

• 药材与资源 •

不同品种灰毡毛忍冬 ACS3 基因克隆、表达及生物信息学分析

刘畅宇¹, 陈 勋¹, 陈 娅¹, 龙雨青¹, 童巧珍¹, 刘湘丹^{1,2*}, 周日宝^{1*}

1. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208

2. 湖南省中药饮片标准化及功能工程技术研究中心, 湖南 长沙 410208

摘要: 目的 分别克隆灰毡毛忍冬野生型与湘蕾型 ACS3 基因, 并进行生物信息学和表达模式分析。方法 筛选灰毡毛忍冬转录组数据库中与 ACS 蛋白同源性较高的 Unigene 序列, 设计引物, 利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 及 RACE 技术对该 Unigene 进行全长克隆; 用生物信息学软件分析蛋白的理化性质、结构域和同源性等特性; 借助 qRT-PCR 检测 1-氨基环丙烷-1-羧酸合酶 (ACS3) 基因在不同品种、不同花期灰毡毛忍冬中表达模式。结果 从灰毡毛忍冬野生品种及湘蕾品种中分别克隆得 Lm-ACS3 (GenBank: MH724196) 及 Lm-XL-ACS3 (GenBank: MH724197), 开放阅读框长度均为 1 452 bp, 编码 483 个氨基酸, 包含保守的 Aminotran_1_2 结构域, 与其他植物的 ACC 合酶具较高相似度; qRT-PCR 结果显示, 野生型 ACS3 基因不同花期间表达差异显著, 从花期 3 开始呈整体明显上升趋势, 湘蕾型中花期间表达差异相对较小。结论 分别克隆得到灰毡毛忍冬野生型和湘蕾型 ACS3 基因, 该基因在 2 品种中具不同表达模式; 推测 ACS3 基因或为导致灰毡毛忍冬不同品种间差异表型的可能功能基因之一, 为进一步验证该基因在调控蕾期长短及花表型的生物学功能提供实验基础。

关键词: 灰毡毛忍冬; 乙烯生物合成; 1-氨基环丙烷-1-羧酸合酶; 基因克隆; 生物信息学; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)09-2154-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.09.022

Cloning, space-time expression and bioinformatics analysis of ACS3 gene from different species of *Lonicera macranthoides*LIU Chang-yu¹, CHEN Xun¹, CHEN Ya¹, LONG Yu-qing¹, TONG Qiao-zhen¹, LIU Xiang-dan^{1,2}, ZHOU Ri-bao¹

1. College of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. Hunan Traditional Chinese Medicine Piece Standardization and Function Technology Research Center, Changsha 410208, China

Abstract: Objective To clone ACS3 gene from wild type and 'Xianglei' cultivar of *Lonicera macranthoides*, respectively, followed by bioinformatics analysis and detection of spatio-temporal expression pattern. **Methods** Unigene sequence which is highly homologous with ACS protein from the transcriptome database of *L. macranthoides* was screened, the primers were designed based on it to amplify the full length of the Unigene by qRT-PCR and RACE techniques; Bioinformatics tools were used to analyze and identify the physicochemical property, conserved domain and gene homology of ACS3 proteins; Finally, qRT-PCR technique was used to detect the gene expression patterns of different species of *L. macranthoides*. **Results** Lm-ACS3 (GenBank: MH724196) and Lm-XL-ACS3 (GenBank: MH724197) were isolated from wild type and 'Xianglei' cultivar of *L. macranthoides*, respectively. The length of open reading frame (ORF) were all 1 452 bp, encoding 483 amino acids, containing the conserved Aminotran_1_2 structural domain, which were highly similar to the ACC synthase of other plants; And qRT-PCR results showed that the expression

收稿日期: 2018-11-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81673546); 国家自然科学基金资助项目 (81203007); 中央引导地方科技发展专项资金项目 (2017XF5044); 湖南省自然科学基金资助项目 (2017JJ3237); 湖南省教育厅资助科研项目 (16B193); 湖南省科技厅重点研发项目 (2017SK2124); 国家中医药管理局中药标准化项目 (ZYBZH-Y-HUN-24); 湖湘中药资源保护与利用 2011 协同创新中心项目 (湘教通 [2015] 351); 湖南中医药大学中药学一流学科项目 (校行科字 [2018] 3 号)

作者简介: 刘畅宇, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药资源与质量。Tel: 18711041445 E-mail: 619751411@qq.com

***通信作者** 刘湘丹, 女, 博士, 副教授, 研究方向为中药资源与质量开发。Tel: (0731)88458233 E-mail: paeonia_dd@126.com

周日宝, 男, 博士, 教授, 研究方向为中药资源质量与开发研究。E-mail: 1057323510@qq.com

quantity of ACS3 gene in wild *L. macranthoides* changed significantly at different blossoming stages, the overall trend was upward from flowering stage 3, while the expression difference between the flowering stages was relatively small in “Xianglei” cultivar. **Conclusion** Lm-ACS3 and Lm-XL-ACS3 gene were separately obtained from *L. macranthoides* and *L. macranthoides* ‘Xianglei’ cultivar, the expression patterns of ACS3 in this two varieties were different; It’s speculated that ACS3 gene might be a possible functional gene that causing different phenotypes of two strains of *L. macranthoides*, it provides theoretical basis for further verifying the biological function of ACS3 gene in regulating flower’s bud duration and phenotype.

Key words: *Lonicera macranthoides* Hand. -Mazz.; ethylene biosynthesis; 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene; gene cloning; bioinformatic analysis; qRT-PCR

灰毡毛忍冬 *Lonicera macranthoides* Hand. -Mazz. 来源于忍冬科 (Caprifoliaceae) 忍冬属 *Lonicera* L., 为中药材山银花主要来源之一, 具清热解毒、疏散风热等功效, 适用于痈肿疔疮、喉痹、丹毒、热毒血痢、风热感冒、温病发热等病症^[1], 亦为提取绿原酸的主要原料^[2-3], 应用于制药、香料、化妆品等领域, 市场开发潜力大。

《中国药典》2015 年版规定, 灰毡毛忍冬以干燥花蕾及初开的花入药^[1]。而灰毡毛忍冬野生株花蕾期仅 3~4 d, 开花后第 2 天即开始凋谢^[4], 其蕾期正值南方梅雨季节, 生产上为人工采摘, 常因不能及时采摘, 造成资源浪费。20 世纪 90 年代末, 有研究者于湖南省溆浦县发现一株灰毡毛忍冬自然变异株, 与野生株比, 表现出花蕾整齐、蕾期长、花冠不展开, 20 余天才开始凋谢等优良性状^[4-6], 基于其特殊优良性状, 研究者对该自然突变株进行无性栽培, 培育出稳定的优良品种, 命名为“湘蕾金银花” *Lonicera macranthoides* ‘Xianglei’ (Lm-XL)^[7]。

研究表明, 内源激素乙烯在植物开花和衰老过程中起关键作用^[8-9]。为探究乙烯是否为导致 2 个品种灰毡毛忍冬差异表型的可能原因, 前期研究^[4]对灰毡毛忍冬野生型和湘蕾型不同花期花样品乙烯释放量进行测定及比较, 结果显示, 两者乙烯生成速率动态变化趋势不同, 内源乙烯差异或为导致两者差异表型的可能原因。乙烯在植物中生物学效应的发挥主要体现在两方面, 即乙烯生物合成和乙烯信号转导^[10]。而乙烯生物合成途径中, 1-氨基环丙烷-1-羧酸合酶 (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase, ACS) 为其中重要限速酶^[11-13], 可催化 S-腺苷蛋氨酸 (S-adenosylmethionine, SAM) 转化成乙烯的直接前体 1-氨基环丙烷羧酸 (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, ACC)^[10,14-15], ACS 酶活性为 ACC 和乙烯调控植物生长发育的基础, 其表达水平直接影响植物体内乙烯的含量^[13,16-17]。

因此, 控制和修饰 ACS 基因, 可能影响乙烯生成, 从而延缓花衰老或凋谢。

目前, 尚未从分子水平上开展对灰毡毛忍冬中乙烯生物合成和转导途径相关基因的研究, 本研究拟克隆灰毡毛忍冬乙烯生物合成途径 ACS 相关基因并对其进行分析。课题组前期对灰毡毛忍冬野生型和湘蕾型进行了转录组测序和分析, 获得多条差异明显基因, 筛选转录组中注释为 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 的 Unigene 片段, 其中 Unigene 5191 基因差异明显, 对其设计引物进行 cDNA 全长克隆、生物信息学及表达分析。以期后续验证该基因在调控蕾期长短及花表型的生物学功能提供实验基础, 为进一步寻找湘蕾品种花蕾期长、花冠不展开的系列优势基因, 培育出花蕾期长、花冠不展开的优良种质提供参考^[18]。

1 材料与试剂

1.1 材料

于 2018 年 5~6 月分别采收野生型及湘蕾型灰毡毛忍冬不同花期花样品, 花蕾用密封袋封好, 液氮速冻, 保存于-80 °C 冰箱。据花蕾发育阶段, 野生型及湘蕾型均分为 7 个花期, 其中野生型分为: 花蕾初期、青绿色花蕾期、绿白色花蕾期、白色花蕾期、白色开花期、金黄色开花期、花朵枯萎期^[4]; 湘蕾型分为: 花蕾初期、青绿色花蕾期、浅绿色花蕾期、绿白色花蕾期、白色花蕾期、黄白色花蕾期、花蕾枯萎期^[4], 分别记为花期 1~7。以上样品均采自湖南中医药大学药植园, 经湖南中医药大学周日宝教授鉴定为野生型及湘蕾型灰毡毛忍冬 *Lonicera macranthoides* Hand. -Mazz. 花样品。

1.2 试剂

多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (Biospin 公司, 杭州博日科技有限公司); RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific 公司, 美国); SMARTer[®] RACE 5'/3' Kit (Clontech 公司,

美国); TranStart[®] Green qPCR SuperMix UDG; pEASY[®]-T1 试剂盒、pEASY[®]-Blunt 试剂盒(全式金生物科技有限公司); 2×Taq Master Mix (Dye)、2×Pfu MasterMix (Dye)、DM 2000 DNA

Marker、CW2302 琼脂糖凝胶回收 DNA 试剂盒(康为世纪科技有限公司), 其余试剂均为国产分析纯(AR); 采用 Primer Premier 5.0 软件设计引物, 委托上海生物工程有限公司合成, 相关引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名称	序列 (5'-3')	引物用途
ACS3-F	GAGAAAGTGAGAGGAGACAGAGTGACAT	核心片段克隆
ACS3-R	AAGCAATAGGCGAGTGAGGAGAGATACG	
ACS3-3'	ACGCAGCCACGGTCTTCAACAAGCCCTC	3'-RACE 扩增 (outer primer)
ACS3-N3'	CGAACAACAACTGCAACCGTGACCTC	3'-RACE 巢式扩增 (inner primer)
ACS3-5'	CATTGAGAAGCCTACGCAAGTCCATCCA	5'-RACE 扩增
V-ACS3-F	GAACTCTTAGCGTCAACTGATTTATTTATTAG	cDNA 全长验证
V-ACS3-R	CGAATCACAGAATCAAAATATTCTCCTTGAA	
q-ACS3-F	TGGTGCCACACCATATTAC	实时荧光定量 PCR
q-ACS3-R	CTTTGTCTAGGCTGCTTCT	
18 S rRNA-F	CTTCGGGATCGGAGTAATGA	内参基因
18 S rRNA-R	GCGGAGTCCTAGAAGCAACA	

2 方法

2.1 灰毡毛忍冬总 RNA 提取与 cDNA 第一链合成

分别取灰毡毛忍冬野生品种及湘蕾品种花样品于液氮中研磨, 根据多糖多酚植物试剂盒法提取总 RNA^[19], 操作按试剂盒说明书进行, 总 RNA 于 -80 °C 保存, 用微量分光光度计检测提取 RNA 的浓度和纯度, 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。

选择高质量 RNA 为模板, 根据 Thermo 有限公司反转录 cDNA 第一链合成试剂盒说明书分别合成野生型与湘蕾型品种 cDNA 第一链, 反转录产物置于 -20 °C 保存, 备用。

2.2 灰毡毛忍冬 ACS3 基因 cDNA 全长克隆

2.2.1 灰毡毛忍冬 ACS3 核心片段克隆 根据前期实验获得的灰毡毛忍冬转录组数据库, 筛选转录组中与 NCBI 中 ACS 基因蛋白同源性较高且 2 品种差异明显的 Unigene 片段, 设计引物 ACS3-F 及 ACS3-R (表 1), 以“2.1”项获得的 cDNA 为模板, 进行 RT-PCR, 目标条带为 1 108 bp。PCR 反应体系 (25 μL): 2×Taq PCR Master Mix 12.5 μL, ddH₂O 9.5 μL, 正向引物及反向引物各 1 μL, cDNA 1 μL。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, 60 °C 复性 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 执行 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。反应结束后, PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶以 150 V, 30

min 条件电泳, 按琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒方法回收。将回收的 PCR 产物按 pEASY[®]-T1 Cloning Kit 试剂盒说明书进行 T 载体连接、转化及过夜平板培养, 筛选白斑并进行菌液 PCR, 将经鉴定的阳性克隆菌液送至上海生工生物工程有限公司进行测序。

2.2.2 灰毡毛忍冬 ACS3 基因 5' 末端序列的获得 参照 SMARTer[®] RACE 5'/3' Kit 说明书方法, 以“2.1”项下提取的灰毡毛忍冬 RNA 为模板合成 5'RACE cDNA。并根据“2.2.1”项测序得到的 ACS3 序列信息, 设计其 5'RACE 特异性引物, 序列见表 1。参照 SMARTer[®] RACE 5'/3' Kit 说明书进行 5'RACE, 5'RACE 反应体系及反应条件如下: PCR-Grade H₂O 15.5 μL, 2×Seq Amp Buffer 25.0 μL, Seq Amp DNA Polymerase 1.0 μL, 混匀并短暂离心, 室温放置, 作为 A 液备用; 5'RACE cDNA 2.5 μL, 5'GSP (特异性引物 ACS3-5' 10 μmol/L) 1 μL, 10×UPM 5 μL, 轻轻混匀, 并短暂离心, 作为 B 液; 将 A 液加入 B 液得到最终 PCR 体系 50 μL。扩增程序: 94 °C 变性 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 5 个循环; 94 °C 变性 30 s, 70 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 5 个循环; 94 °C 变性 30 s, 68 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环。

2.2.3 灰毡毛忍冬 ACS3 基因 3' 末端序列的获得

3'RACE cDNA 合成及 3'RACE 特异性引物设计同“2.2.2”项,前期实验发现采用 1 次 RACE, 3'RACE 条带易出现弥散或拖尾现象,故本研究 3'RACE 采用巢式 PCR (nest PCR)。分别设计 3'RACE 外引物 (outer primer) 及内引物 (inner primer),序列见表 1。参照 SMARTer[®] RACE 5'/3' Kit 说明书进行 3'RACE, 3'RACE 反应体系及反应条件如下。

第 1 轮反应体系:参照“2.2.2”项配制 A 液备用; 3'RACE cDNA 2.5 μ L, 3' Outer GSP (3'外引物 ACS3-3' 10 μ mol/L) 1 μ L, 10 $\times$ UPM 5 μ L, 轻轻混匀,并短暂离心,作为 B 液;将 A 液加入 B 液得到第 1 轮 PCR 体系 50 μ L。随后进行第 1 轮 RACE 扩增,PCR 程序同“2.2.2”项下 5'RACE PCR 程序。得到 1 次 PCR 产物,保存于-20 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

取 3'RACE PCR 1 次产物,以 1:20 用 Tricine-EDTA buffer 稀释,作为巢式 PCR 反应模板。3'RACE 巢式 PCR 反应体系:参照“2.2.2”项配制 A 液备用;经 TE 稀释的 3'RACE PCR 产物 5.0 μ L, 3' Inner GSP (3'内引物 ACS3-N3' 10 μ mol/L) 1 μ L; UPS 1 μ L, 轻轻混匀,并短暂离心,作为 B 液;将 A 液加入 B 液得到巢式 PCR 体系 50 μ L。随后进行巢式 PCR,PCR 扩增程序:94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 68 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 25 个循环。

5'RACE 及 3'RACE PCR 产物检测及回收同“2.2.1”项,载体改用适用于连接末端的 pEASY[®]-Blunt 载体,将回收的 RACE PCR 产物按 pEASY[®]-Blunt Cloning Kit 试剂盒说明书进行载体连接、转化和过夜平板培养,筛选白斑并进行菌液 PCR,将经鉴定的阳性克隆菌液送至上海生工生物工程有限公司测序。

2.2.4 灰毡毛忍冬 ACS3 基因 cDNA 全长序列的拼接及验证 根据已测定的核心片段、5'和 3'端序列及其重叠区域,使用 Contig Express 软件进行序列分析及拼接,获得 ACS3 基因 cDNA 全长序列。根据拼接得到的 cDNA 全长,设计 ACS3 基因全长扩增引物,利用 RT-PCR 验证 ACS3 拼接结果有无错漏,引物分别为 V-ACS3-F 及 V-ACS3-R,见表 1。以“2.1”项得到的 cDNA 为模板,反应体系 50 μ L: 2 $\times$ Pfu MasterMix (Dye) 25 μ L, ddH₂O 19 μ L, cDNA 2 μ L, V-ACS3-F 和 V-ACS3-R 各 2 μ L。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火

30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min, 循环 35 次; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min, 目的条带回收和测序等过程同“2.2.1”,载体选用 Blunt 载体。将验证无误的灰毡毛忍冬 ACS3 cDNA 碱基序列上传至 NCBI,并分别命名。

2.3 灰毡毛忍冬 ACS3 基因生物信息学分析

将序列上传到 NCBI-ORF Finder 平台 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>),查找开放阅读框 (ORF) 并翻译成氨基酸序列。通过在线软件 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 预测蛋白结构,分析目的基因编码蛋白质的氨基酸组成、蛋白质相对分子质量、理论等电点及稳定性等参数;采用 ProtScale 软件 (<https://web.expasy.org/protscale/>) 测定蛋白亲/疏水性;WOLF PSORT (<https://wolfsort.hgc.jp/>) 在线预测蛋白质亚细胞定位情况;TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 进行蛋白质跨膜结构分析;SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>) 预测信号肽;利用 NCBI 的 CDD 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 检索并分析蛋白的保守域;SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 和 SWISS-MODEL (<https://www.swissmodel.expasy.org/>) 软件分别预测分析蛋白质的二级结构及三级结构;通过 NCBI 的蛋白质序列数据库进行 Blastp,筛选出同源性较高的物种,利用 DNAMAN 软件进行氨基酸多重序列比对,MEGA 7 软件构建系统进化树。

2.4 灰毡毛忍冬 ACS3 基因的表达分析

根据拼接得到的野生型与湘蕾型灰毡毛忍冬 ACS3 基因全长序列,设计同样适用于 2 品种 ACS3 基因荧光定量 PCR 的特异性引物 q-ACS3-F 和 q-ACS3-R,见表 1,以 18 S rRNA 为内参基因^[5]。按“2.1”项方法分别提取灰毡毛忍冬 2 品种不同花期花总 RNA,将 RNA 定量至同一浓度,按“2.1”项方法合成 cDNA,在 Bio-Rad CFX96 上进行 qRT-PCR。反应体系 20 μ L: TranStart[®] Green qPCR SuperMix UDG 10 μ L, ddH₂O 8.2 μ L, cDNA 1 μ L, 正向引物和反向引物各 0.4 μ L。反应程序:50 $^{\circ}$ C、2 min, 94 $^{\circ}$ C、10 min; 94 $^{\circ}$ C、5 s, 55 $^{\circ}$ C、15 s, 72 $^{\circ}$ C、10 s, 40 个循环;做熔解曲线分析,每个样品重复 4 次,反应结束后通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计

算基因的相对表达量。

3 结果和分析

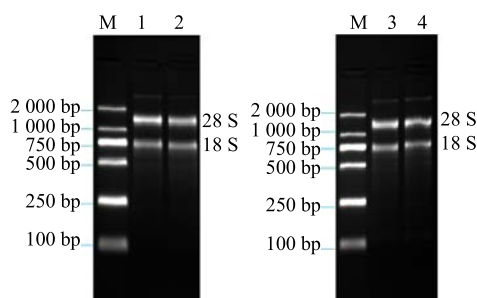
3.1 野生型及湘蕾型灰毡毛忍冬总 RNA 提取

通过微量分光光度计测定提取灰毡毛忍冬花总 RNA, 结果显示 $1.8 < A_{260}/A_{280} < 2.0$, $A_{260}/A_{230} > 2.0$; 琼脂糖凝胶电泳结果见图 1, 由图 1 可见 28 S 和 18 S 条带明显, 28 S 约是 18 S 2 倍亮, 说明 RNA 质量较高, 完整性及纯度较好, RNA 质量符合后续实验要求。

3.2 灰毡毛忍冬 ACS3 全长 cDNA 的获得

通过 qRT-PCR, 野生品种及湘蕾品种均得到长度为 1 108 bp 的 ACS3 核心片段, 琼脂糖凝胶电泳结果见图 2, 通过 DNAMAN 比对, 测序所得的序列与 Unigene 模板序列匹配。

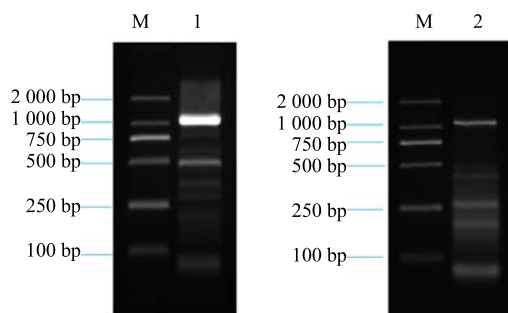
利用表 1 中 RACE 引物分别进行 5'RACE 和



M-Marker 1、2-野生型花蕾总 RNA 3、4-湘蕾型花蕾总 RNA
M-Marker 1 and 2-total RNA of *L. macranthoides* bud 3 and 4-
total RNA of *L. macranthoides* 'Xianglei' bud

图 1 野生型及湘蕾型灰毡毛忍冬花蕾总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Total RNA agarose gel electrophoresis of *L. macranthoides* and *L. macranthoides* 'Xianglei' cultivar



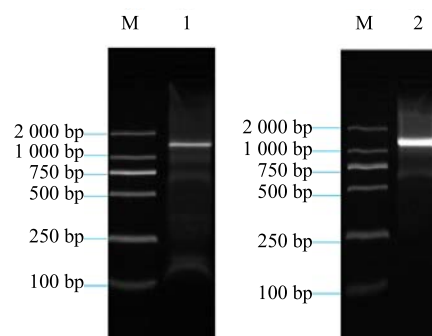
M-Marker 1-野生型 RT-PCR 产物 2-湘蕾型 RT-PCR 产物
M-Marker 1-RT-PCR products of *L. macranthoides* 2-RT-PCR
products of *L. macranthoides* 'Xianglei' cultivar

图 2 野生型及湘蕾型灰毡毛忍冬 ACS3 核心片段 RT-PCR 产物

Fig. 2 Core fragment products of ACS3 gene cloned from *L. macranthoides* and *L. macranthoides* 'Xianglei' cultivar

3'RACE, 得到约 1 280 bp 5'RACE 产物, 与约 1 065 bp 的 3'RACE 产物, 琼脂糖凝胶电泳结果分别见图 3 和图 4; 拼接后得到序列全长分别为 1 993 bp 和 1 994 bp 的野生型及湘蕾型灰毡毛忍冬 ACS3 cDNA 特异性片段。

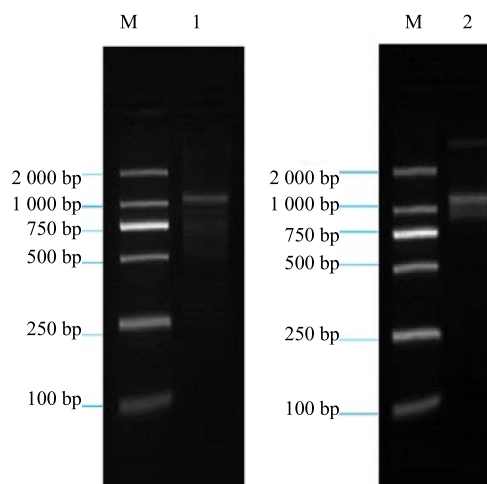
最终利用表 1 中验证引物再次进行 RT-PCR, 对 2 品种灰毡毛忍冬 ACS3 基因进行全长验证, 琼脂糖凝胶电泳结果见图 5, 通过 DNAMAN 比对分析, PCR 产物测序结果与拼接结果一致。



M-Marker 1-野生型 5'RACE 产物 2-湘蕾型 5'RACE 产物
M-Marker 1-5'RACE PCR products of *L. macranthoides* 2-5' RACE
PCR products of *L. macranthoides* 'Xianglei' cultivar

图 3 野生型及湘蕾型灰毡毛忍冬 ACS3 基因 5'RACE PCR 产物

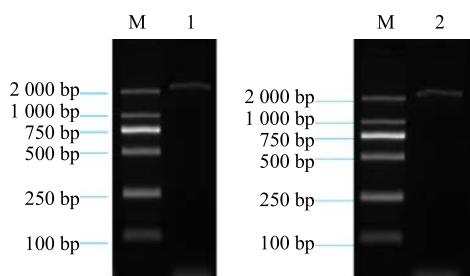
Fig. 3 5'RACE PCR products of ACS3 gene cloned from *L. macranthoides* and *L. macranthoides* 'Xianglei' cultivar



M-Marker 1-野生型 3'RACE 产物 2-湘蕾型 3'RACE 产物
M-Marker 1-3'RACE PCR products of *L. macranthoides* 2-3' RACE
PCR products of *L. macranthoides* 'Xianglei' cultivar

图 4 野生型及湘蕾型灰毡毛忍冬 ACS3 基因 3'RACE PCR 产物

Fig. 4 3'RACE PCR products of ACS3 gene cloned from *L. macranthoides* and *L. macranthoides* 'Xianglei' cultivar



M-Marker 1-野生型全长 cDNA 产物 2-湘蕾型全长 cDNA 产物
M-Marker 1-full-length cDNA products of *L. macranthoides*
2-full-length cDNA products of *L. macranthoides* 'Xianglei' cultivar

图 5 野生型及湘蕾型灰毡毛忍冬全长 cDNA RT-PCR 产物

Fig. 5 Full-length cDNA products cloned from *L. macranthoides* and *L. macranthoides* 'Xianglei' cultivar

3.3 灰毡毛忍冬 ACS3 基因生物信息学分析

3.3.1 灰毡毛忍冬 ACS3 基因序列分析 将获得的野生型及湘蕾型灰毡毛忍冬 ACS3 基因分别命名为 Lm-ACS3 和 Lm-XL-ACS3，并将序列上传至 NCBI，基因登录号分别为 MH724196 和 MH724197，基因全长分别为 1 993 bp 和 1 994 bp，5'端非编码区（UTR）均为 163 bp，3'端非编码区（UTR）分别为 378、379 bp，中间均具 ORF 1 452 bp，编码 483 个氨基酸，有 7 个位点具碱基差异，编码氨基酸 1 个不同，全长序列及编码氨基酸分别见图 6-A、B。

3.3.2 灰毡毛忍冬 ACS3 编码氨基酸理化性质分析 通过分子生物学软件分析可得，Lm-ACS3 及 Lm-XL-ACS3 基因编码的蛋白相似，区别较小。2 品

A

```

1  GAACCTTAGCGTCAACTGATTTTATTTATTTAGTCATTCTGTTGTTCAATTTACAAACATACATCAGTTAAAGCTACCACTTACAATTATT
91  CAACCACTACAAAATCATTCTCTCTCTACAATTTCCATCTTCTCTCTAAATCTTGAAAAATTTCCAAAGCATGAGTTTCATAATGAG
                                     M E F I M R
181  GAACACGCAGCTACTGTCCAAGATAGCAACGAACGATGGGCACGGTGAAAAGTCGCCTTATTTGACGGATGGAAGGCTTATGACAGCGA
7   N T Q L L S K I A T N D G H G E K S P Y F D G W K A Y D S D
271  TCCGTTTCAGCCCTAGAACCAATCTTGCCTGCTAATTCAAATGGGTCTGGCGGAAAATCAGCTTTCCTTTGATTTAATCCAACAATGGGT
37   P F S P R T N P C G V I Q M G L A E N Q L S F D L I Q Q W V
361  CGTAAATCACCAGAGCCTCCATTGCACTGCCGAAGGATCAAAAGACTTCAAGGAAATGCAATTTTCAAGATTATCATGGCTTACC
67   V N H P R A S I C T A E G S K D F K E I A I F Q D Y H G L P
451  AGAGTTTCAGAAATGCCATTGCTAAGTTTATGGAGAAAGTGAGAGGAGACAGAGTGACATTCGACCCCTGACCGGATTGTTATGGCCGGAGG
97   E F R N A I A K F M E K V R G D R V T F D P D R I V M A G G
541  AGCCACCGGAGCAGATGAAATGTTGGCTTTTGGCTGGCTGATCCCGTGGAAGCTTCTTGGTGCCACACCATATTACCTTGGATTGA
127  A T G A H E M L A F C L A D P G E A F L V P T P Y Y G F D
631  TAGAGATTAAAGATGGAGAACGGGTGGAGCTAGTTCCAGTATTGTGACAGCTCCAACAATTCAAGATTACACAAAGAGCCTTAGA
157  R D L R W R T G V E L V P V I C D S S N N F K I T Q R A L E
721  AGCAGCCTACGACAAAGCCAAAGAAATCAACATCAAAAGTAAAGGGCTTGCTCATAACCAACCATCAAAATCCTTTGGGCACAACTTGGGA
187  A A Y D K A K E S N I K V K G L L I T N P S N P L G T I L D
811  CAGAGAAACCTTAACAAATCTAGTAACCTTACAGATGAAAAAATCCACCTTGTATGTGACGAAATATACGACGCCACGGCTTCAA
217  R E T L T N L V T F T D E K N I H L V C D E I Y A A T V F N
901  CAAGCCCTCTTTTGTGAGCATAGCCGAAATAATCAAAACAAACAACTGCAACCGTGACCTCATACATCGTCTATAGCCTCTCCAAAGA
247  K P S F V S I A E I I K Q T N C N R D L I H I V Y S L S K D
991  CATGGGATTCCCGGTTTCAGGTCGGGATTGTCTACTCGTACACGATGCAGTTGTAAGCTGTCGGCTAAATGTCGAGTTTCGGACT
277  M G F P G F R V G I V Y S Y N D A V V N C A R K M S S F G L
1081 AGTTTCTACCCAAACACAACTTTAATAGCATCGATGTTGTCTGACGAATCTTCTTGAGAAATTCATAGCTGAAAGTGGTGAGCGGTT
307  V S T Q T Q L L I A S M L S D E S F L E K F I A E S G E R L
1171 AGCCACAAGGCACACAGCTTACCCGTTGGCCTCGAACAAGTAGGCATTGGGAGCCTAAAGAGCAATGCCGGGCTTTTCTTTGGATGGA
337  A T R H N T F T R G L E Q V G I G S L K S N A G L F F W M D
1261 CTTGCGTAGGCTTCTCAATGAGCCACGGTCGAAGCTGAAATGAAGCTTGGCGCATAATTATCAACGAGGTGAAGCTTAATGTTTCACC
367  L R R L L N E P T V E A E M K L W R I I I N E V K L N V S P
1351 GGGCTCTTCATTTCATTGCTCCGAGCCCGGTTGGTTGAGGTTTGGCTTTCGAAATATGGATGATGAGACCATGATGGTTGCTTTGAGAAG
397  G S S F H C S E P G W F R V C F A N M D D E T M M V A L R R
1441 AATCAGGAACCTTGTGCTTAAGGCCAAGGAAGTGAAGTGGCTTCTAAGAAGCAATGCGCGGTAGTAACCTTCAACTCAGCCTATCGTT
427  I R N F V L K A K E L E V A S K K H C R R S N L Q L S L S F
1531 TAGGAGATTGGACGATATTATGATGACTCCGCTATCTCTCTCACTCGCCTATTGCTTCTCGCCCTCGTTGAGCAACTTAGATAAA
457  R R L D D I M M T P R I S P H S P I A S S P L V R A T *
1621 GATTGTGTTCAAAACTTTTATGCTTATGAGGTATAACATAAATGTGAAAATAGTGATCAACTTTAATTCATCAAAATCATTGTATGTG
1711 ACTAAAAGCTATGTAGTATCGTGTCTTTTTTTTTTCCCTGTATGTTCTGGCGGATGGGAATTTCCAACAAATAGGAGTTTCCCTTCT
1801 TCCTCTGCACATTGTGTTTCTCAATAAGCGTACCGTTGTGTCATTGTAAGCAAAATGCGTGTTCAAATTAACGGTAATTGTGAGAGTTC
1891 AGTCTCTGTAATTAATTAATCATGATTATTACCAAGTTTTTCAAGGAGAATATTTGATTCTGTGATTGCAAAAAA
1981 AAAAAAAAAA
    
```

B	1	GAACCTTAGCGTCAACTGATTTTATTTATTTAGTCATTCGTTGTTCAATTACAAACATACATCAGTTAAAGCTACCACITACAATTATT
	91	CAACCACTACAAAATCATTCTCTCTCTACAATTTTCCATCTTCTCTATAAATCTTGAAATTTTTCCAAGCATGAGITCATAATGAG
		M E F I M R
	181	GAACACGACGCTACTGTCCAAGATAGCAACGATGGGCACGGTGAAAAGTCGCCTTATTTGACGGATGGAAGGCTTATGACAGCGA
	7	N T Q L L S K I A T N D G H G E K S P Y F D G W K A Y D S D
	271	TCCGTTACGCCCTAGAACCAATCCTTGGCGCGTAATTCAAATGGGCTTTCAGAAAATCAGCTTTCCTTTGATTATCAACAATGGGT
	37	P F S P R T N P C G V I Q M G L A E N Q L S F D L I Q Q W V
	361	CGTAAATCACCAAGAGCCTCCATTGCACTGCCGAAGGATCAAAAGACTTCAAGGAAATGCAATTTTCAAGATTATCATGGCTTACC
	67	V N H P R A S I C T A E G S K D F K E I A I F Q D Y H G L P
	451	AGAGTTCAGAAATGCCATTGCTAAGTTTATGGAGAAAGTGAGAGGAGACAGAGTGACATTGACCCCTGACCGGATTTGTTATGCGCGGAGG
	97	E F R N A I A K F M E K V R G D R V T F D P D R I V M A G G
	541	AGCCACCGAGCACATGAAATGTTGGCTTTTGCCTGGCTGATCCCGTGAAAGCTTCTTGGTGCCACACCATATTACCTGGATTGGA
	127	A T G A H E M L A F C L A D P G E A F L V P T P Y Y P G F D
	631	TAGAGATTAAAGATGGAGAACAGGGGTGGAGCTAGTTCAGTTATTTGTGACAGCTCCAACAATTTCAAGATTACACAAAGAGCCTTAGA
	157	R D L R W R T G V E L V P V I C D S S N N F K I T Q R A L E
	721	AGCAGCTACGACAAAGCCAAAGATCCAACATCAAAGTAAAGGGCTTGCTCATAACCAACCCATCAATCCTTTGGGCACAACTTTGGA
	187	A A Y D K A K E S N I K V K G L L I T N P S N P L G T I L D
	811	CAGAGAAACCTTAACAAATCTAGTAACCTTCACAGATGAAAAAACATCCACCTTGATGTGACGAAATATACGACGACCGGTCTTCAA
	217	R E T L T N L V T F T D E K N I H L V C D E I Y A A T V F N
	901	CAAGCCCTCTTTGTGACGATAGCCGAAATAATCGAACAACAACTGCAACCGTGACCTCATACATCGTCTATAGCTCTCCAAAGA
	247	K P S F V S I A E I I E Q T N C N R D L I H I V Y S L S K D
	991	CATGGGATTCGCCGTTTTCAGGGTCGGGATTGTCTACTCGTACAACGATGCAGTTGTAAGCTGTGCCGTAAAATGTGAGTTTCGGACT
	277	M G F P G F R V G I V Y S Y N D A V V N C A R K M S S F G L
	1081	AGTTTACCCAAACACAACCTTTTAATAGCATCGATGTTGTCTGACGAATCTTCTTGGAGAAATTCATAGCTGAAAGTGGTGAGCGGTT
	307	V S T Q T Q L L I A S M L S D E S F L E K F I A E S G E R L
	1171	AGCCACAAGGCACACACGTTACCCGCTGGCCTCGAACAAGTAGGCATTGGGAGCCTAAAGAGCAATGCCGGGCTTTCTTTTGGATGGA
	337	A T R H N T F T R G L E Q V G I G S L K S N A G L F F W M D
	1261	CTTGCGTAGGCTTCTCAATGAGCCACGGTCGAAGCTGAAATGAAGCTTTGGCGCATAATATCAACGAGGTGAAGCTTAATGTTTCACC
	367	L R R L L N E P T V E A E M K L W R I I I N E V K L N V S P
	1351	GGGCTCTTCATTTGCTCCGAGCCCGGTTGGTTGAGGGTTGCTTTGCAATATGGATGATGAGACCATGATGGTTGCTTTGAGAAG
	397	G S S F H C S E P G W F R V C F A N M D D E T M M V A L R R
	1441	AATCAGGAACCTTTGTGCTTAAGGCCAAGGAAGTGAAGTGGCTTCTAAGAAGCATTGCCCGTAGTAACCTTCAACTCAGCCTATCGTT
	427	I R N F V L K A K E L E V A S K K H C R R S N L Q L S L S F
	1531	TAGGAGATTGGACGATATTATGATGACTCCCGGTATCTCTCTCACTCGCCTATTGCTTCTTCCGCCCTCGTTGAGCAACTAGATAAA
	457	R R L D D I M M T P R I S P H S P I A S S P L V R A T *
	1621	GATTTGTTTCAAACTTTTATGCTTATGAGGTATAACATAAATGTGAAAATAGTGATCAACTTTAATTGCATCAAATCATTGTATGTG
	1711	ACTAAAAGCTATGTAGTATCGTGTCTTTTCTTTTCCCTGTATGTTCTGCGGATGGGAATTTCCAACAAATAGGAGTTTCCCTTC
	1801	TTCCTCTGCACATTTGTTTTCTCAATAAGCGTACCGTTGTGTCATTTGAAGCAATGCGGTGTTCAAATTAACGGTAAITGTCAGAGTT
	1891	CAGTTCTGTAAATTAATTAATCATTTGATTATTAACCAAGTTTTTCAAGGAGAATATTTGATTCTGTGATTGAAAAA
	1981	AAAAAAAAAAAAA

方框-起始密码子及终止密码子

Pane-initiation codon and termination codon

图 6 Lm-ACS3 (A) 和 Lm-XL-ACS3 (B) 基因的 ORF 序列及其编码的氨基酸序列

Fig. 6 ORF sequences of Lm-ACS3 (A) and Lm-XL-ACS3 (B) genes and their deduced amino acid sequences

种 ACS3 编码蛋白理化性质见表 2, 蛋白间仅存在极细微差别, Lm-XL-ACS3 较 Lm-ACS3 相对分子质量稍大, 理论等电点较低, 两者不稳定指数均 < 40, 推测 2 种蛋白均属于稳定蛋白; 其中二者含量最高的氨基酸序列均为 Leu (8.9%); 而 ProtScal 分析表明, 灰毡毛忍冬 2 品种 ACS3

亲水/疏水氨基酸分布基本相同, 亲水氨基酸分布大于疏水氨基酸, 且结合表 2 结果中 2 蛋白平均总疏水系数为负, 推测 ACS3 蛋白为亲水性蛋白。对于亚细胞定位、信号肽及跨膜域, 2 个 ACS3 蛋白基本没有区别, 均为非分泌型蛋白, 不具跨膜区域, 定位于叶绿体中的可能性最高。

表 2 灰毡毛忍冬不同品种 ACS3 蛋白理化性质
Table 2 Physicochemical properties of ACS3 protein in different species of *L. macranthoides*

理化性质	Lm-ACS3	Lm-XL-ACS3
分子式	C ₂₄₂₆ H ₃₈₁₃ N ₆₆₅ O ₇₀₇ S ₂₆	C ₂₄₂₅ H ₃₈₀₈ N ₆₆₄ O ₇₀₉ S ₂₆
相对分子质量	54 441.55	54 442.50
理论等电点	7.13	6.58
不稳定系数	37.36	38.35
带正电残基 (Arg+Lys)	56.00	55.00
带负电残基 (Asp+Glu)	56.00	57.00
脂肪系数	85.61	85.61
平均疏水系数	-0.167	-0.166

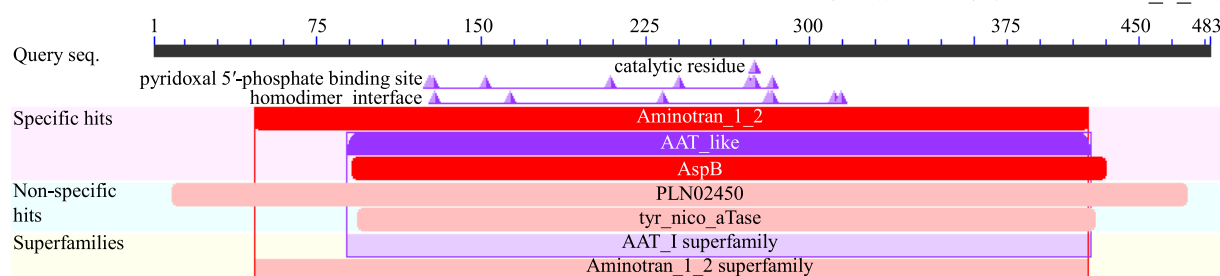


图 7 CDD 预测灰毡毛忍冬 Lm-ACS3 及 Lm-XL-ACS3 蛋白结构域

Fig. 7 Domain of Lm-ACS3 and Lm-XL-ACS3 coding protein predicted by NCBI-CDD

族和 AAT_I 超家族。

通过 SOPMA 在线预测 ACS3 蛋白二级结构，纵观其整体，2 个 ACS3 蛋白脉络大致相同， α 螺旋 (alpha helix) 和随机卷曲 (random coil) 为两者二级结构的主要元件，间次分散于整个蛋白质。其氨基酸序列二级结构组成差别较小，构成成分及比例分别为 Lm-ACS3: α 螺旋占 41.82%、随机卷曲占 34.78%、延伸链 (extended strand) 占 15.73%、 β 转角 (beta turn) 占 7.66%；Lm-XL-ACS3: α 螺旋占 44.93%、随机卷曲占 33.95%、延伸链占 14.08%、 β 转角占 7.04%。

通过 SWISS-MODEL 预测得到灰毡毛忍冬 ACS3 蛋白的三维结构 (图 8)，并可通过在线对该蛋

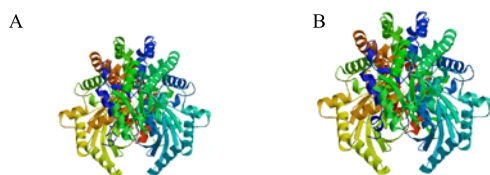


图 8 预测的 Lm-ACS3 (A) 及 Lm-XL-ACS3 (B) 的蛋白三级结构

Fig. 8 Predicted protein tertiary structures of Lm-ACS3 (A) and Lm-XL-ACS3 (B)

3.3.3 灰毡毛忍冬 ACS3 蛋白结构域、二级结构和三级结构预测 利用 NCBI-CDD 在线分析灰毡毛忍冬 2 品种 ACS3 编码蛋白的保守结构域，结果显示 2 品种 ACS3 结构域分析结果相同 (图 7)，均具保守的 Aminotran_1_2 结构域 (注释为 Aminotransferase class I and II)，属于 Aminotran_1_2 superfamily；且非特定匹配 PLN02450 注释为 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase。其蛋白有 3 个特定匹配 (specific hits)：Aminotran_1_2 结构域 (pfam00155，位于 47~427 位)、AAT_like 结构域 (cd00609，位于 89~428 位) 和 AspB 结构域 (COG0436，位于 91~435 位)，以及 2 个可能的超家族 Aminotran_1_2 超家

白质进行三级结构分析，发现 Lm-ACS3 与 Lm-XL-ACS3 蛋白三级结构基本一致，仅存在细微差别，同源二聚体预测结果与数据库中苹果的 ACC 合酶晶体结构一致性分别达 55.08% 及 54.85%，覆盖率均为 88%，氨基酸序列范围为 11~431 位，注释为 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase。

3.3.4 灰毡毛忍冬 ACS3 同已知 ACS 氨基酸序列同源性及多序列比对 将 Lm-ACS3 及 Lm-XL-ACS3 编码的氨基酸分别与其他植物 ACS 氨基酸经 NCBI-Blastp 进行比对，两者同源性比对结果相似，结果表明，与烟草 *Nicotiana tabacum* L. (NP_001313149.1)、紫草 *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc. (ACX71871.1)、葡萄 *Vitis vinifera* L. (XP_002278489.2)、茶 *Camellia sinensis* L. (ABM88785.1)、苹果 *Malus domestica* Borkh (NP_001280870.1)、枇杷 *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. (ACT54524.2)、紫花风铃木 *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex. DC) Mattos (PIM99848.1) 等同源性达 74%~77%。运用 DNAMAN 对 Lm-ACS3 及 Lm-XL-ACS3 和上述植物 ACS 蛋白进行多序列比对，结果如图 9 所示，总相似度达 81.98%。

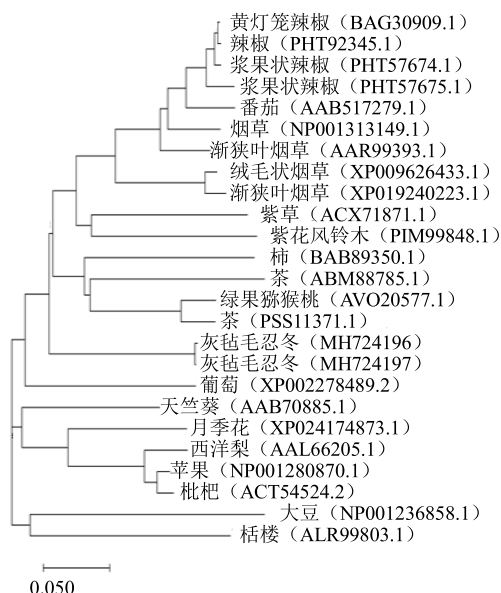


图 10 灰毡毛忍冬 ACS3 蛋白与多种植物 ACS 蛋白系统进化树

Fig. 10 Phylogenetic tree of Lm-ACS3 and Lm-XL-ACS3 with ACS protein from other plants

系最近，聚为一小类。

3.4 灰毡毛忍冬 ACS3 基因在不同花期中表达模式

利用 qRT-PCR 检测 ACS3 基因在灰毡毛忍冬 2 品种不同花期中表达情况，结果见图 11。ACS3 基因在野生型与湘蕾型灰毡毛忍冬花开放衰老过

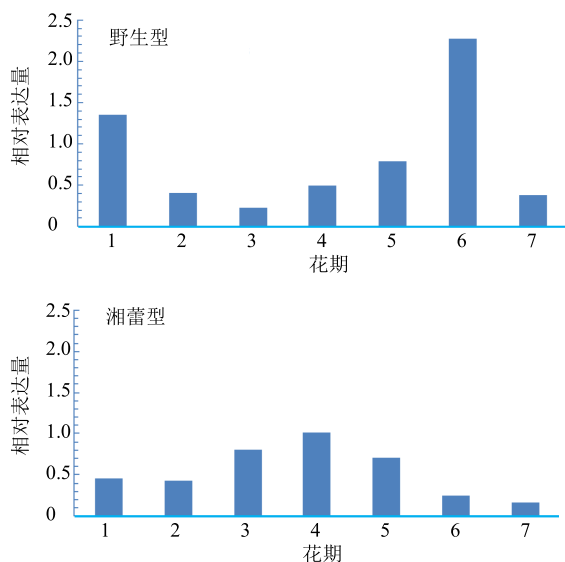


图 11 ACS3 基因在野生品种及湘蕾品种不同花期中表达模式

Fig. 11 Expression patterns of ACS3 in different flowering stages of *L. macranthoides* and *L. macranthoides* 'Xianglei' cultivar

程中具有不同的表达模式和变化规律。在灰毡毛忍冬野生品种不同花期表达量差异明显，变化较显著；湘蕾品种表达差异相对较小，变化较平缓。整体来看，野生品种 ACS3 基因花期 2~5 表达相对较低，从花期 3 开始 ACS3 表达量呈逐渐上升趋势，直至花期 6 达到顶峰，增幅达显著水平，到花期末期（枯萎期）ACS3 表达量骤降；而在湘蕾品种中呈较缓和先升后降趋势，花期 4 表达量相对最高，但各花期间表达差异相对野生品种明显较小。

4 讨论

因山银花药用价值高，价格远低于金银花，部分中成药处方中将金银花更改为山银花入药。灰毡毛忍冬作为山银花的主要来源，其野生株蕾期短、易凋谢，不易采摘等缺陷是灰毡毛忍冬生产中亟待解决的问题，若能延长其蕾期将带来巨大的经济价值。其突变株湘蕾品种蕾期长、花冠不展开等优良特性的出现为灰毡毛忍冬的开发利用打开了新思路，探究湘蕾品种优良表型的根本原因，对灰毡毛忍冬新品培育具有积极的促进作用和重要的研究意义。

本研究通过对灰毡毛忍冬野生品种与湘蕾品种乙烯生物合成途径中 ACS 基因进行研究，分别克隆获得 Lm-ACS3 和 Lm-XL-ACS3，通过序列与蛋白分析，两者相似度非常高，全长 cDNA 分别为 1 993 bp 与 1 994 bp，均编码 483 个氨基酸，7 个位点具碱基差异，编码氨基酸仅 1 个不同，NCBI-CDD 显示，两者结构域相同，均具保守的 Aminotran_1_2 结构域与 AAT_like 结构域，与文献中其他植物 ACS 基因编码的保守结构域相同^[20-23]，且非特定匹配 PLN02450（1-amino cyclopropane-1-carboxylate synthase）E 值达到 0，表示两者为目的氨基酸。同时 Lm-ACS3 和 Lm-XL-ACS3 的蛋白结构和理化性质虽存在细小差别，但相似度非常高，两者均为稳定的亲水蛋白，二级结构均以 α 螺旋和随机卷曲为主，仅百分比存在细微差别。通过进化树分析，可见灰毡毛忍冬 Lm-ACS3 和 Lm-XL-ACS3 归属于一小类，亲缘性最高，而其他亲缘性较近的植物除猕猴桃、茶和葡萄外，均具双子叶合瓣花特征，与灰毡毛忍冬的特征较为相符，其中葡萄与转录组中筛选的模板 Unigene 5191 注释结果相同。

前期研究结果^[4]表明，灰毡毛忍冬野生型与湘蕾型内源乙烯生成速率动态变化趋势具差异，其乙烯生成动态变化规律与本研究 ACS3 基因在不同品

种灰毡毛忍冬中表达模式具一定相似性：野生品种乙烯释放速率从花期 4 逐渐上升，花期 6 剧烈上升，花期 7 到达峰值，而本研究 Lm-ACS3 表达量从花期 3 始呈逐渐上升趋势，花期 5~6 跃变明显，花期 6 表达量达最高值；而湘蕾品种乙烯释放速率变化不明显，整体呈缓慢上升趋势，与 Lm-XL-ACS 在不同花期间表达量变化较平缓较为相似。2 品种 ACS3 表达量上升均在乙烯释放速率提高之前，总体趋势不完全相同，这表明 ACS3 表达量提高可能是乙烯产生的前提条件之一，且乙烯不完全受 ACS3 基因调控。2 品种花蕾末期表达量均下降，可能与样品枯萎、细胞活性不高、ACS mRNA 在植物组织内不稳定、极易分解有关^[24]。结合灰毡毛忍冬乙烯生成动态变化规律与时空表达结果推测：ACS3 的分子表达特性差异可能为导致 2 品种灰毡毛忍冬乙烯生成类型差异原因之一。

因植物花朵开放衰老是一个影响因素众多，多基因家族间互作的复杂植物生理过程。ACS3 基因是否是导致灰毡毛忍冬品种间表型差异的功能基因还需进一步进行功能验证。本研究为后续确定 ACS3 基因功能提供了实验基础，为探明灰毡毛忍冬湘蕾品种蕾期长等优良表型分子原因，以期为培育灰毡毛忍冬优良种质提供了参考依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 陶湘辉. 灰毡毛忍冬绿原酸提取分离技术研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2008.
- [3] 童巧珍, 周日宝, 贺又舜, 等. 灰毡毛忍冬花蕾中绿原酸和咖啡酸的含量测定 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2004, 6(2): 61-63.
- [4] 孙梦姗, 周日宝, 彭晓丹, 等. 灰毡毛忍冬不同品种开花时期内源乙烯动态变化的研究 [J]. 中成药, 2013, 35(9): 1969-1972.
- [5] 蔡嘉洛, 朱贻霖, 谢舒平, 等. 灰毡毛忍冬内参基因筛选和 Mads-box 家族基因 AGL15 的时空表达分析 [J]. 中草药, 2016, 47(15): 2727-2733.
- [6] 徐玉琴, 王 珊, 刘湘丹, 等. 灰毡毛忍冬花蕾总 RNA 提取方法的研究 [J]. 中医药导报, 2015(24): 31-34.
- [7] 彭美晨, 徐玉琴, 王 珊, 等. 灰毡毛忍冬 Lm-XL-AP1 基因克隆、生物信息学和时空表达分析 [J]. 中草药, 2018, 49(7): 1652-1660.
- [8] 李球红. FYF 基因的克隆及转化桂花和大岩桐 [D]. 杭州: 杭州师范大学, 2015.
- [9] 孙申申, 温秀萍, 杨菲颖, 等. ‘云香’水仙 ACC 合成酶基因 NtACS1 的克隆及遗传转化 [J]. 西北植物学报, 2017, 37(2): 250-257.
- [10] Larsen P B. Mechanisms of ethylene biosynthesis and response in plants [J]. *Essays Biochem*, 2015, 58(1): 61-70.
- [11] 刘进平. 乙烯生物合成关键酶基因研究进展 [J]. 热带农业科学, 2013, 33(1): 51-57.
- [12] 石海燕, 张玉星. 高等植物 ACC 合成酶基因的克隆及其表达调控的研究进展 [J]. 中国农学通报, 2012, 28(9): 160-162.
- [13] 吕淑芳, 江 静. 拟南芥乙烯合成酶 ACS 基因家族研究进展 [J]. 生物技术通报, 2014(11): 7-13.
- [14] Bakshi A, Shemansky J M, Chang C, *et al*. History of research on the plant hormone ethylene [J]. *J Plant Growth Regul*, 2015, 34(4): 809-827.
- [15] Adams D O, Yang S F. Ethylene biosynthesis: Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76(1): 170-174.
- [16] Wen C K. *Ethylene in Plants* [M]. Dordrecht: Springer, 2015.
- [17] 曾娜霞, 胡姗姗, 郝庆林, 等. 罗汉果乙烯合成关键酶基因 SgACS3 的克隆及表达分析 [J]. 农业生物技术学报, 2018, 26(5): 784-792.
- [18] 易刚强, 蔡嘉洛, 朱贻霖, 等. 灰毡毛忍冬 MADS-box 基因家族 AGL15 基因的克隆、生物信息学和表达分析 [J]. 中草药, 2016, 47(4): 640-647.
- [19] 刘湘丹, 徐玉琴, 王 珊, 等. 适用于基因全长克隆的灰毡毛忍冬不同器官总 RNA 提取方法筛选 [J]. 湖南中医药大学学报, 2015, 35(12): 60-63.
- [20] 董 晨, 李伟才, 张 纯, 等. 香蕉 ACS 基因家族的系统进化分析 [J]. 分子植物育种, 2017, 15(2): 425-432.
- [21] Shi H, Wang Y, Qi A, *et al*. PpACS1b, a pear gene encoding ACC synthase, is regulated during fruit late development and involved in response to salicylic acid [J]. *Sci Hortic*, 2013, 164: 602-609.
- [22] 曾娜霞, 胡姗姗, 周 琼, 等. 罗汉果乙烯合成酶 SgACS1 基因的克隆与表达分析 [J]. 分子植物育种, 2017, 15(3): 821-832.
- [23] 翟建盛. 葡萄 ACS 家族基因的克隆及表达分析 [D]. 大连: 辽宁师范大学, 2012.
- [24] 李 玲. 文心兰乙烯代谢相关基因克隆与表达及 ACO 功能验证 [D]. 福州: 福建农林大学, 2014.