

## 油桐 *DGAT2* 基因克隆及其 RNAi 双元表达载体构建

徐玲娜<sup>1,2</sup>, 汪阳东<sup>1\*</sup>, 陈益存<sup>1</sup>, 张姗姗<sup>1,2</sup>

(1. 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400; 2. 安徽师范大学生命科学学院, 安徽 芜湖 241000)

关键词: 油桐; *DGAT2*; RNAi; 双向启动子

中图分类号: S794.3 文献标识码: A

### Cloning of Tung Tree *DGAT2* Gene and Construction of RNAi Binary Expression Vector with Convergent Promoters

XU Ling-na<sup>1,2</sup>, WANG Yang-dong<sup>1</sup>, CHEN Yi-cun<sup>1</sup>, ZHANG Shan-shan<sup>1,2</sup>

(1. Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, Zhejiang, China;

2. College of Life Science, Anhui Normal University, Wuhu 241000, Anhui, China)

**Abstract:** To identify the physiological function of Diacylglycerol Acyltransferase 2 (*DGAT2*) coding gene in the process of tung oil biosynthesis, *DGAT2* was cloned from cDNA of tung tree kernel and then linked with pMD18-T vector for sequencing. The 969bp fragment containing Open Reading Frame was acquired. Subsequently, RNAi binary expression vector pD35-*DGAT2* was constructed, which expressed *DGAT2* in two opposite ways. The studies provide the possibilities to further identify the function of *DGAT2* in tung oil biosynthesis by RNAi technology and hold promise for genetic engineering of *Vernicia fordii*.

**Key words:** tung tree; *DGAT2*; RNAi; convergent promoters

油桐 (*Vernicia fordii* (Hemsl.) Airy-Shaw) 隶属大戟科 (Euphorbiaceae) 油桐属 (*Vernicia* Lour.), 是我国重要的工业油料树种, 利用油桐籽榨取的桐油是一种优质干性油, 在涂料、油墨、合成树脂、药品等领域有着广泛的应用<sup>[1]</sup>。桐油中 80% 以上是桐酸, 涂料生产要求桐油中桐酸含量高, 而制造优质生物柴油则要求单不饱和脂肪酸含量尽量高, 因此, 根据不同用途和目标调控油桐桐酸生物合成成为油桐品种改良的一个重要途径。桐酸一般以三酰甘油 (Triacylglycerol, TAG) 形式存在于油桐成熟种子中, 二酰甘油酰基转移酶 2 (Diacylglycerol Acyltransferase 2, *DGAT2*) 是三酰甘油合成后期的关键酶, 其主要机制是使二酰甘油加上脂肪酸酰基辅酶 A 以共价键结合形成三酰甘油。植物 *DGAT2* 基因的研究报道相对

较少, 近些年来, 陆续在蓖麻 (*Ricinus communis* L., GenBank 收录号 AY916129)、甘蓝型油菜 (*Brassica napus* L., GenBank 收录号 AF155224)、芥菜 (*B. juncea* (L.) Czern. et Coss., GenBank 收录号 DQ016107)、麻风树 (*Jatropha curcas* L., GenBank 收录号 EU395774)、油桐 (GenBank 收录号 DQ356682) 等少数植物中分离出来。Shockey 等<sup>[2]</sup> 通过利用酵母模型作为宿主表达油桐 *DGAT2* 编码基因, 发现 *DGAT2* 在桐油合成后期起重要作用; 然而, *DGAT2* 是否是桐油合成后期“唯一限速酶”以及是否在油桐种子发育、代谢生理生化过程中扮演其它角色, 需要进一步通过反向遗传学的方法进行探讨。

基因功能的鉴定方法有很多, 按照原理可分为定向克隆及转基因表达等正向遗传学以及基因敲

收稿日期: 2010-11-26

基金项目: 国家林业局“948”引进项目“木本油料植物油脂合成基因高通量分析技术引进”(2009-4-23)

作者简介: 徐玲娜 (1985—), 女, 安徽合肥人, 在读硕士研究生, 主要从事林木分子育种研究。

\* 通讯作者: 汪阳东, 副研究员. E-mail: wyd11111@126.com

除、RNAi (RNA interference, RNAi) 等反向遗传学 2 种方式。RNAi 是指在进化过程中高度保守的、由双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 诱发的、同源 mRNA 高效特异性降解的现象<sup>[3-7]</sup>。该项技术的优点在于可快速建立基因与表型间的直接对应关系, 明确基因的功能。目前, 油菜、花生 (*Arachis hypogaea* L.) 等油料作物已通过 RNAi 技术在油脂合成关键基因功能鉴定及分子改良方面取得了一定的进展<sup>[8-9]</sup>, 但在油桐、油茶 (*Camellia oleifera* Abel.) 等木本油料中采用该项技术进行研究鲜有报道, 主要原因是木本植物组织培养及转化实验技术还不成熟, 周期较长。本实验室张姗姗等<sup>[10]</sup>已建立起油桐的快速繁殖体系, 利用组织培养手段缩短育种时间并达到了大量繁殖的目的, 这给 RNAi 载体构建后转化油桐形成转基因植株奠定了技术基础。本研究从油桐正在发育的种子中分离得到 *DGAT2* 基因, 并构建了正反向启动子 RNAi 表达载体, 为进一步研究分析 *DGAT2* 基因在桐油生物合成中的作用及分子改良奠定了实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

油桐种子采自中国林业科学研究院亚热带林业研究所种植圃。RNA 干扰载体 pD35 由浙江省林科院燕飞博士赠送。pMD18-T simple vector 购自 TaKaRa 公司。大肠杆菌感受态 *E. coli* DH5 $\alpha$  为 Tiangen 公司产品。

### 1.2 生化试剂及试剂盒

SuperScript II Reverse Transcriptase 反转录试剂盒为 Invitrogen 公司产品。T4 DNA 连接酶购自 Promega。Ex Taq<sup>TM</sup> DNA 聚合酶、限制性内切酶、DNAMarker 等均购自 TaKaRa 公司。质粒 DNA 小量纯化试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒购自 Axygen 公司。琼脂糖、酵母提取物、蛋白胨等生化试剂购自上海生工生物工程技术有限公司。测序由上海生工公司完成。

### 1.3 试验方法

1.3.1 油桐种仁总 RNA 提取 由于油桐种子中含有大量的多糖、多酚及一些成分复杂的次生代谢物质, 参照文献<sup>[11]</sup>提取油桐种仁总 RNA 的方法, 在常规 TRIzol 提取方法的基础上增加氯仿抽提次数至 2~3 次, 以提高 RNA 的纯度。1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 紫外分光光度计测定 RNA 的纯度。

1.3.2 cDNA 的合成 cDNA 合成按 SuperScript II Reverse Transcriptase 反转录试剂 (Invitrogen) 说明合成。

1.3.3 *DGAT2* 基因的克隆 根据 GenBank 中的油桐 *DGAT2* 序列 (GenBank 收录号 DQ356682), 利用分子生物学分析软件 Oligo 6.0 设计目的片段两端含酶切位点 *Bam*H I/*Sac* I 的引物: DGP1B: 5'-CGGGATCCATGGGGATGGTGAAG-3' (含 *Bam*H I 酶切位点); DGP2S: 5'-CGAGCTCTCAAAAAATTTCAAGTTTAAGG-3' (含 *Sac* I 酶切位点)。

PCR 扩增 *DGAT2* 基因, 反应体系: Ex Taq (5 U  $\cdot$   $\mu$ L<sup>-1</sup>) 0.1  $\mu$ L; 10 (Ex Taq 缓冲液 (Mg<sup>2+</sup> Free) 2.5  $\mu$ L; MgCl<sub>2</sub> (25 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 1.5  $\mu$ L; dNTP 混合物 (各 2.5 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 2.0  $\mu$ L; DGP1B (10  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 1.0  $\mu$ L; DGP2S (10  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 1.0  $\mu$ L; 油桐种仁总 cDNA 约 1.5 ng; ddH<sub>2</sub>O 15.9  $\mu$ L; 终体积 25  $\mu$ L。

PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58  $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳检测, 并切下目的条带, 回收纯化。

将 PCR 回收产物与 pMD18-T simple vector 按以下反应体系连接: PCR 回收产物约 0.3 pmol; pMD18-T simple vector (50 ng  $\cdot$   $\mu$ L<sup>-1</sup>) 1.0  $\mu$ L; Solution I 5.0  $\mu$ L, 终体积 10  $\mu$ L。16  $^{\circ}$ C 反应 1 h。转化大肠杆菌感受态 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 在含有 Amp 的 LB 平板上转化菌落, 随机挑取单克隆, PCR 和酶切鉴定后送往上海生工公司测序。

1.3.4 RNAi 载体 pD35-*DGAT2* 构建 根据 pMD-T-*DGAT2* 载体质粒测序结果设计一对引物, 由上海生工公司合成, 引物序列为: *DGAT2* forward: 5'-CGGGATCC ATTAAAATGGG-3' (含 *Bam*H I 酶切位点); *DGAT2* reverse: 5'-CCGCTCGAGTTCTGATTTCTG-3' (含 *Xho* I 酶切位点)。

以 pMD-T-*DGAT2* 质粒为模板进行 PCR 扩增, 其反应体系: Ex Taq (5 U  $\cdot$   $\mu$ L<sup>-1</sup>) 0.1  $\mu$ L; 10 (Ex Taq 缓冲液 (Mg<sup>2+</sup> Free) 2.5  $\mu$ L; MgCl<sub>2</sub> (25 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 1.5  $\mu$ L; dNTP 混合物 (各 2.5 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 2  $\mu$ L; 模板 pMD-T-*DGAT2* 约 1.5 ng; *DGAT2* forward (10  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 1  $\mu$ L; *DGAT2* reverse (10  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 1  $\mu$ L; ddH<sub>2</sub>O 14.9  $\mu$ L, 终体积 25  $\mu$ L。

PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 46  $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min。PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶上

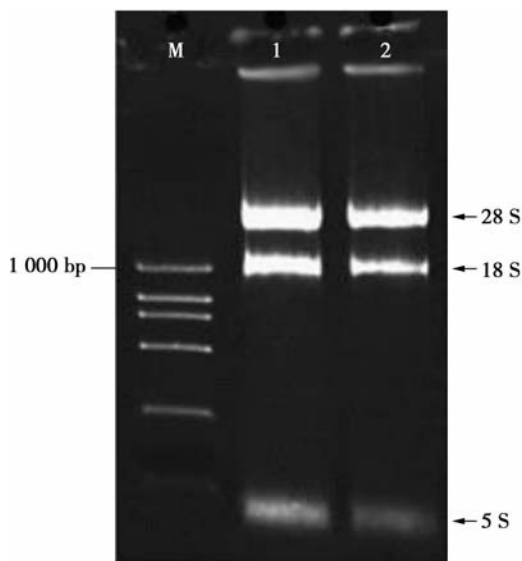
电泳检测,并切下目的条带回收。

用 *Bam*H I + *Xho* I 双酶切 PCR 纯化产物和 RNA 干扰表达载体 pD35,连接时载体和目的片段的摩尔比为 1:1、1:3,按此比例分别用 T4 DNA 连接酶连接并转化大肠杆菌感受态 *E. coli* DH5 $\alpha$ ,在含有 Kan 的 LB 平板上筛选转化菌落,随机挑取单克隆,PCR 和酶切鉴定后送往上海生工公司测序。

## 2 结果与分析

### 2.1 油桐种仁总 RNA 的提取

以油桐种仁为材料提取总 RNA,在常规 TRIzol 提取方法的基础上增加氯仿抽提次数至 2~3 次,有效地提高了 RNA 的纯度。1% 琼脂糖凝胶电泳检测得到 28S RNA、18S RNA 和 5S RNA 3 条带,且 28S RNA 与 18S RNA 的亮度比例约为 2:1,5S 条带较弱(图 1)。经紫外分光光度计检测 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值在 1.9~2.0 之间,表明总 RNA 没有降解,质量和纯度符合下一步逆转录的实验要求。



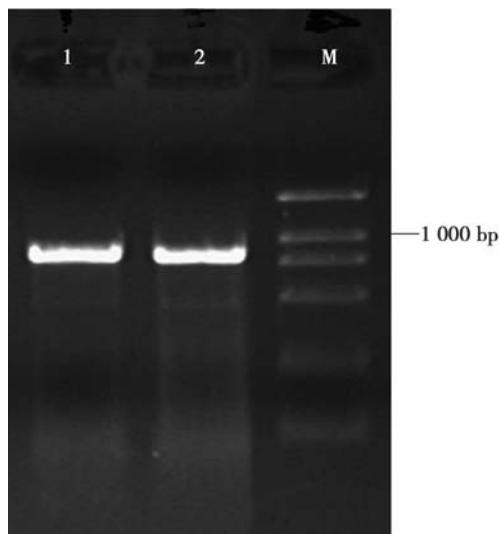
M:DNA Marker;1~2:RNA 提取电泳检测结果

图 1 总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图

### 2.2 *DGAT2* 基因的克隆及鉴定

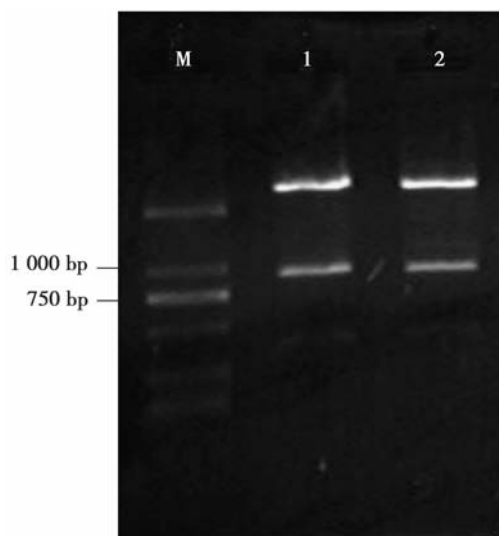
以油桐种仁 cDNA 为模板,DGP1B 和 DGP2S 为引物,扩增 *DGAT2* 基因,经凝胶电泳分析,得到的片段约 1 000 bp(图 2),大小符合目的片段要求。回收纯化该片段,将其与 pMD18-T simple vector 连接转化。蓝白斑平板筛选,挑取白斑进行菌落 PCR 鉴定,模板为单克隆菌落,扩增出大小约为 1 000 bp 的目的条带。挑取检测为阳性的菌落在含 Amp 的 LB 液体培养基中培养过夜。提取重组质粒 pMD-T-

*DGAT2*, *Bam*H I/*Sac* I 分步双酶切鉴定,得到 1 000 bp 的条带(图 3),说明该目的片段可能已成功地插入 pMD18-T simple vector 中,即得到重组质粒 pMD-T-*DGAT2*。取 PCR 和酶切鉴定均为阳性的重组子进行测序,测序结果与报道序列完全一致。



1~2:*DGAT2* 克隆的 RT-PCR 扩增电泳检测结果;M:DNA Marker

图 2 *DGAT2* 克隆的 RT-PCR 扩增



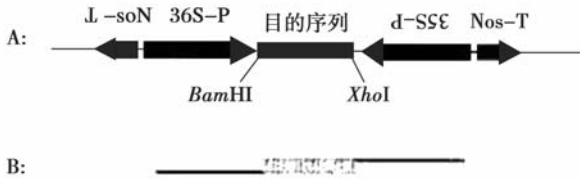
M:DNA Marke ;2~3:*Bam*H I/*Sac* I 双酶切质粒 pMD-T-*DGAT2*

电泳检测结果

图 3 重组质粒 pMD-T-*DGAT2* 的酶切验证

### 2.3 RNA 干扰载体 pD35-*DGAT2* 的构建与鉴定

本实验采用 pD35 RNAi 载体,表达框架如图 4 所示。该载体大小约 15 000 bp,含有正反向 CaMV35S 启动子、正反向 Nos 终止子、目的基因片段插入替换序列。该载体可一步插入目的序列而构建成 RNA 干扰质粒,表达产生其同源基因的双链 RNA(dsRNA)。

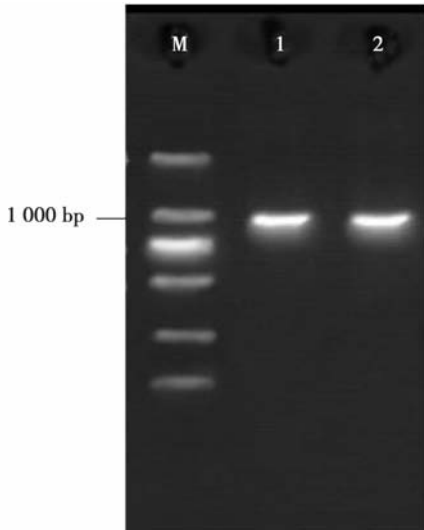


A: 载体中 CaMV35S 启动子正反向连接构成的表达框架结构

B: 该框架表达出目的序列的双链 RNA 形态

图4 pD35RNA 干扰载体表达框架示意

2.3.1 *DGAT2* 的 PCR 扩增结果 以 pMD-T-*DGAT2* 重组质粒为模板, *DGAT2* forward 和 *DGAT2* reverse 为引物, PCR 扩增后凝胶电泳检测, 得到大小约 1 000 bp 亮度适中的特异性条带 (图 5)。该条带可能为目的片段 *DGAT2*, 其大小和亮度均符合下一步



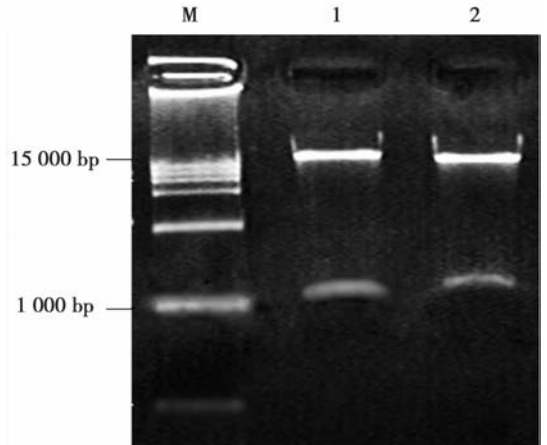
M: DNA Marker; 1~2: *DGAT2* 的 PCR 扩增电泳检测结果

图5 *DGAT2* 的 PCR 扩增

连接干扰载体实验的要求。

2.3.2 连接 pD35 与 *DGAT2* 的摩尔比 用 *Bam*H I + *Xho* I 双酶切 PCR 纯化产物和 RNA 干扰表达载体 pD35, 按 Promega T4 DNA 连接酶 (Catalog#1801) 说明书操作, 设计载体和目的片段连接的摩尔比分别为 1:1、1:3, 分别用 T4DNA 连接酶连接后转化大肠杆菌感受态 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 结果见表 1。载体 pD35 与目的片段 *DGAT2* 的摩尔比为 1:3 时平板上生长的单克隆数最多、假阳性最少, 表明本实验中此摩尔比下载体与目的片段的连接效率最高。

2.3.3 pD35-*DGAT2* 的酶切鉴定结果 提取重组 pD35-*DGAT2* 菌液质粒, *Bam*H I + *Xho* I 双酶切后电泳检测, 得到约 1 000 bp 片段 (图 6), 符合预期实验结果, 可初步证明 *DGAT2* 基因连接到了干扰载体 pD35 上。



M: DNA Marker; 2~3: pD35-*DGAT2* 酶切电泳检测结果

图6 重组质粒 pD35-*DGAT2* 酶切检测

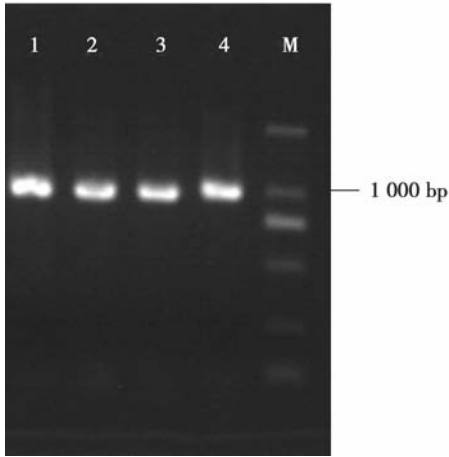
表 1 pD35 与 *DGAT2* 不同摩尔比的连接转化结果

pD35: <i>DGAT2</i> (摩尔比)	干扰载体 pD35 质量/ ng	目的片段 <i>DGAT2</i> 质量/ ng	平板上单克隆 总个数	随机挑取鉴定的 单克隆个数	鉴定后假阳性 单克隆个数
1:1	约 100	约 20.0	22	10	2
1:3	约 100	约 6.7	78	10	0

2.3.4 pD35-*DGAT2* 的 PCR 及测序鉴定结果 以重组 pD35-*DGAT2* 菌液为模板, *DGAT2* forward 和 *DGAT2* reverse 为引物 PCR, 1% 凝胶电泳检测, 得到约 1 000 bp 的特异性条带 (图 7)。取 PCR 和酶切均为阳性的重组子进行测序, 整条序列与 GenBank 收录的油桐 *DGAT2* 基因序列比较后完全一致, 该序列包含一个长度为 969 bp 的完整开放阅读框。由此, 油桐 *DGAT2* 基因的 RNA 干扰载体 pD35-*DGAT2* 构建成功。

### 3 讨论

目前, RNA 干扰技术最广泛的应用是得到可诱导已知基因沉默的 siRNA, 通过合适的手段将其导入细胞或机体, 使该基因表达水平下降或完全沉默, 从而了解该基因的功能。对于植物 RNAi 技术而言, 一般采用构建载体表达较长的双链 RNA 的方法来达到实验目的。构建植物 RNAi 载体, 一般需连接 2~3 个甚至更多的片段以得到中间连有间隔序



1~4: pD35-*DGAT2* 质粒 PCR 电泳检测结果; M: DNA Marker

图7 重组质粒 pD35-*DGAT2* PCR 检测

列的反向连接结构完成<sup>[12-13]</sup>;而本实验采用的 pD35RNA 干扰载体为正反向双启动子表达载体,即将真核表达启动子正反向连接,使其表达二者之间插入的同一段序列的正义、反义两条链而达到表达双链 RNA 的目的。该载体能够一步插入目的序列,较传统方法显著减少了构建的工作量并提高了载体的稳定性。

在油料作物方面,目前已成功利用 RNAi 技术对油菜、花生等与油脂合成的相关基因作了较多研究,田保明等<sup>[14]</sup>构建的油菜 *FAD2* RNA 干扰载体使种子内源表达的 *FAD2* 基因有效沉默,并且产生了能够稳定遗传两代的表型变化;但对多年生木本油料植物而言,采用该项技术研究较少。这本身与植物 RNAi 载体构建及转化的难度大有关,更重要的是 RNAi 表达具有不稳定性,而对于多年生植物来说,需要一个稳定表达的性状,这使得 RNAi 技术在木本植物上应用有了很大局限;但已有学者为验证 RNAi 技术在林木上的可行性,对杨树 RNAi 转基因植株进行了田间试验,成功证明了 RNAi 技术可以高效地用于多年生植物的功能基因组研究中<sup>[15]</sup>。这一成功示例为油桐等木本油料植物利用 RNAi 技术研究功能基因提供了很好的平台。本研究组 2009 年成功建立了油桐快速繁殖体系,愈伤分化实验也取得突破性进展<sup>[10]</sup>,并且进行了油桐种仁功能基因组学和分子辅助育种研究<sup>[16-17]</sup>,为载体构建后基因转化工作奠定了技术基础。

三酰甘油(TAG)是大多数油料植物种子主要储藏脂类,合成的一般过程为:在质体中以乙酰 CoA 为底物合成脂肪酸,再以复合体的形式释放到细胞

质中进一步形成脂酰 CoA,在内质网中脂酰 CoA 连续的结合到甘油上形成 TAG<sup>[18]</sup>。DGAT 催化这一过程的最后一步,即二酰甘油(diaclyglycerol, DAG)和脂酰 CoA 合成 TAG,是该过程关键的限速酶。*DGAT* 基因家族包括 *DGAT1*、*DGAT2* 和 *DGAT3*,在种子发育过程中影响 TAG 含量、含油量、脂肪酸组成<sup>[2,19-20]</sup>,在幼苗发育、叶片新陈代谢等方面同样有重要作用<sup>[21-22]</sup>。油桐中 *DGAT2* 在发育的种子中大量表达,该蛋白编码基因在种子中表达规律与桐酸及脂肪酸积累时期大体一致<sup>[2]</sup>,并且 *DGAT2* 虽然与 *DGAT1* 都催化二酰甘油结合 CoA 形成三酰甘油,但 *DGAT2* 可能更侧重于特殊脂肪酸(桐酸)的积累<sup>[2]</sup>。

桐油生物合成是一个非常复杂的生理生化过程,鉴于油桐 *DGAT2* 在桐油合成后期的重要催化作用,通过其超表达来提高油脂含量是应用之一。Lardizabal 等<sup>[23]</sup>将 *Umbelopsis ramanniana DGAT2A* (*UrDGAT2A*)在大豆中转基因表达,使得种子含油量提高了 1.5%。但 *DGAT2* 在油桐种子发育过程中的作用及参与的代谢途径中是否还扮演着其它角色?利用反向遗传学方法,进一步鉴定油桐 *DGAT2* 是否是桐油合成最后阶段“唯一限速酶”,以及鉴定 *DGAT2* 在桐油种子发育、代谢途径中其它可能的角色具有重要的生物学意义,对基因工程改良创制油桐新品种有重要的实践指导意义。本研究成功构建了油桐 *DGAT2* 的 RNAi 双元表达载体,为 RNAi 技术在油桐中的应用及反向鉴定 *DGAT2* 编码基因功能奠定了基础。

## 参考文献:

- [1] 方嘉兴,何方. 中国油桐[M]. 北京:中国林业出版社,1998: 337-340
- [2] Shockey J M, Gidda S K, Chapital D C, et al. Tung tree *DGAT1* and *DGAT2* have nonredundant functions in Triacylglycerol biosynthesis and are localized to different subdomains of the endoplasmic reticulum[J]. The Plant Cell, 2006, 18:2294-2313
- [3] Kooter J M, Matzke M A, Meyer P. Listening to the silent genes: transgene silencing gene regulation and pathogen control[J]. Trends Plant Science, 1999, 4(9):340-347
- [4] Li W X, Ding S W. Viral suppressors of RNA silencing[J]. Curr Opin Biotechnol, 2001, 12(2):150-154
- [5] Lee R C, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*[J]. Science, 2001, 294 (5543):862-864
- [6] Tijsterman M, Ketting R F, Okihara K L, et al. RNA helicase MUT-14-dependent gene silencing triggered in *C. elegans* by short antisense RNAs[J]. Science, 2002, 295(5555):694-697
- [7] Tang G, Reinhart B J, Bartel D P, et al. A biochemical framework

- for RNA silencing in plants[J]. *Genes Development*, 2003, 17(1): 49-63
- [8] 李帅,邓薇,高勇,等. 油菜 *BnCr4* 基因 RNAi 载体构建及植株转化[J]. *西北植物学报*, 2009, 29(7):1303-1308
- [9] 黄冰艳,张新友,苗利娟,等. 花生 *FAD2* 基因 RNAi 载体转化及转基因籽粒脂肪酸分析[J]. *中国油料作物学报*, 2008, 30(3): 290-293
- [10] 张姗姗,陈益存,汪阳东. 油桐的组织培养与快速繁殖[J]. *植物生理学通讯*, 2009, 45(10):1008
- [11] 汪阳东,李元,李鹏. 油桐桐酸合成酶基因克隆和植物表达载体构建[J]. *浙江林业科技*, 2007, 7(2):1-5
- [12] 陈占宽,张新友,苗利娟,等. 花生  $\Delta^{12}$ -脂肪酸去饱和酶基因 RNAi 表达载体的构建[J]. *华北农学报*, 2006, 1(4):9-12
- [13] 金亮,孙振元,刘芸,等. 香石竹 *GA20-oxidase* 基因的克隆及 RNA 干扰载体的构建[J]. *农业生物技术学报*, 2009, 17(1):107-113
- [14] 田保明,廉玉利,凌华,等. RNAi 干扰油菜  $\Delta^{12}$ -脂肪酸脱饱和酶基因的表达效果[J]. *中国油料学报*, 2009, 31(2):132-136
- [15] Li J Y, Brunner A M, Shevchenko O, *et al.* Efficient and stable transgene suppression via RNAi in field-grown poplars[J]. *Transgenic Research*, 2008, 17(4):679-694
- [16] Chen Y C, Wang Y D, Zhou G, *et al.* Key mediators modulating TAG synthesis and accumulation in woody oil plants[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2008, 7(25):4743-4749
- [17] Li P, Zhang X P, Chen Y C, *et al.* Genetic diversity and germplasm resource research on tung tree (*Vernicia fordii*) cultivars, investigated by inter-simple sequence repeats[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2008, 7(8):1054-1059
- [18] Kennedy E P. Biosynthesis of complex lipids[J]. *Fed Proc*, 1961, 20:934-940
- [19] Jako C, Kumar A, Wei Y D, *et al.* 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
- [20] Perry H J, Harwood J L. Changes in the lipid content of developing seeds of *Brassica napus* [J]. *Phytochemistry*, 1993, 32(6):1411-1415
- [21] Feussner I, Kühn H, Wasternack C. Lipoxygenase dependent degradation of storage lipids[J]. *Trends Plant Science*, 2001, 6(6):268-273
- [22] Kaup M T, Frese C D, Thonpson J E. Arole for diacylglycerol acyltransferase during leaf senescence [J]. *Plant Physiology*, 2002, 129(4):1616-1626
- [23] Lardizabal K, Effertz R, Levering C, *et al.* Expression of *Umbelopsis ramanniana DGAT2A* in seed increases oil in soybean[J]. *Plant Physiology*, 2008, 148:89-96