

## 大豆 *GmCOL8* 基因的克隆及表达分析

马锦花<sup>1</sup>, 张清哲<sup>1</sup>, 陈新建<sup>1,\*</sup>, 傅永福<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>河南农业大学生命科学学院, 郑州 450002; <sup>2</sup>中国农业科学院作物科学研究所, 农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程, 北京 100081

**摘要:** 从大豆品种‘垦农18’中克隆了一个 *CONSTANS-like* 基因, 命名为 *GmCOL8*。进化树分析表明它属于 *CONSTANS-like* 亚家族1的成员。mRNA表达分析显示, *GmCOL8* 在短日下具有明显的生物钟节律性表达特性, 其表达高峰出现在凌晨。*GmCOL8* 主要在复叶中表达, 表达高峰出现在开花时期。

**关键词:** 大豆; *CONSTANS-like*; 生物钟节律; 生物信息学

## Cloning and Expression Analysis of *GmCOL8* Gene in Soybean (*Glycine max* L.)

MA Jin-Hua<sup>1</sup>, ZHANG Qing-Zhe<sup>1</sup>, CHEN Xin-Jian<sup>1,\*</sup>, FU Yong-Fu<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; <sup>2</sup>National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement, Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

**Abstract:** A *CONSTANS-like* gene, named *GmCOL8*, was cloned from soybean (*Glycine max*) cultivar ‘Kennong 18’ in the study. The analysis of phylogenetic tree showed that *GmCOL8* was a member of soybean *CONSTANS-like* subfamily group 1. The mRNA expression pattern revealed that *GmCOL8* had rhythmicity of circadian clock under the condition of short day, and reached a peak at dawn. It expressed mainly in trifoliolates, and the maximum level appeared at the stage of flowering.

**Key words:** *Glycine max*; *CONSTANS-like*; circadian clock; bioinformatics

*CONSTANS (CO)* 是植物光周期开花途径中的关键基因之一, 它位于光周期生物节律钟基因 (circadian clock genes, 如: *GIGANTEA*, *GI*) 与下游开花调节基因 (如: *Flowering Locus T*, *FT*) 之间, 控制着光信号到成花信号的转换, 从而控制着植物由营养生长向生殖生长的转变 (Koorneef 等 1991; Putterill 等 1995; Kardailsky 等 1999; Suarez-Lopez 等 2001; Yanovsky 和 Kay 2002; Klejnot 和 Lin 2004; Abe 等 2005; Jaeger 等 2006; Thomas 2006)。CO 基因编码一个具有锌指结构的转录因子, 其N端有两个与蛋白之间相互作用有关的 B-box 锌指结构 (C-X2-C-X16-C-X2-C) (Borden 1998; Torok 和 Etkin 2001), C端有一个与 CO 蛋白核定位有关的富含 45 个碱性氨基酸的 CCT (CO, CO-like, TOC1) 域 (Strayer 等 2000; Robson 等 2001; Griffiths 等 2003), CCT 域还可能与 HAP3 和 HAP5 形成复合体有关 (Wenkel 等 2006)。CO 同源基因广泛存在于植物界中, 如水稻、大麦、小麦、牵牛、甜菜、衣藻等 (Liu 等 2001; Griffiths 等 2003; Nemoto 等 2003; Chia 等 2008) 中均检测到 CO 同源基因的存在。拟

南芥中有 16 个 *CONSTANS-like* 成员, 其中大部分成员的具体作用还不清楚。

CO 具有生物钟节律表达特性, 且在长日和短日条件下的表达变化存在差异 (Samach 等 2000; Suarez-Lopez 等 2001; Hayama 和 Coupland 2004)。在长日条件下, 拟南芥 CO mRNA 的峰值出现在凌晨和光照后 16 h, 而在短日条件下, 其峰值出现在光照后 12~20 h 之间 (Suarez-Lopez 等 2001)。光照条件下, 光受体 CRY2 和 PHYA 调节 CO 蛋白的稳定而不被降解; 而在暗中, CO 蛋白被 E3 泛素连接酶 COP1 (constitutive photomorphogenic 1) 泛素化后在蛋白酶体 (proteasome) 中降解 (Jang 等 2008; Liu

收稿 2009-09-25 修定 2009-12-29

资助 国家支撑计划 (2007BAD59B02)、转基因专项 (2008ZX08009-001、2008ZX08004-005、2008ZX08010-004)、“863”项目 (2006AA10Z107、2006AA10A111、2007AA10Z119) 和“973”项目 (2004CB117206)。

致谢 陈其军先生提供 pGWC 载体。胡瑞波先生和范成明先生给予技术支持和实验帮助。

\* 通讯作者 (E-mail: xinjian@371.net, fuyf@caas.net.cn; Tel: 0371-63558722)。

等2008)。在长日条件下,高水平积累的CO蛋白激活了FT基因的表达,从而促进拟南芥在长日条件下开花;短日条件下,CO mRNA只在暗中才能达到高峰,CO蛋白无法积累,故不能在短日条件下诱导开花(Hayama和Coupland 2004)。水稻中CO基因的功能与拟南芥中相反,长日条件下,水稻CO的同源基因Hdl (*heading date 1*) mRNA的高水平积累出现在午间到黄昏之间,Hdl蛋白在黄昏时能稳定积累达到峰值,高水平积累的Hdl蛋白抑制OsFTL2 (*Hd3a*)的表达和开花;而在短日条件下,Hdl mRNA峰值出现在暗中,Hdl蛋白被降解而不能稳定积累,因而Hd3a得以表达,最终诱导开花(Kojima等2002; Hayama和Coupland 2004; Tamaki等2007)。从拟南芥和水稻的开花促进途径对比中可知,长日和短日植物的开花促进途径有很强的保守性,同时又存在各自的特殊性(Yano等2000; Izawa等2002; Kojima等2002; Hayama和Coupland 2004)。

大豆是起源于我国的短日植物,其光周期现象明显,因而种植范围受到限制。所以研究大豆光周期形成的机制,改变其光周期习性,有一定的理论和实践意义。目前大豆CO的研究尚属空白。本文克隆到了一个大豆的CONSRANS-like基因——GmCOL8,并用生物信息学方法确定其为大豆GmCOL家族的一员,用Real-time PCR的方法分析其不同光周期诱导、不同发育阶段及不同组织器官表达变化,显示GmCOL8具有明显生物钟节律和组织器官特异表达模式。本文目的在于为进一步解析CO基因在大豆开花的光周期诱导过程中的作用机制积累基础性资料。

## 材料与amp;方法

植物材料为大豆品种‘垦农18’ (*Glycine max* L. ‘Kennong 18’)。取大田土壤与有机肥以2:1的比例混匀,在花盆中种植,温室培养,温度为25~28℃,光照分为短日(SD, 8 h光照/16 h黑暗)条件与长日(LD, 18 h光照/6 h黑暗)条件,光源由荧光灯提供(TLD 18 W/54, Philips),光照强度为40~90  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。

生物节律实验(LD/SD条件)只取样品的单叶,将种子分别种植于长日和短日条件下,从单叶完全

展开时开始,每隔2 h一次,各取24个时间点(48 h),随后将幼苗分别转移至连续光照(LL)和连续黑暗(DD)条件下培养,每隔2 h取一次样,各取24个时间点(共48 h)。所有样品取后立即用液氮冷冻后贮于-80℃下备用。

组织特异性取样(SD条件)以特征叶片完全展开为标志,按照大豆叶片的发育时期分别进行取材。在单叶展开之前(播种后8 d)取地上部分的幼苗,在单叶期(播种后14 d)取根、下胚轴、上胚轴、子叶、单叶和茎尖(包括顶端分生组织和幼叶),分别于单叶期、第1复叶期、第2复叶期、第3复叶期、开花期(即第4复叶期)取地上部分,在开花期(播种后45 d)取根、茎、单叶、第1复叶、第2复叶、第3复叶、侧生叶和花,分别于开花后7、14和21 d取不同发育时期的莢和种子。样品及其缩写见表1。所有样品均在光照开始后0.5 h取样,取后立即用液氮处理后贮于-80℃下备用。

根据拟南芥CONSTANS基因的蛋白序列,在大豆基因组蛋白数据库(<http://www.phytozome.net/soybean>)中进行候选基因的筛选。对于所得不完整的基因在Softberry服务器上用FGENESH程序重新预测(<http://www.softberry.com/berry.phtml>)。根据预测基因GmCOL8的UTR及CDS序列,设计特异引物(表2)。Trizol法提取‘垦农18’大豆幼苗cDNA进行PCR扩增。其反应程序如下:94℃预变性5 min;94℃ 30 s,50~55℃ 30 s,72℃ 1~2 min循环25~35次;最后72℃延伸8 min。

回收PCR产物,与Gateway T载体(pGWG-T)连接、转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ ,挑取阳性克隆测序(在北京三博生物技术公司进行测序)。

根据拟南芥CO家族成员(17个)及部分已报道的其他物种CO家族与GmCOL8蛋白全长序列,用MEGA 4.0 (Tamura等2007)构建系统发育树。采用Neighbor-joining (NJ)算法的Complete deletion模式建树,Bootstrap值取1 000。

GmCOL8的表达特性分析采用Trizol法提取大豆‘垦农18’不同处理样品的总RNA,反转录合成cDNA后作为qPCR (quantitative PCR)扩增模板。利用Beacon Designer 7.0软件设计引物(表2),用SYBR Green I染料,在ABI StepOne仪上进行。数据处理采用ABI 2中的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算基因相对表

表1 不同发育时期和组织器官的样品

Table 1 Samples of different tissues/organs and developmental stages

样品	样品缩写	样品	样品缩写
播种后1周幼苗	幼苗	第1复叶期单叶	T1-U
单叶期根	U-R	第2复叶期单叶	T2-U
单叶期下胚轴	U-HH	第3复叶期单叶	T3-U
单叶期上胚轴	U-EH	第1复叶期第1复叶	T1-T1
单叶期子叶	U-C	第2复叶期第1复叶	T2-T1
单叶期单叶	U-U	第3复叶期第1复叶	T3-T1
单叶期茎尖	U-SAM	第2复叶期第2复叶	T2-T2
开花期根	F-R	第3复叶期第2复叶	T3-T2
开花期茎	F-St	第3复叶期第3复叶	T3-T3
开花期侧生叶	F-L	开花后7d的种子	7 DAF
开花期单叶	F-U	开花后14d的种子	14 DAF
开花期第1复叶	F-T1	开花后21d的种子	21 DAF
开花期第2复叶	F-T2	成熟期种子	M
开花期第3复叶	F-T3	单叶期地上部	U-A
开花期第4复叶	F-T4	第1复叶期地上部	T1-A
花蕾	F	第2复叶期地上部	T2-A
开花后7d的荚	Pd1	第3复叶期地上部	T3-A
开花后14d的荚	Pd2	开花期地上部	F-A
开花后21d的荚	Pd3		

表2 引物序列及其用途

Table 2 Primer sequences and their roles

基因名称	上游引物(5' → 3')	下游引物(5' → 3')	用途
<i>GmCOL8</i> -UTR	GGAGCAAAAGTAGAGGCAGT	TAAACAGAAAGGCAACC	克隆 <i>GmCOL8</i>
<i>GmCOL8</i> -CDS	ATGGGAATTGAAAGAGG	CTAAAACGATGGTACGAC	克隆 <i>GmCOL8</i>
<i>CYP2</i>	GCCTCTGGATCCTGCTCAAG	ACCTCCTCCTCAAACCTCCTCTC	荧光定量 RT-PCR
<i>ACT11</i>	ATCTTGACTGAGCGTGGTTATTCC	GCTGGTCTGGCTGTCTCC	荧光定量 RT-PCR
<i>GmCOL8</i>	ACAGCGTCGTTCCAGTTC	CACCACTCCAACATCAAGC	荧光定量 RT-PCR

达量。qPCR用两步法,程序参数如下:95℃ 10 s,热启动;95℃ 5 s,60℃ 1 min,40个循环。在扩增循环结束后做熔解曲线,其程序为:95℃,15 s;60℃,1 min;95℃,15 s;温度以每个循环0.5℃递增。

## 实验结果

### 1 大豆 *GmCOL8* 的克隆

将拟南芥 *CONSTANS* 基因的蛋白序列,在大豆蛋白数据库(<http://www.phytozome.net>)中进行比对分析,预测到12个大豆 *CONSTANS-like* 家族基因,暂命名为 *GmCOL1*~*GmCOL12* (数据未列出)。其中 *GmCOL8* 基因(大豆基因组网站预测序列号为 Glyma17g07420.1)位于第17条染色体上,基因全长

1 911 bp, CDS 长 1 125 bp, 包含 1 个内含子(847~936 bp), 2 个外显子(103~846 bp 和 937~1 317 bp), 编码一个由 375 个氨基酸组成的蛋白。根据大豆基因组网上序列,先对位于 33 bp 处的 3' UTR 和 1 500 bp 处的 5' UTR 区域设计特异引物(表 2),以大豆‘垦农 18’幼苗 cDNA 为模板,通过 PCR 扩增,获得含有部分 UTR 的 cDNA 片段,测序结果表明该 cDNA 片段与大豆基因组中的 *GmCOL8* 一致,说明大豆‘垦农 18’的 *GmCOL8* 的与 Williams 的 Glyma17g07420.1 属同一基因。再以此片段为模板,通过 PCR 扩增获得完整编码区序列。*GmCOL8* 基因的蛋白序列具有 CO 家族的典型保守结构:含有 2 个完整的 B-box,均在第一个外显上, CCT domain

在第二个外显子处,且在碳末端含有6个保守氨基酸的T-motif。该序列已提交GenBank,登录号为GQ864262。

## 2 大豆 *GmCOL8* 的亲缘关系分析

将大豆 *GmCOL8* 与部分已报道的具有完整CDS序列的CO同源基因进行蛋白比对分析并构建系统发育树。由比对结果可知, *GmCOL8* 与 *AtCO* 的相似性为38.8%, 与 *OsA* (*Hd1*) 的相似性为35.5%,

与 *PpCOL1* 的相似性为49.7%。*GmCOL8* 与 *AtCOL5* 相似性最高为59.2%。*CO* 基因家族按照其保守结构的不同可以分成3个亚家族(group), 目前被广泛研究的主要是 Group 1 中的 *CO* 基因, 本文中的 *GmCOL8* 也隶属于该组中。大豆的 *GmCOL8* 与拟南芥 *CO* 基因家族的 Group1 成员聚在同一支, 且与 *AtCOL5* 亲缘关系最近, 与小立碗藓 (*Physcomitrella patens*) 处在同一个进化枝上。

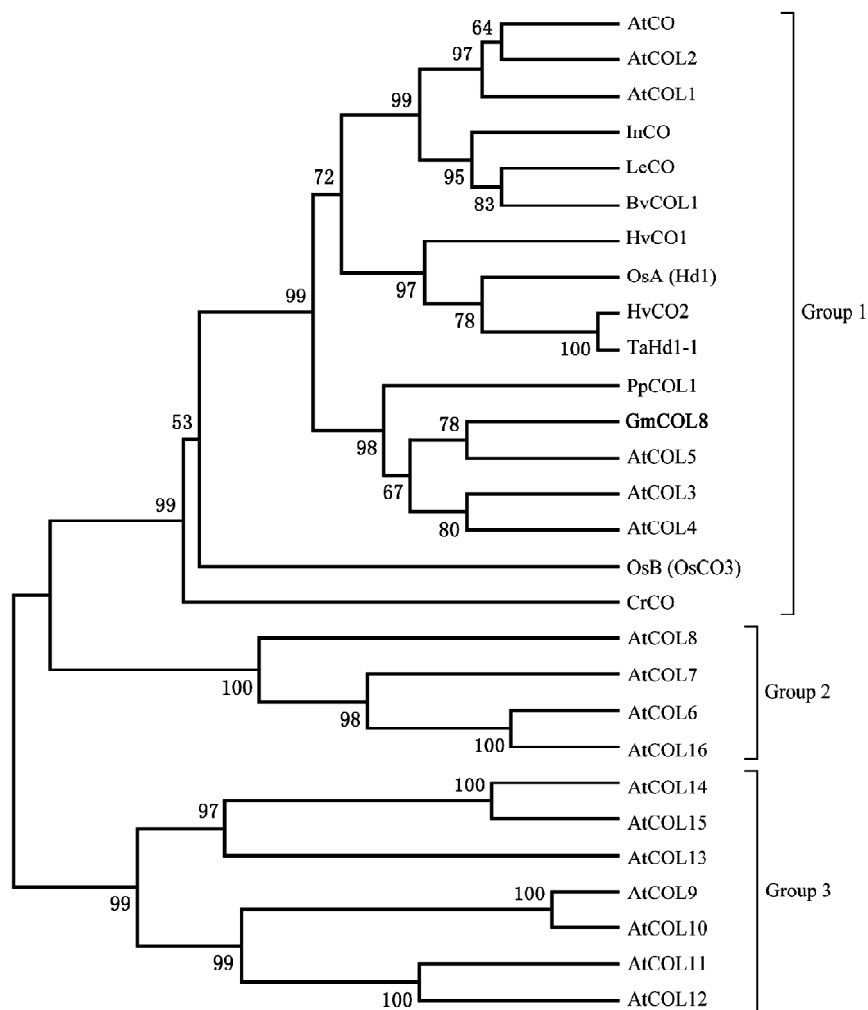


图1 *GmCOL8* 系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree of *GmCOL8*

拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*): *AtCO* (At5G15840), *AtCOL1* (At5G15850), *AtCOL2* (At3G02380), *AtCOL3* (At2G24790), *AtCOL4* (At5G24930), *AtCOL5* (At5G57660), *AtCOL6* (At1G68520), *AtCOL7* (At1G73870), *AtCOL8* (At1G49130), *AtCOL9* (At3G07650), *AtCOL10* (At5G48250), *AtCOL11* (At4G15250), *AtCOL12* (At3G21880), *AtCOL13* (At2G47890), *AtCOL14* (At2G33500), *AtCOL15* (At1G28050), *AtCOL16* (At1G25440); 水稻 (*Oryza sativa*): *OsA* (AB041840.1), *OsB* (AB001887.1); 大麦 (*Hordeum vulgare*): *HvCO1* (AF490467.1), *HvCO2* (AF490469.1); 小麦 (*Triticum aestivum*): *TaHd1-1* (BAC92735.1); 番茄 (*Lycopersicon esculentum*): *LeCO* (AY490253.1); 小立碗藓 (*Physcomitrella patens*): *PpCOL1* (AB185925.1); 牵牛 (*Ipomoea nil*): *InCO* (AF300700.1); 甜菜 (*Beta vulgaris*): *BvCOL1* (EU437782.1); 衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*): *CrCO* (AM940003.1); 萝卜 (*Raphanus sativus*): *RsCOL1* (AAC35496.1)。

### 3 *GmCOL8* 特异性表达分析

大豆 *GmCOL8* mRNA 主要在叶中表达, 整体趋势是开花期表达量高于单叶期(图 2)。在不同组织器官中, *GmCOL8* 在根、茎、叶中均有表达, 花和荚中表达量较低, 在开花期复叶中表达量较高, 尤其在开花期第 2 复叶中表达量达到峰值(图 2-a)。

不同发育时期的叶片中, *GmCOL8* 在单叶中的表达量随着大豆的生长呈下降趋势, 在单叶期的单叶表达量最高, 在开花期的第 2 复叶中表达量最高(图 2-c)。 *GmCOL8* 在不同发育时期的种子和地上部分的表达中, 在成熟种子中的表达量明显高于未成熟种子(图 2-b), 地上部表达量在复叶期较高, 第 3 复

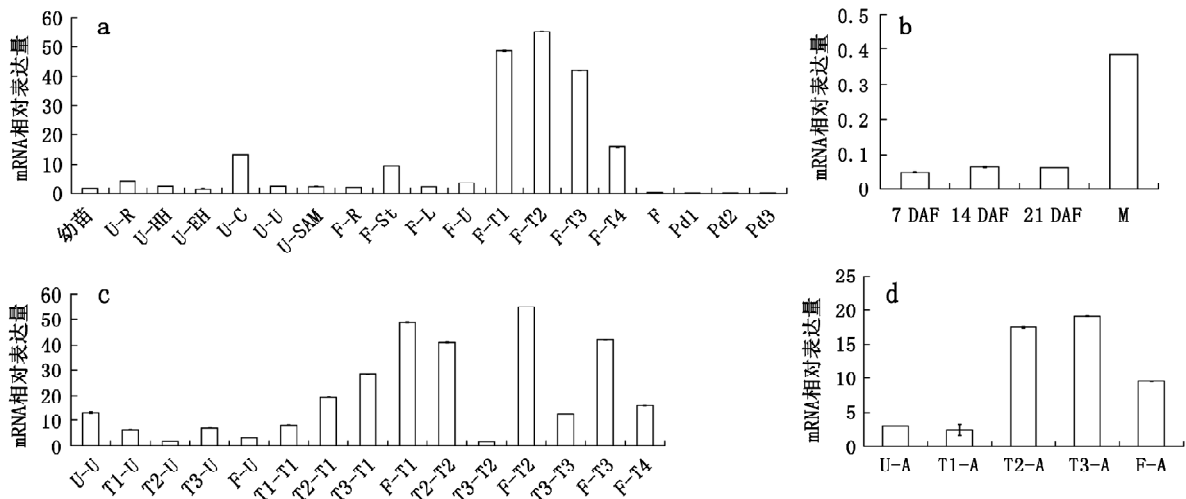


图 2 *GmCOL8* 特异性表达分析

Fig.2 Specific expression profiles of soybean *GmCOL8*

a: 不同组织器官的相对表达量; b: 不同组织发育时期种子的相对表达量; c: 不同发育时期叶片的相对表达量; d: 不同发育时期地上部的相对表达量。样品缩写见表 1。

叶期达到峰值(图 2-d)。

### 4 *GmCOL8* 生物节律钟表达分析

*GmCOL8* mRNA 表达水平在长短日条件下有明显差异, 短日下的表达丰度比长日下低。 *GmCOL8* 具有明显的生物钟节律。长日条件下, *GmCOL8* mRNA 表达量随着光照快速上升, 在 6 h (光周期第 6 小时), 出现表达高峰, 随后下降直到黑暗开始时。在黑暗条件下, 表达量有小的上升趋势(光周期第 18 小时), 随后又下降到下一个光周期开始(光周期第 24 小时)(图 3-a、b)。短日条件下, mRNA 表达高峰出现在凌晨(光周期第 0 小时), 随后 2 h 内出现降低, 然后又快速回升出现第二个峰(光周期第 4~6 小时)。在黑暗开始后第 8 h (即光周期第 18 小时)开始上升, 直到这个光周期结束时到达高峰(光周期第 24 小时)(图 3-c、d)。将长日/短日条件下的幼苗分别移至连续光照或连续黑暗下, *GmCOL8* 的 mRNA 在连续光照条件下均表现出与

长日/短日条件下相似的节律性, 而连续黑暗条件下的表达节律要弱得多(图 3)。由此可以看出, 该基因主要受生物钟的调节, 同时也受光照调节。

## 讨 论

根据保守结构的差异, 拟南芥的 CO 家族可以分为 3 个亚家族(Group): Group 1 包括 CO 和 COL1~COL5, 有 2 个保守的 B-box 锌指结构, 1 个 CCT 域, 并在 C 末端含特有的 6 个保守氨基酸的 T-motif (G-I/V-V-P-S/T-F); Group 2 包括 COL6、COL8 和 COL16, 只含有 1 个保守的 B-box 锌指结构, 1 个 CCT 域; Group 3 包括 COL9~COL15, 有 1 个保守的 B-box 和 1 个变异的锌指结构, 1 个 CCT 域 (Robson 等 2001)。大豆 *GmCOL8* 有 2 个保守的 B-box 锌指结构, 2 个 CCT 域, 且 *GmCOL8* 在 C 末端含有 Group 1 特有的 T-motif, 因此, *GmCOL8* 属于 CO 家族的 Group 1。

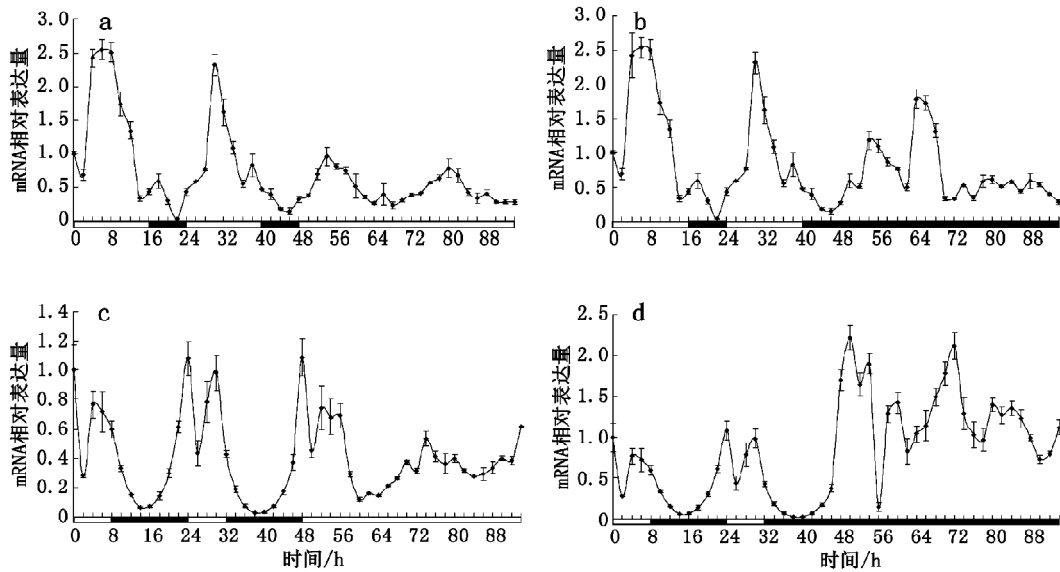


图3 *GmCOL8* mRNA在长/短日(LD/SD)条件下昼夜节律表达

Fig.3 Expression levels of soybean *GmCOL8* mRNA under LD/SD

a: 长日转连续光照(LD-LL); b: 长日转连续黑暗(LD-DD); c: 短日转连续光照(SD-LL); d: 短日转连续黑暗(SD-DD)。

已知拟南芥的 *AtCO* 主要在茎和叶中表达, *AtCOL1*、*AtCOL2*、*AtCOL5* 在叶中表达量比茎中多, 且 *AtCOL5* 具有部分互补 *CO* 基因的功能 (Hassidim 等 2009)。萝卜的 *CO* 同源基因 mRNA 分析显示抽薹期花芽中的表达量最高, 当花芽成熟后降低, 在叶与根中均有表达 (Moon 等 1998)。 *GmCOL8* 表达与 *AtCOL5* 非常相似, *GmCOL8* 也是在叶中的表达量高, 花、荚以及种子中几乎均不表达, 尤其在开花期复叶中表达量达到高峰 (图2), 此时正是大豆由营养生长向生殖生长转变的关键时期, 表明 *GmCOL8* 可能在大豆由营养生长向生殖生长转变过程中起作用。

拟南芥和水稻 *CO* mRNA 具有明显的节律变化 (Hayama 和 Coupland 2004)。 *GmCOL8* mRNA 的表达特征与水稻类似。在长日和短日条件下, *GmCOL8* mRNA 的表达丰度有差异, *GmCOL8* mRNA 的表达丰度在长日条件下高, 短日条件下低。长日条件下, *GmCOL8* mRNA 表达量随着光照快速上升, 在 6 h 出现表达高峰, 随后下降, 直到黑暗开始。这些与水稻 *CO* 同源基因类似。但是, 在短日条件下, 大豆 *GmCOL8* 表达峰值出现在凌晨及光周期第 4~6 小时, 这与水稻 *CO* 同源基因的表达模式不同, 与拟南芥 *AtCOL5* 短日下的表达也不

同, 却与拟南芥 *AtCO* 长日下的表达类似, 只是表达峰值出现的时间点不同 (图 3-c、d)。这说明大豆 *CO* 基因的表达模式有别于拟南芥和水稻

总之, *GmCOL8* 具有 *CONSTANS* 家族的典型特征, 其在大豆开花中具体作用尚待进一步研究。

#### 参考文献

- Abe M, Kobayashi Y, Yamamoto S, Daimon Y, Yamaguchi A, Ikeda Y, Ichinoki H, Notaguchi M, Goto K, Araki T (2005). FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science*, 309 (5737): 1052~1056
- Borden KLB (1998). RING fingers and B-boxes: zinc-binding protein-protein interaction domains. *Biochem Cell Biol*, 76 (2~3): 351~358
- Chia TYP, Muller A, Jung C, Mutasa-Gottgens ES (2008). Sugar beet contains a large *CONSTANS-LIKE* gene family including a *CO* homologue that is independent of the early-bolting (*B*) gene locus. *J Exp Bot*, 59 (10): 2735~2748
- Griffiths S, Dunford RP, Coupland G, Laurie DA (2003). The evolution of *CONSTANS-like* gene families in barley, rice, and *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 131 (4): 1855~1867
- Hassidim M, Harir Y, Yakir E, Kron I, Green RM (2009). Overexpression of *CONSTANS-LIKE 5* can induce flowering in short-day grown *Arabidopsis*. *Planta*, 230 (3): 481~491
- Hayama R, Coupland G (2004). The molecular basis of diversity in the photoperiodic flowering responses of *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol*, 135 (2): 677~684

- Izawa T, Oikawa T, Sugiyama N, Tanisaka T, Yano M, Shimamoto K (2002). Phytochrome mediates the external light signal to repress *FT* orthologs in photoperiodic flowering of rice. *Genes Dev*, 16 (15): 2006~2020
- Jaeger KE, Graf A, Wigge PA (2006). The control of flowering in time and space. *J Exp Bot*, 57 (13): 3415~3418
- Jang S, Marchal V, Panigrahi KC, Wenkel S, Soppe W, Deng XW, Valverde F, Coupland G (2008). *Arabidopsis* COP1 shapes the temporal pattern of CO accumulation conferring a photoperiodic flowering response. *EMBO J*, 27 (8): 1277~1288
- Kardailsky I, Shukla VK, Ahn JH, Dagenais N, Christensen SK, Nguyen JT, Chory J, Harrison MJ, Weigel D (1999). Activation tagging of the floral inducer *FT*. *Science*, 286 (5446): 1962~1965
- Klejnnot J, Lin C (2004). A *CONSTANS* experience brought to light. *Science*, 303 (5660): 965~966
- Kojima S, Takahashi Y, Kobayashi Y, Monna L, Sasaki T, Araki T, Yano M (2002). *Hd3a*, a rice ortholog of the *Arabidopsis* *FT* gene, promotes transition to flowering downstream of *Hdl* under short-day conditions. *Plant Cell Physiol*, 43 (10): 1096~1105
- Koornneef M, Hanhart CJ, van der Veen JH (1991). A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet*, 229 (1): 57~66
- Liu J, Yu J, McIntosh L, Kende H, Zeevaart JA (2001). Isolation of a *CONSTANS* ortholog from *Pharbitis nil* and its role in flowering. *Plant Physiol*, 125 (4): 1821~1830
- Liu LJ, Zhang YC, Li QH, Sang Y, Mao J, Lian HL, Wang L, Yang HQ (2008). COP1-mediated ubiquitination of *CONSTANS* is implicated in cryptochrome regulation of flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 20 (2): 292~306
- Moon YH, Chae S, Jung JY, An G (1998). Expressed sequence tags of radish flower buds and characterization of a *CONSTANS LIKE 1* gene. *Mol Cells*, 8 (4): 452~458
- Nemoto Y, Kisaka M, Fuse T, Yano M, Ogihara Y (2003). Characterization and functional analysis of three wheat genes with homology to the *CONSTANS* flowering time gene in transgenic rice. *Plant J*, 36 (1): 82~93
- Putterill J, Robson F, Lee K, Simon R, Coupland G (1995). The *CONSTANS* gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell*, 80 (6): 847~857
- Robson F, Costa MM, Hepworth SR, Vizir I, Pineiro M, Reeves PH, Putterill J, Coupland G (2001). Functional importance of conserved domains in the flowering-time gene *CONSTANS* demonstrated by analysis of mutant alleles and transgenic plants. *Plant J*, 28 (6): 619~631
- Samach A, Onouchi H, Gold SE, Ditta GS, Schwarz-Sommer Z, Yanofsky MF, Coupland G (2000). Distinct roles of *CONSTANS* target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. *Science*, 288 (5471): 1613~1616
- Serrano G, Herrera-Palau R, Romero JM, Serrano A, Coupland G, Valverde F (2009). Chlamydomonas *CONSTANS* and the evolution of plant photoperiodic signaling. *Curr Biol*, 19 (5): 359~368
- Strayer C, Oyama T, Schultz TF, Raman R, Somers DE, Mas P, Panda S, Kreps JA, Kay SA (2000). Cloning of the *Arabidopsis* clock gene *TOC1*, an autoregulatory response regulator homolog. *Science*, 289 (5480): 768~771
- Suarez-Lopez P, Wheatley K, Robson F, Onouchi H, Valverde F, Coupland G (2001). *CONSTANS* mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature*, 410 (6832): 1116~1120
- Tamaki S, Matsuo S, Wong HL, Yokoi S, Shimamoto K (2007). *Hd3a* protein is a mobile flowering signal in rice. *Science*, 316 (5827): 1033~1036
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 24: 1596~1599
- Thomas B (2006). Light signals and flowering. *J Exp Bot*, 57 (13): 3387~3393
- Torok M, Etkin LD (2001). Two B or not two B? Overview of the rapidly expanding B-box family of proteins. *Differentiation*, 67 (3): 63~71
- Wenkel S, Turck F, Singer K, Gissot L, Le Gourrierec J, Samach A, Coupland G (2006). *CONSTANS* and the CCAAT box binding complex share a functionally important domain and interact to regulate flowering of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 18 (11): 2971~2984
- Yano M, Katayose Y, Ashikari M, Yamanouchi U, Monna L, Fuse T, Baba T, Yamamoto K, Umehara Y, Nagamura Y et al (2000). *Hdl*, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the *Arabidopsis* flowering time gene *CONSTANS*. *Plant Cell*, 12 (12): 2473~2484
- Yanovsky MJ, Kay SA (2002). Molecular basis of seasonal time measurement in *Arabidopsis*. *Nature*, 419 (6904): 308~312
- Zobell O, Coupland G, Reiss B (2005). The family of *CONSTANS-like* genes in *Physcomitrella patens*. *Plant Biol (Stuttg)*, 7 (3): 266~275