

## 可变剪接调控植物开花的作用机制进展

卢欢欢<sup>1</sup>, 邓琴霖<sup>1</sup>, 吴梦丹<sup>1</sup>, 王志敏<sup>1</sup>, 魏大勇<sup>1</sup>, 王鹤冰<sup>2</sup>, 向华丰<sup>2</sup>, 张洪成<sup>2</sup>, 汤青林<sup>1</sup>

1 西南大学 园艺园林学院, 重庆 400715

2 重庆市农业科学研究院, 重庆 401329

卢欢欢, 邓琴霖, 吴梦丹, 等. 可变剪接调控植物开花的作用机制进展. 生物工程学报, 2021, 37(9): 2991-3004.

Lu HH, Deng QL, Wu MD, et al. Mechanisms of alternative splicing in regulating plant flowering: a review. Chin J Biotech, 2021, 37(9): 2991-3004.

**摘 要:** 开花是植物生长发育的关键转折, 与种子生产和作物产量密切相关。开花转变受到复杂的基因网络调控, 许多开花相关基因通过可变剪接产生多种转录本, 调控开花时间。文中从多个角度系统地综述了可变剪接调控植物开花的分子机制, 并对将来的研究进行了展望。

**关键词:** 可变剪接, 开花, 剪接因子, 表观调控

## Mechanisms of alternative splicing in regulating plant flowering: a review

Huanhuan Lu<sup>1</sup>, Qinlin Deng<sup>1</sup>, Mengdan Wu<sup>1</sup>, Zhimin Wang<sup>1</sup>, Dayong Wei<sup>1</sup>, Hebing Wang<sup>2</sup>,  
Huafeng Xiang<sup>2</sup>, Hongcheng Zhang<sup>2</sup>, and Qinglin Tang<sup>1</sup>

1 College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400715, China

2 Chongqing Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 401329, China

**Abstract:** Flowering is a critical transitional stage during plant growth and development, and is closely related to seed production and crop yield. The flowering transition is regulated by complex genetic networks, whereas many flowering-related genes generate multiple transcripts through alternative splicing to regulate flowering time. This paper summarizes the molecular mechanisms of alternative splicing in regulating plant flowering from several perspectives, future research directions are also envisioned.

**Keywords:** alternative splicing, flowering, splicing factor, epigenetic regulation

**Received:** October 2, 2020; **Accepted:** January 21, 2021

**Supported by:** Natural Science Foundation of Chongqing, China (Nos. cstc2019jcyj-zdxmX0022, cstc2019jcyj-msxmX0335), Technology Innovation and Application Development Project of CQ CSTC, China (No. cstc2019jscx-gksbX0114, cstc2018jscx-mszdX0010).

**Corresponding author:** Qinglin Tang. Tel: +86-23-68251274; E-mail: swutql@163.com

重庆市自然科学基金 (Nos. cstc2019jcyj-zdxmX0022, cstc2019jcyj-msxmX0335), 重庆市技术创新与应用发展专项 (No. cstc2019jscx-gksbX0114, cstc2018jscx-mszdX0010) 资助。

网络出版时间: 2021-02-01

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20210201.1143.005.html>

植物开花是营养生长向生殖生长的转变,这一发育进程受到多种因素调控,例如温度、光照等外在环境条件以及衰老信号、昼夜节律等内在遗传因素<sup>[1-2]</sup>。开花相关因子能在转录水平和转录后水平调控开花<sup>[3]</sup>,例如可变剪接<sup>[4]</sup>以及甲基化、乙酰化等表观修饰<sup>[5]</sup>。近年研究表明,可变剪接在开花调控中具有重要作用<sup>[6]</sup>。可变剪接在许多生物中很常见,例如模式植物拟南芥中至少 61% 的内含子基因都存在可变剪接,产生多种成熟转录本及其功能不同的变异体,这极大地增加了潜在功能蛋白的数量<sup>[7]</sup>。

可变剪接可选择不同剪接位点,从而产生多个 mRNA 转录异构体。可变剪接方式主要包括:外显子跳跃 (Exon skipping)、内含子保留 (Intron retaining)、互斥外显子剪接 (Mutually exclusive exons)、可变 5'端剪接位点 (Alternative 5'splice site)和可变 3'端剪接位点 (Alternative 3' splice site)<sup>[8]</sup>。其中,内含子保留为常见的可变剪接方式<sup>[9]</sup>。可变剪接可能会导致蛋白质结构和功能发生变化,例如蛋白功能域的改变或完全去除。此外,由于内含子保留和 3'或 5'端可变剪接位点的偏移,会引入过早终止密码子 (Premature termination codon, PTC),可形成蛋白截短体或无义衰变 (Nonsense-mediated mRNA decay, NMD)。另外,由于缺少所必需的结构域,外显子跳跃还可形成非功能性蛋白<sup>[10]</sup>。因此,本文综述了可变剪接在开花调控中的作用机制,为其全面深入研究提供借鉴。

## 1 发育年龄诱发 FT 可变剪接调控开花

植物通常在发育到特定时期或生育年龄时才触发开花<sup>[11]</sup>。*Flowering Locus T (FT)* 作为成花素调控着年龄发育的成花信号。FT 蛋白是磷脂酰乙醇胺结合蛋白 (Phosphatidylethanolamine-binding protein, PEBP) 家族的一个分支,它在植物中高度保守。FT 蛋白在叶片中合成后,通过脉管系统

进入茎尖分生组织 (Shoot apical meristem, SAM),与 14-3-3 蛋白质和碱性亮氨酸拉链 (Basic leucine zipper, bZIP) 转录因子 *flowering locus D (FD)* 相互作用,诱导开花<sup>[12]</sup>。FT-FD 复合体能启动许多 MADS 盒基因 (例如 *APETALA1*、*FRUITFULL* 和 *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1*) 的表达,从而促进开花和花器官发育<sup>[13]</sup>。

在单子叶植物二穗短柄草 *Brachypodium distachyon* 中有 FT 的两个同源基因 *FT1* 和 *FT2*,其中 *FT2* 具有年龄依赖的不同可变剪接体 *FT2 $\alpha$*  和 *FT2 $\beta$* ,它们能够协同调节开花时间。蛋白结构域分析显示,*FT2 $\beta$*  蛋白剪接体缺失了 PEBP 结构域 (*FT2* 的 N 端区域),从而丧失了该结构域的相关功能。*FT2 $\beta$*  不能与 14-3-3 蛋白、FD 蛋白相互作用,但仍可与 *FT2 $\alpha$* 、*FT1* 蛋白互作。二穗短柄草中异位表达 *FT2 $\alpha$*  导致营养生长停滞、开花提前;然而,在超表达 *FT2 $\beta$*  的转基因株系中开花和抽穗期均延迟<sup>[14]</sup>。有趣的是,*FT2 $\beta$*  不但不能与 FD 或 14-3-3 蛋白互作,反而与 *FT2 $\alpha$*  形成复合物,作为一种抑制因子竞争性减弱了 *FT2 $\alpha$*  与 FD 和 14-3-3 蛋白的结合,从而减少了功能性复合物的表达量,延缓开花。当 *FT2 $\beta$*  被特异性敲除后,开花抑制因子 *VERNALIZATION1 (VRN1)* 的表达也会显著升高<sup>[14]</sup>。由此说明,*FT2 $\beta$*  剪接体确实能调节开花基因表达及开花时间。

利用实时定量聚合酶链反应 (Quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 分析发现,在短柄草整个发育过程中 *FT2 $\alpha$*  和 *FT2 $\beta$*  的转录水平都会逐渐升高,但随着发育年龄的增长 *FT2 $\alpha$*  比 *FT2 $\beta$*  增加更快,*FT2 $\beta$ /FT2 $\alpha$*  丰度比值呈下降趋势。说明 *FT2 $\beta$*  转录本在植株的幼苗期和营养生长期中更丰富,而 *FT2 $\alpha$*  转录本在成株期和生殖生长期中更丰富<sup>[14]</sup>。由此表明 *FT2* 通过年龄发育途径来调整剪接体 *FT2 $\alpha$*  与 *FT2 $\beta$*  的比值,*FT* 能够将内源性年龄发育信号整合到开花调

控途径。

Xia 等最近分析比较了高型和矮型两种椰子的幼苗和成熟期的转录组信息,发现椰树的开花受光周期途径调节,*FT*是参与此信号转导途径的关键基因。8–10年生开花的高型椰子具有丰富的较长*FT*转录本;而3–5年生开花的矮型椰子只含有缺失了6 bp的较短*FT*转录本<sup>[15]</sup>。推测*FT*的这种可变剪接可能会导致矮型和高型椰子之间开花时间的差异,但需进一步研究验证。

## 2 环境温度引起开花因子可变剪接

### 2.1 *FCA* 和 *COOLAIR* 可变剪接

近年来,不少科研人员聚焦于植物温度适应的分子机制研究。众所周知,即使环境温度的微小变化也可能会极大地影响植物生长发育,改变株型,例如茎伸长和花期提早等。环境温度的波动可引起开花基因发生可变剪接。拟南芥 *Flowering Control Locus A (FCA)* 就是一个很好的例子,它能参与 *miR172* 的富集<sup>[16]</sup>。随着温度变化,拟南芥 *FCA* 产生多个可变剪接体。在 23 °C 下产生的 *FCA* 功能性全长蛋白比在 16 °C 下更为丰富,更能引起 *miR172* 的积累<sup>[17]</sup>。最近研究发现,拟南芥 *miR172* 通过控制靶标基因 *COOLAIR* 的表达,间接调控开花抑制基因 *Flowering Locus C (FLC)*。*FLC* 在春化途径中起着核心调节作用,属于 MADS 盒转录因子;*COOLAIR* 是来自 *FLC* 基因座的长的非编码反义 RNA<sup>[18]</sup>。此外,拟南芥 *COOLAIR* 的可变剪接也具有温度依赖性,它能产生两类 *COOLAIR* 变体,它们分别终止于 *FLC* 基因座的近端(有义内含子 6, I 类)和远端位点(有义启动子, II 类)<sup>[19]</sup>。其中,具有近端聚腺苷酸化作用的 I 类 *COOLAIR* 转录本与 *FLC* 抑制相关;相比之下,II 类 *COOLAIR* 转录本与 *FLC* 高表达水平相关<sup>[19]</sup>。

### 2.2 *FLM* 可变剪接与 *FLM-SVP* 模式

*FLOWERING LOCUS M (FLM)* 又称为

*MADS AFFECTING FLOWERING 1 (MAF1)*, 也是一个 MADS 盒转录因子,它参与温敏开花途径,延迟开花时间<sup>[20]</sup>。那么,温度信号是如何驱使 *FLM* 发挥开花调控功能呢?最近研究发现,拟南芥 *FLM* 可通过选择性剪接产生多个不同的转录本:*FLM-α*、*FLM-β*、*FLM-γ* 和 *FLM-δ*。其中 *FLM-α* 和 *FLM-γ* 不具有开花调控功能。*FLM* 选择性剪接后的转录本在较高温度下会被 NMD 途径快速降解,而在不太高的环境温度下则相对稳定<sup>[21]</sup>。

*FLM* 可变剪接体除了能被 NMD 途径降解之外,还存在另外一种分子互作方式调节其开花功能。拟南芥 *FLM* 和 *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)* 参与温敏开花途径,它们能发生蛋白互作从而调控开花。当它们突变之后均对环境温度的变化不敏感<sup>[22]</sup>。在拟南芥 *FLM* 的可变剪接体中,*FLM-β* 和 *FLM-δ* 是具有功能的主要形式,分别在该基因的第二和第三外显子上各不相同,其剪接体形式对温度敏感<sup>[20]</sup>。它们对开花的调节功能相反,其中 *FLM-β* 为开花抑制子,而 *FLM-δ* 为促进因子<sup>[23]</sup>。*FLM-β*、*FLM-δ* 剪接体能与 *SVP* 蛋白竞争性结合,其中 *FLM-δ/SVP* 复合体缺乏 DNA 结合活性<sup>[22]</sup>。当温度较高时,拟南芥 *SVP* 蛋白与 *FT* 基因启动子的结合能力降低。另外,在 *flm* 突变体中,*SVP* 与 *FT* 基因的温敏性结合特性也会消失。由此说明 *FLM* 促进了 *SVP* 与 *FT* 基因的结合能力<sup>[22]</sup>。

在 16 °C 相对较低温度下,*FLM-β* 剪接体的表达水平较高,*FLM-β/SVP* 和 *SVP/SVP* 复合物占主导地位,负调开花整合子(例如 *SOC1* 和 *FT*)的表达,抑制开花。相反,在 27 °C 相对较高温度下大量诱导 *FLM-δ* 剪接体,并与 *FLM-β* 相互竞争,*FLM-δ/SVP* 复合物较为丰富,竞争性削减了 *FLM-β/SVP* 的数量,从而间接促进开花转变(图 1)<sup>[21–23]</sup>。虽然 *FLM-δ* 的超表达促进开花,但它属于温敏型开花途径,与低温春化途径的调控机制并不相同<sup>[24]</sup>。进一步利用 CRISPR/Cas9 编辑技术

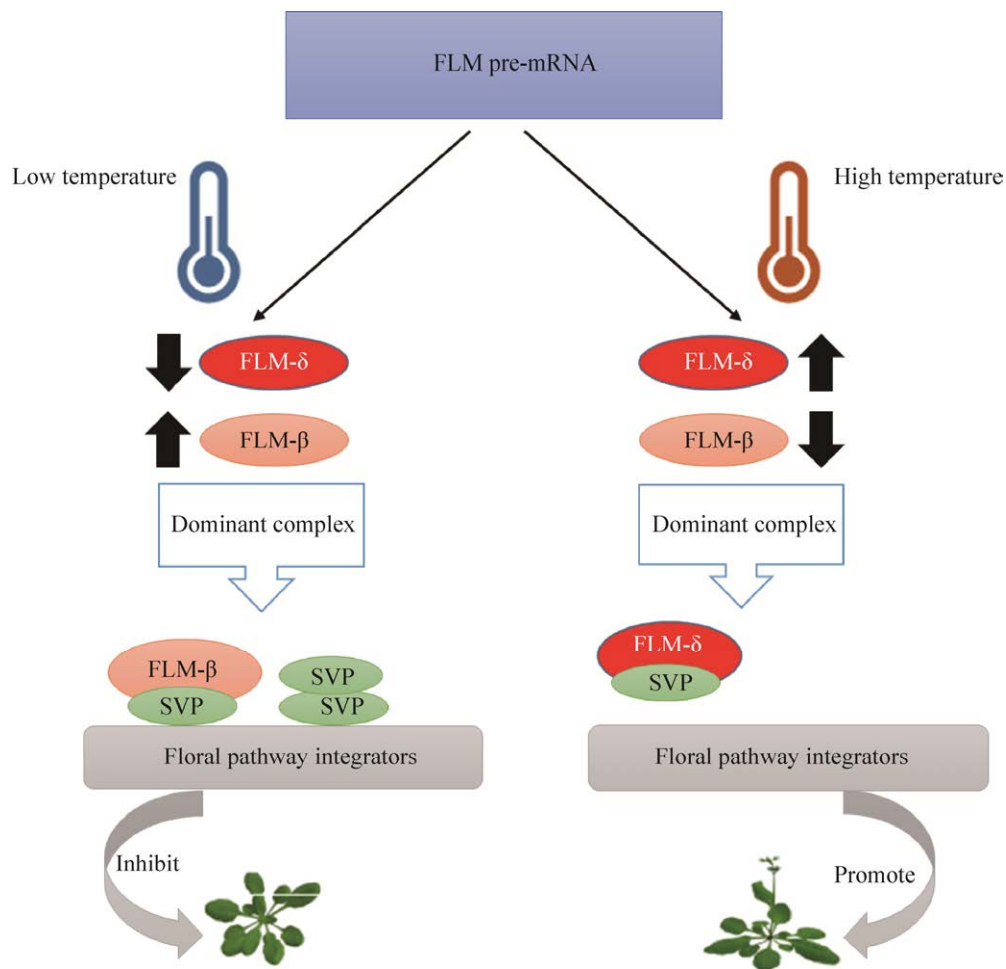


图1 *FLM* 可变剪接的开花调控机制<sup>[21-23]</sup>

Fig. 1 Regulatory mechanism of *FLM* alternative splicing in flowering time control<sup>[21-23]</sup>.

定向删除 *FLM-β* 和 *FLM-δ* 的特异性外显子,产生仅表达 *FLM-β* 或 *FLM-δ* 转录本的株系<sup>[23]</sup>。只表达 *FLM-β* (无 *FLM-δ* 表达) 的突变体株系开花延迟;而仅产生 *FLM-δ* (无 *FLM-β* 表达) 的株系提早开花<sup>[23]</sup>。说明 *FLM-β* 能够抑制开花,两种剪接体 *FLM-β/FLM-δ* 的比例可调节开花时间,并受环境温度影响<sup>[25]</sup>。

此外,通过外显子序列的环化产生的环状 RNA (Circular RNA, CircRNA),也可作为可变剪接的产物。CircRNA 在植物生长和发育调控中起重要作用。最近发现:*FLM-β* circRNA 具有与 *FLM-β* mRNA 相似的温度依赖性表达模式,该 circRNA 可在低温下诱导高丰度的 *FLM-β* 蛋白<sup>[26-27]</sup>。

### 2.3 *MAF2* 可变剪接和 *MAF2-SVP* 作用模式

*MADS AFFECTING FLOWERING 2 (MAF2)* 是一个与 *FLM* 密切相关的 MADS 盒因子,也受到温度依赖性可变剪接调控。拟南芥 *MAF2* 可产生 3 种剪接体: *MAF2var1*、*MAF2var2* 和 *MAF2var5*。其中 *MAF2var1* 是拟南芥 *MAF2* 的主要剪接变体,它在较低温度下诱导表达, *MAF2var1* 与 SVP 形成蛋白复合物,抑制开花<sup>[28]</sup>。拟南芥 *MAF2var2* 剪接变体在较高温度下诱导表达,它的内含子被保留其中,含有提前的终止密码子 PTC。由 *MAF2var2* 产生的截短蛋白缺少一部分 K 域以及整个 C 域,而 K 域、C 域对该蛋白同源或异源二聚体的形成很重要<sup>[29-30]</sup>。因此,

MAF2var2 截短蛋白不能与 SVP 结合形成抑制性复合物。MAF2 的另一个重要剪接变体是 MAF2var5, 它能跳过第 6 个外显子引起 PTC<sup>[31]</sup>。尽管拟南芥 MAF2var5 的表达水平较低且其表达对环境温度变化有些不敏感, 但 MAF2var5 蛋白能够与 SVP 相互作用<sup>[31]</sup>。此外, 拟南芥 MAF2var5 超表达导致开花提早, 暗示 MAF2var5 与 FLM 彼此竞争性与 SVP 互作, 这可能与 FLM- $\delta$  蛋白的功能相似<sup>[31]</sup>。

综上所述, 在 *FLC* 分支上的几个成员 (例如 FLM、MAF2) 都与温敏途径有关, 它们也能产生不同剪接体, 与 SVP 蛋白直接或间接作用。在不同温度的诱导下, 这些可变剪接体的表达量和比例也有明显差异。例如, MAF2-SVP 和 FLM-SVP 两种作用模式均可感知环境温度, 它们协同调节开花的时间。

#### 2.4 温度敏感的其他可能作用模式

在开花调控中, 温度介导的可变剪接的范围并不局限于以上这些例子。近年发现, 碳水化合物是植物开花调控的重要诱导信号。例如, 拟南芥 *INDETERMINATED DOMAIN 14 (IDD14)* 转录因子受温度依赖的可变剪接影响, 调控淀粉积累以应答寒冷胁迫, 碳水化合物与温度信号转导之间相互关联, 可能引起开花转变<sup>[32]</sup>。该领域另一个核心问题是, 植物温度调节机制如何影响花期调控因子的可变剪接事件呢? 目前已有一些研究旨在破译植物中的热传感器<sup>[33]</sup>。最具特色的是红色/远红色的光敏色素感光体, 它在拟南芥中起着热传感器作用。众所周知, 在温暖条件下会促进生理活化的光敏色素远红光 (Phytochrome far-red light, Pfr) 向非活性光敏色素红光 (Phytochrome red light, Pr) 转化, 说明植物中很可能存在红光依赖性的选择性剪接<sup>[34]</sup>。由此可见, 在温敏途径中, 除了开花基因会通过可变剪接调节开花之外, 其他代谢途径的一些因子也可能依赖可变剪接调控开花。

### 3 光周期途径 *CONSTANS* 的可变剪接激发开花转变

#### 3.1 *CO* 的调控及其剪接变体相互作用

在拟南芥光周期开花途径中, *CONSTANS (CO)* 作用于开花整合子 *FT* 从而调节其表达, 促进开花<sup>[2]</sup>。黄素结合蛋白 (FLAVIN-BINDING KELCH REPEAT F-BOX 1, FKF1) 和 *GIGANTEA (GI)* 能在长日照 (Long days, LDs) 下发生蛋白互作, 但该作用不能在短日照 (Short days, SDs) 下发生<sup>[35]</sup>。FKF1-GI 复合物对 *CO* 的阻遏物 *CYFLING DOF FACTOR 1 (CDF1)* 具有抑制作用, 从而诱导 *CO* 主要在 LDs 下转录。*CO* 除了受到转录调控之外, *CO* 的编码蛋白也会受到翻译后修饰<sup>[36]</sup>。*CO* 蛋白的稳定性由一组 E3 泛素连接酶调节, 高表达渗透反应因子 1 (High expression of osmotically responsive gene1, HOS1) 能在清晨触发 *CO* 的降解<sup>[37]</sup>。同时光形态建成因子 1 (Constitutive photomorphogenesis 1, COP1) 指导夜间 *CO* 的降解。另外, FKF1 将蓝光信息传递到泛素蛋白酶体系统中, 以增强 *CO* 蛋白的稳定性, 从而调节光周期<sup>[38]</sup>。

*CO* 也能发生选择性剪接, 产生 2 种剪接体: 具有完整功能的全长 *CO $\alpha$*  和 C 末端缺失的截短体 *CO $\beta$* <sup>[39]</sup>。全长 *CO $\alpha$*  包含 B-box (BBX) 和 CCT 结构域; 而截短体 *CO $\beta$*  则缺少 CCT 结构域。DNA 测序发现, *CO $\beta$*  的转录本包含一个在 *CO $\alpha$*  中不存在的内含子, 说明 *CO* 的选择性剪接由内含子保留介导, 并且不会被 NMD 途径降解<sup>[39]</sup>。*CO* 剪接变体的亚细胞定位发现, *CO $\alpha$*  和 *CO $\beta$*  转录物也可位于细胞质。酵母双杂交和双分子荧光互补检测均表明, *CO $\alpha$* 、*CO $\beta$*  剪接体彼此可相互作用, 形成同源二聚体或异源二聚体<sup>[39]</sup>。

#### 3.2 光周期调控 *CO* 的可变剪接引起开花转变

拟南芥的全长 *CO $\alpha$*  超表达会提早开花。然而, 截短体 *CO $\beta$*  超表达则延迟开花, 这与 *CO* 缺陷型突变植株的表型相似<sup>[40]</sup>。另外, 当 *CO $\beta$*  与 *CO $\alpha$*  共表达时, *CO $\alpha$*  对开花诱导的促进作用会受

到阻碍,表明 CO $\beta$  是 CO $\alpha$  的竞争性抑制物<sup>[40]</sup>。同时, *FT* 是 CO 转录因子的直接目标,通过光周期诱导的 CO 来直接激活开花促进因子 *FT* 的表达<sup>[41-42]</sup>。另外, CO 还能与一些转录因子聚合,增强其与 DNA 之间的结合力和特异性<sup>[32]</sup>。例如,拟南芥 CO $\alpha$  剪接体可与组蛋白或血红素相关蛋白 (Histone-or heme-associated proteins, HAP) HAP5A 转录因子形成二聚体,并结合 DNA; 然而 CO $\beta$  不与靶基因结合,但它可与 CO $\alpha$  结合,从而抑制 CO $\alpha$ -HAP5A 二聚体的形成<sup>[39]</sup>。因此, CO $\beta$  与 CO $\alpha$  具有相互竞争性,在靶基因 DNA 上削减了含 CO $\alpha$  的二聚体,从而降低 CO 活性。拟南芥 CO $\beta$  与 CO $\alpha$  共表达不会干扰 CO $\alpha$  的激活能力,即 CO $\beta$  不会影响 CO $\alpha$  转录激活活性<sup>[42]</sup>。

那么,光周期信号如何与 CO 可变剪接相关呢? 近期研究发现:拟南芥 CO $\beta$  的表达能增强 CO $\alpha$  与降解酶 HOS1 和 COP1 的相互作用,但抑制了其 与黄素结合蛋白 FKF1 的相互作用;而且 CO $\beta$  不与 E3 酶相互作用<sup>[39]</sup>。HOS1 负责白天的 CO 降解,而 COP1 则指导夜间的 CO 降解。因此,在白天和黑暗条件下,拟南芥 CO $\beta$  超量表达都会导致 CO $\alpha$  不稳定。此外,CO $\beta$  减少了 CO $\alpha$  与 FKF1 的相互作用,从而使 LDs 处理导致 CO 在傍晚时具有稳定性<sup>[39]</sup>。

CO 属于 BBX 转录因子家族,拟南芥中有 32 个 BBX 成员。据报道,在结构上与 CO $\alpha$  或 CO $\beta$  相似的其他 BBX 转录因子也参与开花调控<sup>[43]</sup>,暗示 CO 选择性剪接与光周期开花调控相关。CO 选择性剪接事件并不局限于拟南芥,短柄草 CO 也会发生选择性剪接,产生两种蛋白剪接体:全长 CO 剪接体和 C 末端截短的 CO 剪接体<sup>[39]</sup>。由此说明,CO 可变剪接现象存在于多种植物中,并依赖光周期途径调节开花。

## 4 剪接因子调节开花基因 *FLC* 和 *FLM*

mRNA 的前体剪接由剪接体催化,剪接体主要部分是由 U1、U2、U4、U5 和 U6 组成的大型且高度动态的核糖核蛋白复合体 (Small nuclear

ribonucleoprotein particle, snRNP)<sup>[44]</sup>。在剪接的第一步, U1snRNP 和 U2snRNP 参与剪接位点识别,在此过程中, U1 snRNP 和 U2 snRNP 辅助因子 (U2 auxiliary factor, U2AF) 分别与内含子的 5'和 3'剪接位点结合<sup>[45]</sup>。人的 U2AF 由两个亚基组成:较小亚基 U2AF35 和较大亚基 U2AF65<sup>[46]</sup>。目前已在拟南芥、烟草、玉米和水稻中鉴定出 U2AF35 和 U2AF65 的同系物<sup>[47-50]</sup>。基于最新发现,我们收集并整理了一些剪接因子,它们通过调节前体 mRNA 的剪接进而调节开花因子 *FLC*、*FLM*。

### 4.1 剪接因子调节 *FLC* 的可变剪接

*FLC* 属于 MADS 盒转录因子,它在自主开花途径和低温春化途径中起着核心调节作用。*FLC* 蛋白可抑制拟南芥开花整合子 (例如 *FT* 和 *SOC1*) 的表达。因此, *FLC* 的表达调控对于拟南芥在转录和翻译后水平的开花调节至关重要<sup>[51]</sup>。mRNA 前体剪接是调节 *FLC* 表达的重要方式<sup>[52]</sup>。在拟南芥 *FLC* 剪接调控中已发现几个剪接因子。例如,在进行拟南芥早花突变体筛选时, Mahrez 等鉴定了 *BRR2a* 等位基因,它对 U5snRNP 的剪接激活必不可少<sup>[53]</sup>。*BRR2* 蛋白在真核生物中高度保守,拟南芥 *BRR2a* 基因在植物多个部位广泛表达,主要参与开花基因 *FLC* 转录本的加工剪接<sup>[53]</sup>。

最近研究发现拟南芥 AtU2AF65a 和 AtU2AF65b 均与 *FLC* 前体 mRNA 的剪接有关<sup>[50,54]</sup>。拟南芥 AtU2AF65a 和 AtU2AF65b 蛋白均与酵母或人的 U2AF65 同源。AtU2AF65a 和 AtU2AF65b 的功能丧失型突变体分别表现晚花和早花,而且在这两个突变体中 *FLC* 的非规范性剪接变体增加。但是,在 *atu2af65a* 和 *atu2af65b* 突变体之间的非规范剪接变体的差异明显<sup>[54]</sup>。由此表明, AtU2AF65a 和 AtU2AF65b 可以识别 *FLC* 的不同内含子。这种差异可能分别导致 *atu2af65a* 和 *atu2af65b* 突变体的 *FLC* mRNA 水平升高或降低。进一步研究表明,在 *atu2af65b* 突变体的茎尖中, *FLC* 的内含子 1 和 6 的保留增强,从而导致这些内含子的剪接效率降低以及 *FLC* mRNA 水平下降<sup>[50]</sup>。

SNW/Ski 相互作用蛋白 (SNW/Ski-interacting protein, SKIP) 作为一种核剪接因子, 可通过拟南芥中的选择性剪接控制生物钟昼夜节律<sup>[55]</sup>。最近报道, 在正常生长条件下, 剪接因子 SKIP 突变会影响前体 mRNA 的剪接。功能丧失的 *skip-1* 突变体在 LD 和 SD 条件下均表现出早花。另外, 拟南芥 *skip-1* 突变会导致多种器官发育异常, 包括根系变短、花器官缩小、花器官异常和角果变长等<sup>[56]</sup>。进一步研究表明, SKIP-1 的突变还会抑制 *FLC*、*MAF1*、*MAF4* 和 *MAF5* 的表达, 从而促进下游开花整合子 (例如 *SOC1*、*FT* 和 *TWIN SISTER OF FT* (TSF)) 的表达, 导致开花提前<sup>[56]</sup>。但是, 拟南芥 SKIP 并不会直接影响 *FLC* 前体 mRNA 的剪接, 而是通过某种间接方式调节 *FLC* 表达以控制开花<sup>[57]</sup>。深入研究发现, *skip-1* 突变体会造成 *SERRATED LEAVES AND EARLY FLOWERING* (*SEF*) 前体 mRNA 剪接缺陷, 由于内含子保留, 导致成熟的 *SEF* mRNA 水平降低。而且成熟 *SEF* mRNA 含量的降低会使 *FLC*、*MAF4* 和 *MAF5* 的表达失活, 最后加速开花。由此表明,

*PHOTOPERIOD-INDEPENDENT EARLY FLOWERING 1* (*PIE1*)、*ACTIN-RELATED PROTEIN 6* (*ARP6*) 和 *SEF* (即 SWR1 chromatin remodeling complex *SWR1-C* 组成基因) 突变之后会导致 *FLC*、*MAF4* 和 *MAF5* 基因沉默, 提早开花 (图 2)<sup>[58-60]</sup>。

此外, SKIP 调节 *SEF* Pre-mRNA 的剪接与组蛋白变体有关。*SEF* 蛋白是 SWR1-C 的一个组成部分, *SEF* 能将组蛋白 H2A 交换为 H2A.Z, 从而产生变体核小体。SWR1-C 是在 3 个位置 (*FLC*、*MAF4* 和 *MAF5*) 募集 H2A.Z 所必需的。目前已开展了大量有关 *FLC* 和 *MAF* 表观遗传修饰研究, 包括 DNA 甲基化、组蛋白甲基化、乙酰化、单泛素化和染色质重塑<sup>[61]</sup>。拟南芥 H2A.Z 正是在 *FLC*、*MAF4* 和 *MAF5* 染色质上富集和重塑, 促进了它们的转录并延迟开花<sup>[62]</sup>。拟南芥 SKIP 不仅起着剪接因子的作用, 调节 *FLC* 和 *MAF* 的表达并控制开花时间, 而且还具有转录共激活因子的作用。例如, SKIP 能通过选择性剪接和 POLYMERASE-ASSOCIATED FACTOR 1 (PAF1) 复合体直接调节 *MAF1* 的表达<sup>[57]</sup>。

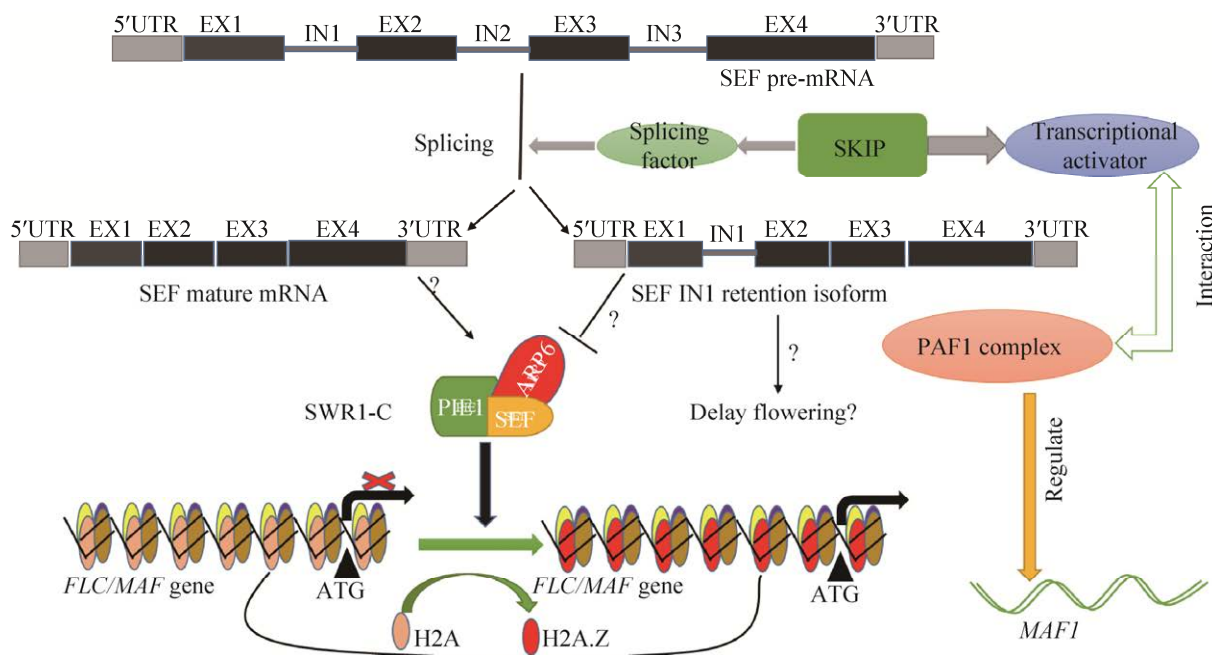


图 2 基于 *SEF* 可变剪接方式调节 *FLC* 的机制<sup>[58-60]</sup>

Fig. 2 Regulatory mechanism of *FLC* in flowering time control based on *SEF* alternative splicing<sup>[58-60]</sup>.

## 4.2 剪接因子调节 *FLM* 可变剪接

拟南芥 *FLM* (*MAF1*) 及其同系物依赖温度调控开花的作用机制已有不少研究<sup>[63]</sup>, 目前已发现一些特定剪接因子参与 *FLM* 和 *MAF* 可变剪接, 调控开花时间。例如, 拟南芥 *ARABIDOPSIS* *SF1* *HOMOLOG* (*AtSF1*) 通过直接结合到 *FLM* 的不同内含子位点从而调节 *FLM* 剪接<sup>[64]</sup>。*AtSF1* 蛋白具有 RNA 识别基序 (RNA recognition motif, RRM), RRM 结构域中的突变可以影响 *FLM*- $\beta$  可变剪接。在缺失 RRM 结构域的 *AtSF1* 突变体中, *FLM*- $\beta$  剪接体水平和 *SVP* 表达均显著降低; *AtSF1* 的 RRM 结构域丢失仅影响特定转录物可变剪接<sup>[64]</sup>。

除 *AtSF1* 之外, 拟南芥 *AtU2AF65a/b* 因子也参与 *FLM* 和 *MAF* 的可变剪接<sup>[50]</sup>。虽然不清楚 *AtU2AF65b* 是否在温敏开花调控中发挥直接作用, 但是在较低环境温度下, 拟南芥 *AtU2AF65a* 的转录产物会减少<sup>[65]</sup>。说明 *AtU2AF65a* 能依赖环境温度在 *FLM* 和 *MAF* 的可变剪接中起一定作用<sup>[54,65]</sup>。拟南芥 *AtU2AF65a* 可能充当多聚嘧啶串结合蛋白 (Polypyrimidine tract binding protein, PTB), 并参与控制 *FLM* 可变剪接体的 H3K36me3-MRG15-PTB 复合物的形成<sup>[63]</sup>。有趣的是, 拟南芥 *AtU2AF65a* 能够响应温度变化而剪接成 3 个不同的亚型, *AtU2AF65a* 的剪接由细胞周期蛋白依赖性激酶 G1 (Cyclin-dependent kinase 1, CDKG1) 控制。CDKG1 是一种含 RS 基序的蛋白。在较高的环境温度下发生雄性减数分裂, 与剪接因子 RSZ33 互作进而形成花粉壁, 这些环节都需要 CDKG1 参与<sup>[66-67]</sup>。在野生型拟南芥中已鉴定出拟南芥 *AtU2AF65a* 的 3 种亚型, 即其 mRNA1-3。在 12 °C 时, 该 mRNA1 丰度最高, 而在 27 °C 时, 该 mRNA2 和 mRNA3 的水平会显著增加。拟南芥 CDKG1 在 *AtU2AF65a* 剪接中起作用。在较高温度下, *AtU2AF65a* 的 mRNA2 和 mRNA3 含量较高, 说明它们可能不会被 NMD 途径降解。取而代之的

是, 它们可能被翻译成一些截短蛋白, 调节 *FLM* 的可变剪接<sup>[66-67]</sup>。

CDKG1 在参与温度相关的调控中自身也能发生可变剪接。例如, 在野生型拟南芥中发现了两种长短不同的 CDKG1 亚型, 分别通过保留和去除内含子 1 形成 CDKG1L 和 CDKG1S 变异体<sup>[68]</sup>。CDKG1S 缺少核定位信号和精氨酸/丝氨酸富集 Arg/Ser-rich (RS) 域, 可位于细胞核和细胞质中; 而 CDKG1L 只定位于细胞核<sup>[68]</sup>。低温时 CDKG1L 占主导地位, 而高温时 CDKG1S 会增加<sup>[69]</sup>。此外, CDKG1 的可变剪接受 CDKG2 和 CYCL1 (*CYCLINL1*) 调节, 以便适应环境温度变化。另外, CDKG2 是开花负调节因子<sup>[70]</sup>。CYCL1 是 CDKG1 和 CDKG2 的同源细胞周期蛋白。在较高温度 (27 °C) 下, *cdkg2 cycl1* 双突变会显著抑制 CDKG1S 的量<sup>[68]</sup>。因此, 从 CDKG2、CYCL1 到 *FLM* 和 *MAF* 可能会出现级联反应, 从而响应环境温度的变化并通过可变剪接来调节开花。

综上所述, 首先 CDKG2 和 CYCL1 会触发 CDKG1 的可变剪接, 产生长异构体 CDKG1L 和短异构体 CDKG1S。在低温下以 CDKG1L 为主, 当温度升高时 CDKG1S 会增加。然后 CDKG1 的两个变构体会导致 *AtU2AF65a* 可变剪接产生 3 个变体。*AtU2AF65a* 变体 1 (*AtU2AF65a.1*) 在低温下占主导地位, 而 *AtU2AF65a.2* 和 *AtU2AF65a.3* 在高温下占主导地位。*AtU2AF65a.1* 在具有功能的 *FLM*- $\beta$  亚型的剪接中起作用。相比之下, *AtU2AF65a.2/3* 可促进非功能性的 *FLM* 剪接 (这些剪接体通过 NMD 途径降解)。*FLM*- $\beta$  通过与 *SVP* 相互作用来抑制 *FT* 和 *SOC1* 等开花基因的表达, 进而延缓低温下的开花进程。由此说明, 剪接因子除了调控基因剪接, 自身也可发生剪接, 不同剪接体的产生也依赖于植物内源和外源的信号。

## 5 染色质修饰影响开花因子的选择性剪接

近年来表观遗传学研究发现, 染色质修饰在

植物的环境适应中发挥着重要作用,例如组蛋白甲基化修饰<sup>[63,71]</sup>。随着温度升高拟南芥中会发生大量的剪接事件<sup>[71]</sup>。其中我们比较熟知的是受温度影响的开花调节因子 *FLM*, *FLM* 随着温度升高会产生不同剪接体,促进 *FT* 转录上调<sup>[25,72]</sup>。瓦赫宁根大学分子生物学实验室曾报道,温度升高所诱发的差异剪接基因的 H3K36me3 会达到很高水平<sup>[63]</sup>。在较高温度下 H3K36me3 的富集导致在全基因组水平上的差异剪接,可能是通过“H3K36me3-(Morf related gene, MRG)-聚嘧啶束结合染色质-衔接子”的机制实现<sup>[73]</sup>。MRG 蛋白作为组蛋白读取器,通过与组蛋白 H4 特异性乙酰转移酶、MYST 家族蛋白 (MYST family proteins, MYST) 的组蛋白乙酰转移酶 HISTONE ACETYLTRANSFERASE OF THE MYST FAMILY 1 (HAM1) 和 HAM2 的相互作用识别 H3K4me3/H3K36me3,从而调节基因表达<sup>[74-75]</sup>。通过该过程可调节一些开花基因,包括 *FLM*、*MAF2*、*PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 3 (PRR3)* 和 *PRR7*。它们响应于较高温度而出现差异剪接<sup>[63]</sup>。*FLM* 与 *MAF2* 编码开花抑制子<sup>[76]</sup>,并且在 *FLM* 剪接变体中,含有内含子 2 的变体具有 PTC,并且受到无义介导的 mRNA 衰变 (NMD)。因此,该变体不具有抑制开花的功能,它会使开花时间提前<sup>[21]</sup>。

拟南芥 H3K36me3 由组蛋白甲基转移酶 SET DOMAIN GROUP 8 (SDG8) 和 SDG26 所介导。在拟南芥 SDG 缺失突变后,开花基因在环境温度应答下的可变剪接会受到干扰<sup>[63]</sup>。利用 SDG8 和 SDG26 甲基转移酶的缺失突变实验表明:相对于野生型植株而言,当环境温度升高后,这些突变体中的温敏开花基因的可变剪接发生了明显变化;然而在环境温度较低时,彼此之间可变剪接仅有微小差异<sup>[63,77]</sup>。由此说明,在温暖条件下 H3K36me3 增加与相关基因的可变剪接存在某种必然联系。简而言之, H3K36me3 参与调控环境温度所诱导的开花基因的选择性剪接,从而影响

开花时间。

染色质修饰影响开花因子可变剪接的外在因素并不局限于温度。最近对短柄草中 *FT* 同源基因 *FTL1* 和 *FTL2* 的研究发现,长日照条件也会影响 *FTL1* 的可变剪接。短柄草中 ES43 复合物在早期发育阶段能与 H3K4me3 结合,通过染色质重塑来抑制 *FTL1* 基因座的转录起始和延长效率<sup>[78]</sup>。剪接的共转录行为意味着染色质环境和 RNA 聚合酶 II (RNAP II) 的合成能力对剪接结果有很大影响。在植物中,光周期变换会调节 RNAP II 延伸率,进而控制剪接,表明可变剪接、转录和植物生长之间具有协调性<sup>[79]</sup>。简而言之, *FTL1* 的转录效率越低,在早期生长阶段其可变剪接事件发生越频繁。但随着发育的进行, *FTL2* 表达增加,并通过它们的相互作用影响 ES43 复合物的功能。该相互作用进一步会导致 *FTL1* 转录抑制及其剪接减少<sup>[79]</sup>。

## 6 总结与展望

成花转换是一个非常复杂的过程,许多开花基因响应环境和内源性信号,发生可变剪接,调节成花转变。不同剪接变体及其剪接调控因子对开花调控具有较大差异。例如,拟南芥 *FLM* 可变剪接和短柄草 *FT2* 选择性剪接分别受发育年龄信号和环境温度影响<sup>[14,23]</sup>。此外,光周期途径中 CO 的两个剪接体 CO $\alpha$  和 CO $\beta$  的比例在一天中不同时段会发生动态变化<sup>[39]</sup>;然而自主开花途径中 FCA 的选择性剪接转录本的比例没有变化<sup>[80]</sup>。由此说明,植物开花调控中选择性剪接的作用机制和模式具有多样性和差异性,很可能还有更多开花调控因子的选择性剪接需深入研究和探索。

我们最近发现,芥菜 *AGL18* 具有可变剪接,产生 2 个剪接体蛋白 (全长 *AGL18 $\alpha$*  和移码截短体 *AGL18 $\beta$* ),它们差异性调节开花时间,但其精细的作用机制仍不清楚<sup>[81]</sup>,尚待深入研究。另外,虽然 *FLM*- $\delta$  的超表达促进了开花,但它与拟南芥

中低温春化响应的开花机制并不相同。那么, *FLM-δ* 是否与其他调控因子有相互作用, 以及如何作用来促进开花转变呢? 其精细的分子机制仍需深入研究。

FT 作为开花整合子, 可发生可变剪接, 例如短柄草中会形成 FT2 $\alpha$  和 FT2 $\beta$  两个剪接体。有趣的是, miR156 和 miR172 也参与了不同植物开花的年龄依赖途径调控, 在开花转换过程中可提供发育年龄转变信号。即 miRNA 介导的目标转录物降解及其翻译抑制被认为是传递发育信号的主要分子机制<sup>[82]</sup>。miR156-miR172 途径在植物中广泛保守。那么, miRNA 所介导的发育信号是否与 FT2 选择性剪接事件相关联呢? 它是否会影响剪接变体 FT2 $\alpha$  和 FT2 $\beta$  的表达丰度、蛋白定位及其翻译后修饰? 这也值得深入研究。

可变剪接事件受剪接因子对原始转录本的差异调节导致成花转变, 这也是近些年的研究热点。在调节 *FLC* 可变剪接的相关剪接因子中, 每一个剪接因子都扮演着不同角色, 可直接或间接作用于开花基因。有趣的是, 有些剪接因子不仅起着剪接作用, 还具有转录因子功能。例如, 充当剪接因子的 SKIP 直接与 *SEF* 的 pre-mRNA 结合以抑制其不利性剪接。由于 *SEF* 激活了 *FLC* 转录, 因此在 *skip* 缺陷型突变体中其转录水平明显较低, 这表明剪接因子在开花转变中起着至关重要的作用<sup>[56]</sup>。参与 *FLC* 基因可变剪接调控的剪接因子除了 SKIP、U2AF65、BRR2 之外, 还有其他一些剪接因子有待深入发掘, 并且这些剪接因子是如何被招募以及怎样参与其可变剪接的分子机制也不清楚。

剪接因子对可变剪接的调控机制非常复杂而又精细, 它们能整合多个生长发育和环境信号, 剪接因子的活性受到外在环境因素和内在遗传因素的调节, 例如转录和翻译后修饰以及剪接体复合物的形成<sup>[83-84]</sup>。已知组蛋白甲基化修饰可影响开花相关基因可变剪接, 那么除此之外, 乙酰化、磷酸化修饰等是否也参与可变剪接的表观调控?

这也值得深入研究。随着研究技术的不断发展, 转录组数据的进一步获得, 同时结合生物信息分析软件工具辅助研究, 再就是基本的机理分析, 将来有望开发出更精确的可变剪接调控策略, 比如可变剪接的动态调控。

## REFERENCES

- [1] Wang JW. Regulation of flowering time by the miR156-mediated age pathway. *J Exp Bot*, 2014, 65(17): 4723-4730.
- [2] Shim JS, Kubota A, Imaizumi T. Circadian clock and photoperiodic flowering in *Arabidopsis*: CONSTANS is a hub for signal integration. *Plant Physiol*, 2017, 173(1): 5-15.
- [3] Wang HP, Pan JJ, Li Y, et al. The DELLA-CONSTANS transcription factor cascade integrates gibberellic acid and photoperiod signaling to regulate flowering. *Plant Physiol*, 2016, 172(1): 479-488.
- [4] Eckardt NA. Alternative splicing and the control of flowering time. *Plant Cell*, 2002, 14(4): 743-747.
- [5] Kim HJ, Hyun Y, Park JY, et al. A genetic link between cold responses and flowering time through *FVE* in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet*, 2004, 36(2): 167-171.
- [6] Seo PJ, Park MJ, Lim MH, et al. A self-regulatory circuit of CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED1 underlies the circadian clock regulation of temperature responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2012, 24(6): 2427-2442.
- [7] Marquez Y, Brown JWS, Simpson C, et al. Transcriptome survey reveals increased complexity of the alternative splicing landscape in *Arabidopsis*. *Genome Res*, 2012, 22(6): 1184-1195.
- [8] Pillmann H, Hatje K, Odrionitz F, et al. Predicting mutually exclusive spliced exons based on exon length, splice site and reading frame conservation, and exon sequence homology. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12: 270, DOI: 10.1186/1471-2105-12-270.
- [9] Kim E, Goren A, Ast G. Alternative splicing: current perspectives. *Bioessays*, 2008, 30(1): 38-47.
- [10] Kalyna M, Simpson CG, Syed NH, et al. Alternative splicing and nonsense-mediated decay modulate

- expression of important regulatory genes in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(6): 2454-2469.
- [11] Yu S, Galvão VC, Zhang YC, et al. Gibberellin regulates the *Arabidopsis* floral transition through miR156-targeted SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE transcription factors. *Plant Cell*, 2012, 24(8): 3320-3332.
- [12] Jaeger KE, Wigge PA. FT protein acts as a long-range signal in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 2007, 17(12): 1050-1054.
- [13] Taoka KI, Ohki I, Tsuji H, et al. 14-3-3 proteins act as intracellular receptors for rice Hd3a florigen. *Nature*, 2011, 476(7360): 332-335.
- [14] Qin ZR, Wu JJ, Geng SF, et al. Regulation of *FT* splicing by an endogenous cue in temperate grasses. *Nat Commun*, 2017, 8: 14320. DOI: 10.1038/ncomms14320.
- [15] Xia W, Liu R, Zhang J, et al. Alternative splicing of flowering time gene *FT* is associated with halving of time to flowering in coconut. *Sci Rep*, 2020, 10: 11640, DOI: 10.1038/s41598-020-68431-2.
- [16] Macknight R, Bancroft I, Page T, et al. *FCA*, a gene controlling flowering time in *Arabidopsis*, encodes a protein containing RNA-binding domains. *Cell*, 1997, 89(5): 737-745.
- [17] Jung JH, Seo PJ, Ahn JH, et al. *Arabidopsis* RNA-binding protein FCA regulates microRNA172 processing in thermosensory flowering. *J Biol Chem*, 2012, 287(19): 16007-16016.
- [18] Sun QW, Csorba T, Skourti-Stathaki K, et al. R-Loop stabilization represses antisense transcription at the *Arabidopsis FLC* locus. *Science*, 2013, 340(6132): 619-621.
- [19] Swiezewski S, Liu FQ, Magusin A, et al. Cold-induced silencing by long antisense transcripts of an *Arabidopsis* polycomb target. *Nature*, 2009, 462(7274): 799-802.
- [20] Balasubramanian S, Sureshkumar S, Lempe J, et al. Potent induction of *Arabidopsis thaliana* flowering by elevated growth temperature. *PLoS Genet*, 2006, 2(7): e106.
- [21] Sureshkumar S, Dent C, Seleznev A, et al. Nonsense-mediated mRNA decay modulates *FLM*-dependent thermosensory flowering response in *Arabidopsis*. *Nat Plants*, 2016, 2(5): 16055. DOI: 10.1038/nplants.2016.55.
- [22] Lee JH, Ryu HS, Chung KS, et al. Regulation of temperature-responsive flowering by MADS-Box transcription factor repressors. *Science*, 2013, 342(6158): 628-632.
- [23] Capovilla G, Symeonidi E, Wu R, et al. Contribution of major *FLM* isoforms to temperature-dependent flowering in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot*, 2017, 68(18): 5117-5127.
- [24] Lutz U, Nussbaumer T, Spannagl M, et al. Natural haplotypes of *FLM* non-coding sequences fine-tune flowering time in ambient spring temperatures in *Arabidopsis*. *Elife*, 2017, 6: e22114. DOI: 10.7554/elife.22114.
- [25] Lutz U, Posé D, Pfeifer M, et al. Modulation of ambient temperature-dependent flowering in *Arabidopsis thaliana* by natural variation of *FLOWERING LOCUS M*. *PLoS Genet*, 2015, 11(10): e1005588. DOI: 10.1371/journal.pgen.1005588.
- [26] Conn VM, Hugouvieux V, Nayak A, et al. A circRNA from *SEPALLATA3* regulates splicing of its cognate mRNA through R-loop formation. *Nat Plants*, 2017, 3: 17053. DOI: 10.1038/nplants.2017.53.
- [27] Cheng JP, Zhang Y, Li ZW, et al. A lariat-derived circular RNA is required for plant development in *Arabidopsis*. *Sci China Life Sci*, 2018, 61(2): 204-213.
- [28] Ratcliffe OJ, Kumimoto RW, Wong BJ, et al. Analysis of the *Arabidopsis MADS AFFECTING FLOWERING* gene family: *MAF2* prevents vernalization by short periods of cold. *Plant Cell*, 2003, 15(5): 1159-1169.
- [29] Yang YZ, Jack T. Defining subdomains of the K domain important for protein-protein interactions of plant MADS proteins. *Plant Mol Biol*, 2004, 55(1): 45-59.
- [30] Ma H, Yanofsky MF, Meyerowitz EM. *AGL1-AGL6*, an *Arabidopsis* gene family with similarity to floral homeotic and transcription factor genes. *Genes Dev*, 1991, 5(3): 484-495.
- [31] Airoidi CA, McKay M, Davies B. *MAF2* is regulated by temperature-dependent splicing and represses flowering at low temperatures in parallel with *FLM*. *PLoS ONE*, 2015, 10(5): e0126516. DOI: 10.1371/journal.pone.0126516.

- 10.1371/journal.pone.0126516.
- [32] Seo PJ, Kim MJ, Ryu JY, et al. Two splice variants of the IDD14 transcription factor competitively form nonfunctional heterodimers which may regulate starch metabolism. *Nat Commun*, 2011, 2: 303. DOI: 10.1038/ncomms1303.
- [33] Legris M, Klose C, Burgie ES, et al. Phytochrome B integrates light and temperature signals in *Arabidopsis*. *Science*, 2016, 354(6314): 897-900.
- [34] Shikata H, Hanada K, Ushijima T, et al. Phytochrome controls alternative splicing to mediate light responses in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(52): 18781-18786.
- [35] Sawa M, Nusinow DA, Kay SA, et al. FKF1 and GIGANTEA complex formation is required for day-length measurement in *Arabidopsis*. *Science*, 2007, 318(5848): 261-265.
- [36] Liu LJ, Zhang YC, Li QH, et al. COP1-mediated ubiquitination of CONSTANS is implicated in cryptochrome regulation of flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2008, 20(2): 292-306.
- [37] Lazaro A, Valverde F, Piñeiro M, et al. The *Arabidopsis* E3 ubiquitin ligase HOS1 negatively regulates CONSTANS abundance in the photoperiodic control of flowering. *Plant Cell*, 2012, 24(3): 982-999.
- [38] Song YH, Lee I, Lee SY, et al. CONSTANS and ASYMMETRIC LEAVES 1 complex is involved in the induction of *FLOWERING LOCUS T* in photoperiodic flowering in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2012, 69(2): 332-342.
- [39] Gil KE, Park MJ, Lee HJ, et al. Alternative splicing provides a proactive mechanism for the diurnal CONSTANS dynamics in *Arabidopsis* photoperiodic flowering. *Plant J*, 2017, 89(1): 128-140.
- [40] Wenkel S, Turck F, Singer K, et al. CONSTANS and the CCAAT box binding complex share a functionally important domain and interact to regulate flowering of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2006, 18(11): 2971-2984.
- [41] Samach A, Onouchi H, Gold SE, et al. Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. *Science*, 2000, 288(5471): 1613-1616.
- [42] Tiwari SB, Shen Y, Chang HC, et al. The flowering time regulator CONSTANS is recruited to the *FLOWERING LOCUS T* promoter via a unique *cis*-element. *New Phytol*, 2010, 187(1): 57-66.
- [43] Wang CQ, Guthrie C, Sarmast MK, et al. BBX19 interacts with CONSTANS to repress *FLOWERING LOCUS T* transcription, defining a flowering time checkpoint in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2014, 26(9): 3589-3602.
- [44] Matera AG, Wang ZF. A day in the life of the spliceosome. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(2): 108-121.
- [45] Shao CW, Yang B, Wu TB, et al. Mechanisms for *U2AF* to define 3' splice sites and regulate alternative splicing in the human genome. *Nat Struct Mol Biol*, 2014, 21(11): 997-1005.
- [46] Wang YY, Xiong F, Ren QP, et al. Regulation of flowering transition by alternative splicing: the role of the U2 auxiliary factor. *J Exp Bot*, 2020, 71(3): 751-758.
- [47] Domon C, Lorković ZJ, Valcárcel J, et al. Multiple forms of the U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor *U2AF* subunits expressed in higher plants. *J Biol Chem*, 1998, 273(51): 34603-34610.
- [48] Wang BB, Brendel V. Molecular characterization and phylogeny of *U2AF35* homologs in plants. *Plant Physiol*, 2006, 140(2): 624-636.
- [49] Jang YH, Park HY, Lee KC, et al. A homolog of splicing factor SF1 is essential for development and is involved in the alternative splicing of pre-mRNA in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2014, 78(4): 591-603.
- [50] Xiong F, Ren JJ, Yu Q, et al. *AtU2AF65b* functions in abscisic acid mediated flowering via regulating the precursor messenger RNA splicing of *ABI5* and *FLC* in *Arabidopsis*. *New Phytol*, 2019, 223(1): 277-292.
- [51] Whittaker C, Dean C. The *FLC* locus: a platform for discoveries in epigenetics and adaptation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2017, 33: 555-575.
- [52] Hu GL, Hu ZL, Li Y, et al. A splicing site mutation in *BrpFLC1* and repressed expression of *BrpFLC* genes are associated with the early flowering of purple flowering stalk. *Russ J Plant Physiol*, 2011, 58(3): 431-438.
- [53] Mahrez W, Shin J, Muñoz-Viana R, et al. *BRR2a* affects flowering time via *FLC* splicing. *PLoS Genet*,

- 2016, 12(4): e1005924. DOI: 10.1371/journal.pgen.1005924.
- [54] Park HY, Lee HT, Lee JH, et al. *Arabidopsis* *U2AF65* regulates flowering time and the growth of pollen tubes. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 569. DOI: 10.3389/fpls.2019.00569.
- [55] Wang XX, Wu FM, Xie QG, et al. *SKIP* is a component of the spliceosome linking alternative splicing and the circadian clock in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2012, 24(8): 3278-3295.
- [56] Cui ZB, Tong AZ, Huo YQ, et al. *SKIP* controls flowering time via the alternative splicing of *SEF* pre-mRNA in *Arabidopsis*. *BMC Biol*, 2017, 15(1): 80. DOI: 10.1186/s12915-017-0422-2.
- [57] Zhang X, Min JH, Huang P, et al. *AtSKIP* functions as a mediator between cytokinin and light signaling pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep*, 2014, 33(3): 401-409.
- [58] Noh YS, Amasino RM. *PIE1*, an ISWI family gene, is required for *FLC* activation and floral repression in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2003, 15(7): 1671-1682.
- [59] Martin-Trillo M, Lázaro A, Poethig RS, et al. *EARLY IN SHORT DAYS 1 (ESD1)* encodes *ACTIN-RELATED PROTEIN 6 (AtARP6)*, a putative component of chromatin remodelling complexes that positively regulates *FLC* accumulation in *Arabidopsis*. *Development*, 2006, 133(7): 1241-1252.
- [60] Choi K, Park C, Lee J, et al. *Arabidopsis* homologs of components of the SWR1 complex regulate flowering and plant development. *Development*, 2007, 134(10): 1931-1941.
- [61] Naftelberg S, Schor IE, Ast G, et al. Regulation of alternative splicing through coupling with transcription and chromatin structure. *Annu Rev Biochem*, 2015, 84: 165-198.
- [62] Deal RB, Topp CN, McKinney EC, et al. Repression of flowering in *Arabidopsis* requires activation of *FLOWERING LOCUS C* expression by the histone variant H2A.Z. *Plant Cell*, 2007, 19(1): 74-83.
- [63] Pajoro A, Severing E, Angenent GC, et al. Histone H3 lysine 36 methylation affects temperature-induced alternative splicing and flowering in plants. *Genome Biol*, 2017, 18: 102. DOI: 10.1186/s13059-017-1235-x.
- [64] Lee KC, Jang YH, Kim SK, et al. RRM domain of *Arabidopsis* splicing factor *SFI* is important for pre-mRNA splicing of a specific set of genes. *Plant Cell Rep*, 2017, 36(7): 1083-1095.
- [65] Verhage L, Severing EI, Bucher J, et al. Splicing-related genes are alternatively spliced upon changes in ambient temperatures in plants. *PLoS ONE*, 2017, 12(3): e0172950. DOI: 10.1371/journal.pone.0172950.
- [66] Huang XY, Niu J, Sun MX, et al. *CYCLIN-DEPENDENT KINASE G1* is associated with the spliceosome to regulate *CALLOSE SYNTHASE5* splicing and pollen wall formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2013, 25(2): 637-648.
- [67] Zheng T, Nibau C, Phillips DW, et al. *CDKG1* protein kinase is essential for synapsis and male meiosis at high ambient temperature in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(6): 2182-2187.
- [68] Cavallari N, Nibau C, Fuchs A, et al. The cyclin-dependent kinase G group defines a thermo-sensitive alternative splicing circuit modulating the expression of *Arabidopsis* *ATU2AF65A*. *Plant J*, 2018, 94(6): 1010-1022.
- [69] Nibau C, Gallemí M, Dadarou D, et al. Thermo-sensitive alternative splicing of *FLOWERING LOCUS M* is modulated by cyclin-dependent kinase G2. *Front Plant Sci*, 2020, 10: 1680. DOI: 10.3389/fpls.2019.01680.
- [70] Ma XY, Qiao Z, Chen DH, et al. *CYCLIN-DEPENDENT KINASE G2* regulates salinity stress response and salt mediated flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 2015, 88(3): 287-299.
- [71] Steffen A, Staiger D. Chromatin marks and ambient temperature-dependent flowering strike up a novel liaison. *Genome Biol*, 2017, 18: 119. DOI: 10.1186/s13059-017-1259-2.
- [72] Posé D, Verhage L, Ott F, et al. Temperature-dependent regulation of flowering by antagonistic *FLM* variants. *Nature*, 2013, 503(7476): 414-417.
- [73] Luco RF, Pan Q, Tominaga K, et al. Regulation of alternative splicing by histone modifications. *Science*, 2010, 327(5968): 996-1000.
- [74] Bu ZY, Yu Y, Li ZP, et al. Regulation of *Arabidopsis* flowering by the histone mark readers *MRG1/2* via

- interaction with CONSTANS to modulate *FT* expression. *PLoS Genet*, 2014, 10(9): e1004617. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004617.
- [75] Xu YF, Gan ES, Zhou J, et al. *Arabidopsis* MRG domain proteins bridge two histone modifications to elevate expression of flowering genes. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(17): 10960-10974.
- [76] Bouché F, Lobet G, Tocquin P, et al. FLOR-ID: an interactive database of flowering-time gene networks in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(D1): D1167-D1171.
- [77] Kumar SV, Wigge PA. H2A.Z-containing nucleosomes mediate the thermosensory response in *Arabidopsis*. *Cell*, 2010, 140(1): 136-147.
- [78] Cao SH, Luo XM, Xie L, et al. The florigen interactor BdES43 represses flowering in the model temperate grass *Brachypodium distachyon*. *Plant J*, 2020, 102(2): 262-275.
- [79] Petrillo E, Kalyna M, Mandadi KK, et al. Editorial: alternative splicing regulation in plants. *Front Plant Sci*, 2020, 11: 913. DOI: 10.3389/fpls.2020.00913.
- [80] Qi HD, Lin Y, Ren QP, et al. RNA splicing of *FLC* modulates the transition to flowering. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 1625. DOI: 10.3389/fpls.2019.01625.
- [81] Li SN, Li ZC, Zhang JL, et al. Flowering signal integrator AGL24 interacts with K domain of AGL18 in *Brassica juncea*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 518(1): 148-153.
- [82] Wu G, Park MY, Conway SR, et al. The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *Cell*, 2009, 138(4): 750-759.
- [83] Stankovic N, Schloesser M, Joris M, et al. Dynamic distribution and interaction of the *Arabidopsis* *SRSF1* subfamily splicing factors. *Plant Physiol*, 2016, 170(2): 1000-1013.
- [84] Shang XD, Cao Y, Ma LG. Alternative splicing in plant genes: a means of regulating the environmental fitness of plants. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(2): 432. DOI: 10.3390/ijms18020432.

(本文责编 郝丽芳)