

· 药学基础 ·

## 中药火麻仁基原植物大麻的 TIFY 基因家族鉴定及功能分析

温东<sup>1</sup>, 王梦月<sup>1</sup>, 米要磊<sup>1</sup>, 马伟<sup>2</sup>, 孙伟<sup>1\*</sup>, 师玉华<sup>1\*</sup>

(1. 中国中医科学院 中药研究所 中药鉴定与安全性评估重点实验室, 北京 100700;

2. 黑龙江中医药大学 药学院, 哈尔滨 150040)

**[摘要]** 目的:从全基因组层面对大麻(*Cannabis sativa*)TIFY 基因家族进行鉴定与功能分析,为解析大麻 TIFY 家族基因功能及其对大麻素等次生代谢产物生物合成的调控机理奠定基础。方法:采用已有大麻基因组数据,通过 NCBI, PlantTFDB, MEME 及 TBtools 等生物信息学分析工具,鉴定大麻中的 TIFY 家族基因,并对其编码蛋白的理化性质、系统进化、基因结构、染色体定位及组织差异表达模式等进行分析 and 可视化作图。结果:该研究共鉴定到大麻 TIFY 家族基因成员 14 个(*CsTIFY1~CsTIFY14*),分属于 TIFY, JAZ, ZML 和 PPD 共 4 个亚家族,其核酸序列长度为 365~1 369 bp,编码氨基酸长度为 118~442 aa,等电点为 4.64~9.96。14 个 *CsTIFYs* 不均匀的分布在 8 条染色体上,亚细胞定位预测其蛋白均定位细胞核中。*CsTIFYs* 基因的启动子区具有多种非生物胁迫响应的顺式作用元件,可参与植物的不同生长发育和非生物胁迫调控。转录组表达热图分析表明,*CsTIFYs* 在不同大麻品种的雌花及同一品种的花、苞片、茎、叶中均存在表达差异。结论:该研究从全基因组水平鉴定到大麻 *CsTIFY* 家族转录因子 14 个,并对其结构特点和表达模式进行研究,预测大麻 *CsTIFYs* 可能在大麻的 JA 信号转导通路、非生物胁迫及大麻素生物合成中发挥重要调控作用,将对大麻中 TIFY 家族的基因功能研究以及大麻优质品种选育提供科学参考。

**[关键词]** 生物信息学; 大麻; TIFY 基因家族; 成员鉴定; 功能分析

**[中图分类号]** R284.2; R289; R22; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)24-0134-10

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20202311

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20201015.1645.007.html>

**[网络出版日期]** 2020-10-16 09:17

### Genome-wide Identification and Characterization of TIFY Gene Family in Medicinal Plant *Cannabis sativa*

WEN Dong<sup>1</sup>, WANG Meng-yue<sup>1</sup>, MI Yao-lei<sup>1</sup>, MA Wei<sup>2</sup>, SUN Wei<sup>1\*</sup>, SHI Yu-hua<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Beijing for Identification and Safe Evaluation of Chinese Medicine, Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. College of Pharmaceutical Sciences, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

**[Abstract]** **Objective:** The TIFY gene family will be identified and characterized from the whole genome level in *Cannabis sativa*, which will lay the foundation for gene function study on TIFY family genes and their regulation mechanism on the biosynthesis of cannabinoids and other secondary metabolites. **Method:** Using the existing genomic data of cannabis, the *CsTIFY* genes were identified through bioinformatics analysis

**[收稿日期]** 20200908(012)

**[基金项目]** 国家“重大新药创制”科技重大专项(2019ZX09201005-006-004);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ZZ13-YQ-101)

**[第一作者]** 温东,在读硕士,从事药用植物生物工程研究,E-mail:dwen0219@163.com

**[通信作者]** \* 师玉华,助理研究员,从事药用植物代谢调控研究,E-mail:yhshi@icmm.ac.cn;

\* 孙伟,副研究员,从事药用植物功能研究,E-mail:wsun@icmm.ac.cn

tools such as NCBI, PlantTFDB, MEME and TBtools etc., and physicochemical properties, phylogenetic trees, gene structures, chromosome locations and gene expression patterns were analyzed and visualized. **Result:** Fourteen TIFY family genes (*CsTIFY1-CsTIFY14*) were identified in *Cannabis sativa*, which belong to four subfamilies: TIFY, JAZ, ZML, and PPD. The *CsTIFYs* are composed of 365-1 369 bp nucleotides encoding 118-442 amino acid residues, and their isoelectric points are 4.64-9.96. The 14 *CsTIFYs* are unevenly distributed on 8 chromosomes, and their proteins are all located in the nucleus. The promoter of *CsTIFYs* contain multiple abiotic stress responsive *cis*-acting elements, which indicated that *CsTIFYs* might involved in the regulation of different abiotic stresses. Transcriptome profiling revealed that *CsTIFYs* expressed differently in female flowers of 10 differently cannabis varieties, or in flowers, bracts, stems, and leaves of the same variety. **Conclusion:** Fourteen TIFY family genes were characterized from the whole genome level in *C. sativa*, and their phylogenetic evolutions and gene expression patterns were analyzed, indicating that *CsTIFYs* may play important regulatory roles in JA signal transduction, abiotic stress and cannabinoid biosynthesis. This study will provide valuable reference for gene function study of the TIFY family genes in cannabis and cannabis breeding.

[**Key words**] bioinformatics; *Cannabis sativa*; TIFY gene family; indetifine of members; functional analysis

大麻 (*Cannabis sativa*) 是大麻科 (Cannabinaceae) 大麻属 (*Cannabis*) 一年生草本植物<sup>[1]</sup>。大麻的种子又称为火麻仁, 是我国常用的中药材之一, 能够润燥、滑肠、通淋及活血等<sup>[2]</sup>, 具有重要的药用价值<sup>[3]</sup>。大麻中的主要活性成分是大麻素 (cannabinoids)<sup>[4]</sup>, 包括四氢大麻酚 (tetrahydrocannabinol, THC), 大麻二酚 (cannabidiol, CBD), 大麻环萜酚 (cannabichromene, CBC), 大麻酚 (canna-binol, CBN) 及大麻萜酚 (cannabigerol, CBG) 等。其中 CBD 和 THC 的总含量最高, 是大麻中最重要的两种大麻素类化合物。CBD 能够治疗炎症、癫痫、癌症、焦虑及抑郁等, 还能提高免疫力、抗氧化及抗炎除粉刺等<sup>[5]</sup>。THC 在临床上可作为抗呕吐剂用于肿瘤化疗病人的治疗, 但其具有精神活性, 能够使人致幻、成瘾<sup>[6]</sup>, 已被大部分国家禁止使用。我国规定 THC 质量分数 >0.3% 的大麻品种是严禁种植和使用的。因此, 低 THC 高 CBD 含量的工业大麻 (药用大麻) 是目前大麻品种选育的研究重点。

大麻素为萜类化合物, 主要聚集在大麻雌花的腺毛中。大麻素的生物合成途径目前已经比较清晰, 主要是由脂肪酸途径<sup>[7]</sup> (fatty acid biosynthesis) 和萜类途径<sup>[8]</sup> (DOXP/MEP pathway) 分别生成大麻素合成的起始底物一戊基二羟基苯酸 (olivetolic acid, OA) 和焦磷酸香叶酯 (geranyl pyrophosphate, GPP), 然后二者结合再形成单萜类化合物大麻萜酚酸 (cannabigerolic acid, CBGA), CBGA 在大麻萜酚酸合成酶 (cannabidiolic acid

synthase, CBDAS) 和四氢大麻酚酸合成酶 (tetrahydrocannabinolic acid synthase, THCAS) 的作用下, 生成大麻二酚 (CBD) 和四氢大麻酚 (THC)<sup>[9-12]</sup>, 见图 1。因此, 结合大麻素的生物合成途径, 研究人员通过调整适宜的生态因子、诱变及倍性育种、调控代谢途径与腺毛生长以及采用基因敲除的手段使大麻素生物合成途径中 THC 途径的关键酶失活等方式来选育低 THC, 高 CBD 含量的药用大麻品种<sup>[13]</sup>。也有研究表明, 在大麻开花期对其进行紫外照射、干旱胁迫和脱落酸处理后, 大麻中大麻素的生物合成受到影响, THC 和 CBD 的含量均有不同程度的升高<sup>[14-16]</sup>。然而, 目前关于大麻素生物合成的调控研究仍然很少, 其合成的调控机制尚不明确, 仍需进一步研究。

TIFY 蛋白是植物中特有的一类转录因子, 曾被称为花序分生组织中表达的锌指蛋白 (Zinc-finger protein expressed in inflorescence meriste, ZIM) 家族, 因其具有一个高度保守的 TIFY 功能结构域, 即 TIF[F/Y]XG 氨基酸序列, 因此被命名为 TIFY 基因家族。根据保守结构域的不同, TIFY 家族蛋白分为 TIFY, JAZ, ZML (包括 ZIM 和 ZML (ZIM-like) 蛋白) 和 PPD 共 4 个亚家族<sup>[17]</sup>。其中 TIFY 亚家族含有 TIFY 结构域; JAZ 亚家族含有 TIFY 结构域和 Jas 结构域; PPD 亚家族含有 TIFY 结构域, Jas 结构域 (PY 基序缺失) 及 PPD 结构域; ZML 亚家族含有 TIFY 结构域, CCT 基序及 GATA 锌指结构域<sup>[18-19]</sup>。首个被鉴定的 TIFY 家族转录因子是拟南芥的 *TIFY1* (*ZIM*)<sup>[20]</sup>。目前, TIFY 家族已在多种植物中被鉴定

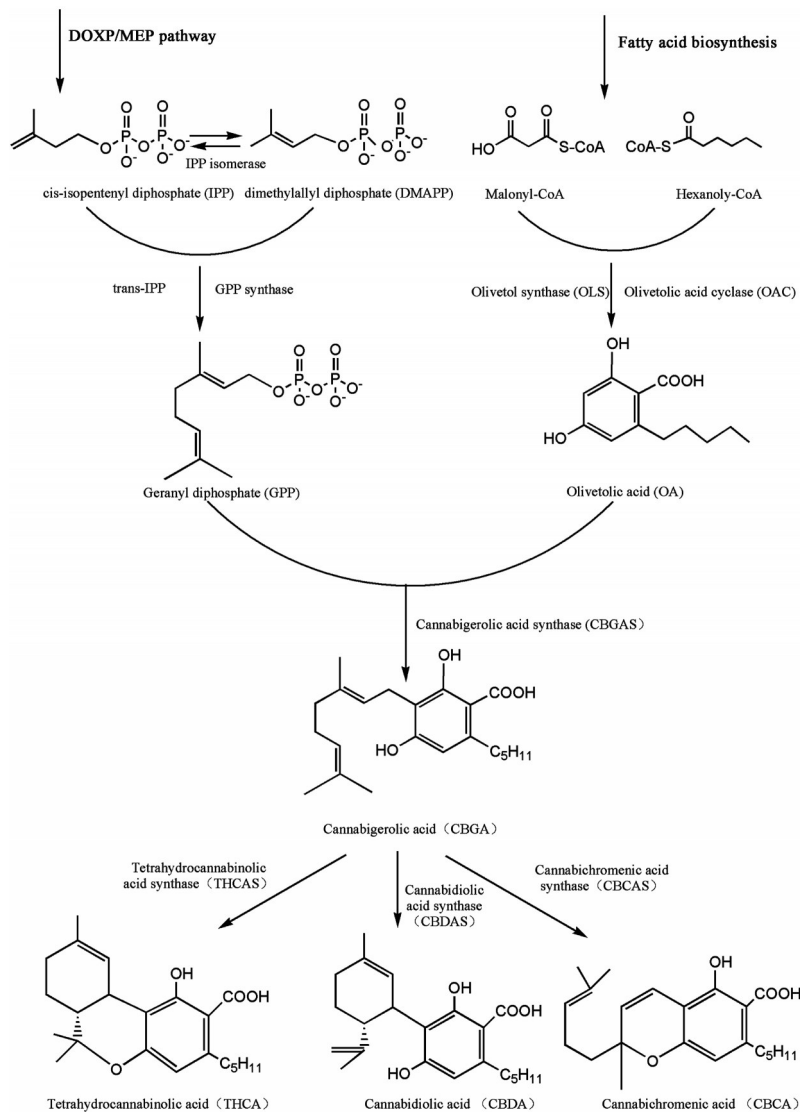


图1 大麻素生物合成途径

Fig. 1 Synthetic pathways of cannabinoids

出来。例如拟南芥 18 个、水稻 20 个、大豆中 34 个、杨树 25 个、葡萄 16 个<sup>[17,21-22]</sup>。多项研究表明, TIFY 家族基因参与植物中各种生物途径的控制, 包括参与调控茎叶、花的发育、非生物胁迫的响应、多种激素信号网络转导以及种子萌发等。例如在拟南芥中, ZIM 基因与花序的发育和开花有关<sup>[17]</sup>; *AtTIFY4a* (*PPD1*) 和 *AtTIFY4b* (*PPD2*) 基因可调节叶片的大小、限制叶片边缘的弯曲程度<sup>[23]</sup>; *AtJAZ7* 基因通过调节植物的光合作用, 防御代谢物等产生耐旱

性<sup>[24]</sup>。多项研究结果表明茉莉酸 (jasmonic acid, JA) 对植物次生代谢产物积累有显著诱导效应<sup>[25-26]</sup>。TIFY 转录因子家族的 JAZ 蛋白, 是 JA 信号从 SCFCO11 复合体向下游茉莉酸响应基因传导的重要枢纽, 还可与其他信号通路调控因子相互作用, 在复杂激素调节网络中具有重要作用, 是 JA 信号通路的抑制因子<sup>[27]</sup>, 可影响多种信号通路从而影响植物次生代谢产物的积累。因此, 推测 TIFY 转录因子家族成员可能在大麻响应 JA 信号途径和大麻素生

物合成中发挥重要的调控作用,然而目前大麻中关于 *TIFY* 转录因子家族基因的系统鉴定分析和功能研究尚没有报道。

VAN BAKEL 等<sup>[28]</sup> 在 2011 年发表了大麻品种 Purple Kush(PK)的基因组草图,为大麻的基因挖掘和功能研究奠定了数据基础。本研究以大麻基因组为参考数据,运用系统发育分析、染色体定位分析和基因结构分析等对大麻 *TIFY* 转录因子家族进行全基因组范围的鉴定与功能分析,并利用课题组已有的高 CBD 含量的大麻品种雌株的花、茎、叶和苞片等组织器官的转录组数据,对大麻 *TIFY* 家族基因的不同组织表达差异进行分析,为后续大麻 *TIFY* 基因家族及 JAZ 蛋白功能研究和大麻优质品种选育提供科学参考。

## 1 材料

大麻全基因组及注释文件是通过 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 网站获取,其品种为 CRBRx 雌株<sup>[29]</sup>。拟南芥 *TIFY* 基因的数据来自 PlantTFDB(<http://plantfdb.cbi.pku.edu.cn/>) 数据库。拟南芥、水稻全基因组数据来自 NCBI 网站。大麻转录组数据中的 9 个不同品种雌性花序 RNA-seq 数据 (PRJNA498707)<sup>[30]</sup> 获取于 NCBI 网站,分别为 Mama Thai (MT), White Cookies (WC), Canna Tsu (CT), Black Lime (BL), Terple (T), Cherry Chem (CC), Black Berry Kush (BB), Sour Diesel (SD) 及 Valley Fire (VF), 大麻不同组织器官茎、叶、苞片和花的 RNA-seq 数据是本课题组通过测序大麻 Diku 雌性植株 (Dinamed Kush CBD Autoflowering, 是 Purple Kush 和 Dinamed Autoflowering CBD 的杂交品种, CBD 含量高) 获得。

## 2 方法

**2.1 大麻 *CsTIFY* 基因家族鉴定** 采用 TBtools<sup>[31]</sup> 软件提取大麻所有蛋白序列,利用 PlantTFDB (<http://plantfdb.cbi.pku.edu.cn/>) 网站进行转录因子预测。将预测获得的 *TIFY* 基因家族成员进行筛选,去除重复转录本,然后导入 Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) 数据库中,利用 HMMER search 查找 *TIFY* 结构域 (编号 PF06200) 的蛋白,去除不含 *TIFY* 保守结构域的假阳性数据,最终筛选得到 14 个大麻 *TIFY* 家族成员。大麻 *TIFY* 蛋白分子量、等电点和氨基酸数目等理化性质利用 ExPASy 网站 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 进行分析。

**2.2 大麻 *CsTIFY* 基因家族染色体定位与亚细胞定位分析** 将大麻的全基因组注释文件与 14 个大麻

*CsTIFY* 基因家族成员信息导入 TBtools 软件,确定每个大麻 *CsTIFY* 基因的染色体位置信息,绘制其所对应的染色体物理位置图。利用 WoLFPSORT 网站 (<http://www.genscript.com/wolf-psort.html>) 对大麻 *TIFY* 蛋白在线进行亚细胞定位分析。

**2.3 大麻 *CsTIFY* 基因的基因结构、保守基序与系统进化分析** 应用 MEGA6 软件将大麻 *TIFY* 蛋白序列进行多序列比对分析,通过邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建系统发育树 (bootstrap 重复数为 1 000 次)。然后应用 TBtools 软件,注释大麻 *CsTIFY* 基因的内含子和外显子信息,并将其与大麻 *TIFY* 蛋白进化树相结合进行可视化作图。

运用 MEME (<http://memesuite.org/tools/meme>) 网站预测大麻 *TIFY* 蛋白保守基序 (motif 参数设为 10), 利用 NCBI 的 CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/structure./index.shtml>) 数据库预测大麻 *TIFY* 家族的蛋白结构域。然后,通过 TBtools 软件对大麻 *TIFY* 蛋白保守基序和保守结构域结合其系统进化树进行可视化作图。

从 PlantTFDB 网站下载拟南芥 *TIFY* 蛋白数据,使用 MEGA6 软件将拟南芥和大麻的 *TIFY* 蛋白进行多序列比对分析,然后通过邻 NJ 构建拟南芥和大麻 *TIFY* 蛋白系统发育树 (bootstrap 重复数为 1 000 次),进行大麻 *CsTIFY* 基因亚家族分类。

**2.4 大麻 *CsTIFY* 基因与拟南芥、水稻共线性分析**

从 NCBI 网站下载拟南芥、大麻和水稻的全基因组数据,在 TBtools 软件中导入三者的基因组序列信息,同时导入大麻 *CsTIFY* 基因的序列信息,对三者之间的共线性关系进行可视化分析。

**2.5 大麻 *CsTIFY* 基因顺式作用元件预测** 利用 TBtools 软件分别提取大麻 14 个 *CsTIFYs* 基因上游各 2 kb 序列作为启动子序列。再应用 PlantCare (<http://www.plantcare.co.uk/>) 网站预测启动子区的顺式作用元件,最后用 TBtools 软件进行可视化作图。

**2.6 大麻 *CsTIFY* 基因表达模式分析** 提取已获得的 9 个大麻栽培品种雌性花序以及同一大麻品种的花、叶、苞片和茎的 RNA-seq 数据中大麻 *CsTIFY* 基因的表达量 (FPKM) 数据,经 row scale 进行均一化处理,并运用 TBtools 软件绘制热图,进行基因聚类 and 差异表达分析。

## 3 结果与分析

**3.1 大麻 *CsTIFY* 基因家族成员的鉴定** 通过对 NCBI 网站获得的大麻基因组数据及 PlantTFDB 网

站获得的拟南芥 TIFY 基因家族数据进行比对,共获得大麻 TIFY 基因序列 28 条,去除重复和结构域确认后,共筛选得到大麻 CsTIFY 基因家族成员 14 个,依次命名为 CsTIFY1~CsTIFY14。分析结果表

明,大麻 CsTIFY 基因编码的核苷酸长度为 365~1 369 bp,氨基酸长度在 118~442 aa,蛋白相对分子质量大小在 13 328.50~46 479.54 Da,等电点介于 4.64~9.96,见表 1。

表 1 大麻 TIFY 基因家族基本信息及特征

Table 1 Information and characteristics of CsTIFYs in *Cannabis sativa*

基因号	基因名称	核苷酸长度/bp	氨基酸长度/aa	等电点(PI)	相对分子质量(MW)	染色体
LOC115696976	CsTIFY1	483	156	9.13	17 524.89	Chr9
LOC115697696	CsTIFY2	1 130	365	5.30	32 461.79	Chr1
LOC115697707	CsTIFY3	1 115	360	9.96	39 725.91	Chr1
LOC115699142	CsTIFY4	1 369	442	6.05	46 479.54	Chr1
LOC115701213	CsTIFY5	365	118	5.83	13 328.50	Chr10
LOC115705512	CsTIFY6	598	193	9.16	21 190.96	Chr2
LOC115706817	CsTIFY7	811	262	9.35	28 721.44	Chr2
LOC115707122	CsTIFY8	976	315	4.64	34 251.27	Chr2
LOC115711241	CsTIFY9	1 183	382	9.04	40 204.84	Chr3
LOC115712145	CsTIFY10	616	199	6.40	22 310.31	Chr4
LOC115714189	CsTIFY11	1 226	396	4.78	42 771.57	Chr4
LOC115718519	CsTIFY12	1 192	385	8.06	41 775.33	Chr6
LOC115719706	CsTIFY13	982	317	9.88	33 897.48	Chr6
LOC115723116	CsTIFY14	1 010	326	7.64	35 518.60	Chr7

注:亚细胞定位均为细胞核。

**3.2 大麻 CsTIFY 基因家族染色体与亚细胞定位分析** 染色体定位分析结果见图 2。14 个大麻 CsTIFYs 基因分别分布在大麻的 8 条染色体上,分别是染色体 1,2,3,4,6,7,9,10。还分析出 CsTIFY 基因同源基因簇 2 组,分别为位于 1 号染色体上的 CsTIFY2 和 CsTIFY3,位于 6 号染色体上的 CsTIFY12 和 CsTIFY13。亚细胞定位预测结果见表 1,所有 CsTIFY 蛋白均定位在细胞核中。

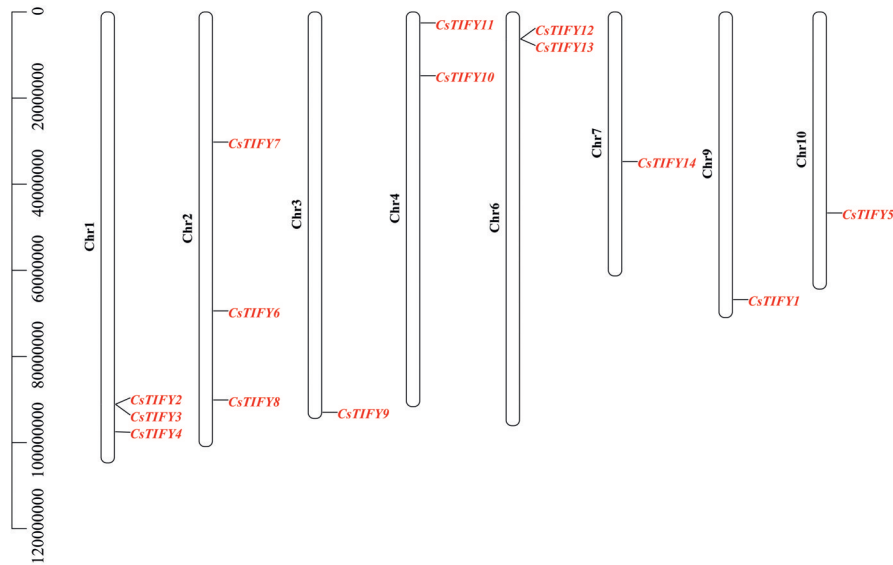
**3.3 大麻 CsTIFY 基因的结构、保守基序与系统进化分析** 14 个大麻 CsTIFYs 基因的内含子、外显子信息分析结果见图 3。CsTIFY 基因结构中内含子的数量为 2~10 个,其中 CsTIFY3 含有 10 个,数量最多,CsTIFY1 和 CsTIFY5 含有 2 个,数目最少,其余成员均含 4~9 个不等。为明确大麻 CsTIFY 基因的进化关系,将 14 个 TIFY 全长蛋白序列构建进化树,结果显示在进化树中位置相近的基因结构也相似。

通过 NCBI 中的 CDD 数据库对大麻 CsTIFY 基因的保守结构域进行鉴定。使用 MEME 网站对大麻 TIFY 蛋白保守基序进行分析,保守基序鉴定的个数上限为 10,分别命名为 Motif 1~Motif 10。并使用 TBtools 软件将大麻 CsTIFY 基因保守基序、保守

结构域结合进化树进行可视化作图。结果显示,CsTIFYs 中在 N 端含有 TIFY motif(motif 2),C 端含有 Jas motif(motif 1),GATA motif(motif 3)和 CCT motif(motif 5)等 4 个已知的结构域,其余 6 个结构域不均匀的分布在 CsTIFYs 基因中。见图 4。

为对大麻 CsTIFY 家族进行分类,将 14 个大麻 TIFY 蛋白和 18 个拟南芥 TIFY 蛋白导入 MEGA6 软件,采用 NJ 建立系统发育树。根据拟南芥 TIFY 家族分类方法<sup>[17]</sup>对大麻 CsTIFY 家族进行分类。结果表明,大麻的 TIFY 家族蛋白分别聚类到 4 个亚家族:JAZ 亚家族基因 7 个,ZML 亚家族基因 4 个,TIFY 亚家族基因 2 个和 PPD 亚家族基因 1 个,每个亚家族的结构域特点与拟南芥一致,见图 4,5。其中 JAZ 亚家族又被分为 5 个亚组,I 组有 CsTIFY7 和 CsTIFY8,II 组有 CsTIFY9,III 组有 CsTIFY1 和 CsTIFY5,IV 组有 CsTIFY10,V 组有 CsTIFY6。

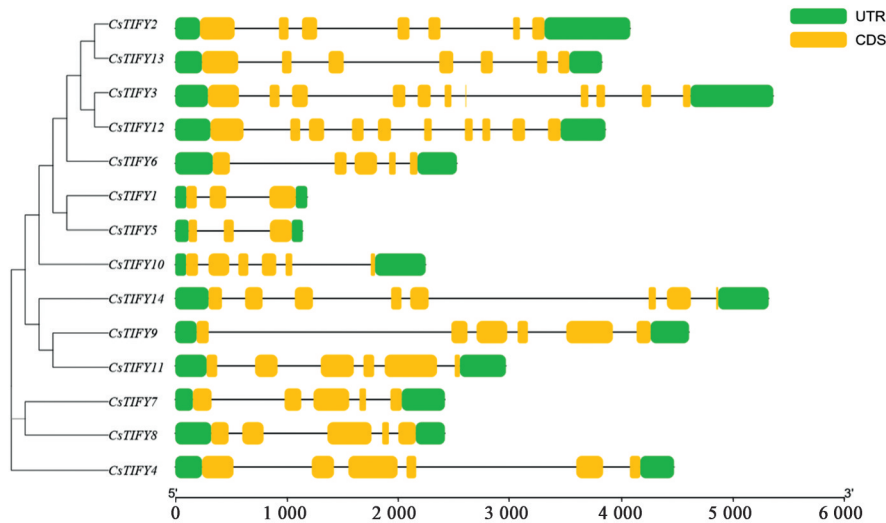
**3.4 大麻 CsTIFY 基因家族与拟南芥及水稻基因的共线性分析** 利用共线性原理,将大麻 CsTIFY 基因家族与拟南芥和水稻基因进行共线性分析并建立图谱,分析三者中 TIFY 家族基因的同源关系。分析结果表明,大麻 CsTIFY 家族基因与拟南芥和



染色体的 NC 号分别为 1.NC\_044370.1; 2.NC\_044371.1; 3.NC\_044372.1; 4.NC\_044373.1; 6.NC\_044375.1; 7.NC\_044376.1; 9.NC\_044378.1; 10.NC\_044379.1

图2 大麻 *CsTIFY* 基因染色体定位

Fig. 2 Chromosomal locations of *CsTIFY* genes in *Cannabis sativa*



UTR.非编码区;CDS.编码区

图3 大麻 *CsTIFY* 基因的基因结构

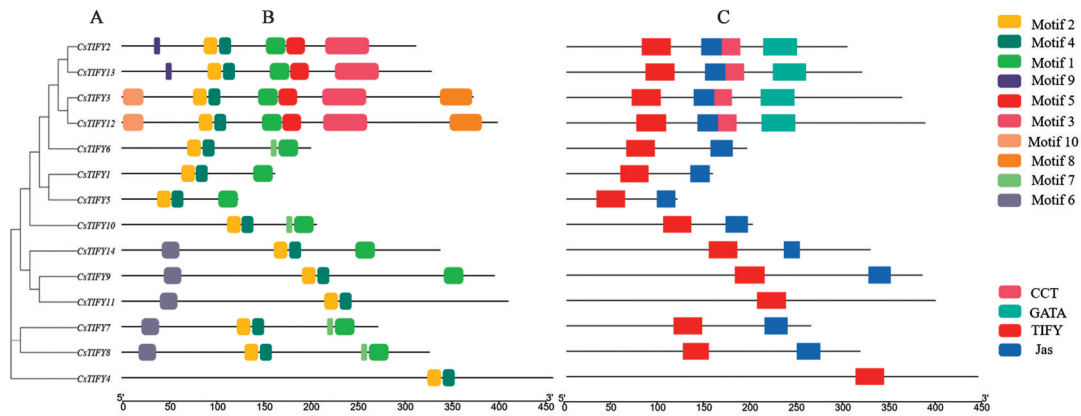
Fig. 3 Gene structure of *CsTIFY* genes

水稻的基因间共有 14 对同源基因对,其中有 4 对为三者共有的同源基因,见图 6;大麻和拟南芥之间 TIFY 家族同源基因较多,有 10 对同源基因,分别是 *CsTIFY1/AtJAZ8*, *CsTIFY1/AtJAZ7*, *CsTIFY2/AtZIM*, *CsTIFY5/At3G22275*, *CsTIFY6/AtJAZ12*, *CsTIFY7/AtJAZ1*, *CsTIFY8/AtJAZ6*, *CsTIFY8/AtJAZ5*, *CsTIFY9/AtJAZ4*, *CsTIFY14/AtPPD1*, 其中 *At3G22275* 基因未归属到拟南芥的 TIFY 基因家族。而大麻和水稻仅有 4 对 TIFY 家族同源基因,分别为

*Os07t0153000/CsTIFY1*, *CsTIFY8/Os03t0180900*, *CsTIFY8/Os07t0615200*, *CsTIFY8/Os09t0439200*。该结果暗示大麻与拟南芥之间的关系更近。

### 3.5 大麻 *CsTIFY* 基因启动子的顺式作用元件分析

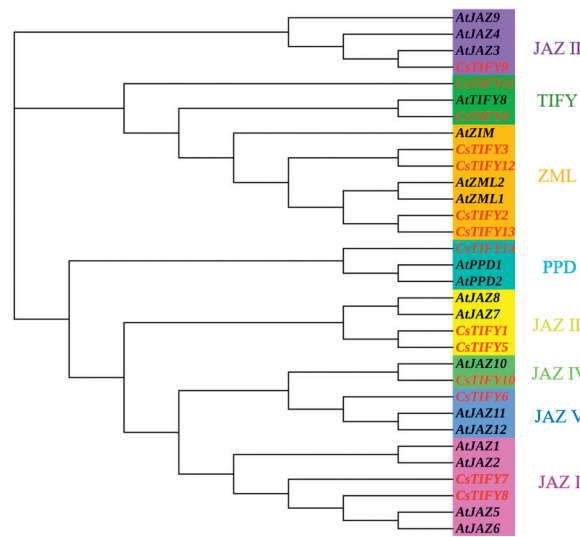
该研究进一步获取了大麻 *CsTIFY* 家族基因成员的启动子区 DNA 序列,进行顺式作用元件预测和可视化分析,见图 7。结果发现, *CsTIFYs* 基因启动子区的顺式作用元件种类及分布具有多样性。其中属于 JAZ 亚家族的 *CsTIFY9* 含有的顺式作用元件数



A. *CsTIFY* 基因进化树; B. *CsTIFY* 蛋白保守基序; C. *CsTIFY* 基因家族保守结构域

图4 大麻 *CsTIFY* 蛋白保守基序

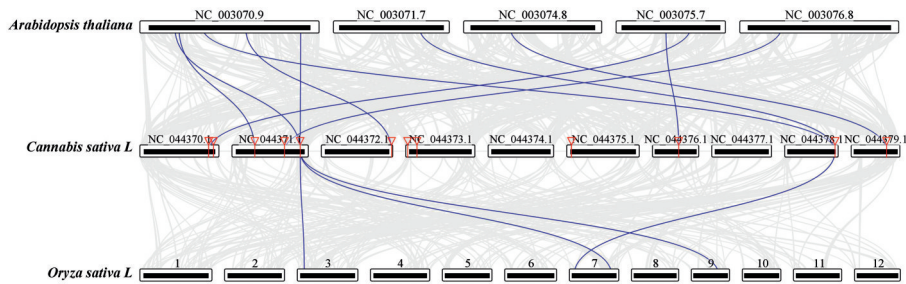
Fig. 4 Conserved motifs of *CsTIFY* proteins



At. 拟南芥; Cs. 大麻

图5 大麻和拟南芥的 TIFY 家族基因系统发育树及其分类 (Bootstrap 重复数为 1 000 次)

Fig. 5 Phylogenetic analysis of TIFY family genes from *Cannabis sativa* and *Arabidopsis thaliana*



At. 拟南芥; Cs. 大麻; Os. 水稻; 蓝色线代表同源基因对

图6 大麻 (*Cannabis sativa*), 水稻 (*Oryza sativa*) 和拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 三者之间的共线性关系

Fig. 6 Collinear relationship between *Cannabis sativa*, *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*

目最多,包括光响应、茉莉酸甲酯诱导、赤霉素和低温响应元件等共7种顺式作用元件, *CsTIFY3* 含有的顺式作用元件数目最少,只含有光响应、脱落酸和无氧诱导响应3种元件。在 *CsTIFYs* 中光响应元

件数目最多,激素诱导类元件次之。其中 JAZ 亚家族的 *CsTIFY5*, *CsTIFY7*, *CsTIFY8* 和 *CsTIFY9* 中均含有茉莉酸甲酯诱导响应元件。

3.6 大麻 *CsTIFY* 基因表达模式分析 为探究大麻

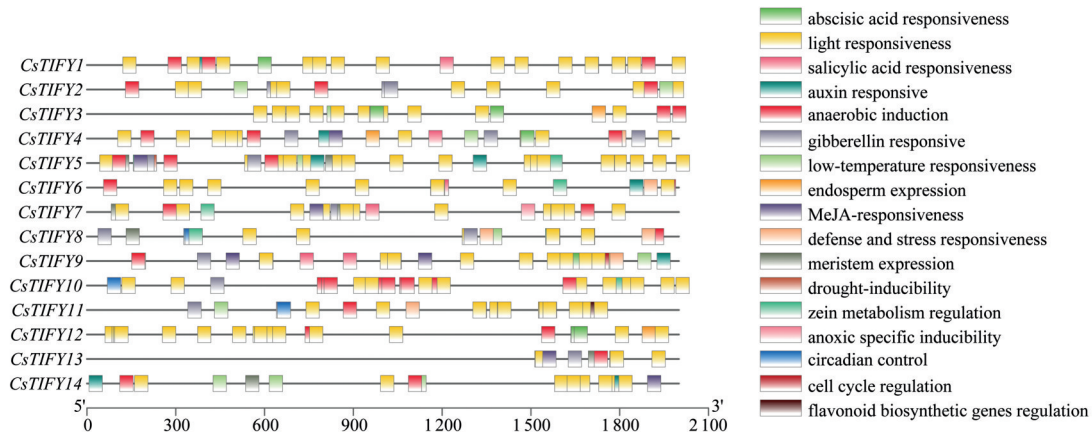


图 7 大麻 CsTIFYs 家族基因的启动子区顺式作用元件

Fig. 7 cis-acting elements within the promoter of CsTIFY family genes in Cannabis sativa

CsTIFY 基因家族在大麻不同组织器官以及不同品种间的表达模式,将 9 个不同来源的大麻品种的雌性花序的转录组数据以及大麻 Diku 品种的雌性植株茎、叶、苞片和花的转录组数据进行基因表达差异热图分析。在大麻 9 个不同品种雌性花序及 Diku 的雌性植株花中 14 个 CsTIFYs 基因均有不同程度表达,见图 8A。CsTIFY1, CsTIFY6 表达量高于其他

基因。CsTIFY1 在 BB, CT, BL, CC, SD, VF, T3, MT 品种中表达最高, CsTIFY6 在 WC, Diku 品种中表达最高。同一品种的茎、叶、苞片和花中, CsTIFYs 表达模式存在差异,见图 8B。CsTIFY1 在茎中表达量最高, CsTIFY6 在花、叶及苞片中表达量最高。表明大麻 CsTIFY 基因家族成员在不同组织器官和品种中表达均存在差异性,暗示其功能存在分化。

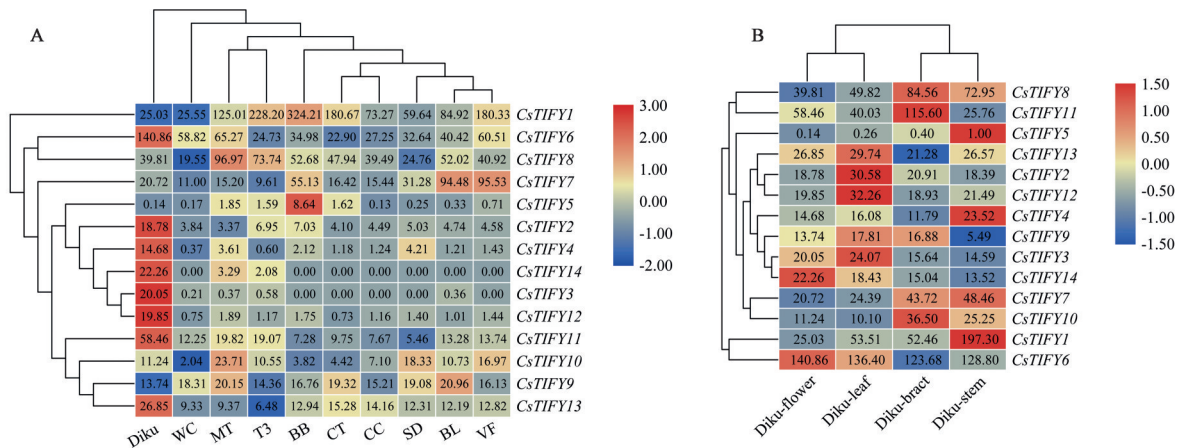


图 8 大麻 CsTIFY 家族基因的表达模式分析

Fig. 8 Expression pattern of CsTIFY family genes in Cannabis sativa

#### 4 讨论

TIFY 蛋白是植物特有的转录因子,在植物的生长发育、响应逆境胁迫和信号转导等中发挥重要作用。本研究系统的鉴定并获得大麻 TIFY 基因家族基因 14 个,并对其基因结构、染色体定位及系统发

育等进行一系列生物信息学分析,结果表明大麻 TIFY 基因家族中含有 JAZ 亚家族基因 7 个, ZML 亚家族基因 4 个, TIFY 亚家族基因 2 个和 PPD 亚家族基因 1 个,其中 JAZ 亚家族基因占比最多。研究表明, JAZ 蛋白是 JA 信号通路的重要负调控蛋白,通

过响应茉莉酸刺激来启动JA应答基因的转录<sup>[32]</sup>。在拟南芥中JAZ蛋白共12个,主要通过CO1, MYC2, NINJA, MYB和bHLH等转录因子互作,参与到茉莉酸信号转导通路中<sup>[28]</sup>。JAZ蛋白还可参与到脱落酸(abscisic acid, ABA)代谢途径中,例如AtJAZ12是拟南芥中唯一一个能够与环E3泛素连接酶互作的蛋白,参与到ABA代谢通路中<sup>[33]</sup>。此外,JAZ蛋白在参与到植物次生代谢调控途径中也发挥重要作用。例如AtJAZ1, AtJAZ3蛋白能与WD-Repeat/bHLH/MYB(MBW)复合体相互作用,进而抑制花青素的合成<sup>[34]</sup>。黄花蒿JAZ8可与AaMYC2, AaORA和AaTCP14转录因子结合,抑制黄花蒿中抗疟疾活性倍半萜青蒿素的生物合成<sup>[35]</sup>。丹参JAZ8负调控丹参酚酸B的生物合成,JAZ3和JAZ9负调控丹参酮的生物合成<sup>[36]</sup>。因此推测大麻CsTIFYs尤其是CsJAZ蛋白在JA信号转导通路、非生物胁迫及大麻素等次生代谢产物生物合成调控中具有一定的作用,具体的功能和作用机制仍需进一步的研究。

大麻的CsTIFYs启动子分析发现大量与激素和胁迫相关的作用元件,但不同基因之间含有元件的种类和个数均不同,表明大麻CsTIFYs基因响应激素的种类和程度不同,进而导致基因之间存在功能差异性。此外,部分基因还同时含有多个胁迫响应元件,推测CsTIFY可能参与不同激素信号之间的调控,从而对环境胁迫做出应答。为进一步了解大麻CsTIFYs的表达模式,本研究对CsTIFYs在10个不同大麻品种的花及同一品种的茎、叶、花和苞片的基因表达模式进行分析,结果发现CsTIFY6在花中表达量最高,而且在Diku品种的花中,57%的大麻CsTIFYs基因表达量高于其他9个品种。大麻CsTIFYs基因在不同品种、不同组织均存在表达差异性,推测CsTIFYs在基因调控上也存在一定的功能分化。

本研究对大麻CsTIFY转录因子家族基因进行全基因组的系统鉴定与功能分析,并对其在大麻不同器官和不同品种间的表达模式进行分析,为大麻TIFY基因家族的基因功能鉴定及其在大麻素等次生代谢产物调控中的机制研究奠定基础,同时为大麻的分子育种和品种改良提供有力的科学支撑。

#### [参考文献]

[1] 姜黎,皮建华,孙琴,等. 大麻研究现状综述[J]. 四川警察学院学报,2012,24(3):56-61.

[2] 张乔会,殷红清,问小龙,等. 大麻仁研究概述[J]. 湖北农业科学,2019,58(21):10-14.

[3] LUO X, REITER M A, ESPAUX L D, et al. Complete biosynthesis of cannabinoids and their unnatural analogues in yeast [J]. Nature, 2019, 567 (7746) : 123-126.

[4] FLORES-SANCHEZ I J, CHOI Y H, VERPOORTE R. Metabolite analysis of *Cannabis sativa* L. by NMR spectroscopy [J]. Methods Mol Biol, 2012, 815 (2) : 363-375.

[5] 李秋实,孟莹,陈士林. 药用大麻种质资源分类与研究策略[J]. 中国中药杂志,2019,44(20):4309-4316.

[6] 宁康,董林林,李孟芝,等. 非精神活性药用大麻的应用及开发[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(8):228-240.

[7] SHOYAMA Y, YAGI M, NISHIOKA I, et al. Biosynthesis of cannabinoid acids [J]. Phytochem, 1975,14(10):2189-2192.

[8] FELLERMEIER M, EISENREICH W, BACHER A, et al. Biosynthesis of cannabinoids. Incorporation experiments with (13) C-labeled glucoses [J]. Eur J Biochem, 2010,268(6):1596-1604.

[9] TAURA F, MORIMOTO S, SHOYAMA Y, et al. First direct evidence for the mechanism of DELTA. 1-tetrahydrocannabinolic acid biosynthesis [J]. J Am Chem Soc, 1995,117(38):9766-9767.

[10] TAURA F, MORIMOTO S, SHOYAMA Y. Purification and characterization of cannabidiolic-acid synthase from *Cannabis sativa* L. [J]. J Biol Chem, 1996,271(29):17411-17416.

[11] MORIMOTO S, KOMATSU K, TAURA F, et al. Enzymological Evidence for Cannabichromenic Acid Biosynthesis[J]. J Nat Prod, 1997,60(8):854-857.

[12] MORIMOTO S, KOMATSU K, TAURA F, et al. Purification and characterization of cannabichromenic acid synthase from *Cannabis sativa*[J]Phytochemistry, 1998,49(6):1525-1529. .

[13] 张际庆,陈士林,尉广飞,等. 高大麻二酚(CBD)含量药用大麻的新品种选育及生产[J]. 中国中药杂志, 2019,44(21):4772-4780.

[14] CAPLAN D, DIXON M, ZHENG Y. Increasing inflorescence dry weight and cannabinoid content in medical cannabis using controlled drought stress [J]. Hort Science, 2019,54(5):964-969.

[15] LYDON J, TERAMURA A H, COFFMAN C B. UV-B radiation effects on photosynthesis, growth and cannabinoid production of two *Cannabis sativa* chemotypes [J]. Photochem Photobiol, 1987, 46 (2) :

- 201-206.
- [16] FINKELSTEIN R. Abscisic Acid synthesis and response [J]. The Arabidopsis Book, 2013, doi: 10.1199/tab.0166.
- [17] VANHOLME B, GRUNEWALD W, BATEMAN A, et al. The tify family previously known as ZIM [J]. Trends Plant Sci, 2007, 12(6):239-244.
- [18] BAI Y H, MENG Y J, HUANG D L, et al. Origin and evolutionary analysis of the plant-specific *TIFY* transcription factor family[J]. Genomics, 2011, 98(2): 128-136.
- [19] CHUNG H S, NIU Y J, BROWSE J, et al. Top hits in contemporary JAZ: An update on jasmonate signaling [J]. Phytochemistry, 2009, 70(13): 1547-1559.
- [20] NISHII A, TAKEMURA M, FUJITA H, et al. Characterization of a novel gene encoding a putative single Zinc-finger protein, ZIM, expressed during the reproductive phase in *Arabidopsis thaliana* [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2000, 64(7):1402-1409.
- [21] 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 Bio, 2009, 71(3):291-305.
- [22] 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.
- [23] WHITE D W R. PEAPOD regulates lamina size and curvature in *Arabidopsis* [J]. Proc Natl Acad Sci, 2006, 103(35):13238-13243.
- [24] MENG L, ZHANG T, GENG S, et al. Comparative proteomics and metabolomics of JAZ7-mediated drought tolerance in *Arabidopsis* [J]. J Proteomics, 2019, 196(2):81-91.
- [25] CHINI A, FONSECA S, CHICO J M, et al. The ZIM domain mediates homo- and heteromeric interactions between *Arabidopsis* JAZ proteins [J]. Plant J, 2009, 59(1):77-87.
- [26] 黄文峰,王立丰,田维敏. 茉莉酸反应基因转录抑制因子 JAZ 蛋白家族研究进展 [J]. 热带作物学报, 2009, 30(9):1383-1387.
- [27] 孙程,周晓今,陈茹梅,等. 植物 JAZ 蛋白的功能概述 [J]. 生物技术通报, 2014(6):1-8.
- [28] VAN BAKEL H, STOUT J M, COTE A G, et al. The draft genome and transcriptome of *Cannabis sativa* [J]. Genome Biol, 2011, 12(10):R102.
- [29] CHRISTOPHER J, GRASSA, J P W, et al. A complete *Cannabis* chromosome assembly and adaptive admixture for elevated cannabidiol (CBD) content [J]. BioRxiv, 2018, doi: <https://doi.org/10.1101/458083>.
- [30] ZAGER JORDAN J, LANGE I, SRIVIDYA N, et al. Gene networks underlying cannabinoid and terpenoid accumulation in cannabis [J]. Plant Physiol, 2019, 180(4):01506.
- [31] CHEN C, XIA R, CHEN H, et al. TBtools, a Toolkit for Biologists integrating various HTS-data handling tools with a user-friendly interface [J]. Biorxiv, 2018, doi: [doi:org/10.1101/289660](https://doi.org/10.1101/289660).
- [32] 吴莹,陶雷,袁红梅,等. JAZ 蛋白介导的茉莉酸信号传递 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(16):6811-6812.
- [33] PAUWELS L, RITTER A, GOOSSENS J, et al. The RING E3 Ligase KEEP ON GOING Modulates JASMONATE ZIM-DOMAIN12 Stability [J]. Plant Physiol, 2015, 169(2):1405-1417.
- [34] QI T, SONG S, REN Q, et al. The Jasmonate-ZIM-domain proteins interact with the WD-Repeat/bHLH/MYB complexes to regulate Jasmonate-mediated anthocyanin accumulation and trichome initiation in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Cell, 2011, 23(5): 1795-1814.
- [35] CHINI A, BOTER M A, SOLANO R. Plant oxylipins: COI1/JAZs/MYC2 as the core jasmonic acid-signalling module [J]. Febs J, 2009, 276(17):4682-4692.
- [36] SHI M, ZHOU W, ZHANG J, et al. Methyl jasmonate induction of tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots is mediated by JASMONATE ZIM-DOMAIN repressor proteins [J]. Sci Rep, 2016, 6:20919.

[责任编辑 顾雪竹]