

安子贤, 李宜轩, 郑友峰, 等. 基于苋菜转录组的 *TCP* 基因家族成员鉴定及表达分析 [J]. 福建农业学报, 2022, 37 (7): 869–879.
AN Z X, LI Y X, ZHENG Y F, et al. Transcriptome-based Identification and Expressions of Amaranth *TCP* Gene Family [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2022, 37 (7): 869–879.

基于苋菜转录组的 *TCP* 基因家族成员鉴定及表达分析

安子贤¹, 李宜轩¹, 郑友峰¹, 肖 昉¹, 王 乐¹,
陈 何¹, 赖钟雄¹, 牟建梅², 刘生财^{1*}

(1. 福建农林大学园艺植物生物工程研究所, 福建 福州 350002; 2. 苏州市农业科学院, 江苏 苏州 215000)

摘 要:【目的】基于大红苋菜转录组数据库, 对苋菜 *TCP* 基因家族成员进行筛选鉴定, 为深入探讨苋菜 *TCP* 基因家族对苋菜生长发育及非生物胁迫响应提供参考。【方法】在转录组数据库中, 筛选鉴定 *TCP* 基因家族成员, 并对其进行生物信息学分析; 在不同条件处理下培养苋菜幼苗, 并利用 qRT-PCR 技术分析其不同处理下的表达模式。【结果】苋菜 *TCP* 基因家族有 14 个成员, 全部定位于细胞核; *AtrTCP* 蛋白质长度在 230~721 aa 区间内, 预测相对分子量为 25.25~78.57 kD, 等电点为 6.15~9.45, 包含 15 个保守基序; 除 *AtrTCP11* 为稳定蛋白外, 其余均为不稳定蛋白; miRNA 预测到两个 *AtrTCP* 家族成员 *AtrTCP2* 和 *AtrTCP6* 为 miR319 靶基因。qRT-PCR 结果显示: 在盐溶液不同浓度 (0、50、100、200 mmol·L⁻¹) 处理下, 该基因家族具有不同的表达模式; 在蓝光处理下, *AtrTCP10* 基因表达量上调达到了显著水平; *AtrTCP2*、*AtrTCP3*、*AtrTCP8*、*AtrTCP9*、*AtrTCP11* 和 *AtrTCP13* 表达量下调达到了显著水平; 在不同铵硝比 (0:0、0:10、3:7、5:5、7:3、10:0) 处理下, *TCP* 基因家族各成员表达模式不同, 其中, *AtrTCP3* 参与整个氮代谢过程; 在苋菜各部位进行 qRT-PCR 分析发现: *AtrTCP3*、*AtrTCP12* 在叶片中高表达, 其余家族成员均在根部的表达量较高。【结论】在不同条件处理下, 苋菜 *TCP* 基因家族各成员表达模式不同, 表明苋菜 *TCP* 基因家族各成员可能广泛参与非生物胁迫。

关键词: 苋菜; *TCP* 转录因子; 基因家族; 生物信息学分析; 表达

中图分类号: S 636.4

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2022) 07-0869-11

Transcriptome-based Identification and Expressions of Amaranth *TCP* Gene Family

AN Zixian¹, LI Yixuan¹, ZHENG Youfeng¹, XIAO Fang¹, WANG Le¹,
CHEN He¹, LAI Zhongxiong¹, MOU Jianmei², LIU Shengcai^{1*}

(1. Institute of Horticultural Plant Bioengineering, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China;
2. Suzhou City Academy of Agricultural Sciences, Suzhou, Jiangsu 215000, China)

Abstract: 【Objective】Members of the amaranth *TCP* gene family were identified based on the transcriptome database for an in-depth understanding on the roles they associated with the growth, development, and abiotic stress of the plant. 【Method】Members of the *TCP* gene family were identified by screening the transcriptome database on Dahong amaranth (*Amaranthus tricolor* L.) for a bioinformatics analysis. Amaranth seedlings were cultured under different conditions and their expressions under different treatments analyzed by qRT-PCR. 【Results】Amaranth *TCP* gene family has 14 members, all localized in the nucleus. The length of *AtrTCP* protein was in the range of 230–721 aa, the predicted relative molecular weight was 25.25–78.57 kD, the isoelectric point was 6.15–9.45, and it contained 15 conserved motifs. Except *AtrTCP11*, which was stable protein, all the other proteins were unstable. Two *AtrTCP* family members, *AtrTCP2* and *AtrTCP6*, were predicted as miR319 target genes by miRNA. qRT-PCR showed differentiated expressions of the family members under salt solutions of varied concentrations (i.e., 0, 50, 100, and 200 mmol·L⁻¹). The expression of the upregulated *AtrTCP10* reached a significant level under blue light, and so did those of the downregulated *AtrTCP2*, *AtrTCP3*, *AtrTCP8*, *AtrTCP9*, *AtrTCP11*, and *AtrTCP13*. Under different concentrations of ammonium nitrate ratio (0:0, 0:10, 3:7, 5:5, 7:3, 10:0) treatment, the expressions of the *TCP* genes differed. *AtrTCP3* was shown to be involved in the entire nitrogen metabolism process. In tissues of amaranth,

收稿日期: 2022-06-23 初稿; 2022-07-07 修改稿

作者简介: 安子贤 (1998–), 女, 硕士研究生, 研究方向: 蔬菜育种与生物技术 (E-mail: 1010051118@qq.com)

* 通信作者: 刘生财 (1980–), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 园艺植物生物技术、次生代谢通路 (E-mail: 1215698900@qq.com)

基金项目: 福建省自然科学基金项目 (2018J01700); 福建农林大学经济作物种业工程服务队项目 (11899170125)

AtrTCP3 and *AtrTCP12* were highly expressed in leaves, while the others in roots. 【Conclusion】 Depending on the treatments, the expressions of the amaranth *TCP* gene family members differed. It suggested a broad spectrum of involvements by the members associated with abiotic stresses on amaranth.

Key words: *Amaranthus tricolor* L.; transcription factor; gene family; bioinformatics analysis; expression

0 引言

【研究意义】苋菜 (*Amaranthus tricolor* L.) 属石竹目苋科苋属富含甜菜色素的一年生双子叶草本植物^[1-3], 环境条件对苋菜的营养品质和产量具有重要影响。因此, 探究非生物胁迫对苋菜产量及品质的影响具有重要意义。【前人研究进展】TCP 是植物特有的一类转录因子, 由 TB1 (TEOSINTE BRANCHED1)、CYC (CYCLOIDEA) 和 PCFs (PCF1、PCF2) 3 个成员组成, 含有 59 个氨基酸, 其主要特征在于其 N 端含有一个高度保守的 bHLH 结构域, 该结构域又称为 TCP 结构域^[4]。在模式植物拟南芥中, *TCP* 基因主要对花、芽和叶片的生长发育起到调控作用, 参与信号转导, 对细胞有一定的调控作用, 同时响应多种非生物胁迫应答反应。研究发现, 多数柳枝稷 *TCP* 基因对盐胁迫有响应, 并且在盐胁迫条件下表现出不同的表达谱^[5]; 在菜豆研究中发现, *TCP* 基因与盐胁迫相关^[6]; 李佳皓等^[7] 研究证实马铃薯 *TCP* 对盐胁迫下马铃薯的生长发育有一定的调控作用。*TCP* 基因与 miR319 二者对甘蓝型油菜盐胁迫均有响应, *TCP* 靶基因的表达受到 miR319 的控制进而调控植株的耐盐性^[8]; *TCP* 参与植物器官的形态发育及细胞分裂的调控等^[9-10]; 任丽^[11] 对白桦 *TCP* 基因的研究证实了 *BpTCP3* 在白桦的不同部位均有表达, 尤其在根部表达量最为显著。【本研究切入点】*TCP* 在陆地植物、藻类植物和苔藓植物当中均有发现, 并且对于植物中 *TCP* 基因的研究非常广泛^[12]。目前, 在拟南芥^[13]、马铃薯^[14]、茄子^[15]、水稻^[16]、高粱^[9] 和玉米^[17] 等园艺植物中对 *TCP* 在其物种中的作用和功能均有研究。但 *TCP* 基因在苋菜中的表达情况及功能尚不明确。【拟解决的关键问题】对苋菜 *TCP* 基因家族进行筛选鉴定, 探讨不同条件下 *TCP* 基因表达情况, 为探究该家族基因在非生物胁迫条件下对苋菜产量和品质的影响奠定基础, 为调控苋菜生长发育过程提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与处理

苋菜种子为苏苋 1 号, 由苏州市农业科学院提供。采用纸床法, 将种子播种在培养皿中, 分别进行

NaCl 盐胁迫 (0、50、100、200 mmol·L⁻¹)、不同铵硝比 (二者浓度为 0:0、0:10、3:7、5:5、7:3、10:0), 分别用 NCK、N1、N2、N3、N4、N5 表示)^[18] 及黑暗和蓝光培养, 培养温度 (25 ± 2) °C, 除黑暗条件下培养外, 其他处理光照时间为 16 h/8 h (光/暗)。培养 5 d 后取整株苋菜进行 RNA 提取用于后续试验。苋菜不同组织部位采用 30 d 盆栽苗, 分别取根、茎、叶进行 RNA 提取用于 qRT-PCR 分析。

1.2 试验方法

1.2.1 数据来源及 *AtrTCP* 家族基因的鉴定 数据来源于大红苋菜胚轴的转录组数据库 (登录号 SRA: SRR5930345), 该数据库由本实验室课题组获得, 基因筛选方法参考王乐等^[19] 基因鉴定方法, 通过 Nr、Nt、Swissprot 和 Pfam 4 个数据库筛选基因, 在筛选时输入“TCP”进行筛选, 得到初筛基因, 并利用 SMART (<https://smart.embl-heidelberg.de/>) 和 NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 对初筛基因进行筛选及鉴定。

1.2.2 *AtrTCP* 基因家族蛋白生物信息学分析及保守结构域分析 利用 ExPASy-ProtParam tool (<https://web.expasy.org/protparam/>)、SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)、Plant-mPLoc Server (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/#>) 和 MEME Suite 5.1.0 (<http://meme-suite.org/tools/meme>) 等在线软件对 *AtrTCP* 蛋白序列的理化性质、蛋白质二级结构、亚细胞定位和保守基序进行分析; 利用 TBtools、MEGA-X、DNAMAN 生物信息学分析软件构建系统进化树; 利用 psRNATarget (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>) 在线软件对 miRNA 进行预测。具体分析方法参照王乐等^[19] 方法进行基因家族分析。

1.2.3 不同条件处理苋菜幼苗及 qRT-PCR 分析 通过纸床法对苋菜幼苗在盐胁迫、铵硝配比及黑暗和蓝光下进行处理, 在培养皿中放置 3 层滤纸, 分别加入 5 mL 处理液, 以 ddH₂O 为对照组, 除黑暗和蓝光处理外, 其余处理均放在 16 h/8 h (光/暗) 培养室中进行培养; 苋菜放在黑暗和蓝光下进行处理, 处理 5 d 后进行取样。使用天漠科技开发有限公司 (北京) 提供的总 RNA 提取试剂盒提取不同浓度盐胁迫

迫、硝酸配比以及黑暗、蓝光处理条件下的苋菜总 RNA，经过逆转录得到 cDNA 模板，利用 DNAMAN 软件进行引物设计，该基因组定量引物及内参引物（*EF1a*）设计见表 1，该引物由铂尚生物技术有限公司（福州）合成。qRT-PCR 结果分析根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因表达量。

2 结果与分析

2.1 苋菜 *TCP* 基因家族的鉴定

基于苋菜转录组数据，通过 SMART 筛选以及 NCBI 比对后，最终得到 14 个 *TCP* 家族成员基因，依次命名为 *AtrTCP1*~*AtrTCP14*（表 2）。通过对 *TCP* 基因家族成员进行理化性质分析，结果显示 *AtrTCP* 蛋白质长度在 230~721 aa，相对分子量为 25.25~78.57 kD，等电点为 6.15~9.45；*AtrTCP11* 为稳定蛋白外，其余均为不稳定蛋白；*AtrTCP* 蛋白全部为亲水蛋白（表 2）。在对其蛋白质二级结构分析时发现，无规卷曲比例最高，处于 54.91%~71.63%；其次是 α -螺旋，为 11.82%~24.23%；延伸链为 10.23%~21.33%； β -转角比例最低，为 1.69%~10.95%；对该基因家族亚细胞定位发现全部定位于细胞核中（表 3）。

表 1 <i>AtrTCP</i> 定量引物		
Table 1 Quantitative primers of <i>AtrTCP</i>		
基因 Gene	正向引物序列（5'-3'） Forward primer sequences（5'-3'）	反向引物序列（5'-3'） Reverse primer sequences（5'-3'）
<i>AtrTCP1</i>	GCTGCTACTGGTGCTTCTATT	ACCCATACCCATACCCATC
<i>AtrTCP2</i>	GATGAGCAGCAACATTTCACT	CACCACTTCCACCAACACT
<i>AtrTCP3</i>	TCTTCAACAAGCCGAACC	ATTTCCCACTCAATCCC
<i>AtrTCP4</i>	GGTTAGTTCAAACGGCAGA	ACTGTCTTCCAATCGGGT
<i>AtrTCP5</i>	TTATCCATACCCGAACAGC	TTTAGTGTGACGGTCTTTGG
<i>AtrTCP6</i>	TTGCTACTGGTAGAGGTGGT	CCGGACCCATGTAACATTGA
<i>AtrTCP7</i>	AACCTCCACCAAGACCGT	GTTTCTCCATCTGACTTATGCC
<i>AtrTCP8</i>	GCCTACAGAAACAGTAACCCCTC	CCCGTTCAAGAAGCCATT
<i>AtrTCP9</i>	TCCACCAAGGTCATCATCTT	ATCATCGTCTCTCCGTCCA
<i>AtrTCP10</i>	CGCAGAATCAAGAACAAGC	TGACTTTGGTATGGCGGT
<i>AtrTCP11</i>	TGCTACAGGAACCGGGACTATT	GATGGCTTGGATCACTCAACTG
<i>AtrTCP12</i>	TGGAGGCAAAGATAGACATAGC	TAATGGGCAAAGGAGGGA
<i>AtrTCP13</i>	CAACCATCATCTGTCCTCAA	AGTTCCACTTTCGGCTGT
<i>AtrTCP14</i>	ACCACAGCCACAACAAAGT	GCGGATACTGAGTCAAAGGA
<i>EF1a</i>	GGGATGCTGGTATGGTGAA	ACGGGTCATTCTTCTCTGAG

表 2 *AtrTCP* 基因家族理化性质分析
Table 2 Physicochemical properties of *AtrTCP* family

基因 ID Gene ID	基因名称 Gene name	蛋白质长度 Protein length/aa	分子式 Formula	理化性质 Physicochemical properties			
				相对分子量 Relative molecular weight/kD	等电点 Theoretical pI	不稳定系数 Instability index	平均亲水系数 Grand average of hydropathicity
<i>CL11166.Contig2_All</i>	<i>AtrTCP1</i>	377	C ₁₇₄₇ H ₂₇₇₇ N ₅₃₅ O ₅₇₀ S ₁₄	40.84	6.61	50.76	-0.712
<i>CL1181.Contig4_All</i>	<i>AtrTCP2</i>	423	C ₁₉₅₀ H ₃₀₀₈ N ₆₀₈ O ₆₃₆ S ₆	45.34	6.64	54.40	-0.805
<i>CL4511.Contig1_All</i>	<i>AtrTCP3</i>	326	C ₁₅₂₀ H ₂₄₃₂ N ₄₆₂ O ₄₉₅ S ₆	35.29	9.17	50.51	-0.540
<i>CL531.Contig1_All</i>	<i>AtrTCP4</i>	514	C ₂₃₀₉ H ₃₆₄₀ N ₇₃₆ O ₇₉₅ S ₁₄	54.88	8.57	43.25	-0.823
<i>CL7519.Contig2_All</i>	<i>AtrTCP5</i>	231	C ₁₀₉₆ H ₁₇₁₁ N ₃₄₁ O ₃₄₂ S ₉	25.43	9.00	49.08	-0.764
<i>CL7919.Contig2_All</i>	<i>AtrTCP6</i>	355	C ₁₆₇₁ H ₂₅₇₅ N ₅₁₉ O ₅₄₃ S ₉	38.91	6.79	40.47	-0.860
<i>CL9396.Contig1_All</i>	<i>AtrTCP7</i>	430	C ₁₉₅₁ H ₃₀₃₆ N ₆₁₆ O ₆₅₄ S ₉	45.87	6.66	47.14	-0.747
<i>Unigene1202_All</i>	<i>AtrTCP8</i>	345	C ₁₅₄₄ H ₂₅₂₂ N ₄₆₂ O ₅₁₈ S ₉	36.13	9.30	47.05	-0.408
<i>Unigene22459_All</i>	<i>AtrTCP9</i>	299	C ₁₃₇₃ H ₂₂₁₄ N ₄₂₂ O ₄₄₄ S ₄	31.87	9.45	56.13	-0.563
<i>Unigene27038_All</i>	<i>AtrTCP10</i>	231	C ₁₁₁₅ H ₁₇₇₁ N ₃₁₇ O ₃₄₀ S ₆	25.25	9.23	63.06	-0.492
<i>Unigene27184_All</i>	<i>AtrTCP11</i>	347	C ₁₆₀₆ H ₂₄₈₃ N ₄₈₅ O ₅₂₃ S ₁₀	37.27	8.49	38.62	-0.743
<i>Unigene35431_All</i>	<i>AtrTCP12</i>	230	C ₁₁₁₈ H ₁₇₈₇ N ₃₂₉ O ₃₆₄ S ₄	25.79	8.56	44.38	-0.820
<i>Unigene6554_All</i>	<i>AtrTCP13</i>	431	C ₁₉₅₅ H ₃₀₄₂ N ₆₁₈ O ₆₅₆ S ₉	45.99	6.66	47.05	-0.754
<i>Unigene73441_All</i>	<i>AtrTCP14</i>	721	C ₃₃₉₅ H ₅₄₃₄ N ₁₀₀₆ O ₁₁₀₅ S ₁₇	78.57	6.15	58.04	-0.602

表 3 *AtrTCP* 基因家族蛋白质二级结构及亚细胞定位分析
Table 3 Protein secondary structures and subcellular localizations of *AtrTCP* family

转录因子 Transcription factor	TCP结构域 TCP domain	蛋白质二级结构 Secondary protein structure				亚细胞定位 Subcellular localization
		α -螺旋 Alpha helix/%	β -转角 Beta turn/%	延伸链 Extended strand/%	无规卷曲 Random coil/%	
AtrTCP1	111-377	19.36	5.04	13.79	61.80	Nucleus.
AtrTCP2	43-178	14.42	2.36	11.58	71.63	Nucleus.
AtrTCP3	86-326	24.23	5.52	15.34	54.91	Nucleus.
AtrTCP4	95-253	14.20	2.53	15.18	68.09	Nucleus.
AtrTCP5	57-228	13.85	9.52	16.45	60.17	Nucleus.
AtrTCP6	55-223	14.08	1.69	14.65	69.58	Nucleus.
AtrTCP7	88-290	20.70	4.19	10.23	64.88	Nucleus.
AtrTCP8	65-176	15.65	5.22	10.43	68.70	Nucleus.
AtrTCP9	51-258	19.73	6.02	18.06	56.19	Nucleus.
AtrTCP10	91-231	19.05	4.76	13.42	62.77	Nucleus.
AtrTCP11	69-256	11.82	10.95	21.33	55.91	Nucleus.
AtrTCP12	54-215	22.61	5.22	13.48	58.70	Nucleus.
AtrTCP13	88-291	14.39	5.10	11.37	69.14	Nucleus.
AtrTCP14	51-332	20.11	5.83	16.37	57.70	Nucleus.

2.2 苋菜 *AtrTCP* 家族系统进化树分析

根据 *TCP* 基因家族进化关系，将 *TCP* 基因家族划分为 2 个亚族：Class I 和 Class II；Class I 为 *PCF*，而 Class II 划分 2 个分支 *CYC/TB1* 和 *CIN*。通过 MEGA-X 软件，对筛选得到的 14 个 *AtrTCP* 基因家族成员进行基因家族进化树的构建，根据苋菜 *AtrTCP* 基因与模式植物拟南芥 *AtTCP* 基因聚类分析发现，Class I 亚族中，含有 22 个 *TCP* 家族成员，其中拟南芥 12 个，苋菜 10 个；Class II 亚族中，*CIN* 分支含有 12 个 *TCP* 家族成员，其中拟南芥 8 个，苋菜 4 个；*CYC/TB1* 分支含有 4 个 *TCP* 家族成员，全部为拟南芥。*AtrTCP1* 与 *AtTCP20*、*AtrTCP4* 与 *AtTCP2*、*AtrTCP8* 与 *AtTCP19*、*AtrTCP10* 与 *AtTCP11* 和 *AtrTCP12* 与 *AtTCP13* 基因亲缘关系较近（图 1），表明这 5 个苋菜 *AtrTCP* 基因与拟南芥 *AtTCP* 基因具有相似功能。

2.3 苋菜 *AtrTCP* 蛋白保守基序分析

通过 MEME 对 *AtrTCP* 蛋白进行保守基序分析，共获得了 15 个保守基序，依次命名为 Motif1~Motif15。所有 *AtrTCP* 都含有 Motif1 基序，Motif1 高度保守；除 *AtrTCP2*、*AtrTCP4*、*AtrTCP6* 和 *AtrTCP12* 外，其余 *AtrTCP* 均含有 Motif2 基序，Motif5 出现 6 次，Motif12 出现 5 次，其余蛋白保守基序均少于 5 次

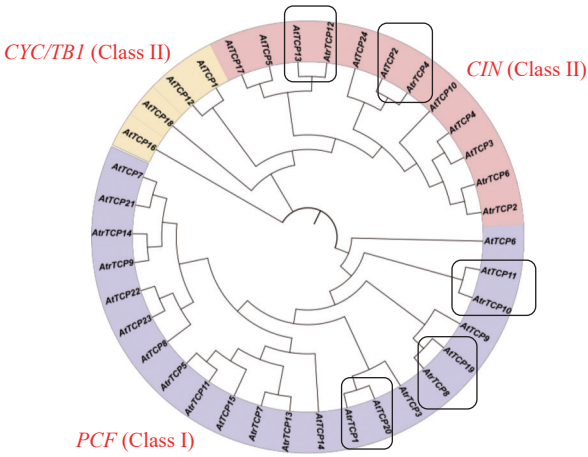


图 1 苋菜 *AtrTCP* 与拟南芥 *AtTCP* 基因家族进化树对比
Fig. 1 Comparison of *AtrTCP* family trees of amaranth and *Arabidopsis thaliana*

（图 2）。结合聚类分析发现，*PCF*（Class I）亚族成员包含特有的 Motif2 基序；*CIN*（Class II）亚族成员均含有 Motif3 基序（图 1、2）。

2.4 调控苋菜 *AtrTCP* 的 miRNA 预测

通过 psRNA Target 在线软件，以苋菜 small RNA 数据库为参考，*AtrTCP* 核苷酸序列为待测序列，将筛选得到的 14 个 *AtrTCP* 家族成员进行 miRNA 预测，结果显示，只有 4 个 *AtrTCP* 家族成员受到 miRNA 的

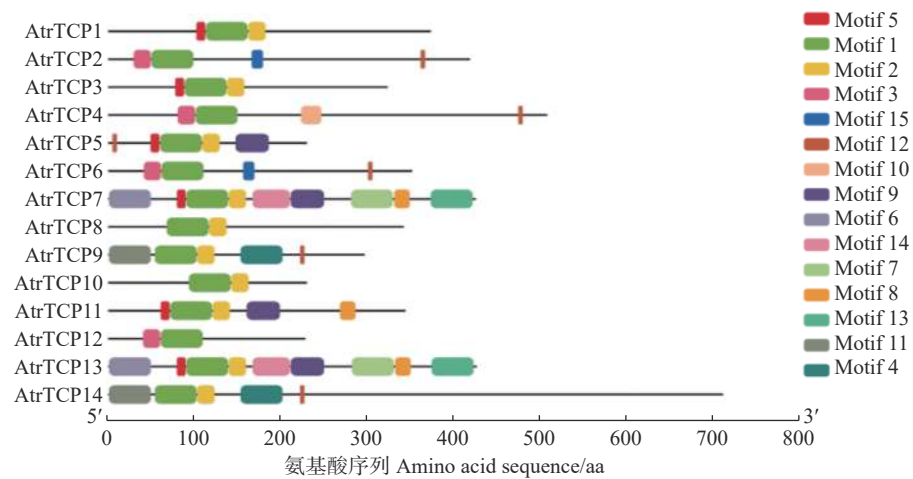


图 2 *AtrTCP* 基因家族保守氨基酸分析

Fig. 2 Conserved amino acids in *AtrTCP* family

调控, *AtrTCP6* 和 *AtrTCP2* 受到 miR319_1、miR319_2、miR319a-3p 和 miR319a_1 的调控; *AtrTCP11* 和 *AtrTCP13* 受到 miR5658 的调控 (表 4)。miRNA 的表达趋势结果显示, *AtrTCP6* 和 *AtrTCP2* 总体表现为上调趋势。

2.5 不同处理下苋菜 *AtrTCP* 实时荧光定量 PCR 分析

2.5.1 盐胁迫下苋菜 *AtrTCP* 家族成员 qRT-PCR 分析

NaCl 盐溶液处理下的苋菜 *AtrTCP* 基因家族各成员 qRT-PCR 结果显示, *AtrTCP2* 在 50 mmol·L⁻¹ 的处理下表达量最高, 随着浓度升高, 该基因表达量呈下

调趋势; *AtrTCP6*、*AtrTCP11* 和 *AtrTCP12* 的表达量随着盐溶液浓度的升高呈上调趋势, 在 100 mmol·L⁻¹ 的处理下表达量达到最高值, 而后呈下调趋势; *AtrTCP8*、*AtrTCP9* 和 *AtrTCP14* 的表达量随着盐溶液浓度的升高呈下调趋势; *AtrTCP1* 在 200 mmol·L⁻¹ 的处理下表达量达到最大值; 随着浓度的升高, *AtrTCP3* 和 *AtrTCP10* 的表达量呈现先下调后上调的趋势; *AtrTCP7* 和 *AtrTCP13* 的表达量呈现上调趋势; 在不同盐浓度处理下 *AtrTCP5* 的表达量无明显变化 (图 3)。

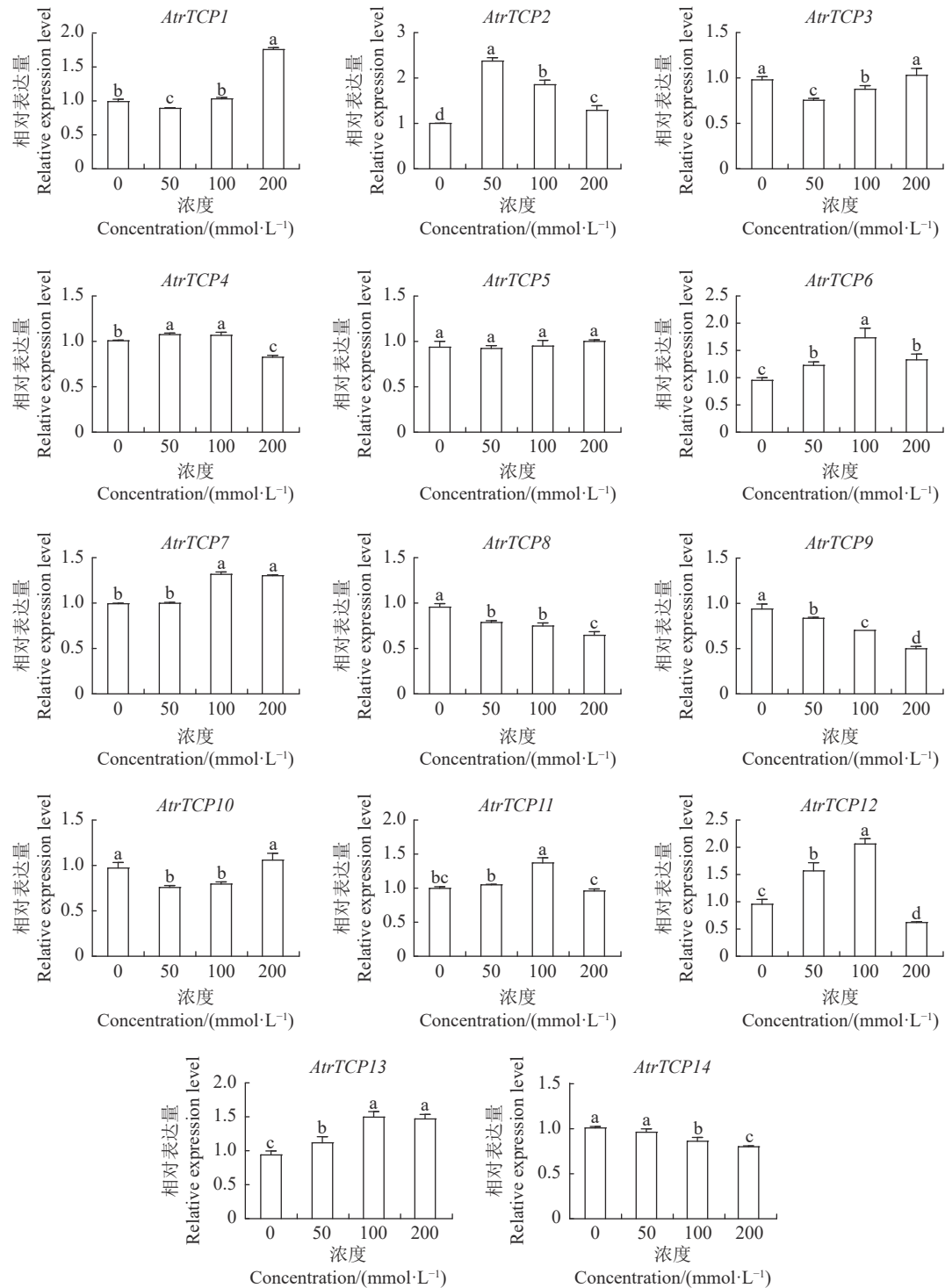
表 4 苋菜 *AtrTCP* 基因家族 miRNA 的预测及差异表达分析

Table 4 Prediction and differential expressions of *AtrTCP* family miRNA

基因名称 Gene name	对应 miRNA	期望值 Expectation	抑制 Inhibition	多样性 Multiplicity	表达量 Expression quantity	表达趋势 Express trend
<i>AtrTCP6</i>	miR319_1	1.5	切割 Cleavage	1	0.764797327	上调 Up
	miR319_2	1.5	切割 Cleavage	1	-0.396055889	下调 Down
	miR319a-3p	1.5	切割 Cleavage	1	-0.134714289	下调 Down
	miR319a_1	1.5	切割 Cleavage	1	0.179984679	上调 Up
	miR319a	2.5	切割 Cleavage	1	-0.06725778	下调 Down
	miR319c_3	2.5	切割 Cleavage	1	0.137854295	上调 Up
	miR159a_1	3.0	切割 Cleavage	1	0.073891584	上调 Up
	Total miRNA	—	—	—	0.558499927	上调 Up
<i>AtrTCP2</i>	miR319_1	3.0	切割 Cleavage	1	0.764797327	上调 Up
	miR319_2	3.0	切割 Cleavage	1	-0.396055889	下调 Down
	miR319a-3p	3.0	切割 Cleavage	1	-0.134714289	下调 Down
	miR319a_1	3.0	切割 Cleavage	1	0.179984679	上调 Up
	Total miRNA	—	—	—	0.414011828	上调 Up
<i>AtrTCP11</i>	miR5658	3.0	切割 Cleavage	1	-0.227576991	下调 Down
<i>AtrTCP13</i>	miR5658	3.0	切割 Cleavage	1	-0.227576991	下调 Down

“Total miRNA”表示基因对应miRNA的总表达趋势; “—”表示无结果。

"Total miRNA" represents the Total expression trend of miRNA corresponding to the gene. "—" indicates no result.



小写字母代表在 0.05 水平上差异显著。图 5、6 同。

Data with lowercase letters represent significant differences at *P* < 0.05. Same for Figs. 5 and 6.

图 3 *AtrTCP* 家族对苋菜盐胁迫处理下的影响

Fig. 3 Effect of *AtrTCP* family on amaranth under salt stress

2.5.2 光质处理下苋菜 *AtrTCP* 基因家族 qRT-PCR 分析 蓝光和黑暗处理下的苋菜 *AtrTCP* 基因家族 qRT-PCR 分析结果显示, *AtrTCP1*、*AtrTCP4*、*AtrTCP6* 和 *AtrTCP10* 在蓝光条件下表达呈上调趋势, 其余成员的表达均呈下调趋势, 其中, *AtrTCP10* 基因在蓝光条件下, 表达量显著上调; *AtrTCP2*、*AtrTCP3*、

AtrTCP8、*AtrTCP9*、*AtrTCP11* 和 *AtrTCP13* 表达量下调达到了显著水平 (图 4)。

2.5.3 不同铵硝比处理下苋菜 *AtrTCP* 基因家族成员 qRT-PCR 分析 不同铵硝比处理下的苋菜 *AtrTCP* 基因家族成员 qRT-PCR 结果显示, *AtrTCP2*、*AtrTCP3*、*AtrTCP9* 和 *AtrTCP10* 在铵硝比为 0:10 和 3:7 的表达

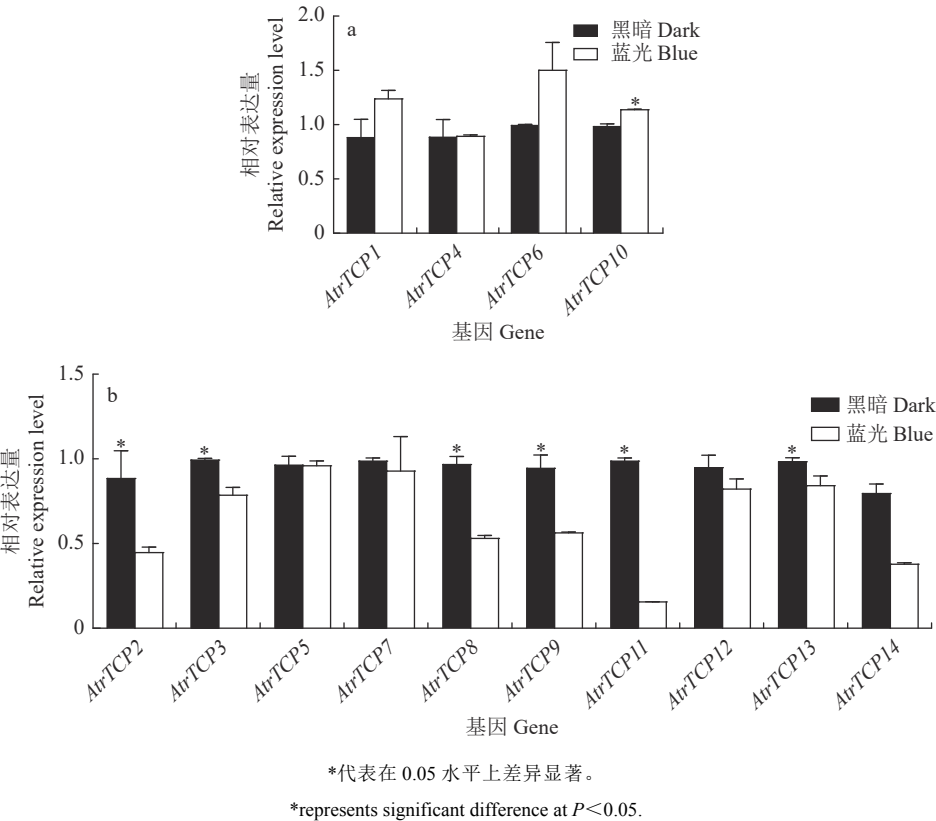


图 4 *AtrTCP* 家族在不同光质处理下的表达量
Fig. 4 Expressions of *AtrTCP* family under light exposures

量显著高于铵硝比为 10:0 和 7:3 的表达量，其中 *AtrTCP3* 在不同铵硝比处理下与 NCK 对照发现，各处理表达量均上调，且均与 NCK 有显著差异，参与整个氮代谢；而 *AtrTCP1* 则在铵硝比为 10:0 和 7:3 的表达量更高；*AtrTCP4*、*AtrTCP7*、*AtrTCP8*、*AtrTCP10*、*AtrTCP11*、*AtrTCP12*、*AtrTCP13* 和 *AtrTCP14* 在不同铵硝比处理下表达量均下调；*AtrTCP5* 随着铵态氮配比的增大，表达量呈现先下降再上升再下降的趋势，其中，在铵硝比为 0:0 的处理下表达量最高，但在 0:10、3:7、7:3 和 10:0 处理下无显著差异（图 5）。
2.5.4 苋菜不同组织部位 qRT-PCR 分析 通过对苋菜不同部位的 TCP 家族成员进行 qRT-PCR 分析，结果显示，*AtrTCP* 家族成员 *AtrTCP3*、*AtrTCP12* 在叶部的表达量较高，其余家族成员均在根部的表达量较高（图 6）。

3 讨论与结论

TCP 转录因子在 N 段端有着高度保守的结构域，是植物特有的一类转录因子。植物的转录因子数量差异也很大，研究发现，多数植物中存在 TCP 基因，玉米 52 个^[20]、小麦 28 个^[21]、水稻 27 个^[16]、高粱 27 个^[9]、棉花 73 个^[22]、谷子 26 个^[23]、拟南芥 24 个^[24] 和牡丹 18 个^[25] 等，而在苋菜中鉴定出 14 个

成员，少于已报道的物种，这说明植物 TCP 转录因子数量在不同物种间差异比较大，这种现象产生的原因可能是由于苋菜 TCP 基因来源于转录组数据库，部分基因没有表达，而其他物种均来源于全基因组数据库。

在对不同物种进行生物信息学分析时发现，不同物种中聚类关系越紧密，说明两者很大可能上具有相似的功能，在进化树中发现，*AtrTCP1* 与 *AtTCP20*、*AtrTCP4* 与 *AtTCP2*、*AtrTCP8* 与 *AtTCP19*、*AtrTCP10* 与 *AtTCP11* 和 *AtrTCP12* 与 *AtTCP13* 等 5 对可能具有相似的功能，其中，*AtrTCP1* 可能与 *AtTCP20* 功能相似，参与调控细胞扩增、细胞分裂及细胞分化等^[26]；*AtrTCP4* 可能与 *AtTCP2* 功能相似，在调控植物叶片形态和大小上发挥着重要作用^[27]；*AtrTCP8* 可能与 *AtTCP19* 功能相似，参与植物防御^[28]；*AtrTCP10* 与 *AtTCP11* 具有相似的功能，在调控维管束的发育方面发挥着重要的作用^[29]；*AtrTCP12* 可能在调控细胞分裂素信号途径应答方面发挥作用^[30]。microRNA（miRNA）作为一种调控植物生长发育以及响应胁迫的内源性小 RNA 分子存在^[31]。miRNA 预测发现，*AtrTCP* 基因家族大多均受到 miR319 的调控，这与芥菜^[32]、蝴蝶兰^[33] 等多种植物相同，miRNA319 对植物 TCP 基因家族的调控具有重要作用，并且已经证

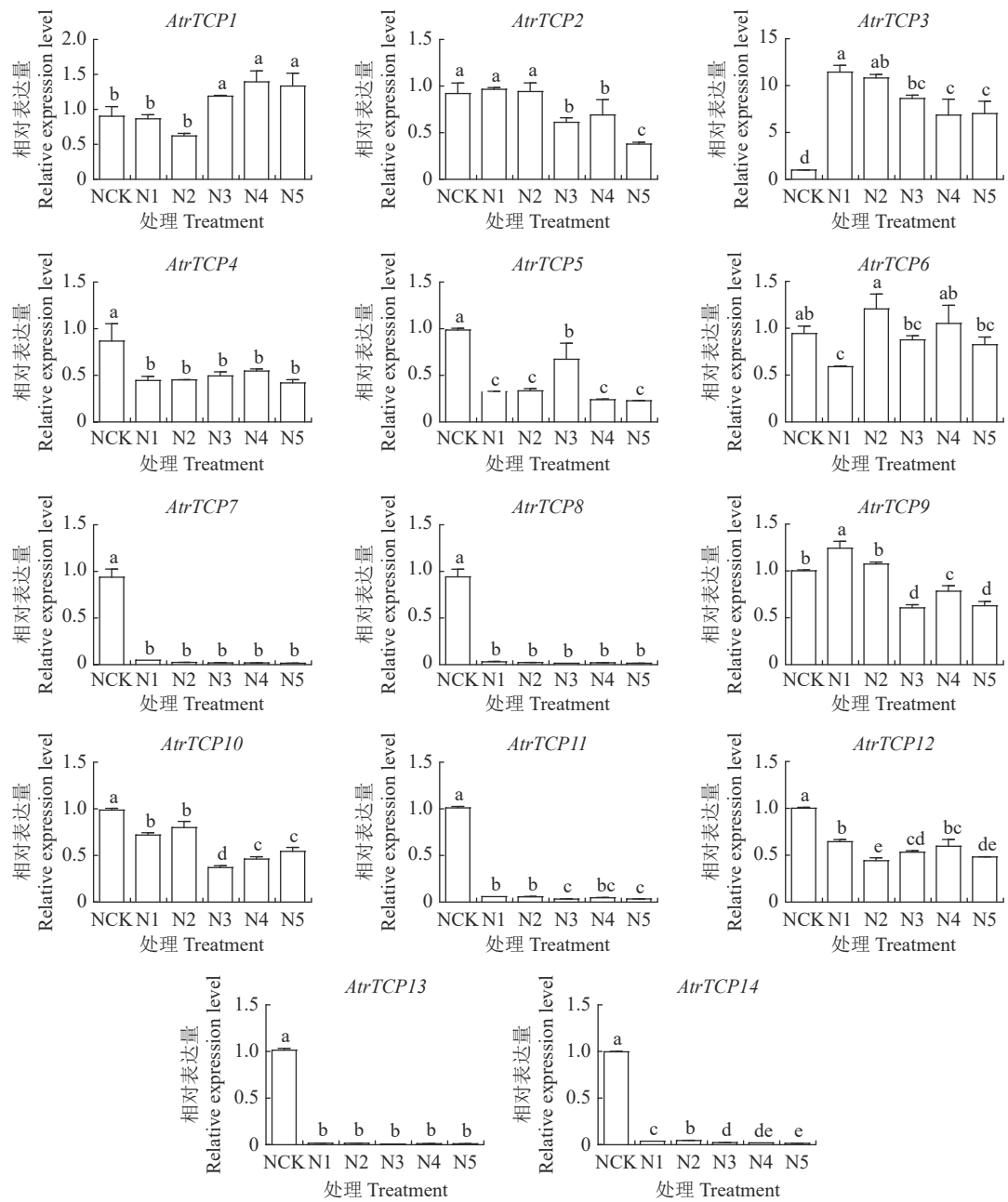


图 5 *AtrTCP* 家族成员在不同铵硝比处理下的表达量

Fig. 5 Expression levels of *AtrTCP* family members treated with different ammonium to nitrate ratios

实 miR319 靶向 *TCP* 基因^[5]，而 miRNA 和 *TCP* 基因家族主要参与叶片的生长发育，对叶片有多层次的调控^[34]。本研究发现 *AtrTCP2* 和 *AtrTCP6* 受多种 miRNA 调控，主要为 miR319。有研究表明，蓝光对于甜菜色素的合成有促进作用^[35]，苋菜 *AtrTCP* 基因家族成员 *AtrTCP1*、*AtrTCP4*、*AtrTCP6* 和 *AtrTCP10* 在蓝光条件下表达量上调，推测 *AtrTCP1*、*AtrTCP4*、*AtrTCP6* 和 *AtrTCP10* 促进苋菜中甜菜色素的合成，但是 *TCP* 转录因子参与甜菜色素的合成机制有待进一步研究。

对苋菜的不同部位 qPCR 结果分析发现，*AtrTCP* 基因家族中的不同成员对苋菜不同组织部位具有不

同表达模式，各成员在根部的表达量均较高，说明 *TCP* 直接作用到根部，进而影响整株植物的生长发育。而在茎部中，*AtrTCP5* 表达量最高，其次是 *AtrTCP3*，研究表明，芥菜中 Class I 亚族成员在茎的发育过程中发挥着重要作用^[32]。*AtrTCP12* 在叶部的表达量最高，*AtrTCP2*、*AtrTCP3* 和 *AtrTCP4* 在叶部也具有较高的表达趋势，这也进一步印证不同物种中亲缘关系较近的植株之间存在相似的功能，*TCP* 基因家族中部分成员在调控植物叶片生长发育过程中发挥着重要作用。

对盐胁迫下苋菜 *TCP* 基因定量结果分析发现，

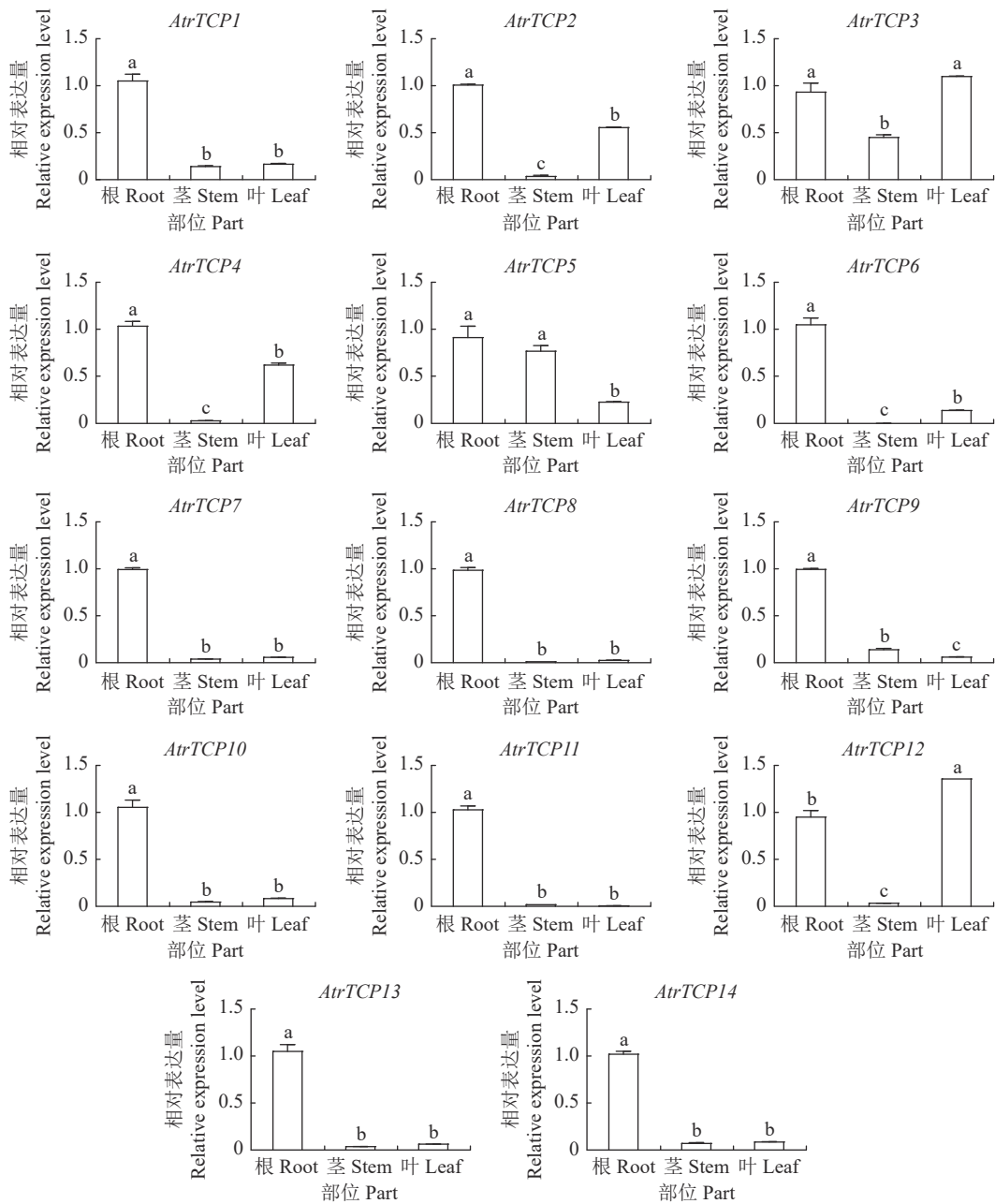


图 6 *AtrTCP*家族在苋菜不同部位的表达趋势

Fig. 6 Expressions of *AtrTCP* family in different tissues of amaranth plant

高浓度的盐胁迫对苋菜的生长发育有明显的抑制作用，高浓度下植物改变体内通路；而低浓度的盐胁迫对苋菜的生长发育的抑制作用较弱，低浓度下植物体内自身防御系统起作用，而王廷芹等^[36]对苋菜幼苗和曾泳怡等^[37]对水稻幼苗等对生理研究结果相一致。*AtrTCP*基因在不同光质、不同硝酸配比处理中发现，*AtrTCP*对光、非生物胁迫等有不同程度的响应，这与谷子等^[23]植物盐胁迫相关研究结果相一致。研究结果为进一步探究 *TCP* 基因家族提供依据，并为 *TCP* 基因在苋菜生长过程中的作用机制及对苋菜非生物胁迫及发育的影响提供参考。

参考文献：

[1] 全亚楠, 刘雪, 刘秀洁, 等. 苋菜原生质体和瞬时转化体系的建立及应用 [J]. *分子植物育种*, 2021, 19 (19): 6476–6481.
TONG Y N, LIU X, LIU X J, et al. Establishment and application of protoplast and transient transformation system of edible amaranth (*Amaranthus* spp.) [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2021, 19 (19): 6476–6481. (in Chinese)

[2] STRACK D, VOGT T, SCHLIEMANN W. Recent advances in betalain research [J]. *Phytochemistry*, 2003, 62 (3): 247–269.

[3] 柳燕, 谢礼洋, 赖钟雄, 等. 苋菜amaAG基因克隆与生物信息学分析 [J]. *江西农业大学学报*, 2017, 39 (1): 168–174.
LIU Y, XIE L Y, LAI Z X, et al. Cloning and bioinformatics analysis

- of ama AG in *Amaranthus tricolor* L [J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2017, 39 (1): 168–174. (in Chinese)
- [4] CUBAS P, LAUTER N, DOEBLEY J, et al. The TCP domain: A motif found in proteins regulating plant growth and development [J]. *The Plant Journal*, 1999, 18 (2): 215–222.
- [5] HUO Y Z, XIONG W D, SU K L, et al. Genome-wide analysis of the TCP gene family in switchgrass (*Panicum virgatum* L.)[J]. *International Journal of Genomics*, 2019: <https://doaj.org/article/613044632d6d4e2f9f696c52793c0ebd>.
- [6] PARK H C, KIM M L, KANG Y H, et al. Pathogen- and NaCl-induced expression of the SCaM-4 promoter is mediated in part by a GT-1 box that interacts with a GT-1-like transcription factor [J]. *Plant Physiology*, 2004, 135 (4): 2150–2161.
- [7] 李佳皓, 谢敏秋, 万传银, 等. 马铃薯转录因子StTCP13基因的原核表达及盐胁迫功能研究 [J]. *华北农学报*, 2021, 36 (2): 33–39.
- LI J H, XIE M Q, WAN C Y, et al. Prokaryotic expression of transcription factor StTCP13 in potato and its function of salt stress [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2021, 36 (2): 33–39. (in Chinese)
- [8] FANG Y J, ZHENG Y Q, LU W, et al. Roles of miR319-regulated TCPs in plant development and response to abiotic stress [J]. *The Crop Journal*, 2021, 9 (1): 17–28.
- [9] 郑玲, 白雪婷, 李会云. 高粱TCP基因家族全基因组鉴定及表达分析 [J]. *河南农业科学*, 2019, 48 (10): 30–36.
- ZHENG L, BAI X T, LI H Y. Genome-wide identification and expression analysis of TCP gene family in *Sorghum bicolor* L [J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2019, 48 (10): 30–36. (in Chinese)
- [10] 李旭娟, 林秀琴, 刘洪博, 等. 甘蔗TBI基因的克隆与生物信息学分析 [J]. *热带作物学报*, 2015, 36 (11): 1978–1985.
- LI X J, LIN X Q, LIU H B, et al. Cloning and bioinformatics analysis of the TBI gene in sugarcane [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2015, 36 (11): 1978–1985. (in Chinese)
- [11] 任丽. 白桦BpTCP3基因的功能研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2019.
- REN L. *Function analysis of BpTCP3 gene in Betula platyphylla*[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2019. (in Chinese)
- [12] DUAN A Q, WANG Y W, FENG K, et al. TCP family genes control leaf development and its responses to gibberellin in celery [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2019, 41 (9): 153.
- [13] RIECHMANN J L, HEARD J, MARTIN G, et al. *Arabidopsis* transcription factors: Genome-wide comparative analysis among eukaryotes [J]. *Science*, 2000, 290 (5499): 2105–2110.
- [14] 冯建英, 李立芹, 李佳皓, 等. 马铃薯TCP家族转录因子鉴定与表达模式分析 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2021, 40 (S2): 2756–2764.
- FENG J Y, LI L Q, LI J H, et al. Identification and expression pattern analysis of TCP family transcription factors in potato [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2021, 40 (S2): 2756–2764. (in Chinese)
- [15] 杨婷, 黎成, 申佳瑜, 等. 茄子TCP基因家族全基因组的鉴定与分析 [J/OL]. *生物工程学报*: 1-21. [2022-07-06]. DOI: 10.13345/j. cjb. 220114.
- YANG T, LI C, SHEN JY, et al. Identification and analysis of the complete genome of the TCP gene family in Eggplant[J/OL]. *Chinese Journal of Bioengineering*: 1-21[2022-07-06]. DOI: 10.13345/j. cjb. 220114. (in Chinese)
- [16] 关紫微, 曹希雅, 张先文, 等. 水稻TCP家族的全基因组鉴定及表达水平分析[J/OL]. *分子植物育种*, 2020: 1-18. (2020-12-29). <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20201229.0941.002.html>.
- GUAN Z W, CAO X Y, ZHANG X W, et al. Genome-wide identification and expression analysis of TCP gene family in rice(*Oryza sativa* L.)[J/OL]. *Molecular Plant Breeding*, 2020: 1-18. (2020-12-29). <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20201229.0941.002.html>.(in Chinese)
- [17] 王景超, 张君, 齐云, 等. 玉米TCP家族基因的表达分析 [J]. *玉米科学*, 2022, 30 (1): 63–68.
- WANG J C, ZHANG J, QI Y, et al. Expression analysis on TCP family genes of maize [J]. *Journal of Maize Sciences*, 2022, 30 (1): 63–68. (in Chinese)
- [18] 陈何, 王乐, 赵春丽, 等. 氮素和红蓝复合光配比对苋菜幼苗亚硝酸还原酶活性及其基因表达的影响 [J]. *中国农业大学学报*, 2021, 26 (8): 61–71.
- CHEN H, WANG L, ZHAO C L, et al. Effects of nitrogen and red and blue light on NiR enzyme activity and gene expression in *Amaranthus tricolor* L. seedlings [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2021, 26 (8): 61–71. (in Chinese)
- [19] 王乐, 陈何, 陈家兰, 等. 基于苋菜转录组的ARF基因家族鉴定及表达 [J]. *应用与环境生物学报*, 2021, 27 (1): 167–176.
- WANG L, CHEN H, CHEN J L, et al. Identification and expression of ARF gene family based on *Amaranthus tricolor* L. transcriptome [J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2021, 27 (1): 167–176. (in Chinese)
- [20] 孙菡笛, 薛江芝, 刘亚洁, 等. 玉米TCP转录因子家族的全基因组鉴定及表达模式分析 [J]. *分子植物育种*, 2021, 19 (8): 2460–2471.
- SUN H D, XUE J Z, LIU Y J, et al. Genome identification and expression pattern analysis of TCP transcription factor family in maize [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2021, 19 (8): 2460–2471. (in Chinese)
- [21] 丁宁, 李梓彰, 田文, 等. 小麦TCP基因家族的全基因组鉴定和对热胁迫的响应 [J]. *麦类作物学报*, 2018, 38 (10): 1157–1165.
- DING N, LI Z Z, TIAN W, et al. Genome-wide identification of the wheat TCP gene family and its response to heat stress [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2018, 38 (10): 1157–1165. (in Chinese)
- [22] YIN Z J, LI Y, ZHU W D, et al. Identification, characterization, and expression patterns of TCP genes and microRNA319 in cotton [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19 (11): 3655.
- [23] 白永宏, 赵赞延, 魏雄博, 等. 谷子TCP转录因子家族成员鉴定与生物信息学分析 [J]. *南方农业学报*, 2020, 51 (6): 1300–1307.
- BAI Y H, ZHAO Z Y, WEI X B, et al. Identification and bioinformatics analysis of TCP transcription factor family member in *Setaria italic* L. (foxtail millet) [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2020, 51 (6): 1300–1307. (in Chinese)

- [24] 冯志娟, 徐盛春, 刘娜, 等. 植物TCP转录因子的作用机理及其应用研究进展 [J]. 植物遗传资源学报, 2018, 19 (1): 112–121.
- FENG Z J, XU S C, LIU N, et al. Molecular mechanisms and applications of TCP transcription factors in plants [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2018, 19 (1): 112–121. (in Chinese)
- [25] 张延召, 罗新, 李会云, 等. 牡丹TCP家族基因的鉴定与生物信息学分析 [J]. 分子植物育种, 2022, 20 (1): 31–37.
- ZHANG Y Z, LUO X, LI H Y, et al. Identification and bioinformatics analysis of TCP family genes in tree peony [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2022, 20 (1): 31–37. (in Chinese)
- [26] HERVÉ C, DABOS P, BARDET C, et al. *In vivo* interference with *AtTCP20* function induces severe plant growth alterations and deregulates the expression of many genes important for development [J]. *Plant Physiology*, 2009, 149 (3): 1462–1477.
- [27] 何志敏. 拟南芥转录因子TCP2与CRY1相互作用的遗传学与生化分析[D]. 长沙: 湖南大学, 2016.
- HE Z M. *The molecular genetical and biochemical study of transcription factor TCP2 and CRY1 interaction in Arabidopsis*[D]. Changsha: Hunan University, 2016. (in Chinese)
- [28] 安新艳, 楼盼盼, 郝娟. 植物TCP转录因子的研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2020, 48 (15): 20–23, 27.
- AN X Y, LOU P P, HAO J. Research progress on plant TCP transcription factors [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2020, 48 (15): 20–23, 27. (in Chinese)
- [29] 安家兴. 拟南芥TCP11调控维管束的发育[D]. 兰州: 兰州大学, 2012.
- AN J X. *TCP11Regalates the development of vascular bundles in arahidopsis thaliana*[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2012. (in Chinese)
- [30] KOROLEVA O A, TOMLINSON M L, LEADER D, et al. High-throughput protein localization in *Arabidopsis* using *Agrobacterium*-mediated transient expression of GFP-ORF fusions [J]. *The Plant Journal:for Cell and Molecular Biology*, 2005, 41 (1): 162–174.
- [31] 张松莲, 曾富华, 喻宁华, 等. 植物miRNA的功能及其作用机制 [J]. 热带亚热带植物学报, 2006, 14 (5): 444–450.
- ZHANG S L, ZENG F H, YU N H, et al. Advances in studies on the function and mechanism of plant microRNA [J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2006, 14 (5): 444–450. (in Chinese)
- [32] 李坤杰, 谭杉杉, 孙勃, 等. 芥菜TCP转录因子家族全基因组鉴定及表达分析 [J]. 四川农业大学学报, 2019, 37 (4): 459–468.
- LI K J, TAN S S, SUN B, et al. Genome-wide identification and analysis of TCP transcription factor family in *Brassica juncea* [J]. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 2019, 37 (4): 459–468. (in Chinese)
- [33] LIN Y F, CHEN Y Y, HSIAO Y Y, et al. Genome-wide identification and characterization of TCP genes involved in ovule development of *Phalaenopsis equestris* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2016, 67 (17): 5051–5066.
- [34] KOYAMA T, SATO F, OHME-TAKAGI M. Roles of miR319 and TCP transcription factors in leaf development [J]. *Plant Physiology*, 2017, 175 (2): 874–885.
- [35] LIU S C, ZHENG X L, PAN J F, et al. RNA-sequencing analysis reveals betalains metabolism in the leaf of *Amaranthus tricolor* L [J]. *PLoS One*, 2019, 14 (4): e0216001.
- [36] 王廷芹, 甘秋霞, 李倩茹. 盐胁迫对苋菜种子的发芽及幼苗生长的影响 [J]. 贵州大学学报(自然科学版), 2021, 38 (1): 10–15, 32.
- WANG T Q, GAN Q X, LI Q R. Effect of salt stress on seed germination and seedling growth of amaranth [J]. *Journal of Guizhou University (Natural Sciences)*, 2021, 38 (1): 10–15, 32. (in Chinese)
- [37] 曾泳怡, 冯梓晴, 曾晓靖, 等. NaCl胁迫对不同基因型水稻种子萌发和幼苗生长的影响 [J]. 安徽农业科学, 2021, 49 (7): 25–29.
- ZENG Y Y, FENG Z Q, ZENG X J, et al. Effects of NaCl stress on seed germination and seedling growth of different rice genotypes [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2021, 49 (7): 25–29. (in Chinese)

(责任编辑：于洪杰)