

引用格式:

杨婷, 于依然, 郝宁, 曹嘉健, 王春华, 武涛, 杜亚琳. 黄瓜CsSCL23基因的克隆与表达特性分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2025, 51(3): 24–32.

YANG T, YU Y R, HAO N, CAO J J, WANG C H, WU T, DU Y L. Cloning and expression analysis of cucumber CsSCL23 gene[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2025, 51(3): 24–32.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



黄瓜CsSCL23基因的克隆与表达特性分析

杨婷^{1,2,3,4}, 于依然^{1,2,3,4}, 郝宁^{1,2,3,4}, 曹嘉健^{1,2,3,4}, 王春华^{1,2,3,4}, 武涛^{1,2,3,4*}, 杜亚琳^{1,2,3,4}

(1. 湖南农业大学园艺学院, 湖南长沙 410128; 2. 农业农村部园艺作物(蔬菜、茶叶等)基因资源评价与利用重点实验室, 湖南长沙 410128; 3. 岳麓山实验室, 湖南长沙 410128; 4. 湖南农业大学黄埔创新研究院, 湖南长沙 410128)

摘要: 本研究通过SCL23蛋白系统发生树, 获得了其在黄瓜中的同源蛋白CsSCL23, 利用黄瓜649对CsSCL23基因进行克隆, 研究其分子特征和表达特性。结果表明: 黄瓜中仅有1个CsSCL23蛋白, 与甜瓜CmSCL23蛋白亲缘关系最近; 该蛋白含有保守的GRAS motif序列, 是1个典型的GRAS家族基因; CsSCL23基因CDS全长为1 335 bp, 编码444个氨基酸, 蛋白相对分子质量为48 766 230, 理论等电点为6.04, 不稳定系数为56.93, 脂肪系数为91.17, 总平均亲水性为-0.245, 不含信号肽和跨膜结构域, 属于不稳定蛋白; 二级和三级结构预测结果表明黄瓜CsSCL23蛋白由4种结构组成, 包括45.27% α -螺旋, 4.27% β -转角, 10.14%延伸链和40.32%无规则卷曲; CsSCL23启动子的顺式作用元件预测结果显示, 该区域存在赤霉素和脱落酸结合相关元件; 基因表达模式分析结果表明, CsSCL23在黄瓜的花、根和叶柄中高表达; 在黄瓜根系施加外源激素赤霉素和脱落酸后, CsSCL23在黄瓜根系的伸长区和成熟区均响应赤霉素和脱落酸的刺激且表达量显著上调; 利用100 μ mol/L外源激素生长素和脱落酸对黄瓜幼苗进行处理后, 发现CsSCL23基因在处理6 h表达量显著上调, 表明CsSCL23基因可能介导植物激素对黄瓜植株生长发育的调控。

关键词: 黄瓜; CsSCL23; 基因克隆; 脱落酸; 生长素

中图分类号: S642.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2025)03-0024-09

Cloning and expression analysis of cucumber CsSCL23 gene

YANG Ting^{1,2,3,4}, YU Yiran^{1,2,3,4}, HAO Ning^{1,2,3,4}, CAO Jijian^{1,2,3,4}, WANG Chunhua^{1,2,3,4}, WU Tao^{1,2,3,4*}, DU Yalin^{1,2,3,4}

(1. College of Horticulture, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 2. Key Laboratory for Evaluation and Utilization of Genetic Resources of Horticultural Crops(Vegetables, Tea, etc.), Department of Agriculture and Rural Affairs, Changsha, Hunan 410128, China; 3. Yuelu Mountain Laboratory, Changsha, Hunan 410128, China; 4. Huangpu Innovation Research Institute of Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China)

Abstract: In this study, CsSCL23(the homologous protein of SCL23) in cucumber was obtained through phylogenetic tree of SCL23. The CsSCL23 gene was cloned from cucumber inbred line 649, and its molecular characteristics and expression characteristics were studied. The results showed that there was only one CsSCL23 protein in cucumber, which was most closely related to melon CmSCL23 protein. The protein contains a conserved GRAS motif sequence and is a typical GRAS family gene. The CDS of CsSCL23 gene was 1 335 bp in length, encoding 444 amino acids. The relative molecular mass of the protein was 48 766 230, the theoretical isoelectric point was 6.04, the instability coefficient was 56.93, the fat coefficient was 91.17, and the total average hydrophilicity was -0.245, with no signal peptide and transmembrane domain,

收稿日期: 2024-09-08

修回日期: 2025-05-12

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32372679、32372700)

作者简介: 杨婷(2000—), 女, 河南洛阳人, 硕士研究生, 主要从事黄瓜分子遗传育种研究, 3252961385@qq.com; *通信作者, 武涛, 博士, 教授, 主要从事黄瓜分子育种研究, wutao@hunau.edu.cn

and belonged to unstable protein. The secondary and tertiary structure prediction results showed that the cucumber *CsSCL23* protein was composed of four structures, including 45.27% α -helix, 4.27% β -turn, 10.14% extended strand and 40.32% random coil. The cis-acting element prediction results of *CsSCL23* promoter showed that there were gibberellin and abscisic acid binding related elements in this region. Gene expression pattern analysis results showed that *CsSCL23* was highly expressed in flowers, roots and petioles of cucumber. After exogenous hormones gibberellin and abscisic acid were applied to cucumber roots, *CsSCL23* was significantly up-regulated in the elongation zone and mature zone of cucumber roots in response to the stimulation of gibberellin and abscisic acid. After cucumber seedlings were treated with 100 $\mu\text{mol/L}$ exogenous auxin and abscisic acid, it was found that the expression of *CsSCL23* gene was significantly up-regulated at 6 h after treatment, indicating that *CsSCL23* gene may mediate the regulation of plant hormones on the growth and development of cucumber plants.

Keywords: cucumber; *CsSCL23*; gene cloning; abscisic acid; auxin

GRAS家族转录因子SCR在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)根和叶片的发育中起着关键作用^[1-2]。*SCL23*作为SCR的同源基因,在植物发育中也具有重要作用,可与SHR协同调控根内皮层发育^[3],也可与SCR共同塑造维管束鞘^[4]。在叶片发育后期,*SCL23*表现出与SCR相同的空间分工,优先在木质部表达,在矿物质转运以及C₃、C₄植物的过渡过程中可能有着特殊的作用^[5-6]。此外,*SCL23*还可以调控茎尖分生组织,通过与WUS蛋白互作影响干细胞命运^[7]。

目前有关*SCL23*和SCR与植物激素的研究较少,但有研究^[8]表明它们可能参与激素信号通路的调控。在拟南芥中,SCR的表达受生长素和细胞分裂素的影响,其内皮层的不对称分裂依赖于生长素极性运输(PIN蛋白)和细胞分裂素信号(如ARR1/ARR12)的协同作用^[9]。此外,SCR与赤霉素(GA)信号存在交叉调控,DELLA蛋白(GA信号抑制因子)可能通过物理互作调节SCR的活性^[10]。有研究^[11]发现,*SCL23*在维管束鞘中的表达模式与油菜素内酯(BR)信号相关基因的表达模式存在部分重叠现象,暗示其可能受BR调控。ISHIKAWA等^[12]研究报道GRAS家族基因(包括*SCL23/SCR*)可能参与多种激素(如GA、BR)介导的细胞分裂调控。

黄瓜(*Cucumis sativus* L.)是葫芦科一年生草本植物,是我国重要的蔬菜^[13]。黄瓜属于维管发育的模式作物,目前有关黄瓜生长发育和激素信号调控的研究较少。本研究采用同源克隆方法从黄瓜中克隆了*CsSCL23*基因,采用多序列比对以及进化树构建等方法,分析黄瓜*CsSCL23*的保守序列和蛋白结构;通过qRT-PCR技术分析了*CsSCL23*基因在黄瓜不同组织部位以及不同激素处理后的表达模式,以期探索

*CsSCL23*对黄瓜生长发育和激素响应的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验以黄瓜种质创新与遗传改良团队实验室繁育的高代自交系华南型黄瓜649为材料,于2024年春季种植于湖南农业大学华穗生态产业园。

1.2 黄瓜RNA的提取及cDNA的合成

黄瓜定植30 d后,对黄瓜植株不同组织(顶芽、叶片、茎、卷须、叶柄、侧芽、雌花、开花0 d的子房、雄花和根)进行取样,用液氮冷冻。使用RNA提取试剂盒(诺唯赞RNA-easy Isolation Reagent),采用TRIzol法提取总RNA,利用反转录试剂盒(诺唯赞HiScript II Q RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper))进行反转录,获得cDNA。每个试验设置3次重复。反转录程序如下:将反应液(Oligo (dT)23VN (50 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , Total RNA 1 μL , RNase-free ddH₂O 11 μL)于65 $^{\circ}\text{C}$ 加热5 min,冰上放置2 min,加4 \times gDNA per Mix 4 μL ,用移液枪吹打混匀,42 $^{\circ}\text{C}$ 变性2 min后,加入10 \times RT Mix 10 μL 和HiScript II Enzyme Mix 2 μL ,50 $^{\circ}\text{C}$ 退火45 min,85 $^{\circ}\text{C}$ 延伸2 min,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3 系统发育分析

利用NCBI数据库中的BLAST蛋白工具获取拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、玉米(*Zea mays*)、水稻(*Oryza sativa*)、大豆(*Glycine max*)等的蛋白序列(表1),使用DNAMAN 9软件和MEGA 12软件进行同源序列比对和系统发育树构建。利用MEME (<https://meme-suite.org/meme/>)^[14]对*CsSCL23*保守基序(Motif)进行预测。将*CsSCL23*蛋白序列提交至NCBI CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)网站,进行序列比对分析,使用TBtools-II软件(<https://www>。

macxin.com/archives/10053.html)对进化树和Motif进行可视化分析并展示。

表1 不同物种的SCL23蛋白信息

Table 1 SCL23 proteins from different species		
蛋白名称	物种	获取号
CsSCL23	黄瓜(<i>Cucumis sativus</i>)	XP_004147738.1
CmSCL23	甜瓜(<i>Cucumis melo</i>)	XP_008451856.1
BhSCL23	冬瓜(<i>Benincasa hispida</i>)	XP_038907178.1
CmoSCL23	南瓜(<i>Cucurbita moschata</i>)	XP_022942296.1
PtSCL23	杨树(<i>Populus trichocarpa</i>)	XP_002308822.1
GmSCL23	大豆(<i>Glycine max</i>)	XP_003537749.1
MtSCL23	苜蓿(<i>Medicago sativa</i>)	XP_024638599.1
AtSCL23	拟南芥(<i>Arabidopsis thaliana</i>)	NP_199007.1
SISCL23	番茄(<i>Solanum lycopersicum</i>)	XP_004243643.1
CaSCL23	辣椒(<i>Capsicum annuum</i>)	XP_016580400.1
OsSCL23	水稻(<i>Oryza sativa</i>)	EAZ04380.1
ZmSCL23	玉米(<i>Zea mays</i>)	NP_001292780.1

1.4 引物设计及基因(启动子)克隆

采用SnapGene 6.0软件(<https://www.snapgene.com/>)设计克隆引物, 交由北京擎科生物科技股份有限公司合成并测序(表2)。从黄瓜基因组数据库V3(<http://cucurbitgenomics.org/v3/>)提取CsSCL23的CDS(启动子)序列并设计引物, 以反转录得到的cDNA为模板, 用高保真酶扩增目的片段以克隆基因(启动子)。反应条件: ddH₂O 20 μL, 2×Phanta Flash Master Mix 25 μL, CsSCL23-F 1 μL, CsSCL23-R 1 μL, cDNA 1 μL。反应程序: 95 °C预变性3 min; 95 °C变性15 s, 55 °C退火15 s, 72 °C延伸1 min, 35次循环; 72 °C终延伸5 min; 4 °C保存。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳分析, 并回收目的条带。连接T载体, 转化至大肠埃希菌中, 挑菌后进行菌液PCR, 并将阳性克隆菌液送至北京擎科生物科技股份有限公司进行测序。

表2 引物信息

Table 2 Primer sequences		
引物名称	引物序列(5'—3')	用途
CsSCL23-F	ATGCTTCGTAGCTTAATCCCT	基因CDS扩增
CsSCL23-R	TTACGTGGGCTGCCATG	
pro-CsSCL23-F	ATAAAAATTCGAAAATAGAAA	启动子扩增
pro-CsSCL23-R	AACTGAGTATGA	
q-CsSCL23-F	GATGGGATGAATTTGGGGGA	qRT-PCR
q-CsSCL23-R	CCACCGACTCCACCGGTTTG	
CsACTIN-F	GTCGTATAAGCAATGATGCA	
CsACTIN-R	CACCAAGCCCAAGAAGATC	
	TAAACCTAATCACCACCAGC	

1.5 生物信息学及启动子分析

利用ExPASy(<https://www.expasy.org/proteomics>)中的ProtScale和ProtParam在线软件分析蛋白理化性质, 包括氨基酸数目、相对分子质量、理论等电点、亲水性以及不稳定系数, 利用Swiss-model(<https://swissmodel.expasy.org/interactive>)在线预测蛋白质的二级结构, 包括α-螺旋、β-转角、延伸链和无规则卷曲。运用PlantCARE在线软件(<https://www.plantcare.co.uk/>)分析CsSCL23基因启动子中的顺式调控元件, 并根据预测的顺式调控元件的调控功能进行分类。

1.6 激素处理及CsSCL23基因组织表达特异性分析

取饱满的黄瓜649种子于55 °C下浸泡30 min, 去壳后, 在超净工作台中用75%的乙醇和次氯酸钠消毒, 用ddH₂O冲洗5~6遍, 设3组处理, CK(ddH₂O)、脱落酸ABA(20 μmol/L)、赤霉素GA₃(2 μmol/L), 播种到1/2 MS培养基上, 每个处理3次重复, 25 °C环境下生长7 d后取幼苗的根部不同区域材料(分生区、伸长区、成熟区), 用液氮保存。

选择具有2叶1心的黄瓜幼苗, 分别用生长素IAA(100 μmol/L)和脱落酸ABA(100 μmol/L)喷施黄瓜植株叶片, 并在处理0、3、6、9、12、24 h后取叶片材料, 用液氮保存。RNA提取及cDNA合成步骤参考1.2。将获得的RNA反转录产物在Roche Light Cycler 96 Real-Time PCR 仪器中对CsSCL23进行qRT-PCR验证。qRT-PCR反应体系如下: 10 μL 2×ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix, 0.4 μL(10 μmol/L)Primer 1, 0.4 μL(10 μmol/L)Primer 2, 2 μL Template DNA/cDNA, 7.2 μL ddH₂O。运用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[15]进行结果分析。

1.7 数据处理与分析

采用DPS 9.01 软件进行数据统计, 选用Duncan新复极差法进行方差分析; 采用GraphPad Prism 8绘图。

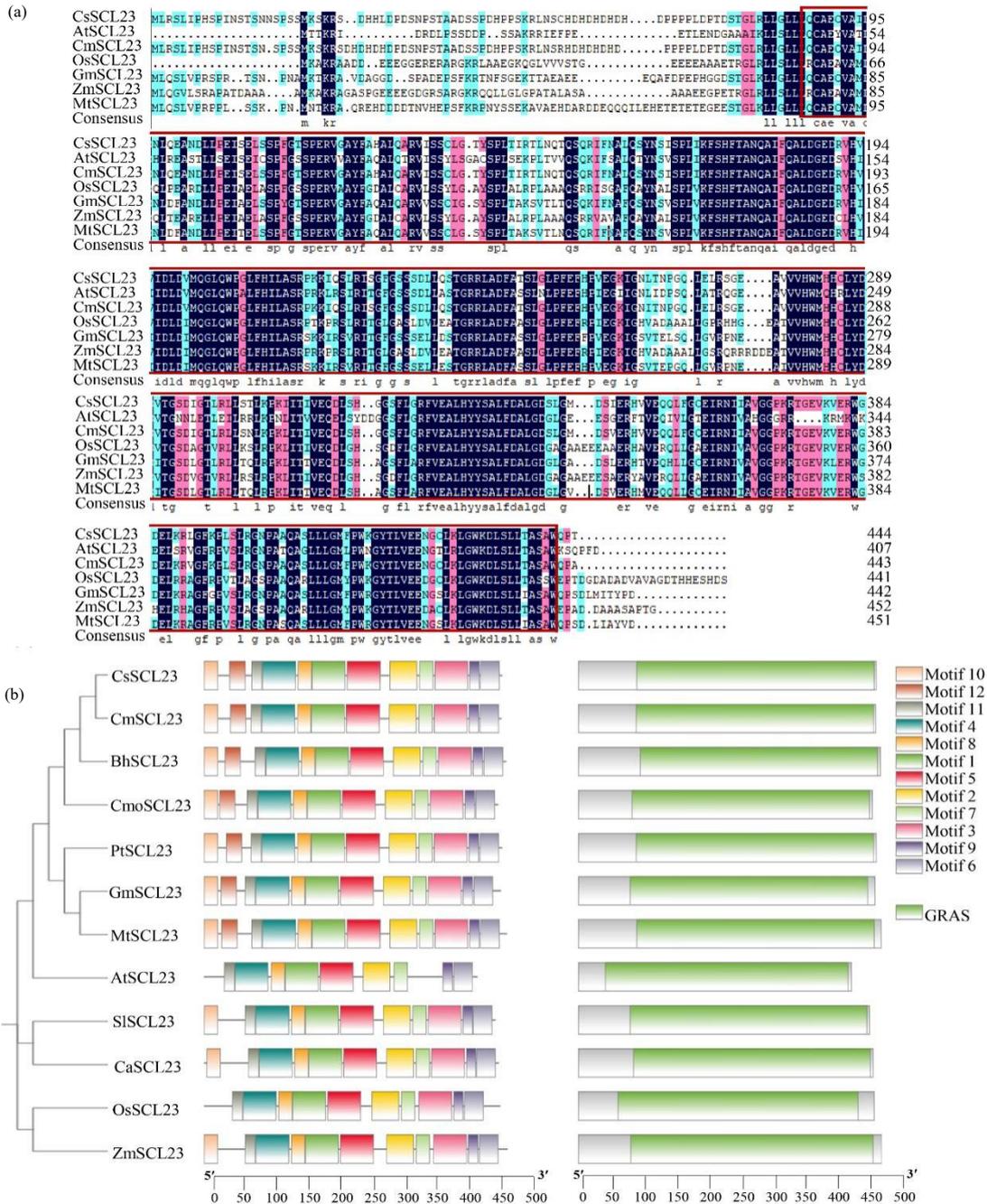
2 结果与分析

2.1 CsSCL23蛋白的进化及保守序列分析

利用拟南芥的SCL23的蛋白序列, 在NCBI网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中利用BLAST检索12种植物的SCL23同源基因的蛋白序列, 结果发现, 在黄瓜基因组中只有1个蛋白序列与拟南芥

AtSCL23亲缘关系最近，本研究将其命名为CsSCL23(CsaV3_4G007400.1)。用DNAMAN软件对拟南芥、水稻、玉米等7种植物进行多序列比对，结果(图1 (a))显示黄瓜与其他物种的CsSCL23蛋白序列相似，表明该基因在进化过程中较为保守。发育树分析结果(图1 (b))显示，CsSCL23与甜

瓜CmSCL23蛋白的亲缘关系最近，与其他几种葫芦科植物的关系次之。用MEME对12种植物蛋白序列的保守基序进行分析，Motif结果(图1 (b))显示，所有蛋白序列均含有Motif1、Motif2、Motif4、Motif5、Motif6、Motif7、Motif8、Motif9、Motif11，其中Motif 1是GRAS保守结构域。



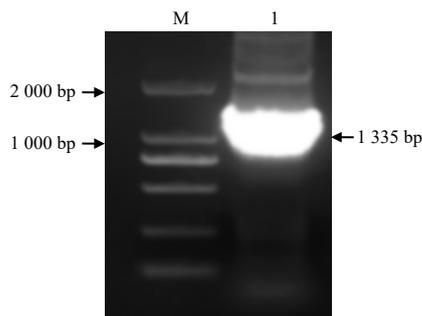
(a) 黄瓜CsSCL23与其他植物SCL23的多序列比对结果，红线框的区域为保守结构域；(b) CsSCL23与其他植物SCL23进化分析及Motif分析结果

图1 CsSCL23蛋白序列分析结果

Fig.1 Phylogenetic analysis of CsSCL23 protein

2.2 CsSCL23基因的克隆

利用黄瓜基因组数据库中CsSCL23基因序列设计特异性引物,以自交系黄瓜649叶片cDNA为模板进行PCR扩增,结果(图2)显示在1 000~2 000 bp处出现扩增条带,符合预计长度。将产物连接T载体转至大肠埃希菌后挑阳性菌落送至北京擎科生物科技股份有限公司进行测序。检测结果表明,该基因片段全长1 335 bp;经对比分析,发现其与黄瓜基因组数据库中的基因序列一致,即为*CsaV3_4G007400.1*基因,编码444个氨基酸。



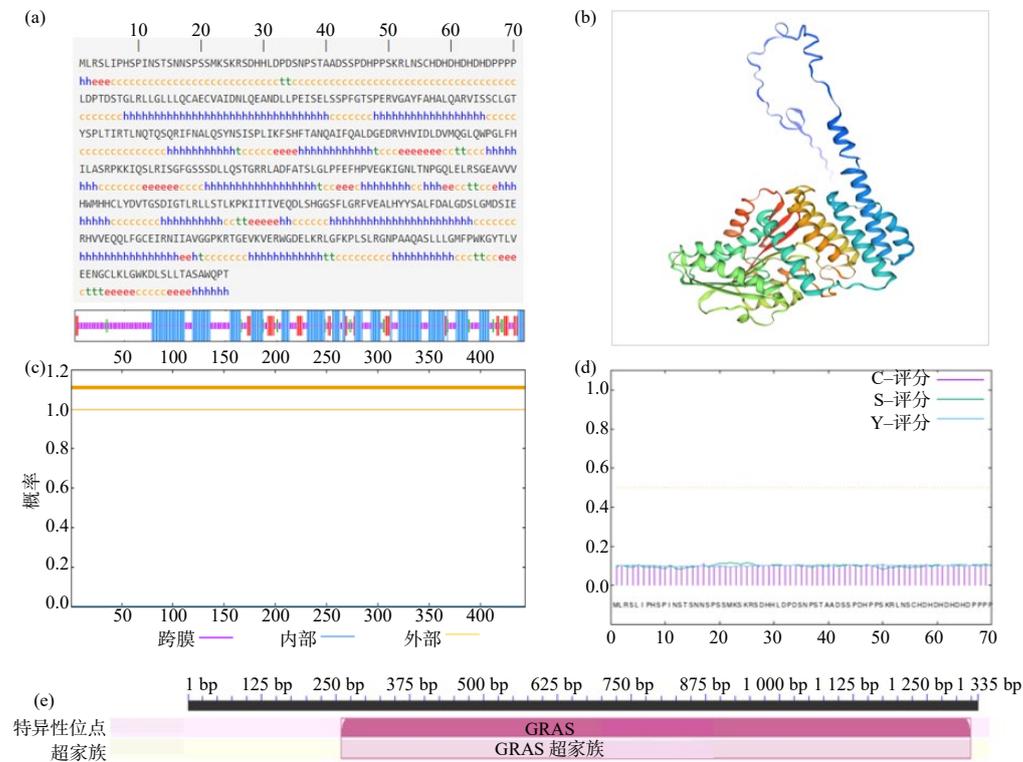
泳道M为DNA分子量标准(DL2000);泳道1为CsSCL23基因PCR产物。

图2 CsSCL23基因cDNA的PCR扩增结果

Fig.2 PCR amplification of CsSCL23 cDNA

2.3 CsSCL23基因生物信息学分析

利用ProtParam对CsSCL23基因编码的蛋白序列进行分析,发现CsSCL23基因编码444个氨基酸,预测蛋白相对分子质量为48 766 230,理论等电点为6.04,不稳定系数为56.93,脂肪系数为91.17。通过SOPMA预测蛋白的二级结构,CsSCL23蛋白二级结构包括45.27% α -螺旋、4.27% β -转角、10.14%延伸链和40.32%无规则卷曲(图3 (a)),说明其三级结构与二级结构预测结果相符(图3 (b))。通过SignalP 5.0预测分析CsSCL23蛋白序列,发现不含有信号肽(图3 (c)),说明CsSCL23可能为非分泌型蛋白;运用在线软件TMHMM Server 2.0对CsSCL23蛋白跨膜结构进行预测分析,结果(图3 (d))显示该蛋白不存在跨膜结构。利用NCBI网站保守结构域分析工具对CsSCL23蛋白进行保守结构域分析,发现其具有1个GRAS保守结构域(图3 (e)),说明该基因属于GRAS家族转录因子。



(a) CsSCL23蛋白二级结构预测结果; (b) CsSCL23蛋白三级结构预测结果; (c) CsSCL23蛋白跨膜结构预测结果;

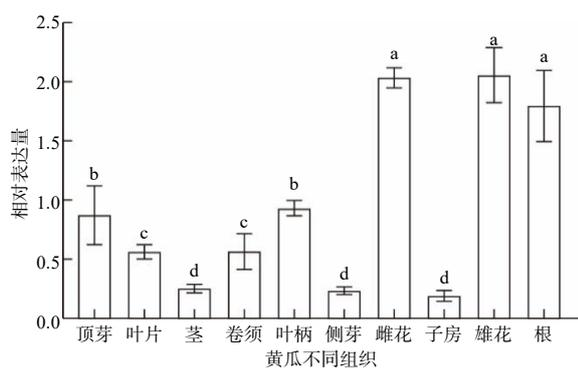
(d) CsSCL23蛋白信号肽预测结果; (e) CsSCL23蛋白保守结构域预测结果

图3 CsSCL23蛋白的生物信息学分析结果

Fig.3 Bioinformatics analysis of CsSCL23

2.4 *CsSCL23* 基因的表达分析

取黄瓜的不同组织部位(顶芽、叶片、茎、卷须、叶柄、侧芽、雌花、开花0 d的子房、雄花和根),提取总RNA进行RT-qPCR分析,结果(图4)表明:*CsSCL23*基因在黄瓜不同部位表达量不同,在雄花、雌花和根中的表达量较高,在叶柄和顶芽中的表达量次之,这与前人在拟南芥中的研究结果一致,推测*CsSCL23*基因参与了黄瓜不同组织的生长发育过程。



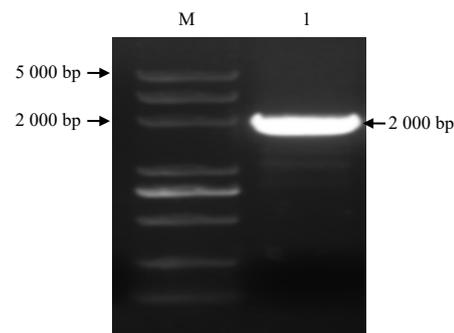
不同小写字母表示不同部位间的差异有统计学意义($P < 0.05$)。

图4 *CsSCL23*基因在黄瓜不同组织部位的相对表达量

Fig.4 Relative expression of *CsSCL23* gene in different tissues of cucumber

2.5 黄瓜*CsSCL23*启动子克隆及元件分析

以黄瓜649叶片DNA为模板进行PCR扩增,获得*CsSCL23*启动子序列(图5),对该基因的启动子区域进行预测和分析。结果(表3)表明,从该基因启动子中鉴定出29个元件,其中包括8个与光响应有关的元件(3-AF1 binding site, TCT-motif, LAMP-element, TCCC-motif, G-Box, Box 4, AE-box, chs-CMA1a), 4个参与赤霉素、脱落酸、代谢、胚乳表达的相关元件(P-box, ABRE, O2-site, GCN4_motif)。推测黄瓜*CsSCL23*可能会响应光、激素调控。



泳道M为DNA分子量标准(DL5000);泳道1为*CsSCL23*启动子PCR产物。

图5 *CsSCL23*基因启动子DNA的PCR扩增结果

Fig.5 PCR amplification of *CsSCL23* promoter DNA

表3 *CsSCL23*基因启动子调控元件分析结果

Table 3 Analysis of *CsSCL23* promoter regulatory elements

位点名称	序列	<i>CsSCL23</i>	功能
STRE	AGGGG	-	
AT-TATA-box	TATATAAA/TATATA	+/-	
WUN-motif	TTATTACAT	-	
3-AF1 binding site	TAAGAGAGGAA	-	光响应元件
P-box	CCTTTTG	+	赤霉素响应元件
TCT-motif	TCTTAC	-	光响应元件的一部分
AAGAA-motif	GAAAGAA	+/-	
MYC	CAATTG/CATGTG	+/-	
H-box	CCTACNNNNNNNCTNNNNA	-	
LAMP-element	CCTTATCCA	+	光响应元件的一部分
ABRE	ACGTG	+	参与脱落酸反应元件
TCCC-motif	TCTCCCT	+	光响应元件的一部分
TCA	TCATCTTCAT	+	
TATA	TATAAAAT	+/-	
MYB recognition site	CCGTTG	-	
O2-site	GATGACATGG	-	参与玉米醇溶蛋白代谢调节的顺式作用调节元件
W box	TTGACC	-	
GCN4_motif	TGAGTCA	-	参与胚乳表达的调控元件
G-Box	CACGTT	-	参与光响应的顺式作用调节元件

表3(续)

位点名称	序列	CsSCL23	功能
MYB	TAACCA	+	
Box 4	ATTAAT	+	参与光响应的保守DNA模块的一部分
TATA-box	ATATAT/ATATAT/ccTATAAAaa/TACAAAA/ TATA/TATAA/TATAAA/TATAAAA/TATAA GAA/TATACA/TATATA/TATATAA/taTATA AAtc/TATATTATATTT/TATTTAAA	+/-	核心启动子元件
CAAT-box	CAAAT/CAAT/CCAAT	+/-	启动子和增强子区域共有的顺式作用元件
MYB-like sequence	TAACCA	+	
CCAAT-box	CAACGG	+	MYBHv1结合位点
Myb	TAACTG	-	
AE-box	AGAACTT	-	光响应模块的一部分
chs-CMA1a	TTACTTAA	+	光响应元件的一部分
Unnamed_4	CTCC	+/-	

2.6 CsSCL23基因对外源植物激素的响应

基于已经发表的黄瓜基因组数据库中的信息^[6], CsSCL23基因在根的不同区域表达量有差异, 在成熟区表达量最高, 推测该基因可能在根系的发育过程发挥功能。根据启动子元件分析结果, 发现CsSCL23启动子具有GA和ABA响应元件。因此, 为了探明CsSCL23响应ABA和GA刺激的机理, 本研究利用20 μmol/L ABA和2 μmol/L GA₃处理黄瓜幼苗, 结果(图6)表明, 外源激素处理影响黄瓜根部

的发育, ABA显著抑制主根和侧根的生长, 而GA₃促进主根和侧根的生长。利用RT-qPCR检测激素处理后CsSCL23在黄瓜根部不同区域的表达水平, 结果(表4)表明, CsSCL23在黄瓜成熟区相对表达量最高, 这与黄瓜基因组数据库的结果一致; ABA处理后, 在黄瓜根分生区、根伸长区和成熟区CsSCL23的相对表达量均极显著上调; GA₃处理后, 在根伸长区和成熟区相对表达量显著上调。以上结果说明CsSCL23可能介导了ABA和GA对根系的发育调控。

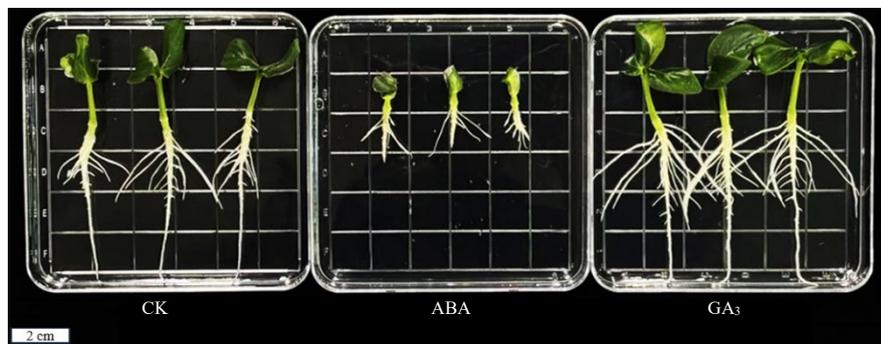


图6 不同植物激素处理后的黄瓜幼苗

Fig.6 Cucumber seedlings treated with different plant hormones

表4 不同激素处理后CsSCL23在黄瓜不同根区的相对表达量

Table 4 Relative expression of CsSCL23 in different root zones of cucumber after different hormone treatments

处理	相对表达量		
	分生区	伸长区	成熟区
CK	0.900 8±0.084 8	0.122 3±0.093 6	1.227 0±0.148 8
ABA	2.005 0±0.267 2***	9.687 0±1.412 0****	8.298 0±0.387 2****
GA ₃	0.978 5±0.086 2	2.006 0±0.263 3****	2.773 0±0.130 0***

注: ***和****分别表示0.001、0.000 1水平下同一区域不同处理下基因的相对表达量的差异有统计学意义。

为了解CsSCL23基因在黄瓜叶片发育过程中是否受到ABA和IAA激素调控, 本研究在黄瓜幼苗发育两叶一心期, 分别用100 μmol/L ABA和IAA喷施黄瓜整株, 利用RT-qPCR检测黄瓜叶片中CsSCL23的表达水平。结果(表5)表明, ABA处理后CsSCL23表达量增加, 在6 h时达到最高, 是0 h处理植株的100.33倍, 随后快速下降; IAA处理0~9 h也显著诱导了CsSCL23的表达, 在处理6 h时表达量达到最高, 是0 h时的32.46倍, 随后快速下降。

表5 不同激素处理后*CsSCL23*在黄瓜叶片中的相对表达量Table 5 Relative expression of *CsSCL23* in cucumber leaves after different hormone treatments

时间/h	相对表达量	
	ABA	IAA
0	(0.328 9±0.029 5)b	(0.285 1±0.037 6)c
3	(1.031 0±0.040 0)b	(0.037 9±0.018 8)c
6	(33.00 0±5.195 0)a	(9.255 0±0.577 1)a
9	(3.461 0±0.121 1)b	(1.044 0±0.018 2)b
12	(1.477 0±0.108 9)b	(0.090 4±0.078 2)c
24	(0.700 8±0.094 1)b	(0.074 5±0.035 0)c

注：同列数据不同小写字母表示处理间的差异有统计学意义($P<0.05$)。

3 结论与讨论

GRAS转录因子在植物生长发育中发挥重要调控作用，响应多种激素信号。本研究通过同源克隆成功获得了黄瓜GRAS家族基因*CsSCL23*的全部编码序列以及启动子区序列；利用系统进化树分析了12个物种的蛋白序列，发现黄瓜*CsSCL23*与甜瓜*CmSCL23*蛋白亲缘关系最近，多序列比对结果表明该蛋白在进化过程中较为保守，属于GRAS家族；生物信息学技术分析结果显示*CsSCL23*蛋白的二级结构主要由45.27% α -螺旋、4.27% β -转角、10.14%延伸链和40.32%无规则卷曲组成。

前人^[17]研究发现蝴蝶兰*PeSCL23*在花器官中的表达量显著高于营养器官的，初步推测*PeSCL23*可能参与蝴蝶兰花唇瓣的形成。桑婷^[18]研究发现干旱胁迫下，*TaSCR*基因调控小麦各生育期生长以及抗旱代谢过程，促进根和地上部生长，增加小麦叶片光合能力，提高产量；也有研究^[19]发现马尾松*PmSCR*在根中的表达量最高，约为子叶表达量的1.25倍。本研究结果表明*CsSCL23*在黄瓜不同组织部位均有表达，在花器官、根中高表达，与上述3个研究结果基本一致。

启动子是启动和调控基因表达的重要元件，在基因转录调控中占有核心地位，决定基因表达的开始时间和表达程度^[20]。拟南芥启动子活性测定结果证明了*SCR*基因的启动子在拟南芥根和叶的表达中起着重要作用^[21]。本研究对黄瓜*CsSCL23*启动子元件进行分析，发现启动子区域有多个激素响应元件，通过外源激素处理试验初步证实

*CsSCL23*受到生长素、脱落酸和赤霉素的诱导并上调表达，暗示其可能参与多个激素的协调作用。董丽莉等^[22]研究发现，在毛竹根中，*SCL23*基因表达水平受到激素GA₃、ABA的影响，且*CsSCL23*基因启动子区包含多种光响应元件。本研究结果发现*CsSCL23*在黄瓜根系的表达相对较高，暗示*CsSCL23*在根发育中可能具有保守的功能。用20 $\mu\text{mol/L}$ ABA和2 $\mu\text{mol/L}$ GA₃处理后，黄瓜伸长区根系因受到激素诱导，其*CsSCL23*表达量显著升高。综上，黄瓜*CsSCL23*基因的表达因受到外源激素ABA和IAA激素诱导而显著上调，说明*CsSCL23*很可能参与了脱落酸和生长素对黄瓜叶片的调控途径，但其具体的调控机制需要进一步研究、解析。

参考文献：

- [1] YOON E K, DHAR S, LEE M H, et al. Conservation and diversification of the SHR-SCR-SCL23 regulatory network in the development of the functional endodermis in *Arabidopsis* shoots[J]. *Molecular Plant*, 2016, 9(8): 1197–1209.
- [2] GAO M J, LI X, HUANG J, et al. SCARECROW-LIKE15 interacts with HISTONE DEACETYLASE19 and is essential for repressing the seed maturation programme[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 7243.
- [3] SBABOU L, BUCCIARELLI B, MILLER S, et al. Molecular analysis of *SCARECROW* genes expressed in white lupin cluster roots[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2010, 61(5): 1351–1363.
- [4] LONG Y C, GOEDHART J, SCHNEIJDERBERG M, et al. SCARECROW-LIKE23 and SCARECROW jointly specify endodermal cell fate but distinctly control SHORT-ROOT movement[J]. *The Plant Journal*, 2015, 84(4): 773–784.
- [5] HUGHES T E, LANGDALE J A. SCARECROW is deployed in distinct contexts during rice and maize leaf development[J]. *Development*, 2022, 149(7): dev200410.
- [6] SLEWINSKI T L, ANDERSON A A, ZHANG C K, et al. *Scarecrow* plays a role in establishing Kranz anatomy in maize leaves[J]. *Plant & Cell Physiology*, 2012, 53(12): 2030–2037.
- [7] BAHAFID E, BRADTMÖLLER I, THIES A M, et al. The *Arabidopsis* SHORTROOT network coordinates shoot apical meristem development with auxin-dependent lateral organ initiation[J]. *eLife*, 2023, 12: e83334.
- [8] CHANG J K, HU J, WU L F, et al. Three RLKs integrate SHR-SCR and gibberellins to regulate root

- ground tissue patterning in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Current Biology*, 2024, 34(22): 5295–5306.e5.
- [9] MOUBAYIDIN L, DI MAMBRO R, SOZZANI R, et al. Spatial coordination between stem cell activity and cell differentiation in the root meristem[J]. *Developmental Cell*, 2013, 26(4): 405–415.
- [10] YOSHIDA H, HIRANO K, SATO T, et al. DELLA protein functions as a transcriptional activator through the DNA binding of the indeterminate domain family proteins[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(21): 7861–7866.
- [11] CUI H C, LEVESQUE M P, VERNOUX T, et al. An evolutionarily conserved mechanism delimiting SHR movement defines a single layer of endodermis in plants[J]. *Science*, 2007, 316(5823): 421–425.
- [12] ISHIKAWA M, FUJIWARA A, KOSETSU K, et al. GRAS transcription factors regulate cell division planes in moss overriding the default rule[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2023, 120(4): e2210632120.
- [13] 赵佳, 李红彦, 马晓芬, 等. 中国黄瓜新品种保护现状与分析[J]. *中国种业*, 2024(7): 12–16.
- [14] 李秀敏, 董轩, 汤冰倩, 等. 辣椒WOX基因家族的鉴定及表达分析[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2023, 49(3): 291–297.
- [15] 高璐瑶, 曹嘉健, 王春华, 等. 黄瓜CsGDSL脂解酶基因的克隆与表达分析[J]. *华北农学报*, 2023, 38(4): 47–53.
- [16] LI Z, ZHANG Z H, YAN P C, et al. RNA-Seq improves annotation of protein-coding genes in the cucumber genome[J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 540.
- [17] 王锐. PeSCL23与PeMYB4L在蝴蝶兰花型与花色形成中的功能研究[D]. 上海: 上海师范大学, 2022.
- [18] 桑婷. TaSCR基因对干旱胁迫下小麦生长生理过程的调控[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2022.
- [19] 朱沛煌. 马尾松GRAS家族SHR和SCR同源基因的克隆与功能初步分析[D]. 南京: 南京林业大学, 2016.
- [20] 王斌, 黄泳彦, 易景怡, 等. 黄瓜GR-RBP3启动子克隆及低温对其活性的诱导[J]. *山东农业科学*, 2022, 54(7): 15–23.
- [21] KOBAYASHI A, MIURA S, KOZAKI A. INDETERMINATE DOMAIN PROTEIN binding sequences in the 5'-untranslated region and promoter of the SCARECROW gene play crucial and distinct roles in regulating SCARECROW expression in roots and leaves[J]. *Plant Molecular Biology*, 2017, 94(1): 1–13.
- [22] 董丽莉, 赵韩生, 王丽丽, 等. 毛竹PeSCR基因的表达与功能[J]. *林业科学*, 2016, 52(6): 35–42.

责任编辑: 毛友纯

英文编辑: 罗维