



植物遗传资源学报

Journal of Plant Genetic Resources

ISSN 1672-1810, CN 11-4996/S

## 《植物遗传资源学报》网络首发论文

题目：油莎豆油体蛋白基因 Oleosin 的全基因组鉴定及功能分析  
作者：陈晨，王会伟，李春鑫，王树峰，程珊，朱雅婧，宋万猷，张向歌  
DOI：10.13430/j.cnki.jpgr.20240919002  
收稿日期：2024-09-19  
网络首发日期：2024-12-17  
引用格式：陈晨，王会伟，李春鑫，王树峰，程珊，朱雅婧，宋万猷，张向歌. 油莎豆油体蛋白基因 Oleosin 的全基因组鉴定及功能分析[J/OL]. 植物遗传资源学报. <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20240919002>



**网络首发：**在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

**出版确认：**纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

# 油莎豆油体蛋白基因*Oleosin*的全基因组鉴定及功能分析

陈晨, 王会伟, 李春鑫, 王树峰, 程珊, 朱雅婧, 宋万献, 张向歌

(河南省农业科学院经济作物研究所, 郑州 450002)

**摘要:** 油体蛋白 (Oleosin) 是油体表面含量最丰富的蛋白, 对植物油体形成和油脂储存起着至关重要的作用。油莎豆 (*Cyperus esculentus* L.) 是一种独特的块茎类油料作物, 探究油莎豆中 *Oleosin* 基因家族特征及筛选响应油脂储存的关键 *Oleosin* 基因对于解析其块茎储存油脂的调控机理具有重要意义。本研究利用生物信息学方法对油莎豆和其他多个物种中 *Oleosin* 基因家族成员进行了系统进化及共线性分析, 并进一步开展了 *CeOLEs* 的组织表达分析、不同组织的油脂含量检测以及拟南芥过表达 *CeOLEs* 功能验证。生物信息学分析显示, 油莎豆全基因组共鉴定到 6 个的 *Oleosin* 基因家族成员 (*CeOLE1-6*), 数目相对较少, 分布在 3 个进化谱系 (U、SL 和 SH 亚家族), 同玉米、水稻的 *Oleosin* 基因家族成员存在较高的进化保守性和共线性。qPCR 分析显示, 6 个 *CeOLEs* 在油莎豆块茎中表达水平较高, 而在根、叶、分蘖节、匍匐茎等组织中表达水平极低。相应地, 油脂含量检测发现, 油莎豆块茎中油脂含量可达 24.68%, 而根、叶、分蘖节和匍匐茎中油脂含量均小于 1.00%。可以看出, 油莎豆油脂含量可能与 *CeOLEs* 的表达水平密切正相关。另外, 通过不同发育时期块茎的 *CeOLEs* 表达水平和油脂含量分析, 发现 *CeOLE1*、*CeOLE2*、*CeOLE3* 和 *CeOLE5* 的表达水平较高, 并且它们的表达模式与块茎中油脂含量变化速率一致 (先升后降), 说明这 4 个 *CeOLEs* 可能是影响油莎豆块茎中油脂含量的关键基因。拟南芥中过表达 *CeOLE1*、*CeOLE2*、*CeOLE3* 和 *CeOLE5* 均可显著提高拟南芥种子的油脂含量, 验证了这 4 个 *CeOLEs* 在油脂储存中的功能。综上所述, 本研究结果明晰了油莎豆中 *Oleosin* 基因家族特征, 筛选和功能验证了响应油脂储存的关键 *Oleosin* 基因, 为进一步的油莎豆油脂储存机制解析及遗传改良奠定基础。

**关键词:** 油莎豆; 油体蛋白; 基因家族; 组织表达分析; 功能验证

## Genome-wide Identification and Functional Analysis of *Oleosin* Genes in *Cyperus esculentus* L.

CHEN Chen, WANG Huiwei, LI Chunxin, WANG Shufeng, CHENG Shan, ZHU Yajing, SONG Wanxian, ZHANG Xiangge

(Industrial Crop Research Institute, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002)

收稿日期: 2024-09-19

**第一作者** 研究方向为油莎豆遗传育种, E-mail: C18337103690@163.com

通信作者: 张向歌, 研究方向为油莎豆遗传育种, E-mail: maizezgx@163.com

**基因项目:** 河南省重大科技专项(211100110100); 河南省重点研发与推广专项(科技攻关)项目(232102110188 & 242102110305); 河南省中央引导地方科技发展资金(Z20231811175)资助

Foundation projects: Major Science and Technology Project of Henan Province (211100110100); Key Research and Development and Promotion Special Project (Science and Technology Research) of Henan Province (232102110188 & 242102110305); The Central Government of Henan Province Guides Local Science and Technology Development Funds (Z20231811175)

**Abstract:** Oleosin is the most abundant protein on the surface of oil body, which plays an important role in the formation of plant oil body and oil storage. *Cyperus esculentus* is a unique tuber oil crop. Exploring the characteristics of the *oleosin* gene family in *Cyperus esculentus* and screening the key *oleosin* genes responding to oil storage are of great significance for analyzing the regulation mechanism of oil storage. In this study, the phylogenetic and collinear analysis of *oleosin* gene family members in *Cyperus esculentus* and several other species were performed using bioinformatics methods, and further tissue expression analysis of *CeOLEs*, oil content detection in different tissues, and functional verification of overexpressing *CeOLEs* in *Arabidopsis* were carried out. Bioinformatics analysis showed that six *oleosin* gene family members (*CeOLE1* - 6) were identified in the whole genome of *Cyperus esculentus*, the number of which was relatively small; however, they distributed in three evolutionary lineages (U, SL and SH subfamilies), and have high evolutionary conservation and collinearity with *oleosin* gene family members of maize and rice. The qPCR analysis showed that the expression levels of the six *CeOLEs* were high in the tubers of *Cyperus esculentus*, but extremely low in roots, leaves, tillering nodes, stolons and other tissues. Accordingly, the oil content of *Cyperus esculentus* tubers was up to 24.68%, while the oil content in roots, leaves, tillering nodes and stolons was less than 1.00%. It can be seen that the oil content of *Cyperus esculentus* may be closely positively correlated with the expression level of *CeOLEs*. In addition, through the analysis of the expression level of *CeOLEs* and oil content in tubers at different development stages, it was found that the expression levels of *CeOLE1*, *CeOLE2*, *CeOLE3* and *CeOLE5* were higher, and their expression patterns were consistent with the change rate of oil content in tubers (first increased and then decreased), indicating that these four *CeOLEs* may be the key genes affecting the oil content in *Cyperus esculentus* tubers. Overexpression of *CeOLE1*, *CeOLE2*, *CeOLE3* and *CeOLE5* in *Arabidopsis* significantly increased the oil content of *Arabidopsis* seeds, which verified the function of these four *CeOLEs* in oil storage. In summary, the results of this study clarified the characteristics of *oleosin* gene family in *Cyperus esculentus*, screened and functionally verified the key *oleosin* genes responding to oil storage, and laid a foundation for further analysis of oil storage mechanism and genetic improvement of *Cyperus esculentus*.

**Key words:** *Cyperus esculentus*; oleosin; gene family; tissue expression analysis; functional verification

植物油脂的主要成分是三酰甘油 (TAG, triacylglycerol), 以油体的形式储存于种子、果实、花粉、根、茎和花等不同组织器官<sup>[1-2]</sup>。通常情况下, 植物细胞质中合成脂肪酸 (FA, fatty acid), 在内质网上组装成TAG, 而后TAG被多种油体表面蛋白包裹形成油体, 最终完成油脂储存<sup>[3-4]</sup>。因而, 油体形成是植物完成油脂储存的最后关键一步。目前, 这些油体表面蛋白根据结构被分为三类: 油体蛋白(OLE, oleosin)、油体钙蛋白和油体固醇蛋白, 其中油体蛋白占比高达 90%<sup>[5-7]</sup>。*Oleosin*基因编码油体蛋白, 已在拟南芥、水稻、大豆等多种植物中被研究报道<sup>[8-11]</sup>。拟南芥中, 在*Oleosin*基因单突变、双突变和三重突变背景下, 油体的大小、数量和空间分布被改变, 进而导致总油脂含量下降<sup>[10]</sup>。水稻中, *Oleosin*基因RNAi株系种子的油脂含量减少 20%~40%左右<sup>[9]</sup>。大豆中, 过表达*Oleosin*基因产生的油体变小但油脂含量能够提高 10%左右<sup>[11]</sup>。由此可见, 作为油体中含量最丰富的表面蛋白, 油体蛋白对植物油体形成及油脂储存至关重要。

植物中往往存在许多*Oleosin*基因，即构成*Oleosin*基因家族。研究发现，*Oleosin*基因家族成员均具有典型的*Oleosin*结构域，包含两亲性的N-末端、C-末端和一个独特的中间疏水性结构（PX<sub>5</sub>SPX<sub>3</sub>P）；油体蛋白成员的分子量一般在14-30 kDa<sup>[12-14]</sup>。Huang等<sup>[15]</sup>通过生物信息学分析揭示了从绿藻到种子植物的油体蛋白的进化谱系，油体蛋白可被分为5类：P（Primitive）、U（Universal）、SL（Seed low molecular weight）、SH（Seed high molecular weight）和T（Tapetum in Brassicaceae）。值得注意的是，P谱系油体蛋白主要分布在绿藻中，可能是U谱系油体蛋白的来源，进而又产生了SL、SH及T谱系油体蛋白，而T谱系油体蛋白一般仅能在十字花科中被检测到<sup>[2, 16]</sup>。不同物种中，*Oleosin*基因家族成员的种类和数量有所差异，而且不同*Oleosin*基因家族成员的组织表达特性以及功能也可能有所不同。拟南芥中报道了16个*Oleosin*基因，其中5个主要在种子中表达，8个在花药中表达，另外3个同时在种子和花药中表达<sup>[6]</sup>。Miquel等<sup>[10]</sup>对拟南芥中几种同源*Oleosin*基因进行了研究，发现*Oleosin1*和*Oleosin4*负向调节油体大小，而*Oleosin2*可能正向增加油体大小。因而，鉴定和功能分析不同物种（尤其是油料作物）中*Oleosin*基因家族成员十分重要，将有助于明确各自物种中负责油脂储存的关键*Oleosin*基因。

油莎豆（*Cyperus esculentus* L.）是一种独特的地下块茎类作物，其独特之处在于块茎能够储存大量油脂（一般约20%~30%），与一般块茎/根类作物（如马铃薯、红薯等）块茎富含糖类、淀粉等明显不同<sup>[17-19]</sup>。油莎豆油的主要成分是油酸（占比高达74.20%），可以作为健康食用植物油或生物柴油燃料的替代资源<sup>[20-22]</sup>。另外，油莎豆抗逆性及适应性极强，能于沙化、荒漠、盐碱化等土壤种植，可以不与粮食竞争耕地<sup>[23-24]</sup>。因而，油莎豆可以说是一种发展潜力巨大的新型油料作物。作为一种宝贵的新型油料资源，油莎豆在油脂合成和积累方面的潜力亟需进一步研究，挖掘其中油脂积累的关键基因，解析油脂积累的分子调控机制，对于培育高油型油莎豆新品种具有至关重要的作用。Wang等<sup>[25]</sup>通过不同发育时期块茎的转录组测序分析，发现从丙酮酸生成到脂肪酸合成再到三酰基甘油合成以及最终油体形成的植物核心油脂合成代谢途径中主要相关基因均在油莎豆中被鉴定到，这些基因呈现不同程度的大量表达，表明油莎豆块茎具有储存油脂的能力。Ji等<sup>[26]</sup>通过油莎豆和香附子（油莎豆近缘种）之间的比较转录组分析，发现脂肪酸合成途径基因（如*ACCase*、*ACP*）以及油体形成相关蛋白基因（*Oleosin*、*Caleosin*、*Steroleosin*）的上调表达是油莎豆能大量油脂积累的主要原因。随着油莎豆基因组信息的发布<sup>[27]</sup>，Zou等<sup>[28]</sup>对油莎豆*Oleosin*基因家族进行了全基因组表征，明确*Oleosin*家族成员数量和分类、序列特征以及时空表达情况，发现了两个*Oleosin*蛋白存在同源和异源相互作用，并通过烟叶瞬时表达系统证明此两个*Oleosin*基因具有促进油脂储存的功能。综上所述，*Oleosin*基因对油莎豆乃至植物的油脂储存至关重要，并且可能是影响不同物种油脂含量高低的关键。因而，进一步了解*Oleosin*基因家族成员在多物种（尤其是一些油料植物和非油料植物）间的进化保守情况，以及明确响应油莎豆油脂储存的关键*Oleosin*基因家族成员，对改造油莎豆乃至其他物种自身油脂合成代谢过程进而提高油脂含量意义重大。本研究拟通过油莎豆、拟南芥、花生、油菜、玉米、水稻、马铃薯、红薯等

多个物种中*Oleosin*基因家族成员对比分析，明确各物种中*Oleosin*基因家族成员基因复制以及多物种间的共线性等情况；同时，联合油莎豆*Oleosin*基因家族成员的组织表达分析和不同组织中油脂储存规律，筛选出油莎豆中响应油脂储存的关键*Oleosin*基因，并通过拟南芥遗传转化进行油莎豆*Oleosin*基因的过表达功能验证，以期阐明油莎豆油脂储存的分子调控机制以及培育高油型油莎豆新品种奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

本研究所用的油莎豆品种为豫油莎 3 号，拟南芥材料为哥伦比亚野生型拟南芥 (Col-0)，均由本实验室提供。pCAMBIA2300 表达载体、大肠杆菌菌株DH5 $\alpha$ 和根癌农杆菌菌株GV3101 均由本实验室保存。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 油莎豆不同组织器官的油脂含量测定** 挑选大小均匀一致的豫油莎 3 号块茎，使用 10%次氯酸钠溶液浸泡消毒 5 min，随后将其沙土种植于人工气候室中（光照/黑暗：14/10 h，30°C）。每 5 天取样观察一次油莎豆植株的生长发育状态：将其地下部分从沙土中取出，观察生根发芽、匍匐茎形成、分蘖形成、块茎形成及膨大等各组织器官的生长发育变化情况。根据油莎豆植株不同组织器官的生长发育情况，选取发育早期和晚期的不同组织器官（根、叶、匍匐茎、分蘖节和块茎）样品，置于 80°C烘箱中烘干（约 48 h），然后采用索氏抽提法<sup>[29]</sup>进行油脂含量测定，每个样品重复 3 次。

**1.2.2 多物种 *Oleosin* 基因家族成员系统进化树的构建** 从 InterPro 数据库 (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/pfam/#table>) 下载*Oleosin*结构域 (PF01277) 的隐马尔可夫模型 (HMM)，从中国国家基因库数据库 (<https://db.cngb.org/>，CNP0003839) 下载油莎豆基因组数据，从 TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>) 下载拟南芥的基因组数据，从美国国家生物技术信息中心 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 下载花生、油菜、大豆、玉米、水稻、马铃薯、红薯的基因组数据，利用 HMMER 3.0 软件在以上物种全基因组蛋白序列中检索*Oleosin*基因家族成员，阈值为  $1e^{-5}$ 。基于以上物种中*Oleosin*基因家族成员的蛋白序列，利用 MEGA X 软件通过邻接法 (NJ, neighbor joining) 构建系统进化树，参数 Bootstrap 设置为 1000，并用 Evolview (<https://www.evolgenius.info/>) 在线工具进行优化。同时，参考 Chen 等<sup>[30]</sup>研究，对多物种的*Oleosin*基因家族成员进行亚家族分类。

**1.2.3 *Oleosin*基因复制和物种间共线性分析** 利用 TBtools 软件中“One StepMC ScanX-SuperFast”程序包分析油莎豆、拟南芥、花生、油菜、玉米、水稻、马铃薯、红薯等物种内及物种间*Oleosin*基因家族成员的关联信息。基于关联信息，利用 TBtools 软件中“Advance Circos”程序包分析各自物种（以油莎豆、拟南芥、大豆和水稻物种为代表）内*Oleosin*基因的重复事件；利用 TBtools 软件中“Dual SystemyPlot for MCscan X”程序包分析油莎豆与其他物种间*Oleosin*基因的共线性情况。

**1.2.4 RNA提取、cDNA合成及qPCR (Quantitative real-time PCR)检测** 利用植物多糖多酚总RNA提取试剂盒(北京天根)提取总RNA, 并通过NanoDrop 2000 检测RNA的质量和浓度。随后, 利用HiScript® II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper) 反转录试剂盒(南京诺唯赞)将RNA反转录成cDNA。利用Primer 5 软件设计qPCR特异性引物, 退火温度为 58 ~ 60°C, 片段长度为 150 ~ 300 bp; 选择*AtACTIN*和*CeACTIN*分别作为拟南芥和油莎豆的内参基因, 引物序列见表 1。采用SYBR Green PCR Master Mix (Takara)体系 (20  $\mu$ L), 通过Bio-Rad CFX96 荧光定量PCR仪进行qPCR检测, 设置 3 个生物学重复和 3 个技术重复。采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算基因在各样品中的相对表达水平。

表 1 本研究引物及序列

Table 1 Primers and sequences in this study

引物名称 Primer name	上游引物 (5'-3') Forward primer	下游引物 (5'-3') Reverse primer
Q-CeOLE1	TGTCAGAATGTCTCCCG	TGCTTACCATGTTCTCGCC
Q-CeOLE2	ATCGTCACGCCGCTGTTTAT	GTTTCTGGCCCGTTCAAGC
Q-CeOLE3	GCACCAGAGAGAAGGACAGC	GCACCAGAGAGAAGGACAGC
qPCR检测 qPCR detection	Q-CeOLE4 TGCCCAAAAACGAGCCAATG	TCCTTAAAATCCCGCGCCTT
Q-CeOLE5	TGATCCGTCATGGGAAGGC	CAACCTGCTGCCCTTACT
Q-CeOLE6	CTCTTAACGGGCGTGACCAT	GCAGATACCCGCCATACTCC
Q-CeACTIN	ACTCTGGTGATGGTGTGAGC	CCCTCTCTCCGTCAGGATCT
Q-AtACTIN	GAGATGGAAACCTCAAAGACCA	TTACCGTACAGATCCTTCCTGA
V-CeOLE1	gtaccgggagatccttagatcgacATGGCGGACCGGGCA G	ttgctcaccatgtactagtgtcgaCTACTGTGCGTCTTCCCGC CAGCCT
载体构建 Vector construction	V-CeOLE2 gtaccgggagatccttagatcgacATGACAGACTACAGCAA GGA	ttgctcaccatgtactagtgtcgaTCAGTACCCATAACCCGCTA
V-CeOLE3	gtaccgggagatccttagatcgacATGGCTGAGCACCAGAG AGAA	ttgctcaccatgtactagtgtcgaTTACGATGCCTGCTGTTCGA C
V-CeOLE5	gtaccgggagatccttagatcgacATGGCAGACCGGGGA GCA	ttgctcaccatgtactagtgtcgaTCAAGTCCTGCCAGCAACC T
PCR检测 PCR detection	P-CeOLE1 ATGGCGGACCGGGGAG	CTACTGTGCGGTCTTCCCGCCAGCCT
P-CeOLE2	ATGACAGACTACAGCAAGGA	TCAGTACCCATAACCCGCTA
P-CeOLE3	ATGGCTGAGCACCAGAGAGAA	TTACGATGCCTGCTGTTCGAC
P-CeOLE5	ATGGCAGACCGGGGAGCA	TCAAGTCCTGCCAGCAACCT

**1.2.5 *CeOLEs*在油莎豆中的表达分析** 选取油莎豆不同组织器官(根、叶、匍匐茎、分蘖节和块茎, 同上), 利用qPCR分析*CeOLEs*在各组织器官的表达情况(相对表达水平), 使用TBtools软件绘制*CeOLEs*的组织表达模式图, 按行进行正态标准化(Normalized)处理。为了进一步了解*CeOLEs*在油莎豆块茎发育不同阶段的表达变化情况, 选取 50、60、70、80、90、100 d植株的块茎进行qPCR检测, 分析每个*CeOLE*在各个块茎发育阶段的表达情况。

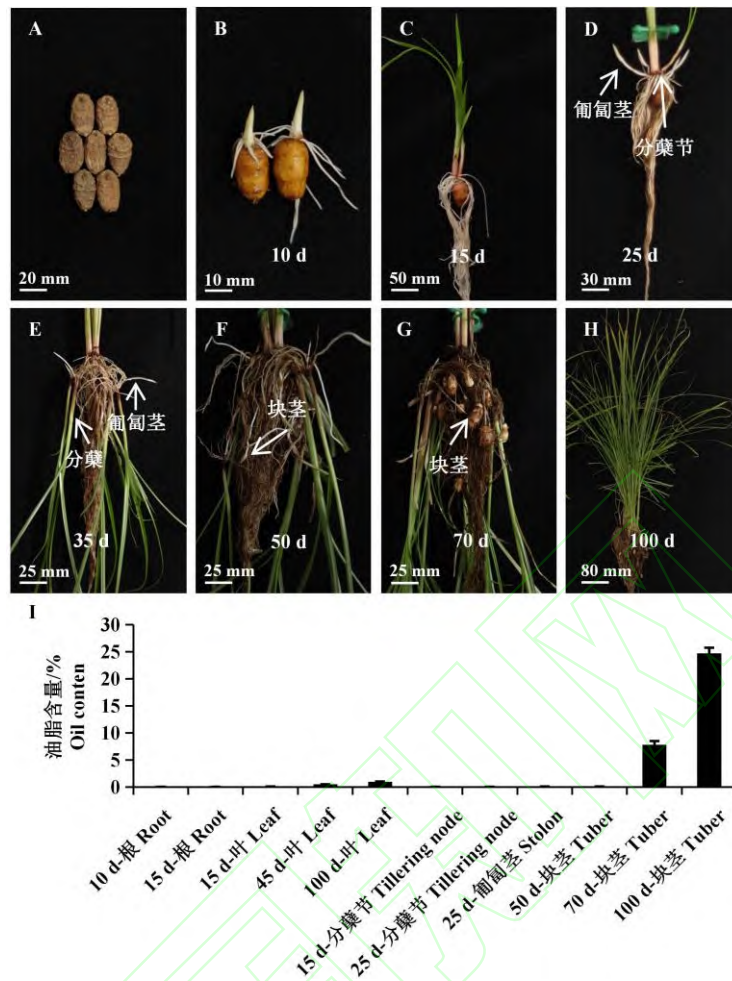
**1.2.6 *CeOLEs*遗传转化拟南芥过表达功能验证** 克隆影响油莎豆油脂含量的关键候选*CeOLEs*的CDS序列, 构建具有卡那霉素抗性、由 35S启动子驱动过的表达载体pCMBIA2300-*CeOLE*。将过表达载体的重组质粒转化

至根癌农杆菌GV3101 中，采用浸花法侵染野生型拟南芥WT。通过卡那霉素筛选、PCR检测（选取叶片组织）以及qPCR验证（选取拟南芥结荚 15 d时的果荚组织），获得稳定遗传的T3 代过表达*CeOLE*拟南芥阳性株系，并且选择株系间*CeOLE*相对表达量较高且相近的株系进行后续表型鉴定。取转基因拟南芥种子和野生型拟南芥WT种子进行油脂含量检测（如上），对比分析二者之间的油脂含量差异。载体构建及PCR检测引物序列见表 1。

## 2 结果与分析

### 2.1 油莎豆的生长发育观察及油脂含量分析

为了明确油莎豆的生长发育特性，利用沙培对豫油莎 3 号进行了全生育期观察。结果发现，油莎豆干块茎（图 1A）沙土种植 10 d左右开始发芽（图 1B），随后形成幼苗并逐渐生长（图 1C）；25 d左右分蘖节处开始逐渐产生地下匍匐茎（图 1D），随后匍匐茎伸长、分化形成分蘖（图 1E），另外新分蘖上也陆续产生匍匐茎（图 1E）；50 d左右部分匍匐茎顶端开始膨大而成块茎（图 1F），随后块茎逐渐变大且新块茎陆续形成（图 1G）；100 d左右叶片开始逐渐枯黄（图 1H），油莎豆基本完成整个生命周期。可以看出，油莎豆植株的组织器官主要包括根、叶、分蘖节、匍匐茎和块茎；地下匍匐茎能够持续产生，前期（25-50 d）主要分化形成分蘖，后期（50 d以后）主要分化形成块茎。通过检测油莎豆植株主要组织器官的油脂含量，发现油莎豆根、叶、分蘖节和匍匐茎中油脂含量较少，均小于 1.00%（图 1I）；块茎中油脂含量随着发育时间逐渐增加，100 d左右块茎的油脂含量可达 24.68%（图 1I），表明油莎豆主要利用块茎组织特异性储存油脂。



A: 油莎豆干块茎; B: 油莎豆块茎发芽; C: 油莎豆幼苗生长; D: 油莎豆匍匐茎形成; E: 油莎豆分蘖形成; F: 油莎豆块茎形成; G: 油莎豆块茎的膨大; H: 油莎豆叶片开始枯黄; I: 油莎豆不同组织器官中油脂含量检测

A: Dried tuber of *Cyperus esculentus*; B: Germination of *Cyperus esculentus* tubers; C: Seedling growth of *Cyperus esculentus*; D: Stolon formation of *Cyperus esculentus*; E: Tillering formation of *Cyperus esculentus*; F: Tuber formation of *Cyperus esculentus*; G: Expansion of *Cyperus esculentus* tubers; H: Leaves of *Cyperus esculentus* are beginning to wither yellow; I: Detection of oil content in different tissues and organs of *Cyperus esculentus*

图 1 油莎豆全生育期观察及组织油脂含量比较

Fig.1 Observation of the whole growth period and comparison of tissue oil content of *Cyperus esculentus*

## 2.2 *Oleosin*基因家族系统进化分析

为了分析*Oleosin*基因在多物种间的分布情况及进化关系,本研究利用HMMER 3.0 软件对油莎豆、拟南芥、花生、油菜、大豆、玉米、水稻、马铃薯和红薯进行了*Oleosin*基因家族鉴定,结果在这些物种中依次鉴定出 6、17、12、44、15、8、6、11、0 个*Oleosin*基因家族成员(表 2)。利用MEGA X软件对油莎豆和以上物种的*Oleosin*基因家族成员进行了系统发育进化分析。结果表明,所有基因可被分为 4 个谱系(亚家族): T-*Oleosin*、U-*Oleosin*、SL-*Oleosin*和SH-*Oleosin*;所有物种均具有U-*Oleosin*、SH-*Oleosin*和SL-*Oleosin*亚家族成员,而T-*Oleosin*亚家族成员仅在拟南芥和油菜这两个十字花科物种所特有(表 2,图 2)。从进化



分析上来看，油莎豆中 5 个 *Oleosin* 基因（*CeOLE1*、*CeOLE3*、*CeOLE4*、*CeOLE5* 和 *CeOLE6*）均与玉米、水稻中一些 *Oleosin* 基因紧密聚在一起（图 2），说明油莎豆与玉米、水稻之间 *Oleosin* 基因家族的进化过程中存在较高的保守性。

表 2 不同物种中 *Oleosin* 基因家族的谱系及成员

Table 2 *Oleosin* gene family lineages and members in different species

谱系 Lineage	油莎豆 <i>Cyperus esculentus</i>	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	花生 <i>Arachis hypogaea</i>	油菜 <i>Brassica napus</i>	大豆 <i>Glycine max</i>	玉米 <i>Zea mays</i>	水稻 <i>Oryza sativa</i>	马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i>	红薯 <i>Ipomoea batatas</i>
普通型 U	<i>CeOLE6</i>	<i>AtOLE1</i> <i>AtOLE4</i>	<i>AhOLE2</i> <i>AhOLE8</i>	<i>BnaOLE2</i> <i>BnaOLE9</i> <i>BnaOLE14 - 15</i> <i>BnaOLE26</i> <i>BnaOLE31</i> <i>BnaOLE34 - 35</i> <i>BnaOLE38</i> <i>BnaOLE1</i> <i>BnaOLE11</i> <i>BnaOLE13</i> <i>BnaOLE17</i> <i>BnaOLE20</i> <i>BnaOLE25</i> <i>BnaOLE33</i> <i>BnaOLE37</i> <i>BnaOLE39</i> <i>BnaOLE3</i> <i>BnaOLE8</i> <i>BnaOLE12</i>	<i>GmOLE4</i> <i>GmOLE6</i> <i>GmOLE8</i> <i>GmOLE11</i>	<i>ZmOLE5</i> <i>ZmOLE7</i>	<i>OsOLE1</i> <i>OsOLE4</i>	<i>StOLE3</i> <i>StOLE6</i>	ND
低分子量 SL	<i>CeOLE3</i> <i>CeOLE4</i>	<i>AtOLE2</i> <i>AtOLE6</i> <i>AtOLE16</i>	<i>AhOLE5</i> <i>AhOLE6</i> <i>AhOLE11</i> <i>AhOLE12</i>	<i>BnaOLE16</i> <i>BnaOLE19</i> <i>BnaOLE27</i> <i>BnaOLE30</i> <i>BnaOLE32</i> <i>BnaOLE41</i> <i>BnaOLE4 - 7</i> <i>BnaOLE10</i> <i>BnaOLE18</i>	<i>GmOLE1 - 2</i> <i>GmOLE5</i> <i>GmOLE7</i> <i>GmOLE15</i>	<i>ZmOLE1</i> <i>ZmOLE3 - 4</i>	<i>OsOLE3</i> <i>OsOLE6</i>	<i>StOLE4 - 5</i> <i>StOLE7 - 11</i>	ND
高分子量 SH	<i>CeOLE1 - 2</i> <i>CeOLE5</i>	<i>AtOLE3</i> <i>AtOLE5</i> <i>AtOLE15</i>	<i>AhOLE1</i> <i>AhOLE3 - 4</i> <i>AhOLE7</i> <i>AhOLE9</i> <i>AhOLE10</i>	<i>BnaOLE16</i> <i>BnaOLE19</i> <i>BnaOLE27</i> <i>BnaOLE30</i> <i>BnaOLE32</i> <i>BnaOLE41</i> <i>BnaOLE4 - 7</i> <i>BnaOLE10</i> <i>BnaOLE18</i>	<i>GmOLE3</i> <i>GmOLE9 - 10</i> <i>GmOLE12 - 14</i>	<i>ZmOLE2</i> <i>ZmOLE6</i> <i>ZmOLE8</i>	<i>OsOLE2</i> <i>OsOLE5</i>	<i>StOLE1 - 2</i>	ND
绒毡层 T	ND	<i>AtOLE7 - 14</i> <i>AtOLE17</i>	ND	<i>BnaOLE21 - 24</i> <i>BnaOLE28 - 29</i> <i>BnaOLE36</i> <i>BnaOLE40</i> <i>BnaOLE42 - 44</i>	ND	ND	ND	ND	ND

ND表示未检测到

ND indicates no detection; U:Universal; SL:Seed low molecular weight; SH: Seed high molecular weight; T:Tapetum in brassicaceae; The same as below

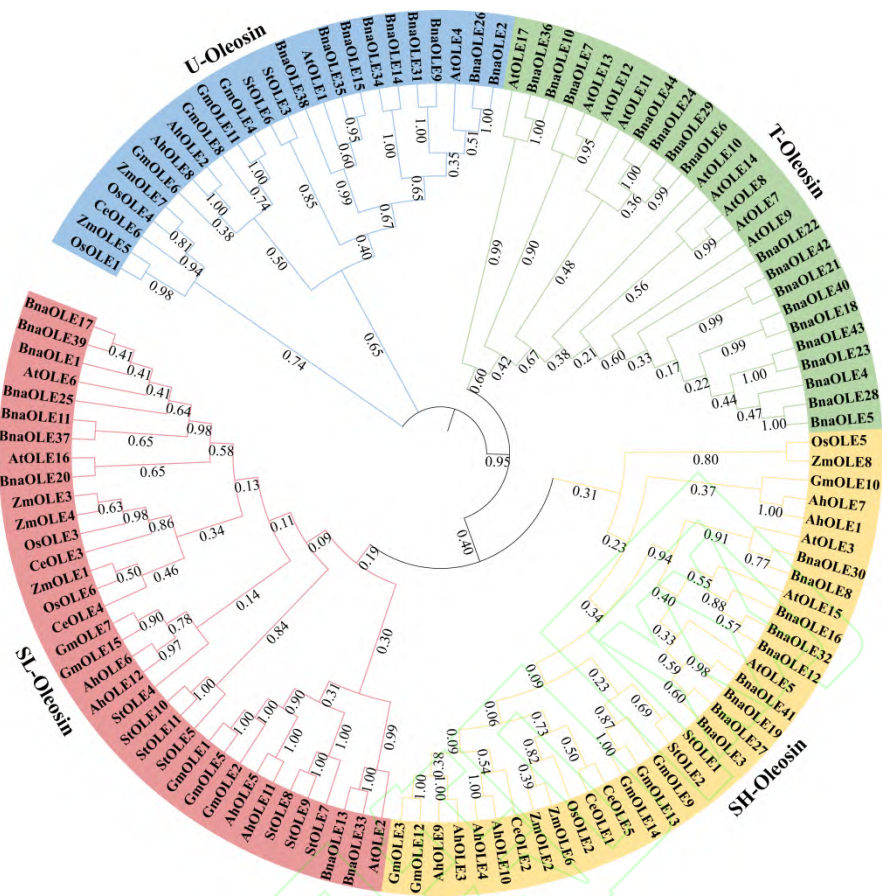


图2 油莎豆、拟南芥、油菜、花生、大豆、玉米、水稻及马铃薯Oleosin基因家族成员的系统进化树

Fig.2 Phylogenetic tree of *Oleosin* gene family members in *Cyperus esculentus*, *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*, *Arachis hypogaea*, *Glycine max*, *Zea mays*, *Oryza sativa* and *Solanum tuberosum*

### 2.3 *Oleosin*基因复制与多物种共线性分析

为了了解不同物种中*Oleosin*基因家族的扩展情况，利用MCScan X程序对油莎豆、拟南芥、大豆和水稻进行了*Oleosin*基因复制事件分析。结果显示，油莎豆中鉴定到1对片段重复基因，拟南芥中鉴定到4对片段重复基因，大豆中鉴定到11对片段重复基因，水稻中鉴定到1对片段重复基因（图3），表明不同物种中一些*Oleosin*基因均可能是通过基因复制事件产生的。值得注意的是，鉴定到的片段重复基因均属于同一亚家族成员，如油莎豆SL亚家族的*CeOLE3/CeOLE4*、拟南芥SH亚家族的*AtOLE3/AtOLE5*（图3），而不同亚家族成员之间不存在重复片段，表明*Oleosin*基因亚家族并不是通过基因复制扩展的，其亚家族成员可能均为祖先基因或由祖先基因分别进化而来。

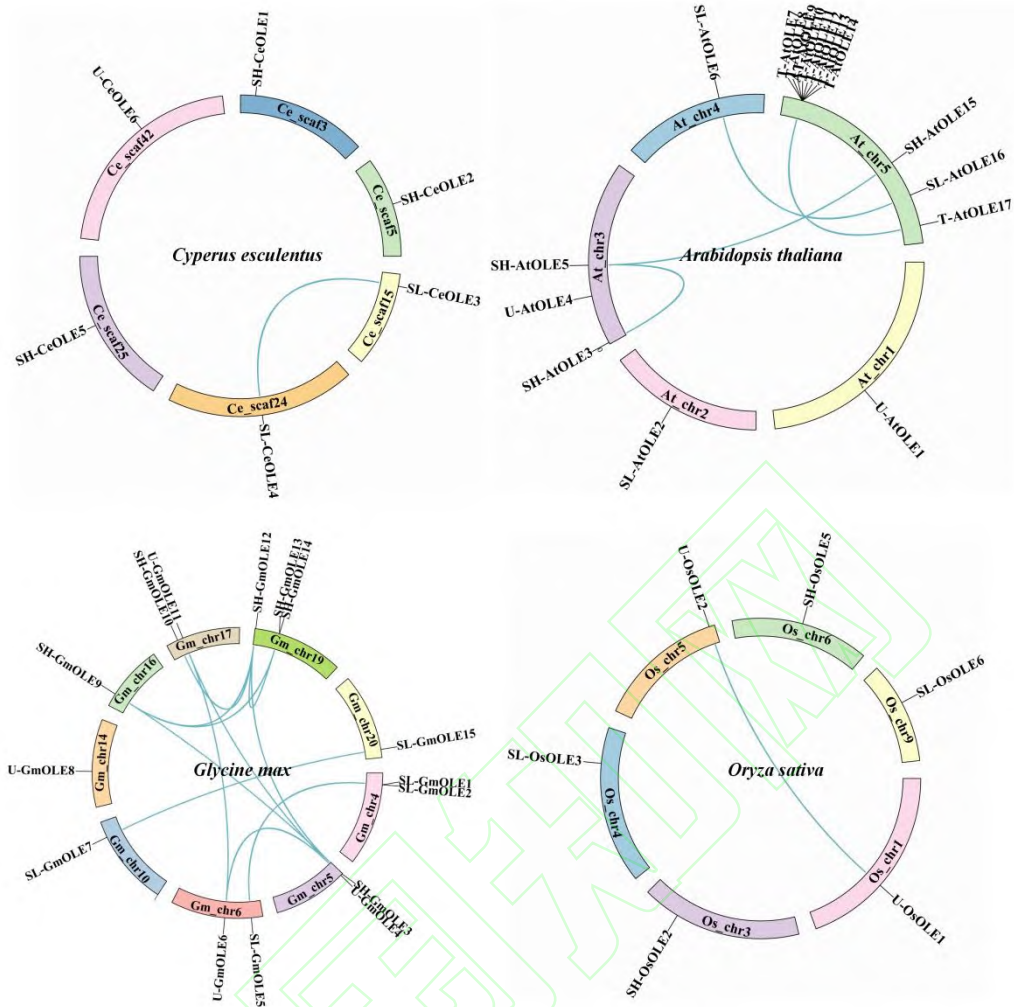


图 3 油莎豆、拟南芥、大豆、及水稻Oleosin基因家族成员的基因复制事件

Fig.3 Gene duplication events in *Oleosin* family members in *Cyperus esculentus*, *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max* and *Oryza sativa*

为了进一步了解油莎豆Oleosin基因家族的进化关系，利用MCScan X程序分别分析了油莎豆CeOLEs和拟南芥、油菜、花生、大豆、玉米、水稻及马铃薯Oleosin基因之间的共线性关系。结果显示，油莎豆和油菜、花生之间均未鉴定到共线性Oleosin同源基因（图4）；油莎豆中仅CeOLE4与拟南芥AtOLE9及AtOLE17同源，仅CeOLE6与大豆GmOLE3同源（图4）；然而，油莎豆和玉米、水稻、马铃薯之间Oleosin基因共线性较高，存在多对同源基因，如CeOLE1和ZmOLE2、CeOLE3和ZmOLE3、CeOLE4和ZmOLE1（或ZmOLE3）、CeOLE6和ZmOLE7（图4）。由此说明，单从Oleosin基因参与植物油脂储存角度而言，油莎豆可能与玉米、水稻、马铃薯进化路径相近。

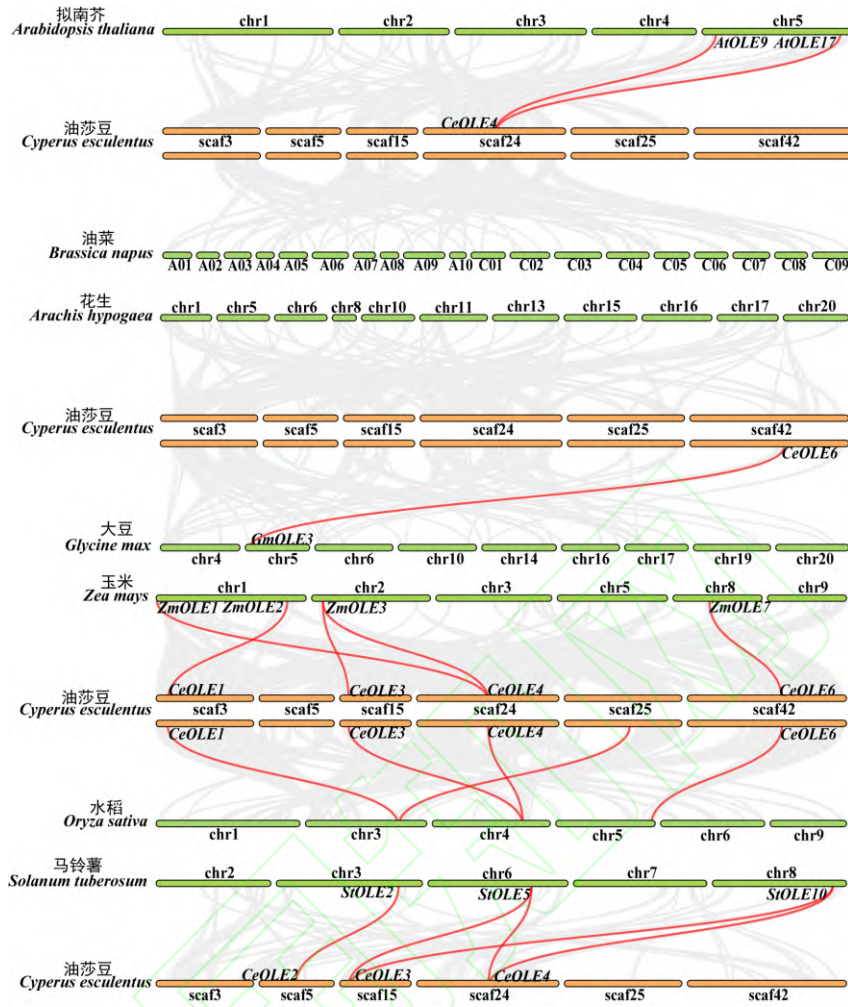


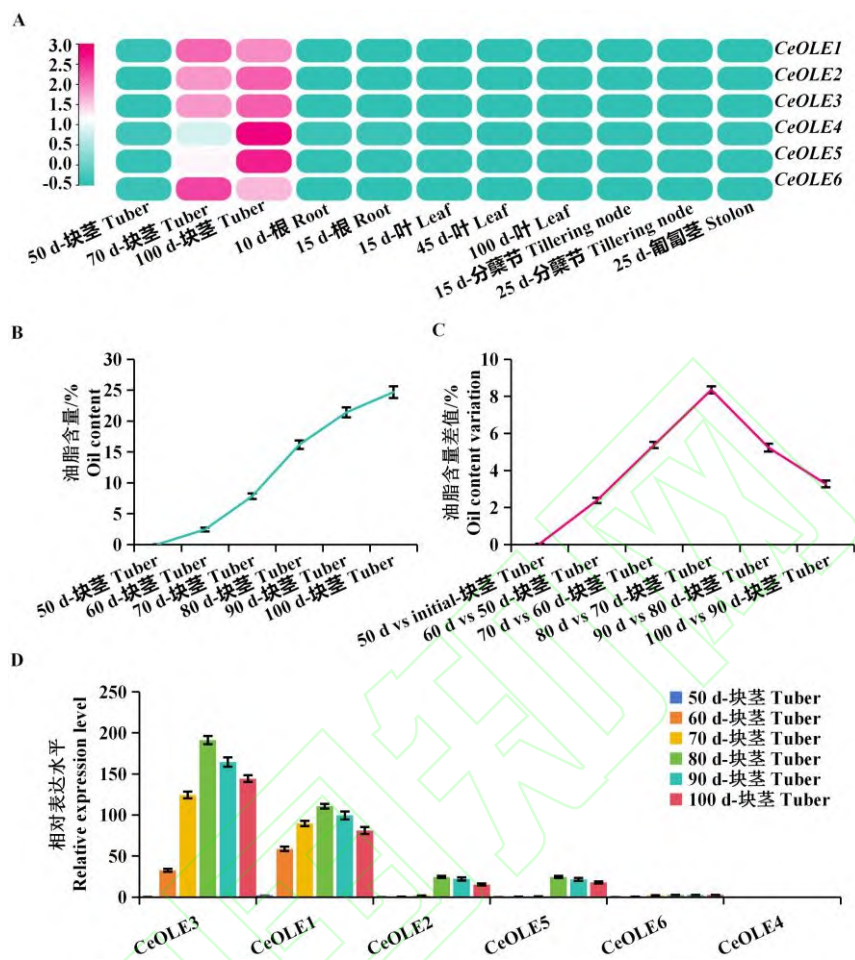
图4 油莎豆与其他物种间Oleosin基因的共线性分析

Fig.4 Synteny analysis of *Oleosin* between *Cyperus esculentus* and other species

## 2.4 油莎豆中CeOLEs表达水平对油脂含量的影响

利用qPCR方法检测了CeOLEs在油莎豆不同发育时期根、叶、分蘖节、匍匐茎和块茎中的相对表达量。结果显示，CeOLE1 - 6在根、叶、分蘖节、匍匐茎以及50 d块茎中表达水平较低，而在70 d和100 d块茎中呈现较高水平表达(图5A)。基于上述油莎豆不同组织的油脂含量分析(图1I)，可以看出油脂含量与CeOLEs的表达水平密切正相关，而所有或某些CeOLEs在油莎豆块茎中的特异性高表达可能是其块茎特异性储存油脂的关键因素。为了进一步探究油莎豆块茎中油脂含量与CeOLE1 - 6表达水平的关系，本研究选取50、60、70、80、90、100 d的块茎分别进行了油脂含量检测和CeOLE1 - 6的qPCR分析。结果发现，油莎豆块茎中油脂含量呈现“S”型增长模式(图5B)，并且油脂含量增长速率从50 d到80 d逐渐升高而后从80 d到100 d又逐渐降低(图5C)；相应地，油莎豆块茎中CeOLE3和CeOLE1的平均表达水平最高，CeOLE2和CeOLE5的次之，而CeOLE6和CeOLE4的极低，同时CeOLE1、CeOLE2、CeOLE3和CeOLE5均呈现出从50 d到80 d逐渐升高而后又逐渐降低的表达模式(图5D)。通常情况下，植物油脂含量增长速率与内在关键基因的表

达模式相一致<sup>[31-32]</sup>，因而以上4个*CeOLEs*（尤其是表达水平最高的*CeOLE3*和*CeOLE1*）可能是影响油莎豆块茎中油脂含量的关键基因。



A: 不同组织中*CeOLEs*相对表达水平的热图; B: 块茎中油脂含量的动态变化; C: 相邻发育时期之间的油脂含量差值变化分析; D: 不同发育时期块茎*CeOLEs*的相对表达水平

A: Heat maps of the relative expression levels of *CeOLEs* in different tissues; B: Dynamic changes of oil content in tubers; C: Analysis of the oil content variation between adjacent developmental stages; D: Relative expression levels of *CeOLEs* in tubers at different developmental stages

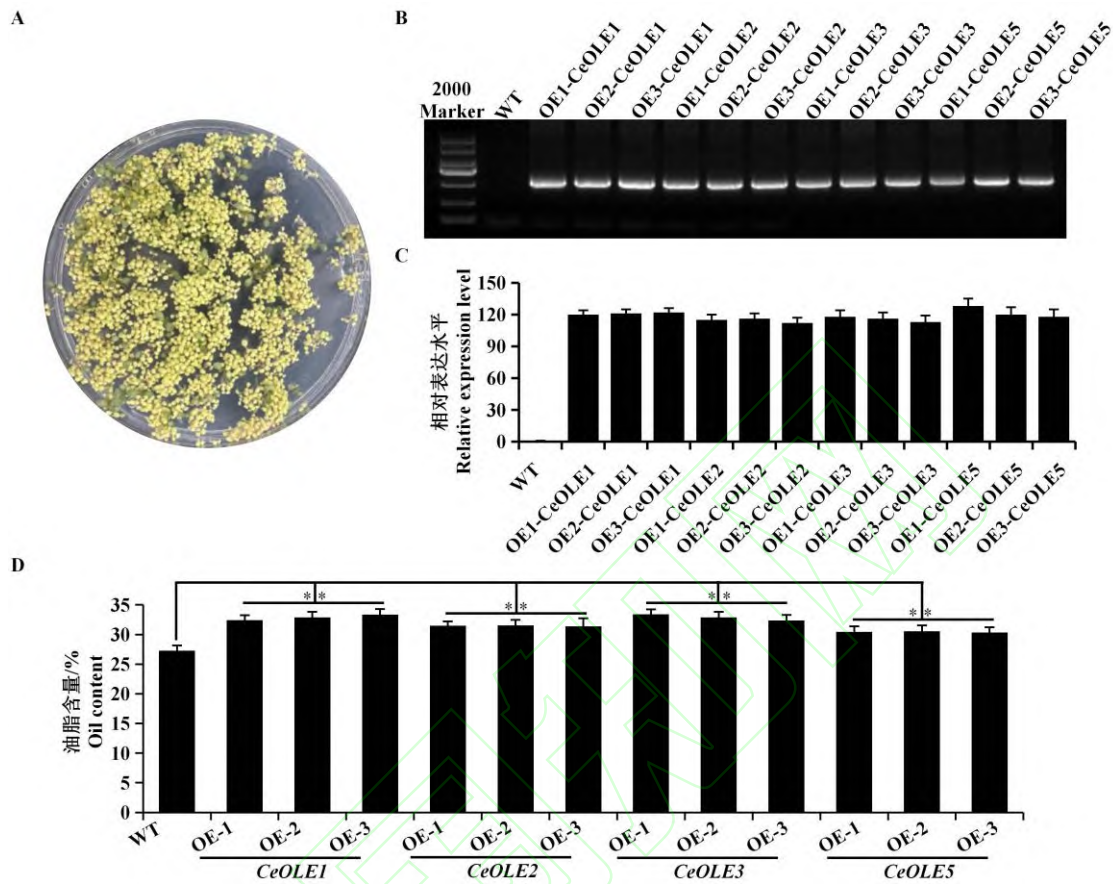
图5 油莎豆*CeOLEs*的组织表达与油脂含量的关系

Fig.5 The relationship between tissue expression of *CeOLEs* and oil content in *Cyperus esculentus*

## 2.5 过表达*CeOLEs*拟南芥种子的油脂含量分析

为了检验上述4个*CeOLEs*在油莎豆块茎油脂储存中的功能，克隆*CeOLE1*、*CeOLE2*、*CeOLE3*和*CeOLE5*的CDS序列，构建过表达载体pCMBIA2300-*CeOLE*，分别创制过表达*CeOLE1*、*CeOLE2*、*CeOLE3*和*CeOLE5*的拟南芥转基因材料。通过含卡那霉素培养基的拟南芥种子抗性筛选（图6A）、目的基因的PCR检测（图6B）以及目的基因的qPCR验证（图6C），筛选出稳定遗传的T3代纯合拟南芥过表达株系。利用索氏抽提法，测定野生型拟南芥WT（对照）和过表达拟南芥株系（3个转化事件）种子的油脂含量。结果发现，相

比于WT，过表达*CeOLE1*、*CeOLE2*、*CeOLE3*和*CeOLE5*拟南芥株系种子的油脂含量均显著提高（图6D），表明这4个*CeOLEs*均具有促进油脂储存的功能。



A: 拟南芥转基因种子的阳性筛选; B: WT和转基因拟南芥中*CeOLEs*的PCR鉴定; C: WT和转基因拟南芥中*CeOLEs*表达量的qPCR检测; D: WT和转基因拟南芥种子的油脂含量检测

A: Positive screening of transgenic *Arabidopsis thaliana* seeds; B: The PCR identification of *CeOLEs* in WT and transgenic *Arabidopsis*; C: The qPCR verification of *CeOLEs* in WT and transgenic *Arabidopsis*; D: Detection of oil content of WT and transgenic *Arabidopsis thaliana* seeds

图6 *CeOLEs*过表达转基因拟南芥的鉴定及油脂含量分析

Fig.6 Identification and oil content analysis of transgenic *Arabidopsis thaliana* overexpressing *CeOLEs*

### 3 讨论

从绿藻到高等植物等不同物种中*Oleosin*基因家族成员广泛分布<sup>[14]</sup>，参与油体的形成和降解以及油体大小与稳定性的维持，在油脂储存过程中发挥着至关重要的作用<sup>[6]</sup>。在植物几百万年的演化中，尽管*Oleosin*逐渐在功能上表现出差异，但仍具有相似的编码序列和保守的结构域特征，尤其是*Oleosin*疏水性中心结构域中高度保守的“脯氨酸结”保守基序（PX<sub>5</sub>SPX<sub>3</sub>P），该结构是油体中特有的结构<sup>[2]</sup>。基于保守的*Oleosin*结构域（PF01277），在拟南芥<sup>[33]</sup>、花生<sup>[34]</sup>、油菜<sup>[30]</sup>、大豆<sup>[3, 11]</sup>等植物中*Oleosin*基因家族成员被陆续分离鉴定。本研究通过油莎豆全基因组*Oleosin*结构域搜索，共鉴定到6个*Oleosin*基因家族成员。从数量上而言，油莎

豆*Oleosin*基因家族成员数目远少于拟南芥（17个）、花生（12个）、油菜（44个）、大豆（15个），而与玉米（8个）、水稻（6个）相近。系统进化分析表明，油莎豆与玉米、水稻之间*Oleosin*基因家族成员亲缘关系较近，存在较高的进化保守性。实际上，油莎豆和玉米、水稻均具有分蘖能力，符合单子叶植物的特征；而拟南芥、花生、大豆、油菜等属于双子叶植物，一般无分蘖能力而呈现出分枝的特征。从油脂储存角度而言，油莎豆利用块茎储存油脂，油脂含量在20%~30%之间<sup>[17]</sup>；而玉米、水稻种子虽然整体含水量不高，但在种子胚芽中可以储存大量油脂，有研究表明玉米种胚芽中油脂含量可达35%~61%<sup>[35]</sup>。由此表明，油莎豆与玉米、水稻的*Oleosin*基因家族成员确实可能存在一定的进化保守性。通过*Oleosin*基因复制事件分析可知，拟南芥和大豆中均存在许多对段重复基因，而油莎豆和水稻中均仅存在1对片段重复基因，说明不同物种中*Oleosin*基因家族成员数目的差异可能与基因复制相关。从进化谱系（亚家族）而言，油莎豆与其他大部分物种（花生、大豆、玉米、水稻）一样，*Oleosin*基因家族成员在3个主要的进化谱系（U、SL和SH亚家族）均有分布。*Oleosin*基因复制事件分析显示，不同亚家族成员之间不存在基因复制事件，说明亚家族之间蛋白功能进化独立，可能具有各自独特的功能。实际上，从绿藻到种子植物，*Oleosin*基因家族一般可被分为5类：P、U、SL、SH和T亚家族，其中P亚家族主要分布在绿藻中，被推测为*Oleosin*祖先基因；T亚家族仅存在于十字花科（如拟南芥、油菜）中，而U、SL和SH亚家族可能普遍均存多数物种中<sup>[2]</sup><sup>[6]</sup>。因而，U、SL和SH亚家族成员可能在植物油体形成过程中是不可或缺的，相互之间可能存在协作关系。有研究表明，不同*Oleosin*基因家族成员在油体形成过程中可能发挥不同的功能，一些家族成员促进油体融合，一些家族成员阻止油体融合，进而共同调控和维持油体大小<sup>[10]</sup>。

一般情况下，*Oleosin*基因主要在油料作物的种子中高水平表达，他们的表达丰度与种子中的油脂含量正相关<sup>[36-38]</sup>。研究表明，过表达*Oleosin*基因可以提高拟南芥、水稻和大豆种子中的油脂含量<sup>[11, 39-40]</sup>。油莎豆是一个三倍体植物，无法形成种子，主要利用块茎储存油脂<sup>[41]</sup>。本研究对油莎豆根、叶、分蘖节、匍匐茎和块茎中*CeOLEs*的表达分析发现，*CeOLEs*主要在块茎中表达，而在其他油脂含量较低的组织中几乎不表达，同样表明油脂含量与*CeOLEs*的表达丰度密切正相关。常见油料作物大豆、花生和油菜的种子中*Oleosin*基因的表达水平极高<sup>[32, 42-43]</sup>，而非油料作物马铃薯和红薯的块茎/根中几乎检测不到*Oleosin*基因的表达<sup>[44-45]</sup>，甚至红薯基因组中出现*Oleosin*基因缺失情况（本研究中表2）。理论上，任何植物都能够合成FA、TAG、膜磷脂（Membrane phospholipid, MP）、甘油三酯等，这些均是机体正常生活所需的；当油体相关蛋白（90%为*Oleosin*）将MP和TAG等包裹形成油体后，植物组织器官以油体形式将油脂储存起来<sup>[5, 14]</sup>。以上数据说明，*Oleosin*对植物油体形成及油脂储存十分关键，*Oleosin*基因的表达水平越高，植物储存油脂的潜力越大。另外，本研究发现表达水平相对较高的*CeOLE1*、*CeOLE2*、*CeOLE3*和*CeOLE5*可能是影响油莎豆块茎中油脂含量的关键基因，它们的表达模式与块茎发育过程中油脂含量的变化速率一致，并且拟南芥中的过表达也证实了它们在油脂储存中的功能。另外，有研究发现一些*Oleosin*基因往往以1:1的比例表达，表明植物油体

形成过程中一些Oleosin成员可能形成二聚体/多聚体而发挥作用<sup>[15, 46]</sup>。Zou等<sup>[28]</sup>通过双分子荧光互补实验发现油莎豆中两个极高表的Oleosin基因家族成员自身以及相互之间存在相互作用，初步证实了Oleosin成员之间可能以二聚体/多聚体的形式协同完成油体组装。同样，本研究发现CeOLE1和CeOLE3的表达水平相似，CeOLE2和CeOLE5的表达水平相似，说明CeOLE1可能与CeOLE3配对而CeOLE2与CeOLE5配对协同促进油体的形成。总之，油莎豆块茎中CeOLE1、CeOLE2、CeOLE3和CeOLE5的特异性高表达是其块茎能像其他油料作物种子一样储存大量油脂的关键。在以上研究基础上，Oleosin基因为何在油料作物种子或油莎豆块茎中特异性高表达将是下一步值得深入研究的关键点，能够拓展人们对植物油脂储存机制的新认识，为油料作物油脂含量提高以及其他非油料作物油脂储存改造奠定基础。

## 参考文献

- [1] Murphy D J. The dynamic roles of intracellular lipid droplets: from archaea to mammals. *Protoplasma*, 2012, 249: 541-585
- [2] Huang A H. Plant lipid droplets and their associated proteins: Potential for rapid advances. *Plant Physiology*, 2018, 176(3): 1894-1918
- [3] 周丹, 赵江哲, 柏杨, 张群, 井文, 章文华. 植物油脂合成代谢及调控的研究进展. *南京农业大学学报*, 2012, 35(5): 77-86  
Zhou D, Zhao J Z, Bai Y, Zhang Q, Jing W, Zhang W H. Research advance in triacylglycerol synthesis, metabolism, and regulation in plants. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2012, 35(5): 77-86
- [4] 范世航, 刘念, 华玮. 油料作物油脂合成调控研究进展. *中国油料作物学报*, 2021, 43(3): 361  
Fan S H, Liu N, Hua W. Research advances in the biosynthesis and regulation of lipid in oil crops. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2021, 43(3): 361
- [5] 胡佳, 刘春林. 植物油体研究进展. *植物学报*, 2017, 52(5): 669  
Hu J, Liu C L. Research progress on vegetable oils. *Chinese Bulletin of Botany*, 2017, 52(5): 669
- [6] Shao Q, Liu X, Su T, Ma C, Wang P. New insights into the role of seed oil body proteins in metabolism and plant development. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 494493
- [7] Scholz P, Chapman K D, Mullen R T, Ischebeck T. Finding new friends and revisiting old ones—how plant lipid droplets connect with other subcellular structures. *New Phytologist*, 2022, 236(3): 833-838
- [8] Jolivet P, Roux E, d'Andrea S, Davanture M, Negroni L, Zivy M, Chardot T. Protein composition of oil bodies in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2004, 42(6): 501-509
- [9] Wu Y Y, Chou Y R, Wang C S, Tseng T H, Chen L J, Tzen J T. Different effects on triacylglycerol packaging to oil bodies in transgenic rice seeds by specifically eliminating one of their two oleosin isoforms. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2010, 48(2): 81-89
- [10] Miquel M, Trigui G, d'Andréa S, Kelemen Z, Baud S, Berger A, Deruyffelaere C, Trubuil A, Lepiniec L, Dubreucq B. Specialization of oleosins in oil body dynamics during seed development in *Arabidopsis* seeds. *Plant Physiology*, 2014, 164(4): 1866-1878
- [11] Zhang D, Zhang H, Hu Z, Chu S, Yu K, Lv L, Yang Y, Zhang X, Chen X, Kan G. Artificial selection on *GmOLEO1* contributes to the increase in seed oil during soybean domestication. *PLoS Genetics*, 2019, 15(7): e1008267
- [12] Abell B M, Holbrook L A, Abenes M, Murphy D J, Hills M J, Moloney M M. Role of the proline knot motif in oleosin endoplasmic reticulum topology and oil body targeting. *The Plant Cell*, 1997, 9(8): 1481-1493
- [13] Huang C Y, Huang A H. Unique motifs and length of hairpin in oleosin target the cytosolic side of endoplasmic reticulum and budding lipid droplet. *Plant Physiology*, 2017, 174(4): 2248-2260
- [14] 赵浩强, 王小斐, 高少培. 植物油体蛋白基因家族研究进展. *遗传*, 2022, 44(12): 1128-1140  
Zhao H Q, Wang X F, Gao S P. Progress on the functional role of oleosin gene family in plants. *Hereditas*, 2022, 44(12): 1128-1140
- [15] Huang M D, Huang A H. Bioinformatics reveal five lineages of oleosins and the mechanism of lineage evolution related to structure/function from green algae to seed plants. *Plant Physiology*, 2015, 169(1): 453-470



- [16] Fang Y, Zhu R L, Mishler B D. Evolution of oleosin in land plants. *PLoS ONE*, 2014, 9(8): e103806
- [17] 杨帆, 朱文学. 油莎豆研究现状及展望. *粮食与油脂*, 2020, 33(7): 4-6  
Yang F, Zhu W X. Research status and prospect of *Cyperus esculentus*. *Cereals and Oils*, 2020, 33(7): 4-6
- [18] 宋玉浩, 史伟玲, 张娇, 丁振宇, 彭洪娟, 蒋春燕, 马秋芹, 李芝静, 赵勇, 唐道彬, 张凯, 王季春, 刘勋. 马铃薯块茎淀粉组分高效检测体系的建立及应用. *园艺学报*, 2021, 48(3): 600-608  
Song Y H, Shi W L, Zhang J, Ding Z Y, Peng H X, Jiang C Y, Ma Q Q, Li Z J, Zhao Y, Tang D B, Zhang K, Wang J C, Liu X. Development and application of an efficient method for the amylose/ amylopectin ratio determination in Potato tubers. *Acta Horticulturae Sinica*, 2021, 48(3): 600-608
- [19] 崔鹏, 赵逸人, 姚志鹏, 庞林江, 陆国权. 低温对甘薯淀粉理化特性及代谢关键基因表达量的影响. *中国农业科学*, 2022, 55(19): 3831-3840  
Cui P, Zhao Y R, Yao Z P, Pang L J, Lu G Q. Starch physicochemical properties and expression levels of anabolism key genes in Sweetpotato under low temperature. *Scientia Agricultura Sinica*, 2022, 55(19): 3831-3840
- [20] 瞿萍梅, 程治英, 龙春林, 苏明华, 杨德. 生物柴油植物“油莎豆”的发展前景. *可再生能源*, 2008 (1):106-109  
Qu P M, Cheng Z Y, Long C L, Su M H, Yang D. Development potentials of chufa for biodiesel production. *Renewable Energy Resources*, 2008(1): 106-109
- [21] 闫军, 杜静, 李聪, 陈邦, 申烨华. 陕西靖边油莎豆主要成分分析. *中国油脂*, 2016, 41(3): 85-88  
Yan J, Du J, Li C, Chen B, Shen Y H. Main components analysis of *Cyperus esculentus* in Jingbian, Shaanxi. *China Oils Fats*, 2016, 41(3): 85-88
- [22] Maduka N, S Ire F. Tigernut plant and useful application of tigernut tubers (*Cyperus esculentus*)-A review. *Current Journal of Applied Science and Technology*, 2018, 29(3): 1-23
- [23] 唐胜德. 新兴油料作物油莎草栽培技术. *农村经济与科技*, 1996(1): 42-42  
Tang S D. Cultivation technology of emerging oil crops. *Agricultural Economics and Technology*, 1996(1): 42-42
- [24] 张学昆. 我国油莎豆产业研发进展报告. *中国农村科技*, 2019, 4: 67-69  
Zhang X K. Progress report on the research and development of China's oil bean industry. *Chin Rural Science and Technology*, 2019, 4: 67-69
- [25] Wang L Y, Jing M L, Ahmad N, Wang Y F, Wang Y J, Li J, Li X W, Liu W C, Wang N, Wang F W, Dong Y Y, Li H Y. Tracing key molecular regulators of lipid biosynthesis in tuber development of *Cyperus esculentus* using transcriptomics and lipidomics profiling. *Gene*, 2021, 12(10): 1492
- [26] Ji H Y, Liu D T, Yang Z L. High oil accumulation in tuber of yellow nutsedge compared to purple nutsedge is associated with more abundant expression of genes involved in fatty acid synthesis and triacylglycerol storage. *Biotechnol Biofuels*, 2021, 14: 54
- [27] Zhao X Q, Yi L X, Ren Y F, Li J, Ren W, Hou Z H, Su S F, Wang J G, Zhang Y Y, Dong Q, Yang X D, Cheng Y C, Lu Z Y. Chromosome-scale genome assembly of the yellow nutsedge (*Cyperus esculentus*). *Genome Biology and Evolution*, 2023, 15(3): evad027
- [28] Zou Z, Zheng Y J, Zhang Z T, Xiao Y H, Xie Z N, Chang L L, Zhang L, Zhao Y G. Molecular characterization of oleosin genes in *Cyperus esculentus*, a Cyperaceae plant producing oil in underground tubers. *Plant Cell Reports*, 2023, 42: 1791-1808
- [29] 魏红, 钟红舰, 汪红. 索氏抽提法测定粗脂肪含量的改进. *中国油脂*, 2004, 29(6): 52-54  
Wei H, Zhong H J, Wang H. Improvement on determination of crude oil by Soxhlet extraction, *China Oils Fats*, 2004, 29(6): 52-54
- [30] Chen K, Yin Y, Liu S, Guo Z, Zhang K, Liang Y, Zhang L, Zhao W, Chao H, Li M. Genome-wide identification and functional analysis of oleosin genes in *Brassica napus* L.. *BMC Plant Biology*, 2019, 19: 294
- [31] 文均. 甘蓝型油菜种子发育过程中油脂积累动态及关键基因的表达差异分析. 重庆: 西南大学, 2017  
Wen J. Oil dynamic accumulation and expression differences of key genes in developing seed in *Brassica napus* L. Chongqing: Southwest University, 2017
- [32] 韩妮莎, 丁硕, 郑月萍, 魏琳燕, 柯星星, 刘宏波, 刘娟, 郑志富. 植物甘油酯合成途径第一步酰化反应的研究进展. *中国油料作物学报*, 2022, 44(4): 699-711  
Han N S, Ding S, Zheng Y P, Wei L Y, Ke X X, Liu H B, Liu J, Zheng G F. Advance in studies on the initial step of the glycerolipid biosynthetic pathway in plants. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2022, 44(4): 699-711
- [33] Shimada T L, Hayashi M, Hara Nishimura I. Membrane dynamics and multiple functions of oil bodies in seeds and leaves. *Plant Physiology*, 2018, 176(1): 199-207
- [34] 徐赫, 潘丽娟, 陈明娜, 陈娜, 王通, 王冕, 禹山林, 梁成伟, 迟晓元. 花生油质蛋白基因的克隆与表达分析. *花生学报*, 2019, 48(3): 9-14

- Xu H, Pan L J, Chen M N, Chen N, Wang T, Wang M, Yu S L, Liang C W, Chi X Y. Cloning and expression analysis of oleosin genes in Peanut. *Journal of Peanut Science*, 2019, 48(3): 9-14
- [35] 倪双双, 杨瑞金, 张文斌, 赵伟, 华霄.乙醇水溶液提取玉米胚芽油的工艺优化. *农业工程学报*, 2016, 32(7): 283-289
- Ni S S, Yang R J, Zhang W B, Zhao W, Hua X. Process optimization for extraction of corn germ oil by aqueous ethanol. *Transactions of the CSAE*, 2016, 32(7): 283-289
- [36] Hu Z, Wang X, Zhan G, Liu G, Hua W, Wang H. Unusually large oilbodies are highly correlated with lower oil content in *Brassica napus*. *Plant Cell Reports*, 2009, 28: 541-549
- [37] Jia Y, Yao M, He X, Xiong X, Guan M, Liu Z, Guan C, Qian L. Transcriptome and regional association analyses reveal the effects of oleosin genes on the accumulation of oil content in *Brassica napus*. *Plants*, 2022, 11(22): 3140
- [38] Zou Z, Zhao Y, Zhang L. Genomic insights into lineage-specific evolution of the oleosin family in Euphorbiaceae. *BMC Genomics*, 2022, 23(1): 178
- [39] Liu W X, Liu H L, Qu L Q. Embryo-specific expression of soybean oleosin altered oil body morphogenesis and increased lipid content in transgenic rice seeds. *Theoretical and Applied Genetics*, 2013, 126: 2289-2297
- [40] Ojha R, Kaur S, Sinha K, Chawla K, Kaur S, Jadhav H, Kaur M, Bhunia R K. Characterization of oleosin genes from forage sorghum in *Arabidopsis* and yeast reveals their role in storage lipid stability. *Planta*, 2021, 254(5): 97
- [41] 王会伟, 朱世新, 张新友, 王艳, 杨铁钢, 张向歌, 王树峰, 李春鑫. 油莎豆基因组大小、倍性和系统发育分析. *河南农业科学*, 2023, 52(1): 34-41
- Wang H W, Zhu S X, Zhang X Y, Wang Y, Yang T G, Zhang X G, Wang S F, Li C X. Genome size, ploidy and phylogeny of *Cyperus esculentus* L. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2023, 52(1): 34-41
- [42] Clevenger J, Chu Y, Scheffler B, Ozias-Akins P. A developmental transcriptome map for allotetraploid *Arachis hypogaea*. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1446
- [43] Yang S, Miao L, He J, Zhang K, Li Y, Gai J. Dynamic transcriptome changes related to oil accumulation in developing soybean seeds. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(9): 2202
- [44] Cai Z, Cai Z, Huang J, Wang A, Ntambiyukuri A, Chen B, Zheng G, Li H, Huang Y, Zhan J. Transcriptomic analysis of tuberous root in two sweet potato varieties reveals the important genes and regulatory pathways in tuberous root development. *BMC Genomics*, 2022, 23(1): 473
- [45] Liu Y, Li Y, Liu Z, Wang L, Lin-Wang K, Zhu J, Bi Z, Sun C, Zhang J, Bai J. Integrative analysis of metabolome and transcriptome reveals a dynamic regulatory network of potato tuber pigmentation. *iScience*, 2023, 26(2): 105903
- [46] Zou Z, Zhao Y G, Zhang L. Genomic insights into lineage-specific evolution of the oleosin family in Euphorbiaceae. *BMC Genomics*, 2022, 23: 178