

徐小勇, 顾铭洲, 梁梦鸽, 等. 枳漆酶基因家族鉴定及其响应盐胁迫的表达分析[J]. 江苏农业科学, 2023, 51(9): 52-59.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.09.007

# 枳漆酶基因家族鉴定及其响应盐胁迫的表达分析

徐小勇, 顾铭洲, 梁梦鸽, 姜丽娟

(扬州大学园艺园林学院, 江苏扬州 225009)

**摘要:**漆酶(LAC)是植物木质素生物合成中催化木质素单体聚合的关键酶,在调控植物生长发育和胁迫响应中发挥着重要作用。对枳漆酶基因家族进行鉴定和分析,并探究其在盐胁迫下的表达模式,可为进一步研究枳漆酶基因功能提供重要的参考信息。采用生物信息学手段鉴定枳漆酶基因家族成员,对其家族成员的理化性质、基因结构、系统进化关系、启动子顺式作用元件等进行分析,并通过 qRT-PCR 方法分析其盐胁迫表达模式。结果表明,枳基因组中共有 20 个 LAC 基因家族成员,其中 18 个分布在 5 条已知染色体上,2 个分布在未知染色体上,被预测定位到细胞膜和细胞核中;共有 6~14 个外显子,5~13 个内含子,9~11 个 motif;系统进化树分析结果显示,20 个枳 LAC 基因家族成员与 17 个拟南芥 LAC 基因家族成员共分成 7 个亚组,20 个枳 LAC 基因家族成员分布在其中的 6 组;20 个枳 LAC 基因家族成员与拟南芥 LAC 基因间存在 19 对共线性关系;启动子区域含有 24 种顺式作用元件,其中厌氧诱导元件、干旱响应元件和茉莉酸甲酯响应元件数量最多;16 个枳 LAC 基因在盐胁迫下显著上调表达,推测枳漆酶基因参与了盐胁迫响应。

**关键词:**枳;漆酶基因;进化树;顺式作用元件;盐胁迫

**中图分类号:**S188<sup>+</sup>.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2023)09-0052-08

漆酶(Laccase, LAC, EC 1.10.3.2)是一种含铜的多酚氧化酶,属于铜蓝氧化酶家族,可催化酚类等多种底物的氧化,并将氧气还原成水<sup>[1]</sup>。漆酶最早在 1883 年由日本学者 Yoshida 从漆树的漆液中发现<sup>[2]</sup>,之后在细菌、真菌、昆虫和其他植物中陆续发现<sup>[3]</sup>。已有研究发现,漆酶参与植物细胞壁木质素生物合成途径的最后阶段,即木质素单体的聚合<sup>[4]</sup>。因此,漆酶在植物生长发育、生物和非生物胁迫响应中具有重要的调控作用<sup>[4]</sup>。

漆酶由多基因编码,随着众多植物基因组数据的公布,不少物种已经完成了漆酶基因家族的鉴定。例如,在模式植物拟南芥中,17 个漆酶基因被鉴定出来,其中 *AtLAC4*、*AtLAC11* 和 *AtLAC17* 与木质素合成有关<sup>[5-6]</sup>;在水稻(*Oryza sativa*)基因组中,共有 30 个 LAC<sup>[7]</sup>;在柳枝稷草(*Panicum virgatum*)中共鉴定出 49 个 LAC<sup>[8]</sup>;在梨(*Pyrus bretschneideri*)中共鉴定出 40 个 LAC<sup>[9]</sup>;在茶树(*Camellia sinensis*)中共鉴定出 43 个 LAC<sup>[10]</sup>;在荔枝(*Litchi chinensis*)中

共鉴定出 61 个 LAC<sup>[11]</sup>;在桃(*Prunus persica*)、茄(*Solanum melongena*)中皆鉴定出 48 个 LAC<sup>[12-13]</sup>。值得注意的是,漆酶基因在逆境胁迫中的作用正获得越来越多的关注。一般而言,漆酶基因在胁迫下会富集表达,特别是在盐胁迫条件下。例如,玉米 *ZmLAC1*、拟南芥 *AtLAC2*、水稻 *OsCh11* 和胡萝卜 *DcLAC1* 在盐胁迫下都显著上调表达,而过表达漆酶基因能提高植物的耐盐性<sup>[14-17]</sup>。

柑橘是世界第一大果树,也是我国栽培面积最大、经济价值较高的果树。然而柑橘以露地栽培为主且对环境条件要求较高,易受多种生物、非生物逆境胁迫的影响,极大程度地限制了我国柑橘产业的良性健康发展。因此,亟待开展柑橘抗逆基因挖掘与鉴定研究<sup>[18-21]</sup>。枳是芸香科枳属小乔木,具有抗寒、抗旱、适应性强等优点,是我国目前应用最多、最广的柑橘砧木。本研究根据已公布的枳基因组数据<sup>[22]</sup>,采用生物信息学手段鉴定枳漆酶基因家族成员,分析其理化特征、基因结构、系统进化关系、启动子顺式作用元件和盐胁迫表达模式,以期挖掘与盐胁迫响应相关的漆酶基因,为枳 LAC 基因功能研究提供理论基础。

收稿日期:2022-09-26

基金项目:国家重点研发计划(编号:2018YFD1000107);江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(21)3024]。

作者简介:徐小勇(1979—),男,江西奉新人,博士,副教授,主要从事果树生物技术研究。E-mail:xyxu@yzu.edu.cn。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试验时间与地点

本试验于 2022 年 3 月在扬州大学园艺园林学院实验室内完成。

### 1.2 枳漆酶基因家族的鉴定

枳(*Poncirus trifoliata* L.) 基因组序列、蛋白质序列及其注释信息均下载自 CPBD 数据库(<http://citrus.hzau.edu.cn/>)。从植物参考基因组数据库 Ensembl(<http://plants.ensembl.org>)中下载拟南芥的基因组相关数据(基因组序列和注释信息)。

以拟南芥的 17 个 LAC 蛋白序列作为查询序列,设置检索阈值(E-value)为  $10^{-5}$ ,通过 TBtools 软件的 BLAST 功能搜索枳蛋白数据库,获得候选枳 LAC 蛋白序列,通过 NCBI、SMART 数据库(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)进行蛋白保守结构域的鉴定。通过在线工具 Expasy - ProtParam(<https://web.expasy.org/protparam/>)对枳 LAC 基因家族成员进行蛋白质理化性质预测。使用在线软件 Plant - mPloc(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>)对枳 LAC 蛋白家族进行亚细胞定位预测。

### 1.3 枳 LAC 基因家族基因结构和 motif 分析

通过在线工具 MEME(<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>)进行 motif 分析,motif 数目设置为 10 个,其他均为默认值,利用 TBtools 软件对基因结构和 motif 数据进行可视化作图。

### 1.4 枳和拟南芥 LAC 基因家族的系统进化树分析

使用枳、拟南芥的 LAC 蛋白序列,用 Mega X 进行多序列比对,并用最大似然法(Maximum likelihood, ML)构建系统进化树,Bootstrap 参数设置为 1 000,其他参数选择默认值。用 Evolvewiew 在线软件对系统发生树进行编辑和美化。

### 1.5 枳和拟南芥 LAC 基因家族的共线性分析

用 MCScanX 程序对枳、拟南芥的基因组信息进行比对,并通过 TBtools 软件的 Multiple SytenyPlot 工具分析其共线性关系。

### 1.6 枳 LAC 基因启动子顺式作用元件分析

选取枳 LAC 基因转录起点上游 2 000 bp 的序列作为启动子区域,利用在线工具 PlantCARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)获得每个枳 LAC 基因启动子区域中所有的顺式作用元件,并筛选出重要的响应元

件,进行统计分析。

### 1.7 植物材料和盐胁迫处理

选择发育一致的 45 日龄枳幼苗,将幼苗在含有 300 mmol/L 氯化钠的溶液中进行盐胁迫处理,处理后 0 ~ 5 d 采收根系。所有样本直接收集到液氮中,于 -80 °C 保存,直至提取 RNA。每个试验设 3 个生物学重复,每个重复采 5 株幼苗样品。

### 1.8 RNA 提取和 qRT - PCR 检测

采用乙二胺四乙酸(EDTA)法提取总 RNA,用凝胶电泳和生物分析仪检测 RNA 质量,用 TransScript 逆转录酶(TaKaRa 公司产品),具体操作参照制造商的说明书。qRT - PCR 的基因特异性引物序列见表 1。以 2 μL cDNA 为模板,用 SYBR® Premix Ex Taq™ II Plus (2 ×)(TaKaRa 公司产品)进行 25 μL PCR 反应,每个引物浓度为 10 μmol/L。采用 CFX96 实时荧光定量 PCR 仪(BIO - RAD)进行 qRT - PCR 检测,以柑橘 β 肌动蛋白基因(*ACTB*)为内控基因。反应过程如下:95 °C 预变性 3 min;95 °C 延伸时间 30 s,根据特定引物设置的退火温度(*T*)下退火 30 s,共 40 个循环。聚合酶链式反应结束后,于 65 ~ 95 °C 进行融化曲线分析。所有 qRT - PCR 分析重复 3 次。采用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法评估基因的表达水平。

## 2 结果与分析

### 2.1 LAC 基因家族成员鉴定及其对应蛋白的理化性质预测

通过 BLAST 和保守结构域鉴定方法,共在枳基因组中发现 20 个 LAC 基因成员(表 2),根据其在染色体的分布将其命名为 *PtrLAC1* ~ *PtrLAC20*(图 1)。其中,*PtrLAC1* 位于 3 号染色体上,*PtrLAC2*、*PtrLAC3* 位于 4 号染色体上,*PtrLAC4*、*PtrLAC5* 位于 5 号染色体上,*PtrLAC6* ~ *PtrLAC13* 位于 6 号染色体上,*PtrLAC14* ~ *PtrLAC18* 位于 8 号染色体上,*PtrLAC19*、*PtrLAC20* 位于未知染色体上。枳 LAC 基因编码的氨基酸长度介于 553 ~ 1 112 之间,相对分子量介于 60.55 ~ 120.82 之间,等电点介于 5.02 ~ 9.88 之间,亲水性介于 -0.247 ~ 0.000 之间。此外,枳 LAC 蛋白的不稳定系数位于 26.00 ~ 38.14 范围,都低于 40.00,表明这 20 个 LAC 基因成员都是稳定的。用在线软件 Plant - mPloc 进行亚细胞定位预测,结果显示,所有枳 LAC 蛋白都位于细胞膜上,此外,发现 *PtrLAC7* 位于细胞核上。这揭示枳

表1 *PtrLACs* 的定量引物序列

基因名称	上游引物序列(5'→3')	下游引物序列(5'→3')
<i>PtrLAC1</i>	AGACCGTGAAACGTCCTTGTC	AATGTAGCGGGTAAGCGGAG
<i>PtrLAC2</i>	ATGCTAGGACCTGGCCAAAC	CAGGGCAAGGGCAGATTTA
<i>PtrLAC3</i>	GCCAAACCACAAATGCCCTT	TTGAGGAAAACGGACCGTA
<i>PtrLAC4</i>	TCACCCCATAGATGTCCCGT	ATTGGCCCTTCACACGAAT
<i>PtrLAC5</i>	GCGGATGGGTTGTATACGA	GAGACTGGACAGCCTGCAAT
<i>PtrLAC6</i>	ATTAACGGACAACCGGGACC	GTGGTTTGGCTGGAGCTAT
<i>PtrLAC7</i>	GAAAGGCAAGGTCACTCCGA	AAACTCTTCGGAGCCTCGTG
<i>PtrLAC8</i>	ACGTTTTGCTGAAAGCCGAC	GACGATGCCTCTCGTGGTAG
<i>PtrLAC9</i>	TCTGGGCAGATGGACCAAAC	CGCAGCATTGAGATGTGAGC
<i>PtrLAC10</i>	TCCCCGFTCGAGTACAGTCT	AAGGGTTTGTTCGAAGGCCA
<i>PtrLAC11</i>	ACTTGCCAAGGACCCAACAA	CACCATAATGTGCTCGGCC
<i>PtrLAC12</i>	TGTTTCGGATGCGTACACCA	CGTAAACGGCATCAGCTTCG
<i>PtrLAC13</i>	CACTCGGAAACAAGGCTCAGT	ATCTCCAGTCGGAActCCA
<i>PtrLAC14</i>	TCACGGTAGGCCCTAGGAACA	TGTTATTGGGTGGAGTGCCC
<i>PtrLAC15</i>	CCCAAACGTCTCTGATGCCT	CTGGGGTGATAACCAGCGTT
<i>PtrLAC16</i>	CCACTTCAAAGCACACAGGC	TAGCAACAACAGGAGACCC
<i>PtrLAC17</i>	ACCGTCTCGTAAAAGTCGT	CGCGTTTAGCAAGATGACG
<i>PtrLAC18</i>	AGGCTTTAATGACACGCCCA	CATCTGGGGCTGTTTCGGATT
<i>PtrLAC19</i>	GCCTGGGAAAACCTACTCC	CTGGGGTGATGAGCACAAct
<i>PtrLAC20</i>	GCCTGGGAAAACCTACTCC	CTGGGGTGATGAGCACAAct

表2 枳 *LAC* 家族成员的基本信息

基因名称	基因编号	染色体	氨基酸长度 (aa)	相对分子量 (ku)	等电点	亲水性	不稳定系数	亚细胞定位 预测
<i>PtrLAC1</i>	Pt3g033930.1	Chr3	571	63.86	6.96	-0.113	36.62	细胞膜
<i>PtrLAC2</i>	Pt4g021050.1	Chr4	579	64.01	8.62	-0.154	33.26	细胞膜
<i>PtrLAC3</i>	Pt4g022270.1	Chr4	553	60.86	9.10	-0.015	26.00	细胞膜
<i>PtrLAC4</i>	Pt5g005740.1	Chr5	583	65.02	5.02	-0.184	34.87	细胞膜
<i>PtrLAC5</i>	Pt5g022220.1	Chr5	579	64.31	6.35	-0.093	36.41	细胞膜
<i>PtrLAC6</i>	Pt6g013530.1	Chr6	555	60.55	9.46	-0.026	35.31	细胞膜
<i>PtrLAC7</i>	Pt6g013930.1	Chr6	1 112	120.82	7.17	-0.247	35.14	细胞膜、核
<i>PtrLAC8</i>	Pt6g013970.1	Chr6	566	62.24	7.33	-0.044	33.56	细胞膜
<i>PtrLAC9</i>	Pt6g013980.1	Chr6	568	62.72	8.59	-0.089	37.64	细胞膜
<i>PtrLAC10</i>	Pt6g014950.1	Chr6	578	63.91	9.44	-0.056	29.42	细胞膜
<i>PtrLAC11</i>	Pt6g014960.1	Chr6	581	64.44	9.88	-0.162	31.00	细胞膜
<i>PtrLAC12</i>	Pt6g014990.1	Chr6	578	64.26	9.13	-0.141	29.26	细胞膜
<i>PtrLAC13</i>	Pt6g018020.1	Chr6	686	76.17	6.26	-0.081	38.14	细胞膜
<i>PtrLAC14</i>	Pt8g008950.1	Chr8	580	63.82	8.96	-0.030	29.40	细胞膜
<i>PtrLAC15</i>	Pt8g009260.1	Chr8	577	63.63	8.99	-0.029	28.46	细胞膜
<i>PtrLAC16</i>	Pt8g010540.1	Chr8	583	64.46	9.34	-0.091	31.20	细胞膜
<i>PtrLAC17</i>	Pt8g011530.1	Chr8	557	61.18	9.23	0.000	29.72	细胞膜
<i>PtrLAC18</i>	Pt8g012550.1	Chr8	578	64.47	9.29	-0.140	36.98	细胞膜
<i>PtrLAC19</i>	PtUn005300.1	ChrUn	582	64.42	9.61	-0.032	32.75	细胞膜
<i>PtrLAC20</i>	PtUn034010.1	ChrUn	582	64.42	9.61	-0.031	32.37	细胞膜

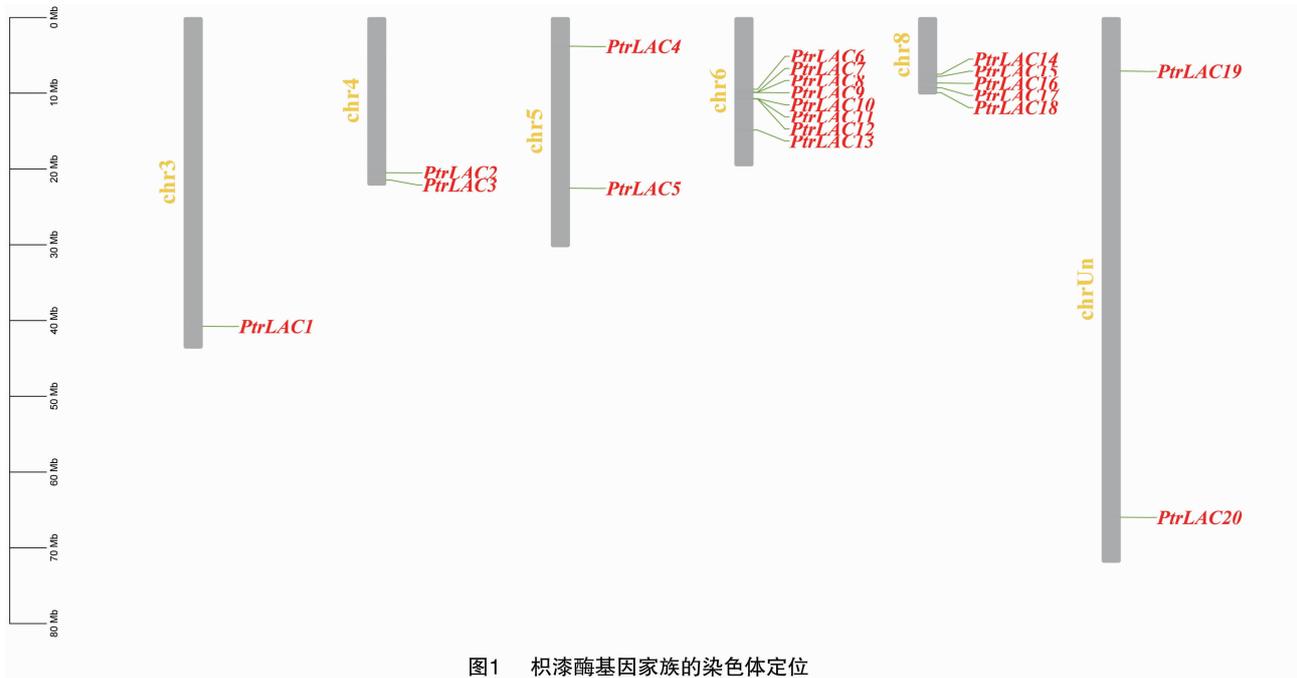


图1 枳漆酶基因家族的染色体定位

LAC 蛋白可能参与细胞壁的木质素合成。

## 2.2 枳 *PtrLAC* 基因结构和 motif 分析

如图2所示,枳 LAC 基因共有 6 ~ 14 个外显子,5 ~ 13 个内含子。总体而言,基因之间的基因结构差异较小,多数为 6 个外显子,5 个内含子。基因结构比较特殊的基因为 *PtrLAC7*、*PtrLAC13*,有较多

外显子、内含子。Motif 分析发现,枳 LAC 蛋白含有 9 ~ 11 个 motif。除 *PtrLAC7*、*PtrLAC13* 外,所有枳 LAC 蛋白具有相同 Motif。有趣的是,*PtrLAC13* 缺失 motif 2,而 *PtrLAC7* 相较于其他枳 LAC 基因家族成员多 1 个 motif 8。



图2 枳 LAC 基因家族进化树、基因结构和 motif 分析

### 2.3 系统进化树及共线性分析

为了探究枳 *PtrLAC* 基因与模式植物拟南芥的进化关系,构建它们的系统进化树(图 3)。根据进化树的结果,将其分为 7 个亚组。*PtrLAC10*、*PtrLAC11*、*PtrLAC12*、*PtrLAC14*、*PtrLAC15*、*PtrLAC16*、*PtrLAC19* 和 *PtrLAC20* 在第 1 组;*PtrLAC3*、*PtrLAC6*、*PtrLAC13* 和 *PtrLAC17* 在第 2 组;*PtrLAC1* 在第 4 组;

*PtrLAC7*、*PtrLAC8* 和 *PtrLAC9* 在第 5 组;*PtrLAC4* 在第 6 组;*PtrLAC2*、*PtrLAC5* 和 *PtrLAC18* 在第 7 组。上述结果表明,枳 LAC 基因家族可能存在功能多样性。共线性分析结果显示,枳和拟南芥 LAC 基因间存在 19 对共线性关系(图 4),暗示这些 LAC 基因对可能来自共同的祖先,具有相似的功能。

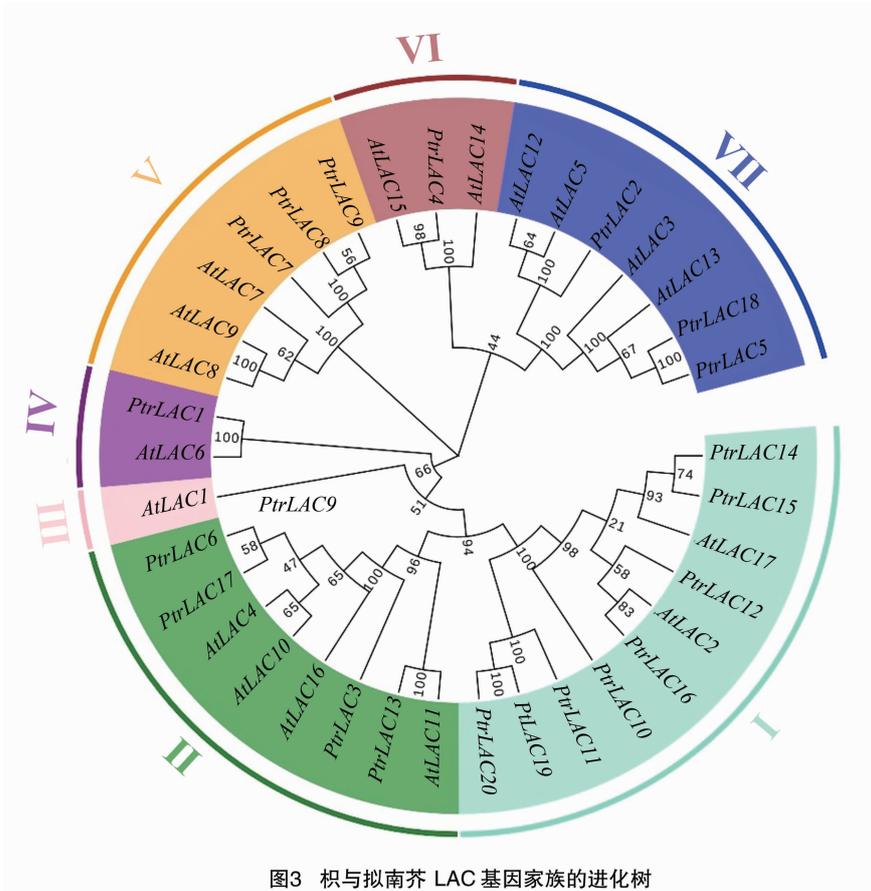


图3 枳与拟南芥 LAC 基因家族的进化树

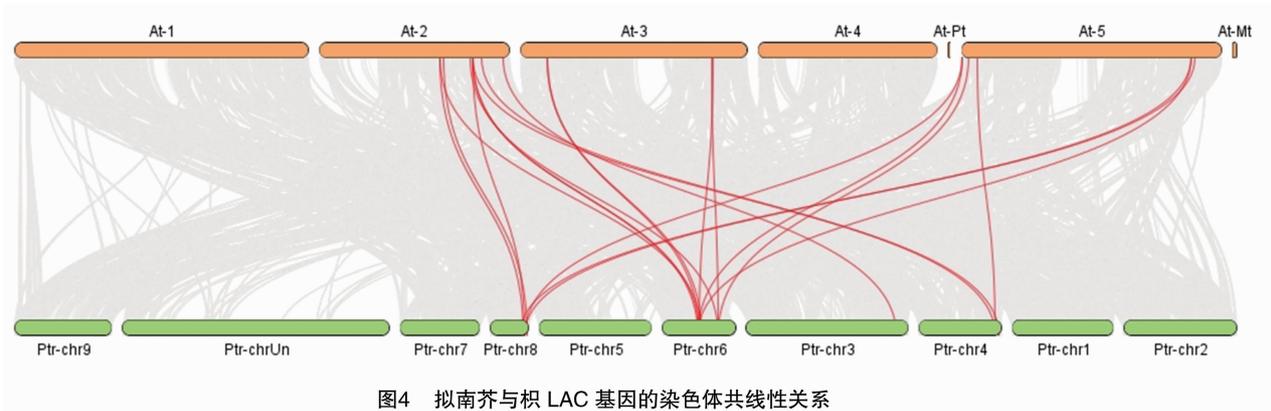


图4 拟南芥与枳 LAC 基因的染色体共线性关系

### 2.4 启动子区域顺式作用元件分析

顺式作用元件分析结果表明,枳 LAC 基因启动子区域共有 24 种顺式作用元件,包括生长发育元

件、激素响应元件和逆境响应元件三大类型(图 5)。其中逆境响应元件类型最多,共有 11 个。生长发育元件主要有分生组织特异性元件(CAT-box, 70%

LAC 成员)和玉米醇溶蛋白代谢调控元件(O<sub>2</sub> - site, 35% LAC 成员)。激素响应元件主要有茉莉酸甲酯响应元件(CGTCA - motif 或 TGACG - motif, 90% LAC 成员)、脱落酸响应元件(ABRE, 80% LAC 成员)和生长素响应元件(AuxRR - core, 50%

LAC 成员),表明枳 LAC 基因可能受到多种激素的调控表达。逆境响应元件主要有厌氧诱导元件(ARE, 所有 LAC 成员)、干旱响应元件(MBS, 90% LAC 成员)和低温响应元件(LTR, 50% LAC 成员),暗示枳 LAC 基因可能响应多种逆境胁迫。

	生长发育元件					激素响应元件							逆境响应元件												
	CAT-box	circadian	GCN4_motif	MSA-like	O2-site	ABRE	AuxRR-core	CGTCA-motif	GARE-motif	P-box	TCA-element	TGACG-motif	TGA-element	AAAC-motif	ARE	CCAAT-box	G-box	GC-motif	GT1-motif	LTR	MBS	MER	Sp1	TC-rich repeats	
<i>PtrLAC1</i>						5		2				1	2	1											
<i>PtrLAC2</i>	1					2		1					2	1	1										1
<i>PtrLAC3</i>	1					5		2					2						5			1			1
<i>PtrLAC4</i>	1					4		2			1	2							5		1	1			
<i>PtrLAC5</i>	1		1	2		2										2	2	3	3	1		4			
<i>PtrLAC6</i>	1		1			3	1	3				3				3	1	4		1	1	4			
<i>PtrLAC7</i>	1	1	1	2	2	10	3	9		1		9				2	1	11			1	3		4	
<i>PtrLAC8</i>	2					10	3	6				6	2			1	1	15	1			1		2	
<i>PtrLAC9</i>	1				1	3	2	11				11	1			2		6		1				2	
<i>PtrLAC10</i>	1					2		2				2	2			4	1	2		1	3	4			
<i>PtrLAC11</i>					1	1	1	1				1	2			2	1	2		2			1		
<i>PtrLAC12</i>	2				1	2	2	1				1	1			3	1	2			4	2			
<i>PtrLAC13</i>	2		1	2			1	1				1	1			5						2		2	
<i>PtrLAC14</i>								3		1		3				3	3		1			2			
<i>PtrLAC15</i>							1			1			1			1	5	1		2	2	1			
<i>PtrLAC16</i>	2					2		2		1		2				3	2	1		1	3				
<i>PtrLAC17</i>	1							6	1			6	1			1	2	2		1	1		1	1	
<i>PtrLAC18</i>	2					4		1				1				1	2	1	1		4				
<i>PtrLAC19</i>					1	1	2	2				1	2			2		3		1		1	1	1	
<i>PtrLAC20</i>					1	1	2	2			1	2				2		3		1		1	1	1	

图5 枳 LAC 基因启动子中顺式作用元件的种类与数量

## 2.5 盐胁迫处理对枳 LAC 基因表达的影响

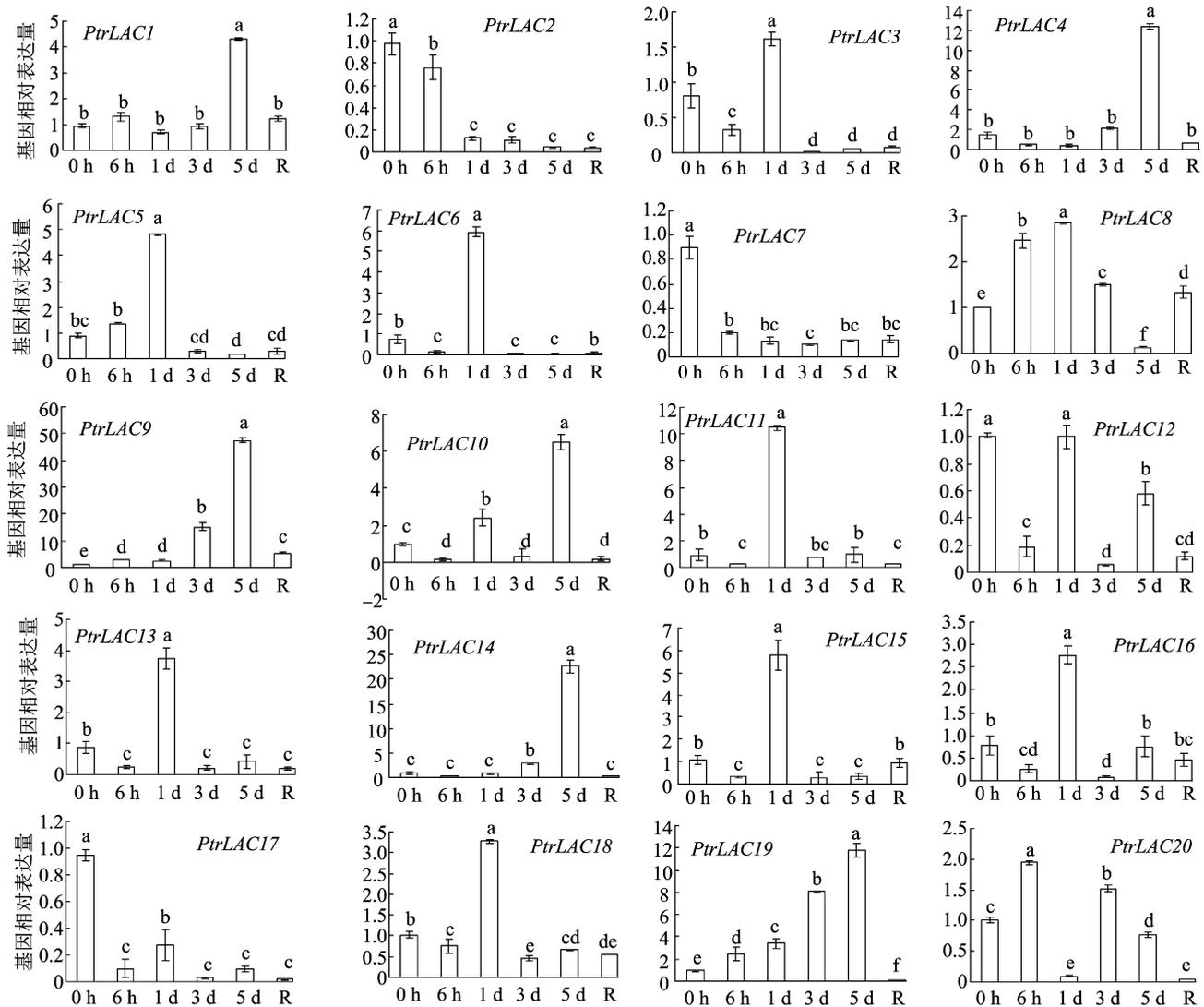
已有研究发现,多种植物的 LAC 基因在盐胁迫下诱导表达<sup>[14-17]</sup>。因此,本研究采用 qRT - PCR 方法分析所有枳 LAC 基因在盐胁迫处理下的表达模式。如图 6 所示,盐胁迫处理使得 80% 的枳 LAC 基因在不同时间点显著上调表达,其中多数集中在处理后第 1 天(*PtrLAC3*、*PtrLAC5*、*PtrLAC6*、*PtrLAC10*、*PtrLAC11*、*PtrLAC13*、*PtrLAC15* 和 *PtrLAC18*) 和第 5 天(*PtrLAC1*、*PtrLAC4*、*PtrLAC9*、*PtrLAC14* 和 *PtrLAC19*),仅 *PtrLAC2*、*PtrLAC7*、*PtrLAC12*、*PtrLAC17* 的相对表达量出现下调。值得注意的是,*PtrLAC9* 的相对表达量在处理 5 d 时急剧升高(约为初始值的 47 倍)。由此推测,*PtrLAC9* 基因是盐胁迫响应的关键 LAC 基因之一。

## 3 讨论与结论

植物漆酶参与木质素单体的聚合,从而影响木

质素合成和组分,在植物的生长和发育、应答生物或非生物胁迫反应中具有重要调控作用。迄今,尚未见关于枳漆酶基因家族的研究报道。本研究通过生物信息学方法在枳中共鉴定出 20 个 LAC 基因(*PtrLAC1* ~ *PtrLAC20*)。但对多数植物而言,枳 LAC 基因成员的数目较少<sup>[7-13]</sup>。枳 LAC 基因在染色体上的分布不均匀,较集中在第 6 号、8 号染色体上,与甜橙 LAC 基因的染色体定位一致<sup>[23]</sup>;共有 6 ~ 14 个外显子、9 ~ 11 个 motif,主要定位在细胞膜上,这些特征在不同物种之间的差异较大<sup>[7-13,23]</sup>。值得注意的是,*PtrLAC7* 定位到细胞膜和细胞核上,且多 1 个 motif 8,暗示该基因可能具有特殊功能。

在本研究中,枳 LAC 基因启动子区域的顺式作用元件分析结果显示,其启动子区域含有 24 种顺式作用元件,包括生长发育元件、激素响应元件和逆境响应元件,暗示着枳 LAC 基因可能受到多种植物激素和环境逆境诱导,并参与植物生长发育过程调



同处理间标有不同小写字母表示经 ANOVA 分析差异显著( $P < 0.05$ )

图6 枳 LAC 基因对盐胁迫的响应

控。对于不同植物而言, LAC 基因启动子区域的顺式作用元件在数量、种类上具有一定差异, 尤其是富集的顺式作用元件种类<sup>[8,10,24]</sup>。例如, 茶树 LAC 基因主要富集厌氧诱导响应元件、茉莉酸甲酯和乙烯响应元件<sup>[10]</sup>; 多数柳枝稷草 LAC 基因存在脱落酸响应元件、茉莉酸甲酯响应元件和干旱响应元件<sup>[8]</sup>; 枳 LAC 基因富含干旱响应元件、厌氧诱导响应元件和茉莉酸甲酯响应元件。但上述预测的顺式作用元件有待通过试验验证。

系统进化树分析将 20 个枳 LAC 基因家族成员与 17 个拟南芥 LAC 基因家族成员分成 7 个亚组, 与前人的研究结果<sup>[9,23]</sup>一致。同一亚组的枳 LAC 基因与拟南芥 LAC 基因可能具有相同或相似的功

能。考虑到 *AtLAC4*、*AtLAC11* 和 *AtLAC17* 与木质素合成有关, 笔者推测 *PtrLAC6* 和 *PtrLAC17* (与 *AtLAC4* 聚类)、*PtrLAC13* (与 *AtLAC11* 聚类) 及 *PtrLAC14* 和 *PtrLAC15* (与 *AtLAC17* 聚类) 参与枳木质素生物合成。此外, *AtLAC7*、*AtLAC8* 和 *AtLAC9* 这 3 个基因在缺铁、创伤或盐胁迫下上调表达<sup>[25]</sup>。因此, 我们预测同一亚组下的 *PtrLAC7*、*PtrLAC8* 和 *PtrLAC9* 可能与胁迫响应相关。本研究的 qRT-PCR 分析结果显示, *PtrLAC8*、*PtrLAC9* 在盐胁迫下显著上调表达, 而 *PtrLAC7* 显著下调表达, 可见这 3 个基因确实与盐胁迫响应相关, 但它们是否参与枳盐胁迫响应调控尚不清楚。目前笔者所在本课题组正在进行 *PtrLAC9* 的功能鉴定研究, 有望进一步

揭示其功能。

#### 参考文献:

- [1] Giardina P, Faraco V, Pezzella C, et al. Laccases: a never – ending story[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2020, 67(3):369 – 385.
- [2] Yoshida H. LXIII. – Chemistry of lacquer (Urushi). Part I. communication from the chemical society of Tokio[J]. Journal of the Chemical Society, Transactions, 1883, 43:472 – 486.
- [3] Janusz G, Pawlik A, Swiderska – burek U, et al. Laccase properties, physiological functions, and evolution[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(3):25.
- [4] Wang J H, Feng J J, Jia W T, et al. Lignin engineering through laccase modification: a promising field for energy plant improvement [J]. Biotechnology for Biofuels, 2015, 8:145.
- [5] Berthet S, Demont – Caulet N, Pollet B, et al. Disruption of *LACCASE4* and *17* results in tissue – specific alterations to lignification of *Arabidopsis thaliana* stems[J]. The Plant Cell, 2011, 23(3):1124 – 1137.
- [6] Zhao Q, Nakashima J, Chen F, et al. *LACCASE* is necessary and nonredundant with *PEROXIDASE* for lignin polymerization during vascular development in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2013, 25(10):3976 – 3987.
- [7] Liu Q Q, Luo L, Wang X X, et al. Comprehensive analysis of rice laccase gene (OsLAC) family and ectopic expression of *OsLAC10* enhances tolerance to copper stress in *Arabidopsis* [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(2):e209.
- [8] Li R, Zhao Y, Sun Z, et al. Genome – wide identification of switchgrass laccases involved in lignin biosynthesis and heavy – metal responses[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23:6530.
- [9] Lu C Y, Yang T Y, Zhang Y W, et al. Genome – wide analyses and expression patterns under abiotic stress of LAC gene family in pear (*Pyrus bretschneideri*) [J]. Plant Biotechnology Reports, 2021, 15(3):403 – 416.
- [10] Yu Y C, Xing Y X, Liu F J, et al. The laccase gene family mediate multi – perspective trade – offs during tea plant (*Camellia sinensis*) development and defense processes [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 22(22):12554.
- [11] 李郑华, 姜成东, 王 鹏, 等. 荔枝漆酶(LAC)基因家族鉴定及表达分析[J/OL]. 分子植物育种, 2022:1 – 22. [2022 – 11 – 03]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.s.20220507.1344.008.html>.
- [12] Qui K, Zhou H, Pan H, et al. Genome – wide identification and functional analysis of the peach (*P. persica*) laccase gene family reveal members potentially involved in endocarp lignification [J]. Trees, 2022, 36:1477 – 1496.
- [13] Wan F X, Zhang L Q, Tan M Y, et al. Genome – wide identification and characterization of laccase family members in eggplant (*Solanum melongena* L.) [J]. Peer J, 2022, 10:e12922.
- [14] Liang M X, Haroldsen V, Cai X N, et al. Expression of a putative laccase gene, *ZmLAC1*, in maize primary roots under stress [J]. Plant Cell and Environment, 2006, 29(5):746 – 753.
- [15] Cai X N, Davis E J, Ballif J, et al. Mutant identification and characterization of the laccase gene family in *Arabidopsis* [J]. Journal of Experimental Botany, 2006, 57(11):2563 – 2569.
- [16] Cho H Y, Lee C, Hwang S G, et al. Overexpression of the *OsChII* gene, encoding a putative laccase precursor, increases tolerance to drought and salinity stress in transgenic *Arabidopsis* [J]. Gene, 2014, 552(1):98 – 105.
- [17] Ma J, Xu Z S, Wang F, et al. Isolation, purification and characterization of two laccases from carrot (*Daucus carota* L.) and their response to abiotic and metal ions stresses [J]. Protein Journal, 2015, 34(6):444 – 452.
- [18] Huang X S, Wang W, Zhang Q, et al. A basic helix – loop – helix transcription factor, *PtbrHLH*, of *Poncirus trifoliata* confers cold tolerance and modulates peroxidase – mediated scavenging of hydrogen peroxide [J]. Plant Physiology, 2013, 162(2):1178 – 1194.
- [19] Dai W S, Wang M, Gong X Q, et al. The transcription factor FcWRKY40 of *Fortunella crassifolia* functions positively in salt tolerance through modulation of ion homeostasis and proline biosynthesis by directly regulating *SOS2* and *P5CSI* homologs [J]. New Phytologist, 2018, 219(3):972 – 989.
- [20] Khan M, Hu J B, Dahro B, et al. ERF108 from *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. functions in cold tolerance by modulating raffinose synthesis through transcriptional regulation of PtrRafS [J]. Plant Journal, 2021, 108(3):705 – 724.
- [21] Zhang Y, Ming R H, Khan M, et al. ERF9 of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. undergoes feedback regulation by ethylene and modulates cold tolerance via regulating a *glutathione S – transferase UI7* gene [J]. Plant Biotechnol Journal, 2022, 20(1):183 – 200.
- [22] Huang Y, Xu Y T, Jiang X L, et al. Genome of a citrus rootstock and global DNA demethylation caused by heterografting [J]. Horticulture Research, 2021, 8(1):69.
- [23] Xu X Y, Zhou Y P, Wang B, et al. Genome – wide identification and characterization of laccase gene family in *Citrus sinensis* [J]. Gene, 2019, 689:114 – 123.
- [24] Sun Z, Zhou Y, Hu Y, et al. Identification of wheat *LACCASEs* in response to *Fusarium graminearum* as potential deoxynivalenol trappers [J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13:832800.
- [25] Turlapati P V, Kim K W, Davin L B, et al. The laccase multigene family in *Arabidopsis thaliana*: towards addressing the mystery of their gene function(s) [J]. Planta, 2011, 233(3):439 – 470.