

粗山羊草 CCT 基因家族进化及节律表达分析

李晓华¹, 丁明亮², 乔玲³, 李刘军¹, 杨堤贻¹, 赵佳佳³, 曹勇³, 郑军^{1,3}, 杨三维³

(¹ 山西大学生物工程学院, 太原 030006; ² 云南省农业科学院粮食作物研究所/

国家小麦改良中心云南分中心, 昆明 650205; ³ 山西省农业科学院小麦研究所, 临汾 041000)

摘要: CCT 家族基因广泛参与植物花期的调控过程, 粗山羊草 (*Aegilops tauschii* Coss.) 作为小麦 D 基因组供体, 给小麦带来新的花期及适应性相关基因。研究粗山羊草 CCT 家族基因不仅可为小麦进化、驯化和演变规律提供参考, 还有助于认识粗山羊草作为杂草的生态适应性。粗山羊草基因组中 26 个 CCT 基因进化分析后发现 GroupA、GroupC、GroupH 和 GroupG 中的 13 个 *AetCCT* 成员出现了快速进化; GroupA 中有 42.1% 的位点存在正选择效应, 表明快速进化提高了粗山羊草的适应性。基因结构分析表明 CCT 结构域在 *AetCCT* 家族中保守性很高, 但不同基因内含子和外显子的排布差异较大, 特异 Motif 可能是不同亚家族基因间功能差异的重要原因。 *AetCCT4*、*AetCCT7*、*AetCCT8*、*AetCCT11*、*AetCCT12*、*AetCCT16*、*AetCCT17*、*AetCCT19*、*AetCCT21* 和 *AetCCT22* 的表达具有明显的“生物钟效应”, 呈现出 24 h 的节律性表达, 且基本都处于快速进化的 GroupA、GroupC、GroupH 和 GroupI。研究结果表明, 这些成员可能参与花期调控等生长发育过程, 在粗山羊草的适应性形成过程中发挥了作用。

关键词: 粗山羊草; CCT 基因家族; 正选择效应; 生物钟效应

Evolution and Rhythm Expression Research on CCT Family Genes of *Aegilops tauschii* Coss.

LI Xiao-hua¹, DING Ming-liang², QIAO Ling³, LI Liu-jun¹, YANG Ti-yi¹,

ZHAO Jia-jia³, CAO Yong³, ZHENG Jun^{1,3}, YANG San-wei³

(¹ College of Bioengineering, Shanxi University, Taiyuan 030006; ² The Institute of Food Crops, Yunnan Academy of Agriculture Sciences/Yunnan Branch Center, National Wheat Improvement Center, Kunming 650205;

³ Institute of Wheat Research, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Linfen 041000)

Abstract: CCT gene family widely participates in the regulation process of flowering of plants. As D genome donor of hexaploid wheat, *Aegilops tauschii* Coss. provides new flowering genes related to adaptability to wheat, which make it adapt to different geographical and ecological environment. Research on CCT gene family of *Ae. tauschii* Coss. may provide a reference for exploring the wheat's evolution, domestication and also help to understand the ecological adaptability of *Ae. tauschii* Coss. The *AetCCT* were divided into ten subgroups based on phylogenetic analysis in this research. Phylogenetic analysis showed that 13 *AetCCT* members in Group A, Group C, Group H and Group G achieved rapid evolution. After normal selection effect of some branches, rapid evolution improved the adaptability of *Ae. tauschii* Coss. The conserved motifs analysis suggested that *AetCCT* genes in the same group might have similar function, the specific motif of different members among families and within family was likely to be the important reason for the different functional differences among different subfamily genes. The expression of *AetCCT4*, *AetCCT7*, *AetCCT8*, *AetCCT11*, *AetCCT12*, *AetCCT16*, *AetCCT17*, *AetCCT19*, *AetCCT21* and *AetCCT22* had obvious biological clock effect, with the 24 h rhythm expression and most of them was divided in Group A, Group C, Group H and

收稿日期: 2017-02-12 修回日期: 2017-03-15 网络出版日期: 2017-10-17

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20171017.1424.028.html>

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(31601307); 山西省自然科学基金(2016011001); 山西省农科院育种工程项目(17yzgc010)

第一作者研究方向为小麦基因资源挖掘与利用。E-mail: lixiaohualff@163.com; 丁明亮为同等贡献作者

通信作者: 郑军, 研究方向为小麦遗传育种。E-mail: sxnkyzj@126.com

杨三维, 研究方向为小麦遗传与栽培。E-mail: ysvsv@163.com

Group I which achieved rapid evolution. So it was speculated that these members were involved in regulating the growth and development events as flowering.

Key words: *Aegilops tauschii* Coss.; CCT gene family; positive selection; biological clock effect

CCT 家族基因编码蛋白的 C 端核定位序列常由 43~45 个保守氨基酸残基组成,该基因家族在裸子和被子植物中广泛存在,多数成员在花期的调控过程中行使重要功能^[1]。模式植物拟南芥和水稻中 CCT 家族基因研究最为深入,拟南芥中 *CO*、*TOC1*、*COL1*、*COL2*、*COL3* 等成员参与花期调控的遗传机制已基本清楚^[1-3];水稻中 *Hd1*、*Ghd7*、*OsCO3*、*OsCOL4*、*DTH2* 和 *Ehd4* 也已经被克隆^[4-6]。S. Griffiths 等^[7]于 2003 年首次对拟南芥、水稻和大麦中分离出的 *CO* 基因进行了较为全面的分析,并根据基因结构、氨基酸的同源程度,将 *CO* 进行了分类。J. Cockram 等^[8]于 2012 年通过整合拟南芥、水稻、高粱和大麦的最新测序信息对 CCT 家族基因进行了重新统计,将其分为 COL (CONSTANS-like)、PRR (Pseudo response regulators)、CMF (CCT MOTIF) 和 zCCT (Encoding ZINC-FINGER/CONSTANS, CONSTANS-LIKE, TOC1 domain transcription factors) 4 个亚族。大量研究发现 CCT 家族基因不仅参与开花途径的调控,还影响植物产量、繁殖和适应性等诸多相关性状,如水稻 *Ghd7* 属于 CMF 亚族,在长日照条件下抑制开花,同时突变体的株高和单株产量明显提高;玉米中 *Ghd7* 通过 CACTA 转座子顺式元件的甲基化程度来调控玉米对光照的敏感度,从而影响玉米驯化后的传播^[9-10]。小麦中克隆到的 CCT 家族基因主要有:控制小麦春化特性的 *VRN* 基因和光周期 *Ppd* 基因^[11]。大部分小麦品种需经过春化,在长日照下抽穗开花,小麦对低温的反应由位于 5A、5B 和 5D 染色体上的 *Vrn* 基因共同作用所决定,其中作用最强的 2 个基因分别命名为 *Vrn1* 和 *Vrn2*^[12]。光周期基因包括 *Ppd-A1*、*Ppd-B1* 和 *Ppd-D1*,位于小麦第 2 部分同源群染色体上,通过 *Ppd* 基因的调控从长日照敏感型过渡到迟钝型,极大地拓展了小麦的适应范围;3 个光周期基因中 *Ppd-D1* 和 *Ppd-B1* 的作用较强,均能加速短日照条件下幼穗分化,但 *Ppd-B1* 对光作用较为迟钝^[12]。进一步研究表明,由于存在 3 个选择剪接位点,导致 *PpdB1* 具有 8 个不同形式的转录产物,其中 4 种形式的转录本提前终止或表达量很低,从而进行不同的光周期响应^[13]。此外,潘衍有^[14]通过研究转基因小麦降低 *TaTOC1* 的表达量后发现无论在长日照还是短日照条件下小麦抽穗均提

前 5~7 d。因此,对作物 CCT 家族基因深入研究,有助于探索物种进化、驯化和演变的规律,可以在更深层次上了解重要农艺性状的形成以及互作网络。

粗山羊草 (*Aegilops tauschii* Coss.) 又称节节麦,是异源六倍体普通小麦 (AABBDD) 的 D 基因组供体。大约在 8000 年前,野生二粒小麦 (AABB) 与粗山羊草 (*Aegilops tauschii* Coss., DD) 杂交形成六倍体小麦。D 基因组的加入使小麦的适应性与品质大大改良,使小麦成为世界上种植区域最广的粮食作物^[15]。此外,粗山羊草作为杂草与小麦激烈竞争光、肥、水等资源,造成小麦减产甚至绝收。目前生产上缺乏成熟有效的防除措施,导致粗山羊草害在很多国家的麦田严重发生,危害程度越来越重并呈迅速蔓延之势^[16]。深入研究粗山羊草适应性和光周期的遗传演化规律有利于有效控制其危害,阻断其传播途径,遏制其扩散蔓延势头。目前,水稻、拟南芥和大麦 CCT 家族成员的组成已基本清楚,但小麦 CCT 家族成员的作用和功能目前研究较少。课题组从粗山羊草基因组测序数据分离了 26 个 CCT 家族基因,分析了家族成员的染色体位置、基因和启动子序列特征,发现不同成员的表达受外源激素、光照和春化作用的影响^[17]。在前期研究的基础上,本文对该家族成员进行了基因结构、系统进化、选择效应和节律性表达的研究,可为小麦 CCT 基因家族的深入研究与利用提供有价值的信息,也有利于认识节节麦扩散蔓延的机制和原因。

1 材料与方法

1.1 功能域分析和系统发生分析

采用 MEME 工具 (<http://meme.nbcr.net/>) 扫描 CCT 保守功能域,相关参数设置为:功能域长度范围 10~300 个氨基酸残基,功能域最大发现数目 4 个,其他参数为默认值。在获得粗山羊草 CCT 基因序列的基础上,根据文献[8]、[17]进行 CCT 家族分类;选取拟南芥、水稻和小麦等物种 CCT 蛋白序列构建系统树,ClustalW 序列比对,使用 MEGA 构建系统发育树,参数设置:NJ 法构树,bootstrap 值 1000,使用 JTT model。

1.2 *AetCCT* 进化速率分析和正选择检测

PAML 软件包中的程序实现了许多检测正选择的密码子置换模型。使用 PAML 软件通过树枝模型

法分析系统发育树中每个 Group 的进化速率 (branch model), 位点模型允许各密码子拥有不同的 ω 值 (氨基酸多态性位点变量), 似然比测验用于比较零模型和备择模型。零模型要求所有位点的 ω 都小于 1, 而备择模型则允许 ω 大于 1 的位点存在; 当 LRT 结果表明存在正选择的时候, 可以用 BEB (Bayes Empirical Bayes) 方法计算每个位点在选择模型 M1a 和 M2a 下分别受纯化选择、中性选择和正选择 3 类选择影响的后验概率; 最后利用 Branch-site model 检测正选择位点。

1.3 AetCCT 节律表达分析

粗山羊草 Y2282 为小麦 D 基因组测序的品种, 由中国农业科学院作物科学研究所小麦基因资源课题组馈赠, 种子出苗经春化处理, 每晚 20:00 至次日 4:00 为暗处理 8 h, 其余时间为光照处理 16 h, 于拔节期取样, 自凌晨 00:00 起开始取样, 每 3 h 1 次, 旗叶取自 3 个不同单株, 连取 48 h。

1.4 RNA 提取及实时荧光定量表达分析

将旗叶剪碎后, 液氮速冻, -80°C 保存。RNA

提取和 cDNA 的制备参考文献 [17]。不同组织样品 RNA 提取后, 采用核酸测定仪检测浓度, 取等量 RNA 样品混合进行反转录。Realtime-PCR 按照 Takara SYBR Premix Ex Taq 使用说明进行操作, 在 ABI7300 Realtime PCR 仪上运行并设置 3 个实验重复, 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (*GAPDH*) 作为内参, 按照 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算目标基因的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 AetCCT 系统进化分析

选取近缘植物 CCT 蛋白进行系统发育树的构建, 从中可以看出 CCT 家族从 A 至 J 分成 10 个 Groups (图 1)。总体上看, 相关 AeCCT 家族成员在进化树的各分支中均有分布, 而且基因家族进化树的进化关系同物种进化树一致。AetCCT 与小麦 CCT 亲缘关系最近, 其次为乌拉尔图小麦、水稻和拟南芥。处于物种间同一进化分枝的基因往往互为同源基因, 或者具有相似的生理学功能, 如 Group A 所在分枝中 AT3G07650 为长日照调控的生物钟基

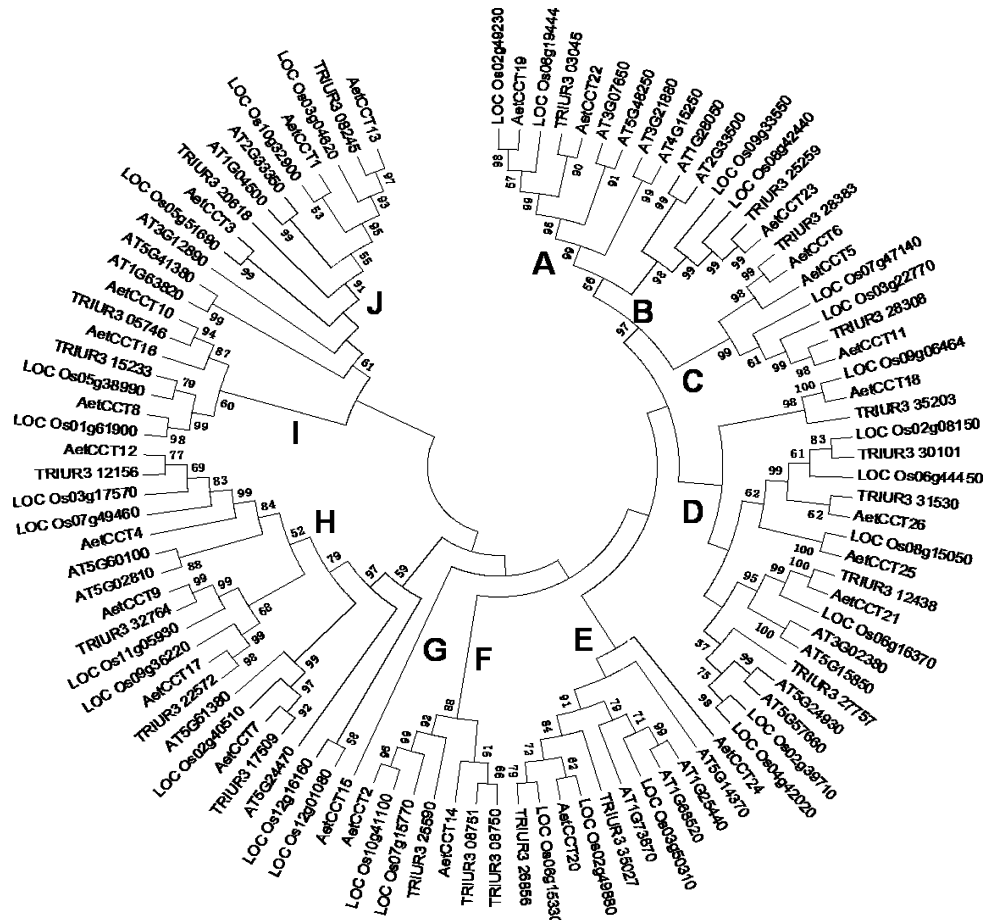


图 1 CCT 蛋白的系统发生

Fig. 1 Phylogenesis of CCT proteins

因,通过降低 *CO* 和 *FT* 表达在长日照条件下延迟开花^[18]; *OsDTH2* (*Os02g49230*) 作为 *AT3G07650* 的同源基因也为长日照特异开花因子,该基因对短光照不敏感,在长光照条件下可延迟水稻抽穗 7.4 d 左右^[19]。

CCT 家族基因在水稻和拟南芥中研究较为深入,部分成员功能已研究清楚,为 *AetCCT* 的功能分析提供了参考。GroupD 分枝中 *Os09g06464* (*OsCO3*) 作为一个开花抑制因子,负向调控 *Hd3a* 和 *FTL* 表达,在短日照条件下调节开花时间^[20]。 *Hd1* (*Os06g16370*) 通过 26S 蛋白酶体介导的通路,在短日照条件下促进抽穗,长日照条件下延迟抽穗; *Os02g39710* 的同源基因 *AT2G24790* 可控制拟南芥侧根分化^[4,21]。在 GroupE 分枝中只有拟南芥 *AT1G73870* 与根伸长和避阴反应有关的报道^[22]; GroupF 分枝中 *Ghd7* (*Os07g15770*),长日照条件下增强表达能推迟抽穗、增加株高和穗粒数,功能减弱的自然突变体能够种植到温带甚至更冷的地区,在水稻产量潜力和适应性方面有非常重要的作用^[9]。 GroupI 分枝中, *Os01g61900* 通过抑制 *Ehd1*、*Hd3a* 以及 *RFT1* 的表达延迟水稻抽穗^[23]。 *Os05g51690* 是 GroupJ 分枝成员,可通过可变剪切,产生 5' 端相同的两种转录本 *NRRa* 和 *NRRb*,除参与花期调控外,在水稻根生长的过程中扮演着负向调节的作用,影响营养元素的吸收和淀粉合成相关基因的表达^[24]。这些已知功能的 CCT 基因成员,可以为同一 Group 的 *AetCCT* 功

能研究提供有用的参考信息。

此外,由于物种进化可能引起基因功能分化,导致同一进化分枝不同种属的基因在基因功能和调控方式上存在差异,如 GroupH 为 PRR 家族,该亚族成员普遍参与植物光周期调控,其中 *Os07g49460* 为 *DTH7* 基因,长日照条件下抑制成花素基因 *Hd3a* 和 *RFT1*,正向调控因子 *Ehd1* 的表达延迟开花^[25];而同组中拟南芥的同源基因 *AT5G02810* 则是温敏型生物钟基因,与 *CCA1* 和 *LHY* 互作^[26]。这些研究结果暗示部分 *AetCCT* 在物种分化和进化的过程中可能存在功能分化的现象。

2.2 *AetCCT* 蛋白的结构分化分析

在进化树的 10 个 Groups 中,GroupA、GroupC 和 GroupD 属于 COL gene family。 GroupB、GroupE、GroupF、GroupG、GroupI 和 GroupJ 属于 CMF family, GroupH 为 PRR family,成员最多,有 *AetCCT4*、*AetCCT7*、*AetCCT9*、*AetCCT12* 和 *AetCCT17*; GroupB 和 GroupG 最少,只含有一个成员。根据进化关系进化树可分为两大进化枝,上部的进化枝包含了 COL gene family 的 GroupA、GroupC、GroupD 以及 CMF gene family 的 GroupB、GroupE、GroupF 和 GroupG,该部分经历了较多的分化,因此各枝的 bootstrap 值较高。保守 motif 分析结果见图 2,表明 CCT domain 在 *AetCCT* 家族基因中保守性很高,但不同基因内含子和外显子的排布差异较大,即使是同一 Group 中的

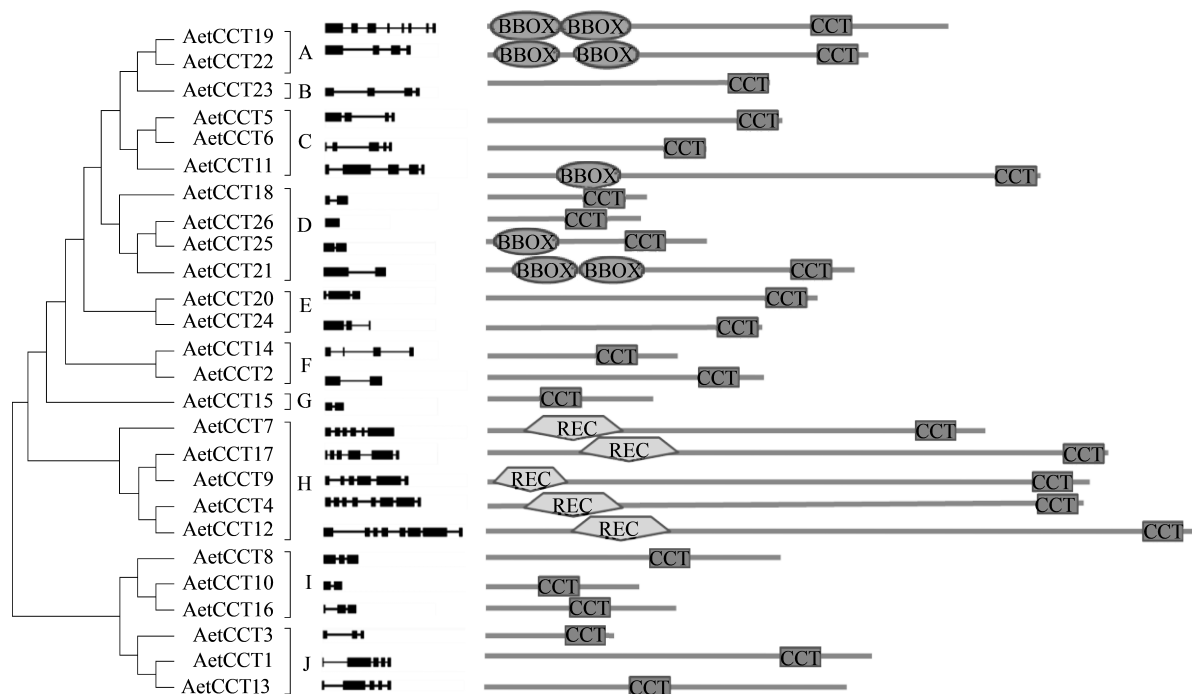


图 2 *AetCCT* 的基因结构

Fig. 2 Intron-exon structures of CCT genes in *Ae. tauschii*

基因内含子和外显子的排布也有较大差异。相同 Group 中的 *AetCCT* 基因 motif 分布相似, Group 间的 motif 分布具有较大的差异。此外,有些 Group 成员的功能结构域在物种间发生变化,如 GroupB 中,其水稻同源基因 *Os08g42440* 含有 BBOX 结构域,在 *AetCCT23* 和 *AetCCT5* 中却发生丢失现象。可见相同 Group 中 *AetCCT* 基因往往具有相似的功能, Group 内和不同 Group 成员所具有的特异 motif 是不同亚家族基因间功能差异的重要原因。

2.3 *AetCCT* 进化速率分析

为进一步分析粗山羊草中不同分枝间是否存在不同的进化机制,本研究使用 PAML 软件采用树枝模型法分析了每个分枝的进化速率(表 1)。*AetCCT* 基因在物种形成过程中不同分枝的进化速率差异较大,其中 GroupB、GroupD、GroupE、GroupF 和 GroupJ 的进化速率很低,而 GroupA、GroupC、GroupH 和 GroupI 出现了快速进化,各分枝的 ω 值(氨基酸多态性位点变量)分别为 0.471、0.246、0.71194 和

表 1 *AetCCT* 不同分枝成员的进化速率分析

Table 1 Evolutionary rate analysis of *AetCCT*

模型	-lnL	参数估计	似然比检验
Model		Estimated parameters	LRT statistic
单比率	-4541.21	$\omega 0 = 0.20$	
One-ratio			
多比率	-4531.14	$\omega 0 = 0.170 (\omega J = \omega 0),$ $\omega A = 0.471, \omega B = 0.007,$ $\omega C = 0.246, \omega D = 0.00852,$ $\omega E = 0.00814, \omega F = 0.00766,$ $\omega H = 0.71194, \omega I = 0.35719,$ $\omega J = 0.09898$	20.14 *
Nine-ratio			

* $P < 0.05$, 似然比检验值由 2 次似然模型计算数据比较所得
* $P < 0.05$, the statistical values of LRT were calculated from twice the log-likelihood difference between the two models

表 2 GroupA 正选择检测

Table 2 Positive selection detection of GroupA

模型	-lnL	参数估计	似然比检验	正选择位点
Model		Estimated parameters	LRT statistic	Positive sites
M1a(中性)	-5751.08	$p0 = 0.435$		不被允许
M1a(Neutral)		$p1 = 0.201 (p2 + p3 = 0.364)$ $\omega 0 = 0.181, \omega 1 = \omega 2 = 1$		
M2a(选择)	-5749.25	$p0 = 0.399$	3.66 *	43I,44W,
M2a(Selective)		$p1 = 0.180 (p2 + p3 = 0.421)$ $\omega 0 = 0.184, \omega 2 = 76.579$		74S, 100S

* 选择 $P < 0.05$ (5% 临界值 2.71) 进行模型分析,表中列出数据为 BEB 分析后. $P > 0.95$ 的正选择位点列出,其中 $P > 0.99$ 的正选择位点用粗体标出, p 为 LRT 值
* The $P < 0.05$ (critical value was 2.71) was choosed for model analysis. The listed date with Bayes Empirical Bayes (BEB) analysis $P > 0.95$, the positive selection sites of $P > 0.99$ were highlighted in bold, p is equal to LRT value

0.35719。值得注意的是这些 Group 的成员在 CCT 家族中进化速率快,表明相关成员与禾本科植物的广泛适应性有关。GroupH 为 PRR 家族,在物种形成过程中该亚族已成为禾本科物种响应光周期的重要因子,对物种广适性至关重要。此外,GroupI 中 *Os01g61900* 报道可能与水稻适应性有关,过表达可使植株在短日照条件下推迟 14 d 开花,而长日照条件下则推迟 25 d 开花,而拟南芥同源基因 *AT5G41380* 目前尚无明确的功能报道^[23]。因此,推测粗山羊的广适性与相关成员快速进化有关,通过周期敏感性基因的改变适应不同的环境。

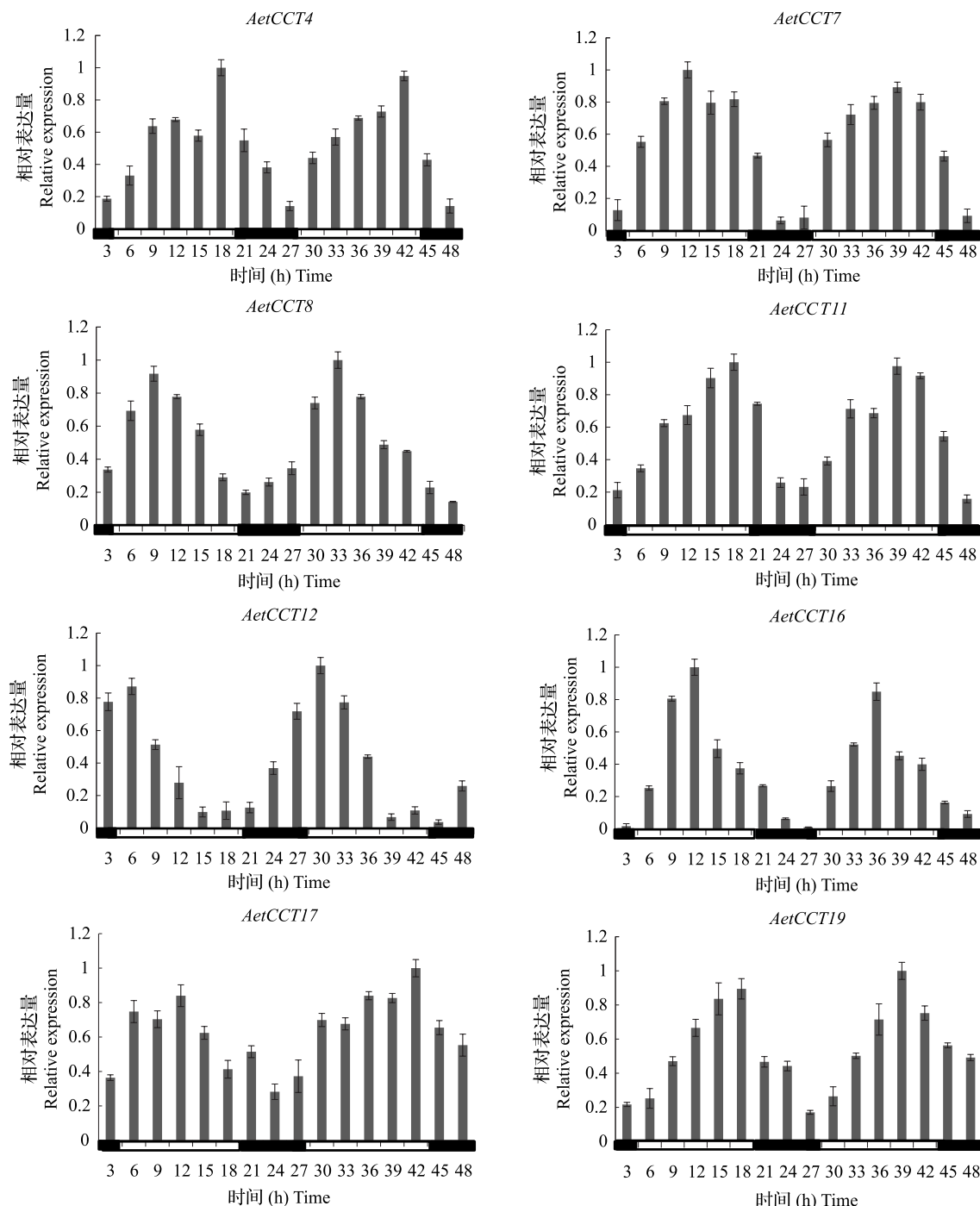
2.4 *AetCCT* 正选择检验

分化后的物种为了适应新的环境,往往需要改变特定蛋白的结构和功能以满足新需要,这就导致有利突变的正选择将会发生并稳定遗传。*AetCCT* 中 GroupA 和 GroupB 进化距离较近,由相同祖先进化而来,但是 GroupA ($\omega A = 0.471$) 和 GroupB ($\omega B = 0.007$) 分化后出现了不同的进化速率。为检测 GroupA 是否在分化后出现正选择,使用 PAML 中的 Branch-site model 检测 GroupA 是否存在正选择位点。从表 2 的结果看,GroupA 中有 42.1% 的位点存在正选择 ($\omega = 76.579$),其中 4 个位点的后验概率 $P > 0.95$, GroupA 可见部分位点经历了正选择,可能促进了序列间的分化。GroupA 所在分枝中 *AT3G07650* 为长日照调控的生物钟基因; *OsDTH2* (*Os02g49230*) 作为 *AT3G07650* 的同源基因也为长日照特异开花因子,且变异位点在驯化过程中受到强烈正选择作用^[18-19]。因此,GroupA 分枝的 *AetCCT* 基因具有正选择现象,可能的原因是基因分化导致新功能的产生,或是丢失了原来的功能致使纯化选择作用发生松弛。

2.5 *AetCCT* 节律表达模式

植物中 60% 左右的基因通过生物钟基因调控参与光周期反应,生物钟效应是 CCT 家族的重要特征^[3]。检测该家族基因表达后发现,*AetCCT4*、*AetCCT7*、*AetCCT8*、*AetCCT11*、*AetCCT12*、*AetCCT16*、*AetCCT17*、*AetCCT19*、*AetCCT21* 和 *AetCCT22* 这 10 个成

员基因表达量具有明显的“生物钟效应”,呈现出 24 h 的节律性表达(图 3),说明这些成员可感知外界光周期变化信号参与生长发育的调控。除 *AetCCT12* 和 *AetCCT22* 外,其余 8 个成员基本上是光照条件下表达,*AetCCT4*、*AetCCT11*、*AetCCT17*、*AetCCT19* 和 *AetCCT21* 随着光照时间表达量持续增高,进入黑暗



图中白色和黑色方框分别代表光照和黑暗时间段

The white and black bars represent the light and dark periods, respectively

图 3 粗山羊草 CCT 家族基因 48 h 表达状况

Fig. 3 Expression patterns of CCT domain genes during 48 h

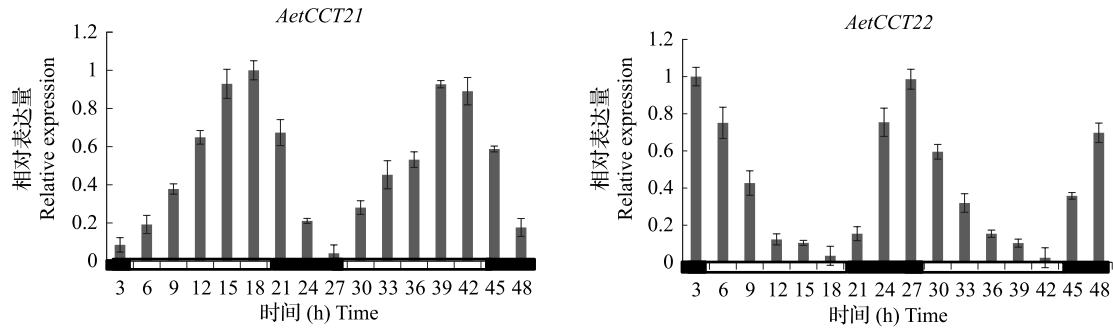


图 3(续)

Fig. 3 (Continued)

条件后表达量逐渐下降,而 *AetCCT7*、*AetCCT8* 和 *AetCCT16* 在某一时刻达到表达高峰,随后表达量降低进入暗反应阶段。*AetCCT12* 和 *AetCCT22* 则是在黑暗条件下表达,*AetCCT22* 光照前表达量最高,在光照条件下表达受到抑制;而 *AetCCT12* 则是黑暗条件下表达,光照 3 h 左右最高,此后表达量逐渐降低。值得注意的是,10 个具有“生物钟效应”的成员中,9 个处于在粗山羊草中快速进化的分枝上,*AetCCT19*和 *AetCCT22* 属于 GroupA, *AetCCT4*、*AetCCT7*、*AetCCT12* 和 *AetCCT17* 属于 GroupH, *AetCCT8* 和 *AetCCT16* 属于 GroupI,实验结果进一步证明 GroupA、GroupC、GroupH 和 GroupI 在粗山羊草的适应性形成过程中发挥了作用。

3 讨论

现已发现,植物体内约有 60% 的基因受到生物钟的调控,拟南芥中对生物钟基因的研究较为深入,相继鉴定了一些生物钟关键基因,比如 *TIMEING OF CAB EXPRESSION*、*ZEITLUPE*、*TEJ*、*TIME FOR COFFEE*、*LUXARRHYTHMO* 和 *FIONA1* 等^[1-3]。通过筛选能够影响由生物钟控制植物生物进程的突变体,比如开花时间、下胚轴伸长等,相继发现了 *EARLY FLOWERING3*、*EARLY FLOWERING4*、*GIGANTEA* 和 *LATE ELONGATED* 等基因,使得拟南芥相关调控机制更加清楚^[21]。可见,深入研究 *AetCCT* 生物钟效应对于认识粗山羊草适应性机制意义重大。已有研究表明,不同 CCT 结构域基因从清晨到午夜依次循序表达,共同影响生物钟的运行,如拟南芥中 *PRR9* 在早上起作用,*PRR7* 从早上到午夜都处在活跃状态,*PRR5* 从中午到午夜发挥功能^[27]。本研究共检测到 10 个成员基因表达具有明显的“生物钟效应”,呈现出 24 h 的节律性表达。其中 *AetCCT12* 和 *AetCCT22* 为夜间表达,剩余成员主要在光照条件

下表达,*AetCCT4*、*AetCCT11*、*AetCCT19* 和 *AetCCT21* 在黑暗前表达量最高,说明这些 *AetCCT* 基因受到生物钟的影响,推测这些基因在粗山羊草生物钟的运行机制中发挥了重要作用。光周期基因的功能还受到翻译后修饰的影响,如 *CCA1* 被 *CASEIN KINASE2* 磷酸化是其行使功能所必需的;*ZTL* 是一个典型的时钟相关调控因子,相关蛋白必须在翻译后修饰才能与 *TOC1* 产生作用,从而提高后者的磷酸化水平和核定位能力^[28-29]。因此,其余未发现昼夜表达节律的成员是否为时钟蛋白仍需后续实验研究。

M. Groussin 等^[30]通过研究太古菌发现在进化过程中,有些基因的进化速率是逐渐增快的,这些基因的加速进化促进了太古菌对地球环境温度逐渐降低的适应,并明确指出了基因家族的快速进化可以提高物种的适应性。C. Li 等^[31]对双子叶和单子叶植物的 11S 球蛋白基因进行了进化历程分析后发现,黄瓜、杨树、水稻、拟南芥等双子叶植物在进化过程中检测到了明显的正选择,单子叶植物内的进化中却没有检测到正选择。这种规律在植物中是否存在普遍性,目前尚无定论。粗山羊草在全球适生区主要分布于北纬 30°~45°之间,西亚、中东、欧洲东南部和非洲北部地中海沿岸是粗山羊草在全球的主要适生区。研究发现粗山羊草在形态学和生态学方面表现出了广泛的适应性,变异中心分布在里海南岸地带,从干旱的蒿属荒漠,到里海南岸的雨湿温带森林均有分布,适生范围不断扩大^[32]。中国黄河流域的杂草型粗山羊草来自伊朗或邻近地区,分属于不同生态区的陕西和河南的杂草型粗山羊草已发生了明显的遗传分化^[16]。造成这种现象的原因可能是:自然选择提高了粗山羊草对不同地域的适应能力。CCT 基因作为植物适应环境的主要调控因子,相关成员必然受到选择作用,而差异选择往往为物种进化和适应性提供了分子基础。*AetCCT* 基因

GroupA、GroupC、GroupH 和 GroupI 出现了快速进化的现象,可能由于植物要适应不同地域的光照周期,正选择保留了较多的有利变异导致。小麦及其祖先种原产于西亚“新月沃”地带。在大约 8000 ~ 10000 年前,小麦的四倍体种(AABB)与粗山羊草(DD)通过天然杂交,生成了六倍体小麦(AABBDD),此后才发展成为全世界最主要的粮食作物,D 基因组的加入提高了小麦的适应性,对小麦发展成为世界第一大粮食作物起了关键的作用^[15]。因此,对粗山羊草 CCT 基因家族进化进行分析,也有助于探索小麦进化、驯化和演变的规律。

参考文献

- [1] Putterill J, Robson F, Lee K, et al. The *CONSTANS* gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors [J]. *Cell*, 1995, 80 (6): 847-857
- [2] Wu F, Price B W, Haider W, et al. Functional and evolutionary characterization of the *CONSTANS* gene family in short-day photoperiodic flowering in soybean [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (1): e85754
- [3] Harmon F, Imaizumi T, Gray W M. *CUL1* regulates *TOC1* protein stability in the *Arabidopsis* circadian clock [J]. *Plant J*, 2008, 55 (4): 568-579
- [4] Doi K, Izawa T, Fuse T, et al. *Ehd1*, a B-type response regulator in rice, confers short-day promotion of flowering and controls *FT-like* gene expression independently of *Hd1* [J]. *Genes Dev*, 2004, 18 (8): 926-936
- [5] Saito H, Ogiso-Tanaka E, Okumoto Y, et al. *E7* encodes an ELF3-like protein and promotes rice flowering by negatively regulating the floral repressor gene *Ghd7* under both short- and long-day conditions [J]. *Plant Cell Physiol*, 2012, 53 (4): 717-728
- [6] Kim S K, Park H Y, Jang Y H, et al. The sequence variation responsible for the functional difference between the *CONSTANS* protein, and the *CONSTANS-like* (COL)1 and COL2 proteins, resides mostly in the region encoded by their first exons [J]. *Plant Sci*, 2013, 199-200 (2): 71-78
- [7] Griffiths S, Dunford R P, Coupland G, et al. The evolution of *CONSTANS-like* gene families in barley, rice, and *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2003, 131 (4): 1855-1867
- [8] Cockram J, Thiel T, Steuernagel B, et al. Genome dynamics explain the evolution of flowering time CCT domain gene families in the Poaceae [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (9): e45307
- [9] Xue W Y, Xing Y Z, Weng X Y, et al. Natural variation in *Ghd7* is an important regulator of heading date and yield potential in rice [J]. *Nat Genet*, 2008, 40 (6): 761-767
- [10] Yang Q, Li Z, Li W Q, et al. CACTA-like transposable element in *ZmCCT* attenuated photoperiod sensitivity and accelerated the postdomestication spread of maize [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110 (42): 16969-16974
- [11] Xiao J, Xu S, Li C, et al. O-GlcNAc-mediated interaction between VER2 and TaGRP2 elicits TaVRN1 mRNA accumulation during vernalization in winter wheat [J]. *Nat Commun*, 2014, 5 (8): 4572-4578
- [12] Nguyen A T, Iehisa J C, Mizuno N, et al. Differential contribution of two *Ppd-1* homoeoalleles to early-flowering phenotype in Nepalese and Japanese varieties of common wheat [J]. *Breed Sci*, 2013, 63 (4): 374-383
- [13] Guo Z A, Song Y M, Zhou R H, et al. Discovery, evaluation and distribution of haplotypes of the wheat *Ppd-D1* gene [J]. *New Phytol*, 2010, 185 (4): 841-851
- [14] 潘衍有. 小麦 *TaTOC1-A*、*TaTOC1-B* 和 *TaTOC1-D* 基因的遗传转化和功能分析 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2011
- [15] Jia J Z, Zhao S C, Kong X Y, et al. *Aegilops tauschii* draft genome sequence reveals a gene repertoire for wheat adaptation [J]. *Nature*, 2013, 496 (7443): 91-95
- [16] 苏亚蕊, 张大乐, 徐守明, 等. 粗山羊草居群间遗传分化及多样性的 SSR 分析 [J]. *生态学报*, 2010, 30 (4): 969-975
- [17] 郑军, 乔玲, 赵佳佳, 等. 粗山羊草 CCT 家族基因序列分析及激素响应 [J]. *植物学报*, 2017, 52 (2): 43-53
- [18] Khanna R, Kronmiller B, Maszle D R, et al. The *Arabidopsis* B-Box zinc finger family [J]. *Plant Cell*, 2009, 21 (11): 3416-3420
- [19] Wu W X, Zheng X M, Lu G W, et al. Association of functional nucleotide polymorphisms at DTH2 with the northward expansion of rice cultivation in Asia [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110 (8): 2775-2780
- [20] Kim S K, Yun C H, Lee J H, et al. *OsCO3*, a *CONSTANS-LIKE* gene, controls flowering by negatively regulating the expression of *FT-like* genes under SD conditions in rice [J]. *Planta*, 2008, 228 (2): 355-365
- [21] Gangappa S N, Botto J F. The BBX family of plant transcription factors [J]. *Trends Plant Sci*, 2014, 19 (7): 460-470
- [22] Wang H, Zhang Z, Li H, et al. *CONSTANS-LIKE 7* regulates branching and shade avoidance response in *Arabidopsis* [J]. *J Exp Bot*, 2013, 64 (4): 1017-1024
- [23] Zhang L, Li Q P, Dong H J, et al. Three CCT domain-containing genes were identified to regulate heading date by candidate gene-based association mapping and transformation in rice [J]. *Sci Rep*, 2015, 5 (1): 7663-7675
- [24] Morita R, Sugino M, Hatanaka K, et al. CO2-responsive *CONSTANS*, *CONSTANS-Like*, and time of chlorophyll a/b binding protein expression1 protein is a positive regulator of starch synthesis in vegetative organs of rice [J]. *Plant Physiol*, 2015, 167 (4): 1321-1331
- [25] Gao H, Jin M N, Zheng X M, et al. Days to heading 7, a major quantitative locus determining photoperiod sensitivity and regional adaptation in rice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111 (46): 16337-16342
- [26] Liu T L, Newton L, Liu M J, et al. A G-box-like motif is necessary for transcriptional regulation by circadian pseudo-response regulators in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2015, 170 (1): 528-541
- [27] Nakamichi N. PSEUDO-RESPONSE REGULATORS, PRR9, PRR7 and PRR5, together play essential roles close to the circadian clock of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2005, 46 (5): 686-698
- [28] Daniel X, Sugano S, Tobin E M. *CK2* phosphorylation of *CCA1* is necessary for its circadian oscillator function in *Arabidopsis* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101 (9): 3292-3297
- [29] Más P, Kim W Y, Somers D E, et al. Targeted degradation of *TOC1* by *ZTL* modulates circadian function in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Nature*, 2003, 426 (6966): 567-570
- [30] Groussin M, Gouy M. Adaptation to environmental temperature is a major determinant of molecular evolutionary rates in archaea [J]. *Mol Biol Evol*, 2011, 28 (9): 2661-2674
- [31] Li C, Li Q, Dunwell J M, et al. Divergent evolutionary pattern of starch biosynthetic pathway genes in grasses and dicots [J]. *Mol Biol Evol*, 2012, 29 (10): 3227-3236
- [32] Fang F, Zhang C, Huang H, et al. Potential distribution of Tausch' goatgrass (*Aegilops tauschii*) in both China and the rest of the world as predicted by MaxEnt [J]. *Acta Pratacul Sin*, 2013, 2 (3): 62-70