

段婷婷, 杨明康, 黄可, 等. 蔓藜苜蓿生物钟基因 *MtTOC1a* 的克隆及功能验证 [J]. 华南农业大学学报, 2023, 44(5): 803-809.  
DUAN Tingting, YANG Mingkang, HUANG Ke, et al. Cloning and functional verification of circadian clock gene *MtTOC1a* in *Medicago truncatula*[J]. Journal of South China Agricultural University, 2023, 44(5): 803-809.

# 蒺藜苜蓿生物钟基因 *MtTOC1a* 的克隆及功能验证

段婷婷<sup>1✉</sup>, 杨明康<sup>1</sup>, 黄可<sup>1</sup>, 黄巍<sup>1,2✉</sup>

(1 华南农业大学 生命科学学院, 广东 广州 510642; 2 广东省农业生物蛋白质功能与调控重点实验室/  
岭南现代农业科学与技术广东省实验室, 广东 广州 510642)

**摘要:**【目的】分析蒺藜苜蓿 *Medicago truncatula* 生物钟基因 *MtTOC1a* 的蛋白结构, 探究 *MtTOC1a* 在生物钟系统中的生物学功能, 比较其与拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 的 *AtTOC1* 功能相似性和差异性。【方法】通过生物信息学分析, 在全基因组范围内鉴定了 *TOC1* 在蒺藜苜蓿中的同源基因。构建 *MtTOC1a* 基因的表达载体, 利用农杆菌介导法引入到拟南芥野生型 Col-及相应的功能丧失突变体 *toc1-2* 中, 进行遗传互补分析。【结果】*MtTOC1a* 和 *MtTOC1b* 均具有保守的功能结构域和三维结构。遗传分析表明, 在早期光形态建成中, 外源转化的 *MtTOC1a* 完全恢复了 *toc1-2* 的下胚轴伸长表型, 但对 *toc1-2* 的提前开花表型没有显著影响。在引入 *CAB::LUC* 报告基因的株系中, 外源转化 *MtTOC1a* 在连续光照下使短周期突变体 *toc1-2* 的近日节律周期延长, 但仍不能完全恢复至野生型水平。【结论】*MtTOC1a* 和拟南芥 *AtTOC1* 的功能存在相似性, 但在不同的下游调控途径中所扮演的角色存在差异。本研究结果为进一步探索 *MtTOC1a* 基因的功能, 利用 *MtTOC1a* 基因改造苜蓿的重要性状提供了理论依据。

**关键词:** 蒺藜苜蓿; 拟南芥; *MtTOC1a*; 生物钟; 生物节律; 农艺性状

中图分类号: Q78; S542

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2023)05-0803-07

## Cloning and functional verification of circadian clock gene *MtTOC1a* in *Medicago truncatula*

DUAN Tingting<sup>1✉</sup>, YANG Mingkang<sup>1</sup>, HUANG Ke<sup>1</sup>, HUANG Wei<sup>1,2✉</sup>

(1 College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2 Guangdong Provincial Key Laboratory of Protein Function and Regulation in Agricultural Organisms/ Guangdong Laboratory for Lingnan Modern Agriculture, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** 【Objective】The goal of this study is to analyze the protein structure of *Medicago truncatula* *MtTOC1a*, explore the biological function of *MtTOC1a* in the circadian clock system, and compare its similarities and differences in function with its ortholog *AtTOC1* in *Arabidopsis thaliana*. 【Method】The orthologous genes of *TOC1* in *Medicago* were identified through bioinformatics analysis, the expression vector of *MtTOC1a* gene was constructed and introduced into *Arabidopsis* wild-type Col and the corresponding loss-of-function mutant *toc1-2* by *Agrobacterium* mediated method for genetic complementation analysis. Both *MtTOC1a* and *MtTOC1b* have conserved functional domains and protein structures. The genetic analysis

收稿日期: 2022-11-01 网络首发时间: 2023-08-28 12:45:24

首发网址: <https://link.cnki.net/urlid/44.1110.S.20230825.0949.002>

作者简介: 段婷婷, 硕士研究生, 主要从事植物生物钟节律调控机制相关研究, E-mail: [t\\_tingduan@163.com](mailto:t_tingduan@163.com); 通信作者:  
黄巍, 教授, 博士, 主要从事植物生物钟节律调控机制相关研究, E-mail: [weihuang@scau.edu.cn](mailto:weihuang@scau.edu.cn)

基金项目: 广东省自然科学基金(2021A1515012148, 2019A1515012009); 岭南现代农业科学项目(NZ2021001)

indicated that during early photomorphogenesis, exogenously transformed *MtTOC1a* fully restored the hypocotyl elongation phenotype of *toc1-2*, but had no significant effect on the premature flowering phenotype of *toc1-2*. In the *CAB::LUC* reporter lines, *MtTOC1a* lengthened the period of the short period mutant *toc1-2* under continuous light conditions, yet the mutant could not fully recover to the wild-type level. 【Conclusion】 *MtTOC1a* and *AtTOC1* have similar functions, but their roles in downstream pathways are still different. The results provide a theoretical basis for further exploring the function of *MtTOC1a* gene and using *MtTOC1a* gene to modify the important traits in *Medicago*.

**Key words:** *Medicago truncatula*; *Arabidopsis thaliana*; *MtTOC1a*; Circadian clock; Circadian rhythm; Agronomic trait

植物为了适应地球自转造成的环境周期性变化,产生了近 24 h 周期的节律性自我调节机制,这种内源性的机制被称为生物钟<sup>[1]</sup>。生物钟参与调控植物几乎全部的生长发育和新陈代谢过程,包括开花时间、下胚轴伸长、激素信号转导等<sup>[2]</sup>。*CAB* 时间表达 1(Timing of *cab* expression 1, *TOC1*)也被称为伪应答调节因子(Pseudo-response regulator 1, *PRR1*)基因,是从短周期的拟南芥突变体中克隆到的第 1 个植物生物钟基因,属于 *PRR* 转录因子家族<sup>[3]</sup>。*TOC1* 的表达以近 24 h 为周期呈现节律性的振荡,在黎明时表达量最低,并在傍晚达到表达量的峰值。*TOC1* 在中央振荡器的核心回路中发挥着重要作用:在傍晚时刻,*TOC1* 通过直接结合 Circadian clock associated 1(*CCA1*) 和晚长下胚轴 1(Late elongated hypocotyl, *LHY*) 的启动子抑制二者的转录活性;而在黎明时分,*CCA1/LHY* 能够反向抑制 *TOC1* 的表达,构成了生物钟的核心反馈回路<sup>[4-6]</sup>。除此以外,*TOC1* 还能够调控绝大部分生物钟基因的表达,其中包括 *PRR9*、*PRR7*、*PRR5* 和 *GIGANTEA(GI)*,因此 *TOC1* 被认为是植物生物钟的核心基因之一<sup>[6]</sup>。

*TOC1* 被发现参与调控植物许多生理活动:例如 *TOC1* 能够抑制光敏色素抑制因子(Phytochrome-interacting factors 4, *PIF4*) 和 *PIF5* 的表达,抑制植株下胚轴过度伸长<sup>[7-8]</sup>;*TOC1* 通过抑制脱落酸相关基因(ABA-related gene, *ABAR*),调控植物 ABA 激素信号,从而影响植物的抗旱反应<sup>[9]</sup>;*TOC1* 通过促进防御化合物的合成促进植物抵抗昆虫取食<sup>[10]</sup>;*TOC1* 还能够抑制细胞分化控制 6(Cell division control 6, *CDC6*) 的表达从而影响细胞的分裂周期<sup>[11]</sup>。

蒺藜苜蓿 *Medicago truncatula* 因其具有基因组小、自花授粉、生长周期短、结实多等优点,是豆科 Leguminosae 苜蓿属 *Medicago* 的模式植物<sup>[12]</sup>。然而,蒺藜苜蓿生物钟基因的结构和功能与拟南

芥的同源基因是否存在差异,目前还鲜有报道。本研究以生物钟核心基因 *TOC1* 为切入点,鉴定蒺藜苜蓿中 *TOC1* 的同源基因 *MtTOC1a* 和 *MtTOC1b*,构建 *MtTOC1a* 的表达载体,以获得拟南芥异源转化植株并进行表型分析,旨在为 *TOC1* 基因在苜蓿植物以及其他作物中的应用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料与培养

本试验所用的蒺藜苜蓿生态型为 A17。拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 野生型为 Columbia(Col) 生态型。*TOC1* 功能丧失突变体 *toc1-2*、荧光素酶报告基因株系 *CAB::LUC* 为华南农业大学植物生物钟实验室留种。培养箱生长条件:22 °C, 12 h 光照/12 h 黑暗, 光照强度为 150  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。

### 1.2 蔴藜苜蓿 *TOC1* 基因的鉴定与结构分析

以拟南芥 *PRR* 家族基因的编码序列(Coding sequence, CDS)(<https://www.arabidopsis.org/>)为索引,使用 BioEdit 软件对蒺藜苜蓿 Mt5.0 基因组 CDS 序列(<https://medicago.toulouse.inra.fr/MtrunA17r5.0-ANR/>)做本地 Blast 分析,以 e-value 大于  $10^{-5}$  的序列为候选的 *MtPRR* 家族基因。使用 NCBI-CDD 在线网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)分析候选基因的保守结构域,并利用 MEGA11.0 软件构建拟南芥和蒺藜苜蓿 *PRR* 家族基因的系统发育树。在 Unipro 数据库(<https://www.uniprot.org/>)检索 AlphaFold 项目组所预测的 *MtTOC1* 蛋白三维结构。

### 1.3 蔴藜苜蓿 *MtTOC1a* 表达载体的构建

根据 NCBI 数据库中 *MtTOC1a* 基因的 CDS 序列,设计扩增引物 *MtTOC1a-F/R*(表 1),利用 TRIZOL 法提取蒺藜苜蓿叶片的总 RNA,反转录合成 cDNA,以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增 *MtTOC1a* 的 CDS 片段。再利用 *AtTOC1pro-F/R* 引

表 1 克隆载体的构建引物序列

Table 1 The primers used for cloning vector construction

基因 Gene	引物名称 Primer name	引物序列 (5'→3') Primer sequence
<i>MtTOC1a</i>	MtTOC1a-F	CTGATCATGGAGAGTGAAGGGTTGATTG
	MtTOC1a-R	TTGCTCACCATAGCATCCCTCGGAGAGTAATCTC
<i>AtTOC1</i>	AtTOC1pro-F	CTCGGTACCCGGGGATCCGAGATCGCTCGGCTAACAA
	AtTOC1pro-R	TTCACTCTCCATGATCAGATTAACAACAAACCCACACA

物, 以拟南芥 DNA 为模板扩增 *AtTOC1* 的启动子片段。PCR 产物经 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳后, 利用 DNA 凝胶电泳回收试剂盒对目的条带进行切胶回收, 纯化后用重组酶组装至克隆载体 pCambia1300。然后将连接产物转化进感受态 DH5 $\alpha$ , 在含有卡那霉素抗性的 LB 平板上筛选阳性菌落, 并送至北京擎科生物科技有限公司进行测序, 测序结果比对成功后, 即得到通过无缝克隆法构建的双元表达载体 *AtTOC1pro::MtTOC1a*。

#### 1.4 拟南芥的遗传转化

将重组表达载体 *AtTOC1pro::MtTOC1a* 转化至 GV3101 农杆菌中, 使用浸花法转化 Col、*toc1-2*、*CAB::LUC* 和 *CAB::LUC/toc1-2* 等植株。收获 T0 代种子后, 在含有潮霉素抗性 1/2MS 平板筛选阳性转化植株。每个基因型的转化植株至少获得 5 个独立株系, 经 PCR 鉴定后, 挑选有代表性的株系做表型试验。

#### 1.5 拟南芥下胚轴长度测量和开花时间观察

拟南芥种子经氯气消毒后均匀撒在 1/2MS 平板上, 于 4 ℃ 低温处理 3 d 后转移至植物房, 在短日照 (8 h 光照/16 h 黑暗) 22 ℃ 条件下生长。下胚轴测量: 将生长 7 d 的拟南芥幼苗铺展在平板上, 拍照后使用 ImageJ 软件测量幼苗的下胚轴长度。开花时间分析: 将生长 7 d 的拟南芥幼苗移栽到培养土中继续生长, 在植株抽薹时统计莲座叶的数量。

#### 1.6 荧光素酶活性和节律周期检测

拟南芥种子经氯气消毒后均匀撒在 1/2MS 平板上, 于 4 ℃ 低温处理 3 d 后, 转移至光照培养箱 (12 h 光照/12 h 黑暗, 22 ℃)。幼苗生长 6 d 后移入装有 170  $\mu$ L 1/2MS 培养基的 96 孔酶标板上。在酶标板的孔中添加 2.5 mmol/L 的 D-Luciferin 30  $\mu$ L, 于化学发光检测仪 (LB942S, Berthold) 中检测发光强度, 每个孔读数 2 s。植株培养条件包括 1 d 光暗交替条件, 和 6 d 持续光照条件。将持续光照下 0~96 h 测得的植株荧光强度数据导入 <https://biodare2.ed.ac.uk/> 网站中进行节律周期分析。

#### 1.7 数据统计分析

试验所得数据使用统计软件 SPSS 19.0 进行分析, 其中下胚轴长度数据  $n \geq 30$ , 莲座叶数量数据  $n \geq 15$ , 生物发光数据  $n \geq 16$ , 样品之间差异采用单因素方差分析和 LSD 多重比较方法进行统计检验, 数据用平均值±标准差表示。

### 2 结果与分析

#### 2.1 蕨藜苜蓿 *MtTOC1* 基因的鉴定

利用拟南芥 *AtTOC1* 基因的 CDS, 对蕨藜苜蓿全基因组进行 Blast 比对。鉴定结果显示, 蕨藜苜蓿中有 8 个 PRR 家族的基因, 其中最接近 *AtTOC1* 的同源基因有 2 个, 分别命名为 *MtTOC1a*(MtrunA17Chr3g0091641) 和 *MtTOC1b*(MtrunA17Chr4g0061021), 其与 *AtTOC1* 的序列相似性分别为 79% 和 77%。系统发育树分析表明, 在 PRR 基因家族中, *MtTOC1a*、*MtTOC1b* 和 *AtTOC1*(也称为 *AtPRRI*) 聚集成一枝; 同时 *MtTOC1a*、*MtTOC1b* 和 *AtTOC1* 都具有典型的 PRR 结构域和 CCT 结构域(图 1)。利用 UNIPROT 数据库检索 AlphaFold 所预测的蛋白结构, 分析发现 *MtTOC1a*、*MtTOC1b* 和 *AtTOC1* 蛋白具有相似的三维结构。如图 2 所示, 可以看到 CCT 结构域折叠成两条  $\alpha$  融合, 并形成一个剪刀状的结构; 而 PR 结构域则由若干  $\alpha$  融合和  $\beta$  折叠共同形成一个保守的桶状结构。以上结果说明 *TOC1* 作为生物钟的核心基因, 在植物演化过程中受到了选择压力, 从而使不同物种中的 *TOC1* 蛋白序列高度保守。

#### 2.2 *MtTOC1a* 基因的克隆和表达载体构建

由于 *MtTOC1a* 与拟南芥 *AtTOC1* 的序列相似性最高, 本研究选择对 *MtTOC1a* 基因进行功能验证。根据 *MtTOC1a* 基因的 CDS 序列, 设计一对引物 *MtTOC1a-F/R*, 以蕨藜苜蓿 A17 生态型的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后得到略小于 2 000 bp 的条带, 和 1 758

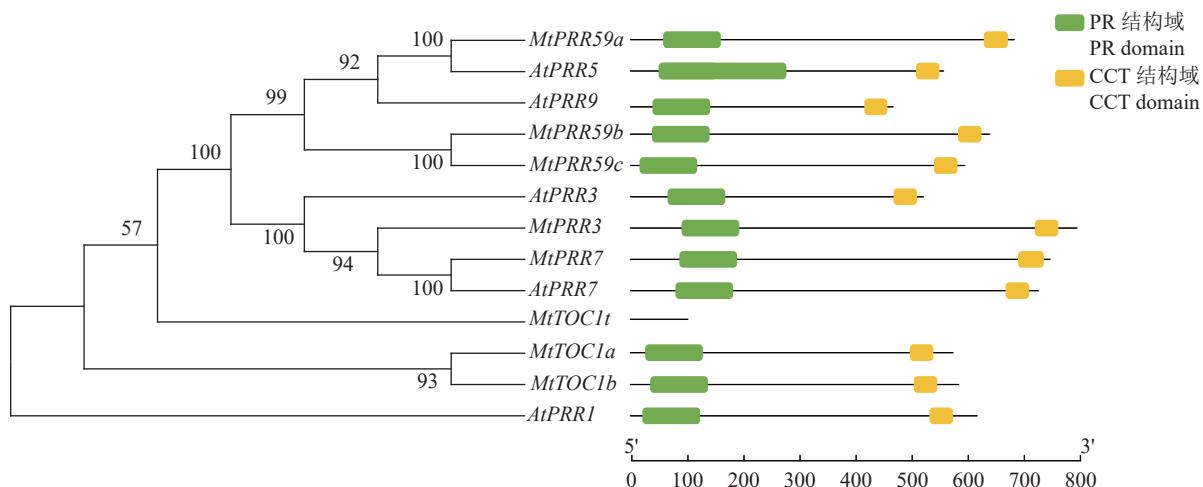
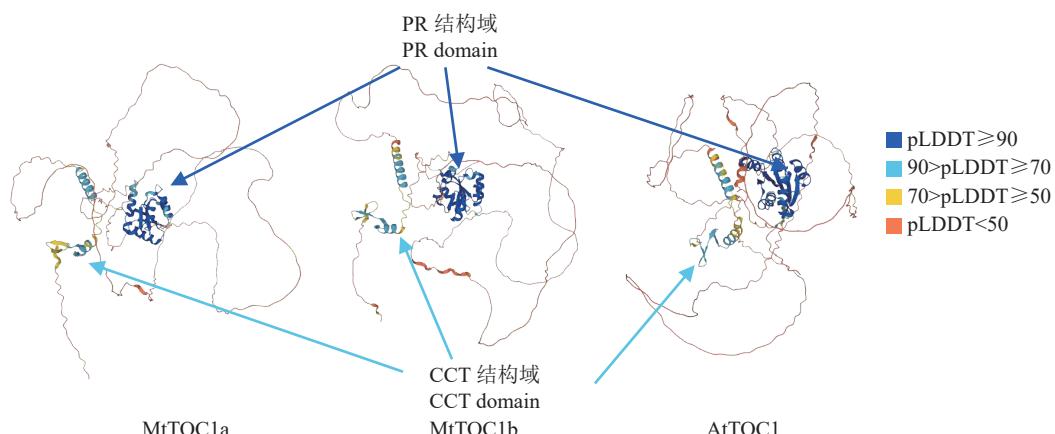


图 1 菜豆苜蓿和拟南芥 PRR 家族基因的系统发育树分析和保守结构域预测

Fig. 1 Phylogenetic tree analysis and domain prediction of PRR family genes in *Arabidopsis thaliana* and *Medicago truncatula*



PR 结构域与置信得分 (pLDDT)  $\geq 90$  的深蓝色区域重合, 呈多股  $\alpha$  融合和  $\beta$  折叠构成的桶状结构; CCT 结构域与  $90 > \text{pLDDT} \geq 50$  的浅蓝色/黄色区域重合, 由两条  $\alpha$  融合构成类似剪刀状的结构

The PR domain overlaps with the dark blue region with a confidence score of (pLDDT)  $\geq 90$ , showing a barrel-like structure composed of multiple strands of  $\alpha$  helices and  $\beta$  folds; The CCT domain overlaps with the light blue/yellow region with  $90 > \text{pLDDT} \geq 50$ , forming a scissor-like structure with two  $\alpha$  helices

图 2 AlphaFold 项目所预测的 MtTOC1a、MtTOC1b 和 AtTOC1 的蛋白三维结构

Fig. 2 3D protein structures of MtTOC1a, MtTOC1b and AtTOC1 predicted by the AlphaFold project

bp 的 *MtTOC1a* 编码序列长度基本符合, 初步认为成功获得目的基因片段 (图 3B)。将 *MtTOC1a* 基因片段和拟南芥 *AtTOC1* 的启动子、NOS 终止子连接, 使用无缝克隆方法组装到 pCambia1300 表达载体上, 构建得到 *AtTOC1pro::MtTOC1a* 双元表达载体 (图 3A、3C)。

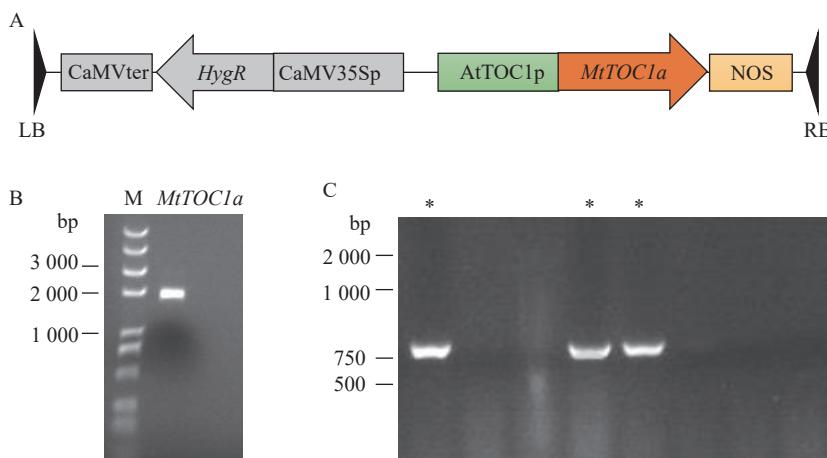
### 2.3 *MtTOC1a* 恢复拟南芥 *toc1-2* 突变体的表型

将 *AtTOC1pro::MtTOC1a* 载体分别转化到拟南芥野生型 Col 和 *toc1-2* 突变体中, 筛选获得 *MtTOC1a* 植株和 *MtTOC1a/toc1-2* 互补植株。对上述植株的表型进行分析发现, 在短日照条件下, *toc1-2* 突变体的下胚轴长度比野生型更长, 但转基因植株 *MtTOC1a*、*MtTOC1a/toc1-2* 的下胚轴长度和野生型相比没有显著差异 (图 4A、5A)。该结果

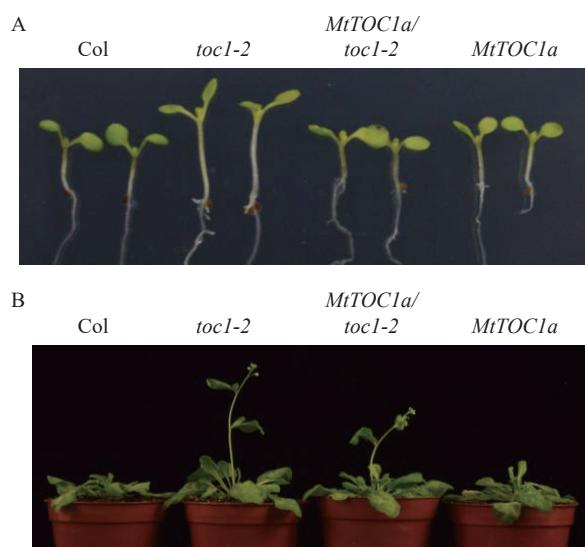
说明 *MtTOC1a* 的功能与 *AtTOC1* 相似, *MtTOC1a* 能够挽救 *toc1-2* 突变体的下胚轴过度伸长表型。开花时间也是生物钟所调控的重要性状, 在短日照生长条件下, 拟南芥 *toc1-2* 突变体的开花时间与野生型相比提前。但值得注意的是 *MtTOC1a/toc1-2* 植株的开花时间仍然与 *toc1-2* 突变体相似, 没有恢复到野生型的水平。另外 *MtTOC1a* 植株的开花时间和野生型接近, 也没有表现出明显的开花时间调控效应 (图 4B、5B)。该结果说明 *MtTOC1a* 和 *AtTOC1* 的功能仍存在差异性, 在拟南芥中 *MtTOC1a* 对开花时间的影响较小。

### 2.4 *MtTOC1a* 基因部分恢复拟南芥 *toc1-2* 的节律周期

*CAB::LUC* 荧光素酶报告基因能够反映植株的

A: *MtTOC1a* 互补表达载体的 T-DNA 区域示意图; B: 首蓿 *MtTOC1a* 基因的克隆; C: *MtTOC1a* 载体的菌落 PCR 结果, “\*”表示阳性菌落

A: Schematic diagram of the T-DNA region of *MtTOC1a* expression vector; B: Cloning of *MtTOC1a* gene in *Medicago*; C: Colony PCR results of *MtTOC1a* expression vector, “\*” indicates positive colony

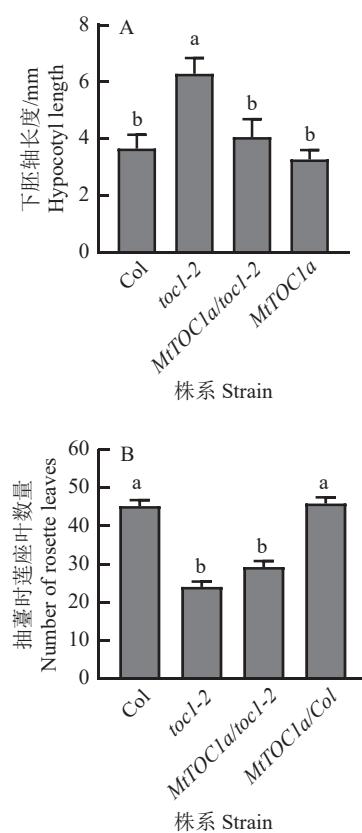
图 3 *MtTOC1a* 表达载体的构建Fig. 3 Construction of *MtTOC1a* expression vector

A: 苗龄 7 d 的下胚轴长度表型; B: 在短日照条件下的开花时间表型

A: The hypocotyl length phenotypes of 7-day-old seedlings; B: The flowering time phenotypes under short-day conditions

图 4 *MtTOC1a* 相关转基因植株表型Fig. 4 Phenotypes of transgenic plants with *MtTOC1a*

近日节律周期, 将 *AtTOC1pro::MtTOC1a* 转基因植株与 *CAB::LUC* 和 *CAB::LUC/toc1-2* 植株杂交, 分离后获得 *MtTOC1a/CAB::LUC* 和 *MtTOC1a/toc1-2/CAB::LUC* 报告株系。在持续光照条件下检测报告基因的发光强度, 研究发现 *toc1-2* 突变体和野生型相比近日周期缩短了大约 3.0 h; *MtTOC1a/toc1-2* 异源互补植株的近日周期比 *toc1-2* 突变体延长了约 1.6 h, 但没有完全恢复至野生型水平; 而 *MtTOC1a* 植株和野生型相比近日周期也轻微延长了约 0.4 h(图 6A)。虽然 4 种植株的周期存在差异, 但它们的相对振幅误差均较小, 说明 *TOC1* 基因不会影响拟南芥植株的节律稳健性(图 6B)。综上所

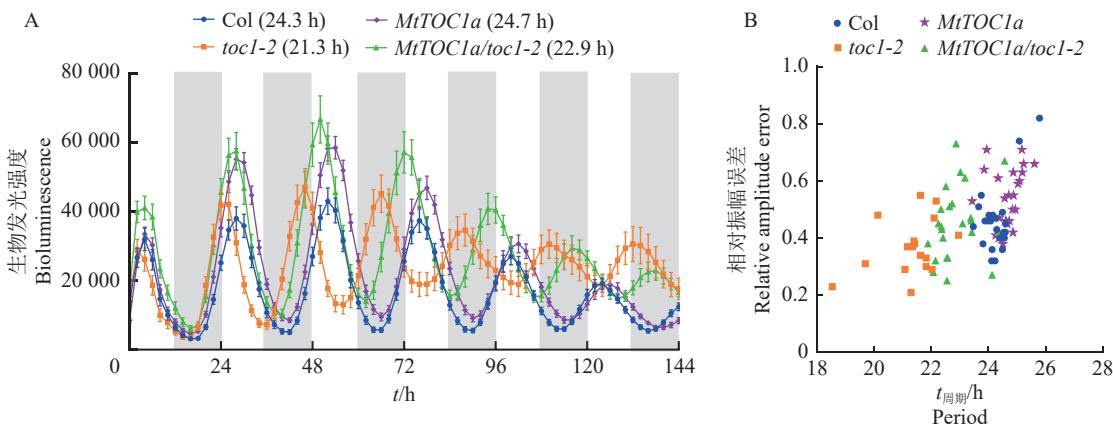


A: 苗龄 7 d 的下胚轴长度,  $n \geq 30$ ; B: 在短日照条件下植株抽薹时莲座叶的数量,  $n \geq 15$ ; 柱子上方的不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ , LSD 法)

A: The hypocotyl lengths of 7-day-old seedlings,  $n \geq 30$ ; B: The number of rosette leaves during bolting of plants under short-day conditions,  $n \geq 15$ ; Different lowercase letters on bars indicate significant differences ( $P < 0.05$ , LSD test)

图 5 *MtTOC1a* 相关转基因植株的表型量化分析Fig. 5 Quantification analysis of the phenotypes of transgenic plants with *MtTOC1a*

述, 本研究结果表明蒺藜苜蓿 *MtTOC1a* 能够部分弥补拟南芥 *AtTOC1* 基因在生物钟节律调控上的功能。



A: 持续光照条件下的 *MtTOC1a* 相关转基因拟南芥植株生物发光节律,  $n \geq 16$ , 图中所有植株均带有 *CAB::LUC* 荧光素酶报告基因, 括号内表示相应植株的近日节律周期, 浅灰色表示主观黑夜; B: A 图中植株的近日节律周期和相对振幅误差的量化, 相对振幅误差数值越小表示植株的节律性越强

A: The bioluminescence rhythm of transgenic *Arabidopsis* plants with *MtTOC1a* under continuous light condition,  $n \geq 16$ , all plants in the figure carried a *CAB::LUC* reporter gene, the daily rhythm cycle of corresponding plants was indicated in parentheses, light gray represents subjective night; B: Quantification of the circadian rhythm period and relative amplitude error of plants in A, and the smaller the relative amplitude error value, the stronger the rhythmicity of the plant

图 6 *MtTOC1a* 相关转基因植株的近日节律周期分析

Fig. 6 Circadian rhythm analysis of transgenic plants with *MtTOC1a*

### 3 讨论与结论

在拟南芥中, 包括 *TOC1* 在内的 *PRR* 家族基因都参与生物钟节律的调控<sup>[13]</sup>。本研究在蒺藜苜蓿中一共鉴定到 8 个 *PRR* 家族的同源基因, 除了因提前终止而截短的 *MtTOC1t* 以外, 其他 *PRR* 基因都具有 2 个典型的保守结构域, 即 N 末端的 PR 结构域和 C 末端的 CCT 结构域。和其他 *PRR* 家族成员不同的是, *TOC1* 的 PR 结构域和 CCT 结构域之间的 IR(Intermediate region) 区域不存在转录抑制基序, 这可能是 *TOC1* 的功能独立于其他 *PPR* 基因的原因之一<sup>[14]</sup>。目前对 *PRR* 基因的三维结构研究还很少, 本研究通过对三维结构的预测发现, *TOC1* 的 CCT 结构域倾向于形成剪刀状结构, PR 结构域倾向于形成桶状结构, 而其他非保守区主要由无规卷曲所构成。*TOC1* 是植物特有的转录因子, CCT 结构与 DNA 分子结合, PR 结构域具有转录调节活性<sup>[14]</sup>, 这些结构域的细微差异可能与不同物种中 *TOC1* 功能的特异性有关。

*TOC1* 的功能在不同植物中既存在保守性也存在特异性。*TOC1* 是起源最古老的生物钟核心基因之一, 在藻类、苔藓植物、被子植物中都能够找到 *TOC1* 的同源基因<sup>[15]</sup>。即使在较原始的植物金牛鸵球藻 *Ostreococcus tauri* 中, *OtTOC1* 仍然对近日节律有明显调控作用, 说明 *TOC1* 的生物钟功能在植物界中是高度保守的<sup>[14]</sup>。然而, 不同植物的 *TOC1* 的功能也存在特殊性, 例如拟南芥的 *TOC1* 突变体具有抗旱性增强表型, 然而在烟草中敲低 *TOC1* 的

表达量则导致植株对干旱更加敏感<sup>[9, 16]</sup>。本研究通过将蒺藜苜蓿 *MtTOC1a* 异源转化拟南芥 *toc1-2* 突变体, 直接比较了 *MtTOC1a* 和 *AtTOC1* 功能的差异, 结果发现 *MtTOC1a* 能够完全恢复 *toc1-2* 的下胚轴伸长表型, 但却对开花时间没有影响, 另外, 对近日节律周期分析发现 *MtTOC1a* 仅能够部分弥补 *AtTOC1* 的功能。蒺藜苜蓿中除了 *MtTOC1a* 以外, 还存在另一个 *TOC1* 的同源基因 *MtTOC1b*, *MtTOC1b* 可能对 *MtTOC1a* 的功能有补充和增强的作用。该结果说明, *MtTOC1a* 和 *AtTOC1* 在植物演化过程中出现了一定程度的功能分化, 不能简单地将拟南芥的研究成果套用到蒺藜苜蓿研究当中。

生物钟基因调控植物众多农艺性状, 例如植株分蘖数、开花时间、抗逆性等<sup>[17]</sup>。最近研究发现, 生物钟对苜蓿的生长发育十分重要, *MtLHY* 能够促进苜蓿根系与根瘤菌的互作, 增加根瘤的数量, 从而使植株生物量提高<sup>[18]</sup>。生物钟夜间复合体基因 *MtLUX* 直接抑制转录因子 *MtTB1*, 调控苜蓿的分枝和株形, 同时对开花时间、根瘤也有重要调控作用<sup>[19-20]</sup>。苜蓿和拟南芥相比, 具有共生固氮等豆科植物特有的性状, 这可能是苜蓿生物钟基因拷贝数增加, 功能出现更多分化的原因。*TOC1* 能够直接抑制 *LHY* 和 *LUX* 的表达<sup>[6]</sup>, 由此推测 *MtTOC1* 可能通过 *MtLHY* 和 *MtLUX* 来间接影响根瘤共生、分枝数等性状。因此, 探究 *MtTOC1* 在苜蓿农艺性状的调控中扮演的角色, 是今后研究中需要重点关注的问题。

## 参考文献:

- [1] HARMER S L. The circadian system in higher plants[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2009, 60: 357-377.
- [2] XU X, YUAN L, YANG X, et al. Circadian clock in plants: Linking timing to fitness[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2022, 64(4): 792-811.
- [3] MILLAR A J, CARRÉ I A, STRAYER C A, et al. Circadian clock mutants in *Arabidopsis* identified by luciferase imaging[J]. *Science*, 1995, 267(5201): 1161-1163.
- [4] 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.
- [5] GENDRON J M, PRUNEDA-PAZ J L, DOHERTY C J, et al. *Arabidopsis* circadian clock protein, TOC1, is a DNA-binding transcription factor[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(8): 3167-3172.
- [6] HUANG W, PÉREZ-GARCÍA P, POKHILKO A, et al. Mapping the core of the *Arabidopsis* circadian clock defines the network structure of the oscillator[J]. *Science*, 2012, 336(6077): 75-79.
- [7] LI N, ZHANG Y, HE Y, et al. Pseudo response regulators regulate photoperiodic hypocotyl growth by repressing *PIF4/5* transcription[J]. *Plant Physiology*, 2020, 183(2): 686-699.
- [8] DING Z, DOYLE M R, AMASINO R M, et al. A complex genetic interaction between *Arabidopsis thaliana* *TOC1* and *CCA1/LHY* in driving the circadian clock and in output regulation[J]. *Genetics*, 2007, 176(3): 1501-1510.
- [9] LEGNAIOLI T, CUEVAS J, MAS P. TOC1 functions as a molecular switch connecting the circadian clock with plant responses to drought[J]. *The EMBO Journal*, 2009, 28(23): 3745-3757.
- [10] VALIM H, DALTON H, JOO Y, et al. *TOC1* in *Nicotiana attenuata* regulates efficient allocation of nitrogen to defense metabolites under herbivory stress[J]. *New Phytologist*, 2020, 228(4): 1227-1242.
- [11] FUNG-UCEDA J, LEE K, SEO P J, et al. The circadian clock sets the time of DNA replication licensing to regulate growth in *Arabidopsis*[J]. *Developmental Cell*, 2018, 45(1): 101-113.
- [12] PECRIX Y, STATON S E, SALLET E, et al. Whole-genome landscape of *Medicago truncatula* symbiotic genes[J]. *Nature Plants*, 2018, 4(12): 1017-1025.
- [13] FARRÉ E M, LIU T. The PRR family of transcriptional regulators reflects the complexity and evolution of plant circadian clocks[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2013, 16(5): 621-629.
- [14] CORELLOU F, SCHWARTZ C, MOTTA J P, et al. Clocks in the green lineage: Comparative functional analysis of the circadian architecture of the *Picoplankton* *ostreococcus*[J]. *The Plant Cell*, 2009, 21(11): 3436-3449.
- [15] PETERSEN J, RREDHI A, SZYTENHOLM J, et al. Evolution of circadian clocks along the green lineage[J]. *Plant Physiology*, 2022, 190(2): 924-937.
- [16] VALIM H F, MCGALE E, YON F, et al. The clock gene *TOC1* in shoots, not roots, determines fitness of *Nicotiana attenuata* under drought[J]. *Plant Physiology*, 2019, 181(1): 305-318.
- [17] BENDIX C, MARSHALL C M, HARMON F G. Circadian clock genes universally control key agricultural traits[J]. *Molecular Plant*, 2015, 8(8): 1135-1152.
- [18] KONG Y, HAN L, LIU X, et al. The nodulation and nyctinastic leaf movement is orchestrated by clock gene *LHY* in *Medicago truncatula*[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2020, 62(12): 1880-1895.
- [19] WANG L, ZHOU A, WANG L, et al. Core clock component MtLUX controls shoot architecture through repression of *MtTB1/MtTCP1A* in *Medicago truncatula*[J]. *The Crop Journal*, 2023, 11(3): 723-732.
- [20] KONG Y, ZHANG Y, LIU X, et al. The conserved and specific roles of the *LUX ARRHYTHMO* in circadian clock and nodulation[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(7): 3473.

【责任编辑 庄 延】