



生物技术通报
Biotechnology Bulletin
ISSN 1002-5464, CN 11-2396/Q

《生物技术通报》网络首发论文

题目：茶树光敏色素互作因子 CsPIF3a 的克隆及其与光温逆境的响应
作者：班秋艳，赵鑫月，迟文静，黎俊生，王琼，夏瑶，梁丽云，贺巍，李叶云，赵广山
DOI：10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2024-0794
收稿日期：2024-08-17
网络首发日期：2025-01-23
引用格式：班秋艳，赵鑫月，迟文静，黎俊生，王琼，夏瑶，梁丽云，贺巍，李叶云，赵广山. 茶树光敏色素互作因子 CsPIF3a 的克隆及其与光温逆境的响应 [J/OL]. 生物技术通报. <https://doi.org/10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2024-0794>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

茶树光敏色素互作因子 *CsPIF3a* 的克隆及其与光温逆境的响应

班秋艳¹ 赵鑫月¹ 迟文静¹ 黎俊生¹ 王琮¹ 夏瑶¹ 梁丽云¹ 贺巍¹
李叶云² 赵广山³

(1. 河南农业大学园艺学院, 郑州 450046; 2. 安徽农业大学茶树生物学与资源利用国家重点实验室, 合肥 230036; 3. 河南农业大学食品科学技术学院, 郑州 450002)

摘要：【目的】PIFs (phytochrome interacting factors) 是光敏色素介导光温信号中的核心成员。研究茶树 (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) *PIF3* 的功能, 为利用光信号途径避免或缓解逆境对茶树造成的危害提供重要的理论指导。【方法】利用同源克隆方法从茶树中克隆 *CsPIF3a*, 并对其进行生物信息学分析, 利用实时荧光定量PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 分析其不同组织及不同光温处理的表达差异, 同时, 利用烟草瞬时表达和酵母双杂技术观察其蛋白定位和转录活性。【结果】*CsPIF3a* 开放阅读框长度为 2 163 bp, 编码 720 个氨基酸, 蛋白分子相对质量为 76.97 kD, 理论等电点为 5.70, 具有亲水性; 系统发育树分析表明, *CsPIF3a* 与毛花猕猴桃 (*Actinidia eriantha* Benth.) 关系最近; *CsPIF3a* 蛋白含有 1 个 bHLH 结构域、1 个 APB 结构域和 1 个 APA 结构域; 二级结构中含 α -螺旋 18.17%、 β -折叠结构 6.80%、 β -转角 1.53%、无规则卷曲 73.51%, 此外, 还含无序化区域 46.87%; *CsPIF3a* 蛋白被定位于细胞核中, 并具有转录活性。RT-qPCR 分析表明, *CsPIF3a* 在老叶和茎中表达水平较高, 响应温度胁迫表达, 且表达量与光照强度相关。【结论】*CsPIF3a* 位于细胞核中, 具有转录活性。*CsPIF3a* 响应温度胁迫, 表达量与光照强度有关。

关键词： *CsPIF3a*; 基因克隆; 生物信息学分析; 亚细胞定位; 转录活性; 表达分析

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2024-0794

Cloning of Phytochrome Interaction Factor *CsPIF3a* and Its Response to Light and Temperature Stress in *Camellia sinensis*

BAN Qiu-yan¹ ZHAO Xin-yue¹ CHI Wen-jing¹ LI Jun-sheng¹ WANG Qiong¹ XIA Yao¹ LIANG Li-yun¹
HE Wei¹ LI Ye-yun² ZHAO Guang-shan³

(1. College of Horticulture, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046; 2. State Key Laboratory of Tea Plant Biology and Utilization, Anhui Agricultural University, Hefei 230036; 3. College of Food Science and Technology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002)

Abstract: 【Objective】PIFs (Phytochrome interacting factors) are the core components in the photopigment-mediated photothermal signaling pathway. Studying the function of PIF3 in tea plant (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) provides important theoretical guidance for alleviate light signaling pathways to avoid or mitigate the harm caused by adverse conditions. 【Method】The *CsPIF3a* gene was cloned from tea plants through homology cloning and subsequently analyzed using bioinformatics tools. Expression patterns of *CsPIF3a* across various tissues and under different light and temperature conditions were assessed using real-time quantitative PCR (RT-qPCR). Additionally, tobacco transient expression assays and yeast two-hybrid assays were conducted to determine the protein localization and transcriptional activity of

收稿日期：2024-08-17

基金项目：茶树生物学与资源利用国家重点实验室开放基金 (SKLTOF20230111), 河南省科技攻关 (242102110155, 242102111061), 河南省豫南茶树资源综合开发重点实验室开放基金 (HNKLT0F2020005)

作者简介：班秋艳, 女, 博士, 讲师, 研究方向：茶树响应逆境胁迫的分子机制; E-mail: qyban717@henau.edu.cn

通信作者：李叶云, 男, 博士, 教授, 研究方向：茶树抗逆栽培及育种; E-mail: lyy@ahau.edu.cn;

赵广山, 男, 博士, 讲师, 研究方向：茶叶加工、精深加工与健康; E-mail: gszhao@henau.edu.cn

CsPIF3a. 【Result】 The open reading frame (ORF) of *CsPIF3a* was 2 163 bp in length, encoding a protein of 720 amino acids. The predicted molecular mass of the encoded protein was 76.97 kD. The theoretical isoelectric point was 5.70, having hydrophilic properties. The phylogenetic tree analysis showed that *CsPIF3a* was closely related to *Actinidia eriantha* Benth. and contained a basic helix-loop-helix (bHLH) domain, an active phytochrome binding (APB) domain, and an APA domain. The secondary structure analysis of *CsPIF3a* revealed that it comprised 18.17% α -helix, 6.80% β -sheet, 1.53% β -turn, and 73.51% random coil, with 46.87% of the regions being disordered. Subcellular localization assays demonstrated that *CsPIF3a* was localized in the nucleus and presented transcriptional activity. Reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) analysis indicated that *CsPIF3a* was predominantly expressed in the old leaves and stems of tea plants. Additionally, its expression was found to be responsive to temperature stress and correlated with light intensity. 【Conclusion】 *CsPIF3a* is localized in the nucleus and exhibits transcriptional activity. In response to temperature stress, the expression level of *CsPIF3a* gene was related to light intensity.

Key words: *CsPIF3a*; gene cloning; bioinformatics analysis; subcellular localization; transcriptional activity; expression analysis

温度控制植物生长发育、分布和季节性行为, 整个植物的生命周期均受环境温度的影响^[1]。光作为自然界中影响生长发育最重要的环境因素之一, 不仅为植物提供光合作用的能量, 而且作为一种重要的环境信号参与调控植物的生长发育和逆境抗性^[2]。温度和光照作为紧密联系的重要环境因子, 共同调控植物的生长和发育过程。

茶树 (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) 是一种喜温怕寒的经济型叶用常绿植物, 主要种植于热带和亚热带地区^[3]。经分析和鉴定, 茶叶中含有 500 多种对人体有益的化学成分, 如茶多酚、茶多糖、茶色素、蛋白质、氨基酸、碳水化合物和矿物质等, 对人体都有很好的营养价值和药理作用, 是一种集营养和保健于一体的天然饮料。茶树在生长发育过程中, 不可避免地遭受低温、干旱或热害等非生物胁迫, 严重影响茶叶的产量和品质。研究茶树在温度逆境下对光信号的响应, 解析光强对茶树抗性的调控机制具有重要的科学意义。

光敏色素 (phytochrome, Phy) 是一类红光/远红光受体, 在植物体内以 2 种较稳定的状态存在, 即红光吸收型 Pr 和远红光吸收型 Pfr。PIFs 因子或称 PILs 因子 (phytochrome interacting factor-like) 是能与光敏色素 Pfr 相互作用的一类 bHLH 转录因子, 是光敏色素 (Phy) 的主要信号传导伙伴, 在 Phy 介导的光信号转导中起关键作用, 能够整合环境信号和植物内部信号, 驱动下游形态发生和抵御逆境。PIF 不仅可调控种子萌发、生物节律、激素信号、糖代谢等生理过程, 还可以通过植物体内各种激素途径, 如油菜素内酯 (brassinosteroid, BR)、脱落酸 (ab-

scisic acid, ABA)、赤霉素 (gibberellin, GA)、生长素 (auxin, IAA) 和乙烯 (ethylene, ETH) 等途径, 共同调节植物对逆境的响应^[4-6]。目前, 拟南芥中已鉴定出 7 个 PIF 转录因子成员, 包括 PIF1、PIF3、PIF4、PIF5、PIF6、PIF7 和 PIF8^[7]。PIFs 因子 N 端相对保守的 APB 结构域 (active phytochrome-binding domain) 能与 PHYB 特异性互作, 已知 PIF1 和 PIF3 能够与 PHYA 相互作用, 且 PIF1 与 PHYA 的相互作用能力比 PIF3 强^[8-9]。此外, 还在一些重要的农作物中发现了一些 PIF 类转录因子家族成员^[10-12]。PIF3 是第一个被发现的 PIFs 家族成员, 与 PHYA、PHYB 的活化形式 Pfr 相互作用将光信号传导下去^[13-14]。PIF3 与 PHYB 的相互作用主要通过 APB domain 实现, 至于 PIF3 与 PHYA 是如何相互作用的, 迄今仍不清楚^[15]。有研究发现, PIF3 的 mRNA 积累是不受光调控的, 但它的蛋白是受光调控的。这个蛋白在黑暗中比较稳定, 在光照下很不稳定, 在红光条件下的半衰期大约只有 10–15 min。进一步的研究发现, 在 PHYA 和 PHYB 介导的光信号通路中的 PIF3 蛋白主要是通过 26S 蛋白酶介导, 并快速被多聚泛素化, 随后被降解^[9]。Jiang 等^[16] 研究表明, PIF3 与 C-重复结合因子 (CBF) 启动子结合, 表达下调, 可作为拟南芥耐冻性的负调控因子。Zhang 等^[17] 通过全基因组学鉴定出茶树 *CsPIF1*、*CsPIF3a/3b*、*CsPIF7a/7b* 和 *CsPIF8a/8b*。

目前, 针对 PIFs 的研究主要集中在拟南芥、水稻、玉米等作物中, 虽然茶树已经开展了 PIF3 转录因子的研究, 但主要聚焦在 *CsPIF3* 参与叶绿素代谢的转录调控^[17]。关于 *CsPIF3* 的抗逆分子机理研究,

仍不清楚。

本研究从茶树‘舒茶早’中克隆 *CsPIF3a*, 通过对其进行序列比对、理化性质、进化树、无序化、二级结构预测、三级结构等生物信息分析, 对 *CsPIF3a* 进行亚细胞定位和转录活性分析; 运用荧光定量 PCR 方法检测 *CsPIF3a* 在茶树对光温胁迫的响应, 为进一步深入研究茶树 *CsPIF3a* 转录因子在茶树光温胁迫调控中的作用提供借鉴, 为利用光信号途径避免或缓解逆境对茶树造成的危害提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料

材料为一年生无性系茶树品种‘舒茶早’, 将其置于 25°C 12 h 白天/25°C 12 h 黑夜、相对湿度 75% 的人工气候箱正常培养。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取和 *CsPIF3a* 的克隆 选取一年生长势良好的幼苗, 提取 RNA, 并反转录 cDNA。从茶树基因组 (<http://tpia.teaplant.org/>) 中获取 *CsPIF3a* (TPIA 登录号: TEA033210)^[18]。利用引物 *CsPIF3a* (F: 5'-TCAGTAGTAGTTTGTCTCGGCTCCTC-3' 和 R: 5'-CCTTCTCTGATGACGAGTTTAGCAC-3') 进行扩增。回收纯化后, 与 pClone007 Versatile Simple Vector-*CsPIF3a* 连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 挑取单克隆进行 PCR 菌落验证, 并测序。

1.2.2 生物信息学分析

(1) 茶树 *CsPIF3a* 系统进化树的构建。运用 NCBI 进行蛋白序列比对, 获得相似度较高的拟南芥、毛花猕猴桃、红马银花等 14 个物种的蛋白序列。利用 MEGA11 软件对 15 个物种的 PIF3 蛋白序列进行多序列比对, 利用邻近法 (neighbor-joining) 分析, 参数为系统默认值, 构建系统进化树。

(2) 茶树 *CsPIF3a* 蛋白氨基酸序列比对。利用 DNAMAN 软件对茶树和上述 14 个物种的同源 PIF3 蛋白氨基酸序列进行多重比对, 每行字母数设为 150 个, 突出显示同源性水平选择 50%, 其余参数为系统默认值。

(3) 茶树 *CsPIF3a* 蛋白氨基酸理化性质分析。利用在线工具包 SMS (<http://www.bio-soft.net/sms>) 和 ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam>) 分析氨基酸的组成及理化性质。

(4) 茶树 *CsPIF3a* 蛋白固有无序化预测与分析。

利用 FoldIndex 程序 (<https://fold.proteopedia.org/cgi-bin/findindex>) 对茶树 *CsPIF3a* 氨基酸序列进行折叠的无序化分析。

(5) 茶树 *CsPIF3a* 二级结构及三级结构预测。运用 SOPMA 网站 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa%20_sopma.html) 进行二级结构预测, 利用 Swiss-Model (<http://www.Swissmodel.expasy.org>) 构建蛋白质三级结构模型。

1.2.3 茶树 *CsPIF3a* 的亚细胞定位 根据 *CsPIF3a* 的 CDS 区设计引物 *CsPIF3a*-GFP (F: 5'-AAGTCCGGAGCTAGCTCTAGAATGCCTTTATCGGAGTTCTATAGAA TG-3' 和 R: 5'-GGTCTCTCGAGACGTCTCTAGAGTCAC CACCTGGTACAATGTC-3') 进行扩增, 用限制性内切酶 *Xba* I 进行酶切, 与经 *Xba* I 酶切的 pCAMBIA1305-d35sGFP 载体连接, 构建 pCambia1305-d35sGFP-*CsPIF3a* 载体, 转化农杆菌 GV3101, 并用 10 mmol/L MgCl₂ (含 100 μ mol/L AS) 悬浮液重悬菌液 OD₆₀₀=0.6~0.8。选取长势良好的 4 周龄烟草进行转化。暗培养 1 d 后, 再正常培养 2 d, 在激光共聚焦显微镜下观察, 并拍照。

1.2.4 茶树 *CsPIF3a* 的转录活性验证 根据 *CsPIF3a* 的 CDS 区设计引物 BD-*CsPIF3a* (F: 5'-AGGACCTGC ATATGGCCATGGATGCCTTTATCGGAGTTCTATAGAA TG-3' 和 R: 5'-CCGGGAATTCGGCCTCCATGGTCACT CACCACCTGGTACAATGTC-3') 进行扩增, 并用限制性内切酶 *Nco* I 进行酶切, 回收纯化后, 与经 *Nco* I 酶切的 pGBKT7 载体连接, 转化、测序, 重组质粒 pGBKT7-*CsPIF3a* 构建成功。

根据茶树 *CsCBF3* 开放阅读框设计引物 BD-*CsCBF3* (F: 5'-AGGACCTGCATATGGCCATGGATGG ATTTCAACAAAGAAATGAATGT-3' 和 R: 5'-CCGGG AATTCGGCCTCCATGGTTAAATTGAGTAGCTCCAGAG TGACAC-3') 进行扩增, 并用限制性内切酶 *Nco* I 进行酶切, 回收纯化后, 与经 *Nco* I 酶切的 pGBKT7 载体连接, 转化、测序, 重组质粒 pGBKT7-*CsCBF3* 构建成功。

在酵母菌株 Y2H Gold 中转化 pGBKT7-*CsPIF3a*、pGBKT7-*CsCBF3* 和 pGBKT7 载体质粒, 之后, 先在单缺 (SD/-Trp) 培养基上涂板, 28°C 培养 3 d 后, 挑取酵母单菌落进行 PCR 检测。将检测正确的酵母

菌再次于三缺 (SD/-Trp-His-Ade) 和添加显色剂的 SD/-Trp-His-Ade + X- α -gal 培养基上进行筛选, 观察颜色变化, 并记录拍照。

1.2.5 茶树 *CsPIF3a* 的实时荧光定量 PCR 检测 选取一年生长势良好的幼苗, 采集其芽、一叶、二叶、老叶、根和茎。花是在当年秋季茶树开花后进行采摘, 进行不同组织中 *CsPIF3a* 的检测。

选取一年生长势良好的幼苗, 进行 4℃ 低温和 38℃ 高温胁迫处理, 以光照强度 250 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 作为强光处理, 以光照强度 50 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 作为弱光处理。以处理 0 d 为对照, 分别在处理 1、3、5 和 7 d 与 1、2、3、4 和 5 d 后取样, 提取 RNA 并反转录 cDNA 进行扩增。

以 *GAPDH* (JF: 5'-TTGGCATCGTTGAGGGTCT-3' 和 JR: 5'-CAGTGGGAACACGGAAAGC-3') 作为不同组织和低温处理的内参基因, 以 *CsPTB* (JF: 5'-TG

ACCAAGCACACTCCACACTATCG-3' 和 JR: 5'-TGCCCCCTTATCATCATCCACAA-3') 作为高温处理的内参基因, 以 *CsPIF3a* (JF: 5'-ATGCCCCAAAAGCCTGAAG-3' 和 JR: 5'-GGATCTACTATGTGCCCTATGA-3') 进行实时荧光定量, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算相对表达量。

1.2.6 数据处理 使用 GraphPad Prism.v5.0. 和 IBM SPSS Statistics 23 进行作图、数据分析和显著性差异分析, 差异水平 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 茶树 *CsPIF3a* 的克隆

以茶树‘舒茶早’叶片的 cDNA 为模板, *CsPIF3a*-F 和 *CsPIF3a*-R 为引物进行扩增, 获得一条约 2 000 bp 的条带, 经测序, 发现 *CsPIF3a* 开放阅读框长度为 2 163 bp, 编码 720 个氨基酸 (图 1)。序列上传至 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 网站, 与登录号 XP_028108728.1 的序列一致。

```

1  at gcct ttt at cgaagt tct at agaatt ggcgaagaggaacct t gaatt gct caaccgaagacaat ggct ctt t caact gat cgaat ct cat ggaccggat aat gaagct t gt ggagct agt a
M P L S E F Y R M A R G S L E S A Q P K T M A L S T D R S H G P D N E L V F V
121 t gggaacacggacagat cat gat caaggaacaaat ct agt agagct aggaagaaat ct act aacaatt ttt caat ct cagact ccaaaacat cgaagt aaagat ct aggaacacagct aac
W E N G Q I M M Q G Q S S R A R R N S T N N F Q S Q T P K H R G K D L G N N A N
241 aatt t aaagat ggaagat t t gggt aat ggaat t ct ttt ggaat gat ttt gcaacagaggt t cagt t aggggaat ggaat t ggaacaaagacat gacat ggt gcct t ggt t gact at
N L K M G R F G V M D S V L D D F A T E V Q L G E M G L E Q D D D M V P W L S Y
361 cccat t gat gat t ct ctaacacagat t act gct ct gaatt t t gcccgaat t at ct ggt gt aact gt t aat gact ct ct cccagaat agt t t gcat cgaat ggaat agagaacagat
P I D D S L Q H D Y C S E L L L P E L S G S Q S D S F A M M K R N S
481 ggt aaccagacaat t aggggt t caact t aagt t t agagaacaaat gcaaccaaggt t t ctt t t t agaagt t ggcgaat ct t t gagaat cgaagat ggcagct t caat ccat ggt ca
G N Q T I R G S H L S L E Q A N A P K V S S L E V G E S L R S R S G Q F N P W S
601 t t ccat gaagat caaacat t ggaat ccat ct ct acaat caggagt t t cgaat at aat t agcaat aat gccaagat accaagcagct gtt t gt ggaat t cgaat t cagct cagact t ca
F H E S Q T L D P S L T S G V S S I I S N N A S N T K H G V C G D S I Q A Q A S
721 ggact t cct acaat aaagact cagaagcaagat t cggact gccaacacat aagct agcat t at gaact t ct ccat t t t caggcccgagct ct t gt t cgaat aat ct t caaat
G L P N I K T Q K Q D S G L P N T N A S I M N F S H F S R P A A L V R A N L Q N
841 gt t ggt gct at ggcact cccgggt acat cgggcacagaagt gat ggcgggt aagaat aaggtt acagct ccaagt act gcaaat ct t gct gat t cgcgt ct t cgt t gact t gact agt gga
V G A M A T P G T T S G T E V M A G K N K G T A P S T G N L A D S A L L E L L S G
961 t t aagaat gaatt ggt t cct t aat caact aat t t ggt gcaact aaggt agat t caaat cagt ggcagct gcaat t gaagt t cact acact ggaacat ct gaagct gt t t gt
L R N E M G S L N Q R N L V P P K V D S K S V A A A L E D S H T T G Q S E A V C
1081 cgagaagat gt t t t aagaat gacaagt caccacaaacaaat t t t ggt t caact gaaagact gt agagccgt agt t gct t t ccat ct gt at gt t cgt gcaat agt cgagagagact
R E D V V K N D K S P K Q I L G S T A K T V E P V V A S S S V C S G N S A E R A
1201 t ct aat gat cgaat ccaagcat aat t t t gaagagaaat gccat gagact gagact ct gaagcagaagt gaagat gt t t gaagaagaat cagt aggt at aagaagaacagct cct gct
S N D P N P T H N L K R K C H E T D D S E G R S E D V E E E S G I R K A A P A
1321 cgagaggt gcaaggt ccaagaagacggagct cgagaggt gcaacat t t at ct gaagagagacgaagat agaat t at gaaagaat gct gcaat t caagaact cat accaact gc
R G G A G S K S R A A E V H N L S E R H R D R I N E K M R A R D R I L P N H
1441 acaaggt gcaacaaat t caat ggt t gat gaagcaat agaat t t t gaagacact t caact ccaagt acagat t at gt ct at ggaagct ggt t at at t gcaacagat gat gt t acca
N K V D K A S M L D E A I E Y L K T L Q L Q V Q I M S M G A G L Y M P P M M L P
1561 cct ggaat gcaaat ct acaat ccaat cat at gcaacat t t t caccat gact gt t t ggaat ggaat ggaat ggaat ggt at ggcact ggcct ggt t t t ggaat ggt at gat g
P G M Q H V H P A H M A H F S P M S V G M G M G M G M G M G M G M G M M L P
1681 gaact gaat ggt ct act at gt ggcct at ggt t cagat gccacagct gcaaggt cat t cccgct cccgct ccacgcccat t cggggcagact agt t ccat ggaat ggt gggg
D M N G G S T M C P M I Q M P H V Q G H F P A P R P P P P P S G P A S F H G M V G
1801 cct aact t cagact t t ggaat ct ggaat cgaagct t gcaat ct cagacacagct gcaact t ggt cct t t cagagaggt cct at aaat t cagat ct gcaact gaat gct ct
P N L Q A F G H L G Q G L M S A P R A P L V P F S G G P P I N S A V E L N A S
1921 ggggt gct gct cct ct ggaagt t caaat t cagct ccat cct caaact caaagact t gagaagacacact aacaat acagat gcaagt t gccaat gaacacagat ct gct cagct gt
G V A A P V E V P N S A P S S N S K D L R E H T N N T D A S C P M N Q T S G Q C
2041 caggcaaaaacagaggt t t t t gaaacgt gt t t gct agt gct t aaaaat gat caact caagat gt cggcagcagt gaagat gt t aact t gaccaagaaat gacat t gct accaggt ggt
Q A K N E G F E Q C S V V L K N D Q P Q D V G S S E D V N L T K E N D I V P G G
2161 gact ga
      •

```

图1 茶树 *CsPIF3a* 核苷酸序列与推测的氨基酸序列

Fig. 1 The nucleotide and amino acid sequences of *CsPIF3a* from tea plant

2.2 茶树 *CsPIF3a* 蛋白氨基酸序列的比对

将 *CsPIF3a* 蛋白序列与拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、毛花猕猴桃 (*Actinidia eriantha* Benth.)、红马银花 (*Rhododendron vialii* Delavay et Franch.)、狭叶油菜 (*Camellia lanceoleos*)、君迁子 (*Diospyros lotus* L.)、葡萄 (*Vitis vinifera* L.)、橡胶树 (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Muell. Arg.)、水蜜桃

(*Prunus persica*)、欧洲甜樱桃 (*Cerasus avium* (L.) Moench.)、酸枣 (*Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chow)、夏栎 (*Quercus robur* L.)、欧榛 (*Corylus avellana* L.)、杨梅 (*Myrica rubra* (Lour.) S. et Zucc.)、胡桃 (*Juglans regia* L.) 的 PIF3 蛋白氨基酸序列进行多重比对, 结果显示 (图 2), *CsPIF3a* 蛋白序列与毛花猕猴桃的同源性最

高, 为66.67%, 与水蜜桃的同源性为52.04%, 与拟南芥的同源性最低, 为26.72%, 所有序列均含有

1个bHLH结构域、1个APB结构域和1个APA结构域。

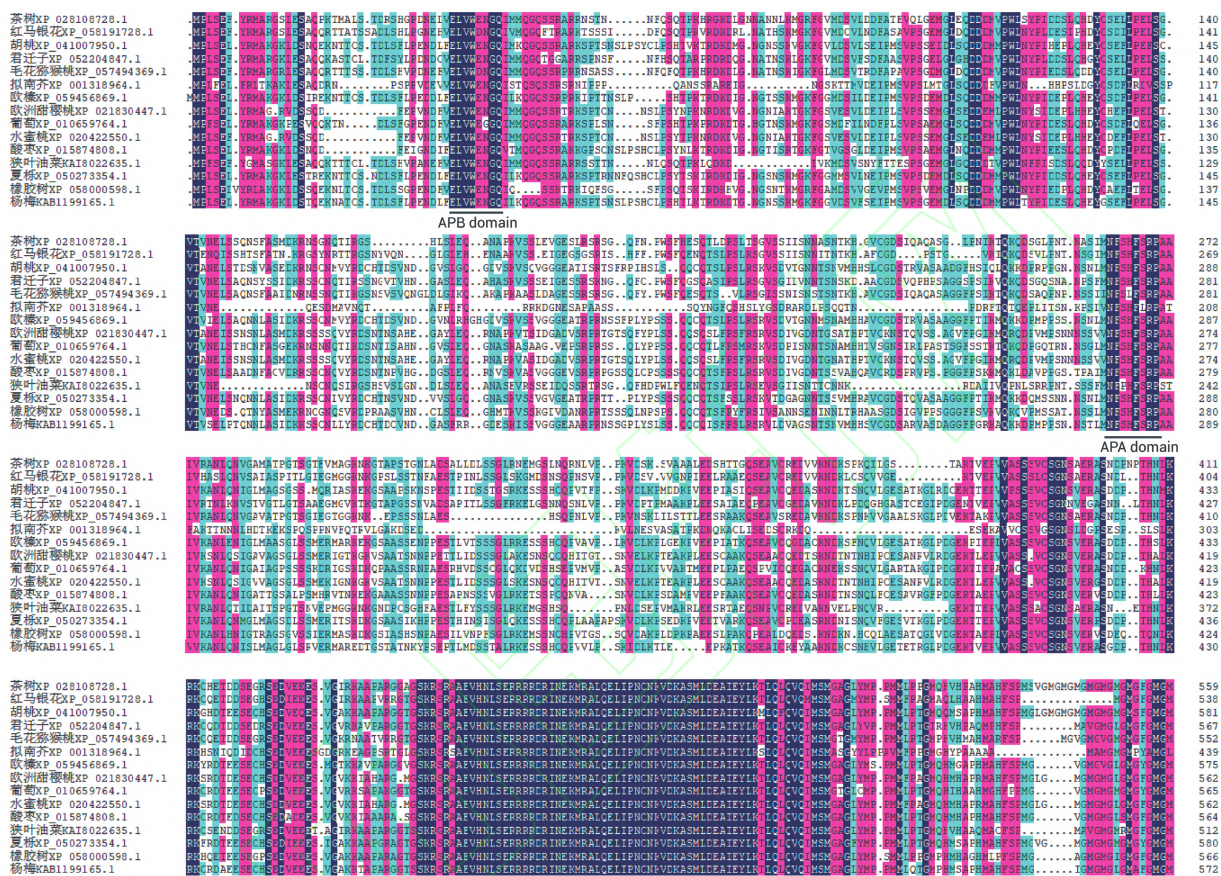


图2 CsPIF3a蛋白与其他植物同源PIF3蛋白氨基酸序列比对

Fig. 2 Deduced amino acid sequence alignment between CsPIF3a and homologous PIF3 proteins of other plants

2.3 茶树CsPIF3a蛋白进化树分析

为了进一步探究茶树CsPIF3a蛋白与其他物种的同源进化关系, 将其与14个物种构建进化树。结果显示(图3), CsPIF3a与毛花猕猴桃、红马银花、狭叶油菜和君迁子的进化树关系相近, 与胡桃、杨梅、拟南芥的进化树关系相对较远。

2.4 茶树CsPIF3a蛋白氨基酸的理化性质分析

通过对CsPIF3a蛋白组成成分和理化性质进行分析。结果显示(表1), 15种植物的PIF3蛋白氨基酸残基数为524~749, 相对分子量为56.99~80.24 kD。理论等电点(pI)为5.64~6.56。碱性氨基酸和酸性氨基酸的平均含量约11%, 芳香族氨基酸和脂肪族氨基酸平均含量分别为4%和15%。各个物种之间的

理化性质相差不大, 在蛋白质可溶性预测中, 除狭叶油菜、红马银花、拟南芥外, 其余物种的主要平均疏水特性(grand average of hydropaticity)均在-0.500左右。

2.5 茶树CsPIF3a蛋白固有无序化预测与分析

氨基酸序列折叠的无序化分析显示(图4), 茶树CsPIF3a转录因子序列中存在6个无序化区域。无序化区域含有氨基酸数为352个, 无序化比例为46.87%, CsPIF3a无序化程度较为明显。

2.6 CsPIF3a二级结构及三级结构预测

蛋白质二级结构预测发现, CsPIF3a由18.17% α -螺旋(α -helix)、6.80% β -折叠(β -turn)、1.53% β -转角(β -turn)和73.51%无规则卷曲(random coil)组

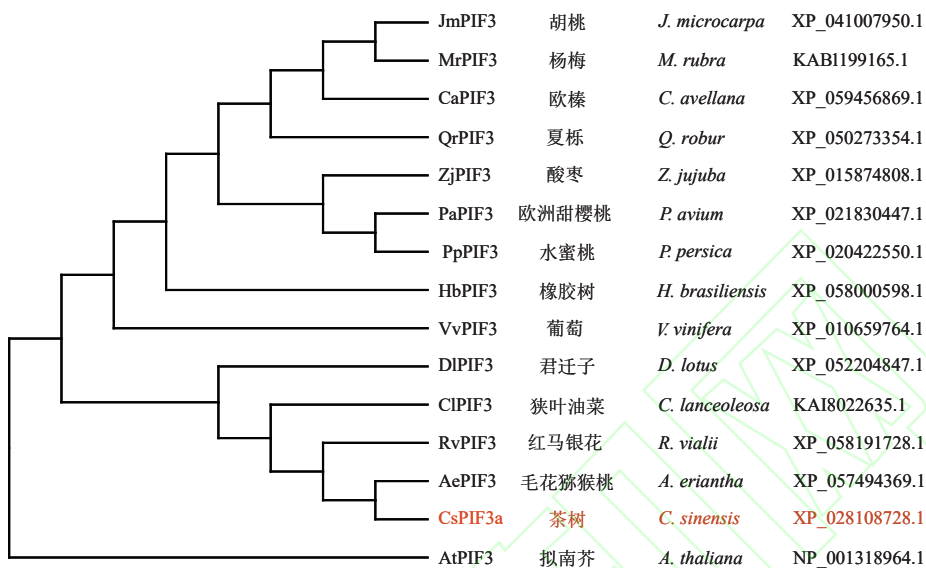


图3 茶树CsPIF3a蛋白的进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree analysis of tea plant CsPIF3a protein

表1 不同植物中CsPIF3a氨基酸组成成分及理化性质分析

Table 1 Composition and chemical characterization analysis of amino acids of CsPIF3a among the different plants

植物 Plant	GenBank 登录号 GenBank accession	氨基酸数 Number of amino acids	相对分子量 Relative molecular weight/kD	理论等电点 Theoretical isoelectric point	碱性	酸性	芳香族	脂肪族	总平均疏水性 Total average hydrophobicity
					氨基酸 Basic amino acids/%	氨基酸 Acidic amino acids/%	氨基酸 Aromatic amino acid/%	氨基酸 Aliphatic amino acids/%	
茶树 <i>C. sinensis</i>	XP_028108728.1	721	76.96	5.70	11	11	3	16	-0.547
杨梅 <i>M. rubra</i>	KAB1199165.1	739	78.80	6.46	13	11	4	16	-0.506
胡桃 <i>J. microcarpa</i>	XP_041007950.1	738	78.93	5.98	12	11	4	15	-0.551
欧榛 <i>C. avellana</i>	XP_059456869.1	744	79.75	6.05	12	11	3	16	-0.502
夏栎 <i>Q. robur</i>	XP_050273354.1	749	80.23	6.05	11	10	4	15	-0.546
酸枣 <i>Z. jujuba</i>	XP_015874808.1	729	77.78	5.64	11	11	4	15	-0.553
水蜜桃 <i>P. persica</i>	XP_020422550.1	729	78.19	5.67	11	11	4	15	-0.579
欧洲甜樱桃 <i>P. avium</i>	XP_021830447.1	728	78.16	5.77	11	11	4	15	-0.584
橡胶树 <i>H. brasiliensis</i>	XP_058000598.1	745	79.20	5.73	11	10	4	15	-0.555
葡萄 <i>V. vinifera</i>	XP_010659764.1	709	75.86	6.30	12	10	4	15	-0.598
君迁子 <i>D. lotus</i>	XP_052204847.1	721	76.31	5.97	11	10	4	16	-0.511
狭叶油菜 <i>C. lanceoleosa</i>	KAI8022635.1	627	68.01	5.64	11	11	4	15	-0.636
红马银花 <i>R. vialii</i>	XP_058191728.1	700	75.50	5.94	12	11	5	16	-0.471
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_001318964.1	524	56.99	6.11	13	12	5	15	-0.728
毛花猕猴桃 <i>A. eriantha</i>	XP_057494369.1	723	77.24	6.56	12	10	4	16	-0.584

成（图 5-A）。利用SWISS-MODEL构建出的CsPIF3a 卷曲、α-螺旋、β-折叠结构和β-转角构成，与二级
三级结构，结果显示（图 5-B），该蛋白主要由无规 结构预测结果大致相同。

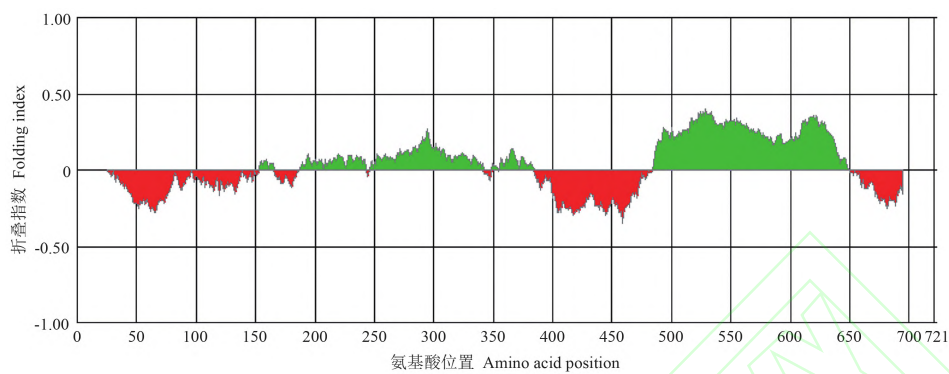


图4 茶树CsPIF3a折叠状态的分析

Fig. 4 Analysis of the folding state of CsPIF3a in tea plant

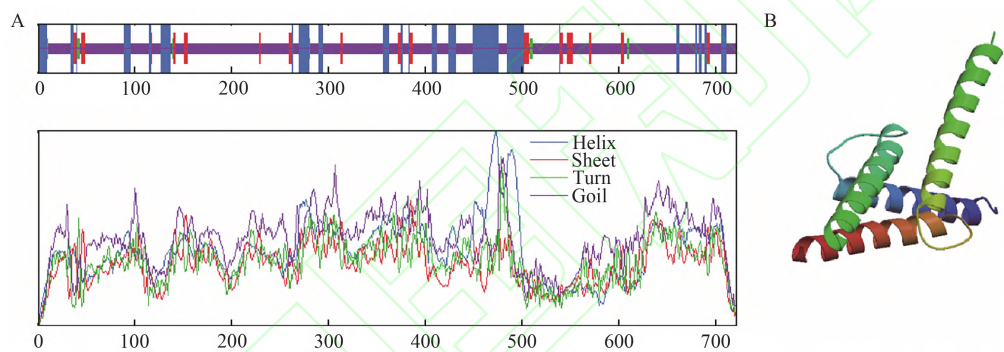


图5 CsPIF3a二级结构(A)和三级结构(B)预测

Fig. 5 Prediction of secondary structure (A) and tertiary structure (B) of CsPIF3a

2.7 CsPIF3a的亚细胞定位分析

为明确CsPIF3a蛋白在茶树细胞中发挥作用的位置，利用烟草瞬时表达体系，激光共聚焦扫描显微镜进行荧光成像。结果表明（图6），侵染35s::eGFP空载体的烟草细胞的绿色荧光信号均匀分布于烟草细胞内细胞质和细胞膜内，无明确的定位。而侵染35s::CsPIF3a-eGFP融合标签载体的存在烟草表皮的细胞核中。表明CsPIF3a蛋白定位于细胞核。

2.8 CsPIF3a转录活性的研究

如图7所示，含有PGBKT7-CsPIF3a和PGBKT7-CsCBF3（作为阳性对照）的酵母可以在单缺（SD/-Trp）和三缺（SD/-Trp-His-Ade）培养基上很好地生长，α-半乳糖苷酶具有活性。然而，携带空载PGBKT7的酵母（作为阴性对照），缺少转录激活域GAL4AD，不能在相同的培养基生长。表明CsPIF3a具有转录活性的功能。

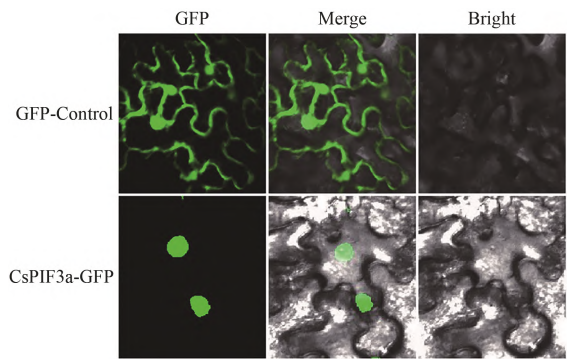


图6 CsPIF3a的亚细胞定位

Fig. 6 Subcellular localization of CsPIF3a

2.9 CsPIF3a在不同组织的表达分析

实时荧光定量PCR结果表明，CsPIF3a在老叶和茎中的表达量最高，在根中的表达量最低（图8）。

2.10 CsPIF3a在光温胁迫下的表达分析

运用实时荧光定量PCR分析‘舒茶早’在低温

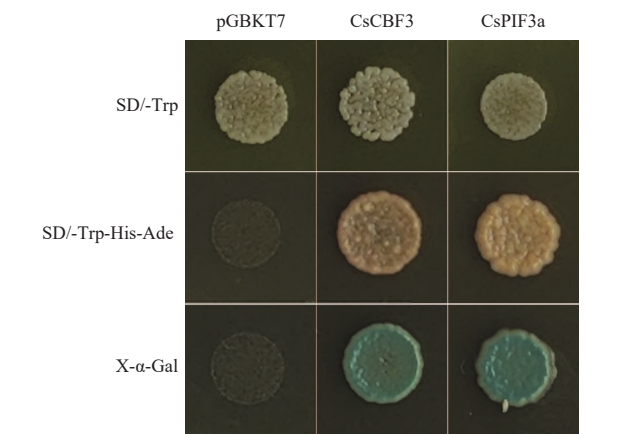


图7 酵母单杂交验证CsPIF3a的转录活性

Fig. 7 Transcriptional activity of CsPIF3a verified by yeast one hybrid

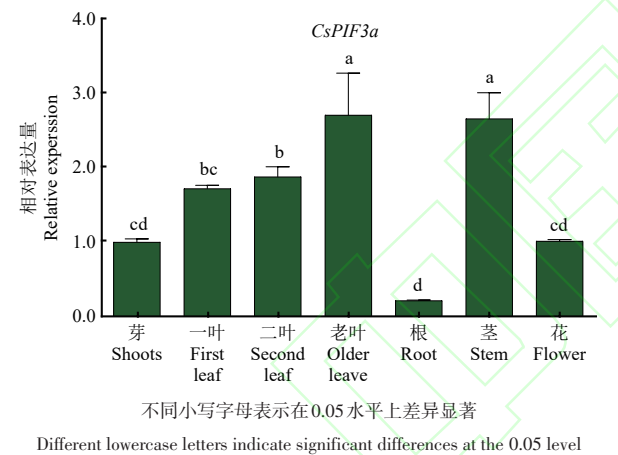


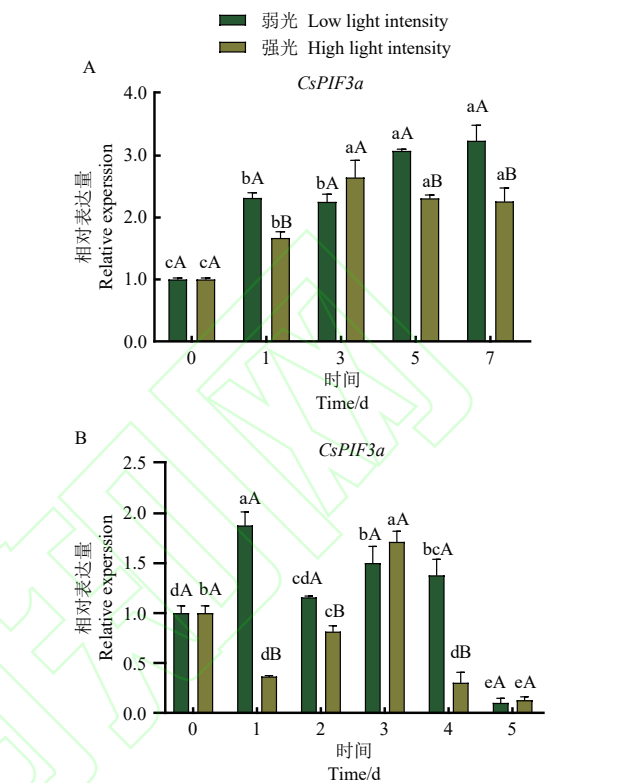
图8 CsPIF3a在茶树不同组织中的表达分析

Fig. 8 Expression analysis of CsPIF3a gene in different tissues of tea plant

弱光/强光、高温弱光/强光胁迫条件下CsPIF3a的表达情况。结果表明，CsPIF3a受低温诱导表达，低温弱光的表达量明显高于低温强光的表达量（图9-A）。CsPIF3a在前4 d，受高温弱光诱导表达；除第3天外，CsPIF3a受高温强光抑制表达，高温弱光的表达量明显高于高温强光的表达量（图9-B）。

3 讨论

太阳给地球上的生物带来光明的同时也带来了热量。在自然环境中，白天温度高，夜晚温度低，因此，光照和温度作为紧密联系的重要环境因子，



A: 低温处理; B: 高温处理。不同小写字母表示相同光照处理下不同天数的相对表达量之间的差异 ($P<0.05$)。不同大写字母表示相同天数不同光照处理后的相对表达量之间的差异 ($P<0.05$)

A: Low temperature treatment. B: High temperature treatment. Different lowercase letters indicate the difference in relative expression between different days under the same light treatment ($P<0.05$). Different capital letters indicate the difference in the relative expression of the same number of days after different light treatments ($P<0.05$)

图9 CsPIF3a在光温胁迫下的表达分析

Fig. 9 Expression analysis of CsPIF3a gene under light and temperature stress

共同调控植物的生长和发育过程^[19]。茶树在生长过程中面临着非常复杂的光温环境，光照过强或光照过低，温度过高或温度过低等都会对茶树的生长发育产生很大的影响。因此，研究和揭示茶树光、温信号通路交叉互作的分子机制，有助于深入理解茶树的环境适应性机理，并为提高茶树在温度胁迫下的生存能力提供新策略。

光敏色素互作因子PIFs (phytochrome-interacting factors) 作为一类可以与光敏色素蛋白相互作用的bHLH家族转录因子，是光信号响应过程中的关键负调控因子。近年来，随着对PIFs研究的不断深入，

发现 PIFs 不仅广泛参与调控植物的生长发育, 在植物抵御逆境胁迫中也发挥重要的作用^[20]。PIF3 是该亚族中第一个被发现的成员, 含有 PAS 结构域的基本螺旋-环-螺旋蛋白, 可以与 phyA 和 phyB 的非光活性羧基末端片段结合, 并在体内光敏色素信号传导中起作用^[21]。目前对 PIF3 的研究集中在拟南芥等为主的模式植物上, 在其他植物上的研究报道较少。本文从茶树品种‘舒茶早’中克隆到 *CsPIF3a* (TEA033210), 该基因开放阅读框长度为 2 163 bp, 共编码 720 氨基酸; 对 *CsPIF3a* 转录因子氨基酸组成成分、理化性质的分析结果显示, *CsPIF3a* 属于亲水性蛋白, 二级、三级结构主要表现为无规卷曲、 α -螺旋、 β -折叠结构和 β -转角。*CsPIF3a* 系统进化树表明茶树与毛花猕猴桃的进化树关系相近, 与胡桃、杨梅、拟南芥的进化树关系相对较远。保守结构域分析表明, *CsPIF3a* 蛋白含有 1 个 bHLH 结构域、1 个 APB 结构域和 1 个 APA 结构域, 属于 bHLH 转录因子家族, 这与油茶 *CoPIF3* 的结构相同^[22]。有研究结果表明, 固有无序蛋白因为自身结构的特点, 可在植物受到逆境胁迫时快速反应, 从而减少逆境对植物的伤害^[23]。*CsPIF3a* 蛋白的无序化比例较高, 由于 *CsPIF3a* 的表达响应温度胁迫且与光照强度有关, 因而推测 *CsPIF3a* 蛋白的无序化区域可能与‘舒茶早’应对光温胁迫的相应调控过程有关。在番茄中, 当幼苗第一次暴露在阳光下时, PIF3 负调控植物在黑暗中生长的原叶绿内酯的合成^[24]。在持续红光下, 拟南芥中过表达 *PIF3* 株系的叶绿素含量降低^[25]。也有研究发现, *PIF3* 的 mRNA 积累是不受光调控的, 但它的蛋白是受光调控的^[9]。胡萝卜 *DcPIF3* 促进胡萝卜类胡萝卜素降解转化生成 ABA, 参与了 ABA 依赖途径的抗旱调控机制^[26]。柑橘 *CsPIF3* 可能对植株的株高和分枝伸长生长有促进的作用^[27]。在苹果愈伤组织和拟南芥中过表达 *MdPIF3* 降低了其对冷胁迫的耐受能力, 苹果 *MdPIF3* 在转录和翻译后水平也能够共同响应光和冷信号^[28]。PIF3 在低温下通过抑制低温信号通路关键转录因子基因 *CBFs*/*DREB1s* 的表达, 负调控植物的抗冻性^[16, 29]; 而 *CBFs* 在低温下积累后与 PIF3 互作, 促进 phyB 蛋白稳定性, 促进 PIF1、PIF4 和 PIF5 的蛋白降解, 诱导 *COR* 的表达, 从而增强植物的抗冻性^[30-31]。植物

的 *CBFs*-PIF3 互作模式, 不仅巧妙地消除了其他 PIFs 对冷信号转导的抑制作用, 同时也防止了 *CBFs* 的过量表达, 保证了植物在冷胁迫下具有耐冷性的同时还能正常生长^[19]。然而目前对于茶树 *CsPIF3a* 表达受光温信号调控的具体途径尚不清楚, 有待今后进一步研究。

4 结论

从‘舒茶早’克隆获得 *CsPIF3a*, 其开放阅读框长度为 2 163 bp, 编码 720 个氨基酸, 蛋白分子相对质量为 76.97 kD, 理论等电点为 5.70, 具有亲水性; 与毛花猕猴桃、红马银花、狭叶油菜和君迁子的进化树关系较近; 含有 1 个 bHLH 结构域、1 个 APB 结构域和 1 个 APA 结构域; 二级结构中含 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角、无规则卷曲和无序化区域; 定位到细胞核并具有转录活性, 响应低温和高温胁迫, 其表达强度与光照强度相关。

参考文献

- [1] Ding YL, Shi YT, Yang SH. Molecular regulation of plant responses to environmental temperatures [J]. Mol Plant, 2020, 13(4): 544-564.
- [2] 王峰. PhyA、HY5 和 PIF4 在光质调控番茄低温抗性中的机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2017.
Wang F. Roles and mechanisms of phyA-, HY5- and PIF4-mediated light quality-regulated cold tolerance in tomato [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2017.
- [3] 班秋艳. 基于蛋白质组学的茶树抗寒分子机制研究及 *CsCBF3* 基因的功能鉴定 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2019.
Ban QY. Molecular mechanism of cold resistance in tea plants based on protein genomics and functional identification of *CsCBF3* gene [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2019.
- [4] Oh E, Yamaguchi S, Hu JH, et al. PIF5, a phytochrome-interacting bHLH protein, regulates gibberellin responsiveness by binding directly to the GAI and RGA promoters in *Arabidopsis* seeds [J]. Plant Cell, 2007, 19(4): 1192-1208.
- [5] Casson SA, Franklin KA, Gray JE, et al. Phytochrome B and PIF4 regulate stomatal development in response to light quantity [J]. Curr Biol, 2009, 19(3): 229-234.
- [6] Lee KP, Piskurewicz U, Turečková V, et al. Spatially and genetically distinct control of seed germination by phytochromes A and B [J]. Genes Dev, 2012, 26(17): 1984-1996.
- [7] 顾婷. 小麦 *TaPIF5-B* 基因的克隆与功能研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2020.

- Gu T. Cloning and functional study of *TaPIF5-B* gene in wheat [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2020.
- [8] Khanna R, Huq E, Kikis EA, et al. A novel molecular recognition motif necessary for targeting photoactivated phytochrome signaling to specific basic helix-loop-helix transcription factors [J]. *Plant Cell*, 2004, 16(11): 3033-3044.
- [9] 赵晓玲. 植物中与光敏色素相互作用的因子 PIFs [J]. *植物生理学通讯*, 2009, 45(6): 531-536.
- Zhao XL. Phytochrome interacting factors (PIFs) in plant [J]. *Plant Physiol Commun*, 2009, 45(6): 531-536.
- [10] Kumar I, Swaminathan K, Hudson K, et al. Evolutionary divergence of phytochrome protein function in *Zea mays* PIF3 signaling [J]. *J Exp Bot*, 2016, 67(14): 4231-4240.
- [11] Shi QB, Zhang HS, Song XY, et al. Functional characterization of the maize phytochrome-interacting factors PIF4 and PIF5 [J]. *Front Plant Sci*, 2018, 8: 2273.
- [12] Nakamura Y, Kato T, Yamashino T, et al. Characterization of a set of phytochrome-interacting factor-like bHLH proteins in *Oryza sativa* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007, 71(5): 1183-1191.
- [13] Ni M, Tepperman JM, Quail PH. Binding of phytochrome B to its nuclear signalling partner PIF3 is reversibly induced by light [J]. *Nature*, 1999, 400(6746): 781-784.
- [14] Zhu Y, Tepperman JM, Fairchild CD, et al. Phytochrome B binds with greater apparent affinity than phytochrome A to the basic helix-loop-helix factor PIF3 in a reaction requiring the PAS domain of PIF3 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(24): 13419-13424.
- [15] Huq E, Al-Sady B, Hudson M, et al. Phytochrome-interacting factor 1 is a critical bHLH regulator of chlorophyll biosynthesis [J]. *Science*, 2004, 305(5692): 1937-1941.
- [16] Jiang BC, Shi YT, Zhang XY, et al. PIF3 is a negative regulator of the CBF pathway and freezing tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(32): E6695-E6702.
- [17] Zhang XN, Xiong LG, Luo Y, et al. Identification, molecular characteristic, and expression analysis of PIFs related to chlorophyll metabolism in tea plant (*Camellia sinensis*) [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(20): 10949.
- [18] Wei CL, Yang H, Wang SB, et al. Draft genome sequence of *Camellia sinensis* var. *sinensis* provides insights into the evolution of the tea genome and tea quality [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(18): E4151-E4158.
- [19] Qi LJ, Shi YT, Terzaghi W, et al. Integration of light and temperature signaling pathways in plants [J]. *J Integr Plant Biol*, 2022, 64(2): 393-411.
- [20] 林荣呈, 刘宏涛, 李继刚, 等. 植物光信号转导研究领域近十年重要研究进展 [J]. *植物生理学报*, 2024, 60(3): 399-429.
- Lin RC, Liu HT, Li JG, et al. Research advances in plant light signaling transduction during the past ten years [J]. *Plant Physiol J*, 2024, 60(3): 399-429.
- [21] Ni M, Tepperman JM, Quail PH. PIF3, a phytochrome-interacting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein [J]. *Cell*, 1998, 95(5): 657-667.
- [22] 张健. 油茶光敏色素互作因子 *CoPIF3* 基因的克隆、表达与特性分析 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2021.
- Zhang J. Cloning, expression and characterization of *CoPIF3* gene of photosensitive pigment interaction factor in *Camellia oleifera* [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2021.
- [23] 王东艳, 崔继哲, 张隽. 固有无序蛋白质及逆境胁迫下的分子功能 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2015, 31(9): 921-929.
- Wang DY, Cui JZ, Zhang J. Molecular functions of intrinsically disordered proteins under environmental stress in plants [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2015, 31(9): 921-929.
- [24] Rosado D, Gramegna G, Cruz A, et al. Phytochrome interacting factors (PIFs) in *Solanum lycopersicum*: diversity, evolutionary history and expression profiling during different developmental processes [J]. *PLoS One*, 2016, 11(11): e0165929.
- [25] Kim J, Yi H, Choi G, et al. Functional characterization of phytochrome interacting factor 3 in phytochrome-mediated light signal transduction [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(10): 2399-2407.
- [26] 王欣蕊. 胡萝卜光敏色素互作因子家族鉴定及 *DcPIF3* 基因功能分析 [D]. 南京: 南京农业大学, 2022.
- Wang XR. Identification of phytochrome interacting factors in carrot and functional analysis of *DcPIF3* gene [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2022.
- [27] 洪乐名. 柑橘矮化相关基因筛选与 *CsPIF3* 基因功能初步鉴定 [D]. 广州: 仲恺农业工程学院, 2023.
- Hong YM. Screening of *Citrus dwarfing* related genes and preliminary identification of *CsPIF3* gene function [D]. Guangzhou: Zhongkai University of Agriculture and Engineering, 2023.
- [28] Zheng PF, Yang YY, Zhang S, et al. Identification and functional characterization of MdPIF3 in response to cold and drought stress in *Malus domestica* [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult PCTOC*, 2021, 144(2): 435-447.
- [29] Lin L, Liu XR, Yin RH. PIF3 integrates light and low temperature signaling [J]. *Trends Plant Sci*, 2018, 23(2): 93-95.
- [30] Jiang BC, Shi YT, Peng Y, et al. Cold-induced CBF-PIF3 interaction enhances freezing tolerance by stabilizing the phyB thermosensor in *Arabidopsis* [J]. *Mol Plant*, 2020, 13(6): 894-906.
- [31] 王美娇, 彭晶, 齐立娟, 等. 光信号调控植物响应非生物胁迫的研究进展 [J]. *植物生理学报*, 2023, 59(4): 682-704.
- Wang MJ, Peng J, Qi LJ, et al. Research advances on light control of plant responses to abiotic stresses [J]. *Plant Physiol J*, 2023, 59(4): 682-704.