

DOI: 10.11686/cyxb2025122

http://cyxb.magtech.com.cn

未丽, 邓育轩, 赵静, 等. 旱生植物霸王 *Zx*CER6 的基因克隆及功能分析. 草业学报, 2026, 35(1): 154—169.

WEI Li, DENG Yu-xuan, ZHAO Jing, et al. Cloning and functional analysis of *Zx*CER6 from the xerophyte *Zygophyllum xanthoxylum*. Acta Prataculturae Sinica, 2026, 35(1): 154—169.

旱生植物霸王 *Zx*CER6 的基因克隆及功能分析

未丽¹, 邓育轩¹, 赵静², 刘俊良², 马克华², 王锁民^{1*}

(1. 兰州大学草地农业科技学院, 兰州大学草种创新与草地农业生态系统全国重点实验室, 甘肃 兰州 730020; 2. 阿拉善盟林业和草原保护站, 内蒙古 巴彦浩特 750306)

摘要: 角质层蜡质在旱生植物霸王抵御不良生境中发挥着重要作用。 β -酮脂酰辅酶 A 合成酶(KCS)是催化蜡质前体物质合成的关键酶。本研究克隆得到霸王 *Zx*KCS6/*CER6* 的 cDNA 全长 1548 bp, 具有 2 个决定底物选择性的高度保守跨膜区和 3 个酶催化位点, 属于缩合酶超家族成员。与其他高等植物同源蛋白的氨基酸序列比对发现, *Zx*CER6 属于 KCS 家族中 CER6 亚家族, 具有第 224 位的半胱氨酸高度保守激活位点。系统进化树分析发现, *Zx*CER6 与拟南芥 *At*CER6 的亲缘关系最近。表达模式分析表明, *Zx*CER6 主要在地上部组织中表达, 尤其在叶表皮中表达丰度最高; 且受 50 mmol·L⁻¹ NaCl 处理的强烈诱导, 其表达丰度在 36 h 时达到峰值。利用表皮特异性启动子驱动 *Zx*CER6 在拟南芥中表达发现, 干旱处理后转基因拟南芥的地上部干鲜重、叶绿素含量、净光合速率和水分利用效率均显著高于野生型, 而离体叶片失水率、叶绿素浸出率和叶片相对质膜透性均低于野生型; 转基因植株地上部角质层蜡质含量, 尤其是烷烃含量显著增加。表明 *Zx*CER6 的超表达可增加转基因植株表皮中烷烃的含量, 减少水分散失, 从而提高其抗旱性。本研究初步揭示了 *Zx*CER6 介导的蜡质积累在荒漠植物霸王抗旱性中的作用, 为优良牧草及农作物抗旱性的遗传改良提供了优异的基因资源。

关键词: 霸王; 角质层蜡质; β -酮脂酰辅酶 A 合成酶; 抗旱性

Cloning and functional analysis of *Zx*CER6 from the xerophyte *Zygophyllum xanthoxylum*

WEI Li¹, DENG Yu-xuan¹, ZHAO Jing², LIU Jun-liang², MA Ke-hua², WANG Suo-min^{1*}

1. College of Pastoral Agriculture Science and Technology, State Key Laboratory of Herbage Improvement and Grassland Agroecosystems, Lanzhou University, Lanzhou 730020, China; 2. Alxa League Forestry and Grassland Protection Station, Bayanhaote 750306, China

Abstract: Cuticular wax plays an important role in resistance to environmental stresses in the xerophyte *Zygophyllum xanthoxylum*. β -ketoacyl-CoA synthase (KCS) is the key enzyme catalyzing the synthesis of wax precursors. In this study, the full-length cDNA of *Zx*KCS6/*CER6* was cloned. The 1548-bp sequence encoded a polypeptide with two highly conserved transmembrane regions that determine substrate selectivity and three enzyme catalytic sites, and it belongs to the condensation enzyme superfamily. Comparison with homologous protein sequences of other higher plants revealed that *Zx*CER6 belongs to the CER6 subfamily of the KCS family and has a highly conserved cysteine activation site at amino acid position 224. A phylogenetic analysis revealed a close relationship between *Zx*CER6 and

收稿日期: 2025-04-08; 改回日期: 2025-05-21

基金项目: 国家自然科学基金(32271749)和阿拉善盟国家级公益林二十年(2004-2023)生态效益评估项目(AMKJZC2024-01)资助。

作者简介: 未丽(1980—), 女, 甘肃白银人, 实验师, 硕士。E-mail: weilil@lzu.edu.cn

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: smwang@lzu.edu.cn

AtCER6 of *Arabidopsis thaliana*. Transcript profile analysis revealed that *Zx*CER6 transcript levels were much higher in aboveground tissues, especially in the leaf epidermis, than in below-ground organs. Expression of *Zx*CER6 was strongly induced by 50 mmol·L⁻¹ NaCl treatment and its transcript level peaked at 36 hours of this treatment. *Zx*CER6 was expressed in *A. thaliana* under the control of an epidermal-specific promoter, and the performance of the transgenic plants was compared with that of wild type plants. Upon drought treatment, the shoot dry and fresh weight, total chlorophyll content, net photosynthetic rate, and water use efficiency of transgenic *Arabidopsis* were significantly higher than those of the wild type, and the water loss rate, chlorophyll leaching rate, and relative membrane permeability of detached leaves were lower than those of the wild type. The wax content, especially the alkane content, in the aboveground cuticle was significantly higher in the transgenic plants than in the wild type plants. These findings indicate that *Zx*CER6 can increase the proportion of alkanes in the cuticular wax on the epidermis of transgenic plants leading to reduced water loss, and consequently, improved drought resistance. The results of this study reveal that *Zx*CER6 mediates the accumulation of epicuticular waxes that play an important role in the drought resistance of the desert plant *Z. xanthoxylum*. Our findings highlight an excellent genetic resource that can be used for the genetic improvement of drought resistance in forage and crop plants.

Key words: *Zygophyllum xanthoxylum*; cuticular wax; β -ketoacyl-CoA synthase; drought tolerance

超长链脂肪酸(very-long-chain fatty acids, VLCFAs)是合成植物角质层蜡质的前体物质。在 VLCFAs 生物合成过程中 β -酮脂酰辅酶 A 合成酶(β -ketoacyl-CoA synthase, KCS)是催化脂肪酸延伸的关键限速酶^[1]。目前,已经在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)基因组中鉴定到 21 个 KCS 基因,根据氨基酸序列同源性可划分为 4 个亚族,分别是 *FAE1*-like、*KCS1*-like、*FDH*-like 和 *CER6*^[2]。其中单一缩合酶 *FAE1* 催化种子中 VLCFAs 的合成;*KCS1*、*FDH*、*CER6* 已被证明参与了蜡质成分的合成^[3]。到目前为止,有关拟南芥 *KCS1*、*KCS2*、*KCS6* (*CER6/CUT1*)、*KCS10* (*FDH*)、*KCS13* (*HIC*) 和 *KCS20* 在表皮蜡质合成中的功能已有详细报道^[3-7]。Todd 等^[4]首先在拟南芥中分离鉴定到 *KCS1*,发现其与 *FAE1* 的同源性为 53%,负责催化蜡质前体 VLCFAs 的合成;但 *kcs1-1* 茎、叶和角果中的醇、醛、烷烃和酮的含量有不同程度的减少,这表明 *KCS1* 可能在蜡质合成的脱羧基和酰基还原中起作用。Lee 等^[5]在拟南芥中克隆到 *KCS2/DAISY* 和 *KCS20*,并且发现 *KCS20* 和 *KCS2/DAISY* 的拟南芥单突变体与野生型相比表皮角质层蜡质含量无显著差异,但是在双突变体中蜡质含量明显减少,表明这两个基因存在功能冗余。Pruitt 等^[6]克隆得到拟南芥 *KCS10* (*FDH*),该基因编码的蛋白能够催化脂肪族化合物的延长,其缺失突变体表现出叶片、花器官融合;其超表达导致植株生长发育迟缓,植株矮化。拟南芥 *KCS13* (*HIC*) 缺失后,在 *hic* 突变体中叶片上的气孔密度增加了 42%,表明该基因负调控气孔发育^[7]。*CER6* (*KCS6/CUT1*) 是目前为止在拟南芥中发现的唯一专门催化角质层蜡质合成的缩合酶,与野生型相比, *cer6* 叶角质层蜡质含量减少了 48%,而茎中减少 80% 以上^[8-9],且发现其功能丧失导致 C24 的蜡质衍生物大量积累,表明该基因参与 C26 及以上碳链的超长链脂肪酸的生物合成,在拟南芥的蜡质合成中发挥着关键作用^[10]。近年来,已经在番茄 (*Lycopersicon esculentum*)^[11]、大麦 (*Hordeum vulgare*)^[12]、棉花 (*Gossypium hirsutum*)^[13]、小盐芥 (*Thellungiella halophila*)^[14]、甘蓝型油菜 (*Brassica napus*)^[15] 等多种植物中鉴定到 *CER6* 基因家族成员。

角质层蜡质是覆盖在陆生植物表面的天然保护屏障,在植物抵御生物和非生物胁迫中起着重要作用^[16-17]。将拟南芥的 *CER1*、*CER6*、*WAX2* 和 *SHINE1* 分别转入番茄中,发现转基因植株的抗旱能力较野生型显著提高^[18];将上述 4 个蜡质合成相关基因的转基因番茄自交后代进行苗期抗旱耐盐性评价,并接种灰霉 (*Botrytis cinera*) 和晚疫 (*Phytophthora infestans*) 病菌,验证了这些基因对生物胁迫的响应^[19]。用 35S 强启动子驱动 *AtCER6* 基因过表达,与野生型相比,转基因植株中 *AtCER6* 基因表达量显著增加,但蜡质并没有积累。利用拟南芥 *CER6* 自身启动子过表达 *AtCER6*,转基因植株茎表皮蜡质含量增加^[10]。超表达蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*) *WXP1* 能够促进紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) 叶表皮蜡质积累、增强保水能力,从而提高其抗旱性^[20]。

利用 *CER6* 启动子驱动 *WXP1* 在紫花苜蓿中表达,发现干旱条件下转基因植株较野生型有更高的相对含水量和叶片水势,蜡质含量增加,提高了植株的抗旱性^[21]。在水稻 (*Oryza sativa*) 中过表达 *OsWRKY89*,使植物蜡质成分改变,不仅提高了转基因水稻的抗旱性,而且增强了其抵御紫外线和抗病能力^[22]。过表达 *OsGL1-2* 增加了水稻叶片的蜡质晶体数量,从而提高了转基因水稻植株的抗旱性^[23]。过表达 *DRF2* 水稻植株叶表面蜡质含量增加,失水速率降低,耐旱性提高,同时蜡质合成和胁迫相关的基因表达上调^[24]。R2R3 MYB 转录因子 *MdMYB30* 通过调节表皮蜡质生物合成来调节植物对病原体的抗性^[25]。过表达 *BnKCS1-1*、*BnKCS1-2* 和 *BnCER1-2* 甘蓝型油菜的叶表皮蜡质晶体密度增加,水分散失率降低,抗旱性增强^[26]。以上研究表明,角质层蜡质合成基因是提高植物抗性的候选基因。

霸王 (*Zygophyllum xanthoxylum*) 是一种多浆旱生植物,主要分布在我国西北部和中亚的沙漠地区,具有极强的抗旱和耐盐能力^[27]。前期研究发现发达的叶表皮角质层是霸王适应荒漠生境的重要特征^[28-30]。然而,有关霸王角质层蜡质生物合成分子机制的研究至今尚未见报道。本研究从霸王中分离得到 *ZxCER6*,并成功构建了拟南芥 *AtCER6* 表皮特异性启动子驱动的 *ZxCER6* 植物表达载体,分析其在角质层蜡质合成及抗旱中的功能,可揭示 *ZxCER6* 介导的蜡质积累在荒漠植物霸王抗旱性中的作用。

1 材料与方 法

1.1 植物材料培养与处理

霸王种子于 2018 年 8 月采自内蒙古阿拉善左旗北部至阿右旗拉腾敖包苏木 (39°05' N, 105°34' E; 海拔 1360 m)。挑选籽粒饱满且大小均匀的无损种子,用自来水漂洗除去杂质,再用 10% 的次氯酸钠浸泡 7~10 min,期间间隔摇晃 3~5 次,然后用蒸馏水冲洗 4~5 次后移至 4 °C 冰箱内避光浸泡 2 d,随后 25 °C 黑暗催芽 2 d。发芽后,将长势良好且较为一致的种子移栽至装有石英砂的营养钵 (5 cm × 5 cm × 5 cm) 中,浇灌 1/2 Hoagland 营养液 [2 mmol·L⁻¹ KNO₃, 0.5 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄, 0.5 mmol·L⁻¹ MgSO₄·7H₂O, 0.5 mmol·L⁻¹ Ca(NO₃)₂·4H₂O, 60 μmol·L⁻¹ Fe-citrate·3H₂O, 50 μmol·L⁻¹ H₃BO₃, 10 μmol·L⁻¹ MnCl₂·4H₂O, 1.6 μmol·L⁻¹ ZnSO₄·7H₂O, 0.6 μmol·L⁻¹ CuSO₄·5H₂O, 0.05 μmol·L⁻¹ Na₂MoO₄·2H₂O] 进行培养。每 2 d 更换一次营养液,温室的昼夜温度为 (28 ± 2) °C / (23 ± 2) °C,光照 16 h·d⁻¹,光照强度 8000 lx (150 μmol·m⁻²·s⁻¹),相对湿度为 50%。

对 3 周龄霸王幼苗的不同叶位叶片:上层叶(由上向下数的第 2 层)、中层叶(由下向上数的第 3 层)和下层叶(子叶),以及根和上层叶表皮分别进行取样,用于基因的表达模式分析。

同时对 3 周龄的霸王幼苗进行 50 mmol·L⁻¹ NaCl 处理下的表达模式分析:用含有 50 mmol·L⁻¹ NaCl 的营养液处理 0、1、3、6、12、36 和 48 h;处理液每天更换,从而保证处理条件相对恒定。处理结束后,取样时将中层叶剪下,蒸馏水冲洗后用滤纸吸干表面水分,快速冷冻于液氮中,放置于 -80 °C 超低温冰箱中保存,用于后续 RNA 提取。

拟南芥野生型 Col-0 (兰州大学草地农业科技学院草类植物逆境生理与遗传改良研究所实验室保存) 和转 *AtCER6pro::ZxCER6* 拟南芥纯合系种子用 75% 乙醇和 5% 次氯酸钠 (NaClO) 分别消毒 3 min,期间不断晃动以保证种子表面被充分消毒,然后用灭菌的蒸馏水冲洗 5~7 遍,随后将种子浸泡于蒸馏水中放置在 4 °C 春化 2~3 d。将春化后的拟南芥种子播种于装有草炭土的小花盆 (5 株·盆⁻¹) 中进行培养,每 2 d 使用蒸馏水浇灌一次。培养条件:温度 22~23 °C,光照 120~150 μmol·m⁻²·s⁻¹、16 h(昼)/8 h(夜),相对湿度 50%~60%。对生长于草炭土中的 4 周龄野生型 Col-0 (wild type, WT) 及 4 个纯合系转基因拟南芥 OE5、OE8、OE12 和 OE19 植株进行 2 个干旱周期性间歇处理(每个干旱周期为处理 7 d 后复水 1 d,每个处理 5 个重复,每个重复 5 株苗),进行后续生理指标和角质层蜡质含量的测定。

1.2 方 法

1.2.1 特异性引物设计及基因克隆 按照 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒 (上海生工生物工程股份有限公司) 的操作说明书提取不同器官和不同处理下各个时间点的霸王总 RNA。Evo M-MLV RT Kit with gDNA Clean for qPCR 反转录试剂盒 (大连宝生物工程有限公司) 进行 cDNA 合成。参照 Clone-tech SMARTer™

RACE cDNA 扩增试剂盒(大连宝生物工程有限公司)说明书的具体操作流程进行 3' 和 5' cDNA 末端扩增。利用 WF-CER6 和 WR-CER6 PCR 扩增出该基因全序列,反应体系为:正反向引物(表 1)各 0.5 μL , PrimeSTAR Buffer 2 μL , dNTP Mixture (2 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$) 2 μL , PrimeSTAR HS DNA Polymerase 0.5 μL , cDNA 0.5 μL , 加 dd H₂O 定容至 20 μL 。PCR 扩增程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min 45 s, 30 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

表 1 所用引物信息

Table 1 Primer information used in the experiment

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	目的 Purpose
3F-CER6	ACGAGGCGGAGACTGTTATTT	基因克隆
3FN-CER6	ATCCCAATTCAAATGCTGTCTG	Gene cloning
5R-CER6	CTTCATACACGCAACGATAGG	
5RN-CER6	TCATCAGCTCCTTTGTGGGTC	
WF-CER6	AACAGTCCACTGCCTTCAACAGTAC	
WR-CER6	GCCATCCACCAATCAACCTTAT	
P	CTAATACGACTCACTATAGGGC	
NP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	
QF-ZxCER6	CGTTGCGTGTATGAAGAAGAGG	qRT-PCR
QR-ZxCER6	TATGGCTTGATTTTCGGGGTTG	
QF-ZxACTIN	TTTTCCAGCCATCCCTTGTT	
QR-ZxACTIN	TGCAGTGATCTCCTTGCTCATAC	
VF AtCER6(<i>Hind</i> III)	TGTTGGCCCAAGCTTCTTCGATATCGGTTGTTGACGAT	植物表达载体构建
VR AtCER6	CAAGATTTGAGGCATCGTCGGAGAGTTTTAATGTATAAT	Construction of plant expression vector
VF ZxCER6	ATGCCTCAAATCTTGCCCCGATTTCT	
VR ZxCER6(<i>Sac</i> I)	GGGAAATTCGAGCTCCTACAGCTTGACAACCTTCAGGAAT	

1.2.2 生物信息学分析 利用 DNAMAN 6.0 软件对序列进行拼接、比对和翻译。利用在线软件 TMHMM Server v. 2.0、Compute pI/MW、NCBI 网站 CDD search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 以及在线软件 Cell-PLoc 2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>) 进行蛋白质跨膜区、等电点、分子量、保守结构域预测。利用 Clustal X 2.1 和 MEGA 6 软件进行比对并构建系统进化树。

1.2.3 RT-qPCR 分析 采用 SYBR Premix Ex Taq TMII qPCR 试剂盒(大连宝生物工程有限公司)进行荧光定量 PCR。PCR 反应体系为 20 μL : SYBR Premix Ex Taq TMII Buffer 10 μL , ROX Reference Dye 0.4 μL , Forward primer(QF) 0.8 μL , Reverse Primer(QR) 0.8 μL , cDNA 模板 3 μL , 加 dd H₂O 定容至 20 μL 。PCR 扩增程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环。溶解曲线程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。每个样品重复 3 次, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法^[15] 计算 ZxCER6 的相对表达量。

1.2.4 拟南芥遗传转化及转基因植株分子鉴定 将构建好的 *pBIB-BASTA-pAtCER6::ZxCER6* 植物表达载体通过热激法^[31] 转入根癌农杆菌 GV3101 菌株感受态细胞, 在含 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Kana 和 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Rif 的 LB 固体培养基(5 g $\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 5 g $\cdot\text{L}^{-1}$ 酵母粉, 10 g $\cdot\text{L}^{-1}$ 胰蛋白胨, 10 g $\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂粉) 上进行阳性克隆筛选, 经菌落 PCR 验证后将转化成功的农杆菌菌液保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。通过根癌农杆菌介导的花序浸染法^[31] 转化野生型拟南芥, 喷施 0.01% Basta 对侵染的拟南芥植株进行抗性筛选, 分株收获抗性植株的种子。筛选至 T₃ 代后, 获得转基因拟南芥纯合系。并提取转基因拟南芥幼苗叶片总 RNA 及合成 cDNA, 以 *AtActin2* 为内参, 对 ZxCER6 进行 RT-PCR 检测。

1.2.5 生理指标测定 转基因拟南芥经周期性干旱处理后测定如下生理指标: 1) 株高: 用直尺测量^[31]; 2) 地上

部干鲜重:用称重法^[31]测定;3)光合相关参数:用GFS-3000便携式光合仪(德国WALZ公司)测定净光合速率(net photosynthetic rate, P_n)、蒸腾速率(transpiration rate, T_r)和气孔导度(stomatal conductance, G_s),并计算水分利用效率(water use efficiency, $WUE=P_n/T_r$)^[31]。叶面积采用EPSON V750数字化扫描仪[爱普生(中国)有限公司]扫描和Digimizer software图像分析软件统计计算;4)叶绿素含量:采用80%乙醇提取法^[32]测定;5)叶片相对含水量:用饱和鲜重法^[31]测定;6)叶片相对质膜透性:参照田野^[31]的方法测定;7)离体叶片失水率和8)叶绿素浸出率在测定前需将待测植株黑暗处理6 h,使气孔闭合,然后参照Kosma等^[33]的方法称重并计算。

1.2.6 角质层蜡质含量的测定 剪取干旱处理组及其对应的对照组拟南芥植株莲座叶5片和整个花序茎,每个材料3个重复。在10 mL色谱纯氯仿中浸泡30 s,同时每个样品中加入25 μ L正二十四烷烃($1 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)作为内标,之后用NDK200-2N氮吹仪(杭州米欧仪器有限公司)将浸提液吹干,往试管中加入100 μ L BSTFA和100 μ L吡啶,100 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育30 min进行烷基化,待孵育结束后再次用氮吹仪在37 $^{\circ}\text{C}$ 下吹干,随后加入100 μ L色谱纯正己烷溶解。参照Li等^[30]的方法利用气相色谱-质谱联用仪(GC:7890B;MS:7000D,安捷伦科技有限公司)对烷基化后的样品进行测定及分析。以内标的峰面积为参照,对蜡质样品进行定量及定性分析,蜡质含量用 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ 表示。

1.3 数据处理

通过Excel 2019软件整理数据,利用SPSS 19.1软件进行统计分析,使用Origin 9.1作图。不同处理间的差异显著性采用单因素方差分析(One-way ANOVA),显著水平为 $P<0.05$ (LSD检验)。

2 结果与分析

2.1 霸王ZxCER6基因的克隆与生物信息学分析

利用霸王已有的转录组中CL6403. Contig1_All序列为核心片段,经3'和5'端PCR扩增和测序,获得了ZxCER6 3'、5'端长度,分别为1230和1025 bp。将ZxCER6的转录组片段序列、3'及5'端序列用DNAMAN 6.0软件进行比对拼接,得到这个基因的全长序列。为了下一步研究的可靠性,对拼接序列进行引物设计,用高保真酶进行PCR扩增,通过测序得到一个全长1548 bp的cDNA序列,包含1491 bp的开放阅读框(open reading frame, ORF),编码496个氨基酸残基,将其命名为ZxCER6(图1)。推测其分子量为55.9 kDa,等电点为9.22。该序列翻译到的氨基酸含有6个跨膜区,其中有2个高度保守的完全跨膜区(TM1、TM2),分别位于第23~45,58~90氨基酸残基之间(图2A),其决定底物选择性。同时发现该蛋白属于缩合酶超家族,包含3个酶催化位点(Cys224、His391和Asn424),其中第224位的半胱氨酸是高度保守的催化基序,11个产物结合位点,8个丙二酰基-CoA结合位点以及若干个二聚体识别位点(图2B),这些结构均与脂肪酸的合成和降解有关。

2.2 ZxCER6蛋白序列比对及进化树分析

通过在线比对,发现ZxCER6与高等植物的CER6蛋白同源性较高,与相似性较高的7种植物CER6蛋白进行多重比对。结果显示,ZxCER6与其他高等植物CER6蛋白序列具有较高的同源性,包括2个高度保守的完全跨膜区(TM1、TM2),且第224位的半胱氨酸(Cys224)是高度保守的激活位点(图3)。利用MEGA 6软件构建了植物CER6蛋白的系统发育树。结果表明,ZxCER6蛋白与拟南芥、大豆、甜瓜、雷蒙德氏棉(*Gossypium raimondii*)等双子叶植物的CER6蛋白形成一个大的分支,且ZxCER6蛋白与拟南芥AtCER6蛋白的亲缘关系最近,并聚集在同一个分支上,表明它们的氨基酸序列差异较小,具有较高的相似性,亲缘关系较近,在功能上可能也存在相似性。而单子叶植物小果野芭蕉(*Musa acuminata*)、海枣(*Phoenix dactylifera*)等的CER6蛋白被归类为另一个大分支(图4)。

2.3 ZxCER6组织特异性表达及盐处理下的表达模式分析

组织特异性分析发现,ZxCER6在植株地上部组织的表达量较高,尤其在叶表皮中表达丰度较高,在根中的表达丰度极低(图5A)。50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl处理下,霸王叶中ZxCER6的表达被强烈诱导,并在36 h时达到峰值,为对照的14倍,随后急剧下降,但在48 h时的表达丰度仍显著高于对照(图5B)。结果表明,ZxCER6可能参与超长链脂肪酸的合成,且其表达受盐处理的显著诱导。

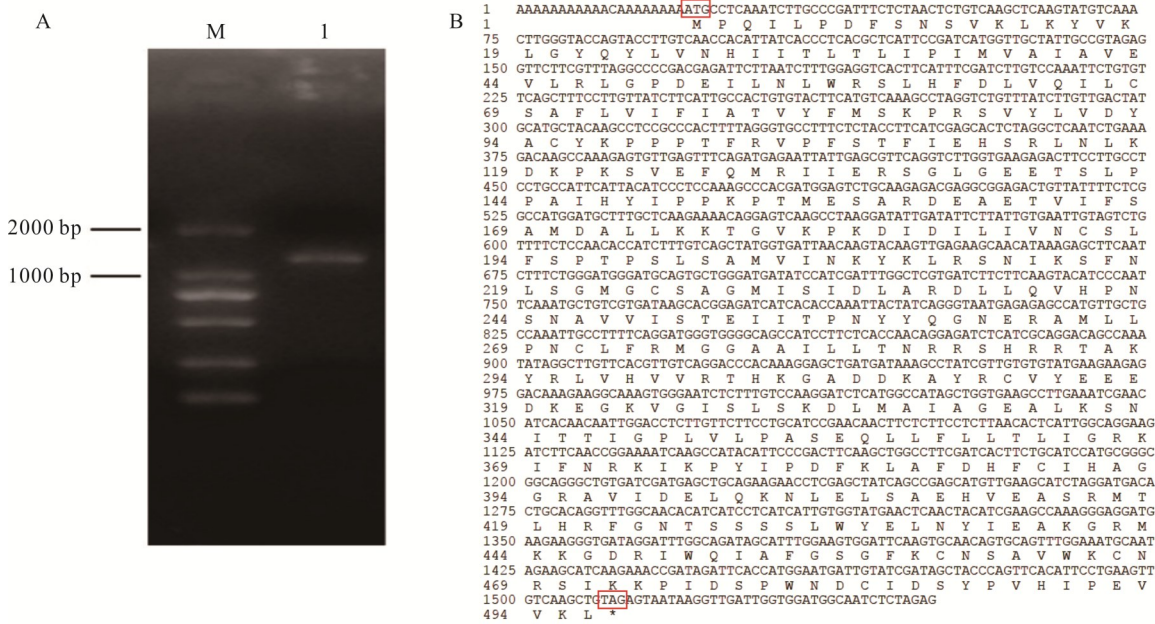


图 1 ZxCER6 的克隆与 cDNA 全长及对应蛋白序列

Fig. 1 Cloning full-length cDNA and corresponding protein sequence of ZxCER6

A: ZxCER6 基因的 PCR 扩增产物 PCR amplification product of ZxCER6 gene; M: DL 2000 DNA marker; 下同 The same below. 1: cDNA 扩增产物 cDNA amplified product. B: ZxCER6 的 cDNA 全长序列 Full cDNA sequence of ZxCER6. 红色方框处为起始密码子(ATG)和终止密码子(TAG). The start codon (ATG) and the stop codon (TAG) were marked in red boxes.

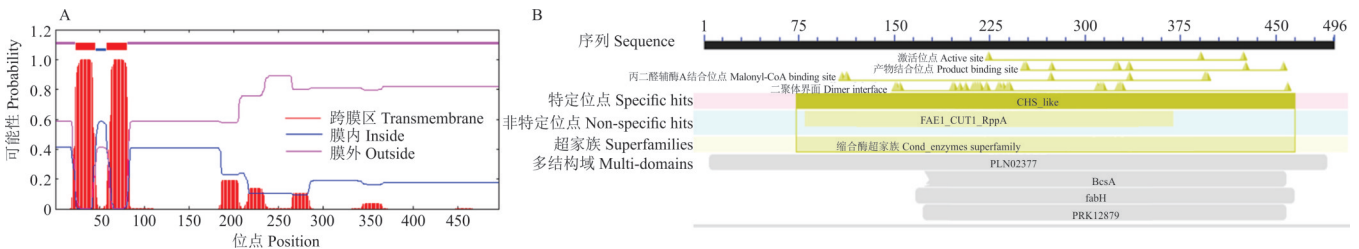


图 2 ZxCER6 蛋白结构特征分析

Fig. 2 Structural characterization analysis of ZxCER6 protein

A: ZxCER6 蛋白的跨膜域 ZxCER6 protein transmembrane domain; B: ZxCER6 蛋白保守结构域 ZxCER6 protein conserved domain.

2.4 植物表达载体的构建

经 *Hind* III 和 *Sac* I 双酶切将 *AtCER6* 启动子和 *ZxCER6* 构建于植物表达载体 *pBIB-BASTA-35S-GWR-FLAG* 中 (图 6A~C)。菌液 PCR 检测得到 1239 和 1506 bp 左右的目标条带 (图 6D)。

2.5 转 ZxCER6 拟南芥的鉴定

对 4 个转基因拟南芥株系 OE5、OE8、OE12、OE19 中 *ZxCER6* 的表达量进行检测,分别得到两个表达量较高 (OE12 和 OE19) 和两个表达量较低 (OE5 和 OE8) 的转基因株系 (图 7),并用于后续生理试验。

2.6 转 ZxCER6 拟南芥的抗旱性分析

2.6.1 干旱处理对转基因拟南芥生长的影响 将 4 周龄野生型及转基因拟南芥进行周期性干旱处理,对 不同干旱周期下的转基因及野生型植株的生长状况进行比较发现,正常条件下,转基因拟南芥与野生型长势基本一致;在第 1 个干旱周期后,野生型拟南芥发生明显萎蔫,而转基因拟南芥生长状态良好,且转基因和野生型植株的株高较对照组明显降低 (图 8)。经过第 2 个干旱周期后,野生型叶片发黄和萎蔫程度较转基因植株明显,对株高 (图 9)、地上部干鲜重 (图 10) 进行测量及称重统计发现,在第 2 个干旱周期结束时,转基因株系 OE12 和 OE19 的株高与对照组相比并无显著差异,均显著高于野生型 ($P < 0.05$)。在第 2 个干旱周期结束时,与对照组相比,野生



图3 ZxCER6与其他高等植物CER6的氨基酸序列多重比对

Fig. 3 Amino acid sequence alignment of ZxCER6 with other CER6 from higher plants

CmCER6: 甜瓜 *Cucumis melo* CER6 (XP_008446598.1); CsCER6: 黄瓜 *Cucumis sativus* CER6 (XP_004135090.1); EgCER6: 巨桉 *Eucalyptus grandis* CER6 (XP_010066726.1); GmCER6: 大豆 *Glycine max* CER6 (XP_003555901.1); PmCER6: 梅 *Prunus mume* CER6 (XP_008243224.1); PtCER6: 毛果杨 *Populus trichocarpa* CER6 (XP_002311457.1); TcCER6: 可可 *Theobroma cacao* CER6 (XP_007044356.2); ZxCER6: 霸王 *Zinnia xanthoxylum* CER6. 下同 The same below. 黄色方框表示 CER6 的 2 个跨膜区 (TM1, TM2), 红色星号表示高度保守激活位点 Cys224. Transmembrane domain (TM1, TM2) was indicated with yellow box. A highly conserved catalytically residue was indicated with red asterisk.

型的地上部鲜、干重分别减少了 36%、21%，而转基因株系分别平均减少了 13% 和 6%。以上结果表明，在干旱条件下转 *ZxCER6* 拟南芥比野生型更能保持较好的长势，从而维持正常生长。

2.6.2 干旱处理对转基因拟南芥叶绿素含量及光合作用参数的影响 与对照组相比，干旱处理后转基因植株叶绿素含量有所下降，净光合速率和气孔导度无显著差异，而水分利用效率显著高于野生型(图 11)。以上结果表明干旱处理后转基因株系通过维持较高的叶绿素含量和气孔导度，从而保证了植株光合作用的正常进行。

2.6.3 干旱处理对转基因拟南芥表皮透性的影响 正常条件下，转基因株系的离体叶片失水率和叶绿素浸出率均低于野生型；经过 2 个周期性干旱处理后，所有转基因株系的离体叶片失水率和叶绿素浸出率相比于对照组均有所下降，但转基因株系仍低于野生型(图 12)。以上结果表明，转 *ZxCER6* 拟南芥株系表皮透性降低，从而减少了水分散失。

2.6.4 干旱处理对转基因拟南芥叶片相对含水量的影响 植物组织相对含水量反映了植物组织的水分状况和植物的保水能力，是植物抗旱能力的重要依据。正常条件下，各株系之间叶片相对含水量并无显著差异($P > 0.05$)，均维持在 72% 左右；在干旱处理后，转基因株系的叶片相对含水量仍维持在 70% 左右，而野生型则降至 54%。由此说明转 *ZxCER6* 拟南芥在受到干旱胁迫后仍能维持较好的水分状态(图 13)。

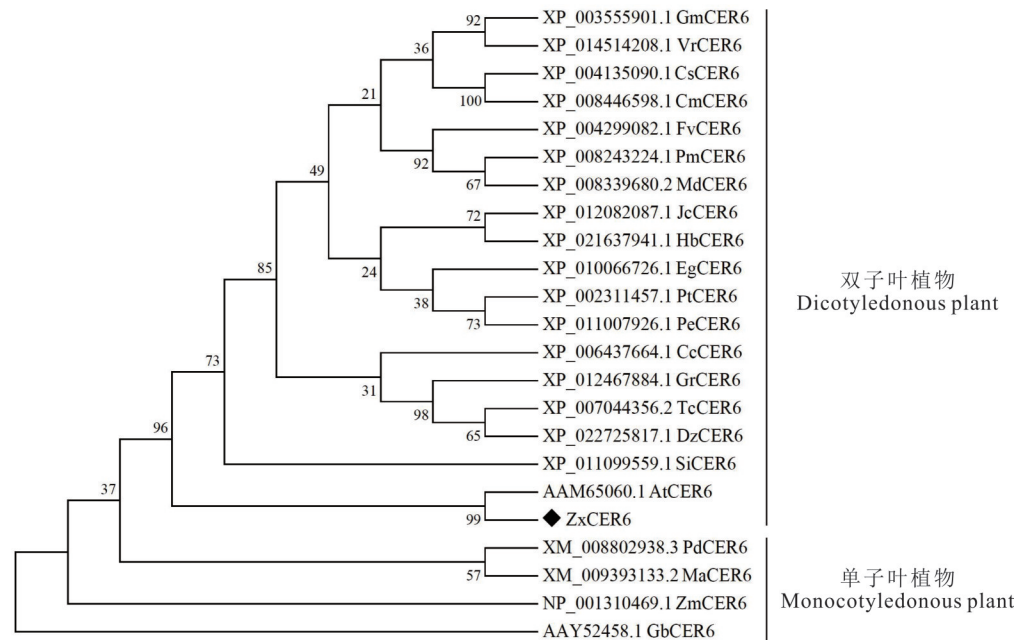
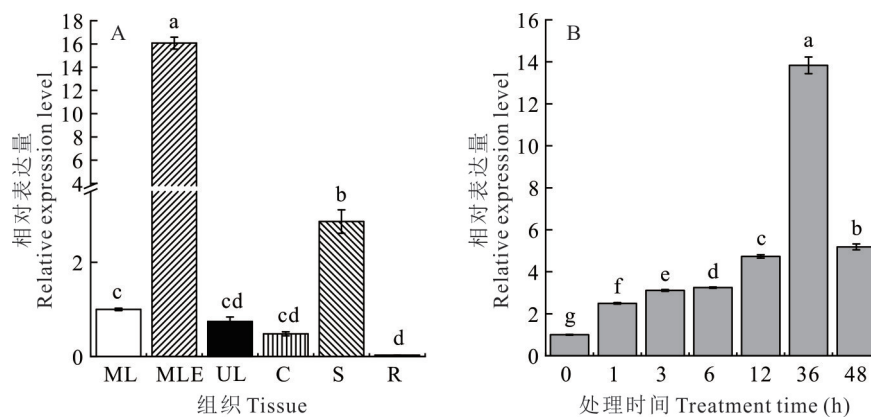


图 4 不同植物 CER6 系统进化树分析

Fig. 4 Phylogenetic tree analysis of CER6 in different plants

VrCER6: 三裂叶绿豆 *Vigna radiata* var. *radiata* CER6; FvCER6: 林地草莓 *Fragaria vesca* subsp. *vesca* CER6; MdCER6: 苹果 *Malus domestica* CER6; JcCER6: 麻疯树 *Jatropha curcas* CER6; HbCER6: 橡胶树 *Hevea brasiliensis* CER6; PeCER6: 胡杨 *Populus euphratica* CER6; CcCER6: 克莱门柚 *Citrus clementina* CER6; GrCER6: 雷蒙德氏棉 *G. raimondii* CER6; DzCER6: 榴莲 *Durio zibethinus* CER6; SiCER6: 芝麻 *Sesamum indicum* CER6; AtCER6: 拟南芥 *A. thaliana* CER6; PdCER6: 海枣 *P. dactylifera* CER6; MaCER6: 小果野芭蕉 *M. acuminata* CER6; ZmCER6: 玉米 *Zea mays* CER6; GbCER6: 银杏 *Ginkgo biloba* CER6.

图 5 *ZxCER6* 的表达模式分析Fig. 5 Expression pattern analysis of *ZxCER6*

A: 组织特异性表达模式 Tissue specific expression pattern; ML: 中层叶 Middle leaves; MLE: 中层叶表皮 Epidermis of middle leaves; UL: 上层叶 Upper leaves; C: 子叶 Cotyledons; S: 茎 Stems; R: 根 Roots. B: 50 mmol·L⁻¹ NaCl 处理下表达模式 Expression patterns under 50 mmol·L⁻¹ NaCl. 不同小写字母表示不同部位或不同处理时间下差异显著 ($P < 0.05$)。Different lowercase letters indicate significant difference among different tissues or different treatments time ($P < 0.05$).

2.6.5 干旱处理对转基因拟南芥相对质膜透性的影响 正常条件下,转基因与野生型植株的相对质膜透性无显著差异 ($P > 0.05$);而干旱处理后,不论是野生型还是转基因植株的相对质膜透性均高于对照组,野生型植株的增幅高达 137%。这说明干旱处理后转 *ZxCER6* 拟南芥株系的细胞膜受损程度显著低于野生型(图 14)。

2.6.6 *ZxCER6* 对拟南芥角质层蜡质生物合成的影响 为了解析 *ZxCER6* 在角质层蜡质合成中的作用,对野生型和 OE5、OE8、OE12 和 OE19 4 个转基因株系的莲座叶和花序茎角质层蜡质的组成和含量进行了分析(图 15

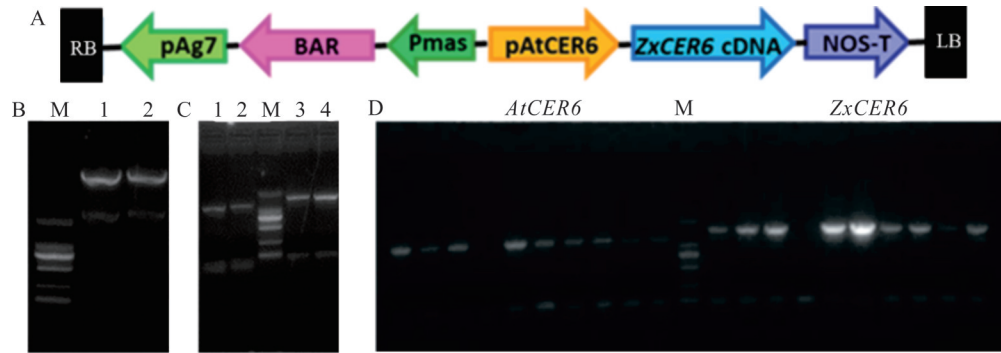


图6 植物表达载体的构建

Fig. 6 Construction of plant expression vector

A: 植物表达载体 *pBIB-BASTA-pAtCER6::ZxCER6* 构建示意图 Schematic diagram of plant expression vector *pBIB-BASTA-pAtCER6::ZxCER6* construction. B: *pBIB-BASTA-35S-GWR-FLAG* 基础载体 *Hind* III 和 *Sac* I 双酶切电泳图谱 *pBIB-BASTA-35S-GWR-FLAG* *Hind* III and *Sac* I double enzyme electrophoresis; 1, 2: 双酶切电泳条带 The electrophoretic bands of double enzyme. C: *AtCER6* 和 *ZxCER6* 分别加入 *Hind* III 和 *Sac* I 酶切位点电泳图谱 *AtCER6* and *ZxCER6* join *Hind* III and *Sac* I enzyme electrophoresis; 1, 2: *AtCER6* 电泳条带 *AtCER6* electrophoretic bands; 3, 4: *ZxCER6* 电泳条带 *ZxCER6* electrophoretic bands. D: *AtCER6* 和 *ZxCER6* 菌液 PCR 电泳图谱 PCR electrophoresis of *AtCER6* and *ZxCER6* strains.

和图 16)。在正常条件下,与野生型相比,OE5、OE8、OE12 和 OE19 转基因植株莲座叶总蜡质含量分别增加了约 69%、56%、87% 和 73%,其中,4 个转基因株系的烷烃含量较野生型分别增加了 96%、85%、129% 和 110%(图 15A)。同时发现转基因株系中的奇数碳链烷烃含量显著高于野生型($P < 0.05$),特别是 C29 烷烃,在 OE12 转基因植株中的含量与野生型相比增加了 1.6 倍(图 15B)。而在野生型和 4 个转基因株系的花序茎中则发现烷烃含量较野生型显著增加($P <$

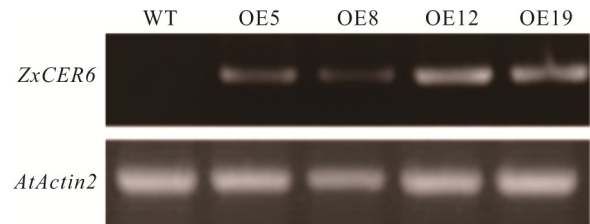


图7 转基因拟南芥中 *ZxCER6* 的 RT-PCR 检测

Fig. 7 RT-PCR detection of *ZxCER6* in transgenic *Arabidopsis*

WT: 野生型拟南芥植株 Wild type *Arabidopsis* plants; OE5, OE8, OE12, OE19: 转基因拟南芥株系 Transgenic *Arabidopsis* lines; *AtActin2*: 内参基因 Internal gene. 下同 The same below.

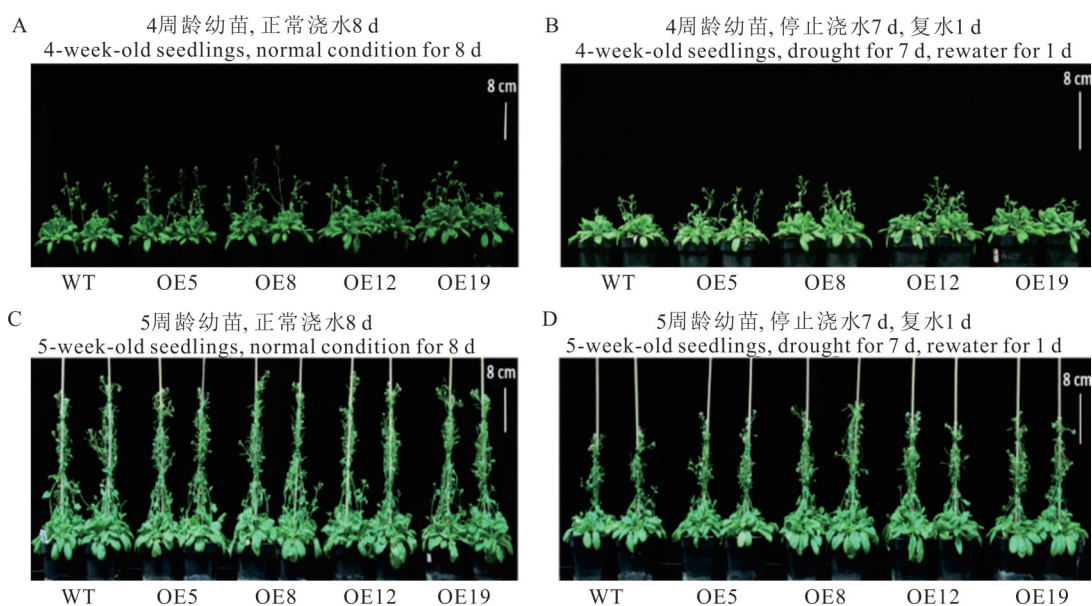


图8 不同干旱周期下野生型和 *ZxCER6* 转基因拟南芥的生长状态

Fig. 8 The growth state of wild type and *ZxCER6* transgenic *Arabidopsis* under different drought periods

图 A 和 B 分别为第 1 个干旱周期对照及处理;图 C 和 D 分别为第 2 个干旱周期对照及处理。A: The first drought period control; B: The first drought period; C: The second drought period control; D: The second drought period.

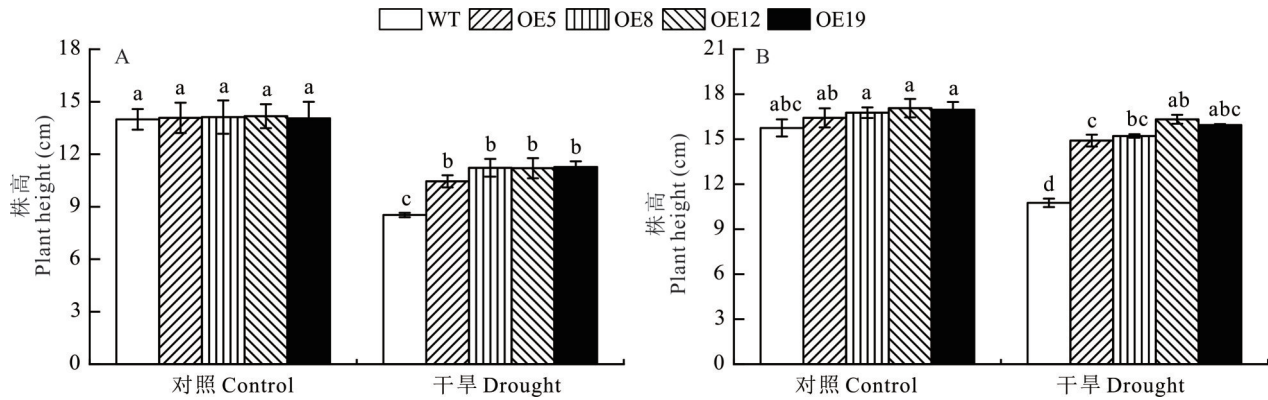


图 9 不同干旱周期下野生型和 *ZxCER6* 转基因拟南芥植株株高

Fig. 9 The plant height of wild type and *ZxCER6* transgenic *Arabidopsis* under different drought periods

A: 第 1 个干旱周期 The first drought period; B: 第 2 个干旱周期 The second drought period. 不同小写字母表示野生型和不同转基因株系在不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)。Different lowercase letters indicate that WT and different transgenic lines have significant differences among different treatments ($P < 0.05$). 下同 The same below.

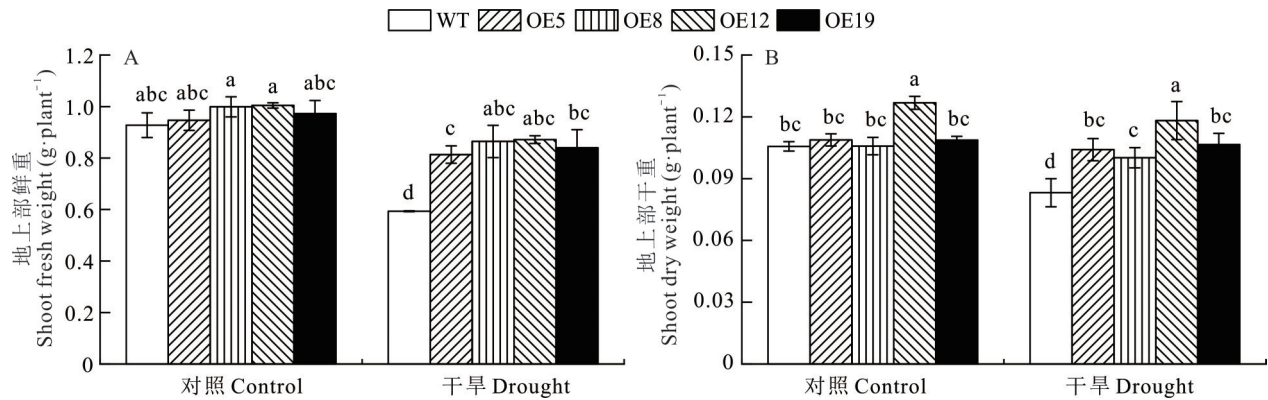


图 10 第 2 个干旱周期下野生型和 *ZxCER6* 转基因拟南芥植株地上部干鲜重

Fig. 10 Shoot dry and fresh weight of wild type and *ZxCER6* transgenic *Arabidopsis* in the second drought periods

0.05, 图 16A)。以上结果表明, *ZxCER6* 的超表达主要影响了蜡质合成中的醛脱羧基合成途径, 从而使烷烃大量积累。

在干旱胁迫下, 与野生型相比, OE5、OE8、OE12 和 OE19 4 个转基因株系植株的莲座叶和花序茎中总蜡质含量分别增加了 54%、39%、94%、55% 和 26%、23%、35%、34%。其中转基因株系莲座叶中烷烃含量较野生型增加了 81%~114%; 而花序茎中增幅较低, 为 49%~56% (图 15C 和图 16C)。同时, 干旱胁迫下, 转基因拟南芥较野生型莲座叶中 C29 烷烃含量分别增加 98%、76%、169% 和 104%; 而花序茎中 C29 烷烃则分别增加了 56%、54%、60% 和 58% (图 15D 和图 16D)。以上结果表明, 干旱胁迫诱导了烷烃的大量合成, 从而增加了蜡质在地上部的积累。

3 讨论

角质层蜡质在植物应对各种生物和非生物胁迫中起着重要作用。目前对植物角质层的研究主要以角质层并不发达的中生植物为对象, 对旱生植物发达的角质层形成机制及其在适应逆境过程中的作用研究尚处于起步阶段。β-酮脂酰辅酶 A 合成酶 (KCS) 作为脂肪酸延伸反应的限速酶, 在蜡质前体物质 VLCFAs 的合成过程中发挥着关键作用。到目前为止, *KCS6/CER6* 的功能研究较为清楚。*CER6 (CUT1)* 的拟南芥沉默植株茎中的角质层蜡质含量仅是野生型的 6%~7%, 蜡质组分分析表明, 其脱羧基途径受到严重抑制, C30 醛、C29 烷烃、C29 次级醇和 C29 酮的含量分别为野生型的 3.5%、2.2%、1.4% 和 2.2%。同时也发现, 转基因植株中初级醇含量为野生型

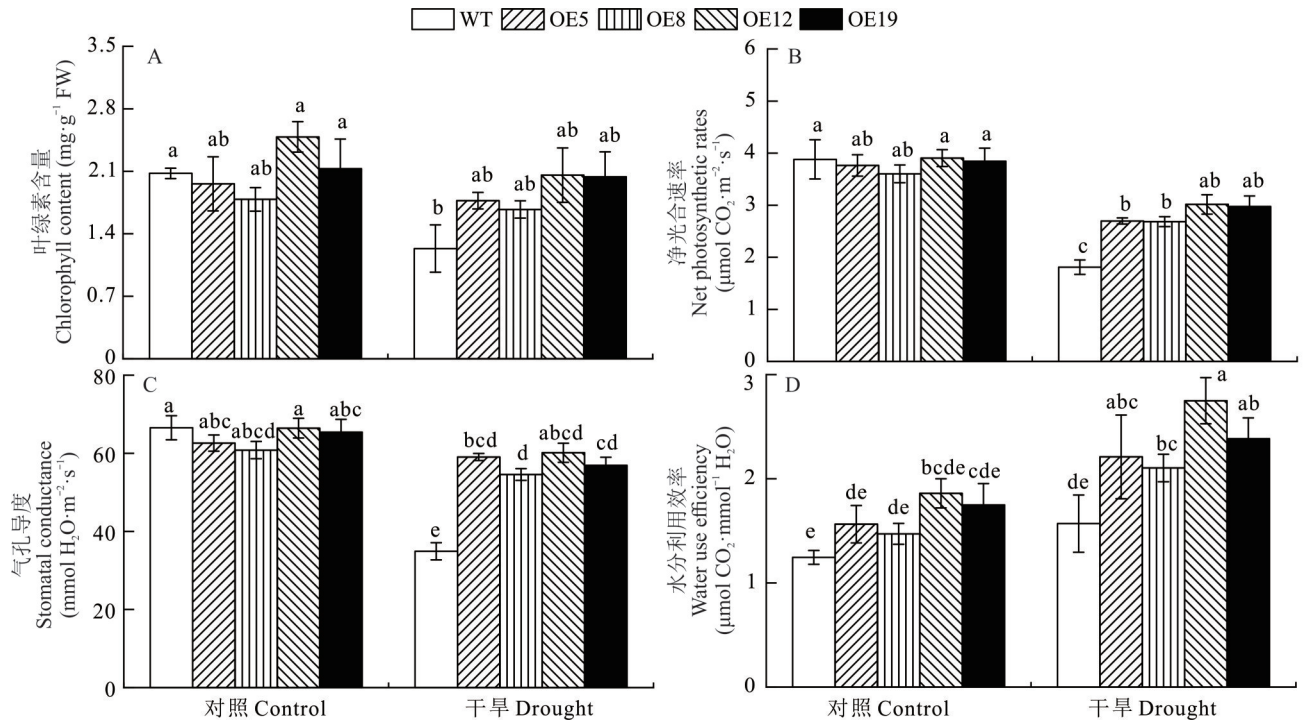


图 11 第 2 个干旱周期下野生型和 *ZxCER6* 转基因拟南芥叶片叶绿素含量和光合参数分析

Fig. 11 Analysis of chlorophyll content and photosynthesis index between wide type and *ZxCER6* transgenic *Arabidopsis* in the second drought period

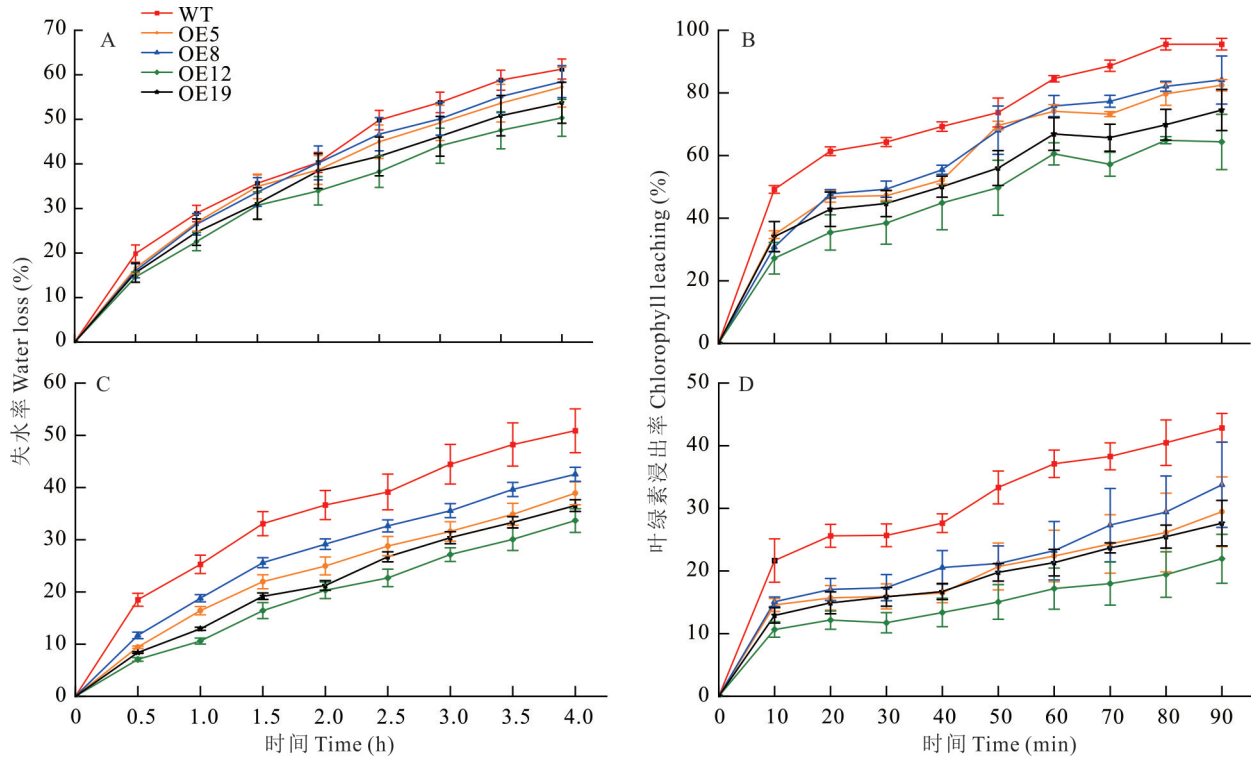


图 12 野生型和 *ZxCER6* 转基因拟南芥叶片的角质层透性

Fig. 12 Cuticle permeability of wide type and *ZxCER6* transgenic *Arabidopsis* leaves

正常条件(A、B)和第2个干旱周期下(C、D)野生型和 *ZxCER6* 转基因拟南芥叶片失水率(A、C)及叶绿素浸出率(B、D)。Water loss rate (A, C) and chlorophyll leaching rate (B, D) of wild type and *ZxCER6* transgenic *Arabidopsis* leaves under control (A, B) and the second drought period (C, D). 数值为平均值±标准误($n=5$)。Data are mean±standard error ($n=5$).

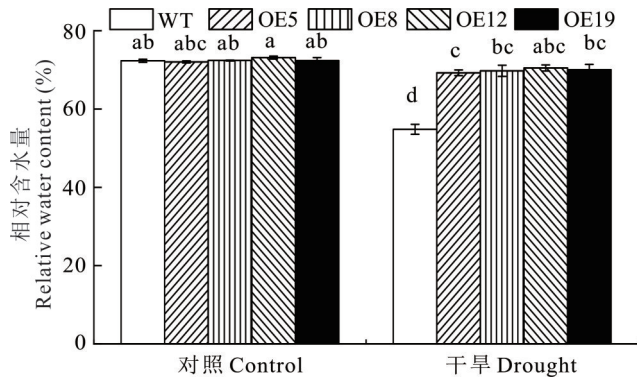


图 13 野生型和 *ZxCER6* 转基因拟南芥叶片相对含水量
 Fig. 13 Relative water content of wide type and *ZxCER6* transgenic *Arabidopsis* leaves

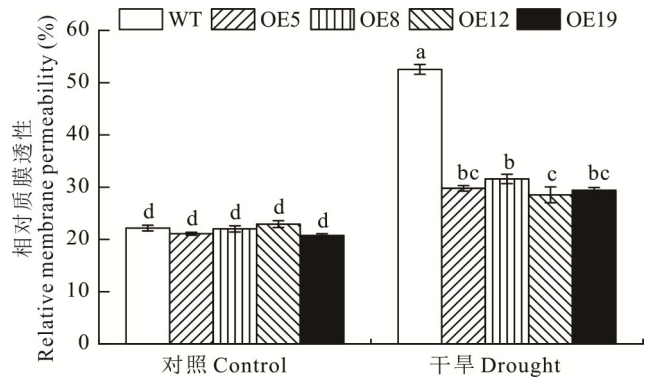


图 14 野生型和 *ZxCER6* 转基因拟南芥叶片相对质膜透性
 Fig. 14 Relative membrane permeability of wide type and *ZxCER6* transgenic *Arabidopsis* leaves

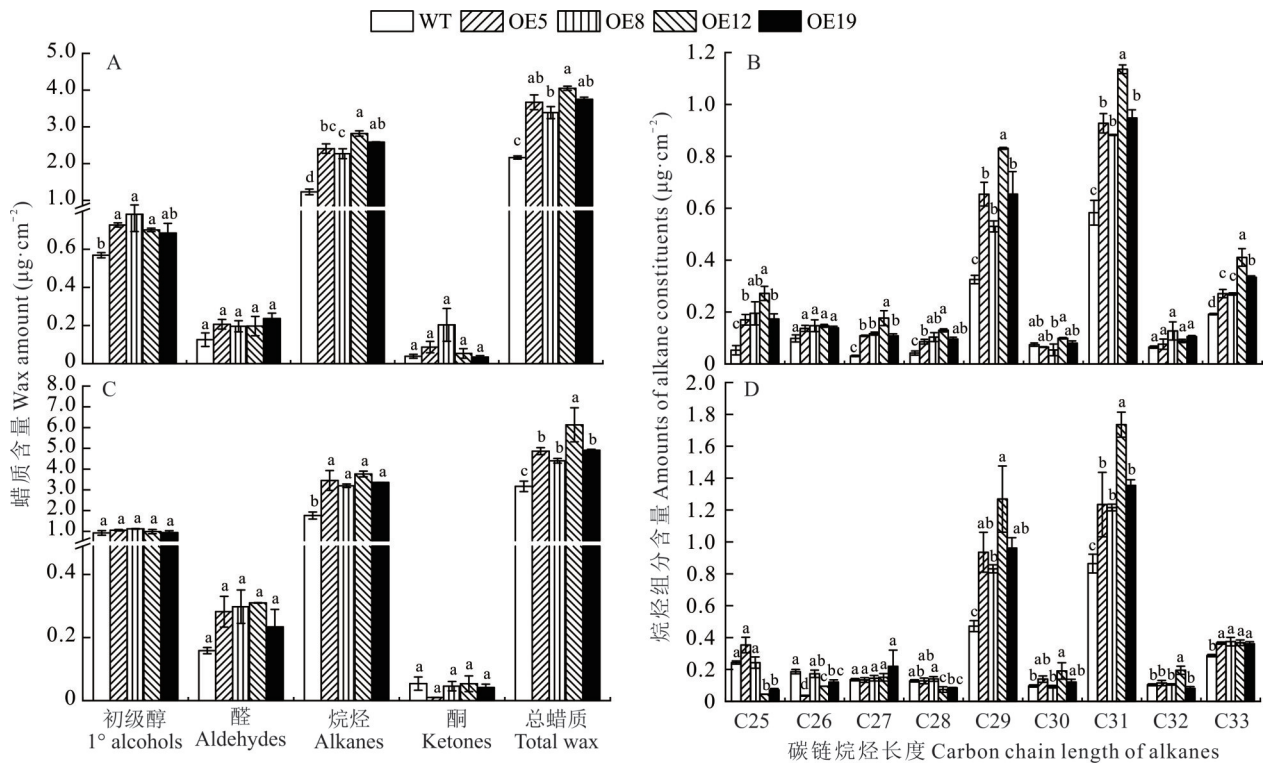


图 15 野生型和 *ZxCER6* 转基因拟南芥莲座叶中角质层蜡质含量及不同碳链长度烷烃组分含量
 Fig. 15 Wax amount and amounts of different chain alkane constituents on rosette leaves of wide type and *ZxCER6* transgenic *Arabidopsis*

正常条件(A、B)和第2个干旱周期下(C、D)野生型和 *ZxCER6* 转基因拟南芥莲座叶角质层蜡质含量(A、C)及不同碳链长度烷烃组分含量(B、D)。Wax amount (A, C) and amounts of different chain alkane constituents (B, D) on rosette leaves of wild type and *ZxCER6* transgenic *Arabidopsis* under control (A, B) and the second drought period (C, D). 不同小写字母表示各株系之间差异显著($P < 0.05$)。下同。Different lowercase letters indicate significant difference among the lines ($P < 0.05$). The same below.

的 45%^[34]。在番茄 *LeCER6* 转座子插入突变体中,叶片和果实缺乏链长超过 C30 的正构烷烃和醛类^[11,35]。水稻中分离得到的 *AtCER6* 同源基因 *OsWSL4* 在水稻中超表达后,转基因植株叶片的蜡质含量比野生型增加了 30.3%,其中 C30~C34 VLCFAs、C32 初级醇和 C27~C33 烷烃在转基因系中均有增加^[36]。因此, *CER6* 同时影响着蜡质合成的两条途径,尤其对脱羧基途径影响较大。本研究克隆到的霸王 *ZxCER6* 与其他植物基因编码的氨基酸序列同源性均在 90% 以上,属于 *CER6* 亚家族。并且具有 KCS 家族特有的 Cys-His-Asn 催化基序,高度保守的半胱氨酸(Cys)是第一步缩合的酰基受体,该蛋白通过两个疏水跨膜结构域锚定在内质网膜上发挥作

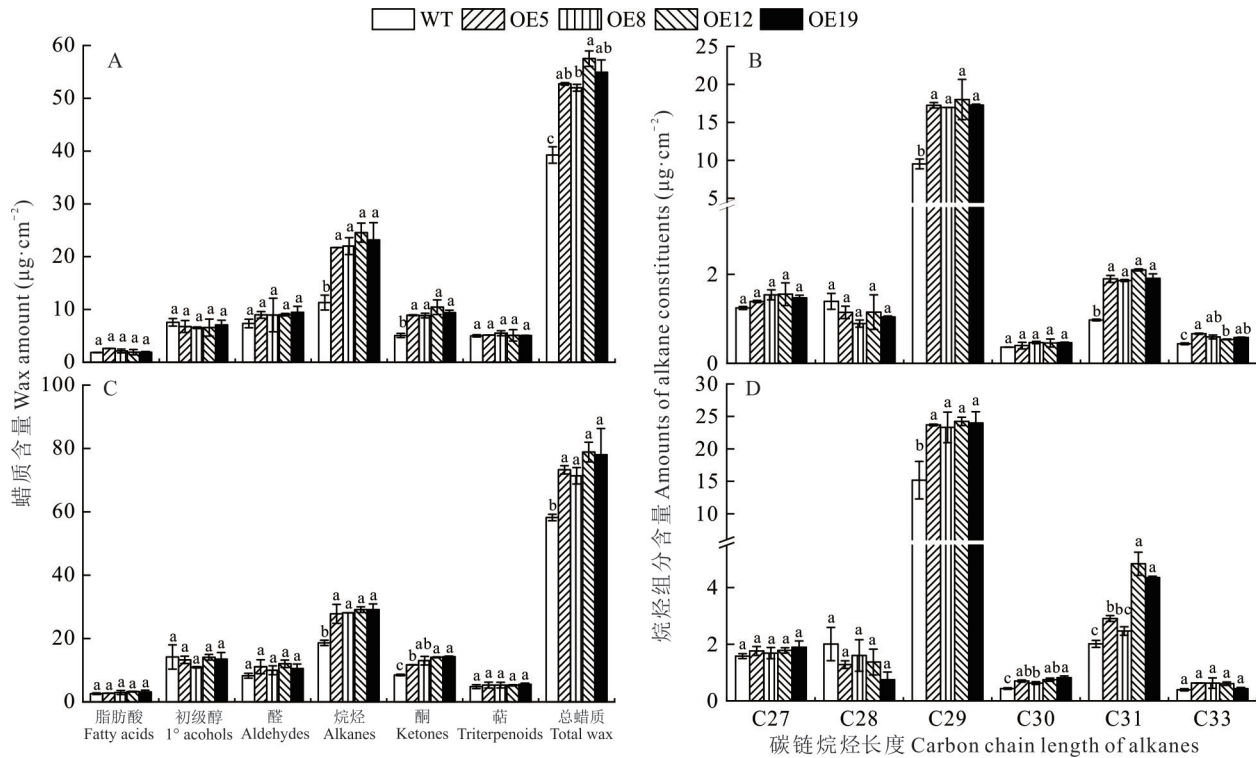


图 16 野生型和 *Zx*CER6 转基因拟南芥花序茎角质层蜡质含量及不同碳链长度烷烃组分含量

Fig. 16 Wax amount and amounts of different chain alkane constituents on inflorescence stems of wild type and *Zx*CER6 transgenic *Arabidopsis*

正常条件(A、B)和第2个干旱周期下(C、D)野生型和 *Zx*CER6 转基因拟南芥花序茎角质层蜡质含量(A、C)及不同碳链长度烷烃组分含量(B、D)。Wax amount (A, C) and amounts of different chain alkane constituents (B, D) on inflorescence stems of wild type and *Zx*CER6 transgenic *Arabidopsis* under control (A, B) and the second drought period (C, D).

用^[37-38]。系统发育分析显示, *Zx*CER6 与来自双子叶植物物种的其他 CER6 蛋白聚集在一起, 特别与拟南芥 *At*CER6 的亲缘关系最近(图4)。与 Hooker 等^[10]通过 RT-PCR, 原位杂交及 β -葡萄糖苷酶(GUS)染色分析的组织特异性表达结果一致, *Zx*CER6 在植株地上部组织中高表达, 尤其是表皮细胞层。以上对霸王 *Zx*CER6 蛋白的结构特征、特异性表达模式及系统发育结果分析表明, *Zx*CER6 属于 KCS 家族 CER6 亚家族, 可能参与调节霸王 VLCFAs 的生物合成。进一步研究发现, 与野生型相比, 转 *Zx*CER6 拟南芥植株莲座叶总蜡质含量增加了 56%~87%, 烷烃含量增加了 85%~129%(图 15A, B), 其蜡质含量的增加主要是由于 C29、C31、C33 的超长链烷烃的显著变化使角质层蜡质总量显著增加, 因此本研究推测 *Zx*CER6 可能参与了超长链烷烃的生物合成。*Zx*CER6 在拟南芥中超表达, 主要影响了蜡质合成中的醛脱羧基合成途径, 从而使烷烃大量积累, 这与拟南芥 *At*CER6 的表达介导了蜡质中脂肪酸向烷烃的转变一致^[39]。

外源基因在植物体内的表达受启动子的影响, 对目的基因的靶向表达和功能发挥起重要作用。早期研究发现, *p35S::AtCER6* 的过表达使 CER6 mRNA 水平升高, 但未能促进蜡质积累或组分的改变^[14]。但在 *AtCER6* 启动子的驱动下, *CER6/CUT1* 过表达导致拟南芥茎中蜡质增加, 并且通过荧光定量分析比较了 35S 启动子和 CER6 启动子的活性, 发现 CER6 启动子在转基因拟南芥中高度活跃^[40]。Jiang 等^[21]在拟南芥 *AtCER6* 启动子驱动 *MtWXP1* 表达的转基因紫花苜蓿植株中发现, CER6 启动子驱动的转基因株系与 *CaMV35S* 启动子驱动的转基因株系之间总蜡质含量没有显著差异, 但生长发育正常。同样, 本研究利用拟南芥 *AtCER6* 启动子驱动 *Zx*CER6 在拟南芥中表达, 发现 4 个转基因拟南芥株系莲座叶和花序茎中角质层蜡质含量均显著高于野生型, 分别增加了 56%~87% 和 32%~47%(图 15A 和图 16A); 但与野生型相比生长并无明显差异(图 8)。因此, 利用表皮特异性启动子驱动蜡质合成相关基因在植物中的表达以增加其蜡质含量, 从而提高植物抗旱性, 是一种非常有

效的转基因手段。

众多研究表明,角质层蜡质在植物抵御环境胁迫中发挥重要作用。角质层蜡质含量增加可以增强抗旱性已在转基因拟南芥^[41-42]、紫花苜蓿^[20, 43]、亚麻芥(*Camelina sativa*)^[44]和落花生(*Arachis hypogaea*)^[45]等中得到了验证。本研究表明,在干旱处理后,4个转 *ZxCER6* 拟南芥株系莲座叶和花序茎中角质层蜡质含量均较野生型分别增加了 39%~94%, 23%~35%(图 15C 和图 16C)。 *ZxCER6* 转基因株系 OE5、OE8、OE12 和 OE19 的烷烃含量显著高于野生型,其中转基因株系莲座叶中烷烃含量较野生型增加了 81%~114%, C29 烷烃含量分别增加了 98%、76%、169% 和 104%。同时转 *ZxCER6* 拟南芥植株角质层的水分散失和叶绿素浸出比野生型更慢(图 12)。这表明 *ZxCER6* 的超表达增加了转基因拟南芥烷烃的大量合成和积累,从而更加有效地阻止水分流失,增强了植株的抗旱性。

4 结论

本研究克隆得到霸王 β -酮脂酰辅酶 A 合成酶编码基因 *ZxCER6*, 该基因 cDNA 全长 1548 bp, 编码 496 个氨基酸, 属于缩合酶超家族。与双子叶植物的 CER6 蛋白同源性较高, 均包含 2 个高度保守的跨膜区, 具有 KCS 家族特异的 Cys-His-Asn 催化基序, 其中 Cys224 是高度保守的酶催化位点。 *ZxCER6* 在植株地上部组织的表达量较高, 尤其在叶表皮中高丰度表达, 且受 50 mmol·L⁻¹ NaCl 处理的强烈诱导。干旱处理后, 转 *ZxCER6* 拟南芥表皮烷烃的大量合成促进了角质层蜡质积累, 降低了表皮透性, 从而增强了转基因拟南芥的保水性, 进而提高其抗旱性。

参考文献 References:

- [1] Rossak M, Smith M, Kunst L. Expression of the *FAE1* gene and *FAE1* promoter activity in development seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 2001, 46(6): 717–725.
- [2] Costaglioli P, Joubès J, Garcia C, et al. Profiling candidate genes involved in wax biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* by microarray analysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2005, 1734(3): 247–258.
- [3] Joubès J, Raffaele S, Bourdenx B, et al. The VLCFA elongase gene family in *Arabidopsis thaliana*: Phylogenetic analysis, 3D modeling and expression profiling. *Plant Molecular Biology*, 2008, 67(5): 547–566.
- [4] Todd J, Post-Beittenmiller D, Jaworski J G. *KCS1* encodes a fatty acid elongase 3-ketoacyl-CoA synthase affecting wax biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 1999, 17(2): 119–130.
- [5] Lee S B, Jung S J, Go Y S, et al. Two *Arabidopsis* 3-ketoacyl CoA synthase genes, *KCS20* and *KCS2/DAISY*, are functionally redundant in cuticular wax and root suberin biosynthesis, but differentially controlled by osmotic stress. *The Plant Journal*, 2009, 60(3): 462–475.
- [6] Pruitt R E, Vielle-Calzada J P, Ploense S E, et al. *FIDDLEHEAD*, a gene required to suppress epidermal cell interaction in *Arabidopsis*, encodes a putative lipid biosynthetic enzyme. *Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America*, 2000, 97(3): 1311–1316.
- [7] Gray J E, Holroyd G H, van der Lee F M, et al. The *HIC* signalling pathway links CO₂ perception to stomatal development. *Nature*, 2000, 408(6813): 713–716.
- [8] Fiebig A, Mayfield J A, Chau S, et al. Alterations in *CER6*, a gene identical to *CUT1*, differentially affect long chain lipid content on the surface of pollen and stems. *Plant Cell*, 2000, 12(10): 2001–2008.
- [9] Jenks M A, Tuttle H A, Eigenbrode S D, et al. Leaf epicuticular waxes of the *eceriferum* mutants in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 1995, 108(1): 369–377.
- [10] Hooker T S, Millar A A, Kunst L. Significance of the expression of the *CER6* condensing enzyme for cuticular wax production in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2002, 129(4): 1568–1580.
- [11] Leide J, Hildebrandt U, Reussing K, et al. The developmental pattern of tomato fruit wax accumulation and its impact on cuticular transpiration barrier properties: Effects of a deficiency in a β -ketoacyl-coenzyme A synthase (*LeCER6*). *Plant Physiology*, 2007, 144(3): 1667–1679.
- [12] Richardson A, Boscarì A, Schreiber L, et al. Cloning and expression analysis of candidate genes involved in wax deposition along the growing barley (*Hordeum vulgare*) leaf. *Planta*, 2007, 226(6): 1459–1473.

- [13] Qin Y M, Pujol F M, Hu C Y, *et al.* Genetic and biochemical studies in yeast reveal that the cotton fibre-specific *GhCER6* gene functions in fatty acid elongation. *Journal of Experimental Botany*, 2007, 58(3): 473–481.
- [14] Li H T. Cloning and characterization of the *ThCER6* gene from *Thellungiella halophila*. Jinan: Shandong Normal University, 2004.
李宏韬. 小盐芥(*Thellungiella halophila*)*ThCER6*基因的克隆与功能研究. 济南: 山东师范大学, 2004.
- [15] Wu Y H, Cao Y L, Luo J L, *et al.* Cloning and functional characterization of *KCS6* genes from *Brassica napus*. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2012, 34(6): 567–574.
武玉花, 曹应龙, 罗军玲, 等. 甘蓝型油菜中*KCS6*基因的克隆和功能分析. 中国油料作物学报, 2012, 34(6): 567–574.
- [16] Krauss P, Markstädter C, Riederer M. Attenuation of UV radiation by plant cuticles from woody species. *Plant Cell Environment*, 1997, 20(8): 1079–1085.
- [17] Sieber P, Schorderet M, Ryser U, *et al.* Transgenic Arabidopsis plants expressing a fungal cutinase show alterations in the structure and properties of the cuticle and postgenital organ fusions. *The Plant Cell*, 2000, 12(5): 721–737.
- [18] Karaba A. Improvement of water use efficiency in rice and tomato using *Arabidopsis* wax biosynthetic genes and transcription factors. Wageningen: Wageningen University & Research, 2007.
- [19] Sun Y Y. Improvement of drought and salt tolerance using *Arabidopsis* *BOUNTIFUL* and *HARDY* gene and epicuticular wax synthesis genes in tomato. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2012.
孙玉燕. 利用拟南芥 *BOUNTIFUL* 和 *HARDY* 基因以及表皮蜡质合成基因提高番茄耐旱和耐盐性. 北京: 中国农业科学院, 2012.
- [20] Zhang J Y, Broeckling C D, Blancaflor E B, *et al.* Overexpression of *WXP1*, a putative *Medicago truncatula* AP2 domain-containing transcription factor gene, increases cuticular wax accumulation and enhances drought tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa*). *The Plant Journal*, 2005, 42(5): 689–707.
- [21] Jiang Q, Zhang J Y, Guo X, *et al.* Physiological characterization of transgenic alfalfa (*Medicago sativa*) plant for improved drought tolerance. *International Journal of Plant Sciences*, 2009, 170(8): 969–978.
- [22] Wang H H, Hao J J, Chen X J, *et al.* Overexpression of rice *WRKY89* enhances ultraviolet B tolerance and disease resistance in rice plants. *Plant Molecular Biology*, 2007, 65(6): 799–815.
- [23] Islam M A, Du H, Ning J, *et al.* Characterization of *Glossy1*-homologous genes in rice involved in leaf wax accumulation and drought resistance. *Plant Molecular Biology*, 2009, 70(4): 443–456.
- [24] Wang Y H. Rice DRF2, a transcriptional activator, is involved in leaf wax synthesis. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2010.
王友华. 水稻ERF转录激活子DRF2调控叶表蜡质合成. 北京: 中国农业科学院, 2010.
- [25] Zhang Y L, Zhang C L, Wang G L, *et al.* The R2R3 MYB transcription factor MdMYB30 modulates plant resistance against pathogens by regulating cuticular wax biosynthesis. *BMC Plant Biology*, 2019, 19(1): 362.
- [26] Wang Y M, Jin S R, Xu Y, *et al.* Overexpression of *BnKCS1-1*, *BnKCS1-2*, and *BnCER1-2* promotes cuticular wax production and increases drought tolerance in *Brassica napus*. *Crop Journal*, 2020, 8(1): 26–37.
- [27] Ma Q, Yue L J, Zhang J L, *et al.* Sodium chloride improves photosynthesis and water status in the succulent xerophyte *Zygophyllum xanthoxylum*. *Tree Physiology*, 2012, 32(1): 4–13.
- [28] Zhao C X, Huang Z C. A preliminary study of xeromorphism of some important xerophytes growing in Tungeli Desert. *Acta Botanica Sinica*, 1981, 23(4): 278–283.
赵翠仙, 黄子琛. 腾格里沙漠主要旱生植物旱性结构的初步研究. 植物学报, 1981, 23(4): 278–283.
- [29] Ma Y L, Wang L, Liu Y X, *et al.* Updates on stress tolerance of main accessory structures and their synergetic interaction in desert plants. *Plant Physiology Journal*, 2015, 51(11): 1821–1836.
马亚丽, 王璐, 刘艳霞, 等. 荒漠植物几种主要附属结构的抗逆功能及其协同调控的研究进展. 植物生理学报, 2015, 51(11): 1821–1836.
- [30] Li H J, Bai W P, Liu L B, *et al.* Massive increases in C31 alkane on *Zygophyllum xanthoxylum* leaves contribute to its excellent abiotic stress tolerance. *Annals of Botany*, 2023, 131(4): 723–736.
- [31] Tian Y. Functional verification of *ZxABCG11* from *Zygophyllum xanthoxylum* and genetic transformation to alfalfa (*Medicago sativa* L.). Lanzhou: Lanzhou University, 2017.
田野. 霸王 *ZxABCG11* 的功能验证及其对紫花苜蓿 (*Medicago sativa* L.) 的遗传转化. 兰州: 兰州大学, 2017.
- [32] Lolle S J, Berlyn G P, Engstrom E M, *et al.* Developmental regulation of cell interactions in the *Arabidopsis* fiddlehead-1

- mutant: a role for the epidermal cell wall and cuticle. *Development Biology*, 1997, 189(2): 311–321.
- [33] Kosma D K, Bourdenx B, Bernard A, *et al.* The impact of water deficiency on leaf cuticle lipids of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2009, 151(4): 1918–1929.
- [34] 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. *Plant Cell*, 1999, 11(5): 825–838.
- [35] Vogg G, Fischer S, Leide J, *et al.* Tomato fruit cuticular waxes and the effects on transpiration barrier properties: functional characterization of a mutant deficient in a very-long-chain fatty acid β -ketoacyl-CoA synthase. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55(401): 1401–1410.
- [36] Wang X C, Guan Y Y, Zhang D, *et al.* A beta-ketoacyl-CoA synthase is involved in rice leaf cuticular wax synthesis and requires a CER2-LIKE protein as a cofactor. *Plant Physiology*, 2017, 173(2): 944–955.
- [37] Lassner M W, Lardizabal K, Metz J G. A jojoba beta-ketoacyl-CoA synthase cDNA complements the canola fatty acid elongation mutant in transgenic plants. *Plant Cell*, 1996, 8(2): 281–292.
- [38] Ghanevati M, Jaworski J G. Active-site residues of a plant membrane-bound fatty acid elongase β -ketoacyl-CoA synthase, FAE1 KCS. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2001, 1530(1): 77–85.
- [39] Busta L, Budke J M, Jetter R. Identification of β -hydroxy fatty acid esters and primary, secondary-alkanediol esters in cuticular waxes of the moss *Funaria hygrometrica*. *Phytochemistry*, 2016, 121(1): 38–49.
- [40] Suh M C, Samuels A L, Jetter R, *et al.* Cuticular lipid composition, surface structure, and gene expression in *Arabidopsis* stem epidermis. *Plant Physiology*, 2005, 139(4): 1649–1665.
- [41] Aharoni A, Dixit S, Jetter R, *et al.* The SHINE clade of AP2 domain transcription factors activates wax biosynthesis, alters cuticle properties, and confers drought tolerance when overexpressed in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2004, 16(9): 2463–2480.
- [42] 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. *Plant Physiology*, 2011, 156(1): 29–45.
- [43] Zhang J Y, Broeckling C D, Sumner L W, *et al.* Heterologous expression of two *Medicago truncatula* putative ERF transcription factor genes, *WXP1* and *WXP2*, in *Arabidopsis* led to increased leaf wax accumulation and improved drought tolerance, but differential response in freezing tolerance. *Plant Molecular Biology*, 2007, 64(3): 265–278.
- [44] Lee S B, Kim H, Kim R J, *et al.* Overexpression of *Arabidopsis MYB96* confers drought resistance in *Camelina sativa* via cuticular wax accumulation. *Plant Cell Reports*, 2014, 33(9): 1535–1546.
- [45] Lokesh U, Venkatesh B, Kiranmai K, *et al.* Overexpression of β -ketoacyl-CoA synthase1 gene improves tolerance of drought susceptible groundnut (*Arachis hypogaea* L.) cultivar K-6 by increased leaf epicuticular wax accumulation. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 9(11): 1869.