

# 杨树 *PIF* 基因家族成员表达模式研究

徐向东<sup>1</sup>, 任逸秋<sup>1,2</sup>, 张利<sup>3</sup>, 李煜<sup>1</sup>, 王丽娟<sup>1</sup>, 卢孟柱<sup>1\*</sup>

(1. 林木遗传育种国家重点实验室, 国家林业局林木培育重点实验室, 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091;  
2. 西北农林科技大学林学院, 陕西 杨凌 712100; 3. 菏泽学院园林工程系, 山东 菏泽 274000)

**摘要:** [目的] 为探究光敏色素相互作用因子 (*PIF*) 基因在杨树生长发育中的功能。 [方法] 利用生物信息学方法预测了杨树基因组中的 *PIF* 基因家族成员并对各成员的基因结构、保守基序进行了系统分析; 在此基础上, 采用实时荧光定量 PCR 技术检测了 *PIF* 成员在不同组织及低温、干旱和 NaCl 胁迫下的表达模式。 [结果] 表明: 杨树基因组中至少含有 10 个 *PtPIF* 成员, 这些成员在进化上相对保守, 均具有典型的 bHLH 结构域。基因表达分析显示: *PtPIF* 基因在杨树不同组织及不同非生物胁迫条件下存在明显的表达差异。 [结论] 杨树 *PtPIF* 基因家族包含 10 个成员参与不同的生物学过程, 研究结果将为深入解析杨树 *PtPIF* 基因的功能奠定了基础。

**关键词:** 杨树; 光敏色素相互作用因子; 表达分析

中图分类号: S718.46

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2018)02-0019-07

## Analysis of Expression Pattern of *PIF* Family Members in *Populus*

XU Xiang-dong<sup>1</sup>, REN Yi-qiu<sup>1,2</sup>, ZHANG Li<sup>3</sup>, LI Yu<sup>1</sup>, WANG Li-juan<sup>1</sup>, LU Meng-zhu<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory of Tree Genetic and Breeding, Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation of the State Forestry Administration, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 2. College of Forestry, Northwest A & F University, Yangling 712100, Shaanxi, China; 3. Department of Landscape Engineering, Heze University, Heze 274000, Shandong, China)

**Abstract:** [Objective] To study the function of phytochrome interacting factor (PIF) in *Populus*. [Method] The molecular characteristics analysis of PIF was conducted, including gene family members, gene structure and conserved motifs. The expression profiles of PIF family members in different tissues were tested under cold, drought and NaCl stresses with real-time quantitative PCR. [Result] The results of bioinformatics analysis showed that there were at least ten *PtPIF* members in *Populus* and the *PtPIF* genes were conserved during evolution of species, all of them contained bHLH domain. [Conclusion] The result of qRT-PCR revealed that *PtPIF* has distinct expression pattern across different tissues and under different abiotic stress conditions. Present study provides references for further decipher the function of *PtPIF* in *Populus*.

**Keywords:** *Populus*; phytochrome-interacting factor; expression analysis

光是影响植物生长发育的最重要的环境因子之一。为了感知生长环境中的光信号并对各种光信号的变化及时做出响应, 植物进化出了不同的光受体, 通过光受体的调节使环境因子达到最适宜植物生长发育的状态<sup>[1]</sup>。先前的研究表明, 植物共进化出四

种光受体, 分别包括感受红光和远红光的光敏色素 (Phy)<sup>[2]</sup>, 感受蓝光的隐花色素 (Cry) 和向光蛋白 (Phot)<sup>[3-4]</sup> 以及感受紫外光-蓝光的 UV-B 受体 (UV-B receptor)<sup>[4-5]</sup>, 其中, 感受红光和远红光的光受体-光敏色素是目前研究较清楚的光受体, 参与了植物

收稿日期: 2017-10-10

基金项目: 国家林业公益性行业科研专项重大项目(201304102); 海外及港澳学者合作研究基金项目(31428002)

作者简介: 徐向东(1991—), 男, 硕士研究生. 主要方向: 林木极性生长调控. E-mail: xuxd317@163.com

\* 通讯作者: 卢孟柱, 研究员, 博士生导师, 从事分子生物学研究. E-mail: lumz@caf.ac.cn

从种子萌发到成熟的整个生长发育过程<sup>[6-7]</sup>。光敏色素是一种可溶性色素蛋白,在植物体内存在两种状态,分别是具有生物活性的远红光吸收型(FR-absorbing form, Pfr)和不具有生物活性的红光吸收型(R-absorbing form, Pr),且这两种光敏色素可以在红光和远红光的照射下进行相互转换<sup>[8]</sup>。

在拟南芥基因组中共发现了 5 个光敏色素基因(PhyA-E)<sup>[9-10]</sup>,根据其在光下的稳定性不同,拟南芥光敏色素可以分为 I 型光敏色素和 II 型光敏色素。I 型光敏色素主要存在于黄化幼苗中,遇光极易降解,PhyA 属于 I 型光敏色素;II 型光敏色素主要存在于绿色组织中,遇光稳定,PhyB-E 属于 II 型光敏色素<sup>[8, 11]</sup>。在暗生长的黄化幼苗中,光敏色素以不具有生物活性的状态定位于细胞质中;感受到红光后,光敏色素转变为具有生物活性的远红光吸收型定位于细胞核中,并与细胞核内的其它蛋白质发生相互作用<sup>[12-14]</sup>。研究表明,光敏色素相互作用因子(PIF)能够直接与具有生物活性的光敏色素结合而启动光信号的传导<sup>[15-16]</sup>。

PIFs 属于 bHLH (basic helix-loop-helix) 转录因子家族的一个亚家族,也称作 PILs (phytochrome interacting factor-like),能够与具有生物活性型的光敏色素相互作用<sup>[17]</sup>。研究表明,大部分 PIFs 蛋白质在 N 端具有保守的 APB 结构域(active phytochrome-binding domain),APB 结构域是 PIFs 与具有生物活性型光敏色素相结合的不可或缺的元件<sup>[18]</sup>。拟南芥中至少有 7 个 PIFs 成员,PIF1、PIF3、PIF4、PIF5、PIF6、PIF7 和 PIF8<sup>[18-24]</sup>,其中,PIF3 是利用 PHYB 作为诱饵通过酵母双杂交筛选出来的最早的 PIFs 家族成员<sup>[20]</sup>。免疫共沉淀结果表明,PIF3 能与具有生物活性型的 PhyA 和 PhyB 的 C 端相结合。拟南芥中只有 PIF1 和 PIF3 能够同时与 PhyA 和 PhyB 相互作用,而 PIF4-PIF8 只能与 PhyB 相互作用<sup>[25]</sup>。拟南芥 PIF 基因家族成员在下胚轴伸长和幼苗避荫反应等过程发挥了重要作用<sup>[26-29]</sup>。PIF3 参与黄花幼苗的形成,在幼苗由黑暗至光照和由光照至黑暗过程中起着重要作用<sup>[30]</sup>。PIF1 参与光诱导的种子萌发,抑制下胚轴伸长,负调控叶绿素合成<sup>[21]</sup>。PIF4 正调控气孔的发育,PIF4、PIF5 和 PIF7 受光周期的调控而影响下胚轴延伸<sup>[31]</sup>。此外,PIF 类的转录因子还具有与靶基因启动子区顺式调控元件 G-box (CACGTG) 相结合的 DNA 结合结构域<sup>[21]</sup>。这些研究表明,PIF 类转录因子在调控种子萌

发、幼苗脱黄化以及开花时间等发育过程具有重要作用。

杨树是多年生木本植物,光是调控其生长发育的重要环境信号之一,光信号的变化使杨树需要具备适应不同发育状态的能力。PIF 作为光敏色素相互作用因子,对光环境的变化做出相应的改变调整其达到最适宜树木生长的状态;但目前对于杨树的 *PtPIF* 基因家族成员在基因组中分布及其表达模式却鲜见报道。为此,本研究利用生物信息学对杨树 *PtPIF* 基因家族成员进行了系统进化分析,鉴定其基因结构、保守结构域,分析了不同家族成员的组织表达特性及其在不同非生物胁迫下的表达规律,研究结果为以后深入解析杨树 *PtPIF* 基因的功能奠定了基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

实验所用材料毛果杨(*Populus trichocarpa* Torr. & Gray)由中国林业科学研究院林木遗传育种国家重点实验室保存。

### 1.2 实验试剂

RNA 提取试剂盒 RNeasy Plant ;Mini 与 RNase-free DNase I 均购买于 Qiagen 公司;反转录试剂盒 Superscript III First-strand Kit 以及 PCR 所用试剂均购买于 Takara 公司。采用 Primer 5.0 软件设计引物,实验所需引物在 Invitrogen 公司合成。

### 1.3 杨树 PIF 基因序列的获取与分析

首先获取 TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>) 数据库中已公布的拟南芥 PIF 基因及其编码的蛋白质序列,并用得到的拟南芥 PIF 蛋白序列作为诱饵,在杨树基因组数据库 (<http://www.phytozome.net/poplar.php>) 中通过 blastp 比对检索,获得 PIF 直系同源序列。使用 MEGA5.0 软件中的 Neighbor-Joining (NJ) 法构建系统发育进化树。杨树 PtPIF 蛋白的基本理化性质采用 ProtParam (<http://web.expasy.org/portparam/>) 分析完成。使用 Gene Structure Display Server (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 软件分析杨树 *PtPIF* 基因的外显子及内含子结构。使用在线软件 MEME (<http://meme-suite.org/>) 分析杨树 PtPIF 蛋白的结构域。

### 1.4 杨树 PIF 基因组织特异性表达分析

使用 RNA 提取试剂盒 (RNeasy Plant Kit) 提取毛果杨的幼叶、成熟叶、初生茎、次生茎和根的总

RNA,反转录合成 cDNA 第一链,并以 cDNA 为模板进行 qRT-PCR。反应体系为:LightCycler®80 2 × SYBR® Premix Ex Taq™ 10 μL,5'-引物(10 μmol · L<sup>-1</sup>)0.8 μL,3'-引物(10 μmol · L<sup>-1</sup>)0.8 μL,cDNA 2 μL,超纯水 6.4 μL;反应程序为:94℃30 s;94℃12 s,58℃30 s,72℃40 s,45 个循环。引物序列见表 1。

表 1 实时荧光定量 PCR 所用引物序列

Table 1 The primer pair sequences used for quantitative real-time PCR

引物 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
<i>PtPIF1-F</i>	TACCTGGTACTAAAGAGATCCGATC
<i>PtPIF1-R</i>	GAGGATATAGCAAATCGGCC
<i>PtPIF3a-F</i>	CAAGTAGCAATCCGGCTG
<i>PtPIF3a-R</i>	GGAAATTGAGCCTCAGGTAGCT
<i>PtPIF3b-F</i>	AATAATCTATGTCAGGATGCTGA
<i>PtPIF3b-R</i>	CTCATTGATCCATCCCTTCG
<i>PtPIF4/5a-F</i>	CATAGAGCCAGACAATGAGCTAGTA
<i>PtPIF4/5a-R</i>	CTTGAATCAAATGACTTGAATTCAG
<i>PtPIF4/5b-F</i>	TGGAAGGAAAGTCGGCTACA
<i>PtPIF4/5b-R</i>	TGAGGTTTATTGTTGTTGAGTTGTC
<i>PtPIF8a-F</i>	AATGGGAATGGGAATGGG
<i>PtPIF8a-R</i>	GGCATTACCGTGGCTGAA
<i>PtPIF8b-F</i>	CAGTACTGGTTCGGACCATGA
<i>PtPIF8b-R</i>	GCTGGGCCGGAGTCTATC
<i>PtPIF9a-F</i>	ATCAACGCTTCTTCTCCTCATTTATA
<i>PtPIF9a-R</i>	GTCTCGTTCTGCATTTCCCG
<i>PtPIF9b-F</i>	AGCTCAGAGCAAAATTTCTCTTAATC
<i>PtPIF9b-R</i>	CGTGGACAGATTGAAAGGCTG
<i>PtPIF10-F</i>	TTCAATGACCAACAATATCTAATGG
<i>PtPIF10-R</i>	ACCTCTTACTGGTAGTGGCATAGTT
<i>PtActin-F</i>	GTCTTCTAACTTCCCAACAGTGC
<i>PtActin-R</i>	GACTACCAAAGTGCTGACCACCA

## 1.5 材料处理

毛果杨组培苗培养 1 个月,转移至人工气候箱中用 Hogaland 营养液水培。水培 15 d 后,分别进行 4℃ 低温处理、干旱处理(10% PEG6000)及盐处

理(150 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl),于处理 6、12、24、36 h 后取由顶端数的第 4 片叶片,每个处理设置 3 个重复,每次重复 3 株,以未处理的毛果杨作为对照。

## 1.6 实时荧光定量 PCR 分析

使用 RNeasy Plant Mini 试剂盒与 RNase-free DNase I 试剂盒提取处理后杨树叶片的 RNA,使用反转录试剂盒 Superscript III First-strand Kit 合成 cDNA 第一链。使用 Primer 5.0 在杨树 *PIF* 基因核苷酸序列的非保守区设计定量 PCR 扩增引物(表 1),引物序列的 GC 含量低于 30%, $T_m$  值为 58 ~ 60℃,并由 Invitrogen 公司合成。实时荧光定量 PCR 根据 SYBR® Premix Ex Taq™ II kit (TaKaRa Dalian, China) 和 Roche480 实时荧光定量 PCR 仪的使用说明进行操作。反应体系为:LightCycler®480 2 × SYBR® Premix Ex Taq™ 10 μL,上下游引物各 0.8 μL,cDNA 2 μL,ddH<sub>2</sub>O 6.4 μL。选取杨树 *Actin*(基因序列号:EF418792.1)作为内参基因。每个 cDNA 模板设置四个重复,所有实验重复三次,采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 计算方法进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因序列分析

通过序列比对分析,在杨树基因组数据库中共筛选得到 10 个 *PtPIF* 基因成员(表 2)。这 10 个 *PIF* 基因长度为 2 810 ~ 6 064 bp,所编码的蛋白序列长度为 310 ~ 742 aa,蛋白质分子质量介于 33 ~ 79 kDa,等电点为 5.42 ~ 9.17,既有酸性蛋白,又有碱性蛋白。使用 NJ 法构建基于杨树和拟南芥 *PIF* 成员序列的系统发育进化树(图 1),根据聚类结果,将杨树 10 个 *PIF* 家族成员基因分别命名为 *PtPIF1*、*PtPIF3a*、*PtPIF3b*、*PtPIF4/5a*、*PtPIF4/5b*、*PtPIF8a*、*PtPIF8b*、*PtPIF9a*、*PtPIF9b* 和 *PtPIF10*。

表 2 *PtPIFs* 基因成员的基本信息

Table 2 Basic information of *PtPIF* family members in *Populus*

基因名 Gene	基因号 Gene number	基因在染色体上的位置 Location	基因长度 Length of gene/bp	蛋白质长度 Length of protein/aa	等电点/分子量 pI/(MW/kDa)
<i>PtPIF1</i>	Potri.002G252800	Chr02(-) 24187022 - 24193085	6 064	615	7.29/(67.366 00)
<i>PtPIF3a</i>	Potri.005G001800	Chr05(-) 107969 - 111992	4 024	742	5.89/(79.784 41)
<i>PtPIF3b</i>	Potri.013G001300	Chr13(-) 86122 - 91428	5 307	719	5.61/(77.620 79)
<i>PtPIF4/5a</i>	Potri.002G055400	Chr02(-) 3705303 - 3709545	4 243	583	6.13/(64.164 79)
<i>PtPIF4/5b</i>	Potri.005G207200	Chr05(+) 22153104 - 22156744	3 641	478	9.17/(52.311 36)
<i>PtPIF8a</i>	Potri.002G143300	Chr02(+) 10651063 - 10655266	4 204	484	8.80/(52.715 58)
<i>PtPIF8b</i>	Potri.014G066500	Chr14(-) 5402159 - 5406848	4 690	471	8.43/(51.139 76)
<i>PtPIF9a</i>	Potri.005G139700	Chr05(+) 11648940 - 11653997	5 058	327	6.13/(35.941 34)
<i>PtPIF9b</i>	Potri.014G025800	Chr14(+) 2209016 - 2211913	2 898	310	5.42/(33.741 64)
<i>PtPIF10</i>	Potri.014G111400	Chr14(-) 8714454 - 8717263	2 810	561	6.97/(61.476 18)

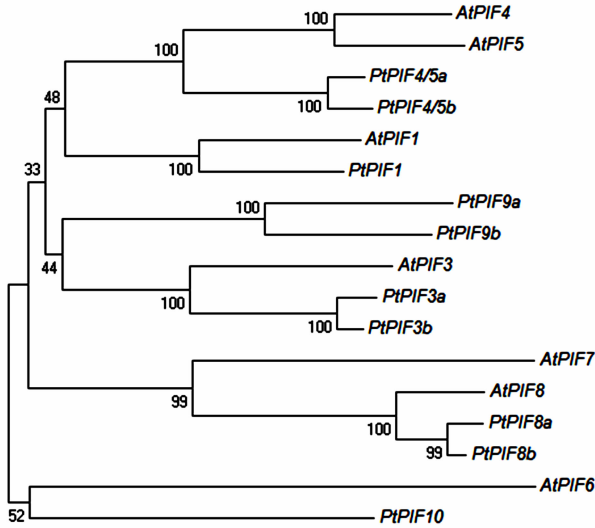


图 1 杨树和拟南芥 PIF 基因家族成员系统进化分析  
Fig. 1 Phylogenetic relationship of PIF family members between Populus and Arabidopsis

通过对杨树 PIF 家族各成员的基因结构(外显子/内含子)分析,发现其中 *PtPIF10* 由 5 个外显子和 4 个内含子组成, *PtPIF4/5b*、*PtPIF8a*、*PtPIF8b* 和 *PtPIF9b* 均由 6 个外显子和 5 个内含子组成, *PtPIF3a*、*PtPIF3b* 和 *PtPIF9a* 均由 7 个外显子和 6 个内含子组成, *PtPIF4/5a* 由 8 个外显子和 7 个内含子组成,而 *PtPIF1* 由 10 个外显子和 9 个内含子组成(图 2)。

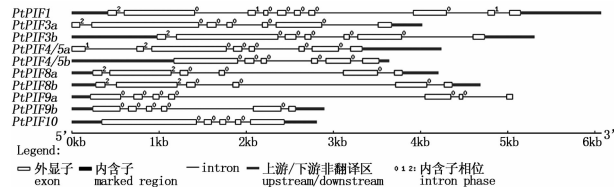


图 2 PtPIF 基因家族成员的结构  
Fig. 2 Gene structures of PtPIF genes

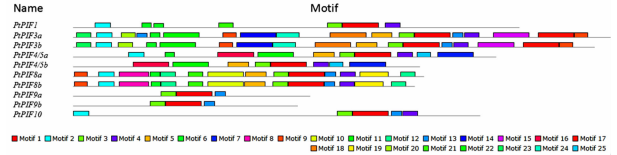
### 2.2 蛋白质结构分析

使用软件对杨树 PIF 蛋白进行保守结构域分析。结果表明:杨树 PIF 蛋白与拟南芥 PIF 蛋白在功能结构域上具有较高的保守性(图 3),都具有 bHLH DNA 结合结构域,推测它们可能具有相似的功能。

### 2.3 基因组织表达特异性分析

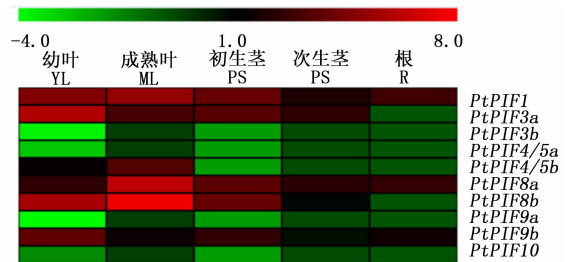
为了探究杨树中 PIF 基因成员的组织表达特性,利用 qRT-PCR 方法分析了 *PtPIF* 在幼叶、成熟叶、初生茎、次生茎及根等不同组织中的表达模式,结果(图 4)表明:*PtPIF1*、*PtPIF8a* 与 *PtPIF9b* 在各

组织中普遍表达,且 *PtPIF1* 与 *PtPIF8a* 均在成熟叶的表达相对较高,而 *PtPIF9b* 在幼叶的表达相对较高。*PtPIF3a* 与 *PtPIF8b* 在根中检测不到表达,但在其他部位均有表达,且在幼叶和成熟叶中高表达。*PtPIF4/5b* 只在成熟叶中表达,在其它部位检测不到表达。*PtPIF3b*、*PtPIF4/5a*、*PtPIF9a* 和 *PtPIF10* 在各组织中的表达水平较低。杨树 PIF 基因家族成员在各组织中的表达差异,说明不同成员在杨树发育过程中可能具有不同的功能。



结构域 Motif	长度 Length/aa	最佳匹配 Best possible match
1	50	HNLSERRRRDRINEKMRALQELIPNSKTKDKASMLDEAIEYKLSQLQVQ
2	22	MPENVEMLTWENGQVVMHSLR
3	21	AKKKAPARSSVSSKRSRAAEV
4	21	PHMHAPVQHQMSPMGMGMGMG
5	29	FGSTERISSGPITNTRKTRDTEESECCS
6	14	NQDDDMVPLWNYPL
7	50	CQTPVLNPNVYQNMQNPITFSDQYARFMGFHMQAASQPMNMRFRGSQTVQ
8	41	KPIASTSPSKYTWDKPRASGILESIVNQATCYPQCNKQTFD
9	19	SSQCQTSWEFCRSRTAQN
10	50	KRERVARVPVEWSRDSQVNSRATFSKKDSQVTVTDSERELGVGFST
11	50	QHDYCSFEIPELSSGVTVNHSSSQSNFSGFKRSFSQVSDTRTSVSNHGL
12	21	ASQSQTMTMDAYVRRSSRYQQ
13	15	MGSLNMPMMLPPG
14	50	NAVHVSVSDIRAPTSGGGFSPIKMKQVPAQSTNSLMLNF SHEARPA
15	50	GCPMYQVPPMHGPHFSGSQMSGSAALHRMGGSSQLQMFGLSQGLPMFSFR
16	50	MPPPRIQVQEQNHISVGGFGKAVNVNFSQFSAPLKVGDRTSSSRQFGGG
17	50	KTNREPNAAGVVGVPIDNLDSATASSKEAIQINISQVMQNNVNVSSMNQT
18	50	KPAEGSVPAELPEETSQEGDSKDRNCRQNFGEAIGKGVDEKVTTEPVV
19	40	DMNTLAARSNMTGYSPVLPHTAFMPMITWDGSSSHERLQT
20	20	PKIRYKDIGNGTNRTRTKGFG
21	21	CVVGCSTRVSGCSAPTATQSE
22	50	QGEVRECSVVTVGSSNQTPRDRFMSRASSN AMGTSGLTSGPSMDDPRKY
23	21	ELLYRMAKGTDSQEKNPSC
24	32	ALYKANTLQNYGMRASTGTSMSERTQNKDKGSI
25	19	MQNPMHLPRVQLYDQISIM

图 3 杨树 PtPIF 保守结构域分布  
Fig. 3 Distribution of conserved motifs in PtPIF proteins



YL: Young Leaf, ML: Mature Leaf, PS: Primary Shoot, SS: Secondary Shoot, R: Root

图 4 杨树 PtPIF 基因的组织表达模式

Fig. 4 Expression analyses of PtPIFs in various tissues

### 2.4 低温、干旱和 NaCl 胁迫下 PIF 基因的表达模式分析

为揭示杨树 PIF 基因在非生物胁迫下的响应机制,利用 qRT-PCR 方法检测其在低温、干旱和 NaCl

胁迫下的表达模式(图 5)。在盐(150 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl)、干旱(10% PEG)及 4℃ 低温处理下,杨树 *Pt-PIF* 基因家族各成员间在响应时间、程度上各有不同。低温处理后, *PtPIF1*、*PtPIF3a*、*PtPIF4/5a*、*Pt-*

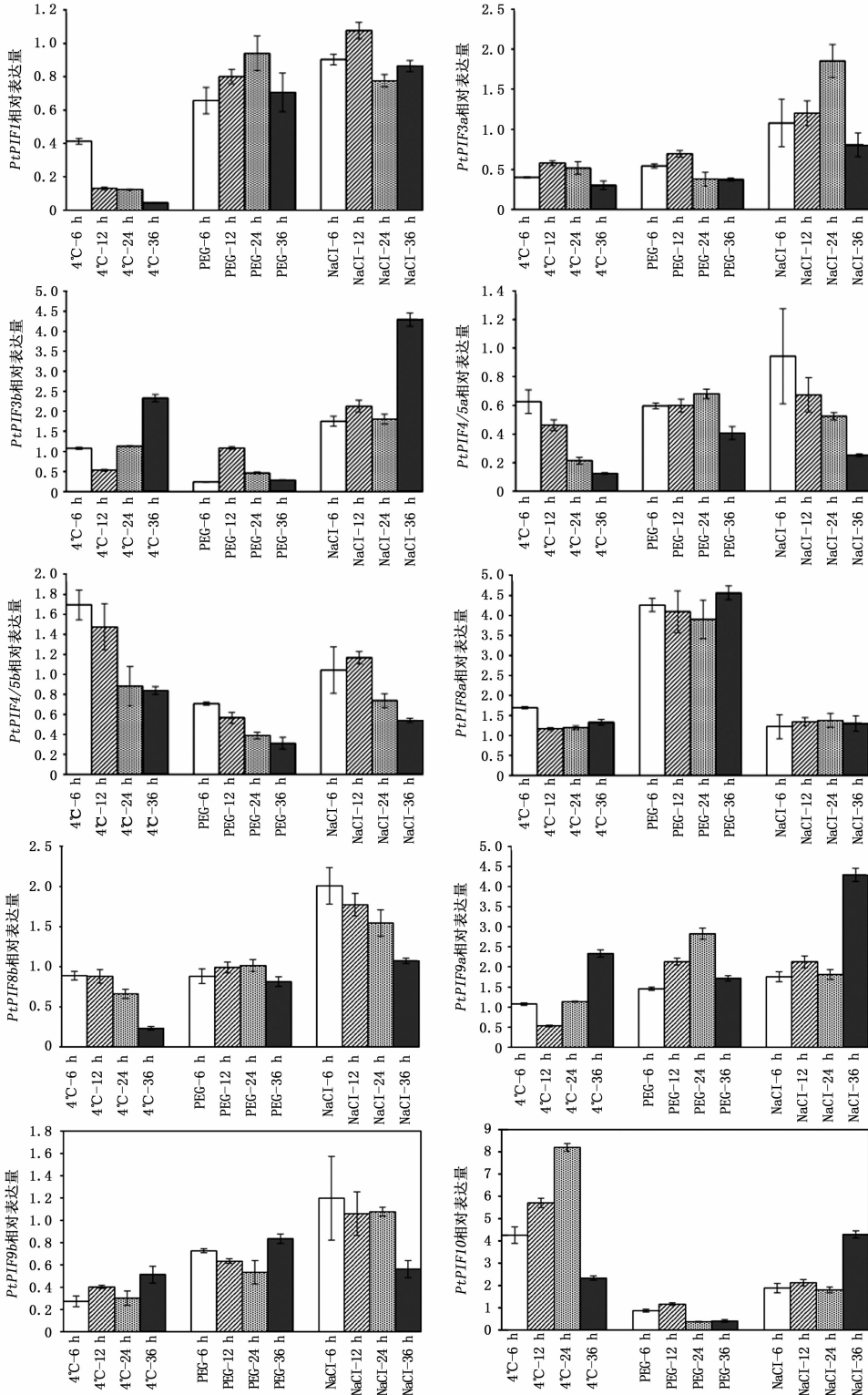


图5 胁迫条件下 *PtPIF* 的表达模式

Fig. 5 Expression patterns of *PtPIF* treated under various stresses

*PIF4/5b*、*PtPIF9b* 和 *PtPIF10* 响应时间较早,表达量均在 6 h 较对照显著改变,其中,*PtPIF9b* 和 *PtPIF10* 分别是对照的 0.3 和 4.3 倍。之后 *PtPIF9b* 的表达量基本维持这个水平,而 *PtPIF10* 的表达量则呈先上升后下降的趋势,在 24 h 达到对照的 8.2 倍,36 h 仅为对照的 2.3 倍。*PtPIF1*、*PtPIF4/5a* 和 *PtPIF8b* 的表达量均随着处理时间的延伸而降低,且在 36 h 达到最低值,分别是对照的 0.12、0.04、0.23 倍。*PtPIF3b* 和 *PtPIF9a* 的表达量呈现先下降后上升的趋势,在 36 h 均到达对照的 2.5 倍。干旱处理下,*PtPIF1*、*PtPIF3a*、*PtPIF3b*、*PtPIF4/5a*、*PtPIF4/5b*、*PtPIF9b* 和 *PtPIF10* 的表达量较对照组均下调,*PtPIF8a* 和 *PtPIF9a* 的表达量上调。盐处理下,*PtPIF3a*、*PtPIF3b*、*PtPIF8b*、*PtPIF9a* 和 *PtPIF10* 的表达量均上调,*PtPIF3b*、*PtPIF9a* 和 *PtPIF10* 的表达量在 36 h 达到对照的 4.3 倍。*PtPIF4/5a* 的表达量随着处理时间的延伸而降低,在 36 h 为对照的 0.25 倍。

### 3 讨论

光是调控杨树生长发育的重要环境信号,PIF 作为 bHLH 转录因子家族的一个亚家族广泛参与光信号传导途径。因此,利用杨树基因组数据进行 *PIF* 基因识别以及表达模式分析对揭示其在杨树生长发育过程中的作用具有重要意义。

基因的表达特性分析是进一步探究其功能的前提。本研究中杨树 *PtPIF* 在不同组织中表达模式存在明显差异,表明它们可能参与了不同的生物学过程。研究发现,拟南芥 *PIF4* 和 *PIF5* 通过促进与衰老相关基因的表达而促使叶片衰老,而光敏色素 B 通过抑制 *PIF4* 和 *PIF5* 的表达而延缓衰老<sup>[32]</sup>。本研究发现,杨树中拟南芥 *PIF4* 和 *PIF5* 的同源基因 *PtPIF4/5a* 和 *PtPIF4/5b* 在成熟叶片中高丰度表达,推测这 2 个基因可能参与杨树叶片衰老过程。GUS 染色发现,水稻光敏色素相互作用因子 *OsPIL1/OsPIL13* 在茎的节间处高表达,超表达 *OsPIL1/OsPIL13* 促进了水稻节间的伸长,表明 *OsPIL1/OsPIL13* 参与了水稻细胞的次生生<sup>[33]</sup>。本研究发现,*PtPIF3b*、*PtPIF4/5a*、*PtPIF9a* 和 *PtPIF10* 在成熟茎中确有高丰度表达,推测这些基因可能参与了杨树茎的次生生。

*PIF* 不仅具有参与光信号转导的能力,而且在响应低温、干旱和盐等非生物胁迫方面发挥着重要

作用<sup>[34-35]</sup>。本研究中,干旱和盐胁迫下,*PtPIF1* 的表达量变化不显著,而在低温胁迫下 *PtPIF1* 的表达量急剧下降,在 36 h 的表达量为对照的 0.04 倍,表明 *PtPIF1* 在响应低温胁迫上具有重要作用。*PtPIF3a*、*PtPIF4/5a*、*PtPIF9b*、*PtPIF8b* 与 *PtPIF1* 类似,在低温胁迫下的表达量显著降低。*PtPIF3b* 与 *PtPIF9a* 在低温和盐胁迫处理下具有相同的表达模式,低温胁迫下均呈先下降后上升的趋势,盐胁迫下均呈随着胁迫时间的延长而逐渐上升;但在干旱处理下却有着不同的表达模式,*PtPIF3b* 的表达量下降,而 *PtPIF9a* 的表达量则呈现上升,表明在响应干旱胁迫时这 2 个基因具有功能互补机制。低温及盐胁迫下 *PtPIF10* 高表达,而干旱胁迫下低表达,表明 *PtPIF10* 在胁迫环境下发挥着重要作用。

### 4 结论

本研究通过对杨树 *PtPIF* 基因家族的结构特点和组织表达特异性的分析,在杨树基因组中检测到 10 个 *PtPIF* 基因成员,且均含有 bHLH 转录因子典型的结构域;对 *PtPIF* 基因家族成员在顶端、幼叶、成熟叶、幼茎、成熟茎和根中的表达量进行分析,发现杨树 *PtPIF* 基因家族成员组织表达各异,表明 *PIF* 基因参与了不同的生物学过程。低温胁迫下,*PtPIF10* 的表达量显著升高,最高时达到对照的 8.2 倍;干旱处理下,*PtPIF8a* 的表达量较对照上升了 4 倍以上;盐胁迫导致 *PtPIF3b*、*PtPIF9a* 和 *PtPIF10* 的表达量在 36 h 达到对照的 4.3 倍,表明杨树 *PtPIF* 基因在低温、干旱和盐等非生物胁迫中发挥着重要作用。本研究为揭示 *PtPIF* 基因在杨树生长发育过程中的作用奠定了基础。

### 参考文献:

- [1] Jiao Y, Lau O S, Deng X W. Light-regulated transcriptional networks in higher plants[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2007, 8(3): 217-230.
- [2] Nagy F, Schäfer E. Phytochromes control photomorphogenesis by differentially regulated, interacting signaling pathways in higher plants[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2002, 53: 329-355.
- [3] Casal J J. Phytochromes, cryptochromes, phototropin: photoreceptor interactions in plants[J]. *Photochemistry and Photobiology*, 2000, 71(1): 1-11.
- [4] Ulm R, Nagy F. Signaling and gene regulation in response to ultraviolet light[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2005, 8(5): 477-482.
- [5] Quail P H. Photosensory perception and signaling in plant cells: new paradigms[J]. *Current opinion of Cell Biology*, 2002, 14(2): 180

- 188.
- [6] Parks B M, Quail P H. *hy8*, a new class of *Arabidopsis* long hypocotyl mutants deficient in functional phytochrome A[J]. *Plant Cell*, 1993, 5(1): 39-48.
- [7] Nagatani A, Reed J W, Chory J. Isolation and initial characterization of *Arabidopsis* mutants that are deficient in phytochrome A[J]. *Plant Physiology*, 1993, 102(1): 269-277.
- [8] Sharrock R A, Quail P H. Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family[J]. *Genes and Development*, 1989, 3(11): 1745-1757.
- [9] Clack T, Mathews S, Sharrock R A. The phytochrome apoprotein family in *Arabidopsis* is encoded by five genes: the sequences and expression of PHYD and PHYE[J]. *Plant Molecular Biology*, 1994, 25(3): 413-427.
- [10] Clough R C, Vierstra R D. Phytochrome degradation[J]. *Plant, Cell and Environment*, 1997, 20(6): 713-721.
- [11] Sharrock R A, Clack T. Patterns of expression and normalized levels of the five *Arabidopsis* phytochromes[J]. *Plant Physiology*, 2002, 130(1): 442-456.
- [12] Rockwell N C, Su Y S, Lagarias J C. Phytochrome structure signaling mechanisms[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2006, 57(1): 837-858.
- [13] Kevei E, Schäfer E, Nagy F. Light-regulated nucleo-cytoplasmic partitioning of phytochromes[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2007, 58(12): 3113-3124.
- [14] Franklin K A, Quail P H. Phytochrome functions in *Arabidopsis* development[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2010, 61(1): 11-24.
- [15] Quail, P H. Phytochrome-interacting factors[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2000, 11(6): 457-466.
- [16] Zhang Y, Mayba O, Pfeiffer A, *et al.* A quartet of PIF bHLH factors provides a transcriptionally centered signaling hub that regulates seedling morphogenesis through differential expression-patterning of shad target genes in *Arabidopsis* [J]. *PLOS Genetics*, 2013, 9(1): e1003244.
- [17] Toledo-Ortiz G, Huq E, Quail P H. The *Arabidopsis* basic/helix-loop-helix transcription factor family [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(8): 1749-1770.
- [18] Khanna R, Huq E, Kikis E A, *et al.* A novel molecular recognition motif necessary for targeting photoactivated phytochrome signaling to specific basic helix-loop-helix transcription factors[J]. *Plant Cell*, 2004, 16(11): 3033-3044.
- [19] Ni M, Tepperman J M, Quail P H. Binding of phytochrome B to its nuclear signaling partner PIF3 is reversibly induced by light[J]. *Nature*, 1999, 400: 781-784.
- [20] Huq E, Quail P H. PIF4, a phytochrome-interacting bHLH factor, functions as a negative regulator of phytochrome B signaling in *Arabidopsis* [J]. *The EMBO Journal*, 2002, 21(10): 2441-2450.
- [21] Huq E, Al-Sady B, Hudson M, *et al.* Phytochrome-interacting factor 1 is a critical bHLH regulator of chlorophyll biosynthesis[J]. *Science*, 2004, 305: 1937-1941.
- [22] Oh E, Kim J, Park E, *et al.* PIF5, a phytochrome-interacting basic helix-loop-helix protein, is a key negative regulator of seed germination in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell*, 2004, 16(11): 3045-3058.
- [23] Leivar P, Monte E, Al-Sady B, *et al.* The *Arabidopsis* phytochrome-interacting factor PIF7, together with PIF3 and PIF4, regulates responses to prolonged red light by modulating phyB levels [J]. *Plant Cell*, 2008, 20(2): 337-352.
- [24] Leivar P, Quail P H. PIFs: Pivotal components in a cellular signaling hub[J]. *Trends in Plant Science*, 2011, 16(1): 19-28.
- [25] Wang H, Wang HY. Phytochrome Signaling: Time to Tight up the Loose Ends[J]. *Molecular Plant*, 2015, 8(4): 540-551.
- [26] Goyal A, Karayekov E, Galvão V C, *et al.* Shade Promotes Phototropism through Phytochrome B-Controlled Auxin Production. [J]. *Current Biology* Cb, 2016, 26(24):3280.
- [27] Ma D, Li X, Guo Y, *et al.* Cryptochrome 1 interacts with PIF4 to regulate high temperature-mediated hypocotyl elongation in response to blue light. [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(1):224-229.
- [28] Miyazaki Y, Jikumaru Y, Takase T, *et al.* Enhance-229ment of hypocotyl elongation by LOV KELCH PROTEIN2 production is mediated by auxin and phytochrome-interacting factors in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell Reports*, 2016, 35(2):455-467.
- [29] Shor E, Paik I, Kangisser S, *et al.* PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS mediate metabolic control of the circadian system in *Arabidopsis* [J]. *New Phytologist*, 2017, 215(1):217-228.
- [30] Monte E, Tepperman J M, Al-Sady B, *et al.* The phytochrome-interacting transcription factor, PIF3, acts early, selectively, and positively in light-induced chloroplast development [J]. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 2004, 101(46): 16091-16098.
- [31] Niwa Y, Yamashino T, Mizuno T. The circadian clock regulates the photoperiodic response of hypocotyl elongation through a coincidence mechanism in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant & Cell physiology*, 2009, 50(4): 838-854.
- [32] Y Sakuraba, J Jeong, MY Kang, *et al.* Phytochrome-interacting transcription factors PIF4 and PIF5 induce leaf senescence in *Arabidopsis* [J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 4636.
- [33] D Todaka, K Nakashima, K Maruyama, *et al.* Rice phytochrome-interacting factor-like protein OsPIL1 function as a key regulator of internode elongation and induces a morphological response to drought stress[J]. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*, 2012, 109(39): 15947-15952.
- [34] He Y, Li Y, Cui L, *et al.* Phytochrome B Negatively Affects Cold Tolerance by Regulating OsDREB1 Gene Expression through Phytochrome Interacting Factor-Like Protein OsPIL16 in Rice[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7:1963.
- [35] M Kudo, S Kidokoro, T Yoshida, *et al.* Double overexpression of DREB and PIF transcription factors improves drought stress tolerance and cell elongation in transgenic plants[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2017, 15(4):458.