

山核桃 *COPI E3* 连接酶的全长克隆及表达分析

沈 辰, 裘佳妮, 黄坚钦

(浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 浙江 临安 311300)

摘要: *COPI E3* 连接酶是一个光形态建成的抑制子和光调控植物发育的分子开关。对山核桃 *Carya cathayensis* 花芽 454 测序获得 *CcCOPI E3* 连接酶的片段, 通过 cDNA 末端快速扩增技术(RACE), 分别获得该基因的全长, 大小为 2 331 bp, 它由 2 个特殊的结构域组成即环形锌指结合域和 WD-40 重复序列, 其编码的蛋白质有较强的亲水性, 在氨基端主要是亲水性氨基酸, 而羧基端主要是疏水性氨基酸。*CcCOPI E3* 连接酶与毛果杨 *Populus trichocarpa* 等的 *COPI E3* 连接酶同源基因相似度较高, 总体高达 77.80%。实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time PCR)结果显示: *CcCOPI E3* 连接酶的表达贯穿于在山核桃雌雄花的发育过程, *CcCOPI E3* 连接酶在山核桃的茎、叶、果实、花芽中均有表达, 但在花芽中表达量最高, 3 月中旬表达量最高, 在 5 月中旬雄花表达量相对较高。*CcCOPI E3* 连接酶与山核桃雌雄花分化有关。图 4 参 21

关键词: 经济林学; 山核桃; *CcCOPI E3* 连接酶; RACE; 序列分析; 表达分析

中图分类号: S718.43; S664.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2014)06-0831-07

Cloning and expression analysis of *COPI E3* ligase in *Carya cathayensis*

SHEN Chen, QIU Jiani, HUANG Jianqin

(The Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: *COPI E3* ligase is a photomorphogenic repressor, a molecular switch for light control in plant development. A fragment of *CcCOPI E3* ligase for *Carya cathayensis* (hickory) was obtained with 454 sequencing. Then, the rapid amplification of cDNA ends (RACE) method was used to obtain the full length of the *COPI E3* ligase gene. Analysis was conducted with reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and included a comparison between *CcCOPI E3* ligase and *COPI E3* ligase. Results showed that the full-length of *COPI E3* ligase was 2 331 bp and consisted of two special structural domains: an annular zinc finger domain and WD-40 repeat sequences with the coding protein being strongly hydrophilic. The end of the amino was mainly hydrophilic amino acids; whereas, the end of the carboxyl was mostly hydrophobic amino acids. The identity between *CcCOPI E3* ligase and *COPI E3* ligase in *Populus trichocarpa* reached 77.8%. Results of the RT-PCR illustrated that expression of *CcCOPI E3* ligase in hickory occurred throughout the development of staminate and pistillate flowers. The gene expressed in stems, leaves, fruits, and flower buds had the highest expression in the flower bud with a peak in the middle of March; however, the male flower bud had its peak in the middle of May. Expression for the staminate flower peaked on March 12th and for the pistillate flower in the middle of May. Thus, it was supposed that *COPI E3* ligase was relevant to the differentiation of pistillate and staminate flowers in hickory. [Ch, 4 fig. 21 ref.]

收稿日期: 2014-02-18; 修回日期: 2014-04-20

基金项目: 国家高技术研究发展计划("863"计划)项目(2013AA102605); 国家自然科学基金资助项目(31170637)

作者简介: 沈辰, 从事经济林栽培与利用研究。E-mail: shenchenxx@163.com。通信作者: 黄坚钦, 教授, 博士, 博士生导师, 从事植物发育生物学研究。E-mail: hjq@zafu.edu.cn

Key words: cash forestry; *Carya cathayensis*; *CcCOPI* E3 ligase; RACE; sequence analysis; expression analysis

光作为重要的环境因子控制着植物一系列生长发育过程,其调控作用是通过光受体介导的信号传导的途径来完成的^[1]。目前,在拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 中共发现了3种 *CRY* (*CRYPTOCHROME*): *CRY1*, *CRY2* 和 *CRY3*, 其中 *CRY1* 和 *CRY2* 通过负调控光形态建成的负调控因子 *COPI* (*CO*nstitutive *Pho*tomorphogenic 1)来实现其调控光形态建成的功能^[2-3]。*COPI* 作为一种重要的调控因子,广泛存在于动植物体内^[4]。在植物中, *COPI* 作为一种 E3 泛素连接酶,具有 E3 泛素连接酶活性使转录调控因子 *LAF1*, *HY5*, *HFR1* 等泛素化,并调控其降解,从而起到抑制光信号调节的作用,进而在光信号转导及植物光形态建成中起重要作用^[5-7]。*COPI* 在细胞核内充当一个特异转录因子的总的调节因子^[8],通过与其互作因子相互结合而使这些光形态建成发育的正向调节子失活^[9-11]。*CO* 是光周期开花转换途径中一个最重要的基因^[12],通过激活下游基因 *FT*, *SOC1* 等表达,使植物由营养生长向生殖发育转变^[13-14]。*COPI* 与 *CO* 存在直接的蛋白相互作用,并在体外作为泛素 E3 连接酶使 *CO* 蛋白发生泛素化,在植物体内促进 *CO* 蛋白的降解,而 *CRY* 介导的信号可能通过负调控 *COPI* 对 *CO* 蛋白的降解作用,使 *CO* 蛋白稳定并发生积累,从而激活下游基因 *FT* 的表达,促进开花^[15-17]。山核桃 *Carya cathayensis* 是中国著名的特色干果,因其种仁中的不饱和脂肪酸成分对人体具有滋补、健脑等保健效果,得到了广大消费者的青睐^[18]。成花是决定山核桃产量的关键因素,而木本植物需要较长时间的营养生长(童期)才转向生殖生长的^[19]。在广泛的研究中,已通过利用分子生物学、遗传学等技术研究花的发育,极大地促进了成花机制的研究^[20-21]。如何运用分子机制促进木本植物山核桃提早开花,为将来进一步阐释山核桃成花的分子机制提供了重要的基因平台,又为促进山核桃早花、早实、丰产等的实际生产应用推广提供必需的理论支持。山核桃全基因组测序工作的完成(数据未发表)得到 *CcCOPI* E3 连接酶片段,利用 cDNA 末端快速扩增技术(RACE)技术克隆获得了 *CcCOPI* E3 连接酶的全长;利用生物信息学手段分析了它的蛋白特性和不同物种的同源基因之间的亲缘关系;利用实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time PCR)技术进一步分析了在 *CcCOPI* E3 连接酶雌雄花发育过程中的表达变化。该研究旨在为研究该基因的生物学功能,为进一步阐明山核桃成花调控的分子机制打下良好的基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

受试植物材料采自浙江省临安市太湖源镇的1株山核桃树,树龄约为30 a。于2013年2月24日、2月28日、3月3日、3月8日、3月12日、3月14日、3月16日、3月18日、3月20日、3月23日、3月26日、3月31日依次采取短果枝顶芽(前期为营养芽状态,后期为雌花芽状态),共采样12次。于2013年4月29日、5月6日、5月11日、5月14日、5月17日、5月21日、5月26日、5月29日、6月1日、6月4日、6月16日、6月23日依次采集短果枝的侧芽(前期为营养芽状态,后期为雄花芽状态),共采样16次。样品采集后立即放入液氮,带回实验室-70℃冰箱保存,用于核糖核酸(RNA)提取。反转录试剂盒、胶回收试剂盒、氨苄青霉素(amp)、限制性内切酶、*rTaq* DNA 聚合酶及PMD18-T载体分别购自生工生物工程(上海)股份有限公司和宝生物工程大连有限公司。

1.2 研究方法

1.2.1 山核桃总RNA的提取、反转录合成cDNA 采用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取山核桃样品的总RNA。以总RNA为模板,使用TaKaRa的PrimeScript™ RT reagent Kit perfect Real Time 试剂盒反转录获得cDNA用于反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)。

1.2.2 *CcCOPI* E3 连接酶的克隆与序列分析 *CcCOPI* E3 连接酶片段取自山核桃成花转录组454测序拼接获得的contig数据。分别设计3'RACE和5'RACE引物(3'RACE引物1:5'-AGCGTGCGTGGAGT-GTTGATTTT-3', 3'RACE引物2:5'-CCTGGATCTAGCAATTACATTGCGG-3', 5'RACE引物1:5'-CG-CACGCTTTTCATGCTCTTCATAC-3', 5'RACE引物2:5'-ATAGCCGCGAGTGTGCTGTCTGTAGA-3'按照Clontech公司RACE试剂盒的说明书,将提好的RNA进行已获得的cDNA为模板分别进行3'RACE和5'RACE反应,RACE反应体系为50.0 μL,内含1×PCR缓冲液(buffer),氯化镁(MgCl₂)1.5 mmol·L⁻¹,

三磷酸脱氧核糖核苷酸(dNTPs) $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $10\times$ 通用引物组合(UPM) $1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 基因特异引物 $0.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, *Taq* 酶(33.34 nkat), 模板约 100 ng 。RACE 扩增的条件为: $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min 预变性后, $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 min , $57 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 min 15 s , $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 2 min 45 s , 共 40 个循环, 最后 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 10 min 。用 DNA 回收试剂盒回收目标片段, 将目标片段连接到 pMD-18T simple 载体中进行 T/A 克隆, 最后将带有目标片段的质粒回收后交付生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。测得的序列通过美国生物技术信息中心(NCBI)的 BLAST 进行同源搜索和功能域推导; 利用 ExPASy 数据库中的 ProParam 在线工具分析其编码蛋白的理化性质和亲水性分析; 用 Clustalx 1.83 软件进行蛋白序列比对, 用 MEGA 3.1 软件的邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统进化树。

1.2.3 实时荧光定量反转录聚合酶链式反应(real-time RT PCR) 根据基因的保守序列设计 real-time RT PCR 引物(正向引物: ATGAAGAGCATGAAAAGCGTGCCTG; 反向引物 GGGTAAACGCTTTGTTCTCC)。Actin 作为内参(Actin 正向引物: TAATGTGTTGGACTCTGGTGATGG; 反向引物: ACATATGAAAGAGCTTTCCTGTGCC), 在 Bio-RAD 荧光定量 PCR 仪上扩增。用 Excel 2003 分析试验数据。

2 结果与分析

2.1 *CcCOPI* E3 连接酶全长的克隆、测序和结构分析

通过 5'RACE 和 3'RACE 的方法分别获得长度约为 $1\ 300 \text{ bp}$ 的 5'末端序列和 700 bp 的 3'末端序列。将最终扩增片段进行测序分析, 获得了 $2\ 331 \text{ bp}$ 的全长 cDNA 序列(图 1A), 命名为 *Carya cathayensis* E3 ubiquitin protein ligase *COPI*-like, 以下统称为 *CcCOPI* E3 连接酶, Genbank 登录号为 KF983530。编码 683 个氨基酸残基(图 1B), 分子量为 77.113 kD , PI 为 7.0。它由 2 个特殊的结构域组成即环形锌指结合域和 WD-40 重复序列。预测这个基因编码的蛋白质都有较强的亲水性, 而且亲水性氨基酸主要集中在氨基端; 可能都没有跨膜结构域(图 1C)。

2.2 *CcCOPI* E3 连接酶序列的同源性分析

从 NCBI 网站上搜寻并下载其他物种的 *CcCOPI* E3 连接酶的序列。序列比对发现, 山核桃 *CcCOPI* E3 连接酶与毛果杨 *Populus trichocarpa* 等的 *COPI* E3 连接酶同源基因相似度较高, 总体高达 77.80% , 其二级结构由 2 个特殊的结构域组成, 即 N-端的环形锌指结合域(ring finger zinc-binding domain, RING), C-端的 WD-40 重复序列(WD-40 repeats, 图 2)。

为了了解 *CcCOPI* E3 连接酶与其他植物 *COPI* E3 连接酶的亲缘关系, 利用 MEGA3.1 软件, 将不同植物的 *COPI* E3 连接酶构建系统进化树(图 3)。根据进化树聚类分析发现, 在已公布的同源基因中, *CcCOPI* E3 连接酶与蓖麻 *Ricinus communis* 等的亲缘关系最近, 而蓖麻属于双子叶植物, 与乌拉尔图小麦 *Triticum urartu* 和二穗短柄草 *Brachypodium distachyon* 等的亲缘关系相对较远, 乌拉尔图小麦和二穗短柄草属于单子叶植物。表明该基因的进化过程存在种属差异性, 与双子叶植物亲缘关系更为接近。

2.3 山核桃雌雄花发生发育过程 *CcCOPI* E3 连接酶的转录表达

总体上, *CcCOPI* E3 基因在山核桃的叶片、茎、花芽、果枝和果实中均有表达, 如(图 4A), 尤其在花芽中的表达量为最高。*CcCOPI* E3 连接酶在山核桃雌花发育过程中 3 月 12 日达到高峰, 之后表达量逐渐下降(图 4B); 在雄花芽中的表达量从 5 月 11 明显升高, 到 5 月 21 日到达高峰, 之后的表达量显著下降(图 4C)。总体上, *CcCOPI* E3 连接酶在山核桃雌花和雄花中的表达均呈现“上升—高峰—下降”的趋势。

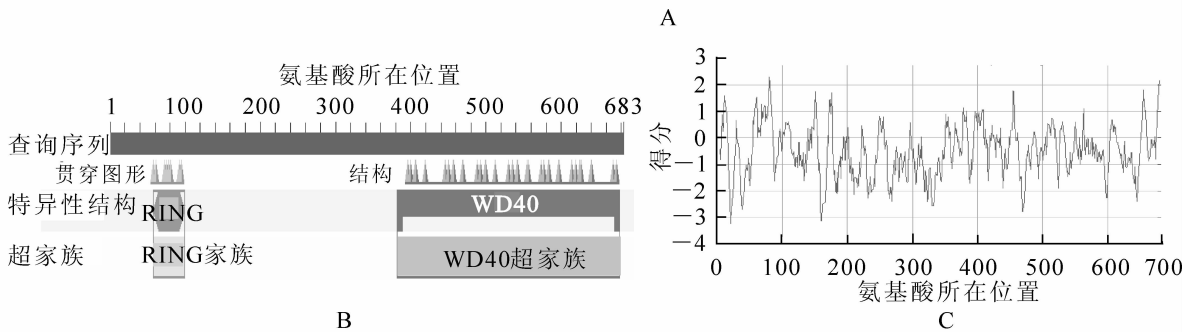
3 讨论

对 *CcCOPI* E3 连接酶功能域分析结果表明: 由 2 个特殊的结构域组成即环形锌指结合域和 WD-40 重复序列。预测这个基因编码的蛋白质都有较强的亲水性, 而且亲水性氨基酸主要集中在氨基端; 可能都没有跨膜结构域。在系统进化上, 山核桃 *CcCOPI* E3 连接酶与毛果杨 *Populus trichocarpa* 等的 *CcCOPI* E3 连接酶同源基因相似度较高。进化树聚类分析发现, 在已公布的同源基因中, *CcCOPI* E3 连接酶与蓖麻等的亲缘关系最近, 与乌拉尔图小麦和穗短柄草等的亲缘关系相对较远, 说明该基因与双子叶植物亲缘关系更为接近。


```

1 ATGGAGGAAGTGTCAAOGGGCAOOGGGGCTGTAGTCCOOGGGTGGTGAAGCOGGAGCOGGAGCOGGAGCATAAGGCGTCTOCATCGGCC 90
1 M E E V S T G T G P V V P A V V K P E P E R E H K A S P S A
91 TTCTCGGGGCTCAGCATCOGGATGAAGAAOCAGAAGGAGGCTCGGGCTGGGATCGGAGGAGCTGGACAAGGACTTGTCTTGTCCGATA 180
31 F S A A Q H P D E E P E G G S G W G S E E L D K D L L C P I
181 TGCATGCAAACGATCAAGGACOGGTTCCTCAOOGTGTGGGTCCACAGCTTCTGCTATATGTGCATCGTCATACACCTCOGCAATAAGAGT 270
61 C M Q T I K D A F L T V C G H S F C Y M C I V I H L R N K S
271 GACTGCCOCTGCTGCTCCACACCTCACOCTOCACCAGTTATTOOCCAACCTTCTTGTGCGATAAGCTTCTGAAGAAGGCTTCTGCTCGC 360
91 D C P C C S H H L T L H Q L F P N F L L D K L L K K A S A R
361 CAAATATOCAGAAOOGCTTCTCTGTGGAACAATTOOCTGOGGCATTACAGCAGGGTTGTGAAGTATCAATTAAGAGCTAGACAGCCTT 450
121 Q I S R T A S P V E Q F R R A L V Q Q G C E V S I K E L D S L
451 TTGTCACTOCTOCCAGACAAGAAGAGGAAAAATGGAACAAGAAGAAGCOGAGAGAAATATGCAAAATATTGCTGACCTTCTTGCATCATTG 540
151 L S L L A D K K R K M E Q E E A E R N M Q I L L T F L H H L
541 AGGCGCAAAAAGTGGACGAGTTGAATGAGGTACAATCTGATCTCCAGTTTATTAAGAGGACATAACTTCTGTAGAGAGACATAGAATG 630
181 R V R L N E V Q S D L Q C Y L Q K R R Q L A N K K D R D
631 GAGTGTATOGAGCAAAGGATAGGTACTCTGTCAAACATGCATATGCTTGGAGATGACTCTAGTGGAGAAAAATCAOOGTCTTCAOCCATG 720
211 E L Y R A K D R Y S V K L H M L G D D S S A R K S R S S P M
721 GATAAAGACAGCAGTGAOCTTATCTOCAGTTCTCTAACTGCAOCTGGAGTGTGGCTACAAGGAATCTOAAAAATAAGAAAGCAGATGGA 810
241 D K N S S D L I S S S L T R D Q V M A T R N L Q N K K D G
811 AAGTCTCAAGTAAOCTCTCATGGGCTACCAAGAAAGGAGCGTTTGTAGTGGCTCAGAATCACAGCACATTAACCAATOGGGTTTATCTGTA 900
271 K S Q V V T S H G L P R K D A L S G S E S Q H I N Q S G L S V
901 GCAAGAAAAAGGGTCCATGCTCAGTTCAGTGAOCTACAAGACTCTTAOCTGCAAAAGAGAOGTCAOCTGGCAAAACAAOACTGAAC 990
301 A R K K R V H A Q F S D L Q C Y L Q K R R Q L A N K K D R D
991 CAGCAGGAGAAGGATAAAAGCATTATACOCOCAGAGGGTTATAATGAGGGTCTTGCAGATTTCOAATOGGTTTTGACTACCTTCAOOGGG 1080
331 Q Q E K D K S I I P R E G Y N E G L A D F Q S V L T T F T R
1081 TACAGTGCATGAGGGTCAATGOGGAAGTTAGACATGGTAATCTAGTCCACTCAGOGAATATAGTATCAAGCATTGAATTTGACOGGTGAC 1170
361 Y S R L R V I A E V R H G N L V H S A N I V S S I E F D R D
1171 GATGAGCTGTTGTACTGCTGGAGTATOCOGGTGCATAAAGGTTTTGACTTCTOCACOGGTTGTGAATGAOCCOGCTGATATGCACTAT 1260
391 D E L F A T A G V S R C I K V F D F S T V V N E P A D M H Y
1261 COOCTTGTGGAGATGGCAOCTGTTCAAACCTCAGCTGCTGAGTTGGAACAATTTACTAAGAACCACATTGCCAGTGTGATTATGAG 1350
421 P V V E M A T R S K L S C L S W N N F T K N H I A S S D Y E
1351 GGAATTTGCAOOGTTTGGGATGTAATCACTOCACAGAGTGTGATGGAGTATGAAGAGCATGAAAAGOGTGOCTGGAGTGTGATTTTTG 1440
451 G I V T V W D V I T R Q S V M E Y E E H E K R A W S V D F S
1441 CGTACAGAAOCCATOGCTTGTATCTGGTAGTGATGATTATAAGGTCAAAGTTTGGTGCACAAACCAGGAAGCTAGTGTCTTAAACATT 1550
481 R T E P S M L V S G S D D Y K V K V W C T N Q E A S V L N I
1531 GACATGAAAAGCAAATATATGCTGTGCAAGTATAATCTGGATCAGCAATTACATTGOGGTTGGTTCTGCAGATCATCAGATCCACTAC 1620
511 D M K A N I C C V K Y N P G S S N Y I A V G S A D H Q I H Y
1621 TATGATTTAAGAAAAGTCACTGATCAGTACATGTTGTTGACGGGGCACAGAAAGCTGTTTCATATGTGAAGTTCTTGCATAAATGAG 1710
541 Y D L R N V S H P L H V F S G H R K A V S Y V K F L S N N E
1711 CTTGCTTCTGCTTCTACAGACAGCACACTGOGGCTATGGGATGTGAAGGAGAACTTGCAGTTGOCACCTTTAGAGGOCACACAAATGAG 1800
571 L A S A S T D S T L R L W D V K E N L P V R T F R G H T N E
1801 AAAAACTTTGTGGGOCGTGACAGTAAATAGCGAGTACATTGATGTTGGCAGGAGACAAATGAAGTGTATGTCTACCAATAAGGAAATCTOC 1890
601 K N F V G L T V N S E Y I A C G S E T N E V Y V Y H K E I S
1891 AGGCOOCTGACTTGGCATAAATTAGTCTCOOAGTTCGCAAGATGCTGATGATGAGGTTGOGTCTTACTTCAATTAGTGTCTGATGCTGG 1980
631 R P V T W H K F S S P D S Q D A A D D E V A S Y F I S A V C W
1891 AAGAGTGTATGCOCTAOCATGCTAACTGCTAATAGTCAAGGACCACTCAAGGTTGCTAGTTCTTGGCGCTTGA 2050
661 K S D S P T M L T A N S Q G T I K V L V L A A *

```



A: *CcCOP1* E3连接酶编码区核苷酸序列及推测的氨基酸序列; B: *CcCOP1* E3连接酶基因的蛋白结构域; C: *CcCOP1* E3连接酶的亲疏水性分析。

图1 *CcCOP1* 基因的序列分析

Figure 1 Sequence analysis of E3 ubiquitin protein ligase *COP1*-like

根据实时荧光定量反转录聚合酶链式反应(real-time RT PCR)分析显示, 在山核桃的叶片、茎、花芽、果枝、果实中均有表达, 尤其在花芽中的表达量为最高, 推测该基因可能参与植物花的发育, 这还有待进一步功能分析研究。具体地, *CcCOP1* E3 连接酶在山核桃雌花发育过程中3月12日达到高峰。黄有军等^[20]从超微结构、显微结构和外部形态变化多个层次上对雌花发育过程的研究, 总结出山核桃雌花花芽分化规律为: 雌花发育过程从3月下旬开始到5月中旬基本完成, 此时正是雌花芽开始分化的时期, 进而促进开花。我们推测再花分化之前, 基因的表达量上升, 促进花分生组织的分化, 进而促进开

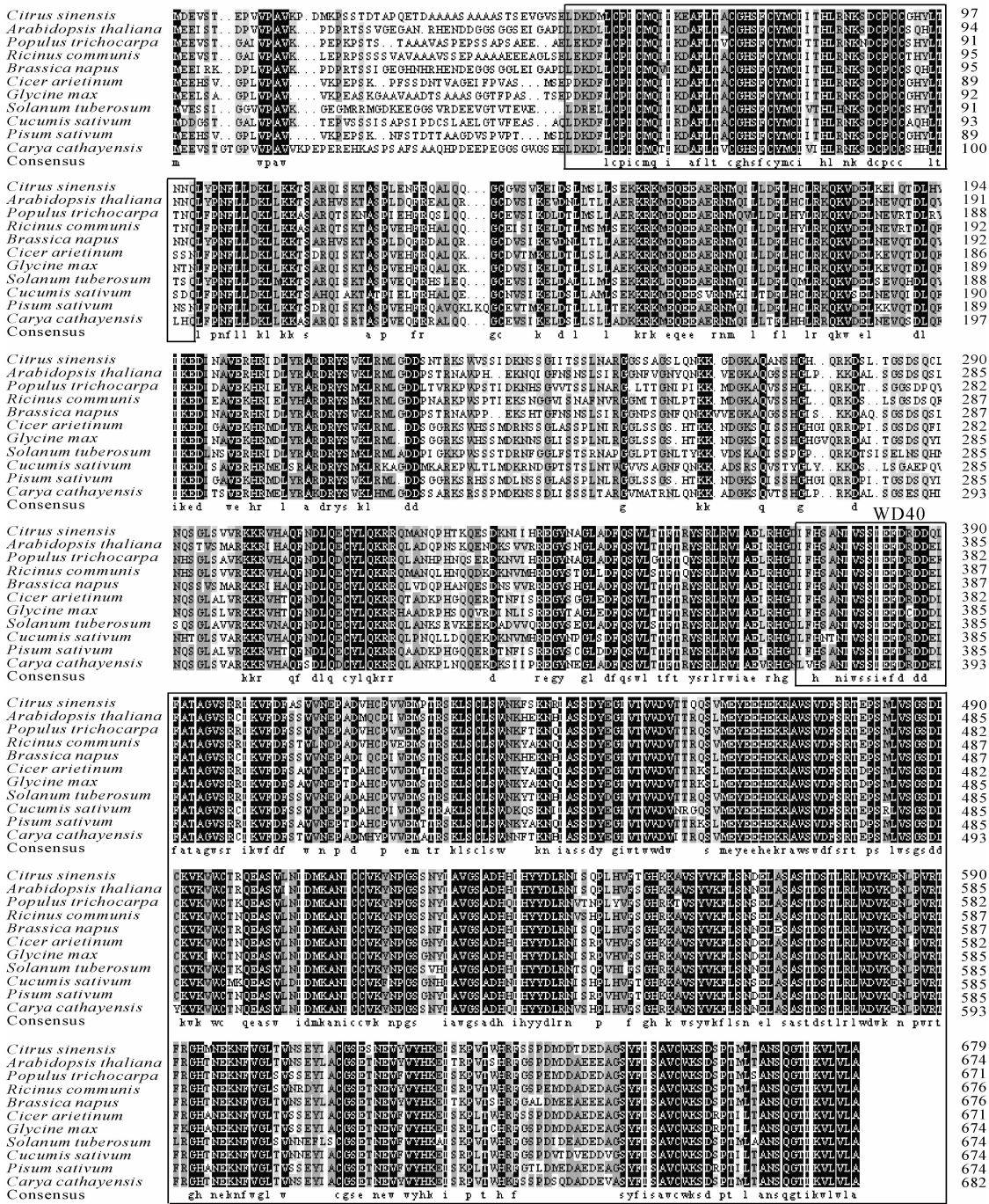


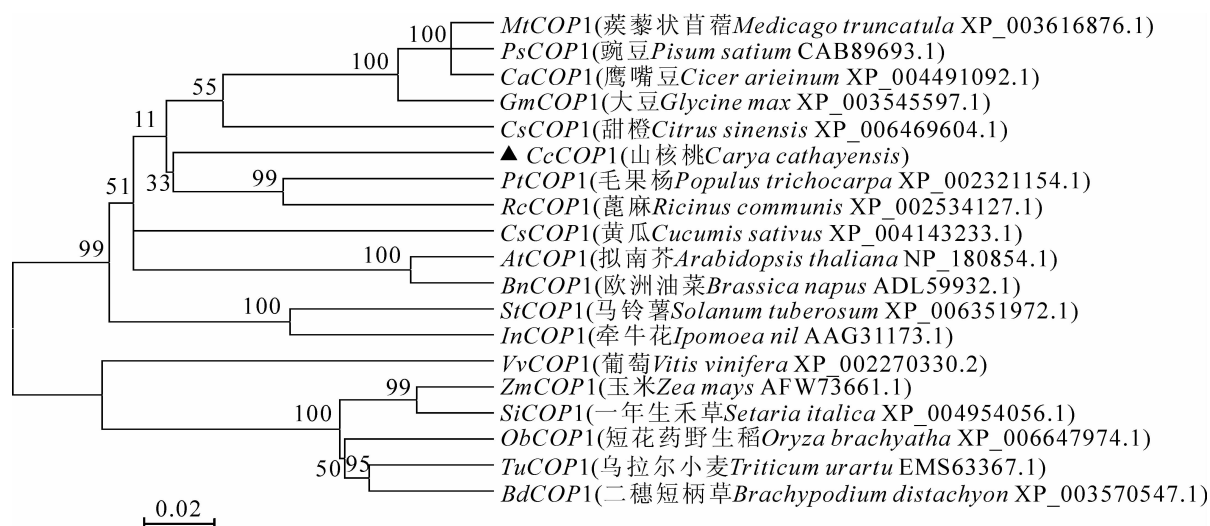
图 2 *CcCOPI* 连接酶同源基因的氨基酸序列比对分析

Figure 2 Amino acid sequence alignment analysis of E3 ubiquitin protein ligase *COPI*-like

花。在雄花芽中的表达量到 5 月 21 日到达高峰，这与山核桃雄花生长习性相关，雄花芽分化自 5 月中下旬至 7 月中旬完成花序原基分化，7 月中旬至次年 3 月中旬为休眠期，次年 3 月中下旬继续分化，花序伸长，完成雄配子体的发育，花粉粒成熟散粉后雄花序脱落^[21]。该基因的表达量在雄花芽分化之前呈上升趋势，到 5 月中旬表达量最高，之后表达量显著降低，进而促进雄花芽的分化。纵观山核桃整个花发育过程，总体上，*CcCOPI* E3 连接酶在山核桃雌花和雄花中的表达均呈现“上升—高峰—下降”的趋势分析，在雌花和雄花的分化过程中，担当重要角色。

结合本课题组对山核桃开花相关基因 *CcCOPI* E3 连接酶的研究，将更有利于对于调控山核桃花芽分化的分子机制的研究，促进雌花的分化及控制雄花的分化对于提高山核桃的产量有着重要的价值。

对于植物 *COPI* 进行了深入研究，其结构、功能及其发挥作用时的分子机制得到了更多的阐释，但



蒺藜状苜蓿 *Medicago truncatula*, 豌豆 *Pisum sativum*, 鹰嘴豆 *Cicer arietinum*, 大豆 *Glycine max*, 甜橙 *Citrus sinensis*, 拟南芥 *Arabidopsis thaliana*, 欧洲油菜 *Brassica napus*, 黄瓜 *Cucumis sativus*, 山核桃 *Carya cathayensis*, 毛果杨 *Populus trichocarpa*, 蓖麻 *Ricinus communis*, 马铃薯 *Solanum tuberosum*, 牵牛花 *Ipomoea nil*, 葡萄 *Vitis vinifera*, 玉米 *Zea mays*, 一年生禾草 *Setaria italica*, 短花药野生稻 *Oryza brachyantha*, 乌拉尔图小麦 *Triticum urartu*, 二穗短柄草 *Brachypodium distachyon*。

图3 *CcCOP1* E3连接酶同源基因编码的氨基酸序列聚类分析

Figure 3 Phylogenetic tree analysis of the deduce coding amino acids sequences of E3 ubiquitin protein ligase COP1-like in different species

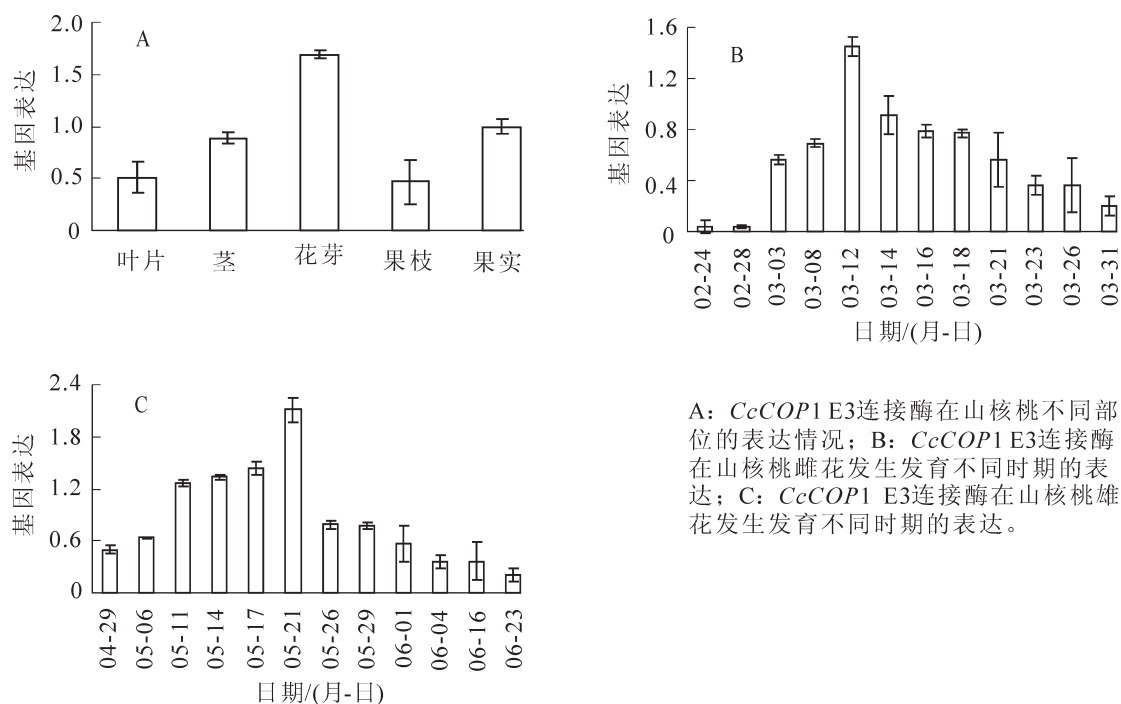


图4 *CcCOP1* E3连接酶在山核桃中的表达情况

Figure 4 Expression of E3 ubiquitin protein ligase COP1-like in hickory

是植物 COP1 蛋白仅是一个大的光信号传递复合物中的一个组分, 而高等植物的光信号传递更加是一个复杂的网络, 光形态建成的调节机制仍然尚未完全明了。另外, 其他植物中也存在 COP1 蛋白, 但其结构和功能以及作用机制是否与山核桃完全一致呢? 这些有待于进一步深入研究。

参考文献:

- [1] AHMAD M, CASHMORE A R. The blue-light receptor cryptochrome 1 shows functional dependence on phytochrome A or phytochrome B in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 1997, **11**(3): 421 – 427.
- [2] ANG L H, CHATTOPADHYAY S, WEI Ning, *et al.* Molecular interaction between *COPI* and *HY5* defines a regulatory switch for light control of *Arabidopsis* development [J]. *Mol Cell*, 1998, **1**(2): 213 – 222.
- [3] YANG Hongquan, TANG Ruhang, CASHMORE A R. The signaling mechanism of *Arabidopsis CRY1* involves direct interaction with *COPI* [J]. *Plant Cell*, 2001, **13**(12): 2573 – 2587.
- [4] DORNAN D, WERTZ I, SHIMIZU H, *et al.* The ubiquitin ligase *COPI* is a critical negative regulator of p53 [J]. *Nature*, 2004, **429**(6987): 86 – 92.
- [5] McNELIS T W, TORII K U, DENG Xingwang. Expression of an N-terminal fragment of *COPI* confers a dominant negative effect on light-regulated seedling development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 1996, **8**(9): 1491 – 1503.
- [6] BALASUBRAMANIAN S, WEIGEL D. Temperature induced flowering in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Signal & Behav*, 2006, **1**(5): 227 – 228.
- [7] BALLARÉ C L. Keeping up with the neighbours: phytochrome sensing and other signalling mechanisms [J]. *Trends Plant Sci*, 1999, **4**(3): 97 – 102.
- [8] KANG Chunying, LIAN Hongli, WANG Fangfang, *et al.* Cryptochromes, phytochromes, and *COPI* regulate light-controlled stomatal development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2009, **21**(9): 2624 – 2641.
- [9] AN Hailong, ROUSSOT C, SUÁREZ-LÓPEZ P, *et al.* *CONSTANS* acts in the phloem to regulate asystemic signal that induces photoperiodic flowering of *Arabidopsis* [J]. *Development*, 2004, **131**(5): 3615 – 3626.
- [10] MAO Jian, ZHANGYanchun, SANG Yi, *et al.* A role for *Arabidopsis* cryptochromes and *COPI* in the regulation of stomatal opening [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2005, **102**(34): 12270 – 12275.
- [11] WANG Haiyang, MA Ligeng, LI Jinming, *et al.* Direct interaction of *Arabidopsis* cryptochromes with *COPI* in light control development [J]. *Science*, 2001, **294**(5540): 154 – 158.
- [12] BLÁZQUEZ M A, WEIGEL D. Independent regulation of flowering by phytochrome B and gibberellins in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 1999, **120**(4): 1025 – 1032.
- [13] MOON J, LEE H, KIM M, *et al.* Analysis of flowering pathway integrators in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2005, **46**(2): 292 – 299.
- [14] MOURADOV A, CREMER F, COUPLAND G. Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity [J]. *Plant Cell*, 2002, **14**(suppl): S111 – S130.
- [15] MOCKLER T C, GUO Hongwei, YANG Hongyun, *et al.* Antagonistic actions of *Arabidopsis* cryptochromes and phytochrome B in the regulation of floral induction [J]. *Development*, 1999, **126**(10): 2073 – 2082.
- [16] LIU Lijun, ZHANGYanchun, LI Qinghua, *et al.* *COPI*-mediated ubiquitination of *CONSTANS* is implicated in cryptochrome regulation of flowering in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2008, **20**(2): 292 – 306.
- [17] IMAIZUMI T, KAY S A. Photoperiodic control of flowering: not only by coincidence [J]. *Trends Plant Sci*, 2006, **11**(11): 550 – 558.
- [18] 程有龙, 徐荣章. 传统山核桃林分的立体经营及其效益[J]. 浙江林业科技, 1996, **16**(1): 10 – 19.
CHENG Youlong, XU Rongzhang. Traditional space management and its efficiency of *Carya cathayensis* forest [J]. *J Zhejiang For Sci Technol*, 1996, **16**(1): 10 – 19.
- [19] 郭传友, 黄坚钦. 山核桃研究综述及展望[J]. 经济林研究, 2004, **22**(1): 61 – 63.
GUO Chuanyou, HUANG Jianqin. Review and perspective of research on *Carya cathayensis* [J]. *Nonwood For Res*, 2004, **22**(1): 61 – 63.
- [20] 黄有军, 夏国华, 王正加, 等. 山核桃雌花发育的解剖学研究[J]. 江西农业大学学报, 2007, **29**(5): 723 – 726.
HUANG Youjun, XIA Guohua, WANG Zhengjia, *et al.* Studies on anatomy of development of female flower in *Carya cathayensis* Sarg. [J]. *Acta Agric Univ Jiangxi*, 2007, **29**(5): 723 – 726.
- [21] 黄有军, 王正加, 郑炳松, 等. 山核桃雄蕊发育的解剖学研究[J]. 浙江林学院学报, 2006, **23**(1): 56 – 60.
HUANG Youjun, WANG Zhengjia, ZHENG Bingsong, *et al.* Anatomy of stamen development on *Carya cathayensis* [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2006, **23**(1): 56 – 60.