

## 景宁木兰 PIF 转录因子的生物信息学分析及极端遮阴条件下的表达模式

陆丹迎<sup>1</sup>, 程少禹<sup>1</sup>, 章颖佳<sup>1</sup>, 刘志高<sup>1</sup>, 金梦婷<sup>1</sup>, 董彬<sup>1</sup>, 张寿洲<sup>2</sup>,  
彭豪<sup>1</sup>, 戴梦怡<sup>1</sup>, 王卓为<sup>1</sup>, 赵宏波<sup>1</sup>, 申亚梅<sup>1</sup>

(1. 浙江农林大学 风景园林与建筑学院, 浙江 杭州 311300; 2. 深圳市/中国科学院 仙湖植物园, 广东 深圳 518004)

**摘要:** 【目的】群落所造成的遮阴是导致景宁木兰 *Magnolia sinostellata* 濒危的重要因素之一。PIF 家族转录因子在光信号传导和植物生长发育中起到重要作用。对 PIF 家族转录因子进行系统分析和研究, 为探究其在景宁木兰光信号转导机制中的作用奠定基础。【方法】从景宁木兰转录组数据中鉴定获得 PIF 家族转录因子并进行生物信息学分析, 利用实时荧光定量聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 技术对其在极端遮阴条件下的表达模式进行分析。【结果】从景宁木兰转录组中共筛选出 9 个 *MsPIFs* 转录因子基因, 其编码的蛋白质长度为 188~735 个氨基酸, 蛋白质大小为 20 314.56~78 957.02 Da, 理论等电点范围为 5.18~8.22。 *MsPIFs* 基因编码的蛋白质均为不稳定蛋白质, 所有蛋白质均为亲水性蛋白质。亚细胞定位预测结果显示所有蛋白质均定位于细胞核。9 个蛋白质均具有丝氨酸 (Ser)、苏氨酸 (Thr) 和酪氨酸 (Try) 磷酸化位点。qRT-PCR 结果表明: 极端遮阴条件下, 9 个 *MsPIFs* 家族基因表达均发生不同程度的变化。其中, *MsbHLH23* 的表达变化较其他基因更为明显, 遮阴处理 5 和 10 d 时的表达量分别上调为对照的 52.77 与 20.03 倍。【结论】景宁木兰 PIF 转录因子家族均能响应遮阴, 为后续对 *MsPIFs* 进行生物学功能鉴定奠定了基础。图 7 表 3 参 32

**关键词:** 景宁木兰; 极端遮阴; PIF 转录因子家族; 生物信息学分析; 表达模式

**中图分类号:** S718.3      **文献标志码:** A      **文章编号:** 2095-0756(2021)03-0445-10

## Bioinformatics analysis of PIF transcription factors in *Magnolia sinostellata* and expression pattern analysis under extreme shading condition

LU Danying<sup>1</sup>, CHENG Shaoyu<sup>1</sup>, ZHANG Yingjia<sup>1</sup>, LIU Zhigao<sup>1</sup>, JIN Mengting<sup>1</sup>, DONG Bin<sup>1</sup>,  
ZHANG Shouzhou<sup>2</sup>, PENG Hao<sup>1</sup>, DAI Mengyi<sup>1</sup>, WANG Zhuowei<sup>1</sup>, ZHAO Hongbo<sup>1</sup>, SHEN Yamei<sup>1</sup>

(1. College of Landscape and Architecture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 2. Fairy Lake Botanical Garden, Shenzhen & Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518004, Guangdong, China)

**Abstract:** [Objective] The shading caused by the community is one of the important factors that lead to the endangerment of *Magnolia sinostellata*. Therefore, it is important to conduct a systematic analysis and research of PIF family transcription factors which play an important role in light signal transduction and plant growth. Also, such analysis will help lay a foundation for the exploration of its role in the light signal transduction mechanism of *M. sinostellata*. [Method] With the transcriptome data of *M. sinostellata* collected, transcription factors of PIF family were identified and analyzed by bioinformatic while the expression patterns were analyzed employing the qRT-PCR technology. [Result] The nine *MsPIFs* transcription factor genes screened from the

收稿日期: 2020-07-28; 修回日期: 2021-01-23

基金项目: “十三五”浙江省林木新品种选育专项 (2016C02056-1); 浙江省重点研发项目 (2019C02023)

作者简介: 陆丹迎 (ORCID: 0000-0002-4182-0131), 从事园林植物与遗传育种研究。E-mail: ludanying0713@163.com。通信作者: 申亚梅 (ORCID: 0000-0002-3079-2817), 教授, 从事园林植物与遗传育种研究。E-mail: yameishen@zafu.edu.cn

*M. sinostellata* enjoyed a length of 188–735 aa, a protein size of 20314.56–78957.02 Da, and a theoretical isoelectric point range of 5.18–8.22. The proteins encoded by *MsPIFs* gene were unstable proteins, and all proteins were hydrophilic proteins localized in the nucleus as was demonstrated in the subcellular localization prediction. All nine proteins have Ser, Thr and Try phosphorylation sites. As was shown in the qRT-PCR results, under extreme shading conditions, there was the occurrence of changes of different degrees in the gene expression of 9 *MsPIFs* families of which *MSBHLH23* has an expression level that was 52.77 and 20.03 times higher than that of the control at 5 d and 10 d after shading treatment. [Conclusion] The PIF transcription factor family of *M. sinostellata* can respond to shading and this study has laid a foundation for the identification of *MsPIFs* biological function. [Ch, 7 fig. 3 tab. 32 ref. ]

**Key words:** *Magnolia sinostellata*; extreme shading; PIF transcription factor family; bioinformatics analysis; expression pattern

景宁木兰 *Magnolia sinostellata* 是木兰科 Magnoliaceae 木兰属 *Magnolia* 植物, 属于典型的极小种群濒危树种。景宁木兰幼苗生长需要一定的荫庇环境<sup>[1]</sup>, 但过度遮阴会抑制景宁木兰幼苗的光合速率<sup>[2]</sup>。自然状态下, 群落所形成的遮阴是影响群落内濒危植物生长发育的重要因素<sup>[3]</sup>。景宁木兰多生长于光照充足的针叶群落, 在针阔混交群落和阔叶群落分布较少<sup>[4]</sup>。据此推断, 群落所形成的遮阴会削弱景宁木兰的生长势, 是导致景宁木兰濒危的重要因素。光是影响植物生长发育的重要环境因子。植物的整个生命周期都受到不断变化的光环境影响。光敏色素是植物重要的光感受器, 能够感受环境中光信号的变化。光敏色素作用因子 (phytochrome interacting factors, PIFs) 能够感知红光和远红光信号, 在光信号传导和植物生长发育中起到重要作用。光信号在通过信号转导后, 能够诱导一系列生理生化反应。光敏色素作用因子是光信号转导中的重要调控因子, 属于 bHLH 超家族的第 15 亚族, 其家族成员都具有高度保守的 bHLH 结构域。bHLH 结构域由约 15 个氨基酸的碱性结构域 (basic region) 和 60 个氨基酸的 HLH(helix-loop-helix) 结构域组成<sup>[5]</sup>。目前对 PIF 家族转录因子的研究主要集中在模式植物拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 中。PIF 转录因子广泛参与了拟南芥的光调控反应, 并在光敏色素介导的光信号网络调控中处于主导地位<sup>[6]</sup>。黑暗条件下, *AtPIF1* 能够抑制拟南芥种子的萌发, *AtPIF3*、*AtPIF4*、*AtPIF5* 能够促进叶绿素分解并抑制叶绿体活性, 从而最终导致叶片衰老<sup>[7]</sup>。遮阴条件下, *AtPIF1* 能够通过调控 *AtHB1* 的表达来促进下胚轴的伸长<sup>[8]</sup>; *AtPIF4*、*AtPIF5* 和 *AtPIF7* 通过促进 *AtFT* 和 *AtTSF* 的表达从而促进拟南芥开花<sup>[9]</sup>; *AtPIF4*、*AtBZR1* 和 *AtARF6* 通过整合生长素信号与 BR 和光敏色素通路来协同促进拟南芥下胚轴的伸长<sup>[10]</sup>。由此可见, PIF 家族转录因子是遮阴条件下光信号转导途径中的关键调控因子。据此推测, PIF 家族转录因子在光照强度对木兰属濒危树种生长发育的影响及光受体信号转导途径中起到重要作用。因此, 本研究对景宁木兰 PIF 家族转录因子进行分析鉴定, 探究其在极端遮阴条件下的表达模式, 从而为揭示光介导的景宁木兰生长发育的分子机制、群落引起的遮阴而导致景宁木兰濒危的内在机制奠定基础, 最终为珍稀植物景宁木兰的保育提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

景宁木兰来自浙江省杭州市青山湖花园中心苗圃培育的 3 年生扦插苗。2019 年 6 月下旬, 选择长势一致且无病虫害的扦插苗作为材料, 置于温度为 (25±2) °C、光照强度为 2 000~2 500 lx、相对湿度为 40%~60% 的人工气候室中进行培养, 光照与黑暗时间各 12 h, 定期浇水保持土壤湿润。

### 1.2 实验设计

3 层遮阳网形成的光照强度是景宁木兰自然生境光照条件之一, 会显著削弱景宁木兰的生长势<sup>[1]</sup>。2019 年 7 月上旬开始遮阴处理, 本研究于浙江省杭州市临安区浙江农林大学人工气候室内, 用 3 层黑色遮阳网及竹竿搭建极端遮阴处理 (25% 光照, ST) 装置, 以模拟遮阴条件下的景宁木兰野外生存环境。

以 100% 全光照为对照 (ck)。所有盆栽苗叶片之间无重叠。每个处理 4 个生物学重复。分别自实验开始处理第 0、1、3、5、10、20、30 天时, 拍照记录植株表型变化、采集景宁木兰植株的中层叶片装入锡纸袋中, 并迅速置于液氮中速冻, 随后转入  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中储存, 用于植物 RNA 的提取及后续实时荧光定量聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 实验。

### 1.3 方法

**1.3.1 景宁木兰 PIF 家族转录因子的筛选** 基于实验室已有的转录组测序数据, 在 NR、NT、Swiss-Prot 这 3 个数据库中进行注释, 初步注释到 46 个 PIF 转录因子相关基因, 将这些基因编码蛋白质逐个进行 NCBI Blast 和 NCBI CDD 预测, 去除重复序列及冗余转录本后, 最终得到 9 个 PIF 家族转录因子的蛋白质序列。利用 MEGA 5.0 对景宁木兰 PIF 转录因子序列与拟南芥 PIF 转录因子序列进行比对分析, 根据 TOLEDO 等<sup>[5]</sup> 命名拟南芥 PIF 家族的方法对 9 个景宁木兰 PIF 转录因子进行命名。拟南芥 PIF 转录因子序列从拟南芥转录因子数据库 (<https://www.arabidopsis.org/>) 中获得。

**1.3.2 景宁木兰 PIF 家族转录因子的理化性质分析** 采用 Compute pI/Mw 在线工具预测景宁木兰 PIF 转录因子蛋白质的等电点及分子量, 采用在线网站 Cell-PLoc 2.0 预测亚细胞定位, 利用 NetPhos 分析蛋白质磷酸化位点; 利用 MEME 分析蛋白质保守结构域; 利用 DNAMAN 比对分析保守结构域; 利用在线软件 heatmapper(<http://www2.heatmapper.ca/expression/>) 绘制热图; 为研究 PIF 转录因子家族的进化关系, 利用 MEGA5.0 将 9 个景宁木兰 MsPIF 蛋白质序列、15 个拟南芥 AtPIF 蛋白质序列<sup>[11]</sup>、6 个玉米 *Zea mays* ZmPIF 蛋白质序列 (<http://www.plantgdb.org/ZmGDB/>)<sup>[12]</sup>、10 个杨树 *Populus trichocar* PtPIF 蛋白质序列 (<http://www.Phytozome.net/poplar.php>)<sup>[13]</sup> 进行序列比对, 并用邻接法构建系统进化树, 进行 Bootstrap 测试, 重复设置为 1 000 次。

**1.3.3 极端遮阴条件下景宁木兰 PIF 家族转录因子的表达模式** 采用植物 RNA 提取试剂盒提取样品总 RNA。取 1  $\mu\text{g}$  RNA 进行第 1 链 cDNA 的合成。所用定量 PCR 试剂为 BCG qPCR Master Mix。根据景宁木兰转录组数据设计特异性引物 (表 1)。以景宁木兰的 *EF1- $\alpha$*  基因作为内参基因<sup>[1]</sup>, 利用 Light Cycler 480II(Roche) 仪器进行目的基因 qRT-PCR 表达分析。反应程序结束后,  $65\sim 95^{\circ}\text{C}$  每隔 0.2 s 作溶解曲线, 采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算目的基因的相对表达量。每个样品重复 3 次。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物

Table 1 Primers used for qRT-PCR analysis

| 基因名称            | 正向(反向)引物序列(5'→3')        | 退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ | 扩增效率/% | 相关系数 $R^2$ |
|-----------------|--------------------------|--------------------------|--------|------------|
| <i>MsbHLH68</i> | F-CCTCAGGCTCTGTCATTGGG   | 59.5                     | 90.86  | 0.998      |
|                 | R-AGCGGTTGGGCTTCTTCACG   | 59.5                     |        |            |
| <i>MsPIF4</i>   | F-GCCGAAGAATCTGAGTGCCA   | 57.4                     | 96.98  | 0.999      |
|                 | R-CTATCCCTCCGTCTCCTTTC   | 57.4                     |        |            |
| <i>MsbHLH1</i>  | F-CTTTGTGCTATCTTCGGGAACG | 57.7                     | 104.48 | 0.997      |
|                 | R-GGGACCCACCAATCAACGAC   | 59.5                     |        |            |
| <i>MsPIF8</i>   | F-AAGCGAGGATGAGAACAAGG   | 55.4                     | 93.01  | 0.983      |
|                 | R-TGCGTTCGGATTGGTTATGG   | 55.4                     |        |            |
| <i>MsbHLH66</i> | F-AGCAGTAACGCACGCAGAC    | 59.5                     | 101.57 | 0.995      |
|                 | R-GAAATGGGCATGAGGCAGAG   | 57.4                     |        |            |
| <i>MsPIF3</i>   | F-CAGACTCAGCCGTCAACTCA   | 57.4                     | 92.93  | 0.991      |
|                 | R-GCAGGCCCACTTCCACCAAT   | 59.5                     |        |            |
| <i>MsPIF1</i>   | F-CCACATATTCCTCCATTGAT   | 51.7                     | 100.90 | 0.994      |
|                 | R-GAAGGCTGAGGTAGTGTGATA  | 55.8                     |        |            |
| <i>MsbHLH48</i> | F-CCGTCGAGTCTCCAGTGGTC   | 61.6                     | 96.92  | 0.993      |
|                 | R-CGTTTGAAGGAAGGTAGGG    | 57.4                     |        |            |
| <i>MsbHLH23</i> | F-GCAGACAAAGGACCCAAGGA   | 57.4                     | 93.01  | 0.993      |
|                 | R-CACGAGGAGTGAGGAACAAGAA | 57.7                     |        |            |

1.3.4 数据分析 采用 SPSS 19.0 进行方差分析并用 SigmaPlot 14 绘图, 对平均值采用独立样本  $T$  检验进行比较, 显著水平为 0.05。

## 2 结果与分析

### 2.1 序列鉴定及理化性状分析

利用 ExPASy 对 9 个基因编码的氨基酸进行理化性质进行分析 (表 2), 发现 9 个基因编码的蛋白质大小不等, 最小的为 *MsPIF1*, 编码 188 个氨基酸, 最大的为 *MsPIF3*, 编码 735 个氨基酸。9 个蛋白质的理论等电点为 5.18(*MsbHLH68*)~8.22(*MsPIF8*), 表明不同的 PIF 家族蛋白质在不同的微环境中发挥不同的生物学功能。9 个 PIF 家族蛋白质均属于不稳定、亲水性蛋白质。

表 2 *MsPIF* 基因家族

Table 2 *MsPIF* gene family of *M. sinostellata*

| 基因名称            | 蛋白质分子量/Da | 氨基酸数/个 | 等电点  | 不稳定系数 | 脂肪系数  | 平均亲水性  | 亚细胞定位  | 磷酸化位点 |     |     |
|-----------------|-----------|--------|------|-------|-------|--------|--------|-------|-----|-----|
|                 |           |        |      |       |       |        |        | Ser   | Thr | Tyr |
| <i>MsbHLH68</i> | 53 604.79 | 506    | 5.18 | 58.19 | 77.51 | -0.447 | 细胞核(N) | 47    | 10  | 1   |
| <i>MsPIF4</i>   | 57 883.06 | 527    | 5.96 | 56.05 | 64.57 | -0.611 | 细胞核(N) | 40    | 12  | 3   |
| <i>MsbHLH1</i>  | 74 557.30 | 671    | 5.52 | 53.08 | 79.66 | -0.452 | 细胞核(N) | 34    | 14  | 6   |
| <i>MsPIF8</i>   | 50 048.29 | 456    | 8.22 | 42.09 | 58.29 | -0.686 | 细胞核(N) | 36    | 20  | 4   |
| <i>MsbHLH66</i> | 45 976.46 | 430    | 6.79 | 60.45 | 69.72 | -0.558 | 细胞核(N) | 45    | 14  | 1   |
| <i>MsPIF3</i>   | 78 957.02 | 735    | 6.31 | 67.37 | 63.80 | -0.513 | 细胞核(N) | 74    | 13  | 3   |
| <i>MsPIF1</i>   | 20 314.56 | 188    | 5.93 | 60.78 | 60.32 | -0.341 | 细胞核(N) | 4     | 2   | 1   |
| <i>MsbHLH48</i> | 40 255.00 | 366    | 6.43 | 59.85 | 70.90 | -0.639 | 细胞核(N) | 40    | 6   | 2   |
| <i>MsbHLH23</i> | 39 480.07 | 362    | 5.82 | 72.07 | 70.14 | -0.577 | 细胞核(N) | 43    | 9   | 2   |

说明: Ser为丝氨酸, Thr为苏氨酸, Tyr为酪氨酸

### 2.2 蛋白质亚细胞定位预测

通过在线软件 Cell-PLoc 2.0(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>) 对 9 个 PIF 基因家族成员的氨基酸序列进行亚细胞定位预测 (表 2), 9 个基因编码的蛋白质均定位于细胞核内, 符合其转录因子的功能, 可能通过调控细胞核基因的转录来发挥功能。

### 2.3 蛋白质磷酸化位点分析

蛋白质磷酸化在很多植物信号转导过程中起着重要作用<sup>[14]</sup>。蛋白质磷酸化的可逆性使得植物细胞能够快速响应外部环境变化<sup>[15]</sup>。在正常光条件下, PIF 家族转录因子与光敏色素相互作用, 从而导致 PIF 蛋白质的磷酸化和降解<sup>[16]</sup>。而在低光照条件下, PIF 蛋白质的磷酸化和降解受到抑制<sup>[17]</sup>。因此, 分析 PIF 蛋白质的磷酸化位点对研究其在信号转导中的功能有重要意义。利用 NetPhos 对 9 个 PIF 家族蛋白质的磷酸化位点进行分析 (表 2), 发现 9 个蛋白质均具有丝氨酸 (Ser)、苏氨酸 (Thr) 和酪氨酸 (Tyr) 磷酸化位点, 且 Ser 的磷酸化位点最多, Tyr 的磷酸化位点最少。其中磷酸化位点最多的是 *MsPIF3*, 为 94 个, *MsPIF1* 的磷酸化位点最少, 仅 7 个。

### 2.4 蛋白质的基序分析

进一步利用 MEME 在线软件分析 *MsPIF* 蛋白质<sup>[16]</sup>, 共鉴定到 6 个基序 (表 3)。结果显示 (图 1): 9 个蛋白质含有不同数目的基序, *MsPIF4* 和 *MsPIF8* 含有的基序最多, 为 5 个, 而 *MsbHLH48* 中含有的基序最少, 仅 2 个。*bHLH* 家族蛋白质均含有 *bHLH* 基序, 该基序由位于 N 端的 basic 基序 (图 2A) 和位于 C 端的 HLH 基序 (图 2B) 组成<sup>[5]</sup>。9 个 PIF 家族蛋

表 3 景宁木兰 PIF 家族蛋白质的主要 MEME 基序

Table 3 Major MEME motif sequences in *M. sinostellata* PIF protein

| 基序     | 宽度/个 | 最佳匹配                                        |
|--------|------|---------------------------------------------|
| Motif1 | 40   | MKALQELIPNSNKTDKASMLDEAIEY<br>LKSLQLQVQMLSM |
| Motif2 | 21   | RGRAAEVHNLSERRRRERINE                       |
| Motif3 | 21   | MMFPGVQYQYMPMGMGMGMG                        |
| Motif4 | 36   | FEQZIVKLMEEDMGMSAMQYLQKGKL<br>CLMPIALAAAI   |
| Motif5 | 8    | ELLWENGQ                                    |
| Motif6 | 8    | CVPBWBTD                                    |



白质均含有 basic 基序及 HLH 基序。不同蛋白质的同源异型基序之间存在一定差异。MsPIF4、MsPIF3 和 MsPIF8 中含有 APB 基序 (active phyB-binding motif)(图 2C)，表明其可以与 PhyB(phytochrome B) 相结合，从而对下游基因的表达进行调控<sup>[16]</sup>。此外，MsPIF4 和 MsPIF3 中还含有 APA 基序 (active phyA-binding motif)(图 2D)，表明其既可以与 PhyA(phytochrome A) 相结合也可以与 PhyB 相结合。

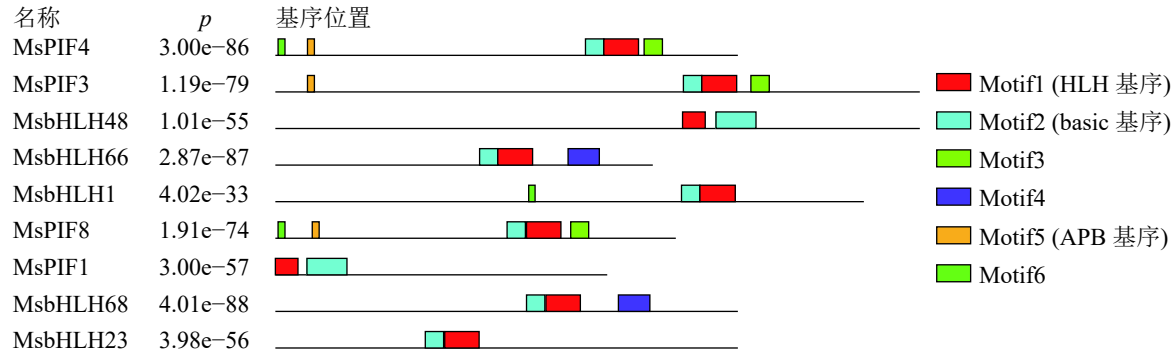


Figure 1 Motif of MsPIF protein

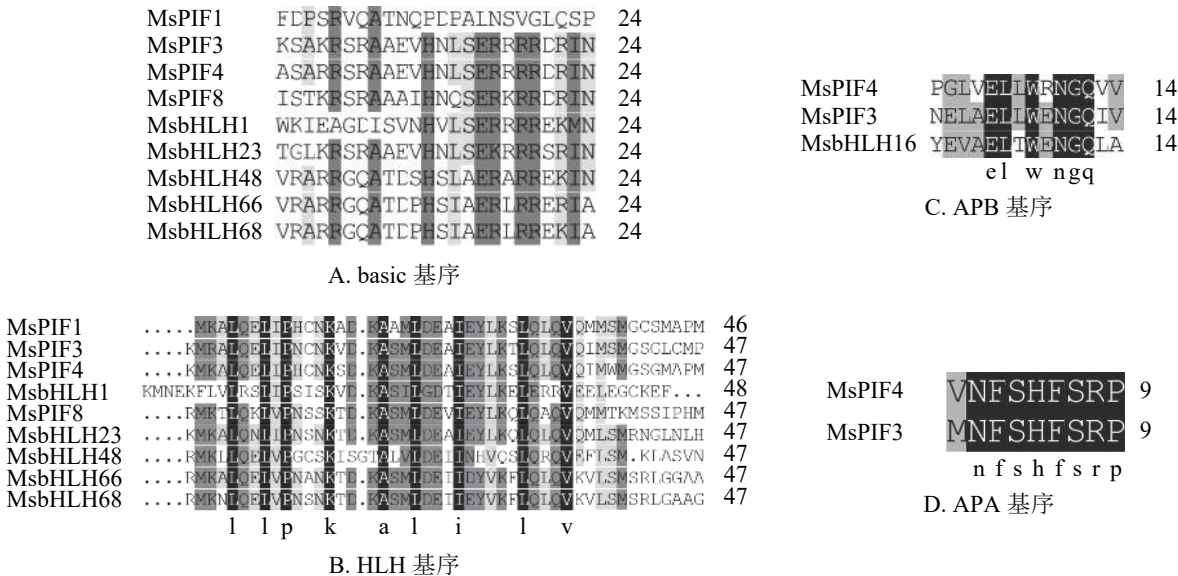


图 2 MsPIF 家族蛋白质的 basic、HLH、APB 和 APA 基序蛋白质序列比对

Figure 2 Sequence alignment of basic, HLH, APB and APA motif protein sequences of MsPIF

2.5 系统进化分析

运用 MEGA5 对所得景宁木兰的蛋白质序列与拟南芥、玉米、杨树中的序列对比分析 (图 3)，采用邻接法及 Bootstrap 分析 (1 000 次重复) 构建系统进化树<sup>[18]</sup>。结果表明：植物 PIF 家族蛋白质表现出多样性，可以分为 7 个进化分枝。其中，9 个 MsPIF 蛋白质分布在  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\eta$ 、 $\epsilon$  等 6 个进化枝。15 个 AtPIF 蛋白质分布在  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\zeta$ 、 $\epsilon$  等 6 个进化枝，其中  $\zeta$  为拟南芥所特有。ZmPIF 蛋白质仅分布于  $\beta$  和  $\delta$  进化枝，10 个 PtPIF 蛋白质分布在  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$  等 5 个进化枝。从进化树可以看出，MsPIF8、MsPIF4、MsPIF1、MsPIF3 及 MsbHLH23 均与相应的拟南芥蛋白质与杨树蛋白质聚类在一起，表明其亲缘关系较为接近。MsbHLH68、MsbHLH66、MsbHLH48 汇聚于  $\eta$  枝，为景宁木兰所特有。

2.6 长期极端遮阴条件下 MsPIF 家族基因的表达

光照是植物生长发育过程中不可或缺的因素，极端遮阴处理过程中，景宁木兰叶片表型变化十分明显 (图 4)。处理 10 d，景宁木兰叶片出现褐色斑点；处理 20 d，褐色斑点面积增大，植株开始萎蔫；处理 30 d，大量叶片干枯脱落，植株萎蔫严重。

PCR 扩增琼脂糖凝胶电泳检测发现 9 个基因均扩出预期条带 (图 5)。qRT-PCR 检测结果 (图 6) 表

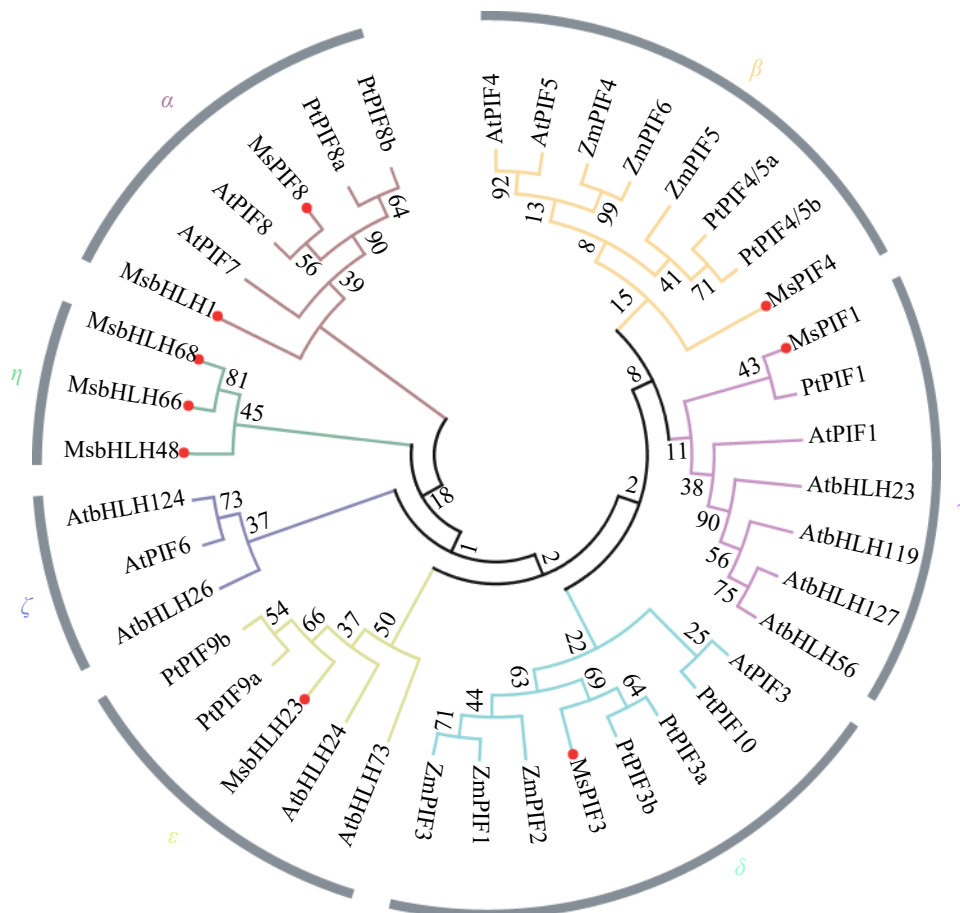


图3 景宁木兰、拟南芥、玉米和杨树的PIF家族蛋白质的系统进化分析

Figure 3 Phylogenetic tree analysis of MsPIF protein and AtPIF protein sequences in *M. sinostellata*, *A. thaliana*, *Z. mays*, *P. trichocarpa*

明:遮阴处理 1 d 时, *MsbHLH23* 和 *MsbHLH66* 的表达水平显著上调, *MsbHLH1*、*MsbHLH48*、*MsPIF8*、*MsPIF3* 的表达水平均显著下调, 其余基因表达水平无显著变化。遮阴处理 3 d 时, *MsPIF8* 的表达显著低于对照, 其余基因的表达均显著上调。遮阴处理 5 d 时, *MsPIF8* 的表达仍显著降低, *MsbHLH68*、*MsbHLH23*、*MsbHLH66*、*MsbHLH1*、*MsbHLH48* 的表达显著上调, 其余基因的表达无显著差异。遮阴处理 10 d 时, *MsPIF8*、*MsPIF7*、*MsPIF3* 的表达均显著下调, *MsbHLH68*、*MsbHLH23*、*MsbHLH66*、*MsPIF4* 的表达显著上调。遮阴处理 20 d 时, *MsPIF8*、*MsbHLH23*、*MsPIF1* 的表达相对于对照显著下调, *MsPIF7* 的表达无显著差异。遮阴处理 30 d 时, *MsPIF8*、*MsbHLH23*、*MsbHLH66*、*MsbHLH48*、*MsPIF3* 的表达显著上调。显, 遮阴处理 5 和 10 d 时的表达量分别上调为对照的

基因的表达模式与基因功能关系密切, 基于获得的景宁木兰处理组的 qRT-PCR 数据, 采用 heatmap 在线软件对这些基因的差异表达进行分层聚类分析 (图 7)。结果发现: *MsPIF1*、*MsPIF3*、*MsPIF4*、*MsPIF8* 的表达模式十分相似, 其表达均在处理 3 d 时明显升高, 随后逐渐下降。*MsbHLLH48* 的表达在处理 0~30 d 逐渐上调, 其中处理 30 d 时的表达上调最为明显。*MsbHLLH1*、*MsbHLLH68*、*MsbHLLH66*、*MsbHLLH23* 的表达模式均为先逐渐上调后逐渐下调, 其中 *MsbHLLH1* 和 *MsbHLLH23* 的表达

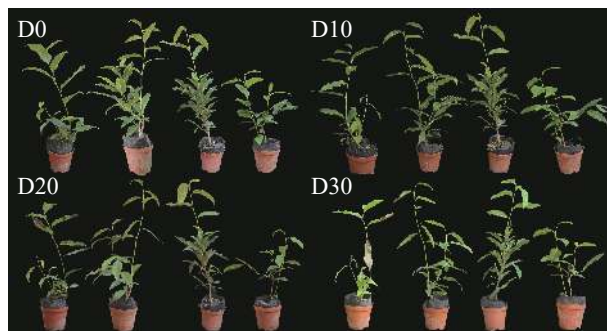
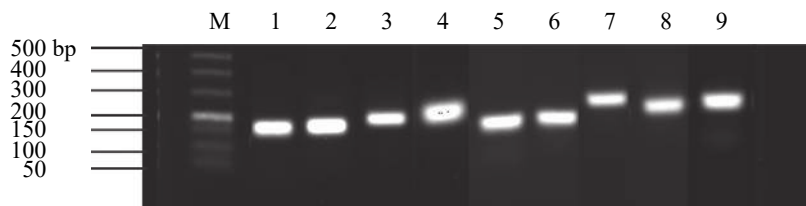


图4 遮阴处理过程中景宁木兰的表型变化

Figure 4 Phenotypic changes of *M. sinostellata* during shading treatment



M. 500 bp DNA marker; 1~9. 9 个基因的 PCR 产物

图 5 qRT-PCR 扩增产物特异性

Figure 5 Specificity of qRT-PCR amplification products

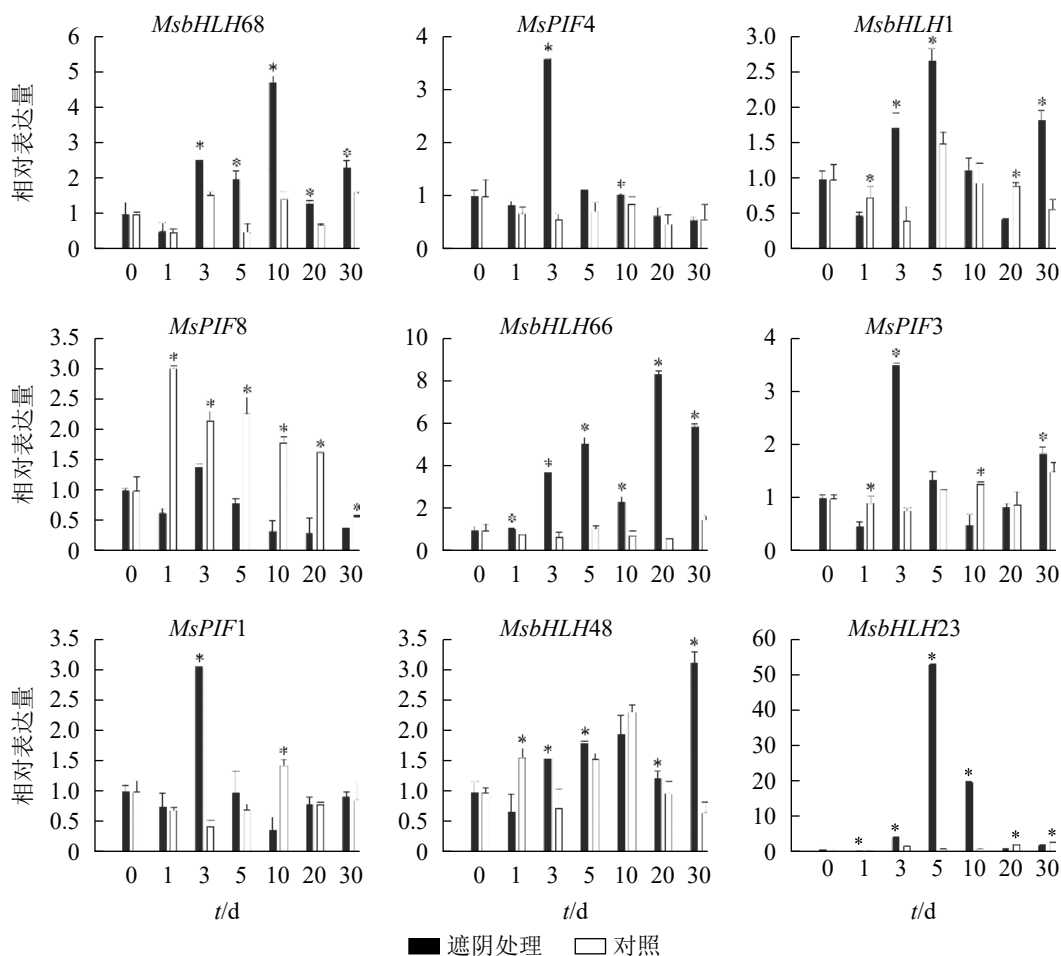
\*表示各处理天数时对照与处理间差异显著 ( $P < 0.05$ )

图 6 遮阴条件下景宁木兰 PIF 转录因子的 qRT-PCR 分析

Figure 6 qRT-PCR analysis of PIF transcription factor under shading treatment of *M. sinostellata*

在处理 5 d 显著上调, *MsHLH68* 和 *MsHLH66* 的表达分别在处理 10 和 20 d 明显上调。

### 3 讨论

#### 3.1 景宁木兰中 PIF 家族转录因子

PIF 家族转录因子广泛存在于植物中。目前 PIF 家族转录因子在拟南芥中研究的最为透彻, 共有 15 个<sup>[5]</sup>。在其他物种中, 杨树至少存在 10 个<sup>[13]</sup>, 玉米有 6 个<sup>[12]</sup>, 水稻 *Oryza sativa* 有 6 个<sup>[19]</sup>。本研究从景宁木兰中仅筛选到 9 个, 这一方面是由于景宁木兰本身具有特异性, 另一方面可能是因为转录组数据库还不够丰富造成的。NCBI blast 及 NCBI CDD 预测结果表明: 9 个 PIF 蛋白质均含 bHLH 结构域, 属于 PIF 转录因子家族。同源性较高的蛋白质通常功能也相似<sup>[18]</sup>。因此, 本研究用所得 9 个景宁木兰 PIF 家族转录因子编码蛋白质与 6 个 ZmPIFs、10 个 PtPIFs 和 15 个功能明确的 AtPIFs 编码蛋白质作系统

进化树, 主要根据与 15 个拟南芥 PIF 家族转录因子编码蛋白质进化关系的远近推测景宁木兰 PIF 转录因子的功能。AtPIF3 与 PtPIF3a、PtPIF3b 同源性较高, 且与 AtPIF3 和 ZmPIF3 位于同一进化枝, 据此推测 MsPIF3 与 AtPIF3 功能相似。MsPIF4 与 PtPIF4、ZmPIF4、AtPIF4 位于同一进化枝。AtPIF3 蛋白质在植株刚刚暴露到光下时会急剧减少, 在黑暗条件下会重新积累, 在拟南芥幼苗阶段, AtPIF3 在光诱导的叶绿体发育中起到积极的作用<sup>[20]</sup>。AtPIF3、AtPIF4 和 AtPIF5 在年龄引起的和黑暗引起的植物衰老中起到重要作用, 其中 AtPIF4 通过调控叶绿素降解和维持叶绿体活性的相关基因从而促进植株衰老<sup>[7]</sup>。AtPIF4 能够调控下游基因从而促进拟南芥开花<sup>[21]</sup>。

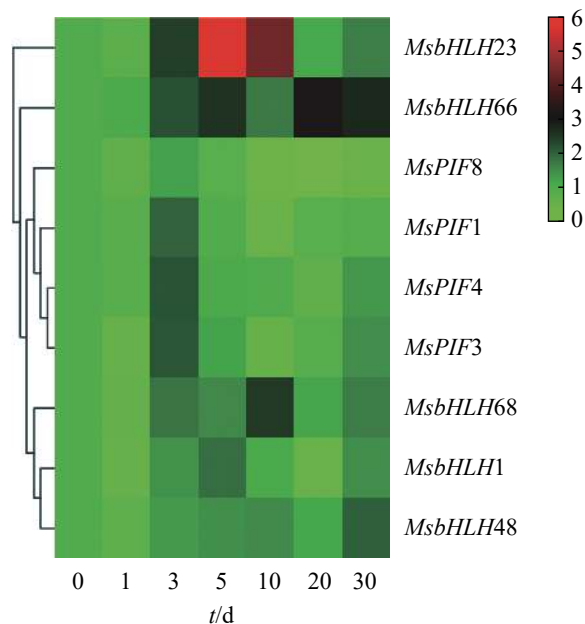
此外, AtPIF4 能与 AtBZR1 共同调节下游光响应的相关基因。AtPIF7 与 MsbHLH1 同源性较高, 推测其功能可能类似。遮阴条件下, AtPIF7 是调控拟南芥茎伸长的重要因子<sup>[17]</sup>。AtPIF7 是调节植物去黄化的弱负反馈因子, 与 PhyB 结合的过程中通常不伴随着可以监测到的磷酸化和分解<sup>[22]</sup>。MsPIF8 与 AtPIF8 同源, 推测其功能相似。与 AtPIF3 不同, AtPIF8 蛋白质在远红光下的积累比在黑暗条件中或红光条件下更多, AtPIF8 能够抑制由 PhyA 介导的种子萌发、下胚轴伸长等生命活动<sup>[23]</sup>。MsbHLH23 与 AtbHLH24 功能相似, AtbHLH24 在抑制种子萌发和维持种子休眠状态中具有重要作用<sup>[24]</sup>。AtbHLH24 能够激活细胞分裂素信号, 同时激活生长素生物合成和雄蕊内部结构域的转运基因, 并且在花瓣和果实发育中起到重要作用<sup>[25]</sup>。MsbHLH68, MsbHLH66 和 MsbHLH48 共同汇集于同一进化枝, 其功能还需要进一步挖掘。但是, 即使是同一分支内蛋白质功能也可能存在差异, 并且不同物种之间具有较大的差异<sup>[18]</sup>。因而关于 MsPIF 家族蛋白质的具体功能还需要通过后续研究。

### 3.2 景宁木兰内在濒危机制

群落层片造成的遮阴会降低下层植被的生长率与成活率<sup>[26]</sup>。本研究极端遮阴处理组的景宁木兰在处理过程中逐步萎蔫死亡。光敏色素作用因子 (PIFs) 在植物的生长发育中起到重要调节作用。PIFs 作为光信号转导途径中的负调控因子, 对植物生长发育的多个过程都有调控作用<sup>[27-32]</sup>。PIF 家族转录因子是光敏色素介导的光信号转导途径中的负反馈因子<sup>[28]</sup>。遮阴条件下, PIF 蛋白质大量积累, 从而调控植物发生一系列生理生化反应。考虑到植物的个体差异和基因表达差异, 本研究的每个取样时间点都作了相应的空白对照。本研究中, 长期极端遮阴条件下, 景宁木兰的 PIF 类家族转录因子的表达水平多数显著上调, 只有 MsPIF8 的表达水平显著下调。在拟南芥中, 与其他 PIF 家族成员相比, AtPIF8 能够与 PhyB 结合但效果微弱<sup>[23]</sup>。MsPIF8 的表达模式与前人的研究结论存在差异, 可能与物种特异性相关, 有关 MsPIF8 的功能还需要进一步研究。MsPIF1、MsPIF3 和 MsPIF4 的表达模式与前人的研究结论<sup>[29]</sup>吻合。黑暗条件下, AtPIF1 的表达上调, 从而抑制叶绿素的合成与种子萌发; AtPIF3、AtPIF4 的表达显著上调, 从而促进叶绿素的降解与叶片衰老<sup>[29]</sup>。植物群落造成的遮阴使得 AtPIF4 的表达上调, 从而使成花诱导相关基因的表达上调, 最终诱导拟南芥提早开花<sup>[21]</sup>。PIF 功能十分复杂, 景宁木兰 PIF 家族转录因子在遮阴调控网络中发挥的作用还需要进一步研究。

## 4 参考文献

- [1] YU Qin, SHEN Yamei, WANG Qianying, *et al.* Light deficiency and waterlogging affect chlorophyll metabolism and photosynthesis in *Magnolia sinostellata* [J]. *Trees*, 2019, 33(1): 11–22.



基于景宁木兰 qRT-PCR 数据的计算得出, 每种颜色代表相应表达量的数值, 基因表达水平取 1 g (FPKM)

图 7 长期极端遮阴条件下景宁木兰 PIF 转录因子的表达模式

Figure 7 Pattern of expression of PIF family during shading treatment period of *M. sinostellata*



- [2] 俞芹, 王倩颖, 刘志高, 等. 光强与水分处理下景宁木兰光合光响应模型拟合比较[J]. 生态学杂志, 2018, **37**(3): 898 – 905.
- YU Qin, WANG Qianying, LIU Zhigao, *et al.* Comparison of the light response models of photosynthesis in leaves of *Magnolia sinostellata* under different light intensity and moisture conditions [J]. *Chin J Ecol*, 2018, **37**(3): 898 – 905.
- [3] TAMAKI I, NOMURA K, NOMURA R, *et al.* Evaluation of a field experiment for the conservation of a *Magnolia stellata* stand using clear-cutting [J]. *Landscape Ecol Eng*, 2018, **14**(2): 269 – 276.
- [4] 余泽智, 陈翔翔, 卢璐, 等. 玉景宁玉兰种群分布与群落结构研究[J]. 浙江林业科技, 2015, **35**(3): 47 – 52.
- YU Zezhi, CHEN Xiangxiang, LU Lu, *et al.* Distribution and community structure of *Magnolia sinostellata* [J]. *J Zhejiang For Sci Technol*, 2015, **35**(3): 47 – 52.
- [5] 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.
- [6] CASTILLON A, SHEN Hui, HUQ E. Phytochrome interacting factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks [J]. *Trends Plant Sci*, 2007, **12**(11): 514 – 521.
- [7] SONG Yi, YANG Chuangwei, GAO Shan, *et al.* Age-triggered and dark-induced leaf senescence require the bHLH transcription factors PIF3, 4, and 5 [J]. *Mol Plant*, 2014, **7**(12): 1776 – 1787.
- [8] CAPELLA M, RIBONE P A, ARCE A L, *et al.* *Arabidopsis thaliana* HomeoBox 1 (AtHB1), a homeodomain-leucine zipper I (HD-Zip I) transcription factor, is regulated by PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 1 to promote hypocotyl elongation [J]. *New Phytol*, 2015, **207**(3): 669 – 682.
- [9] GALVÃO V C, FIORUCCI A S, TREVISAN M, *et al.* PIF transcription factors link a neighbor threat cue to accelerated reproduction in *Arabidopsis* [J]. *Nat Commun*, 2019, **10**(1): 4005. doi: [10.1038/s41467-019-11882-7](https://doi.org/10.1038/s41467-019-11882-7).
- [10] EUNKYOO O, ZHU Jiaying, BAI Mingyi, *et al.* Cell elongation is regulated through a central circuit of interacting transcription factors in the *Arabidopsis* hypocotyl [J]. *eLife*, 2014, **3**: e03031. doi: [10.7554/eLife.03031](https://doi.org/10.7554/eLife.03031).
- [11] HASAN M, RASHID M, KHATUN S, *et al.* Computational identification of microbial phosphorylation sites by the enhanced characteristics of sequence information [J]. *Sci Rep*, 2019, **9**: 8258. doi: [10.1038/s41598-019-44548-x](https://doi.org/10.1038/s41598-019-44548-x).
- [12] 陈亮, 崔芬芬, 王勇飞, 等. 基于转录组金银花 WRKY 转录因子的挖掘与分析[J]. 分子植物育种, 2019, **17**(6): 1780 – 1787.
- CHEN Liang, CUI Fenfen, WANG Yongfei, *et al.* Mining and analysis of WRKY transcription factors in transcriptome-based *Lonicera japonica* [J]. *Mol Plant Breed*, 2019, **17**(6): 1780 – 1787.
- [13] ESSER D, HOFFMANN L, PHAM T K, *et al.* Protein phosphorylation and its role in archaeal signal transduction [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2016, **40**(5): 625 – 647.
- [14] PHAM V N, KATHARE P K, HUQ E. Phytochromes and phytochrome interacting factors [J]. *Plant Physiol*, 2018, **176**(2): 1025 – 1038.
- [15] HUANG Xu, ZHANG Qian, JIANG Yupei, *et al.* Shade-induced nuclear localization of PIF7 is regulated by phosphorylation and 14-3-3 proteins in *Arabidopsis* [J]. *eLife*, 2018, **7**: e31636. doi: [10.7554/eLife.31636](https://doi.org/10.7554/eLife.31636).
- [16] 庄黎丽, 王剑, 杨志民. 基于转录组数据库的高羊茅 HD-Zip I 转录因子的鉴定及表达模式解析[J]. 草业学报, 2017, **27**(3): 67 – 77.
- ZHUANG Lili, WANG Jian, YANG Zhimin. Transcriptome-wide identification and expression analysis of HD-Zip I transcription factors in *Festuca arundinacea* [J]. *Acta Prat Sin*, 2017, **27**(3): 67 – 77.
- [17] 徐向东, 任逸秋, 张利, 等. 杨树 PIF 基因家族成员表达模式研究[J]. 林业科学研究, 2018, **31**(2): 19 – 25.
- XU Xiangdong, REN Yiqiu, ZHANG Li, *et al.* Analysis of expression pattern of PIF family members in *Populus* [J]. *For Res*, 2018, **31**(2): 19 – 25.
- [18] GAO Yong, REN Xiaoyun, QIAN Jingjie, *et al.* The phytochrome-interacting family of transcription factors in maize (*Zea mays* L.): identification, evolution, and expression analysis [J]. *Acta Physiol Plant*, 2019, **41**(1): 8. doi: [10.1007/s11738-018-2802-9](https://doi.org/10.1007/s11738-018-2802-9).
- [19] NAKAMURA Y, KATO T, YAMASHINO T, *et al.* Characterization of a set of phytochrome-interacting factor-like bHLH proteins in *Oryza sativa* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007, **71**(5): 1183 – 1191.
- [20] 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]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(46): 16091 – 16098.
- [21] KUMAR S V, LUCYSHYN D, JAEGER K E, *et al.* Transcription factor PIF4 controls the thermosensory activation of flowering [J]. *Nature*, 2012, **484**(7393): 242 – 245.
- [22] 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.
- [23] OH J, PARK E, SONG K, *et al.* PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR8 Inhibits phytochrome a-mediated far-red light responses in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2020, **32**(1): 186 – 205.
- [24] PENFIELD S, JOSSE E M, KANNANGARA R, *et al.* Cold and light control seed germination through the bHLH transcription factor SPATULA [J]. *Curr Biol*, 2005, **15**(22): 1998 – 2006.
- [25] REYES-OLALDE J I, ZÚÑIGA-MAYO V M, SERWATOWSKA J, *et al.* The bHLH transcription factor SPATULA enables cytokinin signaling, and both activate auxin biosynthesis and transport genes at the medial domain of the gynoecium [J]. *PLoS Genet*, 2017, **13**(4): e1006726. doi: [10.1371/journal.pgen.1006726](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006726).
- [26] GROSZMANN M, PAICU T, SMYTH D R. Functional domains of SPATULA, a bHLH transcription factor involved in carpel and fruit development in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2008, **55**(1): 40 – 52.
- [27] LU Deliang, WANG G G, ZHANG Jinxin, *et al.* Converting larch plantations to mixed stands: effects of canopy treatment on the survival and growth of planted seedlings with contrasting shade tolerance [J]. *For Ecol Manage*, 2018, **409**: 19 – 28.
- [28] DONG Jie, SUN Ning, YANG Jing, *et al.* The transcription factors TCP4 and PIF3 antagonistically regulate organ-specific light induction of *SAUR* genes to modulate cotyledon opening during de-etiolation in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2019, **31**(5): 1155 – 1170.
- [29] OH E, YAMAGUCHI S, HU Jianhong, *et al.* 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.
- [30] OH E, ZHU Jiaying, WANG Zhiyong. Interaction between BZR1 and PIF4 integrates brassinosteroid and environmental responses [J]. *Nat Cell Biol*, 2012, **14**(8): 802 – 809.
- [31] PARK E, PARK J, KIM J, *et al.* Phytochrome B inhibits binding of phytochrome-interacting factors to their target promoters [J]. *Plant J*, 2012, **72**(4): 537 – 546.
- [32] 任小芸, 吴美琴, 陈建民, 等. 光敏色素作用因子 PIFs 参与植物激素信号转导的分子机制 [J]. 植物生理学报, 2016, **52**(10): 1466 – 1473.
- REN Xiaoyun, WU Meiqin, CHEN Jianmin, *et al.* The molecular mechanisms of phytochrome interacting factors (PIFs) in phy-tohormone signaling transduction [J]. *Plant Physiol Commun*, 2016, **52**(10): 1466 – 1473.