

Genome Wide Bioinformatics Analysis of Lipoxigenase (LOX) Gene Family in *Medicago truncatula*

Azizi^{1*}, S., Chamani², F. and Bagheri², H.

Received Date: 17 May 2024

Accepted Date: 14 August 2024

(Research Article)

Abstract

Lipoxygenases (LOXs; EC1.13.11.12) are a family of iron- or manganese-containing dioxygenases that catalyze the oxygenation of polyunsaturated fatty acids (PUFAs). In plants, these enzymes are encoded by a multigene family and play key roles in growth, development, and responses to biotic and abiotic stresses. This study aimed to determine the evolutionary characteristics and members of the LOX gene family in *Medicago truncatula* (annual medicago) and their function in stress responses. The LOX gene family in *M. truncatula* was identified, and their general characteristics, phylogenetic relationships, gene structure, conserved domains, cis-regulatory elements in the promoter region, post-transcriptional regulation, and expression were studied. Twenty-five homologous *LOX* genes were identified and classified into 9-LOX, 13-LOX type I, and 13-LOX type II subgroups based on phylogeny with chickpea, bean, soybean, rice, *Arabidopsis*, and maize. The *LOX* genes contained conserved lipoxygenase and PLAT/LH2 domains. Conservation was also observed in gene structure, intron phase, and physicochemical properties of the encoded proteins. The presence of cis-regulatory elements responsive to hormones and stresses (e.g., ERE, MYB, MYC) in LOX promoters suggests their roles in plant development and environmental stress responses. Additionally, various identified miRNAs regulate post-transcriptional expression of *LOX* genes via cleavage or translational inhibition. This study provides valuable information for understanding *LOX* gene functions and further exploration of the LOX gene family in *M. truncatula*.

Keywords: Lipoxygenase, *Medicago truncatula*, Gene family, Promoter, Abiotic stress

1. PhD of Agricultural Biotechnology, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
2 and 3. MSc Graduated, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

※: Corresponding author Email: azizisolmaz2020@gmail.com

مطالعه خانواده ژنی لیپواکسیژناز (LOX) در گستره ژنوم یونجه یک‌ساله (*Medicago truncatula*)

A Genome-Wide Analysis of Lipoxigenase (LOX) Gene Family in *Medicago truncatula*

سولماز عزیزی^{۱*}، فرشید چمنی بالاییگلو^۲ و حمید باقری^۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۲۴

چکیده

لیپوکسیژنازها (LOXs; EC1.13.11.12) خانواده‌ای از دی‌اکسیژنازهای حاوی آهن یا منگنز هستند که اکسیژن‌رسانی اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه (PUFAs) را کاتالیز می‌کنند. در گیاهان، این آنزیم‌ها توسط یک خانواده چند ژنی کد شده و نقش مهمی در رشد، نمو و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی دارند. این پژوهش با هدف تعیین ویژگی‌های تکاملی و اعضای خانواده ژنی LOX در یونجه یک‌ساله و عملکرد آن در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی انجام گرفت. در این مطالعه خانواده ژنی LOX در یونجه یک‌ساله (*Medicago truncatula*) شناسایی و ویژگی‌های عمومی آن‌ها، روابط فیلوژنی، ساختار ژنی، دومین‌های حفاظت شده، عناصر تنظیم‌کننده سیس ناحیه پروموتری، تنظیم بیان پس از رونویسی و بیان مطالعه گردید. ۲۵ ژن همولوگ LOX در گیاه یونجه از این خانواده ژنی شناسایی شد که این ژن‌ها بر اساس روابط فیلوژنتیکی با نخود، لوبیا، سویا، برنج، آرابیدوپسیس و ذرت به زیرگروه‌های 9-LOX، 13-LOX، 13-LOX تیپ یک و 13-LOX تیپ دو تقسیم می‌شوند. ژن‌های LOX مورد مطالعه دارای دارای دومین‌های حفاظت شده لیپواکسیژناز و PLAT/LH2 هستند. همچنین نتایج این تحقیق حاکی از وجود این حفاظت‌شدگی در سایر قسمت‌ها نظیر ساختار ژنی، فاز اینترون و ویژگی‌های فیزیوشیمیایی پروتئین‌های کد شده به‌وسیله این ژن‌ها بود. وجود چندین عنصر تنظیمی سیس پاسخ به هورمون‌ها و تنش‌ها نظیر ERE، MYB و MYC در پروموتور ژن‌های LOX نشان‌دهنده نقش این ژن‌ها در نمو گیاه و پاسخ آن‌ها به تنش‌های محیطی می‌باشد. علاوه بر این، انواع مولکول‌های miRNA شناسایی شده، بیان پس از رونویسی ژن‌های LOX را از طریق برش یا ممانعت از ترجمه تنظیم می‌کند. این مطالعه اطلاعات ارزشمندی را برای درک بهتر کارکردهای ژن‌های LOX و کشفیات بیشتر خانواده ژنی LOX یونجه یک‌ساله فراهم می‌کند.

واژه‌های کلیدی: یونجه یک‌ساله، لیپواکسیژناز، خانواده ژنی، پروموتور، تنش غیرزیستی

۱. دکترای بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۲ و ۳. دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

* نویسنده مسؤول Email: azizisolmaz2020@gmail.com

مقدمه

آنزیم لیپواکسیژناز (LOX; EC 1.13.11.12) از اسیدهای چرب هیدروکسی پراکسید ایجاد شده و از خانواده دی اکسیژنازهای دارای آهن غیرهم (Nonheme iron-containing) می باشد و در بسیاری از موجودات زنده شامل گیاهان، جانوران، قارچ ها و باکتری ها شناسایی شده است (Banthiya et al., 2016). بر اساس این که سوبسترای آنزیم در کربن شماره ۹ یا ۱۳ اکسیژنه می شود، LOX های گیاهی را به دو گروه 9-LOX و 13-LOX تقسیم می کنند (Feussner & Wasternack, 2002). از سوی دیگر بر اساس ساختار اولیه و میزان تشابه توالی ها، LOX های گیاهی به دو زیرخانواده تقسیم می شوند. LOX های تیپ یک که فاقد پپتید موقت بوده و تشابه توالی بالای ۷۵ درصد را نشان می دهند. در مقابل LOX های تیپ دو دارای پپتید موقت بوده و تشابه توالی پروتئینی آن ها در حدود ۳۵ درصد می باشد. تیپ دو انحصاراً مربوط به گروه 13-LOX ها هستند (Porta et al., 2002). مطالعات تکاملی انجام گرفته نشان داده است که گروه های 9-LOX و 13-LOX در زیرگروه های متفاوت درخت فیلوژنتیکی قرار می گیرند (Liu et al., 2021; Kang et al., 2021). این خانواده در بسیاری از گیاهان مانند آراییدوپسیس، برنج، ذرت، موز، کلباز، چای، ارزن، و پنبه شناسایی و روابط تکاملی، ساختاری و کارکردی آن ها مطالعه شده است (Umate et al., 2011; Liu et al., 2021; Kang et al., 2021; Zhu et al., 2018; Zhang et al., 2021; Shaban et al., 2018). بر این اساس مشخص شده است که LOX های گیاهی دارای یک دمین حفاظت شده لیپواکسیژناز در انتهای کربوکسیل و یک دمین PLAT/LH2 در انتهای آمینو می باشند (Tolley et al., 2018). دمین LOX دارای ۵ اسید آمینه هیستیدین حفاظت شده بوده و تشکیل His-(X)17-His-(X)4-His-(X)4-His-(X)18-His می دهد که در اتصال اتم آهن نقش دارد. دمین PLAT/LH2 به صورت هشت رشته آنتی پارالل بشکله ای (Antiparallel barrel) بوده و در اتصال به پروکولپاز (Procolipase) دارای نقش است (Wang et al., 2019). LOX ها دارای کارکردهای متفاوتی بوده و در رشد و نمو، جوانه زنی بذر، رسیدگی میوه، پیری، مرگ سلولی، سنتز هورمون های آبسازیک اسید (ABA) و جاسمونیک اسید (JA)، پاسخ به تنش های زیستی و غیرزیستی نقش دارند (Chen et al., 2015; Wang et al., 2019; Viswanath et al., 2020). برای مثال میزان فعالیت کل LOX ارزن مرورایدی در پاسخ به تنش های خشکی و نیکل افزایش یافته و از طریق تأثیر بر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت تأثیر منفی این تنش ها را کاهش می دهد (Kotapati et al., 2017). بیان LOX در پاسخ

به هورمون های ABA، JA، سالیسیلیک اسید (SA) و نیتریک اکسید (NO) القا می شود. با توجه به نتایج به دست آمده شناسایی این ژن ها و بررسی نقش کارکردی آن ها می تواند نقش مهمی در تولید گیاهان مقاوم به تنش ها داشته باشد (Viswanath et al., 2020).

یونجه های یک ساله از خویشاوندان نزدیک یونجه زراعی (*Medicago sativa* L.) هستند که بومی مناطق مدیترانه ای بوده و دارای رشد سریع و علوفه مطلوبی می باشند (Callum et al., 2001). گیاهان این گونه ها دارای ژن های مفید زیادی از جمله ژن های دخیل در مقاومت به تنش های زیستی و غیر زیستی بوده و برای جلوگیری از فرسایش خاک و تولید کود سبز و علوفه مورد استفاده قرار می گیرند (Callum et al., 2001). همچنین یونجه های یک ساله به دلیل داشتن ژنوم کوچک (۵۰۰ Mbp)، دیپلوئید بودن و چرخه زندگی کوتاه به عنوان گیاه مدل در خانواده بقولات محسوب می شوند (Tang et al., 2014). موجود بودن اطلاعات ژنومی امکان تجزیه و تحلیل خانواده ژنی LOX با هدف درک تاریخ تکاملی، مکانیسم های عملکردی اعضای آن و شناسایی ژن های مؤثر این خانواده در فرایندهای زیستی را فراهم کرده است. در این مطالعه خانواده ژنی LOX در گیاه یونجه یک ساله (*Medicago truncatula*) شناسایی و ویژگی های عمومی آن ها، روابط فیلوژنتیکی، ساختار ژنی، دمین های حفاظت شده، عناصر تنظیم کننده سیس ناحیه پروموتری، تنظیم بیان پس از رونویسی مطالعه گردید.

مواد و روش ها

شناسایی اعضاء خانواده ژنی LOX

شناسایی اعضاء خانواده ژنی LOX در یونجه یک ساله با استفاده از الگوریتم tBLASTn انجام شد. بدین منظور توالی پروتئینی LOX برنج از پایگاه داده RGAP (<http://rice.uga.edu>) و آراییدوپسیس از پایگاه داده TAIR (<https://www.arabidopsis.org/index.jsp>) دریافت و در مرحله بعد به عنوان توالی اولیه جهت جستجوی توالی های همولوگ با روش tBLASTn در پایگاه داده فایتوزوم (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov>) استفاده شد. سپس نتایج تکراری حذف و توالی های باقی مانده به سرور SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) ارائه شد تا وجود دمین های اختصاصی Lipoxxygenase و PLAT/LH2 بررسی شود (Zhang et al., 2021). تنها ژن هایی که دارای هر دو دمین بودند به عنوان ژن LOX در نظر گرفته شدند. برای

استفاده از نرم افزار TBtools مصورسازی شد (Chen *et al.*, 2020). ساختار اگزون- اینترونی و فاز اینترونی ژن های *LOX* در گیاه مورد مطالعه با استفاده از سرور GSDS (<http://gsds.gao-lab.org>) بررسی شد. جهت استفاده از این سرور نیاز به توالی های DNA ژنومی و CDS می باشد.

شناسایی عناصر تنظیمی سیس پاسخ به هورمون ها و تنش ها و بررسی مولکول های miRNA واکنش گر
به منظور شناسایی عناصر تنظیمی سیس پاسخ به هورمون ها و تنش ها در ژن های *LOX* یونجه یک ساله، ۱۵۰۰ جفت باز بالادست ناحیه کدکننده ژن ها به عنوان پروموتور در نظر گرفته شد. در ادامه شناسایی عناصر تنظیمی سیس با استفاده از سرور PlantCare (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/>) انجام شد. شناسایی مولکول های miRNA واکنش گر به ژن های *LOX* و مؤثر بر تنظیم بیان پس از رونویسی این ژن ها با استفاده از سرور psRNATarget (<https://www.zhaolab.org/psRNATarget>) انجام شد.

نتایج و بحث

شناسایی اعضاء خانواده ژنی *LOX* در یونجه یک ساله
از طریق الگوریتم tBLASTn و پس از حذف توالی های فاقد دمین های لیپواکسیژناز و PLAT/LH2، ۲۵ ژن در یونجه یک ساله (*MtLOX1-MtLOX25*)، شناسایی شد (جدول ۱). بررسی جایگاه ژن های *LOX* نشان داد که این ژن ها به صورت غیریکنواخت بر روی کروموزوم ها قرار گرفته اند. به طوری که کروموزوم های ۵ و ۷ دارای یک ژن، کروموزوم های ۱، ۲ و ۴ دارای دو ژن، کروموزوم ۳ دارای چهار ژن و کروموزوم ۸ دارای ۱۳ ژن هستند. همچنین بر روی کروموزوم ۶، هیچ ژنی از این خانواده حضور نداشت (جدول ۱).

نامگذاری ژن های شناسایی شده ابتدا با توجه به نام گیاه، پیشوند Mt در نظر گرفته شد. سپس *LOX* اضافه شده و در نهایت شماره ژن که براساس جایگاه کروموزومی ژن ها بود اضافه گردید.

درخت فیلوژنتیکی ژن های *LOX*

برای رسم درخت فیلوژنتیکی و بررسی روابط تکاملی بین ژن های *LOX*، توالی پروتئینی این آنزیم در آرکیدوپسیس، برنج، ذرت، نخود، لوبیا و سویا براساس اطلاعات قبلی دریافت شد. رسم درخت براساس طول کامل پروتئین ها و الگوریتم نزدیکترین همسایه ها و آزمون بوت استراپ با ۱۰۰۰ تکرار و ویرایش و رنگ بندی آن با استفاده از نرم افزار MEGA7 انجام شد. در مرحله بعد هم ردیفی این توالی ها همراه با توالی پروتئینی *LOX* یونجه یک ساله از طریق سرور ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) انجام گردید. نتیجه این مرحله که در فرمت Fasta بود جهت رسم درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم افزار MEGA7 و الگوریتم نزدیکترین همسایه ها (NJ) و با بوت استراپ برابر با ۱۰۰۰ تکرار استفاده شد (Kumar *et al.*, 2016).

مطالعه ویژگی های پروتئینی، دمین های حفاظت شده و ساختار

اگزون- اینترونی خانواده ژنی *LOX*

ویژگی های عمومی آنزیم های *LOX* شامل وزن مولکولی، طول پروتئین و نقطه ایزوالکتریک با استفاده از سرور ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam>) ارزیابی شد. جایگاه سلولی این آنزیم ها از طریق سرور CELLO پیش بینی شد. همچنین برای شناسایی موتیف های حفاظت شده از سرور MEME (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) استفاده شد که پارامترها شامل شناسایی ۲۰ موتیف با حداقل و حداکثر طول ۶ تا ۵۰ اسید آمینه می باشد. نتیجه این آنالیز با

جدول ۱: مشخصات عمومی ژن‌های *LOX* در یونجه یک‌سالهTable 1: General characteristics of *LOX* genes in *Medicago truncatula*

شماره دسترسی (پایگاه فایتوزوم) Accessnumber (phytosome database)	نام ژن Gene name	کروموزوم Chromosome	شروع ژن Gene start (bp)	پایان ژن Gene end (bp)	طول پروتئین (اسید آمینه) Length (aa)	وزن پروتئین (کیلو دالتون) MW (KDa)	نقطه ایزوالکتریک PI	جایگاه سلولی Subcellular localization
Medtr1g083020	MtLOX1	Chr01	36920655	36927114	859	97.66	6.16	سیتوپلاسم
Medtr1g104650	MtLOX2	Chr01	47126095	47132583	857	97.27	6.65	کلروپلاست
Medtr2g099560	MtLOX3	Chr02	42686173	42690338	864	96.93	6.22	سیتوپلاسم
Medtr2g099570	MtLOX4	Chr02	42691747	42697437	862	97.4	6.52	سیتوپلاسم
Medtr3g079420	MtLOX5	Chr03	35705582	35709331	866	99.44	5.8	کلروپلاست
Medtr3g079450	MtLOX6	Chr03	35719843	35725300	903	103.26	6.49	کلروپلاست
Medtr3g479460	MtLOX7	Chr03	35725453	35729835	904	103.07	7.03	کلروپلاست
Medtr3g081130	MtLOX8	Chr03	36742841	36746629	859	97.41	6.52	سیتوپلاسم
Medtr4g066170	MtLOX9	Chr04	24959921	24968304	907	103.58	5.37	کلروپلاست
Medtr4g088810	MtLOX10	Chr04	35409075	35415156	896	101.69	7.82	سیتوپلاسم
Medtr5g024020	MtLOX11	Chr05	9600482	9607033	868	98.02	6.32	سیتوپلاسم
Medtr7g113410	MtLOX12	Chr07	46708553	46714819	868	98.36	6.09	کلروپلاست
Medtr8g018420	MtLOX13	Chr08	6261408	6266199	857	96.18	5.16	سیتوپلاسم
Medtr8g018430	MtLOX14	Chr08	6273027	6277365	862	97.63	7.69	سیتوپلاسم
Medtr8g018450	MtLOX15	Chr08	6287218	6291683	829	94.74	6.36	سیتوپلاسم
Medtr8g018510	MtLOX16	Chr08	6319619	6324603	870	97.81	6.7	سیتوپلاسم
Medtr8g018520	MtLOX17	Chr08	6330368	6340159	869	98.1	6.45	سیتوپلاسم
Medtr8g018550	MtLOX18	Chr08	6350475	6356214	869	97.73	6.23	سیتوپلاسم
Medtr8g018570	MtLOX19	Chr08	6361499	6365556	871	98.27	6.17	سیتوپلاسم
Medtr8g018690	MtLOX20	Chr08	6422466	6426852	866	96.7	6.64	سیتوپلاسم
Medtr8g018730	MtLOX21	Chr08	6448981	6454397	865	97.02	6.14	سیتوپلاسم
Medtr8g018735	MtLOX22	Chr08	6455504	6459438	866	96.95	6.31	سیتوپلاسم
Medtr8g020970	MtLOX23	Chr08	7436326	7443707	928	104.82	7.94	سیتوپلاسم
Medtr8g020990	MtLOX24	Chr08	7457385	7463228	869	97.36	6.81	سیتوپلاسم
Medtr8g080230	MtLOX25	Chr08	34466671	34473858	917	102.99	7.42	سیتوپلاسم

است (شکل ۱). در تشکیل زیر گروه تیپ دو LOX-13 چهار ژن یونجه مشارکت داشته و سه ژن یونجه در زیر گروه تیپ یک LOX-13 قرار گرفت (شکل ۱). با توجه به رابطه تکاملی گیاهان در هر گروه گیاهان تکلیه و دولپه عموماً به صورت مجزا کنار هم قرار گرفته‌اند. این امر از یک سو می‌تواند نشان‌دهنده وجود جد مشترک برای این خانواده ژنی قبل از انشقاق گیاهان تکلیه و دولپه بوده و از سوی دیگر می‌تواند دلالت بر مسیر تکاملی متفاوت و مجزای خانواده ژنی LOX گیاهان تکلیه و دولپه داشته باشد (Chen *et al.*, 2015). مطالعه رابطه تکاملی ژن‌ها می‌تواند در پیش‌بینی نقش زیستی آن‌ها مؤثر باشد زیرا از نظر تکاملی، انشقاق ژن‌ها در درخت فیلوژنتیکی نشان دهنده انشقاق در نقش کارکردی آن‌ها بوده و از سوی دیگر ژن‌های یک کلاستر احتمالاً کارکرد مشابه دارند (Zhu *et al.*, 2018). مطالعات نشان داده است که ژن‌های *AtLOX1* و *AtLOX5* نقش مهمی در پاسخ آرابیدوپسیس به تنش‌ها دارند. ژن *AtLOX1* در مسیر بیوسنتز JA و سایر اکتانودکانوئیک‌ها (Octadecadienoics) در پاسخ به پاتوژن‌ها نقش دارد (Zheng *et al.*, 2007). از سوی دیگر *AtLOX5* در نمو ریشه جانبی و پاسخ دفاعی آرابیدوپسیس دارای نقش کلیدی است (Vellosillo *et al.*, 2007). جهش‌یافته‌های *lox1* و *lox5* باعث کاهش مقاومت آرابیدوپسیس به تنش‌ها و افزایش محتوای مالون‌دی‌آلدئید می‌شوند (Bannenberget *et al.*, 2009). با توجه به نقش این ژن‌ها در آرابیدوپسیس می‌توان گفت که ژن‌های هم‌گروه آن‌ها ممکن است در بیوسنتز JA و پاسخ به تنش نقش داشته باشند. با این حال جزئیات نقش کارکردی آن‌ها نیاز به مطالعات بیشتر دارد.

ویژگی‌های پروتئینی، دمین‌های حفاظت شده و ساختار ژنی

ویژگی‌های عمومی پروتئین‌های کد شده به وسیله خانواده‌های ژنی شامل وزن مولکولی، طول پروتئین، نقطه ایزوالکتریک و جایگاه سلولی از نظر تکاملی و گروه‌بندی آن‌ها حائز اهمیت هستند. آنالیزهای انجام گرفته در مورد پروتئین‌های LOX یونجه یک‌ساله نشان دهنده حفاظت شدگی بالای این آنزیم‌ها می‌باشد. به طوری که از ۲۰ موتیف شناسایی شده در ۲۵ توالی پروتئینی بررسی شده مربوط به خانواده LOX در این گیاه، ۱۸ موتیف در تمام ۲۵ توالی حضور داشتند که این مقدار برابر ۹۲ درصد کل موتیف‌هاست. در یونجه یک‌ساله میانگین طول پروتئین ۸۷۴ اسید آمینه (بین ۸۲۹ تا ۹۲۸)، وزن مولکولی ۹۸/۸ کیلودالتون (بین ۹۴/۷۴ تا ۱۰۴/۸۲) و نقطه ایزوالکتریک ۶/۵ (۵/۱۶ تا ۷/۹۴) می‌باشد (جدول ۱). بررسی جایگاه سلولی پروتئین‌های LOX نشان داد که تمامی اعضاء گروه LOX-13

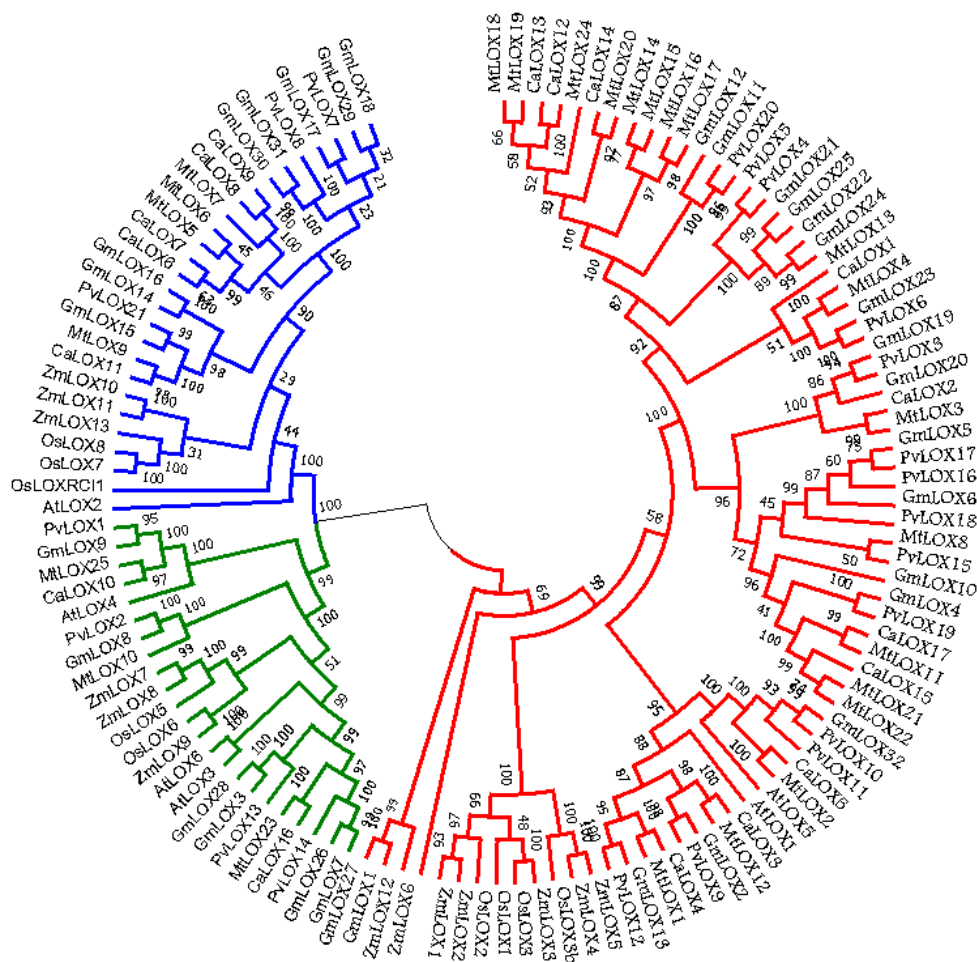
تعداد ژن‌ها موجود بر روی برخی از کروموزوم‌ها و ترتیب قرارگیری و فاصله آن‌ها مانند ژن‌های موجود بر روی کروموزوم نشان‌دهنده کلاستر یا خوشه‌ای بودن ژن‌های LOX-۸ در این مناطق ژنومی و احتمال ایجاد این کلاستر در اثر مضاعف شدگی تاندیم یا می‌باشد (جدول ۱). مطالعات نشان داده است که در گیاهان بسیاری از ژن‌های کلاستر در پاسخ به تنش‌ها و یا بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه نقش دارند لذا می‌توان گفت که نیز می‌توانند در این فرآیندهای زیستی نقش ژن‌های LOX داشته باشند (Polturak *et al.*, 2021). از سوی دیگر بر اساس مطالعات پیشین، خانواده ژنی LOX شامل ۱۳ ژن در ذرت، ۶ ژن در آرابیدوپسیس، ۱۴ ژن در برنج، ۱۲ ژن در ارزن، ۱۱ ژن در چای، ۳۳ ژن در کلزا و ۲۱ ژن در پنبه می‌باشد. این تفاوت نشان‌دهنده این امر است که علی‌رغم کارکرد بیوشیمیایی مشابه این ژن‌ها، مسیر تکاملی آن‌ها احتمالاً متفاوت می‌باشد (Feussner and Wasternack, 2002). از این گیاهان اشاره شده بزرگ‌ترین خانواده LOX به ترتیب مربوط به کلزا و پنبه می‌باشد. این دو گیاه از نظر ژنومی پلی‌پلوئیدی می‌باشند. از سوی دیگر رابطه معنی‌داری بین اندازه این خانواده ژنی و اندازه ژنوم مشاهده نمی‌شود. به عنوان مثال اندازه ژنومی برنج و یونجه یک‌ساله (۵۰۰ مگاجفت باز) و ارزن (۴۹۰ مگاجفت باز) و اندازه ژنوم ذرت ۲/۴ گیگاجفت باز می‌باشد (<http://plants.ensembl.org/index.html>). با این حال تعداد ژن‌های LOX این دو گیاه تفاوت معنی‌داری نداشته و لذا پلی‌پلوئیدی عامل مؤثر در بسط این خانواده ژنی در کلزا و پنبه می‌باشد.

مطالعه رابطه تکاملی ژن‌های LOX

جهت بررسی روابط تکاملی و تعیین گروه‌بندی ژن‌های LOX، درخت فیلوژنتیکی بر مبنای نزدیکترین همسایه‌ها و با ۱۰۰۰ تکرار آزمون بوت‌استرپ رسم شد. بدین منظور ۱۲۳ توالی پروتئین LOX مربوط به برنج (C3) و ذرت (C4) از گیاهان تکلیه و سویا، نخود، لوبیا، یونجه یک‌ساله و آرابیدوپسیس از گیاهان دولپه استفاده شد (شکل ۱). استفاده از گیاهان گونه‌های مختلف تکلیه و دولپه موجب افزایش دقت گروه‌بندی‌ها و همچنین افزایش درک ما از نحوه تکامل ژن‌های LOX می‌شود. همانگونه که مطالعه این خانواده در سایر گیاهان نشان داده بود، در درخت فیلوژنتیکی رسم شده ژن‌های LOX به دو گروه LOX-9 و LOX-13 تقسیم شدند (Liu *et al.*, 2021; Kang *et al.*, 2021). گروه LOX-13 به نوبه‌ی خود در دو زیرگروه تیپ یک و دو قرار گرفتند. در گروه LOX-9 هجده ژن یونجه قرار داشته و نسبت به LOX-13 گروه بزرگ‌تری

تیپ دو در کلروپلاست فعال هستند (جدول ۱). همچنین محل فعالیت تمامی ژن‌های گروه 13-LOX تیپ یک و اکثر ژن‌های گروه 9-LOX سیتوپلاسم پیش‌بینی شد (جدول ۱). نتایج مشاهده شده در مورد جایگاه سلولی گروه 13-LOX کاملاً با نتایج سایر مطالعات هماهنگ می‌باشد. اما مطالعات نشان داده است که در گروه 9-LOX مکان فعالیت آنزیم‌ها سیتوپلاسم می‌باشد در حالی که در این مطالعه محل فعالیت برخی اعضاء این گروه کلروپلاست پیش‌بینی شد که این نتایج با یافته‌های

پیشین در برنج (Muzino *et al.*, 2003) و موز (Liu *et al.*, 2021) نیز هم‌خوانی داشت. در مطالعه‌ای که روی خانواده ژنی LOX در هلو انجام گرفت، مشاهده شده که چنین حالتی وجود داشته و برخی از اعضاء هر یک از گروه‌ها در جایگاه‌های سلولی متفاوت فعال هستند. وجود چنین پدیده‌ای می‌تواند بر اثر مضاعف‌شدگی‌های کروموزومی و تاریخچه تکاملی آن خانواده ژنی باشد (Zhu *et al.*, 2018).



شکل ۱: درخت فیلوژنتیکی خانواده ژنی LOX در یونجه یک‌ساله، نخود، لوبیا، سویا، آرابیدوپسیس، برنج و ذرت. گروه‌های مختلف LOX با رنگ‌های مختلف نشان داده شده است، رنگ قرمز گروه 9-LOX، رنگ سبز گروه 13-LOX Type I و رنگ آبی گروه 13-LOX Type II را نشان می‌دهد

Fig.1: Phylogenetic tree of LOX gene family in *Medicago truncatula*, *Cicer arietinum*, *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max*, *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Zea mays*. The tree was drawn based on the full length of the proteins and the neighbor-joining method and the bootstrap test with 1000 repetitions. Different groups of LOX are shown with different colors, red color shows 9-LOX group, green color shows 13-LOX Type I group and blue color shows 13-LOX Type II group. Drawing, editing and coloring of the tree was done using MEGA7 software

آمینو و توالی‌های ویژه با کارکرد مهم بیولوژیکی نظیر اتصال سوبسترا یا کوفاکتور می‌باشند (Bailey *et al.*, 2006). بر این اساس ۲۰ موتیف حفاظت شده با طول بین ۱۸ تا ۵۰ اسید

به‌منظور آنالیز بهتر و مشخص کردن تفاوت‌های ساختاری و میزان تشابه و تفاوت توالی پروتئین‌های LOX یونجه یک‌ساله از سرور MEME استفاده شد. موتیف‌ها عموماً دارای اسیدهای

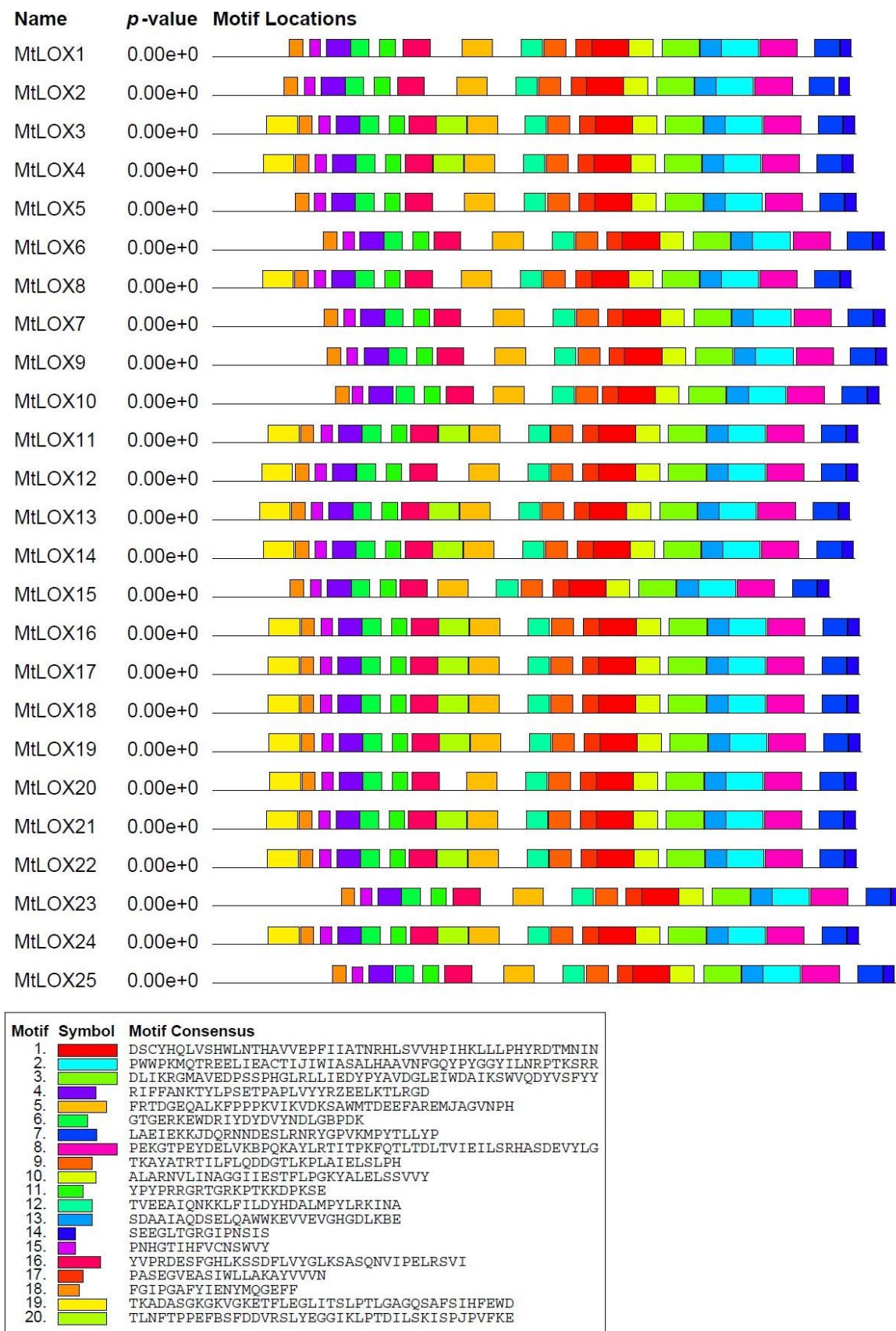
است که نقش مهمی در اتصال آهن و پایداری و فعالیت آنزیم داشته و دارای شش اسید آمینه هیستیدین حفاظت شده می‌باشد (شکل ۳) (Shaban *et al.*, 2018). همچنین موتیف شماره دو دارای بخش‌های اتصال به اکسیژن می‌باشد که نقش مهمی در فعالیت کاتالیتیکی لیپواکسیژناز دارد (شکل ۳) (Padilla *et al.*, 2012).

آمینو شناسایی شد. موتیف‌های ۱۹ مربوط به دمین PLAT و ۲۰ مربوط به دمین lipoygenase به ترتیب در ۱۵ و ۱۲ توالی پروتئینی شناسایی شد. بقیه موتیف‌ها در هر ۲۵ توالی پروتئینی یونجه یک‌ساله شناسایی شدند. (جدول ۲). نتایج نشان‌دهنده حفاظت شدگی بالای این پروتئین‌ها می‌باشد. موتیف شماره یک دارای یک توالی ۳۶ اسید آمینه‌ای به صورت His-(X)4-His-(X)4-His-(X)17-His-(X)18-His

جدول ۲: موتیف‌های حفاظت شده شناسایی شده در خانواده ژنی LOX و مشخصات آن‌ها

Table 2: The conserved motifs identified in the LOX gene family and their characteristics

شماره موتیف Motif Number	خطا E-value	فراوانی Frequency	طول Length	توالی دمین Domin sequence
Motif 1	4.4 e-1009	25	50	DSCYHQLVSHWLNTHAVVEPFIIATNRHLSVVHPIHKLPHYRDTMNIN
Motif 2	1.1 e-885	25	50	PWWPKMQTREELIEACTIJIWIASALHAAVNFGQYPYGGYILNRPTKSRR
Motif 3	2.0e-862	25	50	DLIKRGMAVEDPSSPHGLRLLIEDYPYAVDGLIWDIAKSWVQDYVSFFYY
Motif 4	2.2 e-483	25	32	RIFFANKTYLPSETPAPLVYYRZEELKTLRGD
Motif 5	3.2 e-578	25	41	FRTDGEQALKFPPPKVIKVDKSAWMTDEEFAREMJAGVNP
Motif 6	1.7 e-398	25	25	GTGERKEWDRIYDYDVYNDLGBDPK
Motif 7	3.6 e-414	25	33	LAEIEKKJDQRNNDSELRNRYGPVKMPYTLTY
Motif 8	9.8 e-626	25	50	PEKGTPEYDELVBKPBQKAYLRITITPKFQTLTDLTVIEILSRHASDEVYLG
Motif 9	7.2 e-430	25	29	TKAYATRITLFLQDDGTLKPLAIELSLPH
Motif 10	1.8 e-403	25	29	ALARNVLINAGGIHSTFLPGKYALELSSVVY
Motif 11	5.6 e-313	25	21	YPYPRRGRTGRKPTKKDPKSE
Motif 12	7.5 e-477	25	29	TVEEAIQNKKLFDLYHDALMPYLRKINA
Motif 13	8.9e-366	25	29	SDAAIAQDSELQAWWKEVVEVGHGDLKBE
Motif 14	7.8 e-213	25	15	SEEGLTGRGIPNSIS
Motif 15	2.0 e-204	25	15	PNHGTIHFVCNSWVY
Motif 16	2.9 e-384	25	36	YVPRDESGHLKSSDFLVYGLKSASQNVPELRSVI
Motif 17	1.9 e-262	25	21	PASEGVEASIWLLAKAYVVVN
Motif 18	3.0 e-204	25	18	FGIPGAFYIENYMQGEFF
Motif 19	2.1 e-258	15	41	TKADASGKGKVGKETFLEGLITSLPTLGAGQSAFSIHFEWD
Motif 20	1.4e-236	12	41	TLNFTPPEFBSFDDVRSLEYGGIKLPTDILSKISJPVFKE



شکل ۲: موتیف‌های حفاظت شده در خانواده ژنی LOX در یونجه یک‌ساله که با استفاده از سرور MEME شناسایی شد. هر موتیف با رنگ متفاوت مشخص شده است

Fig. 2: Conserved motifs in the LOX gene family in *Medicago truncatula* identified using the MEME server. Each motif is marked with a different color



شکل ۳: برخی دمین‌های کارکردی شناسایی شده در خانواده ژنی LOX. میزان حفاظت شدگی هر اسید آمینه بر اساس اندازه آن مشخص شده است

Fig. 3: Some functional domains identified in the LOX gene family. The degree of coservation of each amino acid is determined based on its letter size

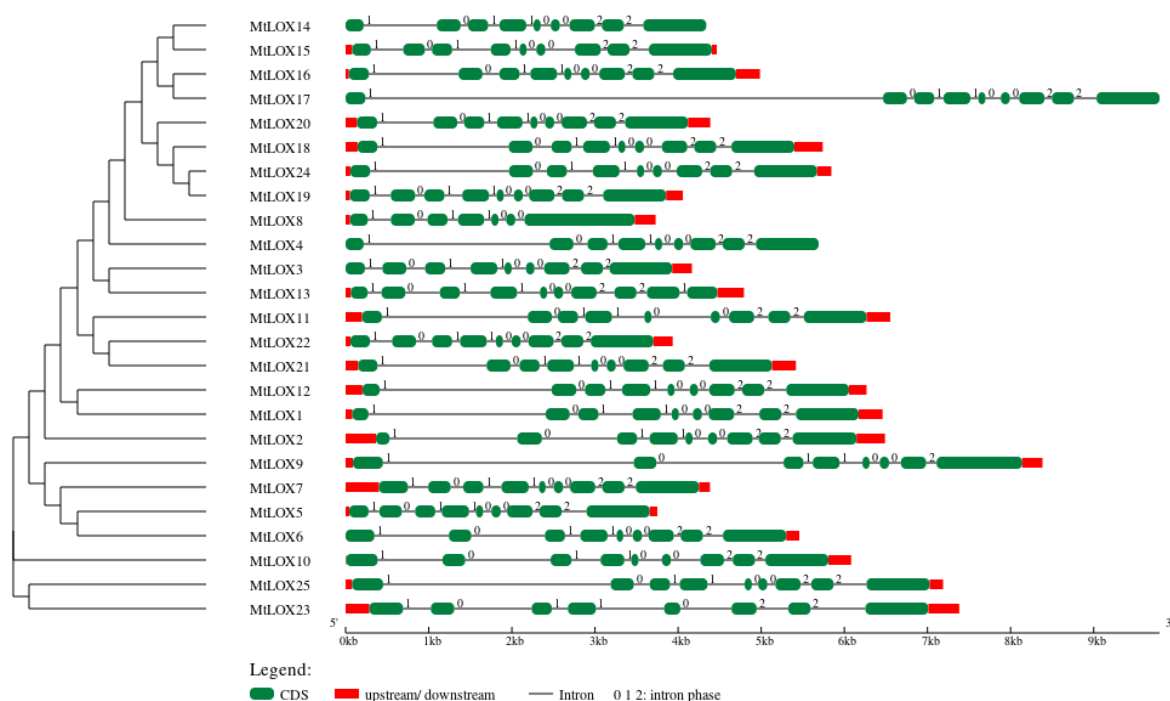
۸ هزار جفت باز طول دارند. دلیل اصلی طول بلند این ژن‌ها وجود اینترون‌های بلند در آن‌ها می‌باشد. مطالعه ساختار ژنی خانواده LOX در یونجه یک‌ساله نشان داد که این ژن‌ها عموماً دارای هشت اینترون هستند. البته ژن *MtLOX8* دارای شش اینترون و ژن *MtLOX13* دارای نه اینترون می‌باشد (شکل ۴).

مطالعه ساختار ژنی شامل تعداد اگزون و اینترون و همچنین فاز اینترونی می‌تواند اطلاعات با ارزشی را در مورد مسیر تکاملی و ویژگی‌های هر خانواده ژنی ارائه دهد. مقایسه طول ژن‌های LOX در یونجه یک‌ساله نشان می‌دهد که بلندترین ژن‌ها شامل *MtLOX17* و *MtLOX9* می‌باشد که به ترتیب ۱۰ و

طی تکامل می‌باشند. مطالعه فاز اینترون‌های *LOX* نشان داد که الگوی غالب برای این ژن‌ها ۱۰۱۱۰۰۲۲ است (شکل ۴). با این حال در برخی از ژن‌ها تفاوت‌هایی مشاهده شد. در ژن *MtLOX23* الگوی فاز اینترون‌ی بصورت ۱۰۱۱۰۰۲۲ می‌باشد و ژن *MtLOX9* به صورت ۱۰۱۱۰۰۲ است. همچنین ژن *MtLOX13* دارای الگوی ۱۰۱۱۰۰۲۲۱ و ژن *MtLOX8* دارای الگوی ۱۰۱۱۰۰ می‌باشند (شکل ۴). وجود تفاوت مشاهده شده در تعداد و فاز اینترون برخی از ژن‌های *LOX* می‌تواند به دلیل حذف یا به دست آوردن اینترون در طی تکامل بوده و احتمالاً موجب ایجاد یک نقش کارکردی اختصاصی برای آن‌ها شده است (Liu et al., 2020). از سوی دیگر نتایج نشان داد که بسیاری از ژن‌های *LOX* دارای ساختار ژنی و فاز اینترون‌ی مشابه هستند. بر این اساس می‌توان گفت که این ژن‌ها دارای کارکرد مشابه می‌باشند (Paterson et al., 2006).

مطالعه ساختار ژنی خانواده *LOX* در سایر گونه‌ها نیز نشان‌دهنده غنی بودن این خانواده ژنی از نظر اینترون است. به عنوان مثال تعداد اینترون در ژن‌های *LOX* پنبه چهار تا نه، در کلزا شش تا ۱۱ و در فلغل هفت تا هشت عدد گزارش شده است (Sarde et al., 2018; Shaban et al., 2018; Kang et al., 2021).

فاز اینترون به سه نوع، صفر، یک و دو تقسیم می‌شود که به ترتیب به درج یک اینترون بین دو کدون متوالی، بین باز اول و دوم کدون و بین باز دوم و سوم یک کدون اشاره دارد. توزیع فاز اینترون در طی تکامل، حفاظت شده و ناهمگن بوده و بیشترین فراوانی و حفاظت شدگی به ترتیب برای فازهای صفر، یک و دو مشاهده شده است (Nguyen et al., 2006). در این مطالعه مشخص شد که فراوانی فازهای صفر، یک و دو به ترتیب ۳۷/۵، ۲۳/۵ و ۳۷ درصد می‌باشد. لذا می‌توان گفت که این خانواده ژنی دارای حفاظت شدگی بالایی از نظر ساختار ژنی در



شکل ۴: ساختار ژنی اگزون-اینترون خانواده ژنی *LOX* در یونجه یک‌ساله. نواحی غیر کدکننده، اگزون‌ها و اینترون‌ها به ترتیب با رنگ قرمز، سبز و سیاه نشان داده شده‌اند

Fig. 4: Gene structure of *LOX* gene family in *Medicago truncatula*. Non-coding regions, exons and introns are shown in red, green and black, respectively

ژن‌ها هستند که از طریق میانکنش با عوامل رونویسی در تنظیم بیان ژن‌ها در پاسخ به فرآیندهای زیستی مختلف نظیر پاسخ به تنش نقش اساسی ایفا می‌کنند (Lu et al., 2018). بر این اساس بخش پروموتور ژن‌های *LOX* یونجه یک‌ساله آنالیز و عناصر تنظیمی سیس پاسخ به تنش‌ها و هورمون‌ها شناسایی شد. نتایج نشان داد که ۲۹ نوع سیس المنت به تعداد ۲۸۴

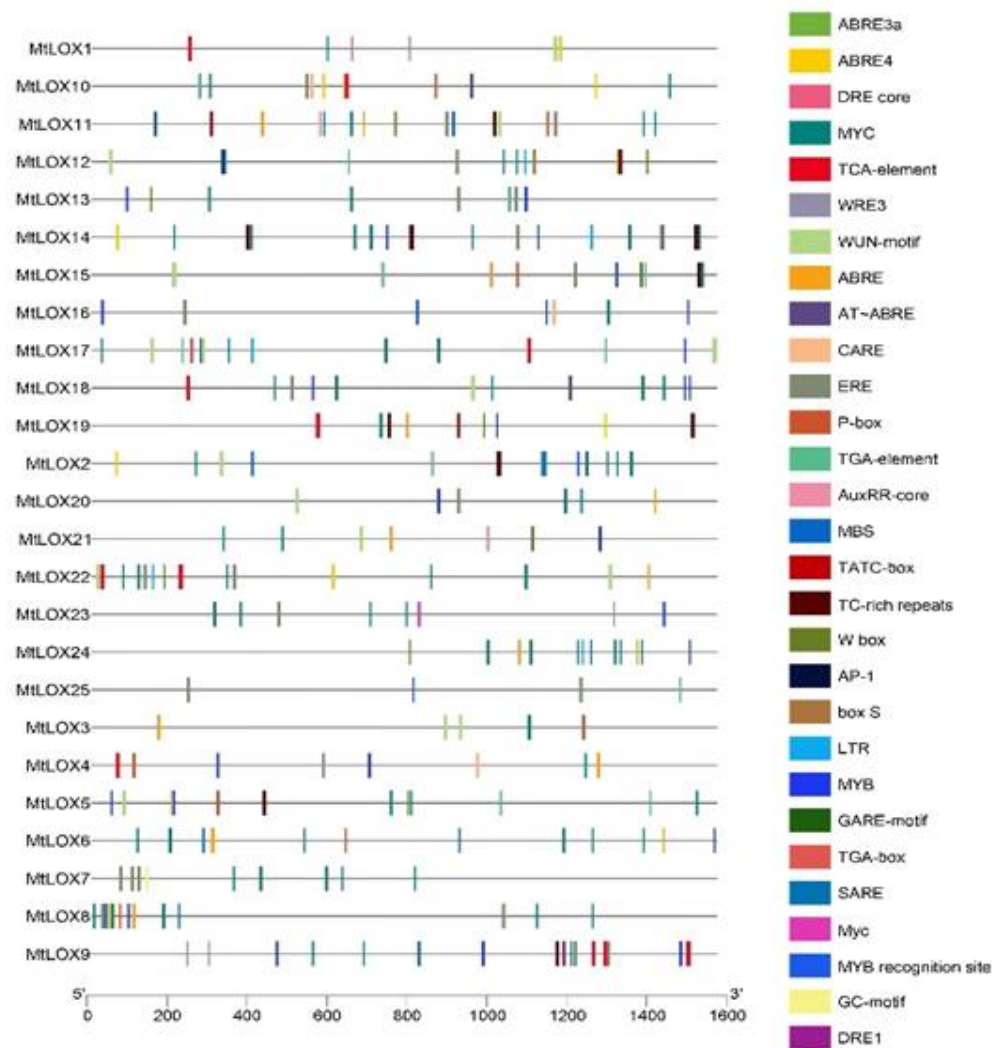
مطالعه *In Silico* ناحیه پروموتری و شناسایی مولکول‌های miRNA مؤثر ژن‌های *LOX*

در موجودات زنده بیان ژن در سطوح مختلف تنظیم می‌شود که در میان آن‌ها تنظیم در سطح رونویسی یک مکانیسم تنظیمی مهم می‌باشد (Li et al., 2019). از جمله عوامل مؤثر در تنظیم رونویسی، عناصر تنظیمی سیس ناحیه پروموتری

واقع مولکول‌های miRNA مولکول‌های غیرکدکننده با طول ۲۰ تا ۲۴ نوکلئوتید بوده و از طریق ممانعت از ترجمه و یا برش رونوشت ژن‌های هدف نقش خود را ایفا می‌کنند (Singh *et al.*, 2021). با توجه به اهمیت این مولکول‌های تنظیمی، نقش آن‌ها در تنظیم بیان ژن‌های *LOX* مطالعه شد. با توجه به اهمیت این مولکول‌های تنظیمی، نقش آن‌ها در تنظیم بیان ژن‌های *LOX* مطالعه شد. نتایج نشان داد که در یونجه یک‌ساله تمامی ژن‌های *LOX* تحت تنظیم پس از رونویسی به‌وسیله مولکول‌های miRNA هستند. از میان ژن‌های *LOX* یونجه یک‌ساله، ژن *MtLOX14* بیشترین تأثیرپذیری را از مولکول‌های miRNA داشته و ۱۱ نوع miRNA توانایی تأثیر بر روی بیان این ژن را دارند. همچنین تنظیم پس از رونویسی ژن *MtLOX24* متأثر از ۱۰ نوع miRNA بوده و ژن‌های *MtLOX2*، *MtLOX3* و *MtLOX23* تحت تأثیر ۹ نوع miRNA قرار دارند. همچنین مولکول‌های mtr-miR5554a-5p و mtr-miR5289a مؤثرترین مولکول‌های miRNA در تنظیم بیان پس از رونویسی ژن‌های *LOX* یونجه یک‌ساله بوده و به ترتیب بر روی پنج و هشت ژن مؤثر هستند که از طریق برش رونوشت ژن، نقش کارکردی خود را ایفا می‌کنند. با توجه به عناصر تنظیمی سیس شناسایی شده در این ژن‌ها و همچنین تأثیرپذیری ژن‌های *LOX* از مولکول‌های miRNA می‌توان گفت که این نوع تنظیم بیان ژن‌های لیپواکسیژناز در گیاه مورد مطالعه در سطح رونویسی و پس از رونویسی پیچیده بوده و نشان دهنده کارکردهای مختلف این ژن‌ها در پاسخ به فرآیندهای متفاوت زیستی می‌باشد. همچنین تعداد بالاتر ژن‌های *LOX-9* در *Medicago truncatula* (۵ کپی) نسبت به سایر بقولات مانند نخود (۲ کپی) و لوبیا (۳ کپی) نتیجه یک رویداد دپلیکاسیون نسبی خاص این گونه نیست، بلکه بیشتر بازتابی از فشار انتخابی مثبت و همزیستی پیچیده آن با ریزوبیوم در شرایط محیطی پر تنش هست. مهم‌ترین پیامد عملی این یافته برای اصلاح نباتات این است که پروموتور ژن *LOX-9* ویژه گرhek (مثلاً *MtLOX5*) می‌تواند برای بیان اختصاصی ژن‌های دفاعی در ریشه لوبیا یا سویا در شرایط کم‌آبی به کار رود، همچنین آلل‌های مرتبط با سطح بالای اسید جاسمونیک در جمعیت‌های بومی نخود به‌عنوان نشانگرهای انتخاب به کمک مارکر (MAS) برای افزایش تحمل به خشکی و پوسیدگی ریشه مورد استفاده قرار گیرند.

عدد در پروموتور این ژن‌ها وجود دارد (شکل ۵). عناصر تنظیمی سیس پاسخ به هورمون‌ها شامل عناصر پاسخ به ABA (*ABRE*, *ABRE4*, *ABRE3a*, *AT-ABRE*), پاسخ به جیبرلین (*GARE*, *P-box*, *TATC-box*), پاسخ به سالیسیلیک اسید (*SARE*, *TCA-element*), پاسخ به اتیلن (*ERE*), پاسخ به اکسین (*TGA-box*, *TGA-element*, *AuxRR-core*) و پاسخ هم‌زمان به جیبرلین و ABA (*CARE*) می‌باشد. برخی ژن‌های موردنظر ما از جمله *MtLOX 5,6* و ۱۹ دارای چندین عنصر تنظیمی *ABRE* و *CGTCA-motif* بودند که این امر نشان‌دهنده احتمال نقش داشتن این ژن‌ها در تنظیم هورمون‌های گیاه می‌باشد که این امر با مطالعات دیگر نیز هم‌خوانی دارد (Xu *et al.*, 2024). بیشترین تعداد عنصر تنظیمی پاسخ به هورمون مربوط به سیس المنت *ERE* با فراوانی ۲۶ است. عناصر تنظیمی پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی شامل پاسخ به الیسیاتور (*WRE3*), پاسخ به زخم و پاتوژن (*W box*, *box S*, *WUn-motif*), پاسخ به خشکی (*DRE core*, *DRE1*, *MBS*, *MYB*, *MYB recognition site*), پاسخ به کادمیوم (*AP-1*), پاسخ به سرما (*LTR*), پاسخ به استرس (*TC-rich repeats*) و پاسخ به *anoxic* (*GC-*) (*motif*) نیز در ژن‌های مورد مطالعه شناسایی شدند (شکل ۵). بیشترین فراوانی عناصر تنظیمی پاسخ به تنش‌ها مربوط به *MYC* و *MYB* است که به ترتیب ۷۷ و ۳۳ موتیف مربوط به این عناصر در پروموتور ژن‌های *LOX* شناسایی شده است. هورمون‌های جاسمونیک اسید، سالیسیلیک اسید و اتیلن سه هورمون اصلی در پاسخ به تنش‌های زیستی می‌باشند. وجود سیس المنت‌های پاسخ به هورمون‌ها و تنش‌های زیستی نظیر الیسیاتورها، پاتوژن‌ها و زخم‌ها در پروموتور ژن‌های *LOX* نشان‌دهنده نقش آن‌ها در پاسخ به تنش‌های زیستی است (Liu *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2019). همچنین وجود عناصر تنظیمی پاسخ به تنش‌های غیرزیستی حاکی از نقش این ژن‌ها در پاسخ به این تنش‌ها می‌باشد. به‌عنوان مثال مشخص شده است که بیان ژن‌های *LOX* گوجه‌فرنگی در پاسخ به تنش‌های شوری، سرما و خشکی القاء می‌شوند (Upadhyay *et al.*, 2019).

از مهم‌ترین مولکول‌های پیام‌رسان که طیف وسیعی از پاسخ‌های گیاهی به تنش‌ها را تنظیم می‌کند مولکول‌های miRNA هستند که مربوط به کلاس RNAهای غیرکدکننده بوده و در تنظیم بیان پس از رونویسی ژن‌ها نقش دارند. در



شکل ۵: عناصر تنظیمی شناسایی شده در پروموتور ژن‌های *LOX* یونجه یک‌ساله. هر عنصر تنظیمی و جایگاه آن بر روی پروموتور با یک رنگ متمایز نمایش داده شده است

Fig. 5: Regulatory elements identified in the promoter region of *LOX* genes in *Medicago truncatula*. Each regulatory element and its location on the promoter region is represented by a distinct color

شش تا نه اینترون دارند. وجود عناصر تنظیمی پاسخ به تنش‌ها و هورمون‌ها با فراوانی متفاوت نظیر ERE، MYB و MYC در پروموتور ژن‌های *LOX* و همچنین تأثیر مولکول‌های miRNA نظیر مولکول‌های mtr-miR5554a-5p و mtr-miR5289a بر تنظیم بیان پس از رونویسی این ژن‌ها حاکی از تنظیم پیچیده بیان ژن‌های *LOX* در سطح رونویسی و پس از رونویسی بوده و دلالت بر تنوع کارکردی آن‌ها دارد. نتایج این مطالعه اطلاعات ما در مورد خانواده ژنی *LOX* در یونجه یک‌ساله را افزایش داده و می‌تواند مطالعات در زمینه تاریخچه تکاملی ژن‌های *LOX* افزایش دهد.

نتیجه‌گیری و پیشنهادات

در این مطالعه اعضای خانواده ژنی *LOX* گیاه یونجه یک‌ساله (۲۵ ژن) از خانواده بقولات شناسایی و از نظر تکاملی و کارکردی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان‌دهنده حفاظت‌شدگی بالای این ژن‌ها از نظر ساختار ژنی، دمین‌های حفاظت شده، فاز اینترون و ویژگی‌های فیزیوشیمیایی پروتئین‌های کد شده به‌وسیله ژن‌های *LOX* می‌باشد. از نظر تکاملی همانند سایر گیاهان ژن‌های *LOX* یونجه یک‌ساله به دو گروه 9-*LOX* و 13-*LOX* تقسیم شدند که تعداد اعضاء تشکیل‌دهنده گروه 9-*LOX* بیشتر بود. مطالعه اگزون و اینترونی نشان داد که این خانواده غنی از اینترون بوده و بین

References

Bannenberg, G., Martínez, M., Hamberg, M. and Castresana, C. 2009. Diversity of the enzymatic activity in the lipoxygenase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Lipids*, 44(2): 85-95.

- Bailey, T. L., Williams, N., Misleh, C. and Li, W. W. 2006. MEME: Discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. *Nucleic Acids Research*, 34(suppl_2): W369-W373.
- Banthiya, S., Kalms, J., Yoga, E. G., *et al.*, 2016. Structural and functional basis of phospholipid oxygenase activity of bacterial lipoxygenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Biology of Lipids*, 1861(11): 1681-1692.
- Callum, J. B., Dixon, R. A., Farmer, A. D., *et al.*, 2001. The Medicago Genome Initiative: A model legume database. *Nucleic Acids Research*, 29: 114-117.
- Chen, C., Chen, H., Zhang, Y., *et al.*, 2020. TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Molecular Plant*, 13(8): 1194-1202.
- Chen, Z., Chen, X., Yan, H., *et al.*, 2015. The lipoxygenase gene family in poplar: Identification, classification, and expression in response to MeJA treatment. *PLOS ONE*, 10(4): e0125526.
- Feussner, I., & Wasternack, C. 2002. The lipoxygenase pathway. *Annual Review of Plant Biology*, 53: 275-297.
- Kang, Y., Liu, W., Guan, C., *et al.*, 2021. Evolution and functional diversity of lipoxygenase (*LOX*) genes in allotetraploid rapeseed (*Brassica napus* L.). *International Journal of Biological Macromolecules*, 188: 844-854.
- Kotapati, K. V., Palaka, B. K. and Ampasala, D. R. 2017. Alleviation of nickel toxicity in finger millet (*Eleusine coracana* L.) germinating seedlings by exogenous application of salicylic acid and nitric oxide. *The Crop Journal*, 5(3): 240-250.
- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7): 1870-1874.
- Li, N., Han, X., Feng, D., *et al.*, 2019. Signaling crosstalk between salicylic acid and ethylene/jasmonate in plant defense: Do we understand what they are whispering? *International Journal of Molecular Sciences*: 20(3), 671.
- Liu, F., Li, H., Wu, J., *et al.*, 2021. Genome-wide identification and expression pattern analysis of lipoxygenase gene family in banana. *Scientific Reports*, 11(1): 1-19.
- Liu, J., Zhou, Y., Li, J., *et al.*, 2020. Comprehensive genomic characterization and expression analysis of the lipoxygenase gene family in watermelon under hormonal treatments. *Agriculture*, 10(10): 429.
- Lu, Z., Ricci, W. A., Schmitz, R. J. and Zhang, X. 2018. Identification of cis-regulatory elements by chromatin structure. *Current Opinion in Plant Biology*, 42: 90-94.
- Mizuno, K., Iida, T., Takano, A., Yokoyama, M. and Fujimura, T. 2003. A new 9-lipoxygenase cDNA from developing rice seeds. *Plant & Cell Physiology*, 44(11): 1168-1175.
- Nguyen, H. D., Yoshihama, M. and Kenmochi, N. 2006. Phase distribution of spliceosomal introns: Implications for intron origin. *BMC Evolutionary Biology*, 6(1): 1-9.
- Padilla, M. N., Hernández, M. L., Sanz, C. and Martínez-Rivas, J. M. 2012. Molecular cloning, functional characterization and transcriptional regulation of a 9-lipoxygenase gene from olive. *Phytochemistry*, 74: 58-68.
- Paterson, A. H., Chapman, B. A., Kissinger, J. C., *et al.*, 2006. Many gene and domain families have convergent fates following independent whole-genome duplication events in *Arabidopsis*, *Oryza*, *Saccharomyces*, and *Tetraodon*. *Trends in Genetics*, 22(11): 597-602.
- Polturak, G. and Osbourn, A. 2021. The emerging role of biosynthetic gene clusters in plant defense and plant interactions. *PLOS Pathogens*, 17(7): e1009698.
- Porta, H. and Rocha-Sosa, M. J. P. P. 2002. Plant lipoxygenases: Physiological and molecular features. *Plant Physiology*, 130(1): 15-21.
- Sarde, S. J., Kumar, A., Remme, R. N. and Dicke, M. 2018. Genome-wide identification, classification and expression of the lipoxygenase gene family in pepper. *Plant Molecular Biology*, 98(4): 375-387.
- Shaban, M., Ahmed, M. M., Sun, H., *et al.*, 2018. Genome-wide identification of lipoxygenase gene family in cotton and functional characterization in response to abiotic stresses. *BMC Genomics*, 19(1): 1-13.
- Singh, P., Dutta, P. and Chakrabarty, D. 2021. miRNAs play critical roles in response to abiotic stress by modulating cross-talk of phytohormone signaling. *Plant Cell Reports*, 40(9): 1617-1630.
- Tang, H., Krishnakumar, V., Bidwell, S., *et al.*, 2014. An improved genome release (version Mt4.0) for the model legume *Medicago truncatula*. *BMC Genomics*, 15: 312.
- Tolley, J. P., Nagashima, Y., Gorman, Z., *et al.*, 2018. Isoform-specific subcellular localization of *Zea mays* lipoxygenases and oxo-phytodienoate reductase 2. *Plant Gene*, 13: 36-41.
- Umate, P. 2011. Genome-wide analysis of lipoxygenase gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Signaling & Behavior*, 6(3): 335-338.
- Upadhyay, R. K., Handa, A. K. and Mattoo, A. K. 2019. 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.). *Genes*, 10(9): 683.
- Vellosillo, T., Martínez, M., López, M. A., *et al.*, 2007. Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in *Arabidopsis* regulate lateral root development and defense responses. *The Plant Cell*, 19(3): 831-846.
- Viswanath, K. K., Varakumar, P., Pamuru, R. R., *et al.*, 2020. Plant lipoxygenases and their role in plant physiology. *Journal of Plant Biology*, 63(2): 83-95.
- Wang, J., Hu, T., Wang, W., *et al.*, 2019. Bioinformatics analysis of the lipoxygenase gene family in radish (*Raphanus sativus*) and functional characterization in response to abiotic and biotic stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23): 6095.

- Xu, L., Zhu, X., Yi, F., Liu, Y., Sod, B., Li, M., Chen, L., Kang, J., Yang, Q. and Long, R. 2024. A genome-wide study of the lipoxygenase gene families in *Medicago truncatula* and *Medicago sativa* reveals that MtLOX24 participates in the methyl jasmonate response. BMC Genomics, 25(1): 195. <https://doi.org/10.1186/s12864-024-10071-1>
- Zhang, Q., Zhao, Y., Zhang, J., *et al.*, 2021. The responses of the lipoxygenase gene family to salt and drought stress in foxtail millet (*Setaria italica*). Life, 11(11): 1169.
- Zheng, S.-J., van Dijk, J. P., Bruinsma, M. and Dicke, M. 2007. Sensitivity and speed of induced defense of cabbage (*Brassica oleracea* L.): Dynamics of *BoLOX* expression patterns during insect and pathogen attack. Molecular Plant-Microbe Interactions, 20(11): 1332-1345.
- Zhu, J., Wang, X., Guo, L., *et al.*, 2018. Characterization and alternative splicing profiles of the lipoxygenase gene family in tea plant (*Camellia sinensis*). Plant & Cell Physiology, 59(9): 1765-1781.