

植物生理学报 Plant Physiology Journal 2022, 58 (8): 1575-1586 doi: 10.13592/j.cnki.ppj.100015

豌豆TCP基因家族的鉴定与分析

杜姗姗^{1,2},周绍礼^{1,2},赵宝林¹,赵维月¹,陈江华^{1,*} ¹中国科学院西双版纳热带植物园,中国科学院热带植物资源可持续利用重点实验室,昆明650223 ²中国科学院大学,北京100049 *通信作者(jhchen@xtbg.ac.cn)

摘要: TCP (TEOSINTE BRANCHED 1, CYCLOIDEA, PROLIFERATING CELL FACTORS 1和2)作为植物 特有的转录调控因子,在高等植物的生命过程中发挥着十分重要的功能。豌豆(Pisum sativum)作为重要 的豆科作物和模式植物,目前还没有豌豆TCP基因家族系统性进化分析的研究报道。本研究对豌豆的 TCP基因家族进行了初步的进化和表达分析。结果表明:豌豆TCP基因家族共有22个成员,不同TCP成员 之间的氨基酸数、分子量和等电点差异较大;所有TCP家族成员都定位于细胞核。系统进化分析显示豌 豆TCP家族成员分为2个亚家族: Class I (PCF)和Class II,基因结构分析显示:豌豆TCP基因结构较为简单, 内含子数目较少。该家族成员共包含10种保守基序(Motif1~Motif10),顺式元件分析发现,豌豆TCP基因 家族的启动子序列中包含了多个非生物胁迫响应元件。对该家族成员的表达模式分析表明,豌豆大部分 TCP成员的表达具有组织特异性,且多集中于叶和花等部位。

关键词:豌豆; TCP基因家族; 进化分析; 表达分析

Identification and analysis of TCP gene family in Pisum sativum

DU Shanshan^{1,2}, ZHOU Shaoli^{1,2}, ZHAO Baolin¹, ZHAO Weiyue¹, CHEN Jianghua^{1,*}

¹Chinese Academy of Sciences Key Laboratory of Tropical Plant Resources and Sustainable Use, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Kunming, 650223, China

²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

*Corresponding author (jhchen@xtbg.ac.cn)

Abstract: TCP (TEOSINTE BRANCHED 1, CYCLOIDEA, PROLIFERATING CELL FACTORS 1 and 2) is plant-specific transcription factor, play important roles in diverse life processes of higher plant species. The pea is an important legume crop and model species. However, we could not find any reports about the phylogenetic analysis of *TCP* gene family of pea so far. In this study, we carried out the systematically analysis of PsTCP. The 22 members of *PsTCP* were identified from the genome database of pea. The PsTCPs carried variant amino acid number, molecular weight and isoelectric point but all members were predicted to located in the nucleus. The results of phylogenetic analysis showed that the PsTCPs could be divided into two subfamily: Class (PCF) and Class . The structure of *PsTCP* genes are simple and some are even withfewer introns. Ten conserved motifs were identified from the PsTCP family, The cis-element analysis showed that the promoter of *PsTCP* harbored several abiotic-stress response elements. Most of *PsTCP* genes showed

收稿 2021-08-10 修定 2022-03-22

资助 国家自然科学基金(31460376)、兵团重点领域科技攻关项目(2018AB012)、兵团重大科技项目(2020AA005)和石河子大学科研项 目(ZZZC201931B)。

tissue specific expression pattern and majority of them were highly expressed in leaves and flowers. **Key words:** *Pisum sativum*; *TCP* gene family; phylogenetic analysis; expression analysis

TCP基因家族编码植物特异的转录因子,其起 源于藻类和苔藓植物,并在植物演化过程中逐渐 复制和扩增,最终发展成为多基因家族(Nishiyama 等2018; Liu等2019)。该基因家族的命名来源于4 个同源基因的首字母: 玉米的TEOSINTE BRANC-HED 1 (TB1) 基因(Doebley 等1997)、金鱼草的CY-CLOIDEA (CYC)基因(Luo等1999)和水稻的PRO-LIFERATING CELL FACTOR1/2 (PCF1/2)基因(Kosugi和Ohashi 1997; Cubas等1999b)。TCP转录因子 蛋白的N端具有十分保守的basic Helix-Loop-Helix (bHLH)结构域,又称为TCP结构域,该结构域具有 结合DNA以及蛋白质的功能(Martin-Trillo和Cubas 2010)。根据bHLH结构域的氨基酸序列的同源性, 可将TCP转录因子家族划分为Class I (PCF或者 TCP-P类群)和Class II (TCP-C类群) 2个亚家族,其 中Class I和Class II的TCP结构域分别由55个和59 个保守的氨基酸组成。根据除TCP以外的结构域, Class II亚家族又可进一步划分为CYC/TB1 (ECE)类 群和CIN类群,前者通常包含glutamic acid-cysteineglutamic acid stretch (ECE)结构域和arginine-rich domain (R)结构域,后者则一般具有microRNA的结 合位点(Nicolas和Cubas 2016; Liu等2019)。

TCP转录因子广泛参与植物的生长发育调控 和环境胁迫应答(冯雅岚等2018)。在调控植物生 长发育方面,已有的研究报道表明TCP转录因子家 族成员广泛参与调控腋芽体眠和分蘖/分枝发育,花 瓣属性决定和花对称性建立,以及叶形态建成等。 TCP基因家族成员TEOSINTE BRANCHED1 (TB1) (Doebley等1997)是玉米驯化过程中被人工选择的 重要基因之一,TB1通过正向调控下游的TASSELS REPLACE UPPER EARS1 (TRU1)基因的表达来抑制 腋芽和分枝的生长(Hubbard等2002; Clark等2006; Dong等2017)。已有的研究报道显示TB1的基因功 能十分保守,广泛参与拟南芥(Arabidopsis thaliana) (Aguilar-Martínez等2007; Finlayson 2007; González-Grandío等2017)、水稻(Oryza sativa) (Minakuchi等 2010)、番茄(Solanum lycopersicum) (Martín-Trillo

等2011)、马铃薯(Solanum tuberosum) (Nicolas等 2015)、黄瓜(Cucumis sativa) (Shen等2019)和豌豆 (Pisum sativa) (Braun等2012)等物种的分蘖/分枝发 育。TCP基因在调控花对称性方面也发挥着保守但 又具有一定分化的功能。金鱼草(Antirhinum majus)中与TB1同属于CYC/TB1类群的CYCLOIDEA (CYC)和DICHOTOMA (DICH)基因特异性地在花 原基背部区域表达,其通过调控RADIALIS (RAD) 及DIVARICATA (DIV)的转录活性来调控花的对称性 和形态(Luo等1996; Galego等2002; Corley等2005)。 除了CYC基因在金鱼草中调控花的对称性之外, CYC 的同源基因还广泛参与同属于玄参科(Scrophulariaceae)的柳川鱼(Linaria vulgaris) (Cubas等1999a)、 苦苣苔科(Gesneriaceae)的五数苣苔(Bournea leiophylla) (Zhou等2008)、金虎尾草科(Malpighiaceae) (Zhang等2010)、车前科(Plantaginaceae) (Reardon 等2014)、唇形科(Lamiaceae) (Zhong等2017)、禾 本科(Poaceae) (Yuan等2009)和菊科(Asteraceae) (Kim等2008)等不同植物类群花对称性及形态的调 控。在豆科植物(Leguminosae)百脉根(Lotus japonicus)和豌豆中; LjCYC1/PsCYC1和LjCYC2 (SQU)/ PsCYC2 (LSTI)共同决定背部花瓣特征, 而LiCYC3 (KEW)/PsCYC3(K)则控制侧部花瓣特征, 三者协 同调控花的对称性(Feng等2006; Wang等2008; Xu 等2016)。TCP基因家族的CIN类群在调控植物叶 片发育方面同样发挥着十分重要的功能。CINCIN-NATA (CIN)在金鱼草叶片发育过程中通过影响细 胞分裂和生长来调控叶片和花瓣的平展性及形态 (Nath等2003; Crawford等2004)。在拟南芥中TCP4 等受到miR-JAW的调控,在控制叶片形态建成过 程中发挥着十分重要的功能(Palatnik等2003)。同 时,已有研究报道显示TCP可通过调控边界基因的 表达来影响侧生器官发育过程中边界的形成及最 终的形态(Weir等2004; Koyama等2007, 2017; Ori 等2007)。TCP基因家族成员除了通过影响细胞分 裂活性来调控生长发育过程之外,其还参与多种植 物激素如赤霉素(gibberellins, GAs)、生长素(auxin)、

细胞分裂素(cytokinin)、脱落酸(abscisic acid, ABA) 和油菜素内酯(brassinosteroids, BR)的合成、转运 及信号转导,以响应植物体内外环境的变化(Nicolas和Cubas 2016)。

鉴于TCP基因家族在调控植物生长发育和环境 适应方面发挥着十分重要的功能,已有的研究已经 对拟南芥和水稻(Yao等2007)、番茄(Parapunova等 2014)、黄瓜(Wen等2020)、大豆(Glycine max) (Feng 等2018)和蒺藜苜蓿(Medicago truncatula) (Wang等 2018)等重要的模式植物中该基因家族进行了系统 分析。豌豆(Pisum sativum)作为最经典的模式植物 之一,从孟德尔时代开始便被广泛用于遗传学和 发育生物学等相关问题的研究,同时豌豆也是最 重要的豆科作物之一,具有十分重要的食用价值。 Kreplak等(2019)于近年来已完成了豌豆高质量参 考基因组的测序组装,但是截至目前还没有关于 豌豆的TCP基因家族系统性分析研究的报道。本 研究通过生物信息学方法对豌豆基因组数据库进 行检索,筛选并鉴定到了22个TCP基因家族成员,其 分布在所有染色体上。系统进化分析显示,豌豆的 TCP家族基因可被划分为Class I (PCF)和Class II亚 家族,其中Class II亚家族又被划分为CYC/TB1和 CIN亚类群。同时我们对豌豆TCP蛋白结构的分析 发现,所有的TCP成员都包含保守的TCP结构域。 通过对豌豆TCP基因启动子序列进行分析,我们在 豌豆TCP基因启动子中发现了多种环境响应、激素 信号及生长发育相关的顺式作用元件。表达模式 分析发现多数豌豆TCP家族成员的表达具有组织 特异性,证明这些基因在调控生长发育过程中很 可能发挥着十分重要的功能。该研究系统地对豌 豆TCP基因家族进行了进化和表达分析,这些结果 将为后期基因功能的研究以及豌豆的育种工作提 供十分重要的参考信息。

1 材料与方法

1.1 豌豆TCP基因的鉴定及理化性质分析

首先在豌豆基因组数据库中(https://urgi.versailles.inra.fr/Species/Pisum)下载豌豆(*Pisum sativum* L.)全基因组蛋白序列,在TBtools中以拟南芥TCP序 列来寻找可能的豌豆TCP基因,所用到的E值小于 10⁻⁵为序列选取标准。对每一条符合条件的序列,又 在SMART (http://smart.embl-hei-delberg.de)和Pfam (http://pfam.sanger.ac.uk)数据库中检测其是否含有 TCP结构域,去除无TCP结构域的候选序列,剩下 的基因定为豌豆*TCP*家族成员,共得到22条*TCP*基 因序列,利用ExPASy网站(http://web.expasy.org/ protparam/)对豌豆TCP家族成员蛋白质进行氨基酸 数目、分子量和等电点等理化性质分析,用CELLO (http://cello.life.nctu. edu.tw/)对其进行亚细胞定位 的预测分析。

1.2 豌豆TCP基因家族的染色体定位

从豌豆基因组数据库中,下载豌豆TCP基因家 族全部成员的染色体定位信息。豌豆TCP基因家族 22个成员,有1个还没有确定其在染色体(Psat0s-1198g0040.1)上的位置。其余21个成员都可以根 据其定位信息,通过TBtools工具作出染色体定位 图谱(Chen等2020)。

1.3 豌豆TCP基因的基因结构及保守基序分析

利用TBtools对豌豆TCP基因的结构进行了鉴定,利用在线MEME程序版本5.0.5 (http://memesuite.org/tools/meme)对豌豆TCP的保守基序进行预测,保守基序长度设为6~100个氨基酸,保守基序 个数设为10个。结合进化树分析结果,基因结构和 保守基序图使用TBtools绘制。

1.4 豌豆TCP系统进化树构建

以22个PsTCP和24个AtTCP的蛋白序列进行 系统进化分析。用MEGA软件v.10.1.8 (https://www. megasoftware.net/)采用邻接法(Neighbor-Joining)构 建进化树,参数设置: Bootstrap Replications为1 000, Model/Method是p-distance, Gap/Missing Data Treatment为Pairwise deletion,聚类结果使用Evolview V3 (https://www.evolgenius)显示。

1.5 豌豆TCP基因家族miR319靶位点预测

用psRNATarget在线软件(http://plantgrn.noble. org/psRNATarget/)预测豌豆*TCP*基因家族成员的 miR319靶位点,期望值(expectation)设置为≤2.5, 后用软件DNAMAN 8.0进行多序列的比对。

1.6 豌豆TCP基因启动子顺式作用元件分析

在豌豆基因组数据库中下载PsTCP家族成员 基因转录起始位点上游2000 bp的序列,用PlantCARE (http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/ plantcare/html/)将来自*PsTCP*基因翻译起始位点的 上游2 kb的序列进行了顺式元件分析,并利用 TBtools软件绘制启动子顺式作用元件热图。

1.7 豌豆TCP基因的表达分析

基因的时空表达在一定程度上反映了基因的 功能特性,根据已发布的豌豆转录组数据(https:// urgi.versailles.inra.fr/download/pea/Pea_PSCAM_ transcriptome/),提取豌豆*TCP*基因20个组织的FPKM 值(FragmentPer Kilobase of exon model per Million mapped reads),并将FPKM值(+1)转换成log2值,用 TBtools软件绘制热图,对基因的表达模式进行了 分析。

2 实验结果

2.1 豌豆TCP基因的分离鉴定

本研究中,我们首先利用玉米的TB1、水稻的

PCF1/2、金鱼草的CYC以及拟南芥的TCP1等具有 代表性的TCP转录因子序列作为参考在豌豆基因 组网站(https://urgi.versailles.inra.fr/Species/Pisum)进 行初步的检索分析,共分离到了22个豌豆的TCP转 录因子编码基因。接着利用Pfam数据库(http://www. pfam.xfam.org/)和NCBI的CCD数据库(https://www. ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi)对所分离的 豌豆TCP家族成员的蛋白序列进行进一步分析,确 认所有成员都包含保守的TCP结构域。根据其在染 色体上的顺序,将所分离的豌豆TCP基因家族成员 分别命名为PsTCP1~PsTCP22,其中在6号染色体上 分布的数目最多(5个)(表1)。在22个成员中, PsT-CP7、PsTCP1和PsTCP19分别是已报道的调控花发 育的PsCYC1、PsCYC2 (LST1)和PsCYC3 (K), PsTCP9 是已报道的调控腋芽休眠和分枝发育的PsBRCI基 因。根据对豌豆TCP家族成员的蛋白质理化性质分析 结果显示,豌豆TCP家族成员的氨基酸序列长度介

基因号	基因名	染色体位置	蛋白长度/aa	分子质量/Da	等电点	亚细胞定位
Psat1g061800.1	PsTCP1	Chr1: 96 398 759~96 401 196	320	36 354.73	9.65	细胞核
Psat1g067000.1	PsTCP2	Chr1: 104 322 517~104 325 587	312	35 488.86	6.18	细胞核
Psat1g188440.1	PsTCP3	Chr1: 339 783 685~339 787 561	394	43 671.64	6.48	细胞核
Psat1g221880.1	PsTCP4	Chr1: 369 910 997~369 915 082	518	54 500.08	6.46	细胞核
Psat2g121520.1	PsTCP5	Chr2: 317 012 801~317 015 464	419	44 227.42	6.46	细胞核
Psat3g162880.1	PsTCP6	Chr3: 321 630 308~321 632 028	278	30 208.06	8.65	细胞核
Psat3g190960.1	PsTCP7	Chr3: 408 066 752~408 068 730	361	41 163.31	8.32	细胞核
Psat3g202920.1	PsTCP8	Chr3: 428 621 740~428 624 025	366	41 370.56	7.97	细胞核
Psat4g043560.1	PsTCP9	Chr4: 75 715 015~75 717 959	414	47 647.65	8.79	细胞核
Psat4g047560.1	PsTCP10	Chr4: 80 703 081~80 704 795	313	35 000.75	8.90	细胞核
Psat4g151280.1	PsTCP11	Chr4: 297 115 393~297 118 429	368	39 991.25	9.05	细胞核
Psat4g170920.1	PsTCP12	Chr4: 336 184 000~336 187 537	410	44 816.05	6.70	细胞核
Psat5g205080.1	PsTCP13	Chr5: 418 967 532~418 969 828	392	44 414.90	7.00	细胞核
Psat5g240240.1	PsTCP14	Chr5: 477 780 415~477 781 472	332	36 017.26	6.98	细胞核
Psat5g274920.1	PsTCP15	Chr5: 536 962 555~536 964 520	213	23 501.85	6.87	细胞核
Psat6g072200.1	PsTCP16	Chr6: 91 274 325~91 275 687	200	21 872.51	6.58	细胞核
Psat6g099920.1	PsTCP17	Chr6: 164 478 648~164 481 498	223	24 260.97	8.85	细胞核
Psat6g203920.1	PsTCP18	Chr6: 405 824 125~405 825 895	413	44 124.27	5.88	细胞核
Psat6g206120.1	PsTCP19	Chr6: 409 709 963~409 712 213	415	47 148.82	6.78	细胞核
Psat6g233680.1	PsTCP20	Chr6: 468 612 846~468 615 643	255	27 324.46	9.51	细胞核
Psat7g165080.1	PsTCP21	Chr7: 317 682 247~317 683 218	313	35 213.39	5.65	细胞核
Psat0s1198g0040.1	PSTCP22	Scaffold01198: 92 190~96 640	473	52 565.83	7.09	细胞核

表1 豌豆TCP转录因子家族蛋白的基本信息 Table 1 The basic information of TCP transcription factor of *P. sativum*

于200~518 aa之间, 分子质量在21 872.51~54 500.08 Da之间, 蛋白等电点最小为5.65, 最大为9.65 (表1)。 蛋白定位预测结果显示所有的豌豆TCP家族成员 都定位于细胞核中(表1)。

2.2 豌豆TCP基因家族的染色体定位分析

对豌豆TCP基因家族成员分离鉴定之后,使用 TBtools软件绘制了22个TCP成员在染色体(2n=14) 上的位置。分析结果显示,豌豆22个TCP基因不 均匀地分布在7条染色体上,其中PsTCP1、PsTCP2、 PsTCP3和PsTCP4位于1号染色体,PsTCP5位于2号 染色体,PsTCP6、PsTCP7和PsTCP8位于3号染色 体,PsTCP9、PsTCP10、PsTCP11和PsTCP12位于 4号染色体,6号染色体成员最多,分布着PsTCP16、 PsTCP17、PsTCP18、PsTCP19和PsTCP20,PsTCP21 位于7号染色体,除此之外,PsTCP22基因定位在 未拼接完整的染色体片段上(图1)。

2.3 豌豆TCP系统进化分析

为了进一步了解豌豆TCP转录因子家族的系 统进化关系,利用MEGA 7.0软件对拟南芥的24个 及豌豆的22个TCP成员进行系统进化分析。系统 进化树显示拟南芥和豌豆的TCP成员被划分为 Class I (PCF)和Class II两个亚家族,其中Class I共 包含豌豆的8个TCP成员,分别是PsTCP4、PsTCP5、 PsTCP6、PsTCP11、PsTCP16、PsTCP17、PsTCP18 和PsTCP20, Class II亚家族可进一步划分为CIN 和CYC/TB1两个亚类群,分别包含有10个和4个成员。其中CIN亚类群包括PsTCP2、PsTCP3、PsT-CP8、PsTCP10、PsTCP12、PsTCP13、PsTCP14、 PsTCP15、PsTCP21和PsTCP22; CYC/TB1亚类群 包括PsTCP1、PsTCP7、PsTCP9和PsTCP19(图2)。 此处拟南芥的TCP进化分析结果与之前的报道一 致,证明以上的进化分析结果比较可靠(Aguilar-Martínez等2007; Finlayson 2007; González-Grandío 等2017)。

2.4 豌豆TCP转录因子家族的进化、蛋白保守结 构域及编码基因结构分析

利用豌豆TCP转录因子家族的蛋白序列构建 了无根进化树(unrooted phylogenetic tree),分析结 果显示豌豆的22个TCP家族成员可被分为Class I 和Class II两个亚家族(图3-A)。然后使用MEME在 线软件对豌豆TCP成员进行了保守结构域分析,结 果显示PsTCP成员共包含了10种不同的保守结构 域(Motif1~Motif10),每一个PsTCP所包含结构域 的种类和数目差异都比较大。首先在种类方面,如 PsTCP5、PsTCP16和PsTCP18只有2种结构域,而 PsTCP1/PsTCP7则包含了7种结构域;其次在结构域 数量方面,PsTCP5、PsTCP16、PsTCP18仅出现两 个结构域,但是PsTCP22则包含了10个结构域(图 3-B)。这些结构域种类和数目上的差异暗示不同的



Fig. 1 Chromosomal localization of *PsTCP* genes



图2 豌豆与拟南芥TCP家族成员的系统分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of TCP transcription factors of Arabidopsis and P. sativum



图3 豌豆TCP转录因子家族进化树(A)、蛋白保守结构域(B)及基因结构(C)分析 Fig. 3 Phylogenetic (A) and conserved motif (B) analysis of PsTCP transcription factors, and gene structure (C) analysis of *PsTCP* genes

PsTCP成员可能在豌豆中发挥着不同的调控功能。 另一方面, Motif1和Motif2则出现在了所有的PsTCP 成员中, 说明Motif1和Motif2具有较强的保守性, 其 对于PsTCP来说很可能具有十分重要的功能(图3-B)。 除此之外, 分析结果显示亲缘关系较近的PsTCP含 有相似的结构域, 不同进化分支内出现了特有的保 守结构域, 这表明在进化过程中特定结构域的出 现很可能是PsTCP发生功能分化的重要原因(图 3-B)。

本文对PsTCP进行了基因结构分析,绘制了基因 结构图谱并比较了PsTCP基因的非翻译区(UTR)、 外显子(exon)和内含子(intron)组成。分析结果显示, 豌豆TCP基因结构相对简单,外显子数目为1~3个, 其中大部分豌豆TCP基因仅仅具有1个外显子,而 PsTCP18外显子数目最多,为3个;内含子数目为1 或2个;22个基因中有21个含有UTR (图3-C),其中 PsTCP14由于基因数据注释不全而没有在图中显 示出相应的UTR区域。以上分析结果与之前报道的模式植物中TCP基因结构类似,说明TCP基因在结构上具有一定的保守性。

2.5 豌豆TCP基因启动子顺式作用元件分析

基因启动子序列上的顺式作用元件(*cis*-acting element)对于基因的转录调控具有十分重要的功能,由于启动子多数位于基因转录起始点的上游,我们通过对豌豆TCP基因起始密码子ATG上游2000 bp的基因序列进行分析,在其中发现了多种顺式作用元件,如植物激素响应元件、光响应元件、胁迫响应元件等(图4)。在植物激素响应元件中,除PsT-CP13、PsTCP14和PsTCP11外,其他PsTCP成员启动子都具有一个或多个响应脱落酸(ABA)的ABRE顺式作用元件(图4)。在这些启动子中还有大量与光响应相关的顺式作用元件,包括G-Box结合位点Box 4,其中所有PsTCP成员启动子都包含了Box 4 顺式作用元件(图4)。除了以上激素和光响应元件



图4 豌豆TCP基因启动子顺式作用元件分析 Fig. 4 Cis-acting elements analysis of the promotors of PsTCP genes

之外,几乎所有豌豆PsTCP启动子中都发现了与胁迫响应相关的Myb和Myc元件,提示PsTCP在豌豆响应生物和非生物胁迫反应中也具有重要的功能(图4)。

2.6 豌豆TCP基因家族miR319靶位点预测

因为之前已有多项研究报道证明TCP基因在 调控侧生器官发育过程中受到miRNA的调控,如 在拟南芥中,AtTCP2、AtTCP3、AtTCP4、AtTCP10 和AtTCP24参与调控叶片发育,其受到miR319的转 录后调控(Palatnik等2003),AtTCP3可间接调节边 界特异性基因CUC和LOB的表达,miR319转录后调 控AtTCP3进而控制叶片的发生和发育(Szklarczyk 等2017),所以我们对豌豆TCP基因家族成员的基 因序列进行了miRNA结合位点的预测分析。分析 结果显示PsTCP3、PsTCP12、PsTCP14、PsTCP15 和PsTCP22具有miR319的靶位点(图5),并且这些 成员在进化分析中与拟南芥中miR319的靶标基因 具有较高的同源性,故推测豌豆的这些基因在表 达过程中很可能也被miRNA调控。

2.7 豌豆TCP基因家族的表达模式分析

基因的表达模式对于理解基因的功能具有十分重要的参考意义,我们利用豌豆已有的转录组数据对PsTCP的表达模式进行了分析。分析结果(图6)显示,不同的豌豆TCP亚家族成员具有不同的表达模式和特征,指示其在基因功能上的分化。Class II亚家族中的CIN亚类群成员主要在叶(PsTCP2、PsTCP8、PsTCP13、PsTCP15)、果荚(PsTCP12、PsT-CP13)、茎尖(PsTCP12、PsTCP21、PsTCP22)和种

子(PsTCP3、PsTCP10、PsTCP14)中表达。Class II亚 家族中CYC/TB1亚类群的PsTCP1、PsTCP7、PsT-CP19非常特异地在花器官中表达,其分别指代已报 道的参与花对称性调控的PsCYC1、PsCYC2(LST1) 和PsCYC3(K)基因; PsTCP9在叶卷须中具有较高的 表达。Class I亚家族的基因主要在叶片(PsTCP18)、 花(PsTCP11)、果荚(PsTCP5、PsTCP17)、茎尖(Ps-TCP5、PsTCP17、PsTCP20)和种子(PsTCP6、Ps-TCP18)中表达。总体来说,一部分进化关系较近 的PsTCP成员具有较为相似的表达模式,如PsTCP2 和PsTCP8, PsTCP3和PsTCP22, PsTCP1、PsTCP7 和PsTCP19, PsTCP17和PsTCP20, 这些表达模式相 似的基因在基因功能上可能存在冗余,其中已报 道的PsTCP1、PsTCP7和PsTCP19共同协同调控豌 豆花的对称性和形态,是这方面的佐证。但也有一 些表达模式存在差异但是进化关系较近的基因, 如PsTCP10和PsTCP13, PsTCP12和PsTCP15(图6), 表达模式的差异可能导致功能的分化。另一方面, 很大一部分PsTCP的表达集中于叶、花和果荚种 子等侧生器官,表明豌豆TCP转录因子很有可能主 要在侧生器官的生长发育和环境响应等方面发挥 着重要功能,这可能与其他模式植物中已报道的 TCP转录因子功能具有一定的保守性。

3 讨论

TCP家族作为植物所特有的转录因子,在调控 植物生长发育、激素信号和非生物胁迫响应等方 面发挥着重要的功能(Martin-Trillo和Cubas 2010;

 miR319
 CCUCGUGGGAAGUCAGGUU

 PsTCP3
 GGGGGGACCCUUCAGUCCAA

 PsTCP12
 GGGGGGACCCUUCAGUCCAG

 PsTCP14
 GGGGGGACCCCUUCAGUCCAG

 PsTCP15
 GGGGGGGACCCCUUCAGUCCAG

 PsTCP22
 GGGGGGGACCCUUCAGUCCAA

 B5
 豌豆TCP基因家族miR319靶位点预测

Fig. 5 The predicted target sites of miR319 of *PsTCP* gene family





5

图6 豌豆TCP基因的表达模式 Fig. 6 The expression profiles of TCP genes of P. sativum

Nicolas和Cubas 2016)。基于其重要的基因功能,之前的研究报道已对拟南芥、水稻、番茄、大豆和 蒺藜苜蓿等多个重要模式植物的TCP基因家族进 行了系统性的基因、蛋白结构、表达模式和系统 进化分析,这些结果对TCP基因家族的进化和功能 研究具有十分重要的参考价值。在植物进化过程中, TCP基因最初起源于藻类植物,之后TCP基因家族 发生了多次复制事件,数量逐步增加(Nishiyama等 2018; Liu等2019)。在已报道的被子植物中,拟南 芥有24个TCP成员(Yao等2007),水稻中鉴定到了 22个成员(Yao等2007),番茄共有36个成员(Parapunova等2014;李菲等2018),蒺藜苜蓿具有21个成 员(Wang等2018),四倍体大豆包含54个成员(Feng 等2018),证明在不同的被子植物中TCP基因家族 可能经历了不同的进化事件。除此之外,所有的物种TCP蛋白成员都包含有保守的TCP结构域,按照该结构域的特征都能够将其划分为Class I和Class II两个亚家族,且Class II又可以进一步划分为CIN和CYC/TB1亚类群。本研究利用生物信息学方法,在豌豆基因组数据库中共鉴定到了22个TCP转录因子,所有成员都包含TCP结构域且都定位于细胞核中,与其他模式植物相似,PsTCP被划分为Class I和Class II两个亚家族,其中Class I包括8个成员,Class II亚家族可进一步划分为CIN、CYC/TB1两个亚类群,分别含有10个和4个成员。同一亚家族或者亚类群的基因结构、所包含的保守结构域以及编码基因的表达模式具有一定的相似性(图3和6)。以上这些线索说明不同被子植物类群中TCP基因的进

化存在一定的保守性,其他模式植物TCP基因的研究对于豌豆TCP的功能研究具有重要的参考意义。

从基因功能来看, TCP的Class II亚家族中CYC/ TB1多个成员被报道在不同的被子植物类群花发育 过程中发挥着重要的功能,除了参与调控花发育之 外, CYC/TB1成员在调控植物腋芽休眠及分枝发 育方面也发挥着保守的功能(苏甜等2021)。玉米的 TB1是最先被克隆的参与调控植物腋芽和分枝发育 的TCP编码基因(Doebley等1997; Hubbard等2002; Clark等2006; Dong等2017), 现有的研究报道证明, TB1 在 拟 南 芥 (Aguilar-Martínez 等 2007; Finlayson 2007; González-Grandío等2017)、水稻(Minakuchi等 2010)、番茄(Martín-Trillo等2011)、马铃薯(Solanum tuberosum) (Nicolas等2015)、黄瓜(Shen等2019)等 物种中的同源基因也广泛参与分枝的发育调控。 豌豆TB1的同源基因为PsBRC1/PsTCP9、参与豌豆 分枝和株型的调控(Braun等2012), 这说明TCP参与 分枝调控同样具有保守性,这些结果也从另外一方 面证明了本研究中TCP系统进化分析的可靠性。 CIN亚类群成员在其他物种中被报道广泛参与叶 的形态建成,且受到miRNA的调控(Nath等2003; Crawford等2004; Palatnik等2003), 在豌豆中, 进化 分析显示PsTCP3、PsTCP12、PsTCP14、PsTCP15 和PsTCP22与拟南芥中miR319的靶标基因聚类在 一起,且都具有miR319的结合位点,故推测这些基 因很可能参与调控豌豆叶片形态发生。在拟南芥 中AtTCP14基因在种子萌发前期具有较高的表达水 平,其正调控胚的生长(Tate-matsu等2008),本研究的 系统进化分析显示AtTCP14与PsTCP5聚类在一起, 故推测PsTCP5也可能在种子萌发过程中发挥相似 的作用。在拟南芥中AtTCP8参与病原菌的生物胁 迫响应(Wang等2015),水稻中OsPCF5和OsPCF6 分别在水稻抗盐、耐旱和抵抗冷胁迫中发挥功能 (Liu等2018), 系统进化树分析显示: PsTCP5、Ps-TCP11与OsTCP5、OsTCP6, PsTCP4与AtTCP8具 有较高的同源性,推测豌豆中这几个TCP成员很可 能参与到生物和非生物胁迫的响应。

本研究通过对豌豆TCP基因启动子的顺式作 用元件进行分析,结果显示PsTCP基因的启动子上 具有多种与植物激素响应、光响应、胁迫响应、 低温和创伤响应、以及分生组织和昼夜节律控制 相关的元件(图4)。同时基因表达模式分析显示不 同PsTCP成员具有不同的表达模式和特征(图6)。 以上这些结果说明PsTCP可能广泛参与豌豆的不 同生命过程,但是截至目前关于PsTCP基因功能的 报道仍然很少。本研究首次对豌豆TCP基因家族 进行检索,并系统地对鉴定到的22个PsTCP进行了 多方面的比较分析,这些分析结果将为进一步解 析豌豆TCP基因家族的功能及进化提供重要的参 考信息。

参考文献(References)

- Aguilar-Martínez JA, Poza-Carrión C, Cubas P (2007). Arabidopsis BRANCHED1 acts as an integrator of branching signals within axillary buds. Plant Cell, 19 (2): 458–472
- Braun N, de Saint Germain A, Pillot JP, et al (2012). The pea TCP transcription factor PsBRC1 acts downstream of Strigolactones to control shoot branching. Plant Physiol, 158 (1): 225–238
- Chen C, Chen H, Zhang Y, et al (2020). TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. Mol Plant, 13 (8): 1194–1202
- Clark RM, Wagler TN, Quijada P, et al (2006). A distant upstream enhancer at the maize domestication gene *tb1* has pleiotropic effects on plant and inflorescent architecture. Nat Genet, 38 (5): 594–597
- Corley SB, Carpenter R, Copsey L, et al (2005). Floral asymmetry involves an interplay between TCP and MYB transcription factors in *Antirrhinum*. Proc Natl Acad Sci USA, 102 (14): 5068–5073
- Crawford BC, Nath U, Carpenter R, et al (2004). *CINCINNA-TA* controls both cell differentiation and growth in petal lobes and leaves of *Antirrhinum*. Plant Physiol, 135 (1): 244–253
- Cubas P, Lauter N, Doebley J, et al (1999b). The TCP domain: A motif found in proteins regulating plant growth and development. Plant J, 18 (2): 215–222
- Cubas P, Vincent C, Coen E (1999a). An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry. Nature, 401: 157–161
- Doebley J, Stec A, Hubbard L (1997). The evolution of apical dominance in maize. Nature, 386 (6624): 485–488
- Dong Z, Li W, Unger-Wallace E, et al (2017). Ideal crop plant architecture is mediated by *tassels replace upper ears1*, a BTB/POZ ankyrin repeat gene directly targeted by TE-OSINTE BRANCHED1. Proc Natl Acad Sci USA, 114 (41): E8656–E8664

- Feng X, Zhao Z, Tian Z, et al (2006). Control of petal shape and floral zygomorphy in *Lotus japonicus*. Proc Natl Acad Sci USA, 103 (13): 4970–4975
- Feng YL, Xiong Y, Zhang J, et al (2018). Role of TCP transcription factors in plant development and biotic stress responses. Plant Physiol J, 54 (5): 709–717 (in Chinese with English abstract) [冯雅岚, 熊瑛, 张均等(2018). TCP转录因子在植物发育和生物胁迫响应中的作用. 植物生理学报, 54 (5): 709–717]
- Feng ZJ, Xu SC, Liu N, et al (2018). Soybean TCP transcription factors: Evolution, classification, protein interaction and stress and hormone responsiveness. Plant Physiol Biochem, 127: 129–142
- Finlayson SA (2007). Arabidopsis TEOSINTE BRANCHED1-LIKE 1 regulates axillary bud outgrowth and is homologous to monocot TEOSINTE BRANCHED1. Plant Cell Physiol, 48 (5): 667–677
- Galego L, Almeida J (2002). Role of *DIVARICATA* in the control of dorsoventral asymmetry in *Antirrhinum* flowers. Genes Dev, 16 (7): 880–891
- González-Grandío E, Pajoro A, Franco-Zorrilla JM, et al (2017). Abscisic acid signaling is controlled by a *BRANCHED1/HD-ZIP I* cascade in *Arabidopsis* axillary buds. Proc Natl Acad Sci USA, 114 (2): E245–E254
- Hubbard L, McSteen P, Doebley J, et al (2002). Expression patterns and mutant phenotype of *teosinte branched1* correlate with growth suppression in maize and teosinte. Genetics, 162 (4): 1927–1935
- Kim M, Cui ML, Cubas P, et al (2008). Regulatory genes control a key morphological and ecological trait transferred between species. Science, 322 (5904): 1116–1119
- Kosugi S, Ohashi Y (1997). PCF1 and PCF2 specifically bind to *cis* elements in the rice proliferating cell nuclear antigen gene. Plant Cell, 9 (9): 1607–1619
- Koyama T, Furutani M, Tasaka M, et al (2007). TCP transcription factors control the morphology of shoot lateral organs via negative regulation of the expression of boundary-specific genes in *Arabidopsis*. Plant Cell, 19 (2): 473–484
- Koyama T, Sato F, Ohme-Takagi M (2017). Roles of miR319 and TCP transcription factors in leaf development. Plant Physiol, 175 (2): 874–885
- Kreplak J, Madoui MA, Cápal P, et al (2019). A reference genome for pea provides insight into legume genome evolution. Nat Genet, 51 (9): 1411–1422
- Li F, He XH, Zhang YB, et al (2018). Identification and bioinformatics analysis of TCP transcription factor family in tomato. Mol Plant Breed, 16 (21): 6899–6906 (in Chinese with English abstract) [李菲,何小红,张宇斌等(2018). 番茄TCP转录因子家族的鉴定和生物信息学分析.分

子植物育种, 16 (21): 6899-6906]

- Liu HL, Wu M, Li F, et al (2018). TCP transcription factors in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*): genome-wide identification and expression analysis. Front Plant Sci, 9: 1263
- Liu MM, Wang MM, Yang J, et al (2019). Evolutionary and comparative expression analyses of TCP transcription factor gene family in land plants. Int J Mol Sci, 20 (14): 3591
- Luo D, Carpenter R, Copsey L, et al (1999). Control of organ asymmetry in flowers of *Antirrhinum*. Cell, 99 (4): 367– 376
- Luo D, Carpenter R, Vincent C, et al (1996). Origin of floral asymmetry in *Antirrhinum*. Nature, 383 (6603): 794–799
- Martin-Trillo M, Cubas P (2010). TCP genes: a family snapshot ten years later. Trends Plant Sci, 15 (1): 31–39
- Martín-Trillo M, Grandío EG, Serra F, et al (2011). Role of tomato *BRANCHED1*-like genes in the control of shoot branching. Plant J, 67 (4): 701–714
- Minakuchi K, Kameoka H, Yasuno N, et al (2010). FINE CULM1 (FC1) works downstream of strigolactones to inhibit the outgrowth of axillary buds in rice. Plant Cell Physiol, 51 (7): 1127–1135
- Nath U, Crawford B C, Carpenter R, et al (2003). Genetic control of surface curvature. Science, 299 (5611): 1404–1407
- Nicolas M, Cubas P (2016). TCP factors: new kids on the signaling block. Curr Opin Plant Biol, 33: 33–41
- Nicolas M, Rodríguez-Buey ML, Franco-Zorrilla JM, et al (2015). A recently evolved alternative splice site in the *BRANCHED1a* gene controls potato plant architecture. Curr Biol, 25 (14): 1799–1809
- Nishiyama T, Sakayama H, de Vries J, et al (2018). The chara genome: secondary complexity and implications for plant terrestrialization. Cell, 174 (2): 448–464
- Ori N, Cohen AR, Etzioni A, et al (2007). Regulation of LAN-CEOLATE by miR319 is required for compound-leaf development in tomato. Nat Genet, 39 (6): 787–791
- Palatnik JF, Allen E, Wu X, et al (2003). Control of leaf morphogenesis by microRNAs. Nature, 425 (6955): 257–263
- Parapunova V, Busscher M, Busscher-Lange J, et al (2014). Identification, cloning and characterization of the tomato TCP transcription factor family. BMC Plant Biol, 14: 157
- Reardon W, Gallagher P, Nolan KM, et al (2014). Different outcomes for the MYB floral symmetry genes *DIVARI-CATA* and *RADIALIS* during the evolution of derived actinomorphy in *Plantago*. New Phytol, 202 (2): 716–725
- Shen J, Zhang Y, Ge D, et al (2019). CsBRC1 inhibits axillary bud outgrowth by directly repressing the auxin efflux car-

rier *CsPIN3* in cucumber. Proc Natl Acad Sci USA, 116 (34): 17105–17114

- Su T, Zhang YH, Lu X, et al (2021). Advances in molecular regulation mechanism of lateral branch development in plants. J Plant Physiol, 57 (8): 1609–1616 (in Chinese with English abstract) [苏甜, 张应华, 吕霞等(2021). 植 物侧枝发育的分子调控机理研究进展. 植物生理学报, 57 (8): 1609–1616]
- Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, et al (2017). The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. Nucleic Acids Res, 45 (D1): D362–D368
- Tatematsu K, Nakabayashi K, Kamiya Y, et al (2008). Transcription factor AtTCP14 regulates embryonic growth potential during seed germination in *Arabidopsis thaliana*. Plant J, 53 (1): 42–52
- Wang H, Wang H, Liu R, et al (2018). Genome-wide identification of *TCP* family transcription factors in *Medicago truncatula* reveals significant roles of *miR319*-targeted TCPs in nodule development. Front Plant Sci, 9: 774
- Wang X, Gao J, Zhu Z, et al (2015). TCP transcription factors are critical for the coordinated regulation of *isochorismate synthase 1* expression in *Arabidopsis thaliana*. Plant J, 82 (1): 151–162
- Wang Z, Luo Y, Li X, et al (2008). Genetic control of floral zygomorphy in pea (*Pisum sativum* L.). Proc Natl Acad Sci USA, 105 (30): 10414–10419
- Weir I, Lu J, Cook H, et al (2004). *CUPULIFORMIS* establishes lateral organ boundaries in *Antirrhinum*. Develop-

ment, 131 (4): 915–922

- Wen H, Chen Y, Du H, et al (2020). Genome-wide identification and characterization of the *TCP* gene family in cucumber (*Cucumis sativus* L.) and their transcriptional responses to different treatments. Genes (Basel), 11 (11): 1379
- Xu Z, Cheng K, Li X, et al (2016). Transcriptional and post-transcriptional modulation of SQU and KEW activities in the control of dorsal-ventral asymmetric flower development in Lotus japonicus. Mol Plant, 9 (5): 722–736
- Yao X, Ma H, Wang J, et al (2007). Genome-wide comparative analysis and expression pattern of *TCP* gene families in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*. J Integr Plant Biol, 49: 885–897
- Yuan Z, Gao S, Xue DW, et al (2009). *RETARDED PALEA1* controls palea development and floral zygomorphy in rice. Plant Physiol, 149 (1): 235–244
- Zhang W, Kramer EM, Davis CC (2010). Floral symmetry genes and the origin and maintenance of zygomorphy in a plant-pollinator mutualism. Proc Natl Acad Sci USA, 107 (14): 6388–6393
- Zhong J, Preston JC, Hileman LC, et al (2017). Repeated and diverse losses of corolla bilateral symmetry in the Lamiaceae. Ann Bot, 119 (7): 1211–1223
- Zhou XR, Wang YZ, Smith JF, et al (2008). Altered expression patterns of TCP and MYB genes relating to the floral developmental transition from initial zygomorphy to actinomorphy in *Bournea* (Gesneriaceae). New Phytol, 178 (3): 532–543