

doi:10.7668/hbxb.2014.05.007

甘蓝型油菜 *LPAT5* 基因克隆与表达分析

肖旦望¹, 刘 聪¹, 陈社员², 官春云^{1,2}, 熊兴华^{1,2}

(1. 湖南农业大学 作物基因工程湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410128; 2. 湖南农业大学 国家油料改良中心湖南分中心, 湖南 长沙 410128)

摘要:克隆并对溶血磷脂酸酰基转移酶时空表达和逆境表达进行分析,旨在为进一步研究其生物学功能奠定基础。结合同源克隆与半定量 RT-PCR 的方法,克隆得到甘蓝型油菜湘油 15 *LPAT5* 的 1 条全长 1 041 bp 的 CDs 序列,并命名为 *BnLPAT5*。序列分析表明,它具有 LPLAT_LCLAT1 样结构域,属于 LPLAT 超基因家族。时空表达分析表明,*BnLPAT5* 在根中的表达量最高,是茎和胚的 2 倍。逆境分析表明,*BnLPAT5* 在 NaCl、PEG4000、水渍、6BA 和 ABA 的胁迫下呈现 2 种不同的表达模式,他们均对 *BnLPAT5* 基因的表达具有抑制作用。在 NaCl、PEG4000 及水渍处理下,*BnLPAT5* 呈“骤降缓升”的表达模式,处理 3 h 时,达到最低表达量。对于 6BA 和 ABA 的处理,*BnLPAT5* 却呈现“缓降缓升”的表达模式,处理 12 h 时,表达量最低。极差分析显示,高盐、干旱、水渍、6BA 和 ABA 对 *BnLPAT5* 基因的表达影响程度相当,相对而言,高盐对其表达的影响较大。试验首次从甘蓝型油菜中克隆得到 *LPAT5* 的 1 个拷贝,并分析了其时空表达和逆境表达,认为所得基因为普遍表达基因,并对干旱比较敏感。

关键词:*LPAT5*; 甘蓝型油菜; 时空表达; 非生物逆境; 表达分析

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2014)05-0033-06

Cloning and Expression Analysis of *LPAT5* from *Brassica napus*

XIAO Dan-wang¹, LIU Cong¹, CHEN She-yuan², GUAN Chun-yun^{1,2}, XIONG Xing-hua^{1,2}

(1. Crop Gene Engineering Key Laboratory of Hunan Province, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Hunan Branch of National Oilseed Crops Improvement Center, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: In order to further study on biological function of *BnLPAT5*, we cloned and analysed this gene for its temporal and spatial expression and stress expression. Combined with the technology of homology-based cloning and semi-quantitative RT-PCR, one copy of *LPAT5* full-length CDs sequence (1 041 bp) had been cloned from *Brassica napus* of Xiangyou 15 in our study, and designated as *BnLPAT5*. Sequence analysis revealed that *BnLPAT5* had the LPLAT_LCLAT1 like domain and belonged to the LPLAT superfamily. Temporal and spatial expression results showed that the highest expression of *BnLPAT5* was in root and the expression levels was two times of stem and embryo. Stress analysis indicated that *BnLPAT5* presented two kinds of expression patterns under the treatments of NaCl, PEG4000, waterlogging, 6BA and ABA, and which limited to the expression of *BnLPAT5*. Under the treatment of NaCl, PEG4000 and water logging, *BnLPAT5* presented a model of, rapidly fall and then slowly ascent and the minimum was at 3 h after treatment. As for the treatment of 6BA and ABA, *BnLPAT5* presented a model of slowly ascent and then slowly fall' and the minimum was at 12 h after treatment. Compared the influence of, high-salt, arid, water logging, 6BA and ABA, range analysis showed those factors regulated the expression of *BnLPAT5* in the similarity level. In comparison, high-salt's influence was more obvious. A copy of *LPAT5* was isolated from *Brassica napus* and analysed its temporal and spatial expression and stress expression for the first time. We thought *BnLPAT5* was a ubiquitous expression gene and sensitive to the arid.

Key words: *LPAT5*; *Brassica napus*; Temporal and spatial expression; Abiotic stress; Expression analysis

溶血磷脂酸酰基转移酶 (LPAT; EC 2.3.1.51) 作为 TAG 组装过程中介导 sn-2 位置上酰基化反应

收稿日期: 2014-07-22

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (“863” 计划) 项目 (2012AA101107-3); 湖南农业大学作物学科开放基金项目 (ZWKF201303)

作者简介: 肖旦望 (1988-), 男, 湖南益阳人, 在读硕士, 主要从事分子生物学研究。

通讯作者: 熊兴华 (1967-), 男, 湖南长沙人, 副研究员, 博士, 主要从事分子生物学研究。

的一个关键酶,具有催化溶血磷脂酸转变成磷脂酸的功能^[1]。在调节植物生长发育,调控种子含油量^[2]、膜不对称性和多态性^[3]及甘油酯的立体分布(Stereospecific distribution)和响应非生物逆境^[4]等方面具有重要作用。

目前,LPAT 已从拟南芥^[5]、椰子^[6-8]、油菜^[9-10]、甘蓝^[11]、绣线菊^[12-13]、棕榈^[14]、玉米^[15]、红花^[16-17]、蓖麻^[18]和花生^[19]等植物中分离。研究显示 LPAT 具有多种异构酶,且具有不同的生物学功能。以拟南芥为例,拟南芥中至少存在 6 种异构酶,其中 LPAT1 定位于质体,与胚胎发育密切相关^[20]。LPAT2 定位于内质网,影响雌配子的发育,LPAT3 定位未知,却主要在花粉中表达^[5],同样关于 LPAT 能够影响生殖细胞的发育在果蝇上也有报道^[21]。LPAT4 和 LPAT5 在体外检测不到溶血磷脂酸酰基转移酶活性,它们可能与心磷脂合成有关^[22]。以及 2009 年新发现的一个由 At4g24160 编码的可溶性 LPAT,兼具酯酶和水解酶活性,推测其在维持膜的稳定性上具有重要作用^[23]。

目前,油菜中已经克隆的 LPAT 基因包括 BAT2^[9]、BAT1. 5、BAT1. 12 和 BAT1. 13^[24],其中 BAT2 属于油菜 LPAT1 的范畴,BAT1. 5、BAT1. 12 和

BAT1. 13 属于油菜 LPAT2 的范畴,其余油菜 LPAT 异构酶基因均未见报道。关于 LPAT5 的报道,也仅限于拟南芥。因此,克隆并研究油菜 LPAT5 基因的表达,可以弥补在油菜 LPAT5 基因研究上的空白,从而为进一步研究其功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料及试剂

湘油 15 (作物基因工程湖南省重点实验室保种),pMD-19 T 载体购自宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa)。反转录试剂盒、TransZol UP 植物总 RNA 提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、DEPC、高保真 DNA 聚合酶、dNTP、100 bp DNA Maker、DNase I 等均购自北京全式金生物技术有限公司(Trans-Gen)。非生物逆境处理试剂 PEG4000、ABA、6BA 和 NaCl 等购自索莱宝科技有限公司(Solarbio)。

1.2 方法

1.2.1 *BnLPAT5* 基因克隆 通过同源比对拟南芥、白菜、甘蓝和油菜已知 EST 的方法,结合 Primer 5 设计引物,并编号为 LPAT5-Fw 和 LPAT5-Rv。该对引物的相关信息如表 1 所示。

表 1 PCR 反应引物及其参数

Tab. 1 PCR reaction primers and parameters

引物名称 Primer name	上游引物(5'-3') Forward primer	下游引物(5'-3') Reverse primer	退火温度/℃ Annealing temperature	循环数 No. of cycles
LPAT5	CTGATGGTGCTGGTTTCAACAG	GAAATTGGATAGAGTCTTAACCTC	54	35
BnE5	CTTGAGGCAGATGGTTTCCAGT	ATTTGGGATTTGGTTTGGCTG	62	25
ACTIN	CGAGCAGGAGATGGAGACT	GCTGAGGGAAGCAAGAATG	58	28

取 22 ℃,光周期为 16 h/8 h 条件下培养至 2 片真叶的湘油 15 幼苗 50 ~ 100 mg,液氮充分研磨后,按照 Trans UP 试剂盒上提供的方法,进行总 RNA 的提取。总 RNA 的提取以及第 1 链 cDNA 合成的具体方法,分别参见 TransGen TRIzol RNA 提取试剂盒和 EasyScript™ First-Strand cDNA Synthesis Super-Mix 试剂盒说明书。

以上述 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系:模板 1 μL,10 mmol/L dNTPs 0.5 μL,2 μmol/L LPAT5-Fw 0.75 μL,2 μmol/L LPAT5-Rv 0.75 μL,10 × Reaction Buffer 1 μL,HiFi 高保真 DNA 聚合酶 0.5 μL,ddH₂O 5.5 μL。程序:预变性 94 ℃ 3 min;94 ℃ 45 s,54 ℃ 45 s,72 ℃ 90 s,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶检测,并回收目标带。将回收产物克隆至 pMD19-T 载体,经菌落 PCR 鉴定后测序。

1.2.2 *BnLPAT5* 序列分析 利用 NCBI 数据库分

别对 *BnLPAT5* 进行 BlastN 和 BlastP 序列比对分析。使用 Mega 5.2 进行油菜、拟南芥、白菜和甘蓝的 LPAT5 相似性以及多态性分析。利用 Expasy 数据库进行理化性质预测、保守结构域和同源建模预测以及氨基酸功能预测。

1.2.3 *BnLPAT5* 聚类分析 用 Mega 5.2 对拟南芥、白菜、甘蓝以及甘蓝型油菜的核苷酸序列进行 UPGMA 聚类。同时,从 NCBI 数据库中检索其他已知植物的 LPAT5 氨基酸序列,与拟南芥 LPAT 家族氨基酸序列进行 UPGMA 分析。

1.2.4 *BnLPAT5* 基因表达特征分析 *BnLPAT5* 时空表达分析:分别提取种植于田间的湘油 15 开花期植株的根、茎、叶、花以及开花后 1 ~ 5 周的胚和 1 ~ 4 周果荚的总 RNA,进行半定量 RT-PCR 分析。以甘蓝型油菜 ACTIN (FJ529167.1) 基因为内参,进行半定量 RT-PCR,检测甘蓝型油菜 *BnLPAT5* 基因表达。RT-PCR 反应体系(10 μL):5 U/μL DNA Polymerase

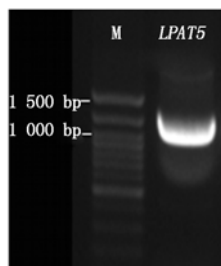
0.2 μ L, 10 mmol/L dNTPs 0.1 μ L, 10 \times PCR 缓冲液 1 μ L, 50 ng/ μ L 模板 1 μ L, 2 μ mol/L 正反引物各 0.5 μ L, ddH₂O 6.7 μ L。PCR 程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 34 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 恒温保存。所用引物、退火温度及循环数信息见表 1。

***BnLPAT5* 非生物逆境胁迫表达分析:** 将油菜种子于育苗盆中, 待长出 4~5 片真叶时用于处理。分别提取经处理 0, 3, 6, 12, 24 h 的油菜叶片 RNA 进行半定量 RT-PCR 分析。PCR 引物、体系和程序及电泳同上。处理方法参照文献[4, 25], 略有改变。水渍处理是将育苗钵浸泡至清水中, 水面淹没油菜根部; 干旱胁迫用 20% PEG4000 溶液喷洒油菜叶面浇灌根部; 盐胁迫以 300 mmol/L NaCl 溶液喷洒叶面浇灌根部; 植物生长调节剂处理是分别将浓度为 0.1 mg/L 6-BA 和 3 mg/L ABA 溶液喷洒叶面浇灌根部。叶面喷洒量为 2 mL/株, 根部浇灌量即将育苗钵中土壤浇透, 约 50 mL/钵。

2 结果与分析

2.1 *BnLPAT5* 全长 CDs 序列的克隆

以湘油 15 幼苗 RNA 反转录所得 cDNA 为模板, PCR 扩增结果如图 1 所示。所得片段大小约 1 000 bp 左右, 测序结果显示, 该片段长度为 1 041 bp, 将其命名为 *BnLPAT5*, GenBank 登录号为 KJ186847。



M. Trans 100 bp PlusII DNA 分子量标准。

M. Trans 100 bp PlusII DNA ladder.

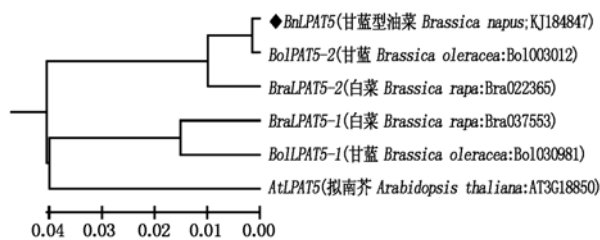
图 1 *LPAT5* RT-PCR 电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis analysis of *LPAT5* RT-PCR products

2.2 *BnLPAT5* 生物信息学分析

2.2.1 *BnLPAT5* 核苷酸序列分析 BlastN 分析表明, *BnLPAT5* 与深山南芥 *LPAT5* 全长 CDs (XM_002885236) 的相似度最高, 相似度和覆盖度分别为

89% 和 99%。BlastX 比对结果与 BlastN 基本相同。Mega 5.2 对拟南芥、白菜、甘蓝以及 *BnLPAT5* 进行序列比对和聚类分析显示, *BnLPAT5* 同 *BolLPAT5-2* 的相似度最高, 其相似度为 99.7%, 其次为 *BraLPAT5-2*, 其值为 97.9%。核苷酸聚类结果如图 2 所示。聚类结果同相似度分析结果完全一致。表明所得 *BnLPAT5* 为甘蓝型油菜 *LPAT5* 的 1 个拷贝, 且同白菜和甘蓝 *LPAT5-2* 同源性较高。



BraLPAT5-1 和 *BraLPAT5-2* 来自白菜, 其分别定位于 A01 和 A05 号染色体; *BolLPAT5-1* 和 *BolLPAT5-2* 来自于甘蓝, 其中 *BolLPAT5-1* 定位在 C01; 而 *BolLPAT5-2* 定位未知(来源于 Bioinformatics at Geboc 数据库); “◆”标记的 *BnLPAT5* 表示从甘蓝型油菜克隆的 *LPAT5* 基因。

BraLPAT5-1 and *BraLPAT5-2* from *B. rapa*, which were located on chromosome A01 and A05, respectively; *BolLPAT5-1* and *BolLPAT5-2* from *B. oleracea*, in which *BolLPAT5-1* was located on chromosome C01; *BolLPAT5-2* was still unknown; The *BnLPAT5* with “◆” marker means *LPAT5* gene sequence from *B. napus*.

图 2 拟南芥、白菜、甘蓝和甘蓝型油菜 *LPAT5* 核苷酸聚类分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of *LPAT5* gene CDs from *A. thaliana*, *B. rapa*, *B. oleracea* and *B. napus*

2.2.2 *BnLPAT5* 氨基酸序列分析 通过 ExPASy 蛋白质数据库 (<http://www.expasy.org>) 对 *BnLPAT5* 的理化性质分析显示, *BnLPAT5* 由 346 个氨基酸组成, 其相对分子量和等电点分别为 40.40 kDa 和 9.02。氨基酸组成显示, 带正电荷氨基酸为 Lys 和 Arg, 占氨基酸总数的 12.1%, 带 42 个单位的正电荷。带负电的氨基酸为 Asp 和 Glu, 占氨基酸总数的 9.8%, 带 33 个单位的负电荷。该基因所编码的蛋白比较稳定, 其稳定性为 60.89%, 在酵母细胞内的半衰期大于 20 h, 在大肠杆菌细胞内的半衰期大于 10 h。同时, 该蛋白的脂肪族指数和缩水性指数分别为 0.907 和 0.033。

保守结构域分析显示, *BnLPAT5* 所编码的蛋白具备 LPLAT_LCLAT1 样结构域, 属于 LPLAT 超基因家族, 保守结构域如图 3 所示。

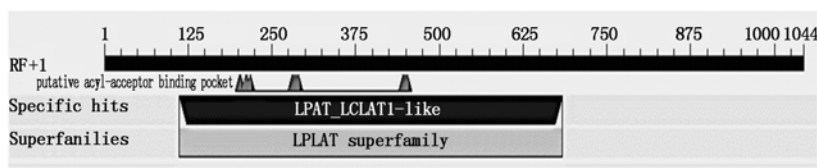
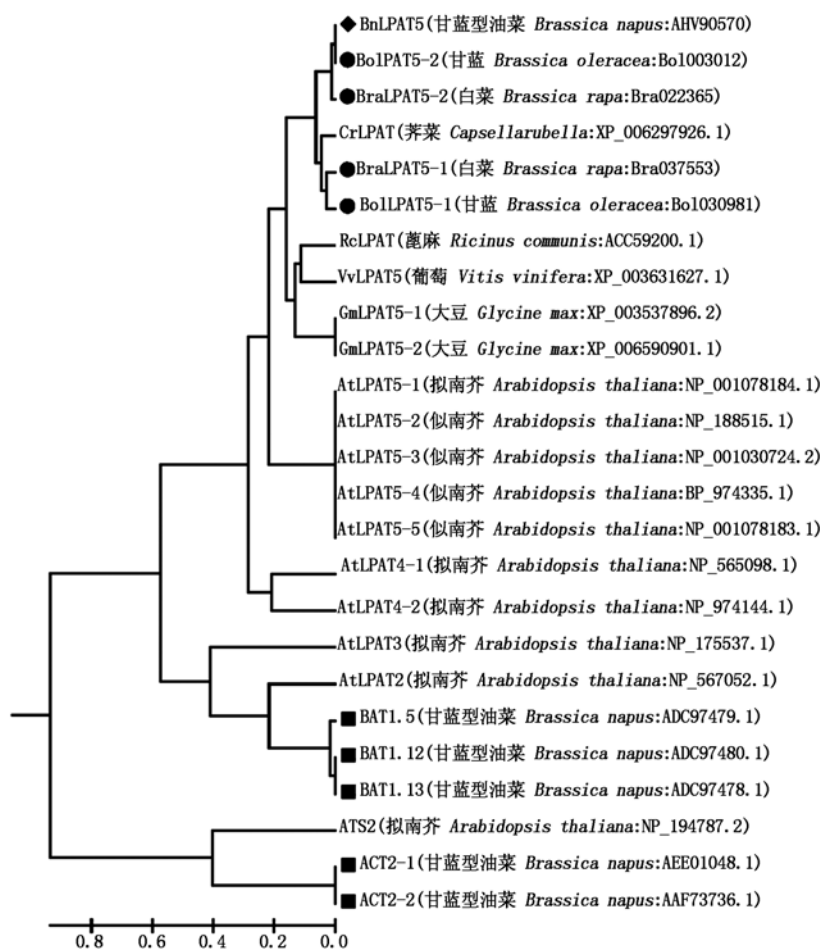


图 3 *BnLPAT5* 的保守结构域

Fig. 3 Conserved domain of *BnLPAT5*

2.2.3 BnLPAT5 聚类分析 经 BlastP, 获取 NCBI 数据库中已经公布的其他植物 LPAT5 氨基酸序列。所得序列如下: 荠菜 (XP_006297926.1)、蓖麻 (ACC59200.1)、葡萄 (XP_003631627.1) 和 大豆 (XP_003537896.2 和 XP_006590901.1)。将上述序列同拟南芥该家族成员 (NP_194787.2、NP_567052.1、NP_175537.1、NP_565098.1、NP_974144.1、NP_001078184.1、NP_188515.1、NP_001030724.2、NP_974335.1 和 NP_001078183.1)、白菜 (Bra037553 和 Bra022365)、甘蓝 (Bol030981 和 Bol003012) 以及油菜 已知的 LPAT 氨基酸序列 (AEE01048.1、AAF73736.1、

ADC97479.1、ADC97480.1 和 ADC97478.1) 进行聚类, 聚类结果如图 4 所示。由图 4 可知, 以 0.5 为节点, 可以将其分成三大类。第 1 类为 LPAT1, 它包括 ATS2、ACT2-1 和 ACT2-2; 第 2 大类包括 LPAT2 和 LPAT3, 包括 AtLPAT3、AtLPAT2、BAT1.5、BAT1.12 和 BAT1.13; 第 3 类由 LPAT4 和 LPAT5 组成, 其中 BnLPAT5 便归于此类。同时, BnLPAT5 与 BolLPAT5-2 和 BraLPAT5-2 亲缘关系最近, 该结果与核苷酸聚类结果一致。进一步推断, BnLPAT5 为甘蓝型油菜 LPAT5 家族中的一员。



“◆”表示从甘蓝型油菜克隆所得的 LPAT5 氨基酸序列; “●”表示白菜和甘蓝型 LPAT5 氨基酸序列; “■”表示已报道的甘蓝型油菜 LPAT 氨基酸序列。

The BnLPAT5 in “◆” marker mean LPAT5 amino acid sequence isolated from *B. napus*; The LPAT5 from *B. rapa* or *B. oleracea* were in “●”; The reported LPAT amino acids sequences of *B. napus* were in “■” marker.

图 4 不同植物可能的 LPAT5 及拟南芥 LPAT 家族氨基酸聚类图

Fig. 4 Phylogenetic tree of amino acid sequences of probable LPAT5 of different plants and *Arabidopsis thaliana* LPAT family

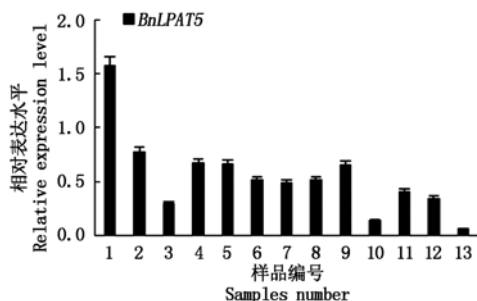
2.3 BnLPAT5 表达分析

2.3.1 BnLPAT5 时空表达分析 半定量 RT-PCR 结果 (图 5) 显示, BnLPAT5 主要在根中表达, 其表达量大概是茎、花和胚表达量的 2 倍, 是叶表达量的 6.5 倍。在整个胚的发育过程中呈现先降低后升高后降低的趋势, 但变化幅度不大。在果荚发育的过

程呈现先升高后降低的趋势, 在 2 周果荚中相对表达量最高, 其相对表达量为 0.4。

2.3.2 BnLPAT5 胁迫表达结果 非生物逆境胁迫下, BnLPAT5 在叶中的表达主要呈现 2 种不同的模式, 结果如图 6 所示。在 NaCl、PEG4000 及水渍处理下, BnLPAT5 呈“骤降缓升”的表达模式, 处理 3 h

时,达到最低表达量。对于 6BA 和 ABA 的处理, *BnLPAT5* 却呈现“缓降缓升”的表达模式,处理 12 h 时,表达量最低。极差分析显示,高盐、干旱、水渍、6BA 和 ABA 对 *BnLPAT5* 基因的表达影响程度相当,相对而言,高盐对其表达的影响较大。



1~4. 根、茎、叶和花;5~9. 花后 1~5 周胚;10~13. 花后 1~4 周果荚。
1~4. Root, stem, leaf and flower; 5~9. 1 to 5 weeks after pollination embryos; 10~13. 1 to 4 weeks after pollination capsules.

图 5 *BnLPAT5* 的时空表达

Fig. 5 Temporal and spatial expression of *BnLPAT5*

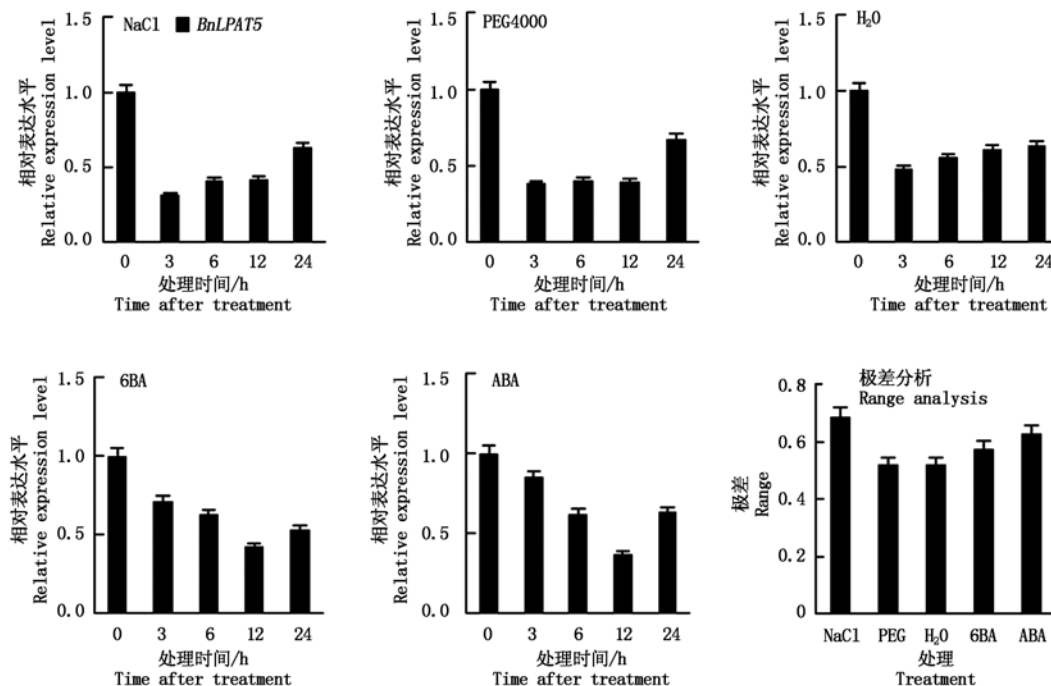


图 6 逆境胁迫下 *BnLPAT5* 的表达模式与极差分析

Fig. 6 Express pattern and range analysis of *BnLPAT5* under abiotic stresses

BnLPAT5 在甘蓝型油菜的各个发育时期均有表达,为普遍型表达基因。同时,拟南芥 *LPAT5* 存在 5 种不同的剪接形式,他们可能在不同的组织或不同的时期行使不同的生物学功能。甘蓝型油菜与拟南芥同属十字花科植物,且其作为一个异源四倍体植物,其 *LPAT5* 存在多少种剪接形式以及对应某种特定的剪接形式是由 A/C 基因组中的哪个基因组来编码,仍有待进一步研究。本研究所得 CDs 序列 *BnLPAT5*,可能仅仅是 C 基因组 *LPAT5* 的一种剪接形式。

3 讨论

核苷酸聚类及氨基酸聚类结果表明,与 *BraLPAT5-2* 相比, *BraLPAT5-1* 与 *BolLPAT5-1* 的序列相似度较高,同理, *BraLPAT5-2* 与 *BolLPAT5-2* 的序列相似度较高。这一结果与芸薹属 A、B、C 3 个染色体组间的异源配对的频率高于每个染色体组内的同源配对频率,染色体组间的同源性高于染色体组内的同源性的结论相一致^[26]。同时, *BraLPAT5-1* 与 *BolLPAT5-1* 分别来自于 A01 和 C01 号染色体,说明该基因在染色体定义上也存在一定的相似性。由于甘蓝型油菜是白菜 (AA) 和甘蓝 (CC) 的天然杂交种,属于异源四倍体植物,故而欲从 A/C 基因组水平上,区分某一基因的不同拷贝,就目前的技术水平来说,仍具有一定的难度。

LPAT 作为 TAG 合成过程中,催化甘油-3-磷酸骨架 Sn-2 上的酰基反应,通常被认为 *LPAT* 基因的表达与种子含油量之间存在某种必然的联系。然而 *BnLPAT5* 在根中的表达量最高,是胚中表达量的 2 倍。说明该基因在根的生长发育过程中具有一定的作用,而与种子含油量无关,和 Chen 等^[19]的研究结果一样。

在高盐、干旱、水渍、生长素类似物等非生物逆境的胁迫下, *BnLPAT5* 在叶中的表达均处于抑制状态,说明油菜可能通过负调控 *BnLPAT5* 基因的表达

达,来适应上述 5 种非生物逆境,以实现其在该逆境条件下的正常生长。同时,从该基因在不同非生物逆境条件下的表达模式来看,*BnLPAT5* 的表达对高盐、干旱和水渍较为敏感。

参考文献:

- [1] Baud S, Dubreucq B, Miquel M, *et al.* Storage reserve accumulation in *Arabidopsis*: metabolic and developmental control of seed filling [M]. *The Arabidopsis Book*/American Society of Plant Biologists, 2008; e0113.
- [2] 陈四龙, 黄家权, 雷永, 等. 花生溶血磷脂酸酰基转移酶基因的克隆与表达分析 [J]. *作物学报*, 2012, 38 (2): 245 – 255.
- [3] Hishikawa D, Shindou H, Kobayashi S, *et al.* Discovery of a lysophospholipid acyltransferase family essential for membrane asymmetry and diversity [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105 (8): 2830 – 2835.
- [4] Kim H U, Vijayan P, Carlsson A S, *et al.* A mutation in the *LPAT1* gene suppresses the sensitivity of *fab1* plants to low temperature [J]. *Plant Physiology*, 2010, 153 (3): 1135 – 1143.
- [5] Kim H U, Li Y, Huang A H. Ubiquitous and endoplasmic reticulum-located lysophosphatidyl acyltransferase, *LPAT2*, is essential for female but not male gametophyte development in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2005, 17 (4): 1073 – 1089.
- [6] López-Villalobos A, Dodds P F, Hornung R. Changes in fatty acid composition during development of tissues of coconut (*Cocos nucifera* L.) embryos in the intact nut and *in vitro* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2001, 52 (358): 933 – 942.
- [7] Knutzon D S, Hayes T R, Wyrick A, *et al.* Lysophosphatidic acid acyltransferase from coconut endosperm mediates the insertion of laurate at the sn-2 position of triacylglycerols in lauric rapeseed oil and can increase total laurate levels [J]. *Plant Physiology*, 1999, 120 (3): 739 – 746.
- [8] Knutzon D S, Lardizabal K D, Nelsen J S, *et al.* Cloning of a coconut endosperm cDNA encoding a 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase that accepts medium-chain-length substrates [J]. *Plant Physiology*, 1995, 109 (3): 999 – 1006.
- [9] Bourgis F, Kader J C, Barret P, *et al.* A plastidial lysophosphatidic acid acyltransferase from oilseed rape [J]. *Plant Physiology*, 1999, 120 (3): 913 – 922.
- [10] Bernerth R, Frentzen M. Utilization of erucoyl-CoA by acyltransferases from developing seeds of *Brassica napus* (L.) involved in triacylglycerol biosynthesis [J]. *Plant Science*, 1990, 67 (1): 21 – 28.
- [11] Taylor D C, Barton D L, Giblin E M, *et al.* Microsomal lyso-phosphatidic acid acyltransferase from a brassica oil-eracea cultivar incorporates erucic acid into the sn-2 position of seed triacylglycerols [J]. *Plant Physiology*, 1995, 109 (2): 409 – 420.
- [12] Lassner M W, Levering C K, Davies H M, *et al.* Lysophosphatidic acid acyltransferase from meadowfoam mediates insertion of erucic acid at the sn-2 position of triacylglycerol in transgenic rapeseed oil [J]. *Plant Physiology*, 1995, 109 (4): 1389 – 1394.
- [13] Cao Y Z, Oo K C, Huang A H. Lysophosphatidate acyltransferase in the microsomes from maturing seeds of meadowfoam (*Limnanthes alba*) [J]. *Plant Physiology*, 1990, 94 (3): 1199 – 1206.
- [14] Oo K C, Huang A H. Lysophosphatidate acyltransferase activities in the microsomes from palm endosperm, maize scutellum, and rapeseed cotyledon of maturing seeds [J]. *Plant Physiology*, 1989, 91 (4): 1288 – 1295.
- [15] Brown A P, Coleman J, Tommey A M, *et al.* 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 [J]. *Plant Molecular Biology*, 1994, 26 (1): 211 – 223.
- [16] Ichihara K, Asahi T, Fujii S. 1-Acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase in maturing safflower seeds and its contribution to the non-random fatty acid distribution of triacylglycerol [J]. *European Journal of Biochemistry/FEBS*, 1987, 167 (2): 339 – 347.
- [17] Griffiths G, Stobart A K, Stymne S. The acylation of sn-glycerol 3-phosphate and the metabolism of phosphatidate in microsomal preparations from the developing cotyledons of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed [J]. *The Biochemical Journal*, 1985, 230 (2): 379 – 388.
- [18] Arroyo-Caro J M, Chileh T, Kazachkov M, *et al.* 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 [J]. *Plant Science*, 2013, 199 – 200: 29 – 40.
- [19] Chen S L, Huang J Q, Lei Y, *et al.* Identification and characterization of a gene encoding a putative lysophosphatidyl acyltransferase from *Arachis hypogaea* [J]. *Journal of Biosciences*, 2012, 37 (6): 1029 – 1039.
- [20] Kim H U, Huang A H. Plastid lysophosphatidyl acyltransferase is essential for embryo development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2004, 134 (3): 1206 – 1216.
- [21] Steinhauer J, Gijón M A, Riekhof W R, *et al.* Drosophila lysophospholipid acyltransferases are specifically required for germ cell development [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2009, 20 (24): 5224 – 5235.
- [22] Li Y H, Basil S, Fred B, *et al.* Acyl-lipid metabolism [M]. *Am Soc Plant Biol*, 2013: 1 – 70.
- [23] Ananda K, Ghosh N C S R. At4g24160, A soluble acyl-coenzyme a-dependent lysophosphatidic acid acyltransferase [J]. *Plant Physiology*, 2009, 151: 869 – 881.
- [24] Maisonneuve S, Bessoule J J, Lessire R, *et al.* Expression of rapeseed microsomal lysophosphatidic acid acyltransferase isozymes enhances seed oil content in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2010, 152 (2): 670 – 684.
- [25] Gong Q, Li P, Ma S, *et al.* Salinity stress adaptation competence in the extremophile *Thellungiella halophila* in comparison with its relative *Arabidopsis thaliana* [J]. *The Plant Journal*, 2005, 44 (5): 826 – 839.
- [26] 姚行成. 芸薹属栽培种与野生种 *Brassica maurorum* 的种间杂交及基因组关系 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.