

DOI: 10.11913/PSJ.2095-0837.2017.20252

李利超, 孙化雨, 娄永峰, 杨意宏, 赵韩生, 高志民. 毛竹漆酶基因 *PeLAC* 的克隆与表达分析 [J]. 植物科学学报, 2017, 35(2): 252~259
 Li LC, Sun HY, Lou YF, Yang YH, Zhao HS, Gao ZM. Cloning and expression analysis of *PeLAC* in *Phyllostachys edulis* [J]. Plant Science Journal, 2017, 35(2): 252~259

毛竹漆酶基因 *PeLAC* 的克隆与表达分析

李利超, 孙化雨, 娄永峰, 杨意宏, 赵韩生, 高志民*

(国际竹藤中心, 国家林业局竹藤科学与技术重点开放实验室, 北京 100102)

摘要: 漆酶(LAC)对植物生长发育具有重要作用。本研究以毛竹(*Phyllostachys edulis* (Carr.) Lehaie)为实验材料, 克隆获得毛竹漆酶基因 *PeLAC* 的 cDNA 和基因组序列, 长度分别为 1692 bp 和 2785 bp。该基因包含 5 个内含子和 6 个外显子; *PeLAC* 蛋白编码 563 个氨基酸, 推测的分子质量和等电点分别为 62.3 kD 和 9.056。系统进化分析表明, *PeLAC* 与其它植物的漆酶具有较高的一致性。经预测 *PeLAC* 基因编码序列中含有 miR397 的靶点, 利用 RLM-5' RACE 技术证明 miR397 对 *PeLAC* 能够准确切割, 位点位于靶序列的第 10 ~ 11 位碱基之间。组织特异性分析表明, *PeLAC* 基因在茎中表达丰度最高, 根中次之, 叶鞘中较少, 叶片中几乎未检测到表达; 随着笋高度的增加, *PeLAC* 表达丰度上升, 生长至 15 cm 时达到最大值, 30 cm 时又有所下降; 而 miR397 的表达与 *PeLAC* 相反。本研究同时克隆了 *PeLAC* 基因上游启动子序列 *PeLACp*, 其包含 ABRE、MBS 等多种与逆境胁迫相关的响应元件。利用 ABA(100 μmol/L) 和 NaCl(400 mmol/L) 溶液处理可明显诱导 *PeLAC* 在毛竹根中表达, 而 GA₃(100 μmol/L) 处理则对其表达具有抑制作用。

关键词: 毛竹; 漆酶基因; miR397; 表达分析

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2017)02-0252-08

Cloning and expression analysis of *PeLAC* in *Phyllostachys edulis*

Li Li-Chao, Sun Hua-Yu, Lou Yong-Feng, Yang Yi-Hong, Zhao Han-Sheng, Gao Zhi-Min*

(International Center for Bamboo and Rattan, State Forestry Administration Key Laboratory on the Science and Technology of Bamboo and Rattan, Beijing 100102)

Abstract: Laccase (LAC) has many functions in plants, playing important roles in both growth and development. The cDNA, genomic DNA, and promoter sequences of *PeLAC* were isolated from Moso bamboo (*Phyllostachys edulis* (Carr.) Lehaie) using PCR techniques. The open reading frame (ORF) and genomic DNA sequences of *PeLAC* in *Ph. edulis* were 1692 bp and 2785 bp, respectively. There were six exons separated by five introns in the *PeLAC* genomic sequence, which were in full compliance with the intron splicing principle of GT-AG. *PeLAC* encoded 563 amino acid residues with a calculated molecular weight of 62.3 kD and theoretical isoelectric point of 9.056. Phylogenetic analysis demonstrated that *PeLAC* had high identities with LACs from other plants. Prediction showed that a putative miR397-targeted site was found in the coding region of *PeLAC*, which was further validated by RLM-5' RACE. The sequencing result of cleavage products showed that the cleavage site was at the 10th base of miR397 complementary to *PeLAC* in *Ph. edulis*, confirming that miR397 can guide mRNA cleavage of *PeLAC*. Tissue specific expression analysis showed that *PeLAC* was

收稿日期: 2016-07-15, 退修日期: 2016-09-14。

基金项目: 公益性行业科研专项(201504106); “十二五”国家科技计划课题(2015BAD04B01)。

This work was supported by grants from the Special Fund for Forest Scientific Research in the Public Welfare from State Forestry Administration of China (201504106), and National Sci-Tech Support Plan of the Twelfth Five-Year (2015BAD04B01).

作者简介: 李利超(1991-), 男, 硕士研究生, 研究方向为竹藤花卉分子育种(E-mail: liliachao1991@126.com)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: gaozhimin@icbr.ac.cn)。

expressed at the highest level in the stem, followed by the root and leaf sheath, but hardly at all in the leaf blade. With increasing shoot height, the expression abundance of *PeLAC* increased to a maximum at 15 cm, and then declined at 30 cm; whereas the expression of miR397 showed the opposite pattern. The promoter sequence of *PeLAC* was also isolated, and was 2000 bp and included many responsive elements such as ABRE and MBS related to abiotic stresses, indicating that *PeLAC* might be involved in responses to hormones and drought. Further experiments confirmed that *PeLAC* was obviously upregulated in roots under ABA (100 $\mu\text{mol/L}$ for 24 h) and NaCl (400 mmol/L for 4 h) treatment, but was downregulated after treatment with GA₃ (100 $\mu\text{mol/L}$ for 3 h). The isolation and expression analysis of *PeLAC* presented in this research has laid a foundation for further study on the biological functions of LACs in *Ph. edulis*.

Key words: *Phyllostachys edulis*; LAC; miR397; Expression analysis

漆酶(laccase, LAC)，又名酚酶，是一种含铜的多酚氧化酶，广泛存在于细菌、真菌、高等植物和一些昆虫中。真菌中漆酶可以氧化降解酚型木质素结构单元，被认为是参与自然界木质素循环与利用的重要酶之一^[1]。近年来，有关植物漆酶的研究逐渐成为热点，越来越多的高等植物漆酶基因家族成员被相继报道。如拟南芥(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh) *TT10* 基因不仅编码漆酶多酚氧化酶，而且还参与了黄酮类化合物的氧化聚合反应^[2]；*AtLAC4* 和 *AtLAC17* 直接指导拟南芥次生壁木质化和原生木质部维管的发育^[3]。在二穗短柄草(*Brachypodium distachyon* (L.) Roem. et Schult)中漆酶参与了茎秆的木质化^[4]；北美鹅掌楸(*Liriodendron tulipifera* L.)的漆酶 LMCO 可能参与铁代谢^[5]；在拟南芥中过量表达水稻(*Oryza sativa* L.)漆酶前体 *OsCHI1*，可提高转基因植株的抗旱和耐盐能力^[6]。因此，漆酶在植物中具有多种功能。

研究表明，高等植物漆酶基因的表达除受外界环境的影响外，还受到转录因子和 microRNA (miRNA)的调控。如转录因子 MYB58 和 MYB63 可以激活漆酶参与木质素的生物合成过程，其中 MYB58 可直接激活 *LAC4* 进行木质素合成^[7]。miRNA 通过与靶基因形成复合物实现对靶基因的降解^[8]。miR397 是一类高度保守的 miRNA 基因家族，大多数漆酶基因家族成员的序列中具有 miR397 识别靶序列，如拟南芥中 *AtLAC2*、*AtLAC4* 和 *AtLAC17* 都是 miR397 的靶基因，表明漆酶的表达可能受 miR397 的调控^[9]。过表达 *Ptr-miR397a* 的毛果杨(*Populus trichocarpa* Torr. &

Gray)转基因植株中，17 个 *PtrLAC* 基因表达均下调，且木质素含量减少^[10]，表明 miR397 通过调控漆酶基因的表达参与木质素合成的调控。

纤维素、木质素和半纤维素是木材细胞的主要成分，其中木质素被认为是工业上唯一能从可再生资源中获取的芳香族化合物^[11]。毛竹(*Phyllostachys edulis* (Carr.) Lehaie)是我国重要的经济竹种，用途广泛，研究毛竹漆酶基因对于探讨毛竹木质素的生物合成以及调控机制具有重要价值。随着毛竹基因组草图的发布^[12]，为从分子水平研究毛竹的生长发育调控机制提供了便利条件。本文以毛竹为材料，克隆获得毛竹漆酶基因 *PeLAC*，通过 RLM-5' RACE 技术验证该基因为 miR397 的靶基因；本文还进一步研究了毛竹 *PeLAC* 的组织表达特异性，*PeLAC* 与 miR397 在不同生长高度笋中的表达规律，以及激素和 NaCl 处理对 *PeLAC* 表达的影响，以期为毛竹漆酶基因家族成员的功能研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究以毛竹实生苗(0.5 年生和 3 年生)为材料，以腐殖质土为基质，于实验室中盆栽培养(温度 25°C，光照强度 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ，光暗周期 16 h/8 h)。分别取 3 年生毛竹实生苗的根、茎、叶片和叶鞘，用于基因组织表达特异性分析。

毛竹笋的生长特点是从基部开始，自下而上逐节向上推移。下部节处于生长末期，中部节为盛期，上部节为生长初期^[13]。因此笋的基部最先成熟，木质化程度最高。在实验室盆栽条件下，3 年

生毛竹笋高度约为30 cm, 本研究选取3年生同一生长条件下毛竹所发不同高度笋(2、5、15、30 cm)的基部(长度0.5 cm)为材料, 研究目的基因在笋不同发育时期的表达情况。

取生长势一致的毛竹实生苗(0.5年生), 分别利用20 mL赤霉素(GA₃)(100 μmol/L)、脱落酸(ABA)(100 μmol/L)溶液喷洒叶片。GA₃处理后分别在0、0.25、0.5、1、3 h对植物主根取样; ABA处理后分别在0、1、3、6、12、24 h对植物主根取样^[14]。此外, 将毛竹根部浸入400 mmol/L的NaCl溶液中, 分别在0、2、3、4 h后对主根取样^[15]。所取样品经液氮速冻后, 于-80℃保存、备用。

1.2 DNA提取、RNA分离与cDNA的合成

以毛竹叶片为材料, 采用改良CTAB法提取毛竹基因组DNA^[16], 于-20℃备用。采用改良的Trizol法提取上述不同高度笋及各处理后样品的总RNA^[17], 并合成cDNA。

1.3 基因克隆与分析

以二穗短柄草漆酶基因*BDLAC6*^[4]序列为参考, 根据毛竹基因组数据库(<http://www.bamboogdb.org/>)中的同源序列(PH01001798G0410)及其对应的基因组DNA序列设计引物LAC410-F和LAC410-R(表1)。PCR反应总体系为20 μL, 包括: 5 × Primer STAR™ Buffer 4 μL, dNTP Mixture(2.5 mmol/L) 2 μL, LAC410-F(10 μmol/L) 0.5 μL, LAC410-R(10 μmol/L) 0.5 μL, 毛竹cDNA或基因组DNA模板2 μL, Primer STAR™ HS DNA polymerase 0.2 μL, DMSO 1 μL。反应程序为: 98℃预变性4 min; 98℃变性30 s, 60℃退火30 s, 72℃延伸1 min 50 s(基因组DNA

表1 PCR扩增所用引物
Table 1 List of PCR primer sequences

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')
LAC410-F	ATGGCCGTGCCGCCGCATCT
LAC410-R	TTAGCACTGCGGAAGATCTTGGGTG
OUT410R1	GTTGTCACCTGTAAAGGGAGCATC
IN410R2	GGCCTGGAGTGATGAGCAGGGTATCGGT
410P-F	CTCCTAATTCCCCTGTAGAGAG
410P-R	ACCGGCTGCGGAGCTAGCT
qLAC410-F	ACACCATCACGGTCACCCCTG
qLAC410-R	GTCTGGCCTGGAGTGATGAG
qLAC410-F1	GGGGCCGACCCCTATACGCAAG
qLAC410-R1	GAGCGTACACGTTGGCCGATAAT

扩增时延伸2 min 30 s), 共35个循环; 72℃延伸10 min, 4℃保存。PCR产物回收后进行加A反应, 反应体系为: 10 × LA PCR Buffer 1.0 μL、dATP(2.5 mmol/L) 1.0 μL、回收产物7.8 μL、LA Taq酶0.2 μL。反应程序为: 70℃, 30 min。用加A产物连接pGEM-T easy载体, 转化大肠杆菌DH5α, 选取阳性克隆测序。

根据PH01001033G0410上游2000 bp启动子区域的序列设计引物410P-F和410P-R(表1), 以毛竹基因组DNA为模板, 采用Primer STAR™ HS DNA polymerase进行扩增。PCR程序为: 98℃变性5 min; 98℃变性30 s, 64℃退火30 s, 72℃延伸2 min, 共35个循环; 72℃延伸10 min, 4℃保存。扩增产物经转化后送测序。

采用DNAMAN软件对测序结果进行初步分析。采用BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)程序进行序列同源性比较。蛋白结构域预测采用TMHMM 2.0(http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan)完成。利用在线软件(<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>)预测毛竹miR397的靶位点。采用DNAMAN软件对蛋白质进行特性分析和氨基酸多序列比较。采用MEGA 6.0软件构建基于漆酶蛋白序列的系统进化树。

1.4 RLM-5' RACE实验

应用RLM-5' RACE技术对miR397漆酶靶基因进行切割验证。根据预测的miR397靶基因序列, 在切割位点下游设计RLM-5' RACE特异性引物OUT410R1和IN410R2(表1)。按照RLM-RACE试剂盒(TaKaRa)操作步骤, 获得cDNA。

Outer PCR反应体系为: 2 × GC Buffer I 10 μL、1 × cDNA Dilution Buffer 8 μL、毛竹cDNA模板2 μL、特异性引物OUT410R1(10 μmol/L) 2 μL、5' RACE Outer Primer(10 μmol/L) 2 μL、LA Taq(5 U/μL) 0.25 μL、dH₂O 25.75 μL。反应程序为: 94℃预变性3 min; 94℃变性30 s, 60℃退火30 s, 72℃延伸30 s, 共30个循环。Inner PCR以第一轮PCR产物为模板进行, 反应体系为: 2 × GC Buffer I 10 μL、dNTP Mixture(2.5 mmol/L) 1.6 μL、Outer PCR反应液1 μL、特异性引物IN410R2(10 μmol/L) 1 μL、5' RACE Inner引物(10 μmol/L) 1 μL、LA Taq(5 U/μL) 0.2 μL、dH₂O 5.2 μL, 反

应程序为: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 60℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 共 30 个循环。

1.5 基因表达分析

利用引物 LAC410-F 和 LAC410-R(表 1)对毛竹不同组织中 *PeLAC* 基因的表达进行半定量 RT-PCR 分析, 以毛竹 *Actin* 基因为内参^[18]。利用引物 qLAC410-F 和 qLAC410-R(表 1)以及毛竹 miR397 定量引物^[19]分别对 *PeLAC* 和 miR397 在不同生长高度笋中的表达进行定量分析, 此外还利用引物 qLAC410-F1 和 qLAC410-R1 定量分析 GA₃、ABA 和 NaCl 处理后 *PeLAC* 表达量的变化。miR397 和 *PeLAC* 的定量分析所用内参基因分别为 *U6*^[20] 和 *NTB*^[21]。PCR 反应在 qTOWER2.2 (Jena, Germany) 仪器上进行, 反应总体积 10.0 μL, 包括: 5.0 μL LightCycler® 480 SYBR Green I Master Mix (Roche, USA), 0.8 μL cDNA, 正、反向引物各 0.2 μL, 3.8 μL ddH₂O。反应程序为: 95℃预变性 5 min; 95℃变性 30 s, 60℃退火 10 s, 共 40 个循环; 反应重复 3 次。实验结果采用 2^{-ΔΔCt} 法^[22]进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 *PeLAC* 的克隆与序列分析

采用引物 LAC410-F、LAC410-R 对毛竹基因组 DNA 和 cDNA 进行扩增, 测序结果显示扩增序列长度分别为 2785 bp 和 1692 bp。且获得序列与毛竹基因组数据库中对应的 PH01001798G0410 基

因组序列和预测的编码区序列完全一致。序列结构分析表明, 该基因包括 5 个内含子和 6 个外显子, 内含子均为 GT-AG 型(图 1)。同时发现其 cDNA 的第 679 ~ 698 位点 (5'-ATCAACGCTGCCACT-CAACGA-3') 与 miR397 (3'-UAGUUGCGA-CGUGAGUUGC-5') 为互补靶点, 由此初步判断该基因为 miR397 的靶基因。

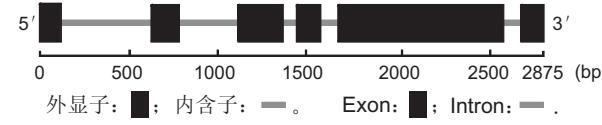
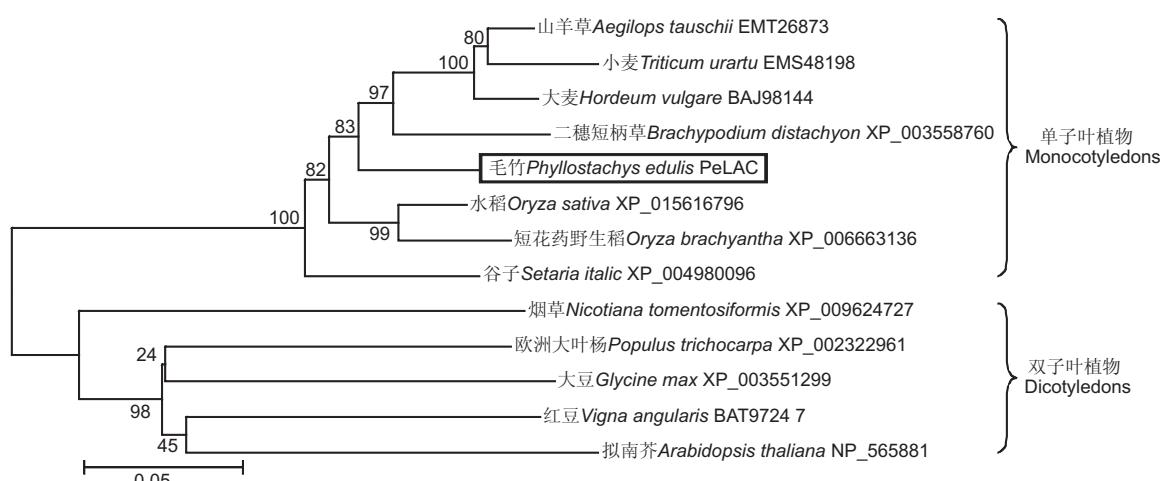


图 1 *PeLAC* 基因结构示意图
Fig. 1 Structural diagram of *PeLAC*

该基因的蛋白编码 563 个氨基酸, 理论等电点为 9.056, 推测的分子量为 62.3 kD。蛋白结构域分析结果显示, 该蛋白具有 3 个保守的铜离子结构域 T1(第 36 ~ 152 位)、T2(第 162 ~ 314 位)和 T3(第 413 ~ 547 位), 还包含漆酶活性中心必须的 10 个组氨酸残基及 1 个半胱氨酸残基, 与漆酶的结构特征相符合, 因此将该基因命名为 *PeLAC*。

在 NCBI 中对 *PeLAC* 基因序列进行 BlastP 在线比对分析, 结果显示该基因编码的氨基酸序列与其它植物的漆酶序列具有较高的一致性, 其中与水稻的一致性最高为 92%; 其次与二穗短柄草的一致性为 91%; 与拟南芥 LAC4 的一致性为 63%。用邻接法 (Neighbor-joining) 构建的系统进化树显示, 单子叶和双子叶植物的 LAC4 家族成员被分为 2 大支(图 2)。



每个分枝上的数字表示 1000 次重复搜索的自展值。

Numbers on major branches indicate bootstrap estimates for 1000 replicates.

图 2 基于 LAC 蛋白序列构建的系统进化树
Fig. 2 Phylogenetic tree based on sequences of LAC

2.2 *PeLAC* 启动子序列的克隆与分析

采用特异引物(410P-F 和 410P-R)扩增 *PeLAC* 上游启动子区域, 扩增产物序列长度为 2000 bp, 将其命名为 *PeLACp*。序列启动子元件分析显示, 该序列除含有 TATA-box、CAAT-box 等基本作用元件外, 还含有多个与逆境胁迫相关的响应元件, 如温度 LTR、HSE, 干旱 MBS, 赤霉素 ABRE, 光 3-AF1 binding site、ATCT-motif 和 Box 4 等响应元件(表 2)。表明 *PeLAC* 基因可能对毛竹响应干旱、光、赤霉素、温度等逆境胁迫起到一定作用。

表 2 *PeLAC* 启动子区域调控元件分析
Table 2 Regulatory element analysis in promoter region of *PeLAC*

响应元件 Responsive element	外部因子 External factor
3-AF1 binding site、ATCT-motif、 Box 4、CATT-motif	光 Light
LTR、HSE	温度 Temperature
ABRE	赤霉素 Gibberellin
MBS	干旱 Drought

2.3 miR397 准确切割靶基因 *PeLAC*

RLM-5' RACE 技术是验证 microRNA 作用其靶基因的有效方法之一。通过对 RLM-5' RACE 的 PCR 产物进行测序, 10 个样品获得了一致序列, 长度为 148 bp, 包含特异性 Inner 引物 IN410R2 (22 bp)、5' RACE Inner 引物(TCGACTGATCATCAGTAGGCTGTGGATCCGCGTG) 34 bp 和基因序列 92 bp (CGCTGAATGATGACCTATTCTTCAAGATTGCCAGGCATGAACTAACGTGGTTGAGGTTGATGCAATCTATACCAAGCCATATAAG, 其中加粗序列为切割后靶点序列)。序列分析发现 miR397 的剪切位点均位于靶点序列的第 10 ~ 11 位碱基之间(图 3)。



箭头表示切割位置, 数字表示 5' RACE 克隆测序切割位点及测序位点正确数量。

Vertical arrows indicate the 5' termini of miRNA-guided cleavage products, numbers represent the frequency of the sequenced clones.

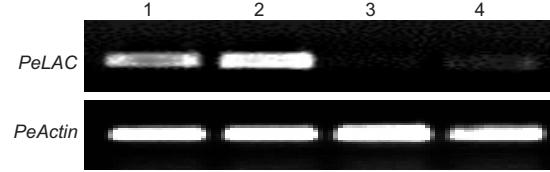
图 3 miR397 对靶基因 *PeLAC* 的切割位点验证

Fig. 3 Cleavage site verification of *PeLAC*

targeted by miR397

2.4 *PeLAC* 组织表达特异性分析

以毛竹根、茎、叶片和叶鞘的 cDNA 为模板, 进行半定量 RT-PCR 检测其在不同组织中的表达模式。结果显示, *PeLAC* 在茎中的表达丰度最高, 其次是根, 叶鞘较低, 而在叶片中几乎未检测到表达(图 4), 推测 *PeLAC* 在毛竹茎秆的生长发育中可能发挥重要作用。



1: 根; 2: 茎; 3: 叶片; 4: 叶鞘。

1: Root; 2: Stem; 3: Leaf blade; 4: Leaf sheath.

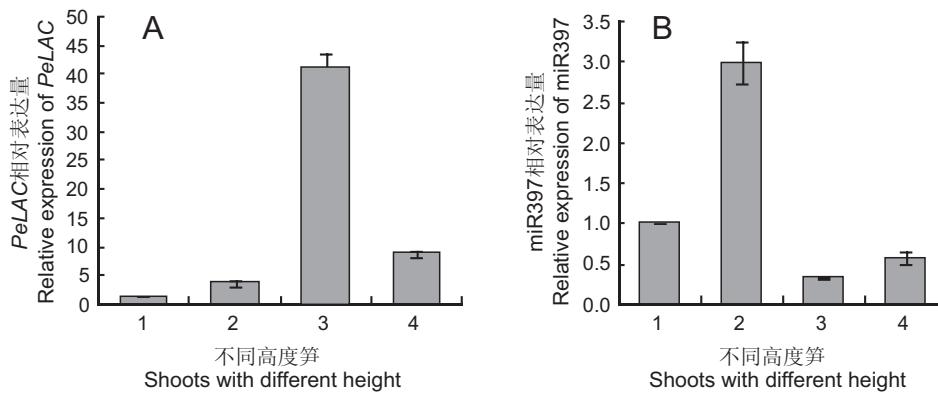
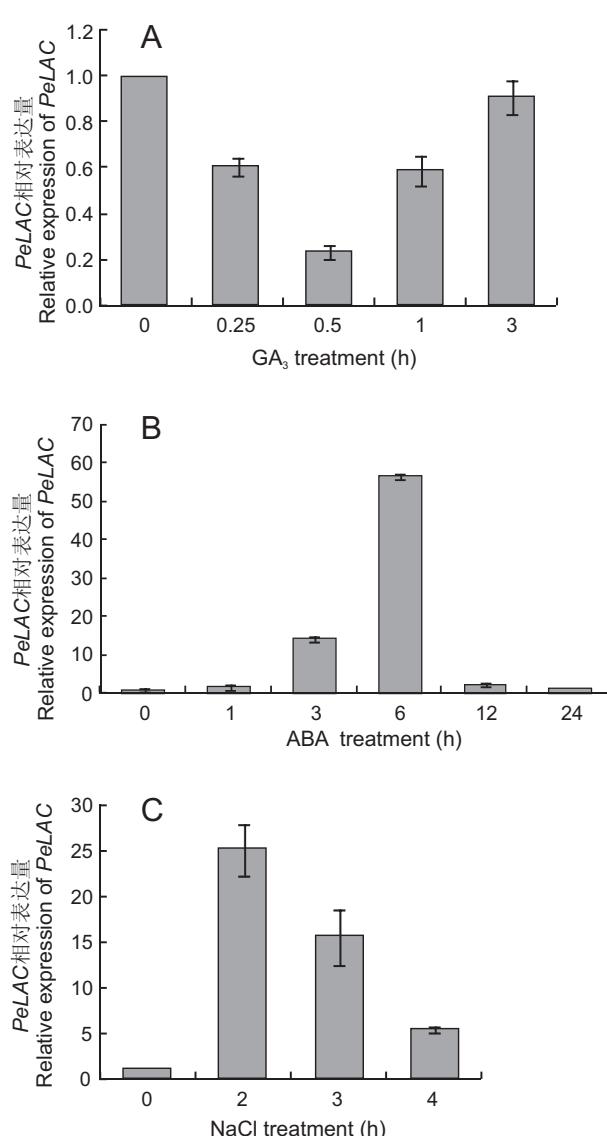
图 4 *PeLAC* 在毛竹组织中的表达特异性分析

Fig. 4 Tissue specific expression of *PeLAC* in different tissues of *Ph. edulis*

本研究进一步对 *PeLAC* 基因在不同生长高度笋中的表达情况进行了检测。结果表明, 随着笋高度的增加, *PeLAC* 表达量呈先上升后下降的趋势。笋生长至 15 cm 时相对表达量达到最大值, 而在 30 cm 高的笋中又开始下降(图 5: A)。同时检测 miR397 的表达情况, 发现其在 5、15、30 cm 高的笋中表达量恰与 *PeLAC* 相反, 即随着高度的增加, miR397 表达量逐渐下降, 至 15 cm 高时达到最低值, 至 30 cm 时又有所上升(图 5: B)。miR397 表达量降低, 其靶基因 *PeLAC* 的表达量上升, 这与 Xiao 等^[11]的研究结果一致, 也进一步说明 miR397 可对其靶基因 *PeLAC* 表达进行调控, 同时也表明 *PeLAC* 在毛竹笋木质化的过程中可能发挥十分重要的作用。

2.5 不同处理对 *PeLAC* 表达的影响

GA₃ 是促进植物生长的激素, 而 ABA 则是对植物生长起负调控作用的因子。经 GA₃ 处理后, 毛竹根中 *PeLAC* 的相对表达量在处理 0.25 h 时下降至对照(0 h)的 42%, 随后表达量逐渐恢复, 至 3 h 处理时该基因的表达量与对照接近(图 6: A), 表明毛竹根中 *PeLAC* 的表达量在短时间内总体受到外源 GA₃ 的抑制。经 ABA 处理后, 根中 *PeLAC* 的表达量逐渐上升, 至处理 6 h 时上升到最大值, 约为对照的 63 倍, 随后迅速下降, 至 24 h 时基本恢复至对照的表达水平(图 6: B)。经 NaCl 处理后, 根中 *PeLAC* 的表达逐渐上升, 至处理 2 h 时

图 5 毛竹 *PeLAC*、*miR397* 在不同高度笋中的表达分析Fig. 5 Expression analyses of *PeLAC* and *miR397* in *Ph. edulis* shoots of different height图 6 *GA*₃、*ABA*、*NaCl* 处理对 *PeLAC* 表达的影响Fig. 6 Effect of *GA*₃, *ABA*, and *NaCl* treatmentson the expression of *PeLAC*

上升到最大值，约为对照的 25 倍，随后逐渐下降，但总体明显高于对照的表达水平(图 6: C)。以上研究表明，*GA*₃、*ABA* 和 *NaCl* 处理均可影响毛竹根中 *PeLAC* 的表达，实验结果验证了该基因可参与毛竹对环境外源激素和盐分胁迫的响应，同时也与其启动子序列中包含多个胁迫应答元件相互映证。

3 讨论

基因的分子特征是决定生物学功能的内在因素，*PeLAC* 基因编码的漆酶蛋白具有 3 个保守的铜离子结构域，与其它植物中漆酶的保守结构域相类似^[23]，表明 *PeLAC* 可能与其它植物中的漆酶具有相似的功能。组织表达特异性分析表明，*PeLAC* 为组成型表达模式，且在茎中表达最多，说明该基因可能在木质化较高的组织中发挥重要作用。植物木质化是木质素在植物细胞壁中积累的结果，漆酶在木质部或正在木质化的细胞壁中表达较高，参与木质素的生物合成^[24]。笋是毛竹快速生长的茎杆，其生长过程包含了细胞分裂、分化、伸长和木质化。*PeLAC* 在 3 年生盆栽毛竹高 2 cm 和 5 cm 的笋中表达量相对较少，而生长至 15 cm 时迅速上升，30 cm 时表达量有所下降，原因可能与 30 cm 高时笋开始分枝、其木质化过程基本完成有关，但其表达量仍然是 2 cm 高时的 8.6 倍，这一结果与笋快速生长过程中木质素的大量合成相一致^[25]。由此表明 *PeLAC* 在木质素合成过程中具有重要功能。

研究发现 *LAC* 基因受 microRNA 介导的转录

后调控^[26]，在番茄(*Solanum lycopersicum* L.)中过表达miR397后，其靶基因几乎检测不到该基因的表达^[27]。本研究通过RLM-5' RACE成功验证了miR397能够在转录水平对其靶基因*PeLAC*进行精确切割，这与柑橘(*Citrus reticulata* Blanco.)中miR397对靶基因*LAC4*和*LAC17*的准确切割位点相一致^[28]。miR397在毛竹笋生长至5、15、30 cm时的相对表达量变化与*PeLAC*基因相反，进一步证实了miR397可调控*PeLAC*的表达。此外，漆酶基因的表达还受到激素、环境因子的影响。本研究中，ABA处理时*PeLAC*表达量变化比较明显，这一结果与拟南芥*LAC4*受ABA胁迫时的表达模式相似^[14]，表明*PeLAC*对外源ABA较为敏感，可能在响应ABA过程中发挥一定作用；而在NaCl胁迫条件下，*PeLAC*的表达与水稻*OsChl1*^[6]、玉米(*Zea mays* L.)*ZmLAC1*^[15]、番茄漆酶基因^[29]等在高盐条件下转录水平提高的实验结果相似，这可能是NaCl胁迫导致了木质部和韧皮部次生壁提前木质化，降低了细胞壁的延展性^[30]，增强抗逆性的同时抑制了植物生长的原因。

漆酶是植物中比较复杂的基因家族，漆酶可通过调控木质素的合成间接提高植物对外界环境中生物及非生物胁迫的抗性，然而有关漆酶基因对激素及非生物胁迫响应过程中的功能和作用的研究开展较少。现已从毛竹基因组数据库中搜索得到23个漆酶家族成员，它们在毛竹中的功能有待进一步揭示。目前从分子水平对漆酶开展研究已逐渐成为热点，并已进入基因工程阶段，如过表达棉花(*Gossypium arboreum* L.)*GaLAC1*的新疆杨(*Populus alba* L. var. *pyramidalis* Bunge)转基因植株中总木质素含量增加^[31]、敲除美洲黑杨(*Populus deltoids* Marsh)的漆酶基因可导致细胞壁的化学改变及糖释放量的增加^[32]。本研究可为今后深入探讨毛竹*PeLAC*的功能以及利用*PeLAC*开展竹子基因工程育种奠定基础。

参考文献：

- [1] Kudanga T, Nyanhongo GS, Guebitz GM, Burton S. Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: a review[J]. *Enzyme Microb Technol*, 2011, 48(3): 195–208.
- [2] Pourcel L, Routaboul JM, Kerhoas L, Caboche M, Lepiniec L, Debeaujon I. TRANSPARENT TESTA10 encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in *Arabidopsis* seed coat[J]. *Plant Cell*, 2005, 17(11): 2966–2980.
- [3] Schuetz M, Benske A, Smith RA, Watanabe Y, Tobimatsu Y, Ralph J, Demura T, Ellis B, Samuels AL. Laccases direct lignification in the discrete secondary cell wall domains of protoxylem[J]. *Plant Physiol*, 2014, 166(2): 798–807.
- [4] Wang Y, Bouchabke-Coussa O, Lebris P, Antelme S, Soulhat C, Gineau E, Dalmais M, Bendahmane A, Morin H, Mouille G, Legée F, Cézard L, Lapierre C, Sibout R. LACCASE 5 is required for lignification of the *Brachypodium distachyon* culm[J]. *Plant Physiol*, 2015, 168(1): 192–204.
- [5] Hoopes JT, Dean JF. Ferroxidase activity in a laccase-like multicopper oxidase from *Liriodendron tulipifera*[J]. *Plant Physiol Biochem*, 2004, 42(1): 27–33.
- [6] Cho HY, Lee C, Hwang SG, Park YC, Lim HL, Jang CS. Overexpression of the *OsChl1* gene, encoding a putative laccase precursor, increases tolerance to drought and salinity stress in transgenic *Arabidopsis*[J]. *Gene*, 2014, 552(1): 98–105.
- [7] Zhou J, Lee C, Zhong R, Ye ZH. MYB58 and MYB63 are transcriptional activators of the lignin biosynthetic pathway during secondary cell wall formation in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2009, 21(1): 248–266.
- [8] 方良, 梁远学, 李东栋, 曹献英, 郑育生. 油棕(*Elaeis guineensis*)中果皮发育miRNA的表达动态分析[J]. 植物科学学报, 2013, 31(3): 304–312.
Fang L, Liang YX, Li DD, Cao XY, Zheng YS. Dynamic expression analysis of miRNAs during the development process of oil palm mesocarp[J]. *Plant Science Journal*, 2013, 31(3): 304–312.
- [9] Abdel-Ghany SE, Pilon M. MicroRNA-mediated systemic down-regulation of copper protein expression in response to low copper availability in *Arabidopsis*[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(23): 15932–15945.
- [10] Lu S, Li Q, Wei H, Chang MJ, Tunlaya-Anukit S, Kim H, Liu J, Song J, Sun YH, Yuan L, Yeh TF, Peszlen I, Ralph J, Sederoff RR, Chiang VL. Ptr-miR397a is a negative regulator of laccase genes affecting lignin content in *Populus trichocarpa*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(26): 10848–10853.
- [11] Xiao ZG, Li YH, Wu XR, Qi GY, Li NB, Zhang K, Wang DH, Sun XZSS. Utilization of sorghum lignin to improve adhesion strength of soy protein adhesives on wood veneer [J]. *Ind Crop Prod*, 2013, 50: 501–509.
- [12] Peng Z, Lu Y, Li L et al. The draft genome of the fast growing non-timber forest species moso bamboo (*Phyllostachys heterocycla*) [J]. *Nat Genet*, 2013, 45 (4):

- 456–461.
- [13] 马乃训, 赖广辉, 张培新, 张宏亮. 中国刚竹属 [M]. 浙江: 浙江科学技术出版社, 2014.
- Ma NX, Lai GH, Zhang PX, Zhang HL. The Genus *Phyllostachys* in China [M]. Zhejiang: Zhejiang Science and Technology Press, 2014.
- [14] 张盛春, 鞠长亮, 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 SC, Ju CL, Wang XJ. *Arabidopsis* laccase gene *AtLAC4* regulates plant growth and responses to abiotic stress [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2012, 47(4): 357–365.
- [15] Liang M, Haroldsen V, Cai X, Wu Y. Expression of a putative laccase gene, *ZmLAC1*, in maize primary roots under stress [J]. *Plant Cell Environ*, 2012, 29(5): 746–753.
- [16] 高志民, 范少辉, 高健, 李雪平, 蔡春菊, 彭镇华. 基于 CTAB 法提取毛竹基因组 DNA 的探讨 [J]. 林业科学研究, 2006, 19(6): 725–728.
- Gao ZM, Fan SH, Gao J, Li XP, Cai CJ, Peng ZH. Extract genomic DNA from *Phyllostachys edulis* by CTAB-based method [J]. *Forest Research*, 2006, 19(6): 725–728.
- [17] Gao ZM, Li XP, Li LB, Peng ZH. An effective method for total RNA isolation from bamboo [J]. *Chinese Forestry Science and Technology*, 2006, 5(3): 52–54.
- [18] Gao ZM, Wang XC, Peng ZH, Zheng B, Liu Q. Characterization and primary functional analysis of phenylalanine ammonia-lyase gene from *Phyllostachys edulis* [J]. *Plant Cell Rep*, 2012, 31(7): 1345–1356.
- [19] 王丽丽, 赵韩生, 孙化雨, 董丽莉, 娄永峰. 毛竹 miR397 和 miR1432 的克隆及其逆境胁迫响应表达分析 [J]. 林业科学, 2015, 51(6): 63–70.
- Wang LL, Zhao HS, Sun HY, Dong LL, Lou YF. Cloning and expression analysis of miR397 and miR1432 in *Phyllostachys edulis* under stresses [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2015, 51(6): 63–70.
- [20] Ding Y, Chen Z, Zhu C. Microarray-based analysis of cadmium-responsive microRNAs in rice (*Oryza sativa*) [J]. *J Exp Bot*, 2011, 62(10): 3563–3573.
- [21] Fan C, Ma J, Guo Q, Wang H, Lu M. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bamboo (*Phyllostachys edulis*) [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56573.
- [22] Livak KJ, Schmittgen TD. 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.
- [23] Turlapati PV, Kim KW, Davin LB, Lewis NG. The laccase multigene family in *Arabidopsis thaliana*: towards addressing the mystery of their gene function(s) [J]. *Planta*, 2011, 233(3): 439–470.
- [24] O'allMey DM, Whetten R, Bao W, Sederoff R. The role of laccase in lignification [J]. *Plant J*, 1993, 4(5): 751–757.
- [25] 陈勰, 阚建全. 麻竹笋生长期木质素合成生理研究 [J]. 西南师范大学学报, 2009, 34(4): 128–132.
- Chen X, Kan JQ. Studied of synthesis of lignin with the growth of bamboo shoots [J]. *Journal of Southwest China Normal University*, 2009, 34(4): 128–132.
- [26] Jones-Rhoades MW, Bartel DP. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA [J]. *Mol Cell*, 2004, 14(6): 787–799.
- [27] 赵先炎, 庞明利, 由春香. 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 XY, Pang ML, You CX. Cloning and expression analysis of tomato *LeLAC^{miR397}* gene [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2015, 42(7): 1285–1298.
- [28] Huang JH, Qi YP, Wen SX, Guo P, Chen XM, Chen LS. Illumina microRNA profiles reveal the involvement of miR397a in *Citrus* adaptation to long-term boron toxicity via modulating secondary cell-wall biosynthesis [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 22900.
- [29] Wei JZ, Tirajoh A, Effendy J, Plant AL. Characterization of salt-induced changes in gene expression in tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots and the role played by abscisic acid [J]. *Plant Sci*, 2000, 159(1): 135–148.
- [30] Cachorro P, Ortiz A, Barcelo AR, Cerda A. Lignin deposition in vascular tissues of *Phaseolus vulgaris* roots in response to salt stress and Ca^{2+} ions [J]. *Phyton-Annales Rei Botanicae*, 1993, 33(1): 33–40.
- [31] 王骥, 朱木兰, 卫志明. 棉花漆酶基因在新疆杨中的表达及其对木质素合成的影响 [J]. 分子细胞生物学报, 2008, 41(1): 11–18.
- Wang J, Zhu ML, Wei ZM. Cotton laccase gene overexpression in transgenic *Populus alba* var. *pyramidalis* and its effects on the lignin biosynthesis in transgenic plants [J]. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2008, 41(1): 11–18.
- [32] Bryan AC, Jawdy S, Gunter L, et al. Knockdown of a laccase in *Populus deltoides* confers altered cell wall chemistry and increased sugar release [J]. *Plant Biotechnol J*, 2016, 1–11.