文章编号:1000-7601(2022)06-0056-07 **doi**:10.7606/j.issn.1000-7601.2022.06.06

干旱和盐胁迫对向日葵叶片蜡质积累的影响及蜡质烷烃合成基因的克隆

隗正阳,安沛沛,吴洪启,刘　乐,肖恩时,景　兵,王中华

(西北农林科技大学农学院,陕西 杨凌 712100)

摘　要:植物表皮蜡质在植物逆境胁迫响应中发挥重要作用。为了研究干旱和盐胁迫对向日葵叶片蜡质积累的影响,对三周龄向日葵分别进行干旱和盐胁迫处理,7 d 后提取蜡质并利用气相色谱-质谱联用仪进行分析。结果表明:向日葵幼苗叶片蜡质主要由初级醇、烷烃和脂肪酸组成,其含量分别占蜡质总含量的 79%、10%和 9%。干旱和盐胁迫均没有改变向日葵幼苗叶片蜡质的组成,但是能够显著提高蜡质总含量,与对照相比,分别增加了 8.8%和 8.5%。所有蜡质组分中,烷烃含量变化最大,分别在干旱和盐胁迫后较对照增加了 62.5%和 47.0%,表明了向日葵幼苗叶片蜡质组分中,烷烃积极响应干旱和盐胁迫。为进一步研究参与向日葵蜡质烷烃合成的基因,在向日葵基因组中进行同源检索,共获得 6 个差异表达的候选基因,克隆了两个在叶片中表达水平较高的 *HaCER1-1* 和 *HaCER3-1*。测序结果显示,*HaCER1-1* 和 *HaCER3-1* 编码区长度分别为 1 869 bp 和 1 674 bp,编码 622 个和 557 个氨基酸的蛋白质。利用 qRT-PCR 技术进一步分析了 NaCl 和 PEG 溶液处理下 *HaCER3-1* 的表达水平,结果显示,在处理后的 12 h 时,*HaCER3-1* 在叶片中的表达分别增加了 11 倍和 3.5 倍,表明 *HaCER3-1* 的表达受到干旱和盐胁迫的诱导。本研究为解析向日葵蜡质响应渗透胁迫和烷烃合成机制奠定了分子基础。

关键词:向日葵;烷烃;基因表达;干旱胁迫

中图分类号:S565.5　　**文献标志码**:A

Effects of drought and salt stresses on leaf wax accumulation and cloning of wax alkane synthesis genesin sunflower (*Helianthus annuus* L.)

WEI Zhengyang, AN Peipei, WU Hongqi, LIU Le, XIAO Enshi, JING Bing, WANG Zhonghua

(*College of Agriculture*, *Northwest Agriculture and Forestry University*, *Yangling*, *Shaanxi* 712100, *China*)

Abstract: Cuticular wax plays an important role in plant stress response. To study the effects of drought and salt stresses on wax accumulation of sunflower leaves, three-week-old sunflower plants were separately treated with drought and salt stresses. After seven days, leaf wax was extracted and analyzed by using gas chromatography-mass spectrometry. The results showed that the leaf wax of sunflower seedlings was mainly composed of primary alcohols, alkanes and fatty acids, which accounting for 79%, 10% and 9% of the total wax content, respectively. Drought and salt stresses did not alter the composition of leaf wax in sunflower seedlings, but resulted in a significant increase in the total wax content by 8.8% and 8.5% respectively compared to the control. Among all wax components, the content of alkanes was the most influenced and increased by 62.5% and 47.0% compared to the control after drought and salt stresses, respectively. This indicated that alkanes in sunflower seedling leaves were more sensitive to drought and salt stresses than other wax components. To further study the genes involved in wax alkane formation in sunflower, a homology search was performed in the sunflower genome, and six differentially expressed candidate genes were obtained, in which *HaCER1-1* and *HaCER3-1* with higher expression levels in leaves were cloned. The sequencing results showed that the coding regions of *HaCER1-1* and *HaCER3-1* were 1 869 bp and 1 674 bp in

收稿日期:2022-01-03　　**修回日期**:2022-03-21

基金项目:国家特色油料产业技术体系向日葵杨凌综合试验站项目(CARS-14-2-21);国家自然科学基金项目(31601335);陕西省重点研发项目(2022NY-073)

作者简介:隗正阳(1994-),男,河南驻马店人,硕士生,研究方向为作物分子生物学。E-mail:1950168901@qq.com

通信作者:王中华(1969-),男,宁夏人,教授,主要从事作物适应性和品质的分子生物学和遗传育种研究。E-mail:zhonghuawang@nwsuaf.edu.cn
景兵(1983-),男,山西运城人,副教授,主要从事特色油料作物遗传育种和栽培技术研究。E-mail:jingbing@nwsuaf.edu.cn

length, encoding proteins of 622 and 557 amino acids, respectively. The expression levels of *HaCER3-1* under the treatments of sodium chloride solution and PEG6000 solution were further analyzed by qRT-PCR technology. The results showed that the expression levels of *HaCER3-1* in leaves were up-regulated by 11 times and 3.5 times at 12 h after treatments, indicating that the expression of *HaCER3-1* was induced by drought and salt stress. This study provides some molecular foundation for dissecting the mechanisms of sunflower wax in response to osmotic stress and alkane biosynthesis.

Keywords: sunflower; alkane; gene expression; drought stress

植物表皮蜡质覆盖在植物表皮细胞最外层,是由超长链脂肪酸及其衍生的醇、烷烃、醛、酮等组成的疏水性混合物,其主要功能是限制植物非气孔水分流失,进而提高植物抗旱性[1-3]。同时表皮蜡质还可使植物免受紫外线伤害及减少植物表面空气污染物的沉积,在植物育性、植物-病原菌互作方面也具有重要作用[4-7]。

植物叶表皮蜡质的积累是植物体内重要的生理过程,受环境胁迫的影响较为严重[8]。通常情况下,干旱和盐胁迫能够导致叶片蜡质显著增加。Kosma 等[5]研究发现,干旱和盐胁迫 8d 后拟南芥叶片蜡质总含量分别增加了 80%和 75%;所有蜡质组分中,烷烃含量增加最明显,可分别增加 98%和 93%。这种变化与角质层渗透性降低有关,并且可能有助于植物在水分缺失条件下生长。同样,干旱胁迫后胡杨、盐生水芹和番茄等植物叶片蜡质明显增加,而这种变化也是由烷烃组分含量增加导致[9-11]。以上研究表明,蜡质组分中烷烃在植物响应干旱和盐胁迫中起着重要作用。然而,烷烃作为植物表皮蜡质的重要组成成分,其合成的具体机制仍不清楚[12-13]。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和玉米(*Zea mays*)相应突变体中的研究证明了 CER1 和 CER3 及其同源基因在烷烃合成中的重要作用,拟南芥中改变 CER1(At1G02205)和 CER3(At5G57800)的表达都直接影响其烷烃含量[7]。在豌豆(*Pisum sativum*)和蓝藻(*Cyanobacteria*)的研究中证明烷烃的合成需要两个步骤:首先脂酰辅酶 A 还原酶将脂酰辅酶 A 转化为中间体醛,然后醛脱羰基酶催化中间体醛脱羰基生成烷烃[14-15]。基于蓝藻中烷烃合成的步骤及拟南芥突变体表型的研究,CER1 蛋白被认为是一种催化醛脱羰基酶,而 CER3 蛋白被认为是一种可以将脂酰辅酶 A 还原为醛的酶[6, 7]。Bernard 等[16]利用改造的酵母证明了 CER1 和 CER3 蛋白能够相互作用形成二聚体酶复合物,并在辅助因子 CYTB5 的促进作用下将脂酰辅酶 A 转化为烷烃。

向日葵(*Heliauthus annuus* L.)是我国干旱、半干旱地区的重要油料作物,干旱、盐胁迫能够导致向日葵产量和种子含油量大幅下降,是限制向日葵生产的主要因素[17]。目前关于向日葵表皮蜡质与干旱和盐胁迫的研究鲜有报道,因此探究胁迫条件下向日葵表皮蜡质的变化,挖掘表皮蜡质相关合成基因的工作尤为必要。本研究拟分析向日葵叶片表皮蜡质的组成及其在干旱和盐胁迫下的变化,在向日葵基因组中检索到 6 个烷烃合成候选基因,分析候选基因的组织表达谱,并在向日葵叶片中克隆其中的两个候选基因 *HaCER1-1* 和 *HaCER3-1*,利用 qRT-PCR 分析 *HaCER3-1* 基因在胁迫下的表达量变化,研究成果可望为后续研究向日葵中烷烃合成机制奠定理论基础。

1　材料与方法

1.1　试验材料

供试材料为油用向日葵(*Heliauthus annuus* L.)高代自交系'SKY02R-32'。供试材料种植于 10 cm × 10 cm 的塑料花盆内,在培养箱(GDN 型,宁波)内培养,光周期为 16 h/8 h,温度为 22℃/21℃。

1.2　试验方法

1.2.1　干旱、盐胁迫下向日葵叶片表皮蜡质提取　对三周龄的向日葵进行缺水、200 mmol · L^{-1}氯化钠(NaCl)、15% 聚乙二醇 6000(PEG6000)和 H_2O(对照组)处理,除缺水处理外各溶液均取 100 mL 浇灌根系,处理一周后剪取所有叶片提取表皮蜡质,每个处理设 3 个生物学重复,利用 ImageJ 软件计算叶面积,用氯仿浸提表皮蜡质同时加入 20 μg C_{24}烷烃作为内参,浸提液过滤至烧杯内,挥发至 0.5~1.0 mL 时转移到 GC 瓶内,利用氮吹仪吹干,然后加入 40 μL 吡啶和 40 μL BSTFA[N,O-双(三甲基硅烷基三氟乙酰胺)]混匀并置于 70℃水浴锅内反应 60 min,反应结束用氮气吹干 GC 瓶内液体,最后加入 800 μL 氯仿用于气相色谱—质谱联用仪(GC-MS, GCMS-QP2010S,日本岛津)分析。

1.2.2　GC-MS 分析　利用气相色谱—质谱联用仪检测浸提的蜡质混合物获得各成分的离子峰,通过检索质谱数据库对各离子峰进行定性,利用 Lab Solution

软件对各离子峰进行积分,获得峰面积,根据 C_{24} 内标的加入量对所有成分进行定量分析。计算公式如下:

$$M=(20\cdot S_{峰})/(S_{叶}\cdot S_{内标}) \quad (1)$$

式中,M 表示表皮蜡质某一成分绝对含量(ng·cm^{-2}),$S_{峰}$表示该成分离子峰面积(cm^2),$S_{叶}$表示该样品叶片表面积(cm^2),$S_{内标}$表示 C_{24}烷烃的离子峰面积(cm^2)。

1.2.3 烷烃合成候选基因生物信息学分析 利用拟南芥烷烃合成基因 *AtCER1*(AT1G02205)和 *AtCER3*(AT5G57800)序列在向日葵数据库(https://www.heliagene.org/)中检索相应同源基因,利用在线工具 Pfam(http://pfam.xfam.org)分析蛋白结构域并利用 TBtools 作图,运用 MEGA6 软件的邻位相连法构建系统进化树。

1.2.4 烷烃合成候选基因表达模式分析 在向日葵转录组数据库(https://lipm-browsers.toulouse.inra.fr/plants/FATAL/cgi/HELAN.cgi)中下载烷烃合成候选基因的表达谱数据,利用 TBtools 软件对数据进行可视化。

1.2.5 *HaCER1-1* 和 *HaCER3-1* 的克隆 利用 Primer Premier 5 进行引物设计(表1),以'SKY02R-32'叶片 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,将扩增产物纯化回收后备用。利用 Xba Ⅰ 酶将 pCAMBIA2300 载体线性化,用无缝克隆试剂盒(DT101-01,DiNing,北京)将目的片段与载体连接后转化大肠杆菌感受态 DH5α,进行抗性筛选,挑选单克隆,PCR 鉴定后送往上海生工生物股份有限公司测序。测序正确的菌液扩大培养后用质粒小提试剂盒(StarPrep,GenStar,北京)提取质粒"pCAMBIA2300-HaCER1"和"pCAMBIA2300-HaCER3"。

1.2.6 NaCl 和 PEG 处理下 *HaCER3-1* 的表达分析 分别用 200 mmol·L^{-1}NaCl(溶剂为 H_2O)、15% PEG6000 和 H_2O(对照组)100 mL 浇灌四叶期向日葵幼苗,处理 3、6、12、24 h 时剪取叶片,每个处理取 3 个生物学重复,利用 RNA 提取试剂盒(贝贝生物科技有限公司)提取 RNA,反转录合成 cDNA(Vazyme,南京)用于 qRT-PCR 分析,使用 QuantStudio3(美国)进行 qRT-PCR 分析,每个反应设置 3 个技术重复,反应体系及反应程序按照北京康润诚业生物科技有限公司的实时荧光定量试剂盒(A311,康润诚业,北京)说明书确定。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算基因的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 干旱、盐胁迫下向日葵叶片表皮蜡质分析

为了研究干旱及盐胁迫对向日葵幼苗表皮蜡质的影响,提取了胁迫处理后向日葵的叶表皮蜡质进行了 GC-MS 分析。图1 显示,正常状态下三周龄向日葵幼苗叶片表皮蜡质主要成分为初级醇、烷烃和脂肪酸等,初级醇含量达到 0.988 μg·cm^{-2},约占叶片蜡质总量的 70%~80%,烷烃含量为 0.12 μg·cm^{-2},占 10%~14%,脂肪酸含量为 0.114 μg·cm^{-2},占 9%~13%。初级醇共鉴定到 6 种,烷烃鉴定到 11 种,脂肪酸鉴定到 6 种。碳链长度分析结果显示,初级醇的碳链长为 22-34;烷烃碳链长为 25-35,C_{27}和 C_{29}烷烃含量最高;脂肪酸碳链长为 16-28。缺水、氯化钠和 PEG 的处理均能提高向日葵叶片表皮蜡质总量,且缺水和氯化钠处理下表皮蜡质总量升高最为显著,分别提高了 8.8%和 8.5%,其中升高的主要是烷烃和脂肪酸的含量,缺水和盐胁迫处理下,烷烃单位叶面积升高量分别为 62.5%和 47%,脂肪酸升高量为 45%和 49%(表2)。

2.2 烷烃合成候选基因生物信息学分析

利用拟南芥烷烃合成基因 *AtCER1*(AT1G02205)和 *AtCER3*(AT5G57800)序列在向日葵基因组中进行同源比对,共获的 3 个 *AtCER1* 同源基因和 3 个 *AtCER3* 同源基因,将其命名为 *HaCER1-1*(HanXRQr2_Chr16g0763931)、*HaCER1-2*(HanXRQr2_Chr15g0714831)、*HaCER1-3*(HanXRQr2_Chr13g0570411)、*HaCER3-1*(HanXRQr2_

表1 研究中使用的引物

Table 1 Primers used in the study

引物名称 Primer name	正向引物(5'-3') Forward primer	反向引物(5'-3') Reverse primer	用途 Application
H1	GGATCCCTATCGATTATGGCTACCACTCCTGGATTTC	CCTTTGCCCATGGCTTTAGTTTGATTTGGTTATAGG	*HaCER1-1* 的克隆 Cloning of *HaCER1-1*
H3	GGATCCCTATCGATTATGCTTTTCATAAATCGAAATC	CCTTTGCCCATGGCTTTAAACCGGCTTGAACCCATGT	*HaCER3-1* 的克隆 Cloning of *HaCER3-1*
qH3	GAGCCATCGCCCTTTACT	TCCATTTGCCAATTATCCA	qRT-PCR
HaActin	ATCAGGAGACAGATGAAAGCG	CCCAAAGTACACCTGGTCAAG	内参基因 Actin

表 2　不同处理下向日葵叶片表皮蜡质各组分的含量

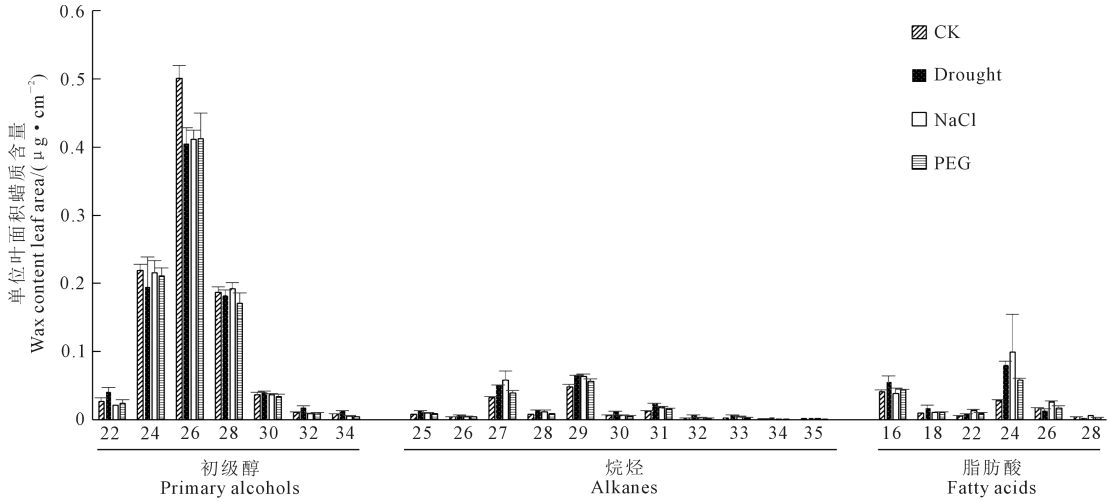
Table 2　The content of the cuticular wax compositions in sunflower leaves/(μg · cm^{-2})

组分 Component	对照 CK	干旱 Drought	氯化钠 NaCl	聚乙二醇 PEG
脂肪酸 Fatty acids	0.114±0.021	0.165±0.025*	0.170±0.003	0.134±0.004
烷烃 Alkanes	0.120±0.012	0.195±0.014**	0.176±0.021*	0.140±0.006*
初级醇 Primary alcohols	0.988±0.004	0.957±0.046	0.972±0.023	0.979±0.010
其他 Others	0.027±0.002	0.041±0.004*	0.037±0.005	0.032±0.003*
总量 Total load	1.249±0.030	1.359±0.003*	1.356±0.029*	1.284±0.009

注:* 表示差异显著($P<0.05$),** 表示差异极显著($P<0.01$)。

Note: * represents significant difference ($P<0.05$), ** represents extremely significant difference ($P<0.01$).

Chr02g0049271)、*HaCER3 - 2*(HanXRQr2_Chr06g0262671)和 *HaCER3 - 3*(HanXRQr2_Chr05g0202951)。氨基酸序列分析发现这 6 个序列与其他物种中的同源序列都含有两个完整的保守结构域-脂肪酸脱氢酶超家族(FA_hydroxylase)和 Wax2_C(图 2),说明这两个结构域对于烷烃的合成至关重要。系统进化树分析表明 3 个 HaCER1 蛋白能够与其他物种 CER1 同源蛋白聚为一类;3 个 HaCER3 蛋白同样与其他 CER3 同源蛋白聚为一类;*HaCER3-1* 与拟南芥 *AtCER3* 的进化关系最近;同时向日葵的这 6 个蛋白与双子叶植物亲缘关系更近(图 2)。



注:柱形图下方各数字表示该化合物所含碳原子数

Note: Number below in each column is the carbon atom number of thecorresponding chemical compound

图 1　干旱、盐胁迫下向日葵叶片表皮蜡质主要组分

Fig.1　Main components of sunflower leaf cuticular wax under drought and salt stress

2.3　烷烃合成候选基因表达模式分析

通过转录组数据库获得各基因在不同组织中表达的 RPKM 值,结果显示 6 个基因在根中的表达都很低,在茎中只有 *HaCER3-1* 和 *HaCER3-2* 表达,在叶片中 *HaCER1-1* 和 *HaCER3-1* 两基因的表达量最高,可能参与了叶片中烷烃的合成。而在向日葵花冠中 *HaCER1-2*、*HaCER1-3*、*HaCER3-2* 和 *HaCER3-3* 均有较高的表达量(图 3)。

2.4　*HaCER1-1* 和 *HaCER3-1* 的克隆

对候选基因 *HaCER1-1* 和 *HaCER3-1* 进行 PCR 扩增后,其目的片段与预期大小一致,约 1 700 bp。经测序两个基因的 CDS 序列分别为 1 869 bp 和 1 674 bp(图 4),分别包含一个完整开放阅读框,编码氨基酸个数分别为 622 和 557。

2.5　NaCl 和 PEG 处理下 *HaCER3-1* 的表达分析

qRT-PCR 结果表明,*HaCER3-1* 的表达受到 NaCl 和 PEG 诱导,在 12 h 内随着处理时间的增加,基因的表达量均呈逐渐上升的趋势,在第 12 h 时表达量达到最大值,200 mmol · L^{-1} NaCl 溶液的处理可以使 *HaCER3-1* 增加 10 倍以上,15% PEG6000 溶液的处理可以使其增加 3 倍以上;在第 24 h 时基因的表达量下降,但仍高于 0 h(图 5)。由此推测 *HaCER3-1* 在响应干旱及盐胁迫过程中起重要作用。

3　讨论与结论

不同植物的表皮蜡质组分及比例均有不同,拟南芥叶片表皮蜡质主要由烷烃、醇类和脂肪酸组成,小麦叶片表皮蜡质中主要为初级醇、烷烃和二酮,番茄叶片表皮蜡质主要由烷烃、初级醇和三萜类组成,糜子的表皮蜡质主要是初级醇和烷烃,约占蜡质总量的 95%[18-21]。本研究通过 GC-MS 技术分析了油葵自交系'SKY02R-32'叶片的表皮蜡质组分,发现向日葵幼苗表皮蜡质主要成分为初级醇、烷烃和脂肪酸等。

注:除向日葵外,其他物种蛋白 ID 如下 AtCER1(NP_001184890.1);AtCER1-like1(NP_171721.3);AtCER3(NP_200588.2);BnCER1(XP_013722199.1);ZmGL1(ONM55119.1);OsGL1-1(XP_015651446.1);OsGL1-2(XP_015623214.1);OsGL1-3(XP_015641638.1);OsGL1-4(XP_015627618.1);OsGL1-5(Q7XDI3.1);OsGL1-6(XP_015624738.1);OsGL1-7(CAE03390.2);CsCER1(XP_004153200.1);CsCER3(XP_004149879.1)

图 2 系统进化树和蛋白保守结构域图

Fig.2 The phylogenetic tree and protein conserved domain analysis

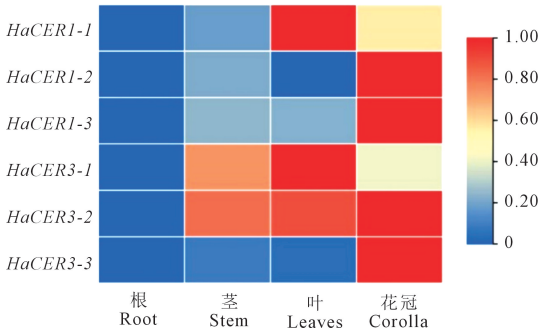


图 3 基因组织表达谱

Fig.3 Gene expression profiles in different tissues

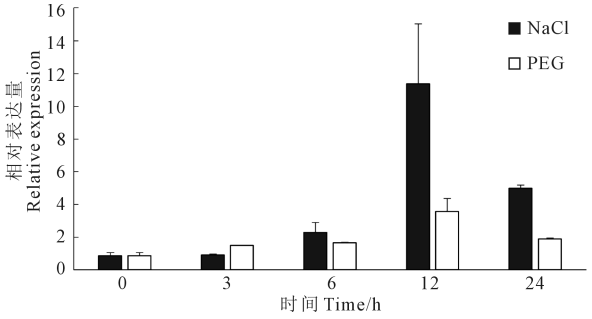


图 5 胁迫下 *HaCER3-1* 的表达量变化

Fig.5 *HaCER3-1* expression at different time under different abiotic stresses

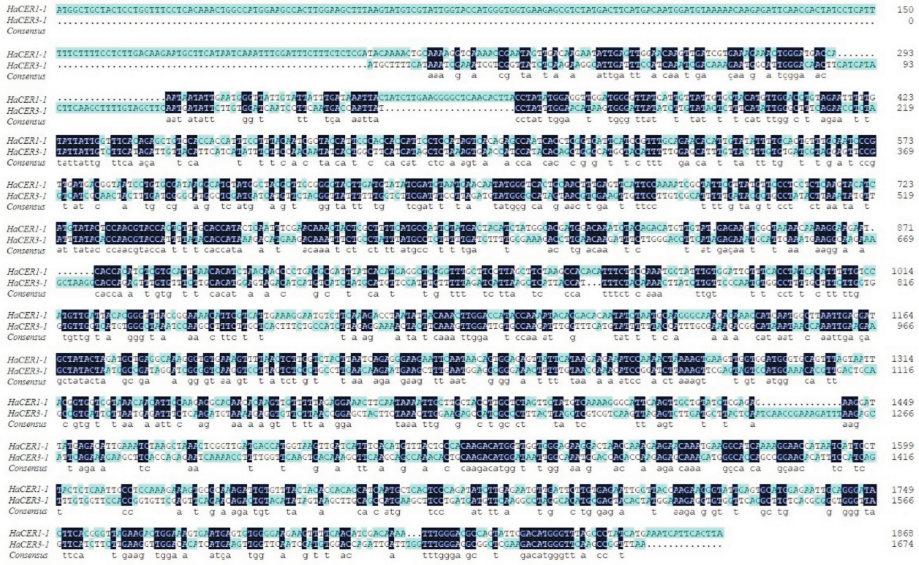


图 4 *HaCER1-1* 和 *HaCER3-1* 的序列

Fig.4 Sequences of *HaCER1-1* and *HaCER3-1*

在许多植物中干旱胁迫能够诱导植物单位叶面积表皮蜡质含量的提升,包括拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、玉米(*Zea mays*)、小麦(*Triticum aestivum*)、水稻(*Oryza sativa*)、烟草(*Nicotiana tobacum*)等[5, 22-26]。本试验对向日葵干旱及盐胁迫后的叶片表皮蜡质进行分析,发现干旱胁迫和盐胁迫均能提高向日葵叶片单位面积蜡质总量。虽然较多研究表明植物表皮蜡质与其抗旱性密切相关,但是表皮蜡质组分、结构与植物抗旱性的关系仍然缺乏深入研究[27]。Leide 等[28]发现角质层透水性与角质层的厚度无关,而是与其特定组分如烷烃有关。Parsons 等[29]在辣椒(*Capsicum annuum*)采后失水率有关的研究中同样发现,辣椒采后失水率的高低与蜡质总量无关,而与烷烃比例呈负相关。Kim 等[30]对 18 个芝麻品种进行缺水处理,之后分析了这些品种的叶片表皮蜡质变化,结果显示这些品种的叶蜡中平均 59%为烷烃,干旱胁迫后叶蜡总量增加 34%,其中主要是烷烃的增加。本研究发现干旱和盐胁迫后向日葵叶片表皮蜡质总量有明显提升,其中烷烃含量的提高最为明显,推测烷烃对向日葵响应干旱、盐胁迫,提高保水能力具有重要意义。

Eceriferum(*CER*)家族是胁迫条件下调控表皮蜡质合成的主要基因家族之一,目前 CER 基因在拟南芥、小麦、玉米、番茄(*Lycopersicon esculentum*)、黄瓜(*Cucumis sativus*)等植物中都有报道[6, 31-34]。CER1 和 CER3 蛋白被认为是烷烃合成途径的关键酶[7, 16, 35]。二者在表达模式、结构域方面有许多相似之处,如两种蛋白的 N 端都有一个富含组氨酸的结构域-脂肪酸脱氢酶超家族,C 端都有一个 WAX2 结构域[9],本研究在向日葵数据库内共检索到 3 个 CER1 同源蛋白和 3 个 CER3 同源蛋白,6 个蛋白序列均有完整的保守结构域,并且系统进化树表明 6 个蛋白与已知的 CER1 和 CER3 同源蛋白进化关系较近。通过转录组数据分析 6 个基因的表达谱,发现在根、茎和叶组织中表达的有 *HaCER1-1*、*HaCER3-1* 和 *HaCER3-2*,推测这三个基因在向日葵叶片合成烷烃的过程中起作用。本研究克隆了其中两个烷烃合成候选基因,命名为 *HaCER1-1* 和 *HaCER3-1*,其 CDS 长分别为 1 869、1 674 bp。利用 qRT-PCR 分析了 NaCl 和 PEG 处理下 *HaCER3-1* 的表达量变化,发现 *HaCER3-1* 的表达有明显的上调。因此推测 *HaCER3-1* 可能参与向日葵叶片中烷烃合成,在向日葵响应干旱和盐等胁迫,适应缺水环境的过程中具有重要作用。

干旱和盐胁迫是限制植物生产力的主要因素之一,转基因育种和分子设计育种是培育抗旱耐盐品种最经济有效的途径之一,因此发现和挖掘向日葵抗逆基因至关重要。本研究分析了向日葵幼苗叶片表皮蜡质组成及干旱、盐胁迫下其表皮蜡质的变化,并克隆了两个烷烃合成候选基因 *HaCER1-1* 和 *HaCER3-1*,利用 qRT-PCR 技术分析了胁迫下 *HaCER3-1* 的表达量变化,为后续深入研究向日葵烷烃合成的机制奠定基础。

参 考 文 献:

[1] KERSTIENS G. Water transport in plant cuticles: an update[J]. Journal of Experimental Botany, 2006, 57(11): 2493-2499.

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

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

[4] KUNST L, SAMUELS A L. Biosynthesis and secretion of plant cuticularwax[J]. Progress in Lipid Research, 2003, 42(1): 51-80.

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

[6] AARTS M G, KEIJZER C J, STIEKEMA W J, et al. Molecular characterization of the CER1 gene of *Arabidopsis* involved in epicuticular wax biosynthesis and pollen fertility[J]. The Plant Cell, 1995, 7(12): 2115-2127.

[7] CHEN X B, GOODWIN S M, BOROFF V L, et al. Cloning and characterization of the *WAX2* gene of *Arabidopsis* involved in cuticle membrane and wax production [J]. The Plant Cell, 2003, 15(5): 1170-1185.

[8] JENKS M A, EIGENBRODE S D, LEMIEUX B. Cuticular waxes of *Arabidopsis*[J].The Arabidopsis Book, 2002, 1: e0016.

[9] XU X J, FENG J C, LÜ S Y, et al. Leaf cuticular lipids on the Shandong and Yukon ecotypes of saltwater cress, Eutrema salsugineum, and their response to water deficiency and impact on cuticle permeability[J]. Physiologia Plantarum, 2014, 151(4): 446-458.

[10] XU X J, XIAO L, FENG J C, et al. Cuticle lipids on heteromorphic leaves of *Populuseuphratica* Oliv.growing in riparian habitats differing in available soil moisture[J]. Physiologia Plantarum, 2016, 158(3): 318-330.

[11] 吴洪启,罗文巧,赵帅,等.干旱胁迫对番茄叶片蜡质积累的影响[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2017,45(7):73-80.
WU H Q, LUO W Q, ZHAO S, et al. Effects of drought stress on the accumulation of wax in tomato leaves[J]. Journal of Northwest A&F University(Natural Science Edition), 2017, 45(7): 73-80.

[12] SAKURADANI E, ZHAO L F, HASLAM T M, et al. The CER22 gene required for the synthesis of cuticular wax alkanes in *Arabidopsis thaliana* is allelic to CER1[J]. Planta, 2013, 237(3): 731-738.

[13] CHAUDHARY K, GEETA R, PANJABI P. Origin and diversification

of *ECERIFERUM1* (*CER1*) and *ECERIFERUM3* (*CER3*) genes in land plants and phylogenetic evidence that the ancestral *CER1/3* gene resulted from the fusion of pre-existing domains[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2021, 159: 107101.

[14] CHEESBROUGH T M, KOLATTUKUDY P E. Alkane biosynthesis by decarbonylation of aldehydes catalyzed by a particulate preparation from *Pisum sativum*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1984, 81(21): 6613-6617.

[15] SCHIRMER A, RUDE M A, LI X Z, et al. Microbial biosynthesis of alkanes[J]. Science, 2010, 329(5991): 559-562.

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

[17] ORAKI H, ALAHDADI I, KHAJANI F P. Investigation of the effect of water deficit stress on yield and yield components in sunflower hybrids[J]. African Journal of Agricultural Research, 2011, 6(10): 2358-2363.

[18] WEN M, JETTER R. Composition of secondary alcohols, ketones, alkanediols, and ketols in *Arabidopsis thaliana* cuticularwaxes[J]. Journal of Experimental Botany, 2009, 60(6): 1811-1821.

[19] WANG Y, WANG J H, CHAI G Q, et al. Developmental changes in composition and morphology of cuticular waxes on leaves and spikes of glossy and glaucous wheat (*Triticumaestivum* L.)[J]. PLoS One, 2015, 10(10): e0141239.

[20] WANG Y, WANG M L, SUN M L, et al. FAR5, a fatty acyl-coenzyme A reductase, is involved in primary alcohol biosynthesis of the leaf blade cuticular wax in wheat (*Triticumaestivum* L.)[J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 66(5): 1165-1178.

[21] 李芮,刘晓宇,刘乐,等.糜子叶片表皮蜡质的组分及晶体结构分析[J].干旱地区农业研究,2020,38(6):7-12.
LI R, LIU X Y, LIU L, et al. Composition and crystal structure analysis of waxy cuticles in the leaves of Mimosa *chinensis*[J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2020, 38(6): 7-12.

[22] LI L, DU Y C, HE C, et al. Maize *glossy6* is involved in cuticular wax deposition and drought tolerance[J]. Journal of Experimental Botany, 2019, 70(12): 3089-3099.

[23] ZHANG Z Z, WANG W, LI W L. Genetic interactions underlying the biosynthesis and inhibition of β-diketones in wheat and their impact on glaucousness and cuticle permeability[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e54129.

[24] LAM P, ZHAO L F, EVELEIGH N, et al. The exosome and trans-acting small interfering RNAs regulate cuticular wax biosynthesis during *Arabidopsis* inflorescence stem development[J]. Plant Physiology, 2015, 167(2): 323-336.

[25] ZHU X Y, XIONG L Z. Putative megaenzyme DWA1 plays essential roles in drought resistance by regulating stress-induced wax deposition in rice[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(44): 17790-17795.

[26] CAMERON K D, TEECE M A, SMART L B. Increased accumulation of cuticular wax and expression of lipid transfer protein in response to periodic drying events in leaves of tree tobacco[J]. Plant Physiology, 2006, 140(1): 176-183.

[27] XUE D W, ZHANG X Q, LU X L, et al. Molecular and evolutionary mechanisms of cuticular wax for plant drought tolerance[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 621.

[28] 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 β-ketoacyl-coenzyme A synthase (LeCER6)[J]. Plant Physiology, 2007, 144(3): 1667-1679.

[29] PARSONS E P, POPOPVSKY S, LOHREY G T, et al. Afruit cuticle lipid composition and fruit post-harvest water loss in an advanced backcross generation of pepper (*Capsicum* sp.)[J]. Physiologia Plantarum, 2012, 146(1): 15-25.

[30] KIM K S, PARK S H, JENKS M A. Changes in leaf cuticular waxes of sesame (*Sesamumindicum* L.) plants exposed to water deficit[J]. Journal of Plant Physiology, 2007, 164(9): 1134-1143.

[31] LI T T, SUN Y L, LIU T X, et al. *TaCER1-1A* is involved in cuticular wax alkane biosynthesis in hexaploid wheat and responds to plant abiotic stresses[J]. Plant Cell & Environment, 2019, 42(11): 3077-3091.

[32] STURARO M, HARTINGS H, SCHMELZER E, et al. Cloning and characterization of *GLOSSY1*, a maize gene involved in cuticle membrane and wax production[J]. Plant Physiology, 2005, 138(1): 478-489.

[33] XIONG C, XIE Q M, YANG Q H, et al. WOOLLY, interacting with MYB transcription factor MYB31, regulates cuticular wax biosynthesis by modulating *CER6* expression in tomato[J]. The Plant Journal, 2020, 103(1): 323-337.

[34] WANG W J, ZHANG Y, XU C, et al. Cucumber *ECERIFERUM1* (*CsCER1*), which influences the cuticle properties and drought tolerance of cucumber, plays a key role in VLC alkanes biosynthesis[J]. Plant Molecular Biology, 2015, 87(3): 219-233.

[35] YEATS T H, ROSE J K C. The formation and function of plant cuticles[J]. Plant Physiology, 2013, 163(1): 5-20.