



大豆磷脂酶 D 家族基因全基因组鉴定及耐盐性分析

何芳蕾^{1,2}, 李兰馨², 卢秋连², 曹 婕², 秦 君³, 孔凡江², 苏 彤², 林 春¹

(1. 云南农业大学 农学与生物技术学院/云南农业大学特色小宗作物研究中心, 云南 昆明 650201; 2. 广州大学 生命科学院/分子遗传与进化创新中心/广东省植物适应与分子设计重点实验室, 广东 广州 510006; 3. 河北省农林科学院 粮油作物研究所, 河北 石家庄 050035)

摘 要: 磷脂酶 D (Phospholipase D, PLD) 及其产物磷脂酸 (Phosphatidic Acid, PA) 在植物生长发育和胁迫响应的调控中起着重要作用。目前, 对大豆 *PLD* 基因家族的研究仍不够全面。为进一步寻找与大豆抗逆性相关的潜在候选基因, 本研究利用全基因组分析方法对 28 个 *GmPLDs* 的基因结构、蛋白保守结构域、共线性和系统发育关系等进行研究, 并采用 qRT-PCR 方法分析基因在盐胁迫下的表达量。结果表明: 大豆 *PLD* 家族基因分布在 16 条染色体上, 片段复制在大豆 *PLD* 基因家族的扩展中发挥了重要作用。基因表达模式分析显示 *GmPLDs* 在不同组织中的表达存在差异, 启动子顺式作用元件分析显示 *GmPLDs* 具有参与非生物胁迫和激素途径的潜在功能。qRT-PCR 分析显示, 18 个大豆 *PLDs* 基因表达受盐胁迫诱导显著上调, 可能参与大豆耐盐胁迫。研究结果为解析及克隆大豆耐盐基因提供理论依据, 并为挖掘响应非生物逆境胁迫 *GmPLDs* 基因提供了基础信息。

关键词: 大豆; 磷脂酶; *PLD*; 基因家族; 盐胁迫

Genome-wide Identification and Salt Tolerance Analysis of Phospholipase D Gene Family in Soybean

HE Fanglei^{1,2}, LI Lanxin², LU Qiulian², CAO Jie², QIN Jun³, KONG Fanjiang², SU Tong², LIN Chun¹

(1. College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University/Research Center of Characteristic Small Population Crops, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. Innovative Center of Molecular Genetics and Evolution, School of Life Sciences, Guangzhou University/Guangdong Key Laboratory of Plant Adaptation and Molecular Design, Guangzhou 510006, China; 3. Institute of Cereal & Oil Crop, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050035, China)

Abstract: Phospholipase D (PLD) and its product phosphatidic acid (PA) play important roles in the regulation of plant growth and development and stress response. Currently, the study of the *PLD* gene family in soybean is still not comprehensive enough. In order to further search for potential candidate genes related to soybean stress resistance, we used genome-wide analysis to study the gene structure, protein conserved domains, collinearity and phylogenetic relationships of 28 *GmPLDs*. And the expression levels of genes under salt stress were analyzed by qRT-PCR. The results indicated that *GmPLDs* were distributed on 16 chromosomes, fragment duplication played an important role in the expansion of the soybean *PLD* gene family. The gene expression pattern analysis showed that the expression of *GmPLDs* varied in different tissues, and the promoter *cis*-acting element analysis showed that *GmPLDs* have potential functions involved in abiotic stresses and hormonal pathways. The qRT-PCR Analysis showed that 18 *GmPLDs* expression was significantly up-regulated by salt stress induction, which may be involved in soybean salt tolerance stress. The results provide theoretical basis for the analysis and cloning of soybean salt-tolerant genes, and provide basic information for mining *GmPLDs* in response to abiotic stress.

Keywords: soybean; phospholipase; *PLD*; gene family; salt stress

非生物胁迫会对特定环境下的植物造成一系列不利影响, 阻碍植物的生长发育和产量。植物为了应对胁迫影响, 设计了一系列适应性机制如 ABA 信号转导途径、 Ca^{2+} 信号转导途径、MAPK 级联信号途径和脂质介导的信号转导途径等^[1]。其中脂质介导的信号转导途径在植物应对多种胁迫时会被触发, 膜磷脂的水解会产生多种不同种类的脂质和脂质衍生物的信号^[1-2]。磷脂是脂质信号通路中的二级信使, 通过激活磷脂酶或脂质激酶在各种应

激下立即产生瞬时反应^[3]。其中, 磷脂酶 D (Phospholipase D, PLD) 催化磷脂水解, 产生磷脂酸 (Phosphatidic Acid, PA) 和胆碱^[4], 是植物中产生 PA 的主要酶家族, 并在调节 PA 产生的位置和时间中起关键作用^[5]。所有真核生物 PLD 根据蛋白结构域的不同可分为 3 个亚家族 (C2-PLD、PX-PH-PLD 和 SP-PLD), C2-PLD 亚家族调节 Ca^{2+} 依赖性, 其 C2 结构域用于 Ca^{2+} 或其他效应子 (包括磷脂, 肌醇磷酸盐和蛋白质) 的结合^[6-8], 而 PX-PH-PLD 亚家

收稿日期: 2024-04-29

基金项目: 国家自然科学基金 (32060421); 河北省重点研发计划: 现代种业科技创新专项 (22326316D)。

第一作者: 何芳蕾 (1999—), 女, 硕士研究生, 主要从事大豆耐盐调控分子机理研究。E-mail: 2932082060@qq.com。

通讯作者: 苏彤 (1991—), 女, 博士, 讲师, 主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: sutong@gzhu.edu.cn;

林春 (1971—), 女, 博士, 教授, 主要从事植物生理生化研究。E-mail: linchun@ynau.edu.cn。

族包含 PX (Phox homology) 和 PH (Pleckstrin Homology) 结构域,调节 Ca^{2+} 非依赖性活性^[9-10],PX 和 PH 结构域是两种不同的磷酸肌醇相互作用结构折叠,介导多磷酸肌醇信号转导中的蛋白膜靶向^[11]。SP-PLD 亚家族的成员在其 N 末端含有 1 个信号肽^[12],只存在于少数植物如水稻中。迄今为止,已有多个物种报道了 *PLD* 基因家族的全基因组鉴定,包括玉米^[13]、水稻^[12]、拟南芥^[10]、葡萄和杨树^[14]、高粱^[15]、不结球白菜^[16]、亚洲棉^[17]等。

植物 *PLD* 及其产物 *PA* 在缺氧、冷冻、干旱和耐盐等非生物胁迫中起着重要的作用^[2,5,18-20]。在植物中,不同的 *PLDs* 产生的磷脂酸(*PA*)对特定蛋白质表现出不同的亲和力,在特定的胁迫中具有不同或重合的功能^[21-22]。如 *PLD α 3* 和 *PLD ϵ* 可增强植物生长和高渗耐受性^[23],*PLD δ* 的敲除使植物对冷冻和氧化应激敏感^[24-25]。*PLD ζ 1* 过表达导致根毛分枝和肿胀^[26],*PLD ζ 1* 和 *PLD ζ 2* 的敲除会减少主根的生长^[27]。*PLD β 1* 参与损伤和病原体反应^[28-29]。在植物中,同亚型的 *PLDs* 在不同物种中可能具有相同的功能。如在拟南芥中,*AtPLD α 1* 过表达会对 ABA 高度敏感,增强气孔闭合,从而减少水分流失增加耐旱性^[30-31]。相反,*AtPLD α 1* 缺陷型株系增加了蒸腾作用的水分损失^[32];在水稻和甘蓝型油菜中,*PLD α 1* 过表达可改善水稻植株严重缺水,减少对产量的影响^[33-34];在烟草中过表达 *CsPLD α* 显著增强了其幼苗的耐旱性^[35];小麦 *TaPLD α* 在脱落酸和干旱处理后表达上调^[32,36];在苹果耐旱性中 *MdPLD17* 起正向调控作用^[37]。此外,同一 *PLD* 基因在不同的胁迫下可能展现不同的作用。如在缺氧条件下,*AtPLD α 1-3*、*AtPLD β 1* 和 *AtPLD γ 1-3* 可能参与钙信号传导以及 *PA* 的产生,除 *PLD γ 3* 外所有 *PLD* 基因都参与 *ROS* 升高^[38];在盐胁迫条件下,*AtPLD α 1* 产生 *PA* 并与 *MPK6* 结合刺激其激酶活性,进而磷酸化并激活 $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ 逆向转运蛋白基因 *SOS1*,将 Na^{+} 从细胞质转运到质外体并维持离子浓度稳态^[39]。总之,*PLD* 与多种植物胁迫反应有关,其基因转录和活性在各种胁迫条件下增加,导致胁迫耐受性改变。

大豆[*Glycine max* (L.) Merrill]是世界上最重要的粮饲兼用作物之一,植物蛋白质和油脂的主要来源。土壤盐碱化严重降低作物产量及品质^[40-41],

大豆是一种中等耐盐的作物^[42],因此其产量和种植面积 的扩大也受到土壤盐碱化的阻碍。在大豆中,已有 18 个 *PLDs* 基因被鉴定,在大肠杆菌中表达的 *GmPLD α 1* 蛋白在 *PLD α* 和 *PLD δ* 的反应条件下均具有活性,可水解常见的膜磷脂磷脂酰胆碱(*PC*)、磷脂酰乙醇胺(*PE*)和磷脂酰甘油(*PG*)^[43],但大豆 *PLD* 基因家族(*GmPLD*)的全基因组鉴定和基因家族成员的详细信息以及它们对盐胁迫的响应信息仍不完善。本研究鉴定 28 个 *GmPLDs* 基因,对大豆中 *PLD* 基因家族成员的基本结构和生物信息进行更全面的分析,并通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 方法分析大豆 *PLD* 家族基因在盐胁迫下的响应情况。研究旨在为大豆 *PLD* 基因家族的相关研究和大豆耐盐相关基因的克隆和分子育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

以大豆品种 Williams 82(Wm82) 为材料进行盐胁迫下基因表达量分析。

1.2 试验设计

对大豆幼苗进行盐胁迫处理。发育良好的大豆种子在蛭石中萌发 5 d,然后转移到含有 Hoagland 营养液的培养盆中,放在相对湿度为 60% ,温度为 25 ℃ ,光照强度为 $500\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的长日照 (16 h 光照/8 h 暗光照) 培养箱 (康威龙,加拿大) 生长。植株发育至 V1 期后,处理组以加入 $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ *NaCl* 的 Hoagland 营养液处理,对照组以无 *NaCl* 的 Hoagland 营养液处理,分别于 *NaCl* 处理后 4 h 采集样品。在整个培养过程中,利用氧气泵保持连续通气,确保溶液有足够的氧气供应,促进有效的根呼吸。

1.3 方法

1.3.1 大豆 *PLD* 基因的鉴定与注释 以拟南芥 *PLD* 蛋白序列为参考模板,利用 Phytozome 13 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) 进行 BLASTP,获得大豆中的同源序列,比对序列设置严格的标准,序列同源性最低为 60% ,*e* 值 $\leq 1.0\text{ e}^{-20}$ ^[44],并通过 Pfam 数据库 (<http://pfam.xfam.org/search>) 验证这些同源基因的蛋白结构域是否属于 *PLD* 基因家族^[45]。

表 1 拟南芥 *PLD* 基因家族的基因名称和基因 ID

Table 1 Gene name and gene ID of *Arabidopsis* *PLD* gene family

基因名称 Gene name	基因 Gene ID
<i>AtPLDa1</i>	At3g15730
<i>AtPLDa2</i>	At1g52570
<i>AtPLDa3</i>	At5g25370
<i>AtPLDa4</i>	At1g55180
<i>AtPLDβ1</i>	At2g42010
<i>AtPLDβ2</i>	At4g00240
<i>AtPLDγ1</i>	At4g11850
<i>AtPLDγ2</i>	At4g11830
<i>AtPLDγ3</i>	At4g11840
<i>AtPLDδ</i>	At4g35790
<i>AtPLDζ1</i>	At3g16785
<i>AtPLDζ2</i>	At3g05630

1.3.2 大豆 PLD 蛋白理化性质分析 利用 ExPASy 软件 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 中的 Prot Param 对预测的大豆 PLD 蛋白的氨基酸数、分子量、等电点和平均疏水性指数进行分析^[46]。

1.3.3 大豆 *PLDs* 基因的系统发育分析 为研究 *PLDs* 基因的系统发育关系,利用 MEGA10 软件对大豆及拟南芥 *PLDs* 基因对应的氨基酸序列进行多重序列比对及系统发育分析,采用最大似然法和包含 1 000 次重复的 bootstrap 测试^[47]。使用 ITOL 构建系统发育进化树^[48]。

1.3.4 *PLDs* 基因的基因结构和保守结构域分析 利用 TBtools 分析 *PLDs* 基因的基因结构、外显子和内含子的位置和数量。利用 TBtools 软件和 GFF3 文件构建大豆 *PLD* 基因家族 28 个成员的基因结构图,利用 NCBI CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>) 预测蛋白保守结构域,通过 TBtools 软件对结果进行可视化处理^[49-50]。

1.3.5 染色体定位与共线性分析 从 Phytozome 数据库中获取 *PLD* 基因家族成员的染色体物理位置。使用 TBtools 中的 One Step MCScanX 插件对大豆内部结构进行共线性分析,并使用 Advanced Circos 插件进行可视化。为了探索 *GmPLD* 重复事件后受到的选择方式,使用中 MEGA10 的简单 Ka/Ks 计算器计算每个 *PLDs* 基因对的非同义 (Ka) 和同义 (Ks) 替换率的比值。

1.3.6 顺式作用元件分析 从基因组数据库中获取每个 *PLDs* 基因的上游序列 (3 000 bp),利用

PlantCARE 程序 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 识别假定的顺式调控元件,并通过 TBtools 可视化元件的类型和在上游区域的分布^[51]。

1.3.7 *PLDs* 基因在不同组织中的表达分析 通过大豆多组学数据库 SoyMD (<https://yanglab.hzau.edu.cn/SoyMD/#/transcriptomics/expression>) 获取基因表达数据包,筛选出根 (root)、茎 (stem)、茎尖分生组织 (shoot apical meristem)、真叶 (euphyllia)、三出复叶 (trifoliolate leaf) 和花 (flower) 的 FPKM (Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads) 数据,通过热图显示大豆 *PLD* 基因家族的表达模式^[52]。

1.3.8 盐胁迫下大豆 *PLD* 家族基因表达分析 对大豆幼苗进行盐胁迫处理,并在 4 h 后采集叶片并采用超纯 RNA 试剂盒 (CWBIO, 中国) 提取总 RNA。利用 Prime Script RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Takara, 日本) 试剂盒将 500 μg 的 RNA 反转录成 cDNA,以 *Gmcons6* 为内参基因,根据实时荧光定量 PCR 试剂盒 (cat. no. RR430, Takara, 日本) 在 Roche Light Cycler 480 仪器上 (Roche Molecular Biochemicals, USA) 进行 PCR 反应。每 10 μL 反应体系含有 1 μL 1:5 稀释的 cDNA,每个引物 0.2 μL, SYBR Green Master Mix 5 μL,水补充至最终体积 10 μL。每个样品一式 3 次,进行 3 次生物复制。试验使用 Primer-BLAST 软件^[53] 设计的引物如附表 1 所示。

1.4 数据分析

采用 2^{-ΔΔCT} 方法定量测定各 *PLDs* 基因在盐胁迫下的相对表达变化^[54],使用 IBM SPSS Statistics 22 (IBM SPSS, Turkey) 程序进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 大豆 *PLDs* 基因的鉴定

为筛选和鉴定大豆 *PLD* 基因家族成员,利用拟南芥 (*A. thaliana*) 的 12 个 PLD 蛋白序列 (表 1) 作为查询序列进行 BLASTP 分析,在大豆中鉴定出了 28 个高置信度的 *PLD* 基因家族成员,并通过 Pfam 数据库 (<http://pfam.xfam.org/search>) 预测了这些基因的蛋白结构域类型,验证其属于 *PLD* 基因家族。根据它们与拟南芥同源基因的关系,将其分为 α、β、γ、δ 和 ζ 亚族。其中, *AtPLDα* 的同源基因最

多,有 11 个成员,分别是 *GmPLDα1* ~ *GmPLDα11*;其次是 *AtPLDδ*,有 6 个同源基因,分别是 *GmPLDδ1* ~ *GmP-LDδ6*; *AtPLDβ* 有 5 个同源基因,分别是 *GmPLDβ1* ~ *GmPLDβ5*; *AtPLDζ* 有 4 个同源基因,分别是 *GmPLDζ1* ~ *GmPLDζ4*;而 *AtPLDγ* 在大豆中只有两个同源基因,分别是 *GmPLDγ1* 和 *GmPLDγ2*(表 2)。

大豆 PLD 基因家族编码蛋白理化性质分析结果如表 2 所示:PLDα3 的氨基酸序列最短,为 265 个,相对分子质量为 30.32;最长的氨基酸为

PLDζ3,其长度为 1 126,分子量为 127.84。蛋白等电点 pI 为 5.48(PLDα10) ~ 9.36(PLDζ1),其不稳定系数为 32.95(PLDγ1) ~ 52.89(PLDγ2),脂肪系数为 70.79(PLDβ4) ~ 89.27(PLDα8)。

使用最大似然法构建大豆和拟南芥的 *PLD* 基因家族系统发育树如图 1 所示。*PLD* 基因家族成员分为 3 个分支,分别是 I、II 和 III。进化枝 I 和 II 的成员比较大,而演化枝 III 只有 6 个成员。分析结果提示 *PLD* 基因家族在进化过程中出现了分化。

表 2 大豆中 PLDs 蛋白理化性质

Table 2 Physicochemical properties of protein coded by PLDs gene in soybean

基因名称	基因 ID	蛋白长度	分子量		不稳定系数	脂肪系数	基因位置
Gene name	Gene ID	Protein	Molecular	pI	Instability	Aliphatic	Gene
		length/aa	weight/kDa		index	index	location
<i>GmPLDα1</i>	Glyma.07G010900	769	88.23	6.11	41.17	77.97	Chr07;830442-834361
<i>GmPLDα2</i>	Glyma.08G194100	776	89.34	6.23	41.21	78.14	Chr08;15635255-15639129
<i>GmPLDα3</i>	Glyma.13G351100	265	30.32	8.92	39.05	76.23	Chr13;44037497-44039749
<i>GmPLDα4</i>	Glyma.15G023500	759	87.08	6.75	41.41	76.17	Chr15;1855930-1859297
<i>GmPLDα5</i>	Glyma.06G068600	826	94.26	5.77	30.27	80.70	Chr06;5257870-5262176
<i>GmPLDα6</i>	Glyma.06G068700	821	93.47	6.16	38.27	80.95	Chr06;5264110-5268817
<i>GmPLDα7</i>	Glyma.15G008500	711	81.22	6.01	44.00	84.60	Chr15;679167-684356
<i>GmPLDα8</i>	Glyma.15G008400	464	52.65	6.12	42.38	89.27	Chr15;674148-677358
<i>GmPLDα9</i>	Glyma.13G364900	807	92.08	5.90	41.36	86.22	Chr13;45119804-45125074
<i>GmPLDα10</i>	Glyma.07G031100	809	91.55	5.48	42.06	82.20	Chr07;2461422-2465693
<i>GmPLDα11</i>	Glyma.08G211700	788	89.30	5.49	40.63	81.66	Chr08;17098304-17101929
<i>GmPLDβ1</i>	Glyma.03G018900	759	85.05	6.72	42.49	75.13	Chr03;1886323-1892076
<i>GmPLDβ2</i>	Glyma.20G049900	291	33.65	6.80	41.34	85.15	Chr20;10146547-10150981
<i>GmPLDβ3</i>	Glyma.07G080400	1047	117.36	6.63	45.54	74.00	Chr07;7312326-7319873
<i>GmPLDβ4</i>	Glyma.02G093500	1106	124.09	6.63	47.80	70.79	Chr02;8320962-8329508
<i>GmPLDβ5</i>	Glyma.18G288600	1097	123.22	6.64	46.15	71.00	Chr18;56840392-56849007
<i>GmPLDγ1</i>	Glyma.01G215100	853	96.10	7.65	32.95	80.53	Chr01;54579927-54585779
<i>GmPLDγ2</i>	Glyma.19G034800	291	33.87	9.06	52.89	71.99	Chr19;4609484-4611782
<i>GmPLDδ1</i>	Glyma.05G168300	857	96.97	7.24	36.19	83.36	Chr05;35880139-35891738
<i>GmPLDδ2</i>	Glyma.08G126700	857	96.94	7.22	33.77	83.48	Chr08;9760165-9769637
<i>GmPLDδ3</i>	Glyma.01G162100	864	98.12	6.56	35.47	79.22	Chr01;50010864-50019215
<i>GmPLDδ4</i>	Glyma.11G081500	866	98.44	6.56	35.12	79.61	Chr11;6113533-6121086
<i>GmPLDδ5</i>	Glyma.04G020400	847	96.10	6.94	40.68	79.28	Chr04;1603208-1610515
<i>GmPLDδ6</i>	Glyma.06G020500	847	96.41	7.09	37.96	79.50	Chr06;1546982-1555296
<i>GmPLDζ1</i>	Glyma.10G150200	350	39.56	9.36	51.21	73.43	Chr10;38559851-38564099
<i>GmPLDζ2</i>	Glyma.20G238000	1120	128.45	5.85	39.75	83.66	Chr20;46972127-46987629
<i>GmPLDζ3</i>	Glyma.09G041400	1126	127.84	6.31	45.50	81.68	Chr09;3462604-3475431
<i>GmPLDζ4</i>	Glyma.15G152100	1123	127.63	6.28	45.09	82.24	Chr15;12613311-12626308

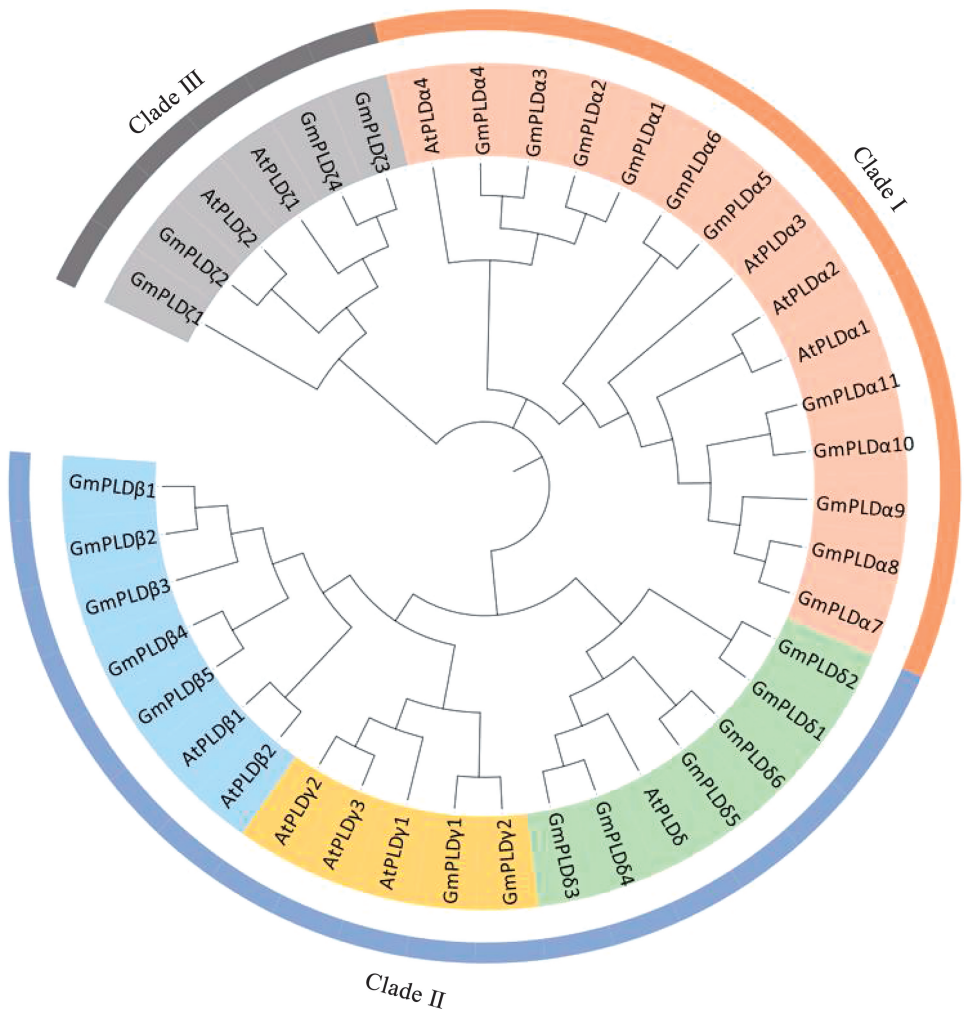


图1 大豆和拟南芥 *PLD* 家族的系统发育树

Fig.1 Phylogenetic relationships of *PLD* family genes from soybean and *Arabidopsis*

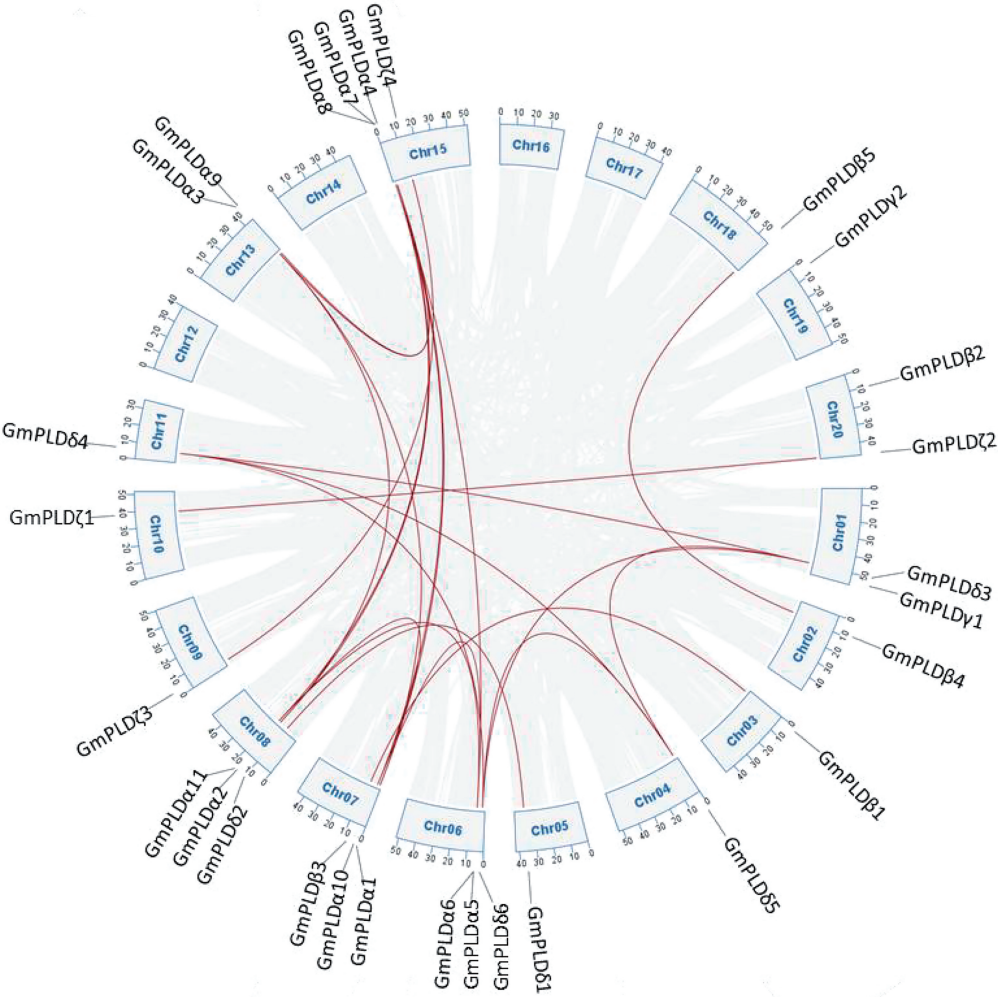
2.2 大豆 *PLDs* 基因分布及共线性分析

大豆 *PLD* 家族基因分布在 16 条染色体上 (图 2)。染色体 Chr02、Chr03、Chr04、Chr05、Chr9、Chr10、Chr11、Chr18 和 Chr19 上只有 1 个 *PLD* 基因。染色体 Chr01、Chr13 有两个 *PLD* 基因。染色体 Chr06、Chr07 和 Chr08 均含有 3 个 *PLD* 基因。*PLD* 基因在 Chr15 染色体上最多,为 4 个。没有基因被定位到 Chr12、Chr14、Chr16 和 Chr17 染色体上。*PLDs* 基因多数位于各染色体两端,但每条染色体上 *PLD* 基因的数量不同。

串联复制和片段复制是基因家族扩张的关键机制,通常串联复制的特点是在同一条染色体上出现两个相邻的基因,而片段复制导致基因组中存在大量复制的染色体区块,并且通常与染色体的重组

有关^[55-56]。共线性分析显示,除 *GmPLDα5* 与 *GmPLDα6*、*GmPLDα7* 与 *GmPLDα8* 存在串联复制外,另外 24 个基因都随机分布在大豆的 16 条染色体上,没有水稻、玉米等植物物种中常见的 *PLD* 基因簇形成,说明大豆 *PLDs* 基因可能存在与水稻、玉米等植物不同的进化模式。但在整个大豆基因组中存在 23 个 *PLD* 基因片段复制事件 (图 2)。结果表明大豆中 *PLD* 基因家族的起源主要来源于染色体加倍事件或片段复制。

计算 *GmPLD* 基因对的 K_a/K_s 值 (非同义替换率比同义替换率) 结果如附表 2 所示, *GmPLD* 基因对的 K_a/K_s 值均 < 1 , 表明复制的基因受到的纯化选择,自然选择去除了有害突变并维持了蛋白质稳定性。



注:红色曲线连接片段复制的基因对。
Note: Red curves connect pairs of genes with segmental duplications.

图2 大豆 *PLDs* 基因的染色体定位和共线性关系

Fig.2 Chromosomal distribution and interchromosomal relationships of *GmPLDs*

2.3 *PLDs* 基因编码的基因结构和保守结构域特征

基因结构分析表明,*PLDs* 基因中外显子和内含子数目变化显著,最少为4个外显子和3个内含子,最多为22个外显子和22个内含子。其中,多数处于同一进化分支上的外显子、内含子数目及其分布较为相似,如分支 I 中 *GmPLDα1-2*、*GmPLDα4*、*GmPLDα6*、*GmPLDα11* 都含有4个外显子和3个内含子, *GmPLDα3*、*GmPLDα7* 都含有6个外显子和5个内含子;分支 II 中 *GmPLDβ3-5*、*GmPLDγ1*、*GmPLDδ3-6* 都含有10个外显子和9个内含子;分支 III 中 *GmPLDζ3-4* 含有20个外显子和19个内含子,

并在基因组中大量交叉分布。其中, *GmPLDα10* (3)、*GmPLDα5* (4)、*GmPLDδ1-2* (10)、*GmPLDζ2* (22)具有相同数量的外显子和内含子(图3a)。

大豆 *PLDs* 基因根据蛋白质结构可分为两个亚家族: C2-*PLDs* 和 PX/PH-*PLDs*。通过 PFAM 数据库 (<http://pfam.xfam.org/search>) 对28个 *GmPLDs* 进行结构域分析,发现多数 *GmPLDs* 含 C2 结构域。其中, *GmPLDαs* 和 *GmPLDδs* 均含有 C2 结构域, *GmPLDβs* 除了 *GmPLDβ2* 均含有 C2 结构域, *GmPLDγ1* 也含有 C2 结构域。 *GmPLDζs* (*GmPLDζ2-4*) 存在 PH 结构域。大豆中 *GmPLDζs* 中不含 PX 结构域,与拟南芥不同(图3b)。

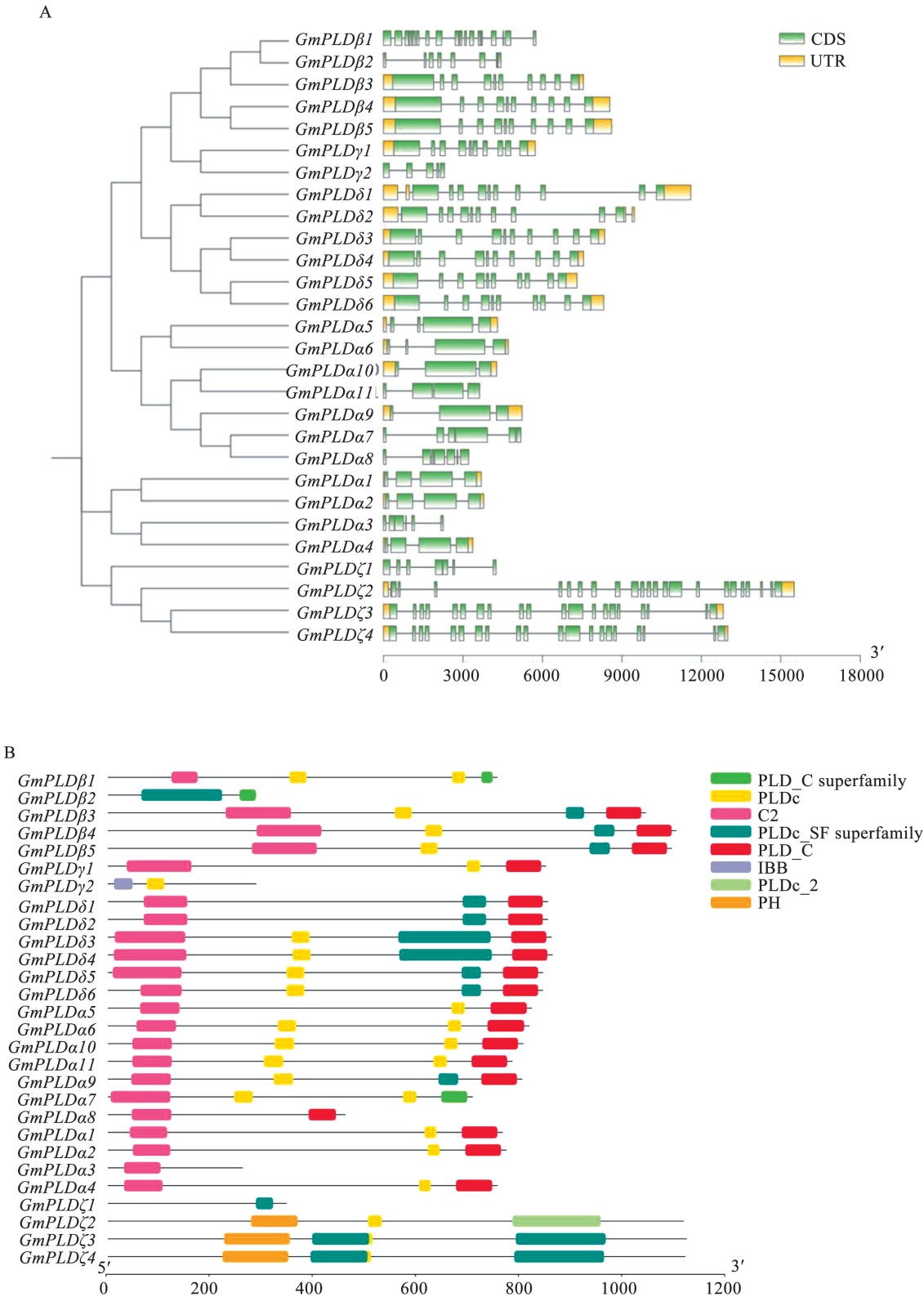


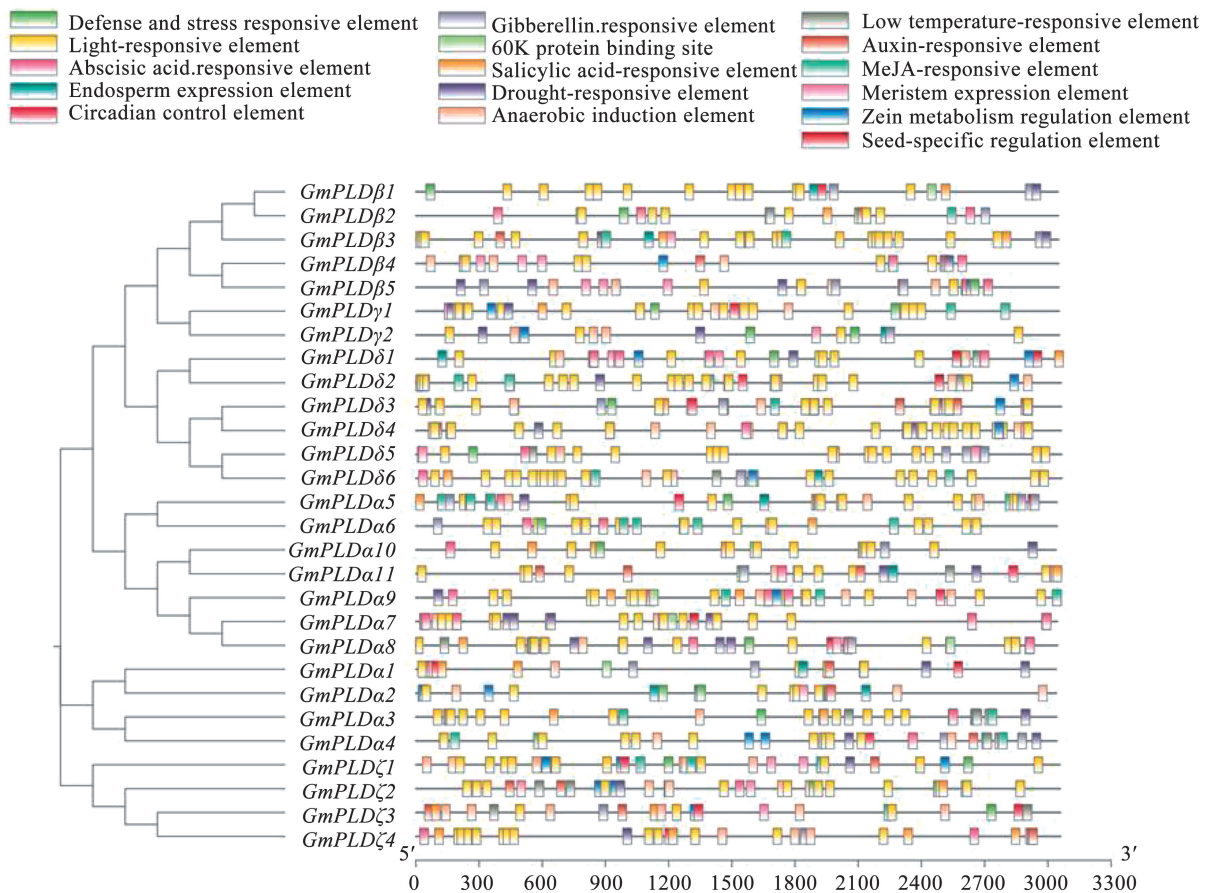
图 3 大豆 *PLDs* 基因结构

Fig. 3 Structure of *GmPLDs*

2.4 大豆 *PLDs* 基因启动子的顺式元件分析

利用 *PLDs* 基因各自上游 3 000 bp 序列预测顺式元件。在 *GmPLD* 基因启动子区共鉴定出 16 种顺式调控元件,其中,启动子中存在一些光反应元件(light-responsive element)和昼夜节律控制元件(circadian control element),表明 *PLDs* 基因可能参与光信号传导。启动子还存在一些与胚乳表达相关元件(endosperm expression element)、分生组织特异性表达元件(meristem expression element)以及玉米醇溶蛋白代谢调节元件(zein metabolism regulation element)。此外,与非生物胁迫相关和植

物激素相关的元件最多,如防御和胁迫响应元件(defense and stress responsive element)、低温响应元件(low temperature-responsive element)、厌氧诱导元件(anaerobic induction element)、干旱响应元件(drought-responsive element)、生长素应答(auxin-responsive element)、脱落酸应答(abscisic acid-responsive element)、水杨酸应答(salicylic acid-responsive element)和茉莉酸甲酯应答(meja-responsive element)等元件,其大量及广泛的分布表明 *PLDs* 基因参与了多种生物过程,并对非生物胁迫表现出不同的反应(图 4)。



注:不同类型的顺式元件用不同的颜色表示。启动子序列的长度由图底部的比例尺表示。
Note:The different types of *cis*-elements represented by different colors. The length of the promoter sequence is indicated by scale bars at the bottom of the figure.

图 4 大豆 *PLDs* 基因启动子的元件分析

Fig. 4 Cis-element analysis of *GmPLDs* promoters

2.5 大豆 PLDs 基因的表达模式

大豆多组学数据库 SoyMD 中基因表达模式数据显示,多数 PLDs 基因在根、茎、茎尖分生组织、真叶、三出复叶和花组织中表达水平较低,而 *GmPLDα9*、*GmPLDα11* 在所有组织中表达水平相对较高;*GmPLDα10*、*GmPLDδ3* 和 *GmPLDδ4* 除在三出复叶中表达水平较低以外在其它组织中表达水平相均对较高。一些 *GmPLDs* 基因在特定组织中表现出高表达水平,如 *GmPLDβ3* 在生长点中高表达, *GmPLDγ1* 在三出复叶中高表达, *GmPLDα7* 和 *GmPLDα8* 在根和茎中高表达。同时, *GmPLDβ2*、*GmPLDγ2* 以及 *GmPLDζ1* 在所有组织中几乎不表

达。这些发现表明不同的 *GmPLDs* 基因可能在特定组织中发挥特定作用, *GmPLDs* 基因家族在各组织具有特异性功能(图 5)。

2.6 PLDs 基因对盐胁迫的响应

使用 qRT-PCR 对未处理和 200 mmol·L⁻¹ NaCl 溶液处理之间 28 个 *GmPLDs* 基因的表达水平变化分析显示, *GmPLDα1* ~ 2、*GmPLDα4* ~ 6、*GmPLDα9* ~ 11、*GmPLDβ1*、*GmPLDβ3* ~ 5、*GmPLDγ1*、*GmPLDδ1*、*GmPLDδ3*、*GmPLDζ1*、*GmPLDζ3* ~ 4 等 18 个 PLDs 基因在盐胁迫处理 4 h 后的表达水平显著上调,而 *GmPLDδ5* 的表达水平显著下调,说明这些基因可能参与盐胁迫的响应(图 6)。

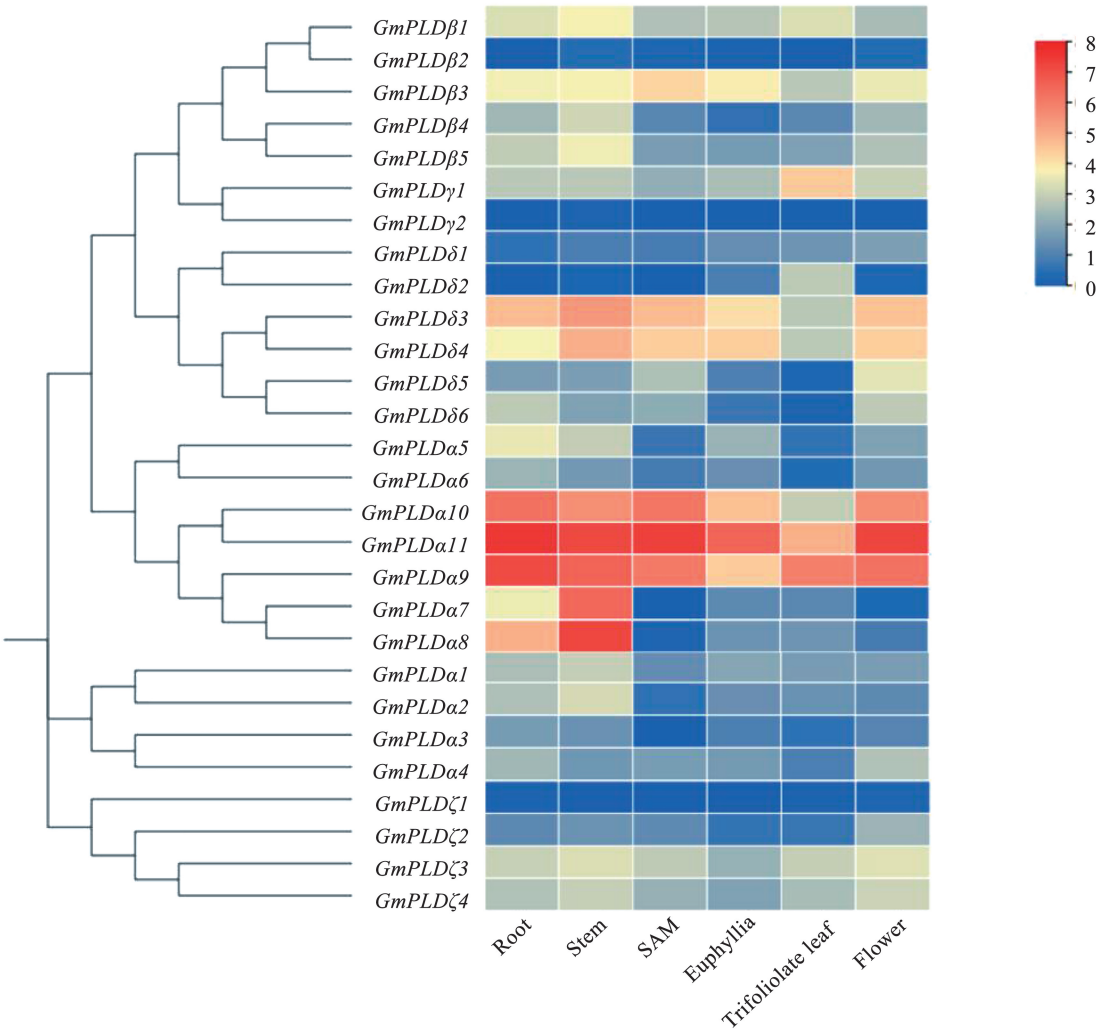
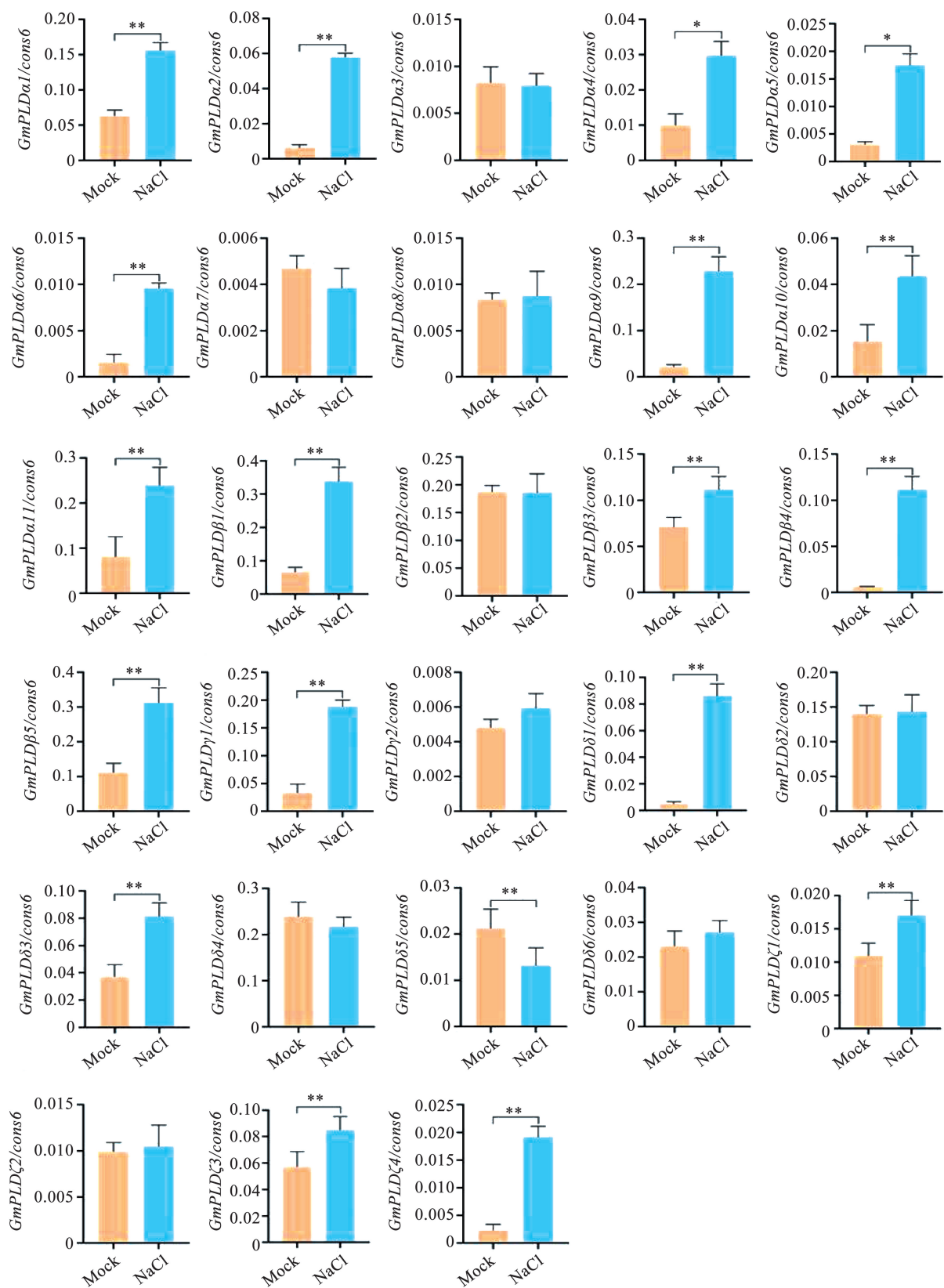


图5 不同组织中 PLDs 基因的表达分析

Fig. 5 Expression analysis of *GmPLDs* in different tissues



注：* 和 ** 分别表示 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 水平下存在显著性。
Note: * and ** indicate significance at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ levels, respectively.

图6 盐胁迫诱导下大豆 *PLDs* 基因的表达模式
Fig.6 Analysis of the *GmPLDs* under salt treatments by qRT-PCR

3 讨论

近年来,我国大豆生产发展缓慢并且高度依赖进口,其产量和品质无法满足国内对大豆日益增长的需求。盐胁迫会对植物造成多方面的损伤,如离子失衡、氧化胁迫与渗透胁迫等,盐浓度过高甚至会导致植物死亡^[57]。据报道,随着盐胁迫的增加,大豆产量减少 40%^[58]。植物在各种胁迫环境下迅速发生响应,许多情况下信号转导与特异性磷脂酶的激活有关,植物 PLD 可增强对不良环境胁迫的抵御能力,在响应盐胁迫等逆境胁迫反应中有着重要作用。PLD 家族成员的数量因物种而异,拟南芥有 12 个,葡萄有 11 个,玉米有 13 个,水稻有 17 个,杨树有 18 个,甘蓝型油菜有 32 个,苜蓿有 59 个^[37]。前人鉴定了大豆中的 18 个 PLDs 基因^[43]。本研究利用大豆最新全基因组序列测序数据,参考拟南芥基因家族序列,鉴定到 28 个 *GmPLDs* 基因,并对其进行了系统的分析。基于鉴定结果,所有 *GmPLDs* 基因被分为 5 个亚族(α 、 β 、 γ 、 δ 和 ζ),同一亚族的 *GmPLDs* 基因的结构和保守结构域非常相似,同一家族成员的亲缘关系更密切,*GmPLDs* 与多种已报道的植物 *PLD* α 具有较高的序列相似性和较近的系统进化关系,不同的亚族表明大豆 *PLD* 家族成员的多样性和高度复杂性,表明一个亚家族的所有成员在进化上是接近的。

基因组复制事件被认为是基因家族扩张的主要原因,复制方式主要为串联复制和片段复制,结果表明,大豆 *PLD* 基因家族的 28 个成员在大豆基因组的 16 条染色体上的分布是随机的,分别存在于 23 个片段重复区,说明大豆中 *PLD* 家族的扩张主要归因于片段复制。大多数 *GmPLDs* 存在一定的组织特异性表达,且表达水平有所差异,表明它们可能在植物的各部位发挥不同的作用。在 α 、 β 、 γ 、 δ 和 ζ 亚家族中, *GmPLD* α 9 ~ 11、*GmPLD* β 1, *GmPLD* γ 1、*GmPLD* δ 3 ~ 4、*GmPLD* ζ 3 ~ 4 的整体表达水平较高,推测它们可能在各亚基因家族中发挥主要作用。*GmPLD* α 7 和 *GmPLD* α 8 在茎的表达水平较高,暗示其可能参与茎的发育过程。

许多植物 *PLD* 基因被证明在响应盐胁迫过程中有着重要作用,并在盐胁迫处理下受到诱导表达,例如番茄 *LePLD* 在用 NaCl 处理的细胞悬液中 *PLD* α 1 基因的表达增加^[59],拟南芥 *AtPLD* δ 在盐胁迫处理 1 h 后被快速诱导并在 5 h 后达到峰值^[60],毛果杨 *PtrPLD* 家族基因在盐胁迫后 12 h 内表达

显著上调^[61]。本研究利用启动子中顺式作用元件分析发现,*GmPLDs* 启动子区域存在许多对光、非生物胁迫响应和激素诱导相关的顺式作用元件,表明 *PLD* 基因可能参与多种生物过程。在盐胁迫条件下,对 28 个 *GmPLDs* 基因家族成员的差异表达进行了定量分析,发现 18 个 *GmPLDs* 的基因表达显著上调,表明 *GmPLDs* 基因可能正向调控盐胁迫耐受机制。但是,研究发现 *GmPLD* δ 5 基因表达在盐胁迫下显著下调,推测 *GmPLD* δ 5 可能在大豆 *PLDs* 基因响应盐胁迫的过程中具有其它作用方式,对于这一点有待进行进一步研究。

综上所述,*GmPLDs* 在大豆耐盐胁迫中起着积极的调节作用,*GmPLDs* 可以作为一个有利的靶基因,在提高大豆耐盐性的遗传应用中发挥作用。

4 结论

本研究鉴定到了 28 个 *GmPLDs* 基因,这些 *GmPLDs* 基因被分为 5 个亚族(α 、 β 、 γ 、 δ 和 ζ),同一亚族的 *GmPLDs* 基因具有结构相似的特点。大豆 *PLD* 基因家族成员分布于大豆基因组的 16 条染色体,基因复制方式主要为片段复制。大多数 *GmPLDs* 存在一定的组织特异性。*GmPLDs* 启动子区域存在许多对光、非生物胁迫响应和激素诱导相关的顺式作用元件。18 个 *GmPLDs* 基因响应盐胁迫。

参考文献

[1] CHINNUSAMY V, SCHUMAKER K, ZHU J. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants[J]. Journal of Experimental Botany, 2004, 55(395): 225-236.

[2] BARGMANN B O, MUNNIK T. The role of phospholipase D in plant stress responses[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2006, 9(5): 515-522.

[3] MEIJER H J G, MUNNIK T. Phospholipid-based signaling in plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2003, 54: 265-306.

[4] JENKINS G M, FROHMAN M A. Phospholipase D: A lipid centric review[J]. Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS, 2005, 62(19/20): 2305-2316.

[5] WANG X, DEVAIAH S P, ZHANG W, et al. Signaling functions of phosphatidic acid[J]. Progress in Lipid Research, 2006, 45(3): 250-278.

[6] NALEFSKI E A, FALKE J J. The C2 domain calcium-binding motif: Structural and functional diversity[J]. Protein Science, 1996, 5(12): 2375-2390.

[7] RIZO J, SÜDHOF T C. C2-domains, structure and function of a universal Ca²⁺-binding domain[J]. The Journal of Biological

- Chemistry, 1998, 273(26): 15879-15882.
- [8] ZHENG L, KRISHNAMOORTHY R, ZOLKIEWSKI M, et al. Distinct Ca^{2+} binding properties of novel C2 domains of plant phospholipase dalpha and beta [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(26): 19700-19706.
 - [9] MUNNIK T, IRVINE R F, MUSGRAVE A. Phospholipid signalling in plants [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1998, 1389(3): 222-272.
 - [10] QIN C, WANG X. The *Arabidopsis* phospholipase D family. Characterization of a calcium-independent and phosphatidylcholine-selective PLD zeta 1 with distinct regulatory domains [J]. Plant Physiology, 2002, 128(3): 1057-1068.
 - [11] LI J, WANG X. Phospholipase D and phosphatidic acid in plant immunity [J]. Plant Science: an International Journal of Experimental Plant Biology, 2019, 279: 45-50.
 - [12] LI G, LIN F, XUE H W. Genome-wide analysis of the phospholipase D family in *Oryza sativa* and functional characterization of PLD beta 1 in seed germination [J]. Cell Research, 2007, 17(10): 881-894.
 - [13] CHEN L, CAO B, HAN N, et al. Phospholipase D family and its expression in response to abiotic stress in maize [J]. Plant Growth Regulation, 2017, 81(2): 197-207.
 - [14] LIU Q, ZHANG C, YANG Y, et al. Genome-wide and molecular evolution analyses of the phospholipase D gene family in Poplar and Grape [J]. BMC Plant Biology, 2010, 10: 117.
 - [15] 张政, 吕阳, 韩少鹏, 等. 高粱磷脂酶 D 基因家族的鉴定和表达分析 [J]. 生物资源, 2022, 44(6): 572-589. (ZHANG Z, LÜ Y, HAN S P, et al. Identification and expression analysis of phospholipase D gene family in *Sorghum bicolor* [J]. Biotic Resources, 2022, 44(6): 572-589.)
 - [16] 张艺思, 刘高峰, 刘路平, 等. 白菜 PLD 基因家族全基因组鉴定及对高温胁迫的响应 [J]. 西北植物学报, 2019, 39(8): 1361-1370. (ZHANG Y S, LIU G F, LIU L P, et al. Genome-wide identification of PLD gene family in Chinese cabbage and its response to high temperature stress [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2019, 39(8): 1361-1370.)
 - [17] TANG K, DONG C, LIU J. Genome-wide analysis and expression profiling of the phospholipase D gene family in *Gossypium arboreum* [J]. Science China Life Sciences, 2016, 59(2): 130-141.
 - [18] HONG Y, PAN X, WELTI R, et al. Phospholipase Dα3 is involved in the hyperosmotic response in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2008, 20(3): 803-816.
 - [19] HONG Y, DEVAIAH S P, BAHN S C, et al. Phospholipase D epsilon and phosphatidic acid enhance *Arabidopsis* nitrogen signaling and growth [J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2009, 58(3): 376-387.
 - [20] BARGMANN B O R, LAXALT A M, TER RIET B, et al. Multiple PLDs required for high salinity and water deficit tolerance in plants [J]. Plant and Cell Physiology, 2009, 50(1): 78-89.
 - [21] ZHANG W, QIN C, ZHAO J, et al. Phospholipase D alpha 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(25): 9508-9513.
 - [22] ZHANG Y, ZHU H, ZHANG Q, et al. Phospholipase Dα1 and phosphatidic acid regulate NADPH oxidase activity and production of reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal closure in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2009, 21(8): 2357-2377.
 - [23] HONG Y, ZHANG W, WANG X. Phospholipase D and phosphatidic acid signalling in plant response to drought and salinity [J]. Plant, Cell & Environment, 2010, 33(4): 627-635.
 - [24] LI W, LI M, ZHANG W, et al. The plasma membrane-bound phospholipase Dδ enhances freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. Nature Biotechnology, 2004, 22: 427-433.
 - [25] ZHANG W, WANG C, QIN C, et al. The oleate-stimulated phospholipase D, PLDdelta, and phosphatidic acid decrease H_2O_2 -induced cell death in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2003, 15(10): 2285-2295.
 - [26] OHASHI Y, OKA A, RODRIGUES-POUSADA R, et al. Modulation of phospholipid signaling by GLABRA2 in root-hair pattern formation [J]. Science, 2003, 300(5624): 1427-1430.
 - [27] LI M, WELTI R, WANG X. Quantitative profiling of *Arabidopsis* polar glycerolipids in response to phosphorus starvation. Roles of phospholipases D zeta1 and D zeta2 in phosphatidylcholine hydrolysis and digalactosyldiacylglycerol accumulation in phosphorus-starved plants [J]. Plant Physiology, 2006, 142(2): 750-761.
 - [28] LI M, HONG Y, WANG X. Phospholipase D- and phosphatidic acid-mediated signaling in plants [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2009, 1791(9): 927-935.
 - [29] WANG C, ZIEN C A, AFITLHILE M, et al. Involvement of phospholipase D in wound-induced accumulation of jasmonic acid in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2000, 12(11): 2237-2246.
 - [30] MISHRA G, ZHANG W, DENG F, et al. A bifurcating pathway directs abscisic acid effects on stomatal closure and opening in *Arabidopsis* [J]. Science, 2006, 312(5771): 264-266.
 - [31] PENG Y, ZHANG J, CAO G, et al. Overexpression of a PLDα1 gene from *Setaria italica* enhances the sensitivity of *Arabidopsis* to abscisic acid and improves its drought tolerance [J]. Plant Cell Reports, 2010, 29(7): 793-802.
 - [32] WANG J, DING B, GUO Y, et al. Overexpression of a wheat phospholipase D gene, TaPLDα, enhances tolerance to drought and osmotic stress in *Arabidopsis thaliana* [J]. Planta, 2014, 240(1): 103-115.
 - [33] ABREU F R M, DEDICOVA B, VIANELLO R P, et al. Overexpression of a phospholipase (*OsPLDα1*) for drought tolerance in upland rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Protoplasma, 2018, 255(6): 1751-1761.
 - [34] LU S, BAHN S C, QU G, et al. Increased expression of phospholipase Dα1 in guard cells decreases water loss with improved seed production under drought in *Brassica napus* [J]. Plant Biotechnology Journal, 2013, 11(3): 380-389.
 - [35] JI T, LI S, LI L, et al. Cucumber phospholipase D alpha gene overexpression in tobacco enhanced drought stress tolerance by

regulating stomatal closure and lipid peroxidation[J]. BMC Plant Biology, 2018, 18(1): 355.

[36] 王雅静, 张欣莹, 黄桂荣, 等. 磷脂酶 D 参与冬小麦对于干旱胁迫的响应[J]. 中国农业气象, 2019, 40(4): 222-229. (WANG Y J, ZHANG X Y, HUANG G R, et al. Phospholipase D of winter wheat is involved in responses to drought stress[J]. Chinese Journal of Agrometeorology, 2019, 40(4): 222-229.)

[37] FANG S, HAN X, YUAN P, et al. Genome-wide analysis of the apple *PLD* gene family and a functional characterization of MdPLD17 in drought tolerance[J]. Scientia Horticulturae, 2023, 321: 112311.

[38] PREMKUMAR A, LINDBERG S, LAGER I, et al. *Arabidopsis* PLDs with C2-domain function distinctively in hypoxia[J]. Physiologia Plantarum, 2019, 167(1): 90-110.

[39] VADOVI Ć P, ŠAMAJOVÁ O, TAKÁ Ć T, et al. Biochemical and genetic interactions of phospholipase D alpha 1 and mitogen-activated protein kinase 3 affect *Arabidopsis* stress response[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 275.

[40] MUNNS R, TESTER M. Mechanisms of salinity tolerance[J]. Annual Review of Plant Biology, 2008, 59: 651-681.

[41] XIANG L, HU L, XU W, et al. Exogenous γ -aminobutyric acid improves the structure and function of photosystem II in muskmelon seedlings exposed to salinity-alkalinity stress[J]. PLoS One, 2016, 11(10): e0164847.

[42] LEUNG H S, CHAN L Y, LAW C H, et al. Twenty years of mining salt tolerance genes in soybean[J]. Molecular Breeding, 2023, 43(6): 45.

[43] ZHAO J, ZHOU D, ZHANG Q, et al. Genomic analysis of phospholipase D family and characterization of GmPLD α s in soybean (*Glycine max*) [J]. Journal of Plant Research, 2012, 125(4): 569-578.

[44] GOODSTEIN D M, SHU S, HOWSON R, et al. Phytozome: A comparative platform for green plant genomics[J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40(Database issue): D1178-D1186.

[45] MISTRY J, CHUGURANSKY S, WILLIAMS L, et al. Pfam: The protein families database in 2021[J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49(D1): D412-D419.

[46] WILKINS M R, GASTEIGER E, BAIROCH A, et al. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server[M]//2-D Proteome Analysis Protocols. New Jersey: Humana Press, 2003: 531-552.

[47] KUMAR S, STECHER G, LI M, et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. Molecular Biology and Evolution, 2018, 35(6): 1547-1549.

[48] LETUNIC I, BORK P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation[J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49(W1): W293-W296.

[49] CHEN C, CHEN H, ZHANG Y, et al. TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. Molecular Plant, 2020, 13(8): 1194-1202.

[50] LU S, WANG J, CHITSAZ F, et al. CDD/SPARCLE: The conserved domain database in 2020[J]. Nucleic Acids Research, 2020, 48(D1): D265-D268.

[51] LESCOT M, DÉHAIS P, THUIS G, et al. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences[J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(1): 325-327.

[52] YANG Z, LUO C, PEI X, et al. SoyMD: A platform combining multi-omics data with various tools for soybean research and breeding[J]. Nucleic Acids Research, 2024, 52(D1): D1639-D1650.

[53] YE J, COULOURIS G, ZARETSKAYA I, et al. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction[J]. BMC Bioinformatics, 2012, 13: 134.

[54] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.

[55] WANG J, SUN Z, LIU H, et al. Genome-wide identification and characterization of the soybean Snf2 gene family and expression response to rhizobia[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(8): 7250.

[56] TANG B L. (WNK)ing at death: With-no-lysine (Wnk) kinases in neuropathies and neuronal survival[J]. Brain Research Bulletin, 2016, 125: 92-98.

[57] ONISHI M, TACHI H, KOJIMA T, et al. Molecular cloning and characterization of a novel salt-inducible gene encoding an acidic isoform of PR-5 protein in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) [J]. Plant Physiology and Biochemistry: PPB, 2006, 44(10): 574-580.

[58] PAPIERNIK S K, GRIEVE C M, LESCH S M, et al. Effects of salinity, imazethapyr, and chlorimuron application on soybean growth and yield[J]. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 2005, 36(7/8): 951-967.

[59] LAXALT A M, TER RIET B, VERDONK J C, et al. Characterization of five tomato phospholipase D cDNAs: Rapid and specific expression of LePLD β 1 on elicitation with xylanase[J]. The Plant Journal, 2001, 26(3): 237-247.

[60] KATAGIRI T, TAKAHASHI S, SHINOZAKI K. Involvement of a novel *Arabidopsis* phospholipase D, AtPLD δ , in dehydration-inducible accumulation of phosphatidic acid in stress signalling[J]. The Plant Journal, 2001, 26(6): 595-605.

[61] 刘聪, 张洋, 夏德安, 等. 毛果杨 PLD 基因家族全基因组水平鉴定及其盐胁迫下的表达分析[J]. 林业科学研究, 2021, 34(3): 23-36. (LIU C, ZHANG Y, XIA D A, et al. Genome-wide identification of PLD gene family of *Populus trichocarpa* and its responses to salt stress[J]. Forest Research, 2021, 34(3): 23-36.)