

段婷婷, 杨明康, 黄可, 等. 蒺藜苜蓿生物钟基因 *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¹, 杨明康¹, 黄可¹, 黄巍^{1,2}

(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 Tingting¹, YANG Mingkang¹, HUANG Ke¹, HUANG Wei^{1,2}

(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; 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

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^[1]。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^[2]。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^[3]。*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^[4-6]。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^[6]。

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^[7-8]; *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^[9]; *TOC1* 通过促进防御化合物的合成促进植物抵抗昆虫取食^[10]; *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^[11]。

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^[12]。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 ℃, 12 h 光照/12 h 黑暗,光照强度为 150 μmol·m⁻²·s⁻¹。

1.2 蒺藜苜蓿 *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 蒺藜苜蓿 *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	CTGATCATGGAGAGTGAAGGGTTTGATTG
	MtTOC1a-R	TTGCTCACCATAGCATCCCTCGGAGAGTAATCTC
<i>AtTOC1</i>	AtTOC1pro-F	CTCGGTACCCGGGGATCCGAGATCGCTCGGCTCAACAA
	AtTOC1pro-R	TTCACCTCTCCATGATCAGATTAACAACATAACCCACACA

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 α ,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 板低温处理 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 μ 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 μ 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 \pm 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 蒺藜苜蓿 *MtTOC1* 基因的鉴定

利用拟南芥 *AtTOC1* 基因的 CDS,对蒺藜苜蓿全基因组进行 Blast 比对。鉴定结果显示,蒺藜苜蓿中有 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 *AtPRR1*) 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 α 螺旋,并形成剪刀状的结构;而 *PR* 结构域则由若干 α 螺旋和 β 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,以蒺藜苜蓿 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

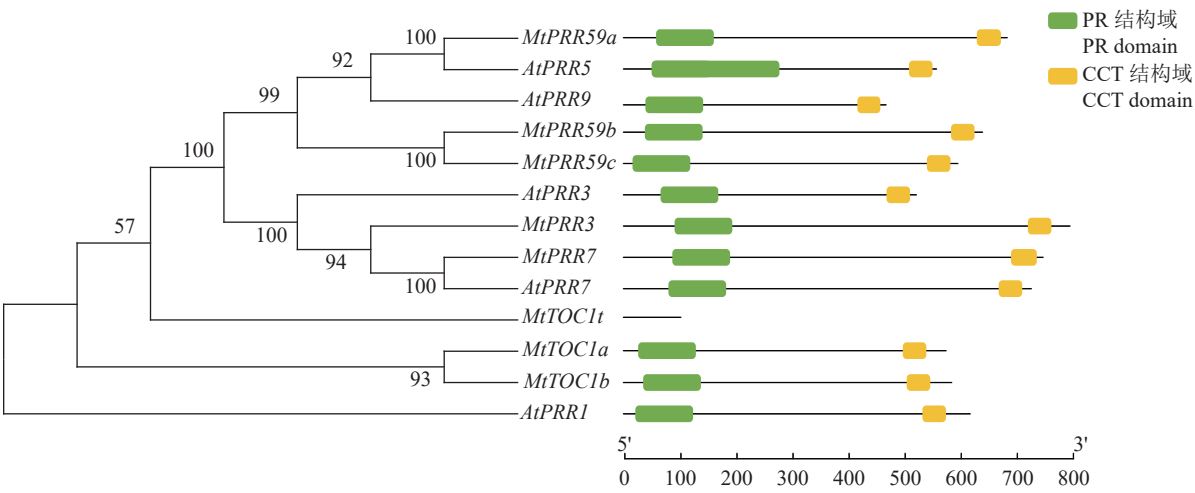
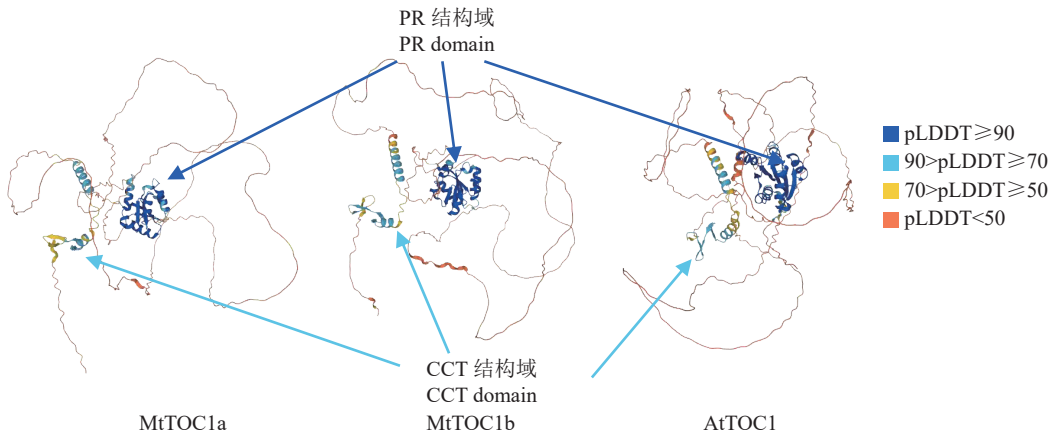


图 1 蒺藜苜蓿和拟南芥 PRR 家族基因的系统发育树分析和保守结构域预测

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) ≥ 90 的深蓝色区域重合, 呈多股 α 螺旋和 β 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 α 螺旋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) ≥ 90 , showing a barrel-like structure composed of multiple strands of α helices and β folds; The CCT domain overlaps with the light blue/yellow region with $90 > \text{pLDDT} \geq 50$, forming a scissor-like structure with two α 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

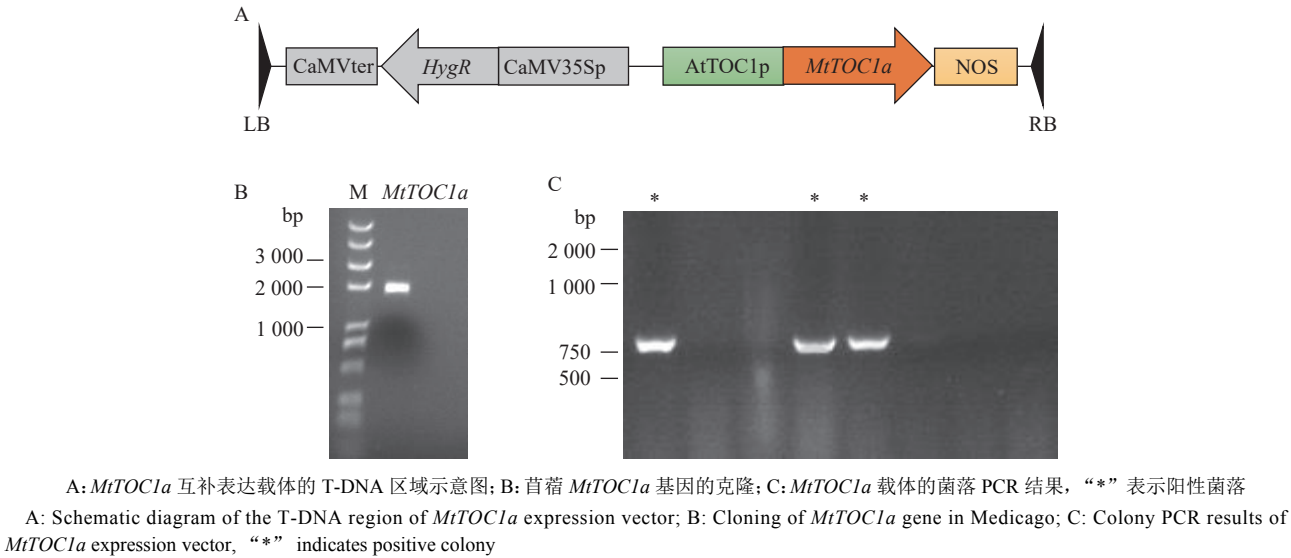
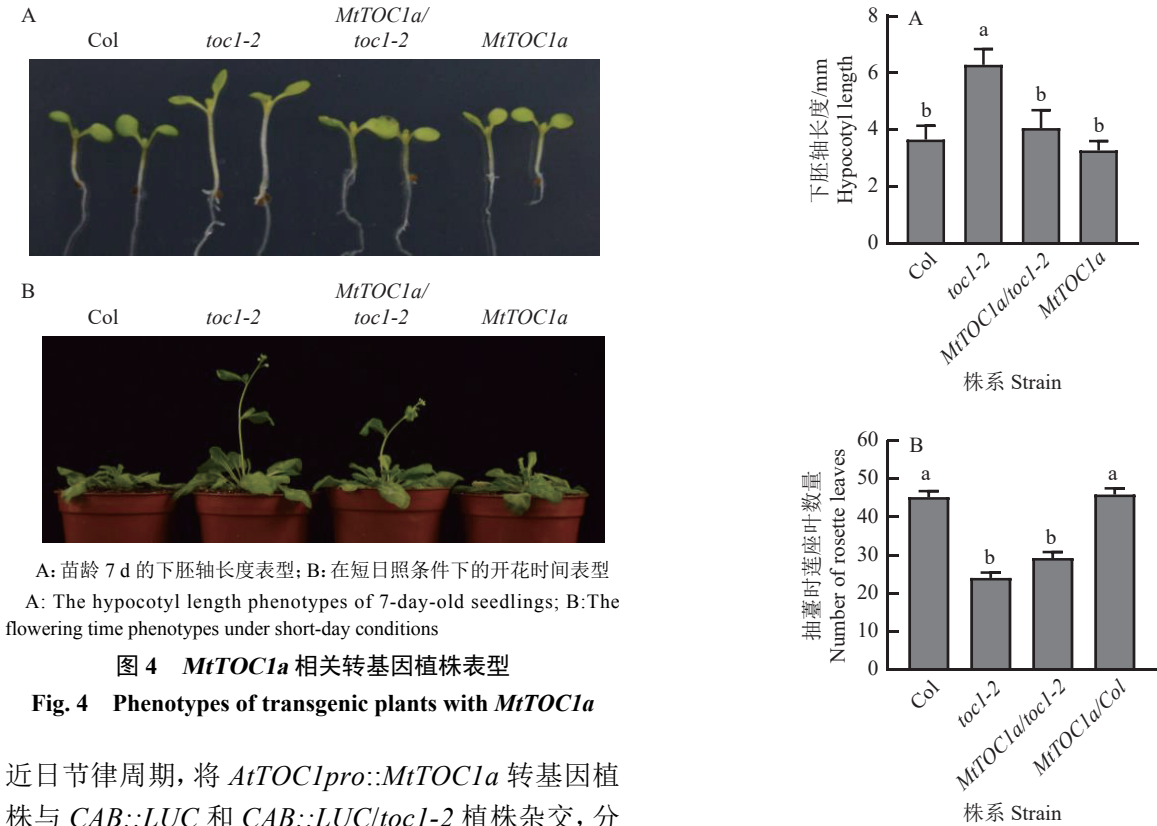


图 3 *MtTOC1a* 表达载体的构建

Fig. 3 Construction of *MtTOC1a* expression vector



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)。综上所述

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。

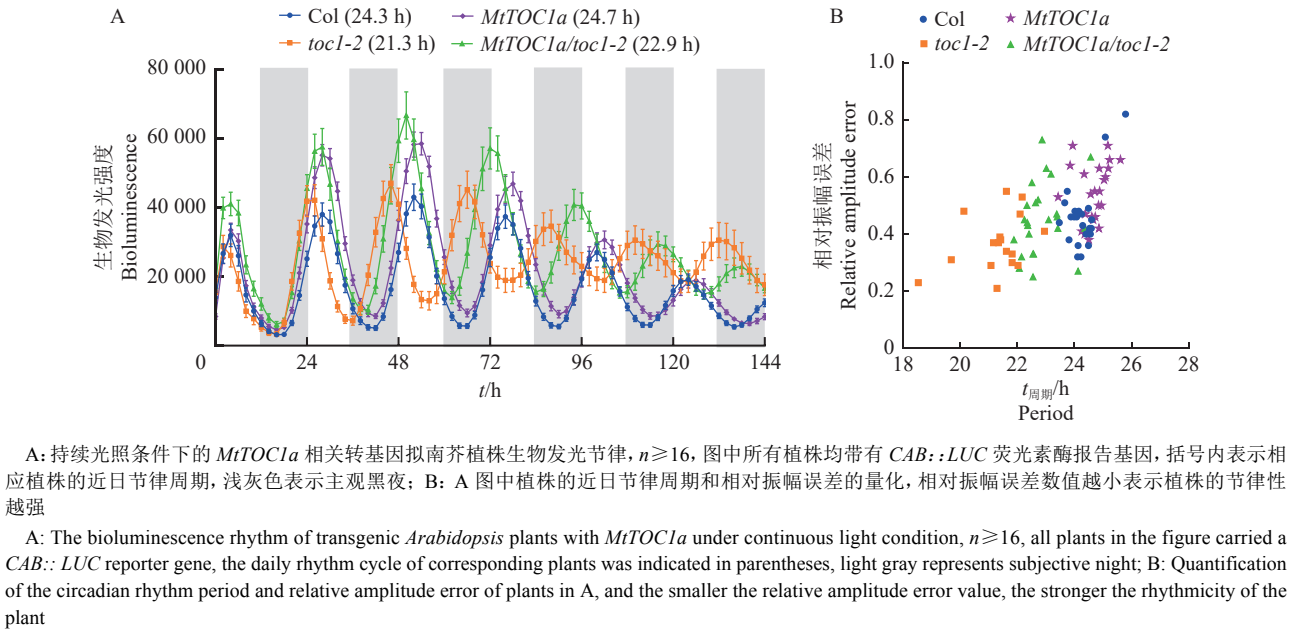


图 6 *MtTOC1a* 相关转基因植株的近日节律周期分析
Fig. 6 Circadian rhythm analysis of transgenic plants with *MtTOC1a*

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^[13]。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 *PRR* 基因的原因之一^[14]。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^[14], 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^[15]。即使在较原始的植物金牛蛇球藻 *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^[14]。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^[9, 16]。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^[17]。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^[18]。生物钟夜间复合体基因 *MtLUX* 直接抑制转录因子 *MtTBI*, 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^[19-20]。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^[6], 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 *Picoeukaryote* *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】