

曹华盛, 李堂, 熊亮, 等. 水稻溶血磷脂酸酰基转移酶基因 (*LPAT*) 家族生物信息学分析及在籽粒油脂合成中的作用[J]. 华南农业大学学报, 2023, 44(6): 925-935.

CAO Huasheng, LI Tang, XIONG Liang, et al. Bioinformatics analysis of rice lysophosphatidic acid acyltransferase gene (*LPAT*) family and its function in the oil synthesis of rice grains[J]. Journal of South China Agricultural University, 2023, 44(6): 925-935.

# 水稻溶血磷脂酸酰基转移酶基因 (*LPAT*) 家族生物信息学分析及在籽粒油脂合成中的作用

曹华盛<sup>1</sup>, 李堂<sup>1,2</sup>, 熊亮<sup>1</sup>, 王福军<sup>1</sup>, 李曙光<sup>1</sup>, 顾海永<sup>1</sup>,  
何高<sup>1</sup>, 罗文永<sup>1</sup>, 梁世胡<sup>1</sup>

(1 广东省农业科学院 水稻研究所, 广东 广州 510640; 2 华中农业大学 植物科学技术学院, 湖北 武汉 430070)

**摘要:**【目的】挖掘水稻溶血磷脂酸酰基转移酶 (Lysophosphatidic acid acyltransferase, *LPAT*) 基因家族成员信息, 分析其生物信息学特征及在水稻籽粒油脂合成中的作用。【方法】通过生物信息学分析, 对 *OsLPAT* 基因家族进行基因结构、系统进化树、组织表达谱以及激素和逆境表达谱等分析。利用比较代谢组和转录组学的方法, 分析 *OsLPAT* 家族各成员在水稻籽粒油脂合成中的作用。【结果】水稻基因组中 *LPAT* 家族包含 5 个成员, 分别命名为 *OsLPAT1*~*OsLPAT5*。除 *OsLPAT1* 外, 其他成员均含有 4~6 个外显子, 且各成员均包含 Acyltransferase C-terminus (PF01553) 结构域; 进化分析显示, *LPAT* 基因在单子叶植物中较为保守; *OsLPAT2* 的表达受多种逆境条件及激素诱导, *OsLPAT3* 和 *OsLPAT5* 的表达受到脱落酸 (Abscisic acid, ABA) 的强烈诱导, 而 *OsLPAT4* 则特异性地受到渗透胁迫的诱导; 比较代谢组和转录组学分析显示, *OsLPAT* 家族各成员分别在籽粒发育的不同阶段发挥功能, 从而促进油脂 (Triacylglycerol, TAG) 合成。【结论】水稻基因组中存在 5 个 *LPAT* 基因, 其表达受到不同激素的诱导, 可能在水稻激素响应过程中发挥作用。该家族成员参与了不同发育阶段籽粒中的油脂前体磷脂酸 (Phosphatidic acid, PA) 的合成, 从而正调控籽粒中的油脂合成。

**关键词:** 水稻; 溶血磷脂酸酰基转移酶基因; 生物信息学; 油脂合成

中图分类号: S511

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2023)06-0925-11

## Bioinformatics analysis of rice lysophosphatidic acid acyltransferase gene (*LPAT*) family and its function in the oil synthesis of rice grains

CAO Huasheng<sup>1</sup>, LI Tang<sup>1,2</sup>, XIONG Liang<sup>1</sup>, WANG Fujun<sup>1</sup>, LI Shuguang<sup>1</sup>, GU Haiyong<sup>1</sup>,  
HE Gao<sup>1</sup>, LUO Wenyong<sup>1</sup>, LIANG Shihu<sup>1</sup>

(1 Rice Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China; 2 College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** 【Objective】To explore the information of rice lysophosphatidic acid acyltransferases (*LPAT*) gene family, and analyze the bioinformatics characteristics and its role in rice grain oil synthesis. 【Method】

收稿日期: 2023-07-09 网络首发时间: 2023-08-29 10:39:10

首发网址: <https://link.cnki.net/urlid/44.1110.S.20230828.0845.002>

作者简介: 曹华盛, 助理研究员, 博士, 主要从事水稻品质改良相关研究, E-mail: [yhx222541@aliyun.com](mailto:yhx222541@aliyun.com); 通信作者: 罗文永, 副研究员, 博士, 主要从事水稻三系恢复系选育相关研究, E-mail: [418462344@qq.com](mailto:418462344@qq.com); 梁世胡, 研究员, 主要从事水稻三系不育系创制相关研究, E-mail: [liangshihu@sina.cn](mailto:liangshihu@sina.cn)

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金 (2021A1515010948); 广东省重点领域研发计划 (2020B202090003); 广东省水稻育种新技术重点实验室 (2020B1212060047)

Through bioinformatics analysis, the gene structure, phylogenetic tree, tissue expression profiles, hormone and stress expression profiles of *OsLPAT* gene family were analyzed. The roles of *OsLPAT* family members in rice grain oil synthesis were analyzed by comparative metabolomics and transcriptome methods. 【Result】 The rice genome contain five *LPAT* genes, named *OsLPAT1-OsLPAT5*. Except *OsLPAT1*, other members all contain 4–6 exons, and each member contains the acyltransferase C-terminal (PF01553) domain. The evolutionary analysis showed that the *LPAT* genes were relatively conservative in monocotyledon. *OsLPAT2* was sensitive to various stress conditions and hormones. The expressions of *OsLPAT3* and *OsLPAT5* were strongly induced by abscisic acid (ABA), while *OLPAT4* was specifically induced by osmotic stress. Comparative metabolomics and transcriptome analysis showed that each member of the *OsLPAT* family played roles in different stages of grain development, thereby promoting the synthesis of oil triacylglycerol (TAG). 【Conclusion】 There are five *LPAT* genes in rice genome, whose expression are induced by different hormones and may play roles in the hormone response process of rice. The members of this family are involved in the synthesis of phosphatidic acid (PA), the oil precursor in grains at different development stages, thus positively regulating the oil synthesis in rice grains.

**Key words:** Rice; Lysophosphatidic acid acyltransferase gene (*LPAT*); Bioinformatics; Oil synthesis

水稻 *Oryza sativa* L. 是我国最重要的粮食作物之一, 它以占全国 28.1% 的粮食播种面积, 生产出全国 40.2% 的粮食<sup>[1]</sup>, 对保障我国的粮食安全和农业可持续发展具有举足轻重的意义。自 20 世纪 50 年代以来, 经过几代育种家的不懈努力, 水稻单产实现了 3 次质的飞跃, 彻底解决了 14 亿中国人的温饱问题<sup>[2]</sup>。随着生活水平的提高, 人们对稻米的品质要求也越来越高, 产量高而米质不理想的“稻强米弱”现象显得愈发突出, 因此“产量和品质协同提升”取代“产量优先”及“产量为先兼顾品质”, 日益成为水稻育种家重视的课题。

随着饮食结构的精细化以及生活水平的不断提高, 人们对大米的外观品质、适口性及营养品质的要求都不断提高。脂类作为稻米主要的储藏物质之一, 不仅具有丰富的营养价值, 而且对稻米品质尤其是蒸煮食味品质也具有较大影响<sup>[3-7]</sup>。脂类主要以贮藏脂肪形式存在于稻米中。水稻种子在开花后 5~12 d 迅速积累贮藏油脂, 其主要成分是三酰甘油 (Triacylglycerol, TAG), 由脂肪酸与甘油脱水缩合生成。溶血磷脂酸酰基转移酶 (Lysophosphatidic acid acyltransferase, *LPAT*) 催化溶血磷脂酸 (Lysophosphatidic acid, LPA) sn-2 位酰基化形成磷脂酸 (Phosphatidic acid, PA), 是油脂从头合成中的关键限速酶之一<sup>[8]</sup>。目前, 研究人员已从多种植物中分离得到 *LPAT* 基因, 包括拟南芥 *Arabidopsis*<sup>[9-10]</sup>、棉花 *Gossypium*<sup>[11-12]</sup>、玉米 *Zea mays*<sup>[13]</sup>、花生 *Araxhis hypogaea*<sup>[14]</sup>、蓖麻 *Ricinus communis*<sup>[15]</sup> 等。拟南芥基因组中存在 5 个 *LPAT* 基因, 广泛参与了拟南芥生长发育的各个生物学过程。其中, *AtLPAT1* 参与

叶绿体中的磷脂合成, 它的缺失将导致胚胎致死现象的发生<sup>[16]</sup>; 内质网定位的 *AtLPAT2* 参与了磷脂的从头合成途径, 在拟南芥生长发育各个阶段起着重要的作用, 而且它能够通过刺激磷脂的合成而参与拟南芥对低磷胁迫的响应<sup>[17-19]</sup>; *AtLPAT4* 和 *AtLPAT5* 参与内质网中磷脂的合成, 从而正调控拟南芥对低氮胁迫的响应<sup>[20]</sup>。另外, 有研究显示水稻 *LPAT2* 及其产物 PA 通过介导脱落酸 (Abscisic acid, ABA) 信号正调控水稻对高渗胁迫的响应<sup>[21]</sup>。除参与磷脂合成外, *LPAT* 基因家族成员也参与了油菜 *Brassica napus*、棉花、花生和蓖麻等作物种子中油脂 TAG 的合成。研究表明, 超表达 *BnLPAT2* 和 *BnLPAT5* 分别通过促进二酰基甘油的合成及磷脂酸的合成而显著提高油菜种子的含油量<sup>[22]</sup>; 在拟南芥中超表达花生 *AhLPAT2*, 能显著提高超表达材料种子中的含油量<sup>[23]</sup>; 在蓖麻中超表达 *RcLPAT2* 不仅能提高总含油量, 还能提高油脂 TAG 中的不饱和脂肪酸含量<sup>[24]</sup>。

到目前为止, 关于水稻 *LPAT* 基因家族在水稻籽粒油脂合成中的功能鲜见相关报道。因此, 研究 *LPAT* 家族在籽粒油脂合成中的作用, 挖掘 *LPAT* 家族各成员的可用遗传变异, 对于高油性品质水稻品种的遗传改良和培育具有重要意义。*LPAT* 家族在水稻基因组中存在 5 个成员, 但目前仅有 *LPAT2* 被报道与高渗胁迫响应相关, 其在水稻籽粒油脂合成中的功能鲜见相关报道。本研究通过生物信息学、比较转录组学和代谢组学等方法对水稻 *LPAT* 基因家族成员的可能功能进行分析, 以期为进一步解析该基因家族成员在水稻生长发育及籽粒

油脂合成中的功能奠定基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 供试材料

本研究用水稻品种为‘广8B’(G8B)和‘象牙香占’(XYXZ),两者均系广东省农业科学院水稻研究所培育的优质水稻品种。其中‘广8B’为广东省大面积推广三系不育系‘广8A’对应的保持系,其饭味具有油性好、松软弹滑的特征<sup>[25]</sup>。

### 1.2 试验处理及样品准备

1.2.1 转录组分析 1) 样品准备:种植水稻品种‘广8B’和‘象牙香占’分别在灌浆初期(授粉后10 d, 10 DAF)、灌浆中期(授粉后20 d, 20 DAF)、灌浆后期(授粉后30 d, 30 DAF)取水稻种子样品; 2) 样品前处理:与叶片组织相比,水稻胚乳(种子)含有大量的淀粉,故抽提RNA时主要注意除去淀粉且防止RNA被淀粉粒包裹后一同沉降,抽提缓冲液的高浓度盐离子有助于达到这一目的。提取Buffer为:4 mol 尿素,4 mol 盐酸胍,3 mmol EDTA,10 mmol HEPES(pH7.0),提取方法与Trizol法类似;提取完成后检测RNA质量,将质量合格的RNA送至武汉迈维代谢有限公司进行转录组测序; 3) 转录组测序:采用Illumina HiSeq 测序平台进行测序,其程序主要包括RNA样品检测,富集mRNA,合成双链cDNA,文库构建,文库检测和Illumina HiSeq 平台测序; 4) 结果分析:根据测序结果分析脂质代谢相关基因的表达差异。

1.2.2 脂质代谢组分析 种植水稻品种‘广8B’和‘象牙香占’,分别在灌浆初期(10 DAF)、灌浆中期(20 DAF)、灌浆后期(30 DAF)取水稻种子样品;将稻米捣碎,称取米粉约200 mg,加入内标(0.1 mg/mL, 10  $\mu$ L),再用正己烷3 mL 超声提取1 h,取上清,再加入异丙醇3 mL 再次提取30 min,合并两次上清,氮吹仪吹干,用异丙醇复溶至1 mL,5 000 r/min 离心10 min,过0.22  $\mu$ mol 滤器;用UPLC-Qtof 法测定脂质成分及含量,其色谱系统为shimadzu UPLC LC-30AD,色谱柱为Phenomenex Kinate C18 column(100  $\text{Å}$ ×2.1 mm, 2.6  $\mu$ m),进样量10  $\mu$ L,流速0.4 mL/min,柱温60  $^{\circ}$ C,样品室温度4  $^{\circ}$ C。A相:H<sub>2</sub>O:MeOH:ACN(含5 mmol NH<sub>4</sub>Ac)体积比为1:1:1; B相:IPA:乙腈(含5 mmol NH<sub>4</sub>Ac)体积比为5:1。梯度洗脱条件:0.5 min,  $\phi$ 为20%的B相;1.5 min,  $\phi$ 为40%的B相;3 min,  $\phi$ 为60%的B相;13 min,  $\phi$ 为98%的B相;13.1 min,  $\phi$ 为20%的B相;17 min,  $\phi$ 为20%的

B相。质谱系统:ABSciex TripleTOF® 6 600, ESI 离子源,正模式,质谱采集的质量数范围为  $m/z$  100~1 200,质谱条件:Curtain Gas: 35.000 psi; Ion Source Gas1: 50.000 psi; Ion Source Gas2: 50.000 psi; IonSpray Voltage: 5 500.00 V; Temperature: 600  $^{\circ}$ C。

### 1.3 生物信息学分析

1.3.1 同源基因查找 在拟南芥基因组数据库(<https://www.arabidopsis.org>)中下载拟南芥LPAT蛋白序列(At4g30580、At3g57650、At1g51260、At1g75020和At3g18850),通过NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的BLAST 比对同源基因,得到候选水稻LPAT 家族成员,同时,在Ensemble plant 水稻数据库([http://plants.ensembl.org/Oryza\\_sativa/Info/Index](http://plants.ensembl.org/Oryza_sativa/Info/Index))中搜索关键词Lysophosphatidic acid acyltransferase,比较2个数据库中的搜索结果,最终确认水稻LPAT 基因家族成员,并利用Expasy 在线网站(<http://www.expasy.org>)分析相关蛋白的氨基酸长度、分子量、理论等电点、不稳定系数、水溶指数等。

1.3.2 保守结构域分析 分别通过Interproscan(<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>)及SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)数据库分析水稻LPAT 家族成员的保守结构域;保守基序和基因结构分析:利用MEME 在线网站(<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>)对LPAT 家族成员进行基序分析,利用GSDS(<http://gsds.gao-lab.org/>)分析OsLPAT 家族成员基因结构,并使用TBtools 软件进行可视化。

1.3.3 系统进化树分析 为了进一步了解LPAT 在植物系统中的进化关系,本研究收集了水稻、拟南芥、雷蒙德氏棉 *Gossypium raimondii*、蓖麻、大豆 *Glycine max*、二穗短柄草 *Brachypodium distachyon*、小麦 *Triticum aestivum*、高粱 *Sorghum bicolor*、花生、亚麻芥 *Camelina sativa*、欧洲油菜 *Brassica napus* 等11种作物的LPAT 蛋白序列注释文件,利用MEGA 软件构建系统发育树,建树完成后在Itol(<https://itol.embl.de/tree/>)网站进行进化树的进一步美化。

1.3.4 顺式作用元件分析 利用plantCARE 数据库(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)对水稻LPAT 家族成员起始密码子上游2 kb 序列进行顺式作用元件分析,以期揭示OsLPAT 可能的生物学功能。

1.3.5 时空表达谱、激素和逆境表达谱分析 利用RAP-DB(<https://ricexpro.dna.affrc.go.jp/>)数据库分

析水稻 *LPAT* 基因家族在水稻生长发育不同阶段组织中的表达量, 以及在不同激素处理及非生物胁迫条件下的表达情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 水稻 *LPAT* 家族成员鉴定及蛋白质理化性质分析

通过比对 NCBI 中 BLASTP 及 Ensemble plant

中关键词搜索结果发现, 水稻 *LPAT* 基因家族共有 5 个成员, 分别为 Os10g0497100 (*OsLPAT1*)、Os11g0637800 (*OsLPAT2*)、Os04g0625200 (*OsLPAT3*)、Os05g0502200 (*OsLPAT4*) 和 Os01g0782500 (*OsLPAT5*)。蛋白质理化性质分析结果表明, *sLPAT* 基因家族成员编码蛋白的氨基酸数量在 292~399, 相对分子质量在 32317.06~45773.74, 等电点大于 8.5, 亚细胞预测均定位于内质网 (表 1)。

表 1 水稻 *LPAT* 基因鉴定及其编码蛋白质的理化性质分析

Table 1 Identification of rice *LPAT* genes and physicochemical properties analyses of encoded proteins

基因名称 Gene name	基因ID Gene ID	氨基酸数 Number of amino acids	$M_r$	等电点 Theoretical PI	总亲水性平均系数 Grand average of hydrophaticity	亚细胞定位 Subcellular location
<i>OsLPAT1</i>	Os10g0497100	332	36 097.28	10.05	0.176	内质网
<i>OsLPAT2</i>	Os11g0637800	374	42 429.28	9.85	0.253	内质网
<i>OsLPAT3</i>	Os04g0625200	292	32 317.06	9.77	0.137	内质网
<i>OsLPAT4</i>	Os05g0502200	397	45 773.74	8.95	0.015	内质网
<i>OsLPAT5</i>	Os01g0782500	399	45 534.06	8.58	0.079	内质网

### 2.2 保守结构域分析

Interproscan 数据库中的保守结构域分析结果表明, 通过同源搜索得到的 5 个 *OsLPAT* 均具有 PF01553(Acyltransferase C-terminus) 这一保守结构域; 另外, SMART 数据库中的分析结果显示, *OsLPAT* 家族成员均具有 PlsC(Phosphatase

acyltransferases) 保守结构域。除此之外, *OsLPAT2*、*OsLPAT4*、*OsLPAT5* 均含 Acyltransf\_C 端结构域 (图 1), 上述结果表明, 通过生物信息学分析得到的 5 个 *OsLPAT* 可能具有酰基转移酶活性, 推测其在催化溶血磷脂酸向磷脂酸转化的过程中发挥作用。

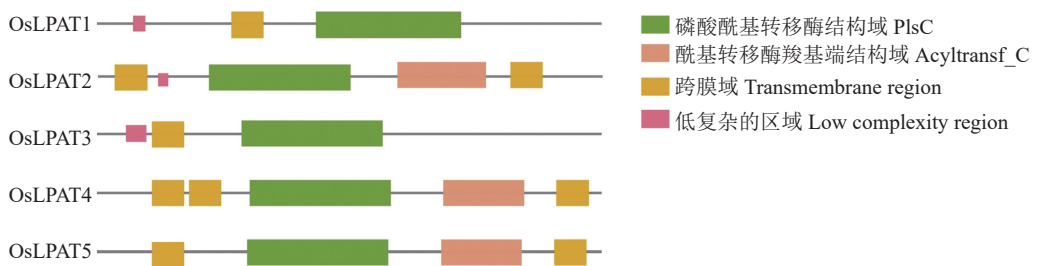


图 1 *OsLPAT* 家族保守结构域分析

Fig. 1 Conservative structural domain analysis of *OsLPAT* family

### 2.3 保守基序和基因结构分析

保守基序和基因结构分析是分析基因间同源性高低的重要手段。MEME 分析结果显示, 水稻 *LPAT* 家族成员之间保守基序数量存在较大差异 (图 2)。其中 *OsLPAT1* 和 *OsLPAT3* 仅分别存在 1 个保守的 Motif (Motif 2 和 Motif 8), 而 *OsLPAT4* 和 *OsLPAT5* 则存在 8 个同样的保守基序 (Motif 1~Motif 8), 这个结果表明, 水稻 *LPAT* 家

族成员之间功能可能存在分化, 而 *OsLPAT4* 和 *OsLPAT5* 同源性较高, 功能上可能存在冗余。另外, 我们还分析了水稻 *LPAT* 基因家族成员的基因结构 (图 3)。结果显示 *OsLPAT1*、*OsLPAT3*、*OsLPAT4* 和 *OsLPAT6* 分别具有 4~6 个外显子, 而 *OsLPAT2* 基因则由 11 个外显子和 10 个内含子组成。这个结果预示着 *OsLPAT1*、*OsLPAT3*、*OsLPAT4* 和 *OsLPAT6* 在进化上是比较保守的, 而

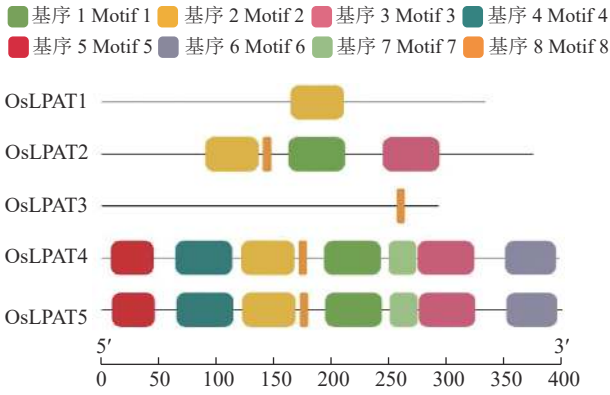


图 2 水稻 *LPAT* 家族蛋白保守基序分析

Fig. 2 The conserved motif analysis of rice *LPAT* family proteins

*OsLPAT2* 在进化中可能经历了选择性剪接或基因复制事件。

## 2.4 系统进化树分析

为了进一步了解 *LPAT* 在植物系统中的进化关系, 本研究获取水稻、拟南芥、玉米、大豆、小麦、高粱等 6 种作物的 *LPAT* 蛋白序列注释文件, 然后利用 MEGA 软件构建系统发育树。建树完成后, 在 ItoI 网站进行进化树的进一步美化。进化树分析结果显示, 与拟南芥相比, 水稻中 *LPAT* 蛋白家族同样存在 5 个成员, 分别命名为 *OsLPAT1*~*OsLPAT5*, 而且 *OsLPAT2* 和 *OsLPAT3* 同源性较高, 而 *OsLPAT4* 则与 *OsLPAT5* 同源性较高, 这与我们利用 MEME 分析得到的结果是一致的。我们还发现除大豆外, 其他植物中 *LPAT* 蛋白家族均可分为 5 个亚家族 (I、II、III、VI、IX)(图 4)。我们的结果还显示, *OsLPAT1*、*OsLPAT2*、*OsLPAT3* 和

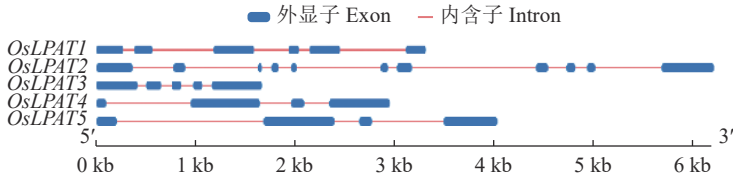


图 3 水稻 *LPAT* 家族基因结构分析

Fig. 3 Gene structure analysis of rice *LPAT* family

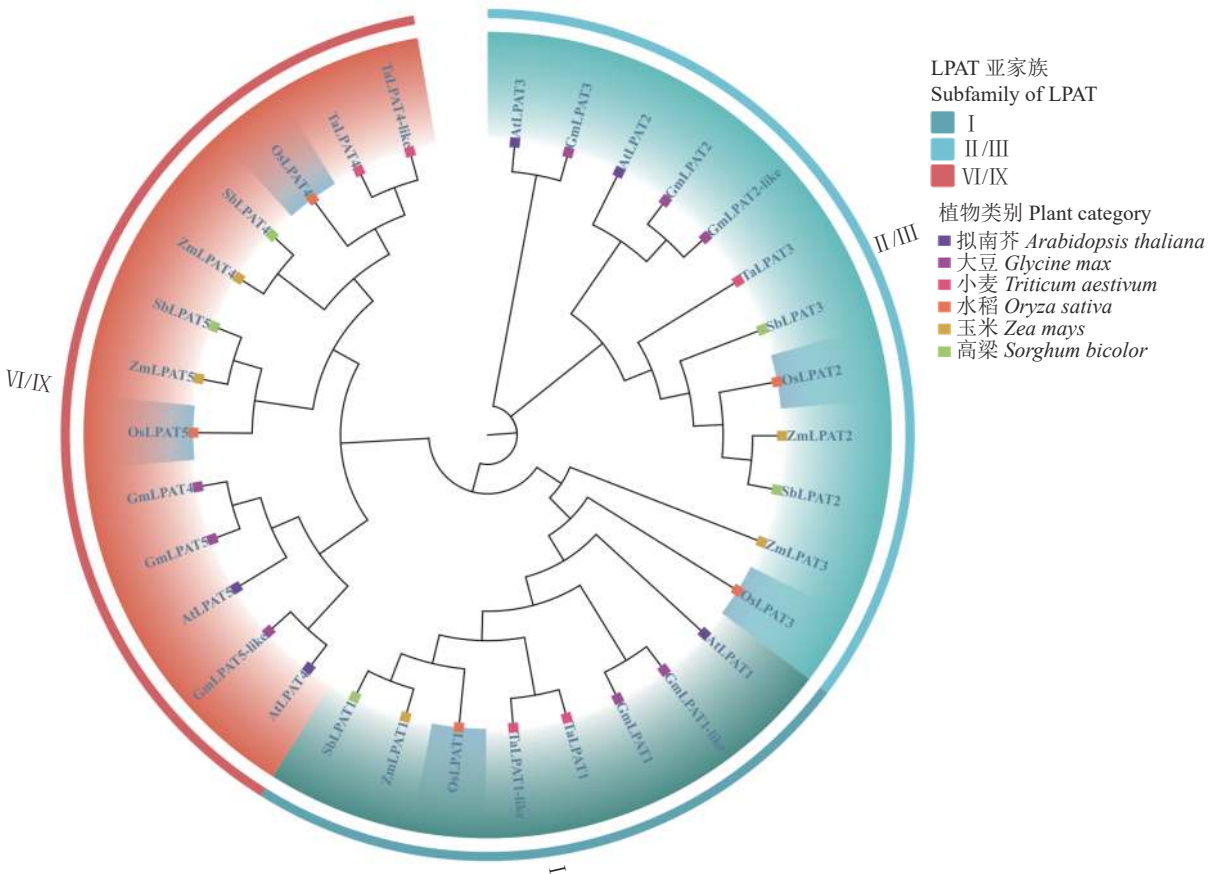


图 4 植物 *LPAT* 家族系统进化树分析

Fig. 4 Phylogenetic analysis of *LPAT* family in plant

*OsLPAT5* 与高粱、玉米的家族基因在进化分支上聚为同一类。表明同为 *LPAT* 基因在单子叶植物中是较为保守的,可能具有类似的生物学功能。

## 2.5 顺式作用元件分析

启动子区域的顺式调控元件不仅可能影响基因的时空表达模式,而且还会影响基因对外界环境(如激素和逆境胁迫)的响应过程。为了了解水稻 *LPAT* 家族成员的表达特性,我们将 *OsLPAT1*~*OsLPAT5* 这 5 个基因起始密码子上游 2 kb 序列进行了顺式作用元件分析。结果显示, *OsLPAT3* 启动子区存在生长素响应、茉莉酸甲酯和赤霉素信号响应元件, *OsLPAT4* 启动子区存在生长素响应元件,另外,在 *OsLPAT1*、*OsLPAT2*、*OsLPAT5* 启动子区均发现低温诱导元件,而在 *OsLPAT2* 启动子区则发现存在厌氧诱导元件(图 5)。上述结果表明,

*OsLPAT* 家族成员可能参与了水稻对众多植物激素及逆境胁迫的响应过程。

## 2.6 组织表达谱、激素和逆境表达谱分析

为了了解水稻 *LPAT* 家族基因的表达特性,我们利用转录组数据库提取了水稻 *LPAT* 基因在水稻叶片、叶鞘、根和茎, 3~4 mm 的幼穗以及授粉后 7、14、28 和 42 d 胚胎的表达量(图 6)。结果显示:*OsLPAT2* 和 *OsLPAT5* 在水稻整个生长发育过程中均有表达,其中 *OsLPAT2* 在根、茎、3~4 mm 的幼穗和叶鞘、7 d 的胚中表达量较高;*OsLPAT4* 在胚、茎和 3~4 mm 的幼穗中呈现出较高表达量;*OsLPAT3* 在叶鞘中表达量较高;而 *OsLPAT1* 各生长发育阶段表达量均较低。上述结果表明,水稻 *LPAT* 基因家族成员可能存在功能分化,分别参与了对水稻不同生长发育过程的调控。另外,为了进一步探讨水稻

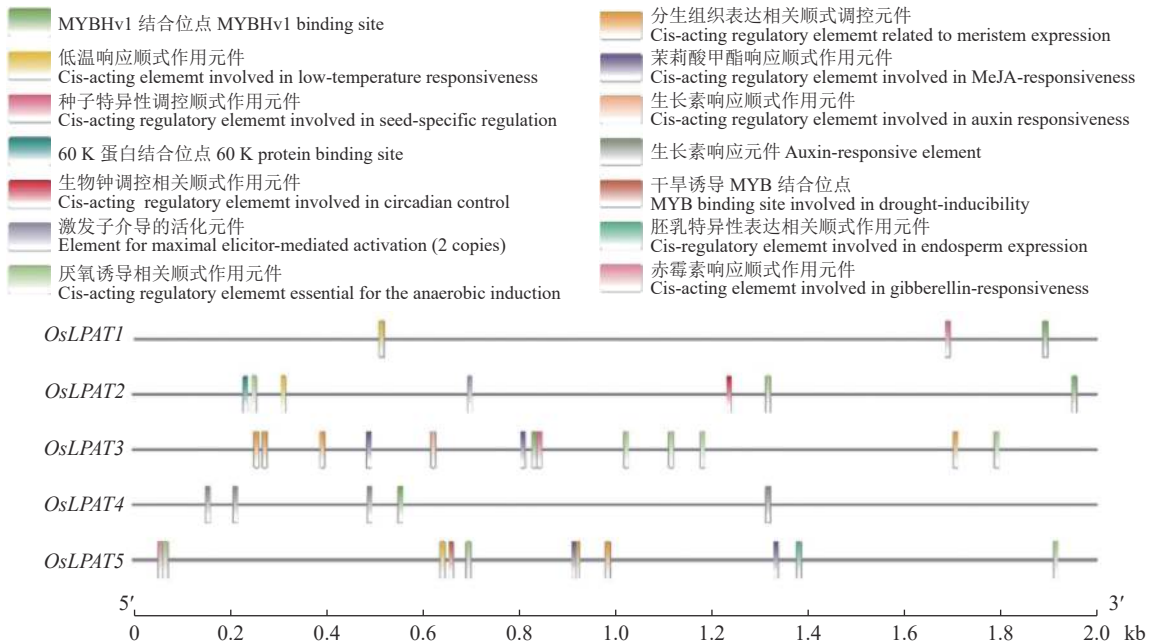


图 5 水稻 *LPAT* 基因家族启动子顺式作用元件分析

Fig. 5 Analysis of cis-acting elements in promoters of rice *LPAT* gene family

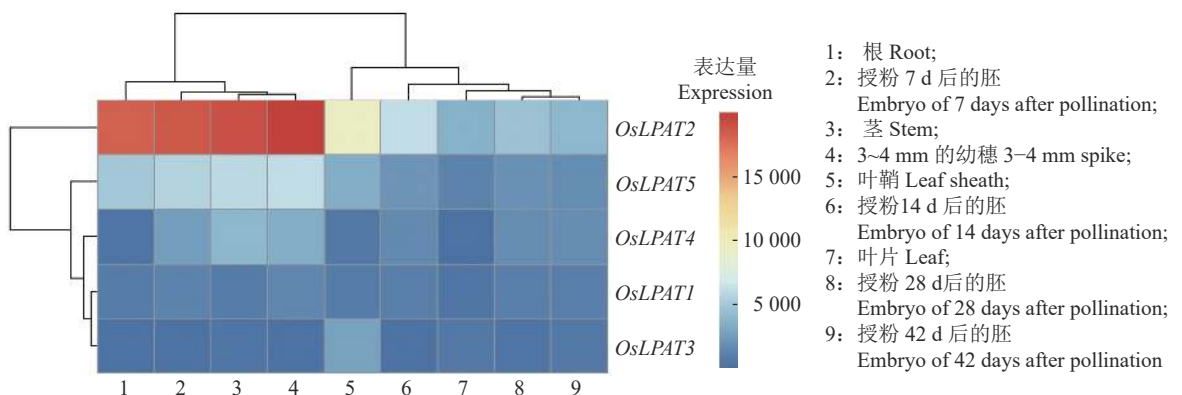
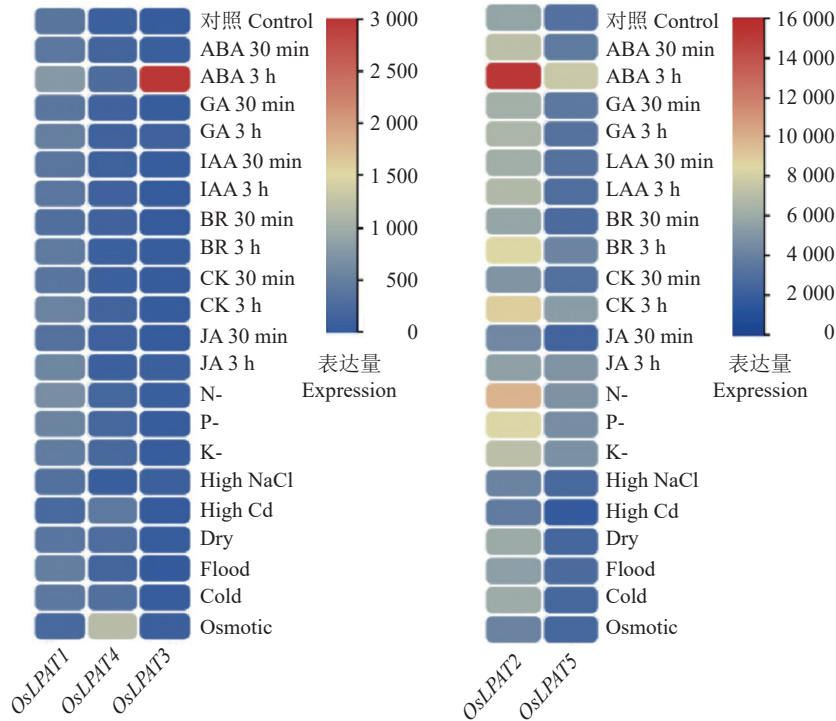


图 6 水稻 *LPAT* 基因家族组织表达谱分析

Fig. 6 Tissue expression profile analysis of rice *LPAT* gene family

*LPAT* 基因家族成员是否参与了水稻对激素及非生物逆境的响应,我们利用转录组数据库信息分析了 *LPAT* 基因家族各成员在 ABA、油菜素内酯 (Brassinosteroids, BR)、生长素 (Auxin, IAA)、赤霉素 (Gibberellin, GA)、茉莉酸 (Jasmonic acid, JA)、细胞分裂素 (Cytokinin, CTK) 处理条件下的表达量,结果显示,与对照相比, *OsLPAT2* 受到了各种激

素及逆境胁迫的诱导,包括 ABA、BR、CK、N-、P- 的诱导。 *OsLPAT1*、*OsLPAT3* 和 *OsLPAT5* 受到 ABA 处理的诱导,其中 *OsLPAT3* 的表达量在 ABA 处理 3 h 后上升了将近 100 倍,而 *OsLPAT3* 的表达量特异性地受到了氧化胁迫的诱导 (图 7)。上述结果表明,水稻 *LPAT* 基因家族成员广泛参与了植物对激素和逆境胁迫的响应。



ABA: 脱落酸; GA: 赤霉素; IAA: 生长素; BR: 油菜素内酯; CK: 细胞分裂素; JA: 茉莉酸甲酯; N-: 低氮胁迫; P-: 低磷胁迫; K-: 低钾胁迫; High NaCl: 高盐胁迫; High Cd: 高铬胁迫; Dry: 干旱胁迫; Flood: 淹水胁迫; Cold: 冷胁迫; Osmotic: 氧化胁迫

ABA: Abscisic acid; GA: Gibberellin; IAA: Auxin; BR: Brassinolide; CK: Cytokinin; JA: Jasmonic acid methyl ester; N-: Low nitrogen stress; P-: Low phosphorus stress; K-: Low potassium stress

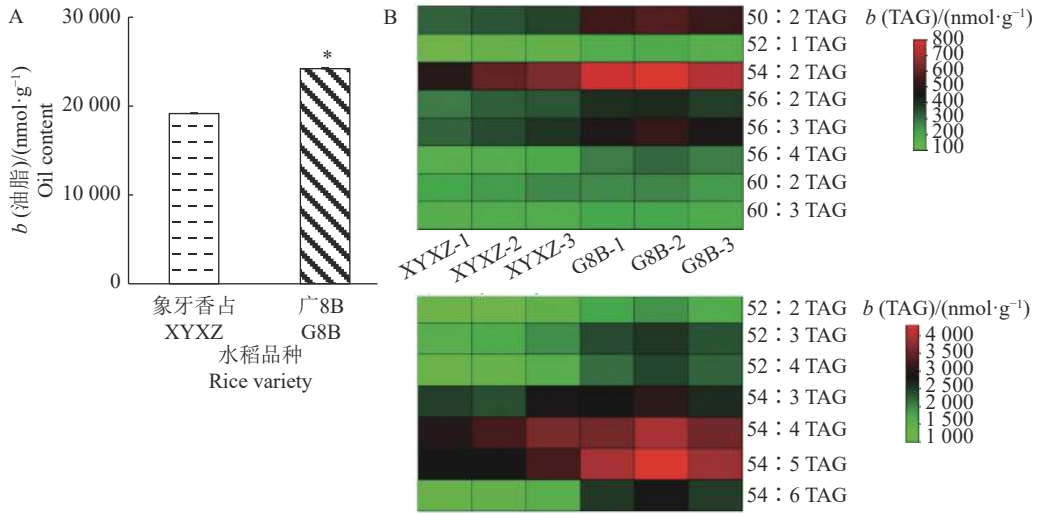
图 7 水稻 *LPAT* 基因家族激素和逆境表达谱分析

Fig. 7 Hormone and stress expression profiles of rice *LPAT* gene family

## 2.7 *OsLPAT* 家族成员在水稻籽粒油脂合成中的作用分析

为了进一步分析 *OsLPAT* 家族成员在水稻籽粒油脂合成中的作用,我们测定了水稻品种‘象牙香占’和‘广 8B’抽穗 30 d 后籽粒中的油脂含量 (图 8A),测定结果显示‘广 8B’ (G8B) 籽粒中的油脂含量 (22234 nmol/g) 显著高于‘象牙香占’ (XYXZ) 籽粒中的油脂含量 (17058 nmol/g)。油脂 TAG 组分分析显示‘广 8B’油脂各 TAG 组分显著高于‘象牙香占’,特别是 TAG (50:2)、TAG (54:2)、TAG (56:3)、TAG (54:4)、TAG (54:5) 和 TAG (54:6) 等富含不饱和脂肪酸的油脂组分 (图 8B)。为了进一步分析造成 2 个品种水稻籽粒油脂含量差异的原因,我们对这 2 个材料不同时期的籽粒样品 (分别于抽穗后 10、20 和 30 d 取样) 进行

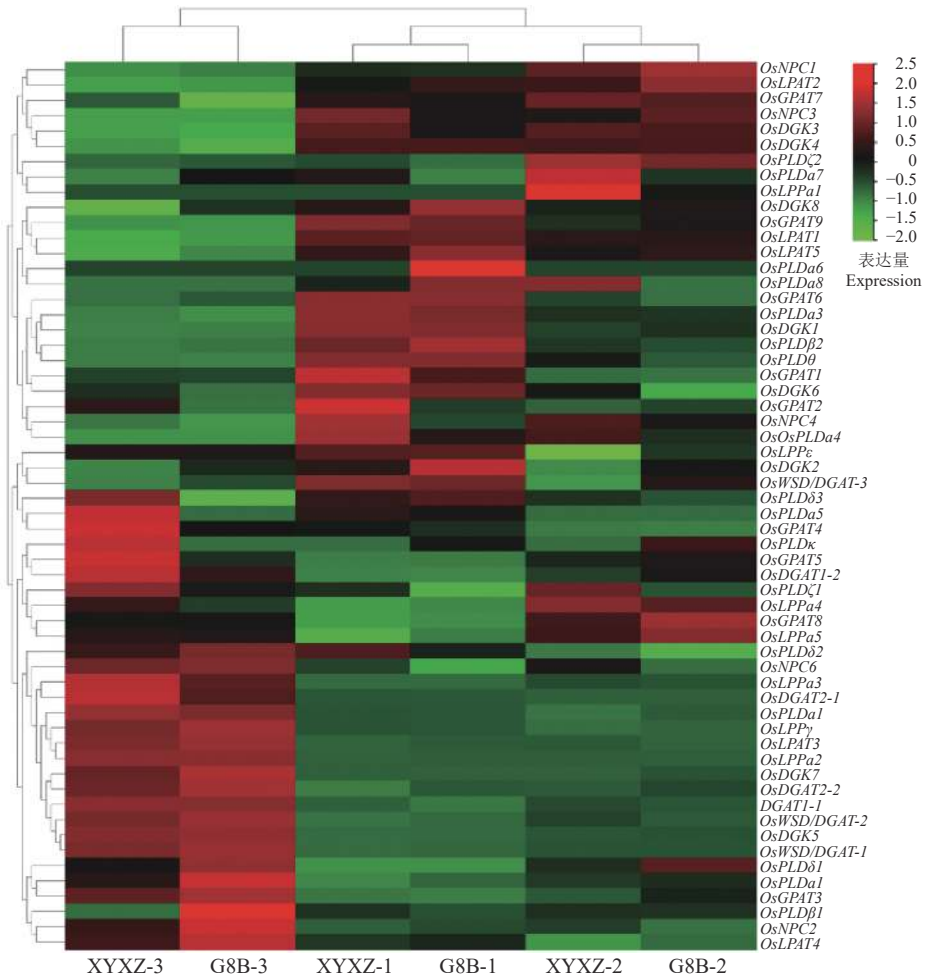
了转录组学测序,并对其中影响籽粒油脂代谢的相关基因的表达量进行了比较分析 (图 9)。通过分析‘广 8B’与‘象牙香占’籽粒不同发育时期的转录组数据,我们发现油脂代谢通路相关基因在籽粒发育的不同阶段 (前/中/后期) 发挥作用,2 个品种籽粒中油脂含量的差异可能是受多基因共同调控的结果。其中,在‘广 8B’籽粒发育前期 (授粉后 10 d, 10 DAF), *OsLPAT5*/*OsPLDα6*/*OsPLDα8*/*OsPLDδ3* 基因的表达量显著高于其在‘象牙香占’相同发育时期籽粒中的表达量;在‘广 8B’籽粒发育中期 (授粉后 20 d, 20DAF), *OsGPAT3*/*OsGPAT8*/*OsLPAT2*/*OsPLDδ1*/*OsPLDκ*/*OsNPC1*/*OsNPC3*/*OsWSD/DGAT-3* 的表达量显著高于其在‘象牙香占’相同发育时期籽粒中的表达量;而到了籽粒发育后期 (授粉后 30 d, 30 DAF), 我们同样



“\*”表示在 0.05 水平差异显著 (t 检验); XYXZ-1/2/3: 授粉后 10/20/30 d 的 ‘象牙香占’ 籽粒; G8B-1/2/3: 授粉后 10/20/30 d 的 ‘广 8B’ 籽粒  
 “\*” indicates significant difference at the 0.05 level (t test); XYXZ-1/2/3: ‘Xiangya Xiangzhan’ grains of 10/20/30 days after pollination; G8B-1/2/3: ‘Guang 8B’ grains of 10/20/30 days after pollination

图 8 水稻品种 ‘象牙香占’ 和 ‘广 8B’ 籽粒油脂含量及三酰甘油 (TAG) 组分分析

Fig. 8 Oil content and triacylglycerol (TAG) composition analyses in grains of rice varieties ‘Xiangya Xiangzhan’ and ‘Guang 8B’



XYXZ-1/2/3: 授粉后 10/20/30 d 的 ‘象牙香占’ 籽粒; G8B-1/2/3: 授粉后 10/20/30 d 的 ‘广 8B’ 籽粒

XYXZ-1/2/3: ‘Xiangya Xiangzhan’ grains of 10/20/30 days after pollination; G8B-1/2/3: ‘Guang 8B’ grains of 10/20/30 days after pollination

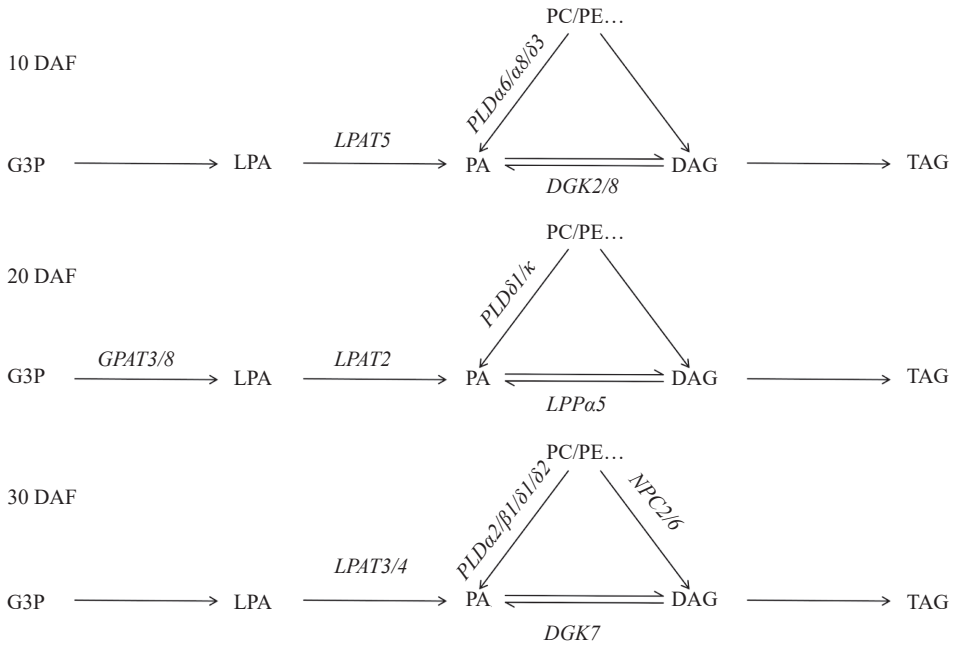
图 9 水稻品种 ‘象牙香占’ 和 ‘广 8B’ 籽粒油脂代谢相关基因表达量分析

Fig. 9 Expression analyses of genes related to grain oil metabolism in rice varieties ‘Xiangya Xiangzhan’ and ‘Guang 8B’



观察到 *OsLPAT3/OsLPAT4/OsPLD $\alpha$ 2/OsPLD $\beta$ 1/OsPLD $\delta$ 1/OsPLD $\delta$ 2/OsDGAT2-2/OsWSD/OsDGAT-2* 在‘象牙香占’中的表达量显著低于其在‘广 8B’相同时期籽粒中的表达量 (图 9、图 10)。上述

结果表明, 在籽粒发育的不同时期, ‘广 8B’和‘象牙香占’油脂代谢相关基因的表达存在显著差异, 预示着这些基因表达差异可能是形成两者籽粒中油脂含量差异的根本原因。



10/20/30 DAF: 授粉后 10/20/30 d; G3P: 三磷酸甘油; LPA: 溶血磷脂酸; PA: 磷脂酸; DAG: 二酰基甘油; TAG: 三酰基甘油; PC: 磷脂酰胆碱; PE: 磷脂酰乙醇胺; PLD: 磷脂酶 D 基因; DGK: 二酰基甘油激酶基因; GPAT: 甘油三磷酸酰基转移酶基因; LPAT: 溶血磷脂酸酰基转移酶基因; LPP: 脂磷酸磷酸酶基因; NPC: 非特异性磷脂酶 C

10/20/30 DAF: 10/20/30 days after pollination; G3P: Glycerol 3-phosphate; LPA: Lysophosphatidic acid; PA: Phosphatidic acid; DAG: Diacylglycerol; TAG: Triacylglycerols; PC: Phosphatidylcholine; PE: Phosphatidylethanolamine; PLD: Phospholipase D; DGK: Diacylglycerol kinase; GPAT: Glycerol-3-phosphate acyltransferase; LPAT: Lysophosphatidic acid acyltransferase; LPP: Lipid phosphate phosphatase; NPC: Nonspecific phospholipase C

图 10 水稻品种‘象牙香占’和‘广 8B’籽粒油脂代谢相关基因差异表达分析

Fig. 10 Differential expression of genes related to grain oil metabolism between rice varieties ‘Xiangya Xiangzhan’ and ‘Guang 8B’

### 3 讨论与结论

溶血磷脂酸酰基转移酶 (LPAT; EC 2.3.1.51) 催化溶血磷脂酸 (LPA)sn-2 位置上酰基化反应形成磷脂酸 (PA)。越来越多的证据表明磷脂酸 PA 作为一个重要的信号分子在细胞信号转导过程中发挥着重要的作用, 广泛参与了植物生长发育及逆境响应等众多生物学过程<sup>[26-27]</sup>。现有研究表明, PA 的信号功能是通过其与靶标蛋白的互作实现的。在动物细胞中, 人们最初认为 PA 的作用依赖于其去磷酸化后的产物二酰基甘油, 但随后的研究发现, PA 通过直接与靶标蛋白结合来发挥其功能。随着对 PA 信号研究的深入, 不断有新的 PA 靶标被发现, 包括一系列转录因子、蛋白激酶和蛋白磷酸酶等。研究表明, PA 对生理活动的调节主要是通过对靶标蛋白的调控 (增强/减弱其活性、影响其亚细胞定位等) 而得以实现。在 ABA 信号响应中, PA 和脱落酸钝感蛋白 1 (Abscisic acid insensitive 1, ABI1) 互

作将 ABI1 锚定在质膜上, 阻止 ABI1 进入细胞核, 从而阻断 ABI1 激活 ABA 信号负调节因子 ATHB6 的效应, 最终实现 PA 对 ABA 信号的正调控作用<sup>[26]</sup>; 此外, 在拟南芥根中, PA 能直接与转录因子 Werewolf (WER) 互作并介导其入核发挥功能, 从而调控根毛的生长<sup>[27]</sup>。在本研究中, 我们发现 *OsLPAT3* 基因启动子区存在茉莉酸甲酯信号响应元件, *OsLPAT4* 基因启动子区存在生长素信号响应元件, 而 *OsLPAT5* 基因启动子区则同时存在生长素信号响应与茉莉酸甲酯信号响应元件, 这些结果预示着水稻 *OsLPAT* 可能参与水稻对众多激素的响应过程。另外, 在 *OsLPAT1*、*OsLPAT2* 及 *OsLPAT5* 基因启动子区还存在着低温响应元件及厌氧诱导元件等, 暗示这些基因可能在水稻低温响应及厌氧条件下的生长发育中起作用。此外, 我们的分析结果还显示, *OsLPAT2* 和 *OsLPAT3* 受到了 ABA 处理的强烈诱导, 特别是 *OsLPAT2*, 其表达水平在 ABA 处理条件下比对照增加了 100 倍。上述

结果暗示水稻 OsLPAT 可能通过介导磷脂酸 PA 的合成及其信号转导而参与了水稻对各种激素信号及逆境胁迫的响应。但其具体功能及机制有待进一步研究。

油脂 (主要是三酰基甘油 TAG) 及其衍生物不仅是植物体内重要的储能物质, 同时也是植物中角质等生物聚合物的不可或缺的成分<sup>[28-29]</sup>, 在种子萌发和植物有性生殖等方面也发挥着重要的作用<sup>[30]</sup>。现有的研究表明, 溶血磷脂酸酰基转移酶 LPAT 是油脂合成途径中的关键酶之一, 其产物磷脂酸 PA 不仅具有脂质第 2 信使的功能, 还是植物合成各种磷脂和油脂的重要中间产物, 在提高种子含油量及改良种子油性品质等方面发挥着重要的作用。因此, LPAT 与含油量的关系是前人研究 LPAT 功能的主要出发点。研究表明, 在拟南芥中异位表达 2 个油菜 LAPT 异构酶, 均能通过增加含油量和增加粒重的方式提高产量<sup>[10]</sup>; 研究人员通过研究油菜种子发育过程中 Kennedy 途径的各种酶的活性变化, 发现 LPAT 活性最高, 且高含油量品系中 LPAT 活性高于低含油量品系<sup>[31]</sup>。另外, 有研究表明, 花生种子含油量的积累速率与溶血磷脂酸酰基转移酶 LPAT 的表达量相对比, 其变化是一致的<sup>[14]</sup>。在本研究中, 我们发现水稻 LPAT 家族成员在籽粒发育的不同时期发挥着主导作用。在籽粒发育前期 (抽穗后 10 d), 高含油量的水稻籽粒 ‘广 8B’ 中 LPAT5 的表达量显著高于其在低含油量水稻籽粒 ‘象牙香占’ 中的表达量; 在籽粒发育中期 (抽穗后 20 d), LPAT2 在 ‘广 8B’ 籽粒中的表达量显著高于其在 ‘象牙香占’ 中的表达量; 而在籽粒发育后期 (抽穗后 30 d), LPAT3 和 LPAT4 的表达量在不同含油量水稻品种籽粒中存在显著差异。上述结果表明, 水稻 LPAT 基因家族各成员在籽粒发育的不同阶段发挥其磷脂酸 PA 合成的作用, 其表达差异可能是形成高含油量与低含油量水稻品种籽粒中油脂含量差异的重要原因。目前为止, 水稻中关于 LPAT 基因家族功能的报道较少, 而关于该家族各成员在油脂合成中的作用更是鲜见报道, 本研究对水稻 LPAT 基因家族详细的生物信息学分析及其在水稻籽粒油脂合成中的作用初探, 将为进一步开展该家族基因功能的研究打下基础。

#### 参考文献:

- [1] 万建民. 中国水稻遗传育种与品种系谱: 1986—2005 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2010.
- [2] ASAKI A, ASHIKARI M, UEGUCHI-TANAKA M, et al. A mutant gibberellin-synthesis gene in rice[J]. *Nature*, 2002, 416(6882): 701-702.
- [3] YOON M R, KOH H J, KANG M Y. Variation of properties of lipid components in rice endosperm affected on palatability[J]. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 2008, 51(3): 207-211.
- [4] NUENSLI J, PUTAUX J L, BAIL P L, et al. Crystal structure of amylose complexes with small ligands[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2003, 33(4/5): 227-234.
- [5] NIMZO O, GESSLER K, USÓN I, et al. Inclusion complexes of V-amylose with undecanoic acid and dodecanol at atomic resolution: X-ray structures with cycloamylose containing 26 d-glucoses (cyclohexaicosose) as host[J]. *Carbohydrate Research*, 2004, 339(8): 1427-1437.
- [6] NEBESNY E, KWAŚNIEWSKA-KAROLAK I, ROSICKA-KACZMAREK J. Dependence of thermodynamic characteristics of amylose-lipid complex dissociation on a variety of wheat[J]. *Starch - Stärke*, 2005, 57(8): 378-383.
- [7] CHIEN J T, LIEN Y Y, SHOEMAKER C F. Effect of polarity of complexing agents on thermal and rheological properties of rice starch gels[J]. *Cereal Chemistry Journal*, 1999, 76(6): 837-842.
- [8] MISRA N, PANDA P K, PARIDA B K. Genome-wide identification and evolutionary analysis of algal LPAT genes involved in TAG biosynthesis using bioinformatic approaches[J]. *Molecular Biology Reports*, 2014, 41(12): 8319-8332.
- [9] YIN Y T, GUO Z Y, CHEN K, et al. Ultra-high  $\alpha$ -linolenic acid accumulating developmental defective embryo was rescued by lysophosphatidic acid acyltransferase 2[J]. *The Plant Journal*, 2020, 103(6): 2151-2167.
- [10] 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.
- [11] 丁检, 吴双, 蔡彩平, 等. 棉花溶血磷脂酸酰基转移酶 (LPAT) 家族基因的发掘和表达分析[J]. *作物学报*, 2015, 41(3): 378-385.
- [12] WANG N H, MA J J, PEI W F, et al. A genome-wide analysis of the lysophosphatidate acyltransferase (LPAAT) gene family in cotton: Organization, expression, sequence variation, and association with seed oil content and fiber quality[J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 1-18.
- [13] 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.
- [14] 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.

- [15] ARROYO-CAROJ 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.
- [16] YU B, WAKAO S T, FAN J L, et al. Loss of plastidic lysophosphatidic acid acyltransferase causes embryolethality in *Arabidopsis*[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2004, 45(5): 503-510.
- [17] KIM H U, LI Y B, 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.
- [18] ANGKAWIJAYA A E, NGUYEN V C, NAKAMURA Y. Enhanced root growth in phosphate-starved *Arabidopsis* by stimulating *de novo* phospholipid biosynthesis through the overexpression of *LYSOPHOSPHATIDIC ACID ACYLTRANSFERASE 2 (LPAT2)*[J]. *Plant Cell and Environment*, 2017, 40(9): 1807-1818.
- [19] BARROGA N A M, NAKAMURA Y. LYSOPHOSPHATIDIC ACID ACYLTRANSFERASE 2 (LPAT2) is required for *de novo* glycerolipid biosynthesis, growth, and development in vegetative and reproductive tissues of *Arabidopsis*[J]. *The Plant Journal*, 2022, 112(3): 709-721.
- [20] ZHANG K, HE J J, YIN Y T, et al. Lysophosphatidic acid acyltransferase 2 and 5 commonly, but differently, promote seed oil accumulation in *Brassica napus*[J]. *Bio-technology for Biofuels and Bioproducts*, 2022, 15(1): 1-19.
- [21] SHAIKH A A, ALAMIN A, JIA C X, et al. The examination of the role of rice lysophosphatidic acid acyltransferase 2 in response to salt and drought stresses[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(17): 9796. doi: 10.3390/ijms23179796.
- [22] ANGKAWIJAYA A E, NGUYEN V C, NAKAMURA Y. LYSOPHOSPHATIDIC ACID ACYLTRANSFERASES 4 and 5 are involved in glycerolipid metabolism and nitrogen starvation response in *Arabidopsis*[J]. *New Phytologist*, 2019, 224(1): 336-351.
- [23] CHEN S L, LEI Y, XU X, et al. The peanut (*Arachis hypogaea* L.) gene *AhLPAT2* increases the lipid content of transgenic *Arabidopsis* seeds[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0136170. doi: 10.1371/journal.pone.0136170.
- [24] CHEN G, VAN ERP H, MARTIN-MORENO J, et al. Expression of *Castor* LPAT2 enhances ricinoleic acid content at the sn-2 position of triacylglycerols in *Lesquerella* seed[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(4): 507. doi: 10.3390/ijms17040507.
- [25] 曹华盛, 王福军, 李曙光, 等. 优质高产丝苗型不育系广8A的选育与应用[J]. *广东农业科学*, 2022, 49(9): 84-91.
- [26] ZHANG W H, QIN C B, ZHAO J, et al. Phospholipase D $\alpha$ 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(25): 9508-9513.
- [27] YAO H Y, WANG G L, GUO L, et al. Phosphatidic acid interacts with a MYB transcription factor and regulates its nuclear localization and function in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2014, 25(12): 5030-5042.
- [28] 高凯, 刘佳伟, 许多, 等. 水稻甘油-3-磷酸酰基转移酶基因(GPATs)家族的生信分析[J/OL]. *分子植物育种*, [2023-07-06]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.s.20230309.1756.010.html>.
- [29] SHENG X Y, YUNG Y C, CHEN A, et al. Lysophosphatidic acid signalling in development[J]. *Development*, 2015, 142(8): 1390-1395.
- [30] 程红焱, 宋松泉. 种子的贮油细胞器: 油体及其蛋白[J]. *植物学通报*, 2006(4): 418-430.
- [31] 戚维聪. 油菜发育种子中油脂积累与 Kennedy 途径酶活性的关系研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2008.

【责任编辑 李晓卉】