

水稻蜡质合成相关基因 *OsCER4* 自身启动子驱动的反义 RNA 转化植株获得

周玲艳¹, 姜大刚², 李 静², 周 海², 庄楚雄²
(1 仲恺农业工程学院 生命科学院, 广东 广州 510225;
2 华南农业大学 生命科学院, 广东 广州 510642)

摘要:水稻 *OsCER4* 基因编码脂肪醛脱羧酶, 与拟南芥 *CER1* 基因高度同源, 是否参与植物表面蜡质合成尚不清楚, 为了探讨其功能, 扩增了 *OsCER4* 基因起始密码子 ATG 上游约 2 kb 的序列作为该基因的启动子, 以常规技术将启动子和 *OsCER4* 基因反义片段克隆到 pCAMBIA 双元载体 1380 中, 采用农杆菌介导法转化粳稻品种中花 11, 并进行了转化苗 *OsCER4* 蛋白的表达量变化分析. 结果表明, 成功构建了由 *OsCER4* 自身启动子驱动的反义 RNA 载体, 并通过农杆菌介导法成功转入水稻中花 11 中, 多数 *OsCER4* 基因反义转化植株为阳性转化植株, 后代分离比符合 3:1, 反义 RNA 转化植株在蛋白水平上的表达量下降.

关键词:水稻; 蜡质合成相关基因; 自身启动子; 反义 RNA
中图分类号:Q751 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2013)01-0051-06

Acquisition of Wax Biosynthesis Related Gene *OsCER4* Antisense-RNA Transgenic Plants by the Cognate Promoter

ZHOU Lingyan¹, JIANG Dagang², LI Jing², ZHOU Hai², ZHUANG Chuxiong²
(1 College of Life Sciences, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China;
2 College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: *OsCER4* gene is a member of fatty aldehyde decarboxylase gene family and is highly homologous to *CER1* gene in *Arabidopsis*, however, it is still not known whether *OsCER4* participates in the synthesis of cuticular wax. A 1946-bp genomic fragment located on the upstream of the annotated ATG start codon was amplified and used as cognate promoter for antisense RNA vector construction, and a 624-bp fragment of the *OsCER4* cDNA was amplified from total RNAs isolated from Zhonghua 11, and then the cognate promoter and *OsCER4* cDNA fragments were cloned into the pCAMBIA1380 which was transformed into rice by *Agrobacterium*-mediated method. The results showed that the antisense transgene driven by the cognate promoter was constructed and transformed into rice successfully, and most of the *OsCER4* antisense RNA transgenic plants were positive and segregated as single T-DNA insertion by PCR and segregation analysis of Hyg-resistant in T₁ progeny, and the expression of *OsCER4* significantly decreased in the *OsCER4* antisense RNA transgenic plants by Western blotting.

Key words: *Oryza sativa*; wax biosynthesis related genes; cognate promoter; antisense RNA vector

植物的叶表皮位于表皮细胞的外面,由沉积的角质和蜡质组成^[1].表皮覆盖的角质和蜡质层是植物最外面的保护层,能限制植物非气孔性水分丧失,降低植物表面水分蒸发而使植物具有保水抗旱的作用,同时还可抵抗紫外线辐射,抵抗病菌和真菌侵入及防止草食性昆虫吞食等^[2-8].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.近年来,已有大量与表皮蜡质相关的分子生物学研究报告,从拟南芥 *Arabidopsis thaliana*、玉米 *Zea mays* 等植物中已经克隆了多个与蜡质合成相关的基因^[9-10],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.蜡质缺陷突变体在许多植物中得到分离,如大麦 *Hordeum vulgare*、拟南芥、玉米、高粱 *Sorghum bicolor* 和油菜 *Brassica napus*.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*^[11].化学成分分析表明,突变体的蜡质总量比野生型要少或者是其化学组成发生了很大程度的变化^[12].*CER1* 是第一个从拟南芥中克隆出的蜡质合成基因^[13],蜡质成分分析表明 *CER1* 突变体的烷烃、二级醇和酮含量显著减少,醛含量增加,*CER1* 基因被推测编码催化醛转化成烷烃的乙醛脱羧酶^[14-16].

对于蜡质合成相关基因的功能研究主要集中在拟南芥和玉米中,水稻蜡质合成相关基因的功能研究起步较晚.目前,已有 3 个水稻蜡质合成相关基因的相关功能研究报道,Jung 等^[17]从 T-DNA 插入突变体克隆了第 1 个水稻蜡质缺陷基因 *Wdal*,*Wdal* 主要在花药的表皮细胞中表达,*Wdal* 缺失突变体在花粉粒和花药壁形态以及蜡质合成方面均发生了改变.分析 *Wdal* 缺失突变体的花粉蜡质成分发现,极长链的脂肪酸、烷烃、烯烃和一级醇严重减少,认为 *Wdal* 可能参与长链脂肪酸生物合成的整个过程.而 *OsGLI-1* (*WSL2*) 主要影响叶的角质层蜡质覆盖和角质膜层厚度,*OsGLI-1* (*WSL2*) 突变体干旱敏感性提高^[18-19],蜡质成分分析表明,*OsGLI-1* (*WSL2*) 突变体中 C₂₂~C₃₂ 脂肪酸减少,认为 *OsGLI-1* (*WSL2*) 可能参与长链脂肪酸的延长^[19].*OsGLI-2* 突变体叶的表面蜡质覆盖明显减少,而过表达植株叶表面蜡质覆盖量增加,抗干旱增强,表明角质层蜡质在抗旱中起重要作用^[20].*Wdal*、*OsGLI-2* 和 *OsGLI-1* 都属于脂肪醛脱羧酶(Fatty aldehyde decarbonylase)基因家族成员,

蜡质合成相关基因 *OsCER4* 也属于该家族成员,但是否参与蜡质合成尚不清楚.在水稻基因功能研究中,基因同源启动子启动的反义 RNA 转基因相比较组成型启动子来说是一个更好的基因沉默策略^[21].本研究通过构建蜡质合成相关基因 *OsCER4* 自身启动子启动的反义 RNA 载体,通过农杆菌介导法转化水稻,并通过后代遗传分析和 Western 杂交确认获得了单位点插入、表达量下降的转基因植株,为蜡质合成相关基因 *OsCER4* 的功能研究打下坚实的基础.

1 材料与方法

1.1 材料

- 1.1.1 植物材料 粳稻 *Oryza sativa* 品种中花 11,由华南农业大学遗传工程实验室保存.
- 1.1.2 载体质粒与菌株 克隆测序载体为 pUC18,购买于 TaKaRa 公司. 二元穿梭载体为 pCAMBIA 1380,大肠埃希菌 *Escherichia coli* 菌株为 DH10B,农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 菌株为 EHA105,均由华南农业大学遗传工程实验室保存.
- 1.1.3 引物序列 引物序列见表 1.

表 1 引物序列
Tab. 1 Sequences of primers

引物名称	引物序列(5'-3')	酶切位点
<i>OsCER4</i> Pf	AAAAGGATCCGGTTTGGAGATACAATCTGTG	<i>Bam</i> H I
<i>OsCER4</i> Pr	AAAAGTCGACTAGAGCCCATGATAGCTAGC	<i>Sal</i> I
<i>OsCER4</i> Af	AAAAGTCGACTTACCATCCTCACCTGGATC	<i>Sal</i> I
<i>OsCER4</i> Ar	AAAAAAGCTTACAAGTCAAGCGACGAGCTG	<i>Hind</i> III

1.2 方法

- 1.2.1 生物信息学分析 以拟南芥 *CER1* 蛋白和 *CER1* 基因 cDNA 序列分别在 GenBank 中对水稻蛋白和基因进行 BLAST 检索,相似性分析采用软件 Clustalx 和 Mega4.1 等进行.
- 1.2.2 蜡质合成相关基因 *OsCER4* 自身启动子驱动的反义 RNA 载体构建 *OsCER4* 自身启动子驱动的反义 RNA 载体构建方法参照 Li 等^[21].以 *OsCER4*Pf、*OsCER4*Pr 为引物,以微量抽提的中花 11 DNA 为模板扩增 ATG 起始密码子上游的 1 946 bp 的基因片段,将其连接到克隆测序载体 pUC18 上.以 *OsCER4*Af、*OsCER4*Ar 为引物,水稻中花 11 幼苗 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板扩增 *OsCER4* cDNA 的 624 bp 基因片段.将 *OsCER4* 反义片段连接到启动子的下游.扩增反应体系为:10 × Buffer 3 μL, *OsCER4*Pf 引物 1 μL, *OsCER4*Pr 引物 1 μL, MgSO₄

1.2 μL,dNTP(2 mmol/L)2 μL,*Taq* 酶 1 μL,DNA 模板1 μL,ddH₂O 19.8 μL. PCR 扩增程序为:94 ℃ 5 min,94 ℃ 30 s,58 ℃ 30 s,68 ℃ 2 min,6 个循环;94 ℃ 30 s,65 ℃ 30 s,68 ℃ 2 min,27 个循环;72 ℃

10 min. *OsCER4* 启动子和 cDNA 片段均通过测序确认序列没有碱基突变.然后以 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切将 *OsCER4* 启动子和 cDNA 反义片段亚克隆到 pCambia1380 中.

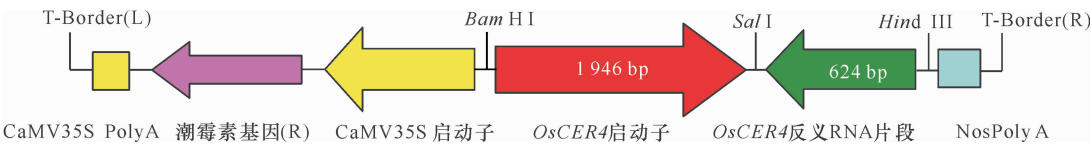


图1 *OsCER4* 反义 RNA 载体 pCambia1380:: *OsCER4P*::anti-*OsCER4* RNA 构建示意图

Fig.1 Schematic presentation of the constructed pCambia1380:: *OsCER4P*::anti-*OsCER4* RNA vector

1.2.3 *OsCER4* 反义 RNA 转化植株的获得 转化方法参见文献[22].

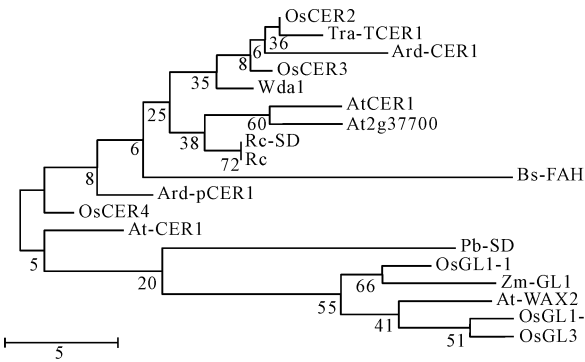
1.2.4 *OsCER4* 反义 RNA 转化植株的鉴定和分析 取转化苗 T₀ 代植株进行 DNA 微量抽提,取适量 DNA 进行 *HPT* 基因部分序列的 PCR 扩增,循环参数为:94 ℃ 4 min,94 ℃ 30 s,60 ℃ 1 min,72 ℃ 90 s,35 个循环;72 ℃ 7 min. PCR 产物于 13 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测.剪取 PCR 扩增阳性植株的 T₁ 代植株约 2 cm 左右的叶片,浸泡于含 100 mg/L 潮霉素和 1 mg/L 6-BA 的溶液中,3 d 后观察叶片的变化情况^[23].

1.2.5 *OsCER4* 反义 RNA 转化植株的 Western-blot 分析 取转化苗的叶约 0.3 g,加入 1 mL 蛋白抽提液(0.1 mol/L Tris-HCl,25 mmol/L EDTA,pH7.5)磨成匀浆,12 000 r/min 离心 10 min,取一定量的上清液进行 SDS-PAGE 电泳后,进行电转移至 NC 膜上.用封闭液(50 mmol/L Tris-HCl,pH7.5、150 mmol/L NaCl,*w* 为 5% 的脱脂奶粉)37 ℃ 封闭膜 1 h,将膜取出加入用含 *w* 为 5% 脱脂奶粉的 TBS(50 mmol/L Tris-HCl,pH7.5、150 mmol/L NaCl)稀释的一抗(自制,另文发表)37 ℃ 孵育 1 h,然后用 TTBS(50 mmol/L Tris-HCl,pH7.5、150 mmol/L NaCl, φ 为 0.1% Tween20)洗膜 5 次,每次 5 min.将膜取出后加入用 TBS(含 *w* 为 5% 的脱脂奶粉)稀释的二抗(1:10 000, Sigma),37 ℃ 孵育 1 h.接着用 TTBS(50 mmol/L Tris-HCl,pH7.5、150 mmol/L NaCl, φ 为 0.1% Tween20)洗膜 5 次,每次 5 min.最后采用 ECL 显影检测.

2 结果与分析

2.1 水稻蜡质合成相关基因 *OsCER4* 相似性分析 通过 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blastp.cgi>)进行蛋白序列相似性比对,水稻、玉米、拟南芥以及其他植物存在多个与 *OsCER4* 同源的基因.选取几个已有研究的拟南芥和玉米蜡质合成相关基因、水稻的 7 个蜡质合成相关基因以及其他植物中与 *OsCER4* 有一定相似性的基

因,通过软件 Clustalx 和 Mega4.1 等进行聚类分析,构建出进化树(图2).进化树结果表明,位于水稻第 2 染色体上的 *OsCER4* 基因以及位于水稻第 10 染色体的 Os10g0471100(*Wda1*),第 2 染色体的 Os02g0621300(*OsCER2*),第 4 染色体的 Os04g0512100(*OsCER3*)与拟南芥的 *CER1*、At2g37700 以及大麦、小麦的 *CER1* 等属于一个大类.而水稻蜡质合成相关基因 *OsGL3* (Os06g0653000)与位于水稻第 9 染色体的 Os09g0426800 (*OsGL1-1*),第 2 染色体 Os02g0178800(*OsGL1-2*)以及玉米 *GLI* 和拟南芥 *WAX2* 属于一个大类.



同源蛋白 ID: *Wda1* (NP_001064826); *OsCER2* (NP_001047459); *OsCER3* (NP_001053295); *OsCER4* (NP_001048490); *OsGL1-1* (NP_001063227); *OsGL1-2* (NP_001046080); *OsGL3* (NP_001058237); *Zm-GL1* (NP_001105247); *AtCER1* (NP_973742); *At2g37700* (NP_181306); *At-CER1* (NP_171723); *Rc-SD* (XP_002526512); *Pb-SD* (ZP_01017596); *Ard-CER1* (ABF51011); *Ard-pCER1* (ABG47420); *Tra-TCER1* (ACA14353).

图2 *OsCER4* 的聚类分析

Fig.2 Phylogenetic analysis of *OsCER4*

2.2 *OsCER4* 反义 RNA 载体构建

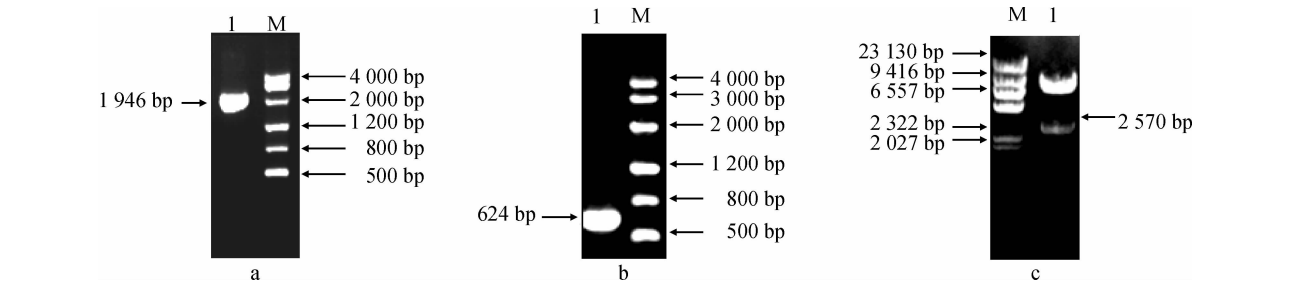
以 pUC18 为克隆载体,pCambia 1380 为表达载体,分别从中花 11 的基因组和 cDNA 中扩增 1 946 bp 的 *OsCER4* 启动子和 624 bp 的 *OsCER4* cDNA 片段.结果表明,扩增的启动子和反义片段如预期大小(图 3a、3b).将扩增的启动子和反义片段回收后,先后克隆到 pUC18 载体中,测序正确后,再亚克隆到 pCambia1380 双元表达载体,酶切电泳结果表明,成

功地构建了 *OsCER4* 反义 RNA 载体 pCAMBIA1380::*OsCER4P*::anti-RNA(图 3c).

2.3 *OsCER4* 反义 RNA 转化植株的获得

取中花 11 成熟种子灭菌后接于诱导培养基,由胚诱导而来的愈伤组织经过 3~4 次继代培养后产生淡黄色致密颗粒的胚性愈伤组织.挑取生长状态良好的胚性愈伤组织用于农杆菌浸染,浸染时间为 20 min,多余的菌液尽量以灭菌的滤纸吸干,农杆菌和愈伤组织

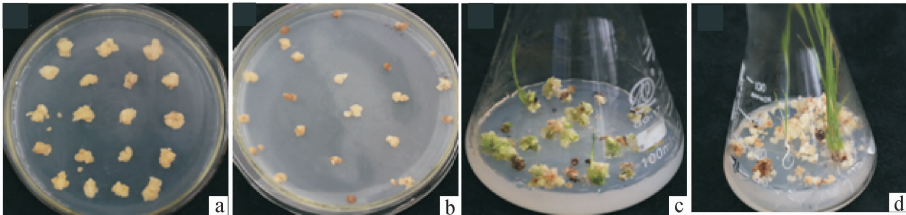
在 26℃ 黑暗条件下,共培养 2~3 d,将共培养后的愈伤组织干燥 2~3 d 后转接至含潮霉素 50 mg/L 的筛选培养基上,每 2 周继代 1 次,连续筛选 2 次.生长良好的抗性愈伤组织接入预分化培养基,约 15 d 左右将出现绿点的愈伤组织转入分化培养基,待长出小苗后再接入生根壮苗培养基,待小植株根系发育健全时取出,洗净培养基,炼苗 2~3 d 后移栽于室外.农杆菌介导的转化方法共获得 21 个转化株系(图 4).



1:目的片段;M:Marker;a:*OsCER4P* 启动子片段的扩增;b:*OsCER4* 反义片段的扩增;c:反义 RNA 载体 *CER4P*::anti-RNA 的酶切鉴定.

图 3 *OsCER4* 反义 RNA 载体的构建

Fig. 3 Construction of antisense RNA vector pCAMBIA1380::*OsCER4P*::anti-RNA



a:愈伤组织继代;b:抗性愈伤组织筛选;c:抗性愈伤预分化;d:抗性愈伤分化.

图 4 中花 11 愈伤组织及农杆菌浸染后各阶段生长情况

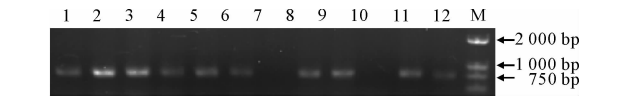
Fig. 4 Subculture calli of Zhonghua11 and infected calli in different periods

2.4 转化植株的鉴定及后代遗传分析

通过 PCR 对转化苗阳性植株进行鉴定,结果表明,获得的转化植株多数为阳性(图 5).通过以含 100 mg/L 潮霉素的水溶液对转基因植株 T_1 代植株叶片进行浸泡,可以筛选后代阳性植株,同时也可对后代的分离情况进行分析.结果表明,此方法简单可行(图 6),分析结果与 PCR 结果一致(图略),基本符合 3:1 的分离比(表 2),也说明此方法筛选后代阳性植株可行.

2.5 *OsCER4* 反义 RNA 转化植株 Western-blot 分析

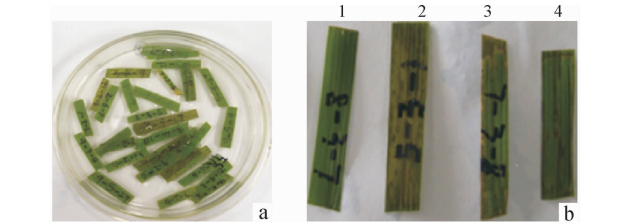
以自制的 *OsCER4* 抗体^[24]对 *OsCER4* 反义 RNA 转化植株进行 Western-blot 分析,结果表明,反义 RNA 转化植株中 *OsCER4* 在蛋白水平上明显下降(图 7),说明转 *OsCER4* 反义片段导致内源基因表达下调,从而为 *OsCER4* 功能的进一步分析研究打下基础.



1~12:转化植株;M:DL2000 marker.

图 5 *OsCER4* 反义 RNA 转化植株 T_0 代的潮霉素抗性基因 *HPT* 扩增

Fig. 5 PCR identification of *HPT* in *OsCER4* anti-RNA transgenic plants



a:潮霉素浸泡 3 d 的叶;b:浸泡结果(1:阳性植株;2,3:阴性植株;4:对照).

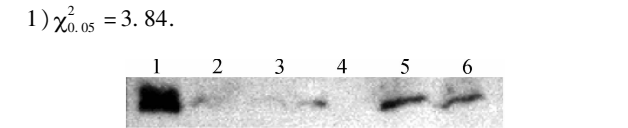
图 6 *OsCER4* 反义 RNA 转化植株 T_1 代叶的潮霉素浸泡

Fig. 6 The immersed condition of *OsCER4* anti-RNA T_1 generation transgenic plants by 100 mg/L Hyg

表 2 *OsCER4* 反义 RNA 转化植株 T₁ 代分离情况¹⁾

Tab. 2 The segregation situation of *OsCER4* anti-RNA T₁ generation transgenic plants

转化植株编号	检测的植株数量	阳性植株数	阴性植株数	χ^2
2-1	16	12	4	0.833 3
3-4	22	16	6	0
5-3	20	14	6	0.066 6
6-1	15	9	6	1.088 8
7-3	15	10	5	0.200 0
8-3	16	13	3	0.083 3
21-1	17	14	3	0.176 4



1: 中花 11; 2~6: *OsCER4* 反义 RNA 转化植株.

图 7 *OsCER4* 反义 RNA 转化植株 T₁ 代幼苗的 Western-blot 分析

Fig. 7 Western-blot of *OsCER4* anti-RNA T₁ generation transgenic plants seedlings

3 讨论

角质层蜡质在植物抵抗各种生物和非生物胁迫中起着非常重要的作用,如防止水分的非气孔性丢失^[4],抵抗病菌入侵和防止草食性昆虫吞食^[5-7],抵抗紫外辐射和霜冻等^[8]. 抵抗各种生物和非生物胁迫的角质层蜡质基因研究为改良作物抗性提供了新的途径. 近年来,人们正在研究利用蜡质相关基因提高作物产量和抗旱性. 将蜡质合成相关的转录因子 *WXP1* 转入苜蓿中,转基因植株叶的单位面积蜡质含量增加,抗旱性提高^[25]. *WXP1* 及 *WXP2* 转化拟南芥同样提高了其蜡质含量和抗水分胁迫的能力^[26]. 同时,角质层蜡质在介导花粉-柱头之间的信号识别以及影响花粉育性方面也发挥着重要作用.

CER1 是第 1 个从拟南芥中克隆出的蜡质合成基因. *CER1* 基因主要在茎、花和果实中表达,并与花粉育性密切相关^[15]. 而过表达拟南芥 *CER1* 基因可以提高植物的抗逆性^[27]. 水稻是重要的禾谷类作物,也是功能基因组研究的模式植物,但有关蜡质合成的基因研究报道较少. 我们以拟南芥 *CER1* 蛋白和 *CER1* 基因 cDNA 序列分别在 GenBank 中对水稻蛋白和基因进行 BLAST 检索,发现在水稻中主要有 7 个与蜡质合成密切相关的基因 *OsCER1/Wda1*、*OsCER2*、*OsCER3*、*OsCER4*、*OsGL1/OsGL1-1*、*OsGL2/OsGLI-2* 和 *OsGL3*, 基因编码分别为 Os10g0471100、Os02g0621300、Os04g0512100、Os02g0814200、Os09g0426800、Os02g0178800 和 Os06g0653000. 其中, *OsC-*

ER1/Wda1、*OsCER2*、*OsCER3* 和 *OsCER4* 与拟南芥的 *CER1* 相似性较高,而 *OsGL1/OsGL1-1*、*OsGL2/OsGLI-2* 和 *OsGL3* 与玉米 *GLI* 相似性较高. Jung 等^[17] 首先报道了在水稻中利用 T-DNA 插入突变体克隆了一个花药蜡质缺陷基因 *Wda1*, *Wda1* 缺失突变体在花粉粒和花药壁形态以及蜡质合成方面均发生了改变. Qin 等^[18] 以及 Mao 等^[19] 发现 *OsGL1-1* 突变体的角质层蜡质减少,对于旱敏感. Islam 等^[20] 通过蜡质合成相关基因 *OsGL1-2* 的过表达发现,蜡质的积累可增强水稻对于旱的抗性. *OsCER4* 属于脂肪酸酰化酶超家族成员,该家族成员与胆固醇的生物合成和植物角质层蜡质的生物合成相关^[15],但 *OsCER4* 是否参与了表面蜡质合成尚不清楚.

本研究构建了蜡质合成相关基因 *OsCER4* 自身启动子启动的反义 RNA 载体,通过农杆菌介导法转化水稻,并通过后代遗传分析和 Western 杂交确认获得了单位点插入、表达下降的转基因植株,为蜡质合成相关基因 *OsCER4* 的功能研究打下坚实的基础.

参考文献:

[1] JUNIPER B E, JEFFREE C E. Plant surfaces [M]. London: Edward Arnold, 1983: 93.

[2] KOLATTUKUDY P E. Biosynthetic pathways of cutin and waxes and their sensitivity to environmental stresses [C] // KERSTIENS G. Plant Cuticles: An Integrated Functional Approach. Oxford, UK: Bios Scientific Publishers, 1996: 83-108.

[3] JEFFREE C. Structure and ontogeny of plant cuticles [C] // KERSTIENS G. Plant Cuticles: An Integrated Functional Approach. Oxford, UK: Bios Scientific Publishers, 1996: 33-82.

[4] RIEDERER M, SCHREIBER L. Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles [J]. J Exp Bot, 2001, 52(363):2023-2032.

[5] JENKS M A, JOLY R J, PETERS P J, et al. Chemically induced cuticle mutation affecting epidermal conductance to water vapor and disease susceptibility in *Sorghum bicolor* (L.) moench [J]. Plant Physiol, 1994, 105(4):1239-1245.

[6] EIGENBRODE S D, ESPELIE K E. Effects of plant epicuticular lipids on insect herbivores [J]. Annu Rev Entomol, 1995, 40:171-194.

[7] JENKS M A, EIGENBRODE S D, LEMIEUX B. Cuticular waxes of *Arabidopsis* [C] // SOMERVILLE C R, MEYEROWITZ E M. The *Arabidopsis* Book. Rockville, USA: American Society of Plant Biologists, 2002: 1-22.

[8] KRAUSS P, MARKSTADTER C, RIEDERER M. Attenuation of UV radiation by plant cuticles from woody species

- [J]. Plant Cell Environ, 1997, 20:1079-1085.
- [9] KUNST L, SAMUELS L. Plant cuticles shine: Advances in wax biosynthesis and export[J]. Curr Opin Plant Biol, 2009, 12(6):721-727.
- [10] KUNST L, SAMUELS A L. Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax[J]. Prog Lipid Res, 2003, 42(1): 51-80.
- [11] POST-BEITENMILLER D. The cloned *Eceriferum* genes of *Arabidopsis* and the corresponding *Glossy* genes in maize [J]. Plant Physiol Biochem, 1998, 36(1/2):157-166.
- [12] BARTHOLOTT W, NEINHUIS C, CUTLER D, et al. Classification and terminology of plant epicuticular waxes[J]. Bot J Linn Soc, 1998, 126:237-260.
- [13] HANNOUFA A, McNEVIN J, LEMIEUX B. Epicuticular waxes of *eceriferum* mutants of *Arabidopsis thaliana* [J]. Phytochemistry, 1993, 33(3): 851-855.
- [14] JENKS M A, TUTTLE H A, EIGENBRODE S D, et al. Leaf epicuticular waxes of the *eceriferum* mutants in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 1995, 108(1):369-377.
- [15] 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]. Plant Cell, 1995, 7(12):2115-2127.
- [16] HANSEN J D, PYEE J, XIA Yiji, et al. The *glossy1* locus of maize and an epidermis-specific cDNA from *Kleinia odorata* define a class of receptor-like proteins required for the normal accumulation of cuticular waxes[J]. Plant Physiol, 1997, 113(4):1091-1100.
- [17] JUNG K H, HAN M J, LEE D Y, et al. *Wax-deficient anther1* is involved in cuticle and wax production in rice anther walls and is required for pollen development[J]. Plant Cell, 2006, 18(11):3015-3032.
- [18] QIN Baoxiang, TANG Ding, HUANG Jian, et al. Rice *OsGLI-1* is involved in leaf cuticular wax and cuticle membrane[J]. Mol Plant, 2011:1-11.
- [19] MAO Bigang, CHENG Zhijun, LEI Cailin, et al. Wax crystal-sparse leaf2, a rice homologue of WAX2/GL1, is involved in synthesis of leaf cuticular wax [J]. Planta, 2011, 235(1):39-52.
- [20] ISLAM M A, DU Hao, NING Jing, et al. Characterization of *Glossy1*-homologous genes in rice involved in leaf wax accumulation and drought resistance[J]. Plant Mol Biol, 2009, 70(4):443-456.
- [21] LI Jing, JIANG Dagang, ZHOU Hai, et al. Expression of RNA-interference/antisense transgenes by the cognate promoters of target genes is a better gene-silencing strategy to study gene functions in rice[J]. PLoS One, 2011, 6(3): 1-9.
- [22] 周玲艳,姜大刚,庄楚雄,等.基TAC载体的水稻转化系统的建立[J].遗传学报,2005,32(5):514-518.
- [23] 周玲艳,秦华明,谢振文.转基因水稻后代的遗传分析[J].湖北农业科学,2007,46(5):674-676.
- [24] 周玲艳,秦华明,庄楚雄,等.水稻蜡质基因 *OsCER4* 的原核表达及多克隆抗体制备[J].仲恺农业工程学院学报,2012,25(1):1-5.
- [25] ZHANG Jiye, BROECKLING C D, BLANCAFLOR E B, et al. 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(5):689-707.
- [26] ZHANG Jiye, BROECKLING C D, SUMNER L W, et al. Heterologous expression of two *Medicago truncatula* putative ERF transcription factor genes, *WXPI* and *WXP2*, in *Arabidopsis* led to increased leaf wax accumulation and improved drought tolerance, but differential response in freezing tolerance[J]. Plant Mol Biol, 2007, 64(3):265-278.
- [27] 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 [J]. Plant Physiol, 2011, 156(1):29-45.

【责任编辑 李晓卉】