

练从龙, 兰金旭, 杨晶凡, 等. 基于冬凌草全长转录组的 *TIFY* 基因家族鉴定与表达分析 [J]. 福建农业学报, 2024, 39 (3): 290–301.

LIAN C L, LAN J X, YANG J F, et al. Identification and Expressions of *TIFY* Family Based on the Full-Length Transcriptome in *Isodon rubescens* [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2024, 39 (3): 290–301.

基于冬凌草全长转录组的 *TIFY* 基因家族 鉴定与表达分析

练从龙, 兰金旭, 杨晶凡, 李晶晶, 杨 灏, 陈随清*

(河南中医药大学药学院 / 河南省中药资源与中药化学重点实验室 / 豫药全产业链研发河南省

协同创新中心, 河南 郑州 450046)

摘要:【目的】*TIFY* 蛋白是茉莉酸 (JA) 信号通路的关键调节因子, 在植物生长发育、非生物胁迫以及次生代谢产物的积累中具有显著的调控作用, 揭示冬凌草 (*Isodon rubescens*) 的 *TIFY* 基因可为冬凌草的抗逆性改良育种和次生代谢产物合成研究提供理论依据。【方法】基于冬凌草三代全长转录组序列, 通过生物信息学方法对冬凌草 *TIFY* 基因家族进行鉴定和分析, 并采用 RT-qPCR 技术分析其在不同组织中的表达特性。【结果】(1) 成功从冬凌草中鉴定出 12 个 *TIFY* 家族基因成员; (2) 理化性质分析表明, 其氨基酸长度 124~378 aa, 分子量 13 924.89~39 692.38 Da, 等电点 5.05~9.69; 除 IrTIFY10 蛋白为稳定蛋白, 其他均为不稳定蛋白; IrTIFYs 蛋白的亚细胞定位均在细胞核, 均为亲水性蛋白, 且不含信号肽。(3) 结构分析表明, IrTIFY 家族蛋白成员无跨膜结构, 二级结构中含量最多的结构类型为无规则卷曲; 且含有多个磷酸化位点。(4) 密码子偏好性分析结果表明, IrTIFY 基因家族密码子偏好性较弱, 稍倾向于使用以 A 或 U 结尾的密码子。(5) 启动子元件分析表明冬凌草 *TIFY* 家族成员中存在多个光响应元件、激素响应元件和逆境响应元件等, 但不同成员之间的元件存在差异。(6) 进化树分析表明, 冬凌草 *TIFY* 家族 12 个成员分为 PPD (IrTIFY2)、ZML (IrTIFY3/8/10)、TIFY (IrTIFY7/12) 和 JAZ (IrTIFY1/4/5/6/9/11) 4 个亚家族, 进化上与同为唇形科的丹参 (*Salvia miltiorrhiza*) 亲缘关系最近。(7) RT-qPCR 分析结果显示冬凌草 *TIFY* 家族 12 个成员在不同组织中的表达量均表现为叶>茎>根, 且大部分成员存在显著差异。【结论】*TIFY* 基因家族在冬凌草的生长发育过程中可能发挥重要的调控作用, 并且可能参与调控冬凌草次生代谢产物的合成, 为进一步深入研究冬凌草 *TIFY* 基因家族的功能奠定基础 and 提供了思路。

关键词: 冬凌草; *TIFY* 基因家族; 生物信息学分析; 表达分析

中图分类号: R286

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2024) 03-0290-12

Identification and Expressions of *TIFY* Family Based on the Full-Length Transcriptome in *Isodon rubescens*

LIAN Conglong, LAN Jinxu, YANG Jingfan, LI Jingjing, YANG Hao, CHEN Suiqing*

(School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine / Henan Key Laboratory of Chinese Medicine Resources and Chemistry / Collaborative Innovation Center of Research and Development on the Whole Industry

Chain of Yu-Yao, Zhengzhou, Henan 450046, China)

Abstract: 【Objective】*TIFY* protein is a key regulator of the JA signalling pathway and plays a significant regulatory role in plant growth and development, abiotic stress and the accumulation of secondary metabolites. The identification of the *TIFY* gene in *Isodon rubescens* provides a theoretical foundation for the breeding of *I. rubescens* with enhanced stress tolerance and the investigation of the synthesis of secondary metabolites. 【Method】*TIFY* family was identified using bioinformatic methods based on the full-length transcriptome database of *I. rubescens*. Expressions of the genes in tissues were analyzed by RT-qPCR. 【Result】(1) A total of 12 IrTIFYs genes were identified in *I. rubescens*. (2) The amino acid length was

收稿日期: 2023-10-11 修回日期: 2023-12-02

作者简介: 练从龙 (1988—), 男, 博士, 讲师, 主要从事药用植物生理生态与分子生物学研究, E-mail: 770379183@qq.com

* 通信作者: 陈随清 (1965—), 男, 博士, 教授, 主要从事中药资源与质量评价研究, E-mail: chsq@hactcm.edu.cn

基金项目: 河南省科技研发计划联合基金项目 (优势学科培育类) (232301420078); 河南省中药材产业技术体系项目 (豫科项 (2022) 30 号); 中医药公共卫生服务补助专项 (豫财社 (2019) 40 号)

124—378, the molecular weight 13 924.89—39 692.38 Da, and the isoelectric point ranged from 5.05 to 9.69. All members were unstable proteins, except for IrTIFY10. IrTIFY proteins were all located in the nucleus and were hydrophilic proteins without signal peptides. (3) Structural analysis indicates that IrTIFY proteins lack transmembrane structure and that the most abundant secondary structure type is random coil. Furthermore, all TIFY proteins contain multiple phosphorylation sites. (4) The *IrTIFY* gene family had weak codon preference, with a slight tendency to use codons ending in A or U. (5) There were many light-, hormone-, and stress-responsive *cis*-elements in the IrTIFY gene family, but *cis*-elements were difference in numbers and types among different members. (6) Evolutionary tree analysis showed that the 12 members of the TIFY family were divided into four subfamilies: PPD (*IrTIFY2*), ZML (*IrTIFY3/8/10*), TIFY (*IrTIFY7/12*), and JAZ (*IrTIFY1/4/5/6/9/11*). They were closest to that of *Salvia miltiorrhiza* of *Labiaceae* family. (7) RT-qPCR analysis revealed that the expression of all 12 members of the *TIFY* family of *I. rubescens* in different tissues was as follows: leaves > stems > roots, and most of them were significantly different. 【Conclusion】 Based on the above results, it is hypothesised that the *TIFY* gene family plays an important regulatory role in the growth and development of *I. rubescens* and may be involved in the regulation of the synthesis of secondary metabolites of *I. rubescens*, which lays the foundation for further in-depth study of the function of the *TIFY* gene family in *I. rubescens* and provides an idea for the further study of the function of the *TIFY* gene family in *I. rubescens*.

Key words: *Isodon rubescens*; *TIFY* gene family; bioinformatics analysis; expression analysis

0 引言

【研究意义】冬凌草为唇形科香茶菜属植物碎米桠 [*Isodon rubescens* (Hemsl.) Hara], 为多年生草本或亚灌木植物, 气微香; 其干燥地上部分入药, 药材名为冬凌草, 并于 1977 年被收入《中华人民共和国药典》, 味苦、甘, 微寒; 归肺、胃、肝经; 具有清热解毒, 活血止痛功效; 用于咽喉肿痛, 症瘕痞块, 蛇虫咬伤^[1]。现代药理研究表明, 冬凌草主要活性成分冬凌草甲素具有广谱抗肿瘤、抗癌以及抗炎等作用, 如对急性扁桃体炎、慢性肝炎、气管炎、食管癌、肝癌、乳腺癌等均有缓解作用, 是目前抗癌药物研究的热点^[2]。因此, 随着分子生药学技术的发展, 对冬凌草甲素的生物合成相关调控基因的挖掘研究成为一个重要的研究方向。当前, 冬凌草相关基因研究主要集中在其代谢通路关键基因的挖掘^[3], 而其他可能间接调控的基因鲜见报道。以往研究表明, 冬凌草甲素主要分布于冬凌草腺毛中, 茉莉酸甲酯作为植物逆境处理激素, 可调控冬凌草的生长发育和腺毛的生长, 进而调节冬凌草的生理生态和次生代谢^[4]。而 TIFY 蛋白作为茉莉酸 (JA) 信号通路的关键调节因子, 响应茉莉酸甲酯诱导^[5], 推测其间接调控冬凌草甲素的合成。因此, 研究冬凌草 *TIFY* 基因家族的成员、基因表达和系统发育分析将为 *TIFY* 基因在冬凌草中的作用机制分析奠定基础, 且为进一步研究茉莉酸甲酯调控冬凌草甲素合成提供理论依据。【前人研究进展】TIFY 蛋白家族曾被称为锌指蛋白 (ZIM) 家族, 它是植物中一类特异性转录因子。*TIFY* 基因家族分为 4 个系统发育亚家族, 分别为 TIFY (苏氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸)、JAZ (茉莉酸 ZIM 结构域)、PPD

(PEAPOD) 和 ZML^[6]。以往研究表明 *TIFY* 基因家族在植物中分布广泛, 对调控植物的根、茎、叶、花的发育过程起重要作用; 影响植物次生代谢的合成; 响应多种生物胁迫和非生物胁迫, 如干旱胁迫、渗透胁迫、盐胁迫等^[7]。在盐处理下, 水稻 (*Oryza sativa*) 中 *OsTIFY11a/OsJAZ9* 的过表达显著提高水稻对盐的耐受性和脱水胁迫, 抑制 *OsJAZ9* 通过调节 JA 信号传导降低了耐盐性^[8]; Myc 蛋白是植物中茉莉酸信号传导的关键介质, 而 *TIFY* 基因家族中的 Jas 蛋白可与 Myc 蛋白结合, 进而参与植物激素信号的调控^[9]。于欣欣等^[10]研究发现人参 (*Panax ginseng*) *TIFY* 基因对人参生长发育有重要调控作用, 并且可能参与人参皂苷的生物合成; 巩永永等^[11]研究表明甜菜 (*Beta vulgaris*) *TIFY* 基因在非生物胁迫和激素应答方面具有高度的特异性和生物学功能, 一些甜菜 *TIFY* 基因在耐盐碱胁迫中发挥着巨大作用; 姚新转等^[12]研究发现茶树 (*Camellia sinensis*) *TIFY* 基因可能在保护茶树抵抗非生物胁迫方面发挥多功能作用。以上研究表明 *TIFY* 基因对植物逆境响应以及次生代谢产物的合成起着重要的调控作用。【本研究切入点】近年来, *TIFY* 基因家族在多种药用植物中被鉴定和分析, 如人参^[10]、杜仲 (*Eucommia ulmoides*)^[13]、铁皮石斛 (*Dendrobium officinale*)^[14]、甘草 (*Glycyrrhiza uralensis*)^[15] 等。但在冬凌草中 *TIFY* 家族相关分析及研究还有待深入进行。【拟解决的关键问题】利用冬凌草三代转录组数据, 以 *TIFY* 基因家族为研究对象, 对其家族进行成员鉴定和生物信息学预测分析, 明确其在冬凌草基因组中的结构特点与进化特征, 进一步通过实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 分析其在不同组织中的表达模式, 为进一步深入研究 *IrTIFYs* 的生物学功能

解析奠定基础,同时为冬凌草 *TIFY* 家族可能参与调控冬凌草甲素的合成研究提供思路。

1 材料与方法

1.1 材料

冬凌草采自河南省济源市,由河南中医药大学陈随清教授鉴定为唇形科香茶菜属植物冬凌草,将该植株培育于人工智能气候箱中,培养条件为营养土和蛭石体积比为 2:1、光周期 14L:10D、相对湿度 70%、培养温度 25℃。待植株长至 2 个月后,分别取冬凌草的根、茎和叶等组织作为 *TIFY* 基因家族的组织表达分析。

1.2 方法

1.2.1 冬凌草 *TIFY* 基因家族鉴定

使用 TBtools 软件对冬凌草三代转录组的所有蛋白序列进行分析,通过 TAIR 网站直接对拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) *TIFY* 基因家族进行分析,下载得到拟南芥 *TIFY* 的蛋白序列,进一步利用 TBtools 软件获取冬凌草 *TIFY* 的蛋白序列。利用 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>) 对冬凌草 *TIFY* 保守结构域进一步筛选,得到所需要的冬凌草 *TIFY* 蛋白序列。

1.2.2 冬凌草 *TIFY* 基因家族理化性质分析

利用在线分析工具 Protparam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析蛋白质理化性质,再利用 ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) 并选取 Kyte and Doolittle 算法,预测不同氨基酸中的蛋白亲疏水性。

1.2.3 冬凌草 *TIFY* 家族蛋白结构分析

蛋白质二级结构采用 SOPMA (https://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 在线软件分析; SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 确定蛋白质三级结构; TMHMM2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 分析蛋白质跨膜结构;蛋白保守结构序列比对采用 DNAMEN 7 软件进行;利用 Pfam (<https://pfam.xfam.org>) 分析 IrTIFYs 蛋白的结构域,并进一步采用 TBtools 软件对 IrTIFYs 结构域进行可视化处理;使用 MEME 网站 (<https://meme-suite.org/meme/>) 在线预测蛋白保守基序 (motif), motif 值设为 10,并使用 TBtools 软件^[16] 将保守基序与 IrTIFYs 进化树进行可视化处理。

1.2.4 冬凌草 *TIFY* 家族蛋白磷酸化、信号肽、亚细胞定位、密码子偏好性分析和启动子元件分析

NetPhos3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 分析蛋白质磷酸化位点; SignalP-5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 分析蛋白质信号肽; Plant-

mPLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>) 分析蛋白质亚细胞定位;利用 EMBOSS 软件中的程序在线分析软件 Cusp 和 Chips 分析密码子偏好性。启动子序列的获得基于 bioedit 软件对冬凌草 *TIFY* 家族 cDNA 序列和冬凌草基因组 (CNCBdb: CNP0002852) 序列进行比对,选取翻译起始密码子上游 2000 bp 序列作为启动子序列,进一步采用 Plantcare 在线网站 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 进行启动子元件预测^[17],并采用 TBtools 软件^[16] 作图进行可视化处理。

1.2.5 冬凌草 *TIFY* 家族蛋白进化树及蛋白互作预测分析

使用 MEGA6.0 软件^[18] 的 ClustalW 程序进行冬凌草、拟南芥、丹参 (*Salvia miltiorrhiza*)、杨树 (*Populus trichocarpa*) 和水稻的 *TIFY* 蛋白序列的多重比对;采用邻接法 (neighbor joining, NJ) 构建系统进化发育树,Bootstrap 值设为 1000,其余参数保持默认。最后生成的图形使用 Evolviewv2 (<https://www.evolgenius.info/evolview-v2/>) 进行美化^[19]。

1.2.6 冬凌草 RT-qPCR 分析

按照艾德莱公司的 RN33-PLANTpure 通用植物总 RNA 快速提取试剂盒的操作步骤提取总 RNA,进行凝胶电泳检测和 NanoDrop P330 检测仪测定不同组织总 RNA 浓度。进一步采用艾德莱公司的 PC70-TRUEscript RT MasterMix (OneStep gDNA Removal) 一步基因组清除反转录试剂盒将总 RNA 逆转录合成 cDNA, NanoDrop P330 检测浓度后于 -20℃ 保存备用。采用 DNAMAN 7 软件设计荧光定量引物,并送生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。进一步采用荧光定量 PCR 仪 (QuantStudio5.0),以冬凌草的 *UBQ* 基因为内参基因,对待检测的基因进行不同样本中的表达量进行分析。RT-qPCR 反应体系为 SYBR II Premix Ex *Taq*TM (2×) 10.0 μL; 上下游引物各 0.4 μL; 50 × ROX Reference Dye II 0.4 μL, cDNA 1.0 μL; ddH₂O 7.8 μL。PCR 反应程序参照 SYBR II Premix Ex *Taq*TM 试剂说明书进行。每个反应重复 3 次,采用 2^{-ΔΔCt} 法分析结果,并将表达量最大的作归一化处理。文中所用引物见表 1。

2 结果与分析

2.1 冬凌草 *TIFY* 基因家族鉴定及理化性质分析

利用比对分析,经过保守结构域确认,最终在冬凌草三代转录组中共鉴定得到 12 条冬凌草 *TIFY* 基因家族成员,分别命名为 *IrTIFY1*~*IrTIFY12*,并将序列提交至 NCBI (GenBank: PP133220~PP133231)。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列
Table 1 Primer sequences for RT-qPCR

基因名称 Gene name	正向引物序列 (5'-3') Forward primer sequence (5'-3')	反向引物序列 (5'-3') Reverse primer sequence (5'-3')
<i>UBQ</i>	CTGAGGCTTCGTGGAGGGAT	TGTAGTCTGCAAGAGTCCTT
<i>IrTIFY1</i>	TGTCACCCCTTTTCGTTACAC	AGTCATCGGAGGGCCATTTC
<i>IrTIFY2</i>	TTGATAAGCCGCTCCACCAG	TTTCCGCTCACCAGTTGTGT
<i>IrTIFY3</i>	CGAGAACTGGGATTCAGGCA	TGTTGCGCCACATTAACCCA
<i>IrTIFY4</i>	ACGGAAAGCATCTCTGGCTC	ACCTGCATTCTTGCTCTGGT
<i>IrTIFY5</i>	ACGCTTGGCTTCACTCCTAC	CCTCGGGCTTAATCTGGGTC
<i>IrTIFY6</i>	GCCGCTCCAAATTCAGAGGA	TCCGGAGGGTCAACTACCA
<i>IrTIFY7</i>	GCGATCATATCGTTGGCGAG	GCGATCTCTTCATCGACAGC
<i>IrTIFY8</i>	GGGGAACAGATGGCAATGGA	CGGCGCATCATTGGAGTAGA
<i>IrTIFY9</i>	AGGAGGCAACCAGGAAATC	CATTGAGGGCTGGGGTTGAG
<i>IrTIFY10</i>	TATGATGCGACGTGGACCAG	TAATGGCGTTTGCAGGAGGT
<i>IrTIFY11</i>	ATTACGTCGAGGGCCATTCC	ACTCGTGCTCGGGTTCATTT
<i>IrTIFY12</i>	TGGGTAGTTTGAGCAGGCAG	CCGGCTCCAATCCAATCAA

冬凌草 TIFY 蛋白质序列长度为 124~378 aa；分子大小为 13 924.89~39 692.38 Da，等电点 5.05~9.69；不稳定指数 37.71~68.06，其中 IrTIFY10 为稳定蛋白，其他 11 个为不稳定蛋白；结合 ProtScale 对 IrTIFYs 蛋白的亲水氨基酸分布进行在线预测，发现 IrTIFY 家族蛋白中亲水氨基酸分布比疏水氨基酸的分布要多，因此推测冬凌草 *TIFY* 家族中 12 个蛋白均

为亲水性蛋白（表 2）。

2.2 冬凌草 *TIFY* 家族蛋白结构分析

使用在线分析网站 SOPMA 分析 IrTIFYs 蛋白的二级结构组成结果表明（表 3），冬凌草 *TIFY* 家族所有成员蛋白的二级结构组成都是由四种类型构成的： α -螺旋、延伸链、 β -转角和无规卷曲。其中，无规则卷曲百分比最大（55.12%~77.51%）， β -转角最小（2.53%~5.78%）；除了 IrTIFY1 与 IrTIFY12 外，其余蛋白成员的延伸链占比少于 α -螺旋。如 IrTIFY2 蛋白中 α -螺旋占比 19.77%，延伸链占比 7.56%， β -转角占比 3.2%，无规卷曲占比 69.48%。

进一步利用 SWISS-MODEL 基于同源建模，以 5t0q.1.B（Protein TIFY 9）为模板进行建模，结果表明冬凌草 *TIFY* 家族蛋白的三级结构图所展示的结构分布与预测的二级结构组成相符（图 1）。

2.3 冬凌草 *TIFY* 家族蛋白磷酸化位点、信号肽、跨膜结构、亚细胞定位分析

蛋白质磷酸化是指通过激酶把磷酸从三磷酸腺苷或三磷酸鸟苷转移到特定的氨基酸上磷酸化底物，这个反应主要在丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸上进行^[20]。冬凌草 IrTIFYs 蛋白的磷酸化位点分析表明，12 个成员中都包含了丝氨酸和苏氨酸的磷酸化位点，除 IrTIFY5/6/8/11 蛋白外，其余蛋白质均包含酪氨酸的磷酸化位点。IrTIFYs 蛋白存在 18~59 个磷酸化位点不等，其中丝氨酸位点最多，为 13~41 个，苏氨酸次之（2~20 个），酪氨酸不含或仅含 1~3 个（表 4、图 2）。以上结果表明冬凌草 *TIFY* 家族不同

表 2 冬凌草 *TIFY* 家族蛋白理化性质分析
Table 2 Physicochemical properties of *TIFY* family proteins in *I. rubescens*

基因名称 Gene name	转录组基因ID Gene ID in transcriptome	长度 Length/aa	分子量 Molecular weight/Da	等电点 Isoelectric point	不稳定指数 Instability index	脂肪族指数 Aliphatic index	亲水性平均值 Grand average of hydropathicity
<i>IrTIFY1</i>	D-tissues_transcript_12000	356	37,515.67	9.01	58.96	76.97	-0.169
<i>IrTIFY2</i>	D-tissues_transcript_12412	344	37,381.18	8.09	50.35	69.22	-0.633
<i>IrTIFY3</i>	D-tissues_transcript_13824	343	37,606.01	5.05	49.03	66.56	-0.567
<i>IrTIFY4</i>	D-tissues_transcript_14652	299	31,555.55	8.59	56.46	58.83	-0.438
<i>IrTIFY5</i>	D-tissues_transcript_15941	229	24,182.28	7.81	53.98	72.71	-0.315
<i>IrTIFY6</i>	D-tissues_transcript_16425	173	18,692.28	8.99	41.53	75.78	-0.409
<i>IrTIFY7</i>	D-tissues_transcript_17017	124	13,924.89	9.69	66.65	77.26	-0.473
<i>IrTIFY8</i>	D-tissues_transcript_27842	299	32,514.88	6.17	40.31	58.66	-0.819
<i>IrTIFY9</i>	D-tissues_transcript_48324	250	27,235.7	8.93	68.06	66.4	-0.634
<i>IrTIFY10</i>	D-tissues_transcript_51903	300	32,486.03	5.63	37.71	59.2	-0.761
<i>IrTIFY11</i>	D-tissues_transcript_53470	273	29,436.81	9.15	56.22	65.79	-0.778
<i>IrTIFY12</i>	D-tissues_transcript_57396	378	39,692.38	9.22	46.47	46.8	-0.815

表 3 冬凌草 *TIFY* 家族蛋白二级结构分析
Table 3 Secondary structure of *TIFY* family proteins in *I. rubescens*

基因名称 Gene name	转录组基因ID Gene ID in transcriptome	α -螺旋 α -helix/%	延伸链 Extension/%	β -转角 β -angle/%	无规则卷曲 Random curling/%
<i>IrTIFY1</i>	D-tissues_transcript_12000	11.24	12.36	2.53	73.88
<i>IrTIFY2</i>	D-tissues_transcript_12412	19.77	7.56	3.2	69.48
<i>IrTIFY3</i>	D-tissues_transcript_13824	22.45	10.79	5.83	60.93
<i>IrTIFY4</i>	D-tissues_transcript_14652	12.04	11.37	2.68	73.91
<i>IrTIFY5</i>	D-tissues_transcript_15941	17.9	12.66	4.37	65.07
<i>IrTIFY6</i>	D-tissues_transcript_16425	23.12	13.29	5.78	57.8
<i>IrTIFY7</i>	D-tissues_transcript_17017	27.56	11.81	5.51	55.12
<i>IrTIFY8</i>	D-tissues_transcript_27842	19.06	11.71	4.68	64.55
<i>IrTIFY9</i>	D-tissues_transcript_48324	20	7.6	4	68.4
<i>IrTIFY10</i>	D-tissues_transcript_51903	18	13.33	4.67	64
<i>IrTIFY11</i>	D-tissues_transcript_53470	13.92	6.59	2.93	76.56
<i>IrTIFY12</i>	D-tissues_transcript_57396	7.41	12.43	2.65	77.51

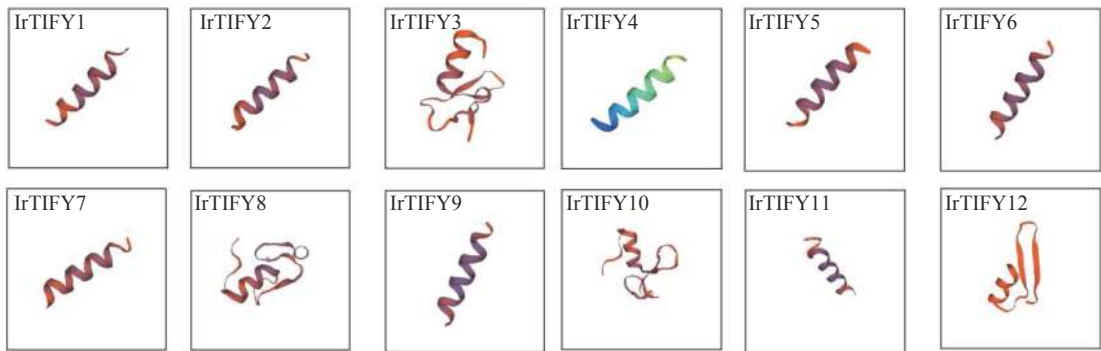


图 1 冬凌草 *TIFY* 家族蛋白三级结构预测分析
Fig. 1 Predicted tertiary structure of *TIFY* family proteins in *I. rubescens*

成员之间差异的磷酸化位点可能赋予不同成员之间差异的生物学修饰功能。

利用 SignalP-5.0 对 IrTIFYs 蛋白中的信号肽进行分析, 结果表明 IrTIFYs 蛋白的信号肽分值均低于 0.5, 说明 IrTIFYs 蛋白不含有信号肽, 因此推测 IrTIFYs 蛋白均不属于分泌蛋白 (表 4)。跨膜结构分析表明 IrTIFYs 蛋白全部分布在膜外区, 没有跨膜区域和跨膜结构 (表 4)。亚细胞定位分析表明冬凌草 IrTIFYs 蛋白都存在于细胞核, 这与 *TIFY* 家族作为转录因子的功能相符合 (表 4)。

2.4 冬凌草 *TIFY* 家族蛋白结构域分析

采用 DNAMEN 软件对冬凌草 *TIFY* 蛋白序列的保守结构域进行比对分析, 结果表明: 总体上 *TIFY* 家族蛋白存在两个保守区域, 分别为 tify 区域和 Jas_motif, 其中 TIFY12 蛋白不含有 Jas_motif 保守结构域。然而, 除保守结构域外, 其他部分序列差

异较大, 可能在冬凌草 *TIFY* 家族不同成员功能分化上发挥一定的作用 (图 2)。利用 Pfam 软件分析和 TBtools 软件的可视化对冬凌草 IrTIFYs 蛋白的结构域分析结果表明 (图 3): 12 个蛋白都存在 tify 结构域, 均属于 *TIFY* 家族成员。*TIFY* 家族蛋白按其保守域的成分可划分为: TIFY、JAZ、PPD 和 ZML4 个亚家族。其中 IrTIFY3、IrTIFY8 和 IrTIFY10 蛋白均存在 tify、Jas_motif、CCT、GATA 结构域; IrTIFY12 蛋白只存在 tify 结构域; 其余 7 个 IrTIFY 蛋白均存在 tify、Jas_motif 结构域。

2.5 冬凌草 *TIFY* 家族蛋白保守基序分析

使用 MEME 及 TBtools 软件对冬凌草 IrTIFYs 蛋白的保守基序分析, 结果表明 (图 4) 冬凌草每个 *TIFY* 家族成员蛋白中至少含有 3 个基序, 其中 Motif 1 存在于所有成员中, Motif 2 不存在于 IrTIFY12 蛋白中, Motif 3 与 Motif 5 仅存在于 IrTIFY3/8/10 中;

表 4 冬凌草 *TIFY* 家族蛋白磷酸化位点、信号肽、跨膜结构和亚细胞定位分析

Table 4 Phosphorylation site, signal peptide, transmembrane structure, and subcellular localization of *TIFY* family proteins in *I. rubescens*

基因名称 Gene name	磷酸化位点 Phosphorylation sites	丝氨酸位点 Serine site/个	苏氨酸位点 Threonine site/个	酪氨酸位点 Tyrosine site/个	信号肽值 Signal peptides value	有无信号肽 Signal peptides	跨膜位置 Trans membrane localization	跨膜结构 Trans- membrane domain	亚细胞定位 Subcellular localization
<i>IrTIFY1</i>	54	32	20	2	0.001	无 No	膜外 Outside	0	细胞核 Nuclear
<i>IrTIFY2</i>	44	25	16	3	0.0007	无 No	膜外 Outside	0	细胞核 Nuclear
<i>IrTIFY3</i>	38	20	17	1	0.0007	无 No	膜外 Outside	0	细胞核 Nuclear
<i>IrTIFY4</i>	36	29	6	1	0.0005	无 No	膜外 Outside	0	细胞核 Nuclear
<i>IrTIFY5</i>	20	18	2	0	0.0013	无 No	膜外 Outside	0	细胞核 Nuclear
<i>IrTIFY6</i>	18	14	4	0	0.0018	无 No	膜外 Outside	0	细胞核 Nuclear
<i>IrTIFY7</i>	18	13	4	1	0.0014	无 No	膜外 Outside	0	细胞核 Nuclear
<i>IrTIFY8</i>	27	18	9	0	0.0011	无 No	膜外 Outside	0	细胞核 Nuclear
<i>IrTIFY9</i>	32	25	5	2	0.0012	无 No	膜外 Outside	0	细胞核 Nuclear
<i>IrTIFY10</i>	33	20	10	2	0.0022	无 No	膜外 Outside	0	细胞核 Nuclear
<i>IrTIFY11</i>	38	32	6	0	0.0035	无 No	膜外 Outside	0	细胞核 Nuclear
<i>IrTIFY12</i>	59	41	16	2	0.0011	无 No	膜外 Outside	0	细胞核 Nuclear

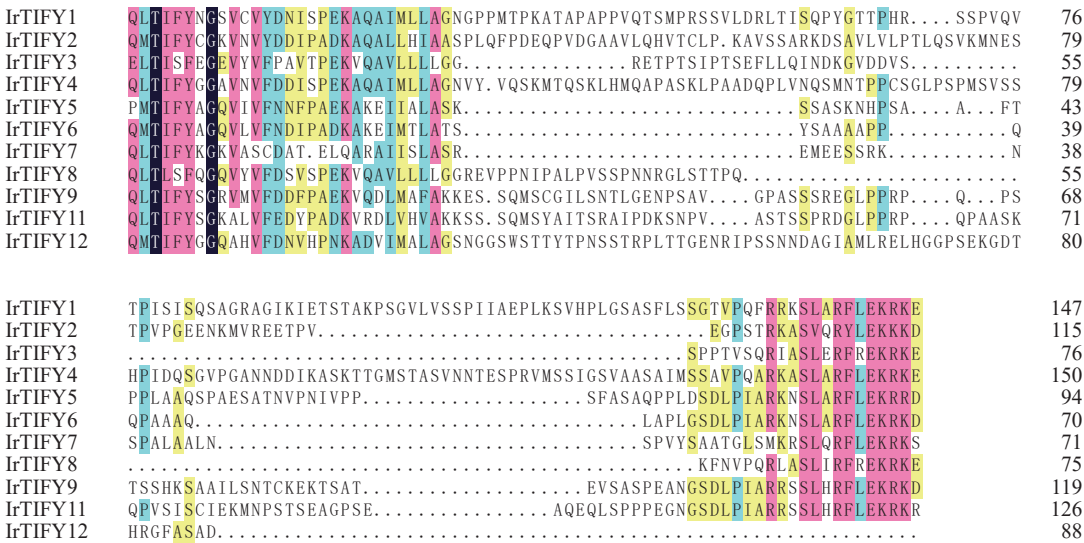


图 2 冬凌草 *TIFY* 家族蛋白保守结构域比对分析

Fig. 2 Alignment analysis on conserved domain of *TIFY* family proteins of *I. rubescens*

Motif 4 仅存在于 IrTIFY9/11/6/5 中；Motif 6 仅存在于 IrTIFY1/8 中；Motif 7 仅存在于 IrTIFY5/6 中；Motif 8 仅存在于 IrTIFY1/4 中；Motif 9 仅存在于 IrTIFY3/4 中；Motif 10 仅存在于 IrTIFY1/3/8/10 中。结合 IrTIFYs 蛋白的保守结构域分析表明 Motif 1 为 IrTIFYs 蛋白的共有特征性结构域，即 tify 结构域；JAZ 亚家族均含有 Motif 1、Motif 2 和 Motif 4 基序；ZML 亚家族均含有 Motif 1、Motif 2、Motif 3 和 Motif 5 基序；其余 5 个结构域不均匀地分布在 IrTIFYs 蛋白中。

2.6 冬凌草 *TIFY* 家族密码子偏好性分析

密码子作为核酸和蛋白质之间的纽带，可以用来推断基因组内部或基因组之间的进化关系，而不同种类或同一种类的基因对密码子使用有不同的偏好模式^[21]。对 *IrTIFY* 基因家族中的 12 条核苷酸序列中密码子 GC 的总含量（GC）以及同义密码子第一位（GC1s）、第二位（GC2s）与第三位（GC3s）的 GC 含量进行分析结果表明（表 5）：在 12 条 *IrTIFYs* 基因序列的 GC、GC1s、GC2s 和 GC3s 的均值分别为 45.28%、44.64%、44.37% 和 46.85%，均小

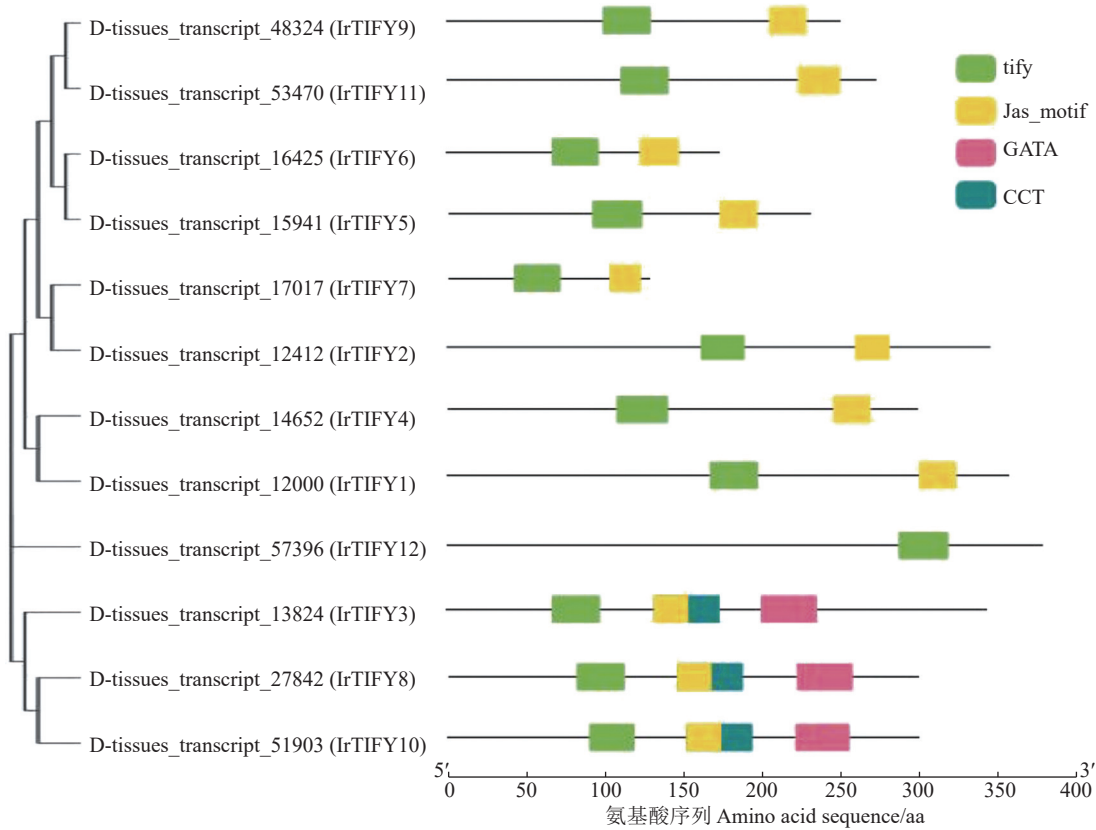


图 3 冬凌草 *TIFY* 家族蛋白结构域可视化分析

Fig. 3 Visualization of conserved protein domain of *TIFY* family proteins in *I. rubescens*

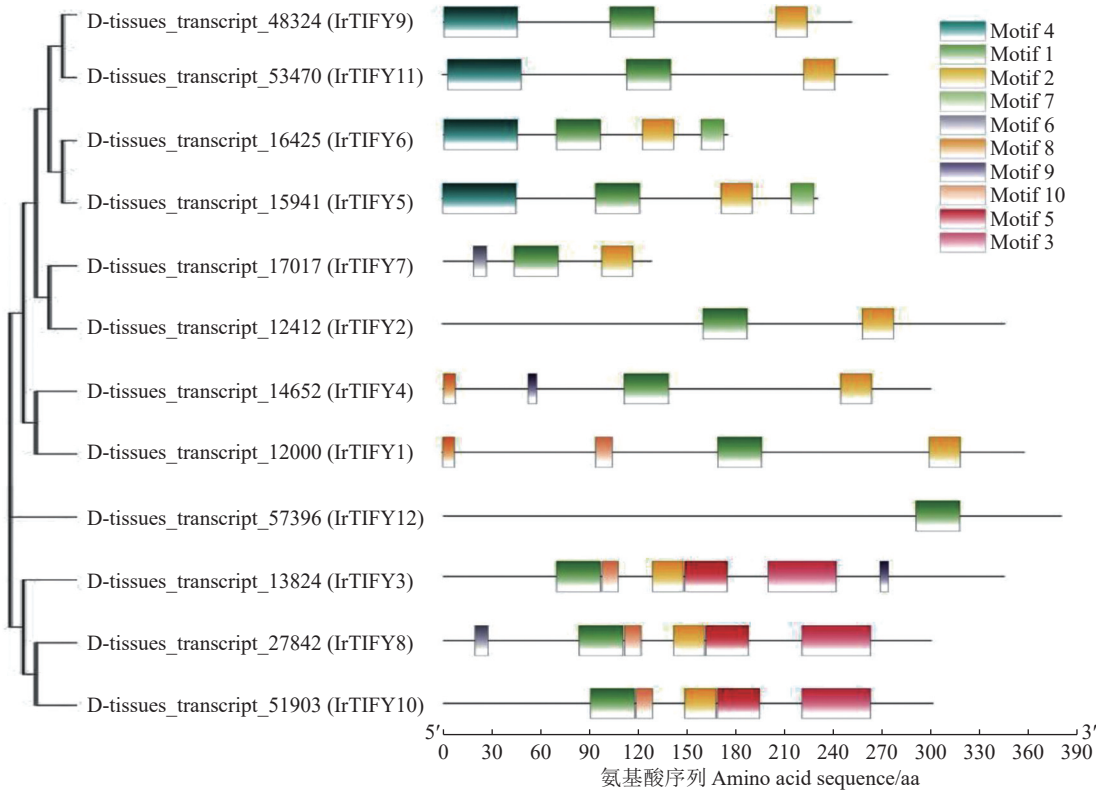


图 4 冬凌草 *TIFY* 家族蛋白保守基序

Fig. 4 Schematic conserved motif of *TIFY* family proteins in *I. rubescens*

于 50%，表明冬凌草 *TIFY* 家族的基因更偏向于 A 或 U 结尾的密码子。

有效密码子数（ENC）反映了密码子偏离随机选择的结果，它是对同义密码子非均衡使用偏好程度的一个重要指标，ENC 数值在 20~61，可以通过比较 ENC 值来确定基因表达的相对高低；ENC≤35 表示密码子有较强的偏好性，而 ENC>35 则表示密码子偏好性较弱^[22]。结果显示（表 5）：冬凌草 *TIFY* 家族成员的 ENC 数值为 50.617~60.714 个，平均值为 55.247 个，说明冬凌草 *TIFY* 家族基因的密码子偏好性较弱。

2.7 冬凌草 TIFY 基因家族启动子元件分析

基于冬凌草的基因组数据，分别获得冬凌草 *TIFY* 基因家族成员起始密码子（ATG）前面 2 000 bp 序列作为成员的启动子序列，对其启动子元件分析表明（图 5），冬凌草 *TIFY* 家族成员的启动子中存在多个光响应元件、激素响应元件和逆境响应元件等，但不同成员之间的元件存在差异。其中 12 个成员中均含有多个光响应元件；在响应激素调控方面：*IrTIFY1*、*IrTIFY2*、*IrTIFY3*、*IrTIFY4*、*IrTIFY7*、*IrTIFY8*、*IrTIFY11* 和 *IrTIFY12* 含有茉莉酸甲酯（MeJA）响应元件；*IrTIFY4*、*IrTIFY5*、*IrTIFY8*、*IrTIFY9* 和 *IrTIFY10* 含有水杨酸（Salicylic acid）响应元件；*IrTIFY2*、*IrTIFY3*、*IrTIFY4*、*IrTIFY5*、*IrTIFY6*、*IrTIFY7*、*IrTIFY8*、*IrTIFY9*、*IrTIFY10*、*IrTIFY11* 和 *IrTIFY12* 含有脱落酸（Absciscic acid）响应元件；*IrTIFY1*、*IrTIFY2*、*IrTIFY3*、*IrTIFY5*、*IrTIFY6*、

IrTIFY7 和 *IrTIFY10* 含有赤霉素（Gibberellin）响应元件；*IrTIFY2*、*IrTIFY5*、*IrTIFY11* 和 *IrTIFY12* 含有生长素（Auxin）响应元件等。在逆境胁迫方面：*IrTIFY5*、*IrTIFY8*、*IrTIFY11* 和 *IrTIFY12* 响应干旱胁迫（Drought-inducibility）；*IrTIFY5*、*IrTIFY8*、*IrTIFY10* 和 *IrTIFY11* 含有逆境响应元件（Defense and stress responsiveness）；*IrTIFY1*、*IrTIFY3*、*IrTIFY4*、*IrTIFY6*、*IrTIFY7*、*IrTIFY8*、*IrTIFY9* 和 *IrTIFY10* 含有响应低温胁迫元件（Low-temperature responsiveness）等。此外，部分成员还含有类黄酮合成调控元件（*IrTIFY1*）；分生组织表达元件（*IrTIFY3*、*IrTIFY6*、*IrTIFY12*）；胚乳特异表达元件（*IrTIFY10*）。综上，启动子元件分析表明，冬凌草 *TIFY* 家族不同成员之间存在差异元件，且部分成员还存在特异性元件，表明 *IrTIFY* 家族不同成员在功能上存在潜在的分化，可能行使不同的生物学功能，进而调控冬凌草的生长发育过程。

2.8 冬凌草 TIFY 家族成员系统进化分析

将冬凌草的 12 个成员蛋白序列与拟南芥、水稻、杨树和丹参中的 *TIFY* 家族成员蛋白序列进行进化树分析，结果（图 6）表明 *TIFY* 家族同样分为 4 个亚家族，分别为 *TIFY*、*JAZ*、*PPD* 和 *ZML*，其中 *TIFY* 蛋白又分为两个分支为 *TIFY I* 和 *TIFY II*，*JAZ* 分为 5 个分支，分别为 *JAZ I*、*JAZ II*、*JAZ III*、*JAZ IV* 和 *JAZ V*。冬凌草 *TIFY* 家族成员蛋白分布在各个进化树分支中，其分布为 *PPD*（*IrTIFY2*）和 *ZML*（*IrTIFY3/8/10*），*TIFY* 又分为两个分支为 *TIFY*

表 5 冬凌草 TIFY 家族蛋白密码子偏好性分析
Table 5 Codon bias of TIFY family proteins in I. rubescens

基因名称 Gene name	转录组基因号 Gene ID in transcriptome	有效密码子数 ENC/个	GC/%	GC1s/%	GC2s/%	GC3s/%
<i>IrTIFY1</i>	D-tissues_transcript_12000	50.869	44.06	47.06	44.85	40.26
<i>IrTIFY2</i>	D-tissues_transcript_12412	55.717	46.92	45.85	50.19	44.72
<i>IrTIFY3</i>	D-tissues_transcript_13824	59.099	45.66	46.24	42.37	48.39
<i>IrTIFY4</i>	D-tissues_transcript_14652	54.066	43.83	43.44	39.62	48.45
<i>IrTIFY5</i>	D-tissues_transcript_15941	55.686	48.84	47.13	52.27	47.13
<i>IrTIFY6</i>	D-tissues_transcript_16425	52.629	46.55	44.21	44.21	51.23
<i>IrTIFY7</i>	D-tissues_transcript_17017	54.526	43.25	39.22	37.93	52.59
<i>IrTIFY8</i>	D-tissues_transcript_27842	58.699	44.06	42.25	48.49	41.45
<i>IrTIFY9</i>	D-tissues_transcript_48324	50.617	40.31	37.7	42.67	40.58
<i>IrTIFY10</i>	D-tissues_transcript_51903	53.436	49.66	50.77	50.26	47.96
<i>IrTIFY11</i>	D-tissues_transcript_53470	56.905	43.92	42.18	41.19	48.39
<i>IrTIFY12</i>	D-tissues_transcript_57396	60.714	46.35	49.59	38.39	51.07

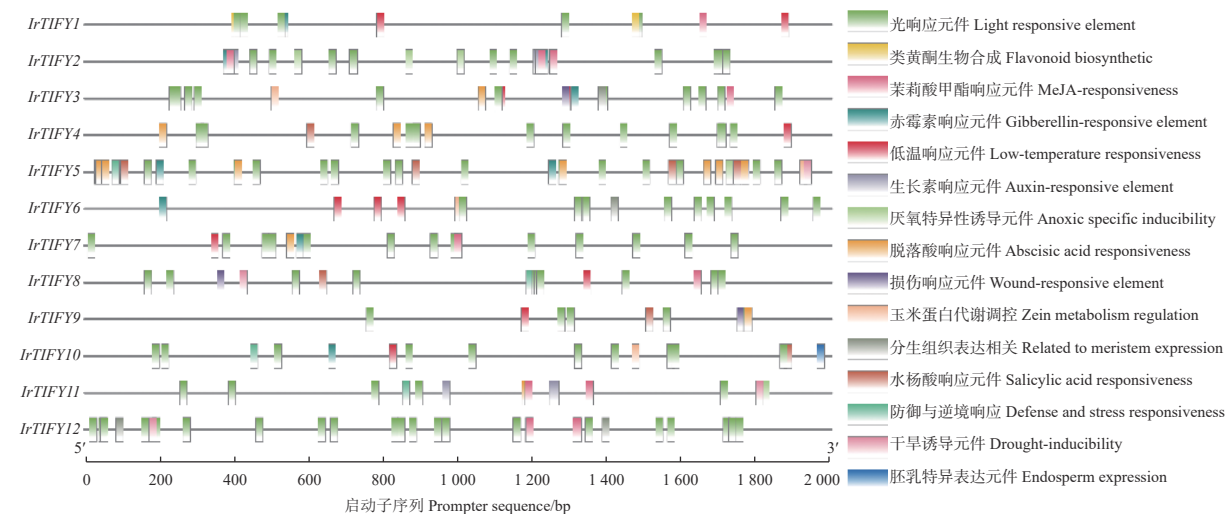
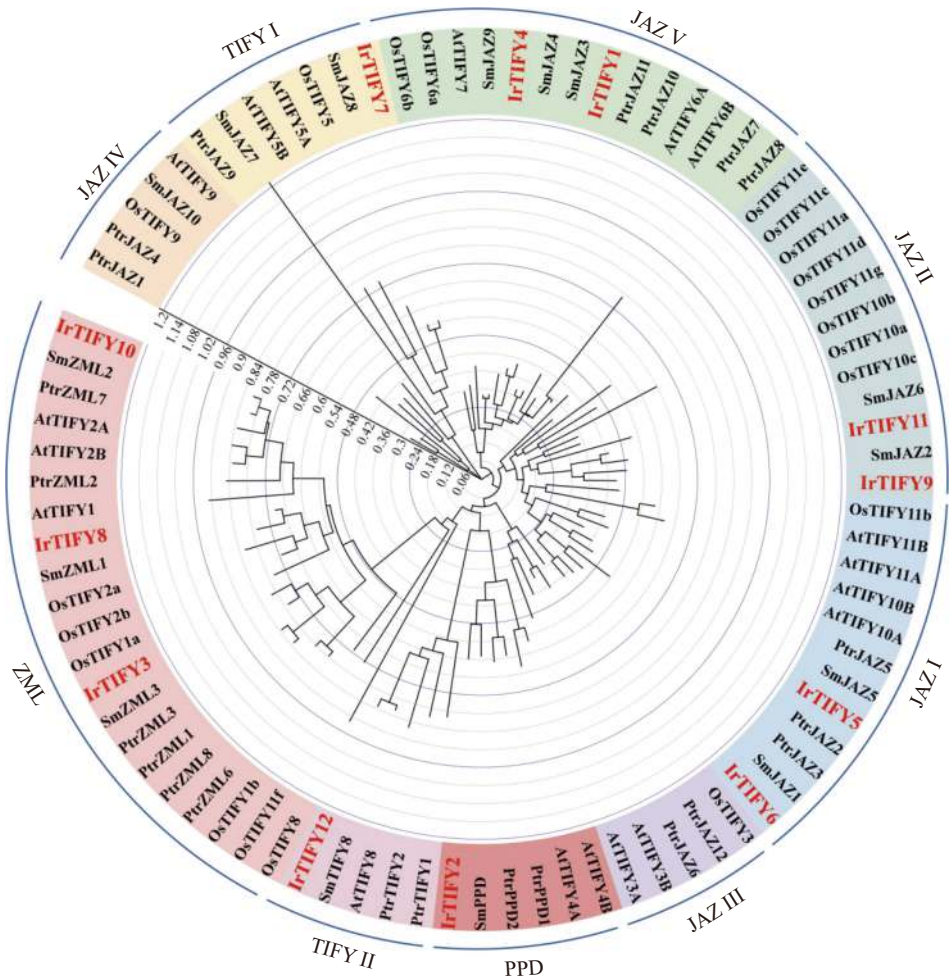


图 5 冬凌草 *TIFY* 家族成员启动子元件分析

Fig. 5 *Cis*-elements analysis of *TIFY* family promoters in *I. rubescens*

I (IrTIFY7) 和 TIFY II (IrTIFY12), JAZ 分为 5 个分支, 分别为 JAZ I (IrTIFY5/6)、JAZ II (IrTIFY9/11)、JAZ III、JAZ IV 和 JAZ V (IrTIFY1/4)。此

外, 从图中可以看出, 冬凌草中的 *TIFY* 基因家族的每一个成员均与丹参中相应的成员关系最近, 这表明冬凌草与丹参同为唇形科植物, 亲缘关系较近。



Ir: 冬凌草; At: 拟南芥; Sm: 丹参; Os: 水稻; Ptr: 杨树。

Ir: *I. rubescens*; At: *Arabidopsis thaliana*; Sm: *Salvia miltiorrhiza*; Os: *Oryza sativa*; Ptr: *Populus trichocarpa*.

图 6 冬凌草、拟南芥、丹参和水稻 *TIFY* 家族成员的系统树分析

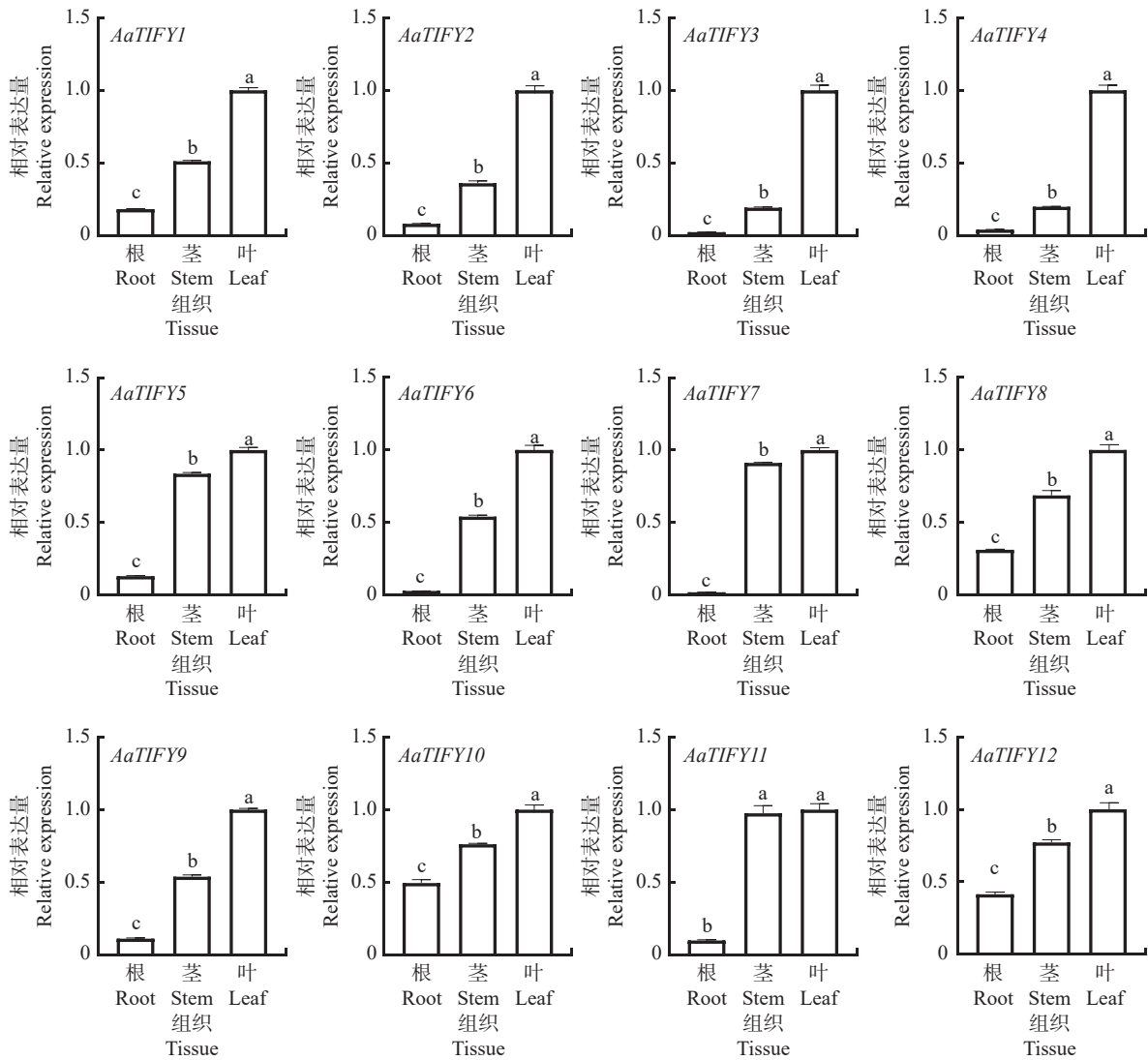
Fig. 6 Phylogenetic trees of *TIFY* family members in *I. rubescens*, *A. thaliana*, *S. miltiorrhiza*, *O. sativa*, and *P. trichocarpa*

然而，丹参比冬凌草中多了一个成员 SmJAZ7 蛋白，这可能是物种间存在的差异导致，也不排除与冬凌草所用的全长转录组数据的局限性有关。

2.9 冬凌草 *TIFY* 家族在不同组织部位中的表达分析

为了探究冬凌草 *TIFY* 基因家族在冬凌草不同组织器官的表达模式，对 12 个成员进行不同组织部位

的 RT-qPCR 分析结果表明（图 7）：*TIFY* 家族的 12 个成员在根、茎、叶中表现出差异的表达水平，其中在叶中的表达量最高，茎中次之，根中表达最低；除 *IrTIFY11* 在叶和茎中的表达相近之外，其他成员在根、茎、叶的不同组织部位中的表达存在显著差异。



不同小写字母代表在 0.05 水平差异显著。

Data with different lowercase letters represent significant differences($P<0.05$).

图 7 冬凌草 *TIFY* 家族成员的不同组织表达分析

Fig. 7 Expressions of *TIFYs* in different tissues of *I. rubescens*

3 讨论与结论

TIFY 基因家族在植物中的分布非常广泛，是植物特有转录因子，也是 JA 信号通路的关键调节因子，参与调节许多植物的生物学过程，例如生长发育、防御和应激反应、生育力和繁殖以及次生代谢物的生物合成^[7]。现阶段，*TIFY* 基因家族在多种物种中已经得到鉴定和进行了相关研究。随着更多植

物中 *TIFY* 基因的鉴定，对 *TIFY* 基因的认识也逐渐加深，*TIFY* 基因的生物学功能也逐渐明确，但该家族在冬凌草中的研究未见报道。本研究基于冬凌草三代转录组数据库，利用生物信息学方法在冬凌草中鉴定获得冬凌草 *TIFY* 基因家族 12 个成员。理化性质分析显示，除 *IrTIFY10* 为稳定蛋白外，其余 11 个蛋白为不稳定蛋白；12 个成员蛋白均为亲水性蛋白；*IrTIFY3* 和 *IrTIFY8* 等电点小于 7，属于酸性蛋

白质, 其余 10 个蛋白均属于碱性蛋白质。IrTIFYs 无跨膜结构, 不含有信号肽, 基于信号肽是分泌性蛋白的决定性因子^[23], 推测 IrTIFYs 蛋白均为非分泌性蛋白; 亚细胞定位表明 IrTIFYs 蛋白均在细胞核, 这与转录因子在细胞核发挥作用相符。磷酸化位点分析表明 IrTIFYs 蛋白有丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸等多个磷酸化位点, 说明 IrTIFYs 蛋白活性可能受到不同程度的磷酸化修饰的调节, 且不同成员的磷酸化水平存在差异。

以往研究表明, JAZ 蛋白为不含 DNA 结合结构域的阻遏蛋白, 因此必须依赖于蛋白间的相互作用来行使功能, 其结构除包含 TIFY 结构域外, 还存在 Jas 结构域, 该结构域可与 MYC2 蛋白发生互作, 能参与到 JA 信号传导途径中, 还可以与 MYB、EIN3、EIL1 等转录因子互作^[7, 24]。对冬凌草 TIFY 家族结构分析显示, 12 个 IrTIFYs 蛋白均含有 tify 结构域, 且除 IrTIFY2 和 12 蛋白外, 其余 10 个成员均含有 Jas 结构域; 启动子元件分析表明 *IrTIFY1*、*IrTIFY2*、*IrTIFY3*、*IrTIFY4*、*IrTIFY7*、*IrTIFY8*、*IrTIFY11*、*IrTIFY12* 启动子中含有 MeJA 响应元件, 推测大多数 IrTIFYs 蛋白可与 MYC2 蛋白发生互作, 参与到 JA 信号传导途径, 进而响应茉莉酸 (JA)、茉莉酸甲酯 (MeJA) 等的应激反应。此外, 对冬凌草的研究发现, 低剂量茉莉酸甲酯可以增加冬凌草的腺毛频度, 促进腺毛的生长, 使其具有更多的药物活性物质贮存空间, 从而可提高冬凌草甲素的积累量^[4], 推测冬凌草 TIFY 家族部分成员在介导茉莉酸甲酯调控冬凌草甲素的合成中发挥一定作用, 有待进一步研究。

TIFY 基因家族蛋白根据其保守结构域的组成, 分为 4 个亚家族: TIFY、JAZ、PPD 和 ZML。对冬凌草的保守结构域和保守基序分析表明, 10 个保守基序分布在不同的成员中, 这可能有助于 TIFY 蛋白功能的多样化; 结合进化树分析表明, 冬凌草 TIFY 家族 12 个成员同样分为 4 个亚家族, 分别为 PPD (*IrTIFY2*)、ZML (*IrTIFY3/8/10*)、TIFY (*IrTIFY7/12*) 和 JAZ (*IrTIFY1/4/5/6/9/11*), 这与以往 TIFY 在其他物种中的研究结果相符, 如铁皮石斛 (*Dendrobium officinale*)^[14]、黄瓜 (*Cucumis sativus*)^[25]等。不同成员的分类和进化分析为进一步揭示冬凌草 TIFY 基因家族中不同成员功能的差异和相似性奠定了重要的基础。荧光定量分析表明, TIFY 家族的 12 个成员在根、茎、叶中表现出差异的表达水平, 表明 TIFY 家族在不同组织部位中发挥的功能存在差异性; 且在叶中的表达量最高, 这与以往研究表明 TIFY 在调控植物叶片的生长发育中发挥重要作用结论相符。如

沙梨 (*Pyrus pyrifolia*) 中 *PpTIFY* 基因在叶片中的表达量最高, 而在果实成熟过程中表达量明显下降^[26]。过表达水稻 *OsTIFY11b*, 其转基因植株不仅表现在抽穗期叶片较长, 其叶鞘和茎中的淀粉和蔗糖含量显著增加^[27]。在拟南芥中, *AtTIFY4a* 和 *AtTIFY46b* 基因可调节叶片的大小以及限制叶片边缘的弯曲程度^[28]。此外, 结合实验室前期研究结果表明, 冬凌草甲素含量在不同组织中的含量模式为: 叶 > 茎 > 根^[29], 这与 TIFY 家族的基因表达趋势相符, 为进一步推测冬凌草 TIFY 家族部分成员可能参与介导冬凌草甲素的合成提供依据, 也为后期的研究方向提供了思路。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典-二部: 2020 年版 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [2] 谢涛, 杨正强, 徐文武, 等. 冬凌草化学成分、药理作用及临床应用研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53 (1): 317-325.
XIE T, YANG Z Q, XU W W, et al. Research progress on chemical constituents, pharmacological effects and clinical application of *Rabdosia rubescens* [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2022, 53(1): 317-325. (in Chinese)
- [3] 靳保龙. 冬凌草二萜合酶基因的克隆及其功能研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2019.
JIN B L. Cloning and functional study of the diterpene synthase genes from *Isodon rubescens* [D]. Wuhan: Hubei University of Chinese Medicine, 2019. (in Chinese)
- [4] 张济萌. 茉莉酸甲酯对冬凌草次生代谢的调控机理研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2021.
ZHANG J M. Regulation mechanism of methyl jasmonate on secondary metabolism of *Isodon rubescens* [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2021. (in Chinese)
- [5] 李永华, 肖能文, 刘勇波. 植物防御中茉莉酸信号通路抑制与终止的作用机制 [J]. 植物保护学报, 2021, 48 (3): 563-569.
LI Y H, XIAO N W, LIU Y B. Mechanisms of repression and termination of jasmonate signaling in plant defense [J]. *Journal of Plant Protection*, 2021, 48(3): 563-569. (in Chinese)
- [6] BAI Y H, MENG Y J, HUANG D L, et al. Origin and evolutionary analysis of the plant-specific TIFY transcription factor family [J]. *Genomics*, 2011, 98(2): 128-136.
- [7] 杨锐佳, 张中保, 吴忠义. 植物转录因子 TIFY 家族蛋白结构和功能的研究进展 [J]. 生物技术通报, 2020, 36 (12): 121-128.
YANG R J, ZHANG Z B, WU Z Y. Progress of the structural and functional analysis of plant transcription factor TIFY protein family [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2020, 36(12): 121-128. (in Chinese)
- [8] WU H, YE H Y, YAO R F, et al. *OsJAZ9* acts as a transcriptional regulator in jasmonate signaling and modulates salt stress tolerance in rice [J]. *Plant Science*, 2015, 232: 1-12.
- [9] ZHANG F, YAO J, KE J Y, et al. Structural basis of JAZ repression of MYC transcription factors in jasmonate signalling [J]. *Nature*, 2015, 525(7568): 269-273.
- [10] 于欣欣, 米要磊, 孟祥霄, 等. 人参 TIFY 基因家族鉴定与分析 [J].

- 中华中医药学刊, 2022, 40 (3): 72–76, 261–263.
- YU X X, MI Y L, MENG X X, et al. Identification and analysis of *TIFY* gene family of Renshen (*Panax ginseng* C. A. Meyer) [J]. *Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine*, 2022, 40(3): 72–76, 261–263. (in Chinese)
- [11] 巩永永, 端木慧子. 甜菜 *TIFY* 基因家族的全基因组鉴定与生物信息学分析 [J]. 中国农学通报, 2022, 38 (8): 17–24.
- GONG Y Y, DUANMU H Z. *TIFY* gene family in sugar beet: Whole genome identification and bioinformatics analysis [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2022, 38(8): 17–24. (in Chinese)
- [12] 姚新转, 张宝会, 陈湖芳, 等. 茶树 *TIFY* 基因家族鉴定及非生物胁迫下表达分析 [J]. 广西植物, 2022, 42 (12): 2044–2055.
- YAO X Z, ZHANG B H, CHEN H F, et al. Genome identification of *Camellia sinensis* *TIFY* gene family and its expression analysis of abiotic stress [J]. *Guihaia*, 2022, 42(12): 2044–2055. (in Chinese)
- [13] 刘俊, 陈玉龙, 刘燕, 等. 杜仲 *TIFY* 转录因子鉴定与表达分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27 (19): 165–174.
- LIU J, CHEN Y L, LIU Y, et al. Identification and expression analysis of *TIFY* transcription factor in *Eucommia ulmoides* [J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2021, 27(19): 165–174. (in Chinese)
- [14] 胡睿, 郭建秀, 郭小强, 等. 铁皮石斛 DoTIFY 基因家族全基因组鉴定及在原球茎发育过程中的表达 [J]. 生物学杂志, 2021, 38 (5): 53–58.
- HU R, GUO J X, GUO X Q, et al. Genome-wide identification and analysis of the *TIFY* gene family in *Dendrobium officinale* Kimura et Migo during protocorm development [J]. *Journal of Biology*, 2021, 38(5): 53–58. (in Chinese)
- [15] 秦振芬, 孟祥霄, 温东, 等. 乌拉尔甘草 *TIFY* 基因家族鉴定及调控分析 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2022, 24 (5): 1855–1864.
- QIN Z F, MENG X X, WEN D, et al. Genome-wide identification and regulatory analysis of the *TIFY* gene family in *Glycyrrhiza uralensis* [J]. *Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology*, 2022, 24(5): 1855–1864. (in Chinese)
- [16] CHEN C J, CHEN H, ZHANG Y, et al. TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1194–1202.
- [17] LESCOT M, DÉHAIS P, THIJS G, et al. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences [J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(1): 325–327.
- [18] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12): 2725–2729.
- [19] ZHANG H K, GAO S H, LERCHER M J, et al. EvolView, an online tool for visualizing, annotating and managing phylogenetic trees [J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(W1): W569–W572.
- [20] 王晨玮. 磷酸化蛋白质组数据整合及分析 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2020.
- WANG C W. Data integration and analysis of phosphoproteome [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2020. (in Chinese)
- [21] 周慧琦. 基因组 GC 含量与碱基、密码子和氨基酸使用偏好的关系 [D]. 成都: 电子科技大学.
- ZHOU H Q. Analysis of the relationship between genomic GC content and patterns of base usage, Codon usage and amino acid usage in prokaryotes [D]. Chengdu: University of Electronic Science and Technology of China. (in Chinese)
- [22] 郭玉平, 单天雷, 袁延超, 等. 不同作物 FAD2 基因密码子偏好性分析 [J]. 山东农业科学, 2013, 45 (7): 24–28, 32.
- GUO Y P, SHAN T L, YUAN Y C, et al. Analysis of Codon usage bias of *FAD2* gene in different crops [J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2013, 45(7): 24–28, 32. (in Chinese)
- [23] 张维洵, 潘小勇, 沈红斌. 基于深度学习与领域规则建模的蛋白质信号肽及其切割位点预测 [J]. 南京理工大学学报, 2020, 44 (3): 278–287.
- ZHANG W X, PAN X Y, SHEN H B. Predicting protein signal peptides and their cleavage sites based on deep learning and domain rule modeling [J]. *Journal of Nanjing University of Science and Technology*, 2020, 44(3): 278–287. (in Chinese)
- [24] WANG W J, LIU G S, NIU H X, et al. The F-box protein CO11 functions upstream of *MYB305* to regulate primary carbohydrate metabolism in tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. TN90) [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(8): 2147–2160.
- [25] DAI Z N, DONG S Y, MIAO H, et al. Genome-wide identification of *TIFY* genes and their response to various pathogen infections in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. *Scientia Horticulturae*, 2022, 295: 110814.
- [26] MA Y J, SHU S S, BAI S L, et al. Genome-wide survey and analysis of the *TIFY* gene family and its potential role in anthocyanin synthesis in Chinese sand pear (*Pyrus pyrifolia*) [J]. *Tree Genetics & Genomes*, 2018, 14(2): 25.
- [27] HAKATA M, KURODA M, OHSUMI A, et al. Overexpression of a rice *TIFY* gene increases grain size through enhanced accumulation of carbohydrates in the stem [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2012, 76(11): 2129–2134.
- [28] WHITE D W R. PEAPOD regulates lamina size and curvature in *Arabidopsis* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(35): 13238–13243.
- [29] LIAN C L, LAN J X, ZHANG B, et al. Molecular cloning and functional analysis of IrUGT86A1-like gene in medicinal plant *Isodon rubescens* (Hemsl.) Hara [J]. *Life*, 2022, 12(9): 1334.

(责任编辑: 林海清)