

# 拟南芥异源表达紫斑牡丹 *PrLPAAT1* 对种子脂肪酸含量的影响

于蕊, 赵永青, 张庆雨, 白章振, 孙道阳, 胡佳媛, 牛立新\*, 张延龙\*

(西北农林科技大学风景园林艺术学院, 陕西杨凌 712100)

**摘要:** 克隆得到的紫斑牡丹 (*Paeonia rockii*) 脂肪酸代谢相关基因 *PrLPAAT1*, 构建 2S2::*PrLPAAT1* 过表达载体并利用花序浸染法转化拟南芥, 通过潮霉素抗性筛选以及 PCR 检测得到 3 个 T<sub>3</sub> 代纯合转基因拟南芥株系 L10X-11、L10X-17 和 L10X-19。半定量 RT-PCR 证明 *PrLPAAT1* 在 3 个转基因拟南芥株系中均显著表达。与野生型相比, 过表达 *PrLPAAT1* 拟南芥的单株种子产量未产生明显变化。GC-MS 测定结果表明, L10X-11、L10X-17 和 L10X-19 株系的总脂肪酸含量较野生型分别为无显著差异和提高了 5.3% 和 5.2%; 油酸 (C18:1) 含量分别提高了 19.9%、24.6% 和 19.4%。实时荧光定量 PCR 分析表明, 过表达 *PrLPAAT1* 拟南芥中油脂合成相关基因 *AtACPI*、*AtDGATI* 和 *AtSUS3* 的表达水平均显著增加。由此推测 *PrLPAAT1* 在牡丹种子的脂肪酸合成过程中发挥重要的作用。

**关键词:** 紫斑牡丹; 溶血磷脂酸酰基转移酶; 脂肪酸; 三酰甘油

**中图分类号:** S 685.11

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2018) 11-2188-11

## Effect of Ectopic Expression of *Paeonia rockii PrLPAAT1* on Fatty Acids Content of Seed

YU Rui, ZHAO Yongqing, ZHANG Qingyu, BAI Zhangzhen, SUN Daoyang, HU Jiayuan, NIU Lixin\*, and ZHANG Yanlong\*

(College of Landscape Architecture and Arts, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** *PrLPAAT1* gene was cloned from *Paeonia rockii*. The expression vector 2S2::*PrLPAAT1* was constructed and transformed into wild-type (WT) *Arabidopsis* plants by the floral dip method. Three positive T<sub>3</sub> transformants L10X-11, L10X-17 and L10X-19 were confirmed via hygromycin-resistant selection and PCR method. Semi-quantitative RT-PCR analysis indicated that *PrLPAAT1* was highly expressed in transgenic *Arabidopsis* lines. Phenotypic analysis suggested that the seed yield had no significant changes in transgenic *Arabidopsis* lines, compared to WT plants. We analyzed the content and composition of FAs in mature seeds of the transgenic *Arabidopsis* using GC-MS. Compared with WT plants, seeds of L10X-11, L10X-17, and L10X-19 line showed increased total fatty acids (FAs) content of 5.3%, and 5.2%, and the oleic acid (OA) content of 19.9%, 24.6%, and 19.4%, respectively. Quantitative real-time PCR analysis indicated that a few endogenous genes (*AtACPI*, *AtDGATI*, and *AtSUS3*) involved

收稿日期: 2018-05-11; 修回日期: 2018-09-03

基金项目: 国家林业局公益性行业科研专项 (201404701)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: niulixin@nwfau.edu.cn, zhangyanlong@nwfau.edu.cn)

in lipid biosynthesis were up-regulated in *PrLPAAT1*-overexpressing lines. These results showed that *PrLPAAT1* may play an important role in fatty acid biosynthesis of seed.

**Keywords:** *Paeonia rockii*; lysophosphatidic acid acyltransferase; fatty acid; triacylglycerol

牡丹籽油中不饱和脂肪酸 (unsaturated fatty acids, UFAs) 含量约占 90%, 其中  $\alpha$ -亚麻酸 ( $\alpha$ -linolenic acid, ALA) 含量约占 40%, 对于改善人类饮食结构和健康具有重要作用 (戚军超 等, 2005; 高婷婷, 2012; 杨勇 等, 2015; 宋淑香 等, 2016)。

三酰甘油 (triacylglycerol, TAG) 是植物种子、花粉粒等器官贮存化学能量和碳源的主要形式, 是植物油的主要组成成分, 作为可再生能源被广泛用于食品、生物以及工业领域 (Durrett et al., 2008; Dyer et al., 2008; Zhang et al., 2009; Libeisson et al., 2010; Bates & Browse, 2012; Yuan et al., 2015)。在 TAG 的合成过程中, 溶血磷脂酸酰基转移酶 (LPAAT) 参与其中 (Weselake et al., 2009)。

在植物中, LPAAT 与叶绿体膜、内质网膜以及线粒体外膜等多个膜系统相关, 从定位结构来看, 可分为质体膜结合型和内质网膜结合型 (Chen et al., 2012)。来自不同植物的研究表明, 至少存在两个进化家族 (A 类和 B 类) 编码微粒体 LPAAT (Frentzen, 1998)。A 类 LPAAT 基因已经在玉米 (*Zea mays*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、荷包蛋花 (*Limnanthes douglasii*)、油菜 (*Brassica napus*) 和蓖麻 (*Ricinus communis*) 等植物中被分离克隆出来 (Brown et al., 1994, 2002; Arroyocaro et al., 2013; Kim et al., 2005)。B 类 LPAAT 基因最早是在荷包蛋花 (*L. douglasii*) 和椰子树 (*Cocos nucifera*) 中被克隆和验证, 最近又在蓖麻 (*R. communis*) 中发现 (Brown et al., 1995; Hanke et al., 1995; Knutson et al., 1995; Arroyocaro et al., 2013)。目前在拟南芥 (*A. thaliana*) 中有 5 个 LPAAT 基因被鉴定注释, 包括 1 个质体同工酶基因 *AtLPAAT1* 和 4 个细胞质同工酶基因 *AtLPAAT2*、*AtLPAA3*、*AtLPAA4* 和 *AtLPAAT5*。*AtLPAAT1*、*AtLPAAT2* 和 *AtLPAAT3* 是植物生长发育所必需的, 而 *AtLPAAT4* 和 *AtLPAAT5* 在 5'-UTR 具有不同的可变剪接形式, 表明它们在催化磷脂酸 (phosphatidic acid, PA) 合成中具有严格的顺序 (Kim et al., 2005; Roscoe, 2005; Arroyocaro et al., 2013)。

在牡丹中已经克隆验证了 *LPAAT4* 基因 (Zhang et al., 2017)。在紫斑牡丹 (*Paeonia rockii*) 种子中克隆获得了 *PrLPAAT1* 基因 (Zhang et al., 2016), 为了验证 *PrLPAAT1* 的功能, 在本研究中构建了 2S2::*PrLPAAT1* 过表达载体并成功转化拟南芥, 通过 GC-MS 技术对 T3 代纯合转基因株系的脂肪酸成分及含量进行了测定和分析, 以期初步揭示 *PrLPAAT1* 在牡丹种子脂肪酸代谢中的作用机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

野生型和转基因拟南芥均种植于人工智能光照培养箱 (Rxz-380C, 江南仪器厂, 宁波), 温度 ( $22 \pm 2$ ) °C, 光照 14 h, 光量子密度  $120 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 相对湿度 70%。

2016 年 9 月, 于国家林业局油用牡丹工程中心转化拟南芥, 采集授粉后 14 d 新鲜种子, 立即放入液氮, 后贮存于 -80 °C 冰箱备用。成熟期收集种子, 一部分在 60 °C 烘箱干燥后测定脂肪酸含量; 另一部分单株采收, 统计植株产量和种子质量。

## 1.2 *PrLPAAT1* 基因表达载体的构建

根据已经报道的种子特异表达 2S2 启动子, 设计带有 *EcoR* I 和 *Sac* I 酶切位点的一对引物 (表 1), 在牡丹基因组 DNA 中扩增获得 2S2 启动子。使用 *EcoR* I 和 *Sac* I 对 pCAMBIA1300m 进行酶切, 去除原有的 CaMV 35S 启动子, 胶回收后与 2S2 启动子连接, 进行测序和酶切鉴定, 确认种子特异性表达载体构建成功。采用 *Kpn* I 和 *Xba* I 分别对 *pUCm-T-PrLPAAT1* 和 pCAMBIA1300m 质粒进行双酶切, 酶切产物切胶回收。将回收得到的 *PrLPAAT1* 片段与 pCAMBIA1300m 片段用 T4 DNA 连接酶进行连接; 热激法将构建成功的 2S2::*PrLPAAT1* 过表达载体转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 挑取的单克隆经过菌落 PCR 和质粒酶切鉴定。阳性克隆过夜摇菌, 提取质粒, 冻融法将过表达载体转化农杆菌 GV1301 感受态, 经上海生工生物工程股份有限公司测序确认表达载体构建成功。

## 1.3 花序浸润法转化拟南芥

挑选阳性农杆菌转化菌株, 接种到含有利福平 (rif)、卡那霉素 (kan) 和庆大霉素 (gen) 的 YEP 培养基中, 28  $^{\circ}\text{C}$ 、250  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  振荡培养。当菌液 OD<sub>600</sub> = 1.5 ~ 2.0 时, 将培养液按 1 : 50 比例转接培养, 在 OD<sub>600</sub> = 1.8 ~ 2.0 时终止培养。离心收集菌体, 用花序浸染液 (1/2 MS 培养基 + 50  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖 + 0.5  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  2- 吗啉乙磺酸) 悬浮菌体, 并加入表面活性剂 Silwet, 使其终浓度达到 0.02%。利用花序浸润法将构建的 2S2::*PrLPAAT1* 过表达载体转化野生型拟南芥, 农杆菌侵染的当代植株为 T0 代 (Clough & Bent, 1998)。

## 1.4 转基因拟南芥抗性筛选及纯合株系的获得

将收获的 T0 代成熟种子放入 2 mL 离心管中, 75% 无水乙醇消毒 30 s, 再加入 10% 次氯酸钠, 振荡 10 min, 无菌水冲洗 5 次, 播种在含有 20  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  潮霉素 (hyg) 的 1/2MS 培养基上, 放于 4  $^{\circ}\text{C}$  低温处理 2 d 后, 置于人工智能培养箱培养 10 d。根系生长正常的幼苗初步确定为阳性 T1 代株系。采集 T1 代株系幼嫩叶提取 DNA, 用 hyg 抗性基因 HPT 的引物和目的基因的引物 (表 1) 进行 PCR 鉴定。继续 hyg 抗性筛选, 选择抗、感分离比例为 3 : 1 的单株, 按单株收获为 T2 代株系。将 T2 代种子再次 hyg 筛选, 得到幼苗全部为抗性、不发生分离的株系则该株系为纯合 T3 代转基因植株。最终得到 3 个 *PrLPAAT1* 过表达纯合转基因株系, 分别命名为 L10X-11、L10X-17 和 L10X-19。

## 1.5 转基因拟南芥种子产量以及脂肪酸含量测定

分别采收 L10X-11、L10X-17 和 L10X-19 纯合转基因拟南芥株系的成熟种子, 统计每株的角果数及每个角果的种子数, 每个株系至少取 10 株, 每株至少取 10 个角果。干燥后使用 1/1000 天平称量每个株系的百粒及单株种子质量, 重复 5 ~ 10 次。

利用 GC - MS 测定种子中脂肪酸含量, 总脂的提取和油脂的甲酯化参考 Li 等 (2015) 和白章振等 (2017) 的方法。所用分析系统为 Agilent GC - MS (GC7890A /MS5975C), 色谱柱为 HP-88 聚硅氧烷聚合物色谱柱, 30  $\text{m} \times 0.25 \text{ mm}$ , 0.20  $\mu\text{m}$  (Agilent, 美国)。分析脂肪酸所用的升温程序如下: 100  $^{\circ}\text{C}$  保持 2 min, 然后以 15  $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$  升至 230  $^{\circ}\text{C}$ , 保持 5 min, 进样口温度 250  $^{\circ}\text{C}$ , 分流进样, 分流比为 10 : 1, 进样体积 1  $\mu\text{L}$ , 载气为高纯氦气, 流速 1.0  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 电离方式为 EI, 电子能量 70 eV, 传输线温度 280  $^{\circ}\text{C}$ , 离子源温度 230  $^{\circ}\text{C}$ , 四级杆温度 150  $^{\circ}\text{C}$ , 质量扫描范围 ( $m/z$ ): 30 ~ 450, 采用 NIST05 Library 标准谱库检索和与标准品比对定性。利用内标标准曲线法进行线性回归定量, 以拟南芥种子油中不存在的十七烷酸作为内标。相同提取条件下, 每个样品重复 3 次。

1.6 野生型和转基因拟南芥种子的半定量 RT-PCR 及实时荧光定量 PCR 检测

采集野生型和转基因拟南芥授粉后 14 d 的种子, 采用北京 TIANGEN 公司的 RNA Prep Pure Plant kit 提取 RNA, 通过电泳检测 RNA 质量, 核酸蛋白定量仪测定 RNA 含量。参照大连 TaKaRa 公司 PrimeScript® RT reagent Kit with gDNA Eraser 说明书反转录合成 cDNA 第一链, 用内参基因 *Atactin7* 的引物进行 PCR 扩增以检测 cDNA 质量。之后, 拟南芥 *Atactin7* 作为等量上样参照进行半定量 PCR 检测。反应条件为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 次循环; 72 °C 延伸 10 min。

采用 Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time) kit (TaKaRa, DRR041A) 试剂盒进行实时荧光定量 PCR 分析, 反应体系参考相应说明书, 每个样品重复 3 次。运行于 LightCycler480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics)。RT-PCR 运行程序为 95 °C 15 s; 95 °C 5 s, 57 °C 30 s, 72 °C 31 s, 45 个循环; 生成熔解曲线分析 PCR 扩增是否为单一产物; 在 72 °C 延伸步骤末期采集荧光数据信号。用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  公式计算基因的相对表达量 (Livak & Schmittgen, 2001)。半定量及定量引物见表 1。

表 1 试验所用引物  
Table 1 Primers used in this study

用途 Application	引物 Primer name	引物序列 (5' - 3') Primer sequence
扩增 2S2 启动子 Amplification of 2S2 promoter	2S2-F	AAAGAATTCCAAATGCGTAGAGACAAATGG
	2S2-R	AAAGAGCTCGAGTAAAGAGTGAAGTGAAGAG
纯合转基因拟南芥的筛选 Screening of homozygous transgenic <i>Arabidopsis</i>	HPT-F	CGGTCGCGGAGGCTATGGATG
	HPT-L	GCTTCTGCGGGCGATTTGTGTA
	LPAAT1-F	TCTTCGGATTGCCACATTTCG
	LPAAT1-R	GTTAGCCTTGAGAATTGAGCG
半定量 RT-PCR Semi-quantitative RT-PCR	LPAAT1RT-F	ACAGCAGAAGCCAGTTGGAG
	LPAAT1RT-R	CGCAGGCATTATTTGTCCCCG
半定量 RT-PCR 及实时荧光定量 PCR Semi-quantitative RT-PCR and qRT-PCR	Atactin7-F	GGAAGTGAATGGTGAAGGCTG
	Atactin7-R	CGATTGGATACTTCAGAGTGAGGA
qRT-PCR	AtFAD2-F	ATGGGTGCAGGTGGAAGAAT
	AtFAD2-R	CCAGGAGAAGTAAGGGACGA
	AtBCCP2-F	AACCAATGGGATCTCCTTTCCCT
	AtBCCP2-R	ATAAATTCAGAGAGCTCGGCGGGT
	AtACP1-F	AATCTATCCTTCAACCTCCGCCGT
	AtACP1-R	AGAGAATCTGCTCCAAGGTCAGCA
	AtGPAT9-F	TCGGAACCGGCGACGTAAGC
	AtGPAT9-R	TGGCACCAGCAGCTTCAGTGAG
	AtLPAAT2-F	CCGGGTGGTTGCAGAAACCTTGT
	AtLPAAT2-R	TCCAGGCAACCTGACCGCT
	AtDGAT1-F	TGGAGCTCCCGCCGACGTTA
	AtDGAT1-R	TCGCCCTCCGATGAGCTGGA
	AtOleosin-F	TCCTTTATCCTCAGAGTGGCCCTT
	AtOleosin-R	AAGGCTGCTGGTACAATAACCGGA
	AtSUS3-F	GAGATACCGCAGGGAGAGTT
	AtSUS3-R	CAGCATTTCACTCAAGGG
	AtFPA1-F	CACCGTGCTTACTACCAAC
	AtFPA1-R	TTCTCCGTCCAACATAATCTCTG
	AtPGK-F	TGCTGCTGGAAGTGAAGCCG
	AtPGK-R	GCGAGGACTCCTGGAAGTGGC
	AtAGP-F	CGCCAAGCCTGCCGTTCTTA
	AtAGP-R	TGCGGTTTGAAGTGGCCGCA

## 2 结果与分析

### 2.1 重组质粒的双酶切检测和 PCR 鉴定

通过酶切和连接反应，将具有完整编码框的 *PrLPAAT1* 基因正向插入到表达载体 pCambia1300m 中，构建过 pCambia1300m-*PrLPAAT1* 表达载体。重组质粒的双酶切电泳（图 1，A）显示：重组质粒中出现一条与目的基因大小一致的条带（1 047 bp），表明目标载体构建完成。如图 1，B 所示，采用 PCR 扩增方法检测农杆菌的转化效率，随机抽取 5 个菌落均能扩增出与目的基因大小一致的条带，表明冻融法转化农杆菌的效率较高。

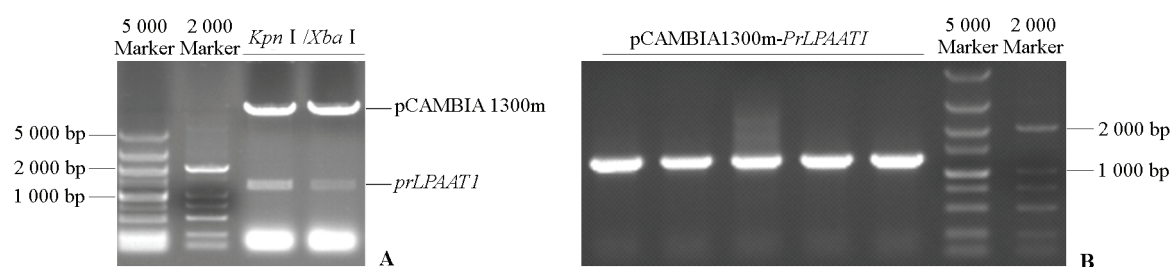


图 1 重组质粒的双酶切检测 (A) 和 PCR 检测 (B)

Fig. 1 Digestive results of recombinant plasmid by double enzymes (A) and PCR identification of recombinant plasmid (B)

### 2.2 转 *PrLPAAT1* 拟南芥种子中 *PrLPAAT1* 的表达分析

采用半定量 PCR 技术检测拟南芥 3 个纯合转 *PrLPAAT1* 株系授粉后 14 d 种子中该基因的表达情况，以野生型拟南芥 (WT) 为对照，*Atactin7* (At5g09810.1) 为内参基因。结果 (图 2) 表明：*PrLPAAT1* 在 3 个转基因纯合株系 L10X-11、L10X-17 和 L10X-19 种子中均有表达，而在野生型中未见表达。

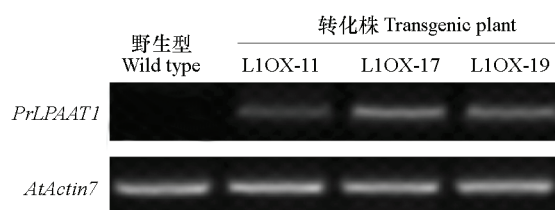


图 2 半定量 RT-PCR 分析转基因拟南芥种子中 *PrLPAAT1* 的表达

Fig. 2 Semi-quantitative RT-PCR analysis of *PrLPAAT1* transcript abundance in the seeds of transgenic *Arabidopsis*, compared to wild type

### 2.3 转 *PrLPAAT1* 拟南芥单株种子产量

由表 2 可以看出，3 个转基因纯合株系的单株角果数、单果种子数、百粒质量及单株产量等与野生型均无显著差异，说明 *PrLPAAT1* 在拟南芥中异源表达并未对种子产量造成显著影响。

表2 转 *PrLPAAT1* 拟南芥 T3 代纯合植株 (L1OX-11、L1OX-17 和 L1OX-19) 的种子质量变化  
Table 2 Effect of *PrLPAAT1* overexpression on seed number and weight in transgenic *Arabidopsis* plants

株系 Plant	单株角果数 Number of siliques per plant	单角果种子数 Number of seeds per silique	百粒质量/mg Hundred grain weight	单株种子质量/mg Seed yield per plant
野生型	86.86 ± 9.51	36.25 ± 5.26	1.81 ± 0.12	34.69 ± 3.87
L1OX-11	98.41 ± 12.14	42.89 ± 8.93	2.00 ± 0.17	32.02 ± 4.53
L1OX-17	89.17 ± 11.79	38.48 ± 3.46	1.98 ± 0.17	34.71 ± 4.81
L1OX-19	86.03 ± 12.17	33.62 ± 6.83	1.83 ± 0.20	34.48 ± 5.43

2.4 转 *PrLPAAT1* 拟南芥种子的脂肪酸含量与组成

与野生型 (WT) 拟南芥相比, L1OX-17 和 L1OX-19 株系的总脂肪酸含量分别提高了 5.3%和 5.2%, L1OX-11 与野生型差异不显著 (图 3)。

进一步分析 5 种主要脂肪酸的含量发现, L1OX-11、L1OX-17 和 L1OX-19 的种子中油酸 (C18:1) 含量与 WT 差异极显著, 分别提高了 19.9%、24.6%和 19.4% (图 4)。

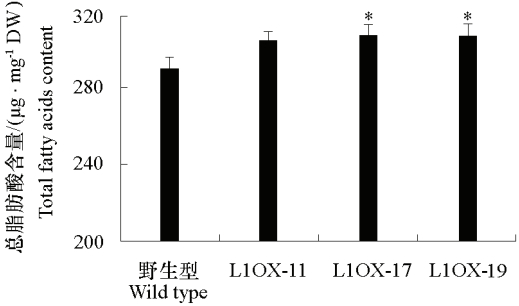


图3 转 *PrLPAAT1* 拟南芥 (L1OX-11、L1OX-17 和 L1OX-19) 种子总脂肪酸含量  
Fig. 3 Effect of *PrLPAAT1* overexpression on total FAs content in transgenic *Arabidopsis* seeds  
\*  $P < 0.05$ .

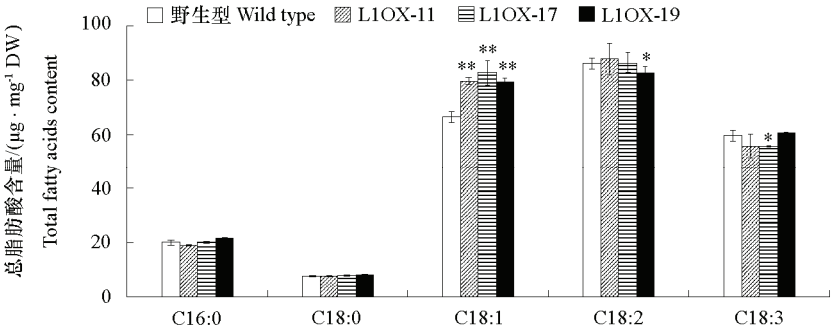


图4 转 *PrLPAAT1* 拟南芥种子中脂肪酸含量及组成分析  
Fig. 4 Effect of *PrLPAAT1* overexpression on main FA content and composition in transgenic *Arabidopsis* seeds  
\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

2.5 转 *PrLPAAT1* 拟南芥种子中脂肪酸合成和 TAG 合成相关基因的表达分析

采用实时 qRT-PCR 技术检测 7 个脂肪酸和 TAG 生物合成关键基因的表达水平。选取的基因涉及脂肪酸的从头合成过程, 包括油酸去饱和酶基因 (*AtFAD2*, At3g12120)、生物素羧基载体蛋白基因 (*AtBCCP2*, At5g15530) 和酰基载体蛋白基因 (*AtACPI*, At3g05020); 肯尼迪途径, 包括甘油 - 3 - 磷酸酰基转移酶基因 (*AtGPAT9*, At5g60620)、溶血磷脂酸酰基转移酶基因 (*AtLPAAT2*, At3g57650) 和二酰甘油酰基转移酶基因 (*AtDGAT1*, At2g19450) 以及油体蛋白基因 (*AtOleosin*, At3g01570)。结果 (图 5) 表明: 相比于野生型, *AtACPI* 的转录水平在 L1OX-17 和 L1OX-19 植株中显著增加;

*AtDGAT1* 基因表达量在 L1OX-11、L1OX-17 和 L1OX-19 中均显著增加, 分别增加了 21.7%、64.0% 和 33.8%。

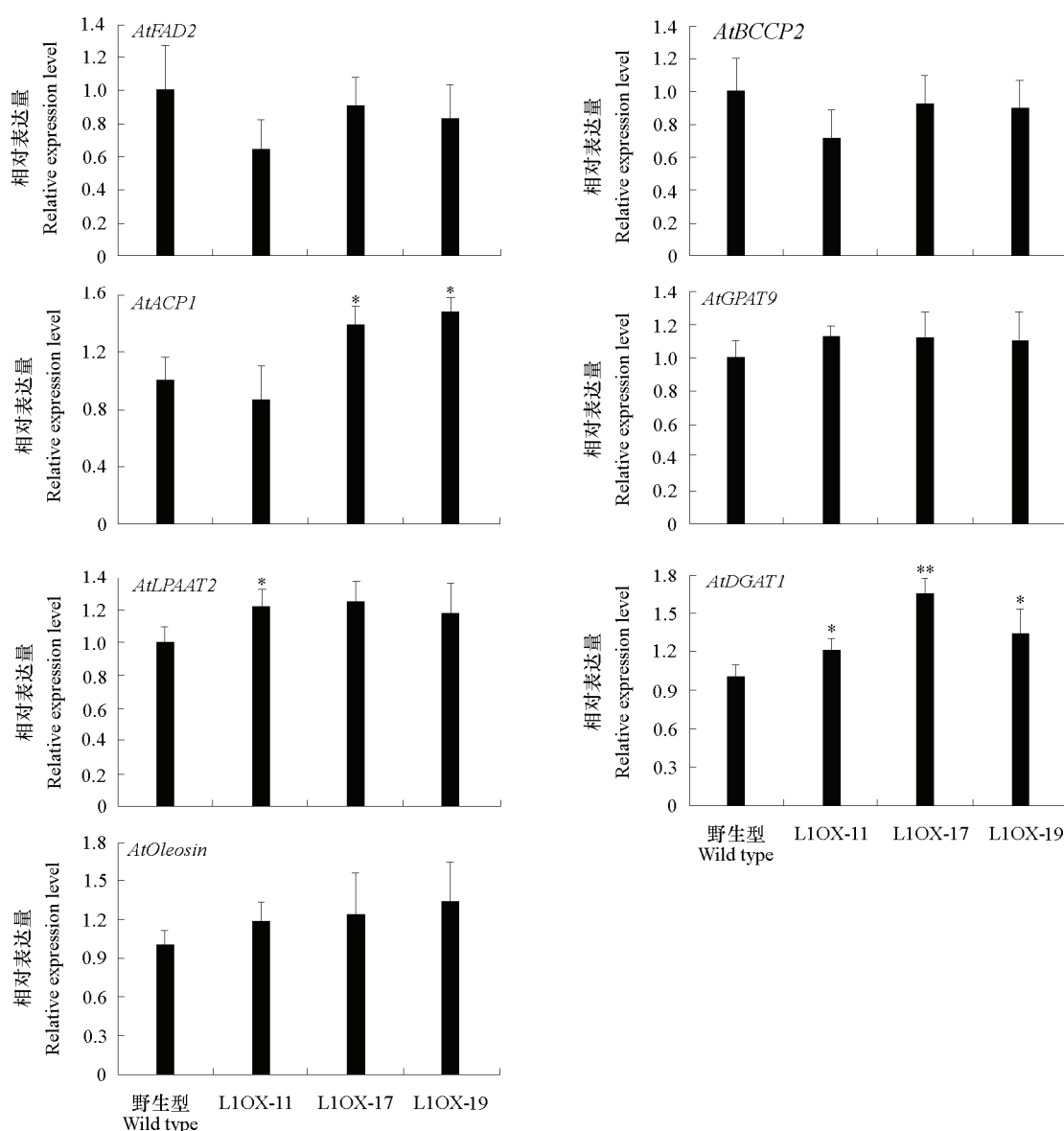


图 5 转 *PrLPAAT1* 拟南芥 (L1OX-11、L1OX-17 和 L1OX-19) 发育种子中脂肪酸和 TAG 生物合成相关基因表达分析

Fig. 5 Transcript levels of genes involved in the FA and TAG biosynthesis pathway in developing seeds of *PrLPAAT1*-overexpressing transgenic *Arabidopsis*

\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

## 2.6 转 *PrLPAAT1* 拟南芥种子中蔗糖代谢及糖酵解合成相关基因的表达差异

采用 qRT-PCR 检测了糖代谢相关内源基因蔗糖合酶基因 (*AtSUS3*, At4g02280)、果糖 - 1,6 - 二磷酸醛缩酶基因 (*AtFPA1*, At2g21330)、磷酸甘油酸激酶基因 (*AtPGK*, At1g79550) 和腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶基因 (*AtAGP*, At5g19220) 的表达。结果 (图 6) 显示, L1OX-11、L1OX-17、

L1OX-19 植株种子中的 *AtSUS3* 表达水平相对于野生型有极显著增加, 分别增加了 105.7%、260.4% 和 357.9%。

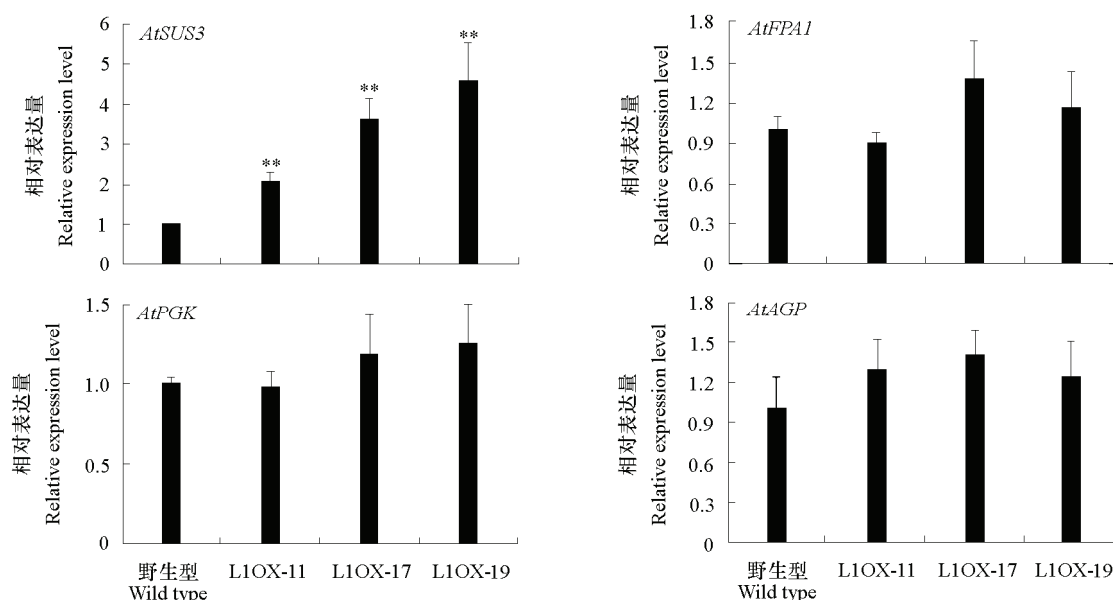


图 6 转 *PrLPAAT1* 拟南芥 (L1OX-11、L1OX-17 和 L1OX-19) 发育种子中糖代谢和糖酵解合成相关基因表达分析

Fig. 6 Transcript levels of genes involved in the sucrose metabolism and glycolysis in developing seeds of *PrLPAAT1*-overexpressing transgenic *Arabidopsis*

\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

### 3 讨论

LPAAT 蛋白属于膜结合 *O*-酰基转移酶 (membrane-bound *O*-acyltransferase, MBOAT) 家族, 存在于原核和真核细胞中, 在几乎所有生物的新陈代谢中发挥着重要作用 (Körbes et al., 2016)。作者发现, 转 *PrLPAAT1* 基因拟南芥成熟种子的总脂肪酸含量显著提高, 与已报道研究结果一致。过表达油菜 (*Brassica campestris*) LPAAT 基因 (*BAT1.13* 和 *BAT1.5*) 的拟南芥种子总脂肪酸含量比野生型增加了 13% (Maisonneuve et al., 2010; Chen et al., 2012); 在毕赤酵母中异源表达三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricornutum*) 的 LPAAT 基因, 酵母转化子的总脂肪酸含量显著提高 (张军平等, 2012); 花生 (*Arachis hypogaea*) *AhLPAAT2* 在拟南芥种子中特异性表达提高了籽油的含量 (Chen et al., 2015)。另外, 酵母 *SLC1* 和 *SLC1-1* (与拟南芥内质网胞质结合型 LPAAT 同源) 在拟南芥、油菜和大豆 (*Glycine max*) 中过表达, 均提高了转基因植株种子中 TAG 的含量 (Zou et al., 1997; Rao & Hildebrand, 2009)。由此可见, LPAATs 基因在脂质合成过程中发挥了重要作用, 其过表达可显著促进种子中 TAG 和总脂肪酸的积累。

在植物种子的 TAG 组装中, LPAAT 是对底物选择性最强的酰基转移酶 (Laurent & Huang, 1992)。椰子 (*Cocos nucifera*) 中的 LPAAT 对中等链长的脂肪酸存在较强特异性, 比如 C12:0 (Knutzon et al., 1995), 亚麻 (*Linum usitatissimum*) 中的 LPAAT 则偏好以 C18:2 (亚油酸) 作为底物 (Sørensen et al., 2005)。LPAAT 对底物的偏好性导致植物中特殊脂肪酸含量增加 (Bernierth & Frentzen, 1990; Cao & Huang, 1990)。在本研究中, *PrLPAAT1* 过表达拟南芥株系的油酸 (C18:1) 含量显著提高, 表明

*PrLPAAT1* 可能对油酸具有较强的偏好性。总体来看,不同植物的 LPAAT 对脂肪酸底物的选择性存在明显差异。

本研究中发现,拟南芥中 *PrLPAAT1* 过表达显著提高了 TAG 生物合成途径关键基因 *AtACP1* 和 *AtDGAT1* 的表达水平。ACP 作为酰基载体在脂肪酸合成中发挥重要作用 (Byers & Gong, 2007; Upadhyay et al., 2009)。DGAT 可以影响种子的含油量、种子质量以及脂肪酸组成等 (Jako & Taylor, 2001)。将拟南芥的 *DAGT1* 基因在烟草中过表达,导致种子脂肪酸含量显著升高 (Andrianov et al., 2010),而将陆地棉 *GhDGAT1* 基因沉默后,种子含油量下降了 3.13% (刘正杰 等, 2013)。值得注意的是,在 *PrLPAAT1* 过表达拟南芥植株中, *AtSUS3* 的表达量也显著增加。SUS 参与贮藏器官中淀粉合成、碳源分配等生理过程 (Chourey et al., 1998; Baud et al., 2004),在玉米中沉默 *SUS* 基因,种子的质量和脂肪酸组成变化明显 (Chourey et al., 1998)。由此表明, *PrLPAAT1* 过表达可能促进了蔗糖向油脂的转换,为脂肪酸合成提供充足的前体物质乙酰 - CoA。

本研究初步揭示了 *PrLPAAT1* 基因在牡丹种子脂肪酸代谢中的作用机理,然而 *PrLPAAT1* 对脂肪酸合成相关基因的调控机制仍有待进一步研究。

## References

- Andrianov V, Borisjuk N, Pogrebnyak N, Brinker A, Dixon J, Spitsin S, Flynn J, Matyszczyk P, Andryszak K, Laurelli M. 2010. Tobacco as a production platform for biofuel: overexpression of *Arabidopsis* *DGAT* and *LEC2* genes increases accumulation and shifts the composition of lipids in green biomass. *Plant Biotechnology Journal*, 8 (3): 277 - 287.
- Arroyocaro J M, Chileh T, Kazachkov M, Zou J, Alonso D L, Garciamaroto F. 2013. The multigene family of lysophosphatidate acyltransferase (LPAT) -related enzymes in *Ricinus communis*: cloning and molecular characterization of two *LPAT* genes that are expressed in castor seeds. *Plant Science*, 199 - 200 (3): 29 - 40.
- Bai Zhang-zhen, Zhang Yan-long, Yu Rui, Li Jian, Niu Li-xin. 2017. Comparison of different extraction methods for seed oil from the 'Fengdan' peony cultivar. *Food Science*, 38 (1): 136 - 141. (in Chinese)
- 白章振, 张延龙, 于蕊, 李建, 牛立新. 2017. 不同方法提取 '凤丹' 牡丹籽油品质比较. *食品科学*, 38 (1): 136 - 141.
- Bates P D, Browse J. 2012. The significance of different diacylglycerol synthesis pathways on plant oil composition and bioengineering. *Frontiers in Plant Science*, 3 (4): 147.
- Baud S, Vaultier M N, Rochat C. 2004. Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 55 (396): 397 - 409.
- Bernerth R, Frentzen M. 1990. Utilization of erucoyl-CoA by acyltransferases from developing seeds of *Brassica napus* (L.) involved in triacylglycerol biosynthesis. *Plant Science*, 67 (1): 21 - 28.
- Brown A P, Brough C L, Kroon J T M, Slabas A R. 1995. Identification of a cDNA that encodes a 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase from *Limnanthes douglasii*. *Plant Molecular Biology*, 29 (2): 267 - 278.
- Brown A P, Carnaby S, Brough C, Brazier M, Slabas A R. 2002. *Limnanthes douglasii* lysophosphatidic acid acyltransferases: immunological quantification, acyl selectivity and functional replacement of the *Escherichia coli* *plsC* gene. *Biochemical Journal*, 364: 795 - 805.
- Brown A P, Coleman J, Tommey A M, Watson M D, Slabas A R. 1994. Isolation and characterisation of a maize cDNA that complements a 1-acyl sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase mutant of *Escherichia coli* and encodes a protein which has similarities to other acyltransferases. *Plant Molecular Biology*, 26: 211 - 223.
- Byers D M, Gong H. 2007. Acyl carrier protein: structure-function relationships in a conserved multifunctional protein family. *Biochemistry & Cell Biology-biochimie Et Biologie Cellulaire*, 85 (6): 649 - 662.
- Cao Y Z, Huang A H C. 1990. Lysophosphatidate acyltransferase in the microsomes from maturing seeds of meadowfoam (*Limnanthes alba*). *Plant Physiology*, 94 (3): 1199 - 1206.

- Chen S L, Huang J Q, Lei Y, Zhang Y T, Ren X P, Chen Y N, Jiang H F, Yan L Y, Li Y R, Liao B S. 2012. Identification and characterization of a gene encoding a putative lysophosphatidyl acyltransferase from *Arachis hypogaea*. *Journal of Biosciences*, 37 (6): 1029 - 1039.
- Chen S L, Lei Y, Xu X, Huang J Q, Jiang H F, Wang J, Cheng Z S, Zhang J A, Song Y H, Liao B S, Li Y R. 2015. The peanut (*Arachis hypogaea* L.) gene *AhLPAT2* increases the lipid content of transgenic *Arabidopsis* seeds. *PLoS ONE*, 10 (8): 1 - 23.
- Chourey P S, Taliercio E W, Carlson S J, Ruan Y L. 1998. Genetic evidence that the two isozymes of sucrose synthase present in developing maize endosperm are critical, one for cell wall integrity and the other for starch biosynthesis. *Molecular Genetics and Genomics*, 259 (1): 88 - 96.
- Clough S J, Bent A F. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 16 (6): 735 - 743.
- Durrett T P, Benning C, Ohlrogge J. 2008. Plant triacylglycerols as feedstocks for the production of biofuels. *Plant Journal*, 54 (4): 593 - 607.
- Dyer J M, Stymne S, Green A G, Carlsson A S. 2008. High-value oils from plants. *Plant Journal*, 54: 640 - 655.
- Frentzen M. 1998. Acyltransferases from basic science to modified seed oils. *Fett Lipid*, 100 (4 - 5): 161 - 166.
- Gao Ting-ting. 2012. Analysis of peony seed oil composition and storage conditions research [M. D. Dissertation]. Beijing: Beijing Forestry University. (in Chinese)
- 高婷婷. 2012. 牡丹籽油成分分析及储藏条件研究 [硕士论文]. 北京: 北京林业大学.
- Hanke C, Wolter F P, Coleman J, Peterek G, Frentzen M. 1995. A plant acyltransferase involved in triacylglycerol biosynthesis complements an *escherichia-coli* sn-1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase mutant. *European Journal of Biochemistry*, 232 (3): 806 - 810.
- Jako C, Taylor D C. 2001. Seed-specific over-expression of an *Arabidopsis* cDNA encoding a diacylglycerol acyltransferase enhances seed oil content and seed weight. *Plant Physiology*, 126 (2): 861 - 874.
- Körbes A P, Kulcheski F R, Margis R, Margis-Pinheiro M, Turchetto-Zolet A C. 2016. Molecular evolution of the lysophosphatidic acid acyltransferase (*LPAT*) gene family. *Molecular Phylogenetics & Evolution*, 96: 55 - 69.
- Kim H U, Li Y, Huang A H C. 2005. Ubiquitous and endoplasmic reticulum-located lysophosphatidyl acyltransferase, *LPAT2*, is essential for female but not male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 17 (4): 1073 - 1089.
- Knutzon D S, Lardizabal K D, Nelsen J S, Bleibaum J L, Davies H M, Metz J G. 1995. Cloning of a coconut endosperm cDNA encoding a 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase that accepts medium-chain-length substrates. *Plant Physiology*, 109: 999 - 1006.
- Laurent P, Huang A H. 1992. Organ- and development-specific acyl coenzyme A lysophosphatidate acyltransferases in palm and meadowfoam. *Plant Physiology*, 99 (4): 1711 - 1715.
- Li S S, Yuan R Y, Chen L G, Wang L S, Hao X H, Wang L J, Zheng X C, Du H. 2015. Systematic qualitative and quantitative assessment of fatty acids in the seeds of 60 tree peony (*Paeonia* section *Moutan* DC.) cultivars by GC - MS. *Food Chemistry*, 173: 133 - 140.
- Libeisson Y H, Shorrosh B, Beisson F, Andersson M X, Arondel V, Bates P D, Baud S, Bird D, Debono A, Durrett T P. 2010. Acyl-lipid metabolism. *Arabidopsis Book*, 8 (8): e0133.
- Livak K J, Schmittgen T D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 25: 402 - 408.
- Liu Zheng-jie, Zhang Yuan, Wang Yu-mei, Liang Wei, Hua Jin-ping. 2013. Construction and transformation of RNAi vector of gene *GhDGAT1* in upland cotton. *Journal of China Agricultural University*, 18 (5): 1 - 8. (in Chinese)
- 刘正杰, 张园, 王玉美, 梁伟, 华金平. 2013. 陆地棉 *GhDGAT1* 基因干涉载体构建与遗传转化. *中国农业大学学报*, 18 (5): 1 - 8.
- Maisonneuve S, Bessoule J J, Lessire R, Delseny M, Roscoe T J. 2010. Expression of rapeseed microsomal lysophosphatidic acid acyltransferase isozymes enhances seed oil content in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 152 (2): 670 - 684.
- Qi Jun-chao, Zhou Hai-mei, Ma Jin-qi, Li Pu. 2005. Analysis of the chemical constituents in peony seed oil by GC - MS. *Cereals Oils*, (11): 22 - 23. (in Chinese)
- 戚军超, 周海梅, 马锦琦, 李朴. 2005. 牡丹籽油化学成分 GC-MS 分析. *粮食与油脂*, (11): 22 - 23.
- Rao S S, Hildebrand D. 2009. Changes in oil content of transgenic soybeans expressing the yeast gene. *Lipids*, 44 (10): 945 - 951.

- Roscoe T J. 2005. Identification of acyltransferases controlling triacylglycerol biosynthesis in oilseeds using a genomics-based approach. *European Journal of Lipid Science & Technology*, 107 (4): 256 – 262.
- Sørensen B M, Furukawa-Stoffer T L, Marshall K S, Page E K, Mir Z, Forster R J, Weselake R J. 2005. Storage lipid accumulation and acyltransferase action in developing flaxseed. *Lipids*, 40 (10): 1043 – 1049.
- Song Shu-xiang, Guo Xian-feng, Ma Yan, Li Jun-jie, Han Lu-le. 2016. Isolation and expression analysis of *PoFAD2* gene in *Paeonia ostii*. *Acta Horticulturae Sinica*, 43 (2): 347 – 355. (in Chinese)
- 宋淑香, 郭先锋, 马 燕, 李俊杰, 韩璐璐. 2016. 凤丹 (*Paeonia ostii*) 脂肪酸去饱和酶基因 *PoFAD2* 的克隆及表达分析. *园艺学报*, 43 (2): 347 – 355.
- Upadhyay S K, Misra A, Srivastava R, Surolia N, Surolia A, Sundd M. 2009. Structural insights into the acyl intermediates of the *Plasmodium falciparum* fatty acid synthesis pathway: the mechanism of expansion of the acyl carrier protein core. *Journal of Biological Chemistry*, 284 (33): 22390 – 22400.
- Weselake R J, Taylor D C, Rahman M H, Shah S, Laroche A, McVetty P B, Harwood J L. 2009. Increasing the flow of carbon into seed oil. *Biotechnology Advances*, 27: 866 – 878.
- Yang Yong, Liu Jia-kun, Zeng Xiu-li, Wu Yun, Song Hui-xing, Liu Guang-li. 2015. A comparative study on composition of seed oil fatty acids of some wild populations of *Paeonia decomposita*. *Acta Horticulturae Sinica*, 42 (9): 1807 – 1814. (in Chinese)
- 杨 勇, 刘佳坤, 曾秀丽, 吴 云, 宋会兴, 刘光立. 2015. 四川牡丹部分野生居群种子脂肪酸组分比较. *园艺学报*, 42 (9): 1807 – 1814.
- Yuan Y, Liang Y, Gao L, Sun R, Zheng Y, Li D. 2015. Functional heterologous expression of a lysophosphatidic acid acyltransferase from coconut (*Cocos nucifera* L.) endosperm in *Saccharomyces cerevisiae* and *Nicotiana tabacum*. *Scientia Horticulturae*, 192: 224 – 230.
- Zhang Jun-ping, Jiang Mu-lan, Gong Yang-min, Wan Xia, Liang Zhuo, Huang Feng-hong. 2012. Influence of expression of *Phaeodactylum tricornutum* LPAAT gene in yeast on oil content and fatty acid composition of TAG. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 34 (5): 483 – 488. (in Chinese)
- 张军平, 江木兰, 龚阳敏, 万 霞, 梁 焯, 黄凤洪. 2012. 三角褐指藻 LPAAT 基因在酵母中表达对脂肪酸的影响. *中国油料作物学报*, 34 (5): 483 – 488.
- Zhang M, Fan J L, Taylor D C, Ohlrogge J B. 2009. *h* and *PDAT1* acyltransferases have overlapping functions in *Arabidopsis* triacylglycerol biosynthesis and are essential for normal pollen and seed development. *Plant Cell*, 21 (12): 3885 – 3901.
- Zhang Q Y, Niu L X, Yu R, Zhang X X, Bai Z Z, Duan K, Gao Q H, Zhang Y L. 2016. Cloning characterization, and expression analysis of a gene encoding a putative lysophosphatidic acid acyltransferase from seeds of *Paeonia rockii*. *Applied Biochemistry & Biotechnology*, 182 (2): 721 – 741.
- Zhang Q, Yu R, Sun D, Bai Z Z, Li H, Xue L, Zhang Y L, Niu L X. 2017. PrLPAAT4, a putative lysophosphatidic acid acyltransferase from *Paeonia rockii*, plays an important role in seed fatty acid biosynthesis. *Molecules*, 22 (10): 1694.
- Zou J, Katavic V, Giblin E M, Barton D L, Mackenzie S L, Keller W A, Hu X, Taylor D C. 1997. Modification of seed oil content and acyl composition in the brassicaceae by expression of a yeast *sn-2* acyltransferase gene. *Plant Cell*, 9 (6): 909 – 923.