

油茶种子发育期油脂合成积累的 源汇基因协同表达

吴 波, 阮成江*, 丁 健, 杜 维, 李景滨, 闫 蕊, 刘凌悦

(大连民族大学 资源植物研究所, 辽宁大连 116600)

摘 要: 为探讨油茶种子油脂的合成积累与源汇基因表达间的关系, 以高油品系‘MY003’和低油品系‘MY008’的不同发育时期(6月2日、7月4日、8月5日、9月3日)种子为材料, 利用氯仿甲醇法测定含油率, 采用qRT-PCR技术分析油脂合成源基因(*GPD1*)和汇基因(*DGAT1*和*DGAT2*)在高低油种子间的表达差异及其对油脂合成积累的影响, 为进一步研究油茶种子油脂合成积累的分子机制提供理论依据。结果显示: (1) 油茶种子含油率均处于逐渐上升趋势(0.16%~24.1%), 并在7月4日以后开始迅速上升, 且‘MY003’种子含油率一直高于‘MY008’。(2) 在‘MY003’种子中*GPD1*、*DGAT1*和*DGAT2*基因表达量均明显高于‘MY008’, *DGAT1*和*DGAT2*在源基因*GPD1*高水平表达后仍出现表达高峰; 源基因*GPD1*在种子发育初期高表达, 促进了TAG前体G3P的高效合成, 而汇基因*DGAT1*和*DGAT2*在种子发育后期高表达, 则促进了TAG的高效积累, *GPD1*与*DGAT1*、*DGAT2*之间呈正相关关系。研究表明, 油茶种子油脂的合成积累来源于源基因*GPD1*和汇基因*DGAT1*与*DGAT2*的协同高表达。

关键词: 油茶; 油脂合成; 源基因; 汇基因; 表达分析

中图分类号: Q945.6⁺5; Q786

文献标志码: A

Coordinated Expression of Source and Sink Genes Involved in Lipid Biosynthesis and Accumulation during *Camellia oleifera* Seed Development

WU Bo, RUAN Chengjiang*, DING Jian, DU Wei, LI Jingbin, YAN Rui, LIU Lingyue

(Dalian Nationalities University, Institute of Plant Resources, Dalian, Liaoning 116600, China)

Abstract: The objective of this study is to explore the relationship between lipid biosynthesis and expression of source and sink genes during *Camellia oleifera* seed development. The line “MY003” with high oil content in the seeds and the line “MY008” with low oil content in the seeds were selected as sample trees. These seeds were harvested at June 2, July 4, August 5, and September 3. The oil contents in the seeds were determined by the method of chloroform methanol. The differential expression of source gene (*GPD1*) and sink genes (*DGAT1* and *DGAT2*) involved in lipid biosynthesis between high and low oil content lines were determined using qRT-PCR, and the effects of these three genes on lipid biosynthesis and accumulation were analyzed. The results showed that: (1) the oil contents in the seeds of two lines were in a gradual upward trend (0.16%–24.1%), and it began to rise rapidly after July 4. The oil contents in the seeds of “MY003” were higher than that of “MY008” at all stages; (2) The peak values of *GPD1*, *DGAT1*

收稿日期: 2017-07-31; 修改稿收到日期: 2017-11-07

基金项目: 贵州省科技计划项目(黔科合支撑[2017]2521, [2016]2517-1, [2016]2519, [2013][201])

作者简介: 吴 波(1991—), 男, 在读硕士研究生, 主要从事资源植物开发利用与遗传育种研究。E-mail: 512703926@qq.com

* 通信作者: 阮成江, 教授, 主要从事木本油料种质创新与开发利用研究。E-mail: ruan@dlnu.edu.cn

and *DGAT2* expression in the seeds of “MY003” were significantly higher than that of “MY008” during seed development. The expression of *DGAT1* and *DGAT2* still appeared peak values after the high level expression of *GPD1*, but the peaks of *GPD1* gene appeared in the early period of seed development, and the peaks of *DGAT1* and *DGAT2* genes appeared in the later period of seed development. The high expression of source gene *GPD1* contributed to promote the TAG precursor G3P high synthesis efficiency in the early of seed development, and the high expression of sink genes *DGAT1* and *DGAT2* accelerated high TAG accumulation in later period of seed development. There were positively correlated relationships in expressions among *GPD1*, *DGAT1* and *DGAT2* genes. Thus, the coordinated expression of source gene *GPD1* and sink genes *DGAT1* and *DGAT2* resulted in the lipid biosynthesis and accumulation in *C. oleifera* seeds. These results could provide scientific bases for studying on molecular mechanism of lipid biosynthesis in the seeds of *C. oleifera*.

Key words: *Camellia oleifera*; lipid biosynthesis; source gene; sink gene; expression analysis

油茶(*Camellia oleifera* Abel.)是中国南方重要的木本油料树种,种子含油率高。油茶籽生产的山茶油不仅含有多不饱和脂肪酸(油酸占 75%以上),而且富含角鲨烯和茶多酚等多种生物活性物质^[1],长期食用可降低胆固醇和血脂,在预防心血管疾病和癌症等方面具有特殊功效^[2]。但中国油茶产量不稳定,种子含油率变化较大,正严重制约着中国油茶产业的快速健康发展。目前,对于油茶高低油品间种子油脂合成代谢机制的研究鲜有报道,且其调控的关键基因和代谢途径尚未见深层次解析。

油茶油脂的主要成分是三酰甘油(triacylglycerols, TAG),其含量与种子含油率密切相关^[3]。三酰甘油在内质网上形成,其组装过程通过 Kennedy 途径完成,首先,活化的 3-磷酸甘油(glycerol-3-phosphate, G3P)和脂酰 CoA 提供底物,在位于内质网膜上磷酸甘油脂酰转移酶 GPAT、溶血磷脂酸酰基转移酶 LPPAT、磷脂酸磷酸酯酶 PAP 和二酰甘油脂酰转移酶 DGAT 等酶的催化下最后形成三酰甘油。TAG 含量的多少取决于前体物质 3-磷酸甘油的积累,而关键酶 GPD1(glycerol-3-phosphate dehydrogenase)催化磷酸二羟丙酮到 3-磷酸甘油之间的氧化还原转化反应,调控 G3P 的正向合成,是甘油合成代谢途径中的限速酶,直接影响 G3P 和 TAG 水平^[4]。研究发现,在植物中过量表达 *GPD1* 基因,可增强植物 Kennedy 代谢途径,提高 TAG 含量^[5],Vigeolas 等^[6]在油菜中重组表达酵母 *GPD1* 基因,当基因表达量增加 2 倍可使油菜种子中 G3P 含量增加 3~4 倍,种子含油量提高 40%。DGAT 酶是 Kennedy 途径的最后一步,也是该途径的唯一限速酶,是 TAG 合成的关键基因,作用是将二酰甘油(diacylglycerol, DAG)催化最终生成 TAG^[7]。研

究证实, DGAT 在 TAG 合成途径中至关重要,影响种子含油量、种子重量、TAG 含量和脂肪酸组成, DGAT 有 *DGAT1* 和 *DGAT2* 两个非同源转录本, *DGAT1* 在 TAG 代谢中作用更广泛^[8]。研究发现,在野生型拟南芥中过表达 *DGAT1* 基因,可显著提高种子含油量和重量^[9];油桐 *DGAT2* 基因分别转入拟南芥和红酵母中发现,油桐 *DGAT2* 基因能够提高拟南芥种子含油量,并促进拟南芥种子与酵母油脂内脂肪酸的积累^[10]。

阮成江等^[11]研究表明,调控 *DGAT* 基因(汇基因)和 *GPD1* 基因(源基因)在提高种子含油率方面均有显著效果,而 TAG 含量与种子含油率密切相关。GPD1 是甘油合成代谢途径中的限速酶,也是 TAG 生物合成通路上的“源基因”,负责调控 TAG 合成底物 3-磷酸甘油的积累。DGAT 是 Kennedy 途径中最关键的酶^[11],催化 Kennedy 途径最后一步,在 DGAT 酶的催化下将 DAG 合成 TAG,是 TAG 合成途径的“汇基因”。Vanhercke 等^[12]将增加脂肪酸生物合成定义为“Push”,参与 TAG 合成组装定义为“Pull”,当两者共表达时可有效提高种子油脂含量和品质。因此,研究源汇基因在油脂合成积累中的协同作用对提高种子含油量和产量具有重要意义。

本研究以油茶高油品系“MY003”和低油品系“MY008”种子为材料,分析不同发育期种子含油率,采用 qRT-PCR 方法分析油脂合成源基因(*GPD1*)和汇基因(*DGAT1* 和 *DGAT2*)在高低油品系不同发育期种子中的表达,结合相应时期种子含油率和源汇基因表达的变化,揭示油茶高低油种子油脂合成积累与源汇基因表达间的关系,旨在为后续开展油茶种子含油量的遗传改良研究提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

以油茶高油品系“MY003”和低油品系“MY008”为试验材料,种子分别于 2016 年 6 月 2 日、7 月 4 日、8 月 5 日和 9 月 3 日,采自于贵州省玉屏侗族自治县油茶农业示范园区的油茶种质资源圃。样品均采自同一植株不同部位,果实采摘后立即剥取种子,用锡纸包裹后放入液氮中速冻,后置于实验室-80 ℃超低温冰箱保存。

1.2 方 法

1.2.1 种子含油率测定 种子含油率测定采用氯仿甲醇法^[13]:将-80 ℃超低温冰箱保存的油茶种子于液氮中充分研磨成匀质粉末状后,分别装入 50 mL 离心管中在冷冻干燥机中真空干燥 2 d(11 Pa,-53 ℃),取出后分别加入氯仿和甲醇溶液(2:1,V/V,均为色谱纯,购自 Honeywell 公司)漩涡震荡 5 min 后超声 30 min,小心吸取上清液转移至新离心管中,残渣再用氯仿甲醇溶液(2:1,V/V)再次提取,合并上清液加入 1/4 体积的质量浓度为 0.88%的 KCl 溶液,摇匀静置分层,分层后去掉上层,收集下层液转移至玻璃样品瓶中,挥发至恒重。
含油率(%)=(m_1-m_2)/ $m\times100$; m_1 为油脂和玻璃样品瓶的质量(g); m_2 为玻璃样品瓶的质量(g); m 为干燥样品粉末的质量(g),实验进行 3 次重复。

1.2.2 qRT-PCR 检测 油茶种子总 RNA 提取参照柱式植物总 RNA 提取试剂盒方法(上海生物工程有限公司)提取;cDNA 合成参照 PrimeScript™ RT Master Mix(Perfect Real Time)试剂盒方法(大连宝生物公司)合成第一链 cDNA。本实验室前期构建了油茶种子转录组数据库,获得了大量的功能基因注释以及差异表达基因信息,利用筛选得到的目的基因片段,通过 PrimerQuest 在线软件设计特异

引物(表 1)。采用 SYBR Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)试剂盒(大连宝生物公司)方法,20 μL 反应体系,使用 ABI7500 Real time PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司)推荐程序进行 qRT-PCR 实验,以 *CoEF1α* 为油茶内参基因,采用 2^{-ΔΔC_t} 方法分析目的基因相对表达量^[14],实验进行 3 次重复。

1.2.3 数据统计分析 数据表示为平均值±标准误差(Mean±SE),利用 SPSS 软件进行单因素方差分析和 LSD 法进行差异性检验($P<0.05$),采用 Origin8.5 作图。

2 结果与分析

2.1 油茶种子发育过程中含油率的动态变化

油茶果实及种子在 6 月 2 日至 9 月 3 日期间,颜色和体积都发生了明显变化(图 1)。在 6 月 2 日至 7 月 4 日期间,果实逐渐增大,种子颜色由白色转变为黄色,7 月 4 日以后种子由黄色逐渐开始变为褐色并硬化,果皮由青色转变为青黄色,光滑鲜亮。

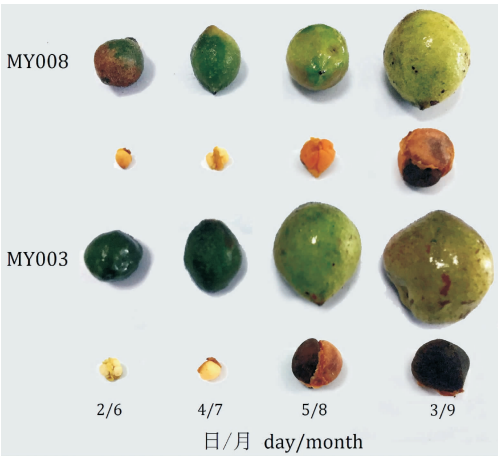


图 1 品系“MY003”和“MY008”果实和种子的形态和颜色
Fig.1 Morphology and color of fruits and seeds of the lines “MY003” and “MY008”

表 1 基因名称及实时荧光定量 PCR 引物

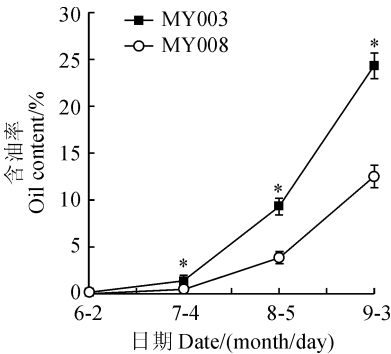
Table 1 Gene names and real time fluorescent quantitative PCR primer used in this study

基因名称 Gene name	蛋白名称 Protein name	引物序列 Primer sequence(5'→3')		扩增长度 Fragment length/bp
		正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer	
<i>CoEF1-α</i>	延伸因子 1-α Elongation factor 1-alpha	CATGATCACTGGTACCTCACAG	CAAGGGTAAAGGCAAGCAAAG	128
<i>GPD1</i>	甘油-3-磷酸酰脱氢酶 1 Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1	ACGGGTTGGAAATGGGAAATA	CCTTGACAGACGAGAACAGAAG	99
<i>DGAT1</i>	二酰甘油酰基转移酶 1 Diacylglycerol acyltransferase 1	GACGATGTAACCGTTCTTGCG	TTGGCTGCGGCTGCTGT	178
<i>DGAT2</i>	二酰甘油酰基转移酶 2 Diacylglycerol acyltransferase 2	TGGAAGCCTGATGGGAAAC	ATGCATTGGACGGTGATAGG	111

油茶种子不同发育期, 品系“MY003”和“MY008”含油率均处于逐渐上升趋势(图 2), 7 月 4 日开始迅速累积, 其中在 8 月 5 日至 9 月 3 日期间含油率增长幅度最快。各种子发育时期, 品系“MY003”的种子含油率均高于品系“MY008”。

2.2 GPD1、DGAT1 和 DGAT2 基因表达分析

GPD1 基因在品系“MY003”种子中表达量呈先微量下调再上调表达模式(图 3), 在 7 月 4 日以后表达量开始迅速增长, 且在 9 月 3 日到达峰值; GPD1 基因在品系“MY008”种子中先呈微量下调表达, 7 月 4 日以后开始上调表达, 后微量下调。这一结果与种子含油率在 7 月 4 日以后开始逐渐上升趋势相吻合, 且“MY003”种子的 GPD1 基因表达量一直显著高于“MY008”。



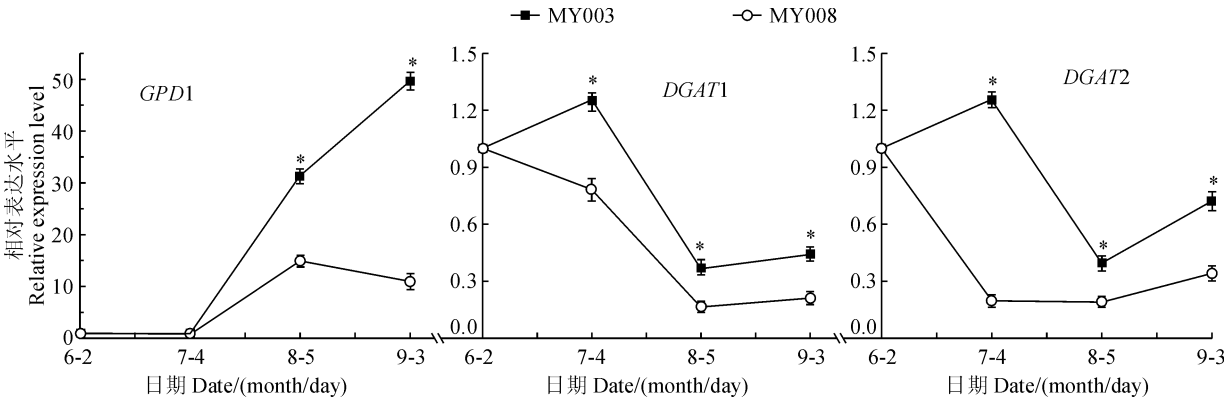
* 表示同一时期 2 个品系间含油率在 0.05 水平上的显著差异
图 2 品系“MY003”和“MY008”种子发育期间的含油率变化
* indicates significant differences of oil contents between two lines at the same harvest time at 0.05 level
Fig. 2 Changes of oil contents of lines “MY003” and “MY008” during seed development

DGAT1 基因在“MY003”种子中先上调表达后微量下调, 8 月 5 日后上调表达, 而在“MY008”种子中先下调后微量上调。“MY003”种子中的 DGAT1 基因表达量一直显著高于“MY008”, 且与“MY003”种子含油率显著高于“MY008”相一致。DGAT2 基因表达量在品系“MY003”种子中先上调后下调, 在 8 月 5 日以后开始上调, 其表达量一直高于“MY008”; 且在 7 月 4 日至 9 月 3 日期间达显著差异水平, 与“MY003”种子含油率在 7 月 4 日至 9 月 3 日显著高于“MY008”相一致。

与低油品系“MY008”相比, 源基因 GPD1 在高油品系“MY003”种子发育期油脂合成的高表达水平, 为 TAG 合成提供了更多的初始底物 G3P; 且汇基因 DGAT1 和 DGAT1 在 GPD1 高水平表达后, 仍维持上调表达模式, 加快 TAG 合成组装。可见, 源汇基因的协同高表达促进了 TAG 合成积累。

3 讨论

油茶种子油脂中富含大量油酸等不饱和脂肪酸, 是中国优质食用油的重要来源, 其种子含油率的高低是影响油茶种植推广及开发利用的重要因素。本研究测定了油茶高低油品系不同时期种子含油率, 6 月 2 日至 7 月 4 日期间种子含油率增长缓慢, 这可能与种子发育初期, 果实体积增长迅速及干物质积累较少有关^[15]。7 月 4 日以后, 油茶品系“MY003”种子的 GPD1 基因表达量一直显著高于“MY008”, 促使“MY003”的种子含油率显著高于“MY008”。GPD1 基因在“MY003”种子发育期中的高表达, 为油脂合成积累了更多的初始底物 G3P,



* 表示同一采收期 2 个品系间的基因相对表达量在 0.05 水平上的显著差异
图 3 GPD1、DGAT1 和 DGAT2 基因在油茶品系“MY003”和“MY008”种子中的表达差异
* indicates significant difference in gene relative expression between two lines at the same harvest time at 0.05 level

Fig. 3 Expression differences of GPD1, DGAT1 and DGAT2 genes in the *C. oleifera* seeds of “MY003” and “MY008”

从而促进油茶种子油脂合成。近年来,拟南芥^[16]和油菜^[17]种子发育过程中 G3P 水平的研究表明,G3P 供应速率与 TAG 合成速率成正比,而 *GPD1* 是合成 G3P 的关键酶^[18]。Vigeolas 等^[6]在油菜中表达酵母 *GPD1* 基因后,发现 G3P 水平增加 3~4 倍,种子含油量提高 40%。

油茶果实发育过程中,随着不同关键基因的表达,以及表达丰度的差异,其含油率也随之变化^[19]。高油品系“MY003”种子的汇基因 *DGAT1* 和 *DGAT2* 在源基因 *GPD1* 高水平表达后仍出现表达高峰,且明显高于低油品系“MY008”,表明 *DGAT1* 和 *DGAT2* 基因在种子发育期间的高表达促进了油脂积累。有研究发现,*DGAT* 基因的活性高低与大豆含油量,油脂积累速率呈正相关^[20-21],Jako 等^[9]在发育的拟南芥种子中过量表达 *DGAT* 后,发现种子发育过程中 *DGAT* 的活性相对提高,且种子的油脂含量增加 9%~12%,可见其活性与油脂积累呈正相关。Xu 等^[22]将旱金莲 *TmDGAT1* 基因分别转入野生型拟南芥、高芥酸油菜和低芥酸油菜中,发现都能将植物干种子的含油量提高 3.5%~10%。将土壤真菌 *Umbelopsis ramanniana* 中的 *DGAT2* 基因转入大豆中,种子含油量提高了 1.5%^[23]。可见 *DGAT1* 和 *DGAT2* 基因具有参与促进 TAG 合成组装,调控油脂合成的作用^[24-25]。“MY003”种子的 *DGAT1* 和 *DGAT2* 的基因表达量在 7 月 4 日至 9 月 3 日期间均高于“MY008”,可催化更多 DAG 转化为 TAG,从而使种子含油率高于“MY008”。油

茶高油品系“MY003”的源基因 *GPD1* 在种子发育初期高表达,而汇基因 *DGAT1* 和 *DGAT2* 在种子发育后期仍协同高表达,可见三者之间呈明显正相关关系,源汇基因的协同高表达共同促进了油茶种子的油脂合成积累。植物种子油脂合成受多种关键酶基因的调控,未来深入研究它们之间的相互作用机制将是解析油茶种子油脂合成分子机制的另一个重要突破口。

本研究以油茶高油品系“MY003”和低油品系“MY008”不同发育期的种子为材料,分析了种子含油率和油脂合成代谢中源汇基因的表达。结果显示,两个品系间的种子油脂合成积累模式相似,但品系“MY003”的种子含油率一直显著高于“MY008”。品系“MY003”种子的 *GPD1*、*DGAT1* 和 *DGAT2* 基因表达量均明显高于“MY008”,*DGAT1* 和 *DGAT2* 在源基因 *GPD1* 高水平表达后仍出现表达高峰,而 *GPD1* 基因是在 7 月 4 日以后开始快速上升并出现表达高峰,7 月份为油茶种子发育初期,油脂开始逐渐积累。源基因 *GPD1* 在种子发育初期高表达,促进了 TAG 合成底物 G3P 高效积累,而汇基因 *DGAT1* 和 *DGAT2* 在种子发育后期高表达,则促进了 TAG 的高效积累。源基因 *GPD1* 和汇基因 *DGAT1* 与 *DGAT2* 的协同高表达,在促进 TAG 合成底物 G3P 积累的同时也加速了 TAG 的合成组装。研究结果首次揭示了油茶种子油脂合成积累的源汇基因协同表达机制,可为提高油茶种子含油量提供理论依据。

参考文献:

[1] 王仲伟. 浙江红山茶花青素和脂肪酸合成相关基因克隆与表达分析[D]. 南京: 南京林业大学, 2013.

[2] 廖书娟, 吉当玲, 童华荣. 茶油脂脂肪酸组成及其营养保健功能[J]. 粮食与油脂, 2005, (6):7-9.

LIAO S J, JI D L, TONG H R. Study on fatty acid composition and nutrition health protection function of the oil tea *Camellia* seed oil[J]. *Cereals & Oils*, 2005, (6):7-9.

[3] RUAN C J, RUMPUNEN K, NYBOM H. Advances in improvement of quality and resistance in a multipurpose crop: sea buckthorn[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2013, **33** (2): 126-144.

[4] REMIZE F, BARNAVON L, DEQUIN S. Glycerol export and glycerol-3-phosphate dehydrogenase, but not glycerol phosphatase, are rate limiting for glycerol production in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Metabolic Engineering*, 2001, **3** (4):301-312.

[5] 杨泽楠, 张雨靖, 高文英, 等. *GPD1* 基因莱茵衣藻表达载体构建及农杆菌介导转化莱茵衣藻[J]. 西北大学学报(自然科学版), 2017, **47**(1):75-81.

YANG Z S, ZHANG Y J, GAO W Y, *et al.* Construction of *GPD1* gene binary vector and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Journal of Northwest University*(Natural Science Edition), 2017, **47**(1): 75-81.

[6] VIGEOLAS H, WALDECK P, ZANK T, *et al.* Increasing seed oil content in oil-seed rape (*Brassica napus* L.) by over-expression of a yeast glycerol-3-phosphate dehydrogenase under the control of a seed-specific promoter[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2007, **5**(3):431-441.

[7] 王龙龙, 彭振英, 邵媛媛, 等. 植物二酰甘油酰基转移酶基因(*DGAT*)研究进展[J]. 西北植物学报, 2009, **29**(9):1 924-1 931.

WANG L L, PENG Z Y, SHAO Y Y, *et al.* Progress in the

study of plant diacylglycerol acyltransferase (*DGAT*) gene[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2009, **29** (9): 1 924-1 931.

[8] 刘 敏. 油茶 *DGAT1* 基因的表达和功能研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2014.

[9] JAKO C, TAYLOR D C. Seed-specific over-expression of an *Arabidopsis* cDNA encoding a diacylglycerol acyltransferase enhances seed oil content and seed weight[J]. *Plant Physiology*, 2001, **126**(2):861-874.

[10] 崔琴琴. 油桐 *FAD2* 与 *DGAT2* 基因的功能分析[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2013.

[11] 阮成江, 李 群. 基因调控种子含油量研究进展及生物柴油用海滨锦葵遗传改良策略[J]. 可再生能源, 2008, **26**(4): 35-40.

RUAN C J, LI Q. Status of oil content control in seed by genetic regulation and the strategy for improving the gene of *Kosteletzkya* for biodiesel production[J]. *Renewable Energy*, 2008, **26**(4):35-40.

[12] VANHERCKE T, EI T A, SHRESTHA P, *et al.* Synergistic effect of *WRI1* and *DGAT1* coexpression on triacylglycerol biosynthesis in plants[J]. *Febs Letters*, 2013, **587** (4): 364-369.

[13] 丁 健, 阮成江, 单金友, 等. 沙棘种子形成发育过程中油脂合成积累关键基因的表达分析[J]. 西北植物学报, 2016, **36**(8):1 642-1 647.

DING J, RUAN C J, SHAN J Y, *et al.* Expression of key genes involved in lipid biosynthesis and accumulation during seeds formation and development in *Hippophae rhamnoides* [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2016, **36** (8): 1 642-1 647.

[14] SCHMITTGEN T D, LIVAK K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method[J]. *Nature Protocols*, **3**(6): 1 101-1 108.

[15] 陈 丽, 刘映良, 柳 青, 等. 油茶果实经济性状及含油率比较[J]. 贵州农业科学, 2012, **40**(5):162-165.

CHEN L, LIU Y L, LIU Q, *et al.* Comparative study of economic characters and oil contents of oil tea[J]. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2012, **40**(5):162-165.

[16] GIBON Y, VIGEOLAS H, TIESSEN A, *et al.* Sensitive and high throughput metabolite assays for inorganic pyrophosphate, ADPGlc, nucleotide phosphates, and glycolytic intermediates based on a novel enzymic cycling system[J]. *Plant Journal*, 2002, **30**(2):221-235.

[17] VIGEOLAS H, GEIGENBERGER P. Increased levels of glycerol-3-phosphate lead to a stimulation of flux into triacylglycerol synthesis after supplying glycerol to developing seeds of *Brassica napus* L. in planta[J]. *Planta*, 2004, **219**(5): 827-835.

[18] 刘 野. 海滨锦葵茎尖再生体系建立及 *GPD1* 和 *DGAT* 植物表达载体构建[D]. 辽宁大连: 辽宁师范大学, 2010.

[19] 曾艳玲, 谭晓风, 张党权, 等. 油茶脂肪酸代谢途径中关键酶基因调控油脂合成的规律研究[J]. 中国粮油学报, 2014, **29**(2):26-29.

ZENG Y L, TAN X F, ZHANG D Q, *et al.* Regulation about control oil synthesis by key genes in fatty acid metabolic pathway of *Camellia oleifera* [J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2014, **29**(2):26-29.

[20] WANG H W, ZHANG J S, GAI J Y, *et al.* Cloning and comparative analysis of the gene encoding diacylglycerol acyltransferase from wild type and cultivated soybean[J]. *Theoretical & Applied Genetics*, 2006, **112**(6):1 086-1 097.

[21] LUNG S C, WESELAKE R J. Diacylglycerol acyltransferase; a key mediator of plant triacylglycerol synthesis[J]. *Lipids*, 2006, **41**(12):1 073-1 088.

[22] XU J, FRANCIS T, MIETKIEWSKA E, *et al.* Cloning and characterization of an acyl-CoA-dependent diacylglycerol acyltransferase 1 (*DGAT1*) gene from *Tropaeolum majus*, and a study of the functional motifs of the *DGAT* protein using site-directed mutagenesis to modify enzyme activity and oil content[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2008, **6**(8):799-818.

[23] LARDIZABAL K, EFFERTZ R, LEVERING C, *et al.* Expression of *Umbelopsis ramanniana DGAT2A* in seed increases oil in soybean[J]. *Plant Physiology*, 2008, **148** (1): 89-96.

[24] ZHENG P Z, ALLEN W B, ROESLER K, *et al.* A phenylalanine in *DGAT* is a key determinant of oil content and composition in maize[J]. *Nature Genetics*, 2008, **40**(3):367-372.

[25] LOCK Y Y, SNYDER C L, ZHU W, *et al.* Antisense suppression of type 1 diacylglycerol acyltransferase adversely affects plant development in *Brassica napus* [J]. *Physiologia Plantarum*, 2009, **137**(1):61-71.

(编辑:宋亚珍)