

生物钟调控植物生长代谢过程的相关研究进展

陈克^{1,2,3}, 张亮^{1,2}, 彭亚军³, 郭亚楠^{1,2}, 赵正洪¹, 柏连阳^{1,2,*}, 王立峰^{1,2,3,*}

¹湖南大学研究生院隆平分院, 长沙410082

²湖南省农业科学院农业生物技术研究, 长沙410125

³湖南省农业科学院植物保护研究所, 长沙410125

*共同通信作者: 柏连阳(lybai@hunaas.cn)、王立峰(ifwang@hunaas.cn)

摘要: 植物中普遍存在生物钟系统, 使其能够感受外界环境中光强、温度等具有周期性的环境信号, 并通过连锁反馈通路调节下游信号转导网络进而参与调控植物的营养生长、生殖生长、应对非生物胁迫、代谢活动等生长代谢过程, 增强植物的环境适应性。本文综述了近年来生物钟调控植物生长代谢过程的相关研究进展, 以期今后有关生物钟组分在植物遗传改良上的研究提供理论参考。

关键词: 生物钟; 非生物胁迫; 营养生长; 生殖生长; 植物代谢

Related research progress on circadian clock regulating plant growth and metabolism process

CHEN Ke^{1,2,3}, ZHANG Liang^{1,2}, PENG Yajun³, GUO Yanan^{1,2}, ZHAO Zhenghong¹,
BAI Lianyang^{1,2,*}, WANG Lifeng^{1,2,3,*}

¹Longping Branch, Graduate School of Hunan University, Changsha 410082, China

²Hunan Agricultural Biotechnology Research Institute, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410125, China

³Hunan Institute of Plant Protection, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410125, China

*Co-corresponding authors: Bai LY (lybai@hunaas.cn), Wang LF (ifwang@hunaas.cn)

Abstract: The circadian clock system is widespread in plants, which enables it to sense periodic environmental signals such as light intensity and temperature from the external environment. The circadian clock system can regulate downstream signal transduction networks through interlocking feedback loops to participate in the regulation of plant growth and metabolism processes such as vegetative growth, reproductive growth, respond to abiotic stress and metabolic activities, and therefore the environmental suitability of plants will be enhanced. This article summarizes the research progress of the circadian clock regulating plant growth and metabolism in recent years, hoping to provide a theoretical reference for future research on the circadian clock components in plant genetic improvement.

Key words: circadian clock; abiotic-stress; vegetative growth; reproductive growth; plant metabolism

地球自转使得昼夜更替不断进行, 导致一天中不同时间存在温度、光照强度等环境因素差异。在漫长的进化过程中, 植物已经进化出生物钟系统来增强自身的环境适应性。生物钟赋予植物能够根据所处的昼夜环境发生相应生理生化反应的

能力, 从而充分协调自身代谢稳态、抗逆反应以及

收稿 2020-09-11 修定 2020-12-26

资助 国家重点研发计划项目(2017YFD0301505)、国家自然科学基金(31601652)和长沙市杰出创新青年培养计划(kq1802013)。

生长等过程, 最终提高自身环境适应性(徐小冬等2013; Harmer等2009)。

从单细胞生物到高等动植物中均已发现相应生物钟组分及节律。在高等植物中, 有许多重要的生物学过程受生物钟调控(Harmer等2000; Schaffer等1998)。本文围绕生物钟系统综述了近年来有关生物钟调控植物生长代谢过程的相关研究。

1 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)生物钟核心振荡器的分子结构

生物钟系统是一种内源性的分子调控机制, 它主要由信号输入途径、核心振荡器、信号输出途径三部分构成, 其中维持生物钟核心功能的是核心振荡器。经过长期研究, 生物钟核心振荡器已经发展成为公认的多层级负反馈联锁调控模型(图1)。核心振荡器主要分为核心反馈环、早间循环和晚间循环。以模式植物拟南芥为例, 核心反馈环的关键组成基因是具有部分功能冗余的Myb转录因子 *CIRCADIAN-CLOCK-ASSOCIATED 1* (*CCA1*) 和 *LATE ELONGATED HYPOCOTYL* (*LHY*) (Wang等1998; Mizoguchi等2002; Alabadi等2002; Matsushika等2000) 以及 *PSEUDO RESPONSE REGULATOR* (*PRR*) 家族基因 *TIMING OF CAB 1* (*TOC1*), 它

在其他物种中的同源基因有时被称为 *PRR1* (Matsushika等2000)。*CCA1*和*LHY*的表达高峰在黎明后, 二者功能存在部分冗余, 而*TOC1*的表达在傍晚之前达到高峰。*CCA1/LHY*能够与*TOC1*启动子中存在的夜晚元件(evening element, EE)结合并抑制其转录(Alabadi等2001)。而*TOC1*是诱导*CCA1*和*LHY*表达所必需的(Alabadi等2002)。第二个循环是早间循环(morning loop)。早间循环由*CCA1/LHY*和*PRR* (*PSEUDO RESPONSE REGULATOR*) 基因家族的*PRR7*、*PRR9*构成。*CCA1*和*LHY*与*PRR7/9*的启动子结合并诱导其表达, 而*PRR7*和*PRR9*则会通过与*TOPLESS*基因家族的成员互作, 结合组蛋白去乙酰化酶HISTONE DEACETYLASE 6/19 (*HDA6/19*) 形成转录抑制复合体从而负调控*CCA1*和*LHY*的表达(Farré等2005)。第三个循环是晚间循环(evening loop)。晚间循环由Myb类转录因子*LUX*与核蛋白体*ELF3* (*EARLY FLOWERING3*)、*ELF4* (*EARLY FLOWERING4*)组成的EC复合体(evening complex) (Nusinow等2011)和*TOC1*构成(Adams等2015)。

2 生物钟调控拟南芥生长发育过程

植株种子在适宜的温度、光照等环境条件下开始萌发。种子萌发过程中, 胚根分生组织细胞不

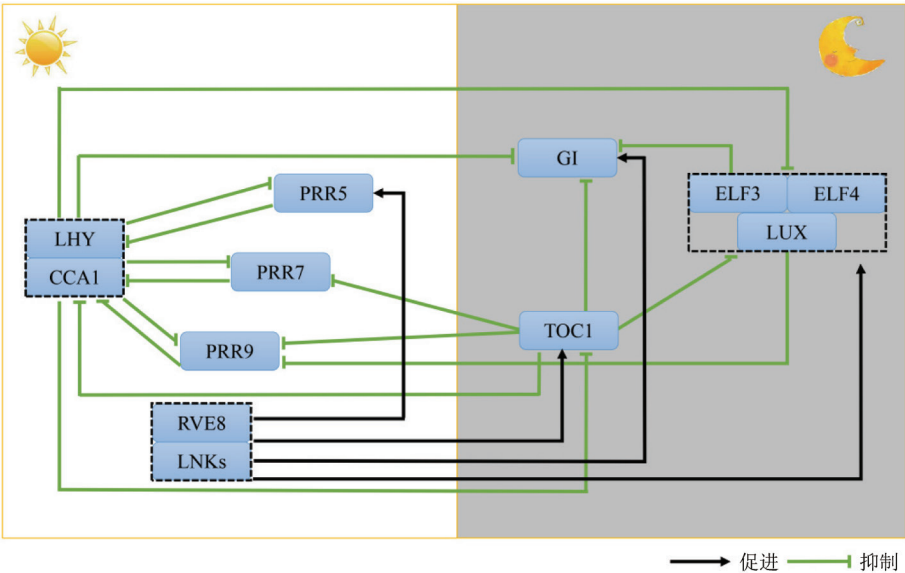


图1 拟南芥生物钟核心振荡器分子网络模型
Fig. 1 Molecular network model of *Arabidopsis* biological clock core oscillator

断发生分裂和伸长,使植株根部不断增长。胚芽顶端细胞不断分裂,生长发育为茎,部分细胞分化形成幼叶,最终发育形成植株的叶片。植株生长至开花结果之前,这一段生长时期被称之为营养生长阶段。有关生物钟对植物营养生长调控的研究主要集中在模式植物拟南芥上,例如对种子萌发、下胚轴伸长等过程的调控(图2)。但是有关生物钟调控植物根茎伸长生长、叶片发育等方面的研究尚且较少。

2.1 生物钟调控拟南芥营养生长

2.1.1 生物钟调控种子休眠与萌发

Footitt等(2017)研究发现拟南芥生物钟核心振荡器基因 $cca1$ 的过表达品系在休眠诱导上的表现与各自的野生型相比较有所不同。在拟南芥哥伦比亚型(Col-0)背景中,过表达的 $cca1$ 品系在第一个低温阶段比Col-0能够更快地诱导次生休眠,并且在25℃下仅4 d就完全休眠,而在Col-0中需要7 d。而在兰德伯格型(Ler)背景下, lhy 过表达系种子在第一低温阶段不能解除休眠,故休眠程度高于Ler野生型。

Zhang等(2007)通过构建节律基因 $cir1$ ($rve2$)突变体发现 $CIR1$ 的组成型表达会影响种子在黑暗

中的萌发。他们发现 $cir1$ 过表达系的种子萌发率与 $CIR1$ 的表达水平呈负相关。在完全黑暗中保存6 d后,四种 $cir1$ 过表达品系的种子发芽率均低于50%,其中 $cir1-ox-10$ 品系种子的萌发率最低,仅有10%左右,而野生型种子的发芽率高达90%。进一步研究发现,用红光和白光连续照射3 d可以使 $cir1-ox$ 种子的发芽率显著提高,四个过表达品系的发芽率都能达到90%以上。蓝光连续照射3 d也可以在一定程度上提高这些种子的发芽率。而用远红光连续照射3 d对过表达品系种子发芽率的提升效果不明显。从而推测 $cir1$ 的组成型表达可能影响光敏色素B (phytochrome B, phyB)和/或隐花色素(cryptochrome, Cry)调控的种子萌发过程。

2.1.2 生物钟调控下胚轴伸长

植物幼苗从土壤中伸出后,为适应外界环境而表现出具有节律性的生长。光周期是植物形态建成和决定生长发育的关键环境因子。目前研究认为,光敏色素互作因子4 ($PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4$, $PIF4$)、光敏色素互作因子5 ($PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 5$, $PIF5$)能够整合光、激素和生物钟信号在光形态建成的早期适当调控下胚轴生长(Niwa等2009)。

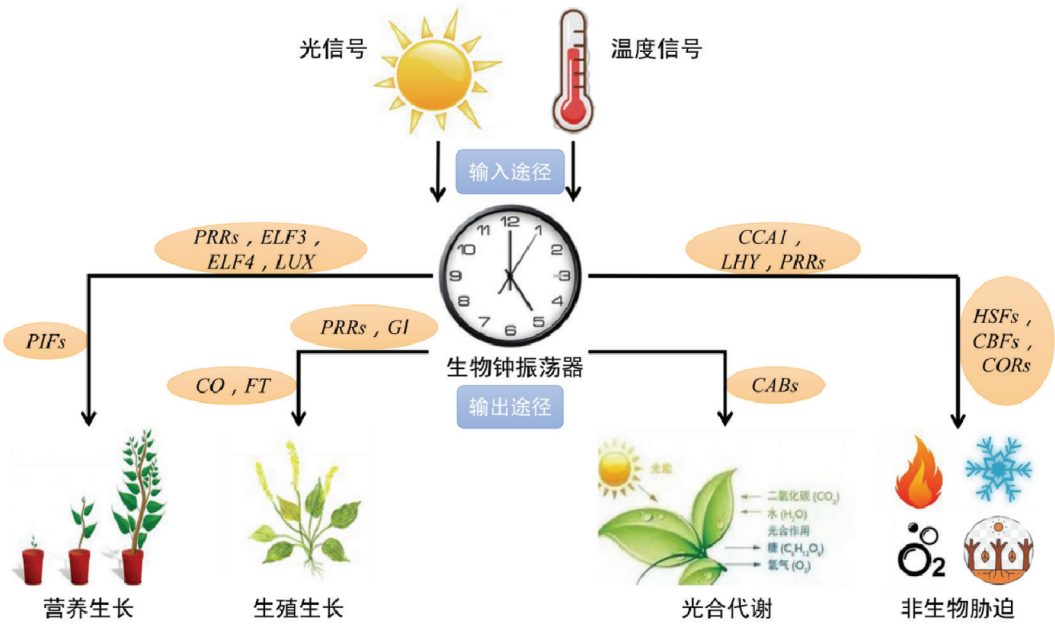


图2 植物生物钟调控网络模型
Fig. 2 Plant circadian clock regulation network model

Niwa等(2009)研究发现, 拟南芥下胚轴的长度一般与日长成反比。他们发现短日照条件(SD)对于增强 $PIF4/PIF5$ 在夜间的表达是必要的。换言之, 长日照条件下的短夜期不足以打开夜间 $PIF4$ 和 $PIF5$ 表达的生物钟门控。所以在一定的短日光周期条件下拟南芥幼苗下胚轴的生长表现出稳定的昼夜节律。

Nusinow等(2011)通过利用酵母双杂交体系和酵母三杂交体系与免疫共沉淀技术发现ELF3能够连接ELF4与LUX形成复合体, 被称为晚间复合体(EC)。之后利用 $elf3$ 、 lux 、 $elf4$ 单突变体、双突变体以及三突变体研究发现 $PIFs$ 参与生物钟调控的下胚轴伸长反应是由于EC在傍晚和前半夜的表达量较高从而抑制 $PIF4$ 和 $PIF5$ 的表达, 而在后半夜EC表达量下降导致 $PIF4/PIF5$ 表达量上升从而促进下胚轴伸长。

此外拟南芥PRR基因家族的5个成员 $PRR9$ 、 $PRR7$ 、 $PRR5$ 、 $PRR3$ 和 $TOC1$ 的蛋白产物含量在一天中以2~3 h的时长为间隔从黎明到黄昏按照一定间隔连续达到峰值(Matsushika等2000), Soy等(2016)和Zhu等(2016)研究发现 $TOC1$ 能够与 $PIFs$ 发生相互作用并抑制其转录活性从而负调控下胚轴伸长。

2.2 生物钟调控拟南芥生殖生长

当植株的营养生长到达一定阶段后, 便开始分化形成花芽, 之后开花、结果, 这个阶段即为植物的生殖生长阶段。目前有关生物钟调控拟南芥生殖生长的研究主要集中在调控拟南芥开花上(图2), 而有关生物钟参与调控其其他生殖生长过程的研究还较少。

2.2.1 生物钟调控开花过程

开花是植物生长发育过程中的一个重要阶段, 是高等植物遗传与繁殖能力的体现, 在植物生长发育与作物经济效益等方面具有重要意义。开花过程包括成花诱导、成花决定、花的发端以及花器官形成等阶段, 其中成花决定阶段标志着植物成花的开始, 直接控制植物的开花时间。 $FLOWERING LOCUS T (FT)$ 是调控植物开花的关键基因之一, 它能够整合光周期、春化和自主途径所感知的信号并传递给下游的开花发育基因(Mouradov

等2002), 从而促进植株开花。植物生物钟主要通过与 FT 之间的相互作用从而参与调控开花过程。

*Constans (CO)*是一种在长日照下加速开花的基因。Kobayashi等(1999)研究发现, 该基因激活下游基因 $LEAFY (LFY)$ 。 FT 与 LFY 共同促进开花, 并受到 CO 的正向调控。 FT 的丢失会导致开花延迟, 而 FT 的过度表达会导致早熟开花。并且 FT 部分作用于 CO 下游, 以与其同源基因 $TERMINAL FLOWER1 (TFL1)$ 拮抗的方式介导开花信号。

研究发现, 被认为可能是拟南芥生物钟晚间循环组分的基因—— $GIGANTEA (GI)$ 参与调控开花。Anwer等(2020)研究发现 $ELF3$ 和 GI 共同感知光周期信号并传递至核心振荡器。他们通过 $elf3 gi$ 双突变体来研究它们在钟控生长上的遗传关系。分析表明 $ELF3$ 和 GI 对于同步内源性细胞机制与外部环境信号是必不可少的。如果没有它们, 核心振荡器将无法与外界环境的明暗周期同步。故在该突变体中, 生物钟介导的光周期反应生长和发育完全丧失。

除 GI 外, 生物钟基因 $PRR3/5/7/9$ 也参与调控植物开花。Hayama等(2017)研究发现拟南芥 $prrr5 prrr7 prrr9$ 突变植株表现出晚花表型。经研究发现, 是由于 $PRRs$ 能够在一天中的不同时间与 CO 相互作用并促进其蛋白产物结合在 FT 启动子上从而诱导 FT 表达, 进而调控开花。

赤霉素作为一种重要的植物激素, 通过调节赤霉素信号途径中的抑制因子DELLA蛋白的含量来调控拟南芥开花。赤霉素浓度提高后, DELLA蛋白通过泛素化途径被降解, DELLA调控的相关下游基因, 如 FT 、 LFY 等参与调控开花的基因的表达由此发生变化。Yan等(2020)最新研究发现节律基因 $fkl1$ 突变体在开花过程中对外源GA的响应较弱, 而 $FKF1$ 过表达植株的开花过程对外源GA更加敏感。随后发现 $fkl1$ 突变体中GA信号关键抑制子DELLA蛋白在长日照条件下的下午时段积累, $FKF1$ 过表达植物中DELLA蛋白水平则降低, 说明 $FKF1$ 可能通过调控DELLA蛋白水平进而调控拟南芥的开花时间。但研究发现 $FKF1$ 突变并不影响GA介导的DELLA蛋白降解过程。进一步研究 $FKF1$ 与DELLA蛋白的相互作用, 发现 $FKF1$ 与

DELLA蛋白在细胞核中互作, 并能够促进DELLA蛋白的泛素化降解。因此该研究认为FKF1可能介导DELLA蛋白在长日照条件下的下午时段的降解, 从而促进开花调节因子*FT*、*SOC1*和*LFY*的转录表达, 进而促进植物开花。

3 生物钟调控拟南芥代谢过程

3.1 生物钟调控光合代谢

生物钟长期以来一直被认为影响植物初级同化作用的各个方面, 如光合作用(Harmer等2009)(图2)。捕光叶绿素a/b结合蛋白基因(*light-harvesting chlorophyll a/b*, *CAB*)编码叶绿素结合A/B蛋白的途径在拟南芥中受到生物钟的调控。Millar等(1991)研究发现在将拟南芥从明/暗周期培养转移至恒定黑暗下, *CAB2*和*CAB3*基因表现出强烈的近日节律。进行体外核连续转录实验表明在拟南芥中*CAB1*和*CAB2*基因转录受到生物钟调控。

3.2 生物钟调控糖代谢

植物光合作用的一些产物通常是以淀粉的形式贮存起来的, 从而维持夜间的新陈代谢及生长。故淀粉在夜间的降解是调控拟南芥生长的一个关键因素。

Graf等(2010)研究发现在拟南芥叶片中, 淀粉在夜间的降解速率呈线性, 几乎所有的淀粉都会在黎明前被耗尽。进一步研究发现当拟南芥在异常日长条件下生长时(28或17 h日长), 无论实际的黎明何时到来, 淀粉都会在上个黎明的24 h后耗尽, 表现出一个近24 h的节律。进一步研究发现*lhy/ccal*突变体在24 h内生长减慢是由于淀粉降解速率不适当并由此引起夜间碳饥饿所致。表明淀粉的降解具有昼夜节律并受到生物钟的调控。

Haydon等(2013)研究发现向生长培养基中加入外源糖类可以缩短连续光照条件下生长的拟南芥幼苗的生物钟基因表达周期。与外源糖的作用相反, James等(2008)研究发现*PRR7*基因参与编码*CCA1*的抑制子, 并且抑制光合作用会由于对*PRR7*产生了去抑制从而延长表达周期。

3.3 生物钟调控矿物元素的吸收代谢

Haydon等(2011)研究发现氮磷硫的转运受生物钟调控。Ho等(2009)和Fan等(2009)研究发现硝

酸盐和铵吸收蛋白编码基因的转录本在黎明前后达到表达高峰, 而韧皮部装载硝酸盐基因的转录本在黄昏后达到高峰, 从而在夜间驱动N从源到库的移动。钙离子(Ca^{2+})是一种在植物中含量丰富的营养离子, 约占叶片干重的3%。钙离子的移动依赖于蒸腾流, 并以高浓度储存在液泡和质体中, 其中很大一部分包含在细胞壁的果胶成分中。钙离子也在细胞信号传递中扮演第二信使的角色, 参与广泛的生理过程。

Johnson等(1995)研究发现胞质中游离钙离子的浓度具有昼夜节律, 并且其相位会随着昼夜环境信号的改变而发生变化。在将幼苗转移至恒定黑暗后, 可观察到叶绿体钙离子浓度的昼夜节律现象, 其内在分子机制目前仍不清楚。

钾离子(K^+)是植物中含量最丰富的阳离子, 在酶活化、膜运输和渗透调节中发挥作用。钾影响植物生理生化反应的许多方面, 尤其是对水和溶质通量的影响。Haydon等(2013)发现在拟南芥中, 有几个 K^+ 转运基因的转录水平存在昼夜节律。

镁(Mg)在植物中有两个主要作用: 位于叶绿素的叶绿素环中心和ATP的活性形式。这两个角色都对光合作用至关重要, 因此叶绿体对镁离子具有高需求, 特别是在光合作用期间。然而由于细胞新陈代谢的能量需求在一天中会有变化, 镁的动员及转运可能是必要的, 但是暂未发现生物钟在调控镁转运中的作用。Hermans等(2010)研究发现缺酶拟南芥的转录组图谱中生物钟基因的表达发生变化, 在光/暗周期下缺镁植物的*CCA1*和*LHY*的表达时间均有延迟。

4 拟南芥生物钟与非生物胁迫相互作用

植物生物钟能够显著调控其非生物胁迫应激途径以提高植物对于非生物胁迫的耐受性。其中, 有关拟南芥生物钟对冷、热、干旱、氧化等非生物胁迫的应激调控机制研究的较为深入(图2)。

4.1 生物钟调控冷胁迫应激

在冷胁迫反应应答过程中, 植物暴露在低温下会通过诱导*CBF/DREB1*基因(*CREPEAT BINDING FACTOR/DEHYDRATION RESPONSIVE ELEMENT BINDING*)的表达进而促进*COR*等一系列基

因的表达,从而应答冷胁迫。研究发现生物钟参与调控CBF以及某些CBF调节基因的表达。

Dong等(2011)进行遗传分析和利用芯片技术发现在拟南芥中, *CCA1/LHY*正向调控*CBF1/2/3*的节律性表达。*cca1-11 lhy-21*双突变株中, *CBF1/2/3*的冷诱导表达明显减弱, *CBF1*和*CBF3*的节律性表达基本丧失, *CBF2*的节律性表达虽未丧失但振幅显著降低。此外,冷调节基因*COR15A*、*COR47*和*COR78*等3个CBF调节基因的生物钟调控和冷诱导也大大减弱。表明CBF基因介导的冷胁迫应激受到生物钟核心基因*CCA1*和*LHY*的调控。

Keily等(2013)研究发现,在*toc1*突变体*toc1-101*中具有更高的*CBF3*表达,随之而来的是对冷胁迫的耐受性更强。进一步研究发现其内在的分子机制是*TOC1*与*CBF3*启动子区域结合进而调控其表达。

Nakamichi等(2009)使用Affymetrix ATH-1基因芯片技术对拟南芥野生型和*prp9-11 prp7-10 prp5-10*三重突变体(*d975*)的基因表达进行了比较研究。研究发现, *d975*的“夜间基因”表达水平低于野生型,而“白天基因”的表达水平高于野生型,而*d975*比野生型植物具有更强的抗寒性。因此认为*PRR5*、*PRR7*和*PRR9*可能作为*CBF1*、*CBF2*或*CBF3*的直接负调控因子,它们参与调控冷胁迫应激反应。

4.2 生物钟调控热胁迫应激

植物暴露在高温下会激活热休克反应途径并引起热休克蛋白(heat shock protein, HSP)的合成。热休克因子(heat shock factor, HSF)能诱导调节热休克蛋白的合成。Mockler等(2007)研究发现拟南芥中有21个HSF,其中17个HSF的转录丰度具有节律性特征。其中5个HSF能够在自由运行的恒光恒温条件下进行节律性表达,而16个则能够在光循环或热循环下进行节律性表达。此外,HSF从早至晚都有表达,并且每隔4 h至少有一个HSF的表达达到其峰值水平。

Blair等(2019)研究发现。在拟南芥中, *HSFA2*和*HSFA7b*分别在清晨(zeitgeber time 1, ZT1)和中午(ZT6)受到热胁迫的诱导表达并在下午受到的诱导作用相对较高, *HSFA3*转录本丰度在下午的积累比上午更高。*HSFB1*、*HSFB2A*和*HSFB2B*都是热

诱导的,它们在下午的转录丰度较高,而*HSFC1*基因的表达在一天中的任何时间都受到热的抑制。为了进一步确定植物生物钟对热胁迫反应的影响。在2019年他们重点研究了拟南芥四个核心生物钟基因*CCA1*、*LHY*、*PRR7*和*PRR9*突变株在清晨(ZT1)和中午(ZT6)分别暴露于高温(37°C)和中度寒冷(10°C)后与野生型的基因差异表达情况。与清晨相比,中午的差异表达基因增加了约30%。在对热胁迫有特异性反应的约3 000个差异表达基因中,有70%在ZT1或ZT6发生了反应,即使是在两个时间点都会表达的约1 400个基因中,也观察到了不同时间点上转录水平的差异。而在不同的突变体中发现约有2%的基因对温度胁迫表现出不同的反应,他们发现*CCA1/LHY*对植物白天的热应激调控作用比*PRR7/PRR9*更显著。

4.3 冷、热胁迫反馈调节生物钟

在一定的温度范围内,温度的改变不会影响生物钟基因的表达,然而超过该温度范围后,当植物暴露在极端温度下时则会改变其表达。

Chow等(2014)研究发现,白天的冷胁迫会降低拟南芥生物钟基因的周期振幅,并会抑制或破坏输出基因的周期。冷信号是通过CBF调控*LUX*的表达进而被整合到生物钟中的,在这个过程中*CBF1*与*LUX*启动子中的*CRT*基序结合, *CBF1*的过表达导致*LUX*的上调,进而改变其他生物钟基因如*PRR9*、*CCA1*、*LHY*等的转录丰度。

此外Cao等(2005)研究发现, *GI*受冷胁迫诱导,并且通过不依赖于CBF的途径正向调节耐寒性。通过研究*gi*功能缺失突变体*gi-3*,发现相对于野生型,该突变体植株对冷胁迫表现出更高的敏感性。

除此之外,Seo等(2012)研究发现,选择性剪接是将低温信号传输至生物钟的另一种方式,低温抑制*CCA1*的选择性剪接,从而减少*CCA1-β*的产生,它是一种参与DNA结合的N端缺少MYB基序的*cca1*剪接突变体, *CCA1-β*是*CCA1-α*和*LHY*的转录活性抑制剂。*CCA1-α*的组成性表达诱导CBF基因的表达从而增强冷驯化过程中的耐寒性,因此,抑制*CCA1*的选择性剪接对于提高拟南芥的耐寒性是必需的。

Blair等(2019)研究发现*CCA1*、*PRR7*、*PRR9*

在受到热应激时, 其转录本丰度增加, 并且在一天中的特定时间[上午(ZT1)或下午(ZT6)]诱导作用更强。相反, 通常被认为与CCA1具有功能冗余作用的LHY在热胁迫下转录丰度降低, 表明热胁迫也能够反馈调节生物钟。

4.4 生物钟调控氧化胁迫应激

植物在进行光合作用和呼吸作用等有氧代谢过程中会产生氧(O²)的有毒副产物, 例如单线态氧、超氧阴离子、过氧化氢和羟自由基。它们被统称为活性氧(reactive oxygen species, ROS)。一旦植物体内活性氧的产生不受控制, 植物就会因为细胞氧化还原状态的失衡而遭受氧化应激, 并最终导致细胞凋亡(Apel等2004)。因此, 植物已经进化出酶和非酶的活性氧清除机制, 以保持体内活性氧处于正常水平。

氧化应激反应通路的激活和维持需要很高的能量。经研究发现(Covington等2008; Legnaioli等2009), 生物钟调节氧化应激可以最大程度地缓解氧化压力, 并最大程度地减少能量的浪费。由于ROS可以在胁迫下作为重要的第二信使, 所以为增加植物的环境适应性, ROS的稳态与日常的明暗周期相协调是有利的(D'Autréaux等2007)。经研究发现, 在拟南芥中, ROS相关基因的表达以及相关产物的积累具有明显的周期性, 并且代谢ROS的相关酶系的表达也具有周期性。同时, 在拟南芥*cca1/lhy*功能缺失突变体(*cca1-1/lhy-11*)中观察到, ROS产物及其相关基因的表达发生显著表达差异。证明植物生物钟能够显著调节植物的氧化代谢过程。然而两者之间具体的生物学联系还正在研究中。

4.5 生物钟调控干旱胁迫应激

Nakamichi等(2016)通过构建功能类似于*prr5*功能缺失突变体的*prr5-VP*植株发现*prr5*显著影响植株的抗旱性, 由于植株大小偶尔会影响植株抗旱性, 故他们在试验时选用了大小相似的*prr5-VP*植株和野生型植株, 对21日龄的植株进行缺水处理16 d后发现, *prr5-VP*植株的存活率显著高于野生型植株。

植物激素脱落酸(abscisic acid, ABA)能够通过调控植物叶片衰老、促使植物重新分配体内水分养分, 从而提高作物抗旱性。Caldeira等(2014)研

究发现LHY驱动ABA的节律性积累, 保证植物激素的积累在植物叶片水分亏缺最严重的黄昏时期达到峰值。

Adams等(2018)研究发现LHY直接抑制ABA生物合成途径限速酶9-顺式-环氧类胡萝卜素二加氧酶的表达。LHY过表达植株在干旱胁迫下有着更低的ABA水平。在功能缺失突变体中, 其ABA积累节律也发生了变化。LHY还可以结合ABA信号通路中许多组分的启动子, 表明其有可能参与调控激素的一些下游响应。此外, Legnaioli等(2009)研究发现TOC1能够与ABA相关基因(*Abar/CHLH/GUN5*)的启动子相结合并控制其节律性表达。

5 生物钟基因在农艺上的研究与应用

近几十年来, 研究人员以模式植物拟南芥入手, 正在对水稻(*Oryza sativa*)、大豆(*Glycine max*)、大麦(*Hordeum vulgare*)等主要农作物的生物钟基因进行充分挖掘与分析, 相关研究也正在逐步开展。

水稻是主要的粮食作物之一, 全球约一半人口以大米为主食。生物钟调控水稻生长发育的研究正在全面进行, 以期进一步促进水稻产量。抽穗期标志着农作物由营养生长阶段转向生殖生长阶段, 此阶段营养生长和生殖生长并进。这是决定农作物产量的关键时期。Zhu等(2018)之前已经研究证明一种含有C3HC4环状结构域的E3泛素连接酶——HAF1对于精准调控水稻抽穗日期和在短日照条件下进行正常的光周期反应是必不可少的。在最新研究中他们发现水稻生物钟基因*OsELF3*是HAF1在体外和体内泛素化的直接底物, 而HAF1又是维持光周期下*OsELF3*的节律性表达所必须的。他们发现在长日照条件下由于*OsELF3*与HAF1互作区域内的一个氨基酸变异(L558S)会导致*haf1 oself3*双突变体的抽穗时间晚于*oself3*突变体植株, 表明生物钟参与调控水稻抽穗时间。水稻在抽穗后, 一个穗子顶端最先抽出, 穗子顶端枝梗上的颖花先开花, 然后伴随穗子的抽出自上而下, 依次开花。Hayama等(2017)研究发现*GI*在水稻中的同源基因*OSGI*发生突变会降低水稻对光周期的敏感性, 导致水稻在短日照(SD)和长日照(LD)条件下分别在萌发后91和103 d开花。除了抽穗外, 分蘖也

是影响水稻产量的一个重要因素。Wang等(2020)研究发现水稻*OsTBI*、*D14*、*OsSPL14*基因作用于*OsCCA1*下游。*OsCCA1*通过正向调控它们的表达从而抑制分蘖生长。下调或过表达*OsCCA1*会分别增加或减少分蘖数,然而调控*OsPRR1*的表达会导致不同的效果

在另一种重要的作物大豆中, Li等(2020)最新研究发现在大豆中*GmPRR3b*是一个主要的花期调控基因。基因表达谱分析表明, *GmPRR3b* (*H6*)表现出节律性和光周期依赖性的表达。过表达*GmPRR3b* (*H6*)增加了主茎节数和产量, 而利用CRISPR/Cas9技术敲除*GmPRR3b* (*H6*)则延缓了生长和花期转换。非生物胁迫也是影响大豆产量的一个重要因素, Wang等(2020)研究发现拟南芥生物钟核心基因*CCA1/LHY*在大豆中的同源基因*GmLHYs*负调控大豆抗旱性。四个*GmLHYs*基因的表达均受干旱诱导, *Gmlhys*四重突变体的抗旱性显著增强, 转录组分析表明, *GmLHYs*通过调控ABA信号途径从而调控大豆抗旱。

大麦是世界上最古老的种植作物之一, 具有食用、饲用、酿造、药用等多种用途。目前有关生物钟对大麦生长发育的调控还知之甚少。Gierczik等(2017)根据系统发育需要, 将大麦基因组中的*CBF*基因分成了三个亚族, 分别是*HvCBF1*、*HvCBF3*和*HvCBF4*。他们发现只有*HvCBF4*家族成员的表达具有昼夜节律, 但具体的分子机制仍不清楚。Ford等(2016)研究发现当大麦受到高温刺激后, *CCA1*和*PRR73*的表达水平迅速降低, 而*GI*和*PRR59*的表达水平迅速升高, 但在*elf3*突变体中未发现这种现象, 表明它们对温度的响应可能是由*ELF3*介导的。

将生物钟调控植物生长发育过程的研究应用至作物生产上, 将有利于为作物分子育种与提高作物产量提供新的理论依据与思考。

6 讨论与展望

植物生长在不断变化的环境中, 在漫长的进化过程中形成了精密的调控网络。生物钟就是漫长进化过程中的产物之一。植物通过感受光信号与温度信号并传导至生物钟振荡器, 从而在经过

一系列反应后调控植物的生长代谢过程。

植物生物钟的内在分子机制较为复杂, 并且植物生物钟与植物生长过程、代谢活动、抗逆反应等许多反应途径相互作用。近几十年来, 以模式植物拟南芥入手, 已经在水稻、大豆、玉米、小麦等作物上进行了有关植物生物钟调控网络的广泛研究。但是有关植物生物钟与其他生物学过程之间相互作用的具体分子机制还有待进一步探索。

此外, 已有许多研究表明不同生物钟基因的转基因植株, 在生长代谢过程中相较于野生型植株表现得更加出色, 为植物育种提供了新的思路。对植物生物钟调控生长代谢方面进行深入研究, 并将理论与实际应用相结合, 可以为作物高效生产, 农业可持续发展提供新的理论依据。

参考文献(References)

- Adams S, Grundy J, Veflingstad SR, et al (2018). Circadian control of abscisic acid biosynthesis and signalling pathways revealed by genome-wide analysis of LHY binding targets. *New Phytol*, 220 (3): 893–907
- Adams S, Manfield I, Stockley P, et al (2015). Revised morning loops of the *Arabidopsis* circadian clock based on analyses of direct regulatory interactions. *PLOS One*, 10 (12): e0143943
- Alabadi D, Oyama T, Yanovsky MJ, et al (2001). Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the *Arabidopsis* circadian clock. *Science*, 293: 880–883
- Alabadi D, Yanovsky MJ, Mas P, et al (2002). Critical role for CCA1 and LHY in maintaining circadian rhythmicity in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 12: 757–761
- Anwer MU, Davis A, Davis SJ, et al (2020). Photoperiod sensing of the circadian clock is controlled by EARLY FLOWERING 3 and GIGANTEA. *Plant J*, 101 (6): 1397–1410
- Apel K, Hirt H (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*, 55: 373–399
- Blair EJ, Bonnot T, Hummel M, et al (2019). Contribution of time of day and the circadian clock to the heat stress responsive transcriptome in *Arabidopsis*. *Sci Rep*, 9 (1): 4814
- Cao S, Ye M, Jiang S (2005). Involvement of GIGANTEA gene in the regulation of the cold stress response in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep*, 24: 683–690
- Caldeira CF, Jeanguenin L, Chaumont F (2014). Circadian rhythms of hydraulic conductance and growth are en-

- hanced by drought and improve plant performance. *Nature Commun*, 5: 5365
- Chow BY, Sanchez SE, Breton G, et al (2014). Transcriptional regulation of LUX by CB-F1 mediates cold input to the circadian clock in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 24: 1518–1524
- Covington MF, Maloof JN, Straume M (2008). Global transcriptome analysis reveals circadian regulation of key pathways in plant growth and development. *Genome Biol*, 9 (8): R130.6
- D'Autr aux B, Toledano MB (2007). ROS as signalling molecules: Mechanisms that gene-rate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8 (10): 813–824
- Dong MA, Farre EM, Thomashow MF (2011). Circadian clock-associated 1 and late elongated hypocotyl regulate expression of the C-repeat binding factor (CBF) pathway in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108: 7241–7246
- Fan SC, Lin CS, Hsu PK, et al (2009). The *Arabidopsis* nitrate transporter NRT1.7, expressed in phloem, is responsible for source-to-sink remobilization of nitrate. *Plant Cell*, 21: 2750–2761
- Farré EM, Harmer SL, Harmon FG, et al (2005). Overlapping and distinct roles of PRR7 and PRR9 in the *Arabidopsis* circadian clock. *Curr Biol*, 15: 47–54
- Footitt S, et al (2017). A laboratory simulation of *Arabidopsis* seed dormancy cycling provides new insight into its regulation by clock genes and the dormancy-related genes DOG1, MFT, CIPK23 and PHYA. *Plant Cell Environ*, 40 (8): 1474–1486
- Ford B, Deng WW, Clausen J, et al (2016). Barley (*Hordeum vulgare*) circadian clock genes can respond rapidly to temperature in an EARLY FLOWERING 3-dependent manner. *J Exp Bot*, 67: 5517–5528
- Fukushima A, Kusano M, Nakamichi N, et al (2009). Impact of clock-associated *Arabidopsis* pseudo-response regulators in metabolic coordination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106: 7251–7256
- Gierczik K, Nov k A, Ahres M, et al (2017) Circadian and light regulated expression of CBFs and their upstream signalling genes in barley. *Int J Mol Sci*, 18 (8): 1828
- Graf A, Schlereth A, Stitt M, et al (2010). Circadian control of carbohydrate availability for growth in *Arabidopsis* plants at night. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107: 9458–9463
- Harmer SL (2009). The circadian system in higher plants. *Annu Rev Plant Biol*, 60: 357–377
- Harmer SL, Hogenesch JB, Straume M, et al (2000). Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science*, 290: 2110–2113
- Hayama R, Sarid-Krebs L, Richter R, et al (2017). PSEUDO RESPONSE REGULATORS stabilize CONSTANS protein to promote flowering in response to day length. *EMBO J*, 36 (7): 904–918
- Haydon MJ, Bell LJ, Webb AA (2011). Interactions between plant circadian clocks and solute transport. *J Exp Bot*, 62 (7): 2333–2348
- Haydon MJ, Mielczarek O, Robertson FC, et al (2013). Photosynthetic entrainment of the *Arabidopsis thaliana* circadian clock. *Nature*, 502: 689–692
- Hermans C, Vuylsteke M, Coppens F, et al (2010). Early transcriptomic changes induced by magnesium deficiency in *Arabidopsis thaliana* reveal the alteration of circadian clock gene expression in roots and the triggering of abscisic acid-responsive genes. *New Phytol*, 187 (1): 119–311
- Ho CH, Lin SH, Hu HC, et al (2009). CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell*, 138: 1184–1194
- James AB, Monreal JA, Nimmo GA, et al (2008). The circadian clock in *Arabidopsis* roots is a simplified slave version of the clock in shoots. *Science*, 322 (5909): 1832–1835
- Johnson CH, Knight MR, Kondo T, et al (1995). Circadian oscillations of cytosolic and chloroplastic free calcium in plants. *Science*, 269 (5232): 1863–1865
- Keily J, MacGregor DR, Smith RW, et al (2013). Model selection reveals control of cold signaling by evening-phased components of the plant circadian clock. *Plant J*, 76 (2): 247–257
- Kobayashi Y, Kaya H, Goto K, et al (1999). A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science*, 286 (5446): 1960–1962
- Legnaioli T, Cuevas J, Mas P (2009). TOC1 functions as a molecular switch connecting the circadian clock with plant responses to drought. *EMBO J*, 28 (23): 3745–3757
- Li C, Li YH, Li YF, et al (2020). A domestication-associated gene GmPRR3b regulates the circadian clock and flowering time in soybean. *Mol Plant*, 13 (5): 745–759
- Matsushika A, Makino S, Kojima M, et al (2000). Circadian waves of expression of the APRR1/TOC1 family of pseudo-response regulators in *Arabidopsis thaliana*: insight into the plant circadian clock. *Plant Cell Physiol*, 41 (9): 1002–1012
- Millar AJ, Kay SA (1991). Circadian control of cab gene transcription and mRNA accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 3: 541–550
- Mizoguchi T, Wheatley K, Hanzawa Y, et al (2002). LHY and CCA1 are partially redundant genes required to maintain circadian rhythms in *Arabidopsis*. *Dev Cell*, 2: 629–641
- Mockler TC, Michael TP, Priest HD, et al (2007). The DIURNAL project: DIURNAL and circadian expression profiling, model-based pattern matching, and promoter analysis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 72: 353–363
- Moseley RC, Mewalal R, Motta F, et al (2018). Conservation and diversification of circadian rhythmicity between a

- model crassulacean acid metabolism plant *kalanchoë fedtschenkoi* and a model C3 photosynthesis plant *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci*, 9: 1757
- Mouradov A, Cremer F, Coupland G (2002). Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity. *Plant Cell*, 14: S111–S130
- Nakamichi N, Saori T, Toru K, et al (2016). Improvement of *Arabidopsis* biomass and cold, drought and salinity stress tolerance by modified circadian clock-associated PSEUDO-RESPONSE REGULATORS. *Plant Cell Physiol*, 57 (5): 1085–1097
- Nakamichi N, Kusano M, Fukushima A, et al (2009). Transcript profiling of an *Arabidopsis* PSEUDO RESPONSE REGULATOR arrhythmic triple mutant reveals a role for the circadian clock in cold stress response. *Plant Cell Physiol*, 50: 447–462
- Niwa Y, Yamashino T, Mizuno T (2009). The circadian clock regulates the photoperiodic response of hypocotyl elongation through a coincidence mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 50: 838–854
- Nusinow DA, Helfer A, Hamilton EE, et al (2011). The ELF4-ELF3-LUX complex links the circadian clock to diurnal control of hypocotyl growth. *Nature*, 475 (7356): 398–402
- Schaffer R, Ramsay N, Samach A, et al (1998). The late elongated hypocotyl mutation of *Arabidopsis* disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell*, 93 (7): 1219–1229
- Seo PJ, Park MJ, Lim MH, et al (2012). A self-regulatory circuit of CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED1 underlies the circadian clock regulation of temperature responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 24 (6): 2427–2442
- Soy J, Leivar P, González-Schain N, et al (2016). Molecular convergence of clock and photosensory pathways through PIF3-TOC1 interaction and co-occupancy of target promoters. *Proc Natl Acad Sci USA*, 113 (17): 4870–4875
- Wang F, Han T, Song Q, et al (2020). The rice circadian clock regulates tiller growth and panicle development through strigolactone signaling and sugar sensing. *Plant Cell*, 32 (10): 3124–3138
- Wang K, Bu T, Cheng Q, et al (2020). Two homologous *LHY* pairs negatively control soybean drought tolerance by repressing the ABA responses. *New Phytol*, 17019
- Wang ZY, Tobin EM (1998). Constitutive expression of the CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (*CCA1*) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell*, 93 (7): 1207–1217
- Xu XD, Xie QG (2013). The circadian clock in plants. *Chin J Nat*, 35 (2): 118–126 (in Chinese with English abstract) [徐小冬, 谢启光(2013). 植物生物钟研究的历史回顾与最新进展. *自然杂志*, 35 (2): 118–126]
- Yan J, Li X, Zeng B, et al (2020). FKF1 F-box protein promotes flowering in part by negatively regulating DELLA protein stability under long-day photoperiod in *Arabidopsis*. *J Integr Plant Biol*, 62 (11): 1717–1740
- Zhang X, Chen Y, Wang ZY, et al (2007). Constitutive expression of *CIR1* (*RVE2*) affects several circadian-regulated processes and seed germination in *Arabidopsis*. *Plant J*, 51 (3): 512–525
- Zhu C, Peng Q, Fu D, et al (2018). The E3 ubiquitin ligase HAF1 modulates circadian accumulation of *EARLY FLOWERING3* to control heading date in rice under long-day conditions. *Plant Cell*, 30 (10): 2352–2367
- Zhu JY, Oh E, Wang TN, et al (2016). TOC1-PIF4 interaction mediates the circadian gating of thermoresponsive growth in *Arabidopsis*. *Nat Commun*, 7: 13692