李梦娇,范帆,杨贤鹏,等.拟南芥蜡质突变体*gs1*的鉴定和突变基因克隆[J].山西农业大学学报(自然科学版),2025,45(3):54-63.
Li M J, Fan F, Yang X P, et al. Identification of Arabidopsis wax-deficient mutant *gs1* and cloning of the associated mutated gene[J]. Journal of Shanxi Agricultural University(Natural Science Edition), 2025,45(3):54-63.
doi: 10.13842/j.cnki.issn1671-8151.202501026

拟南芥蜡质突变体*gs1*的鉴定和突变基因克隆

李梦娇[1],范帆[1],杨贤鹏[2],崔莉莉[1*]

(1.山东师范大学 地理与环境学院,山东 济南 250014;2.山东师范大学 生命科学学院,山东 济南 250014)

摘　要:[目的]蜡质是陆生植物表面的疏水性屏障,筛选和鉴定拟南芥蜡质缺失突变体有助于进一步完善植物表皮蜡质合成途径。[方法]从拟南芥EMS诱变突变体库(Col-0背景)中筛选茎秆光亮表型的突变体*glossy stem 1*(*gs1*)。通过扫描电子显微镜和气相色谱方法系统分析*gs1*突变体茎和叶片蜡质表型,然后挖掘候选突变基因并利用酵母异源表达分析和拟南芥转基因回补方法验证候选基因的功能。[结果]与拟南芥野生型相比,*gs1*茎表皮非常光滑,蜡质晶体结构几乎完全缺失。进一步气相色谱分析发现,*gs1*的茎秆和叶片蜡质含量急剧下降,并呈现C28及以上碳链蜡质单体含量显著降低,C24-C26碳链长度蜡质单体含量显著增加的模式。基于该表型的候选基因筛选并结合重测序发现,*gs1*突变体中编码β-酮脂酰CoA合成酶的重要蜡质合成关键基因*CER6/KCS6*的编码区上存在G1384A单碱基变异,对应mRNA上的UGG密码子突变为终止密码子UGA。最终导致编码蛋白在翻译过程中提前终止,缺失ACP_syn_lll结构域。随后,从拟南芥野生型和*gs1*中分别克隆*CER6/KCS6*基因并在酵母细胞中异源表达,通过脂肪酸分析发现*gs1*中的单碱基突变导致CER6/KCS6蛋白的功能完全丧失,不能合成C26和C28超长链脂肪酸。同时,将*CER6pro::CER6-GFP*引入*gs1*构建了转基因回补株系*gs1R1*和*gs1R2*。扫描电子显微镜和气相色谱分析发现*gs1R1*和*gs1R2*叶片中蜡质含量恢复到了野生型水平,而茎中蜡质部分恢复。[结论]*gs1*突变体*CER6/KCS6*基因发生G1384A单碱基变异,导致编码蛋白翻译过程提前终止,并丧失β-酮脂酰CoA合成酶活性,最终影响拟南芥茎和叶片蜡质的积累。

关键词:拟南芥;蜡质;超长链脂肪酸;β-酮脂酰CoA合成酶
中图分类号:Q945.18　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1671-8151(2025)03-0054-10

Identification of the Arabidopsis wax mutant *gs1* and cloning of the associated mutant gene

Li Mengjiao[1], Fan Fan[1], Yang Xianpeng[2], Cui Lili[1*]

(*1.College of Geography and Environment, Shandong Normal University, Ji'nan 250014, China; 2.College of Life Sciences, Shandong Normal University, Ji'nan 250014, China*)

Abstract:[Objective]Cuticular wax is a hydrophobic barrier on the surface of terrestrial plants. Screening and identifying Arabidopsis wax-deficient mutants can help further elucidate the biosynthetic pathways of plant epidermal wax. [Methods]The glossy stem mutant *glossy stem 1* (*gs1*) was isolated from an ethyl methyl sulfone (EMS)-mutagenized Arabidopsis mutant population (Col-0 background). The wax crystal structure of stems and leaves in *gs1* were systematically analyzed using scanning electron microscope (SEM) and gas chromatography (GC). Candidate mutant genes were then identified, and their functions were validated through heterologous expression in yeast and genetic complementation in Arabidopsis. [Results]Compared with the wild type, the stem epidermis of *gs1* mutant appeared significantly smoother, with nearly complete loss of wax crystal structure. GC analysis revealed a sharp decrease in wax content in both leaves and stems of the *gs1* , accompanied by a significantly reduction

收稿日期:2025-01-16　　**修回日期**:2025-02-27
基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(42207445);山东省自然科学基金青年基金项目(ZR2021QD017)
作者简介:李梦娇(ORCID:0009-0007-3928-2462),硕士研究生,研究方向:植物与环境互作
*通信作者:崔莉莉(ORCID:0000-0002-8625-951X),副教授,硕士生导师,E-mail:sdnucll@sdnu.edu.cn

in C28 and longer-chain wax monomers and a notable increase in C24-C26 chain-length wax monomers. Candidate gene screening based on this wax composition changes, combined with resequencing, a G1384A single-nucleotide mutation in CER6/KCS6, a key gene encoding β-ketoacyl-CoA synthase in wax biosynthesis. This mutation converted a UGG codon into a premature stop codon UGA in the mRNA, which caused the truncated protein translation and loss of the ACP_syn_III domain in protein. Subsequently, CER6/KCS6 was cloned from both wild-type and *gs1* mutant and heterologously expressed in yeast. Fatty acid analysis confirmed that the single-base mutation in *gs1* completely abolished the function of CER6/KCS6 , rendering it incapable of synthesizing C26 and C28 very-long-chain fatty acids in yeast. Additionally, transgenic complementation lines (*gs1R1* and *gs1R2*) were generated by introducing *CER6pro::CER6−GFP*, into *gs1*. SEM and GC analyses showed that wax content in the leaves of *gs1R1* and *gs1R2* were restored to wild-type levels, while stem wax content was partially restored. [Conclusion] The *gs1* mutant carried a G1384A mutation in *CER6/KCS6*, resulting in premature translational termination and loss of β-ketoacyl-CoA synthase activity. This ultimately disrupted wax accumulation in Arabidopsis leaves and stems.

Keywords: Arabidopsis, Wax, Very-long-chain fatty acid, β-ketoacyl-CoA synthase

表皮蜡质是覆盖在陆生植物最外层的疏水性脂质结构,与植物水分的非气孔性散失和气体交换等密切相关,并在植物应答环境中各种生物和非生物胁迫中起着重要作用[1-4]。例如,干旱、盐胁迫和激素脱落酸处理都能显著诱导拟南芥蜡质合成关键基因的表达,促进叶片蜡质的积累从而降低水分散失[5]。此外,拟南芥中蜡质组分的过量积累或缺失,都能显著影响植物的水分散失速率及其对干旱的抗性[6]。同时,在水稻中的研究发现,疏水性的表皮蜡质层能促进水稻叶片表面气膜的形成,从而维持水淹条件下叶片中氧气和二氧化碳交换[7]。

表皮蜡质是在植物表皮细胞中合成的复杂混合物,主要由C20-C38链长的超长脂肪酸(Very-long-chain fatty acid,VLCFA)及其衍生物和萜类物质等组成,包括初级醇、次级醇、蜡酯、烷烃、醛、酮等多种类型的蜡质单体[1-4],其中C30及以上碳链的VLCFA衍生物是拟南芥蜡质最主要的化学组成[1]。目前,蜡质合成在模式植物拟南芥中研究较为清楚[1-4]。蜡质合成起始于质体中脂肪酸的从头合成。首先质体中合成的C16和C18脂肪酸转运到内质网后并在长链酰基辅酶A合酶(Long-chain acyl-CoA synthetase, LACS)作用下转变为相应的CoA形式[8-9]。随后,C16和C18脂酰辅酶A在超长链脂肪酸延伸复合体(Fatty acid elongase, FAE)的催化下合成C20-C38的VLCFA-CoAs[1, 4, 10]。FAE复合体是由4种核心酶相互作用结合形成的复合体,包括β-酮脂酰CoA合成酶(β-ketoacyl-CoA synthase)、β-酮脂酰基辅酶A还原酶(β-ketoacyl-CoA reductase, KCR)、β-羟酰基辅酶A水解酶(β-hydroxyacyl-CoA dehydratase, HCD)和烯酰基辅酶A还原酶(enoyl-CoA reductase, ECR)[10]。这4个酶分别催化VLCFA-CoAs的缩合,还原,脱羟,还原四步反应[10]。在每一轮反应中VLCFA-CoAs的碳链长度增加2个碳原子,并且丙二酰辅酶A作为这2个碳原子的供体[10]。此外,CER2和其同源蛋白CER2-LIKEs被鉴定为FAE复合体的新成员,协同参与C30及以上碳链的VLCFA-CoAs的合成[11-12]。这些不同碳链长度的VLCFA-CoAs作为前体分别进入烷烃合成途径在CER1、CER3和MAH1等酶的催化下合成醛类、烷烃、次级醇和酮等蜡质单体[6, 13-14],或者进入醇合成途径在CER4和WSD1等酶作用下生成初级醇和蜡酯类单体[15-16]。最后,这些不同的蜡质单体被运输到植物表皮细胞外组装形成表皮蜡质层结构[1, 4]。

近30年来,通过甲基磺酸乙酯(Ethyl methyl sulfone, EMS),X射线和快中子等物理诱变以及T-DNA插入等方法,已经在拟南芥中筛选出20多个蜡质缺失突变体,被命名为 *eceriferum1-24* (*cer1−24*)[17-20]。目前,大部分拟南芥*cer*蜡质突变体的表型控制基因都已被图位克隆并完成深入功能解析。研究发现这些基因都是蜡质合成、转运和调控途径上的关键基因[1-4],同时结合反向遗传学克隆的蜡质合成调控新基因,从而初步构建了拟南芥的蜡质合成代谢网络[1-4]。然而,目前还有多个蜡质缺失突变体的相关基因未被克隆鉴定,包括 *cer12*、*cer14*、*cer15*、*cer18*、*cer20*、*cer21*、*cer23* 和 *cer24* 等,表明拟南芥中蜡质合成通路仍不够完善,需要进一步深入解析。本研究前期利用甲基磺酸乙酯(EMS)诱变拟南芥,并通过筛选获得一株具有茎秆光滑发亮表型的突变体 *glossy stem 1*

(*gs1*)。蜡质的严重缺失一般会造成茎秆光亮,因此*GS1*很可能是蜡质合成途径的重要基因。本研究通过系统鉴定*gs1*的蜡质缺失表型,并对控制该表型的基因进行挖掘鉴定,旨在为深入解析蜡质合成调控分子机制提供参考。

1 材料和方法

1.1 试验材料

从拟南芥EMS诱变突变体库(Col-0背景)中筛选发现一株具有茎秆光亮表型的突变体,命名为*glossy stem 1*(*gs1*)。将该突变体连续自交3代后,茎秆光亮表型一直稳定存在且性状不分离。

1.2 试验方法

1.2.1 蜡质晶体结构分析

从正常生长6周的拟南芥植株上收集花序茎,用锋利刀片切割为1~2 cm的小段并自然干燥2周。随后,将花序茎置于溅射仪(MC1000,日立)中喷金2 min进行样品准备。最后使用扫描电子显微镜(TM3030,日立)将花序茎放大3000倍观察蜡质晶体的形态结构。

1.2.2 拟南芥蜡质组分的提取与分析

从正常生长4周和6周的拟南芥植株上分别收集莲座叶和花序茎,放入装有10 mL正己烷的样品瓶中,轻柔震荡30 s提取蜡质。然后将正己烷提取液转至新样品瓶中,并将剩余样品用10 mL的正己烷重复提取蜡质。合并2次正己烷提取液,密封后放置于冰箱4 ℃保存待用。将提取完蜡质的叶片或者花序茎,置于扫描仪中获取高清图像,并通过Image J软件计算叶片和花序茎的表面积。

在蜡质正己烷提取液中加入100 μL二十四烷(50 mg/L)作为内标。随后,使用氮吹仪将正己烷提取液浓缩至近干并加入50 μL衍生化试剂N,O-双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺(BSTFA),轻柔震荡混匀后100 ℃反应15 min。待样品完全冷却后,加入适量正己烷稀释样品,然后吸取1 μL用于气相色谱分析。所使用的气相色谱仪(8860,安捷伦)配置氢火焰离子化检测器和DB-5色谱柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm,安捷伦),并将氦气作为载气(流速0.5 mL/min)。气相色谱仪进样口和检测器温度都设置为300 ℃,色谱柱的温度按如下程序设置:起始温度为80 ℃,然后以40 ℃/min速率升到200 ℃,然后再以10 ℃/min速率升温到270 ℃。以上每个升温节点都保持2 min。随后色谱柱温度以3 ℃/min的速率升高到320 ℃,并维持40 min。待程序完成后,统计所有蜡质组分和内标的峰面积,并根据比值和加入二十四烷内标的质量(5 μg)计算样品中不同蜡质组分的质量。最后根据叶片或者花序茎的表面积即可计算获得不同组织的单位面积蜡质组成和含量(μg/dm^2)。

1.2.3 *CER6*基因酵母表达载体构建

收集野生型Col-0和*gs1*突变体的莲座叶迅速置于液氮中研磨至粉末,然后使光谱型植物RNA提取试剂盒(gDNA-Filter)(RNE,北京诺贝莱生物科技有限公司)提取总拟南芥RNA,并使用HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit(+gDNA wiper)反转录试剂盒(R312-0,南京诺唯赞生物科技股份有限公司)和Oligo dT$_{20}$引物将1 μg总RNA反转录合成cDNA。将Col-0和*gs1*莲座叶的cDNA分别稀释到合适浓度后,取2 μL作为模板并使用高保真DNA聚合酶预混液2× Hieff Canace® Gold PCR Master Mix(10149ES0,翌圣生物科技(上海)股份有限公司)扩增*CER6*基因(AT1G68530)的CDS全长(GenBank Accession:NM_105524)。引物序列为CER6-GAL1-F:GGAGAAAAAACCCCGGATCCATGCCTCAGGCACCGATGCC和CER6-GAL1-R:CGGTACCAAGCTTACTCGAGTTAGAGTTTGACAACTTCGG。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测分析后,使用琼脂糖凝胶回收试剂盒(19101ES70,翌圣生物科技(上海)股份有限公司)纯化后备用。使用*Bam*HI和*Xho*I限制性内切酶(15003ES76和15034ES76,翌圣生物科技(上海)股份有限公司)对酵母表达载体pESC-*His*进行线性化处理(37 ℃孵育3 h),经1%琼脂糖凝胶电泳检测后,将剩余酶切反应体系85 ℃孵育10 min使限制性内切酶完全失活。随后,参考说明书吸取合适体积的*CER6*扩增产物(已纯化)和pESC-*His*线性化载体以及5 μL DNA Assembly Mix Ultra快速多片段DNA无缝克隆预混液(EG24204S,愚公生物),移液器轻柔吹打混匀后50 ℃孵育15 min。随后,通过热激法将连接产物转入大肠杆菌感受态细胞(*Fast-T1*)中,并涂布于LB培养基(含有50 mg/L的羧苄青霉素),37 ℃培养14~16 h。阳性菌落经菌落PCR验证后,转

入5 mL液体LB培养基(含有50 mg/L的羧苄青霉素)中37 ℃培养14～16 h。收集菌液并使用质粒小提试剂盒(19001ES70,翌圣生物科技(上海)股份有限公司)提取高纯度质粒,经擎科生物公司测序无误后用于后续试验。

1.2.4　酿酒酵母转化

将酿酒酵母菌株*BY4741Δfah1Δelo3*划线于YPD固体培养基后,28 ℃培养2 d。挑取单菌落转移到5 mL液体YPD培养基中,28 ℃,180 r/min过夜培养。吸取菌液并按1∶50比例转接到20 mL的2 × YPD培养基中继续培养4～5 h。收集酵母菌液,经12 000 r/min离心后弃去上清,并加入灭菌水洗涤2次,即完成酵母感受态细胞制备。将酿酒酵母*BY4741Δfah1Δelo3*感受态细胞分装于1.5 mL Eppendorf离心管中,并依次加入1 μg酵母表达质粒、100 μg单链鲑鱼精DNA(ssDNA)、36 μL 1M醋酸锂和240 μL 50% PEG3350 (v/v),震荡混匀后置于水浴锅42 ℃孵育40 min。随后,反应体系经12 000 r/min离心后弃去上清,加入50 μL灭菌水重悬酵母菌体,涂布于酵母缺陷型培养基(-His,2%葡萄糖),并置于28 ℃培养2～3 d直到转基因菌落长出。

1.2.5　酵母脂肪酸的提取与分析

将阳性酵母单菌落转接到5 mL的酵母缺陷型培养基(-His,2%葡萄糖)中28 ℃,180 r/min过夜培养。收集酵母菌液并通过离心去除上清液,沉淀使用灭菌水洗涤2次,并用1 mL灭菌水重悬。随后,利用紫外分光光度计测定菌液在600 nm波长下的吸光值,将菌液浓度稀释为OD_{600}= 0.05,然后将其转接到20 mL的SC酵母培养基(-His,2%葡萄糖或半乳糖),28 ℃,180 r/min培养7 d。收集酵母菌液到玻璃样品瓶中,通过离心弃去上清。然后加入2 mL新鲜配制的5%硫酸甲醇(v/v)和50 μL C17∶0甲酯(1 mg/mL),90 ℃孵育2 h。待冷却至室温后,依次往样品瓶中加入2 mL正己烷及2 mL 0.9%(v/v)氯化钠溶液,并剧烈震荡30 s。随后通过2000 r/min离心5 min使有机相和水相分层,使用玻璃吸管将上层有机相(包含脂肪酸甲酯)转移到新样品瓶中,并在氮气下吹至近干,然后加入100 μL正己烷溶解,吸取1 μL样品用于气相色谱分析。气相色谱仪(8860,安捷伦)配置氢火焰离子化检测器和DB-23色谱柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm,安捷伦),并且氦气作为载气(流速为0.6 mL/min)。气相色谱仪进样口和检测器温度都设置为240 ℃,分流比为15∶1,色谱柱的温度按如下程序设置:起始温度为180 ℃保持1 min,然后以3 ℃/min速率升到240 ℃并保持39 min。

1.2.6　*CER6pro::CER6-GFP*植物表达载体和*gs1*转基因回补株系构建

*CER6pro::CER6-GFP*植物表达载体的构建流程参考试验方法1.2.3。首先,使用拟南芥野生型叶片的cDNA及引物CER6pro-CER6-GFP-F: AATTATACATTAAAACTCTCCGACGA-TGCCTCAGGCACCGATG和CER6pro-CER6-GFP-R: CCCCCTCGAGGCGCGCCAGAGTT-TGACAACTTCGGGAATAAAGAC,扩增*CER6*基因的编码区全长。随后,通过无缝克隆方式将其引入*pMDC83-CER6pro-GFP*载体,构建*CER6pro::CER6-GFP*。重组质粒经擎科生物公司测序无误后,通过冻融法将其转入农杆菌GV3101,并采用蘸花法侵染拟南芥*gs1*突变体。收获的T0代种子经潮霉素B(50 mg/L)筛选后获得多个转基因株系,随机挑选2株命名为*gs1R1*和*gs1R2*,并通过自交获得纯合的*gs1*转基因回补株系。为了进一步在分子水平鉴定上述转基因株系,分别提取拟南芥野生型Col-0、*gs1*、*gs1R1*和*gs1R2*的DNA,使用特异引物CER6-F: TCTGCCGTGTGGAAATGTAA和CER6-R: CCCCAAATGAAAAGCAGAGA以及CER6-F和GFP-R: CATCACCTTCACCCTCTCCAC-TG进行PCR扩增,然后利用1%琼脂糖凝胶电泳对PCR产物进行检测。

1.3　统计分析

样本间差异通过利用Excel 2013软件进行Student's *t*-test检验($P<0.05$),或者SPSS 19软件进行单因素方差分析,并采用LSD方法进行多重比较($P<0.05$)。

2　结果与分析

2.1　拟南芥*gs1*蜡质突变体的表型分析

为了检测拟南芥*gs1*突变体茎表皮蜡质结构的完整性,利用扫描电子显微镜对野生型Col-0和*gs1*的茎表面进行了观察。与野生型Col-0相比,*gs1*突变体茎表面非常光滑,几乎观

察不到任何蜡质晶体结构(图1),表明*GS1*基因突变的确造成了拟南芥茎秆的严重蜡质缺失。随后,进一步利用气相色谱对野生型Col-0和*gs1*突变体茎表皮蜡质的化学组成进行了测定。拟南芥茎表皮蜡质包括脂肪酸、醛、初级醇、蜡酯、烷烃、次级醇和酮类等。和野生型Col-0相比,*gs1*突变体茎中所有C28及以上碳链的蜡质单体几乎完全缺失,尤其是占据蜡质主要含量的C29烷烃、C29次级醇和C29酮(图2A、图2B),这可能是导致*gs1*突变体茎表皮出现光亮的原因。此外,我们发现*gs1*突变体茎中C26初级醇和C26脂肪酸的含量显著降低,然而C24初级醇的含量却急剧升高(图2A、图2B)。此外,对野生型Col-0和*gs1*突变体的叶片蜡质组分进行分析,发现几乎所有C28及以上碳链的蜡质组分积累都显著降低,而C24和C26碳链长度的蜡质组分都显著增加(图2C)。以上结果表明,*gs1*突变体中C26及以上碳链的超长链脂肪酸前体的合成可能被阻断,从而影响了下游所有C26以上碳链的蜡质单体合成。

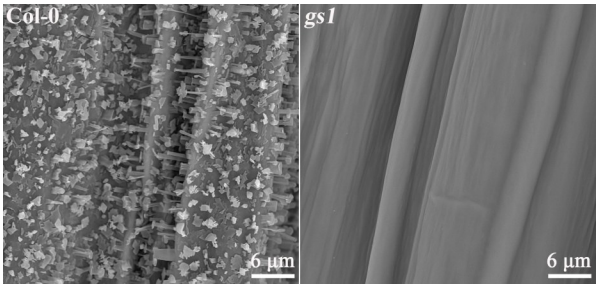
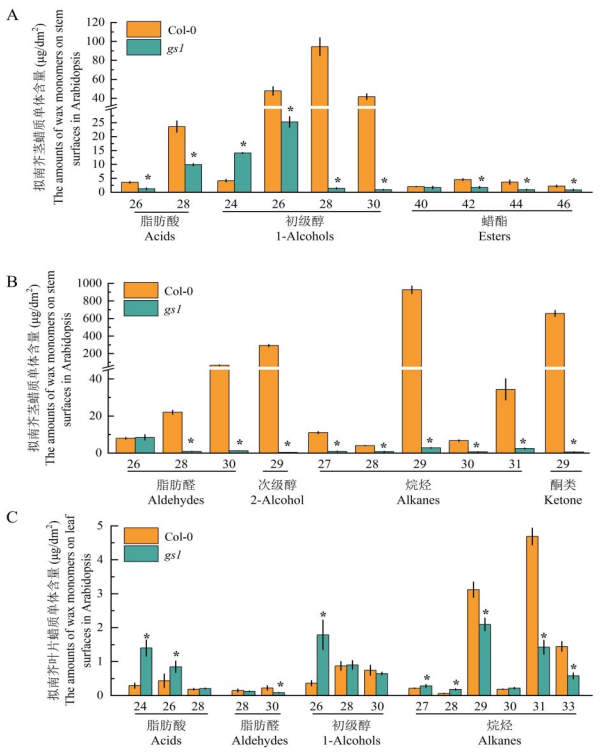


图1 拟南芥野生型Col-0和*gs1*突变体茎表皮扫描电镜图

Fig.1 Scanning electron micrographs of wax crystals on the stem surfaces of Col-0 and *gs1* mutant

2.2 控制*gs1*蜡质缺失表型的候选基因鉴定

通过遗传分析发现,*gs1*的蜡质缺失表型是由隐性单基因控制。之前研究报道,*CER6/KCS6*基因(AT1G68530)编码β-酮脂酰CoA合成酶,参与催化蜡质前体VLCFA合成的第一步反应。*CER6*基因突变会导致拟南芥茎表皮蜡质含量急剧下降,并表现出C28及以上碳链蜡质缺失而C24-C26碳链长度蜡质积累的表型[21-22]。这与我们研究的*gs1*突变体茎蜡质组成变化非常相似,因此推测可能是*CER6/KCS6*基因突变造成了*gs1*突变体蜡质缺失的表型。EMS诱变通常造成核苷酸序



A和B:拟南芥茎表皮蜡质分析结果;C:拟南芥叶表皮蜡质测定结果;*表示两样本间差异显著($P<0.05$)

A and B: The wax analysis results for Arabidopsis stems. C: The wax analysis results for Arabidopsis leaves. The asterisk (*) indicated significant differences between samples ($P < 0.05$)

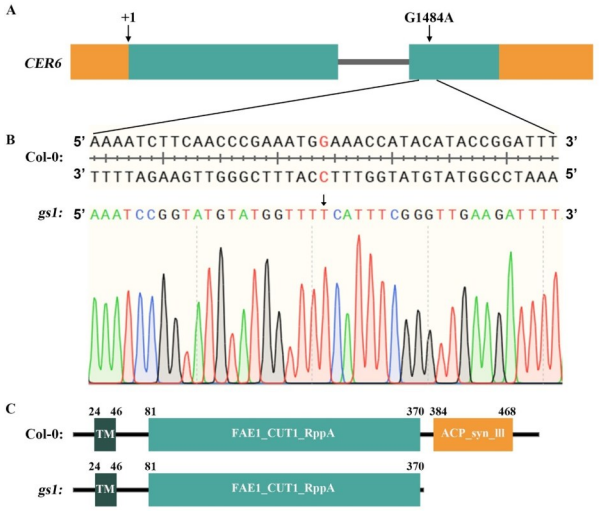
图2 气相色谱分析拟南芥茎和叶片蜡质组分含量

Fig.2 Cuticular wax profiles on stems and leaves of Arabidopsis determined by gas chromatography

列中GC到AT碱基对的变换。为了检测*CER6*基因是否发生突变,分别从野生型Col-0和*gs1*突变体中克隆了*CER6*,并进行测序分析。结果显示,*CER6*基因第1484位的核苷酸发生了G到A的变异(图3A和B),这将导致mRNA第375位UGG密码子突变为终止密码子UGA。因此,*gs1*突变体中CER6蛋白在翻译过程中会发生提前终止,最终缺失ACP_syn_lll结构域(图3C)。

2.3 酵母异源表达验证*CER6*基因功能

由于酿酒酵母也能合成超长链脂肪酸,并具有和拟南芥类似的FAE复合体。因此可在酵母细胞中过表达拟南芥KCS蛋白,并通过分析转基因酵母细胞中脂肪酸组成的变化,探究KCS是否具有合成VLCFA功能[23]。为了确定*gs1*突变体中G1484A核苷酸变异是否影响CER6蛋白的功能,我们在酵母中表达了*gs1*突变体中的*CER6*(后续命名为*mCER6*),同时拟南芥野生型



A：*CER6*基因结构模式图；B：*gs1*中*CER6*基因的突变位点；C：CER6蛋白保守结构域分析

A：Schematic representation of *CER6* gene structure. B：Mutation site on *CER6* gene in *gs1* mutant. C：Conserved domain analysis of CER6 protein

图3　拟南芥*gs1*突变体中*CER6*基因突变位点分析

Fig.3　Analysis of mutation site of *CER6* gene in Arabidopsis *gs1* mutant

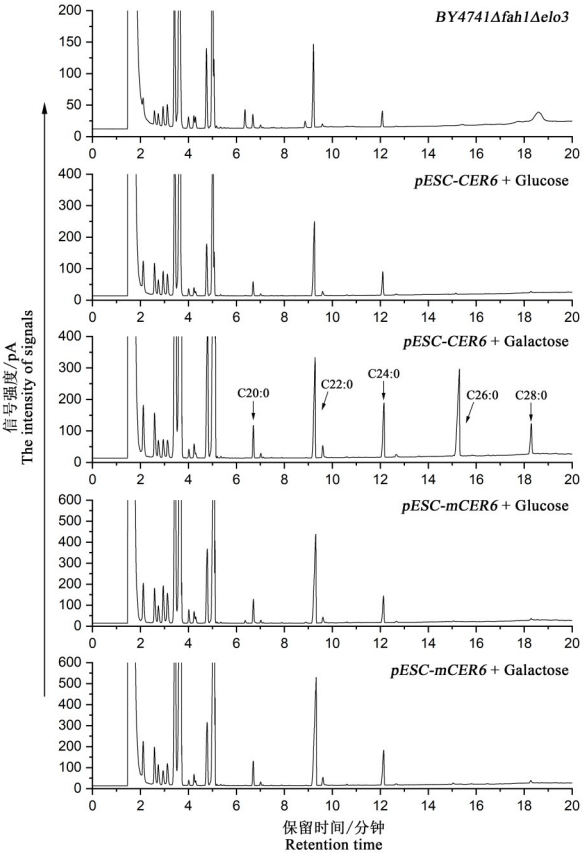


图4　酵母异源表达分析CER6合成超长链脂肪酸的功能

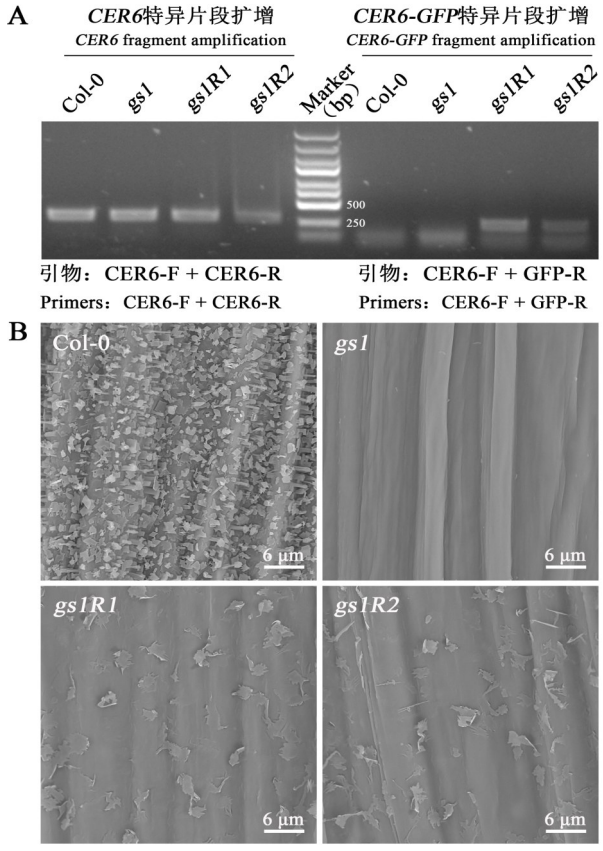
Fig.4　Heterologous expression of CER6 in yeast cells to analyze its function in VLCFA biosynthesis

Col-0中*CER6*作为正对照。使用的酿酒酵母菌株为*BY4741Δfah1Δelo3*，仅能合成VLCFA能到C24:0，非常适合用于KCS蛋白的功能鉴定[24]。当酵母培养基中添加葡萄糖为碳源，无论是含有*pESC－CER6*或*pESC－mCER6*质粒的转基因酵母，其*CER6*和*mCER6*基因都不能表达。因此转基因酵母细胞和*BY4741Δfah1Δelo3*相比，其VLCFA组成没有发生任何变化(图4)。然而当酵母培养基中添加半乳糖为碳源，CER6和mCER6的表达都被激活，但仅在含有*pESC－CER6*质粒的酵母细胞中能检测到C26:0和C28:0脂肪酸的合成，表明*gs1*突变体中mCER6的功能完全丧失。以上结果表明，*CER6*基因突变是造成*gs1*突变体蜡质缺失的原因。

2.4　*CER6pro::CER6－GFP*转基因回补*gs1*蜡质缺失表型

为进一步确定*gs1*突变体的蜡质缺失表型是由于*CER6/KCS6*基因突变造成，试验构建了植物表达载体*CER6pro::CER6－GFP*，并转化拟南芥*gs1*突变体获得转基因回补株系*gs1R1*和*gs1R2*。随后，分别从*CER6*基因和转入的*CER6pro::CER6－GFP*上设计特异引物，并在DNA水平上利用PCR对转基因株系进行鉴定。结果如图5A所示，Col-0、*gs1*、*gs1R1*和*gs1R2*株系都能扩增出*CER6*基因上特异DNA片段(293 bp)，但仅*gs1R1*和*gs1R2*株系能扩增出*CER6pro::CER6－GFP*上的特异DNA片段(253 bp)。进一步利用扫描电子显微镜对*gs1R1*和*gs1R2*回补株系茎表面进行观察(图5B)。与*gs1*完全光滑的茎表皮结构相比，两个回补株系的茎表皮都覆盖着片状结构的蜡质晶体，但其密度稀疏，明显低于野生型Col-0，表明*CER6pro::CER6－GFP*转基因部分互补了*gs1*突变体的茎蜡质缺失表型。

气相色谱分析结果显示，与*gs1*突变体相比，转基因回补株系*gs1R1*和*gs1R2*茎表皮蜡质含量显著增加，尤其是C26和28碳链长度的蜡质单体，大部分恢复到了野生型甚至更高的水平，尤其是C26初级醇(图6A、图6B)。同时，我们还观察到*gs1R1*和*gs1R2*茎表皮中C30 VLCFA衍生蜡质单体的含量也呈现部分恢复，包括C29烷烃、C29次级醇和C29酮等(图6A、图6B)。此



A：*gs1*转基因回补株系的分子鉴定；B：*gs1*转基因回补株系茎表面的电镜分析，标尺为6 μm

A：Molecular identification of *gs1* transgenic complementary lines. B：Scanning electron microscope analysis of *gs1* transgenic complementary lines. Scale bar = 6 μm

图5 *gs1*转基因回补株系的分子鉴定和扫描电镜分析

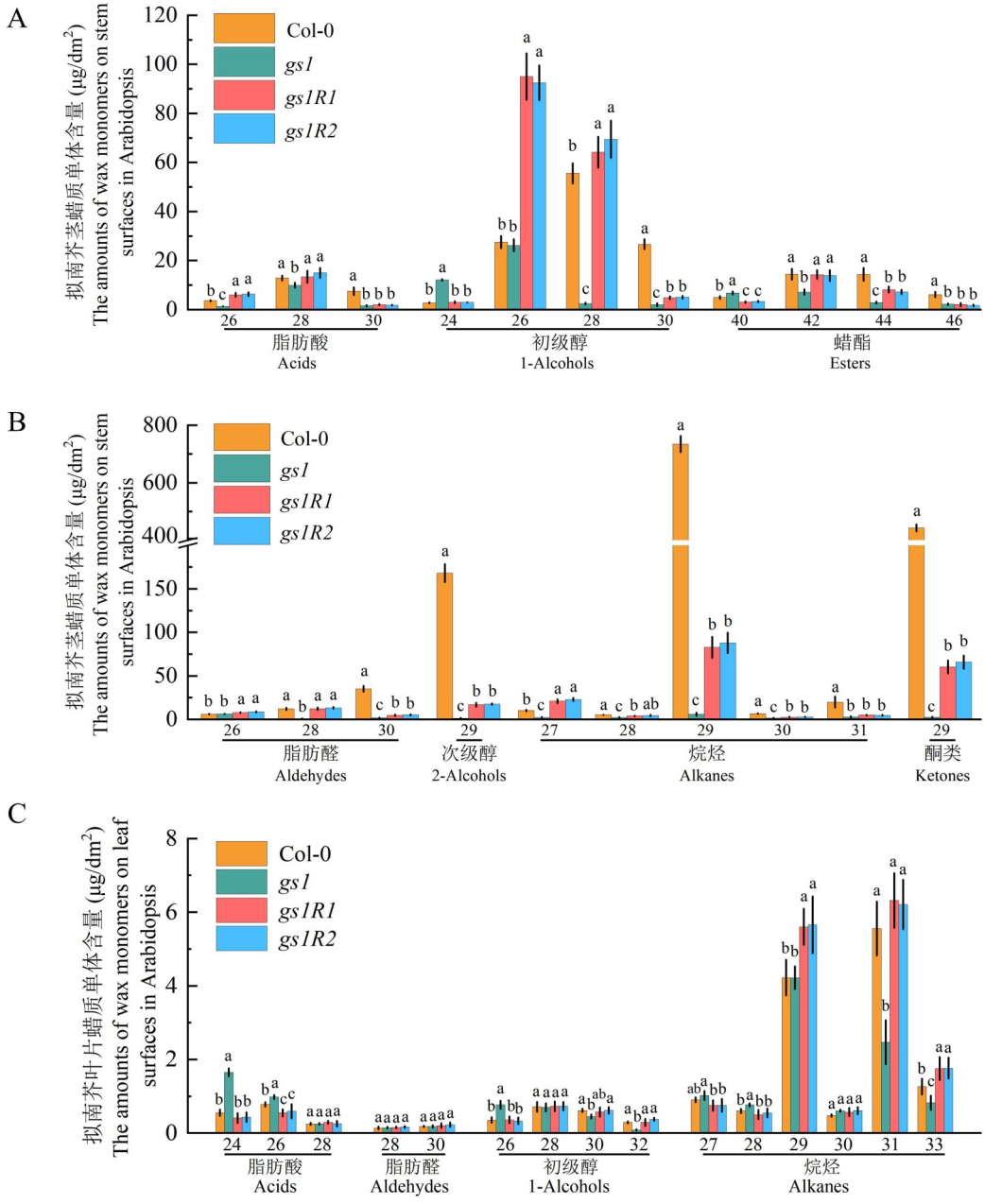
Fig.5 Molecular identification and scanning electron micrograph analysis of *gs1* transgenic complementary lines

外，在*gs1*突变体茎表皮蜡质中显著升高的C24醇，在转基因回补株系*gs1R1*和*gs1R2*中也恢复到了野生型水平(图6A)。这些结果进一步表明*CER6pro::CER6－GFP*转基因部分互补了*gs1*突变体的茎蜡质缺失表型。同时，对转基因回补株系*gs1R1*和*gs1R2*的叶片蜡质组分进行分析(图6C)，与*gs1*突变体相比，2个回补株系中所有蜡质单体的含量都恢复到了野生型甚至更高水平。该结果进一步表明*CER6pro::CER6－GFP*转基因能互补*gs1*突变体的蜡质缺失表型，即*gs1*突变体的蜡质缺失表型是由*CER6/KCS6*基因突变造成。

3 讨论

在拟南芥中，KCS家族有21个成员，具有不同的底物特异性，催化合成不同碳链长度的VLCFA-CoAs。其中，*CER6/KCS6*最为关键，该基因突变会造成拟南芥茎蜡质的几乎完全缺失，因此受到了广泛的关注和研究[21-22]。然而，尽管*cer6*突变体中几乎所有C28及以上碳链的VLCFA衍生蜡质几乎完全缺失，但C24-C26碳链长度的蜡质合成却显著积累。在我们*gs1*突变体中也观察到类似现象(图2A、图2B)，并且进一步酵母异源表达和转基因回补分析结果表明*gs1*突变体蜡质缺失的表型是由于*CER6/KCS6*基因突变造成(图4～图6)。在*gs1*突变体叶片中，虽然*gs1*突变体也出现C24和C26长度碳链蜡质显著增加，部分C28以上碳链的蜡质显著降低的表型，但和茎秆蜡质变化相比，整体变化幅度较弱。这一现象在之前报道的*kcs6－1*突变体也同样观察到，这可能与*CER6/KCS6*的同源基因*KCS5*有关[21]。KCS5和CER6/KCS6的催化功能非常类似，但两个基因的表达模式并不相同。*CER6/KCS6*在茎秆和叶片都高表达，而*KCS5*仅在叶片高表达。因此，仅*CER6/KCS6*基因的突变即可造成拟南芥茎秆蜡质的几乎完全缺失[21]。但在叶片中，和野生型相比，拟南芥*kcs6－1*或者*kcs5－1*突变体的蜡质都显著下降并具有类似的变化趋势，并不会造成叶片蜡质的完全缺失[21]。

拟南芥CER6/KCS6蛋白包含FAE1_CUT1_RppA和ACP_syn_lll结构域[24]。在本研究中，*gs1*突变体中*CER6/KCS6*基因上的G1484A突变，导致CER6/KCS6蛋白在翻译过程中发生提前终止，最终缺失ACP_syn_lll结构域(图3C)，因此*gs1*突变体是非常适宜研究CER6/KCS6结构域功能的植物材料。酵母表达分析发现G1484A这一突变导致CER6/KCS6功能完全丧失(图4)，结合拟南芥*gs1*突变体中严重的蜡质缺失表型(图1、图2)，表明ACP_syn_lll结构域是CER6/KCS6蛋白发挥活性所必须的。根据之前研究报道，CER6/KCS6与FAE脂肪酸延伸复合体中其它3个成员相互结合形成复合体才能其发挥功能[25]，并且FAE1_CUT1_RppA结构域是CER6/KCS6与复合体结合的区域[24]。因此，*gs1*突变体中CER6/KCS6蛋白ACP_syn_lll结构域的缺失可能不影响CER6/KCS6与FAE复合体的结合，但可能抑制CER6/KCS6蛋白自身酶活性的发挥，即催化长链酰基辅



A和B:拟南芥茎表皮蜡质分析结果;C:拟南芥叶表皮蜡质测定结果;不同小写字母表示各样本间差异显著($P<0.05$)

A and B: The wax analysis results for Arabidopsis stems. C: The wax analysis results for Arabidopsis leaves. The different lowercase letters indicate significant differences among samples ($P < 0.05$)

图6　气相色谱分析拟南芥*gs1*转基因回补株系茎和叶片蜡质组分含量

Fig.6　Cuticular wax profiles on stems and leaves of Arabidopsis *gs1* transgenic complementation lines determined by gas chromatography

酶A和丙二酰辅酶A反应生成酮脂酰辅酶A。

在转基因回补株系*gs1R1*和*gs1R2*中,叶片蜡质单体的含量完全恢复到了野生型水平(图6C)。然而,在茎表皮蜡质中,C28及以下碳链的蜡质单体含量完全恢复到野生型水平,但C30及以上碳链蜡质单体的含量仅仅呈现部分回补(图6A、图6B),表明*gs1R1*和*gs1R2*中CER6/KCS6催化C30碳链的VLCFA合成的功能受到了影响。之前研究表明,酵母中异源表达CER6/KCS6仅能合成VLCFA到C28碳链长度[1,21],这在我们研究结

果也进一步被证实(图4)。进一步研究发现CER2蛋白能与CER6/KCS6相互作用形成复合体[21],调节CER6/KCS6活性并催化合成VLCFA到C30碳链长度。在本研究中,*gs1*突变体中CER6/KCS6翻译被提前终止,但其蛋白仍包含FAE1_CUT1_RppA结构域(图3C),能与FAE脂肪酸延伸复合体中其它3个成员相互作用。我们推测在*gs1*突变体中,尽管截短的CER6丧失催化功能,但仍能和CER2蛋白相互结合。这将导致*gs1R1*和*gs1R2*转基因回补株系体内的截短CER6/KCS6蛋白(仅含FAE1_CUT1_RppA)和外源表达的CER6-GFP竞争结合CER2蛋白,最终影响CER6-GFP和CER2协同参与C30碳链VLCFA的合成,从而造成转基因回补株系茎中C30碳链以上蜡质单体积累呈现部分回补的现象(图6A、图6B)。

4 结论

综上所述,本研究对*gs1*突变体的蜡质结构和化学组成进行了系统分析,并通过重测序、酵母异源表达和转基因互补手段鉴定了控制*gs1*蜡质缺失表型的*CER6/KCS6*基因,相关研究结果为蜡质合成通路的完善以及深入解析不同结构域对*CER6/KCS6*蛋白功能的影响提供了新的遗传材料和参考。

参考文献

[1]Bernard A, Joubès J. *Arabidopsis* cuticular waxes: A dvances in synthesis, export and regulation [J]. Progress in Lipid Research, 2013, 52(1): 110-129.

[2]Lee S B, Suh M C. Advances in the understanding of cuticular waxes in *Arabidopsis thaliana* and crop species[J]. Plant Cell Reports, 2015, 34(4): 557-572.

[3]Lewandowska M, Keyl A, Feussner I. Wax biosynthesis in response to danger: its regulation upon abiotic and biotic stress [J]. New Phytologist, 2020, 227(3): 698-713.

[4]Yeats T H, Rose J K. The formation and function of plant cuticles[J]. Plant Physiology, 2013, 163(1): 5-20.

[5]Kosma D K, Bourdenx B, Bernard A, et al. The impact of water deficiency on leaf cuticle lipids of *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2009, 151(4): 1918-1929.

[6]Bourdenx B, Bernard A, Domergue F, et al. Overexpression of *Arabidopsis ECERIFERUM1* promotes wax very-long-chain alkane biosynthesis and influences plant response to biotic and abiotic stresses[J]. Plant Physiology, 2011, 156(1): 29-45.

[7]Kurokawa Y, Nagai K, Huan P D, et al. Rice leaf hydrophobicity and gas films are conferred by a wax synthesis gene (*LGF1*) and contribute to flood tolerance [J]. New Phytologist, 2018, 218(4): 1558-1569.

[8]Lü S Y, Song T, Kosma D K, et al. *Arabidopsis CER8* encodes LONG-CHAIN ACYL-COA SYNTHETASE 1 (LACS1) that has overlapping functions with LACS2 in plant wax and cutin synthesis[J]. The Plant Journal, 2009, 59(4): 553-564.

[9]Zhao L F, Haslam T M, Sonntag A, et al. Functional overlap of Long-Chain Acyl-CoA Synthetases in *Arabidopsis*[J]. Plant and Cell Physiology, 2019, 60(5): 1041-1054.

[10]Haslam T M, Kunst L. Extending the story of very-long-chain fatty acid elongation[J]. Plant Science, 2013, 210: 93-107.

[11]Haslam T M, Haslam R, Thoraval D, et al. ECERIFERUM2-LIKE proteins have unique biochemical and physiological functions in very-long-chain fatty acid elongation [J]. Plant Physiology, 2015, 167(3): 682-692.

[12]Haslam T M, Mañas-Fernández A, Zhao L F, et al. *Arabidopsis* ECERIFERUM2 is a component of the fatty acid elongation machinery required for fatty acid extension to exceptional lengths [J]. Plant Physiology, 2012, 160(3): 1164-1174.

[13]Bernard A, Domergue F, Pascal S, et al. Reconstitution of plant alkane biosynthesis in yeast demonstrates that *Arabidopsis* ECERIFERUM1 and ECERIFERUM3 are core components of a very-long-chain alkane synthesis complex[J]. The Plant Cell, 2012, 24(7): 3106-3118.

[14]Greer S, Wen M, Bird D, et al. The cytochrome P450 enzyme CYP96A15 is the midchain alkane hydroxylase responsible for formation of secondary alcohols and ketones in stem cuticular wax of *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2007, 145(3): 653-667.

[15]Li F L, Wu X M, Lam P, et al. Identification of the wax ester synthase/acyl-coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase WSD1 required for stem wax ester biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2008, 148(1):97-107.

[16]Rowland O, Zheng H Q, Hepworth S R, et al. *CER4* encodes an alcohol-forming fatty acyl-coenzyme A reductase involved in cuticular wax production in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2006, 142(3): 866-877.

[17]Samuels L, DeBono A, Lam P, et al. Use of *Arabidopsis eceriferum* mutants to explore plant cuticle biosynthesis [J]. Journal of Visualized Experiments, 2008, (16): 709.

[18]Rashotte A M, Jenks M A, Ross A S, et al. Novel *eceriferum* mutants in *Arabidopsis thaliana*[J]. Planta, 2004, 219(1): 5-13.

[19]McNevin J P, Woodward W, Hannoufa A, et al. Isolation and characterization of *eceriferum* (*cer*) mutants induced by T-DNA insertions in *Arabidopsis thaliana*[J]. Genome, 1993, 36(3): 610-618.

[20]Koornneef M, Hanhart C J, Thiel F. A genetic and phenotypic description of *eceriferum* (*cer*) mutants in *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of Heredity, 1989, 80(2): 118-122.

[21]Huang H D, Ayaz A, Zheng M L, et al. *Arabidopsis KCS5* and *KCS6* play redundant roles in wax synthesis [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(8): 4450.

[22]Millar A A, Clemens S, Zachgo S, et al. *CUT1*, an *Arabidopsis* gene required for cuticular wax biosynthesis and pollen fertility, encodes a very-long-chain fatty acid condensing enzyme[J]. The Plant Cell, 1999, 11(5): 825-838.

[23]Batsale M, Alonso M, Pascal S, et al. Tackling functional redundancy of *Arabidopsis* fatty acid elongase complexes[J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 14: 1107333.

[24]Huang H D, Yang X P, Zheng M L, et al. An ancestral role for 3-KETOACYL-COA SYNTHASE3 as a negative regulator of plant cuticular wax synthesis[J]. The Plant Cell, 2023, 35(6): 2251-2270.

[25]Kim J, Kim R J, Lee S B, et al. Protein-protein interactions in fatty acid elongase complexes are important for very-long-chain fatty acid synthesis[J]. Journal of Experimental Botany, 2022, 73(9): 3004-3017.

(编辑:吕俊俐)