

杜仲 *CONSTANS-like* 全基因组鉴定、 系统进化及表达模式分析

刘俊^{1,2,3}, 李龙⁴, 陈玉龙¹, 刘燕¹, 吴耀松¹, 任闪闪¹

(1. 河南中医药大学 中医药科学院 河南省中医方证信号传导重点实验室, 河南 郑州 450046; 2. 国际竹藤中心 国家林业和草原局竹藤科学与技术重点开放实验室, 北京 100102; 3. 国际竹藤中心 安徽太平试验中心, 安徽 黄山 245700; 4. 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 【目的】揭示 *CONSTANS-like* 在杜仲 *Eucommia ulmoides* 基因组中的分布、结构特征及表达模式。【方法】利用生物信息学方法, 对杜仲 *CONSTANS-like* 基因家族进行鉴定及理化性质、进化关系、基因结构、启动子元件和表达模式分析。【结果】杜仲基因组中共鉴定到 8 个 *EuCOLs* 基因, 分别命名为 *EuCOL1*~*EuCOL8*, 氨基酸数目为 315~469, 理论等电点分布范围为 5.10~6.47, 分子量为 35.21~52.65 kDa。亚细胞定位预测均定位在细胞核中, 为亲水性蛋白, 分布于 8 条染色体。系统进化分为 2 个亚家族(群组 I 和群组 III), 分别包含 2 和 6 个 *EuCOLs* 蛋白, 同一亚家族基序具有相似性。*EuCOLs* 基因结构简单, 启动子中含有多个光周期响应元件。表达模式分析显示: *EuCOLs* 在杜仲叶片发育中表达水平相对较低, *EuCOL7* 在杜仲胶形成中表达量最高, 各家族成员表达特征存在差异。蛋白互作预测显示: *EuCOL7* 可与多个光周期响应蛋白互作。【结论】杜仲 *CONSTANS-like* 基因家族含有典型的 CCT 和 B-box 结构域, 可能参与叶片发育及杜仲胶的形成。图 8 表 1 参 56

关键词: 杜仲; *CONSTANS-like*; 生物信息学; 表达模式分析

中图分类号: S718.4; Q754 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2022)03-0475-11

Genome-wide identification, system evolution and expression pattern analysis of *CONSTANS-like* in *Eucommia ulmoides*

LIU Jun^{1,2,3}, LI Long⁴, CHEN Yulong¹, LIU Yan¹, WU Yaosong¹, REN Shanshan¹

(1. Henan Key Laboratory of TCM Prescription and Syndrome Signaling, Academy of Chinese Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Henna 450046, Zhengzhou, China; 2. Key Open Laboratory of Bamboo and Rattan Science and Technology, National Forestry and Grassland Administration, International Center for Bamboo and Rattan, Beijing 100102, China; 3. Anhui Taiping Experimental Station of International Center for Bamboo and Rattan, Huangshan 245700, Anhui, China; 4. College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China)

Abstract: [Objective] This study aims to reveal the distribution and expression pattern of *CONSTANS-like* in *Eucommia ulmoides* genome. [Method] Bioinformatics method was used to identify the *CONSTANS-like* gene family of *E. ulmoides* and analyze its physicochemical properties, evolutionary relationship, gene structure, promoters and expression patterns. [Result] A total of 8 *EuCOL* genes (*EuCOL1*–*EuCOL8*) were identified in *E. ulmoides* genome, composed of 315–469 amino acid residues. Their isoelectric point distribution range was

收稿日期: 2021-05-20; 修回日期: 2021-12-09

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目 (22A360005); 国家林业和草原局/北京市共建竹藤科学与技术重点实验室开放基金资助项目 (ICBR-2020-05); 国际竹藤中心安徽太平试验中心开放课题 (1632021006-4); 河南中医药大学博士科研启动基金项目 (RSBSJJ2019-04)

作者简介: 刘俊 (ORCID: 0000-0003-0468-5927), 助理研究员, 博士, 从事植物分子生物学研究。E-mail: liujun_0325@163.com

5.10–6.47 and the molecular weight was 35.21–52.65 kDa. Subcellular localization predicted that they were all located in the nucleus and were hydrophilic proteins, distributed on 8 chromosomes. *EuCOL* gene family was divided into two subfamilies (Group I and Group III), containing 2 and 6 *EuCOLs* proteins, respectively, the motifs of the same subfamily were similar. *EuCOL* genes were simple in structure and contained multiple photoperiodic response elements in their promoters. Expression pattern analysis showed that the expression level of *EuCOLs* was relatively low during the development of *E. ulmoides* leaves, the expression level of *EuCOL7* was the highest in gutta-percha formation, and the expression characteristics of family members were different. Protein interaction prediction showed that *EuCOL7* could interact with multiple photoperiod responsive proteins. [Conclusion] The *CONSTANS-like* gene family of *E. ulmoides* contains a typical CCT and B-box domain, which may be involved in leaf development and gutta-percha formation. [Ch, 8 fig. 1 tab. 56 ref.]

Key words: *Eucommia ulmoides*; *CONSTANS-like*; bioinformatics; expression pattern analysis

CONSTANS-like 是植物中保守的一类锌指蛋白转录因子, N端含有1个或2个由2个半胱氨酸组成 C-X₂-C-X₁₆-C-X₂-C(C为半胱氨酸, X为可变氨基酸)介导蛋白互作的 B-box 结构域^[1], C端包含1个由43个氨基酸组成参与蛋白核定位的 CCT(*CONSTANS*、*CONSTANS-like*、*TOC1*) 结构域^[2-3]。*CO/CO-like(COL)* 基因家族已在多个物种中进行了报道, 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 中鉴定到17个 *CONSTANS-like* 成员^[2], 水稻 *Oryza sativa* 中有17个^[4], 甜菜 *Beta vulgaris* 中有13个^[5], 大麦 *Hordeum vulgare* 中有9个^[4], 甘蓝型油菜 *Brassica napus* 中有4个^[6], 小麦 *Triticum aestivum* 中有3个^[7], 挪威云杉 *Picea abies* 中含有2个 *COL* 成员^[8]。

研究表明: *COL* 基因具有功能多样性, 特别是在光响应介导的开花和生长调控方面^[2, 4-5, 9]。*CO* 基因的表达和蛋白稳定受生物钟和光周期调节; 长日照条件下, *CO* 与 *FLOWERING LOCUS T (FT)* 启动子结合, 诱导 *FT* 基因表达, 促进拟南芥提前开花^[10-11], *CO* 通过调节 *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)* 的表达, 抑制 *FT* 诱导开花^[12]。*AtCOL9* 通过抑制 *CO* 基因表达, 减缓 *FT* 转录, 延迟开花^[13]。在水稻中, 超表达 *OsCOL15* 通过上调开花抑制因子 *Ghd7* (grain number, plant height and heading date 7), 下调激活因子 *RID1* (rice indeterminate 1)、*Ehd1* (early heading date 1)、*Hd3a* (heading date 3a)、*FLT1* (*FLOWERING LOCUS T1*), 导致开花延迟^[14]。在长日照条件下, 过表达甘菊 *Chrysanthemum lavandulifolium* 的 *CICOL5* 诱导转基因拟南芥提前开花^[15]。大部分 *PheCOLs* 在毛竹 *Phyllostachys edulis* 叶片中表达量最高, 具有显著的光周期响应模式^[16]; 在早竹 *Ph. violascens* 中, *PvCO1* 和 *PvCO2* 主要在叶片中表达^[17]。毛果杨 *Populus trichocarpa* 的 *PtCOLs* 优先在叶片中表达^[18]; 银杏 *Ginkgo biloba* 中 *GbCO* 基因主要在叶片和茎尖表达^[19]。超表达 *PhCOL16* 提高转基因矮牵牛 *Petunia corollas* 叶绿素含量, 正调控叶绿素生物合成^[20]。*COL* 不仅参与开花调控, 在植物发育和逆境胁迫中也发挥重要作用。*AtCOL4* 提高转基因植株盐和脱落酸 (abscisic acid, ABA) 耐受性^[21], *AtCOL7* 促进拟南芥侧枝形成和下胚轴伸长^[22]。

杜仲 *Eucommia ulmoides* 是单科、单属、单种植物, 雌雄异株, 广泛分布于陕西、河南、四川、贵州、云南等地, 是中国特有的经济树种。因杜仲树皮、根、叶、花和果实中均含有大量的白色丝状杜仲橡胶, 被誉为优质的天然橡胶树种^[23]。*COL* 蛋白在植物生长发育的多个方面发挥重要作用, 具有重要的药用价值和橡胶用价值。杜仲 *COL* 基因家族系统进化及其在杜仲叶片生长发育和杜仲胶形成中的表达模式尚未报道。本研究以杜仲基因组数据为基础, 利用生物信息学分析方法, 对杜仲 *CONSTANS-like* 基因家族进行全基因组鉴定、理化性质和系统进化分析, 初步鉴定 *EuCOLs* 基因在杜仲叶片生长发育及杜仲胶生物合成中的功能, 为进一步探索 *EuCOLs* 基因的功能提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

杜仲种植于西北农林科技大学苗圃 (陕西杨凌)。取生长正常, 长势一致的2年生‘秦仲1号’‘Qinzhong 1’杜仲幼苗的叶芽 (茎尖)、生长叶 (3 cm 长叶片)、幼叶 (完全展开的新叶)、老叶 (完全展开 60 d 叶片); 取同一生长条件, 与‘秦仲1号’相同发育时期的‘紫叶’杜仲 *E. ulmoides* ‘Ziye’ 叶片, 经液氮处理后冻存于-80℃冰箱, 用于RNA提取。

1.2 方法

1.2.1 杜仲 *COL* 基因家族鉴定及理化性质分析 从杜仲基因组数据库 Genome Warehouse (<https://bigd.big.ac/gwh/Assembly/13/show>) 中下载 *COL* 蛋白候选序列, 利用美国国家生物信息中心 (NCBI) 保守结构域搜索服务 (CD Search) 分析蛋白结构域, 保留含有完整 B-box 和 CCT 结构域序列。通过在线软件 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析蛋白理化性质, 使用 Plant-mPLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>) 预测 *EuCOLs* 蛋白亚细胞定位, 利用在线工具 ExPASy (<https://www.expasy.org/tools>) 分析 *EuCOLs* 氨基酸数量、分子量、理论等电点, 通过 Expasy (<https://web.expasy.org/protscale/>) 软件分析蛋白的亲疏水性, 利用 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.plpage=npsa_sopma.html) 软件预测蛋白的二级结构。

1.2.2 杜仲 *COLs* 基因 scaffold 定位及系统进化分析 通过杜仲基因组数据库, 查找 *EuCOLs* 基因在 scaffolds 上的位置以及 scaffolds 长度, 使用 DNAMAN 软件进行 *EuCOLs* 蛋白序列比对, 通过 Clustal X1.83 软件对杜仲、水稻、拟南芥、毛果杨和玉米 *Zea mays* 的 *COLs* 蛋白进行多序列比对, 利用 MEGA 6.0 的邻接法 (neighbor-joining), 重复次数设置为 1 000 次^[24], 构建系统发育树。

1.2.3 杜仲 *COLs* 基因结构、基序及启动子分析 利用 GSDS (<http://gsds.gao-lab.org/index.php>) 软件分析 *EuCOLs* 基因结构, 通过 MEME (<http://meme-suite.org/>) 对 *EuCOLs* 进行基序分析 (参数是: any number of Repetitions (anr), maximum number of Motifs= 20, minimum width $\geq$ 6, and maximum width $\leq$ 50)。通过 Clustal X 1.83 比对和 DNAsp5 软件分析 *EuCOLs* 同源基因对, 并计算非同义替换率 (non-synonymous substitution rate, K_a) 和同义替换率 (synonymous substitution rate, K_s)。杜仲同源基因复制和分离的时间 (t) 由公式 $t=K_s/1.3\times 10^{-8}$ 计算^[16]。利用 Plant CARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 软件对 *EuCOLs* 基因启动子 (ATG) 上游 2 000 bp 序列进行查找分离, 进行启动子顺式作用元件分析。

1.2.4 杜仲 *EuCOL* 基因家族表达模式分析 从 NCBI 的 Short Read Archive (SRA) 数据库中下载 ‘秦仲 1 号’ 不同发育时期叶片 (叶芽、初生叶、幼叶、老叶, 版本号: SRP218063)^[25] 及不同胶含量杜仲品种 (高产胶杜仲品种 ‘秦仲 2 号’ ‘Qinzhong 2’、低产胶杜仲品种 ‘小叶’ ‘Xiaoye’ 含量, 版本号: SRP158357)^[26] 的转录组数据, 利用 1 百万个映射上的碱基中映射到外显子的 1 千个碱基上的碱基个数 (fragments per kilobase million, FPKM) 值表示 *EuCOLs* 基因相对表达丰度 (A), 对该数值取对数 ($\log_2 A$) 进行统计分析, 通过 TBtools 工具绘制基因表达图谱^[27]。

利用 Trizol (天根 DP424) 试剂提取 ‘紫叶’ 杜仲的叶芽 (茎尖)、生长叶 (3 cm 长叶片)、嫩叶 (完全展开的新叶) 总 RNA, 反转录合成 cDNA, 利用 Quant Studio 6 (Life Technologies 公司, 新加坡), All-in-One SYBR Premix EX Taq™ kit (Gene Copoeia 公司, 美国) 进行实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 反应, 10.0 μ L 反应体系: 2 $\times$ mix 5.0 μ L、正向引物/反向引物各 0.25 μ L、cDNA 2.0 μ L、ddH₂O 2.5 μ L。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 10 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 45 个循环。内参基因为 *UBC E2*^[28], 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对 3 次生物学重复的数据进行分析。

1.2.5 杜仲 *COL7* 蛋白互作分析 利用 STRING 软件 (<https://string-db.org/>), 选择拟南芥数据库进行序列比对, 根据已知拟南芥 *COLs* 蛋白互作关系, 预测 *EuCOL7* 互作蛋白, 通过 Cytoscape 3.7.0 软件进行评估和预测^[16]。

2 结果与分析

2.1 杜仲 *COL* 基因家族鉴定及理化性质分析

通过 Genome Warehouse 数据库, 从杜仲基因组中共查找到 8 个 *EuCOLs* 基因, 利用 Pfam 和 NCBI 的 Conserved Domain Search 软件, 验证 *EuCOLs* 蛋白保守结构域。结果显示: 8 个 *EuCOLs* 蛋白均含有 B-box 和 CCT 结构域, 分别命名为 *EuCOL1*~*EuCOL8*。通过 ExPASy 工具, 对 *EuCOL* 家族成员进行理化性质分析, *EuCOL3* 蛋白序列最长, 编码 469 个氨基酸, *EuCOL7* 序列最短, 编码 315 个氨基酸, 分子量分布区域为 35.21~52.65 kDa, 等电点范围是 5.10 (*EuCOL1*)~6.47 (*EuCOL6*), 亚细胞定位预测结果显示: *EuCOLs* 均定位在细胞核中 (表 1), 属于疏水性蛋白, 8 个 *EuCOLs* 分布于 8 条 scaffolds。

2.2 杜仲 *COLs* 蛋白系统进化分析

为了分析杜仲 *EuCOL* 基因家族的进化关系, 将 8 个 *EuCOLs* 蛋白与 17 个拟南芥 *AtCOLs*、水稻

表 1 杜仲 CO-like 蛋白序列特征及亚细胞定位预测

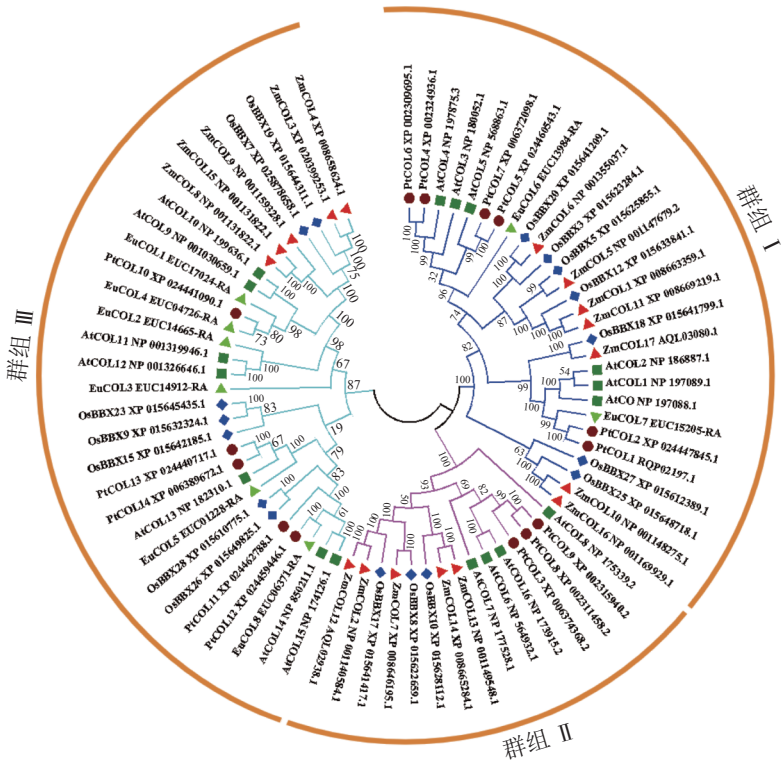
Table 1 Sequence characteristics and predicted subcellular location of *E. ulmoides* CO-like proteins

基因ID	基因名	染色体定位	位置/bp	CDS长度/bp	蛋白质序列/个	分子量/kDa	等电点	亚细胞定位
EUC17024-RA	<i>EuCOL1</i>	Super-Scaffold_183	1 758 965~1 761 661	1 128	375	41.70	5.10	细胞核
EUC14665-RA	<i>EuCOL2</i>	Super-Scaffold_127	1 395 219~1 398 047	1 287	428	47.26	5.25	细胞核
EUC14912-RA	<i>EuCOL3</i>	Super-Scaffold_121	1 876 239~1 890 694	1 410	469	52.65	5.95	细胞核
EUC04726-RA	<i>EuCOL4</i>	Super-Scaffold_3	2 229 604~2 240 203	1 155	384	42.06	5.85	细胞核
EUC01228-RA	<i>EuCOL5</i>	scaffold416_obj	336 319~340 482	1 038	345	39.01	6.47	细胞核
EUC13984-RA	<i>EuCOL6</i>	scaffold20_obj	133 259~134 581	972	323	35.50	5.52	细胞核
EUC15205-RA	<i>EuCOL7</i>	Super-Scaffold_275	13 124~15 540	948	315	35.21	5.59	细胞核
EUC06371-RA	<i>EuCOL8</i>	Super-Scaffold_162	322 024~324 298	1 347	448	49.49	5.71	细胞核

OsCOLs、ZmCOLs 和 14 个毛果杨 PtCOLs^[18] 导入 MEGA 6.0 软件, 通过邻接法构建系统发育树, 73 个 COLs 蛋白分为 3 个亚家族 (分别是群组 I、群组 II 和群组 III)(图 1)。群组 I 亚家族包含 2 个 B-box 和 1 个 CCT 结构域, 由 28 个 COLs 蛋白组成, 包含 2 个 EuCOLs 蛋白 (*EuCOL6* 和 *EuCOL7*); 群组 II 亚家族含有 1 个 B-box、1 个 CCT 和 1 个分化的锌指结构域, 所含 COLs 蛋白数量最少, 有 15 个 COLs 蛋白, 分别含有 4 个 AtCOLs, 3 个 PtCOLs 蛋白和 OsCOLs 蛋白, 5 个 ZmCOLs 蛋白, 不含 EuCOLs 蛋白; 群组 III 亚家族由 1 个 B-box 和 1 个 CCT 结构域组成, 所含蛋白数量最多, 包含 30 个 COLs 蛋白, 有 6 个 EuCOLs 蛋白, 进化关系显示杜仲与毛果杨亲缘关系最近。

2.3 杜仲 COLs 基因结构与基序分析

为了进一步分析 *EuCOLs* 基因的保守性和多样性, 对 *EuCOLs* 基因结构及蛋白基序进行了分析, 结果显示: *EuCOLs* 基因结构较为简单 (图 2), *EuCOL1* 和 *EuCOL6* 分别含有 2 个和 3 个外显子, 4 个 *EuCOLs* 基因含有 4 个外显子, *EuCOL2* 和 *EuCOL3* 外显子数目最多, 含有 6 个外显子。



利用 MEGA 6.0 的邻接法构建系统进化树。不同物种 CO-like 蛋白用不同颜色标记: 绿色方形代表拟南芥, 蓝色菱形代表水稻, 红色三角形代表玉米, 深红色圆形代表毛果杨, 绿色三角形代表杜仲 CO-likes

图 1 杜仲、水稻、拟南芥、毛果杨和玉米 CO-likes 蛋白系统进化树

Figure 1 Phylogenetic tree of CO-like proteins from *E. ulmoides*, *O. sativa*, *A. thaliana*, *P. trichocarpa* and *Z. mays*

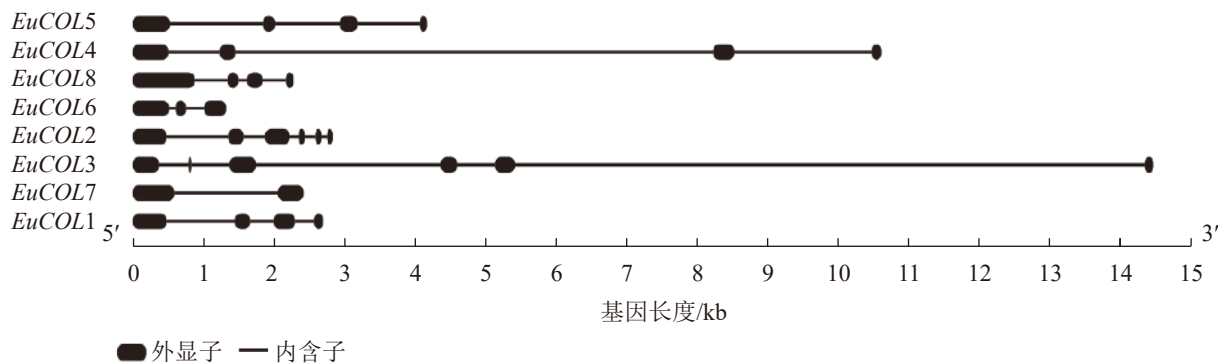


图 2 杜仲 *COLs* 基因结构分析
Figure 2 Structural analysis of *COLs* in *E. ulmoides*

利用 MEME 在线软件, 对 *EuCOLs* 家族进行保守基序分析, 基序鉴定个数设置为 20, 分别命名为 motif 1~motif 20。结果如图 3 所示: motif 1 和 motif 2 为 *EuCOLs* 蛋白的特征性结构域, 存在于所有 *EuCOLs* 蛋白中。只有 *EuCOL7* 含有 1 个 B-box 结构域, 其余 *EuCOLs* 蛋白均由 2 个 B-box 组成, 这与图 2 蛋白序列比对结果一致。同一亚家族 *EuCOLs* 基序具有高度相似性, 其中 motif 1 包含 1 个典型的由 C-X₂-C-X₁₆-C-X₂-C 编码的 GATA 锌指结构域。不同亚家族基序存在显著差异, 例如: motif 7 和 motif 14 只存在于群组 III 亚家族, motif 12 只在群组 II 亚家族中存在。*EuCOLs* 蛋白之间基序也有差异, 只有 *EuCOL1* 和 *EuCOL4* 含有 motif 5、motif 7 和 motif 9, motif 10 仅存在于 *EuCOL2*, 推测基因功能差异可能与基序有关。

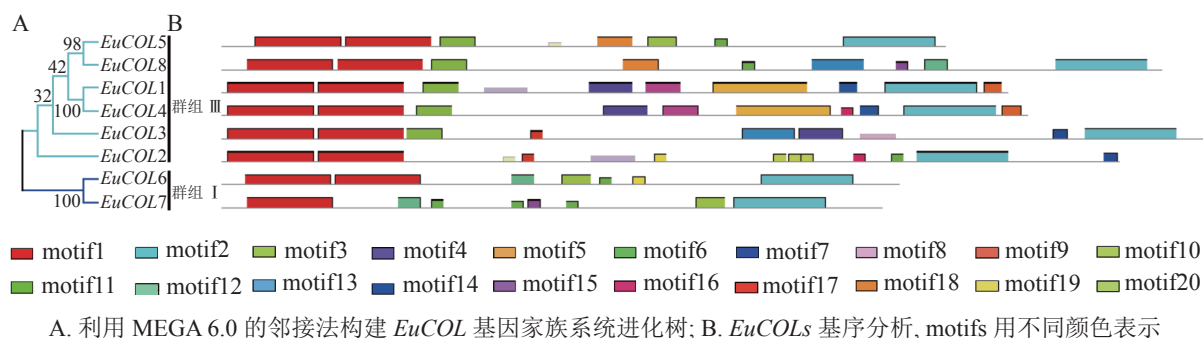


图 3 *EuCOLs* 蛋白保守基序分析
Figure 3 Conservative motif analysis of *EuCOL* proteins

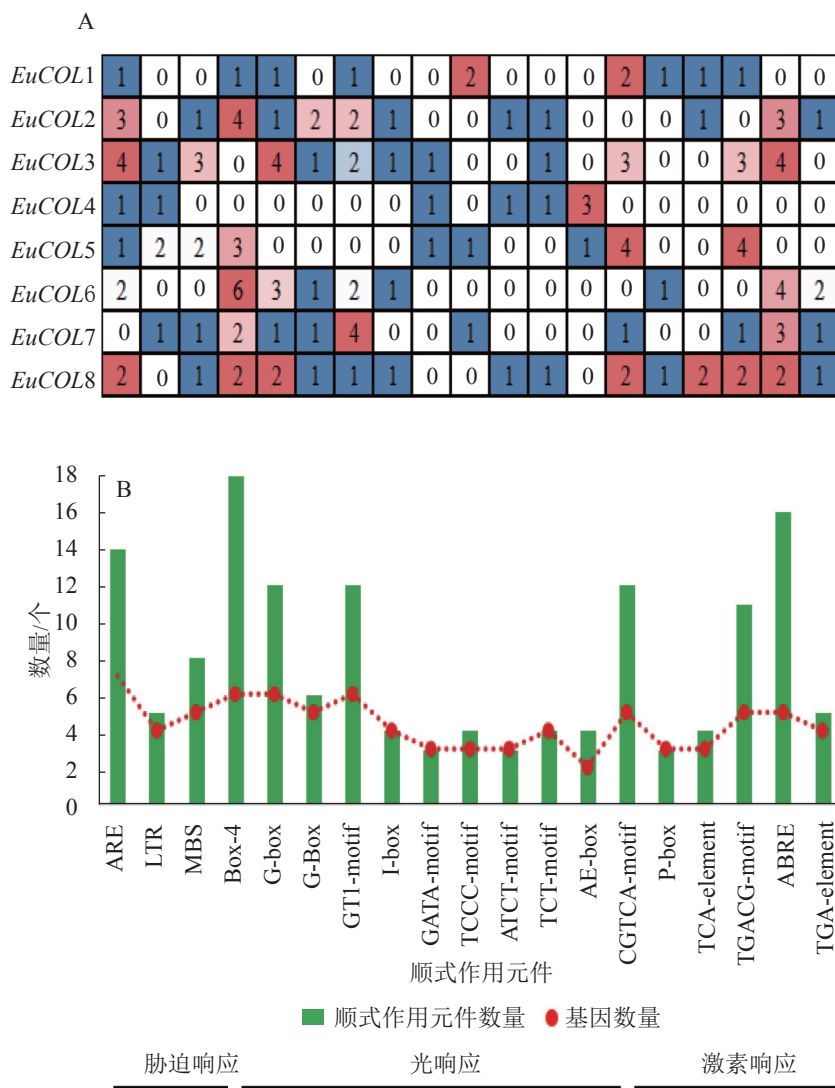
2.4 杜仲 *COLs* 启动子顺式作用元件分析

利用 Plant CARE 软件对 *EuCOLs* 起始密码子 (ATG) 上游 2 000 bp 序列进行顺式作用元件分析 (图 4)。 *EuCOLs* 启动子中不仅包含基本顺式作用元件, 还存在 3 种类型元件。①胁迫响应元件, 如干旱胁迫响应元件 MBS; 低温响应元件 LTR; 厌氧胁迫相关元件 ARE 等。②光响应元件, 如 Box 4、G-box、G-Box、GT1-motif、I-box、GATA-motif、TCCC-motif 等。③激素响应元件, 如赤霉素响应元件 ABRE; 生长素响应元件 AuxRR-core; 水杨酸响应元件 CGTCA-motif 等。推测 *EuCOLs* 可能参与杜仲生长发育、胁迫响应以及光周期调控。*EuCOLs* 基因中光响应元件数量最多, 共 79 个, 包含 18 个 Box 4、G-box 和 GT1-motif 均有 12 个, 暗示 *EuCOLs* 基因的转录可能受光周期调控。*EuCOLs* 启动子区域含有 16 个 ABRE 和 14 个 ARE 元件 (图 4B), 推测 *EuCOLs* 可能参与 ABA 调节和厌氧调控。

2.5 杜仲 *COLs* 基因表达模式分析

为了探索 *EuCOLs* 基因在杜仲叶片发育中的功能, 利用杜仲叶片不同发育时期的转录组数据, 进行表达模式分析。图 5 显示: *EuCOLs* 在杜仲叶片发育中转录水平较低, 大部分基因 FPKM 值小于 1, *EuCOL6* 在杜仲叶片中不表达, 暗示 *EuCOLs* 在杜仲叶片中发挥作用较小, *EuCOL5* 在叶片中的转录水平相对较高, 并且随着叶片发育, 转录水平逐渐升高, 推测 *EuCOL5* 在杜仲叶片中可能发挥正调控作用。

利用高产胶杜仲品种‘秦仲 2 号’和低产胶杜仲品种‘小叶’成熟叶片转录组数据, 检测 *EuCOLs* 基因的表达水平, 结果如图 6 所示。大部分 *EuCOLs* 转录水平较低, 只有 *EuCOL5* 和 *EuCOL7*



A. *EuCOLs* 基因启动子顺式作用元件数量; B. 顺式作用元件和 *EuCOLs* 基因数量

图4 *EuCOLs* 启动子顺式作用元件分布

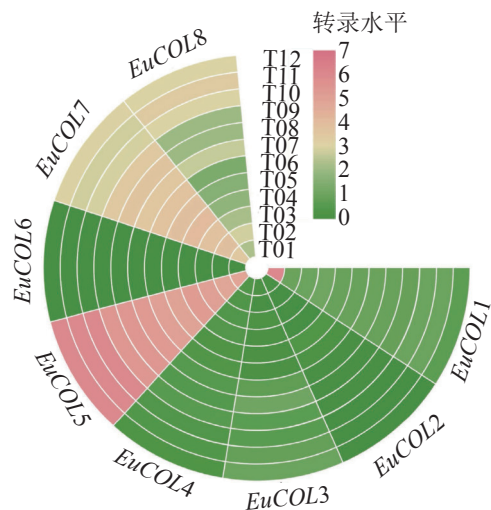
Figure 4 Cis-elements distributed in the promoters of *EuCOLs*

的表达量较高, *EuCOL7* 在各样品中的 FPKM 值大于 150, 并且高胶含量叶片中的转录水平高于低胶含量叶片, 推测 *EuCOL7* 在杜仲胶形成过程中发挥正调控作用, 相反 *EuCOL5* 在‘小叶’中的转录水平高于‘秦仲 2 号’, 暗示 *EuCOL5* 在杜仲胶形成中可能发挥负调控作用。

为了验证 *EuCOLs* 基因在杜仲叶片发育中的表达模式, 以‘紫叶’杜仲不同发育阶段的叶片为材料, 通过 qRT-PCR 检测 *EuCOLs* 基因的表达水平。结果显示: *EuCOLs* 在杜仲叶片中差异表达 (图 7), *EuCOL1* 和 *EuCOL4* 在叶芽中表达量最高, 随着叶片发育, 表达水平逐渐降低, 嫩叶中降为最低, 暗示 *EuCOL1* 和 *EuCOL4* 在杜仲叶片发育的起始阶段发挥重要作用; 相反 *EuCOL7* 随着叶片发育转录水平逐渐升高, 嫩叶中的表达量是叶芽中的 5.8 倍, 推测 *EuCOL7* 在杜仲成熟叶片中扮演重要角色。5 个 *EuCOLs* 基因 (*EuCOL2*、*EuCOL3*、*EuCOL5*、*EuCOL6* 和 *EuCOL8*) 在幼叶中表达量最高, 在叶片发育中, 呈现先升高后降低的表达趋势。

2.6 杜仲 COL7 蛋白互作网络预测

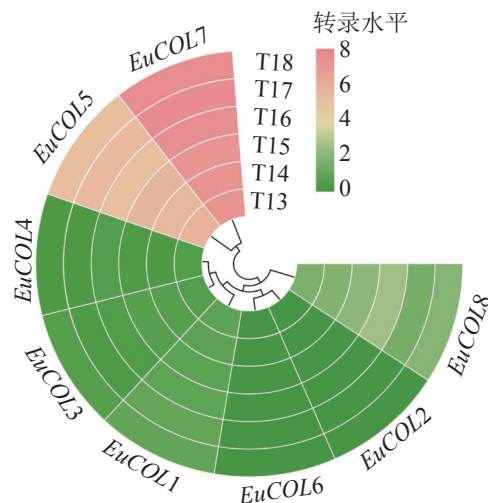
表达模式分析显示: *EuCOL7* 在杜仲叶片发育和杜仲胶形成中均具有较高表达量, 暗示 *EuCOL7* 在叶片发育和杜仲胶形成中发挥重要作用。利用 STRING 软件, 预测 *EuCOL7* 与其他蛋白质的互作关系。结果显示: *EuCOL7* 可以与 10 个蛋白质发生相互作用 (图 8), 其中 3 个属于 BBX 蛋白质家族, LHY、CCA 和 JAC 家族各有 1 个, 7 个蛋白质 (LNK2、LHY、CCA、RVE、COL、BBX25 和 BBX19) 参与光周期响应。



T01~T03. 叶芽; T04~T06. 初生叶; T07~T09. 幼叶; T10~T12. 老叶。热图右侧为色标, 绿色表示低表达丰度, 红色表示高转录水平

图 5 *EuCOLs* 基因在杜仲叶片不同发育时期表达模式

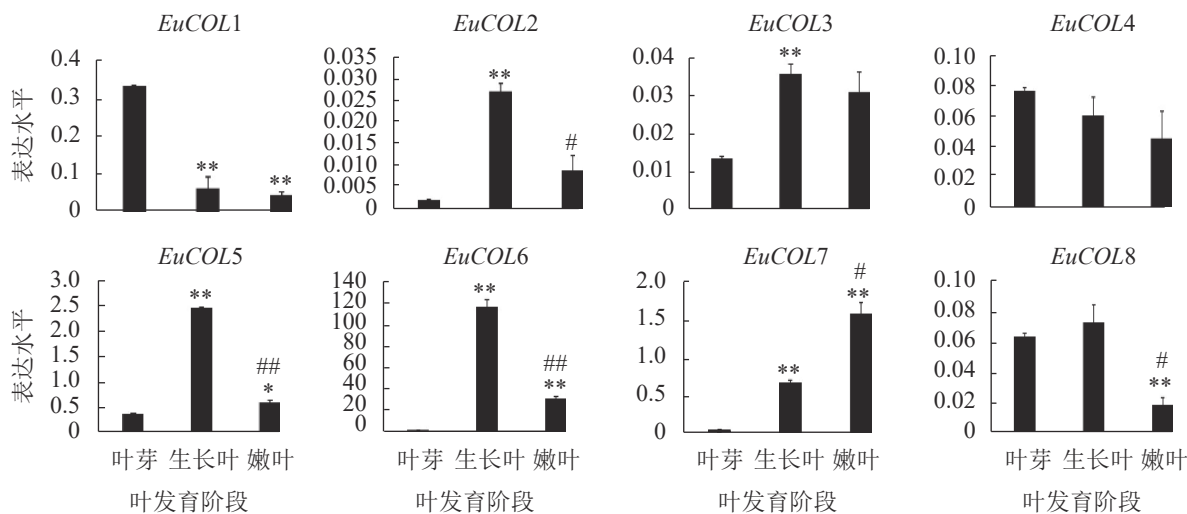
Figure 5 Expression patterns of *EuCOLs* genes at different development stages of *E. ulmoides* leaves



T13~T15. 低胶含量叶片; T16~T18. 高胶含量叶片。热图上方为色标, 绿色表示低转录水平, 红色表示高转录水平

图 6 *EuCOLs* 基因在杜仲胶形成中的表达模式

Figure 6 Expression pattern of *EuCOL* genes in the formation of eu-rubber



*, ** 分别表示叶芽与生长叶和嫩叶之间的差异显著 ($P < 0.05$) 和极显著 ($P < 0.01$); #、## 分别表示生长叶与嫩叶之间的差异显著 ($P < 0.05$) 和极显著 ($P < 0.01$)

图 7 杜仲 *COL* 家族基因在叶片发育中的表达模式

Figure 7 Expression patterns of *E. ulmoides* *COL* family genes during leaf development

3 讨论

杜仲具有重要的经济价值、药用价值和生态价值, 广泛分布于中国 27 个省(市、自治区)^[29]。*COL* (*CONSTANS-like*) 基因是植物光周期途径重要的调控基因。在营养生长阶段, *COL* 基因在叶片中表达; 光周期途径中, *COL* 可将光信号和生物钟信号转变为开花信号, 诱导成花基因 *FT*、*LFY* 表达, 促进植株开花^[30-31]。本研究以杜仲基因组数据为基础, 通过生物信息学方法, 搜索杜仲 *CONSTANS-Like* 基因家族, 共鉴定到 8 个 *EuCOLs* 基因, 根据基因组注释位置, 8 个 *EuCOLs* 基因分别映射到 8 条特定的染色体上, 表明 *EuCOLs* 基因在染色体上均匀分布。

系统进化结果显示: *EuCOLs* 分为 2 个亚家族 (群组 I 和群组 III), 分别包含 2 和 6 个 *EuCOLs* 蛋白。在拟南芥中, *AtCO*、*AtCOL1*~*AtCOL5* 属于群组 I 亚家族, 含有 2 个 B-box 和 1 个 CCT 结构域, 超表达 *AtCOL3* 延长转基因拟南芥开花时间^[32], 在短日照条件下, 超表达 *AtCOL5* 可以促进 *FT* 和 *SOC1* 基

因表达,诱导拟南芥提前开花^[33]。大麦 *HvCO1* 和 *Hd1* 基因与 *CO* 亲缘关系最近,可以通过激活 *HvFT1* 诱导大麦开花^[4],拟南芥 *co* 突变体过表达牵牛花 *Pharbitis nil* 的 *PnCO* 基因可促进植物开花^[34]。黑麦草 *Lolium perenne* 的 *LpCO* 可以互补拟南芥 *co* 突变体晚花表型^[35],毛果杨 *PtCO* 促使植株提前开花,也可调控植株的生长和芽的分化^[36]。群组Ⅲ亚家族含有 1 个 B-box 和 1 个 CCT 结构域。在拟南芥中, *AtCOL6~AtCOL8* 和 *AtCOL16* 属于群组Ⅲ亚家族, *AtCOL7* 和 *AtCOL8* 在开花调控中是转录抑制因子,超表达 *AtCOL7* 和 *AtCOL8* 导致转基因拟南芥开花延迟^[22, 37-38],推测 *EuCOLs* 可能也参与杜仲开花调控。

蛋白序列比对结果显示: *EuCOLs* 与拟南芥、毛果杨 *COLs* 蛋白结构域具有高度的相似性, N 末端含有 1~2 个典型的 B-box 结构域, C 端包含 1 个

CCT 结构域。B-box1 和 B-box2 结构域保守氨基酸残基分布相似, B-box1 结构域中的 5 个 Cys 残基和 2 个 His 残基比其他氨基酸残基更保守, B-box2 结构域中的第 1 个组氨酸 (His) 残基被苏氨酸 (Thr) 取代或者丢失 (*EuCOL2* 和 *EuCOL7*)。在葡萄 *Vitis vinifera* 中, *VviBBX9* 和 *VviBBX10* 蛋白 B-box2 结构域中的第 1 个 His 残基被天冬酰胺 (Asn) 取代^[39],暗示 *EuCOL2* 和 *EuCOL7* 可能具有特异的功能。

外显子-内含子结构与基因系统进化存在密切关系,外显子-内含子的增加或减少有助于基因家族的扩展和多样化^[40]。结构分析显示: *EuCOLs* 基因含有 2~6 个外显子, *EuCOL2* 含有 6 个外显子,其同源基因 *EuCOL8* 含有 4 个外显子, *EuCOL3* 和 *EuCOL6* 分别含有 6 和 3 个外显子,而 *EuCOL5* 和 *EuCOL7* 分别含有 4 和 2 个外显子,推测 *EuCOLs* 在进化过程中可能存在外显子丢失现象,这与葡萄 *VviBBXs* 蛋白情况类似^[39]。基序分析发现: motif 1 和 motif 2 分别编码 B-box 和 CCT 结构域,存在于所有 *EuCOLs* 转录因子,同一亚家族 *EuCOLs* 蛋白 motifs 分布较为相似,不同亚族之间有差异。

EuCOLs 启动子中含有多个胁迫、激素和光周期响应元件,其中光响应元件数量最多,共有 79 个,暗示 *EuCOLs* 可能参与杜仲光周期调节。研究表明: *COLs* 基因参与多种植物光周期开花调控,在矮牵牛中, *PnCO* 和 *PnCOL1* 具有显著的昼夜振荡节律, *PnCO* 可以恢复拟南芥 *co* 突变体晚开花表型^[41-42];大部分香蕉 *Musa acuminata* 的 *MaCOLs* 基因表达量在白天达到峰值,夜晚降为最低^[43]。杨树 *PttCO1* 和 *PttCO2* 黄昏时表达水平开始增加,黎明时达到峰值^[44]。短日照条件下, *OsCOL3* 通过抑制 *Hd3a* 和 *RFT* 基因表达,导致水稻延迟开花^[45], *OsCOL13* 和 *OsCOL10* 在开花中发挥负调控作用^[46-47];超表达 *HvCO1* 和 *CICOL3* 促进开花^[15, 48]。 *EuCOLs* 在杜仲雄花芽苞叶原基分化中期和雄蕊原基分化初期差异表达, *EuCOL7* 在雄蕊原基分化初期上调表达, *EuCOL1* 下调表达^[49],表明 *EuCOLs* 参与杜仲开花调控。

大量研究表明: *COLs* 不仅调控植物开花,还参与非生物胁迫以及生长发育等生物学过程^[22, 50]。拟南芥 *STO* 与 *CONSTNS* 结构相似,超表达 *STO* 提高转基因植株的耐盐性^[51]。在菊花 *Chrysanthemum morifolium* 中, *Cm-BBX24-RNAi* 转基因株系开花提前,冷冻和干旱胁迫耐受性降低,光周期和赤霉素生物合成相关基因上调表达,表明 *Cm-BBX24* 在菊花开花时间和非生物胁迫中发挥多重作用^[52]。低温诱导葡萄叶片、茎和花中 *VvZFPL* 基因上调表达,超表达 *VvZFPL* 导致转基因拟南芥下胚轴伸长,莲座叶变小,叶绿素含量降低^[53],提高转基因拟南芥低温、干旱和盐胁迫耐受性^[54]。 *AtCOL4* 基因表达受 ABA、高盐和渗透胁迫的诱导,在种子萌发和子叶绿化过程中, *atcol4* 突变体增加 ABA 和盐胁迫的敏感性^[21]。表达模式分析显示:大部分 *EuCOLs* 在杜仲叶片发育中表达水平较低,各发育阶段转录水平无显著差异。 *EuCOL5* 转录水平相对较高,尤其在老叶中; *EuCOL7* 在幼叶中表达量最高。在杜仲胶形成中, *EuCOL5* 在‘小叶’中高量表达, *EuCOL7* 在‘秦仲 2 号’中表达水平最高。qRT-PCR 结果显示: *EuCOL1* 和 *EuCOL4* 在叶片发育起始阶段表达量最高, *EuCOL7* 随着叶片发育,转录水平逐渐增加, *EuCOL2*、

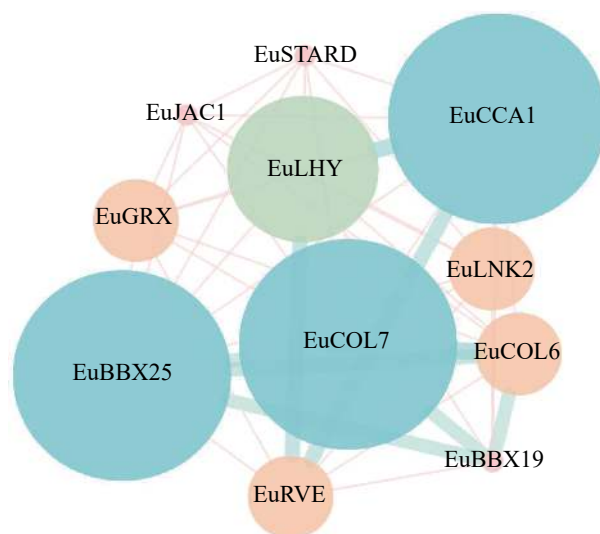


图 8 *EuCOL7* 蛋白互作网络预测

Figure 8 Prediction of interaction network between *EuCOL7*

EuCOL3、*EuCOL5*、*EuCOL6* 和 *EuCOL8* 在叶片发育中, 呈现先升高后降低的表达趋势, 表明 *EuCOLs* 在杜仲叶片发育中具有功能差异性。

蛋白互作网络结果显示: *EuCOL7* 可以与 10 个蛋白质互作, 10 个蛋白质中有 7 个 (LNK2、LHY、CCA、RVE、COL、BBX25 和 BBX19) 参与光周期调控, 推测 *EuCOL7* 参与杜仲光周期响应, 具体互作蛋白还需实验验证。在毛竹中, *PheCOLs* 具有显著的昼夜振荡表达模式, 光照抑制大部分 *PheCOLs* 基因表达, 黑暗诱导。酵母单杂交结果显示: *PheCOL14* 可以与 *PheCOL3* 启动子结合^[16]。在拟南芥中, LHY 属于同源域蛋白超家族, 参与昼夜调控, 与 *APRR1/TOC1* 和 *TCP21/CHE* 的启动子结合, 抑制其转录, 并抑制 *CCA1* 基因表达^[55-56]。*AtCOL5* 在维管组织中表达, 超表达 *AtCOL5* 导致开花提前, 然而 *AtCOL5* 缺失突变体并不影响开花时间, 暗示 *AtCOL5* 可能与其他开花调控因子存在功能冗余现象^[33]。

4 参考文献

- [1] TOROK M, ETKIN L D. Two B or not two B? Overview of the rapidly expanding B-box family of proteins [J]. *Differentiation*, 2001, **67**(3): 63 – 71.
- [2] ROBSON F, COSTA M M, HEPWORTH S R, *et al.* Functional importance of conserved domains in the flowering-time gene *CONSTANS* demonstrated by analysis of mutant alleles and transgenic plants [J]. *Plant J*, 2001, **28**(6): 619 – 631.
- [3] YAMASHINO T, YAMAWAKI S, HAGUI E, *et al.* Clock-controlled and *FLOWERING LOCUS T (FT)*-dependent photoperiodic pathway in *Lotus japonicus*(L) verification of the flowering associated function of an FT homolog [J]. *Biosci, Biotechnol, Biochem*, 2013, **77**(6): 747 – 753.
- [4] GRIFFITHS S, DUNFORD R P, COUPLAND G, *et al.* The evolution of *CONSTANS-Like* gene families in barley, rice, and *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2003, **131**(4): 1855 – 1867.
- [5] CHIA T Y, MULLER A, JUNG C, *et al.* Sugar beet contains a large *CONSTANS-LIKE* gene family including a CO homologue that is independent of the early-bolting (B) gene locus [J]. *J Exp Bot*, 2008, **59**(10): 2735 – 2748.
- [6] ROBERT L S, ROBSON F, SHARPE A, *et al.* Conserved structure and function of the *Arabidopsis* flowering time gene *CONSTANS* in *Brassica napus* [J]. *Plant Mol Biol*, 1998, **37**(5): 763 – 772.
- [7] NEMOTO Y, KISAKA M, TAKUICHI F, *et al.* Characterization and functional analysis of three wheat genes with homology to the *CONSTANS* flowering time gene in transgenic rice [J]. *Plant J*, 2003, **36**(1): 82 – 93.
- [8] HOLEFORS A, OPSETH L M, ROSNES A K R, *et al.* Identification of *PaCOL1* and *PaCOL2*, two *CONSTANS-like* genes showing decreased transcript levels preceding short day induced growth cessation in Norway spruce [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2009, **47**(2): 105 – 115.
- [9] ALMADA R, CABRERA N, CASARETTO J A, *et al.* *VvCO* and *VvCOL1*, two *CONSTANS* homologous genes, are regulated during flower induction and dormancy in grapevine buds [J]. *Plant Cell Rep*, 2009, **28**(8): 1193 – 1203.
- [10] SUÁREZ-LÓPEZ P, WHEATLEY K, ROBSON F, *et al.* *CONSTANS* mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis* [J]. *Nature*, 2001, **410**(6832): 1116 – 1120.
- [11] SONG Y H, SMITH R W, TO B J, *et al.* FKF1 conveys timing information for *CONSTANS* stabilization in photoperiodic flowering [J]. *Science*, 2012, **336**(6084): 1045 – 1049.
- [12] LUCCIONI L, KRZYMUSKI M, SÁNCHEZ-LAMAS M, *et al.* *CONSTANS* delays *Arabidopsis* flowering under short days [J]. *Plant J*, 2019, **97**(5): 923 – 932.
- [13] CHENG Xiaofei, WANG Zengyu. Overexpression of *COL9*, a *CONSTANS-LIKE* gene, delays flowering by reducing expression of *CO* and *FT* in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 2005, **43**(5): 758 – 768.
- [14] WU Weixun, ZHANG Yingxin, ZHANG Miao, *et al.* The rice *CONSTANS-like* protein OsCOL15 suppresses flowering by promoting *Ghd7* and repressing *RID1* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, **495**(1): 1349 – 1355.
- [15] FU Jianxin, YANG Liwei, DAI Silan. Identification and characterization of the *CONSTANS-like* gene family in the short-day plant *Chrysanthemum lavandulifolium* [J]. *Mol Genet Genomics*, 2015, **290**(3): 1039 – 1054.
- [16] LIU Jun, CHENG Zhanchao, LI Xiangyu, *et al.* Expression analysis and regulation network identification of the *CONSTANS-Like* gene family in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) under photoperiod treatments [J]. *DNA Cell Biol*, 2019, **38**(7): 607 – 626.
- [17] XIAO Guohui, LI Bingjuan, CHEN Hongjuan, *et al.* Overexpression of *PvCO1*, a bamboo *CONSTANS-LIKE* gene, delays flowering by reducing expression of the *FT* gene in transgenic *Arabidopsis* [J]. *BMC Plant Biol*, 2018, **18**(1): 232 – 247.
- [18] LI Juan, GAO Kai, YANG Xiaoyu, *et al.* Identification and characterization of the *CONSTANS-like* gene family and its

- expression profiling under light treatment in *Populus* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, **161**: 999 – 1010.
- [19] YAN Jiaping, MAO Dun, LIU Xiaomeng, *et al.* Isolation and functional characterization of a circadian-regulated CONSTANS homolog (GbCO) from *Ginkgo biloba* [J]. *Plant Cell Rep*, 2017, **36**(9): 1387 – 1399.
- [20] OHMIYA A, ODA-YAMAMIZO C, KISHIMOTO S. Overexpression of *CONSTANS-like 16* enhances chlorophyll accumulation in petunia corollas [J]. *Plant Sci*, 2019, **280**: 90 – 96.
- [21] MIN J H, CHUNG J S, LEE K H, *et al.* The CONSTANS-like 4 transcription factor, AtCOL4, positively regulates abiotic stress tolerance through an abscisic acid-dependent manner in *Arabidopsis* [J]. *J Integrative Plant Biol*, 2015, **57**(3): 313 – 324.
- [22] WANG Honggui, ZHANG Zenglin, LI Hongyu, *et al.* CONSTANS-LIKE 7 regulates branching and shade avoidance response in *Arabidopsis* [J]. *J Exp Bot*, 2013, **64**(4): 1017 – 1024.
- [23] 王淋. 杜仲橡胶合成相关酶基因的克隆及功能研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2014.
WANG Lin. *Cloning and Function Analysis of Related Genes Involved in Rubber Biosynthesis of Eucommia ulmoides*[D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology, 2014.
- [24] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, *et al.* MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. *Mol Biol Evol*, 2013, **30**(12): 2725 – 2729.
- [25] LI Long, LIU Minhao, SHI Kan. Dynamic changes in metabolite accumulation and the transcriptome during leaf growth and development in *Eucommia ulmoides*[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2019, **20**(16): 4030[2021-05-20]. doi: [10.3390/ijms20164030](https://doi.org/10.3390/ijms20164030).
- [26] YE Jing, HAN Wenjing, FAN Ruisheng, *et al.* Integration of transcriptomes, small RNAs, and degradome sequencing to identify putative miRNAs and their targets related to eu-rubber biosynthesis in *Eucommia ulmoides*[J/OL]. *Genes*, 2019, **10**(8): 623[2021-05-20]. doi: [10.3390/genes10080623](https://doi.org/10.3390/genes10080623).
- [27] CHEN Chengjie, CHEN Hao, ZHANG Yi, *et al.* TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. *Mol Plant*, 2020, **13**(8): 1194 – 1202.
- [28] YE Jing, JIN Cangfu, LI Nan, *et al.* Selection of suitable reference genes for qRT-PCR normalization under different experimental conditions in *Eucommia ulmoides* Oliv[J/OL]. *Sci Rep*, 2018, **8**(1): 15043[2021-05-15]. doi: [10.1038/s41598-018-3342-w](https://doi.org/10.1038/s41598-018-3342-w).
- [29] 杜红岩. 中国杜仲图志[M]. 北京: 中国林业出版社, 2014: 24 – 25.
DU Hongyan. *China Eucommia Pictorial*[M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 2014: 24 – 25.
- [30] 付建新, 王翊, 戴思兰. 高等植物 *CO* 基因研究进展[J]. *分子植物育种*, 2010, **8**(5): 1008 – 1016.
FU Jianxin, WANG Yi, DAI Silan. Advanced research on *CO* genes in higher plants [J]. *Mol Plant Breed*, 2010, **8**(5): 1008 – 1016.
- [31] 帅敏敏, 张启香, 黄有军. 光周期途径成花关键基因 *CONSTANS* 的进化机制[J]. *浙江农林大学学报*, 2019, **36**(1): 7 – 13.
SHUAI Minmin, ZHANG Qixiang, HUANG Youjun. Evolution of the flowering time gene *CONSTANS* in a photoperiod pathway [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2019, **36**(1): 7 – 13.
- [32] DATTA S, HETTIARACHCHI G H C M, DENG Xingwang, *et al.* *Arabidopsis* *CONSTANS-LIKE3* is a positive regulator of red light signaling and root growth [J]. *Plant Cell*, 2006, **18**(1): 70 – 84.
- [33] HASSIDIM M, HARIR Y, YAKIR E, *et al.* Over-expression of *CONSTANS-LIKE5* can induce flowering in short-day grown *Arabidopsis* [J]. *Planta*, 2009, **230**(3): 481 – 491.
- [34] HAYAMA R, AGASHE B, LULEY E, *et al.* A circadian rhythm set by dusk determines the expression of *FT* homologs and the short-day photoperiodic flowering response in *Pharbitis* [J]. *Plant Cell*, 2007, **19**(10): 2988 – 3000.
- [35] MARTIN J, STORGAARD M, ANDERSEN C H, *et al.* Photoperiodic regulation of flowering in perennial ryegrass involving a *CONSTANS-like* homolog [J]. *Plant Mol Biol*, 2004, **56**(2): 159 – 169.
- [36] BOHLENIUS H, HUANG Tao, CHARBONNEL-CAMPAA L, *et al.* *CO/FT* regulatory module controls timing of flowering and seasonal growth cessation in trees [J]. *Science*, 2006, **312**(5776): 1040 – 1043.
- [37] TAKASE T, KAKIKUBO Y, NAKASONE A, *et al.* Characterization and transgenic study of *CONSTANS-LIKE8(COL8)* gene in *Arabidopsis thaliana*: expression of *35S::COL8* delays flowering under long-day conditions [J]. *Plant Biotechnol*, 2011, **28**(5): 439 – 446.
- [38] ZHANG Zenglin, JI Ronghuan, LI Hongyu, *et al.* *CONSTANS-LIKE7 (COL7)* is involved in phytochrome B (phyB)-mediated light-quality regulation of auxin homeostasis [J]. *Mol Plant*, 2014, **7**(9): 1429 – 1440.

- [39] ZHANG Xiuming, ZHANG Li, JI Miaomiao, *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of the B-box transcription factor gene family in grapevine (*Vitis vinifera* L.) [J/OL]. *BMC Genomics*, 2021, **22**(1): 22 [2021-05-15]. doi: [10.1186/s12864-021-07479-4](https://doi.org/10.1186/s12864-021-07479-4).
- [40] XU Guixia, GUO Chunce, SHAN Hongyan, *et al.* Divergence of duplicate genes in exon-intron structure [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2012, **109**(4): 1187 – 1192.
- [41] LIU Jiayou, YU Jianping, MCINTOSH L, *et al.* Isolation of a *CONSTANS* ortholog from *Pharbitis nil* and its role in flowering [J]. *Plant Physiol*, 2001, **125**(4): 1821 – 1830.
- [42] KIM S J, MOON J H, LEE I, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of a *CONSTANS* homologue, *PnCOL1*, from *Pharbitis nil* [J]. *J Exp Bot*, 2003, **54**(389): 1879 – 1887.
- [43] CHAURASIA A K, PATIL H B, AZEEZ A, *et al.* Molecular characterization of *CONSTANS-Like(COL)* genes in banana (*Musa acuminata* L. AAA Group, cv. Grand Nain) [J]. *Physiol Mol Biol Plants*, 2016, **22**(1): 1 – 15.
- [44] DING Jihua, BÖHLENIUS H, RÜHL M G, *et al.* *GIGANTEA-like* genes control seasonal growth cessation in *Populus* [J]. *New Phytol*, 2018, **218**(4): 1491 – 1503.
- [45] KIM S K, YUN C H, LEE J H, *et al.* *OsCO3*, a *CONSTANS-LIKE* gene, controls flowering by negatively regulating the expression of *FT-like* genes under SD conditions in rice [J]. *Planta*, 2008, **228**(2): 355 – 365.
- [46] SHENG Peike, WU Fuqing, TAN Junjie, *et al.* A *CONSTANS-like* transcriptional activator, *OsCOL13*, functions as a negative regulator of flowering downstream of *OsphyB* and upstream of *Ehd1* in rice [J]. *Plant Mol Biol*, 2016, **92**(1/2): 209 – 222.
- [47] TAN Junjie, JIN Mingna, WANG Jiachang, *et al.* *OsCOL10*, a *CONSTANS-Like* gene, functions as a flowering time repressor downstream of *Ghd7* in rice [J]. *Plant Cell Physiol*, 2016, **57**(4): 798 – 812.
- [48] CAMPOLI C, DROSSE B, SEARLE I, *et al.* Functional characterisation of *HvCO1*, the barley (*Hordeum vulgare*) flowering time ortholog of *CONSTANS* [J]. *Plant J*, 2012, **69**(5): 868 – 880.
- [49] 朱利利, 杜庆鑫, 何凤, 等. 杜仲雄花芽 2 个发育时期转录组分析 [J]. *植物研究*, 2020, **40**(2): 284 – 292.
ZHU Lili, DU Qingxin, HE Feng. Sequencing analysis of transcriptome of male floral bud at two development stages in *Eucommia ulmoides* [J]. *Plant Res*, 2020, **40**(2): 284 – 292.
- [50] MORITA R, SUGINO M, HATANAKA T, *et al.* CO₂-responsive *CONSTANS*, *CONSTANS-like*, and time of chlorophyll a/b binding protein expression protein is a positive regulator of starch synthesis in vegetative organs of rice [J]. *Plant Physiol*, 2015, **167**(4): 1321 – 1331.
- [51] NAGAOKA S, TAKANO T. Salt tolerance-related protein *STO* binds to a Myb transcription factor homologue and confers salt tolerance in *Arabidopsis* [J]. *J Exp Bot*, 2003, **54**(391): 2231 – 237.
- [52] YANG Yingjie, MA Chao, XU Yanjie, *et al.* A zinc finger protein regulates flowering time and abiotic stress tolerance in *Chrysanthemum* by modulating gibberellin biosynthesis [J]. *Plant Cell*, 2014, **26**(5): 2038 – 2054.
- [53] TAKUHARA Y, KOBAYASHI M, SUZUKI S. Low-temperature-induced transcription factors in grapevine enhance cold tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants [J]. *J Plant Physiol*, 2011, **168**(9): 967 – 975.
- [54] KOBAYASHI M, HORIUCHI H, FUJITA K, *et al.* Characterization of grape C-repeat-binding factor 2 and B-box-type zinc finger protein in transgenic *Arabidopsis* plants under stress conditions [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, **39**(8): 7933 – 7939.
- [55] ALABADÍ D, OYAMA T, YANOVSKY M J, *et al.* Reciprocal regulation between *TOC1* and *LHY/CCA1* within the *Arabidopsis* circadian clock [J]. *Science*, 2001, **293**(5531): 880 – 883.
- [56] GREEN R M, TOBIN E M. The role of *CCA1* and *LHY* in the plant circadian clock [J]. *Dev Cell*, 2002, **2**(5): 516 – 518.