山茶属(*Camellia* Linn.),为多年生常绿木本植物,是中国重要的叶类经济作物。茶叶中富含茶多酚、茶氨酸和咖啡碱等物质,在抗癌、抗衰老、抗炎症和预防心脑血管疾病等方面发挥一定作用^[1-2]。茶叶的产量和品质与茶树的生长环境密切相关,光照是其重要的影响条件之一。如:采摘前适当遮光可提高茶叶中茶氨酸等鲜爽类物质含量,降低黄酮等苦涩味物质含量;长日照条件可延长茶芽可采周期;光质的差异化可影响茶叶多酚类和香气组分^[3-5]。目前,尽管凭借种植经验可通过改变光照环境调节茶树的生长,但茶树受光调控机制不明确阻碍了园艺措施精细化和育种定向化^[6-7]。

植物中存在一系列的光受体,如光敏色素(phytochromes, PHYs)、向光素(phototropins, PHOTs)、隐花色素(cryptochromes, CRYs)和紫外抗性位点8(UV resistance locus 8, UVR8),通过感知光质特征和光的强弱以及改变光周期调节植物对环境的适应性^[8-9]。研究表明:茶树在光照环境中的发育和代谢受到光受体的调控^[3-4,10]。因此,进一步开展茶树光受体基因研究对于茶园园艺措施改进和茶树品种改良具有重要意义。

隐花色素是一种类似于光裂解酶的蓝光/近紫外光的光受体蛋白^[11-12]。植物中的 Plant CRY 和 CRY-DASH 类隐花色素属于光裂解酶/隐花色素超级家族(photolyase/cryptochrome superfamily)^[13]。有关植物中 Plant CRY 类隐花色素的研究较多,其生物学功能较为明确^[13]。Plant CRY 类隐花色素具有 N

端的光裂解酶同源区域(photolyase homology region, PHR)以及长度和序列多变的 C 端隐花色素延伸域(cryptochrome C-terminal extension, CCE) 2 个结构域^[11,13]。Plant CRY 类隐花色素通过传导蓝光信号调节植物的生长发育和物质代谢,如抑制下胚轴生长^[14]、开花^[15]、气孔发育^[16]、子叶发育^[17]和类黄酮合成^[18]等。目前,Plant CRY 类隐花色素基因已在多种植物中被分离和鉴定,如拟南芥[*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.]^[14]、水稻(*Oryza sativa* Linn.)^[19]、小麦(*Triticum aestivum* Linn.)^[20]、番茄(*Solanum lycopersicum* Linn.)^[21]、高粱[*Sorghum bicolor* (Linn.) Moench]^[22]、莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)^[23]、大豆[*Glycine max* (Linn.) Merr.]^[24]和胡杨(*Populus euphratica* Oliv.)^[25]等。Liu 等^[3]和 Zheng 等^[4]利用茶树转录组和代谢组对其受单色光调控的机制进行了研究,结果显示:蓝光促进茶叶中多酚类物质的积累,推测这可能与隐花色素基因介导调控有关。然而,茶树中隐花色素基因尚未被克隆鉴定,其生物学功能还需进一步研究。

本研究通过同源序列比对茶树基因组和转录组数据^[26-27],克隆到 2 个茶树隐花色素基因,对其编码蛋白序列的功能结构域、系统进化关系、二级结构和 PHR 结构域的三级结构进行了生物信息学分析,对这 2 个基因启动子的顺式作用元件进行了预测分析,并利用实时荧光定量 PCR 技术分析了这 2 个隐花色素基因在不同组织以及不同光照和激素处理下的表达模式,较为系统地阐述了茶树隐花色素结构和功能

特征,以期为进一步开展其在光照环境中网络调控作用机制的研究提供帮助。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料为茶树品种‘福鼎大白茶’(‘Fuding Dabaicha’)1年生扦插苗,购自南京雅润茶叶有限公司。

1.2 方法

1.2.1 处理方法 于2020年4月选取长势一致的茶树幼苗种植于花盆(直径16.5 cm,高17.5 cm)中,栽培基质为体积比1:1的草泥土和蛭石,然后置于RDN-300B-4人工气候光照培养箱(宁波东南仪器有限公司)中,培养条件为温度25℃、光照时间16 h·d⁻¹、光照强度180 μmol·m⁻²·s⁻¹,白光。培养2周后,用于后续实验。

组织表达分析:分别选用茶树幼苗顶部向下数第3枚叶片、嫩茎、花和嫩根。

光照处理:将茶树幼苗分别置于白光、黑暗、蓝光和红光的培养箱中,分别于处理0和4 h采摘顶部向下数第3枚叶片。每个处理3个生物学重复,每个重复3株。实验用光源(白光、红光和蓝光)均为LED灯,光照强度均为180 μmol·m⁻²·s⁻¹,其他培养条件与前期培养条件一致。

激素处理:将茶树幼苗置于培养箱中,培养条件与前期培养条件一致。设置0.1 mmol·L⁻¹脱落酸(ABA)、1.0 mmol·L⁻¹吲哚乙酸(IAA)、1.0 mmol·L⁻¹赤霉素(GA₃)和1.0 mmol·L⁻¹的茉莉酸甲酯(MeJA)4个激素处理,其中,ABA用蒸馏水配制,IAA、GA₃和MeJA用体积分数2%乙醇配制。ABA处理以等体积蒸馏水为对照,IAA、GA₃和MeJA处理以等体积的体积分数2%乙醇为对照。每个处理3个生物学重复,每个重复3株。每株幼苗叶片正、反面一次性均匀喷洒20 mL处理液,分别于处理0、4、12和24 h采摘顶部向下数第3枚叶片。

所有样品采摘后迅速浸入液氮中,然后置于-80℃冰箱保存,备用。

1.2.2 总RNA提取、cDNA合成及基因克隆 按照Quick RNA Isolation Kit试剂盒(北京华越洋生物科技有限公司)操作说明提取叶、茎和花中总RNA,根中总RNA提取采用Trizol提取法。采用Goldenstar™

RT6 cDNA Synthesis Kit试剂盒(北京擎科生物科技有限公司)反转录合成cDNA第1链。使用Primer premier 5.0软件设计*CsCRY1*和*CsCRY2*基因的克隆引物,其中,*CsCRY1*-CF引物序列为5'-ATGTCAGGACGTGGGTGTAGCATAG-3',*CsCRY1*-CR引物序列为5'-TTACCCAGTTTGTAGAAAGCCGCCTC-3';*CsCRY2*-CF引物序列为5'-ATGGGTAGCAATTCAAAAACCATTG-3',*CsCRY2*-CR引物序列为5'-TTAACCTCCCACAGCTCCATTTTTG-3'。*CsCRY1*基因的PCR扩增体系总体积为50 μL,包括金牌Mix(green)(北京擎科生物科技有限公司)45 μL,10 μmol·L⁻¹*CsCRY1*-CF和*CsCRY1*-CR引物各2 μL,1 ng·μL⁻¹模板cDNA 1 μL;*CsCRY2*基因的PCR扩增体系总体积为50 μL,包括金牌Mix(green)45 μL,10 μmol·L⁻¹*CsCRY2*-CF和*CsCRY2*-CR引物各2 μL,1 ng·μL⁻¹模板cDNA 1 μL。基因扩增模板cDNA来自光照处理0 h叶片。扩增程序为:98℃预变性2 min;98℃变性10 s、55℃退火30 s、72℃延伸20 s,30个循环;72℃延伸1 min。用1.2 g·L⁻¹琼脂糖凝胶电泳回收PCR产物。采用pClone007平末端载体连接PCR产物(北京擎科生物科技有限公司),然后转化到大肠杆菌DH5α感受态细胞中,挑取单克隆,培养、鉴定后送至北京擎科生物科技有限公司测序。

1.2.3 生物信息学分析 基于茶树基因组和转录组^[26-27],通过拟南芥*AtCRY1*(登录号AT4G08920)和*AtCRY2*(登录号AT1G04400)基因碱基序列进行同源序列比对,检索茶树隐花色素基因。BLASTn和BLASTp序列检索在NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)和BioEdit软件中完成。使用DNAMAN 6.0软件进行氨基酸序列比对。采用MEGA 5.1软件中的Neighbor-joining法构建系统进化树。利用SOPMA(<https://prabi.ibcp.fr/html/site/web/home>)在线软件预测*CsCRY1*和*CsCRY2*蛋白的二级结构。利用SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org/>)在线软件预测*CsCRY1*和*CsCRY2*蛋白PHR结构域的三级结构。利用PlantCARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)在线软件分析*CsCRY1*和*CsCRY2*基因上游1 500 bp内启动子顺式作用元件。

1.2.4 基因的表达模式分析 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)在CFX96™ Real-Time System(美国Bio-Rad公司)上进行。设计用于*CsCRY1*基因检测的

CsCRY1-JF 引物序列为 5'-TAGGGCTGAAGTGCCAA CGAATGTC-3', *CsCRY1*-JR 引物序列为 5'-TGTGGT GGAGTTGCGTTGCTTTGGA-3'; 设计用于 *CsCRY2* 基因检测的 *CsCRY2*-JF 引物序列为 5'-ATCATTGCTGG GAAGCCTGAAACAT-3', *CsCRY2*-JR 引物序列为 5'-GCATCAACCAAAGGTAACCAGTCC-3'。扩增体系总体积为 20.0 μL , 包括 2 \times T5 Fast qPCR Mix (SYBR Green I) (北京擎科生物科技有限公司) 10.0 μL , 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 正向和反向检测引物各 0.8 μL , 0.05 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 模板 cDNA 2.0 μL 和 ddH₂O 6.4 μL 。扩增反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 5 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 s, 40 个循环。

组织表达和光照处理的内参基因采用 *ACT* 基因, 其 *CsACT*-F 引物序列为 5'-GAGATTCGGTTGCCCTGAAGTCCTG-3', *CsACT*-R 引物序列为 5'-TCCTTCTCATAACGGTCTGCGATAC-3'; 激素处理内参基因采用 *TBP*, 其 *CsTBP*-F 引物序列为 5'-GGCGGATCAAGTGTTGGAAGGGAG-3', *CsTBP*-R 引物序列为 5'-ACGCTTGGGATTGTATTCGGCATT-3'^[28]。采用 Pfaffl^[29] 的方法计算基因的相对表达水平。

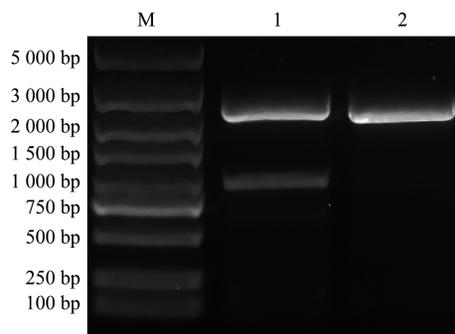
2 结果和分析

2.1 茶树 *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 基因的克隆与分析结果

经序列同源比对, 在茶树中获得 2 个隐花色素基因, 登录号分别为 CSS0033306.1 和 CSS0018720.1。根据这 2 个基因序列设计克隆引物, 以茶树品种‘福鼎大白茶’cDNA 为模板, 扩增获得 2 条长度约 2 000 bp 的明亮条带(图 1)。经切胶回收和连接转化后测序, 测序结果与预测结果一致, 将 2 个基因分别命名为 *CsCRY1* 和 *CsCRY2*。*CsCRY1* 基因的开放阅读框长度为 2 055 bp, 编码 684 个氨基酸; *CsCRY2* 基因的开放阅读框长度为 1 944 bp, 编码 647 个氨基酸。*CsCRY1* 和 *CsCRY2* 基因碱基序列的相似度较低, 一致性为 55.30%。与茶树基因组比对, *CsCRY1* 基因序列包含 4 个外显子和 3 个内含子, *CsCRY2* 基因序列包含 5 个外显子和 4 个内含子。

2.2 茶树 *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 蛋白的生物信息学相关分析结果

2.2.1 功能结构域分析 利用 DNAMAN 6.0 软件进行序列比对, 发现茶树 *CsCRY1* 蛋白与拟南芥



M: DL5000 DNA marker; 1: *CsCRY1* 基因 *CsCRY1* gene; 2: *CsCRY2* 基因 *CsCRY2* gene.

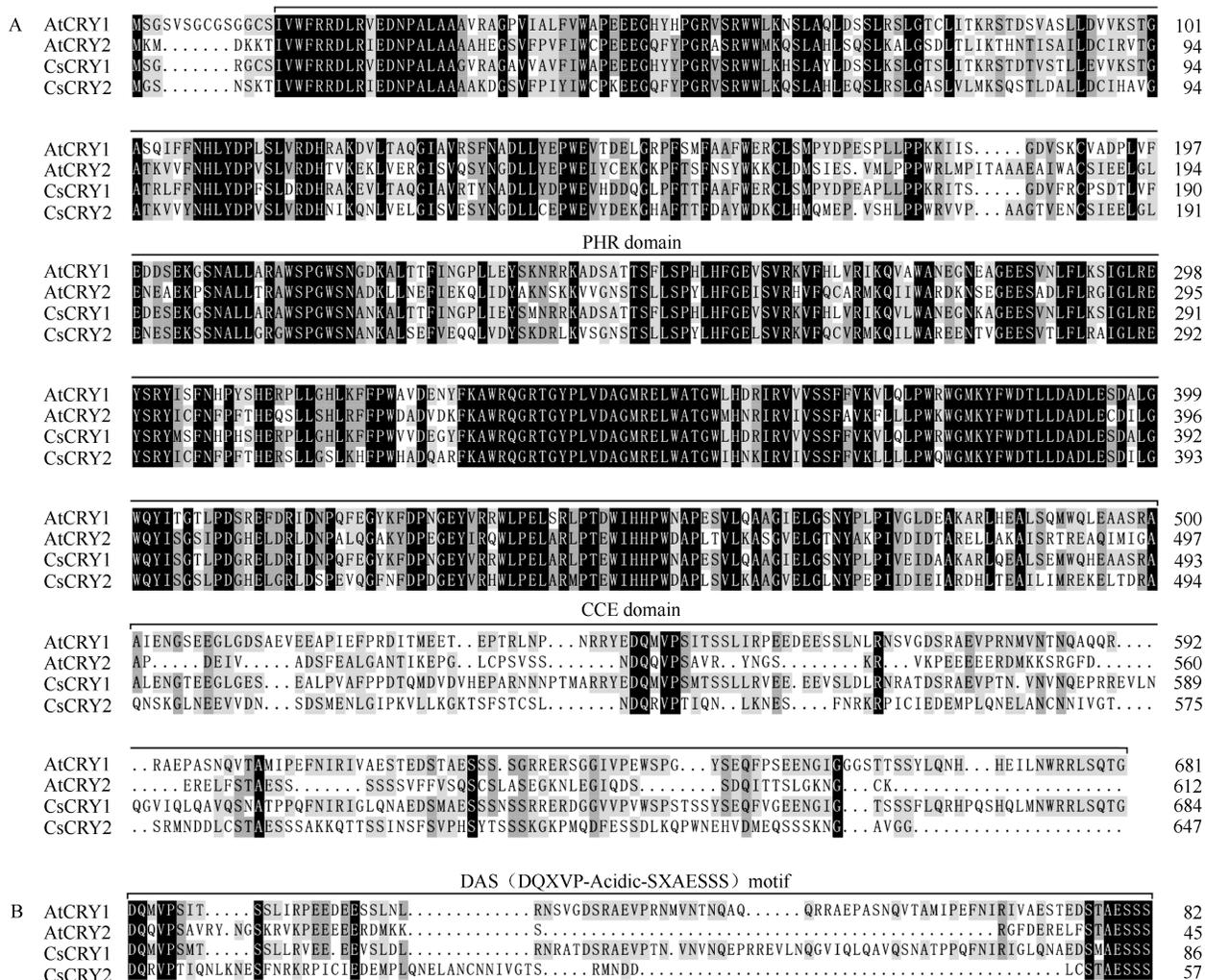
图 1 茶树 *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 基因的 PCR 产物电泳图
Fig. 1 PCR-product electrophoretogram of *CsCRY1* and *CsCRY2* genes in *Camellia sinensis* (Linn.) Kuntze

AtCRY1 蛋白(登录号 AAB28724)氨基酸序列的一致性为 75.97%, *CsCRY2* 蛋白与 *AtCRY2* 蛋白(登录号 NP_849588)氨基酸序列的一致性为 61.54%。*CsCRY1* 和 *CsCRY2* 蛋白氨基酸序列的 N 端最为保守, 具有明显的 PHR 结构域, 该结构域与拟南芥对应氨基酸序列的一致性较高(图 2-A)。此外, *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 蛋白氨基酸序列的 C 端均具有 CCE 结构域, 该结构域与拟南芥对应氨基酸序列的差异较大(图 2-A)。

截取 CCE 结构域的氨基酸序列片段重新进行比对, 发现 *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 蛋白的氨基酸序列均含有保守的 DAS (DQXVP-Acidic-SXAESSS) 基序(图 2-B)。

上述研究结果表明: 茶树 *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 蛋白可能具有与拟南芥中相似的蓝光信号调控机制。

2.2.2 系统进化分析 从 NCBI 数据库中选取了滇山茶 (*Camellia reticulata* Lindl.)、中华猕猴桃 (*Actinidia chinensis* Planch.)、苹果 [*Malus domestica* (Suckow) Borkh.]、毛果杨 (*Populus trichocarpa* Torr. et A. Gray ex Hook.)、拟南芥、可可 (*Theobroma cacao* Linn.)、葡萄 (*Vitis vinifera* Linn.)、水稻、节节麦 (*Aegilops tauschii* Coss.) 和玉米 (*Zea mays* Linn.) 10 种植物以及石果衣真菌 (*Endocarpon pusillum*) 的光裂解酶/隐花色素超级家族成员序列, 构建系统进化树。结果(图 3)显示: 在光裂解酶/隐花色素超级家族中, 茶树 *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 蛋白与其他 10 种植物和石果衣真菌中的家族成员分为 6 个亚族, 分别是 Plant PHR2、CRY-DASH、(6-4)PHR、Plant CRY、CPD



色块颜色越深表示相似度越高 The darker the color blocks, the higher the similarity.

A: 全长氨基酸序列 Full-length amino acid sequence; B: DAS 基序氨基酸序列 DAS motif amino acid sequence.

图 2 茶树 *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 蛋白与拟南芥 *AtCRY1* 和 *AtCRY2* 蛋白氨基酸序列的多重比对

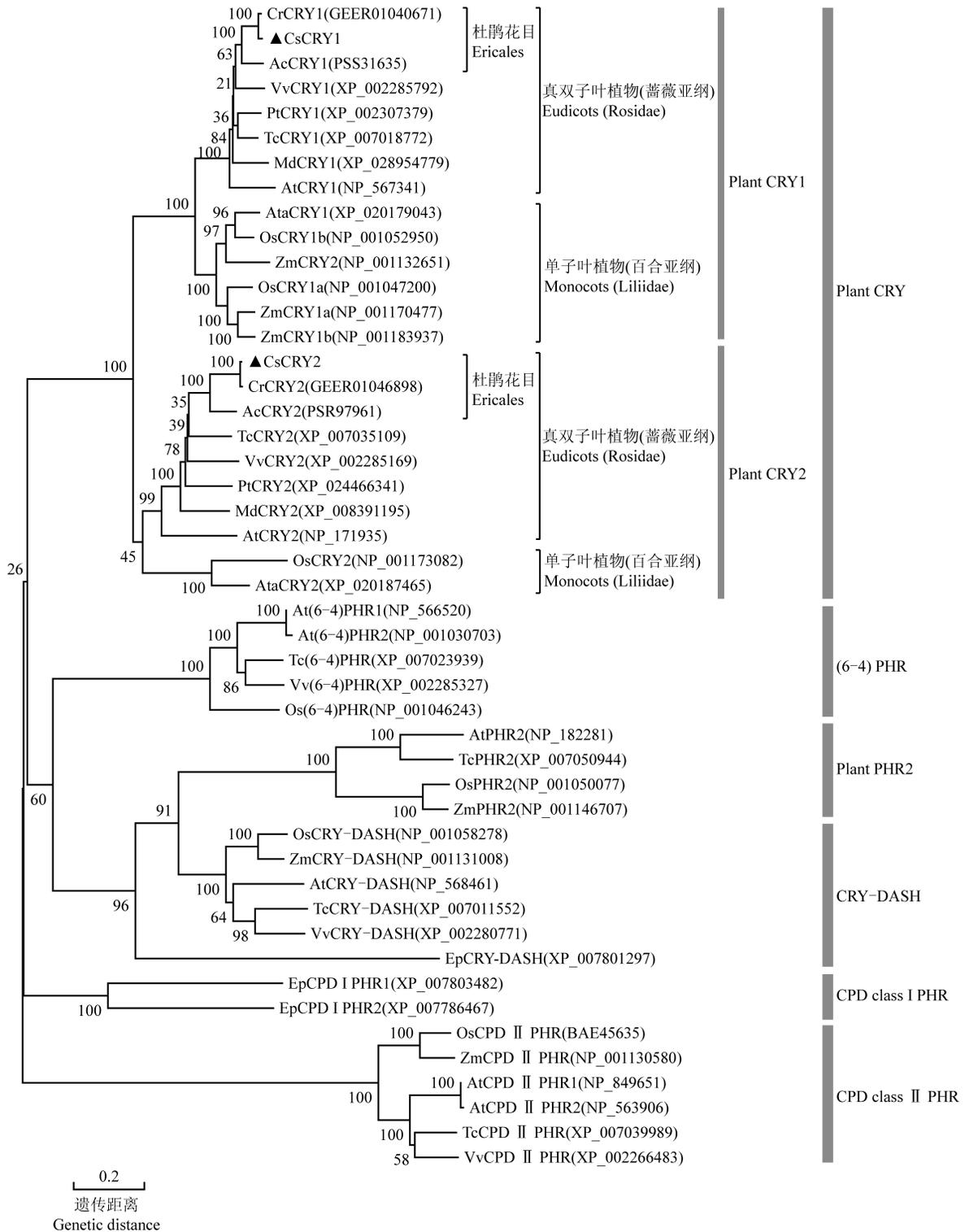
Fig. 2 Multiple alignment on amino acid sequences of *CsCRY1* and *CsCRY2* proteins in *Camellia sinensis* (Linn.) Kuntze with those of *AtCRY1* and *AtCRY2* proteins in *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.

class I PHR 和 CPD class II PHR。*CsCRY1* 和 *CsCRY2* 蛋白被分在了 Plant CRY 亚族中,说明茶树 *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 蛋白属于 Plant CRY 类隐花色素。Plant CRY 亚族包括 Plant CRY1 和 Plant CRY2 2 个分支, *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 蛋白分别分布于这 2 个分支。在进化树分支距离上,茶树 *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 蛋白与滇山茶和中华猕猴桃较近,与单子叶植物较远。

2.2.3 二级和三级结构分析 利用 SOPMA 在线软件对茶树 *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 蛋白氨基酸序列的二级结构进行预测,结果(图 4)显示;*CsCRY1* 蛋白中无规则卷曲(random coil)(43.13%)和 α 螺旋(α -helix)

(41.96%)所占比例较高, β 折叠(β -sheet)(9.21%)和 β 转角(β -turn)(5.70%)所占比例较低;*CsCRY2* 蛋白中也是无规则卷曲(48.84%)和 α 螺旋(37.71%)所占比例较高, β 折叠(8.96%)和 β 转角(4.48%)所占比例较低。

以拟南芥 *AtCRY1* 的 PHR 晶体结构 1u3d.1.A 为参照模型,利用 SWISS-MODEL 在线软件预测茶树 *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 蛋白 PHR 结构域的三级结构,结果(图 5)显示;茶树 *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 蛋白的 PHR 结构域与参照模型相似,主要由 α 螺旋、无规则卷曲和 β 折叠组成,且在 N 端具有 α 螺旋和 β 折叠结构域,与二级结构预测结果相吻合。



分支上数据代表自展值 The datums on the branches represent the bootstrap values. Cr; 滇山茶 *Camellia reticulata* Lindl.; Cs; 茶树 *Camellia sinensis* (Linn.) Kuntze; Ac; 中华猕猴桃 *Actinidia chinensis* Planch.; Vv; 葡萄 *Vitis vinifera* Linn.; Pt; 毛果杨 *Populus trichocarpa* Torr. et A. Gray ex Hook.; Tc; 可可 *Theobroma cacao* Linn.; Md; 苹果 *Malus domestica* (Suckow) Borkh.; At; 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.; Ata; 节节麦 *Aegilops tauschii* Coss.; Os; 水稻 *Oryza sativa* Linn.; Zm; 玉米 *Zea mays* Linn.; Ep; 石果衣真菌 *Endocarpon pusillum*.

图 3 基于氨基酸序列茶树 CsCRY1 和 CsCRY2 蛋白与其他 10 种植物和石果衣真菌光裂解酶/隐花色素超级家族成员的系统进化树
Fig. 3 Phylogenetic tree of CsCRY1 and CsCRY2 proteins in *Camellia sinensis* (Linn.) Kuntze with the members of photolyase/cryptochrome superfamily of other 10 plants and *Endocarpon pusillum* based on amino acid sequences

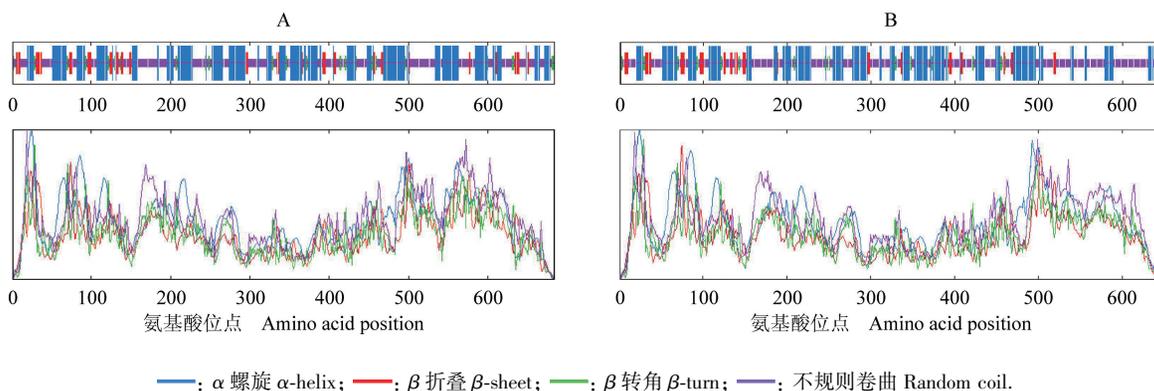


图 4 茶树 *CsCRY1* (A) 和 *CsCRY2* (B) 蛋白二级结构预测

Fig. 4 Prediction on secondary structure of *CsCRY1* (A) and *CsCRY2* (B) proteins of *Camellia sinensis* (Linn.) Kuntze

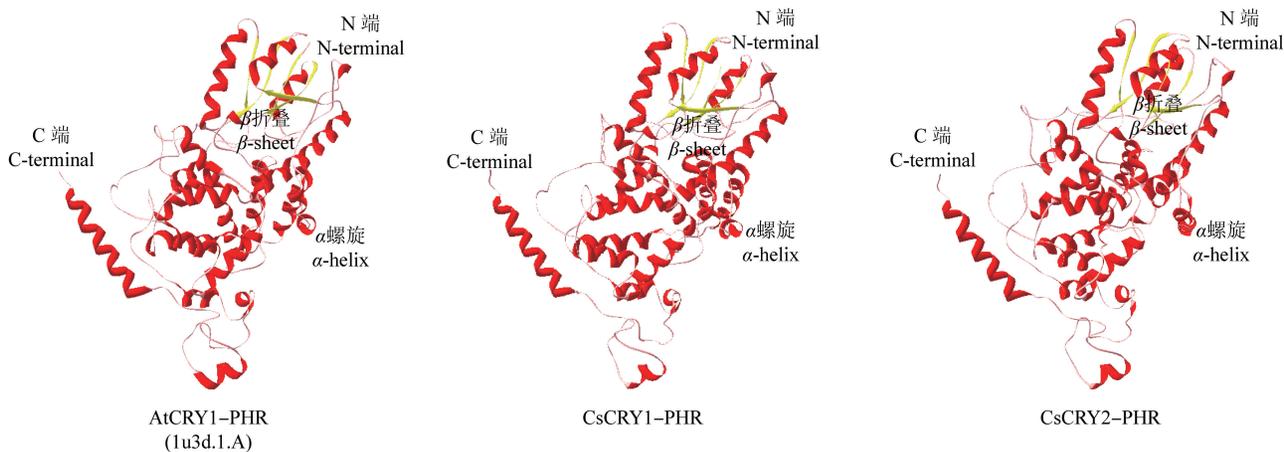


图 5 茶树 *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 蛋白 PHR 结构域的三级结构预测

Fig. 5 Prediction on tertiary structure of PHR domain of *CsCRY1* and *CsCRY2* proteins of *Camellia sinensis* (Linn.) Kuntze

2.2.4 启动子顺式作用元件预测分析 利用 PlantCARE 软件对茶树 *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 基因上游 1 500 bp 内启动子顺式作用元件进行预测分析,结果分别见表 1 和表 2。

由表 1 可见,茶树 *CsCRY1* 基因上游 1 500 bp 区域中主要含 60 个核心启动子元件 (TATA-box)、28

个启动子增强子区域元件 (CAAT-box) 以及多个参与光响应的调控元件 (AT1-motif、G-box、chs-CMA1a、GATA-motif 和 Box 4)。此外,还包括赤霉素响应元件 (P-box)、脱落酸响应元件 (ABRE)、低温响应元件 (LTR) 和厌氧诱导必需顺式作用调控元件 (ARE) 等。

表 1 茶树 *CsCRY1* 基因启动子的顺式作用元件及其功能预测

Table 1 Prediction on *cis*-acting elements and their functions of promoter of *CsCRY1* gene in *Camellia sinensis* (Linn.) Kuntze

顺式作用元件 <i>Cis</i> -acting element	序列 Sequence	功能 Function	数量 Number
CAAT-box	CAAT,CAAAT,CCAAT	启动子增强子区域元件 Promoter enhancer region element	28
AT1-motif	AATATATTTTATT	部分光响应元件 Part of light response element	1
G-box	TACGTG	光响应顺式作用元件 Light response <i>cis</i> -acting element	1
ERE	ATTTTAA	无 Without	1
chs-CMA1a	TTACTTAA	部分光响应元件 Part of light response element	2
LTR	CCGAAA	低温响应元件 Low temperature response element	1

续表1 Table 1 (Continued)

顺式作用元件 <i>Cis-acting element</i>	序列 Sequence	功能 Function	数量 Number
ARE	AAACCA	厌氧诱导必需顺式作用调控元件 <i>Cis-acting regulatory element essential for the anaerobic induction</i>	4
MYC	CAATTG	无 Without	1
MYB	CAACCA	无 Without	2
STRE	AGGGG	无 Without	4
GATA-motif	GATAGGG, GATAGGA	部分光响应元件 Part of light response element	2
Unnamed 6	taTAAATATct	无 Without	1
ABRE3a	TACGTG	无 Without	1
TATA-box	ATATAT, TATA, TATATA, ATATAA, TATACA, ccTATAAAaa, ATTATA, TATAA, TATATTTATATTT, TACAAAA, TATAAAA, TATAAA, TATTTAAA	核心启动子元件 Core promoter element	60
TATA	TATAAAAT	无 Without	3
ABRE4	CACGTA	无 Without	1
P-box	CCTTTTG	赤霉素响应元件 Gibberellin response element	1
ABRE	ACGTG	脱落酸响应元件 Abscisic acid response element	1
WUN-motif	AAATTTCTT	无 Without	2
Box 4	ATTAAT	光响应保守 DNA 的部分模块 Part of a conserved DNA module involved in light responsiveness	2
AT~TATA-box	TATATA	无 Without	5

表 2 茶树 *CsCRY2* 基因启动子的顺式作用元件及其功能预测Table 2 Prediction on *cis-acting elements* and their functions of promoter of *CsCRY2* gene in *Camellia sinensis* (Linn.) Kuntze

顺式作用元件 <i>Cis-acting element</i>	序列 Sequence	功能 Function	数量 Number
MBS	CAACTG	干旱诱导的 MYB 结合位点 Drought induced MYB binding site	1
As-1	TGACC	无 Without	1
MYB	TAACCA, CAACCA, TAACTG	无 Without	4
ATCT-motif	AATCTAATCC	光响应保守 DNA 的部分模块 Part of a conserved DNA module involved in light responsiveness	1
CGTCA-motif	CGTCA	茉莉酸甲酯响应元件 Methyl jasmonate response element	1
AE-box	AGAAACAA	部分光响应元件 Part of light response element	1
W box	TTGACC	无 Without	1
Myb	TAACTG, CAACTG	无 Without	2
AAGAA-motif	gGTAAAGAAA, GAAAGAA	无 Without	2
TATA-box	TACAAAA, TATAA, TATA, ATATAT, TATATA, TATAAA, taTATAAAatc, TATAAAT, TATACA	核心启动子元件 Core promoter element	25
TGACC-motif	TGACC	茉莉酸甲酯响应顺式作用元件 Methyl jasmonate response <i>cis-acting element</i>	1
TCA-element	TCAGAAGAGG	水杨酸响应顺式作用元件 Salicylic acid response <i>cis-acting element</i>	1
STRE	AGGGG	无 Without	1
ARE	AAACCA	厌氧诱导必需顺式作用调控元件 <i>Cis-acting regulatory element essential for the anaerobic induction</i>	1
CAAT-box	CAAT, CAAAT, CCAAT	启动子增强子区域元件 Promoter enhancer region element	33
AT~TATA-box	TATATA	无 Without	2
ERE	ATTTCATA	无 Without	1
TATC-box	TATCCCA	赤霉素响应元件 Gibberellin response element	1
Box 4	ATTAAT	光响应保守 DNA 的部分模块 Part of a conserved DNA module involved in light responsiveness	3
Unnamed 4	CTCC	无 Without	4
MYC	CATTTG, CAATTG	无 Without	3
MYB-like sequence	TAACCA	无 Without	2

由表 2 可见: 在茶树 *CsCRY2* 基因上游 1 500 bp 区域中主要含 33 个启动子增强子区域元件 (CAAT-box)、25 个核心启动子元件 (TATA-box) 以及多个参与光响应的调控元件 (ATCT-motif、AE-box 和 Box 4)。此外, 还包括参与茉莉酸甲酯响应的元件 (CGTCA-motif 和 TGACG-motif)、水杨酸响应顺式作用调控元件 (TCA-element)、赤霉素响应元件 (TATC-box)、干旱诱导的 MYB 结合位点 (MBS) 和厌氧诱导必需顺式作用调控元件 (ARE) 等。

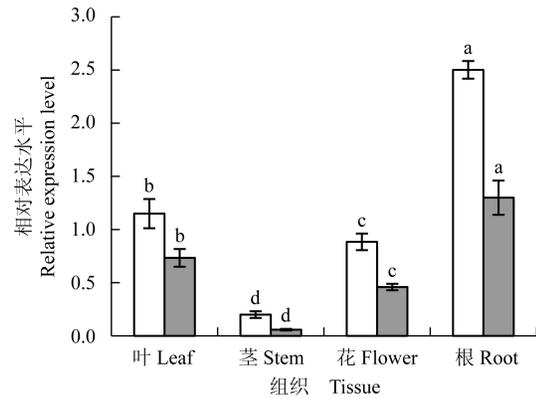
预测结果显示: *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 基因启动子均含有参与光响应、赤霉素响应和厌氧诱导的调控元件。*CsCRY1* 基因启动子含有特有的参与脱落酸和低温响应元件, 而 *CsCRY2* 基因启动子含有特有的参与茉莉酸甲酯和水杨酸响应元件以及干旱诱导元件。

2.3 茶树 *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 基因的表达模式

2.3.1 不同组织中的表达模式 结果(图 6)显示: 茶树根中 *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 基因的相对表达水平均最高, 叶中的相对表达水平次之, 花中的相对表达水平较低, 茎中的相对表达水平最低, 且不同组织间的相对表达水平差异显著。

2.3.2 不同光照处理的表达模式 结果(图 7)显示: 处理 4 h, 蓝光处理下, 茶树 *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 基因的相对表达水平显著升高。白光、黑暗和红光处理下, *CsCRY1* 基因的相对表达水平差异不大; 白光和红光处理下, *CsCRY2* 基因的相对表达水平无明显变化, 但较黑暗处理有所降低。

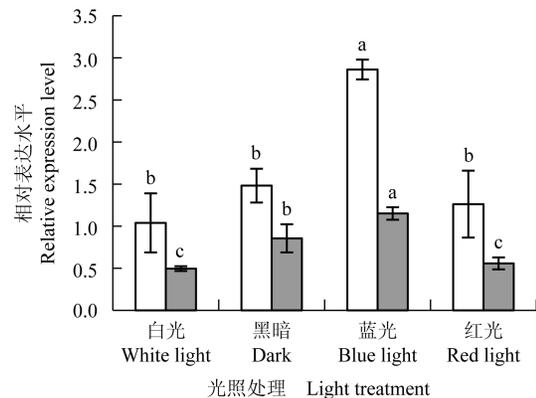
2.3.3 不同激素处理的表达模式 结果(表 3)显示: 不同激素处理茶树 *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 基因的表达模式基本一致。0.1 mmol · L⁻¹ ABA 处理下, *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 基因的相对表达水平呈先升高后降低的变化趋势, 分别于处理 12 和 4 h 达到最高; 1.0 mmol · L⁻¹



□: *CsCRY1* 基因 *CsCRY1* gene; ■: *CsCRY2* 基因 *CsCRY2* gene.

同一基因的不同小写字母表示差异显著 ($p < 0.05$) Different lowercases of the same gene indicate the significant ($p < 0.05$) difference.

图 6 茶树不同组织中 *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 基因的相对表达水平
Fig. 6 Relative expression levels of *CsCRY1* and *CsCRY2* genes in different tissues of *Camellia sinensis* (Linn.) Kuntze



□: *CsCRY1* 基因 *CsCRY1* gene; ■: *CsCRY2* 基因 *CsCRY2* gene.

同一基因的不同小写字母表示差异显著 ($p < 0.05$) Different lowercases of the same gene indicate the significant ($p < 0.05$) difference.

图 7 不同光照处理茶树 *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 基因的相对表达水平
Fig. 7 Relative expression levels of *CsCRY1* and *CsCRY2* genes in *Camellia sinensis* (Linn.) Kuntze under different light treatments

表 3 不同激素处理茶树 *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 基因的相对表达水平 ($\bar{X} \pm SD$)¹⁾

Table 3 Relative expression levels of *CsCRY1* and *CsCRY2* genes in *Camellia sinensis* (Linn.) Kuntze under different hormone treatments ($\bar{X} \pm SD$)¹⁾

激素处理 Hormone treatment	不同处理时间 <i>CsCRY1</i> 基因的相对表达水平 Relative expression level of <i>CsCRY1</i> gene at different treatment times				不同处理时间 <i>CsCRY2</i> 基因的相对表达水平 Relative expression level of <i>CsCRY2</i> gene at different treatment times			
	0 h	4 h	12 h	24 h	0 h	4 h	12 h	24 h
0.1 mmol · L ⁻¹ ABA	1.00±0.04c	1.36±0.13b	2.14±0.14a	0.86±0.08c	1.00±0.08c	2.09±0.02a	1.84±0.03b	1.15±0.10c
1.0 mmol · L ⁻¹ IAA	1.00±0.04d	2.19±0.04a	1.35±0.05c	1.61±0.07b	1.00±0.08c	2.31±0.22a	1.33±0.11b	2.14±0.20a
1.0 mmol · L ⁻¹ GA ₃	1.00±0.04c	2.07±0.13b	5.25±0.36a	1.82±0.12b	1.00±0.08d	2.13±0.09b	6.60±0.43a	1.70±0.08c
1.0 mmol · L ⁻¹ MeJA	1.00±0.04c	2.48±0.24b	6.06±0.33a	2.05±0.74bc	1.00±0.08d	2.64±0.08b	6.62±0.61a	1.76±0.54c

¹⁾ ABA: 脱落酸 Abscisic acid; IAA: 吲哚乙酸 Indole acetic acid; GA₃: 赤霉素 Gibberellin; MeJA: 茉莉酸甲酯 Methyl jasmonate. 同行中同一基因的不同小写字母表示差异显著 ($p < 0.05$) Different lowercases in the same row of the same gene indicate the significant ($p < 0.05$) difference.

GA₃和1.0 mmol · L⁻¹ MeJA 处理下,2个基因的相对表达水平呈先升高后降低的变化趋势,并于处理12 h达到最高;1.0 mmol · L⁻¹ IAA 处理下,2个基因的相对表达水平呈“升高—降低—升高”的变化趋势,于处理4 h达到最高。

3 讨 论

尽管植物缺少感光器官,但光受体的发现证明植物具有感知光信号和适应光环境的能力^[30]。植物隐花色素基因最早在拟南芥的 *hy4* 突变体中分离获得,即 *AtCRY1* 基因^[14]。随后从拟南芥中陆续获得 *AtCRY2* 和 *AtCRY3* 基因^[31-32]。*AtCRY1* 和 *AtCRY2* 蛋白属于 Plant CRY 类隐花色素,仅存在于植物中,而 *AtCRY3* 蛋白属于 CRY-DASH 类隐花色素,广泛分布于原核和真核生物中^[13]。本研究以茶树品种‘福鼎大白茶’为材料,克隆获得2个隐花色素基因,分别命名为 *CsCRY1* 和 *CsCRY2*。序列分析结果显示:茶树 *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 蛋白与拟南芥 *AtCRY1* 和 *AtCRY2* 蛋白结构相似,其氨基酸序列均在 N 端有1个光裂解酶同源区域(PHR),在 C 端有1个隐花色素延伸域(CCE),属于 Plant CRY 类隐花色素典型结构特征^[11,13,33],推测 *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 基因为植物特有的保守基因,可能在响应光信号中发挥重要作用。茶树 *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 蛋白的二级结构及其 PHR 结构域三级结构的预测结果同样证明其与拟南芥 *AtCRY1* 和 *AtCRY2* 蛋白相似。

在植物中,保守的低拷贝基因常用作构建物种系统发育分类的有效标记^[34]。利用茶树与其他10种植物和真菌构建的光裂解酶/隐花色素超级家族成员构建系统进化树,显示亚族的分支区别明显,且 Plant CRY 类隐花色素的分支与 APG IV 系统中纲、目分类相互对应^[35],表明隐花色素基因在植物中具有保守度较高且拷贝较低的特点,可用于开发植物系统发育分类标记。茶树 *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 蛋白在系统进化树中与同目的滇山茶和中华猕猴桃处于同一小分支,这3种植物在植物学分类上同属于真双子叶植物中杜鹃花目(Ericales),其中,滇山茶与茶树最近,二者均隶属于山茶科,而中华猕猴桃隶属于猕猴桃科(Actinidiaceae),其植物学分类和基因组进化树距离与茶树较近^[36],表明 Plant CRY 类隐花色素构建的系统进化树可用作植物属的分类标记。Plant CRY

类隐花色素的生物学功能在不同植物中有所分化,是否与系统进化树分支距离有关仍有待考证。如大麦(*Hordeum vulgare* Linn.) *HvCRY1a* 和 *HvCRY1b* 基因通过介导表达脱落酸生物合成相关基因来诱导谷物休眠^[37];番茄隐花色素介导了番茄红素在其果实中的积累^[38];茶树隐花色素表达与光处理中多酚形成相关^[4]。

隐花色素对于植物根的发育具有调控作用,如拟南芥 *AtCRY1* 基因通过参与生长素的调节,促进初生根的延长以及限制侧根的发育,但 *AtCRY2* 基因对根起到抑制作用^[18,39]。组织表达结果显示:茶树根中 *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 基因的相对表达水平最高,其后依次为叶、花、茎,推测2个基因可能在茶树根的发育中发挥调控作用。该结果与胡杨 *PeCRY1* 基因的组织表达情况相似,*PeCRY1* 基因在根和叶中的表达量最高^[25]。此外,有研究表明甘菊 [*Chrysanthemum lavandulifolium* (Fisch. ex Trautv.) Makino] 根中 *ClCRY1a/b* 基因的表达量最低^[40],该结果与茶树中得到的结果相反。隐花色素基因的表达与光照条件有关,其在不同植物根中的表达高低不一,推测可能与激素调节或者取样部位有关^[25,39]。

茶树 *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 基因的启动子顺式作用元件预测分析显示:在上游1500 bp 区域序列中主要存在多种光响应和激素响应元件,如 AT1-motif、Box 4、P-box 和 TATC-box 等元件。蓝光条件下,茶树 *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 基因的相对表达水平显著提高。拟南芥 *AtCRY1* 和 *AtCRY2* 基因的转录和表达不受光条件的调控,尽管其蛋白通过接受和传导蓝光信号调节光适应生理活动^[41]。可见,与拟南芥不同,蓝光可能具有引起茶树 *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 基因转录以及蛋白光信号传导的双重调控作用。外源激素 ABA、GA₃、IAA 和 MeJA 均能引起 *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 基因相对表达水平的上调。启动子顺式作用元件预测分析表明:ABA 响应元件和 MeJA 响应元件分别为 *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 基因启动子特有元件,然而 ABA 和 MeJA 均能诱导 *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 基因的表达。已有研究结果表明:光信号和激素信号均处于植物信号调控网络中,二者具有协同作用^[42]。其中,隐花色素在光信号传导中与多种激素共同调控下胚轴生长、根发育和避荫等生物学过程^[18,43-44]。在茶树中,同样发现光信号与激素信号互相关联^[4]。因此,外源激素可能直接或者间接调控茶树 *CsCRY1* 和 *CsCRY2*

基因的转录和表达。

综上所述,本研究克隆到茶树 *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 基因,*CsCRY1* 和 *CsCRY2* 蛋白具有典型的 Plant CRY 类隐花色素结构特征;可利用隐花色素高保守度、低拷贝的特点,开发用于构建物种系统发育的分类标记;蓝光介导了 *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 基因的转录表达并可能在蛋白光信号传导上发挥作用;外源激素介导了 *CsCRY1* 和 *CsCRY2* 基因的转录,激素信号可能与光信号互相关联调节生物学过程。

参考文献:

- [1] FANG J, SUREDA A, SILVA A S, et al. Trends of tea in cardiovascular health and disease: a critical review[J]. Trends in Food Science and Technology, 2019, 88: 385–396.
- [2] SANLIER N, GOKCEN B B, ALTUĞ M. Tea consumption and disease correlations[J]. Trends in Food Science and Technology, 2018, 78: 95–106.
- [3] LIU L, LI Y, SHE G, et al. Metabolite profiling and transcriptomic analyses reveal an essential role of UVR8-mediated signal transduction pathway in regulating flavonoid biosynthesis in tea plants (*Camellia sinensis*) in response to shading[J]. BMC Plant Biology, 2018, 18: 233.
- [4] ZHENG C, MA J-Q, MA C-L, et al. Regulation of growth and flavonoid formation of tea plants (*Camellia sinensis*) by blue and green light[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(8): 2408–2419.
- [5] FU X, CHEN Y, MEI X, et al. Regulation of formation of volatile compounds of tea (*Camellia sinensis*) leaves by single light wavelength[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 16858.
- [6] 俞少娟, 王婷婷, 陈寿松, 等. 光对茶树生产与茶叶品质影响及其应用研究进展[J]. 福建茶叶, 2016, 38(5): 3–5.
- [7] 王新超, 王璐, 郝心愿, 等. 中国茶树遗传育种 40 年[J]. 中国茶叶, 2019, 41(5): 1–6.
- [8] MÖGLICH A, YANG X, AYERS R A, et al. Structure and function of plant photoreceptors[J]. Annual Review of Plant Biology, 2010, 61: 21–47.
- [9] RIZZINI L, FAVORY J-J, CLOIX C, et al. Perception of UV-B by the *Arabidopsis* UVR8 protein[J]. Science, 2011, 332(6025): 103–106.
- [10] WANG P, CHEN S, GU M, et al. Exploration of the effects of different blue LED light intensities on flavonoid and lipid metabolism in tea plants via transcriptomics and metabolomics[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(13): 4606.
- [11] BRAUTIGAM C A, SMITH B S, MA Z, et al. Structure of the photolyase-like domain of cryptochrome 1 from *Arabidopsis thaliana* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(33): 12142–12147.
- [12] HUANG Y, BAXTER R, SMITH B S, et al. Crystal structure of cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana* and its implications for photolyase activity [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(47): 17701–17706.
- [13] MEI Q, DVORNYK V. Evolutionary history of the photolyase/cryptochrome superfamily in eukaryotes[J]. PLOS ONE, 2015, 10(9): e0135940.
- [14] AHMAD M, CASHMORE A R. *HY4* gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor [J]. Nature, 1993, 366(6415): 162–166.
- [15] GUO H, YANG H, MOCKLER T C, et al. Regulation of flowering time by *Arabidopsis* photoreceptors [J]. Science, 1998, 279(5355): 1360–1363.
- [16] KANG C-Y, LIAN H-L, WANG F-F, et al. Cryptochromes, phytochromes, and COP1 regulate light-controlled stomatal development in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2009, 21: 2624–2641.
- [17] WU G, SPALDING E P. Separate functions for nuclear and cytoplasmic cryptochrome 1 during photomorphogenesis of *Arabidopsis* seedlings[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(47): 18813–18818.
- [18] ZENG J, WANG Q, LIN J, et al. *Arabidopsis* cryptochrome-1 restrains lateral roots growth by inhibiting auxin transport [J]. Journal of Plant Physiology, 2010, 167(8): 670–673.
- [19] ZHANG Y-C, GONG S-F, LI Q-H, et al. Functional and signaling mechanism analysis of rice CRYPTOCHROME 1 [J]. The Plant Journal, 2006, 46: 971–983.
- [20] XU P, ZHU H L, XU H B, et al. Composition and phylogenetic analysis of wheat cryptochrome gene family[J]. Molecular Biology Reports, 2010, 37(2): 825–832.
- [21] FANTINI E, SULLI M, ZHANG L, et al. Pivotal roles of cryptochromes 1a and 2 in tomato development and physiology[J]. Plant Physiology, 2019, 179: 732–748.
- [22] ZHOU T, MENG L, MA Y, et al. Overexpression of sweet sorghum cryptochrome 1a confers hypersensitivity to blue light, abscisic acid and salinity in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell Reports, 2018, 37(2): 251–264.
- [23] FRANZ-BADUR S, PENNER A, STRAß S, et al. Structural changes within the bifunctional cryptochrome/photolyase *CraCRY* upon blue light excitation[J]. Scientific Reports, 2019, 9: 9896.
- [24] ZHANG Q, LI H, LI R, et al. Association of the circadian rhythmic expression of *GmCRY1a* with a latitudinal cline in photoperiodic flowering of soybean[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(52): 21028–21033.
- [25] MAO K, JIANG L, BO W, et al. Cloning of the cryptochrome-encoding *PeCRY1* gene from *Populus euphratica* and functional analysis in *Arabidopsis* [J]. PLOS ONE, 2014, 9(12): e0115201.
- [26] XIA E, TONG W, HOU Y, et al. The reference genome of tea

- plant and resequencing of 81 diverse accessions provide insights into its genome evolution and adaptation [J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(7): 1013–1026.
- [27] WU Z-J, LI X-H, LIU Z-W, et al. *De novo* assembly and transcriptome characterization: novel insights into catechins biosynthesis in *Camellia sinensis* [J]. *BMC Plant Biology*, 2014, 14: 277.
- [28] WU Z-J, TIAN C, JIANG Q, et al. Selection of suitable reference genes for qRT-PCR normalization during leaf development and hormonal stimuli in tea plant (*Camellia sinensis*) [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 19748.
- [29] PFAFFL M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(9): e45.
- [30] KHARSHIING E, SREELAKSHMI Y, SHARMA R. The light awakens! Sensing light and darkness [M] // SOPORY S. *Sensory Biology of Plants*. Singapore: Springer Singapore, 2019: 21–57.
- [31] LIN C, YANG H, GUO H, et al. Enhancement of blue-light sensitivity of *Arabidopsis* seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2 [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(5): 2686–2690.
- [32] KLEINE T, LOCKHART P, BATSCHAUER A. An *Arabidopsis* protein closely related to *Synechocystis* cryptochrome is targeted to organelles [J]. *The Plant Journal*, 2003, 35: 93–103.
- [33] SANG Y, LI Q-H, RUBIO V, et al. N-terminal domain-mediated homodimerization is required for photoreceptor activity of *Arabidopsis* CRYPTOCHROME 1 [J]. *The Plant Cell*, 2005, 17: 1569–1584.
- [34] ZHANG N, ZENG L, SHAN H, et al. Highly conserved low-copy nuclear genes as effective markers for phylogenetic analyses in angiosperms [J]. *New Phytologist*, 2012, 195: 923–937.
- [35] BYNG J W, CHASE M W, CHRISTENHUSZ M J M, et al. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV [J]. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2016, 181(1): 1–20.
- [36] WU H, MA T, KANG M, et al. A high-quality *Actinidia chinensis* (kiwifruit) genome [J]. *Horticulture Research*, 2019, 6: 117.
- [37] BARRERO J M, DOWNIE A B, XU Q, et al. A role for barley CRYPTOCHROME1 in light regulation of grain dormancy and germination [J]. *The Plant Cell*, 2014, 26: 1094–1104.
- [38] GILIBERTO L, PERROTTA G, PALLARA P, et al. Manipulation of the blue light photoreceptor cryptochrome 2 in tomato affects vegetative development, flowering time, and fruit antioxidant content [J]. *Plant Physiology*, 2005, 137: 199–208.
- [39] CANAMERO R C, BAKRIM N, BOULY J-P, et al. Cryptochrome photoreceptors cry1 and cry2 antagonistically regulate primary root elongation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Planta*, 2006, 224(5): 995–1003.
- [40] YANG L, FU J, QI S, et al. Molecular cloning and function analysis of *CiCRY1a* and *CiCRY1b*, two genes in *Chrysanthemum lavandulifolium* that play vital roles in promoting floral transition [J]. *Gene*, 2017, 617: 32–43.
- [41] 汤 淼, 杨洪全. 拟南芥中光信号系统中关键基因 *CRY1*、*CRY2* 和 *COP1* 启动子的表达模式分析 [J]. *植物生理学通讯*, 2010, 46(6): 541–548.
- [42] LAU O S, DENG X W. Plant hormone signaling lightens up: integrators of light and hormones [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2010, 13(5): 571–577.
- [43] SHARMA P, CHATTERJEE M, BURMAN N, et al. Cryptochrome 1 regulates growth and development in *Brassica* through alteration in the expression of genes involved in light, phytohormone and stress signalling [J]. *Plant, Cell and Environment*, 2014, 37: 961–977.
- [44] KELLER M M, JAILLAIS Y, PEDMALE U V, et al. Cryptochrome 1 and phytochrome B control shade-avoidance responses in *Arabidopsis* via partially independent hormonal cascades [J]. *The Plant Journal*, 2011, 67: 195–207.

(责任编辑: 张明霞)