

油茶种仁脂肪酸代谢关键基因的挖掘与分析

成新琪, 吴诗颖, 李欣悦, 刘文超, 刘宏涛, 胡孝明, 朱华国

(黄冈师范学院生物与农业资源学院/经济林木种质改良与资源综合利用湖北省重点实验室, 湖北黄冈 438000)

摘要: 为挖掘油茶含油量及脂肪酸代谢的关键基因, 对3个关键发育时期的油茶种仁进行转录组分析, 并对富集的脂肪酸代谢关键基因表达量、含油量和各脂肪酸组分比例进行相关性分析。转录组分析表明, 共获得17772个差异表达基因, 其中11006个基因上调表达, 6766个基因下调表达。GO分析表明, 3个比较组共有的1302个差异表达基因富集到195个GO条目, 每个比较组特有的差异表达基因分别富集到14个、1个和17个GO条目。KEGG分析显示, 3个比较组共有的差异表达基因富集在类黄酮生物合成、苯丙烷生物合成、二芳基庚烷和姜酚生物合成、黄酮和黄酮醇生物合成以及谷胱甘肽代谢5条通路中。此外, 在脂肪酸合成关键时期的Em0707vsEm1003比较组中, 差异表达基因富集在脂肪酸生物合成、脂肪酸代谢、生物素代谢和丙酮酸代谢4条通路中, 其中12个差异表达基因参与脂肪酸代谢通路; 进一步测定不同时期种仁含油量和脂肪酸组分, 并进行相关性分析, 表明ACC、KASIII、PATE、KAT2和SAD基因的表达量与种仁含油量和油酸呈极显著正相关, KASIII、ACC、PATE和KAT2基因与棕榈酸呈极显著负相关, 可能是调控油茶含油量及脂肪酸代谢相关的关键基因。上述研究为油茶遗传改良提供了科学依据。

关键词: 油茶; 脂肪酸; 转录组; 基因表达; 相关性

Exploration and Analysis of Key Genes Involved in Fatty Acid Metabolism in *Camellia oleifera* Seeds Kernel

CHENG Xinqi, WU Shiyong, LI Xinyue, LIU Wenchao, LIU Hongtao, HU Xiaoming, ZHU Huaguo

(College of Biology and Agricultural Resources, Huanggang Normal University/Hubei Key Laboratory of Economic Forest Germplasm Improvement and Resources Comprehensive Utilization, Huanggang 438000, Hubei)

Abstract: To explore the key genes involved in oil content and fatty acid metabolism in *Camellia oleifera*, transcriptome analysis was performed on the kernel at three key developmental stages. Correlation analysis was conducted on the expression levels, oil content, and proportions of each fatty acid component of the enriched fatty acid metabolism key genes. Transcriptome analysis revealed 17772 differentially expressed genes (DEGs), of which 11006 were up-regulated, and 6766 were down-regulated. Gene Ontology (GO) analysis showed that 1302 DEGs were enriched with 195 GO terms across the three comparative groups. DEGs in each pairwise group were enriched with 14, 1, and 17 GO terms. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analysis showed that DEGs were enriched in five pathways: flavonoid biosynthesis, phenylpropanoid biosynthesis, diarylheptanoid and gingerol biosynthesis, and glutathione metabolism. During the critical period of fatty acid synthesis, in the Em0707vsEm1003 comparison group, DEGs were enriched in four pathways: fatty acid biosynthesis, fatty acid metabolism, biotin metabolism and pyruvate metabolism.

收稿日期: 2024-06-19 网络出版日期: 2024-09-02

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20240619003>

第一作者研究方向为植物遗传改良, E-mail: 360028055@qq.com

通信作者: 朱华国, 研究方向为作物遗传改良及生物技术利用, E-mail: zhuhuaguo@hgnu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(31660427); 湖北省高等学校优秀中青年科技创新团队(T2023025); 湖北省教育厅科学技术研究项目(Q20222903); 黄冈师范学院高级别重大项目培育计划项目(204202314304)

Foundation projects: National Natural Science Foundation of China(31660427); Excellent Young and Middle Aged Science and Technology Innovation Team of Higher Education Institutions in Hubei Province(T2023025); Hubei Provincial Department of Education Science and Technology Research Foundation(Q20222903); High Level Major Project Cultivation Plan Foundation of Huanggang Normal University(204202314304)

Twelve DEGs were involved in the fatty acid metabolism pathway. Further determination of oil content and fatty acid composition at different stages of kernel development and correlation analysis, showed that the expression levels of *ACC*, *KASIII*, *PATE*, *KAT2* and *SAD* genes were extremely significantly positively correlated with seed oil content and oleic acid. In contrast, *KASIII*, *ACC*, *PATE*, and *KAT2* genes were extremely significantly negatively correlated with palmitic acid. These genes may be key regulators of oil content and fatty acid metabolism in *Camellia oleifera*, thus providing a scientific basis for future genetic improvement of *Camellia oleifera*.

Key words: *Camellia oleifera*; fatty acids; transcriptome; gene expression; correlation

油茶(*Camellia oleifera* Abel)是中国特有的木本食用油料树种,与油橄榄(*Olea europaea* L.)、油棕(*Elaeis guineensis* Jacq.)和椰子(*Cocos nucifera* L.)并称为世界四大木本油料植物,与油桐(*Vernicia fordii*)、乌桕(*Sapium sebiferum* L.)和核桃(*Juglans regia* L.)并称为中国四大木本油料植物。茶油含有90%以上的不饱和脂肪酸,主要成分油酸和亚油酸是人体不可或缺但自身不能合成的多不饱和脂肪酸,具有调节血压和抗氧化的作用,还能有效地预防高血压、冠心病等疾病,是世界上最优质的食用植物油之一^[1-2];此外,油茶含有黄酮类与角鲨烯等物质,具有极佳的抗炎、抗癌效果^[3]。

在高等植物中,脂肪酸从头生物合成主要发生在质体中。乙酰-CoA羧化酶(*ACC*, acetyl-CoA carboxylase)作为脂肪酸生物合成的起始酶,将乙酰-CoA羧化成丙二酸单酰-CoA,丙二酸单酰-CoA-ACP转酰基酶(*MCAT*, malonyl-CoA: ACP transacylase)催化丙二酸单酰-CoA生成丙二酸单酰-ACP。丙二酸单酰-ACP在酮脂酰-ACP合酶(*KAS*, ketoacyl-ACP synthase)和酮脂酰-ACP还原酶(*KAR*, ketoacyl-ACP reductase)作用下生成羟丁醇-ACP和NADP⁺。在脂肪酸合成中,通过“缩合-还原-脱水-还原”的循环反应,每次增加两个碳来形成酰基碳链,最终生成棕榈酰-ACP(C16:0-ACP),在 β -酮脂酰 ACP 合成酶 II (*KASII*, β -ketoacyl-acyl carrier protein synthase II)的作用下,C16:0-ACP将延伸两个碳形成硬脂酰-ACP(C18:0-ACP),大部分C18:0-ACP被 Δ^9 -硬脂酰-脱氢 ACP 脱氢酶(*SAD*, Δ^9 -stearoyl-ACP-desaturase)催化产生单不饱和油酸-ACP(C18:1-ACP)。在内质网中, Δ^{12} -脂肪酸去饱和酶(*FAD2*, Δ^{12} -fatty acid desaturase)是单不饱和油酸(C18:1)转变为多不饱和脂肪酸亚油酸(C18:2)的关键酶,直接影响高等植物体内亚油酸含量和比例^[4]。

目前,关于油茶脂肪酸代谢的研究越来越多。*Zeng*等^[5]发现*CoFBA*和*CoSAD*基因控制茶油产量及油酸的合成,而*CoFAD2*基因可能影响茶油中的脂肪酸组成。*林萍*等^[6]通过转录组测序技术发现*CoFAD2-2*基因是调控底物油酸和产物亚油酸相对含量的关键基因。*吕晓杰*等^[7]研究发现,*ACCase*、*KASIII*、*LACS2*和*GPAT4*等4个基因随着油茶籽的成熟,其表达水平呈上升趋势,且与种仁的含油量的变化趋势相一致。*Lin*等^[8]利用转录组技术研究发现,*FADs*和*SADs*基因作为调控油酸生物合成的关键酶基因,参与了油茶成熟后期油酸的积累过程。*张帆航*^[9]发现*ACCase*、*MCAT*、*ACPR*、*AR*、*ACPS*、*FabZ*、*SAD*、*FAT*、*LACS*等9个蛋白家族的26个基因参与了脂肪酸生物合成。此外,*Wu*等^[10]发现了*ABI3*、*FUS3*、*LEC1*、*WR11*、*TTG2*和*DoF4.6*等6个关键转录因子在油茶种子发育过程中发挥着重要作用,*Wang*等^[11]进一步研究发现,*ERF*、*GRAS*、*GRF*、*MADS*、*MYB*、*WRKY*等转录因子可能参与脂肪酸的合成及细胞内脂质的转运。*沈军*等^[12]采用定量蛋白质组学技术对油茶‘闽43’成熟过程中3个时期的籽仁进行分析,研究发现不饱和脂肪酸含量的调控与油脂代谢相关蛋白表达模式和酶活性的变化密切相关,*SAD*和胆碱激酶(*CK*, choline kinase)蛋白表达量的下调,可能与不饱和脂肪酸生成速率减缓有关。上述研究结果为深入认识茶油脂肪酸代谢提供了重要参考。

本研究采集‘长林40号’3个不同发育时期油茶种仁进行转录组分析,同时对富集获得的脂肪酸代谢相关差异基因表达量、3个发育时期的种仁含油量和各脂肪酸组分比例进行相关性分析,挖掘分析油茶脂肪酸合成与代谢关键基因,为油茶遗传改良、新品种选育和分子育种提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

研究材料采集于湖北省黄冈市黄梅县湖北省林业科学研究院油茶林基地(115°59'E, 30°9'N), 试验材料‘长林40号’作为湖北省长林系列主栽品种, 具有长势旺、抗性强、高产、稳产且极少染病的特点。2023年7月7日、8月14日和10月3日, 分别采集‘长林40号’油茶植株不同方向树冠上中下3层各5个油茶果混合, 设置3个重复, 将其分别命名为Em0707、Em0814和Em1003, 剥去果皮和种壳, 液氮速冻, 保存于-80℃中用于转录组测序、含油量和脂肪酸组分分析。

1.2 RNA测序与数据处理

剥去油茶果实果皮和种子种壳, 采集3个时期的油茶种仁, 送往北京贝瑞和康生物技术有限公司进行RNA提取、文库构建与质检和测序工作。FASTq格式的原始数据使用Perl脚本进行处理以确定数据的质量, 包括GC含量、Q20比例和Q30比例。过滤并消除低质量数据, 过滤后的数据用于后续分析。从二倍体油茶数据库下载基因模型注释文件(https://github.com/Hengfu-Yin/CON_genome_data)作为参考基因组。HTSeq v0.9.1^[13]用于计数映射到每个基因的读数, 然后根据基因的长度计算每个基因的FPKM。使用TopHat v2.0.12^[14]将生成的过滤数据对比到油茶基因组上。使用Cufflinks软件^[15]计算每个基因的表达量(FPKM)。利用R语言(<http://www.r-project.org/>)进行主成分分析(PCA, principal component analysis)。根据各样本基因的表达量, 计算样本间的相关性系数, 绘制热图。通过DESeq软件用于确定负二项分布差异表达基因(DEGs, differentially expressed genes), 并利用

Benjamini和Hochberg方法计算错误发现率(FDR, false discovery rate)以及 q_{value} (校正后的 P_{value})。使用DESeq R软件包(1.18.0)(<https://bioc.nucl.berkeley.edu/packages/release/bioc/html/DESeq2.html>)对3个重复进行差异表达分析, $|\log_2(\text{Fold Change})| \geq 2$ 且 $q_{value} < 0.05$ 作为样本中差异表达基因识别的阈值。

1.3 GO条目和KEGG通路的功能注释

使用Cluster Profiler R软件(<http://www.bioc.nucl.berkeley.edu/packages/release/bioc/html/clusterProfiler.html>)进行GO功能富集分析, 利用二倍体油茶数据库(https://github.com/Hengfu-Yin/CON_genome_data)对差异表达基因进行功能注释, $q_{value} < 0.05$ 作为样本中GO功能显著富集的筛选标准。通过KOBAS 2.0软件(<http://bioinfo.org/kobas>)对KEGG富集通路进行分析, 以拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)TAIR10版本数据库(<https://www.arabidopsis.org/>)对差异表达基因进行近源Blast和富集通路注释。以 $q_{value} < 0.05$ 作为KEGG通路显著富集的阈值, 满足上述条件的通路定义为显著富集, 挑选 q_{value} 值富集程度排名前20的通路统计作图。使用OmicShare Tools软件(<https://www.omicshare.com/tools/home/report/reporticabg.html>)绘制基因表达量热图。

1.4 qRT-PCR分析

使用Trizol试剂提取不同发育时期种仁总RNA, 利用NCBI Primer-BLAST在线软件设计特异性引物(表1)。使用Power SYBR Green Master (Roche, Basel, Switzerland)在Roche Light Cycler 480系统上进行qRT-PCR, 反应如下: 94℃预变性2 min; 94℃ 20 s, 58℃ 20 s, 72℃ 20 s, 40个循环。以*CoEF1 α* 用作油茶内参基因^[16], 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 方法用于评估相对定量变化, 试验进行3次生物学重复。

表1 qRT-PCR引物序列

Table 1 Sequences of qRT-PCR primers

引物名称 Primer name	正向引物序列(5'-3') Forward primer sequence (5'-3')	反向引物序列(5'-3') Reverse primer sequence (5'-3')
<i>CoEF1α</i>	CACGATCACTGGTACCTCACAG	ACCCACCCAATGAAGGCAAG
<i>SAD</i>	TACCTATCTGGGCGTGTGGA	ATGGAACGGTGCCTACTTGT
<i>KASIII</i>	CACCAGAGCGGGTCATTCT	TGATTGCACCTTCCCACCTC
<i>PATE</i>	TGGAGCTGTTAGCACACAG	CCTGATGCTCCAACCCATGT
<i>KAR</i>	GAGCTTCCATGGCTGCTTCT	GCCGGTGATCGGAGAGAAAT
<i>ACC</i>	CGGAGGTTTTGGATCAGCCT	CCTGCCTTAGCAACCTCCAA
<i>SDR</i>	GAAGGTACGGCCAACCAGAA	GGGCCTGCACAAACCTCTAT

1.5 油茶种仁脂肪酸组成分析

试剂配制:5%(体积百分比)浓硫酸/甲醇溶液;5 mg/mL 碳十七脂肪酸甲酯/石油醚(90~120 °C)溶液;0.9%(质量百分比)NaCl/水溶液。

对不同发育时期的种仁进行清洁、干燥和研磨。通过0.5 mm筛过筛后,称重1 g样品粉末转移至提取瓶中,加入5 mg/mL 碳十七脂肪酸甲酯/石油醚溶液100 μ L,再加入5%浓硫酸/甲醇溶液2 mL,甲苯300 μ L。用压盖器将顶空瓶用带聚四氟乙烯垫的铝盖封好,将上述混合物轻微晃动混匀,然后于恒温水浴锅中95 °C水浴1.5 h提取脂肪酸;提取结束后取出冷却至室温,加入0.9% NaCl溶液2 mL,稍微振荡,用1 mL正己烷萃取,离心(5000 r/min,5 min)分层,取上清于上样瓶中进行气相色谱分析。气相色谱仪的工作条件:FID 氢火焰离子化检测器,DB-FastFAME 色谱柱,进样口温度250 °C,分流比20:1,检测器温度260 °C,色谱柱初温80 °C,保持0.5 min,以40 °C/min程序升温至165 °C,保持1 min,以4 °C/min

程序升温至230 °C,并在此温度下维持6 min。油脂含量=(S1/S2) \times N/M,S1为总峰面积,S2为内标峰面积,N为内标用量,M为样本质量。利用SPSS 11.5软件对数据进行相关性分析。

2 结果与分析

2.1 转录组数据分析

对9个文库(3个发育时期 \times 3个生物重复)测序的原始数据进一步精细过滤,共产生416635122个过滤后的数据,过滤后的碱基数共62495268300 bp,GC含量的平均值为46.26%,Q20和Q30平均比例分别为96.81%和92.15%(表2)。不同样本之间皮尔逊相关系数的热图显示,同一发育时期3个重复之间的系数为0.994~0.996,所有样品生物学重复之间相关系数都大于0.8(图1A)。主成分分析将样本分为3组,表明样本之间具有良好的相关性和差异性(图1B)。所有数据显示,测序结果可靠,能够用于后续的分析。

表2 数据产出和质量统计

Table 2 Statistics of transcriptome sequencing and read mapping

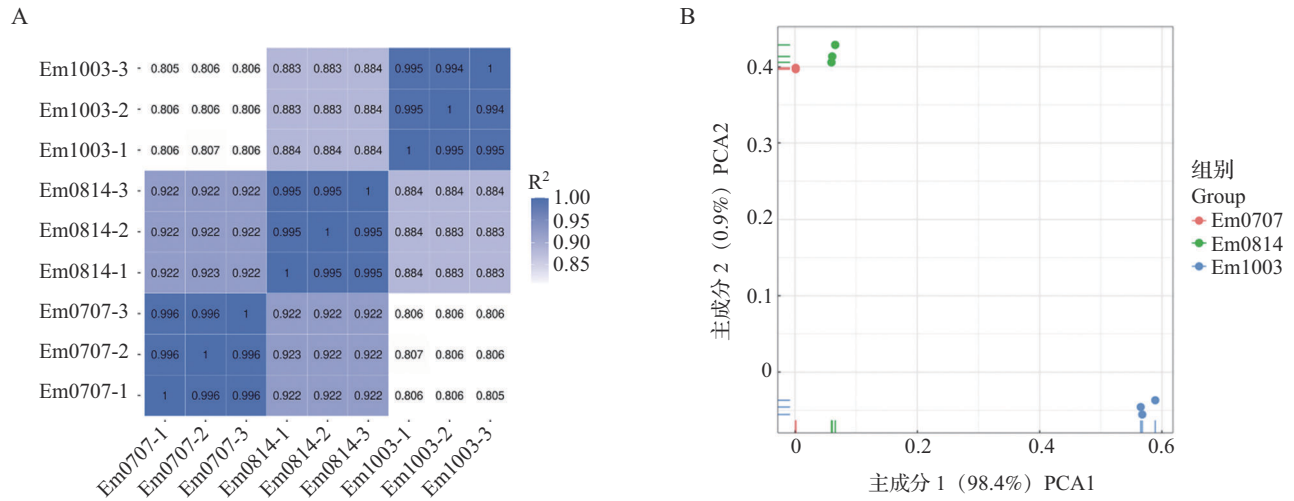
样品 Sample	过滤后数据 Clean reads	过滤后碱基数(bp) Clean bases	GC含量(%) GC content	Q20比例(%) Q20 ratio	Q30比例(%) Q30 ratio
Em0707-1	39335052	5900257800	45.69	96.86	92.17
Em0707-2	50018672	7502800800	45.74	96.74	91.84
Em0707-3	49993570	7499035500	45.71	96.76	92.05
Em0814-1	45610422	6841563300	45.22	96.98	92.50
Em0814-2	43330344	6499551600	45.30	96.96	92.43
Em0814-3	48184132	7227619800	45.31	96.86	92.28
Em1003-1	48376708	7256506200	47.73	96.72	91.99
Em1003-2	45230518	6784577700	47.70	96.94	92.48
Em1003-3	46555704	6983355600	47.92	96.46	91.65
总计 Total	416635122	62495268300	46.26	96.81	92.15

Em0707、Em0814和Em1003分别表示2023年7月7日、8月14日和10月3日油茶种仁样品;1、2和3分别表示3个生物学重复
Em0707, Em0814 and Em1003 represent *Camellia oleifera* kernel samples from July 7th, August 14th, and October 3rd, 2023; 1, 2 and 3 represent three biological replicates, respectively

2.2 差异表达基因分析

利用DESeq软件分析差异表达基因显著性,分析参数为 $|\log_2(\text{Fold Change})| \geq 2$ 且 $q_{\text{value}} < 0.05$ 。3个不同发育时期种仁中,共获得17772个差异表达基因,其中,上调表达的基因有11006个(61.93%),下调表达的基因有6766个(38.07%)。各时期上调表达的差异表达基因数量均高于下调表达的差异表达基因数量。与Em0707vsEm0814和Em0814vsEm

1003相比,Em0707vsEm1003中差异表达基因数量最多(图2A)。韦恩图显示,去除重复后共获得9625个差异表达基因,其中3个比较组共有的差异表达基因有1302个,在Em0707vsEm0814、Em0707vsEm1003和Em0814vsEm1003中每个比较组特有的差异表达基因分别为452个、1652个和676个(图2B)。

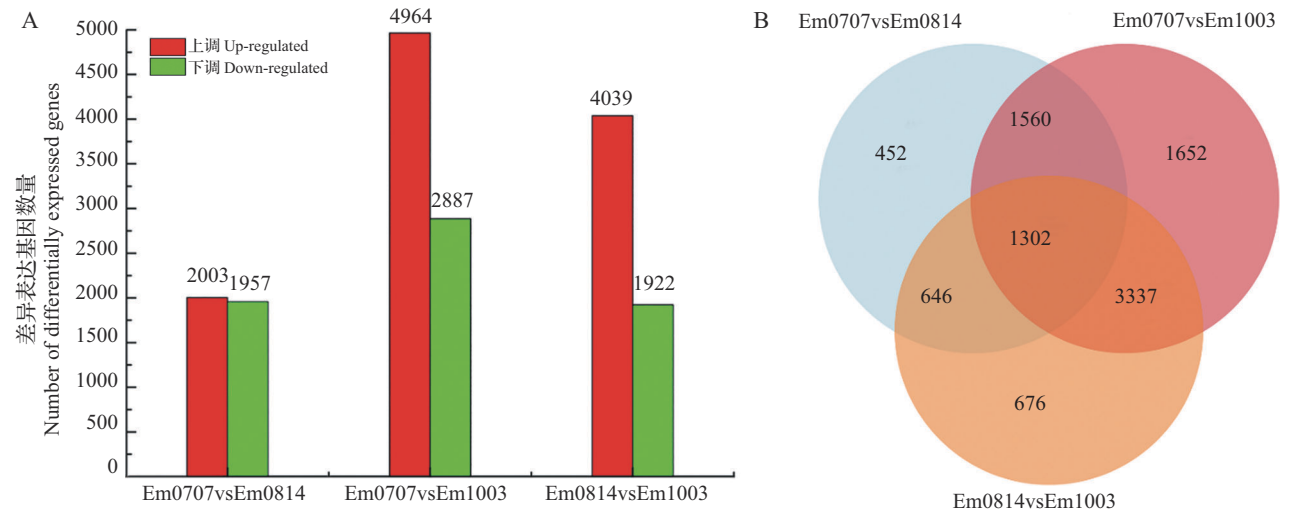


A: 样本之间皮尔逊相关系数热图; B: 样本之间主成分分析

A: Heat map of Pearson correlation coefficient between samples; B: Principal component analysis between samples

图 1 样本之间皮尔逊相关系数热图和主成分分析

Fig. 1 Heat map of Pearson correlation coefficient and principal component analysis between samples



A: 种仁 3 个发育时期上调或下调的差异表达基因数量; B: 在不同种仁发育时期共有的差异表达基因或每个发育阶段特有的差异表达基因, vs 表示后者相对于前者

A: The number of differentially expressed genes that were up-regulated or down-regulated in the three seed kernel development stages;

B: Differentially expressed genes overlapping in different seed kernel development stages or unique to each developmental stage, vs represents the latter relative to the former

图 2 差异表达基因的数量和分布

Fig. 2 The number and distribution of differentially expressed genes

2.3 差异表达基因的 GO 富集分析

以 $q_{value} < 0.05$ 为筛选标准, 对 3 个比较组共有的差异表达基因和每个比较组特有的差异表达基因进行 GO 富集分析。3 个比较组共有的 1302 个差异表达基因富集于 195 个 GO 条目, 选取富集最显著的 20 条 GO 条目进行分析, 结果显示, 生物过程方面主要富集半纤维素代谢过程 (Hemicellulose metabolic process)、木聚糖代谢过程 (Xylan metabolic process)、细胞壁大分子代谢过程 (Cell wall macromolecule

metabolic process)、细胞壁多糖代谢过程 (Cell wall polysaccharide metabolic process) 和次生代谢过程 (Secondary metabolic process) 等代谢过程; 细胞组分方面主要富集于外部封装结构 (External encapsulating structure)、植物型细胞壁 (Plant-type cell wall)、细胞壁 (Cell wall)、单层包围脂质储存体 (Monolayer-surrounded lipid storage body) 和质外体 (Apoplast) 等; 分子功能主要富集在葡萄糖基转移酶 (Glucosyltransferase activity)、转移酶活性 (Transferase

activity)、UDP 葡萄糖基转移酶活性 (UDP-glucosyltransferase activity)、木聚糖 O-乙酰转移酶活性 (Xylan O-acetyltransferase activity) 和茉莉酰基-异亮氨酸-12-羟化酶活性 (Jasmonoyl-isoleucine-12-hydroxylase activity) 等催化活性方面 (图3)。对每个比较组特有的差异表达基因进行 GO 富集分析显示, Em0707vsEm0814 中 452 个特有的差异表达基因富集

于 14 个 GO 条目, 包括 10 个生物过程和 4 个分子功能; Em0707vsEm1003 中 1652 个特有的差异表达基因富集于 1 个分子功能方面的 GO 条目, 为 3-氧代酰基-酰基载体蛋白还原酶 (3-oxoacyl- [acyl-carrier-protein] reductase) 活性; Em0814vsEm1003 中 676 个特有的差异表达基因富集于 17 个 GO 条目, 包括 10 个生物过程和 7 个分子功能 (表3)。

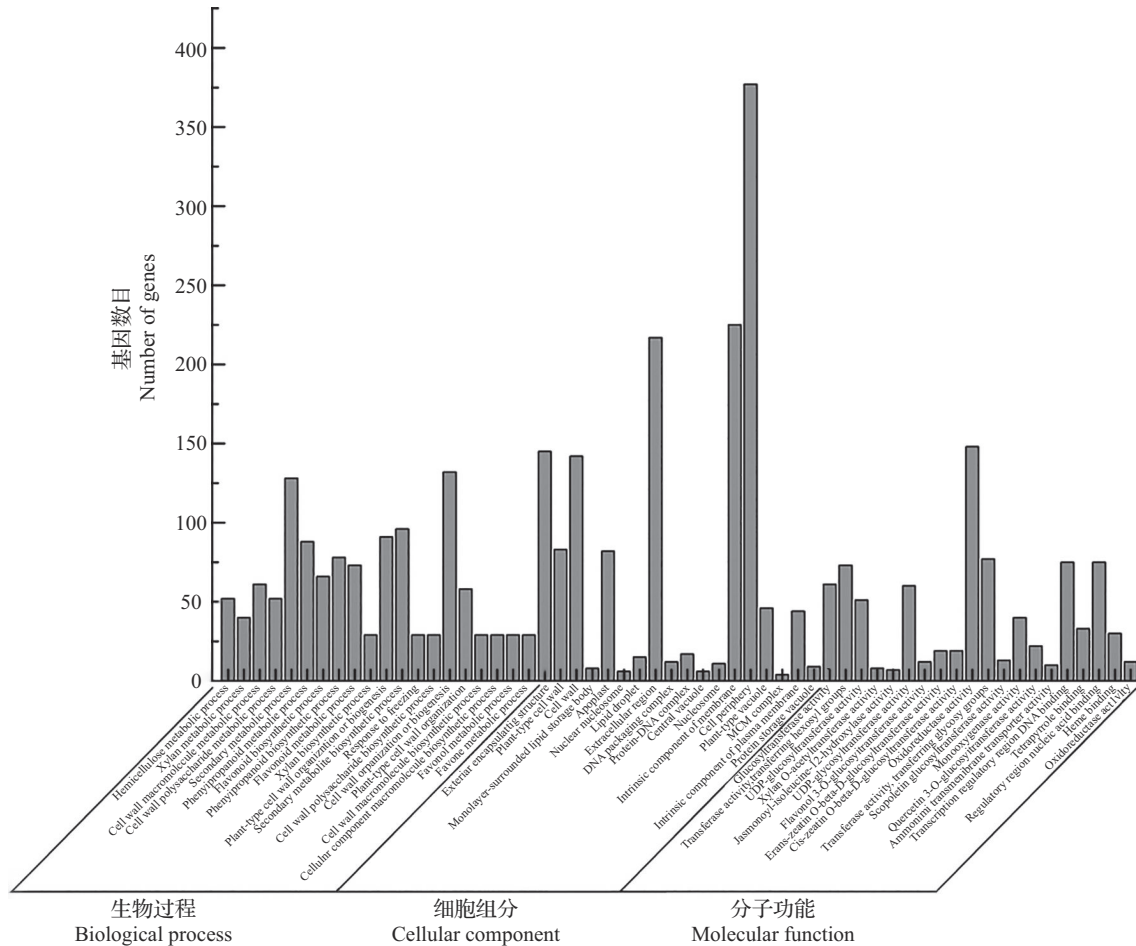


图3 种仁 3 个比较组共有差异表达基因的基因本体分类

Fig. 3 Gene ontology classification of common differentially expressed genes in three comparison groups of seed kernel

表3 每个比较组差异表达基因的 GO 分类

Table 3 GO classification of differentially expressed genes in each comparison groups

样品 Sample	GO 类别 GO category	GO 编号 GO number	通路描述 Terms description	基因数目 Number of genes	q 值 q value
Em0707vsEm0814	生物过程	GO:0050896	刺激反应	209	0.0431
		GO:0055046	刺激微配子发生	9	0.0431
		GO:0090358	色氨酸代谢过程的正调控	4	0.0431
		GO:0022410	昼夜节律/周期循环过程	2	0.0431
		GO:0042745	昼夜节律/周期循环	2	0.0431
		GO:0042749	昼夜节律/周期循环的调节	2	0.0431

表3(续)

样品 Sample	GO类别 GO category	GO编号 GO number	通路描述 Terms description	基因数目 Number of genes	<i>q</i> 值 <i>q value</i>
Em0707vsEm0814	生物过程	GO:0045187	昼夜节律/周期循环的调节	2	0.0431
		GO:0050802	昼夜节律/周期循环	2	0.0431
		GO:0033240	细胞胺代谢过程的正调控	4	0.0431
		GO:0045764	细胞氨基酸代谢过程的正调控	4	0.0431
	分子功能	GO:0016594	甘氨酸结合	3	0.0243
		GO:0042165	神经递质结合	3	0.0243
		GO:0033759	黄酮合酶活性	2	0.0243
Em0707vsEm1003	分子功能	GO:0034722	γ -谷氨酰肽酶活性	3	0.0307
		GO:0004316	3-氧酰基-酰基载体蛋白还原酶	6	0.0079
		Em0814vsEm1003	生物过程	GO:0009725	响应激素
GO:0050896	刺激反应	338		0.0005	
GO:0009719	内源性刺激反应	174		0.0005	
GO:0010033	有机物反应	198		0.0006	
GO:0006952	防御反应	136		0.0038	
GO:0033993	脂质反应	109		0.0065	
GO:1901700	含氧化合物反应	176		0.0074	
GO:0042221	化学物质反应	234		0.01099	
GO:0048825	子叶发育	18		0.0189	
GO:0048366	叶片发育	56		0.0273	
分子功能	GO:0016298	脂肪酶活性		14	0.0437
	GO:0008477	嘌呤核苷酶活性		3	0.0437
	GO:0038023	信号受体活性		29	0.0437
	GO:0008782	腺苷同型半胱氨酸核苷酶活性		2	0.0437
	GO:0008930	甲硫腺苷核苷酶活性		2	0.0437
	GO:0050203	草酰辅酶A连接酶活性		2	0.0437
	GO:0019199	跨膜受体蛋白激酶活性	20	0.0437	

2.4 差异表达基因的KEGG通路富集分析

为了进一步分析差异表达基因功能,选择富集程度排名前20的通路进行KEGG分析作图,以 $q_{value} < 0.05$ 作为KEGG通路显著富集的阈值。结果表明,对3个比较组共有的和每个比较组特有的差异表达基因分析发现,3个比较组共同有的差异表达基因显著富集于5条KEGG通路,主要为类黄酮生物合成、苯丙烷生物合成、二芳基庚烷和姜酚的生物合成、黄酮和黄酮醇的生物合成及谷胱甘肽代谢(图4)。对每个比较组特有的差异表达基因进行KEGG分析发现,根据 $q_{value} < 0.05$ 筛选标准,在Em0707vsEm0814和Em0814vsEm1003比较组中未获得KEGG显著性富

集通路,而在Em0707vsEm1003比较组中,有4条KEGG通路显著富集,主要包含脂肪酸生物合成、脂肪酸代谢、生物素代谢和丙酮酸代谢(图5)。

2.5 脂肪酸代谢通路的差异表达基因分析

脂肪酸生物合成和脂肪酸代谢通路分别有10个和12个差异表达基因,进一步分析发现,其中10个差异表达基因为2个通路中共有,2个差异表达基因为脂肪酸代谢特有。12个差异表达基因中,4个基因编码NADPH依赖性醛还原酶(NADPH-dependent aldehyde reductase, ALR1、ALR2、ALR3、ALR4);其余8个基因分别编码3-氧代酰基-ACP合酶3(KASIII, 3-oxoacyl-ACP synthase3)、短链脱氢

酶(SDR, short-chain dehydrogenase)、烯醇辅酶A水合酶1(ECH, enoyl-CoA hydratase)、^Δ9-硬脂酰-ACP-去饱和酶(SAD, ^Δ9-stearoyl- ACP -desaturase)、棕榈酰基载体蛋白硫酯酶(PATE, palmitoyl-acyl carrier protein thioesterase)、酮酰-ACP还原酶(KAR, ketoacyl-ACP reductase)、3-酮脂酰辅酶A硫解酶2(KAT2, 3-ketoacyl-CoA thiolase 2)和乙酰辅酶A羧化酶羧基转移酶(ACC, acetyl-coenzyme A carboxylase transferase)。对12个差异表达基因进行表达分析表明,随着种仁的发育, KAR、ALR1、SDR和

ALR3四个基因的表达量先上升后下降,其余8个基因表达量逐渐升高(图6)。

2.6 转录组数据的qRT-PCR验证

为了进一步验证转录结果的准确性,使用qRT-PCR分析转录组结果中鉴定的差异表达基因。选取脂肪酸代谢中表达量逐渐升高的4个差异表达基因和表达量先上升后下降的2个差异表达基因进行qRT-PCR分析,结果表明,qRT-PCR和转录组中6个差异表达基因表达量的变化趋势基本一致(图7),表明转录组测序数据和结果可靠。

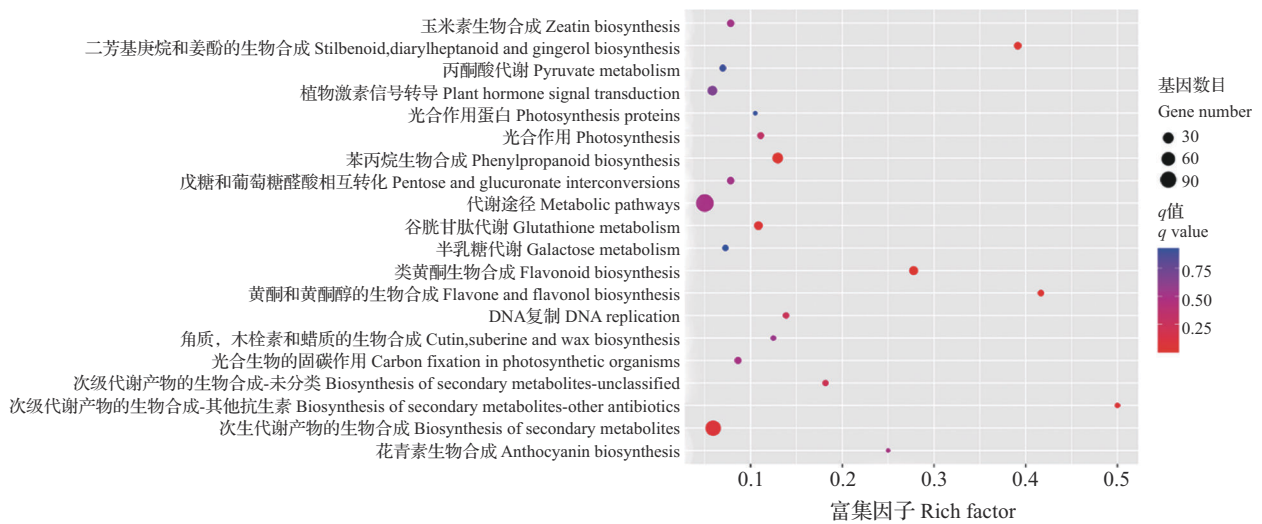


图4 三个时期共有差异表达基因的KEGG通路分析

Fig. 4 KEGG pathway analysis of common differentially expressed genes in three stages

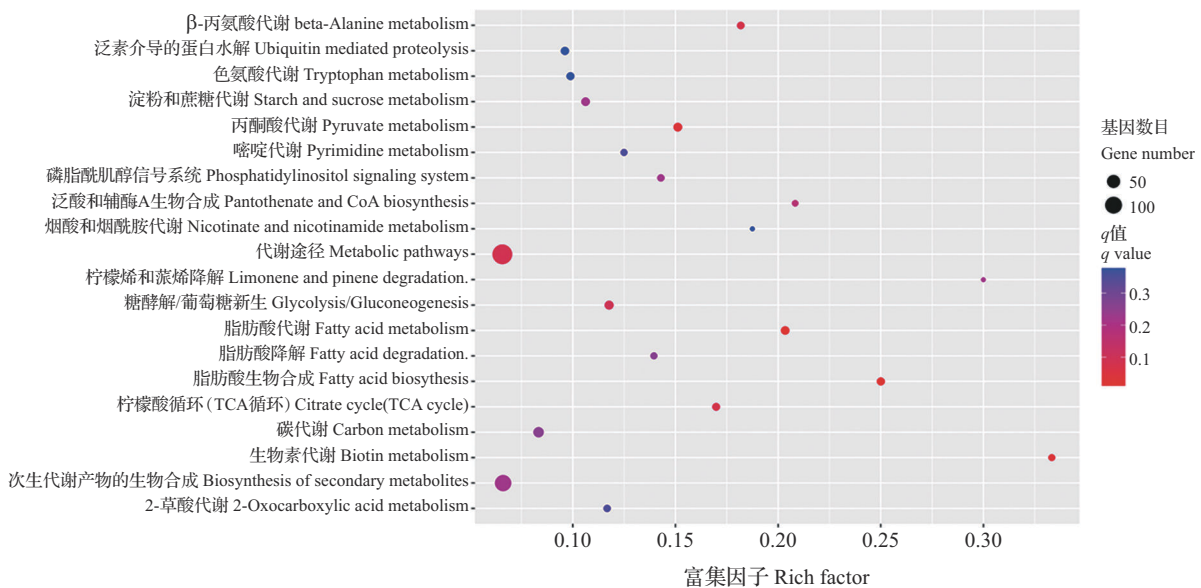
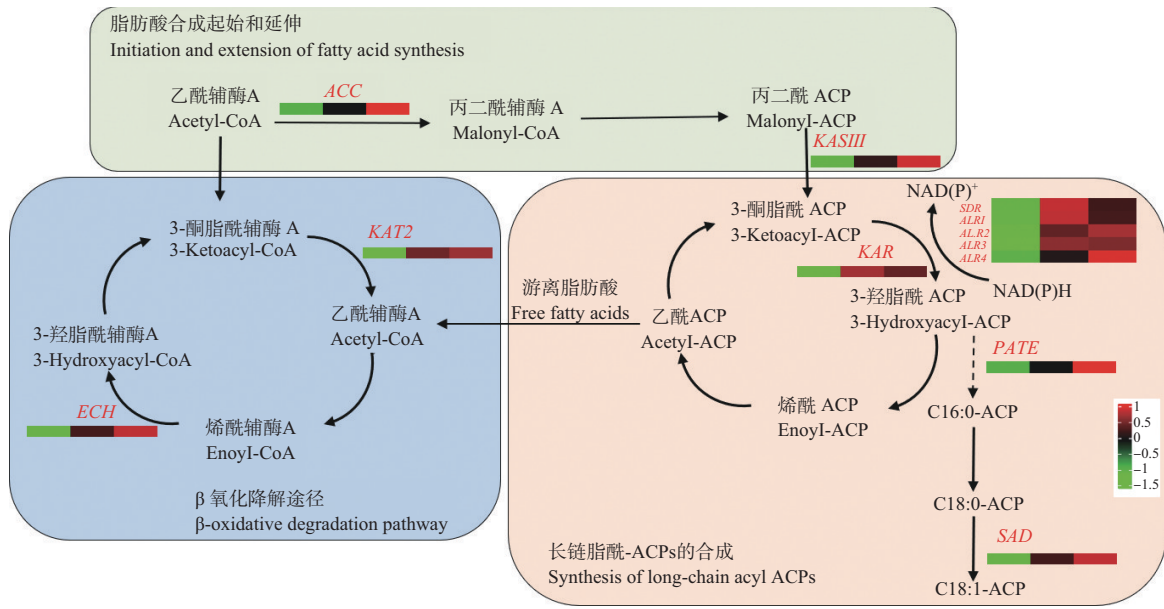


图5 Em0707vsEm1003中差异表达基因的KEGG通路分析

Fig. 5 KEGG pathway analysis of differentially expressed genes in Em0707vsEm1003

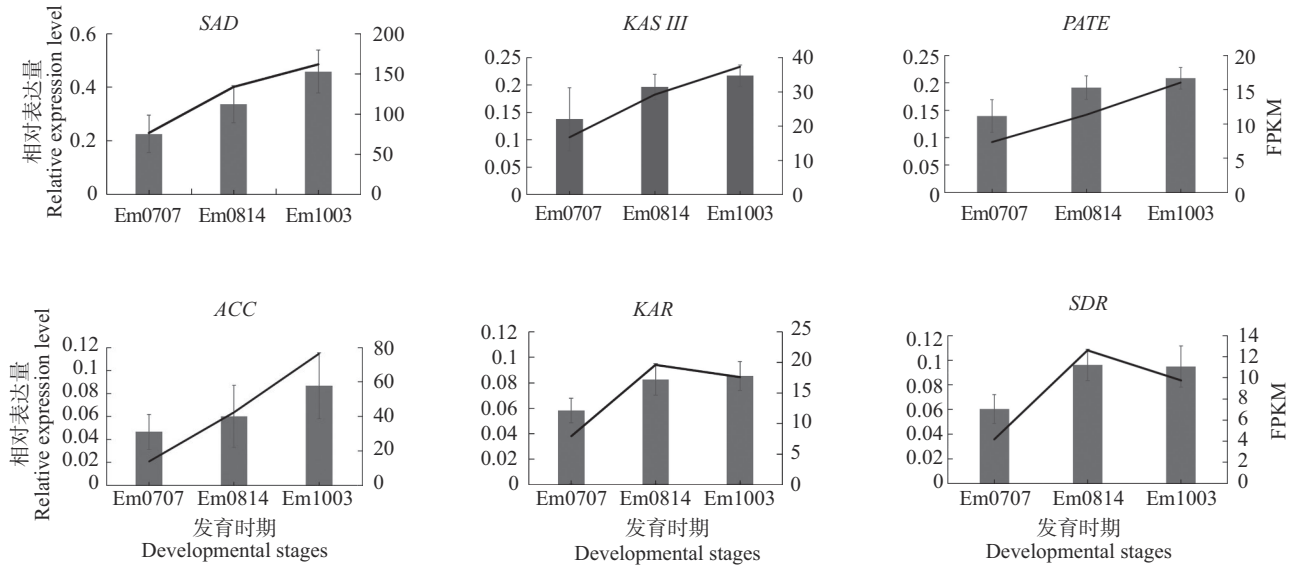


热图从左至右依次为 Em0707、Em0814 和 Em1003 时期

The heatmap from left to right shows the stages of Em0707, Em0814 and Em1003, respectively

图 6 三个不同时期种仁中脂肪酸代谢相关差异表达基因表达网络

Fig. 6 Expression network of differentially expressed genes related to fatty acid metabolism in three different stages of seed kernels



柱状图表示 qRT-PCR 中基因相对表达量，折线图表示转录组中 FPKM 值

The histogram represents the relative expression levels of genes in qRT-PCR, line chart represents FPKM values in transcriptome

图 7 脂肪酸代谢 6 个差异表达基因的相对表达分析

Fig. 7 Relative expression analysis of six differentially expressed genes in fatty acid metabolism

2.7 油茶种仁含油量和脂肪酸组分变化

测定种仁含油量发现,3 个时期含油量分别为 31.29 mg/g、188.06 mg/g 和 307.69 mg/g,表明随着种仁的发育,含油量逐渐增加(表 4)。进一步对 3 个发育时期的油茶种仁样本进行脂肪酸检测,共检出 7 种脂肪酸。结果显示,Em1003 种仁中主要的脂肪酸组分是单不饱和脂肪酸油酸(C18:1n-9c, 81.67%)、

饱和脂肪酸棕榈酸(C16:0, 9.23%)、多不饱和脂肪酸亚油酸(C18:2n-6c, 6.44%)和硬脂酸(C18:0, 1.88%),其他成分的比例均小于 1%。随着种仁的发育,硬脂酸含量由 1.09% 增加到 1.88%,油酸由 59.94% 积累到 81.67%,其余脂肪酸相对含量与种仁发育时期呈相反趋势(表 4)。

表 4 三个发育时期油茶种仁含油量和各脂肪酸组分比例

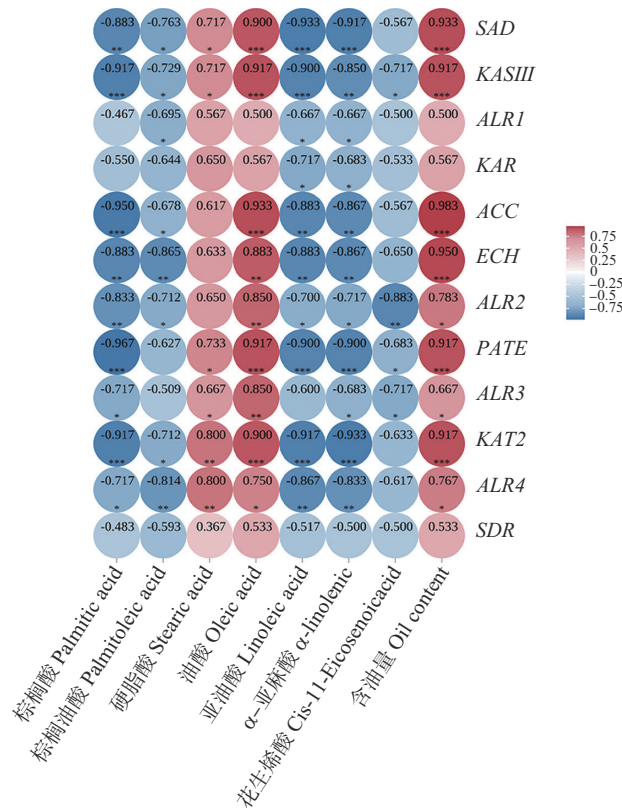
Table 4 Oil content and proportion of various fatty acid components in *Camellia oleifera* kernels during three developmental stages

组分 Components	Em0707	Em0814	Em1003
含油量(mg/g)Oil content	31.29 ± 6.04	188.06 ± 14.36	307.69 ± 9.24
棕榈酸(C16:0)(%)Palmitic acid (C16:0)	19.16 ± 1.38	13.18 ± 1.08	9.23 ± 0.12
棕榈油酸(C16:1)(%)Palmitoleic acid (C16:1)	0.32 ± 0.07	0.14 ± 0.04	0.12 ± 0.03
硬脂酸(C18:0)(%)Stearic acid (C18:0)	1.09 ± 0.13	1.47 ± 0.32	1.88 ± 0.08
油酸(C18:1n-9c)(%)Oleic acid (C18:1n-9c)	59.94 ± 1.39	71.72 ± 1.56	81.67 ± 1.39
亚油酸(C18:2n-6c)(%)Linoleic acid (C18:2n-6c)	16.24 ± 1.53	12.45 ± 1.58	6.44 ± 0.28
α-亚麻酸(C18:3n-3)(%)α-linolenic acid (C18:3n-3)	2.33 ± 0.20	0.71 ± 0.12	0.34 ± 0.11
花生烯酸(C20:1)(%)Cis-11-Eicosenoicacid (C20:1)	0.92 ± 0.19	0.33 ± 0.07	0.32 ± 0.07

2.8 脂肪酸代谢相关差异表达基因表达量、含油量和各脂肪酸组分比例相关性分析

对脂肪酸代谢相关差异表达基因表达量、含油量和各脂肪酸组分比例进行相关性分析表明,所有基因表达量与种仁的含油量、硬脂酸和油酸均呈正相关,与其余脂肪酸组分均呈负相关。其中ACC、

ECH、*SAD*、*KASIII*、*PATE*和*KAT2*基因与含油量呈极显著正相关($P < 0.001$),*ACC*、*KASIII*、*PATE*、*SAD*和*KAT2*基因与油酸均呈极显著正相关($P < 0.001$);*PATE*、*ACC*、*KASIII*和*KAT2*基因与棕榈酸呈极显著负相关($P < 0.001$)(图8)。



无标记表示相关不显著,*表示在 $P < 0.05$ 水平上相关显著,**表示在 $P < 0.01$ 水平上相关显著,***表示在 $P < 0.001$ 水平上相关显著
 Unmarked represents no significant correlation, * represents significant correlation at the $P < 0.05$ level, ** represents significant correlation at the $P < 0.01$ level, *** represents significant correlation at the $P < 0.001$ level

图 8 油茶种仁脂肪酸代谢差异表达基因表达量、含油量和脂肪酸组分相关性

Fig. 8 Correlation between differentially expressed gene expression levels, oil content, and fatty acid composition in *Camellia oleifera* seed kernel

3 讨论

油茶果实发育主要经历3个增长高峰期,第1个高峰期是6月中下旬至7月中下旬果实生长期,第2个高峰期是8月上旬至9月上旬营养物质和脂肪酸积累时期,第3个高峰期是9月中下旬至10月下旬果实成熟期^[17];7月至10月份为油茶果实成长、油脂形成和转化的关键时期。通过对7月7日、8月14日和10月3日3个关键发育时期的油茶种仁进行转录组测序和分析,发现3个比较组共有差异表达基因富集在类黄酮生物合成、苯丙烷生物合成、二芳基庚烷和姜酚生物合成、黄酮和黄酮醇生物合成以及谷胱甘肽代谢5条通路,这些差异表达基因富集通路参与重要的次级代谢和氨基酸代谢,是脂肪酸合成和代谢通路的前提物质基础。黄酮类化合物是一组多酚类化合物,作为次生代谢产物在水果、蔬菜以及其他粮食作物等植物的重要性状形成中扮演了重要角色^[18-20]。

油茶基因组数据的公布,对油茶重要性状基因的发掘及遗传改良具有指导意义^[21-24]。脂肪酸从头合成主要发生在质体中,ACC作为脂肪酸合成的起始酶促进脂肪酸和油脂的合成^[25]。本研究发现,随着油茶种仁的发育,ACC基因的表达量和含油量都逐渐上升,且ACC基因表达量与种仁含油量呈显著正相关,表明ACC活性与种子的含油量呈极显著正相关,不同植物中也具有相似的研究结果^[26-27]。豌豆ACC基因在拟南芥和亚麻芥中异源表达,T1代转基因拟南芥种子含油量比野生型高14%,T1代转基因亚麻芥种子含油量平均增加了8%^[28]。由此推测,ACC基因上调表达能够促进脂肪酸的合成,最终提高油茶种仁的含油量,通过对该基因过表达可能会增加油茶种子含油量,从而获得高含油量的油茶品种。另外,ACC催化乙酰辅酶A生成丙二酸单酰-ACP,然后在KAS和KAR作用下生成羟丁醇-ACP和NADP⁺,KASIII负责脂肪酸合成的启动,其活性决定脂肪酸合成碳链的长度。麻风树KASIII基因表达影响C18/C16的比值^[29],三角褐指藻中过表达KASIII基因,显著增强了脂质(1.49倍)和脂肪酸(1.31倍)的生物合成^[30]。本研究发现,随着种子的发育KASIII基因表达量不断增加,并且表达量与棕榈酸呈极显著负相关,与油酸呈显著正相关,推测油茶中KASIII基因表达量升高有利于不饱和脂肪酸合成。PATE是参与质体脂肪酸生物合成的关键酶之一,决定油料中棕榈酸含量变化,对油棕中

PATE基因构建过表达和沉默载体并转化拟南芥发现,与野生型相比,过表达转基因株系中棕榈酸的含量从8.91%增加至11.78%,沉默株系中棕榈酸含量从8.91%略微降低至8.13%^[31]。本研究发现随着油茶种仁的发育,PATE基因的表达量逐渐升高,相关性分析发现,该基因表达量与棕榈酸呈极显著负相关,与前人的研究结果相反,推测油茶中PATE基因可能与其他基因存在协同作用或具有其他功能,关于油茶中PATE基因的功能还需进一步的研究。KAT作为脂肪酸 β -氧化中的关键酶基因,以3-酮脂酰-CoA为底物,催化乙酰乙酰CoA及脂肪酸碳链的分解,形成乙酰-CoA。对该基因的研究主要集中在时空表达^[32]、非生物胁迫^[33]和激素响应^[34]等方面,关于KAT基因在脂肪酸组分变化中的研究未见报道。本研究发现,随着油茶种子的发育,KAT2基因表达量逐渐升高,且相关性分析表明,KAT2基因与含油量和油酸呈极显著正相关,与棕榈酸呈极显著负相关,油茶KAT2基因的功能研究是后续的主要工作。此外,SAD是脂肪酸中不饱和度的关键去饱和酶,该酶可以将硬脂酸催化形成油酸,研究者发现,异源表达羽扇豆SAD基因转化烟草,烟草种子中硬脂酸和油酸含量积累,特别是油酸含量迅速提高了11%^[35]。通过抑制棉花中的SAD基因,导致种子中硬脂酸含量增加^[36];向日葵和大豆sad基因突变体发现,SAD蛋白失活导致硬脂酸含量增加^[37-38];此外,六倍体油茶转录组结合代谢组分析发现,SAD基因参与油茶不饱和脂肪酸的生物合成,特别是硬脂酸催化形成油酸的过程^[24],与本研究中SAD基因表达量与含油量和油酸呈极显著正相关相符。另一方面,本研究发现的5个关键基因与油茶种仁含油率高度相关;也有研究发现多个物种种仁含油率还与其他代谢途径有关,甘油三酯(TAG, triacylglycerol)合成途径中的关键基因DGAT1、DGAT2、PDAT1、FAD2和FAD3参与了胡麻种子和油茶种仁含油量的积累^[24,39],油茶中的AP2和C2H2及油菜中的NAC13和SCL31转录因子是含油量的正向调控因子^[24,40]。

本研究对油茶3个关键发育时期种仁进行转录组分析,在KEGG通路中富集到12个差异表达基因,并对这些基因的表达量与种仁含油量及各脂肪酸组分比例进行相关性分析,发现ACC、KASIII、PATE、KAT2和SAD基因的表达量与种仁含油量和油酸呈极显著正相关,表明这5个关键基因在油茶种仁含油量积累和脂肪酸代谢中具有重要作用,上

述结果可为油茶脂肪酸代谢调控机制和基因功能研究提供参考。

参考文献

- [1] Yang C Y, Liu X M, Chen Z Y, Lin Y S, Wang S Y. Comparison of oil content and fatty acid profile of ten new *Camellia oleifera* cultivars. *Journal of Lipids*, 2016, 2016 (1):3982486
- [2] Lee W T, Tung Y T, Wu C C, Tu P H, Yen G C. *Camellia* oil (*Camellia oleifera* Abel.) modifies the composition of gut microbiota and alleviates acetic acid-induced colitis in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66 (28): 7384-7392
- [3] Lee C P, Yen G C. Antioxidant activity and bioactive compounds of tea seed (*Camellia oleifera* Abel.) oil. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2006, 54(3): 779-784
- [4] Ma L H, Cheng X Q, Wang C, Zhang X Y, Xue F, Li Y J, Zhu Q H, Sun J, Liu F. Explore the gene network regulating the composition of fatty acids in cottonseed. *BMC Plant Biology*, 2021, 21(1): 177
- [5] Zeng Y L, Tan X F, Zhang L, Jiang N, Cao H P. Identification and expression of fructose-1, 6-bisphosphate aldolase genes and their relations to oil content in developing seeds of tea oil tree (*Camellia oleifera*). *PLoS ONE*, 2014, 9 (9): e107422
- [6] 林萍, 周长富, 姚小华, 曹永庆. 普通油茶两个 Δ -12 脂肪酸脱氢酶基因序列特征及表达模式研究. *林业科学研究*, 2016, 29(5): 743-751
- Lin P, Zhou C F, Yao X H, Cao Y Q. Sequence and expression characterization of two genes encoding Δ -12 fatty acid desaturases from *Camellia oleifera*. *Forest Research*, 2016, 29(5): 743-751
- [7] 吕晓杰, 潘德灼, 李健, 陈世品, 陈伟. 油茶种仁成熟过程油脂合成代谢的转录组分析. *森林与环境学报*, 2018, 38(2): 156-163
- Lyu X J, Pan D Z, Li J, Chen S P, Chen W. Transcriptomic analysis of lipid synthesis metabolism in *Camellia oleifera* seed kernel during its maturation period. *Journal of Forest and Environment*, 2018, 38(2): 156-163
- [8] Lin P, Wang K L, Zhou C F, Xie Y H, Yao X H, Yin H F. Seed transcriptomics analysis in *Camellia oleifera* uncovers genes associated with oil content and fatty acid composition. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(1): 118
- [9] 张帆航. 油茶4个主栽品种果实和种子发育比较研究. 长沙: 中南林业科技大学, 2020: 48-52
- Zhang F H. Comparative study on fruit and seed development of four *Camellia oleifolia* cultivars. Changsha: Central South University of Forestry and Technology, 2020: 48-52
- [10] Wu B, Ruan C J, Han P, Ruan D, Xiong C W, Ding J, Liu S H. Comparative transcriptomic analysis of high- and low-oil *Camellia oleifera* reveals a coordinated mechanism for the regulation of upstream and downstream multigenes for high oleic acid accumulation. *3 Biotech*, 2019, 9(7): 257
- [11] Wang Z W, Huang B, Ye J S, He Y C, Tang S J, Wang H L, Wen Q. Comparative transcriptomic analysis reveals genes related to the rapid accumulation of oleic acid in *Camellia chekiangoleosa*, an oil tea plant with early maturity and large fruit. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2022, 171: 95-104
- [12] 沈军, 邱智敏, 余玉云, 李志真, 陈伟, 陈世品. 油茶籽成熟过程中油脂代谢的蛋白质组学分析. *植物生理学报*, 2023, 59(7): 1398-1406
- Shen J, Qiu Z M, Yu Y Y, Li Z Z, Chen W, Chen S P. Proteomic analysis of lipid metabolism in *Camellia oleifera* seeds during maturation. *Plant Physiology Journal*, 2023, 59 (7): 1398-1406
- [13] Anders S, Pyl P T, Huber W. HTSeq-a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 2015, 31(2): 166-169
- [14] Trapnell C, Pachter L, Salzberg S L. TopHat: Discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics*, 2009, 25(9): 1105-1111
- [15] Trapnell C, Williams B A, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, Baren M J, Salzberg S L, Wold B J, Pachter L. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnology*, 2010, 28(5): 511-515
- [16] 宋志波, 刘敏, 贾宝光, 田雷, 曾艳玲, 周俊琴, 谭晓风, 张琳. 油茶总RNA的提取与内参基因的初选. *经济林研究*, 2014, 32(2): 93-98
- Song Z B, Liu M, Jia B G, Tian L, Zeng Y L, Zhou J Q, Tan X F, Zhang L. RNA extraction and primary screening of reference genes in *Camellia oleifera*. *Nonwood Forest Research*, 2014, 32(2): 93-98
- [17] 陈永忠, 肖志红, 彭邵锋, 杨小胡, 李党训, 王湘南, 段玮. 油茶果实生长特性和油脂含量变化的研究. *林业科学研究*, 2006, 19(1): 9-14
- Chen Y Z, Xiao Z H, Peng S F, Yang X H, Li D X, Wang X N, Duan W. Study of fruit growing specialties and its oil content in Oil-Tea *Camellia*. *Forest Research*, 2006, 19(1): 9-14
- [18] Wang S Y, Chen H, Camp M J, Ehlenfeldt M K. Flavonoid constituents and their contribution to antioxidant activity in cultivars and hybrids of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei* Reade). *Food Chemistry*, 2012, 132(2): 855-864
- [19] Miles T D, Vandervoort C, Nair M G, Schilder A C. Characterization and biological activity of flavonoids from ripe fruit of an anthracnose-resistant blueberry cultivar. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2013, 83: 8-16
- [20] Shen N, Wang T, Gan Q, Liu S, Wang L, Jin B. Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 2022(30): 383
- [21] Lin P, Wang K L, Wang Y P, Hu Z K, Yan C, Huang H, Ma X J, Cao Y Q, Long W, Liu W X, Li X L, Fan Z Q, Li J Y, Ye N, Ren H D, Yao X H, Yin H F. The genome of oil-*Camellia* and population genomics analysis provide insights

- into seed oil domestication. *Genome Biology*, 2022, 23(1): 14
- [22] Gong W F, Xiao S X, Wang L K, Liao Z Y, Chang Y H, Mo W J, Hu G X, Li W Y, Zhao G, Zhu H G, Hu X M, Ji K, Xiang X F, Song Q L, Yuan D Y, Jin S X, Zhang L. Chromosome-level genome of *Camellia lanceoleosa* provides a valuable resource for understanding genome evolution and self-incompatibility. *Plant Journal*, 2022, 110(3): 881-898
- [23] Shen T F, Huang B, Xu M, Zhou P Y, Ni Z X, Gong C, Wen Q, Cao F L, Xu L A. The reference genome of *camellia chekiangoleosa* provides insights into *camellia* evolution and tea oil biosynthesis. *Horticulture Research*, 2022, 9: uhab083
- [24] Zhu H G, Wang F Q, Xu Z P, Wang G Y, Hu L S, Cheng J Y, Ge X H, Liu J X, Chen W, Li Q, Xue F, Liu F, Li W Y, Wu L, Cheng X Q, Tang X X, Yang C C, Lindsey K, Zhang X L, Ding F, Hu H Y, Hu X M, Jin S X. The complex hexaploid oil-*Camellia* genome traces back its phylogenomic history and multi-omics analysis of *Camellia* oil biosynthesis. *Plant Biotechnology Journal*, 2024, 22(10): 2890-2906
- [25] 李洁琼, 郑世学, 喻子牛, 张吉斌. 乙酰辅酶A羧化酶: 脂肪酸代谢的关键酶及其基因克隆研究进展. *应用与环境生物学报*, 2011, 17(5): 753-758
- Li J Q, Zheng S X, Yu Z N, Zhang J B. Acetyl-coenzyme A Carboxylase: A key metabolic enzyme of fatty acid and progress of its gene clone. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2011, 17(5): 753-758
- [26] Pereira A, Tcacenco F A, Klabunde G H F, de Andrade A. Detecting acetyl-coenzyme a carboxylase resistance gene in rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular Biology Reports*, 2019, 46(6): 6271-6276
- [27] Yannicari M, Gigón R. Cross-resistance to acetyl-CoA carboxylase-inhibiting herbicides conferred by a target-site mutation in perennial ryegrass (*Lolium perenne*) from Argentina. *Breast Cancer*, 2020, 68(2): 116-124
- [28] Wang M, Garneau M G, Poudel A N, Lamm D, Koo A J, Bates P D, Thelen J J. Overexpression of pea α -carboxyltransferase in *Arabidopsis* and camelina increases fatty acid synthesis leading to improved seed oil content. *Plant Journal*, 2022, 110(4): 1035-1046
- [29] Li J, Li M R, Wu P Z, Tian C E, Jiang H W, Wu G J. Molecular cloning and expression analysis of a gene encoding a putative beta-ketoacyl-acyl carrier protein (ACP) synthase III (KAS III) from *Jatropha curcas*. *Tree Physiology*, 2008, 28(6): 921-927
- [30] Ye G B, Qin Z H, Bin X Y, Mou J H, Lin C S K, Li H Y, Wang X. 3-Oxoacyl acyl carrier protein reductase overexpression reveals its unprecedented roles in biofuel production and high-temperature tolerance in diatom. *Fuel*, 2022, 325: 124844
- [31] Ghulam-kadir A P, Othman A, Ramin N, Bohari B. Functional analysis of oil palm palmitoyl-acyl-ACP thioesterase (*FatB*) gene via down-regulation in a model plant: *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Oil Palm Research*, 2010, 22(2): 803-813
- [32] 周延清, 张永华, 张喻, 陈艳梅, 白妍妍, 魏海方, 段红英, 周春娥. 怀地黄 3-酮酰 CoA-硫解酶基因的克隆、序列特征和时空表达分析. *中草药*, 2013, 44(1): 76-84
- Zhou Y Q, Zhang Y H, Zhang Y, Chen Y M, Bai Y Y, Wei H F, Duan H Y, Zhou C E. Gene cloning, features of sequence, and analysis on temporal and spatial expression of *Rehmannia glutinosa* f. *hueichingensis* 3-ketoacyl CoA-thiolase. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2013, 44(1): 76-84
- [33] Sreeja S, Shylaja M R, Nazeem P A, Mathew D. Peroxisomal *KAT2* (3-ketoacyl-CoA thiolase 2) gene has a key role in gingerol biosynthesis in ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 2023, 9: 1-16
- [34] Jiang T, Zhang X F, Wang X F, Zhang D P. *Arabidopsis* 3-ketoacyl-CoA thiolase-2 (*KAT2*), an enzyme of fatty acid β -oxidation, is involved in ABA signal transduction. *Plant and Cell Physiology*, 2011, 52(3): 528-538
- [35] Zaborowska Z, Starzycki M, Femiak I, Swiderski M, Legocki A B. Yellow lupine gene encoding stearoyl-ACP desaturase-organization, expression and potential application. *Acta Biochimica Polonica*, 2002, 49(1): 29-42
- [36] Liu Q, Singh S, Green A. High-oleic and high-stearic cottonseed oils: Nutritionally improved cooking oils developed using gene silencing. *Journal of the American College of Nutrition*, 2002, 21(3): 205S-211S
- [37] Salas J J, Youssar L, Martínez-Force E, Garcés R. The biochemical characterization of a high-stearic acid sunflower mutant reveals the coordinated regulation of stearoyl-acyl carrier protein desaturases. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2008, 46(2): 109-116
- [38] Ruddle P H, Whetten R, Cardinal A, Upchurch R G, Miranda L. Effect of a novel mutation in a⁹-stearoyl-ACP-desaturase on soybean seed oil composition. *Theoretical and Applied Genetics*, 2013, 126(1): 241-249
- [39] 李闻娟, 齐燕妮, 王利民, 党照, 赵利, 赵玮, 谢亚萍, 王斌, 张建平, 李淑洁. 不同胡麻品种 TAG 合成途径关键基因表达与含油量、脂肪酸组分的相关性分析. *草业学报*, 2019, 28(1): 138-149
- Li W J, Qi Y N, Wang L M, Dang Z, Zhao L, Zhao W, Xie Y P, Wang B, Zhang J P, Li S J. Correlation between oil content or fatty acid composition and expression levels of genes involved in TAG biosynthesis in flax. *Acta Prataculturae Sinica*, 2019, 28(1): 138-149
- [40] Tan Z D, Peng Y, Xiong Y, Xiong F, Zhang Y T, Guo N, Tu Z, Zong Z X, Wu X K, Ye J, Xia C J, Zhu T, Liu Y M, Lou H X, Liu D X, Lu S P, Yao X, Liu K D, Snowdon R J, Golicz A A, Xie W B, Guo L, Zhao H. Comprehensive transcriptional variability analysis reveals gene networks regulating seed oil content of *Brassica napus*. *Genome Biology*, 2022, 23(1): 233