

石蒜 1-氨基环丙烷-1-羧酸合酶基因 *LrACS* 的克隆及功能鉴定

樊雅婷, 李雪纯, 李晓丹^①, 汪仁^①

[江苏省中国科学院植物研究所(南京中山植物园)江苏省植物资源研究与利用重点实验室, 江苏 南京 210014]

摘要: 为了解 1-氨基环丙烷-1-羧酸合酶(ACS)基因在石蒜(*Lycoris radiata* (L'Hér.) Herb.) 乙烯合成中的作用, 对石蒜 ACS 基因 *LrACS* 进行了克隆, 并通过系统进化树和氨基酸序列比对分析明确 *LrACS* 与其他同源蛋白的进化关系。利用亚细胞定位分析 *LrACS* 在细胞中的定位, 对 *LrACS* 重组蛋白进行体外活性检测, 并利用实时荧光定量逆转录 PCR(qRT-PCR)分析不同生长时期 *LrACS* 的组织特异性表达。结果显示:*LrACS* 的开放阅读框长度为 1 473 bp, 编码 490 个氨基酸。*LrACS* 的理论相对分子质量为 54 954.97, 理论等电点为 pI 8.21。系统进化树分析结果表明 *LrACS* 与忽地笑(*Lycoris aurea* (L'Hér.) Herb.) *LaACS* 的亲缘关系最近, 均属于 I 型 ACS 蛋白。亚细胞定位结果显示 *LrACS* 主要定位于细胞质基质。体外活性检测结果证实 *LrACS* 重组蛋白能够催化 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)生成 1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)。qRT-PCR 分析结果显示:*LrACS* 在花期和叶期的石蒜各组织中均有表达, 但其表达具有组织特异性, 其中, 花期花瓣中 *LrACS* 的相对表达量极显著 ($P < 0.01$) 高于根、鳞茎、花茎, 叶期根中 *LrACS* 的相对表达量极显著高于鳞茎和叶。综上所述, *LrACS* 主要定位于细胞质基质并在石蒜不同生长时期行使催化 SAM 生成 ACC 的功能。

关键词: 石蒜; 1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC); 1-氨基环丙烷-1-羧酸合酶(ACS); 亚细胞定位; 酶活; 功能鉴定

中图分类号: Q785; Q943.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2024)05-0074-09

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2024.05.07

Cloning and functional identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene *LrACS* in *Lycoris radiata* FAN Yating, LI Xuechun, LI Xiaodan^①, WANG Ren^① [Jiangsu Key Laboratory for the Research and Utilization of Plant Resources, Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences (Nanjing Botanical Garden Mem. Sun Yat-Sen), Nanjing 210014, China], *J. Plant Resour. & Environ.*, 2024, 33(5): 74-82

Abstract: To understand the role of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase (ACS) gene in ethylene synthesis of *Lycoris radiata* (L'Hér.) Herb., the ACS gene of *L. radiata* namely *LrACS* was cloned, and the evolutionary relationship between *LrACS* and other homologous proteins was clarified through phylogenetic tree and amino acid sequence alignment analysis. The location of *LrACS* in the cell was determined by using subcellular localization, *in vitro* activity assay was performed for the *LrACS* recombinant protein, and the tissue-specific expression of *LrACS* at different growth stages was analyzed by using real-time fluorescent quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR). The results show that the length of open reading frame of *LrACS* is 1 473 bp, encoding 490 amino acids. The theoretical relative molecular mass of *LrACS* is 54 954.97, and its theoretical isoelectric point is pI 8.21. The phylogenetic tree analysis result shows that *LrACS* has the closest genetic relationship with *LaACS* in *Lycoris aurea*

收稿日期: 2024-05-24

基金项目: 江苏省植物资源研究与利用重点实验室基金项目(JSPKLB202213)

作者简介: 樊雅婷(1998—), 女, 山西太原人, 硕士研究生, 主要从事植物生物化学和分子生物学方面的研究。

^①通信作者 E-mail: lixiaodan@cnbg.net; rwang@cnbg.net

引用格式: 樊雅婷, 李雪纯, 李晓丹, 等. 石蒜 1-氨基环丙烷-1-羧酸合酶基因 *LrACS* 的克隆及功能鉴定[J]. 植物资源与环境学报, 2024, 33(5): 74-82.

(L'Hér.) Herb., and they are both of type I ACS proteins. The subcellular localization result shows that *LrACS* is mainly localized in the cytoplasmic matrix. The *in vitro* activity assay result confirms that the *LrACS* recombinant protein can catalyze the conversion of *S*-adenosylmethionine (SAM) to 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC). The qRT-PCR analysis result shows that *LrACS* is expressed in all tissues of *L. radiata* at the flowering stage and leaf stage, but its expression exhibits tissue specificity, in which, the relative expression of *LrACS* in petals at the flowering stage is extremely significantly ($P < 0.01$) higher than those in roots, bulbs, and flowering stems, and the relative expression of *LrACS* in roots at the leaf stage is extremely significantly higher than those in bulbs and leaves. In conclusion, *LrACS* is mainly localized in the cytoplasmic matrix and functions to catalyze the conversion of SAM to ACC at different growth stages in *L. radiata*.

Key words: *Lycoris radiata* (L'Hér.) Herb.; 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC); 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase (ACS); subcellular localization; enzyme activity; functional identification

石蒜 [*Lycoris radiata* (L'Hér.) Herb.] 为石蒜科 (Amaryllidaceae) 石蒜属 (*Lycoris* Herb.) 植物, 又称彼岸花、曼珠沙华, 原仅分布于亚洲, 后引入至非洲和北美洲^[1]。石蒜作为东亚常见的园林观赏植物, 冬可赏叶, 秋可赏花, 花期 8 月至 9 月, 其鳞茎中含有加兰他敏等 10 余种石蒜科生物碱, 具有重要的药用价值^[2]。

乙烯作为相对分子质量最小的植物激素, 具有简单的 C_2H_4 结构, 以气体形式存在于自然界, 同时广泛存在于植物的整个生命周期。乙烯作为调节植物生长发育和植物衰老的重要内源激素, 参与种子萌发、开花、器官衰老与脱落、果实成熟、性别分化以及生物胁迫和非生物胁迫响应等生理过程。作为一种较早被发现的植物激素, 乙烯的信号转导通路是目前研究的较为清楚的通路之一^[3-5]。在模式植物拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.] 中, 乙烯有 5 个受体, 且均定位在内质网膜上^[6-7]。

在被子植物中, 乙烯的生物合成反应被广泛研究^[8]。乙烯在植物体内的生物合成途径分为 3 步: 第 1 步, 甲硫氨酸在甲硫氨酸腺苷转移酶的催化下转化为 *S*-腺苷甲硫氨酸 (SAM); 第 2 步, 1-氨基环丙烷-1-羧酸合酶 (ACS) 将 SAM 转化为 1-氨基环丙烷-1-羧酸 (ACC)^[9-10]; 第 3 步, ACC 被 1-氨基环丙烷-1-羧酸氧化酶 (ACO) 催化生成乙烯^[11-12]。此外, ACS 还受翻译后调控, 例如乙烯合成负调控因子参与的泛素介导的 ACS 的降解过程^[13-14]。作为 SAM 转化为乙烯途径的限速酶, ACS 的诱导和激活受环境因子的影响, ACS 活性直接影响植物体内乙烯的产生速率。已有研究表明: 石蒜和换锦花 (*Lycoris sprengeri* Comes ex Baker) 在花芽分化期被乙烯利处理后, 二者休眠鳞茎的生化特性, 包括可溶性糖含量、可溶性蛋

白质含量以及核酸含量均有所改变^[15]。此外, 乙烯利处理鳞茎后, 石蒜叶片中叶绿素和类胡萝卜素的含量也随着处理浓度的增加呈下降趋势^[16]。但这些研究都着眼于乙烯或乙烯利直接作用于石蒜科植物, 而不是乙烯合成途径中的关键限速酶 ACS。鉴于此, 本研究聚焦于石蒜 ACS 基因, 对其进行了克隆和生物信息学分析, 并进一步分析了石蒜 ACS 蛋白的亚细胞定位、在原核体系中的表达及 ACS 基因在石蒜各组织中的特异性表达, 以期了解石蒜 ACS 基因在石蒜乙烯信号通路中的功能, 为研究乙烯信号通路参与石蒜属植物生理过程的机制探索提供一定的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试石蒜植株和野生型拟南芥 (Col-0) 种子均来自江苏省中国科学院植物研究所分子实验室。分别于石蒜花期 (9 月) 和叶期 (3 月) 取完整植株 3 或 4 株, 分组织 (花期的根、鳞茎、花茎、花瓣, 叶期的根、鳞茎、叶) 混合、洗净、分装后液氮速冻, 然后置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存、备用。

1.2 方法

1.2.1 基因克隆 使用天根生化科技 (北京) 有限公司的多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒提取石蒜不同组织的总 RNA, 使用 TaKaRa PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒 (日本 TaKaRa 公司) 反转录合成 cDNA。根据 GenBank 中得到的拟南芥 *AtACS* 序列, 在石蒜属植物忽地笑 [*Lycoris aurea* (L'Hér.) Herb.] 转录组测序数据中, 通过本地 blast 筛选到忽地笑 *LaACS* 片段, 根据 *LaACS* 序列设计简

并引物(正向引物序列为 5'-ATGGGATTYCCTRTG ARCAAC-3',反向引物序列为 5'-TTAGGTAGYAGY TGGAYGAGGG-3'),使用高保真聚合酶 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)进行 PCR 扩增;扩增产物经回收、连接和转化后挑取阳性克隆送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序^[17]。

1.2.2 序列分析 利用 ExPASy 在线工具(https://web.expasy.org/compute_pi/)计算石蒜 ACS 蛋白的理论等电点、理论相对分子质量;利用 SignalP 软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>)预测信号肽;利用 TMHMM 在线软件(<http://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>)预测跨膜结构;利用 SOPMA 在线工具(http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)预测二级结构;利用 SWISS-MODEL 在线工具(<http://swissmodel.expasy.org>)预测三级结构;利用 PROSITE 数据库(<http://prosite.expasy.org>)预测功能结构;利用 MEGA 7.0 软件中 Neighbor-joining(NJ)法,基于石蒜 ACS 蛋白与其他植物 ACS 蛋白的氨基酸序列构建系统进化树;利用 NCBI 网站的 blastp 程序(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行序列比对。

1.2.3 亚细胞定位 根据已获得的石蒜 ACS 基因的编码序列(CDS)和带有绿色荧光蛋白(GFP)的载体 pAN580 的序列设计引物(正向引物序列为 5'-AAGTC CGGAGCTAGCTCTAGAGGATTCCTGTGAGCAACCA-3',下划线示 *Xba* I 酶切位点;反向引物序列为 5'-GCCCTTGCTCACCATGGATCCGGTAGTAGTGTGGATG AGGG-3',下划线示 *Bam*H I 酶切位点),使用高保真聚合酶 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 进行 PCR 扩增。使用 ClonExpress® II One Step Cloning Kit 试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)将 PCR 产物连入 pAN580 载体的多克隆位点,转化至作者所在实验室保存的大肠杆菌感受态细胞 DH5 α ,挑选阳性克隆送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。细胞质基质 Marker (AtGAPC-mCherry)和内质网 Marker (mCherry-HDEL)为本实验室保存,具体构建过程参照 Sun 等^[18]的方法。参照 Wu 等^[19]的亚细胞定位方法,进行拟南芥原生质体的制备和转染,将构建好的 pAN580-LrACS-GFP 重组质粒和 pAN580-GFP 空载体质粒转化到拟南芥原生质体中,最后,通过 LSM900 激光共聚焦显微镜

(德国 Zeiss 公司)观察原生质体的荧光情况。

1.2.4 蛋白质体外活性检测

1.2.4.1 石蒜 ACS 基因在原核系统中的表达及总蛋白质提取 以石蒜 cDNA 为模板,使用特异性引物(正向引物序列为 5'-CCGCGTGGATCCCCGGAATTC GGATTCCTGTGAGCAACCA-3',下划线示 *Eco*R I 酶切位点;反向引物序列为 5'-GTCACGATGCGGCCG CTCTGAGTTAGGTAGCAGTGTGGATGA-3',下划线示 *Xho* I 酶切位点)和高保真聚合酶 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 进行石蒜 ACS 基因序列的扩增,使用同样的限制性内切酶将 pGEX-4T-1 载体进行酶切,通过 ClonExpress® II One Step Cloning Kit 试剂盒对酶切后的 pGEX-4T-1 载体和目标片段进行同源重组。随后将其转化至大肠杆菌感受态细胞 DH5 α ,挑选阳性克隆送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。测序结果验证序列正确后,转化至作者所在实验室保存的大肠杆菌 BL21(DE3)中。

取经 0.1 mmol · L⁻¹ 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导的转重组质粒和转空载体质粒(对照)的菌液各 50 mL,分别于 4 °C、10 000 r · min⁻¹ 离心 3 min,加入 20 mL 磷酸盐缓冲液 NTA-0(含 20 mmol · L⁻¹ tris-HCl、0.5 mol · L⁻¹ NaCl、2 mL 甘油,pH 7.8)重悬菌体,再加入 10 mL 1 mmol · L⁻¹ 苯甲基磺酰氟-异丙醇混合溶液,然后将重悬的菌体置于小烧杯中,于冰水浴超声(功率 500 W)破碎 30 min 左右,直至菌液澄清透亮,于 4 °C、12 000 r · min⁻¹ 离心 30 min,分别得到含石蒜 ACS 重组蛋白溶液和对照溶液,备用^[20]。

1.2.4.2 石蒜 ACS 重组蛋白体外活性检测体系构建和 ACC 检测 参照李剑峰等^[21]的方法构建石蒜 ACS 重组蛋白活性检测体系,共设置 4 组实验,第 1 组和第 2 组分别含石蒜 ACS 重组蛋白溶液和对照溶液,其他反应条件相同;第 3 组含石蒜 ACS 重组蛋白溶液但不含底物 SAM,其他反应条件与第 1 组相同;在第 1 组的基础上,第 4 组添加甲醇对石蒜 ACS 重组蛋白进行变性处理,其他反应条件与第 1 组相同。每组实验 3 次重复,并重复发酵 3 次以排除系统误差。采用高效液相色谱(HPLC)法^[22]检测反应产物中的 ACC 和 SAM。

1.2.5 基因表达分析 采用实时荧光定量逆转录 PCR(qRT-PCR)检测不同生长期石蒜不同组织中 *LrACS* 基因的表达情况,每个组织设置 5 个重复样本,每个样本重复实验 3 次。选择 *Tip41*(GenBank 登

录号 AT4G34270) 作为内参基因(正向引物序列为 5'-GCAACCATCCAAAGTTTAACTGCT-3', 反向引物序列为 5'-AATGTGCAAGCAGGGCTAGTAA-3')。根据石蒜 ACS 基因序列设计引物(正向引物序列为 5'-GCAACCATCCAAAGTTTAACTGCT-3', 反向引物序列为 5'-AATGTGCAAGCAGGGCTAGTAA-3') 进行 qRT-PCR, 分析检测 *LrACS* 基因在花期和叶期不同组织的表达量。反应体系总体积 15.0 μL , 包含 cDNA 模板 2.0 μL , SYBR Green Master Mix 7.5 μL , 正向和反向引物各 0.1 μL , 无菌水 5.3 μL 。反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 20 s, 共 40 个循环。PCR 程序结束后, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法^[23], 计算目标基因的相对表达量。

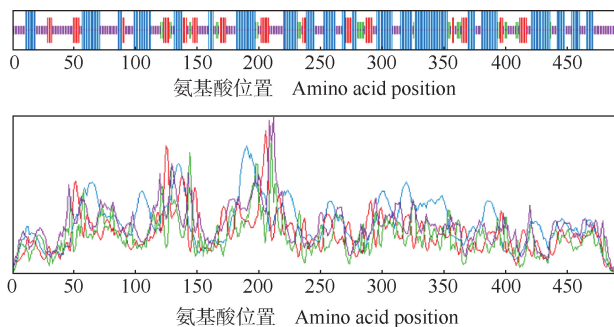
1.3 数据统计和分析

利用 WPS Office 软件对实验数据进行统计, 利用 GraphPad Prism 9.0.0 软件对数据进行差异显著性分析(t 检验)。

2 结果和分析

2.1 *LsACS* 基因克隆及其生物信息学分析

石蒜 *LrACS* 的开放阅读框长度为 1 473 bp, 编码 490 个氨基酸。预测结果显示: *LrACS* 的理论相对分子质量为 54 954.97, 理论等电点为 pI 8.21; 该蛋白位于细胞质基质, 且为非跨膜蛋白。通过 SOPMA 在线工具预测, *LrACS* 氨基酸序列的二级结构包含 43.27% 的 α 螺旋、13.27% 的 β 折叠、6.53% 的 β 转角和 36.94% 的无规卷曲(图 1)。通过 SWISS-MODEL 在



—: α 螺旋 α -helix; —: β 折叠 β -sheet; —: β 转角 β -turn; —: 无规卷曲 Random coil.

图 1 石蒜 *LrACS* 二级结构预测

Fig. 1 Secondary structure prediction of *LrACS* in *Lycoris radiata* (L'Hér.) Herb.

线工具进行同源建模, 预测 *LrACS* 的三级结构, 以苹果 (*Malus pumila* Mill.) ACS 蛋白 (SMTL ID: 1m4n.1) 的结构为模板, 序列相似度为 54.46%, *LrACS* 由 2 个相同亚基的二聚体组成, 酶活中心的反应位点位于 2 个亚基中间(图 2)。

2.2 *LrACS* 的系统进化分析和氨基酸序列比对

利用 MEGA 7.0 软件构建石蒜 *LrACS* 与其他植物 ACS 蛋白的系统进化树(图 3)。结果显示: 石蒜

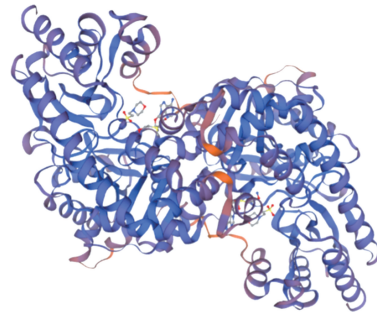
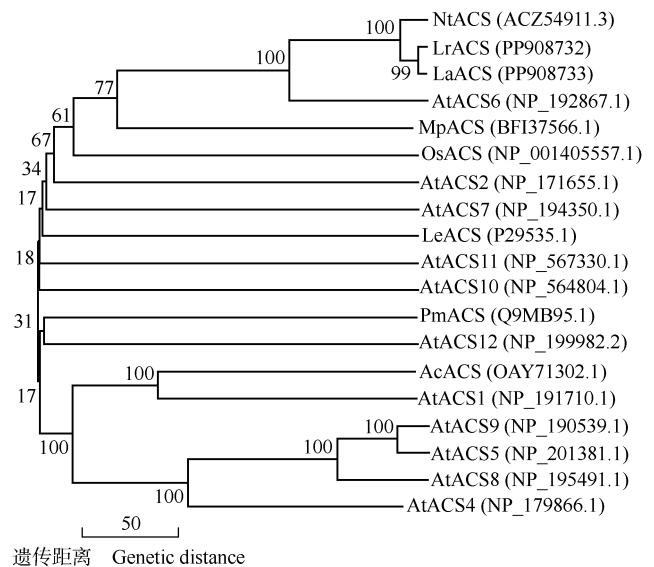


图 2 石蒜 *LrACS* 三级结构预测

Fig. 2 Tertiary structure prediction of *LrACS* in *Lycoris radiata* (L'Hér.) Herb.



分支上的数据为自展支持率 The values on the branches are the bootstrap values. Nt: 水仙 *Narcissus tazetta* subsp. *chinensis* (M. Roem.) Masam. et Yanagih.; Lr: 石蒜 *Lycoris radiata* (L'Hér.) Herb.; La: 忽地笑 *Lycoris aurea* (L'Hér.) Herb.; At: 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.; Mp: 苹果 *Malus pumila* Mill.; Os: 水稻 *Oryza sativa* Linn.; Le: 番茄 *Lycopersicon esculentum* Mill.; Pm: 梅 *Prunus mume* Siebold et Zucc.; Ac: 凤梨 *Ananas comosus* (Linn.) Merr. 括号中编号为 GenBank 登录号 Nos. in the brackets are accession numbers in GenBank.

图 3 石蒜 *LrACS* 与其他植物 ACS 蛋白的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of *LrACS* in *Lycoris radiata* (L'Hér.) Herb. and ACS proteins in other plants

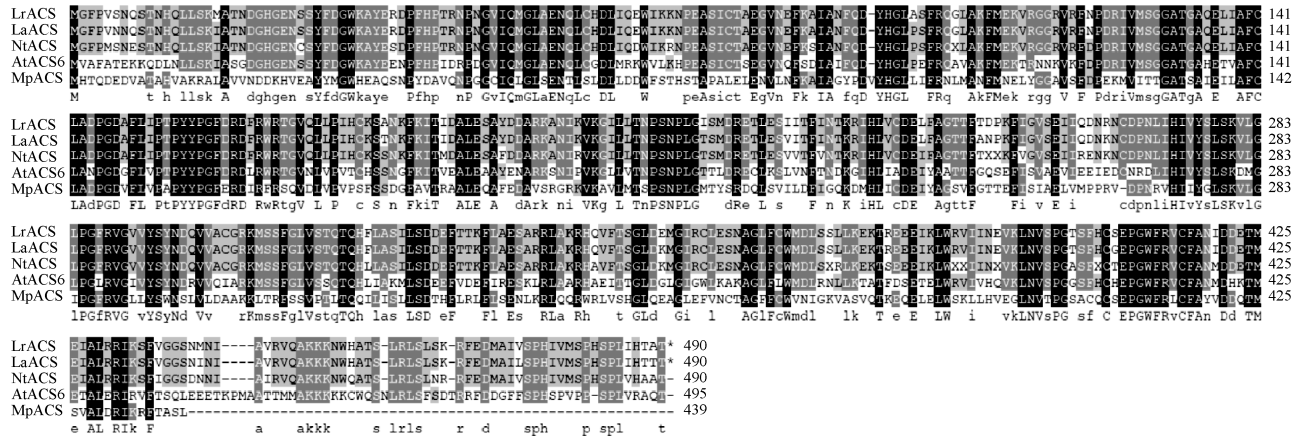
LrACS 先与忽地笑 LaACS (GenBank 登录号 PP908733) 聚在一起, 然后与水仙 [*Narcissus tazetta* subsp. *chinensis* (M. Roem.) Masam. et Yanagih.] NtACS (GenBank 登录号 ACZ54911. 3) 和拟南芥 AtACS6 (GenBank 登录号 NP_192867.1) 聚在一起, 亲缘关系较近。

石蒜 LrACS 与其他植物 ACS 蛋白的氨基酸序列比对结果见图 4。结果显示: 与水仙、拟南芥和苹果

中的 ACS 蛋白相比, 石蒜 LrACS 与忽地笑 LaACS 的氨基酸序列具有更高的相似度, 序列一致性高达 98.02%, 推测这是由于石蒜和忽地笑同属于石蒜属, 具有更近的亲缘关系。

2.3 LrACS 的亚细胞定位

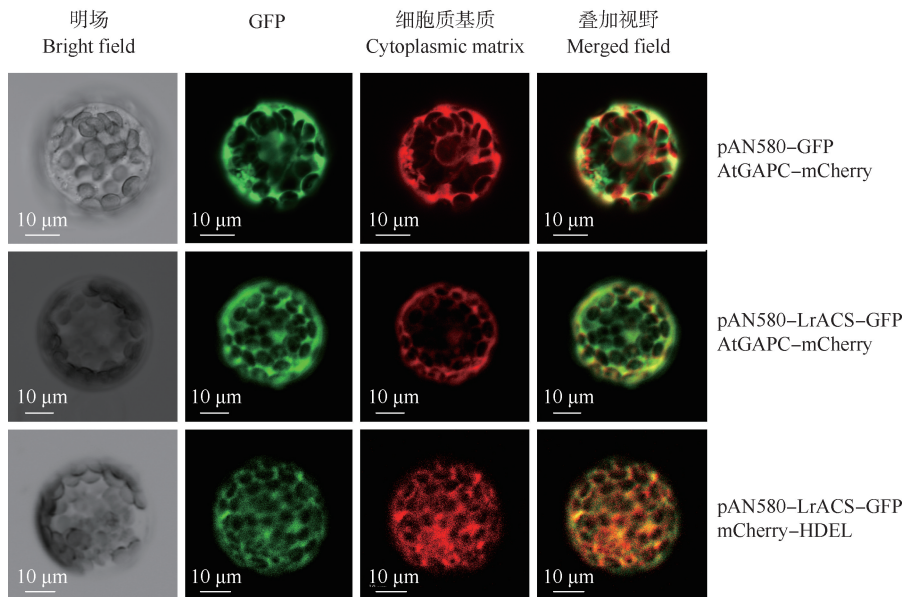
亚细胞定位 (图 5) 结果所示: 空载体 pAN580-GFP 的绿色荧光主要存在于细胞质基质和细胞核, LrACS-GFP 融合蛋白的绿色荧光与细胞质基质激发



Lr: 石蒜 *Lycoris radiata* (L'Hér.) Herb.; La: 忽地笑 *Lycoris aurea* (L'Hér.) Herb.; Nt: 水仙 *Narcissus tazetta* subsp. *chinensis* (M. Roem.) Masam. et Yanagih.; At: 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.; Mp: 苹果 *Malus pumila* Mill.

图 4 石蒜 LrACS 与其他植物 ACS 蛋白的氨基酸序列比对

Fig. 4 Alignment of amino acid sequences between LrACS in *Lycoris radiata* (L'Hér.) Herb. and ACS proteins in other plants



GFP: 绿色荧光蛋白 Green fluorescent protein.

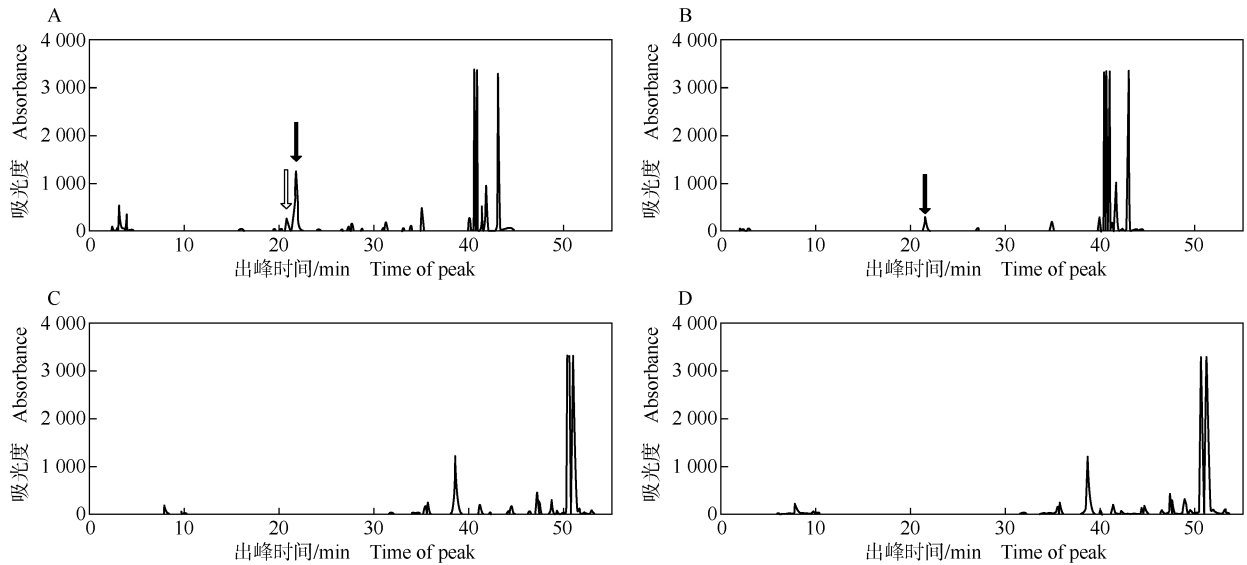
图 5 石蒜 LrACS 的亚细胞定位

Fig. 5 Subcellular localization of LrACS in *Lycoris radiata* (L'Hér.) Herb.

出的红色荧光几乎完全重叠,与内质网激发出的红色荧光大部分重合,推测 *LrACS* 主要定位于细胞质基质中。

2.4 *LrACS* 重组蛋白的体外活性检测

石蒜 *LrACS* 重组蛋白体外反应产物的高效液相色谱(HPLC)检测结果见图 6。结果显示:含 *LsACS*



白色箭头示 1-氨基环丙烷-1-羧酸吸收峰,黑色箭头示 *S*-腺苷甲硫氨酸吸收峰 The white arrow indicates the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid absorption peak, and the black arrows indicate the *S*-adenosylmethionine absorption peaks.

A: 含 *LsACS* 重组蛋白溶液的反应体系 The reaction system containing *LrACS* recombinant protein solution; B: 含对照溶液的反应体系 The reaction system containing the control solution; C: 含 *LsACS* 重组蛋白溶液但不含 *S*-腺苷甲硫氨酸的反应体系 The reaction system containing *LrACS* recombinant protein solution but without *S*-adenosylmethionine; D: 含甲醇变性的 *LrACS* 重组蛋白溶液的反应体系 The reaction system containing methanol-denatured *LrACS* recombinant protein solution.

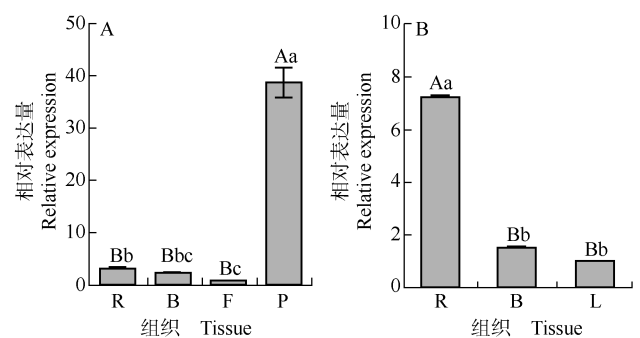
图 6 石蒜 *LrACS* 重组蛋白体外反应产物的高效液相色谱(HPLC)检测结果

Fig. 6 High performance liquid chromatography (HPLC) detection result of *in vitro* reaction products of *LrACS* recombinant protein in *Lycoris radiata* (L'Hér.) Herb.

重组蛋白溶液的反应体系中,HPLC 能够检测到反应产物 1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC),且底物 *S*-腺苷甲硫氨酸(SAM)吸收峰的出峰时间在 ACC 吸收峰之后(图 6-A);含对照溶液的反应体系中,HPLC 未检出反应产物 ACC,且 SAM 被大量消耗,说明 SAM 未转化为 ACC(图 6-B);含 *LsACS* 重组蛋白溶液但不含 SAM 的反应体系以及含甲醇变性的 *LsACS* 重组蛋白溶液的反应体系中,HPLC 均未检出反应产物 ACC(图 6-C,D)。上述结果证明 *LrACS* 重组蛋白在体外具有将底物 SAM 转化为 ACC 的活性。

2.5 *LrACS* 的组织特异性表达分析

石蒜花期和叶期不同组织中 *LrACS* 的表达情况见图 7。结果显示:*LrACS* 在石蒜花期和叶期的各组织中均有表达,其中,花期花瓣中 *LrACS* 的相对表达量最高,极显著($P < 0.01$)高于根、鳞茎和花茎,且根中 *LrACS* 的相对表达量显著($P < 0.05$)高于花茎,而



同一柱形图中不同小写和大写字母分别表示不同组织间差异显著($P < 0.05$)和极显著($P < 0.01$) Different lowercases and uppercases in the same bar graph indicate the significant ($P < 0.05$) and extremely significant ($P < 0.01$) differences between different tissues respectively.

R: 根 Root; B: 鳞茎 Bulb; F: 花茎 Flowering stem; P: 花瓣 Petal; L: 叶 Leaf.

图 7 石蒜花期(A)和叶期(B)不同组织中 *LrACS* 的表达情况
Fig. 7 Expression status of *LrACS* in different tissues of *Lycoris radiata* (L'Hér.) Herb. at the flowering stage (A) and leaf stage (B)

花茎中 *LrACS* 的相对表达量最低;叶期根中 *LrACS* 的相对表达量最高,极显著高于鳞茎和叶,而叶中 *LrACS* 的相对表达量最低。

3 讨论和结论

根据前期获得的忽地笑转录组数据^[24],首先克隆了忽地笑 1-氨基环丙烷-1-羧酸合酶(ACS)基因 *LaACS*,并通过简并引物扩增出石蒜 *ACS* 基因 *LrACS*。根据拟南芥 ACS 蛋白的 C 端序列的差异,拟南芥 ACS 蛋白可分为 3 个类型: I 型 ACS 蛋白包含 1 个钙依赖蛋白激酶(CDPK)磷酸化位点和 3 个有丝分裂原蛋白激酶(MAPK)磷酸化位点,这一类型 ACS 蛋白的 C 端最长,代表蛋白为 *AtACS1*、*AtACS2* 和 *AtACS6*; II 型 ACS 蛋白仅含有 1 个 CDPK 磷酸化位点,代表蛋白为 *AtACS4*、*AtACS5*、*AtACS8* 和 *AtACS9*; III 型 ACS 蛋白的 C 端较短且不包含 CDPK 磷酸化位点和 MAPK 磷酸化位点,代表蛋白为 *AtACS7* 和 *AtACS11*,该类型 ACS 蛋白可持续激活 CDPK 进而诱导植物体内乙烯生物合成,MAPK 磷酸化位点则通过增加 ACS 蛋白的稳定性而引起植物体内乙烯合成量的升高^[25-28]。此外,部分 ACS 蛋白并不拥有传统的催化 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)生成 1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)的功能,如 *AtACS1* 不具酶促活性,*AtACS3* 是假基因,*AtACS10* 和 *AtACS12* 则额外具有氨基转移酶功能等^[28-29]。系统进化树分析结果显示:石蒜 *LrACS* 和忽地笑 *LaACS* 与拟南芥 *AtACS2*、*AtACS6* 先聚在一起。*LrACS* 与 *AtACS2* 和 *AtACS6* 同属于 I 型 ACS 蛋白,包含 1 个 CDPK 磷酸化位点和 3 个 MAPK 磷酸化位点。

目前,拟南芥^[28]、番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.)^[30]、水稻(*Oryza sativa* Linn.)^[31]和苹果^[32]等植物中 ACS 蛋白的活性已被鉴定。三维结构显示:石蒜 *LrACS* 由 2 个相同亚基的二聚体组成,且 *LrACS* 的酶活反应位点位于 2 个亚基中间,正常条件下不易失活,但容易被麦芽糖结合蛋白(MBP)等较大的蛋白标签影响空间结构,从而影响其正常功能。根据蛋白质的三维结构、载体的纯化特点以及预实验结果,选择带有谷胱甘肽-S-转移酶(GST)标签的 pGEX-4T-1 载体,以大肠杆菌 BL21(DE3)为宿主,成功获得了 *LrACS* 蛋白的可溶性表达,并进一步通过体外粗酶催化反应证实了 *LrACS* 重组蛋白具备将底物

SAM 转化为 ACC 的活性,为具有催化活性的 ACS 蛋白增加了新的成员。

在拟南芥中,当空气中乙烯浓度较低时,乙烯受体与降钙素受体 CTR1 激酶的 N 端结合,抑制信号的向下传递,细胞核中乙烯稳定的转录因子 EIN3/EIL1 被泛素化蛋白酶体降解,乙烯信号通路处于沉默或失活状态;当空气中乙烯浓度增加时,乙烯分子和受体结合,使 CTR1 失活,无法磷酸化乙烯不敏感受体 EIN2,同时细胞核中 EIN3/EIL1 累积,进而调控乙烯响应基因的表达,以帮助植物应对环境的变化^[6-7]。蛋白质在细胞内的定位和分布对于理解蛋白质功能有很大的帮助。通过亚细胞定位可以初步判断 *LrACS* 主要定位于细胞质基质中。细胞质基质在真核细胞中作为许多代谢过程的细胞室,石蒜 *LrACS* 在该区域的亚细胞定位意味着石蒜中乙烯的产生有很大可能发生在细胞质基质中。

本研究中,石蒜花期花瓣中 *LrACS* 的相对表达量最高,极显著高于根、鳞茎和花茎;叶期根中 *LrACS* 的相对表达量最高,极显著高于鳞茎和叶。由此推测,在石蒜花期,*LrACS* 可能在生殖过程中发挥功能,并可能与石蒜的生殖行为紧密相关;在石蒜叶期,*LrACS* 则集中表达于石蒜的根部,可能与植物营养吸收有关,并为新一轮的生长和繁殖周期做储备。综合植物的生殖行为和之前的研究结果^[33],推测 ACC 和乙烯在石蒜的生殖过程中可能发挥一定的作用。乙烯抑制植物根、叶、花的生长发育,并在花和叶的脱落方面起着重要作用^[34],这也解释了 *LrACS* 在根、叶、花中均有表达。

综合上述,*LrACS* 主要定位于石蒜的细胞质基质中,具有将 SAM 催化生成 ACC 的活性。在石蒜的花期和叶期,*LrACS* 基因的表达具有组织特异性,这可能也代表着在不同时期石蒜植株对于合成 ACC 与乙烯有着不同的需求,*LrACS* 基因在石蒜的整个生命过程中都有着深远的影响。此外,茉莉酸信号对植物体的次生代谢会产生一定的影响^[35],而茉莉酸信号途径与乙烯信号途径存在交叉,因此乙烯可能对植物体的次生代谢也有着重要影响,比如乙烯能够促进夏雪片莲(*Leucojum aestivum* Linn.)中加兰他敏的合成,甲基茉莉酸甲酯可以促进石蒜科植物中石蒜科生物碱的合成^[36-37]。由于乙烯信号通路和茉莉酸信号通路在很多方面可能存在协同作用,本研究对石蒜 *LrACS* 的研究结果为之后的研究方向提供了思路,*LrACS* 的

表达调控是否与石蒜的其他生理过程相关,除茉莉酸信号外,乙烯信号通路在石蒜中是否存在与其他信号的协同调控,都值得进一步探究。

参考文献:

- [1] 王仁师. 关于石蒜属 (*Lycoris*) 的生态地理[J]. 西南林学院学报, 1990, 10(1): 41-48.
- [2] 刘姚, 麦任娣, 黄晶, 等. 石蒜属植物生物碱类化合物及其构效关系研究进展[J]. 林业与环境科学, 2019, 35(5): 114-121.
- [3] JU C L, CHANG C. Mechanistic insights in ethylene perception and signal transduction[J]. *Plant Physiology*, 2015, 169(1): 85-95.
- [4] NISHIYAMA T, SAKAYAMA H, DE VRIES J, et al. The *Chara* genome: secondary complexity and implications for plant terrestrialization[J]. *Cell*, 2018, 174(2): 448-464.
- [5] JU C L, VAN DE POEL B, COOPER E D, et al. Conservation of ethylene as a plant hormone over 450 million years of evolution[J]. *Nature Plants*, 2015, 1: 14004.
- [6] LI W H, LI Q Y, LYU M H, et al. Lack of ethylene does not affect reproductive success and synergid cell death in *Arabidopsis* [J]. *Molecular Plant*, 2022, 15(2): 354-362.
- [7] ADAMS D O, YANG S F. Methionine metabolism in apple tissue: implication of *S*-adenosylmethionine as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene[J]. *Plant Physiology*, 1977, 60(6): 892-896.
- [8] DUBOIS M, VAN DEN BROECK L, INZÉ D. The pivotal role of ethylene in plant growth[J]. *Trends in Plant Science*, 2018, 23(4): 311-323.
- [9] OSBORNE D J, WALTERS J, MILBORROW B V, et al. Evidence for a non-ACC ethylene biosynthesis pathway in lower plants[J]. *Phytochemistry*, 1996, 42(1): 51-60.
- [10] WALTERS J, OSBORNE D J. Ethylene and auxin-induced cell growth in relation to auxin transport and metabolism and ethylene production in the semi-aquatic plant, *Regnellidium diphyllum*[J]. *Planta*, 1979, 146(3): 309-317.
- [11] 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]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1979, 76(1): 170-174.
- [12] ZHAO H, YIN C C, MA B, et al. Ethylene signaling in rice and *Arabidopsis*: new regulators and mechanisms [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2021, 63(1): 102-125.
- [13] THOMANN A, LECHNER E, HANSEN M, et al. *Arabidopsis CULLIN3* genes regulate primary root growth and patterning by ethylene-dependent and -independent mechanisms [J]. *PLoS Genetics*, 2009, 5(1): e1000328.
- [14] YOON G M. New insights into the protein turnover regulation in ethylene biosynthesis [J]. *Molecules and Cells*, 2015, 38(7): 597-603.
- [15] 李莹, 王呈伟, 郑玉红, 等. 植物生长调节剂浸液对花芽分化期石蒜和换锦花鳞茎生化特性的影响[J]. *植物资源与环境学报*, 2011, 20(1): 31-39.
- [16] 王磊, 赵九洲, 汤庚国. 几种植物生长调节剂对石蒜生理生化特性的影响[J]. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 2004, 28(4): 39-42.
- [17] 郑乾明, 王红林, 王小柯, 等. 红肉火龙果 α -淀粉酶基因 *HpaAMY3* 的克隆及功能鉴定[J]. *植物资源与环境学报*, 2024, 33(2): 22-29.
- [18] SUN B, WANG P, WANG R, et al. Molecular cloning and characterization of a *meta/para-O*-methyltransferase from *Lycoris aurea*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(7): 1911.
- [19] WU F H, SHEN S C, LEE L Y, et al. Tape-*Arabidopsis* Sandwich: a simpler *Arabidopsis* protoplast isolation method [J]. *Plant Methods*, 2009, 5: 16.
- [20] LIZADA M C, YANG S F. A simple and sensitive assay for 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid[J]. *Analytical Biochemistry*, 1979, 100(1): 140-145.
- [21] 李剑峰, 周惠, 徐增富, 等. 番茄 ACC 合酶 (*LeACS2*) 在大肠杆菌中的可溶性表达 [J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 2005, 44(6): 71-74, 78.
- [22] ZHOU J Y, STRINGLIS I A, WEN J, et al. Interplay between Amarylidaceae alkaloids, the bacteriome and phytopathogens in *Lycoris radiata*[J]. *New phytologist*, 2024, 241(5): 2258-2274.
- [23] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [24] WANG R, XU S, WANG N, et al. Transcriptome analysis of secondary metabolism pathway, transcription factors, and transporters in response to methyl jasmonate in *Lycoris aurea* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 7: 1971.
- [25] HANSEN M, CHAE H S, KIEBER J J. Regulation of ACS protein stability by cytokinin and brassinosteroid [J]. *The Plant Journal*, 2009, 57(4): 606-614.
- [26] YOSHIDA H, NAGATA M, SAITO K, et al. *Arabidopsis* ETO1 specifically interacts with and negatively regulates type 2 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthases [J]. *BMC Plant Biology*, 2005, 5: 14.
- [27] TSUCHISAKA A, THEOLOGIS A. Heterodimeric interactions among the 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase polypeptides encoded by the *Arabidopsis* gene family [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(8): 2275-2280.
- [28] YAMAGAMI T, TSUCHISAKA A, YAMADA K, et al. Biochemical diversity among the 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase isozymes encoded by the *Arabidopsis* gene family [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(49): 49102-49112.

- [29] 高佳钰, 游晓商, 张 瞳, 等. 黄梁木 ACS 基因家族鉴定及其表达模式分析[J]. 分子植物育种, 2023, 21(7): 2200–2210.
- [30] YIP W K, MOORE T, YANG S F. Differential accumulation of transcripts for four tomato 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase homologs under various conditions[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992, 89(6): 2475–2479.
- [31] ZAREMBINSKI T I, THEOLOGIS A. Anaerobiosis and plant growth hormones induce two genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Molecular Biology of the Cell, 1993, 4(4): 363–373.
- [32] LI T, TAN D M, YANG X Y, et al. Exploring the apple genome reveals six ACC synthase genes expressed during fruit ripening[J]. Scientia Horticulturae, 2013, 157: 119–123.
- [33] MOU W S, KAO Y T, MICHAEL E, et al. Ethylene-independent signaling by the ethylene precursor ACC in *Arabidopsis* ovular pollen tube attraction [J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 4082.
- [34] BURG S P. Ethylene in plant growth [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1973, 70(2): 591–597.
- [35] STASWICK P E, TIRYAKI I. The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2004, 16(8): 2117–2127.
- [36] COLQUE R, VILADOMAT F, BASTIDA J, et al. Improved production of galanthamine and related alkaloids by methyl jasmonate in *Narcissus confusus* shoot-clumps [J]. Planta Medica, 2004, 70(12): 1180–1188.
- [37] IVANOV I, GEORGIEV V, PAVLOV A. Elicitation of galanthamine biosynthesis by *Leucojum aestivum* liquid shoot cultures [J]. Journal of Plant Physiology, 2013, 170(12): 1122–1129.

(责任编辑: 张明霞)

欢迎订阅 2025 年《植物资源与环境学报》

《植物资源与环境学报》为江苏省中国科学院植物研究所和江苏省植物学会联合主办的学术刊物, 国内外公开发行人。本刊为全国中文核心期刊(北大核心)、中国科技核心期刊和中国科学引文数据库核心期刊(CSCD 核心), 并为 BA(预评)、CAB、BCI、JST、EBSCO、中国生物学文摘、中国环境科学文摘、中国科学引文数据库、万方数据——数字化期刊群、中国学术期刊(光盘版)、超星期刊域出版平台、长江文库和中文科技期刊数据库等国内外著名刊库收录。2013 年荣获“首届江苏省新闻出版政府奖·期刊奖”及江苏省精品科技期刊项目; 2015 年荣获“第六届江苏省科技期刊金马奖·精品期刊奖”; 2015 年至 2023 年均荣获江苏省精品科技期刊项目; 2021 年荣获第三届江苏省新闻出版政府奖·期刊奖提名奖。1 篇论文入选第二届江苏省科技期刊优秀论文; 2 篇论文入选第三届江苏省科技期刊优秀论文。

本刊围绕植物资源与环境两个中心命题, 报道我国植物资源的考察、开发利用和植物物种多样性保护, 自然保护区与植物园的建设和管理, 植物在保护和美化环境中的作用, 环境对植物的影响以及与植物资源和植物环境有关学科领域的原始研究论文、研究简报和综述等。凡从事植物学、生态学、自然地理学以及农、林、园艺、医药、食品、轻化工和环境保护等

领域的科研、教学、技术人员及决策者均可以从本刊获得相关学科领域的研究进展和信息。

本刊为双月刊, 大 16 开本, 每期 120 页。全国各地邮局均可订阅, 邮发代号 28–213, 每期定价 30 元, 全年定价 180 元。国内统一连续出版物号 CN 32–1339/S, 国际标准连续出版物号 ISSN 1674–7895。若错过征订时间或需补齐, 请直接与编辑部联系。1992 年至 1993 年每年 8 元; 1994 年至 2000 年每年 16 元; 2001 年至 2005 年每年 24 元; 2006 年至 2008 年每年 40 元; 2009 年至 2011 年每年 60 元; 2012 年至 2019 年每年 80 元; 2020 年至 2021 年每年 120 元; 2022 年至 2023 年每年 156 元; 2024 年至 2025 年每年 180 元(均含邮资, 如需挂号另付挂号费 3 元; 快递到付)。

编辑部地址: 江苏省南京市中山门外前湖后村 1 号 江苏省中国科学院植物研究所内; 邮编: 210014; 电话: 025–84347014; QQ: 2219161478; E-mail: zwzybjb@163.com; 网址: <http://zwzy.cnbg.net>。

欢迎扫码关注本刊微信公众号。

