

引用格式:

徐清华, 黄慧, 蒋杰, 余思晴, 张兴平, 吴佶塍, 周仲华, 贺云新. 棉花 LOX 基因家族全基因组鉴定、进化分析及其在镉胁迫与外源MeJA处理下的表达调控[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2025, 51(6): 50–62.
XU Q H, HUANG H, JIANG J, YU S Q, ZHANG X P, WU J T, ZHOU Z H, HE Y X. Genome-wide identification, evolutionary analysis and expression regulation of LOX gene family in cotton under cadmium stress and exogenous MeJA treatment[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2025, 51(6): 50–62.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



棉花 LOX 基因家族全基因组鉴定、进化分析及其在镉胁迫与外源MeJA处理下的表达调控

徐清华¹, 黄慧², 蒋杰², 余思晴¹, 张兴平², 吴佶塍², 周仲华¹, 贺云新^{2*}

(1. 湖南农业大学农学院, 湖南 长沙 410128; 2. 湖南省棉花与蚕桑研究所, 湖南 长沙 410127)

摘要: 为解析棉花 LOX 基因家族的进化特征及其在镉胁迫中的功能, 本研究结合陆地棉、海岛棉、亚洲棉和雷蒙德氏棉的全基因组数据, 系统鉴定 LOX 家族成员; 以耐镉陆地棉品种‘湘K27’为材料, 探究其响应镉胁迫及外源茉莉酸甲酯(MeJA)处理的表达模式; 通过系统发育、保守基序、基因结构及顺式作用元件分析, 解析 LOX 家族进化特征; 采用RT-qPCR技术检测棉花 $GhLOX$ 同源基因在镉胁迫和外源MeJA处理下的表达情况, 筛选关键候选基因。结果表明: 共鉴定到30个陆地棉 $GhLOX$ 基因, 33个海岛棉 $GbLOX$ 基因, 19个亚洲棉 $GaLOX$ 基因和20个雷蒙德氏棉 $GrLOX$ 基因; 4种棉花 LOX 家族分为6个亚家族, 各亚家族中大部分基因的保守基序完全一致, 均有10个基序(motif); $LOX-1$ 、 $LOX-2$ 和 $LOX-4$ 亚家族中有少数基因的motif数量较少, 可能是因为在进化过程中发生了缺失; LOX 各亚家族之间具有相似的基因结构。顺式作用元件分析结果表明, 棉花 LOX 基因家族含有与茉莉酸响应有关的顺式作用元件。表达模式分析结果表明, $GhLOX$ 基因家族成员在根、茎、叶组织以及冷、热、盐、PEG胁迫下的表达具有差异性, 其中, $GhLOX-03A$ 、 $GhLOX-18D$ 为响应逆境的优势表达基因; $GhLOX$ 同源基因可能通过茉莉酸合成途径参与棉花镉胁迫, 且 $GhLOX-20D$ 、 $GhLOX-22D$ 、 $GhLOX-27D$ 为镉胁迫响应的关键候选基因。

关键词: 棉花; LOX 基因; 镉; 生物信息学分析; 茉莉酸

中图分类号: S562

文献标志码: A

文章编号: 1007–1032(2025)06–0050–13

Genome-wide identification, evolutionary analysis and expression regulation of LOX gene family in cotton under cadmium stress and exogenous MeJA treatment

XU Qinghua¹, HUANG Hui², JIANG Jie², YU Siqing¹, ZHANG Xingping², WU Jitang², ZHOU Zhonghua¹, HE Yunxin^{2*}

(1. College of Agriculture, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 2. Hunan Cotton and Sericulture Research Institute, Changsha, Hunan 410127, China)

Abstract: In order to analyze the evolutionary characteristics of cotton LOX gene family and its function under cadmium stress, the LOX family members were systematically identified by combining the whole genome data of *Gossypium hirsutum* L., *G. barbadense* L., *G. arboreum* L. and *G. raimondii* L. The expression patterns of cadmium-tolerant upland cotton ‘Xiang K27’ in response to cadmium stress and exogenous methyl jasmonate (MeJA) treatment were investigated. Through phylogenetic analysis, conserved motifs, gene structure and cis-acting elements analysis, the evolutionary characteristics of the LOX family were analyzed. The expression of cotton $GhLOX$ homologous genes under cadmium stress

收稿日期: 2025–01–21

修回日期: 2025–03–07

基金项目: 湖南省自然科学基金项目(2021JJ50133); 湖南省棉花产业技术体系项目(2024); 湖南省棉花科技创新项目(2023)

作者简介: 徐清华(1999—), 女, 辽宁鞍山人, 硕士, 主要从事作物生理及分子生物学研究, 3048352271@qq.com; *通信作者, 贺云新, 硕士, 研究员, 主要从事作物遗传育种研究, heyunxin20@163.com

and exogenous MeJA treatment was detected using RT-qPCR technology, and key candidate genes were screened. The results showed that a total of 30 *GhLOX* genes in upland cotton, 33 *GbLOX* genes in island cotton, 19 *GaLOX* genes in Asian cotton and 20 *GrLOX* genes in Raymond's cotton were identified. The *LOX* family of the above four mentioned cotton species was classified into six subfamilies by using the phylogenetic evolutionary tree. Among them, the conserved motifs of most genes in the six subfamilies were identical, with each containing 10 motifs. The various subfamilies of *LOX* had similar genetic structures. The analysis results of cis-acting elements indicated that the cotton *LOX* gene family contained cis-acting elements related to jasmonic acid response. The expression pattern analysis results showed that the members of the *GhLOX* gene family had differential expressions in root, stem, leaf tissues, as well as under cold, heat, salt, and PEG stress conditions. Among them, *GhLOX-03A* and *GhLOX-18D* were the dominant expression genes responding to adverse conditions. The *GhLOX* homologous genes may participate in cotton cadmium stress response through jasmonic acid synthesis, and *GhLOX-20D*, *GhLOX-22D* and *GhLOX-27D* were the key candidate genes responding to cadmium stress.

Keywords: cotton; *LOX* gene; Cd; bioinformatics analysis; jasmonic acid

土壤是农业活动中重要的生产要素,作物生长离不开土壤提供的营养元素,但人类活动、工业生产的污水排放及化肥、农药的使用,使重金属元素在土壤中富集,其中,镉是土壤中主要的重金属污染物之一^[1]。植物从土壤中吸收水分、养分的同时,也会吸收镉元素(Cd),并将镉元素从植物根系运输到茎、叶和籽粒中,最终进入食物链,被人类食用^[2]。人类长期食用镉超标的食物,积累到一定程度会引发较多疾病,对人类健康造成极大的威胁。棉花主要用于纺织加工,几乎不会进入人体食物链。因此,农业生产中常在镉污染农田里选择种植棉花。

镉元素不是棉花生长所必需的,相反,棉花吸收过量的镉元素会产生一系列不良影响,抑制其生长。在镉胁迫下,棉花幼苗矮化,叶片枯萎发黄^[3],幼苗时期Cd积累量增加,会使根系变粗、伸长缓慢,降低其吸收和运输养分、水分的能力,阻碍地上部植株发育,最终对棉苗产生毒害作用,造成棉花减产^[4-5]。缓解镉对棉花生长的危害、降低棉花减产风险,不仅对镉污染耕地的有效利用具有重要意义,也为棉花育种工作提供了方向。

茉莉酸(jasmonic acid, JA)和茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)是调节植物生长发育以及植物应对各种生物和非生物胁迫的信号分子^[6]。MeJA是一种参与植物信号转导的激素,可以缓解胁迫危害。植物脂氧合酶(LOX)是参与JA合成的关键蛋白^[7],它是非血红素含铁双加氧酶家族的成员,可以催化多不饱和脂肪酸加氧反应,进一步通过酶促或非酶促途径生成氧脂素(oxylipins),从而参与调节生长发育、胁迫应答等过程^[8]。LOX基因在植物生长发育过

程中起着多种作用,与逆境胁迫有关,在植物抵抗非生物胁迫中发挥着关键作用。研究者在蒺藜苜蓿和苜蓿中分别鉴定了30个和95个LOX同源基因^[9],在马铃薯中鉴定到17个*StLOX*^[10],在大豆中鉴定到36个*GmLOX*^[11],在茄子中共鉴定出12个*SmeLOX*基因^[12]。外源JA缓解了LOX3敲除导致的水稻防御响应降低,提高了水稻抗瘟性^[13]。MeJA能够缓解Cd胁迫对马铃薯生长及生理的不利影响,增加块茎产量,改善品质,提高镉胁迫的耐受性^[14]。外源MeJA通过调节内源激素代谢及渗透调节物质,增强秋葵对Cd胁迫的耐受性^[15]。联合施加Si和MeJA能减轻Cd对番茄幼苗的不利影响^[16]。目前,针对棉花LOX基因与MeJA的研究报道较少,陆地棉、海岛棉、雷蒙德氏棉、亚洲棉的LOX基因家族成员尚未鉴定,还需进一步挖掘验证。

本研究结合陆地棉、海岛棉、亚洲棉和雷蒙德氏棉的全基因组数据,系统鉴定LOX基因家族成员;以耐镉陆地棉品种‘湘K27’为材料,探究其响应镉胁迫及外源MeJA处理的表达模式,以期为研究棉花LOX基因响应镉胁迫的分子机制及棉花耐镉分子育种提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

耐镉棉花‘湘K27’种子由湖南省棉花与蚕桑研究所提供。RNA提取、反转录、qPCR试剂盒由南京诺唯赞生物科技股份有限公司提供。荧光定量PCR仪由美国Bio-Rad公司生产。

1.2 试验方法

1.2.1 棉花LOX基因家族成员鉴定

为了鉴定棉花LOX基因家族成员,在TAIR拟南芥数据库(<https://www.arabidopsis.org>)中获得6个*AtLOX*蛋白序列,通过本地BLAST数据库比对查询到陆地棉、海岛棉、亚洲棉和雷蒙德氏棉4个棉花品种的同源基因。在棉花功能基因组学数据库(<https://cottonfgd.net>)下载这4个棉花品种LOX同源基因的蛋白质序列,删除不完整的结构域。通过检索、多序列比较,确定棉花LOX基因家族成员。

1.2.2 系统发育进化树分析

运用MAGE7对陆地棉、海岛棉、亚洲棉、雷蒙德氏棉及已报道的拟南芥的LOX基因家族成员的蛋白质序列进行多重序列比对,根据比对结果,采用NJ邻接法构建系统发育进化树,并利用Evolview网站进行可视化分析。

1.2.3 基因结构和保守基序分析

运用MEME网站对棉花LOX基因家族成员的保守基序(motif)进行分析。从棉花功能基因组学数据库(<https://cottonfgd.net>)获得4个棉花品种的基因组注释文件。用TBtools软件进行可视化作图。

1.2.4 顺式作用元件预测

从棉花功能基因组学数据库(<https://cottonfgd.net>)下载棉花基因家族成员启动子上游2 000 bp的DNA序列,利用TBtools软件对其进行可视化处理。

1.2.5 染色体定位分析

从棉花功能基因组学数据库(<https://cottonfgd.net>)中获得基因组注释文件,利用TBtools软件进行可视化作图。

1.2.6 LOX基因的表达模式分析

利用NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的RNA-Seq数据(PRJNA490626)获得陆地棉LOX基因在不同组织及其在冷(4℃)、热(37℃)、盐(0.4 mol/L NaCl)和PEG(200 g/L)胁迫下的叶片中的表达水平^[17]。用TBtools软件对数据进行可视化处理后,分析陆地棉LOX基因在不同组织、不同胁迫处理下的表达模式。

1.2.7 Cd胁迫及添加外源MeJA时陆地棉LOX基因表达量分析

在植物生长室进行陆地棉盆栽试验,待棉花生长至苗期进行水培实验,取三叶一心期的棉花进行处理,设置5个处理组,分别为0 μmol/L Cd+0 μmol/L MeJA(CK)、1 000 μmol/L Cd+0 μmol/L MeJA、1 000 μmol/L Cd+0.100 μmol/L MeJA、1 000 μmol/L Cd+0.020 μmol/L MeJA、1 000 μmol/L Cd+0.002 μmol/L MeJA。处理5 d后,采集棉花侧根、嫩茎、真叶,并将其全部剪成小块,混合均匀后,随机分组,用锡箔纸包好并立即用液氮速冻,存放在-80℃冰箱中,以便后续提取RNA。

使用RNA提取试剂盒分别提取根、茎、叶组织的RNA,将其反转录为cDNA后,进行实时荧光定量PCR反应,以*Actin*基因为内参基因,设计*GhLOX-20D*、*GhLOX-22D*、*GhLOX-27D*基因的引物(表1),用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算相对表达量,各样品设3个重复。

表1 实时荧光定量PCR引物

Table 1 Real-time fluorescent quantitative PCR primers	
引物名称	引物序列(5'—3')
<i>GhLOX-20D</i> -F	CGAGGATGACCCAGAGTACC
<i>GhLOX-20D</i> -R	TCTCCACGTTGAAAGCTCCT
<i>GhLOX-22D</i> -F	GCCACCAAATCGTTCCATGT
<i>GhLOX-22D</i> -R	ACCGCAATTGCCAACTTCAT
<i>GhLOX-27D</i> -F	AACTAAGCCTCCCTCACACC
<i>GhLOX-27D</i> -R	CCAATTGGTGAAACACCAGCA

2 结果与分析

2.1 棉花LOX基因家族成员的鉴定结果

本试验利用棉花功能基因组学数据库从4个棉花品种中鉴定到102个LOX基因,包括30个陆地棉(*Gossypium hirsutum*)基因、33个海岛棉(*G. barbadense*)基因、19个亚洲棉(*G. arboreum*)基因和20个雷蒙德氏棉(*G. raimondii*)基因。对这102个LOX基因编码的蛋白进行理化性质分析,结果(表2)显示,这些蛋白的氨基酸序列长度为168~999 aa,基因外显子数量为1~12个,蛋白相对分子质量为 $19.115\times 10^3\sim 115.922\times 10^3$ 。雷蒙德氏棉、亚洲棉、陆地棉和海岛棉中的LOX蛋白家族成员的氨基酸序列长度分别为243~999 aa, 171~956 aa, 168~982 aa和293~957 aa;外显子数量分别为1~12个、2~11个、2~11个和4~11个;相对分子质量分别为 $27.792\times 10^3\sim$

115.922×10³, 19.886×10³~ 111.177×10³, 19.115×10³~ 114.156×10³和33.293×10³~ 111.251×10³。以上结果 说明：4个棉花品种的LOX蛋白的氨基酸序列长度、外显子数量和分子量均具有较高的相似性。

表2 LOX基因家族成员信息

Table 2 Information about members of the LOX gene family						
棉花品种	基因ID	基因名称	染色体	氨基酸序列长度/aa	外显子数量/个	相对分子质量/10 ³
雷蒙德氏棉	Gorai.001G228100	<i>GrLOX-01</i>	Chr01	852	9	97.453
	Gorai.004G059500	<i>GrLOX-02</i>	Chr04	908	9	105.175
	Gorai.004G059700	<i>GrLOX-03</i>	Chr04	999	12	115.922
	Gorai.004G059900	<i>GrLOX-04</i>	Chr04	971	11	113.131
	Gorai.004G060100	<i>GrLOX-05</i>	Chr04	881	8	103.061
	Gorai.004G092100	<i>GrLOX-06</i>	Chr04	660	8	75.868
	Gorai.004G241100	<i>GrLOX-07</i>	Chr04	824	9	95.030
	Gorai.004G241300	<i>GrLOX-08</i>	Chr04	859	9	97.545
	Gorai.004G241400	<i>GrLOX-09</i>	Chr04	859	10	97.075
	Gorai.005G041900	<i>GrLOX-10</i>	Chr05	877	9	99.710
	Gorai.005G170200	<i>GrLOX-11</i>	Chr05	912	10	103.639
	Gorai.006G087200	<i>GrLOX-12</i>	Chr06	911	9	102.854
	Gorai.006G238200	<i>GrLOX-13</i>	Chr06	900	9	102.933
	Gorai.009G071200	<i>GrLOX-14</i>	Chr09	904	9	103.173
	Gorai.010G220400	<i>GrLOX-15</i>	Chr10	243	2	27.792
	Gorai.010G255600	<i>GrLOX-16</i>	Chr10	866	8	98.201
	Gorai.010G255700	<i>GrLOX-17</i>	Chr10	886	7	100.925
	Gorai.011G060400	<i>GrLOX-18</i>	Chr11	919	8	104.167
	Gorai.013G121100	<i>GrLOX-19</i>	Chr13	254	1	29.366
	Gorai.013G124500	<i>GrLOX-20</i>	Chr13	865	9	98.643
亚洲棉	Ga03G0360	<i>GaLOX-01</i>	Chr03	877	9	99.800
	Ga03G1717	<i>GaLOX-02</i>	Chr03	912	9	103.431
	Ga03G2218	<i>GaLOX-03</i>	Chr03	171	2	19.886
	Ga05G0720	<i>GaLOX-04</i>	Chr05	913	9	104.118
	Ga05G3705	<i>GaLOX-05</i>	Chr05	200	3	22.896
	Ga06G2399	<i>GaLOX-06</i>	Chr06	886	7	101.250
	Ga06G2400	<i>GaLOX-07</i>	Chr06	886	7	100.924
	Ga07G2275	<i>GaLOX-08</i>	Chr07	855	9	97.778
	Ga08G0563	<i>GaLOX-09</i>	Chr08	907	9	104.989
	Ga08G0569	<i>GaLOX-10</i>	Chr08	956	9	111.177
	Ga08G0908	<i>GaLOX-11</i>	Chr08	410	7	46.788
	Ga08G2449	<i>GaLOX-12</i>	Chr08	803	10	92.433
	Ga08G2450	<i>GaLOX-13</i>	Chr08	872	9	98.931
	Ga08G2452	<i>GaLOX-14</i>	Chr08	871	9	98.519
	Ga09G0875	<i>GaLOX-15</i>	Chr09	703	11	79.739
	Ga09G2472	<i>GaLOX-16</i>	Chr09	873	8	99.662
	Ga10G2500	<i>GaLOX-17</i>	Chr10	919	8	104.058
	Ga13G1370	<i>GaLOX-18</i>	Chr13	849	10	96.960
	Ga13G2185	<i>GaLOX-19</i>	Chr13	195	4	21.860
陆地棉	GH_A02G0326	<i>GhLOX-01A</i>	A02	877	9	99.685
	GH_A03G1485	<i>GhLOX-02A</i>	A03	912	9	103.461
	GH_A05G0687	<i>GhLOX-03A</i>	A05	905	9	103.331
	GH_A06G2307	<i>GhLOX-04A</i>	A06	856	8	97.452
	GH_A06G2308	<i>GhLOX-05A</i>	A06	886	7	101.111

表2(续)

棉花品种	基因ID	基因名称	染色体	氨基酸序列长度/aa	外显子数量/个	相对分子质量/10 ³
海岛棉	GH_A07G2230	<i>GhLOX-06A</i>	A07	855	9	97.705
	GH_A08G0535	<i>GhLOX-07A</i>	A08	982	11	114.156
	GH_A08G0541	<i>GhLOX-08A</i>	A08	957	9	111.168
	GH_A08G2376	<i>GhLOX-09A</i>	A08	168	2	19.115
	GH_A08G2378	<i>GhLOX-10A</i>	A08	873	9	99.040
	GH_A08G2379	<i>GhLOX-11A</i>	A08	871	9	98.522
	GH_A09G2358	<i>GhLOX-12A</i>	A09	873	8	99.683
	GH_A10G0553	<i>GhLOX-13A</i>	A10	919	8	104.110
	GH_A13G1284	<i>GhLOX-14A</i>	A13	490	5	55.933
	GH_A13G2024	<i>GhLOX-15A</i>	A13	190	3	22.018
	GH_D02G0353	<i>GhLOX-16D</i>	D02	877	9	99.558
	GH_D02G1659	<i>GhLOX-17D</i>	D02	912	9	103.657
	GH_D05G0687	<i>GhLOX-18D</i>	D05	904	9	103.133
	GH_D06G2344	<i>GhLOX-19D</i>	D06	655	6	74.981
	GH_D06G2345	<i>GhLOX-20D</i>	D06	886	7	100.530
	GH_D07G2167	<i>GhLOX-21D</i>	D07	852	9	97.523
	GH_D08G0545	<i>GhLOX-22D</i>	D08	951	9	110.689
	GH_D08G2382	<i>GhLOX-23D</i>	D08	873	9	99.160
	GH_D08G2383	<i>GhLOX-24D</i>	D08	864	9	97.550
	GH_D09G0867	<i>GhLOX-25D</i>	D09	911	9	102.854
	GH_D09G2298	<i>GhLOX-26D</i>	D09	873	8	99.809
	GH_D10G0585	<i>GhLOX-27D</i>	D10	919	8	104.153
	GH_D13G1213	<i>GhLOX-28D</i>	D13	865	9	98.655
	GH_D13G1984	<i>GhLOX-29D</i>	D13	356	5	40.187
	GH_scaffold2396_objG0001	<i>GhLOX-30</i>	scaffold2396_obj	912	9	103.461
	GB_A02G0320	<i>GbLOX-01A</i>	A02	877	9	99.712
	GB_A03G1558	<i>GbLOX-02A</i>	A03	912	9	103.462
	GB_A04G0521	<i>GbLOX-03A</i>	A04	300	5	34.666
	GB_A05G0691	<i>GbLOX-04A</i>	A05	911	9	103.953
	GB_A06G2338	<i>GbLOX-05A</i>	A06	872	8	99.834
	GB_A06G2339	<i>GbLOX-06A</i>	A06	538	6	61.800
	GB_A07G2318	<i>GbLOX-07A</i>	A07	855	9	97.758
	GB_A08G0541	<i>GbLOX-08A</i>	A08	957	9	111.251
	GB_A08G0870	<i>GbLOX-09A</i>	A08	424	6	48.831
	GB_A08G2487	<i>GbLOX-10A</i>	A08	717	9	82.990
	GB_A08G2488	<i>GbLOX-11A</i>	A08	873	9	99.060
	GB_A08G2489	<i>GbLOX-12A</i>	A08	872	9	98.620
	GB_A09G1020	<i>GbLOX-13A</i>	A09	648	11	73.459
	GB_A09G2461	<i>GbLOX-14A</i>	A09	873	8	99.653
	GB_A10G0555	<i>GbLOX-15A</i>	A10	919	8	104.076
	GB_A13G1388	<i>GbLOX-16A</i>	A13	865	9	98.788
	GB_A13G2154	<i>GbLOX-17A</i>	A13	293	4	33.293
	GB_D02G0361	<i>GbLOX-18D</i>	D02	877	9	99.710
	GB_D02G1717	<i>GbLOX-19D</i>	D02	912	9	103.680
	GB_D05G0683	<i>GbLOX-20D</i>	D05	904	9	103.133
	GB_D06G2437	<i>GbLOX-21D</i>	D06	844	8	96.385
	GB_D06G2438	<i>GbLOX-22D</i>	D06	886	7	100.591

表2(续)

棉花品种	基因ID	基因名称	染色体	氨基酸序列长度/aa	外显子数量/个	相对分子质量/10 ³
	GB_D07G2282	GbLOX-23D	D07	852	9	97.524
	GB_D08G0555	GbLOX-24D	D08	783	10	91.485
	GB_D08G0557	GbLOX-25D	D08	949	10	110.798
	GB_D08G0558	GbLOX-26D	D08	951	9	110.737
	GB_D08G0870	GbLOX-27D	D08	371	5	42.651
	GB_D08G2479	GbLOX-28D	D08	897	8	101.996
	GB_D08G2480	GbLOX-29D	D08	858	9	96.970
	GB_D09G0871	GbLOX-30D	D09	911	9	102.932
	GB_D09G2306	GbLOX-31D	D09	873	8	99.749
	GB_D10G0577	GbLOX-32D	D10	919	8	104.123
	GB_D13G1299	GbLOX-33D	D13	865	9	98.654

2.2 系统发育进化树分析

为了解LOX基因家族成员的系统进化关系，分别获取拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和4个棉花品种的LOX基因编码的蛋白序列，利用MEGA构建系统

进化树，并通过Evolview网站对其进行可视化展示。进化分析结果(图1)表明，4个棉花品种和拟南芥的LOX基因家族成员共分为6个亚家族，分别为LOX-1、LOX-2、LOX-3、LOX-4、LOX-5、LOX-6。这6个亚家族分别包含24、21、19、11、8、25个LOX基因。

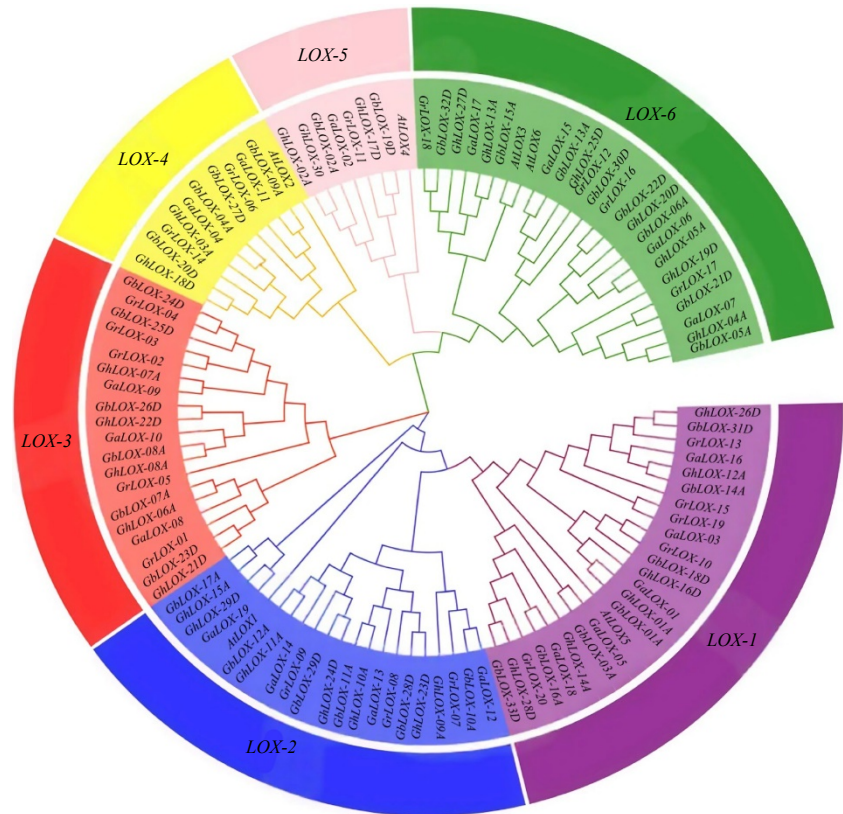


图1 陆地棉、海岛棉、亚洲棉、雷蒙德氏棉和拟南芥LOX基因家族成员的系统进化树

Fig.1 Evolutionary tree of LOX family in *G. hirsutum*, *G. barbadense*, *G. arboreum*, *G. raimondii* and *Arabidopsis thaliana*

2.3 棉花LOX基因家族成员的蛋白保守基序和基因结构分析

为了进一步研究4个棉花品种的LOX基因家族成员的蛋白保守基序和基因结构，利用MEME在线网站和TBtools软件对其进行分析，结果(图2)显示，

共鉴定出10个保守基序(motif1~motif10)，每个LOX基因的保守基序数量为2~10个。LOX-1~LOX-6亚家族中，大部分基因的保守基序是完全一致的，均有10个motif；LOX-1、LOX-2和LOX-4亚家族中有少数基因的motif数量较少，可能是因为在进化过程中

发生了缺失。棉花 LOX -4亚家族由10个基因组成, 分别有10、2、9、7个保守基序。根据基因结构可视化分析结果可知, LOX 基因外显子数量为1~12个,

多数基因包含9个外显子、8个内含子。综上可知, 棉花 LOX 基因亚家族的绝大多数成员具有相似的基因结构, 少数基因可能在进化过程中出现了缺失。



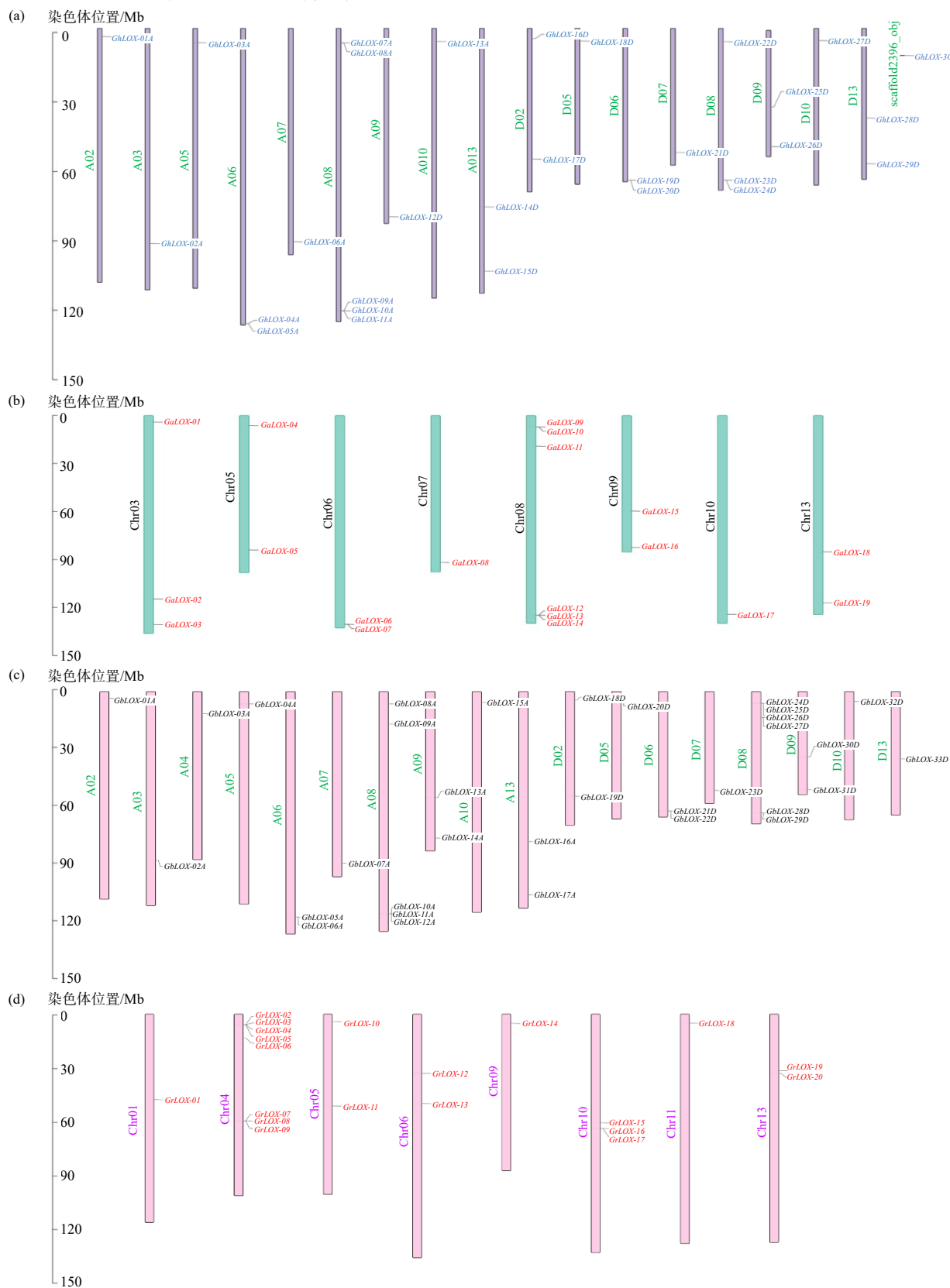
图2 棉花 LOX 基因家族成员的基因结构、保守基序分析

Fig. 2 Gene structure and motif analysis of LOX family members in cotton

2.4 棉花 *LOX* 基因染色体定位分析

对 *LOX* 基因家族成员的染色体分布进行可视化

分析, 结果显示(图3): 有 30 个 *GhLOX* 基因不均匀地分布在 A02、A03、A05 等 18 条染色体上, 19 个 *GaLOX*



(a) 陆地棉; (b) 亚洲棉; (c) 海岛棉; (d) 雷蒙德氏棉

图3 *LOX* 基因在陆地棉、亚洲棉、海岛棉和雷蒙德氏棉染色体上的分布

Fig. 3 Chromosome location of *LOX* genes in *G. hirsutum*, *G. barbadense*, *G. arboreum* and *G. raimondii*

基因不均匀地分布在Chr03、Chr05、Chr06等8条染色体上, 33个*GbLOX*基因不均匀地分布在A02、A03、A04等18条染色体上, 有20个*GrLOX*基因不均匀地分布在Chr01、Chr04、Chr05等8条染色体上。其中, 亚洲棉Chr08和陆地棉D08染色体有6个*LOX*基因, 雷蒙德氏棉Chr04有8个*LOX*基因(*GrLOX-02*, *GrLOX-03*, *GrLOX-04*, *GrLOX-05*, *GrLOX-06*, *GrLOX-07*, *GrLOX-08*, *GrLOX-09*)。在陆地棉中, 共有30个*GhLOX*基因, 其中15个分布在A亚基因组, 14个分布在D亚基因组。

2.5 顺式作用元件分析结果

对*LOX*基因启动子区的顺式作用元件进行分析, 结果(图4)表明, 海岛棉中所有*LOX*基因成员都含有与逆境胁迫相关的调控元件, 包括抵御胁迫响应、脱落酸响应、茉莉酸响应、赤霉素响应、水杨酸响应、生长素响应、低温响应以及伤口响应元件。陆地棉有6个基因(*GhLOX-24D*、*GhLOX-25D*、*GhLOX-01A*、*GhLOX-02A*、*GhLOX-03A*、*GhLOX-04A*)含有响应逆境的调控元件。以上结果说明棉花*LOX*家族可能通过调节激素水平而抵御逆境胁迫。

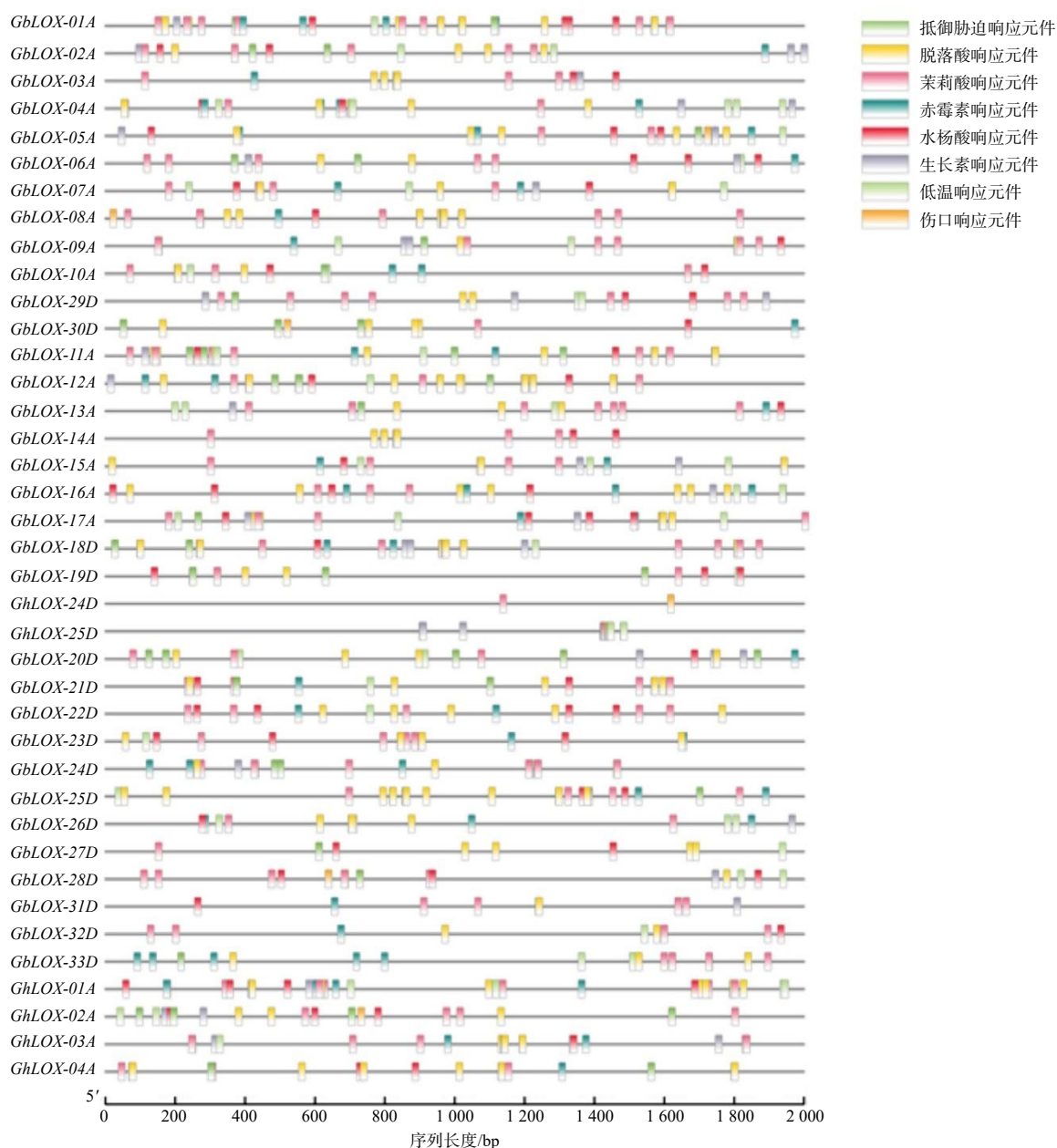


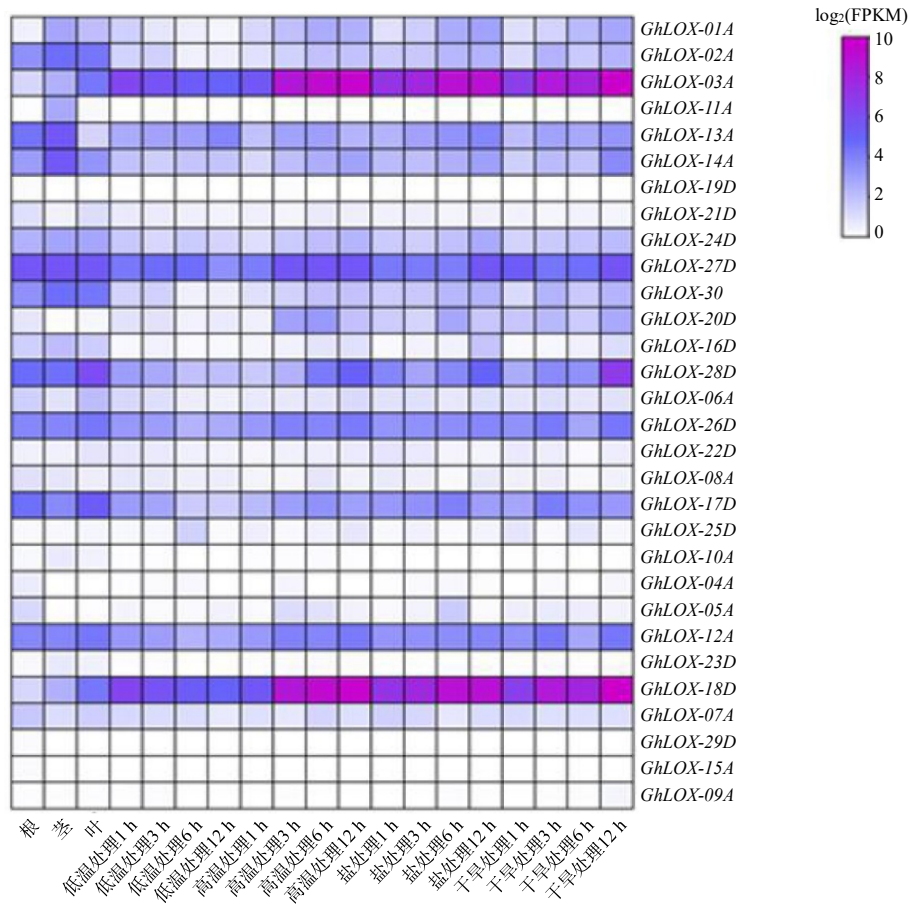
图4 棉花*LOX*基因家族成员的顺式作用元件

Fig. 4 Cis-acting elements of cotton *LOX* family members

2.6 陆地棉 GhLOX 基因家族在不同组织及不同非生物胁迫下的表达

为了研究 GhLOX 基因家族成员在陆地棉的生长发育过程中及其面对非生物胁迫时所发挥的作用,对其表达模式进行可视化分析。结果(图5)显示, GhLOX-02A、GhLOX-03A、GhLOX-13A、GhLOX-14A、GhLOX-24D、GhLOX-27D、GhLOX-30、GhLOX-28、GhLOX-26D、GhLOX-17D、GhLOX-12A、GhLOX-

18D在根、茎、叶中的相对表达量较高,表明这些基因可能在陆地棉根、茎和叶中发挥作用。GhLOX-11A、GhLOX-19D、GhLOX-21D、GhLOX-10A、GhLOX-04A、GhLOX-23D、GhLOX-29D、GhLOX-15A、GhLOX-09A在冷、热、盐、干旱(PEG)胁迫下表达相对较低。GhLOX-03A、GhLOX-18D在冷、热、盐、干旱胁迫后的相对表达量较高,推测二者可能是响应逆境胁迫的关键基因。



FPKM为衡量基因相对表达量的指标, FPKM越大, 说明基因的相对表达量越高。

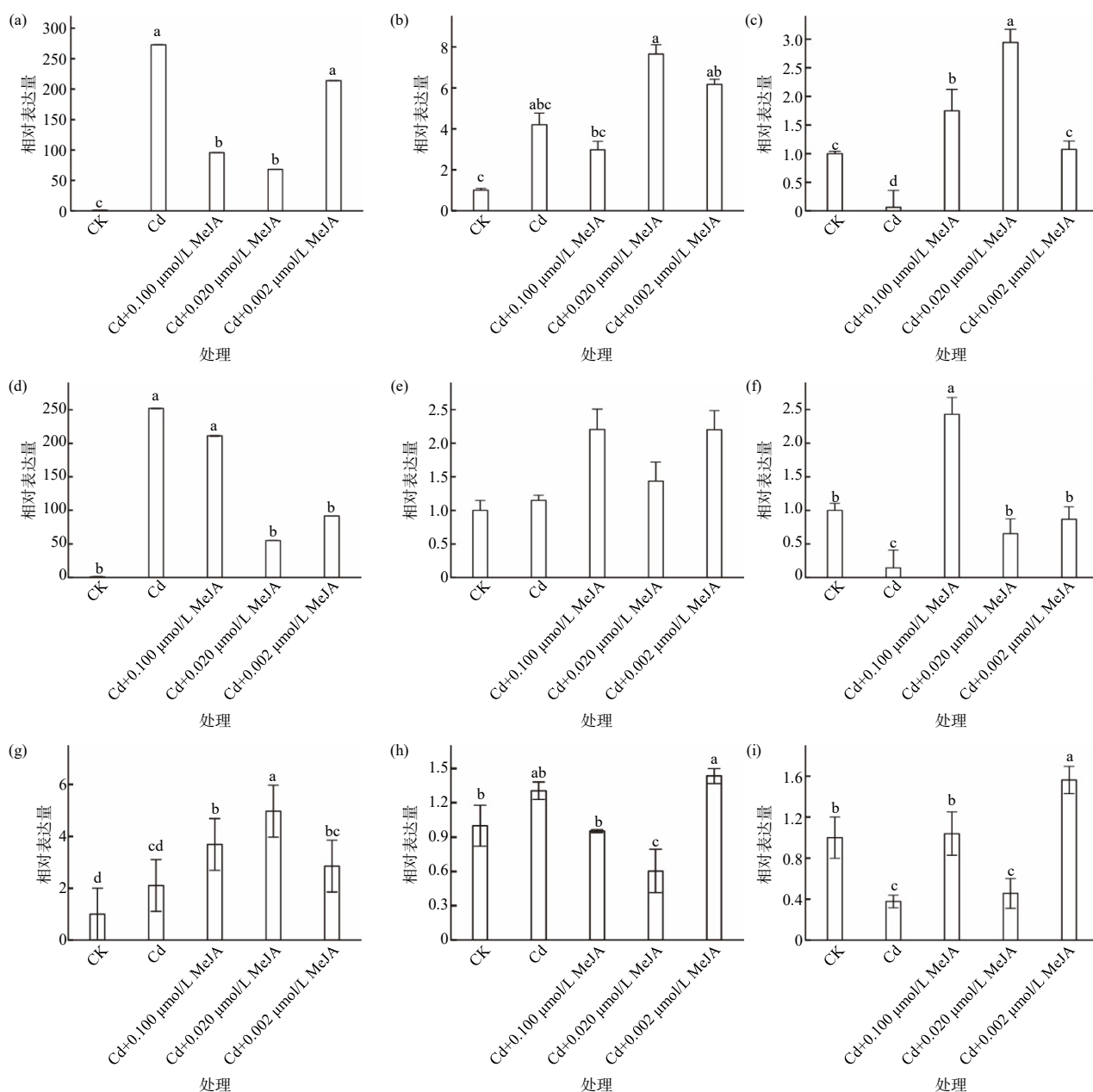
图5 LOX 基因的表达模式

Fig. 5 Expression patterns among members of LOX genes

2.7 陆地棉同源基因在镉胁迫和添加外源茉莉酸甲酯条件下的表达

为了研究 GhLOX 同源基因对镉胁迫和外源 MeJA 的响应,选取了三叶一心期的长势一致的棉花幼苗,处理之后分别提取根、茎、叶的 RNA,进行实时荧光定量 PCR 实验,对其表达量进行检测。结果(图6)表明, GhLOX-20D、GhLOX-22D 和 GhLOX-27D 均响应 Cd 和 MeJA 胁迫。GhLOX-20D 和 GhLOX-22D 均在 Cd 处理后的根和叶组织中出现差

异表达。根组织中的 GhLOX-27D 在 MeJA 处理后出现上调表达,其中, 0.020 $\mu\text{mol/L}$ MeJA 处理时的相对表达量最高;在茎和叶组织中, GhLOX-27D 均出现差异表达,且均在 0.020 $\mu\text{mol/L}$ MeJA 处理时的相对表达量最低。以上结果表明, GhLOX 同源基因响应 MeJA 和 Cd 胁迫, GhLOX 的同源基因对 Cd+0.020 $\mu\text{mol/L}$ MeJA 处理最敏感,说明 GhLOX 同源基因响应镉胁迫,且 MeJA 可能在上述基因响应镉胁迫中发挥了关键作用,其可能是通过茉莉酸的合成响应棉花镉胁迫。



不同小写字母表示同一组织、不同处理间的差异有统计学意义($P < 0.05$)。

(a) 根, *GhLOX-20D*; (b) 茎, *GhLOX-20D*; (c) 叶, *GhLOX-20D*; (d) 根, *GhLOX-22D*; (e) 茎, *GhLOX-22D*; (f) 叶, *GhLOX-22D*;
(g) 根, *GhLOX-27D*; (h) 茎, *GhLOX-27D*; (i) 叶, *GhLOX-27D*

图6 镉胁迫及MeJA处理下*GhLOX*的相对表达量

Fig. 6 Relative expression levels of *GhLOX* under Cd stress and MeJA treatment

3 讨论

本研究利用生物信息学技术在海岛棉、陆地棉、雷蒙德氏棉和亚洲棉中分别鉴定到33个、30个、20个和19个*LOX*基因家族成员,系统进化分析结果表明其可分为6个亚家族,各亚家族成员之间的基因结构具有较高的相似性,少数基因的保守基序可能在进化过程中出现了缺失,说明该基因家族整体上在进化过程中是相对保守的。海岛棉及部分陆地

棉的*LOX*基因家族成员含有响应逆境胁迫的顺式作用调控元件,仅部分*LOX*基因对已知的逆境胁迫相关顺式作用元件具有特异性结合能力。上述结果提示,*LOX*基因家族成员中可能存在部分尚未被发现的顺式作用元件,这与文献[18]中的结果相符。已有研究表明,*LOX*在合成JA过程中发挥重要作用,参与调节植物生长发育。例如,在马铃薯中,*StLOX*基因参与对盐胁迫和干旱胁迫的响应^[10];在拟南芥中,*AtLOX3*在盐胁迫下被诱导表达且外源MeJA减

弱了盐胁迫的伤害^[19]。本研究结果显示陆地棉 *GhLOX* 响应镉胁迫且外源 MeJA 能够缓解镉胁迫的危害, 这与文献[14–20]中的结果相符。

本研究结果显示, 在 Cd+外源 MeJA 处理下, 棉花 *GhLOX-20D*、*GhLOX-22D*、*GhLOX-27D* 均出现差异表达, 尤其是 *GhLOX-20D*、*GhLOX-22D* 在根、茎、叶中的相对表达量均较高, 推测 *GhLOX-20D*、*GhLOX-22D*、*GhLOX-27D* 可能在调控 MeJA 缓解 Cd 胁迫的过程中起着重要作用。目前, 关于植物外源 MeJA 的研究已有较多报道。叶面施加 MeJA 可以降低小麦幼苗根系的镉吸收量, 降低植株的镉含量, 促进活性态镉向惰性镉的转化, 缓解镉毒害^[20]。MeJA 对叶绿体结构具有保护作用^[21], 能提高 α -亚麻酸(ALA)含量并降低植株 Cd 含量^[22]。MeJA 可能通过增加番茄植株的抗氧化能力、将 Cd 隔离在细胞壁内以及抑制 Cd 跨膜吸收来缓解 Cd 对番茄植株的毒性^[23]。MeJA 与 JA 的生物合成途径以及茉莉酸信号通路有关, 外源 MeJA 对植物镉胁迫有缓解作用。低浓度的外源 MeJA 通过降低渗透调节物质的含量, 诱导增强抗氧化酶活性, 促进波斯菊种子萌发和幼苗的生长, 进而提高波斯菊幼苗的耐镉性能^[24]。外源 MeJA 降低了植物的 Cd 含量, 且根、茎、叶、籽粒中的 Cd 含量依次降低^[25]。在本研究中, qRT-PCR 分析结果显示, MeJA 处理诱导了 *GhLOX-20D*、*GhLOX-22D*、*GhLOX-27D* 的表达, 推测这与 LOX 基因参与 JA 的生物合成有关。低浓度的 MeJA 对种子萌发和活性氧代谢有抑制作用, 可有效缓解 Cd 胁迫对大豆幼苗的伤害^[26], 减轻 Cd 对辣椒幼苗的伤害^[27], 降低龙葵茎和根中的 Cd 转运量^[28]。本研究中, 外源添加 0.020 $\mu\text{mol/L}$ MeJA 时, 棉花对 Cd 的响应更敏感, 说明适宜浓度的外源 MeJA 可以缓解 Cd 胁迫。

4 结论

本研究对海岛棉、陆地棉、雷蒙德氏棉和亚洲棉这 4 个棉花品种的全基因组数据进行生物学信息分析, 共鉴定出了 102 个 LOX 基因, 其基因序列均具有较高的保守性, 其中, 陆地棉 *GhLOX-03A* 和 *GhLOX-18D* 基因在冷、热、盐、干旱(PEG)胁迫下均有较高表达。顺式作用元件分析结果显示, 棉花 LOX 基因家族含有与激素相关的非生物逆境胁迫元件。在不同组织(根、茎、叶)中, Cd 胁迫及 Cd 胁迫+外源

MeJA 处理下 *GhLOX-20D*、*GhLOX-22D*、*GhLOX-27D* 的表达情况存在差异, 且 Cd+0.020 $\mu\text{mol/L}$ MeJA 时的差异表达最明显, 说明 MeJA 可能在 *GhLOX-20D*、*GhLOX-22D*、*GhLOX-27D* 响应镉胁迫过程中发挥了关键作用。

参考文献:

- [1] 陈世宝, 王萌, 李杉杉, 等. 中国农田土壤重金属污染防治现状与问题思考[J]. 地学前缘, 2019, 26(6): 35–41.
- [2] SONG Y, JIN L, WANG X J. Cadmium absorption and transportation pathways in plants[J]. International Journal of Phytoremediation, 2017, 19(2): 133–141.
- [3] RAMANAS, TRIPATHI A K, KUMAR A, et al. Potential of cotton for remediation of Cd-contaminated soils[J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2021, 193(4): 186.
- [4] LI L, YAN X Y, LI J, et al. Metabolome and transcriptome association analysis revealed key factors involved in melatonin mediated cadmium-stress tolerance in cotton[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 995205.
- [5] 刘连涛, 陈静, 孙红春, 等. 镉胁迫对棉花幼苗生长效应及不同器官镉积累的影响[J]. 棉花学报, 2014, 26(5): 466–470.
- [6] NAGELS DURAND A, PAUWELS L, GOOSSENS A. The ubiquitin system and jasmonate signaling[J]. Plants, 2016, 5(1): 6.
- [7] CALDELARI D, WANG G G, FARMER E E, et al. *Arabidopsis lox3 lox4* double mutants are male sterile and defective in global proliferative arrest[J]. Plant Molecular Biology, 2011, 75(1): 25–33.
- [8] 曹嵩晓, 张冲, 汤雨凡, 等. 植物脂氧合酶蛋白特性及其在果实成熟衰老和逆境胁迫中的作用[J]. 植物生理学报, 2014, 50(8): 1096–1108.
- [9] XU L, ZHU X X, YI F Y, et al. A genome-wide study of the lipoyxygenase gene families in *Medicago truncatula* and *Medicago sativa* reveals that MtLOX24 participates in the methyl jasmonate response[J]. BMC Genomics, 2024, 25(1): 195.
- [10] ZHU J Y, CHEN L M, LI Z T, et al. Genome-wide identification of LOX gene family and its expression analysis under abiotic stress in potato(*Solanum tuberosum* L.)[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(6): 3487.
- [11] 张晶. “中黄13”脂氧合酶(Lox)基因家族的鉴定及功能分析[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2023.
- [12] 赵国富, 严亚琴, 汪精磊, 等. 茄子脂氧合酶家族基因全基因组鉴定与表达分析[J]. 浙江农业学报, 2021, 33(6): 1025–1034.

- [13] KERAMAT B, KALANTARI K M, ARVIN M J. Effects of methyl jasmonate treatment on alleviation of cadmium damages in soybean[J]. *Journal of Plant Nutrition*, 2010, 33(7): 1016–1025.
- [14] SHABAN M, AHMED M M, SUN H, et al. Genome-wide identification of lipoxygenase gene family in cotton and functional characterization in response to abiotic stresses[J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 599.
- [15] WANG F B, WAN C Z, WU W Y, et al. Exogenous methyl jasmonate(MeJA) enhances the tolerance to cadmium(Cd) stress of okra(*Abelmoschus esculentus* L.) plants[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture(PCTOC)*, 2023, 155(3): 907–922.
- [16] WEI T, LI X, YASHIR N, et al. Effect of exogenous silicon and methyl jasmonate on the alleviation of cadmium-induced phytotoxicity in tomato plants[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021, 28(37): 51854–51864.
- [17] HU Y, CHEN J D, FANG L, et al. *Gossypium barbadense* and *Gossypium hirsutum* genomes provide insights into the origin and evolution of allotetraploid cotton[J]. *Nature Genetics*, 2019, 51(4): 739–748.
- [18] UPADHYAY R K, HANDA A K, MATTOO A K. Transcript abundance patterns of 9- and 13-lipoxygenase subfamily gene members in response to abiotic stresses(heat, cold, drought or salt) in tomato(*Solanum lycopersicum* L.) highlights member-specific dynamics relevant to each stress[J]. *Genes*, 2019, 10(9): 683.
- [19] DING H, LAI J B, WU Q, et al. Jasmonate complements the function of *Arabidopsis* lipoxygenase3 in salinity stress response[J]. *Plant Science*, 2016, 244: 1–7.
- [20] MANZOOR H, MEHWISH, BUKHATS, et al. Methyl jasmonate alleviated the adverse effects of cadmium stress in pea(*Pisum sativum* L.): a nexus of photosystem II activity and dynamics of redox balance[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 860664.
- [21] PER T S, KHAN N A, MASOOD A, et al. Methyl jasmonate alleviates cadmium-induced photosynthetic damages through increased S-assimilation and glutathione production in mustard[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1933.
- [22] REPKINAN, MURZIN A S, VORONIN V P, et al. Does methyl jasmonate effectively protect plants under heavy metal contamination? Fatty acid content in wheat leaves exposed to cadmium with or without exogenous methyl jasmonate application[J]. *Biomolecules*, 2023, 13(4): 582.
- [23] WEI T, SUN Y N, LI H, et al. Methyl jasmonate triggers cadmium detoxification in tomato plants *via* depressing Cd^{2+} influx, altering the subcellular distribution, and chemical forms of cadmium[J]. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2022, 233(11): 460.
- [24] 鲜靖苹. 外源MeJA对镉胁迫下波斯菊生长及抗氧化系统的影响[J]. *西北植物学报*, 2019, 39(9): 1627–1635.
- [25] KANU A S, ASHRAF U, MANSARAY L R, et al. Exogenous methyl jasmonate application improved physio-biochemical attributes, yield, quality, and cadmium tolerance in fragrant rice[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 849477.
- [26] 崔晓霞, 石晨乐, 刘学勤. 外源茉莉酸甲酯对镉胁迫下大豆种子萌发及幼苗生理的影响[J]. *中国土壤与肥料*, 2024(12): 204–210.
- [27] YAN Z Z, CHEN J, LI X Z. Methyl jasmonate as modulator of Cd toxicity in *Capsicum frutescens* var. fasciculatum seedlings[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2013, 98: 203–209.
- [28] YAN Z, ZHANG W, CHEN J, et al. Methyl jasmonate alleviates cadmium toxicity in *Solanum nigrum* by regulating metal uptake and antioxidative capacity[J]. *Biologia Plantarum*, 2015, 59(2): 373–381.

责任编辑: 伍锦花

英文编辑: 张承平