

黄瓜调控蜡质合成相关基因 *CsCER7* 的克隆与表达分析

刘小凤¹, 安静波¹, 张立新², 王文娇¹, 徐冲¹, 任华中^{1,*}

(¹ 中国农业大学设施蔬菜生长发育调控北京市重点实验室, 北京 100193; ² 北京市优质农产品产销服务站, 北京 100101)

摘要: 通过蛋白序列同源比对和 PCR 技术从黄瓜中克隆获得了调控蜡质合成相关基因 *CER7* 的序列, 命名为 *CsCER7*。系统发育进化树分析发现 *CsCER7* 与番茄 *SICER7* 进化距离较近; 荧光定量 PCR、GUS 染色、原位杂交和亚细胞定位结果表明: *CsCER7* 在黄瓜植株中各个器官均有表达, 果实中在表皮细胞处特异表达; 启动子序列分析显示 *CsCER7* 的启动子含有 ABA 应答的顺式作用元件 MYC 和 ABREs, 同时荧光定量 PCR 的结果也证明了在 ABA 处理下 *CsCER7* 的表达量明显升高, 且蜡质总含量也明显增多。据此推测, *CsCER7* 响应 ABA, 表达量上调, 进一步影响果皮蜡质的形成。

关键词: 黄瓜; 果皮蜡质; *CsCER7*; 序列分析; 表达分析

中图分类号: S 642.2

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2014) 04-0661-11

Cloning and Expression Analysis of *CsCER7*, a Relative Gene May Regulate Wax Synthesis in Cucumber

LIU Xiao-feng¹, AN Jing-bo¹, ZHANG Li-xin², WANG Wen-jiao¹, XU Chong¹, and REN Hua-zhong^{1,*}

(¹Beijing Key Laboratory of Growth and Development Regulation for Protected Vegetable Crops, China Agricultural University, Beijing 100193, China; ²Beijing High-quality Agro-products Service Station, Beijing 100101, China)

Abstract: *CsCER7*, a homology exonucleases gene of *Arabidopsis thaliana* *CER7*, was recently cloned from cucumber (*Cucumis sativus* L.). Phylogenetic reconstruction indicated that *CsCER7* has closer relation with *SICER7*. *CsCER7* expression was characterized by RT-PCR, GUS staining, in situ hybrid (ISH). The results showed that *CsCER7* is expressed in tested organs, especially in the epidemic cells of fruits. A GFP fusion protein analysis showed that *CsCER7* protein is localized in the nucleus and partial cytoplasm where *AtCER7* protein is also localized previously reported. Promoter prediction showed that it contains several cis-acting elements such as MYCs and ABREs which response to ABA. RT-PCR analyses that expression of *CsCER7* in cucumber fruit peel is increased under treatment with ABA. And wax load of fruit is also improved upon ABA treatment. Collectively, these results indicated that *CsCER7* acts response to ABA which induces its higher expression, and further changes the accumulation of fruit cuticular wax.

收稿日期: 2013-12-10; **修回日期:** 2014-03-17

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (‘863’ 计划) 项目 (2012AA100103); 国家科技支撑项目 (2013BAD20B01); 国家公益性行业 (农业) 项目 (201203003); 北京市科技计划项目 (D131100000713001); 北京市产业技术体系创新团队果蔬类项目

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: renhuazhong@cau.edu.cn)

Key words: cucumber; pericarp wax; *CsCER7*; sequence analysis; expression analysis

植物表皮由沉积的角质层和蜡质共同组成 (Juniper & Jeffree, 1983), 而蜡质又可分为两层, 其中一层填充在角质层中, 称为内蜡质层; 另一层分布在角质层外, 称为外蜡质层。不同物种的蜡质成分和含量不同, 同一植株不同器官及不同生长发育时期的蜡质分布和组分也存在差异 (Susan et al., 1997; 李高阳 等, 2004; 倪郁和郭彦军, 2008; 李宏建 等, 2009)。Barthlott 等 (1998) 调查了 13 000 多种植物表皮蜡质的形态结构, 发现其微观形态不是固定的, 在植物生长过程中因成分变化而相互转化。蜡质对于保护植物内部生理功能、防止体内水分散失 (Lu et al., 2009) 和抵御非生物和生物胁迫 (Steinmüller & Tevini, 1985; Seo & Park, 2010) 等均具有重要作用。此外蜡质还可能影响植物器官发育 (Smirnova et al., 2013)。

目前有关拟南芥茎表皮蜡质合成途径及其分子调控机制已经基本清晰: 首先是蜡质前体超长链脂肪酸 (VLCFAs) 的合成, 然后由两个途径分别形成蜡质的不同组分: (1) 酰基还原途径合成蜡质酯类和伯醇, (2) 脱羧基途径合成烷类、仲醇以及酮类 (Kunst & Samuels, 2003)。此外已明确在拟南芥茎表皮蜡质合成过程中起作用的基因有 *CER1*、*CER2*、*WAX2/CER3*、*CER4*、*CER6*、*CER8*、*KCS11*、*KCS12*、*KCS13*、*PAS2*、*LACS8*、*LACS2*、*MAH1*、*WSD1*、*FATB* 等; 调控蜡质分泌的基因包括 *CER5*、*WBC11*、*LTPG* 等; 对蜡质合成基因具有调控作用的基因有 *CER7*、*WIN1*、*MYB96*、*MYB16* 等。其中, *WAX2/CER3* 是拟南芥茎表皮蜡质合成中的 1 个关键基因, 主要在脱碳途径中发挥作用 (Rowland et al., 2007)。*CER7* 编码一个核酸外切酶, 具有 3' - 5' 核酸外切酶活性, 是参与 RNA 降解的外切体复合物中的核心单元 (Hooker et al., 2007)。*CER7* 参与构成的外切体复合物主要通过降解 *CER3* 的抑制子来影响 *CER3* 的转录水平, 进而影响拟南芥茎表皮蜡质的合成。通过 *cer7-1* 突变体的抑制子筛选, 得到两个介导 RNA 沉默的因子 RDR1 和 SGS3, RDR1 和 SGS3 参与 *CER3* 在植物体内的 RNA 沉默机制, 形成了 *CER7*-SGS3、RDR1-*CER3* 的蜡质调节途径 (Lam et al., 2012)。

前人就黄瓜子叶蜡质含量进行了研究, 认为近轴端叶面蜡质的形成受紫外线 B (UV-B) 的影响较大 (Fukuda et al., 2008), 但有关黄瓜蜡质形成的分子机制研究尚未见报道。本试验中克隆了黄瓜调控蜡质合成相关基因 *CsCER7*, 分析了其基因结构、蛋白结构、启动子结构和表达模式, 并初步预测了 *CsCER7* 在调控黄瓜果皮蜡质形成中的作用, 为研究黄瓜果皮蜡质形成的分子机制提供了新的理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料及其处理

供试材料为黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 高代自交系 '3401', 由中国农业大学设施蔬菜生长发育调控北京市重点实验室提供。供试材料于 2012 年 3 月 18 日播种于北京金六环农业园日光温室, 5 月 12 日选取 3 株进行试验, 每株选取两个开花当天的果实, 分别用 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA (以 H_2O 为溶剂) 和 H_2O (对照组) 均匀喷施; 在其花后 4 d 采用同样方法处理 1 次; 花后 9 d 时取果皮用于相关试验。

拟南芥品种为 'Landsberg', 引自拟南芥种质资源中心 (<http://www.arabidopsis.org>)。种子在 MS 培养基上发芽, 10 d 后移到营养土中, 在光照培养箱中培养, 光周期为 16 h 光照/8 h 黑暗, 昼夜温度为 $24^\circ\text{C}/16^\circ\text{C}$ 。

1.2 *CsCER7* 的克隆及测序

根据拟南芥 *CER7*(AT3G60500)的蛋白与 CDS 序列,从黄瓜基因组数据库(<http://www.cucumber.genomics.org.cn>)中下载同源性最高的基因 Csa006488, 命名为 *CsCER7*。根据以上基因的 CDS 序列设计 PCR 扩增引物。上游引物: 5'-ATGGAGCAGAGATTAGCCAATAC-3', 下游引物: 5'-CTAATCCACATCGATAGGGGTG-3'。提取黄瓜果皮样品总 RNA (采用华越洋 RNA 提取试剂盒), 并反转录为 cDNA (采用艾德莱快速反转录试剂盒) 作为模板对 *CsCER7* 片段进行 PCR 扩增。反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 58 °C 复性 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 34 个循环; 72 °C 10 min。琼脂糖凝胶回收产物在 3'末端加 A (TaKaRa 加 A 试剂盒) 后, 用 TaKaRa 连 T 载体试剂盒连接 pMD18-T 载体, 冰上放置 30 min 后 42 °C 热激 90 s, 然后转化大肠杆菌 DH5 α , PCR 鉴定后将含有目标片段的阳性单克隆送至华大生物技术有限公司测序。

1.3 *CsCER7* 的生物信息学鉴定

在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中, 使用 Blast 程序在 GenBank 搜索与 *CsCER7* 蛋白同源性高的植物蛋白序列。同时在 TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>) 中找出 ECERIFERUM (*CER*) 家族其他重要成员的氨基酸序列, 构建一个系统发育树。用 CLUSTAL W 程序进行序列的多态性分析 (Wang et al., 2014), 用 MEGA version 5.0 构建系统进化树 (Tamura et al., 2011)。选取 *CsCER7*、*AtCER7*、*AtRRP45A*、*SlCER7*、*cacaoCER7b* 的蛋白序列利用 MEGA version 5.0 进行氨基酸序列比对和一致性分析。

从基因数据库中提取 *CsCER7* 的开放阅读框上游启动子序列 1 500 bp, 采用在线工具 plantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcar/html/>) 对其进行顺式作用元件分析。

1.4 实时荧光定量 PCR

在黄瓜结果期采集根、茎、茎表皮、幼叶、雄花芽、雌花芽、卷须以及花后 2 d (开花当天为花后 0 d) 的果实和果皮用于分析 *CsCER7* 的空间表达变化; 此外, 采集空白处理 (H₂O) 和 ABA 处理 9 d 后的果皮分析 *CsCER7* 的表达量。仪器 ABI7500, 试剂盒 SYBR Premix Ex *Taq* (TaKaRa)。*CsCER7* 引物为 5'-AAATGATGTCCTCTGAGTCTATGGTT-3' 和 5'-CGATAGGGGTGGTGGTCTTC-3'。所用内参基因为 *TUA*, 引物为 5'-ACGCTGTTGGTGGTGGTAC-3' 和 5'-GAGAGGGGTAAACAGTGAATC-3'。PCR 反应体系为: SYBR Premix Ex *Taq* 12.5 μ L, 上游引物 (10 μ mol \cdot L⁻¹) 0.5 μ L, 下游引物 (10 μ mol \cdot L⁻¹) 0.5 μ L, 50 \times ROX Reference Dye II 0.5 μ L, cDNA 模板 2 μ L, 最后加灭菌去离子水至 25 μ L。PCR 扩增程序为: 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 复性 40 s, 40 个循环。设置 3 个技术性重复, 2 个生物学重复。引物溶解曲线分析表明溶解曲线为单峰, 且峰出现的位置在 80 ~ 85 °C 之间。采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 相对定量分析方法计算出基因的相对表达量。

1.5 *CsCER7* 启动子克隆、构建 *CsCER7* Promoter:GUS 转基因植株以及 GUS 染色

从黄瓜基因组数据库中 *CsCER7* 开放阅读框上游选取 1 480 bp 的片段克隆, 设计引物进行 PCR。上游引物: 5'-GCTCTAGATCACCTGCATCTCTTGATACTCTG-3', 下游引物: 5'-TCCCCCGGGAGAGTTCCACGTACTGGCTAAAA-3'。PCR 扩增为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 56 °C 复性 30 s, 72 °C 延伸 1 min 45 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min。将 PCR 产物与载体 PCAMBIA1305.1 用 *Pst* I 和 *Nco* I 双酶切, 凝胶回收后用 T4 连接酶连接, 冰上放置 30 min 后 42 °C 热激 90 s 转化大肠杆菌 DH5 α , PCR 鉴定后的阳性菌液送华大公司测序。选择测序正确的菌液提取质粒后用电击法转化农杆菌 C58, PCR 方法鉴定后将携带 *CsCER7* Promoter:GUS 质粒的农杆菌用蘸花法遗传转化拟南芥。

收获 T0 代种子, 用 0.03% Triton-X 消毒, 播种于含潮霉素 $30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 MS 固体培养基上, 于 4°C 冰箱低温处理 3 d 后置于光照培养箱, 10~14 d 后将筛选出的植株移入灭菌营养土中, 在光照培养箱中培养。提取 DNA, PCR 鉴定出 6 个 T1 代株系, 编号为 #1~#6。

选取 #4 株系, 取莲座叶、花、发育中期的果和生长点放入 GUS 染色液中, 抽气 20 min, 置于 37°C 摇床中 (转速为 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 直至染色, 然后于 70% 酒精中脱色 24 h, 在体视显微镜下观看拍照。

1.6 CsCER7-GFP 融合蛋白在洋葱表皮中的定位

根据 CsCER7 开放阅读框设计引物 (上游: $5'\text{-GCTCTAGAATGGAGCAGAGATTAGCCAATAC-3}'$; 下游: $5'\text{-TCCCCCGGGATCCACATCGATAGGGGTGG-3}'$)。将 PCR 产物融合到 PUC-SPYNE 载体的绿色荧光蛋白 (GFP) 上游 Xba I 和 Sma I 间的位置。用基因枪将携带 CsCER7-GFP 融合基因的载体打入洋葱表皮进行培养, 利用共焦激光扫描显微镜 (Nikon C1, 日本) 观察 (Hongyun et al., 2013)。

1.7 原位杂交

选择 CsCER7 的特异区域设计引物。T7 引物: $5'\text{-GATTTAGGTGACACTATAGAATGCTAGTTAGGGCGTGTAAATAGACCG-3}'$; SP6 引物: $5'\text{-TGTAATACGACTCACTATAGGGTGACAGAAGCAATTCCG CAGAC-3}'$ 。片段长度为 474 bp。探针制作以及原位杂交参照柳美玲等 (2013) 的方法。

1.8 蜡质分析

取 ABA 处理后 9 d 的果实 (处理与对照), 截取果实中间部位, 用游标卡尺测量截取部位的长度与横径, 把截取部分当做圆柱体计算其侧面积; 常温下用氯仿浸提 1 min, 然后 60°C 氯仿浸提 2 min, 用氮气将氯仿吹干。加入 $100 \mu\text{L}$ 硅烷化试剂 (bis-N,N-trimethylsilyl trifluoroacetamide), 115°C 下衍生化 30 min, 然后加入 $30 \mu\text{g}$ 二十一烷作为内标, 溶于 $500 \mu\text{L}$ 己烷中。用 GC-MS (气质联用仪) 测定蜡质含量 (Millar et al., 1999)。

取开花当天处理后 9 d 的果实中间部位的果皮, 面积约为 3 mm^2 , 厚度约为 3 mm, 用戊二醛固定 (4°C)。用 PBS (pH 7.2) 洗 3 次后用 1% OsO_4 固定, 然后在酒精系列梯度中干燥。观察扫描电子图像之前将样品裹上金粉, 用扫描电子显微镜 (Hitachi S-4700) 于 2 kV 加速电压下观察; 用环氧树脂包埋样品, 超微切片机切片, 安装在铜载网上固定, 在透射电子显微镜 (ECNAI G2 12) 下观察透射电镜图 (Zhou et al., 2013)。

2 结果与分析

2.1 黄瓜 CsCER7 的基因结构与氨基酸序列分析

将拟南芥调节蜡质合成相关基因 CER7 (AT3G6050) 的 CDS 与蛋白序列在 NCBI 基因组数据库中同源比对, 得到一些已知序列推测的 CER7, 本实验室将黄瓜相关基因命名为 CsCER7。

通过同源克隆得到黄瓜 CsCER7 的 CDS 序列。CsCER7 的基因组序列为 7 192 bp, cDNA 序列全长 1 796 bp, 含有 1 359 bp 的开放阅读框。CsCER7 的基因结构分析显示其与拟南芥的 AtCER7 基因结构相似, 也含有 9 个外显子 (图 1), 且高度保守。CsCER7 编码 452 个氨基酸, 含有 1 个保守的 RNA 酶的 PH 结构域。将 CsCER7 与 AtCER7、AtRRP45A、CsCER7、SICER7 和 cacaoCER7b 进行蛋白序列比对, 结果表明 CsCER7 与其他 CER7 蛋白均含有两个核糖核酸外切酶的磷酸化结构域, 分别为域 1 和域 2, 除 AtRRP45A 外, 在 N 端有一段细胞核定位的氨基酸序列 (图 2)。CsCER7 与 SICER7 蛋白比对一致性最高, 为 64.60%; 与 cacaoCER7b 的一致性为 61.62%; 与 AtCER7 的一

致性为 60.04%; 与 *AtRRP45A* 的一致性为 47.57%。表明 *CsCER7* 在氨基酸序列上高度保守, 因此推测 *CsCER7* 是 1 个核糖核酸外切酶, 且功能可能与拟南芥中 *AtCER7* 功能相似, 影响蜡质的形成。

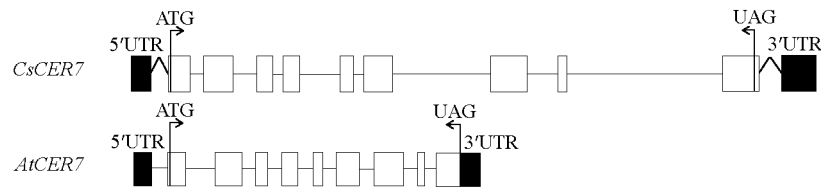


图 1 *AtCER7* 和 *CsCER7* 的外显子—内含子结构分析

黑色方块代表 UTR, 白色方块代表外显子, 横线代表内含子。

Fig. 1 Exon - intron structure of *AtCER7* and *CsCER7*

Black boxes represent UTR, black boxes represent exons and lines represent introns.

<i>CsCER7</i>	1	MEORLANTWRLSANEKKFIETALLSRLVDGRGPFYRNLTINFGKDDGSSEVQLGQTHV
<i>AtCER7</i>	1	MEGRLANMWRLTVNESKFWETALQSELVDGRGLYDYLKLTIKFKGEGSSQVQLGQTHV
<i>AtRRP45A</i>	1	MEGRLANMWRLTVNESKFWESALQSELVDGRGLYDYLKLTIKFKGEGSSQVQLGQTHV
<i>SICER7</i>	1	MEORLGSTWRMTVNEKKFIESALESELVDGRGPFYRNLTINFGKDDGSSEVQLGQTHV
<i>cacaoCER7b</i>	1	MDTLANTWRMTVNEKKFIETALLSEVRHIDGRKPFERNIINFGSEDGLAEVQLGQTRV
<i>CsCER7</i>	61	MGFVTAQLVQPYRDRPNEGTLSTYTFEFSPMADPSFEPGRPGESAVELGRVIDRGLRESRA
<i>AtCER7</i>	61	MGFVTAQLVQPYKDRPNEGSLSTYTFEFSPMADPSFEPGRPGESAVELGRVIDRGLRESRA
<i>AtRRP45A</i>	61	MAFVTAQLVQPYKDRPSEGSLSTYTFEFSPMADPSFEPGRPGESAVELGRVIDRGLRESRA
<i>SICER7</i>	61	MSFVTSQVLVQPYRDRPNEGTLSTYTFEFSPMADPSFEPGRPGESAVELGRVIDRGLRESRA
<i>cacaoCER7b</i>	61	MGFVTAQLVQPYQDRPNEGTLSTYTFEFSPMADPSFEPGRPGESAVELGRVIDRGLRESRA
<i>CsCER7</i>	121	VDTESLCVVSGLKSVWVAIRVDLHILDNGGNLVDAAANVAALALSTFRPPECSSLGDDGOEV
<i>AtCER7</i>	121	VDTESLCVLAGKMWVSVRIDLHILDNGGNLVDAAANIAALALMTFRPPECSTVGGENGQEV
<i>AtRRP45A</i>	121	VDTESLCVLAGKMWVSVRIDLHILDNGGNLVDAAANVAALALMTFRPPECSTVGGENGQEV
<i>SICER7</i>	121	VDTESLCVVGKMWVSIRIDLHILDNGGNLVDAAANIAALALMTFRPPECSTVGGENGQEV
<i>cacaoCER7b</i>	121	VDTESLCVLAGKMWVIRIDLHILDNGGNLVDAAANIAALALMTFRPPECSSLGDDGOEV
<i>CsCER7</i>	181	IIHPPEVREPLPLIIHHLPIAVTFAPFRSESLVIDPTECEAVMCGRMTVTVNANGDVC
<i>AtCER7</i>	181	IIHPPEVREPLPLIIHHLPIAVTFAPFRSESLVIDPTECEAVMCGRMTVTVNANGDVC
<i>AtRRP45A</i>	181	IIHPPEVREPLPLIIHHLPIAVTFAPFRSESLVIDPTECEAVMCGRMTVTVNANGDVC
<i>SICER7</i>	181	TLHPPEVREPLPLIIHHLPIAVTFAPFIG-DEHMVIDPTECEAVMCGRMTVTVNANGDVC
<i>cacaoCER7b</i>	181	IIHPPEVREPLPLIIHHLPIAVTFAPFIDESESLVIDPTECEAVMCGRMTVTVNANGDVC
<i>CsCER7</i>	241	AIQKAGGEGVLKSVIMOCLEIASVKGDIITKTKINAVETYSARQLRKRRHPSVNLVDVG
<i>AtCER7</i>	241	AIQKPGEGVNSVILHCLRLASSRAAATTKIIRREEVAYNCERSLOKVKRHHPLAKSEV
<i>AtRRP45A</i>	241	AIQKPGEGVNSVILHCLRLASSRAAATTKIIRDAVEAYNRERSLOKVKRHHPLAKSEV
<i>SICER7</i>	240	AIQKAGGEGVLKSVIMOCLEIASVKGDIITKTKINAVETYSARQLRKRRHPSVNLVDVG
<i>cacaoCER7b</i>	241	AIQKAGGEGVNSVIMOCLEIASVKGDIITKTKINAVETYSARQLRKRRHPSVNLVDVG
<i>CsCER7</i>	301	G-GTGSGLKDSQGISDGQKSIN-----DQESVVSQSGSIKNDASTNQGGOLDKRDSDAKNFI
<i>AtCER7</i>	301	S-GPTVAVKEEHRKSSDQ-----ERAAEISREHVERLKLSTEEVRSK-EEEAANEK
<i>AtRRP45A</i>	301	L-GPIVIV-----
<i>SICER7</i>	300	N-APG--EKAKQVLEGPK-LK-----SEECVSQS-----DDMDVEQGRKIKKSKDKRSFT
<i>cacaoCER7b</i>	301	KESQNSLDNKGVELAGQYMERLKLVSRESCIGQSNDDDEADSKLSALSGT-DANGINFI
<i>CsCER7</i>	355	GGPSGWDPHSKGADSDFLKATLASRGNLTATKKEDLSDEMSSSMVDQEAKEVDENLS
<i>AtCER7</i>	351	GGPSNWDPPYSBAMVDLSLVSASRGDPVTKSSSTKKMNGSGNAQKVG-VEISVEVGTG-
<i>AtRRP45A</i>	347	GRPSSWDPPYSBGNVDLFLKATLASRGSVAVPMNLDNLGDNIREDTKTDEPLPDVNVQSSS
<i>SICER7</i>	360	GGPFSWDPPYSKGVDFEFLKASLASKGLSTPNKKKGSSSDEKPGAEEREPYKDVNPKLSA
<i>cacaoCER7b</i>	360	GGPFSWDPPYSKGVDFEFLKASLASKGLSTPNKKKGSSSDEKPGAEEREPYKDVNPKLSA
<i>CsCER7</i>	415	PVAAKTLSEENGKTKLDAVKPKNKKKKKTTPIDVD
<i>AtCER7</i>	409	ELGKKDKTKKDGEMTLKDAVKPKNKKKKK-----
<i>AtRRP45A</i>	407	TDSAGKEMTMSKEKTLQDAVKPKNKKKKKSSNTAAV-
<i>SICER7</i>	420	VDASETEMQTKGOKTLKDAVKPKNKKKKKSSMI----
<i>cacaoCER7b</i>	420	VDASETEMQTKGOKTLKDAVKPKNKKKKKSSMI----

图 2 黄瓜 *CsCER7* 的氨基酸序列分析

CsCER7: 黄瓜 (Csa006488); *AtCER7*: 拟南芥 (AT3G6050); *AtRRP45A*: 拟南芥 (AT3G12990); *SICER7*:

番茄 (XP_004240124); *cacaoCER7b*: 可可 (EOY10081)。单线和双线分别表示核糖核酸

外切酶磷酸化结构域 1 和结构域 2, 方框内为预测的核定位信号。

Fig. 2 Alignment of amino acid sequences of *CsCER7*

CsCER7: *Cucumis sativus* L. (Csa006488); *AtCER7*: *Arabidopsis thaliana* (AT3G6050); *AtRRP45A*: *Arabidopsis thaliana* (AT3G12990);

SICER7: *Solanum lycopersicum* L. (XP_004240124); *cacaoCER7b*: *Theobroma cacao* L. (EOY10081).

Single lines and double lines indicate phpsphprlytic domain 1 and phpsphprlytic domain 2 of exoribonuclease respectively, and the box indicates the predicted nuclear localization signal.

2.2 系统进化树分析

选取了黄瓜、拟南芥、可可、苜蓿、番茄、玉米、水稻及人基因组中预测的 *CER7* 的蛋白序列, 以及拟南芥中 *CER* 家族中其他重要成员进行系统进化树分析, 结果显示 *CER7* 蛋白被分成了 3 个进化枝: 双子叶植物、单子叶植物和以人为代表的动物; 与拟南芥中 *CER* 家族其他重要成员 (*CER1*、*WAX2*、*CER6* 以及 *CER8*) 处于不同的分枝, 遗传距离较远 (图 3)。双子叶植物中, 番茄的 *SICER7* 与黄瓜的 *CsCER7* 在同一分枝, 氨基酸序列高度同源, 这与氨基酸序列分析中的结果是一致的。

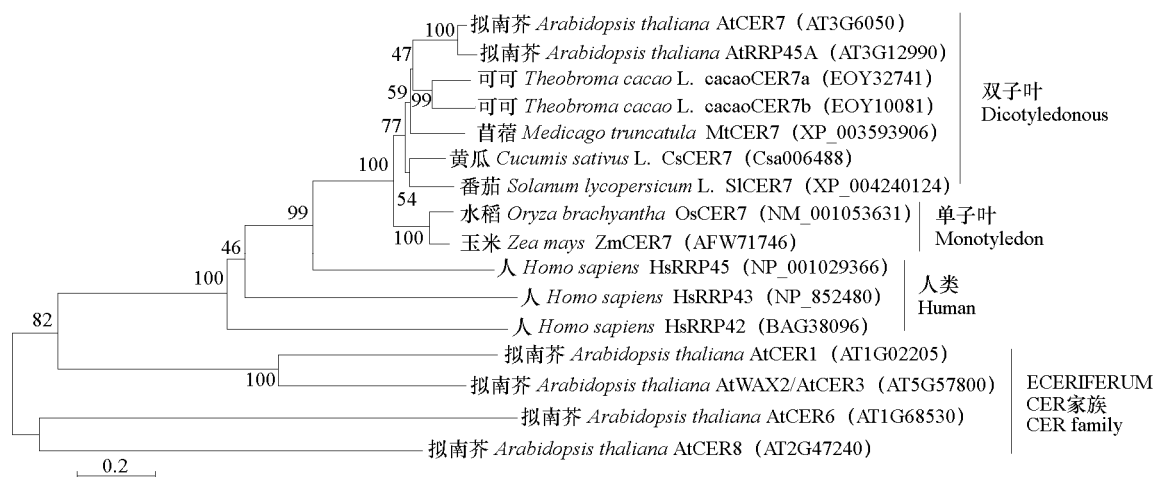


图 3 黄瓜 *CsCER7* 与其他物种 *CER7* 同源蛋白及拟南芥中 *CER* 家族重要成员的进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree analysis of *CsCER7*, *CER7* homologs from other species and *CER* family members in *Arabidopsis*

2.3 *CsCER7* 在黄瓜中的表达模式

采用荧光定量 PCR 技术分析 *CsCER7* 在黄瓜不同组织中的表达模式, 结果显示: *CsCER7* 在所检测的黄瓜各个器官组织中均有表达, 其中在茎表皮、幼嫩的叶、花芽以及果皮中表达明显, 而根中微弱表达 (图 4)。值得注意的是, 在茎表皮和果皮中的表达量几乎是茎和果实中表达量的 3 倍。

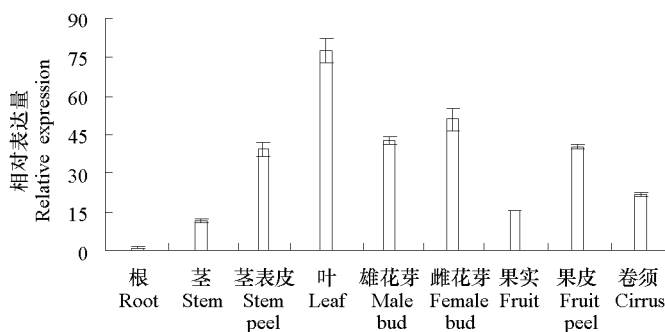


图 4 *CsCER7* 在黄瓜不同器官的表达

Fig. 4 Expression of *CsCER7* in different organs of cucumber

CsCER7 Promoter: GUS 转基因 T1 代#4 株系 GUS 染色结果显示: *CsCER7* 在花柱顶端靠近柱头的部位有表达, 但在柱头顶端不表达, 在花丝及萼片的脉中有表达 (图 5, A); 莲座叶的表皮、叶脉及叶缘尖处部分表达显著; 在表皮毛基座及表皮毛细胞中表达显著 (图 5, B、C、D); 在花序顶端有表达, 其中萼片的无分枝表皮毛中同样表达显著 (图 5, E、F、K); 在果实头部有表达, 果实下部表达逐渐变强, 但在果实开裂的部位没有表达 (图 5, G、H、I), 果柄的花瓣离层与萼片离层处有强烈表达 (图 5, G、I); 从果实开裂处剖开, 种子没有表达, 但胎座处有表达 (图 5, J)。

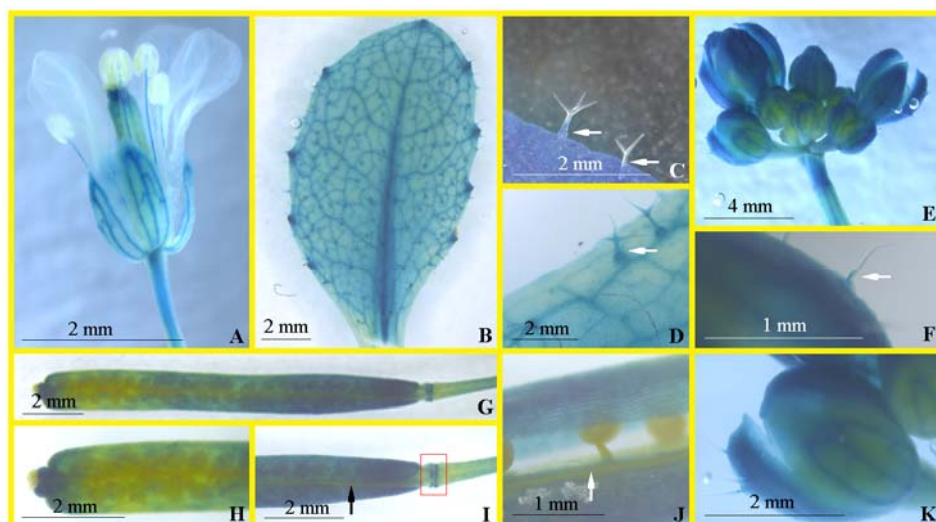


图 5 GUS 报告基因分析 *CsCER7* 在拟南芥中的空间表达模式

A: 花; B: 莲座叶; C 和 D: 叶片表皮毛, 箭头表示表皮毛基部; E: 花序; F: 花苞萼片的无分枝表皮毛, 箭头表示表皮毛基部; G、H 和 I: 果实, 箭头表示果实开裂处; J: 剥开的果实, 箭头指示胎座; K: 花苞。

Fig. 5 Spatial expression pattern of *CsCER7* detected by a GUS reporter gene assay in *Arabidopsis*

A: Flower; B: Rosette leaf; C and D: Trichomes of leaf, arrows indicate the base of trichomes; E: Inflorescence; F: The trichome of bud, arrow indicates the base of trichome; G, H and I: Fruit, arrow indicates the valve margin, red box indicates the abscission of petal and sepal from flower stem; J: Stripped fruit, arrow the placenta; K: Flower bud.

由于 *CsCER7* 在黄瓜果皮中表达量高, 试验中选取了果长约 1 cm (心室已形成) 与果长约 0.5 cm (心室未形成) 的幼果进行原位杂交, 同时选取了根部进行原位杂交。结果显示: 在果实中, *CsCER7* 只在果实表皮细胞处特异表达, 且在心室已形成的果实表皮细胞处表达较强 (图 6, B), 心室未形

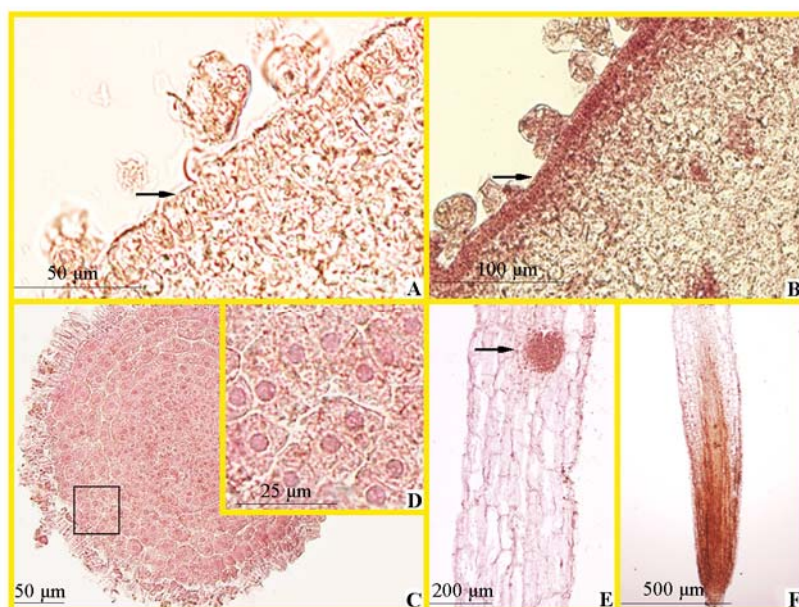


图 6 *CsCER7* 的 mRNA 在黄瓜果实和根中的原位杂交定位

A 和 B: 果皮, 箭头指示表皮细胞; C: 根尖的横切面; D: C 图中方框处的放大图; E: 根的纵切, 箭头指示侧根原基; F: 根尖的纵切面。

Fig. 6 In situ localization of *CsCER7* mRNA in fruit and root in cucumber

A and B: Peel of fruit, arrows indicate the epidermic cells; C: Transsection of root tip; D: Enlarged view of the box in the C;

E: The vertical section of root, arrow indicates the root primordium; F: The vertical section of root tip.

成的果实表皮细胞处表达特别微弱（图 6，A），表明 *CsCER7* 调控果皮蜡质的合成在果实发育最初期是不明显的。根部的原位杂交结果表明，*CsCER7* 在根尖处特异表达（图 6，F），将根尖横切后发现，在根尖各个皮层均有表达（图 6，C），且单个细胞内的细胞质中均有表达，在细胞核内表达显著（图 6，D），同时在侧根原基中也有强烈表达（图 6，E）。

洋葱表皮细胞的瞬时 GFP 结果显示，*CsCER7* 主要定位在细胞核及细胞质中（图 7）。*CsCER7* 亚细胞定位结果与 *AtCER7* 一致，同时与原位杂交结果中根尖处的表达结果一致。

综合荧光定量 PCR、GUS 染色、原位杂交及瞬时 GFP 结果，*CsCER7* 主要在植株地上部的器官组织中表达，果实中只在表皮细胞处特异表达且显著，说明 *CsCER7* 可能在植物表皮发育中发挥重要作用。

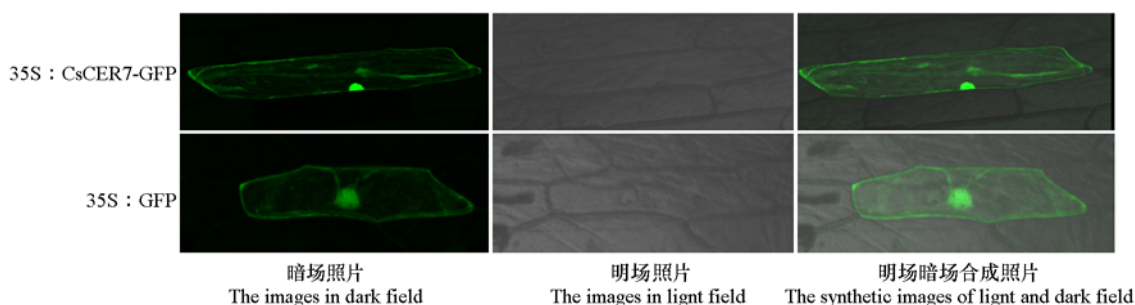


图 7 *CsCER7*-GFP 在洋葱表皮细胞的瞬时表达

Fig. 7 The transient expression of *CsCER7*-GFP in onion epidermal cells

2.4 ABA 对 *CsCER7* 的表达以及果皮蜡质积累的影响

对 *CsCER7* 的启动子进行克隆与分析发现，在其 ATG 上游 1 500 bp 的启动子区域，除含有真核生物启动子固有的 TATA 区及 CAAT 区外，还存在 ABA 应答的顺式作用元件 MYC 和 ABREs（图 8）。

```

TTCATCGAGGGCCTCACCTGCATCTCTTGATACTCTGTACATAAAATAAAATCCACCCCACTTCTTACCAAC
CAAAGGAAGTGGTCATTGTCTAGCTACATAATTCCAGTTTGACCATAAGGGCCAACACCAAAATGAAACAA
ATTTAGTTTAGCTACAAAAAGACACTCTACTAGTTACATTGGAAGTTGGGTCACTACAAAATCAGACCTCAA
GAAATCCTTCCACACGAGAAGTTTGGTTGTACAAAATCAGATCCATAAAATATCCTTACTTCTTCTTCAATT
GTTGGGTTGCTTTAGTCTGTGGTGTCTTTAGTTTGTGGTGTGCCCTCTTGAGGCGTGTGATCAGTGCTAT
TTTTGGGATTGATGACCGTGGTTGGAGTTCTCTGTGATACACAGAAAGTTGAGGCTTTGGGTTTGGTATT
ATGAAGTGAAAGGAGTGTGTTTAATTTGTTGAGTTTCTATGGGTGATGGGAAAGGCTTTAGGTTTGG
GAAGATAATTGGCGTGCTCCGCAACCTGTTGTGACTTTGTACCATGATATTATGTTATCTCCACTGAAAAAGA
ACTTGTCTTAGATTGTTGGAATCTCTGAAACAAGCTTGGGATTGGGGTTATGGAGAAACCTCTTGATAG
AGAAGTTGGAAGTCCATTACTTGTGCCCAATTTATTGAATCTTGGGTGGTAAATGGAAATAGAAGCAAGTT
ACCTGAGAGATCGACTCCTCAGGCCAGCTTCTACGAAATCCACCTTTCTAAACTTGATAAAGGTTTACAG
AAAATAAACTCCCTATGTTCAACTTATATTGAAGCTTAGAATTCCTAAGAAAGTGAAGATCTTCTACGGTCC
CTTGCTTATAGAAGTCTAAATACTCACGGAAAGCTTCAAAGGAAATCCCATATTGGATCCTCACCCCTCCAT
TTTCTGTCTTTGTCTTAGAGAGATGAATACTATAGATCACTTGTTTCTACACTGCGAGTTTGCTTCTAAAGAGT
GGTGTTTTTTTTAGTACTTTTGGGTGGCTAGTGCCTCCCAAGAAGATTGATGATTGGATGATGGAGGGT
CTTGACGGTGGGAGCTTTGATGAAAAGAAAAATCCTTGGAGATGTGCTACGTGTCTTTTGTGGTGG
CTTTGGAAAGAAAAGATAGTAGGATGTTTGAAGATAAGTCTACGTCTTTGATTCTTTTGGCTCTTTTCA
AACTACAACCTTTTGGTGTGTACAAATTACATCAATTTCTTTTGTAAATATAACCTATTATGATTATTAACAGT
TAGAGAGCTCTTCTTTAGTTTGTGAGGAGGGGTTCCCTCTACCCTCTTTCTAGGCTGTTTGTGGTCT
TTTGATGAAATATATACCTTTGTGTACTATAAAAAAGTTAATAGCATAATATAATCTCTCTAATGTATAGTT
TGAATTTTAGCCAGTACGTGGAAGTCTCTTTGTGAATG

```

图 8 *CsCER7* 启动子元件分析

蓝色：CAAT 区；红色：TATA 区；黄色：MYC 元件；绿色：ABREs；ATG 为起始密码子。

Fig. 8 The promoter element analysis of *CsCER7*

Blue sequences represent CAAT boxes; Red sequences represent TATA boxes; Yellow sequences represent MYC; Green sequences represent ABREs; ATG represents the start codon.

据此,于黄瓜果实花后 0 d、4 d 时进行 ABA 处理,并于花后 9 d 时进行果皮蜡质总量分析。结果表明,ABA 处理后 *CsCER7* 的表达量明显升高(图 9, A),且果皮蜡质总含量明显升高(图 9, B 和图 10)。据此推测, *CsCER7* 可能促进黄瓜果皮蜡质合成相关基因的表达,且 ABA 可以通过调控 *CsCER7* 的表达,进一步影响果皮蜡质的形成。

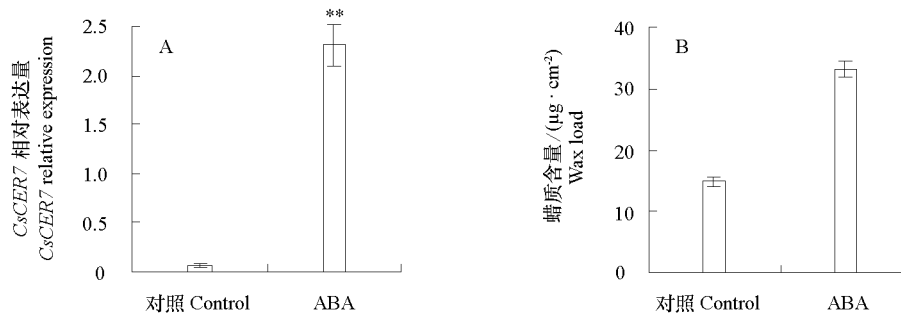


图 9 ABA 处理对果皮 *CsCER7* 表达量 (A) 和蜡质含量 (B) 的影响

Fig. 9 ABA influenced *CsCER7* expression (A) and fruit cuticle wax loads (B)

** $P < 0.01$.

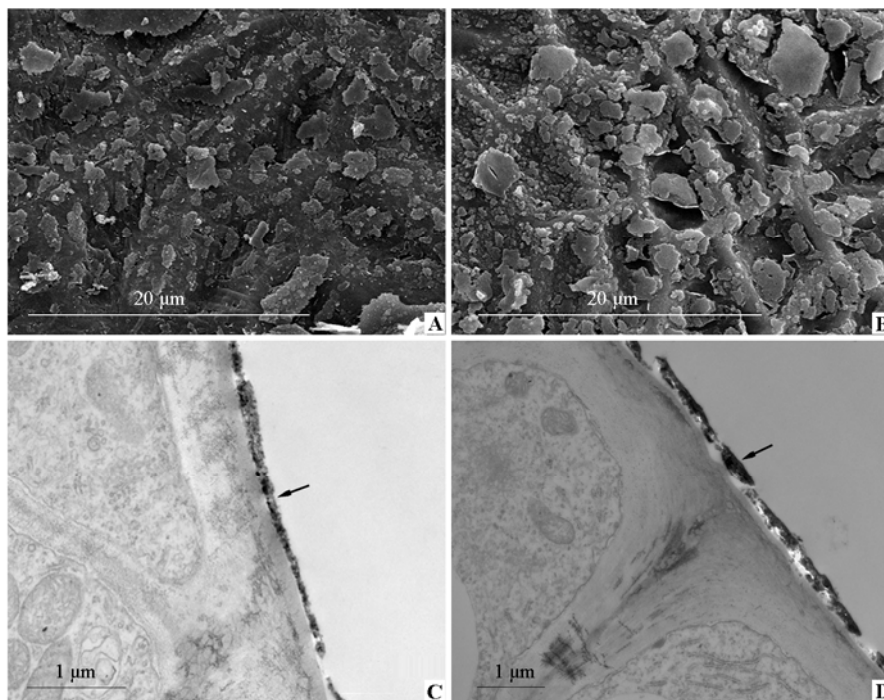


图 10 ABA 处理后果皮蜡质的扫描电镜图 (A、B) 和透射电镜图 (C、D)

A 和 C: 对照 (H_2O 处理); C 和 D: ABA 处理, 箭头指示为蜡质层。

Fig. 10 The SEM (A, B) and TEM (C, D) views of fruit cuticular wax after ABA treatment

A and C: Control (H_2O treatment); C and D: ABA treatment, the arrows indicate the wax layer.

3 讨论

3.1 *CsCER7* 可能是核糖核酸外切酶

核糖核酸外切酶是核糖核酸 (RNA) 的外切酶, 是一种能降解 RNA, 并在 5'端或 3'端的核苷酸

移除的酶,主要在核中以及细胞质中含有 RNA 的部位发挥作用。拟南芥 CER7 是一个 3'-5'的核糖核酸外切酶,与酵母菌中的 RRP45p 功能同源,是 RNA 加工和降解的外来体的一个核心单位(Hooker et al., 2007)。酵母和人类的同源 CER7 都被定义为 3'-5'的核糖核酸外切酶(RNA 加工和降解的外来体)的核心单元之一(Liu et al., 2006)。将 AtCER7 与 GFP 融合转入烟草中,发现 AtCER7 在细胞质以及细胞核中(除核仁外)均有表达,这与核糖核酸外切酶发挥功能的区域是一致的。本研究中通过将 CsCER7 与拟南芥、番茄、水稻等其他物种进行基因结构分析与氨基酸序列比对,发现 CsCER7 与拟南芥的 CER7 基因结构相似,同时含有 9 个外显子,且同样含有 1 个保守的 RNA 酶 PH 结构域,两个核糖核酸外切酶磷酸化区域,以及 3'端的一段核定位序列。另外,进化树分析也表明 CsCER7 与 AtCER7 在一个分组内,同源性较高。这些结果均表明, CsCER7 是 1 个核糖核酸外切酶。

3.2 CsCER7 可能影响黄瓜果皮蜡质的积累

陆生植物表皮蜡质存在于地上部器官组织表皮,且蜡质是在表皮细胞中合成并运输到表皮外的(Kunst & Samuels, 2003)。蜡质合成基因 AtCER6 启动子在烟草中启动的 GUS 信号在茎表皮细胞处特异显色(Hooker et al., 2002);蜡质合成基因 LACS1 启动子连接 GUS 同样在茎表皮细胞中特异表达(Lu et al., 2009);而 CsCER7 在黄瓜茎表皮与果皮中的表达量均远高于在茎和果实中的表达量,原位杂交的结果显示 CsCER7 在果实中只在表皮细胞处特异表达,同时 GUS 染色表明 CsCER7 在叶片表皮处表达。综上推测, CsCER7 参与黄瓜表皮细胞的发育,可能参与调控蜡质的形成。此外,在拟南芥 CER7 的突变体中,茎部与角果表皮的蜡质含量与所对应的野生型相比分别下降了 30% 和 50%(Goodwin et al., 2005),且蜡质成分与含量的变化与 WAX2 的突变体一致;同时 CER7 突变体中 WAX2 的表达量下降,且 WAX2 的启动子所启动的 GUS 信号明显减弱甚至消失。推测 AtCER7 主要通过降解编码了 WAX2 负调节因子的 mRNA 来控制 WAX2 的表达,进而调节表皮蜡质的形成(Hooker et al., 2007)。在拟南芥中,MYB96 调节蜡质含量受到干旱的调节,而干旱则通过 ABA 途径来调节 MYB96 的表达,MYB96 进一步调控蜡质合成的基因 KCS 和 KCR 的表达来最终影响表皮蜡质的沉积(Seo et al., 2011)。CsCER7 启动子中含有 MYC、ABREs 等响应 ABA 的顺式作用元件(郭晋燕等, 2011),且经 ABA 处理,花后 9 d 的果皮中表达量明显升高,同时果皮中的蜡质含量也显著增加。综上推测, ABA 影响 CsCER7 的表达,且 CsCER7 可能参与黄瓜果皮的发育,调节黄瓜果皮蜡质的形成,但 CsCER7 是否会调控 WAX2 的表达,尚有待进一步研究与验证。

References

- Barthlott W, Neinhuis C, Cutler D, Ditsch F, Meusel I, Theisen I, Wilhelmi H. 1998. Classification and terminology of plant epicuticular waxes. Botanical Journal of the Linnean Society, 126: 237 - 260.
- Fukuda S, Satoh A, Kasahara H, Matsuyama H, Takeuchi Y. 2008. Effects of ultraviolet-B irradiation on the cuticular wax of cucumber (*Cucumis sativus*) cotyledons. Journal of Plant Research, 121: 179 - 189.
- Goodwin S M, Rashotte A M, Rahman M, Feldmann K A, Jenks M A. 2005. Wax constituents on the inflorescence stems of double eceriferum mutants in *Arabidopsis* reveal complex gene interactions. Phytochemistry, 66: 771 - 780.
- Guo Jin-yan, Deng Xiao-yu, Zou Cui-xia, Li Qiu-li. 2011. The research progress of the transcription factors and promoter cis-elements induced by plant abiotic stress. Biotechnology Bulletin, 4: 16 - 20. (in Chinese)
- 郭晋燕, 郑晓瑜, 邹翠霞, 李秋莉. 2011. 植物非生物胁迫诱导启动子顺式元件及转录因子研究进展. 生物技术通报, 4: 16 - 20.
- Hooker T S, Lam P, Zheng H, Kunst L. 2007. A core subunit of the RNA-processing/degrading exosome specifically influences cuticular wax biosynthesis in *Arabidopsis*. Plant Cell, 19: 904 - 913.
- Hooker T S, Millar A A, Kunst L. 2002. Significance of the expression of the CER6 condensing enzyme for cuticular wax production in *Arabidopsis*. Plant Physiology, 129 (4): 1568 - 1580.

- Juniper B E, Jeffree C E. 1983. Plant surfaces. London: Edward Arnold: 3.
- Kunst L, Samuels A L. 2003. Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Progress in Lipid Research*, 42: 51 – 80.
- Lam P, Zhao L, McFarlane H E, Aiga M, Lam V, Hooker T S, Kunst L. 2012. RDR1 and SGS3, Components of RNA-mediated gene silencing, are required for the regulation of cuticular wax biosynthesis in developing inflorescence stems of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 159: 1385 – 1395.
- Li Gao-yang, Wang Li, Bao Wei-kai. 2004. Leaf anatomical observation of four kinds of mosses plants. *Acta Botanica Yunnanica*, 26: 305 – 309. (in Chinese)
- 李高阳, 王 丽, 包维凯. 2004. 四种藓类植物叶片解剖结构观察. *云南植物研究*, 26: 305 – 309.
- Li Hong-jian, Yi Kai, Li Bao-jiang, Liu Zhi, Sun Peng. 2009. The research of fruit organizational structure in different apple varieties. *China Fruits*, (3): 13 – 17. (in Chinese)
- 李宏建, 伊 凯, 李宝江, 刘 志, 孙 鹏. 2009. 苹果不同品种果实组织结构研究. *中国果树*, (3): 13 – 17.
- Liu Mei-ling, Ding Lian, Zhang Xiao-lan. 2013. RNA in situ hybridization technology of vegetable crops. *Journal of Shanxi Agricultural University*, 33: 42 – 45. (in Chinese)
- 柳美玲, 丁 莲, 张小兰. 2013. 蔬菜作物的 RNA 原位杂交技术. *山西农业大学学报*, 33: 42 – 45.
- Liu Q, Greimann J C, Lima C D. 2006. Reconstitution, activities, and structure of the eukaryotic RNA exosome. *Cell*, 127: 1223 – 1237.
- Lu S, Song T, Kosma D K, Parsons E P, Rowland O, Jenks M A. 2009. *Arabidopsis* CER8 encodes LONG-CHAIN ACYL-COA SYNTHETASE 1 (LACS1) that has overlapping functions with LACS2 in plant wax and cutin synthesis. *Plant Journal*, 59 (4): 553 – 564.
- Millar A A, Clemens S, Zachgo S, Giblin E M, Taylor D C, Kunst L. 1999. CUT1, an *Arabidopsis* gene required for cuticular wax biosynthesis and pollen fertility, encodes a very-long-chain fatty acid condensing enzyme. *American Society of Plant Physiologists*, 11: 825 – 838.
- Ni Yu, Guo Yan-jun. 2008. Research status of plant long chain fatty acids and the cuticle wax biosynthesis gene related. *Hereditas*, 30: 561 – 567. (in Chinese)
- 倪 郁, 郭彦军. 2008. 植物超长链脂肪酸及角质层蜡质生物合成相关酶基因研究现状. *遗传*, 30: 561 – 567.
- Rowland O, Lee R, Franke R, Schreiber L, Kunst L. 2007. The CER3 wax biosynthetic gene from *Arabidopsis thaliana* is allelic to WAX2/YRE/FLP1. *FEBS Letters*, 581: 3538 – 3544.
- Seo P J, Lee S B, Suh M C, Park M J, Go Y S, Park C M. 2011. The MYB96 transcription factor regulates cuticular wax biosynthesis under drought conditions in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 23: 1138 – 1152.
- Seo P J, Park C M. 2010. MYB96-mediated abscisic acid signals induce pathogen resistance response by promoting salicylic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 186: 471 – 483.
- Smirnova A, Leide J, Riederer M. 2013. Deficiency in a very-long-chain fatty acid beta-ketoacyl-coenzyme A synthase of tomato impairs microgametogenesis and causes floral organ fusion. *Plant Physiology*, 161: 196 – 209.
- Steinmüller D, Tevini M. 1985. Action of ultraviolet radiation (UV-B) upon cuticular waxes in some crop plants. *Planta*, 164 (4): 557 – 564.
- Susan J L, Graeme P B, Eric M E, Katherine A K, Wolf D R, Pruitt R E. 1997. Developmental regulation of cell interactions in the *Arabidopsis* fiddlehead-1 mutant: A role for the epidermal cell wall and cuticle. *Developmental Biology*, 189: 311 – 321.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731 – 2739.
- Wang H Y, Sui X L, Guo J J, Wang Z Y, Cheng J T, Ma S, Li X, Zhang Z X. 2014. Antisense suppression of cucumber (*Cucumis sativus* L.) sucrose synthase 3 (*CsSUS3*) reduces hypoxic stress tolerance. *Plant, Cell & Environment*, 37 (3): 795 – 810.
- Zhou L, Ni E, Yang J, Zhou H, Liang H, Li J, Jiang D, Wang Z, Liu Z, Zhuang C. 2013. Rice OsGL1-6 is involved in leaf cuticular wax accumulation and drought resistance. *PLoS ONE*, 8: e65139.