

植物角质层蜡质合成与调控的分子生物学研究进展

胡晓敏, 张志飞, 饶力群*, 黄卫

(湖南农业大学生物科学技术学院, 长沙 410128)

摘 要: 角质层覆盖于陆生植物的地上部分。沉积于其表面的外角质层蜡质组成了植物与外部环境之间的屏障。蜡质的合成是由大量酶类协同作用的结果, 又是一个积极可调控的过程。综述了近年来角质层蜡质合成与调控的分子生物学研究进展, 包括突变体筛选、基因克隆和鉴定, 以及功能基因组学研究等三方面, 并对植物蜡质代谢基因克隆鉴定中存在的问题进行了探讨。

关键词: 角质层蜡质; 突变体; 基因; 微阵列

中图分类号: Q753

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2007)04-0377-04

Molecular Biology Research Progress in the Biosynthesis and Genetic Manipulation of Plant Cuticular Wax

HU Xiao-Min, ZHANG Zhi-Fei, RAO Li-Qun*, HUANG Wei

(College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China)

Abstract: The cuticle covers the aerial organs of land plants. Epicuticular wax, deposited on the surface, constitutes a barrier between the plant and its environment. Wax biosynthesis requires the coordinated activity of a large number of enzymes with genetic manipulation. The recent progress in the mutant screening, cloning, functional characterization and expression regulation of genes involved in wax metabolism was reviewed and the existing problems were discussed.

Key words: Cuticular wax; Mutant; Gene; Microarray

所有植物的地上部分表皮细胞外都覆盖着角质层。角质层的主要功能是防止植物水分损失, 同时也是外源物质渗入和微生物入侵的有效屏障。作为植物角质层的表面部分, 植物角质层结构由外到内依次为外角质层蜡质(epicuticular wax)、包埋蜡质(intracuticular wax)和角质层基质(cutin matrix)。即角质膜由外层的高度亲脂的角质层, 向内逐渐过渡到亲水的纤维素、果胶质。

植物角质层蜡质主要由饱和极长链脂肪酸(very long chain fatty acid, VLCFA)及其衍生物组成, 还包括萜类和其它微量的次级代谢物如固醇和类黄酮类物质^[1]。外角质层蜡质是由长链(C20-C37, 少数的长可达 C50)的烷烃、伯醇、仲醇、醛、酮组成; 包埋蜡质则是由垂直于叶面的中等长链的脂肪酸(C16-C18)和长链碳氢化合物组成。作为一个复杂的过程, 植物角质层蜡质的合成以极长链脂肪酸为前体, 分为两个主要合成途径: 一是乙酰还原途

径(the acyl-reduction pathway), 主要生成伯醇和酯; 二是脂肪酸脱羧途径(the decarbonylation pathway), 主要生成醛、仲醇、烷烃和酮类。合成的产物由 ABC transporter(ATP binding cassette transporter) 输出细胞质膜, 最终由脂转运蛋白(lipid transfer proteins, LTP)运至植物角质层。

一般来讲, 更多的蜡质位于外角质层蜡质, 多呈现出绿灰色或灰白色。角质层蜡质的物理化学性质决定了其功能对植物生命活动的重要性。它限制了非气孔性的水分散失, 降低紫外线辐射损伤^[2,3], 还通过降低植物表皮的水分含量减少了灰尘、花粉和大气污染物的沉积^[4,5]。此外, 表皮蜡质还被认为在抵抗细菌和真菌病原体的侵害方面起到重要作用^[6], 并且还参与了植物与昆虫的相互作用^[7]。鉴于角质层蜡质在植物抗逆境方面的重要作用, 越来越多的研究开始关注这一领域, 并在蜡质突变体的筛选、蜡质基因克隆与功能鉴定等方面取得众多进展。

收稿日期: 2006-12-30, 修回日期: 2007-04-02。

作者简介: 胡晓敏(1982-), 男, 硕士, 研究方向为分子生物学。

* 通讯作者(E-mail: raoliquan@163.com)。

1 蜡质突变体的筛选

Dellaert 等^[8]于1979年报道了第一个拟南芥角质层蜡质突变体,并取名为 *eceriferum* (*cer*)。通过识别植株是否有白色粉状或外表是否光泽,Koornneef 等^[9]鉴定了一共位于21个拟南芥突变位点的89个蜡质突变体,这些位点包括 *CER1* 至 *CER20* (*ECERIFERUM*),及 *TT5* (*TRANSPARENT TESTA5*)。由于拟南芥基因组测序的完成和近年来 T-DNA 插入突变技术的不断完善,目前根据拟南芥茎表面白色粉状蜡质层缺失突变已筛选出120多个上表皮层突变体,代表32个突变位点^[10],而另一被广泛研究的作物大麦 (*Hordeum vulgare*) 也已被筛选出85个突变位点之多^[11]。其它物种包括玉米 (*Zea mays*)、高粱 (*Sorghum bicolor*) 和油菜 (*Brassica napus*) 中已经鉴定出有蜡质缺失突变体^[1],其中拟南芥和大麦中的突变位点被命名为 *eceriferum* (*cer*),玉米、高粱和油菜中的突变位点被称为 *glossy*。

然而,大部分蜡质突变体并未表现出蜡质代谢中间产物的积累,相反多表现为合成前体转向另一分支代谢途径,因而导致了蜡质组分的复杂变化^[11,12]。只有表皮蜡质含量变化达到一定量时,可以通过目测法筛选突变体,比如调控基因突变体和影响表皮发育的基因突变体。而单个合成酶类的突变体则难以发现。事实上,许多酶促反应步骤的基因仍未获得。对于传统的目测法来说,需要突变体的蜡质晶体密度发生一定程度的变化才能使肉眼观察到,而达不到这一阈值时则将不可避免地遗漏可能的突变体。这些遗漏的也许是占相当比例甚至是大部分的蜡质突变体。

有鉴于此,Aaron M. Rashotte 等^[13]认为目测法难以胜任对大量突变体的筛选工作。他们建立了一种更为严格的方法,即对用甲基磺酸乙酯 (ethyl methane sulfonate, EMS) 诱变的拟南芥,采用气相色谱检测花序茎的角质层蜡质主要组分的变化,为提高染色体定位的效率,他们采用了 PCR-简单序列长度多态性分析 (simple sequence length polymorphism, SSLP) 进行基因作图。通过这一方法,Aaron M. Rashotte 等^[13]从1229个样品中得到75个可能的突变体,并进一步筛选得到了3个新的拟南芥蜡质突变体: *cer22*、*cer23* 和 *cer24*。*cer22* 和 *cer23* 具有光泽的外表,而 *cer24* 与野生型外表无异。其中 *cer22* 突变体可能阻碍了 C30 醛向 C29 烷烃的转化,其茎的蜡质组分中 C30 醛的含量相对野生型上升了204%,

而 C29 烷烃、C29 仲醇和 C29 酮含量都有着不同程度的下降。在 *cer23* 突变体的茎中,C26 和 C28 伯醇的含量有极显著的上升(167% 和 194%),C30 醛、C29 烷烃、C29 仲醇和 C29 酮则普遍下降。*cer24* 突变体的茎较野生型相比,仅有 C28 和 C30 伯醇含量有显著下降,*CER24* 基因产物被认为与 C28 和 C30 脂肪酸的还原有关。

2 蜡质合成与调控基因的克隆和鉴定

经过多年的研究,虽然人们已初步了解植物角质层蜡质合成途径代谢,但是对参与植物角质层组分代谢的基因及基因调控过程却知之甚少。现在,大量的序列信息和基因组序列数据库无疑成为现今鉴定新基因有力工具。而不断克隆得到的新基因为阐明蜡质合成的遗传机制带来了新的突破。

Kunst 和 Samuels^[1]综述了植物角质层蜡质的合成与分泌过程,对已知的35个编码蜡质合成酶的基因做了一个归纳,Patricia Costaglioli 等^[14]以此为基础从公共数据库 (TIGR, TAIR, Arabidopsis Membrane Protein Library, The Arabidopsis Lipid Gene Database) 中检索得到147个相似序列作为蜡质合成基因候选基因。

2004年,Broun 等^[15]克隆了乙烯反应因子型转录因子基因 *WIN1*。在转基因拟南芥中超强表达 *WIN1*,其叶片中的蜡质含量达到对照组4.5倍以上,茎中蜡质含量也有显著增长。而许多与蜡质合成相关的基因如 *CER1*、*KCSI* 和 *CER2* 均受到 *WIN1* 诱导,这可能是由于 *WIN1* 增强了某些蜡质合成途径基因表达水平。

2004年,Pighin 等^[16]发现 ABC transporter 在蜡质穿过上皮细胞膜到植物表面的过程中起关键作用,而 *CER5* 基因编码一个位于细胞质膜的 WBC12 transporter。与其它突变体不同,*cer5* 突变体细胞质脂内含物具有一种独特结构,而这一结构竟与遗传疾病肾上腺白细胞营养不良症 (adrenoleukodystrophy, ALD) 病人出现的情况极为相似。ALD 是由一种 ABC transporter 缺陷导致的。

2005年,Sturaro 等^[17]从玉米中克隆得到 *GLOSSY1* 基因。*glossy1* 突变体无论在蜡质含量还是蜡质组成均较野生型有较大差异。*GLOSSY1* 基因预测蛋白质产物含有3个富含组氨酸区域,且与从拟南芥得到的 *WAX2* 在氨基酸顺序上具有较高的同源性(62%)。

2005年,Zhang 等^[18]从豆科模式植物蒺藜状苜

蓿(*Medicago truncatula*)中克隆得到认为编码转录因子的基因 *WXP1* 并将其转入紫花苜蓿(*Medicago sativa*)中过量表达。该基因具有一个保守的 AP2 区域,与拟南芥的 *AtRAP 2.4* 相似性较高,达到 48.8%。转 *WXP1* 的紫花苜蓿叶片中主要增加了伯醇含量,而烷烃等其它蜡质成分没有显著变化,说明 *WXP1* 主要参与蜡质合成途径中的乙酰还原途径。

2006 年,Rowland 等^[19]从拟南芥中克隆得到编码脂酰 CoA 还原酶的 *CER4* 基因。在酵母中表达 *CER4* 的 cDNA,导致 C24 和 C26 伯醇的累积。通过 RT-PCR 对该基因的表达进行分析,发现 *CER4* 在叶、茎、花、角果和根中均有表达,并专一于角质层蜡质合成。

3 拟南芥蜡质合成功能基因组学研究

分子生物学研究的重要模式植物拟南芥和重要单子叶农作物模式植物水稻的基因组测序完成后,植物生物学的研究热点已转向功能基因组学。确定大量基因的功能,并进而从整体水平研究基因及其产物在不同时间、空间和内外外部条件下形成的控制生物体代谢和发育的调节网络及活动规律是功能基因组学研究的核心问题。

虽然新的蜡质合成基因被不断克隆得到并鉴定,但是就目前为止,人们从不同植物中得到的蜡质基因数目还非常有限。为了进一步阐明蜡质合成途径,Patricia Costaglioli 等^[14]首先从拟南芥基因组中选取 147 个蜡质合成基因相似序列和 135 个编码 ABC transporter 的基因作为候选基因,以生长 15 d 的拟南芥幼苗为材料,运用微阵列技术(microarray)对这 282 个基因在植株地上部分的表达水平分类进行分析,其中 204 个基因的表达被检测到,包括 18 个酮脂酰 CoA 合成酶(beta-keto acyl-CoA synthase, KCS)、2 个酮脂酰 CoA 还原酶(beta-keto acyl-CoA reductase, KCR)、5 个反烯酰 CoA 还原酶(trans-2-enoyl-CoA reductase, ECR)、6 个脂酰 CoA 还原酶(fatty acyl-CoA reductase, FAR)、10 个蜡质合成酶(wax synthase, WS)、3 个蜡质合成酶/甘油二酯酰基转移酶双功能酶(bifunctional wax synthase/diacylglycerol acyltransferase, WS/DGAT)、37 个脂质转运蛋白(lipid transfer protein, LTP)、113 个 ABC transporter 和 10 个 CER 相关基因。这 204 个候选基因中只有 25% 的表达量达到显著水平,这大大缩小了拟南芥蜡质基因研究的范围。值得注意的是,被认为参与乙酰还原途径的 8 个 *FAR* 基因同源序

列和 12 个 *WS* 基因同源序列要么表达量很低,要么根本检测不到。也就是说在拟南芥中,乙酰还原途径中的 *FAR* 和 *WS* 基因还未被鉴定出来,或者伯醇和酯有另外的合成途径。而拟南芥共 135 个被鉴定为 ABC transporter 的编码序列中,113 个基因的表达量要低于背景值,只有 3 个高度表达,28 个为中等程度,22 个为较低程度,其中 *CER5* 基因编码的 WBC12 transporter 表达程度为低水平。这一结果证实了 Pighin 等^[15]认为在蜡质转运过程中还具有其它转运体的观点。

4 回顾与展望

植物角质层蜡质对植物生命活动的重要性促成人们对蜡质合成与调控研究的巨大关注。Kolattukudy^[20,21], von Wettstein-Knowles^[12,22]等研究先驱为我们揭示了蜡质合成的基本途径。对拟南芥和其它物种突变体的分离,结合对突变体表型的生物化学分析,为蜡质合成基因产物的分析鉴定和对大量蜡质合成基因的克隆创造了条件。然而,这些传统的遗传学方法具有较大的随机性,需要筛选大量的突变体,工作量大。到目前为止,仍有大量与蜡质合成途径有关的合成、调控和转运途径的基因尚未获得,对蜡质转运和合成调控的分子机理的了解依然不甚清楚。

要获得更多蜡质合成相关基因、了解它们在植物蜡质合成中的具体作用和地位,一方面需要对蜡质突变体筛选、基因克隆与功能分析鉴定等的传统方法加以改进;另一方面,利用基因组学工具如转录后基因沉默(post transcribed gene silencing, PTGS)或 RNA 干扰(RNAi)技术创造突变体,病毒诱导基因沉默(virus-induced gene silencing, VIGS)技术鉴定基因功能等都已展现出良好的前景。随着这些新技术的逐渐成熟和广泛应用,将为植物角质层蜡质合成机理的深入研究带来新的动力。

参考文献:

- [1] Kunst L, Samuels A L. Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax [J]. *Prog Lipid Res*, 2003, **42**: 51-80.
- [2] Kersteins G. Cuticular water permeability and its physiological significance [J]. *J Exp Bot*, 1996, **47**: 1813-1832.
- [3] Riederer M, Schreiber L. Protecting against water loss; analysis of the barrier properties of plant cuticles [J]. *J Exp Bot*, 2001, **52**: 2023-2032.
- [4] Kersteins G. Signaling across the divide: A wider perspective of cuticular structure-function relationship [J]. *Trends Plant Sci*, 1996, **1**: 125-129.

- [5] Barthlott, Nienhuis W. Purity of scared lotus or escape from contamination in biological surfaces [J]. *Planta*, 1997, **202**: 1 – 8.
- [6] Jenks M A, Joly R J. Chemically induced cuticle mutation affecting epidermal conductance to water vapor and disease susceptibility in *Sorghum bicolor* (L.) Moench [J]. *Plant Physiol*, 1994, **105**: 1239 – 1245.
- [7] Eigenbrode S D, Espelie K E. Effects of plant epicuticular lipids on insect herbivores [J]. *Ann Rev Entomol*, 1995, **40**: 171 – 194.
- [8] Dellaert L M W, van Es J Y P, Koornneef M. Eceriferum mutants in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh: II. Phenotypic and genetic analysis [J]. *Arabid Inf Serv*, 1979, **16**: 10 – 26.
- [9] Koornneef M, Hanhart C J, Thiel F. A genetic and phenotypic description of eceriferum (cer) mutants in *Arabidopsis thaliana* [J]. *J Hered*, 1989, **80**: 118 – 122.
- [10] 向建华, 陈信波, 周小云. 植物角质层蜡质基因研究进展 [J]. *生物技术通讯*, 2005, **16**: 224 – 227.
- [11] Post-Beittenmiller D. The cloned Eceriferum genes of *Arabidopsis* and the corresponding Glossy genes in maize [J]. *Plant Physiol Bioch*, 1998, **36**: 157 – 166.
- [12] von Wettstein-Knowles P. Genetics and biosynthesis of plant epicuticular waxes [A]. In: Appelqvist L A, Liljenberg L eds. *Advances in the Biochemistry and Physiology of Plant Lipids* [C]. Amsterdam: Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1979, 1 – 26.
- [13] Rashotte A M, Jenks M A, Ross A S, Feldmann K A. Novel eceriferum mutants in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Planta*, 2004, **219**: 5 – 13.
- [14] Costaglioli P, Joubès J. Profiling candidate genes involved in wax biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* by microarray analysis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, **1734**: 247 – 258.
- [15] Broun P, Poindexter P, Osborne E, Jiang C Z, Riechmann J L. *WIN1*, a transcriptional activator of epidermal wax accumulation in *Arabidopsis* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **13**: 4706 – 4711.
- [16] Pighin J A, Zheng H, Balakshin L J, Goodman I P, Western T L, Jetter R, Kunst L, Samuels A L. Plant cuticular lipid export requires an ABC transporter [J]. *Science*, 2004, **306**: 702 – 704.
- [17] Sturaro M, Hartings H. Cloning and characterization of *GLOSSY1*, a maize gene involved in cuticle membrane and wax production [J]. *Plant Physiol*, 2005, **138**: 478 – 89.
- [18] Zhang J Y, Broeckling C D. Overexpression of *WXPI*, a putative *Medicago truncatula* AP2 domain-containing transcription factor gene, increases cuticular wax accumulation and enhances drought tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa*) [J]. *Plant J*, 2005, **42**: 689 – 707.
- [19] Rowland O, Zheng H. *CER4* Encodes an Alcohol-Forming Fatty Acyl-CoA Reductase [J]. *Plant Physiol*, 2006, **142**: 866 – 877.
- [20] Kolattukudy P E. Biopolyesters of plants: Cutin and suberin [J]. *Science*, 1980, **208**: 990 – 1000.
- [21] Kolattukudy P E. Structure, biosynthesis and biodegradation of cutin and suberin [J]. *Annu Rev Plant Physiol*, 1981, **32**: 539 – 567.
- [22] von Wettstein-Knowles P. Elongase and epicuticular wax biosynthesis [J]. *Physiol Veg*, 1982, **20**: 797 – 809.