生 物 工 程 学 报
Chinese Journal of Biotechnology
CSTR: 32114.14.j.cjb.240141
DOI: 10.13345/j.cjb.240141

Feb. 25, 2025, 41(2): 845-856
http://journals.im.ac.cn/cjbcn
©2025 Chin J Biotech, All rights reserved

·农业生物技术·

月季漆酶基因 *RcLAC15* 克隆与表达分析

李琪，彭义方，董琪婧，杨芊，刘笑雨，韩瑜*

北京林业大学 园林学院 国家花卉工程技术研究中心，北京 100083

李琪，彭义方，董琪婧，杨芊，刘笑雨，韩瑜. 月季漆酶基因 *RcLAC15* 克隆与表达分析[J]. 生物工程学报，2025，41(2): 845-856.
LI Qi, PENG Yifang, DONG Qijing, YANG Qian, LIU Xiaoyu, HAN Yu. Cloning and expression analysis of the laccase gene *RcLAC15* from *Rosa chinensis*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(2): 845-856.

摘　要：漆酶(laccase, LAC)属于铜蓝蛋白氧化酶家族，与植物木质素合成及响应生物与非生物胁迫等生物学功能密切相关，但目前关于月季漆酶基因的研究尚未见报道。皮刺对月季的管理和采摘造成极大的不便，已成为月季育种关注的重点。为了探究漆酶基因在月季中的表达模式，本研究以古老月季品种‘月月粉’(*Rosa chinensis* ‘Old Blush’)为材料，克隆了 1 个漆酶基因并将其命名为 *RcLAC15*。基因表达分析结果表明，*RcLAC15* 在月季皮刺中的表达量显著高于在根、茎、叶等器官中的表达量。在月季基因组中鉴定了 58 个漆酶基因，生物信息学分析发现 *RcLAC15* 是 *AtLAC15* 的同源基因，预测 RcLAC15 为稳定的亲水蛋白，不具备跨膜结构。将重组表达载体 pBI121-proRcLAC15::*GUS* 转化拟南芥，GUS 染色结果表明 *RcLAC15* 启动子在拟南芥叶片边缘特异性驱动了 *GUS* 基因表达。本研究发现 *RcLAC15* 在月季皮刺特异性表达，为探索漆酶基因在月季皮刺中的生物学功能提供了参考。
关键词：月季；*RcLAC15*；皮刺特异性表达；GUS 染色

Cloning and expression analysis of the laccase gene *RcLAC15* from *Rosa chinensis*

LI Qi, PENG Yifang, DONG Qijing, YANG Qian, LIU Xiaoyu, HAN Yu*

National Engineering Research Center for Floriculture, School of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract: Laccases (LACs), belonging to the multicopper oxidase family, are closely associated with various biological functions including lignin synthesis and responses to biotic and abiotic stresses in plants. However, few studies have reported the laccase genes in China rose (*Rosa*

资助项目：中央高校基本科研业务费专项资金(2021ZY43)
This work was supported by the Fundamental Research Fund for the Central Universities, China (2021ZY43).
*Corresponding author. E-mail: hanyubjfu@bjfu.edu.cn
Received: 2024-02-26; Accepted: 2024-05-06; Published online: 2024-05-08

chinensis). Prickles cause difficulties to the management and harvest of *R. chinensis* and have become a trait concerned in the breeding. To investigate the expression patterns of laccase genes in roses, we cloned a laccase gene from an ancient variety *R. chinensis* 'Old Blush' and named it *RcLAC15*. The expression level of *RcLAC15* in prickles was significantly higher than those in roots, stems, and leaves. Fifty-eight laccase genes were identified in the genome of *R. chinensis*, and bioinformatics analysis revealed that *RcLAC15* was a homolog of *AtLAC15*, predicting that RcLAC15 was a stable hydrophilic protein without transmembrane structures. The recombinant expression vector pBI121-proRcLAC15::*GUS* was introduced into *Arabidopsis*, and GUS staining results showed that the *RcLAC15* promoter specifically drove *GUS* gene expression at the edges of *Arabidopsis* leaves. In summary, *RcLAC15* is a gene specifically expressed in the prickles of *R. chinensis*. This discovery provides a reference for exploring the biological functions of laccase genes in the prickles of *R. chinensis*.

Keywords: *Rosa chinensis*; *RcLAC15*; prickle-specific expression; GUS staining

月季(*Rosa chinensis* Jacq.)是四大切花之首，具有独特的观赏特性和重要的经济价值[1]。漆酶(laccase, LAC)属于铜蓝蛋白氧化酶家族，与植物木质素的合成、伤口的愈合及响应生物与非生物胁迫等密切相关[2]。研究表明毛果杨及杜仲等植物中的 *LAC* 基因参与木质素合成的调控机制[3-4]。在损伤修复方面，*LAC* 基因表达受到机械损伤的诱导，其表达有助于伤口愈合并防止感染[5-6]。为了研究 *LAC* 基因的表达模式，研究人员对植物 *LAC* 基因启动子及其顺式作用元件展开了分析，研究主要集中在拟南芥和烟草等模式植物中[7-8]，目前尚未见针对月季中漆酶基因的相关报道。

在生长发育期和不同的逆境胁迫下，植物进化出严格的基因表达调控网络，其中转录水平上的调控是基因表达的起始和关键的一步，包括基因转录的激活、抑制、延长等[9]。启动子为调控基因转录的重要元件，是构建表达载体的重要组成部分，可分为组成型启动子、组织特异性启动子与诱导型启动子[4,10]。研究人员在研究过程中逐步采用组织特异性启动子和诱导型启动子替代组成型启动子，从而实现基因在特定诱导条件下或特定组织中的特异性表达[11]。启动子调控机制十分复杂，例如水通道蛋白基因 *Rh-PIP2;1* 启动子的活性在未开放的花瓣中较低，在完全开放的花瓣中达到峰值；转基因拟南芥植株中，*Rh-PIP2;1* 启动子驱动的 *GUS* 基因的表达表现出时空性[12]。

月季的皮刺为植物表皮或皮层形成的尖锐突起，通过自然进化而来，是月季育种的主要关注性状。研究人员曾通过基因工程手段研究皮刺的功能及分子机制，发现植物皮刺能够起到储水和防御生物及非生物胁迫等作用[13]。不同月季品种中皮刺的形状、大小、密度和颜色都不尽相同，目前对于月季皮刺的研究较少，寻找月季皮刺特异性表达基因，可以为月季皮刺功能研究以及以皮刺为目标性状的育种工作提供参考。

本研究从月季中分离获得 1 个漆酶基因，命名为 *RcLAC15*，并对该基因的时空表达模式进行实验验证，发现该基因在月季皮刺中特异表达，克隆其启动子序列，采用异源稳定表达方法来证明该启动子在拟南芥叶片边缘特异性表达，以期为探索漆酶基因在月季和其他有刺植物中参与皮刺抵抗生物及非生物胁迫、损伤修复等功能提供参考。

1 材料与方法

1.1 植物材料与质粒载体

本实验所用的植物材料中国古老月季品种‘月月粉’(*R. chinensis* ‘Old Blush’)种植于北京林业大学北林科技胖龙温室，拟南芥(*Arabidopsis thaliana* ‘Columbia’)在人工气候箱中培养，温度(25±2) ℃，相对湿度 50%−60%，光周期 16 L/8 D。载体 pBI121 为本课题组保存。

1.2 月季总 RNA 提取和基因克隆

为克隆目的基因，以带花苞的‘月月粉’整株幼苗为材料，利用 SV Total RNA 提取试剂盒(Promega 公司)，采用 TRIzol 法提取月季总 RNA。cDNA 合成体系见表 1，具体操作方法如下：将 RNA 与 Oligo(dT)$_{15}$混匀后，70 ℃加热 5 min，随后迅速置于冰上降温 2 min，接着依次加入反应组分，充分混匀后于 42 ℃反应 50 min，最后 95 ℃ 5 min 终止反应，置于冰上冷却。

基于课题组前期研究，根据月季基因组数据库(https://lipm-browsers.toulouse.inra.fr/pub/RchiOBHm-V2/)中的信息，通过 DNAMAN (version 9)软件设计全长序列引物，引物序列见表 2。使用 KOD-Plus 高保真酶(TOYOBO 公司)进行扩增，参考 KOD-Plus 说明书配制 PCR 反应体系(50 μL)。PCR 的反应程序为：94 ℃ 5 min；94 ℃ 30 s，56 ℃ 30 s，72 ℃ 2 min，32 个循环；72 ℃延伸 5 min。PCR 产物通过 1%琼脂糖凝胶电泳进行检测并使用普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]进行回收纯化，将回收产物送至北京诺赛基因组研究中心有限公司测序。

表 1 ‘月月粉’ cDNA 合成体系

Table 1 cDNA synthesis system of ‘Old Blush’

Component	Content
RNA	1 μg
Oligo(dT)$_{15}$	100 pmol
RNase inhibitor	25 units
M-MLV buffer	5 μL
M-MLV reverse transcriptase	200 units
dNTP	40 mmol
RNase free ddH_2O	Up to 25 μL

1.3 基因表达分析

分别以月季的根、茎(皮刺之间的茎段，不包含皮刺)、叶、皮刺、雄蕊、雌蕊和 4 个不同时期的花瓣为材料提取 RNA 并合成 cDNA，使用 CFX Connect Real-Time System，参考 TB Green® Premix *Ex Taq*™ II (TaKaRa公司)试剂盒说明书进行基因表达分析。每个样品设置 3 次生物学重复，以 *RcActin* 为内参基因[14]，引物序列见表 2。反应程序为：95 ℃预变性 30 s；95 ℃变性 5 s，60 ℃退火 30 s，40 个循环；95 ℃ 5 s；熔解曲线温度为 65−95 ℃，以 0.5 ℃/s 的速度升温。基因的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算[15]，并参照内源 *RcActin* 的表达量进行归一化处理。

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5′→3′)	Product size (bp)
RcLAC15-CDS-F	ATGTGGTCTGCTAAGAAGTGGAAATCAG	1 803
RcLAC15-CDS-R	TCAACACGGCGGCATGTCTAG	
RcLAC15-promoter-F	AAGCTTTGTGCATCATAAATTACAGTC	1 200
RcLAC15-promoter-R	GGATCCCTTCCTTAATTTGAATTGAAT	
RT-qPCR-*RcLAC15*-F	TCCGAGTAATCAACGCTGC	141
RT-qPCR-*RcLAC15*-R	CAACGGTTTGTCCAGGAGAT	
RT-qPCR-*RcActin*-F	CAATGCTCCCGCTATGTATG	158
RT-qPCR-*RcActin*-R	AGGTCAAGTCGCAGAATGG	

1.4 月季漆酶基因家族生物信息学分析

根据已报道的漆酶蛋白的 3 个保守结构域：Cu-oxidase (PF00394)、Cu-oxidase_2 (PF07731) 和 Cu-oxidase_3 (PF07732)[8]，利用 InterPro (https://www.ebi.ac.uk/interpro/)数据库、NCBI 的 CDD (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi) 功能和 SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/)数据库进行查找和筛选，最终确定月季 LAC 基因家族成员。从拟南芥基因组数据库(https://www.arabidopsis.org/)获得 17 个 LAC 基因家族的蛋白序列[16]。利用 MEGA 11 软件(https://megasoftware.net)，采用邻接法(neighbor-joining method)构建进化树，所有参数选用默认值。使用 MEME (http://meme-suite.org/tools/meme）网站分析月季漆酶基因家族编码蛋白的基序(motif)；使用 iTOL v5 (https://itol.embl.de)在线工具对结果进行加工处理。

1.5 蛋白的理化性质和结构域预测

使用 ProtParam 网站(https://web.expasy.org/protparam/)分析蛋白质的理化性质；利用 TMHMM 2.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/)在线软件预测蛋白质的跨膜结构域；使用 Clustal X 2.1 软件进行蛋白序列多重比对，并利用 GeneDoc 软件处理结果。

1.6 启动子克隆及序列分析

采用常规 CTAB 法，参考植物 DNA 提取试剂盒(Omega Bio-Tek 公司)说明书提取月季 DNA。以月季基因组 DNA 为模板，参考 KOD-Plus 高保真酶说明书配制 PCR 反应体系(50 μL)，以基因起始密码子上游 1 200 bp 序列为模板设计引物进行扩增，克隆引物见表 2。对 PCR 产物进行回收，将回收产物连接到 pEASY®-Blunt (北京全式金生物技术有限公司)克隆载体，转化 Trans1-T1 大肠杆菌感受态并提取质粒，最后将阳性重组质粒送至北京诺赛基因组研究中心有限公司测序，获得启动子片段。使用在线网站 PlantCare (https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/)对启动子序列进行顺式作用元件分析。

1.7 载体构建

在 proRcLAC15 克隆引物两端加酶切位点 *Hin*d III 和 *Bam*H I，重新克隆启动子序列，利用限制性内切酶 *Hin*d III 和 *Bam*H I 对该序列和载体 pBI121 分别进行双酶切。采用 T4 DNA 连接酶(TaKaRa 公司)连接目的片段和载体，将连接产物转化 Trans1-T1 大肠杆菌感受态，将重组质粒送至北京诺赛基因组研究中心有限公司测序并进行酶切检测，最终获得 pBI121-proRcLAC15::*GUS* 重组表达载体。

1.8 拟南芥遗传转化

将重组质粒 pBI121-35S::*GUS* 和 pBI121-proRcLAC15::*GUS* 分别转化农杆菌感受态 AGL0，选取阳性克隆菌斑振荡培养，得到 OD_{600}=0.6−0.8 的重组农杆菌菌液。将野生型拟南芥的花序浸没于重悬菌液中，避光处理 3−5 min，重复操作 1 次。待植株干枯后收获成熟种子并命名为 T1 代。将 T1 代种子消毒后接种在含有卡那霉素(kanamycin, Kan) (50 mg/L)的 MS 培养基上，筛选转基因阳性植株，植株成熟后收集种子并将其命名为 T2 代。重复筛选过程，直至获得纯合的 T3 代遗传转化拟南芥植株。

1.9 GUS 基因表达检测

选用 20 d 苗龄的拟南芥幼苗，并将 proRcLAC15::*GUS* 转基因株系的叶柄轻轻划伤。分别将野生型、35S::*GUS* 和 proRcLAC15::*GUS* 转基因植株放入离心管中，加入一定量的 GUS 染色液直至浸没整个株系。将离心管放入 37 ℃的培养箱中避光染色 24 h，随后用 70%乙醇酒精脱色 3−4 次至野生型植株绿色褪去。脱色完成后，对样品进行观察记录。

2 结果与分析

2.1 *RcLAC15* 在月季皮刺中特异性表达

本研究克隆了 1 个月季漆酶基因，并命名为 *RcLAC15* (GenBank 登录号：PP358757)。分别收集了‘月月粉’绿瓣期、转色期、红瓣期和盛开期共 4 个不同开放时期的花瓣材料，结合其叶片、茎、皮刺、雄蕊、雄蕊和根这 6 个组织和器官材料，对 *RcLAC15* 基因进行了实时荧光定量 PCR (real-time quantitative-polymerase chain reaction, RT-qPCR)分析，分析结果如图 1 所示，*RcLAC15* 基因在月季皮刺中表达量高，在其他被检测的器官和组织中有极微量表达。

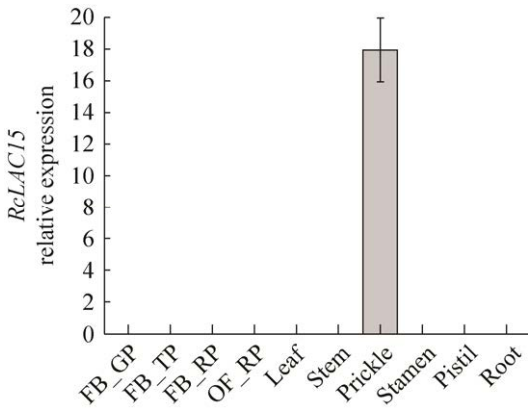

图 1 *RcLAC15* 在月季‘月月粉’不同器官中的定量表达分析 FB_GP：绿瓣期；FB_TP：转色期；FB_RP：红瓣期；OF_RP：盛开期；Leaf：叶片；Stem：茎；Prickle：皮刺；Stamen：雄蕊；Pistil：雌蕊；Root：根。

Figure 1 Quantitative expression analysis of *RcLAC15* in different organs of *Rosa chinensis* ‘Old Blush’. FB_GP: Green petal stage; FB_TP: Turning-color period; FB_RP: Red petal stage; OF_RP: Petals in full bloom.

2.2 月季漆酶基因家族鉴定及系统进化树

从‘月月粉’基因组数据库中鉴定到了 58 个漆酶家族成员。参考拟南芥 17 个漆酶基因的分类，将进化树分为 5 个亚家族 I–V (图 2)。亚家族 I 和II都包含 8 个月季漆酶基因成员，亚家族III中有 9 个成员，亚家族IV有 10 个，亚家族 V 中的成员数量最多，有 23 个。在皮刺中特异表达的 *RcLAC15* 与拟南芥 *AtLAC14* 和 *AtLAC15* 聚为一支，均为亚家族IV的成员。

对月季漆酶基因家族 58 个成员的全长蛋白进行分析，共预测到 10 个 motifs (图 3)。蛋白序列的 N 端主要是 motif 7 和 motif 3，只有 1 个成员的 N 端是 motif 2；大多数成员 C 端是 motif 1，有 1 个是 motif 5，而亚家族II和IV中分别有 1 个成员的 C 端缺少 motif 1、motif 5 和 motif 9。

将 *RcLAC15* 与同一亚家族的 9 个月季漆酶基因和 2 个拟南芥漆酶基因 *AtLAC14* 和 *AtLAC15* 进行氨基酸序列多重比对(图 4)，结果显示，RcLAC15 蛋白与 AtLAC14 蛋白和 AtLAC15 蛋白的保守结构域相同，都具有植物漆酶蛋白的典型铜离子结合域 Cu-oxidase、Cu-oxidase_2 和 Cu-oxidase_3，说明 RcLAC15 蛋白具有漆酶蛋白的基本功能。不同的是，月季漆酶基因 *RchiOBHmChr2g0120941* 编码的蛋白缺少 Cu-oxidase_2 结构域。

蛋白理化性质预测结果显示，RcLAC15 蛋白的分子式为 $C_{3049}H_{4627}N_{799}O_{869}S_{15}$，相对分子质量约为 66.9 kDa，不稳定系数是 25.76，脂肪系数和总亲水性分别为 81.87 和−0.215，故推测该蛋白为稳定且亲水的蛋白。跨膜结构域预测结果显示 RcLAC15 蛋白不存在跨膜螺旋区(图 5)，为非跨膜蛋白。

2.3 *RcLAC15* 启动子序列顺式作用元件分析

利用启动子特异性克隆引物，克隆了 1 200 bp 的 *RcLAC15* 启动子片段。对 proRcLAC15 序列(GenBank 登录号：PP358764)进行顺式作用元

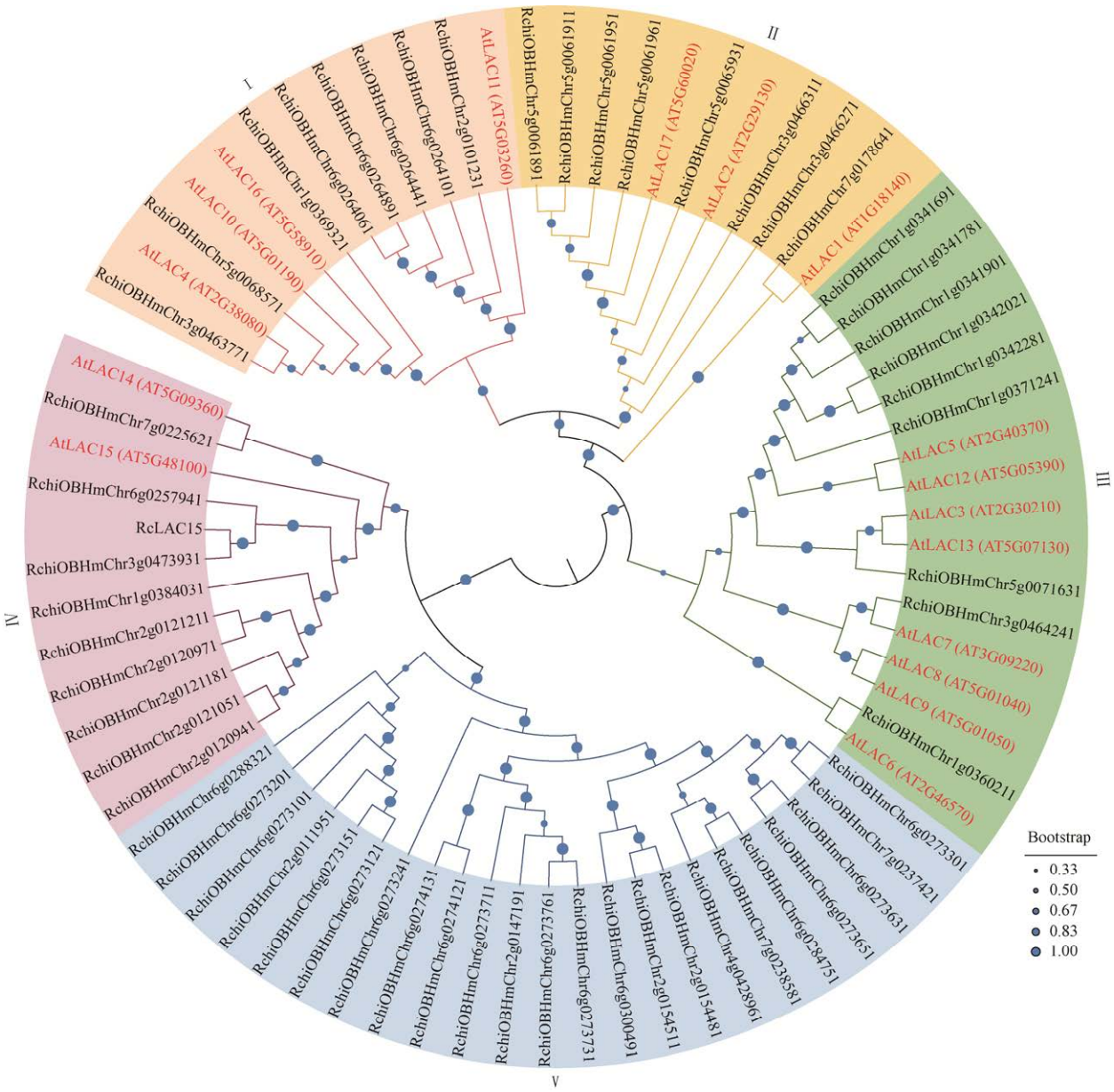

图 2 月季和拟南芥漆酶基因家族系统进化树 拟南芥漆酶蛋白用红色字体表示；月季漆酶蛋白用黑色字体表示。粉色代表亚家族 I；黄色代表亚家族II；绿色代表亚家族III；紫色代表亚家族IV；蓝色代表亚家族 V。蓝色圆圈表示自展值。

Figure 2 Phylogenetic tree of the *Rosa chinensis* and *Arabidopsis thaliana* laccase gene family. The *Arabidopsis* laccase proteins are represented in red font; The rose laccase proteins are represented in black font. Pink represents subfamily I; Yellow represents subfamily II; Green represents subfamily III; Blue represents subfamily IV; Purple represents subfamily V. The blue circle represents the bootstrap value.

件分析，结果见表 3。除了典型的 TATA-box 和 CAAT-box 外，proRcLAC15 序列包含的顺式作用元件可分为 4 种类型，即与光响应相关、与激素响应相关、与生长发育相关和与胁迫响应相关。与光响应相关的顺式作用元件一共有 7 种，分别为 ACE (1 个)、Box 4 (2 个)、chs-CMA2a

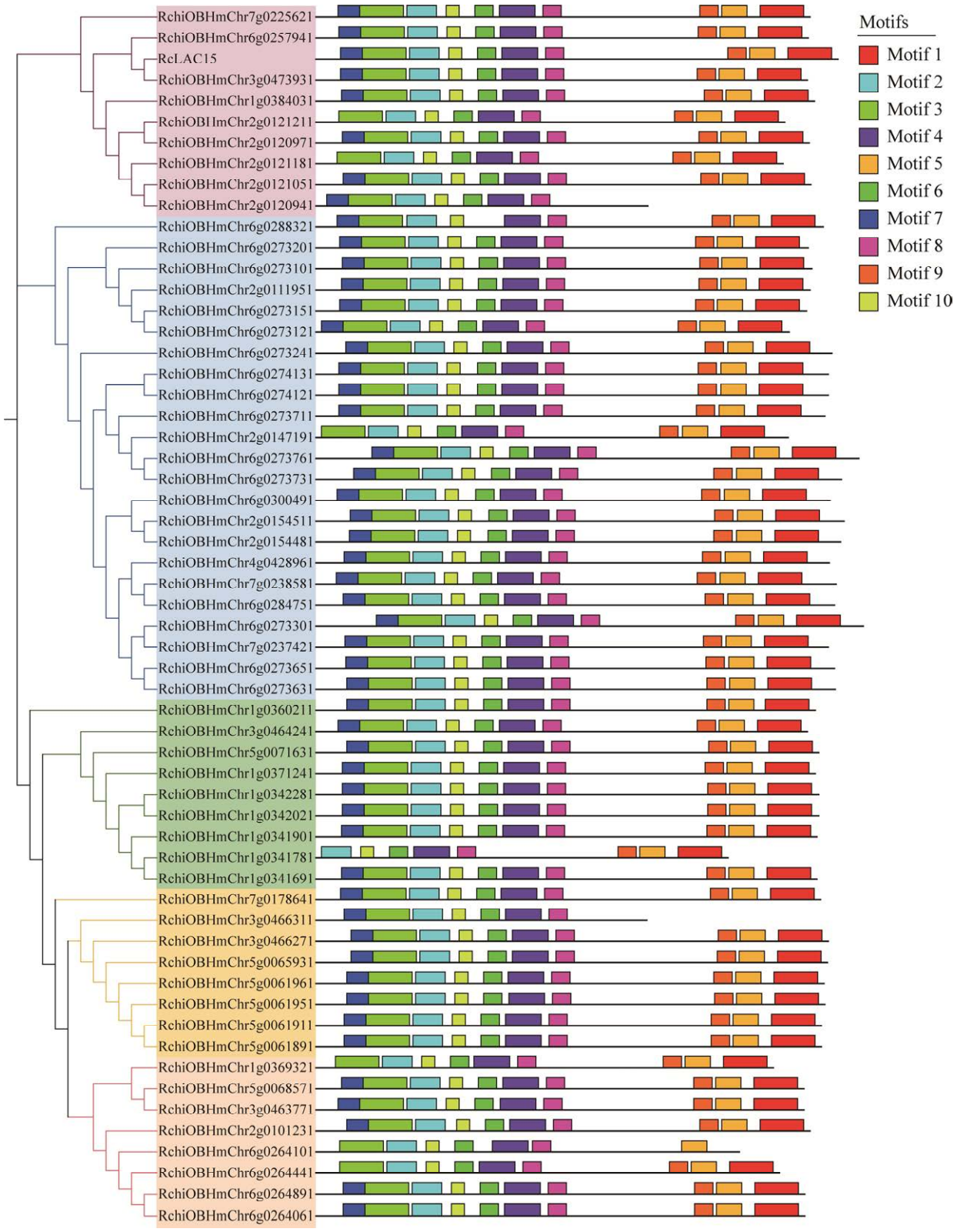

图 3　月季漆酶蛋白 motif 分析

Figure 3　Motif analysis of rose laccase protein.

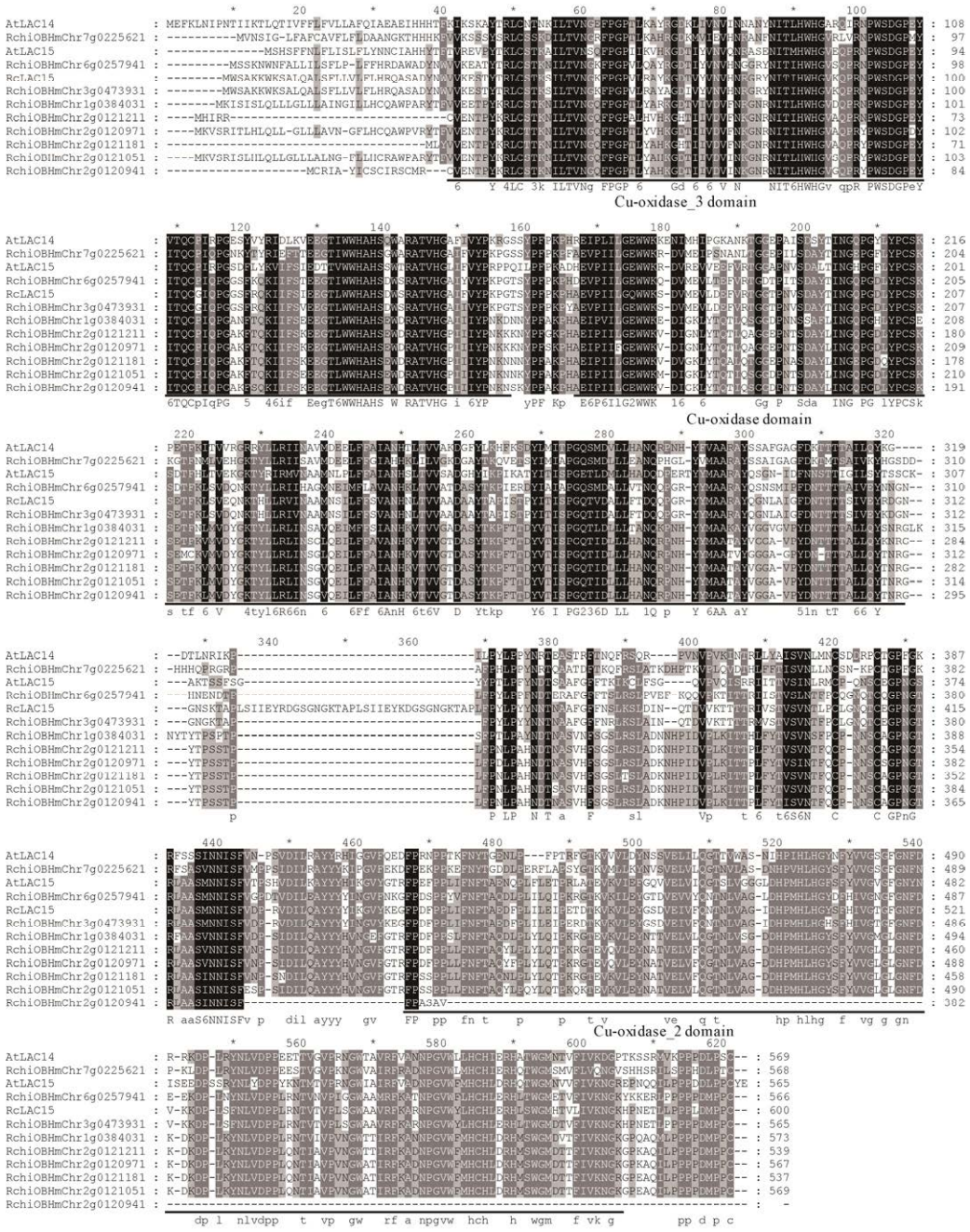

图 4　漆酶亚家族IV成员氨基酸序列的多重比对　下划线表示 LAC 蛋白的 3 个保守区域；Cu-oxidase、Cu-oxidase_2 和 Cu-oxidase_3 为蛋白结构域；“●”表示氨基酸序列的间隙；颜色深浅表示氨基酸序列同源性的高低。AtLAC14：拟南芥 LAC14 蛋白(AT5G09360)；AtLAC15：拟南芥 LAC15 蛋白 (AT5G48100)；RcLAC15：月季 LAC15 蛋白(RchiOBHmChr3g0473941)。

Figure 4　Multiple alignment of amino acid sequences of laccase subfamily IV members. Underscores represent the three conserved regions of LAC protein; Cu-oxidase, Cu-oxidase_2 and Cu-oxidase_3 are protein domains; “●” represents amino acid gap; The different color depth indicates the homology of amino acid sequence. AtLAC14: *Arabidopsis thaliana* LAC14 (AT5G09360); AtLAC15: *Arabidopsis thaliana* LAC15 (AT5G48100); RcLAC15: *Rosa chinensis* LAC15 (RchiOBHmChr3g0473941).

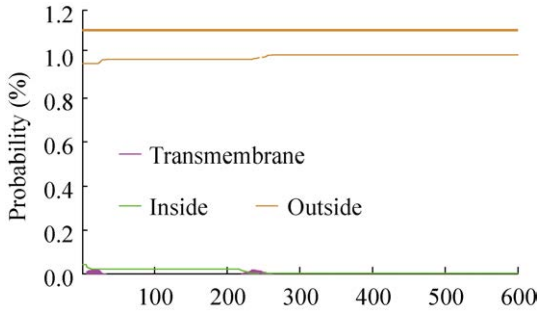

图 5　RcLAC15 蛋白跨膜结构预测结果　横坐标表示蛋白序列的氨基酸序号，纵坐标表示氨基酸跨膜的可能性。

Figure 5　The prediction results of transmembrane structure of RcLAC15 protein. The abscissa represents the amino acid sequence number of the protein sequence, the ordinate represents the possibility of amino acid transmembrane.

(1 个)、LAMP-element (1 个)、GATA-motif (1 个)、G-box (2 个)和 GT1-motif (3 个)。有 5 种顺式作用元件能够响应激素信号，其中 3 个 ABRE 元件能响应脱落酸信号，CGTCA-motif 和 TGACG-motif 各有 3 个，且均能响应茉莉酸甲酯信号，1 个 TATC-box 能参与赤霉素信号响应，而 1 个 TGA-element 元件能参与生长素响应。CAT-box 和 HD-Zip 1 元件都能参与生长发育调控，分别各有 1 个，其中 CAT-box 与分生组织表达相关，而 HD-Zip 1 则参与栅栏组织叶肉细胞的分化。MBS 元件是参与干旱诱导的 MYB 结合位点，是 proRcLAC15 序列中唯一一个与胁迫响应相关的顺式作用元件。

2.4　proRcLAC15 在拟南芥叶片边缘特异性表达

为了进一步验证 proRcLAC15 的表达特性，构建了 pBI121-proRcLAC15::*GUS* 重组表达载体并对其进行了双酶切检测，结果如图 6 所示。将 pBI121-proRcLAC15::*GUS* 载体转化拟南芥，多次筛选后获得稳定转化株系，将野生型拟南芥株系作为对照。分别从野生型和 2 个转基因株系中选取 3 株苗龄 20 d 的拟南芥植株，对其进行 GUS 染色。图 7 展示了 GUS 染色结果。结果表明，野生型植株未被染色，pBI121-proRcLAC15::*GUS* 遗传转化实验株系 1 叶片边缘和主叶脉呈蓝色而其他部位未被染色，实验株系 2 叶片边缘、主叶脉和损伤部位(箭头指示)呈蓝色而其他部位未被染色。

表 3　proRcLAC15 的顺式作用元件

Table 3　The *cis*-acting element of proRcLAC15

Classification	Name	Function	Quantity
Light response	ACE	*Cis*-acting element involved in light responsiveness	1
	Box 4	Part of a conserved DNA module involved in light responsiveness	2
	chs-CMA2a	Part of a light responsive element	1
	LAMP-element	Part of a light responsive element	1
	GATA-motif	Part of a light responsive element	1
	G-box	*Cis*-acting regulatory element involved in light responsiveness	2
	GT1-motif	Light responsive element	3
Hormone response	ABRE	*Cis*-acting element involved in the abscisic acid responsiveness	3
	CGTCA-motif	*Cis*-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness	3
	TGACG-motif	*Cis*-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness	3
	TATC-box	*Cis*-acting element involved in gibberellin-responsiveness	1
	TGA-element	Auxin-responsive element	1
Development	CAT-box	*Cis*-acting regulatory element related to meristem expression	1
	HD-Zip 1	Element involved in differentiation of the palisade	1
Stress response	MBS	MYB binding site involved in drought-inducibility	1

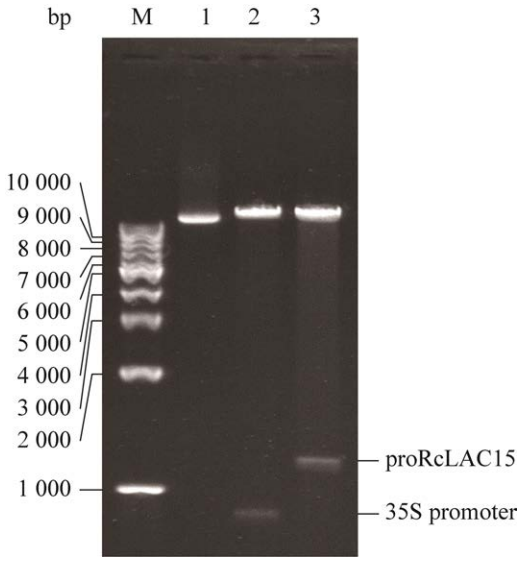

图 6 重组表达载体的双酶切检测 泳道 M 代表 1 kb DNA Ladder；泳道 1 为 pBI121-35S::*GUS* 载体；泳道 2 为使用 *Hin*d III 和 *Bam*H I 双酶切 pBI121-35S::*GUS* 载体获得的产物；泳道 3 为使用 *Hin*d III 和 *Bam*H I 双酶切 pBI121-proRcLAC15::*GUS* 载体获得的产物。

Figure 6 Double enzyme digestion detection of recombinant expression vector. Lane M: 1 kb DNA Ladder; Lane 1: pBI121-35S::*GUS* vector; Lane 2: Products obtained by double digestion of the pBI121-35S::*GUS* vector using *Hin*d III and *Bam*H I; Lane 3: Products obtained by double digestion of the pBI121-proRcLAC15::*GUS* vector using *Hin*d III and *Bam*H I.

3 讨论与结论

本研究鉴定到了一个在月季皮刺中特异性表达的漆酶基因并命名为 *RcLAC15*，生物信息学分析发现，月季漆酶基因家族共有 58 个成员，分为 5 个亚家族，其中 *RcLAC15* 属于亚家族IV，和 *AtLAC15* 进化关系接近。此前 *AtLAC15* 已被报道能参与木质素合成和次生壁形成[17]，蛋白结构域分析结果显示，三者具有相同的保守结构域，提示 *RcLAC15* 在功能上可能与 *AtLAC15* 存在相似性。另外，月季 58 个漆酶基因中，有部分成员编码蛋白的 3′端缺少一个 Cu-oxidase_2 结构域，因此推测月季漆酶基因家族成员之间可能具有不同的生物学功能。

顺式作用元件分析结果揭示 *RcLAC15* 启动子序列存在多个典型的 TATA-box 和 CAAT-box。以往研究表明，TATA-box 和 CAAT-box 均没有方向性，前者能决定转录起始位点，起着指导起始前复合物形成的作用；后者无距离特异性，对基因转录起着激活作用，是启动子中常见的顺式作用元件[18-19]。Zhou 等[13]对 110 份蔷薇属种质资源的皮刺进行了调查，提出皮刺起源于原表皮下的基本分生组织。随后，左美娜[20]对 8 种蔷薇属植物的皮刺进行了细致的形态学和

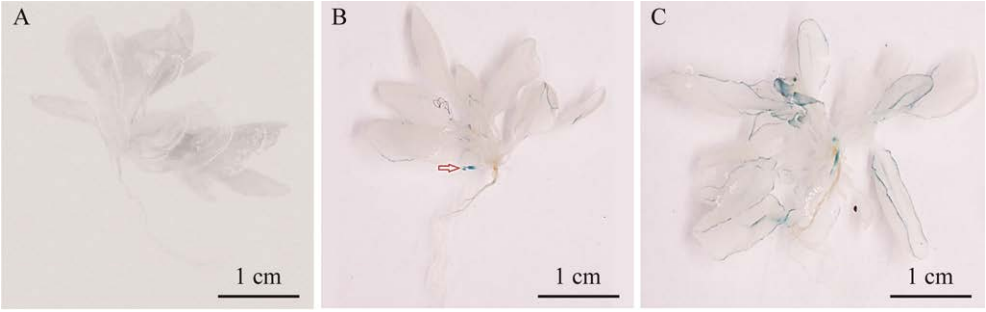

图 7 转基因拟南芥 GUS 染色表型观察 A：野生型拟南芥；B：proRcLAC15::*GUS* 转基因株系 1；C：proRcLAC15::*GUS* 转基因株系 2。

Figure 7 GUS staining phenotype observation of transgenic *Arabidopsis thaliana*. A: Wild type; B: proRcLAC15::*GUS* transgenic line 1; C: proRcLAC15::*GUS* transgenic line 2.

组织学研究，并将皮刺的发生发育过程分为 5 个阶段，研究发现，在起始期，皮刺的原始母细胞来源于茎尖原表皮下的基本分生组织，该结论与 Zhou 等[13]的一致。值得注意的是，在本研究中，从 *RcLAC15* 启动子序列中鉴定到了与分生组织表达相关的 CAT-box 元件和参与栅栏叶肉细胞分化的元件 HD-Zip 1。结合前人的研究结果[13,20]，推测 CAT-box 元件可能是决定 *RcLAC15* 在皮刺中特异性表达的关键元件。但 *RcLAC15* 启动子序列中是否存在其他调控基因特异性表达的顺式元件目前仍不清楚，还有待进一步研究确认。

值得注意的是，*RcLAC15* 在月季皮刺中特异表达，将其启动子转化无皮刺结构的拟南芥后，该启动子却在叶片边缘驱动 *GUS* 基因表达。对该结果的进一步探讨发现，植物叶片边缘具有叶齿状的突出结构，早期研究证实叶齿具有减轻叶片在风力下被撕裂的功能，被视为较薄叶片的保护结构；另外，叶齿具有适口性差的特点，能减少植食动物的取食，因此可以作为植物的防御结构[21]。皮刺同样也是植物的一种适应性的防御策略，可以用来避免食草动物的啃食和外界造成的机械损伤[22]。二者在功能方面具有较大的相似性，故推测这可能是月季皮刺特异性表达启动子 proRcLAC15 异源转化拟南芥后在其叶边缘特异表达的原因之一。

植物的皮刺会对作物的管理和采摘造成极大的不便，截至目前，皮刺发育调控过程中的分子功能层面还有待深入研究[22]。植物器官特异性启动子可以作为研究目的基因在特定组织中的功能、改变特定组织特性的有力工具，它能降低目的基因过表达对植物正常生长发育造成的干扰[23]。本研究在月季中鉴定到了 1 个皮刺特异性表达的基因 *RcLAC15*，其启动子可以在拟南芥叶片边缘启动 *GUS* 基因表达，并且响应机械损伤，*RcLAC15* 启动子可以作为驱动目的基因在皮刺特异表达的工具，进而为研究皮刺发育调控的分子机制提供参考。

REFERENCES

[1] HIBRAND SAINT-OYANT L, RUTTINK T, HAMAMA L, KIROV I, LAKHWANI D, ZHOU NN, BOURKE PM, DACCORD N, LEUS L, SCHULZ D, VAN DE GEEST H, HESSELINK T, VAN LAERE K, DEBRAY K, BALZERGUE S, THOUROUDE T, CHASTELLIER A, JEAUFFRE J, VOISINE L, GAILLARD S, et al. A high-quality genome sequence of *Rosa chinensis* to elucidate ornamental traits[J]. Nature Plants, 2018, 4: 473-484.

[2] HOEGGER PJ, KILARU S, JAMES TY, THACKER JR, KÜES U. Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences[J]. The FEBS Journal, 2006, 273(10): 2308-2326.

[3] 刘佳佳. 杜仲漆酶基因 *EuLAC1* 的克隆及功能分析[D]. 贵阳: 贵州大学, 2020.
LIU JJ. Cloning and functional analysis of *EuLAC1* encoding laccase in *Eucommia ulmoides* oliv[D]. Guiyang: Guizhou University, 2020 (in Chinese).

[4] 刘亚娣. 毛果杨漆酶基因 *PtrLAC16*、*PtrLAClike*、*PtrLAC17* 的功能及作用机制研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2020.
LIU YD. Study on the function and mechanism of laccase genes *PtrLAC16*, *PtrLAClike* and *PtrLAC17* in *Populus tomentosa*[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2020 (in Chinese).

[5] NITTA K, KATAOKA K, SAKURAI T. Primary structure of a Japanese lacquer tree laccase as a prototype enzyme of multicopper oxidases[J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2002, 91(1): 125-131.

[6] 黄晨, 陈帅, 程小芳, 张新, 黎星辉, 孙晓玲. 茶树漆酶基因 *CsLAC4* 和 *CsLAC12* 的克隆与表达分析[J]. 植物保护学报, 2018, 45(5): 1069-1077.
HUANG C, CHEN S, CHENG XF, ZHANG X, LI XH, SUN XL. Cloning and expression analysis of the laccase genes *CsLAC4* and *CsLAC12* from the tea plant[J]. Journal of Plant Protection, 2018, 45(5): 1069-1077 (in Chinese).

[7] 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.

[8] WANG Q, LI G, ZHENG KJ, ZHU XB, MA JJ, WANG DM, TANG KQ, FENG XX, LENG JT, YU H, YANG SX, FENG XZ. The soybean laccase gene family: evolution and possible roles in plant defense and stem strength selection[J]. Genes, 2019, 10(9): 701.

[9] 李昕雨, 王泽博, 邱颖胜, 刘燕敏, 刘骊骊. 植物启动子响应非生物逆境胁迫研究进展[J]. 种子科技, 2022, 40(3): 16-18.

LI XY, WANG ZB, QIU YS, LIU YM, LIU SS. Research progress of plant promoters responding to abiotic stress[J]. Seed Science & Technology, 2022, 40(3): 16-18 (in Chinese).

[10] 邓泽宜, 宋想, 洪艳, 戴思兰. 启动子在观赏植物基因工程中的应用综述[J]. 园艺学报, 2021, 48(6): 1250-1264.
DENG ZY, SONG X, HONG Y, DAI SL. Applications of promoters in the genetic engineering of ornamental plants: a review[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2021, 48(6): 1250-1264 (in Chinese).

[11] 贺红霞, 陈亮, 林春晶, 柳青. 组织特异性启动子在作物基因工程中的研究进展[J]. 中国农学通报, 2014, 30(9): 225-231.
HE HX, CHEN L, LIN CJ, LIU Q. The research progress of tissue-specific promoters in crop gene engineering[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2014, 30(9): 225-231 (in Chinese).

[12] LI YH, WU ZY, MA N, GAO JP. Regulation of the rose *Rh-PIP2;1* promoter by hormones and abiotic stresses in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell Reports, 2009, 28(2): 185-196.

[13] ZHOU NN, SIMONNEAU F, THOUROUDE T, OYANT LHS, FOUCHER F. Morphological studies of rose prickles provide new insights[J]. Horticulture Research, 2021, 8: 221.

[14] HAN Y, WAN HH, CHENG TR, WANG J, YANG WR, PAN HT, ZHANG QX. Comparative RNA-seq analysis of transcriptome dynamics during petal development in *Rosa chinensis*[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 43382.

[15] RAO XY, HUANG XL, ZHOU ZC, LIN X. An improvement of the 2^(-delta delta CT) method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis[J]. Biostatistics, Bioinformatics and Biomathematics, 2013, 3(3): 71-85.

[16] CAI XN, DAVIS EJ, BALLIF J, LIANG MX, BUSHMAN E, HAROLDSEN V, TORABINEJAD J, WU YJ. Mutant identification and characterization of the laccase gene family in *Arabidopsis*[J]. Journal of Experimental Botany, 2006, 57(11): 2563-2569.

[17] LIANG MX, DAVIS E, GARDNER D, CAI XN, WU YJ. Involvement of *AtLAC15* in lignin synthesis in seeds and in root elongation of *Arabidopsis*[J]. Planta, 2006, 224(5): 1185-1196.

[18] 王颖, 麦维军, 梁承邺, 张明永. 高等植物启动子的研究进展[J]. 西北植物学报, 2003, 23(11): 2039-2047.
WANG Y, MAI WJ, LIANG CY, ZHANG MY. Advances on studies of plant promoters[J]. Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica, 2003, 23(11): 2039-2047 (in Chinese).

[19] 张春晓, 王文棋, 蒋湘宁, 陈雪梅. 植物基因启动子研究进展[J]. 遗传学报, 2004, 31(12): 1455-1464.
ZHANG CX, WANG WQ, JIANG XN, CHEN XM. Review on plant gene promoters[J]. Acta Genetica Sinica, 2004, 31(12): 1455-1464 (in Chinese).

[20] 左美娜. 蔷薇属植物腺体型皮刺的形态结构及发育规律[D]. 武汉: 华中农业大学, 2023.
ZUO MN. Morphological structure and developmental regularity of glandular prickles of the *Rosa* genus[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2023 (in Chinese).

[21] 李耀琪, 王志恒. 植物叶片形态的生态功能、地理分布与成因[J]. 植物生态学报, 2021, 45(10): 1154-1172.
LI YQ, WANG ZH. Leaf morphological traits: ecological function, geographic distribution and drivers[J]. Chinese Journal of Plant Ecology, 2021, 45(10): 1154-1172 (in Chinese).

[22] 储娅冬. 玫瑰皮刺发育的显微观察与关键基因挖掘[D]. 扬州: 扬州大学, 2022.
CHU YD. Microscopic observation and key gene mining of rose prickle development[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2022 (in Chinese).

[23] 王焕, 郑日如, 曹声海, 张通, 史若明, 王彩云, 罗靖. 月季花瓣特异表达启动子的筛选和鉴定[J]. 园艺学报, 2020, 47(4): 686-698.
WANG H, ZHENG RR, CAO SH, ZHANG T, SHI RM, WANG CY, LUO J. Selection and identification of petal-specific promoter in rose[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2020, 47(4): 686-698 (in Chinese).