

沙棘 LBD 基因家族鉴定及其在花芽发育过程中的表达分析

李昕娟¹, 杨盼盼², 张恬¹, 任乾丹¹, 周武^{1*}

1 青海大学 生态环境工程学院, 青海 西宁 810016

2 新疆大学 生命科学与技术学院 新疆生物资源与基因工程重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830046

李昕娟, 杨盼盼, 张恬, 任乾丹, 周武. 沙棘 LBD 基因家族鉴定及其在花芽发育过程中的表达分析[J]. 生物工程学报, 2025, 41(2): 753-770.

LI Xinjuan, YANG Panpan, ZHANG Tian, REN Qiandan, ZHOU Wu. LBD gene family in *Hippophae rhamnoides*: identification and expression pattern during flower bud development[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(2): 753-770.

摘要: 外侧器官边界域(lateral organ boundaries domain, LBD)转录因子广泛存在于高等植物中,并在植物生长发育和逆境胁迫等过程中发挥了非常重要的作用。沙棘(*Hippophae rhamnoides* L.)作为一种抗旱、耐寒、耐盐碱的灌木,具有一定的生态价值和经济价值。为了分析 LBD 基因家族在中国沙棘雌雄花芽发育过程中的作用,本研究利用生物信息学方法从沙棘全基因组数据中鉴定出了 11 个 LBD 基因。LBD 基因家族不均匀分散在 5 条染色体上,编码 159–302 个氨基酸,分子质量为 18 249.91–33 202.01 Da。亚细胞定位预测表明蛋白质分布于细胞核或叶绿体中;LBD 序列较为保守,具有高度相似的基序、基因结构和蛋白质三维结构;将沙棘与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、大麦(*Hordeum vulgare*)的 LBD 基因进行系统发育分析发现, HrLBD 基因家族均可细分为 Class I 和 Class II 两大亚家族;转录组及反转录实时荧光定量聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-qPCR)结果显示, HrLBD 基因在沙棘雄性花芽发育过程中表达量更高,并随着花芽发育过程表达量逐渐升高,推测 HrLBD 基因在特定时期影响沙棘雄性花芽发育。本研究为阐明 HrLBD 基因在沙棘雌雄花芽生长发育中的作用和性别分化机制奠定了理论基础。

关键词: 沙棘; 外侧器官边界域(LBD)基因家族; 花芽发育; 基因表达; 反转录实时荧光定量聚合酶链式反应

资助项目: 国家自然科学基金(32160386); 青海省科技厅应用基础研究项目(2024-ZJ-782)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32160386) and the Applied Basic Research Projects of Qinghai Science and Technology Department (2024-ZJ-782).

*Corresponding author. E-mail: zhouwu870624@qhu.edu.cn

Received: 2024-02-28; Accepted: 2024-05-06; Published online: 2024-05-07

LBD gene family in *Hippophae rhamnoides*: identification and expression pattern during flower bud development

LI Xinjuan¹, YANG Panpan², ZHANG Tian¹, REN Qiandan¹, ZHOU Wu^{1*}

1 College of Eco-environmental Engineering, Qinghai University, Xining 810016, Qinghai, China

2 Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, Xinjiang, China

Abstract: Lateral organ boundaries (LOB) domain (LBD) genes encode a family of transcription factors ubiquitous in higher plants, playing crucial roles in the growth, development, and stress responses. *Hippophae rhamnoides*, known for its drought, cold, and saline-alkali tolerance, offers significant economic benefits and ecological values. Utilizing the whole genome data and bioinformatics approaches, this study identified and analyzed the LBD gene family in *H. rhamnoides*. Additionally, we examined the expression pattern of HrLBD genes by integrating the transcriptome data from male and female flower buds in development. Eleven LBD genes were identified in *H. rhamnoides*, and these genes were distributed on five chromosomes. The HrLBD proteins showed the lengths ranging from 159 aa to 302 aa, the molecular weights between 18 249.91 Da and 33 202.01 Da, and the subcellular localization in the nucleus or chloroplasts. LBD protein domains and gene structures were highly conserved, featuring similar motifs. The phylogenetic analysis of HrLBD genes and the LBD genes in *Arabidopsis thaliana* and *Hordeum vulgare* revealed that HrLBD genes fell into two major categories: Class I and Class II. The transcriptome data and RT-qPCR showed that HrLBD genes were highly expressed in male flower buds, with up-regulated expression levels throughout bud development, indicating a role in the specific stage of male flower bud development. This study lays a theoretical foundation for exploring the roles of HrLBD genes in the growth, development, and sex differentiation of *H. rhamnoides* flower buds.

Keywords: *Hippophae rhamnoides*; lateral organ boundaries (LOB) domain (LBD) gene family; flower bud development; gene expression; reverse transcription-polymerase chain reaction

沙棘(*Hippophae rhamnoides* L.)属胡颓子科(Elaeagnaceae)沙棘属(*Hippophae*), 是雌雄异株的多年生落叶灌木, 主要分布于亚欧大陆。沙棘是一种抗旱、耐寒、耐盐碱的灌木, 在土壤中生长的同时还可对土壤土质进行改善^[1], 对恶劣环境有很强的适应性。同时, 作为一种具有悠久历史的药用植物, 其果实富含多种维生素和药理活性物质, 如具有抗氧化、抗疲劳和保肝特性的多糖^[2], 可减少脂质氧化并缓解疼

痛的生育酚^[3], 降低中风和心脏病发作风险的有机酸^[4], 与食欲、睡眠及记忆力有关的香豆素和三萜^[5]。因此, 沙棘既有生态价值又具有经济价值, 在进行开发利用的同时也可为生态修复作出贡献^[6]。

LBD 基因家族因其包含保守的外侧器官边界(lateral organ boundaries, LOB)结构域而得名, 因此 LBD 基因也可被称为 LOB 基因^[7]。在对调控拟南芥植物叶片发育机制的研究中,

最早得到了 *AtASL4* (*AtLOB*) 基因, 因此 LBD 基因家族又被命为不对称叶 (asymmetric leaves2-like, ASL)^[8]。LBD 迄今为止只在植物中被发现, 是一类植物特有的转录因子^[9]。LBD 基因包含 3 个特定的保守结构域, 分别是类似锌指结构的 CX2CX6CX3C 结构域、类似亮氨酸拉链 (LX6LX3LX6L) 的螺旋卷曲 (coiled coil) 二级结构和甘氨酸-丙氨酸-丝氨酸 (GAS) 区域^[10]。

LBD 基因家族与多种转录因子协作形成多个分子调控网络, 在植物应对环境胁迫响应及调控生长发育等生理方面发挥着重要作用^[11]。从已有的部分研究结果来看, 不同物种间的同源 LBD 基因具有相似的生物学功能, 说明其可能参与同一器官在近缘物种的发育过程^[12-14]。对水稻抽穗期的研究, 更正了大多数报道认为第二类 LBD 基因参与代谢而不参与生长的观点^[15-16]。LBD 基因家族参与高等植物生长和代谢过程中的多个生物学反应并在其中起着重要作用。

LBD 基因家族参与植物的生长、发育和形态建成, 并对应答生物和非生物等逆境胁迫有重要的作用。比如, LBD 可以调控植物对低温、干旱和盐胁迫的响应^[17-18]。目前, LBD 基因家族的研究仅在少数物种中有所涉及, 包括毛果杨 (*Populus trichocarpa*)、甜瓜 (*Cucumis melo*)、谷子 (*Setaria italica*)、胡杨 (*Populus euphratica*)、沙地云杉 (*Picea mongolica*) 等。在拟南芥中, *AtLBD* 过表达时, 会造成植物花器官的异常, 继而导致不育^[19]; *AtAS2* (*AtLBD6*) 在拟南芥幼嫩花器官中与具有 C2H2 锌指结构的转录因子 JAGGED (JAG) 可协同抑制多个基因的表达, 从而促进花器官的正常发育^[20]。在禾本科植物的花序发育过程中, 与拟南芥 *AtLBD* 同源的基因均具有保守表达模式^[21]。*AtLBD27* 也被称作侧车花粉 (sidecar pollen, SCP) 蛋白, 与 *AtLBD10* 在花粉发育的特定阶段作为转录激活因子发挥

作用^[9]。*AtLBD18* 和 *AtLBD30* 则在未成熟的导管分子中, 参与导管的分化^[22]。*CmLBD2* 的表达量随甜瓜果实成熟度的增加逐渐上升, 且 1-甲基环丙烯 (1-methylcyclopropene, 1-MCP) 会抑制其表达水平, 推测 *CmLBD2* 的表达可能受乙烯的正向调控^[23]。LBD 基因在毛果杨的多种组织中均有不同程度的表达, 在休眠花芽和开放花芽中分别有 4 个和 1 个 LBD 基因高表达, 一部分基因在花芽休眠过程中均存在着表达量的变化, 可能与花芽的休眠有关^[24]。在沙地云杉中 LBD 基因在特定组织中高表达, 在沙地云杉的生长发育中起重要作用^[25]。在长穗偃麦草 (*Thinopyrum elongatum*) 中, LBD 基因参与对光、激素和逆境的响应^[26]。LBD 基因在萝卜的不同组织中都有表达, 推测与心里美萝卜肉质根花青素的合成、萝卜叶片的形态建成和花的发育有关^[27]。辣椒中的 LBD 基因与拟南芥和水稻等植物的 LBD 基因家族具有相似的表达模式; 在热激条件下 Class II 中基因表达量显著高于 Class I, 在应答过程中也更敏感^[12]。葡萄中的 LBD 基因家族成员均与逆境的响应有关, 在不同逆境胁迫中的响应程度存在差异^[10]。

植物的生长发育是个复杂的过程, 不仅受到外界环境因素的影响, 更是植物体内的各基因与调节因子相互作用的结果^[28]。随着测序技术的发展和测序价格的降低, 多个物种已完成了全基因组测序, 为 LBD 基因家族在全基因组水平的鉴定和功能研究奠定了基础^[27]。LBD 基因家族在多个物种中的功能也被研究, 然而有关沙棘 LBD 基因家族的全基因组鉴定尚未见报道。本研究通过信息生物学对沙棘 LBD 基因的顺式作用元件、系统发育树、基因结构、染色体分布、亚细胞定位、预测蛋白三维结构、分析保守结构域、构建系统进化树等进行鉴定与分析, 初步探究了沙棘 LBD 基因家族的基

因结构及其在雌雄植株花芽发育不同阶段中的功能。

1 材料与amp;方法

1.1 材料及数据来源

沙棘花芽样本均采集自青海省西宁大通回族土族自治县边麻沟村(N36°96'65.64", E101°84'16.39")。分别采集雌雄花芽在发育过程中开花前后 3 个不同阶段的样品(3 次生物学重复), 提供样品的雌雄沙棘树均呈现自然散生状态。

由于沙棘为雌雄异株植物, 因此需分别选取生长发育正常的雌、雄中国沙棘树各 3 株进行样品采集。通过对中国沙棘花芽分化关键期的观察及相关数据的总结, 决定于 4-5 月分 3 阶段对样品进行采集, 第一阶段和第二阶段均为花芽开花之前, 第三阶段为开花后, 3 个阶段之间均相隔 10 d。将采集得到的样本进行标注, 雌性命名为 PF, 雄性为 SF, 并放入液氮中速冻, 后转移至-80 °C 冰箱中保存备用。

沙棘的全基因组数据及基因结构注释文件均来自于 CNGBdb 数据库(<https://db.cngb.org/>), 利用 Phytozome13 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>)数据库查找并下载拟南芥和大麦 LBD 基因的蛋白质序列, 保留含有完整 LOB 结构域的蛋白序列。从 Pfam (<http://pfam-legacy.xfam.org/>)数据库搜索并下载 LBD 结构域(PF03195)对应的隐马尔可夫模型。

1.2 沙棘 LBD 基因家族成员的鉴定

使用 LBD 结构域(PF03195)的隐马尔可夫模型文件在中国沙棘蛋白数据库中进行 HMMER 检索, 利用 SMART、NCBI 工具和 Pfam (<http://pfam-legacy.xfam.org/>)数据库, 对筛选出来的转录因子的结构域进行比对和确认, 最终获得沙棘 LBD 基因家族序列。

1.3 基因及其编码蛋白分析

使用 ExPASy 网站(https://web.expasy.org/compute_pi/)分析沙棘 LBD 基因家族成员的蛋白质相对分子质量、分子长度、等电点等理化性质。同时使用 Cell-PLoc 网站(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc/>)对其亚细胞定位进行预测。利用 TBtools 软件将提取出的 LBD 基因家族成员与沙棘通用特征格式(general feature format, GFF)文件相结合绘制沙棘 LBD 基因在染色体上的定位图。将获取的 11 个沙棘 LBD 基因的蛋白序列通过软件 MEGA 11 的 Clustal W 进行比对, 继而使用 GeneDoc 软件将比对结果进行调整。

利用蛋白质序列分析网站 MEME (<http://meme-suite.org/>)对已经鉴定的中国沙棘 LBD 相关蛋白进行保守基序分析和可视化绘图, 设置搜索 motif 的总个数为 10。从沙棘 GFF 文件中提取出所需的 LBD 基因家族的内容, 获得基因在染色体上的外显子、内含子位置信息, 再利用 GSDS 网站(<http://gsds.gao-lab.org/>)结合 PhyloSuite 软件得到的沙棘 LBD 基因家族的进化树, 绘制基因结构图。使用启动子在线分析数据库 PlantCARE 对鉴定得到的中国沙棘 LBD 基因家族的基因进行顺式作用元件分析。

利用 McscanX 对多个基因组中共线性区段的关系查找共线性, 根据沙棘和拟南芥物种间位置信息得到共线性绘图。

采用 SOPMA 对沙棘 LBD 蛋白进行二级结构预测分析, 使用网站 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>), 采用同源建模的方法构建蛋白质 3D 模型, 选择好合适的模型构建 3D 模型, 之后保存模型的 pdb 文件, 提交至 SAVES (<https://saves.mbi.ucla.edu/>)网站进行评估, 其中有 3 个模型显示通过, 即表示模型可用。

1.4 系统发育树构建与分析

利用 PhyloSuite 软件对沙棘、拟南芥和大麦的 LBD 蛋白序列进行多序列比对, 利用该软件中贝叶斯法构建系统进化树。使用 iTOL (<https://itol.embl.de/>)对进化树进行美化。

1.5 基于转录组的沙棘 LBD 基因表达分析

将 3 个不同时间阶段雌、雄花芽样本分别提取总 RNA, 对总 RNA 进行浓度和纯度的测定, 并检测其完整性。均合格后构建文库, 使用 Illumina NovaSeq6000 测序平台进行 PE150 模式测序(青岛百迈客生物科技有限公司, <http://www.biomarker.com.cn/>), 并进行真核有参转录组的测序分析。对经过 RNA-Seq 测序获得的原始数据(raw data)进行质控, 去除含有接头的 reads, 过滤含有未知碱基比例大于 10% 的片段, 过滤质量值 ≤ 10 的碱基占整条 read 的 50% 以上的 reads, 获得高质量 clean data。

使用 HISAT2 软件将 clean data 比对至参考沙棘基因组上(Hippophae_rhamnoides.CNSA_v1.0.genome.fa), 获取 reads 在沙棘参考基因组上的定位信息, 再利用 StringTie 将已经比对上的 reads 进行重组, 得到重构转录组, 采取每千个碱基的转录每百万映射读取的片段(fragments per kilobase million, FPKM)进行标准化, 作为衡量基因表达水平的指标。使用 DESeq2 软件进行差异分析, 设置筛选标准为 $|\text{fold change}| \geq 2$ 、错误发生率(false discovery rate, FDR)=0.01 且差异倍数(fold change, FC)为 2。将得到的 LBD 基因在花芽开花前后的 FPKM 进行归一化处理, 后利用 TBtools 绘制成图。

1.6 RT-qPCR 验证及数据处理

在得到的 LBD 基因中选择 6 个基因, 使用天根 FastKing 一步法除基因组 cDNA 第一链合成预混试剂盒对 RNA 进行反转录, 得到 cDNA

并储存至 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中, 将 cDNA 浓度定量至 $1\text{ }\mu\text{g}$ 后作为模板使用, 使用 Primer3 设计引物(表 1), 采用 *Tubulin* 作为内参基因, 使用 Roche LightCycler[®] 96 仪器进行扩增, 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相对表达量, 分别使用 TBtools 和 GraphPad Prism10 软件绘制热图和柱状图。

表 1 实时荧光定量引物

Table 1 Primers of RT-qPCR

Primer names	Primer sequence (5'→3')
<i>HrLBD1</i> -F	GCTGATCGTTGTGAGGCAGTTTC
<i>HrLBD1</i> -R	GCTGTGTTCTTGCTTGCATTAGTTG
<i>HrLBD6</i> -F	CATCACCAGCAGCAGCAACAAC
<i>HrLBD6</i> -R	CAACGAAGGCGACACAACAGC
<i>HrLBD7</i> -F	CGAGACTCCACAAGCCCAAGG
<i>HrLBD7</i> -R	AATCAGGGACGGCGAGATAAAG
<i>HrLBD8</i> -F	TTTGCCCTTGCCCTTGTCTCTC
<i>HrLBD8</i> -R	ATCCAGTTCAGTCCAGCCAGAAAG
<i>HrLBD9</i> -F	TTCCAGAGAGACACAGAGAAGATGC
<i>HrLBD9</i> -R	GCTGACAAATAGCACCTGCACTAC
<i>HrLBD10</i> -F	GGTCCACCTGGAACCCTAAACAC
<i>HrLBD10</i> -R	GGACATTCTTGAGCACACCTTCTTC
<i>Tubulin</i> -F	GGAGATGTTCCGCAGAGTTAG
<i>Tubulin</i> -R	GTGAACCTCCATCTCATCCATACC

2 结果与分析

2.1 沙棘 LBD 基因家族成员及其理化性质分析

通过利用生物信息学方法, 最终从沙棘全基因组中鉴定出 11 个 LBD 基因家族成员, 利用网站 ExPASy 对沙棘 LBD 的分子质量和等电点进行了预测(表 2), 结果发现最长的沙棘 LBD 蛋白含 302 个氨基酸残基, 其相对分子质量为 33 202.01 Da, 最短的蛋白含有 159 个氨基酸残基, 其相对分子质量为 18 249.91 Da; 其中有 4 个成员蛋白质长度在 100–200 aa 之间; 有 6 个家族成员的长度在 200–300 aa 之间; 有 1 个家族成员的长度在 300–400 aa 之间。4 个基因家族成员编码的蛋白质等电点大于 7, 是

碱性蛋白质, 其余 7 个基因家族成员编码的蛋白质等电点均小于 7, 为酸性蛋白质。亚细胞定位预测结果显示, 这些蛋白在细胞核和叶绿体中均有分布。

2.2 染色体定位分析

通过提取的沙棘 LBD 基因家族成员结合 GFF 文件, 绘制 LBD 基因在染色体上的分布图, 结果显示(图 1), 11 个 LBD 基因家族成员不均匀地分布于沙棘 12 对染色体中 5 条染色体上。

其中 chr3 上分布有 3 个 LBD 基因, chr12 上有 4 个 LBD 基因, chr8 上有 2 个 LBD 基因, 而 chr6 和 chr7 上各有 1 个 LBD 基因。*HrLBD2*、*HrLBD3* 在 chr3 上紧密相邻, *HrLBD8*、*HrLBD11* 和 *HrLBD10* 在 chr12 上紧密相邻, 但通过共线性关系分析发现, 它们之间在进化上不存在复制关系。沙棘 LBD 基因在染色体上的非均匀性, 表明其在演化过程中具有一定的遗传多样性。

表 2 沙棘 LBD 基因成员信息

Table 2 The information of LBD in *Hippophae rhamnoides*

Gene names	Gene ID	Amino acids length	Molecular weight (Da)	Theoretical pI	Subcellular localization
<i>HrLBD1</i>	Hiprha1gene00185	218	24 123.45	7.55	Nucleus
<i>HrLBD2</i>	Hiprha1gene00186	222	25 212.94	5.97	Nucleus
<i>HrLBD3</i>	Hiprha1gene00216	200	22 314.96	6.57	Nucleus
<i>HrLBD4</i>	Hiprha1gene00950	221	24 479.15	4.75	Nucleus
<i>HrLBD5</i>	Hiprha1gene01195	159	18 249.91	8.36	Chloroplast
<i>HrLBD6</i>	Hiprha1gene01907	302	33 202.01	6.82	Nucleus
<i>HrLBD7</i>	Hiprha1gene02068	234	25 589.27	8.09	Chloroplast
<i>HrLBD8</i>	Hiprha1gene02287	195	21 427.11	6.50	Chloroplast
<i>HrLBD9</i>	Hiprha1gene02326	249	27 668.30	6.80	Nucleus
<i>HrLBD10</i>	Hiprha1gene02480	235	26 105.47	8.59	Nucleus
<i>HrLBD11</i>	Hiprha1gene02499	178	19 961.88	6.36	Nucleus

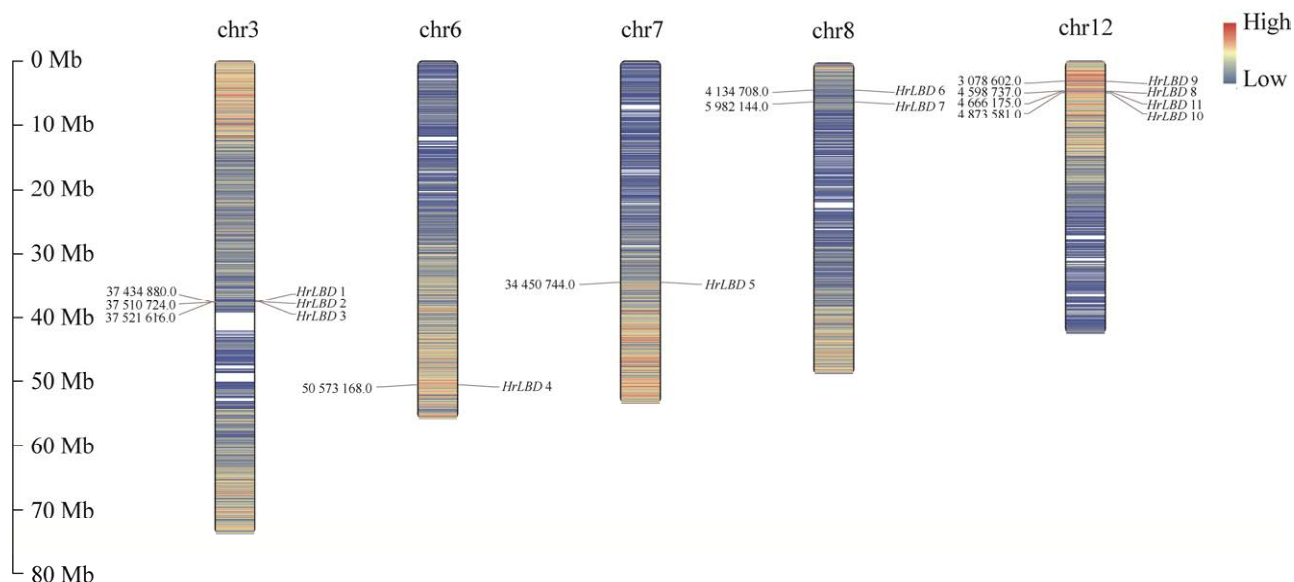


图 1 沙棘 LBD 基因染色体定位分布

Figure 1 The chromosomal location and distribution of LBD genes in *Hippophae rhamnoides*.

2.3 编码蛋白多序列比对分析

将 11 个沙棘 LBD 蛋白序列使用软件 MEGA 11, 选择 Clustal W 进行比对, 利用 GeneDoc 软件将比对结果进行调整。结果如图 2 所示, 在沙棘 LBD 蛋白的 N 末端, 都有一个 CX2CX6CX3C 的保守结构, 由 15 个氨基酸残基构成, 这表明它可能与下游的顺式作用元件相结合有关。N 端为一个类似亮氨酸拉链的螺旋卷曲结构(亮氨酸拉链式基序 LX6LX3LX6L), 可能参与转录因子的二聚化过程。另外, 沙棘 LBD 蛋白还含有 GAS 模块(GAS-block), 该模块的 C 端含有 2 种保守的脯氨酸(P)和甘氨酸(G), 脯氨酸和甘氨酸是重要的氨基酸, 具有多种生物学功能, 它们在沙棘 LBD 基因家族的生物学功能中可能发

挥至关重要的作用。

2.4 蛋白质保守基序及基因结构分析

应用 MEME 在线分析了 11 个沙棘 LBD 基因家族的基因序列, 构建了沙棘 LBD 蛋白的保守基序及保守氨基酸序列图(图 3)。每个沙棘 LBD 蛋白均包含 4-6 个 motif, 并且大多数都含有 motif 1、motif 2, 构成了 LOB 结构域中高度保守的部分, 基序的相对位置大多相似, 但不同的 HrLBD 成员间也存在差异。例如, 除 HrLBD7 外均含有 motif 3, motif 4 存在于 HrLBD4、HrLBD7、HrLBD8 和 HrLBD9 中, motif 5 仅存在于 HrLBD1、HrLBD7 中, motif 6 只出现在 HrLBD2、HrLBD5 中, 只有 HrLBD2、HrLBD3 中含有 motif 10。



图 2 沙棘 LBD 编码蛋白的多序列比对

Figure 2 The LBD protein multiple sequence alignment of *Hippophae rhamnoides*.

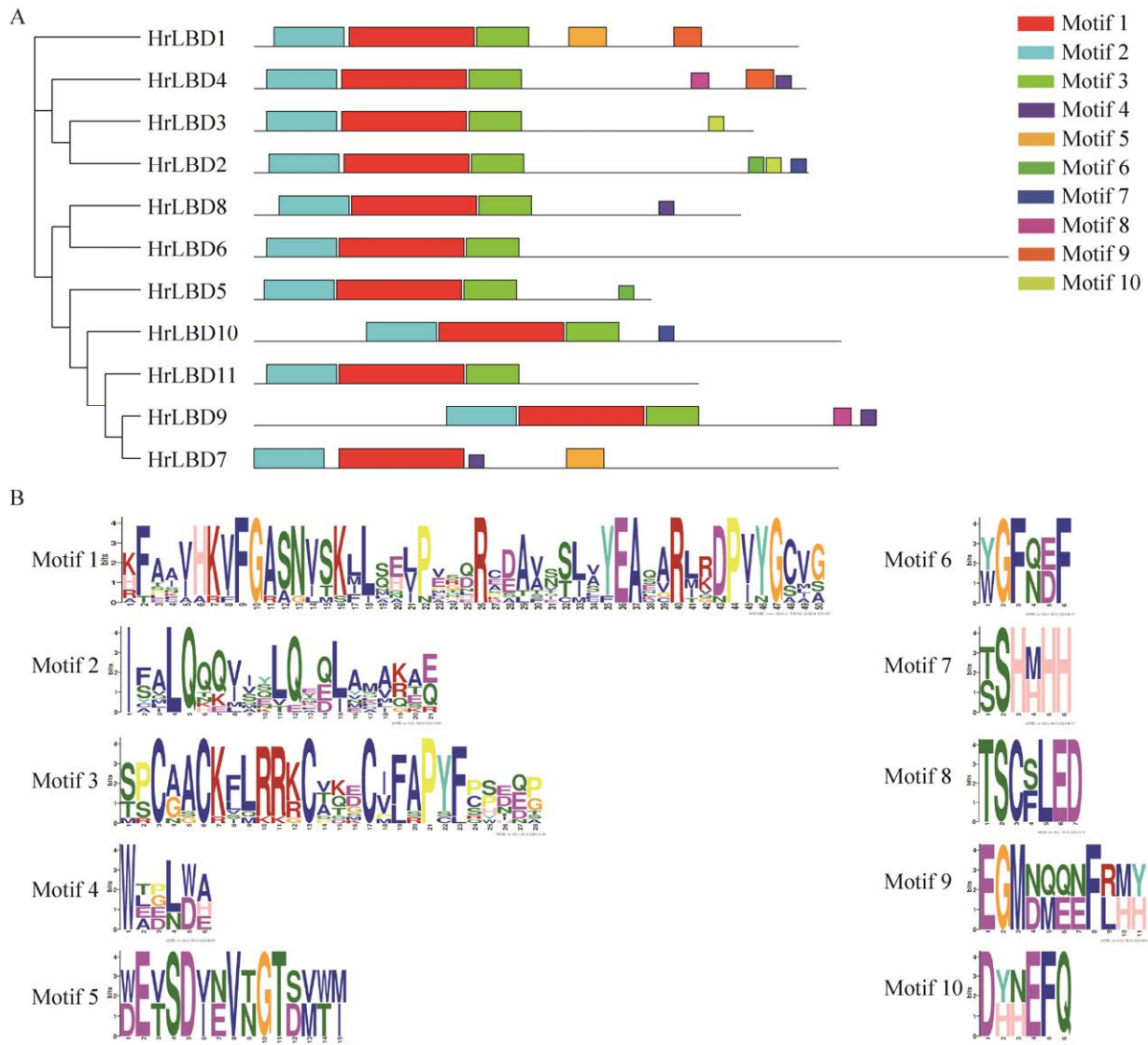


图3 HrLBD 蛋白保守基序(A)及保守氨基酸序列(B)

Figure 3 Conserved motifs (A) and conserved amino acid sequences (B) of HrLBD proteins.

结合图 2 多序列比对图可知, 此处的 motif 1 为保守结构域 GAS, motif 2 则是 CX2CX6CX3C, motif 3 是 LX6LX3LX6L 基序。

内含子外显子结构的差异往往是基因家族演化过程中非常重要的因素, 可以帮助了解基因的结构, 从而更好地支持系统发生类群的研究。因此, 研究内含子外显子结构差异对于了解基因家族的演化过程具有重要意义。为了进一步了解沙棘 LBD 基因结构, 对沙棘 LBD 基

因的内含子和外显子结构进行了分析(图 4)。结果表明, 沙棘的 11 个 LBD 基因中, 有 2 个 HrLBD 基因仅含有 1 外显子, 7 个 HrLBD 基因含有 2 个外显子, 2 个含有 3 个外显子, 表明在沙棘中 LBD 基因的结构较为简单。

2.5 顺式作用元件分析

为进一步探讨 HrLBD 基因在沙棘中的功能及表达调控方式, 使用 PlantCARE 在线分析鉴定起始密码子上游 2 000 bp 的顺式作用元件

(图 5), 可知 HrLBD 的启动子除包括基本的顺式作用元件外, 还具有 3 种类型元件: (1) 光响应元件如光响应元件 G-Box、Box-4 和 GT1-motif 等; (2) 胁迫响应调控元件, 如厌氧胁迫相关元件(antioxidant response elements, ARE);

(3) 激素响应元件, 如脱落酸响应元件(abscisic acid responsive elements, ABRE)、赤霉素响应元件 P-box 和水杨酸响应元件 TCA-element; 推测 HrLBD 可能在植物的光周期响应、逆境胁迫和生长发育中发挥着重要的作用。HrLBD 基因中

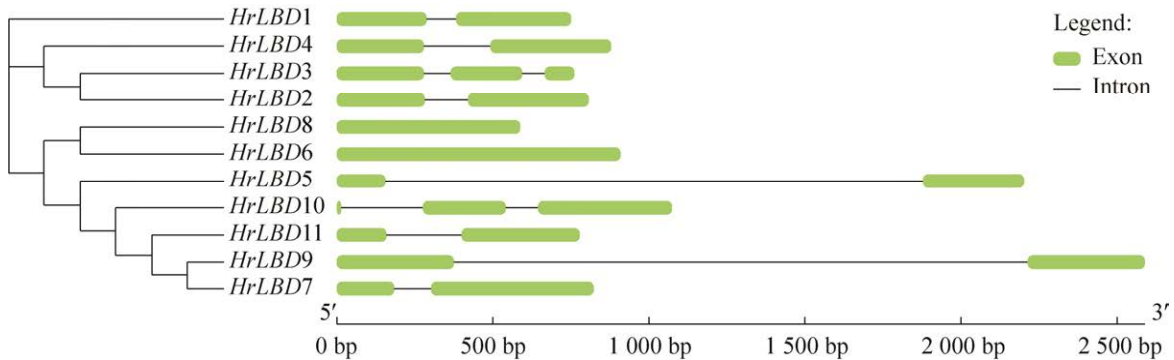


图 4 沙棘 LBD 基因的系统发育树及基因结构图

Figure 4 Phylogenetic trees and gene structures of LBD genes in *Hippophae rhamnoides*.

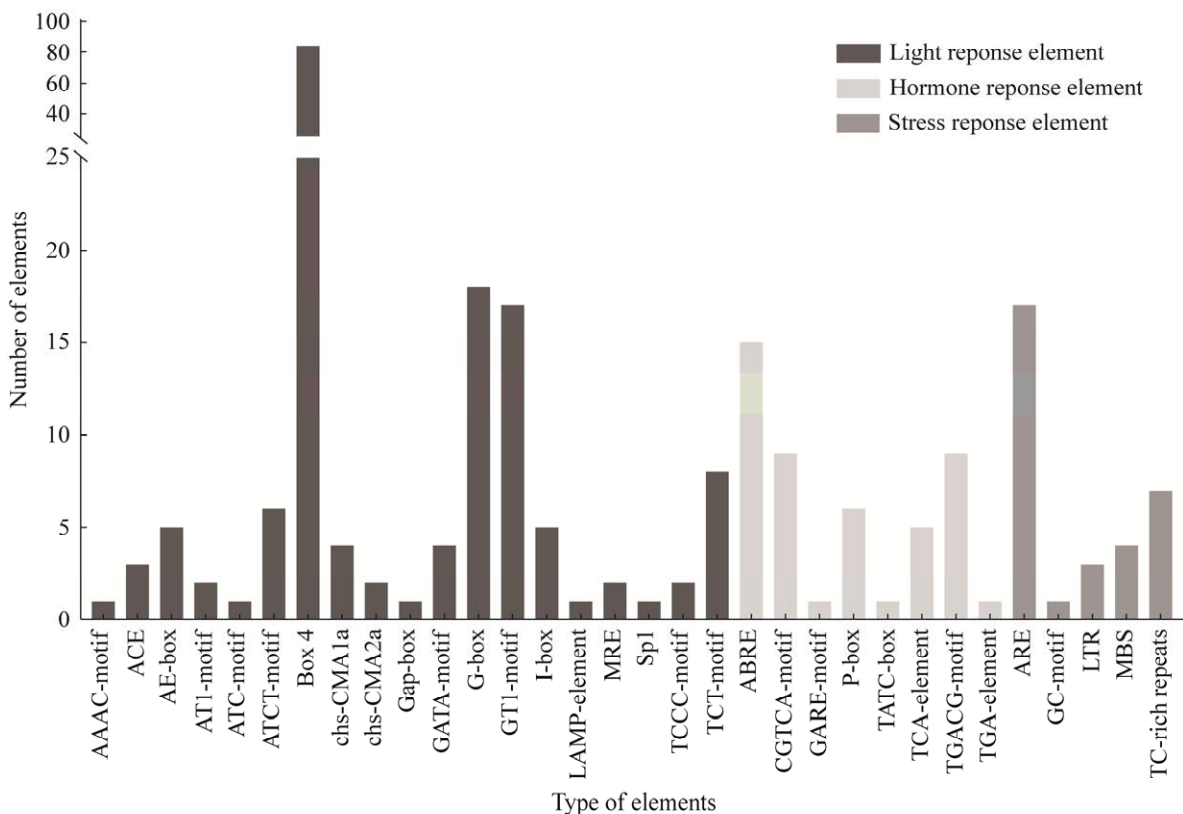


图 5 沙棘 LBD 启动子顺式作用元件分析

Figure 5 Analysis of *cis*-acting elements of LBD promoters in *Hippophae rhamnoides*.

光响应元件最多, 共有 167 个, 其中含有 84 个 Box-4 顺式作用元件、18 个 G-box 元件与 17 个 GT1-motif 元件, 推测 HrLBD 基因的转录可能与光周期有关。激素响应调控元件和胁迫响应调控元件则分别有 47 个和 32 个。使用 TBtools 软件绘制调控元件分布图, 可观察到在 *HrLBD8* 基因上并未存在胁迫响应调控元件, 其余 10 个 HrLBD 基因上均有 3 种类型元件的分布。此处选取元件数量较多的 11 种元件进行展示(图 6)。

2.6 物种间共线性分析

利用 McscanX 查看多个基因组中的共线性

区段, 并根据沙棘和拟南芥物种间的位置信息, 绘制出共线性图谱(图7)。结果发现, 沙棘中 chr6 与拟南芥中 chr5 有对应关系; 沙棘中 chr8 与拟南芥中 chr5、chr3、chr2、chr4 有对应关系; 沙棘中 chr12 与拟南芥中 chr3、chr2 有对应关系。这些共线性关系表明拟南芥和沙棘在进化上具有同源关系, 说明拟南芥和沙棘产生分化时间相对较近。

2.7 蛋白二级结构及三维结构预测

将蛋白序列输入 SOPMA 对蛋白质的二级结构进行预测, 结果见表 3。可知 HrLBD1、

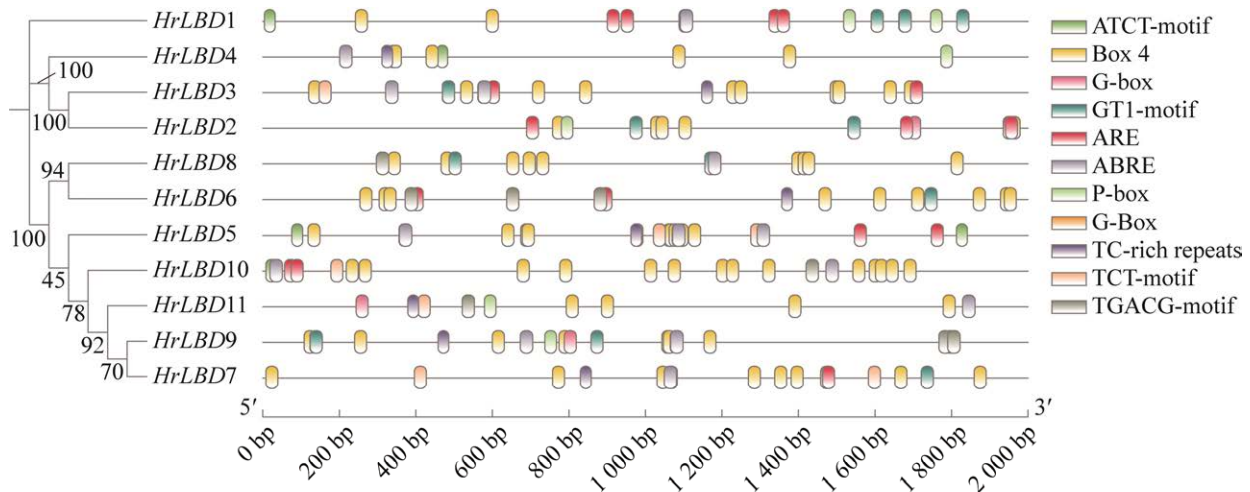


图 6 沙棘 LBD 启动子顺式作用元件分布

Figure 6 Distribution of *cis*-acting elements of LBD promoters in *Hippophae rhamnoides*.

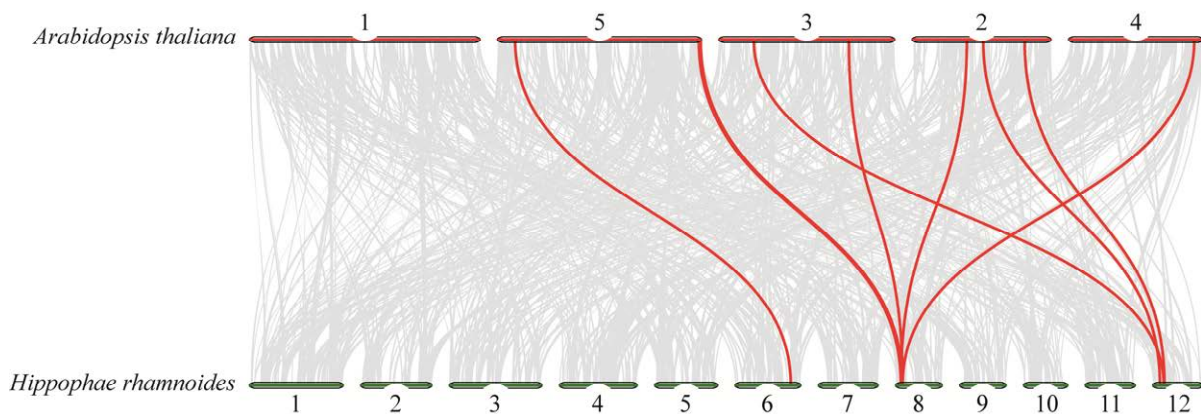
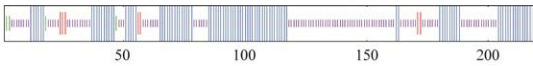
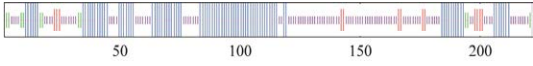


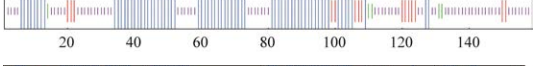


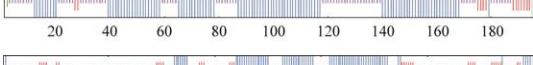

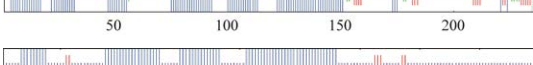
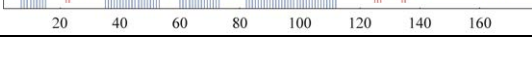


图 7 沙棘和拟南芥组间共线性可视化分析

Figure 7 Visualization analysis of collinearity among *Hippophae rhamnoides* and *Arabidopsis thaliana*.

表 3 沙棘 LBD 蛋白二级结构预测

Table 3 Secondary structure prediction of LBD in *Hippophae rhamnoides*

Protein name	Alpha helix (%)	Beta turn (%)	Extended strand (%)	Random coil (%)	Distribution of secondary structural elements	
HrLBD1	42.66	1.83	3.67	51.83		Extracellular protein
HrLBD2	40.09	4.95	6.76	48.20		Extracellular protein
HrLBD3	55.50	2.00	3.00	39.50		Extracellular protein
HrLBD4	49.77	1.36	6.33	42.53		Extracellular protein
HrLBD5	42.77	3.14	9.43	44.65		Extracellular and intracellular protein
HrLBD6	39.74	1.99	7.95	50.33		Extracellular and intracellular protein
HrLBD7	20.94	5.98	11.11	61.97		Extracellular and intracellular protein
HrLBD8	53.33	1.03	7.18	38.46		Extracellular and intracellular protein
HrLBD9	30.12	2.01	13.65	54.22		Extracellular and intracellular protein
HrLBD10	43.83	3.83	7.66	44.68		Extracellular and intracellular protein
HrLBD11	41.01	0.00	3.93	55.06		Extracellular and intracellular protein

HrLBD2、HrLBD3 和 HrLBD4 为胞外蛋白，其余皆为存在于跨膜区的蛋白。在 HrLBD11 中不存在 β -转角，11 个基因均具有 α -螺旋和无规则卷曲。

以同源模型为基础，对沙棘 11 个 LBD 基因中的编码蛋白进行了蛋白三维结构分析(图 8)。结果发现它们具有高度的相似性，处于系统发育树不同分组 LBD 基因的三维结构模型整体相似度较高，同一类群蛋白三维结构模型相似度也较高，均由 α -螺旋、 β -折叠和无规则卷曲等组成。LBD 蛋白的空间结构主要包括：不同的氨基酸排列、蛋白质与配体之间的结合以及蛋白质内部的相互作用等，空间结构决定了 LBD 蛋白的功能，所以不同的 LBD

蛋白具有不同的活性和功能。

2.8 系统进化分析

为了更好地了解沙棘的 LBD 基因家族的亲缘关系，利用 MEGA 11 软件对沙棘、拟南芥和大麦的 LBD 蛋白序列进行比对分析并构建系统进化树(图 9)。该进化树中包含 11 个 HrLBD (沙棘)、40 个 AtLBD (拟南芥)和 33 个 HvLBD (大麦)蛋白。根据模式植物拟南芥的蛋白家族分类，将 84 个 LBD 蛋白分为 Class I (72 个)和 Class II (12 个)两大亚家族，其中 Class I 又可被分为 Class I a (26 个)、Class I b (9 个)、Class I c (9 个)、Class I d (11 个)和 Class I e (17 个)这 5 类；Class II 可被分为 Class II a (6 个)和 Class II b (6 个)这 2 类。

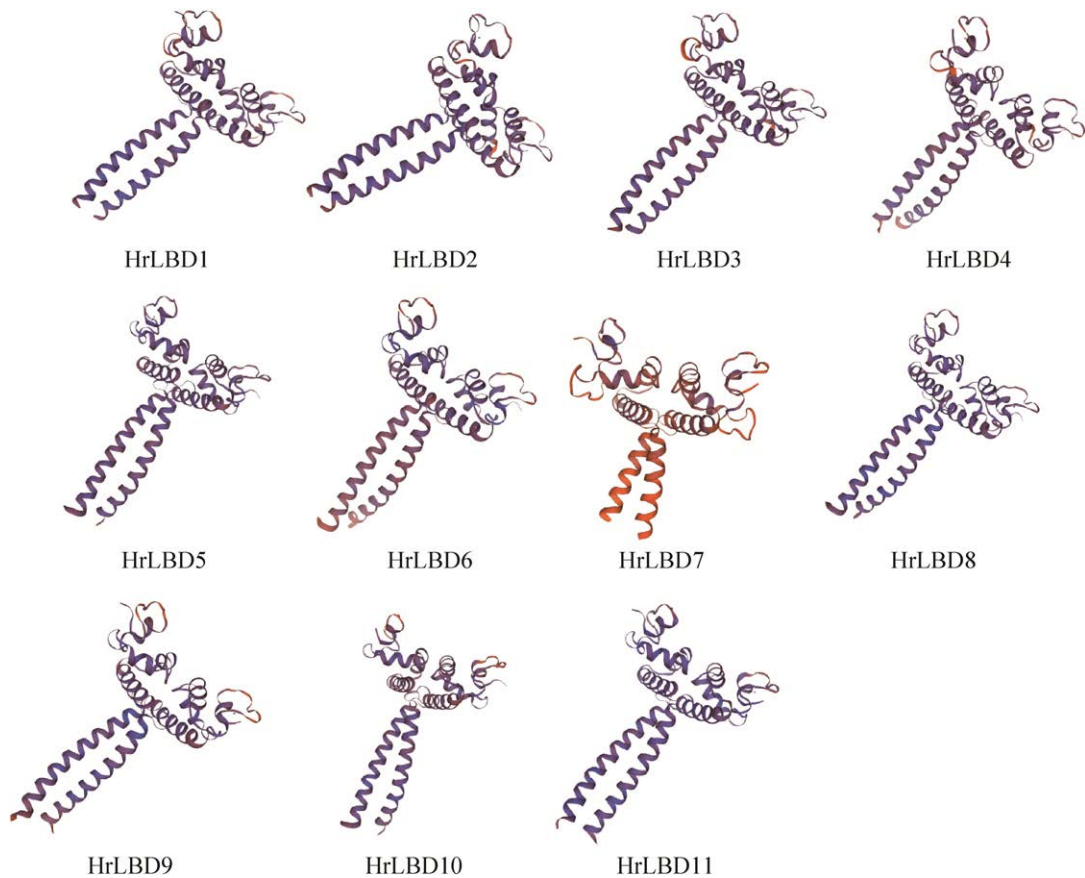


图 8 沙棘 LBD 蛋白三维结构

Figure 8 Three-dimensional structure of LBD protein in *Hippophae rhamnoides*.

沙棘 LBD 基因多分布于 Class I 中(10 个), 在 Class I a (3 个)、Class I b (2 个)、Class I c (1 个)、Class I d (3 个)和 Class I e (1 个)中均有分布, 仅有 1 个成员分布在 Class II a 中, Class II b 中没有 HrLBD 基因, 可能是 HrLBD 的数量较少导致。

Class I a 中存在着数量最多的 LBDs, 包含 3 个 HrLBD、14 个 AtLBD 和 9 个 HvLBD, 共 26 个; Class II a 和 Class II b 均含有最少数量的 LBD, Class II a 中存在 1 个 HrLBD、3 个 AtLBD 和 2 个 HvLBD, 而在 Class II b 中仅存在 3 个 AtLBD 和 3 个 HvLBD。综上可知, 沙棘的 LBD 基因家族在保守的同时也存在一定差异。

2.9 沙棘 LBD 在开花前后花芽中的表达分析

为探究 LBD 基因在沙棘花芽发育的不同阶段中的潜在功能, 对 11 个 LBD 基因在雌、雄沙棘花芽开花前后的 3 阶段中的表达量进行了分析, 并利用 TBtools 制作热图(图 10)。可知, *HrLBD1*、*HrLBD6*、*HrLBD7*、*HrLBD8*、*HrLBD9*、*HrLBD10* 在雌、雄花芽的不同发育阶段中均有较稳定的表达。其中, *HrLBD8* 在雌、雄花芽的不同阶段均有较高的表达水平, 在雌性花芽发育的第三阶段(开花后)表达最强烈。*HrLBD10* 在雄性花芽的第二阶段(即将开花)和第三阶段(开花后)表达水平高于第一阶段, 同时也高于在雌性花芽发育的 3 个阶段中的表达量。以上结

果表明,不同的 HrLBD 在雌、雄花芽间功能存在差异,同时在同一性别花芽的不同发育阶段中也存在差异。

为进一步探究 LBD 基因家族在沙棘雌、雄花芽开花前后不同 3 个阶段中的表达情况,利用 RT-qPCR 技术对 6 个 HrLBD 基因在雌、雄花芽发育 3 个阶段中的表达状况进行了分析,

并绘制成图(图 11)。结果表明,多数 HrLBD 在雄性花芽中的表达量高于其在雌性花芽中的表达量,与转录组中 FPKM 值的表达相符;且大多数的 HrLBD 基因在雄性花芽中的表达量较高,并随着花芽发育表达量逐步升高,而在雌性花芽中的表达量较低,同时不具有规律性的变化。

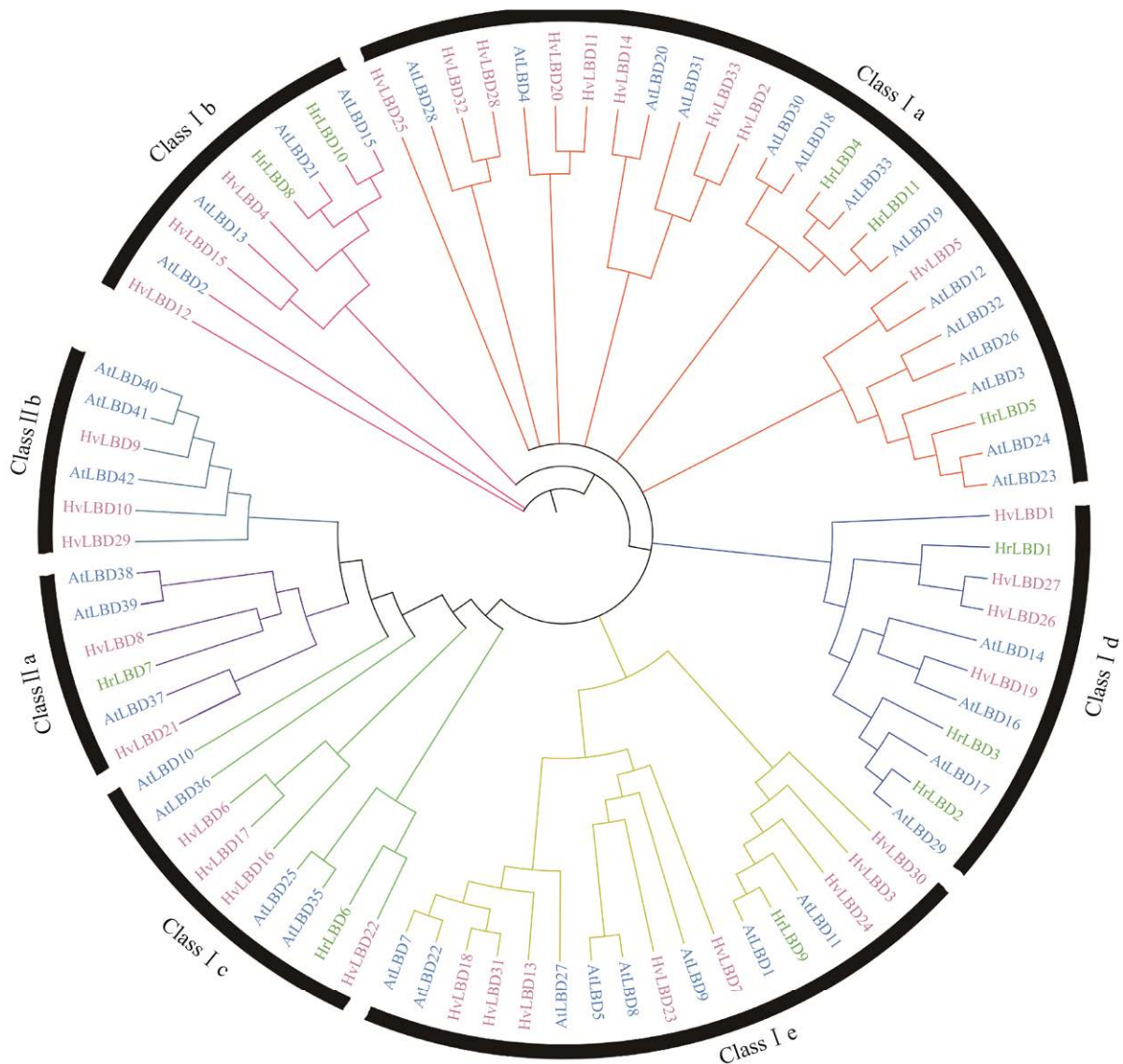


图 9 沙棘、拟南芥和大麦 LBD 蛋白系统发育树

Figure 9 LBD protein phylogenetic tree of *Hippophae rhamnoides*, *Arabidopsis thaliana* and *Hordeum vulgare*. Green indicates *Hippophae rhamnoides*, blue indicates *Arabidopsis thaliana*, and pink indicates *Hordeum vulgare*.

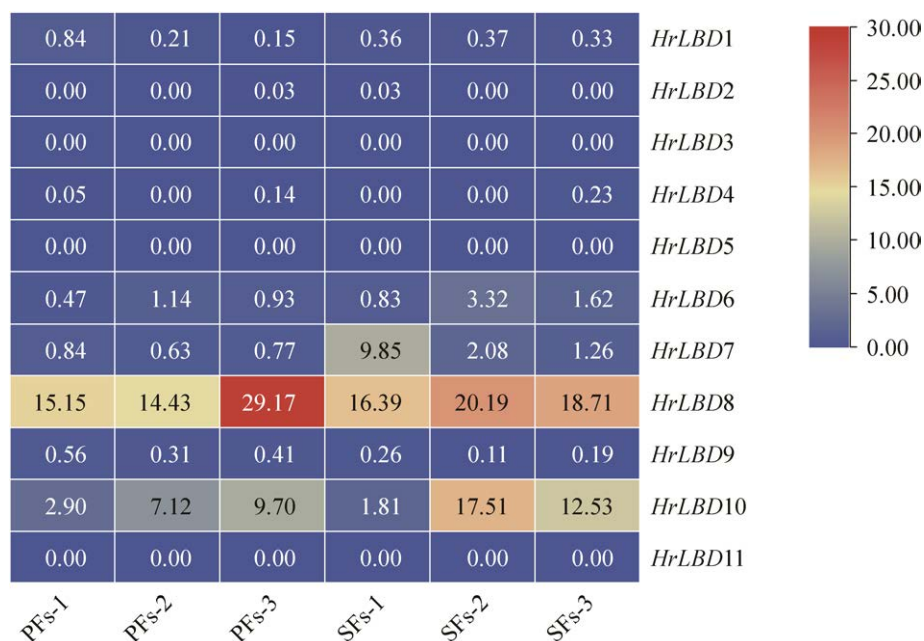


图 10 LBD 在沙棘花芽不同发育阶段中的表达

Figure 10 Expression of LBD at different stages of flower buds in *Hippophae rhamnoides*. Red indicates high expression, and green indicates low expression; PF indicates female and SF indicates male.

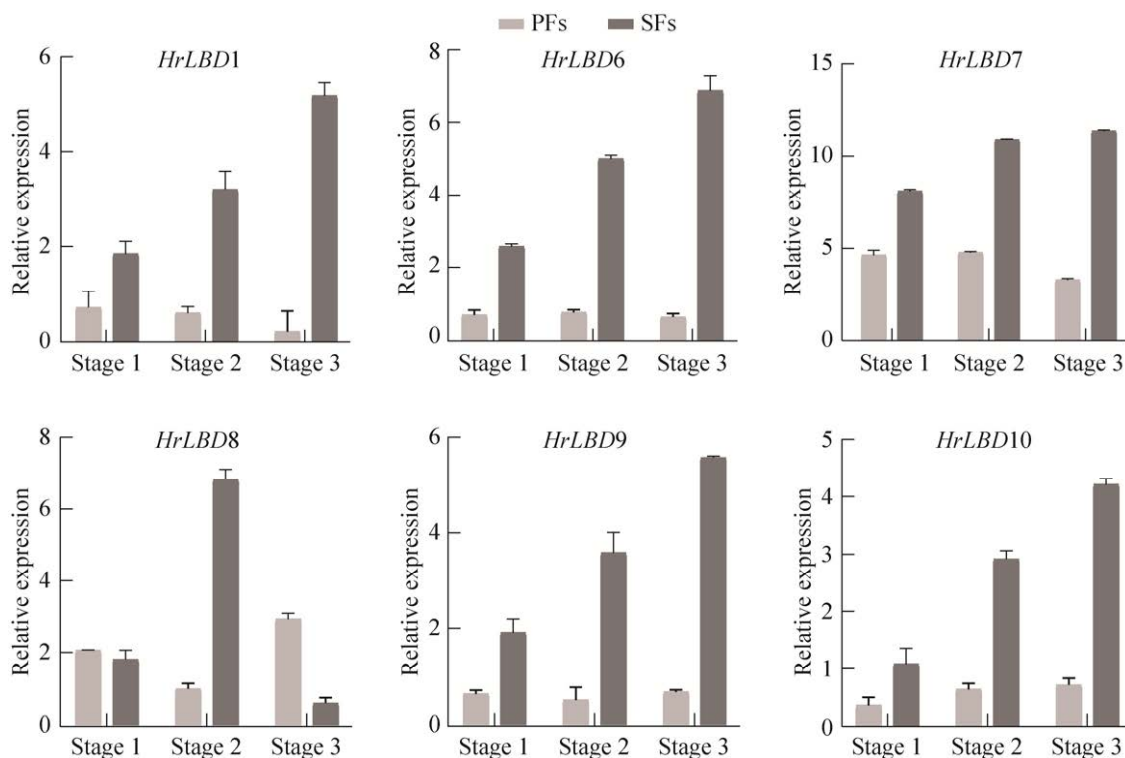


图 11 6 个 LBD 的 RT-qPCR 结果

Figure 11 RT-qPCR results of 6 LBD. PF indicates female and SF indicates male.

3 讨论

LBD 转录因子在高等植物中广泛存在, 在植物生长发育和逆境胁迫等过程中具有非常重要的作用。本研究在沙棘中鉴定出 11 个 LBD 基因, 基因数量少于大部分已完成 LBD 基因家族鉴定的物种, 例如拟南芥(40 个)、大麦(33 个)、葡萄(98 个)和杨树(57 个); 通过数据的比较可知沙棘基因组大小约为杨树的 2 倍, 但 LBD 基因家族的数量远少于杨树, 说明基因家族的数量和基因组的大小没有直接的关系。雷彪等^[29]在谢正文^[30]的研究基础上对谷子的 LBD 家族进行了鉴定, 发现了 33 个 SiLBD 基因, 与拟南芥、水稻和玉米一样存在 Class I 和 Class II 两个亚家族, 并通过研究推测得出 SiLBD26 有可能参与雄穗、胚囊和叶片的发育; 陈强等^[23]在甜瓜中鉴定出的 32 个 CmLBD 基因和王亚萍等^[25]从沙地云杉中鉴定得到的 30 个 PmLBD 基因均存在 2 个亚家族。通过对沙棘与拟南芥和大麦的 LBD 蛋白进行系统发育分析可知, 沙棘中的 11 个 HrLBD 基因也存在于 2 个亚家族中, Class I 中含有 10 个 HrLBD, 而 Class II 中仅有 1 个 HrLBD。以往研究中, 82% 的大豆 GmLBD 基因^[31]、84% 的玉米 ZmLBD 基因^[32]和 84% 的甜瓜 CmLBD 基因^[28]均属于 Class I, 本研究中 91% 的沙棘 HrLBD 基因属于 Class I。

对沙棘 LBD 的分子质量和等电点进行的研究, 沙棘 LBD 蛋白长度为 159–302 aa, 平均分子量为 24 394.04 Da, 平均等电点为 6.94。亚细胞定位预测结果显示, 蛋白质在细胞核或叶绿体中都有分布。染色体定位分析结果显示, HrLBD 中 11 条基因不均匀分布在沙棘基因组的 5 条染色体上, 且 LBD 基因大部分分布在沙棘 chr3 和 chr12 上。通过对 HrLBD 基因进行多

序列比对分析, 推测沙棘 LBD 蛋白可能参与转录因子的二聚化过程。

结合系统发育树对 HrLBD 的保守基序进行分析可知, 在系统发育树中亲缘关系较近的成员之间, 经常会有一些共同 motif, 例如 HrLBD2 与 HrLBD3 均存在于 Class I d 中, 均含有 motif 6。从沙棘 LBD 蛋白的保守基序可知, 除了 HrLBD7 这 1 个基因外, 10 种 HrLBD 都包含 motif 1 和 motif 2, 表明 motif 1 和 motif 2 在 LBD 蛋白中是高度保守的, HrLBD1、HrLBD2、HrLBD3、HrLBD7、HrLBD9、HrLBD11 这 6 个基因都具有 4 种 motif, HrLBD5、HrLBD6 最为特殊, 仅具有 motif1 和 motif2, 将保守基序与系统发育树结合起来分析, 不同进化树的分组所含的 motif 也有所区别, 这些特定的 motif 可能是引起 LBD 功能分化的因素之一。

对沙棘 HrLBD 基因结构进行分析后发现, HrLBD 的基因结构相对简单, 外显子数最多为 3 个, 大多数沙棘 LBD 基因含有 2 个外显子, 多数基因没有或只有少量的内含子, 在遗传中以相对稳定的形态存在; 在谷子、玉米和水稻中 LBD 基因的外显子数目分别在 1–4^[29]、1–5^[32]和 2–4^[31]个之间, 可推知, 在这几类物种中 LBD 基因的结构简单, 或在进化上存在相似性。顺式作用元件分析结果表明, 含有光响应元件的 LBD 基因数量最多, 推测沙棘 LBD 基因的转录或受光周期调控, 从而调节植物对外界环境变化的响应。并且还同时具有胁迫响应调控元件和激素响应调控元件, 表明 LBD 基因可能与胁迫响应、光响应、激素响应等有关。

通过对拟南芥和沙棘的 LBD 基因进行物种间共线性分析可知二者在进化上具有同源关系, 再基于系统发育树进一步分析发现, 在拟

南芥中被称作 SCP 蛋白的同源基因 *AtLBD27* 与沙棘 *HrLBD9* 属同一亚家族中的一类(Class I e), *AtLBD10* 则与 *HrLBD6* 同属于 Class I c, *AtLBD27* 与 *AtLBD10* 会在特定阶段作为转录激活因子参与到花粉发育过程中^[9], 结合 HrLBDs 在沙棘花芽不同发育阶段中的表达量结果和 RT-qPCR 结果, 发现 *HrLBD9* 与 *HrLBD6* 均在雄蕊开花前后的 3 个发育阶段有规律地表达, 且趋势较为一致, 推测 *HrLBD9* 与 *HrLBD6* 或在功能上与 *AtLBD27* 与 *AtLBD10* 相似。通过对 HrLBD 基因在开花前后雌雄花芽中的表达进行分析, 推测 HrLBD 基因可能参与雄性花芽生长发育过程。

在毛果杨中, 共鉴定出 57 个 LBD 基因, 这些基因大多在毛果杨的不同组织中均有表达, 但在时空表达上存在差异, *Potri.010G186000*、*Potri.012G056800*、*Potri.004G100100*、*Potri.017G114500* 在休眠后期的花芽中高表达, *Potri.005G145500* 在开放的花芽中高表达^[24]。*Potri.010G186000* 在芦强^[24]等的研究中被归为 Class I b, 拟南芥中的同源基因为 *AtLBD21*, 由图 9 可知 *AtLBD21* 在沙棘中同源的基因为 *HrLBD8*, 该基因在沙棘的雌雄花芽中均有较高的表达; *Potri.012G056800*、*Potri.004G100100*、*Potri.017G114500* 被归为 Class II b, 与拟南芥中的 *AtLBD40*、*AtLBD41* 和 *AtLBD42* 同源, 在沙棘中暂未有同源基因; *Potri.005G145500* 被归为 Class II a, 与拟南芥中的 *AtLBD37* 和 *AtLBD38* 为同源基因, 拟南芥中的这 2 个基因与 *HrLBD7* 同源, 该基因也在沙棘花芽中高表达。刘同金等^[27]对 LBD 基因在白皮白肉萝卜和绿皮红肉萝卜(心里美)不同发育时期的表达进行了研究, 发现不同 LBD 基因在不同组织中的表达量不同, 例如 *Rsa10015759*、*Rsa10007737* 仅在花中表达, *Rsa10015759*、*Rsa10007737* 分

别是 *AtLBD6* 和 *AtLBD27* 的同源基因, *AtLBD6* 在沙棘中没有同源基因, *AtLBD27* 基因在沙棘中的同源基因为 *HrLBD9*, 经上述讨论, 认为 *HrLBD9* 可能参与雄性花芽的发育。辣椒中的 *Capana03g001070*、*Capana06g001218*、*Capana02g000739* 和 *Capana02g003133* 基因均在花器官中异常高表达, *Capana03g001070* 和 *Capana06g001218* 在拟南芥中的同源基因分别为 *AtLBD27* 和 *AtLBD7*, *AtLBD27*、*AtLBD7* 与 *HrLBD9* 归为一支, *Capana02g000739* 和 *Capana02g003133* 的同源基因为 *AtLBD36*, *AtLBD36* 与 *HrLBD6* 归为一支, 而 *HrLBD6* 与 *HrLBD9* 均在雌雄花芽的发育过程中高表达^[12]。

LBD 基因在多物种的花器官中均存在高表达, 但 LBD 基因也不只在花器官中起作用。沙地云杉中的 *PmLBD9*、*PmLBD20* 和 *PmLBD23* 均在侧根中高表达, *PmLBD9* 的同源基因 *AtLBD13* 在拟南芥的侧根发育过程中发挥重要作用^[25], *AtLBD13* 在沙棘中与 *HrLBD8*、*HrLBD10* 归为一支, 推测 *HrLBD8*、*HrLBD10* 基因不仅在花芽发育过程中起作用, 还参与侧根的发育, 这需要进一步实验验证。

4 结论

本研究在沙棘全基因组的基础上, 利用各类软件及工具对沙棘 LBD 基因家族进行了全面的生物信息学分析, 共鉴定出了 11 个 HrLBD 基因, 分布在 5 条染色体上; 系统进化树显示 11 个 LBD 基因可细分为 Class I 和 Class II 两大亚家族中, Class II 中仅有 *HrLBD7*。HrLBD 基因编码 159–302 个氨基酸残基的蛋白质, 分子质量介于 18 249.91–33 202.01 Da 之间。经亚细胞定位预测可知, HrLBD 蛋白在细胞核和叶绿体中均有分布。HrLBD 基因的结构较简单, 仅有 1–3 个外显子。HrLBD 基因在开花前后的雌、

雄花芽中具有差异性的表达, 在雄性花芽中的表达量较高, 且进行验证的大部分基因都随着雄性花芽的发育过程, 表达量逐渐升高, 而在雌性花芽中表达量较低。本研究为初步阐明 HrLBD 基因在中国沙棘雌雄花芽生长发育中的作用和性别分化机制奠定了研究基础。

REFERENCES

- [1] 何彩云, 李梦颖, 罗红梅, 高国日, 张建国. 不同沙棘品种抗旱性的比较[J]. 林业科学研究, 2015, 28(5): 634-639.
HE CY, LI MY, LUO HM, GAO GR, ZHANG JG. Comprehensive evaluation on drought resistance of *Hippophae Rhamnoides*[J]. Forest Research, 2015, 28(5): 634-639 (in Chinese).
- [2] TENG H, HE ZG, HONG CZ, XIE SZ, ZHA XQ. Extraction, purification, structural characterization and pharmacological activities of polysaccharides from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.): a review[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2024, 324: 117809.
- [3] KALLIO H, YANG BR, PEIPPO P. Effects of different origins and harvesting time on vitamin C, tocopherols, and tocotrienols in sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) berries[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(21): 6136-6142.
- [4] YANG B, KALLIO HP. Fatty acid composition of lipids in sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berries of different origins[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(4): 1939-1947.
- [5] GREY C, WIDÉN C, ADLERCREUTZ P, RUMPUNEN K, DUAN RD. Antiproliferative effects of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) extracts on human colon and liver cancer cell lines[J]. Food Chemistry, 2010, 120(4): 1004-1010.
- [6] 张慧琴. 沙棘的营养价值及综合开发利用技术[J]. 果农之友, 2023(7): 49-51.
ZHANG HQ. Nutritional value and comprehensive development and utilization technology of seabuckthorn[J]. Fruit Growers' Friend, 2023(7): 49-51 (in Chinese).
- [7] 邢光伟, 王梦醒, 马小飞, 赵贤, 张婷, 聂小军, 宋卫宁. 小麦 LBD 基因家族的全基因组鉴定、表达特性及调控网络分析[J]. 麦类作物学报, 2017, 37(7): 855-863.
XING GW, WANG MX, MA XF, ZHAO X, ZHANG T, NIE XJ, SONG WN. Genome-wide analysis, expression characteristics and regulatory network of LBD gene family in bread wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. Journal of Triticeae Crops, 2017, 37(7): 855-863 (in Chinese).
- [8] 王震, 米要磊, 孟祥霄, 万会花, 季爱加, 孙伟, 马伟. 中药火麻仁基原植物大麻 LBD 基因家族成员的鉴定与表达分析[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(22): 5477-5486.
WANG Z, MI YL, MENG XX, WAN HH, JI AJ, SUN W, MA W. Genome-wide analysis of LBD (lateral organ boundaries domain) gene family in *Cannabis sativa* of traditional Chinese medicine hemp seed[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2020, 45(22): 5477-5486 (in Chinese).
- [9] XU CZ, LUO F, HOCHHOLDINGER F. LOB domain proteins: beyond lateral organ boundaries[J]. Trends in Plant Science, 2016, 21(2): 159-167.
- [10] 何红红, 马宗桓, 张元霞, 张娟, 卢世雄, 张志强, 赵鑫, 吴玉霞, 毛娟. 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): 4102-4118.
HE HH, MA ZH, ZHANG YX, ZHANG J, LU SX, ZHANG ZQ, ZHAO X, WU YX, MAO J. Identification and expression analysis of *LBD* gene family in grape[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2018, 51(21): 4102-4118 (in Chinese).
- [11] 石玉, 沈诗雅, 张倩茹, 孙振美, 邬荣领, 郭允倩. LBD 基因家族研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2019, 41(4): 738-745.
SHI Y, SHEN SY, ZHANG QR, SUN ZM, WU RL, GUO YQ. The research progress of LBD gene family[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2019, 41(4): 738-745 (in Chinese).
- [12] 郑忠凡, 张亚利, 胡灿, 戴雄泽, 刘峰, 袁祖华. 辣椒全基因组中 LBD 转录因子的鉴定与表达分析[J]. 园艺学报, 2016, 43(4): 683-694.
ZHENG ZF, ZHANG YL, HU C, DAI XZ, LIU F, YUAN ZH. Genome-wide identification and expressing analysis of LBD transcription factors in pepper[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2016, 43(4): 683-694 (in Chinese).
- [13] CAO H, LIU CY, LIU CX, ZHAO YL, XU RR. Genomewide analysis of the lateral organ boundaries domain gene family in *Vitis vinifera*[J]. Journal of Genetics, 2016, 95(3): 515-526.
- [14] ARIEL FD, DIET A, CRESPI M, CHAN RL. The LOB-like transcription factor Mt LBD1 controls *Medicago truncatula* root architecture under salt stress[J]. Plant Signaling & Behavior, 2010, 5(12): 1666-1668.
- [15] MATSUMURA Y, IWAKAWA H, MACHIDA Y, MACHIDA C. Characterization of genes in the asymmetric leaves2/lateral organ boundaries (as2/lob) family in *Arabidopsis thaliana*, and functional and molecular comparisons between As2 and other family members[J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2009, 58(3): 525-537.
- [16] YANG Y, YU XB, 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(1): 248-262.
- [17] OKUSHIMA Y, OVERVOORDE PJ, ARIMA K, ALONSO JM, CHAN A, CHANG C, ECKER JR, HUGHES B, LUI A, NGUYEN D, ONODERA C, QUACH H, SMITH A, YU GX, THEOLOGIS A. Functional genomic analysis of the auxin response factor gene family members in *Arabidopsis thaliana*: unique and overlapping functions of *arf7* and *arf19*[J]. *The Plant Cell*, 2005, 17(2): 444-463.
- [18] LUO YW, MA B, ZENG QW, XIANG ZH, HE NJ. Identification and characterization of lateral organ boundaries domain genes in mulberry, *Morus notabilis*[J]. *Meta Gene*, 2016, 8: 44-50.
- [19] SHUAI B, REYNAGA-PEÑA CG, SPRINGER PS. The lateral organ boundaries gene defines a novel, plant-specific gene family[J]. *Plant Physiology*, 2002, 129(2): 747-761.
- [20] XU B, LI ZY, ZHU Y, WANG H, MA H, DONG AW, HUANG H. *Arabidopsis* genes *ASI*, *AS2*, and *JAG* negatively regulate boundary-specifying genes to promote sepal and petal development[J]. *Plant Physiology*, 2008, 146(2): 323-324.
- [21] 殷小雨, 胡凤荣, 杨盼盼. LBD 转录因子调控植物生长发育的研究进展[J]. *分子植物育种*, 2024, 22(7): 2205-2215.
- YIN XY, HU FR, YANG PP. Research progress of LBD transcription factors regulating plant growth and development[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2024, 22(7): 2205-2215 (in Chinese).
- [22] SOYANO T, THITAMADEE S, MACHIDA Y, CHUA NH. Asymmetric leaves2-like19/lateral organ boundaries domain30 and asl20/lbd18 regulate tracheary element differentiation in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2009, 20(12): 3359-3373.
- [23] 陈强, 邹明康, 宋家敏, 张冲, 吴隆坤. 甜瓜 LBD 基因家族的鉴定和果实发育进程中的表达分析[J]. *生物技术通报*, 2023, 39(3): 176-183.
- CHEN Q, ZOU MK, SONG JM, ZHANG C, WU LK. Identification and analysis of LBD gene family and expression analysis of fruit development in *Cucumis melo*[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2023, 39(3): 176-183 (in Chinese).
- [24] 芦强, 邵芬娟, 邱德有. 毛果杨 LBD 基因家族的全基因组分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2018, 37(1): 313-325.
- LU Q, SHAO FJ, QIU DY. Genome-wide analysis of gene family of lateral organ boundaries domain in *Populus trichocarpa*[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2018, 37(1): 313-325 (in Chinese).
- [25] 王亚萍, 隋明明, 白玉娥. 沙地云杉 LBD 基因家族鉴定及盐胁迫响应分析[J]. *西北植物学报*, 2023, 43(9): 1450-1458.
- WANG YP, SUI MM, BAI YE. Identification and expression patterns in response to salt stress of the LBD gene family in *Picea mongolica*[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2023, 43(9): 1450-1458 (in Chinese).
- [26] 王新华, 许娜丽, 姚明明, 余慧霞, 王彦青, 邱国岩, 刘凤楼, 刘彩霞, 张晓岗, 李清峰, 王掌军. 长穗偃麦草 LBD 基因家族的鉴定与进化分析[J]. *西北农业学报*, 2022, 31(2): 202-216.
- WANG XH, XU NL, YAO MM, YU HX, WANG YQ, QIU GY, LIU FL, LIU CX, ZHANG XG, LI QF, WANG ZJ. Identification and evolution analysis of LBD gene family in *Thinopyrum elongatum*[J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2022, 31(2): 202-216 (in Chinese).
- [27] 刘同金, 张晓雪, 张晓辉, 王海平, 邱杨, 宋江萍, 李锡香. 萝卜全基因组中 LBD 基因家族成员的鉴定与分析[J]. *植物遗传资源学报*, 2019, 20(1): 168-178.
- LIU TJ, ZHANG XX, ZHANG XH, WANG HP, QIU Y, SONG JP, LI XX. Genome-wide characterization of the LBD gene family in radish[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2019, 20(1): 168-178 (in Chinese).
- [28] 李爱宏, 张亚芳, 戴正元, 张洪熙, 潘学彪. LBD 基因家族在高等植物中的研究进展[J]. *分子植物育种*, 2006, 4(3): 301-308.
- LI AH, ZHANG YF, DAI ZY, ZHANG HX, PAN XB. Progress of LBD gene family in higher plants[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2006, 4(3): 301-308 (in Chinese).
- [29] 雷彪, 曲瑞芳, 任超, 卢成达, 李红英, 韩彦卿, 马芳芳, 韩渊怀, 邢国芳. 谷子 LBD 基因家族的鉴定及其对逆境胁迫的响应[J]. *植物生理学报*, 2023, 59(3): 527-542.
- LEI B, QU RF, REN C, LU CD, LI HY, HAN YQ, MA FF, HAN YH, XING GF. Identification of SiLBDs gene family in foxtail millet and its participation in stress response[J]. *Plant Physiology Journal*, 2023, 59(3): 527-542 (in Chinese).
- [30] 谢政文. 禾本科植物 F-box 和 LBD 基因家族的比较和进化分析[D]. 扬州: 扬州大学, 2015.
- XIE ZW. Comparative and evolutionary analysis of F-box and LBD gene families in grasses[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2015 (in Chinese).
- [31] YANG H, SHI GX, DU HY, WANG H, ZHANG ZZ, HU DZ, WANG J, HUANG F, YU DY. Genome-wide analysis of soybean lateral organ boundaries domain-containing genes: a functional investigation of *gmlbd12*[J]. *The Plant Genome*, 2017, 10(1): 1-19.
- [32] ZHANG YM, ZHANG SZ, ZHENG CC. Genomewide analysis of lateral organ boundaries domain gene family in *Zea mays*[J]. *Journal of Genetics*, 2014, 93(1): 79-91.