

实验技术与方法

DOI:10.14188/j.ajsh.20251224001

巨桉 *PIF* 基因家族的鉴定及表达模式分析郑宁宇^{1,2}, 景上玲^{1,2}, 刘思雯^{1,2}, 麻佳思², 安丽君², 李慧玲^{1,2*}

(1. 华南农业大学 广东省森林植物种质创新与利用重点实验室, 广东 广州 510642;

2. 华南农业大学 林学与风景园林学院, 广东 广州 510642)

摘要: 光敏色素作用因子(phytochrome interacting factors, PIFs)是 *bHLH* 家族中的关键转录因子。目前, *PIF* 基因已在拟南芥、玉米、油菜等植物中得到了广泛的研究, 已证实其在植物生长发育、光反应及逆境响应过程中具有重要作用。然而, 巨桉 (*Eucalyptus grandis*) 中 *PIF* 基因家族成员的系统鉴定与分析尚未报道。对桃金娘科速生树种巨桉 *PIF* 家族基因的特征和进化进行了研究, 从巨桉中鉴定出 10 个巨桉 *PIF* 基因 (*EgPIF1*–*EgPIF10*), 编码的氨基酸数量为 405~660 aa, 分子质量范围为 44.6~70.0 kDa, 等电点(pI)为 5.41~8.73; 染色体定位分析显示, *EgPIF* 不均匀地分布在 4 条染色体上。多序列比对结果表明, *EgPIF* 均存在 *bHLH* 保守结构域; 启动子区域分析表明 *EgPIF* 基因含有光响应元件。分析了 *EgPIF* 基因在茉莉酸甲酯、氯化钠和水杨酸处理下的表达模式, 结果显示, *EgPIF1-3/5* 在不同的处理下一直表现出较高的表达水平, 表明其在应对各种逆境中发挥重要作用。上述研究结果可为进一步探究 *EgPIF* 基因家族成员在巨桉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: 巨桉; *EgPIF* 基因家族; 生物信息学; 全基因组鉴定

中图分类号: S792.39

文献标志码: A

文章编号: 2096-3491(2026)03-0314-10

Identification and expression pattern analysis of the *PIF* gene family in *Eucalyptus grandis*ZHENG Ningyu^{1,2}, JING Shangling^{1,2}, LIU Siwen^{1,2}, MA Jiasi², AN Lijun², LI Huiling^{1,2*}

(1. Guangdong Key Laboratory for Innovative Development and Utilization of Forest Plant Germplasm, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China; 2. College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China)

Abstract: Phytochrome-interacting factors (PIFs) are key transcription factors belonging to the *bHLH* family. Currently, *PIF* genes have been extensively studied in plants such as *Arabidopsis thaliana*, maize (*Zea mays* L.), and rapeseed (*Brassica napus* L.), and their crucial roles in plant growth and development, photoresponse, and stress adaptation have been well established. However, systematic identification and analysis of *PIF* gene family members in *Eucalyptus grandis* have not yet been reported. This study investigated the characteristics and evolution of the *PIF* gene family in *E. grandis*, a fast-growing species of Myrtaceae family. A total of 10 *E. grandis* *PIF* genes (*EgPIF1*–*EgPIF10*) were identified, encoding proteins ranging from 405 to 660 amino acids in length, with molecular weights between 44.6 and 70.0 kDa and isoelectric points (pI) ranging from 5.41 to 8.73. Chromosomal localization analysis revealed that *EgPIFs* are unevenly distributed across four chromosomes. Multiple sequence alignment indicated that all *EgPIFs* contain the con-

收稿日期: 2025-12-24 修回日期: 2026-01-22 接受日期: 2026-06-15

作者简介: 郑宁宇(2001-), 女, 硕士生, 研究方向为林学, E-mail: zhengningyu423@163.com

* 通信作者: 李慧玲(1988-), 女, 副教授, 研究方向为林学, E-mail: lihl@scau.edu.cn

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金(2024A1515011209); 广州市科技计划项目(202201011282)

引用格式: 郑宁宇, 景上玲, 刘思雯, 等. 巨桉 *PIF* 基因家族的鉴定及表达模式分析[J]. 生物资源, 2026, 48(3): 314-323.Zheng N Y, Jing S L, Liu S W, et al. Identification and expression pattern analysis of the *PIF* gene family in *Eucalyptus grandis* [J].

Biotic Resources, 2026, 48(3): 314-323.

served bHLH domain. Promoter region analysis demonstrated that *EgPIF* genes contain light-responsive cis-elements. Expression patterns of *EgPIFs* under methyl jasmonate (MeJA), sodium chloride (NaCl), and salicylic acid (SA) treatments were analyzed. The results showed that *EgPIF1*, *EgPIF2*, *EgPIF3*, and *EgPIF5* consistently exhibited relatively high expression levels under different treatments, suggesting their important roles in responding to various stresses. These findings lay a foundation for further investigation into the functions of *EgPIF* gene family members in regulating growth and development and signal transduction pathways in *E. grandis*.

Key words: *Eucalyptus grandis*; *EgPIF* gene family; bioinformatics; genome-wide identification

0 引言

光合作用对植物的生长发育起重要作用。光作为重要的环境信号,以错综复杂的方式调控植物多项生理功能,包括信号转导和激素调节^[1]。大量研究表明,植物可以通过多样化的光受体捕捉并整合光信号,实时监测光合产物的时空分布动态,从而精准协调源-库关系与能量分配^[2]。在形态建成层面,植物分化出光形态发生和暗形态发生^[3],二者均由植物内在遗传模块与外部环境信号的相互作用共同调控^[4]。转录因子是植物基因表达调控的核心,转录因子家族成员的系统鉴定是解析基因调控网络、阐明植物对内外源信号响应分子机制的关键,更是挖掘功能基因、解析性状调控规律的重要基础,对深入揭示植物生长发育与逆境适应的分子机制具有重要的理论与实践价值。

光敏色素相互作用因子(phytochrome interacting factors, *PIF*)是 *bHLH* 转录因子家族中的重要亚家族成员^[5]。作为植物生长发育调控中的关键因子,*PIF* 不仅能显著影响植物生长发育进程,协调各类生理反应,而且在光感受器调控的光介导响应中扮演核心角色^[6]。此外,*PIF* 还广泛参与其他基因家族的协同互作。其中,*PIF* 与 *SPL* (SQUAMOSA-promoter binding protein-like) 基因家族的互作尤为重要:二者在抑制植物分蘖与分枝过程中协同发挥关键作用,共同调控植物的生长发育模式^[7]。

在 *PIF* 基因家族成员的功能机制研究中,已有证据表明, *PIL1* (*PIF3-like 1*) 与 *PIF1*、*PIF3*、*PIF4*、*PIF5* 发生相互作用,进而抑制 *PIF* 直接靶基因的转录过程,形成 *PIF* 家族内部的调控网络^[8]。在远红光响应中,*PIF3* 具有特殊的调控作用,其通过光敏色素-GAL4-DNA 结合域融合蛋白与 *PIF3*-GAL4-激活域融合蛋白的协同作用实现。当植株受到红光照射时,两类融合蛋白互作诱导含 Gal4 DNA 结合位点的启动子表达,从而启动下游光响应通路^[9]。此外,在昼夜循环周期中,*PIF3* 的活性还受光感受器的快速且可逆的调节,以适应环境光信号的动态变化^[10]。同时,*PIF3* 也是 CBFs-*PIF3*-phyB 通路中

的关键调控组件,参与调控植物对低温胁迫的响应,提高植株的抗寒性^[11]。作为光信号和温度信号的核心调节因子,*PIF4* 协同处理这两种信号,调控植物暗形态建成、光形态建成和热形态建成^[12]。已有研究表明,*PIF4* 在保卫细胞(GCPIF4)中过表达可以显著降低植物蒸腾作用,进而逆转 *pir4* 突变体的高蒸腾表型^[13]。除此之外,*PIF4* 还调节植物生长发育进程^[14],并在植物适应逆境胁迫中发挥关键作用^[15]。在 *PIF* 基因家族成员中,*PIF4* 和 *PIF5* 共同参与对光信号的精确控制,通过协同作用促进光诱导的形态发生过程^[16];而 *PIF6* 则在种子发育阶段呈现高丰度表达特征^[17]。

巨桉(*Eucalyptus grandis*)隶属于桃金娘科桉属^[18],其特点是生长迅速、产量高、有显著的药用价值和木材纤维价值,对经济景观具有重大贡献^[19]。对林木中关键转录因子家族进行全基因组鉴定,是挖掘物种特异调控基因,解析其生长发育与抗逆性分子调控机制的重要途径,更是实现林木定向遗传改良以及提升其产量与抗逆性能的重要基础。*PIF* 基因家族在植物生长发育调控、激素信号转导和逆境胁迫响应等方面发挥核心作用,且该家族已在拟南芥、烟草、玉米等模式植物中完成鉴定。目前,巨桉 *EgPIF* 基因家族的基因组鉴定、表达模式分析及其作用机理仍未见报道。本研究基于巨桉基因组,对 *EgPIF* 基因家族进行生物信息学分析,包括 *EgPIF* 基因家族成员的鉴定、理化性质分析、染色体定位、保守基序分析、系统进化树、蛋白质结构预测和启动子顺式作用元件分析,同时,分析不同处理下 *EgPIFs* 基因的表达模式。本研究成果为深入解析 *EgPIFs* 在巨桉生长发育和逆境响应中的生物学功能奠定基础,也为巨桉分子育种提供潜在的基因靶点和理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本试验所使用的植物材料是巨桉无性系 GL1。

1.2 实验方法

1.2.1 *EgPIF* 基因家族成员的鉴定

基于已报道的拟南芥 PIF 家族鉴定结果,从拟南芥数据库 TAIR(<http://www.arabidopsis.org/>)下载拟南芥 AtPIFs 蛋白序列,从 phytozome 数据库(<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>)下载巨桉全基因组序列以及 GFF3 和 FASTA 文件。

本研究以拟南芥 PIFs 蛋白序列为参考,利用 TBTools 软件 BLAST 与巨桉基因组进行序列比对,使用基因结构可视化工具排除过长或过短的外显子,确定巨桉 PIF 基因家族的成员及其数量。

1.2.2 *EgPIF* 基因家族成员的理化性质分析

使用 ExPASy 网站(<https://web.expasy.org/>)提供的 ProtParam 工具分析了巨桉 PIF 家族成员的分子量大小、等电点和不稳定系数等理化性质。

1.2.3 *EgPIF* 基因家族成员的系统发育树构建

选择了小立碗藓(*Physcomitrella patens*)、江南卷柏(*Selaginella moellendorffii*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)与巨桉 *EgPIFs* 进行了序列比较和序列相似性分析。使用 TBTools 软件筛选这 4 个物种的同源蛋白质,用最大似然法(ML)构建系统发育树。通过 iTOL(<https://itol.embl.de/>)网站对所得到的进化树进行可视化展示。

1.2.4 *EgPIF* 基因家族成员染色体位置和分布可视化

从巨桉基因组 GFF3 注释文件中提取基因染色体定位信息及染色体物理长度数据,使用 Tbtools 软件对 *EgPIFs* 基因在巨桉染色体上的分布进行定位分析并可视化展示。

1.2.5 *EgPIF* 基因家族成员保守结构域序列及 motif 分析

通过批量检索从 NCBI 中获得了 PIF 基因的保守结构域。使用 MEME 网站分析 *EgPIFs* 蛋白序列的保守基序。使用 TBTools 软件进行可视化。

1.2.6 *EgPIF* 基因家族成员共线性分析

使用 Tbtools 软件中的 one step McscanX 插件,对 *EgPIFs* 基因与拟南芥和青甘杨(*Populus przewalskii* Maxim.) 之间进行共线性分析及可视化。

1.2.7 *EgPIF* 基因家族成员顺式作用元件预测

使用 Tbtools 软件中的 GXF 序列提取 *EgPIF* 家族成员起始密码子(ATG)上游 2 000 bp 作为 *EgPIF* 基因家族成员的启动子序列,然后将序列提交到 PlantCare 网站(<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)预测顺式作用调控元

件,将预测结果导入 Tbtools 软件的 Simple BioSequence Viewer 工具进行可视化。

1.2.8 *EgPIF* 基因家族成员表达模式分析

通过 ePlant(https://bar.utoronto.ca/eplant_eucalyptus/)网站获取巨桉 PIF 家族成员在各组织部位的表达情况,结合 1 月龄的根、茎、叶组织;3 年树龄的器官(幼叶、成熟叶、花)和组织(侧枝、韧皮部);6 年树龄的组织(木质部、韧皮部)的转录组数据,对 *EgPIFs* 基因进行表达模式分析。

在激素和胁迫试验中,激素处理包括在叶片上喷洒 100 $\mu\text{mol/L}$ 水杨酸和茉莉酸甲酯,胁迫处理为使用 200 mmol/L 氯化钠浇灌植株。随后,在处理 0、1、6、24 和 168 h 对处理后的植物材料进行采样。使用 TBTools 软件对水杨酸、茉莉酸甲酯和盐胁迫处理 0、1、6、24 和 168 h 的植物材料进行差异表达分析,并利用 TBTools 热图功能对转录组数据进行对数归一化处理。

1.2.9 *EgPIF* 基因家族成员蛋白结构预测

采用 SOPMA 工具预测二级结构中 α -螺旋与 β -折叠的比例分布,并通过 SWISS-MODEL 在线网站(<https://swissmodel.expasy.org/>)分析 *EgPIFs* 的保守基序,并预测其蛋白三级结构。

2 结果与分析

2.1 *EgPIF* 基因家族成员鉴定及理化性质分析

在本研究中,以拟南芥 8 个 PIF 家族成员(即 *AtPIL1*、*ATPIF1* 和 *AtPIF3~8*)蛋白序列作为源序列^[20-22],通过 BLAST 鉴定,共获得 98 个巨桉候选序列。根据拟南芥 PIF 基因保守结构域和巨桉的基因结构,进一步鉴定了巨桉 PIF 基因,并根据筛选顺序将其命名为 *EgPIF1~10*。

通过 ExPASy 分析 *EgPIFs* 蛋白序列的氨基酸理化性质(表 1)。结果表明,*EgPIFs* 蛋白的氨基酸数量在 405~660 aa;分子质量为 44.6~70.0 kDa;等电点最小值为 5.41(*EgPIF6* 和 *EgPIF7*),最大值为 8.73(*EgPIF8*)。其中 *EgPIF5* 的氨基酸长度为 405,蛋白质相对分子质量为 44.6 kDa,是家族中结构最为精简的成员。*EgPIF3*、*EgPIF8*、*EgPIF9*、*EgPIF10* 的等电点大于 7.0,属于碱性氨基酸;*EgPIF1*、*EgPIF2*、*EgPIF4*、*EgPIF5*、*EgPIF6*、*EgPIF7* 的等电点小于 7.0,属于酸性氨基酸。蛋白不稳定系数在 47.46(*EgPIF6*、*EgPIF7*)~67.85(*EgPIF8*),表明 *EgPIFs* 的稳定性较差。脂肪族氨基酸指数范围在 53.85(*EgPIF9*)~63.32(*EgPIF6*、*EgPIF7*),具有较强的溶解性。*EgPIFs* 的平均亲水系

数为负数,表明蛋白质具有亲水特征。EgPIF1与EgPIF2的理化性质高度一致,EgPIF6与EgPIF7也呈现完全相同的理化特征,这种一致性可能与其在系统进化关系中的亲缘关联性相关,暗示其可能具有相似的生物学功能。

2.2 EgPIF 基因家族成员系统发育树分析

为研究 PIF 的进化特征,对不同植物的 PIF 家族进行了遗传分析,其中包括小立碗藓、江南卷柏、拟南芥和巨桉,共同构建了 PIF 基因家族成员的多物种进化树(图1)。结果显示,PIF 进化树分为4个分支(I~IV)。分支I包括EgPIF1~5和AtPIF5,表现出相近的系统发育和相似的生理特性。分支II由EgPIF8~9、SmPIF1~3和PpPIF1~7组成,涵盖了江南卷柏和小立碗藓的整个PIF基因家族,表明了它们在进化过程中的亲缘关系和极端分化。分支III包括EgPIF6~7/10和AtPIL1、AtPIF4,表明EgPIF6~7/10可能具有与AtPIL1和AtPIF4类似的功能。分支IV包括AtPIF1/3/6/7/8,表明与桉树PIF基因的亲缘关系较远,进化过程中的交集很小。

2.3 EgPIF 基因家族成员的染色体定位分析

基因定位分析表明,巨桉 PIF 基因家族成员呈现不均匀的染色体分布模式,10个EgPIFs基因分布在4条染色体上(01、02、04、11)(图2)。EgPIF1/2/3/5在01号染色体上共享一个共同的染色体位置,显示出高的基因密度。EgPIF6/7位于02号染色体上的同一位置,具有基因含量较低的特点。整个PIF基因家族都位于各自染色体的下段。

2.4 EgPIF 基因家族成员的保守基序和保守结构域分析

使用MEME在线网站对10个EgPIF基因进行

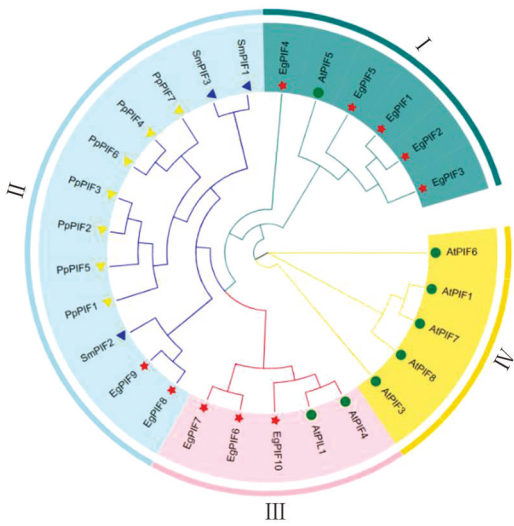


图1 PIF 基因家族多物种进化树

Figure 1 Multi-species evolutionary tree of PIF genes family

注:不同的颜色代表不同的分支。绿色为分支I,蓝色为分支II,粉色为分支III,黄色为分支IV。不同颜色的符号代表不同的物种PIF基因,绿色圆圈为拟南芥,红星为巨桉,黄色三角形为小立碗藓,蓝色三角形为江南卷柏。

Note: Different colors represent different subclasses. The I subclass is green, II subclass is blue, III subclass is pink, IV subclass is yellow. The symbols in different colors represent PIFs from different species: green circles represent *A. thaliana*, red stars represent *E. grandis*, yellow triangles represent *P. grandis*, and blue triangles represent *S. moellendorffii*.

保守基序分析,将获得的保守基序记为Motif1~Motif10(图3),发现Motif1与Motif3在所有EgPIF基因中均有分布,据此推测这两个基序是EgPIF基因家族的核心保守基序,EgPIF1、EgPIF2和EgPIF3包含全部10个Motif,保守元件完整性

表1 巨桉PIF基因家族成员理化性质

Table 1 Physicochemical properties of PIF gene family members in *E. grandis*

基因名称	基因ID	氨基酸长度	相对分子质量/kDa	等电点	不稳定系数	脂肪族氨基酸系数	平均亲水系数
EgPIF1	Eucgr.A02043.3.v2.0	533	58.4	6.50	62.41	54.33	-0.709
EgPIF2	Eucgr.A02043.2.v2.0	533	58.4	6.50	62.41	54.33	-0.709
EgPIF3	Eucgr.A02043.1.v2.0	568	62.3	7.66	59.32	58.89	-0.641
EgPIF4	Eucgr.K03592.1.v2.0	533	58.0	6.32	66.32	58.44	-0.675
EgPIF5	Eucgr.A02043.4.v2.0	405	44.6	6.41	59.11	56.10	-0.849
EgPIF6	Eucgr.B01825.2.v2.0	660	70.0	5.41	47.46	63.32	-0.416
EgPIF7	Eucgr.B01825.1.v2.0	660	70.0	5.41	47.46	63.32	-0.416
EgPIF8	Eucgr.K02496.1.v2.0	429	47.3	8.73	67.85	62.82	-0.778
EgPIF9	Eucgr.D02499.1.v2.0	515	53.3	8.33	52.99	53.84	-0.391
EgPIF10	Eucgr.A00998.1.v2.0	541	59.2	7.59	52.22	61.72	-0.702

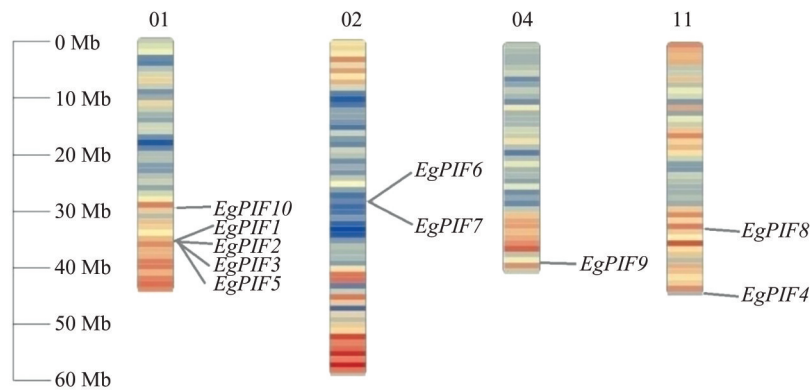


图2 *EgPIF* 基因家族成员染色体定位

Figure 2 Chromosomal locations of *EgPIF* gene family members

注:左侧刻度为染色体长度。染色体数目由每个染色体插图顶部的黑色数字表示。*EgPIF* 基因的位置在染色体上以黑色文本突出显示。从蓝色到红色的颜色渐变表示相对基因密度,较红的颜色表示 *EgPIF* 基因密度较高的区域。

Note: The scale on the left indicates chromosome length. Chromosome numbers are shown by the black numerals at the top of each chromosome illustration. The positions of *EgPIF* genes are highlighted in black text on the chromosomes. The color gradient from blue to red represents the relative gene density, with redder colors indicating regions of higher *EgPIF* gene density.

最高。

经 TBTools 验证,10 个 *EgPIF* 蛋白均含有 bHLH 保守结构域。系统发育分析表明,分属两个不同分支的基因亚群(*EgPIF*1~3/5 与 *EgPIF*6~7)具有密切的进化关系,且二者在基序组成模式与外显子长度上表现出显著相似性,提示这两个亚群可能具有相似的生物学功能。此外,UTR 分析显示,所有 *EgPIFs* 成员均含有 3'UTR 区,仅 *EgPIF*3 含有 1 个 UTR,其余 9 个 *EgPIF* 基因均完整包含 2 个 UTR 区域,这一差异可能与 *EgPIF*3 的基因表达调控特性相关。

2.5 *EgPIF* 基因家族成员的共线性分析

共线性分析可以揭示物种间的亲缘关系,存在于共线性区域的基因越多,物种间的亲缘关系就越近。在拟南芥、巨桉、青甘杨间的共线性关系中(图4),巨桉 01 号染色体和 04 号染色体上的基因与拟南芥中的 4 个基因形成 4 对同源基因;而巨桉 01 号染色体、02 号染色体和 04 号染色体上的基因与青甘杨上的 6 个基因共形成了 6 对同源基因,即巨桉和青甘杨之间存在 6 对共线性关系,由此说明巨桉和青甘杨之间的共线性关系更为紧密,且这些存在同源关系的基因之间可能在 *PIF* 基因家族的进化中发

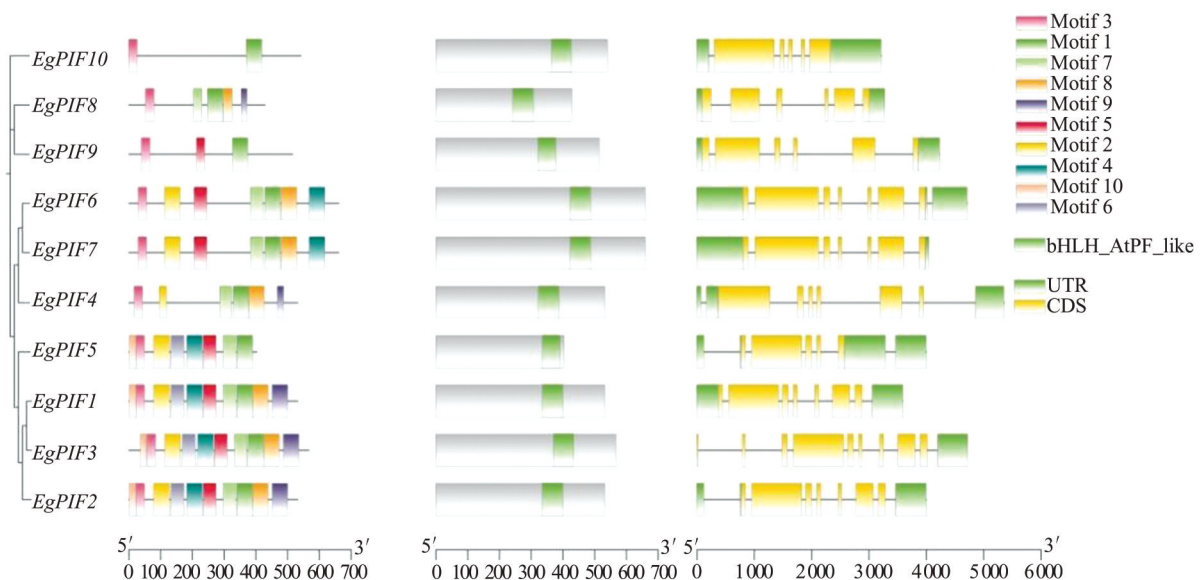


图3 *EgPIF* 基因家族成员的保守基序和基因结构分析

Figure 3 Conserved motifs and gene structure analysis of *EgPIF* gene family members

挥相似的重要作用。位于巨桉 11 号染色体的 *EgPIF8* 和 *EgPIF4* 在拟南芥和青甘杨中均未查找到共线性基因,其可能存在物种特异性的功能分化。

2.6 *EgPIF* 基因家族成员顺式作用元件分析

使用 PlantCARE 对 10 个 *EgPIF* 基因上游 2 000 bp 的启动子区域的顺式作用元件进行系统分析,结果显示(图 5),大多数 *EgPIF* 基因启动子区域含有与光响应相关的顺式作用元件,构成了光响应模块的一部分。此外,*EgPIF* 基因启动子区域包含脱落酸、生长素和水杨酸等激素响应作用元件,以及参与生长发育、生长组织表达和防御应激相关的顺式作用元件。

值得注意的是,*EgPIF6/7* 具有相同的功能元件。*EgPIF1~3* 和 *EgPIF5* 虽关系密切,但 *EgPIF3* 具有不同的顺式作用元件,表明顺式作用元件和进化关系之间存在潜在的相关性,*EgPIF3* 的差异可能

是由进化过程中基因结构的变化引起的。

2.7 *EgPIF* 基因家族成员的组织差异表达

本研究深入探讨了巨桉 *PIF* 基因家族在不同发育阶段的组织表达特异性,使用 ePlant 网站选取了巨桉 *PIF* 基因家族成员不同组织、不同发育阶段的基因表达数据,见图 6(a)、(b)、(c)。转录组分析显示,1 月龄的巨桉中,*EgPIF1~3/5* 和 *EgPIF6~7* 在叶片和茎中高表达;在 3 年树龄的巨桉中,*EgPIF6~7* 在韧皮部的表达量最高,*EgPIF9/10* 在成熟叶和侧枝中的表达量达到高峰;而在 6 年树龄的巨桉中,*EgPIF4/6/7* 在木质部和韧皮部中的表达水平最高。相反,其余基因的表达水平较低。

这些结果表明,*EgPIFs* 在不同组织中发挥着关键作用,*EgPIF6/7* 在植物的不同部位表现出一致的表达,突显了它们在桉树组织生长和发育中的重要

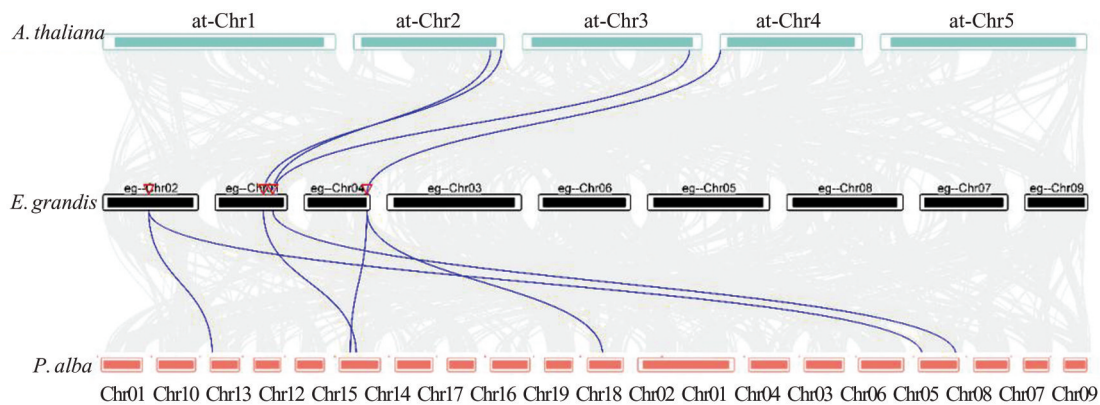


图 4 巨桉与拟南芥、青甘杨 *PIF* 基因的物种间共线性分析

Figure 4 Interspecific collinearity analysis of *PIF* genes between *E. grandis*, *A. thaliana*, and *P. trichocarpa*

注:横条代表每个物种的染色体,顶部是拟南芥(Chr1~Chr5),中间是巨桉(Chr1~Chr9),底部是青甘杨(Chr01~Chr19);共线性关系由连接染色体的蓝色线条描述,表明物种间基因序列的进化保守。

Note: Horizontal bars represent the chromosomes of each species, labeled at the top for *A. thaliana* (Chr1—Chr5), in the middle for *E. grandis* (Chr1—Chr9), and at the bottom for *P. alba* (Chr01—Chr19). Syntenic relationships are depicted by blue lines connecting the chromosomes, indicating evolutionary conservation of gene order among the species.

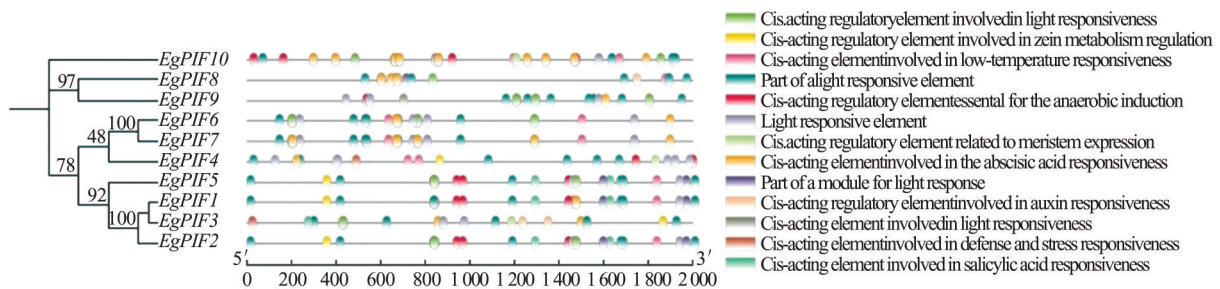


图 5 *EgPIF* 基因家族启动子顺式作用元件的预测

Figure 5 Cis-acting elements analysis in the *PIF* gene family of *E. grandis*

注:不同颜色的方框代表不同的顺式元件,底部的比例代表启动子序列的长度。

Note: Different colored boxes represent different cis-elements and the scale at the bottom represents the length of the promoter sequence.

性作用。其他基因在不同的发育阶段发挥组织特有的作用。

2.8 *EgPIF* 基因家族成员的逆境差异表达

为了更深入地研究巨桉 *PIF* 基因家族的表达动态,并了解其对各种激素的响应,本研究对植物进行了不同的处理,包括茉莉酸甲酯、氯化钠和水杨酸处理,见图 6(d)、(e)、(f)。结果显示,*EgPIF1*~*3/5*在不同的处理下与其他基因相比一直表现出更高的表达水平,表明其主要在应对各种逆境中发挥作用。相反,*EgPIF8/9/10*在不同的处理下均呈现低表达模式,提示该家族基因的转录表达未受这些

逆境相关信号分子或胁迫条件的显著诱导,其可能未参与植株对相应逆境的响应过程。

2.9 *EgPIF* 基因家族成员的蛋白结构预测

为了研究 *EgPIFs* 的蛋白结构,通过 SOPMA 平台预测巨桉 *PIF* 基因家族成员的二级蛋白结构,结果表明,巨桉 *PIF* 家族的蛋白序列主要由 α -螺旋、无规则卷曲和延伸链等结构元素构成(表 2)。 α -螺旋和无规则卷曲占据二级结构的主要部分,约占总体的 99%;其中, α -螺旋占比为 12.42%~21.21%,无规则卷曲占比最大,为 78.55%~86.21%。延伸链占比则较小,为 0.23%~1.66%,

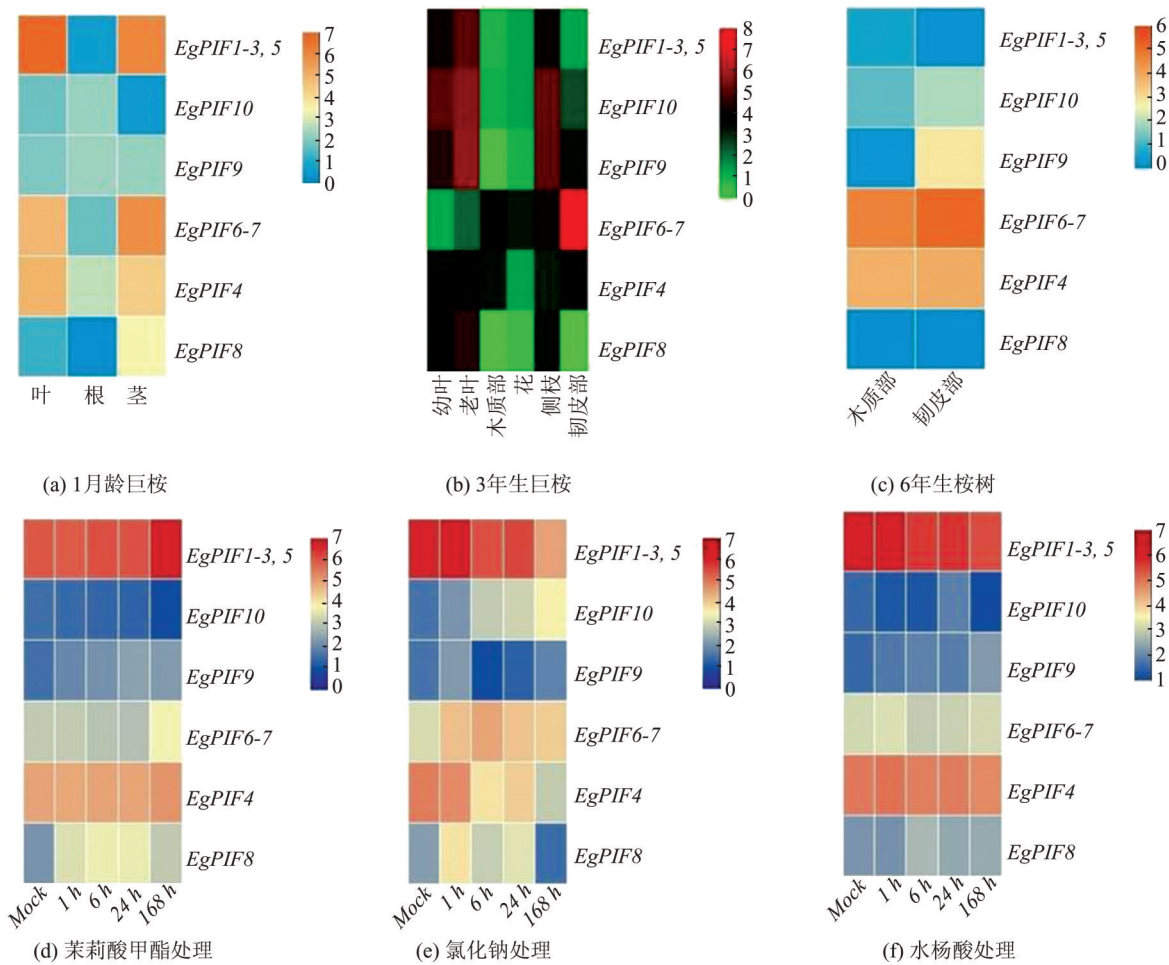


图 6 *EgPIF* 家族基因的表达分析

Figure 6 Expression analysis of *EgPIF* family genes

(a): 1月龄巨桉 *PIF* 基因家族成员在叶、根和茎中的表达; (b): 3年生巨桉 *PIF* 基因家族成员在幼叶 (Young Leaf)、老叶 (Adult Leaf)、木质部 (Xylem)、花 (Flower)、侧枝 (lateral branch) 和韧皮部 (Phloem) 中的表达; (c): 6年生桉树 *PIF* 基因在木质部 (Xylem) 和韧皮部 (Phloem) 中的表达; (d): 茉莉酸甲酯处理中 *PIF* 基因的表达; (e): 氯化钠处理中 *PIF* 基因的表达; (f): 水杨酸处理中 *PIF* 基因的表达

(a): expression of *PIF* gene family members in leaves, roots, and stems of 1-month old *Eucalyptus grandis*; (b): expression of *PIF* gene family members in young leaves, adult leaves, xylem, flowers, lateral branches, and phloem of three-year old *Eucalyptus grandis*; (c): expression of *PIF* genes in xylem and phloem of six-year old *Eucalyptus grandis*; (d): expression of *PIF* genes under methyl jasmonate treatment; (e): expression of *PIF* genes under sodium chloride treatment; (f): expression of *PIF* genes under salicylic acid treatment

无 β -折叠。进一步使用SWISS-MODEL预测10个PIF蛋白的三维结构。结果表明,EgPIF蛋白成员在三维空间折叠上存在差异(图7)。EgPIF4的结构呈现出相对延伸的形态,而EgPIF8则更趋于紧凑;EgPIF1与EgPIF2的结构整体较为相似,这种结构上的多样性可能与它们在巨桉生长发育过程中,响应光信号、调控不同靶基因表达等特定功能的分化密切相关,为后续深入探究各EgPIF蛋白具体的生物学功能提供了结构层面的依据。

表2 巨桉PIF蛋白二级结构预测
Table 2 Secondary structure prediction of *E. grandis* PIF proteins

蛋白名称	α -螺旋/%	延伸链/%	无规则卷曲/%
EgPIF1	13.70	0.75	85.55
EgPIF2	13.70	0.75	85.55
EgPIF3	14.96	1.76	83.27
EgPIF4	14.26	0.94	84.80
EgPIF5	18.77	1.23	80.00
EgPIF6	12.42	1.36	86.21
EgPIF7	12.42	1.36	86.21
EgPIF8	21.21	0.23	78.55
EgPIF9	20.39	0.78	78.83
EgPIF10	12.94	1.66	85.40

3 讨论

本研究借助生物信息学方法,在巨桉中成功鉴定出10个PIF基因。系统发育树显示,EgPIF与*AtPIFs*亲缘关系较近,部分基因存在同源性。*EgPIF1~5*和*AtPIF5*为同源基因。已有研究表明,*AtPIF5*能够通过降低光受体PhyB的丰度,负向调控红光诱导的下胚轴的伸长^[16],同时还可以抑制红光诱导的启动子的活性^[15]。因此,推测*Eg-*

*PIF1~5*也具有类似的功能。此外,在胁迫条件下,*EgPIF1~5*维持了较高的表达水平,这暗示其可能在巨桉抗逆过程中发挥作用。对于*EgPIF6~7/10*,系统发育分析表明它们与*AtPIL1*、*AtPIF4*属于同一亚类,由此推测它们可能具有相似的功能。*AtPIF4*负向调节拟南芥的向光性,直接刺激生长素相关基因的表达,并至少通过两种不同的机制促进开花^[23],同时还是温度调节的关键因子^[24]。*AtPIL1*在拟南芥的稳定性和光形态发生中具有重要作用^[8]。综合这些研究结果,本研究推测*EgPIF6~7/10*也具有这一功能。

综合分析,*EgPIF1~5*、*EgPIF6~7/10*可能具有较高的功能相似性,且存在相互作用的可能性。先前的研究表明,*AtPIF4/5*可调节与生长素生物合成和反应相关基因的表达,从而促进植物生长,它们受CSU6转录和生物活性的负调控,进而促进光抑制下胚轴的伸长,并诱导拟南芥的叶片衰老^[25];同时*AtPIF4/5*至少通过两种方式促进开花:在长日照中诱导FT表达,在短日照中以一种未知的机制作用于FT外^[23]。本研究还发现,*EgPIF6*及*EgPIF7*在韧皮部与木质部中持续高表达,其可能参与巨桉次生生长与物质运输的调控。然而,上述基因在巨桉中的具体作用机制尚未明确,有待进一步解析。此外,本研究主要依赖于生物信息学分析与公共转录组数据,启动子顺式作用元件预测尚未经过实验验证,且缺乏基因功能缺失或过表达、蛋白质互作等分子实验证据。因此,相关功能推断仍需后续实证支持。未来的研究可通过基因编辑等手段对关键*EgPIF*成员进行功能验证,在表型、生理及分子水平系统揭示其在光形态建成、逆境响应与生长发育调控中的作用,从而为巨桉分子育种与遗传改良提供理论基础与基因资源。

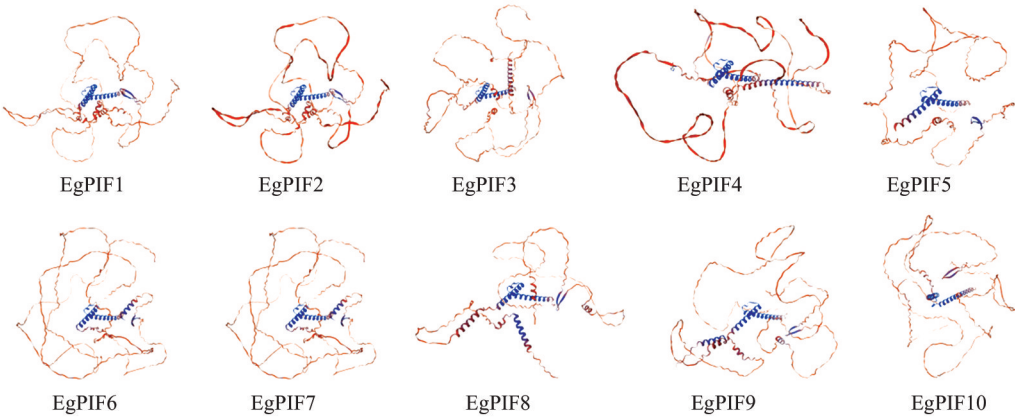


图7 *EgPIF* 基因家族成员蛋白三级结构预测
Figure 7 Tertiary structure prediction of *E. grandis* PIF proteins

4 结 论

本研究通过多维度生物信息学分析,在巨桉基因组中成功鉴定出 10 个巨桉 PIF 基因,并对其进行系统性解析。基因结构、基序和结构域分析表明,该家族具有高度保守性。顺式作用元件分析显示, *EgPIF* 基因启动子区域除含有与光响应相关的顺式作用元件外,还含有激素响应作用元件、参与生长发育、生长组织表达和防御应激相关的顺式作用元件,表明其参与广泛的生物学过程。转录组分析进一步揭示, *EgPIF1~3*、*EgPIF5* 基因存在较高的功能相似性。综上,本研究通过系统性的生物信息学分析,为巨桉 PIF 基因家族的功能验证提供了明确的候选基因与理论依据。

参考文献

- [1] Zheng P F, Wang X, Yang Y Y, et al. Identification of phytochrome-interacting factor family members and functional analysis of MdPIF4 in *Malus domestica* [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21 (19): 7350.
- [2] Jones M A. Interplay of circadian rhythms and light in the regulation of photosynthesis-derived metabolism [M]//Progress in Botany Vol. 79. Cham: Springer International Publishing, 2017: 147-171.
- [3] Xu X S, Paik I, Zhu L, et al. Illuminating progress in phytochrome-mediated light signaling pathways [J]. Trends in Plant Science, 2015, 20(10): 641-650.
- [4] Pashkovskiy P, Kreslavski V, Khudyakova A, et al. Independent responses of photosynthesis and plant morphology to alterations of PIF proteins and light-dependent microRNA contents in *Arabidopsis thaliana pif* mutants grown under lights of different spectral compositions[J]. Cells, 2022, 11(24): 3981.
- [5] Jin J P, Tian F, Yang D C, et al. PlantTFDB 4.0: toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants [J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(D1): D1040-D1045.
- [6] Xiang S Y, Wu S G, Zhang H Y, et al. The PIFs redundantly control plant defense response against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis* [J]. Plants, 2020, 9 (9): 1246.
- [7] Zhang L C, He G H, Li Y P, et al. PIL transcription factors directly interact with SPLs and repress tillering/branching in plants [J]. New Phytologist, 2022, 233 (3): 1414-1425.
- [8] Luo Q, Lian H L, He S B, et al. COP1 and phyB physically interact with PIL1 to regulate its stability and photomorphogenic development in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2014, 26(6): 2441-2456.
- [9] Shimizu-Sato S, Huq E, Tepperman J M, et al. A light-switchable gene promoter system [J]. Nature Biotechnology, 2002, 20(10): 1041-1044.
- [10] 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 Sciences of the United States of America, 2004, 101(46): 16091-16098.
- [11] Jiang B C, Shi Y T, Peng Y, et al. Cold-induced CBF-PIF3 interaction enhances freezing tolerance by stabilizing the phyB thermosensor in *Arabidopsis* [J]. Molecular Plant, 2020, 13(6): 894-906.
- [12] Xu Y, Zhu Z Q. PIF4 and PIF4-interacting proteins: at the nexus of plant light, temperature and hormone signal integrations [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(19): 10304.
- [13] Kelly G, Yaaran A, Gal A, et al. Guard cell activity of PIF4 and HY5 control transpiration [J]. Plant Science, 2023, 328: 111583.
- [14] Holalu S V, Reddy S K, Blackman B K, et al. Phytochrome interacting factors 4 and 5 regulate axillary branching via bud abscisic acid and stem auxin signalling [J]. Plant, Cell & Environment, 2020, 43(9): 2224-2238.
- [15] Liu Z J, Wang Y, Fan K, et al. PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 4 (PIF4) negatively regulates anthocyanin accumulation by inhibiting PAP1 transcription in *Arabidopsis* seedlings [J]. Plant Science, 2021, 303: 110788.
- [16] Lan H X, Heng Y Q, Li J, et al. COP1 SUPPRESSOR 6 represses the PIF4 and PIF5 action to promote light-inhibited hypocotyl growth [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2022, 64(11): 2097-2110.
- [17] Penfield S, Josse E M, Halliday K J. A role for an alternative splice variant of PIF6 in the control of *Arabidopsis* primary seed dormancy [J]. Plant Molecular Biology, 2010, 73(1): 89-95.
- [18] Koursaoui L, Badr S, Ghanmi M, et al. Phytochemical analysis, antioxidant and antimicrobial activity of three *Eucalyptus* species essential oils from the Moroccan Maâmora Forest: *Eucalyptus cladocalyx* F. Muell, *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden and *Eucalyptus botryoides* Sm [J]. Chemical Data Collections, 2023, 48: 101101.
- [19] Elaissi A, Salah K H, Mabrouk S, et al. Antibacterial activity and chemical composition of 20 *Eucalyptus* species' essential oils [J]. Food Chemistry, 2011, 129

- (4): 1427-1434.
- [20] Pham V N, Kathare P K, Huq E. Phytochromes and phytochrome interacting factors[J]. *Plant Physiology*, 2018, 176(2): 1025-1038.
- [21] Favero D S. Mechanisms regulating PIF transcription factor activity at the protein level[J]. *Physiologia Plantarum*, 2020, 169(3): 325-335.
- [22] Hoang Q T N, Han Y J, Kim J I. Plant phytochromes and their phosphorylation[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(14): 3450.
- [23] Thines B C, Youn Y, Duarte M I, et al. The time of day effects of warm temperature on flowering time involve PIF4 and PIF5[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(4): 1141-1151.
- [24] Hornitschek P, Kohnen M V, Lorrain S, et al. Phytochrome interacting factors 4 and 5 control seedling growth in changing light conditions by directly controlling auxin signaling[J]. *The Plant Journal*, 2012, 71(5): 699-711.
- [25] Sakuraba Y, Jeong J, Kang M Y, et al. Phytochrome-interacting transcription factors PIF4 and PIF5 induce leaf senescence in *Arabidopsis*[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 4636.