

甘蔗野生种割手密的 PIF 基因家族鉴定与表达分析

王 郑^{1,2,3}, 王文治^{2,3}, 王 鹏¹, 孙婷婷^{2,3}, 熊国如^{2,3}, 张树珍^{2,3}, 何美丹^{1*}, 沈林波^{2,3*}

1. 海南大学热带农林学院/热带作物生物育种全国重点实验室, 海南海口 570223; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南海口 571101; 3. 中国热带农业科学院三亚研究院, 海南三亚 572024

摘 要: 光敏色素作用因子 (phytochrome interacting factors, PIFs) 是调控植物光形态建成的关键转录因子, 在植物生长发育及逆境响应过程中具有重要作用。目前, PIF 基因已在多种植物中得到鉴定, 但尚有关于甘蔗近缘野生种割手密 (*Saccharum spontaneum* L.) SsPIF 基因家族成员的系统鉴定与分析的报道。本研究对甘蔗近缘野生种割手密 SsPIF 基因家族进行鉴定, 系统分析 SsPIF 家族基因的蛋白理化性质、染色体定位、物种内及物种间共线性比较及启动子顺式作用元件等特征, 并利用荧光定量 PCR 技术 (qRT-PCR) 分析 SsPIF 基因在甘蔗不同组织及 3 种植物激素处理下的表达模式。结果显示: 从割手密全基因组中鉴定出 12 个 SsPIF 基因, 编码的氨基酸数量在 435~765 之间, 分子质量范围为 48.14~83.91 kDa; 等电点 (pI) 在 5.59~6.97 之间, 大多数等电点接近中性, 少数偏向酸性或碱性; 亚细胞定位发现所有 SsPIF 蛋白均定位在细胞核; 染色体定位分析显示 SsPIF 不均匀地分布在 10 条染色体上; 多序列比对结果表明 SsPIF 家族成员均存在 bHLH 和 APB 保守结构域, 其中 SsPIF3 亚组存在特有的 APA 结构域; 物种间共线性显示 SsPIF 在水稻中存在 14 对同源基因; 启动子区域分析表明 SsPIF 基因富含光响应、激素响应与逆境响应元件; SsPIF 基因的表达具有组织特异性, 与割手密的生长发育相关。本研究结果为进一步探究 SsPIF 基因家族在割手密的生长发育调控和信号转导通路中的功能奠定基础。

关键词: 割手密; SsPIF; 基因家族; 生物信息学; 表达分析

中图分类号: S566.1 文献标志码: A

Identification and Expression Analysis of the PIF Gene Family in Wild *Saccharum spontaneum* L.

WANG Zheng^{1,2,3}, WANG Wenzhi^{2,3}, WANG Peng¹, SUN Tingting^{2,3}, XIONG Guoru^{2,3}, ZHANG Shuzhen^{2,3}, HE Meidan^{1*}, SHEN Linbo^{2,3*}

1. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University / National Key Laboratory of Tropical Crop Breeding, Haikou, Hainan 570223, China; 2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China; 3. Sanya Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Sanya, Hainan 572024, China

Abstract: Phytochrome-interacting factors (PIFs) are key transcription factors that regulate plant photomorphogenesis and play important roles in plant growth, development, and responses to environmental stresses. To date, PIF gene family have been identified in many plant species; however, systematic identification and analysis of the PIF gene family in *Saccharum spontaneum* L., a wild relative of sugarcane, have not yet been reported. In this study, the PIF gene family in *S. spontaneum* (SsPIF) was identified, and comprehensive analyses were conducted on the physicochemical properties of the encoded proteins, chromosomal localization, intra- and interspecific synteny relationships, and cis-acting elements

收稿日期 2025-08-20; 接受日期 2025-09-02

基金项目 海南省自然科学基金面上项目 (No. 323MS103); 国家糖料产业技术体系项目 (No. CARS-17); 海南省自然科学基金青年基金项目 (No. 321QN313)。

作者简介 王 郑 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 甘蔗抗病毒分子育种。*通信作者 (Corresponding author): 何美丹 (HE Meidan), E-mail: hemeidan@hainanu.edu.cn; 沈林波 (SHEN Linbo), E-mail: shenlinbo@itbb.org.cn。

in promoter regions. In addition, quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to analyze the expression patterns of *SsPIF* genes in different tissues of sugarcane and under three plant hormone treatments. The results showed that 12 *SsPIF* gene were identified from the *S. spontaneum* genome. These genes encode proteins ranging from 435 to 765 amino acids in length, with molecular weights between 48.14–83.91 kDa. The predicted isoelectric points (pI) ranged from 5.59 to 6.97; most *SsPIF* proteins had pI values close to neutral, while a few tended to be acidic or basic. Subcellular localization analysis indicated that all *SsPIF* proteins are localized in the nucleus. Chromosomal mapping revealed that the *SsPIF* genes are unevenly distributed across 10 chromosomes. Multiple sequence alignment demonstrated that all *SsPIF* family members contain conserved basic helix–loop–helix (bHLH) and APB domains, while members of the *SsPIF3* subgroup possess a unique APA domain. Comparative synteny analysis showed that fourteen orthologous gene pairs exist between *S. spontaneum* and rice. Promoter analysis revealed that *SsPIF* genes are enriched in cis-acting elements related to light responsiveness, hormone signaling, and stress responses. The expression profiles of *SsPIF* genes exhibited clear tissue specificity, indicating their involvement in the growth and development of *S. spontaneum*. Furthermore, qRT-PCR analysis revealed distinct expression patterns of the twelve *SsPIF* genes in response to methyl jasmonate, gibberellin, and auxin treatments. Overall, these findings provide a solid foundation for further functional characterization of the *SsPIF* gene family and for elucidating their roles in regulating growth, development, and signal transduction pathways in *S. spontaneum*.

Keywords: *Saccharum spontaneum* L; *SsPIF*; gene family; bioinformatics; expression analysis

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2026.01.004

光敏色素互作因子 (phytochrome interacting factors, PIFs) 是植物响应光信号的重要转录因子之一, 属于碱性-螺旋-环-螺旋 (basic helix-loop-helix, bHLH) 转录因子第 15 亚家族成员^[1]。光信号作为外部环境因子, 在调控植物生长发育过程中发挥着重要作用, 植物体内存在的光受体能够使植物感知到光信号, 其中 PIF 是一类能够反应红光和远红光的光感受器, 能够根据环境中的光照条件调控植物的生长与发育。在植物中能够参与调控种子萌发、幼苗光形态建成、下胚轴伸长和叶片衰老等多个生长发育过程^[2]。PIF 在 C 端具有保守的 bHLH 结构域, 该结构域通常由 50~60 个氨基酸组成, bHLH 结构域在结合 DNA 和二聚化中发挥功能^[3]。PIF 在 N 端具有保守的活性光敏色素 A 结合结构域 (active phytochrome A-binding motif, APA) 和活性光敏色素 B 结合结构域 (active phytochrome B-binding motif, APB), 分别与参与光活化的 phyB 和 phyA 特异性结合^[4-5]。PIF 作为多种信号通路的核心调控因子^[6], 不仅参与植物生长发育、激素信号传导、生物钟、温度反应以及响应生物和非生物胁迫反应^[7], 还通过调控植物体内各种激素 [赤霉素 (gibberellin, GA)、生长素 (auxin, IAA)、脱落酸 (abscisic acid, ABA)、乙烯 (ethylene, ETH) 和油菜素类固醇 (brassinosteroid, BR)] 来控制植物生长发育^[8-9]。

甘蔗 (*Saccharum spp.*) 属禾本科甘蔗属多年生草本植物, 是世界上最重要的糖源之一, 除了用

于生产糖外, 还用于生产乙醇、饲料等产品^[10]。甘蔗亲本种质资源丰富, 其中割手密 (*Saccharum spontaneum* L.) 能够适应多种复杂的自然逆境环境, 具有生长势强、分蘖强、抗逆性强、耐旱、抗病虫害等优点^[11]。在甘蔗杂交育种中, 割手密因其优良的抗逆性能而被视为重要的野生亲本, 为抗逆基因的挖掘提供丰富资源。目前, PIF 基因家族作为一类重要的转录因子, 在调控植物生长发育、激素信号转导及逆境胁迫响应等方面发挥着关键作用。该基因家族成员的功能已在多种植物中得到鉴定, 包括十字花科的白菜 (*Brassica rapa*)^[12]、禾本科的水稻 (*Oryza sativa*)^[13] 和玉米 (*Zea mays*)^[14]、茄科的番茄 (*Solanum lycopersicum* L.)^[15]、葡萄科的葡萄 (*Vitaceae Juss*)^[16] 以及模式植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)^[17] 和烟草 (*Nicotiana glauca*)^[18] 等。

目前, 割手密 *SsPIF* 基因家族的基因组鉴定、表达模式分析及其在生长发育和逆境响应中的分子调控机制仍不清楚。因此, 本研究运用生物信息学方法对甘蔗近缘野生种割手密 *SsPIF* 基因家族进行鉴定, 系统分析 *SsPIF* 家族基因的蛋白理化性质、染色体定位、物种内及物种间共线性比较及启动子顺式作用元件等特征。此外, 利用荧光定量 PCR 技术 (qRT-PCR) 分析 *SsPIF* 基因在甘蔗不同组织及 3 种植物激素处理下的表达模式。为深入解析 *SsPIF* 在割手密生长发育和逆境

响应中的生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为甘蔗近缘野生种割手密 Np-X 品种, 选取健康植株的根、茎和叶组织进行取样, 用于组织特异性表达分析。

1.2 方法

1.2.1 SsPIF 基因家族成员的鉴定及其理化性质分析 从拟南芥数据库 TAIR (<https://www.arabidopsis.org/index.Jsp/>) 下载拟南芥蛋白 PIF 序列, 从甘蔗基因组数据库 (<https://sugarcane-genome.cirad.fr/>) 下载割手密 Np-X 品种全基因组数据, 以拟南芥 PIF 蛋白序列为参考, 利用 TBtools 软件在 Np-X 基因组中进行比对, 去除重复序列及不完整 N 端和 C 端序列后, 得到 12 条含有完整功能的 bHLH 结构域序列。为进一步验证候选成员的可靠性, 从 pfam 数据库网站 (<http://pfam.xfam.org/>) 中利用 pfam ID 号下载 PIF 家族的隐马尔可夫模型, 在 NCBI 中使用 CD-search 工具检查蛋白质序列以识别具有默认参数设置的保守域, 并利用 SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi) 在线软件检验获得的序列, 最终得到 12 个 SsPIF 蛋白序列。使用 ExPASy 网站中的 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 在线工具计算割手密 PIF 蛋白的分子量、等电点 (pI) 和亲疏水性 (GRAVY) 均值; 利用 Plant-mPLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>) 在线软件预测割手密 PIF 蛋白的亚细胞定位。利用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 在线软件预测割手密 PIF 蛋白质三级结构。

1.2.2 SsPIF 基因家族系统发育树的构建 以拟南芥和甘蔗品种 SP80-3280 PIF 家族为参照, 利用 MEGA11 软件的邻接法 (neighbour joining, NJ) 构建割手密 SsPIF 基因家族系统发育树, 利用 ITOL (<https://itol.embl.de/>) 在线软件美化进化树。

1.2.3 SsPIF 基因家族保守结构域序列及 motif 分析 通过 GSDS (<https://gsds.gao-lab.org/>) 在线软件确定 SsPIF 内含子和外显子的分布模式, 通过 MEME (<https://meme-suite.org/meme/>) 在线软件分析 SsPIF 家族蛋白保守基序。基于基因组注释信息文件及 MEME 分析结果, 利用 TBtools 软件对 SsPIF 基因结构特征和保守基序分布进行可视化分析。

1.2.4 SsPIF 基因家族染色体定位及共线性 从甘蔗基因组数据库 (<https://sugarcane-genome.cirad.fr/>) 中获取割手密 Np-X 基因组及其注释文件, 从 Ensemble plants (<https://plants.ensembl.org/index.html>) 数据库下载水稻的基因组及注释文件, 利用 TBtools 软件对 SsPIF 基因在割手密染色体上的分布进行定位分析和可视化分析。使用 TBtools 软件中的 One Step MCScanX 插件分析 SsPIF 基因与其他物种之间进行共线性关系并制图。

1.2.5 SsPIF 基因家族启动子顺式作用元件预测 利用 TBtools 软件提取 SsPIF 基因家族各成员起始密码子上游的 2000 bp 序列, 作为其启动子区域, 并利用 Plant CARE (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plant-care/html/>) 在线软件预测该区域的顺式作用元件, 将预测所得结果导入 TBtools 软件进行可视化分析。

1.2.6 SsPIF 基因家族在不同组织的表达分析 使用 Omega 公司的 E.Z.N.A.Plant RNA Kit 植物总 RNA 提取试剂盒分别提取割手密根、茎和叶组织的 RNA。经凝胶电泳检测后, 使用 Nano Drop One 微量分光光度计测定其纯度和浓度, 于 -80 °C 冰箱保持。使用 Hifair III 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR 反转录试剂盒 [翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司] 合成 cDNA。荧光定量 PCR 检测引物 (表 1) 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。以 GADPH 为内参基因, 参照 2^{-ΔΔCt} SYBR qPCR Master Mix 试剂盒说明书设置 qRT-PCR 反应体系和反应程序, 在 qTOWER3G 仪器 (德国耶拿公司) 进行 qRT-PCR, 测定 SsPIF 基因家族在不同组织的相对表达水平。采用 2^{-ΔΔCt} 法计算基因相对表达量, 进行 3 次重复试验。使用 DPS 软件处理试验数据, 使用 TBtools 软件制图。

1.2.7 SsPIF 基因家族在不同激素处理后的表达模式 将茉莉酸甲酯 (MeJA)、生长素 (IAA) 和赤霉素 (GA) 三种激素粉末分别溶解于乙醇中, 用无菌纯水稀释, 获得终浓度为 100 μmol/L 的 MeJA、IAA 和 GA 溶液, 用 0.22 μm 滤膜过滤除菌。将 100 μmol/L 的 MeJA、IAA 和 GA 溶液分别喷施于割手密叶片表面, 分别采集处理前和处理后第 1、5、12 h 叶片样品。每种处理设 3 个生物学重复, 采样后立即放入液氮中速冻, 于 -80 °C 冰箱中保存。割手密叶片 RNA 的提取及 SsPIF 基因家族的相对表达量测定方法同 1.2.6。

表 1 qRT-PCR 引物
Tab. 1 Primers for qRT-PCR

基因名称 Gene name	上游引物（5'-3'） Forward primer (5'-3')	下游引物（5'-3'） Reverse primer (5'-3')
<i>SsPIF3.1</i>	CGGGCTCCTCTCGCTCATCC	CCTGGGGCTGCTTCCTCCTC
<i>SsPIF3.2</i>	TGGATCCACTACCCCATCGT	CTTCTGTTGTTGCCGGTGTG
<i>SsPIF3.3</i>	CTCCTCTCGCTCATCCACCAAG	GCCTGCCCCGTTCTCCCATAG
<i>SsPIF3.4</i>	ACTGCTTGCTCACCTCCATC	AACTCGTTGCTGTCTGGACAT
<i>SsPIF3.5</i>	ATGCTGCTGCCACCAACCATG	ACCGCTGCTGTGCTGTTCATATC
<i>SsPIF4.1</i>	AGCGTCCATGTCCACAAGAG	TGAACTTCAGCTGCACGAGT
<i>SsPIF4.2</i>	AGGGGAGGTGTAGAGACGAC	AGTGTGGGATCAGCTCTTGC
<i>SsPIF4.3</i>	CACAGCGTCCATGTCCACAAG	CTCCTCGGTTGCCTCCTCAC
<i>SsPIF5.1</i>	TCCTCGTTCTCTGTTGCTCCTG	TGTCCAAGTCGGCGTCTCTG
<i>SsPIF5.2</i>	AGGACGCCGACTTGGACACC	GCTCGCATCTTCTCGTTGATCCG
<i>SsPIF5.3</i>	CGGCGGGTCCACTTCCAG	TCGGCGTCTCTCGTTGAACTC
<i>SsPIF5.4</i>	CGCCGACTTGACACCGTAG	CTTCTCCTCCGTCCTCGACATG
<i>GADPH</i>	CACGGCCACTGGAAGCA	TCCTCAGGGTTCCTGATGCC

2 结果与分析

2.1 SsPIF 家族成员鉴定及氨基酸理化性质

本研究运用生物信息学方法，以拟南芥 PIF 家族成员蛋白序列作为源序列，在甘蔗基因组数据库中 进行 Blastp，共鉴定出 12 个 SsPIF 家族成员。SsPIF 蛋白的氨基酸数量在 435~765 之间；分子质量范围为 48.14~83.91 kDa，平均分子质量为 61.78 kDa，等电点为 5.59~8.97，大多数等电点接近中性，少数偏向酸性或碱性。亚细胞定位预测结果显示，所有 SsPIF 蛋白均定位于细胞核。根据理化性质分析结果可知，该家族成员均为亲

水性蛋白，且具有较强的亲水性。其不稳定系数介于 52.71~65.93 之间，均超过 40，表明 SsPIF 蛋白整体的稳定性较差（表 2）。蛋白三级结构预测结果显示，SsPIF 蛋白的三级结构主要由无规则卷曲、延伸链、 α -螺旋及 β -折叠组成（图 1）。

2.2 SsPIF 家族系统进化分析

以拟南芥和甘蔗品种 SP80-3280 的 PIF 蛋白氨基酸序列为参照，利用 MEGA 11 软件，使用邻接法构建系统发育树。由图 2 可知，PIF 可划分为 4 个亚家族，其中拟南芥的 AtPIF4、AtPIF5 聚类为亚家族 I；12 个 SsPIF 聚类到其他 3 个亚家

表 2 SsPIF 蛋白理化性质
Tab. 2 Physicochemical properties of SsPIF proteins

基因名称 Gene name	基因 ID Gene ID	氨基酸数量 Number of amino acid/aa	分子质量 Molecular weight/kDa	等电点 pI	亚细胞定位 Subcellular localization	亲水性平均系数 GRAVY	不稳定性系数 Instability index
<i>SsPIF3.1</i>	Npp.03C014250.1.t1	657	70.51	6.80	细胞核	-0.476	59.43
<i>SsPIF3.2</i>	Npp.03B010730.1.t1	675	72.29	6.93	细胞核	-0.422	60.31
<i>SsPIF3.3</i>	Npp.03D011650.1.t1	760	82.18	8.97	细胞核	-0.559	58.68
<i>SsPIF3.4</i>	Npp.03A012170.1.t1	606	64.88	6.93	细胞核	-0.439	63.21
<i>SsPIF3.5</i>	Npp.03A012170.1.t2	638	68.23	6.45	细胞核	-0.492	62.10
<i>SsPIF4.1</i>	Npp.01C006430.1.t1	505	53.28	6.41	细胞核	-0.420	59.46
<i>SsPIF4.2</i>	Npp.01A007110.1.t1	444	48.14	5.93	细胞核	-0.648	65.93
<i>SsPIF4.3</i>	Npp.01A007020.1.t1	444	48.14	5.93	细胞核	-0.648	65.93
<i>SsPIF5.1</i>	Npp.02D000630.1.t1	472	50.57	6.23	细胞核	-0.308	52.71
<i>SsPIF5.2</i>	Npp.02A003350.1.t1	765	83.91	5.59	细胞核	-0.435	53.26
<i>SsPIF5.3</i>	Npp.02C003980.1.t1	435	45.99	5.83	细胞核	-0.377	55.93
<i>SsPIF5.4</i>	Npp.02D003850.1.t1	501	53.23	6.01	细胞核	-0.338	53.98

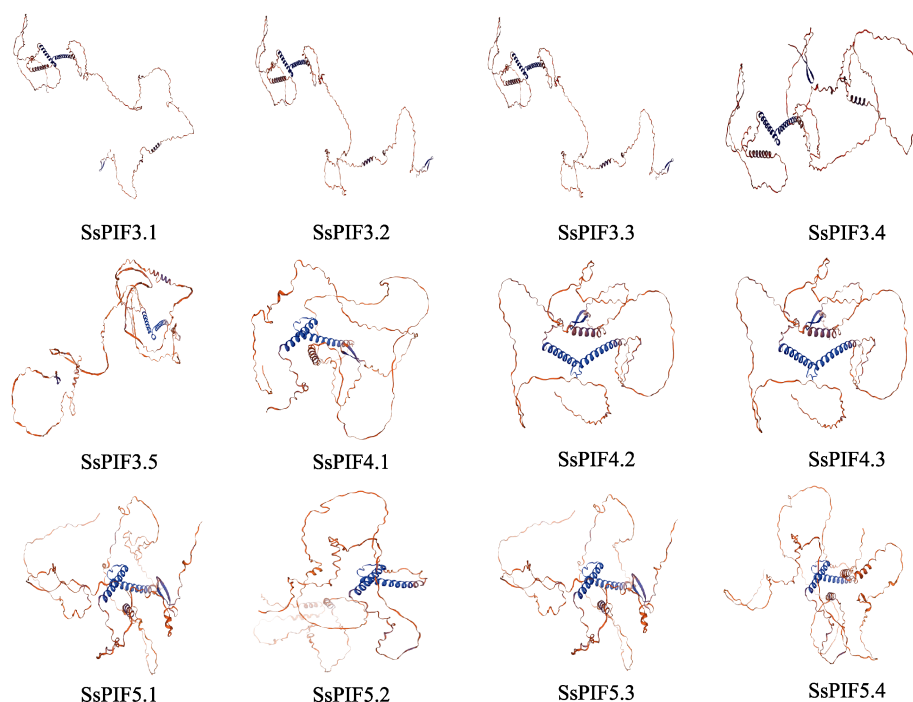


图 1 SsPIF 蛋白的三级结构

Fig. 1 Tertiary structure of SsPIF proteins

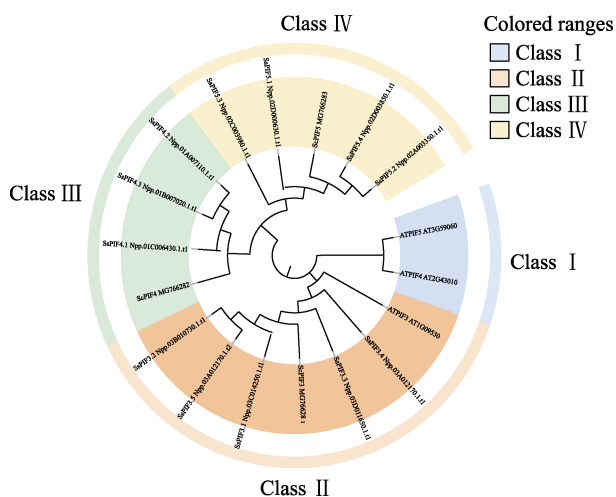


图 2 PIF 蛋白的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of PIF proteins

族, SsPIF3.1~SsPIF3.5 与 AtPIF3、甘蔗 ScPIF3 聚类到亚家族 II; SsPIF4.1~SsPIF4.3 与 ScPIF4 聚类到亚家族 III; SsPIF5.1~SsPIF5.4 与 ScPIF5 聚类到亚家族 IV。系统发育分析结果显示, 相同 PIF 成员之间紧密聚类, 表明这些蛋白具有较高的同源性和相似的基因功能。

2.3 SsPIF 家族基因结构及蛋白保守基序

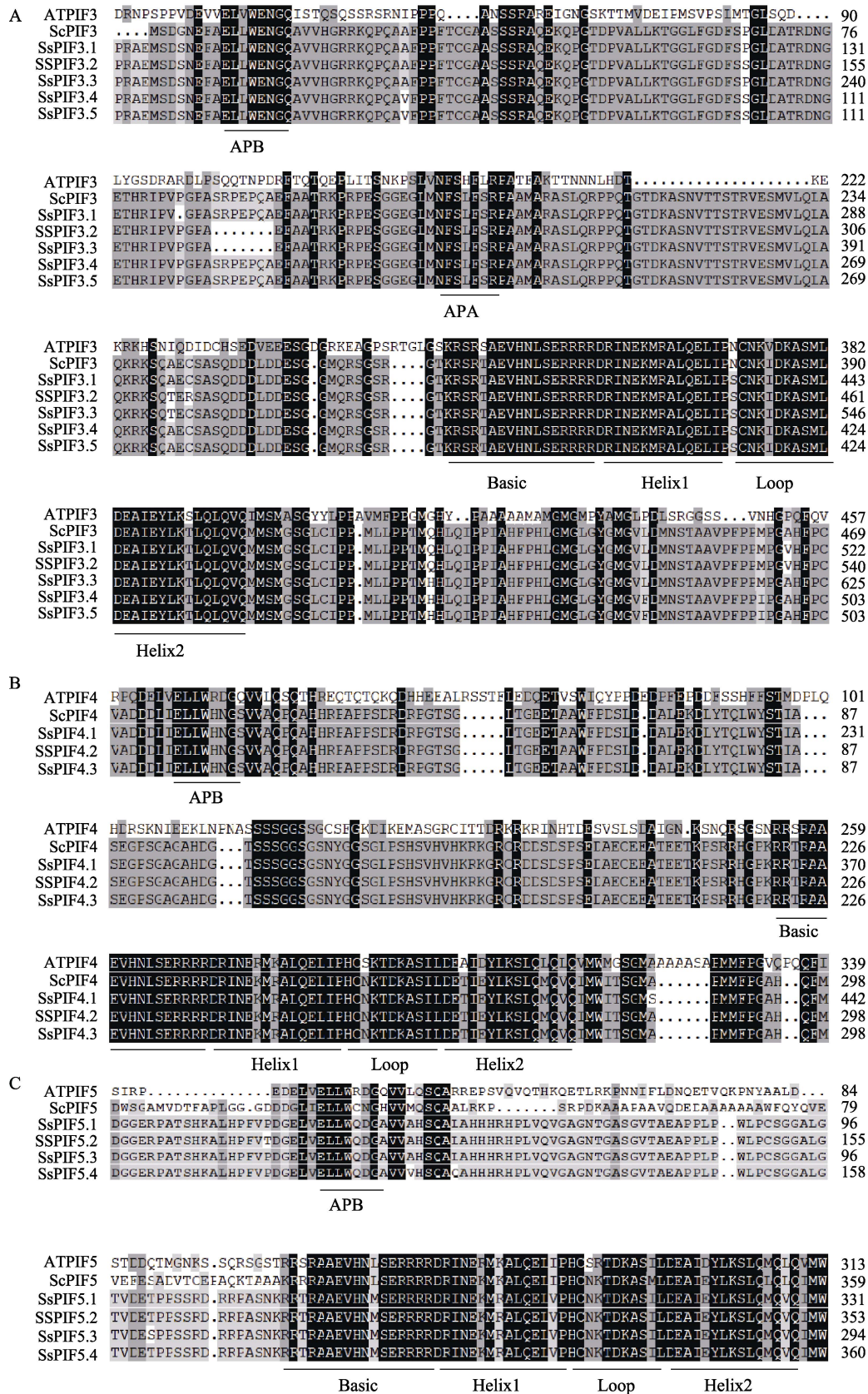
拟南芥、甘蔗品种 SP80-3280 及割手密的 PIF 蛋白多序列比对结果 (图 3) 显示, 所有 SsPIF 成员的 C 端均具有 bHLH 保守结构域, N 端则均

具有 APB 保守结构域。SsPIF3 除含有 APB 结构域外, 还含有其特有的 APA 结构域, 该结构域既能够与 phyA 相结合, 也能够与 phyB 相结合发挥功能。

为深入分析割手密 *PIF* 基因的结构特征, 对其编码序列 (CDS) 进行系统分析, 结果显示, *SsPIF* 基因由多个外显子和内含子组成, 结构相对复杂, 且外显子和内含子长度分布极不均匀 (图 4A)。推测 *SsPIF* 基因的核心保守结构域 (如 bHLH 结构域), 可能对应部分较长或较集中的外显子区域, 这与已研究的关于 PIF 类转录因子功能域分布相一致。保守基序分析结果显示, SsPIF 家族成员中共有 12 类保守基序 (图 4B)。对其在各蛋白中的分布特征进行比对后发现, motif 1、motif 2、motif 4 以及 motif 8 在所有 SsPIF 蛋白中均有出现, 推测其可能为该家族转录因子的核心保守基序, 其中, motif 2 对应 APB 结构域, motif 4 对应 bHLH 结构域。该结果表明割手密 SsPIF 基因家族保守基序的保守性强。

2.4 SsPIFs 家族染色体定位

染色体定位分析显示, 12 个 *SsPIF* 基因不均匀分布于割手密的 10 条染色体上, Chr3A 和 Chr2D 染色体各有 2 个 *SsPIF* 基因, 其余 8 条染色体均有 1 个 *SsPIF* 基因 (图 5)。



A: PIF3 成员结构域; B: PIF4 成员结构域; C: PIF5 成员结构域。

A: PIF3 member domains; B: PIF4 member domains; C: PIF5 member domains.

图 3 拟南芥、甘蔗 SP80-3280 和割手密的 PIF 氨基酸多序列比对

Fig. 3 Multiple sequence alignment of PIF amino acids in *A. thaliana*, *Sugarcane* (SP80-3280) and *S. spontaneum*

2.5 SsPIF 家族基因共线性分析

割手密物种内共线性分析显示, SsPIF 基因家族在进化过程中发生了较多的基因复制, 12 个 SsPIF 基因存在 12 对共线性基因对 (图 6)。割手密与单子叶植物水稻的共线性分析结果显示, 水稻与割手密的 PIF 基因形成了 14 对共线性基因对, 说明割手密与水稻之间存在较高的关联性,

割手密与水稻在系统发育上具有一定的亲缘关系, 反映出单子叶禾本科植物基因组演化过程中具有一定的保守性 (图 7)。

2.6 SsPIF 基因家族启动子区顺式作用元件分析

本研究通过对 SsPIF 基因上游 2000 bp 的启动子序列进行顺式作用元件分析, 以预测 SsPIF 家族的潜在功能。由图 8 可知, SsPIF 家族基因的

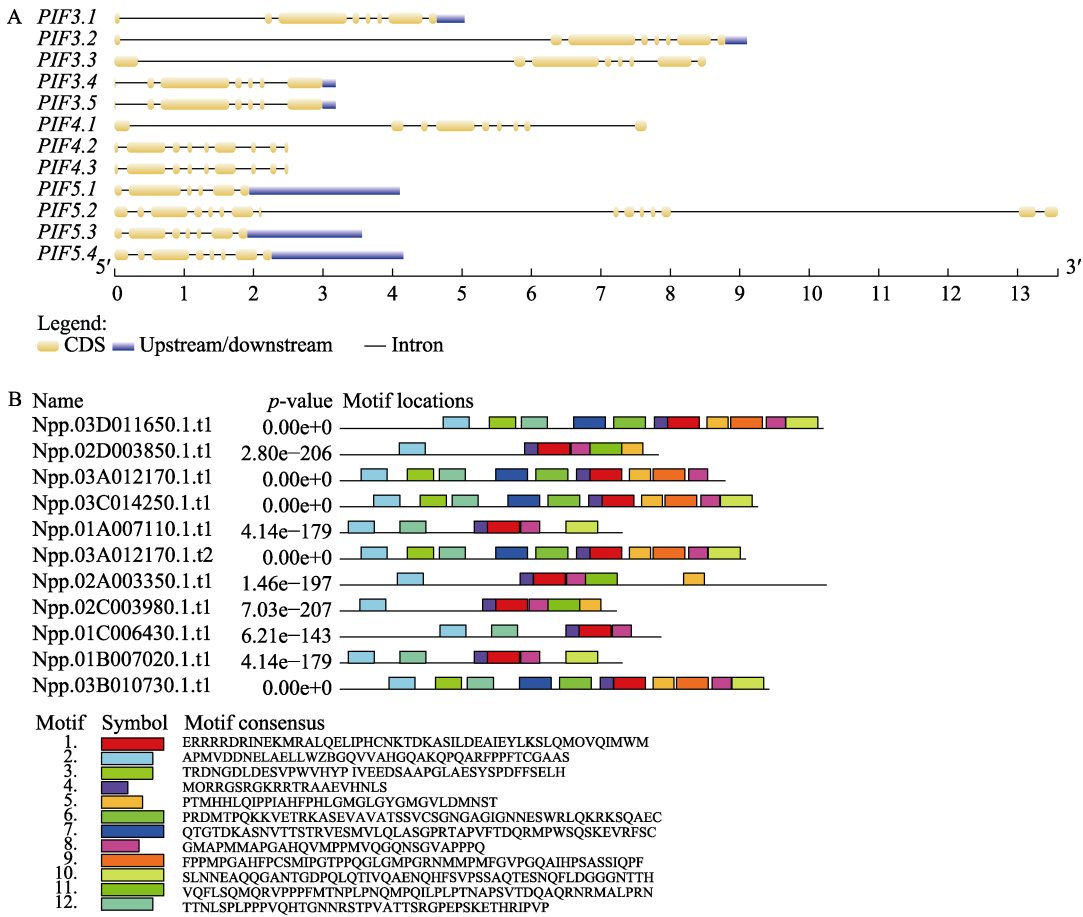


图 4 SsPIF 基因结构 (A) 及其蛋白保守基序 (B)
Fig. 4 SsPIF gene structure (A) and protein conserved motif (B)

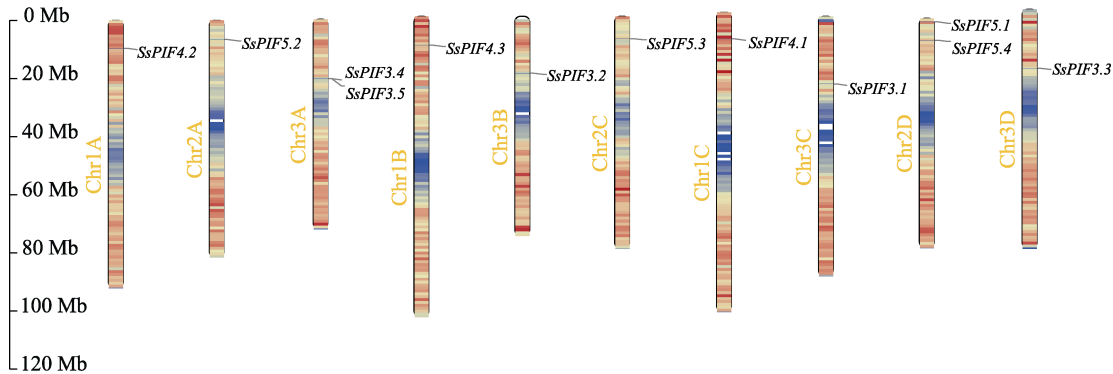


图 5 SsPIF 家族成员染色体定位
Fig. 5 Chromosomal localization of SsPIF family members

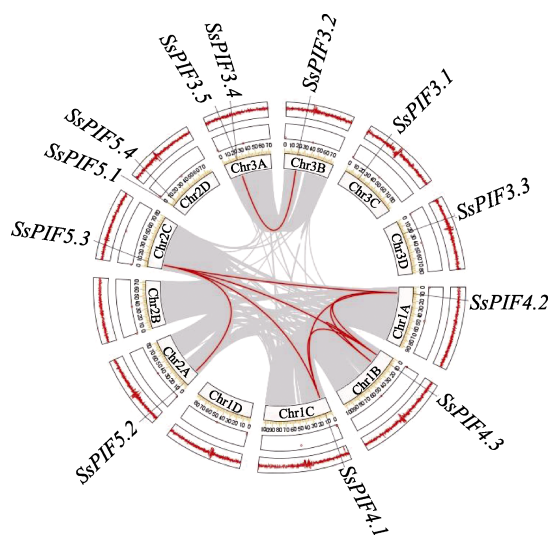


图 6 物种内 SsPIF 家族基因的共线性分析
Fig. 6 Collinearity analysis of SsPIF family genes within species

启动子含有多种作用元件，不同成员之间所含有的作用元件的数量和种类也不同。SsPIF 成员均含有光响应作用元件且存在茉莉酸甲酯 (MeJA)、脱落酸 (ABA)、生长素 (IAA)、水杨酸 (SA) 及赤霉素 (GA) 等激素响应作用元件。除光响应作用元件及激素响应元件外，SsPIF 成员还具有植物生长发育和逆境胁迫响应相关的作用元件。部分 SsPIF 基因 (如 SsPIF5.4、SsPIF5.3 和 SsPIF3.3 等) 的启动子区域含有低温响应的启动子区域，表明这些基因可能在割手密的生长发育过程中发挥调控作用。

2.7 SsPIF 基因在不同组织中的表达模式分析

SsPIF 基因在割手密的根、茎和叶等组织部位中的表达模式分析结果显示，SsPIF 基因在割手密的不同组织中均有表达，但其表达水平存在显著差异 (图 9)。SsPIF3.3 在茎和叶中均表现出较高的表达，尤其在叶中的表达最为显著，其表达量为 10.59；SsPIF4.3 也主要在茎和叶中表达，且在叶中表达较高，其表达量为 6.73。SsPIF5.3 在叶中的表达显著高于其他组织，其表达量为 7.94；大多数 SsPIFs 在根中表达量均较低。

2.8 SsPIF 基因在不同激素处理下表达模式分析

为了探究割手密 SsPIF 基因在激素胁迫下的响应机制，结合 SsPIFs 启动子顺式作用元件分析结果，利用 qRT-PCR 方法检测其在 IAA、MeJA 和 GA 等激素处理下的表达模式 (图 10)。MeJA 处理后，SsPIF 基因的表达量均呈上调趋势，其中 SsPIF4.1、SsPIF4.3 和 SsPIF5.4 的表达量在 1 h 时显著提高，直至 12 h 时，其表达量仍均处于较高水平。SsPIF4.2 和 SsPIF5.3 的表达水平在 1、5 h 阶段显著上调，随后略有下调。其余基因表达水平的上升幅度较为平缓。IAA 处理后，SsPIF 基因的表达量均呈现缓慢上调趋势，SsPIF3.4、SsPIF4.2、SsPIF4.3 在处理 12 h 后的表达量达到显著水平。GA 处理后，SsPIF 基因的表达水平整体呈下调趋势，其中，SsPIF3.1 的表达量在 1 h 时显著下降，在 5、12 h 时略微恢复，但其表达

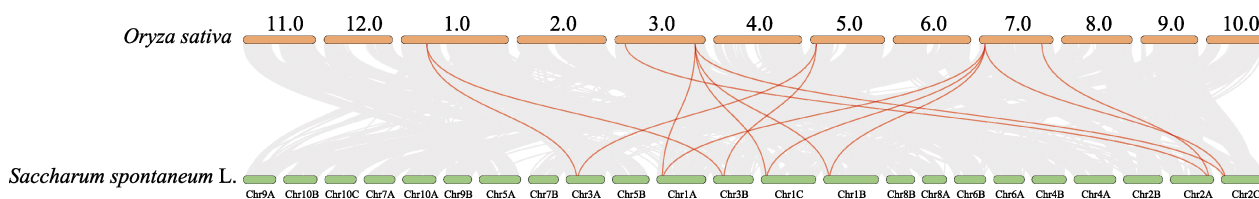


图 7 水稻与割手密的 PIF 基因共线性分析
Fig. 7 Collinearity analysis of PIF genes between *O. sativa* and *S. spontaneum* L.

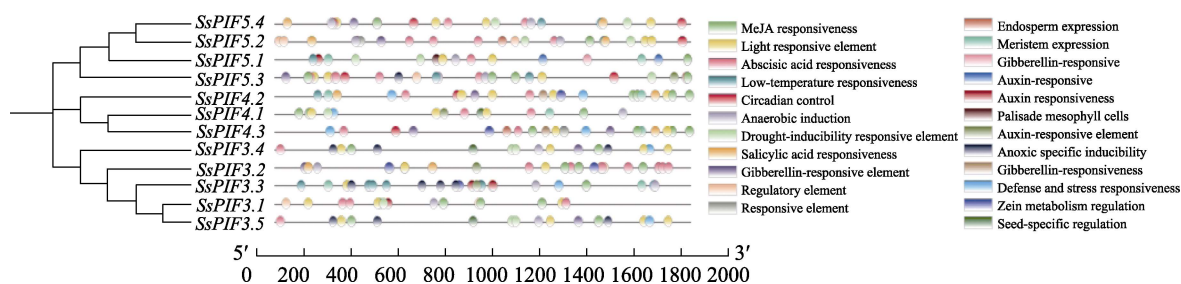


图 8 启动子顺式作用元件分析
Fig. 8 Analysis of cis-acting elements in promoter region

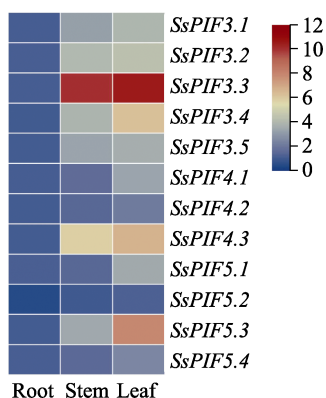


图 9 *SsPIF* 基因在不同组织中的表达分析

Fig. 9 Expression analysis of *SsPIF* genes in different tissues

量还是低于处理前。部分 *SsPIF* 基因(如 *SsPIF4.1*、*SsPIF4.2*、*SsPIF4.3*、*SsPIF3.4*) 在 GA 处理后, 其表达量在 1 h 先上调, 随后再下调, 在 12 h 时

显著低于处理前。

3 讨论

光敏色素作用因子 (PIFs) 是植物重要的转录因子之一, 是植物信号通路的核心枢纽^[19]。本研究从割手密基因组中鉴定到 12 个 *SsPIF* 家族成员, 这些成员在氨基酸大小、相对分子量和不稳定性系数等方面表现出显著差异, 推测 *SsPIF* 家族的不同成员可能在应对不同环境时发挥的功能不同。12 个 *SsPIF* 的亚细胞定位预测结果一致, 均定位于细胞核中, 表明其可能作为核定位转录因子发挥功能。赵金栋等^[20]研究发现黄瓜 (*Cucumis sativus*) 的 6 个 *CsPIF* 全部定位于细胞核, 李小芳等^[21]发现龙眼 (*Dimocarpus longan* Lour.) 的 8 个 *DlPIF* 家族成员同样都定位于细胞核, 与本研究结果一致。

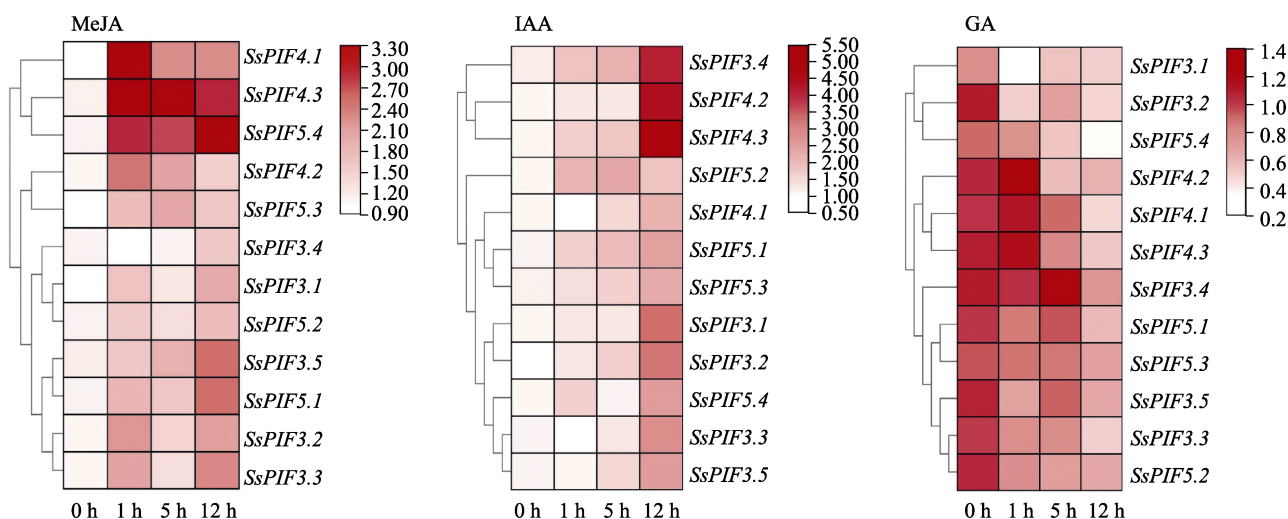


图 10 *SsPIF* 基因在不同激素处理下的表达模式

Fig. 10 Expression patterns of *SsPIF* genes under different hormone treatments

本研究发现, 大部分 *SsPIF* 基因在割手密不同组织中均有一定程度的表达, 且同一基因在不同组织中的表达量有明显差异, 这种组织特异性表明不同 *SsPIF* 基因在甘蔗生长发育过程发挥不同的作用。*SsPIF3.3*、*SsPIF4.3* 和 *SsPIF5.3* 在叶和茎中表达量较高, 在根中表达较低。ZHENG 等^[22]在苹果 (*Malus domestica*) 中鉴定出 7 个 *MdPIF* 家族成员, *MdPIF* 基因均在叶片中具有较高的表达水平。班秋艳等^[23]分析茶树 (*Camellia sinensis*) *CsPIF3a* 在不同组织的中表达量, 发现 *CsPIF3a* 在老叶和茎中的表达量最高, 在根中的表达量最低。这些结果表明, *PIF* 基因在植物的叶片中的

表达量较高, 这可能与叶片是植物的主要光合器官有关。

本研究还发现, *SsPIF* 基因家族的启动子区域含有茉莉酸甲酯、生长素和赤霉素等植物激素响应元件。这些激素作为植物生长发育的重要信号因子, 不仅参与调控植物次生代谢产物的合成途径, 还在植物抗逆防御反应中发挥重要作用^[24]。茉莉酸 (JA) 和茉莉酸甲酯 (MeJA) 是 2 种紧密相关的植物激素。茉莉酸是存在于高等植物体内的内源生长调节物质, 而茉莉酸甲酯则是茉莉酸的甲酯化衍生物, 茉莉酸甲酯可以从植物的气孔进入植物体内, 在细胞质中被酯酶水解为茉莉酸^[25]。

本研究用 MeJA 处理割手密后, *SsPIF* 基因的表达量均呈上调趋势, 推测可能是茉莉酸甲酯在割手密体内被水解为茉莉酸, 导致茉莉酸含量增加, 茉莉酸信号通路中的负调控因子 JAZ (jasmonate-zim-domain protein, JAZ) 蛋白含量上升, 与 DELLA 蛋白互作, 阻碍 DELLA 蛋白与 PIF 结合, 使自由状态的 *SsPIF* 积累^[26], 导致割手密 *SsPIF* 含量增加。

4 结论

本研究在割手密中鉴定出 12 个 *SsPIF* 基因, *SsPIF* 家族成员均为亲水性蛋白且亲水性较强, *SsPIF* 可分为 PIF3、PIF4 和 PIF5 三个亚家族。所有 *SsPIF* 家族成员的 C 端均具有 bHLH 保守结构域, N 端都包含保守的 APB (EL××××GQ) 结构域, 该结构域是 PIF 家族成员与光敏色素互作的重要位点。此外, *SsPIF3* 还含有其特有 APA 结构域, 该结构域既能够与 phyA 相结合, 也能够与 phyB 相结合发挥功能^[27-29]。组织特异性表达分析表明, *SsPIF* 基因在叶中表达量显著高于其他部位。激素响应分析显示, *SsPIF* 基因能响应多种植物激素 (IAA、MeJA 和 GA), 在割手密生长发育过程中发挥重要作用。以上结果为进一步研究 *SsPIF* 基因在割手密生长发育及激素信号调控中的功能和作用机制提供理论依据和数据基础。

参考文献

- [1] JEONG J, CHOI G. Phytochrome-interacting factors have both shared and distinct biological roles[J]. *Molecules and Cells*, 2013, 35(5): 371-380.
- [2] LEE N, CHOI G. Phytochrome-interacting factor from *Arabidopsis* to liverwort[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2017, 35: 54-60.
- [3] 江薇, 肖宁, 陆怡, 戴毅, 吴美琴, 陈建民, 高勇. 植物光敏色素作用因子 PIFs 的生物学功能[J]. *植物生理学报*, 2014, 50(6): 698-706.
JIANG W, XIAO N, LU Y, DAI Y, WU M Q, CHEN J M, GAO Y. Biological functions of phytochrome interacting factors PIFs in plants[J]. *Plant Physiology Journal*, 2014, 50(6): 698-706. (in Chinese)
- [4] PHAM V N, KATHARE P K, HUQ E. Phytochromes and phytochrome interacting factors[J]. *Plant Physiology*, 2018, 176(2): 1025-1038.
- [5] CASTILLON A, SHEN H, HUQ E. Phytochrome interacting factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks[J]. *Trends Plant Science*, 2007, 12: 514-521.
- [6] LEIVAR P, TEPPERMAN J M, MONTE E, CALDERON R H, LIU T L, QUAIL P H. Definition of early transcriptional circuitry involved in light-induced reversal of PIF-imposed repression of photomorphogenesis in young *Arabidopsis* seedlings[J]. *Plant Cell*, 2009, 21(11): 3535-3553.
- [7] HE Z Y, ZHAOT T, YIN Z P, LIU J H, CHENG Y J, XU J. The phytochrome-interacting transcription factor CsPIF8 contributes to cold tolerance in citrus by regulating superoxide dismutase expression[J]. *Plant Science*, 2020, 298: 110580.
- [8] SUN J Q, QI L L, LI Y N, CHU J F, LI C Y. PIF4-mediated activation of *YUCCA8* expression integrates temperature into the auxin pathway in regulating *Arabidopsis* hypocotyl growth[J]. *PLoS Genetics*, 2012, 8(3): e1002594.
- [9] OH E, YAMAGUCHI S, HU J H, YUSUKE J, JUNG B, PAIK I, LEE H, SUN T P, KAMIYA Y, CHOI G. PIL5, a phytochrome-interacting bHLH protein, regulates gibberellin responsiveness by binding directly to the *GAI* and *RGA* promoters in *Arabidopsis* seeds[J]. *Plant Cell*, 2007, 19(4): 1192-1208.
- [10] GOLDEMBERG J, COELHO S T, GUARDABASSI P. The sustainability of ethanol production from sugarcane[J]. *Energy Policy*, 2008, 36: 2086-2097.
- [11] 赵小坤, 毛钧, 字秋艳, 徐超华, 李旭娟, 刘洪博, 陆鑫, 刘新龙. 割手密野生资源抗逆性研究进展[J]. *植物遗传资源学报*, 2020, 21(2): 287-295.
ZHAO X K, MAO J, ZI Q Y, XU C H, LI X J, LIU H B, LU X, LIU X L. Research progress on stress resistance of wild germplasms *Saccharum spontaneum* L.[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2020, 21(2): 287-295. (in Chinese)
- [12] 袁凌云, 张利婷, 蓝天, 陈壮, 朱世东, 侯金锋, 刘同坤, 陈国户, 唐小燕, 汪承刚. 白菜 PIF 基因家族鉴定及表达模式分析[J]. *分子植物育种*, 2023, 21(17): 5611-5619.
YUAN L Y, ZHANG L T, LAN T, CHEN Z, ZHU S D, HOU J F, LIU T K, CHEN G H, TANG X Y, WANG C G. Identification and expression analysis of PIF gene family in Chinese cabbage[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2023, 21(17): 5611-5619. (in Chinese)
- [13] NAKAMURA Y, KATO T, YAMASHINO T, MURAKAMI M, MIZUNO T. Characterization of a set of phytochrome-interacting factor-like bHLH proteins in *Oryza sativa*[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2007, 71(5): 1183-1191.
- [14] WU G X, ZHAO Y P, SHEN R X, WANG B B, XIE Y R, MA X J, ZHENG Z G, WANG H Y. Characterization of maize phytochrome-interacting factors in light signaling and photomorphogenesis[J]. *Plant Physiology*, 2019, 181(2): 1183-1191.

- 789-803.
- [15] ROSADO D, GRAMEGNA G, CRUZ A, LIRA B S, FRESCHI L, DE SETTA N, ROSSI M. Phytochrome-interacting factors (PIFs) in *Solanum lycopersicum*: diversity, evolutionary history and expression profiling during different developmental processes[J]. PLoS One, 2016, 11: e0165929.
- [16] ZHANG K, ZHENG T, ZHU X, JIU S, LIU Z, GUAN L, JIA H, FANG J. Genome-wide identification of PIFs in Grapes (*Vitis vinifera* L.) and their transcriptional analysis under lighting/shading conditions[J]. Genes, 2018, 9(9): 451.
- [17] LEIVAR P, QUAIL P H. PIFs: pivotal components in a cellular signaling hub[J]. Trends in Plant Science, 2011, 16(1): 19-28.
- [18] ZHANG X, WANG D, ZHAO P Z, SUN Y W, FANG R X, YE J. Near-infrared light and PIF4 promote plant antiviral defense by enhancing RNA interference[J]. Plant Communications, 2024, 5(1): 100644.
- [19] MCGINNIS K M, THOMAS S, SOULE J, STRADER L, ZALE J, SUN T, STEBER C. The *Arabidopsis* *SLEEPY1* gene encodes a putative F-Box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase[J]. The Plant Cell, 2003, 15(5): 1120-1130.
- [20] 赵金栋, 廖伟民, 朱楚霞, 刘建萍, 杨有新, 周勇. 黄瓜光敏色素互作因子的鉴定及表达分析[J]. 南方农业学报, 2023, 54(1): 169-178.
- ZHAO J D, LIAO W M, ZHU C X, LIU J P, YANG Y X, ZHOU Y. Identification and expression analysis of phytochrome-interacting factors in cucumber[J]. Journal of Southern Agriculture, 2023, 54(1): 169-178. (in Chinese)
- [21] 李小芳, 林晓艺, 苏炳茜, 张城瑜, 罗彬彬, 陈裕坤, 杜迎刚, 赖钟雄. 龙眼 PIFs 家族全基因组鉴定及其表达分析[J]. 福建农业学报, 2022, 37(8): 1025-1037.
- LI X F, LIN X Y, SU B Q, ZHANG C Y, LUO B B, CHEN Y K, DU Y G, LA Z X. Genome-wide identification and expressions of PIF family in longan[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2022, 37(8): 1025-1037. (in Chinese)
- [22] ZHENG P F, WANG X, YANG Y Y, YOU C X, ZHANG Z L, HAO Y J. Identification of phytochrome-interacting factor family members and functional analysis of *MdPIF4* in *Malus domestica*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(19): e7350.
- [23] 班秋艳, 赵鑫月, 迟文静, 黎俊生, 王琼, 夏瑶, 梁丽云, 贺巍, 李叶云, 赵广山. 茶树光敏色素互作因子 *CsPIF3a* 的克隆及其与光温逆境的响应[J]. 生物技术通报, 2025, 41(4): 256-265.
- BAN Q Y, ZHAO X Y, CHI W J, LI J S, WANG Q, XIA Y, LIANG L Y, HE W, LI Y Y, ZHAO G S. Cloning of phytochrome-interaction factor *CsPIF3a* and its response to light and temperature stress in *Camellia sinensis*[J]. Biotechnology Bulletin, 2025, 41(4): 256-265. (in Chinese)
- [24] YANG D L, YAO J, MEI C S, TONG X H, ZENG L J, LI Q, XIAO L T, SUN T P, LI J, DENG X W, LEE C M, THOMASHOW M F, YANG Y, HE Z, HE S Y. Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade[J]. Plant Biology, 2012, 109(19): 1192-1200.
- [25] SEO H S, SONG J T, CHEONG J J, LEE Y H, LEE Y W, HWANG I, LEE J S, CHOI Y D. Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 2001, 98(8): 4788-4793.
- [26] HOU X, LEE L Y, XIA K, YAN Y, YU H. DELLAs modulate jasmonate signaling via competitive binding to JAZs[J]. Developmental Cell, 2010, 19(6): 884-894.
- [27] SAUD S, SHI Z J, XIONG L B, DANISH S, DATTA R, AHMAD I, FAHAD S, BANOUT J. Recognizing the basics of phytochrome-interacting factors in plants for abiotic stress tolerance[J]. Plant Stress, 2022, 3: 100050.
- [28] NI M, TEPPERMAN J M, QUAIL P H. Binding of phytochrome B to its nuclear signalling partner PIF3 is reversibly induced by light[J]. Nature Plant, 1999, 400(6746): 781-784.
- [29] ZHU Y, TEPPERMAN J M, FAIRCHILD C D, QUAIL P H. Phytochrome B binds with greater apparent affinity than phytochrome A to the basic helix-loop-helix factor PIF3 in a reaction requiring the PAS domain of PIF3[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 2000, 97(24): 13419-13424.