

文章编号:1001-1498(2013)05-0649-06

## 杨树生物钟节律基因 *PtCCA1* 的 克隆及表达模式研究

刘无双, 杜明会, 陶维康, 杨 贞, 诸葛强\*

(林木遗传与生物技术省部共建教育部重点实验室, 南京林业大学, 江苏 南京 210037)

**摘要:**生物钟节律基因 *CCA1* 在植物的光周期反应中起着重要的调控作用。利用 RT-PCR 方法克隆获得了一条包含 1 902 bp 开放阅读框的杨树 *CCA1* 基因 cDNA 序列, 其编码 633 个氨基酸残基, 蛋白的分子量约为 68.90 kDa, 等电点为 6.33。分析显示含有 1 个 Myb-like DNA 结合域及 2 个蛋白跨膜结合域。实时荧光定量 PCR 分析发现, *PtCCA1* 基因主要在杨树叶组织中表达; 随着光照时间的变化, 该基因在杨树中的表达量呈现白昼不断降低而夜晚逐渐升高的昼夜变化趋势。研究结果为进一步探索 *PtCCA1* 基因在调控杨树光周期响应途径中的功能以及杨树光周期敏感机制提供了科学基础。

**关键词:** 杨树; *PtCCA1*; 生物节律钟; 基因表达

中图分类号: S792.117

文献标识码: A

## Cloning and Expression Analysis of Circadian Clock Gene *CCA1* in *Populus*

LIU Wu-shuang, DU Ming-hui, TAO Wei-kang, YANG Zhen, ZHUGE Qiang

(Key Laboratory of Forest Genetics and Biotechnology of Ministry of Education, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

**Abstract:** *CCA1* gene plays an important role in circadian clock sensitivity in *Populus*. In this study, *PtCCA1* was isolated from *Populus tomentosa* by RT-PCR. It has an open reading frame (ORF) of 1902 bp in length and encodes a protein of 663 amino acid residues, with protein molecular weight of 68.90 kDa and isoelectric point of 6.33. The amino acid sequence contained one Myb-like DNA binding domains and two putative transmembrane spanning regions. The results of fluorescence quantitative RT-PCR showed that the *PtCCA1* gene was expressed mainly in leaf tissues. Along with the change of illumination time, the expression amount of *PtCCA1* gene decreased during the day but gradually increased during the night. This study provides some references for further study of *PtCCA1* function in regulating photoperiod sensitivity and the mechanism of circadian synchronization in poplars.

**Key words:** *Populus*; *PtCCA1*; circadian clock; gene expression

由于地球以约 24 h 为周期的自转, 光线、温度、紫外线强度等环境因素也都周期性地改变, 地球上许多生物历经了漫长的进化, 形成了自己的计时系统即昼夜节律系统, 可以预测这些环境因子的周期性变化, 并周期性地改变生物体内的生理、生化反应

及代谢过程, 从而与外界的环境变化相适应<sup>[1-3]</sup>。植物昼夜节律系统调控了植物的诸多生理活动, 如光合作用、光周期调控的开花时间等, 对植物正常的生长发育过程至关重要<sup>[4-6]</sup>。如拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) *CCA1* (CIRCADIAN CLOCK

收稿日期: 2013-05-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(30571518)

作者简介: 刘无双(1984—), 女, 山东青岛人, 博士研究生, 主要从事分子生物学研究。

\* 通讯作者: 教授, 博士生导师, 主要从事杨树遗传改良研究。E-mail: qzhuge@njfu.edu.cn.

ASSOCIATED 1) 基因编码一个 MYB 结合蛋白<sup>[7]</sup>, 它是光周期振荡器的重要组成部分, 如果发生突变, 植物体的昼夜节律振幅将会变短<sup>[8]</sup>。

目前, 拟南芥 *AtCCA1*、大麦 (*Hordeum vulgare* Linn.) *BaCCA1* 和玉米 (*Zea mays* Linn.) *ZmCCA1* 基因研究中呈现节律性表达, 杨树 (*Populus* spp.) 中 *CCA1* 基因的研究尚未报道<sup>[9-11]</sup>。本研究利用 RT-PCR 方法, 从毛白杨 (*P. tomentosa* Carr.) 中克隆杨树 *PtCCA1* 基因, 并对其序列分析、同源性比较、遗传进化和启动子顺式作用元件分析, 另外对其组织表达模式及在不同光照周期处理过程中各时间点的表达规律进行了研究, 探索该基因对杨树光周期的响应规律, 旨在为阐明杨树光周期敏感现象的分子机制提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

毛白杨植株继代于 WPM 培养基, 在光照培养箱中培养 (光照 12 h/黑暗 12 h, 25℃)。

### 1.2 RNA 提取与 cDNA 第 1 链的合成

参照 RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen 公司, 美国) 说明书进行总 RNA 的纯化及 DNase I 消化。采用 Invitrogen 公司的反转录酶 (M-MLV) 进行反转录, 合成 cDNA 第 1 链。

### 1.3 目的基因克隆及序列测定

利用报道的拟南芥 *CCA1* 基因序列作为靶序列, 通过 NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 及 JGI ([http://genome.jgi-psf.org/Poptr1\\_1/Poptr1\\_1.home.html](http://genome.jgi-psf.org/Poptr1_1/Poptr1_1.home.html)) 生物信息数据库, 利用 RT-PCR 方法获得杨树 *CCA1* 基因序列。

根据电子克隆到的杨树 *PtCCA1* 基因序列, 设计包含全长 ORF 序列的基因特异引物 *PtCCA1* 5': 5'-GTTAGCGAGGATTTGAAGCAGC-3', *PtCCA1* 3': 5'-CAACAGAGAAGTATATTTATCTAGCCACCTC-3', 进行目的基因的 PCR 扩增。PCR 反应扩增体系如下: 反转录 cDNA 模板 30~50 ng, 10 × Ex PCR Buffer (Mg<sup>2+</sup> Free) 5.0 μL, MgCl<sub>2</sub> (25 mmol · L<sup>-1</sup>) 5.0 μL, 正反引物 (10 μmol · L<sup>-1</sup>) 各 2.0 μL, 高保真 TaKaRa Ex Taq (TaKaRa 公司, 中国大连) (5 U · μL<sup>-1</sup>) 0.5 μL, 加灭菌水补至 50.0 μL。PCR 反应程序: 94℃ 预变性 8 min; 94℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 3 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 5 min。目的扩增片段克隆参照宝诚生物工程公司的 pMD18-T Sim-

ple Vector 说明书进行, 序列测定由上海英骏生物技术有限公司完成。

### 1.4 杨树 *PtCCA1* 基因生物信息学分析

利用克隆测序得到杨树 *PtCCA1* 基因序列, 对其编码的氨基酸序列进行结构域分析、蛋白质结构预测及进化树的构建。

通过 Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) 推测蛋白质结构域。蛋白质跨膜区和疏水结构预测采用 TMpred ([http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)) 和 ProtScale (<http://ca.expasy.org/tools/protscale.html>) 工具进行。利用 MEGA5.1 软件邻接 (neighbor joining, NJ) 算法构建 *CCA1* 蛋白的系统进化树<sup>[12]</sup>。利用 PlantCARE 网站 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 分析各物种 *CCA1* 基因启动子顺式作用元件。

### 1.5 不同光照周期处理

毛白杨植株继代于 WPM 培养基, 光照培养箱中培养 (光照 12 h/黑暗 12 h, 25℃) 45 d 后进行 3 种光照周期处理: LD (光照 12 h/黑暗 12 h, 25℃)、LL (持续光照, 25℃)、DD (持续黑暗, 25℃)。取整株植株, LD 处理自光照 1 h 开始持续 24 h, 期间每隔 2 h 取样, 共计 13 个时间点的样品; LL 处理开始 1 h 后每隔 4 h 取样, 共计 13 个时间点的样品; DD 处理开始 1 h 后每隔 4 h 取样, 共计 13 个时间点的样品。每个时间点 3 株重复, 于液氮中速冻后置于 -80℃ 超低温冰箱中保存备用。

### 1.6 实时荧光定量 PCR 表达分析

分别提取生长于培养基 6 周龄植株的根、茎、叶组织 RNA, 反转录成 cDNA, 进行杨树 *PtCCA1* 基因不同光照周期表达分析, LD、LL、DD 3 种光照周期处理过程中各时间点获取的 cDNA 样品用于目的基因的实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 表达分析。

采用 Beacon Designer 7.5 软件进行 qRT-PCR 引物设计, qPCR *PtCCA1* 5': 5'-CAAGCAATCCT-TATCCTCGAAAGAC-3', qPCR *PtCCA1* 3': 5'-TAG-CATTGGTTGGCCTCTCATC-3', 以管家基因即延伸因子蛋白基因 EF (Elongation Factor) 为 qRT-PCR 的内参照, 扩增引物为 *PtEF1* 5': 5'-AAGCCATGGGAT-GATGAGAC-3', *PtEF1* 3': 5'-ACTGGAGCCAATTTT-GATGC-3'。qRT-PCR 采用 SYBR Green Master Mix (Rox), 在 ABI 7500 Real-time PCR Systems (Applied Biosystems 公司, 美国) 上完成, 每反转录样品 3 次重复。反应体系为: 2 × SYBR Green Master Mix 10

$\mu\text{L}$ , 正反引物 ( $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 各  $1 \mu\text{L}$ , cDNA  $1 \mu\text{L}$  ( $10 \sim 50 \text{ ng}$ ), 灭菌水  $7 \mu\text{L}$ 。反应程序为:  $95^\circ\text{C}$   $1 \text{ min}$ ;  $95^\circ\text{C}$   $15 \text{ s}$ ,  $60^\circ\text{C}$   $1 \text{ min}$ , 40 个循环。

## 2 结果与分析

### 2.1 *PtCCA1* 基因的克隆和序列分析

利用引物 *PtCCA1* 5' 和 *PtCCA1* 3' 进行扩增、克隆并回收测序, 获得  $1\ 902 \text{ bp}$  的开放阅读框编码蛋白质, 含有 633 个氨基酸残基, 编码蛋白分子量为

$68.90 \text{ kDa}$ , 等电点为  $6.33$ 。该片段与拟南芥 *CCA1* 高度同源, 因此将其命名为 *PtCCA1*。

氨基酸序列分析及编码蛋白的结构域预测显示: *PtCCA1* 具有 Myb-like DNA 结合域, 位于 24 ~ 68 位(图 1); ProtScale 分析其为疏水蛋白(图 2); 用 TMpred 分析该氨基酸具有 2 个蛋白跨膜结合域, 在 383 ~ 406 位和 433 ~ 450 位的疏水性跨膜区域, 氨基端位于膜内(图 3)。



图 1 杨树 *PtCCA1* 基因蛋白结构域分析

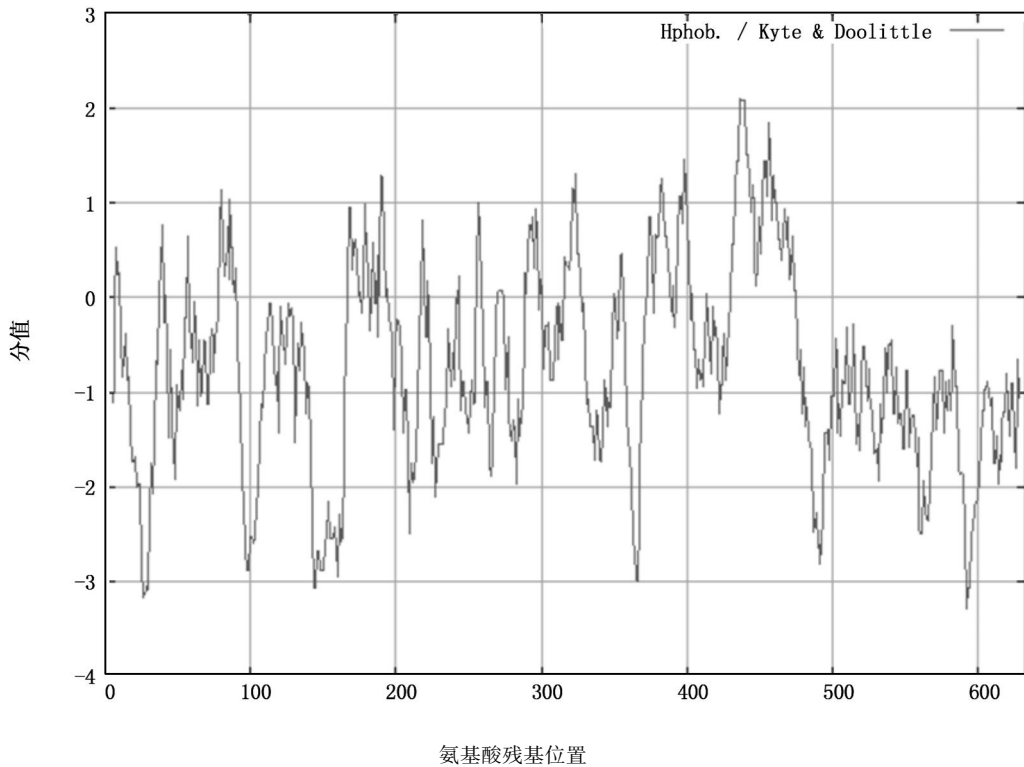


图 2 杨树 *PtCCA1* 基因疏水性分析

### 2.2 *CCA1* 蛋白结构域及系统进化树分析

通过 DNAMAN 软件分析发现, *CCA1* 蛋白结构域相似性很高(图 4), 杨树 *PtCCA1* 结构域与双子叶植物拟南芥 *AtCCA1*、冰叶日中花 (*Mesembryanthemum crystallinum* Linn.) *McCCA1* 以及单子叶植物水稻 (*Oryza sativa* Linn.) *OsCCA1*、玉米 *ZmCCA1*、大麦 *HvCCA1* 的序列高度保守, 相似度分别为 88.89%、100%、95.56%、93.33% 和 93.33%。

根据氨基酸序列上的相似性, 利用 MEGA5.1 软

件绘制了 *CCA1* 蛋白的遗传进化树(图 5)。发现双子叶植物杨树、拟南芥和冰叶日中花聚在同一个类群, 而单子叶植物水稻、玉米、大麦则聚在另一类群, 说明该基因在进化上应始于单双子叶植物分化之后。

### 2.3 *CCA1* 基因启动子元件分析

通过 JGI 数据库 ([http://genome.jgi-psf.org/Poptr1\\_1/Poptr1\\_1.home.html](http://genome.jgi-psf.org/Poptr1_1/Poptr1_1.home.html)) 获取杨树、拟南芥、水稻、玉米 *CCA1* 基因启动子区域  $1\ 500 \text{ bp}$  序列, 利用

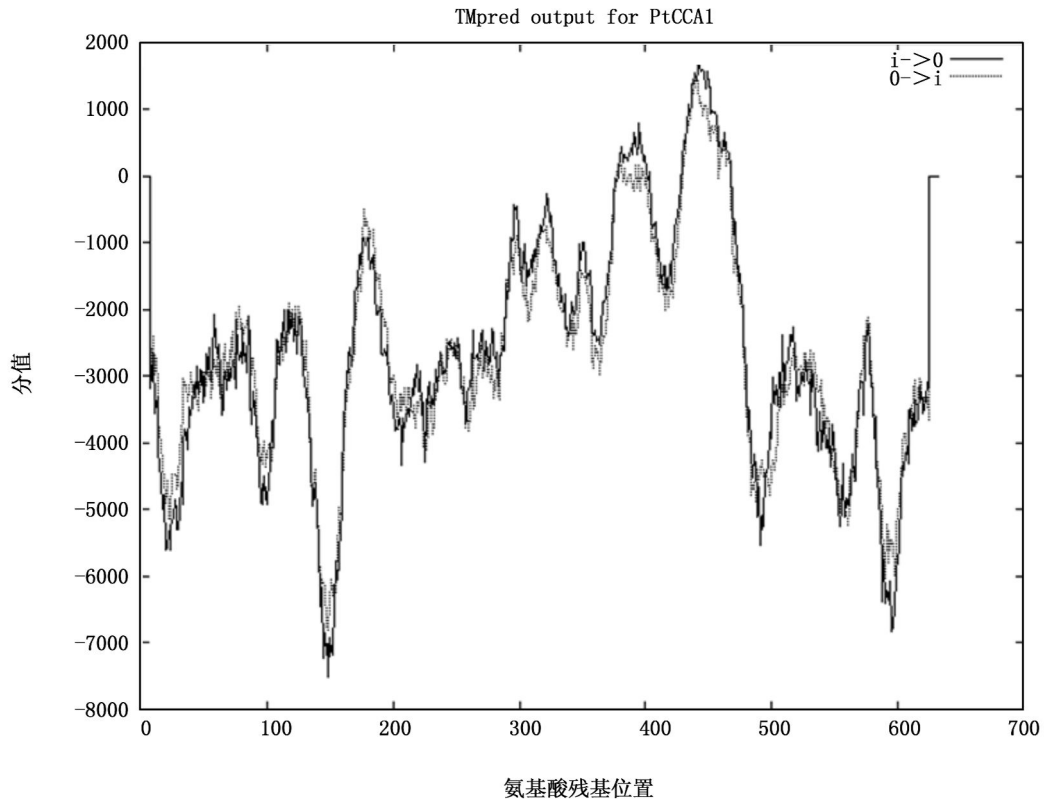


图3 杨树 *PtCCA1* 基因跨膜结构分析

PtCCA1	RERWTFEEENRF	EAL	LYGRAWCE	IEEH	ICTKTAVÇIRSHAQKF
AtCCA1	RERWTFEEENRF	EAL	LYGRAWCE	IEEHV	TKTAVÇIRSHAQKF
HvCCA1	RERWTFEEENRF	EAL	LYGRAWCE	IEEHV	TKTAVÇIRSHAQKF
McCCA1	RERWTFEEENRF	EAL	LYGRAWCE	IEEH	ICTKTAVÇIRSHAQKF
OsCCA1	RERWTFEEENRF	EAL	LYGRAWCE	IEEHV	TKTAVÇIRSHAQKF
ZmCCA1	RERWTFEEENRF	EAL	LYGRAWCE	IEEHV	TKTAVÇIRSHAQKF

图4 不同物种 *CCA1* 基因 Myb-like DNA 结合域氨基酸序列分析

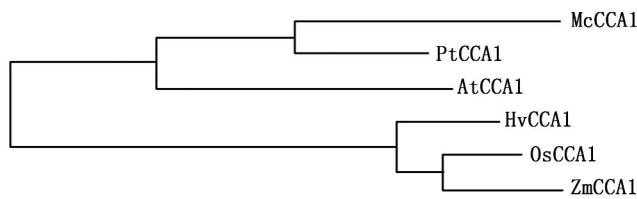


图5 *CCA1* 基因进化树

PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 网站对各物种 *CCA1* 基因

进行启动子顺式作用元件预测分析,统计顺式作用元件种类及数量如表1。通过启动子元件种类、数量对比,发现杨树与其它物种 *CCA1* 基因启动子区域存在许多功能一致的顺式作用元件。所有 *CCA1* 基因启动子序列中均含有与生物钟节律周期相关的 circadian 元件间接说明 *CCA1* 基因参与植物生物钟节律生命活动。其启动子区域还含有与光信号响应功能相关的 Sp1、G-Box 等顺式作用元件,暗示着 *CCA1* 基因的表达与光照密切联系。因此,下一步实验作者设计 LD(光照 12 h/黑暗 12 h, 25℃)、LL(持续光照, 25℃)、DD(持续黑暗, 25℃) 3 种不同的光照周期处理,通过 qRT-PCR 技术检测杨树 *CCA1* 基因的表达情况。

表1 *CCA1* 基因启动子元件预测结果

元件	功能	<i>PtCCA1</i>	<i>AtCCA1</i>	<i>OsCCA1</i>	<i>ZmCCA1</i>
circadian	参与生物节律顺式调控	2	2	2	2
Sp1	光应答	2	1		5
I-box	部分光应答		1	2	2
G-box	参与顺式调控光应答	6	4		4
CATT-motif	部分光应答		1	1	1
AE-box	部分光应答模块	1	2	1	
5UTR Py-rich stretch	顺式调控高水平转录		1	1	2

### 2.4 *PtCCA1* 基因组织表达模式分析

提取毛白杨植株的根、茎、叶 RNA 经处理后反转录成 cDNA,通过 qRT-PCR 检测杨树 *PtCCA1* 基因表达,分析杨树 *PRR* 家族基因表达的组织特性。qRT-PCR 检测结果如图 6 所示,*PtCCA1* 基因表达量由高到底依次为:叶、茎、根,叶中的表达量远高于茎及根组织,因此得出 *PtCCA1* 基因主要在叶中表达的结论。

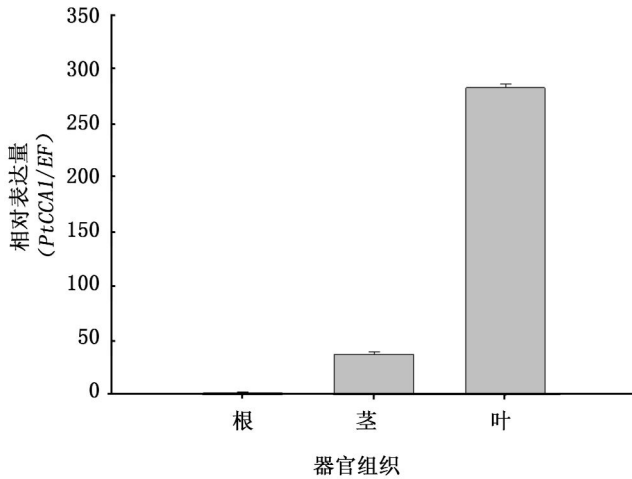


图 6 *PtCCA1* 基因表达模式

### 2.5 不同光照周期 *PtCCA1* 基因表达分析

分别提取 LD、LL、DD 3 种光照周期处理下各时间点的整株植株材料,以 *EF* 为内参基因,进行 qRT-PCR 分析。在 LD 光照周期条件下,*PtCCA1* 基因表达峰首先出现在凌晨,之后表达量逐渐下降,进入夜晚后表达又逐步升高,完成一个循环周期(图 7)。在 LL 光照周期条件下,*PtCCA1* 基因虽然保持着表达节律性,但在后期表达振幅有所减小(图 8)。在 DD 光照周期条件下,*PtCCA1* 基因表达开始保持着表达节律性,之后节律性减弱,这也许是与 *PtCCA1* 基因启动子区中光响应顺式作用元件的调控作用有关(图 9)。

## 3 讨论

杨树是首个完成基因组序列测定的模式树木,生长迅速,无性繁殖容易,种间可杂交,组织培养和遗传转化体系比较完善,遗传学研究有较好基础,其功能基因组学的研究将为其其它林木的同类研究提供理论和方法上的直接借鉴<sup>[13-14]</sup>。

植物体内存在一种以 24 h 为周期的内源调节机制,影响植物体内基因的表达、代谢调控以及生殖过程等一系列生理进程<sup>[15]</sup>。植物通过感知光周期

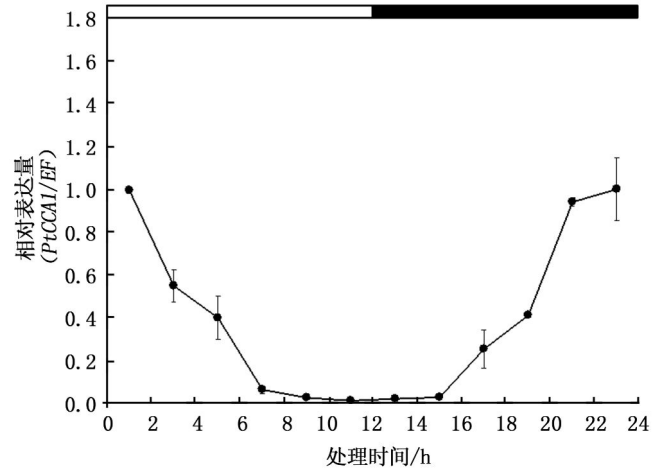


图 7 LD 光照周期 *PtCCA1* 基因表达水平

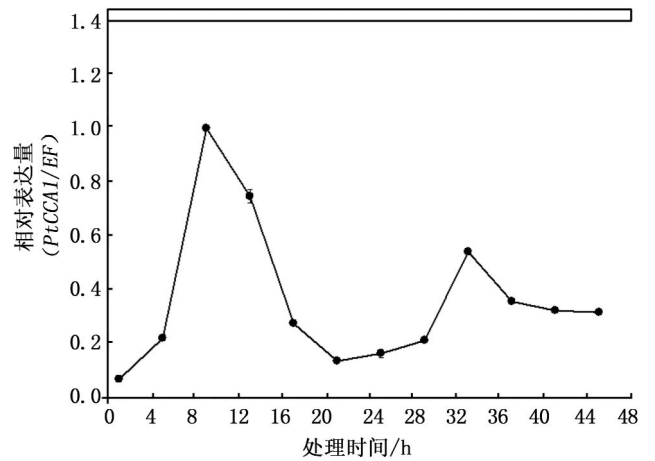


图 8 LL 光照周期 *PtCCA1* 基因表达水平

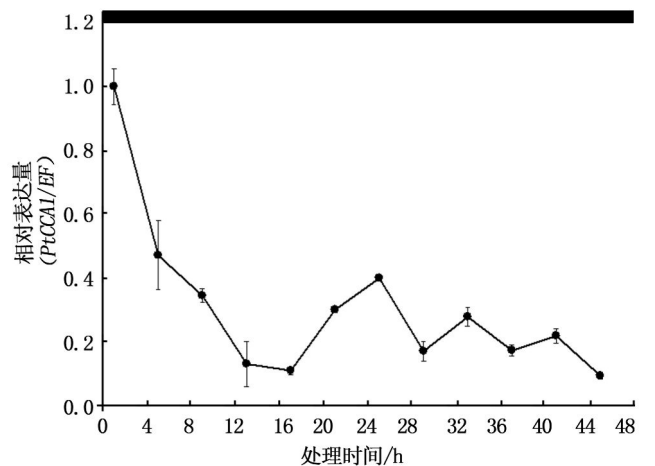


图 9 DD 光照周期 *PtCCA1* 基因表达水平

的变化来判断昼夜的变化<sup>[16]</sup>。*CCA1* 是与生物钟相关的 MYB 类转录因子<sup>[17]</sup>,是拟南芥昼夜节律振荡器的重要组成部分<sup>[18]</sup>,通过与 *TOC1* (*TIMING OF CAB EXPRESSION 1*) 转录因子相互作用形成一个转录—翻译水平的反馈抑制环<sup>[19-21]</sup>,调控植物对昼夜变化

做出响应,是维持生物钟节律的必需组分<sup>[8]</sup>。

杨树 *PtCCA1* 基因具有 1 902 bp 的完整读码框,编码 633 个氨基酸残基的肽链,含有一个保守的 MYB 结构域,此结构域在拟南芥、水稻、玉米中都存在<sup>[17,22]</sup>,而且它们的相似性高达 95.93%,说明该基因在双子叶植物和单子叶植物之间极其保守。

*PtCCA1* 基因主要在叶组织中表达。在光照开始后 *PtCCA1* 基因 mRNA 转录产物开始下降,直至进入黑暗后表达量逐渐回升。这与拟南芥 *CCA1* 在凌晨时表达量最高而黄昏时表达量最低的研究结果一致<sup>[15]</sup>。与拟南芥相比,虽然杨树 *PtCCA1* 基因在 DD 光照周期条件下后期表达节律性有所减弱,杨树 *PtCCA1* 基因在 LL、DD 光照周期条件下的表达模式与拟南芥中的研究结果是相似的<sup>[23]</sup>,表明作者克隆获得的杨树 *PtCCA1* 基因与拟南芥中的 *CCA1* 基因在光周期调控中发挥的功能相近。

目前对杨树生物钟节律基因功能鉴定的报道很少,但其它高等植物的光周期调控关键基因的研究及基因的保守性关系能够为杨树光周期基因的克隆提供一定的依据,特别是高通量测序技术的发展,以及相关物种基因组序列的公布,为解析杨树光周期遗传机理提供了便利。由于生物节律会对植物各方面的生命活动产生影响,因此杨树生物钟节律机制的研究对杨树生长发育的认识具有重要的理论意义。

#### 参考文献:

- [1] Michael T P, Salomé P A, Yu H J, *et al.* Enhanced fitness conferred by naturally occurring variation in the circadian clock [J]. *Science*, 2003, 302(5647): 1049 - 1053
- [2] Dodd A N, Salathia N, Hall A, *et al.* Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage [J]. *Science*, 2005, 309(5734): 630 - 633
- [3] Ni Z, Kim E D, Ha M, *et al.* Altered circadian rhythms regulate growth vigour in hybrids and allopolyploids [J]. *Nature*, 2009, 457(7227): 327 - 331
- [4] Rund-Kangisser S, Yakir E, Green R. Proteasomal regulation of CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (*CCA1*) stability is part of the complex control of *CCA1* [J]. *Plant Signal Behav*, 2013, 8(3) . pii: e23206
- [5] Gutierrez R A, Stokes T L, Thum K, *et al.* Systems approach identifies an organic nitrogen-responsive gene network that is regulated by the master clock control gene *CCA1* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(12): 4939 - 4944
- [6] Niwa Y, Ito S, Nakamichi N, *et al.* Genetic linkages of the circadian clock-associated genes, *TOC1*, *CCA1* and *LHY*, in the photoperiodic control of flowering time in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2007, 48(7): 925 - 937
- [7] Kawamura M, Ito S, Nakamichi N, *et al.* The function of the clock-associated transcriptional regulator *CCA1* (CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED 1) in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2008, 72(5): 1307 - 1316
- [8] Alabadi D, Yanovsky M, Mas P, *et al.* Critical role for *CCA1* and *LHY* in maintaining circadian rhythmicity in *Arabidopsis* [J]. *Curr Biol*, 2002, 12(9): 757 - 761
- [9] Matsushika A, Makino S, Kojima M, *et al.* The APRR1/TOC1 quintet implicated in circadian rhythms of *Arabidopsis thaliana*: II. Characterization with *CCA1*-overexpressing plants [J]. *Plant Cell Physiol*, 2002, 43(1): 118 - 122
- [10] 邢国芳, 宋 萌, 姚 涵, 等. 大麦 (*Hordeum vulgare*) 昼夜节律钟基因 *CCA1* 的克隆及表达分析 [J]. *山西农业大学学报*, 2012, 32(3): 207 - 212
- [11] 邢国芳, 杜伟建, 张雁明, 等. 玉米昼夜节律钟基因 *CCA1* 的克隆及表达分析 [J]. *山西农业大学学报*, 2011, 31(4): 332 - 337
- [12] Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731 - 2739
- [13] Tuskan G. A, Difazio S, Jansson S, *et al.* The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray) [J]. *Science*, 2006, 313(5793): 1596 - 1604
- [14] Jansson S, Douglas C J. *Populus*: a model system for plant biology [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2007, 58: 435 - 458
- [15] Daniel X, Sugano S, Tobin E M, *et al.* CK2 phosphorylation of *CCA1* is necessary for its circadian oscillator function in *Arabidopsis* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(9): 3292 - 3297
- [16] Lu S X, Webb C J, Knowles S M, *et al.* *CCA1* and *ELF3* interact in the control of hypocotyl length and flowering time in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2012, 158(2): 1079 - 1088
- [17] Mizoguchi T, Wheatley K, Hanzawa Y, *et al.* *LHY* and *CCA1* are partially redundant genes required to maintain circadian rhythms in *Arabidopsis* [J]. *Dev Cell*, 2002, 2(5): 629 - 641
- [18] Ito S, Nakamichi N, Nakamura Y, *et al.* Genetic linkages between circadian clock-associated components and phytochrome-dependent red light signal transduction in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2007, 48(7): 971 - 983
- [19] Alabadi D, Oyama T, Yanovsky M, *et al.* Reciprocal regulation between *TOC1* and *LHY/CCA1* within the *Arabidopsis* circadian clock [J]. *Science*, 2001, 293(5531): 880 - 883
- [20] Kikis E A, Khanna R, Quail P H, *et al.* *ELF4* is a phytochrome-regulated component of a negative-feedback loop involving the central oscillator components *CCA1* and *LHY* [J]. *Plant J*, 2005, 44(2): 300 - 313
- [21] Fujimori T, Sato E, Yamashino Y, *et al.* *PRR5* (PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 5) plays antagonistic roles to *CCA1* (CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED 1) in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2005, 69(2): 426 - 430
- [22] Wang X, Wu L, Zhang S, *et al.* Robust expression and association of *ZmCCA1* with circadian rhythms in maize [J]. *Plant Cell Rep*, 2011, 30(7): 1261 - 1272
- [23] Ovadia A, Tabibian-Keissar H, Cohen Y, *et al.* The 5' UTR of *CCA1* includes an autoregulatory cis element that segregates between light and circadian regulation of *CCA1* and *LHY* [J]. *Plant Mol Biol*, 2010, 72(6): 659 - 671