

沙棘TCP基因家族鉴定与*HrTCP12*的功能初探

王婷 秦德彬 安新民*

(林木遗传育种全国重点实验室, 林木育种与生态修复国家工程中心, 林木分子设计育种高精尖创新中心,
林木花卉遗传育种教育部重点实验室, 树木花卉育种生物工程国家林业和草原局重点实验室,
生物科学与技术学院, 北京林业大学, 北京 100083)

摘要 沙棘(*Hippophae rhamnoides* L.)作为药食同源的重要植物,其果实在多个领域都有极高的利用价值。近年来,对经济树种的分枝进行改良是提高果实产量的一个重要途径。而TCP基因家族在调控生长发育及逆境响应中具有关键作用,其家族成员在植物分枝发育中有着重要作用。该研究通过生物信息学结合实验验证,系统鉴定了沙棘的TCP基因家族,并解析了其功能特性。该研究基于基因组数据筛选出29个沙棘TCP基因,并通过进化分析将其分为Class I(PCF亚族)和Class II(CYC/TB1亚族及CIN亚族)。研究发现,Class II亚族的TCP结构域碱性区比Class I亚族多4个保守氨基酸。染色体定位显示,沙棘TCP家族成员在染色体上分布不均,理化性质分析表明沙棘TCP家族多数蛋白呈亲水性且定位于细胞核。启动子分析发现了在沙棘TCP家族成员的启动子中,光响应、激素(如ABA)及胁迫相关顺式元件富集,暗示了沙棘TCP家族参与多重调控网络。共线性分析揭示了沙棘TCP基因与拟南芥、枣存在广泛进化保守性,且家族扩张主要由全基因组复制/片段复制驱动的跨染色体重复主导。组织特异性表达显示,CYC/TB1亚族基因*HrTCP12*在刺和侧芽中高表达,在其余部位表达量较低,暗示其调控分枝发育的功能。亚细胞定位证实*HrTCP12*和*HrTCP18*主要定位于细胞核,符合转录因子特性。在84k杨中过表达*HrTCP12*显著抑制杨树分生组织活性基因*PagWUS1/2*的表达,初步验证了其通过抑制侧芽生长调控植物分枝的保守机制。该研究在全基因组范围内鉴定了沙棘TCP基因家族成员,并对CYC/TB1亚族基因进行了表达模式分析,发现了其成员具有明显的组织特异性表达特征,同时发现了*HrTCP12*抑制杨树分生组织活性基因表达,为利用基因工程改良沙棘分枝特性提供了候选基因。

关键词 沙棘; TCP基因家族; 生物信息学; 共线性分析; 表达模式分析

Genome-Wide Identification of the TCP Gene Family and Preliminary Functional Investigation of *HrTCP12* in *Hippophae rhamnoides*

WANG Ting, QIN Debin, AN Xinmin*

(State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, National Engineering Research Center of Tree Breeding and Ecological Restoration, Advanced Innovation Center for Tree Breeding by Molecular Design, Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants of Ministry of Education, Tree and Ornamental Plant Breeding and Biotechnology Laboratory of National Forestry and Grassland Administration, College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.), as an important plant of medicinal and food origin, its fruits are highly utilised in several fields. In recent years, the improvement of branching of economic tree species is an important way to increase its fruit yield. While the TCP gene family has a key role in regulating growth and development and response to adversity, its family members have important roles in plant meristem development.

收稿日期: 2025-04-16

接受日期: 2025-06-17

*通信作者: Tel: 13381379249, E-mail: anxinmin@bjfu.edu.cn

Received: April 16, 2025

Accepted: June 17, 2025

*Corresponding author. Tel: +86-13381379249, E-mail: anxinmin@bjfu.edu.cn

In this study, the TCP gene family in sea buckthorn was systematically identified and its functional properties were resolved through bioinformatics combined with experimental validation. In this study, 29 TCP genes were identified in sea buckthorn based on genomic data. Phylogenetic analysis classified them into Class I (PCF subfamily) and Class II (CYC/TB1 and CIN subfamilies). Notably, the TCP domain's basic region in Class II contained four additional conserved amino acids compared to Class I. Chromosomal localisation showed that the family members were unevenly distributed on chromosomes, and physicochemical analyses showed that most of the proteins of the sea buckthorn TCP family were hydrophilic and localised in the nucleus. Promoter analysis revealed that the promoters of the family members were enriched in light-responsive, hormone (e.g., ABA) and stress-related *cis*-elements, suggesting their involvement in multiple regulatory networks. Covariance analysis revealed extensive evolutionary conservation of the sea buckthorn TCP genes with *Arabidopsis thaliana* and date, and the family expansion was dominated by trans-chromosomal duplications driven by whole-genome duplication/segmental duplication. Tissue-specific expression showed that the CYC/TB1 subfamily gene *HrTCP12* was highly expressed in thorns and lateral shoots, with lower expression in the rest of the site, implying its function in regulating meristem development. Sub-cellular localisation confirmed that *HrTCP12* and *HrTCP18* were predominantly localised in the nucleus, consistent with transcription factor identity. Overexpression of *HrTCP12* in 84k poplar significantly inhibited the expression of the active genes *PagWUS1/2* in the meristematic tissue of poplar, which preliminarily verified its conserved mechanism of regulating plant meristems by inhibiting lateral shoot growth. In this study, TCP gene family in sea buckthorn was identified at a genome-wide scale and the expression patterns of the CYC/TB1 subfamily genes were analysed. It was found that their members exhibit obvious tissue-specific expression characteristics. Additionally, *HrTCP12* was found to inhibit the expression of active genes in the meristematic tissue of poplar, offering candidate genes for the improvement of meristematic characteristics in sea buckthorn using genetic approaches.

Keywords sea buckthorn; TCP gene family; bioinformatics; synteny analysis; expression pattern analysis

沙棘 (*Hippophae rhamnoides* L.) 是胡颓子科 (Elaeagnaceae) 沙棘属 (*Hippophae*) 植物, 是一种落叶性灌木, 是一种优良的生态树种, 被广泛应用于水土保持^[1]。同时, 沙棘作为药食同源植物, 其果实具有重要经济价值, 在食品、医疗、保健方面有着广阔的开发应用前景^[2-8]。

植物的分枝作为经济树种结构和产量的最重要特征之一, 其形成不仅影响植物的整体株型与果实产量, 还与其光环境感知、资源获取能力、竞争策略以及对逆境条件(如干旱、贫瘠、高温等)的适应性密切相关^[9-11]。从发育生物学角度来看, 分枝的形成是一个连续的过程, 包括腋芽的发生、休眠状态的维持与解除, 最终发育为伸长枝^[12]。其受到一系列内源信号与外界环境因子的协同调控。其中以植物激素、转录因子与外界光照/温度信号等因素的耦合网络调控最为关键。目前已知, 多个植物激素——生长素(auxin)^[13-15]、细胞分裂素(cytokinin)^[16]、油菜素内酯(brassinolide)^[17]、赤霉素(gibberellin)^[18]以及近年深入研究的独脚金内酯

(strigolactone)^[19-21]——协同参与对腋芽命运的调控。研究显示, 主茎生长点合成的生长素向下运输会在基部抑制腋芽生长, 这是顶端优势现象的基础^[22]。而细胞分裂素则通过促进细胞分裂与活化腋芽, 发挥解除休眠的作用^[16-23]。而在这些分枝调控的遗传网络中, 一类保守的植物特异性转录因子——TCP(TEOSINTE BRANCHED1/CYCLOIDEA/PCF)家族成员发挥着“信息整合点”的作用^[24-26]。特别是在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中, CYC/TB1亚家族的代表性成员 *BRC1*(*AtTCP18*) 和 *BRC2*(*AtTCP12*), 承担着整合多种激素信号(如 SL、CK、Auxin)以调控腋芽命运与分枝潜能的核心作用, 被广泛认为是多重激素信号协调后调控腋芽命运的关键“执行子”^[26-29]。这些基因的表达量直接决定了腋芽是否发生以及是否进一步形成侧枝或枝刺等结构, 不同物种中这些基因的功能具有较高的保守性, 但也呈现出一定的功能分化。例如, *BRC1*及其在多种植物(如水稻、黄瓜、苹果以及杨树)中的同源基因的表达受顶端优势及激素调节,

且 *BRC1* 及其同源基因对腋芽的休眠状态起直接抑制作用^[24-26,29,32-35]。虽然研究较少,但 *BRC2* 在特定组织中不仅表现出与 *BRC1* 的功能冗余性,还可能独立抑制侧枝发育。有研究证实, *BRC2* 虽功能较弱但在部分器官如侧枝的发育中扮演辅助性角色^[34-36]。在木本植物中,该功能可能呈现出新的强化或分化模式。例如在杨树 (*Populus trichocarpa*) 中, *BRC2* 类基因演化出更强的功能, CRISPR 敲除 *PtBRC2* 导致枝条发育显著异常、侧枝显著增多,说明其功能在多种植物类型中并不完全保守^[33]。

TCP 基因家族作为高等植物特有的转录因子家族,其家族成员广泛地参与到植物的生长发育相关过程(包括花和叶的形状调控、腋生分生组织发育过程、芽的分枝、配子体的发育、激素信号转导、种子发芽、生物钟的调节和防御)中^[37-42]。TCP 基因家族成员根据 DNA 结合结构域的一级结构不同,分为 Class I (TCP-P/PCF) 和 Class II (TCP-C) 两个亚家族^[43-46], Class II 比 Class I 在 TCP 结构域的碱性区域中多出 4 个保守氨基酸,且 Class II 亚族部分蛋白在靠近 C-端区域有一个未知功能的 R 结构域,该结构域预测会形成一个螺旋卷曲结构参与蛋白互作。根据碱性区和 bHLH 结构氨基酸的不同将 Class II 亚族进一步划分为 CYC/TB1 和 CIN 两类,其中 CYC/TB1 是被子植物特有的分支^[39,46],这一分支包括玉米 *TB1*、拟南芥 *BRC1/2*,与植物地上部分枝的发育有关^[47]。

鉴于 TCP 基因在不同的生物过程中的关键作用,尤其是其成员对分枝的调控广受关注,这个基因家族已经在各种植物(特别是在被子植物)中被鉴定出来,它通常有 20 多个成员^[46]。目前关于沙棘 TCP 基因家族的系统鉴定与分析报道较少,姚莹等^[48]曾对沙棘 TCP 家族进行了鉴定,但是在鉴定过程中仅用拟南芥、枣 (*Ziziphus jujuba* Mill.)、水稻的部分 TCP 家族成员进行比对,结果仅鉴定到 22 个沙棘 TCP 家族成员,鉴定结果不够全面。本研究将通过生物信息学方法在全基因组范围内对沙棘 TCP 基因家族成员进行鉴定,并对其系统进化关系、基因结构、保守基序、启动子元件、染色体定位、理化性质、共线性关系进行分析,旨在为研究沙棘 TCP 基因的功能提供有利信息。

1 材料与方法

1.1 数据获取

从国家基因库生命大数据平台(CNGBdb)

(<https://ftp.cnbg.org/pub/CNSA/data2/CNP0001846/CNS0383685/CNA0022752/>) 下载沙棘的基因组注释信息序列文件(gff文件)、CDS 序列文件、基因组 fasta 文件和蛋白序列文件(pep文件)。搜集并下载拟南芥^[49]和枣^[50]的 TCP 基因家族数据、基因组注释信息序列文件(gff文件)和基因组 fasta 文件。在 Pfam 数据库(<http://pfam.xfam.org/>)中搜索 TCP 基因家族相应的 Pfam 编号: PF03634, 下载 TCP 结构域对应的隐马尔可夫模型(hidden Markov model, 简称 HMM 或 hmm)。

1.2 实验材料及试剂

本研究所用沙棘植物材料采自内蒙古自治区乌兰察布市兴和县黄花梁生态公园,采集沙棘幼苗后移栽至北京林业大学植物科学中心。

植物 RNA 提取试剂盒和反转录试剂盒购自天根生化科技有限公司;胶回收试剂盒购自诺唯赞生物科技股份有限公司;TB Green Premix Ex TaqTM II FAST qPCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司;大肠杆菌 DH5 α 感受态以及农杆菌 GV3101 感受态购自北京擎科生物科技股份有限公司。

1.3 沙棘 TCP 家族成员的鉴定

在沙棘蛋白数据库中,利用下载的 TCP 家族对应的 TCP 结构域的隐马尔可夫模型,在沙棘蛋白数据库中进行 Hmmer 检索,以 *e* 值 < 0.001 为标准,去除重复值,获得沙棘的 TCP 家族候选成员。

进一步用 TBtools 进行 Blast 比对,主要用拟南芥的 TCP 蛋白序列和沙棘的蛋白序列进行 Blast 比对,得到的结果去掉重复值,获得候选的沙棘 TCP 蛋白序列及基因 ID。用枣的 TCP 蛋白序列和沙棘蛋白序列进行同样的操作。

为保证结果的准确性,将上述得到的 3 个筛选结果提交至 Pfam 在线工具,对候选转录因子的结构域进行比对和确认。同时,通过 NCBI 的在线工具 Batch CD-Search(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>)对候选蛋白进行保守结构域分析,去除没有 TCP 保守结构域的蛋白,取剩余具有 TCP 蛋白结构域的序列作为最终结果。

1.4 沙棘 TCP 家族蛋白理化性质预测

使用 TBtools 软件对沙棘的 TCP 蛋白进行理化性质分析,使用在线网站 WoLF PSORT(<https://wolfpsort.hgc.jp/>)对沙棘 TCP 家族成员进行亚细胞定位预测。

1.5 沙棘TCP家族系统发育、Motif、Domain、基因结构分析

首先通过贝叶斯法构建沙棘TCP家族的进化树。用MAFFT v7(<https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>)对沙棘TCP家族成员的CDS序列和蛋白进行多序列比对, 用在线工具Gblock 0.91b(http://www.phylogeny.fr/one_task.cgi?task_type=gblocks)^[51]对比对后的CDS序列进行序列保守区的选择, 得到沙棘TCP家族成员的CDS保守区序列, 将比对后的蛋白序列上传至ESPrpt3.0网站(<https://esprpt.ibcp.fr/ESPrpt/ESPrpt/>)^[52]进行着色。将得到的CDS保守序列使用DAMBE软件^[53-54]进行核苷酸替换饱和度检验。检验通过后, 使用MrM-Tgui软件中的MrModeltest进行最佳核苷酸替代模型的选择, 选择AIC给出的最佳模型, 进行后续进化树构建。根据得到的最佳核苷酸替代模型, 用MRBAYES构建进化树, MRBAYES构建进化树参数脚本如下:

```
BEGIN MRBAYES;
*Lset nst=6 rates=gamma;
*Prset statefreqpr=fixed(equal);
mcmc ngen=2 000 000 printfreq=1 000 sample-
freq=100 nchains=4 savebrlens=yes;
sumt contype=allcompat burnin=2 000;
END;
*为MrModeltest计算出的最佳核苷酸替代模型。
```

用在线软件MEME5.5.7(<https://meme-suite.org/meme/>)对沙棘TCP蛋白的保守Motif进行分析, Motif的数目设为20, 其余参数为默认值, 得到的结果用TBtools进行可视化。使用TBtools软件对沙棘TCP家族成员进行基因结构分析。通过NCBI的在线工具Batch CD-Search(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>)对沙棘TCP蛋白进行保守结构域分析, 用TBtools进行可视化作图。

1.6 沙棘TCP家族顺式作用元件分析

使用TBtools软件提取沙棘全基因组中所有基因起始密码子上游2 000 bp的启动子序列。随后, 基于已鉴定的TCP家族成员信息, 从上述提取的全基因组启动子文件中筛选出TCP基因对应的启动子序列。将获得的TCP基因启动子序列提交至PlantCare在线平台(<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)进行顺式作用元件预测,

最后利用TBtools软件可视化启动子顺式作用元件的分布情况。

1.7 沙棘TCP家族系统进化树构建

根据1.5中用贝叶斯法构建沙棘TCP家族进化树的方法, 对拟南芥24个TCP家族成员、枣21个TCP家族成员和沙棘最终鉴定到的29个TCP家族成员进行系统进化分析, 并使用FigTree v1.4.5和在线工具iTOL(<https://itol.embl.de/upload.cgi>)^[55]对得到的进化树进行美化。

1.8 沙棘TCP家族染色体定位及共线性分析

根据沙棘基因组gff文件获得沙棘TCP基因在染色体上的位置信息, 并用TBtools软件进行可视化绘图。

利用下载的沙棘、拟南芥、枣基因组数据, 通过TBtools的One Step MCScan对其进行共线性分析, 利用Advanced Circos对共线性结果进行可视化。

1.9 CYC/TB1亚族表达模式分析

CYC/TB1亚族成员在植物中与分枝的发育有关, 为初步研究其成员在沙棘分枝发育中的功能, 通过实时荧光定量对CYC/TB1亚族的表达模式进行分析。利用RNA Easy Fast植物组织RNA快速提取试剂盒[DP452, 天根生化科技(北京)有限公司]说明书所示方法, 提取沙棘根、茎、叶、发育中的刺、顶芽、未萌发的侧芽以及果实的总RNA。利用FastKing一步法除基因组cDNA第一链合成预混试剂[KR118-02, 天根生化科技(北京)有限公司]进行cDNA合成。使用TB Green® Premix Ex Taq™ II(Tli RNaseH Plus)(TaKaRa, 日本)试剂盒以及7500 Fast Real-Time PCR System(ABI, 美国)进行实时荧光定量PCR(RT-qPCR)。选择*HrACTIN*为内参基因, 使用Primer Premier 6设计RT-qPCR引物(表1)。RT-qPCR反应体系为10 μ L: 1.0 μ L cDNA模板(100 ng), 上、下游引物各0.4 μ L(10 μ mol/L), 0.2 μ L Rox Reference Dye II, 5 μ L 2 $\times$ Green Premix Ex Taq™ II, 3 μ L ddH₂O。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C预变性30 s; 随后进行40个循环的扩增(95 $^{\circ}$ C变性5 s, 56 $^{\circ}$ C退火/延伸34 s); 最后进行熔解曲线分析(95 $^{\circ}$ C变性15 s, 60 $^{\circ}$ C退火1 min, 95 $^{\circ}$ C终变性30 s)^[56]。使用2^{- $\Delta\Delta$ C_t}法计算目的基因的相对表达量, 每个样品设4次重复, 利用Graphpad Prism 9.5软件进行绘图。

1.10 亚细胞定位

植物分枝是决定其形态建成的重要因素, 是由叶腋内的腋芽发育成枝条的过程, 研究发现, 拟南

芥TCP家族成员*BRC1(TCP18)*可响应并整合多种信号来调控植物的分枝^[57-58]。本研究通过Blast比对, 找到了沙棘中*BRC1*和*BRC2*的同源基因, 分别为Hprhalgene23642和Hprhalgene07913, 在前期命名时, 为了便于理解, 将其分别命名为了*HrTCP18*和*HrTCP12*。根据1.9所示方法, 提取沙棘总RNA并合成cDNA, 以载体pCAM-BIA1300为骨架, 选择*Xba* I和*Kpn* I为酶切位点, 根据两个基因的CDS序列, 设计去除终止密码子且带有酶切位点的引物(表1), 以沙棘刺的cDNA为模板, 扩增*HrTCP18*和*HrTCP12*的CDS序列。用*Xba* I和*Kpn* I对纯化后的pCAM-BIA1300质粒进行酶切, 采用同源重组技术分别将*HrTCP18*和*HrTCP12*连接至*Xba* I和*Kpn* I酶切位点之间, 构建亚细胞定位载体, 命名为pCAMBIA1300-MASPro::HrTCP18-eGFP-Tnos和pCAMBIA1300-MASPro::HrTCP12-eGFP-Tnos。进行测序验证后将两个重组质粒转化至农杆菌GV3101, 将含两个重组质粒和pCAMBIA1300-MASPro::eGFP空载体的农杆菌与含核定位信号mCherry-NLS的农杆菌混合后注射入本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)进行瞬时表达, 暗培养24 h后, 再转入光下培养24 h, 于激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

1.11 *HrTCP12*功能的初步研究

根据前人研究, *TCP12(BRC2)*通过调控下游基因(如*HB53*、*WUS*)的表达, 限制分生组织活性, 导致侧芽休眠或确定性生长(如刺的形成)^[27,59], 为了探究*HrTCP12*是否具有相似功能, 根据1.10小节得到的*HrTCP12*的CDS序列, 以本课题组改造后的pCAM-BIA2301载体为骨架, 选择*Kpn* I和*Sal* I为酶切位点, 设计带有接头的引物(表1), 用*Kpn* I和*Sal* I对纯化后的pCAMBIA2301质粒进行酶切, 采用同源重组技术将*HrTCP12*连接至*Kpn* I和*Sal* I酶切位点之间, 构建过表达载体pCAMBIA2301-35S::HrTCP12-T35S-35S::GUS-Tnos, 载体进行测序之后转化至农杆菌GV3101。采用农杆菌介导的叶盘法将*HrTCP12*过表达载体转化至84k杨, 对其功能进行验证。对转化后的不定芽进行生根培养, 后续通过GUS染色以及DNA水平的PCR进行阳性转基因植株的鉴定。根据1.9所示方法, 提取转基因阳性植株和野生型植株根、茎、叶和芽的RNA, 并反转录成cDNA, 进行RT-qPCR分析。

通过与拟南芥*AtHB53*和*AtWUS*进行Blast比对, 找到这两个基因在84k杨中的同源基因, 使用Primer Premier 6软件设计RT-qPCR引物(表1), 以*ACTIN*为

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因名 Gene name	上游引物(5'→3') Forward primer (5'→3')	下游引物(5'→3') Reverse primer (5'→3')	用途 Application
<i>HrTCP18</i> -eGFP	ATA CAC CAA ATC GAC TCT AGA ATG GAG TTA TCA GCT AAT AAT ACT GAT- CAT	GCC CTT GCT CAC CAT GGT ACC TGG ATC CAT GTT TTG CCA	Construction of subcellular localization vector
<i>HrTCP12</i> -eGFP	ATA CAC CAA ATC GAC TCT AGA ATG TTC CCT TCT AGC TAT AGC AAT ATT C	GCC CTT GCT CAC CAT GGT ACC GTA ATT GGC ACT AGC ATA ATT GC	Construction of subcellular localization vector
<i>HrTCP12</i> -OE	GAG AGG ACA GAG CTC GGT ACC ATG TTC CCT TCT AGC TAT AGC AAT ATT C	AAA GCA TGC CTG CAG GTC GAC TTA GTA ATT GGC ACT AGC ATA ATT GC	Overexpression vector
q <i>HrACTIN</i>	AGG CTT GCT TGA TGA GTC CAA	CGC TTC CTC ACC ACA GAT GAA	Gene expression analysis
qHprhalgene23642	ATT TGA GGC TCC CAA GTT GTT G	GAG GAG GAA GCA CTT GTA AGG A	Gene expression analysis
qHprhalgene07913	GGG CAA ATT CCG AGG ATG ATT T	GCT GAG ATG GCT GCT TCA CA	Gene expression analysis
qHprhalgene22920	CGC CAC CGT TTC TGC TAT GA	ACC CTT CGA TCC CTT AGT CCA T	Gene expression analysis
qHprhalgene02974	AAC TCA GCG GCG ACA ACA TA	GTC ATT TCC AAC ACA CCT CCA A	Gene expression analysis
qHprhalgene21792	ACA ATT CCA ACG ACG CCA TTA C	AAC AGC AGC TTC AGT ACA TTC C	Gene expression analysis
qPag <i>ACTIN</i>	CTC CAT CAT GAA ATG CGA TG	TTG GGG CTA GTG CTG AGA TT	Gene expression analysis
qPag <i>HB53a</i>	ACC ACG ACG AAG GCG AAA GAA G	AAC GGC AAC TTG GCG AGG ATC	Gene expression analysis
qPag <i>HB53b</i>	CCG AAG GGC AAG GTG GAA GAA C	TGA ACT GGG ACT GCT GGT GGA A	Gene expression analysis
qPag <i>WUS1</i>	TGG TGA GGA CAT CAG CAG CTC T	GGT CCA GGG AAG TAC GGG AAG T	Gene expression analysis
qPag <i>WUS2</i>	GCG GTT ACT GTT GGG CAA GCA	TCA GCG GCT TCC TGG TCT TGA T	Gene expression analysis

内参基因,对转基因84k杨中*AtHB53*和*AtWUS*的同源基因进行RT-qPCR分析,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因相对表达量,每个样品设4次重复,利用Graphpad Prism 9.5软件进行绘图。

2 结果

2.1 沙棘TCP家族成员的鉴定

通过Hmmer检索,得到了30个候选沙棘TCP蛋白序列,记为result1;通过与拟南芥和枣的TCP家族成员进行Blast比对,分别得到了30个和57个候选沙棘TCP蛋白序列,分别记为result2和result3;用Venn图取3个结果的交集,得到29条沙棘TCP蛋白序列,记为result4。对候选沙棘TCP蛋白序列的保守结构域进行比对和确认,result1和result2中都分别剔除一条不具有TCP保守结构域的蛋白序列,result3中剔除28条不具有TCP保守结构域的蛋白序列,剔除不含TCP保守结构域的序列后,result1、result2和result3剩余结果恰好为交集部分,即result4,从而确认result4的结果为最终的TCP家族成员。Pfam在线工具的保守结构域分析结果与上述筛选结果一致,证实了最终29个TCP家族成员的可靠性。

2.2 沙棘TCP家族蛋白理化性质预测

使用TBtools软件对沙棘TCP蛋白进行理化性质预测,使用在线网站WoLF PSORT对沙棘TCP家族进行亚细胞定位预测。沙棘TCP蛋白理化性质分析结果显示,沙棘TCP蛋白氨基酸数在158到598之间,相对分子质量在16 852.86到66 713.12之间。在29个沙棘TCP家族成员中,除了HrTCP7和HrTCP25的蛋白质不稳定系数小于40(分别为37.86和39.11),蛋白质比较稳定外,其余27个家族成员的蛋白质不稳定系数均大于40,蛋白质可能不稳定。此外,沙棘TCP蛋白的脂肪指数均小于100,总平均亲水性均为负数,说明沙棘TCP蛋白亲水性较好。HrTCP3亚细胞定位预测在叶绿体,HrTCP8和HrTCP25亚细胞定位预测在细胞质,其余26个TCP家族成员亚细胞定位预测都在细胞核(表2)。

2.3 沙棘TCP家族系统发育、Motif、Domain、基因结构分析

沙棘TCP家族成员蛋白序列比对结果显示,29个沙棘TCP蛋白均包含1个完整的TCP结构域,与Class II(CYC/TB1及CIN)相比,Class I(PCF)在Basic结构域中缺失4个氨基酸(图1A)。

对沙棘TCP家族成员保守核苷酸替换饱和度进行检验,结果 $Iss < Iss.c$ 且 $P=0.000\ 0$ (极其显著),说明序列替换未饱和,适合建树。使用MrModeltest中AIC给出的最佳核苷酸替代模型Lset nst=6 rates=gamma; Prset statefreqpr=dirichlet(1,1,1,1)构建进化树,并使用TBtools将进化树、Motif、Domain、基因结构分析的结果综合作图(图1B)。结果显示沙棘TCP家族成员均含有保守基序Motif 1,Class I亚族中除HrTCP3和HrTCP25外其他成员均含有Motif 1和Motif 2基序,Motif 2只分布在Class I亚族中,除HrTCP12外Class II亚族成员均含有Motif 1和Motif 3基序,Motif 3只分布在Class II亚族中,图1C的LOGO图量化了20个保守基序中各位点的残基保守性。沙棘TCP蛋白Domain分析结果表明,Class I亚族都拥有保守的TCP和TCP superfamily,CIN亚族有TCP2和TCP/TCP2 superfamily,CYC/TB1亚族除HrTCP18含TCP superfamily外,其余均含TCP保守结构域。对沙棘TCP家族成员基因结构进行分析,发现沙棘TCP基因外显子数目为1~6,HrTCP8外显子最多,有6个,HrTCP25和HrTCP24有4个外显子,HrTCP6、HrTCP13和HrTCP18有3个外显子,HrTCP1、HrTCP2、HrTCP17、HrTCP21和HrTCP29有2个外显子,其余18个成员均只有1个外显子。

2.4 沙棘TCP家族顺式作用元件分析

顺式作用元件位于基因旁侧序列,能够影响基因的表达。为进一步理解沙棘TCP基因的功能,对沙棘TCP基因上游2 000 bp区域的顺式作用元件进行分析,共发现27种顺式作用元件,总体上可分为五大类,分别是参与生长发育的顺式作用元件、与生物和非生物胁迫相关的顺式作用元件、与激素响应相关的顺式作用元件、光响应相关的顺式作用元件和厌氧诱导响应作用元件(图2B~图2D)。在沙棘TCP家族中,除HrTCP17和HrTCP19外,沙棘TCP基因都至少含有1个生物胁迫或非生物胁迫相关的顺式作用元件,主要包括低温胁迫干旱诱导和防御应激响应相关顺式作用元件,暗示该家族成员极有可能参与非生物胁迫反应,同时,每个沙棘TCP成员也都包含激素响应相关顺式作用元件,如茉莉酸甲酯、生长素、脱落酸(abscisic acid, ABA)和赤霉素等响应元件,脱落酸是植物水分利用的中心调节因子,直接调控气孔的开放和蒸腾作用,而沙棘TCP家族有18个成员拥有脱落酸响应元件ABRE(图2C)。除HrTCP8、HrTCP21和HrTCP27外,其余沙棘TCP家

表2 沙棘TCP家族蛋白理化性质分析

Table 2 Physicochemical characterization of <i>Hippophae rhamnoides</i> TCP family proteins								
基因名 Gene name	基因ID Gene ID	氨基酸数 Number of amino acids	分子质量 Molecular weight	等电点 Theo- retical pI	不稳定 系数 Instability index	脂肪指数 Aliphatic index	总平均亲水性 Grand average of hydropathicity	亚细胞定位预测 Subcellular local- ization prediction
<i>HrTCP1</i>	Hiprhalgene02974	293	33 374.26	8.73	53.45	66.96	-0.785	Nucleus
<i>HrTCP2</i>	Hiprhalgene03247	518	56 701.19	8.45	54.47	57.24	-0.790	Nucleus
<i>HrTCP3</i>	Hiprhalgene05124	158	16 852.86	8.40	44.03	69.87	-0.399	Chloroplast
<i>HrTCP4</i>	Hiprhalgene06036	370	41 017.97	6.23	56.38	66.14	-0.751	Nucleus
<i>HrTCP5</i>	Hiprhalgene08017	475	52 272.15	6.87	52.78	62.67	-0.867	Nucleus
<i>HrTCP6</i>	Hiprhalgene11043	362	39 648.10	6.17	50.98	85.41	-0.216	Nucleus
<i>HrTCP7</i>	Hiprhalgene12631	263	27 048.15	9.72	37.86	65.67	-0.364	Nucleus
<i>HrTCP8</i>	Hiprhalgene13434	598	66 713.12	6.80	56.61	67.36	-0.645	Cytoplasm
<i>HrTCP9</i>	Hiprhalgene15464	397	44 633.58	8.96	46.19	62.64	-0.851	Nucleus
<i>HrTCP10</i>	Hiprhalgene16660	258	28 021.31	8.87	54.37	65.81	-0.649	Nucleus
<i>HrTCP11</i>	Hiprhalgene16695	425	46 338.29	7.01	57.44	61.11	-0.645	Nucleus
<i>HrTCP12</i>	Hiprhalgene07913	427	48 727.01	6.16	56.02	63.72	-0.874	Nucleus
<i>HrTCP13</i>	Hiprhalgene17162	513	54 525.99	7.48	62.61	56.20	-0.660	Nucleus
<i>HrTCP14</i>	Hiprhalgene18380	264	27 224.41	9.40	44.87	66.52	-0.369	Nucleus
<i>HrTCP15</i>	Hiprhalgene21292	542	56 825.88	7.10	61.54	49.80	-0.720	Nucleus
<i>HrTCP16</i>	Hiprhalgene21792	321	36 603.45	6.32	60.92	60.47	-0.858	Nucleus
<i>HrTCP17</i>	Hiprhalgene22920	308	34 781.54	6.31	51.35	65.91	-0.792	Nucleus
<i>HrTCP18</i>	Hiprhalgene23642	258	29 808.12	6.62	59.35	68.72	-0.978	Nucleus
<i>HrTCP19</i>	Hiprhalgene22975	413	43 815.00	6.24	47.05	68.50	-0.392	Nucleus
<i>HrTCP20</i>	Hiprhalgene23009	361	40 721.48	4.93	66.04	66.40	-0.857	Nucleus
<i>HrTCP21</i>	Hiprhalgene23509	344	38 254.19	6.26	41.02	61.25	-0.734	Nucleus
<i>HrTCP22</i>	Hiprhalgene24581	427	47 018.59	6.84	51.93	59.20	-0.789	Nucleus
<i>HrTCP23</i>	Hiprhalgene26251	339	36 881.90	9.70	51.80	72.54	-0.421	Nucleus
<i>HrTCP24</i>	Hiprhalgene26869	570	64 096.01	7.23	53.03	64.35	-0.716	Nucleus
<i>HrTCP25</i>	Hiprhalgene27491	359	39 453.84	7.58	39.11	83.65	-0.202	Cytoplasm
<i>HrTCP26</i>	Hiprhalgene28440	239	26 181.66	9.54	50.50	73.89	-0.554	Nucleus
<i>HrTCP27</i>	Hiprhalgene29165	314	36 123.43	8.41	56.97	78.28	-0.677	Nucleus
<i>HrTCP28</i>	Hiprhalgene30354	422	46 338.21	7.33	58.92	56.71	-0.748	Nucleus
<i>HrTCP29</i>	Hiprhalgene30468	379	41 016.30	5.59	50.79	69.21	-0.426	Nucleus

族成员均含有与厌氧诱导相关的顺式作用元件 GC-Motif和 ARE, 在沙棘含有的五类顺式作用元件中, 与光反应相关的元件在种类和数量上都最多, 其中 Box 4 的分布最广、数量最多(图2D)。

2.5 沙棘TCP家族系统进化树构建

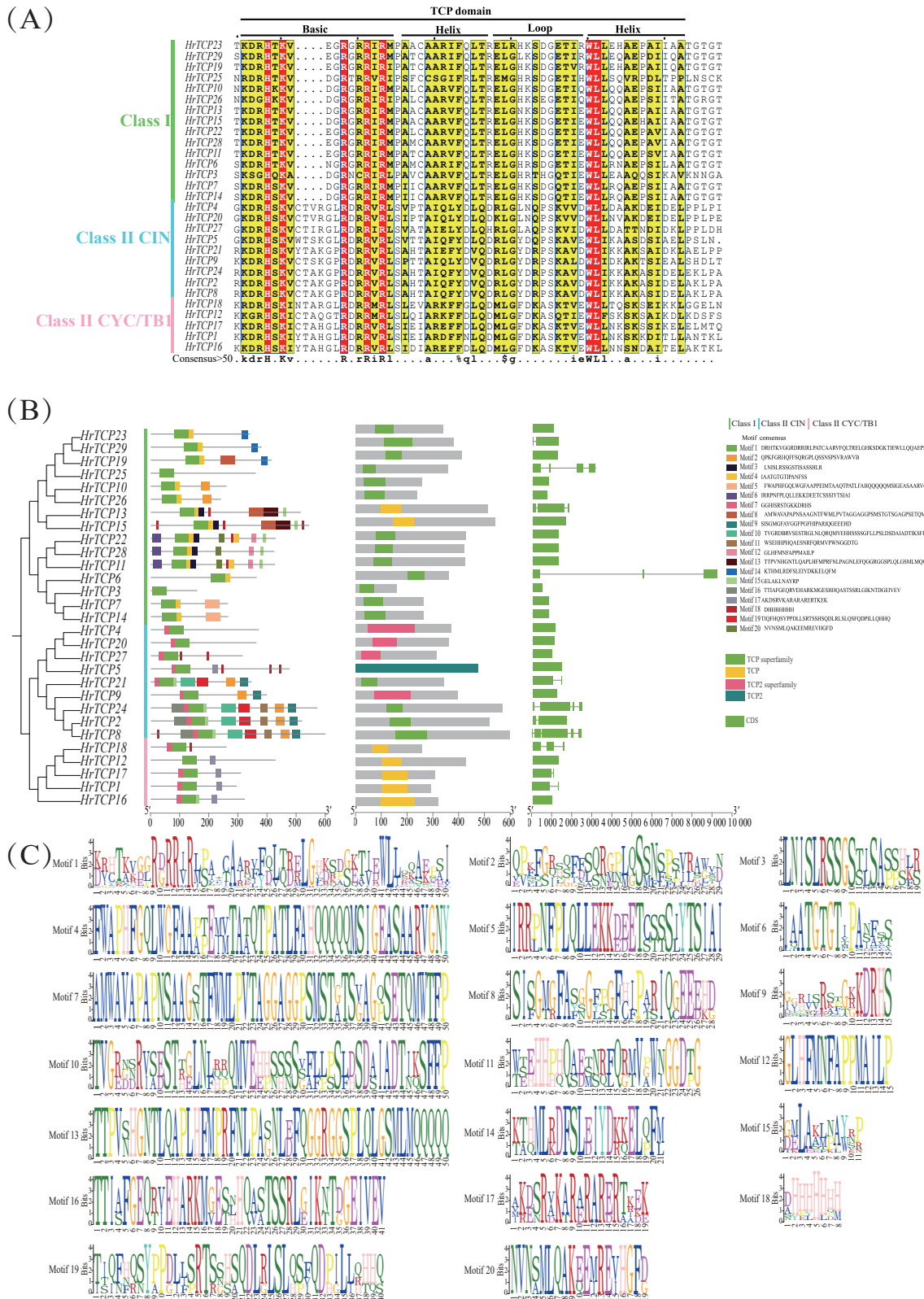
3个物种 TCP家族基因的核苷酸替换饱和度和检验结果 $Iss < Iss.c$ 且 $P=0.000\ 0$ (极其显著), 说明序列替换未饱和, 适合建树。检验通过后, 使用 MrModeltest 中 AIC 给出的最佳核苷酸替代模型: Lset nst=6 rates=invgamma; Prset statefreqpr=dirichlet(1,1,1,1) 构建进化树。从进化树可以看出, 沙棘 TCP家族同其他物种的 TCP家族一样, 分为2个分支, Class I(PCF亚

族)和 Class II, Class II 又进一步分为 CIN 和 CYC 亚族, 其中 PCF 亚族中有 15 个 TCP 成员, CIN 亚族中有 9 个成员, CYC/TB1 亚族中有 5 个成员(图3)。

2.6 沙棘TCP家族染色体定位及共线性分析

根据染色体定位, 除 *HrTCP10* 由于染色体组装问题未被定位到染色体上外, 沙棘的 TCP 家族成员不均匀地分布在除 chr 9 外的 11 条染色体上(图4)。

为进一步研究沙棘 TCP 家族成员之间的种内进化机制及跨物种保守性特征, 本研究通过基因家族分析和共线性分析(包括种内和种间比较), 揭示了该基因家族的扩增模式及系统发育关系。基因组中基因复制的事件, 包括全基因组复制(whole-



A: TCP家族保守结构域; B: TCP家族进化树、Motif分布、蛋白结构域以及基因结构(从左至右); C: TCP家族保守基序。

A: conserved structural domains of the TCP family; B: evolutionary tree, motif distribution, protein structural domain and gene structure of the TCP family (from left to right); C: the conserved motifs of the TCP family.

图1 沙棘TCP家族成员的蛋白保守结构域序列比对、进化树、Motif、Domain、基因结构分析以及保守基序序列标识

Fig.1 Sequence alignment of protein conserved structural domains, phylogenetic tree, motif, domain, gene structure analyses, and sequence logo plots of conserved motifs of *Hippophae rhamnoides* TCP gene family members

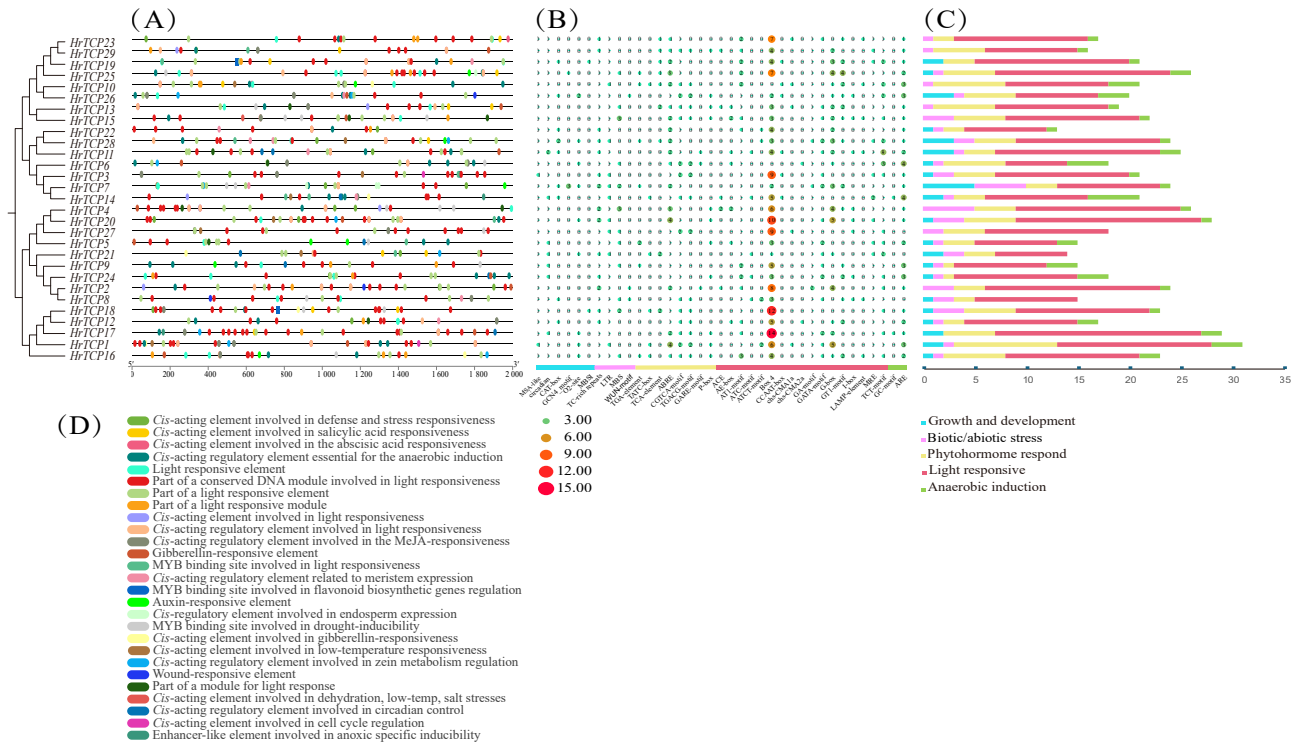
genome duplication, WGD)、片段复制(segmental duplication, SD)、串联复制(tandem duplicate, TD)、转置复制(transposed duplication, TRD)或分散复制(dispersed duplication, DSD)。在种内共线性分析中, TBtools中的One Step MCScanX算法检测显示, 在沙棘的TCP家族中, 没有发现明显的串联重复事件, 沙棘TCP家族的进化扩增主要依赖于全基因组复制/片段复制或分散复制。结合家族进化关系, 在沙棘TCP家族Class I的15个成员中, 8个成员(*HrTCP11/13/15/19/22/23/28/29*)来自全基因组复制/片段复制, 剩余7个基因来自分散复制; 在Class II的14个成员中, 除*HrTCP5/18/27*来自分散复制外, 其余成员均来自全基因组复制/片段复制, 印证了全基因组复制/片段复制事件在家族进化中的核心作用。值得注意的是, 沙棘29个TCP基因中有19个来自全基因组复制/片段复制事件, 这19个基因形成了17对跨染色体的复制基因对(图5)。

跨物种共线性分析显示, 在沙棘的TCP家族中, 有17个基因与拟南芥的14个基因存在22对共线性

基因对, 其中5个基因(*HrTCP2/8/14/19/24*)与拟南芥中的基因形成了多重共线性关系; 有26个基因与枣的21个基因存在41对共线性基因对, 其中12个基因(*HrTCP9/11/12/16/19/20/21/22/23/25/26/29*)与枣中的基因形成了多重共线性关系。而*HrTCP7/3/10*在拟南芥和枣中均未检测到共线性基因, 提示其可能经历了物种特异性的功能分化(图6)。

2.7 CYC/TB1亚族表达模式分析

为深入了解沙棘CYC/TB1亚族成员在不同组织中的表达情况, 以初步研究其在沙棘分枝发育中的功能, 本研究选取沙棘根、茎、叶、发育中未木质化的刺、顶芽、未萌发的侧芽和果实7个组织部位对沙棘TCP家族CYC/TB1亚族5个基因进行实时荧光定量分析。结果表明, 沙棘TCP家族CYC/TB1亚族基因具有组织特异性, 且不同基因在相同组织中表达存在显著差异。其中, *HrTCP12*在刺中表达量最高, 在侧芽中表达量次之, 在其余部位表达量极低, 其表达具有明显的组织特异性; *HrTCP18*在顶芽中表达量最高, 在侧刺中表达量第二; 此外, 相对于



A: TCP家族进化树; B: TCP家族顺式作用元件分布; C: 不同成员启动子中不同顺式作用元件的数量气泡图; D: 不同成员启动子中不同种类顺式作用元件数量堆积图。

A: TCP family evolutionary tree; B: TCP family *cis*-acting element distribution; C: bubble diagram of the number of different *cis*-acting elements in different member promoters; D: stacking diagram of the number of different kinds of *cis*-acting elements in different member promoters.

图2 沙棘TCP家族顺式作用元件分析

Fig.2 Analysis of *cis*-acting elements of *Hippophae rhamnoides* TCP family

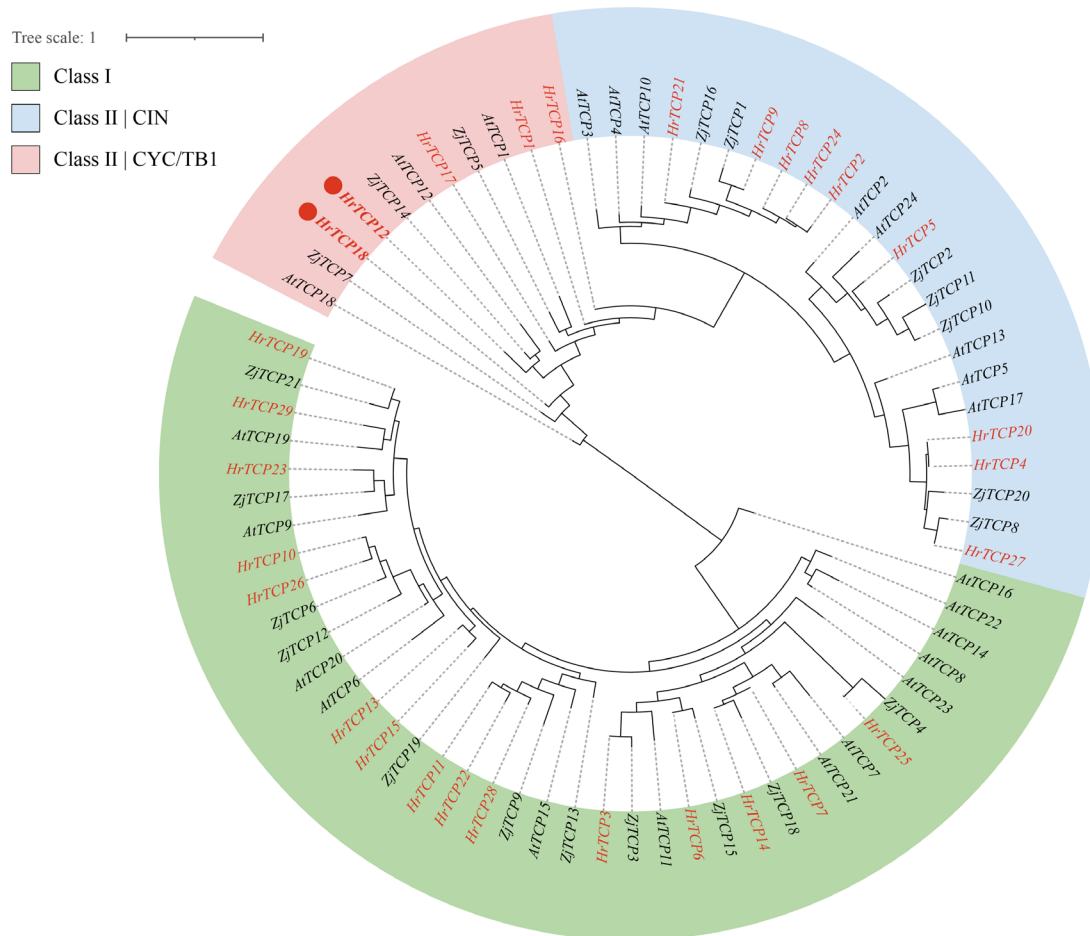


图3 沙棘、拟南芥和枣TCP基因家族的系统进化树

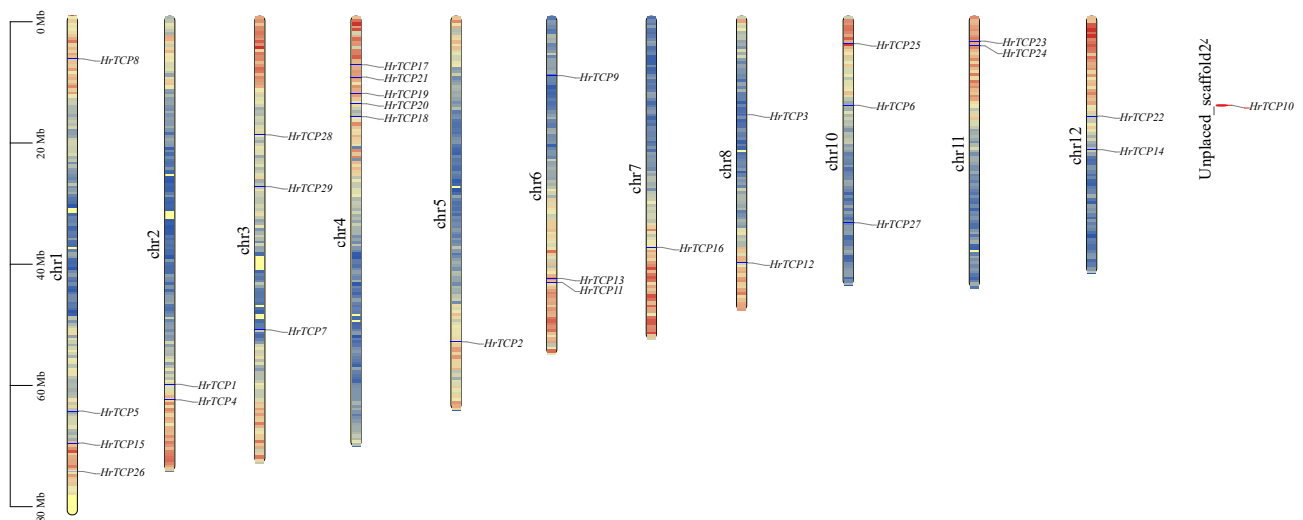
Fig.3 Phylogenetic tree of TCP gene family in *Hippophae rhamnoides*, *Arabidopsis thaliana* and *Ziziphus jujub*

图4 沙棘TCP家族基因在染色体上的位置

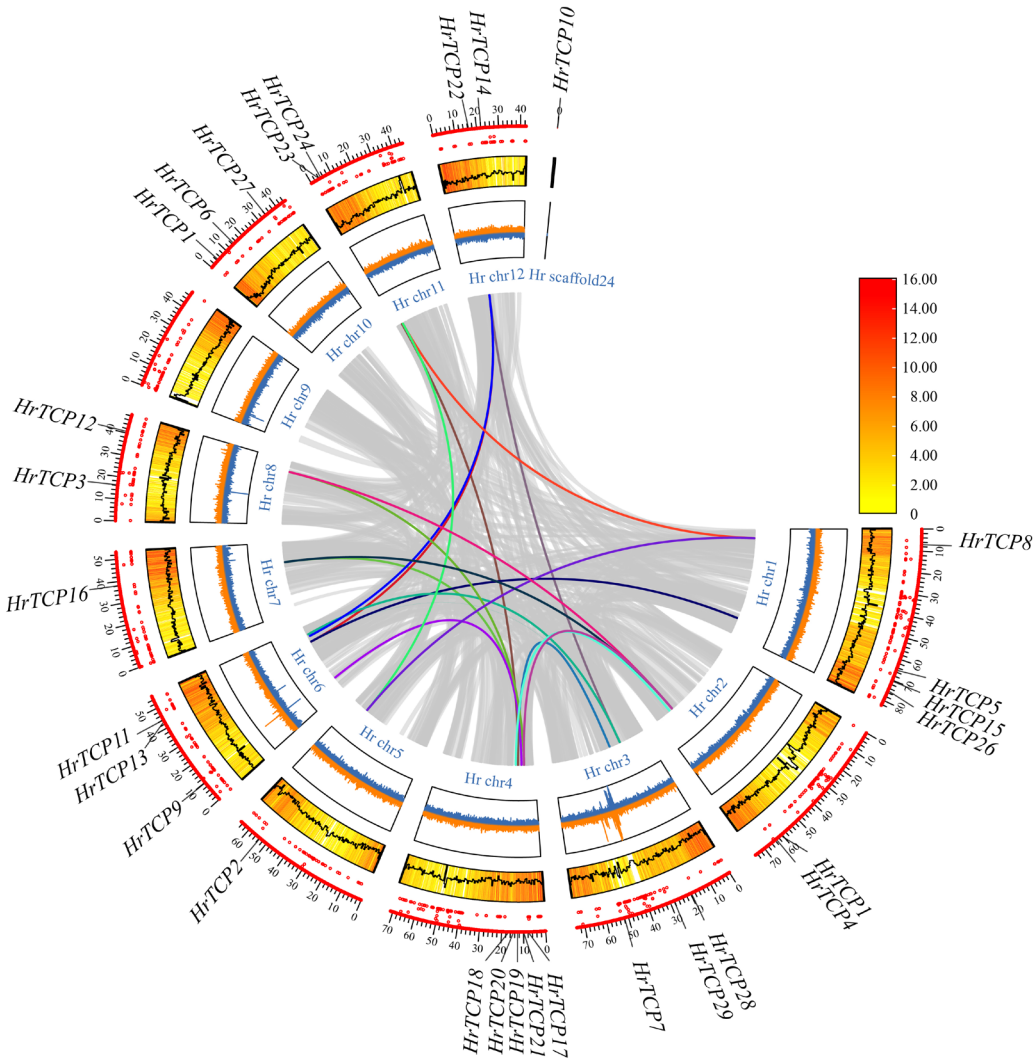
Fig.4 Location of the *Hippophae rhamnoides* TCP family genes on the chromosome

其他组织, CYC/TB1亚族的其他3个基因在侧芽中的表达量均排在第一或第二位, *HrTCP1*在侧芽中的表达最高, 而这5个基因在果实中的表达量均非常低,

几乎没有表达(图7)。

2.8 亚细胞定位

通过对 CYC/TB1亚族成员进行表达模式分析,



由内到外分别为种内共线性关系、GC skew、染色体基因密度及GC含量折线图、未知碱基(N)分布。
From inside to outside are intraspecific covariance, GC skew, chromosomal gene density and GC content folding, and unknown base (N) distribution.

图5 沙棘TCP家族成员种内共线性分析
Fig.5 Intraspecific covariance analysis of TCP family members in *Hippophae rhamnoides*

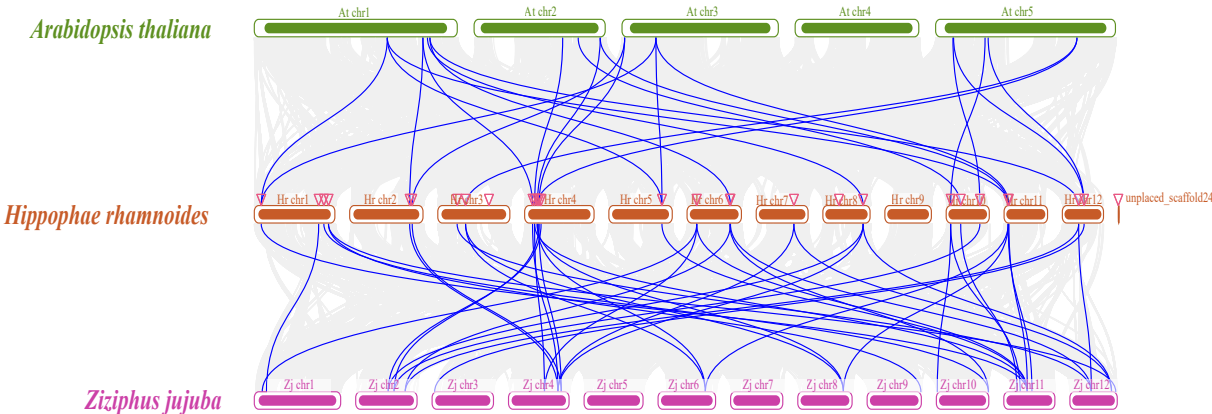
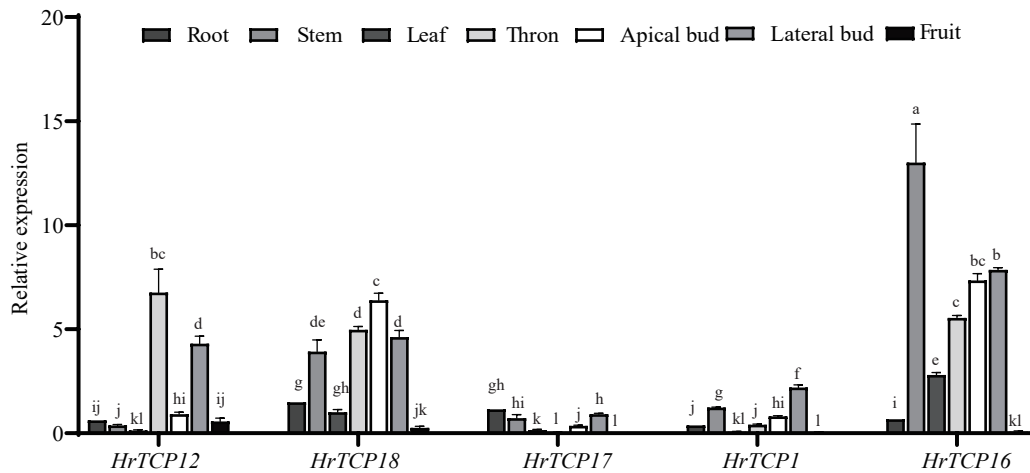


图6 沙棘、拟南芥、枣TCP家族成员物种间共线性分析
Fig.6 Analysis of covariance among species of *Hippophae rhamnoides*, *Arabidopsis thaliana*, and *Ziziphus jujuba* TCP family members



以*HrTCP18*在叶中的表达量为对照组(1.0-fold);不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平差异显著。

With the expression level of *HrTCP18* in leaves as the control (calibrated to 1.0-fold); different lowercase letters indicate significant difference at $P < 0.05$ level.

图7 沙棘TCP基因家族CYC/TB1亚族RT-qPCR分析

Fig.7 Analysis of the CYC/TB1 subfamily of the TCP gene family of *Hippophae rhamnoides* via RT-qPCR

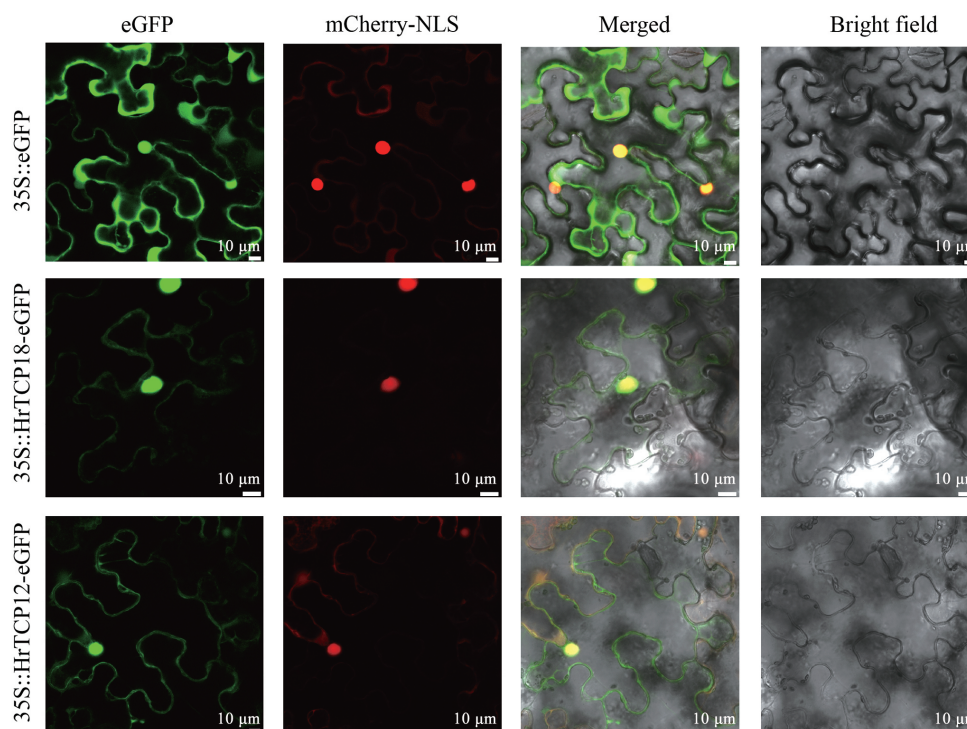
发现*HrTCP12*在刺和侧芽中特异表达,同时根据前人研究,在不同物种中,*BRC1(TCP18)*的同源基因也对分枝发育有重要调控作用,而*BRC2(TCP12)*是与*BRC1*密切相关的TCP转录因子,能够抑制腋芽发育和生长。通过WoLF PSORT在线预测软件分析发现,*HrTCP12*和*HrTCP18*的亚细胞定位均位于细胞核。为进一步验证预测结果,构建*HrTCP12*和*HrTCP18*的eGFP融合表达载体,以pCambia1300-MASPro::eGFP空载体为对照组,利用烟草叶片表皮细胞进行瞬时表达实验。结果发现,在对照组烟草叶片的细胞核、细胞质和细胞膜中都能观察GFP荧光信号;而*HrTCP18::eGFP*和*HrTCP12::eGFP*融合蛋白的荧光信号则主要位于细胞核;同时*HrTCP18::eGFP*和*HrTCP12::eGFP*在细胞质中也有荧光信号存在(图8),实验结果与WoLF PSORT预测比较一致,*HrTCP18*和*HrTCP12*的核定位特性与其作为转录调控因子的分子功能高度一致。*HrTCP18*和*HrTCP12*的亚细胞定位呈现核-质双分布,暗示该转录因子可能受到动态核质穿梭的调控。

2.9 *HrTCP12*功能的初步研究

根据CYC/TB1亚族的实时荧光定量分析,*HrTCP12*在刺和侧芽中特异表达,为了验证*HrTCP12*基因的功能,构建带有该基因的过表达载体pCambia2301-35S::TCP12-T35S-35S::GUS-T35S(图9A),并转化84k杨,得到*HrTCP12*过表达植株。通过

PCR进行DNA水平的鉴定,以*HrTCP12*的过表达载体质粒为模板作为阳性对照,以H₂O和WT的DNA为模板作为阴性对照,结果阴性对照均未扩增出条带,株系OE-9和OE-30与阳性对照扩增出的片段大小一致,表明*HrTCP12*过表达载体成功转化至植物体内(图9D),GUS染色进一步证明目的基因成功转化至84k杨中(图9C)。

根据前人研究,*TCP12(BRC2)*通过调控下游基因(如*HB53*、*WUS*)的表达,限制分生组织活性,导致侧芽休眠或确定性生长(如刺的形成)^[27,59]。通过与拟南芥*AtHB53*和*AtWUS*进行Blast比对,在84k杨中分别找到了这两个基因的同源基因,并将其命名为*PagHB53a*、*PagHB53b*、*PagWUS1*和*PagWUS2*,采用RT-qPCR对转基因植株中这四个基因的表达量进行进一步分析,发现与WT相比,这四个基因的表达几乎在所有组织部位均有不同程度的下调,其中,*PagHB53a*和*PagHB53b*在茎段和芽中表达量较高,*PagWUS1*和*PagWUS2*均在芽中高表达,这与其维持茎尖分生组织中的干细胞生态位、侧原基的分化、植物细胞的全能性的功能相吻合^[60]。在转基因株系中,*PagWUS1*和*PagWUS2*表达在芽中的下调极为显著,在其余部位也均有一定程度的下调;*PagHB53a*和*PagHB53b*在茎段和芽的表达显著下调,同时,*PagHB53a*和*PagHB53b*在叶中的表达也有一定程度的下调。*WUS*基因RT-qPCR分析的结果与前人研究

图8 *HrTCP12*和*HrTCP18*的亚细胞定位Fig.8 Subcellular localization analysis of *HrTCP18* and *HrTCP12* gene

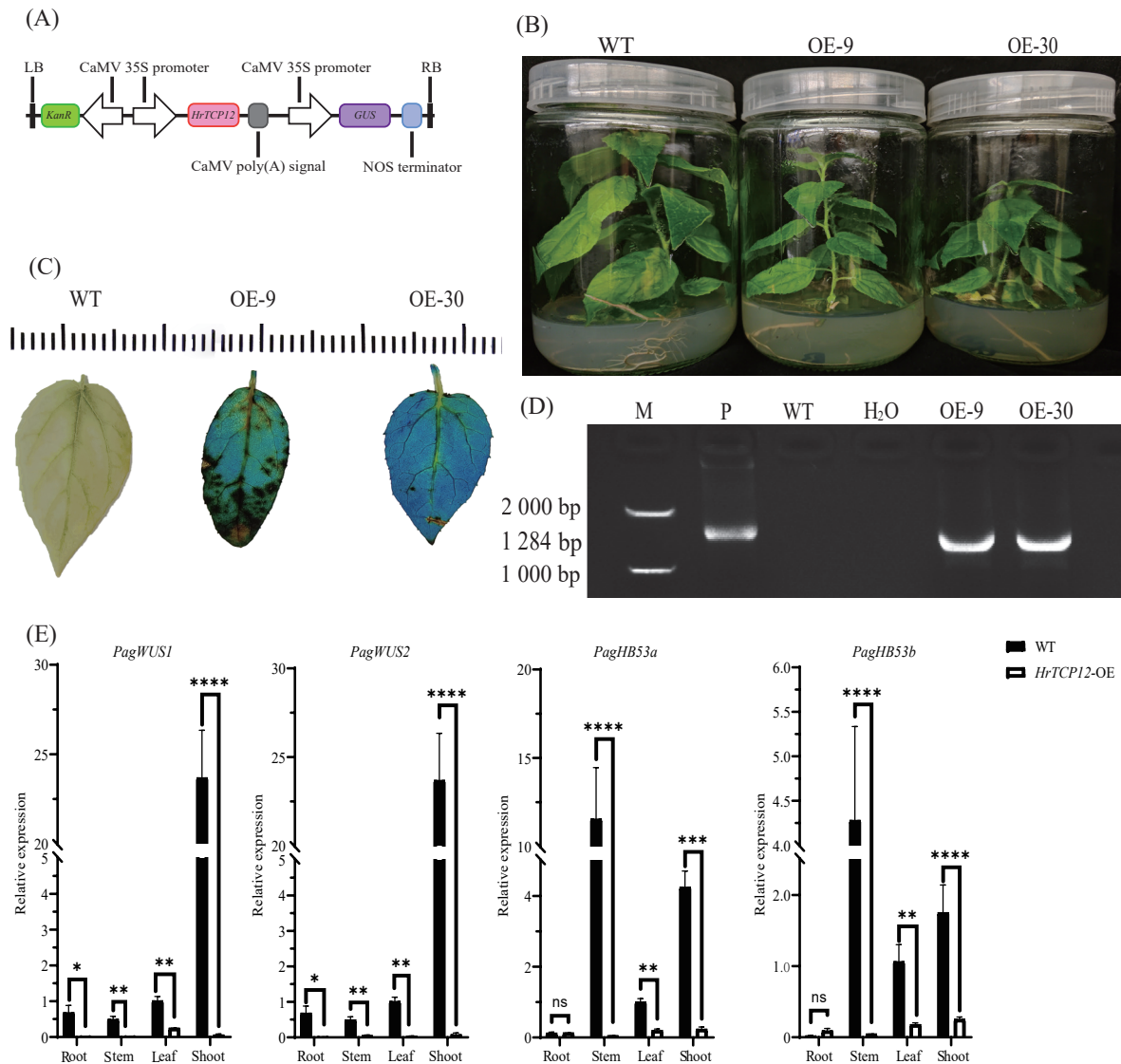
一致,说明*HrTCP12*也具有相似的功能,能够通过控制植物侧芽休眠从而调控植物的分枝(图9)。

3 讨论

本研究通过生物信息学方法对沙棘TCP家族进行了系统鉴定与分析,揭示了其在沙棘基因组中的分布、进化关系、基因结构、保守结构域、顺式作用元件及表达模式。研究表明,沙棘TCP家族包含29个成员,分布在除9号和11号染色体外的其他染色体上,且这些基因在进化上可分为Class I和Class II两大类,其中Class II进一步分为CYC/TB1和CIN两个亚族,这一分类模式与拟南芥和枣等植物的TCP家族分类一致,表明TCP家族在植物中的功能保守性^[43]。

TCP家族在植物生长发育中具有重要作用,尤其是在调控花器官发育、叶片形态、分枝模式及生物和非生物胁迫响应中发挥关键作用^[39]。本研究发现,沙棘TCP家族成员的启动子区域包含多种顺式作用元件,如与生长发育、激素响应、光响应及胁迫响应相关的元件。这些元件的存在表明沙棘TCP基因可能参与了多种生物学过程。例如,脱落酸响应元件ABRE在18个沙棘TCP基因中被发现,这

与ABA在植物水分利用和胁迫响应中的核心作用一致^[42,61]。共线性分析显示,沙棘TCP家族的进化扩增主要依赖于全基因组复制(WGD)、片段复制(SD)及分散复制(DSD)事件,跨物种共线性分析揭示,沙棘TCP基因与拟南芥和枣的TCP基因存在广泛的共线性关系,表明这些基因在进化过程中具有较高的保守性。沙棘和拟南芥存在22对共线性基因,这一数目超过了沙棘和拟南芥中存在共线性关系的基因的数目(沙棘中17个基因与拟南芥中14个基因存在共线性关系),同样地,沙棘和枣存在41对共线性基因,这一数目超过了沙棘和枣中存在共线性关系的基因的数目(沙棘中26个基因与枣中21个基因存在共线性关系),深入分析发现,存在5个沙棘TCP家族基因(*HrTCP2/8/14/19/24*)与拟南芥中的基因形成了多重共线性关系,12个沙棘TCP家族基因(*HrTCP9/11/12/16/19/20/21/22/23/25/26/29*)与枣中的基因形成了多重共线性关系,这一现象表明,沙棘TCP家族基因在进化过程中可能经历了物种特异性的扩张或复制事件,导致其与近缘物种间形成了复杂的多重共线性网络,这一结果与TCP家族在被子植物中的广泛保守性一致^[46]。研究通过共线性分析,系统阐明了沙棘TCP家族的进化动力学特征:种内扩



A: *HrTCP12*过表达载体示意图; B: 野生型植株与过表达植株表型对比; C: 过表达植株GUS染色鉴定; D: 过表达植株DNA水平鉴定; M: DNA分子量标准(Marker), P: 阳性对照(阳性转化子), WT: 未转基因的野生型对照; H₂O: 无模板DNA的阴性对照; OE-9、OE-30: 过表达目标基因的独立转基因株系(OE-9和OE-30); E: 过表达植株中*HrTCP12*下游基因*PagHB53a/b*和*PagWUS1/2*的表达水平检测; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$; $^{ns}P > 0.05$, 无显著差异。

A: schematic diagram of *HrTCP12* overexpression vector; B: comparison of phenotypes between wild-type and overexpression plants; C: identification of overexpression plants by GUS staining; D: identification of overexpression plants at the DNA level; M: DNA molecular weight marker (Marker); P: positive control (positive transformant); WT: wild-type control (non-transgenic); H₂O: no-template DNA negative control; OE-9, OE-30: independent transgenic lines overexpressing the target gene (OE-9 and OE-30); E: detection of expression levels of the downstream genes of *PagHB53a/b* and *PagWUS1/2* in overexpression plants of *HrTCP12*; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$; $^{ns}P > 0.05$, no significant difference.

图9 *HrTCP12*过表达载体及转基因植株的鉴定

Fig.9 Schematic representation of *HrTCP12* overexpression vectors and identification of transgenic plants

增以WGD/SD驱动的跨染色体重复为主导, 而跨物种比较则揭示了核心TCP基因的深层保守性, 为深入解析该家族的分子进化机制提供了重要理论依据。

CYC/TB1亚族在植物分枝和花器官发育中具有重要功能^[46-47,62]。本研究发现, 沙棘CYC/TB1亚族的5个基因在侧芽中均有表达, 其中*HrTCP12*在刺中

表达量最高, 而在果实中表达量极低; *HrTCP18*在顶芽中表达量最高, 在刺中的表达量次之, 在侧芽中的表达量只略低于刺, 表明CYC/TB1亚族在沙棘分枝的发育中可能具有重要功能, 在刺的形成过程中也可能发挥作用。此外, CYC/TB1亚族基因的表达模式具有明显的组织特异性, 这可能与其在沙棘不同

组织中的功能分化有关^[42]。

本研究证实*HrTCP18*和*HrTCP12*定位于细胞核,符合TCP家族作为转录调控因子的典型特征,暗示其通过直接结合DNA或表观修饰调控靶基因表达,进而参与沙棘分枝发育。同时*HrTCP18*和*HrTCP12*在细胞质中也存在微弱信号,这一结果与前人发现*CtTCP3*在红花中同时定位于细胞核和细胞质的结果一致,表明转录因子的亚细胞定位有许多例外^[63]。瞬时表达实验中,*HrTCP18*和*HrTCP12*在细胞质中存在微弱的荧光信号,这一结果提示其这两个基因功能可能受核-质动态转运调控,这为探究激素或胁迫信号对其活性的调节提供了线索。

进一步功能研究表明,*HrTCP12*过表达显著抑制杨树中*PagHB53a/b*和*PagWUS1/2*的表达,尤其在茎段和芽中下调最为显著。*PagWUS*作为干细胞生态位维持的关键因子,其表达被抑制与侧芽休眠表型高度契合,与前人报道的*BRC2*通过抑制分生组织活性限制分枝的机制一致,表明*HrTCP12*功能在进化上具有保守性。此外,*PagHB53a/b*在转基因植株中的表达情况与前人研究相反,多次实验排除了实验操作及样本不同可能造成的影响,考虑过表达载体采用35S强启动子,可能造成84K杨直系同源基因和旁系同源基因(*TCP12/18*)表达被抑制,结合前人研究,*HB53*更多受*TCP18*的调控,推测其表达下调可能是由于84K杨内源基因*TCP18*表达受抑制导致的,具体原因有待进一步实验验证^[64-66]。

尽管本研究对沙棘TCP基因家族进行了系统鉴定与分析,但仍存在一些局限性。首先,本研究主要基于生物信息学预测,缺乏实验验证。未来需要通过基因敲除、过表达等实验手段进一步验证沙棘TCP基因的功能。其次,本研究仅分析了CYC/TB1亚族的表达模式,未来应扩展至其他亚族,以全面揭示TCP基因家族在沙棘中的功能。此外,*HrTCP12*是否通过直接结合靶基因启动子或与其他调控蛋白互作发挥作用仍需验证。*HrTCP18*的生物学功能及其与*HrTCP12*的协同或拮抗关系亦有待解析。最后,沙棘TCP基因在非生物胁迫响应中的具体机制仍需进一步研究,尤其是在干旱、盐碱等胁迫条件下的表达调控网络。

本研究完成了沙棘TCP基因家族的系统鉴定,揭示了其基因组分布特征、进化模式及组织特异性表达规律。研究结果表明,*HrTCP12*作为CYC/TB1亚族

关键成员,在刺和侧芽中的特异性表达暗示其调控枝刺发育与分枝建立的生物学功能。通过遗传学实验证实,*HrTCP12*通过抑制分生组织活性基因(*PagWUS1/2*)的表达限制侧芽生长,这一机制为解析木本植物分枝调控网络提供了新视角。综上,该研究不仅为沙棘遗传改良提供了候选靶基因(*HrTCP12*),还为沙棘TCP基因的功能研究及遗传改良提供了重要的理论依据,同时为解析TCP基因在植物生长发育和胁迫响应中的调控网络奠定了基础。

参考文献 (References)

- [1] 胡洁婷. 沙棘资源开发现状及发展前景[J]. 甘肃科技(HU J T. Current situation and development prospect of sea buckthorn resource development [J]. Gansu Science and Technology), 2012, 28(10): 143-4,146.
- [2] SYTAŘOVÁ I, ORSAVOVÁ J, SNOPEK L, et al. Impact of phenolic compounds and vitamins C and E on antioxidant activity of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berries and leaves of diverse ripening times [J]. Food Chem, 2020, 310: 125784.
- [3] TKACZ K, WOJDYŁO A, TURKIEWICZ I P, et al. UPLC-PDA-Q/TOF-MS profiling of phenolic and carotenoid compounds and their influence on anticholinergic potential for AChE and BuChE inhibition and on-line antioxidant activity of selected *Hippophaë rhamnoides* L. cultivars [J]. Food Chem, 2020, 309: 125766.
- [4] MA X, LAAKSONEN O, ZHENG J, et al. Flavonol glycosides in berries of two major subspecies of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) and influence of growth sites [J]. Food Chem, 2016, 200: 189-98.
- [5] LI Y, CHI G, SHEN B, et al. Isorhamnetin ameliorates LPS-induced inflammatory response through downregulation of NF-κB signaling [J]. Inflammation, 2016, 39(4): 1291-301.
- [6] CRISTE A, URCAN A C, BUNEA A, et al. Phytochemical composition and biological activity of berries and leaves from four romanian sea buckthorn (*Hippophaë Rhamnoides* L.) varieties [J]. Molecules, 2020, 25(5): 1170.
- [7] ALEV T A, EMILIANO P, VIŠNJA S, et al. Involvement of *NRF2* in breast cancer and possible therapeutical role of polyphenols and melatonin [J]. Molecules, 2021, 26(7): 1853.
- [8] GAO S, HU G, LI D, et al. Anti-hyperlipidemia effect of sea buckthorn fruit oil extract through the AMPK and Akt signaling pathway in hamsters [J]. J Funct Foods, 2020, 66: 103837.
- [9] YIOTIS C, MCELWAIN J C, OSBORNE B A. Enhancing the productivity of ryegrass at elevated CO₂ is dependent on tillering and leaf area development rather than leaf-level photosynthesis [J]. J Exp Bot, 2021, 72(5): 1962-77.
- [10] DRUMMOND R S, JANSSEN B J, LUO Z, et al. Environmental control of branching in petunia [J]. Plant Physiol, 2015, 168(2): 735-51.
- [11] AALIYA B, NOREEN Z, RUBINA N, et al. Harnessing the role of genes involved in plant architectural changes [J]. Plant Growth Regulation, 2023, 101(1): 15-34.
- [12] 李丽冰, 李威涛, 刘依柔, 等. 植物分枝形成及影响分枝数主要

- 因素的研究进展[J]. 植物遗传资源学报(LI L B, LI W T, LIU Y R, et al. Research progress on branching formation and the main factors affecting branching number in plants [J]. Journal of Plant Genetic Resources), 2024, 25(12): 2009-19.
- [13] WANG Q, KOHLEN W, ROSSMANN S, et al. Auxin depletion from the leaf axil conditions competence for axillary meristem formation in *Arabidopsis* and tomato [J]. Plant Cell, 2014, 26(5): 2068-79.
- [14] WANG Y, WANG J, SHI B, et al. The stem cell niche in leaf axils is established by auxin and cytokinin in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2014, 26(5): 2055-67.
- [15] PERNISOVÁ M, VERNOUX T. Auxin does the SAMba: auxin signaling in the shoot apical meristem [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2021, 13(12): a039925.
- [16] MÜLLER D, WALDIE T, MIYAWAKI K, et al. Cytokinin is required for escape but not release from auxin mediated apical dominance [J]. Plant J, 2015, 82(5): 874-86.
- [17] XIA X, DONG H, YIN Y, et al. Brassinosteroid signaling integrates multiple pathways to release apical dominance in tomato [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2021, 118(11): e2004384118.
- [18] ZHANG Q Q, WANG J G, WANG L Y, et al. Gibberellin repression of axillary bud formation in *Arabidopsis* by modulation of DELLA-SPL9 complex activity [J]. J Integr Plant Biol, 2020, 62(4): 421-32.
- [19] WANG L, WANG B, YU H, et al. Transcriptional regulation of strigolactone signalling in *Arabidopsis* [J]. Nature, 2020, 583(7815): 277-81.
- [20] 姚瑞枫, 谢道昕. 独脚金内酯信号途径的新发现——抑制子也是转录因子[J]. 植物学报(YAO R F, XIE D X. New insight into strigolactone signaling [J]. Chinese Bulletin of Botany), 2020, 55(4): 397-402.
- [21] XIE Y, LIU Y, MA M, et al. *Arabidopsis* FHY3 and FAR1 integrate light and strigolactone signaling to regulate branching [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 1955.
- [22] VERNOUX T, BESNARD F, TRAAS J. Auxin at the shoot apical meristem [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010, 2(4): a001487.
- [23] 刘杨, 顾丹丹, 许俊旭, 等. 细胞分裂素对水稻分蘖芽生长及分蘖相关基因表达的调控[J]. 中国农业科学(LIU Y, GU D D, XU J X, et al. Effect of cytokinins on the growth of rice tiller buds and the expression of the genes regulating rice tillering [J]. Scientia Agricultura Sinica), 2012, 45(1): 44-51.
- [24] WANG B, SMITH S M, LI J. Genetic regulation of shoot architecture [J]. Annu Rev Plant Biol, 2018, 69: 437-68.
- [25] HILL J L Jr, HOLLENDER C A. Branching out: new insights into the genetic regulation of shoot architecture in trees [J]. Curr Opin Plant Biol, 2019, 47: 73-80.
- [26] LUO Z, JANSSEN B J, SNOWDEN K C. The molecular and genetic regulation of shoot branching [J]. Plant Physiol, 2021, 187(3): 1033-44.
- [27] LI G, TAN M, MA J, et al. Molecular mechanism of MdWUS2-MdTCP12 interaction in mediating cytokinin signaling to control axillary bud outgrowth [J]. J Exp Bot, 2021, 72(13): 4822-38.
- [28] AMOO O M. 利用CRISPR/CAS9技术鉴定BRANCHED1和BRANCHED2基因参与调控油菜分枝的功能[D]. 武汉: 华中农业大学, 2020.
- [29] 刘静, 汤定钦, 傅鹰, 等. 模式植物侧芽和竹子笋芽分化发育的研究进展[J]. 农业生物技术学报(LIU J, TANG D Q, FU Y, et al. Research progress of differentiation and development of model plant lateral buds and bamboo shoot bud [J]. Journal of Agricultural Biotechnology), 2017, 25(5): 788-804.
- [30] ZHANG K, ZHANG J, CUI C, et al. The WRKY28-BRC1 transcription factor module controls shoot branching in brassica napus [J]. Plants, 2025, 14(3): 486.
- [31] W V E S, AITOR M, J R F, et al. A gene regulatory network critical for axillary bud dormancy directly controlled by *Arabidopsis* BRANCHED1 [J]. New Phytol, 2023, 241(3): 1193-209.
- [32] RUIXUE L, RUI M, YULING Z, et al. A study of the molecular regulatory network of *VcTCP18* during blueberry bud dormancy [J]. Plants, 2023, 12(14): 2595.
- [33] MUHR M, PAULAT M, AWWANAH M, et al. CRISPR/Cas9-mediated knockout of *Populus* BRANCHED1 and BRANCHED2 orthologs reveals a major function in bud outgrowth control [J]. Tree Physiol, 2018, 38(10): 1588-97.
- [34] RINNE P L H, PAUL L K, VAHALA J, et al. Long and short photoperiod buds in hybrid aspen share structural development and expression patterns of marker genes [J]. J Exp Bot, 2015, 66(21): 6745-60.
- [35] FULI M, SHANQI Z, YU Y, et al. Jujube witches' broom phytoplasmas inhibit *ZjBRC1*-mediated abscisic acid metabolism to induce shoot proliferation [J]. Hortic Res, 2023, 10(9): uhad148.
- [36] MING T, GUOFANG L, XIAOJIE L, et al. Exogenous application of GA3 inactively regulates axillary bud outgrowth by influencing of branching-inhibitors and bud-regulating hormones in apple (*Malus domestica* Borkh.) [J]. Mol Genet Genomics, 2018, 293(6): 1547-63.
- [37] MANASSERO N G, VIOLA I L, WELCHEN E, et al. TCP transcription factors: architectures of plant form [J]. Biomol Concepts, 2013, 4(2): 111-27.
- [38] KOSUGI S, OHASHI Y. DNA binding and dimerization specificity and potential targets for the TCP protein family [J]. Plant J, 2002, 30(3): 337-48.
- [39] MARTÍN-TRILLO M, CUBAS P. TCP genes: a family snapshot ten years later [J]. Trends Plant Sci, 2010, 15(1): 31-9.
- [40] DANISMAN S, VAN DER WAL F, DHONDT S, et al. *Arabidopsis* class I and class II TCP transcription factors regulate jasmonic acid metabolism and leaf development antagonistically [J]. Plant Physiol, 2012, 159(4): 1511-23.
- [41] LUCERO L E, MANAVELLA P A, GRAS D E, et al. Class I and Class II TCP transcription factors modulate *SOC1*-dependent flowering at multiple levels [J]. Mol Plant, 2017, 10(12): 1571-4.
- [42] SHANG Y, YUAN L, DI Z, et al. A CYC/TB1-type TCP transcription factor controls spikelet meristem identity in barley [J]. J Exp Bot, 2020, 71(22): 7118-31.
- [43] YAO X, MA H, WANG J, et al. Genome-wide comparative analysis and expression pattern of TCP gene families in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* [J]. J Integr Plant Biol, 2007, 49(6): 885-97.
- [44] LI X, ZHANG G, LIANG Y, et al. *TCP7* interacts with nuclear factor-Ys to promote flowering by directly regulating *SOC1* in *Arabidopsis* [J]. Plant J, 2021, 108(5): 1493-506.
- [45] MONDRAGÓN-PALOMINO M, TRONTIN C. High time for a roll call: gene duplication and phylogenetic relationships of TCP-like genes in monocots [J]. Ann Bot, 2011, 107(9): 1533-44.

- [46] LIU M M, WANG M M, YANG J, et al. Evolutionary and comparative expression analyses of TCP transcription factor gene family in land plants [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(14): 3591.
- [47] DOEBLEY J, STEC A, HUBBARD L. The evolution of apical dominance in maize [J]. *Nature*, 1997, 386(6624): 485-8.
- [48] 姚莹, 王伟, 孙永媛, 等. 沙棘HrTCP转录因子家族鉴定及其干旱胁迫下的表达分析[J]. 西北植物学报(YAO Y, WANG W, SUN Y Y, et al. Identification of HrTCP transcription factors in seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) and its response to drought stress [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2021, 41(4): 576-84.
- [49] WANG J L, WANG H W, CAO Y N, et al. Comprehensive evolutionary analysis of the TCP gene family: further insights for its origin, expansion, and diversification [J]. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 994567.
- [50] CHEN P, LI J, YE X, et al. Genome-wide identification of *Ziziphus jujuba* TCP transcription factors and their expression in response to infection with jujube witches' broom phytoplasma [J]. *Acta Physiol Plant*, 2019, 41(6): 1-11.
- [51] DEREPPER A, GUIGNON V, BLANC G, et al. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist [J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36: W465-9.
- [52] ROBERT X, GOUET P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: W320-4.
- [53] XIA X, XIE Z, SALEMI M, et al. An index of substitution saturation and its application [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2003, 26(1): 1-7.
- [54] XIA X, LEMEY P. Assessing substitution saturation with DAMBE, 2nd ed [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2009.
- [55] LETUNIC I, BORK P. Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool [J]. *Nucleic Acids Res*, 2024, 52(W1): W78-w82.
- [56] 鲁海琳, 吴茹茜, 安新民. 锦叶槲栎光合特性变化与光合电子传递关键基因*KpPetC*的克隆及特性分析[J]. 中国细胞生物学学报(LU H L, WU R Q, AN X M. Changes in photosynthetic traits, cloning and characteristics analysis of *KpPetC* gene involving in photosynthetic electron transfer of *Koeleria paniculata* 'Jinye' [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2024, 46(5): 967-81.
- [57] MAURYA J P, SINGH R K, MISKOLCZI P C, et al. Branching regulator *BRC1* mediates photoperiodic control of seasonal growth in hybrid aspen [J]. *Curr Biol*, 2020, 30(1): 122-6, e2.
- [58] SEALE M, BENNETT T, LEYSER O. *BRC1* expression regulates bud activation potential but is not necessary or sufficient for bud growth inhibition in *Arabidopsis* [J]. *Development*, 2017, 144(9): 1661-73.
- [59] ZHANG F, WANG Y, IRISH V F. CENTRORADIALIS maintains shoot meristem indeterminacy by antagonizing THORN IDENTITY1 in *Citrus* [J]. *Curr Biol*, 2021, 31(10): 2237-42, e4.
- [60] JHA P, OCHATT S J, KUMAR V. WUSCHEL: a master regulator in plant growth signaling [J]. *Plant Cell Rep*, 2020, 39(4): 431-44.
- [61] 石磊, 关雅静, 宋玉霞. ABA信号通路在植物胁迫响应中的作用[J]. 宁夏农林科技(SHI L, GUAN Y J, SONG Y X. Effect of ABA signaling pathway on plant stress responses [J]. *Journal of Ningxia Agriculture and Forestry Science and Technology*, 2017, 58(11): 4.
- [62] LUO D, CARPENTER R, VINCENT C, et al. Origin of floral asymmetry in *Antirrhinum* [J]. *Nature*, 1996, 383(6603): 794-9.
- [63] LU D, WANG L, YU Y, et al. Genome-wide identification and functional analyses of the TCP gene family in *Carthamus tinctorius* L [J]. *Sci Rep*, 2025, 15(1): 12970.
- [64] ZHENG X J, YANG X F, CHEN Z, et al. *Arabidopsis* *SMAX1* overaccumulation suppresses rosette shoot branching and promotes leaf and petiole elongation [J]. *Biochem Bioph Res Co*, 2021, 553: 44-50.
- [65] YAN Y, MICHAEL N, JINZHE Z, et al. Correction: The *TIE1* transcriptional repressor controls shoot branching by directly repressing *BRANCHED1* in *Arabidopsis* [J]. *PLoS Genet*, 2018, 14(8): e1007565.
- [66] GONZÁLEZ-GRANDÍO E, PAJORO A, FRANCO-ZORRILLA J M, et al. Absciscic acid signaling is controlled by a *BRANCHED1*/HD-ZIP I cascade in *Arabidopsis* axillary buds [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(2): E245-E54.