

赵 贺, 冀亚亮, 梁 潇, 等. 水稻 LEA 基因家族的全基因组鉴定及综合分析[J]. 沈阳农业大学学报, 2025, 56(5): 000-000.
ZHAO H, JI Y L, LIANG X, et al. Genome-wide identification and comprehensive analysis of LEA family in rice[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2025, 56(5): 000-000.

水稻 LEA 基因家族的全基因组鉴定及综合分析

赵 贺¹, 冀亚亮², 梁 潇³, 阮班普⁴, 于彦春^{4*}, 马殿荣^{5*}

(1. 沈阳农业大学 水稻研究所, 沈阳 110161; 2. 北京康普森生物技术有限公司, 北京 100000; 3. 辽东学院 农学院, 辽宁 丹东 118003; 4. 杭州师范大学 生命与环境科学学院, 杭州 310000; 5. 辽宁省农业科学院, 沈阳 110161)

摘要: [目的]大量研究表明, LEA 蛋白能够通过多种机制帮助植物应对环境压力, 在水稻中仍有大量 LEA 家族成员的功能尚未得到充分验证。因此, 通过对水稻 LEA 基因家族 (*OsLEA*) 的生物信息学分析, 并结合其在不同胁迫下的基因表达变化, 旨在挖掘参与水稻中响应非生物胁迫的 *OsLEA* 新成员。[方法]采用全基因组生物信息学方法对 *OsLEA* 基因家族进行了鉴定和分析。[结果]水稻基因组中共包含 83 个 *OsLEA* 基因家族成员, 这些基因不均匀地分布在 12 条染色体上, 根据其结构域特征可分为 8 个亚家族。理化性质分析显示, LEA 蛋白具有广泛的亲水性和较强的稳定性。亚细胞定位预测表明, 大多数 LEA 蛋白分布在细胞质、细胞膜和线粒体等细胞组分中。启动子顺式作用元件分析表明, *OsLEA* 基因的启动子区域富含与非生物胁迫、植物激素响应和生长发育相关的元件。组织表达模式和激素响应分析揭示, *OsLEA* 基因在不同组织和不同植物激素处理中表现出显著的表达特异性。此外, 非生物胁迫 (低温、高温、盐和重金属镉) 处理下, 部分 *OsLEA* 基因表现出明显的应答。[结论]通过整合生物信息学分析及多种激素与逆境胁迫下的表达谱数据, 初步揭示了 *OsLEA* 基因家族参与逆境响应的分子调控机制。基于此, 成功筛选出 *Os04g0589800*、*Os05g0362600*、*Os06g0324400* 和 *Os08g0163600* 等核心成员基因, 其在高盐、高温及低温胁迫下均呈现显著表达上调特征, 证实了它们在非生物胁迫应答中的关键生物学功能, 为抗逆水稻育种提供了极具应用潜力的分子靶标。

关键词: 水稻; LEA 基因家族; 非生物胁迫; 启动子顺式作用元件; 组织表达模式

中图分类号: S511

文献标识码: A

文章编号: 1000-1700(2025)05-0000-00

Genome-wide Identification and Comprehensive Analysis of LEA Gene Family in Rice

ZHAO He¹, JI Yaliang², LIANG Xiao³, RUAN Banpu⁴, YU Yanchun^{4*}, MA Dianrong^{5*}

(1. Rice Research Institute, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China; 2. Beijing CompSen Biotechnology Co., LTD., Beijing 100000, China; 3. School of Agriculture, Liaodong University, Dandong, Liaoning 118003, China; 4. College of Life and Environmental Science, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310000, China; 5. Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang 110161, China)

Abstract: [Objective] A large number of studies have shown that LEA proteins can help plants cope with environmental stress through various mechanisms. However, the functions of many LEA family members in rice have not been fully verified. Therefore, this study aimed to identify new LEA members involved in rice responses to abiotic stress through bioinformatics analysis of the *OsLEA* gene family and by combining their gene expression changes under different stresses. [Method] The *OsLEA* gene family was identified and analysed using a genome-wide bioinformatics approach. [Result] The results reveal that the rice genome contains 83 *OsLEA* family members, which are unevenly distributed across 12 chromosomes and can be classified into eight subfamilies based on structural

收稿日期: 2025-04-11 修回日期: 2025-07-30

基金项目: 辽宁省科技重大专项项目 (2024JH1/11700006)

第一作者: 赵 贺 (1996-), 男, 博士研究生, 从事水稻遗传育种, E-mail: 2021200080@stu.syau.edu.cn

通信作者: 于彦春 (1973-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 从事于水稻和拟南芥重要性状基因的克隆和功能研究, E-mail: ycyu@hznu.edu.cn; 马殿荣 (1974-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 从事北方粳稻种质资源创新利用、遗传育种及栽培生理生态研究, E-mail: madianrong@163.com

domain features. Physicochemical property analysis shows that LEA proteins are highly hydrophilic and stable. Subcellular localization predictions indicate that most LEA proteins are localized in cellular compartments such as the cytoplasm, cell membrane, and mitochondria. Promoter cis-acting element analysis highlights that the *OsLEA* gene promoters are enriched with elements associated with abiotic stress response, phytohormone regulation, and growth and development. Tissue expression pattern and hormone response analyses reveal significant expression specificity across different tissues and under various phytohormone treatments. Additionally, certain *OsLEA* genes exhibit notable responses to abiotic stresses such as low and high temperatures, salt, and heavy metal (cadmium) treatments. These findings provide valuable insights into the role of *OsLEA* genes in coping with environmental stress. **[Conclusion]** This study integrated bioinformatics analysis with expression profiling data under multiple hormone treatments and abiotic stress conditions, preliminarily revealing the molecular regulatory mechanisms through which the *OsLEA* gene family participates in stress responses. Building on these findings, we successfully screened core member genes—including *Os04g0589800*, *Os05g0362600*, *Os06g0324400*, and *Os08g0163600*—which exhibited significant upregulation under high-salinity, high-temperature, and low-temperature stresses. This confirms their critical biological functions in abiotic stress responses and establishes them as highly promising molecular targets for breeding stress-resistant rice cultivars.

Keywords: rice; *LEA* gene family; abiotic stress; promoter cis-acting elements; tissue expression pattern

胚胎发育晚期丰富蛋白(Late Embryogenesis Abundant Protein, LEA)是一类在植物种子胚胎发育晚期特异性积累的小分子蛋白,最早发现于棉花(*Gossypium hirsutum*)子叶的胚胎发育后期,后续在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻(*Oryza sativa*)等物种中相继被鉴定^[1-2]。基于序列特征和功能域差异,LEA 蛋白家族被系统划分为 8 个亚家族,包括 LEA1、LEA2、LEA3、LEA4、LEA5、LEA6、脱水素(Dehydrin)和种子成熟蛋白(Seed Maturation Protein, SMP)^[2-3]。大部分 LEA 蛋白的氨基酸组成中富含亲水性氨基酸(如 Gly、Ala、Ser),因此这类蛋白也通常被认为是亲水蛋白^[1,4]。但部分亚家族(如 LEA2、LEA3 和 SMP)成员因含有疏水性结构域被归类为非典型 LEA 蛋白,反映了该家族在进化过程中的功能分化和环境适应性^[1,5]。LEA 蛋白广泛分布于植物细胞的亚细胞区室,包括细胞质、细胞核、质膜、线粒体及叶绿体,其定位多样性与其在胁迫响应中的特异性功能密切相关^[3,6]。研究表明,LEA 蛋白的生物学功能主要体现 3 个方面:(1)部分 LEA 蛋白在脱水过程中会发生构象改变,折叠形成 α -螺旋结构,通过横向嵌入到细胞膜中从而维持细胞膜的稳定性^[7];(2)作为分子伴侣,LEA 蛋白能够抑制胁迫引起的蛋白质聚集,并通过调控玻璃态基质形成维持细胞内亚细胞结构的完整性^[8-9]。(3)部分 LEA 蛋白可通过螯合多种金属阳离子,发挥离子稳态调控作用,从而隔离金属离子污染^[5]。

通过上述机制,LEA 蛋白在水稻应对非生物胁迫中发挥着重要作用。*OsLEA1a* 蛋白在溶液中呈现高度无序的构象,但在干旱引起的脱水过程中发生构象变化,同时该蛋白与非还原糖和磷脂的相互作用,因此 *OsLEA1a* 可能在干旱发生时通过稳定细胞膜或生物膜的结构,发挥保护作用^[10]。*OsLEA3-1* 的表达受干旱和盐碱胁迫处理的强烈诱导,过表达 *OsLEA3-1* 基因的水稻在田间条件下表现出显著增强的抗旱能力^[11]。体外研究表明 *OsLEA3-2* 可以保护乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, LDH)免受胁迫引起的聚集和失活;同时过表达 *OsLEA3-2* 拟南芥和水稻在干旱和盐碱条件下的生存能力显著高于野生型^[12]。*OsLEA14-A* 的蛋白在功能上与 *OsLEA3-2* 类似,体外纯化的 *OsLEA14-A* 能够维持 LDH 的活性,免受冻融、高温和干燥引起的失活^[13]。同样,在水稻中过表达 *OsLEA14-A*,提高了转基因水稻在干旱、高盐和重金属(铜和汞)胁迫下的存活率^[13]。*OsEm1* 基因编码的 I 类 LEA 蛋白在响应干旱、盐分、低温等非生物胁迫时发挥作用,过表达该基因使水稻对脱落酸(ABA)的敏感性增强,并显著提高转基因水稻在干旱胁迫下的存活率^[14]。II 类 LEA 蛋白 Rab16A 通过激活抗氧化酶(如 SOD、CAT)、分子伴侣(如 HSP70)及 ROS 清除系统,协同增强水稻对盐胁迫的耐受性^[15]。此外,外源导入 *OsLEA4* 蛋白可提高大肠杆菌对高盐、高温、冷冻和紫外线辐射的耐受性^[16]。另一项关于 *OsLEA5* 的研究中指出, *OsLEA5* 作为 ABA 信号通路中的正调控因子,通过增强抗氧化酶活性、调控 ABA 生物合成/代谢基因表达,并与 ZFP36 协同激活 *OsAPX1* 启动子活性,从而提升植物抗逆性并介导 ABA 对种子萌发的双向调控^[17]。

大量研究表明,LEA 蛋白能够通过多种机制帮助植物应对环境压力,并通过转基因试验展示了其在提升植物抗逆性方面的作用。然而在水稻中,仍有大量 LEA 家族成员的功能尚未得到充分验证。因此,本研究通过对水稻 LEA 家族的生物信息学分析,并结合其在不同胁迫下的基因表达变化,旨在挖掘参与水稻中响应非生

物胁迫的 LEA 新成员。

1 材料与方法

1.1 *OsLEA* 基因家族成员的鉴定

从 Pfam 数据库 (<http://pfam.xfam.org>) 下载 *OsLEA* 基因家族的隐马尔可夫模型 (HMM) 文件, 包括 LEA1 (PF03760)、LEA2 (PF03168)、LEA3 (PF03242)、LEA4 (PF02987)、LEA5 (PF00477)、LEA6 (PF10714)、脱水素 (Dehydrin, PF00257) 及种子成熟蛋白 (Seed Maturation Protein, SMP, PF04927)^[4-5]。同时, 从 TAIR 数据库 (<https://www.arabidopsis.org>) 获取拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 已发表的 LEA 全蛋白组序列 (对于 PF10714, 由于缺乏已验证的基因, 采用两条未验证序列作为补充)。从 Ensembl Plants 数据库 (<http://plants.ensembl.org>) 下载水稻 (*Oryza sativa*) 全蛋白组序列及注释文件。使用 HMMER 软件包中的 hmmsearch 工具 (v3.4), 以 $e\text{-value} < 0.000\ 1$ 为筛选阈值, 对水稻全蛋白组序列进行 *OsLEA* 基因家族成员的初步鉴定。随后, 基于水稻全蛋白序列构建本地 BLAST 数据库, 利用拟南芥 LEA 蛋白序列进行 BLASTP 比对 ($e\text{-value} < 0.000\ 1$)。将 HMMER 和 BLASTP 鉴定结果取交集, 获得候选的 *OsLEA* 基因家族成员。最后, 使用 PfamScan 工具 (v33.1) 对候选序列进行结构域验证, 确保其包含目标 LEA 结构域。在 Linux 环境下对鉴定结果进行处理, 每个基因仅保留最长的转录本进行后续分析。

1.2 染色体定位分析、进化树绘制、基因及蛋白结构分析

基于水稻基因组 GFF 注释文件, 提取 *OsLEA* 基因的染色体位置信息, 使用 MG2C 在线工具 (http://mg2c.iask.in/mg2c_v2.1/index.html) 绘制染色体分布图谱。利用 MEGA11 软件进行多序列比对及构建最大似然法 (Maximum Likelihood, ML) 系统发育树 (1 000 次 Bootstrap 重复)^[18]。利用 Python 脚本从水稻基因组 CDS 序列中提取 *OsLEA* 基因的编码区, 计算其编码蛋白的理化特性, 包括氨基酸组成、分子量、理论等电点 (pI)、不稳定性指数及疏水性 (GRAVY 值), 并通过 ExPASy 的 ProtParam 工具 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 进行验证。

1.3 亚细胞定位预测

使用 WoLF PSORT 工具 (<https://www.genscript.com/wolf-psort.html/>) 预测 *OsLEA* 蛋白的亚细胞定位。通过 GSDB 2.0 网站 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 绘制 *OsLEA* 基因的外显子-内含子结构图; 利用 MEME Suite (<http://meme-suite.org>) 预测保守基序 (设置基序数为 10, 宽度范围为 5~20 个氨基酸残基), 并通过 TBtools 进行可视化。Motif logo 图使用在线工具 (<https://logojs.wenglab.org/>) 生成。

1.4 启动子顺式作用元件分析

从水稻参考基因组注释文件中提取 *OsLEA* 基因的坐标信息。使用 Bedtools (v2.31.1) 提取每个基因起始密码子上游 2 000 bp 的启动子区域序列。通过 PlantCARE 在线工具 (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 预测启动子区域中的顺式作用元件, 包括与非生物胁迫、植物激素响应及生长发育相关的元件^[19]。使用 Python 脚本对预测结果进行统计和可视化, 生成顺式元件分布热图。

1.5 组织表达模式与植物激素响应

从 RiceXPro 数据库 (<https://ricexpro.dna.affrc.go.jp/>) 获取 *OsLEA* 基因在不同组织 (根、茎、叶、种子等) 中的表达数据 (FPKM 数据)。利用 R 软件 (v3.6.1) 中的 pheatmap 包 (v1.0.12) 绘制组织特异性表达热图, 颜色梯度表示基因表达水平的高低。基于 RiceXPro 提供的激素处理数据 (如脱落酸 ABA、赤霉素 GA、细胞分裂素等), 分析 *OsLEA* 基因在不同激素处理下的表达变化, 并通过热图展示其响应模式。

1.6 植物材料、生长条件和逆境处理

以水稻品种“中花 11”为试验材料, 选取生长 2 周的幼苗进行非生物胁迫处理。热处理: 将幼苗置于植物培养箱中, 设置温度为 45 °C, 相对湿度为 60%。分别在处理前 (0 h) 及处理后 1, 3, 6 h 采集地上部分样品。冷处理: 将幼苗转移至 16 °C 冷室 (相对湿度 45%) 模拟冷胁迫, 取样时间点同热处理。盐处理: 使用 200 mM 氯化钠 (NaCl) 溶液模拟盐胁迫, 分别在 0, 1, 3, 6 h 采集地上部分样品。重金属处理: 采用 100 μ M CdCl₂ 溶液处理幼苗, 分别在 0, 1, 3, 6 h 采集根系样品。所有样品立即液氮速冻, 保存于 -80 °C 超低温冰箱, 用于后续 RNA 提取及 qRT-PCR 分析。

1.7 RNA 提取及定量实时 PCR

使用 TRIzol 法从水稻不同处理下的组织中提取 RNA。RNA 反转录合成 cDNA, 随后进行定量实时 PCR。定量实时 PCR 选择两步法, 参数为 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 40 个循环。荧光定量引物见补充表格。相对定量使用

2^{-△△CT}法计算,以每种处理的 0 h 为对照。使用 SPSS 22.0 软件对各时间点表达量进行单因素方差分析^[20]。所有使用的引物序列列于表 1。

2 结果与分析

2.1 *OsLEA* 基因家族成员的鉴定与分类

通过对隐马尔可夫模型搜索(HMMsearch,Hidden Markov Model search)和 BLASTP 方法的综合分析,本研究共鉴定出 83 个 *OsLEA* 家族基因,并根据其结构域特征及系统发育关系对其进行了分类。水稻基因组中 *OsLEA* 基因的分布呈现特定的染色体定位模式(图 1)。这些基因分布在水稻的 12 条染色体上,但在不同染色体上的分布存在差异。其中,1 号和 3 号染色体上含有较多 *OsLEA* 基因,而 9 号和 10 号染色体仅含有少量基因。

表1 引物序列
Table 1 Primer Sequence

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
actinF	catcttggcatctctcagcac
actinR	aactttgtccacgctaalgaa
Os04g0589800-F	aagtcgaagcacaaaacgca
Os04g0589800-R	cttcgcgctctgcatttttc
Os05g0362600-F	acctctgcctcaaaattgagcttg
Os05g0362600-R	cagacttcaccgccttgt
Os06g0324400-F	catgaaagccaagccagg
Os06g0324400-R	tcgcctcgcgttcttctcat
Os08g0163600-F	gcctcgtcccgcttcaagta
Os08g0163600-R	cttggatttgggttggagc
Os08g0327700-F	gcgatgcagtcaccaagga
Os08g0327700-R	cttctccactggccttgc

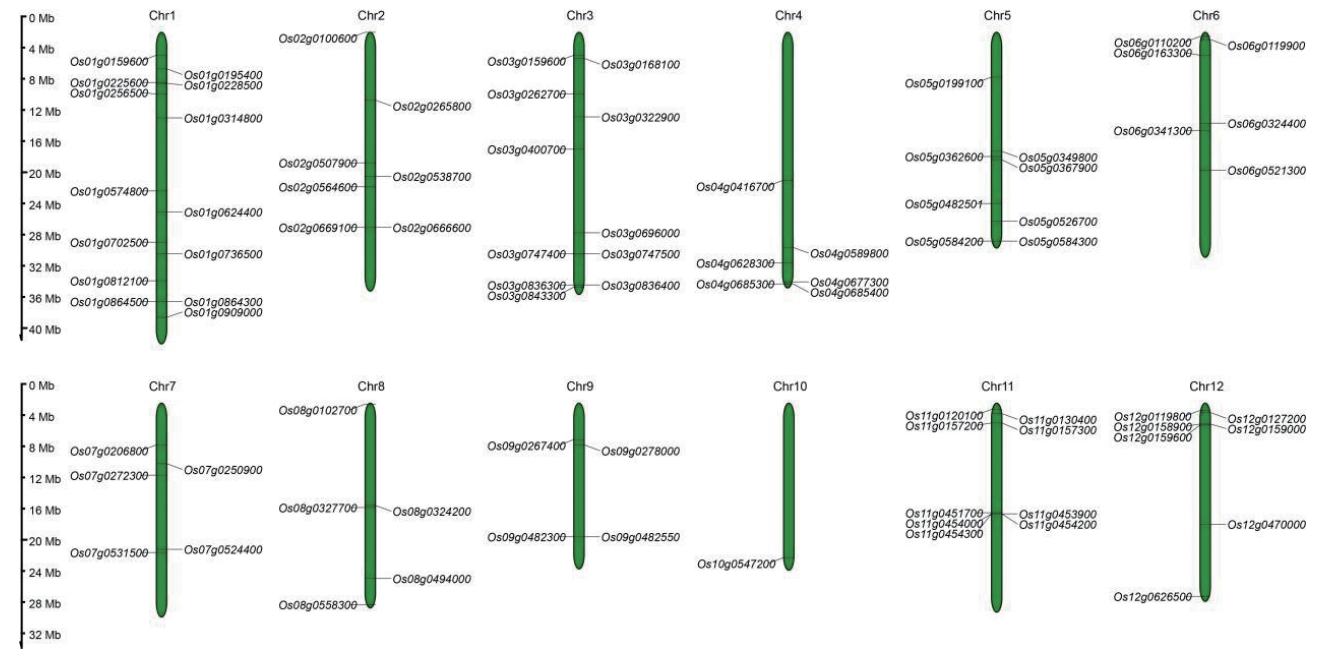


图1 *OsLEA* 基因在水稻染色体上的分布
Figure 1 Chromosomal location of *OsLEA* gene

基于 *OsLEA* 基因的结构域特征和系统发育分析,可将其归类为 8 个亚家族,包括 LEA1 至 LEA6、脱水素(Dehydrin)和种子成熟蛋白(SMP)。根据系统发育树的分析,基因家族成员在不同的亚家族中分布存在显著差异,且各组的基因数量并不均匀(图 2)。其中,LEA2 亚家族形成了一个明显的单系群(monophyleticclade),成员数量最多,共计 54 个基因,包括 *Os03g0262700*、*Os11g0130400* 等,表明其在进化过程中可能经历了较多的基因扩增事件。

2.2 *OsLEA* 基因的理化性质分析与亚细胞定位预测

本研究对 *OsLEA* 基因家族成员的多个特征进行了分析和预测,涵盖了基因长度、氨基酸数量、分子量、理论等电点、稳定性指数、疏水性及亚细胞定位预测等(表 2)。由表 2 可知,*OsLEA* 基因长度从 321~993 碱基对不等,基因结构以可视化的方式展示于图 3A,氨基酸数量在 93~330。其编码的蛋白质分子量差异显著,从约 10 kDa 到超过 35 kDa。理论等电点(pI)范围为 5.00~10.83,稳定性指数在 11.41~53.93,表明蛋白质稳定性差异较大。大多数 *OsLEA* 蛋白具有较强的亲水性(GRAVY 值为负),提示它们可能在细胞质或其他水溶性环境中稳定。亚细胞定位分析显示,*OsLEA* 蛋白广泛分布于细胞质、细胞膜、线粒体和溶酶体等。

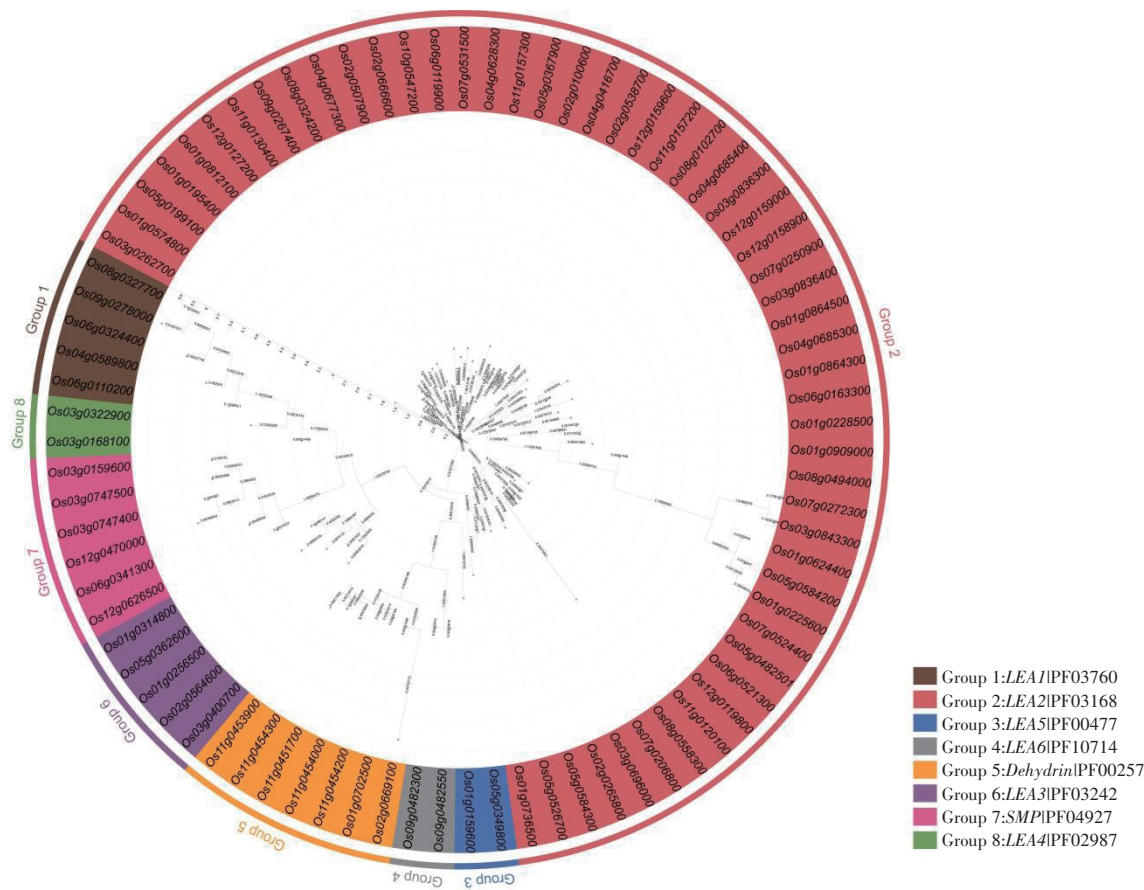


图2 OsLEA 系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of OsLEA

表 2 OsLEA 蛋白序列理化性质

Table 2 Physical and chemical properties of OsLEA

基因位点编号 Gene locus ID	基因长度/bp Gene length	氨基酸长度 Amino acid number	分子量/Da Molecular weight	等电点 Theoretical pI	稳定指数 Instability index	疏水性指数 GRAVY	亚细胞定位 Localizations
Os01g0159600	282	93	10 136.20	7.95	36.01	-1.21	细胞质 Cytoplasm
Os01g0195400	867	288	29 784.27	9.87	43.69	0.08	细胞膜 Cell membrane
Os01g0225600	456	151	16 239.35	5.00	11.41	-0.07	线粒体 Mitochondrion
Os01g0228500	993	330	35 385.38	8.84	53.93	-0.22	细胞膜 溶酶体 液泡 Cell membrane Lysosome Vacuole
Os01g0256500	321	106	10 378.43	10.83	30.92	0.01	线粒体 Mitochondrion
Os01g0314800	282	93	9 792.19	10.14	40.84	-0.33	线粒体 Mitochondrion
Os01g0574800	876	291	29 913.30	10.38	52.25	0.15	细胞膜 Cell membrane
Os01g0624400	456	151	16 243.70	8.92	38.22	0.30	胞外 Extracellular
Os01g0702500	567	188	19 342.07	9.25	49.32	-0.86	细胞质 细胞核 Cytoplasm Nucleus
Os01g0736500	771	256	27 275.57	5.80	44.82	-0.03	细胞膜 溶酶体 液泡 Cell membrane Lysosome Vacuole
Os01g0812100	1 044	347	37 384.42	10.30	52.69	-0.16	细胞膜 Cell membrane
Os01g0864300	726	241	26 737.72	9.30	29.87	0.04	细胞膜 溶酶体 液泡 Cell membrane Lysosome Vacuole
Os01g0864500	717	238	26 010.37	9.88	35.92	-0.25	细胞膜 Cell membrane
Os01g0909000	1 368	455	49 143.29	10.14	70.35	-0.47	细胞膜 Cell membrane
Os02g0100600	645	214	22 500.56	10.44	63.15	0.14	细胞膜 Cell membrane
Os02g0265800	606	201	20 362.48	11.32	45.25	0.46	细胞膜 Cell membrane
Os02g0507900	753	250	26 865.33	6.07	39.65	-0.20	细胞膜 Cell membrane
Os02g0538700	675	224	23 714.10	9.04	49.35	0.22	细胞膜 Cell membrane
Os02g0564600	276	91	9 417.59	10.37	46.07	-0.19	线粒体 Mitochondrion

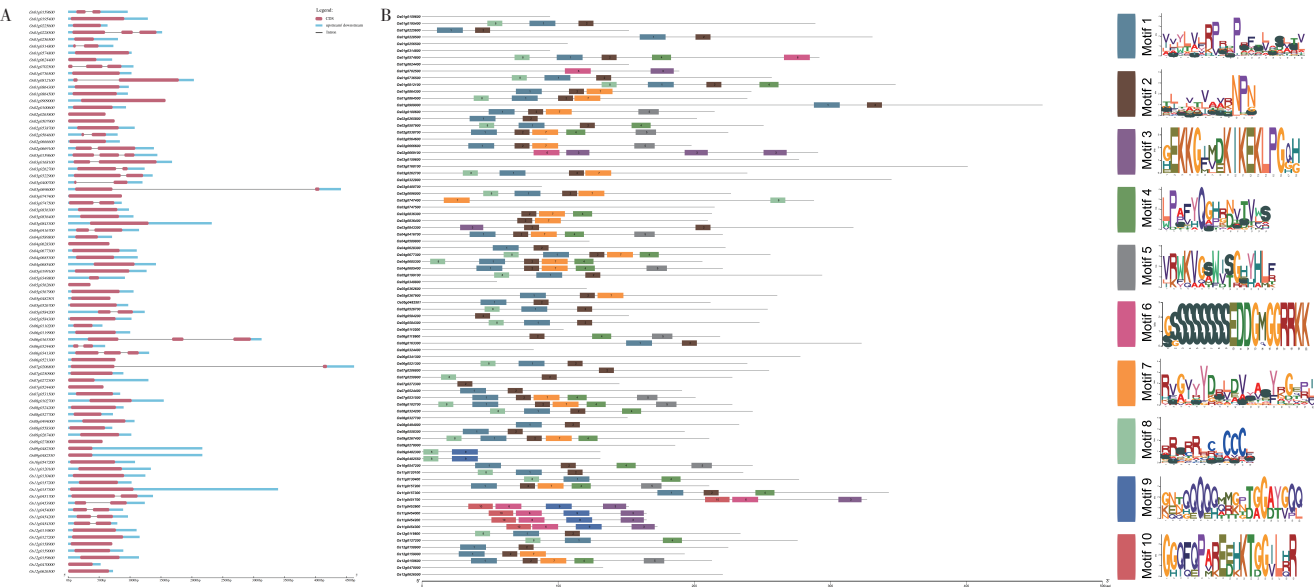
续表2

基因位点编号 Gene locus ID	基因长度/bp Gene length	氨基酸长度 Amino acid number	分子量/Da Molecular weight	等电点 Theoretical pI	稳定指数 Instability index	疏水性指数 GRAVY	亚细胞定位 Localizations
Os02g0666600	594	197	21 527.93	10.49	44.67	0.14	细胞膜 Cell membrane
Os02g0669100	873	290	30 921.88	5.68	62.61	-1.10	细胞质 Cytoplasm
Os03g0159600	831	276	27 189.91	4.95	38.02	-0.15	细胞质 细胞核 Cytoplasm Nucleus
Os03g0168100	1 203	400	41 859.41	8.26	27.72	-1.04	内质网 Endoplasmic reticulum
Os03g0262700	717	238	25 158.84	9.25	36.14	0.34	细胞膜 Cell membrane
Os03g0322900	1 035	344	36 790.79	6.39	15.28	-1.01	细胞质 细胞膜 Cytoplasm Cell membrane
Os03g0400700	264	87	9 388.54	9.50	44.79	-0.16	线粒体 Mitochondrion
Os03g0696000	681	226	24 426.97	9.12	36.87	0.15	细胞膜 Cell membrane
Os03g0747400	864	287	31 007.95	12.00	85.01	-0.79	细胞质 Cytoplasm
Os03g0747500	645	214	21 272.94	4.42	44.20	-0.33	细胞质 Cytoplasm
Os03g0836300	639	212	22 799.22	9.46	31.24	0.16	细胞膜 Cell membrane
Os03g0836400	630	209	22 382.13	8.16	33.19	0.11	细胞膜 Cell membrane
Os03g0843300	951	316	34 798.05	4.90	23.09	-0.38	细胞质 Cytoplasm
Os04g0416700	663	220	23 557.95	8.26	42.91	0.29	细胞膜 Cell membrane
Os04g0589800	369	122	12 563.74	9.52	16.54	-0.94	细胞质 线粒体 Cytoplasm Mitochondrion
Os04g0628300	669	222	23 602.96	9.86	40.73	0.17	细胞膜 Cell membrane
Os04g0677300	768	255	27 788.94	10.17	49.10	-0.07	细胞膜 Cell membrane
Os04g0685300	618	205	22 206.71	9.14	49.53	0.30	细胞膜 Cell membrane
Os04g0685400	663	220	24 532.02	7.61	48.18	0.13	细胞膜 Cell membrane
Os05g0199100	882	293	30 328.71	10.03	39.59	0.09	细胞膜 Cell membrane
Os05g0349800	165	54	5 880.29	8.30	31.33	-1.66	细胞质 细胞核 Cytoplasm Nucleus
Os05g0362600	363	120	13 165.77	6.12	24.66	-0.38	线粒体 Mitochondrion
Os05g0367900	783	260	26 759.26	8.77	42.98	0.17	细胞膜 溶酶体 液泡 Cell membrane Lysosome Vacuole
Os05g0482501	636	211	22 070.48	11.70	45.34	0.29	细胞膜 Cell membrane
Os05g0526700	762	253	26 418.31	9.15	31.14	0.28	细胞膜 溶酶体 液泡 Cell membrane Lysosome Vacuole
Os05g0584200	456	151	16 545.97	5.07	23.54	0.02	线粒体 Mitochondrion
Os05g0584300	744	247	25 987.85	9.51	25.34	0.21	细胞膜 Cell membrane
Os06g0110200	312	103	11 184.72	10.04	27.31	-0.82	细胞质 Cytoplasm
Os06g0119900	657	218	23 422.58	8.44	37.55	0.14	细胞膜 Cell membrane
Os06g0163300	969	322	34 710.27	9.41	50.69	-0.21	细胞膜 Cell membrane
Os06g0324400	246	81	8 716.55	6.84	23.40	-1.31	细胞质 Cytoplasm
Os06g0341300	834	277	27 921.07	4.19	25.57	-0.29	细胞质 细胞核 Cytoplasm Nucleus
Os06g0521300	717	238	24 950.31	6.74	53.69	0.21	细胞膜 溶酶体 液泡 Cell membrane Lysosome Vacuole
Os07g0206800	765	254	27 151.33	9.57	45.90	0.22	细胞膜 溶酶体 液泡 Cell membrane Lysosome Vacuole
Os07g0250900	684	227	24 545.17	7.76	29.88	0.15	细胞膜 Cell membrane
Os07g0272300	435	144	16 249.02	4.78	21.16	-0.69	线粒体 Mitochondrion
Os07g0524400	573	190	19 643.61	9.04	27.18	0.60	细胞膜 Cell membrane
Os07g0531500	603	200	22 544.80	8.98	33.13	-0.11	细胞膜 Cell membrane
Os08g0102700	684	227	25 208.83	9.20	31.33	0.14	细胞膜 Cell membrane
Os08g0324200	729	242	25 723.17	8.39	44.27	0	细胞膜 Cell membrane
Os08g0327700	453	150	15 163.28	9.10	34.14	-0.82	细胞质 Cytoplasm
Os08g0494000	699	232	25 214.53	10.43	65.36	0.32	细胞膜 Cell membrane
Os08g0558300	579	192	20 601.22	6.11	53.32	0.12	线粒体 Mitochondrion
Os09g0267400	633	210	22 636.72	7.53	35.02	0.09	细胞膜 Cell membrane
Os09g0278000	558	185	17 333.87	6.98	38.37	-0.18	细胞质 细胞膜 Cytoplasm Cell membrane
Os09g0482300	393	130	13 853.09	6.54	36.81	-0.82	细胞核 Nucleus
Os09g0482550	393	130	13 853.09	6.54	36.81	-0.82	细胞核 Nucleus
Os10g0547200	729	242	25 916.45	8.93	48.05	0.20	细胞膜 Cell membrane
Os11g0120100	708	235	25 248.06	10.06	49.05	0.23	细胞膜 Cell membrane
Os11g0130400	831	276	29 746.24	10.97	48.58	-0.07	细胞膜 Cell membrane
Os11g0157200	633	210	23 038.14	7.69	37.08	0.15	细胞膜 Cell membrane
Os11g0157300	1 029	342	36 233.17	9.79	65.82	-0.15	细胞膜 Cell membrane
Os11g0451700	981	326	31 251.22	8.95	16.81	-0.69	细胞质 细胞核 Cytoplasm Nucleus
Os11g0453900	456	151	15 551.66	9.13	37.68	-1.25	细胞质 细胞核 Cytoplasm Nucleus
Os11g0454000	495	164	16 724.11	9.25	25.21	-1.05	细胞质 细胞核 Cytoplasm Nucleus

续表2

基因位点编号 Gene locus ID	基因长度/bp Gene length	氨基酸长度 Amino acid number	分子量/Da Molecular weight	等电点 Theoretical pI	稳定指数 Instability index	疏水性指数 GRAVY	亚细胞定位 Localizations
Os11g0454200	495	164	16 536.84	9.27	24.32	-1.03	细胞质 细胞核 Cytoplasm Nucleus
Os11g0454300	519	172	17 325.72	9.19	14.17	-1.08	细胞质 细胞核 Cytoplasm Nucleus
Os12g0119800	702	233	24 894.44	9.49	41.40	0.20	细胞膜 溶酶体 液泡 Cell membrane Lysosome Vacuole
Os12g0127200	828	275	29 375.80	10.50	47.78	-0.01	细胞膜 Cell membrane
Os12g0158900	675	224	23 060.42	9.64	38.75	0.22	细胞膜 Cell membrane
Os12g0159000	579	192	20 808.36	9.08	23.13	-0.11	细胞膜 内质网 Cell membrane Endoplasmic reticulum
Os12g0159600	639	212	23 143.17	8.26	41.55	0.14	细胞膜 Cell membrane
Os12g0470000	399	132	13 923.55	5.74	50.52	-0.12	细胞质 Cytoplasm
Os12g0626500	663	220	21 891.84	4.61	44.70	-0.32	细胞质 细胞核 Cytoplasm Nucleus

为进一步探究 *OsLEA* 基因的功能特点,本研究对其基因结构和保守基序(Motif)进行了系统分析。通过 MEME 工具预测,鉴定出 *OsLEA* 基因中 10 个显著的保守基序(Motif),并分析了这些基序在基因中的分布情况(图 3B)。每个基序都具有独特的氨基酸组成,提示这些区域可能在 *OsLEA* 蛋白的功能执行中发挥关键作用。具体而言,Motif 1 至 Motif 10 中的保守氨基酸残基在不同基序间有显著差异,显示它们在蛋白质功能上的多样性。从结构上看,这些 Motif 在 *OsLEA* 基因中并非均匀分布。例如,Motif 2 和 Motif 7 在大多数 *OsLEA* 基因中具有较高的出现频率,这表明它们可能在某些情况下与水稻对非生物胁迫的应答相关,但需要通过进一步的功能验证来确认它们的具体作用机制。与此相比,Motif 6 和 Motif 9 的出现频率较低,但在特定基因中有集中分布,表明它们在调节特定细胞过程或特定胁迫条件下可能起到重要作用。



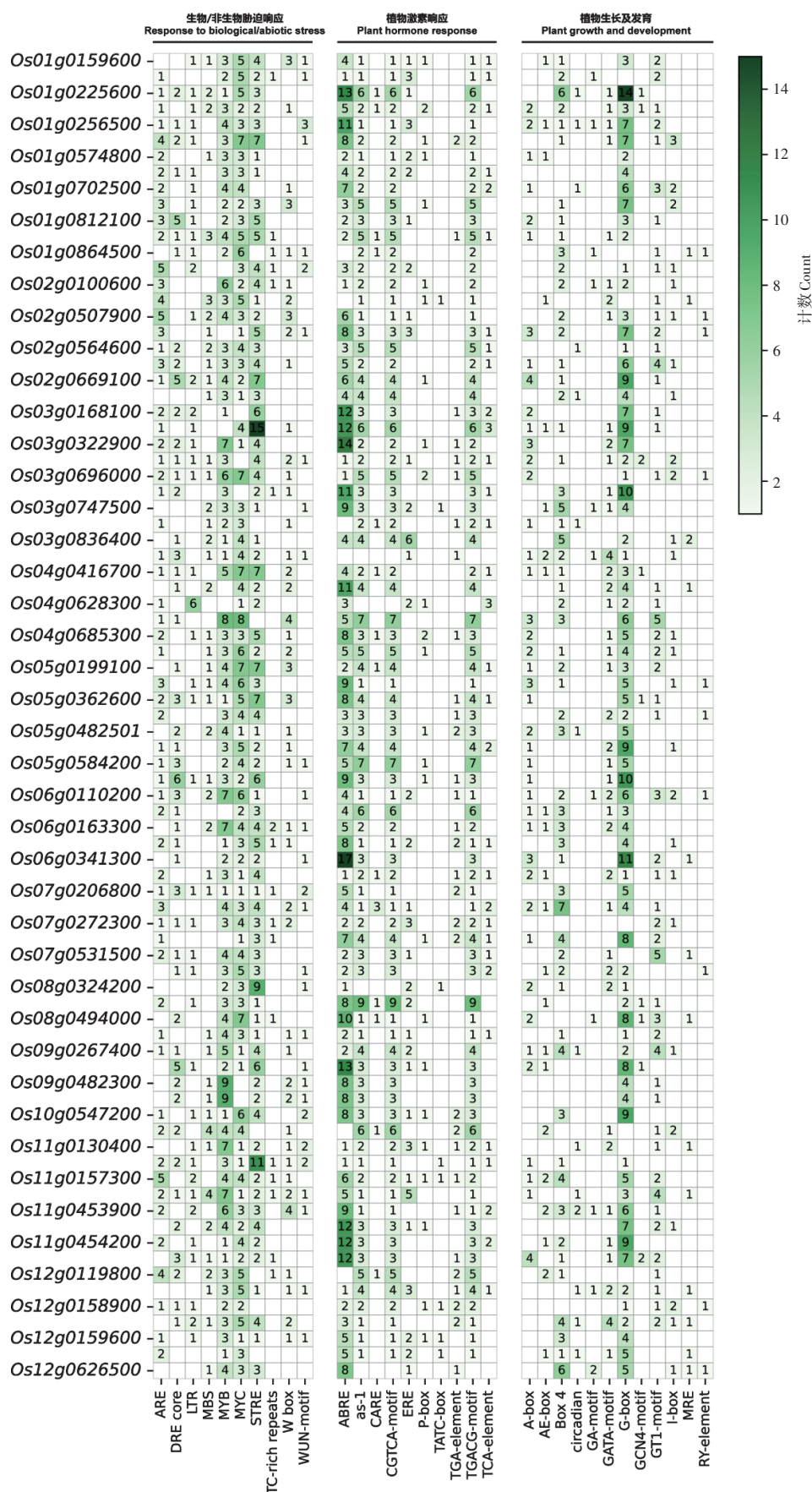
A. *OsLEA* 基因结构; B. *OsLEA* 蛋白 Motif 分析
A. Analysis of gene structure for *OsLEA* family; B. Analysis of *OsLEA*-protein motif domain.

图 3 *OsLEA* 基因结构与 Motif 分析

Figure 3 Schematic graph of *OsLEA* gene structure and *OsLEA* Motif analysis

2.3 启动子顺式调控元件分析

为探讨 *OsLEA* 基因在逆境响应、植物激素调控及生长发育中的功能,本研究首先对其启动子区域的顺式调控元件(cis-elements)进行了分析。结果显示,与非生物胁迫相关的 DRE、LTR 和 MBS 等元件广泛分布,表明 *OsLEA* 基因可能在盐碱、低温等胁迫响应中发挥重要作用(图 4)。此外,激素响应元件(如 as-1、TGA-box 和 AuxRR-core)在多个 *OsLEA* 基因启动子中富集。不同 *OsLEA* 基因的顺式作用元件分布存在显著差异。如 *Os03g0322900* 和 *Os06g0341300* 含有丰富的 ARE、DREcore 和 MYB 结合位点,可能增强其抗氧化及抗旱能力;

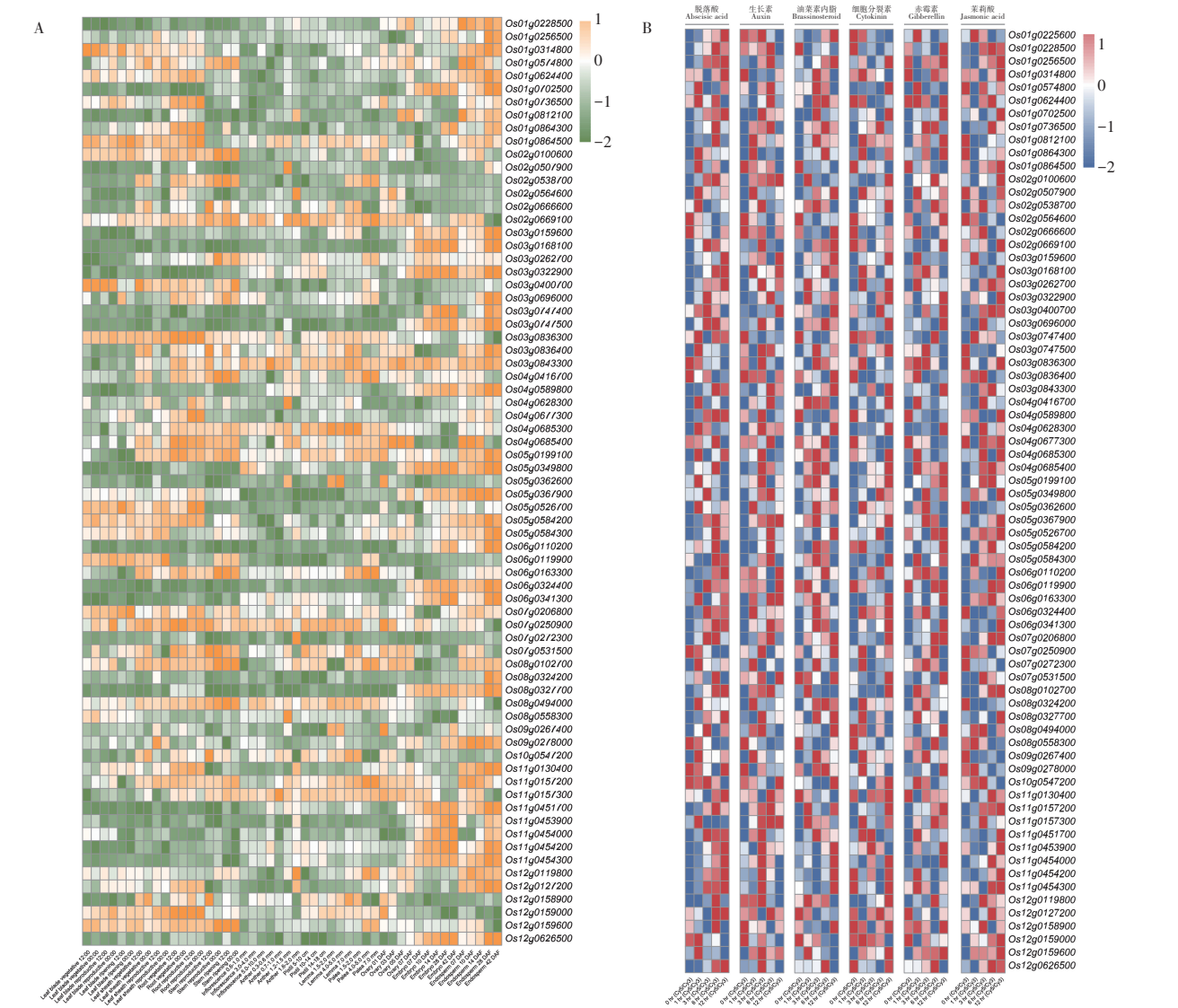
图 4 *OsLEA* 启动子顺式调控元件特征Figure 4 Characteristics of the cis-regulatory elements of the *OsLEA* promoters

Os01g0225600 则富含 G-box(16 个拷贝),可能影响光照响应、种子成熟及胚乳发育。值得注意的是,部分 *Os-LEA* 基因同时富含多种顺式作用元件,提示其可能在逆境胁迫、激素信号传导及生长发育之间发挥协调作用。

2.4 *OsLEA* 基因的组织表达模式与激素响应分析

为探讨水稻不同组织中 *OsLEA* 基因的时空表达特征,本研究基于公共数据库 RiceXPro 数据对其在不同组织和生长阶段的表达模式进行了分析与可视化(图 5A)。不同基因在各组织中的表达存在显著差异。例如, *Os01g0159600* 在叶片和茎部的表达较低,而在胚乳中的表达显著增加,比叶片和茎部高约 10 倍,提示其可能在胚乳发育中起关键作用。 *Os01g0256500* 在整个生长周期中表现出稳定的高表达,提示其在水稻生长发育中扮演基础功能角色。

图 5B 进一步展示了这些 *OsLEA* 基因在植物激素响应中的表达模式。热图中显示了 *OsLEA* 基因在处理不同六大植物激素后的表达变化。分析结果表明,部分基因在特定激素处理下表现出显著的表达波动。例如,基因 *Os05g0349800* 在 ABA 与茉莉酸(Jasmonic acid,JA)处理下的表达变化最为显著,尤其在 JA 处理后,其表达变化范围达到 8.22,远高于其他激素处理的变化。 *Os02g0564600* 在多个激素处理下,尤其是 JA 和生长素(Auxin,IAA)处理中,都表现出稳定的表达变化,提示其可能参与激素间的交叉调控。

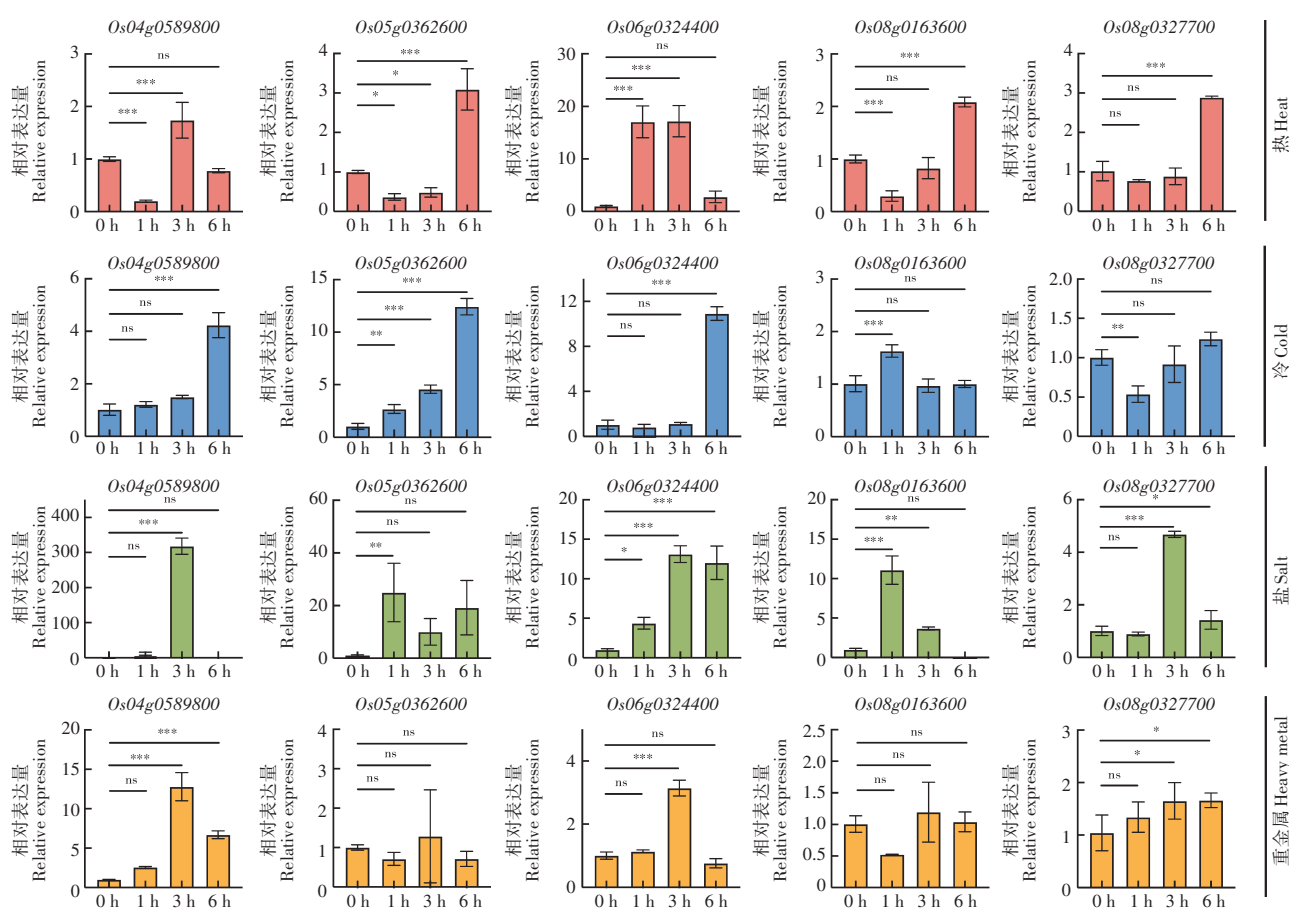


A. *OsLEA* 组织表达模式表达量热图,颜色表示基因的表达水平,其中橙色表示较高表达,绿色代表较低表达。B. 激素响应分析热图。红色表示较高表达,蓝色表示较低表达
A. Heatmap of *OsLEA* tissue expression patterns. The color indicates gene expression levels, with orange representing higher expression and green indicating lower expression. B. Heatmap of hormone response analysis. Red represents higher expression, while blue indicates lower expression

图 5 *OsLEA* 基因的表达模式
Figure 5 Expression pattern of *OsLEA*

2.5 非生物胁迫下*OsLEA*基因的表达变化

为探讨 *OsLEA* 基因在非生物胁迫下的表达变化,本研究选择了数个未被发掘功能的 *OsLEA* 基因家族成员,通过实时荧光定量 PCR 实验分析了它们在高温、低温、盐和重金属(镉)胁迫下的相对表达量(图 6)。结果显示,不同 *OsLEA* 基因在不同胁迫条件下的表达变化具有显著差异。在低温处理下,多个 *OsLEA* 基因的表达显著上调。例如,*Os05g0362600* 在低温处理的 1 h 后相较于对照组(0 h)表现出明显的上调,并且在 6 h 时达到最高表达量。*Os04g0589800* 和 *Os06g0324400* 则在 6 h 后表达明显上升。在高温胁迫下,*Os06g0324400* 在处理 1 h 表达量显著上升,提示该基因可能对参与水稻响应热胁迫的早期阶段。在盐胁迫下,许多 *OsLEA* 基因的表达明显上调,尤其是 *Os04g0589800*,在处理后的 3 h 内表达量显著增加(300 倍)。在重金属镉(Cd)胁迫下, *Os04g0589800* 和 *Os06g0324400* 在镉胁迫的 3 h 后表现出明显的上调,显示出这些基因可能参与水稻对镉胁迫的应答过程。相反, *Os08g0163600* 的表达在镉胁迫下则未发生变化,表明这些基因可能不直接参与水稻对重金属胁迫的响应。



数据是来自 3 组生物学重复的平均值±标准差($n=3$);顶部的星号表示与 0 h 相比差异显著(*, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$)

The data are presented as the mean $\pm$ SD ($n=3$); The asterisks on the top of the columns indicate significant differences from the value at 0 h (*, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$)

图 6 *OsLEA* 基因(部分)在不同胁迫条件下的表达分析

Figure 6 Expression analysis of *OsLEA* genes (part) under different stress conditions

3 讨论与结论

本研究通过全基因组分析在水稻中鉴定出 83 个 *OsLEA* 基因家族成员,并将其划分为 8 个亚家族。系统发育分析表明,LEA2 亚家族成员数量显著多于其他亚家族,这一现象与玉米、高粱等 LEA 家族的进化模式相似,这种亚家族的显著扩增可能与其特有的环境适应策略相关^[21-24]。

启动子顺式作用元件分析揭示了 *OsLEA* 基因在非生物胁迫和激素响应中的潜在调控网络。例如,ABRE

元件在31个基因启动子中的高频富集表明ABA信号通路对*OsLEA*基因的调控具有普遍性,这与其他物种的分布相似,其功能可能类似于拟南芥*AtLEA3*通过激活ABA依赖性途径增强耐旱性^[25-26]。此外,部分基因启动子同时存在多种胁迫响应元件,如*Os03g0322900*的启动子区域存在DRE和MYB元件,暗示其可能通过DREB/CBF和MYB转录因子协同调控,从而整合多种胁迫信号^[27]。

组织表达分析显示,*OsLEA*基因的表达具有显著的时空特异性。例如,*Os01g0225600*在胚乳中的高表达,结合顺式作用元件分析结果,这种高表达可能与其启动子中富集的G-box元件(调控种子成熟)相关^[28-29]。激素响应分析进一步表明,*OsLEA*基因可能参与激素交叉调控网络。例如,*Os05g0349800*对JA和ABA的共同响应暗示其可能通过JA-ABA协同通路增强抗逆性^[30-31]。

qRT-PCR结果证实了*OsLEA*基因在非生物胁迫中的动态响应。*Os04g0589800*能够被多种胁迫诱导表达(镉、盐、热和冷胁迫),结合其顺式作用元件分析(存在16个ABRE和4个MYC结合位点)和激素响应结果(响应ABA),该基因很有可能ABA信号转导途径激活植物的应激反应,或通过MYC等转录因子的调控途径在各种非生物胁迫下被激活^[32-33]。与之相反,*Os08g0327700*基因的表达水平在多种胁迫条件下均发生变化,但并不强烈,表明其功能可能不局限于胁迫响应,而可能参与调控植物的其他生理过程。

尽管本研究系统解析了*OsLEA*基因家族的进化特征、表达模式及胁迫响应机制,但仍存在局限:表达数据依赖公共数据库,可能受品种特异性或试验条件影响;未通过转基因或基因编辑技术验证候选基因的功能。未来研究可以通过基因功能验证和转基因试验,进一步探讨这些基因在提高作物抗逆性方面的潜力。

参考文献:

- [1] ARTUR M A S,ZHAO T,LIGTERINK W,et al.Dissecting the genomic diversification of late embryogenesis abundant (LEA) protein gene families in plants[J].Genome Biology and Evolution,2019,11(2):459-471.
- [2] MERTENS J,ALIYU H,COWAN D A.LEA proteins and the evolution of the WHy domain[J].Applied and Environmental Microbiology,2018,84(15):e00539-18.
- [3] DOS REIS S P,LIMA A M,DE SOUZA C R B.Recent molecular advances on downstream plant responses to abiotic stress[J].International Journal of Molecular Sciences,2012,13(7):8628-8647.
- [4] 李 乐,许红亮,杨兴露,等.大豆LEA基因家族全基因组鉴定、分类和表达[J].中国农业科学,2011,44(19):3945-3954.
LI L,XU H L,YANG X L,et al.Genome-wide identification,classification and expression analysis of LEA gene family in *Soybean*[J].Scientia Agricultura Sinica,2011,44(19):3945-3954.
- [5] 陈 凯,佟晓楠,张晓媛,等.枳LEA基因家族鉴定及其对非生物胁迫的响应[J].西北植物学报,2023,43(6):918-928.
CHEN K,TONG X N,ZHANG X Y,et al.Genome-wide identification and abiotic stress responses of LEA gene family in *Poncirus trifoliata*[J].Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica,2023,43(6):918-928.
- [6] SUN Z P,LI S Y,CHEN W Y,et al.Plant dehydrins:expression,regulatory networks,and protective roles in plants challenged by abiotic stress[J].International Journal of Molecular Sciences,2021,22(23):12619.
- [7] CANDAT A,PASZKIEWICZ G,NEVEU M,et al.The ubiquitous distribution of late embryogenesis abundant proteins across cell compartments in Arabidopsis offers tailored protection against abiotic stress[J].The Plant Cell,2014,26(7):3148-3166.
- [8] WU C L,HU W,YAN Y,et al.The late embryogenesis abundant protein family in cassava(*Manihot esculenta* Crantz):Genome-wide characterization and expression during abiotic stress[J].Molecules,2018,23(5):1196.
- [9] LIANG Y,XIONG Z Y,ZHENG J X,et al.Genome-wide identification,structural analysis and new insights into late embryogenesis abundant (LEA) gene family formation pattern in *Brassica napus*[J].Scientific Reports,2016,6:24265.
- [10] SHIH M D,HUANG L T,WEI F J,et al.OsLEA1a,a new Em-like protein of cereal plants[J].Plant & Cell Physiology,2010,51(12):2132-2144.
- [11] XIAO B Z,HUANG Y M,TANG N,et al.Over-expression of a LEA gene in rice improves drought resistance under the field conditions[J].Theoretical and Applied Genetics,2007,115(1):35-46.
- [12] DUAN J L,CAI W M.OsLEA3-2,an abiotic stress induced gene of rice plays a key role in salt and drought tolerance[J].PLoS One,2012,7(9):e45117.
- [13] HU T Z,LIU Y L,ZHU S S,et al.Overexpression of OsLea14-a improves the tolerance of rice and increases Hg accumulation under diverse stresses[J].Environmental Science and Pollution Research International,2019,26(11):10537-10551.
- [14] YU J,LAI Y M,WU X,et al.Overexpression of OsEm1 encoding a group I LEA protein confers enhanced drought tolerance

- in rice[J].Biochemical and Biophysical Research Communications,2016,478(2):703-709.
- [15] GANGULY M,DATTA K,ROYCHOUDHURY A,et al.Overexpression of Rab16A gene in indica rice variety for generating enhanced salt tolerance[J].Plant Signaling & Behavior,2012,7(4):502-509.
- [16] HU T Z,ZENG H,HE S,et al.Molecular analysis of OsLEA4 and its contributions to improve *E.coli* viability[J].Applied Biochemistry and Biotechnology,2012,166(1):222-233.
- [17] HUANG L P,ZHANG M Y,JIA J,et al.An atypical late embryogenesis abundant protein OsLEA5 plays a positive role in ABA-induced antioxidant defense in *Oryza sativa* L[J].Plant & Cell Physiology,2018,59(5):916-929.
- [18] 薛亚莉,魏晓双,周海连,等.水稻 LEA2 家族的鉴定与表达谱分析[J].华中农业大学学报,2021,40(2):93-102.
- XUE Y L,WEI X S,ZHOU H L,et al.Characterization and expression profile analysis of LEA_2 family in rice[J].Journal of Huazhong Agricultural University,2021,40(2):93-102.
- [19] 张 琪,刘 爽,胡艳娟,等.水稻 *OsRIP* 基因家族的全基因组鉴定及其表达分析[J].沈阳农业大学学报,2023,54(4):385-395.
- ZHANG Q,LIU S,HU Y J,et al.Genome-wide identification and expression analysis of the *OsRIP* gene family in rice[J].Journal of Shenyang Agricultural University,2023,54(4):385-395.
- [20] 陈宏伟,商文奇,吕桂兰,等.东北粳稻穗部性状全基因组关联分析[J].沈阳农业大学学报,2025,56(3):23-32.
- CHEN H W,SHANG W Q,LÜ G L,et al.Genome-wide association study of panicle traits in japonica rice from Northeast China[J].Journal of Shenyang Agricultural University,2025,56(3):23-32.
- [21] BIES-ETHÈVE N,GAUBIER-COMELLA P,DEBURES A,et al.Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Arabidopsis thaliana*[J].Plant Molecular Biology,2008,67(1/2):107-124.
- [22] HUNDERTMARK M,HINCHA D K.LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*[J].BMC Genomics,2008,9:118.
- [23] NAGARAJU M,KUMAR S A,REDDY P S,et al.Genome-scale identification,classification,and tissue specific expression analysis of late embryogenesis abundant (LEA) genes under abiotic stress conditions in *Sorghum bicolor* L[J].PLoS One,2019,14(1):e0209980.
- [24] ZHANG Y P,ZHANG X J,ZHU L J,et al.Identification of the maize LEA gene family and its relationship with kernel dehydration[J].Plants,2023,12(21):3674.
- [25] ZHAO P S,LIU F,MA M,et al.Overexpression of AtLEA3-3 confers resistance to cold stress in *Escherichia coli* and provides enhanced osmotic stress tolerance and ABA sensitivity in *Arabidopsis thaliana*[J].Molekuliarnaia Biologiya,2011,45(5):851-862.
- [26] JIA H L,WANG X M,SHI Y H,et al.Overexpression of *Medicago sativa* LEA4-4 can improve the salt,drought,and oxidation resistance of transgenic *Arabidopsis*[J].PLoS One,2020,15(6):e0234085.
- [27] NAKASHIMA K,ITO Y,YAMAGUCHI-SHINOZAKI K.Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses[J].Plant Physiology,2009,149(1):88-95.
- [28] NIU B X,DENG H,LI T T,et al.OsbZIP76 interacts with OsNF-YBs and regulates endosperm cellularization in rice (*Oryza sativa*)[J].Journal of Integrative Plant Biology,2020,62(12):1983-1996.
- [29] WANG J C,XU H,ZHU Y,et al.OsbZIP58, a basic leucine zipper transcription factor,regulates starch biosynthesis in rice endosperm[J].Journal of Experimental Botany,2013,64(11):3453-3466.
- [30] KIM J A,BHATNAGAR N,KWON S J,et al.Transcriptome analysis of ABA/JA-dual responsive genes in rice shoot and root[J].Current Genomics,2018,19(1):4-11.
- [31] VERMA V,RAVINDRAN P,KUMAR P P.Plant hormone-mediated regulation of stress responses[J].BMC Plant Biology,2016,16:86.
- [32] SONG C,CAO Y P,DAI J,et al.The multifaceted roles of MYC₂ in plants:Toward transcriptional reprogramming and stress tolerance by jasmonate signaling[J].Frontiers in Plant Science,2022,13:868874.
- [33] NAKASHIMA K,YAMAGUCHI-SHINOZAKI K.ABA signaling in stress-response and seed development[J].Plant Cell Reports,2013,32(7):959-970.