

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.00561

# 植物超长链脂肪酸及角质层蜡质生物合成相关酶基因研究现状

倪郁<sup>1</sup>, 郭彦军<sup>2</sup>

1. 西南大学农学与生物科技学院, 重庆 400715;

2. 西南大学动物科技学院, 重庆 400715

**摘要:** 超长链脂肪酸(very long chain fatty acids, VLCFAs)在生物体中具有广泛的生理功能, 它们参与种子甘油酯、生物膜脂及鞘脂的合成, 并为角质层蜡质的生物合成提供前体物质。角质层是覆盖在植物地上部分最表层的保护层, 由角质和蜡质组成, 其中蜡质又分为角质层表皮蜡和内部蜡, 在植物生长发育、适应外界环境方面起重要作用。VLCFAs 的合成由脂肪酰-CoA 延长酶催化, 该酶是由 $\beta$ -酮脂酰-CoA 合酶、 $\beta$ -酮脂酰-CoA 还原酶、 $\beta$ -羟脂酰-CoA 脱水酶和反式烯脂酰-CoA 还原酶组成的多酶体系。合成后的 VLCFAs 通过脱羧基与酰基还原作用进入角质层蜡质合成途径, 形成各种蜡质组分。文章就 VLCFAs 及角质层蜡质合成代谢途径中相关酶基因研究进展方面做了综述, 并对植物蜡质基因研究中存在的问题提出一些看法。

**关键词:** 脂肪酰-CoA 延长酶; 角质层蜡质; 基因; 超长链脂肪酸

## Progress in the study on genes encoding enzymes involved in biosynthesis of very long chain fatty acids and cuticular wax in plants

NI Yu<sup>1</sup>, GUO Yan-Jun<sup>2</sup>

1. College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. College of Animal Science and Technology, Southwest University, Chongqing 400715, China

**Abstract:** Very long chain fatty acids (VLCFAs) play a comprehensive role in organisms. They are essential biological components in seed storage triacylglycerols (TAGs), membrane lipids, and sphingolipids. They also serve as precursors of wax layer compounds. The cuticle covers the aerial surface of land plants, which consists of cutin and wax. The wax, including amorphous intracuticular wax embedded in cutin polymer and epicuticular wax crystalloids that cover the outer plant surface, plays crucial roles in plant growth and development, and adaptation to environment. Biosynthesis of VLCFAs is catalyzed by the fatty acyl-CoA elongase, a membrane-bound enzymatic complex containing 3-ketoacyl-CoA synthase (KCS), 3-ketoacyl-CoA reductase (KCR), 3-hydroxyacyl-CoA dehydratase (HCD), and trans-2, 3-enoyl-CoA reductase (ECR). Very long chain fatty acid wax precursors flux into cuticular wax biosynthetic pathways through acyl reduction and decarbonylation, and then are converted to all kinds of wax components. This article reviews the functions of VLCFAs and cuticular wax, and the recent progress in cloning and characterization of genes encoding enzymes involved in catalyzing VLCFAs and cuticular wax biosynthesis. The problems existing in researches of wax genes are also discussed.

收稿日期: 2007-10-20; 修回日期: 2008-01-16

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973 计划)项目(编号: 2007CB108901)资助[Supported by Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (973 Program)]

作者简介: 倪郁(1975-), 女, 内蒙古赤峰人, 副教授, 博士, 研究方向: 植物生理生化与分子生物学。Tel: 023-68251264;

E-mail: nmniyu@126.com

通讯作者: 郭彦军(1974-), 男, 青海贵德人, 副教授, 博士, 研究方向: 牧草营养。Tel: 023-68251196; E-mail: qhgyj@126.com

**Keywords:** fatty acyl-CoA elongase; cuticular wax; gene; very long chain fatty acids (VLCFAs)

超长链脂肪酸(very long chain fatty acids, VLCFAs)为生物体中碳原子数超过 18C 的脂肪酸。这类脂肪酸在生物体中具有广泛的生理功能,它们参与种子甘油酯、生物膜脂及鞘脂的合成,并为角质层蜡质的生物合成提供前体物质。角质层是覆盖在植物地上部分最表层的保护层,由最外层的上表皮蜡质层和角质膜层组成。上表皮蜡质层主要由可溶性的超长链脂肪酸、烷烃、一级醇、二级醇、脂肪醛、酮类和酯类组成,是植物自我防护的最后一道屏障,在植物生长发育、适应外界环境作用方面中起重要作用。拟南芥、芸苔属植物角质层蜡质含量还与花粉育性密切相关<sup>[1,2]</sup>。脂肪酸从头合成及延长形成 VLCFAs 的机制已基本明确,参与催化合成 VLCFAs 的脂肪酰-CoA 延长酶基因的研究在近 10 年取得较大进展。角质层蜡质的生物合成需要多种酶协调作用,催化产生蜡质前体物质和多种脂肪族复合物。近年来借助许多遗传与生化分析技术的发展,如蜡质缺失突变体的分离鉴定、气相色谱/质谱分析、同位素示踪等,在以拟南芥为主要材料研究植物角质层蜡质生物合成代谢酶基因及功能研究方面取得了许多进展。

## 1 VLCFAs 合成代谢酶基因研究进展

VLCFAs 的生物合成分为两个阶段,并在细胞不同部位进行。第一个阶段是在细胞质中由可溶性的脂肪酸合成酶催化从头合成 16C/18C 的饱和脂肪酸,合成过程中不断延长的酰基碳链由酰基载体蛋白(ACP)携带。第二阶段是在内质网中由脂肪酰-CoA 延长酶催化 16C/18C 的脂肪酸延长产生不同链长的 VLCFAs,合成过程中延长的酰基碳链由 CoA 携带。脂肪酰-CoA 延长酶属于膜绑定多酶复合体,包括 $\beta$ -酮脂酰-CoA 合酶(3-ketoacyl-CoA synthase, KCS)、 $\beta$ -酮脂酰-CoA 还原酶(3-ketoacyl-CoA reductase, KCR)、 $\beta$ -羟脂酰-CoA 脱水酶(3-hydroxacyl-CoA dehydratase, HCD)和反式烯脂酰-CoA 还原酶(trans-2, 3-enoyl-CoA reductase, ECR)。

### 1.1 $\beta$ -酮脂酰-CoA 合酶(KCS)基因研究

催化 VLCFAs 合成第一步缩合反应的 KCS 被认为是延伸反应的限速酶<sup>[3,4]</sup>。第一个被分离的脂肪酰

-CoA 延长酶基因就是用转座子标签法从拟南芥突变体中克隆到的种子特异性 KCS 基因 *FAE1*。*FAE1* 位于拟南芥的第 4 条染色体上,没有内含子,只包含一个长 1 521 bp 的开放阅读框<sup>[5]</sup>。*FAE1* 在发育的胚中特异表达<sup>[6]</sup>,编码的蛋白特异性催化  $C_{20}$ 、 $C_{22}$  脂肪酸的合成<sup>[7]</sup>。之后又陆续分离得到拟南芥 *KCS1*<sup>[8]</sup>、*KCS2*<sup>[9]</sup>、*CUT1*<sup>[1]</sup>、西蒙德木(*Simmondsia chinensis*) *KCS*<sup>[3]</sup>、油菜 *FAE1*<sup>[10]</sup>、雷斯克勒(*Lesquerella fendleri*) *KCS3*<sup>[11]</sup>、苔藓类植物地衣(*Marchantia polymorpha*) *FAE2*<sup>[12]</sup>等。目前的研究表明,拟南芥 KCS 基因家族有 21 个基因成员,并根据氨基酸序列同源性可划分为 *FAE1*、*KCS1*、*FDH*、*CER6* 四个亚组(图 1)。这些 KCS 基因存在组织、器官特异性表达和底物特异性。它们对饱和的及单不饱和的  $C_{16}$ 、 $C_{18}$  脂肪酰-CoA 具有较高的活性,其中 7 个基因(*FAE1*、*KCS1*、*KCS2*、*At5g43760*、*At1g04220*、*CER60*、*At2g16280*)在酵母中异源表达后可催化 VLCFAs 合成,不同程度的积累  $C_{20}$ - $C_{30}$  脂肪酸<sup>[13,14]</sup>。拟南芥的 *KCS1* 与 *FAE1* 有 53% 的同源性,该基因在根、茎、子叶、叶、花和角果等器官中都有表达。*kcs1* 突变体叶片的长链脂类含量降低,但茎上的蜡质含量无明显变化。当 *KCS1* 表达完全受抑制时导致  $C_{26}$  至  $C_{30}$  蜡质醇、醛减少 80%<sup>[8]</sup>。*KCS1* 蛋白可能在蜡质合成的脱羧和酰基还原中起作用。*FDH* 主要在花和幼叶等器官中表达,其突变体表现出叶片、花器官发生后殖融合;在拟南芥中的超表达导致植株生长发育迟缓,植株矮化;*FDH* 编码的蛋白质能够催化脂肪族化合物的延长<sup>[15,16]</sup>。最小的亚组只有 *CER6*、*CER60* 两个基因组成。*CUT1* 是延长  $C_{24}$  超长链脂肪酸必需的,抑制 *CUT1* 基因表达导致转基因植株茎和角果的蜡质严重缺失和条件性雄性不育<sup>[1]</sup>。*cer6* 突变体花粉表面蜡质含量减少,花粉不育,但其育性在高湿度条件下部分恢复。Fiebig 等<sup>[17]</sup>克隆了 *CER6* 基因,序列分析表明,*CER6* 与 *CUT1* 为同一基因,并发现了与 *CER6*(*CUT1*) 高度同源的 *CER60*,但这两个基因的表达水平存在差异,*CER6* 的表达水平比 *CER60* 高 10 倍。*CER6* (*CUT1*) 的过量表达导致拟南芥一些植株茎表皮蜡质含量增加,因此认为 *CER6* 的表达水平是拟南芥茎表皮蜡质积累的控制因素之一<sup>[18]</sup>。*KCS1*、*FDH*、*HIC* 等 KCS 基因对拟南芥细胞、器官形态发生和环境适

应方面具有重要作用<sup>[8,15,19]</sup>。油菜中编码KCS的同功酶基因*Bn-FAE1.1*和*Bn-FAE1.2*特异性催化种子中芥酸等的合成,其中*Bn-FAE1.1*起主要作用,并主要存在于高芥酸品种中<sup>[20]</sup>。催化VLCFAs合成的延长酶基因的分离可以为利用生物技术定向调控油料作物油脂组成、提供有益脂肪酸奠定基础。

KCS基因家族主要存在于植物界,在真菌与酵母中,由ELO基因家族催化脂肪酸延长的第一步反应。酵母中分离的第一个延长酶基因是*ELO1*<sup>[21]</sup>。在动物与真菌中,ELO延长酶催化合成的VLCFAs特异性合成鞘脂<sup>[22-24]</sup>。

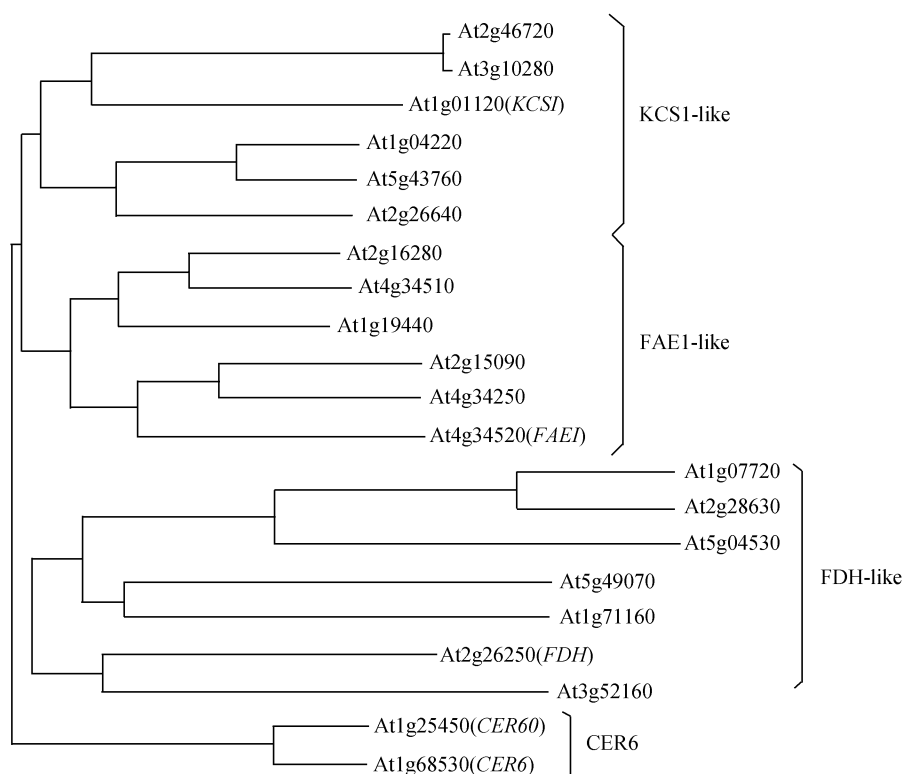


图 1 拟南芥KCS基因家族成员<sup>[25]</sup>

根据拟南芥中 21 个 KCS 基因所对应的氨基酸序列,采用 CLUSTALW (V 1.83) 和 TreeView 软件制作系统发生树。

Fig. 1 The members of the KCS family in *Arabidopsis thaliana*<sup>[25]</sup>

The dendrogram was generated using CLUSTALW (V 1.83) and TreeView softwares based on the amino acid sequences of the 21 KCS-related genes identified in the *Arabidopsis* genome.

## 1.2 $\beta$ -酮脂酰-CoA 还原酶(KCR)基因研究

对脂肪酸延长酶基因的研究主要集中在KCS上,有关延长酶系其他 3 个酶的活性及它们对微粒体脂肪酸延长酶活性和特异性的具体贡献鲜有报道。延长反应中的KCR、HCD与ECR被认为是所有微粒体脂肪酸延长酶所共有的,没有底物特异性<sup>[4]</sup>。近年来对两个还原酶基因的研究取得一些进展。第一个被分离的KCR基因是从玉米突变体*glossy8*中获得的,*GLOSSY8*在所有发育阶段与组织器官中均有表达<sup>[26,27]</sup>。Beaudoin等<sup>[28]</sup>利用生物信息学等方法鉴定出一个酵母KCR基因*YBR159W*,该基因为脂肪酸延长酶活性所需要,但非必需,*ybr159w*突变体表现为生长缓慢,对温度敏感,而由于*YBR159W*基因的缺失所

导致的致死性因酵母菌株而异。KCR的异源超表达能够使延长酶活性增强。拟南芥*Atlg67730*与酵母*YBR159W*具有同源性,且功能互补于酵母突变体*ybr159w*<sup>[28]</sup>。从甘蓝型油菜中克隆的KCR基因*Bn-KCR1*、*BN-KCR2*在植株中普遍表达,并以在种子与根系中的表达最丰富,在酵母中异源表达恢复了延长酶的活性<sup>[29]</sup>。在高芥酸油菜品种中,*Bn-FAE1*和*Bn-KCR*在种子发育阶段共表达。Qin等<sup>[30]</sup>从棉花纤维中克隆了两个KCR基因——*GhKCR1*和*GhKCR2*,二者在棉纤维中高度表达,而在根、茎、叶的表达较低,在酵母突变体*ybr159w*中表达恢复了酵母的生长速度,体外酶活性分析显示GhKCR是依赖NADPH的还原酶。

### 1.3 烯脂酰-CoA 还原酶(ECR)基因研究

Kohlwein等<sup>[23]</sup>首次从一个温度敏感、缺乏鞘脂合成的酵母突变体*tsc13*中分离了编码ECR的基因*TSC13*。该基因编码的蛋白与酵母KCS——Elo2p和Elo3p相互作用催化VLCFAs的合成,为脂肪酸延长酶活性所必需。拟南芥*At3g55360(AtTSC13)*功能互补于酵母突变体*tsc13*,编码的蛋白与Elo2p和Elo3p相互作用,在拟南芥植株中普遍表达<sup>[31]</sup>。拟南芥*cer10*突变体, T-DNA插入*At3g55360*基因内,导致鞘脂、角质层蜡与种子VLCFAs合成受阻,抑制细胞扩增,植株形态改变。这表明ECR基因产物参与VLCFAs的合成,并因此而影响由VLCFAs参与合成的鞘脂、角质层蜡与种子甘油酯的积累<sup>[32]</sup>。近年来的研究表明,鞘脂参与了细胞的很多重要过程,与细胞的生长、分化、衰老、凋亡以及应急反应等都有密切关系。酵母中催化VLCFAs合成的延长酶基因突变,积累的鞘脂大幅度下降,抑制酵母的生长<sup>[22~24]</sup>。Costaglioli等<sup>[25]</sup>在拟南芥中鉴定出4个与*AtTSC13*高度同源的基因——*At1g72590*、*At2g16530*、*At2g38050*、*At5g16010*,其中*At5g16010*在15天的幼苗中的表达比*AtTSC13*更丰富。

到目前为止,脂肪酰-CoA延长酶系统中只有编码 $\beta$ -羟脂酰-CoA脱水酶(HCD)的基因仍然未知。体外酶学试验揭示了一些有关HCD的信息。HCD的酶活性最早是在银扇草(*Lunaria annua*)和韭葱(*Allium porrum*)中通过分离延长反应中间产物—— $\beta$ -羟脂酰-CoA、反式- $\beta$ -烯脂酰-CoA而得到证实。韭葱幼苗中HCD对其催化底物R构型的 $\beta$ -羟脂酰-CoA比对S构型的底物有更强的亲和性<sup>[33]</sup>。发育中油菜籽的HCD活性通过加入表面活性剂Triton X-100而促进了底物进入酶催化中心,酶活性增强<sup>[34]</sup>。

## 2 角质层蜡合成途径酶基因研究进展

经过30多年的研究,现已基本明确植物角质层蜡合成途径。在包括拟南芥在内的大多数植物中,角质层蜡生物合成主要通过脱羰基途径与酰基还原途径进行(图2)。在拟南芥中,醛、二级醇、烷、酮等约80%的蜡质组分通过脱羰基途径产生,而一级醇、蜡酯等约20%的蜡质组分由酰基还原途径产生。

### 2.1 酰基还原途径

Kolattukudy<sup>[35]</sup>提出VLCFAs还原生成一级醇需要两个步骤,首先由依赖NADH的酰基-CoA还原酶

催化VLCFAs还原生成醛,然后由依赖NADPH的醛还原酶进一步催化醛还原生成一级醇。然而对豌豆(*Pisum sativum*)的研究表明从VLCFAs还原生成一级醇只需要脂肪酰-CoA还原酶(fatty acyl-CoA reductase, FAR)催化<sup>[36]</sup>。第一个被分离的FAR基因是从加州希蒙得木中获得的,该基因在大肠杆菌和油菜中的异源表达导致了脂肪醇的积累,并进一步证实了FAR独自催化VLCFAs还原生成一级醇<sup>[37]</sup>。根据与加州希蒙得木FAR的同源性分析,拟南芥被预测有八个FAR基因<sup>[38]</sup>。拟南芥*cer4*突变体表现出一级醇、蜡酯水平的下降和醛、烷、次级醇、酮的增加,暗示了CER4基因编码FAR。Rowland等<sup>[39]</sup>分离克隆了拟南芥CER4基因(*At4g33790*),CER4基因在拟南芥根、茎、叶、花、角果中均有表达,而

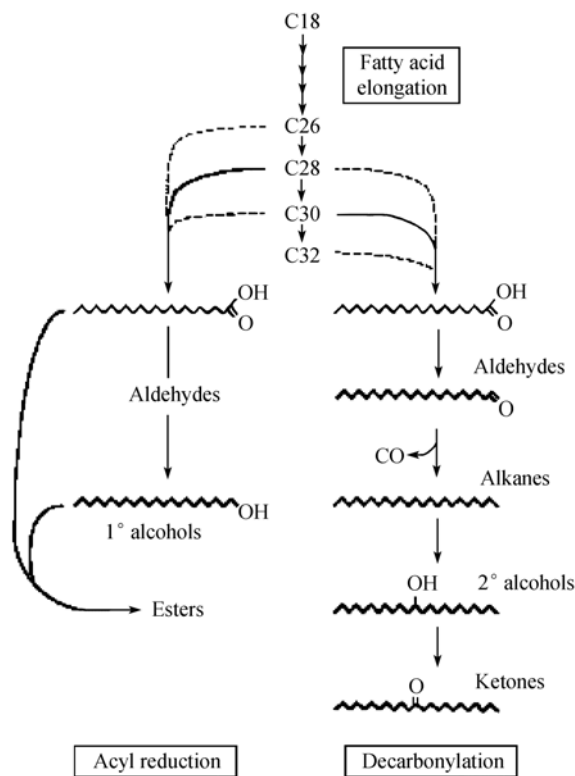


图2 拟南芥蜡质生物合成代谢途径<sup>[1]</sup>

表皮细胞 VLCFAs 通过脱羰基途径与酰基还原途径形成各种蜡质组分。前者产生醛、烷、次级醇和酮;后者产生一级醇和蜡酯。

Fig. 2 Proposed metabolic pathways for wax biosynthesis in *Arabidopsis* stems<sup>[1]</sup>

VLCFA in the epidermal cells are converted through two biosynthetic pathways to all of the other wax components. The decarbonylation pathway produces aldehydes, alkanes, secondary (2°) alcohols, and ketones, whereas the acyl reduction pathway yields primary (1°) alcohols and esters. The widths of the arrows indicate relative metabolic fluxes through different reactions.



在酵母中异源表达导致C<sub>24</sub>与C<sub>26</sub>一级醇的积累,进一步为CER4基因编码FAR提供了证据。

蜡酯的合成由脂肪醇酰基转移酶即蜡酯合成酶(wax ester synthase, WS)催化进行,从加州希蒙得木分离克隆的WS在拟南芥异源表达时,在转基因种子中检测到高水平的WS活性<sup>[40]</sup>。拟南芥中与加州希蒙得木WS同源的基因有12个,其中一些基因为拟南芥茎、叶蜡质合成所需<sup>[38]</sup>。但Costaglioli等<sup>[25]</sup>在拟南芥幼苗中没有检测到这些基因的显著表达。

## 2.2 脱羧基途径

VLCFAs前体物质进入脱羧基途径是由脂肪酰-CoA还原酶催化合成脂肪醛起始。这个还原酶的分子量和生化特性与参与酰基还原途径的FAR不同<sup>[37]</sup>。编码这个还原酶的基因目前还不确定,但有研究表明,WAX2基因可能控制从长链酰基辅酶A向醛类和角质层组分的转化。wax2突变体角质层较野生型轻20%,但厚36%;蜡质组分总量降低78%以上;叶面水分蒸发显著增强;对除草剂的耐受力降低。Chen等<sup>[41]</sup>从拟南芥中克隆了WAX2,并发现该基因能同时影响上表皮蜡质层和角质膜层的组成与结构。Kurata等<sup>[42]</sup>随后报道了YRE(WAX2)只在茎表皮分生组织与嫩叶、茎、果实和根的形成初期的细胞中特定表达,在生长的表面毛上有高表达。拟南芥cer7突变体角质层蜡减少,YRE(WAX2/CER3)转录水平极大地降低。Hooker等<sup>[43]</sup>报道拟南芥CER7基因编码一个与酵母核糖核酸酶PH45(RRP45p)同源的具有3'→5'外切活性的核糖核酸酶,并推测该酶通过降解YRE(WAX2/CER3)转录的一个负调节子的mRNA而控制YRE(WAX2/CER3)表达。

催化产生的醛随后在醛脱羧基酶的作用下形成奇数链的烷,并释放出一氧化碳。拟南芥cer1突变体的茎表现出醛大量积累,烷、次级醇和酮含量显著下降,暗示了CER1蛋白为脱羧基酶,催化长链醛到烷的转化<sup>[44, 45]</sup>。Aarts等<sup>[46]</sup>克隆了CER1基因,该基因主要在茎、花和果实中表达,并与花粉育性密切相关。乙烯反应因子型的转录因子WIN1在转基因拟南芥中的超表达使得包括CER1、KCS1在内的蜡质合成基因的表达水平增加,茎、叶中蜡质含量增加<sup>[47]</sup>。

关于角质层蜡质合成后的运转途径,目前主要存在2种假说:第一种是蜡质组分从内质网到质膜的直接运输,第二种是从内质网开始由高尔基体做中间体通过胞饮作用向质膜运输<sup>[42]</sup>。

## 3 展望

过去几十年里,蜡质成分、形态结构和生理方面的研究较多,并分离鉴定了一批蜡质基因,取得了一定的进展。但这些基因与突变体数量和多种蜡质组分相比还远远不够。大部分蜡质组分来自脱羧基途径,拟南芥中80%的蜡质组分由脱羧基途径产生。然而目前对参与催化这条途径的四个酶(酰基-CoA还原酶、脱羧基酶、羟化酶、氧化酶)基因的相关信息还所知甚少。WAX2是否为酰基-CoA还原酶、CER1蛋白是否为脱羧基酶以及烷是否是羟基化反应的真正底物还有待于提供更多的证据。现在所知的关于酰基还原途径的许多信息主要来自对加州希蒙得木的研究。为全面揭示蜡质合成途径,还需要加强对拟南芥及其他植物蜡质合成途径的研究。

随着蜡质突变体的不断发现、基因克隆和相关研究的深入,蜡质在植物中的功能将被更多的揭示。在拟南芥中过量表达蜡质相关转录因子WIN1,能够促进蜡质合成、调节表皮的渗透性及增强植株耐旱性<sup>[47, 48]</sup>。Zhang等<sup>[49]</sup>将豆科植物的一个转录因子WXP1转入苜蓿(Medicago sativa)中,诱导了蜡质相关基因的表达,转基因植株叶片的单位面积蜡质含量增加,抗旱性提高。耐旱和抵抗病菌相关的角质层基因的克隆与转基因研究为改良作物抗性提供了新的途径。在生产实践中,植物体表面层的生化性质、结构特点,是选育抗病品种、使用农药或除草剂时必须考虑的因素。

拟南芥作为研究遗传学和分子生物学的一种模式植物,具有典型的角质层结构及组分,因此,拟南芥在植物角质层的生态学特性研究上也应该是个模式系统。拟南芥角质层蜡在防止植株紫外线辐射、低温、介导与病原物的互作方面等还没有研究。随着更多的拟南芥蜡质缺失突变体的鉴定,必将促进对角质层蜡的各种生态功能的研究,从而为揭示其他植物与环境的互作提供一个模式系统。

## 参考文献(References):

- [1] Millar AA, Clemens S, Zachgo S, Giblin M, Taylor DC, Kunst L. 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. [\[DOI\]](#)
- [2] Mariani C, Wolters-Arts M. Complex waxes. *Plant Cell*, 2000, 12(10): 1795-1797. [\[DOI\]](#)
- [3] Lassner MW, Lardizabal K, Metz JG. A jojoba

- beta-Ketoacyl-CoA synthase cDNA complements the canola fatty acid elongation mutation in transgenic plants. *Plant Cell*, 1996, 8(2): 281–292. [\[DOI\]](#)
- [4] Millar AA, Kunst L. Very-long-chain fatty acid biosynthesis is controlled through the expression and specificity of the condensing enzyme. *Plant J*, 1997, 12(1): 121–131. [\[DOI\]](#)
- [5] James DW Jr, Lim E, Keller J, Plooy I, Ralston E, Dooner HK. Directed tagging of the *Arabidopsis* *FATTY ACID ELONGATION1* (*FAE1*) gene with the maize transposon activator. *Plant Cell*, 1995, 7(3): 309–319. [\[DOI\]](#)
- [6] Rossak M, Smith M, Kunst L. Expression of the *FAE1* gene and *FAE1* promoter activity in developing seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 2001, 46(6): 717–725. [\[DOI\]](#)
- [7] Kunst L, Taylor DC, Underhill EW. Fatty acid elongation in developing seed of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem*, 1992, 30(4): 425–434.
- [8] Todd J, Post-Beittenmiller D, Jaworski JG. *KCS1* encodes a fatty acid elongase 3-ketoacyl-CoA synthase affecting wax biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 1999, 17(2): 119–130. [\[DOI\]](#)
- [9] Clemens S, Kunst L. Patent cooperation treaty int. *Patent Appl*. WO 0107586. 2001.
- [10] Fourmann M, Barret P, Renard M, Pelletier G, Delourme R, Brunel D. The two genes homologous to *Arabidopsis* *FAE1* co-segregate with the two loci governing erucic acid content in *Brassica napus*. *Theor Appl Genet*, 1998, 96(6): 852–858. [\[DOI\]](#)
- [11] Moon H, Smith MA, Kunst L. A condensing enzyme from the seeds of *Lesquerella fendleri* that specifically elongates hydroxy fatty acids. *Plant Physiol*, 2001, 127(4): 1635–1643. [\[DOI\]](#)
- [12] Kajikawa M, Yamaoka S, Yamato KT, Kanamar UH, Sakuradani E, Shimizu S, Fukuzawa H, Ohya K. Functional analysis of a beta-ketoacyl-CoA synthase gene, *MpFAE2*, by gene silencing in the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003, 67(3): 605–612. [\[DOI\]](#)
- [13] Trenkamp S, Martin W, Tietjen K. Specific and differential inhibition of very-long-chain fatty acid elongases from *Arabidopsis thaliana* by different herbicides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(32): 11903–11908. [\[DOI\]](#)
- [14] Paul S, Gable K, Beaudoin F, Cahoon E, Jaworski J, Napier JA, Dunn TM. Members of the *Arabidopsis* *FAE1*-like 3-ketoacyl-coA synthase gene family substitute for the elop proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 2006, 281(14): 9018–9029. [\[DOI\]](#)
- [15] Yephremov A, Wisman E, Huijser P, Huijser C, Wellesen K, Saedler H. Characterization of the *FIDDLEHEAD* gene of *Arabidopsis* reveals a link between adhesion response and cell differentiation in the epidermis. *Plant Cell*, 1999, 11(11): 2187–2201. [\[DOI\]](#)
- [16] Pruitt RE, Vielle-Calzada JP, Ploense SE, Grossniklaus U, Lolle SJ. *FIDDLEHEAD*, a gene required to suppress epidermal cell interactions in *Arabidopsis*, encodes a putative lipid biosynthetic enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(3): 1311–1316. [\[DOI\]](#)
- [17] Fiebig A, Mayfield JA, Miley NL, Chau S, Fischer LF, Preuss D. 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. [\[DOI\]](#)
- [18] Hooker TS, Millar AA, Kunst L. Significance of the expression of the *CER6* condensing enzyme for cuticular wax production in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2002, 129(4): 1568–1580. [\[DOI\]](#)
- [19] Gray JE, Holroyd GH, van der Lee FM, Bahrami AR, Sijmons PC, Woodward FI, Schuch W, Hetherington AM. The *HIC* signalling pathway links CO<sub>2</sub> perception to stomatal development. *Nature*, 2000, 408(6813): 713–716. [\[DOI\]](#)
- [20] Han J, Lühs W, Sonntag K, Borchardt DS, Frentzen M, Wolter FP. Functional characterization of  $\beta$ -ketoacyl-CoA synthase genes from *Brassica napus* L. *Plant Mol Biol*, 2001, 46(2): 229–239. [\[DOI\]](#)
- [21] Schneider R, Tatzer V, Gogg G, Leitner E, Kohlwein SD. Elo1p-dependent carboxy-terminal elongation of C14:1 Delta (9) to C16:1 Delta (11) fatty acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 2000, 182(13): 3655–3660. [\[DOI\]](#)
- [22] Oh CS, Toke DA, Mandala S, Martin CE. *ELO2* and *ELO3*, homologues of the *Saccharomyces cerevisiae* *ELO1* gene, function in fatty acid elongation and are required for sphingolipid formation. *J Biol Chem*, 1997, 272(28): 17376–17384. [\[DOI\]](#)
- [23] Kohlwein SD, Eder S, Oh CS, Martin CE, Gable K, Bacikova D, Dunn T. Tsc13p is required for fatty acid elongation and localizes to a novel structure at the nuclear-vacuolar interface in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(1): 109–125. [\[DOI\]](#)
- [24] Han G, Gable K, Kohlwein SD, Beaudoin F, Napier JA, Dunn TM. The *Saccharomyces cerevisiae* *YBR159w* gene encodes the 3-ketoreductase of the microsomal fatty acid elongase. *J Biol Chem*, 2002, 277(38): 35440–35449. [\[DOI\]](#)
- [25] Costaglioli P, Joubes J, Garcia C, Stef M, Arveiler B, Lessire R, Garbay B. Profiling candidate genes involved in wax biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* by microarray analysis. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1734(3): 247–258.
- [26] Xu X, Dietrich CR, Delledonne M, Y Xia, Wen TJ, Robertson DS, Nikolau BJ, Schnable PS. Sequence analysis of the cloned *glossy8* gene of maize suggests that it may code for a beta-ketoacyl reductase required for the biosynthesis of cuticular waxes. *Plant Physiol*, 1997, 115(2): 501–510. [\[DOI\]](#)
- [27] Xu X, Dietrich CR, Lessire R, Nikolau BJ, Schnable PS. The endoplasmic reticulum-associated maize GL8 protein is a component of the acyl-coenzyme A elongase involved in the production of cuticular waxes. *Plant Physiol*, 2002, 128(3): 924–934. [\[DOI\]](#)

- [28] Beaudoin F, Gable K, Sayanova O, Dunn T, Napier JA. A *Saccharomyces cerevisiae* gene required for heterologous fatty acid elongase activity encodes a microsomal beta-keto-reductase. *J Biol Chem*, 2002, 277(13): 11481–11488. [\[DOI\]](#)
- [29] Puyaubert J, Dieryck W, Costaglioli P, Chevalier S, Breton A, Lessire R. Temporal gene expression of 3-ketoacyl-CoA reductase is different in high and in low erucic acid *Brassica napus* cultivars during seed development. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1687(3): 152–163.
- [30] Qin YM, Ma Pujol F, Shi YH, Feng JX, Liu YM, Kastaniotis AJ, Hiltunen JK, Zhu YX. Cloning and functional characterization of two cDNAs encoding NADPH-dependent 3-ketoacyl-CoA reductase from developing cotton fibers. *Cell Res*, 2005, 15(6): 465–473. [\[DOI\]](#)
- [31] Gable K, Garton S, Napier JA, Dunn TM. Functional characterization of the *Arabidopsis thaliana* orthologue of Tsc13p, the enoyl reductase of the yeast microsomal fatty acid elongating system. *J Exp Bot*, 2004, 55(396): 543–545. [\[DOI\]](#)
- [32] Zheng H, Rowland O, Kunst L. Disruptions of the *Arabidopsis* enoyl-coA reductase gene reveal an essential role for very-long-chain fatty acid synthesis in cell expansion during plant morphogenesis. *Plant Cell*, 2005, 17(5): 1467–1481. [\[DOI\]](#)
- [33] Lessire R, Domergue F, Spinner C, Lellouche JP, Mioskowski C, Cassagne C. Study of the 3-hydroxy eicosanoyl-coenzyme A dehydratase and (E)-2,3 enoyl-coenzyme A reductase involved in acyl-coenzyme A elongation in etiolated leek seedlings. *Plant Physiol*, 1999, 119(3): 1009–1016. [\[DOI\]](#)
- [34] Domergue F, Chevalier S, Créach A, Cassagne C, Lessire R. Purification of the acyl-CoA elongase complex from developing rapeseed and characterization of the 3-ketoacyl-CoA synthase and the 3-hydroxyacyl-CoA dehydratase. *Lipids*, 2000, 35(5): 487–494. [\[DOI\]](#)
- [35] Kolattukudy PE. Enzymatic synthesis of fatty alcohols in *Brassica oleracea*. *Arch Biochem Biophys*, 1971, 142(2): 701–709. [\[DOI\]](#)
- [36] Vioque J, Kolattukudy PE. Resolution and purification of an aldehyde-generating and an alcohol-generating fatty acyl-CoA reductase from pea leaves (*Pisum sativum* L.). *Arch Biochem Biophys*, 1997, 340(1): 64–72. [\[DOI\]](#)
- [37] Metz JG, Pollard MR, Anderson L, Hayes R, Lassner MW. Purification of a jojoba embryo fatty acyl-Coenzyme A reductase and expression of its cDNA in high erucic acid rapeseed. *Plant Physiol*, 2000, 122(3): 635–644. [\[DOI\]](#)
- [38] Kunst L, Samuels AL. Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Prog Lipid Res*, 2003, 42(1): 51–80.
- [39] Rowland O, Zheng H, Hepworth SR, Lam P, Jetter R, Kunst L. *CER4* encodes an alcohol-forming fatty acyl-coA reductase involved in cuticular wax production in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2006, 142(3): 866–877. [\[DOI\]](#)
- [40] Lardizabal KD, Metz JG, Sakamoto T, Hutton WC, Pollard MR, Lassner MW. Purification of a jojoba embryo wax synthase, cloning of its cDNA, and production of high levels of wax in seeds of transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2000, 122(3): 645–655. [\[DOI\]](#)
- [41] Chen X, Goodwin SM, Boroff VL, Liu X, Jenks MA. Cloning and characterization of the *WAX2* gene of *Arabidopsis* involved in cuticle membrane and wax production. *Plant Cell*, 2003, 15(5): 1170–1185. [\[DOI\]](#)
- [42] Kurata J, Kawabata-Awai C, Sakuradani F, Shimizu S, Okada K, Wada T. The *YORE-YORE* gene regulates multiple aspects of epidermal cell differentiation in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2003, 36(1): 55–66. [\[DOI\]](#)
- [43] Hooker TS, Lam P, Zheng H, Kunst L. A core subunit of the RNA-processing/degrading exosome specifically influences cuticular wax biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2007, 19 (3): 904–913. [\[DOI\]](#)
- [44] Hannoufa A, McNevin J, Lemieux B. Epicuticular waxes of eceriferum mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, 1993, 33(4): 851–855. [\[DOI\]](#)
- [45] McNevin JP, Woodward W, Hannoufa A, Feldmann KA, Lemieux B. Isolation and characterization of eceriferum (*cer*) mutants induced by T-DNA insertions in *Arabidopsis thaliana*. *Genome*, 1993, 36(3): 610–618.
- [46] Aarts MGM, Keijzer CJ, Stiekema WJ, Pereira A. Molecular characterization of the *CER1* gene of *Arabidopsis* involved in epicuticular wax biosynthesis and pollen fertility. *Plant Cell*, 1995, 7(12): 2115–2127. [\[DOI\]](#)
- [47] Broun P, Poindexter P, Osborne E, Jiang CZ, Riechmann JL. WIN1, a transcriptional activator of epidermal wax accumulation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(13): 4706–4711. [\[DOI\]](#)
- [48] Kannangara R, Branigan C, Liu Y, Penfielda T, RaobV, Mouillec G, Höftc H, Paulyd M, Riechmannb JL, Broun P. Transcription factor WIN1/SHN1 regulates cutin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. In: The 3rd European Symposium on Plant Lipids, in April, 2007.
- [49] Zhang JY, Broeckling CD, Blancaflor EB, Sledge M, Sumner LW, Wang ZY. 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*). *Plant J*, 2005, 42(5): 689–707. [\[DOI\]](#)