DOI: 10. 11686/cyxb2024206
http://cyxb. magtech. com. cn
罗天蓉, 马健芝, 杜明阳, 等. 紫花苜蓿*LACS*基因家族成员鉴定及表达分析. 草业学报, 2025, 34(4): 124－136.
LUO Tian-rong, MA Jian-zhi, DU Ming-yang, *et al*. Identification and expression analysis of *LACS* gene family members in *Medicago sativa*. Acta Prataculturae Sinica, 2025, 34(4): 124－136.

紫花苜蓿*LACS*基因家族成员鉴定及表达分析

罗天蓉[1],马健芝[1],杜明阳[1],多杰措[2],熊辉岩[2],段瑞君[1*]
(1. 青海大学生态环境工程学院,青海 西宁 810016;2. 青海大学农牧学院,青海 西宁 810016)

摘要:长链脂酰辅酶A合成酶(LACS)基因家族是包含在酰基激活酶超家族中的一类,在脂肪酸合成代谢中具有重要的作用。基于紫花苜蓿基因组数据,采用生物信息学方法对紫花苜蓿*LACS*基因家族成员进行鉴定,构建系统发育树,进行理化性质、染色体定位、保守基序和基因结构、顺式作用原件及组织特异性表达分析,然后构建蛋白互作网络分析,通过qRT-PCR试验进行非生物胁迫表达分析。结果表明:在紫花苜蓿基因组中共鉴定得到10个*MsLACS*家族成员,分别位于5条染色体上;通过构建系统发育树,将*MsLACS*分为5支;保守基序分析发现12个不同的保守基序,Motif3构成了AMP保守结构域,*MsLACS*基因均含10～12个基序不等;基因结构分析发现,*MsLACS*基因结构大有不同,*MsLACS*基因的外显子数量为11～22个,所含内含子数量为0～3个不等,*MsLACS1-1*和*MsLACS3*不含内含子;*MsLACS*基因的启动子区域中主要有光反应元件、激素反应元件和非生物胁迫反应元件等;*MsLACS*基因在不同组织中表达不同,且具有明显的组织特异性;非生物胁迫表达分析表明:紫花苜蓿*MsLACS*基因对于干旱胁迫和盐胁迫响应水平整体较高,对冷胁迫响应水平偏低,表达量整体呈先升高后降低的起伏型,在叶片组织中偏高,根组织中较低;干旱和盐胁迫下,*MsLACS*基因在叶片中均高表达,胁迫时间段为6 h时,表达量水平整体达到最高;紫花苜蓿10个*MsLACS*基因共同互作,各蛋白与其他蛋白互作连线分别有18条,相互间有较强互作。研究结果可为探究紫花苜蓿中*LACS*基因表达以及胁迫育种提供一定研究基础。

关键词:紫花苜蓿;长链脂酰辅酶A合成酶(LACS);基因家族;非生物胁迫;表达

Identification and expression analysis of *LACS* gene family members in *Medicago sativa*

LUO Tian-rong[1], MA Jian-zhi[1], DU Ming-yang[1], DUO Jie-cuo[2], XIONG Hui-yan[2], DUAN Rui-jun[1*]
1. *College of Ecological and Environmental Engineering*, *Qinghai University*, *Xining* 810016, *China*; 2. *College of Agriculture and Animal Husbandry*, *Qinghai University*, *Xining* 810016, *China*

Abstract: Members of the long-chain acyl-coenzyme A (CoA) synthetase (LACS) family, in the acyl-activating enzyme superfamily, play important roles in fatty acid anabolic metabolism. In this study, based on genomic data of *Medicago sativa* (alfalfa), *LACS* gene family members were identified by bioinformatics methods, a phylogenetic tree was constructed, and the physicochemical properties of the putative proteins were determined. The chromosome localization, conserved motifs and gene structure, *cis*-acting elements, and tissue-specific expression patterns of the *LACS* genes were analyzed, and a protein-protein interaction (PPI) network was constructed. The transcript profiles of *LACS* genes under biotic stress were analyzed by qRT-PCR. The results showed that 10 *MsLACS* family

收稿日期:2024-06-03;改回日期:2024-07-22
基金项目:青海省重点研发与转化计划(2022-NK-135)和青海省高原紫花苜蓿品种适应性评价与示范资助。
作者简介:罗天蓉(1998－),女,青海都兰人,在读硕士。E-mail: 2919390280@qq. com
* 通信作者 Corresponding author. E-mail: ruijunduan@163. com

members were present in the alfalfa genome, and were located on five chromosomes. In the phylogenetic tree, the 10 *MsLACS* were grouped into five branches. Motif3 constituted the conserved AMP-binding domain, and the alfalfa *MsLACS* genes contained 10－12 motifs. There were differences in gene structure among the 10 *MsLACS* genes, with the number of exons ranging from 11 to 22, and the number of introns ranging from 0 to 3. *MsLACS1-1* and *MsLACS3* had no introns. The promoter region of *MsLACS* contained light response elements, hormone response elements, and abiotic stress response elements. The transcript profiles of *MsLACS* genes differed among different tissues and showed obvious tissue specificity. Analyses of gene expression by qRT-PCR revealed higher transcript levels of *MsLACS* genes under drought stress and salt stress than under cold stress. Under cold stress, the transcript levels of *MsLACS* genes in alfalfa initially increased and then decreased, and were higher in the leaves than in the roots. Under drought and salt stress, *MsLACS* genes were highly expressed in leaves, with peak transcript levels at 6 h. The PPI network analysis showed that the 10 proteins encoded by *MsLACS* genes in alfalfa interacted with each other, with 18 lines of interaction among the proteins. These results provide a basis for further research on *LACS* genes in alfalfa and their applications in breeding for stress resistance.

Key words: *Medicago sativa*; long-chain acyl-coenzyme A (CoA) synthetase (LACS); gene family; abiotic stress; expression

外源脂肪酸以及内源脂肪酸在参加其代谢途径之前,都必须经过活化合成相应的脂酰辅酶 A,这类催化脂肪酸活化的酶称为脂酰辅酶 A 合成酶[acyl-coenzyme A (CoA) synthetase, ACS],也称为酰基激活酶(acyl-activating enzyme, AAE)超家族[1]。长链脂酰辅酶 A 合成酶[long-chain acyl-coenzyme A (CoA) synthetase, LACS]是包含在AAE超家族中的一类酶,在脂肪酸合成和分解代谢中具有重要作用[2],可催化游离脂肪酸形成相应脂酰辅酶 A,进入其代谢途径。LACS的功能作用主要有两个方面:第一是在三酰甘油(triacylglycerols, TAG)的合成过程中,利用Kenedy循环方式,为脂酰辅酶A和甘油三酯的合成提供中间产物[3],同时还参与TAG的装配过程[4];第二是参与脂肪酸的β-氧化过程:在油料植物中,TAG是油脂的主要贮存形式,在种子萌发的过程中,通过脂肪酶的作用释放出脂肪酸[5],这类游离脂肪酸一般具有一定的毒性,LACS可将这类有毒物质通过活化作用,形成无毒的脂酰辅酶A,从而进入β-氧化途径[6]。同时由于脂肪酸的活化发生在细胞液中,而线粒体里包含催化脂肪酸氧化的酶系,因此活化后的脂酰辅酶A合成酶首先得进入线粒体之后,才能够被氧化[7]。

*LACS*基因广泛存在于真核生物中,很多生物体中都能检测到*LACS*的存在。在模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中,共鉴定出9个*AtLACS*基因家族成员,分为5支,第Ⅰ支包括*AtLACS1*,第Ⅱ支包括*AtLACS2*,第Ⅲ支包括*AtLACS3*、*AtLACS4*、*AtLACS5*,第Ⅳ支包括*AtLACS6*、*AtLACS7*,第Ⅴ支包括*AtLACS8*、*AtLACS9*,并且大部分*AtLACS*基因在花以及萌发的种子中大量表达,表明这些基因不仅参与花组织的油脂代谢,且对种子甘油酯的合成起到关键作用[8]。*AtLACS1*参与脂肪酸的降解代谢,但并没有参与过氧化酶体的β-氧化途径,利用亚细胞定位,发现*AtLACS1*定位于细胞质中,通过Northern和RT-PCR分析,得到拟南芥*AtLACS1*基因的表达谱,发现在种子萌发初期表达量最高,证明*AtLACS1*对于种子萌发起一定的作用,同时也影响着成熟期植株的生长发育[9]。*AtLACS2*定位在内质网上,在叶、根、花芽这些幼嫩的延伸组织中大量表达,研究表明拟南芥的*AtLACS1*和*AtLACS2*具有一定的冗余功能[10],推测*AtLACS1*和*AtLACS2*参与叶片角质层的生物合成[11]。*AtLACS4*定位于内质网,参与蜡质和脂质生物合成过程,在从内质网到质体转运中发挥作用,同时刺激甘油脂质的合成[12-13]。*AtLACS6*和*AtLACS7*在过氧化物酶体脂肪酸β-氧化中发挥着重叠的功能[14],*AtLACS8*和*AtLACS9*在脂质的合成中具有一定功能[14-15]。*AtLACS3*和*AtLACS5*在植物中的功能尚不明确。此外,在酵母中也发现了*LACS*基因的同功能酶基因,是活化外源的脂肪酸[16]。通过对酵母*LACS*基因的研究发现,酵母中至少含有5种*LACS*基因的同功能酶,且只有长链脂肪酸需要LACS的活化[17]。在苹果(*Malus pumila*)中,鉴定得到11个*MdLACS*基因,并发现*MdLACS*基因表达量在不同的非生物胁迫下存在一定差异,

*MdLACS1*基因可能是非生物胁迫的调节因子[18]。大肠杆菌*LACS*基因的研究中发现，LACS可能是一种内膜上的结合蛋白，参与长链脂肪酸的转运过程[19]。

紫花苜蓿(*Medicago sativa*)，又名紫苜蓿，豆科苜蓿属多年生草本植物。紫花苜蓿原产于亚洲的西部，含有丰富的蛋白质、维生素及微量营养素，被誉为“牧草之王”[20]。紫花苜蓿的根能深入地下，具有防风固沙和保护生态环境的作用[21]，产量高而质优，又能改良土壤，广泛栽培，主要用于制干草、青贮饲料或用作牧草，紫花苜蓿固氮能力较强，可以提高土壤有机质，也可作为绿肥作物[22]。紫花苜蓿具有较强的抗干旱、抗寒冷和抗盐特性，价值较高。因此，紫花苜蓿*LACS*基因的研究，不仅有助于理解植物脂肪酸代谢途径，在提高牧草抗逆性，增加产量等方面的研究中发挥关键性作用，也可为植物胁迫遗传育种和改造当下农艺现状提供科学的策略，在生物能源的开发与利用、化工、生物与医药等领域的应用具有一定的参考价值。

紫花苜蓿*LACS*基因的研究，在于紫花苜蓿中*LACS*基因家族成员的鉴定以及抗逆性机制的研究。通过对紫花苜蓿*LACS*基因的研究，揭示*LACS*基因参与非生物胁迫的过程及调控机制，可为改良得到紫花苜蓿耐胁迫的品种特性提供理论依据和技术指导。紫花苜蓿作为牧草，利用生物信息学手段和基因工程的方法研究其对冷、旱、盐非生物胁迫的抵抗能力，以扩大种植的范围，提升营养价值，从而满足牲畜对于饲料的要求，培育出能适应恶劣环境的新品种，来推动紫花苜蓿在农业生产和生态保护中的应用。因此，紫花苜蓿*LACS*基因的鉴定及研究其在非生物胁迫表达中的作用具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

使用紫花苜蓿“中苜一号”种子，用10%浓度的过氧化氢浸泡种子2 min进行消毒处理，再用无菌水冲洗干净，种植到普通营养土中，培养条件为16 h光照，8 h黑暗，温度为22 ℃，1周之后，使用霍格兰营养液水培。4周后，对紫花苜蓿使用胁迫营养液，在16 h光照，8 h黑暗处理条件下，冷胁迫培养温度为4 ℃，干旱和盐胁迫培养温度为22 ℃，分别进行冷、旱、盐胁迫处理。

冷胁迫营养液配制：大量元素各4 mL，微量元素各0.5 mL，EDTA NaFe 1 mL，加去离子水至1 L。干旱胁迫营养液配制：大量元素各4 mL，微量元素各0.5 mL，EDTA NaFe 1 mL，再加PEG 6000 219.5 g，最后加去离子水至1 L。盐胁迫营养液配制：大量元素各4 mL，微量元素各0.5 mL，EDTA NaFe 1 mL，再加NaCl 11.7 g，最后加去离子水至1 L。

胁迫处理过程中取样，分别在胁迫0，3，6，9，12，24，48 h时间段，取紫花苜蓿叶、根和对照组样品，每个样品取3个生物学重复，取样后立即放入液氮中，存放于−80 ℃冰箱中备用，取样及试验时间为2023年7−10月，重复3次。

1.2 紫花苜蓿*LACS*基因家族成员的鉴定及其编码蛋白理化性质的分析

从figshare数据库(https://figshare.com)下载紫花苜蓿(中苜一号)基因组和注释信息，从TAIR数据库(https://www.arabidopsis.org/)下载拟南芥基因组和注释信息。从EMBL-Pfam数据库(http://pfam.xfam.org/)下载AMP结构域的隐马尔可夫模型(Hidden Markov Model，HMM)文件(AMP-binding：PF00501)，通过HMM搜索与序列同源性搜索工具(BLASTP)比对，筛选紫花苜蓿基因组中含有保守AAE结构域的蛋白。对所得的结果分别在Pfam(http：//pfam.xfam.org/)和SMART数据库(http：//smart.embl-heidelberg.de/)进行结构域验证，选择具有结构域的成员进一步分析。

将拟南芥*AAE*基因家族成员与上述鉴定得到的紫花苜蓿AAE成员构建系统发育树，将AtLACS家族的蛋白序列通过本地BLASTP比对确定紫花苜蓿*MsLACS*基因家族成员，据其与拟南芥AtLACS1～AtLACS9序列的同源性，命名为MsLACS1～MsLACS9-2，在ExPASy数据库(https://www.expasy.org/)中对紫花苜蓿所有LACS蛋白序列进行理化性质预测分析，主要包括蛋白分子量、等电点、不稳定指数、脂溶性系数和总疏水平均值。

1.3　染色体定位

使用紫花苜蓿基因组注释文件提取染色体长度以及*MsLACS*家族成员位置信息，利用 Mapchart v2.2 软件对紫花苜蓿*MsLACS*基因的染色体定位可视化，并采用Adobe Illustrator 2022软件对图片进行修饰。

1.4　系统发育分析

利用拟南芥AtLACS蛋白和紫花苜蓿MsLACS蛋白构建系统发育树。采用ClustalW进行多序列比对，利用MEGAX软件，使用邻域连接（neighbor joining，NJ）算法，选择默认参数，生成系统发育树。使用 Evolview v3（https://www.evolgenius.info/evolview/#login）生成图片，使用Adobe Illustrator 2022美化。

1.5　蛋白质保守基序和基因结构分析

使用GSDS（http://gsds.cbi.pku.edu.cn/）在线预测*MsLACS*基因结构，使用MEME（http://memesuite.org/tools/meme）工具预测MsLACS蛋白保守基序，重复次数为任意次数，最大基序数量为12，以及最佳基序宽度限制在6和200残基之间。用TBtools软件可视化。

1.6　顺式作用元件分析

使用TBtools提取*MsLACS*基因上游2 kb序列作为顺式作用元件预测的启动子区。利用在线工具PlantCARE对*MsLACS*基因启动子顺式作用元件进行预测，并利用GSDS在线软件绘制预测结果，使用TBtools软件做可视化处理。

1.7　组织特异性分析

通过NCBI公共数据库下载紫花苜蓿转录组数据，对转录组数据进行处理，分析*MsLACS*基因在不同组织的表达情况。通过TBtools的Heatmap程序对各表达数据做可视化处理并以热图呈现。

1.8　定量PCR

通过qRT-PCR技术研究*MsLACS*基因在受到冷、旱、盐非生物胁迫下的表达模式。使用试剂盒提取RNA，反转录为cDNA。基于编码序列（coding sequence，CDS）长度，使用Primer Premier 5.0软件设计引物，扩增长度为150～250 bp，引物序列见表1。qRT-PCR反应体系为20 μL体系，反应体系中，cDNA模板1 μL、上下游引物各0.6 μL、2×SuperReal Color PreMix 10.0 μL和ddH_2O 7.8 μL，反应程序为：第1步：95 ℃，15 min，1个循环；第2步：95 ℃，10 s；55～65 ℃，20 s；72 ℃，32 s；40个循环。试验设置3次生物学重复。所得数据，使用$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法[23]计算基因的相对表达量，使用软件GraphPad Prism 8作图。

表1　qRT-PCR引物

Table 1　qRT-PCR primers

基因 Gene	上游引物 Forward primer（5′－3′）	下游引物 Reverse primer（3′－5′）
MsLACS1-1	CATGCTGGGATGGCGTAAAAT	AGTGAAGCACTTTTTGCAACC
MsLACS1-2	TACCATGGGGTCAAAGCTCG	CCAACAGTACCAAGCATGCAC
MsLACS2	TTGGTTTCATACAGCCATGAAAAT	TTCTGTCGGGGACTACCACA
MsLACS3	CGGGGCTGTGGAGTTTGTTA	CATGACCCCCGATCTTCTCA
MsLACS5	GGAACGGGACCTTATCACTCC	GCAGTCAGTAAAAGACAGCTCAT
MsLACS8	ACTGGTGACATTGGGCGATT	CCAGAGACTGACGTGAAGCA
MsLACS9-2	TTCAGGGTTGTTTCAGGCGA	CAGCCGTGTCCAACAGATGA
Msactin	CAAAAGATGGCAGATGCTGAGGAT	CATGACACCAGTATGACGAGGTCG

1.9　蛋白互作网络

利用String数据库预测*MsLACS*基因编码蛋白之间的蛋白质互作网络。

2 结果与分析

2.1 紫花苜蓿*LACS*基因家族成员鉴定及其编码蛋白理化性质分析

通过HMM搜索与BLASTP方法对紫花苜蓿基因组数据进行分析，共鉴定出10个*MsLACS*基因。根据其与拟南芥*LACS*基因的对应关系，将10个*MsLACS*基因命名为*MsLACS1*～*MsLACS9-2*。

对紫花苜蓿LACS蛋白的理化性质进行预测分析，结果表明，MsLACS蛋白氨基酸大小为584（MsLACS3）～860 aa（MsLACS9-1），平均大小为682.7 aa（表2）。MsLACS蛋白相对分子质量为65477.89（MsLACS3）～94959.34 kD（MsLACS9-1），等电点为5.74（MsLACS1-2和MsLACS2）～8.00（MsLACS1-1），即2个为碱性蛋白，8个为酸性蛋白。亚细胞定位结果表明，MsLACS2和MsLACS4定位于细胞核，MsLACS5、MsLACS3、MsLACS6和MsLACS1-2定位于细胞质，MsLACS8、MsLACS9-2、MsLACS1-1和MsLACS9-1定位于叶绿体。脂溶性系数均在84及以上，不稳定系数除MsLACS2外均小于40，说明大部分蛋白都能稳定存在。

表2 *MsLACS*基因编码蛋白理化性质分析

Table 2 Physicochemical property analysis of *MsLACS* gene encoded protein

基因 Gene	基因ID号 Gene ID	氨基酸数 Number of amino acids (aa)	分子质量 Molecular mass (kD)	等电点pI	不稳定系数 Instability coefficient	脂溶性系数 Fat solubility coefficient	染色体定位 Chromosomal localization	亚细胞定位 Subcellular localization
MsLACS1-1	MsG0180004774.01.T01	610	68724.49	8.00	27.09	88.48	Chr1	叶绿体 Chloroplast
MsLACS1-2	MsG0780041383.01.T01	597	66899.61	5.74	31.70	84.00	Chr7	细胞质 Cytoplasm
MsLACS2	MsG0180001276.01.T02	654	73203.98	5.74	40.29	86.90	Chr1	细胞核 Cell nucleus
MsLACS3	MsG0480023684.01.T01	584	65477.89	6.66	31.47	87.77	Chr4	细胞质 Cytoplasm
MsLACS4	MsG0580024346.01.T01	662	73949.13	6.37	33.60	89.18	Chr5	细胞核 Cell nucleus
MsLACS5	MsG0580024344.01.T01	744	83552.61	6.67	34.62	91.67	Chr5	细胞质 Cytoplasm
MsLACS6	MsG0180005634.01.T01	692	76661.51	6.35	29.23	88.03	Chr1	细胞质 Cytoplasm
MsLACS8	MsG0380016055.01.T02	727	79391.51	7.19	29.26	93.59	Chr3	叶绿体 Chloroplast
MsLACS9-1	MsG0380016352.01.T01	860	94959.34	6.30	31.37	98.36	Chr3	叶绿体 Chloroplast
MsLACS9-2	MsG0180001085.01.T01	697	76384.23	6.51	30.95	95.24	Chr1	叶绿体 Chloroplast

pI：等电点 Isoelectric point；Chr：染色体 Chromosome.

2.2 染色体定位分析

根据紫花苜蓿基因组的注释，10个*MsLACS*基因不均匀地分布在5条染色体上（图1），其中1号染色体上分布最多，有4个*MsLACS*基因，3和5号染色体上分别有2个*MsLACS*基因，4和7号染色体上分别有1个*MsLACS*基因，5号染色体上有一对串联重复基因。

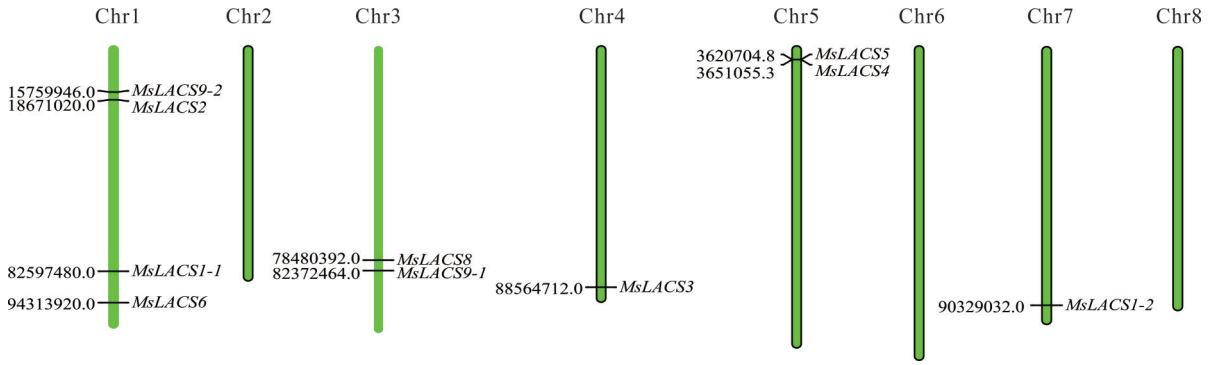

图1 紫花苜蓿*MsLACS*基因的染色体定位

Fig. 1 Chromosome location of *MsLACS* genes

2.3　系统发育分析

对紫花苜蓿 10 个 MsLACS 蛋白序列与拟南芥 9 个 AtLACS 蛋白序列进行系统发育分析，参考拟南芥 LACS 的分类，19 个 LACS 蛋白被分为 5 个进化分支（图 2）。第 Ⅰ 支包含 AtLACS1、MsLACS1-1、MsLACS1-2，第 Ⅱ 支包括 AtLACS2、MsLACS2，第 Ⅲ 支包括 AtLACS3、AtLACS4、AtLACS5、MsLACS3、MsLACS4、MsLACS5，第 Ⅳ 支包括 AtLACS6、AtLACS7、MsLACS6，第 Ⅴ 支包括 AtLACS8、AtLACS9、MsLACS8、MsLACS9-1、MsLACS9-2。

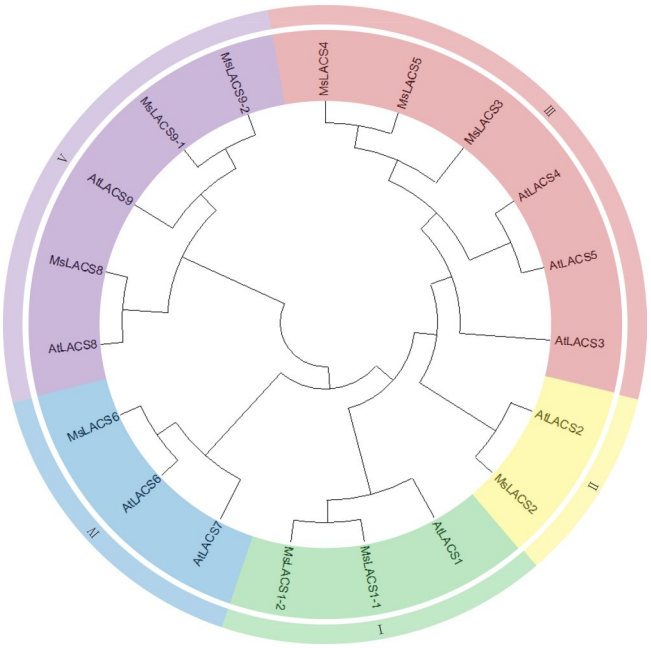

图 2　*MsLACS* 基因家族系统进化分析

Fig. 2　Phylogenetic analysis of the *MsLACS* gene family

2.4　蛋白质保守基序和基因结构分析

使用在线 MEME 搜索工具研究 MsLACS 蛋白的保守性，发现均含 10～12 个不等的保守基序（图 3A），MsLACS9-1 含 Motif 数量最少，为 10 个，MsLACS4、MsLACS5 和 MsLACS9-2 含有 Motif 数量最多，为 12 个，其余蛋白均含有 11 个 Motif。*MsLACS* 基因均含有 Motif1、Motif2、Motif13、Motif4、Motif5、Motif7 和 Motif9，其中 Motif3 构成 AMP 保守结构域。

利用 GSDS 2.0 在线网站对 10 个 *MsLACS* 基因进行基因结构分析（图 3B），发现基因结构有很大不同，*MsLACS* 基因所含外显子数量为 11～22 个，*MsLAC8* 和 *MsLAC9-1* 所含外显子最少，为 11 个，*MsLACS6* 含有外显子最多，为 22 个。

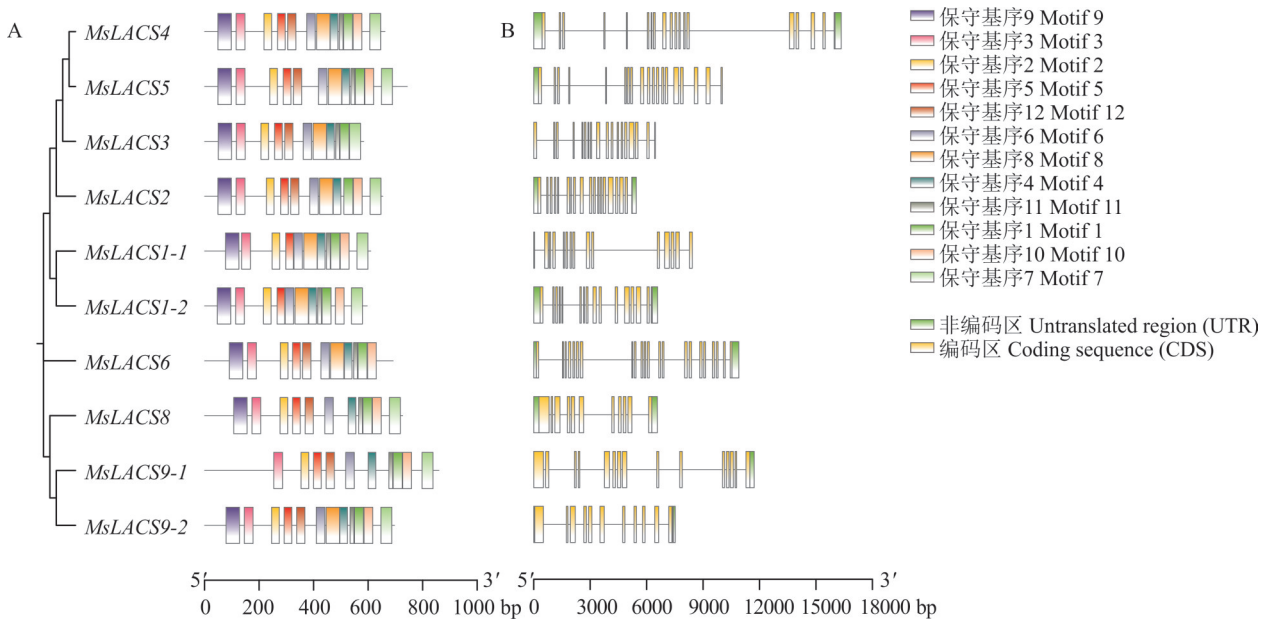

图 3　*MsLACS* 保守基序（A）和基因结构（B）分析

Fig. 3　Conserved motif (A), and gene structure (B) analyses of *MsLACS*

2.5　顺式作用元件分析

借助 PlantCARE 识别并分析了这些基因上游 2 kb 启动子区域中潜在的顺式作用元件（图 4），结果发现 10 个 *MsLACS* 基因的启动子区域中含有 33 个顺式作用元件，其中光反应相关元件共 9 个；激素相关作用元件 8 个，包

括茉莉酸甲酯反应元件、水杨酸反应元件、赤霉素反应元件、脱落酸反应元件、类黄酮生物合成元件、生长素反应元件等；非生物胁迫相关作用元件共5个，包括低温反应元件、干旱诱导元件、厌氧诱导元件、防御应激元件和缺氧诱导元件；蛋白结合位点相关元件共4个，包括热MYBHv1结合位点、休克蛋白结合位点和DNA结合蛋白结合位点等；其他作用元件共7个，包括启动子核心元件、顺式调节元件、昼夜节律控制元件等。

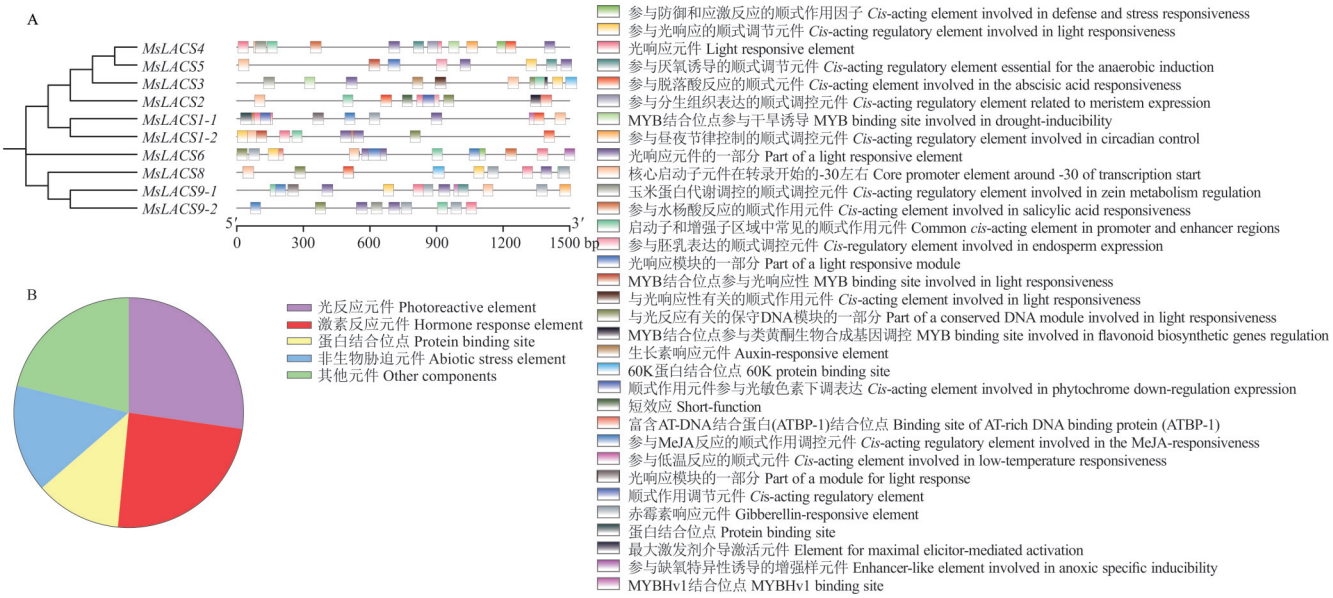

图4 *MsLACS*基因顺式作用元件分布(A)及分类(B)

Fig. 4 *Cis*-acting element distribution map (A) and classification (B)

2.6 *MsLACS*组织表达分析

总体来看，除*MsLACS5*和*MsLACS8*外，紫花苜蓿*MsLACS*基因整体表达量偏低(图5)。*MsLACS5*在不同组织中均表达，在根和根瘤中表达量较高；*MsLACS8*在根、茎、叶、花和根瘤组织均表达，在花中表达量最高；其余基因的低表达也有组织差异，例如，*MsLACS1-1*主要在花和茎中表达，*MsLACS1-2*在花、叶和茎中表达，在叶片中表达量较高；*MsLACS2*主要在茎和叶中表达；在不同组织中均检测不到*MsLACS3*的表达；*MsLACS4*除叶之外，在其他组织中均少量表达；*MsLACS6*在不同组织均表达，且表达量都较低，*MsLACS9-1*除在叶中不表达，在其他组织中均有少量表达；*MsLACS9-2*主要在茎、花和叶中表达。

2.7 基因非生物胁迫分析

紫花苜蓿*MsLACS*基因对于冷胁迫响应水平整体偏低，表达量整体呈先升高后降低的起伏型(图6)。在不同的组织中，叶片中表达量最高的为*MsLACS3*基因，根组织中表达量最高的为*MsLACS5*基因，但叶组织和根组织中表达量差异不大。在不同的胁迫时间段，紫花苜蓿*MsLACS*基因整体表达水平在24 h达到最高。叶片组织中胁迫时间为0 h表达量较高的基因是*MsLACS2*，*MsLACS1-2*、*MsLACS3*和*MsLACS9-2*在胁迫时间为3 h时，表达量达到最高，胁迫到24 h时，*MsLACS1-1*、*MsLACS5*和*MsLACS8*表达量最高；根组织中，*MsLACS1-2*在0 h表达量最高，*MsLACS8*在3 h表达量最高，*MsLACS5*在12 h时表达量最高，在24 h时，*MsLACS1-1*、*MsLACS2*、*MsLACS3*、*MsLACS9-2*表达量最高。

紫花苜蓿*MsLACS*基因对于干旱胁迫响应水平，在叶片组织中偏高，根组织中较低，表达量整体也呈先升高后降低的起伏型(图7)，在干旱胁迫下，不同*MsLACS*基因，在相同时间段表达量均达到最高，相同组织中，表达量水平差别不大。叶片组织和根组织中表达量最高的均是*MsLACS1-2*基因，*MsLACS*基因在叶片组织中高表达，叶片组织中总体表达水平高于根组织。在不同的胁迫时间段，叶片组织中胁迫时间为6 h时，*MsLACS1-1*、

MsLACS1-2、*MsLACS2*、*MsLACS3*、*MsLACS5*、*MsLACS8*、*MsLACS9-2*基因表达量均达到最高值；根组织中，除*MsLACS8*在 3 h时表达量最高，其他基因在 6 h时，表达量达到最高。

紫花苜蓿*MsLACS*基因对于盐胁迫响应水平和干旱胁迫一样，整体水平在叶片组织中偏高，根组织中较低，表达量整体也呈先升高后降低的起伏型（图 8），在相同时间段表达量均达到最高，相同组织中，表达量水平差别整体不大。叶片组织中表达量最高的是*MsLACS3*，根组织中表达量最高的是*MsLACS5*，*MsLACS*基因也在叶片组织中超表达，叶片组织中总体表达水平高于根组织。在不同的胁迫时间段，叶片组织中 7 个基因均在胁迫时间为 6 h时表达量达到最高，根组织中，*MsLACS1-1*、*MsLACS1-2*、*MsLACS9-2*在胁迫时间为 9 h时表达量达到最高，*MsLACS2*、*MsLACS3*、*MsLACS5*在胁迫时间为 6 h时表达量最高，*MsLACS8*在胁迫时间为 48 h达到最高，总体上，*MsLACS*基因在胁迫时间段为 6 h时，表达量水平达到最高。

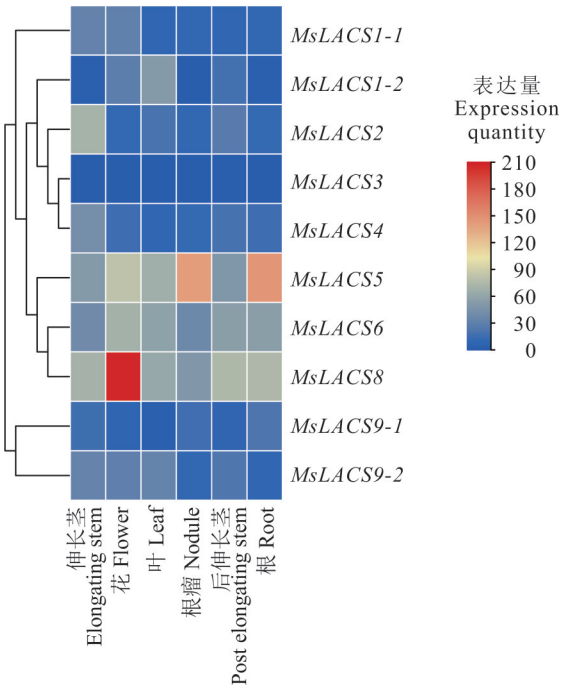

图 5　*MsLACS*在不同组织中的表达热图

Fig. 5　Expression heatmaps of *MsLACS* genes in different tissues

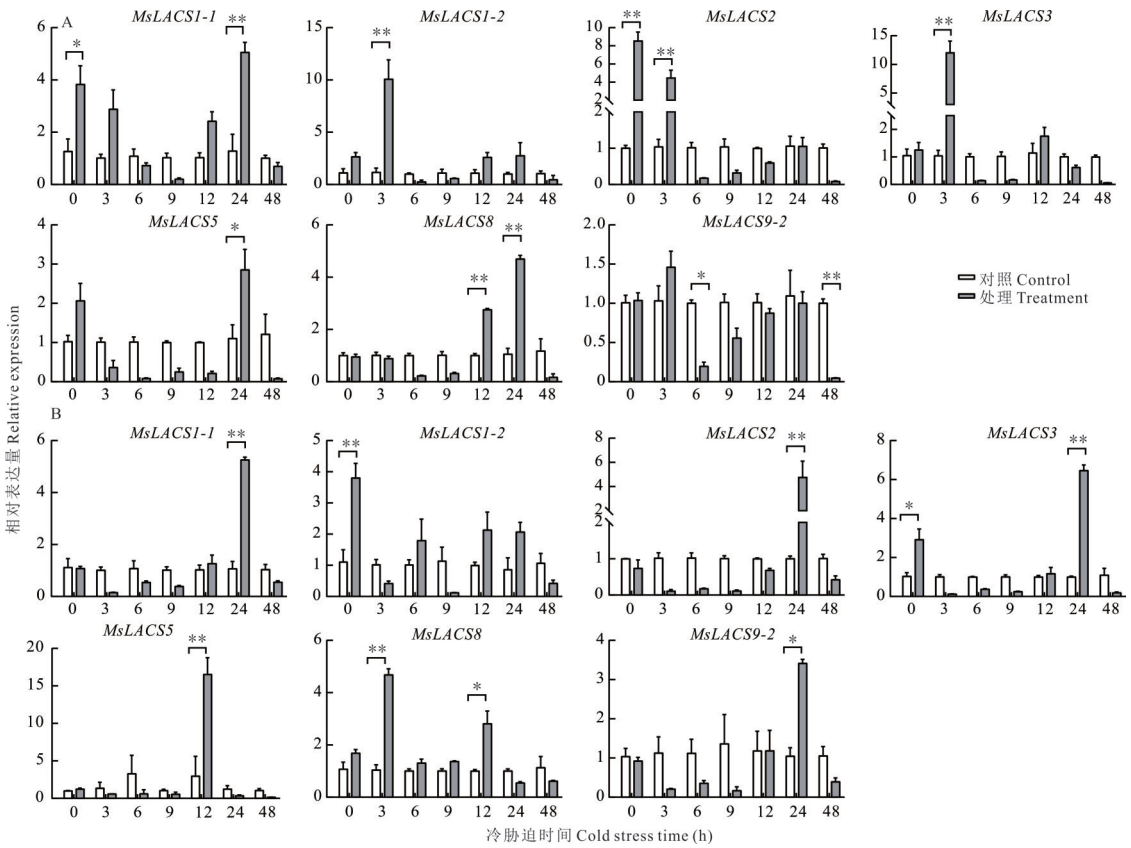

图 6　冷胁迫下紫花苜蓿*MsLACS*基因在叶片和根中的表达

Fig. 6　Expression of *MsLACS* gene in leaves and roots of alfalfa under cold stress

A：叶 leaf；B：根 Root. *：$P<0.05$；**：$P<0.01$. 下同 The same below.

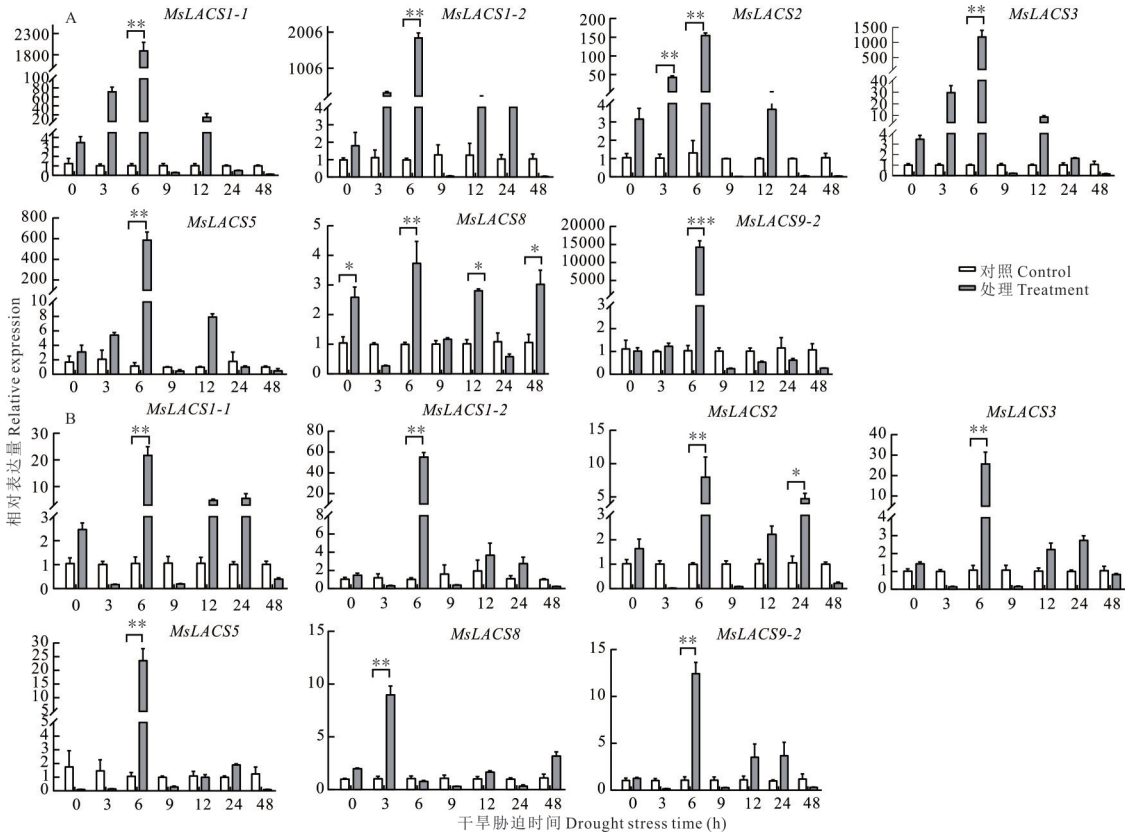

图7 干旱胁迫下紫花苜蓿*MsLACS*基因在叶片和根中的表达

Fig. 7 Expression of *MsLACS* gene in leaves and roots of alfalfa under drought stress

***: $P<0.001$. 下同 The same below.

总体来看，紫花苜蓿*MsLACS*基因对于干旱胁迫和盐胁迫响应水平整体较高，对冷胁迫响应水平偏低；表达量整体呈先升高后降低的起伏型，在叶片组织中偏高，根组织中较低，干旱和盐胁迫下，多数*MsLACS*基因在叶片中均高表达，胁迫时间段为6 h时，表达量水平整体达到最高。

2.8 MsLACS蛋白互作网络

利用String数据库预测了MsLACS蛋白之间的互作网络(图9)。结果显示，10个MsLACS蛋白之间的互作水平大致一样，各蛋白与其他蛋白互作连线分别有18条，与其他LACS蛋白互作基本一致，相互间有较强互作。

3 讨论

长链酰基辅酶A合成酶，在脂质合成和储存、脂肪酸分解、载体酰化以及角质层角质和蜡质的合成中具有重要的作用，*LACS*基因的研究可以揭示其潜在功能。*LACS*基因数量在不同物种中有所不同，拟南芥[8]、向日葵(*Helianthus annuus*)[24]、山杏(*Prunus sibirica*)[25]、辣椒(*Capsicum annuum*)[26]和大白菜(*Brassica rapa* subsp. *pekinensis*)[27]中分别含有9、13、6、10和13个成员，本研究中，在紫花苜蓿中共鉴定出10个*LACS*基因家族成员，不同物种中鉴定出的*LACS*基因数量不同，可能是因为基因大小或基因复制方式的不同造成的。系统发育分析树将紫花苜蓿*LACS*基因分为5支，与拟南芥LACS家族分类一致，第Ⅰ支包含2个*MsLACS*基因成员，第Ⅱ支有1个*MsLACS*基因成员，第Ⅲ支有3个*MsLACS*基因成员，第Ⅳ支包含1个*MsLACS*基因成员，第Ⅴ支有3个*MsLACS*基因成员。

基于紫花苜蓿MsLACS蛋白保守基序、基因结构和启动子顺式作用元件分析，MsLACS蛋白具有相似基序类型和数量，基因结构简单，仅MsLACS9-1同时含有内含子和外显子。顺式作用元件分析表明，*MsLACS*基因中含有胁迫和激素反应元件，此外还含有光反应元件、应激反应元件、参与有氧缺氧特异性诱导反应元件和昼夜

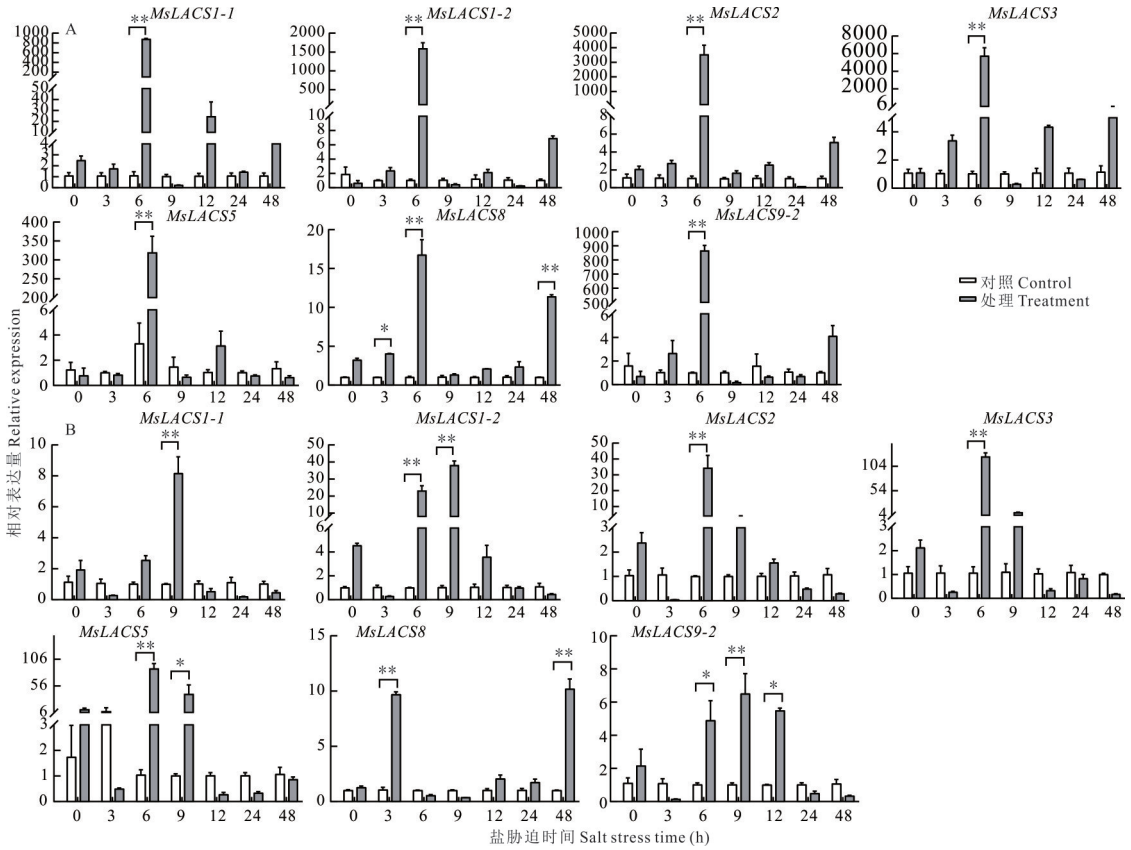

图 8　盐胁迫下紫花苜蓿 *MsLACS* 基因在叶片和根中的表达

Fig. 8　Expression of *MsLACS* gene in leaves and roots of alfalfa under salt stress

节律控制的调控元件等，说明 *MsLACS* 基因可能参与紫花苜蓿生长过程中的激素调节，在非生物胁迫防御调节中具有一定功能，同时也在光合作用、逆境适应机制、有氧无氧呼吸和昼夜生理活动规律调节中发挥作用。

拟南芥 9 个 *AtLACS* 基因功能不同，且具有协同效应，紫花苜蓿 10 个 *MsLACS* 基因含有较多相似基序，均含有 10～12 个基序不等，蛋白互作中，10 个蛋白共同互作，各蛋白与其他蛋白互作连线条数相同，与其他 LACS 蛋白互作基本一致，相互间有较强互作，表明紫花苜蓿 10 个 *MsLACS* 基因可能也具有协同效应。拟南芥 *AtLACS1* 具有催化脂肪酸 C_{16} 活性的功能，*MsLACS1-1* 定位于叶绿体中，叶绿体为光合作用场所，系统进化分析中，*AtLACS1* 和 *MsLACS1-1* 都在第 I 支上，根据与拟南芥同源性，推测 *MsLACS1-1* 可能具有催化脂肪酸活性的功能，*MsLACS1-1*、*MsLACS1-2* 和 *MsLACS2* 在干旱胁迫和盐胁迫时，在叶片组织中大量表达，且基因蛋白互作关系中，互作较强，*MsLACS1-1*、*MsLACS1-2* 和 *MsLACS2* 分别有 10 个相同基序，系统进化分析中和拟南芥同源性较

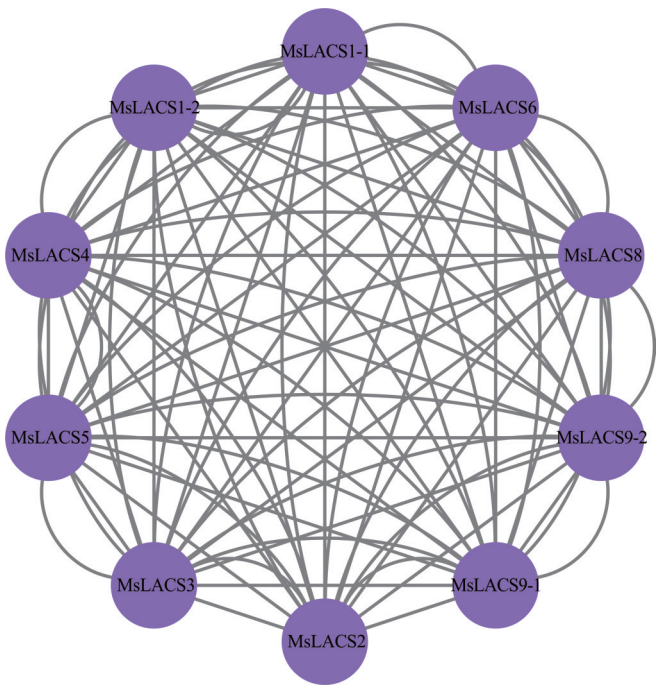

图 9　MsLACS 蛋白互作网络

Fig. 9　MsLACS protein interaction network

高，推测*MsLACS1-1*、*MsLACS1-2*和*MsLACS2*参与叶片角质层的生物合成，在功能上可能也具有一定的重叠性。拟南芥*AtLACS1*和*AtLACS2*在参与叶片角质层的生物合成过程中具有一定的重叠功能，紫花苜蓿LACS蛋白两两互作中，MsLACS2和MsLACS1-1、MsLACS1-2分别有两条连线，表明MsLACS2和MsLACS1-1、MsLACS1-2互作较强。

MsLACS3、*MsLACS5*定位于相同的细胞器，都定位于细胞质中，干旱胁迫和盐胁迫时，在叶片组织中超表达，在保守基序分析中，都含有相同的11个保守基序，系统进化树中都在第Ⅲ分支中，同源性较高，推测*MsLACS3*、*MsLACS*5具有相似功能，*MsLACS3*具有干旱响应元件，推测*MsLACS3*在抵抗非生物胁迫中具有一定作用。拟南芥*AtLACS4*定位于内质网，参与蜡质生物合成和脂质生物合成过程，在从内质网到脂质转运中发挥作用，同时刺激甘油脂质的合成[13-14]，*MsLACS4*定位于细胞核，在第5条染色体与*MsLACS5*串联重复，系统发育分析中，和拟南芥*AtLACS4*都位于第III支，推测*MsLACS4*可能参与植物叶片蜡质或脂质生物合成。*MsLACS6*定位于细胞质，包含多个非生物胁迫响应元件，可能参与非生物胁迫防御调节。

拟南芥*AtLACS8*和*AtLACS9*参与脂质的合成，*MsLACS8*、*MsLACS9-1*、*MsLACS9-2*均定位于叶绿体，具有多个相似基序，系统发育分析中都位于第Ⅴ分支，蛋白互作中，3个蛋白间分别有2条连线，互作性较强，推测*MsLACS8*、*MsLACS9-1*和*MsLACS9-2*可能都参与脂质合成，*MsLACS9-2*在干旱胁迫和盐胁迫下，在叶片组织中超表达，可能*MsLACS9-2*也参与叶片的角质层的合成。拟南芥*AtLACS8*和*AtLACS9*在脂质的合成中具有一定功能上的重叠性，紫花苜蓿MsLACS8和MsLACS9-1、MsLACS9-2也分别有两条连线，表明MsLACS8和MsLACS9-1、MsLACS9-2互作较强。

在辣椒和向日葵的研究中，*LACS*基因在不同时间段和组织中的表达均呈先升后降的趋势[19,21]。紫花苜蓿*MsLACS*基因对于冷、旱、盐胁迫，表达量先升高后降低。在不同的组织中，*MsLACS*基因表达量也不同，叶片组织中*MsLACS*基因表达量较根组织中高很多，主要在叶片组织中超表达。如*MsLACS1-2*基因在干旱胁迫处理和盐胁迫时，在叶片组织中，胁迫时间为6 h时，*MsLACS1-2*均超表达，冷胁迫下表达水平不明显，推测其可能在紫花苜蓿响应干旱和盐胁迫过程中发挥关键作用，在辣椒的研究中，*CaLACS1*基因在NaCl处理12 h时的叶片中显著上调表达；其中*CaLACS2*基因在NaCl胁迫3 h时的根部中表达量最高[21]。大白菜中*LACS*基因高表达同样主要集中在6 h[22]，*MsLACS*基因在不同的胁迫时间段表达也不同，首先基因表达量逐渐上升，主要在6 h时，表达量达到最高，6 h之后，表达量逐渐下降。

本研究利用生物信息学方法对紫花苜蓿*MsLACS*基因进行鉴定，并从系统发育、理化性质、染色体定位、保守基序和基因结构、顺式作用元件、组织特异性表达、蛋白互作网络等方面分析，以及分析*MsLACS*基因在非生物胁迫中的调控表达，可为*LACS*基因在不同物种中的鉴定及非生物胁迫响应的研究提供一定参考价值。

参考文献 References：

[1] Wang Y P, Zeng Y, Luo P. Advances in metabolic engineering of plant fatty acids. Chinese Journal of Oil Crop Science, 1998, 20(4): 88-92.
王幼平，曾宇，罗鹏. 植物脂肪酸代谢工程研究进展. 中国油料作物学报，1998，20(4)：88-92.

[2] Li Q G, Tao Z, Yang Y Z, *et al*. Research progress of long chain acyl-CoA synthetase. China Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2012, 39(6): 137-140.
李庆岗，陶著，杨玉增，等. 长链脂酰CoA合成酶(ACSL)的研究进展. 中国畜牧兽医，2012，39(6)：137-140.

[3] Zhou D, Zhao J Z, Bai Y, *et al*. Research advance in triacylglycerol synthesis, metabolism, and regulation in plants. Journal of Nanjing Agricultural University, 2012, 35(5): 77-86.
周丹，赵江哲，柏杨，等. 植物油脂合成代谢及调控的研究进展. 南京农业大学学报，2012，35(5)：77-86.

[4] Somerville C, Browse J. Plant lipids: Metabolism, mutants, and membranes. Science, 1991, 252(5002): 80-87.

[5] Hills M J, Beevers H. ATPase in lipid body membranes of castor bean endosperm. Plant Physiology, 1986, 82(3): 671－674.

[6] Mukherjee K D. Plant lipases and their application in lipid bio-transformations. Progress Lipid Research, 1994, 33(1/2): 165－174.

[7] Lv J B, Tan X F, Long H X, *et al*. Research progress in the study of plant long-chain acyl-coenzyme A(coA). Journal of Plant Physiology, 2017, 53(7): 1185－1191.
吕佳斌, 谭晓风, 龙洪旭, 等. 植物长链脂酰辅酶A合成酶研究进展. 植物生理学报, 2017, 53(7): 1185－1191.

[8] Shockey J M, Fulda M S, Browse J A. Arabidopsis contains nine long-chain acyl-coenzyme A synthetase genes that participate in fatty acid and glycerolipid metabolism. Plant Physiology, 2002, 129(4): 1710－1722.

[9] Tan X L. Characterization of an *Arabidopsis* long chain fatty acyl-coenzyme A synthetase, which is required for seedling establishment without exogenous sugar. Yangling: Northwest AF University, 2003.
谭小力. 拟南芥长链脂肪酰辅酶A合成酶基因的克隆及功能鉴定. 杨凌: 西北农林科技大学, 2003.

[10] Lv S Y, Song T, Kosma D K, *et al*. *Arabidopsis* CER8 encodes long-chain acyl-CoA synthetase 1 (LACS1) that has overlapping functions with LACS2 in plant wax and cutin synthesis. The Plant Journal, 2009, 59 (4): 553－564.

[11] Trick H N, Finer J J. Sonication-assisted agrobacterium-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue. Plant Cell Reports, 1998, 17(6): 482－488.

[12] Jessen D, Olbrich A, Knüfer J, *et al*. Combined activity of LACS1 and LACS4 is required for proper pollen coat formation in Arabidopsis: LACS activity and pollen coat formation. The Plant Journal, 2011, 68(4): 715－726.

[13] Jessen D, Roth C, Wiermer M, *et al*. Two activities of long-chain acyl-coenzyme A synthetase are involved in lipid trafficking between the endoplasmic reticulum and the plastid in *Arabidopsis*. Plant Physiology, 2015, 167(2): 351－366.

[14] Fulda M, Shockey J, Werber M, *et al*. Two long-chain acyl-CoA synthetases from *Arabidopsis thaliana* involved in peroxisomal fatty acid β-oxidation: Fatty acid activation in peroxisomes of plants. The Plant Journal, 2002, 32(1): 93－103.

[15] Zhao L, Haslam T M, Sonntag A, *et al*. Functional overlap of long-chain acyl-CoA synthetases in *Arabidopsis*. Plant and Cell Physiology, 2019, 60(5): 1041－1054.

[16] Dahlqvist A, Stahl U, Lenman M, *et al*. Phospholipid: Diacylglycerol acyltransferase: An enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(12): 6487－6492.

[17] Visser W F, van Roermund C W, Ijlst L, *et al*. Metabolite transport across the peroxisomal membrane. Biochemical Journal, 2007, 401(2): 365－375.

[18] Zhang C L, Mao K, Zhou L J, *et al*. Genome-wide identification and characterization of apple long-chain acyl-CoA synthetases and expression analysis under different stresses. Plant Physiology and Biochemistry, 2018, 132: 320－332.

[19] Black P N, DiRusso C C, Metzger A K, *et al*. Cloning, sequencing, and expression of the *fadD* gene of *Escherichia coli* encoding acyl coenzyme A synthetase. J Biol Chem, 1993, 267(35): 25513－25520.

[20] Dai H P, Shan C J, Zhao H., *et al*. The difference in antioxidant capacity of four alfalfa cultivars in response to Zn. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2015, 114: 312－317.

[21] Song X, Fang C, Yuan Z Q, *et al*. Long-term alfalfa (*Medicago sativa* L.) establishment could alleviate phosphorus limitation induced by nitrogen deposition in the carbonate soil. Journal of Environmental Management, 2022, 324: 116346.

[22] Li Y J, Ma J W, Li Y Q, *et al*. Effect of nitrogen on the phytoremediation of Cd-PAHs co-contaminated dumpsite soil by alfalfa (*Medicago sativa* L.) and on the soil bacterial community structure. Environmental Science, 2022, 43(10): 4779－4788.

[23] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Methods, 2001, 25(4): 402－408.

[24] Yang J B, Zhang Z, Zhou Z M, *et al*. Cloning and function analysis of a *HaLACS9* gene in *Helianthus annuus* L. Acta Agronomica Sinica, 2023, 49(2): 426－437.
杨佳宝, 张展, 周至铭, 等. 向日葵*HaLACS9*基因的克隆与功能分析. 作物学报, 2023, 49(2): 426－437.

[25] Deng S Y, Xiao Y, Zhang H T, *et al*. Bioinformatics and expression analysis of the *LACS* gene family in *Prunus sibirica*. Molecular Plant Breeding, 2018, 16(6): 1977-1984.
邓舒雅, 肖羽, 张鹤婷, 等. 山杏LACS基因家族生物信息学及表达分析. 分子植物育种, 2018, 16(6): 1977-1984.

[26] Jia Q, Liu Y B, Wang F, *et al*. Identification of LACS family genes in *Capsicum annuum* L. and their response to abiotic stress. Journal of Yangtze University(Natural Science Edition), 2022, 19(6): 117-126.
贾切, 刘亚博, 王飞, 等. 辣椒中LACS家族基因鉴定及其对非生物胁迫的响应. 长江大学学报(自然科学版), 2022, 19(6): 117-126.

[27] Wang R H, Wang S B, Liu S T, *et al*. Identification and expression analysis of LACS family genes in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). Shandong Agricultural Sciences, 2022, 54(6): 1-9.
王荣花, 王树彬, 刘栓桃, 等. 大白菜LACS家族基因鉴定与表达分析. 山东农业科学, 2022, 54(6): 1-9.