

功能丧失突变揭示 *ATS1* 对拟南芥种子发育的非必需作用

柯星星¹, 刘亚坤¹, 徐雪珍¹, 林怡馨¹, 郑志富^{1,2}, 郑月萍^{1,2}

(1. 浙江农林大学 现代农学院, 浙江 杭州 311300; 2. 浙江农林大学 油料作物种质创新与利用研究所, 浙江 杭州 311300)

摘要: 【目的】甘油酯是生物膜的重要组成成分, 植物中的 *ATS1* 催化甘油酯原核合成途径的第 1 步酰化反应, 但目前 *ATS1* 在植物正常生长发育中的功能并不完全清楚。本研究运用反向遗传学手段剖析 *ATS1* 功能丧失对植物生长发育的影响。【方法】运用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术, 构建拟南芥 *Arabidopsis thaliana* *ATS1* 基因功能丧失型突变体, 并比较分析突变体与野生型在整个生育期的表型差异。【结果】分子鉴定显示: 多个突变体中 *ATS1* 基因的第 1 个外显子碱基数呈非 3 的倍数的缺失或插入, 从而导致移码突变或翻译提前终止。这些突变体的叶片中多不饱和脂肪酸 C16:3 的含量急剧下降, 而 C18:3 含量则显著增加。相随的表型分析显示: *ATS1* 基因功能丧失有时会使叶片略显黄色, 但对种子发育未产生可见影响。【结论】在正常生长条件下, *ATS1* 并非拟南芥种子发育所必需的。图 3 表 2 参 25

关键词: 拟南芥; *ATS1*; 基因编辑; *ats1* 突变体

中图分类号: Q946.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2023)04-0707-07

Loss-of-function mutations in *ATS1* reveal its dispensable role in normal seed development of *Arabidopsis thaliana*

KE Xingxing¹, LIU Yakun¹, XU Xuezheng¹, LIN Yixin¹, ZHENG Zhifu^{1,2}, ZHENG Yueping^{1,2}

(1. College of Advanced Agricultural Sciences, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China;

2. Institute for Oilseed Crop Germplasm Innovation and Utilization, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] Glycerolipids are the main constituents of biological membranes. *ATS1* catalyzes the first acylation reaction in the prokaryotic pathway of glycerolipid synthesis. However, the function of *ATS1* in normal plant growth and development is not completely understood. The present study was intended to dissect the effect of loss of function of *ATS1* on plant growth and development by taking a reverse genetic approach. [Method] Loss-of-function mutants of the *ATS1* gene were constructed by using CRISPR/Cas9 gene editing technology. Then, comparative analysis was conducted on phenotypic difference between the mutants and wild type *Arabidopsis thaliana* during the entire growth phase. [Result] Molecular characterization of multiple mutants revealed that the number of base pairs inserted or deleted in the first exon of the *ATS1* gene is not a multiple of three, resulting in frameshift mutations or premature translation termination. Consistent with this, the content of polyunsaturated fatty acid C16:3 in the leaves of these mutants decreased sharply, concomitant

收稿日期: 2022-11-29; 修回日期: 2023-03-01

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目 (32100209); 浙江省自然科学基金青年基金资助项目 (Q21C020003); 国家自然科学基金面上基金资助项目 (31871660)

作者简介: 柯星星 (ORCID: 0000-0003-4206-4638), 从事植物生物技术研究。E-mail: 568533807@qq.com。通信作者: 郑月萍 (ORCID: 0000-0002-8702-9556), 讲师, 博士, 从事植物生化和代谢研究。E-mail: 630713861@qq.com

with significant increases in the content of C18:3. Meanwhile, phenotypic analysis showed that loss of *ATS1* gene function sometimes made the leaves turn slightly yellow, while having no visible effect on seed development. [Conclusion] The above results strongly indicate that *ATS1* is dispensable for *A. thaliana* seed development under normal growth conditions. [Ch, 3 fig. 2 tab. 25 ref.]

Key words: *Arabidopsis thaliana*; *ATS1*; gene editing; *ats1* mutant

甘油酯包括甘油磷脂和甘油糖脂,是细胞膜及信号分子的重要组成部分,参与广泛的生理生化过程,在植物生长发育过程中发挥重要作用^[1-5]。在高等植物中,甘油酯的合成涉及2条途径,即在质体外进行真核合成途径和质体中进行原核合成途径^[6-7]。在原核合成途径中,由 *ATS1* 基因编码的3-磷酸甘油酰基转移酶 (glycerol-3-phosphate acyltransferases, GPAT) 催化甘油酯生物合成途径的第一步酰化反应,该反应被认为是关键的限速步骤^[8-10]。

有关质体中 *ATS1* 基因的克隆与功能已有较多研究^[11-13]。随着现代分子生物学的发展,人们已从南瓜 *Cucurbita moschata*、红花 *Carthamus tinctorius*、向日葵 *Helianthus annuus* 和油菜 *Brassica napus* 等植物中分离鉴定了多个与拟南芥 *Arabidopsis thaliana* *ATS1* 同源的基因^[14-17]。这些 *ATS1* 基因表现出多种生理功能,在植物生长发育和抗逆性中发挥着重要作用。如 YAN 等^[18] 研究发现:在烟草 *Nicotiana tabacum* 中异源表达甜椒 *Capsicum frutescens* 质体 *ATS1* 基因可增强转基因烟草对高温胁迫的耐受性。KANG 等^[17] 报道甘蓝型油菜 *BnATS1* 的过表达增加了细胞膜中多不饱和脂肪酸的积累,从而促进了甘蓝型油菜在低温条件下的生长。另有研究表明:*ATS1* 在植物高盐和低磷等非生物胁迫中具有重要作用^[19-20]。

然而, *ATS1* 在植物正常生长发育中的功能并不完全清楚。KUNST 等^[21] 利用 EMS 诱变创制了多个拟南芥 *ats1* 突变体,尽管这些突变体叶片的质体中脂肪酸组分发生了急剧变化,但是 *ATS1* 基因上的点突变并未对种子发育产生明显影响。相反,在高于 28 ℃ 的温度条件下,突变体的生长速度比野生型略快。与上述 *ats1* 表型不一致的是, *ATS1* 基因的 T-DNA 插入纯合突变体呈现败育现象,并且发现运用 RNAi 干扰技术下调 *ATS1* 基因的表达会导致植株变小、胚胎发育受阻、种子结实率下降^[9]。目前,尚不清楚造成这种不一致性的真正原因,但一种可能原因是,转基因植株中的 T-DNA 可能会干扰其插入位点或上下游基因的功能,从而对表型产生某种影响。

为了进一步明确 *ATS1* 在拟南芥正常生长发育中的功能,本研究利用现代基因编辑技术,采用优化后的 CRISPR/Cas9 基因编辑载体对 *ATS1* 基因进行定点编辑,创建功能丧失型突变体,并分析 *ATS1* 基因功能的丧失对拟南芥生长发育的影响,有助于进一步了解高等植物中甘油酯原核合成途径在植物生长发育过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 拟南芥株系与植物生长

野生型拟南芥为哥伦比亚生态型 (Col-0),购自美国索尔克生物研究所 (Salk Institute for Biological Studies),编号为 SALK_063776。

1.2 *ATS1* 基因功能丧失型突变体的构建

1.2.1 *ats1* 突变体的构建 参照 WANG 等^[22] 和朱丽颖等^[23] 的方法进行 CRISPR/Cas9 靶序列的设计和目的基因载体的构建。运用 CRISPR 在线设计软件 (<http://www.genome.arizona.edu/crispr/CRISPRsearch.html>) 筛选目标基因的靶序列。并对选择的靶序列进行分析,最终从拟南芥 *ATS1* 基因中分别选取了 GC 含量较高、基因特异性较强的 2 个关键片段 *ATS1* target sequence 1 (5'-CGAAGAGTCGACGAAGCGAG-3') 和 *ATS1* target sequence 2 (5'-TAGTCATTCCCGTACTTTCT-3') 作为靶序列。之后,以 1 mg·L⁻¹ 的 pCBC-DT1T2 为模板进行四接头引物 (5'-GGAAGAGTCGACGAAGCGA-3', 5'-AGAAAGTACGGGAATGACT-3', 5'-GGAAGAGTCGTCGACGAAGCGAG-3' 和 5'-AGAAAGTACGGG AATGACTC-3') PCR 扩增并纯化回收 PCR 产物。同时用 BsaI 酶切回收的 PCR 产物和骨架载体 pHEE401,经 T4 连接酶连接,获得具有 2 个靶序列的 CRISPR/Cas9 基因编辑载体。

1.2.2 拟南芥的遗传转化 所用植物材料为拟南芥 Col-0, 植物生长的昼夜温度为 22 °C/18 °C, 湿度为 40%, 光照/黑暗时长分别为 14 h/10 h。参考李丹丹等^[24]的方法使用农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 转化法将基因编辑载体转化至拟南芥。

1.2.3 拟南芥突变体的筛选与分子鉴定 以种子专一表达的 *At2S3* 基因启动子驱动荧光蛋白报告基因 *mCherry* 的表达, 将这一筛选标记克隆至 CRISPR/Cas9 编辑载体中^[23]。由于 *mCherry* 荧光蛋白在蓝光激发下会发出红光, 因此可将获得的成熟转基因拟南芥 T₁ 代种子置于荧光显微镜下, 筛选蓝色激发光下发出红光的种子, 即为转基因阳性种子。

种植筛选获得的 T₁ 代转基因阳性种子, 30 d 后, 提取植株叶片的 DNA, 作为模板进行 PCR 扩增。根据拟南芥参考基因组, 分别在靶序列上下游约 100 bp 设计 PCR 引物 (*ATS1*-FP: 5'-TCACCAAACAC GCTTTAATGAC-3' 和 *ATS1*-RP: 5'-AGACATGGCTCTCACACTAACG-3')。将 PCR 产物经质量浓度为 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE), 筛选出与对照电泳条带不同的株系, 即为发生了基因编辑的株系。将这些株系的 PCR 产物进行测序验证, 并收获 T₂ 代种子。

每个株系挑选 16 粒不含红色荧光的 T₂ 代种子进行种植。1 个月后提取叶片基因组 DNA 进行 PCR 扩增。综合 PCR 产物的 PAGE 和测序结果, 挑选靶序列发生纯合突变的植株, 即获得了不含转基因的 *ATS1* 基因突变株系。将这些株系重新编号, 并收获 T₃ 代种子, 进行扩繁, 用于后续实验。

1.3 叶片脂肪酸组分分析

脂质提取步骤参考徐雪珍等^[25]的方法。取播种 4 周的拟南芥叶片至研钵中, 加入液氮充分研磨成粉末, 称取 100 mg 样本转入 12 mL 离心管。经过 6 mL 氯仿-甲醇-甲酸溶液 (体积比为 10:10:1) 和 2 mL 氯仿-甲醇-水溶液 (体积比为 5:5:1) 提取液的 2 次抽提, 并合并 2 次上清液, 加入 3 mL 含 0.2 mol·L⁻¹ 磷酸和 1.0 mol·L⁻¹ 氯化钾的混合溶液, 提取下层氯仿相。萃取液用氮气吹干, 加入 200 μL 氯仿溶解萃取物, 再加入 2 mL 体积分数为 1% 硫酸-甲醇溶液, 80 °C 加热 2 h, 对油脂的脂键进行充分的水解。之后置于冰上, 加入 2 mL 正己烷及 1 mL 质量浓度为 0.9% 的生理盐水, 对脂肪酸甲酯进行萃取, 取上层相转至新的 12 mL 离心管中, 萃取 2 次, 合并萃取液, 萃取液通过氮吹法浓缩至 100 μL。最后, 利用气相色谱仪分析叶片脂肪酸组分。每个株系设置 3 个生物学重复。

1.4 叶绿素测定

取播种后 30 d 的植株整个地上部, 放入 12 mL 玻璃管中, 加入 3 mL 体积分数为 80% 的丙酮溶液, 4 °C 下避光保存 14 h 后, 测定叶绿素。每个株系设置 5 个生物学重复。

1.5 地上部生物量测定

选取播种后 28 d 的拟南芥植株整个地上部分, 称取鲜质量。每个株系设置 10 个生物学重复。

1.6 单荚粒数测定

选取播种后 60 d 的植株果荚, 测量每个果荚的种子数量, 并通过体视显微镜进行拍照。每个株系设置 5 个生物学重复。

1.7 数据处理与统计分析

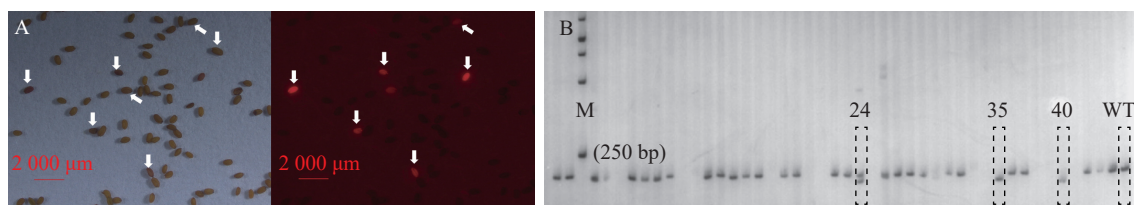
数据以平均值±标准差表示, 并通过 GraphPad Prism 6 软件进行统计分析。通过 *t* 检验或单因素方差分析进行组间差异比较, 显著性水平为 0.05。

2 结果与分析

2.1 *ATS1* 基因功能丧失型突变体的构建

运用农杆菌介导法将含 *ATS1* 靶序列的 CRISPR/Cas9 基因编辑载体 (含 *mCherry* 报告基因) 转到拟南芥中, 并筛选带荧光的 T₁ 代转基因种子 (图 1A)。随后, 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法鉴定转基因阳性植株中 *ATS1* 基因编辑产物的 PCR 扩增片段特性 (图 1B)。经连续多代筛选, 从不同转基因株系的后代分离群体中获得 3 个纯合且稳定遗传的突变体, 分别命名为 *ats1-1*、*ats1-2*、*ats1-3*。同时, 对这些突变体的自交后代进行连续多代的 PCR 检测与荧光观察, 获得不含任何外源 T-DNA 插入片段的突变体, 这些突变体中既不含 *Cas9* 基因, 也不带荧光蛋白报告基因 (*mCherry*)。

进而, 对这些突变体的靶位点附近序列进行测序分析, 结果显示这些突变体的突变位点均位于第 1



A. 借助 mCherry 荧光蛋白报告基因高效筛选转基因拟南芥种子。左图和右图分别为 T_1 代转基因种子在明场中和在蓝光激发下的照片。箭头指示在蓝光激发下能够显示红色荧光的种子, 即转基因阳性种子, 比例尺为 2 000 μm ; B. 转基因植株中 *ATS1* 基因扩增产物的 8% (质量浓度) 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。泳道 24、35 和 40 对应编辑过的 *ATS1* 基因 PCR 扩增产物。M 为 1 kb DNA marker; WT 为野生型对照。

图 1 转基因拟南芥的 mCherry 荧光蛋白鉴定与 *ATS1* 编辑产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定

Figure 1 Screening of transgenic plants carrying the mCherry fluorescent protein and those with CRISPR/Cas9-edited *ATS1* gene product

个外显子上 (图 2)。在 *ats1-1* 突变体中, *ATS1* 基因的 92~314 bp (相对起始密码子 ATG 的位置) 处发生 215 bp 碱基缺失和 8 bp 碱基替换。在 *ats1-2* 中, *ATS1* 基因在 2 个位置发生 1 bp 碱基插入, 分别位于 91 和 293 bp 处。在 *ats1-3* 中, *ATS1* 基因的 91~92 bp 之间存在 7 bp 碱基插入, 而在 275~289 bp 间发生 11 bp 碱基缺失和 4 bp 碱基替换 (表 1)。上述这些突变大多位于 PAM 序列 (NGG) 的切割位点附近, 其特点是 *ATS1* 基因的第 1 个外显子的碱基数呈非 3 的倍数的插入或缺失, 从而导致移码突变或翻译提前终止, 且由之产生的蛋白不含酰基转移酶保守结构域。这些结果表明, 上述 3 个 *ATS1* 基因突变体均属功能丧失型突变体。这些突变体可成为 *ATS1* 基因功能研究的理想遗传材料。

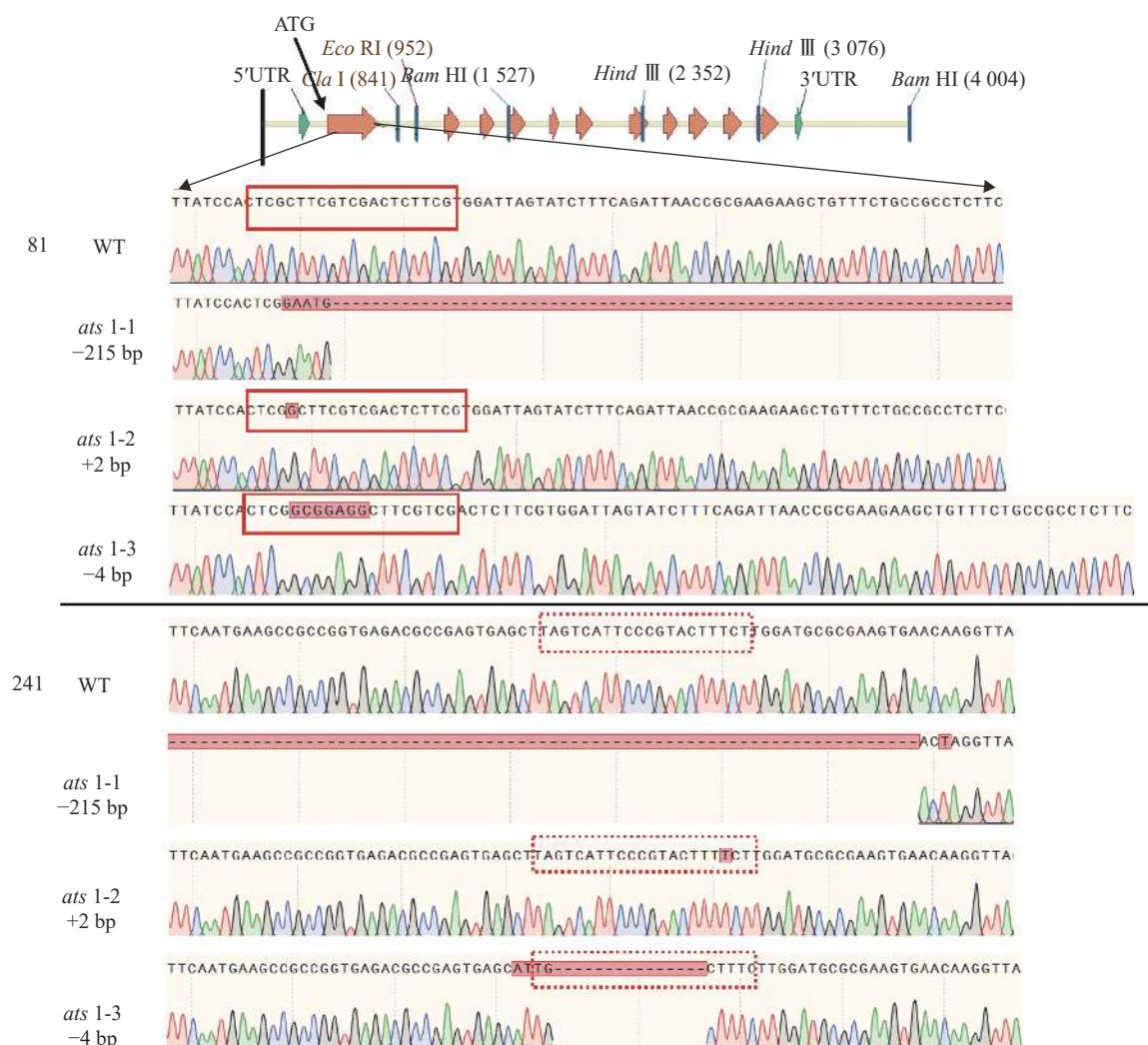


图 2 不同 *ats1* 突变体中 *ATS1* 基因的突变位点序列

Figure 2 Sequences of mutational sites in *ATS1* gene in different *ats1* mutants

2.2 突变体叶片的脂肪酸组分分析

ATS1 是甘油酯原核合成途径中参与第一步酰化反应的关键酶，过去的研究表明，*ATS1* 基因突变会改变膜脂组分及脂肪酸组分，特别是质体中的 C16:3 含量急剧下降^[6]。对生长 4 周的拟南芥植株叶片进行脂肪酸组分分析显示：与野生型相比，3 个突变体 (*ats1-1*、*ats1-2* 和 *ats1-3*) 中不饱和脂肪酸 C16:3 的含量急剧下降，而不饱和脂肪酸 C18:3 的含量显著增加 (表 2)，这与过去基于 EMS 诱变产生的 *ATS1* 突变体的脂肪酸组分变化完全一致^[6]。因为质体外的甘油酯不含 C16:3，其通常存在于质体中的单半乳糖基二酰基甘油 (monogalactosyldiacylglycerol, MGDG) 骨架的 *sn*-2 位置^[6, 21]，因此，*ats1-1*、*ats1-2* 和 *ats1-3* 中 C16:3 的大幅降低，印证了这些突变体中参与甘油酯原核合成途径中第一步酰化反应的 *ATS1* 基因的功能丧失。

表 1 不同 *ats1* 突变体名称及其相应突变位点序列信息

Table 1 Designation of different <i>ats1</i> mutants and the sequences of corresponding mutational sites	
突变体	突变位点
<i>ats1-1</i>	92~314 bp: 215 bp 缺失; 8 bp 替换
<i>ats1-2</i>	91~92 bp: 插入 1 bp; 293~294 bp: 插入 1 bp
<i>ats1-3</i>	91~92 bp: 7 bp 插入; 275~289 bp: 11 bp 缺失, 4 bp 替换

表 2 野生型拟南芥与 *ats1* 突变体叶片的脂肪酸组分

Table 2 Leaf fatty acid composition of *ats1* mutants and wild-type *A. thaliana*

脂肪酸	脂肪酸组分含量/%						
	C16:0	C16:1	C16:3	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
WT	14.91±0.73 a	7.35±0.53 a	11.56±0.38 a	6.17±1.55 a	4.37±0.59 b	14.89±1.30 b	38.50±3.04 b
<i>ats1-1</i>	11.91±0.65 b	5.55±0.69 b	0.70±0.15 b	3.89±0.87 a	8.65±0.75 a	18.61±0.54 a	49.14±2.24 a
<i>ats1-2</i>	11.20±0.18 b	5.93±0.89 ab	0.65±0.15 b	4.67±0.32 a	8.89±1.06 a	18.67±0.98 a	48.31±1.68 a
<i>ats1-3</i>	12.29±0.81 b	6.00±0.93 ab	0.57±0.18 b	6.02±1.62 a	9.08±1.02 a	18.28±0.88 a	46.04±1.45 a

说明：WT 为野生型对照，*n*=3，不同小写字母表示不同株系间显著差异 (*P*<0.05)。

2.3 突变体的表型鉴定

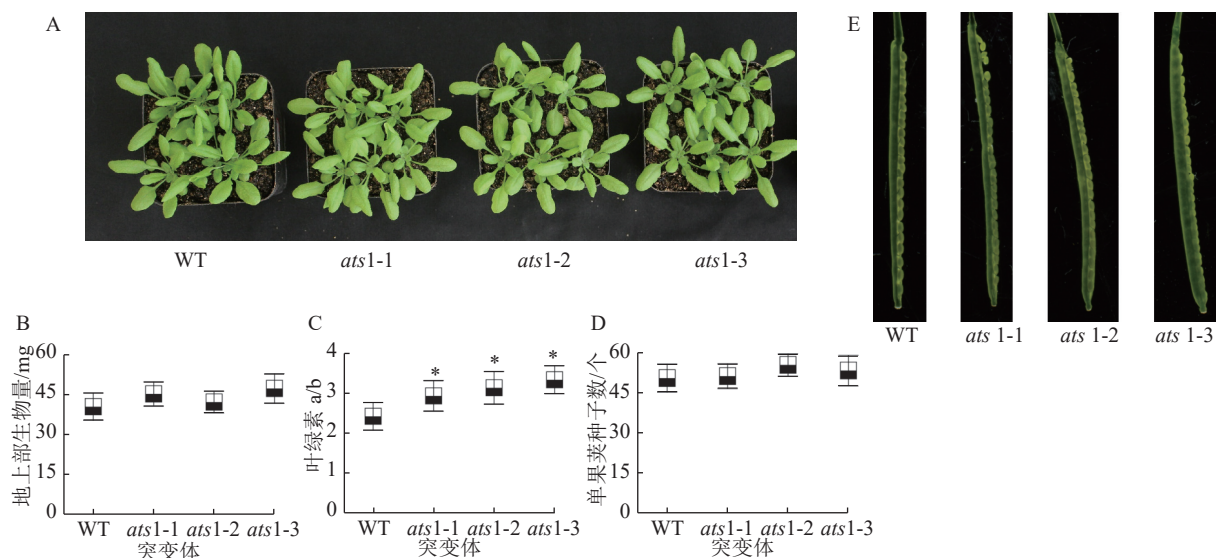
如图 3 A 所示：在营养生长期，与野生型相比，突变体 (*ats1-1*、*ats1-2* 和 *ats1-3*) 有时会出现叶片略微变黄的现象，但植株叶片发育与野生型相比无明显差异。对植株地上部生物量检测结果显示：与野生型相比，突变体植株地上部生物量无显著差异 (图 3 B)。对植株叶片叶绿素检测结果显示：与野生型相比，突变体植株叶绿素 a/b 约上升 29.5% (图 3 C)。拟南芥果荚生长分析显示：与野生型一样，突变体株系的种子发育正常，无败育现象出现 (图 3 D 和 E)，这一结果不支持 XU 等^[9]的研究结果。本研究结果表明在正常生长条件下 *ATS1* 基因的功能丧失对拟南芥种子发育并不产生可见影响。

3 讨论

3.1 *ats1-1*、*ats1-2* 和 *ats1-3* 是功能丧失型突变体

之前，研究者利用 EMS 诱变获得的 *ats1* 突变体和 T-DNA 插入突变体，对 *ATS1* 基因的功能进行了大量研究，然而基于不同突变体的研究得出的结论不一致^[6, 9]。这可能存在 2 个原因，一是，EMS 诱变产生的点突变可能不会使基因产物完全丧失活性，因而在某些特定条件下，突变体的表型变得不明显；二是，T-DNA 插入虽然可以导致目标基因的功能完全丧失^[9]，但 T-DNA 插入可能会干扰插入位点附近基因的表达，从而对突变体的表型产生额外的影响。为了排除上述因素对 *ATS1* 基因功能研究产生的干扰，本研究运用现代基因编辑技术创制了不含外源 T-DNA 插入片段的 *ATS1* 功能丧失型突变体。

对其中的 3 个突变体 (*ats1-1*、*ats1-2* 和 *ats1-3*) 进行了分子与生化鉴定，发现这些突变体在 *ATS1* 第 1 个外显子上发生了插入、缺失、替换等几种不同类型的突变，这些突变导致非 3 的倍数的碱基插入或缺失，使阅读框发生移码及翻译提前终止，最终使得 *ATS1* 基因丧失功能。与此一致，脂肪酸组分分析显示：所有突变体的叶片中不饱和脂肪酸 C16:3 (来源于叶绿体中的甘油糖脂) 的含量大幅降低，而 C18:3 的含量显著升高。这一结果与基于 EMS 诱变产生的 *ats1* 突变体的分析结果相吻合^[6]。总之，分子与生化鉴定的结果表明本研究获得的突变体为 *ATS1* 功能丧失型突变体。



A. 播种后第 30 天不同基因型植物的生长表型; B. 播种后第 28 天不同基因型植物地上部鲜质量 ($n=10$); C. 播种后第 30 天叶绿素 a/b ($n=5$); D, E. 播种后第 60 天, 单果荚的种子数。WT 为野生型对照, * 表示与 WT 相比差异显著 ($P < 0.05$)。

图 3 营养生长与生殖生长阶段野生型拟南芥与 *ats1* 突变体的表型比较

Figure 3 Phenotypic comparison of the wild type and *ats1* mutants during the vegetative and reproductive stages

3.2 ATSI 对拟南芥种子发育的非必需作用

目前, 对 *ATSI* 基因在植物生长发育中的作用存在某些争议。由 EMS 诱变产生的 *ats1* 突变体呈正常的种子发育过程^[21], 而当用 RNAi 干扰技术下调 *ATSI* 基因的表达, 拟南芥的种子发育异常, 结实率下降^[9]。为了完善人们对 *ATSI* 基因功能的认知, 本研究利用不含外源 DNA 插入片段的多个 *ATSI* 功能丧失型突变体分析其在正常生长发育过程中的作用。表型分析显示: 在正常生长条件下, 这些突变体植株生长良好, 除了其叶片有时会略显黄色, 种子生长发育正常、无败育现象, 这一表型与源于 EMS 诱变的 *ats1* 突变体分析结果一致^[21], 因此有充足理由推断拟南芥 *ATSI* 并非种子发育所必需的。

ATSI 对种子发育的非必需性, 需要重新评估甘油酯原核合成途径对植物正常生长发育的贡献, 并调查植物细胞的质体中是否存在其他酰基转移酶参与甘油酯合成的第 1 步酰化反应。另外, 期望本研究获得的功能丧失型突变体, 能够更好地剖析植物细胞中真核合成途径与原核合成途径产生的不同甘油酯分子之间的交换机制。

4 参考文献

- [1] MURATA N, TASAKA Y. Glycerol-3-phosphate acyltransferase in plants [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1997, **1348**(1/2): 10 – 16.
- [2] CHEN Xue, SNYDER C L, TRUKSA M, et al. Sn-glycerol-3-phosphate acyltransferases in plants [J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2011, **6**(11): 1695 – 1699.
- [3] 韩妮莎, 丁硕, 郑月萍, 等. 植物甘油酯合成途径第一步酰化反应的研究进展[J]. *中国油料作物学报*, 2022, **44**(4): 699 – 711.
HAN Nisha, DING Shuo, ZHENG Yueping, et al. Advance in studies on the initial step of the glycerolipid biosynthetic pathway in plants [J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2022, **44**(4): 699 – 711.
- [4] GAN Yi, SONG Yu, CHEN Yadong, et al. Transcriptome analysis reveals a composite molecular map linked to unique seed oil profile of *Neocinnamomum caudatum* (Nees) Merr [J/OL]. *BMC Plant Biology*, 2018, **18**(1): 303 [2022-11-10]. doi:10.1186/s12870-018-1525-9.
- [5] ZHENG Zhifu, XIA Qun, DAUK M, et al. *Arabidopsis AtGPAT1*, a member of the membrane-bound glycerol-3-phosphate acyltransferase gene family, is essential for tapetum differentiation and male fertility [J]. *The Plant Cell*, 2003, **15**(8): 1872 – 1887.
- [6] KUNST L, BROWSE J, SOMERVILLE C. Altered regulation of lipid biosynthesis in a mutant of *Arabidopsis* deficient in chloroplast glycerol-3-phosphate acyltransferase activity [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, **97**(12): 6485 – 6490.

- States of America*, 1988, **85**(12): 4143 – 4147.
- [7] OHLROGGE J, BROWSE J. Lipid biosynthesis [J]. *The Plant Cell*, 1995, **7**(7): 957 – 970.
- [8] NISHIDA I, TASAKA Y, SHIRAIISHI H, *et al.* The gene and the RNA for the precursor to the plastid-located glycerol-3-phosphate acyltransferase of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Molecular Biology*, 1993, **21**(2): 267 – 277.
- [9] XU Changcheng, YU Bin, CORNISH A J, *et al.* Phosphatidylglycerol biosynthesis in chloroplasts of *Arabidopsis* mutants deficient in acyl-ACP glycerol-3-phosphate acyltransferase [J]. *The Plant Journal*, 2006, **47**(2): 296 – 309.
- [10] KIM H U, HUANG A H. Plastid lysophosphatidyl acyltransferase is essential for embryo development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2004, **134**(3): 1206 – 1216.
- [11] 陈娜, 郭尚敬, 颜坤, 等. 甜椒甘油-3-磷酸酰基转移酶基因的克隆与表达分析[J]. *园艺学报*, 2005, **32**(5): 58 – 62.
CHEN Na, GUO Shangjing, YAN Kun, *et al.* Cloning and expression analysis of glycerol-3-phosphate acyltransferase gene from sweet pepper [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2005, **32**(5): 58 – 62.
- [12] FRITZ M, HEINZ E, WOLTER F P. Cloning and sequencing of a full-length cDNA coding for sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase from *Phaseolus vulgaris* [J]. *Plant Physiology*, 1995, **107**(3): 1039 – 1040.
- [13] WEBER S, WOLTER F P, BUCK F, *et al.* Purification and cDNA sequencing of an oleate-selective acyl-ACP: sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase from pea chloroplasts [J]. *Plant Molecular Biology*, 1991, **17**(5): 1067 – 1076.
- [14] NISHIDA I, SUGIURA M, ENJU A, *et al.* A second gene for acyl-(acyl-carrier-protein): glycerol-3-phosphate acyltransferase in squash, *Cucurbita moschata* cv. Shirogikuza(*), codes for an oleate-selective isozyme: molecular cloning and protein purification studies [J]. *Plant Cell Physiology*, 2000, **41**(12): 1381 – 1391.
- [15] BHELLA R S, MACKENZIE S L. Nucleotide sequence of a cDNA from *Carthamus tinctorius* encoding a glycerol-3-phosphate acyl transferase [J]. *Plant Physiology*, 1994, **106**(4): 1713 – 1714.
- [16] PAYA-MILANS M, VENEGAS-CALERON M, SALAS J J, *et al.* Cloning, heterologous expression and biochemical characterization of plastidial sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase from *Helianthus annuus* [J]. *Phytochemistry*, 2015, **111**: 27 – 36.
- [17] KANG Huiling, JIA Chenxi, LIU Ni'an, *et al.* Plastid glycerol-3-phosphate acyltransferase enhanced plant growth and prokaryotic glycerolipid synthesis in *Brassica napus* [J/OL]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, **21**(15): 5325 [2022-11-20]. doi:10.3390/ijms21155325.
- [18] YAN Kun, CHEN Na, QU Yanyan, *et al.* Overexpression of sweet pepper glycerol-3-phosphate acyltransferase gene enhanced thermotolerance of photosynthetic apparatus in transgenic tobacco [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2008, **50**(5): 613 – 621.
- [19] 李昊根. *ATS1* 异位表达对拟南芥甘油脂合成及磷胁迫响应的影响[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2019.
LI Haogen. *Effects of Ectopic Expression of ATS1 on Glycerolipid Biosynthesis and Response to Phosphorus Stress in Arabidopsis thaliana* [D]. Hangzhou: Zhejiang A&F University, 2019.
- [20] BAHIELDIN A, SABIR J S M, RAMADAN A, *et al.* Control of glycerol biosynthesis under high salt stress in *Arabidopsis* [J]. *Functional Plant Biology*, 2013, **41**(1): 87 – 95.
- [21] KUNST L, BROWSE J, SOMERVILLE C. Altered chloroplast structure and function in a mutant of *Arabidopsis* deficient in plastid glycerol-3-phosphate acyltransferase activity [J]. *Plant Physiology*, 1989, **90**(3): 846 – 853.
- [22] WANG Zhiping, XING Huili, DONG Li, *et al.* Egg cell-specific promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in *Arabidopsis* in a single generation [J/OL]. *Genome Biology*, 2015, **16**: 144 [2022-11-10]. doi:10.1186/s13059-015-0715-0.
- [23] 朱丽颖, 郑月萍, 徐雪珍, 等. 一种准确、简便测定CRISPR/Cas9基因编辑效率的方法[J]. *江苏农业学报*, 2020, **36**(2): 299 – 305.
ZHU Liying, ZHENG Yueping, XU Xuezheng, *et al.* A convenient and accurate method for determining the efficiency of CRISPR/Cas9-based gene editing [J]. *Jiangsu Academy of Agricultural Sciences*, 2020, **36**(2): 299 – 305.
- [24] 李丹丹, 林蓉, 李新国, 等. *AtJAR1* 基因在拟南芥耐盐性中的功能分析[J]. *浙江农林大学学报*, 2022, **39**(5): 998 – 1009.
LI Dandan, LIN Rong, LI Xinguo, *et al.* Functional analysis of *AtJAR1* gene in salt tolerance of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2022, **39**(5): 998 – 1009.
- [25] 徐雪珍, 郑月萍, 张夏婷, 等. 拟南芥 *AtFAD6* 基因突变体的构建[J]. *江苏农业学报*, 2021, **37**(5): 1125 – 1130.
XU Xuezheng, ZHENG Yueping, ZHANG Xiating, *et al.* Construction of *Arabidopsis AtFAD6* gene mutant [J]. *Jiangsu Academy of Agricultural Sciences*, 2021, **37**(5): 1125 – 1130.