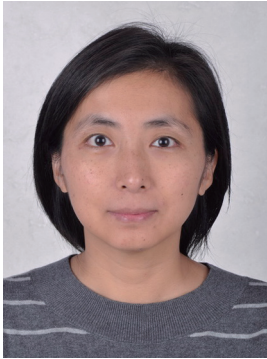


DOI: 10.13376/j.cblls/2015186

文章编号: 1004-0374(2015)11-1336-09



徐小冬, 博士, 教授。2009年起作为河北师范大学“细胞生物学国家重点学科”海外人才引进, 特聘教授, 博士生导师。研究方向为植物周期节律与生长发育调控: 研究以24小时为周期的生物节律 (biological rhythms) 参与植物生长发育和环境适应性调控的作用机制。在细胞跨膜信号转导、生物钟转录水平调控机理、胞质游离钙离子昼夜节律的分子机制、生物钟基因的选择性拼接机理、农作物生物钟系统定量遗传学, 以及建立 LCI、BRET 实时、活体跟踪观察蛋白质的单细胞水平的互作等研究中均有成果发表。

## 植物生物钟与关键农艺性状调控

谢启光, 徐小冬\*

(河北师范大学生命科学学院, 教育部分子细胞生物学重点实验室; 河北省细胞信号与环境适应协同创新中心, 石家庄 050024)

**摘要:** 生物钟参与调控植物体几乎全部的生长发育和新陈代谢过程, 赋予植物体“预知”外界环境条件变化的能力, 使得其生理生化反应与外界环境达到时空同步, 从而获取更多的资源, 减少能量消耗, 增强植物体环境适应性和竞争能力。现概括介绍了植物生物钟领域的最新研究进展, 包括由核心调控组分构成的多重转录-翻译反馈环路, 特别强调了生物钟输出途径的研究成果, 以期促进生物钟基础理论研究应用于农业生产的可行性探索。

**关键词:** 生物钟; 周期节律; 作物; 环境适应; 胁迫抗性

**中图分类号:** Q945.4      **文献标志码:** A

## Circadian clock and the control of key agronomic traits in higher plants

XIE Qi-Guang, XU Xiao-Dong\*

(Key Laboratory of Molecular and Cellular Biology of the Ministry of Education, College of Life Sciences, Hebei Normal University, Hebei Collaboration Innovation Center for Cell Signaling, Shijiazhuang 050024, China)

**Abstract:** Circadian rhythms are generated by an internal timekeeping system that is synchronized to the light-dark and temperature cycles of the planet. Living organisms display fitness advantage from circadian control by anticipating the diurnal and seasonal changes in environments. In the circadian system of *Arabidopsis*, many clock oscillators were identified, consisted of the multiple transcription-translation feedback loops. In this review, we described the updated network architecture of the plant clock system and discussed many critical output pathways on plant physiology. The current understanding of circadian regulation could lead to important agricultural applications.

**Key words:** circadian clock; biological rhythms; crop; adaptive fitness; stress response

收稿日期: 2015-08-01

基金项目: 科技部“973计划”前期研究专项(2012CB126303); 国家自然科学基金项目(30971507, 31071247, 31170265); 河北省杰出青年科学基金项目(C2011205034); 教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-13-0771)

\*通信作者: E-mail: xiaodong.xu@hebtu.edu.cn

自然界在漫长的演化过程中, 由于地球的自转引起各类环境因子产生近 24 h 的节律性变化, 如日照长度变化 (光周期, photoperiodism) 和昼夜温度变化 (温度周期) 等。在原始地球环境中, 还可能存在着强烈的紫外线的昼夜节律性变化。所有这些情况都会对生命体的生存产生选择压力, 因此, 从部分原核生物到真核生物, 如动物、植物、真菌, 以及一些细菌、蓝藻等诸多生命形式, 为了协调生物体自身生长发育和各类环境信号的昼夜变化, 分别独立进化出不同的内源性时间调控机制去适应环境中的 24 h 周期节律现象, 从而保证物种的生存和繁衍, 使生物个体可以节省或避免资源和能量的损失, 从生物钟的调节机制中获益。这种殊途同归的进化方式, 也从一个侧面说明了生物钟对于各类生物体适应性生存的重要意义<sup>[1-4]</sup>。

生物钟的研究摆脱经验性阶段, 正式采用科学的方法起始于对植物体周期节律现象的观测。1720 年, De Mairan (Jean-Jacques d'Ortous de Mairan) 通过实验证实, 在持续黑暗条件下, 含羞草叶片开合现象依然保持着如同昼夜周期下同样的节律性。植物生物钟和其他生物钟领域的研究工作相互借鉴和促进, 共同经历了生物钟基本特性的确立和时间生物学学科的成型以及逐步缓慢发展阶段, 可以称为生物钟研究的厚积阶段。随着生物钟理论的逐步明晰, 和新的生物学技术方法不断引入生物钟研究领域, 近些年进入了井喷阶段。在植物生物钟核心循环调控机制方面, 陆续发现了一系列新的调控组份, 阐明了新的分子作用机制, 同时也纠正了过去一些不确定的观点和结论; 在生物钟的输出途径研究方面, 陆续发表的高水平研究成果揭示出生物钟以及周期节律对植物体光合效率、生物量、杂种优势、生物和非生物逆境胁迫的抗性以及农产品收获后的贮藏等重要农艺性状具有关键调控作用<sup>[5-13]</sup>, 展现出生物钟及周期节律研究对农业生产具有重要的理论价值和广泛的应用前景。生物钟的整体调控是从基因组水平上对生理生化途径关键基因的调控开始, 进而影响到植物生长发育的不同时期和进程, 如植物开花、生长和衰老、组织器官的节律性生长、花瓣开合、叶片运动、茎的环绕运动、气孔开闭和叶绿体等细胞器的运动; 在生理生化方面, 生物钟调控着植物激素的节律性表达和降解以及应答反应、细胞游离钙离子浓度的周期性振荡、蛋白质磷酸化和其他修饰过程。总而言之, 植物生物钟从“纤毫”到整体调控着植物诸多生化和分子信号途径,

处于“高屋建瓴”的地位。

由于不同类型物种的生物钟都是独立进化而来, 因此, 植物与人类、斑马鱼、果蝇、蓝藻和脉孢菌等其他模式物种相比, 生物钟的关键调控组分有明显不同, 但是植物生物钟依然遵循着 3 个主要特征规律。第一, 生物钟节律独立于外界环境信号的周期性变化 (光暗周期、温度周期等), 其产生是内源性的, 在持续条件下 (例如持续光照、恒定温度等) 可以自主地以近 24 h 为周期振荡 (free-running), 或者说生物钟调控系统是遗传得来的, 由细胞内自身的组份来控制, 使得生物体能够具有“预测”时间和外界环境周期性变化的能力。第二, 生物钟调控的节律可以被环境中的信号 (如光、温度等) 所引导 (entrainable) 和重新设定, 如同我们旅行到地球另外一个时区要矫正随身携带的手表一样, 生物体自身的节律也可以被调节去更好地适应外界环境。第三, 生物钟调控的节律具有温度补偿现象 (temperature compensation), 节律性振荡的周期 (period) 在一定温度范围内始终维持在近 24 h。这就意味着对于大多数生理反应的温度系数  $Q_{10}$  大于 2 (例如温度每升高 10 度, 酶促反应速度相应提高 1 倍) 在生物钟控制的节律中并不成立, 其节律的  $Q_{10}$  接近 1, 在一定温度范围内生物节律性可以维持稳定状态。此外, 植物生物钟调控的节律性振荡的周期长短与光照强度成反比关系, 即随着光强增加, 自由振荡的周期缩短 (Aschoff's rule)。本文将按照生物钟系统传统的三部分组成: 输入途径 (input pathways)、生物钟核心振荡器 (core oscillators)、输出途径 (output pathways), 来介绍植物领域的研究进展。

## 1 “蝴蝶效应”——植物生物钟的输入途径

生物钟输入途径主要包括两个重要的环境因子——光照和温度。自然环境中, 植物生物钟处于每天节律性变化的外界环境因子 (特别是光照和温度) 的影响下, 在植物整个生长发育进程中, 机体感受到外界光照长短和温度高低等的变化, 不停地重新校对生物钟, 使之与环境变化同步。这里的光和温度等的一次昼夜变化, 正如“蝴蝶翅膀的一次扇动”。植物通过生物钟系统的输入途径可以感知外界环境的变化, 进一步通过生物钟核心调控和下游信号途径的网络级联反应, 最终产生与之适应的生化和分子功能的变化。

对于植物生物钟输入途径的研究主要集中在光

照和温度两种环境信号上,相关工作涉及到红光受体光敏色素 (phytochrome, PHY)、蓝光受体隐花色素 (cryptochrome, CRY) 和其他光受体以及相关的光信号转导组分方面。拟南芥有 5 种光敏色素 (PHYA-PHYE)<sup>[14-15]</sup>、2 种隐花色素 (CRY1、CRY2)<sup>[16]</sup>, 其他相关的光信号转导组分有 PIFs 因子 (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR)、ELF3 (EARLY FLOWERING 3)、ELF4、FHY3 (FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL 3)、DET1 (DE-ETIOLATED 1) 和 HY5 (LONG HYPOCOTYL 5), 但是除了几篇关于光受体对生物钟影响的研究论文外, 光受体下游组分对生物钟系统的调控方式目前知之甚少, 目前根据已有的结果很难拼出整体调控框架<sup>[17-19]</sup>。此外, ZTL 家族成员之一的 ZTL (ZEITLUPE) 也被证明是和生物钟紧密相关的蓝光受体, ZTL 在蓝光调控下影响 TOC1 (TIMING OF CAB2 EXPRESSION 1) 的稳定性。ZTL 的 LOV 结构域可以和 TOC1、PRR5 (PSEUDO RESPONSE REGULATOR 5) 结合, 然后通过蛋白酶依赖的降解途径降解掉 TOC1 和 PRR5。然而, 蓝光可以诱导 ZTL 的 LOV 结构域的构象变化更加倾向于结合 GI (GIGANTEA), 从而保护 TOC1、PRR5 和 ZTL 在夜晚之前不被降解。GI (GIGANTEA) 除了能够与 ZTL 相互作用, 稳定 ZTL 不被降解外, 也与生物钟系统的温度补偿机制密切相关<sup>[20-21]</sup>。上述生物钟相关组分承担着感受外界光信号的变化, 并将这种变化传导给生物钟核心循环, 使之能够迅速地重新设定生物钟系统。目前研究结果表明, 隐花色素在温度感受中也起了重要作用。蓝光受体除了在光敏色素下游起一定的作用外, 还独立于光敏色素的途径, 并且在温度补偿过程中起重要的调节作用<sup>[22]</sup>。尽管目前对于光信号如何传导到生物钟还不清楚, 但是已经确定了生物钟系统内部对光信号响应的基因, 包括: CCA1 (CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1)、LHY (LATE ELONGATED HYPOCOTYL)、PRR9 (PSEUDO RESPONSE REGULATOR 9) 和 GI 等<sup>[23-26]</sup>。环境温度对生物钟系统的影响主要集中在温度补偿现象, 此方面的研究结果较多, 但是温度补偿机制似乎比较复杂, 目前比较确定的是 CCA1、LHY、TOC1 和 GI 等基因对温度变化比较敏感, 遗传学分析结合基因表达分析表明, CCA1 在低温情况下起主要作用, 而 LHY 在高温情况下发挥着更重要的功能。此外, 温度还通过影响 mRNA 的拼接机制来进一步作用于生物钟系统, 在 *gi* 突变体和 *prp7 prp9* 双缺失突

变体中对于该机制参与温度补偿现象的研究比较深入<sup>[20,27-30]</sup>。除了光和温度外, 氮营养和铁微量元素也在生物钟系统输入途径中显示出重要作用。氮源对生物节律的相位响应曲线 (phase response curves, PRC) 结果表明, 在不同时间处理会导致 CCA1 表达节律的相位延迟或提前, 说明氮源做为植物体重要的营养元素, 在生物钟输入途径中也起着重要作用。在微量元素铁缺乏时, 导致生物节律的周期延长, 对生物钟突变体在不同程度铁供应的情况下, 以及铁相关突变体的生物钟表型变化的研究表明, 铁稳态代谢和生物钟系统之间存在着应答反应<sup>[31-34]</sup>。

## 2 “中庸之道”——植物生物钟的核心调控网络

随着对植物生物钟研究的深入, 越来越多生物钟核心作用组份和影响生物钟的相关基因被报道出来, 随着对这些基因的转录、转录后调控机制的研究, 生物钟核心循环早已经从最初简单的负反馈循环逐步发展成多重负反馈循环模型, 进而逐步演化为目前复杂的调控网络。生物钟调控模式不同于其他信号转导的级联式的调控方式, 生物钟总体上必须要维持相对稳定的平衡状态以保证植物获得生存的最大利益。正因为如此, 可能在进化过程中, 生物钟选择了这种相互拮抗的、反馈式的复杂网状调控模式, 使得植物在内外环境信号的周期性变化过程中, 生物钟系统保持相对稳定, 维持机体正常的生长和发育。环境因素的变化需要植物生物钟核心调控网络具有较强的补偿效应, 使得生物钟能够保持“中庸”状态, 行使功能。

对以双子叶模式植物拟南芥为代表的高等植物生物钟的研究结果进行分析, 发现其不同于其他物种的一个重要特征就是涉及到的生物钟核心组分和相关基因很多 (表 1), 它们之间形成复杂的转录水平上的反馈调控网络, 而且还涉及到 mRNA 拼接、蛋白质磷酸化修饰、蛋白质复合体、核定位和蛋白质降解等转录后调控机制。

在生物钟调控网络中, 最突出的特点就是在拮抗中保持平衡状态。生物钟在外界环境变化时保持相对的稳定对植物的生长尤为重要。清晨出现表达高峰的生物钟核心基因——CCA1 和 LHY, 它们在功能上有很程度的互补性。作为 Myb 转录因子, CCA1/LHY 对同样出现在清晨表达高峰的基因 PRR9/PRR7 具有促进作用, 但对于傍晚或夜间表达高峰的基因 PRR5 和 TOC1 起抑制作用。RVE4/



表1 生物钟相关基因及周期节律表型汇总(文献略)

| AGI编号     | 基因名称                   | 缺失突变体  | 超表达植株                |
|-----------|------------------------|--|----------------------|
| AT1G01060 | <i>LHY</i>             | 短周期, 与CCA1功能很大程度上互补                              | 无节律                  |
| AT1G04400 | <i>CRY2</i>            | 蓝光下长周期   | 蓝光下短周期               |
| AT1G09570 | <i>PHYA</i>            | 远红光、弱红光和蓝光下长周期                                   | 远红光下短周期              |
| AT1G10470 | <i>ARR4</i>            | 与ARR3同源, <i>arr3 arr4</i> 双突为长周期表型               | 节律无显著变化              |
| AT1G12910 | <i>LWD1</i>            | 与LWD2同源, <i>lwd1 lwd2</i> 双突为短周期表型               |                      |
| AT1G17440 | <i>CKH1</i>            | 持续黑暗下短周期   |                      |
| AT1G22770 | <i>GI</i>              | 振幅降低(缺失突变), 短周期或长周期(不同点突变)                       | 短周期, 振幅下降            |
| AT1G52340 | <i>ABA2</i>            | 持续黑暗下短周期   |                      |
| AT1G59940 | <i>ARR3</i>            | 与ARR4同源, <i>arr3 arr4</i> 双突为长周期表型               |                      |
| AT1G66340 | <i>ETR1</i>            | 持续黑暗下短周期并且相位延迟                                   |                      |
| AT1G68050 | <i>FKF1</i>            | 节律无显著变化, 与ZTL和LKP2同源                             | 节律无显著变化              |
| AT1G77180 | <i>SKIP</i>            | 长周期  |                      |
| AT2G18790 | <i>PHYB</i>            | 红光下长周期, 白光下相位提前                                  | 红光下短周期, 白光下相位滞后      |
| AT2G18915 | <i>LKP2</i>            | 节律无显著变化, 与FKF1和ZTL同源                             | 无节律                  |
| AT2G21070 | <i>FIO1</i>            | 长周期  | 节律无显著变化              |
| AT2G21150 | <i>XAP5</i>            | 短周期  | 节律无显著变化              |
| AT2G25930 | <i>ELF3</i>            | 持续光照下无节律   | 长周期                  |
| AT2G31870 | <i>TEJ</i>             | 长周期  | 节律无显著变化              |
| AT2G39810 | <i>HOS1</i>            |  | 长周期                  |
| AT2G40080 | <i>ELF4</i>            | 无节律  | 长周期                  |
| AT2G44680 | <i>CKB4</i>            |  | 短周期                  |
| AT2G46340 | <i>SPA1</i>            | 短周期  |                      |
| AT2G46790 | <i>PRR9</i>            | 长周期, 与PRR7功能很大程度上互补,<br><i>prp7 prr9</i> 双突为超长周期 | 短周期                  |
| AT2G46830 | <i>CCA1</i>            | 短周期, 与LHY功能很大程度上互补                               | 无节律                  |
| AT3G02380 | <i>COL2</i>            |  |                      |
| AT3G09600 | <i>RVE8</i>            | 长周期, 与RVE4和RVE6功能某种程度上互补                         | 短周期                  |
| AT3G11540 | <i>SPY</i>             | 长周期  | 短周期                  |
| AT3G20810 | <i>JMJD5</i>           | 短周期  | 短周期                  |
| AT3G22170 | <i>FHY3</i>            | 持续红光下节律紊乱  |                      |
| AT3G22380 | <i>TIC</i>             | 短周期, 振幅减弱  |                      |
| AT3G26640 | <i>LWD2</i>            | 与LWD1同源, <i>lwd1 lwd2</i> 双突为短周期表型               |                      |
| AT3G46640 | <i>LUX/PCL1</i>        | 无节律  | 无节律                  |
| AT3G54500 | <i>LNK2</i>            | 长周期  |                      |
| AT3G60250 | <i>CKB3</i>            |  | 短周期                  |
| AT4G02570 | <i>CUL1/AXR6</i>       | 长周期  |                      |
| AT4G04920 | <i>SFR6</i>            | 长周期(蔗糖依赖)  |                      |
| AT4G08920 | <i>CRY1</i>            | 蓝光下长周期, 比cry2周期更长                                | 蓝光下短周期               |
| AT4G10180 | <i>DET1</i>            | 短周期  |                      |
| AT4G31120 | <i>PRMT5</i>           | 长周期  |                      |
| AT5G02810 | <i>PRR7</i>            | 长周期, 与PRR9功能很大程度上互补,<br><i>prp7 prr9</i> 双突为超长周期 | 长周期                  |
| AT5G02840 | <i>RVE4</i>            | 节律无显著变化  |                      |
| AT5G05660 | <i>EBI,NFX1-LIKE 2</i> | 短周期  | 节律无显著变化              |
| AT5G08330 | <i>TCP21/CHE</i>       | 节律无显著变化, 促进CCA1启动子活性                             | 节律无显著变化, 抑制CCA1启动子活性 |
| AT5G10140 | <i>FLC</i>             | 27 °C下长周期  |                      |
| AT5G11260 | <i>HY5</i>             | 短周期  |                      |
| AT5G15850 | <i>COL1</i>            |  | 短周期                  |
| AT5G24470 | <i>PRR5</i>            | 短周期, 与PRR7功能某种程度上互补                              | 振幅降低, 长周期            |

续表

|           |            |                   |           |
|-----------|------------|-------------------|-----------|
| AT5G57360 | ZTL        | 长周期, 与FKF1和LKP2同源 | 无节律       |
| AT5G59560 | SRR1       | 短周期, 振幅减弱         |           |
| AT5G59570 | BOA        |                   | 长周期, 振幅增强 |
| AT5G60100 | PRR3       | 短周期               | 与野生型相同    |
| AT5G61380 | TOC1/APRR1 | 短周期               | 无节律       |
| AT5G64170 | LNK1       | 长周期               |           |

RVE6/RVE8 (REVEILLE family), 同样作为 Myb 转录因子, 功能可能部分互补, 对 *PRR9/PRR7*、*PRR5* 和 *TOC1* 起转录促进作用。而 PRRs (PSEUDO RESPONSE REGULATOR family), 按照转录本表达高峰出现的顺序依次是 *PRR9*、*PRR7*、*PRR5*、*PRR3* (维管组织特异性表达) 和 *TOC1* (*PRR1*), 则作为转录抑制因子使 *CCA1/LHY* 或者 *RVE8* 等基因的表达下调。因此, PRRs 基因出现在 *CCA1* 等清晨表达高峰基因的转录峰的下降区段。生物钟系统中在夜间起关键调控作用的傍晚蛋白复合体 (evening complex, ELF3/ELF4/LUX) 在受到 *CCA1/LHY* 抑制的同时, 也受到 *RVE8* 等的激活调控, ELF3/ELF4/LUX (LUX ARRHYTHMO) 构成的蛋白质复合体同时反馈性地抑制 *CCA1/LHY* 和 *RVE8* 等的转录<sup>[35]</sup>。近些年对于早晨调控机制仅限于针对单个早晨表达基因和蛋白质的表达和调控研究, 缺乏对于早晨蛋白质复合体的调控机制的综合研究。最新发表的关于 *LNK1/LNK2* 调控机制的研究表明, LNK1/LNK2 与早晨蛋白 *CCA1/LHY/RVE4/RVE8* 直接相互作用, 同时具备转录激活活性, 可能起到关键的桥梁作用, 该工作对于早晨蛋白质复合体的确立起到了重要作用<sup>[36]</sup>。综上所述可以看出, 生物钟的核心组份间始终处于相互拮抗的调控状态, 正是这种调控方式使得生物钟节律不会偏离 24 h 太远。在正常的昼夜节律下, 外界环境因子可以为植物校对生物钟提供依据, 保证不会出现大的偏差。

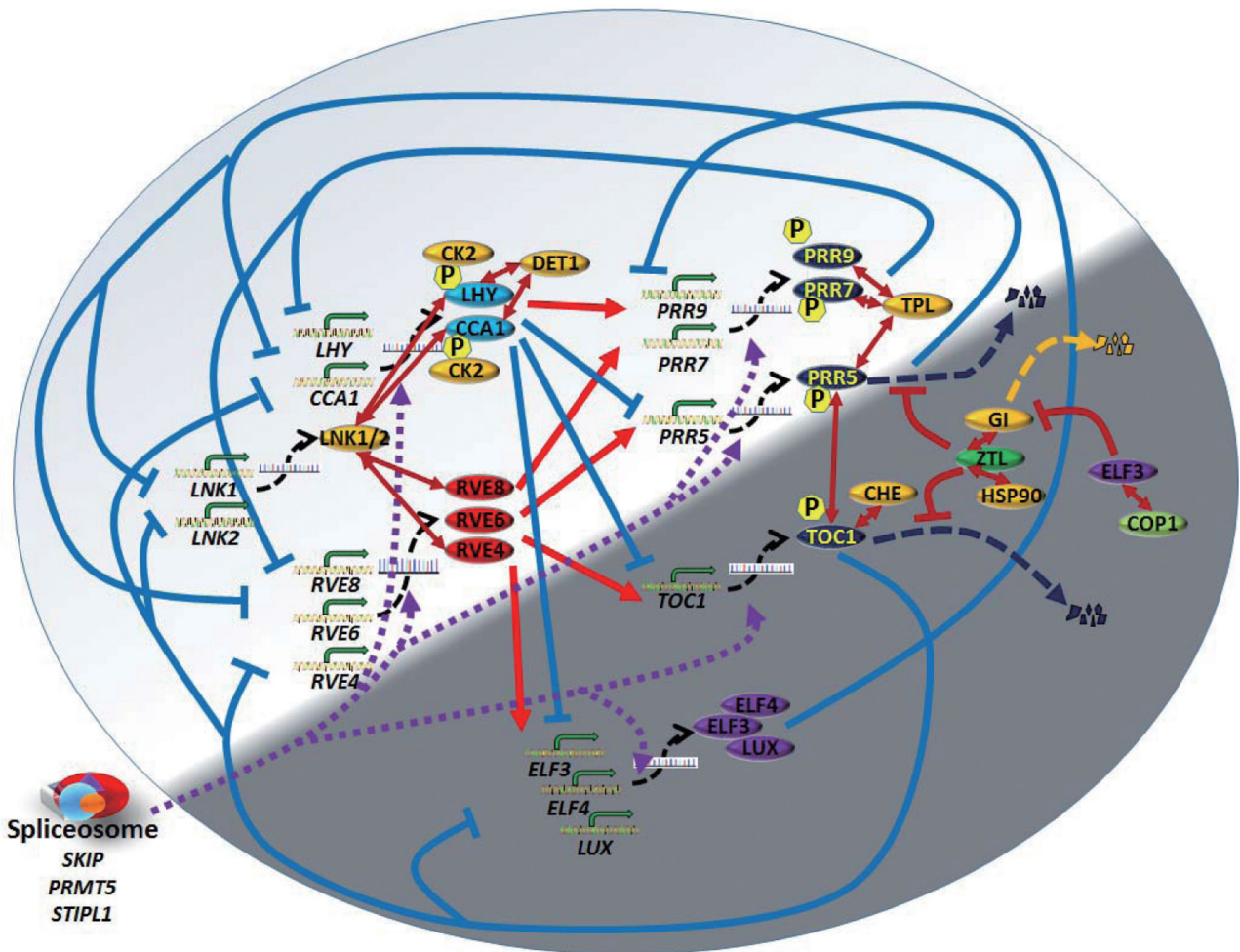
转录后水平的调控在生物钟机制中也尤为重要, 其中关键组分的磷酸化是一种重要调控方式。CK2 激酶 (casein kinase 2) 在生物钟系统中的作用得到了较好的研究, *cka1 cka2 cka3* 三突为长周期突变体, 而超表达 *CKβ3* 或 *CKβ4* 则导致周期缩短, α 和 β 亚基主要可能通过磷酸化 *CCA1* 来调控生物钟的功能<sup>[37-41]</sup>。生物钟关键组分 PRRs 的磷酸化状态也决定了它们的稳定性和亚细胞定位, 在这方面, ZTL 与 *PRR5* 和 *TOC1* 的相互作用, 以及 *PRR5* 和 *TOC1* 的相互作用提供了极好的例证<sup>[42-44]</sup>。2013 年,

Wang 等<sup>[45]</sup> 还证明了 *PRR5*、*PRR7*、*PRR9* 通过与 TOPLESS/TOPLESS-RELATED 家族蛋白相互作用, 从而抑制 *CCA1* 和 *LHY* 的表达。mRNA 的选择性拼接是另一种重要的转录后调控机制, *CCA1*、*PRR9* 等关键基因都表现出了受生物钟调控的选择性拼接方式, *PRMT5* (*protein arginine methyltransferase 5*)、*SKP1* (*SNW/Ski-interacting protein*) 和 *STIPL1* (*SPLICEOSOMAL TIMEKEEPER LOCUS1*) 3 个拼接相关的基因研究结果揭示了 RNA 拼接机制在生物钟调控中的重要作用, 似乎影响拼接效率的最终结果是导致生物钟周期延长<sup>[29, 46-48]</sup>。近些年的植物生物钟的研究开始更加精细地分析生物钟的组织特异性情况, 根的生物钟被认为比叶生物钟调控网络更加简化, 但是叶生物钟通过某种机制可以影响到根生物钟的模式<sup>[49]</sup>。对于叶肉细胞和维管束组织生物钟的关系研究结果也让人耳目一新, 相比叶肉组织, 维管束组织生物钟似乎对于生物钟调控的开花等生理过程具有主导调控效应<sup>[50]</sup> (图 1)。

### 3 “天人合一”——生物钟的输出途径与植物的环境适应性

“天人合一”是中国古典哲学的根本观念之一, 可以帮助我们理解生物钟与植物环境适应性的反馈调控关系。“天”这里指自然环境因素, 具体来说就是前面所提到的输入途径的重要因素: 光照、温度、营养、环境中生物和非生物胁迫等很多环境因子都有昼夜节律性; “人”这里借指植物和其受生物钟调节的生理生化输出途径; “合一”这里指受生物钟调节的输出途径与环境变化因素的同步化。在漫长的进化历程中, 生命体为了适应自然界的周期性变化, 进化出的一套内源性适应机制——生物钟。生物钟的存在使植物能够对外界环境的变化“未卜先知”, 从而节省能量消耗, 减少损失, 获得生存的最大利益。

植物生物钟的输出途径众多, 几乎包括了植物生理生化、发育和代谢过程的所有方面, 主要是由



黑色虚线：转录和翻译过程；红色实线带箭头：转录激活；蓝色实线带末端短线：转录抑制。椭圆区域明亮部分：白天；灰暗区域：晚上。位于明亮区域的基因的表达峰处于白天，位于灰暗区域的基因的表达峰处于晚上

图1 拟南芥生物钟关键基因转录及转录后调控简图

于生物钟调控着上述过程的关键基因，这一点可以从芯片数据中得到证实，即使设定了很高的分析门槛，也有将近 10% 以上的基因受生物钟调控，几乎囊括了各个生理过程和信号通路的关键基因<sup>[51-52]</sup>。

生物钟调控的细胞质游离钙离子浓度的 24 h 振荡节律是种特殊的生化水平的输出途径。作为植物细胞中最重要的第二信使之一的钙离子，在植物的生长发育和许多逆境信号转导过程起着重要作用。陆续的研究表明，钙振荡受红光和蓝光的共同调控，光受体在其中起了不同的作用。红光途径主要通过 *PHYB* 介导，*CRY1*、*CRY2* 双重介导了蓝光途径，蓝光对细胞质中  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  水平的提升调控需要 *PHYB*、*CRY1*、*CRY2* 的共同参与。*ELF3* 在其中起到了如同阀门 (gating) 的作用，直接通过控制生物钟的光输入途径来调节细胞内游离钙离子节律<sup>[19,53]</sup>。

目前研究表明，生物钟调控的气孔开闭和下游靶基因的节律性表达对于植物抗病性非常重要。生物钟调控的靶基因中很多直接或间接参与了基本防御反应和 R- 基因介导的抗性反应，使得植物可以预测到病原菌的侵染时间，有针对性地调动相应的防御基因开始表达。同时，气孔开闭的时间调控对防止病原菌的侵染也至关重要，其中 *CCA1* 和 *LHY* 在生物钟帮助植物应对生物胁迫反应中可能起到关键作用<sup>[6,54]</sup>。以拟南芥为材料的实验还证明了植物可以通过生物钟“预测”昆虫的取食行为，通过调动茉莉酸介导的防御反应与昆虫做斗争。2012 年和 2013 年，Goodspeed 等<sup>[9,55]</sup> 研究揭示，对采摘后各种蔬菜和水果进行昼夜性的节律处理可以大大提高蔬果对害虫的抗性。活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 是植物体内代谢产生的一类含氧基团，在植物的生长发育、基因表达调控和生物与非生物胁迫



反应中担负着重要功能。Laia 等<sup>[56]</sup>研究表明, CCA1 和其他生物钟基因参与 ROS 反应相关基因的表达调控, CCA1 可能作为一个主要调控因子, 通过结合到 ROS 相关基因启动子上的顺式元件 (evening element), 调控它们的节律性表达。

生物钟核心组份及其调控的靶基因在非生物胁迫反应中也起了一定的作用。*prp5 prp7 prp9* 三缺失突变体植株中 ABA 合成途径关键基因的表达显著上调, 导致 ABA 含量明显高于野生型, 暗示 *PRR5/PRR7/PRR9* 可能在植物适应低温、高盐和干旱胁迫中也起到了重要作用<sup>[8,57]</sup>。Legnaioli 等<sup>[7]</sup>研究表明, ABA 可以上调 *TOC1 (PRR1)*, *TOC1* 也可以通过直接结合 *ABAR* 启动子区调控 *ABAR* 的周期性表达, 因此 *TOC1* 被认为在干旱胁迫信号途径和生物钟之间起到分子开关的作用。对 *PRR7* 靶基因的分析表明, 许多 *PRR7* 调控的靶基因同时受到 ABA 调控, 通过对 *PRR7* 基因的突变体、超表达及野生型植株对 ABA 响应的分析, 推测 *PRR7* 至少部分参与了 ABA 的时间依赖性信号转导反应<sup>[58]</sup>。另一个生物钟重要组分 *GI* 也被证实通过与 *SOS2* 相互作用进而调控盐胁迫反应。在没有胁迫的情况下, *GI/SOS2* 复合体阻止 *SOS2* 激活 *SOS1*; 盐胁迫可以诱导 *GI* 的降解, 与 *GI* 解离后的 *SOS2* 可以激活下游反应; *GI* 的上述功能也为解开胁迫和开花之间的关系提供了很好的一个线索<sup>[59]</sup>。随着 *GI* 参与诸多生理过程研究结果的发表, *GI* 有成为一个研究生物钟调控不同输出途径的新热点的趋势<sup>[60]</sup>。

除了在模式植物中证实生物钟对杂种优势和开花调控等的重要作用外<sup>[5,61]</sup>, 生物钟机理的研究在农作物上也逐步展开。目前主要是根据基因的同源性在水稻、大豆等主要作物中克隆并验证了一些生物钟相关基因的功能<sup>[62-64]</sup>。随着理论研究的深入, 生物钟将会在农业生产若干领域, 诸如杂种优势的利用、高产高效优质品种的培育、提高作物抗性、拓展作物的地域性、调控花期和提高有用器官的生物量等方面, 发挥积极的作用。

### [参 考 文 献]

- [1] Dunlap JC. Molecular bases for circadian clocks. *Cell*, 1999, 96(2): 271-90
- [2] Pruneda-Paz JL, Kay SA. An expanding universe of circadian networks in higher plants. *Trends Plant Sci*, 2010, 15(5): 259-65
- [3] Woelfle MA, Ouyang Y, Phanvijhitsiri K, et al. The adaptive value of circadian clocks: an experimental assessment in cyanobacteria. *Curr Biol*, 2004, 14(16): 1481-6
- [4] Dodd AN, Salathia AN, Hall A, et al. Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. *Science*, 2005, 309(5734): 630-3
- [5] Ni Z, Kim ED, Ha M, et al. Altered circadian rhythms regulate growth vigour in hybrids and allopolyploids. *Nature*, 2009, 457(7227): 327-31
- [6] Wang W, Barnaby JY, Tada Y, et al. Timing of plant immune responses by a central circadian regulator. *Nature*, 2011, 470(7332): 110-4
- [7] Legnaioli T, Cuevas J, Mas P. *TOC1* functions as a molecular switch connecting the circadian clock with plant responses to drought. *EMBO J*, 2009, 28(23): 3745-57
- [8] Nakamichi N, Kusano M, Fukushima A, et al. 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*, 2009, 50(3): 447-62
- [9] Goodspeed D, Chehab EW, Min-vedaitti A, et al. *Arabidopsis* synchronizes jasmonate-mediated defense with insect circadian behavior. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(12): 4674-7
- [10] Snin J, Heidrich K, Sanchez-villarrear A, et al. Time for coffee represses accumulation of the MYC2 transcription factor to provide time-of-day regulation of jasmonate signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2012, 24(6): 2470-82
- [11] Goodspeed D, Liu JD, Chehab EW, et al. Postharvest circadian entrainment enhances crop pest resistance and phytochemical cycling. *Curr Biol*, 2013, 23(13): 1235-41
- [12] Bendix C, Marshall CM, Harmon FG. Circadian clock genes universally control key agricultural traits. *Mol Plant*, 2015, 8(3): 1135-52
- [13] Zhou M, Wang W, Karapetyan S, et al. Redox rhythm reinforces the circadian clock to gate immune response. *Nature*, 2015, 523(7561): 472-6
- [14] Nagy F, Schafer E. Phytochromes control photomorphogenesis by differentially regulated, interacting signaling pathways in higher plants. *Annu Rev Plant Biol*, 2002, 53: 329-55
- [15] Quail PH. Phytochrome photosensory signalling networks. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3(2): 85-93
- [16] Lin C. Blue light receptors and signal transduction. *Plant Cell*, 2002, 14 Suppl: S207-25
- [17] Devlin PF, Kay SA. Cryptochromes are required for phytochrome signaling to the circadian clock but not for rhythmicity. *Plant Cell*, 2000, 12(12): 2499-510
- [18] Somers DE, Devlin PF, Kay SA. Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the *Arabidopsis* circadian clock. *Science*, 1998, 282(5393): 1488-90
- [19] Xu X, Hotta CT, Dodd AN, et al. Distinct light and clock modulation of cytosolic free  $Ca^{2+}$  oscillations and rhythmic *CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN2* promoter activity in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2007, 19(11): 3474-90
- [20] Gould PD, Locke JC, Larue C, et al. The molecular basis

- of temperature compensation in the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell*, 2006, 18(5): 1177-87
- [21] Kim WY, Fujiwara S, Suh SS, et al. Zeitlupe is a circadian photoreceptor stabilized by Gigantea in blue light. *Nature*, 2007, 449(7160): 356-60
- [22] Gould PD, Ugarte N, Domijan M, et al. Network balance via CRY signalling controls the *Arabidopsis* circadian clock over ambient temperatures. *Mol Syst Biol*, 2013, 9: 650
- [23] Kim JY, Song HR, Taylor BL, et al. Light-regulated translation mediates gated induction of the *Arabidopsis* clock protein LHY. *EMBO J*, 2003, 22(4): 935-44
- [24] Locke JC, Southern MM, Kozma-Bognar L, et al. Extension of a genetic network model by iterative experimentation and mathematical analysis. *Mol Syst Biol*, 2005, 1: 13
- [25] Tepperman JM, Zhu T, Chang HS, et al. Multiple transcription-factor genes are early targets of phytochrome A signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(16): 9437-42
- [26] Wang ZY, Tobin EM. Constitutive expression of the Circadian Clock Associated 1 (*CCA1*) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell*, 1998, 93(7): 1207-17
- [27] Salome PA, Mcclung CR. Pseudo-response regulator 7 and 9 are partially redundant genes essential for the temperature responsiveness of the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell*, 2005, 17(3): 791-803
- [28] Salome PA, Weigel D, Mcclung CR. The role of the *Arabidopsis* morning loop components *CCA1*, *LHY*, *PRR7*, and *PRR9* in temperature compensation. *Plant Cell*, 2010, 22(11): 3650-61
- [29] Wang X, Wu F, Xie Q, et al. Skip is a component of the spliceosome linking alternative splicing and the circadian clock in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2012, 24(8): 3278-95
- [30] James AB, Syed NH, Bordage S, et al. Alternative splicing mediates responses of the *Arabidopsis* circadian clock to temperature changes. *Plant Cell*, 2012, 24(3): 961-81
- [31] Gutierrez RA, Stokes TL, Thum K, et al. Systems approach identifies an organic nitrogen-responsive gene network that is regulated by the master clock control gene *CCA1*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(12): 4939-44
- [32] Salome PA, Oliva M, Weigel D, et al. Circadian clock adjustment to plant iron status depends on chloroplast and phytochrome function. *EMBO J*, 2013, 32(4): 511-23
- [33] Hong S, Kim SA, Guerinot ML, et al. Reciprocal interaction of the circadian clock with the iron homeostasis network in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2013, 161(2): 893-903
- [34] Chen YY, Wang Y, Shin LJ, et al. Iron is involved in maintenance of circadian period length in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2013, 161(3): 1409-20
- [35] Sanchez SE, Yanovsky MJ. Time for a change. *ELife*, 2013, 2: e00791
- [36] Xie Q, Wang P, Liu X, et al. LNK1 and LNK2 are transcriptional coactivators in the *Arabidopsis* circadian oscillator. *Plant Cell*, 2014, 26(7): 2843-57
- [37] Sugano S, Andronis C, Green RM, et al. Protein kinase CK2 interacts with and phosphorylates the *Arabidopsis* circadian clock-associated 1 protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(18): 11020-5
- [38] Sugano S, Andronis C, Ong MS, et al. The protein kinase CK2 is involved in regulation of circadian rhythms in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(22): 12362-6
- [39] Daniel X, Sugano S, Tobin EM. CK2 phosphorylation of *CCA1* is necessary for its circadian oscillator function in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(9): 3292-7
- [40] Portoles S, Mas P. The functional interplay between protein kinase CK2 and *CCA1* transcriptional activity is essential for clock temperature compensation in *Arabidopsis*. *PLoS Genet*, 2010, 6(11): e1001201
- [41] Lu SX, Liu H, Knowles SM, et al. A role for protein kinase CK2 $\alpha$  subunits in the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Physiol*, 2011, 157 (3): 1537
- [42] Wang L, Fujiwara S, Somers DE. *PRR5* regulates phosphorylation, nuclear import and subnuclear localization of *TOC1* in the *Arabidopsis* circadian clock. *EMBO J*, 2010, 29(11): 1903-15
- [43] Mas P, Kim WY, Somers DE, et al. Targeted degradation of *TOC1* by *ZTL* modulates circadian function in *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 2003, 426(6966): 567-70
- [44] Kiba T, Henriques R, Sakakibara H, et al. Targeted degradation of Pseudo-Response Regulator5 by a SCF $ZTL$  complex regulates clock function and photomorphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 2007, 19(8): 2516-30
- [45] Wang L, Kim J, Somers DE. Transcriptional corepressor TOPLESS complexes with pseudoresponse regulator proteins and histone deacetylases to regulate circadian transcription. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(2): 761-6
- [46] Jones MA, Williams BA, Mcnicol J, et al. Mutation of *Arabidopsis* spliceosomal timekeeper locus1 causes circadian clock defects. *Plant Cell*, 2012, 24(10): 4066-82
- [47] Hong S, Song HR, Lutz K, et al. Type II protein arginine methyltransferase 5 (*PRMT5*) is required for circadian period determination in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(49): 21211-6
- [48] Sanchez SE, Petrillo E, Beckwith EJ, et al. A methyl transferase links the circadian clock to the regulation of alternative splicing. *Nature*, 2010, 468(7320): 112-6
- [49] James AB, Monreal JA, Nimmo GA, et al. The circadian clock in *Arabidopsis* roots is a simplified slave version of the clock in shoots. *Science*, 2008, 322(5909): 1832-5
- [50] Eedo M, Shimizu H, Nohales MA, et al. Tissue-specific clocks in *Arabidopsis* show asymmetric coupling. *Nature*, 2014, 515(7527): 419-22
- [51] Covington MF, Maloof JN, Straume M, et al. Global transcriptome analysis reveals circadian regulation of key pathways in plant growth and development. *Genome Biol*, 2008, 9(8): R130
- [52] Covington MF, Harnes SL. The circadian clock regulates auxin signaling and responses in *Arabidopsis*. *PLoS Biol*, 2007, 5(8): e222



- [53] Johnson CH, Knight MR, Kondo T, et al. Circadian oscillations of cytosolic and chloroplastic free calcium in plants. *Science*, 1995, 269(5232): 1863-5
- [54] Zhang C, Xie Q, Anderson RG, et al. Crosstalk between the circadian clock and innate immunity in *Arabidopsis*. *PLoS Pathog*, 2013, 9(6): e1003370
- [55] Goodspeed D, Chehab EW, Covington MF, et al. Circadian control of jasmonates and salicylates: the clock role in plant defense. *Plant Signal Behav*, 2013, 8(2): e23123
- [56] Laia G, Doherty YC, Mueller-Roeber B, et al. CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED 1 regulates ROS homeostasis and oxidative stress responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(42): 17129-34
- [57] Fukushima A, Kusano M, Nakamichi N, et al. Impact of clock-associated *Arabidopsis* pseudo-response regulators in metabolic coordination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 7251-6
- [58] Liu T, Carisson J, Takeuchi T, et al. Direct regulation of abiotic responses by the *Arabidopsis* circadian clock component PRR7. *Plant J*, 2013, 76(1): 101-14
- [59] Kim WY, Ali Z, Park HJ, et al. Release of SOS2 kinase from sequestration with GIGANTEA determines salt tolerance in *Arabidopsis*. *Nat Commun*, 2013, 4: 1352
- [60] Panigrahi KCS, Mishra P. Gigantea - an emerging story. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 8
- [61] Putterill J, Laurie R, Macknight R. It's time to flower: the genetic control of flowering time. *Bioessays*, 2004, 26(4): 363-73
- [62] Marcolino-Gomes J, Rodrigues FA, Fuganti-Pagllarini R, et al. Diurnal oscillations of soybean circadian clock and drought responsive genes. *PLoS One*, 2014, 9(1): e86402
- [63] Xue ZG, Zhang XM, Lei CF, et al. Molecular cloning and functional analysis of one ZEITLUPE homolog GmZTL3 in soybean. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(2): 1411-8
- [64] Yang Y, Peng Q, Chen GX, et al. OsELF3 is involved in circadian clock regulation for promoting flowering under long-day conditions in rice. *Mol Plant*, 2013, 6(1): 202-15