

杜仲 *LBD* 基因家族全基因组鉴定与进化表达分析

刘俊^{1,4,5}, 李龙³, 陈玉龙¹, 吴耀松¹, 刘燕¹, 任闪闪¹, 董诚明²

1. 河南中医药大学 中医药科学院, 河南省中医方证信号传导重点实验室, 河南 郑州 450046

2. 河南中医药大学 河南省道地药材生态种植工程技术研究中心, 河南 郑州 450046

3. 西北农林科技大学林学院, 陕西 杨凌 712100

4. 国际竹藤中心 国家林业和草原局竹藤科学与技术重点开放实验室, 北京 100102

5. 国际竹藤中心 安徽太平试验中心, 安徽 黄山 245716

摘要: 目的 通过对杜仲 *LBD* 基因家族进行全面鉴定, 以期为 *EuLBDs* 基因功能深入研究提供依据。方法 以杜仲基因组数据库为基础, 利用生物信息学方法, 对杜仲 *LBD* 基因家族进行全面鉴定和表达模式分析。结果 从杜仲基因组中共鉴定到 19 个 *EuLBDs*, 分为 Class I 与 Class II 2 大类, 进一步划分为 6 个亚家族 (Ia、Ib、Ic、Id 与 IIa、IIb)。理化性质分析显示: *EuLBDs* 编码 152~293 个氨基酸, 理论等电点分布于 4.62~9.91, 相对分子质量区域为 17 420~31 820, 均为亲水性蛋白, 以 α -螺旋和不规则卷曲为主, 亚细胞定位于细胞核中。*EuLBD* 基因家族含有类锌指、亮氨酸拉链和甘氨酸-丙氨酸-丝氨酸 (GAS) 保守结构域。表达模式分析显示, *EuLBDs* 参与杜仲叶片发育, 随着叶片发育, 水平逐渐降低, *EuLBDs* 基因表达不受叶片胶含量的影响。结论 从杜仲基因组水平对 *LBD* 基因家族进行了全面鉴定和生物信息学分析, 为进一步研究杜仲 *LBDs* 基因功能奠定基础。

关键词: 杜仲; *LBD* 基因家族; 系统进化; 基因表达; *EuLBDs*

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)10-3142-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.10.025

Identification, evolution and expression analysis of *LBD* gene family in *Eucommia ulmoides*

LIU Jun^{1,4,5}, LI Long³, CHEN Yu-long¹, WU Yao-song¹, LIU Yan¹, REN Shan-shan¹, DONG Cheng-ming²

1. Henan Key Laboratory of TCM Prescription and Syndrome Signaling, Academy of Chinese Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

2. Henan Province Genuine Medicinal Materials Ecological Planting Engineering Technology Research Center, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

3. College of Forestry, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China

4. Key Open Laboratory of Bamboo and Rattan Science and Technology, International Center for Bamboo and Rattan, China National Forestry and Grassland Administration, Beijing 100102, China

5. Anhui Taiping Experimental Station of International Center for Bamboo and Rattan, Huangshan 245716, China

Abstract: Objective In order to provide a basis for further research on the function of *EuLBDs* gene, the *LBD* gene family of *Eucommia ulmoides* was comprehensively identified in this study. **Methods** Based on *E. ulmoides* genome database, this study used bioinformatics methods to identify and analyze *E. ulmoides LBD* gene family. **Results** A total of 19 *EuLBDs* were identified from *E. ulmoides* genome, which were divided into Class I and Class II groups and further divided into six subfamilies (Ia, Ib, Ic, Id and IIa, IIb). *EuLBDs* encodes 152—293 amino acids, and the theoretical isoelectric points distribution were 4.62—9.91, molecular weight between 17 420—31 820 by physicochemical analysis, all of *EuLBD* proteins were hydrophilic proteins. α -Helix and

收稿日期: 2021-10-03

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目 (22A360005); 国家林业和草原局/北京市共建竹藤科学与技术重点实验室开放基金 (ICBR-2020-05); 国际竹藤中心安徽太平试验中心开放课题基金 (1632021006-4); 河南中医药大学博士科研基金资助项目 (RSBSIJ2019-04)

作者简介: 刘俊 (1990—), 女, 助理研究员, 博士, 主要从事药用植物分子生物学研究。E-mail: liujun_0325@163.com

irregular curl were the main structure of the secondary structure in the *EuLBD* gene family which was mainly expressed in nucleus. *EuLBD* gene family had sinusoidal structure, the leucine zipper and the glycine-alanine-serine (GAS) structure domain. Expression pattern analysis showed that *EuLBDs* involved in *E. ulmoides* leaves development, and the transcription level of *EuLBDs* gradually decreased with leaf development, which were not affected by the leaf gum content. **Conclusion** In this study, the members of the LBD family were comprehensively identified and bioinformatics analysis from the genomic level of *E. ulmoides*, which laid a foundation for further functional research of *EuLBD* genes.

Key words: *Eucommia ulmoides* Oliver; LBD gene family; phylogeny analysis; gene expression; *EuLBDs*

杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliver 为杜仲科杜仲属落叶乔木, 是中国特有的单科、单属、单种的名贵中药材, 集“经济、生态、社会效益于一体”^[1], 为我国二级保护植物。杜仲主要以树皮入药, 具有抗疲劳、抗肿瘤、预防太空骨质疏松, 还具有利胆止血、抗菌、利尿、免疫镇静等作用^[2]。LBD 蛋白(lateral organ boundaries domain/ASYMMETRIC LEAVES2-Like) 是植物特有的一类转录因子^[3-6], *N*-末端含有由 100 个氨基酸残基 3 个基序(C-block、GAS-block 和 leu zipper coiled coil) 组成的保守 LOB 结构域。C-block 由 4 个半胱氨酸残基(CX2CX6CX3C) 组成, 主要参与 DNA 与顺式作用元件结合, GAS-block 由 49 个氨基酸残基组成, 以 FX2VH 序列开始, DP (V/I) 序列结束^[7], Leu zipper coiled coil 包含 1 个“LX6LX3LX6C” 序列的亮氨酸拉链结构, 主要参与蛋白质二聚化过程^[8]。LBD 基因家族分为 Class I 和 Class II 2 大类, 研究报道显示, Class I 类 LBDs 基因主要在侧生器官的原基边缘表达, 调控根、叶、花和胚胎生长发育^[9]; Class II 类基因主要参与植物花青素的合成以及氮代谢调控^[10-17]。

自第一个 LBD 基因从拟南芥中发现以后, 其他物种 LBD 蛋白也相继被报道。研究显示, LBD 转录因子参与植物侧生器官发育、激素调节、氮素代谢等多种生物学过程^[5,18]。在拟南芥中, *AtASL1* (*AtLBD36*)、*AtASL4* (*AtLOB*) 和 *AtASL5* (*AtLBD12*) 参与分生组织侧枝器官发育^[8,19-20], *AtLBD29* (*AtASL16*)、*AtLBD18* (*AtASL20*) 和 *AtLBD16* (*AtASL18*) 主要在侧根中表达^[21-22]; *AtLBD18* 和 *AtLBD33* 形成异源二聚体, 激活下游基因 *E2Fa* 转录^[23], 促使根部侧生分生组织细胞进入细胞周期, 影响拟南芥侧根发育^[24-25]。*AtLBD41* 在拟南芥叶片发育中发挥重要作用^[20], *AtAS2* 主要在幼嫩花器官近轴面特异表达^[6,26], 调控花器官发育^[27]。*TaLBDs* 基因特异性调控小麦组织发育, Class Ib 亚家族主要参与盐胁迫响应^[28]。丹参 *SmLBD23* 异源转化拟南芥, 导致转基因植株花青素和总酚酸含量降低, 干

扰植株叶中黄酮含量升高, 根中黄酮含量降低; *SmLBD16* 导致转基因拟南芥花青素和总酚酸含量升高, 由此说明, 丹参 LBDs 基因参与花青素和总酚酸代谢调控^[5,29]。

随着分子生物学的发展, LBDs 基因已在多个物种中进行了研究(表 1), 然而杜仲 LBD 基因家族还未报道。本研究以杜仲基因组数据^[30]为基础, 从基因组水平对 LBD 基因家族进行全面鉴定、理化性质分析、进化关系、保守基序以及表达模式分析, 以期为进一步探索杜仲 LBDs 基因功能奠定基础。

1 材料

杜仲材料种植于西北农林科技大学苗圃(陕西杨凌), 经西北农林科技大学李龙博士鉴定为杜仲 *E. ulmoides* Oliver。取生长正常, 长势一致的 2 年

表 1 不同物种 LBD 基因家族分布

Table 1 Distribution of LBD gene family in different species

物种	拉丁名	分类	总数	文献
水稻	<i>Oryza sativa</i> L.	单子叶植物	35	31
玉米	<i>Zea mays</i> L.	单子叶植物	44	32
大麦	<i>Hordeum vulgare</i> L.	单子叶植物	24	33
小麦	<i>Triticum aestivum</i> L.	单子叶植物	75	28
二穗短柄草	<i>Brachypodium distachyum</i> L.	单子叶植物	28	34
杜仲	<i>Eucommia ulmoides</i> Oliver	双子叶植物	19	
桉	<i>Eucalyptus grandis</i> Hill	双子叶植物	46	6
拟南芥	<i>Arabidopsis thaliana</i> L.	双子叶植物	43	8
毛果杨	<i>Populus trichocarpa</i> L.	双子叶植物	57	6
黄瓜	<i>Cucumis sativus</i> L.	双子叶植物	39	35
番茄	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	双子叶植物	46	4
马铃薯	<i>Solanum tuberosum</i> L.	双子叶植物	43	36
辣椒	<i>Capsicum annuum</i> L.	双子叶植物	45	37
蒺藜苜蓿	<i>Medicago sativa</i> L.	双子叶植物	56	38
胡萝卜	<i>Daucus carota</i> L.	双子叶植物	59	39
烟草	<i>Nicotiana tabacum</i> L.	双子叶植物	98	40
桑树	<i>Morus alba</i> L.	双子叶植物	31	41
葡萄	<i>Vitis vinifera</i> L.	双子叶植物	50	42
苹果	<i>Malus pumila</i> Mill.	双子叶植物	58	43
雷蒙德氏棉	<i>Gossypium raimondii</i> L.	双子叶植物	66	6
芜菁	<i>Brassica rapa</i> L.	双子叶植物	55	44

生“秦仲 1 号”“Qinzhong 1”杜仲幼苗的叶芽（茎尖）、生长叶（3 cm 长叶片）、幼叶（完全展开的新叶）、老叶（完全展开 60 d 叶片）；采集高产胶杜仲品种“秦仲 2 号”“Qinzhong 2”和低产胶杜仲品种“小叶”“Xiaoye”成熟叶片，设置 3 个生物学重复，经液氮处理后冻存于 -80 °C 冰箱，用于 RNA 提取。无菌水、乙醇、TRIzol、液氮、反转录试剂盒、qRT-PCR SYBR 试剂盒等。

2 方法

2.1 杜仲 LBD 基因家族鉴定及理化性质分析

从杜仲基因组数据库 Genome Warehouse (<https://bigd.big.ac.cn/gwh/Assembly/13/show>) 中下载 LBD 蛋白候选序列，利用 NCBI 在线分析软件 [Conserved Domain Search Service (CD Search)] 分析序列的结构域，保留含有完整 LOB 结构域的蛋白序列。通过在线软件 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析蛋白的理化性质，使用 Plant-mPLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>) 预测 EuLBDs 蛋白的亚细胞定位，利用在线工具 ExPASy (<https://www.expasy.org/tools>) 预测 EuLBDs 氨基酸数量、相对分子质量、理论等电点^[45]，通过 ExPASy (<https://web.expasy.org/protscale/>) 软件分析蛋白的亲疏水性，利用 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.plpage=npsa_sopma.html)^[46]和 Phyre 2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>)^[47]软件分别预测蛋白的二级结构和三级结构。

2.2 杜仲 LBDs 蛋白系统发育树构建

通过 Clustal X1.83^[48]软件对杜仲、水稻、拟南芥和毛果杨 LBDs 氨基酸序列进行多序列比对，利用 MEGA 6.0 的邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建系统发育树，重复次数设置为 1000 次，其他参数为默认值^[49]。

2.3 保守基序及启动子分析

为了分析 EuLBDs 蛋白的保守基序，通过 MEME (<http://meme-suite.org/>) 在线软件对 EuLBD 基因家族成员进行基序分析 (参数为 any number of Repetitions (anr), maximum number of Motifs=10, minimum width≥6, and maximum width≤50)^[50]。为了解析 EuLBDs 启动子区域顺式作用元件，对 EuLBDs 基因 ATG 上游 2000 bp 的序列进行查找分离，利用 Plant CARE (<http://bioinformatics.psb.>

ugent.be/webtools/plantcare/html/) 软件进行启动子分析^[51]。

2.4 杜仲 EuLBD 基因家族表达模式分析

从 NCBI 的 Short Read Archive (SRA) 数据库中下载杜仲叶片不同发育时期 (叶芽、初生叶、幼叶、老叶)^[52]及不同胶含量 (低含量、高含量)^[53]转录组数据，EuLBDs 基因在不同组织中的相对表达丰度用 FPKM 值表示，对该数值取对数 (Log₂) 进行统计分析，通过 MeV4-9-0 工具绘制基因表达图谱，表达量最高的用红色方框表示，表达量最低的用绿色方框表示。

2.5 杜仲 LBDs 蛋白互作网络预测

利用 STRING 软件 (<https://string-db.org/>) 上传 EuLBDs 蛋白序列，选择拟南芥数据库进行序列比对，根据已知拟南芥蛋白互作关系，通过 Blast 比对杜仲同源蛋白，通过 Cytoscape 3.7.0 软件进一步分析，对 EuLBD 基因家族蛋白互作信息进行评估和预测^[54]。

3 结果与分析

3.1 杜仲 LBD 基因家族鉴定及理化性质分析

利用 Genome Warehouse 数据库，通过生物信息学方法，从杜仲基因组中鉴定到 19 个 EuLBDs 基因 (表 2)，通过 Pfam 和 NCBI 的 Conserved Domain Search 在线分析软件对 EuLBDs 蛋白结构域进行检测。结果显示，19 个 EuLBDs 蛋白均含有保守 LOB 特征结构域，分别命名为 EuLBD1~EuLBD19。通过 ExPASy 工具，对 EuLBD 家族成员进行蛋白质理化性质分析，最长蛋白 EuLBD12 编码 293 个氨基酸，最短蛋白 EuLBD3 编码 152 个氨基酸，相对分子质量分布区域为 17 420~31 820，等电点范围是 4.62 (EuLBD8)~9.91 (EuLBD9)。亚细胞定位预测结果显示，EuLBDs 均定位在细胞核中 (表 2)。

3.2 杜仲 LBD 转录因子亲疏水性分析

利用 ProtScale 在线软件分析杜仲 LBDs 转录因子的亲疏水性。结果如图 1 所示，19 条 EuLBDs 蛋白均存在明确的亲疏水区域，亲水区域多于疏水区域，表明 EuLBDs 多肽链均为亲水性蛋白。EuLBD1 的最低值为 -2.133，在 218 位，最高值为 2.011，位于第 47 氨基酸残基处；EuLBD2 在 145 位处于最低值为 -3.489，于 88 位氨基酸残基处达到最高值是 1.922，其他蛋白的最低值、最高值及具体位置见图 1。

表 2 杜仲 LBD 基因家族基本信息

Table 2 Basic information of *EuLBD* gene family

基因识别号	基因名	亚家族	CDS 长度/bp	蛋白大小/aa	相对分子质量	等电点	染色体定位	亚细胞定位
EUC08714-RA	<i>EuLBD1</i>	Ic	696	231	24 491.84	7.71	Super-Scaffold_114	细胞核
EUC20345-RA	<i>EuLBD2</i>	Ia	543	180	20 484.31	7.14	Super-Scaffold_16	细胞核
EUC21682-RA	<i>EuLBD3</i>	Id	459	152	17 422.81	8.68	Super-Scaffold_16	细胞核
EUC11380-RA	<i>EuLBD4</i>	Ic	591	196	21 621.70	6.99	scaffold109_obj	细胞核
EUC25875-RA	<i>EuLBD5</i>	Ia	570	189	20 764.88	8.45	scaffold165438_obj	细胞核
EUC09084-RA	<i>EuLBD6</i>	IIa	675	224	24 454.64	9.24	Super-Scaffold_119	细胞核
EUC04110-RA	<i>EuLBD7</i>	Id	696	231	26 321.49	5.13	Super-Scaffold_6	细胞核
EUC23917-RA	<i>EuLBD8</i>	Id	825	274	30 674.93	4.62	scaffold1884_obj	细胞核
EUC20049-RA	<i>EuLBD9</i>	IIb	732	243	26 477.14	9.91	Super-Scaffold_20	细胞核
EUC25816-RA	<i>EuLBD10</i>	Ia	627	208	22 350.64	5.93	scaffold1219_obj	细胞核
EUC19372-RA	<i>EuLBD11</i>	Ia	522	173	19 107.81	6.57	scaffold269_obj	细胞核
EUC00496-RA	<i>EuLBD12</i>	IIb	882	293	31 824.72	5.95	scaffold150_obj	细胞核
EUC14736-RA	<i>EuLBD13</i>	Ia	546	181	19 932.81	7.64	Super-Scaffold_10	细胞核
EUC00643-RA	<i>EuLBD14</i>	Ic	708	235	25 304.51	6.49	Super-Scaffold_172	细胞核
EUC04109-RA	<i>EuLBD15</i>	Id	657	218	24 519.67	4.92	Super-Scaffold_6	细胞核
EUC02244-RA	<i>EuLBD16</i>	Ib	522	173	19 288.75	5.42	Super-Scaffold_558	细胞核
EUC25778-RA	<i>EuLBD17</i>	Ia	522	173	18 884.42	4.93	scaffold1253_obj	细胞核
EUC09243-RA	<i>EuLBD18</i>	Ib	699	232	25 705.59	9.30	scaffold567_obj	细胞核
EUC16341-RA	<i>EuLBD19</i>	Ia	627	208	22 780.85	5.52	Super-Scaffold_38	细胞核

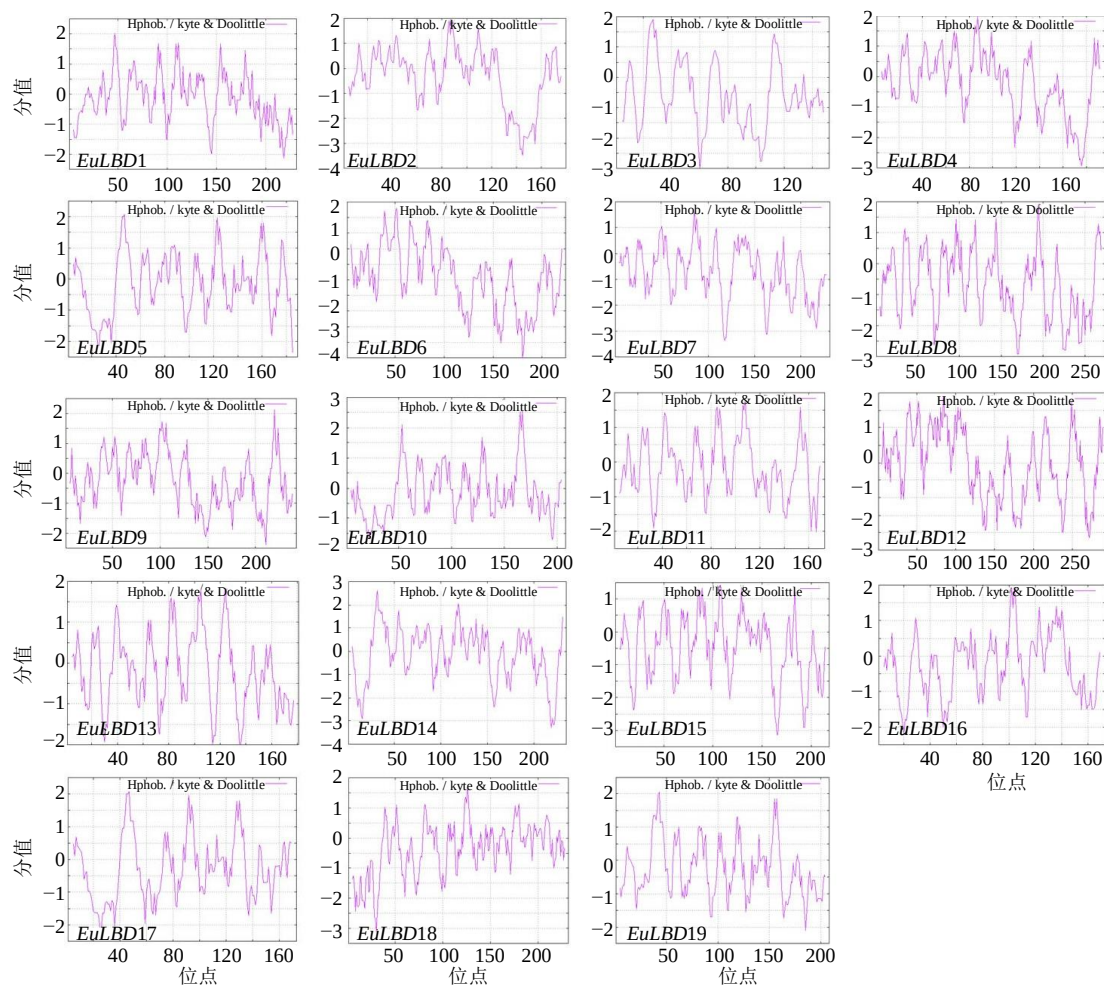


图 1 杜仲 LBDs 转录因子亲疏水性预测

Fig. 1 Prediction of hydrophilic and hydrophobic of *EuLBDs* transcription factor

3.3 杜仲 LBDs 蛋白结构分析

EuLBDs 蛋白二级结构分析显示, α -螺旋、无规则卷曲、延伸链和 β -转角在杜仲 LBD 蛋白家族中均有分布。 α -螺旋在 DNA 结合基序中发挥重要作用, 无规则卷曲易受侧链相互作用, 构成活性部位和功能部位。杜仲 LBDs 蛋白二级结构有 2 种类型, 其中 α 螺旋>无规则卷曲>延伸链> β 转角的数量最多, 有 11 个基因, 所占比例为 57.89%; 8

个基因二级结构顺序为无规则卷曲> α 螺旋>延伸链> β 转角, 比例是 42.11%, 具体情况见表 3。

采用 Phyre2 在线软件进行杜仲 LBDs 蛋白高级结构同源建模预测, 结果如图 2 所示, 除 EuLBD17 三级结构出现特异性外, 其余蛋白三级结构非常相似, 均由 α -螺旋、 β -折叠和随机卷曲等组成, 19 个 EuLBDs 中随机卷曲所占比例最大, 空间结构不同, 决定 EuLBDs 蛋白功能的差异。

表 3 杜仲 LBD 基因家族二级结构分析

Table 3 Secondary structures analysis of EuLBD gene family

基因名	拟南芥同源基因	最低值	位点	最高值	位点	α -螺旋 (占比/%)	延伸链 E (占比/%)	β 转角 (占比/%)	无规则卷曲 (占比/%)
EuLBD1	AT4G00220.1	-2.133	218	2.011	47	80 (34.63)	13 (5.63)	11 (4.76)	127 (54.98)
EuLBD2	AT3G58190.1	-3.489	145	1.922	88	100 (55.56)	8 (4.44)	4 (2.22)	68 (37.78)
EuLBD3	AT1G75240.1	-3.000	60	1.900	27	71 (46.71)	11 (7.24)	3 (1.97)	67 (44.08)
EuLBD4	AT2G42430.1	-2.944	176	1.978	87	86 (43.88)	7 (3.57)	3 (1.53)	100 (51.02)
EuLBD5	AT1G07900.1	-2.133	25	1.956	123	91 (48.15)	13 (6.88)	2 (1.06)	83 (43.92)
EuLBD6	AT3G49940.1	-2.744	181	1.811	51	71 (31.70)	23 (10.27)	13 (5.8)	117 (52.23)
EuLBD7	AT3G13850.1	-3.367	118	1.656	86	124 (53.68)	16 (6.93)	6 (2.6)	85 (36.80)
EuLBD8	AT3G13850.1	-2.911	169	1.878	194	111 (40.51)	14 (5.11)	6 (2.19)	143 (52.19)
EuLBD9	AT1G68510.1	-2.389	211	2.133	220	70 (28.81)	36 (14.81)	14 (5.76)	123 (50.62)
EuLBD10	AT2G28500.1	-1.700	195	2.533	167	91 (43.75)	13 (6.25)	3 (1.44)	101 (48.56)
EuLBD11	AT2G30130.1	-2.038	166	1.789	108	78 (45.09)	16 (9.25)	5 (2.89)	74 (42.77)
EuLBD12	AT1G67100.1	-2.656	272	1.289	249	93 (31.74)	41 (13.99)	17 (5.80)	142 (48.46)
EuLBD13	AT2G30130.1	-1.978	114	1.911	124	105 (58.01)	16 (8.84)	1 (0.55)	59 (32.60)
EuLBD14	AT3G03760.1	-3.110	219	2.622	32	108 (45.96)	26 (11.06)	8 (3.40)	93 (39.57)
EuLBD15	AT3G13850.1	-3.122	165	1.411	107	106 (48.62)	13 (5.96)	3 (1.38)	96 (44.04)
EuLBD16	AT3G11090.1	-2.189	20	1.922	104	108 (45.96)	26 (11.06)	8 (3.40)	93 (39.57)
EuLBD17	AT1G07900.1	-2.133	25	2.078	47	90 (52.02)	13 (6.94)	0 (0.00)	71 (41.04)
EuLBD18	AT2G30340.1	-3.100	30	1.711	126	110 (47.41)	27 (11.64)	10 (4.31)	85 (36.64)
EuLBD19	AT1G07900.1	-2.100	185	2.044	43	87 (41.83)	24 (11.54)	1 (0.48)	96 (46.15)

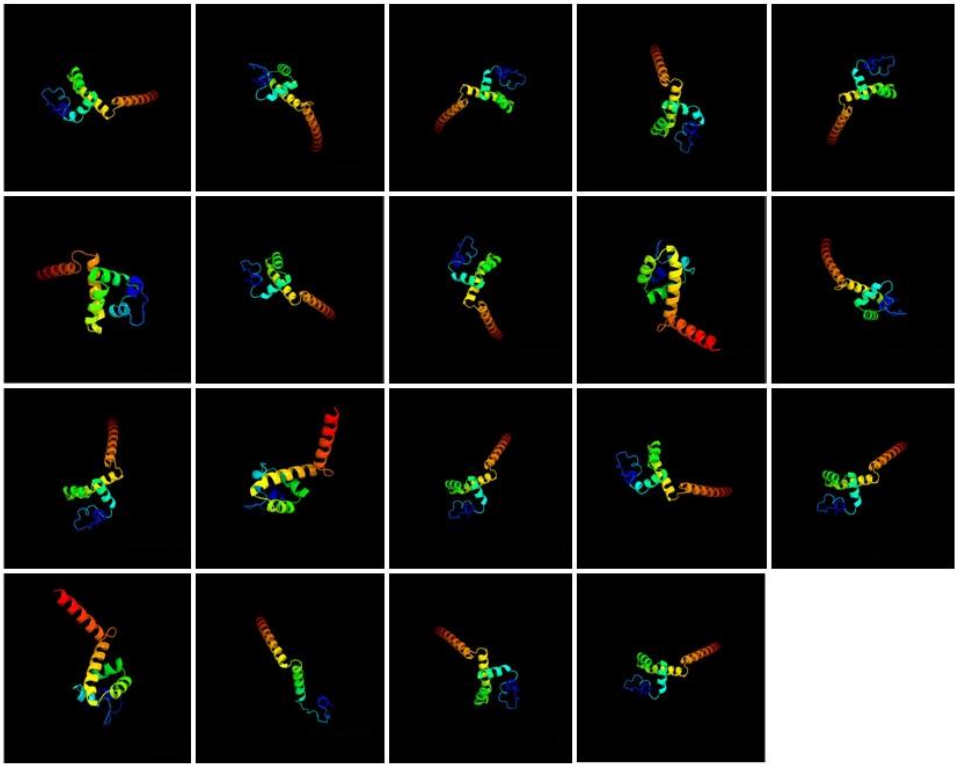
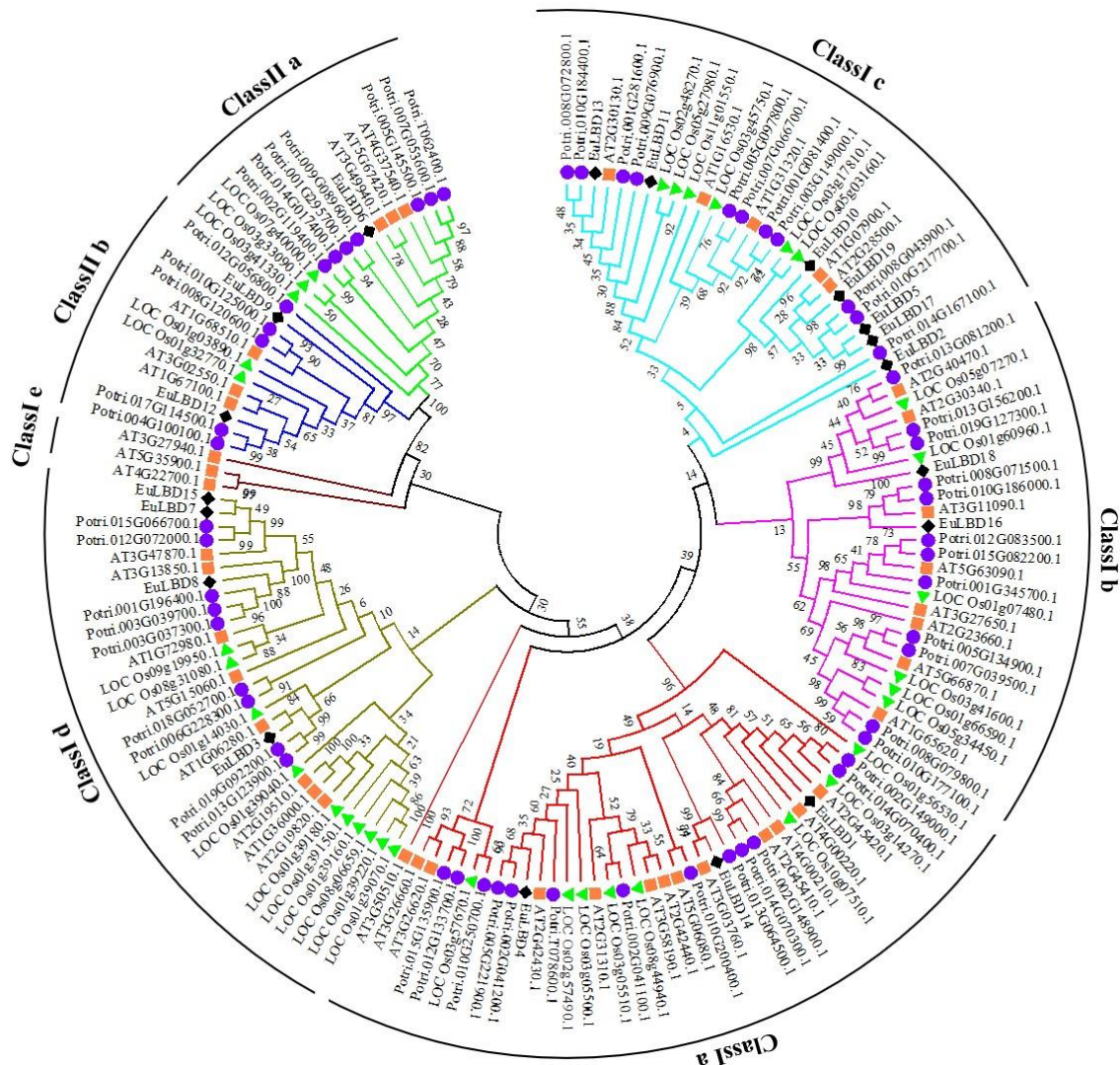


图 2 杜仲 LBDs 蛋白三级结构预测
Fig. 2 Tertiary structure prediction of EuLBD proteins

3.4 杜仲 LBDs 蛋白系统进化分析

利用 MEGA 6.0 分析软件,对 19 个杜仲 EuLBDs, 35 个水稻 OsLBDs^[31], 43 个拟南芥 AtLBDs^[8]和 57 个毛果杨 PtLBDs^[55]蛋白进行 1000 次重复搜索,构建系统进化树。结果如图 3 所示, 154 个 LBDs 蛋白分为 Class I 和 Class II 2 个大亚家族, 其中 Class I 亚家族进一步划分为: Ia、Ib、Ic、Id 和 Ie 小亚家族; Class II 亚家族划分为: IIa 和 IIb。154 个 LBDs 蛋白共分为 7 个小亚家族(如图 3 所示), Class Ia 亚家族所含 LBDs 成员数量最多, 共有 37 个 LBDs 蛋白, 分别包含 3

个 EuLBDs, 13 个 AtLBDs, 8 个 OsLBDs 和 13 个 PtLBDs 蛋白; 其次是 Class Id 亚家族, 由 31 个 LBDs 蛋白组成, Class Ib 亚家族含有 28 个 LBDs 蛋白; 29 个 LBDs 蛋白属于 Class Ic 亚家族, Class Ie 亚家族所含蛋白数量最少, 仅有 3 个 AtLBDs; Class IIa 和 Class IIb 亚家族分别含有 14、13 个 LBDs。EuLBDs 在 Class Ic 亚家族中的分布最多, 有 7 个蛋白, 所占比例为 36.8%, 除 Class Ic 亚家族外, EuLBDs 在 7 个亚家族中的蛋白数量最少, 这可能与 EuLBDs 在 4 个物种中数量最少有关。



利用 MEGA 6.0 的邻接法构建系统进化树, 不同物种的 LBDs 蛋白用不同颜色点标记, 红色方形代表拟南芥, 绿色三角形代表水稻, 紫色圆形代表毛果杨, 杜仲 LBDs 蛋白由黑色菱形标记

The phylogenetic tree was generated with MEGA 6.0 software using the neighbour-joining method, LBD proteins from the different species were marked with different colored dots, red boxes represented Arabidopsis, green triangles represented rice, purple circles represented Populus, and *E. ulmoides* LBDs proteins were marked by black rhombuses

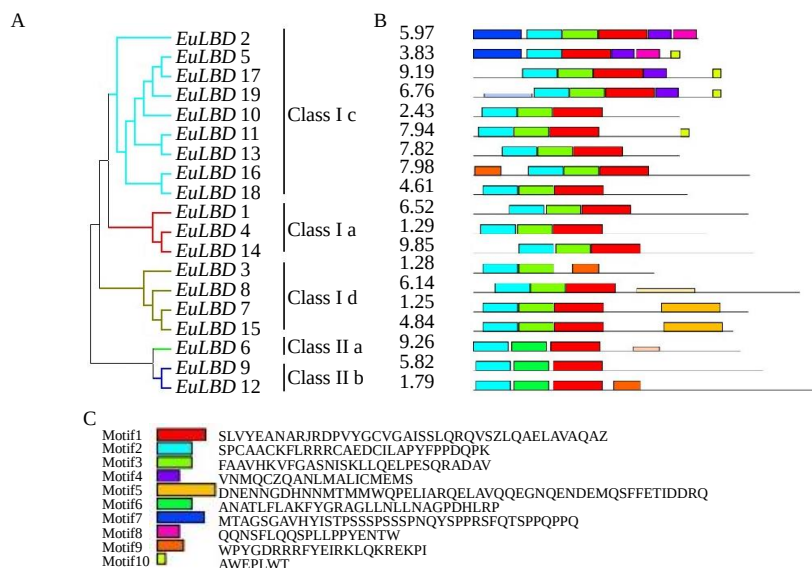
图 3 杜仲、水稻、拟南芥和毛果杨 LBDs 蛋白系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of LBD proteins from *E. ulmoides*, *Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana*, and *Populus trichocarpa*

3.5 杜仲 LBD 转录因子基序分析

为了解析 *EuLBDs* 基因结构多样性和进化关系, 利用 MEME 在线分析软件, 对 19 条 *EuLBDs* 蛋白保守结构域进行分析。结果如图 4 所示, *EuLBDs* 蛋白由 1~10 个 Motifs 组成 (表 4), 均含有保守 LOB 结构域 (Motif 1 和 Motif 2), 表明 19

个 *EuLBDs* 均属于 LBD 家族成员。*EuLBDs* 蛋白 (除 *EuLBD5* 外) 均含有 Motif 3, 有些 Motifs 只存在于特定亚家族, Motif 5 仅在 Class Ib 亚家族中存在, Motif 4、Motif 7 和 Motif 10 只存在于 Class Ic 亚家族, 只有 Class IIa 亚家族含有 Motif 9, 这可能与不同亚家族功能不同相关。



A-利用 MEGA 6.0 的邻接法构建 *EuLBD* 基因家族系统进化树 B-*EuLBDs* 基因结构分析 C-保守基序氨基酸分布

A-phylogenetic tree of *EuLBD* gene family was generated with MEGA 6.0 software using the neighbour-joining method B-gene structure analysis of *EuLBDs* C-conserved motif amino acid distribution

图 4 *EuLBDs* 蛋白保守基序分析

Fig. 4 Conservative motif analysis of *EuLBD* proteins

表 4 杜仲 LBDs 蛋白保守基序分布

Table 4 Conserved motif distribution of *EuLBD* proteins

基序名	E 值	位	宽度	最佳匹配
Motif1	1.2×10^{-264}	1	41	SLVYEANARJRDPVYGCVGAISSLQRQVSZLQAEALVAQAZ
Motif2	2.6×10^{-225}	1	29	SPCAACKFLRRRCAEDCILAPYFPDQPK
Motif3	6.4×10^{-182}	1	29	FAAVHKVFGASNISKLLQELPESQRADAV
Motif4	1.6×10^{-20}	4	19	VNMQCZQANLMALICMEMS
Motif5	3.1×10^{-16}	2	49	DNENNGDHNNMTMMWQPELIARQELAVQQEGNQENDEM QSFFETIDDRQ
Motif6	4.0×10^{-12}	3	29	ANATLFLAKFYGRAGLLNLLNAGPDHLRP
Motif7	3.6×10^{-9}	2	40	MTAGSGAVHYISTPSSSPSSPNQYSPPRSFTSPPQPPQ
Motif8	0.047	2	19	QQNSFLQSQSLLPPYENTW
Motif9	0.110	3	22	WPYGDRRRFYEIRKLQKREKPI
Motif10	0.190	4	7	AWEPLWT

3.6 杜仲 LBDs 蛋白序列保守性分析

利用 DNAMAN7.0 工具对 19 个 *EuLBDs* 蛋白保守结构域进行比对, 结果如图 5 所示, *EuLBDs* 蛋白 N 端均含有 1 个由 15 个氨基酸残基组成的 CX2CX6CX3C 保守基序, 暗示其可能与下游基因顺式元件的结合有关, Class II 类蛋白 C 端含有赖

氨酸组成的类似亮氨酸拉链 (LX6LX3LX6L) 二级结构 (图 5), 参与转录因子二聚化。Class Ia、Ib 和 Ic 亚家族含有 1 个 GAS 模块 (GAS-block), 该模块 C 端含有保守的脯氨酸 (P) 和甘氨酸 (G), 脯氨酸在 LBD 基因家族生物学功能中发挥重要作用 [56]。

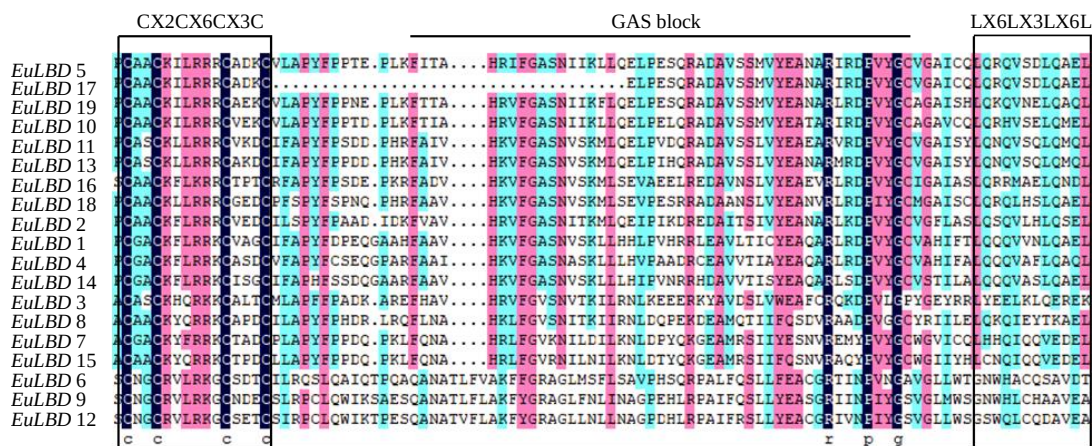


图 5 杜仲 LBDs 蛋白保守结构域序列比对

Fig. 5 Sequence alignment of conserved domains of EuLBD proteins

3.7 杜仲 LBDs 启动子顺式作用元件分析

为了探索 *EuLBDs* 基因的功能和表达调控模式, 利用 PlantCARE 在线软件对 *EuLBDs* 起始密码子 (ATG) 上游 2000 bp 进行顺式作用元件分析, 结果如图 6 所示, *EuLBDs* 启动子不仅含有基本顺式作用元件, 还存在 3 种类型元件: (1) 生长发育调控元件, 如赤霉素响应元件 ABRE; 生长素响应元件 AuxRR-core; 水杨酸响应元件 CGTCA-motif; (2) 胁迫响应调控元件, 如干旱胁迫响应元件 MBS、

低温响应元件 LTR 和厌氧胁迫相关元件 ARE; (3) 光响应元件, 如 GT1-motif、GATA-motif、Sp1、G-Box 和 ACE 等, 推测 *EuLBDs* 可能在杜仲生长发育、逆境胁迫以及光周期调控中发挥重要作用。*EuLBDs* 基因中光响应元件数量最多, 共有 232 个, 包含 55 个 Box 4, 34 个 G-box 元件, 暗示 *EuLBDs* 基因的转录可能受光周期调控。*EuLBDs* 基因启动子区域含有 48 个 ABRE 元件, 表明 *EuLBDs* 可能参与 ABA 调控。

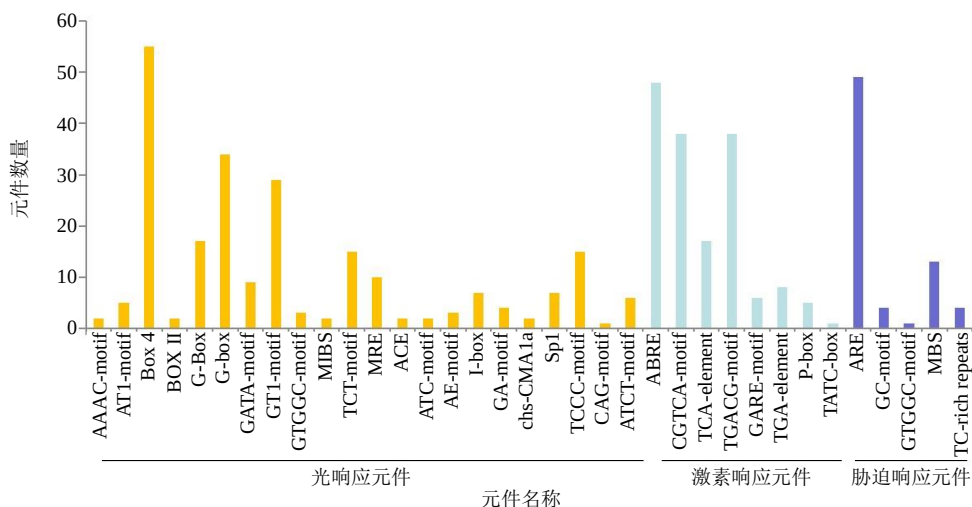


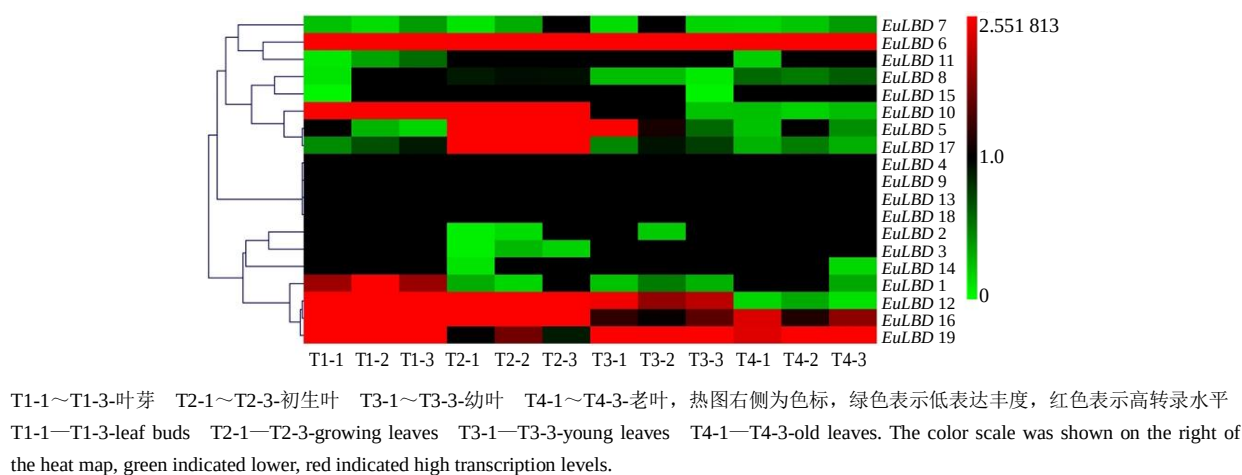
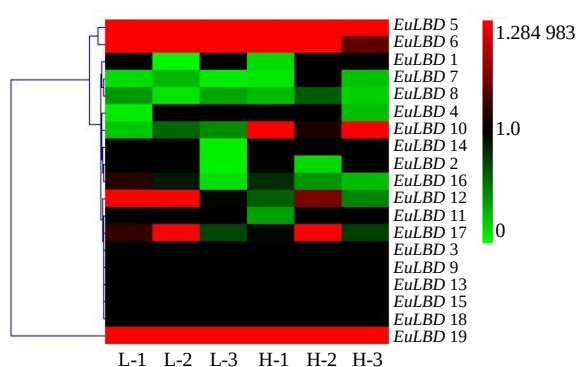
图 6 杜仲 LBDs 启动子顺式作用元件分析

Fig. 6 Cis-elements analysis in promoter of *EuLBDs*

3.8 杜仲 LBD 基因家族表达模式分析

为了探索 *EuLBDs* 基因在杜仲叶片不同发育时期及杜仲胶形成中的功能, 根据转录组数据, 检测 *EuLBDs* 基因表达模式 (图中显示基因编号与文中基因命名一致)。结果如图 7 和 8 所示, 不同 *EuLBDs*

基因在杜仲叶片不同发育时期及杜仲胶含量中表达丰度存在显著差异, 大部分 *EuLBDs* 基因在杜仲叶片发育中表达丰度较低, 其中有 4 个 *EuLBDs* 基因 (*EuLBD3*、*EuLBD9*、*EuLBD13* 和 *EuLBD15*) 在杜仲叶片中不表达, 表明 *EuLBD3*、*EuLBD9*、*EuLBD13*

图 7 *EuLBDs* 基因在杜仲叶片不同发育时期的表达模式Fig. 7 Expression patterns of *EuLBDs* genes at different development stages of *E. ulmoides* leaves图 8 *EuLBDs* 基因在杜仲不同胶含量叶片中的表达模式
Fig. 8 Expression pattern of *EuLBDs* genes in leaves with different gum content

和 *EuLBD15* 在杜仲叶片发育中不发挥作用。*EuLBDs* 基因随着杜仲叶片发育, 表达水平逐渐降低, *EuLBD12* FPKM 值在叶芽中是 357.0, 幼叶中为 62.0, 成熟叶中是 2.2, 老叶中仅为 0.2, 表明大部分 *EuLBDs* 基因参与杜仲叶片发育, 特别在叶片发育的早期阶段。

为了检测 *EuLBDs* 在杜仲胶形成中发挥的作用, 利用不同胶含量的转录组数据, 检测 *EuLBDs* 的表达水平。结果如图 8 所示, *EuLBDs* 基因在杜仲不同胶含量中的表达水平均较低, 几乎检测不到, 转录水平不随胶含量的高低而改变, 由此说明 *EuLBDs* 在杜仲胶形成过程中发挥的作用较小, 这

可能与 *EuLBDs* 在杜仲成熟叶中表达量较低有关。

3.9 杜仲 LBDs 蛋白互作网络预测

表达模式分析显示, *EuLBD6* 和 *EuLBD19* 在杜仲叶片不同发育阶段和杜仲胶形成中表达量较高, 表明 *EuLBD6* 和 *EuLBD19* 在杜仲叶片发育和胶形成过程中发挥重要作用。为了检测 *EuLBD6* 和 *EuLBD19* 与其他蛋白的互作关系, 利用 STRING 数据库, 预测 *EuLBD6* 和 *EuLBD19* 互作蛋白。结果如图 9-A 所示, *EuLBD6* 可以与 10 个蛋白发生相互作用, 其中 8 个属于 *EuLBD* 家族, 一个是 MYB-like 转录因子, 另一个为 NLP7 蛋白; *EuLBD19* 可与 5 个蛋白产生互作关系(图 9-B), 其中 3 个为 *EuLBD* 蛋白, 一个 Auxin-like 转录因子, 一个 MYB-like 蛋白, 暗示 *EuLBD6* 和 *EuLBD19* 可能参与杜仲生长素信号调控。

为了探索 *EuLBD* 基因家族潜在调控关系, 构建了 *EuLBD* 家族共表达调控网络。结果如图 10 所示, 调控网络中共有 14 个节点(代表 *EuLBDs* 蛋白)和 19 条边(代表蛋白质之间的相互作用), 表明 19 个 *EuLBDs* 中有 14 个蛋白表现出共表达相关性, 其中 *EuLBD12* 互作蛋白数量最多, 可与 8 个 *EuLBDs* 蛋白发生互作关系, 暗示 *EuLBD12* 可能是 *EuLBD* 基因家族的核心蛋白, *EuLBD6*、*EuLBD4* 和 *EuLBD1*, 分别可以与 4 个 *EuLBDs* 蛋白互作, 其余 *EuLBDs* 蛋白互作关系较少。

4 讨论

杜仲全基因组测序完成以后, 已有多基因家族进行了分析报道, 例如 *MAPK*^[57]、*LOX*^[58]、*HMGRS*^[59]、*MK*^[60]、*ACOTS*^[61]、*HMGs*^[62] 基因家族等。LBD 转录因子是植物特有的一类转录因子, 在

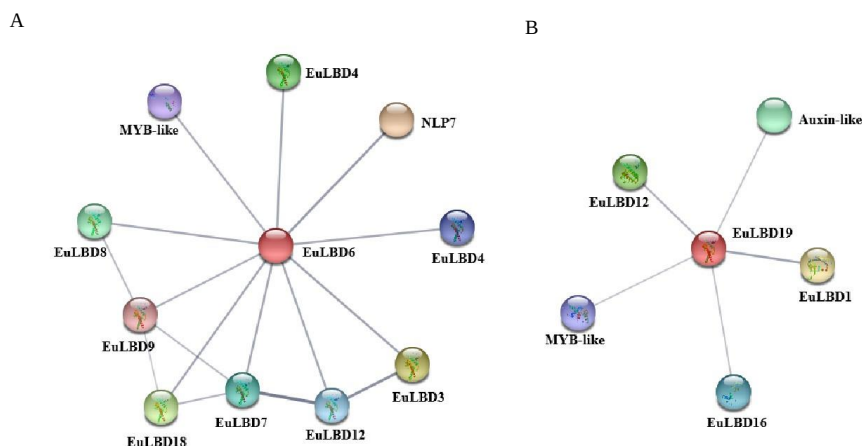


图 9 EuLBD6 (A) 和 EuLBD19 (B) 蛋白相互作用网络

Fig. 9 Interaction network of EuLBD6 (A) and EuLBD19 (B)

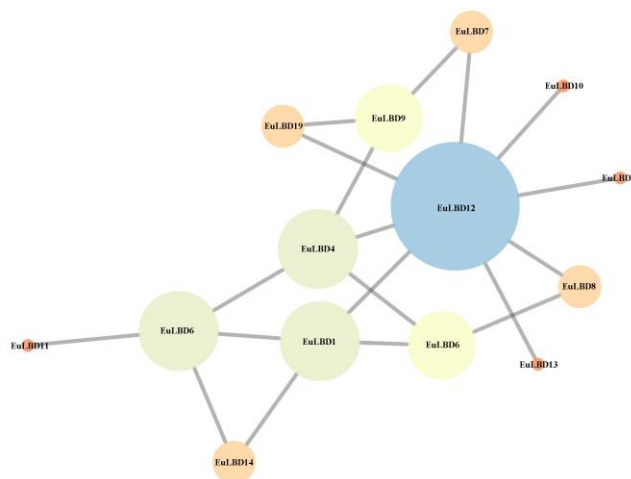


图 10 EuLBD 基因家族蛋白互作网络

Fig. 10 Protein interactions network of *EuLBD* gene family

植物侧生器官发育、激素响应、逆境胁迫、花青素和氮素代谢等途径中发挥了重要作用^[63]。本研究以杜仲基因组数据为基础,通过全基因组查找和生物信息学分析,鉴定出 19 个含有完整 LOB 结构域的 LBD 转录因子,基因数量均少于二穗短柄草 (28 个)^[34]、拟南芥 (43 个)^[8]、水稻 (35 个)^[31]、玉米 (44 个)^[32]、杨树 (57 个)^[6]、番茄 (46 个)^[4]、辣椒 (56 个)^[37]、烟草 (45 个)^[40]、葡萄 (98 个)^[42],杜仲基因组大小是 1.18 Gb^[64],是水稻 (441 Mb)^[65]的 2 倍多,为二穗短柄草 (300 Mb)^[66]的 3 倍多,是拟南芥 (164 Mb) 的 7 倍,为番茄 (850 Mb) 的 1 倍多,然而 LBD 基因数量与基因组大小不成正比,这可能与杜仲和双子叶共同祖先发生分化后,进行全基因组复制 (WGD) 及基因丢失事件有关。

拟南芥、水稻、杜仲和毛果杨 LBD 蛋白聚类分析结果显示,19 个 EuLBDs 分为 2 个大亚家族,分

别是 Class I 和 Class II,进一步划分为 7 个小亚家族 (Ia、Ib、Ic、Id、Ie、IIa 和 IIb) (图 3)。Class I 大亚家族含有 16 个 EuLBDs 蛋白, Ia 亚家族中所含 EuLBDs 蛋白数量最多,有 7 个 EuLBDs, Ie 亚家族不含 EuLBDs。Class II 大亚家族含有 3 个 EuLBDs (分别是 EuLBD6、EuLBD9、EuLBD12)。系统进化结果显示,杜仲 EuLBD5、EuLBD6、EuLBD11 和 EuLBD15 与拟南芥 AtLBD37 (AtASL39)、AtLBD38 (AtASL40) 和 AtLBD39 (AtASL41) 聚为一支,属于 Class II 大亚家族。AtLBD37、AtLBD38 和 AtLBD39 参与拟南芥花青素合成和氮代谢^[5,13,23],推测 EuLBD5、EuLBD6、EuLBD11 和 EuLBD15 可能具有功能相似性。EuLBD14 是 AtLBD6 的同源基因, AtLBD6 (AtAS2) 参与拟南芥花序发育调控^[67],暗示 EuLBD14 在杜仲花序发育中可能发挥重要作用。AtLBD16

(*AtASL18*)、*AtLBD17* (*AtASL15*) 和 *AtLBD29* (*AtASL16*) 与杜仲 *EuLBD1* 和 *EuLBD13* 互为同源基因, *AtLBD16* (*AtASL18*)、*AtLBD17* (*AtASL15*) 和 *AtLBD29* (*AtASL16*) 诱导愈伤组织形成, 参与植物的再生过程^[68-69], 表明 *EuLBD1* 和 *EuLBD13* 在杜仲愈伤组织形成中可能具有相似的功能。

基因结构决定基因功能, *EuLBDs* 蛋白结构分析发现, 同一亚家族含有相似的结构域, *LX6LX3LX6L* 结构域(Motif 1)存在于所有 *EuLBDs* 转录因子中, 表明 *EuLBDs* 转录因子结构具有保守性。不同 *EuLBDs* 转录因子结构存在差异, 除 *EuLBD4* 和 *EuLBD11* 不含 *CX2CX6CX3C* 结构域(Motif 2)外, 其他 *EuLBDs* 蛋白均含有 Motif 2, Class I 大亚家族基因结构较为复杂, 不仅含有保守的 LOB 结构域, 还含有特异结构域, 这可能与基因功能的多样性有关。

研究报道, 水稻、小麦、拟南芥、毛果杨、番茄、辣椒、巨桉等物种 LBD 蛋白参与植物叶片发育、侧生根形成、次生木质部和韧皮部发育、细胞分裂素、生长素以及非生物胁迫等生物学过程^[15, 24, 43, 70-71]。基因表达与其功能特征密切相关, 利用转录组数据, 分析 *EuLBDs* 基因在杜仲叶片不同发育时期(图 7)以及杜仲胶含量中的表达模式(图 8)。结果显示, *EuLBDs* 基因在杜仲叶芽中转录水平最高, 随着叶片发育, 表达水平逐渐减低, 推测 *EuLBDs* 参与杜仲叶片发育, 特别是叶芽形成期。*EuLBD6*、*EuLBD12* 和 *EuLBD16* 在叶片 4 个发育阶段表达量均较高, 表明 *EuLBD6*、*EuLBD12* 和 *EuLBD16* 在杜仲叶片生长发育中发挥重要作用, 这为进一步探索 *EuLBDs* 基因在杜仲叶片发育中的功能提供了重要的候选基因。*EuLBD4*、*EuLBD9*、*EuLBD13*、*EuLBD15* 和 *EuLBD18* 转录水平较低, 在各发育阶段表达丰度几乎为 0, 暗示 *EuLBD4*、*EuLBD9*、*EuLBD13*、*EuLBD15* 和 *EuLBD18* 在杜仲叶片中发挥的作用较小。*AtLBD6* 参与拟南芥旗叶形成, 超表达 *AtLBD6* 导致转基因植株叶片细小、卷曲^[12]。在水稻中, 降低 *OsLBD37* 和 *OsLBD38* 表达水平, 影响水稻抽穗时间关键基因 *Ehd1* 的表达, 导致水稻延迟抽穗^[72]。在巨桉中, *EgLBD37* 在韧皮部高量表达^[6], 超表达 *EgLBD37* 导致转基因植株次生木质部增厚, 韧皮纤维增多^[73], 表明 LBD 基因家族在植物叶片发育、花序形成、次生发育等过程发挥重要作用。

进化分析显示, *EuLBD6* 是拟南芥 *AtLBD38* 的同源基因, 在 N/NO₃ 缺失条件下, 超表达 *AtLBD38* 强烈抑制花青素合成关键调控因子 PAP1 和 PAP2, 以及类黄酮合成过程中花青素特异基因的表达; 相反, *lbd38* 突变体在 N/NO₃ 充足条件下积累花青素, 组成性表达花青素生物合成基因, *AtLBD38* 抑制多种氮应答基因表达, 表明 *AtLBD38* 是花青素生物合成和氮有效性利用的新抑制因子^[74]。蛋白互作网络结果显示, *EuLBD6* 不仅可以与 LBD 蛋白发生相互作用, 还可与 MYBL2 蛋白互作, 在拟南芥中 *mir858a* 通过翻译抑制花青素生物合成关键负调控因子 MYBL2 的表达, 是拟南芥幼苗花青素生物合成的正调控因子^[75], 推测 *EuLBD6* 在杜仲花青素合成中可能也发挥重要作用。*EuLBD19* 与 *LBD1* 互为同源基因, *PtaLBD1* 在韧皮部和形成层中表达量最高, 显性抑制因子 *PtaLBD1* 通过与抑制因子 *SRDX* 区域融合, 减少杨树直径增长, 抑制韧皮部发育, 并且高度不规则, 表明 *PtaLBD1* 在杨树次生木质部生长过程中具有广泛的调控作用^[76], 暗示 *EuLBD19* 在杜仲次生生长过程中可能也发挥重要作用。

综上所述, 本研究以杜仲全基因组数据为背景, 对杜仲 LBD 转录因子家族进行了全面的生物信息学分析, 共鉴定出 19 个 *EuLBDs* 基因, 分为 Class I 与 Class II 2 大类, 划分为 6 个亚家族(Ia、Ib、Ic、Id 与 IIa、IIb)。理化性质分析显示: *EuLBDs* 编码 152~293 个氨基酸, 理论等电点分布于 4.62~9.91, 相对分子质量区域为 17 420~31 820, 均为亲水性蛋白, 以 α -螺旋和无规则卷曲为主, 亚细胞定位于细胞核中。*EuLBDs* 蛋白含有类锌指、亮氨酸拉链和甘氨酸-丙氨酸-丝氨酸(GAS)保守结构域。表达模式分析显示, *EuLBDs* 参与杜仲叶片发育, 随着叶片发育, 转录水平逐渐降低, *EuLBDs* 基因表达不受叶片胶含量的影响, 本研究为深入研究杜仲 *EuLBDs* 基因功能奠定了理论基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 程娜. 剥皮对杜仲生长期生理特性及次生代谢物含量的影响 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2009.
- [2] Li Z Y, Gu J, Yan J, et al. Hypertensive cardiac remodeling effects of lignan extracts from *Eucommia ulmoides* Oliv. bark: A famous traditional Chinese medicine [J]. *Am J Chin Med*, 2013, 41(4): 801-815.
- [3] Husbands A, Bell E M, Shuai B, et al. LATERAL

- ORGAN BOUNDARIES defines a new family of DNA-binding transcription factors and can interact with specific bHLH proteins [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(19): 6663-6671.
- [4] 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): 2501-2513.
- [5] 王美艳. 两种 LBD 转录因子及其 DNA 结合结构域的表达与纯化 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2013.
- [6] 芦强. 巨桉、毛果杨、雷蒙德氏棉 LBD 基因家族的研究 [D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2017.
- [7] Lin W C, Shuai B, Springer P S. The *Arabidopsis* lateral organ boundaries-domain gene asymmetric leaves2 functions in the repression of *Knox* gene expression and in adaxial-abaxial patterning [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(10): 2241-2252.
- [8] Shuai B, Reynaga-Peña C G, Springer P S. The lateral organ boundaries gene defines a novel, plant-specific gene family [J]. *Plant Physiol*, 2002, 129(2): 747-761.
- [9] 任杨柳. 玉米侧生器官分化基因 *ZmLBD16* 转化拟南芥的功能分析 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2017.
- [10] 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 leaves [J]. *Development*, 2001, 128(10): 1771-1783.
- [11] Taramino G, Sauer M, Stauffer J L Jr, et al. The maize (*Zea mays* L.) *RTCS* gene encodes a LOB domain protein that is a key regulator of embryonic seminal and post-embryonic shoot-borne root initiation [J]. *Plant J*, 2007, 50(4): 649-659.
- [12] Matsumura Y, Iwakawa H, Machida Y, et al. 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]. *Plant J*, 2009, 58(3): 525-537.
- [13] 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]. *Plant Cell*, 2009, 21(11): 3567-3584.
- [14] Albinsky D, Kusano M, Higuchi M, et al. Metabolomic screening applied to rice FOX *Arabidopsis* lines leads to the identification of a gene-changing nitrogen metabolism [J]. *Mol Plant*, 2010, 3(1): 125-142.
- [15] Bell E M, Lin W C, Husbands A Y, et al. *Arabidopsis* lateral organ boundaries negatively regulates brassinosteroid accumulation to limit growth in organ boundaries [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(51): 21146-21151.
- [16] Thatcher L F, Powell J J, Aitken E A B, et al. The lateral organ boundaries domain transcription factor LBD20 functions in *Fusarium* wilt susceptibility and jasmonate signaling in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2012, 160(1): 407-418.
- [17] Kim M J, Kim M, Lee M R, et al. Lateral organ boundaries domain (*lbd*)₁₀ interacts with sidecar pollen/*lbd27* to control pollen development in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2015, 81(5): 794-809.
- [18] 汤玮婧. LBD 转录因子家族的起源与进化 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2013.
- [19] Nakazawa M, Ichikawa T, Ishikawa A, et al. Activation tagging, a novel tool to dissect the functions of a gene family [J]. *Plant J*, 2003, 34(5): 741-750.
- [20] Chalfun-Junior A, Franken J, Mes J J, et al. *ASYMMETRIC LEAVES2-LIKE1* gene, a member of the *AS2/LOB* family, controls proximal-distal patterning in *Arabidopsis* petals [J]. *Plant Mol Biol*, 2005, 57(4): 559-575.
- [21] 张娇娇, 江力, 杨杰, 等. 拟南芥抗旱突变体的筛选和鉴定 [J]. 合肥工业大学学报: 自然科学版, 2012, 35(4): 531-535.
- [22] Berckmans B, Vassileva V, Schmid S P C, et al. Auxin-dependent cell cycle reactivation through transcriptional regulation of *Arabidopsis* E2Fa by lateral organ boundary proteins [J]. *Plant Cell*, 2011, 23(10): 3671-3683.
- [23] 李艳艳. 红豆杉韧皮部分化、发育关键基因的克隆及功能分析 [D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2015.
- [24] Okushima Y, Overvoorde P J, ARIMA K, et al. Functional genomic analysis of the auxin response factor gene family members in *Arabidopsis thaliana*: Unique and overlapping functions of *arf7* and *arf19* [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(2): 444-463.
- [25] Laplace L, Parizot B, Baker A, et al. GAL4-GFP enhancer trap lines for genetic manipulation of lateral root development in *Arabidopsis thaliana* [J]. *J Exp Bot*, 2005, 56(419): 2433-2442.
- [26] 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 Physiol*, 2009, 151(3): 1377-1389.
- [27] 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 Physiol*, 2009, 151(3): 1377-1389.
- [28] 孙亭亭. 烟草分枝异常类型突变体基因鉴定及相关家族分析 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2015.
- [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 Cell Physiol*, 2002, 43(5): 467-478.
- [30] 邢光伟. 小麦 LBD 转录因子家族的鉴定、系统进化及表达分析 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.
- [31] 冯书超. 丹参转录因子 SmLBD23 和 SmLBD16 的克隆及功能研究 [D]. 西安: 陕西师范大学, 2018.
- [32] Wuyun T N, Wang L, Liu H M, *et al.* The hardy rubber tree genome provides insights into the evolution of polyisoprene biosynthesis [J]. *Mol Plant*, 2018, 11(3): 429-442.
- [33] Yang Y, Yu X B, Wu P. Comparison and evolution analysis of two rice sub species lateral organ boundaries domain gene family and their evolutionary characterization from *Arabidopsis* [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2006, 39(1): 248-262.
- [34] Zhang Y M, Zhang S Z, Zheng C C. Genomewide analysis of lateral organ boundaries domain gene family in *Zea mays* [J]. *J Genet*, 2014, 93(1): 79-91.
- [35] Guo B J, Wang J, Lin S, *et al.* A genome-wide analysis of the asymmetric leaves2/lateral organ boundaries (As2/lob) gene family in barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2016, 17(10): 763-774.
- [36] Gombos M, Zombori Z, Szécsényi M, *et al.* Characterization of the LBD gene family in *Brachypodium*: A phylogenetic and transcriptional study [J]. *Plant Cell Rep*, 2017, 36(1): 61-79.
- [37] Wu J, Liu S Y, Guan X Y, *et al.* Genome-wide identification and transcriptional profiling analysis of auxin response-related gene families in cucumber [J]. *BMC Res Notes*, 2014, 7: 218.
- [38] Liu H Z, Cao M X, Chen X L, *et al.* Genome-wide analysis of the lateral organ boundaries domain (LBD) gene family in *Solanum tuberosum* [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(21): 5360.
- [39] 郑忠凡, 张亚利, 胡灿, 等. 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.
- [40] Yang T Q, Fang G Y, He H, *et al.* Genome-wide identification, evolutionary analysis and expression profiles of lateral organ boundaries domain gene family in *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula* [J]. *PLoS One*, 2016, 11(8): e0161901.
- [41] 刘同金, 张晓雪, 张晓辉, 等. 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.
- [42] 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.
- [43] Luo Y W, Ma B, Zeng Q W, *et al.* Identification and characterization of lateral organ boundaries domain genes in mulberry, *Morus notabilis* [J]. *Meta Gene*, 2016, 8: 44-50.
- [44] Grimplet J, Pimentel D, Agudelo-Romero P, *et al.* The lateral organ boundaries domain gene family in grapevine: Genome-wide characterization and expression analyses during developmental processes and stress responses [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 15968.
- [45] Wang X F, Zhang S Z, Su L, *et al.* A genome-wide analysis of the lbd (lateral organ boundaries domain) gene family in *Malus domestica* with a functional characterization of mdlbd11 [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(2): e57044.
- [46] Yu Q, Hu S M, Du J C, *et al.* Genome-wide identification and characterization of the lateral organ boundaries domain gene family in *Brassica rapa* var. *rapa* [J]. *Plant Divers*, 2020, 42(1): 52-60.
- [47] Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, *et al.* ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(13): 3784-3788.
- [48] Geourjon C, Deléage G. SOPMA: Significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments [J]. *Comput Appl Biosci*, 1995, 11(6): 681-684.
- [49] Kelley L A, Sternberg M J E. Protein structure prediction on the Web: A case study using the Phyre server [J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(3): 363-371.
- [50] Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, *et al.* Clustal W and clustal X version 2.0 [J]. *Bioinformatics*, 2007, 23(21): 2947-2948.
- [51] Tamura K, Stecher G, Peterson D, *et al.* MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. *Mol Biol Evol*, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [52] Bailey T L, Williams N, Misleh C, *et al.* MEME: Discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs [J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34: W369-W373.
- [53] Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, *et al.* Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999 [J]. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(1): 297-300.
- [54] Li L, Liu M H, Shi K, *et al.* Dynamic changes in

- metabolite accumulation and the transcriptome during leaf growth and development in *Eucommia ulmoides* [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(16): 4030.
- [55] Liu J, Cheng Z C, Li X Y, *et al.* Expression analysis and regulation network identification of the *CONSTANS*-like gene family in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) under photoperiod treatments [J]. *DNA Cell Biol*, 2019, 38(7): 607-626.
- [56] Lee H W, Kim M J, Park M Y, *et al.* The conserved proline residue in the LOB domain of LBD18 is critical for DNA-binding and biological function [J]. *Mol Plant*, 2013, 6(5): 1722-1725.
- [57] Jing T, Wang L, Liu H M, *et al.* Genome-wide identification of mitogen-activated protein kinase cascade genes and transcriptional profiling analysis during organ development in *Eucommia ulmoides* [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 17732.
- [58] 朱利利, 庆军, 杜庆鑫, 等. 杜仲脂氧合酶基因家族全基因组鉴定及其表达特性研究 [J]. 植物研究, 2019, 39(6): 927-934.
- [59] 王淋, 乌云塔娜, 叶生晶. 杜仲 EuHMGRS 基因家族的鉴定及生物信息学分析 [J]. 经济林研究, 2013, 31(4): 16-24.
- [60] 乌云塔娜, 王淋, 叶生晶. 杜仲甲羟戊酸激酶(EuMK)基因鉴定及生物信息学分析 [J]. 经济林研究, 2014, 32(1): 6-12.
- [61] 乌云塔娜, 王淋, 叶生晶. 杜仲 EuACOTS 基因家族的鉴定及生物信息学分析 [J]. 经济林研究, 2013, 31(4): 1-8.
- [62] 王淋, 乌云塔娜, 叶生晶. 杜仲 EuHMGS 基因鉴定及生物信息学分析 [J]. 经济林研究, 2014, 32(1): 13-20.
- [63] 贾喜涛, 刘文献, 谢文刚, 等. 蒺藜苜蓿 LBD 转录因子基因家族全基因组分析 [J]. 西北植物学报, 2014, 34(11): 2176-2187.
- [64] 王淋. 杜仲基因组分析及适应性和橡胶生物合成的分子基础研究 [D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2017.
- [65] Burr B. Mapping and sequencing the rice genome [J]. *Plant Cell*, 2002, 14(3): 521-523.
- [66] International B I. Genome sequence analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*: insights into grass genome evolution [J]. *Nature*, 2009, 463(7282): 763-768.
- [67] Xu B, Li Z Y, Zhu Y, *et al.* *Arabidopsis* genes AS1, AS2, and JAG negatively regulate boundary-specifying genes to promote sepal and petal development [J]. *Plant Physiol*, 2008, 146(2): 566-575.
- [68] Fan M Z, Xu C Y, Xu K, *et al.* Lateral organ boundaries domain transcription factors direct callus formation in *Arabidopsis* regeneration [J]. *Cell Res*, 2012, 22(7): 1169-1180.
- [69] Liu J C, Sheng L H, Xu Y Q, *et al.* WOX11 and 12 are involved in the first-step cell fate transition during de novo root organogenesis in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2014, 26(3): 1081-1093.
- [70] Naito T, Yamashino T, Kiba T, *et al.* A link between cytokinin and asl9 (asymmetric leaves 2 like 9) that belongs to the As2/lob (lateral organ boundaries) family genes in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007, 71(5): 1269-1278.
- [71] Zentella R, Zhang Z L, Park M, *et al.* Global analysis of the direct targets in early gibberellin signaling in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2007, 19(10): 3037-3057.
- [72] Li C N, Zhu S S, Zhang H, *et al.* OsLBD37 and OsLBD38, two class II type LBD proteins, are involved in the regulation of heading date by controlling the expression of Ehd1 in rice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 486(3): 720-725.
- [73] Lu Q, Shao F J, MacMillan C, *et al.* Genomewide analysis of the lateral organ boundaries domain gene family in *Eucalyptus grandis* reveals members that differentially impact secondary growth [J]. *Plant Biotechnol J*, 2018, 16(1): 124-136.
- [74] 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]. *Plant Cell*, 2009, 21(11): 3567-3584.
- [75] Wang Y L, Wang Y Q, Song Z Q, *et al.* Repression of MYBL2 by both microRNA858a and HY5 leads to the activation of anthocyanin biosynthetic pathway in *Arabidopsis* [J]. *Mol Plant*, 2016, 9(10): 1395-1405.
- [76] Yordan S, Yordanov, Sharon R, *et al.* Members of the LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN transcription factor family are involved in the regulation of secondary growth in populus [J]. *Plant Cell*, 2010, 22: 3662-3677.

[责任编辑 时圣明]