生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):198-206

*CmoNST1*基因C端截短导致南瓜裸仁表型

申琼* 刘亚楠 孟洪玉
（山西农业大学园艺学院，太原 030031）

摘 要： 【目的】探究南瓜裸仁性状形成的分子基础，通过比较野生型与突变体中*NST1*等位基因（*CmoNST1*与*Cmonst1*）的序列、表达及蛋白定位差异，解析其功能差异，为南瓜分子育种提供理论依据。【方法】以有种皮自交系HS-A和裸仁自交系HLS-B为材料，克隆*CmoNST1*与*Cmonst1*基因，通过序列比对分析其变异特征，结合生物信息学方法预测蛋白结构与亚细胞定位，并利用RT-qPCR技术比较二者在各组织的表达模式。基于同源关系利用CRISPR/Cas9双靶点系统敲除黄瓜直系同源基因CsaV3_6G008900，经农杆菌转化、PCR鉴定获得阳性突变体。进一步利用显微CT三维成像比较种皮细胞结构，并测定种皮木质素、纤维素和半纤维素的含量，综合评价基因功能。【结果】野生型*CmoNST1*（1 185 bp）及其突变等位基因*Cmonst1*（1 072 bp）被成功克隆，二者分别编码394与112个氨基酸。两者均含有典型的NAM保守结构域，无跨膜结构域与信号肽，二级结构主要由无规则卷曲和α-螺旋构成。CmoNST1为不稳定酸性蛋白，而Cmonst1为稳定碱性蛋白。亚细胞定位显示，CmoNST1主要定位于细胞核，Cmonst1分布于细胞核与细胞质。表达分析表明，二者在种皮中表达量显著高于其他组织。系统进化分析表明，CmoNST1与葫芦科物种亲缘关系最近。CRISPR/Cas9敲除黄瓜同源基因CsaV3_6G008900后，黄瓜种皮变薄而且种皮木质素、纤维素和半纤维素的含量显著降低，细胞排列松散并出现空洞。【结论】*CmoNST1*是调控南瓜种皮发育的关键基因，其突变体*Cmonst1*虽保留NAM结构域，但因C端截短导致磷酸化调控潜力丧失，蛋白理化性质改变，可能使其丧失转录激活功能，进而导致裸仁表型。

关键词： 南瓜；裸仁；*CmoNST1*；NAC；种皮发育；种皮成分；CRISPR/Cas9；功能丧失型突变
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2026-0220

C-terminal Truncation of *CmoNST1* Leads to Hull-less Seeds in *Cucurbita moschata* Duch.

SHEN Qiong* LIU Ya-nan MENG Hong-yu
（*College of Horticulture, Shanxi Agricultural University, Taiyuan* 030031）

Abstract: 【Objective】This study aimed to investigate the molecular basis of the hull-less seed trait in *Cucurbita moschata* by comparing the sequence, expression, and protein localization differences between the *NST1* alleles (*CmoNST1* and *Cmonst1*) from wild-type and mutant lines, with the goal of elucidating their functional divergence and providing a theoretical foundation for molecular breeding of hull-less *C. moschata*. 【Method】The *CmoNST1* and *Cmonst1* genes were cloned from the hulled inbred line HS-A and the hull-less line HLS-B, respectively. Sequence alignment was performed to identify variant characteristics, and protein domain architecture was predicted. Subcellular localization was predicted using bioinformatics tools. Tissue-specific expression patterns of both genes were compared via RT-qPCR. To investigate gene function, we knocked out the cucumber ortholog CsaV3_6G008900 using a CRISPR/Cas9 system with dual guide RNAs. After *Agrobacterium*-mediated transformation, positive mutants were identified by PCR. The gene's role was further evaluated by examining seed coat cellular structures with 3D micro-CT imaging and measuring lignin, cellulose, and hemicellulose content. 【Result】The wild-type mediated transformation, positive mutants were identified by PCR. *CmoNST1* (1 185 bp) and mutant *Cmonst1* (1 072 bp) encode 394 and 112 amino acids, respectively. Both proteins contain a conserved NAM domain and lack transmembrane domains or signal peptides; their secondary structures are mainly composed of random coils and α-helices. Physicochemical analysis indicated that CmoNST1 is an unstable acidic protein,

收稿日期：2026-02-24
基金项目：国家自然科学基金青年科学基金项目（32202490）
*通信作者：申琼 shenqiong08@163.com

whereas Cmonst1 is a stable basic protein. Subcellular localization revealed that CmoNST1 is predominantly nuclear, while Cmonst1 distributes in both the nucleus and cytoplasm. Expression analysis showed that transcript levels of both genes are significantly higher in the seed coat than in other tissues. Phylogenetic analysis indicated that CmoNST1 is most closely related to homologs from other Cucurbitaceae species. Knockout of the cucumber ortholog CsaV3_6G008900 using CRISPR/Cas9 resulted in thinner seed coats, significantly reduced lignin, cellulose, and hemicellulose content, and loosely arranged seed coat cells with visible cavities.【Conclusion】These results demonstrate that *CmoNST1* is a key regulator of seed coat development in *C. moschata*. Although the mutant allele *Cmonst1* retains the NAM domain, its C-terminal truncation eliminates phosphorylation regulatory potential and alters physicochemical properties, which likely disrupts its transcriptional activation function and leads to the hull-less phenotype.

Keywords: *Cucurbita moschata*; hull-less; *CmoNST1*; NAC; seed coat development; seed coat composition; CRISPR/Cas9; loss-of-function mutation

南瓜（*Cucurbita moschata* Duch.），又名中国南瓜，起源于美洲，全球种植范围广泛，是具有重要经济价值的南瓜属栽培种之一。其种子富含蛋白质、不饱和脂肪酸及多种矿物质（如钾、磷、铁等），并含有多种生物活性成分，兼具营养与功能价值，是食品及制药工业的重要原材料之一。[1-3]。选育籽粒营养价值高、产量高、适宜不同用途的籽用南瓜成为育种者的重要育种目标之一，而其中“裸仁”南瓜（种皮退化）特色资源的发现、选育并逐步发展，极大地提高了食品原料加工的便利性，为籽用南瓜的健康发展提供有力支撑[4-5]。

种皮作为进化中相对保守的器官，其发育受到精细的遗传调控[6-8]。本团队前期研究表明，南瓜裸仁性状由单个隐性核基因（N）控制；与正常南瓜种皮典型的5层结构（表皮层E、下皮层H、厚壁组织层S、薄壁组织层A、绿色组织层C）相比，裸仁突变体的种皮发生了明显改变。裸仁南瓜的种皮在发育过程中发生严重退化，各结构层坍塌成膜状[9-11]。同时其纤维素与木质素含量及相关合成酶，如苯丙氨酸解氨酶（PAL）、4-香豆酸辅酶A连接酶（4CL）、肉桂酸-4-羟化酶（C4H）、肉桂醇脱氢酶（CAD）和过氧化物酶（POD）的酶活性均显著降低[5]。通过图位克隆，在南瓜17号染色体上鉴定到一个编码NAC家族转录因子的候选基因CmoCh17G004790。该转录因子被证实为胞壁加厚促进因子1（*NST1*），本团队将该基因命名为*CmoNST1*。序列分析结果显示，野生型与裸仁突变体在*CmoNST1*的基因组DNA序列上并无差异，但其转录本在裸仁突变体种皮中发生了种皮特异性可变剪接，导致编码序列缺失了113 bp，这可能是产生功能缺陷蛋白的原因。转录组分析结果进一步提示，*CmoNST1*可能是调控木质素生物合成及次生细胞壁形成的核心因子，并与其他NAC、MYB转录因子共同构成复杂网络[11]。

尽管*CmoNST1*基因在调控南瓜种皮发育中的功能已得到初步确认，但其在裸仁与野生型种皮形成过程中的具体作用机制尚不明确。该基因在野生型与裸仁突变体之间的功能差异、其导致种皮结构缺失的内在细胞与分子原因有待进一步深入解析。因此，本研究通过克隆与鉴定野生型和裸仁突变体中*CmoNST1*基因，并从序列特征、表达模式和亚细胞定位等方面对二者进行比较分析，以期助力解析裸仁性状形成的分子机制，深化对植物种皮发育调控途径的理解，为裸仁南瓜分子育种提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　材料

南瓜有种皮材料HS-A和裸仁材料HLS-B由本课题组提供。

1.2　方法

1.2.1　*CmoNST1*和*Cmonst1*基因鉴定　课题组前期在南瓜多组学联合分析基础上，挖掘到裸仁调控候选基因*CmoNST1*。通过葫芦科基因库中国南瓜（*Cucurbita moschata* Rifu）基因组数据库（http://cucurbitgenomics.org/organism/9）下载南瓜基因组信息数据文件，并下载参考基因的编码序列，对比野生型*CmoNST1*、裸仁突变体*Cmonst1*和参考基因序列。

1.2.2　南瓜总RNA提取及反转录　挑选饱满正常的种子，浸种催芽后播种于50孔穴盘，待植株长至两叶一心时定植。取人工自交授粉后20 d（days post

anthesis, DPA）的根、茎、叶、花和种皮，于研钵中加入液氮充分研磨，利用TRNzol Universal（TIANGEN）提取总RNA，通过1.5%琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性和纯度后，选取高质量RNA，参照Prime Script™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒（TaKaRa）说明书反转录合成cDNA，于-20 ℃保存备用。

1.2.3 南瓜*CmoNST1*克隆、回收及测序 利用Primer Premier 5.0软件设计特异性克隆引物（附表1）。以反转录cDNA为模板进行PCR扩增，50 μL体系包括上下游引物各2 μL（10 μmol/L）、Green mix 25 μL、cDNA 2 μL、ddH_2O 19 μL；扩增程序为：95 ℃ 预变性3 min；95 ℃变性30 s，57.5 ℃退火30 s，72 ℃延伸1 min 20 s，35个循环；72 ℃终延伸，10 min。产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测后，使用天根胶回收试剂盒进行纯化。将回收片段连接至pMD18-T载体，并转化大肠杆菌DH5α感受态细胞。选择阳性克隆菌液送生工生物工程（上海）股份有限公司测序。

1.2.4 南瓜*CmoNST1*基因生物信息学分析 基于附表2所示的在线平台，解析野生型CmoNST1和突变体Cmonst1蛋白结构特征。利用NCBI的Protein BLAST对二者氨基酸序列进行同源比对，并获取其他物种中相似度较高的同源序列。使用ClustalX 2.1软件进行多序列比对，经GeneDoc美化后，在MEGA 7.0中以邻接法构建系统进化树（Bootstrap=1 000）。

1.2.5 亚细胞定位分析 采用农杆菌（GV3101）介导的瞬时转化体系。将构建的融合表达载体*35S*::*CmoNST1*-GFP（野生型）、*35S*::*Cmonst1*-GFP（突变体）以及空载体对照*35S*-GFP分别电转化至农杆菌，于25 ℃培养48 h。菌体经离心收集后，用含120 μmol/L乙酰丁香酮的10 mmol/L $MgCl_2$溶液重悬，调整OD_{600}至0.6。选取4周龄健康烟草叶片，使用去针头注射器从下表皮注射菌液。注射后植株置于弱光条件下培养48 h。剪取注射区叶片制作临时装片，于激光共聚焦显微镜下观察，采集GFP荧光信号，分析CmoNST1及Cmonst1蛋白的亚细胞分布。

1.2.6 实时荧光定量PCR 选取南瓜根、茎、叶、花、种皮组织，经RNAprep Pure试剂盒（TIANGEN）提取总RNA后，用PrimeScript™ RT试剂盒（宝日医生物技术）反转录为cDNA。使用Primer 5.0设计*CmoNST1*和*Cmonst1*特异性qPCR引物，以*CmoActin*基因作为内参（附表1）。qPCR采用TB Green Premix Ex Taq II（TaKaRa）进行实时荧光定量PCR，反应程序为：95 ℃ 15 s；60 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s，45个循环。设置3次生物学重复与技术重复，数据采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法分析获得基因相对表达量。

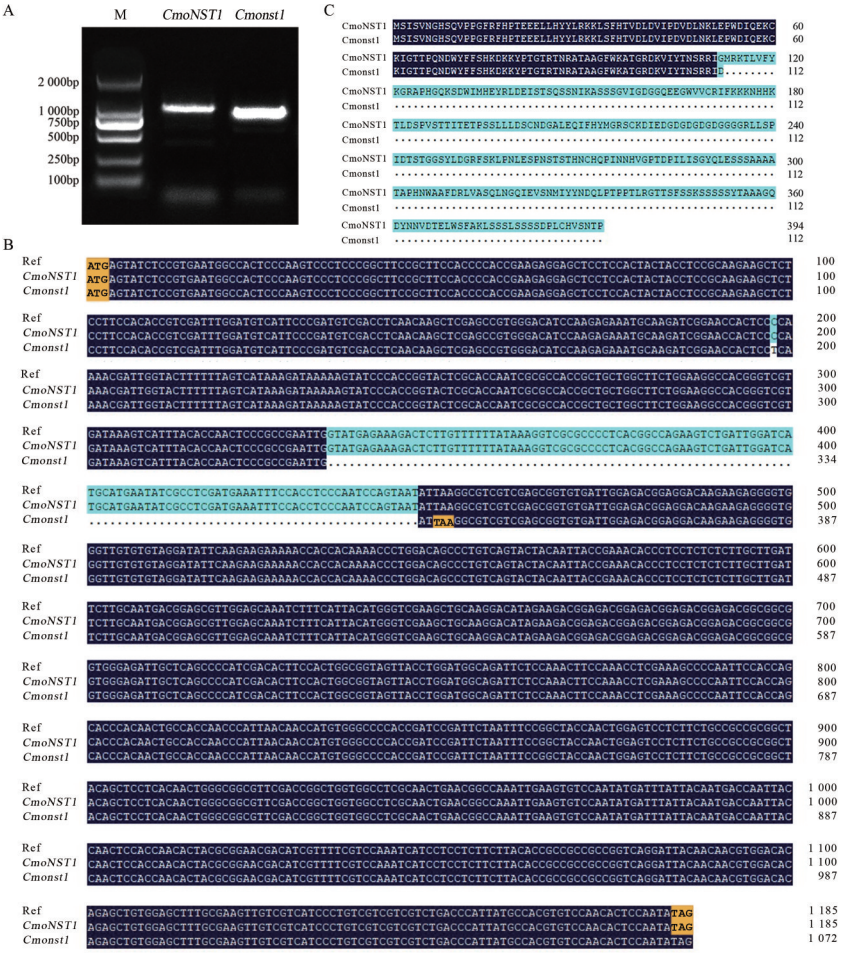
1.2.7 转基因载体构建与鉴定 由于南瓜转基因体系尚未建立，而黄瓜与南瓜同属葫芦科且亲缘关系较近，因此基于前期同源性分析，本团队选择黄瓜基因CsaV3_6G008900作为功能验证的靶标。以CsaV3_6G008900为靶标，利用CRISPR-P2.0在线工具，在其编码区（CDS）的外显子序列中，设计并筛选靠近起始密码子（ATG）且预测脱靶效应低的sgRNA靶点，选取最优靶点CsaV3_6G008900-QC1和CsaV3_6G008900-QC2，分别合成其寡核苷酸序列（附表1），通过酶切-连接法克隆至植物CRISPR-Cas9表达载体的sgRNA表达盒中，构建靶向该基因的双靶点敲除载体。随后，将上述重组载体及空载体对照通过电转法导入农杆菌C58菌株。利用已建立的黄瓜农杆菌介导遗传转化体系，使用该工程菌液侵染黄瓜外植体。对抗性筛选再生的植株，通过特异引物PCR筛选转基因阳性苗，最终获得基因编辑突变体株系。

1.2.8 数据统计分析 使用Microsoft Excel 2019和SPSS 27.0软件进行统计分析，用GraphPad Prism 9.5软件绘图。

2 结果

2.1 基因克隆及序列分析

以野生型和裸仁突变体的种皮cDNA为模板，克隆获得长度约为1 100 bp的目的片段（图1-A）。测序结果显示，野生型*CmoNST1*全长1 185 bp，编码394个氨基酸；突变体*Cmonst1*全长1 072 bp，较野生型缺失113 bp的编码区序列（图1-B）。该缺失导致阅读框移码，在新的阅读框中，于原野生型第112个氨基酸对应的密码子位置附近提前出现终止密码子（TAA），因此突变体仅编码一个112 aa的截短蛋白（图1-C）。与南瓜参考基因CmoCh17G004790相比，*CmoNST1*序列完全一致；而*Cmonst1*除113 bp



A：*CmoNST1*和*Cmonst1*全长CDS扩增产物电泳检测；B：*CmoNST1*、*Cmonst1*与参考核苷酸序列比对；C：CmoNST1和Cmonst1蛋白序列比对；Ref：参考序列

A: Electrophoresis analysis of full-length CDS amplification products of *CmoNST1* and *Cmonst1*. B: Nucleotide sequence alignment of *CmoNST1*, *Cmonst1*, and the reference nucleotide sequence. C: Protein sequence alignment of CmoNST1 and Cmonst1. Ref: Reference sequence

图1　南瓜*CmoNST1*和*Cmonst1*基因克隆和序列分析

Fig. 1　Gene cloning and sequence analysis of *CmoNST1* and *Cmonst1* in pumpkin

缺失外，还存在一个单核苷酸变异，序列相似度为90.5%。

2.2　蛋白理化性质分析

通过ExPASy ProtParam在线工具对CmoNST1和Cmonst1蛋白的理化性质进行预测，结果显示，CmoNST1蛋白由394个氨基酸残基构成，相对分子质量为43.35 kD，分子式为$C_{1899}H_{2926}N_{534}O_{610}S_{11}$。等电点（isoelectric point, pI）为6.20，属酸性蛋白。氨基酸组成分析表明，丝氨酸（Ser）含量最高（12.7%），甲硫氨酸（Met）含量最低（1.3%）。该蛋白携带负电荷的氨基酸残基（天冬氨酸Asp和谷氨酸Glu）共44个，携带正电荷的氨基酸残基（精氨酸Arg和赖氨酸Lys）共38个。蛋白不稳定指数为51.51（>40），推测其为不稳定蛋白。脂肪系数为66.09。Cmonst1蛋白由112个氨基酸残基组成，相对分子质量为13.11 kD，分子式为$C_{593}H_{902}N_{164}O_{170}S_2$。pI为9.04，属于碱性蛋白。氨基酸组成分析表明，Lys和Thr的含量最高（8.9%），色氨酸（Trp）含量最低（1.1%）。不含吡咯赖氨酸（Pyl）和硒半胱氨酸（Sec）等稀有氨基酸。该蛋白携带负电荷的氨基酸残基（Asp和Glu）共14个，携带正电荷的氨基酸残基（Arg和Lys）共17个。蛋白不稳定指数为

32.76（<40），推测其为稳定蛋白，脂肪系数为64.38。

借助TMHMM在线工具对蛋白结构进行分析，结果显示CmoNST1与Cmonst1蛋白均未预测到跨膜结构域（附图1-A,B）。CmoNST1和Cmonst1的蛋白疏水性平均值分别为-0.614和-0.812，说明两种蛋白都为亲水性蛋白（附图1-C,D）。

借助SignalP-6.0在线工具进行信号肽预测，结果显示CmoNST1和Cmonst1蛋白均不含信号肽（附图2-A,B）。进一步利用Netphos3.1分析其磷酸化位点，结果表明CmoNST1蛋白存在61个潜在磷酸化位点，包括丝氨酸（Ser）39个、苏氨酸（Thr）19个及酪氨酸（Tyr）3个；Cmonst1蛋白共预测到12个磷酸化位点，其中丝氨酸5个、苏氨酸6个、酪氨酸1个（附图2-C,D）。

2.3 CmoNST1蛋白结构域、二级、三级结构预测

结构域作为蛋白质中能独立折叠并执行特定功能的功能单元，是解析蛋白质功能的重要切入点。通过NCBI CD-Search在线工具对CmoNST1蛋白进行保守结构域预测，结果表明该野生型CmoNST1蛋白和突变体Cmonst1蛋白都含有典型的No Apical Meristem（NAM）保守结构域（附图3-A,B），表明其属于NAC转录因子超家族。结合前期序列分析，尽管113 bp的缺失造成了突变体蛋白C端截短，但NAM结构域本身的编码序列并未被破坏。这说明，突变体功能丧失并非源于DNA结合核心域（NAM）的破坏，而很可能归因于C端调控区域的缺失，该区域可能包含对转录激活至关重要的位点。

对CmoNST1和Cmonst1蛋白的二级结构进行分析预测（附图3-C,D），发现两者均具有极高的无规则卷曲含量（CmoNST1 81.98%，Cmonst1 73.21%），而规则的α-螺旋和延伸链占比较低，这两种蛋白可能是结构柔性较高的分子。对比两者，Cmonst1蛋白的α-螺旋（从7.61%增至8.04%）和延伸链（从10.41%增至18.75%）比例略有增加，同时无规则卷曲比例相应降低，说明该突变可能使蛋白质的局部结构变得略微有序，并未显著改变蛋白质整体的二级结构构象。

在SWISSMODEL系统中，分别以笋瓜（*Cucurbita maxima*）和木豆（*Cajanus cajan*）的NAC结构域蛋白为模板，成功构建野生型CmoNST1及突变体Cmonst1的三维结构（附图3-E,F）。建模数据显示，尽管突变体与模板的序列一致性（90.09%）略低于野生型（96.95%），且覆盖率也稍低，但其核心NAC结构域的折叠方式与野生型高度相似。综合上述结构域、二级及三级结构分析结果表明，113 bp缺失导致的移码突变，使Cmonst1蛋白仅保留了N端的NAM结构域（DNA结合核心域），而C端的大部分序列（包括转录调控区）因移码而缺失并提前终止。该突变并未破坏NAM结构域的折叠方式，但足以移除C端关键的转录调控区。据此推测，该突变导致Cmonst1蛋白保留了N端的DNA结合域，而缺失了C端的转录激活域。这种“DNA结合域完整、转录激活域缺失”的结构特征，可能是裸仁性状形成的分子基础。然而，突变体蛋白是否仍具备正常的DNA结合活性，尚需进一步实验验证。

2.4 序列比对和系统进化树

在NCBI数据库中，使用BLASTP工具，以CmoNST1的氨基酸序列作为查询序列进行同源比对。根据E值及相似度比对结果，筛选出来自14种不同植物的、同源性较高的氨基酸序列（图2）。结果显示，*CmoNST1*和*Cmonst1*编码蛋白的相似度为71.5%；与葫芦科植物西葫芦（Cp4.1G12g04350.1）的同源性最高，相似度为99.42%，与笋瓜（RimuC17G004780.1）、灰籽南瓜（KAG7013810.1）、黄瓜（CsaV3_6G008900.1）和甜瓜（KAL4015115.1）的相似度分别为96.58%、93.2%、82.1%和80.2%，而与木豆（XP 020227650.1）的同源性最低，仅为55.13%。系统进化分析进一步证实，*CmoNST1*和*Cmonst1*与上述葫芦科物种聚集于同一进化分支，亲缘关系较近，符合物种进化规律。

2.5 南瓜CmoNST1亚细胞定位

将重组质粒pART-CAM-EGFP转化农杆菌，并分别以*35S*-GFP和*35S*::*CmoNST1*/*Cmonst1*-GFP作为对照与实验组，在烟草表皮细胞中瞬时表达目标蛋白。亚细胞定位结果显示（图3），CmoNST1蛋白的绿色荧光主要分布在烟草细胞的细胞核中，在细胞质中也有微弱信号；而Cmonst1蛋白的荧光在细胞核、细胞质，未观察到明显的定位特异性改变。上述结果表明，CmoNST1是一个典型的核定位蛋白，

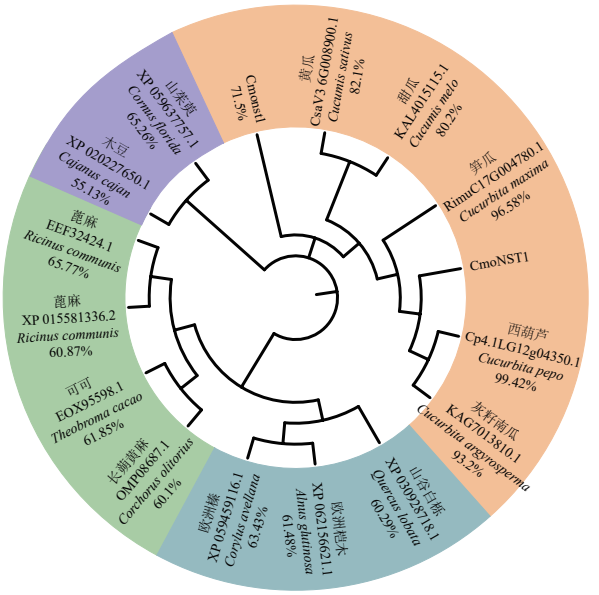
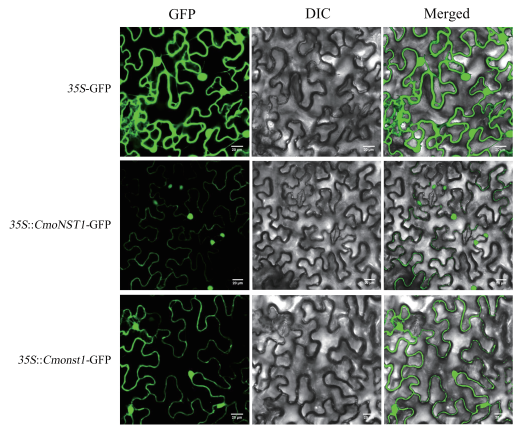


图2　CmoNST1的系统进化树分析

Fig. 2　Phylogenetic tree analysis of CmoNST1



从左到右分别为GFP绿色荧光蛋白、明场和叠加图。比例尺=20.0 μm

From left to right: GFP green fluorescent protein, bright field, and merge. Scale bar = 20.0 μm

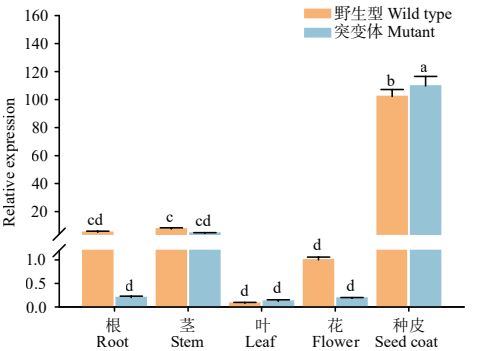
图3　CmoNST1和Cmonst1的亚细胞定位

Fig. 3　Subcellular localization of CmoNST1 and Cmonst1

而C端截短未显著影响其进入细胞核的能力，但其在细胞质中的信号增强可能与蛋白结构改变有关。

2.6　*CmoNST1* 基因表达模式分析

RT-qPCR分析表明，*CmoNST1* 和 *Cmonst1* 在所有器官中均有表达（图4）。*CmoNST1* 和 *Cmonst1* 在根、茎、叶、花、种皮中表达趋势是一致的，在种皮中表达量最高，其次为茎、根、花，在叶中表达量最低。在野生型HS-A中，*CmoNST1* 在种皮中的表达量分别为茎、根、花和叶中表达量的13.44倍、19.68倍、102.17倍和1 311.21倍。在突变体HLS-B中，*Cmonst1* 在种皮中的表达量分别为茎、根、花和叶中表达量的23.84倍、551.58倍、590.13倍和914.71倍。在裸仁突变体材料中，种皮中的表达量明显高于其他组织。



不同小写字母表示差异显著（P<0.05）

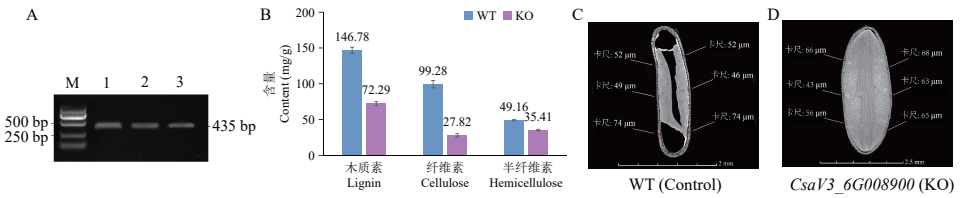
Different lower letters indicate significant differences (P<0.05)

图4　*CmoNST1*（野生型）和 *Cmonst1*（突变体）组织特异性表达分析

Fig. 4　Tissue-specific expression analysis of *CmoNST1* (wild type) and *Cmonst1* (mutant)

2.7　黄瓜CsaV3_6G008900（*CmoNST1* 同源基因）敲除株系的表型分析

通过PCR扩增检测黄瓜基因敲除T_1代株系中目标基因CsaV3_6G008900的特异性片段（预期产物大小为435 bp）。琼脂糖凝胶电泳结果显示，在突变体株系中检测到目标条带（图5-A）。通过CT扫描比较基因敲除植株与野生型黄瓜（9930）成熟种子的种皮结构，并测定两者种皮中木质素、纤维素和半纤维素的含量。结果显示，种皮木质素、纤维素和半纤维素的含量变化趋势与种皮厚度一致（图5-B）。野生型种子种皮厚度约为60.2 μm，结构完整，种皮细胞规则，内容物填充正常（图5-C）；而基因敲除T_1代种子种皮厚度降至约57.8 μm，种皮细胞内容物明显缺失，细胞排列松散，出现空洞结构，种仁发育不完整（图5-D）。上述结果表明，敲除 *CmoNST1* 在黄瓜中的直系同源基因CsaV3_6G008900后，种皮厚度与木质素含量等指标均发生显著变化。这进一



A:载体鉴定;B:种皮木质素、纤维素和半纤维素含量;C:对照黄瓜种子结构;D:突变体黄瓜种子结构;M:DNA marker;1-3:载体鉴定;WT(Control):对照野生型黄瓜种子;KO:敲除CsaV3_6G008900的突变体黄瓜种子

A: Characterization of the vector. B: Contents of lignin, cellulose, and hemicellulose in the seed coat. C: Seed structure of the control cucumber. D: Seed structure of the mutant cucumber. M: DNA marker. 1-3: Characterization of the vector. WT (Control): Wild-type cucumber seed. KO: Mutant cucumber seed with CsaV3_6G008900 knockout

图5 CsaV3_6G008900基因敲除对种皮发育的影响

Fig. 5 Effect of CsaV3_6G008900 knockout on seed coat development

步证实了*CmoNST1*及其同源基因在葫芦科植物种皮发育中具有功能保守性。

3 讨论

本研究克隆了有种皮南瓜中的*CmoNST1*及其裸仁突变等位基因*Cmonst1*。尽管突变体中检测到*Cmonst1*转录本，但该转录本能否翻译出截短蛋白并在体内稳定发挥功能尚不明确。

真核细胞中存在无义介导的mRNA降解（NMD）机制，可识别含有提前终止密码子的异常转录本并使其降解[12]。即便少量截短蛋白得以合成，其C端截短也可能影响蛋白的整体稳定性，使其易被泛素-蛋白酶体系统（UPS）识别并降解[13]。然而，保守结构域预测显示，突变体蛋白仍保留完整的NAM结构域（位于N端），三维结构建模和二级结构预测进一步表明，C端的缺失并未影响该核心结构域的正常折叠。亚细胞定位结果也证实突变体蛋白仍具备进入细胞核的能力。这意味着，若该截短蛋白能够逃逸NMD和UPS两大质控系统并在体内稳定存在，其DNA结合及核定位功能可能得以保留。但这种“核心保留、调控末端缺失”的突变方式是否影响其转录激活功能尚不明确。后续的蛋白理化性质分析，为功能缺失假说提供了间接证据。

蛋白理化性质分析显示，野生型CmoNST1为不稳定的酸性蛋白，而突变体Cmonst1为稳定的碱性蛋白。等电点从酸性向碱性的转变，可能影响蛋白与带负电荷的DNA骨架的结合能力[14]。此外，CmoNST1含有61个潜在磷酸化位点，远多于Cmonst1的12个。C端大量磷酸化位点的丢失，可能导致Cmonst1无法有效响应上游信号通路的磷酸化调控，从而削弱其转录激活能力[15-16]。尽管Cmonst1仍为亲水蛋白且不含跨膜域，但其稳定性的提高可能反而不利于其作为转录因子完成快速更新和降解的动态调控过程[17]。同时，亚细胞定位显示CmoNST1主要定位于细胞核，而Cmonst1在细胞核和细胞质中均有分布，这种分布模式的改变可能干扰其正常转录调控功能。

从功能层面分析，*CmoNST1*和*Cmonst1*在种皮中显著高表达，与已知*NST*类基因表达规律一致[18]。在裸仁突变体中，*Cmonst1*在种皮中的表达量依然显著高于其他组织，表明突变体表型并非由于基因表达缺失，综合序列、结构及理化性质等间接证据，推测这可能是由C端截短导致蛋白功能丧失，但其转录激活功能仍有待后续实验直接验证。

进一步的证据支持这一功能缺失假说。显微CT扫描结果显示，基因功能缺失导致种皮变薄，细胞排列松散并出现空洞，种皮木质素、纤维素和半纤维素含量显著降低，推断*CmoNST1*可能直接激活种皮次级细胞壁合成相关的木质素生物合成基因。该结果与拟南芥*NST1/NST2*促进厚壁组织的次生壁增厚的作用高度相似[18]。Zhong等[19]证实，*NST1*可直接结合于木质素合成基因的启动子区域并激活其表达。因此，*CmoNST1*很可能通过类似的调控机制，维持种皮机械强度；当其功能受损时，木质素含量下降，种皮细胞因缺乏支撑而形成空洞，最终导致裸仁表型。然而，*CmoNST1*与下游靶基因的直接相互作用尚需通过EMSA或ChIP-qPCR等方法进一步验证。

从进化视角来看，*CmoNST1*与葫芦科物种等聚为一支，相似度较高。结合黄瓜中敲除该同源基因

能重现种皮缺陷表型的结果，说明*NST*类转录因子在葫芦科作物种皮发育中的功能具有保守性。为利用基因编辑技术改良瓜类作物种皮性状提供了重要的理论依据。

本研究为理解可变剪接在NAC转录因子功能调控中的作用提供了新证据。本研究发现，可变剪接导致*Cmonst1*开放阅读框破坏及翻译提前终止，改变了该转录因子的功能完整性。这一发现揭示了可变剪接在转录后水平调控种皮性状的潜在机制。可变剪接广泛参与植物生长发育、胁迫应答等多种生理过程[20-27]，NAC转录因子家族在植物发育与胁迫响应中发挥枢纽作用[28-29]。本研究进一步表明，可变剪接可直接作用于这一关键转录因子家族，在转录后水平精准干预其功能。该发现拓展了可变剪接在植物发育调控中的功能维度，为深入理解NAC家族转录因子的功能多样性提供了新视角。后续将利用原位杂交揭示基因表达的组织特异性差异，并通过转录激活活性检测明确可变剪接事件是否产生有功能的蛋白，从而深入解析裸仁南瓜种皮退化的分子机制。

4　结论

裸仁南瓜中*Cmonst1*因113 bp缺失导致C端截短，编码蛋白由394个氨基酸缩短至112个氨基酸。该蛋白虽保留NAM结构域与核定位能力，但可能丧失转录激活功能，表现为“核心保留、调控末端缺失”的功能丧失型突变。*CmoNST1*在种皮特异性高表达，可能通过调控木质素等合成维持种皮完整性，其C端截短是裸仁性状形成的关键因素之一。

文章所有附图附表请点击链接获取（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260707105345_NewsFile_59.pdf）。

参考文献

[1] Singh A, Kumar V. Pumpkin seeds as nutraceutical and functional food ingredient for future: a review [J]. Grain Oil Sci Technol, 2024, 7(1): 12-29.

[2] Bergantin C, Maietti A, Tedeschi P, et al. HPLC-UV/Vis-APCI-MS/MS determination of major carotenoids and their bioaccessibility from “delica” (*Cucurbita maxima*) and “violina” (*Cucurbita moschata*) pumpkins as food traceability markers [J]. Molecules, 2018, 23(11): 2791.

[3] Vinayashree S, Vasu P. Biochemical, nutritional and functional properties of protein isolate and fractions from pumpkin (*Cucurbita moschata* var. *kashi* Harit) seeds [J]. Food Chem, 2021, 340: 128177.

[4] Zraidi A., Pachner M, Lelley T. On the genetics and histology of the hull-less character of styrian lipid-pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) [J]. Cucurbit Genet Coop Rep, 2003, 26: 57-61.

[5] 申琼. 薄种皮南瓜种皮发育生理及分子标记筛选 [D]. 太谷: 山西农业大学, 2019.
Shen Q. Developmental physiology and screening molecular marker for hull-less seeds of *Cucurbita moschata* [D]. Taigu: Shanxi Agricultural University, 2019.

[6] Huss JC, Gierlinger N. Functional packaging of seeds [J]. New Phytol, 2021, 230(6): 2154-2163.

[7] Figueiredo DD, Sharma RA. The mysterious dialogue between the embryo, endosperm, and seed coat, and its implications for seed traits [J]. J Exp Bot, 2026, 77(7): 1976-1990.

[8] North H, Baud S, Debeaujon I, et al. *Arabidopsis* seed secrets unravelled after a decade of genetic and omics-driven research [J]. Plant J, 2010, 61(6): 971-981.

[9] Kreft M, Zorec R, Janeš D, et al. Histolocalisation of the oil and pigments in the pumpkin seed [J]. Ann Appl Biol, 2009, 154(3): 413-418.

[10] Shen Q, Wu LY, Zhao XH, et al. Comparative analysis of electron microscopic structure of seed testa, lignin and biosynthesis-related enzyme activities in hulled and hull-less seeds of *Cucurbita moschata* [J]. Sci Hortic, 2019, 245: 137-143.

[11] Shen Q, Weng YQ. Alternative splicing of *NAC* transcription factor gene *CmNST1* is associated with naked seed mutation in pumpkin, *Cucurbita moschata* [J]. Genes, 2023, 14(5): 962.

[12] Raxwal VK, Riha K. The biological functions of nonsense-mediated mRNA decay in plants: RNA quality control and beyond [J]. Biochem Soc Trans, 2023, 51(1): 31-39.

[13] Wang XW, Liu X, Song KX, et al. An insight into the roles of ubiquitin-specific proteases in plants: development and growth, morphogenesis, and stress response [J]. Front Plant Sci, 2024, 15: 1396634.

[14] Huang WZ, Miao M, Kud J, et al. *SlNAC1*, a stress-related transcription factor, is fine-tuned on both the transcriptional and the post-translational level [J]. New Phytol, 2013, 197(4): 1214-1224.

[15] Seet BT, Dikic I, Zhou MM, et al. Reading protein modifications with interaction domains [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006, 7(7): 473-483.

[16] Mittag T, Pappu RV. A conceptual framework for understanding phase separation and addressing open questions and challenges [J]. Mol Cell, 2022, 82(12): 2201-2214.

[17] Olsen AN, Ernst HA, Leggio LL, et al. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse [J]. Trends Plant Sci, 2005, 10(2): 79-87.

[18] Mitsuda N, Seki M, Shinozaki K, et al. The NAC transcription factors NST1 and NST2 of *Arabidopsis* regulate secondary wall thickenings and are required for anther dehiscence [J]. Plant Cell, 2005, 17(11): 2993-3006.

[19] Zhong RQ, Lee C, Ye ZH. Global analysis of direct targets of secondary wall NAC master switches in *Arabidopsis* [J]. Mol Plant, 2010, 3(6): 1087-1103.

[20] Yu YT, Guo SG, Ren Y, et al. Quantitative transcriptomic and proteomic analysis of fruit development and ripening in watermelon (*Citrullus lanatus*) [J]. Front Plant Sci, 2022, 13: 818392.

[21] Ahiakpa JK, Munir S, Karikari B, et al. Alternative splicing occurs in auxin-mediated trade-off between fruit development and quality in tomato [J]. BMC Plant Biol, 2025, 25: 1241.

[22] Qüesta JI, Song J, Geraldo N, et al. *Arabidopsis* transcriptional repressor VAL1 triggers Polycomb silencing at *FLC* during vernalization [J]. Science, 2016, 353(6298): 485-488.

[23] Liu L, Wu DP, Gu YJ, et al. Comprehensive profiling of alternative splicing landscape during secondary dormancy in oilseed rape (*Brassica napus* L.) [J]. Mol Breeding, 2022, 42(8): 44.

[24] James AB, Sharples C, Laird J, et al. *REVEILLE2* thermosensitive splicing: a molecular basis for the integration of nocturnal temperature information by the *Arabidopsis* circadian clock [J]. New Phytol, 2024, 241(1): 283-297.

[25] van der Hoven TC, McFarlane ZG, Dinge S, et al. Temperature-dependent alternative splicing enables circadian adaptation to ambient temperature [J]. Plant Physiol, 2026, 200(2): kiaf689.

[26] Xu WB, Wang M, Zhang XH, et al. Unraveling branch point-driven SR45a splicing dynamics in heat stress for plant adaptation [J]. Sci Adv, 2026, 12(13): eadz7859.

[27] Huang C, Tang JW, Sun WQ, et al. Gibberellin modulates the post-transcriptional regulation of CsHDZ34 to positively regulate bud break in tea plants [J]. New Phytol, 2026, 249(4): 1850-1870.

[28] Reboledo G, Agorio A, Ponce De León I. Moss transcription factors regulating development and defense responses to stress [J]. J Exp Bot, 2022, 73(13): 4546-4561.

[29] Lu L, Fang JB, Xia N, et al. Phosphorylation of the transcription factor OsNAC29 by OsMAPK3 activates diterpenoid genes to promote rice immunity [J]. Plant Cell, 2024, 37(1): koae320.

（责任编辑　高洁）