

苦荞*FtTCPlike1*和*FtTCPlike2*的克隆及表达分析

张嘉丽^{1,2}, 黄铭坤², 孙伟², 陈庆富³, 刘霞^{1,2,*}

¹武汉理工大学化学化工与生命科学学院, 武汉430070

²中国中医科学院中药研究所, 北京100700

³贵州师范大学荞麦产业技术研究中心, 贵阳550001

摘要: 植物TCP转录因子家族是一类调控植物生长、发育的重要转录因子, 主要分为class I和class II两种类型。在本研究中, 我们克隆了苦荞(*Fagopyrum tataricum*)两个TCP转录因子基因并分别命名为*FtTCPlike1*和*FtTCPlike2*。蛋白聚类分析表明*FtTCPlike1*属于class II而*FtTCPlike2*属于class I, 并且均含有TCP转录因子典型的保守结构域。亚细胞定位实验也表明*FtTCPlike1*和*FtTCPlike2*与报道的其他物种TCP转录因子类似, 都定位在细胞核中。本文同时收集了苦荞芽期的子叶和下胚轴、第1~3片长出的真叶以及5个时期由幼嫩到成熟的种子和花共11种样本进行了实时荧光定量PCR, 发现*FtTCPlike1*和*FtTCPlike2*在苦荞的各个不同时期和不同组织中均有不同的表达, 并且在种子的某个特定时期(*FtTCPlike1*和*FtTCPlike2*分别在种子发育第3、第4时期和第1、第3时期)有较高的表达量, 表明这两个基因可能参与种子发育。从苦荞芽期来看, *FtTCPlike1*在子叶中表达量较高但在下胚轴表达较低, 而*FtTCPlike2*则相反, 这说明*FtTCPlike1*和*FtTCPlike2*在苦荞早期形态建成中的调控方式可能有很大区别。

关键词: 苦荞; TCP; 基因克隆; 亚细胞定位; 基因表达

苦荞(*Fagopyrum tataricum*)是蓼科荞麦属的一种双子叶植物, 主要在中国、印度还有尼泊尔有栽培, 同时在欧洲的部分地区, 比如德国和比利时也有生产(Bonafaccia等2003)。在我国苦荞和甜荞(*F. esculentum*)为荞麦的两个常见栽培品种。研究证明苦荞种子中芦丁的含量远远高于普通荞麦(石磊等2016), 而且在苦荞种子中可以检测到槲皮素与槲皮苷的存在, 然而在普通荞麦的种子中几乎检测不到这两种化合物(Fabjan等2003; Nam等2015)。在我国苦荞常用作一种药食两用的中药, 苦荞营养成分丰富多样, 相比于普通谷物其蛋白质和脂肪的含量均较高, 同时其含有的类黄酮化合物, 如芦丁、槲皮素、花青素等均具有良好的临床药用价值。Lee等(2013)在CCl₄诱导肝损伤的小鼠上采用苦荞75%醇提物(主要成分为芦丁和槲皮素)进行试验, 证明芦丁和槲皮素在肝损伤的小鼠中能起到良好的抗炎及抗氧化作用。还有研究表明苦荞中的类黄酮化合物具有抗癌活性(Zheng等2012; Peng等2015; Zhu 2016)及降血糖(刘刚等2012)和抗疲劳的作用(Jin和Wei 2011)。

转录因子是指能够与目的基因启动子区域中的某些顺式作用元件发生特异性互作的一类蛋白, 能够调节某些下游基因的表达(李岗和周春江2014)。TCP基因能够编码含有TCP结构域的蛋

白。TCP结构域是一个能够形成非典型碱性螺旋-环-螺旋(basic helix-loop-helix, bHLH)结构的保守区域, 该结构可能参与转录因子与目的基因结合的过程。有些TCP转录因子家族的成员在TCP结构域的下游还有一个保守的R结构域(Cubas等1999)。TCP转录因子是由最开始鉴定得到的4个不同的蛋白来命名的, 这4个蛋白分别为玉米(*Zea mays*)中的teosinte branched 1 (TB1)(Doebley等1997)、金鱼草(*Antirrhinum majus*)中的cycloidea (CYC)(Luo等1996)和水稻(*Oryza sativa*)中的proliferating cell factors 1和2 (PCF1和PCF2)(Kosugi和Ohashi 1997)。根据TCP结构域的不同, 可以将TCP转录因子家族分为两个大类, 其中class I类包括PCF1和PCF2, class II类包括CYC和TB1。class II中的基因根据其TCP结构域的不同还可以分为CIN亚类和CYC/TB1亚类(刘丽娟和高辉2016)。TCP基因家族被证实参与多项植物形态发育的过程, 比如能够参与调控植物叶片大小和形状(Aguilar-Martínez和Sinha 2013; Ma等2016; Danisman等2012)及双子叶植物花的对称性生长(Horn等2014; Huang等2016; Jun-

收稿 2017-09-18 修定 2018-01-25

资助 国家自然科学基金(81403046和31471562)。

* 通讯作者(lxr1125@126.com)。

theikki-Palovaara等2014), 还能够参与植物的免疫调节(Lopez等2015)。然而TCP转录因子在苦荞中的功能尚不清楚。

本研究中以苦荞为材料, 克隆得到了2个TCP基因*FtTCPlike1*和*FtTCPlike2*, 序列比对分析表明它们所编码的蛋白分别属于class II和class I类TCP转录因子家族。*FtTCPlike1*和*FtTCPlike2*均定位在细胞核。不同组织表达分析也说明*FtTCPlike1*和*FtTCPlike2*与苦荞发育相关, 这些结果为验证TCP转录因子参与调控苦荞发育过程的分子机制研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

pGreen-35S-GFP载体、根癌农杆菌GV3101::psoup菌株、本氏烟草[*Nicotiana benthamiana* (K.) Domin]种子、苦荞[*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.]种子均由本实验室保存。

于播种后7 d, 苦荞还未发育出真叶时, 分别采集子叶和下胚轴(图1-A); 待苦荞长出5片真叶时, 从下至上依次取第1~3片长出的真叶(叶龄从大到小, 叶片状态从成熟到幼嫩; 图1-B); 开花后收集花样本(图1-C); 结种时, 依照种子发育情况(大小)分别取5种不同时期的种子(图1-D)。样品各取3份, 液氮速冻, 置于-80°C冰柜保存。

1.2 苦荞总RNA提取和第一链cDNA合成

采用RNAprep Pure多糖多酚植物总RNA提取试剂盒(天根)提取苦荞总RNA, 采用Epoch超微量微孔板分光光度计的Take3板检测样品RNA浓度, 使用PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (TaKaRa)反转录得到第一链cDNA。

1.3 PCR引物设计及扩增

基于课题组前期研究结果, 设计了引物*FtTCPlike1*-F、*FtTCPlike1*-R和*FtTCPlike2*-F、*FtTCPlike2*-R (表1), 以苦荞cDNA为模板进行PCR扩增,

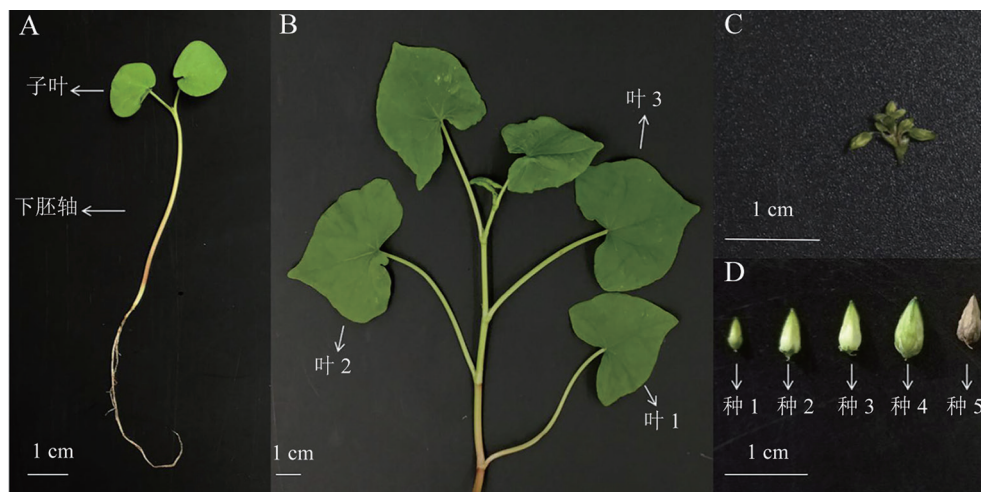


图1 苦荞各时期的不同组织

Fig.1 *F. tataricum* tissues at different stages

A: 子叶和下胚轴; B: 3个不同时期的真叶; C: 花; D: 5个不同时期的种子。

表1 扩增*FtTCPlike1*和*FtTCPlike2*所用的引物

Table 1 Primers used in PCR of *FtTCPlike1* and *FtTCPlike2*

名称	序列(5'→3')
<i>FtTCPlike1</i> -F	CCCAAGCTTATGGAGCCCAGAAAGGGTT
<i>FtTCPlike1</i> -R	CGCGGATCCATGGCGAGAGCCGGAGGAC
<i>FtTCPlike2</i> -F	CCCAAGCTTATGGCTGCCTCCGATGGTC
<i>FtTCPlike2</i> -R	CGCGGATCCGCGGAATCATCCTCTCTC

得到了*FtTCPlike1*和*FtTCPlike2*全长cDNA序列。序列拼接使用DNAMAN软件进行。

1.4 PCR产物的克隆

PCR产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳检测,在紫外线切胶仪器上切下目的条带,用AxyPrep™ DNA Gel Extraction Kit (Axygen)回收目的片段,经纯化后用pEASY-Blunt Cloning Kit (TransGen Biotech)进行连接,然后用热激法转入大肠杆菌Trans1-T1菌株(TransGen Biotech)中。挑取单菌落摇菌,经菌液PCR鉴定后送去美吉公司进行测序。

1.5 序列分析

将氨基酸序列在NCBI网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>)进行Blast同源比对分析,并用MEGA 7.0软件将*FtTCPlike1*和*FtTCPlike2*与TCP转录因子家族中其他成员构建系统进化树并分析它们的保守域结构。

1.6 实时荧光定量PCR

采用TransStart Green qPCR SuperMix UDG (北京全式金生物技术有限公司)试剂盒进行实时荧光定量PCR。分别提取苦荞不同时期、不同组织的33个样本的总RNA并反转录得到第一链cDNA,检测*FtTCPlike1*和*FtTCPlike2*基因的相对表达量,分别以苦荞的子叶、下胚轴、第1片长出的真叶、第2片长出的真叶、第3片长出的真叶、5个不同发育时期的种子和花的cDNA为模板,以苦荞的*HISTONE 3 (H3)*基因(GenBank登录号JF769134)作为内参基因。利用设计的实时荧光定量PCR引物QFtTCPlike1-F、QFtTCPlike1-R和QFtTCPlike2-F、QFtTCPlike2-R(表2)进行扩增。每个样品的扩增按3次生物学重复,3次技术重复进行。

1.7 亚细胞定位实验

将PCR扩增得到的*FtTCPlike1*和*FtTCPlike2*

片段和pGreen-35S-GFP载体用HindIII和BamHI (Thermo Scientific)酶切后纯化连接。将*FtTCPlike1*和*FtTCPlike2*序列片段插入到带有绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)标签和35S启动子序列的pGreen-35S-GFP载体上,构建用于亚细胞定位的35S-FtTCPlike1-GFP和35S-FtTCPlike2-GFP载体并转化至农杆菌GV3101::psoup中。挑取单克隆菌株,将其接种到5 mL含有卡那霉素的LB培养基中,于28°C、200 rpm下培养至OD₆₀₀为0.5,取出2 mL培养液,1 000×g离心10 min后收集菌体,弃掉上清液,加入2 mL渗透液[含0.5%葡萄糖、500 mmol·L⁻¹ 2-吗啉乙磺酸(2-morpholinoethanesulfonic acid, MES)、20 mmol·L⁻¹ Na₃PO₄·12H₂O、1 mol·L⁻¹ 乙酰丁香酮]重悬菌体,1 000×g离心10 min,弃掉上清液,加入2 mL渗透液重悬菌体。取适量菌体,稀释成OD₆₀₀为0.03~0.1,用1 mL去针头注射器吸取稀释后的1 mL菌液按标记好的烟草叶片下表皮,将菌液注射进去。注射完后的烟草弱光培养16 h后恢复正常生长3 d。将烟草叶片剪下在4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染料(10 μg·mL⁻¹)中浸染15 min,用荧光显微镜观察荧光信号。

2 实验结果

2.1 苦荞TCP基因的克隆与进化分析

以苦荞cDNA为模板,通过PCR扩增,测序、拼接得到*FtTCPlike1*和*FtTCPlike2*,编码区(coding sequence, CDS)全长分别为1 494和813 bp,编码498和271个氨基酸。通过MAGE 7.0将*FtTCPlike1*和*FtTCPlike2*基因编码的氨基酸序列与已经登录于NCBI中的其他植物TCP基因编码的氨基酸序列进行多重比较,发现它们都具有一段相对保守的区域,即TCP结构域,且相比于class II, class I家族的TCP转录因子在TCP结构域有4个氨基酸的缺失(图2-A)。将*FtTCPlike1*和*FtTCPlike2*与其他已经克隆得到的植物TCP转录因子构建进化树分析(图2-B),结果显示*FtTCPlike1*与class II的AmCIN较为相近,CIN能够调控植物侧生器官的发育(Koyama等2007),金鱼草中的AmCIN被证实参与调控了植物花瓣裂片的发育生长(Crawford等2004),拟南芥中的TCP-like也证实能够调控植株叶片发育(Uber-

表2 实时荧光定量PCR所用的引物

Table 2 Primers used in quantitative real-time PCR

名称	序列(5'→3')
QFtTCPlike1-F	CCATTGATGCCCTTGACG
QFtTCPlike1-R	ATGTTTGACCCTCGCTGT
QFtTCPlike2-F	GGTCTGCTCCATTCATC
QFtTCPlike2-R	ATCGCCAGTATCCATTA
QFtH3-F	AAGGAAGCAATTGGCAAC
QFtH3-R	TCACGAAGAGCAACGGTA

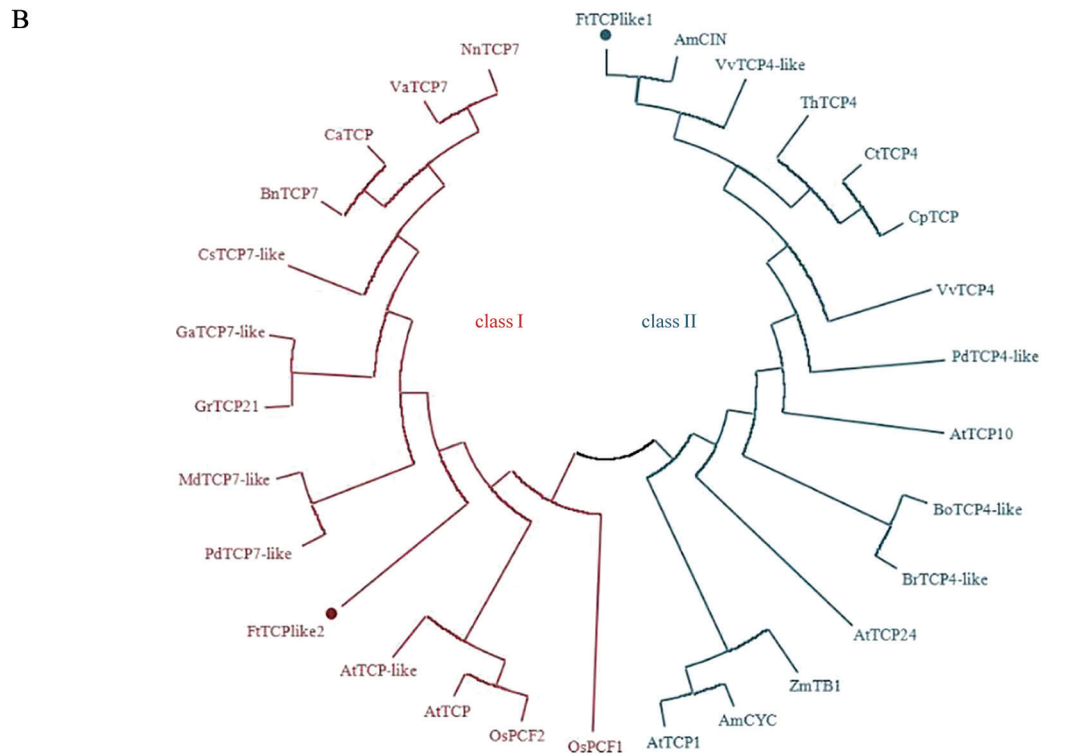
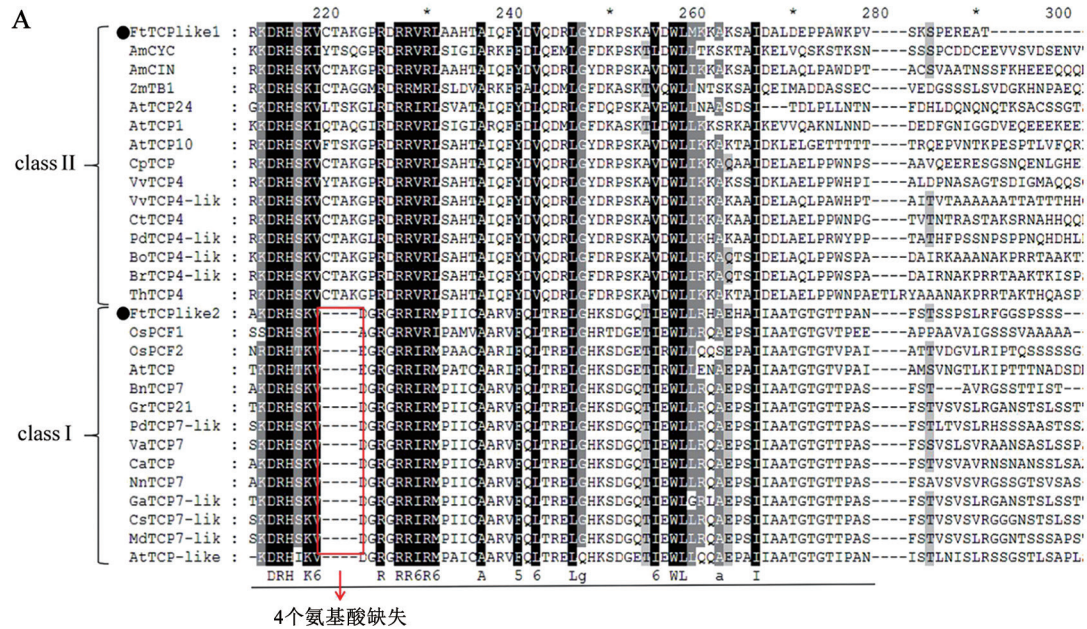


图2 FtTCPlike1和FtTCPlike2蛋白序列分析

Fig.2 Analyses of protein sequences of FtTCPlike1 and FtTCPlike2

A: FtTCPlike1和FtTCPlike2与其他物种TCP蛋白序列结构域比较。B: FtTCPlike1和FtTCPlike2与其他物种TCP蛋白聚类分析。分析所使用的各物种TCP转录因子的氨基酸序列为: 金鱼草AmCIN (AAO43102)、AmCYC (O49250); 玉米ZmTB1 (AAL17055); 水稻OsPCF1 (O23875)、OsPCF2 (XP_015648330); 拟南芥AtTCP10 (NP_565712)、AtTCP (NP_182092)、AtTCP1 (NP_001077781)、AtTCP24 (NP_564351)、AtTCP-like (NP_174789); 葡萄VvTCP4 (XP_010657020)、VvTCP4-like (XP_003634670); 醉蝶花ThTCP4 (XP_010519240); 甘蓝BoTCP4-like (XP_013616186); 油菜BnTCP7 (XP_013736882); 雷蒙德氏棉GrTCP21 (XP_012479842); 海枣PdTCP7-like (XP_008787053)、PdTCP4-like (XP_008793767); 枳CtTCP4 (ACV95483); 仙客来CpTCP (BAK18571); 茛苳BrTCP4-like (XP_009116532); 赤豆VaTCP7 (XP_017412340); 刺苞菜蓟CcTCP (KVH95851); 莲NnTCP7 (XP_010249637); 树棉GaTCP7-like (KHG20696); 甜橙CsTCP-like (XP_006484582); 苹果MdTCP7-like (XP_008365949)。

ti-Manassero等2012; Efroni等2008)。而*FtTCPlike2*与class I中的水稻PCF1和PCF2聚为一枝, 且与海棠中的PdTCP7-like和苹果中的MdTCP7-like亲缘关系较近, 水稻中的PCFs基因被证实能够与PCNA启动子结合并且调控拟南芥叶片发育(Kosugi和Ohashi 1997), 而且还能够参与调控寒冷条件下的应答机制(Wang等2014)。

2.2 GFP定位

构建35S-*FtTCPlike1*-GFP和35S-*FtTCPlike2*-GFP载体, 通过注射烟草并利用荧光显微镜观察发现GFP的荧光信号在细胞核中, 并且与核特异染料DAPI信号重叠(图3), 说明*FtTCPlike1*和*FtTCPlike2*

与其他大部分TCP转录因子定位类似, 都定位在细胞核。但是在TCP转录因子中也发现过一些没有定位在细胞核的转录因子(Kosugi和Ohashi 2002; Koroleva等2005)。这些转录因子不含核定位信号区, 如拟南芥中的AtTCP17、水稻中的OsTCP18等都在植物体内定位于叶绿体而非细胞核中(Navaud等2007)。

2.3 苦荞*FtTCPlike1*和*FtTCPlike2*的时空表达模式

利用实时荧光定量PCR技术, 对*FtTCPlike1*和*FtTCPlike2*基因在苦荞不同时期、不同组织的表达情况进行分析。在苦荞下胚轴中, *FtTCPlike1*几乎不表达且在所有被检测的组织样本中表达量最

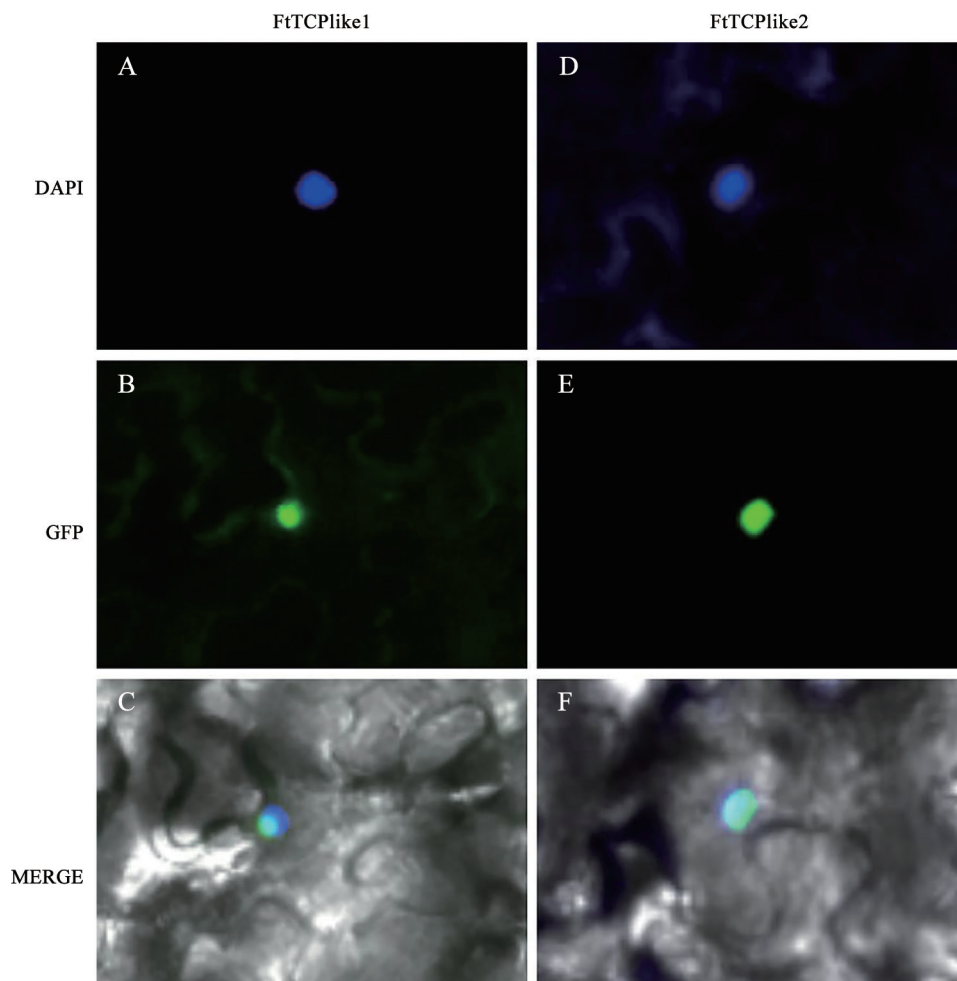


图3 *FtTCPlike1*和*FtTCPlike2*的亚细胞定位

Fig.3 Subcellular localization of *FtTCPlike1* and *FtTCPlike2*

A: 注射*FtTCPlike1*的烟草叶片DAPI染色; B: 注射*FtTCPlike1*的烟草叶片在荧光显微镜下GFP融合蛋白荧光; C: 注射*FtTCPlike1*的烟草叶片细胞核定位信号和GFP融合蛋白荧光融合图片; D: 注射*FtTCPlike2*的烟草叶片DAPI染色; E: 注射*FtTCPlike2*的烟草叶片在荧光显微镜下GFP融合蛋白荧光; F: 注射*FtTCPlike2*的烟草叶片细胞核定位信号和GFP融合蛋白荧光融合图片。

低;相反, *FtTCPlike2*在下胚轴中的表达量最高。在苦荞真叶生长阶段,随着叶龄的减小*FtTCPlike1*表达略微增高, *FtTCPlike2*的表达变化不明显。在苦荞种子的成熟过程中,第1阶段到第2阶段*FtTCPlike1*的表达减少,但是到第3阶段突然增加至最大值,然后又随着种龄的增加表达逐渐降低, *FtTCPlike1*在种子的第3发育阶段的表达量是在所有组织样本中最高的; *FtTCPlike2*在种子中的表达趋势与*FtTCPlike1*相似。 *FtTCPlike1*在种子的第3发育阶段中最高表达量不超过0.4,但是*FtTCPlike2*在下胚轴中的相对表达量超过了0.8 (图4)。我们推测*FtTCPlike2*在苦荞下胚轴中存在特异性表达。

3 讨论

本研究克隆得到了苦荞中两个新的TCP转录因子家族基因*FtTCPlike1*和*FtTCPlike2*,其编码的蛋白具有保守的TCP结构域。TCP转录因子家族在植物形态发育上的作用已经被广泛认可。TCP转录因子根据其结构域可以主要分为class I和class II两个家族。 *FtTCPlike1*和金鱼草中的*CIN*基因同源性较高,属于class II中的CIN亚类;而*FtTCPlike2*则属于class I,与PCFs同源性较高。class I的家族基因主要存在于植物的分生组织中,特异性较强,能够参与调控细胞分裂周期,从而影响植株发育。class II家族中具有代表性的金鱼草的*CYC*基因(Martin-Trillo等2011)中已经被证实能够调控植株分枝的形成,并且在腋芽部位的表达比在其他部位的表达明显升高,而在花和叶片等组织中的表达量则较低;这和*FtTCPlike2*的表达量有相似之处。

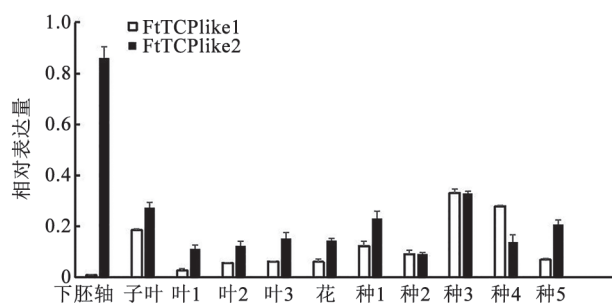


图4 *FtTCPlike1*和*FtTCPlike2*在苦荞不同时期各组织中的相对表达量

Fig.4 The relative transcript levels of *FtTCPlike1* and *FtTCPlike2* in *F. tataricum* tissues at different developmental stages

近期,Viola等(2016)研究发现,在高强度光照条件下拟南芥中的TCP15转录因子参与负调节类黄酮化合物花青素的合成,而TCP15转录因子属于TCP转录因子class I家族。 *FtTCPlike2*同属于class I家族,同时苦荞中富含的类黄酮化合物具有良好的临床功效, *FtTCPlike2*可能也具有调控苦荞中类黄酮化合物生物合成途径的作用。

参考文献(References)

- Aguilar-Martínez JA, Sinha N (2013). Analysis of the role of *Arabidopsis* class I TCP genes *AtTCP7*, *AtTCP8*, *AtTCP22* and *AtTCP23* in leaf development. *Front Plant Sci*, 4 (1): 1–13
- Bonafaccia G, Gambelli L, Fabjan N, et al (2003). Trace elements in flour and bran from common and tartary buckwheat. *Food Chem*, 83 (1): 1–5
- Braun N, De Saint Germain A, Pillot JP, et al (2012). The pea TCP transcription factor PsBRC1 acts downstream of strigolactones to control shoot branching. *Plant Physiol*, 158 (1): 225–238
- Crawford BC, Nath U, Carpenter R, et al (2004). CINCINNA-TA controls both cell differentiation and growth in petal lobes and leaves of *Antirrhinum*. *Plant Physiol*, 135 (1): 244–253
- Cubas P, Lauter N, Doebley J, et al (1999). The TCP domain: a motif found in proteins regulating plant growth and development. *Plant J*, 18 (2): 215–222
- Danisman S, van der Wal F, Dhondt S, et al (2012). *Arabidopsis* class I and class II TCP transcription factors regulate jasmonic acid metabolism and leaf development antagonistically. *Plant Physiol*, 159 (4): 1511–1523
- Doebley J, Stec A, Hubbard L (1997). The evolution of apical dominance in maize. *Nature*, 386: 485–488
- Efroni I, Blum E, Goldshmidt A, et al (2008). A protracted and dynamic maturation schedule underlies *Arabidopsis* leaf development. *Plant Cell*, 20: 2293–2306
- Fabjan N, Rode J, Kosir IJ, et al (2003). Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) as a source of dietary rutin and quercitrin. *J Agric Food Chem*, 51: 6452–6455
- Horn S, Pabón-Mora N, Theuß VS, et al (2015). Analysis of the CYC/TB1 class of TCP transcription factors in basal angiosperms and magnoliids. *Plant J*, 81 (4): 559–571
- Huang D, Li XW, Sun M, et al (2016). Identification and characterization of *CYC*-like genes in regulation of ray floret development in *Chrysanthemum morifolium*. *Front Plant Sci*, 7: e1002628
- Jin HM, Wei P (2011). Anti-fatigue properties of tartary buckwheat extracts in mice. *Int J Mol Sci*, 12 (8): 4770–4780
- Juntheikki-Palovaara I, Tähtiharju S, Lan T, et al (2012). Functional diversification of duplicated *CYC2* clade

- genes in regulation of inflorescence development in *Gerbera hybrida* (Asteraceae). *Plant J*, 79 (5): 783–796
- Koroleva OA, Tomlinson ML, Leader D, et al (2005). High-throughput protein localization in *Arabidopsis* using *Agrobacterium*-mediated transient expression of GFP-ORF fusions. *Plant J*, 41 (1): 162–174
- Kosugi S, Ohashi Y (1997). PCF1 and PCF2 specifically bind to *cis* elements in the rice proliferating cell nuclear antigen gene. *Plant Cell*, 9 (9): 1607–1619
- Kosugi S, Ohashi Y (2002). DNA binding and dimerization specificity and potential targets for the TCP protein family. *Plant J*, 30 (3): 337–348
- Koyama T, Furutani M, Tasaka M, et al (2007). TCP transcription factors control the morphology of shoot lateral organs via negative regulation of the expression of boundary-specific genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 19 (2): 473–484
- Lee CC, Shen SR, Lai YJ, et al (2013). Rutin and quercetin, bioactive compounds from tartary buckwheat, prevent liver inflammatory injury. *Food Funct*, 4 (5): 794–802
- Li K, Zhou CJ (2014). Research progress in WRKY transcription factors in plants. *J Plant Physiol*, 50 (9): 1329–1335 (in Chinese with English abstract) [李崧, 周春江(2014). 植物WRKY转录因子的研究进展. *植物生理学报*, 50 (9): 1329–1335]
- Liu G, Tan SC, HU XX, et al (2012). A study of the effects of the extract from black buckwheat stem and leaves for regulating blood glucose in hyperglycemia mice. *J Southwest China Norm Univ (Nat Sci Ed)*, 37 (2): 109–113 (in Chinese with English abstract) [刘刚, 谭善财, 胡细享等(2012). 黑苦荞茎叶提取物对高血糖小鼠降血糖功能研究. *西南师范大学学报(自然科学版)*, 37 (2): 109–113]
- Liu LJ, Gao H (2016). Research progress on the family of TCP genes. *Biotechnol Bull*, 32 (9): 14–22 (in Chinese with English abstract) [刘丽娟, 高辉(2016). TCP家族基因研究进展. *生物技术通报*, 32 (9): 14–22]
- Lopez JA, Sun Y, Blair PB, et al (2015). TCP three-way handshake: linking developmental processes with plant immunity. *Trends Plant Sci*, 20 (4): 238–245
- Luo D, Carpenter R, Vincent C, et al (1995). Origin of floral asymmetry in *Antirrhinum*. *Nature*, 383: 794–799
- Ma XD, Ma JC, Fan D, et al (2016). Genome-wide identification of TCP family transcription factors from *Populus euphratica* and their involvement in leaf shape regulation. *Sci Rep*, 6: 1–9
- Martin-Trillo M, Grandío EG, Serra F, et al (2011). Role of tomato *BRANCHED1*-like genes in the control of shoot branching. *Plant J*, 67 (4): 701–714
- Nam TG, Lee SM, Park JH, et al (2015). Flavonoid analysis of buckwheat sprouts. *Food Chem*, 170 (1): 97–101
- Navaud O, Dabos P, Carnus E, et al (2007). TCP transcription factors predate the emergence of land plants. *J Mol Evol*, 65 (1): 23–33
- Peng W, Hu CL, Shu ZH, et al (2015). Antitumor activity of tatariside F isolated from roots of *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn against H22 hepatocellular carcinoma via up-regulation of p53. *Phytomedicine*, 22: 730–736
- Shi L, Liu C, Liang X, et al (2016). Study on the changes of the contents of rutin and quercetin in buckwheat germination. *Food Res Dev*, 37 (15): 30–33 (in Chinese with English abstract) [石磊, 刘超, 梁霞等(2016). 萌发荞麦中芦丁和槲皮素含量变化的研究. *食品研究与开发*, 37 (15): 30–33]
- Uberti-Manassero NG, Lucero LE, Viola IL, et al (2012). The class I protein AtTCP15 modulates plant development through a pathway that overlaps with the one affected by CIN-like TCP proteins. *J Exp Bot*, 63 (2): 809–823
- Viola IL, Camoirano A, Gonzalez DH (2016). Redox-dependent modulation of anthocyanin biosynthesis by the TCP transcription factor TCP15 during exposure to high light intensity conditions in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 170: 74–85
- Wang ST, Sun XL, Hoshino Y, et al (2014). MicroRNA319 positively regulates cold tolerance by targeting *OsPCF6* and *OsTCP21* in rice (*Oryza sativa* L.). *PLoS ONE*, 9 (3): e91357
- Zheng CJ, Hu CL, Ma XQ, et al (2012). Cytotoxic phenylpropanoid glycosides from *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. *Food Chem*, 132 (1): 433–438
- Zhu F (2016). Chemical composition and health effects of tartary buckwheat. *Food Chem*, 203: 231–245

Molecular cloning and analyzing of *FtTCPlike1* and *FtTCPlike2* in *Fagopyrum tataricum*

ZHANG Jia-Li^{1,2}, HUANG Ming-Kun², SUN Wei², CHEN Qing-Fu³, LIU Xia^{1,2,*}

¹School of Chemistry, Chemical Engineering and Life Sciences, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, China

²Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

³Research Center of Buckwheat Industry Technology, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China

Abstract: The TCP transcription factor family is largely involved in regulating plant growth and development. Based on the similarity of protein, *TCP* family can be divided into two classes, class I and class II. In this study, we isolated two *TCP* genes from *Fagopyrum tataricum*, named *FtTCPlike1* and *FtTCPlike2*. Both *FtTCPlike1* and *FtTCPlike2* contained the reported conserved TCP-domain. Furthermore, phylogenetic tree based on the protein sequences showed that *FtTCPlike1* belonged to class II, while *FtTCPlike2* clustered into class I. *FtTCPlike1* and *FtTCPlike2* were found to be sub-located in the nucleolus similar to the previous reported. Next, we collected cotyledons, hypocotyls, three types of true leaves at different developmental stages, flowers and seeds during five stages of development, isolated the RNA and conducted quantitative real-time PCR to analyze the expression of *FtTCPlike1* and *FtTCPlike2* in these tissues. The results showed that *FtTCPlike1* and *FtTCPlike2* were expressed in all the tissues analyzed. In addition, *FtTCPlike1* and *FtTCPlike2* were expressed highly in specific stages (e.g. *FtTCPlike1* in stages 3 and 4; *FtTCPlike2* in stages 1 and 3) during seed development, indicating that the two genes might play various roles in seed development. Interestingly, *FtTCPlike1* was expressed highly in cotyledons but not in hypocotyls, while the expression of *FtTCPlike2* was opposite compared to *FtTCPlike1*, which indicated the distinct role in early *F. tataricum* morphogenesis.

Key words: *Fagopyrum tataricum*; TCP; gene cloning; subcellular localization; gene expression

Received 2017-09-18 Accepted 2018-01-25

This work was supported by the Natural Science Foundation of China (81403046 and 31471562).

*Corresponding author (lxr1125@126.com).