工业大麻 *TCP* 基因家族的鉴定及表达分析

秦振芬，孟祥霄，陈伟强，万会花，王思凡，杨　维，曹　雪*，孙　伟*

中国中医科学院中药研究所 中药鉴定与安全性评估北京市重点实验室 北京　100700

摘　要：目的　*TCP* 基因家族在植物叶片发育、侧枝形成、花器官形成、植物激素合成与信号转导等生理过程中发挥着关键的作用。对工业大麻 *Cannabis sativa TCP* 基因进行全基因组鉴定及表达分析为工业大麻 *TCP* 基因家族的功能分析提供科学参考。**方法**　基于已发布的工业大麻基因组，利用生物信息学方法对工业大麻 *TCP* 基因家族成员进行鉴定并对其理化性质、基因结构、以及表达模式进行分析。**结果**　共鉴定出 17 个工业大麻 *TCP* 基因（CsTCP1～CsTCP17）分为 2 类 3 个亚科（PCF、CIN 和 CYC/TB1），编码的氨基酸长度在 163～585 aa，蛋白质相对分子质量为 18 310～64 070，蛋白等电点介于 4.99～9.36，亚细胞定位大部分为细胞核。共线性进化分析发现，工业大麻与拟南芥、番茄、水稻分别存在 9、20 和 6 对同源基因。顺式元件预测结果表示光响应元件和脱落酸元件在 *TCP* 基因启动子区域分布广泛。基因表达分析结果表明，工业大麻 *TCP* 基因的表达存在组织特异性，大部分在叶和花中高表达。**结论**　为深入研究工业大麻 *TCP* 基因家族的功能奠定了基础，进一步阐明了 *TCP* 基因可能参与工业大麻生长发育的各个阶段，并对工业大麻的药用资源发展提供理论基础。

关键词：生物信息学；工业大麻；*TCP* 基因家族；鉴定；功能分析

中图分类号：R282.12　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2023)23 - 7806 - 09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.23.023

Genome-wide identification and expression analysis of *TCP* gene family in *Cannabis sativa*

QIN Zhen-fen, MENG Xiang-xiao, CHEN Wei-qiang, WAN Hui-hua, WANG Si-fan, YMNG Wei, CAO Xue, SUN Wei

Key Laboratory of Beijing for Identification and Safety Evaluation of Chinese Medicine, Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100070, China

Abstract: Objective　The *TCP* gene family plays a crucial role in plant development and physiological processes. This study provides a scientific reference for the functional analysis of the *TCP* gene family in Gongyedama (*Cannabis sativa*) through . **Methods**　Based on the published *C. sativa* genome, bioinformatics methods were used to identify the *TCP* gene family members of *C. sativa* and analyze their physicochemical properties, gene structure, and expression patterns. **Results**　A total of 17 *C. sativa TCP* genes (CsTCP1—CsTCP17) were identified, divided into two categories and three subfamilies (PCF, CIN, and CYC/TB1), encoding amino acid lengths ranging from 163—585 aa, protein molecular weights ranging from 18 310 to 64 070, protein isoelectric points ranging from 4.99 to 9.36, and most of subcellular localization in the nucleus. Collinearity analysis showed that *C. sativa* had 9, 20, and 6 homologous genes with Arabidopsis, tomato and rice, respectively. The predicted results of *cis* elements indicated that there were more light responsiveness and abscisic acid elements in *TCP* gene promoter area. The results of gene expression analysis indicated that the expression of *C. sativa* TCP gene was tissue specific, with higher expression in leaves and flowers. **Conclusion**　This study lays the foundation for in-depth research on the functions of the *TCP* gene family in *C. sativa*, further elucidates the possible involvement of *TCP* genes in various stages of *C. sativa* growth and development, and provides a theoretical basis for the development of medicinal resources of *C. sativa*.

Key words: bioinformatics; *Cannabis sativa* L.; TCP gene family; identify; functional analysis

收稿日期：2023-04-09

基金项目：中国中医科学院优秀青年科技人才培养专项（ZZ15-YQ-043）；国家自然科学基金青年基金资助项目（82204579）；中国中医科学院中药研究所国家自然科学基金培育专项（ZXKT22010）

作者简介：秦振芬，硕士研究生。E-mail:qinzhenfen@126.com

*通信作者：曹　雪，助理研究员，主要研究方向为分子生药学。E-mail: xcao@icmm.ac.cn

孙　伟，研究员，主要研究方向为中药资源学。E-mail: wsun@icmm.ac.cn

大麻 *Cannabis sativa* L.是二倍体（2*n*＝20）一年生草本植物隶属于大麻科大麻属，分布于世界各地[1-2]。大麻在历史上被广泛应用于药用、食品和纤维等领域，具有悠久的历史。根据中医传统，大麻果实被称为“火麻仁”，最早见于《神农本草经》，它被认为有润肠通便和滋养作用，并对消化系统、心血管系统和中枢神经系统具有一定的药理作用[3]。因此，它可以用于治疗肠燥便秘、风湿性疼痛等疾病。此外，大麻还富含 90 多种不饱和脂肪酸，具备药食两用的功能[4-5]。大麻的根部常被用于治疗炎症和疼痛[6]。而雌性大麻花序表面的分泌型腺毛则富含大麻素[7]，这些物质具有药用或娱乐特性。值得一提的是，大麻还富含植物纤维，其茎材可用于纤维生产，是制造高品质纺织品和造纸的优质原料[8]。在数千年的人工驯化和野生栽培过程中，种植者培育出多个品种的大麻，主要用于药物和纤维制品[9]。总的来说，大麻在不同部位的应用广泛且多样化，为人类提供了重要的药用价值和经济效益。

TCP 转录因子是植物特有的蛋白家族，最早于 20 世纪 90 年代末被描述[10-11]。TCP 是最早发现的 3 个物种中的基因名称的首字母缩写：来自玉米 *Zea mays* 的 TB1（大刍草 BRANCHED 1）[12]，来自金鱼草（金鱼草）的环形棘皮纲（CYC）[13]，以及来自水稻 *Oryza sativa* L.的 Proliferating cell factor 1 和 2（PCF1 和 2）[11]。TCP 基因在植物界中高度保守，含有一个保守的非典型碱性-螺旋-环-螺旋（bHLH）保守结构域，由 58～62 个氨基酸残基组成，参与 DNA 结合、蛋白质与蛋白质的相互作用和蛋白质的核定位[11]。根据 TCP 结构域的序列相似度不同，可以将其分为 2 类：I 类（也称为 PCF 类[14]或 TCP-P 类[15]）和 II 类（也称为 *TCP*-C 类）。与 II 类蛋白质相比，I 类蛋白质的基本结构域中有 4 个氨基酸的缺失，而 II 类也可以根据 TCP 结构域内的差异进一步细分为 2 个分支[11]：CIN 和 CYC/TB1。有研究表明，I 类 TCP 基因主要参与促进细胞增殖和植物生长，如水稻中的 PCF1/PCF2 和拟南芥中的 TCP20[16-17]，而 CYC/TB1 进化枝（或 ECE 进化枝）包括主要参与腋生分生组织发育（产生花和侧枝）的基因，如斑叶草中的 CpCYC1/2[18]可以和玉米中的 BAD1[19]可以调控叶夹角。

TCP 基因家族作为植物特有的转录因子，广泛参与植物分支生长发育调控，已在拟南芥[20]、烟草[21]等模式植物以及杜仲[22]、薏苡[23]、人参[24]和藜麦[25]等药用植物中被鉴定。以生产火麻仁为目标的大麻品种需要更多分枝及花序形成，以达到高产需求。TCP 是植物分枝发育和花发育重要调控因子，因此，研究大麻 TCP 具有重要意义。然而关于大麻 *TCP* 基因家族的鉴定及分析尚未报道，本研究在大麻基因组及转录组数据基础上，通过生物信息学技术对大麻 *TCP* 基因家族进行鉴定和分析，为后续研究大麻 *TCP* 基因功能提供科学基础及参考依据，为工业大麻分子育种提供理论支持。

1 材料

本研究使用的雌性大麻 CBDRx 的全基因组和注释文件（GCA_900626175.1）以及水稻、金鱼草、玉米 TCP 基因序列信息，参考序列来源于 NCBI（https://www.ncbi.nlm.nih.gov）网站，拟南芥基因组数据来源于 TAIR 在线数据库（https://www.arabidopsis.org）。番茄和水稻基因组数据分别来源于 https://solgenomics.net/和 http://rapdb.dna.affrc.go.jp/download/irgsp1.html。工业大麻 *C. sativa* L.的叶、花、茎和种子转录组数据由本课题组测序获得。

2 方法

2.1 工业大麻 *CsTCP* 基因家族成员及理化性质鉴定

采用 2 种方法在工业大麻中鉴定 *TCP* 基因家族成员，首先，利用 TBtools 进行工业大麻和拟南芥的双向 blast 去预测大麻中的 TCP 成员，然后使用 Pfam 数据库（http://pfam-legacy.xfamorg/family/browse）中的 TCP 结构域（PF03634）进一步筛选 TCP 家族成员，最后去除 2 种方法中的重复转录本后获取 CsTCP 蛋白序列。采用 ExPASy 在线网站（https://web.expasy.org/protparam/）对 CsTCP 蛋白理化性质进行预测。在 WoLF PSORT（https://wolfpsort.hgc.jp）网站对 CsTCP 蛋白进行亚细胞定位。

2.2 工业大麻 *CsTCP* 基因家族系统进化分析

利用 MEGA 6.0 软件中的 MUSCLE 对氨基酸序列进行比对。以工业大麻和拟南芥 TCP 家族成员为研究对象，采用 1000 个 bootstrap 的邻接法（neighbor-joining，NJ）构建系统发树。并利用 iTOL 在线工具进一步对系统发育树进行美化。

2.3 工业大麻 *CsTCP* 基因保守基序及基因结构分析

通过 MEME 数据库（https://meme-suite.org/meme/）对 CsTCP 的蛋白保守基序进行预测，

使用 CDD 在线网站（https://www.ncbi. nlm.nih.gov/cdd）对 CsTCP 的蛋白结构域进行预测。使用 TBtools 软件将蛋白保守基序、保守结构域和其系统进化树整合及可视化作图。

2.4 工业大麻 *CsTCP* 基因顺式作用元件预测

通过 TBtools 使用基因组序列和结构注释文件分别提取 17 个 *CsTCP* 基因上游各 2000 bp 序列作为启动子区域。然后对启动子区的顺式作用元件的预测通过 PlantCare（https://www.plantcare.co.uk/）进行，将预测结果进行可视化作图。

2.5 工业大麻 *CsTCP* 基因染色体及共线性分析

使用 TBtools 软件分析工业大麻的基因组注释文件，提取每个 *TCP* 基因的在染色体上的位置信息并进行可视化绘制。从 NCBI 网站下载拟南芥、工业大麻的全基因组数据，从 https://solgenomics.net/ 和 http://rapdb.dna.affrc.go.jp/download/irgsp1.html 网站分别下载水稻和番茄的全基因组数据，使用 TBtools 软件对其共线性关系进行可视化处理。

2.6 工业大麻 *CsTCP* 基因差异表达分析

使用 Dinamed kush CBD autoflowering（Diku）的花、叶、苞片、茎、种子和根的转录组数据计算 *CsTCP* 基因的表达量（FPKM），并运用 TBtools 软件绘制热图，进行基因聚类和差异表达模式分析。根据 RNAseq 数据，选取 *CsTCP1*、*CsTCP9*、*CsTCP16*、*CsTCP17* 进行 Real-time PCR 验证分析。使用 Quick RNA isolation Kit（0416-50，华越洋有限公司）试剂盒对工业大麻的根、茎、叶、花、苞片、种子进行 RNA 提取，然后用 HiScript II Q RT SuperMix for qPCR（R223-01，Vazyme）试剂盒反转录得到对应组织的 cDNA。利用 NCBI 设计引物（表 1），用 AceQ qPCR SYBR Green Master Mix（Q111-02，Vazyme）试剂盒进行 Real-time PCR 分析，反应程序为 95 ℃预变性 3 min，95 ℃变性 10 s，60 ℃退火 15 s，72 ℃延伸 15 s，循环 40 次。

3 结果与分析

3.1 *CsTCP* 基因家族成员鉴定

通过与拟南芥 *TCP* 基因家族双向比对以及 Pfma 网站结构域筛选，去除重复及冗余后共鉴定到 17 个大麻 *CsTCP* 基因，按照染色体位置将其命名为 *CsTCP1*～*CsTCP17*。利用 ExPASy 在线网站对鉴定到的 CsTCP 蛋白的基本理化性质进行分析（表 2）。研究发现，所有的 CsTCP 蛋

表 1 qRT-PCR 引物

Table 1 Primers for qRT-PCR

引物	正向 (5’-3’)	反向 (3’-5’)	长度/bp
*CsTCP*1	TCCCCATGTGGACCATACCT	AAACGGTGTCGCTGAGTTCT	146
*CsTCP*9	TGACGGTGTTTCGGTAGTCG	ATCGTCTGCTGCTGGACAAA	171
*CsTCP*16	TCTTTCTTAGGCAGCGGTGG	TCCAGGAGGGCATACCAAGA	159
*CsTCP*17	TGTTTCACAACAGGGTGCCT	ACTCCCTCCTCCAACTCCTC	103

表 2 *CsTCP* 基因家族成员基本信息

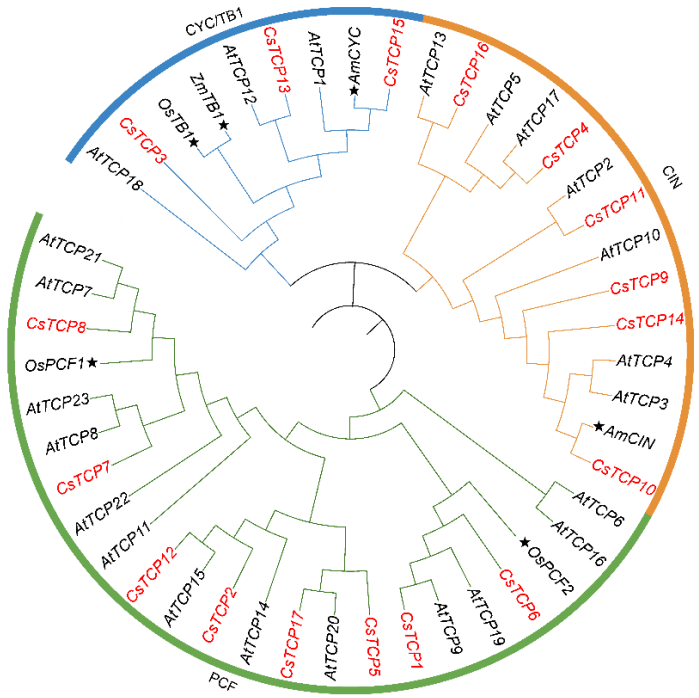
Table 2 Information of *CsTCP* gene family

基因号	转录本登录号	重命名	氨基酸数目	相对分子质量	等电点	亚细胞定位
gene-LOC115706624	rna-XM_030634337.1	*CsTCP*1	380	40 941.1	7.08	细胞核
gene-LOC115709774	rna-XM_030637982.1	*CsTCP*2	467	49 382.5	7.07	细胞核
gene-LOC115711674	rna-XM_030640047.1	*CsTCP*3	476	53 730.3	6.29	细胞核
gene-LOC115709028	rna-XM_030637061.1	*CsTCP*4	368	40 545.7	9.36	细胞核
gene-LOC115714915	rna-XM_030643673.1	*CsTCP*5	264	28 415.6	9.07	细胞核
gene-LOC115715920	rna-XM_030644597.1	*CsTCP*6	246	26 428.7	4.99	细胞质
gene-LOC115719378	rna-XM_030648397.1	*CsTCP*7	569	59 701.9	7.00	细胞核
gene-LOC115722085	rna-XM_030651206.1	*CsTCP*8	437	46 213.9	8.83	细胞核
gene-LOC115725189	rna-XM_030654624.1	*CsTCP*9	163	18 314.2	5.51	细胞核
gene-LOC115697611	rna-XM_030624683.1	*CsTCP*10	396	43 606.5	6.20	细胞核
gene-LOC115697072	rna-XM_030623981.1	*CsTCP*11	585	64 071.9	7.40	细胞核
gene-LOC115700557	rna-XM_030628127.1	*CsTCP*12	436	46 212.9	7.83	细胞核
gene-LOC115699317	rna-XM_030626663.1	*CsTCP*13	469	53 152.0	7.40	细胞核
gene-LOC115700694	rna-XM_030628320.1	*CsTCP*14	377	40 809.4	6.25	细胞核
gene-LOC115698877	rna-XM_030626081.1	*CsTCP*15	419	46 781.7	7.83	细胞核
gene-LOC115701300	rna-XM_030629052.1	*CsTCP*16	433	48 763.9	5.93	细胞核
gene-LOC115699632	rna-XM_030627136.1	*CsTCP*17	329	35 150.9	8.54	细胞核

白质氨基酸大小范围为 163～585，蛋白质相对分子质量为 18 310～64 070，此外这些 CsTCP 蛋白的等电点介于 4.99～9.36。亚细胞定位预测显示，全部的 *CsTCP* 基因家族成员大部分在细胞核中，与其他物种中 *TCP* 基因家族成员理化性质相近（表 2）。

3.2 *CsTCP* 基因家族成员的系统进化分析及分类

为了研究 CsTCP 与其他植物物种 TCP 之间的进化关系，基于 *CsTCP* 基因家族成员的多样性，将工业大麻、拟南芥、水稻、玉米、金鱼草的 *TCP* 基因共同构建系统发育树，以拟南芥 *TCP* 基因家族的分类方法为参考将 CsTCP 分为 3 个亚家族（图 1）。大麻中 3 个亚家族的分布情况为 PCF 亚家族有 8 个成员，其中 *CsTCP*8 和 *CsTCP*7 聚在一个分支，*CsTCP*12、*CsTCP*2、*CsTCP*17 和 CsTCP5 聚在一个分支，*CsTCP*1 和 *CsTCP*6 聚为一支。CIN 亚家族有 6 个成员，其中 *CsTCP*10、*CsTCP*14、*CsTCP*9 和 *CsTCP*11 在一个分支上，*CsTCP*4 和 *CsTCP*16 在同一分支。CYC 亚家族有 3 个成员，*CsTCP*3、*CsTCP*13 和 *CsTCP*15 与拟南芥、水稻和金鱼草的 CYC 亚家族的成员聚为一支。



红色字体代表 *CsTCP* 基因，AT-拟南芥　Os-水稻　Am-金鱼草　Zm-玉米

Red font represents *CsTCP* gene, AT-*Arabidopsis*　Os-rice　Am-snapdragon　Zm-corn

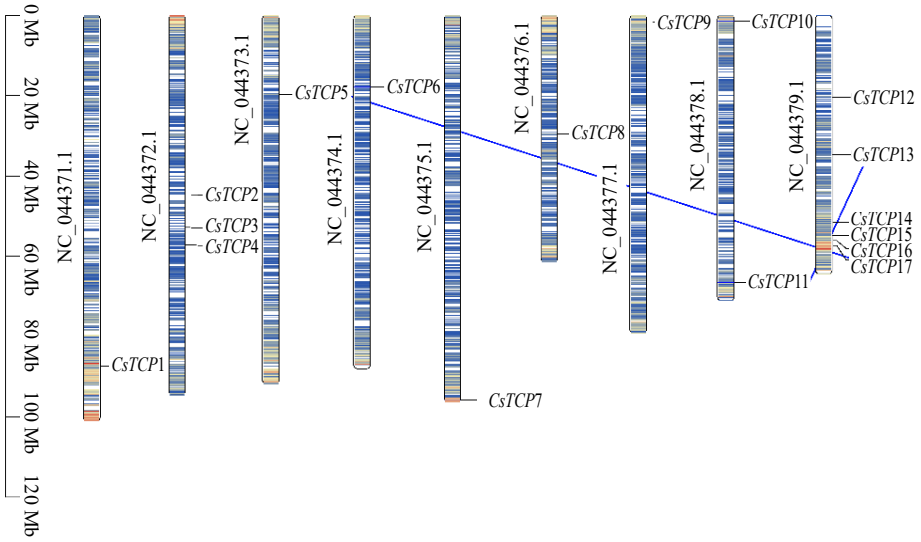
图 1　*CsTCP* 基因家族系统发育分析

Fig. 1　Phylogenic tree of CsTCP family

3.3 *CsTCP* 基因的染色体定位及共线性分析

根据工业大麻基因组数据对 *CsTCP* 基因家族成员进行染色体定位分析（图 2），发现 17 个 *CsTCP* 基因不均匀的分布在 9 条染色体上，而 NC_044370.1 染色体上没有 *CsTCP* 基因，其余染色体上都有不同数量的 *CsTCP* 基因。NC_044379.1 染色体上分布的 *CsTCP* 基因最多为 6 个，其次为 NC_044372.1 染色体，有 3 个 *CsTCP* 基因分布在该染色体上，有 2 个 *CsTCP* 基因分布在 NC_044378.1 染色体，其余染色体上均含有 1 个 *CsTCP* 基因。

为了更深入的探究 *CsTCP* 基因的结构和功能之间的相关性，以及阐明不同物种之间的进化关系，对工业大麻、拟南芥、水稻、番茄进行共线性分析（图 3），彩色线代表其他物种中基因与 *CsTCP* 基因具有共线性，其中拟南芥有 9 个、番茄有 20 个、水稻有 6 个与大麻 TCP 存在共线性基因对。其中有 4 个 *CsTCP* 基因（*CsTCP1*、*CsTCP10*、*CsTCP11*、*CsTCP17*）在这 4 个物种中共同发生了基因组共线性。此外，*CsTCP* 基因组内部发生了 2 次共线性事件，其中有一对 *CsTCP11*/*CsTCP13* 发生在相邻的染色体上，另外一对为 *CsTCP5*/*CsTCP17*（图 2）。以上结果表明 *TCP* 基因家族在不同物种中的具有一定进化保守性。



黑色字体为染色体名称及 *CsTCP* 名称，蓝色的线代表 *CsTCP* 种内共线性基因

black font represents the chromosome name and the *CsTCP* name, blue line represents the *CsTCP* intraspecific collinearity gene

图 2　*CsTCP* 基因染色体分布情况

Fig. 2　Chromosomal distribution of *CsTCP*

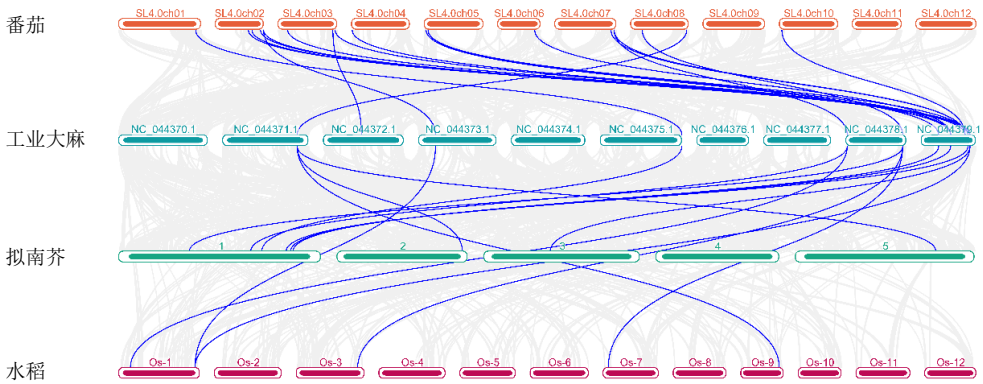


图 3　*CsTCP* 共线性分析

Fig. 3　Collinearity analysis of *CsTCP*

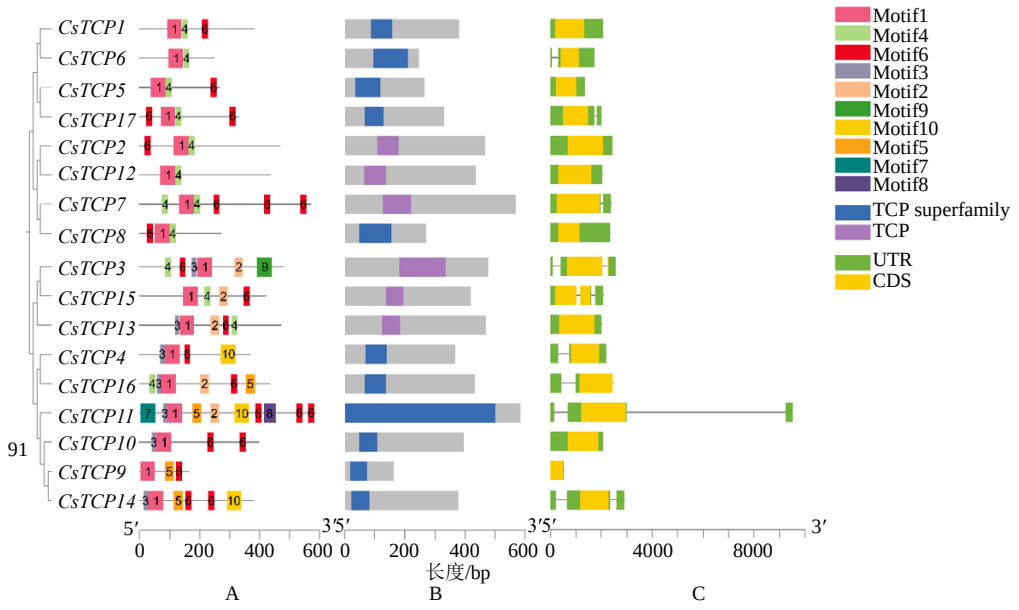
3.4　*CsTCP* 基因家族保守结构域和基因结构分析

基因保守结构域通常与特定功能相关，例如转录激活/抑制、核定位和蛋白质相互作用。因此，利用 MEME 网站鉴定了 CsTCP 蛋白的保守结构域，并选择了 10 个保守基序进行进一步分析（图 4）。结果表明 Motif1 和 Motif 6 2 个保守基序在所有的 *CsTCP* 均分布，但是没有 *CsTCP* 包含所有的 10 个保守基序，表明这 2 个基序在 *CsTCP* 蛋白序列中分布最广、保守程度最高（图 4-A）。所有的 CsTCP 蛋白均包含 TCP 保守结构域（图 4-B）。另外，在所有的 CsTCP 中均存在不同程度的保守基序变异现象，但每个 CsTCP 含有 3～10 个保守基序。

为了进一步解析 *CsTCP* 基因的结构多样性，对 *CsTCP* 中的内含子、外显子进行了研究（图 4-C），结果显示 *CsTCP* 中的内含子数量为 0～2 不等，其中 *CsTCP1*、*CsTCP2*、*CsTCP12*、*CsTCP8*、*CsTCP13*、*CsTCP10* 和 *CsTCP9* 没有内含子，其余均含有内含子。这些 *CsTCP* 中都至少有 2 个外显子，*CsTCP11* 有 5 个外显子。*CsTCP* 基因的内含子和外显子分布结构紧密相连，高度保守，为基因家族复制研究奠定了基础。

3.5　*CsTCP* 基因顺式作用元件预测

转录因子在控制植物如何响应生物和非生物胁迫方面很重要，其启动子序列中的各种顺式调节元件调节基因表达。为了探索 17 个 *CsTCP*



A-保守基序 B-保守结构域 C-基因结构

A-conserved motif B-conserved domain C-gene structure

图 4 *CsTCP* 家族功能结构域

Fig. 4 Conserved motifs and gene structure analysis of *CsTCP* gene family

基因在大麻中的潜在功能，预测了其启动子中的顺式调节元件（起始密码子前 2000 bp）（图 5）。所有 *CsTCP* 总共包括 419 个顺式元件。它们参与了 14 个非生物胁迫，包括光响应性、水杨酸响应性、防御和胁迫响应性和低温响应性等。每个启动子中都有大量的光响应性元素占所有顺式元件的 53%，其数量远远超过其他元素，其次是脱落酸响应元件，占所有顺式元件的 10.7%，在所有顺式元件中昼夜节律调控元件占比最少，仅为 0.5%（图 6）。此外，17 个 *CsTCP* 中有 9 个对 MeJA 有反应，有 14 个参与脱落酸反应。此外，由于参与光响应性，脱落酸响应性，MeJA 响应性和厌氧诱导调节的 *TCP* 基因构成了这些基因的很大一部分，推测这些基因可能在响应这些胁迫方面发挥重要作用。这些结果可以作为未来预测基因功能的理论基础。

3.6 *CsTCP* 基因表达模式分析

为了探究 *CsTCP* 基因在工业大麻不同组织的

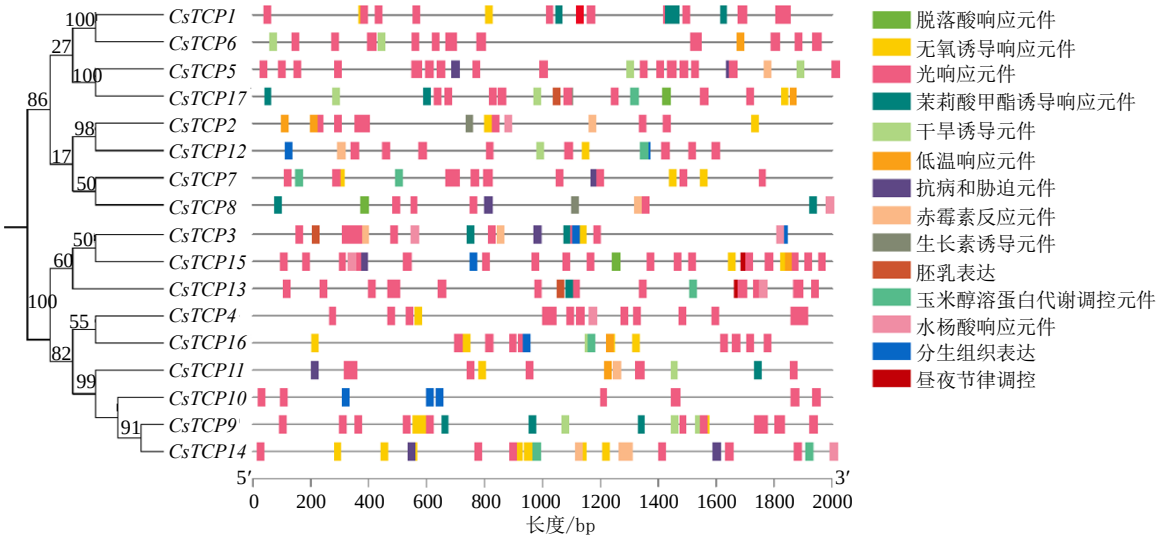


图 5 *CsTCP* 顺式作用元件分析

Fig. 5 The *cis*-acting elements analysis of the *CsTCP*

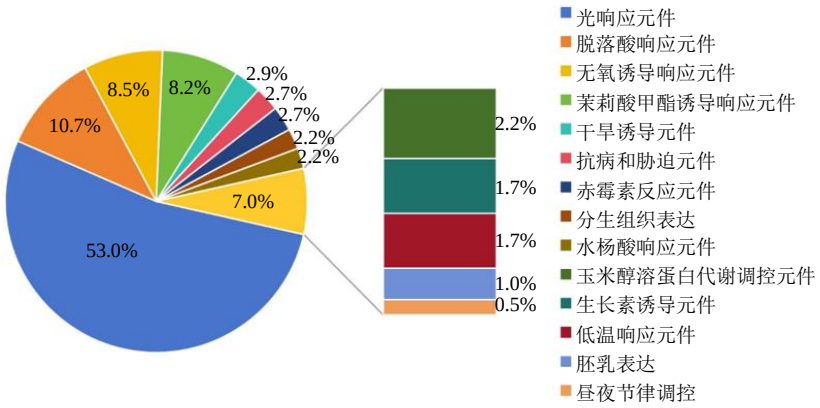


图 6　*CsTCP* 顺式作用元件数量分析

Fig. 6　Number of *cis*-acting elements analysis of *CsTCP*

表达模式，对工业大麻品种的根、茎、叶、花、苞片、种子的转录组测序数据进行分析。结果表明 *CsTCP* 基因在 6 个组织中表达模式不同，通过聚类分析发现，大部分基因在花、叶、苞片中高表达，小部分在根、茎、种子中高表达（图 7）。*CsTCP17*、*CsTCP8*、*CsTCP11* 在 6 个组织中均有较好的表达，*CsTCP1* 在种子中几乎不表达，在其余 5 个组织中均高表达，在所有 *CsTCP* 基因中花和叶中 *CsTCP1* 表达量最高。此外 *CsTCP9*、*CsTCP13*、*CsTCP3*、*CsTCP15* 在 6 个组织中的表达均偏低，而这几个基因均属于 CYC/TB1 和 CIN 亚家族。筛选在组织间有显著差异且表达量较高的 *CsTCP1*、*CsTCP9*、*CsTCP16*、*CsTCP17* 4 个基因进行 qRT-PCR 验证，结果显示（图 8），结果显示 4 个基因不同组织间的表达趋势和转录组结果一致。

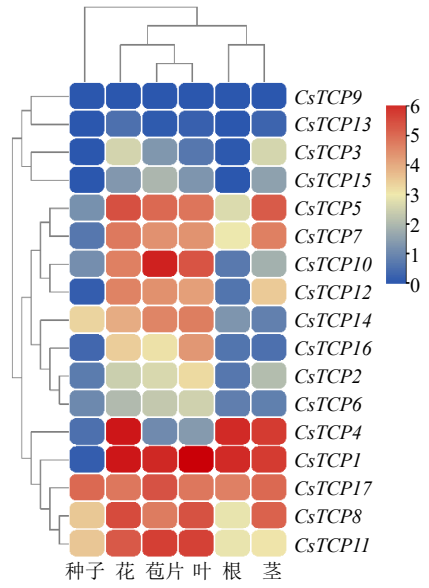


图 7　*CsTCP* 基因表达模式分析

Fig. 7　Gene expression pattern analysis of the *CsTCP*

4　讨论

TCP 基因是植物中一类独特的小分子转录因子，在激素反应、次生代谢产物积累和生长发育调控

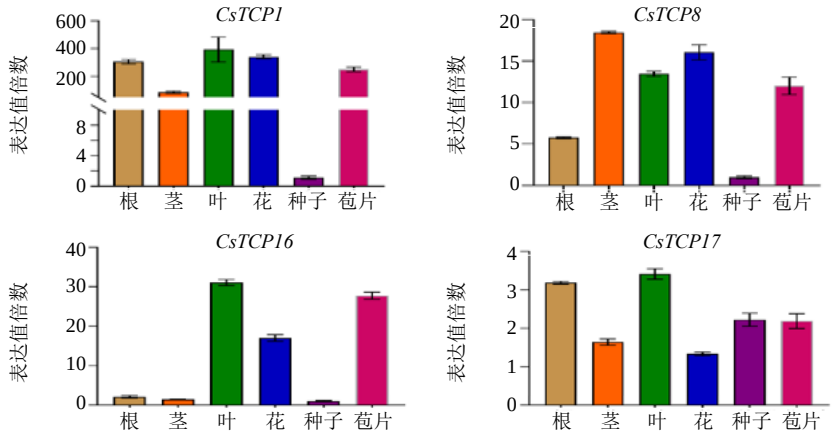


图 8　*CsTCP* Real-time PCR 检测

Fig. 8　Real-time PCR of of the *CsTCP*

中起着重要的作用。TCP 蛋白参与调控植物生命周期中的许多生长发育过程，如萌发、叶片发育、开花、花器官发育、枝条生长、花粉发育等，通过其他因子的互作和不同激素途径的调节发挥作用[26-29]。然而工业大麻中 *TCP* 基因的机制尚未得到研究。

在过去的几十年中，TCP 转录因子的特性和表达研究取得了很大的进展，提高了人们对 *TCP* 基因家族的认识。*TCP* 基因家族成员已在多个物种中被鉴定，目前被鉴定到最多的 *TCP* 基因的是烟草，多达 63 个[21]，在其他植物中 *TCP* 基因的数量在 24～58 个（拟南芥 24 个[30]、小麦 58 个[24]、水稻 27 个[31]）。本研究在工业大麻基因组中共鉴定到在工业大麻基因组中共鉴定出 17 个 TCP 转录因子，基因数量和拟南芥相当，但明显少于烟草和玉米的 TCP 基因。在不同植物基因组中 TCP 的数量差异可能与物种是否存在古老的全基因组复制或者近期的串联重复复制有关。此外，我们还研究了基因家族的物理化学特征；结果表明，17 个 CsTCP 在分子量、等电点和氨基酸数量方面表现出较大的差异，这表明工业大麻在进化过程中发生了变化。

先前的研究已经证明了内含子在调节基因表达方面的重要性，因此研究 *CsTCP* 基因的结构可以揭示其功能。结果表明，所有 *CSTCP* 中的内含子范围为 0～2，几种 *CsTCP* 具有 1 或 2 个内含子，如 *CsTCP6*、*CsTCP7* 和 *CsTCP3*（图 4-C），表明这些特殊的内含子可能与特定的基因功能有关。TCP 结构域由大约 60 个氨基酸组成，并且在许多植物中高度保守[11,16,21]，来自工业大麻的 TCP 包含相同的保守结构域（图 4-B）。

植物中已知的 TCP 主要参与叶和花的形态以及茎分支的相关调控，例如有研究表明，拟南芥中的部分 *TCP* 基因表达下调之后，与野生型相比叶片形状发生了较大的变化[32]，在玉米中也已经证明 TCP 相关基因 BAD1 可以调控叶的夹角[19]，这说明 TCP 蛋白在叶发育过程中发挥了极其重要的作用。TCP 也与花瓣的发育相关，例如在拟南芥中发现 *tcp5* 突变体花瓣较野生型更宽，而将 *TCP5* 沉默之后的花瓣比野生型窄[33]。有研究也表明，在斑叶草中 CYC 类基因具有不对称性的自调控和相互调控功能，在花对称性、花朝向和蜜导模式关联的进化中扮演了重要的角色[18]。在工业大麻基因组中共鉴定出的 17 个 TCP 转录因子，可分为 2 类 3 个亚科（PCF、CIN 和 CYC/TB1）。其中 CsTCP3、CsTCP13、CsTCP15、CsTCP16、CsTCP4、CsTCP11、CsTCP9、CsTCP14 和 CsTCP10 属于 CIN 和 CYC/TB1 亚科，而转录组数据分析显示 *CsTCP4*、*CsTCP11* 和 *CsTCP10* 在花中均有较高的表达，根据上述已知 TCP 功能研究证明 CIN 和 CYC/TB1 亚科的 *TCP* 基因通常参与调控花的形态，故推测 *CsTCP4*、*CsTCP11* 和 *CsTCP10* 在工业大麻中可能也有调控花发育的功能，可能对火麻仁生产具有指导意义。在侧枝发育过程中，*TCP* 基因主要起到抑制侧枝形成的作用。一个典型例子是在玉米中最早发现的 *TB1* 基因。这个基因通过抑制植物的侧枝生长来发挥功能，在玉米中过度表达 *TB1* 会显著减少分支数量[12]。类似于 *TB1* 在水稻中的同源基因 *OsTB1*，过表达该基因也会导致水稻的分蘖数下降[34]。此外，在拟南芥中与 *TB1* 有功能相似的同源基因 *TCP*18 和 *TCP*12，过表达它们可以使拟南芥的分枝数显著增多[35-36]。此外，*TB1* 基因还被报道在番茄[37]、豌豆[38]和马铃薯[39]中具有抑制分枝的能力，这表明 TCP 转录因子对组织生长的抑制活性在植物演化过程中是高度保守的。将玉米、拟南芥的 *TB1* 基因和大麻的 TCP 构建了系统发育树，发现大麻中的 *CsTCP3*、*CsTCP13* 和 *CsTCP15* 与上述的 *TB1* 基因聚集在一起。这提示在大麻中，*CsTCP3*、*CsTCP13* 和 *CsTCP15* 可能具有类似于 TB1 的抑制分枝的功能，其中转录组分析发现 *CsTCP3* 在茎中具有较高表达量，在研究工业大麻侧枝发育时可优先将其作为候选基因进行分析。这一发现可能对以大麻茎材为原料的纤维类品种选育具有指导意义，但需要更多地后续研究来确定其功能。由于工业大麻作为经济和药用价值都很高的植物，在近年来得到了广泛关注和研究。随着技术的进步，我们可以期待未来对工业大麻中 *TCP* 基因的机制进行更详尽的探索，以揭示其在工业大麻生长发育和代谢调控中的作用机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] McPartland J M, Small E. A classification of endangered high-THC *Cannabis* (*Cannabis sativa* subsp. indica) domesticates and their wild relatives [J]. *PhytoKeys*, 2020, 144: 81-112.

[2] 李俊, 米要磊, 王思嘉, 等. 基于 UPLC-QQQ-MS/MS 的工业大麻中 6 种大麻素类成分定量研究 [J]. 中草药, 2022, 53(4): 1163-1172.

[3] 张汉文, 张文君, 张国锋, 等. 基于中药配伍的火麻仁药理作用研究进展 [J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42(6): 659-664.

[4] Schluttenhofer C, Yuan L. Challenges towards revitalizing hemp: A multifaceted crop [J]. *Trends Plant Sci*, 2017,

22(11): 917-929.
[5] Callaway J C. Hempseed as a nutritional resource: An overview [J]. *Euphytica*, 2004, 140(1): 65-72.
[6] Ryz N R, Remillard D J, Russo E B. *Cannabis* roots: A traditional therapy with future potential for treating inflammation and pain [J]. *Cannabis Cannabinoid Res*, 2017, 2(1): 210-216.
[7] Livingston S J, Quilichini T D, Booth J K, *et al*. *Cannabis* glandular trichomes alter morphology and metabolite content during flower maturation [J]. *Plant J*, 2020, 101(1): 37-56.
[8] 周永凯, 张建春, 张华. 大麻纤维的抗菌性及抗菌机制 [J]. 纺织学报, 2007, 28(6): 12-15.
[9] Xie Z Y, Mi Y L, Kong L Z, *et al*. *Cannabis sativa*: Origin and history, glandular trichome development, and cannabinoid biosynthesis [J]. *Hortic Res*, 2023, 10(9): 150.
[10] Cubas P, Lauter N, Doebley J, *et al*. The TCP domain: A motif found in proteins regulating plant growth and development [J]. *Plant J*, 1999, 18(2): 215-222.
[11] Kosugi S, Ohashi Y. PCF_1 and PCF_2 specifically bind to *cis* elements in the rice proliferating cell nuclear antigen gene [J]. *Plant Cell*, 1997, 9(9): 1607-1619.
[12] Doebley J, Stec A, Hubbard L. The evolution of apical dominance in maize [J]. *Nature*, 1997, 386(6624): 485-488.
[13] Luo D, Carpenter R, Vincent C, *et al*. Origin of floral asymmetry in *Antirrhinum* [J]. *Nature*, 1996, 383(6603): 794-799.
[14] Viola I L, Gonzalez D H. TCP transcription factors in plant reproductive development: Juggling multiple roles [J]. *Biomolecules*, 2023, 13(5): 750.
[15] Martín-Trillo M, Cubas P. *TCP* genes: A family snapshot ten years later [J]. *Trends Plant Sci*, 2010, 15(1): 31-39.
[16] Li C X, Potuschak T, Colón-Carmona A, *et al*. *Arabidopsis* TCP20 links regulation of growth and cell division control pathways [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(36): 12978-12983.
[17] Howarth D G, Donoghue M J. Phylogenetic analysis of the ECE (CYC/TB1) clade reveals duplications predating the core eudicots [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(24): 9101-9106.
[18] Yang X, Wang Y, Liu T X, *et al*. CYCLOIDEA-like genes control floral symmetry, floral orientation, and nectar guide patterning [J]. *Plant Cell*, 2023, 35(8): 2799-2820.
[19] Bai F, Reinheimer R, Durantini D, *et al*. Tcp transcription factor, branch angle defective 1 (bad1), is required for normal tassel branch angle formation in maize [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(30): 12225-12230.
[20] Aggarwal P, Das Gupta M, Joseph A P, *et al*. Identification of specific DNA binding residues in the TCP family of transcription factors in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2010, 22(4): 1174-1189.
[21] 张路阳, 韩文龙, 徐晓雯, 等. 烟草 TCP 基因家族的鉴定及表达分析 [J]. 生物技术通报, 2023, 39(6): 248-258.
[22] 刘俊, 李龙, 吴耀松, 等. 杜仲 TCP 转录因子鉴定及生物信息学分析 [J]. 中草药, 2022, 53(18): 5813-5824.
[23] 雷静, 班秀文, 刘荣, 等. 薏苡 (*Coix lacryma*-jobi L.) TCP 家族全基因组鉴定及响应非生物胁迫的表达规律 [J/OL]. 分子植物育种, [2023-05-11]. https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230510.1438.004.html.
[24] 吕齐, 焦红红, 余祺瑞, 等. 人参 TCP 转录因子家族生物信息学分析与功能预测 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(15): 3838-3845.
[25] 肖玉林. 藜麦 TCP 基因家族鉴定分析与功能验证 [D]. 济南: 山东师范大学, 2021.
[26] Viola I L, Alem A L, Jure R M, *et al*. Physiological roles and mechanisms of action of class I TCP transcription factors [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(6): 5437.
[27] Nicolas M, Cubas P. TCP factors: New kids on the signaling block [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2016, 33: 33-41.
[28] Danisman S. TCP transcription factors at the interface between environmental challenges and the plant's growth responses [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 1930.
[29] Manassero N G, Viola I L, Welchen E, *et al*. TCP transcription factors: Architectures of plant form [J]. *Biomol Concepts*, 2013, 4(2): 111-127.
[30] Danisman S, van Dijk A D J, Bimbo A, *et al*. Analysis of functional redundancies within the *Arabidopsis* TCP transcription factor family [J]. *J Exp Bot*, 2013, 64(18): 5673-5685.
[31] 关紫微, 曹希雅, 张先文, 等. 水稻 TCP 家族的全基因组鉴定及表达分析 [J]. 分子植物育种, 2022, 20(10): 3145-3156.
[32] Nath U, Crawford B C W, Carpenter R, *et al*. Genetic control of surface curvature [J]. *Science*, 2003, 299(5611): 1404-1407.
[33] Huang T B, Irish V F. Temporal control of plant organ growth by TCP transcription factors [J]. *Curr Biol*, 2015, 25(13): 1765-1770.
[34] Takeda T, Suwa Y, Suzuki M, *et al*. The OsTB1 gene negatively regulates lateral branching in rice [J]. *Plant J*, 2003, 33(3): 513-520.
[35] Aguilar-Martínez J A, Poza-Carrión C, Cubas P. *Arabidopsis* BRANCHED1 acts as an integrator of branching signals within axillary buds [J]. *Plant Cell*, 2007, 19(2): 458-472.
[36] Poza-Carrión C, Aguilar-Martínez J A, Cubas P. Role of *TCP* gene BRANCHED1 in the control of shoot branching in *Arabidopsis* [J]. *Plant Signal Behav*, 2007, 2(6): 551-552.
[37] Martín-Trillo M, Grandío E G, Serra F, *et al*. Role of tomato BRANCHED1-like genes in the control of shoot branching [J]. *Plant J*, 2011, 67(4): 701-714.
[38] Braun N, de Saint Germain A, Pillot J P, *et al*. The pea TCP transcription factor PsBRC1 acts downstream of Strigolactones to control shoot branching [J]. *Plant Physiol*, 2012, 158(1): 225-238.
[39] Nicolas M, Rodríguez-Buey M L, Franco-Zorrilla J M, *et al*. A recently evolved alternative splice site in the BRANCHED1a gene controls potato plant architecture[J]. *Current Biol*, 2015, 25(14): 1799-1809.

[责任编辑 时圣明]