



红花昼夜节律相关基因*CtPRR1*的特征及功能研究

吴建辉, 何贝轩, 贾鑫磊, 郭美丽

Characterization and function study of circadian rhythm gene *CtPRR1* in *Carthamus tinctorius* L.

WU Jianhui, HE Beixuan, JIA Xinlei, GUO Meili

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.1006-0111.202102007>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

2-(3,4-二甲氧基苯基)-4-氧代-4*H*-色烯-3-基乙酸酯的晶体结构及旋光性

Crystal structure and optical activity of 2-(3,4-dimethoxyphenyl)-4-oxo-4*H*-chromen-3-yl acetate

药学实践杂志. 2018, 36(2): 170-172,179 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.02.015

4个黄芪异黄酮类化合物对PC 12细胞分化的影响

The effect of four compounds of astragalus isoflavones on the differentiation of PC 12 cells

药学实践杂志. 2020, 38(3): 232-236 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202001045

新型氮唑类化合物的合成及抗真菌活性研究

Synthesis and antifungal activity of the novel azole compounds

药学实践杂志. 2017, 35(1): 22-25,59 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.01.006

没食子酰哌嗪类化合物的合成及抗真菌作用研究

Study on synthesis and antifungal activities of galloyl piperazine derivatives

药学实践杂志. 2020, 38(6): 506-508, 542 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.201908127

啤酒花中黄酮类成分的含量分析

Analysis of flavonoids contents of hops

药学实践杂志. 2018, 36(1): 64-67 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.01.013

*UGT1A1*基因多态性对药物代谢和临床作用影响的进展

Research progress on the effect of *UGT1A1* gene polymorphisms on drug metabolism and clinical efficacy

药学实践杂志. 2018, 36(6): 488-492 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.06.003



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 论著 ·

红花昼夜节律相关基因 *CtPRR1* 的特征及功能研究

吴建辉^{1,2}, 何贝轩², 贾鑫磊^{1,2}, 郭美丽^{1,2} (1. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122; 2. 海军军医大学药学院, 上海 200433)

【摘要】 目的 探究昼夜节律基因对红花黄酮类物质生物合成的影响及机制。方法 基于红花花冠转录组及代谢组数据库筛选潜在调控红花黄酮类化合物生物合成的昼夜节律基因; 用 qPCR 测定红花各部位以及花冠单日不同时间点昼夜节律基因的表达量, 液质联用测定黄酮类化合物的积累量, 并分析二者的相关性; 酵母双杂交实验验证昼夜节律基因的互作蛋白。结果 获得 7 个昼夜节律基因 PRR1、PRR2、ELF3、FT、PHYB、GI、ZTL, 其中 PRR1 基因与黄酮类化合物积累量呈正相关($r \geq 0.7$)。PRR1 全长 3 201 bp, 编码 421 个氨基酸, 与水稻 *OsPRR73* 基因高度同源, 将其命名为 *CtPRR1* (GenBank 登录号: MW492035)。*CtPRR1* 主要在花中表达, 表达量在日间逐渐升高, 晚间逐渐下降; 黄酮类化合物芹菜素、槲皮素、HSYA、山奈酚、Carthamin、山奈酚-3-O-葡萄糖苷以及野黄芩素的含量为白天逐渐降低, 晚间逐渐升高, 二者都有昼夜节律性且呈负相关($r \geq -0.7$)。酵母双杂交实验得到 2 个热休克蛋白、3 个 AP2 转录因子。结论 *CtPRR1* 对红花黄酮类成分的昼夜节律性积累起负调节作用; *CtPRR1* 可能受这些互作蛋白的影响调控红花黄酮类成分的昼夜节律性积累。

【关键词】 红花; 昼夜节律基因; 黄酮类化合物; 互作蛋白

【中图分类号】 S567.2

【文献标志码】 A

【文章编号】 1006-0111(2022)01-0038-06

【DOI】 10.12206/j.issn.1006-0111.202102007

Characterization and function study of circadian rhythm gene *CtPRR1* in *Carthamus tinctorius* L.

WU Jianhui^{1,2}, HE Beixuan², JIA Xinlei^{1,2}, GUO Meili^{1,2} (1. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China; 2. School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

【Abstract】 Objective To explore the effect of circadian rhythm genes on flavonoids biosynthesis in safflower and its molecular mechanism. **Methods** Based on the transcriptome and metabolomic database of safflower corolla, we screened the circadian rhythm genes that correlate with biosynthesis of flavonoids in safflower. qPCR was used to quantify the expressions of circadian rhythm genes in different flowering stages at different time points in a single day. LC-MS was performed to determine the accumulation of flavonoids. The correlation between them was analyzed as well. Yeast Two-Hybrid experiment was used to verify the interactive proteins of these genes. **Results** Seven circadian rhythm genes PRR1, PRR2, ELF3, FT, PHYB, GI and ZTL were obtained. PRR1 gene was positively correlated with flavonoids accumulation ($r \geq 0.7$). The full length of PRR1 is 3 201 bp, encoding 421 amino acids, which is highly homologous with rice *OsPRR73* gene and named as *CtPRR1* (GenBank accession number: MW492035). *CtPRR1* was mainly expressed in flowers, and the expression level increased in the daytime and declined in the evening gradually. Correspondingly, the content of flavonoids showed an opposite variation. Both of them displayed a circadian rhythm with a negative correlation ($r \geq -0.7$). In addition, 2 heat shock proteins along with 3 AP2 transcription factors interacting with *CtPRR1* protein were obtained via Yeast Two-Hybrid experiment. **Conclusion** *CtPRR1* negatively regulated the safflower flavonoids accumulation in a circadian rhythm way, which may be affected by these interacting proteins.

【Key words】 *Carthami flos*; circadian gene; flavonoids; interaction protein

药用植物中的次生代谢物是中药药效物质的主要来源, 已知的植物次生代谢物生物合成途径有乙酸-丙二酸途径、异戊二烯途径、莽草酸途径等^[1], 探究植物生物合成的调控因素不仅能提升药材的

品质, 也为中药有效成分体外合成的工业化提供可能。

植物昼夜节律钟是植物体内应对光照、温度等外界因素随昼夜节律性改变而进化出的一套适应机制^[2], 对植物生长发育具有不可或缺的作用。大量研究表明, 如黄酮类化合物合成的相关结构基因表达, 也具有明显的昼夜节律性特点, 受昼夜节律钟调控^[3-4]。昼夜节律钟的核心部分中央振荡器是

【作者简介】 吴建辉, 硕士研究生, Email: wujianhui95@163.com

【通信作者】 郭美丽, 教授, 研究方向: 中药种质资源与评价, Email: mlguo@126.com

MYB 蛋白 LHY (late elongated hypocotyl)、CCA1 (circadian clock associated 1) 和伪应答调控蛋白家族 (PRRs, pseudo-response regulators) 组成, 对维持植物昼夜节律的稳定至关重要^[5-6]。

PRRs 基因都带有 2 个保守的结构域, 氨基端的响应接受结构域 (receiver-like domain, RLD), 其结构上与磷酸接受域相似, 羧基端带有的 CCT (Constans/Constans-like/TOC1) 结构域, 这 2 个结构域被一个保守程度不高的“可变域”所分隔^[7-9]。目前研究发现在 CO、CO-like 以及 TOC1 基因中也有带此类结构域, 对于植物开花进程有着重要作用^[10-11]。

研究表明 PRRs 家族基因具有增加植物抗逆性, 影响植物生物量的积累^[12-14], 以及调控花发育及衰老等作用^[15]。目前对模式植物中 PRRs 基因的研究较多, 如在拟南芥以及水稻中的 PRRs 基因证明具有调控开花周期的作用^[17], 但药用植物中 PRRs 基因的研究则罕见报道。

中药红花 (*Carthami flos*) 是菊科植物红花 (*Carthamus tinctorius* L.) 的干燥花, 有活血化瘀的功效。研究表明, 红花主要药效物质为黄酮类化合物, 如羟基红花黄色素 A (HSYA)、红花素、槲皮素、山奈酚、野黄芩苷^[18] 等, 目前已有对红花黄酮类化合物生物合成的关键基因查尔酮合酶、查尔酮异构酶、糖基转移酶等多种研究^[19-20], 但调控红花中黄酮类化合物生物合成途径的基因未完全明确。验证昼夜节律钟调控红花中黄酮类化合物的生物合成对提升红花品质意义重大。

本研究依据前期红花转录组数据库基因注释筛选昼夜节律相关基因, 并与红花黄酮类化合物的积累量进行相关分析, 得到具有调控红花黄酮类化合物生物合成功能的昼夜节律基因, 通过 qPCR、液质联用 (UHPLC-MS) 等方法以期阐释 PRRs 基因的特征与功能, 为进一步研究昼夜节律钟调控红花黄酮类化合物的生物合成积累资料。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

植物材料: 云南巍山红花品系 (编号 ZHH0119), 种植于海军军医大学药学院温室, 温室条件: 恒温 25 °C, 昼夜节律为 16 h 光照/8 h 黑暗。仪器与试剂: 荧光 qPCR 仪: ABI7500; Phanta Max Master Mix 高保真酶, Trans Top green qPCR super mix, Trans one-step cDNA synthesis super mix 逆转录试剂盒 (北京全式金公司); Meitler Toledo 电子天平 (十万分之一量程); 高效液相色谱仪: Agilent1290

Infinty LC system; 质谱仪: Agilent 6538 Accurate Mass。

1.2 红花总 RNA 的提取与 cDNA 第一链的合成

取用新鲜红花的花冠, 根、茎、叶约 100 mg 研磨成粉。依据 Plant Zol 说明书提取总 RNA, 并用紫外分光光度计测定总 RNA 浓度与质量, 样品的 A_{260}/A_{280} 在 1.9 ~ 2.1 之内可认为符合后续实验要求。将其作为模板逆转录合成 cDNA 第一链, -20 °C 保存备用。

1.3 红花 PRRs 基因的筛选与克隆

基于红花转录组数据库, 结合基因注释筛选出昼夜节律相关基因, 通过红花花冠表达谱获取表达量, 与红花代谢组数据库中不同花期黄酮类化合物的积累量进行 Pearson 分析, 获取与黄酮类化合物积累量相关系数 $r \geq 0.7$ 的昼夜节律基因进行生物信息学分析, 设计引物 (表 1) 进行克隆。PCR 产物进行凝胶电泳, 回收含有目的条带的凝胶, 连接载体后转化大肠杆菌感受态细胞, LBA 平板培养, 挑取阳性克隆送至上海生工生物工程有限公司测序。

表 1 全长克隆引物

引物名称	引物序列
PRR1-F	ACCTCAAGGGCCACTGGTTC
PRR1-R	GTAACAAAAGACTTTCTGAA

1.4 红花 PRR1 生物信息学分析

在 NCBI 网站用 BLAST 在线分析红花 PRR1 全长序列以及编码蛋白的氨基酸序列进行比对以及同源性分析; 在 ExPASy 在线工具 SOMPA 得出所编码蛋白的二级结构特征; 通过 Swiss-Model 同源建模预测蛋白三级结构; 在 ClustalX 2.1 软件对其编码蛋白的氨基酸序列与同源蛋白的氨基酸序列进行多重比对分析; 使用相邻节点算法 (Neighbor-Joining) 构建系统进化树, 自展分析法 (Bootstrap analysis) 进行 1 000 次重复验证进化树可靠性。

1.5 红花 PRR1 基因表达分布特征分析

以红花根、茎、叶、花 4 个部位; 花冠开花前 3 d (I 期)、开花 1 d (II 期)、开花 3 d (III 期)、开花 5 d (IV 期) 4 个时期^[12] 以及 1 d 中 8 个时间点 (6:00、9:00、12:00、15:00、18:00、21:00、0:00、3:00) 的花冠第一链 cDNA 为模板, 设计 RT-qPCR 引物, 以 *Ct60s* (KJ634810) 作为内参基因, 进行 qPCR 实验, 每个样品设 3 个复孔。

1.6 红花中黄酮类化合物含量测定

取红花Ⅲ期单日内4个时间点(9:00、12:00、15:00、21:00)的花冠烘干至恒重,精密称取5.00 mg置1.5 ml离心管,再加入精密量取的1 ml 60% 甲醇,室温放置12 h后超声处理40 min,12 000 r/min,10 min离心取上清液,UHPLC-MS在正、负离子模式下进行检测(表2),参比离子:正离子模式为121.050 9,922.009 8;负离子模式为119.036 3,966.000 7,数据采集与分析使用Agilent MassHunter Analysis4.0软件。以柚皮素、芹菜素、槲皮素、HSYA、山奈酚、红花素、山奈酚-3-O-葡萄糖苷以及野黄芩素为对照品。

表2 UHPLC-MS分析方法

色谱条件	质谱条件
色谱柱: Agilent ZORBAX C ₁₈ (3.5 μm, 2.1 mm ×100 mm)	毛细管电压: 3.5 kV
流动相: A:0.1%甲酸-水;B:乙腈	锥孔电压: 60 V
流速: 0.4 ml/min	离子源温度: 350 °C
柱温: 40 °C	碎裂电压: 120 V
进样量: 0.4 ml	采集范围: 50 ~ 1 100 m/z
梯度洗脱: 0 min,5%B; 4 min,20%B; 6 min, 21% B; 9 min, 26% B; 11 min, 40% B; 15 min, 80% B; 17 min, 95% B	

1.7 红花 PRR1 蛋白互作体系研究

1.7.1 红花 PRR1 蛋白互作网络预测

使用 STRING 数据库对 *CtPRR1* 基因进行蛋白互作网络分析,可信区间设置为 0.4。利用 Python 下的 networkX 将互作基因进行可视化。

1.7.2 红花酵母双杂 cDNA 文库构建

将红花 cDNA 均一化处理得到红花酵母双杂 cDNA 文库,与载体 PGADT7 进行同源克隆,产物转化大肠杆菌感受态细胞,涂布 LBA 平板,37 °C

培养过夜,挑取单克隆菌落进行菌液 PCR 验证

1.7.3 红花 PRR1 载体构建与酵母转化

根据 PRR1 ORF 设计同源引物引入 BamHI、XhoI 酶切位点。PCR 产物经电泳后回收,连接酶切载体 pGBKT7 转入大肠杆菌,测序验证后完成 pGBKT7-PRR1 bait 载体的构建。

将 pGBKT7-PRR1bait 质粒通过 PEG/LiAc 法转化酵母感受态细胞,涂布 SD 平板,28 °C 培养,挑取单克隆进行菌液 PCR 鉴定。将阳性单克隆酵母菌液划线涂布含有 X-α-gal 和 Aba 的平板。

1.7.4 酵母双杂文库筛选红花 PRR1 互作蛋白

将酵母感受态细胞、载体 DNA、红花酵母双杂 cDNA 文库质粒按共转法混合处理后均匀涂布于 SD/-His/-Trp/-Ura 三缺平板培养,挑取单克隆转移至含有 X-α-gal 的 SD/-His/-Trp/-Ura 培养基,扩增阳性质粒用于测序以及酵母双杂验证。

1.8 统计分析

实验结果经 SPSS19.0 软件处理,计量资料统一表示为($\bar{x} \pm s$),组间比较采用 ANOVA 分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 实验结果

2.1 红花昼夜节律相关基因的筛选

基于红花花冠转录组数据库的基因注释,检索出 PRR1、PRR2、ELF3、FT、PHYB、GI、ZTL7 个昼夜节律基因,将其在花冠不同时期的表达量与红花代谢组数据库中柚皮素、HSYA、苯丙氨酸、山奈酚-3-O-葡萄糖苷、芹菜素、槲皮素、野黄芩素、槲皮素-3-葡萄糖苷 7 个化合物含量进行 PEARSON 相关性分析,如图 1 所示,PRR1 与红花中主要黄酮类成分的积累量具有良好的相关性($r \geq 0.7$)。



图 1 红花昼夜节律基因与黄酮类物质相关性热图

2.2 红花 PRR1 基因全长克隆与生物信息学分析

在红花全长转录组数据库中得到的 PRR1 基因全长序列 3 201 bp, ORF FINDER 结果显示开放阅读框 1 549 ~ 2 814 bp, 编码 421 个氨基酸, 命名为 *Ct*PRR1 (GenBank 登录号: MW492035), 将全长序列进行 BLAST, 系统发育进化树分析如图 2A, *Ct*PRR1 氨基酸序列与水稻 (*Oryza sativa* L.) *O*_sPRR73

氨基酸序列 (A2XFB7.2) 同源性最高。Prot-param 分析 PRR1 基因所编码的蛋白质分子式 C₁₉₀₀H₃₀₃₉N₆₁₁O₆₅₃S₁₅, 分子量为 45 300, 理论 pI=8.52, 对 PRR 蛋白质三维结构预测如图 2B, Prot Scale 分析表明预测 PRR1 蛋白为亲水性蛋白, 无信号肽属非分泌蛋白; 蛋白跨膜性分析预测 PRR 不含有跨膜区域, 为非跨膜蛋白。

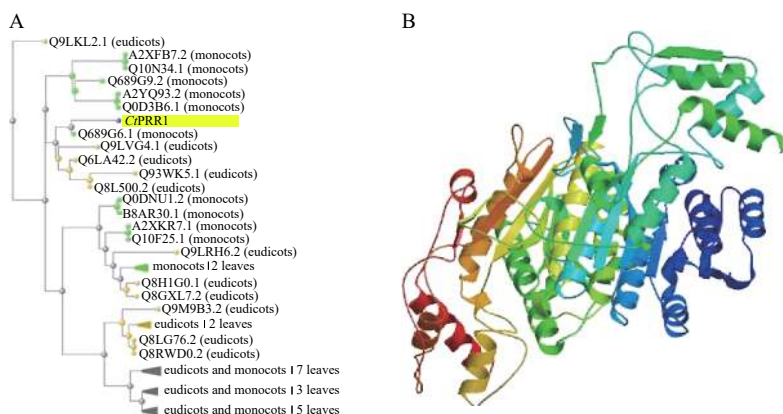


图 2 *Ct*PRR1 生物信息学分析
A. 系统进化树; B. *Ct*PRR1 蛋白三级结构。

2.3 *Ct*PRR1 基因在红花中的表达特征

qPCR 结果表明 (图 3A) 在红花不同部位中, *Ct*PRR1 基因在花中的表达量最高, 且与根、茎、叶都有显著性差异 ($P < 0.05$), 对红花花冠 I 期、II 期、III 期、IV 期的 *Ct*PRR1 基因的表达情况进行分析, *Ct*PRR1 在 I 期花冠中表达含量最低; II 期表达水平略有上升, 与 I 期无显著性差异; III 期花冠中表达量明显上升, 相比 I, II 期具有显著性差异, IV 期

花冠中的 *Ct*PRR1 基因表达水平略微下降 (图 3B), 表明 *Ct*PRR1 基因在 III 期花冠中转录水平最高, *Ct*PRR1 在不同时间表达量的变化与红花黄酮类化合物积累量的变化相符^[22]。对红花 8 个时间点的花冠 *Ct*PRR1 表达量分析发现 *Ct*PRR1 表达量在日间 6:00 至 18:00 逐渐升高, 18:00 达峰值, 晚间 21:00 至 2:00 逐渐下降, 3:00 最低, 表达水平在白天与夜晚两个连续的时间周期内呈现昼夜节律性 (图 3C)。

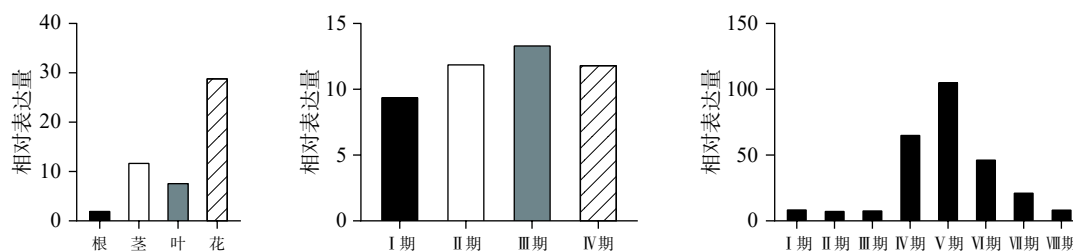


图 3 *Ct*PRR1 不同部位及不同时间的相对表达量
A. *Ct*PRR1 各部位相对表达量; B. *Ct*PRR1 不同花期相对表达量; C. *Ct*PRR1 红花 III 期单日不同时间点相对表达量。

2.4 红花中黄酮类化合物含量测定

UHPLC-MS 检测黄酮类化合物在单日内不同时间的含量变化 (图 4), 除柚皮素外的 7 个化合物在白天含量逐渐降低, 而在晚间含量又升至较高的水平, 柚皮素则相反在白天升高, 晚间下降, 但 8 个化合物含量变化也呈现昼夜节律性, 与同时间点 *Ct*PRR1 的表达量进行 PEARSON 分析得到红花素 ($r = -0.9485$)、山奈酚 ($r = -0.9423$)、野黄芩苷

($r = -0.9504$)、HSYA ($r = -0.8372$)、山奈酚-3-O-葡萄糖苷 ($r = -0.8792$)、柚皮素 ($r = 0.7415$)、芹菜素 ($r = -0.6652$)、槲皮素 ($r = -0.4876$), 目前研究认为柚皮素在红花黄酮类化合物生物合成途径的上游^[20], 而 *Ct*PRR1 与柚皮素呈正相关, 与其他化合物呈负相关, 说明 *Ct*PRR1 对整体黄酮类化合物生物合成具有负调控作用而导致柚皮素的积累量增多, 进一步说明 *Ct*PRR1 参与调控红花黄酮类化

化合物的合成。

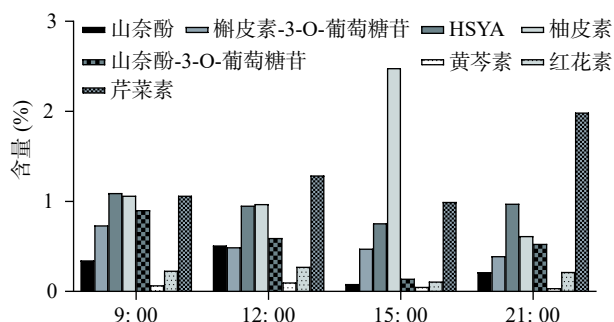


图4 单日内不同时间红花花冠黄酮类物质含量

2.5 *Ct*PRR1 蛋白互作研究

STRING 数据库预测红花转录组数据库中 *Ct*PRR1 的互作蛋白, 获得互作蛋白 TOC1、PIF3、COP1、ZTL、LHY、ELF4、ELF3、CCA1、GI、PRR5、GRP7、TIC、FKF1、RVE114 个, 互作关系网络如图 5。与 PRRs 基因共同参与调控植物生长发育, 调控植物次生代谢途径。由此获得了较为完善的花昼夜节律核心元件系统, 为进一步探索昼夜节律调控红花次生代谢的分子机制提供了依据。

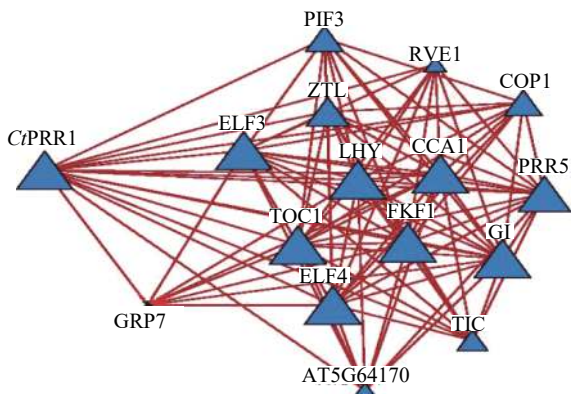


图5 *Ct*PRR1 互作蛋白网络预测

通过酵母双杂实验发现, 转入 pGBKT7-PRR bait 质粒的酵母细胞在 28 °C 生长 4 d 后情况正常。带有 pGBKT7-PRR bait 载体的酵母细胞与构建的红花 cDNA 文库质粒共转后, 28 °C 培养 2 d 后可以观察到蓝色菌斑出现, 4 d 后出现直径约 2 mm 的蓝色单克隆菌斑(图 6), 菌液 PCR 鉴定为阳性克隆。结果如表 3 所示, 有 2 个热休克蛋白, 3 个 AP2 转录因子, 热休克蛋白具有增强植物抗逆性的功能, AP2 转录因子广泛参与植物生长发育, 调控体内次生代谢。

3 讨论

红花作为常用的活血化瘀中药, 对其主要药效物质黄酮类化合物的生物合成途径及调控机制的

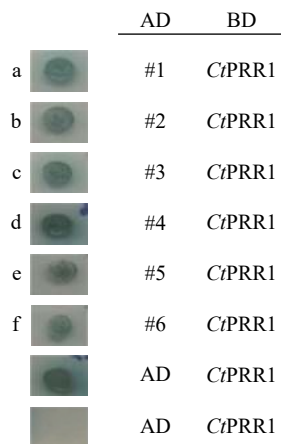


图6 酵母双杂结果

表3 酵母双杂筛选互作蛋白

序号	蛋白家族名称	预测功能
1	热休克蛋白	广泛参与植物响应外界环境胁迫, 生物合成以及生长发育相关的转录调控
2	热休克蛋白	
3	AP2转录因子	
4	AP2转录因子	
5	AP2转录因子	

研究越来越多^[20], 但目前红花黄酮类化合物生物合成途径及调控机制仍未阐明。

本研究首次克隆了一个 PRRs 家族基因 *Ct*PRR1, 生物信息学分析表明其与水稻、拟南芥等其他物种中的 PRRs 家族基因序列高度相关, 说明红花中的 PRRs 基因具有高度保守性。 *Ct*PRR1 基因主要在花中表达且开花后第 3 天时表达量最高, 与红花不同花期黄酮类化合物的累积规律一致, 存在显著相关。我们认为, *Ct*PRR1 调控了红花黄酮类化合物的生物合成。进一步的研究发现, *Ct*PRR1 的单日表达量在日间逐渐升高, 晚间逐渐下降; 随着 *Ct*PRR1 在单日表达量的升高, 芹菜素、槲皮素、HSYA、山奈酚、红花素、山奈酚-3-O-葡萄糖苷以及野黄芩素积累量为白天逐渐降低, 晚间逐渐升高。 *Ct*PRR1 对红花这些黄酮类成分的昼夜节律性积累起负调节作用; 唯 *Ct*PRR1 与柚皮素的积累量呈正相关, 可能与柚皮素处于黄酮生物合成途径的较上游以及参与其他代谢过程并受到其他调控基因的影响有关。

PRRs 与 CCA1、LHY 基因作为昼夜节律系统中的核心元件, 对多种植物的昼夜节律钟输出途径中与黄酮合成结构酶基因具有相互作用^[22-23], 本研究发现红花 *Ct*PRR1 可能受 2 个热休克蛋白, 3 个 AP2 转录因子的影响对黄酮化合物的积累起负调

节作用,丰富了昼夜节律基因调控黄酮类化合物机制的研究资料。

本研究结果为深入研究红花昼夜节律基因对黄酮生物合成途径的调控机制提供了资料。下一步的工作,我们将采用基因过表达以及基因敲除技术结合代谢物分析,进一步验证 *CtPRR1* 调控红花黄酮类化合物生物合成的功能及调控网络,为阐明 *CtPRR1* 的功能提供重要依据。

【参考文献】

- [1] 王升, 蒋待泉, 康传志, 等. 药用植物次生代谢在中药材生态种植中的作用及利用[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(9): 2002-2008.
 - [2] DUNLAP J C. Molecular bases for circadian clocks[J]. *Cell*, 1999, 96(2): 271-290.
 - [3] BENDIX C, MARSHALL C M, HARMON F G. Circadian clock genes universally control key agricultural traits[J]. *Mol Plant*, 2015, 8(8): 1135-1152.
 - [4] 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.
 - [5] BECKWITH E J, YANOVSKY M J. Circadian regulation of gene expression: at the crossroads of transcriptional and post-transcriptional regulatory networks[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2014, 27: 35-42.
 - [6] ITO S, MATSUSHIKA A, YAMADA H, et al. Characterization of the APRR9 pseudo-response regulator belonging to the APRR1/TOC₁ quintet in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Cell Physiol*, 2003, 44(11): 1237-1245.
 - [7] 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.
 - [8] 陈华夏, 申国境, 王磊, 等. 4个物种CCT结构域基因家族的序列进化分析[J]. 华中农业大学学报, 2010, 29(6): 669-676.
 - [9] MATSUSHIKA A, MAKINO S, KOJIMA M, et al. Circadian waves of expression of the APRR1/TOC₁ family of pseudo-response regulators in *Arabidopsis thaliana*: insight into the plant circadian clock[J]. *Plant Cell Physiol*, 2000, 41(9): 1002-1012.
 - [10] KURUP S, JONES H D, HOLDSWORTH M J. Interactions of the developmental regulator ABI₃ with proteins identified from developing *Arabidopsis* seeds[J]. *Plant J*, 2000, 21(2): 143-155.
 - [11] LEGNAIOLI T, CUEVAS J, MAS P. TOC₁ functions as a molecular switch connecting the circadian clock with plant responses to drought[J]. *EMBO J*, 2009, 28(23): 3745-3757.
 - [12] GRUNDY J, STOKER C, CARRÉ I A. Circadian regulation of abiotic stress tolerance in plants[J]. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 648.
 - [13] SEO P J, MAS P. STRESSING the role of the plant circadian clock[J]. *Trends Plant Sci*, 2015, 20(4): 230-237.
 - [14] SALOMÉ P A, WEIGEL D, MCCLUNG C R. The role of the *Arabidopsis* morning loop components CCA1, LHY, PRR7, and PRR9 in temperature compensation[J]. *Plant Cell*, 2010, 22(11): 3650-3661.
 - [15] NAKAMICHI N, KIBA T, HENRIQUES R, et al. PSEUDO-RESPONSE REGULATORS 9, 7, and 5 are transcriptional repressors in the *Arabidopsis* circadian clock[J]. *Plant Cell*, 2010, 22(3): 594-605.
 - [16] MIZUNO T. Two-component phosphorelay signal transduction systems in plants: from hormone responses to circadian rhythms[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2005, 69(12): 2263-2276.
 - [17] 王晗. 生物钟生物学及其研究进展[J]. 生命科学, 2015, 27(11): 1313-1319.
 - [18] 杨志福, 梅其炳, 蒋永培. 红花有效成分及药理作用[J]. *西北药学杂志*, 2001, 16(3): 131-133.
 - [19] 刘飞. 红花黄酮类化合物生物合成途径关键酶基因的克隆与功能验证[D]. 上海: 第二军医大学, 2014.
 - [20] GUO D D, GAO Y, LIU F, et al. Integrating molecular characterization and metabolites profile revealed CtCHI1's significant role in *Carthamus tinctorius* L[J]. *BMC Plant Biol*, 2019, 19(1): 1-13.
 - [21] BROWN B A, JENKINS G I. UV-B signaling pathways with different fluence-rate response profiles are distinguished in mature *Arabidopsis* leaf tissue by requirement for UVR8, HY5, and HYH[J]. *Plant Physiol*, 2008, 146(2): 576-588.
 - [22] FARRÉ E M, WEISE S E. The interactions between the circadian clock and primary metabolism[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2012, 15(3): 293-300.
 - [23] 何贝轩, 郭丹丹, 贾鑫磊, 等. 昼夜节律钟调控花青素类成分的生物合成[J]. 药学学报, 2018, 53(3): 345-355.
- [收稿日期] 2021-02-07 [修回日期] 2021-05-25
[本文编辑] 李睿旻

(上接第33页)

- [11] WAKISAKA S, NISHIMURA T, GOHTANI S. O/W nano-emulsion formation using an isothermal low-energy emulsification method in a mixture of polyglycerol polyricinoleate and hexaglycerol monolaurate with glycerol system[J]. *J Oleo Sci*, 2015, 64(4): 405-413.
 - [12] 刘美, 程勳, 闫碧涵, 等. 星点设计-效应面法优化丹参酮 II A冻干乳的处方[J]. 华西药学杂志, 2015, 30(5): 558-560.
 - [13] 梁珍, 张振, 李景果, 等. 伪三元相图联合星点设计效应面法优化益康唑固体脂质纳米粒的处方[J]. 中国药学杂志, 2020, 55(16): 1358-1362.
 - [14] 罗国平, 妙苗, 白杨, 等. 伪三元相图法优化复方丁香油微乳制备工艺[J]. *中国药业*, 2020, 29(7): 87-89.
 - [15] 曾春姣, 陈玲瓏, 李跃辉. 正交试验优选猫爪草纳米乳喷雾剂的提取工艺[J]. 湖南中医杂志, 2020, 36(4): 150-152.
- [收稿日期] 2021-07-24 [修回日期] 2022-01-05
[本文编辑] 李睿旻