

doi:10.11733/j.issn.1007-0435.2026.06.006

引用格式:杜欣蔚,戎睿伟,华怡雯,等.偏关苜蓿*MsLAC17*基因克隆及其对非生物胁迫的响应分析[J].草地学报,2026,34(6):2022—2031

DU Xin-wei, RONG Rui-wei, HUA Yi-wen, et al. Cloning *MsLAC17* Gene and Analysis of its Response to Abiotic Stress in *Medicago sativa* 'Pianguan' [J]. Acta Agrestia Sinica, 2026, 34 (6): 2022—2031

偏关苜蓿 *MsLAC17* 基因克隆及其对非生物胁迫的响应分析

杜欣蔚¹, 戎睿伟¹, 华怡雯¹, 刘 怡¹, 陶佳丽^{1,2}, 周思懿¹, 许 涛¹, 岑慧芳¹, 朱慧森^{1*}

(1. 山西农业大学草业学院, 山西 太谷 030801; 2. 山西工程技术学院矿业工程系, 山西 阳泉 045000)

摘要:漆酶(Laccase, LAC)作为铜蓝氧化酶蛋白家族的重要成员,在植物生长发育调控及非生物胁迫响应过程中扮演着关键角色。本研究选取山西地方优良种质‘偏关’苜蓿(*Medicago sativa* ‘Pianguan’)作为试验材料,采用PCR技术克隆获得*MsLAC17*基因,通过生物信息学手段对该基因进行分析,并利用荧光定量PCR技术,系统探究了*MsLAC17*基因表达的组织特异性,及其在不同非生物胁迫下的响应情况。结果显示:*MsLAC17*基因全长1782 bp,编码593个氨基酸,该蛋白的相对分子质量为66.26 kDa,理论等电点为10.05,属于亲水性蛋白,主要位于叶绿体和线粒体中。系统进化分析结果表明,‘偏关’苜蓿LAC17蛋白与蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)的LAC17蛋白亲缘关系较近。荧光定量PCR检测发现*MsLAC17*基因在‘偏关’苜蓿茎中表达量最高,且对盐、干旱和ABA处理均有响应,推测该基因可能在调控‘偏关’苜蓿应对非生物胁迫的过程中发挥作用,本研究结果为进一步明晰*MsLAC17*基因的生物学功能奠定理论基础。

关键词:‘偏关’苜蓿;非生物胁迫;*MsLAC17*;表达模式

中图分类号:S541.9

文献标识码:A

文章编号:1007-0435(2026)06-2022-10

Cloning *MsLAC17* Gene and Analysis of its Response to Abiotic Stress in *Medicago sativa* ‘Pianguan’

DU Xin-wei¹, RONG Rui-wei¹, HUA Yi-wen¹, LIU Yi¹, TAO Jia-li^{1,2}, ZHOU Si-yi¹, XU Tao¹,
CEN Hui-fang¹, ZHU Hui-sen^{1*}

(1. College of Grassland Science, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi Province 030801, China;

2. Department of Mining Engineering, Shanxi Institute of Technology, Yangquan, Shanxi Province 045000, China)

Abstract: Laccase (LAC), as an important member of the ceruloplasmin protein family, plays a key role in the regulation of plant growth and development and the response to abiotic stress. In this study, the local superior germplasm of *Medicago sativa* ‘Pianguan’ in Shanxi Province was used as the experimental material. The *MsLAC17* gene was cloned by PCR. And was analyzed by bioinformatics means and fluorescence quantitative PCR technology. The tissue specificity expression of *MsLAC17* gene and its response under different abiotic stresses were systematically explored. The results showed that the length of the *MsLAC17* gene is 1782 bp, encoding 593 amino acids. The relative molecular mass of this protein is 66.26 kDa, and its theoretical isoelectric point is 10.05. It is a hydrophilic protein mainly located in chloroplasts and mitochondria. The results of phylogenetic analysis indicated that the LAC17 protein of *Medicago sativa* ‘Pianguan’ is closely related to that

收稿日期:2025-08-20;修回日期:2025-10-15

基金项目:国家自然科学基金项目(32071872);山西省中央引导地方科技发展资金项目(YDZJSX2022B006);现代种业发展项目(sxzyk202501-7);山西省重点研发计划课题(202102140601006-3);山西省基础研究计划(202303021221101);山西省来晋科研奖励(SXBYKY2022118);优秀博士启动项目(2021BQ01,2023BQ03);山西省研究生实践创新项目(2024SJ133);山西省研究生学术创新项目(2025XS300)资助

作者简介:杜欣蔚(2000-),女,汉族,山东淄博人,硕士研究生,主要从事牧草种质资源与育种相关研究,E-mail:dxwxiamo@163.com;

*通信作者 Author for correspondence. E-mail: zhuhuisen@126.com

of *Medicago truncatula*. Fluorescence quantitative PCR detection revealed that the expression level of the *MsLAC17* gene was the highest in the stem, and responded to salt, drought and ABA treatment. It is speculated that this gene may play a role in regulating the response of *Medicago sativa* ‘Pianguan’ to abiotic stress. The results of this study provide an important basis for further clarifying the biological function of the *MsLAC17* gene.

Key words: *Medicago sativa* ‘Pianguan’; Abiotic stress; *MsLAC17*; Expression pattern

紫花苜蓿(*Medicago sativa*)作为多年生豆科牧草,素有“牧草之王”的美誉,在我国已有 2000 多年的种植历史^[1]。其茎叶富含粗蛋白,根系发达,不仅可作为优质饲料和蔬菜^[2],还能通过固氮作用改善土壤结构,有效减少水土流失^[3-4]。自我国实施奶业振兴计划以来,市场对优质苜蓿的需求持续攀升。然而,紫花苜蓿在生长发育过程中,易受干旱、盐碱胁迫等影响,导致品质和产量大幅下滑^[5],难以满足市场需求。因此,急需培育优质高产、抗逆性强的紫花苜蓿新品种。

漆酶(铜蓝氧化酶)属于氧化酶家族,是一类含铜的多酚氧化酶^[6]。作为木质素单体氧化聚合过程中的关键酶,其在植物细胞壁木质素沉积过程中起着核心调控作用^[7]。而木质素对于增强植物的机械强度、提升植物对非生物胁迫的抵御能力具有重要意义。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)突变体相关研究表明,漆酶功能缺失(如 *LAC17* 和 *LAC14*)会导致木质素含量显著下降,这直接证实了漆酶在木质素生物合成过程中的关键作用^[8-9]。除参与植物木质化进程外,漆酶在植物应对环境胁迫的过程中也发挥着重要作用。已有研究发现,多种植物的漆酶基因在干旱、盐碱等非生物胁迫条件下表达量出现上调的现象^[10-11]。功能验证实验显示,在拟南芥中过表达水稻(*Oryza sativa*)漆酶基因 *OsLAC10* 能显著增强转基因拟南芥对铜的耐受性^[7]。类似地,过表达胡杨(*Populus euphratica*)漆酶基因 *PeuLAC2* 能够增强植株的水分运输能力,从而提高其耐旱性;而沉默柑橘(*Citrus reticulata*)漆酶基因

CsLAC18 则会削弱植株的低温抗性^[12-13]。另有研究显示,过表达 *PeLAC10* 基因可通过增加木质素含量与调控苯丙烷代谢途径,显著提升转基因植物对干旱、酚酸等胁迫的适应能力^[14]。此外,漆酶还参与调控植物凯氏带的形成^[15],进而影响农作物的产量和品质。近年来,对漆酶功能的深度挖掘已成为相关领域研究的热点^[16]。

‘偏关’苜蓿(*Medicago sativa* ‘Pianguan’)作为山西优质地方苜蓿品种,具有抗寒性强、耐瘠薄、产量高、营养价值高等特点^[17],是苜蓿新种质创制的重要候选材料。本试验采用分子生物学技术,克隆并研究漆酶基因 *LAC17* 的生物学功能,该研究为‘偏关’苜蓿新种质选育奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验中‘偏关’苜蓿种子由山西农业大学草业学院种质资源库提供。挑选籽粒饱满、色泽鲜亮的野生型‘偏关’苜蓿种子,播于 30 cm×20 cm 方形盆内,盆中栽培基质按蛭石与营养土 1:1(体积比)配制,随后放置于光照培养箱,培养条件为光照 16 h/黑暗 8 h,昼温 25℃/夜温 20℃,光强 5000 lx,每隔 3 d 浇 1 次霍格兰营养液。

1.2 试验试剂

所用试剂如表 1 所示。

表 1 试验所用试剂

Table 1 Reagents used in the experiment

试剂名称 Reagent name	销售公司 Sales company	生产国家 Country of origin
氨苄霉素(Amp)(CA2031)	北京酷来搏科技有限公司	中国
核酸染料(GL802)、PCR Mix(SH411)、DL 2000 DNA Marker(SM811)	金沙生物科技有限公司	中国
反转录试剂盒(RR047)、琼脂糖凝胶回收试剂盒(9762)	宝日医生物技术(北京)有限公司	日本
RNA 提取试剂盒(0416-50)	北京华越洋生物科技有限公司	中国
PCR 扩增引物	上海生工生物工程有限公司	中国
DH5α 感受态细胞	北京酷来搏科技有限公司	中国
pT0p0001 Blunt Simple Cloning Kit(TC602)	金沙生物科技有限公司	中国

1.3 *MsLAC17* 基因克隆

根据前期转录组测序结果,与已发表的‘中苜

1 号’(*Medicago sativa* ‘Zhongmu No. 1’)^[18]、‘中苜 4 号’(*Medicago sativa* ‘Zhongmu No. 4’)^[19] 及

Phytozome 数据库中蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*) 基因组序列进行比对, 获得 *MsLAC17* 基因序列, 利用 NCBI Primer-BLAST 和 Primer 5.0 在线软件设计引物 (表 2)。使用 RNA 提取试剂盒从‘偏关’苜蓿叶片中提取总 RNA, 并反转录合成 cDNA。以该 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分离后, 切取符合预期大小的目的条带进行凝胶回收纯化。纯化的 DNA 片段连

接至克隆载体 pT0p0001 Blunt Simple Cloning Kit (TC602), 并转化入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。筛选阳性单克隆菌, 菌液 PCR 鉴定后进行测序验证。

1.4 生物信息学分析

为解析 *MsLAC17* 基因的特性, 进行生物信息学分析, 分析内容及软件见表 3。

表 2 *MsLAC17* 序列引物

Table 2 Primers used for *MsLAC17* sequence cloning

引物名称 Primer name	引物序列 5'—3' Primer sequence (5'—3')
<i>MsLAC17</i>	Primer-F: ATGGGTTTTGCTTATATCAAAATGTC
	Primer-R: TCAACATTTGGAAGATCAGAAGG

表 3 生物信息学分析所用软件列表

Table 3 List of software used in bioinformatics analysis

分析内容 Analysis content	分析软件 Analysis software
蛋白质序列理化性质分析 Analysis of the physicochemical properties of protein sequences	ExPASy (http://web.expasy.org/protparam/)
蛋白质亲疏水性预测 Prediction of protein hydrophilicity and hydrophobicity	ProtScale (https://web.expasy.org/protscale/)
蛋白质二级结构预测 Prediction of secondary protein structures	Prabi (https://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)
蛋白信号肽预测 Protein signal peptide prediction	SignalP-6.0 (https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/)
跨膜结构域预测 Transmembrane domain prediction	DeepTMHMM (https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM/)
蛋白质亚细胞定位情况预测 Prediction of protein subcellular localization	WoLF PSORT (https://wolfpsort.hgc.jp/)
氨基酸序列比对 Amino acid sequence alignment	DNAMAN 6.0 (本地软件)
系统进化树构建 Construction of the phylogenetic tree	MEGA 7.0 (本地软件)
磷酸化位点预测 Prediction of phosphorylation sites	NetPhos 3.1 Server (http://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/)

1.5 *MsLAC17* 基因表达模式分析

选取 1 月龄的‘偏关’苜蓿幼苗, 采用水培胁迫实验, 设置干旱胁迫 (含 20% PEG 6000 霍格兰营养液)、盐胁迫 (含 250 mmol·L⁻¹ NaCl 霍格兰营养液) 和脱落酸 (含 80 μ mol·L⁻¹ ABA 霍格兰营养液) 处理, 每个处理均设 5 个生物学重复, 分别于 0 h, 6 h, 12 h, 24 h 和 48 h 采集植株相同部位的成熟叶, 进行 qRT-PCR 检测。选取 2 月龄‘偏关’苜蓿的根 (r), 幼茎 (ys), 老茎 (os), 叶 (l), 花 (f) 5 个组织对 *MsLAC17* 基因表达量进行

检测, 利用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法^[20] 计算 *MsLAC17* 基因的相对表达量。表 4 为 *MsLAC17* 定量引物及内参 *Actin* 引物序列。

表 4 *MsLAC17* 基因荧光定量 PCR 引物序列

Table 4 The qRT-PCR primer sequences of *MsLAC17* gene

引物名称 Primer name	引物序列 (5'—3') Primer sequence (5'—3')
q <i>MsLAC17</i> -F	TAGGGGAGTGGTGGAAAGCAGAC
q <i>MsLAC17</i> -R	ACAGTTGTGGAGAGGACCTGGAAG
<i>Actin</i> -F	CAAAAGATGGCAGATGCTGAGGAT
<i>Actin</i> -R	CATGACACCAGTATGACGAGGTCTG

1.6 数据分析

使用 SPSS 软件分析数据 , GraphPad Prism 9.5.0、WPS Office 软件作图。

2 结果与分析

2.1 *MsLAC17* 基因的克隆鉴定

以‘偏关’苜蓿的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增结果如图 1 所示, 在 2000 bp 左右有特异性条带出现, 且条带大小与目的基因片段的预期大小一致。

测序结果显示克隆得到的 *MsLAC17* 基因长度为 1782 bp, 将测序结果与在线获得的 *MsLAC17* 基因序列利用 DNAMAN 软件进行比对。结果如图 2

所示, 一致性为 100%, 表明‘偏关’苜蓿 *MsLAC17* 基因克隆成功。

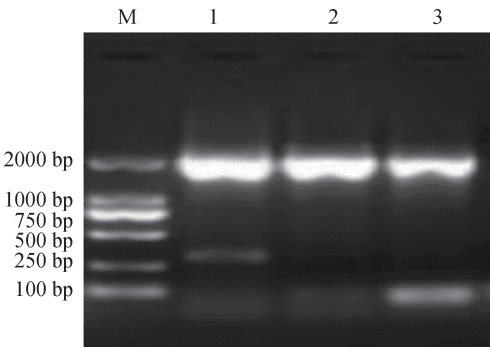


图 1 *MsLAC17* 基因克隆

Fig. 1 Cloning of *MsLAC17* gene

注: M 为 DL2000 Marker; 1~3 为 PCR 扩增产物
Note: M, DL2000 Marker; 1-3, PCR amplification product

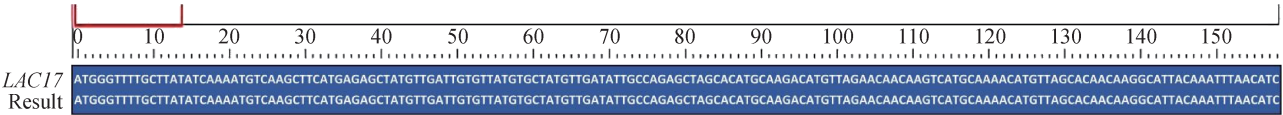


图 2 *MsLAC17* 序列比对结果

Fig. 2 Sequence alignment results of *MsLAC17*

2.2 *MsLAC17* 基因编码蛋白质的理化性质分析

使用 ExPASy 在线工具分析 *MsLAC17* 蛋白的理化性质, 结果显示, ‘偏关’苜蓿 *MsLAC17* 蛋白相对分子质量为 66.26 kDa, 编码 593 个氨基酸, 推测其分子式为 $C_{3027}H_{4721}N_{831}O_{806}S_{19}$, 理论等电点 (isoelectric point, pI) 为 10.05, 脂肪系数为 84.81, 带正电荷氨基酸残基 (Arg+Lys) 有 70 个, 带负电荷氨基酸残基 (Asp+Glu) 有 29 个 (表 5)。*MsLAC17* 基因编码的

氨基酸序列的结构域预测结果显示 *MsLAC17* 是具有铜氧还蛋白结构域的多铜氧化酶 (图 3a)。该蛋白不稳定系数为 29.91, 平均亲水性值为 -0.177, 表明 *MsLAC17* 蛋白属于不稳定亲水性蛋白 (图 3b)。对氨基酸进行磷酸化位点预测结果显示 (图 3c), 该蛋白含有 13 个丝氨酸磷酸化位点, 15 个苏氨酸磷酸化位点以及 2 个酪氨酸磷酸化位点, 表明该蛋白发生磷酸化时主要以苏氨酸为主。

表 5 氨基酸组成

Table 5 Amino acid composition

氨基酸 Amino acid	数目 Number	百分含量 Percentage/%	氨基酸 Amino acid	数目 Number	百分含量 Percentage/%
丙氨酸 Ala (A)	40	6.7	赖氨酸 Lys (K)	47	7.9
精氨酸 Arg (R)	23	3.9	甲硫氨酸 Met (M)	11	1.9
天冬酰胺 Asn (N)	41	6.9	苯丙氨酸 Phe (F)	35	5.9
天冬氨酸 Asp (D)	19	3.2	脯氨酸 Pro (P)	45	7.6
半胱氨酸 Cys (C)	8	1.3	丝氨酸 Ser (S)	33	5.6
谷氨酰胺 Gln (Q)	21	3.5	苏氨酸 Thr (T)	45	7.6
谷氨酸 Glu (E)	10	1.7	色氨酸 Trp (W)	10	1.7
甘氨酸 Gly (G)	35	5.9	酪氨酸 Tyr (Y)	14	2.4
组氨酸 His (H)	25	4.2	缬氨酸 Val (V)	48	8.1
异亮氨酸 Ile (I)	34	5.7	吡咯咯氨酸 Pyl (O)	0	0.0
亮氨酸 Leu (L)	49	8.3	硒代半胱氨酸 Sec (U)	0	0.0

2.3 *MsLAC17* 基因编码蛋白质二级结构及三级结构分析

‘偏关’苜蓿 *MsLAC17* 蛋白的二级结构预测

结果显示 (图 4a), 该蛋白由无规则卷曲 (65.26%)、延伸链 (25.46%)、 α -螺旋 (9.27%) 组成。*MsLAC17* 蛋白的信号肽预测结果 (图 4b) 显

示,该蛋白具有信号肽序列,已有研究证实,绝大多数植物漆酶基因的开放阅读框(ORF)上游均编码信号肽序列(例如拟南芥、水稻中的漆酶家族成员),这符合分泌蛋白的普遍特征。利用 DeepT-

MHMM 进行跨膜结构域预测,结果所示(图 4c), MsLAC17 蛋白无跨膜结构域,推测该蛋白没有跨膜运动,且 MsLAC17 蛋白主要位于叶绿体和线粒体中(图 4d)。

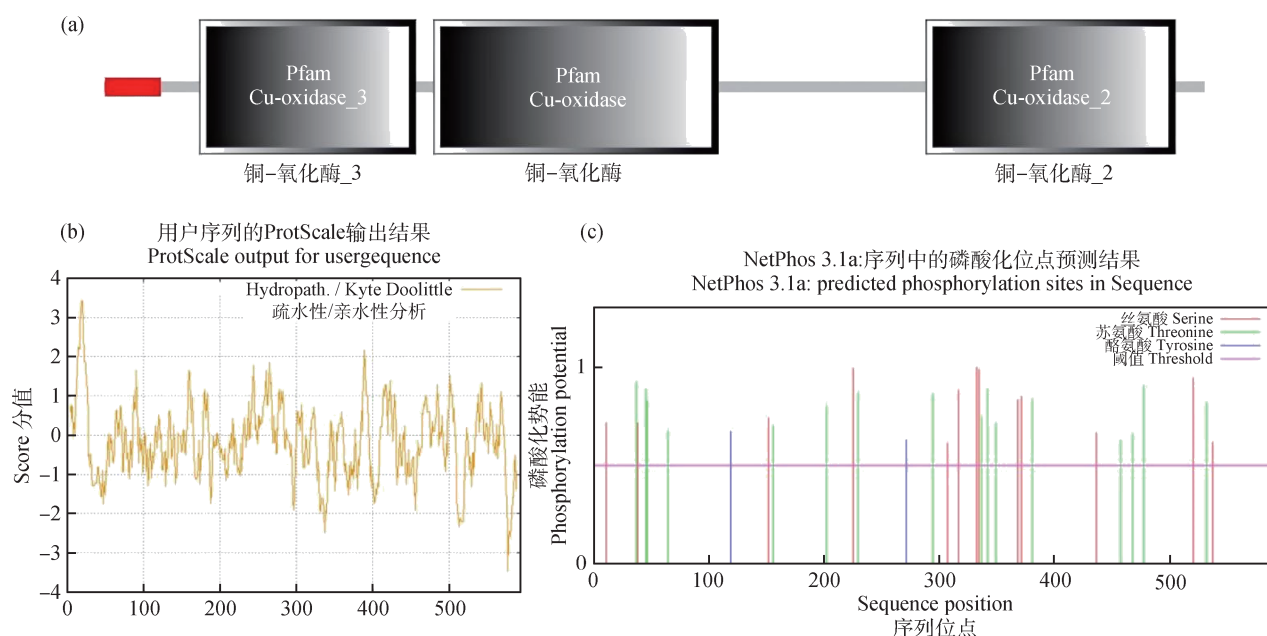


图3 MsLAC17蛋白结构域预测(a)、蛋白亲疏水性(b)和蛋白磷酸化位点(c)

Fig. 3 MsLAC17 protein domain prediction (a), protein hydrophobicity (b) and protein phosphorylation sites (c)

2.4 MsLAC17蛋白序列比对与系统进化树分析

对‘偏关’苜蓿 MsLAC17、蒺藜苜蓿 MtLAC17 (XM_013593436.3)、拟南芥 AtLAC17 (BT015890.1)、红车轴草 (*Trifolium pratense*) TpLAC17 (XM_051056863.1)、豌豆 (*Pisum sativum*) PsLAC17 (XM_045938364.1)、鹰嘴豆 (*Cicer arietinum*) CaLAC17 (XM_004514335.3)、长柔毛野豌豆 (*Vicia villosa*) VvLAC17 (XM_058895223.1)、相思子 (*Abrus precatorius*) ApLAC17 (XM_027497646.1)、毒羊豆 (*Gastrolobium bilobum*) GbLAC17 (XM_061497346.1)、木豆 (*Cajanus cajan*) CcLAC17 (XM_020351329.2)、大豆 (*Glycine max*) GmLAC17 (XM_006583535.3)、野大豆 (*Glycine soja*) GsLAC17 (XM_028384511.1)、豇豆 (*Vigna unguiculata*) VnLAC17 (XM_028070993.1)、狭叶羽扇豆 (*Lupinus angustifolius*) LaLAC17 (XM_019594694.1)、烟草 (*Nicotiana tabacum*) NtLAC17 (XM_016606329.1) 15种植物的 LAC17 蛋白进行多序列比对分析,结果显示 LAC17 蛋白的氨基酸序列在上述物种中表现出高度保守性(图 5)。系统发育树结果(图 6)显示,‘偏关’苜蓿 MsLAC17 蛋白和

蒺藜苜蓿 MtLAC17 蛋白亲缘关系最近。

2.5 MsLAC17基因的表达模式分析

实时荧光定量 PCR 结果显示, MsLAC17 基因在‘偏关’苜蓿根、茎、叶、花中均有表达,幼茎中表达量最高,显著高于老茎、根、叶、花中的表达量 ($P < 0.05$) (图 7a)。为进一步探究 MsLAC17 基因在‘偏关’苜蓿非生物胁迫中发挥的作用,本研究检测干旱、盐和 ABA 胁迫不同时间点下 MsLAC17 基因的相对表达量。随着干旱胁迫时间的延长, MsLAC17 基因呈现出先上升后下降的表达趋势 ($P < 0.05$), 且在 12 h 时表达量达到最高值(图 7b)。盐胁迫处理下, MsLAC17 基因的相对表达量显著上调,在处理 6 h 时表达量达到峰值,随着处理时间的延长,表达量又显著下调 ($P < 0.05$) (图 7c)。ABA 处理下, MsLAC17 基因的相对表达量显著上调 ($P < 0.05$), 在处理 12 h 时表达量达到最高,随后表达量又呈现显著下降的趋势 ($P < 0.05$) (图 7d)。以上结果表明, MsLAC17 基因对干旱、盐和 ABA 等非生物胁迫均有响应,且其表达趋势较相似。

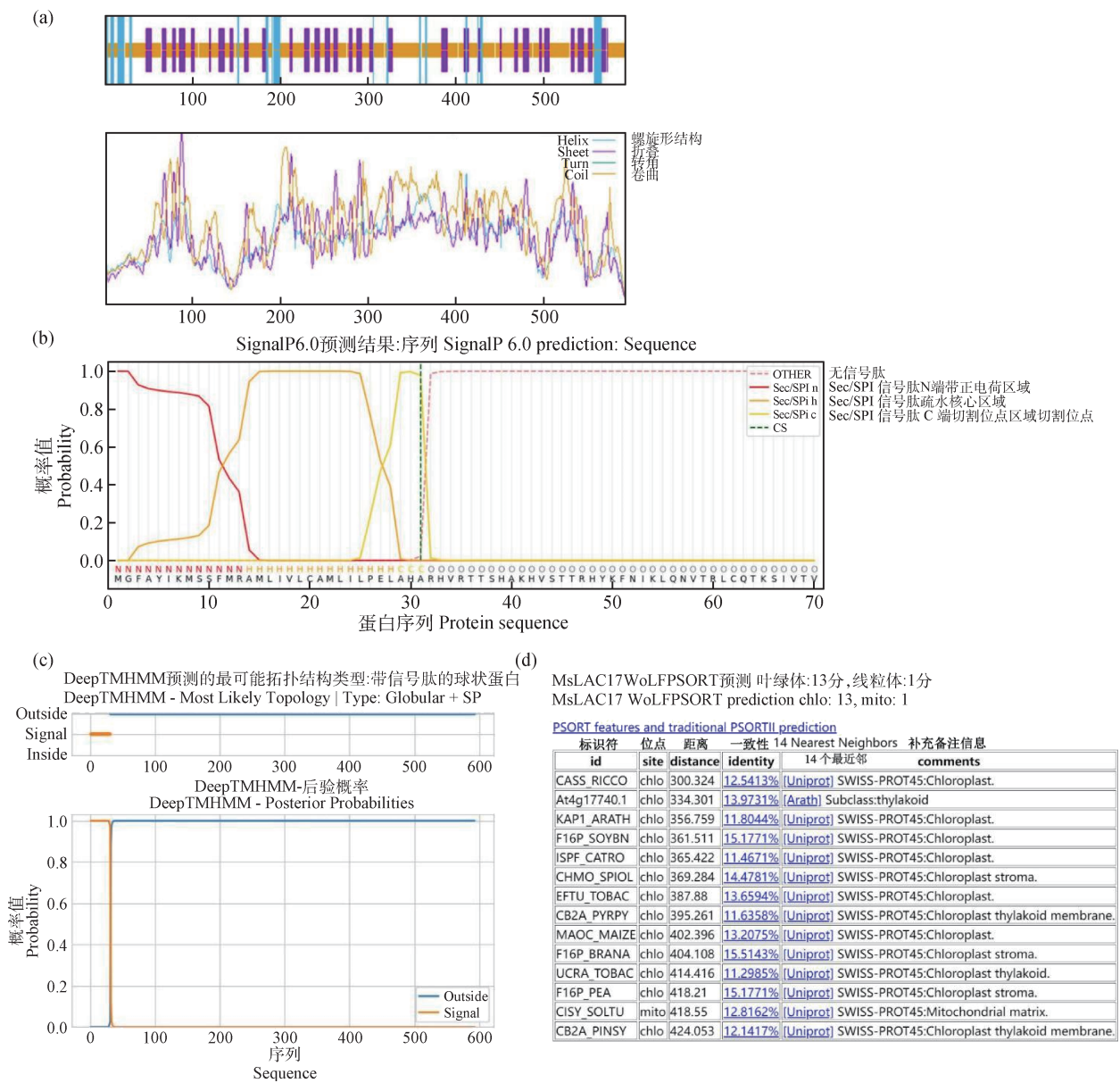


图 4 MsLAC17 蛋白结构与亚细胞定位特征预测

Fig. 4 Prediction of MsLAC17 protein structure and subcellular localization characteristics

注:(a)蛋白二级结构预测、(b)信号肽预测、(c)跨膜结构域预测、(d)亚细胞定位预测

Note: (a) Prediction of protein secondary structure, (b) prediction of signal peptides, (c) prediction of transmembrane domains, (d) prediction of subcellular localization

3 讨论

植物漆酶属于铜蓝蛋白氧化酶家族,作为一种具备多种功能的含铜氧化酶,其结构有着显著特征:四个铜离子分布于三个不同的配位中心^[21]。正是这种独特的结构,使植物漆酶拥有了三个保守的铜氧化酶结构域,而这一结构域在漆酶家族成员鉴定中发挥着关键作用^[22]。本研究预测的 MsLAC17 蛋白结构包含三个典型的铜氧化酶结构域,这与已知的植物漆酶蛋白结构高度吻合。该蛋白的结构

域能与四个铜离子共同构成铜离子活性中心,而这一区域正是漆酶实现氧化还原功能的核心功能单元^[16]。根据氧化还原电位的差异,漆酶被明确分为低氧化还原电位酶与高氧化还原电位酶两大类。其中,低氧化还原电位酶广泛分布于细菌、植物及昆虫等生物体内^[23]。已有研究表明,龙眼(*Dimocarpus longan*)中的 DiLac7 可能定位于线粒体外膜,通过参与细胞色素 C 的氧化还原反应,对植物呼吸作用中的电子传递链产生影响^[24]。本研究 MsLAC17 的亚细胞定位预测结果显示该蛋白可能



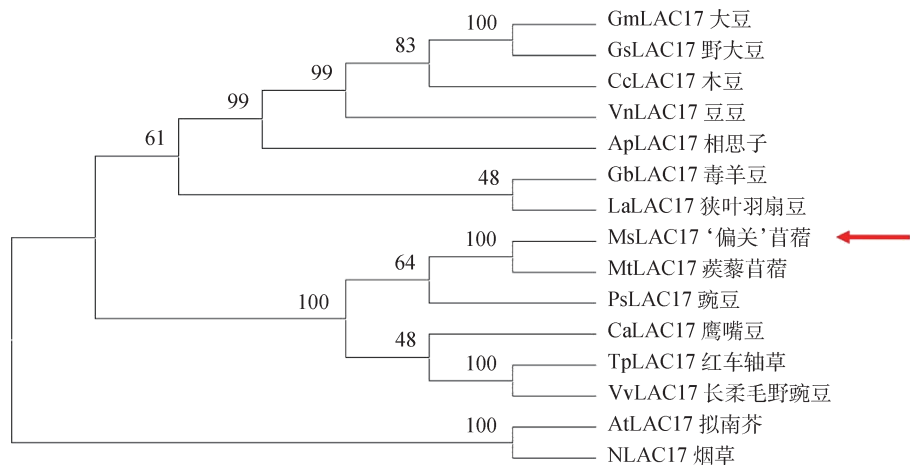


图 6 不同物种 LAC17 蛋白系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree of LAC17 protein in different species

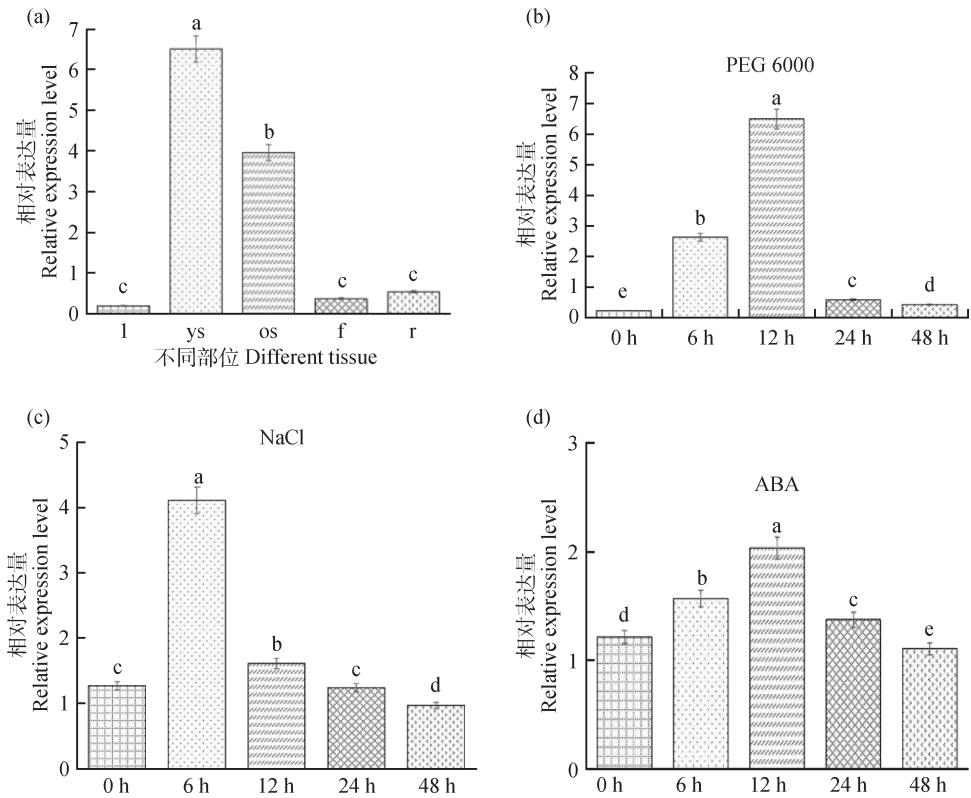


图 7 *MsLAC17* 的组织特异性及在非生物胁迫下的表达模式

Fig. 7 Tissue-specific and expression patterns of *MsLAC17* under different abiotic stresses

注:图中相同处理不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

Note: The same treatment with different lowercase letters in the figure indicates significant differences ($P<0.05$)

存在于线粒体和叶绿体中,这与龙眼 *DILAC7* 的定位情况相似^[24]。进一步对 LAC17 蛋白的氨基酸序列进行比对,并结合系统进化树分析发现,‘偏关’苜蓿的 *MsLAC17* 与蒺藜苜蓿的 *MtLAC17* 同源性最高,二者亲缘关系最近,这一结果符合系统发育保守性规律。

漆酶作为木质素生物合成的关键酶,参与木质素

单体的聚合过程,对植物的生长发育具有重要影响。从基因表达的组织特异性来看,研究发现拟南芥中 *AtLAC4*、*AtLAC17* 等漆酶基因在茎的木质部维管组织(该组织承担水分运输与机械支撑功能)中呈现高表达,其表达模式与木质化进程密切相关^[25-26],这一表达特征与本研究 *MsLAC17* 在幼茎组织中高表达的结果高度一致。此外,多项研究

表明,在双子叶植物如拟南芥^[8,27]、番茄(*Solanum lycopersicum*)^[28]以及单子叶植物如水稻^[7]、玉米(*Zea mays*)^[29]中,部分漆酶基因在根和茎中的表达水平普遍较高。

漆酶基因(LACs)作为植物响应环境胁迫的核心功能基因,其表达模式对非生物胁迫(如重金属胁迫、干旱、盐胁迫、温度胁迫、氧化应激等)及生物胁迫(如病原体侵染、昆虫取食等)呈现出高度敏感性。在胁迫条件下,LACs的转录水平常会发生显著的上调或下调^[30]。已有研究证实,过表达*PtrLAC9*的转基因甜橙(*Citrus sinensis*)^[31]愈伤组织通过降低活性氧的含量,进而显著提高其耐盐性;菜豆(*Phaseolus vulgaris*)基因组中29个LAC基因成员的表达量在低温胁迫下发生变化,其中*PvLAC3*、*PvLAC4*、*PvLAC7*的响应显著,过表达这些基因能够增强植株的耐低温能力^[32]。本研究通过RT-qPCR分析发现*MsLAC17*对盐、干旱及ABA处理均会产生显著响应,*MsLAC17*的相对表达量呈现先显著上调后下降的趋势,与拟南芥*AtLAC14*^[33]和*AtLAC4*^[27]的基因表达模式类似。基于上述表达特征以及*MsLAC17*在茎组织中高表达的特性和功能保守性,我们推测偏关苜蓿*MsLAC17*可能与拟南芥*AtLAC17*具有相似的生物学功能,不仅参与茎部的木质化进程,助力茎的正常生长发育和机械支撑功能,还可能在植物抵御盐胁迫、干旱胁迫等非生物逆境过程中,通过调控木质素的合成或信号转导通路,增强植株的抗逆能力^[25-26]。尽管本研究揭示了*MsLAC17*基因的基本特性及胁迫响应模式,但其具体的生物学功能与调控机制仍需深入探究。未来研究将围绕*MsLAC17*的转基因功能验证、蛋白互作网络解析及其在不同逆境条件下的动态调控机制展开,以期在植物抗逆育种提供新的基因资源和理论支撑。

4 结论

本试验从‘偏关’苜蓿中成功克隆到了*MsLAC17*基因,该基因全长1782 bp,编码593个氨基酸,其编码的蛋白为亲水性蛋白,无跨膜结构,主要位于叶绿体和线粒体。系统进化分析表明,‘偏关’苜蓿*MsLAC17*蛋白与蒺藜苜蓿*MtLAC17*蛋白亲缘关系较近。*MsLAC17*基因在‘偏关’苜蓿幼茎中表达量最高,对干旱、盐胁迫和ABA处理均有响应,

推测其在植物逆境响应中扮演着重要角色,该结果为后续深入探究*MsLAC17*基因在‘偏关’苜蓿中的生物学功能奠定了基础。

参考文献

- [1] 王志龙,黄卫国,王新强,等. 10种紫花苜蓿在酒泉荒漠灌区中轻度盐碱地生产性能比较研究[J]. 畜牧兽医杂志,2021,40(6):14-17,20
WANG Z L, HANG W G, WANG X Q, et al. Comparative study on production performance of 10 alfalfa species in the moderate and mild saline alkali land in Jiuquan Desert irrigation area[J]. Journal of Animal Science and Veterinary Medicine, 2021,40(6):14-17,20
- [2] 陈存仁. 中国药学大辞典(上册)[M]. 上海:世界书局,1935:896
CHEN C R. Chinese pharmacopoeia dictionary (volume 1)[M]. Shanghai: World Publishing House, 1935:896
- [3] 边佳辉,刘自扬,李宗英,等. 紫花苜蓿基因工程改良研究进展[J]. 草业科学,2020,37(1):139-155
BIAN J H, LIU Z Y, LI Z Y, et al. Advances in alfalfa improvement using genetic engineering[J]. Pratacultural Science, 2020, 37(1):139-155
- [4] 张敏,刘爽,刘勇,等. 黄土丘陵缓坡风沙区不同土地利用类型土壤水分变化特征[J]. 水土保持学报,2019,33(3):115-120,128
ZHANG M, LIU S, LIU Y, et al. Soil moisture variation characteristics of different land use types in the moderate slope sandy area of Loess Hilly Region[J]. Journal of Soil and Water Conservation, 2019,33(3):115-120,128
- [5] 张杰一,张众,王静,等. 紫花苜蓿抗逆育种研究进展[J]. 中国草食动物科学,2025,45(2):80-85
ZHANG J Y, ZHANG Z, WANG J, et al. Advances in alfalfa stress resistance breeding[J]. China Herbivore Science, 2025, 45(2):80-85
- [6] HOEGGER P J, KILARU S, JAMES T Y, et al. Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences[J]. The FEBS Journal, 2006, 273(10):2308-2326
- [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):209
- [8] 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
- [9] ZHUO C L, WANG X, DOCAMPO-PALACIOS M, et al. Developmental changes in lignin composition are driven by both monolignol supply and laccase specificity [J]. Science Advances, 2022, 8(10):eabm8145
- [10] 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
- [11] XU X, 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
- [12] NIU Z M, LI G T, HU H Y, et al. A gene that underwent adaptive evolution, *LAC2* (LACCASE), in *Populus euphratica* improves drought tolerance by improving water transport capacity [J]. Horticulture Research, 2021, 8:88
- [13] XU X, ZHANG Y L, LIANG M G, et al. The *Citrus* laccase gene *CsLAC18* contributes to cold tolerance [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(23):14509
- [14] LI L, YANG K B, WANG S N, et al. Genome-wide analysis of laccase genes in moso bamboo highlights *PeLAC10* involved in lignin biosynthesis and in response to abiotic stresses [J]. Plant Cell Reports, 2020, 39(6):751-763
- [15] ZHUANG Y, ZUO D Q, TAO Y H, et al. Laccase3-based extracellular domain provides possible positional information for directing Casparian strip formation in *Arabidopsis* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2020, 117(27):15400-15402
- [16] 白永生, 周嘉杰, 唐玉林. 植物漆酶及其在植物生长发育中的作用 [J]. 生命科学, 2022, 34(9):1135-1144
- BAI Y S, ZHOU J J, TANG Y L. Plant laccases and their roles in plant growth and development [J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2022, 34(9):1135-1144
- [17] 赵娇阳, 李小艳, 朱慧森, 等. 偏关苜蓿种子萌发及植株再生体系优化 [J]. 草地学报, 2020, 28(4):947-955
- ZHAO J Y, LI X Y, ZHU H S, et al. Seed germination and plant regeneration system optimization of *Medicago sativa* 'Pianguan' [J]. Acta Agrestia Sinica, 2020, 28(4):947-955
- [18] SHEN C, DU H L, CHEN Z, et al. The chromosome-level genome sequence of the autotetraploid alfalfa and resequencing of core germplasms provide genomic resources for alfalfa research [J]. Molecular Plant, 2020, 13(9):1250-1261
- [19] LONG R C, ZHANG F, ZHANG Z W, et al. Genome assembly of alfalfa cultivar Zhongmu-4 and identification of SNPs associated with agronomic traits [J]. Genomics, Proteomics & Bioinformatics, 2022, 20(1):14-28
- [20] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method [J]. Methods, 2001, 25(4):402-408
- [21] GIARDINA P, FARACO V, PEZZELLA C, et al. Laccases: a never-ending story [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2010, 67(3):369-385
- [22] MOT A C, SILAGHI-DUMITRESCU R. Laccases: complex architectures for one-electron oxidations [J]. Biochemistry (Moscow), 2012, 77(12):1395-1407
- [23] MUNK L, SITARZ A K, KALYANI D C, et al. Can laccases catalyze bond cleavage in lignin? [J]. Biotechnology Advances, 2015, 33(1):13-24
- [24] 田奇琳, 林玉玲, 郑庆游, 等. 龙眼 *DLLac7* 的克隆及其表达调控分析 [J]. 果树学报, 2016, 33(10):1185-1193
- TIAN Q L, LIN Y L, ZHENG Q Y, et al. Cloning and expression analyses of *DLLac7* in *Dimocarpus longan* [J]. Journal of Fruit Science, 2016, 33(10):1185-1193
- [25] HOFFMANN N, BENSKE A, BETZ H, et al. Laccases and peroxidases co-localize in lignified secondary cell walls throughout stem development [J]. Plant Physiology, 2020, 184(2):806-822
- [26] PERKINS M L, SCHUETZ M, UNDA F, et al. Dwarfism of high-monomerolignol *Arabidopsis* plants is rescued by ectopic LACCASE overexpression [J]. Plant Direct, 2020, 4(9):e00265
- [27] 张盛春, 鞠常亮, 王小菁. 拟南芥漆酶基因 *AtLAC4* 参与生长及非生物胁迫响应 [J]. 植物学报, 2012, 47(4):357-365
- ZHANG S C, JU C L, WANG X J. *Arabidopsis* laccase gene *AtLAC4* regulates plant growth and responses to abiotic stress [J]. Chinese Bulletin of Botany, 2012, 47(4):357-365
- [28] 赵先炎, 庞明利, 赵强, 等. 番茄漆酶基因 *LeLAC^{mir397}* 的克隆与表达分析 [J]. 园艺学报, 2015, 42(7):1285-1298
- ZHAO X Y, PANG M L, ZHAO Q, et al. Cloning and expression analysis of tomato *LeLAC^{mir397}* gene [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2015, 42(7):1285-1298
- [29] LIANG M, HAROLDSEN V, CAI X N, et al. Expression of a putative laccase gene, *ZmLAC1*, in maize primary roots under stress [J]. Plant, Cell & Environment, 2006, 29(5):746-753
- [30] BAI Y, ALI S, LIU S, et al. Characterization of plant laccase genes and their functions [J]. Gene, 2023, 852:147060
- [31] 顾铭洲. 盐胁迫下枳漆酶基因的鉴定及外源茉莉酸甲酯的调节作用研究 [D]. 扬州:扬州大学, 2023:33
- GU M Z. Identification of laccase genes from *Poncirus trifoliata* under salt stress and regulation by exogenous methyl jasmonate [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2023:33
- [32] CHENG T, REN C Y, XU J H, et al. Genome-wide analysis of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) laccase gene family and its functions in response to abiotic stress [J]. BMC Plant Biology, 2024, 24(1):688
- [33] 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

(责任编辑 付 宸)