普通烟草 LBD 基因家族的全基因组 序列鉴定与表达分析

孙亭亭1,龚达平1,张 磊2,陈雅琼1,赵 维1,向小华1,孙玉合1

(1中国农业科学院烟草研究所/烟草行业烟草基因资源利用重点实验室,青岛266101;2华中农业大学园艺林学学院,武汉430070)

摘要:LBD 是一类具有 LOB(lateral organ boundaries)结构域的基因家族,在植物发育过程中起到非常重要的作用。采用 生物信息学方法,根据拟南芥 LBD 基因序列鉴定了普通烟草基因组中的 LBD 基因,并对家族成员进行了序列特征、系统发育 和表达谱分析。结果表明:普通烟草基因组中共有 98 个 LBD 基因成员,其基因结构相对简单,一般含有 1~3 个外显子。LBD 基因家族可分成 I 和 II 两大类,两类均含有 CX₂CX₆CX₃C 保守结构域,但 II 类不含有 LX₆LX₃LX₆L 形成的"卷曲螺旋"二级结 构,根据与拟南芥 LBD 蛋白构建的系统发育树则可细分成 5 个亚家族(Ia、Ib、Ic、Id 和 II)。将 LBD 基因与表达序列标签 (EST)比对,发现 36 个基因有 EST 证据;EST、芯片数据和转录组数据分析表明:LBD 基因具有不同的组织表达模式,部分基 因表现出组织特异性。这些研究结果为普通烟草 LBD 基因家族功能的深入研究奠定了基础。

关键词:普通烟草;LBD 基因家族;系统进化;基因表达

Genome-wide Sequence Identification and Expression Analysis of the LBD Gene Family in *Nicotiana tabacum*

SUN Ting-ting ¹, GONG Da-ping ¹, ZHANG Lei ², CHEN Ya-qiong ¹, ZHAO Wei ¹, XIANG Xiao-hua ¹, SUN Yu-he ¹

(¹Key Laboratory of Tobacco Gene Resources, Institute of Tobacco Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao 266101;²College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract: LBD gene with LOB (lateral organ boundaries) domain plays very important role in plant development. Base on bioinformatic method, the LBD genes of *Nicotiana tabacum* were screened with the sequences of *Arabidopsis*. The sequence structure, phylogenetic relationship and expression pattern of the identified gene sequences were analyzed. The result show that a total of 98 LBD genes were identified from tobacco with simple genetic structures contained 1-3 exons generally. LBD gene family was divided into two types(I and II). All LBD members had conserved domain $CX_2CX_6CX_3C$, however, the type II genes didnot had secondary structure of coil made of LX_6LX_3 LX_6L . Furthermore, LBD genes were divided into 5 subfamilies(Ia, Ib, Ic, Id and II) by their phylogenetic relationship with *Arabidopsis*. A total of 36 members had EST evidence based on the comparison about LBD genes and EST sequences. The analysis of EST, array data and transcriptome showed that the LBD genes had different expression patterns and tissue specificity. These results provided abundant information for further functional analysis of the LBD genes family.

Key words: Nicotiana tabacum; LBD gene family; phylogenetic evolution; gene expression

收稿日期:2014-11-14 修回日期:2014-12-16 网络出版日期:2016-01-28

URL:http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20160128.1532.022.html

基金项目:国家高技术研究发展计划("863"计划)项目(2012AA021801)

第一作者研究方向为烟草基因组学。E-mail:qing.dt@163.com

通信作者:孙玉合,研究方向为烟草功能基因组学。E-mail: yhsun@163.com

LBD (LATERAL ORGAN BOUNDARIES DO-MAIN) 基因是一类具有 LOB(lateral organ boundaries)结构域的植物特有的转录因子基因家族。该 类基因家族在调控植物侧生器官发育、协同激素调 控植物发育、调控植物氮素代谢等过程中起着重要 作用。LBD 蛋白是由 N 端保守的 LOB 结构域和可 变的 C 末端组成。LOB 结构域包含一个典型的由 4 个保守的半胱氨酸残基组成的 CX, CX, CX, C(X 代 表非保守的氨基酸残基)基序。此外,LOB 结构域 还包含一个保守的甘氨酸残基和一个类似亮氨酸拉 链基序(LX₆LX₃LX₆L)。目前在拟南芥、水稻、玉 米、杨树和番茄中分别发现具有 LOB 结构域的 LBD 蛋白 43、35、43、57 和 46 个^[1-5]。对植物 LBD 基因 进行系统进化分析,发现根据 LOB 结构域中亮氨酸 拉链类似基序的有无可将 LBD 基因家族归为两 类[2-6]。第1类既含有类似锌指的结构域,还包含 类似亮氨酸拉链结构域;第2类只含有1个保守的 类似锌指结构域。其中,类似锌指的结构域对于结 合 DNA 是必需的;类似亮氨酸拉链结构域可能与蛋 白二聚化有关,参与蛋白的相互作用^[1-2,7]。

已经明确了一些 LBD 基因的功能,但仍有部分 基因的功能尚待验证。在拟南芥中,AtLBD4 以及 A. Chalfun-junior 等^[8] 发现的 AtLBD41 基因参与调 控植物叶片发育。LBD 中的另一成员 AtAS2 基因, 在幼嫩花器官近轴面特异表达,从而调控植物的花 器官发育^[9-11]。W. R. Scheible 等^[12]和 G. Rubin 等^[13]发现, 拟南芥中第 2 类 LBD 成员 AtLBD37、 AtLBD38、AtLBD39 以及 D. Albinsky 等[14] 在水稻中 发现的 OsLBD37 基因参与调控氮素代谢。R. Zentella 等^[15]发现赤霉素抑制 LBD 成员 AtASL37 的表 达, M. Ikezaki 等^[16]则发现 LBD 的另一成员 AtAS2 基因能够促进赤霉素合成。B. Berckmans 等^[17]发 现拟南芥 AtLBD33 和 AtLBD18 基因通过激活 E2Fa 的表达,促进侧根发育。杨树中与拟南芥 AtLBD1 同源的 LBD1 基因, 与抑制物 SRDX 结构域平移融 合,降低直径增长,抑制韧皮部的发育,调控次生生 长^[18]。目前 LBD 基因在拟南芥、水稻中研究的比 较多,在其他植物中的研究相对较少,仍有部分基因 功能没有得到验证。

烟草是一种重要的经济作物,也是典型的模式 植物。研究烟草基因组中 LBD 基因的分布、基因结 构与表达分析,对进一步研究其在烟草生长发育及 抗性响应中的功能具有重要意义。普通烟草基因组 测序的完成为烟草基因的生物功能研究提供了重要 的序列信息^[19]。然而,目前在全基因组水平上研究 普通烟草 LBD 基因家族尚未有报道。本研究利用 生物信息学方法,从全基因组水平上鉴定与分析 LBD 家族基因在普通烟草中的数目、序列特征、进 化与表达模式,为进一步研究 LBD 家族成员的生物 学功能奠定了理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

普通烟草全基因组数据、EST 序列和转录组数 据以及拟南芥、杨树、玉米、番茄 LBD 蛋白序列均下 载于 GenBank 数据库(http://www.ncbi.nlm.nih. gov)。普通烟草基因芯片数据源于茄科基因组数据 库(http://solgenomics.net)的基因芯片平台。

1.2 LBD 基因家族成员鉴定

首先利用普通烟草全基因组序列构建本地 BLAST数据库,然后以拟南芥(Arabidopsis thaliana)、杨树(Populus)、玉米(Zea mays)、番茄(Solanum lycopersicum)LBD蛋白序列作为Query序列,利 用BLAST程序(1e-10)搜索数据库。将检索到的候 选LBD序列在Pfam数据库中比对验证,筛选含有 LOB结构域(DUF260, PF03195)^[20]的序列。利用 ExPASy ProtParam(http://web.expasy.org/protparam/)对所有普通烟草LBD蛋白氨基酸序列进行 分子量、等电点预测^[21]。

1.3 系统发育树的构建及保守结构域分析

利用 MUSCLE^[22]软件对拟南芥和普通烟草 LBD 蛋白序列进行多序列比对,将多序列比对结果 利用 MEGA5^[23]软件采用邻接法(NJ, neighbor-joining)构建 LBD 基因的系统进化树,校验参数 Bootstrap 设置为 1000 次。采用 DNAMAN 软件进行 LBD 序列的保守域分析。

1.4 LBD 基因家族的结构分析

利用 Perl 程序解析 LBD 的基因结构信息,采用 在线软件 GSDS^[24](http://gsds.cbi.pku.edu.cn/) 工具进行基因外显子-内含子结构作图。

1.5 LBD 基因家族的表达模式分析

采用 BLAST(相似性设置为 95% 以上)对普通 烟草 LBD 基因序列进行比对,筛选对应的 EST 序列 以及相应的转录组数据。根据 EST 序列检索相应 的 LBD 基因的芯片探针,获得基因的表达谱数据。 利用 cluster3.0^[25]软件进行基因芯片和转录组数据 组织表达聚类。

2 结果与分析

2.1 普通烟草 LBD 家族成员鉴定

将模式植物拟南芥与普通烟草的 LBD 成员进行了同源比对分析,寻找拟南芥 LBD 成员在烟草中的同源基因,利用生物信息学方法从普通烟草基因组中共鉴定出 98 个 LBD 转录因子家族成员(表

表1 普通烟草中 LBD 转录因子家族信息

1)。通过 ExPASy 工具,对普通烟草 LBD 基因进行 了蛋白长度、分子量及等电点等生化属性分析。蛋 白质生化属性分析发现,最长的普通烟草 LBD 蛋白 (NtLBD21)包含 554 个氨基酸,最短的普通烟草 LBD 蛋白(NtLBD57)只有 121 个氨基酸残基,其等 电点范围从 4.7(NtLBD26)到 9.61(NtLBD15) 不等。

y in tobacco

蛋白	大小	分子量	等电点	拟南芥同源	E 值	cDNA	蛋白	大小	分子量	等电点	拟南芥同源	E 值	cDNA
编号	(aa)	(D)		基因		文库	编号	(aa)	(D)		基因		文库
Protein	Length	Molecular	Isoelectric	Arabidopsis	E-value	cDNA	Protein	Length	Molecular	Isoelectric	Arabidopsis	E-value	cDNA
ID		weight	point	homologous		library	ID		weight	point	homologous		library
NtLBD11	211	23080.1	6.7	AT1G07900.1	3.00E-49	K ₁	NtLBD97	223	24456.5	6.89	AT5G67420.1	6.00E-53	
NtLBD49	233	26148.8	5.78	AT3G58190.1	8.00E-40		NtLBD79	190	20998.5	8.77	AT1G65620.1	2.00E-53	
NtLBD50	218	23920	8.69	AT2G42430.1	5.00E-46	G_1	NtLBD80	231	25036.4	8.84	AT2G40470.1	2.00E-61	
NtLBD12	174	19430.8	6.29	AT3G11090.1	6.00E-42	K ₁	NtLBD04	154	17013.5	6.09	AT2G30130.1	8.00E-59	
NtLBD51	189	20688.4	5.82	AT5G63090.1	5.00E-34		NtLBD20	197	22358.1	6.89	AT3G47870.1	4.00E-29	
NtLBD52	189	20759.7	5.44	$\operatorname{AT1}\text{G07900.1}$	9.00E-57	$F_1 \ M_1$	NtLBD21	554	61884	7.29	AT3G23240.1	8.00E-24	M_2 S_3
NtLBD53	265	30322.4	5.82	AT3G47870.1	4.00E-30		NtLBD22	212	22750.9	8.28	AT3G27650.1	9.00E-34	
NtLBD54	202	22121.2	5.08	AT1G07900.1	2.00E-57		NtLBD98	236	25583	8.02	AT3G02550.1	1.00E-61	H_1 , I_1 ,
													K_1 , N_2 ,
													R_1
NtLBD13	259	29229.7	4.93	AT3G47870.1	4.00E-24		NtLBD81	146	16476.6	7.6	AT3G26660.1	1.00E-31	
NILDD33	515	34709.0	5.55	A13G47870.1	2.00E-42		NILDD82	182	20111.4	0.4	A15G27050.1	0.00E-35	L_1 , M_1 ,
													K_1
NtLBD56	253	27887.9	9.45	AT2G42430.1	1.00E-44	F ₂ ,K ₁ ,	NtLBD83	198	21718.5	5.22	AT5G06080.1	5.00E-38	
						M_3 S_2							
						T_1, Y_2							
						Z_2							
NtLBD57	121	14063.7	5.66	AT5G63090.1	8.00E-06	-	NtLBD84	231	25036.4	8.84	AT2G40470.1	2.00E-61	
NtLBD58	227	25061.9	8.57	AT1G65620.1	4.00E-59	K ₂	NtLBD23	310	34892.1	6.63	AT5G66870.1	5.00E-61	F_2
NtLBD14	200	23031.1	5.04	AT3G13850.1	1.00E-22		NtLBD88	209	23196.4	6.89	AT3G49940.1	1.00E-60	$M_1 \ T_1$
NtLBD91	245	27267	6.32	AT5G67420.1	3.00E-37		NtLBD24	248	27141	5.83	AT3G03760.1	3.00E-43	$D_1 \ E_2 \$
													K_1 , M_2 ,
													N_1 , P_1
NtLBD92	224	24465.7	6.43	AT5G67420.1	4.00E-66		NtLBD25	167	18445.9	7.64	AT1G31320.1	9.00E-51	
NtLBD93	209	23196.4	6.89	AT3G49940.1	2.00E-55	$M_1 \ T_1$	NtLBD85	176	19446.1	7.59	AT5G66870.1	8.00E-39	K ₁
NtLBD94	297	32340.4	6.09	AT3G02550.1	1.00E-71		NtLBD26	223	25653	4.7	AT3G47870.1	8.00E-24	$C_1 M_3$
NtLBD59	187	20934.5	8.77	AT1G65620.1	8.00E-54		NtLBD27	190	20818.7	7.55	AT2G23660.1	3.00E-29	
NtLBD60	164	18113.4	7.6	AT5G63090.1	4.00E-56	K ₁	NtLBD28	312	35073.3	6.4	AT5G66870.1	2.00E-65	
NtLBD02	223	25914	8.83	AT1G06280.1	3.00E-34		NtLBD05	227	25070.9	8.57	AT1G65620.1	4.00E-59	K5
NtLBD61	272	29667.4	9.51	AT3G13850.1	2.00E-26		NtLBD29	233	26125.7	5.57	AT2G42440.1	4.00E-40	-
NtLBD62	363	41075.2	5.62	AT3G13850.1	2.00E-42		NtLBD30	247	26967.9	5.79	AT3G03760.1	1.00E-47	
NtLBD63	182	20111.4	6.4	AT3G27650.1	8.00E-53	L_1, M_1	NtLBD31	247	26967.9	5.79	AT3G03760.1	4.00E-43	
						к.							
						R							
NtLBD64	229	25704.1	8.2	AT5G66870.1	2.00E-59		NtLBD32	164	18283.5	6.19	AT5G63090.1	5.00E-56	$M_1 \ K_1$
NtLBD65	553	60113.2	5.54	ATTG65620.1	4.00E-31	$C_1 \ F_1 \$	NtLBD01	166	18269.6	7.64	AT3G11090.1	2.00E-49	
						M_4 R_3							
						S_2							
NtLBD66	176	19430.1	7.59	AT2G30130.1	3.00E-60	K_1	NtLBD33	203	21821.9	8.28	AT3G27650.1	2.00E-34	

表1(续)

蛋白	大小	分子量	等电点	拟南芥同源	E 值	cDNA	蛋白	大小	分子量	等电点	拟南芥同源	E 值	cDNA
编号	(aa)	(D)		基因		文库	编号	(aa)	(D)		基因		文库
Protein		Molecular	Isoelectric	Arabidopsis		cDNA	Protein		Molecular	Isoelectric	Arabidopsis		cDNA
ID	Length	weight	point	homologous	E-value	library	ID	Length	weight	point	homologous	E-value	library
NtLBD86	224	24661	7.61	AT5G67420.1	6.00E-68	B ₁ H ₁	NtLBD06	178	20115.7	6.07	AT3G11090.1	2.00E-49	
						V M							
						$\mathbf{K}_1, \mathbf{M}_2$							
						N_2 R_2 ,							
						T_1							
NtLBD67	166	18269.6	7.64	AT5G63090.1	2.00E-39	F_2	NtLBD07	173	19238.7	5.22	AT2G30130.1	1.00E-41	
NtLBD68	273	27953.6	7.09	AT2G45420.1	1.00E-62	C ₃	NtLBD08	234	27182.9	6.36	AT2G40470.1	7.00E-52	
NtLBD15	277	30456.4	9.61	AT3G13850.1	3.00E-29		NtLBD34	189	20820.8	5.18	AT1G07900.1	6.00E-59	
NtLBD69	301	33516.2	5.58	AT3G47870.1	2.00E-42		NtLBD89	222	24597.1	9.19	AT5G67420.1	7.00E-56	L_1
NtLBD87	298	32222.3	6.19	AT5G67420.1	2.00E-39	A_1 V_6	NtLBD35	266	27459.1	7.06	AT2G45420.1	2.00E-42	
NtLBD70	125	14300.5	6.73	AT3G47870.1	2.00E-19		NtLBD36	163	18169.7	6.27	AT2G30130.1	4.00E-47	
NtLBD71	125	14184.3	5.5	AT3G47870.1	1.00E-18		NtLBD37	125	14272.5	6.73	AT3G47870.1	7.00E-19	
NtLBD72	233	26125.7	5.57	AT2G42440.1	3.00E-44		NtLBD38	125	14156.3	5.5	AT3G47870.1	2.00E-18	
NtLBD73	215	23595.7	8.85	AT2G42430.1	3.00E-42	G_1	NtLBD39	181	20183.3	9.34	AT5G66870.1	2.00E-27	T_1
NtLBD16	161	17667.8	8.26	AT3G27650.1	4.00E-50	M ₁	NtLBD40	213	23423.7	5.93	AT1G07900.1	4.00E-55	
NtLBD95	223	24488.7	7.61	AT5G67420.1	5.00E-52		NtLBD41	204	22360.4	6.06	AT5G63090.1	7.00E-33	
NtLBD17	212	23208.2	6.1	$\operatorname{AT1}\text{G07900.1}$	3.00E-48	$F_1 \ K_1 \$	NtLBD42	197	22459.3	6.42	AT3G47870.1	4.00E-28	
						T ₁							
NtLBD96	248	26876.5	8.01	AT3G02550.1	3.00E-62	1	NtLBD43	189	20758.5	6.07	AT2G42430.1	1.00E-39	Y ₁
NtLBD18	204	22321.4	6.41	AT5G63090.1	6.00E-33		NtLBD44	160	18026.5	7.58	AT3G47870.1	6.00E-29	
NtLBD74	125	14345.5	6.59	AT3G47870.1	7.00E-22		NtLBD45	304	34044	6.54	AT5G66870.1	4.00E-65	\mathbf{F}_1
NtLBD75	185	20134.6	8.22	AT5G63090.1	4.00E-56		NtLBD09	155	17184.7	6.09	AT2G30130.1	5.00E-59	K ₂
NtLBD76	178	19999.6	6.28	AT3G11090.1	4.00E-48		NtLBD90	197	21491.3	6.13	AT3G49940.1	7.00E-44	F_1
NtLBD77	154	16944.9	7.64	AT3G27650.1	1.00E-52		NtLBD10	206	22567.9	5.27	$\operatorname{AT1}\text{G07900.1}$	3.00E-57	
NtLBD03	213	23178.2	8.13	AT2G45410.1	3.00E-48	$F_2 \ K_1 \$	NtLBD46	226	26236.5	9.16	AT1G06280.1	3.00E-34	
						T_1							
NtLBD78	180	19646.1	8.23	AT5G63090.1	3.00E-56		NtLBD47	389	43773.7	8.61	AT1G06280.1	3.00E-14	
NtLBD19	203	22392.2	4.81	AT5G06080.1	8.00E-43		NtLBD48	175	19656.1	6.88	AT3G11090.1	2.00E-40	

K:^[26]种子萌发5d后的幼苗;T:腺毛;P:二细胞原胚;Z:受精卵细胞;H:激素处理后的BY-2细胞;Y:激素处理9h、72h和7d后的BY-2细胞;C:冷胁迫整株;F:2h昼夜交替整株;V:旺长期根;A:打顶一周后根;G:种子发芽;L:叶片;B:打顶前叶片;I:打顶前叶片、打顶后一周叶片和成熟期的叶片;M:移植11d、24d和48d后叶片、顶芽和根混合;D:柱头;N:花、根和叶片归一化聚集;S:衰老期叶片;R:根;E:成熟期叶片。 组织的下标数字代表 EST 的数量

K^[26]:Seedling after seed germination for 5 days, T:Trichome, P:Two-celled proembryo, Z:Zygote, H:BY-2 cells treated by hormone, Y:BY-2 cells treated by hormon for 9 h, 72 h and 7 d, C:Whole individual treated by cold stress, F:Whole plant of 2 h alternating day and night, V:Roots in vigorous growing, A:Root of one week after topping, G:Seed germination, L:Leaf, B:Leaf before topping, I:Leaf from before topping, one week after topping and maturity, M:Normalized cluster of leaves, buds and roots after transplanting for 11 d, 24 d and 48 d, D:Stigmas, N:Normalized cluster of flowers, leaves and root, S: Senescent leaf, R:Root, E:Mature leaf. The subscript number of organization represents the numbers of EST

2.2 普通烟草 LBD 家族基因结构及系统进化分析

为了更好地了解 LBD 基因系统进化关系,利用 普通烟草 LBD 蛋白全长序列构建了系统进化树(图 1 左)。根据亮氨酸拉链类似基序的存在与否,将 98 个普通烟草 LBD 基因分成 Class I 和 Class II 两 类,分别含有 85 个和 13 个 LBD 基因。98 个 LBD 基因形成了 41 个旁系同源基因对,其中 36 对基因 步长值(bootstrap values)为 100。造成这种现象的 原因是:烟草是四倍体,聚到一起的分别是普通烟草 的 2 个祖先种林烟草和绒毛状烟草。但也有单个 的,可能是在多倍化过程中,来源于某个祖先种的拷 贝丢失了。 对 LBD 家族成员的基因结构分析表明(图 1 右),LBD 基因家族大多数成员只有 1 个内含子, 特殊的 *NtLBD65* 基因由 10 个外显子构成。28 个 LBD 基因只由单一的外显子构成,62 个 LBD 基因 含有 1 个内含子,只有 7 个 LBD 基因含有 2 个内 含子。为了进一步明确普通烟草 LBD 基因与其他 物种同源基因的进化关系,构建了普通烟草与拟 南芥 LBD 基因的系统进化树(图 2)。根据进化树 聚类,将 Class I 细分为 I a、I b、I c、I d 等 4 个亚 类,分别包括 27、21、15 和 22 个普通烟草 LBD 成 员。数据分析发现,普通烟草中的 LBD 成员平均分 布在 4 个亚类中。









图 2 普通烟草与拟南芥 LBD 转录因子的系统进化树 Fig. 2 The phylogenetic tree of LBD transcription factors in tobacco and *Arabidopsis*

2.3 普通烟草 LBD 序列的结构域分析

在拟南芥中,LBD 基因家族包括 43 个成员,7 个 Class II 成员。在水稻中,共有 35 个 LBD 基因, 5 个属于 Class II 成员;在玉米基因组中有 43 个 LBD 基因,其中 7 个属于 Class II 。在普通烟草中 通过多序列比对发现,绝大多数普通烟草 LBD 蛋 白含有 1 个由 45 个氨基酸组成的保守的 CX₂CX₆ CX₃C 基序。但是,NtLBD21、NtLBD47、NtLBD63 和 NtLBD82 这4 个成员在第 3 个与第 4 个半胱氨 酸之间含有 4 个氨基酸残基,形成 CX₂CX₆CX₄C 基序。NtLBD63 和 NtLBD82 属于 I a,NtLBD21 和 NtLBD47 属于 I d(图 3)。在 Class I 的 LBD 基因 成员中,LOB 结构域的 C 端均包含有 1 个由多个 赖氨酸组成的类似亮氨酸拉链的 LX₆LX₃LX₆L 螺 旋卷曲二级结构,而普通烟草中 13 个 Class II 成 员中均没有该结构域。

2.4 普通烟草 LBD 基因组织表达分析

将普通烟草 LBD 基因与表达序列标签(EST) 比对,发现 36 个基因有 EST 证据。通过找到的 36 个 EST 序列搜索普通烟草 LBD 基因的芯片数据, 检索到 7 个基因的芯片表达谱数据。这 7 个 LBD 成员从种子萌发到叶片衰老不同时期共 19 个组 织的表达模式如图 4。*NtLBD56* 基因在所有组织 的表达量都比较高。相反,*NtLBD48* 在所有组织 中表达量都非常低,而 *NtLBD73* 基因则在上部茎 中特异表达。*NtLBD87、NtLBD96* 和 *NtLBD98* 3 个 基因主要集中在 T1 ~ T10 组织中(烟草顶端组织) 高表达;同时 *NtLBD98* 在根和早期衰老叶中也有 表达。



T8: Young bud, T9: Upper stem, T10: Lower stem, T11: Cauline leaf, T12: Early senescent leaf, T13: Mid/early senescent leaf,

T14: Late senescent leaf, T15: Mature leaf, T16: Mid/late senescent leaf, T17: Mature root, T18: Young root, T19: Seed

图 4 普通烟草 LBD 基因表达模式

Fig. 4 The expression profile of the common tobacco LBD genes

普通烟草 LBD 基因对应的转录组数据聚类分 析如图 5,从图中可以看出, NtLBD9、NtLBD37、Nt-LBD70 和 NtLBD43 等4 个基因在9 个组织中的表达 量均较高。NtLBD19、NtLBD68、NtLBD78、NtLBD28、 NtLBD75 NtLBD5 NtLBD72 NtLBD29 NtLBD3 Nt-LBD33 和 NtLBD22 等 11 个基因在根中的表达量 非常低: NtLBD22、NtLBD33、NtLBD5、NtLBD44、Nt-LBD64、NtLBD28、NtLBD78、NtLBD21、NtLBD27、Nt-LBD49 NtLBD50 NtLBD45 NTLBD85 NtLBD88 Nt-LBD93、NTLBD59、NtLBD68、NtLBD89、NtLBD79 和 NtLBD66 等在成熟花中的表达量非常低:NtLBD47、 NtLBD75、NtLBD44、NtLBD28、NtLBD78、NtLBD35、 NtLBD59 和 NtLBD62 等8 个基因在衰老花中的表达 量非常低: NtLBD19、NtLBD68、NtLBD21、NtLBD78、 NtLBD75、NtLBD8、NtLBD62 和 NtLBD79 等 8 个基因 在幼叶中的表达量非常低:NtLBD17、NtLBD22、Nt-LBD33 NtLBD58 NtLBD75 NtLBD5 NtLBD60 Nt-LBD44、NtLBD64、NtLBD28、NtLBD78、NtLBD45、Nt-LBD85 NtLBD68 NtLBD13 NtLBD25 NtLBD90 Nt-LBD39、NtLBD18 和 NtLBD66 等 20 个基因在幼花中 的表达量非常低: NtLBD21、NtLBD48、NtLBD62 和 NtLBD58 等4 个基因在成熟叶中的表达量非常低; NtLBD87、NtLBD90、NtLBD48、NtLBD23、NtLBD68、 NtLBD35、NtLBD78、NtLBD28、NtLBD46、NtLBD33、 *NtLBD17* 和 *NtLBD22* 等 12 个基因在干荚果中的表 达量非常低: NtLBD60、NtLBD44、NtLBD78、Nt-LBD23、NtLBD48、NtLBD62、NtLBD66、NtLBD94 和 NtLBD18 等9 个基因在茎中的表达量非常低; Nt-LBD94、NtLBD79、NtLBD62、NtLBD95、NtLBD55、Nt-LBD69、NtLBD93、NtLBD88、NtLBD78 和 NtLBD17 等 10个基因在衰老叶组织中表达量非常低。

3 讨论

本研究通过对普通烟草全基因组进行生物信息 学分析,共鉴定出 98 个 LBD 编码基因。与其他植 物一样,普通烟草 LBD 基因家族分成 2 类(Class I、II),5 个亚家族(Ia、Ib、Ic、Id 和II)。普通烟草是 异源四倍体植物,理论上 1 个基因在普通烟草中会有 2 个拷贝,LBD 家族基因数目是拟南芥、水稻、杨树和 番茄(二倍体植物)中数量的 2 倍。LBD 基因结构简 单,外显子数目少(一般 1~3 个),基因结构稳定。数 量和结构特征以及序列保守性等均说明 LBD 基因是 植物进化中非常保守的一类家族。 在基因结构图中,个别结构与长度差别都较大的反而被聚在临近的进化分支中,可能是由于内含子造成的。内含子在进化过程中受到的选择压比外显子小,所以可能变化比较大。98个 LBD 基因,通过与 EST 序列比对,共发现 36个 LBD 基因有 EST 证据,分别来自不同组织(表1),包括种子、叶片、腺毛、根、花、顶芽、原胚、受精卵、柱头、整株以及经激素诱导之后的各个组织。结合基因芯片表达数据,间接证实了普通烟草中 LBD 基因对烟草发育的影响渗入到了种子、根、叶、花等发育过程的各个方面。在转录组数据表达模式中,也证实了普通烟草 LBD 基因对烟草发育的影响涉及到叶、花、根和茎。

通过将普通烟草与拟南芥比较分析可以看出, LBD 基因的进化非常保守(图 2)。通过聚类分析和 拟南芥 LBD 基因功能注释可以推测普通烟草 LBD 基因的功能。普通烟草中的 NtLBD25 与拟南芥中 At1G16530、At1G31320(【b亚家族)基因高度同源 (表1),T. Naito 等^[27]研究发现拟南芥中的这两个 基因受细胞分裂素诱导。普通烟草中的 NtLBD86~ 93、NtLBD95、NtLBD97(Ⅱ类)成员在拟南芥中的同 源基因为 At5G67420、At3G49940, 拟南芥中的这 2 个基因参与氮素代谢以及积累花青苷[13]。 NtLBD05、NtLBD58~59 等6个基因在拟南芥中的 同源基因 At1 G65620 参与叶极性建立、花器官发育 及形态建成^[28-29]。NtLBD74、NtLBD20、NtLBD26 等 13个基因,在拟南芥中对应的同源基因为 At3G47870, S. A. Oh 等[31] 发现该基因参与雌配子体 的发育过程,使小孢子在正常范围内发生不对称分 裂,普通烟草中的这13个基因可能具有相似功能。 NtLBD18、NtLBD75、NtLBD78 等9个LBD 基因,在拟 南芥中的同源基因是At5g63090,该基因调控叶片早 期发育,与油菜素甾醇共同作用参与侧生器官与分 生组织边界处细胞分化^[32]。据此,推测烟草的这些 LBD 基因可能具有类似的功能。

LBD 基因家族调控植物的发育和激素代谢,在 植物发育过程中起到非常重要的作用。为了更好地 了解普通烟草 LBD 转录因子的结构和功能,本研究 以普通烟草全基因组序列为背景,对普通烟草中的 LBD 转录因子进行了生物信息学分析,为研究 LBD 基因功能奠定了坚实的基础。普通烟草 LBD 转录 因子是如何响应激素信号调控普通烟草的生长发育 还需要今后进行深入的功能研究。



Z1:干荚果;Z2:根;Z3:成熟花;Z4:衰老花;Z5:茎;Z6:成熟叶;Z7:衰老叶;Z8:幼叶;Z9:幼花

Z1: Dry capsule, Z2: Root, Z3: Mature flower, Z4: Senescent flower, Z5: Stem, Z6: Mature leaf, Z7: Senescent leaf, Z8: Young leaf, Z9: Young flower

图 5 LBD 基因转录组数据表达分析



参考文献

- Majer C, Hochholdinger F. Defining the boundaries; structure and function of LOB domain proteins [J]. Trends Plant Sci, 2011, 16 (1):47-52
- [2] Shuai B, Reynaga-Pena 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
- [3] 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]. Mol Phylogenet Evol, 2006, 39(1):248-262
- [4] Zhu Q H, Guo A Y, Gao G, et al. DPTF : a database of poplar transcription factors [J]. Bioinformatics ,2007 ,23 (10) :1307-1308
- [5] 王小菲,刘鑫,苏玲.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
- [6] 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
- [7] Semiarti E, Ueno Y, Tsukaya H, et al. The ASYMMETRIC LEAV-ES2 gene of Arabidopsis thaliana regulates formation of a symmetric lamina, establishment of venation and repression of meristemrelated homeobox genes in leaves [J]. Development, 2001, 128 (10):1771-1783
- [8] Chalfun-junior A, Franken J, Mes J J, et al. ASYMMETRIC LEAV-ES2-LIKE1 gene, a member of the AS2/LOB family, controls proximal-distl pattening in Arabidopsis petals [J]. Plant Mol Biol, 2005,57(4):559-575
- [9] Iwakawa H, Ueno Y, Semiarti E, et al. The ASYMMETRIC LEAV-ES2 gene of Arabidopsis thaliana, required for formation of a symmetric flat leaf lamina, encodes a member of a noval family of proteins characterized by cysteine repeats and a leucine zipper[J]. Plant Cell Physiol, 2002, 43(5):467-478
- [10] Ma Y, Wang F, Guo J, et al. Rice OsAS2 gene, a member of the LOB domain family, functions in the regulation of shoot differentiation and leaf development [J]. J Plant Biol, 2009, 52 (5): 374-381
- [11] Luo J H, Weng L, Luo D. Isolation and expression patterns of LATERAL ORGAN BOUNDARIES-like genes in Lotus japonicus [J]. Physiol Mol Biol Plants, 2006, 32 (2) :202-208
- [12] Scheible W R, Morcuende R, Czechowski T. Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen [J]. Plant Physiol, 2004, 136 (1):2483-2499
- [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, Hiquchi M. 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] Zentella R, Zhang Z L, Park M. Global analysis of DELLA direct targets in early gibberellin signaling in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2007, 19(10):3037-3057
- [16] Ikezaki M, Kojima M, Sakakibara H. Genetic networks regulated

by ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1) and AS2 in leaf development inArabidopsis thaliana: KNOX genes control five morphological events[J]. Plant J,2010,61(1):70-82

- [17] Berckmans B, Vassileva V, Schmid S P, 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
- [18] Yordanov Y S, Regan S, Busov V. Members of the LATERAL OR-GAN BOUNDARIES DOMAIN transcription factor family are involved in the regulation of secondary growth in *populus*[J]. Plant Cell,2010,22(11):3662-3677
- [19] Sierro N, Battey J N, Ouadi S. The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato[J]. Nat Commun, 2014, doi:10.1038/ncomms4833
- [20] Xu Q, Dunbrack R L. Assignment of protein sequences to existing domain and family classification systems; Pfam and the PDB[J]. Bioinformatics, 2012, 28 (21):2763-2772
- [21] Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, et al. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal[J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40:597-603
- [22] Edgar R C. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity [J]. BMC Bioinformatics, 2004,5:113
- [23] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Mol Biol Evol, 2011,28(10):2731-2739
- [24] 郭安源,朱其慧,陈新,等. GSDS:基因结构显示系统[J].遗 传,2007,29(8):1023-1026
- [25] Yeung K Y, Ruzzo W L. Principal Component analysis for clustering gene expression data [J]. Bioinformatics, 2001, 17 (6): 763-774
- [26] Lein W, Usadel B, Stitt M. Large-scale phenotyping of transgenic tobacco plants(*Nicotiana tabacum*) to identify essential leaf functions[J]. Plant Biotechnol J,2008,6(3):246-263
- [27] 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
- [28] Xu L, Xu Y, Dong A, et al. Novel as1 and as2 defects in leaf adaxial-abaxial polarity reveal the requirement for ASYMMETRIC LEAVES1 and 2 and ERECTA functions in specifying leaf adaxial identity[J]. Development, 2003, 130 (17):4097-4107
- [29] Iwakawa H, Iwasaki M, Kojima S, et al. Expression of the ASYM-METRIC LEAVES2 gene in the adaxial domain of Arabidopsis leaves represses cell proliferation in this domain and is critical for the development of properly expanded leaves [J]. Plant J, 2007, 51(2):173-184
- [30] 李爱宏, 张亚芳, 戴正元, 等. 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
- [31] Oh S A, Park K S, Twell D, et al. The SIDECAR POLLEN gene encodes a microspore-specific LOB/AS2 domain protein required for the correct timing and orientation of asymmetric cell division [J]. Plant J, 2010,64(5):839-850
- [32] BellE M, Lin W C, Husbands A Y, et al. Arabidopsis LATERAL ORGAN BOUNDARIES negatively regulates brassinosteriod accumulation to limit growth in organ boundaries [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(51):21146-21151