DOI:10.13332/j.1000−1522.20180430

白桦 *BpTCP*2 基因的克隆及表达特性分析

栾嘉豫　安琳君　任　丽　李慧玉
(东北林业大学林木遗传育种国家重点实验室，黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:【目的】通过克隆白桦 *BpTCP*2 基因，分析其序列特征，并检测该基因在不同组织部位、激素处理及非生物胁迫下的基因表达特性，为揭示 *BpTCP*2 在植物生长发育及逆境应答中的作用提供理论依据。【方法】通过 PCR 技术克隆 *BpTCP*2 基因的全长，并对得到的 cDNA 序列进行生物信息学分析；采用实时荧光定量 PCR 技术分析该基因的组织表达特性，以及在外源植物激素（ABA、IAA、BR、JA、SA）处理和非生物胁迫（$CdCl_2$、NaCl、$NaHCO_3$、PEG）下的响应模式。【结果】成功克隆了 *BpTCP*2 基因的 cDNA 序列；生物信息学分析发现 *BpTCP*2 含有高度保守的 bHLH 结构域，属于 PCF 亚类。qRT-PCR 结果显示，*BpTCP*2 基因在木质部、幼嫩的叶片和茎节中表达量较高；在 $CdCl_2$、NaCl、$NaHCO_3$ 处理下，该基因持续上调表达；且 5 种外源激素均能诱导该基因表达。【结论】*BpTCP*2 基因参与白桦木质部的形成，影响叶片及初期茎节的发育，并能在各激素、重金属、盐、碱的诱导下表达。

关键词：白桦；*BpTCP*2；生物信息学；基因克隆；表达特性
中图分类号：S792.153　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1000−1522(2019)08−0057−10
引文格式：栾嘉豫，安琳君，任丽，等. 白桦 *BpTCP*2 基因的克隆及表达特性分析 [J]. 北京林业大学学报，2019, 41(8):57−66. Luan Jiayu, An Linjun, Ren Li, et al. Cloning and expression characteristics analysis of *BpTCP*2 gene in *Betula platyphylla*[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2019, 41(8): 57−66.

Cloning and expression characteristics analysis of *BpTCP*2 gene in *Betula platyphylla*

Luan Jiayu　An Linjun　Ren Li　Li Huiyu
(State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China)

Abstract: [**Objective**] The *BpTCP*2 gene was cloned, sequence characteristics were analyzed, and the gene expression characteristics of the gene under different tissues, hormone treatments and abiotic stress were detected, which provided a reference for revealing the function of *BpTCP*2 in plant growth and development and stress response. [**Method**] The full-length cDNA sequence of *BpTCP*2 gene was cloned by PCR technology and its cDNA sequence characteristics were analyzed by bioinformatics. Real-time quantitative PCR was used to analyze expression level of the gene in different tissues and the responses of exogenous phytohormones (ABA, IAA, BR, JA, SA) and abiotic stress ($CdCl_2$, NaCl, $NaHCO_3$, PEG). [**Result**] The full-length cDNA sequence of *BpTCP*2 gene was successfully cloned. Bioinformatics analysis found that *BpTCP*2 contained a highly conserved bHLH domain and *BpTCP*2 belongs to TCP-P subclass; qRT-PCR analysis showed that the expression of *BpTCP*2 gene was higher in xylem, young leaves and stem segments. Under the treatment of $CdCl_2$, NaCl and $NaHCO_3$, the gene was up-regulated. Five exogenous phytohormones could induce the expression of the gene. [**Conclusion**] The *BpTCP*2 gene was involved in the development of stems of *Betula platyphylla*, and affects the development of leaves and early stem segments and responds to various hormones and heavy metals, salts and alkalis.

Key words: *Betula platyphylla*; *BpTCP*2; bioinformatics; gene cloning; expression characteristics

收稿日期: 2018−12−25　**修回日期:** 2019−04−16
基金项目: 国家重点研发计划（2017YFD0600603），中央高校基本科研服务专项资金项目（2572018BW03）。
第一作者: 栾嘉豫。主要研究方向：林木基因工程育种。Email：1004388016@qq.com　地址：150040 哈尔滨市和兴路 51 号东北林业大学科技楼。
责任作者: 李慧玉，副教授。主要研究方向：林木基因工程育种。Email：lihuiyu2017@126.com　地址：同上。
本刊网址: http://j.bjfu.edu.cn；http://journal.bjfu.edu.cn

转录因子通过调节动物和植物基因的时空表达水平，来调控生物体的细胞增殖、生长发育及免疫反应过程[1]。*TCP* 基因家族编码植物特有的转录调控因子，该家族成员在植物生长[2]、花瓣的不对称性[3–4]、细胞分裂[5]、叶形态发生[6–7]、衰老[8–9]、胚胎生长[10]、昼夜节律[2] 中起着关键作用。基于蛋白质的 DNA 结构域不同，该家族成员分为 Class I（PCF 类）和 Class II（CIN 和 CYC/TB1）两类。目前，Class I 类基因功能在草本植物中研究的较为深入。在拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）中，*AtTCP*11 通过上调 *VND*7 基因的表达，引起维管发育缺陷[11]；*AtTCP*14 通过细胞增殖控制叶的形态发生；*AtTCP*20 通过抑制茉莉酸（JA）在植物体内的合成，降低其抑制细胞增殖的能力，从而使细胞大小发生改变[12]，同时转 *AtTCP*20::*EAR* 拟南芥表现出发芽延迟、茎尖和根尖分生组织生长速度放缓、子叶变黄，下胚轴区域膨胀等特征[13]。

TCP 基因参与多种激素信号传递过程，调控植物形态发育。在拟南芥中，*AtTCP*5、*AtTCP*13 和 *AtTCP*17 通过 PIFs 依赖途径和不依赖 PIFs 途径两种方式来促进生长素的合成，进而介导拟南芥下胚轴在遮荫条件下的伸长[14]；*AtTCP*3 和 *AtTCP*15 通过调控生长素响应相关基因 *SHY*2/*IAA*3 和 *SAUR* 的表达参与生长素信号的转导[15–16]；*AtTCP*9 通过改变 JA 的代谢从而改变根长[17]；在陆地棉（*Gossypium hirsutum*）中，*GhTCP*1 基因通过促进 JA 的合成而使棉花纤维伸长并促进根毛发育[18]。*AtTCP*14 和 *AtTCP*15 参与细胞分裂素（CK）信号途径的应答，影响细胞分裂[19]；I 类 TCP 转录因子家族参与赤霉素（GA）信号转导，研究发现 GA 通过刺激 DELLA 蛋白的降解来控制茎和节间伸长，而 DELLA 蛋白直接调节植物特异性 I 类 TCP 转录因子家族的活性，从而控制细胞增殖，同时拟南芥 *tcp*8、*tcp*14、*tcp*15、*tcp*22 这 4 个基因的突变体表现出严重的侏儒症和对 GA 作用的反应敏感性降低的性状[20]。目前对 *PCF* 亚类基因的研究主要集中在草本植物上，而在木本植物中研究较少。

白桦（*Betula platyphylla*），桦木科（Betulaceae）落叶类乔木，白桦树干修直、洁白，且耐严寒，生长较快，是我国东北地区珍贵阔叶树种之一。本研究以白桦为试材，克隆了 *BpTCP*2 基因编码区的全长序列，对其进行生物信息学分析，同时采用 qRT-PCR 分析该基因在白桦不同组织部位的表达特征以及对植物激素处理和非生物胁迫的应答机制，为揭示白桦的生长发育、抗逆机制，以及培育优良的白桦新品系提供参考。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 植物材料

材料于 2018 年夏季取自东北林业大学林木遗传育种白桦强化育种基地栽植的 2 年生白桦组培苗木，依次选取 5 株的顶芽、腋芽、第 1 到第 7 茎节（幼嫩到成熟）、成熟茎节的木质部和韧皮部、第 1 到第 13 片叶（包括叶片从幼嫩到衰老过程）。以上植物材料经液氮速冻后，放入− 80 ℃ 超低温冰箱保存，用于 RNA 的提取和研究 *BpTCP*2 在白桦不同组织部位的表达。

从白桦强化育种基地采集的白桦全同胞家系种子通过水培萌发，待长出两片子叶时，分别取 10 株长势均一的植株，放置在涂有相应外源激素和非生物胁迫试剂的 WPM 培养基中。激素处理的种类及浓度分别为：50 mg/L IAA，100 μmol/L ABA，0.2 mg/L 油菜素类固醇（BR），1 μmol/L JA，350 μmol/L 水杨酸（SA）。非生物胁迫处理的浓度分别为：0.4 mol/L NaCl，0.3 mol/L $NaHCO_3$，150 μmol/L $CdCl_2$，20% PEG。分别在 0、2、4、6、12 和 24 h 取材并放置于 1.5 mL 离心管中，液氮速冻后，放入− 80 ℃ 超低温冰箱内保存，用于 RNA 提取。

1.1.2 试 剂

RNA 提取试剂盒为通用植物总 RNA 提取试剂盒（离心柱型），购置于北京百泰克生物技术有限公司，反转录试剂盒为 ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover 试剂盒，购置于东洋纺（上海）生物科技有限公司，TransStart Top Green qPCR SuperMix（Perfect Real Time 染料法实时荧光定量）购置全式金生物（北京）有限公司，Topo 试剂盒为 pENTR™/D-TOPO® Cloning Kit 购置于 invitrogen 公司，大肠杆菌 Trans1-T1 感受态细胞购自世国生物科技（哈尔滨）有限公司。引物由擎科（哈尔滨）公司合成。

1.2 方 法

1.2.1 白桦 *BpTCP*2 基因的克隆

根据白桦基因组和转录组序列比对获得 *BpTCP*2 基因的序列设计引物，上、下游引物序列分别为 5′-CACCGACATGGCAGAGAGCAAGC-3′、5′-ATTCTTCTACTGCCTTGACC-3′。以白桦不同组织部位的 cDNA 为模板，PCR 扩增 *BpTCP*2 基因目标片段，反应体系如下：10 × KOD Buffer 1.7 μL，2 mmol/L dNTPs 1.7 μL，$MgSO_4$ 0.8 μL，cDNA 模板 0.4 μL，上、下游引物各为 10 mmol/L 0.6 μL，KOD Plus 0.4 μL，ddH_2O 补足 20 μL。PCR 扩增程序为 94 ℃

预变性 2 min；94 ℃变性 45 s，58 ℃退火 45 s，68 ℃延伸 2 min，35 个循环；68 ℃延伸 10 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测，并进行胶回收纯化，将纯化产物进行 Topo 反应，连接体系为：胶回收产物 1 μL，Topo Vector 0.5 μL，Salt Solution 0.5 μL，用 ddH_2O 补足反应体系至 3 μL。25 ℃连接 30 min，连接反应完成后，通过热击法将连接产物转化到大肠杆菌 Trans1-T1 感受态细胞中。对获得的单克隆进行 PCR 检测，条带位置正确后送公司测序，保存经测序对比正确的菌液。

1.2.2　生物信息学分析

采用 NCBI ORF Finder 查找序列的 ORF；用在线软件 BioEdit 预测该基因氨基酸序列；用 Blastx 进行同源序列比对，搜索不同物种中的同源基因及蛋白，并先将氨基酸序列利用 Clustal X 进行多序列比对的分析，借助 MEGA 5.1 软件的 Neighbor-Joining 算法，1 000 次重复，以默认参数构建系统发育进化树[21]。

1.2.3　Real-time PCR 分析 *BpTCP*2 基因的表达特性

使用 RNA 提取试剂盒提取白桦不同组织部位（顶芽、腋芽、木质部、韧皮部、1 ~ 7 茎节、1 ~ 13 叶片）、5 种外源植物激素（IAA、ABA、BR、JA、SA）及 4 种非生物胁迫（NaCl、$NaHCO_3$、$CdCl_2$、PEG）处理后的整株材料的总 RNA，并进行反转录。根据克隆获得的 *BpTCP*2 基因的全长 cDNA 序列设计定量引物，同时选用 *α-Tubulin* 作为内参基因[21]（引物见表 1）。获得的 cDNA 稀释 10 倍作为 qPCR 模板。实时定量 PCR 反应体系为：6 μL Top qMix，0.24 μL Passive Reference Dye，2 μL cDNA，10 μmol/L 的上、下游引物各 0.24 μL，用 ddH_2O 补足反应体系至 12 μL。扩增反应在 ABI PRISM® 7500 荧光定量 PCR 仪上完成，反应程序为 94 ℃预变性 30 s，94 ℃变性 5 s，56 ℃退火 15 s，72 ℃延伸 34 s（45 个循环），绘制溶解曲线的温度为 95 ℃持续 15 s，60 ℃持续 1 min，95 ℃持续 30 s。所有样品均进行 3 次重复，采用– ΔΔCt 方法进行基因的相对定量分析。

表 1　实时荧光定量 PCR 引物序列

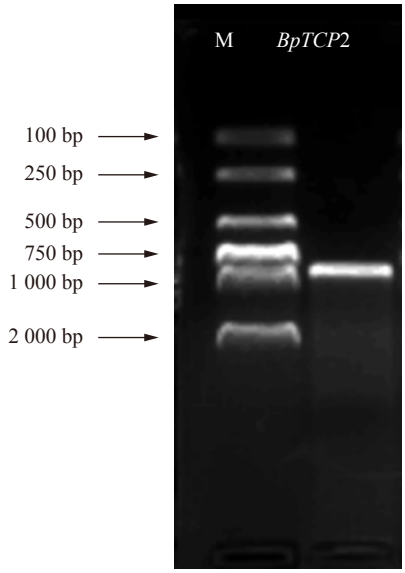
Tab. 1　Real-time PCR primer sequences

引物名称 Primer name	上游引物序列（5′→3′）Forward primer (5′→3′)	下游引物序列（5′→3′）Reverse primer (5′→3′)
*BpTCP*2	5′-GCTTGCATACAAAGATGGAAGG-3′	5′-GGAAAAGCTCAATGGACCCAG-3′
α-Tubulin	5′-GCACTGGCCTCCAAGGAT-3′	5′-TGGGTCGCTCAATGTCAAGG-3′

2　结果与分析

2.1　*BpTCP*2 基因的克隆

以白桦不同组织部位的 cDNA 为模板，根据白桦基因组序列和转录组数据比对获得 *BpTCP*2 基因序列设计特异性引物，PCR 扩增其全长 cDNA 序列，扩增产物于 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测（图 1），纯化后的胶回收产物通过 Topo 反应进行菌液 PCR 检测，结果显示在 813 bp 处获得特异性条带，与预期目标条带大小一致（图 2）。



M.DL2000 Marker.

图 1　*BpTCP*2 基因 PCR 扩增片段

Fig. 1　PCR amplified fragment of *BpTCP*2 gene

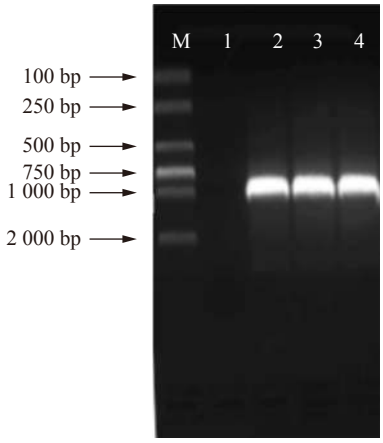
2.2　白桦 *BpTCP*2 基因的生物信息学分析

2.2.1　白桦 *BpTCP*2 基因编码区序列分析

利用 BLASTx 及 NCBI ORF Finder 预测 *BpTCP*2 基因的 ORF 全长，利用生物学软件 BioEdit 预测 *BpTCP*2 基因的 ORF 全长为 804 bp，编码 267 个氨基酸（图 3）。

2.2.2　白桦 *BpTCP*2 基因结构域分析

分别选取拟南芥、葡萄（*Vitis vinifera*）、水稻（*Oryza sativa*）、毛果杨（*Populus trichocarpa*）4 个物种 *PCF* 亚类基因各 2 条与 *BpTCP*2 基因进行氨基酸的多序列比对分析，结果如图 4 所示，*BpTCP*2 基因与其他物种 *PCF* 亚类基因的氨基酸序列均含有 TCP 保守结构域 bHLH[22]。bHLH 基序由 44 个氨基酸组成，包括一个能与 DNA 结合的碱性区域和 α 螺旋 1-环-α 螺旋 2（Helix1- Loop-Helix2）组成[23−24]，其中 Basic 结构域含有 16 个氨基酸，helixI、loop 和 helixII 结构域分别含有 11、8 和 9 个氨基酸。从比对



M. DL2000 Marker; 1.水对照; 2 ~ 4 菌液 PCR。M, DL2000 Marker; 1, water control; 2−4, bacterial solution PCR.

图 2 *BpTCP*2 基因 Topo 菌液 PCR 片段

Fig. 2 PCR fragment of *BpTCP*2 gene

```
1    ATGGCAGAGAGCAAGCCTGCAGAAGTCACGGACTTCCAAATTATGATTGCAAACAAAGAT
1    M  A  E  S  K  P  A  E  V  T  D  F  Q  I  M  I  A  N  K  D

61   GATAGCAAGAAGCAGTTAGCTCCCAAGCGAAGCTCCACCAAAGACAGGCACAAAAAAGTG
21   D  S  K  K  Q  L  A  P  K  R  S  S  T  K  D  R  H  K  K  V

121  GATGGTAGAGGCAGAAGAATAAGGATGCCAGCTCTTTGCGCAGCCAGGGTCTTCCAATTG
41   D  G  R  G  R  R  I  R  M  P  A  L  C  A  A  R  V  F  Q  L

181  ACCAGAGAATTGGGTCACAAGTCCGATGGTGAAACAATTCAGTGGCTCTTACAGCAAGCA
61   T  R  E  L  G  H  K  S  D  G  E  T  I  Q  W  L  L  Q  Q  A

241  GAACCATCAATTATAGCTGCAACCGGTAGTGGGACTATTCCAGCTTCGGCTCTCGCAGCT
81   E  P  S  I  I  A  A  T  G  S  G  T  I  P  A  S  A  L  A  A

301  GCAGGGGCCTCGGTTTCTGAACAGGGGATTTCTGTTTCAACAGGCTTGCATACAAAGATG
101  A  G  A  S  V  S  E  Q  G  I  S  V  S  T  G  L  H  T  K  M

361  GAAGGGCTAGGACCAGGTGTTGGGTCCGGAGGTAGGGCCAATTGGGCAATGATGAGCGGT
121  E  G  L  G  P  G  V  G  S  G  G  R  A  N  W  A  M  M  S  G

421  AACTTGGGTAAACCTCACGTGTCAAGCGGGATGTGGCCCTCTATCGGTGGAATTGGGTCA
141  N  L  G  K  P  H  V  S  S  G  M  W  P  S  I  G  G  I  G  S

481  GGGTTTGTTCACAATTCAAGCCACTCATCGTTGAATTTCGGCGGCGATAACTCGAATTTC
161  G  F  V  H  N  S  S  H  S  S  L  N  F  G  G  D  N  S  N  F

541  TTTCCTAAATTTGGGTTCCATGGGTTTGAATTTCCTAATATGAATCTGGGTCCATTGAGC
181  F  P  K  F  G  F  H  G  F  E  F  P  N  M  N  L  G  P  L  S

601  TTTTCCACATTTATGAGTGGAAATAACCGGCAAGTCCCTGGCTTGGAGCTTGGGCTTTCG
201  F  S  T  F  M  S  G  N  N  R  Q  V  P  G  L  E  L  G  L  S

661  CAGGATGGTCATATTGGGATGCTGAATTCTCAAGCTTTGAGCCAGATTTACCGACAGATG
221  Q  D  G  H  I  G  M  L  N  S  Q  A  L  S  Q  I  Y  R  Q  M

721  GGGCAGAGCCGAGGTGAGGAAGTTTCCTTGAATCAGCACCAGGAAGCTTCTGATAAGGAT
241  G  Q  S  R  G  E  E  V  S  L  N  Q  H  Q  E  A  S  D  K  D

781  GATTCTGAAGGGTCAAGGCAGTAG
261  D  S  E  G  S  R  Q  END
```

图 3 *BpTCP*2 基因编码区序列及推测的氨基酸序列

Fig. 3 *BpTCP*2 gene coding sequence and predicted amino acid sequence

结果可以看出无论是 Basic 结构域还是其他 3 个结构域均高度保守。

2.2.3 白桦 *BpTCP*2 基因的进化树分析

利用 MEGA 5.1 对白桦 *BpTCP*2 与拟南芥、水稻、葡萄及毛果杨 TCP 的蛋白序列进行聚类分析，结果如图 5 所示，97 个 TCP 成员被清楚的分为 Class I（PCF）和 Class II（CIN 和 CYC/TB1）两大类，其中 *BpTCP*2 属于 PCF 亚类，并与毛果杨的 *TCP*1 基因相似性较高。

2.3 *BpTCP*2 基因的组织表达特性分析

2.3.1 不同组织部位

以叶为对照，分析了 *BpTCP*2 基因在顶芽、腋芽、嫩茎、木质部及韧皮部的表达情况（图 6），结果表明：该基因在腋芽中表达量最低，而在其他 4 个组织部位中均上调表达，尤其在木质部和韧皮部中，表达量分别上调 32 倍和 16 倍。

2.3.2 不同叶发育阶段

根据白桦叶片的发育情况，分别选取从幼嫩到衰老整个发育阶段的叶片（图 7），并以第 1 片叶为对照，分析了 *BpTCP*2 基因在叶片不同发育时期的表达情况（图 8），结果表明：该基因随着叶龄的增加整体呈现下调的趋势；在前期发育过程中（第 1 ~ 4 片叶）*BpTCP*2 表达量呈现先下调后上调的趋势；在中期发育过程（第 5 ~ 9 片叶），该基因表达量变化并不明显（< 2 倍），但低于对照；在后期发育过程（第 10 ~ 13 片叶）中，该基因持续下调，在第 12 片叶时下调达到峰值，为对照的 128 倍，在第 13 片叶时表达量略有回升。

2.3.3 茎节发育阶段

根据白桦茎节的发育情况，选取了白桦从幼嫩到成熟的茎节如（图 9），分析 *BpTCP*2基因在茎节发育阶段的表达情况（图 10），以第 1 茎节为对照，该基因在茎发育初期，表达量呈现持续上调的趋势，尤其是在第 4 茎节中表达量达到最高峰，为对照的 4 倍。但从第 5 茎节到成熟茎节其在韧皮部中的表达量变化不明显（< 2 倍）。

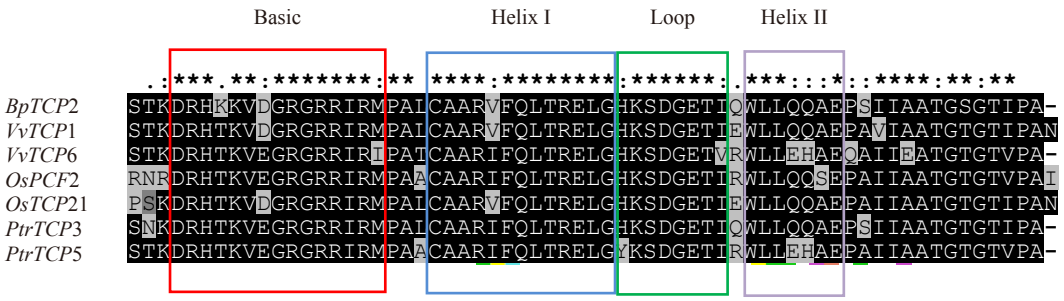


图 4 白桦 *BpTCP*2 基因结构域

Fig. 4 *BpTCP*2 gene domain from *Betula platyphylla*

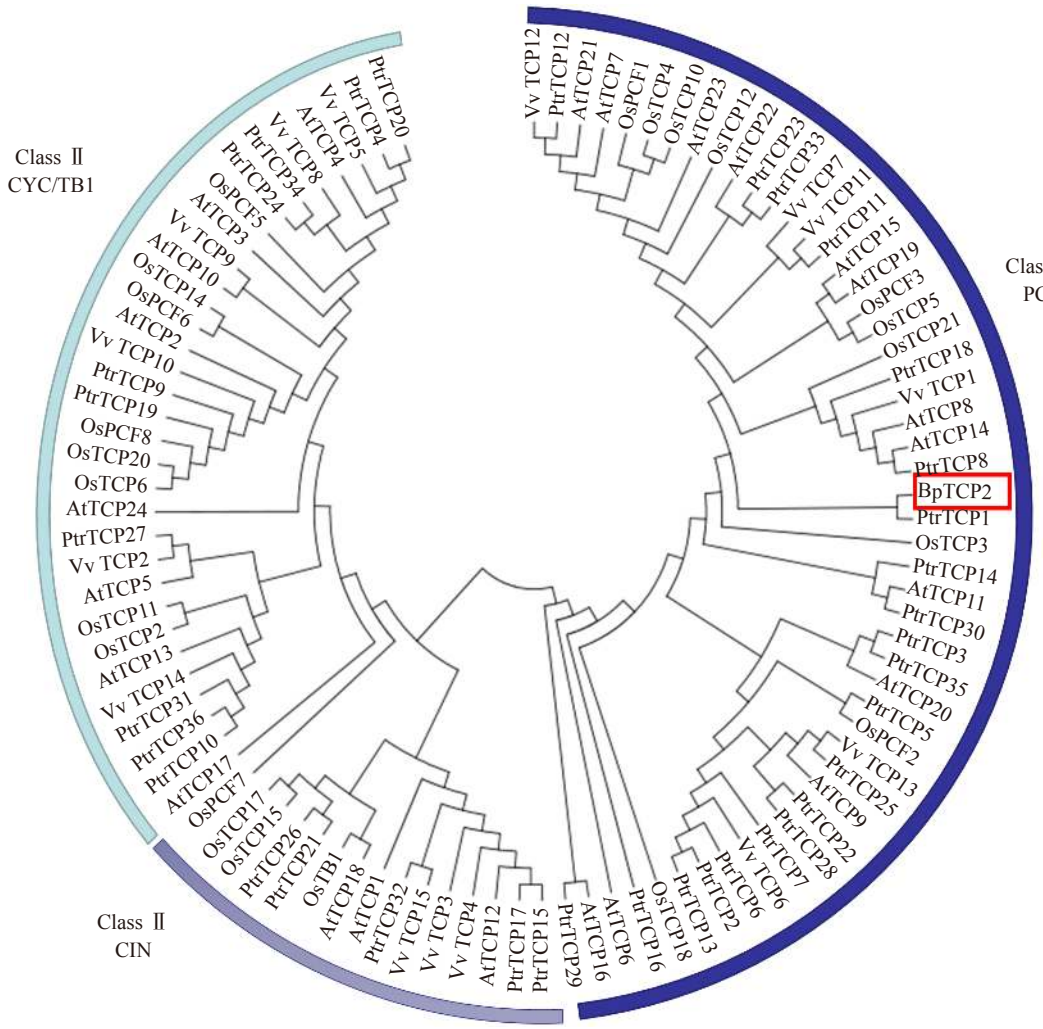
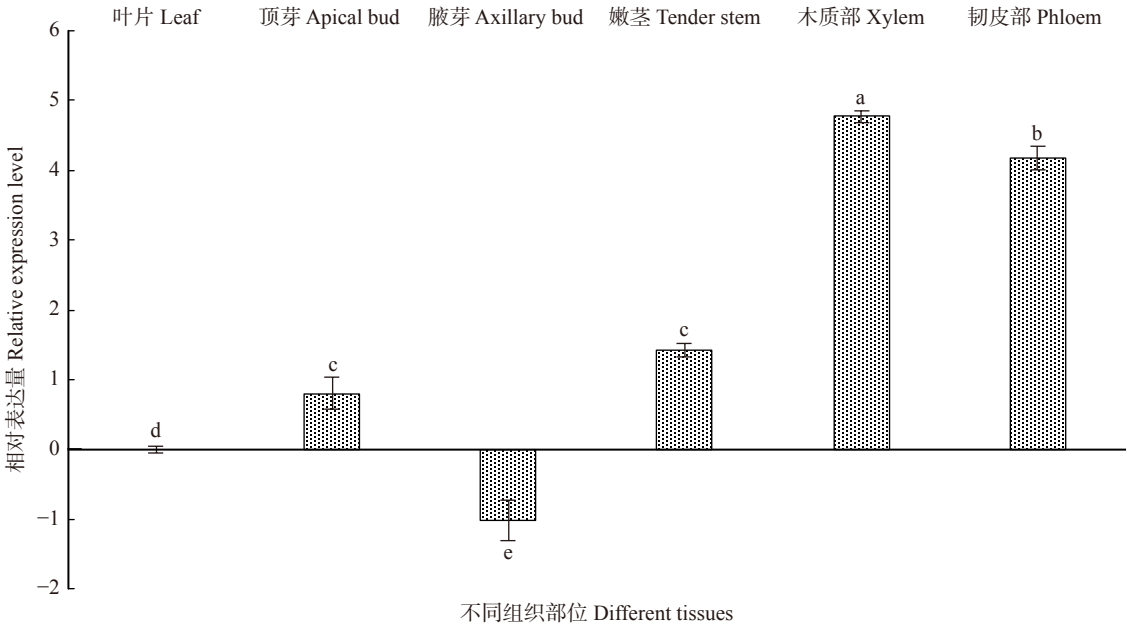


图 5　白桦 BpTCP2 与其他 4 个物种 TCP 蛋白的进化树

Fig. 5　Phylogenetic tree of BpTCP2 and TCP proteins from other four species



不同小写字母表示不同组织部位的基因表达差异显著性（$P < 0.05$）。Different lowercase letters indicate significant differences in gene expression at different tissue sites ($P < 0.05$).

图 6　*BpTCP*2 在不同组织部位下的相对表达量

Fig. 6　Relative expression level of *BpTCP*2 at different tissues of birch

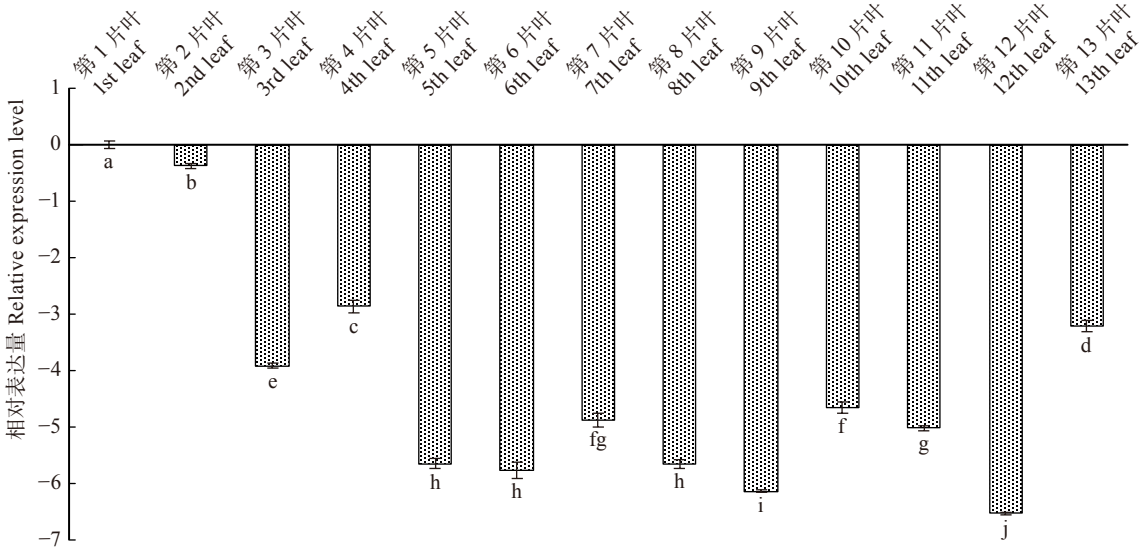
图中叶片从左到右分别是从顶端数第 1 到第 13 片叶片。In the figure, the blades are from the left to the right, representing the first to thirteenth blades from the top.

图 7 不同发育时期的叶片

Fig. 7 Leaves at different developmental stages

2.4 激素应答分析

在 BR、JA、SA、IAA、ABA 这 5 种激素处理下，*BpTCP*2 的表达情况呈现不同的表达趋势，如图 11 所示。在 BR 处理下，*BpTCP*2 基因呈现下调表达的趋势，尤其是在 4 h 时表达量达到最低值，下调为对照的 256 倍，随着处理时间的延长，其略有上升但还是低于处理前（0 h）；在 JA 处理过程中，除 6、12 h 与对照相比变化不明显外，其他时间点均呈现上调表达的趋势，尤其在 4 h 时，其表达量明显比对照提高了 32 倍；SA 处理后，*BpTCP*2 的表达量在 12 h 前均上调，且在 6 h 时达到峰值，为未处理的 8 倍，而在 24 h 时骤然下调为 4 倍；在 IAA 的处理过程中，*BpTCP*2 基因呈现下调表达的趋势，且除了 6 h 外，在其他时间点 *BpTCP*2 基因的表达量没有发生明显的变化（< 2 倍）；在 ABA 处理过程中，*BpTCP*2 的表达量呈现波动，在 12 h 时表达量达到最高峰，为对照的 32 倍，而在 24 h 时表达量最低，为对照的 64 倍。



不同小写字母表示不同发育时期叶片的基因表达差异显著性（$P < 0.05$）。Different lowercase letters indicate significant differences in gene expression between leaves at varied developmental stages ($P < 0.05$).

图 8 *BpTCP*2 在不同叶片发育下的相对表达量

Fig. 8 Relative expression level of *BpTCP*2 during leaf development

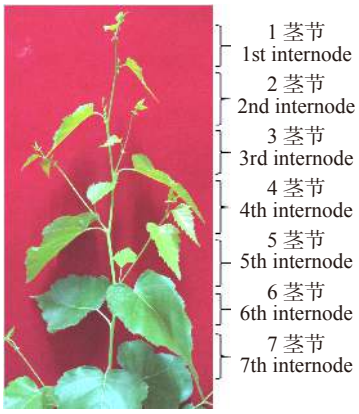


图 9 不同发育时期的茎节

Fig. 9 Stem segments at different developmental stages

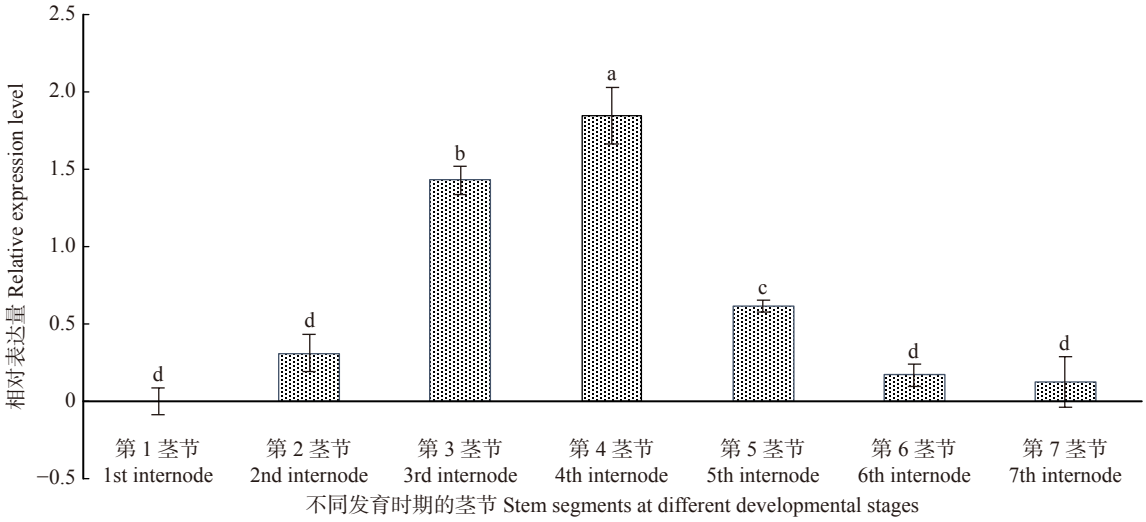
2.5 非生物胁迫应答分析

通过 $CdCl_2$、NaCl、$NaHCO_3$、PEG 4 种胁迫处理，分析 *BpTCP*2 的表达情况，结果如图 12 所示。其中，在 $CdCl_2$、NaCl 和 $NaHCO_3$ 处理下，*BpTCP*2 基因的表达模式相似且均为高表达，并且 $CdCl_2$ 和 NaCl 在处理 12 h 时上调表达量达到峰值，分别为对照的 128 倍和 64 倍，$NaHCO_3$ 处理后表达量最高峰出现在 24 h，为对照的 64 倍；在 PEG 胁迫处理过程中，*BpTCP*2 与对照相比变化并不明显（< 2 倍）。

3 讨 论

通过对白桦的 BpTCP2 氨基酸序列以及葡萄、拟南芥、水稻、毛果杨 TCP 氨基酸序列进行系统聚类分析，根据其序列差异将其分为 Class I（PCF）和 Class II（CIN 和 CYC/TB1）两大类，其中 *BpTCP*2 属于 Class I 类 PCF 亚类。Class I 类和 Class II 类相比，Class I 类在 Basic 结构域上有 4 个氨基酸的缺失[25−26]。

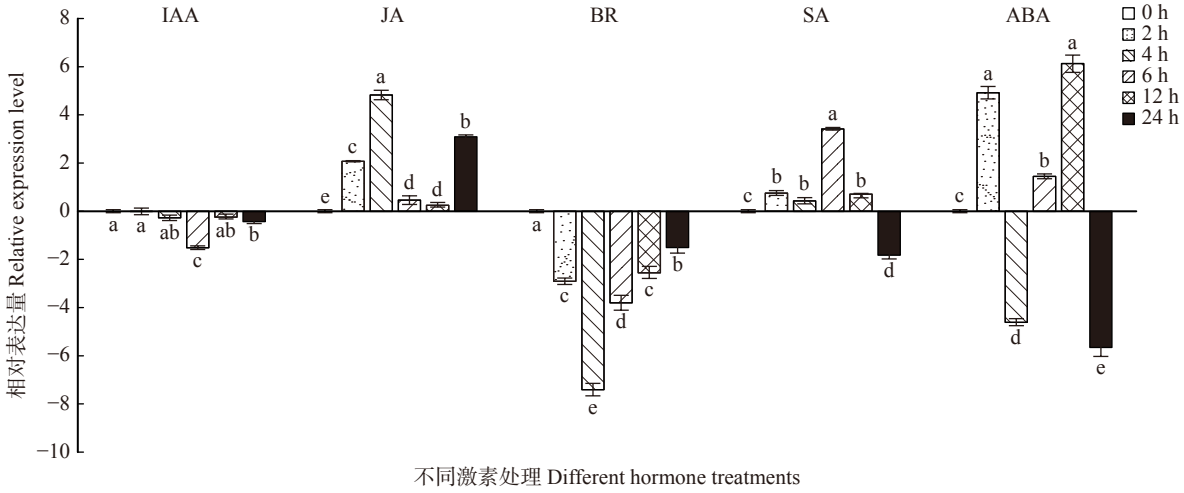
分析 *BpTCP*2 在不同组织部位的特异性表达发



不同小写字母表示不同发育时期的茎节基因表达差异显著性（$P < 0.05$）。Different lowercase letters show significant differences in gene expression between stem segments at different developmental stages ($P < 0.05$).

图 10　*BpTCP*2 在不同茎节发育下的相对表达量

Fig. 10　Relative expression level of *BpTCP*2 during stem development



不同小写字母表示不同处理下不同时间点的基因表达差异显著性（$P < 0.05$），下同。Different lowercase letters mean significant difference in gene expression at different time points under varied treatments ($P < 0.05$). Same as below.

图 11　*BpTCP*2 在植物激素信号下的相对表达量

Fig. 11　Relative expression level of *BpTCP*2 under hormone treatments

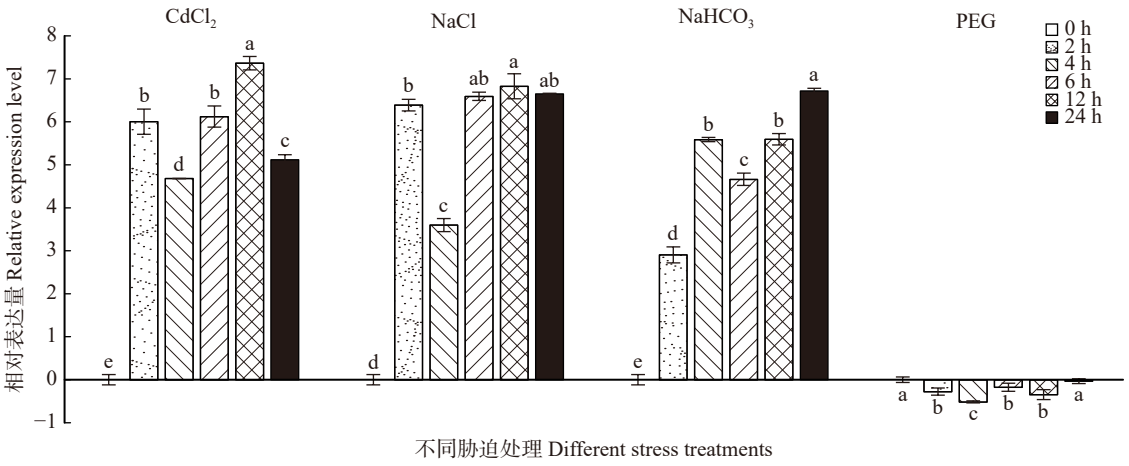


图 12　*BpTCP*2 在植物激素信号下的相对表达量

Fig. 12　Relative expression level of *BpTCP*2 under abiotic stress

现，该基因在嫩茎、木质部、韧皮部、顶芽中均呈上调表达，且在木质部中表达量最高，表明 *BpTCP*2 可能与木质素的生物合成相关。在安家兴等人[11] 的研究中，也证明了 Class I 类 PCF 亚类的 *AtTCP*11 通过改变 *VND*7 的表达量从而影响维管束的发育。分析 *BpTCP*2 在茎节发育中的表达水平，从第 1 茎节到第 4 茎节表达量呈现持续上调的趋势，说明 *BpTCP*2 可能参与白桦茎的初期发育，Kieffer 等[27] 发现了 *AtTCP*15 和 *AtTCP*14 的突变体通过影响细胞增殖来影响茎节发育。在叶片发育的表达分析中，随着叶龄的增加，*BpTCP*2 表达量整体呈现一个下调的趋势说明 *BpTCP*2 可能和延缓衰老相关，张春雷等[28] 人在对拟南芥的 PCF 亚类基因 *AtTCP*15、*AtTCP*22 研究时发现，35*S*::*TCP*15-*SRDX* 和 35*S*::*TCP*22-*SRDX* 同时表现出提前衰老的现象。

近年研究发现 TCP 转录因子除了在植物发育过程中发挥重要作用外，还参与植物激素及胁迫的信号传导等过程[29]，同时我们对 *BpTCP*2 基因的启动子序列进行分析，也发现其含有多种激素和胁迫的应答元件（未发表），故本研究对 *BpTCP*2 基因进行了外源激素和非生物胁迫应答分析，结果表明，在植物激素处理下，*BpTCP*2 呈现不同的表达趋势。经 ABA 处理后，*BpTCP*2 呈现出先上调后下调的波动型表达模式，说明该基因参与 ABA 的信号应答。Mukhopadhyay 等[30] 对 PCF 亚类的 *OsTCP*19 的信号通路进行研究，发现 OsTCP19 通过与转录因子 ABI4 的互作来调控 *ABI*3 的表达从而对 ABA 信号通路进行调控；经 BR 处理后，*BpTCP*2 整体均呈现下调表达，尤其在 4 h 时表达量最低，说明 *BpTCP*2 明显的响应了 BR 的信号且为负响应模式。DWARF4 是 BR 生物合成中的关键酶，在拟南芥中，通过染色体免疫共沉淀发现 *AtTCP*1 可以促进 *DWF*4 的表达，使内源 BR 含量增加，促进植物的生长[29]；在 IAA 处理后，*BpTCP*2 在 6 h 时呈现下调表达的趋势而在其他时间点表达量变化并不明显，说明 *BpTCP*2 也响应了 IAA 的初期信号。在拟南芥中 CIN 类的 *AtTCP*3 可以引起 IAA 合成的负调节因子 CYP83B1/SUR2 的上调[31]，*AtTCP*15（PCF 类）也可间接诱导 *IAA*3/*SHY*2 表达[2]，通过使用 IAA 响应原件 *DR*5::*GUS* 分析，*AtTCP*15 和 *AtTCP*3 在一定程度上功能冗余，表明他们在 IAA 信号通路中可能发挥着相同的作用，这与 *BpTCP*2 处理后的结果类似；在 JA 处理后，*BpTCP*2 除 6 h、12 h 与对照相比变化不明显外，其他时间点均呈现上调表达的趋势，说明 *BpTCP*2 响应了 JA 的信号且为正响应模式，在冯志娟等人[29] 的研究中，*LIPOXYGENASE*2（*LOX*2）基因受 TCP 转录因子的调控且 *LOX*2 的诱导使 JA 积累；在 SA 处理下，*BpTCP*2 的表达量在 12 h 前均为上调表达，但在 24 h 时骤然下降，说明 *BpTCP*2 响应了 SA 的信号，拟南芥 AtTCP8（PCF 亚类）与 ICS1 转录激活因子 SARD1 和 WRKY28 以及 ICS1 阻遏蛋白 NAC019 相互作用，*ICS*1 基因是编码 SA 生物合成过程中必需的酶[32] 且拟南芥中 AtTCP8 可以作为效应诱导免疫过程中的正向调节者[29]。

在 $CdCl_2$、NaCl、$NaHCO_3$ 处理过程中，*BpTCP*2 呈现上调表达的趋势，表明该基因在相应的非生物胁迫过程中表现出正调控模式，这一结果与水曲柳（*Fraxinus mandschurica*）和木薯（*Manihot esculenta*）的研究结果一致，水曲柳的 *FmTCP*4 和木薯的 *MeTCPs* 基因在盐胁迫下也呈现出正响应模式[33−34]；在水稻中，*OsTCP*19 的过表达导致 *LOX*2（茉莉酸信号通路基因）的下调，从而减少水分流失和活性氧的缺失以及脂肪的积累，进而提高植株的耐盐性[30]；本实验团队前期对 $Prom_{TCP7}$::GUS 拟南芥株系进行盐、旱处理，发现该基因对盐、旱途径均有不同程度响应[35]。耐盐性结果与本实验基本一致，但在 PEG（干旱）处理下，*BpTCP*2 的变化并不明显。目前，miR319 的靶位点已在多个物种的 *TCP* 基因中被发现，在植物非生物胁迫应答的过程中，miR319 与 *TCP* 基因的模式靶向关系为负调控[29]，作为 miR319 的靶基因，*TCP* 家族基因间存在功能冗余与分歧；并且在拟南芥中 Viola 等[36] 发现，半胱氨酸（Cys-20）是 *AtTCP*15 保守结构域中的重要组成部分，*AtTCP*15 通过其在氧化胁迫条件下发生的氧化反应从而抑制该基因的转录水平，进而参与非生物胁迫过程。

4 结　　论

本实验成功克隆了 *BpTCP*2 基因，生物信息分析表明该基因属于 Class I 类 PCF 亚类且含有高度保守的 bHLH 结构域；*BpTCP*2 参与木质素的生物合成、初期茎节发育及叶片发育过程；*BpTCP*2 参与植物外源激素（ABA、IAA、BR、JA、SA）及非生物胁迫（重金属、盐、碱）的响应。

参 考 文 献

[1] Ma J, Liu F, Wang Q, et al. Comprehensive analysis of TCP transcription factors and their expression during cotton (*Gossypiumarboreum*) fiber early development[J/OL]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 21535 [2018−11−30]. https://doi.org/10.1038/srep21535.

[2] 冯雅岚, 熊瑛, 张均, 等. TCP 转录因子在植物发育和生物胁迫响应中的作用 [J]. 植物生理学报, 2018, 54(5): 22−30.
Feng Y L, Xiong Y, Zhang J, et al. The role of TCP transcription factors inplant development and biotic stress response[J].

Chinese Journal of Plant Physiology, 2018, 54(5): 22−30.

[3] Luo D, Carpenter R, Vincent C, et al. Origin of floral asymmetry in *Antirrhinum*[J]. Nature, 1996, 83: 794−799.

[4] Luo D, Carpenter R, Copsey L, et al. Control of organ asymmetry in flowers of *Antirrhinum*[J]. Cell, 1999, 99(4): 367−376.

[5] Nath U. Genetic control of surface curvature[J]. Science, 2003, 299: 1404−1407.

[6] Palatnik J F, Allen E, Wu X, et al. Control of leaf morphogenesis by microRNAs[J]. Nature, 2003, 425: 257−263.

[7] Ori N, Cohen A R, Etzioni A, et al. Regulation of *LANCEOLATE* by *miR319* is required for compound-leaf development in tomato[J]. Nature Genetics, 2007, 39(6): 787−791.

[8] Schommer C, Palatnik J F, Aggarwal P, et al. Control of Jasmonate Biosynthesis and Senescence by miR319 Targets[J/OL]. PLoS Biology, 2008, 6(9): e230 [2018−11−30]. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060230.

[9] Mao C, Lu S, Lü B, et al. A rice NAC transcription factor promotes leaf senescence via ABA biosynthesis[J]. Plant Physiology, 2017, 174(3): 1747−1763.

[10] Tatematsu K, Nakabayashi K, Kamiya Y, et al. Transcription factor AtTCP14 regulates embryonic growth potential during seed germination in *Arabidopsis thaliana*[J]. The Plant Journal, 2008, 53(1): 42−52.

[11] 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. *Arabidopsis thaliana TCP11* regulates the development of vascular bundles[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2012.

[12] Cubas P, Lauter N, Doebley J, et al. The TCP domain: a motif found in proteins regulating plantgrowth and development[J]. The Plant Journal, 1999, 18(2): 215−222.

[13] Herve 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.

[14] 周瑜. TCP 转录因子通过促进 PIFs 活性和生长素合成基因的表达调控避荫反应 [D]. 兰州: 兰州大学, 2018.
Zhou Y. TCP transcription factors regulate shade avoidance via promoting the activity of PIFs and the expression of auxin biosynthetic genes[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2018.

[15] Ubertimanasero N G, Lucero L E, Viola I L, et al. The class I protein AtTCP15 modulates plant development through a pathway that overlaps with the one affected by CIN-like TCP proteins[J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63(2): 809−823.

[16] Koyama T, Mitsuda N, Seki M, et al. TCP transcription factors regulatethe activities of ASYMMETRIC LEAVES1 and miR164, as well as the auxin response, during differentiation of leaves in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 2010, 22(11): 3574−3588.

[17] 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 Physiology, 2012, 159(4): 1511−1523.

[18] 刘伟娜, 韩建民, 董金皋, 等. 棉花 TCP 家族转录因子基因 *GhTCP*1 的克隆与表达分析 [J]. 棉花学报, 2010, 22(5): 409−414.
Liu W N, Han J M, Dong J G, et al. Cloning and expression analysis of cotton TCP family transcription factor gene *GhTCP*1[J]. Journal of Cotton, 2010, 22(5): 409−414.

[19] Steiner E, Efroni I, Gopalraj M, et al. The *Arabidopsis* O-linked N-acetylglucosamine transferase SPINDLY interacts with class I TCPs to facilitate cytokinin responses in leaves and flowers[J]. Plant Cell, 2012, 24(1): 96−108.

[20] Daviere J M, Wild M, Regnaul T, et al. Class I TCP-DELLA interactions in inflorescence shoot apex determine plant height[J]. Current Biology, 2014, 24(16): 1923−1928.

[21] 宁坤, 杨洋, 马述山, 等. 11 条白桦 *BpSPL* 家族基因的生物信息学和表达分析 [J]. 林业科学研究, 2016, 29(5): 646−653.
Ning K, Yang Y, Ma S S, et al. Bioinformatics and expression analysis of 11 *BpSPL* family genes in *Betula platyphylla*[J]. Forest Research, 2016, 29(5): 646−653.

[22] 董京祥, 任丽, 张园, 等. 白桦 *BpTCPs* 基因家族生物信息学及时空表达分析 [J]. 南京林业大学学报, 2018, 42(4): 113−118.
Dong J X, Ren L, Zhang Y, et al. Analysis of temporal and spatial expression of *BpTCPs* gene family bioinformatics in *Betula platensis*[J]. Journal of Nanjing Forestry University, 2018, 42(4): 113−118.

[23] 王勇江, 陈克平, 姚勤. bHLH 转录因子家族研究进展 [J]. 遗传, 2008, 30(7): 821−830.
Wang Y J, Chen K P, Yao Q. Research progress of bHLH transcription factor family[J]. Genetics, 2008, 30(7): 821−830.

[24] 刘文文, 李文学. 植物 bHLH 转录因子研究进展 [J]. 生物技术进展, 2013, 3(1): 7−11.
Liu W W, Li W X. Research progress of plant bHLH transcription factors[J]. Progress in Biotechnology, 2013, 3(1): 7−11.

[25] Manassero N G, Viola I L, Welchen E, et al. TCP transcription factors: architectures of plant form[J]. Biomolecular Concepts, 2013, 4(2): 111−127.

[26] De Paolo S, Gaudio L, Aceto S. Analysis of the *TCP* genes expressed in the inflorescence of the orchid *Orchis italica*[J/OL]. Scientific Reports, 2015, 5(1): 16265[2018−11−30]. https://doi.org/10.1038/srep16265.

[27] Kieffer M, Master V, Waites R, et al. TCP14 and TCP15 affect internode length and leaf shape in *Arabidopsis*[J]. The Plant Journal for Cell & Molecular Biology, 2011, 68(1): 147−158.

[28] 张春雷. 拟南芥 *TCP*15、*TCP*22 基因功能的研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2012.
Zhang C L. Study on the function of *TCP*15 and *TCP*22 genes in *Arabidopsis thaliana*[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2012.

[29] 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.

[30] Mukhopadhyay P, Tyagi A K, Tyagi A K. *OsTCP*19 influences

developmental and abiotic stress signaling by modulating ABI4-mediated pathways[J/OL]. Scientific Reports, 2015, 5: 9998 [2018−11−30]. https://doi.org/10.1038/srep09998.

[31] Li S, Zachgo S. TCP3 interacts with R2R3-MYB proteins, promotes flavonoid biosynthesis and negatively regulates the auxin response in *Arabidopsis thaliana*[J]. The Plant Journal, 2013, 76(6): 901−913.

[32] Xiaoyan W, Jiong G, Zheng Z, et al. TCP transcription factors are critical for the coordinated regulation of *ISOCHORISMATE SYNTHASE* 1 expression in *Arabidopsis thaliana*[J]. The Plant Journal, 2015, 82(1): 151−162.

[33] 刘春浩, 梁楠松, 于磊, 等. 水曲柳 *TCP*4 转录因子克隆及胁迫和激素下的表达分析 [J]. 北京林业大学学报, 2017, 39(6): 22−31.

Liu C H, Liang N S, Yu L, et al. Cloning of *TCP*4 transcription factor from ash and expression analysis under stress and hormone[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2017, 39(6): 22−31.

[34] Lei N, Yu X, Li S, et al. Phylogeny and expression pattern analysis of TCP transcription factors in cassava seedlings exposed to cold and/or drought stress[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 10016.

[35] 杨洋. 白桦 *BpTCP*7 基因的功能研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2016.

Yang Y. Function analysis of *BpTCP*7 gene in *Betula platyphylla*[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2016.

[36] Viola I L, Camoirano A, Gonzalez D H. Redox-dependent modulation of anthocyanin biosynthesis by the TCP transcription factor TCP15 during exposure to high light intensity conditions in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2015, 34(1): 35−40.

（责任编辑 崔艳红
责任编委 卢孟柱）