

doi:10.11983/CBB25132

宁夏枸杞果皮蜡质合成关键基因 *LbCER3* 的克隆和功能验证

赵娟红, 李治刚, 郑国琦^{1*}, 刘展飞, 刘祥婷, 寇莉蓉, 王文秀, 周甜甜, 杨涓
宁夏大学生命科学学院, 林木资源高效生产全国重点实验室, 银川 750021

摘要 宁夏枸杞(*Lycium barbarum*)果皮蜡质是果实制干过程中水分正常散失的限制因子。为验证蜡质合成关键基因 *LbCER3* 的功能, 以宁夏主要栽培品种宁杞 1 号和宁杞 5 号为供试材料, 采用 GC-MS、转录组学及分子生物学等方法, 开展了不同发育时期果实角质层外蜡和内蜡含量和组分变化规律研究, 并进行果实蜡质关键基因筛选与克隆和功能验证。结果表明, 果实发育和成熟过程中两种材料的角质层内蜡和外蜡含量均逐渐降低, 但宁杞 1 号总蜡质含量显著高于宁杞 5 号。转录组学和加权基因共表达网络分析(WGCNA)将 *LbCER3* 确定为关键基因, *LbCER3* 基因 CDS 全长 1 884 bp, 编码 628 个氨基酸, 含有 1 个 C 端 WAX2 结构域(Wax2_C)和脂肪酸羟化酶结构域(FA_hydroxylase)。进一步构建了 *LbCER3* 过表达载体, 在番茄(*Solanum lycopersicum*)中成功转化, 转基因株系 T1 代叶片叶绿素浸出率显著降低, 叶片蜡质含量显著增加, 蜡质组分烷烃和酸类含量显著增加。研究结果表明, *LbCER3* 是枸杞果实蜡质合成的关键基因。

关键词 功能验证, *LbCER3*, 宁夏枸杞, 蜡质

赵娟红, 李治刚, 郑国琦, 刘展飞, 刘祥婷, 寇莉蓉, 王文秀, 周甜甜, 杨涓 (2026). 宁夏枸杞果皮蜡质合成关键基因 *LbCER3* 的克隆和功能验证. 植物学报 **61**, 1–16.

植物蜡质是由长链脂肪酸及其衍生物(如烷烃、醛、醇、酮和酯类)和各种亲脂性次级代谢物组成(Tunstad et al., 2024), 具有减少水分蒸发、抵御环境胁迫等功能(Markus et al., 2015)。蜡质的合成是一个复杂的过程, 主要包括脂肪酸的从头合成、超长链脂肪酸的形成以及蜡质各组分的形成(李莉等, 2023)。此过程受到多种结构基因和转录因子的调控。其中, CER 家族的基因研究得最为广泛。CER1 (*ECERIFERUM 1*)和 CER4 (*ECERIFERUM 4*)基因分别参与烷烃和伯醇的合成。例如, 黄瓜(*Cucumis sativus*) CsCER1 基因的过表达促进了烷烃生物合成和耐旱性(Wang et al., 2015); KCS7/2 (*ketoacyl-CoA synthase 7/2*)和 LACS2 基因在脂肪酸合成中起重要作用(张馨月, 2023)。目前, 调控表皮蜡质代谢主要是 AP2 和 MYB 两个家族转录因子。据报道, MdSHINE2 (*WAX PRODUCTION 2*)、MdWRI4 (*WRINKLED 4*)参与苹果(*Malus pumila*)蜡质积累(Li et al., 2020)。此外, MYB94 (MYB Domain Protein 94) (Giulia et al., 2020)、MYB96 (MYB Domain Protein 96) (Buyl et al., 2016)、MYB30 (MYB Domain Protein 30) (Kong et al., 2024)等转录因子可激活植物表皮蜡质合成过程, 促进蜡质在表皮的积累。一些参与烷烃形成的转录因子, 如 WIN1/SHN1 (*WAX INDUCER1*)为调控角质层蜡质生物合成的转录激活因子(Asaph et al., 2004)。

宁夏枸杞(*Lycium barbarum*)是一种多年生茄科灌木, 其果实中含有丰富的黄酮类、多糖和类胡萝卜素等营养物质(Qiang et al., 2023), 是著名的药食同源植物。然而, 宁夏枸杞果实为浆果, 含水量高达 80%, 果皮表面由蜡质覆盖, 阻碍了制干过程中水分的正常散失(王海等, 2015)。蜡质还是果实自我保护的自然屏障, 通过降低病菌侵入及延缓氧化等方式, 显著提高果实的保鲜能力(韩彤等, 2023)。研究表明, 宁夏枸杞蜡质组分中占比最大的为烷烃类(Wang et al., 2021), 而烷烃作为拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和其它植物的主要蜡质组分, 对植物耐旱性相关的角质层特性有重要贡献, 是作物改良的潜在目标(Li et al., 2020)。CER3 (*ECERIFERUM 3*)基因通常编码一种脂肪酰辅酶 A 还原酶, 是烷烃生物合成的关键基因。研

收稿日期: 2025-07-24; 接受日期: 2025-12-06

基金项目: 国家自然科学基金(No.32260409)和宁夏自然科学基金(No.2025AAC020034)

^{1*} 通讯作者。E-mail: Zhengguoqi1977@163.com

究表明拟南芥 *CER1* 和 *CER3* 在转基因番茄(*Solanum lycopersicum*)中的异源表达导致蜡质增加, 减少了水分流失并提高了水分利用效率(Buyl and Chung, 2015)。

目前, 有关植物表皮蜡质的研究主要集中在番茄、拟南芥等模式生物上(段瑞君等, 2017)。由于枸杞转基因体系薄弱, 前人对于枸杞蜡质的研究主要集中在蜡质积累等方面(米娟娟等, 2024), 蜡质生物合成与调控方面的研究鲜有报道, 仅有 *CER1* (袁惠君等, 2019)、*WIN1* (袁惠君等, 2023a)及 *ABCG11* (袁惠君等, 2023b)少数几个基因被表征。因此, 挖掘枸杞果实蜡质合成的关键基因并验证其功能, 为揭示枸杞果实蜡质合成的分子机制提供理论依据, 而且为果实制干以及贮藏保鲜提供实践指导。

1 材料与方法

1.1 供试材料

实验材料均由宁夏杞鑫种业有限公司提供。宁夏杞鑫种业有限公司营盘滩基地 6–8 月的气候特点为炎热且降水集中。6–8 月平均高温 30–32°C, 平均低温 16–20°C, 极端高温 38–39°C, 极端低温 10–13°C, 月均降水量 40–50 mm。选取宁夏主栽品种宁杞 1 号和宁杞 5 号植株, 以开花后天数为指标, 确定枸杞果实发育阶段(Yazdani et al., 2019)。于 2023 年 6–8 月在盛花期标记花朵, 分别选取花后 8、24 和 32 天的果实进行采摘, 采样后置于采样箱冷藏, 带回实验室进行蜡质含量和组分测定。每处理设 3 个生物学重复。样本信息见表 1。同期, 采集转录组测序材料, 采样后置于液氮中速冻, 后置于–80°C 超低温冰箱。每处理进行 4 次重复。矮化番茄(Micro-Tom)、大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、过表达载体骨架 pCambia1300、GV3101 农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)感受态细胞均由武汉伯远生物科技有限公司提供。

表 1 样本信息

Table 1 Sample information

Grouping	Period (d)	Group number
Ningqi No.1 at green fruit stage	8	A 1
Ningqi No.1 at turning stage	24	A 2
Ningqi No.1 at maturity stage	32	A 3
Ningqi No.5 at green fruit stage	8	B 1
Ningqi No.5 at turning stage	24	B 2
Ningqi No.5 at maturity stage	32	B 3

1.2 蜡质含量与组分测定

参照 Liu 等(2015)和张静等(2019)的方法提取果实角质层外蜡。在各发育期每个品种分别选取 30 个果实, 清洗晾干。实验前, 用阿拉伯胶粉末在索氏装置中脱脂, 在蒸馏水中溶解, 将胶液 (1 g·mL⁻¹)涂抹在整个果实表面, 风干 3–5 小时, 形成干燥稳定的聚合物膜时剥离, 将其研磨均匀后溶解于蒸馏水中, 再加入氯仿(蒸馏水:氯仿=1:3, v/v), 剧烈振荡, 直至完全溶解, 静置, 待分层后分离, 过滤。旋转蒸发器在 40°C 蒸发至干燥, 用氯仿润洗烧瓶并将润洗液转移至已称重的 2 mL 离心管中, 待完全吹干后称重, 贮存于–20°C, 待测。蜡质含量为离心管的 2 次重量差(W1–W2)。角质层内蜡以提取完角质层外蜡的果实为材料, 将其浸泡在 30 mL 氯仿中, 提取 30 秒。每个样品的表皮蜡质重复提取 3 次。GC-MS 分析前, 用 2 mL 氯仿充分溶解样品, 并加入 200 μ L (1 μ g· μ L⁻¹)正二十四烷(CAS 646-31-1)作为内标。用 200 μ L 吡啶和 200 μ L 双 N,N-(三氟乙酰胺(BSTFA)于 70°C 条件下处理 40 分钟。样品干燥后, 溶解于 2 mL 三氯甲烷中, 用 0.22 μ m 微孔膜过滤。GC-MS 条件参照刘德春等(2015)的方法。

番茄蜡质的提取参照王宇等(2022)的方法并稍做修改。选取若干叶片和 6 个番茄果实置于室温下 20 mL 氯仿中, 提取 1 分钟, 向提取液中加入 20 μ L 1 mg·mL⁻¹ C24 烷烃为内标, 混匀后进行过滤, 将提取液静置, 待其自然挥发至约 1 mL, 然后转移至气相色谱样品瓶中。用氮气将样品瓶中的氯仿吹干, 加入 20 μ L 吡啶, 再加入 20 μ L BSTFA 衍生剂, 密封混匀后在 70°C 水浴中衍生化 60 分钟, 氮气吹干, 最后用 1 mL 氯仿溶解样品进行 GC-MS 分析。

提取蜡质后的果实或叶片在通风橱吹干, 将果皮剥下并描绘在纸上, 用扫描仪扫描, 通过 Photoshop 2018 计算总表面积(S)。

$$\text{蜡质含量}(\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-2})=(W1-W2)/S$$

1.3 RNA 提取及转录组测序

枸杞果实样品保存在干冰条件下并送至北京百迈客生物技术有限公司进行 RNA 提取和转录组测序, 按照试剂盒说明书用 DNase I (Takara) 去除基因组 DNA, 随后使用 2100 Bioanalyzer (Agilent) 评估 RNA 质量, 使用 ND-2000 进行定量。选符合以下标准的高质量核酸样本用于构建 RNA-seq 文库: OD260/280=1.8–2.2, OD260/230≥2.0, RIN≥6.5, 28S: 18S≥1.0。使用 TBS380 定量后, 用 Illumina HiSeq 2500 测序仪(2×150 bp)对双端 RNA-seq 测序文库进行测序。使用 Fastp v.0.23 (Department of Bioinformatics et al., 2018)对 RNA-seq 原始数据进行质控和过滤。建立基因组索引并使用 Hisat2 v2.2.1 (Lyda Hill Department of Bioinformatics et al., 2019)将过滤后的读段与枸杞参考基因组进行比对, 获得用于后续分析的 mapped reads。

提取枸杞 1 号和枸杞 5 号成熟期果实 RNA, 将 RNA 逆转录为 cDNA, 使用 SYBR Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒 III, 以枸杞组成型 *LbActin* 为内参, 进行实时荧光定量 PCR 反应, 分析荧光值变化曲线及溶解曲线, 并利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法分析基因相对表达量。每个样品设 3 次重复。使用 Prime Premier 5 进行引物设计, qRT-PCR 特异性引物序列见表 2。

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequence

Target genes	Forward primer (5'–3')	Reverse primer (5'–3')
<i>Lb04G01159</i>	GGGGCTCTTGGGTTTCTGAA	CTCTTGCTGCTTCCTCTGCT
<i>Lb12G02295</i>	GGTCAGGCCTTGGTGAAGAA	ACAACCTCAGCTTCTTGCCT
<i>Lb06G01355</i>	CATAGTCTCCGGTGGTGCTC	ATCTGGATGCCCAATGGTGG
<i>Lb04G01745</i>	GATTTGGTGTGGCTGCTGG	TGTGCCCATCTGTTCCAAGA
<i>Lb05G00160</i>	GTAACGGCAGCGAGTAAAGC	ACGTAACCTGAATAGCCGCGT
<i>Lb11G01242</i>	CCATTGCTGCTTCCACATCG	TAGCCACACGTTAACCGAG
<i>Lbactin</i>	CCCATCTACGAGGGTTACGC	TTTCCCGTTCAGCAGTGGTT

1.4 枸杞不同器官 *LbCER3* 基因的表达分析

选择生长健壮的枸杞 1 号和枸杞 5 号枸杞, 分别采集茎、叶、花、青果、转色果和红果, 置于液氮中速冻。提取枸杞各器官 RNA 并检测 RNA 的完整性。选择枸杞组成型表达基因 *LbActin* (GenBank 登陆号: HQ415754.1)作为内参, 利用引物设计软件 Primer 5.0 设计引物。特异性引物为 M143274-97F-CCCATCTACGAGGGTTACGC; M143274-97R-TTTCCCGTT CAGCAGTGGTT (5'–3')。

1.5 加权基因共表达网络分析

利用果实蜡质相关生理指标和转录组数据进行加权基因共表达网络分析(WGCNA)。去除表达量不可检测或表达量相对较低的基因(平均 FPKM≤1.0)。选择变异系数(CV)>0.5 的基因子集, 使用 R 软件包中的 WGCNA 包构建共表达网络模块。共表达模块使用自动网络构建函数 (blockwise modules)获得, 软阈值设置为 7, TOM type 设置为 unsigned, merge cut height 设置为 0.25, deep split 设置为 2, min module size 设置为 30, 其余参数均为默认(Zheng et al., 2023)。Cytoscape 3.10 用于可视化共表达网络构建。

1.6 目的基因的扩增及生物信息学分析

提取枸杞 1 号成熟期果实 RNA, 逆转录成 cDNA。根据 *LbCER3* 的 CDS 序列设计 1 对引物, 以枸杞果实 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增。扩增体系和程序见表 3。引物为 D14980_0S1F-AACACGGGGGACTTTGCAAC, D14980_0S1R-CCTGAAGCGGCCGCTGTACA (5'–3')。使用 1%琼脂糖凝胶电泳进行产物回收, 回收产物标记为: rDNAC1, 检测后与载体进行重组。将 *LbCER3* 基因编码蛋白氨基酸序列与其它物种同源蛋白序列进行比较, 使用 MEGA6.0 软件构建系统发育树, 利用在线工具 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>)分析蛋白保守结构域。

表 3 PCR 扩增体系和反应程序

Table 3 PCR amplification system and reaction program

Amplification system		Reaction program	
Component	Volume (μL)	Steps	Cyclic number
Nuclease-free water	20	94°C for 5 min	1
Biorun Pfu PCR Mix	25	94°C for 30 s	30
Primer (+)	2	50°C for 45 s	30
Primer (-)	2	72°C for 113 s	30
Template	1	72°C for 10 min	1
Total	50	16°C for 30 min	1

1.7 *LbCER3* 过表达载体的构建

利用 PCR 纯化试剂盒对载体酶切产物进行纯化(纯化产物标记为 pCAMBIA1300 (D)), 将目的基因(rDNAC1)与载体连接, 连接产物命名为 pCAMBIA1300-*LbCER3*-Glosgfp, 酶切和重组反应体见表 4。取 5–10 μL 连接产物转化感受态大肠杆菌, 在 Kan 抗性平板上 37°C 培养 12 小时。挑取 10 个菌斑同时进行 1.5 mL EP 管接菌和 PCR 鉴定。pCAMBIA1300-*LbCER3*-Glosgfp 鉴定引物为 35seqF-TTCATTTGGAGAGAACACGGGGGAC, D14980R-CCCAAA CATCTTAAGAAATCAAAGACC (5'–3')。PCR 反应结束后, 取 1–3 个阳性条带对应的菌液 100 μL 进行样本测序, 剩余 400 μL 菌液接种到 5–10 mL Kan 抗性 LB 中, 摇匀, 待测序结果出来, 取正确测序对应的 1 管进行质粒提取, 将菌株和质粒保存到数据库中。

将检测有目的条带的菌落在含 10 mL 50 mg·L⁻¹ 卡那霉素的 LB 液体培养基中 37°C 振荡过夜, 提取质粒, 加入含有 *EcoRV* 的酶切体系, 混匀, 37°C 酶切 3 小时, 1%琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物。酶切体系见表 5。

表 4 载体酶切体系和重组体系

Table 4 Vector digestion system and recombinant reaction system

Digestion system		Reorganization system	
Component	Volume (μL)	component	Volume (μL)
Nuclease-free water	13	Nuclease-free water	0
10×Buffer	2	Biorun 2×EasyClone Mix	10
Bsa1	1	rDNAC1	5
pCAMBIA1300	4	pCAMBIA1300 (D)	5
Total	20	Total	20

表 5 酶切体系

Table 5 Digestion system

Digestion system	Volume (μL)
pCAMBIA1300- <i>LbCER3</i> -Glosgfp	17
10×Buffer	2
<i>EcoRV</i>	1
Total	20

1.8 *LbCER3* 的遗传转化

按照胡盼(2024)的方法进行质粒转化。将 1 μL 质粒加至 50 μL GV3101 农杆菌感受态细胞中, 混匀后移入电转杯中, 电转后加入 1 mL LB 液体培养基, 混匀后移入 1.5 mL 离心管中, 30°C、180 r·min⁻¹ 摇床培养 30 分钟, 取 50 μL 活化后的农杆菌培养液, 接种于 LB 固体培养基中, 30°C 暗培养 48 小时。合成相应检测引物, 配制 PCR 扩增体系, 并充分混匀, 用 PCR 仪进行扩增。配制 1%琼脂糖凝胶, 完成电泳过程。当阳性对照和样品的电泳条带清晰、大小正确, 阴性对照无条带时, 表明可进行下一步实验。

取 Micro-Tom 种子用无菌水清洗 2 分钟, 75%乙醇消毒 40 秒, 84 消毒液清洗 7 分钟, 再用无菌水清洗 3 次, 浸泡 1 小时。将灭菌后的番茄种子播种在发芽培养基上, 暗培养 3–4 天, 种子发芽后放入有光照的组织培养盒中培养 4–5 天。待萌发的番茄幼苗子叶充分展开后, 用手术刀切去叶柄和子叶尖端, 将中间部分切成 2–3 段, 接种到预培养基中, (23±2)°C 预培养 2–3 天, 挑取感染液中的农杆菌, 制备 OD₆₀₀=0.2 的农杆菌重悬浮液, 感染 10–15 分钟后, 将干燥外植体接种于共培养基中, (23±2)°C 暗培养 2 天, 将恢复培养后的愈伤组织接种到筛选培养基中, 在 23°C、16 小时光照/8 小时黑暗下培养 15–30 天; 将筛选出的愈伤组织接种到分化培养基中, 在 23°C、16 小时光照/8 小时黑暗下培养 30–40 天。待分化苗长至 2–3 cm 时从愈伤组织中切下, 接种到生根培养基中, 在 23°C、16 小时光照/8 小时黑暗下培养 10–15 天(孟令君, 2023)。

取已长出叶片且较健壮的植株进行潮霉素抗性鉴定。结果显示, 抽检 22 株均为阳性, 检测引物, M124566-501F-GAGCATATACGCCGGAGTC, M124566-501R-CAAGACCTGCC TGAAACCGA (5'–3')。当幼苗长至 10 cm、根系完整时, 将鉴定出的阳性苗移入育苗钵内炼

苗, 长出 5–7 片真叶时移栽到大田。T0 代转基因番茄种子采集后种植, 得到 T1 代转基因苗, 选 3 个株系(J11-4、J11-7 和 J11-13)采集叶片进行分子鉴定,引物为 M124566-387F-CATGG TGATCACAATCCTCC, M124566-387R-CCCATCTTTGTGTGATGTAGGG (5'–3')。

1.9 转基因番茄叶片角质层渗透性测定

采集盛花期和成熟期的叶片进行黑暗驯化 3 小时, 将叶片样品放入暗室中持续脱水(25°C, 相对湿度 75%), 分别于 2、4、6、8、12 小时后测重量。后将在 70°C 下干燥并称重。失水率表示为与初始叶片重量相比损失重量的百分比。叶绿素浸出率的测定按照文献(Kosma et al., 2009)所述方法进行。取盛花期和成熟期的番茄莲座叶浸入到 20 mL 80%乙醇中, 置于暗处。分别于 2、4、6、8、12 小时后, 在波长 647 nm (A647)和 664 nm (A664)测定吸光值。计算公式(Ritchie, 2008)如下:

$$\text{总叶绿素含量} = 7.93 \times A664 + 19.53 \times A647$$

叶绿素浸出率表示为每个时间点的叶绿素浓度占 12 小时后提取的总叶绿素的百分比。

2 结果与分析

2.1 不同发育时期枸杞果实蜡质含量与组分

为了明确枸杞果实角质层外蜡与内蜡在果实发育和成熟过程中的变化规律, 对宁杞 1 号和宁杞 5 号不同发育时期果实的角质层外蜡和内蜡分别进行提取和测定。结果表明(图 1A, D), 随着果实的发育和成熟, 宁杞 1 号和宁杞 5 号果实的角质层内蜡和外蜡含量逐渐降低, 同一发育时期, 宁杞 1 号蜡质含量均显著高于宁杞 5 号; 在果实发育和成熟过程中, 宁杞 1 号和宁杞 5 号果实的角质层内蜡含量始终大于外蜡。

蜡质组分分析结果表明, 宁杞 1 号和宁杞 5 号果实发育和成熟过程中的角质层外蜡与内蜡组分相同, 均为烷烃类、酯类、醇类、酸类、酮类和醛类, 占总蜡质比最大的是烷烃类, 其次是酯类和酸类, 而醇类、酮类、醛类占比较小。在宁杞 1 号角质层外蜡中, 青果期和转色期果实烷烃类组分含量与成熟期存在显著差异, 酯类在 3 个时期均存在显著差异(图 1B); 角质层内蜡中烷烃类和酯类在 3 个时期存在显著差异(图 1E)。在宁杞 5 号角质层外蜡中, 烷烃类和酯类在 3 个时期存在显著差异(图 1C); 角质层内蜡中烷烃类在 3 个时期存在显著差异(图 1F)。

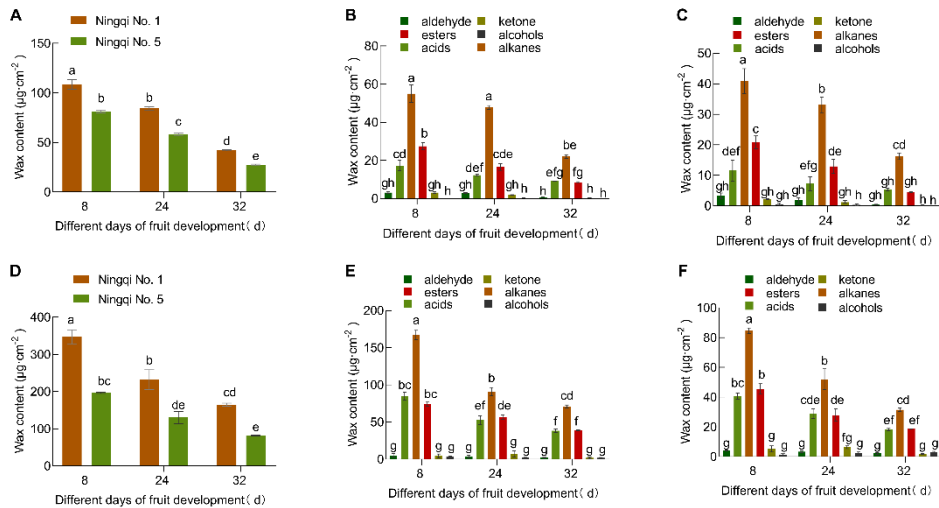


图 1 果实发育过程中蜡质含量和各组分含量变化

(A) 宁杞 1 号和宁杞 5 号不同发育时期角质层外蜡含量; (B) 宁杞 1 号不同发育时期角质层外蜡组分含量; (C) 宁杞 5 号不同发育时期角质层外蜡组分含量; (D) 宁杞 1 号和宁杞 5 号不同发育时期角质层内蜡含量; (E) 宁杞 1 号不同发育时期角质层内蜡组分含量; (F) 宁杞 5 号不同发育时期角质层内蜡组分含量。不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。

Figure 1 The changes in wax content and the content of each component during fruit development

(A) Outer wax content of the stratum corneum of Ningqi No.1 and Ningqi No.5 at different developmental stages; (B) Outer wax components of Ningqi No.1 stratum corneum at different developmental stages; (C) Outer wax components of Ningqi No.5 stratum corneum at different developmental stages; (D) Inner wax

content of the stratum corneum of Ningqi No.1 and Ningqi No.5 at different developmental stages; (E) Inner wax components of Ningqi No.1 stratum corneum at different developmental stages; (F) Inner wax components of Ningqi No.5 stratum corneum at different developmental stages. Different lowercase letters indicate significant differences at the 0.05 level.

2.2 测序数据质量和 DEGs 分析

对不同发育时期宁杞 1 号和宁杞 5 号果实共 24 个样本进行转录组测序，将下机数据进行过滤得到 clean data。本次测序获得了高质量数据。通过主成分分析(PCA)对 RNA-seq 样本进行分离(图 2A)，剔除 6 个离群样本，剩余 18 个样本，保留了 90.56% 的原始数据，各组的离散程度均较低，实验重复性较好。18 个样本相关性分析结果表明(图 2B)，宁杞 1 号和宁杞 5 号不同发育时期的 3 个重复样本的皮尔逊相关系数均大于 0.88，验证了其对进一步分析的适用性。

通过组间比较(A1 vs B1、A2 vs B2 和 A3 vs B3)分析不同组间差异表达基因(DEGs)，筛选差异表达基因条件为表达差异倍数 $|\log_2\text{FoldChange}| > 1$, $P < 0.05$ 。DEGs 分析结果显示(图 2C, D), A1 vs B1、A2 vs B2 和 A3 vs B3 分别筛选到 2 087 (1 567 个上调, 1 120 个下调)、4 089 (2 322 个上调, 1 367 个下调)和 4 823 (2 016 个上调, 2 807 个下调)个 DEGs。值得注意的是，在果实发育和成熟过程中共同的 DEGs 有 618 个。实时定量 PCR 结果显示, 6 个 DEGs 的表达水平与转录组数据一致(图 3)，表明转录组数据是可靠的。

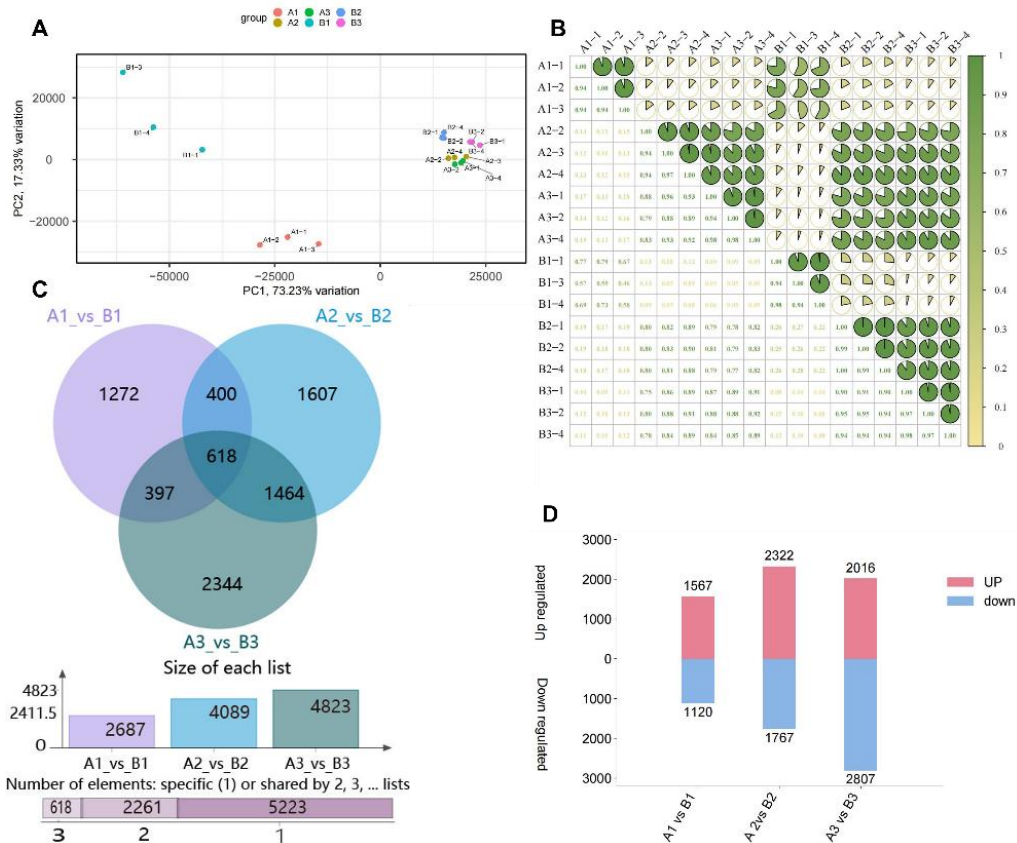


图 2 测序数据质量和差异表达基因(DEGs)分析

(A) 主成分分析(PCA); (B) 样本相关性分析; (C) DEGs 统计; (D) DEGs 上、下调统计

Figure 2 Sequencing data quality and differentially expressed genes (DEGs) analysis

(A) Principal component analysis (PCA); (B) Sample correlation analysis; (C) DEGs statistics; (D) DEGs up- and down-regulation statistics

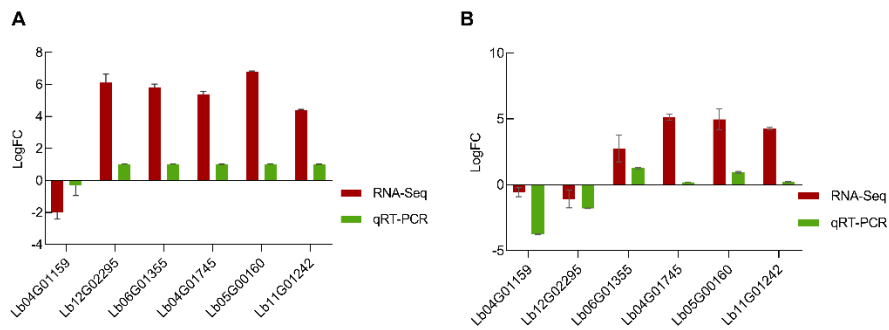


图 3 qRT-PCR 验证差异表达基因

(A) 宁杞 1 号; (B) 宁杞 5 号。

Figure 3 Identification of differential expression genes by qRT-PCR

(A) Ningqi No.1; (B) Ningqi No.5.

2.3 *LbCER3* 基因在枸杞不同器官中的表达

利用 qRT-PCR 技术分析枸杞不同器官中 *LbCER3* 基因的表达特性, 结果表明(图 4), *LbCER3* 基因在枸杞各器官中均表达, 宁杞 1 号花中 *LbCER3* 表达量显著高于其他器官, 而在果实中随着果实成熟呈现下降的趋势, 且青果显著高于转色果(图 4A); 在宁杞 5 号茎中表达量最高, 在果实中随着果实成熟同样呈现下降趋势, 但 3 个时期果实间差异不显著(图 4B)。

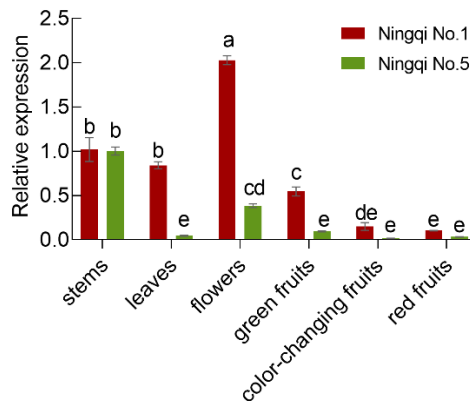


图 4 不同器官中 *LbCER3* 基因的表达量(不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。)

Figure 4 The expression of *LbCER3* gene in different organs(Different lowercase letters indicate significant differences at the 0.05 level.)

2.4 加权基因共表达网络分析(WGCNA)

为全面揭示枸杞果实中蜡质的调控网络, 我们使用与果实蜡质相关的生理指标和转录组数据进行 WGCNA 分析。样本聚类分析结果显示(图 5A, C), 各样品很好地聚类, 验证了数据用于进一步分析的适用性。模块性状关系热图显示(图 5B, D), 角质层内蜡含量(IW)、角质层外蜡含量(OW)、总蜡质含量(TW)以及枸杞蜡质主要成分(如烷烃类(IW_alkanes))与 MEturquoise 模块热图模式相似, 表明存在果实发育和成熟介导的潜在共调节。

本研究利用文献中已报道的拟南芥蜡质基因的枸杞同源基因, 选择宁杞 1 号和宁杞 5 号 MEturquoise 模块构建共表达网络(图 6A, B)。结果表明, 与拟南芥蜡质生物合成基因同源的一些枸杞基因共表达。这些枸杞基因包括 *LTP1Lb03G00960*、*MYB96Lb03G02694*、*SHN3Lb04G01159*、*HHT1Lb03G01924*、*CD1Lb03G03267*、*WIN1Lb11G01242*、*LACS2Lb06G03454*、*RDR1Lb10G00717*、*GLIP7Lb11G00715*、*CYP94B1Lb07G02420*、*KCS20Lb09G02407*、*WRI1Lb06G01856*、*ABCG29Lb03G03205*、*CER4Lb06G00288*、*MIEL1Lb01G01637*、*KCS1Lb01G00549*、*KCS2Lb05G02581*、*CER3Lb04G00004*、*KCS5Lb12G02295*、*HHTLb01G02032*、*LACS4Lb06G01355* 和 *HSTLb11G00409*。此外, 在

共表达网络中还发现参与植物激素生物合成有关基因 *IAA4Lb01G01704*、*IAA28Lb01G01381* 和 *BHLH14Lb01G00553*。通过对共表达网络中的这些蜡质基因的表达模式进行分析(图 6 C), 发现 *CER3Lb04G00004* 的表达模式与宁杞 1 号和宁杞 5 号枸杞果实发育过程中的蜡质主要组分烷烃类含量变化趋势一致(图 6D), 且与宁杞 5 号相比, *CER3Lb04G00004* 在宁杞 1 号中上调表达, 因此将 *CER3Lb04G00004* 确定为候选基因。

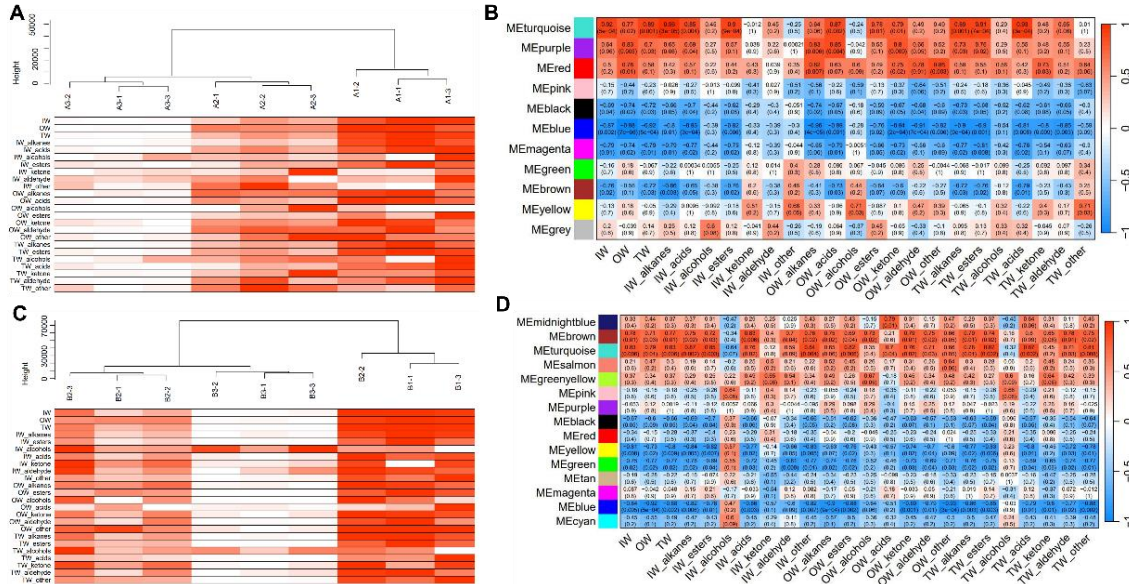


图 5 样品聚类树状图和模块性状关系热图
(A) 宁杞 1 号样品聚类树状图; **(B)** 宁杞 1 号模块性状关系热图; **(C)** 宁杞 5 号样品聚类树状图; **(D)** 宁杞 5 号模块性状关系热图
Figure 5 Sample clustering dendrogram and heatmap of module trait relationships
(A) Ningqi No.1 sample clustering dendrogram; **(B)** Ningqi No.1 module trait relationship heatmap; **(C)** Ningqi No.5 sample clustering dendrogram; **(D)** Ningqi No.5 module trait relationship heatmap

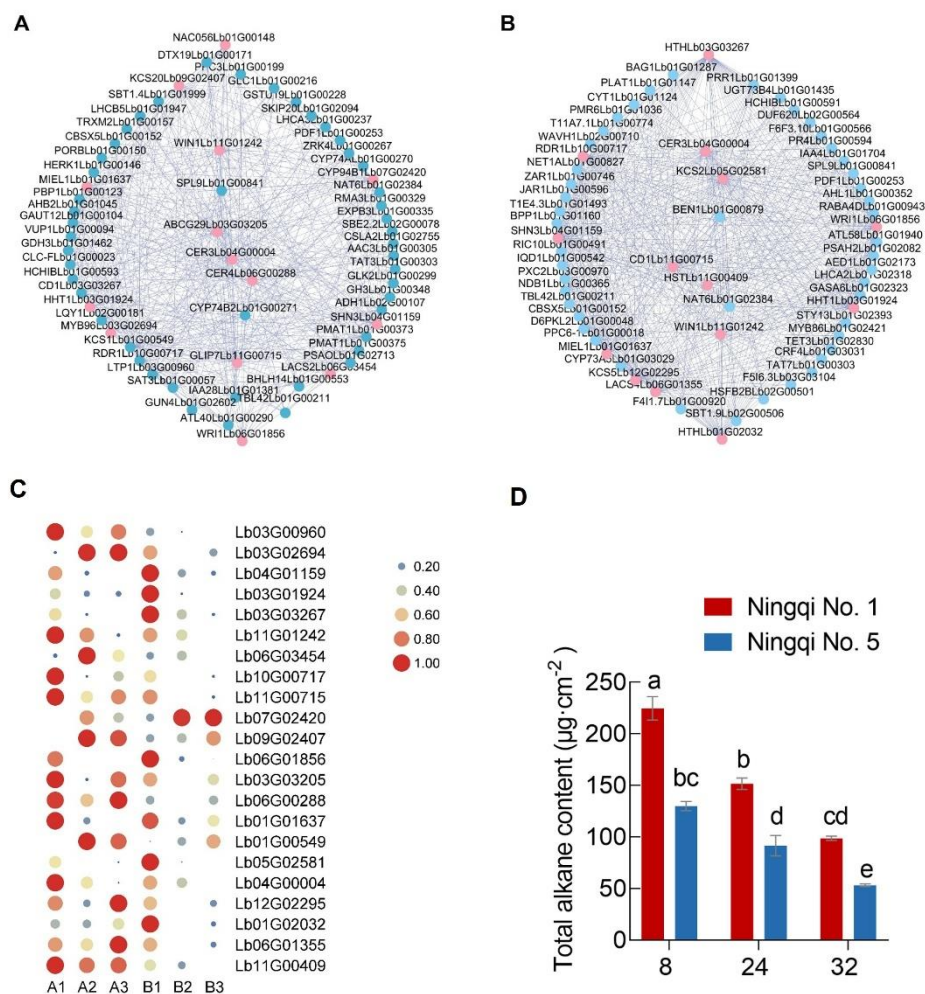


图 6 果实共表达网络、蜡质基因表达模式和烷烃类组分分析
(A) 宁杞 1 号共表达网络; (B) 宁杞 5 号共表达网络; (C) 蜡质基因表达模式; (D) 总蜡质中烷烃类组分含量。不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。

Figure 6 Co-expression network of fruit, expression patterns of wax genes, and analysis of alkane components

(A) Ningqi No.1 co-expression network; (B) Ningqi No.5 co-expression network; (C) Expression pattern of waxy genes; (D) Content of alkane components in total wax. Different lowercase letters indicate significant differences at the 0.05 level.

2.5 目的基因的扩增及生物信息学分析

扩增 *LbCER3* 的 CDS 序列, 根据单克隆测序结果得到 1 个 1 884 bp 的片段, 该序列经测序与目的基因序列相同, 表明克隆成功。*CER3* 蛋白氨基酸序列比对结果表明(图 7 A), *CER3* 蛋白在不同物种间有很高的同源性。系统进化分析结果表明(图 7B), 枸杞 *CER3* 与非非洲枸杞 (*Lycium ferocissimum*) *CER3* 的亲缘关系最近, 也与辣椒 (*Capsicum annuum*)、烟草 (*Nicotiana tabacum*) *CER3* 蛋白亲缘关系较密切。为了确定枸杞与拟南芥 *CER3* 蛋白的功能是否有相似之处, 我们进行了蛋白保守结构域分析(图 7 C), 结果表明枸杞与拟南芥 *CER3* 均含有 1 个 C 端 WAX2 结构域(Wax2_C)和脂肪酸羟化酶结构域(FA_hydroxylase)结构域, 这 2 个结构域是烷烃生物合成所必需的。

2.6 *LbCER3* 过表达载体的构建和转化番茄

为了全面探讨 *LbCER3* 在蜡质代谢过程中的分子生物学功能, 使用 *Bsa1* 酶将载体线性化, 将扩增纯化后的 *LbCER3* 片段与载体连接, 构建由 *CaMV35S* 启动子调控的 *LbCER3* 基因的植物过表达载体。由于载体构建完成后目的片段两端不含有酶切位点, 无法通过双酶切获得目的基因片段和载体骨架片段, 但为了保证重组质粒的准确性, 在测序的同时还用 *EcoRV* 内切酶对重组质粒进行酶切, 以验证重组质粒的实际片段大小是否与理论值相符。重组质粒酶切

结果表明(图 8A), 电泳检测结果与理论值大小一致且测序结果正确, 表明载体构建成功。将载体通过农杆菌介导转化番茄, T0 代抗性基因 PCR 检测结果显示(图 8B), 抽检番茄苗条带清晰, 大小与预期值一致, 对照无条带, 表明转化成功。在进行 T1 代 PCR 目的基因分子鉴定时, 为了避免出现假阳性, 进行了 2 次检测, 将 2 次检测均为阳性的植株确定为最终的阳性植株, 在 3 个株系中共检出 9 株阳性株, 阳性率为 82% (图 8C)。后续实验均以这 9 株为实验材料。

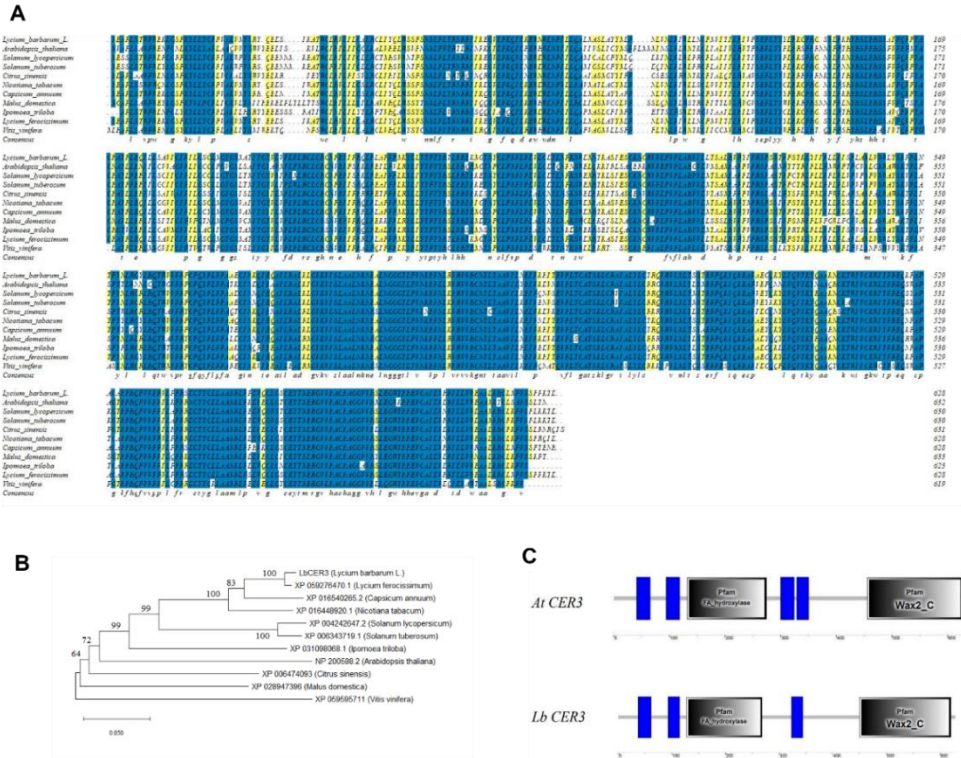


图 7 不同物种 CER3 蛋白同源性分析
(A) 不同物种 CER3 蛋白氨基酸序列多重比对; **(B)** 不同物种 CER3 蛋白系统进化树; **(C)** 枸杞和拟南芥 CER3 保守结构域分析
Figure 7 Homology analysis of CER3 proteins from different species
(A) Multiple sequence alignment of CER3 protein amino acid sequences from different species; **(B)** Phylogenetic tree of CER3 proteins from different species; **(C)** Analysis of conserved domains of CER3 in *Lycium barbarum* and *Arabidopsis thaliana*

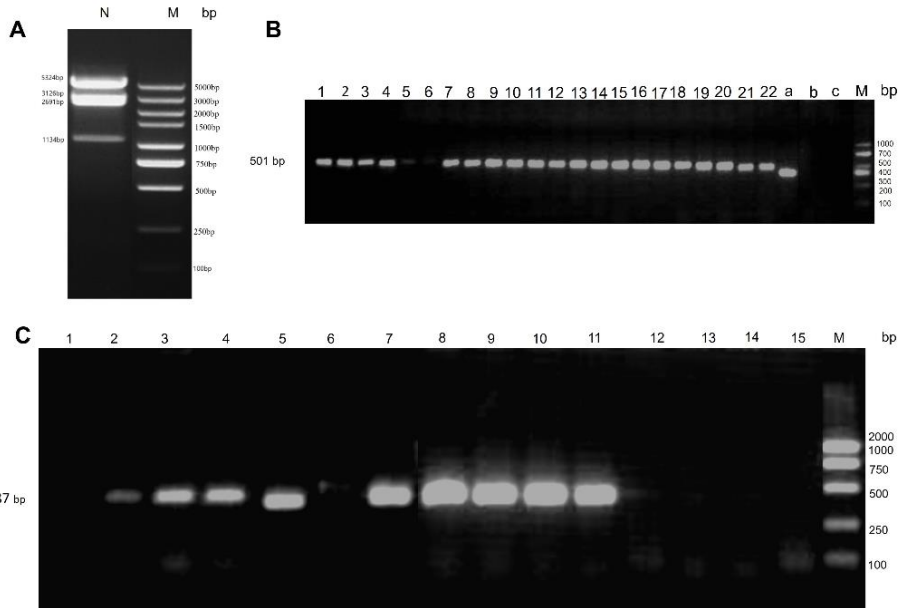


图 8 *LbCER3* 过表达载体构建与遗传转化

(A) 重组载体酶切验证(N:目标条带, M: marker); (B) T0 代植株抗性基因分子鉴定(1-22 为抽检植株, a,b,c,M 依次为阳性对照、空白体系对照、WT 对照、marker); (C) T1 代植株目标基因分子鉴定(1-4 为 J11-4 株系, 5-7 为 J11-7 株系, 8-11 为 J11-13 株系, 12-15 为野生型, M: marker)

Figure 8 *LbCER3* overexpression vector construction and genetic transformation

(A) Restriction enzyme digestion verification of the recombinant vector (N: target band, M: marker); (B) Molecular identification of resistance genes in T0 generation plants (1-22 are the sampled plants; a, b, c, and M correspond to the positive control, blank system control, WT control, and marker, respectively.); (C) Molecular identification of target genes in T1 generation plants (1-4 are J11-4 lines, 5-7 are J11-7 lines, 8-11 are J11-13 lines, and 12-15 are wild type, M: marker)

2.7 转基因番茄角质层渗透性与蜡质分析

对生长发育过程中过表达 *LbCER3* 转基因植株进行观察(图 9A, B), 结果表明, 过表达 *LbCER3* 转基因植株在生长发育期出现生长发育迟缓的现象(萌发延迟, 开花期延迟 1 周左右)。叶片失水率和叶绿素浸出率测定结果表明, 过表达 *LbCER3* 转基因植株盛花期和成熟期的叶片叶绿素浸出率在 6 和 8 小时显著低于野生型(图 10A, C), 失水率仅在盛花期 12 小时达到显著水平(图 10B)。叶片蜡质含量和组分测定结果表明, 过表达 *LbCER3* 转基因植株叶片蜡质含量显著增加(图 10E)。蜡质组分主要为烷烃类和酸类, 还有少量的醇类、酯类和酮类, 其中, 烷烃和酸类的含量显著增加(图 10F)。

果实蜡质含量和组分测定结果表明, 过表达植株蜡质含量差异不显著(图 10G), 蜡质组分主要为烷烃类、酸类、酯类和醇类, 其中, 烷烃类含量差异不显著, 酸类含量显著增加, 醇类含量显著下降(图 10H)。

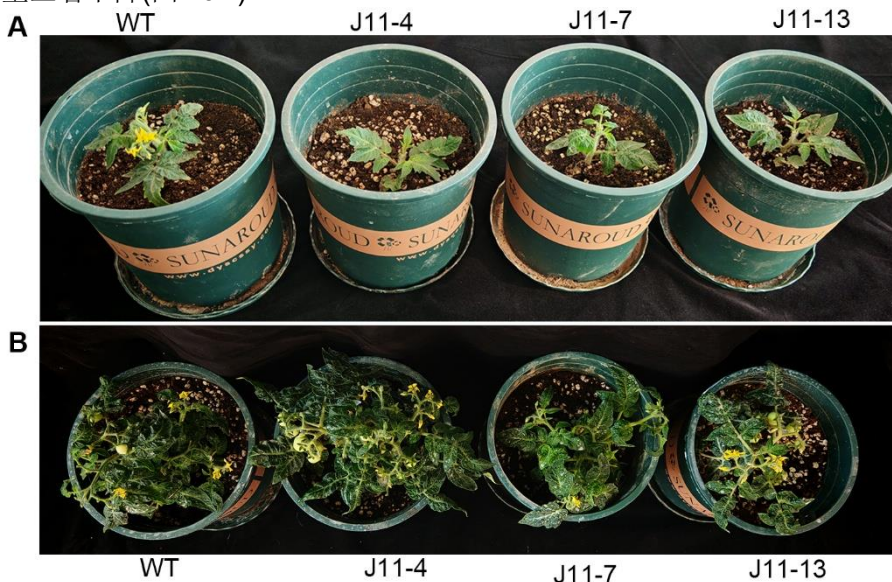


图 9 初花期和成熟期转基因植株表型

(A) 初花期转基因植株表型; (B) 成熟期转基因植株表型

Figure 9 Phenotypes of transgenic plants at early flowering and maturity stages

(A) Phenotype of transgenic plants at early flowering stage; (B) Phenotype of transgenic plants at maturity stage

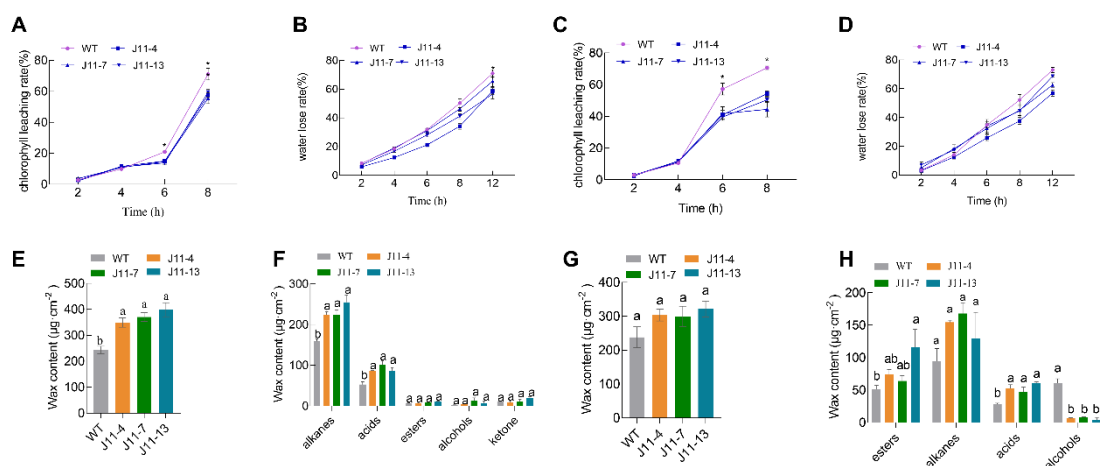


图 10 转基因番茄角质层渗透性与蜡质分析

(A), (B) 盛花期叶绿素浸出率和失水率; (C), (D) 成熟期叶绿素浸出率和失水率; (E), (F) 叶片蜡质含量和组分; (G), (H) 果实蜡质含量和组分。不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。

Figure 10 Analysis of cuticular permeability and wax composition in genetically modified tomatoes

(A), (B) Chlorophyll leaching rate and water loss rate during the peak flowering stage; (C), (D) Chlorophyll leaching rate and water loss rate during the mature stage; (E), (F) Leaf wax content and leaf wax components; (G), (H) Fruit wax content and fruit wax components. Different lowercase letters indicate significant differences at the 0.05 level.

3 讨论

植物蜡质具有保护果实免受水分流失的作用。研究表明,角质膜的渗透性主要由角质层内蜡决定,而角质层外蜡起次要作用(Reinhard and Markus, 2016)。本研究发现,宁杞 1 号和宁杞 5 号的角质层内蜡含量在果皮总蜡质中占比较高,这与王金秋等(2016)的研究结果一致。而 Wang 等(2014)发现纽荷兰脐橙(*Citrus sinensis*)的角质层外蜡在果皮总蜡质中占比较高,这表明蜡质含量因植物种类、果实的成熟阶段以及环境条件而异。植物表皮蜡质主要组分包括烷烃类、醇类、醛类、酮类和脂肪酸类等(Chen et al., 2023)。本研究表明,宁杞 1 号和宁杞 5 号果实蜡质组分主要为烷烃类、酯类和酸类。烷烃作为拟南芥等大多数植物的主要蜡质组分,是采后水分渗入的重要决定因素(Parsons et al., 2013),在减少西葫芦(*Cucurbita pepo*)果实冷藏期间的水分流失和抵御冷害方面也起着重要作用(Fátima et al., 2021)。

基于转录组学的蜡质差异基因筛选是揭示植物蜡质合成机制的有效途径。WGCNA 广泛应用于转录组学研究。杨宏宾(2021)对红橘和枳(*Citrus reticulata*)果实不同发育阶段表皮蜡质的共表达分析表明, *CitKCS1* 和 *CitKCS12* 参与表皮蜡质合成。Zhao 等(2021)基于转录组数据构建了文冠果(*Xanthoceras sorbifolium*)叶片蜡质的共表达网络,确定了 138 个参与蜡质生物合成和运输的 DEGs。本研究通过转录学和 WGCNA 分析,构建了枸杞果实蜡质共表达网络,根据蜡质基因表达模式与蜡质含量及蜡质主要组分烷烃类含量的变化趋势,确定 *LbCER3* 为果实蜡质积累的关键基因。*CER3* 基因属于 *Eceriferum* 家族,该家族基因参与蜡质合成的各个阶段,它们最初是在拟南芥环磷酸胺诱导的突变体中被发现并命名的,这些突变体引起蜡质形态、大小和含量的变化(Lacey et al., 2008)。其中, *CER3* 在烷烃合成中具有重要作用(Lucas and Reinhard, 2017)。

宁夏枸杞果实为浆果,枸杞遗传转化体系相对薄弱,因此,本研究选择异源转化番茄。番茄作为模式植物,由于其表面含有丰富的蜡质且易于分离,具有良好的遗传背景和表型优势,适用于功能验证。本研究克隆了 *LbCER3* 基因的 CDS 序列,构建了过表达载体并转化番茄,得到 T1 代 *LbCER3* 过表达株系。T1 代叶片的叶绿素浸出率显著降低,表明角质层的渗透性发生了改变。据报道,植物表皮的渗透性主要由角质层蜡质决定(Yeats and Rose, 2013)。因此,本研究进一步测定了叶片蜡质,发现转基因番茄蜡质含量显著高于野生型,且烷烃类含量显著增加,暗示主要由烷烃组成的蜡质积累降低了叶表皮的渗透性,这与前人对番茄的研究结果一致(Ding et al., 2018)。同时,对番茄果实蜡质的测定结果表明,果实蜡质含量无显著差异。研究表明,玉米(*Zea mays*)中 *CER3* 同源基因 *GLOSSY1* 参与幼苗叶片角质层蜡质积累

(Monica et al., 2005), 因此, 推测 *LbCER3* 可能具有组织特异性, 是引起转基因番茄叶片蜡质含量显著增加的原因。综上所述, *LbCER3* 是宁夏枸杞果皮蜡质积累的关键基因, 在烷烃生物合成中具有重要功能。然而, 外源基因的遗传稳定性通常需要经过多代筛选和验证, 植物转基因后通常需要筛选三代才能确定稳定遗传, 本课题组后期将继续培育第二代或第三代转基因植株, 使目的基因稳定遗传, 从而更好地验证其在蜡质生物合成中的功能。

作者贡献声明

赵娟红: 负责主要实验的执行、核心数据的获取与分析, 撰写论文; 李治刚, 刘展飞, 刘祥婷, 寇莉蓉, 王文秀, 周甜甜, 杨涓: 参与实验样品的采集与处理, 参与研究设计的讨论并对论文进行审阅与修改; 郑国琦: 提供关键的理论指导、实验资源和资金支持, 深度参与研究结果的解释与讨论, 并对论文的最终版本进行严格的审阅、批判性修改与定稿。

参考文献

- Asaph A, Shital D, Reinhard J, Eveline T, Van Arkel Gert, Andy P** (2004). The *SHINE* clade of AP2 domain transcription factors activates wax biosynthesis, alters cuticle properties, and confers drought tolerance when overexpressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 2463–2480.
- Buyl LS, Chung SM** (2015). Cuticular wax biosynthesis is up-regulated by the *MYB94* transcription factor in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* **56**, 48–60.
- Buyl LS, Uk KH, Chung SM** (2016). *MYB94* and *MYB96* additively activate cuticular wax biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* **57**, 2300–2311.
- Chen C, Zhao C, Minghui C, Jingxue Z, Liwen W, Xuebing Y** (2023). Leaf cuticular waxes of bermudagrass response to environment-driven adaptations of climate effect inferred from latitude and longitude gradient in china. *Chem Biodivers* **20**, 202201104.
- Dechun L, Li Y, Qiong Z, Yuechen W, Minli W, Xia Z, Qi W, Chuanfu L, Shanbei L, Yong L** (2015). Analysis of cuticular wax constituents and genes that contribute to the formation of 'Glossy newhall', a spontaneous bud mutant from the wild-type 'Newhall' navel orange. *Plant Mol Biol* **88**, 573–590.
- Department Of Bioinformatics HBSC, Shenzhen Institutes Of Advanced Technology CAOS, Department Of Bioinformatics HBSC, Department Of Bioinformatics HBSC, Shenzhen Institutes Of Advanced Technology CAOS** (2018). Fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* **34**, i884–i890.
- Ding F, Wang G, Wang M, Zhang S** (2018). Exogenous melatonin improves tolerance to water deficit by promoting cuticle formation in tomato plants. *Molecules* **23**, 1605.
- Duan RJ, Wang AD, Chen GX** (2017). Advances in study of plant cuticle genes. *Chin Bull Bot* **52**, 637–651. (in Chinese)
- 段瑞君, 王爱东, 陈国雄** (2017). 植物角质层基因研究进展. *植物学报* **52**, 637–651.
- Fátima C, Alejandro CC, Raquel JM, Manuel J, Dolores G, Francisco P** (2021). Changes in morphology, metabolism and composition of cuticular wax in zucchini fruit during postharvest cold storage. *Front Plant Sci* **12**, 778745.
- Giulia C, Frédéric D, Matteo C, Massimo Z, Martina P, Valentina R, Stephen HD, Gabriella C** (2020). Drought-responsive *ZmFDL1/MYB94* regulates cuticle biosynthesis and cuticle-dependent leaf permeability. *Plant Physiol* **184**, 266–282.
- Han T, Yu SL, Liu YD, Jiang Y** (2023). Research progress on epicuticular wax and its relationship with fruit storage. *J Food Saf Food Qual* **14**, 191–198. (in Chinese)
- 韩彤, 于姝莉, 刘忆冬, 江英** (2023). 表皮蜡质及其与果实贮藏关系的研究进展. *食品安全质量检测学报* **14**, 191–198.
- Hu P** (2024). Identification of the Aux/IAA Gene Family in *Cinnamomum camphora* and Functional Analysis of *CcIAA11-1* and *CcIAA13-2*. Master's thesis. Nanchang: Jiangxi Agricultural University. pp.1–68. (in Chinese)
- 胡盼** (2024). 樟树 Aux/IAA 基因家族鉴定及 *CcIAA11-1* 和 *CcIAA13-2* 功能研究. 硕士学位论文. 南昌: 江西农业大学. pp.1–68.
- Kong Q, Liu R, Wu W, Chen H, Han Y, Fang X, Zhang Y, Chen H, Mu H, Gao H, Chen J**

- (2024). *VcMYB30* enhances wax production and maintains fruit quality by regulating cuticular wax biosynthesis genes. *Postharvest Biol Technol* **212**, 112856.
- Kosma DK, Bourdenx B, Bernard A, Parsons EP, Lu SY, Joubes J, Jenks MA** (2009). The impact of water deficiency on leaf cuticle lipids of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **151**, 1918–1929.
- Lacey S, Allan D, Patricia L, Miao W, Reinhard J, Ljerka K** (2008). Use of *Arabidopsis eceriferum* mutants to explore plant cuticle biosynthesis. *J Visua Exp* **16**, 709.
- Li H, Guo Y, Cui Q, Zhang Z, Yan X, Ahammed GJ, Yang X, Yang J, Wei C, Zhang X** (2020). Alkanes (c29 and c31)-mediated intracuticular wax accumulation contributes to melatonin- and ABA-induced drought tolerance in watermelon. *J Plant Growth Regul* **39**, 1–10.
- Li L, Zhao MX, Wang JH, Liu SZ, Wang GY, Schnables P** (2023). Research progress on genetic mechanisms of plant epidermal wax synthesis, transport and regulation. *J Agric Univ* **28**, 1–19. (in Chinese)
- 李莉, 赵米贤, 王建华, 刘三震, 王国英, Schnables P** (2023). 植物表皮蜡质合成、运输及调控机制研究进展. *中国农业大学学报* **28**, 1–19.
- Li ZY, Xiang YC, Yuan LY, Jin HY** (2020). Advances in biosynthesis, regulation, and function of apple cuticular wax. *Front Plant Sci* **11**, 1165.
- Liu DC, Wang ML, Yang L, Zeng Q, Liu SB, Liu Y** (2015). A study on the genetic stability of wax composition in the glossy mutant of 'Newhall' navel orange. *Acta Agric Univ Jiangxiensis* **37**, 597–603. (in Chinese)
- 刘德春, 王敏力, 杨莉, 曾琼, 刘山蓓, 刘勇** (2015). 纽荷尔脐橙果皮光泽型突变体及其高接后代果皮蜡质成分比较研究. *江西农业大学学报* **37**, 597–603.
- Lucas B, Reinhard J** (2017). Structure and biosynthesis of branched wax compounds on wild type and wax biosynthesis mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **58**, 1059–1074.
- Lyda Hill Department Of Bioinformatics UOTS, Department Of Computer Science SUSC, Lyda Hill Department Of Bioinformatics UOTS, Lyda Hill Department Of Bioinformatics UOTS, Center For Computational Biology MIOG, Departments Of Biomedical Engineering CSAB** (2019). Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nat Biotechnol* **37**, 907–915.
- Markus R, Katja A, Markus B, Hua H, Michael R, Ann-Christin S, Anna S, Yueming J** (2015). Water loss from litchi (*litchi chinensis*) and longan (*Dimocarpus longan*) fruits is biphasic and controlled by a complex pericarpal transpiration barrier. *Planta* **242**, 1207–1219.
- Meng LJ** (2023). A Study on The Cold Resistance and Molecular Mechanism of *ScPP2C19* Gene in Tomato. Master's thesis. Harbin: Northeast Agricultural University. pp.1–79. (in Chinese)
- 孟令君** (2023). 类番茄 *ScPP2C19* 基因调控番茄的抗冷能力及分子机制研究. 硕士学位论文. 哈尔滨: 东北农业大学. pp.1–79.
- Mi JJ, Zhao JH, Li ZG, Bao H, Huang T, Qin K, Yang J, Zheng GQ** (2024). Relationship between wax accumulation in *Lycium barbarum* peel and meteorological factors. *Sci Silvae Sin* **60**, 22–34. (in Chinese)
- 米娟娟, 赵娟红, 李治刚, 包晗, 黄婷, 秦垦, 杨涓, 郑国琦** (2024). 宁夏枸杞果皮蜡质积累与气象因子的关系. *林业科学* **60**, 22–34.
- Monica S, Hans H, Elmon S, Riccardo V, Francesco S, Mario M** (2005). Cloning and characterization of *GLOSSY1*, a maize gene involved in cuticle membrane and wax production. *Plant Physiol* **138**, 478–489.
- Parsons EP, Popovsky S, Lohrey GT, Alkalai-Tuvia S, Perzelan Y, Bosland P, Bebeli PJ, Paran I, Fallik E, Jenks MA** (2013). Fruit cuticle lipid composition and water loss in a diverse collection of pepper (*Capsicum*). *Physiol Plant* **149**, 160–174.
- Qiang X, Xia T, Geng B, Zhao M, Li X, Zheng Y, Wang M** (2023). Bioactive components of *Lycium barbarum* and deep-processing fermentation products. *Molecules* **28**, 8044.
- Reinhard J, Markus R** (2016). Localization of the transpiration barrier in the epi- and

- intracuticular waxes of eight plant species: water transport resistances are associated with fatty acyl rather than alicyclic components. *Plant Physiol* **170**, 921–934.
- Ritchie RJ** (2008). Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents. *Photosynthetica* **46**, 115–126.
- Tunstad SA, Bull ID, Rands SA, Whitney HM** (2024). The cuticular wax composition and crystal coverage of leaves and petals differ in a consistent manner between plant species. *Open Biol* **14**, 230430.
- Wang H, Gao Y, Wang J, Yao SY, Wang WH, Ran GW, Liu Y, Guo XX, Zhang HY** (2015). Optimal drying method improving quality of *Lycium barbarum* L. *Trans Chin Soc Agric Engin* **31**, 271–276. (in Chinese)
王海, 高月, 王颢, 姚思远, 王伟华, 冉国伟, 刘瑜, 郭雪霞, 张慧媛 (2015). 适宜干燥方法提高干制枸杞品质. *农业工程学报* **31**, 271–276.
- Wang J, Hao H, Liu R, Ma Q, Xu J, Chen F, Cheng Y, Deng X** (2014). Comparative analysis of surface wax in mature fruits between satsuma mandarin (*Citrus unshiu*) and 'Newhall' navel orange (*Citrus sinensis*) from the perspective of crystal morphology, chemical composition and key gene expression. *Food Chem* **153**, 177–185.
- Wang JQ, He YZ, Xu KY, Luo Y, Sheng L, Luo T, Liu H, Cheng YJ** (2016). Characterization of mature fruit surface waxes of three cultivated citrus species. *Sci Agric Sin* **49**, 1936–1945. (in Chinese)
王金秋, 何义仲, 徐坤洋, 罗怿, 盛玲, 罗焘, 刘欢, 程运江 (2016). 三种类型柑橘成熟果实表面蜡质分析. *中国农业科学* **49**, 1936–1945.
- Wang P, Wang JJ, Zhang HY, Wang C, Zhao LNK, Huang T, Qing K** (2021). Chemical composition, crystal morphology, and key gene expression of the cuticular waxes of goji (*Lycium barbarum* L.) Berries. *J Agric Food Chem* **69**, 7874–7883.
- Wang WJ, Zhang Y, Xu C, Ren JJ, Liu XF, Black K, Gai XC, Wang Q, Ren HZ** (2015). Cucumber *ECERIFERUM1* (*CsCER1*), which influences the cuticle properties and drought tolerance of cucumber, plays a key role in VLC alkanes biosynthesis. *Plant Mol Biol* **87**, 219–233.
- Wang Y, Li JY, He Y, Zhang MZ, Shi XQ, Meng LH** (2022). Effects of drought stress on non-specific lipid transporters related to wax synthesis in *Solanum lycopersicum* leaves. *Mol Plant Breed* **20**, 3611–3622. (in Chinese)
王宇, 李俊佑, 何艳, 张梦卓, 史学群, 孟兰环 (2022). 干旱胁迫对番茄叶片蜡质合成相关非特异性脂质转运蛋白的影响. *分子植物育种* **20**, 3611–3622.
- Yang HB** (2021). The Mining of Key Genes Involved in Cuticular Wax Synthesis and QTL Mapping of the Important Postharvest Traits in Citrus Fruit. PhD dissertation. Wuhan: Huazhong Agricultural University. pp.1–170. (in Chinese)
杨宏宾 (2021). 柑橘果面蜡质合成关键基因挖掘及重要采后性状的QTL定位. 博士论文. 武汉: 华中农业大学. pp.1–170.
- Yazdani M, Sun ZX, Yuan H, Zeng SH, Thannhauser TW, Vrebalov J, Ma QY, Xu YM, Fei ZJ, Van Eck J, Tian SP, Tadmor Y, Giovannoni JJ, Li L** (2019). Ectopic expression of ORANGE promotes carotenoid accumulation and fruit development in tomato. *Plant Biotechnol J* **17**, 33–49.
- Yeats TH, Rose JKC** (2013). The formation and function of plant cuticles. *Plant Physiol* **163**, 5–20.
- Yuan HJ, Ma QG, Gao Z, Li XY, Bao JT, Wang CM, Li HJ** (2019). Cloning of *LbCER1* gene and expression analysis under osmotic stress in *Lycium barbarum* ssp. Bianguo. *Acta Agric Boreai-Sin* **34**, 15–22. (in Chinese)
袁惠君, 马倩国, 高泽, 李学勇, 鲍婧婷, 王春梅, 李虎军 (2019). 扁果枸杞角质层蜡质合成相关基因*LbCER1*的克隆及其表达特征分析. *华北农学报* **34**, 15–22.
- Yuan HJ, Su ZZ, Wang CM, Zhang RY, Guan YC, Li XY, Bao JT** (2023a). Cloning and expression analysis of transcription factor gene *LbWIN1* in response to abiotic stress in *Lycium barbarum* ssp. Bianguo. *Pratac Sci* **40**, 1449–1460. (in Chinese)
袁惠君, 苏照中, 王春梅, 张瑞艳, 关玉晨, 李学勇, 鲍婧婷 (2023a). 扁果枸杞转录因子基

- 因*LbWIN1*的克隆及响应非生物胁迫的表达分析. 草业科学 **40**, 1449–1460.
- Yuan HJ, Zhang RY, Guan YC, Yu SM, Xu YY, Ma QG, Bao JT (2023b). Cloning and expression analysis of epidermal wax transport related *LbABCG11* gene in *Lycium barbarum* ssp. Bianguo. *Acta Agric Boreal-Sin* **38**, 45–54. (in Chinese)
- 袁惠君, 张瑞艳, 关玉晨, 余诗曼, 徐琰莹, 马倩国, 鲍婧婷 (2023b). 扁果枸杞表皮蜡质转运相关基因*LbABCG11*的克隆及其表达特征分析. 华北农学报 **38**, 45–54.
- Zhang J, Wang RR, Shan Y, Pan L, Fu FH, Ding SH (2019). Change of cuticle components in mature satsuma mandarin fruits (*Citrus unshiu*) during cold storage and their effects on the growth of *Penicillium digitatum*. *Food Sci* **40**, 233–239. (in Chinese)
- 张静, 王蓉蓉, 单杨, 潘浪, 付复华, 丁胜华 (2019). 冷藏过程中温州蜜柑角质层组分变化及其对指状青霉生长的影响. 食品科学 **40**, 233–239.
- Zhang XY (2023). Roles of *MdERF2* in Apple Fruit Cuticle Wax Metabolism during Postharvest and Its Target Genes Identification. Master's thesis. Zibo: Shandong University of Technology. pp.1–92. (in Chinese)
- 张馨月 (2023). *MdERF2*在苹果采后表皮蜡质代谢中的作用及其靶基因的鉴定. 硕士学位论文. 淄博: 山东理工大学. pp.1–92.
- Zhao Y, Liu XJ, Wang MK, Bi QX, Cui YF, Wang LB (2021). Transcriptome and physiological analyses provide insights into the leaf epicuticular wax accumulation mechanism in yellowhorn. *Hortic Res* **8**, 134.
- Zheng GQ, Wang ZQ, Wei JR, Zhao JH, Zhang C, Mi JJ, Zong Y, Liu GH, Wang Y, Xu X, Zeng SH (2023). Fruit development and ripening orchestrating the biosynthesis and regulation of *Lycium barbarum* polysaccharides in goji berry. *Int J Biol Macromol* **254**, 127970.

Cloning and Functional Validation of the Key Gene *LbCER3* Involved in Waxy Cuticle Synthesis of *Lycium barbarum*

Juanhong Zhao, Zhigang Li, Guoqi Zheng*, Zhanfei Liu, Lirong Kou, Wenxiu Wang, Tiantian Zhou, Juan Yang

State Key Laboratory of Efficient Production of Forest Resources, School of Life Sciences, Ningxia University, Yinchuan 750021, China

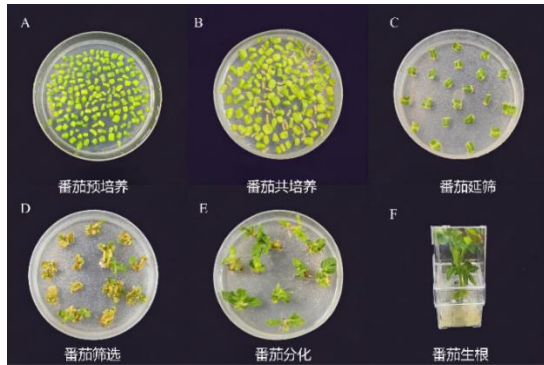
INTRODUCTION: Waxes are protective substances found on the surface of plants, especially on fruits and leaves, which help prevent non-stomatal water loss from plant tissues. *Lycium barbarum* is a characteristic economic forest species of Ningxia. Its fruit is a berry with a high water content, and the surface of the fruit skin is covered with wax, which hinders the normal loss of moisture during the drying process. Alkanes are the main components of the wax on *L. barbarum*, and the *CER3* gene is a key gene involved in alkane biosynthesis. Therefore, an in-depth study of the function of *CER3* in *L. barbarum* provides a theoretical basis for revealing the metabolic synthesis of wax in goji fruits and the molecular mechanism of *LbCER3*.

RATIONALE: Research on the waxy coating of *L. barbarum* fruit skin has mainly focused on the structure and composition of the epicuticular wax, with relatively little attention given to its molecular mechanisms. This study using the main cultivated varieties of *L. barbarum*, Ningqi No.1 and Ningqi No.5, as test materials, this study employed methods such as GC-MS, transcriptomics, and molecular biology to investigate the changes in the content and composition of cuticular waxes on the outer and inner layers of the fruit at different developmental stages. It also involved the screening, cloning, and functional validation of key genes related to fruit wax.

RESULTS: During the development and maturation of the fruit, the content of inner and outer cuticular waxes in Ningqi No.1 and Ningqi No.5 gradually decreased, with the total wax content in Ningqi No.1 being significantly higher than that in Ningqi No.5. The outer and inner wax components of both varieties were the same, primarily consisting of alkanes, esters, and acids. Transcriptomic analysis and weighted gene co-expression network analysis (WGCNA)

identified *LbCER3* as a key gene. The full-length CDS of the *LbCER3* gene is 1 884 bp, encoding 628 amino acids, and contains a C-terminal WAX2 domain (Wax2_C) and a fatty acid hydroxylase domain (FA_hydroxylase). An *LbCER3* overexpression vector was constructed and successfully transformed into tomato, resulting in a significant reduction in chlorophyll leaching rate in the T1 generation transgenic lines, along with a notable increase in leaf wax content and significant increases in the wax components of alkanes and acids.

CONCLUSION: These findings indicate that *LbCER3* is a key gene in the synthesis of wax in *L. barbarum*.



The process of micro Tom transformation

Key words functional verification, *LbCER3*, *Lycium barbarum*, wax

Zhao JH, Li ZG, Zheng GQ, Liu ZF, Kou LR, Wang WX, Zhou TT, Yang J (2026). Cloning and functional validation of the key gene *LbCER3* involved in waxy cuticle synthesis of *Lycium barbarum*. *Chin Bull Bot* **61**, 1–16.

* Author for correspondence. E-mail: Zhengguoqi1977@163.com

(责任编辑: 白羽红)

通讯作者简介

郑国琦, 宁夏贺兰人, 博士, 教授。主要从事植物生理学和结构植物学研究。