

黄瓜 β -酮脂酰辅酶 A 合成酶基因 *CsKCS11* 的功能初步分析

韦明月¹, 郭孝文¹, 邱嘉鑫¹, 宋怡颖¹, 柴乖强^{1,2}, 段义忠^{1,2}

(1. 榆林学院生命科学学院 陕西榆林 719000; 2. 陕西省陕北矿区生态修复重点实验室 陕西榆林 719000)

摘要:为了鉴定和挖掘黄瓜 β -酮脂酰辅酶 A 合成酶(β -Ketoacyl CoA synthetase, KCS)编码基因,以设施黄瓜为材料,通过转录组测序鉴定、基因克隆与表达载体的构建、干旱胁迫下的表达分析和转化拟南芥等方法,研究了 *CsKCS11* 的生物学功能。结果表明,黄瓜 *CsKCS11* 基因(NCBI 登录号 OL660537)的开放阅读框为 1542 bp,编码 513 个氨基酸;序列分析表明,*CsKCS11* 蛋白亲疏水性平均值(Gravy)为-0.083,为亲水性蛋白,二级结构中 α 螺旋、无规则卷曲、延伸链和 β 转角所占比例分别为 44.64%、35.48%、15.20%和 4.68%;系统进化分析表明,*CsKCS11* 与冬瓜 *KCS11* 蛋白亲缘关系最近;同时将 *CsKCS11* 转化拟南芥,转基因拟南芥后代植株具有抵御干旱胁迫的能力;干旱胁迫下的表达分析表明,黄瓜 *CsKCS11* 能够被干旱胁迫诱导表达,且随着干旱胁迫时间的延长,其表达量呈现出先升高后降低的趋势,并且在干旱胁迫 12 h 时达到最高。研究结果为进一步阐明黄瓜 *CsKCS11* 参与蜡质合成的机制奠定了基础。

关键词: 黄瓜; 表皮蜡质; KCS; 抗旱

中图分类号: S642.2 文献标志码: A 文章编号: 1673-2871(2023)10-023-09

Preliminary functional analysis of β -ketoacyl- CoA synthase *CsKCS11* gene from *Cucumis sativus* L.

WEI Mingyue¹, GUO Xiaowen¹, QIU Jiabin¹, SONG Yiyi¹, CHAI Guaiqiang^{1,2}, DUAN Yizhong^{1,2}

(1. College of Life Science, Yulin University, Yulin 719000, Shaanxi, China; 2. Shaanxi Key Laboratory of Ecological Restoration in Shaanbei Mining Area, Yulin 719000, Shaanxi, China.)

Abstract: To identify and excavate the genes encoding β -Ketoacyl CoA synthetase (KCS) in cucumber (*Cucumis sativus* L.), the greenhouse cucumber was used as the material, and the biological function of *CsKCS11* was studied by transcriptome sequencing, gene cloning, expression vector construction, expression pattern analysis under drought stress and genetic transformation in *Arabidopsis thaliana*. The results showed that the open reading frame of *CsKCS11* gene (accession number OL660537) was 1542 bp, encoding 513 amino acids. Sequence analysis showed that the average value of hydrophobicity (Gravy) for *CsKCS11* was -0.083 and it was a hydrophilic protein with proportions of α helix, random curl, extended chain and β folding of 44.64%, 35.48%, 15.20% and 4.68%, respectively. Phylogenetic analysis showed that *CsKCS11* had a high sequence similarity with KCS of other species, and was closely related to *BhKCS11* from white gourd. At the same time, *CsKCS11* was linked to *pCSXN* vector, the plant overexpression vector was successfully constructed, and it was transformed into *A. thaliana*. The transgenic *Arabidopsis* had the ability of drought resistance under drought stress. The expression analysis showed that cucumber *CsKCS11* could be induced to express by drought stress, and with the prolongation of drought stress, the expression level of *CsKCS11* increased at first and then decreased, and reached the peak at 12 h of drought stress. This study provides a basis for further elucidating the mechanism of cucumber *CsKCS11* involved in cuticular wax biosynthesis.

Key words: Cucumber; Cuticular wax; β -ketoacyl CoA synthetase(KCS); Drought resistance

收稿日期: 2022-10-31; 修回日期: 2023-08-30

基金项目: 国家自然科学基金地区项目(32160464); 榆林学院研究生创新基金(2022YLYCX09); 榆林学院高层次人才科研启动基金(18GK11)

作者简介: 韦明月, 女, 在读硕士研究生, 主要从事植物抗旱生理生态研究。E-mail: 2282494985@qq.com

通信作者: 柴乖强, 男, 副教授, 主要从事旱区植物遗传改良与逆境生理研究。E-mail: chaiguaiqiang@126.com

植物表皮是植物体与其所处的环境直接接触的部位,包括角质层和蜡质层^[1-2]。其中,植物表皮蜡质是覆盖在陆生植物表面的一层透明晶状体,是一种不溶于水的有机混合物,其主要成分由烷烃、脂肪酸、醛、初级醇、次级醇、酯类等组成。研究表明,植物表皮蜡质具有调节植物非气孔性水分散失、抵御病虫害等功能^[3-4],因此,在植物抵抗生物、非生物胁迫中发挥着越来越重要的作用。不同植物表皮蜡质的化学成分不同,使得植物表皮蜡质晶体结构存在一定的多样性^[5]。Barthlott等^[6]借助电镜对10000多种植物的表皮进行了扫描分析,将植物表皮蜡质晶体归纳为片状、板片状、柱状、条状、管状、颗粒状、光滑状等。拟南芥茎秆蜡质晶体为柱状^[7],小麦、水稻苗期叶片蜡质形态以片状为主^[8-9],番茄叶片蜡质呈现出光滑状^[10];即使同一种植物的不同器官,其蜡质晶体也存在差异,如小麦旗叶正面和反面的蜡质晶体分别呈现出片状和密集的管状^[11]。

对拟南芥表皮蜡质合成途径的研究表明,拟南芥蜡质合成主要分为在质体内的从头合成、在内质网上超长链脂肪酸的合成以及在内质网中的蜡质合成^[12]。其中,超长链脂肪酸的合成是在头合成形成16碳和18碳的脂酰CoA的基础上,再经过碳链的延长形成各种碳链长度的脂酰CoA,此过程需要碳链延长酶(fatty acid elongase)的催化;而控制脂肪酸碳链延长的酶是一个包括多种酶的复合体,至少需要4种酶参与脂肪酸碳链延长反应,共同完成超长链脂肪酸的合成^[13]。其中, β -酮脂酰辅酶A合成酶(KCS)是脂肪酸碳链延长酶复合体催化反应中第一步反应的酶,也是整个超长链脂肪酸延长合成中的限速酶,因此,鉴定并研究KCS的功能对植物表皮蜡质合成与调控机制的解析具有重要意义^[14-15]。

KCS主要存在于植物体中,其种类和数量在不同物种间存在较大差异。模式植物拟南芥和水稻中分别有21个和34个KCS基因^[16-17]。目前对KCS基因家族的研究主要集中在拟南芥上,如FAEI是首个从拟南芥中克隆出的KCS基因,该基因主要在种子中表达,催化C20和C22脂肪酸的生物合成^[18];CER6/CUT1参与链长大于24个碳以上的脂肪酸合成,并促进茎和花粉的表皮蜡质积累^[19]。此外,在其他植物如甘蓝型油菜、小麦、水稻和紫花苜蓿中都已经克隆了KCS相关基因^[20]。

黄瓜为主要的蔬菜作物,其叶片以及果实表皮

具有较厚的蜡质,但当前对于黄瓜表皮蜡质合成相关研究的报道还较少。王世峰^[21]研究了CsCER10在黄瓜中的表达模式,并利用RNAi技术解析了其在蜡质合成中的功能。王文娇^[22]从黄瓜中分离克隆了CsCER1和CsWAX2,并利用转基因等方法,阐明了黄瓜中CsCER1和CsWAX2基因表达量异常影响了黄瓜表皮蜡质中的烷烃含量。此后,黄瓜蜡质合成相关基因CsCER4、CsCER7也相继被克隆出来^[23-24]。Zhang等^[25]在黄瓜中鉴定了1个AP2/ERF型转录因子CsWIN1,研究表明,CsWIN1通过调控CsCER1、CsCER1-1、CsCER4等的表达促进蜡质的积累。最近,Zhai等^[26]通过图位克隆首次明确了调控黄瓜果实亮度的关键基因D,该基因编码一种C₂H₂类型锌指蛋白转录因子,并通过一系列生理试验及转录组分析发现,D基因通过调控黄瓜果实表皮角质层的发育来影响果实亮度。此外,Yang等^[27]也通过图位克隆的方法获得了调控黄瓜亮度的主效基因CsZFP6,发现该基因能通过参与CsMAHI、CsCER1等共表达,参与黄瓜果皮蜡质的合成。

笔者的研究拟通过分析黄瓜转录数据库,鉴定黄瓜 β -酮脂酰辅酶A合成酶KCS,克隆黄瓜CsKCSII基因,并利用生物信息学分析、转基因功能验证和干旱胁迫下的表达分析等方法解析CsKCSII的生物功能,以期为黄瓜遗传育种和品种改良提供理论依据。

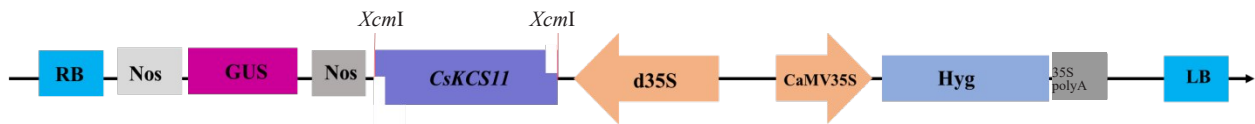
1 材料与方法

1.1 材料

黄瓜品种全兴优冠F₁是抗病耐高温材料,由山东宁阳金兴种业有限公司培育,种植在榆林市榆林学院西区种植园区玻璃日光温室,生育期内水肥管理同温室其他植物。待黄瓜幼苗生长6~8周时,取黄瓜幼嫩叶片样品,置于液氮中保存备用。黄瓜表皮蜡质合成基因CsKCSII转化载体pCX-SN-CsKCSII由榆林学院植物资源化利用及生态修复课题组构建,详见图1。试验于2020年7月至2022年3月在榆林学院植物分子遗传育种实验室进行。

1.2 方法

1.2.1 黄瓜叶片总RNA的提取和cDNA的合成
从温室中取黄瓜叶片用无菌锡箔纸包裹住叶片置于液氮中,在液氮超低温环境中保存,提取RNA时,在研钵中加入液氮,将黄瓜叶片研磨至粉末状,利用多糖多酚RNA试剂盒(全式金)提取RNA,提

图1 植物过表达载体 pCXSN-*CsKCS11*Fig. 1 The construction of pCXSN-*CsKCS11* overexpression vector

取过程严格按照说明书进行。RNA 的完整性通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。同时使用反转录试剂盒完成 cDNA 第一链的合成,并于 -20°C 保存。

1.2.2 黄瓜 *CsKCS11* 基因的克隆 根据实验室前期构建的黄瓜叶片和果实转录组数据库,通过植物蜡质合成通路及注释分析,从中发现了在黄瓜叶片及果皮中表达量均较高的一条 *KCS* 序列,并依据开放阅读框,设计特异引物 F1: CATCGCAATGGGAAATGACGGAG 和 R1: GATCTTG-GCACCCCAAATTAGAGA。以稀释 15 倍的 cDNA 为模板,扩增 *CsKCS11* 基因,扩增体系为 50 μL : 2 \times Pfu Mix buffer 25 μL , dNTP 4 μL , 引物 F、R 各 2 μL , cDNA 0.5 μL , ddH₂O 16.5 μL 。PCR 反应程序为: 95°C 60 s; 95°C 50 s, 53°C 40 s, 72°C 60 s, 35 个循环; 72°C 5 min。产物经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳后回收目标基因片段。将目标基因片段末端加 A 后,连接到 EZ-T 载体,并转化 DH5 α 感受态细胞,在含有氨苄青霉素 ($100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 LB 固体培养基上筛选出阳性克隆,通过菌落 PCR 鉴定阳性克隆^[28]。最后挑选出至少 3 个阳性克隆,送至上海生物工程有限公司测序,筛选出正确的 *CsKCS11* 基因序列。

1.2.3 黄瓜 *CsKCS11* 基因的生物信息学分析 分别通过 ProtScale analysis (<https://web.expasy.org/>)、NPSA- Prabi (<https://npsa-prabi.ibcp.fr/>)、SWISS- MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/interactive>) 在线分析软件对 *CsKCS11* 蛋白的亲疏水性、二级结构和三级结构进行预测。同时分别运用 DNAMAN 和 MEGA7.0 分析 *CsKCS11* 蛋白的保守结构域和物种亲缘关系。

1.2.4 植物遗传表达载体的构建和农杆菌介导的遗传转化 利用高保真酶从测序成功的质粒上扩增 *CsKCS11* 目标片段,并对该片段末端进行加 A 处理;同时,使用 *XcmI* 对 pCXSN 进行单酶切,回收大片段载体,将 pCXSN 与末端加过 A 的 *CsKCS11* 进行连接,连接产物转化 Top10 感受态细胞,并在 LB 固体培养基(含有卡那霉素 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 上培养出菌落,对单克隆进行 PCR 筛选鉴定^[29-30]。挑选至

少 3 个阳性单克隆,送至上海生物工程有限公司测序。测序验证成功后,提取 pCXSN-*CsKCS11* 质粒,并借助农杆菌 GV3101 采用浸花法转化拟南芥^[31]。在 1/2MS 培养基(潮霉素质量浓度为 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 上对 T₁ 和 T₂ 代转化单株的拟南芥种子进行筛选、鉴定,获得转 *CsKCS11* 的 T₃ 代纯合株系,最后进行干旱胁迫处理,处理方法如下^[32]:将 T₃ 代种子播于营养基质中,放于光照培养箱中(14 h(L)/10 h(D)光周期,光照度 8000 lx,温度 22°C ,相对湿度 50%~55%) 生长约 4 周,再进行控水 15 d 处理,待大多数叶片萎蔫并开始变黄时,进行复水处理 10 d。最后统计转基因株系和对照的成活率。每个处理 3 次重复,每个重复选用 32 株植株。

1.2.5 黄瓜 *CsKCS11* 在干旱胁迫下的表达分析 选取约 108 粒饱满的黄瓜种子,用 0.55% 的 NaClO 溶液消毒,在玻璃温室中播种于花盆内,正常浇水。待黄瓜苗长至 5 叶期时,将黄瓜苗从基质中轻轻挖出,小心冲洗掉根上的基质,进行逆境胁迫处理^[33-34]。干旱处理:取 108 株幼苗,每 4 株为 1 个重复,用漂浮板固定好,将其漂浮在含有 10% 的 PEG 6000 溶液中处理 96 h。处理完成后,剪取叶片,转入无 RNAase 的离心管中,液氮速冻。每个处理设 3 次重复。样品 RNA 的抽提按照国产君诺德 RNA 提取试剂盒进行,提取出黄瓜叶片总 RNA 后,使用反转录试剂盒合成 cDNA, -20°C 保存备用。

选取黄瓜 *CsACTIN* 为内参基因(表 1),以相应的 cDNA 为模板,选用 TaKaRa 的 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 试剂盒,采用 CFX96TM Real-Time PCR Detection System 进行 qRT-PCR 扩增,并进行表达量分析,分析方法参考所用仪器说明^[32]。每个处理设 3 次重复。数据分析按照 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算^[35]。

1.3 数据处理

数据采用 Excel 2016 和 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,采用 SigmaPlot 12.5 完成作图。

2 结果与分析

2.1 黄瓜 *KCS* 相关基因的鉴定

利用课题组前期建立的黄瓜果实与叶片转录

表 1 基因表达分析所使用的引物
Table 1 List of primers used for qRT-PCR

引物名称	类型	引物序列(5'-3')	备注
Q-PCR- <i>CsKCS11</i>	F	GTATCGATCCGTGGCTGACACTA	荧光定量引物
	R	CTTACCTTTCATGCACCCTTTC	
<i>CsACTIN</i>	F	ACG TTG CTGTACCGTGATTTAACG	黄瓜内参基因
	R	GTAGTCGACTGACCACTAAGCACG	

组测序数据,通过通路和表达分析,鉴定出黄瓜 *CsKCS* 相关序列 39 个(图 2),其中目标序列 *CsGy1G019580.1* 在黄瓜果实和叶片中均有较高的表达水平,因此选其作为目标基因,命名为 *CsKCS11*,并进行后续的克隆与功能分析。

2.2 黄瓜 *CsKCS11* 基因的克隆

提取黄瓜叶片总 RNA(图 3-A),并反转录成 cDNA,以稀释 15 倍的 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,获得了一条长度约为 1500 bp 的特异条带(图 3-B)。将产物回收后,连接测序载体、转化 DH5 α

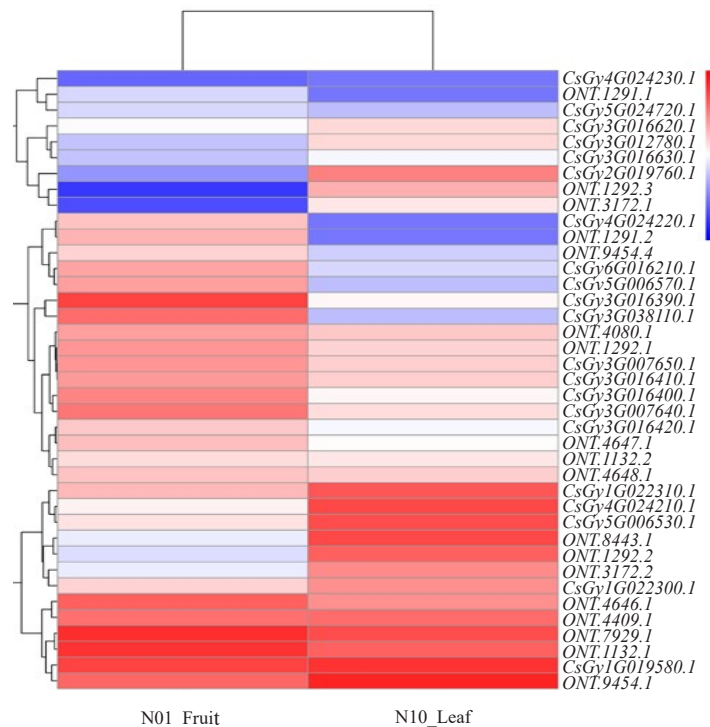
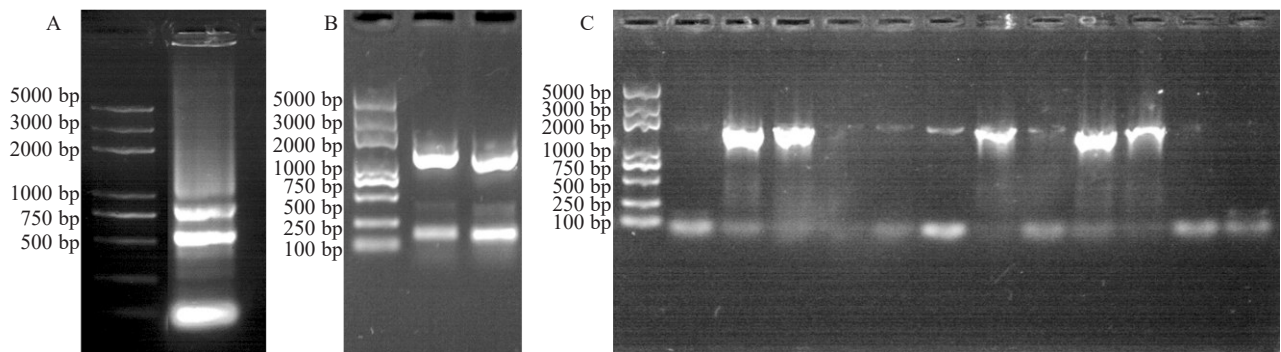


图 2 黄瓜 *CsKCS* 相关基因的热图分析

Fig. 2 Heat map analysis of *CsKCS*-related genes in cucumber



注:A. 黄瓜叶片 RNA 的提取;B. 黄瓜 *CsKCS11* 的扩增;C. 黄瓜 *CsKCS11* 连接到测序载体后,进行菌落 PCR 鉴定。

图 3 黄瓜 *CsKCS11* 的克隆

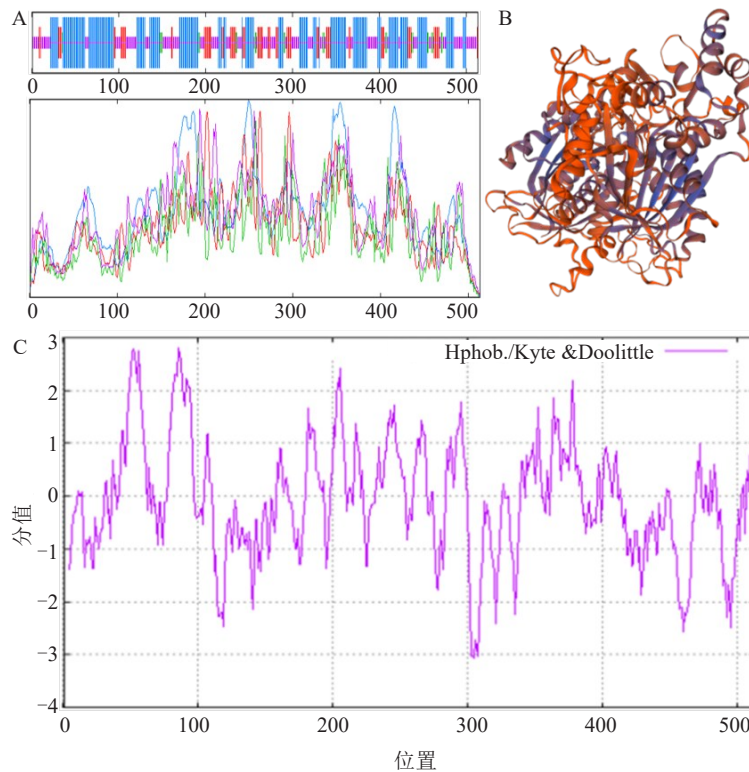
Fig. 3 *CsKCS11* Cloning of cucumber

细胞,经过筛选获得阳性单克隆(图 3-C),选取阳性克隆经测序验证后,将目标序列提交到 NCBI 数据库中(登录号为:OL660537),同时将该基因命名为 *CsKCS11*,其开放阅读框(ORF)大小为 1542 bp,编码 513 个氨基酸。

2.3 黄瓜 *CsKCS11* 的生物信息学分析

通过在线分析数据库 ProtScale analysis 对基因编码蛋白的一级结构以及物理性质进行了分析,预测出黄瓜 *CsKCS11* 编码 513 个氨基酸,其中亮氨酸数量最高,占总氨基酸含量的 12.3%,蛋白分子质量

为 57.76 kDa,理论等电点为 9.26。由此可知,该序列编码蛋白 *CsKCS11* 为碱性蛋白。*CsKCS11* 编码的氨基酸化学分子式为 $C_{2609}H_{4125}N_{85}O_{734}S_{29}$,原子总数为 7582 个。对 *CsKCS11* 蛋白质二级、三级结构进行预测表明,*CsKCS11* 蛋白主要由 44.64%的 α -螺旋、35.48%无规则卷曲、4.68%的 β -转角和 15.20%的延伸链组成(图 4-A~B)。对 *CsKCS11* 蛋白质的亲疏水性进行预测(图 4-C),该蛋白质亲疏水性平均值(Gravy)为-0.083,说明黄瓜 *CsKCS11* 蛋白属于亲水性蛋白。



注:A. 二级结构预测;B. 三级结构分析;C. 亲疏水性分析。

图 4 黄瓜 *CsKCS11* 蛋白的结构分析

Fig. 4 Protein structural analysis of *CsKCS11* in cucumber

利用 DNAMAN 软件将黄瓜 *CsKCS11* 氨基酸序列与 NCBI 中已登录的冬瓜 (*Benincasa hispida*)、苹果 (*Malus domestica*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、甜瓜 (*Cucumis melo*)、南瓜 (*Cucurbita moschata*) 和笋瓜 (*Cucurbita maxima*) 等植物氨基酸序列进行多重序列比对。结果表明,不同物种中 KCS 蛋白在保守区域具有高度的同源性,同源性高达 91.14%(图 5-A)。同时,通过 MEGA 7.0 软件构建了不同植物 KCS11 蛋白的系统发育树,发现不同植物的 KCS11 蛋白主要分为 4 个分支,其中月季、苹果和欧李的 KCS11 聚为第一类;柑橘和榴莲的 KCS11 聚为第二类;枣树的 KCS11 单独聚

为第三类;黄瓜的 KCS11 与冬瓜、甜瓜、南瓜、笋瓜和苦菜的 KCS11 聚为第四类,且黄瓜与冬瓜的 KCS11 的亲缘关系最近(图 5-B)。

2.4 黄瓜 *CsKCS11* 在拟南芥中的表达分析

为了进一步研究 *CsKCS11* 的生物功能,构建了 *CsKCS11* 过表达载体 pCXSN-*CsKCS11*,并将基因 *CsKCS11* 转入模式植物拟南芥中,同时结合荧光定量 PCR 检测,最终获得转 *CsKCS11* 基因拟南芥株系。在 T_3 代选择 1 个转基因株系 Line1,进行干旱胁迫处理,并鉴定其表型,结果表明,转 *CsKCS11* 基因拟南芥株系在干旱 15 d 并复水 10 d 后,其成活率显著高于野生型(图 6-A~C),初步

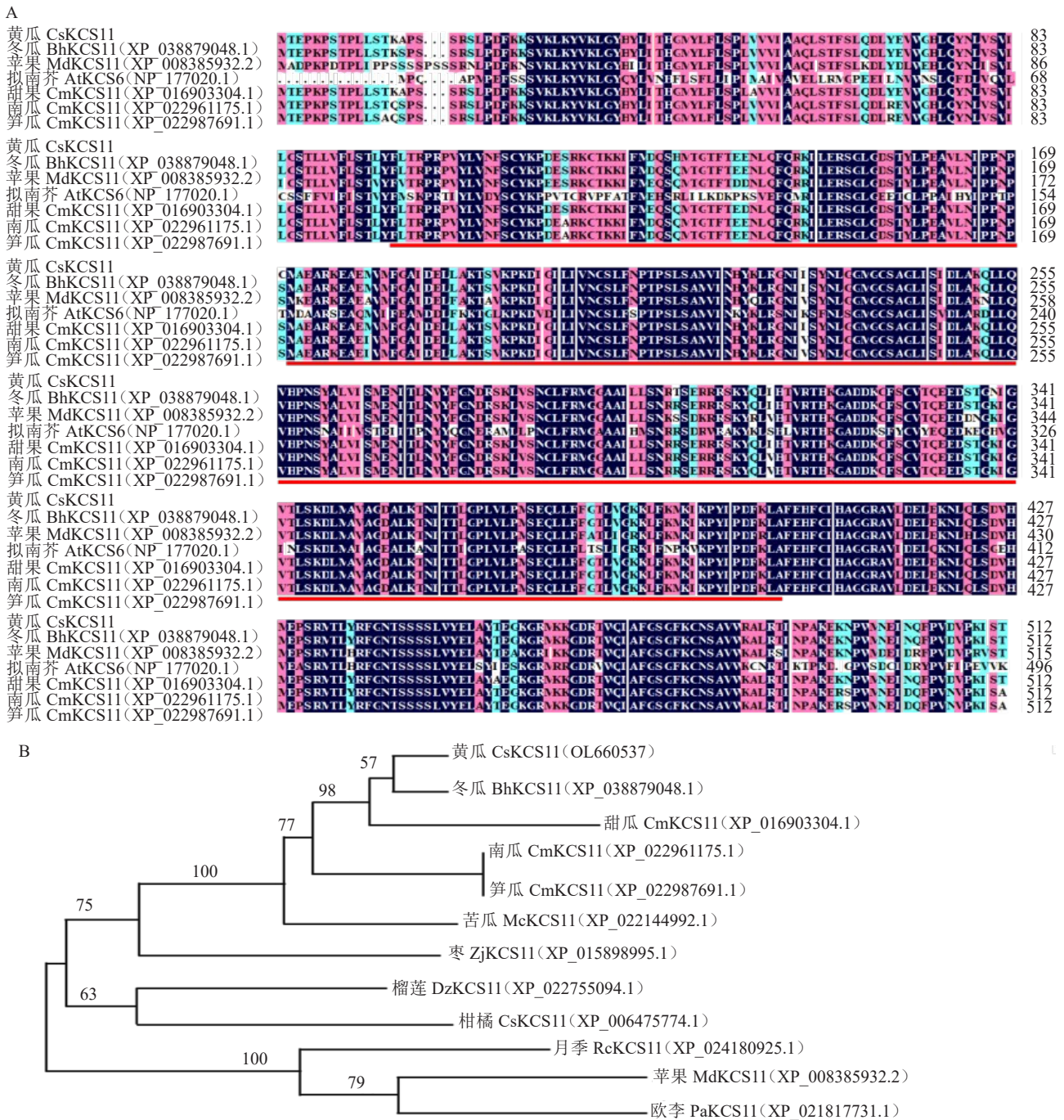


图5 黄瓜 CsKCS11 蛋白的同源性比对和系统发育分析

Fig. 5 CsKCS11 protein domain prediction and Phylogenetic analysis of cucumber

证明了 *CsKCS11* 在拟南芥中具备抵御干旱胁迫的能力。

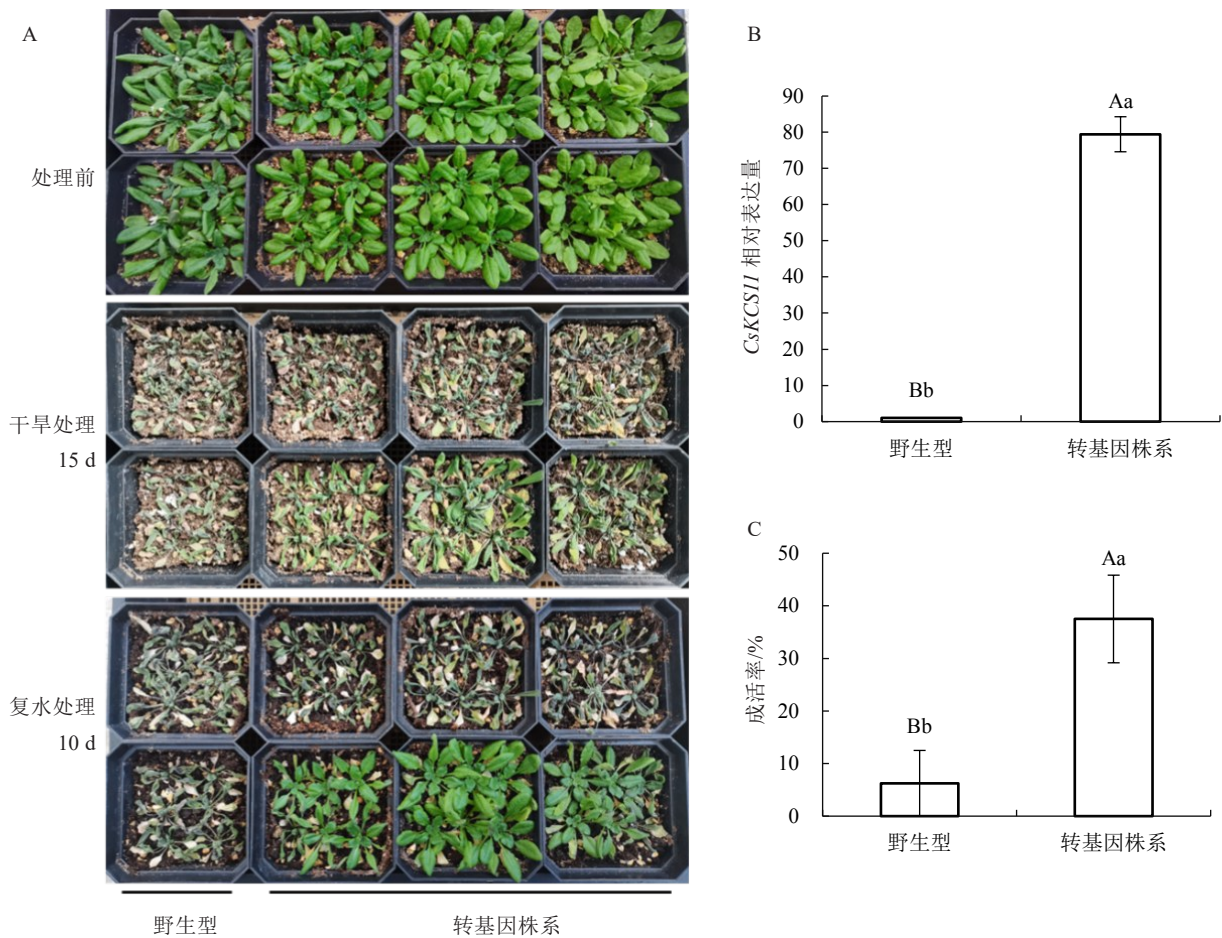
2.5 黄瓜 *CsKCS11* 在干旱胁迫下的表达分析

为了研究 *CsKCS11* 在干旱胁迫下的表达模式，用 10% PEG6000 干旱模拟处理黄瓜幼苗 96 h。分别在 0、1、2、4、6、12、24、48、96 h 采集干旱胁迫处理后的黄瓜叶片提取出 RNA，反转录成 cDNA 后应用荧光定量 PCR 检测 *CsKCS11* 在黄瓜中的表达

量。荧光定量 PCR 结果表明，*CsKCS11* 能够被干旱胁迫诱导表达，诱导表达程度存在一定差异(图 7)，随着干旱胁迫时间的延长，其表达量呈现出先升后降的趋势，在干旱胁迫 12 h 时表达量达到最高值，并且显著高于其他处理。

3 讨论与结论

随着全球气候的逐年变化，干旱、高温、低温、



注:A. 转 *CsKCSII* 拟南芥在干旱处理下的表型鉴定;B. 干旱胁迫处理下 *CsKCSII* 在拟南芥中的表达分析;C. 干旱胁迫并复水处理后,拟南芥成活率统计分析。柱形图上不同大写字母表示各处理间在 0.01 水平差异极显著,不同小写字母表示各处理间在 0.05 水平差异显著。下同。

图 6 黄瓜 *CsKCSII* 在拟南芥中的功能分析

Fig. 6 Functional analysis of *CsKCSII* in *Arabidopsis*

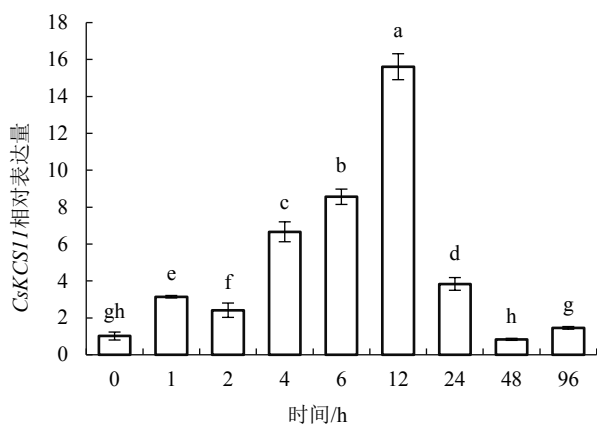


图 7 *CsKCSII* 在黄瓜苗期干旱胁迫下的表达分析

Fig. 7 *CsKCSII* expression analysis under drought stress in seedling of cucumber

高盐等生物胁迫也随之频繁发生,这些极端环境造成的渗透胁迫直接影响着植物生长发育和产量^[36]。黄瓜为主要的设施蔬菜作物,在我国的年种植面积超过 6000 万 hm^2 ,而我国一半以上的地区属于干旱

半干旱地区,严重缺水直接影响着蔬菜的产量和品质,因此培育抗旱黄瓜新品种已经成为一项迫切的工作^[37]。黄瓜叶片和果实表皮含有大量的蜡质晶体,其中果皮表皮蜡质的主要成分有超长链烷烃、脂肪酸、脂肪醛、次级醇和酯类化合物等,并以超长链烷烃含量最高。同时,笔者在本试验前期发现(结果未发表),黄瓜果皮蜡质总含量随着果实发育进程呈现出逐渐增高的趋势。因此本试验前期通过分析黄瓜果实和成熟叶片的转录组数据,根据蜡质合成通路信息和基因注释结果,鉴定了 39 个β-酮脂酰辅酶 A 合成酶 KCS 相关基因,并根据热图分析发现序列 *CsGy1G019580.1* 在黄瓜果实 2 个不同的发育阶段均具有较高的表达量,结合该序列的功能注释信息,将其命名为 *CsKCSII*。同源比对和系统发育分析结果表明,黄瓜 *CsKCSII* 与其他物种的 *KCSII* 具有相似的结构,可能都参与超长链脂肪酸的生物合成。这与 Yang 等^[38]在柑橘表皮中发

现的 *KCS11* 的研究结果相似。

植物的抗逆性是基因与外界环境相互作用的结果,为了提高植物的抗旱性,科学家们选择将抗旱相关的基因转入植物中,获得过量表达的转基因株系,最终应用于生产实践^[39]。转基因植物之所以能表现出较强的抗逆特性,是因为当植物受到生物或非生物胁迫时,这些应激反应基因会迅速表达,应激相关蛋白随后与下游的靶蛋白相互作用,以减缓植物体内活性氧的积累,维持细胞内的稳态,最终增强植物对不利环境的耐受性^[40]。柴乖强^[4]研究表明,在干旱胁迫条件下,小麦叶片表皮蜡质含量显著增高,并且蜡质含量越高植株的抗旱能力也越强。因此,如何提高植物表皮蜡质含量已经成为当前研究的热点之一。其中,在植物表皮蜡质合成基因的应用方面,已经有许多基因被克隆出来,并且通过转基因过表达、转基因敲除或编辑技术,一部分基因的生物学功能已经明晰。为了研究黄瓜 *CsKCS11* 的功能,笔者克隆了 *CsKCS11* 基因并将其连接到 pCXSN 表达载体上,成功构建了 pCXSN-*CsKCS11* 过表达载体,同时利用农杆菌浸花法将 *CsKCS11* 转入拟南芥中,通过后代筛选,成功获得了 T₃ 代转 *CsKCS11* 拟南芥纯合株系,并对转基因 T₃ 代植株进行了干旱胁迫处理,结果发现转 *CsKCS11* 的拟南芥植株具备了较强的抗旱能力,初步验证了 *CsKCS11* 的生物学功能。这与 Chai 等^[30] 在番茄中过表达小麦蜡质合成基因 *TaFAR6* 和 *TaFAR8* 的结果相同,进一步说明了在干旱胁迫下,植物表皮蜡质的增加能增强植物对干旱胁迫的抵御能力。然而,黄瓜 *CsKCS11* 基因调控表皮蜡质合成进而参与植物抵抗干旱胁迫的机制还有待深入研究。

植物体内一些蜡质合成相关基因对外界不同胁迫会作出迅速响应。在本试验中,笔者对黄瓜 *CsKCS11* 在干旱胁迫下的表达量进行了分析,结果表明 *CsKCS11* 能对持续干旱胁迫作出响应,这与 Li 等^[41] 的结论相似,而与 Cheng 等^[42] 研究的结论不同,这可能与研究的植物类型以及植物的生长环境有关。综上所述,笔者从黄瓜中克隆出一个 *CsKCS11* 基因,为进一步研究黄瓜抗旱特性,并且从分子水平上验证其生物学功能和抗旱新品种培育提供了新的思路。此外,本试验中获得了转 *CsKCS11* 拟南芥植株,*CsKCS11* 是否通过调控蜡质的合成途径而提高拟南芥的抗旱能力,还有待进一步通过测定表皮蜡质含量进行研究。

笔者从黄瓜中克隆了 *CsKCS11* 基因,并结合干

旱胁迫下的表达分析和遗传转化等方法,研究了该基因的生物学功能,结果表明,黄瓜 *CsKCS11* 转基因拟南芥后代植株具有抵御干旱胁迫的功能,为进一步阐明黄瓜 *CsKCS11* 参与蜡质合成的机制提供了研究基础。

参考文献

- [1] 武瑞鑫,刘贵波.禾本科植物表皮蜡质形成及其与环境因素的关系[J].草学,2021(4):9-18.
- [2] 韦百阳,徐小静.植物表皮蜡质参与干旱胁迫的反应机制[J].生物技术通报,2015,31(8):1-8.
- [3] KUNST L. New insights into biosynthesis of cuticular wax[J]. The FASEB Journal, 2015, 29(S1):363-366.
- [4] 柴乖强.小麦超长链脂肪酰辅酶 A 还原酶基因 *TaFAR* 的同源克隆与功能分析[D].陕西杨凌:西北农林科技大学,2018.
- [5] 李魏强,张正斌,李景娟.植物表皮蜡质与抗旱及其分子生物学[J].植物生理与分子生物学报,2006,32(5):505-512.
- [6] BARTHLOTT W, NEINHUIS C, CUTLER D, et al. Classification and terminology of plant epicuticular waxes[J]. Botanical Journal of the Linnean Society, 1998, 126(3):237-260.
- [7] PASCAL S, BERNARD A, DESLOUS P, et al. *Arabidopsis* CER1-LIKE1 functions in a cuticular very-long-chain alkane: Forming complex[J]. Plant Physiology, 2019, 179(2):415-432.
- [8] 周小云.水稻叶表皮蜡质发育及蜡质相关转录因子基因 *OsWTF1* 和 *OsWTF2* 的克隆与鉴定[D].长沙:湖南农业大学,2007.
- [9] KOCH K, BARTHLOTT W, KOCH S, et al. Structural analysis of wheat wax (*Triticum aestivum*, c. v. 'Naturastar' L.): From the molecular level to three dimensional crystals[J]. Planta, 2006, 223(2):258-270.
- [10] LEIDE J, HILDEBRANDT U, REUSSING K, et al. The developmental pattern of tomato fruit wax accumulation and its impact on cuticular transpiration barrier properties: Effects of a deficiency in a β -ketoacyl-coenzyme A synthase (*LeCER6*) 1[J]. Plant Physiology, 2007, 144(3):1667-1679.
- [11] 赵帅,罗文巧,王聪,等.小麦不同器官表皮蜡质的组分及晶体结构分析[J].麦类作物学报,2018,38(8):949-956.
- [12] 杨贤鹏.拟南芥表皮蜡质合成相关基因 *CER17* 的功能解析[D].武汉:中国科学院武汉植物园,2017.
- [13] JOUBES J, RAFFAELE S, BOURDENX B, et al. The VLCFA elongase gene family in *Arabidopsis thaliana*: Phylogenetic analysis, 3D modelling and expression profiling[J]. Plant Molecular Biology, 2008, 67:547-566.
- [14] 夏凌峰,史雪,杨昊虹,等.小麦 β -酮脂酰 CoA 合成酶基因 *KCS* 的克隆与酵母表达[J].麦类作物学报,2016,36(9):1121-1129.
- [15] 张高阳,单士莲,邓接楼,等.黄麻 β -酮脂酰-CoA 合酶(*KCS*) 基因分离与功能鉴定[J].分子植物育种,2018,16(20):6718-6722.
- [16] LEE S B, JUNG S J, GO Y S, et al. Two *Arabidopsis* 3-ketoacyl CoA synthase genes, *KCS20* and *KCS2/DAISY*, are functionally redundant in cuticular wax and root suberin biosynthesis, but

- differentially controlled by osmotic stress[J]. *Plant Journal*, 2009, 60(3):462-475.
- [17] GAN L, WANG X, CHENG Z J, et al. Wax crystal-sparse leaf 3 encoding a β -ketoacyl-CoA reductase is involved in cuticular wax biosynthesis in rice[J]. *Plant Cell Reports*, 2016, 35(8): 1687-1698.
- [18] ROSSAK M, SMITH M, KUNST L. Expression of the FAE1 gene and FAE1 promoter activity in developing seeds of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Molecular Biology*, 2001, 46(6): 717-725.
- [19] HOOKER T S, MILLAR A A, KUNST L. Significance of the expression of the CER6 condensing enzyme for cuticular wax production in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2002, 129(4): 1568-1580.
- [20] 陈伟, 刘德春, 杨莉, 等. 植物表皮蜡质及相关基因研究进展[J]. *植物生理学报*, 2016, 52(8):1117-1127.
- [21] 王世峰. *CsCER10* 在黄瓜蜡质合成中的功能分析[D]. 太原: 山西农业大学, 2019.
- [22] 王文娇. 黄瓜蜡质合成基因 *CsCER1* 和 *CsWAX2* 的克隆与功能验证[D]. 北京: 中国农业大学, 2015.
- [23] 宫思宇, 于越, 郭冬雪, 等. 黄瓜蜡质合成相关基因 *CsCER4* 的克隆与表达分析[J]. *河南农业科学*, 2020, 49(4): 101-106.
- [24] 刘小凤, 安静波, 张立新, 等. 黄瓜调控蜡质合成相关基因 *CsCER7* 的克隆与表达分析[J]. *园艺学报*, 2014, 41(4): 661-671.
- [25] ZHANG J, YANG J J, YANG Y, et al. Transcription factor *CsWIN1* regulates pericarp wax biosynthesis in cucumber grafted on pumpkin[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10:1564.
- [26] ZHAI X L, WU H Y, WANG Y R, et al. The fruit glossiness locus, dull fruit (D), encodes a C₂H₂-type zinc finger transcription factor, *CsDULL*, in cucumber (*Cucumis sativus* L.)[J]. *Horticulture Research*, 2022, 9: uhac146.
- [27] YANG Y, CAI C X, WANG Y P, et al. Cucumber glossy fruit 1 (*CsGLF1*) encodes the zinc finger protein 6 that regulates fruit glossiness by enhancing cuticular wax biosynthesis[J]. *Horticulture Research*, 2023, 10(1): uhac237.
- [28] 徐丽, 蔡俊鹏. 菌落 PCR 方法的建立及其与常规 PCR 方法的比较[J]. *华南理工大学学报(自然科学版)*, 2004, 32(5):51-55.
- [29] 张峰桥, 张雁芳, 龙超良, 等. 基于 *XcmI* 识别序列的 T 载体的构建及连接 PCR 片段的优化[J]. *中国应用生理学杂志*, 2016, 32(1):46-50.
- [30] CHAI G Q, LI C L, XU F, et al. Three endoplasmic reticulum-associated fatty acyl-coenzyme a reductases were involved in the production of primary alcohols in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. *BMC Plant Biology*, 2018, 18(1):41.
- [31] 高建强, 梁华, 赵军. 植物遗传转化农杆菌浸花法研究进展[J]. *中国农学通报*, 2010, 26(16):22-25.
- [32] 柴乖强, 秦媛媛, 康雨欣, 等. 油莎豆抗旱基因 *CeDREB2.1* 的克隆与功能分析[J]. *干旱地区农业研究*, 2022, 40(3):11-19.
- [33] WANG Y, SUN Y L, YOU Q Y, et al. Three fatty Acyl-Coenzyme a reductases, BdFAR1, BdFAR2 and BdFAR3, are involved in cuticular wax primary alcohol biosynthesis in *Brachypodium distachyon*[J]. *Plant Cell Physiology*, 2018, 59(3): 527-543.
- [34] 曲淑娟, 宋波, 夏蓓蓓, 等. *Cs-ACSI* 基因克隆与转化黄瓜研究[J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2010, 32(4):79-82.
- [35] WEN X F, GENG F, CHENG Y J, et al. Ectopic expression of *CsMYB30* from *Citrus sinensis* enhances salt and drought tolerance by regulating wax synthesis in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Physiology Biochemistry*, 2021, 166:777-788.
- [36] ZANDALINAS S I, MITTLER R, BALFAGON D, et al. Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures[J]. *Physiology Plant*, 2018, 162(1):2-12.
- [37] 廉晓娟, 王艳, 李明悦, 等. 不同水肥管理模式对日光温室番茄产量、品质及经济效益的影响[J]. *中国蔬菜*, 2016(12):22-25.
- [38] YANG H B, MEI W J, WAN H L, et al. Comprehensive analysis of KCS gene family in Citrinae reveals the involvement of *CsKCS2* and *CsKCSII* in fruit cuticular wax synthesis at ripening[J]. *Plant Science*, 2021, 310:110972.
- [39] MUKARRAM M, CHOUDHARY S, KURJAK D, et al. Drought: Sensing, signalling, effects and tolerance in higher plants[J]. *Physiology Plant Arum*, 2021, 172(2):1291-1300.
- [40] AHANGER M A, SIDDIQUE K H, AHMAD P. Understanding drought tolerance in plants[J]. *Physiology Plant*, 2021, 172(2): 286-288.
- [41] LI T T, SUN Y L, LIU T X, et al. *TaCER1-1A* is involved in cuticular wax alkane biosynthesis in hexaploid wheat and responds to plant abiotic stresses[J]. *Plant Cell Environment*, 2019, 42(11):3077-3091.
- [42] CHENG C, HU S T, HAN Y, et al. Yellow nutsedge WRI4-like gene improves drought tolerance in *Arabidopsis thaliana* by promoting cuticular wax biosynthesis[J]. *BMC Plant Biology*, 2020, 20(1):498.