作物学报 ACTA AGRONOMICA SINICA 2026, 52(6): 1682−1697 http://zwxb.chinacrops.org/
ISSN 0496-3490; CN 11-1809/S; CODEN TSHPA9 E-mail: zwxb301@caas.cn

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2026.54138

陆地棉 I 类 LBD 家族成员鉴定及 *GhLBD6* 调控开花期的功能和单倍型分析

彭佳泺[1] 李 颖[1] 李丹丹[1] 杨军宁[1] 郭学峰[1] 张文姣[1] 俞晓雪[1]
周亚荣[1] 王振玉[2] 王彩香[1] 马雄风[2,*] 宿俊吉[1,*]

[1] 甘肃农业大学生命科学技术学院, 甘肃兰州 730070; [2] 中国农业科学院棉花研究所, 河南安阳 455000

摘 要: 侧生器官边界域(lateral organ boundaries domain, LBD)家族基因在植物多种生物学过程中发挥重要作用。前人研究表明, I 类 *LBD* 基因参与调控植物开花时间, 然而陆地棉 I 类 *LBD* 基因是否具有类似功能尚不清楚。本研究在全基因组水平鉴定并分析陆地棉 I 类 LBD 家族成员; 通过单倍型分析筛选调控开花相关候选基因; 利用 RNA-seq 及 RT-qPCR 确定候选基因在不同组织和早晚花品种中的表达模式; 通过病毒诱导的基因沉默(virus-induced gene silencing, VIGS)验证目标基因的功能, 并对其进行育种演化分析及分子标记开发。结果显示, 在陆地棉中鉴定出 102 个 I 类 *GhLBDs* 基因, 这些基因不均匀分布在 26 条染色体上, 按照进化关系分为 6 个组别, 同一组别内的 LBD 成员具有相似的基序组成与排列模式。通过 *GhLBDs* 的单倍型与表达分析, 筛选出开花期相关候选基因 *GhLBD6*。通过 VIGS 技术结合石蜡切片、荧光定量等, 发现抑制 *GhLBD6* 表达会导致植株花芽分化提前, 现蕾期和开花期分别显著提前 6.57 d 和 6.86 d。另外, *GhLBD6* 编码区存在 2 种单倍型: *GhLBD6*-Hap 1 和 *GhLBD6*-Hap 2。其中, *GhLBD6*-Hap 1 为早花的优异等位变异, 在陆地棉育种过程中受到人工选择。最后开发了可用于区分 *GhLBD6* 两种单倍型的竞争性等位基因特异性 PCR (kompetitive allele-specific PCR, KASP)分子标记。本研究结合正反向遗传学试验结果, 证明了 *GhLBD6* 参与陆地棉开花期调控, 为棉花早熟分子育种奠定了基础。

关键词: 陆地棉; *GhLBD6*; 开花期; 单倍型; 竞争性等位基因特异性 PCR 分子标记

Identification of class I LBD family members in upland cotton and function and haplotype analyses of *GhLBD6* in regulating flowering period

Peng Jia-Luo[1], Li Ying[1], Li Dan-Dan[1], Yang Jun-Ning[1], Guo Xue-Feng[1], Zhang Wen-Jiao[1], Yu Xiao-Xue[1], Zhou Ya-Rong[1], Wang Zhen-Yu[2], Wang Cai-Xiang[1], Ma Xiong-Feng[2,*], and Su Jun-Ji[1,*]

[1] College of Life Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu, China; [2] Institute of Cotton Research of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Anyang 455000, Henan, China

Abstract: Lateral organ boundaries domain (LBD) family genes play important roles in a wide range of plant biological processes. Previous studies have shown that class I *LBD* genes are involved in the regulation of flowering time; however, whether class I *LBD* genes have similar functions in upland cotton remains unclear. In this study, we identified and characterized class I LBD family members at the whole-genome level in upland cotton and screened flowering-related candidate genes through haplotype analysis. The expression patterns of candidate genes in different tissues and in early- and late-flowering varieties were examined

本研究由国家自然科学基金项目(32572431), 新疆自治区重点研发任务专项项目(2025B02001-2), 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系建设专项(棉花, CARS-15-07)和棉花生物育种与综合利用全国重点实验室开放课题基金项目(CB2024A08)资助。
This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (32572431), the Key Research and Development Task Project of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2025B02001-2), the China Agriculture Research System of MOF and MARA (Cotton, CARS-15-07), and the State Key Laboratory of Cotton Bio-breeding and Integrated Utilization Open Fund (CB2024A08).

* 通信作者(Corresponding authors): 宿俊吉, E-mail: sujj@gsau.edu.cn; 马雄风, E-mail: maxiongfeng@caas.cn
第一作者联系方式: E-mail: 3028627812@qq.com

Received (收稿日期): 2025-11-05; Accepted (接受日期): 2026-02-27; Published online (网络出版日期): 2026-03-09.
URL: https://link.cnki.net/urlid/11.1809.S.20260306.1652.012

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

using RNA-seq and RT-qPCR, respectively. The function of the target gene was validated by virus-induced gene silencing (VIGS), followed by analysis of its breeding-related evolutionary dynamics and the development of molecular markers. In total, 102 class I *GhLBD* genes were identified; they were unevenly distributed across 26 chromosomes and were classified into six groups based on evolutionary relationships. LBD members within the same group showed similar motif composition and arrangement. Integrating haplotype and expression analyses, *GhLBD6* was identified as a candidate gene associated with flowering time. VIGS combined with paraffin sectioning and RT-qPCR showed that suppression of *GhLBD6* accelerated floral bud differentiation and significantly advanced budding and flowering by 6.57 d and 6.86 d, respectively. Two haplotypes (*GhLBD6*-Hap 1 and *GhLBD6*-Hap 2) were identified in the *GhLBD6* coding region; among them, *GhLBD6*-Hap 1 represents a favorable early-flowering allele and appears to have been under artificial selection during upland cotton breeding. Finally, we developed a kompetitive allele-specific PCR (KASP) molecular marker to distinguish the two *GhLBD6* haplotypes. Together, these forward- and reverse-genetic results demonstrate that *GhLBD6* contributes to flowering-time regulation in upland cotton, providing a basis for molecular breeding of early-maturing cotton.

Keywords: upland cotton; *GhLBD6*; flowering period; haplotype; KASP molecular marker

侧生器官边界域(lateral organ boundaries domain/asymmetric leaves2-like, LBD/ASL)蛋白是一类植物特异性转录因子[1]。因早期发现其在调控叶片对称性发育方面的功能而被命名为 ASL [2-3], 后因其功能多样性的揭示而基于 LOB (lateral organ boundaries)保守结构域被命名为 LBD [1]。LOB 结构域由类似锌指 CX2CX6CX3C 结构域(结合 DNA 所必需)、Gly-Ala-Ser (GAS)基序(影响与 DNA 结合活性)和类亮氨酸拉链基序 LX6LX3LX6L (与蛋白质二聚化有关)组成[2]。根据类亮氨酸拉链基序的完整性, 可将 LBD 家族分为 I 类(具有完整的类亮氨酸拉链序列)和 II 类(具有不完整的类亮氨酸拉链序列) [2]。I 类 LBD 成员主要参与植物器官的构建和发育。例如 *AtAS2*、*AtLOB* 和 *AtLBD36* 在茎尖和根尖分生组织与侧生器官之间建立表达边界, 抑制细胞增殖, 确保器官正常分离和形态建成[4]; *AtLBD16*、*AtLBD18* 和 *AtLBD29* 位于生长素响应因子(auxin response factors, ARFs)下游调控侧根形成[5]; *AtLBD10* 和菊花 *CmLBD2* 控制雄性配子体的发育[6-7]; *AtLBD11* 可以调节拟南芥形成层细胞增殖和径向生长[8]; *RsLBD3* 调控萝卜肉质根次生发育[9]。II 类 LBD 成员主要参与代谢调控和逆境响应。例如, *AtLBD37*、*AtLBD38* 和 *AtLBD39* 影响氮代谢和花青素合成[10]; 番茄 *SlLBD40* 和 *SlLBD42* 介导病原菌的侵染[11]。总体而言, LBD 家族基因在植物多种生物学过程中发挥重要作用, 其中 I 类 LBD 成员的研究更为系统, 功能也更为多样。

植物从营养生长向生殖生长的转变始于花芽分化, 而开花作为该过程完成的关键表现, 受内部遗传因子和外部环境因素综合调控[12]。在模式植物拟南芥中, 已经揭示光周期、春化、温度、赤霉素、自主以及年龄等遗传途径通过调控整合基因来实现成花转变[13]。研究表明, I 类 *LBD* 基因在开花时间调控中具有重要功能: 拟南芥 *as2* 突变体表现为晚花表型[14]; 在小麦中过表达 *TaLBD16-4D* 会导致抽穗提前[15]; 在拟南芥中过表达苹果 *MdLBD11* 会导致开花延迟[16]; 牡丹 *PoLBD25* 的过表达会推迟开花, 而其沉默则会诱导早花[17]。早熟陆地棉(*Gossypium hirsutum* L.)具有生育期短、成熟期较统一的优势, 可以适应我国西北内陆棉区无霜期短的气候特点, 并符合机械化采收的发展要求[18]。开花期是评价棉花早熟性的重要性状之一, 挖掘调控陆地棉开花期的基因资源对于培育棉花早熟品种具有重要意义[19]。目前, 有关棉属 LBD 家族成员的功能研究已有一些报道, 如 *GhAS2* 参与调控叶形发育[20], *GhLBD100* 可提高陆地棉对黄萎病的抗性[21], GhLBD18 蛋白作用于自噬相关基因 (autophagy-related genes, ATGs) *GhATG18a* 的上游来调控自噬活性并控制体细胞胚胎发生[22], 亚洲棉 *GaLBD1~GaLBD5* 可诱导愈伤组织的形成[23]。然而, 关于棉属 I 类 LBD 家族成员在调控开花期方面的功能尚不明确, 相关研究较为缺乏。因此, 本研究通过鉴定陆地棉 I 类 LBD 家族成员并对其进行生物信息学分析, 结合单倍型与表达模式筛选候选基因, 利用 VIGS 技术进行功能验证, 并开展育种演化分析及相关分子标记开发, 旨在揭示陆地棉 I 类 LBD 家族成员在调控开花期方面的作用, 为未来培育早熟棉花品种提供优异基因资源以及分子辅助选择育种提供筛选标记。

1　材料与方法

1.1　I 类 LBD 家族成员的鉴定

本研究从以下数据库获取各物种基因组及注释文件: 陆地棉(*Gossypium hirsutum*_ZJU)、亚洲棉(*Gossypium arboreum*_CRI)来自 Cottongen (https://

www. cottongen.org/) [24]; 雷蒙德氏棉(*Gossypium raimondii*_v2.1) 、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*_TAIR10)、苹果(*Malus domestica*_v1.1)、水稻(*Oryza sativa*_v7.0) 、玉米(*Zea mays*_APGv4)和大麦(*Hordeum vulgare*_r1)来自 Phytozome (https://phytozome-next.jgi.doe.gov/) [25]; 小麦(*Triticum aestivum*_v2.2)来自 Ensemble plants (https://plants.ensembl.org/index.html) [26]。以拟南芥 43 个 LBD 蛋白序列及 LOB 结构域的 Pfam 号(PF03195) [27]为参照, 利用 TBtools [28]的 BlastP 比对及隐马尔可夫模型(hidden markov model, HMM)检索, 初步鉴定上述物种中的 LBD 蛋白。进一步通过 NCBI CDD 预测保守结构域[29], 并结合 MEME 识别保守基序, 将同时具备 $CX_2CX_6CX_3C$ 基序、GAS 基序和 $LX_6LX_3LX_6L$ 基序的蛋白确定为 I 类 LBD 家族成员。

1.2 I 类 LBD 家族成员的生物信息学分析

利用 MEGA 12.0 [30]对 LBD 蛋白序列构建进化树, 采用邻接(neighbor joining, NJ)法, Bootstrap 值设置为 1000。使用 itol (https://itol.embl.de/)对系统进化树进行美化。通过 TBtools [28]进行保守基序、保守结构域、基因结构和染色体分布的可视化以及种内共线性分析和 K_a/K_s 的计算。利用 JCVI 工具进行陆地棉、亚洲棉、雷蒙德氏棉间的共线性分析及绘图。使用 CottonMD (https://yanglab.hzau.edu.cn/CottonMD/help.1) [31]中的 TM-1 WHU 参考基因组对目标基因进行 ID 转换, 并查询目标基因的 SNP 位点。基于已报道的陆地棉 TM-1 不同组织的转录组数据[32], 对目标基因表达数值(FPKM)进行 $\log_2$(FPKM+1)的归一化处理, 利用 TBtools [28]绘制表达模式热图。

1.3 RNA 提取及 RT-qPCR 检测与分析

利用 AFTSpin Universal Plant Fast RNA Extraction Kit (武汉爱博泰克生物科技有限公司)提取棉花样品总 RNA, 并利用 UnionScript First-strand cDNA Synthesis Mix for qPCR (北京金沙生物科技有限公司)一步法合成 cDNA 第 1 链。*GhActin* 为内参基因[33], 使用 BrightCycle Universal SYBR Green qPCR Mix with UDG (武汉爱博泰克生物科技有限公司)进行 RT-qPCR 试验, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法[34]计算目的基因相对表达量、IBM SPSS Statistics 27 软件进行数据分析、Origin 2024 绘图。RT-qPCR 试验所用引物序列见附表 1。

1.4 陆地棉植株的 VIGS 沉默

使用 NCBI Primer-BLAST 工具设计引物, 引物序列见附表 1。以中棉 113 (Zhongmian 113, ZM113)叶片 cDNA 为模板, 使用 Taq 2X PCR Mix with Dye V2 (武汉爱博泰克生物科技有限公司)扩增得到目标片段, 将目标片段连接到 pTRV2 载体。测序合适的质粒转化 GV3101 农杆菌感受态。用 MMA (10 mmol L^{-1} 2-吗啉乙磺酸、200 mmol L^{-1} 乙酰丁香酮、10 mmol L^{-1} 氯化镁)重悬菌液至 OD_{600} = 1.6~1.8, 室温避光孵育 3~4 h 后, 将辅助菌 pTRV1 重悬液分别与 TRV:00 (阴性对照)、TRV:*GhCLA1* (阳性对照)、TRV:*GhLBD6* (试验组)菌重悬液等比混匀。通过针筒注射法用菌液侵染 1 周龄 ZM113 子叶背面。根据阳性对照植株的白化现象验证试验方法的可行性。通过 RT-qPCR 筛选相对表达量低于 0.5 的 TRV:*GhLBD6* 沉默植株。由生工生物工程股份有限公司进行引物合成和质粒测序。

1.5 棉花顶端分生组织的细胞学观察

取试验组和阴性对照三叶期顶端分生组织于 FAA (70%乙醇∶甲醛∶冰乙酸= 9∶1∶1)固定液中保存。固定 24 h 后的试验材料依次经过冲洗、脱水、透明、浸蜡、包埋、切片(厚度为 5 μm)、摊片(45℃)、烘片(42℃ 36 h)、脱蜡、染色(1%番红), 在光学显微镜下观察试验组和阴性对照组花芽分化情况。

1.6 单倍型分析及基因分型

基于 619 份陆地棉种质资源 SNP 位点, 并结合本实验室前期在 2 个环境下获得的开花时间表型数据[35], 对 *GhLBD6* 基因编码区的变异位点与开花期进行关联分析。选取 5 个早熟品种辽锦棉 3 号(Liaojinmian 3)、新陆早 32 号(Xinluzao 32)、酒棉 11 号(Jiumian 11)、金垦 1161 (Jinken 1161)和中棉 125 (Zhongmian 125), 5 个晚熟品种南瓜棉(Nanguamian)、沪棉 204 (Humian 204)、鄂棉 12 号(Emian 12)、鄂抗棉 8 号(Ekangmian 8)和徐州 553 (Xuzhou 553), 通过 PCR 扩增包含变异位点的基因序列并进行 Sanger 测序, 以证实优异等位变异的存在。针对 619 份种质中目标基因的单倍型, 分析在西北内陆棉区(Northwest inland region, NIR)、黄河流域棉区(Yellow river region, YRR)和长江流域棉区(Yangtze river region, YZRR)三大棉花主产区, 以及不同年代(早期育成品种(Early)、中期育成品种(Middle)及近期育成品种(Modern))育成种质中的频

率分布[34]。同时, 在开花时间最早(Min-50)和最晚(Max-50)的各 50 份极端材料中, 比较不同单倍型在其中所占的比例。采用 VCFtools [36]计算目标区域内的核苷酸多样性(π)和群体间遗传分化指数(F_{ST})。根据 SNP 非同义突变位点设计引物探针(附表 1), 使用 AQPTM-SNP/InDel 分型通用试剂盒(北京嘉程生物科技有限公司)进行 KASP 基因分型。

2　结果与分析

2.1　I 类 LBD 家族成员的鉴定和系统发育分析

基于 BlastP 和 HMM 分析, 从拟南芥、陆地棉、亚洲棉、雷蒙德氏棉、苹果、水稻、玉米、大麦和普通小麦中共鉴定到 574 个 LBD 蛋白, 其数量分别为 43、131、65、68、69、36、49、32 和 81 个。通过对这些蛋白进行保守结构域和保守基序分析, 筛选出 423 个 I 类 LBD 家族成员(附表 2)。系统发育分析将上述 I 类 LBD 蛋白划分为 6 个组别(1 组~6 组) (图 1-A)。其中, 1 组所含蛋白数量最少, 仅为 43 个; 5 组包含的蛋白数量最多, 达 128 个; 其余各组所含蛋白数目分布较为均匀。6 个组中均包含来自上述 9 个物种的 I 类 LBD 蛋白, 不同物种的 I 类 LBD 蛋白在不同组别中的分布不同(图 1-B)。

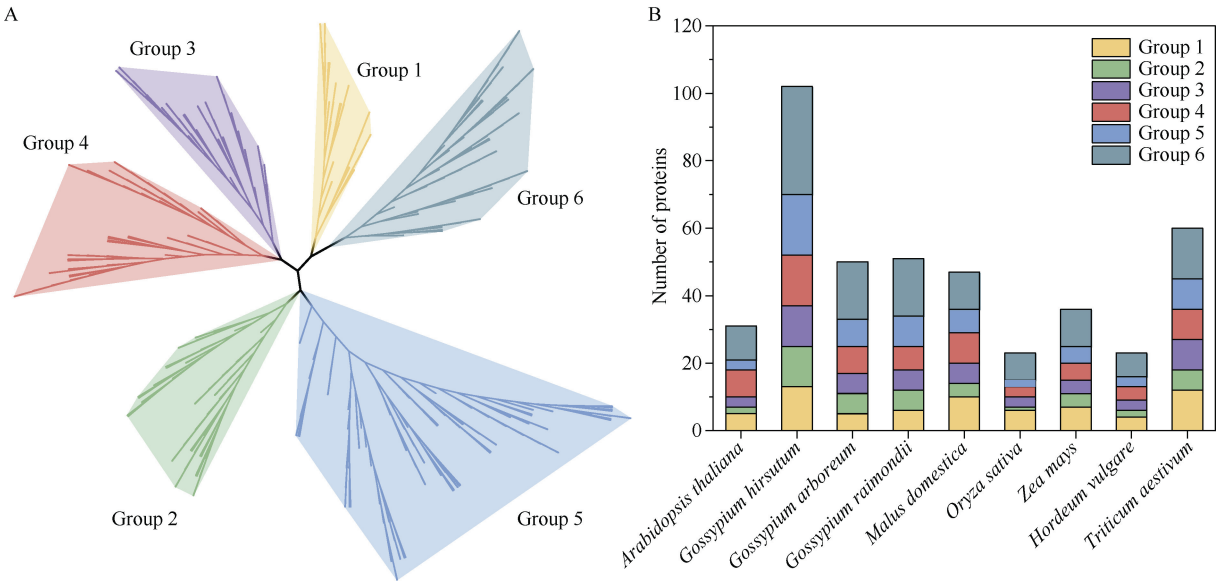


图 1　I 类 LBD 家族成员的鉴定和系统发育分析

Fig. 1　Identification and phylogenetic analysis of class I LBD family members

A: 9 个物种 I 类 LBD 家族成员的系统发育进化树; B: I 类 LBD 家族成员在不同组别的数目分布。

A: phylogenetic tree of class I LBD family members from nine species; B: numbers of class I LBD family members in different groups.

2.2　陆地棉 I 类 LBD 家族成员的保守基序、结构域和基因结构分析

对鉴定出的 102 个陆地棉 I 类 LBD 成员(附表 3)进行保守基序分析表明, 系统进化关系相近的成员(图 2-A)具有相似的基序组成与排列模式(图 2-B), 印证了分组合理性。陆地棉 I 类 LBD 所有成员均包含基序 2、基序 3 和基序 4, 这些基序为构成完整 LOB 结构域所必需的。其中, 5 组所含基序种类最多, 而 1 组和 6 组最少。保守结构域分析(图 2-C)显示, 除 GhLBD15-4 和 GhLBD31-2 含有 2 个结构域外, 其余成员均仅含 1 个结构域。基因结构分析(图 2-D)显示, 陆地棉 I 类 LBD 成员中 24 个基因不包含内含子, 68 个基因仅含 1 个内含子, 9 个基因包含 2 个内含子, 1 个基因(*GhLBD31-2*)包含 12 个内含子, 基因结构的不同暗示了功能的多样性。

2.3　陆地棉 I 类 *LBD* 基因的染色体分布与共线性分析

染色体定位分析(图 3-A)显示, 陆地棉 102 个 I 类 *LBD* 基因不均匀分布于 26 条染色体上, 其中 At 亚基因组包含 50 个成员, Dt 亚基因组包含 52 个成员。共线性分析表明, 在陆地棉的 102 个 I 类 *LBD* 基因中, 有 86 个基因源自二倍体棉花的多倍化事件(图 3-B), 其余 16 个基因在陆地棉基因组中共存在 49 对基因重复事件(图 3-C), 均为片段重复, 这表明全基因组复制和片段重复为该家族基因扩张的主要原因。进一步通过 K_a/K_s 值分析(图 3-D)发现, 陆地棉和亚洲棉之间有 78.02% (71/91)共线基因对的比值小于 1, 陆地棉与雷蒙德氏棉之间有 89.66%

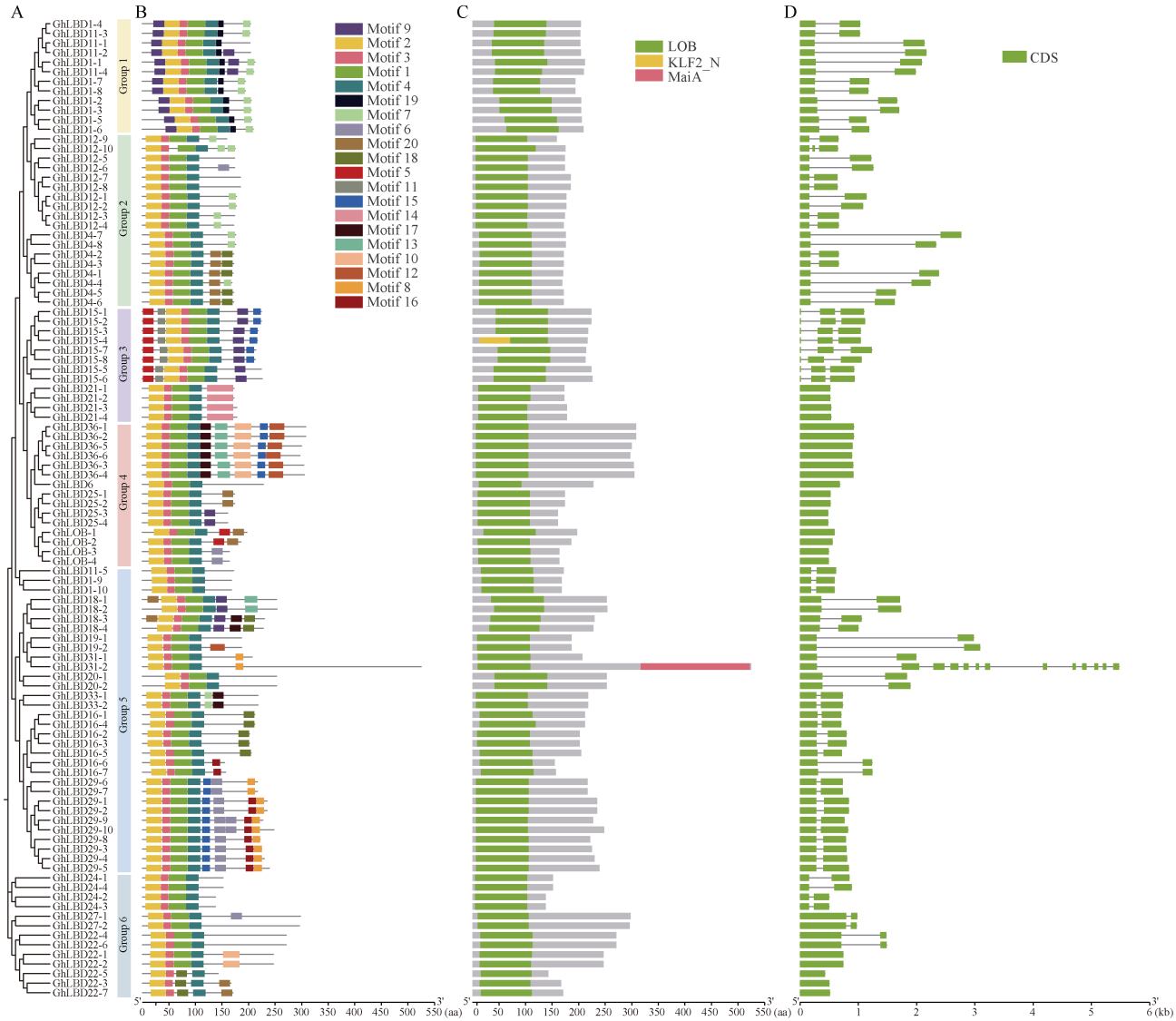
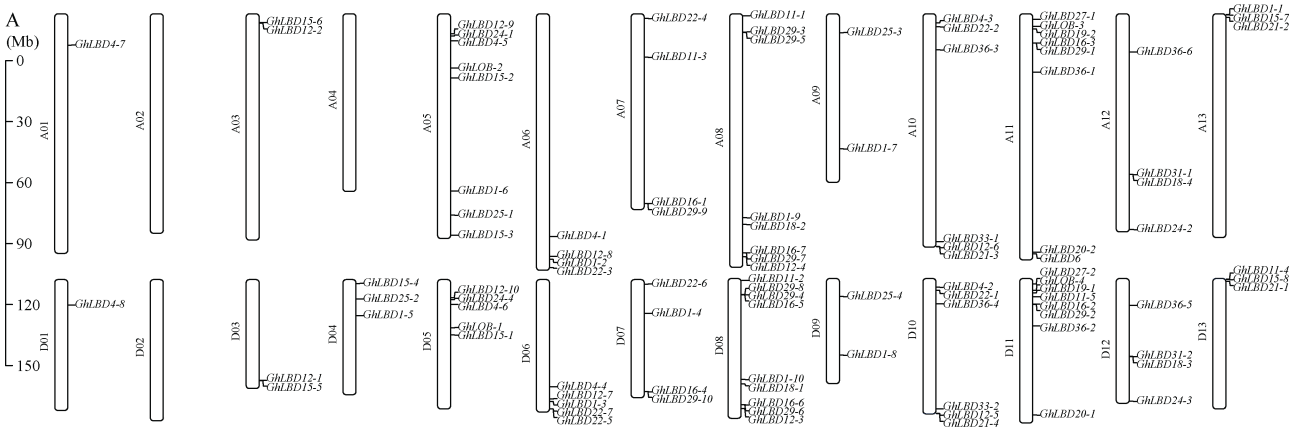


图 2 陆地棉 I 类 LBD 家族成员的系统发育、基因和蛋白结构分析

Fig. 2 Phylogenetic relationships and gene/protein structural features of Class I LBD family members in upland cotton

A: 系统进化树; B: 保守基序分布; C: 保守结构域; D: 基因结构。CDS: 编码序列。

A: phylogenetic tree; B: distribution of conserved motifs; C: conserved domains; D: gene structures. CDS, coding sequence.



(图 3)

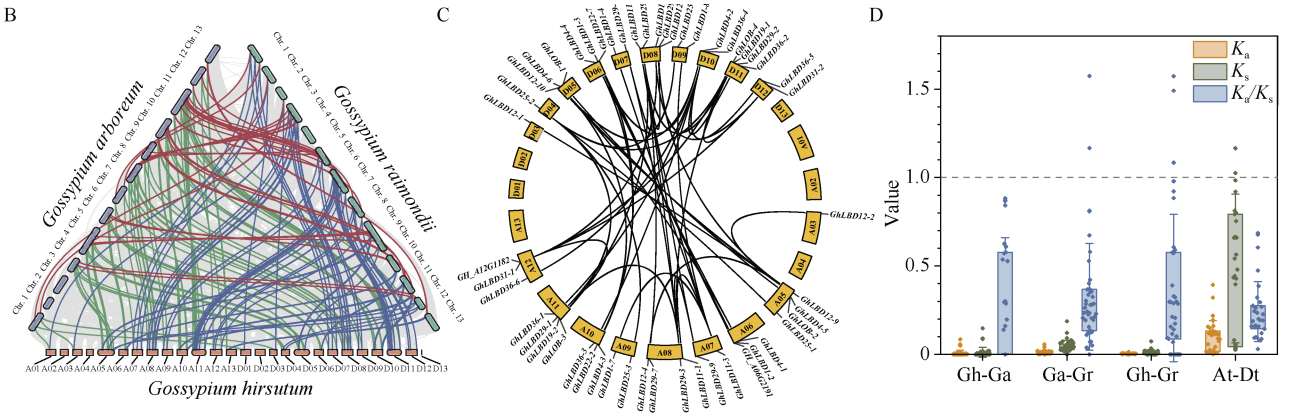


图 3　陆地棉 I 类 *LBD* 基因的染色体分布与共线性分析

Fig. 3　Chromosomal distribution and collinearity analysis of class I *LBD* genes in upland cotton

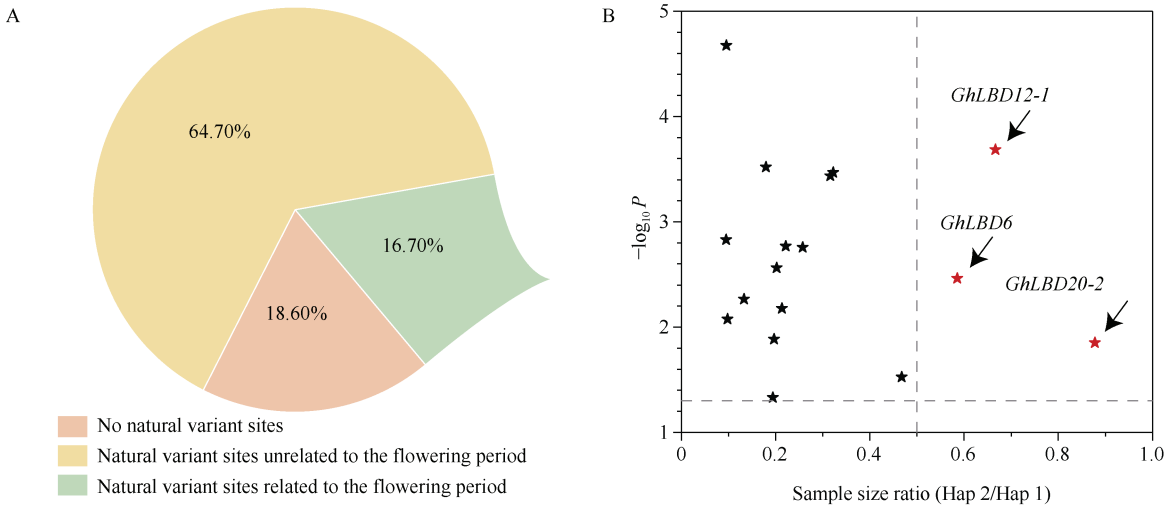
A: I 类 *LBD* 基因的染色体分布, A01–A13 分别代表陆地棉 At 亚基因组上的 13 条染色体, D01–D13 分别代表陆地棉 Dt 亚基因组上的 13 条染色体; B: 陆地棉(Gh)、亚洲棉(Ga)和雷蒙德氏棉(Gr)之间的种间共线性; C: 陆地棉种内共线性; D: 共线性基因对的 K_a、K_s 及 K_a/K_s 值分布。

A: chromosomal locations of class I *LBD* genes, A01–A13 represent the 13 chromosomes of the At subgenome, and D01–D13 represent the 13 chromosomes of the Dt subgenome; B: interspecific collinearity among *Gossypium hirsutum* (Gh), *G. arboreum* (Ga), and *G. raimondii* (Gr); C: intraspecific collinearity in upland cotton; D: distributions of K_a, K_s, and K_a/K_s values for collinear gene pairs.

(78/87)共线基因对的比值小于 1, 亚洲棉与雷蒙德式棉之间有 97.73% (43/44)共线基因对的比值小于 1, 陆地棉 At 和 Dt 亚基因组间的共线基因对中有 96.77% (30/31)的 K_a/K_s 值小于 1, 表明 I 类 *LBD* 基因在进化过程中经历了强烈的纯化选择。

2.4　陆地棉 I 类 *LBD* 基因的单倍型分析及候选基因表达分析

为鉴定可能调控陆地棉开花期的候选基因, 利用 CottonMD 对 102 个陆地棉 I 类 *LBD* 基因进行了自然变异位点分析。结果显示(图 4-A), 18.60%的基因(19 个)不存在自然变异位点; 64.70%的基因(66 个)存在不同数目的自然变异位点, 但均与开花期不相关; 16.70%的基因(17 个)存在与开花期相关的自然变异位点。进一步对这 17 个基因进行单倍型分析(图 4-B), 以 2 种主要单倍型间样本数比值为横坐标, 开花期显著水平的负对数为纵坐标作散点图, 按照 2 种主要单倍型间样本数比值(较小样本数/较大样本数)不低于 0.5 的条件, 筛选出单倍型样本数分布较为均匀的 3 个候选基因 *GhLBD6*、*GhLBD20-2* 和 *GhLBD12-1*。基于陆地棉 TM-1 已发表的不同组织和发育时期转录组数据[31], 构建这 3 个基因的表达热图(图 4-C)。结果表明, *GhLBD6* 在叶片和胚珠中的表达较高, *GhLBD20-2* 主要在雌蕊和胚珠中高表达, *GhLBD12-1* 主要在根和纤维中高表达。通过 RT-qPCR 试验检测 *GhLBD6*、*GhLBD20-2* 和 *GhLBD12-1* 在陆地棉早晚花品种三叶期茎尖和幼叶



(图 4)

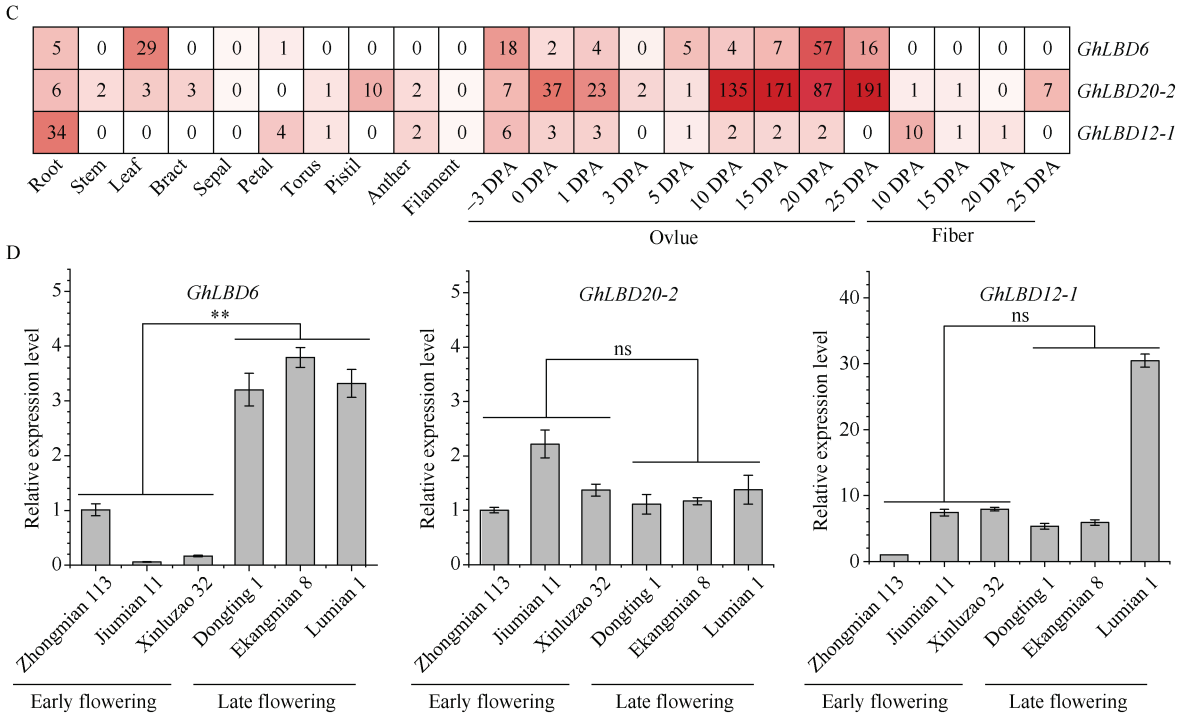


图 4 陆地棉 I 类 LBD 家族成员的单倍型分析及候选基因表达分析

Fig. 4 Haplotype analysis and expression profiling of candidate genes of class I LBD family members in upland cotton

A: 自然变异位点分析; B: 单倍型分析, 按照 2 种主要单倍型样本数比值(较小样本数/较大样本数) ≥ 0.5 筛选候选基因。黑色星星代表未选中的基因, 红色星星代表候选基因; C: 组织表达热图, 数值代表 $\log_2$(FPKM+1)。DPA 代表开花后天数; D: 候选基因在早晚花品种中的相对表达。**表示在 0.01 水平差异显著; ns 表示差异不显著。

A: analysis of natural variant sites; B: haplotype analysis, candidate genes were selected based on the ratio of sample sizes for the two major haplotypes (smaller/larger) ≥ 0.5. Black stars indicate genes not selected, and red stars indicate candidate genes; C: tissue expression heat map, values indicate $\log_2$(FPKM+1). DPA, days post anthesis; D: relative expression of candidate genes in early- and late-flowering cultivars. ** indicates significant differences at $P < 0.01$; ns, no significant difference.

中的相对表达。结果显示(图 4-D), 仅 *GhLBD6* 在早花与晚花品种间的表达存在显著差异, 表明其可能参与调控开花期。

2.5 敲低 *GhLBD6* 表达导致 ZM113 呈早花表型

为验证 *GhLBD6* 在开花期调控中的功能, 通过 VIGS 在 ZM113 中敲低 *GhLBD6* 的表达。农杆菌侵染 7 d 后, TRV:*GhCLA1* 对照组植株出现明显白化表型(图 5-A), 表明 VIGS 体系有效。RT-qPCR 检测显示, 与对照 TRV:00 相比, TRV:*GhLBD6* 植株中 *GhLBD6* 的表达量显著降低至 50%以下(图 5-B)。植物花芽分化是营养生长向生殖生长转变的关键过程, 其发育的早晚直接影响作物熟性[37]。为明确 *GhLBD6* 沉默对花芽分化的影响, 本研究对 TRV:*GhLBD6* 沉默植株和对照植株三叶期茎尖分生组织进行石蜡切片。结果显示, 当 *GhLBD6* 沉默植株已开始花芽分化时, 对照植株仍处于营养生长阶段, 表明 *GhLBD6* 下调可提早花芽分化(图 5-C)。表型统计分析发现, *GhLBD6* 沉默植株的现蕾期和开花期分别比对照显著提前 6.57 d 和 6.86 d (图 5-D), 说明抑制 *GhLBD6* 表达可导致 ZM113 提早开花。通过检测陆地棉开花相关基因的表达发现, *GhLBD6* 沉默后 *GhAP1* (*APETALA1*) [38]和 *GhSVP* (*SHORT VEGETATIVE PHASE*) [39]的表达显著上调, *GhSOC1* (*SUP-PRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1*) [40]和 *GhCAL* (*CAULIFLOWER*) [41]的表达显著下调, *GhLFY* (*LEAFY*) [42]的表达无显著变化(图 5-E)。以上结果表明, 在 ZM113 中下调 *GhLBD6* 表达可提早花芽分化, 促进现蕾与开花, 并影响陆地棉开花相关基因的表达。

2.6 *GhLBD6* 基因早花的优异等位变异鉴定

为进一步验证 *GhLBD6* 为调控花期相关基因, 在 619 份来自不同地域和年代的陆地棉品种中分析了 *GhLBD6* 编码区的自然变异位点, 发现该区域存在 1 个 SNP 和 1 个 InDel, 共同构成 2 种主要单倍型 *GhLBD6*-Hap 1 和 *GhLBD6*-Hap 2 (图 6-A)。通过 PCR 克隆及测序验证, 确认了早晚花品种中 *GhLBD6* 两种主要单倍型的存在(图 6-B)。*GhLBD6* 的 2 种单倍型所对应品种的开花期存在显著差异(图 6-C)。

GhLBD6-Hap 1 所对应品种总体的开花期显著更早, 为早花的优异等位变异。对 14 个陆地棉品种中 *GhLBD6* 的表达水平和开花期进行线性回归分析(图 6-D), 结果表明, *GhLBD6* 的表达水平和开花期存在显著正相关的线性关系(R^2 = 0.4612)。进一步将 14 个陆地棉品种按照单倍型划分为 2 个群体, 其中 *GhLBD6*-Hap 1 型品种中 *GhLBD6* 的表达显著更低(图 6-E)。

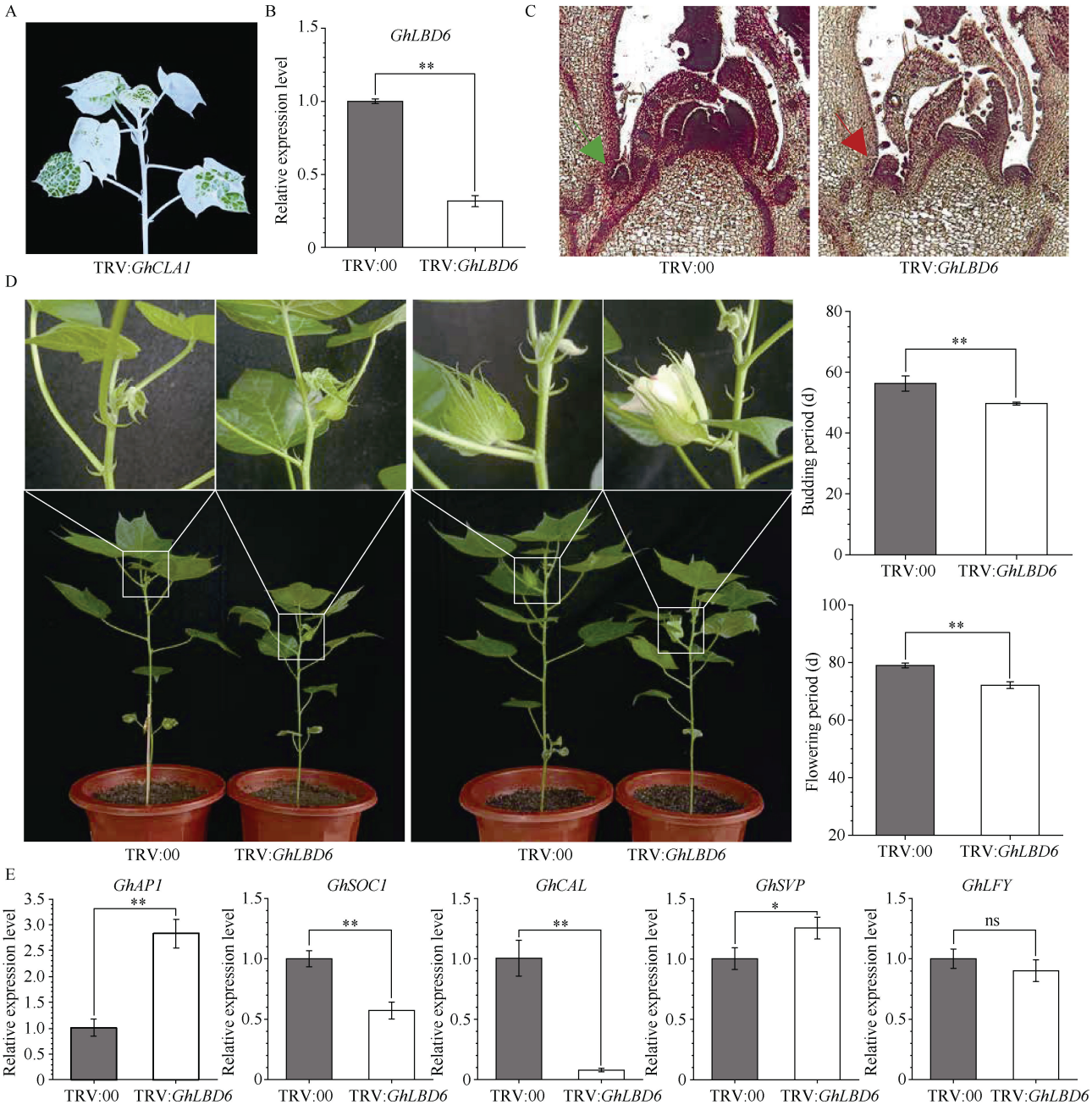
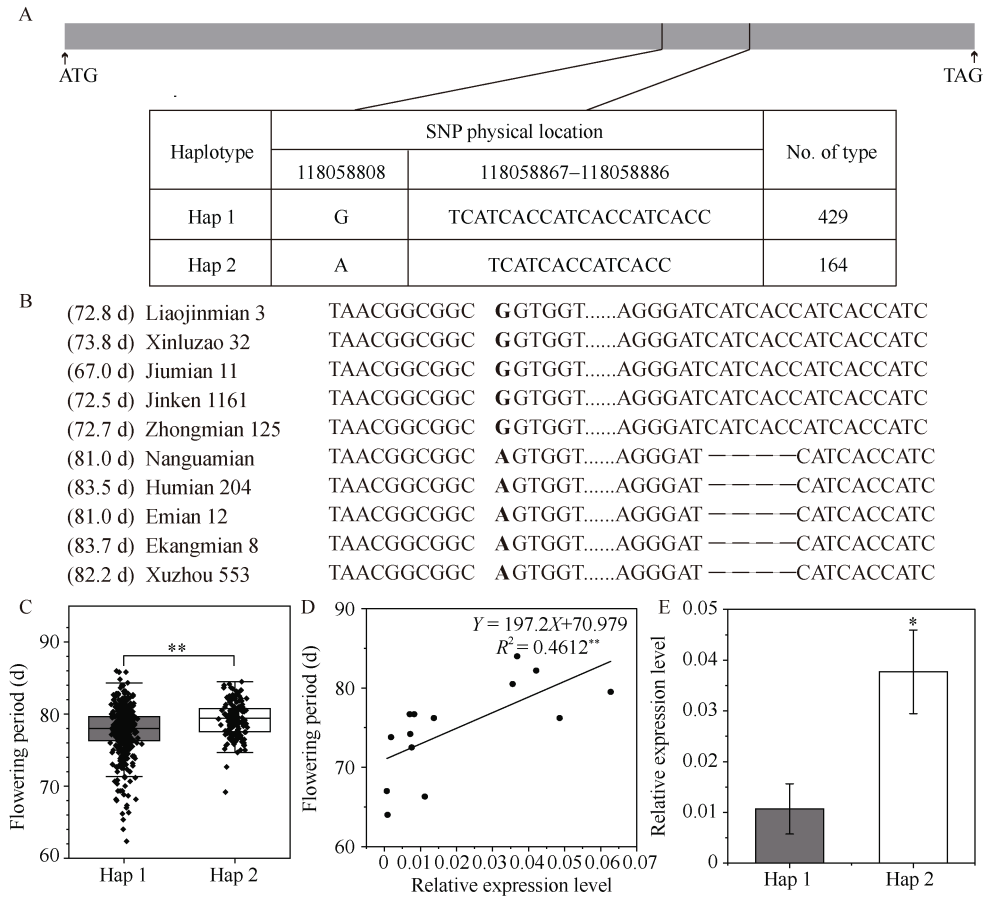


图 5　陆地棉 *GhLBD6* 的 VIGS 沉默植株表型观察统计

Fig. 5　Phenotypic characterization and statistical analysis of *GhLBD6*-silenced plants generated by VIGS in upland cotton

A: 阳性对照的白化表型; B: *GhLBD6* 的相对表达量, TRV:00 和 TRV:*GhLBD6* 分别代表阴性对照和 *GhLBD6* 沉默植株; C: 三叶期顶端分生组织石蜡切片; D: 现蕾、开花表型; E: 开花相关基因的相对表达量。*和**分别表示在 0.05 和 0.01 水平差异显著; ns 表示差异不显著。

A: photobleaching phenotype of the positive control; B: relative expression level of *GhLBD6*, TRV:00 and TRV:*GhLBD6* represent the negative control and *GhLBD6*-silenced plants, respectively; C: paraffin sections of the shoot apical meristem at the three-leaf stage; D: budding and flowering phenotypes; E: relative expression level of flowering-related genes. *and ** indicate significant differences at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively; ns, no significant difference.



Haplotype	SNP physical location		No. of type
	118058808	118058867–118058886	
Hap 1	G	TCATCACCATCACCATCACC	429
Hap 2	A	TCATCACCATCACC	164

图 6 *GhLBD6* 的自然变异、单倍型及其与开花期的关联分析

Fig. 6 Natural variation and haplotypes of *GhLBD6* and their association with flowering time

A: *GhLBD6* 编码区的单倍型组成; B: 单倍型与开花期关联分析; C: 单倍型验证; D: *GhLBD6* 表达水平与开花期的线性回归分析; E: 不同单倍型群体中 *GhLBD6* 的表达水平。*和**分别表示在 0.05 和 0.01 水平差异显著。

A: haplotype composition in the coding region of *GhLBD6*; B: association between haplotypes and flowering time; C: haplotype validation; D: linear regression between *GhLBD6* expression levels and flowering time; E: *GhLBD6* expression levels in different haplotype groups. *and ** indicate significant differences at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

2.7 育种演化分析及分子标记开发

619 份陆地棉种质资源按照地理来源主要划分为 3 个群体: 长江流域棉区(Yangtze river region, YZRR)、黄河流域棉区(Yellow river region, YRR)和西北内陆棉区(Northwest inland region, NIR)。高纬度棉花品种的早花优异等位变异高于低纬度品种, 且随着纬度的增加, 早花优异等位变异的分布频率呈上升趋势(图 7-A)。按育种年代进行划分, 这些种质资源可分为早期育成品种(Early)、中期育成品种(Middle)及近期育成品种(Modern)。随着年代推移, 品种的开花期逐渐提前, 早花优异等位变异的分布频率逐步增加(图 7-B)。为验证该等位基因变异对开花性状的影响, 计算了 Min-50 和 Max-50 中 2 种单倍型品种的频率分布。研究发现, Min-50 品种的早花优异等位变异频率高于 Max-50 品种(图 7-C)。此外, 通过对 *GhLBD6* 基因近缘区域(A11: 118,000,001~118,110,000 bp)进行 π 和 F_{ST} 值的估算。低 π 比值表明该基因区域遗传多样性较低, 核苷酸类型相对单一(图 7-D); 高 F_{ST} 值则说明该区域遗传分化程度较高, 遗传差异显著(图 7-E)。综合分析结果表明, *GhLBD6* 基因在陆地棉品种改良过程中经历了人工选择。此外, 基于 *GhLBD6* 编码区非同义 SNP 开发的 KASP 分子标记在 77 份早晚熟陆地棉品种中实现了基因分型(图 7-F)。

3 讨论

LBD 家族基因编码蛋白广泛存在于由低等到高等的各类植物中[4]。随着不同物种全基因组测序的完成, 许多植物 LBD 家族成员得到鉴定。前人报道, 从陆地棉[43]、亚洲棉[43]、雷蒙德氏棉[43]、苹果[44]、水稻[45]、玉米[46]、大麦[47]和普通小麦[48]中分别鉴定到 131、62、68、69、36、49、24 和 94 个 LBD 成员。

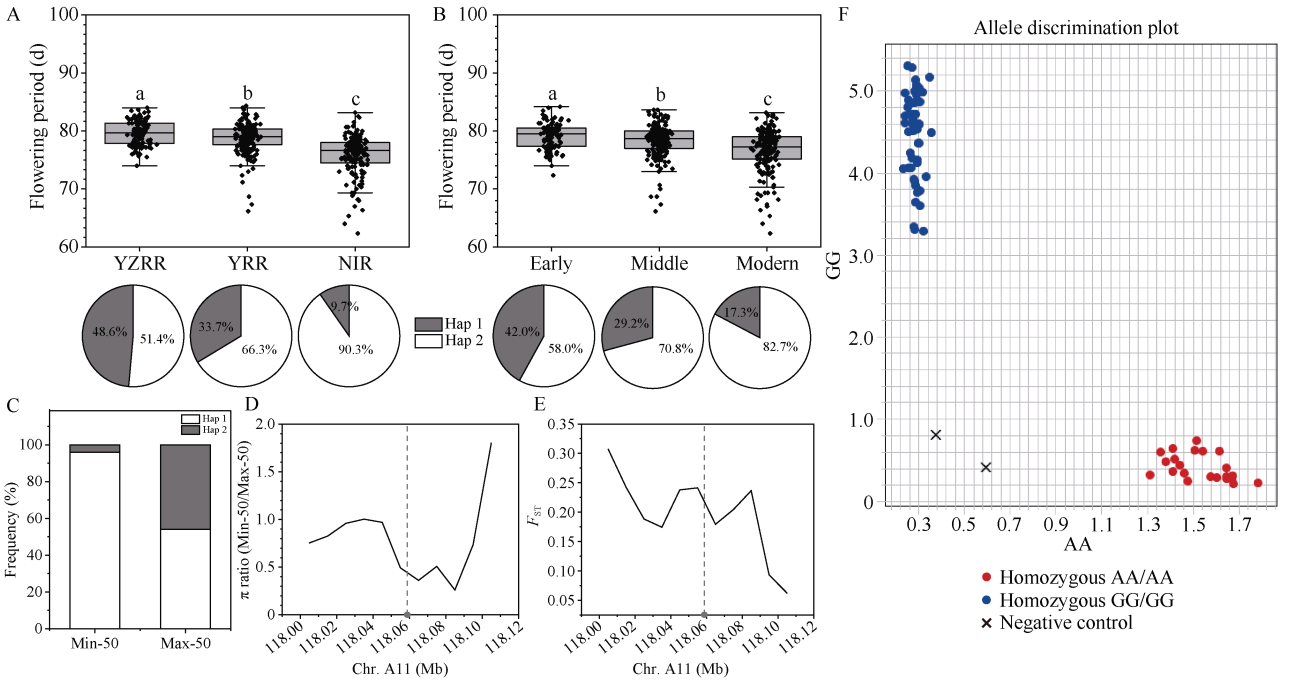


图 7　*GhLBD6* 优异等位变异育种演化分析及基因分型

Fig. 7　Breeding-associated evolutionary analysis of a favorable *GhLBD6* allele and genotyping

A: 单倍型在不同地域陆地棉群体中的分布; B: 单倍型在不同年代陆地棉群体中的分布; C: 单倍型在极端早晚花品种中的频率分布; D: 核苷酸多样性的比值(Min-50/Max-50); E: 遗传分化指数; F: 等位基因鉴别图。YZRR: 长江流域棉区; YRR: 黄河流域棉区; NIR: 西北内陆棉区。不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平差异显著。

A: distribution of haplotypes across geographic regions; B: distribution of haplotypes across release periods; C: haplotype frequencies in extremely early- and late-flowering cultivars; D: ratio of nucleotide polymorphisms (Min-50/Max-50); E: genetic differentiation index; F: allele discrimination plot. YZRR: Yangtze river region; YRR: Yellow river region; NIR: Northwest inland region. Different lowercase letters indicate significant differences at $P < 0.05$.

本研究在多数物种中鉴定出的 LBD 家族成员数目与已有报道一致, 验证了本研究鉴定方法的可靠性。然而, 在亚洲棉、大麦和普通小麦中, 本研究分别鉴定到 65、32 和 81 个成员, 与前人报道结果存在差异, 可能与所使用参考基因组有关。拟南芥中将 *AtLOB* 和 *AtLBD1~AtLBD36* 确定为 I 类 LBD, *AtLBD37~AtLBD42* 确定为 II 类 LBD [1]。本研究在对 574 个 LBD 蛋白进行 MEME 分析后, 发现拟南芥中除 AtLBD37~AtLBD42 外, 还有 6 个蛋白(AtLBD2、AtLBD5、AtLBD8、AtLBD9、AtLBD26 和 AtLBD34)不包含基序 4 (类亮氨酸拉链基序), 所以只从拟南芥中鉴定到 31 个 I 类 LBD 成员。上述 6 个基因在前期研究中被分到 I 类, 可能是其与 I 类 *LBD* 基因的相似程度更高, 推测其可能是介于 I 类和 II 类 *LBD* 基因间的过渡基因。

开花期是评价棉花早熟性的关键性状[18], 发掘自然群体中与开花时间相关的等位基因变异, 对作物改良具有重要意义[49]。本研究通过对 102 个陆地棉 I 类 *LBD* 基因的单倍型分析, 并结合表达模式分析, 发现 *GhLBD6* 可能在调控陆地棉开花期上发挥作用。*GhLBD6* 是拟南芥 *AS2*/*LBD6* 的同源基因。在拟南芥中, AS2 与 AS1 形成复合物作用在 *BOP1*、*BOP2* 等的下游, *KNOX*、*ETT* 等的上游, 与 *LBD30*、*LOB* 和 *LBD36* 等协同调控植物多个生长发育过程[4,50]。拟南芥 *as2* 突变体表现为开花延迟, 其在苹果中的同源基因 *MdLBD11* 在拟南芥中过表达会导致开花延迟[14-15]。本研究在陆地棉中通过 VIGS 技术抑制 *GhLBD6* 表达后, 观察到开花提前的表型, 表明 *GhLBD6* 在调控开花时间方面与拟南芥 *AS2* 功能类似。此外, 前人研究在鸡脚叶棉中沉默 *GhAS2*/*GhLBD6* 或者 *GhAS1* (拟南芥 *AS1* 同源基因), 发现可解除对 *GhKNLs* 基因(拟南芥 *KNOX* 同源基因)的抑制, 进而与叶型相关基因共同调控叶片形态[19], 这与拟南芥中 AS1-AS2 复合体通过 *KNOX* 基因调控叶型的机制相一致[51-52]。本研究中, *GhLBD6* 沉默植株也呈现出叶片下卷的表型, 与拟南芥 *AS2* 过表达植株叶片上卷的表型相对应, 进一步支持了 *GhLBD6* 在叶片发育中的功能保守性。因此, 拟南芥 *AS2* 基因的研究可为深入解析陆地棉 *GhLBD6* 的分子功能提供重要参考。

植物可以利用内在的遗传变异来驱动对变化环境的适应性进化, 从而在不同环境中表现出适应性表型[49]。从我国棉区的变迁来看, 早期以长江流域、黄河流域和西北内陆三大棉区为主, 随种植结构调整, 西北内陆棉区逐渐发展为最重要的棉花产区[53]。西北内陆棉区无霜期短、有效积温有限, 对早熟品种存在迫切需求[54]。本研究发现的早花优异等位变异 *GhLBD6*-Hap 1 很可能在西北内陆引入种质及现代育成品种中受到人工选择, 从而使其在西北内陆和现代育成品种中占有更高的频率。本研究的 VIGS 试验表明, 抑制 *GhLBD6* 的表达可导致开花提前, 表明该基因在陆地棉中可能作为开花抑制因子发挥作用。进一步在 14 个陆地棉不同单倍型代表材料中进行表达分析显示, *GhLBD6* 的表达水平与开花期呈显著正相关的线性关系, 再次支持其作为开花抑制因子的推测。综上, 本研究初步证明了 *GhLBD6* 自然变异、表达水平与开花期之间的关系, 即 *GhLBD6*-Hap 1 型陆地棉品种通常具有较低的 *GhLBD6* 表达和较早的开花期。但这一趋势并非绝对, 本研究仅进行了 *GhLBD6* 基因功能的初步 VIGS 验证和等位基因变异的初步探索, 仍需对该基因的调控机制及其单倍型与开花期的关系进行更深入和系统的研究。此外, 基于 *GhLBD6* 编码区非同义 SNP 开发了可用于区分 *GhLBD6* 两种单倍型的 KASP 分子标记, 证明了该位点具有用于分子辅助选择育种的潜力。

4 结论

从陆地棉中鉴定到 102 个 I 类 *LBD* 基因, 基于单倍型和表达分析筛选出调控花期的候选基因 *GhLBD6*。VIGS 试验表明, 抑制 *GhLBD6* 表达可导致花芽分化提前, 现蕾期和开花期分别显著提前 6.57 d 和 6.86 d, 并引起陆地棉开花相关基因 *GhAP1* 和 *GhSVP* 表达上调、*GhSOC1* 和 *GhCAL* 表达下调。*GhLBD6* 的编码区主要存在 *GhLBD6*-Hap 1 和 *GhLBD6*-Hap 2 两种单倍型。其中, *GhLBD6*-Hap 1 为早花的优异等位变异, 在陆地棉品种改良过程中受到人工选择。基于 *GhLBD6* 编码区非同义 SNP 开发的 KASP 分子标记在 77 份陆地棉品种中实现了基因分型, 为棉花早熟分子育种奠定了基础。

References

[1] Shuai B, Reynaga-Peña C G, Springer P S. The *LATERAL ORGAN BOUNDARIES* gene defines a novel, plant-specific gene family. Plant Physiol, 2002, 129: 747–761.

[2] 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. Plant Cell Physiol, 2002, 43: 467–478.

[3] 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. Development, 2001, 128: 1771–1783.

[4] Rong M, Gao S X, Wen D, et al. The LOB domain protein, a novel transcription factor with multiple functions: a review. Plant Physiol Biochem, 2024, 214: 108922.

[5] Okushima Y, Fukaki H, Onoda M, et al. ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of *LBD*/*ASL* genes in *Arabidopsis*. Plant Cell, 2007, 19: 118–130.

[6] Nguyen T H, Kim M J, Kim J. Transcription factors WRKY2 and WRKY34 control *LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN10* expression in pollen vegetative cell nuclei. Plant Physiol, 2024, 196: 2463–2475.

[7] Teng R D, Wu Z, Xu S J, et al. A novel lateral organ boundary-domain factor CmLBD2 positively regulates pollen development by activating *CmACOS5* in *Chrysanthemum* morifolium. Plant Cell Physiol, 2021, 62: 1687–1701.

[8] Dang T V T, Lee S, Cho H, et al. The LBD11-ROS feedback regulatory loop modulates vascular cambium proliferation and secondary growth in *Arabidopsis*. Mol Plant, 2023, 16: 1131–1145.

[9] Dong J H, Wang Y, Xu L, et al. *RsLBD3* regulates the secondary growth of taproot by integrating auxin and cytokinin signaling in radish (*Raphanus sativus* L.). J Integr Plant Biol, 2025, 67: 1823–1842.

[10] Castaings L, Marchive C, Meyer C, et al. Nitrogen signalling in *Arabidopsis*: how to obtain insights into a complex signalling network. J Exp Bot, 2011, 62: 1391–1397.

[11] Zhang J L, Dong D H, Jia C Y, et al. Fine-tuning of MYC2-mediated *Botrytis* defense response by the LBD40/42-CRL3BPM4 module in tomato. Plant Cell, 2025, 37: koaf258.

[12] Srikanth A, Schmid M. Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. Cell Mol Life Sci, 2011, 68: 2013–2037.

[13] 张艺能, 周玉萍, 陈琼华, 等. 拟南芥开花时间调控的分子基础. 植物学报, 2014, 49: 469–482.
Zhang Y N, Zhou Y P, Chen Q H, et al. Molecular basis of flowering time regulation in *Arabidopsis*. Chin Bull Bot, 2014, 49: 469–482 (in Chinese with English abstract).

[14] Ikezaki M, Kojima M, Sakakibara H, et al. Genetic networks regulated by *ASYMMETRIC LEAVES1* (*AS1*) and *AS2* in leaf development in *Arabidopsis thaliana*: *KNOX* genes control five morphological events. Plant J, 2010, 61: 70–82.

[15] Wang H F, Han X F, Fu X F, et al. Overexpression of *TaLBD16-4D* alters plant architecture and heading date in transgenic wheat. Front Plant Sci, 2022, 13: 911993.

[16] 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. PLoS One, 2013, 8: e57044.

[17] Gao J S, Niu M X, Lei Y, et al. PomiR164 targets PoLBD25 to promote early flowering in tree peony. Hortic Plant J, Published online [2025-09-06], https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468014125001943.

[18] 喻树迅. 我国棉花生产现状与发展趋势. 中国工程科学, 2013, 15(4): 9–13.
Yu S X. Present situation and development trend of cotton production in China. Strategic Study CAE, 2013, 15(4): 9–13 (in Chinese with English abstract).

[19] Li L B, Zhang C, Huang J Q, et al. Genomic analyses reveal the genetic basis of early maturity and identification of loci and candidate genes in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Plant Biotechnol J, 2021, 19: 109–123.

[20] Chang L J, Mei G F, Hu Y, et al. *LMI1-like* and *KNOX1* genes coordinately regulate plant leaf development in dicotyledons. Plant Mol Biol, 2019, 99: 449–460.

[21] 崔静. 棉花 *GbSTK* 和 *GhLBD100* 基因抗黄萎病功能研究. 河北农业大学硕士学位论文, 河北保定, 2020.
Cui J. Functional Analysis of *GbSTK* and *GhLBD100* from Cotton in *Verticillium* wilt resistance. MS Thesis of Hebei Agricultural University, Baoding, Hebei, China, 2020 (in Chinese with English abstract).

[22] 刘醒醒. 陆地棉 GhLBD18-GhATG18a 调控体细胞胚胎发生细胞自噬的机制研究. 郑州大学硕士学位论文, 河南郑州, 2023.
Liu X X. Mechanism Analysis on GhLBD18-GhATG18a Regulating of Autophagy during *Gossypium hirsutum* L. Somatic Embryogenesis. MS Thesis of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan, China, 2023 (in Chinese with English abstract).

[23] 王晔. 亚洲棉 *LBDs* 同源基因的克隆及应用. 华中农业大学硕士学位论文, 湖北武汉, 2015.
Wang Y. Molecular Cloning and Application of *LBDs* from Cotton (*Gossypium arboreum* L.). MS Thesis of Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei, China, 2015 (in Chinese with English abstract).

[24] Yu J, Jung S, Cheng C H, et al. CottonGen: the community database for cotton genomics, genetics, and breeding research. Plants (Basel), 2021, 10: 2805.

[25] Goodstein D M, Shu S Q, Howson R, et al. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. Nucleic Acids Res, 2012, 40: D1178–D1186.

[26] Yates A D, Allen J, Amode R M, et al. Ensembl Genomes 2022: an expanding genome resource for non-vertebrates. Nucleic Acids Res, 2022, 50: D996–D1003.

[27] Finn R D, Mistry J, Schuster-Böckler B, et al. Pfam: clans, web tools and services. Nucleic Acids Res, 2006, 34: D247–D251.

[28] Chen C J, Chen H, Zhang Y, et al. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. Mol Plant, 2020, 13: 1194–1202.

[29] Marchler-Bauer A, Derbyshire M K, Gonzales N R, et al. CDD: NCBI's conserved domain database. Nucleic Acids Res, 2015, 43: D222–D226.

[30] Kumar S, Stecher G, Suleski M, et al. MEGA12: molecular evolutionary genetic analysis version 12 for adaptive and green computing. Mol Biol Evol, 2024, 41: msae263.

[31] Ma Z Y, He S P, Wang X F, et al. Resequencing a core collection of upland cotton identifies genomic variation and loci influencing fiber quality and yield. Nat Genet, 2018, 50: 803–813.

[32] Zhang T Z, Hu Y, Jiang W K, et al. Sequencing of allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L. acc. TM-1) provides a resource for fiber improvement. Nat Biotechnol, 2015, 33: 531–537.

[33] Zhao L J, Lyu Y J, Chen W, et al. Genome-wide identification and analyses of the AHL gene family in cotton (*Gossypium*). BMC Genom, 2020, 21: 69.

[34] Rao X Y, Huang X L, Zhou Z C, et al. An improvement of the 2ˆ(–delta delta CT) method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. Biostat Bioinform Biomath, 2013, 3: 71–85.

[35] Guo X F, Yang J N, Li D D, et al. Genome-wide association study reveals novel SNP loci and candidate genes linked to flowering time in upland cotton. Theor Appl Genet, 2025, 138: 214.

[36] Danecek P, Auton A, Abecasis G, et al. The variant call format and VCFtools. Bioinformatics, 2011, 27: 2156–2158.

[37] 程帅帅. 高分辨率的时间动态转录组图谱鉴定棉花开花关键基因及功能验证. 西北农林科技大学博士学位论文, 陕西杨凌, 2020.
Cheng S S. Identification and Functional Analysis of Key Genes in Cotton Flowering by High-Resolution Temporal Dynamic Transcriptome Landscape. PhD Dissertation of Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi, China, 2020 (in Chinese with English abstract).

[38] Wang C X, Liu J J, Xie X Y, et al. GhAP1-D3 positively regulates flowering time and early maturity with no yield and fiber quality penalties in upland cotton. J Integr Plant Biol, 2023, 65: 985–1002.

[39] Zhang X H, Ren Z Y, Hu G H, et al. Functional divergence of *GhAP1.1* and *GhFUL2* associated with flowering regulation in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). J Plant Physiol, 2022, 275: 153757.

[40] Zhang X H, Wei J H, Fan S L, et al. Functional characterization of *GhSOC1* and *GhMADS42* homologs from upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Plant Sci, 2016, 242: 178–186.

[41] Cheng S S, Chen P Y, Su Z Z, et al. High-resolution temporal dynamic transcriptome landscape reveals a *GhCAL*-mediated flowering regulatory pathway in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Plant Biotechnol J, 2021, 19: 153–166.

[42] Li J, Fan S L, Song M Z, et al. Cloning and characterization of a *FLO*/*LFY* ortholog in *Gossypium hirsutum* L. Plant Cell Rep, 2013, 32: 1675–1686.

[43] Yu J W, Xie Q W, Li C, et al. Comprehensive characterization and gene expression patterns of LBD gene family in *Gossypium*. Planta, 2020, 251: 81.

[44] Liu W C, Guo X Y, Zheng T C, et al. Genome-wide identification and characterization of the lateral organ boundaries domain (LBD) gene family in nine Rosaceae species and expression pattern in *Prunus mume*. Ornament Plant Res, 2024, 4: 1–14.

[45] Sun S, Yi J J, Gu P L, et al. Comprehensive characterization and functional analysis of the lateral organ boundaries domain gene family in rice: evolution, expression, and stress response. Int J Mol Sci, 2025, 26: 3948.

[46] Hao L D, Li S F, Dai J, et al. Characterization and expression profiles of the ZmLBD gene family in *Zea mays*. Mol Biol Rep,

2024, 51: 554.
[47] 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 Zhejiang Univ Sci B, 2016, 17: 763–774.
[48] Xu J, Hu P, Tao Y, et al. Genome-wide identification and characterization of the Lateral Organ Boundaries Domain (LBD) gene family in polyploid wheat and related species. PeerJ, 2021, 9: e11811.
[49] Hou J, Liu M, Yang K, et al. Genetic variation for adaptive evolution in response to changed environments in plants. J Integr Plant Biol, 2025, 67: 2265–2293.
[50] Rast M I, Simon R. *Arabidopsis JAGGED LATERAL ORGANS* acts with *ASYMMETRIC LEAVES2* to coordinate *KNOX* and *PIN* expression in shoot and root meristems. Plant Cell, 2012, 24: 2917–2933.
[51] 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. Plant Cell, 2003, 15: 2241–2252.
[52] Guo M J, Thomas J, Collins G, et al. Direct repression of *KNOX* loci by the ASYMMETRIC LEAVES1 complex of *Arabidopsis*. Plant Cell, 2008, 20: 48–58.
[53] 徐爱武, 李翼然, 尚斌. 我国植棉区棉花种植现状及其发展建议. 中国棉花加工, 2022(5): 28–30.
Xu A W, Li Y R, Shang B. Present situation and development suggestions of cotton planting in cotton planting areas in China. China Cotton Proc, 2022(5): 28–30 (in Chinese).
[54] 王彩香, 袁文敏, 刘娟娟, 等. 西北内陆早熟陆地棉品种的综合评价及育种演化. 中国农业科学, 2023, 56: 1–21.
Wang C X, Yuan W M, Liu J J, et al. Comprehensive evaluation and breeding evolution of early maturing upland cotton varieties in the northwest inland of China. Sci Agric Sin, 2023, 56: 1–21 (in Chinese with English abstract).

附表 1 本研究所用引物列表
Table S1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	序列 Sequence (5′–3′)	引物用途 Primer usage
GhLBD6-F	GTTCACAAGGTGTTCGGTGC	克隆沉默片段和验证单倍型 Clone silent segments and verify haplotypes
GhLBD6-R	GACGTTCATGGCGAGGAGAT	
GhLBD6-MF	GGAATTCGTTCACAAGGTGTTCGGTGC	克隆带酶切位点的沉默片段 Clone silent segments with enzyme-cutting sites
GhLBD6-MR	GGGGTACCGACGTTCATGGCGAGGAGAT	
GhLBD6-QF	GATCTCAGCTGTGCTAAGTCG	RT-qPCR (*GH_A11G3479*)
GhLBD6-QR	TCCTCCTCCTCCACCACT	
GhLBD20-2-QF	CAACAGCAACACTTAGCATCG	RT-qPCR (*GH_A13G0147*)
GhLBD20-2-QR	CTTCGTCGTCATGACACGG	
GhLBD12-1-QF	AATGCAGCACAACCAGGAG	RT-qPCR (*GH_A10G2646*)
GhLBD12-1-QR	TGCAGCAGGGTCTTGAATTAC	
GhActin-QF	ATCCTCCGTCTTGACCTTG	RT-qPCR (内参基因) RT-qPCR (endogenous gene)
GhActin-QR	TGTCCGTCAGGCAACTCAT	
GhAP1-QF	ATGTGGAGCAGGCACATTGG	RT-qPCR (*GH_D03G1119*)
GhAP1-QR	TCATCCATGGCAGCAAGACG	
GhSOC1-QF	AAGTACGGTCTGTTGCCAGG	RT-qPCR (*GH_A11G0861*)
GhSOC1-QR	CTGTTGAGTTGGGTTGCACG	
GhSVP-QF	ATTGGGTTGAGCCGTGTGAT	RT-qPCR (*GH_D12G0863*)
GhSVP-QR	GGTAACTTGTCTTGGGCCGT	
GhLFY-QF	TGGCAAAAAGAACGGCCTTG	RT-qPCR (*GH_D07G0531*)
GhLFY-QR	TAGTGGGGCATTTTTCGCCA	
GhCAL-QF	CGACGGAACATGCACAACAT	RT-qPCR (*GH_A07G0875*)
GhCAL-QR	GGCTTCGTAACTCCCTCCAA	
1-FAM	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTCCTCCTCCTCCACCACC	基因分型 Genotyping
2-HEX	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTCCTCCTCCTCCACCACT	
Reverse primer	GATCTCAGCTGTGCTAAGTCG	

下画线部分为限制性内切酶位点。Underlined sequences indicate restriction enzyme recognition sites.

附表 2　9 物种 I 类 LBD 家族成员的鉴定
Table S2　Identification of Class I LBD family members in nine species

物种 species	1 组 Group 1	2 组 Group 2	3 组 Group 3	4 组 Group 4	5 组 Group 5	6 组 Group 6	总计 Total
拟南芥 *Arabidopsis thaliana*	2	3	3	8	10	5	31
陆地棉 *Gossypium hirsutum*	12	18	12	15	32	13	102
亚洲棉 *Gossypium arboreum*	6	8	6	8	17	5	50
雷蒙德氏棉 *Gossypium raimondii*	6	9	6	7	17	6	51
苹果 *Malus domestica*	4	7	6	9	11	10	47
水稻 *Oryza sativa*	1	2	3	3	8	6	23
玉米 *Zea mays*	4	5	4	5	11	7	36
大麦 *Hordeum vulgare*	2	3	3	4	7	4	23
小麦 *Triticum aestivum*	6	9	9	9	15	12	60
总计 Total	43	64	52	68	128	68	423

附表 3　陆地棉 102 个 I 类 *LBD* 基因的基本信息
Table S3　Basic information of 102 Class I *LBD* genes in *Gossypium hirsutum*

基因 ID Gene ID	重命名 Rename	分组 Group	开花期相关 SNP 显著情况 Significance of SNP related to flowering period	2 种主要单倍型样本数比值 Sample size ratio of two major haplotypes
GH_D07G1252	*GhLBD1-4*	1	—	—
GH_A07G1269	*GhLBD11-3*	1	—	—
GH_A08G0118	*GhLBD11-1*	1	—	—
GH_D08G0123	*GhLBD11-2*	1	*P* = 8.389E-03	33/246
GH_A13G0031	*GhLBD1-1*	1	—	—
GH_D13G0027	*GhLBD11-4*	1	—	—
GH_A09G1214	*GhLBD1-7*	1	—	—
GH_D09G1171	*GhLBD1-8*	1	—	—
GH_A06G1943	*GhLBD1-2*	1	—	—
GH_D06G1967	*GhLBD1-3*	1	—	—
GH_D04G0866	*GhLBD1-5*	1	—	—
GH_A05G3610	*GhLBD1-6*	1	—	—
GH_A05G1095	*GhLBD12-9*	2	—	—
GH_D05G1086	*GhLBD12-10*	2	—	—
GH_D10G2744	*GhLBD12-5*	2	*P* = 1.752E-03	85/330
GH_A10G2639	*GhLBD12-6*	2	—	—
GH_D06G1896	*GhLBD12-7*	2	—	—
GH_A06G1863	*GhLBD12-8*	2	—	—
GH_D03G1614	*GhLBD12-1*	2	*P* = 2.065E-04	92/138
GH_A03G0359	*GhLBD12-2*	2	—	—
GH_D08G2310	*GhLBD12-3*	2	—	—
GH_A08G2303	*GhLBD12-4*	2	—	—
GH_A01G0920	*GhLBD4-7*	2	—	—
GH_D01G0938	*GhLBD4-8*	2	—	—
GH_D10G0505	*GhLBD4-2*	2	*P* = 5.429E-03	49/368
GH_A10G0479	*GhLBD4-3*	2	—	—
GH_A06G1622	*GhLBD4-1*	2	*P* = 2.113E-05	35/365
GH_D06G1660	*GhLBD4-4*	2	*P* = 0.013	66/335

(续附表 3)

基因 ID Gene ID	重命名 Rename	分组 Group	开花期相关 SNP 显著情况 Significance of SNP related to flowering period	2 种主要单倍型样本数比值 Sample size ratio of two major haplotypes
GH_A05G1451	*GhLBD4-5*	2	—	—
GH_D05G1469	*GhLBD4-6*	2	—	—
GH_D05G2831	*GhLBD15-1*	3	*P* = 3.016E-04	61/339
GH_A05G2818	*GhLBD15-2*	3	—	—
GH_A05G4224	*GhLBD15-3*	3	—	—
GH_D04G0152	*GhLBD15-4*	3	—	—
GH_A13G0058	*GhLBD15-7*	3	—	—
GH_D13G0055	*GhLBD15-8*	3	—	—
GH_D03G1635	*GhLBD15-5*	3	—	—
GH_A03G0337	*GhLBD15-6*	3	—	—
GH_D13G0154	*GhLBD21-1*	3	—	—
GH_A13G0147	*GhLBD21-2*	3	—	—
GH_A10G2646	*GhLBD21-3*	3	—	—
GH_D10G2751	*GhLBD21-4*	3	—	—
GH_A11G1984	*GhLBD36-1*	4	—	—
GH_D11G2021	*GhLBD36-2*	4	—	—
GH_D12G0713	*GhLBD36-5*	4	—	—
GH_A12G0708	*GhLBD36-6*	4	—	—
GH_A10G0932	*GhLBD36-3*	4	—	—
GH_D10G1030	*GhLBD36-4*	4	—	—
GH_A11G3479	*GhLBD6*	4	*P* = 3.446E-03	150/256
GH_A05G3760	*GhLBD25-1*	4	—	—
GH_D04G0587	*GhLBD25-2*	4	—	—
GH_A09G0336	*GhLBD25-3*	4	—	—
GH_D09G0343	*GhLBD25-4*	4	—	—
GH_D05G2568	*GhLOB-1*	4	—	—
GH_A05G2547	*GhLOB-2*	4	—	—
GH_A11G0685	*GhLOB-3*	4	—	—
GH_D11G0717	*GhLOB-4*	4	—	—
GH_D11G1053	*GhLBD11-5*	5	—	—
GH_A08G1506	*GhLBD1-9*	5	—	—
GH_D08G1519	*GhLBD1-10*	5	—	—
GH_D08G1617	*GhLBD18-1*	5	—	—
GH_A08G1603	*GhLBD18-2*	5	—	—
GH_D12G1185	*GhLBD18-3*	5	—	—
GH_A12G1184	*GhLBD18-4*	5	—	—
GH_D11G0877	*GhLBD19-1*	5	—	—
GH_A11G0839	*GhLBD19-2*	5	—	—
GH_A12G1183	*GhLBD31-1*	5	—	—
GH_D12G1183	*GhLBD31-2*	5	—	—
GH_D11G3430	*GhLBD20-1*	5	—	—
GH_A11G3425	*GhLBD20-2*	5	P = 0.0141	173/197
GH_A10G2454	*GhLBD33-1*	5	*P* = 6.662E-03	71/332
GH_D10G2563	*GhLBD33-2*	5	—	—

(续附表 3)

基因 ID Gene ID	重命名 Rename	分组 Group	开花期相关 SNP 显著情况 Significance of SNP related to flowering period	2 种主要单倍型样本数比值 Sample size ratio of two major haplotypes
GH_A07G2389	*GhLBD16-1*	5	—	—
GH_D07G2331	*GhLBD16-4*	5	*P* = 1.482E-03	27/383
GH_D11G1372	*GhLBD16-2*	5	—	—
GH_A11G1341	*GhLBD16-3*	5	—	—
GH_D08G0672	*GhLBD16-5*	5	—	—
GH_D08G2179	*GhLBD16-6*	5	—	—
GH_A08G2159	*GhLBD16-7*	5	—	—
GH_D08G2180	*GhLBD29-6*	5	—	—
GH_A08G2160	*GhLBD29-7*	5	—	—
GH_A11G1342	*GhLBD29-1*	5	*P* = 0.0467	67/345
GH_D11G1373	*GhLBD29-2*	5	—	—
GH_A07G2390	*GhLBD29-9*	5	—	—
GH_D07G2332	*GhLBD29-10*	5	*P* = 3.417E-04	99/307
GH_D08G0670	*GhLBD29-8*	5	—	—
GH_A08G0669	*GhLBD29-3*	5	—	—
GH_D08G0671	*GhLBD29-4*	5	—	—
GH_A08G0670	*GhLBD29-5*	5	*P* = 0.0299	130/278
GH_A05G1199	*GhLBD24-1*	6	*P* = 1.708E-03	74/334
GH_D05G1201	*GhLBD24-4*	6	*P* = 2.748E-03	68/336
GH_A12G2803	*GhLBD24-2*	6	—	—
GH_D12G2831	*GhLBD24-3*	6	*P* = 3.667E-04	93/294
GH_A11G0311	*GhLBD27-1*	6	—	—
GH_D11G0325	*GhLBD27-2*	6	—	—
GH_A07G0225	*GhLBD22-4*	6	—	—
GH_D07G0232	*GhLBD22-6*	6	—	—
GH_D10G0628	*GhLBD22-1*	6	—	—
GH_A10G0592	*GhLBD22-2*	6	—	—
GH_D06G2227	*GhLBD22-5*	6	—	—
GH_A06G2192	*GhLBD22-3*	6	—	—
GH_D06G2226	*GhLBD22-7*	6	—	—