

· 农业生物技术 ·

# 烟草 TCP 家族成员鉴定及表达分析

王世泽<sup>1,2</sup>, 李云<sup>1</sup>, 韩玉翠<sup>1</sup>, 余世洲<sup>2</sup>, 王爽<sup>1,2</sup>, 刘勇<sup>2,3</sup>, 林小虎<sup>1\*</sup>

1 河北科技师范学院农学与生物科技学院 河北省作物逆境生物学重点实验室, 河北 秦皇岛 066004

2 贵州省烟草科学研究所, 贵州 贵阳 550009

3 河南农业大学烟草学院, 河南 郑州 450002

王世泽, 李云, 韩玉翠, 余世洲, 王爽, 刘勇, 林小虎. 烟草 TCP 家族成员鉴定及表达分析[J]. 生物工程学报, 2024, 40(1): 226-238.

WANG Shize, LI Yun, HAN Yucui, YU Shizhou, WANG Shuang, LIU Yong, LIN Xiaohu. Identification and expression analysis of TCP family members in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(1): 226-238.

**摘要:** TCP 家族作为植物特有的转录因子, 在植物发育的不同方面发挥着重要作用。为筛选烟草中 TCP 家族成员, 本研究通过全基因组同源比对, 鉴定烟草与拟南芥 TCP 家族同源序列。利用生物信息学的方法分析其理化性质、系统进化关系、顺式作用元件等; 筛选 *AtTCP3/AtTCP4* 的同源基因, 并利用 RT-qPCR 检测在 20% PEG6000 处理下的基因表达量变化。结果表明烟草中含有 TCP 家族成员 63 个, 其氨基酸序列长度范围为 89–596 aa, 蛋白亲水性(grand average of hydropathicity, GRAVY)范围为-1.147–0.125, 等电点(isoelectric point, pI)范围为 4.42–9.94, 内含子个数为 0–3, 亚细胞定位均位于细胞核。保守结构域和系统进化关系分析结果表明, 烟草 TCP 家族可分为 PCF、CIN 和 CYC/TB1 这 3 个亚家族且每个亚家族具有稳定序列。基因启动子区顺式作用元件结果表明, TCP 家族基因含有低温顺式作用元件(LTR)及多种胁迫及代谢调控相关的元件(MYB、MYC)等顺式作用元件。基因表达模式分析表明, *AtTCP3/AtTCP4* 同源基因(*NtTCP6*、*NtTCP28*、*NtTCP30*、*NtTCP33*、*NtTCP42*、*NtTCP57* 和 *NtTCP63*) 在 20% PEG6000 处理下表达量显著上调表达/下调表达, 并发现 *NtTCP30* 和 *NtTCP57* 基因对干旱胁迫响应较为明显。研究结果剖析了烟草基因组中的 TCP 家族, 为烟草抗旱基因功能研究及品种培育提供了候选基因。

**关键词:** 烟草; TCP 家族; 干旱胁迫; 表达分析

资助项目: 中国烟草总公司重大科技项目[110202101032(JY-09)]; 中国烟草总公司贵州省公司科技项目(2023XM02); 贵州省烟草科学研究所科技项目(GZYKY2021-06)

This work was supported by the Major Science and Technology Program of China National Tobacco Corporation (110202101032(JY-09)), the Science and Technology Program of Guizhou Provincial Tobacco Company, China (2023XM02), and the Science and Technology Project of Guizhou Academy of Tobacco Science (GZYKY2021-06).

\*Corresponding author. E-mail: xiaohulin2008@hevtc.edu.cn

Received: 2023-05-06; Accepted: 2023-08-09; Published online: 2023-08-16

# Identification and expression analysis of TCP family members in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)

WANG Shize<sup>1,2</sup>, LI Yun<sup>1</sup>, HAN Yucui<sup>1</sup>, YU Shizhou<sup>2</sup>, WANG Shuang<sup>1,2</sup>, LIU Yong<sup>2,3</sup>, LIN Xiaohu<sup>1\*</sup>

1 Hebei Key Laboratory of Crop Stress Biology, College of Agronomy and Biotechnology, Hebei Normal University of Science and Technology, Qinhuangdao 066004, Hebei, China

2 Guizhou Academy of Tobacco Science, Guiyang 550009, Guizhou, China

3 College of Tobacco Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan, China

**Abstract:** TCP family as plant specific transcription factor, plays an important role in different aspects of plant development. In order to screen TCP family members in tobacco, the homologous sequences of tobacco and *Arabidopsis* TCP family were identified by genome-wide homologous alignment. The physicochemical properties, phylogenetic relationships and *cis*-acting elements were analyzed by bioinformatics. The homologous genes of *AtTCP3/AtTCP4* were screened, and RT-qPCR was used to detect the changes of gene expression upon 20% PEG6000 treatment. The results show that tobacco contains 63 TCP family members. Their amino acid sequence length ranged from 89 aa to 596 aa, and their protein hydrophobicity grand average of hydrophobicity (GRAVY) ranged from -1.147 to 0.125. The isoelectric point (pI) ranges from 4.42 to 9.94, the number of introns is 0 to 3, and the subcellular location is all located in the nucleus. The results of conserved domain and phylogenetic relationship analysis showed that the tobacco TCP family can be divided into PCF, CIN and CYC/TB1 subfamilies, and each subfamily has a stable sequence. The results of *cis*-acting elements in gene promoter region showed that TCP family genes contain low docile acting elements (LTR) and a variety of stress and metabolic regulation related elements (MYB, MYC). Analysis of gene expression patterns showed that *AtTCP3/AtTCP4* homologous genes (*NtTCP6*, *NtTCP28*, *NtTCP30*, *NtTCP33*, *NtTCP42*, *NtTCP57*, *NtTCP63*) accounted for 20% PEG6000 treatment significantly up-regulated/down-regulated expression, and *NtTCP30* and *NtTCP57* genes were selected as candidate genes in response to drought. The results of this study analyzed the TCP family in the tobacco genome and provided candidate genes for the study of drought-resistance gene function and variety breeding in tobacco.

**Keywords:** tobacco; TCP family; drought stress; expression analysis

TCP 家族作为植物特有的转录因子之一, 最开始是在 4 个蛋白中发现: 玉米中的 TB1 (TEOSINTE BRANCHED1)、金鱼草中的 CYC (CYCLOIDEA) 和 水稻 中的 PCF1,2 (PROLIFERATING CELL FACTORS 1,2), 因而被命名为 TCP<sup>[1]</sup>。TCP 家族具有一个非典型的基

本螺旋结构(basic helix-loop-helix, b HLH)和 R 结构域, 其结构功能域高度保守, 一般由 60 个氨基酸组成, 按照结构功能域的相似性, TCP 家族可分为 PCF、CYC/TB1 和 CIN 这 3 类亚家族, 其中 PCF 亚家族主要参与细胞增殖与生长发育过程, 并且受植物中氧化还原反应调控<sup>[2]</sup>;

CYC/TB1、CIN<sup>[3]</sup>亚家族与 PCF 亚家族成员相比, 蛋白序列成员多插入了 4 个氨基酸<sup>[4]</sup>, CYC/TB1 亚家族被认为通过控制花的对称性影响花序类型<sup>[5-6]</sup>并主要存在于高等植物中<sup>[7]</sup>。CIN 亚家族则被认为是双子叶植物分裂到扩增的关键调节器<sup>[8]</sup>。

目前已在多种作物上证明 TCP 家族成员的功能, 例如在拟南芥中异源表达月季 *RcTCP20* 基因, 会对叶片、花序、果实造成影响<sup>[9]</sup>, 且 CYC/TB1 型 TCP 转录因子也可以控制大麦小穗分生组织特性<sup>[10]</sup>。过表达毛竹 *PeTCP10* 基因可增强转基因植株在营养生长期的耐盐性, 提高萌发期和幼苗期的盐敏感性<sup>[11]</sup>, 在拟南芥中过表达玉米 *ZmTCP42* 基因也会导致种子萌发对脱落酸(abscisic acid, ABA)的超敏反应, 从而增强耐旱性<sup>[12]</sup>, 海岛棉花的 *GbTCP4* 基因也被作为提高植物干旱和耐盐性的候选基因<sup>[13]</sup>。由此可见 TCP 家族可在干旱胁迫下发挥作用, 且有研究指出 TCP 家族可用于开发耐旱作物的候选转录因子<sup>[14]</sup>。

干旱胁迫下, 根长是水分吸收的重要影响因素, 研究表明长根或密集根毛可以推迟干燥土壤的土壤限制<sup>[15]</sup>。在拟南芥 TCP 家族中, *miR319* 可下调 *TCP4* 基因在叶和根中表达显著, 且 *miR319-TCP4* 可能是黑麦草根系干旱损伤后的稳态因子<sup>[16]</sup>, 负调控根的生长<sup>[17]</sup>。已有研究证明在拟南芥中过表达 *AtTCP4* 基因株系会表现出较弱的抗旱性<sup>[18]</sup>。除此之外, *AtTCP3*、*AtTCP4* 基因可通过调节细胞分裂素控制新芽的生长<sup>[19]</sup>。针对 *AtTCP3*、*AtTCP4* 基因的上下游调控基因也有初步的研究, 例如 *AtTCP4* 基因可以结合 *LOX2* 功能基因启动子区域影响植物激素茉莉酸的生物合成, 调控植物的生长发育过程<sup>[20]</sup>, *miR319* 可介导 *AtTCP2*、*AtTCP3*、*AtTCP4* 和 *AtTCP10* 基因调控叶片发育、花瓣生长、细胞壁合成和茉莉

酸(jasmonic acid, JA)合成<sup>[21-22]</sup>。*AtTCP3*、*AtTCP4* 基因的功能较为丰富, 且对干旱胁迫具有响应。因此其同源序列可能会对干旱胁迫产生响应, 可初步作为筛选干旱基因的候选基因。

烟草作为重要的经济作物及模式植物, 其生长发育及胁迫应答机制研究尚不完善。本文通过对拟南芥 TCP 家族进行同源基因比对, 筛选烟草 TCP 家族并进行生物信息分析, 测定 *AtTCP3* 和 *AtTCP4* 同源基因干旱胁迫下的响应情况, 为 TCP 家族的研究提供参考依据, 并为植物生长发育及非生物胁迫研究提供理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 烟草 TCP 家族成员的鉴定

在拟南芥基因组数据库([www.arabidopsis.org/index.jsp](http://www.arabidopsis.org/index.jsp))中下载拟南芥的 TCP 家族序列, 利用 Perl 脚本及 Blastp 软件与烟草基因组数据库 Edwards 2017 ([solgenomics.net/](http://solgenomics.net/))进行比对筛选烟草 TCP 家族并提取开放阅读框(open reading frame, ORF)。从蛋白质家族数据库 Pfam (<http://pfam.xfam.org/>)下载 TCP 结构域的隐马可夫模型(PF03634), 通过 HMMER 软件<sup>[23]</sup>进行 TCP 基因初步蛋白序列比对, 最后合并两种方法的结果作为候选基因家族成员。利用 NCBI Conserved Domain Search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>)将得到的基因序列进行功能域预测。

### 1.2 烟草 TCP 家族的理化性质分析

利用在线 EXPASY (<http://web.expasy.org/>)网站预测蛋白质长度(amino acid, aa)、理论分子量(molecular weights, MW)、等电点(isoelectric point, PI)以及蛋白亲水性(grand average of hydropathicity, GRAVY)。使用在线 Plant-PLoc serve (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>)服务器预测亚细胞定位, 利用 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)网站进行跨膜结构域

的预测。

### 1.3 烟草 TCP 家族系统进化树构建

使用 MEGA 10 软件<sup>[24]</sup>对拟南芥及烟草的 TCP 家族的氨基酸序列进行同源序列比对, 并采用邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统进化树, bootstrap 重复值为 1 000, 其他参数为默认值。

### 1.4 烟草 TCP 家族 motif 分析及染色体定位

使用 MEME (meme-suite.org/meme/tools/meme) 在线预测网站分析拟南芥及 TCP 蛋白序列结构域, motif 值设置为 15, 保守基序设置为 6–100 个氨基酸; 在烟草基因组数据库下载基因组注释文件, 提取烟草 TCP 候选基因的基因结构及染色体位置信息, 利用 TBtools 软件对保守基序、基因结构及染色体位置进行可视化。

### 1.5 烟草 TCP 家族顺式作用元件预测

使用 TBtools 软件对烟草 TCP 候选基因家族编码序列(coding sequence, CDS)区域上游的 2 000 bp 的序列提取, 利用 PlantCare (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 网站对顺式作用元件进行预测。

### 1.6 实验材料及处理

试验材料: 烟草 K326 (贵州省烟草科学研究院提供)。

试验处理: 首先将 K326 种子进行催芽, 待 4 真叶期移栽到 Hoagland 营养液中进行水培,

待 7 真叶期时挑选长势一致的植株进行 20% PEG6000 模拟干旱处理, 分别在 0、1、3、6、12、24、36、48 h 取根部样品, 液氮速冻后放置 -80 °C 保存备用。

### 1.7 实时荧光定量 PCR

使用北京全式金生物 EasyPure<sup>®</sup> Plant RNA Kit 试剂盒提取植物根部 RNA, 并利用北京全式金生物 TransScript<sup>®</sup> One-Step RT-PCR SuperMix 试剂盒进行反转录。利用南京诺唯赞生物科技股份有限公司 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒进行扩增, 以烟草 *Actin* 基因作为内参基因, 设置 3 次生物学重复。本实验使用实时荧光定量 PCR (real time quantitative PCR, RT-qPCR) 引物见表 1。

## 2 结果与分析

### 2.1 烟草 TCP 家族筛选

如表 2 所示, 从 Blastp 和 HMMER 结果中共筛选得到 63 个 TCP 家族候选基因, 根据 TCP 家族成员在连锁群的顺序命名为 *NiTCP1–NiTCP63*。结果表明, 氨基酸长度及理化性质存在明显差异, 其中氨基酸长度为 89–596 aa, 细胞亲水性在 -1.147–0.125 之间, 等电点在 4.42–9.94 之间, 内含子个数在 0–3 之间。其中 *NiTCP40* 的基因序列中存在未知的氨基酸序列, 其分子量及等电点

表 1 本实验所用引物序列

Table 1 Primers used in this experiment

Gene	Gene ID	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>Actin</i>	Nitab4.5_0004607g0020.1	TGGTTAAGGCTGGATTGCT	TGCATCCTTTGACCCATAC
<i>qNiTCP6</i>	Nitab4.5_0000246g0120.1	GGTTTGATACCTCGGGTTGC	AGTCTTTGCACCCTCCCAAC
<i>qNiTCP28</i>	Nitab4.5_0002645g0010.1	CAAGTCGAAGGAGGGCGAAT	TCGAGGTATGATCTCTTGGACC
<i>qNiTCP30</i>	Nitab4.5_0003077g0060.1	GATTGCTATTGCCACGGCTG	TTGAAGTATAGTACCTTGGATTTCGT
<i>qNiTCP32</i>	Nitab4.5_0003202g0050.1	ACCCCACTTGGGTTTGACAG	GCTGCCCTGGTTGTGAATTG
<i>qNiTCP33</i>	Nitab4.5_0003291g0010.1	AAGCAAAGCTGTGGATTGGC	AGGATTTTCGAGGTATTTGAACCA
<i>qNiTCP42</i>	Nitab4.5_0005709g0020.1	GCACGAATCCAAGGAACAAGT	CTCGACGATGAACCATTGCC
<i>qNiTCP57</i>	Nitab4.5_0010770g0010.1	AGGGAACCCCTTCAGTCCAA	ACATATCTAATCGACCATGAATCCT
<i>qNiTCP63</i>	Nitab4.5_0014471g0010.1	GGAACCCAGAAATTGATGCAG	CGACTGTGTTTCTCCTCCAG

表 2 烟草 TCP 家族基本信息

Table 2 TCP genes identified in tobacco

Genes	Locus ID	ORF length	Introns	Putative protein				
				Length (aa)	MW (kDa)	PI	GRAVY	Domains
<i>NiTCP1</i>	Nitab4.5_0000069g0220.1	744	0	247	25 894.84	7.93	-0.442	TCP, TCPs, TCP2, TCP24
<i>NiTCP2</i>	Nitab4.5_0000101g0370.1	633	0	210	22 117.01	8.95	-0.284	TCP, TCPs, TCP2, TCP24
<i>NiTCP3</i>	Nitab4.5_0000206g0010.1	1 329	0	442	48 501.86	8.55	-0.907	TCP2, TCPs, TCP, TCP24
<i>NiTCP4</i>	Nitab4.5_0000208g0150.1	1 586	3	296	34 453.79	9.37	-1.008	TCP, TCPs, TCP2, TCP24
<i>NiTCP5</i>	Nitab4.5_0000221g0100.1	923	1	291	33 591.37	9.37	-1.147	TCP, TCPs, TCP2, TCP24
<i>NiTCP6</i>	Nitab4.5_0000246g0120.1	1 272	0	423	46 666.03	6.43	-0.819	TCP, TCPs, TCP2, TCP24
<i>NiTCP7</i>	Nitab4.5_0000269g0060.1	1 520	1	367	39 853.82	7.37	-0.715	TCP, TCPs
<i>NiTCP8</i>	Nitab4.5_0000303g0270.1	981	0	326	34 960.47	6.87	-0.784	TCP, TCPs, TCP24, TCP2
<i>NiTCP9</i>	Nitab4.5_0000365g0240.1	1 670	1	412	44 289.96	8.99	-0.746	TCP, TCPs, TCP24, TCP2
<i>NiTCP10</i>	Nitab4.5_0000376g0110.1	1 101	0	366	41 248.74	5.47	-0.730	TCP, TCPs, TCP2, TCP24
<i>NiTCP11</i>	Nitab4.5_0000410g0060.1	1 384	1	345	39 155.55	8.46	-0.871	TCP, TCPs, TCP2, TCP24
<i>NiTCP12</i>	Nitab4.5_0000519g0050.1	1 137	1	222	24 004.21	9.82	-0.486	TCP, TCPs, TCP2, TCP24
<i>NiTCP13</i>	Nitab4.5_0000703g0090.1	1 041	0	346	37 508.40	8.33	-0.771	TCP, TCPs, TCP2
<i>NiTCP14</i>	Nitab4.5_0000832g0020.1	1 074	0	357	38 007.51	5.53	-0.448	TCP, TCPs, TCP24, TCP2
<i>NiTCP15</i>	Nitab4.5_0000948g0150.1	2 784	1	556	59 692.86	7.19	-0.758	TCP, TCPs, TCP24, TCP2
<i>NiTCP16</i>	Nitab4.5_0001082g0060.1	1 705	1	302	32 469.07	8.65	-0.669	TCP, TCPs, TCP24
<i>NiTCP17</i>	Nitab4.5_0001089g0050.1	786	0	261	27 524.97	9.90	-0.391	TCP, TCPs, TCP2, TCP24
<i>NiTCP18</i>	Nitab4.5_0001188g0020.1	1 605	1	399	43 838.03	6.89	-0.823	TCP, TCPs
<i>NiTCP19</i>	Nitab4.5_0001328g0060.1	1 002	0	333	36 834.87	8.80	-0.705	TCP, TCPs, TCP2, TCP24
<i>NiTCP20</i>	Nitab4.5_0001432g0020.1	1 117	1	229	25 932.05	5.23	-0.618	TCP, TCPs, TCP2, TCP24
<i>NiTCP21</i>	Nitab4.5_0001485g0060.1	984	0	327	36 470.55	7.88	-0.685	TCP, TCPs, TCP2, TCP24
<i>NiTCP22</i>	Nitab4.5_0001594g0010.1	1 510	1	420	46 362.15	5.98	-0.760	TCP2, TCPs, TCP, TCP24
<i>NiTCP23</i>	Nitab4.5_0001599g0190.1	1 458	1	316	35 460.90	8.80	-0.696	TCP, TCPs, TCP2, TCP24
<i>NiTCP24</i>	Nitab4.5_0001645g0060.1	1 101	0	366	41 395.79	5.41	-0.729	TCP, TCPs, TCP2, TCP24
<i>NiTCP25</i>	Nitab4.5_0001721g0060.1	19 770	1	101	10 984.18	6.07	-0.603	TCP2, TCPs, TCP24, TCP
<i>NiTCP26</i>	Nitab4.5_0002108g0090.1	843	1	246	27 543.15	9.67	-0.661	TCP, TCPs, TCP2, TCP24
<i>NiTCP27</i>	Nitab4.5_0002257g0150.1	1 159	1	294	32 330.92	8.71	-0.707	TCP, TCPs, TCP2
<i>NiTCP28</i>	Nitab4.5_0002645g0010.1	1 185	1	183	20 594.71	6.24	-0.795	TCP, TCPs, TCP2
<i>NiTCP29</i>	Nitab4.5_0002963g0020.1	633	0	210	22 362.35	9.51	-0.300	TCP, TCPs, TCP2, TCP24
<i>NiTCP30</i>	Nitab4.5_0003077g0060.1	2 171	2	596	66 701.56	6.14	-0.808	TCP, TCPs, TCP2, TCP24
<i>NiTCP31</i>	Nitab4.5_0003161g0070.1	2 488	2	318	36 366.35	9.91	-0.808	TCP, TCPs, TCP2, TCP24
<i>NiTCP32</i>	Nitab4.5_0003202g0050.1	1 263	0	420	46 356.81	6.57	-0.793	TCP, TCPs, TCP2, TCP24
<i>NiTCP33</i>	Nitab4.5_0003291g0010.1	1 210	2	262	29 581.09	8.95	-0.656	TCP, TCPs, TCP2, TCP24
<i>NiTCP34</i>	Nitab4.5_0003376g0090.1	903	0	300	32 098.86	8.45	-0.525	TCP, TCPs, TCP24, TCP2
<i>NiTCP35</i>	Nitab4.5_0003519g0080.1	6 842	1	193	21 658.17	8.69	-0.795	TCP2, TCPs, TCP, TCP24
<i>NiTCP36</i>	Nitab4.5_0004103g0020.1	1 337	1	362	38 597.00	6.02	-0.665	TCP, TCPs
<i>NiTCP37</i>	Nitab4.5_0004301g0070.1	903	0	300	31 547.45	8.65	-0.324	TCP, TCPs, TCP2, TCP24
<i>NiTCP38</i>	Nitab4.5_0004487g0030.1	1 180	1	262	29 767.49	9.94	-0.860	TCP, TCPs, TCP24, TCP2

(待续)

(续表 2)

Genes	Locus ID	ORF length	Introns	Putative protein				
				Length (aa)	MW (kDa)	PI	GRAVY	Domains
<i>NiTCP39</i>	Nitab4.5_0004548g0010.1	1 323	0	440	48 080.36	7.74	-0.883	TCP2, TCPs, TCP, TCP24
<i>NiTCP40</i>	Nitab4.5_0004980g0010.1	1 161	0	386	null	null	-1.078	TCP, TCPs, TCP24, TCP2
<i>NiTCP41</i>	Nitab4.5_0005379g0040.1	1 080	0	359	38 205.63	5.43	-0.444	TCP, TCPs, TCP2
<i>NiTCP42</i>	Nitab4.5_0005709g0020.1	4 452	2	589	65 993.79	6.65	-0.817	TCP, TCPs, TCP2, TCP24
<i>NiTCP43</i>	Nitab4.5_0005803g0030.1	2 790	2	315	36 380.77	9.12	-1.027	TCP, TCPs, TCP24, TCP2
<i>NiTCP44</i>	Nitab4.5_0005897g0010.1	1 122	0	373	43 059.16	5.93	-1.007	TCP, TCPs, TCP2, TCP24
<i>NiTCP45</i>	Nitab4.5_0005910g0040.1	1 118	1	278	30 998.47	6.67	-0.675	TCP, TCPs, TCP2, TCP24
<i>NiTCP46</i>	Nitab4.5_0006712g0010.1	1 275	0	424	46 478.72	5.70	-0.821	TCP2, TCPs, TCP, TCP24
<i>NiTCP47</i>	Nitab4.5_0007019g0020.1	915	0	304	33 983.72	9.34	-0.763	TCP, TCPs, TCP2, TCP24
<i>NiTCP48</i>	Nitab4.5_0007105g0010.1	993	0	330	37 086.46	8.38	-0.810	TCP, TCPs, TCP2, TCP24
<i>NiTCP49</i>	Nitab4.5_0007160g0050.1	981	0	326	36 351.27	6.80	-0.730	TCP, TCPs, TCP2, TCP24
<i>NiTCP50</i>	Nitab4.5_0007375g0060.1	888	0	295	32 097.59	7.14	-0.744	TCP, TCPs, TCP2, TCP24
<i>NiTCP51</i>	Nitab4.5_0007913g0020.1	2 788	1	544	58 332.36	7.00	-0.761	TCP, TCPs, TCP24
<i>NiTCP52</i>	Nitab4.5_0008460g0020.1	287	1	89	9 677.11	4.42	0.125	TCP2, TCPs, TCP, TCP24
<i>NiTCP53</i>	Nitab4.5_0009198g0010.1	1 260	0	419	44 840.40	8.04	-0.804	TCP, TCPs, TCP24
<i>NiTCP54</i>	Nitab4.5_0010535g0030.1	1 670	1	274	30 436.80	7.96	-0.712	TCP, TCPs, TCP2, TCP24
<i>NiTCP55</i>	Nitab4.5_0010549g0020.1	1 068	0	355	40 833.80	6.36	-0.908	TCP, TCPs, TCP2, TCP24
<i>NiTCP56</i>	Nitab4.5_0010674g0010.1	3 145	1	322	35 945.67	9.63	-0.556	TCP, TCPs, TCP2, TCP24
<i>NiTCP57</i>	Nitab4.5_0010770g0010.1	1 689	2	326	37 075.10	6.68	-0.865	TCP, TCPs, TCP2, TCP24
<i>NiTCP58</i>	Nitab4.5_0010972g0020.1	1 065	1	202	21 856.01	8.46	-0.923	TCP, TCPs, TCP2, TCP24
<i>NiTCP59</i>	Nitab4.5_0011381g0030.1	873	0	290	31 278.79	8.91	-0.598	TCP, TCPs, TCP24, TCP2
<i>NiTCP60</i>	Nitab4.5_0011777g0010.1	786	0	261	27 538.91	9.71	-0.432	TCP, TCPs, TCP2, TCP24
<i>NiTCP61</i>	Nitab4.5_0011812g0020.1	1 218	2	224	25 740.21	9.75	-1.032	TCP, TCPs, TCP2, TCP24
<i>NiTCP62</i>	Nitab4.5_0011935g0010.1	1 902	3	306	35 162.39	9.17	-0.931	TCP, TCPs, TCP2, TCP24
<i>NiTCP63</i>	Nitab4.5_0014471g0010.1	942	0	313	35 705.17	6.57	-1.010	TCP, TCPs, TCP2, TCP24

无法进行预测。结构域预测结果表明烟草 TCP 家族成员有 TCP、TCPs、TCP2 和 TCP24 这 4 个功能域，亚细胞定位结果均在细胞核内且仅有 *NiTCP52* 基因具有跨膜结构。

## 2.2 烟草 TCP 家族进化树分析

为了进一步分析烟草 TCP 家族成员的关系，利用 MEGA 10 软件对拟南芥的 24 个 TCP 家族成员及烟草中的 63 个成员进行系统进化树分析。如图 1 所示，烟草 TCP 家族成员的分类参考拟南芥 TCP 家族分类，分为 3 个亚家族，

其中 PCF 亚家族中含有 24 个烟草基因、13 个拟南芥基因，CYC 亚家族中含有 14 个烟草基因、2 个拟南芥基因，CIN 亚家族中含有 25 个烟草基因、8 个拟南芥基因。亲缘关系较近的基因可能会有相似的功能，在烟草中与 *AtTCP3*、*AtTCP4* 基因亲缘关系较近有 8 个基因，分别为：*NiTCP6*、*NiTCP28*、*NiTCP30*、*NiTCP32*、*NiTCP33*、*NiTCP42*、*NiTCP57* 和 *NiTCP63*，且 8 个基因与 *AtTCP3*、*AtTCP4* 基因在系统发生树在同一个分支上，以供后续研究。

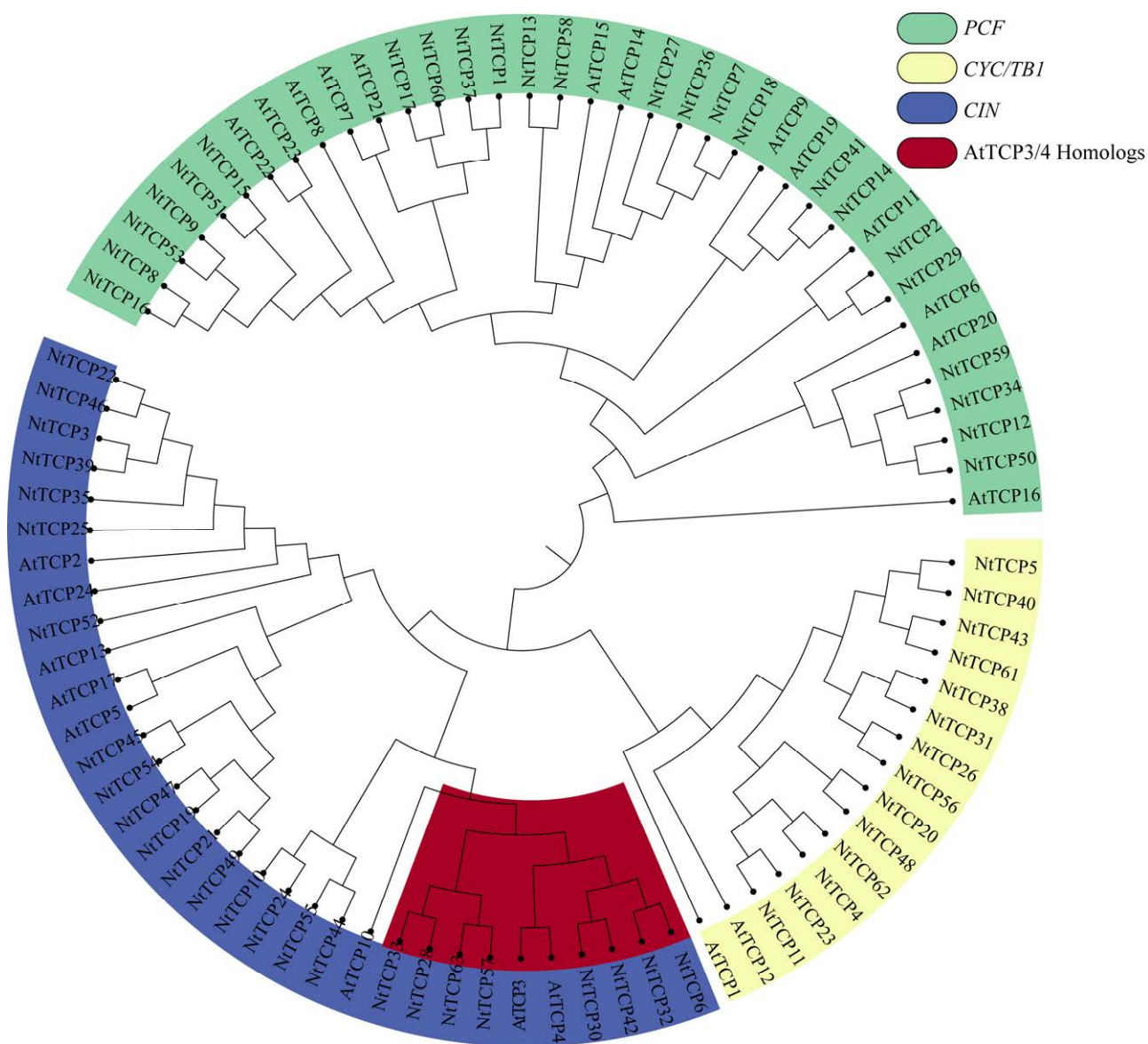


图1 烟草及拟南芥中 TCP 家族系统发生树

Figure 1 Phylogenetic tree of TCP gene family in tobacco and *Arabidopsis thaliana*.

### 2.3 烟草 TCP 家族的染色体分布

烟草 TCP 家族成员的注释文件中仅有 28 个基因有染色体位置信息,分散在 14 条染色体上,其中 4 号染色体上的基因数量较多含有 4 个基因,9、11、15、18、21、24 号染色体仅含有 1 个基因(图 2)。

### 2.4 烟草 TCP 家族的结构域及保守基序预测

利用在线 MEME 程序对 TCP 家族蛋白序列

进行分析,发现 TCP 家族成员由多种 motif 组成,见图 3A。其中 63 个基因家族成员均含有 motif 1 基序,说明 motif 1 基序具有较强的保守性,为 TCP 家族共有的蛋白质结构域。此外,每个 TCP 基因之间所含的结构域的种类及数目差异较大。烟草 TCP 家族含有 1-7 个保守基序,其中 *NiTCP25* 仅含有 motif 1 基序。基因结构分析结果表明,发现 63 个基因之间的排列存在显著差

异, 内含子数量在 0-3 之间, 外显子数量在 1-4 之间, 大部分基因的结构较为简单仅有一个外显子, 但 *NtTCP25* 的结构较为特殊, 其内含子长度较长, 见图 3B。亲缘关系较近的基因有着相似的结构域, 例如 PCF 亚家族多为 motif 2+motif 1+motif 3 组合, CIN 亚家族为 motif 2+motif 1+motif 5 组合, CYC 亚家族为 motif 2+motif 1+motif 4 结构组合, 表明在演化过程中, 不同亚家族之间保守基序存在分化情况, 不同保守基序的组合可能影响 TCP 亚家族成员的功能。拟南芥 *AtTCP3*、*AtTCP4* 基因及烟草候选 8 个基因均含有 motif 13, 其存在的功能可能与此结构域有关。保守基序分析可知, motif 1 和 motif 2 在 TCP 家族中保守, motif 3 在 PCF 亚家族保守, motif 4 在 CYC 亚家族保守, motif 5 在

CIN 亚家族中保守, motif 13 在 *AtTCP3*、*AtTCP4* 分支上保守, 基序信息见图 3C。

## 2.5 顺式作用元件预测

对 63 个烟草 TCP 家族的启动子进行预测发现启动子区域含有较多的非生物胁迫响应元件, 在启动子预测分析中, 低温响应元件(LTR)、多种胁迫及代谢调控相关的元件(MYB、MYC)、应激反应元件(STRE)和 ABA 响应元件(ABRE)广泛分布在各个基因中, 此外, 响应干旱诱导信号传导及下游基因表达的 MBS、G-box、DRE 和 W-box 元件<sup>[25]</sup>也分布其中。如图 4 所示, 烟草 TCP 家族 *AtTCP3*、*AtTCP4* 同源基因中有 4 个基因含有脱水响应元件 DRE, 分别在 *NtTCP63*、*NtTCP57* 基因上游 500 bp 左右的位置, 以及 *NtTCP30*、*NtTCP28* 基因上游 1 700 bp 左右的位置。

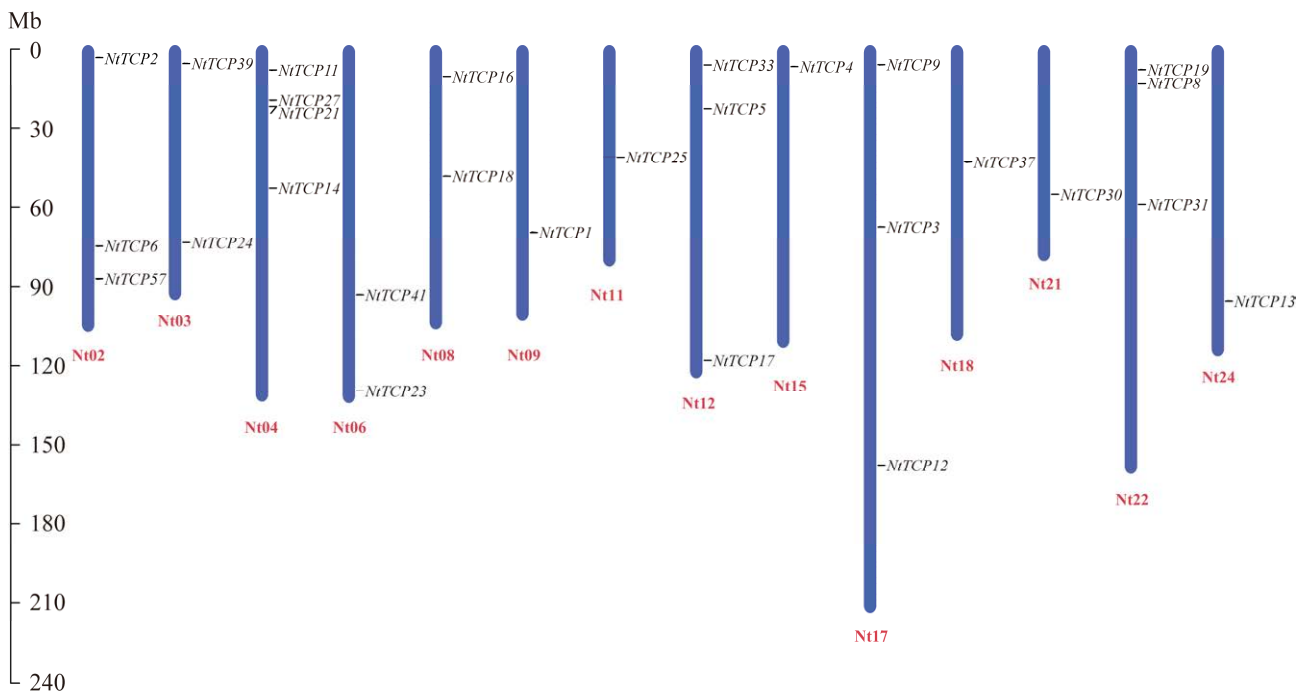


图 2 烟草 TCP 家族染色体分布图

Figure 2 Chromosome distribution map of TCP family in tobacco.



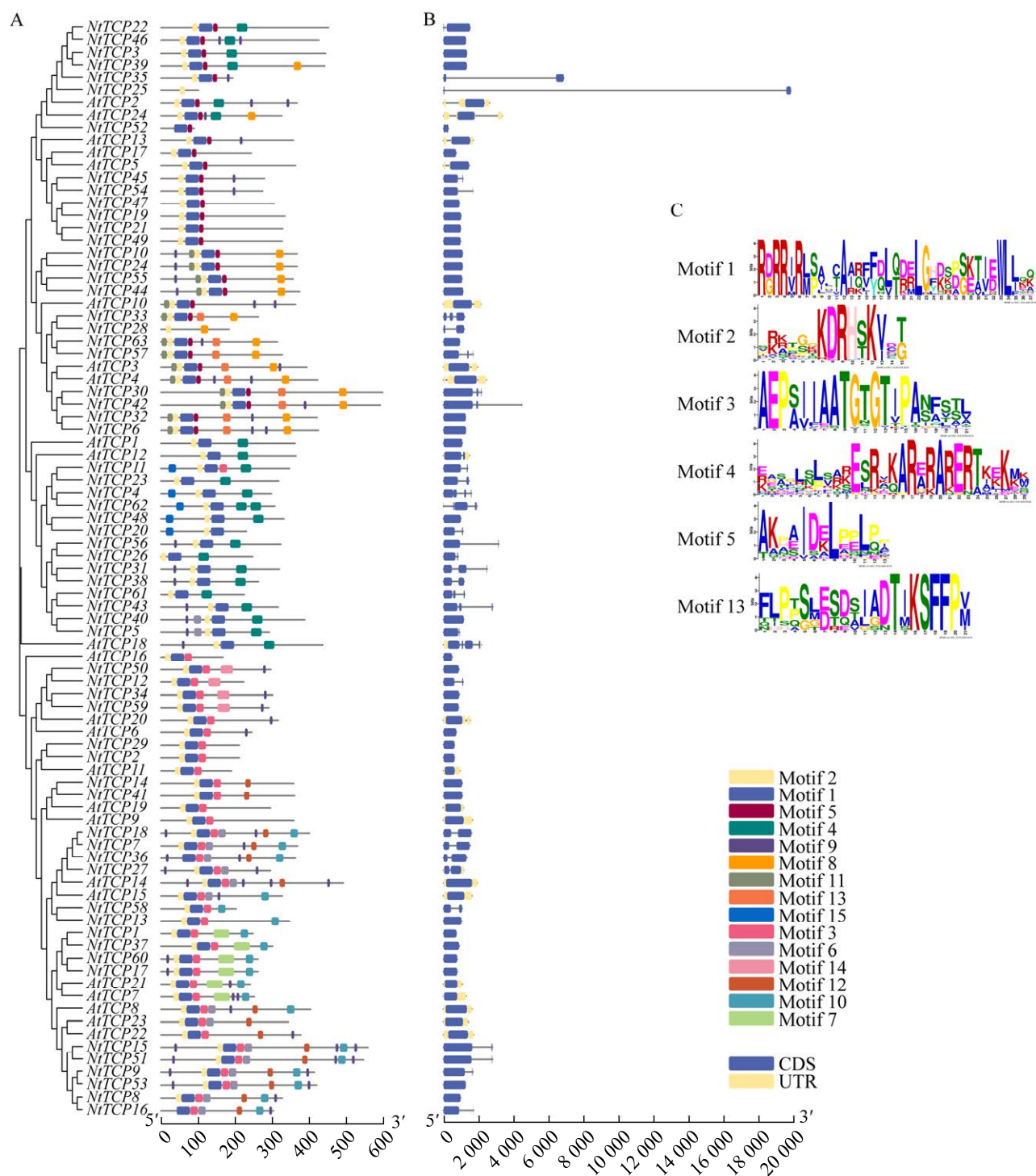


图3 烟草 TCP 家族结构信息 A: 烟草与拟南芥 TCP 家族保守基序. B: 烟草与拟南芥 TCP 家族基因结构图. C: 部分 motif 基序序列

Figure 3 TCP family structure information in tobacco. A: Conservative motif of the TCP family of tobacco and *Arabidopsis thaliana*. B: TCP family gene structure map of tobacco and *Arabidopsis thaliana*. C: Partial motif sequence.

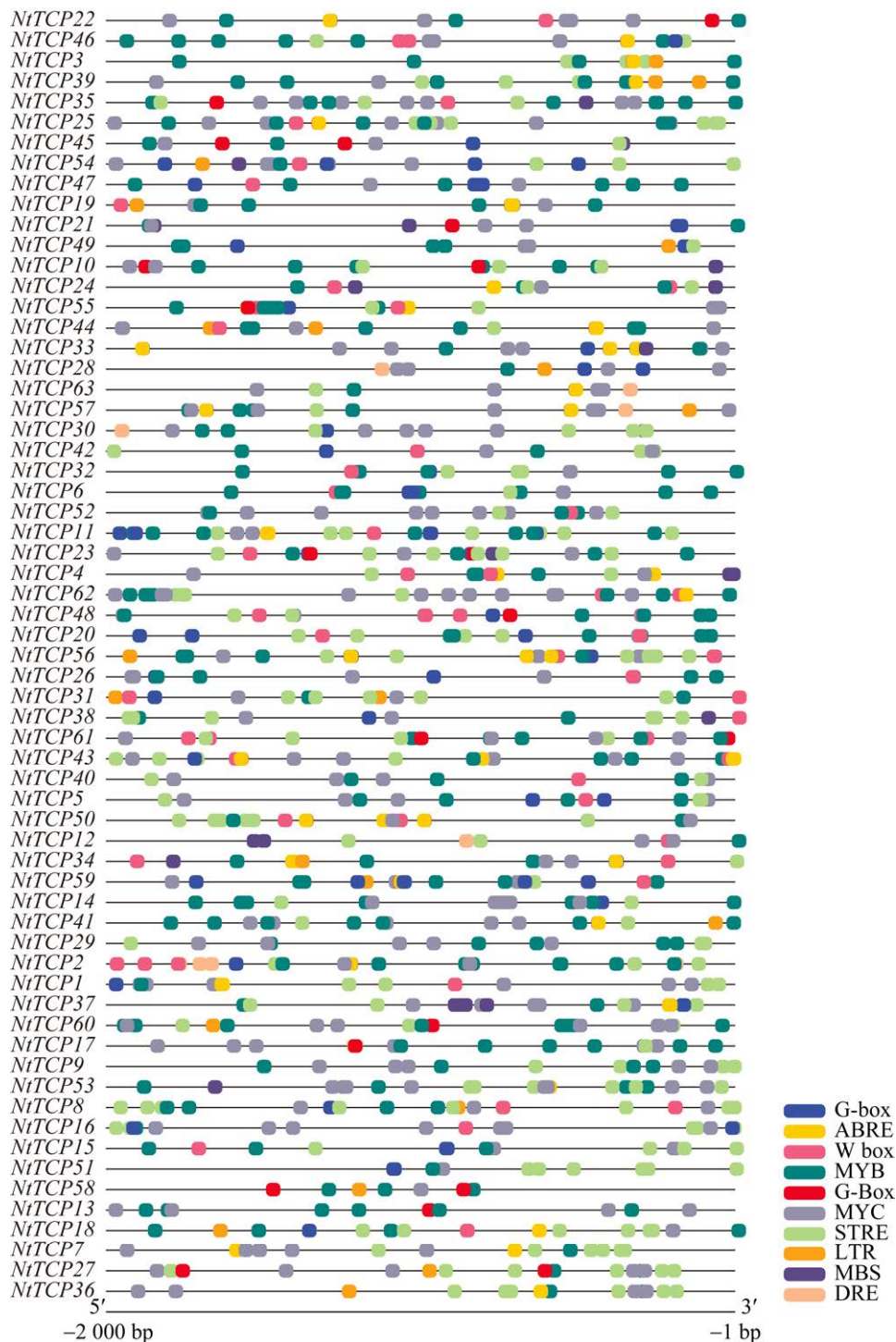


图 4 烟草 TCP 家族顺式作用元件分布图

Figure 4 Map of *cis*-acting elements in tobacco TCP gene family.

### 2.6 基因的表达量分析

如图 5 所示，在 20% PEG6000 模拟干旱胁迫处理下，8 个烟草干旱响应候选基因的相对表

达量表现出差异。其中 *NiTCP28*、*NiTCP33*、*NiTCP63* 基因表达量为先增加后减少的趋势，且 *NiTCP28* 及 *NiTCP33* 在干旱胁迫下 24 h 表达量

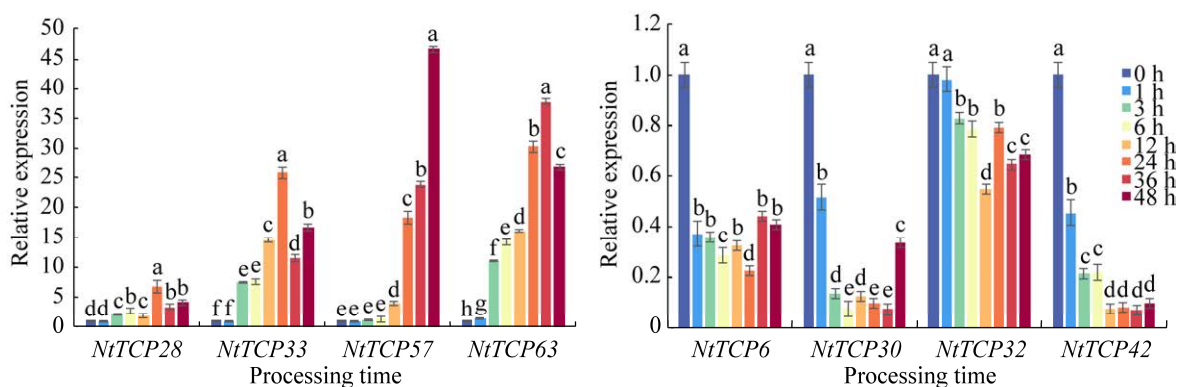


图5 基因相对表达量 不同小写字母表示含量或活性差异显著( $P < 0.05$ )

Figure 5 Relative gene expression. Different lowercase letters indicate significant difference in content or activity ( $P < 0.05$ ).

达到最高值, *NiTCP63* 在 36 h 表达量达到最高。而 *NiTCP57* 基因的表达量随时间变化呈上升趋势, 在 48 h 表达量达到最高。*NiTCP6*、*NiTCP30* 和 *NiTCP42* 基因表达量随处理时间的增加呈下降趋势。*NiTCP32* 基因表达量变化不显著。

### 3 讨论与结论

TCP 家族除在玉米、金鱼草和水稻中发现外, 多种植物也发现了同源基因, 目前在小麦中筛选出 66 个 TCP 基因<sup>[26]</sup>, 玉米中 29 个<sup>[27]</sup>, 拟南芥中 24 个<sup>[28]</sup>, 但烟草的 TCP 家族仅有个别基因克隆及功能分析<sup>[29]</sup>。本文针对烟草 TCP 家族进行了初步筛选, 利用模式植物拟南芥与烟草 TCP 家族构建系统进化树, 并将烟草 TCP 家族分为 3 个亚家族, 有研究表明不同亚家族成员的功能存在差异, 且同源基因可能会存在相似功能。烟草 TCP 家族成员含有多种顺式作用元件, 说明其会对不同的环境作出响应。目前 TCP 家族的研究大部分都基于拟南芥 *AtTCP3*、*AtTCP4* 基因, 其中 *AtTCP4* 基因可以抑制叶绿素的合成阻止拟南芥花瓣变绿<sup>[30]</sup>、参与叶片发育<sup>[31]</sup>及光反应等。通过系统进化树及保守结构域分析得到 8 个与 *AtTCP3*、*AtTCP4* 基因同源性较高的烟草

基因, RT-qPCR 结果显示, 在干旱胁迫下候选基因表达量存在显著差异, 其中有 4 个基因出现上调, 3 个基因出现下调, 1 个基因变化不明显。其中含有干旱响应元件的 *NiTCP63*、*NiTCP57* 和 *NiTCP28* 表现出上升趋势, *NiTCP30* 表现出下降趋势。有研究表明拟南芥 *AtTCP4* 转录因子也参与干旱胁迫调控, 但不依赖 ABA 途径, 而是通过调控主根伸长生长促使根系更好地吸收水分, 使植物适应外界的干旱胁迫<sup>[18]</sup>。且 *miR319* 调控 *AtTCP4* 基因且 *AtTCP4* 基因负调控根的生长<sup>[17]</sup>, 因此推测 TCP 基因家族成员可能对干旱胁迫为负调控, 但也不排除正向调控。由于筛选得到的候选基因可能对干旱胁迫的响应方式不同, 还需进一步证明是否参与干旱胁迫应答。除此之外, *AtTCP4* 同源基因也会响应生物胁迫, 并已在番茄中提出 *miR319/TCP4* 介导的根结线虫抗性的预测模型<sup>[32]</sup>。发现的 7 个烟草 TCP 候选基因也可能对生物胁迫作出响应, 后续可进行下一步的研究。

本研究利用拟南芥 TCP 家族进行全基因组同源比对筛选得到 63 个烟草 TCP 家族成员。将 63 个基因分为了 3 个亚家族, 不同亚家族的结构及保守基序差别较大, 分散在 14 条染色体上

且含有不同功能的顺式响应元件, 并且发现了 7 个响应干旱胁迫的烟草 TCP 基因。本研究结果为烟草 TCP 家族分析提供了参考依据, 为 TCP 家族功能研究开拓了新思路。

## REFERENCES

- [1] CUBAS P, LAUTER N, DOEBLEY J, COEN E. The TCP domain: a motif found in proteins regulating plant growth and development[J]. *The Plant Journal*, 1999, 18(2): 215-222.
- [2] VIOLA IL, GÜTTLEIN LN, GONZALEZ DH. Redox modulation of plant developmental regulators from the class I TCP transcription factor family[J]. *Plant Physiology*, 2013, 162(3): 1434-1447.
- [3] ZHOU HY, HWARARI D, MA HY, XU HB, YANG LM, LUO YM. Genomic survey of TCP transcription factors in plants: phylogenomics, evolution and their biology[J]. *Frontiers in Genetics*, 2022, 13: 1060546.
- [4] VIOLA IL, REINHEIMER R, RIPOLL R, MANASSERO NGU, GONZALEZ DH. Determinants of the DNA binding specificity of class I and class II TCP transcription factors[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(1): 347-356.
- [5] BELLO MA, CUBAS P, ÁLVAREZ I, SANJUANBENITO G, FUERTES-AGUILAR J. Evolution and expression patterns of CYC/TB1 genes in *Anacyclus*: phylogenetic insights for floral symmetry genes in *Asteraceae*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 589.
- [6] LEVIN KA, BODEN SA. A new branch of understanding for barley inflorescence development[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2020, 71(22): 6869-6871.
- [7] QIN LY, HU YH, WANG JP, WANG XL, ZHAO R, SHAN HY, LI KP, XU P, WU HY, YAN XQ, LIU LM, YI X, WANKE S, BOWERS JE, LEEBENS-MACK JH, DEPAMPHILIS CW, SOLTIS PS, SOLTIS DE, KONG HZ, JIAO YN. Insights into angiosperm evolution, floral development and chemical biosynthesis from the *Aristolochia fimbriata* genome[J]. *Nature Plants*, 2021, 7(9): 1239-1253.
- [8] SARVEPALLI K, NATH U. CIN-TCP transcription factors: transiting cell proliferation in plants[J]. *IUBMB Life*, 2018, 70(8): 718-731.
- [9] 王榕, 牛晓茹, 陈己任. 月季 *RcTCP20* 基因的克隆及在拟南芥中的功能分析[J]. *植物生理学报*, 2022, 58(10): 1907-1918.
- WANG R, NIU XR, CHEN JR. Cloning of *RcTCP20* of rose and function analysis in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Physiology Journal*, 2022, 58(10): 1907-1918 (in Chinese).
- [10] SHANG Y, YUAN L, DI ZC, JIA Y, ZHANG ZL, LI SJ, XING LP, QI ZJ, WANG XY, ZHU JH, HUA W, WU XJ, ZHU MQ, LI G, LI CD. A CYC/TB1-type TCP transcription factor controls spikelet meristem identity in barley[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2020, 71(22): 7118-7131.
- [11] XU YZ, LIU HL, GAO YM, XIONG R, WU M, ZHANG KM, XIANG Y. The TCP transcription factor PeTCP10 modulates salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell Reports*, 2021, 40(10): 1971-1987.
- [12] DING SC, CAI ZZ, DU HW, WANG HW. Genome-wide analysis of TCP family genes in *Zea mays* L. identified a role for *ZmTCP42* in drought tolerance[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(11): 2762.
- [13] WANG Y, YU YH, WAN HN, TANG J, NI ZY. The sea-island cotton GbTCP4 transcription factor positively regulates drought and salt stress responses[J]. *Plant Science*, 2022, 322: 111329.
- [14] MANNA M, THAKUR T, CHIROM O, MANDLIK R, DESHMUKH R, SALVI P. Transcription factors as key molecular target to strengthen the drought stress tolerance in plants[J]. *Physiologia Plantarum*, 2021, 172(2): 847-868.
- [15] CAI GC, AHMED MA, ABDALLA M, CARMINATI A. Root hydraulic phenotypes impacting water uptake in drying soils[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2022, 45(3): 650-663.
- [16] GUO MW, LI HY, ZHU L, WU ZN, LI J, LI ZY. Genome-wide identification of microRNAs associated with osmotic stress and elucidation of the role of miR319 in *Medicago ruthenica* seedlings[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2021, 168: 53-61.
- [17] KOYAMA T, FURUTANI M, TASAKA M, OHME-TAKAGI M. TCP transcription factors control the morphology of shoot lateral organs via negative regulation of the expression of boundary-specific genes in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2007, 19(2): 473-484.
- [18] 雷其冬. 拟南芥 miR319-TCP4 调控植物应答干旱胁迫的分子机制研究[D]. 昆明: 昆明理工大学硕士学位论文, 2021.
- LEI QD. The molecular mechanism of miR319-TCP4

- regulating plant drought response in *Arabidopsis thaliana*[D]. Kunming Master's Thesis of Kunming University of Science and Technology, 2021 (in Chinese).
- [19] YANG W, CHOI MH, NOH B, NOH YS. *De novo* shoot regeneration controlled by HEN1 and *TCP3/4* in *Arabidopsis*[J]. *Plant & Cell Physiology*, 2020, 61(9): 1600-1613.
- [20] 雷其冬, 孙旭东, 徐慧妮. 拟南芥 *AtTCP4* 基因克隆及原核表达[J]. 华北农学报, 2021, 36(5): 24-28.  
LEI QD, SUN XD, XU HN. Cloning and prokaryotic expression of *Arabidopsis AtTCP4* gene[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2021, 36(5): 24-28 (in Chinese).
- [21] BRESSO EG, CHOROSTECKI U, RODRIGUEZ RE, PALATNIK JF, SCHOMMER C. Spatial control of gene expression by miR319-regulated TCP transcription factors in leaf development[J]. *Plant Physiology*, 2018, 176(2): 1694-1708.
- [22] 雷其冬, 孙旭东, 徐慧妮. 转录因子 *TCP4* 参与植物生长发育和抗逆调节研究进展[J]. 华北农学报, 2021, 36(S01): 210-214.  
LEI QD, SUN XD, XU HN. Research progress in transcription factor *TCP4* participating in plant growth, development and stress resistance regulation[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2021, 36(S01): 210-214 (in Chinese).
- [23] PRAKASH A, JEFFRYES M, BATEMAN A, FINN RD. The HMMER web server for protein sequence similarity search[J]. *Current Protocols in Bioinformatics*, 2017, 60: 3.15.1-3.15.3.15.23.
- [24] KUMAR S, STECHER G, LI M, KNYAZ C, TAMURA K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [25] NAKASHIMA K, JAN A, TODAKA D, MARUYAMA K, GOTO S, SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Comparative functional analysis of six drought-responsive promoters in transgenic rice[J]. *Planta*, 2014, 239(1): 47-60.
- [26] ZHAO JM, ZHAI ZW, LI YN, GENG SF, SONG GY, GUAN JT, JIA ML, WANG F, SUN GL, FENG N, KONG XC, CHEN L, MAO L, LI AL. Genome-wide identification and expression profiling of the TCP family genes in spike and grain development of wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 1282.
- [27] CHAI WB, JIANG PF, HUANG GY, JIANG HY, LI XY. Identification and expression profiling analysis of TCP family genes involved in growth and development in maize[J]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2017, 23(4): 779-791.
- [28] LI ST. The *Arabidopsis thaliana* TCP transcription factors: a broadening horizon beyond development[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2015, 10(7): e1044192.
- [29] 肖玉洁. 烟草响应低温胁迫的生化与分子基础及 TCP 基因编辑突变的初步研究[D]. 长沙: 湖南农业大学硕士学位论文, 2018.  
XIAO YJ. Studies on physiological and molecular bases of cold response and preliminary research on editing mutation of TCP gene[D]. Changsha: Master's Thesis of Hunan Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [30] ZHENG XH, LAN JQ, YU H, ZHANG JZ, ZHANG Y, QIN YM, SU XD, QIN GJ. *Arabidopsis* transcription factor *TCP4* represses chlorophyll biosynthesis to prevent petal greening[J]. *Plant Communications*, 2022, 3(4): 100309.
- [31] SAINI K, DWIVEDI A, RANJAN A. High temperature restricts cell division and leaf size by coordination of *PIF4* and *TCP4* transcription factors[J]. *Plant Physiology*, 2022, 190(4): 2380-2397.
- [32] ZHAO WC, LI ZL, FAN JW, HU CL, YANG R, QI X, CHEN H, ZHAO FK, WANG SH. Identification of jasmonic acid-associated microRNAs and characterization of the regulatory roles of the miR319/TCP4 module under root-knot nematode stress in tomato[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(15): 4653-4667.

(本文责编 陈宏宇)