林业科学研究 2016,29(5):638～645
Forest Research

文章编号:1001-1498(2016)05-0638-08

白桦 *BpLHY*、*BpTOC1* 与 *BpGI* 节律基因生物信息学及表达分析

孙丰坤[1], 周 姗[1], 李蕾蕾[1], 詹亚光[1,2], 曾凡锁[1,2]*

(1. 东北林业大学生命科学学院; 2. 林木遗传育种国家重点实验室,黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:[**目的**]探究白桦生物钟基因运行机制及在生长发育、胁迫应答中的作用。[**方法**]运用生物信息学方法对白桦 *BpLHY*、*BpTOC*1、*BpGI* 节律基因进行分析,预测其编码蛋白的结构功能。利用 RT-PCR 方法检测白桦 *BpLHY*、*BpTOC*1、*BpGI* 基因昼夜表达模式,在非生物胁迫重金属 Cd、低温(4℃)、与盐(NaCl)及信号诱导 SA(水杨酸)、SNP(硝普钠)下的表达情况。[**结果**]白桦 *BpLHY*、*BpTOC*1、*BpGI* 节律基因编码的均为疏水性非分泌型,具有跨膜能力的 mixed 蛋白。白桦 *BpTOC1*、*BpLHY* 基因表达量均呈现白天低夜晚高的昼夜变化模式,而 *BpGI* 表达量则表现出白天高夜晚低的模式。在重金属 Cd、低温(4℃)、与盐(NaCl)非生物胁迫下,*BpLHY*、*BpTOC*1 与 *BpGI* 均上调表达。SA、SNP 诱导白桦 *BpLHY* 与 *BpTOC1* 表达下调, 而诱导 *BpGI* 表达上调。[**结论**]白桦 *BpLHY*、*BpTOC1*、*BpGI* 节律基因昼夜表达模式及非生物胁迫、信号诱导下的表达特征为进一步研究白桦生物钟基因作用机制及其在植物生长发育和胁迫应答中的作用奠定了基础。

关键词:白桦;节律基因;生物信息学;非生物胁迫

中图分类号:S792.153 **文献标识码**:A

Bioinformatics and Expression Analysis of Circadian Related Gene *BpLHY*、*BpTOC1* and *BpGI* in *Betula platyphylla* Suk.

SUN Feng-kun[1], *ZHOU Shan*[1], *LI Lei-lei*[1], *ZHAN Ya-guang*[1,2], *ZENG Fan-suo*[1,2]

(1. College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China;
2. Key Laboratory of Forest Tree Genetic Improvement and Biotechnology, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China)

Abstract: [**Objective**] To clarify the mechanism and functions in regulating plant growth and stress response of circadian clock genes in *Betula platyphylla* Suk. [**Method**] The sequences of *BpLHY*, *BpTOC1* and *BpGI* were analyzed, and the structure and functions of coding proteins were predicted by bioinformatics method. The expression levels of *BpLHY*, *BpTOC1* and *BpGI* were quantified using qRT-PCR. [**Result**] *BpLHY*, *BpTOC1* and *BpGI* genes in *B. platyphylla* were 2 283bp, 1 623bp, and 3 507bp, encoding 760, 540, and 1 168 amino acids, respectively. The proteins encoded by these genes were hydrophobic, non-secreted transmembrane protein. *BpTOC1* and *BpLHY* transcript levels were low during the daytime, but high at night. In contrast, *BpGI* expression was low during the daytime, and high at night and its highest expression levels increased by 29.28 times at 9:00 am. The expressions of *BpLHY*, *BpTOC1* and *BpGI* increased by 105% to 2 390% in the abiotic stress of heavy metal cadmium, low tem-

收稿日期:2015-08-09

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金项目(2572014DA04)、国家自然科学基金项目(J1210053 和 31200463)、黑龙江省博士后启动基金(LBH-Q12166)资助

作者简介: 孙丰坤(1989—),男,山东泰安人,硕士在读,主要研究方向:植物基因工程。电话:15104595652. E-mail:15104595652@163.com。

* 通讯作者:曾凡锁,副教授,主要研究方向:林木遗传育种和生物技术。E-mail:zengfansuo@126.com 地址:150040 黑龙江省哈尔滨市香坊区和兴路 26 号。

perature (4℃), salt (NaCl); SA and SNP induced the transcription levels of *BpLHY*, *BpTOC1* genes reducing by 70.1% to 97.75% while the expression of *BpGI* increasing by 150% to 280%. [**Conclusion**] This study may provide some references for further study of *BpLHY*, *BpTOC1* and *BpGI* function in regulation of plant growth and stress response and the mechanism of circadian clock in *B. platyphylla*.

Keywords: *Betula platyphylla*; circadian gene; bioinformatics; abiotic stress

生物在长期进化过程中,形成了自身的昼夜节律系统来适应地球昼来夜往的周期性变化。生物节律的大量研究成果主要来自于动物。直到 1720 年,De Mairan 开始研究持续黑暗条件下含羞草的昼夜节律,才开创了植物生物钟研究的先河。近年来,植物节律基因功能的研究逐渐兴起[1]。

输入、输出途径和核心振荡器组成了植物的生物钟系统。生物钟核心循环由复杂的调控网络构成,而调控是在不同层次上进行[2]。其中,对拟南芥生物钟基因的研究发现中心循环是由两个类似于 MYB 转录因子的 *LHY*(late elongated hypocotyl)、*CCA*(circadian clock associated1)以及 *TOC1*(TIMING OF CAB EXPRESSION 1)为主组成的反馈通路[3]。*CCA/LHY* 抑制 *TOC1* 基因转录,*TOC1* 又能直接或间接地通过未知组分来调控 *CCA1* 和 *LHY* 基因的表达,清晨,*LHY* 和 *CCA1* 表达水平达到最高峰[4],而 *TOC1* 的表达高峰出现在入夜时分。正是基于这种转录和翻译水平的反馈调节机制,植物的生物节律才能呈昼夜周期性振荡变化[5]。

生物钟增强了植物的环境耐受性,即对于增强植物的适应性、抗逆性,改造作物的地域性等方面起重要作用。如拟南芥中,*CBF1*、*CBF2* 和 *CBF3* 可能直接受到植物生物钟元件 *CCA1/LHY* 基因的调控[6],参与植物的抗逆行为。水曲柳节律基因 *LHY* 启动子响应盐、高温与低温的非生物胁迫[7]。

迄今,生物钟调控胁迫应答反应的机制研究较少,而且主要集中在拟南芥中。目前,关于白桦生物钟基因的研究还未见报道。本研究中,作者利用前期研究获得的白桦 *BpLHY*、*BpTOC1* 和 *BpGI* 的全长基因,对其编码的蛋白分别进行了生物信息学分析,构建了其系统进化树,并分析了三种节律基因的昼夜表达变化及其在相关信号分子诱导与逆境胁迫条件下的表达模式。本文揭示了 *BpLHY*、*BpTOC1* 和 *BpGI* 节律基因在白桦中的节律表达及对信号诱导和非生物胁迫的响应模式,为进一步研究生物节律对木本植物生长与发育的调控奠定了基础。

1　材料与方法

1.1　材料

实验所用材料为两年生白桦实生苗、组培苗与悬浮培养细胞。

1.2　方法

选取长势良好白桦实生苗,于人工气候箱中培养,控制湿度 70% 和温度 25℃,保持 12 h 光照 12 h 黑暗的光周期变化。一周后,从 0 h 开始,到 24 h 为止,每隔 3 h 取白桦叶片,置于液氮速冻并在 -80℃ 冰箱中保存。

白桦组培苗采用 WPM 固体培养基继代培养,选取继代 20 天后长势相同的白桦苗置于光照培养箱中,除低温处理外控制温度 25℃。分别用 20 μmol · L^{-1} 镉($CdCl_2$)、200 mmol · L^{-1} 的盐(NaCl)以及 4℃ 低温处理,每个处理均 3 次重复。处理后 6 h、12 h、24 h、48 h、96 h 取样并 -80℃ 冻存。

白桦茎段悬浮细胞采用 NT 液体培养基(激素为 0.01 mg · L^{-1} TDZ + 0.1 mg · L^{-1} 6-BA)培养,每瓶接种鲜质量 8 g 的悬浮细胞,继代周期 7 天,第 8 天时分别用 50 mmol · L^{-1} 硝普钠(SNP)和 50 mmol · L^{-1} 水杨酸(SA)处理,对照添加等体积无菌水,6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 取样并 -80℃ 冻存,每个处理重复 3 次。

应用 CTAB 法提取白桦总 RNA,TOYOBO 反转录试剂盒将 1 μg RNA 反转录为 cDNA,cDNA 模板稀释 10 倍用于 RT-PCR。按照 TOYOBO (SYBR Green)试剂盒说明,使用 Applied Biosystems 7 500 进行荧光定量实验,PCR 使用 10 μL 体系,即 THUNDERRIRD SYBR qPCR Mix 5 μL,引物(表 1)各 0.3 μL,样品 cDNA 1 μL,灭菌去离子水补至 10 μL。反应程序如下:95℃ 30 s,95℃ 5 s,60℃ 34 s(2、3 共 40 个循环),95℃ 15 s,60℃ 1 min,5℃ 15 s。每个样品三次重复。采用 -△△CT 法进行结果分析,正值代表表达量上调,反之亦然。

表 1 qRT-PCR 引物序列

引物名称	序列
BpLHY-F	5′ ACACGATAAGTTTCGTGAGCTGGA 3′
BpLHY-R	5′ AAGAGGATACGCTTGGAAGGGGAG 3′
BpTOC1-F	5′ GGTGAGGATTTTGTTGTGCGATA 3′
BpTOC1-R	5′ TGGAAGGTCAAGTTCAGCTAGTA 3′
BpGI-F	5′ TGATGCACTTGCCAAAATGACC 3′
BpGI-R	5′ CAACAAAAGCAGCTACCGCCGT 3′
β-actin-F	5′ TCAACCGCCTTGTCTCTCAGG 3′
β-actin-R	5′ TGGCTCGAATGCACTGTTGG 3′

表 2 *BpLHY*、*BpTOC1* 与 *BpGI* 生物信息学分析

基因名称	*BpLHY*	*BpTOC1*	*BpGI*
Genbank 登入号	KR813316	KR813317	KR813315
基因全长/bp	2 283	1 623	3 507
开放读码框	完整	完整	完整
编码氨基酸数	760	540	1168
蛋白等电点	4.90	5.01	4.81
蛋白不稳定系数	48.61	36.40	43.34
蛋白脂溶系数	32.11	31.05	26.40
疏水区	1 916	1 162	2 237
亲水区	0	1	8
总平均疏水性	0.731	0.904	0.739

2 结果与分析

2.1 氨基酸的理化性质分析

将 *BpGI*、*BpLHY* 与 *BpTOC1* 全长基因,利用在线分析软件 Protparam[8] 对其编码的氨基酸序列的理化性质进行分析。不稳定系数大于 40 时为不稳定蛋白,脂溶系数大于 75.50 是为脂溶性蛋白,反之亦然[9]。结果显示 *BpGI*、*BpLHY* 与 *BpTOC1* 均为非脂溶性不稳定蛋白(表 2)。

2.2 蛋白质一级结构分析

2.2.1 蛋白质疏水区域/亲水区域预测 利用在线分析软件 ProtScale[8] 中的 Kyte and Doolittle 算法对 BpGI、BpLHY 与 BpTOC1 蛋白进行亲水/ 疏水性分析(< -0.5 区域为亲水区, >0.5 区域为疏水区, +0.5 ～ -0.5 之间为两性区域),分析显示 BpGI、BpLHY 与 BpTOC1 均为疏水性蛋白(表 2)。

2.2.2 信号肽及跨膜结构域的预测和分析 蛋白质 N 端的一段 16 ～ 26 个氨基酸序列为信号肽,包括疏水核心区、信号肽的 C 端和 N 端,能够指导分泌型蛋白的跨膜转移。利用在线分析工具 SignalP[10] 的神经网络算法对 BpGI、BpLHY 与 BpTOC1 蛋白进行预测,结果如图 2 -2,其中 BpGI(图 1 左)、BpLHY(图 1 中)与 BpTOC1(图 1 右)编码的蛋白的 Y,C 值均不高,分值曲线非常不典型,判断三种蛋白均没有信号肽,为非分泌蛋白。

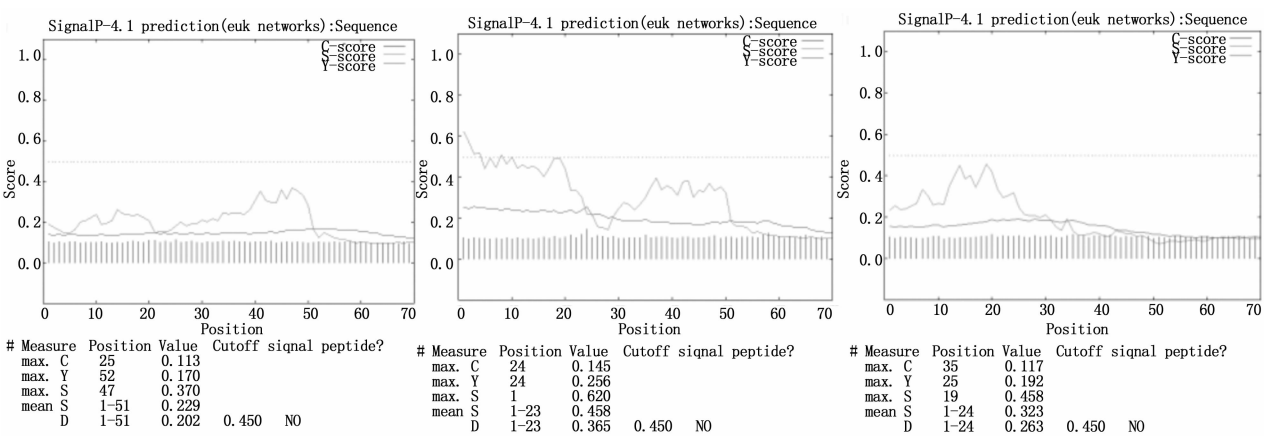

图 1 白桦 *BpGI*、*BpLHY* 与 *BpTOC1* 信号肽预测

利用在线工具 TMPred[11] 对 BpGI、BpLHY 与 BpTOC1 蛋白的跨膜结构进行了分析,结果表明 BpGI(图 2 左)蛋白有 26 个跨膜结构域,从里向外有 14 个跨膜区,从外向里有 12 个跨膜区。BpLHY(图 2 中)蛋白有 4 个跨膜结构域,从里向外有 2 个跨膜区,从外向里有 2 个跨膜区。BpTOC1(图 2 右)蛋白有 3 个跨膜结构域,从里向外有 2 个跨膜区,从外向里有 1 个跨膜区。综上,BpGI、BpLHY 与 BpTOC1 均为跨膜蛋白。

2.3 蛋白质二级结构域的预测与分析

据 skolnick 等的研究,蛋白质二级结构可分为 H、E、T 和 C 四型,分别代表螺旋、折叠、卷曲和线圈。当 H > 45% 、E < 5% 时,为 all-alph 型;当 H < 5% ,E > 45% 时,为 all-beta 型;当 H > 30% ,E > 20% 时,为 alpha-be 型,其他情况为 mixed 型[12-13]。应用 SOPMA[14] 软件对 BpGI(图 3 左)、BpLHY(图 3 中)与 BpTOC1(图 3 右)蛋白的二级结构进行预测和分析,结果如图 3 所示,三种蛋白均为 mixed 型。

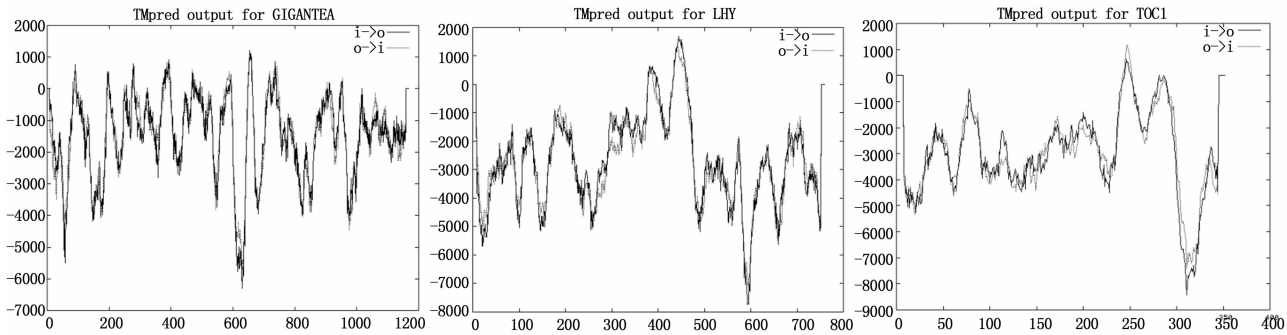

图 2　白桦 *BpGI*、*BpLHY* 与 *BpTOC1* 跨膜结构域分析

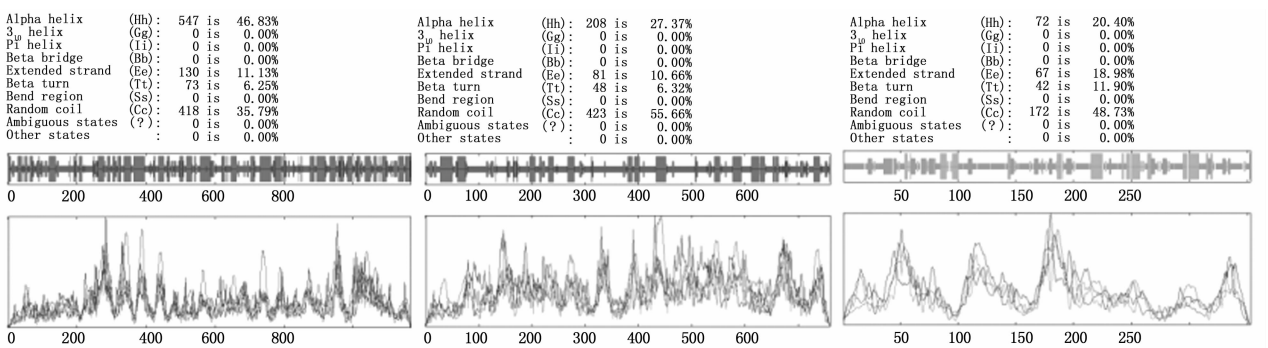

图 3　白桦 *BpGI*、*BpLHY* 与 *BpTOC1* 二级结构预测

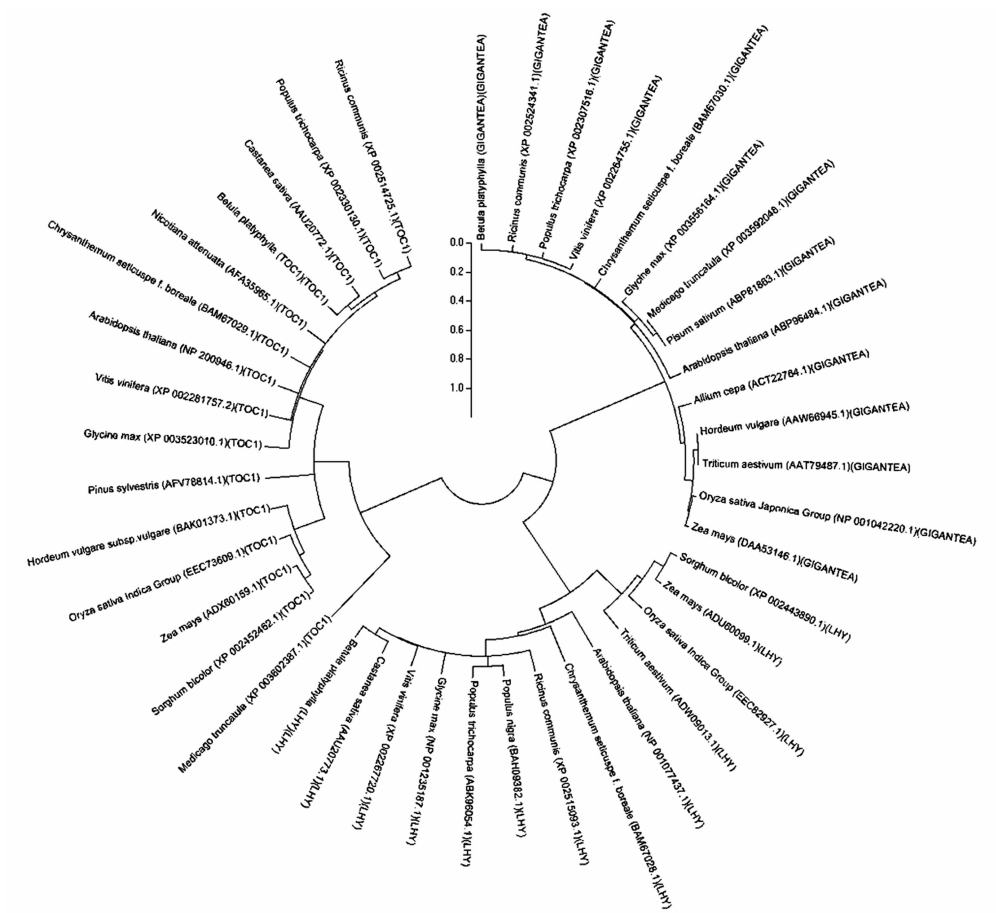

图 4　白桦 *BpGI*、*BpLHY* 与 *BpTOC1* 系统发育进化树

2.4 节律基因的同源进化分析

利用 NCBI 的 Blasxt 进行氨基酸序列比对,选取了同源性较高的序列,利用 MEGA 5.0 软件中 Neighbor-Joining 算法构建系统进化树[15]。白桦 BpGI、BpLHY 与 BpTOC1 分属于三个大的分支,白桦 BpGI 与同是双子叶植物的葡萄、毛果杨、蓖麻的 GI 在同一小分支上,亲缘关系最近,蛋白相似度非别为 85%、85%、83%;同样,白桦 BpLHY 与欧洲栗 LHY、葡萄 LHY,白桦 BpTOC1 与欧洲栗 TOC1、毛果杨 TOC1、蓖麻 TOC1 也分属于两个小分支,除白桦 BpLHY 与欧洲栗 LHY 蛋白相似度为 69% 以外,其余蛋白相似度均在 71% 以上,进一步说明 GI、LHY 与 TOC1 在双子叶植物中进化是保守的。

2.5 节律基因 *BpGI*、*BpLHY* 与 *BpTOC*1 日变化表达

每日 6 时到 18 时光照,18 时到次日 6 时黑暗,以 0 时基因的表达量作为对照,*BpGI*、*BpLHY* 与 *BpTOC1* 三种节律基因的转录表达变化趋势如图 6 所示。其中,*BpTOC1* 的表达量呈现白天低夜间高的趋势,白天 9 时表达量略有上升,是 0 时的 3.53 倍,随后表达量下降,15 时开始表达量显著增高,在 21 时达到最高峰,为 0 时的 7.60 倍。*BpLHY* 从 0 时开始表达量开始上升,在 3 时达到最高水平,是 0 时的 4.88 倍,在 12 时到 21 是之间为痕量表达。*BpGI* 的表达量则呈现白天高夜晚低的趋势,从凌晨 6 时开始表达量逐渐上升,9 时达到最高水平,为 0 时的 30.29 倍,之后一直维持高表达水平,18 时表达量开始下降,但 21 时的表达量仍是 0 时的 13.19 倍。

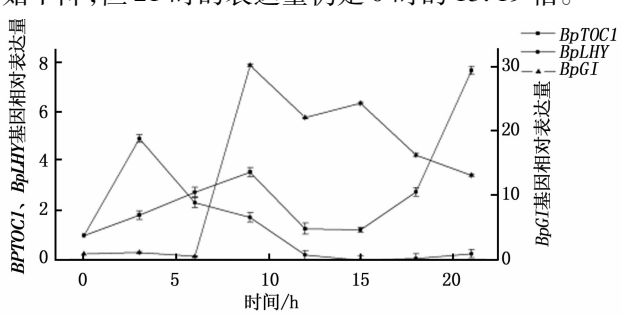

图 5 白桦 *BpGI*、*BpLHY* 与 *BpTOC1* 近日节律变化

2.6 非生物胁迫诱导 *BpGI*、*BpLHY* 与 *BpTOC*1 表达模式分析

在 20 μmol · L^{-1} Cd、4℃ 和 200 mmol · L^{-1} NaCl 处理下,*BpGI*、*BpLHY* 与 *BpTOC1* 响应时间、程度各有不同,但均有不同程度的上调表达。

BpLHY 基因响应时间较早,表达量均在 12 h 达到最高值,分别是对照的 7.31、23.29 和 24.90 倍;之后表达量开始下降,96 h 表达量均低于对照组,分别是对照的 2.05%、2.85% 和 2.25%;*BpGI* 基因表达量在前 48 h 均高于对照组且呈逐渐增高的趋势,48 h 达到最高值,分别是对照的 3.08、3.06 和 2.28 倍,96 h 基因表达量下降并低于对照组;*BpTOC1* 基因表达量在 24 h 前都低于对照组,之后的表达量才开始上调并高于对照,在 48 h 达到最高值,分别是对照的 9.34、7.14 和 2.57 倍。

由此可见 *BpLHY* 对非生物胁迫的响应时间最早,*BpGI* 次之,最晚的是 *BpTOC1*,其转录水平 48 h 才开始升高。在响应程度方面,*BpLHY* 基因表达量在非生物胁迫下上调幅度最大。总之,白桦节律基因 *BpGI*、*BpLHY* 与 *BpTOC1* 对 Cd、4℃ 和 NaCl 非生物胁迫均有响应。

2.7 信号分子诱导 *BpGI*、*BpLHY* 与 *BpTOC*1 表达分析

图 7 显示 SA、SNP 信号分子诱导下 *BpLHY* 与 *BpTOC1* 基因下调表达明显,而 *BpGI* 基因表达量增加。在 SA 与 SNP 诱导下,*BpLHY*、*BpTOC1* 基因表达量虽有上下浮动,但总体表现为下调表达。*BpTOC1* 表达量在 12 h 达到最低水平,分别为对照的 24.4% 和 29.9%;*BpLHY* 表达量分别在 96 h、48 h 达到最低点,分别为对照的 2.25% 和 5.30%。在 SA 诱导下,*BpGI* 基因表达量 0～48 h 表现为上调表达,12 h 表达量最高,为对照的 3.80 倍,之后表达量开始减少;SNP 诱导下,*BpGI* 基因表达量逐渐增加,72 h 是达到对照的 2.50 倍。

综上,SA、SNP 诱导下,*BpLHY*、*BpTOC1* 基因转录水平明显降低,*BpLHY* 表达量甚至会达到对照 10% 以下,而 *BpGI* 基因却被上调表达。

3 讨论

生物钟作为一种内源计时系统,使生物可以根据外界环境的变化调节自身的生理过程,提高生物的生存及竞争能力[16]。研究表明,拟南芥生物钟的中央振荡器是由 TOC1 和 LHY/CCA1 之间的反馈调节构成,其中 TOC1、LHY 的近日节律表达变化与我们的实验结果类似(图 6),即白桦中 *BpLHY* 基因的表达量在接近凌晨时达到最高值,之后表达水平不断下降,傍晚时表达量最低,接近痕量表达;而作为反应调节蛋白基因的白桦 *BpTOC1* 基因的表达量在傍晚时开始增加,夜间保持较高的表达水平,直至白

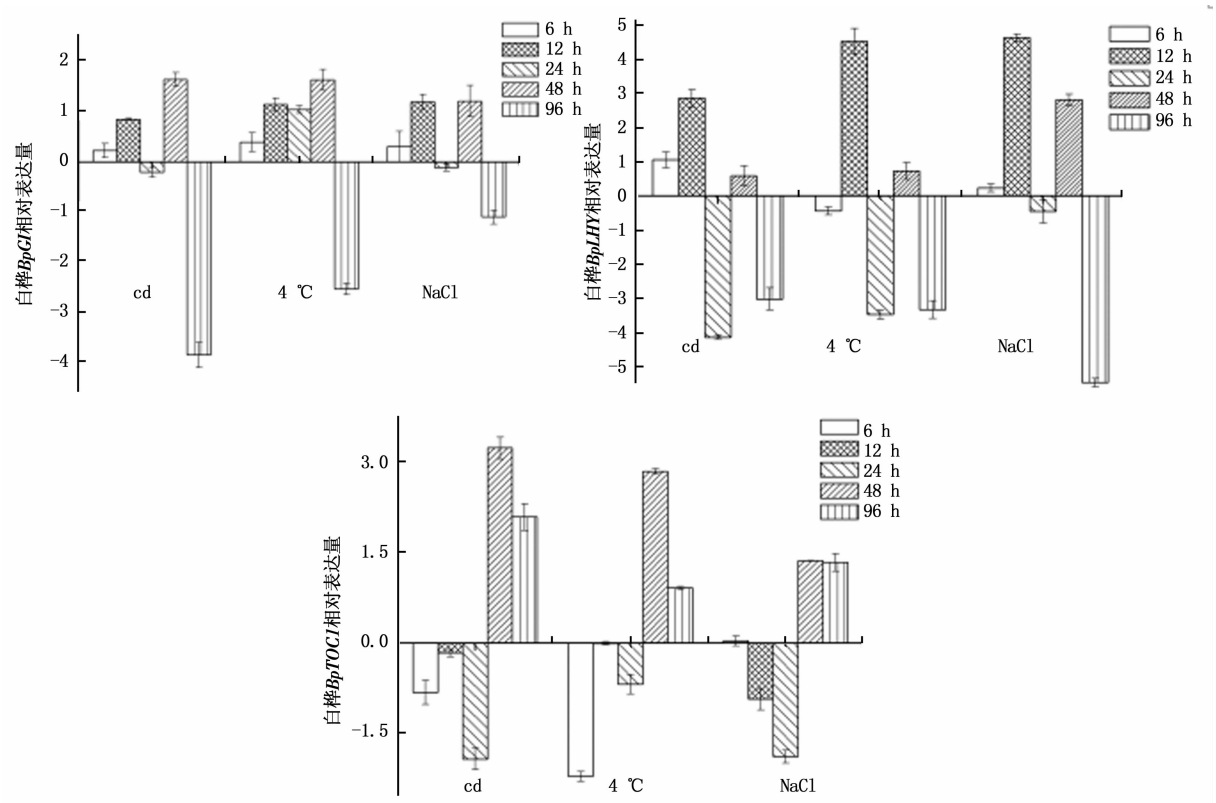

图 6　非生物胁迫下白桦 *BpGI*、*BpLHY*、*BpTOC1* 表达

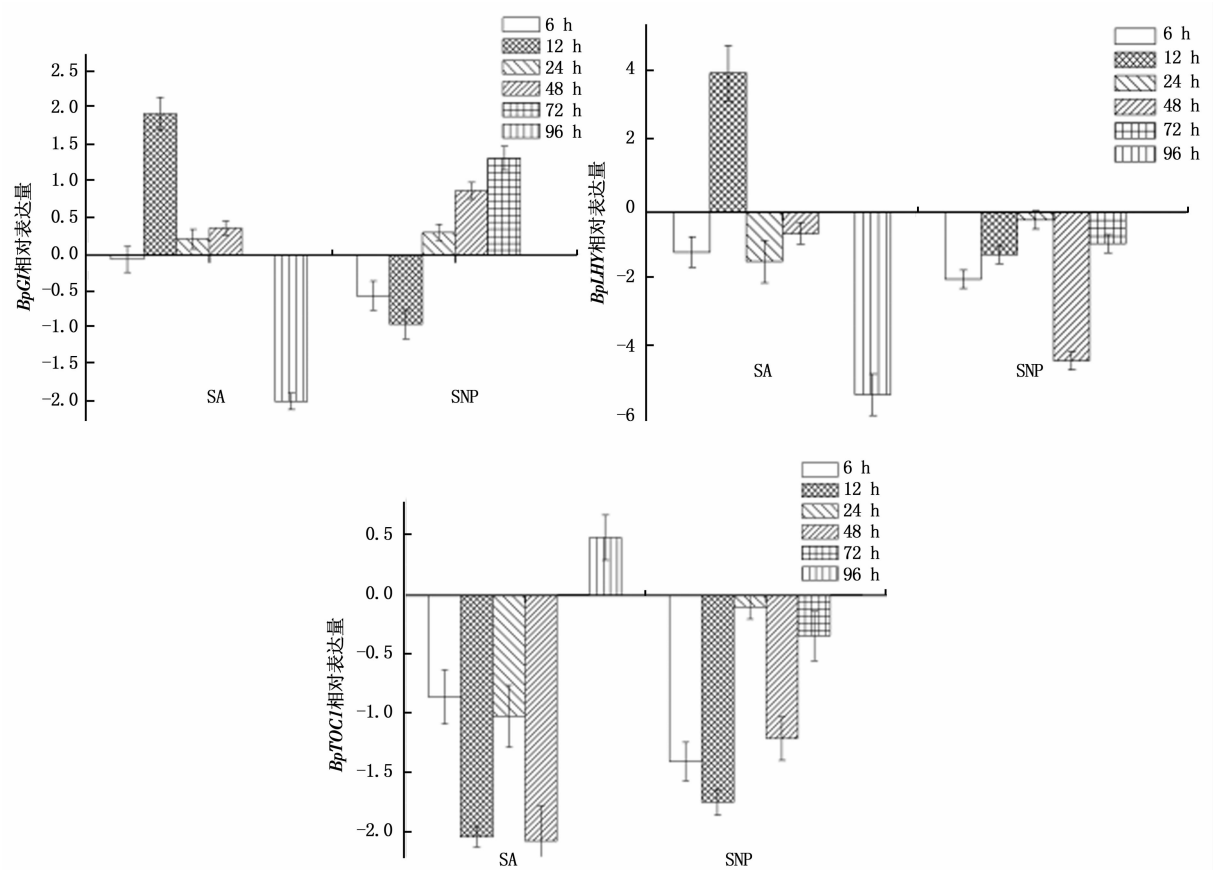

图 7　SA、SNP 信号诱导下白桦 *BpGI*、*BpLHY* 与 *BpTOC1* 表达

天表达量有所降低。由此可见白桦 *BpLHY* 与 *BpTOC1* 两基因的表达量变化趋势同样表现出昼夜循环节律且与拟南芥中生物钟的中央振荡器同类基因的表达模式相吻合,说明白桦 *BpLHY*、*BpTOC1* 与拟南芥中同类基因发挥的功能相近,白桦中可能存在着与拟南芥相似的负反馈调节网络。*GI* 基因是生物钟基因输出途径中的一个重要参与者,白桦中 *BpGI* 的表达量在白天一直维持表高水平,夜晚时表达量下降直至痕量表达。*BpGI* 的表达模式虽与拟南芥、大麦、洋葱等的 *GI* 的节律表达模式不同,但是同样表现出了昼夜振荡节律,说明该基因也参与生物钟的网络调控,这为进一步丰富白桦生物钟 *BpGI* 功能的研究奠定了基础。

植物中受生物钟调控的基因,约有 68% 与渗透、盐、冷、热以及氧化胁迫有关[17],即生物钟可以在可预期的环境胁迫下调节相关基因的表达。当植物受到氧化胁迫时,*CCA1* 基因能够上调 *ROS* 基因的表达,这种调控与 *CCA1* 的表达量关系密切[18]。TOC1 在干旱胁迫信号途径和生物钟之间起到分子开关的作用[19],与 TOC1 同一家族的 PRR5/PRR7/PRR9 分别在植物适应低温、高温、和干旱胁迫中起到关键作用,GI 在植物生长发育和环境适应方面也起着重要作用,如调控植物耐冷和耐热响应[20-22]。本文的结果同样显示(图 7),白桦悬浮细胞在 cd、4℃、NaCl 处理后 *BpLHY*、*BpTOC1*、*BpGI* 基因都有上调表达,值得注意的是 *BpLHY* 基因响应时间最早,并且转录水平能够达到对照的 20 倍以上,*BpGI* 基因作为生物钟输出途径的一员,其在 48 h 对非生物胁迫也做出响应。虽然三种生物钟基因的响应时间不同,但足以说明 *BpLHY*、*BpTOC1* 与 *BpGI* 在白桦非生物胁迫应答中起到重要作用。

水杨酸(SA)和一氧化氮(NO)都是能够诱导植物对非生物胁迫反应的抗逆信号分子,可诱导或增强抗氧化酶系统活性,进而清除体内过量的活性氧(ROS),减少细胞的脂质过氧化,增强植物在干旱、盐、低温、高温及重金属等非生物逆境下的生存能力。本研究中,白桦悬浮细胞经 SNP、SA 处理后,除 SNP 处理后的 6 h 的 *BpLHY* 基因表达量上调之外,其他时间段 *BpLHY*、*BpTOC1* 基因均下调表达,当白桦受到非生物胁迫时,*BpLHY*、*BpTOC1* 基因表达量增加(图 7),推测原因为白桦在受到外界环境胁迫时,*BpLHY*、*BpTOC1* 基因表达量增加,通过调控或协同来增强抗氧化物代谢途径来缓解胁迫损伤;而当外源 SA、SNP 加入后,诱导或增强了抗氧化酶系统活性,这也是研究中白桦 *BpLHY*、*BpTOC1* 表达量下调的可能原因。

4 结论

综上所述,本研究分析了白桦生物钟基因 *BpLHY*、*BpTOC1* 与 *BpGI* 的昼夜表达模式,进一步解释了重金属镉、低温、盐非生物胁迫及 SA、SNP 诱导下白桦 *BpLHY*、*BpTOC1*、*BpGI* 基因表达特征,白桦存在类似于拟南芥等植物中的节律基因,这些参与昼夜节律的基因参与逆境调控。本文为进一步研究白桦节律基因作用机制提供了依据,同时为深入研究生物钟在协同调控植物发育和胁迫应答反应中的作用奠定了基础。

参考文献:

[1] 门中华, 李生秀. 植物生物节律性研究进展[J]. 生物学杂志, 2009, 26(5): 53-55.

[2] 徐小冬, 谢启光. 植物生物钟研究的历史回顾与最新进展[J]. 自然杂志, 2013, 35(2): 118-126.

[3] Casal J J, Luccioni L G, Oliverio K A, *et al*. Light, phytochrome signalling and photomorphogenesis in *Arabidopsis*[J]. Photochemical & Photobiological Sciences, 2003, 2(6): 625-636.

[4] Kim J Y, Song H R, Taylor B L, *et al*. Light-regulated translation mediates gated induction of the *Arabidopsis* clock protein LHY[J]. The EMBO Journal, 2003, 22:935-944.

[5] 陈 晓, 李思远, 吴连成, 等. 光周期影响植物花时的分子机制. 西北植物学报[J], 2006. 26 (7): 1490-1499.

[6] Dong M A, Farré E M, Thomashow M F. CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED 1 and LATE ELONGATED HYPOCOTYL regulate expression of the C-REPEAT BINDING FACTOR (CBF) pathway in *Arabidopsis*[J]. Proceedings of the National Academy of Science, 2011, 108(17):7241-7246.

[7] 王 璇, 曾凡锁, 詹亚光, 等. 水曲柳节律基因 LHY 启动子的克隆和功能分析[J]. 植物生理学报, 2014,11:1675-1682.

[8] John M W. The Proteomics Protocols Handbook[M]. Humana Press 2005: 571-607.

[9] Kyte J, Doolittle R F, A simple method for displaying the hydropathic character of a protein[J]. Journal of Molecular Biology, 1982, 157 (06): 105-132.

[10] Thomas N P, Soren B, Gunnar H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions[J]. Nature Methods, 2011, 785-786.

[11] Hofmann K, Stoffel W. TMbase-A database of membrane spanning proteins segments[M]. Biol Chem Hoppe-Seyler, 1993, 374:166.

[12] Peitsch M C. Protein modeling by E-mail: from amino acid sequence to protein structure: a free one-hour service[J]. Nature Biotechnology, 1995.

[13] Skolnick J, Fetrow J S. From genes to protein structure and function: novel applications of computational approaches in the genomic era[J]. Trends in Biotechnology, 2000, 18(1): 34 – 39.

[14] Sen T Z, Jernigan R L, Garnier J, *et al*. GOR V server for protein secondary structure prediction[J]. Bioinformatics, 2005, (21) 2787 – 2788.

[15] Tamura K, Dudley J, Nei M. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[M]. Molecular Biology and Evolution, 2007: 1596 – 1599.

[16] Covington M F, Maloof J N, Straume M, *et al*. Global transcriptome analysis reveals circadian regulation of key pathways in plant growth and development [J]. Genome Biology, 2008, 9 (8): R130.

[17] Kreps J A, Wu Y, Chang H S, *et al*. Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress[J]. Plant Physiology, 2002, 130(4): 2129 – 2141.

[18] Lai A G, Doherty C J, Mueller – Roeber B, *et al*. CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED 1 regulates ROS homeostasis and oxidative stress responses[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012, 109(42): 17129 – 17134.

[19] 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.

[20] Sarah F, Thomashow M F. *Arabidopsis* Transcriptome Profiling Indicates That Multiple Regulatory Pathways Are Activated during Cold Acclimation in Addition to the CBF Cold Response Pathway [J]. Plant Cell, 2002, 14(8):1675 – 1690.

[21] Shuqing C, Ming Y, Shaotong J. Involvement of GIGANTEA gene in the regulation of the cold stress response in *Arabidopsis*. [J]. Plant Cell Reports, 2005, 24(11):683 – 690.

[22] Paltiel J, Amin R, Gover A, *et al*. Novel roles for GIGANTEA revealed under environmental conditions that modify its expression in *Arabidopsis* and *Medicago truncatula*[J]. Planta, 2006, 224(6): 1255 – 1268.

(责任编辑:张　研)