西北植物学报,2023,43(9):1450-1458
Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.

doi:10.7606/j.issn.1000-4025.2023.09.1450 http://xbzwxb.alljournal.net

沙地云杉 *LBD* 基因家族鉴定及盐胁迫响应分析

王亚萍,隋明明,白玉娥

(内蒙古农业大学 林学院,呼和浩特 010019)

摘　要:沙地云杉(*Picea mongolica*)是我国稀有珍贵树种,具有耐旱、耐寒、耐沙埋的优良抗性。LBD(lateral organ boundaries domain)是植物侧生器官中重要的转录因子,在植物生长发育和胁迫应答进程中起关键作用,但目前尚未报道有关沙地云杉中 *LBD* 基因家族的研究。本研究参考挪威云杉全基因组数据及沙地云杉转录组数据鉴定沙地云杉 *LBD* 基因,进行生物信息学分析并利用 qRT-PCR 检测 *LBD* 基因在不同组织(茎尖、主根、侧根、茎和叶)及盐胁迫胁迫条件下的表达水平。结果表明,在沙地云杉转录组中共鉴定出 30 个 *LBD* 基因(*PmLBD1-30*),蛋白序列长度在 119～309 aa 之间,分子量为 10.5～33.4 kD,等电点介于 5.15～9.26 之间,Cell-PLoc 亚细胞定位显示均位于细胞核中;所有的 LBD 蛋白结构域、基因结构高度保守,并由相似的基序组成;根据系统发育树可将其分为 5 个亚家族(Class Ⅰa～e),沙地云杉在各类中的成员依次为 4,11,5,1,9 个;qRT-PCR 试验结果显示,*PmLBDs* 在不同组织中均有表达,如 *PmLBD2/5/18/19* 在茎中高表达,Class Ⅰb 中的 *PmLBD9/20/23* 基因在侧根中强烈表达;大多数 *PmLBDs* 的表达强烈响应盐胁迫,17 个 *PmLBD* 基因在盐处理后上调表达,而 6 个 *PmLBD* 基因在盐处理后下调表达,且同一亚族基因表达情况呈现相似趋势。

关键词:沙地云杉;*LBD* 基因家族;基因表达;盐胁迫

中图分类号:Q945.78　　**文献标志码**:A

Identification and Expression Patterns in Response to Salt Stress of the *LBD* Gene Family in *Picea mongolica*

WANG Yaping, SUI Mingming, BAI Yu'e

(College of Forestry, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010019, China)

Abstract: *Picea mongolica* is a rare and precious tree species in China, with excellent resistance to drought, cold and sand burial. LBD (lateral organ boundaries domain) is an important transcription factor in plant lateral organs, which plays a key role in plant growth and development and stress response. However, *LBD* genes hadn't yet been reported in *P. mongolica*. In this study, the *LBD* genes were identified by the genome data of *Picea abies* and transcriptome data of *P. mongolica* and bioinformatics analysis were performed. The expression levels of the *LBD* genes in different tissues (shoot tip, main root, lateral root, stem and leaf) and under salt stress were detected by qRT-PCR. The results showed that a total of 30 *LBD* genes (*PmLBD1-30*) were identified in the transcriptome of *P. mongolica*. Their protein sequence length ranged from 119 to 309 aa, molecular weight ranged from 10.5 kD to 33.4 kD, and isoelectric point (pI) ranged from 5.15 to 9.26. Cell-PLoc subcellular localization predictions suggested that all LBD proteins were located in the nucleus. Besides, all LBD protein domains and gene structures were

收稿日期:2023-03-10;**修改稿收到日期**:2023-05-25

基金项目:内蒙古自治区自然科学基金项目(2022MS03037)

作者简介:王亚萍(1994－),女,在读博士研究生,主要从事林木育种研究。E-mail:yapingwang113@gmail.com

* 通信作者:白玉娥,教授,博士生导师,主要从事林木生物技术、林木资源收集与育种研究。E-mail:baiyue@imau.edu.cn

highly conserved and composed of similar motifs. These PmLBDs were divided into 5 categories (Class Ⅰ a-e) according to the phylogenetic tree, containing 4, 11, 5, 1 and 9 genes, respectively. qRT-PCR showed that *PmLBDs* were expressed in different tissues. For example, *PmLBD2/5/18/19* were highly expressed in stems, and *PmLBD9/20/23* of Class Ⅰ b were strongly expressed in lateral roots. The expression of most *LBDs* strongly responded to salt stress, 17 *PmLBDs* were up-regulated and 6 *PmLBDs* were down-regulated under salt treatment, and the expression of genes in the same subfamily showed a similar trend.

Key words: *Picea mongolica*; *LBD* gene family; gene expression; salt stress

沙地云杉(*Picea mongolica*)为松科(Pinaceae)云杉属(*Picea*)常绿乔木，是中国珍稀濒危树种，也是北方地区防风固沙的优良树种，其自然分布在内蒙古浑善达克沙地，具有耐旱、耐寒、耐沙埋的优良抗性。因此吸引很多学者研究其分布、栽培、育苗和生理生化、体细胞胚胎发生等[1]，但其分子生物学相关研究极少，特别是抗性基因挖掘研究有限，限制了其分子育种及抗性改良研究进程。

转录因子(TFs)通过调控基因表达来参与植物许多重要的植物发育过程，如细胞形态发生、信号转导和环境胁迫反应[2]。其中，*LBD* 基因家族是高等植物一大类转录因子之一，具有高度保守的侧器官边界(LOB)结构域。LOB 结构域长度约为 100 个氨基酸，包含 3 个特定的保守结构域，从 N 端到 C 端，分别是 C 结构域(C-block)、Gly-Ala-Ser 区域(GAS-block)和类亮氨酸拉链(LX6LX3LX6L)。C 结构域是 DNA 结合所需的，由高度保守的 CX2CX6CX3C 半胱氨酸基序组成；类亮氨酸拉链(LX6LX3LX6L)主要负责蛋白质二聚化过程；GAS 基序由 49 个氨基酸残基组成，影响蛋白生物功能[3-4]。根据 LOB 结构域不同，LBD 蛋白可分为 ClassⅠ类和 ClassⅡ类。Ⅰ类 LBD 蛋白都含有 C 结构域，GAS 区域与亮氨酸拉链结构；而Ⅱ类蛋白只包含 1 个不完整的亮氨酸拉链结构，不能形成螺旋结构[5-7]，然而，进一步将Ⅰ类细分为Ⅰa～Ⅰe 5 个亚类，Ⅱ类分为Ⅱa 和Ⅱb 2 个亚类[8-9]。首个被发现的 *LBD* 基因是拟南芥中的 *AtLOB*，该基因的表达存在组织特异性，只在侧生器官的近轴端及侧根基部表达[5-6]。近年来，随着植物基因组和转录组数据的不断公布，分别在拟南芥[10]、烟草[11]、玉米[12]、水稻[6]、杨树[13]、葡萄[14]、番茄[15]及大豆[16]中鉴定到 43，98，44，35，57，30，46，46 个 *LBD* 基因。目前的研究表明，*LBD* 基因家族在植物叶、根和花发育、组织再生及胁迫响应过程起重要调控作用。如拟南芥 *LOB* 及 *LBD6* 参与调控叶片发育[3]，*LBD16* 和 *LBD29* 参与调控拟南芥侧根起始[17]，*LBD15* 通过调控 *WUS* 基因参与顶端分生组织分化[18]，*LBD16*、*LBD17*、*LBD18* 及 *LBD19* 促进愈伤组织形成[19]；水稻 *IG1* 基因调控水稻颖壳、花及雌配子体发育[20]；大豆 *LBD12* 响应非生物胁迫(干旱、盐、冷)和 IAA、ABA 及 SA 激素处理进程[16]；番茄 *LBD40* 介导茉莉酸途径负调控其抗旱性[21]；香蕉 *LBD5* 参与茉莉酸信号转导提高其耐寒性[22]；拟南芥 *LBD37*、*LBD38* 和 *LBD39* 通过抑制花青素的生物合成来响应氮胁迫[23]。尽管 *LBD* 基因家族目前已在多个物种中被鉴定和研究，但在沙地云杉中的鉴定和研究还鲜见报道。

本研究以白音敖包自然保护区生长的沙地云杉为材料，通过参考挪威云杉基因组及前期沙地云杉转录组相关数据，筛选并鉴定出 30 条沙地云杉 *LBD* 基因序列，利用生物信息学软件分析所有 *LBD* 的理化性质；并运用多重序列比对对其进行结构和保守性研究；构建沙地云杉、拟南芥及杨树 LBD 蛋白系统进化树，分析其进化关系；利用 qRT-PCR 检测 *LBD* 在沙地云杉不同组织及盐胁迫下的表达水平，以期为进一步探究沙地云杉 *LBD* 基因家族非生物胁迫功能及分子育种奠定基础。

1　材料和方法

1.1　试验材料与处理

采取内蒙古赤峰市白音敖包自然保护区沙地云杉同一母树的成熟种子，将其播种于内蒙古农业大学试验田，培养条件为 25 ℃，16 h 光照/8 h 黑暗条件，生长 1 年的幼苗分成叶片、茎、茎尖、主根、侧根(3 次生物学重复)，所有样品经液氮速冻置于－80 ℃冰箱保存。将生长 1 年的沙地云杉幼苗进行 200 mmol/L 盐胁迫处理，分别在处理 0，6，12，24 h 后采取整株样本，液氮速冻后放置于－80 ℃冰箱保存。

1.2　沙地云杉 *LBD* 基因筛选及理化性质分析

为识别沙地云杉中的 LBD 蛋白，将从模式物种拟南芥基因组数据库(https://www.arabidopsis.org/)获得 43 个 *LBD* 基因的氨基酸序列作为探

针，利用 BioEdit 7.2.0 软件[24]通过 BLASTP 比对和 HMM 比对 2 种方法对前期沙地云杉叶片转录组数据进行了局部 BlastP 搜索，使用默认参数和 *E* 值小于 0.001，初步鉴定 *LBD* 转录因子候选基因，然后用 SMART 在线软件对候选 LBD 蛋白序列进行保守结构域分析，保留具有完整 LBD 保守结构域的序列，从挪威云杉基因组（https://plantgenie.org/）中进行比较，最终获得沙地云杉云杉 *LBD* 基因成员，并根据它们的基因编号进行命名。使用在线软件 ProtParam（http://web. Expasy. org/protparam/）对沙地云杉 *LBD* 基因编码蛋白的理化性质进行分析。利用 ExPASy（http://www. expasy. ch/tools/pi_tool. html）计算 LBD 蛋白氨基酸残基数、等电点（pI）、分子量（MV），利用 CELLO v. 2.5 在线软件预测 LBD 蛋白的亚细胞定位。

1.3 沙地云杉 LBD 系统进化树构建

从 Phytozome13 数据库（https://phytozome-next. jgi. doe. gov/）获取 57 个杨树 LBDs 的蛋白序列，利用 MEGA11 软件对 43 个拟南芥 LBDs、57 个杨树 LBDs 及 30 个沙地云杉 LBDs 蛋白进行多重序列比对，再将多序列比对结果利用 MEGA11 软件采用邻接法（neighbor-joining，NJ）构建 LBD 系统进化树，校验参数设置成 1 000 次。系统进化树使用 Evolgenius 在线软件（http://www. evolgenius. info/evolview）及 Adobe Illustrator 2022 进行美化。

1.4 沙地云杉 LBD 保守结构域分析

采用 DNAMAN 软件沙地云杉 30 个 LBDs 序列进行保守域分析。为分析沙地云杉 LBDs 蛋白的保守 Motif，通过 MEME（http://meme-suite. org/）在线软件对沙地云杉 LBD 进行保守 Motif 分析，将 Motif 数目设置为 10，其他参数都被设置为默认值。

1.5 沙地云杉 *LBD* 的表达水平分析

使用 TAKARA 植物总 RNA 提取试剂盒分别从沙地云杉不同组织及盐胁迫处理样本提取总 RNA，通过 1.0% 琼脂凝胶电泳及 Nanodrop2000 测定其 RNA 完整性和浓度。逆转录的 cDNA 产物在 −20 ℃中保存，将 cDNA 稀释 5 倍后作为模板使用。使用 Primer3 设计 qRT-PCR 引物（表 1）。采用罗氏实时荧光定量 PCR 仪进行扩增，以 *EF1α*（*MA_505653g0010*）作为内参基因，采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算各基因的相对表达量，并使用 SPSS 软件进行显著性差异分析。用 TBtools 和 GraphPadPrism8 软件分别制作热图和柱状图。每个处理 3 个生物重复，每个样本 3 个技术重复。

表 1 *PmLBD* 基因家族表达分析的实时荧光定量引物

Table 1 All the primers for expression analysis of *PmLBDs*

基因 Gene	上游引物 Forward primer(5′→3′)	下游引物 Reverse primer(5′→3′)
EF1α	GATTGAGCGATCCACCAACC	CTCAGACACAGGCACAGTTC
PmLBD1	GCGATCTCAGTTCTGCAAGG	TCCTGATCCCTGCAGTCTTG
PmLBD2	TAGCCCGACTGCAAAGATCA	CAAGTTGGAGGAGGATGGGT
PmLBD3	TCTGCGGAGAGAGTGTATGG	CCGTGAACAGGATCGAGGAT
PmLBD4	GGAAGATGGCGTTGGATGTG	ATAAGGAGCCAGCACACACT
PmLBD5	TAAGATCTTTGGGGCGAGCA	TGACCTTGCAGAACCGAGAT
PmLBD6	TAGGGATGAGGAGGAGGAGG	CGCTTCTTTTATCCACAGGCA
PmLBD7	CAAGAAGGGCGTGATGATGG	TTCTTGACGAATTGGCCGAG
PmLBD8	GGCTGAGAGACCCTGTGTAT	TGATCTCCGCCCTCAACAAT
PmLBD9	GGTCACCAGCTGCCTTAAAC	GGAGACATTGCTTGCACCAA
PmLBD10	TTGCGCCATATTTTCCTCCG	TGCCAATTCCTTTTGCAGCT
PmLBD11	GCCAGCAACGTTAGCAAGAT	ATTGGCCACTTGTTGTTGCA
PmLBD12	AACACATGGGAATGCTGCAG	GTAGGTGCTCATACGGTCGA
PmLBD13	GATGACCCTCACAAGTTCGC	CGAGGGCCAACTGAGATTTG
PmLBD14	GAGAATGCAGCGGGATCATG	CCCTGGAATCATTGGCATCC
PmLBD15	ATGCAGGTGTCCAGAGAACA	GGCACCTTCGCTCCAATAAG
PmLBD16	GAACTGCTAGCTGAGGGGAG	ATGGGGAAAGTGGTCGAGTT
PmLBD17	GAAACTACCAGCTGAGGGGA	AGGGAAAGTGGTCGAGTTGT
PmLBD18	GCCTTATTTCAGCAGCGACA	GAAGAGCAACCGTGAACAGG
PmLBD19	CTGCTGAGACGAAGATGTGC	GGGATCTCTGACTCTCGCAT
PmLBD20	CTGCCTGCAAGTTTCTTCGA	TCTCTGGTGGGGATGCAATT
PmLBD21	TGTGTGCTGGCTCCTTACTT	TGCACAACCATAGACGGGAT
PmLBD22	TGCTGGCTCCTTATTTCCCA	GTGGCCAACTGAGATTGCAA
PmLBD23	ATTCGCGTCTGTTCACAAGG	GCCTCCGAGCGAAATTTGTA
PmLBD24	GCCTTTCTAGTGCTGCATCC	AATGGAGTGCACGTGTTGAG
PmLBD25	TGCTTGCTCCCTACTTTCCA	AGGATCTCGAAGTCTTGCGT
PmLBD26	GCCTGCAGATTGTTGAGGAG	GCTTCGTAAACCATGCTGCT
PmLBD27	CGCAGTGAATTCTTTGGCCT	GCGTCAGTGTGTTTGTTTGC
PmLBD28	CCGTTTGAAAGACCCCGTTT	CTGTAGCCGCGGAATGAATC
PmLBD29	CTTGCACTCATCACAGGCTC	GTGTCCAAACTGAGTCGTCC
PmLBD30	GCCGCTTGTAAGTTCCTGAG	TTTACCGCATCTTCACGCTG

2 结果与分析

2.1 *LBD* 基因鉴定与蛋白质理化性质分析

在沙地云杉中共鉴定到 30 个 *LBD* 基因，并根据基因在挪威云杉数据库的编号进行命名为 *PmLBD1*～*PmLBD30*。沙地云杉 *LBD* 基因的 CDS 长度从 360（*PmLBD3*）～930 bp（*PmLBD3*）；蛋白序列长度为 119（PmLBD3）～309 aa（PmLBD15）；分子量为 10 545.15（*PmLBD22*）～33 359.17 D（*PmLBD15*）；等电点为 5.15（*PmLBD7*，*PmLBD12*）～9.26（*PmLBD9*）；亚细胞定位结果显示，30 个沙地云杉 LBD 蛋白都位于细胞核内，见表 2。

表 2　沙地云杉 *LBD* 基因家族基本信息

Table 2　Information of the *PmLBD* gene family in *P. mongolica*

基因名称 Gene name	基因编号 Gene ID	长度 Length of CDS/bp	蛋白质序列长度 Protein sequence length/aa	分子量 Molecular weight/D	等电点 pI	亚细胞定位 Subcellular localization
*PmLBD*1	MA_16891g0010	708	235	24 238.78	6.69	细胞核 Nucleus
*PmLBD*2	MA_16891g0020	738	245	26 671.34	8.74	细胞核 Nucleus
*PmLBD*3	MA_37490g0010	360	119	13 458.33	8.71	细胞核 Nucleus
*PmLBD*4	MA_55357g0010	717	238	26 818.09	6.15	细胞核 Nucleus
*PmLBD*5	MA_61242g0010	672	223	23 901.03	8.54	细胞核 Nucleus
*PmLBD*6	MA_66501g0010	390	129	14 687.99	8.90	细胞核 Nucleus
*PmLBD*7	MA_66621g0010	882	293	32 882.71	5.15	细胞核 Nucleus
*PmLBD*8	MA_77200g0010	558	185	20 615.61	5.70	细胞核 Nucleus
*PmLBD*9	MA_84752g0010	714	237	26 690.70	9.26	细胞核 Nucleus
*PmLBD*10	MA_88711g0010	651	216	23 301.24	5.49	细胞核 Nucleus
*PmLBD*11	MA_113501g0010	576	191	21 242.89	6.34	细胞核 Nucleus
*PmLBD*12	MA_126761g0010	849	282	30 401.92	6.54	细胞核 Nucleus
*PmLBD*13	MA_127139g0010	456	151	16 656.16	8.65	细胞核 Nucleus
*PmLBD*14	MA_136689g0010	531	176	19 514.32	7.60	细胞核 Nucleus
*PmLBD*15	MA_161608g0010	930	309	33 359.17	8.24	细胞核 Nucleus
*PmLBD*16	MA_170369g0010	582	193	21 318.15	6.06	细胞核 Nucleus
*PmLBD*18	MA_172003g0010	522	173	19 743.47	6.65	细胞核 Nucleus
*PmLBD*19	MA_185511g0010	489	162	17 456.94	9.10	细胞核 Nucleus
*PmLBD*20	MA_290245g0010	675	224	24 598.77	7.68	细胞核 Nucleus
*PmLBD*21	MA_451290g0010	568	188	20 795.66	8.46	细胞核 Nucleus
*PmLBD*22	MA_5258645g0010	633	210	10 545.15	8.81	细胞核 Nucleus
*PmLBD*23	MA_9412105g0010	594	197	21 934.62	9.04	细胞核 Nucleus
*PmLBD*24	MA_962403g0010	858	285	30 443.83	7.36	细胞核 Nucleus
*PmLBD*25	MA_9839150g0010	543	180	19 804.39	5.33	细胞核 Nucleus
*PmLBD*26	MA_9924708g0010	519	172	19 514.14	5.15	细胞核 Nucleus
*PmLBD*27	MA_10056514g0010	488	161	17 360.97	8.91	细胞核 Nucleus
*PmLBD*28	MA_10429262g0010	657	218	23 623.55	6.15	细胞核 Nucleus
*PmLBD*29	MA_10434193g0010	543	180	19 839.55	5.58	细胞核 Nucleus
*PmLBD*30	MA_10434782g0020	693	230	25 679.97	5.79	细胞核 Nucleus

2.2　沙地云杉 LBD 蛋白的保守结构域分析

对 30 个 PmLBD 蛋白进行了多序列比对，所有 PmLBD 家族成员在 N 端都有 1 个高度保守的 LOB 区域，由约 100 个氨基酸组成（图 1）。多序列比较表明，30 个 PmLBD 均具有 1 个保守的 c 基序（CX2CX6CX3C）、GAS-block 和亮氨酸拉链结构（LX6LX3LX6L）。说明 PmLBD 家族序列保守性较高，在沙地云杉内可能行使相似的生物学功能。为了进一步研究 30 个 PmLBD 结构的多样性，笔者利用 MEME 在线工具预测 PmLBD 蛋白的保守基序组成（图 2）。结果表明，PmLBDs 的序列特征识别出了 10 个基序，所有 LBDs 都包含 motif1、motif2 和 motif3，构成了 LOB 结构域中高度保守的部分。除了 PmLBD3/7/18 外，其余 27 个 PmLBD 都具有 motif4。基序在大多数序列中的相对位置相似，但不同 PmLBD 也有一定差异性。其中，motif5 分布于 PmLBD16/17/26/29 中；motif6 分布于 PmLBD1/25 中；motif7 分布于 PmLBD15/27 中；motif8 分布于 PmLBD10/15/28 中；motif9 分布于 PmLBD4/21 中；motif10 分布于 PmLBD1/2/5 中。

10 个 motif 的氨基酸序列如图 3，motif1 为 GAS 保守结构域，motif2 为 CX2CX6CX3C 基序，motif3 为 LX6LX3LX6L。以上结果说明 PmLBD 具有多种生物学功能。

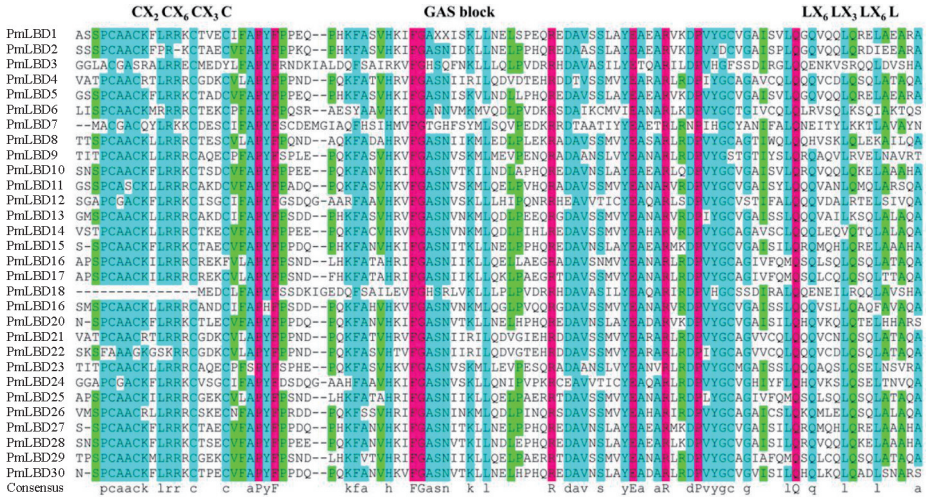
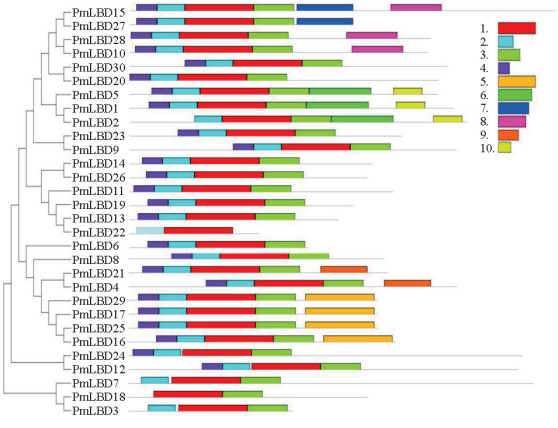


图 1 PmLBD 蛋白保守结构域序列比对

Fig. 1 Sequence alignment of the conserved domain of PmLBD protein



不同颜色的方块代表不同的基序(1—10)。

图 2 PmLBD 蛋白保守基序分析

Different colored blocks represent different motifs (1—10).

Fig. 2 Conservative motif analysis of PmLBD proteins

图 3 PmLBD 蛋白的保守氨基酸序列

Fig. 3 The conserved amino acid sequences of PmLBD proteins

2.3 沙地云杉 LBDs 蛋白系统进化分析

为了深入了解沙地云杉 PmLBD 家族蛋白之间的进化关系，通过 MEGA11 将沙地云杉(30 个)、杨树(57 个)及拟南芥(43 个)的 130 个氨基酸序列构建了系统发育树(图 4)。根据模式植物拟南芥和杨树蛋白家族分类，将 130 个 LBDs 蛋白分为 Class Ⅰ和 Class Ⅱ，共 7 个保守的进化枝。其中，Ⅰ类有 111 个成员：杨树(41%)、拟南芥(32%)和沙地云杉(27%)，分别为 46，36，30 个。Ⅱ类有 19 个成员：杨树(63%)和拟南芥(37%)，分别为 11，7 个。进一步将Ⅰ类可以细分为 5 个子类：Class Ⅰa(14%)，Class Ⅰb(27%)，Class Ⅰc(23%)，Class Ⅰd(24%)，Class Ⅰe(12%)；Class Ⅱ可以细分为Ⅱa(58%)和Ⅱb(42%)。

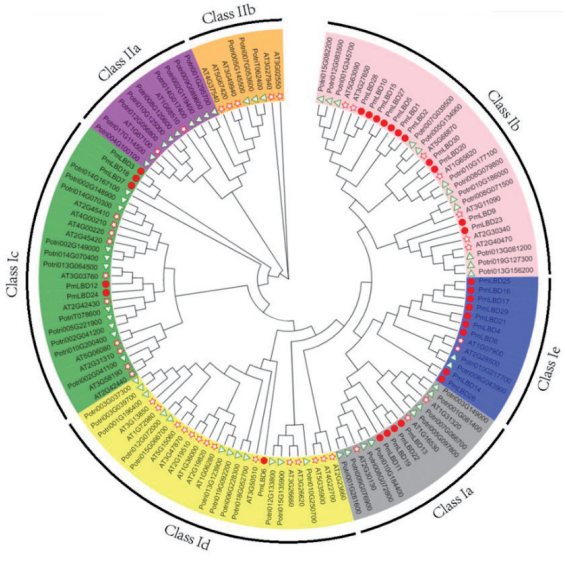
其中，LBDs 数量最多的是 Class Ⅰb，分别包含 12 个 PtLBDs，7 个 AtLBDs 和 11 个 PmLBDs；Class Ⅱb 所含 LBDs 最少，仅有 3 个 AtLBDs 和 5 个 PtLBDs；沙地云杉 LBDs 在 Class Ⅰb 中最多，有 7 个蛋白，但 Class Ⅱ中无沙地云杉 LBDs 蛋白，这可能与 PmLBDs 在 3 个物种中数量最少有关。

系统发育关系结果表明，沙地云杉的 LBD 蛋白与杨树的同源性高于拟南芥。

2.4 沙地云杉 *PmLBDs* 的组织特异性表达分析

为了进一步了解 *LBD* 基因在沙地云杉生长发育中的潜在功能，对 *LBDs* 在沙地云杉不同组织(茎尖、主根、侧根、茎和叶)中的表达水平进行分析。

如热图（图 5）所示，30 个 *PmLBDs* 均被检测到，大部分 *LBDs* 在根和叶中具有较高的转录水平，而在茎尖中表达水平较低，表明它们在根和叶的发育中具有重要功能。此外，4 个基因（*PmLBD2/5/18/19*）在茎中高表达，Class Ⅰb 中的 *PmLBD9/20/23* 基因在侧根中强烈表达。以上结果表明，不同 *PmLBD* 在杨树各组织器官中功能具有差异。



红色圆圈、绿色三角形和红色五角星分别代表沙地云杉、杨树及拟南芥。

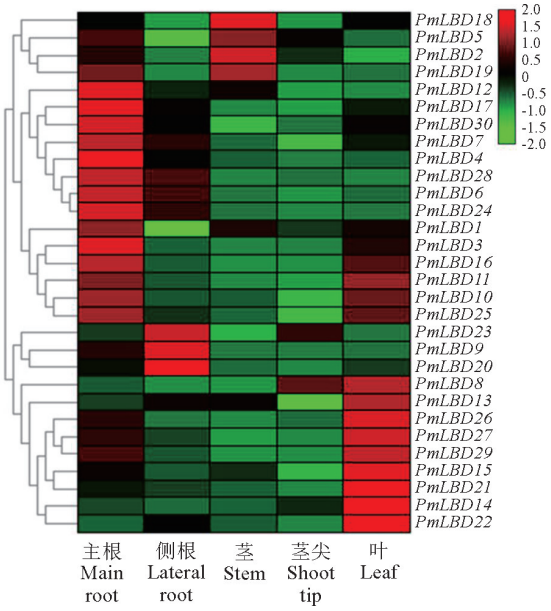
图 4　沙地云杉、毛果杨和拟南芥 LBD 蛋白系统进化树

Red circles, green triangles, and red stars indicate *P. mongolica*, *P. trichocarpa* and *A. thaliana* sequences, respectively.

Fig. 4　Phylogenetic tree of LBD proteins from *P. mongolica*, *P. trichocarpa* and *A. thaliana*

2.5　沙地云杉 *PmLBDs* 在盐胁迫下的表达模式分析

为探究沙地云杉在盐胁迫条件下潜在的生物学功能，利用 RT-PCR 技术对沙地云杉 30 个 *LBD* 基因在盐胁迫处理下的表达情况进行了分析。结果（图 6）表明在盐胁迫处理后，除了 *PmLBD3* 及 *PmLBD27* 基因外，28 个沙地云杉 *LBD* 基因表达量均发生显著的变化，且同源性越近的 *PmLBD* 表达情况越相似。

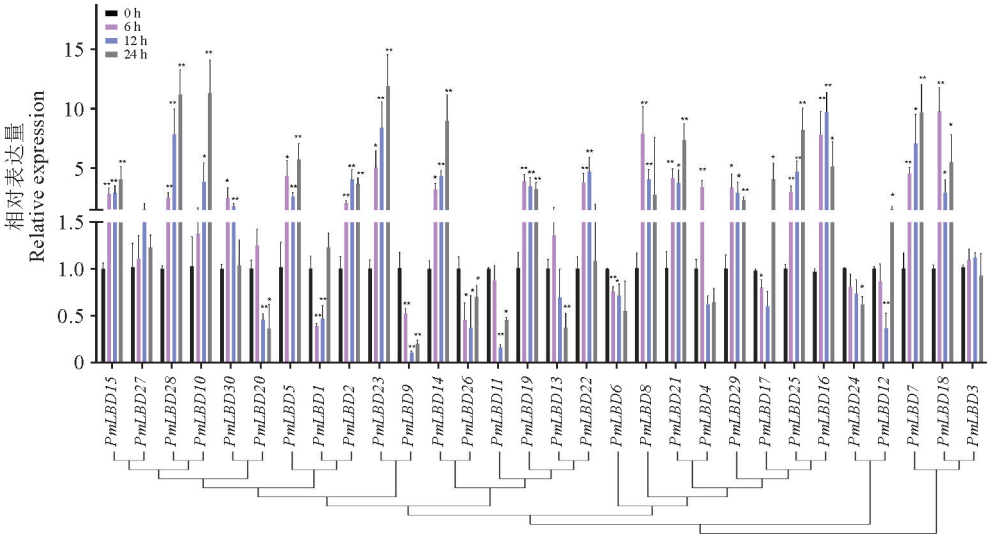


红色代表高表达，绿色代表低表达。

图 5　*PmLBDs* 在沙地云杉不同组织的表达模式

Red indicates high expression, and green indicates low expression.

Fig. 5　Expression patterns of *PmLBDs* at different tissues of *P. mongolica*



* $P < 0.05$，** $P < 0.01$。

图 6　*PmLBDs* 在盐胁迫下的表达模式

Fig. 6　Expression patterns of *PmLBDs* under salt treatment of *P. mongolica*

其中，17 个 *PmLBD* 基因在盐处理后上调表达，不同的 *PmLBD* 基因在不同盐处理时间达到峰值，包括 *PmLBD8/18/19/29/30* 在 6 h 达到峰值及 *PmLBD2/16/22* 在 12 h 达到峰值，其余 *PmLBD* 基因在 24 h 达到峰值，特别是 *PmLBD10*、*PmLBD23* 及 *PmLBD28* 在盐处理 24 h 时上调 10 倍以上；而 6 个 *PmLBD* 基因在盐处理后下调表达，尤其是 *PmLBD9* 在 12 h 时下调表达 10 倍多。以上结果说明沙地云杉 *PmLBD* 基因家族成员在耐盐进程中可能发挥不同作用。

3 讨 论

LBD 基因是 1 个植物特异性转录因子家族，已被证明在植物叶、根和花发育、组织再生及胁迫响应过程起重要调控作用；然而，目前尚未对沙地云杉进行 *LBD* 基因的系统研究。2013 年，“云杉基因组项目”联合课题组在 *Nature* 上发表挪威云杉基因组草图，基因组大小为 20 Gb，共注释约 28 354 个基因[25]。本研究通过参考挪威云杉基因组及前期沙地云杉转录组数据，筛选并鉴定了 30 条沙地云杉 *LBD* 基因序列（表 2）。沙地云杉的基因组庞大，是拟南芥的 100 多倍，但在家族成员数量上，*PmLBDs* 小于 *AtLBDs*，这表明沙地云杉在进化过程中丢失了一小部分的 *LBD* 基因。多序列比较表明，30 个 PmLBD 均具有 1 个保守的 c 基序（CX2CX6CX3C）、GAS-block 和亮氨酸拉链结构（LX6LX3LX6L）（图 1）。基因结构分析表明，不同 LBD 成员既有相似性也存在一定结构差异（图 2）。这种差异可能是因为不同亚类的成员在进化过程中经历了基因片段的剪接或插入[26-27]。LBD 亚类中相似的保守序列和基因结构通常意味着这些基因具有相似的生物学功能，这表明 LBD 家族的基序在整个进化过程中都很保守。

本研究构建了拟南芥、杨树和沙地云杉的 LBD 蛋白系统发育树，130 个 LBDs 蛋白共分为 Class Ⅰ 和 Class Ⅱ（图 4）。以往的研究表明，拟南芥中 86%的 *AtLBD* 基因、大豆中 82%的 *GmLBD* 基因和玉米中 84%的 *ZmLBD* 基因属于Ⅰ类[5,12,16]。同样，在本研究中，沙地云杉 30 个 LBD 均属于Ⅰ类。此外，Ⅰ类基因进一步被分为 5 个亚类。从分布看，Class Ⅰa、Class Ⅰb、Class Ⅰc、Class Ⅰd 和 Class Ⅰe 中每个植物都存在 *LBD* 基因，且 Class Ⅰb 中的所有 *LBD* 基因共享 1 支较长的分支，说明这些 *LBD* 基因已发生了较大的变异，可能已经分化出新的功能。此外，同源 *PmLBD* 基因对在相同组织或相同胁迫下的表达丰度相似（图 5 和图 6），表明沙地云杉中的 *PmLBD* 基因的重复可能导致了功能的冗余。

多项研究表明 LBD 蛋白参与调节植物分枝发育和花、茎、叶和根的形成[28-33]。基因的组织特异性表达可以为深入了解其在生长发育中的功能提供见解[34]。在本研究中，分析了 *PmLBDs* 在沙地云杉不同组织（茎尖、主根、侧根、茎和叶）中的表达水平模式，许多 *PmLBDs* 在特定组织中表现出较高的表达水平（图 5）。例如，属于 Class Ⅰb 分支的 *PmLBD9*、*PmLBD20* 和 *PmLBD23* 在侧根中高表达，其在拟南芥中同源基因是 *AT2G30340*（*AtLBD13*），研究表明 *AtLBD13*、*AtLBD16*、*AtLBD18* 和 *AtLBD29* 在调节拟南芥侧根发育中发挥重要作用[35-37]，故推测其功能可能与 *AtLBD13* 相似，可作为调控沙地云杉侧根发育的候选基因。另外，笔者发现有 4 个基因（*PmLBD2*、*PmLBD5*、*PmLBD18* 和 *PmLBD19*）在沙地云杉茎组织中强烈表达，表明其在沙地云杉茎发育中起着重要作用。基于这些结果，推测沙地云杉 *PmLBD* 基因在其生长发育进程中起着关键作用，但具体的生物学功能其调控分子机制需要进一步验证。

据报道，*MYB*、*WRKY*、*NAC* 等转录因子参与了抵抗非生物胁迫，帮助植物抵抗或适应环境的变化[38-40]。到目前为止，已有多项研究表明 *LBD* 基因在非生物胁迫反应中也发挥着重要作用[41-43]。在本研究中，qRT-PCR 结果表明大部分沙地云杉 *LBD* 基因响应盐胁迫，其中 57%的基因随处理时间表达上调，20%的基因表达下调（图 6）。这些结果表明，*PmLBD* 基因广泛参与沙地云杉的各种非生物胁迫反应。此外，众所周知，根系是响应干旱和盐胁迫的主要器官[44]。在本研究中，*PmLBD10*、*PmLBD23* 及 *PmLBD28* 在根中强烈表达且在盐处理 24 h 时上调 10 倍以上，表明这些基因是调控沙地云杉盐胁迫的候选基因。以往的研究也表明，*LBD* 基因在不同的非生物胁迫下显著上调表达。例如，马铃薯 *StLBD2-6* 和 *StLBD3-5* 是在干旱胁迫下显著上调[9]；小麦 *Ta-6B-LBD81*、*Ta-4B-LBD51* 和 *Ta-U-LBD90* 在盐胁迫下表达上调，*Ta-4A-LBD40* 和 *Ta-4D-LBD62* 在冷胁迫下表达上调，而 *Ta-2A-LBD13*、*Ta-2B-LBD15* 和 *Ta-2D-LBD18* 在干旱胁迫下表达上调[43]。值得注意的是在沙地云杉侧根中高表达的 *PmLBD9* 在 12 h 时下调表达 10 倍多，推测其可能是沙地云杉盐胁迫的负调控基因。在大豆中的研究也发现 36 个 *PvLBDs* 在盐及重金属胁迫处理中下调表达[45]。综上所述，*PmLBD* 基因对盐胁迫

表现出不同程度的反应，虽然其参与非生物胁迫反应的分子机制尚不清楚，但为开展沙地云杉进一步的抗性研究提供了候选基因。

4　结　论

沙地云杉 PmLBD 蛋白家族包含 30 个成员，理化性质分析显示：蛋白序列长度在 119～309 aa 之间，分子量为 10.5～33.4 kD，等电点为 5.15～9.26，Cell-PLoc 亚细胞定位显示均位于细胞核中。按照蛋白结构和聚类分析可以分为 5 个亚家族，Class Ⅰb 与 Class Ⅰe 亚家族包含大部分成员。RT-PCR 结果表明，沙地云杉 *PmLBD9*、*PmLBD20* 和 *PmLBD23* 也可能在侧根发生过程中发挥作用。另外发现大部分沙地云杉 *PmLBD* 基因响应盐胁迫，特别是 *PmLBD10*、*PmLBD23* 及 *PmLBD28* 在盐处理 24 h 时上调 10 倍以上，可作为调控沙地云杉盐胁迫的候选基因，但 *PmLBD9* 在盐胁迫中起相反作用。本研究初步揭示了大部分 *PmLBDs* 在植物生长发育及盐胁迫中发挥的作用，为沙地云杉 *PmLBDs* 基因功能进一步研究奠定了基础。

参考文献：

[1] 哈布尔，白玉娥，候伟峰，等. 沙地特有树种沙地云杉研究进展与展望[J]. 北方园艺，2021(14)：152-157.
HA B E，BAI Y E，HOU W F，*et al*. Research progress and prospect of *Picea mongolica* of species endemic to sandy land [J]. *Northern Horticulture*，2021(14)：152-157.

[2] LATCHMAN D S. Introductory overview-transcription factors：An overview[J]. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*，1997，**29**(12)：1 305-1 312.

[3] MATSUMURA Y，IWAKAWA H，MACHIDA Y，*et al*. Characterization of genes in the *ASYMMETRIC LEAVES2/LATERAL ORGANBOUNDARIES*（*AS2/LOB*）family in *Arabidopsis thaliana*，and functional and molecular comparisons between *AS2* and other family members[J]. *The Plant Journal*，2009，**58**：525-537.

[4] MAJER C，HOCHHOLDINGER F. Defining the boundaries：Structure and function of LOB domain proteins[J]. *Trends in Plant Science*，2011. **16**：47-52.

[5] SHUAI B，REYNAGA-PEÑA C G，SPRINGER P S. The lateral organ bound aries gene defines a novel，plant-specific gene family[J]. *Plant Physiology*，2002，**129**：747-761.

[6] HIDEKAZU I，YOSHIHISA U，ENDANG S，*et al*. The *ASYMMETRIC LEAVES2* gene of *Arabidopsis thaliana*，required for formation of a symmetric flat leaf lamina，encodes a member of a novel family of proteins characterized by cysteine repeats and a leucine zipper[J]. *Plant and Cell Physiology*，2002，**5**：467.

[7] LANDSCHULZ W H，JOHNSON P F，MCKNIGHT S L. The leucine zipper：A hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins [J]. *Science*，1988，**240**(4 860)：1 759-1 764.

[8] CHANDERBALI A S，HE F，SOLTIS P S，*et al*. Out of the water：Origin and diversification of the *LBD* gene family[J]. *Molecular Biology and Evolution*，2015，**32**(8)：1 996-2 000.

[9] LIU H，CAO M，CHEN X，*et al*. Genome-wide analysis of the lateral organ boundaries domain（*LBD*）gene family in *Solanum tuberosum*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*，2019，**20**(21)：5 360.

[10] YANG Y，YU X，WU P. Comparison and evolution analysis of two rice subspecies *LATERAL ORGAN BOUNDARIES* domain gene family and their evolutionary characterization from *Arabidopsis*[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*，2006，39：248-262.

[11] 孙亭亭，龚达平，张　磊，等. 普通烟草 *LBD* 基因家族的全基因组序列鉴定与表达分析[J]. 植物遗传资源学报，2016，**17**(2)：316-325.
SUN T T，GONG D P，ZHANG L，*et al*. Genome-wide sequence identification and expression analysis of the *LBD* gene family in *Nicotiana tabacum*[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*，2016，**17**(2)：316-325.

[12] ZHANG Y M，ZHANG S Z，ZHENG C C. Genomewide analysis of LATERAL ORGAN BOUNDARIES domain gene family in *Zea mays*[J]. *Journal of Genetics*，2014，**93**：79-91.

[13] YORDANOV Y S，REGAN S，BUSOV V. Members of the LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN transcription factor family are involved in the regulation of secondary growth in *Populus*[J]. *The Plant Cell*，2010，**22**：3 662-3 677.

[14] 何红红，马宗桓，张元霞，等. 葡萄 *LBD* 基因家族的鉴定与表达分析[J]. 中国农业科学，2018，**51**(21)：4 102-4 118.
HE H H，MA Z H，ZHANG Y X，*et al*. Identification and expression analysis of *LBD* gene family in grap[J]. *Scientia Agricultura Sinica*，2018，**51**(21)：4 102-4 118.

[15] 王小非，刘　鑫，苏　玲，等. 番茄 *LBD* 基因家族的全基因组序列鉴定及其进化和表达分析[J]. 中国农业科学，2013，**46**(12)：2 501-2 513.
WANG X X，LIU X，SU L，*et al*. Identification，evolution and expression analysis of the *LBD* gene family in tomato[J]. *Scientia Agricultura Sinica*，2013，**46**(12)：2 501-2 513.

[16] YANG H，SHI G，DU H，*et al*. Genome-wide analysis of soybean LATERAL ORGAN BOUNARIES domain-containing genes：A functional investigation of *GmLBD12*[J]. *The Plant Genome*，2017，**10**(1)：1-19.

[17] OKUSHIMA Y，FUKAKI H，ONODA M，*et al*. ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of *LBD/ASL* genes in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*，2007，**19**(1)：118-130.

[18] SUN X，FENG Z，MENG L，*et al*. *Arabidopsis* ASL11/LBD15 is involved in shoot apical meristem development and regulates WUS expression[J]. *Planta*，2013，**237**：1 367-1 378.

[19] FAN M，XU C，XU K，*et al*. LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN transcription factors direct callus formation in *Arabidopsis* regeneration [J]. *Cell Research*，2012，**22**(7)：1 169-1 180.

[20] ZHANG J, TANG W, HUANG Y, *et al*. Down-regulation of a *LBD*-like gene, *OsIG1*, leads to occurrence of unusual double ovules and developmental abnormalities of various floral organs and megagametophyte in rice[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, **66**(1): 99-112.

[21] LIU L, ZHANG J, XU J, *et al*. CRISPR/Cas9 targeted mutagenesis of *SILBD40*, a lateral organ boundaries domain transcription factor, enhances drought tolerance in tomato [J]. *Plant Science*, 2020, **301**: 110 683.

[22] BA J, KUANG J, CHEN J, *et al*. MaJAZ1 attenuates the MaLBD5-mediated transcriptional activation of jasmonate biosynthesis gene Ma*AOC2* in regulating cold tolerance of banana fruit[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, **64**(4): 738-745.

[23] RUBIN G, TOHGE T, MATSUDA F, *et al*. Members of the *LBD* family of transcription factors repress anthocyanin synthesis and affect additional nitrogen responses in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2009, **21**(11): 3 567-3 584.

[24] HALL T A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment program for Windows 95/98/NT [J]. *Nucleic Acids Symposium Series*, 1999, **41**: 95-98.

[25] NYSTEDT B, STREET N R, WETTERBOM A, *et al*. The Norway spruce genome sequence and conifer genome evolution[J]. *Nature*, 2013, **497**: 579-584.

[26] STAIGER D, BROWN J. Alternative splicing at the intersection of biological timing, development, and stress responses[J]. *The Plant Cell*, 2013, **25**(10): 3 640-3 656.

[27] LI J, MENG X, ZONG Y, *et al*. Gene replacements and insertions in rice by intron targeting using CRISPR-Cas9[J]. *Nature Plants*, 2016, **2**: 16 139.

[28] SEMIARTI E, UENO Y, TSUKAYA H, *et al*. The *ASYMMETRIC LEAVES2* gene of *Arabidopsis thaliana* regulates formation of a symmetric lamina, establishment of venation and repression of meristem-related homeobox genes in leave[J]. *Development*, **128**(10): 1 771-1 783.

[29] IWAKAWA H, UENO Y, SEMIARTI E, *et al*. The *ASYMMETRIC LEAVES2* gene of *Arabidopsis thaliana*, required for formation of a symmetric flat leaf lamina, encodes a member of a novel family of proteins characterized by cysteine repeats and a leucine zipper[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2002, **43**: 467-478.

[30] MAJER C, XU C, BERENDZEN K W, *et al*. Molecular interactions of rootless concerning crown and seminal roots, a LOB domain protein regulating shoot-borne root initiation in maize (*Zea mays* L.)[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 2012, **367**(1 595): 1 542-1 551.

[31] CABRERA J, DÍAZ-MANZANO F E, SANCHEZ M, *et al*. A role for *LATERAL ORGAN BOUNDARIES-DOMAIN 16* during the interaction *Arabidopsis-Meloidogyne* spp. provides a molecular link between lateral root and root-knot nematode feeding site development[J]. *New Phytologist*, 2014, **203**: 632-645.

[32] YU J, XIE Q, LI C, *et al*. Comprehensive characterization and gene expression patterns of *LBD* gene family in *Gossypium*[J]. *Planta*, 2020, **251**: 81.

[33] YU Q, HU S, DU J, *et al*. Genome-wide identification and characterization of the lateral organ boundaries domain gene family in *Brassica rapa* var. *rapa*[J]. *Plant Diversity*, 2020, **42**: 52-60.

[34] XIAO J, HU R, GU T, *et al*. Genome-wide identification and expression profiling of *trihelix* gene family under abiotic stresses in wheat[J]. *BMC Genomics*, 2019, **20**: 287.

[35] CANNON S B, MITRA A, BAUMGARTEN A, *et al*. The roles of segmental and tandem gene duplication in the evolution of large gene families in *Arabidopsis thaliana*[J]. *BMC Plant Biology*, 2004, **4**: 10.

[36] GOH T, TOYOKURA K, YAMAGUCHI N, *et al*. Lateral root initiation requires the sequential induction of transcription factors LBD16 and PUCHI in *Arabidopsis thaliana*[J]. *New Phytologist*, 2019, **224**: 749-760.

[37] LEE H W, KIM N Y, LEE D J, *et al*. *LBD18/ASL20* regulates lateral root formation in combination with *LBD16/ASL18* downstream of *ARF7* and *ARF19* in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2019, **151**: 1 377-1 389.

[38] 朱志鹏，刘慧玲，吴可鑫，等. 秋葵 *AeMYB1R1* 转录因子基因克隆及对胁迫的响应[J]. 西北植物学报，2022，**42**(6)：909-919.
ZHU Z P, LIU H L, ZHANG Y X, *et al*. Cloning transcription factor *AeMYB1R1* gene of *Abelmoschus sesculentus* and analysis of its response to abiotic stress[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2022, **42**(6): 909-919.

[39] 杜 萍，吴庆莲，伊文一，等. 茎用莴苣 2 个 WRKYⅢ亚族转录因子基因的克隆与表达[J]. 西北植物学报，2022，**42**(10)：1 644-1 653.
DU P, WU Q L, YI W Y, *et al*. Cloning and expression of two WRKYⅢ subfamily transcription tactor genes from *Asparagus Lettuce* [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2022, **42**(10): 1 644-1 653.

[40] 刘永昌，聂祝运，张 斌，等. 水稻 *NACA* 基因家族的鉴定及 *NACA2* 功能研究[J]. 西北植物学报，2022，**42**(3)：371-380.
LIU Y C, NIE Z Y, ZHANG B, *et al*. Identification of *NACA* gene family in Rice and function analysis of *NACA2*[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2022, **42**(3): 371-380.

[41] KONG Y, XU P, JING X, *et al*. Decipher the ancestry of the plant-specific *LBD* gene family[J]. *BMC Genomics*. 2017, **18**(1): 1-10.

[42] ZHANG X, HE Y, HE W, *et al*. Structural and functional insights into the LBD family involved in abiotic stress and flavonoid synthases in *Camellia sinensis*[J]. *Scientific Reports*, 2019, **9**: 15 651.

[43] WANG Z, ZHANG R, CHENG Y, *et al*. Genome-wide identification, evolution, and expression analysis of LBD transcription factor family in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, **12**: 721 253.

[44] KRESZIES T, EGGELS S, KRESZIES V, *et al*. Seminal roots of wild and cultivated barley differentially respond to osmotic stress in gene expression, suberization, and hydraulic conductivity [J]. *Plant, Cell & Environment*, 2020, **43**: 344-357.

[45] DU Y L, ZHAO Q, LI W J, *et al*. Genome-wide identification of the LBD transcription factor genes in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and expression analysis under different abiotic stresses[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, **12**: 721 253.

（编辑：韦青侠）