

水曲柳 TCP4 转录因子克隆及胁迫和激素下的表达分析

Cloning, analysing and homologous expression of TCP4 transcription factor under abiotic stress and hormone signal in *Fraxinus mandschurica*.

G06 刘春浩 朱晨 吴雅鑫 祁铨格

报告人刘春浩

2019.1.12

中文摘要

英文摘要

前言

1 材料和方法

1.1 材料处理

1.2 研究方法

1.2.1 FmTCP4 基因编码区全长的克隆

1.2.2 FmTCP4 基因编码区序列的生物信息分析

1.2.3 FmTCP4 基因在逆境胁迫和激素信号下的表达分析

2 结果与分析

2.1 FmTCP4 基因编码区全长的鉴定

2.2 FmTCP4 蛋白质一级结构的分析

2.2.1 氨基酸序列理化性质分析

2.2.2 信号肽的预测和分析

2.2.3 跨膜结构的预测及分析

2.2.4 亚细胞定位预测

2.3 FmTCP4 蛋白质三维结构的预测

2.4 FmTCP4 蛋白氨基酸序列比对及保守结构域的预测

2.5 FmTCP4 蛋白系统进化树的构建

2.6 FmTCP4 在非生物胁迫下的表达模式

2.7 FmTCP4 在激素信号下的表达模式

3 结论与讨论

参考文献

摘要： TCP转录因子家族是植物特异的一类调控生长发育和逆境胁迫的重要转录因子。为进一步研究TCP转录因子在水曲柳生长发育和非生物胁迫中的作用，对水曲柳*FmTCP4*基因进行了克隆和详细的生物信息学分析，并且对其在非生物胁迫和激素信号诱导下的基因表达作了分析。多序列比对结果表明，*FmTCP4*与拟南芥中调控发育的*AtTCP4*基因以及水稻寒冷调控中起重要作用的TCP家族基因*OsPCF5*具有较高同源性。系统进化树表明其与金鱼草和芝麻等同源基因亲缘关系较近。基因表达分析表明，*FmTCP4*响应了寒冷、盐、干旱等非生物胁迫以及激素信号，说明其可能参与了植物的生长发育和逆境胁迫的平衡。

关键词： 水曲柳； TCP转录因子； 基因克隆； 生物信息分析

TCP genes encode a plant-specific transcription factors family, which acted as a key role in regulating plant growth and development and stress response. In order to further study the mechanism of TCP transcription factor in regulating the growth and development and abiotic stress of Ash, we cloned detailed analyzed bioinformatics of the *FmTCP4*, and analyzed the gene expression pattern under abiotic stress and hormone signal. Multiple sequence alignment results showed that they have high homology to *Arabidopsis thaliana* gene *AtTCP4* and *Oryza sativa* gene *OsPCF5*, which participated the plant growth and cold regulation, respectively. Molecular evolution analysis results showed that the genetic distance of *FmTCP4* gene between *Antirrhinum majus* and *Sesamum indicum* species is relatively close. Gene expression analysis shows, that *FmTCP4* was responded under cold, salt, drought and other abiotic stress and hormone signals, it indicated that *FmTCP4* may involved in regulating the balance of plant growth and development and stress response.

Key words *Fraxinus mandschurica* Rupr.; TCP transcription factor; gene clone; bioinformatics analysis

转录因子通过调节动物和植物基因的时空表达水平，在生物体的细胞增殖、正常生长发育以及免疫反应过程中起到重要的调控作用[1]。**TCP转录因子家族是根据玉米中的TEOSINTEBRANCHE1 (TB1)、金鱼草中的CYCLOIDEA (CYC) 以及水稻中的PROLIFERATING CELL FACTORS 1和2 (PCF1和PCF2) 的三个基因的首字母来命名的[2-3]。它们是植物特有的碱性螺旋环类 (bHLH) 转录因子，编码59个氨基酸。基于TCP结构域序列上的差别，TCP转录因子家族被分为两个亚家族：class I (又名PCF或TCP-P) 和class II (又名TCP-C)，主要是class I和class II相比，在TCP基本结构域上缺失了一个短的氨基酸的结构 (四个氨基酸残基)，此外class I和class II的蛋白识别位点也有所差别，分别为GGNCCCAC和G (T/C) GGNCCC^[4-5]。TCP家族参与了植物发育中细胞增殖和细胞分化的调控，其中class I类在调控植物的生长以及胁迫应答中，起到正调控的作用，而class II则与I类功能有所拮抗^[4~6]。例如，AtTCP21 (CHE) 可以结合生物钟节律基因CCA1的启动子，直接调控CCA1的启动子并影响CCA1的活性，进而调控植物对昼夜节律^[7]；拟南芥中，AtTCP14参与了种子的萌发，主要表达在种子维管束组织中，并调控了种子胚根基因的表达以激活拟南芥种子的胚的发育^[8]；AtTCP20对于细胞分裂和生长协调是必不可少的，AtTCP20的转录激活域 (VP16) 或抑制域 (EAR) 被修饰后，AtTCP20的表达量发生改变，影响植物的株高、叶片形态 (卷曲) 以及开花时间^[9]；OsTCP19在调节非生物胁迫中发挥了重要的作用，盐和干旱条件下水稻中OsTCP19基因的表达量上调了5到6倍，并且在拟南芥中过量表达的OsTCP19引起ABI3、ABI4、IAA3的上调表达和LOX2下调表达，导致植株的发育异常，例如侧根的减少等^[10]。拟南芥的class II的成员AtTCP2、AtTCP3、AtTCP4、AtTCP10和AtTCP24，及其在不同物种的同源基因，存在miR319的结合位点，miR319靶向TCP转录因子，影响叶片发育以及细胞分化。例如，miR319的过表达，降低了TCP转录因子的表达，突变型叶片与野生型相比，成熟缓慢，分化程度较低；相反，TCP转录因子过表达的植株具有成熟早、细胞分裂减缓的特点^[11-12]。**

水曲柳 (*Fraxinus mandschurica Rupr.*) 系木犀科 (*Oleaceae*) 白蜡树属 (*Fraxinus L.*) 落叶乔木，是东北珍贵硬阔叶用材树种之一，与胡桃楸、黄菠萝合称为中国东北的“三大硬阔”。树干材质坚硬，纹理通直，被广泛地应用于建筑、仪器、家具、室内装饰、车辆中；其种子含油量为24.38%，可制肥皂；其树皮含鞣料3.09%，在某些地方，被作为中药“秦皮”用。但由于过度开采导致水曲柳种群数量明显变少，如不及时保护则易导致濒临灭绝。因此，对水曲柳科学研究、遗传改良、生态建设和社会经济发展具有重要的科学和实践意义^[13-14]。

本研究中获得了水曲柳TCP转录因子TCP4，命名为FmTCP4，*FmTCP4*与水稻中TCP转录因子*OsPCF5*基因具有很高的同源性，在水稻中，*OsPCF5*受到了*miR319*的调控，参与了水稻应对寒冷胁迫的调控。而*FmTCP4*在拟南芥中的同源基因*AtTCP4*参与了拟南芥的种子形成、细胞增殖与分化过程的调控。例如*AtTCP4*过量表达拟南芥的花粉不能产生可育的种子，并且*miR396b*激活编码的*AtTCP4*可以直接抑制细胞增殖分化^[6~11]；*miR319*调控的*AtTCP4*通过调控细胞周期蛋白依赖性激酶抑制蛋白 (*ICK1*) 和激酶抑制蛋白 (*KRP1*) 调控细胞周期^[11]。本文对水曲柳TCP4的编码区进行了克隆，同时进行了详细的生物信息学分析，对其在不同非生物胁迫以及激素等信号调控下的基因表达进行了测定，为进一步研究水曲柳*FmTCP4*的功能奠定了基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料和处理

水曲柳种子、叶片取自东北林业大学实验林场，将水曲柳幼苗置于恒温培养箱中培养，培养基质为V（营养土）：V（蛭石）=3:1。并调整培养箱维持适宜温度和湿度，日照长度为16h，保证植物正常生长。待水曲柳幼苗培养至20d时，取长势均一的植株进行处理。分别用4°C低温、200mM NaCl和20% w/v PEG6000干旱进行胁迫处理；用100μmol/L ABA和100μmol/L GA3进行激素信号处理，对照组不做任何处理。分别于处理后0h、6h、12h、24h、48h和72h取水曲柳幼苗，置于液氮中冷冻，并于-80°C下保存。NaCl、PEG600、ABA和GA3购自于sigma公司，Primer star Taq酶、One Step SYBR® PrimeScript™ RT-PCR Kit等购自于宝生物工程（大连）有限公司。引物合成和测序由生工生物工程（上海）股份有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 FmTCP4基因编码区全长的克隆

以水曲柳叶片作为材料，应用CTAB法提取总RNA。应用反转录试剂盒将RNA反转录为cDNA。**应用水曲柳转录组数据库，通过blastx和blastn比对分析确定TCP4基因序列并设计引物，对TCP4基因编码区全长进行克隆**（扩增引物见表1）。应用凝胶回收试剂盒对特异性扩增产物回收纯化，纯化产物与pMD18-T载体连接，转化克隆进入JM109感受态细胞，送生工生物工程（上海）股份有限公司测序。

表 1 克隆 *FmTCP4* 基因编码区对应引物

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
<i>FmTCP4</i> -F	5'-CCGCTCTACTCCACAACCTCCC-3'
<i>FmTCP4</i> -R	5'-GCTACTAGCTCACCCAGACAATAAAG3'

1.2.2 *FmTCP4*基因编码区序列的生物信息分析

利用**DNAMAN**软件对获得的水曲柳*FmTCP4*基因的核苷酸序列进行分析，并推测其蛋白质编码氨基酸序列。应用**Protparam**[15]在线分析软件分析*FmTCP4*蛋白的理化性质。使用**ProtScale**[15]在线分析软件中的**Kyte and Doolittle算法**分析*FmTCP4*蛋白的亲水/疏水性。应用**SignalP**[16]在线分析工具的神经网络算法预测并分析*FmTCP4*蛋白的信号肽。使用**TMpred**[17]在线工具预测并分析*FmTCP4*蛋白的跨膜结构。应用**COILS**[18]在线分析工具预测和分析*FmTCP4*蛋白的卷曲螺旋。使用**wolf psort**[19]在线工具对*FmTCP4*蛋白进行亚细胞定位分析。应用**GOR4**软件分析*FmTCP4*蛋白的二级结构[20-21]。利用NCBI数据库Conserved Domain Search Service (**CD Search**)在线分析软件，分析*FmTCP4*的保守结构域。应用NCBI数据库**Blast**对*FmTCP4*氨基酸序列进行同源序列比对，搜索不同物种中的同源基因及蛋白。并先采用**ClustalX**将氨基酸序列进行多序列比对的分析，然后利用**MEGA 5.0**软件，算法为Neighbor-Joining，自检举1000次，构建系统发育进化树[22-23]。

1.2.3 *FmTCP4*基因在逆境胁迫和激素信号下的表达分析

以水曲柳微管蛋白基因Tu作为内参基因，引物见表2。PCR反应体系如下：模板cDNA 2 μ L，Master Mix 10 μ L，正反向引物（10 μ mol/L）各1 μ L，用ddH₂O补足至总体积20 μ L。利用Applied Biosystems7500荧光定量PCR仪进行扩增，反应程序：95 $^{\circ}$ C、30s \rightarrow 95 $^{\circ}$ C、5s \rightarrow 60 $^{\circ}$ C、34s（共40个循环） \rightarrow 95 $^{\circ}$ C、15s \rightarrow 60 $^{\circ}$ C、1min \rightarrow 95 $^{\circ}$ C、15s。每份样品重复3次。目标基因表达水平运用相对定量的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法[24]（ $2^{-\Delta\Delta Ct} = \frac{CT_{目的基因} - CT_{管家基因}}{CT_{目的基因} - CT_{管家基因}}$ ）实验组 - （CT目的基因 - CT管家基因）对照，其中CT是热循环仪检测到反应体系中荧光信号的强度值）计算。

2 结果与分析

2.1 FmTCP4基因编码区全长的鉴定

以水曲柳叶片cDNA为模板进行PCR扩增，扩增结果如图1所示。测序后，通过NCBI数据库blastn比对，确定获得了水曲柳TCP4基因序列，并命名为FmTCP4，上传至Genbank数据库，登录号为：KX905155，FmTCP4基因编码区全长为1251bp。经过比对，与拟南芥AtTCP4基因核苷酸序列（AT3G15030.1）的一致性为55.91%；与芝麻（*Sesamum indicum*）TCP4基因核苷酸序列（XM_011084436.1）的一致性为77%；与烟草（*Nicotiana sylvestris*）TCP4基因核苷酸序列（XM_009786850.1）的一致性为71%。

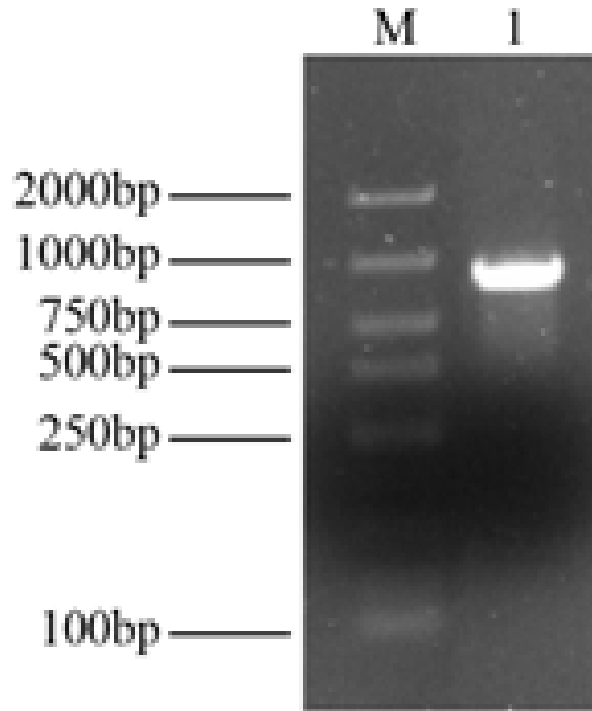


图1 FmTCP4基因PCR扩增片段

Fig. 1 PCR amplified fragments of FmTCP4

获得的水曲柳*FmTCP4*基因编码区全长，应用DNAMAN软件进行分析和预测，推测的氨基酸序列长度为416个氨基酸，如图（图2）所示。

	10	20	30	40	50	60		670	680	690	700	710	720	
1	ATGTCGTC AAGATTGAGAAACACAGGCGGTGAGATAGTGGAAAGTTC AAGGTGGCCATATT							661 CCAATTATGCTCCACCATAACCAACAACAGCCACAGCAGCATCAAAATCCCATT CACCAC						
1	M S S R L R N T G G E I V E V Q G G H I							221 P I M L H H N Q Q Q P Q Q H Q N P I H H						
	70	80	90	100	110	120		730	740	750	760	770	780	
61	ATCAGGTCCACAGGACGAAAAGACGGGCACAGTAAAGTCTGCACCTCTAAAGGACCAAGG							721 AATGAACAATCACAGTTCAATCACAAGCACATGTCCTATTAAGTGACACCCCGCTGGGT						
21	I R S T G R K D R H S K V C T S K G P R							241 N E Q S H V Q S Q A H V L L S D T P L G						
	130	140	150	160	170	180		790	800	810	820	830	840	
121	GACCGCCGCGTTTCGCTTCGCGCACATACTGCCATT CAGTTC TATGATGTACAGGACCGA							781 TTTGATGGCACTGCTGGCTGGTCCGGACAACACCAGCAGATGTCAGAAATCAGCCGGTTC						
41	D R R V R L A A H T A I Q F Y D V Q D R							261 F D G T A G W S G Q H Q Q M S E I S R F						
	190	200	210	220	230	240		850	860	870	880	890	900	
181	CTTGGCTATGACCGCCGAGTAAGGCGGTAGATTGGTTAATAAAGAAGGCCAGGCAGCC							841 CAGAGGCTTGCAGCTTGGAAATGCCGGTGGAGACACGGGGACTGGTAGTGGTGGAAACAGCA						
61	L G Y D R P S K A V D W L I K K A Q A A							281 Q R L A A W N A G G D T G T G S G G T A						
	250	260	270	280	290	300		910	920	930	940	950	960	
241	ATTGATGACCTTGGCAGCTGCCGGCTGGAAACCCACCACTGGTTCATCAGTAGATGCA							901 GGGTACTTGTTCAACTCTCCGTCAGTGCCTCAACCATTGTTACAGCAGCTGTTAGGCCAA						
81	I D D L A Q L P A W K P T T G S S V D A							301 G Y L F N S P S V P Q P L L Q Q L L G Q						
	310	320	330	340	350	360		970	980	990	1000	1010	1020	
301	AGTTTTGAGCAAGAAGATGCACAGAACTGTTTGCTGAAAATCACCAGCAACAGCATCAG							961 AACCAGTTTCTTTCTCAGAGGGGACCCTTCAGTCCAATAAECTCACCTTCGGTTCGTGCT						
101	S F E Q E D A Q K L F A E N H Q Q Q H Q							321 N Q F L S Q R G P L Q S N N S P S V R A						
	370	380	390	400	410	420		1030	1040	1050	1060	1070	1080	
361	TTGGATACTAATATTGCGGGCCGAGTAAAAGGGCAATGACAATGCTGGGAGGTGAAAAGT							1021 TGGATGGACCCATCCGCCATCACTATTGCTACGGCTGATCATAGCCAACAGCAGCAGAAT						
121	L D T N T A G P S K R A M T M L G G E S							341 W M D P S A I T I A T A D H S Q Q Q Q N						
	430	440	450	460	470	480		1090	1100	1110	1120	1130	1140	
421	GAGCAACAAGGCTTGCACCAGAGAGGTAATGTGAATTCGAACCCGAACCAAAGCTTTCTG							1081 CATCCTGCAGTGTTCCCCATTTATCCATCTTCACTACCTGGCATTGGATTGCTCAGGA						
141	E Q Q G L H Q R G N V N S N P N Q S F L							361 H P A V F P T Y P S S L P G T G F A S G						
	490	500	510	520	530	540		1150	1160	1170	1180	1190	1200	
481	CCCCCTTCGTTGGACTCCGATGCCATTGCGAATACTATCAAGTCCTTCTCCCATTTGGAT							1141 GACGGTGGATTCTCTGGGTTTCACATTCTCGCGGAATTCGGGGTATGAAGAGGAGCAC						
161	P P S L D S D A I A N T I K S F F P L D							381 D G G F S G F H I P A R T I R G D E E E H						
	550	560	570	580	590	600		1210	1220	1230	1240	1250		
541	GCTTCGCTGAGTCCAGTTCCTCAGTATGCAGTTTCAGAGCTTCGAAACTTCGATTG							1201 GATGGTTACTCCGACAAGCCATCCTCCGCTTCTCTGATTCCCGCCATTGA						
181	A S A E S S S S A M Q F Q S F E T S D L							401 D G Y S D K P S S A S S D S R H *						
	610	620	630	640	650	660								
601	CTATCAAGACCCAATAGCAAGATTCAAGATCTAAGGCTCTCTTGCATTCACTTCAAGAT													
201	L S R P N S K T Q D L R L S L H S L Q D													

图 2 *FmTCP4* 基因编码区序列及推测的氨基酸序列

Fig. 2 Gene coding region sequence and amino acid sequence of *FmTCP4*

2.2 FmTCP4蛋白质一级结构的分析

2.2.1 氨基酸序列理化性质分析

利用在线分析软件Protparam对FmTCP4基因的氨基酸序列的理化性质进行分析。

FmTCP4蛋白相对**分子量**为45453.91；**等电点**（pI）为6.27；**不稳定系数**为58.77（不稳定系数小于40时，预测蛋白质稳定，反之则不稳定），为不稳定类蛋白；**总平均疏水性**为-0.733，说明该蛋白为亲水性蛋白。

2.2.2 疏水区域/亲水区域预测

蛋白质亲疏水性氨基酸的组成是蛋白质折叠的主要驱动力，通过亲水性预测可以反映蛋白质的折叠情况。利用在线分析软件ProtScale的Kyte and Doolittle算法FmTCP4蛋白进行亲水/疏水性分析（ >0.5 的区域为疏水区， <-0.5 的区域为亲水区，介于 $+0.5\sim-0.5$ 之间主要为两性区域）。结果表明，FmTCP4蛋白共有**16个疏水区**和**29个亲水区**（见图3）。

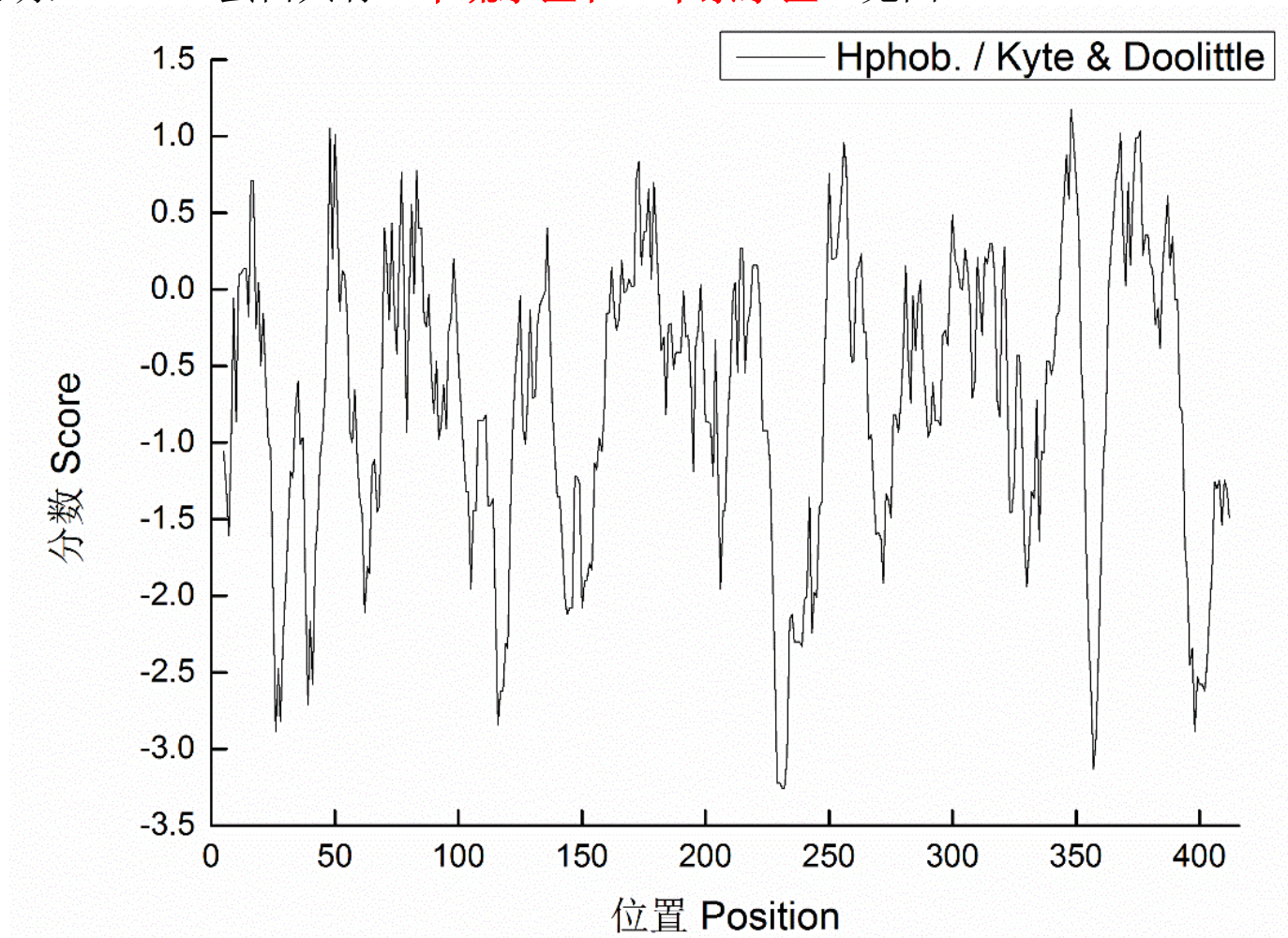
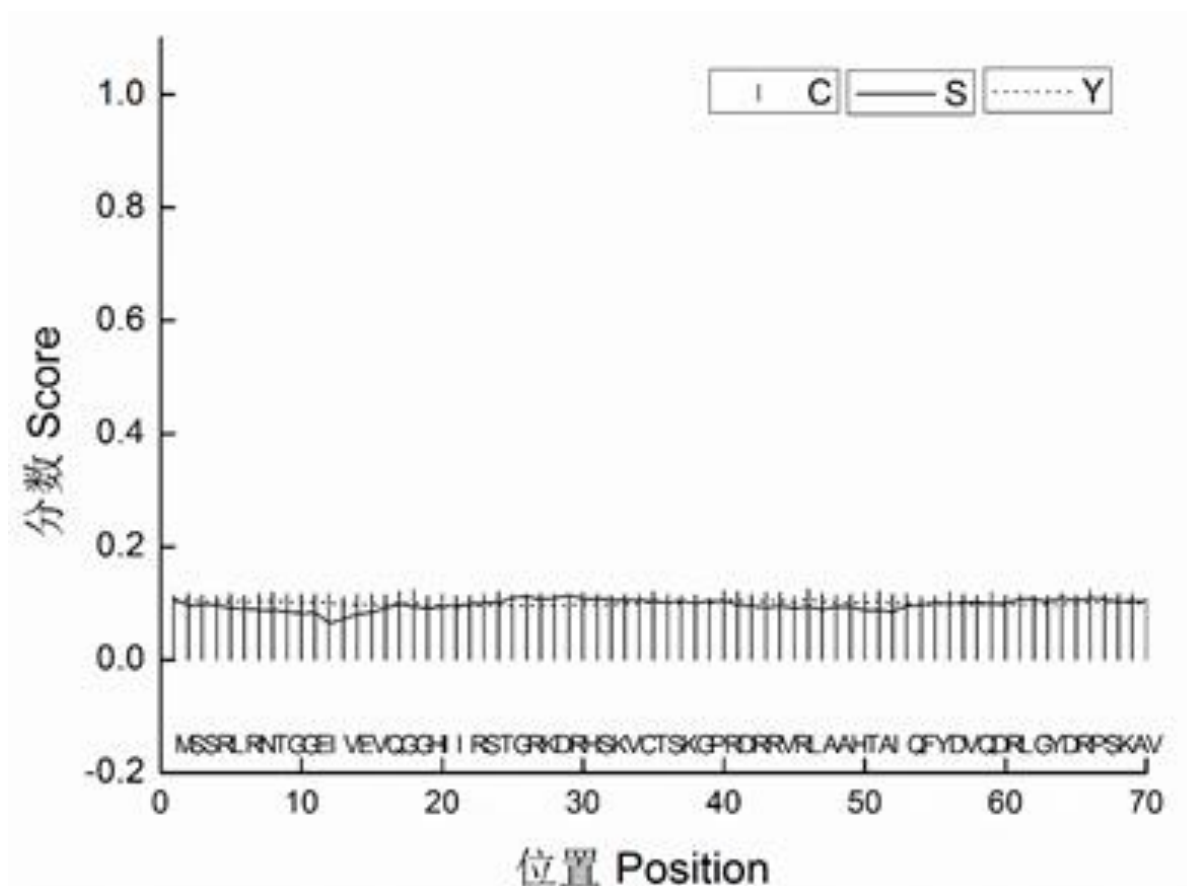


图3 FmTCP4 蛋白进行亲水/疏水性分析

Fig. 3 Hydrophobicity/philicity prediction of FmTCP4 protein

2.2.3 信号肽的预测和分析

信号肽是由16~26个氨基酸残基组成的氨基酸序列，在新合成多肽链中用于指导蛋白质的跨膜转移，位于蛋白质的N端，包括疏水核心区、信号肽的C端和N端[25]。利用在线分析工具SignalP的神经网络算法对FmTCP4蛋白进行预测。结果表明，FmTCP4（见图4）蛋白**可能不存在信号肽**。



C值：原始剪切位点的分值；S值：信号肽的分值；Y值：综合剪切位点的分值
图4 FmTCP4蛋白信号肽的预测和分析（神经网络算法）

Fig. 4 Prediction and analysis of signal peptides in FmTCP4 protein using the neural network algorithm

2.2.4 跨膜结构的预测和分析

跨膜结构是蛋白质与膜结合的一段氨基酸片段，一般由20个左右的疏水性氨基酸残基组成，主要形成 α -螺旋[26]。利用在线工具TMPred对FmTCP4蛋白进行跨膜结构分析。结果表明，FmTCP4蛋白有2个跨膜结构域。其中，由内到外（ $i \rightarrow o$ ）的跨膜结构域有2个，分别位于283~304位和364~389位，分数分别为743和403；由外到内（ $o \rightarrow i$ ）的跨膜结构域有2个分别位于283~304位和363~390位，分数分别为167和667（分数 >500 为显著跨膜结构），其由内到外的跨膜结构域与由外到内的跨膜结构域基本重合。经N-terminus outside模型分析表明，其中 $i \rightarrow o$ 的283~304位，和 $o \rightarrow i$ 的363~390位具有强烈的跨膜螺旋结构。据此分析，FmTCP4蛋白（图5）既有由内到外的跨膜能力，又有由外到内的跨膜能力。

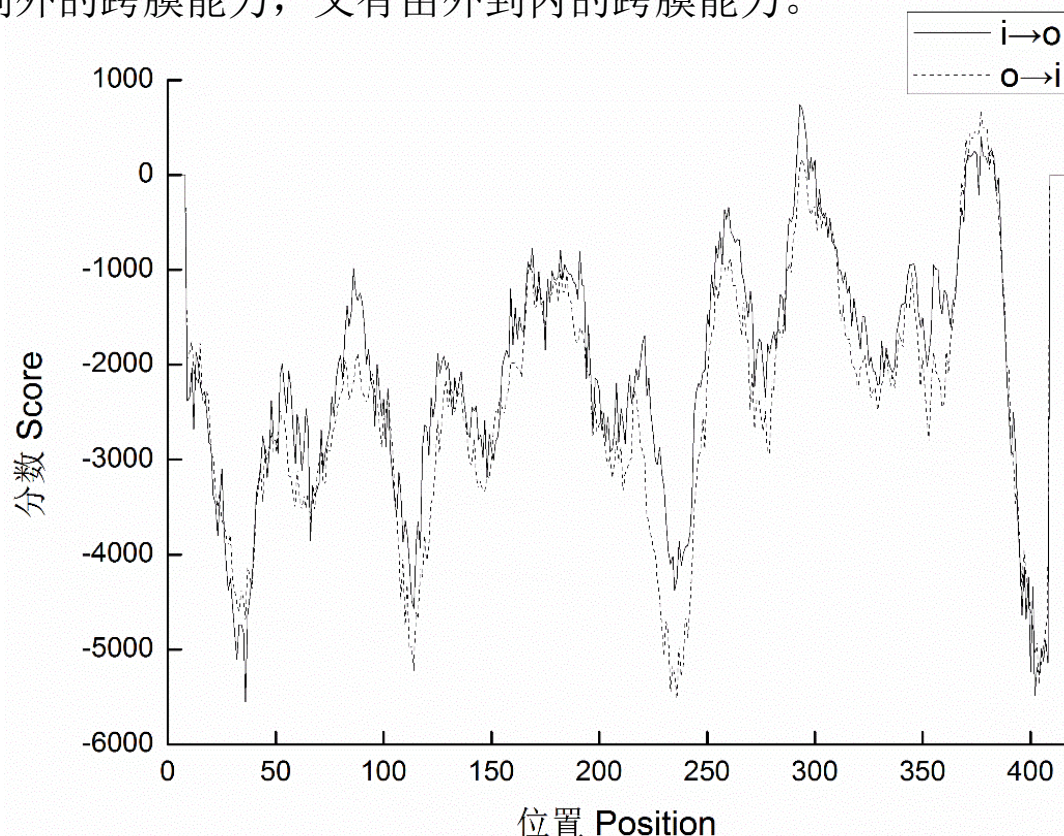


图 5 FmTCP4 蛋白跨膜结构域预测和分析

Fig. 5 Prediction and analysis of transmembrane domain prediction in FmTCP4 protein

2.2.5 亚细胞定位预测

利用在线工具WoLF PSORT分别对FmTCP4蛋白进行亚细胞定位分析。FmTCP4蛋白在细胞核得分为13。说明FmTCP4蛋白可能主要存在于细胞核中，并在细胞质到细胞核的调控中起作用。

2.4 FmTCP4蛋白质三维结构的预测

利用在线分析工具Swiss-Model，对FmTCP4蛋白进行三级结构同源建模，用Swiss-PdbViewer软件对建模结果进行处理[27-29]。FmTCP4蛋白同源建模结果如图7所示，呈现螺旋-环-螺旋结构。同时，利用软件的 α -碳与酰胺平面交角图功能，可以找到1个残基与1个特定平面的构象角（二面角），通过分析二面角，可以判断一个模型的质量。对FmTCP4（见图8）蛋白的二面角分析结果表明，蛋白质残基位于核心区域，说明空间结构稳定，所以同源建模的方法对FmTCP4蛋白的氨基酸序列的建模结果可靠。

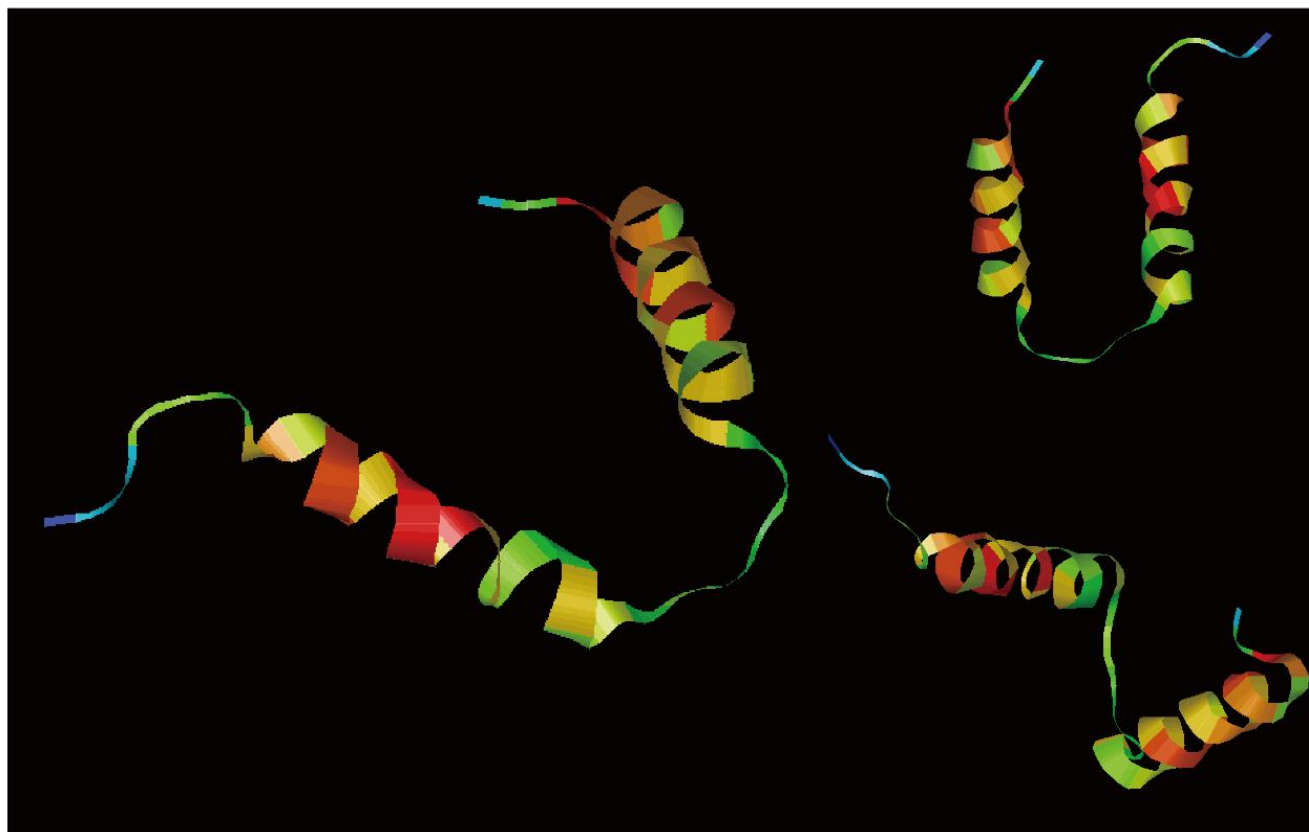


图 7 FmTCP4 蛋白三级结构预测。

Fig. 7 Three-dimensional structure prediction of FmTCP4 protein.

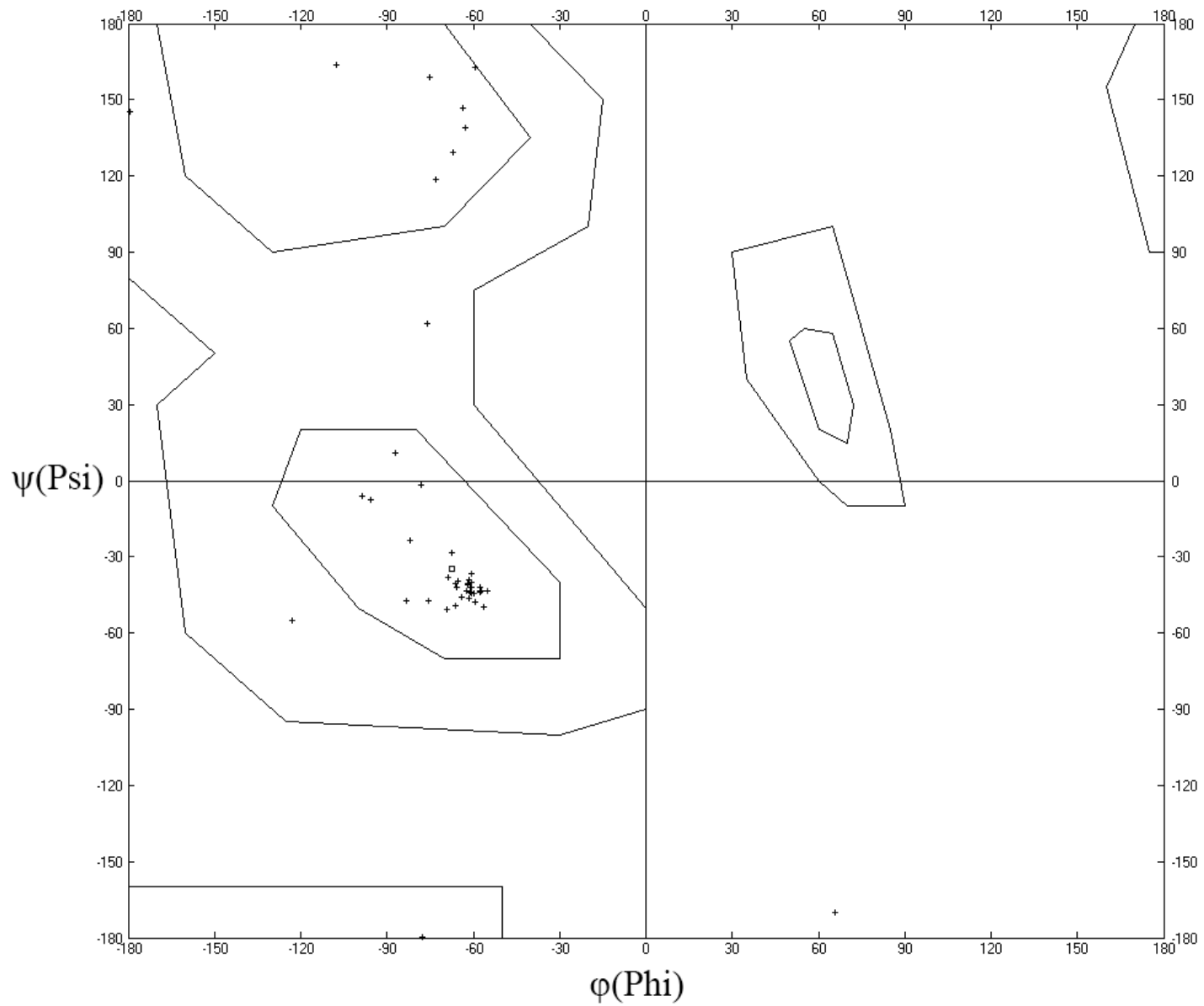


图 8 FmTCP4 蛋白质残基二面角预测

Fig. 8 Prediction of residue dihedr alanges in FmTCP4 protein

2.5 FmTCP4蛋白氨基酸序列比对及保守结构域的预测

利用NCBI数据库Blast对FmTCP4基因序列以及推测的编码蛋白进行同源序列比对，Blastp比对结果表明，FmTCP4蛋白与芝麻*Sesamum indicum* (XP_011098249.1)、烟草*Nicotiana sylvestris* (XP_009785152.1)、金鱼草*Antirrhinum majus* (AAO43102.1)、马铃薯*Solanum tuberosum* (XP_006348284.1)、番茄*Solanum lycopersicum* (NP_001234335.2)、辣椒*Capsicum annuum* (XP_016541752.1)、莲*Nelumbo nucifera* (XP_010277724.1)、葡萄*Vitis vinifera* (XP_003634670.2)、毛果杨*Populus trichocarpa* (XP_006370036.1)、蓖麻*Ricinus communis* (XP_015574905.1)、可可*Theobroma cacao* (XP_017980250.1)、陆地棉*Gossypium hirsutum* (XP_016702532.1)、黄瓜*Cucumis sativus* (XP_004146031)、巨桉*Eucalyptus grandis* (XP_010060659.1)、拟南芥*Arabidopsis thaliana* (AT3G15030.1)和水稻*Oryza sativa Japonica Group* (XP_015634268.1) 同源性较高，一致性分别为68%、64%、64%、62%、61%、59%、56%、56%、54%、53%、53%、51%、50%、50%、45%和39%。并应用ClustIW在多序列比对软件对FmTCP4蛋白以及上述物种中的同源蛋白，进行同源序列比对分析，结果如图（图9）。对多物种同源蛋白氨基酸序列比对结果显示，我们获得的FmTCP4蛋白序列，与芝麻、烟草、金鱼草、马铃薯、番茄、辣椒、莲、葡萄、毛果杨、蓖麻、可可、陆地棉、黄瓜、巨桉、拟南芥和水稻等物种中的同源蛋白序列相比具有很高的保守性，尤其在靠近N端的TCP保守结构域的一致性很高。

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90
Fraxinus mandshurica TCP4  MSSLRLGRNTIGG FIVEVQGGHIVRSTGRKDRHSKVCTAKGPRDRRVRLSAHTAIQFYDVQDRLG
Antirrhinum majus       MGGAGGGGESSNNTTHNHTTTTSSRLGRNNSVGG FIVEVQGGHIVRSTGRKDRHSKVCTAKGPRDRRVRLSAHTAIQFYDVQDRLG
Arabisopsis thaliana   MMSDDQFHHPPSSMRHRSTSDAAGGG FIVEVQGGHIVRSTGRKDRHSKVCTAKGPRDRRVRLSAHTAIQFYDVQDRLG
Capsicum annuum         MGSSRSLGRNNSVGG FIVEVQGGHIVRSTGRKDRHSKVCTAKGPRDRRVRLSAHTAIQFYDVQDRLG
Cucumis sativus        MGEFSSNRRFAKSLRPGATGGGGG FIVEVQGGHIVRSTGRKDRHSKVCTAKGPRDRRVRLSAHTAIQFYDVQDRLG
Eucalyptus grandis     MGDN  HHPQAAATSSRLGRNNSVGG FIVEVQGGHIVRSTGRKDRHSKVCTAKGPRDRRVRLSAHTAIQFYDVQDRLG
Gossypium hirsutum     MGDS  HHQAATSSRLGRNNSVGG FIVEVQGGHIVRSTGRKDRHSKVCTAKGPRDRRVRLSAHTAIQFYDVQDRLG
Nelumbo nucifera      MGEN  HHQQAATSSRLGRNNSVGG FIVEVQGGHIVRSTGRKDRHSKVCTAKGPRDRRVRLSAHTAIQFYDVQDRLG
Nicotiana glauca       MCTSSRFGRNNTIGG FIVEVQGGHIVRSTGRKDRHSKVCTAKGPRDRRVRLSAHTAIQFYDVQDRLG
Populus trichocarpa    MGES  HHQAATSSRLGRNNTIGG FIVEVQGGHIVRSTGRKDRHSKVCTAKGPRDRRVRLSAHTAIQFYDVQDRLG
Ricinus communis       MGES  SQRQHQQPARSRLGRNNTIGG FIVEVQGGHIVRSTGRKDRHSKVCTAKGPRDRRVRLSAHTAIQFYDVQDRLG
Sesamum indicum        MGES  SRRHRSRSLGRNNTIGG FIVEVQGGHIVRSTGRKDRHSKVCTAKGPRDRRVRLSAHTAIQFYDVQDRLG
Solanum tuberosum     MGEN  HHSRSLGRNNTIGG FIVEVQGGHIVRSTGRKDRHSKVCTAKGPRDRRVRLSAHTAIQFYDVQDRLG
Theobroma cacao        MGDS  HHQAATSSRLGRNNTIGG FIVEVQGGHIVRSTGRKDRHSKVCTAKGPRDRRVRLSAHTAIQFYDVQDRLG

```

```

100     110     120     130     140     150     160     170     180
Fraxinus mandshurica TCP4  YDRPSKAVDWLIKKAQAAIDELAEFPWRTTIGSSVDASFEQEDAQKLFAPENHQQQHQLDINTAGPSKRAMTMLGGE
Antirrhinum majus       YDRPSKAVDWLIKKAQAAIDELAEFPWRTTIGSSVDASFEQEDAQKLFAPENHQQQHQLDINTAGPSKRAMTMLGGE
Arabisopsis thaliana   YDRPSKAVDWLIKKAQAAIDELAEFPWRTTIGSSVDASFEQEDAQKLFAPENHQQQHQLDINTAGPSKRAMTMLGGE
Capsicum annuum         YDRPSKAVDWLIKKAQAAIDELAEFPWRTTIGSSVDASFEQEDAQKLFAPENHQQQHQLDINTAGPSKRAMTMLGGE
Cucumis sativus        YDRPSKAVDWLIKKAQAAIDELAEFPWRTTIGSSVDASFEQEDAQKLFAPENHQQQHQLDINTAGPSKRAMTMLGGE
Eucalyptus grandis     YDRPSKAVDWLIKKAQAAIDELAEFPWRTTIGSSVDASFEQEDAQKLFAPENHQQQHQLDINTAGPSKRAMTMLGGE
Gossypium hirsutum     YDRPSKAVDWLIKKAQAAIDELAEFPWRTTIGSSVDASFEQEDAQKLFAPENHQQQHQLDINTAGPSKRAMTMLGGE
Nelumbo nucifera      YDRPSKAVDWLIKKAQAAIDELAEFPWRTTIGSSVDASFEQEDAQKLFAPENHQQQHQLDINTAGPSKRAMTMLGGE
Nicotiana glauca       YDRPSKAVDWLIKKAQAAIDELAEFPWRTTIGSSVDASFEQEDAQKLFAPENHQQQHQLDINTAGPSKRAMTMLGGE
Populus trichocarpa    YDRPSKAVDWLIKKAQAAIDELAEFPWRTTIGSSVDASFEQEDAQKLFAPENHQQQHQLDINTAGPSKRAMTMLGGE
Ricinus communis       YDRPSKAVDWLIKKAQAAIDELAEFPWRTTIGSSVDASFEQEDAQKLFAPENHQQQHQLDINTAGPSKRAMTMLGGE
Sesamum indicum        YDRPSKAVDWLIKKAQAAIDELAEFPWRTTIGSSVDASFEQEDAQKLFAPENHQQQHQLDINTAGPSKRAMTMLGGE
Solanum tuberosum     YDRPSKAVDWLIKKAQAAIDELAEFPWRTTIGSSVDASFEQEDAQKLFAPENHQQQHQLDINTAGPSKRAMTMLGGE
Theobroma cacao        YDRPSKAVDWLIKKAQAAIDELAEFPWRTTIGSSVDASFEQEDAQKLFAPENHQQQHQLDINTAGPSKRAMTMLGGE

```

```

190     200     210     220     230     240     250     260     270
Fraxinus mandshurica TCP4  SIQQGLHQKRGVNSNPNQSEFLPPSLSDSAIANTIKSFFPLDASASSSSAMQFQSFETSDLLSRPNSK
Antirrhinum majus       SIQQGLHQKRGVNSNPNQSEFLPPSLSDSAIANTIKSFFPLDASASSSSAMQFQSFETSDLLSRPNSK
Arabisopsis thaliana   SIQQGLHQKRGVNSNPNQSEFLPPSLSDSAIANTIKSFFPLDASASSSSAMQFQSFETSDLLSRPNSK
Capsicum annuum         SIQQGLHQKRGVNSNPNQSEFLPPSLSDSAIANTIKSFFPLDASASSSSAMQFQSFETSDLLSRPNSK
Cucumis sativus        SIQQGLHQKRGVNSNPNQSEFLPPSLSDSAIANTIKSFFPLDASASSSSAMQFQSFETSDLLSRPNSK
Eucalyptus grandis     SIQQGLHQKRGVNSNPNQSEFLPPSLSDSAIANTIKSFFPLDASASSSSAMQFQSFETSDLLSRPNSK
Gossypium hirsutum     SIQQGLHQKRGVNSNPNQSEFLPPSLSDSAIANTIKSFFPLDASASSSSAMQFQSFETSDLLSRPNSK
Nelumbo nucifera      SIQQGLHQKRGVNSNPNQSEFLPPSLSDSAIANTIKSFFPLDASASSSSAMQFQSFETSDLLSRPNSK
Nicotiana glauca       SIQQGLHQKRGVNSNPNQSEFLPPSLSDSAIANTIKSFFPLDASASSSSAMQFQSFETSDLLSRPNSK
Populus trichocarpa    SIQQGLHQKRGVNSNPNQSEFLPPSLSDSAIANTIKSFFPLDASASSSSAMQFQSFETSDLLSRPNSK
Ricinus communis       SIQQGLHQKRGVNSNPNQSEFLPPSLSDSAIANTIKSFFPLDASASSSSAMQFQSFETSDLLSRPNSK
Sesamum indicum        SIQQGLHQKRGVNSNPNQSEFLPPSLSDSAIANTIKSFFPLDASASSSSAMQFQSFETSDLLSRPNSK
Solanum tuberosum     SIQQGLHQKRGVNSNPNQSEFLPPSLSDSAIANTIKSFFPLDASASSSSAMQFQSFETSDLLSRPNSK
Theobroma cacao        SIQQGLHQKRGVNSNPNQSEFLPPSLSDSAIANTIKSFFPLDASASSSSAMQFQSFETSDLLSRPNSK

```

```

280     290     300     310     320     330     340     350     360
Fraxinus mandshurica TCP4  IQDLRLSLSLQDPIMLLHHNQQQPQQHNIHNEQSHVQSQAHVLLSDIPLGFDGTAGWSGQHQQMSFISRFORLAAWNAG
Antirrhinum majus       IQDLRLSLSLQDPIMLLHHNQSQSQHQNHSEQPHSQSQHYVLLSGTPLGFDGSGWFHQHQQAFLSRFORFAAWNPS
Arabisopsis thaliana   IQDLRLSLSLQDPIMLLHHNQSQSQHQNHSEQPHSQSQHYVLLSGTPLGFDGSGWFHQHQQAFLSRFORFAAWNPS
Capsicum annuum         IQDLRLSLSLQDPIMLLHHNQSQSQHQNHSEQPHSQSQHYVLLSGTPLGFDGSGWFHQHQQAFLSRFORFAAWNPS
Cucumis sativus        IQDLRLSLSLQDPIMLLHHNQSQSQHQNHSEQPHSQSQHYVLLSGTPLGFDGSGWFHQHQQAFLSRFORFAAWNPS
Eucalyptus grandis     IQDLRLSLSLQDPIMLLHHNQSQSQHQNHSEQPHSQSQHYVLLSGTPLGFDGSGWFHQHQQAFLSRFORFAAWNPS
Gossypium hirsutum     IQDLRLSLSLQDPIMLLHHNQSQSQHQNHSEQPHSQSQHYVLLSGTPLGFDGSGWFHQHQQAFLSRFORFAAWNPS
Nelumbo nucifera      IQDLRLSLSLQDPIMLLHHNQSQSQHQNHSEQPHSQSQHYVLLSGTPLGFDGSGWFHQHQQAFLSRFORFAAWNPS
Nicotiana glauca       IQDLRLSLSLQDPIMLLHHNQSQSQHQNHSEQPHSQSQHYVLLSGTPLGFDGSGWFHQHQQAFLSRFORFAAWNPS
Populus trichocarpa    IQDLRLSLSLQDPIMLLHHNQSQSQHQNHSEQPHSQSQHYVLLSGTPLGFDGSGWFHQHQQAFLSRFORFAAWNPS
Ricinus communis       IQDLRLSLSLQDPIMLLHHNQSQSQHQNHSEQPHSQSQHYVLLSGTPLGFDGSGWFHQHQQAFLSRFORFAAWNPS
Sesamum indicum        IQDLRLSLSLQDPIMLLHHNQSQSQHQNHSEQPHSQSQHYVLLSGTPLGFDGSGWFHQHQQAFLSRFORFAAWNPS
Solanum tuberosum     IQDLRLSLSLQDPIMLLHHNQSQSQHQNHSEQPHSQSQHYVLLSGTPLGFDGSGWFHQHQQAFLSRFORFAAWNPS
Theobroma cacao        IQDLRLSLSLQDPIMLLHHNQSQSQHQNHSEQPHSQSQHYVLLSGTPLGFDGSGWFHQHQQAFLSRFORFAAWNPS

```

```

370     380     390     400     410     420     430     440     450
Fraxinus mandshurica TCP4  GDTIGTSGGGTACGLVFNSSPVPQPLLQQLLQONQLSQRGFLQSSNPSVRAWMDPSAITIATADHSQQQ
Antirrhinum majus       GDTIGTSGGGTACGLVFNSSPVPQPLLQQLLQONQLSQRGFLQSSNPSVRAWMDPSAITIATADHSQQQ
Arabisopsis thaliana   GDTIGTSGGGTACGLVFNSSPVPQPLLQQLLQONQLSQRGFLQSSNPSVRAWMDPSAITIATADHSQQQ
Capsicum annuum         GDTIGTSGGGTACGLVFNSSPVPQPLLQQLLQONQLSQRGFLQSSNPSVRAWMDPSAITIATADHSQQQ
Cucumis sativus        GDTIGTSGGGTACGLVFNSSPVPQPLLQQLLQONQLSQRGFLQSSNPSVRAWMDPSAITIATADHSQQQ
Eucalyptus grandis     GDTIGTSGGGTACGLVFNSSPVPQPLLQQLLQONQLSQRGFLQSSNPSVRAWMDPSAITIATADHSQQQ
Gossypium hirsutum     GDTIGTSGGGTACGLVFNSSPVPQPLLQQLLQONQLSQRGFLQSSNPSVRAWMDPSAITIATADHSQQQ
Nelumbo nucifera      GDTIGTSGGGTACGLVFNSSPVPQPLLQQLLQONQLSQRGFLQSSNPSVRAWMDPSAITIATADHSQQQ
Nicotiana glauca       GDTIGTSGGGTACGLVFNSSPVPQPLLQQLLQONQLSQRGFLQSSNPSVRAWMDPSAITIATADHSQQQ
Populus trichocarpa    GDTIGTSGGGTACGLVFNSSPVPQPLLQQLLQONQLSQRGFLQSSNPSVRAWMDPSAITIATADHSQQQ
Ricinus communis       GDTIGTSGGGTACGLVFNSSPVPQPLLQQLLQONQLSQRGFLQSSNPSVRAWMDPSAITIATADHSQQQ
Sesamum indicum        GDTIGTSGGGTACGLVFNSSPVPQPLLQQLLQONQLSQRGFLQSSNPSVRAWMDPSAITIATADHSQQQ
Solanum tuberosum     GDTIGTSGGGTACGLVFNSSPVPQPLLQQLLQONQLSQRGFLQSSNPSVRAWMDPSAITIATADHSQQQ
Theobroma cacao        GDTIGTSGGGTACGLVFNSSPVPQPLLQQLLQONQLSQRGFLQSSNPSVRAWMDPSAITIATADHSQQQ

```

```

460     470     480     490     500
Fraxinus mandshurica TCP4  QNHPAVFPIYPSSLPICGFASGDFGFSGFIPARIQDGFEEHDGVSIDKPPSSASSDSRH
Antirrhinum majus       QNHPAVFPIYPSSLPICGFASGDFGFSGFIPARIQDGFEEHDGVSIDKPPSSASSDSRH
Arabisopsis thaliana   QNHPAVFPIYPSSLPICGFASGDFGFSGFIPARIQDGFEEHDGVSIDKPPSSASSDSRH
Capsicum annuum         QNHPAVFPIYPSSLPICGFASGDFGFSGFIPARIQDGFEEHDGVSIDKPPSSASSDSRH
Cucumis sativus        QNHPAVFPIYPSSLPICGFASGDFGFSGFIPARIQDGFEEHDGVSIDKPPSSASSDSRH
Eucalyptus grandis     QNHPAVFPIYPSSLPICGFASGDFGFSGFIPARIQDGFEEHDGVSIDKPPSSASSDSRH
Gossypium hirsutum     QNHPAVFPIYPSSLPICGFASGDFGFSGFIPARIQDGFEEHDGVSIDKPPSSASSDSRH
Nelumbo nucifera      QNHPAVFPIYPSSLPICGFASGDFGFSGFIPARIQDGFEEHDGVSIDKPPSSASSDSRH
Nicotiana glauca       QNHPAVFPIYPSSLPICGFASGDFGFSGFIPARIQDGFEEHDGVSIDKPPSSASSDSRH
Populus trichocarpa    QNHPAVFPIYPSSLPICGFASGDFGFSGFIPARIQDGFEEHDGVSIDKPPSSASSDSRH
Ricinus communis       QNHPAVFPIYPSSLPICGFASGDFGFSGFIPARIQDGFEEHDGVSIDKPPSSASSDSRH
Sesamum indicum        QNHPAVFPIYPSSLPICGFASGDFGFSGFIPARIQDGFEEHDGVSIDKPPSSASSDSRH
Solanum tuberosum     QNHPAVFPIYPSSLPICGFASGDFGFSGFIPARIQDGFEEHDGVSIDKPPSSASSDSRH
Theobroma cacao        QNHPAVFPIYPSSLPICGFASGDFGFSGFIPARIQDGFEEHDGVSIDKPPSSASSDSRH

```

图 9 FmTCP4 编码的氨基酸序列比对

Fig. 9 Multiple alignment of amino acid sequence of FmTCP4

蛋白质结构域是蛋白质中一段保守结构的氨基酸序列，可能与进化，蛋白功能等相关。蛋白质的结构域一般会形成稳定的折叠，形成特定的3D结构。不同的蛋白中可能存在相同的结构域。蛋白质结构域分析目前广泛的应用于蛋白质功能的预测之中。蛋白质结构域通常有25个氨基酸到500个氨基酸组成。结构域通常会形成功能元件。利用NCBI数据库Conserved Domain Search Service (CD Search) [30]在线分析软件，根据其催化残基、辅酶结合位点、底物结合位点、抑制剂结合位点、四聚体接口对水曲柳FmTCP4蛋白的保守结构域进行预测，判断该编码蛋白包含有1个TCP结构域，位于近N端位置，属于TCP超家族（图10），与前面的多序列比对结果一致。

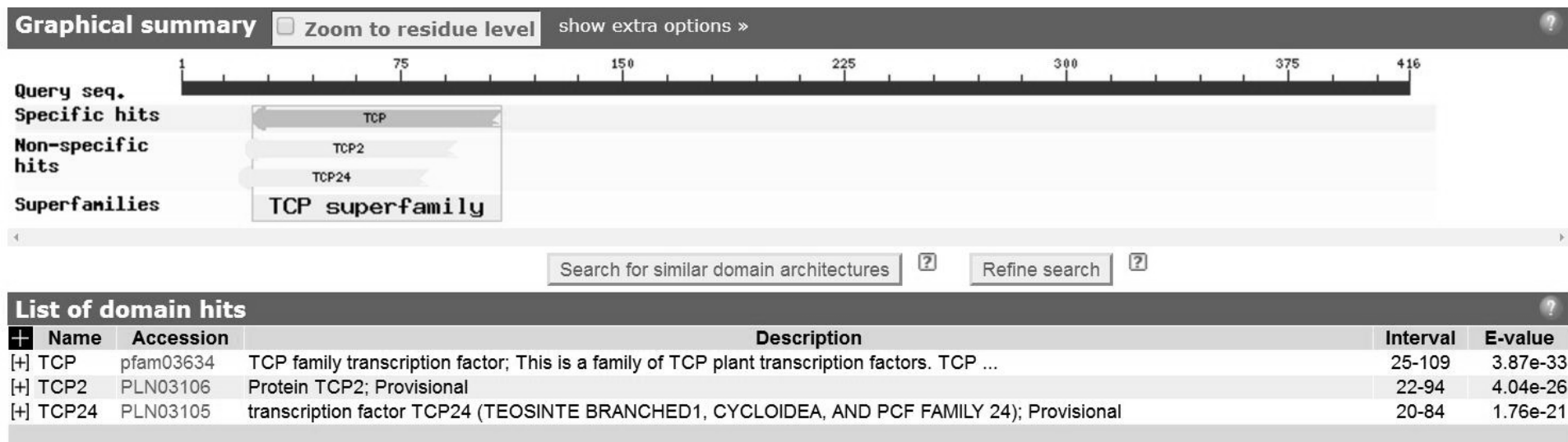


图 10 FmTCP4 蛋白质结构域预测

Fig. 10 FmTCP4 Protein domain prediction

2.6 FmTCP4蛋白系统进化树的构建

系统进化树是物种的进化史，通过构建系统进化树可以根据这些物种的祖先描述它们的进化关系[31]。先采用ClustalX对NCBI比对的氨基酸序列进行多序列比对的分析，然后利用MEGA 5.0软件，应用Neighbor-Joining算法构建系统进化树（见图11）。结果表明，13个物种的13条蛋白序列与拟南芥AtTCP4一致性都比较高，包括拟南芥AtTCP4在内，大致分为7类：其中水曲柳FmTCP4蛋白与芝麻和金鱼草聚为一类，马铃薯、辣椒和烟草聚为一类，莲和葡萄聚为一类，陆地棉、可可、毛果杨和蓖麻聚为一类，而拟南芥、黄瓜分别单独聚为一类，巨桉与水稻与其他物种FmTCP4同源蛋白关系更远，也分别单独聚为一类。

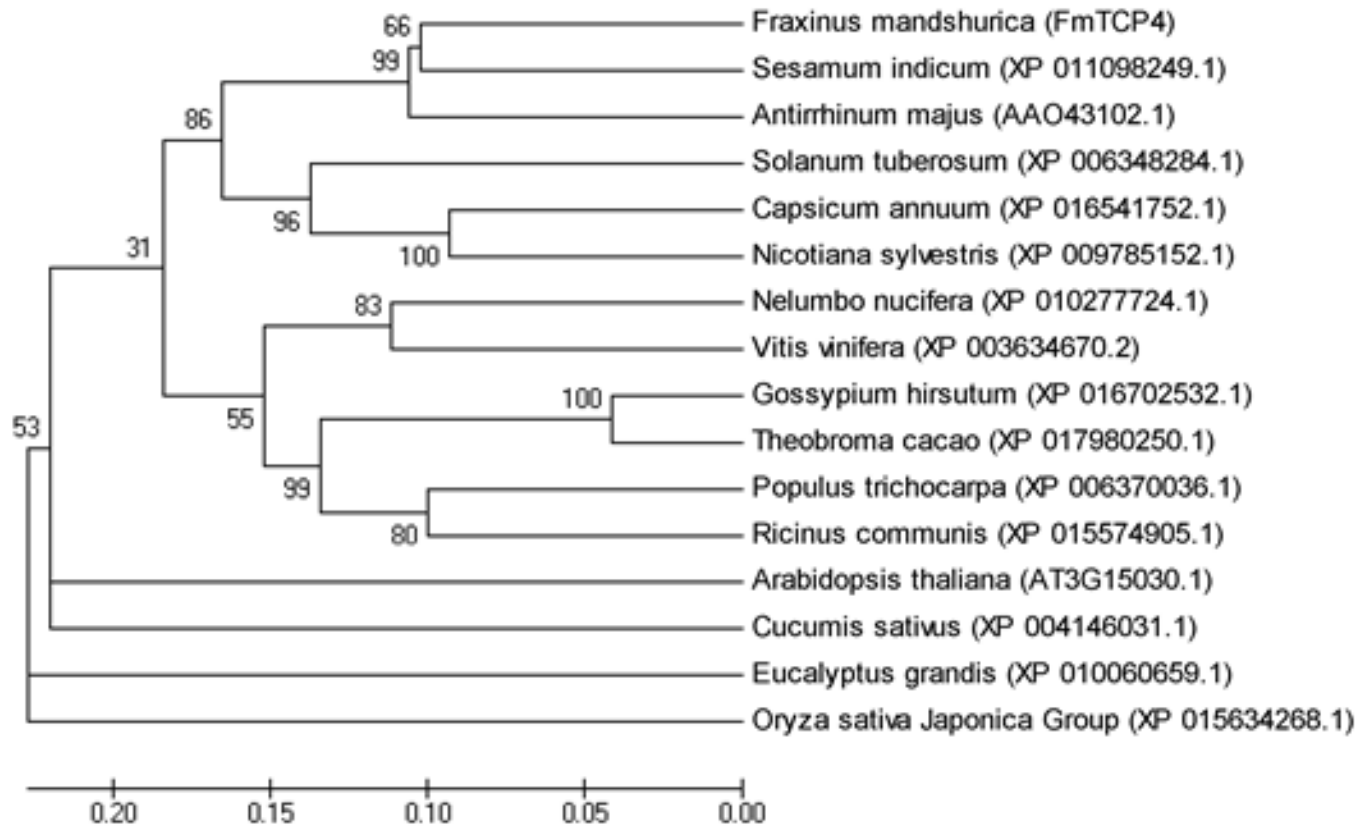


图11 根据FmTCP4蛋白NCBI Blastp比对结果构建的系统进化树

Fig. 11 Phylogenetic tree of FmTCP4 protein based on the Blastp results from NCBI

2.7 FmTCP4在非生物胁迫下的表达模式

水曲柳FmTCP4基因的表达量随着非生物胁迫处理时间的延长发生明显变化（图12），其中，在寒冷（4°C）处理后，FmTCP4基因的表达呈现出先下调后上调的表达趋势，其中，在12h达到下调表达峰值，为对照的0.56倍，并在24h出现上调表达最高峰，表达量达到对照的26.45倍；在NaCl处理后，FmTCP4基因的表达呈现先上调后下调的趋势，且处理组的表达量均高于对照组，并在6h，达到峰值，为对照的70.69倍；在干旱（PEG6000）处理下，FmTCP4基因表达呈现先上调后下调再上调后下调的趋势，且处理组的表达量均高于对照组，并于24h达到峰值，为对照的206.26倍。结果表明，FmTCP4明显响应了这三种非生物胁迫，并且其响应模式并不相同。

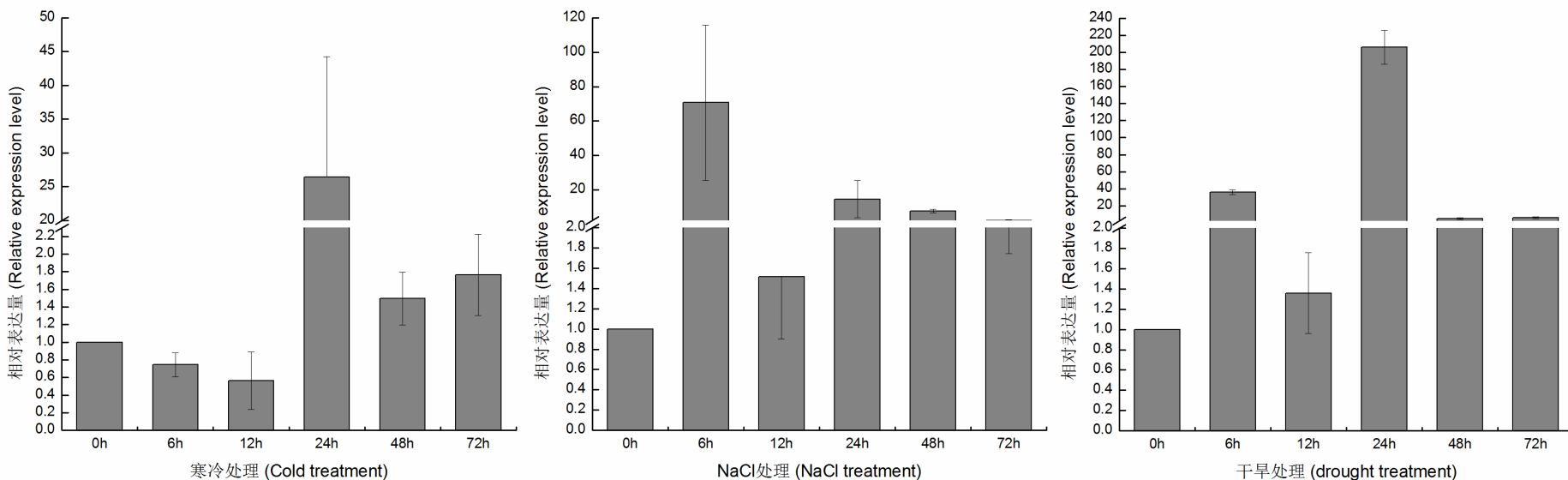


图 12 *FmTCP4* 基因在非生物胁迫下的相对表达量

Fig. 12 Relative expression level of *FmTCP4* under abiotic stress treatment

2.8 FmTCP4在激素信号下的表达模式

水曲柳FmTCP4在激素信号处理下，随着时间的变化，发生了明显的表达变化（图13）。其中，在ABA处理后，FmTCP的表达呈现出先上调表达，后下调表达的趋势，其中，在6h时达到上调表达的峰值，为对照的1.91倍，而在12h后，表达受到抑制，低于对照组，其中在12h表达量最低，为对照的0.38倍；在赤霉素处理后，FmTCP4的表达量先上升后下降，且处理组的表达量均高于对照组，其中在24h达到峰值，为对照组的151.49倍。结果表明，FmTCP4响应了ABA和GA3的信号刺激。

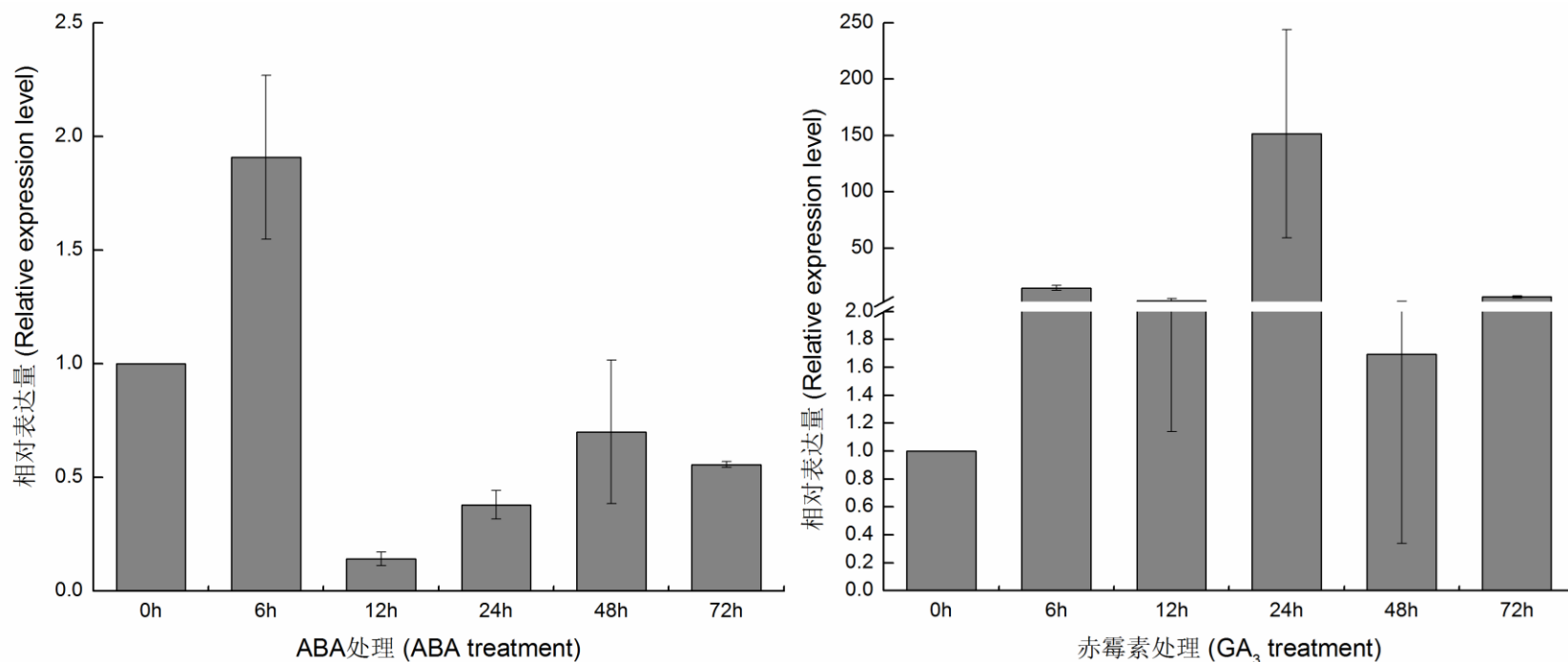


图 13 *FmTCP4* 在植物激素信号下的相对表达量

Fig. 13 Relative expression level of *FmTCP4* under hormone signal

3 结论与讨论

在拟南芥中，*AtTCP4*转录因子通过影响*miR319*调控了细胞增殖和分化的平衡^[6,11]，并且在水稻中研究发现*miR319*调控的*OsPCF5*（*AtTCP4*同源基因）在应对寒冷胁迫中也发挥了重要的作用^[32]。本研究根据水曲柳序列设计引物克隆所得*FmTCP4*，进行同源序列比对，结果表明与拟南芥*AtTCP4*基因以及水稻*OsPCF5*有较高同源性。

本研究通过生物软件，对*FmTCP4*蛋白进行了预测和生物信息学分析。经预测分析，结果表明*FmTCP4*蛋白为亲水性蛋白质，可能不存在信号肽。这个蛋白既有由内到外的跨膜能力，又有由外到内的跨膜能力。*FmTCP4*蛋白亚细胞定位预测表明，其可能主要存在于细胞核中。结合跨膜结构的预测与亚细胞定位的预测，说明*FmTCP4*蛋白可能在细胞质到细胞核的调控中起作用。对*FmTCP4*蛋白的二级结构的分析表明，*FmTCP4*蛋白由 α -螺旋、无规则卷曲、延伸链所组成。通过对*FmTCP4*蛋白进行的三级结构同源建模，绘制出了*FmTCP4*蛋白可能的结构模型（见图7、8），表明了*FmTCP4*基因编码蛋白的结构为bHLH（basic helix-loop-helix）结构。将*FmTCP4*的氨基酸序列应用NCBI网站的Blastp进行比对，比对结果表明，*FmTCP4*蛋白与芝麻、烟草、金鱼草、马铃薯、番茄、辣椒、莲、葡萄、毛果杨、蓖麻、可可、陆地棉、黄瓜、巨桉、拟南芥和水稻等物种的对应蛋白的同源性较高。同时应用比对结果构建了系统进化树（见图9）。进化树表明，水曲柳*FmTCP4*蛋白与芝麻和金鱼草中的同源蛋白聚为一类，说明它们在进化上亲缘关系较近。

本研究同时对FmTCP4基因在非生物胁迫和激素信号下的表达进行了分析。低温胁迫限制了许多野生植物和作物的地理分布，是影响生产率的一个重要因素[33]。不同植物由于分子机制的不同，其对于寒冷胁迫的耐受性也各不相同。研究抗寒基因及其响应机制在生产中也越来越具有实际意义。本实验中，寒冷处理下FmTCP4基因的表达呈现出先下调后上调的表达趋势，并且在寒冷处理前期，FmTCP4基因的表达量低于对照组，这与之前的研究结果，寒冷胁迫下miR319过表达的水稻OsPCF5（FmTCP4同源基因）表达下调的结果类似[32]。结果表明FmTCP4可能在增强水曲柳寒冷耐受性方面发挥了一定的作用。此外，在发现NaCl和干旱分别处理下，FmTCP4基因均上调表达，这与之前关于水稻TCP转录因子OsTCP19基因的研究相似，盐、干旱胁迫下，OsTCP19基因明显上调表达[10]。在植物激素信号的调控下，ABA处理后，FmTCP的表达呈现出先上调表达后下调表达的趋势，赤霉素处理后FmTCP4的表达量先上升后下降，结果证明FmTCP基因也响应了植物激素信号。

综上所述，水曲柳FmTCP4基因同时参与非生物胁迫（寒冷、盐、干旱）的和植物激素ABA以及GA3的响应，在水曲柳中，FmTCP4可能作为的调控植物正常生长发育以及逆境胁迫响应的节点而发挥作用，然而水曲柳TCP转录因子调控网络及分子机制仍有待进一步研究。

参考文献

- [1] MA J, LIU F, WANG Q, et al. Comprehensive analysis of TCP transcription factors and their expression during cotton (*Gossypium arboreum*) fiber early development[J]. Scientific reports, 2016, 6.
- [2] DOEBLEW J, STECT A, HUBBARDT L. The evolution of apical dominance in maize[J]. 1997.
- [3] KOSUGI S, OHASHI Y. PCF1 and PCF2 specifically bind to cis elements in the rice proliferating cell nuclear antigen gene[J]. The Plant Cell, 1997, 9 (9) : 1607-1619.
- [4] DE PAOLO S, GAUDIO L, ACETO S. Analysis of the TCP genes expressed in the inflorescence of the orchid *Orchis italica*[J]. Scientific reports, 2015, 5.
- [5] MA X, MA J, FAN D, et al. Genome-wide Identification of TCP Family Transcription Factors from *Populus euphratica* and Their Involvement in Leaf Shape Regulation[J]. Scientific Reports, 2016, 6.
- [6] MA J, WANG Q, SUN R, et al. Genome-wide identification and expression analysis of TCP transcription factors in *Gossypium raimondii*[J]. Scientific reports, 2014, 4.
- [7] PRUNEDA-PAZ J L, BRETON G, PARA A, et al. A functional genomics approach reveals CHE as a component of the *Arabidopsis* circadian clock[J]. Science, 2009, 323 (5920) : 1481-1485.
- [8] 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.
- [9] HERVÉ C, DABOS P, BARDET C, et al. In vivo interference with AtTCP20 function induces severe plant growth alterations and deregulates the expression of many genes important for development[J]. Plant Physiology, 2009, 149 (3) : 1462-1477.
- [10] MUKHOPADHYAY P, TYAGI A K. OsTCP19 influences developmental and abiotic stress signaling by modulating ABI4-mediated pathways[J]. Scientific reports, 2015, 5: 9998.
- [11] SCHOMMER C, DEBERNARDI J M, BRESSO E G, et al. Repression of cell proliferation by miR319-regulated TCP4[J]. Molecular plant, 2014, 7 (10) : 1533-1544.
- [12] LOPEZ J A, SUN Y, BLAIR P B, et al. TCP three-way handshake: linking developmental processes with plant immunity[J]. Trends in plant science, 2015, 20 (4) : 238-245.
- [13] 尹立辉, 孙亚峰. 水曲柳研究进展和展望[J]. 长春大学学报, 2006, 16 (6) : 72-75.
- YIN L H, SUN Y F. Advances and prospectives of *Fraxinus mandshurica* Rupr[J]. Journal of Changchun University, 2006, 16 (6) : 72-75.
- [14] 林士杰, 张忠辉, 谢朋, 等. 中国水曲柳基因资源的保护与利用[J]. 中国农学通报, 2009, 25 (24) : 158-162. LIN S J, ZHANG Z H, XIE P, et al. Conservation and Application of the Genetic Resource of *Fraxinus mandshurica* in China[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2009, 25 (24) : 158-162.

- [15]WALKER J M. protein protocols handbook[J]. 2002.
- [16]PETERSEN T N, BRUNAK S, VON HEIJNE G, et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions[J]. Nature methods, 2011, 8 (10) : 785-786.
- [17]HOFMANN K, STOFFEL W. TMbase-A database of membrane spanning protein segments[J]. 1993.
- [18]LUPAS A, VAN DYKE M, STOCK J. Predicting coiled coils from protein sequences[J]. Science, 1991, 252 (5009) : 1162-1164.
- [19]HORTON P, PARK K J, OBAYASHI T, et al. WoLF PSORT: protein localization predictor[J]. Nucleic acids research, 2007, 35 (2) : 585-587.
- [20]SEN T Z, JERNIGAN R L, GARNIER J, et al. GOR V server for protein secondary structure prediction[J]. Bioinformatics, 2005, 21 (11) : 2787-2788.
- [21]梁楠松, 周姗, 李蕾蕾, 等. 小黑杨bHLH转录因子基因和启动子的克隆与分析[J]. 经济林研究, 2013, 31 (4) : 58-66.
- LIANG N S, ZHOU S, LI L L, et al. Cloning and analysis of bHLH transcription factor genes and promoters in Populus × xiaohai T.S.Hwang et Liang[J]. Nonwood Forest Research, 2013, 31 (4) : 58-66.
- [22]TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Molecular biology and evolution, 2007, 24 (8) : 1596-1599.
- [23]梁楠松. 小黑杨bHLH转录因子基因的克隆及遗传转化[D]. 东北林业大学, 2014.
- [24]任小龙, 詹亚光, 梁雪, 等. 水曲柳花发育过程中AG, SOC1基因表达的qRT-PCR分析[J]. 植物研究, 2015, 35 (4) : 612-617.
- REN X L, ZHAN Y G, LIANG X, et al. qRT-PCR Analysis of Gene Expression of AG and SOC1 During Flower Development of Fraxinus mandshurica Rupr[J]. Bulletin of Botanical Research, 2015, 35 (4) : 612-617.
- [25]翟中和, 王喜忠, 丁明孝. 细胞生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 191.
- [26]王镜岩, 朱圣庚, 徐长法, 等. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 229.
- [27]ARNOLD K, BORDOLI L, KOPP J, et al. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling[J]. Bioinformatics, 2006, 22 (2) : 195-201.
- [28]SCHWEDE T, KOPP J, GUEX N, et al. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server[J]. Nucleic acids research, 2003, 31 (13) : 3381-3385.
- [29]GUEX N, PEITSCH M C. SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling[J]. electrophoresis, 1997, 18 (15) : 2714-2723.
- [30]MARCHLER-BAUER A, BRYANT S H. CD-Search: protein domain annotations on the fly[J]. Nucleic acids research, 2004, 32 (2) : 327-331.
- [31]JILL HARRISON C, LANGDALE J A. A step by step guide to phylogeny reconstruction[J]. The Plant Journal, 2006, 45 (4) : 561-572.
- [32]YANG C, LI D, MAO D, et al. Overexpression of microRNA319 impacts leaf morphogenesis and leads to enhanced cold tolerance in rice (Oryza sativa L.) [J]. Plant, cell & environment, 2013, 36 (12) : 2207-2218.
- [33]乌凤章, 王贺新, 徐国辉, 等. 木本植物低温胁迫生理及分子机制研究进展[J]. 林业科学, 2015, 51 (7) : 116-128.
- WU F Z, WANG H X, XU G H, et al. Research Progress on the Physiological and Molecular Mechanisms of Woody Plants Under Low Temperature Stress[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2015, 51 (7) : 116-128.

刘春浩, 梁楠松, 于磊, 等. 水曲柳丙二烯氧化物合成酶基因FmAOS序列与表达模式分析[J]. 植物生理学报, 2018(5).

刘春浩, 梁楠松, 于磊, 等. 水曲柳TCP4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.

孙爽, 赵兴堂, 刘春浩, et al. 水曲柳FmABI5基因非生物胁迫及信号诱导的表达模式分析[J]. 植物研究, 2017(3):453-460.