

## 杜仲 TIFY 转录因子鉴定与表达分析

刘俊<sup>1,2\*</sup>, 陈玉龙<sup>1</sup>, 刘燕<sup>1</sup>, 司富春<sup>1</sup>

(1. 河南中医药大学 中医药科学院, 河南省中医方证信号传导重点实验室, 郑州 450046;  
2. 国际竹藤中心 国家林业和草原局竹藤科学与技术重点开放实验室, 北京 100102)

**[摘要]** 目的:从全基因组水平对杜仲(*Eucommia ulmoides*) TIFY 基因家族进行鉴定与表达分析,以期对 *EuTIFYs* 基因功能深入研究奠定基础。方法:以杜仲基因组数据库为基础,通过美国国立生物技术信息中心(NCBI),MEME,PlantCare,白质分析专家系统(ExPASy)及 TBtools 等生物信息学分析软件,对杜仲 TIFY 基因家族进行鉴定,系统分析该基因家族的理化性质、系统进化、基因结构、启动子顺式作用元件及其在叶片发育及杜仲胶形成中的表达模式。结果:该研究从杜仲基因组中共鉴定到 14 个 *EuTIFYs*(*EuTIFY1*~*EuTIFY14*),氨基酸数目介于 102~357,理论等电点分布在 4.99~10.06,相对分子质量区域为 10.8~39.14 kDa,亚细胞定位预测在细胞核中,均为亲水性蛋白,14 个 *EuTIFYs* 分布在 13 条染色体上。系统进化分为 TIFY, JAZ, ZML 和 PPD 4 个亚家族,分别包含 3 个,4 个,5 个和 2 个 *EuTIFYs* 蛋白。*EuTIFYs* 启动子区域含有多种光周期及非生物胁迫响应元件,参与植物杜仲生长发育和非生物胁迫。表达模式分析显示,*EuTIFYs* 在杜仲叶片不同发育时期存在表达差异,大部分基因在叶片发育的早期阶段表达量较高,正调控杜仲胶的形成,*EuTIFYs* 蛋白间存在多种互作关系。结论:该研究从杜仲全基因组水平鉴定到 14 个 *EuTIFYs*,对其结构特点和表达模式进行全面的生物信息学分析,为进一步研究杜仲 *TIFYs* 基因功能提供参考。

**[关键词]** 杜仲; TIFY 转录因子; 系统进化; 表达分析

**[中图分类号]** R284.2;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)19-0165-10

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20211211

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210728.1328.004.html>

**[网络出版日期]** 2021-07-29 9:36

### Identification and Expression Analysis of TIFY Transcription Factor in *Eucommia ulmoides*

LIU Jun<sup>1,2\*</sup>, CHEN Yu-long<sup>1</sup>, LIU Yan<sup>1</sup>, SI Fu-chun<sup>1</sup>

(1. Henan Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Prescription and Syndrome Signaling, Academy of Chinese Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China;  
2. International Center for Bamboo and Rattan, Key Open Laboratory of Bamboo and Rattan Science and Technology, China National Forestry and Grassland Administration, Beijing 100102, China)

**[Abstract]** **Objective:** To identify the TIFY gene family in *Eucommia ulmoides* and analyze its expression from the whole genome level to lay the foundation for further study on *EuTIFYs* gene function. **Method:** Based on the *E. ulmoides* genome database, the TIFY gene family was identified through bioinformatics analysis tools such as National Center for Biotechnology Information(NCBI), MEME, PlantCare, Expert Protein Analysis System (ExPASy), and TBtools. Physicochemical properties, phylogenetic evolution, gene structure, *cis*-acting elements of the promoters and their expression patterns in leaf development and gum formation of the gene family were systematically analyzed. **Result:** In this study, fourteen *EuTIFY* genes (*EuTIFY1*-*EuTIFY14*) were identified in the *E. ulmoides* genome. The *EuTIFYs* were composed of 312-1 074 bp

**[收稿日期]** 20201222(013)

**[基金项目]** 国家林业和草原局/北京市共建竹藤科学与技术重点实验室开放基金项目(ICBR-2020-05);河南中医药大学博士科研启动基金项目(RSBSJJ2019-04)

**[通信作者]** \*刘俊,博士,助理研究员,从事药用植物分子生物学研究,E-mail:liujun\_0325@163.com

nucleotides encoding 102-357 amino acid residues, with isoelectric points of 4.99-10.06 and molecular weight in the range of 10.8-39.14 kDa. According to putative subcellular localization, proteins, which were mainly hydrophilic proteins, localized in the nucleus. The 14 *EuTIFYs* were unevenly distributed on 13 chromosomes. *EuTIFY* gene family was divided into four subfamilies: *TIFY*, *JAZ*, *ZML*, and *PPD*, which contained three, four, five, and two members respectively. The promoters of *EuTIFYs* contained multiple photoperiodic and abiotic stress-responsive cis-acting elements, which were involved in plant growth and abiotic stress regulation. Expression pattern analysis showed that *EuTIFYs* exhibited different expression levels in different development stages of *E. ulmoides* leaves and multiple interactions, and most of the genes were highly expressed in the early stage of leaf development and positively regulated the formation of *E. ulmoides* gum. **Conclusion:** Fourteen *EuTIFYs* were identified from the whole genome of *E. ulmoides*, and their structural characteristics and expression patterns were analyzed by bioinformatics. The findings of this study are expected to provide references for further research on the function of *EuTIFYs*.

**[Keywords]** *Eucommia ulmoides*; TIFY transcription factor; phylogenetic evolution; expression analysis

TIFY 基因家族是植物特有的,首次在拟南芥中发现的一类转录因子<sup>[1]</sup>,由 28 个氨基酸和 TIF[F/Y] XG 核心基序形成的高度保守的 TIFY 结构域组成<sup>[2-3]</sup>。根据其保守结构域组成分为 4 个亚家族 TIFY, JAZ, ZML 和 PEAPOD(PPD)。TIFY 亚家族蛋白只含 TIFY 结构域<sup>[4]</sup>, JAZ 亚家族以其含有 22 个氨基酸的 Jas 基序而命名,不仅包含 TIFY 结构域,而且含有 C 端保守的 Jas 序列与 CCT 结构域的 N 端蛋白相似,具有 SLX2FX2KRX2RX5PY 独特性<sup>[4-5]</sup>。ZML 亚家族由 ZIM 和 ZIM-like(ZML)蛋白组成,含有 C2C2-GATA 锌指结构域, CCT(CONSTANS, CO-like, TOC1)和 TIFY 结构域, CCT 结构域在光信号转导中发挥重要作用,参与蛋白互作<sup>[3]</sup>。PPD 亚家族 N 末端包含 1 个独特的约 50 个氨基酸的 PPD 结构域, 1 个 TIFY 结构域以及 C 末端缺少脯氨酸和酪氨酸的 Jas 结构域(SLX2FX2KRX2RX5)<sup>[5]</sup>。

研究表明, *TIFYs* 参与植物生长发育,非生物胁迫以及激素调节等多种生物学过程。在拟南芥中,过表达 PPD 通过促进叶片和角果发育过程中分生组织细胞的早期阻滞,导致叶片变小, PPD 位点缺失增加叶片面积,叶片呈圆形而非扁平状<sup>[6]</sup>。在香蕉中,丙烯诱导 *MaTIFY1* 基因表达,参与果实成熟<sup>[7]</sup>。在 TIFY 基因家族中, JAZ 亚家族是茉莉酸(JA)信号通路中关键调控因子,参与植物各种生长发育以及生物和非生物胁迫响应。聚乙二醇(PEG), 茉莉酸甲酯(MeJA), 脱落酸(ABA)和赤霉素(GAs)显著诱导 *ZmJAZ14* 基因表达,在拟南芥中超表达 *ZmJAZ14* 增强转基因植株对 JA 和 ABA 的耐受性<sup>[8]</sup>。 *PnJAZ1* 在核桃种子萌发和早期发育中提高了盐胁迫耐受性,降低了 ABA 的敏感性<sup>[9]</sup>。在黄

芪中, *AsJAZ1* 可以通过与 *AsB2510* 相互作用,参与根瘤发育和固氮<sup>[10]</sup>。在水稻中, *OsTIFY3/OsJAZ1* 通过与 *OsMYC2* 和 *OsCOI1b* 相互作用,调控水稻花发育和根的伸长,替换或删除 *OsJAZ1* 核心序列影响花和根发育过程中 JA 信号的特异性和敏感性<sup>[11-12]</sup>,超表达 *OsJAZ1* 提高转基因植株对干旱, MeJA 和 ABA 的敏感性, *OsJAZ1* 突变体可以增强干旱, MeJA 和 ABA 胁迫的耐受性<sup>[13]</sup>。 *OsTIFY11b/OsJAZ10* 通过利用茎秆和叶鞘中碳水化合物的积累和转运,增加转基因植株籽粒大小和质量<sup>[14]</sup>。在小麦中, *TaTIFYs* 参与冷、热、干旱等胁迫响应<sup>[15]</sup>。 *AtJAZ7* 通过调节植物的光合作用、氧化还原、氨基酸、植物激素和防御代谢物提高植株的耐旱性<sup>[16]</sup>。超表达 *GaJAZ5* 降低转基因拟南芥水分丢失,气孔变小,提高转基因植株干旱胁迫耐受性<sup>[17]</sup>。

杜仲 *Eucommia ulmoides* 是我国特有的蔷薇目杜仲科杜仲属多年生落叶乔木,是第三纪孑遗植物<sup>[18]</sup>,杜仲不仅是重要的经济树种,也是我国特有的传统名贵中药材<sup>[19]</sup>,主要分布于陕西、甘肃、河南等地<sup>[20]</sup>。尽管 TIFY 基因家族已在多个物种中进行了研究,但在杜仲 TIFYs 还未报道,本研究以杜仲基因组数据为基础<sup>[21-40]</sup>,从全基因组水平对 TIFY 基因家族进行生物信息学分析,共鉴定到 14 个 *EuTIFYs*,分为 4 个亚家族,对其理化性质、保守基序、染色体位置以及表达模式进行了分析,以期为进一步探索杜仲 *TIFYs* 基因功能奠定基础。

## 1 方法

**1.1 杜仲 TIFY 基因家族鉴定及理化性质分析** 从杜仲基因组数据库 Genome Warehouse(<https://bigd.big.ac.cn/gwh/Assembly/13/show>)查找 TIFY 蛋白候

选序列,利用美国国立生物技术信息中心(NCBI) [Conserved Domain Search Service (CD Search)] 分析蛋白保守结构域,保留含有完整 TIFY 结构域序列。通过在线软件 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析蛋白理化性质,使用 Plant-mPLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>) 预测 EuTIFYs 蛋白亚细胞定位,利用在线工具 ExPASy (<https://www.expasy.org/tools>) 预测 EuTIFYs 氨基酸数量,相对分子质量(MW),理论等电点(PI),通过 Expasy (<https://web.expasy.org/protscale/>) 软件分析蛋白的亲疏水性,使用 SOPMA ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.plpage=npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.plpage=npsa_sopma.html)) 和 Phyre 2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) 软件分别预测蛋白的二级结构和三级结构。

**1.2 杜仲 TIFYs 蛋白系统进化树构建** 通过 Clustal X 1.83 软件对杜仲、水稻、拟南芥、毛果杨和二穗短柄草 TIFYs 蛋白进行多序列比对,利用 MEGA 6.0 的邻接法,重复次数设置为 1 000 次,其他参数为默认值<sup>[41]</sup>,构建系统发育树。利用 Clustal X 1.83 比对和 DNAsp5 软件分析 TIFY 同源基因对,计算非同义替换率( $Ka$ )和同义替换率( $Ks$ ),通过公式  $T=Ks/2 \times 6.5 \times 10^{-9}$  计算杜仲同源基因复制和分离时间(T)<sup>[42]</sup>。

**1.3 保守基序及启动子分析** 通过 MEME (<http://meme-suite.org/>) 在线软件对 EuTIFY 基因家族成员进行基序分析(参数是: any number of Repetitions (anr), maximum number of Motifs=20, minimum width $\geq$ 6, and maximum width $\leq$ 50)。为了解析 EuTIFYs 启动子区域顺式作用元件,对 EuTIFYs 基因启动子(ATG)上游 2 000 bp 序列进行查找分离,利用 Plant CARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 软件进行启动子顺式作用元件分析。

**1.4 杜仲 EuTIFY 基因家族表达模式分析** 从 NCBI 的 Short Read Archive (SRA) 数据库中下载“秦仲 1 号”杜仲叶片不同发育时期(叶芽、生长叶、幼叶、老叶)(版本号 SRP218063)<sup>[43]</sup> 及不同胶含量(高产胶杜仲品种“秦仲 2 号”,低产胶杜仲品种“小叶”含量)(版本号 SRP158357)<sup>[44]</sup> 转录组数据, EuTIFYs 相对表达丰度用 FPKM 值表示,对该数值取对数( $\log_2$ ) 进行统计分析,通过 TBtools 工具绘制基因表达图谱<sup>[45]</sup>,表达量最高的用红色方框表示,表达量最低的用蓝色方框表示。

采集两年生,生长模式相似的“紫叶”杜仲(取自西北农林科技大学苗圃)不同发育阶段的叶片,即叶芽(未成熟茎),生长叶(3 cm 长),幼叶(新完全展开叶)和老叶(完全展开后 60 d)。利用 TRIzol [天根生化科技(北京)有限公司,批号 DP424] 试剂提取总 RNA,反转录合成 cDNA,通过 Quant Studio 6(新加坡 Life Technologies 公司), All-in-One SYBR Premix EX Taq™ Kit(美国 Gene Copoeia 公司)进行实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)。使用 Primer 3 Input 软件 (<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) 设计特异性引物。反应体系 10  $\mu$ L,包括 2 $\times$ mix 5.0  $\mu$ L,正向引物/反向引物各 0.25  $\mu$ L, cDNA 2.0  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 2.5  $\mu$ L。反应程序:95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,95  $^{\circ}$ C 变性 10 s,60  $^{\circ}$ C 退火 10 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 20 s,45 个循环。UBC E2 为内参基因<sup>[46]</sup>,利用 2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup>  法对 3 次生物学重复进行数据分析。

**1.5 杜仲 TIFYs 蛋白互作网络预测** 通过 STRING 软件 (<https://string-db.org/>) 上传 EuTIFYs 蛋白序列,利用拟南芥数据库进行序列比对,根据已知拟南芥 TIFYs 蛋白互作关系,预测 EuTIFYs 互作蛋白,通过 Cytoscape 3.7.0 软件对 EuTIFY 基因家族蛋白互作信息进行评估和预测<sup>[42]</sup>。

## 2 结果与分析

**2.1 杜仲 TIFY 基因家族鉴定及理化性质分析** 通过 Genome Warehouse 数据库,从杜仲基因组中共鉴定到 14 个 EuTIFYs 基因,利用 Pfam 和 NCBI 的 Conserved Domain Search 在线分析软件,对 EuTIFYs 蛋白进行结构域验证。结果显示,14 个 EuTIFYs 蛋白均含有典型的 TIFY 结构域,分别命名为 EuTIFY1~EuTIFY14。通过 ExPASy 工具,对 EuTIFY 家族成员进行蛋白质理化性质分析, EuTIFY11 蛋白序列最长,编码 357 个氨基酸, EuTIFY10 序列最短,编码 102 个氨基酸,相对分子质量分布区域为 10.80~39.14 kDa,等电点范围是 4.99(EuTIFY6)到 10.06(EuTIFY4),亚细胞定位预测结果显示, EuTIFYs 均定位在细胞核中,具体数值见表 1。

EuTIFYs 蛋白二级结构分析显示, $\alpha$ 螺旋、无规则卷曲、延伸链和 $\beta$ 转角在杜仲 TIFYs 蛋白家族中均有分布。 $\alpha$ 螺旋在 DNA 结合基序中发挥重要作用,无规则卷曲易受侧链相互作用,构成活性部位和功能部位。杜仲 TIFYs 蛋白二级结构排列顺利是无规则卷曲 $>$  $\alpha$ 螺旋 $>$ 延伸链 $>$  $\beta$ 转角,无规则卷曲所占比例均 $>$ 50%,氨基酸数量在 61~231,比例区域是

表1 杜仲TIFYs蛋白序列特征及亚细胞定位预测

Table 1 Sequence characteristics and predicted subcellular location of *Eucommia ulmoides* TIFY proteins

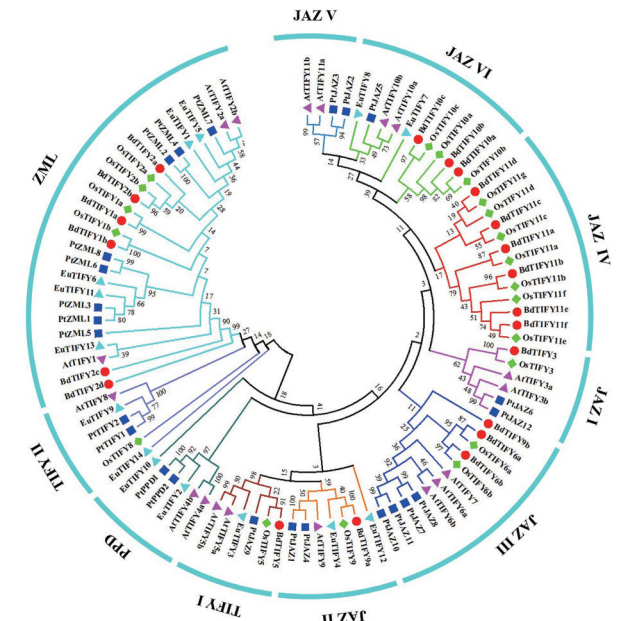
基因ID	基因名	拟南芥同源基因	染色体定位	CDS长度 /bp	蛋白质大小 (aa)	相对分子质量 /Da	等电点
EUC09100-RA	EuTIFY1	AT3G21175	scaffold1029_obj	978	325	34 571.50	6.02
EUC26236-RA	EuTIFY2	AT4G14720	Super-Scaffold_285	792	263	29 218.76	8.60
EUC18145-RA	EuTIFY3	AT1G30135	Super-Scaffold_67	360	119	13 468.51	9.30
EUC06366-RA	EuTIFY4	AT5G13220	Super-Scaffold_162	552	183	20 189.12	10.06
EUC16517-RA	EuTIFY5	AT3G21175	Super-Scaffold_32	924	307	33 973.70	6.26
EUC07637-RA	EuTIFY6	AT3G21175	Super-Scaffold_427	1 062	353	38 855.15	4.99
EUC08780-RA	EuTIFY7	AT1G19180	scaffold111_obj	738	245	27 393.98	9.57
EUC01091-RA	EuTIFY8	AT1G19180	Super-Scaffold_525	780	259	28 117.61	9.47
EUC10113-RA	EuTIFY9	AT4G32570	scaffold637_obj	318	105	10 798.85	6.01
EUC21353-RA	EuTIFY10	AT1G19180	scaffold126962_obj	312	102	11 647.17	6.25
EUC03129-RA	EuTIFY11	AT1G51600	Super-Scaffold_150	1 074	357	39 140.15	5.35
EUC24734-RA	EuTIFY12	AT5G20900	Super-Scaffold_438	654	217	24 548.62	9.66
EUC03130-RA	EuTIFY13	AT4G24470	Super-Scaffold_150	903	300	33 518.22	5.95
EUC09763-RA	EuTIFY14	AT3G17860	scaffold292_obj	789	262	27 505.34	9.80

注:亚细胞定位均在细胞核。

51.26%~75.67%; $\alpha$ 螺旋氨基酸数量为7~80,所占比例是6.67%~22.41%。EuTIFYs蛋白三级结构7个蛋白(EuTIFY2, EuTIFY3, EuTIFY4, EuTIFY7, EuTIFY8, EuTIFY12和EuTIFY14)结构相似,主要以 $\alpha$ 螺旋为主, EuTIFY10蛋白三级结构 $\beta$ 转角所占比例较大。

**2.2 杜仲TIFYs蛋白系统进化分析** 为了对杜仲EuTIFY家族进行分类,将14个杜仲EuTIFYs蛋白和18个拟南芥AtTIFYs蛋白,20个水稻OsTIFYs,21个二穗短柄草BdTIFYs,24个毛果杨PtTIFYs导入MEGA6.0软件,构建系统发育树,97个TIFYs蛋白分为10个分支。在10个分支中,C2和C4由仅含有TIFY结构域的TIFY蛋白组成,分别命名为TIFY I和TIFY II亚组。TIFY I亚组包括1个杜仲蛋白(EuTIFY3),TIFY II亚组含有2个EuTIFYs(EuTIFY9和EuTIFY14)。JAZ亚家族所包含的TIFYs成员数量最多,含有53个TIFYs蛋白,其中PtTIFYs有11个,包含10个AtTIFYs,14个OsTIFYs,14个BdTIFYs和4个EuTIFYs蛋白,JAZ亚家族进一步划分为6个亚组,JAZ I亚组包含2个EuTIFYs蛋白EuTIFY4和EuTIFY12,JAZ VI亚组含有EuTIFY7和EuTIFY8,JAZ II,JAZ III,JAZ IV和JAZ V亚组不含EuTIFY蛋白。PPD亚家族所含蛋白数量最少,仅包含6个TIFYs蛋白,2个PtTIFYs蛋白,2个EuTIFYs(EuTIFY9和

EuTIFY14),AtTIFYs和OsTIFYs各含有1个。ZML亚家族所含EuTIFYs蛋白数量最多,有5个EuTIFYs,5个物种中个, EuTIFYs与毛果杨亲缘关系最近。见图1。



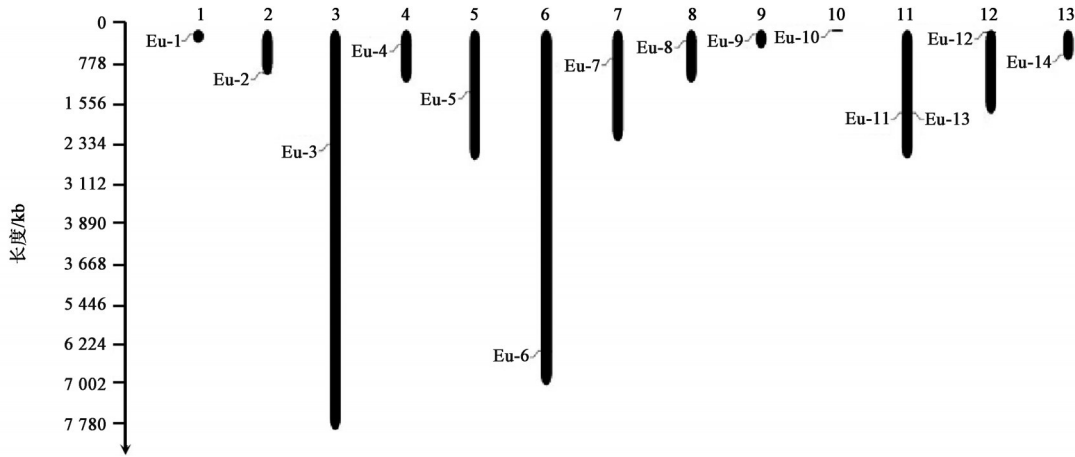
拟南芥. 玫红色;水稻. 绿色;二穗短柄草. 红色;毛果杨. 蓝色;杜仲. 蓝绿色

图1 杜仲、水稻、拟南芥、毛果杨和二穗短柄草TIFYs蛋白系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of TIFY proteins from *Eucommia ulmoides*, rice, *Arabidopsis*, poplar and *Brachypodium distachyon*

2.3 杜仲 TIFY 基因家族染色体分析 14 个 *EuTIFYs* 分布在 13 条染色体上, 11 号染色体上含有 2 个 *EuTIFYs* (*EuTIFY11* 和 *EuTIFY13*), 其余染色体均只含有一个 *EuTIFY* 基因, 见图 2。重复基因 *Ka/*

*Ks* 值估算结果发现, 杜仲基因组中除 *EuTIFY14* 和 *EuTIFY4* 基因对 *Ka/Ks* 值 > 1, 是正向选择外, 其余 *EuTIFYs* 基因对 *Ka/Ks* 值均 < 1, 为纯化选择。*EuTIFYs* 重复基因分离时间为 50.3~220.25MYA。



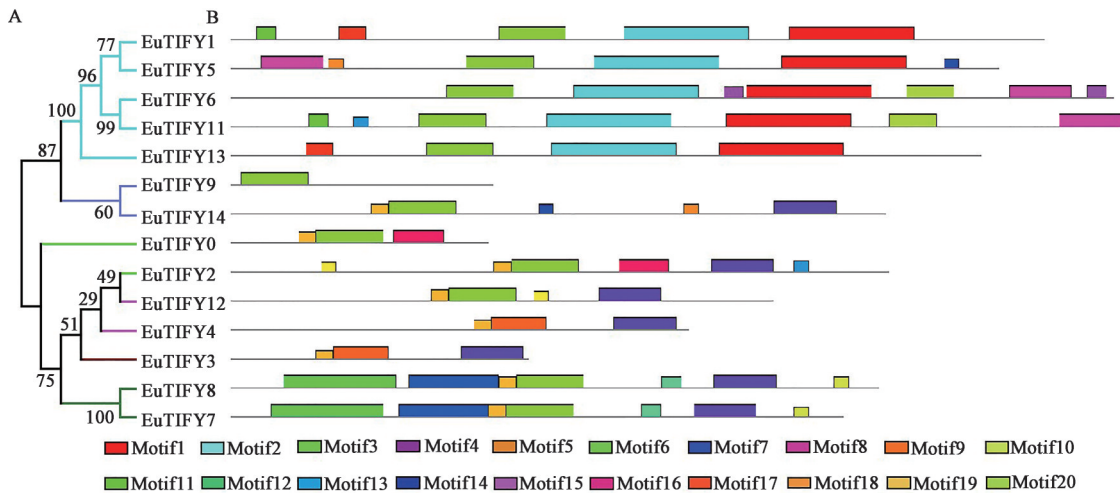
1~13. Chr01~Chr13; Eu-. *EuTIFY*

图2 杜仲 *EuTIFY* 基因染色体定位

Fig. 2 Chromosomal locations of *EuTIFY* genes in *Eucommia ulmoides*

2.4 杜仲 TIFYs 转录因子家族基序分析 利用 MEME 在线软件, 对 *EuTIFYs* 转录因子家族进行基序分析, 保守基序鉴定为 20 个, 分别命名为 Motif 1~Motif 20, 见图 3。 *EuTIFYs* 转录因子分为 4 个亚家族 (TIFY, ZML, JAZ 和 PPD), 进化关系与图 1 结果相一致。 Motif 3 和 Motif 5 为 *EuTIFYs* 蛋白的共有特征性结构域, 其中 Motif 5 含有 T (苏氨酸 Thr), I (异亮氨酸 Ile), F (苯丙氨酸 Phe) 3 个连续氨基酸, Motif 3 含有 Y (酪氨酸 Tyr) 为 TIFY 蛋白 ZIM 结构域的特征性蛋白, Motif 4 则含有 R (精氨酸 Arg), A (丙氨酸 Ala), S (丝氨酸 Ser) 3 个蛋白, 为

TIFY 蛋白 Jas 结构域的特征性蛋白。同一亚家族 *EuTIFYs* 蛋白基序具有高度相似性, ZML 亚家族均含有 Motif 1、Motif 2 和 Motif 3 基序, 其中 Motif 1 包含一个 C-X<sub>2</sub>-C-X<sub>20</sub>-C-X<sub>2</sub>-C 编码的 GATA 典型的锌指结构域。 JAZ VI 亚家族成员均含有 Motif 7, Motif 10 和 Motif 12, 表明同一亚家族 *EuTIFYs* 具有功能相似性。不同亚家族基序存在显著差异, 有些 Motifs 只在特定亚家族中存在, 例如 Motif 16 只存在于 PPD 亚家族, 只有 *EuTIFY14* 含有 Motif 14 和 Motif 18 基序, 推测基因功能特异性可能与基序相关。

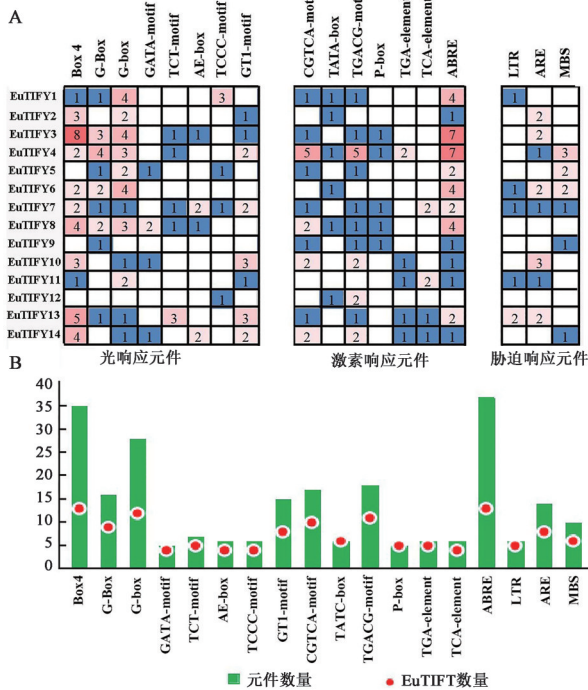


A. 利用 MEGA 6.0 的邻接法构建 *EuTIFY* 基因家族系统进化树; B: *EuTIFYs* 基序分析

图3 *EuTIFYs* 蛋白保守基序分析

Fig. 3 Conservative motif analysis of *EuTIFY* proteins

**2.5 杜仲 TIFYs 启动子顺式作用元件分析** 启动子区域顺式作用元件在基因表达调控过程中发挥重要作用,为了探索 *EuTIFYs* 基因的功能和表达调控模式,利用 Plant CARE 在线软件对起始密码子(ATG)上游 2 000 bp 序列(除 *EuTIFY10* 启动子序列是 1 204 bp, *EuTIFY12* 为 1 162 bp 之外)进行顺式作用元件分析,见图 4。 *EuTIFYs* 顺式作用元件种类及分布呈现多样性,均包含 5 种以上顺式调控元件,多数基因包含 10 种以上顺式作用元件, *EuTIFY1*, *EuTIFY4* 和 *EuTIFY7* 基因启动子区分别包含 16, 20 和 18 种调控元件,主要包含 ABRE, TCA-element, TGA-element, P-box, TGACG-motif, TATC-box, CGTCA-motif 等激素响应元件, LTR, ARE, MBS 等胁迫响应元件, Box 4, G-Box, G-box, GATA-motif, TCT-motif, AE-box, TCCC-motif 和 GT1-motif 等光响应以及 CAT-box, GCN4\_motif 和 MSA-like 生长发育调控元件,暗示 *EuTIFY* 基因家族参与多种信号通路。 *EuTIFYs* 基因中光响应元件数量最多,共有 143 个,其中 Box 4 元件有 35 个, G-box 元件有 28 个, G-Box 有 16 个,暗示 *EuTIFYs* 基因的转录可能受光周期调控。 *EuTIFYs* 启动子区域共有 37 个 ABRE 和 14 个 ARE 元件,推测 *EuTIFYs* 可能参与 ABA 调节和厌氧调控。

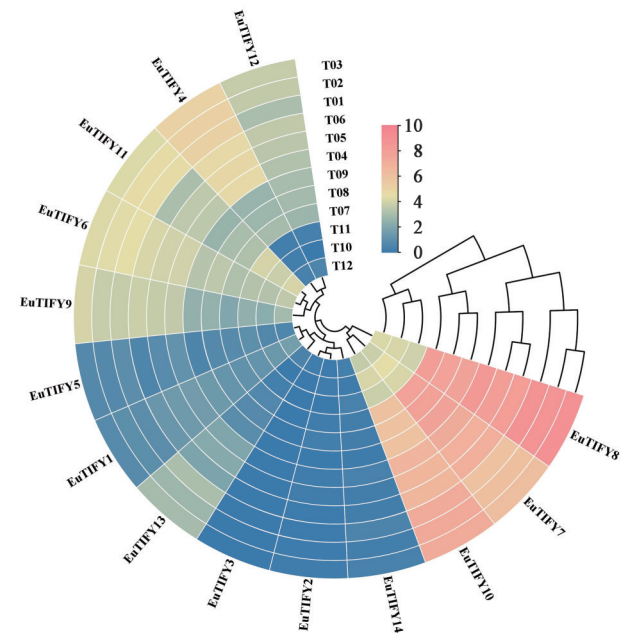


A. 每个 *EuTIFYs* 基因启动子区域顺式作用元件个数; B. 顺式作用元件数量和含有顺式作用元件 *EuTIFYs* 基因数量

图 4 *EuTIFYs* 启动子顺式作用元件分布

Fig. 4 cis-elements distributed in promoters of *EuTIFYs*

**2.6 杜仲 TIFY 基因家族表达模式分析** 为了探究 *EuTIFYs* 基因在杜仲叶片不同发育时期及胶形成中的功能,利用“秦仲 1 号”杜仲叶片 4 个发育时期和不同胶含量的转录组数据,进行基因表达模式分析。 14 个 *EuTIFYs* 基因在杜仲叶片不同发育时期均有表达,表明 *EuTIFYs* 参与杜仲叶片生长发育,见图 5。 *EuTIFY7*, *EuTIFY8* 和 *EuTIFY10* 基因在杜仲叶片中转录水平较高,暗示 *EuTIFY7*, *EuTIFY8* 和 *EuTIFY10* 在杜仲叶片发育中发挥重要作用;相反 *EuTIFY2*, *EuTIFY3*, *EuTIFY5* 和 *EuTIFY14* 转录水平较低,几乎检测不到,推测 *EuTIFY2*, *EuTIFY3*, *EuTIFY5* 和 *EuTIFY14* 在杜仲叶片发育中作用较小。 10 个 *EuTIFYs* 基因在杜仲叶芽时期表达量较高,占总数的 71.4%, *EuTIFY1* 和 *EuTIFY5* 在幼叶中表达量较高, *EuTIFY2* 和 *EuTIFY7* 在成熟期表达量最高,占总数的 14.3%, *EuTIFYs* 基因在杜仲老叶阶段 FPKM 值最低,表明大部分 *EuTIFYs* 基因在杜仲叶片发育的早期阶段发挥重要作用。



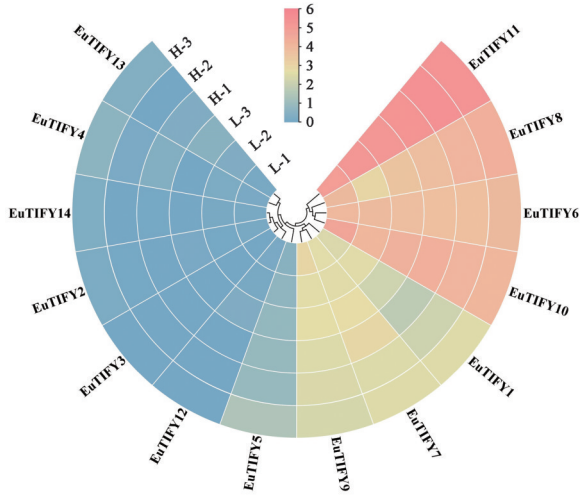
T01~T03. 叶芽; T04~T06. 生长叶; T07~T09. 幼叶; T10~T12. 老叶; 蓝色. 低表达丰度; 红色. 高转录水平

图 5 *EuTIFYs* 基因在杜仲叶片不同发育时期表达模式

Fig. 5 Expression patterns of *EuTIFYs* genes at different development stages of *Eucommia ulmoides* leaves

利用高产胶杜仲品种“秦仲 2 号”和低产胶杜仲品种“小叶”的叶片转录组数据,检测 *EuTIFYs* 基因的转录水平。 大部分 *EuTIFYs* 表达水平较低,不同样品间表达量无显著差异,见图 6。 10 个 *EuTIFYs* 基因 FPKM 值均 < 10, *EuTIFY11* 的表达水平相对最

高,平均值是36.97,其低胶含量中的转录水平低于高胶含量叶片,推测 *EuTIFY11* 可能在杜仲胶形成过程中发挥正调控作用。



L-1~L-3. 低胶含量叶片;H-1~H-3. 高胶含量叶片;蓝色. 低转录水平;红色. 高转录水平

图6 *EuTIFYs* 基因在杜仲不同胶含量中的表达模式  
Fig. 6 Expression pattern of *EuTIFY* genes in different *Eucommia ulmoides* rubber content

以“紫叶杜仲”不同发育阶段叶片为材料,通过 Real-time PCR 检测 *EuTIFYs* 基因的表达水平。*EuTIFY1*, *EuTIFY2*, *EuTIFY7* 和 *EuTIFY10* 基因在叶芽中表达量最高,随着叶片发育表达水平逐渐降低,相反 *EuTIFY3*, *EuTIFY12* 和 *EuTIFY13* 呈现相反的趋势,随着叶片发育表达水平逐渐升高,老叶中转录水平最高, *EuTIFY4*, *EuTIFY5* 和 *EuTIFY8* 随着叶片发育,呈现先降低后升高的表达趋势,见表2。*EuTIFY6* 和 *EuTIFY11* 基因的表达呈现先升高后降低再升高的趋势,表明 *EuTIFYs* 在杜仲叶片发育中呈现不同的表达趋势。

**2.7 杜仲 *EuTIFYs* 蛋白互作网络分析** 利用 STRING 和 Cytoscape 3.7.0 软件,对 14 个 *EuTIFYs* 蛋白进行了互作网络分析,见图7。调控网络中共有 10 个节点(代表 *EuTIFYs* 蛋白),29 条边(代表蛋白质之间的相互作用),表明 14 个 *EuTIFYs* 中有 10 个蛋白存在互作关系。*EuTIFY9* 互作蛋白数量最多,与 9 个 *EuTIFYs* 蛋白存在互作关系,暗示 *EuTIFY9* 可能处于 *EuTIFY* 基因家族核心位置, *EuTIFY3* 和 *EuTIFY4* 分别可以与 7 个 *EuTIFYs* 蛋白互作, *EuTIFY7*, *EuTIFY12*, *EuTIFY13* 和 *EuTIFY14* 均可以与 6 个 *EuTIFYs* 蛋白互作, *EuTIFY2* 和 *EuTIFY5* 与 5 个 *EuTIFYs* 蛋白互作, *EuTIFY1* 和 3 个 *EuTIFYs* 蛋白发生互作关系。

表2 杜仲 *TIFY* 家族基因在叶片发育中的表达模式

Fig. 2 Expression patterns of *Eucommia ulmoides* *TIFY* family genes during leaf development

基因	叶芽	方差	生长叶	方差	幼叶	方差	老叶	方差
<i>EuTIFY1</i>	1.10	0.09	0.71	0.10	0.11	0.01	0.27	0.08
<i>EuTIFY2</i>	0.42	0.06	0.13	0.05	0.04	0.03	0.23	0.06
<i>EuTIFY3</i>	1.99	0.04	2.14	0.33	0.05	0.02	15.24	2.24
<i>EuTIFY4</i>	2.15	0.06	0.45	0.11	0.36	0.07	168.91	28.23
<i>EuTIFY5</i>	1.43	0.08	0.47	0.19	0.14	0.05	8.68	1.33
<i>EuTIFY6</i>	0.48	0.06	1.66	0.39	0.15	0.05	59.18	9.50
<i>EuTIFY7</i>	3.23	0.15	6.79	0.85	0.17	0.03	0.002	0.001
<i>EuTIFY8</i>	38.57	2.61	0.44	0.21	0.69	0.45	1.93	1.66
<i>EuTIFY10</i>	13.26	2.47	5.86	0.38	0.83	0.10	0.57	0.13
<i>EuTIFY11</i>	0.85	0.05	1.24	0.16	0.66	0.05	1.13	0.03
<i>EuTIFY12</i>	0.32	0.13	5.60	0.15	2.28	0.52	9.17	1.72
<i>EuTIFY13</i>	0.02	0.001	0.06	0.02	0.19	0.03	0.11	0.03

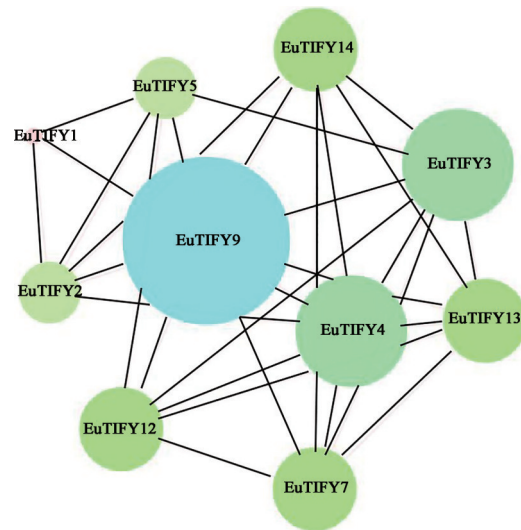


图7 *EuTIFY* 基因家族蛋白互作网络预测

Fig. 7 Prediction of interaction network between *EuTIFY* gene family

### 3 讨论与结论

*TIFY* 蛋白是植物特有一类转录因子,在植物生长、器官发育、信号转导和环境胁迫中发挥重要作用<sup>[2,39,47]</sup>。*TIFYs* 基因功能已在拟南芥<sup>[47]</sup>、水稻<sup>[3]</sup>、小麦<sup>[48]</sup>、毛果杨<sup>[33]</sup>、芫菁<sup>[34]</sup>等物种中进行了研究,杜仲 *TIFYs* 基因还未见报道,本研究从杜仲基因组中鉴定到 14 个 *EuTIFYs* 基因,结果表明杜仲 *TIFYs* 分为 4 个大亚家族 JAZ, ZML, *TIFY* 和 PPD 亚家族。JAZ 亚家族存在 4 个 *EuTIFYs*, ZML 亚家族包含 5 个 *EuTIFYs*, *TIFY* 和 PPD 亚家族分别含有 3 个和 2 个 *EuTIFYs* 基因。结构分析显示,14 个 *EuTIFYs* 基因均含有 *TIFY* 特征结构域,表明他们均属于 *TIFY* 转

录因子家族, ZML亚家族 Motif 1 中包含一个 C-X<sub>2</sub>-C-X<sub>20</sub>-C-X<sub>2</sub>-C 编码的 GATA 典型锌指结构域, 这与其他物种研究结果相一致<sup>[34-35]</sup>。

启动子是起始密码子上游约 2 000 bp 的一段特定的 DNA 序列, 包含多种顺式调控元件, 协助植物对外源植物激素处理和环境胁迫<sup>[49]</sup>。分析显示, *EuTIFYs* 基因至少含有一种胁迫或激素相关启动子调控元件, 表明 *EuTIFYs* 基因参与响应外源激素和胁迫处理。EuTIFY 基因家族光响应元件数量最多, 共有 143 个, 暗示 EuTIFYs 参与杜仲光周期响应。*EuTIFY3*, -8, -11, -13 和 -14 基因启动子区域不存在 CAT-box, circadian, MSA-like 和 GCN4\_Motif 等生长发育相关元件, 表达模式分析显示, *EuTIFY3*, -8, -11, -13 和 -14 均参与杜仲叶片发育, *EuTIFY3* 在叶片发育中表达量较高, 推测 *EuTIFYs* 可能与其他基因相互作用, 参与生长发育。

TIFYs 蛋白在拟南芥、水稻、二穗短柄草、毛果杨和杜仲中分为 10 个亚家族 PPD, ZML, TIFY I, TIFY II, JAZ I, JAZ II, JAZ III, JAZ IV, JAZ V 和 JAZ VI。聚类分析结果显示, *EuTIFY11* 与 *PtZML3* 亲缘关系最近, *PtZML3* 在毛果杨干旱胁迫的根中诱导表达<sup>[49]</sup>, 推测 *EuTIFY11* 可能参与杜仲干旱胁迫。*EuTIFY1* 和 *EuTIFY5* 与 *AtTIFY2a* (*AtZML1*) 和 *AtTIFY2b* (*AtZML2*) 聚为同一分支, *AtZIM*, *AtZML1* 和 *AtZML2* 在拟南芥的茎尖、花序(花和花芽)和根中表达量较高, 长日照条件下(16 h/8 h 光/暗), 超表达 *AtZIM* 增加细胞大小, 导致下胚轴和叶柄伸长; 短日照条件下(8 h/16 h 光/暗), 叶柄较长, 叶片变小<sup>[50]</sup>, 推测 *EuTIFY1* 和 *EuTIFY5* 可能调控杜仲光周期叶柄生长发育。*EuTIFY2* 和 *EuTIFY10* 均属于 PPD 亚家族, *AtTIFY4a* (PPD1) 和 *AtTIFY4b* (PPD2) 在拟南芥叶片和长角果发育中, 通过促进分生细胞的早期逮捕, 导致叶片变小<sup>[6]</sup>, 暗示 *EuTIFY2* 和 *EuTIFY10* 可能参与杜仲叶片和角果发育。*EuTIFY7* 与 *AtTIFY10a*, *AtTIFY10b* 同源性最高, 均属于 JAZ VI 亚家族, *attify10a* 和 *attify10b* 缺失突变体在碱胁迫条件下萌发率降低, 耐受性减弱, *GsTIFY10a* 为 *AtTIFY10a* 和 *AtTIFY10b* 的同源基因, 在苜蓿中超表达 *GsTIFY10a* 可诱导胁迫相关基因表达, 提高转基因植物碱胁迫耐受性及 JA 含量<sup>[51]</sup>, 暗示 *EuTIFY7* 可能在杜仲碱胁迫响应中发挥正调控作用。*AtTIFY9* (*AtJAS1*) 是 *EuTIFY4* 的同源基因, 超表达 *AtJAS1* 降低转基因植株对茉莉酸甲酯的敏感性, 相反 *AtJAS1* RNAi 干扰植株茉莉酸甲酯的敏感性增

强<sup>[52]</sup>, *EuTIFY4* 可能参与茉莉酸甲酯信号通路。

14 个 EuTIFYs 蛋白中有 10 个 EuTIFYs 蛋白与其他蛋白存在互作关系, 3 个 EuTIFYs (*EuTIFY3*, *EuTIFY9* 和 *EuTIFY14*), 3 个 EuZMLs (*EuTIFY1*, *EuTIFY5*, *EuTIFY13*), 3 个 EuJAZs (*EuTIFY4*, *EuTIFY7* 和 *EuTIFY12*), 1 个 EuPPDs (*EuTIFY2*)。EuTIFY9 与 *AtTIFY8* 序列具有高度的同源性, *AtTIFY8* 与 PEAPOD 和 NINJA 发生蛋白互作, *AtTIFY8* 通过 NINJA 与 TOPLESS 蛋白互作, 为转录抑制因子; 在发育期间和丁香假单胞菌感染后, *AtTIFY8* 的表达与 JAZ (JASMONATE ZIM DOMAIN) 呈负相关<sup>[53]</sup>, 推测 *EuTIFY9* 可能与 EuPEAPOD 和 EuNINJA 蛋白互作, 调控 JAZ 表达。*EuTIFY14* 是 *AtJAZ3* 的同源基因, *AtJAZ3* 与 FIL (FILAMENTOUS FLOWER) 蛋白互作, FIL 可调节轴向发育、侧生器官以及芽的生长、顶端分生组织活性和花序分化等发育过程<sup>[54]</sup>, *EuTIFY7* 为 *AtJAZ1* 的同源基因, 预测结果显示 *EuTIFY14* 与 *EuTIFY7* 存在互作关系, 这与拟南芥研究结果一致。

综上所述, 本研究共鉴定出 14 个 *EuTIFYs*, 分为 JAZ, ZML, TIFY 和 PPD 4 个亚家族, 进一步划分为 6 个组 (JAZ I, JAZ VI, TIFY I, TIFY II, ZML 和 PPD)。理化性质分析显示, *EuTIFYs* 编码 102~357 个氨基酸, 理论等电点分布于 4.99~10.06, 相对分子质量区域为 10.8~39.14 kDa, 亚细胞定位于细胞核, 分布在 13 条染色体, 均为亲水性蛋白。EuTIFY 基因家族在杜仲叶片发育中具有不同的表达模式, 大部分基因在叶片发育的早期阶段表达量较高, 正调控杜仲胶的形成, *EuTIFYs* 之间存在多种互作关系, 本研究为深入探索 *EuTIFYs* 基因功能奠定基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] ZHANG Y, GAO M, SINGER S, et al. Genome-wide identification and analysis of the TIFY gene family in grape[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e0044465.
- [2] VANHOLME B, GRUNEWALD W, BATEMAN A, et al. The tify family previously known as ZIM[J]. Trend Plant Sci, 2007, 12(6): 239-244.
- [3] BAI Y, MENG Y, HUANG D, et al. Origin and evolutionary analysis of the plant-specific TIFY transcription factor family[J]. Genomics, 2011, 98(2): 128-136.
- [4] STASWICK P. JAZing up jasmonate signaling [J]. Trend Plant Sci, 2008, 13(2): 66-71.

- [ 5 ] CHUNG H, NIU Y, BROWSE J, et al. Top hitsin contemporary JAZ: an update on jasmonate signaling [J]. *Phytochemistry*, 2009, 70(13/14): 1547-1559.
- [ 6 ] DEREK W. PEAPOD regulates lamina size and curvature in *Arabidopsis* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(35): 13238-13243.
- [ 7 ] 罗冬兰, 巴良杰, 陈建业, 等. 香蕉 MaTIFY1 转录因子特性及其在成熟过程中基因表达分析 [J]. *园艺学报*, 2017, 44(1): 43-52.
- [ 8 ] ZHOU X, YAN S, SUN C, et al. A maize jasmonate Zim-domain protein, ZmJAZ14, associates with the JA, ABA, and GA signaling pathways in transgenic *Arabidopsis* [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0121824.
- [ 9 ] LIU S, ZHANG P, LI C, et al. The moss jasmonate ZIM-domain protein PnJAZ1 confers salinity tolerance via crosstalk with the abscisic acid signalling pathway [J]. *Plant Sci*, 2019, 280: 1-11.
- [ 10 ] LI Y, XU M, WANG N, et al. A JAZ protein in *Astragalus sinicus* interacts with a leghemoglobin through the TIFY domain and is involved in nodule development and nitrogen fixation [J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0139964.
- [ 11 ] CAI Q, YUAN Z, CHEN M, et al. Jasmonic acid regulates spikelet development in rice [J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 3476.
- [ 12 ] TIAN J, CAO L, CHEN X, et al. The OsJAZ1 degron modulates jasmonate signaling sensitivity during rice development [J]. *Development*, 2019, 146(4): 173419.
- [ 13 ] FU J, WU H, MA S, et al. OsJAZ1 attenuates drought resistance by regulating JA and ABA signaling in rice [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 2108.
- [ 14 ] HAKATA M, KURODA M, OHSUMI A, et al. Overexpression of a rice *TIFY* gene increases grain size through enhanced accumulation of carbohydrates in the stem [J]. *Biosci Biotech Bioch*, 2012, 76(11): 2129-2134.
- [ 15 ] XIE S, CUI L, LEI X, et al. The TIFY gene family in wheat and its progenitors: genome-wide identification, evolution and expression analysis [J]. *Curr Genomics*, 2019, 20(5): 371-388.
- [ 16 ] LI M, ZHANG T, GE S, et al. Comparative proteomics and metabolomics of JAZ7-mediated drought tolerance in *Arabidopsis* [J]. *J Proteomics*, 2019, 196: 81-91.
- [ 17 ] ZHAO G, SONG Y, WANG C, et al. Genome-wide identification and functional analysis of the TIFY gene family in response to drought in cotton [J]. *Mol Genet Genomics*, 2016, 291(6): 2173-2187.
- [ 18 ] 张宏达. *中国植物志* [M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [ 19 ] 李竹, 晏媛, 李青. 杜仲的药理活性研究进展 [J]. *中国药事*, 2004, 18(2): 131-132.
- [ 20 ] 王娟娟, 秦雪梅, 高晓霞, 等. 杜仲化学成分、药理活性和质量控制现状研究进展 [J]. *中草药*, 2017, 48(15): 3228-3237.
- [ 21 ] WUYUN T, WANG L, LIU H, et al. The hardy rubber tree genome provides insights into the evolution of polyisoprene biosynthesis [J]. *Mol Plant*, 2018, 11(3): 429.
- [ 22 ] YE H, DU H, TANG N, et al. Identification and expression profiling analysis of TIFY family genes involved in stress and phytohormone responses in rice [J]. *Plant Mol Biol*, 2009, 71(3): 291-305.
- [ 23 ] ZHANG Z, LI X, YU R, et al. Isolation, structural analysis, and expression characteristics of the maize TIFY gene family [J]. *Mol Genet Genomics*, 2015, 290(5): 1849-1858.
- [ 24 ] ZHANG L, YOU J, CHAN Z. Identification and characterization of TIFY family genes in *Brachypodium distachyon* [J]. *J Plant Res*, 2015, 128(6): 995-1005.
- [ 25 ] HUANG Z, JIN S, GUO H, et al. Genome-wide identification and characterization of TIFY family genes in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) and expression profiling analysis under dehydration and cold stresses [J]. *Peer J*, 2016, 4: e2620.
- [ 26 ] 赵晓晓, 谢坤良, 张舒梦, 等. 柳枝稷 TIFY 基因家族的鉴定与分析 [J]. *草地学报*, 2019, 27(5): 1126-1137.
- [ 27 ] 黄英. 丹参 TIFY 基因家族分析及其互作蛋白筛选 [D]. 西安: 陕西师范大学, 2017.
- [ 28 ] 胡利宗, 李超琼, 张雯露, 等. 菜豆 TIFY 基因的全基因组鉴定与系统进化分析 [J]. *分子植物育种*, 2020, 18(10): 3132-3140.
- [ 29 ] ZHU D, BAI X, LUO X, et al. Identification of wild soybean (*Glycine soja*) TIFY family genes and their expression profiling analysis under bicarbonate stress [J]. *Plant Cell Rep*, 2013, 32(2): 263-272.
- [ 30 ] GEETIKA S, POONAM S, PREETI A, et al. Genome-wide characterization and expression profiling of TIFY gene family in pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) under copper stress [J]. *J Plant Biochem Biotechnol*, 2016, 25(3): 301-310.
- [ 31 ] YANG Y, AHAMMED G, WAN C, et al. Comprehensive analysis of TIFY transcription factors and their expression profiles under jasmonic acid and abiotic stresses in watermelon [J]. *Int J Genomics*, 2019, 2019: 6813086.

- [32] MA Y, SHU S, BAI S, et al. Genome-wide survey and analysis of the TIFY gene family and its potential role in anthocyanin synthesis in Chinese sand pear (*Pyrus pyrifolia*) [J]. *Tree Genet Genomes*, 2018, 14 (2) : 1-15.
- [33] WANG Y, PAN F, CHEN D, et al. Genome-wide identification and analysis of the *Populus trichocarpa* TIFY gene family [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2017, 115:360-371.
- [34] SAHA G, PARK J, KAYUM M, et al. A Genome-wide analysis reveals stress and hormone responsive patterns of TIFY family genes in *Brassica rapa* [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7:936.
- [35] HE X, KANG Y, LI W. Genome-wide identification and functional analysis of the TIFY gene family in the response to multiple stresses in *Brassica napus* L [J]. *BMC Genomics*, 2020, 21(1):736.
- [36] LIU X, ZHAO C, YANG L, et al. Genome-wide identification, expression profile of the TIFY gene family in *Brassica oleracea* var. *capitata*, and their divergent response to various pathogen infections and phytohormone treatments [J]. *Genes*, 2020, 11 (2):127.
- [37] LI X, YIN X, WANG H, et al. Genome-wide identification and analysis of the apple (*Malus × domestica* Borkh.) TIFY gene family [J]. *Tree Genet Genomes*, 2015, 11:808.
- [38] 张沪, 肖翠, 王贵元, 等. 柑桔 TIFY 基因结构特征及响应低温表达分析 [J]. *中国南方果树*, 2020, 49(2): 34-39.
- [39] 丁旭坡, 马纳纳, 庞宽壮, 等. 海南龙血树 4 个 DcTIFY10 转录因子的鉴定和表达分析 [J]. *分子植物育种*, 2019, 17(19):6287-6294.
- [40] 温东, 王梦月, 米要磊, 等. 中药火麻仁基原植物大麻的 TIFY 基因家族鉴定及功能分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(24):134-143.
- [41] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6. 0 [J]. *Mol Biol Evolut*, 2013, 30(12):2725-2729.
- [42] LIU J, CHENG Z, LI X, et al. Expression analysis and regulation network identification of the CONSTANS-Like gene family in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) under photoperiod treatments [J]. *DNA Cell Biol*, 2019, 38(7):607-626.
- [43] LI L, LIU M H, SHI K. Dynamic changes in metabolite accumulation and the transcriptome during leaf growth and development in *Eucommia ulmoides* [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(16):E4030.
- [44] YE J, HAN W, FAN R, et al. Integration of transcriptomes, small RNAs, and degradome sequencing to identify putative miRNAs and their targets related to eu-rubber biosynthesis in *Eucommia ulmoides* [J]. *Genes*, 2019, 10(8):623.
- [45] CHEN C, CHEN H, ZHANG Y, et al. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. *Mol Plant*, 2020, 13(8):1194-1202.
- [46] YE J, JIN C F, LI N, et al. Selection of suitable reference genes for qRT-PCR normalization under different experimental conditions in *Eucommia ulmoides* Oliv [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):15043.
- [47] CLARKE J, VOLKO S, LEDFORD H, et al. Roles of salicylic acid, jasmonic acid, and ethylene in cpr-induced resistance in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2000, 12(11):2175-2190.
- [48] EBEL C, BENFEKI A, HANIN M, et al. Characterization of wheat (*Triticum aestivum*) TIFY family and role of *Triticum durum* *TdTIFY11a* in salt stress tolerance [J]. *PLoS One*, 2018, 13 (7) : e0200566.
- [49] WANG H, LENG X, XU X, et al. Comprehensive analysis of the TIFY gene family and its expression profiles under phytohormone treatment and abiotic stresses in roots of *Populus trichocarpa* [J]. *Forests*, 2020, 11(315):1-21.
- [50] MASAHITO S, YUKO M, KOHEI A, et al. Characterization of *Arabidopsis* ZIM, a member of a novel plant-specific GATA factor gene family [J]. *J Experiment Bot*, 2004, 55(397):631-639.
- [51] ZHU D, LI R, LIU X, et al. The positive regulatory roles of the TIFY10 proteins in plant responses to alkaline stress [J]. *PLoS One*, 2014, 9(11):e111984.
- [52] YAN Y, STOLZ S, CHÉTELAT A, et al. A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway [J]. *Plant Cell*, 2007, 19(8):2470-2483.
- [53] AMPARO C, ASTRID N, ROBIN V, et al. The non-JAZ TIFY protein TIFY8 from *Arabidopsis thaliana* is a transcriptional repressor [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1):e84891.
- [54] BOTER M, GOLZ J, GIMÉNEZ-IBAÑEZ S, et al. FILAMENTOUS FLOWER is a direct target of JAZ3 and modulates responses to jasmonate [J]. *Plant Cell*, 2015, 27(11):3160-3174.

[责任编辑 顾雪竹]