

主持人: 张洪亮, 徐 冉

Open Access

# 木薯茉莉酸氧化酶 *JOXs* 基因家族的 鉴定及表达模式分析

胡文成<sup>1,2#</sup>, 朱寿松<sup>1,2</sup>, 王艺璇<sup>1,2</sup>, 阳 达<sup>1,2</sup>, 陈银华<sup>1,2\*</sup>

(1. 海南大学 南繁学院/三亚南繁研究院, 海南 三亚 572025 中国; 2. 海南大学 热带农林学院, 海南 儋州 571737 中国)

**摘要:** 为了探究茉莉酸氧化酶 *JOX* 家族基因在木薯 (*Manihot esculenta*) 生长发育及抵抗逆境胁迫中的作用, 本研究通过生物信息学手段在木薯全基因组中对 *MeJOXs* 家族成员进行鉴定, 并对其基因结构、启动子顺式作用元件、进化关系、蛋白理化性质及相关表达模式等进行了分析。结果表明, 木薯基因组中共有 4 个 *MeJOXs* 家族基因, 每个成员间具有相似的基因结构、保守基序及蛋白结构域, 成员间至少具有 68% 的蛋白同源性, *MeJOX1* 与 *MeJOX4*、*MeJOX2* 与 *MeJOX3* 两两成员间最为相似。启动子顺式作用元件分析表明, *MeJOXs* 基因启动子区含有大量光照响应元件, 此外每个成员还含有数量不等的激素响应等元件; 系统进化分析表明, *MeJOXs* 基因与双子叶植物的 *JOXs* 基因亲缘关系更近; 转录组分析结果表明, 除 *MeJOX2* 基因在不同木薯组织中几乎不表达外, 其余基因在茎、叶、叶中脉、须根等组织中均有不同程度的表达; *MeJOXs* 在不同木薯种质中均受 MeJA 诱导表达, 不同种质中诱导表达程度不同, *MeJOX3* 受诱导表达最明显; *Xpm* 病原菌侵染下 *MeJOX1/3/4* 均能及时响应, 但响应模式存在明显不同, *MeJOX1/3* 表达上调, 而 *MeJOX4* 呈下调表达趋势, *MeJOX2* 几乎不响应。

**关键词:** 木薯; 茉莉酸氧化酶 *JOXs*; 基因家族; 表达分析

中图分类号: S565.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-7054(2026)01-0029-10

胡文成, 朱寿松, 王艺璇, 等. 木薯茉莉酸氧化酶 *JOXs* 基因家族的鉴定及表达模式分析[J]. 热带生物学报 (中英文), 2026, 17(1): 29–38. DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20240199 CSTR: 32425.14.j.cnki.rdswwb.20240199

茉莉酸 (jasmonic acid, JA) 是植物体内重要的内源激素之一, 其与衍生物茉莉酸甲酯 MeJA、异亮氨酸偶联物 JA-Ile 等统称为茉莉酸类物质 (jasmonates, JAs)。JAs 在植物生长发育及抵御昆虫、食草动物取食、坏死性病原菌侵染等生物胁迫及干旱、盐害等非生物胁迫中发挥重要作用<sup>[1-2]</sup>。健康植株中 JAs 含量很少, JA 应答基因被 JA 信号转导关键阻遏物 JAZ (jasmonate ZIM domain) 抑制。一旦植物受伤或遭遇生物非生物胁迫时, JA 生物合成增加, 进而形成 JA-Ile 等活性形式, COI1 (coronatine-insensitive 1) 受体复合物会感知 JA-Ile 等并促进 JAZ 的泛素化降解, 缓解对下游相关转录因子的抑制, 最终启动 JA 应答基因的表达。

随着 JA 含量不断增加, *JAZ* 基因的表达也会逐渐被 JA 激活从而导致 JA 应答基因再次被抑制。JAs 的持续积累会抑制植物生长, 因而, 及时进行 JAs 的分解代谢, 对平衡植物生长发育与防御反应过程显得尤为重要<sup>[3-4]</sup>。植物体内 JA-Ile 的含量直接影响 JA 信号的强度, 控制 JA-Ile 的丰度和动态对于正确调节 JA 响应至关重要。JA-Ile 的分解代谢主要通过  $\omega$  氧化和解偶联 2 种途径实现, 前者通过内质网定位的细胞色素 P450 氧化酶 CYP94B1/B3 将 JA-Ile 羟基化成 12-OH-JA-Ile, 进而通过 CYP94C1 氧化 12-OH-JA-Ile 形成 12COOH-JA-Ile<sup>[5-6]</sup>; 后者依赖于酰胺水解酶 IAR3 和 ILL6 裂解 JA-Ile 形成 JA, 同时也可作用于 12OH-JA-Ile 形成无活性



收稿日期: 2024-12-25

修回日期: 2025-01-18

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32260468); 农业部国家现代农业产业技术体系 (CARS-11-hncyh)

\*第一作者: 胡文成 (1999—), 女, 海南大学热带农林学院 2022 级硕士研究生。E-mail: huwencheng1999@163.com

\*通信作者: 陈银华 (1975—), 男, 教授。研究方向: 植物与微生物互作。E-mail: yhchen@hainanu.edu.cn

形式 12-OH-JA<sup>[7-8]</sup>。然而拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) *iar3/ill6* 基因双突变体依然可以检测到 12-OH-JA, 意味着必然存在其他途径可以产生 12-OH-JA<sup>[3]</sup>。

很长一段时间, 人们都未在植物体内发现 JA 是如何直接羟基化成 12-OH-JA 的。有意思的是, 来自稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*) 的单加氧酶 Abm 却可以直接将植物内源 JA 羟基化从而干扰水稻 (*Oryza sativa*) 免疫<sup>[9]</sup>。2017 年, 拟南芥茉莉酸氧化酶 (jasmonate-induced oxygenases, JOXs/ jasmonic acid oxidases, JAOs) JOXs 蛋白被发现具有直接羟基化 JA 形成 12-OH-JA 的酶活性<sup>[3,10]</sup>。2021 年, 首次报道了拟南芥 JOX2 与底物 JA、共底物 2-酮戊二酸 (2-oxoglutarate, 2OG) 和亚铁原子复合物的晶体结构, 分析并验证了 JOX2 结合 JA 的分子机制<sup>[11]</sup>。JOXs 蛋白属于植物基因组中第二大酶家族 2-酮戊二酸依赖型双加氧酶 2OGD (2-oxoglutarate-dependent dioxygenase) 基因家族 DOXC46 分支类蛋白, 绝大部分 2OGD 蛋白含有 DIOX-N (PF14226, Non-haem dioxygenases in morphine synthesis N-terminal) 和 2OG-Fe(II) (PF03171, 2OG-Fe(II) oxygenase) 结构域; DOXC 类蛋白是植物中最大、功能最多样的一类加氧酶, 参与植物激素如乙烯、赤霉素、生长素、水杨酸等合成或分解代谢过程, 其中 JOXs 蛋白直接参与茉莉酸分解代谢<sup>[3,12]</sup>。拟南芥 *AtJOX1/2/3/4* 基因显著受到 JA 诱导表达, *AtJOX1/2/4* 蛋白均能够单独羟基化 JA, 但 *AtJOX3* 的酶活性很弱; 4 种基因全突变体 *joxQ* 表现出 JA 信号通路升高相似的发育表型, 植物明显比野生型弱小, 但突变体中防御相关基因表达增加并且对坏死型病原真菌灰霉菌 (*Botrytis cinerea*) 和甘蓝夜蛾 (*Mamestra brassicae*) 幼虫抗性提高<sup>[3]</sup>。水稻中也存在类似的现象, *OsJOX4* 酶活性也很弱, 体外酶活实验几乎检测不到 12-OH-JA 产生, *joxs* 全基因突变体水稻生长弱小, 突变体中 JA 通路 Marker 基因的基础表达水平上升, 对 *M. oryzae* 稻瘟病菌的抗性提高<sup>[13]</sup>。渐狭叶烟草 (*Nicotiana attenuata*) 中 4 个 *JOX-like* 类基因分别沉默的植株中均检测到了不同含量的 12-OH-JA 产生, 但沉默 *JOX-like* 基因并不影响烟草生长表型, 这可能与 VIGS 基因沉默的效果和时效性有关, 同时沉默植株也增强了对斜纹夜蛾

(*Spodoptera litura*) 的抗性<sup>[14]</sup>。棉花 (*Gossypium hirsutum*) *GhJOX2* 基因在抗病品种棉花中表达量显著低于感病品种, *GhJOX2* 沉默植株对黄萎病具有更高抵抗力<sup>[15]</sup>。热胁迫会影响植物生长发育, 拟南芥 *AtJOX1/2/3/4* 和 *AtST2A* 磺基转移酶基因高温下表达增加, 共同促进 12HSO<sub>4</sub>-JA 形成从而降低具有生物活性茉莉酸盐的水平, 导致 JAZ 蛋白积累, 促进植物在较高的温度下生长<sup>[16]</sup>。以上这些研究结果表明, 植物 *JOXs* 基因参与 JA 信号通路的调控。

木薯 (*Manihot esculenta*) 属于大戟科 (Euphorbiaceae) 木薯属 (*Manihot*) 多年生直立灌木, 生产上多为一年生栽培品种, 与马铃薯 (*Solanum tuberosum*)、甘薯 (*Dioscorea esculenta*) 并称世界三大薯类作物<sup>[17]</sup>。木薯耐旱耐贫瘠, 粗生易长, 能广泛适应多种土壤及气候条件。木薯块根淀粉含量丰富 (占干物质含量 85% 以上), 可直接煮熟食用或加工成木薯制品; 木薯块根中支链淀粉含量也较其他薯类作物高, 因而也常用于造纸业、纺织业及生物燃料生产等, 是热区重要的粮食及经济作物<sup>[18-19]</sup>。自 19 世纪 20 年代引种以来, 中国华南地区已有 200 余年木薯种植历史, 随着木薯功能特性的不断深入开发利用, 中国对木薯需求量与日俱增, 已成为世界上最大的木薯进口国, 研究和发 展木薯产业符合中国生物能源与粮食生产和谐发展的需求。木薯生产中面临着多种环境及生物胁迫, 茉莉酸氧化酶 *JOXs* 基因家族成员已有报道在拟南芥、烟草等模式植物应对逆境胁迫中发挥重要作用, 但尚未在木薯中有相关报道。因此, 本研究旨在鉴定木薯的 *JOXs* 基因家族, 分析其基因结构、保守结构域、系统进化关系、组织表达特异性及其 JA 处理或病原菌感染下的表达模式, 为阐明木薯 *JOXs* 家族的基因功能及木薯抗逆品种选育奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 木薯 *MeJOXs* 家族成员鉴定

木薯 AM560-2 参考基因组 v8.1 及拟南芥 TAIR10 基因组下载于 Phytozome v13.0 数据库 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>), 通过以下 2 种方法综合确定木薯 *MeJOXs* 家族基因。第 1 种是通过 Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) 数据库下载 2-OGD 家族基因的隐马可夫模

型 PF03171, 使用 HMMER v3.3.2<sup>[20]</sup> 搜索木薯蛋白组 (E-value<10<sup>-5</sup>), 初步候选木薯 2OGD 家族成员; 随后通过 SMART(<https://smart.embl.de/>)、NCBI-CDD(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>)、Pfam 等数据库检验候选蛋白是否至少含有 1 个 2OG-Fe(II) 结构域; 根据拟南芥 2OGD 家族基因氨基酸序列<sup>[12]</sup>, 利用 MUSCLE v5.3<sup>[21]</sup> 软件进行木薯及拟南芥 2OGD 蛋白氨基酸多序列比对, trimAl v1.4.1<sup>[22]</sup> 修剪对齐序列, IQ-TREE v1.6.12<sup>[23]</sup> 最大似然法构建系统进化树; 依据拟南芥 *AtJOXs* 家族基因在进化树中位置筛选出木薯 *MeJOXs* 成员。第 2 种是利用拟南芥中已知的 4 个 *AtJOXs* 基因蛋白序列本地 BLAST(E-value<10<sup>-10</sup>) 搜索木薯蛋白组, 初步候选木薯 *JOXs* 蛋白, 进一步检验候选蛋白是否含有 DIOX-N 及 2OG-Fe(II) 结构域, 确定木薯 *MeJOXs* 家族成员。

**1.2 木薯 *MeJOXs* 蛋白理化特性分析** ExPASy 工具(<http://www.expasy.org/tools>) 计算 *MeJOXs* 蛋白的理化特性。DeepTMHMM-1.0 工具(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/DeepTMHMM-1.0/>) 分析 *MeJOXs* 跨膜结构域。WoLF PSORT 在线工具(<https://wolffpsort.hgc.jp/>)、Cell PLoc 2.0(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>) 等综合预测 *MeJOXs* 亚细胞定位。

**1.3 木薯 *MeJOXs* 家族基因系统进化分析** 以木薯、拟南芥、水稻、烟草 *JOX* 蛋白氨基酸序列为基础, 利用 MUSCLE v5.3 软件进行氨基酸多序列比对, 随后利用 MEGA 7.0 进行 NJ 法 (Neighbour-joining) 构建系统发育进化树, 设置 *p*-distance 模型, Bootstrap 值设为 1 000。

**1.4 木薯 *MeJOXs* 基因结构、启动子及蛋白保守基序分析** 根据木薯基因组注释文件中 *MeJOXs* 家族成员基因结构信息, TBtools- II v2.142 绘制基因结构<sup>[24]</sup>。利用 TBtools- II 从木薯基因组序列中提取 *MeJOXs* 家族成员转录起始位点上游 1 500 bp 序列, PlantCARE 在线工具(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 分析启动子区顺式作用元件<sup>[25]</sup>, TBtools- II 可视化顺式作用元件预测结果。利用 MEME Suite 5.5.7 在线工具(<http://meme-suite.org/>) 分析 *MeJOXs* 蛋白保守基序, motif 最大数量设为 10, 其余参数保持默认值<sup>[26]</sup>, TBtools- II 可视化 motif 预测结果。

**1.5 木薯转录组数据获取及 *MeJOXs* 基因表达模式分析** 木薯不同组织转录组数据 (TCODP0016) 下载于热带作物多组学数据库 (<https://ngdc.cncb.ac.cn/tcod>), MeJA 处理下木薯差异表达信息来源于文献记载<sup>[27]</sup>; 木薯细菌性枯萎病原菌菜豆黄单胞菌木薯萎蔫致病变种 *Xpm* (*Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*) 侵染木薯 ‘华南 8 号’ (‘SC8’) 种质转录组来自本实验室; 利用 TBtools- II 软件基于 TPM (transcripts per million) 值绘制基因表达热图, 基于 Log<sub>2</sub> FC (log<sub>2</sub> fold change) 值绘制差异表达基因热图。

## 2 结果与分析

**2.1 木薯 *MeJOXs* 基因家族鉴定与蛋白理化分析** 利用 HMMER 筛选木薯蛋白组, 剔除不含特定结构域的蛋白后共获得 165 条候选的木薯 *Me2OGDs* 家族成员, 随后与拟南芥 130 条 *At2OGDs* 成员构建最大似然树 (图 1)。由于拟南芥的 *AT1G68080.1* 基因虽然属于 *At2OGD* 家族但不属于任何一个亚族, 尚未确定分组, 且与其进化上最相近的木薯 *Manes.17G088400.1* 基因与同分支其余四个基因同源性极低, 因而根据拟南芥 *AtJOXs* 基因 (*JOX1*: *AT3G11180.1*, *JOX2*: *AT5G05600.1*, *JOX3*: *AT3G55970.1*, *JOX4*: *AT2G38240.1*) 所在分支最终初步候选了 4 条木薯 *MeJOXs* 基因家族成员。

进一步利用拟南芥 *AtJOXs* 蛋白氨基酸序列与木薯蛋白组进行本地 BLASTP 比对, 结合进化树分析结果共筛选出 4 条同时具有 2OGD 家族特有的 DIOX-N 和 2OG-Fe(II) 结构域的木薯 *JOXs* 蛋白 (图 2), 分别位于木薯第 7、8、9、10 号染色体, 根据在染色体上的位置依次命名为 *MeJOX1* ~ 4。氨基酸多序列比对表明木薯 *MeJOXs* 蛋白与拟南芥 *AtJOXs* 蛋白相似度均在 60% 左右, *MeJOXs* 蛋白成员间至少具有 68% 同源性, 其中 *MeJOX1* 与 *MeJOX4*、*MeJOX2* 与 *MeJOX3* 两两之间最为相似, 蛋白同源性分别达到 83%、88%。木薯 *MeJOXs* 蛋白的氨基酸数目基本一致, 除 *MeJOX3* 含有 362 个氨基酸外, 其余均含有 364 个氨基酸; 蛋白分子质量大小为 40.9 ~ 41.2 kDa; 理论等电点位于 5.68 ~ 6.96, 属于偏酸性蛋白; 蛋白亲水性平均系数均小于 0, 表明 4 个木薯 *MeJOXs* 蛋白均为亲水性蛋白。DeepTMHMM 均未预测到 *MeJOXs*

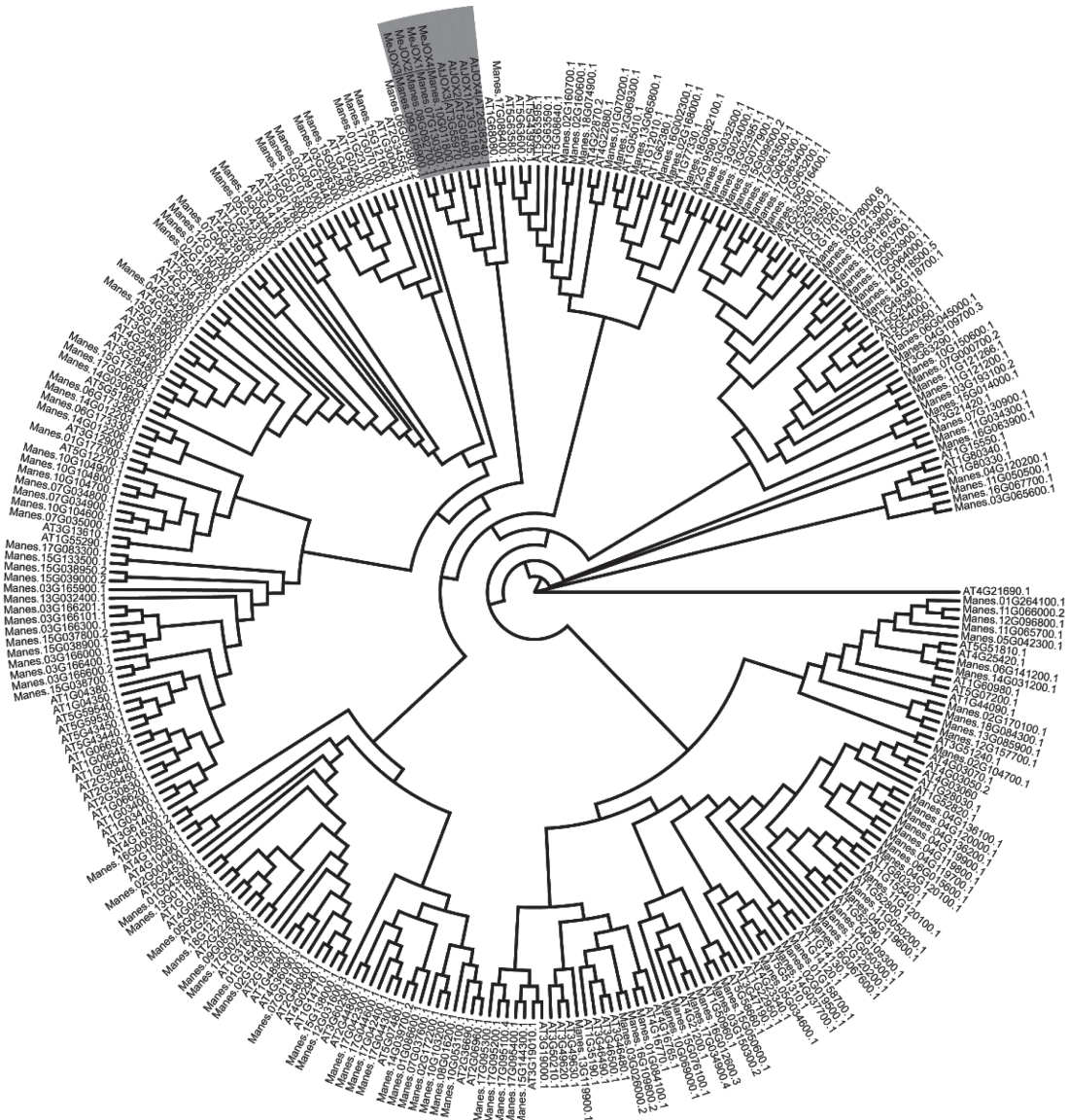


图1 木薯和拟南芥 20GDs 蛋白的系统进化分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of 20GD proteins identified in cassava and *Arabidopsis*

注: 灰色分支代表 AtJOXs 及 MeJOXs 亚族。

Note: The grey clade represents the AtJOXs and MeJOXs subfamily.

蛋白含有跨膜结构域,亚细胞定位预测结果表明所有家族成员均最有可能定位在细胞质中,可能在细胞质中发挥功能(表1)。

**2.2 木薯 MeJOXs 的系统进化分析** 为了研究 JOXs 基因在不同物种间的进化关系,利用 MUSCLE 对拟南芥 4 个 AtJOXs、水稻 4 个 OsJOXs、烟草 6 个 NtJOXs 及木薯 4 个 MeJOXs 进行氨基酸多序列比对,随后利用 MEGA7.0 通过 NJ 法构建系统发育树(图3)。结果表明,同为双子叶植物的 JOXs 基因之间亲缘关系更近,木薯、拟南芥、烟草的 JOXs 基因间亲缘关系较水稻更近,水稻 OsJOXs 基因单独聚成一个分支。此外,

木薯 MeJOXs 基因明显分为两个类群, MeJOX1/4 基因聚为一类, MeJOX2/3 基因聚为另一类,同一分支的 MeJOXs 基因间生物学功能可能类似; MeJOX1/4 基因与拟南芥 AtJOX1/2/3 亲缘关系较近,预示着可能存在相似的生物学功能。

**2.3 木薯 MeJOXs 基因结构、启动子及蛋白保守基序分析** 通过 MEME 对 MeJOXs 家族蛋白分析共发现 8 个保守的 motif 基序,每个成员间含有相似的 motif 分布(图 4-A)。通过对 MeJOXs 家族成员基因结构分析发现,各个成员均包含 5 个外显子,2 个内含子,其中 3 个外显子编码 CDS 区,其余 2 个为 5'UTR 和 3'UTR 非翻译区。此

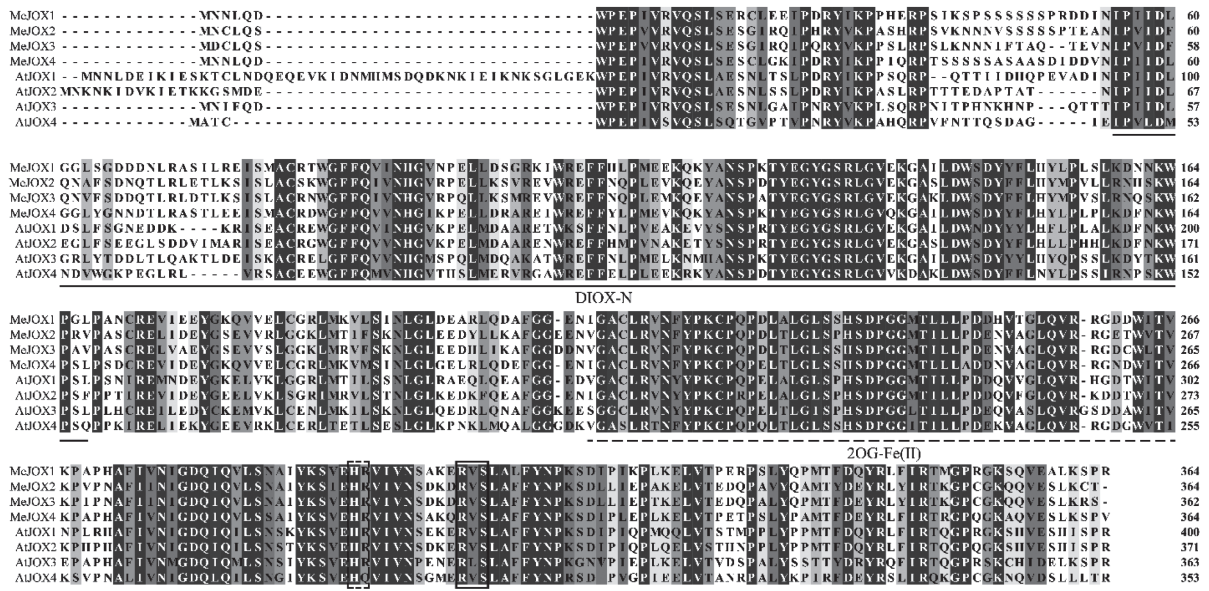


图 2 木薯 *MeJOXs* 蛋白与拟南芥 *AtJOXs* 蛋白的氨基酸多序列比对  
 Fig. 2 Multiple sequence alignment of *JOX* proteins in cassava and *Arabidopsis*

表 1 木薯 *MeJOXs* 家族蛋白的理化性质

Tab. 1 Physical and chemical properties of cassava *JOX* proteins

名称 Name	基因号 Gene ID	氨基酸数 Number of amino acid	分子量/kDa Molecular weight	理论等电点 Theoretical pI	亲水性平均系数 Grand average of hydrophaticity	亚细胞定位 Subcellular localization
<i>MeJOX1</i>	Manes.07G130300.1	364	41.2	6.47	-0.419	细胞质 Cytoplasm
<i>MeJOX2</i>	Manes.08G092700.1	364	41.2	6.41	-0.364	细胞质 Cytoplasm
<i>MeJOX3</i>	Manes.09G105900.1	362	41.1	6.96	-0.346	细胞质 Cytoplasm
<i>MeJOX4</i>	Manes.10G011800.1	364	40.9	5.68	-0.287	细胞质 Cytoplasm

外,进化树中聚到同一类群的 *MeJOXs* 基因显示出相似的基因结构, *MeJOX2* 和 *MeJOX3* 都表现出第 1 个内含子较长、第 2 个内含子较短的基因结构,而 *MeJOX1* 和 *MeJOX4* 第 1 个内含子较短,第 2 个内含子均较长(图 4-B)。

通过对 *MeJOXs* 家族成员转录起始位点上游 1 500 bp 左右启动子区分析发现其启动子区包含多种不同类型的顺式作用元件,除了常见的 CAAT-box、TATA-box 等核心顺式作用元件外,还包含多种功能响应元件,例如光响应、激素响应、低温响应、厌氧响应元件、MYB 结合位点等。每个 *MeJOXs* 成员启动子上分布最多的是光响应元件,包括 AT1-motif、GA-motif、Box4、AE-box、TCT-motif、G-box、ACE、I-box、TCCC-motif 等多种不同类型,表明 *MeJOXs* 可能响应昼夜光照变化;激素响应元件每个成员间分布不同,

*MeJOX1* 启动子含有 2 个 TGACG-motif、CGTCA-motif 类型的茉莉酸响应元件, *MeJOX2* 启动子含有 1 个 TCA-element 类型的水杨酸响应元件、4 个 ABRE 类型的脱落酸响应元件及 1 个 P-box 类型的赤霉素响应元件, *MeJOX3* 和 *MeJOX4* 分别含有 4 个及 1 个 ABRE 类型的脱落酸响应元件;除此之外各个成员还含有自身特有的一些响应元件,如 *MeJOX1* 启动子中含有 1 个 ARE 类型的厌氧响应元件, *MeJOX2* 启动子中含有 2 个 LTR 类型的低温响应元件、*MeJOX4* 启动子中含有 TC-rich repeat 类型防御与胁迫相关响应元件(图 4-C)。这些顺式作用元件的存在暗示 *MeJOXs* 基因可能在激素调节、环境胁迫等相应过程中发挥重要作用。

**2.4 木薯 *MeJOXs* 家族基因组织表达特异性分析**  
 为了探究木薯 *MeJOXs* 家族基因的表达是否存在

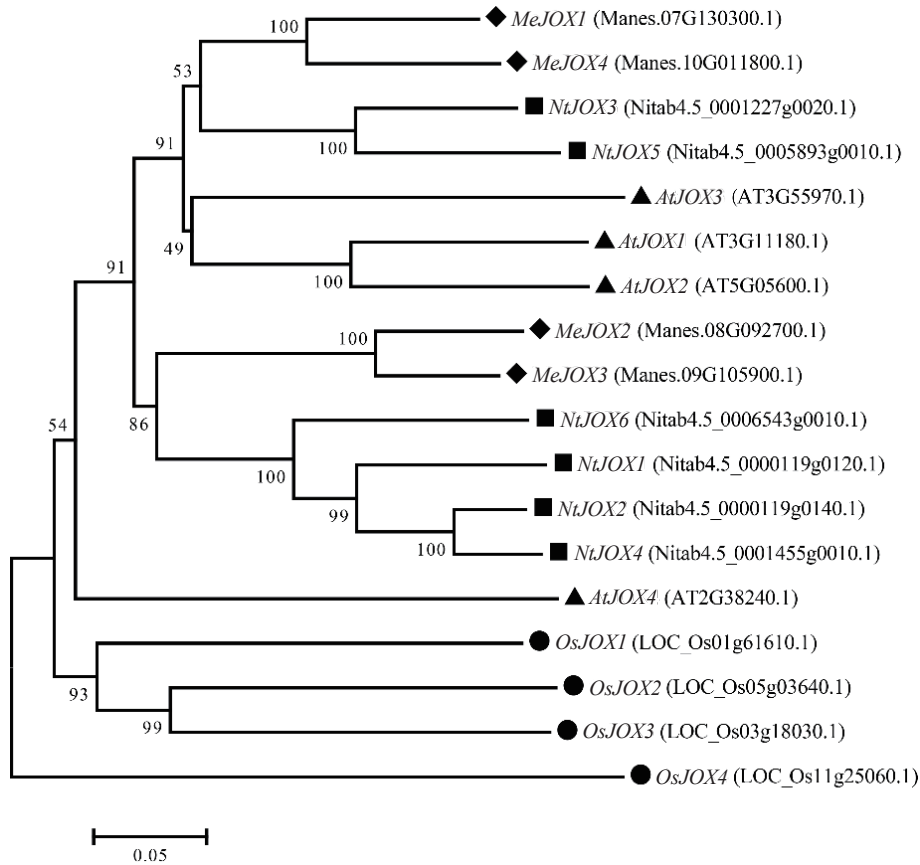


图 3 木薯、拟南芥、水稻和烟草 *JOXs* 基因系统进化树  
 Fig. 3 Phylogenetic tree of *JOX* genes in cassava, *Arabidopsis*, rice, and tobacco

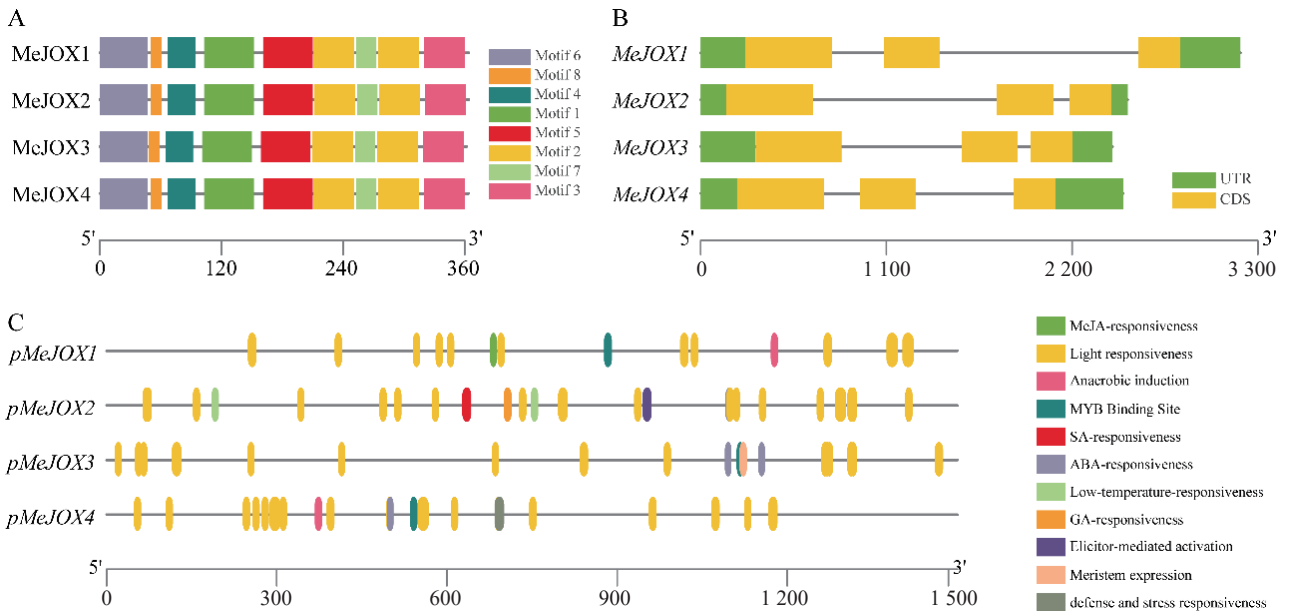


图 4 木薯 *MeJOXs* 成员基因结构、蛋白保守基序及启动子顺式作用元件分析  
 Fig. 4 Gene structures, conserved protein motifs and *cis*-acting elements in the promoter regions of cassava *MeJOXs* members

组织特异性, 本研究利用木薯 11 种不同组织部位 (块根、须根、根尖分生组织、茎、茎尖分生组织、叶片、叶中脉、叶柄、腋芽、体胚、脆性胚性愈伤组织) 的公开转录组对 *MeJOXs* 的表达量

TPM 值进行  $\log_2(\text{TPM}+1)$  对数转换后绘制热图 (图 5)。结果显示, 除 *MeJOX2* 在 11 种木薯组织中几乎均不表达外, 其余 3 个 *MeJOXs* 家族成员在不同组织中具有不同的表达模式, *MeJOX1* 在须

根中显著高表达, *MeJOX4* 在茎、叶片及叶中脉中均显著高表达, 在须根、叶柄及腋芽中也有表达, *MeJOX3* 在须根中有表达, 但不如前两者。以上结果表明, 在木薯不同组织生长发育过程中 *MeJOXs* 家族不同成员可能发挥不同的作用。

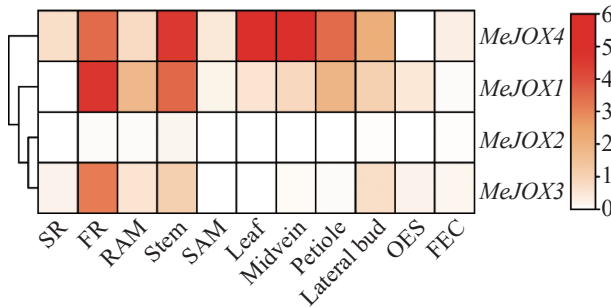


图 5 木薯 *MeJOXs* 家族基因在木薯不同组织中的表达热图  
Fig. 5 The expression heatmap of *MeJOXs* genes in different cassava tissues

注: SR, 块根; FR, 须根; RAM, 根尖分生组织; Stem, 茎; SAM, 茎尖分生组织; leaf, 叶片; Midvein, 叶中脉; Petiole, 叶柄; Lateral bud, 腋芽; OES, 体胚; FEC, 脆性胚性愈伤组织。

Note: SR, storage root; FR, fibrous root; RAM, root apical meristem; SAM, shoot apical meristem; OES, organized embryogenic structures; FEC, friable embryogenic callus.

**2.5 木薯 *MeJOXs* 家族基因 MeJA 及病原菌 *Xpm* 处理下的表达模式分析** 由于拟南芥 *AtJOXs* 基因均显著受到植物激素 MeJA 诱导表达, 因而利用 MeJA 处理木薯种质 ECU72、COL2246 的转录组分析了木薯 *MeJOXs* 家族基因在 MeJA 处理下

的差异表达情况。结果如图 6-A 所示, 在 MeJA 处理后木薯 *MeJOXs* 家族基因均能够响应且不同的时间点存在较为明显的差异表达 ( $|\log_2 FC| \geq 1$  且  $FDR \leq 0.05$ ), *MeJOX1/4* 层次聚类为一类, 在 2 种木薯种质中表达模式更为接近, 相对于 *MeJOX2/3*, 前两者在 2 种种质中 MeJA 处理 0.5 h 后即有明显上调表达趋势, 处理后 1~2 h 表达达到峰值, 随后表达逐渐下降; 后两者在 ECU72 种质中, MeJA 处理 0.5 h 后二者表达甚至稍呈下调趋势 ( $\log_2 FC = -1.2$  或  $-0.6$ ), 随后表达才逐渐上调, 2~4 h 达到峰值后逐渐降低, 但 *MeJOX2* 在 MeJA 处理 12 h 后表达水平还存在一个峰值起伏 ( $\log_2 FC = 5.0$ )。同一层次聚类分支的基因之间表达模式也存在一些区别, 例如 *MeJOX1* 在 COL2246 种质中受 MeJA 诱导表达幅度更大且更早达到峰值 (1 h,  $\log_2 FC = 7.0$ ), 而 *MeJOX4* 在 ECU72 种质中受诱导表达幅度更大且更早达到峰值 (1 h,  $\log_2 FC = 6.2$ )。除此之外, *MeJOX2/3* 虽然在对应种质中表达模式较为相似, 但 *MeJOX3* 在 MeJA 处理后多个时间点表达量上升幅度明显高于其他 3 个 *MeJOXs* 基因, 且在 COL2246 种质中 MeJA 处理 4 h 后表达受诱导最为明显 ( $\log_2 FC = 11.8$ )。以上结果说明, 木薯 *MeJOXs* 家族基因受植物激素 JA 诱导表达。

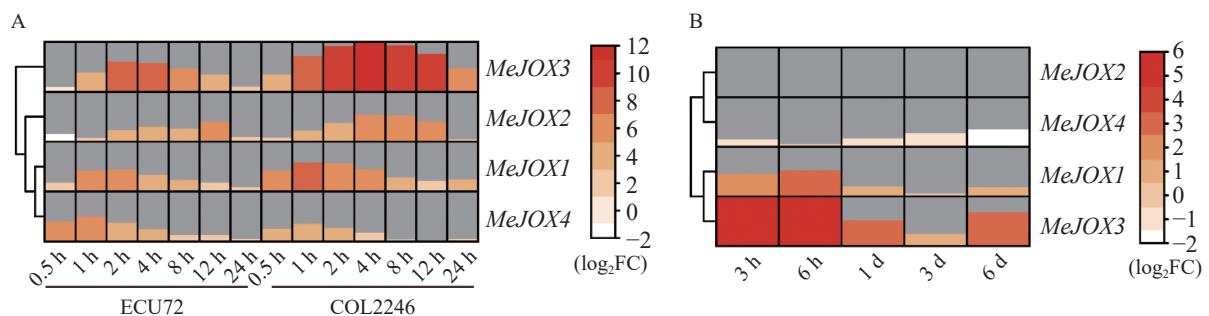


图 6 MeJA (A) 及病原菌 *Xpm* (B) 处理下木薯 *MeJOXs* 家族基因的差异表达热图

Fig. 6 Heatmaps displaying differentially expressed genes of cassava *MeJOXs* under JA or pathogen *Xpm* treatments

注: 表达量以相对于处理 0 h 时的  $\log_2 FC$  值显示。

Note: Expression is displayed as  $\log_2 FC$  values relative to 0 h post treatment.

已有多篇文献报道植物 *JOXs* 基因在病原菌侵染后表达量发生明显变化, 因而利用本实验室已有木薯细菌性枯萎病菌 *Xpm* 侵染木薯‘SC8’种质后的转录组分析了 *MeJOXs* 家族基因响应病原菌 *Xpm* 侵染后的差异表达情况。结果如图 6-B 所示, 除 *MeJOX2* 在病原菌侵染后各个时间点几乎不表达外 ( $TPM \approx 0$ ), 其余 3 个 *MeJOXs* 基因在

各个时间点均有不同程度差异表达 ( $|\log_2 FC| \geq 1$  且  $FDR \leq 0.05$ ), 且响应 *Xpm* 侵染时 *MeJOX1/3*、*MeJOX2/4* 分别层次聚类为一支, 表达模式相近。*MeJOX1/3* 在病原菌侵染后表达即呈上调趋势, 且 *MeJOX3* 受诱导表达情况更明显, 病原菌侵染 3 h 后上调幅度即达到峰值 ( $\log_2 FC = 5.2$ ), 其可能在病原菌侵染早期发挥生物学功能; 而 *MeJOX4*

在病原菌侵染后呈下调表达趋势,6 d后达到峰值( $\log_2 FC = -1.8$ ),暗示其可能在病原菌侵染中发挥与 *MeJOX1/3* 相反的功能。以上结果表明,木薯 *MeJOXs* 家族基因多数都能响应病原菌 *Xpm* 侵染,且不同基因间生物学功能可能存在一定的差异。

### 3 讨论

植物 *2OGDs* 基因家族在激素合成和分解代谢过程中起着关键作用,*2OGD* 家族分为 DOXA、B、C 3 个亚族,目前只有部分基因得到功能验证。茉莉酸氧化酶 *JOXs* 家族基因属于 DOXC46 分支基因,参与茉莉酸分解代谢过程,直接将 JA 羟基化为 12-OH-JA,抑制了 JA 向 JA-Ile 活性形式转变的过程,对调节植物生长发育及应对生物和非生物胁迫至关重要。*2OGDs* 基因家族目前已在多个植物中具有相关报道,例如拟南芥和水稻中分别含有 130 和 114 个<sup>[12]</sup>,烟草中含有 126 个<sup>[28]</sup>,然而木薯中尚未有 *2OGDs* 家族基因相关报道。本研究利用生物信息学手段初步鉴定到木薯 *2OGDs* 家族基因 165 个,多于以上几个物种,但 *JOXs* 亚族基因在每个物种中的数量变化不大,拟南芥和烟草中均只含有 4 个 *JOXs* 基因,烟草中有 6 个 *JOXs* 基因,木薯中也仅鉴定到 4 个 *MeJOXs* 成员,定位在相邻的 4 条染色体上。4 个 *MeJOXs* 在基因结构方面较为类似,内含子外显子数量较少,可能与其需要快速激活应对外界胁迫有关<sup>[29]</sup>。此外,蛋白理化性质方面差异不大,4 个 *MeJOXs* 蛋白含有类似的保守基序,且保守基序在蛋白上的分布情况基本一致,每个 *MeJOX* 蛋白 N 端和 C 端均分别含有保守的 DIOX-N 和 2OG-Fe(II)结构域,2OG-Fe(II)结构域中负责结合 Fe(II)离子的基序 HxDx...H 和 RxS 基序在不同物种中也十分保守,基本不发生变化,暗示其功能在不同物种中具有保守性。*JOXs* 蛋白具有直接羟基化 JA 形成 12-OH-JA 的酶活性,但拟南芥和烟草 *JOXs* 家族成员虽然多数成员均能够单独羟基化 JA,但也都存在个别成员酶活性很弱<sup>[3,13]</sup>,木薯中 4 个 *MeJOXs* 蛋白是否都具有较强的羟基化 JA 酶活还需进一步的体外酶活实验验证。

基因的表达具有时空特异性。木薯 *MeJOXs* 基因在不同组织中的表达存在明显差异,*MeJOX2* 基因在各个组织中基本不表达,可能需要某些特

定的生物或非生物胁迫才能刺激其表达,其余基因在某些特定的组织中显著高表达。例如 *MeJOX1* 在须根中显著高表达,可能与该组织的生长发育密切相关;对 *MeJOXs* 基因启动子区顺式作用元件预测结果表明每个成员启动子区均分布着大量不同类型的光响应元件,可能与光照条件可以影响茉莉酸的生物合成与降解有关,例如某些情况下强光可能促进茉莉酸的积累,弱光可能促进其降解<sup>[30]</sup>,通过感知光照强弱变化调节 *MeJOXs* 的表达可能是植物调节茉莉酸动态平衡的关键;此外 *MeJOXs* 启动子区含有数量不等的茉莉酸、水杨酸、脱落酸等激素响应元件,说明 *MeJOXs* 基因的表达不光可能受茉莉酸调控,很可能还受其他植物激素的调控,可以更灵活地调节基因表达以适应不同的环境压力和信号整合。据报道拟南芥中 4 个 *AtJOXs* 基因均强烈受到 MeJA 诱导表达,尤其 *AtJOX1/2* 的表达量上调了 400 倍以上<sup>[3]</sup>;水稻中除 *OsJOX4* 不受 MeJA 诱导表达外,*OsJOX1/2/3* 也不同程度的受 MeJA 诱导表达<sup>[13]</sup>,*OsJOX2* 最高上调表达约 16 倍,与二者类似,木薯 *MeJOXs* 基因也受到 MeJA 诱导表达,且在 MeJA 处理不同的时间点及不同的木薯种质中受诱导程度存在明显差异,*MeJOX3* 受诱导表达最明显,最高时上调表达 11.8 倍,表明 *MeJOXs* 家族基因参与 JA 调控通路。

拟南芥中 *jaxQ* 全基因突变体对灰霉菌的抗性增加<sup>[3]</sup>,水稻中 *osjoxs* 突变体 JA 通路 Marker 基因的基础表达水平上升,并且对稻瘟病菌的抗性提高<sup>[13]</sup>,这表明在拟南芥和烟草面对灰霉菌和稻瘟病菌侵染时 *JOXs* 基因负调控抗病过程。对木薯‘SC8’在病原菌 *Xpm* 侵染下转录组数据分析表明,除 *MeJOX2* 几乎不响应外,其余 3 个 *MeJOXs* 均能够响应病原菌入侵,但三者之间表达模式存在差异。*MeJOX1* 和 *MeJOX3* 表达情况类似,在病原菌入侵早期即有明显响应,但 *MeJOX3* 响应程度更高,各个时间点诱导表达更明显,而 *MeJOX4* 响应病原菌侵染的表达模式明显异于 *MeJOX1/3*,在病原菌侵染的多数时间点被抑制表达,推测三者之间功能可能存在差异,对病原菌侵染存在正调控和负调控机制。

本研究共鉴定到木薯 4 个 *MeJOXs* 基因,*MeJOXs* 在进化上相对保守,在不同组织中的表达具有组织特异性,受 JA 诱导表达且存在品种差

异,同时多数成员能够响应病原菌侵染。本研究为进一步研究木薯 *MeJOXs* 基因家族在木薯生长发育以及生物和非生物胁迫中的功能提供了理论基础。

### 参考文献:

- [1] Raza A, Charagh S, Zahid Z, et al. Jasmonic acid: a key frontier in conferring abiotic stress tolerance in plants [J]. *Plant Cell Reports*, 2021, 40(8): 1513–1541. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02614-z>
- [2] Wang Y, Mostafa S, Zeng W, et al. Function and mechanism of jasmonic acid in plant responses to abiotic and biotic stresses [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(16): 8568. <https://doi.org/10.3390/ijms22168568>
- [3] Caarls L, Elberse J, Awwanah M, et al. *Arabidopsis* jasmonate-induced oxygenases down-regulate plant immunity by hydroxylation and inactivation of the hormone jasmonic acid [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(24): 6388–6393.
- [4] Yan J, Yao R, Chen L, et al. Dynamic perception of jasmonates by the F-box protein COI1 [J]. *Molecular Plant*, 2018, 11(10): 1237–1247. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.07.007>
- [5] Koo A J, Thireault C, Zemelis S, et al. Endoplasmic reticulum-associated inactivation of the hormone jasmonoyl-L-isoleucine by multiple members of the cytochrome P450 94 family in *Arabidopsis* [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(43): 29728–29738. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.603084>
- [6] Koo A J K, Cooke T F, Howe G A. Cytochrome P450 CYP94B3 mediates catabolism and inactivation of the plant hormone jasmonoyl-L-isoleucine [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(22): 9298–9303.
- [7] Widemann E, Miesch L, Lugan R, et al. The amidohydroxylases IAR3 and ILL6 contribute to jasmonoyl-isoleucine hormone turnover and generate 12-hydroxyjasmonic acid upon wounding in *Arabidopsis* leaves [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(44): 31701–31714. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.499228>
- [8] Zhang T, Poudel A N, Jewell J B, et al. Hormone crosstalk in wound stress response: wound-inducible amidohydroxylases can simultaneously regulate jasmonate and auxin homeostasis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2016, 67(7): 2107–2120. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv521>
- [9] Patkar R N, Benke P I, Qu Z, et al. A fungal monooxygenase-derived jasmonate attenuates host innate immunity [J]. *Nature Chemical Biology*, 2015, 11(9): 733–740. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1885>
- [10] Smirnova E, Marquis V, Poirier L, et al. Jasmonic acid oxidase 2 hydroxylates jasmonic acid and represses basal defense and resistance responses against *Botrytis cinerea* infection [J]. *Molecular Plant*, 2017, 10(9): 1159–1173. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.07.010>
- [11] Zhang X, Wang D, Elberse J, et al. Structure-guided analysis of *Arabidopsis* jasmonate induced oxygenase (JOX) 2 reveals key residues for recognition of jasmonic acid substrate by plant JOXs [J]. *Molecular Plant*, 2021, 14(5): 820–828. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2021.01.017>
- [12] Kawai Y, Ono E, Mizutani M. Evolution and diversity of the 2 - oxoglutarate - dependent dioxygenase superfamily in plants [J]. *The Plant Journal*, 2014, 78(2): 328–343. <https://doi.org/10.1111/tpj.12479>
- [13] Ndecky S, Malherbe L, Villette C, et al. Rice jasmonic acid oxidases (OsJAO) control resting jasmonate metabolism to promote development and repress basal immune responses[EB/OL]. *America: bioRxiv*, (2024-07-24) [2024-12-25]. <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2024.07.24.604933>.
- [14] Tang J, Yang D, Wu J, et al. Silencing JA hydroxylases in *Nicotiana attenuate* enhances jasmonic acid-isoleucine-mediated defenses against *Spodoptera litura* [J]. *Plant Diversity*, 2020, 42(2): 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2019.11.005>
- [15] 刘盟盟, 赵佩, 陈伟, 等. 棉花茉莉酸氧化酶基因 *Gh-JOX2* 参与抗黄萎病的功能分析[J]. *中国科学: 生命科学*, 2022, 52(4): 523–533.
- [16] Zhu T, Herrfurth C, Xin M, et al. Warm temperature triggers JOX and ST2A-mediated jasmonate catabolism to promote plant growth [J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 4804. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24883-2>
- [17] Nassar N M A. Cassava, *Manihot esculenta* Crantz, genetic resources: origin of the crop, its evolution and relationships with wild relatives [J]. *Genetics and Molecular Research*, 2002, 1(4): 298–305.
- [18] Baeyens J, Kang Q, Appels L, et al. Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol [J]. *Progress in Energy and Combustion Science*, 2015, 47: 60–88. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2014.10.003>
- [19] 徐宇佳, 徐锦玲, 李丛希, 等. 世界木薯产业政策新动向及对中国的启示[J]. *中国热带农业*, 2023(6): 5–11. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-0658.2023.06.007>
- [20] Mistry J, Finn R D, Eddy S R, et al. Challenges in homology search: HMMER3 and convergent evolution of coiled-coil regions [J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(12): e121. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt263>
- [21] Edgar R C. Muscle5: high-accuracy alignment ensembles enable unbiased assessments of sequence homology and phylogeny [J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 6968. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34630-w>
- [22] Capella-Gutiérrez S, Silla-Martínez J M, Gabaldón T.

- TrimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(15): 1972–1973. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp348>
- [23] Nguyen L T, Schmidt H A, Von Haeseler A, et al. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2015, 32(1): 268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
- [24] Chen C, Wu Y, Li J, et al. TBtools-II: a “one for all, all for one” bioinformatics platform for biological big-data mining [J]. *Molecular Plant*, 2023, 16(11): 1733–1742. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2023.09.010>
- [25] Lescot M. 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. <https://doi.org/10.1093/nar/30.1.325>
- [26] Bailey T L, Johnson J, Grant C E, et al. The MEME Suite [J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(W1): W39–W49. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv416>
- [27] Nye D G, Irigoyen M L, Perez-Fons L, et al. Integrative transcriptomics reveals association of abscisic acid and lignin pathways with cassava whitefly resistance [J]. *BMC Plant Biology*, 2023, 23(1): 657. <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04607-y>
- [28] Zhang R, Chen X, Wang Y, et al. Genome-wide identification of hormone biosynthetic and metabolism genes in the *2OGD* family of tobacco and *JOX* genes silencing enhances drought tolerance in plants [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 280(P2): 135731.
- [29] Jeffares D C, Penkett C J, Bähler J. Rapidly regulated genes are intron poor [J]. *Trends in Genetics*, 2008, 24(8): 375–378. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2008.05.006>
- [30] Li C, Du J, Xu H, et al. UVR8-TCP4-LOX2 module regulates UV-B tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2024, 66(5): 897–908. <https://doi.org/10.1111/jipb.13648>

## Genome-wide identification and expression analysis of jasmonate-induced oxygenases *JOXs* gene family in *Manihot esculenta*

Hu Wencheng<sup>1,2#</sup>, Zhu Shousong<sup>1,2</sup>, Wang Yixuan<sup>1,2</sup>, Yang Da<sup>1,2</sup>, Chen Yinhua<sup>1,2\*</sup>

(1. Nanfan School/Sanya Nanfan Institute, Hainan University, Sanya, Hainan 572025, China; 2. School of Tropical Agriculture and Forestry, Danzhou, Hainan 571737, China)

**Abstract:** To explore the role of jasmonate-induced oxygenases *JOX* family genes in the growth, development, and stress resistance of cassava (*Manihot esculenta*), *MeJOXs* family members were identified in cassava genome by bioinformatics methods, and their gene structure, promoter *cis*-acting elements, evolutionary relationships and expression patterns were analyzed. The results showed that there were four *MeJOXs* family genes in cassava genome, and each member had similar gene structure, conserved motifs, and protein domains. Each gene member exhibited at least 68% protein homology, with the highest similarity observed between *MeJOX1* and *MeJOX4*, as well as between *MeJOX2* and *MeJOX3*. Promoter *cis*-acting elements analysis showed that *MeJOXs* contained numerous light-responsive elements. Furthermore, each gene member possessed a varying number of hormone-responsive elements. Phylogenetic analysis showed that *MeJOXs* were more closely related to *JOX* genes in dicotyledonous plants. Transcriptome analysis revealed that all the genes were differentially expressed in stems, leaves, midveins, and fibrous roots, with the exception of *MeJOX2* that was scarcely expressed in various cassava tissues. *MeJOXs* were induced by MeJA in different cassava germplasm, with *MeJOX3* demonstrating the most significant expression by inducing. Upon infection by pathogen *Xpm*, *MeJOX1/3/4* responded promptly, but their response patterns were distinctly different. *MeJOX1/3* were upregulated, whereas *MeJOX4* exhibited a trend of downregulation, and *MeJOX2* exhibited negligible response. This study provides a theoretical foundation for further elucidating the functions of the *MeJOXs* gene family in cassava.

**Keywords:** cassava; jasmonate-induced oxygenases *JOXs*; gene family; expression analysis

(责任编辑:潘学峰)