

翅果油树脂肪酸生物合成调控机制研究

李倩倩², 郭媛婷¹, 冯宇奇¹, 胡晓艳², 王兆山³, 张建国³, 张倩³, 杜淑辉^{1,*}

(1.山西农业大学林学院, 晋中 030800; 2.山西农业大学食品科学与工程学院, 晋中 030800; 3.中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091)

摘要:【目的】近年来,翅果油树作为一种新兴且我国北方特有的木本油料树种受到越来越多的关注,其种仁中油酸、亚油酸等不饱和脂肪酸含量高。目前影响翅果油树种仁油脂生物合成的关键基因、转录因子及其调控机制尚不清楚。因此,本研究对翅果油树种仁不同发育阶段的脂肪酸含量动态变化规律及其调控基因进行研究,不仅有助于深入理解翅果油树脂肪酸生物合成调控机制,也可为进一步开展遗传育种工作奠定坚实基础。【方法】以不同发育期的翅果油树种仁为研究对象,采用气相色谱-质谱法(GC-MS)和转录组学方法,解析翅果油树种仁脂肪酸含量动态变化规律及其分子调控机制,筛选出与翅果油树脂肪酸生物合成相关的关键酶基因及关键转录因子。【结果】发育末期翅果油树种仁不饱和脂肪酸含量占脂肪酸总量的90%以上,其中油酸和亚油酸含量高达56.03mg/g油(42.35%)和56.69mg/g油(42.85%)。转录组学分析表明有436个基因参与脂质代谢相关途径,其中有179个基因直接参与脂肪酸生物合成,有2735个基因参与碳水化合物代谢相关途径。结合脂肪酸含量动态变化规律及转录组学分析结果显示,5个*EmSAD*基因和3个*EmFAD2*基因的表达变化对翅果油树种仁油酸和亚油酸的合成和积累具有重要作用,发育中期可能是翅果油树油酸和亚油酸合成积累的关键阶段。加权基因共表达网络分析结果表明turquoise模块与油酸和亚油酸含量呈显著正相关,blue模块与油酸和亚油酸含量呈显著负相关。共表达网络分析结果表明转录因子*EmWRI1*是翅果油树脂肪酸生物合成的重要调控因子。对与*EmWRI1*(evm.TU.Chr04.576)表达量呈显著正相关的1个*EmFAD2*基因和2个*EmPDAT*基因的启动子进行克隆,从中鉴定出了*EmWRI1*特异结合的AW-BOX元件,这表明*WRI1*可能与这些顺式元件结合并调节其在翅果油树种仁脂肪酸生物合成过程中的表达。【结论】翅果油树的脂肪酸合成是一个涉及大量基因的复杂过程,其中包括直接参与脂肪酸合成的基因和参与脂质代谢的其他基因。转录因子*EmWRI1*可能是调控这一过程的关键因子,而特定的基因模块(如turquoise模块)与脂肪酸含量的正相关性可能指示了它们在脂肪酸合成中的潜在作用。

关键词:翅果油树; 油脂积累; 共表达网络分析; 转录因子*EmWRI1*

中图分类号: TS255.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-7488 () -0000-00

Research on the regulatory mechanism of fatty acid biosynthesis in *Elaeagnus mollis*

Li Qianqian¹, Guo Yuanting¹, Feng Yuqi¹, Hu Xiaoyan², Wang Zhaoshan³, Zhang Jianguo³, Zhang Qian³, Du Shuhui^{1,*}

(1. College of Forestry, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030800; 2. College of Food Science and Engineering, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030800; 3. Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091)

Abstract: 【Objective】In recent years, *Elaeagnus mollis*, as an emerging and unique woody oil tree species in northern China, has received more and more attention. Its kernels contain high levels of unsaturated fatty acids

山西省基础研究计划(自由探索类)(20210302124175)

第一作者简介: 李倩倩, 硕士学位, 主要研究方向: 功能油料树种品质形成。电话: 18324928327。E-mail: 2715164030@qq.com.

通讯作者简介: 杜淑辉, 博士学位, 副教授, 主要研究方向: 功能油料树种品质形成。电话: 15535495464。E-mail: agas231@163.com

such as oleic acid and linoleic acid. At present, the key genes, transcription factors and their regulatory mechanisms affecting the biosynthesis of kernel fatty acids in *Elaeagnus mollis* are still unclear. Therefore, this study studied the dynamic changes in fatty acid content and regulatory genes of the *Elaeagnus mollis* kernels at different developmental stages, which not only contributes to a comprehensive understanding of the regulatory mechanisms of fatty acid biosynthesis in *Elaeagnus mollis*, but also lays a solid foundation for further genetic breeding.【Method】In the present study, gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and transcriptomic analysis were conducted to quantify fatty acid content dynamic and the molecular regulatory mechanism of *Elaeagnus mollis* kernel at different developmental stages, and the key enzyme genes and transcription factors related to the fatty acid biosynthesis of *Elaeagnus mollis* were screened out.【Result】At the end of development, unsaturated fatty acids accounted for more than 90% of the total fatty acids, with oleic acid and linoleic acid reaching up to 56.03mg/g oil (42.35%) and 56.69mg/g oil (42.85%). Transcriptomic analysis revealed 436 genes related to lipid metabolism pathways, including 179 genes directly involved in fatty acid synthesis, and 2735 genes associated with carbohydrate metabolism pathways. Combined with the dynamic changes of fatty acid content and transcriptomic analysis, the expression of 5 *EmSAD* genes and 3 *EmFAD2* genes played an important role in the synthesis and accumulation of kernel oleic acid and linoleic acid in *Elaeagnus mollis* seeds, and the middle stage of development may be the key stage of the synthesis and accumulation of oleic acid and linoleic acid in *Elaeagnus mollis*. Weighted gene co-expression network analysis demonstrated a significant positive correlation between the turquoise module and oleic acid and linoleic acid content, and the blue module was negatively correlated with oleic acid and linoleic acid content. Co-expression network analysis indicated that *EmWRII* was a potential important regulator in the fatty acid biosynthesis of *Elaeagnus mollis*. The promoters of one *EmFAD2* gene and two *EmPDAT* genes that were significantly positively correlated with the expression of *EmWRII* (evm.TU.Chr04.576) were cloned, and the AW-BOX elements specifically bound to *EmWRII* were identified, suggesting that *WRII* may bind to these cis-elements and regulate their expression during kernel fatty acid biosynthesis in *Elaeagnus mollis*.【Conclusion】Fatty acid synthesis in *Elaeagnus mollis* is a complex process involving a large number of genes, including genes directly involved in fatty acid synthesis and other genes involved in lipid metabolism. The transcription factor *EmWRII* may be a key factor in regulating this process, while the positive correlation of specific gene modules (e.g., turquoise module) with fatty acid content may indicate their potential role in fatty acid synthesis.

Keywords: *Elaeagnus mollis*; lipid accumulation; co-expression network analysis; transcription factors *EmWRII*

翅果油树 (*Elaeagnus mollis*) 是胡颓子科 (Elaeagnaceae) 胡颓子属的落叶直立乔木或灌木, 其分布范围较窄, 仅天然分布于我国山西、陕西、河南等省 (Du *et al.*, 2020)。翅果油中不饱和脂肪酸含量可达 90% 以上, 其中油酸 (33.6%~51.83%) 和亚油酸 (32.96%~54.8%) 含量相对较高 (Kan *et al.*, 2017; Liang *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2019a)。亚油酸是人体必需不饱和脂肪酸, 人体不能自主合成, 只能从食物中摄取 (Ramaprasad *et al.*, 2006)。不饱和脂肪酸能够调节人体内脂肪酸的代谢, 清理血栓、降低血液粘稠度, 维持人体的低浓度血脂水平, 从而预防心血管疾病的发生 (Baker *et al.*, 2020)。近年来, 翅果油树作为一种新兴且我国北方特有的木本油料树种受到越来越多的关注, 但是目前国内外关于翅果油树脂肪酸合成调控机制的研究还未见报道。

高等植物中, 油脂是种子储藏能量的主要形式之一。作为油脂的重要组成部分, 脂肪酸的合成主要包括在质体中的从头合成以及内质网中的甘油三酯组装和油体生成 (Lin *et al.*, 2017)。此过程涉及脂肪酸脱氢酶、延伸酶、去饱和酶和羧化酶等关键酶的协同作用 (Unver *et al.*, 2017)。尽管不同植物中脂肪酸生物合成途径基本一致, 但在不同植物或组织中的调控机制却存在显著差异, 导致不同植物之间脂肪酸成分和

含量的差别 (Li *et al.*, 2021; Ma *et al.*, 2023; Niu *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2019b; Yuan *et al.*, 2022a)。例如, 油茶 (*Camellia oleifera*) 果仁中饱和脂肪酸含量超过 80%, 主要脂肪酸成分为棕榈酸 (7.79%)、硬脂酸 (2.49%)、油酸 (79.61%)、亚油酸 (10.93%) 和花生酸 (4.77%) (曾永明等, 2023)。油用牡丹 (*Paeonia suffruticosa*) 籽油中饱和脂肪酸含量可高达 90%, 主要脂肪酸成分为棕榈酸 (5.54%)、硬脂酸 (1.82%)、油酸 (22.44%)、亚油酸 (28.88%) 和亚麻酸 (40.86%) (史国安等, 2013)。另外, 大量研究发现 *ABI3* (*ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3*)、*FUS3* (*FUSCA3*)、*LEC1* (*LEAFY COTYLEDON 1*)、*WR11* (*WRINKLED1*) 等转录因子可调控脂肪酸合成基因的表达 (Kumar *et al.*, 2020)。过表达 *BnLEC1* 基因的油菜 (*Brassica napus*) 种子中油脂含量提高 7%~16%; 而抑制该基因表达后种子油脂含量下降了约 9%~12% (Elahi N *et al.*, 2016)。*AGL15* (*AGAMOUS-Like15*) 编码一种含有 MADS 结构域的转录因子, 在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 种子发育过程中调节 *LEC2*、*ABI3* 和 *FUS3* 等基因的表达, 进而调控脂肪酸合成 (Zheng *et al.*, 2009)。MYB、ABI、bZIP 和 Dof 家族成员为槭树 (*Acer miyabei*) 脂肪酸生物合成的潜在关键调控因子 (Ma *et al.*, 2023)。此外, *WR11-1*、*ABI5*、*NF-YA3* (*Nuclear Factor Y, subunit A3*) 和 *NF-YC2* (*Nuclear Factor Y, subunit C2*) 形成的转录复合体与激素信号途径共同调节油棕 (*Elaeis guineensis*) 中脂肪酸的合成 (Yeap *et al.*, 2017)。

目前翅果油树脂肪酸生物合成的调控机制仍不清楚。因此, 本研究拟在精准定量不同发育时期翅果油树种仁脂肪酸含量的基础上结合转录组学数据, 对翅果油树脂肪酸生物合成调控机制进行深入分析, 为提高翅果油的品质和产量提供理论指导, 并为遗传育种工作的开展奠定坚实基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

研究样品来源于山西省翼城县翅果油树省级自然保护区 (N 35°23'-35°52', E 111°34'-112°03'), 所有翅果油树均为实生苗, 于 2014 年育苗后移栽至保护区内。选取 3 棵生长健壮、无病虫害, 立地条件和长势基本一致的优树为采集目标。

从 2022 年 6 月初到 8 月中旬, 每 30 天采样一次, 共采集 3 次【记为 30、60 和 90 授粉后天数 (days after pollination, DAP)】。采样时在每棵树不同方位采集 100 个果实并混合, 去掉外果皮与种皮后等分成 9 份, 其中 6 份液氮速冻后于 -80℃超低温冰箱保存, 另外 3 份直接带回实验室用于脂肪酸含量检测。

1.2 实验方法

1.2.1 脂肪酸含量及种类测定 称取一定量翅果油树种仁粉末装入恒质量的滤纸包内, 放入索氏提取器中, 加入石油醚提取油脂, 水浴温度 45℃, 提取 6h, 取出纸包, 取下圆底烧瓶, 回收石油醚。使用旋转蒸发仪进一步去除回收溶剂, 得到翅果油树种仁油脂, 计算种仁含油率。参照 GB 5009.168-2016《食品安全国家标准-食品中脂肪酸的测定》测定翅果油树种仁中脂肪酸组分及含量。

1.2.2 RNA 提取及转录组学分析 按照杜淑辉的方法提取 RNA (Du *et al.*, 2016), cDNA 文库构建及转录组测序由武汉迈维代谢生物技术有限公司完成。

对原始测序数据进行质控和去杂处理后所获得的 clean reads 用于后续转录组分析。使用 diamond (Buchfink *et al.*, 2015) 软件将 unigene 与京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia

of Genes and Genomes, KEGG)、基因本体 (Gene Ontology, GO)、非冗余蛋白 (Non-Redundant Protein, NR)、通用蛋白质资源 (The Universal Protein Resource, UniProt)、真核生物蛋白相邻类的聚簇 (Clusters of orthologous groups for eukaryotic complete genomes, KOG) 数据库进行序列比对获得注释结果, 比对条件为 $Evalue\ 1e-5$, 利用 iTAK (2016) 软件对 unigene 中的转录因子进行鉴定。使用 feature Counts (Liao *et al.*, 2014) 软件对每个样本中 unigene 的表达量进行归一化处理, 并计算每百万个片段映射的转录本每千碱基片段数 (Fragments Per Kilobase of transcript per Million fragments mapped, FPKM)。利用 DESeq2 筛选差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) (Love *et al.*, 2014), 筛选条件为 $P\text{-adjust value}\leq 0.05$ 且 $|\log_2\text{Fold Change(FC)}|\geq 1$ 。利用迈维云平台 (<https://cloud.metware.cn/#/home>) 的 KEGG 富集分析工具进行差异表达基因的 KEGG 富集分析。

为验证转录组分析结果的准确性, 利用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 验证 10 个 unigene 在不同样本间的相对表达量变化情况。RNA 提取和 cDNA 合成分别采用多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒和反转录试剂盒。利用 Primer Premier 5.0 设计 qRT-PCR 引物。PCR 反应采用 10 μL 体系: 5 μL 2 $\times$ SG Green qPCR Mix, 0.2 μL 上游引物, 0.2 μL 下游引物, 2 μL cDNA 模板和 3.6 μL nuclease-free Water。PCR 程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3min, 之后 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30s, 共 40 个循环。引物信息见表 1, 目的基因的相对表达量分析采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法 (Schmittgen *et al.*, 2008), *actin* 为内参基因, 每个基因三次技术重复。

表 1 qRT-PCR 所用引物信息

Table. 1 Information on primers used for qRT-PCR

引物名称	上游碱基序列 (5'-3')	下游碱基序列 (5'-3')
Primer name	Upstream base sequence (5' -3')	Downstream base sequence (5' -3')
<i>actin</i>	CTTAGTGGCTGCCTGTCGAA	TGTCCCTTGGTGAATTGA
<i>EmBCCP</i>	GTTGCCACCTCCTGCTATGC	GATGGATGAGATGGTGTGCTTGC
<i>EmFABG</i>	GTCGCGCTTTCAAGTCTACTG	CCCAATCCTTCTCCAAGACGAATAG
<i>EmSAD</i>	TGCCAACCAAGAAGTCCAATATGTC	TGATGAGGAAGAAGATTGCTATGCC
<i>EmFAD2</i>	TGACCCAAACACCAGTTAGAACAC	CTTACATCCATCTCTTGCCTCATCC
<i>EmPDAT</i>	CATCCCTTGGCACACATGAACC	CGACGGAGAGACAGATAATTGCTTG
<i>EmPDCT</i>	CTTGCTCTGCCTCATTCAACTCTG	TGCCCGTTTGCCTGCTAATTC
<i>EmKASI</i>	ACTCGGTTTCGGTGTCAGATC	AACCAGACAGTAACGAAGGCAATC
<i>EmFAD3</i>	AACCCAAGAAAGCAGACCTAAGTAG	TGCTGGTCTACAATGGTTGCTATTCT
<i>EmDGAT</i>	GTCCTCACGCCGACTCAGATC	CAAGCCTCCCTATCACAGAATCATC
<i>EmPDH</i>	GCCGATTCTCTTACAAAGCCAAG	CTTCATGCCAACGCGACAG

1.2.3 加权基因共表达网络分析 (Weighted gene co-expression network analysis, WGCNA) 利用 R 软件中的 WGCNA (1.51) 包 (Vinutha *et al.*, 2017), 以 FPKM>1 的 6886 个 DEGs 构建加权基因共表达网络。基于加权相关性对其进行层级聚类分析, 以 $\text{powerEstimate}=18$, $\text{mergeCutHeight}=0.25$, $\text{minModuleSize}=50$ 的标准将其划分为不同的基因模块。然后计算五种脂肪酸 (棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸和 α -亚麻酸) 含量和模块之间的相关性。

1.2.4 共表达网络分析 使用皮尔逊 (Pearson) 相关性方法分别计算脂肪酸组分含量 (棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸和 α -亚麻酸) 与脂肪酸合成基因以及转录因子与脂肪酸合成基因的相关性 ($|R| \geq 0.8$ 和 $p \leq 0.05$), 将上述结果合并后利用 Cytoscape (3.10.0) 构建共表达网络 (Velasco *et al.*, 2002), 利用 Cytohubba 中的 MCC 算法确定在翅果油树脂肪酸生物合成中起关键调控作用的转录因子 (Chin *et al.*, 2014)。

2 结果与分析

2.1 翅果油树种仁脂肪酸含量

翅果油树种仁含油率随发育期延长持续上升 (30DAP: 25.79%; 60DAP: 42.44%; 90DAP: 45.83%)。在三个发育时期的翅果油树种仁样品中共检测到 17 种脂肪酸成分 (表 2), 种仁发育过程中脂肪酸总量可高达 132.29mg/g 油, 饱和脂肪酸含量为 11.60mg/g, 不饱和脂肪酸含量为 120.69mg/g, 饱和脂肪酸与不饱和脂肪酸比约为 8.77:91.23。随种仁发育期延长, 饱和脂肪酸含量逐渐降低, 不饱和脂肪酸含量则逐渐上升。5 种主要脂肪酸成分为棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸和 α -亚麻酸, 其中油酸和亚油酸含量最高。因此本研究重点关注油酸和亚油酸合成有关基因在翅果油树种仁不同发育期表达量的变化。

表 2 翅果油树不同发育阶段脂肪酸含量 (均值 $\pm$ 标准误差)
Table. 2 Fatty acid content at different developmental stages of *Elaeagnus mollis* (Mean $\pm$ SE)

脂质代谢物 Lipid metabolites	不同发育阶段 Different developmental stages		
	30DAP (mg/g oil)	60DAP (mg/g oil)	90DAP (mg/g oil)
C14:0 肉豆蔻酸 Myristic acid	0.21 $\pm$ 0.01a (0.34%)	0.08 $\pm$ 0.01b (0.08%)	0.09 $\pm$ 0.02b (0.07%)
C15:0 十五酸 Pentadecanoic acid	0.26 $\pm$ 0.00 (0.44%)	-	-
C15:1 十五烯酸 Pendedecenoic acid	0.07 $\pm$ 0.01 (0.11%)	-	-
C16:0 棕榈酸 Palmitic acid	11.57 $\pm$ 0.05a (19.01%)	7.21 $\pm$ 0.18c (7.11%)	8.08 $\pm$ 0.07b (6.11%)
C16:1 棕榈油酸 Palmitoleic acid	0.31 $\pm$ 0.05a (0.51%)	0.12 $\pm$ 0.01b (0.12%)	0.13 $\pm$ 0.01b (0.09%)
C17:0 十七酸 Heptadecanoic acid	0.29 $\pm$ 0.01a (0.48%)	-	0.06 $\pm$ 0.02b (0.05%)
C17:1 顺-10-十七碳烯酸 cis-10-heptacenoic acid	0.12 $\pm$ 0.01 (0.19%)	-	-
C18:0 硬脂酸 Stearic acid	2.76 $\pm$ 0.04b (4.53%)	2.61 $\pm$ 0.10b (2.58%)	3.07 $\pm$ 0.08a (2.32%)
C18:1 油酸 Oleic acid	11.17 $\pm$ 0.27c (18.36%)	42.72 $\pm$ 1.41b (42.10%)	56.03 $\pm$ 1.06a (42.35%)
C18:1 反油酸 Reflux oleic acid	1.34 $\pm$ 0.11b (2.20%)	1.49 $\pm$ 0.20b (1.47%)	2.34 $\pm$ 0.48a (1.77%)
C18:2 亚油酸 Linoleic acid	19.54 $\pm$ 0.14c (32.12%)	42.28 $\pm$ 1.21b (41.67%)	56.69 $\pm$ 1.60a (42.85%)
C18:3 α -亚麻酸 α -Linolenic acid	12.03 $\pm$ 0.72a (19.76%)	4.46 $\pm$ 0.23b (4.39%)	4.91 $\pm$ 0.45b (3.71%)
C20:0 花生酸 Arachidic acid	0.54 $\pm$ 0.00a (0.88%)	0.15 $\pm$ 0.02b (0.15%)	0.30 $\pm$ 0.22ab (0.22%)
C20:1 二十碳烯酸 Eicosacenoic acid	0.11 $\pm$ 0.01c (0.18%)	0.04 $\pm$ 0.00b (0.35%)	0.60 $\pm$ 0.10a (0.45%)
C20:3 顺式-11,14,17-二十碳三烯酸 cis-11,14,17-eicosatrienoic acid	0.13 $\pm$ 0.01 (0.21%)	-	-
C22:0 山嵛酸 Behenic acid	0.26 $\pm$ 0.01 (0.43%)	-	-
C24:0 木蜡酸 Lignoceric acid	0.15 $\pm$ 0.00 (0.24%)	-	-
饱和脂肪酸含量 Total saturated fatty acids	16.03 $\pm$ 0.08a (26.35%)	10.05 $\pm$ 0.28c (9.91%)	11.60 $\pm$ 0.29b (8.77%)
不饱和脂肪酸含量 Total unsaturated fatty acids	44.81 $\pm$ 0.87c (73.66%)	91.42 $\pm$ 2.86b (90.09%)	120.69 $\pm$ 2.94a (91.23%)
脂肪酸总量 Total fatty acid	60.84 $\pm$ 0.95c	101.48 $\pm$ 3.13b	132.29 $\pm$ 2.85a

不同小写字母表示同一脂质代谢物各发育阶段在 0.05 水平上差异显著; -代表未检测出该成分; 30DAP、60DAP、90DAP 代表授粉后天数。Different lowercase letters indicate significant differences at the 0.05 level in each developmental stage of the same lipid metabolite; - representing no detection of the component; and 30DAP, 60DAP, and 90DAP representing the number of days after pollination.

2.2 转录组学分析

对 603329238 条原始测序 reads 进行过滤, 得到高质量有效 reads 共 550945950 条 (表 3)。每个样本的整体测序错误率低于 0.03%, Q30 比率在 91.99%~95.47%之间, GC 含量高于 42%。对 3 个发育时期

的样品进行两两比较发现组内样品相关系数（ R^2 ）大于 0.90，组间样品相关系数（ R^2 ）小于 0.70，表明转录组测序结果可靠，可用于后续分析。

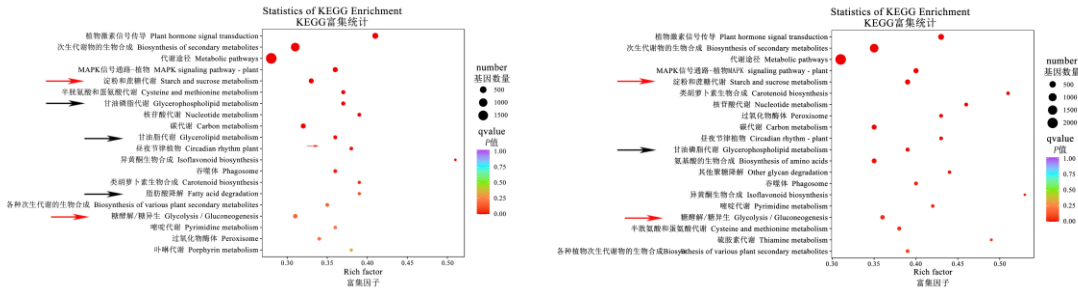
表 3 转录组测序数据质控
Table. 3 Quality control of transcriptome sequencing data

样品 Sample	原始序列 Number of original sequences	质控序列数 Number of QC sequences	净碱基容量 /G Net bases CAPACITY/G	整体测序错误率 /% Overall sequencing error rate/%	Q20/%	Q30/%	GC 含量 /% GC Content/%
30DAP-1	87429054	84664318	12.7	0.03	97.7	93.2	42.31
30DAP-2	74360632	71982824	10.8	0.03	97.89	93.67	42.38
30DAP-3	69348786	67483812	10.12	0.03	98.04	94.03	42.25
60DAP-1	56188000	48312166	7.25	0.02	98.68	94.95	43.08
60DAP-2	52019138	44556956	6.68	0.03	98.62	94.82	43.44
60DAP-3	75046268	70656290	10.6	0.03	96.94	91.99	43.39
90DAP-1	66530198	58049470	8.71	0.02	98.84	95.47	42.82
90DAP-2	60460818	52019386	7.8	0.03	98.68	94.98	42.91
90DAP-3	61946344	53220728	7.98	0.02	98.58	94.74	42.94

Q20 为质量值大于 20 的碱基所占比例；Q30 为质量值大于 30 的碱基所占比例；30DAP、60DAP、90DAP 代表授粉后天数，-1、-2、-3 代表 3 次生物学重复。Q20 is the proportion of bases with mass values greater than 20; Q30 is the proportion of bases with mass values greater than 30; 30DAP, 60DAP, and 90DAP represent the number of days after pollination, and -1, -2, and -3 represent 3 biological replicates.

将 unigene 与各数据库进一步比对，共获得 38066 个有功能注释信息的 unigene，其中包含 14685 个 DEGs。与 30DAP 相比，60DAP 和 90DAP 时期分别有 10304（4211 个上调，6093 个下调）和 12183（5089 个上调，7124 个下调）个 DEGs。

KEGG 富集分析结果表明，在排名前 20 的显著富集通路中，30DAP vs 60DAP 中富集到的与脂质代谢相关的途径有甘油酯代谢、甘油磷脂代谢和脂肪酸降解途径，而在 30DAP vs 90DAP 中仅有甘油磷脂代谢途径被富集。碳水化合物代谢相关途径可为脂肪酸合成提供能量和底物（Yuan *et al.*, 2022b），与碳水化合物代谢途径中糖酵解/糖异生与淀粉和蔗糖代谢在两个比较中均被富集，而 60DAP vs 90DAP 中肌醇磷酸代谢途径也被富集（图 1）。



黑色箭头表示脂质代谢，红色箭头表示碳水化合物代谢。The black arrow indicates lipid metabolism, and the red arrow indicates.

图 1 KEGG 富集分析结果。A: 30DAP vs 60DAP; B: 30DAP vs 90DAP。

Fig. 1 KEGG enrichment analysis results. A: 30DAP vs 60DAP; B: 30DAP vs 90DAP.

2.3 脂肪酸合成相关基因的鉴定

根据转录组数据的功能注释结果，从中发现与脂质代谢和碳水化合物代谢有关的 unigene 分别有 436 和 2735 个，其中鉴定出 179 个 unigene 直接参与脂肪酸的生物合成，128 个 unigene 被定义为 DEGs。这些 DEGs 中，有 60 个与脂肪酸从头合成相关，52 个与三酰甘油组装相关，16 个与油体形成相关。有 5 个 DEGs 编码硬脂酰-ACP 去饱和酶（stearoyl-ACP desaturase, SAD）基因，其中，evm.TU.Chr06.1036 在 30DAP 时表达量最高，evm.TU.Chr02.3142 的表达量在三个时期均处于较低水平，evm.TU.Chr03.2220、evm.TU.Chr02.2138 和 evm.TU.Chr10.89 的表达量在 60DA

P 时达到高峰。3 个 DEGs 编码油酸去饱和酶 (oleate desaturase, FAD2) 基因, 其中 evm.TU.Chr04.991 的表达量在 60DAP 时高达 2013.78, evm.TU.Chr02.4621 的表达量在 90DAP 时达到最高, evm.TU.Chr09.2569 基因的表达量在三个发育阶段均较低。

2.4 qRT-PCR 验证

根据转录组注释结果筛选出的 128 个与脂肪酸生物合成相关的 DEGs, 从中随机挑选 10 个进行 qRT-PCR 验证。结果表明, 所选差异基因的 qRT-PCR 结果与转录组分析结果一致, 相关性高 (图 2), 说明本研究中转录组测序的数据准确可靠, 可用于功能基因的鉴定和挖掘。

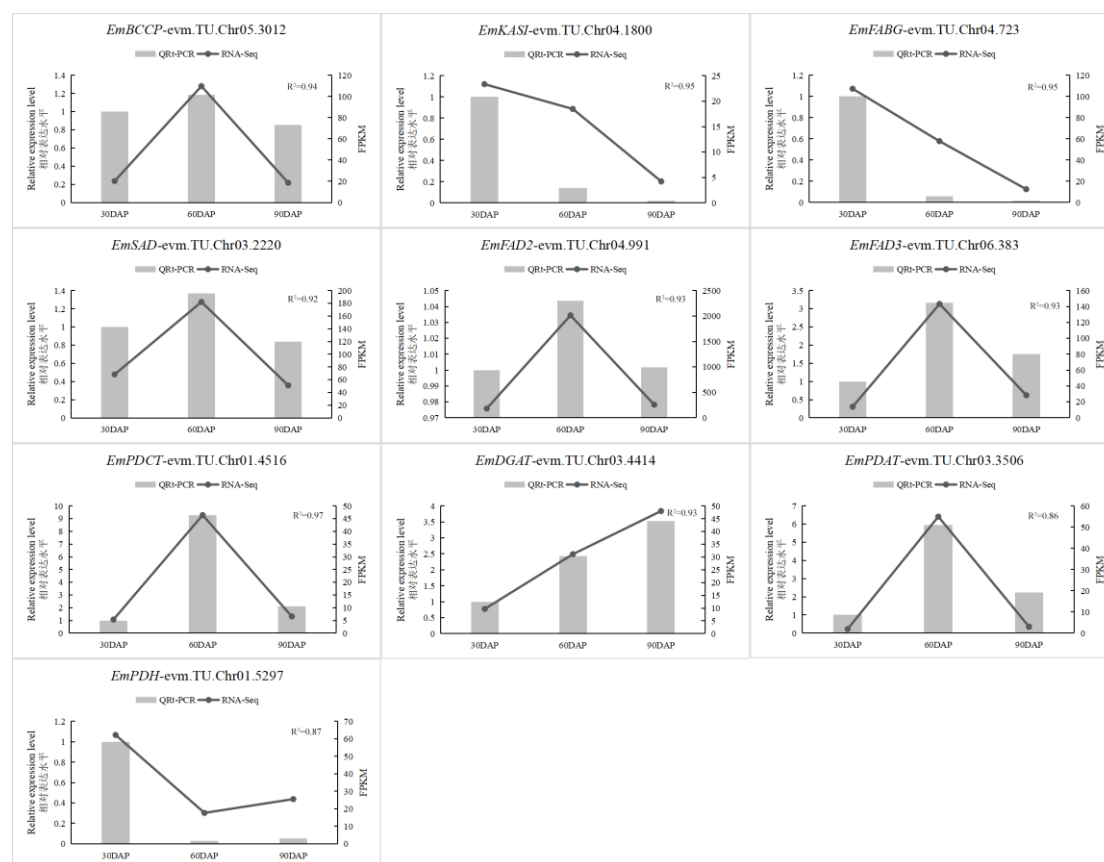


图 2 差异基因在种仁不同发育阶段中基因表达水平

Fig.2 Gene expression levels of differential genes in different developmental stages of seed kernels

2.5 WGCNA 分析

在翅果油树种仁的脂肪酸分析中, 共测到 17 种不同的脂肪酸成分。由于棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸和 α -亚麻酸五种主要脂肪酸含量较高且对整体组成影响显著, 因此我们重点对这些关键成分进行 WGCNA 分析。WGCNA 分析共鉴定出 6 个共表达基因模块, 这些模块与五种脂肪酸含量的相关性分析结果如图 3 所示。turquoise 模块与硬脂酸、油酸和亚油酸含量显著正相关, blue 模块与棕榈酸和 α -亚麻酸含量极显著正相关。turquoise 模块中 DEGs 的 KEGG 富集分析结果表明与脂质代谢相关的通路主要包括脂肪酸降解、甘油酯代谢和甘油磷脂代谢等, 与碳水化合物代谢有关的通路主要包括糖酵解/糖异生、淀粉和蔗糖代谢和氨基糖和核苷酸糖代谢等。

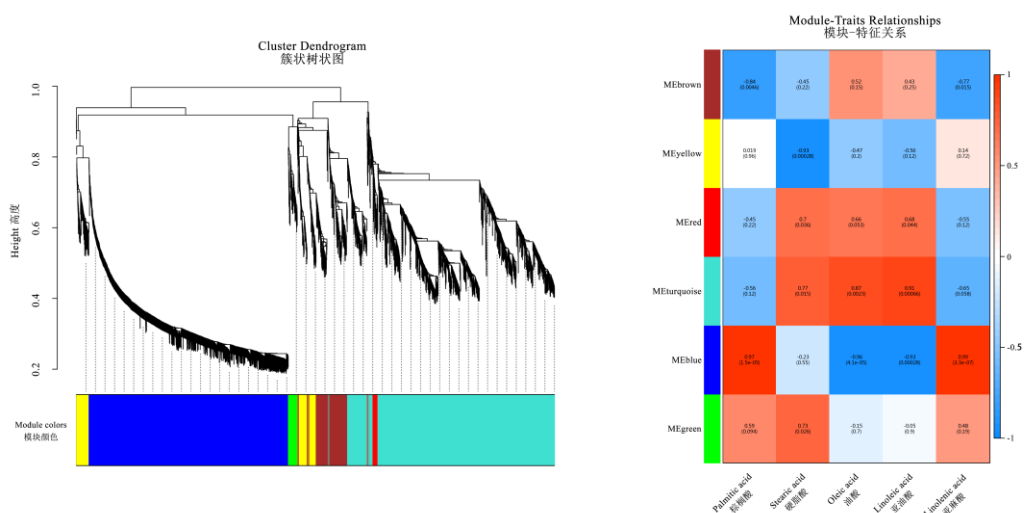


图3 WGCN

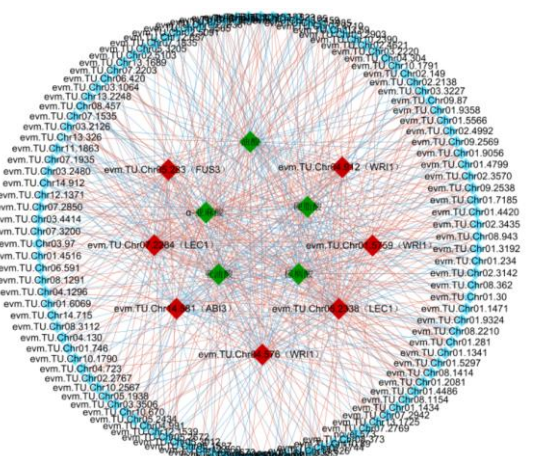
A 分析结果。A：基因聚类树及模块划分；B：模块与性状相关性热图。

Fig.3 WGCNA analysis result. A: Gene clustering tree and module division. B: Heatmap of the correlation between modules and traits.

2.6 共表达分析

前期大量研究表明转录因子 *WR11*、*LEC1*、*ABI3* 和 *FUS3* 在脂肪酸合成过程中发挥关键调控作用 (Kumar *et al.*, 2020)。在所有 DEGs 中共鉴定到 3 个 *EmWR11* (evm.TU.Chr01.5759、evm.TU.Chr04.576 和 evm.TU.Chr04.912)、2 个 *EmLEC1* (evm.TU.Chr05.2338 和 evm.TU.Chr07.2284)、1 个 *EmABI3* (evm.TU.Chr14.581) 和 1 个 *EmFUS3* (evm.TU.Chr05.283) 基因。相关性分析结果表明 *EmWR11* (evm.TU.Chr04.576) 与 1 个 *EmFAD2* 基因和 2 个磷脂：二酰基甘油酰基转移酶 (phospholipid: diacylglycerol acyltransferase, *EmPDAT*) 基因等显著正相关, *EmABI3* (evm.TU.Chr14.581) 与 1 个 *EmSAD* 基因和 1 个 *EmFAD2* 基因等显著正相关。 *EmPDAT* (evm.TU.Chr01.2081) 与棕榈酸和 α -亚麻酸含量显著正相关, 油酸蛋白 (evm.TU.Chr05.1587) 仅与亚油酸含量显著正相关。

将上述相关性分析结果整合后构建的共表达网络图如图 4 所示。利用 Cytoscape 中的 MCC 方法明确在翅果油树脂肪酸合成中发挥重要调控作用的转录因子。结果表明 *EmLEC1* 在翅果油树脂肪酸合成中起重要调控作用, 但是 *EmLEC1* 在种仁不同发育阶段的表达量太低 (基因 evm.TU.Chr05.2338 和 evm.TU.Chr07.2284 在 30DAP 时期表达量分别为 3.29 和 8.24, 在 60DAP 和 90DAP 时期表达量均为 0), 因此确定排名紧随 *EmLEC1* 的 *EmWR11* 为关键转录因子 (表 4)。



红线--正相关; 蓝线--负相关; 蓝色--脂肪酸合成基因; 红色--转录因子; 绿色--脂肪酸组分。Red line – positive correlation; Blue line – negative correlation; Blue - fatty acid synthesis gene; Red - transcription factor; Green - fatty acid component.

图 4 共表达网络分析图
Fig.4 diagram of the co-expression network
表 4 使用 CytoHubba 获得的 MCC 结果

Table 4 The MCC result obtained with CytoHubba

Ran 排名	Name 名称	Score 得分	相对表达量 FPKM value		
			30 DAP	60 DAP	90 DAP
1	LEC1/evm.TU.Chr05.2338	146	3.286333	0.010033	0
2	LEC1/evm.TU.Chr07.2284	138	8.2438	0	0
3	WRI1/evm.TU.Chr04.576	130	38.85083	14.05517	0.101967
4	α -亚麻酸 α -linolenic acid	126			
5	棕榈酸 Palmitic acid	114			
6	油酸 Oleic acid	112			
7	亚油酸 Linoleic acid	111			
8	ABI3/evm.TU.Chr14.581	50	4.0899	66.8941	40.95963
9	WRI1/evm.TU.Chr01.5759	40	39.10797	57.48603	2.6193
10	硬脂酸 Stearic acid	35			

3 讨论

本研究发现翅果油脂肪酸含量随种仁发育逐渐增加,发育末期达到 132.29mg/g 油,其中油酸和亚油酸的含量最高。Wu 等 (2020b) 、Liang 等 (2015)、Kan 等 (2017) 和 Wang 等 (2019a) 等同样发现翅果油中油酸和亚油酸为主要脂肪酸成分,但是检测结果与本研究存在差异,可能与采集样品的地理来源、气候、土壤成分和提取及检测方法等因素有关 (Alasalvar *et al.*, 2010; Seyhan *et al.*, 2007)。与传统草本油料作物与其他木本油料作物相比 (表 5),翅果油中油酸和亚油酸的含量更为均衡。但是与油用牡丹、大豆 (*Glycine max*) 和核桃 (*Juglans regia*) 相比,翅果油中 α -亚麻酸的含量较低 (3.71%)。人类日常饮食中 ω -6 脂肪酸 (如亚油酸) 与 ω -3 脂肪酸 (如 α -亚麻酸) 的最优比例为小于 5 (Joint, 1994),目前翅果油中比例约为 11.57:1,因此了解翅果油树中脂肪酸合成调控机制,对于利用技术手段改良脂肪酸成分并进一步开发为高附加值功能食品有十分重要的意义。

表 5 翅果油与其他油料作物中脂肪酸含量 (mg/g)
Table 5 Fatty acid content in *Elaeagnus mollis* and other oil crops (mg/g)

品种 Variety	油酸 Oleic acid	亚油酸 Linoleic acid	α -亚麻酸 α -linolenic acid	不饱和脂肪酸 U nsaturated fatty acid	总脂肪酸 Total fatty acids
翅果油	56.03±1.06 (42.35%)	56.69±1.60 (42.85%)	4.91±0.45 (3.71%)	120.69±2.94 (91.23%)	132.29±2.85
文冠果 (Wu <i>et al.</i> , 2020b)	210.88±2.14 (26.49%)	276.84±4.18 (34.78%)	9.81±0.10 (1.23%)	693.31±12.37 (87.10%)	795.98±15.11
油用牡丹 (Wu <i>et al.</i> , 2020b)	192.61±1.81 (24.50%)	150.61±2.30 (19.16%)	291.10±4.53 (37.04%)	694.73±10.11 (88.38%)	786.02±11.23
长柄扁桃 (Wu <i>et al.</i> , 2020b)	461.14±4.26 (60.13%)	205.89±2.35 (26.86%)	21.50±0.59 (2.80%)	715.98±9.10 (93.38%)	766.80±12.20
油橄榄 (邱国玉等, 2024)	105.00±0.10 (72.41%)	11.90±0.2 (8.21%)	1.16±0.40 (0.80%)	120.73±0.10 (83.24%)	145.00±0.30
芝麻油 (金春爱等, 2022)	246.00±0.00 (33.20%)	399.00±1.1 (53.85%)	1.85±0.00 (0.25%)	648.00±1.50 (87.45%)	741.00±1.80
大豆油 (金春爱等, 2022)	130.00±0.00 (16.62%)	473.0±0.80 (60.49)	79.30±0.10 (10.14%)	68.30±2.10 (87.34%)	782.00±2.20
核桃 (金春爱等, 2022)	53.20±0.00 (7.69%)	514.00±1.50 (74.28%)	109.00±0.20 (15.75%)	677.20±1.90 (97.86%)	692.00±2.10
玉米胚芽油 (金春爱等, 2022)	111.00±0.00 (22.75%)	315.00±0.70 (64.55%)	2.38±0.10 (0.49%)	42.90±1.10 (87.91%)	488.00±1.40

碳水化合物代谢相关途径可为脂肪酸合成提供能量和含碳底物,因此参与碳水化合物代谢途径基因表达量的变化会对脂肪酸含量产生影响(Yuan *et al.*, 2022b)。例如,拟南芥 *pgm-1* 突变体种子中油脂含量与野生型相比减少了 40%(Periappuram *et al.*, 2000),沉默编码 $\beta 1$ 亚基基因的表达则导致质体丙酮酸激酶活性降低和种子油含量减少 60%(Andre *et al.*, 2007)。脂肪酸生物合成所需的碳和能量主要由三羧酸循环、糖酵解和磷酸戊糖途径提供(Li *et al.*, 2021; Rawsthorne, 2002; Wang *et al.*, 2019b)。糖酵解对于拟南芥种子和其他一些油料作物的油脂生产也具有重要的作用(Andre *et al.*, 2007)。本研究发现三羧酸循环、糖酵解/糖异生和磷酸戊糖途径在差异基因 KEGG 分析中同时富集。因此,翅果油中脂肪酸含量变化可能与上述碳水化合物代谢途径密切相关,重组的碳源和能量供应保证了种子发育过程中脂肪酸的快速合成与积累。

直接参与脂肪酸合成的基因表达量变化对脂肪酸含量和成分具有重要影响。油茶籽粒中编码乙酰辅酶 A 羧化酶基因表达量的增加可以促进油脂的合成(陈俊杰等, 2016)。油棕中过表达长链酰基辅酶 A9 合成酶基因能够降低胚状体中棕榈酸、硬脂酸和油酸含量(Wang *et al.*, 2021)。异源过表达酰基-ACP 硫酯酶 B3 或异源过表达酰基-ACP 硫酯酶 B4 基因可提高棉花(*Gossypium hirsutum*)种子的棕榈酸含量(Liu *et al.*, 2022)。作为直接参与油酸和亚油酸合成的关键酶, SAD 和 FAD2 分别催化硬脂酸和油酸的去饱和,并在调控饱和和不饱和脂肪酸含量中发挥重要作用(McKeon *et al.*, 1982; Tiwari *et al.*, 2016)。过表达芝麻(*Sesamum indicum*)和文冠果(*Xanthoceras sorbifolium*) SAD 基因的拟南芥中不饱和脂肪酸和油酸含量上升,硬脂酸含量降低(Zhao *et al.*, 2015; 周璐等, 2019),油茶茶籽中 SAD 基因表达量上调同样导致油酸积累(郭钰束等, 2020b)。降低玉米(*Zea mays*)、油菜和大豆中 FAD2 基因的表达可显著提高油酸含量(Patel *et al.*, 2004; Schwartzbeck *et al.*, 2001)。通过抑制棉花 SAD 基因表达,可使硬脂酸含量上升到 40%,同时棉籽油中棕榈酸、油酸和亚油酸含量减少(Liu *et al.*, 2002)。HaFAD2-1 基因在高油酸与低油酸向日葵(*Helianthus annuus*)种子中表达差异十分显著,且其表达量与油酸含量呈负相关,与亚油酸含量呈正相关(周菲等, 2023)。在翅果油树种仁发育过程中, EmSAD 和 EmFAD2 基因的表达量在 30DAP 时较低,在 60DAP 时迅速上升,90DAP 时又略微下降,因此 60DAP 时期可能是翅果油树油酸和亚油酸合成积累的关键阶段。同时亚油酸去饱和酶(linoleate desaturase, FAD3)基因的表达量在种子发育过程中一直维持在较低水平,导致 α -亚麻酸的含量较低且亚油酸能够在种子中积累。亚油酸含量的上升通过反馈调节降低了 EmFAD2 基因的表达水平,油酸含量也能够维持在较高水平。本研究,受功能冗余作用的影响,5 个 EmSAD 基因和 3 个 EmFAD2 基因的表达变化趋势并不一致,其中 EmSAD/evm.TU.Chr10.89、EmFAD2/evm.TU.Chr02.4621 和 EmFAD2/evm.TU.Chr04.991 的表达水平是其他基因的 20-2000 倍,暗示了它们在翅果油树油酸和亚油酸脱氢过程中可能具有更重要的作用。植物中的某些基因在特定的基因家族中扮演着重要角色,并且它们的表达水平显著高于其他旁系同源基因(Guo *et al.*, 2020a; Xiong *et al.*, 2023; Zhao *et al.*, 2023)。

共表达网络分析结果表明, EmWRI1 为调控翅果油树脂肪酸合成的关键转录因子。在拟南芥胚胎发育过程中, AtWRI1 基因可调节糖酵解和植物油脂合成相关基因的表达,过表达 AtWRI1 基因还可提高 FAD2 和 FAD3 基因的表达水平(吴端等, 2020a)。WRI1 基因参与并调控核桃种仁脂质生物合成和多不饱和脂肪酸代谢相关基因的表达(Chen *et al.*, 2021)。油菜中过表达 BnWRI1 株系种子中油脂含量与野生型油菜相比提升 18%~38%(Li *et al.*, 2015),种子质量也明显提高(Wu *et al.*, 2014)。WRI1 属于 AP2/ERF 转录因子家族,是植物中的一大类转录因子,在植物基因组中的数量通常超过 100 个(Feng *et al.*, 2020)。该

家族的成员在许多生理生化过程中起着重要的调节作用,如植物形态发生、激素信号转导和代谢物调节等 (Feng *et al.*, 2020; Riechmann *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2022)。本研究中, *EmWRII* (evm.TU.Chr04.576) 与 1 个 *EmFAD2* 基因和 2 个 *EmPDAT* 基因的表达量等呈显著正相关。我们成功克隆了这 3 个基因的启动子,并在其中鉴定出了 *EmWRII* 特异结合的 AW-BOX 元件 (CnTnG (n) 7CG/CG (n) 7CnAnG), 这表明 *EmWRII* 可能与这些顺式元件结合,并调节其在翅果油树种仁脂肪酸生物合成过程中的表达。*WRII* 直接与 AW-box 或 15bp 元件 (CAAAAG (T/G) AGG (G/A) AGTT) 结合,该元件在基因的近端上游区域中保守 (Baud *et al.*, 2009; To *et al.*, 2012)。因此,我们推测在三个时期均有较高表达量的 *EmWRII* 基因可能参与了翅果油树种仁中脂肪酸合成,未来将通过多种方法验证我们的推测。

4 结论

随翅果油树种仁发育,不饱和脂肪酸含量持续上升,发育末期占脂肪酸总量的 90%以上。油酸和亚油酸是主要的不饱和脂肪酸成分,分别占总量的 42.35%和 42.85%。转录组数据共注释出 38066 个 unigene,有 2735 个 unigene 与碳水化合物代谢途径有关,436 个 unigene 与脂质代谢相关,178 个 unigene 与脂肪酸生物合成相关。*EmSAD*/evm.TU.Chr10.89、*EmFAD2*/evm.TU.Chr02.4621 和 *EmFAD2*/evm.TU.Chr04.991 基因在翅果油树油酸和亚油酸脱氢过程中可能具有更重要的作用。共表达网络分析表明 *EmWRII* 为翅果油树脂肪酸生物合成的关键转录因子。*EmWRII*/evm.TU.Chr04.576 与 1 个 *EmFAD2* 基因和 2 个 *EmPDAT* 基因的表达量等呈显著正相关,并且可以与三个基因的启动子相结合,调节其在翅果油树种仁脂肪酸生物合成过程中的表达。本研究的开展不仅有助于深入理解翅果油树脂肪酸生物合成调控机制,也为进一步开展遗传育种工作奠定了坚实基础。

参 考 文 献

- 陈俊杰, 汤佳, 陈辉, 等. 2016. 油茶优良无性系‘闽 43’和‘闽 60’果实发育过程中油脂积累规律研究. 热带作物学报, 37(11): 2133-7.
- (Chen J J, Tang J, Chen H, *et al.* 2016. The variation of oil accumulation during fruit development in superior clones‘Min 43’and‘Min 60’of *Camellia oleifer*. Chinese Journal of Tropical Crops, 37(11): 2133-7. [in Chinese])
- 郭钰东, 王红, 周开兵, 等. 2020b. 越南油茶脂肪酸积累及相关基因表达动态分析. 森林与环境学报, 40(02): 203-10.
- (Guo Y, Wang H, Zhou K B, *et al.* 2020b. Dynamic changes of fatty acid accumulation and related gene expression in *Camellia vietnamensis*. Journal of Forest and Environment, 40(02): 203-10. [in Chinese])
- 金春爱, 王荣灿, 王馨翊, 等. 2022. 核桃油与常用植物油中 37 种脂肪酸和角鲨烯含量比较. 食品工业科技, 43(12): 261-7.
- (Jin C A, Wang R C, Wang X Y, *et al.* 2022. Comparison of 37 fatty acids and squalene in walnut oil and common vegetable oils. Science and Technology of Food Industry, 43(12): 261-7. [in Chinese])
- 邱国玉, 张鑫, 王小芳, 等. 2024. 5 种油橄榄果营养成分分析与品质综合评价. 中国油脂, 49(04): 145-52.
- (Qiu G Y, Zhang X, Wang X F, *et al.* 2024. Analysis and comprehensive evaluation of nutritional composition and quality of five kinds of *Olea europaea* L. fruits China Oils and Fats, 49(04): 145-52. [in Chinese])
- 史国安, 郭香凤, 金宝磊, 等. 2013. 牡丹籽油超临界 CO₂ 萃取工艺优化及抗氧化活性的研究. 中国粮油学报, 28(04): 47-50+107.
- (Shi G A, Guo X F, Jin B L, *et al.* 2013. Optimization of supercritical CO₂ extraction and analysis of antioxidation activity of peony seed oil. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 28(04): 47-50+107. [in Chinese])
- 吴端, 王力军, 杨仕梅, 等. 2020a. 植物种子 α -亚麻酸形成及调控机理研究进展. 植物遗传资源学报, 21(01): 49-62.

- (Wu D, Wang L J, Yang S M, *et al.* 2020a. Advances on formation and regulation mechanism of α -linolenic acid in seeds. Journal of Plant Genetic Resources, 21(01): 49-62. [in Chinese])
- 曾永明, 黄小芮, 栾洁, 等. 2023. 广西地区油茶籽营养成分研究. 轻工科技, 39(06): 27-30.
- (Zeng Y M, Huang X R, Luan J, *et al.* 2023. Study on the nutritional composition of *Camellia oleifera* seeds in Guangxi. Light Industry Science and Technology, 39(06): 27-30. [in Chinese])
- 周菲, 王文军, 马军, 等. 2023. 向日葵 *FAD2-1* 基因克隆与功能分析. 中国油料作物学报, 45(05): 954-64.
- (Zhou F, Wang W J, Ma J, *et al.* 2023. Cloning and functional analysis of *FAD2-1* gene in sunflower. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 45(05): 954-64. [in Chinese])
- 周璐, 刘盼, 黎冬华, 等. 2019. 芝麻硬脂酸脱饱和酶基因 *SiSAD* 的克隆及功能验证. 中国农业科学, 52(10): 1678-85.
- (Zhou R, Liu P, Li D H, *et al.* 2019. Cloning and functional characterization of Sesame *SiSAD* gene Scientia Agricultura Sinica, 52(10): 1678-85. [in Chinese])
- Alasalvar C, Pelvan E, Topal B. 2010. Effects of roasting on oil and fatty acid composition of Turkish hazelnut varieties (*Corylus avellana* L.). International journal of food sciences nutrition, 61(6): 630-42.
- Andre C, Froehlich J E, Moll M R, *et al.* 2007. A heteromeric plastidic pyruvate kinase complex involved in seed oil biosynthesis in *Arabidopsis*. The Plant cell, 19(6): 2006-22.
- Baker E J, Valenzuela C A, De Souza C O, *et al.* 2020. Comparative anti-inflammatory effects of plant-and marine-derived omega-3 fatty acids explored in an endothelial cell line. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 1865(6): 158662.
- Baud S, Wuillème S, To A, *et al.* 2009. Role of WRINKLED1 in the transcriptional regulation of glycolytic and fatty acid biosynthetic genes in *Arabidopsis*. The Plant Journal, 60(6): 933-47.
- Buchfink B, Xie C, Huson D H J N M. 2015. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. 12(1): 59-60.
- Chen D J, Luo X G, Yan L H, *et al.* 2021. Transcriptome analysis of unsaturated fatty acids biosynthesis shows essential genes in sprouting of *Acer truncatum* Bunge seeds. Food Bioscience, 41: 100739.
- Chin C-H, Chen S-H, Wu H-H, *et al.* 2014. cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. BMC systems biology, 8: 1-7.
- Du S H, Sang Y L, Liu X J, *et al.* 2016. Transcriptome profile analysis from different sex types of *Ginkgo biloba* L. Frontiers in plant science, 7: 871.
- Du S H, Ye Z Y, Hu X Y, *et al.* 2020. Phylogeographic investigation of *Elaeagnus mollis* revealed potential glacial refugia and allopatric divergence in central China. Plant Systematics Evolution, 306: 1-9.
- Elahi N, Duncan R W, C. S. 2016. Modification of oil and glucosinolate content in canola seeds with altered expression of *Brassica napus* LEAFY COTYLEDON1. Plant physiology and Biochemistry, 100: 52-63.
- Feng K, Hou X L, Xing G M, *et al.* 2020. Advances in AP2/ERF super-family transcription factors in plant. Critical reviews in biotechnology, 40(6): 750-76.
- Guo J, Wu Y, Wang G, *et al.* 2020a. Integrated analysis of the transcriptome and metabolome in young and mature leaves of *Ginkgo biloba* L. Industrial Crops Products, 143: 111906.
- Joint F. 1994. Fats and oils in human nutrition: report of a joint expert consultation. FAO Food and Nutrition Paper. FAO.
- Kan L N, Wang L, Ding Q Z, *et al.* 2017. Flash extraction and physicochemical characterization of oil from *Elaeagnus mollis* Diels seeds. Journal of Oleo Science, 66(4): 345-52.
- Kumar N, Chaudhary A, Singh D, *et al.* 2020. Transcriptional regulation of seed oil accumulation in *Arabidopsis thaliana*: role of transcription factors and chromatin remodelers. Journal of Plant Biochemistry Biotechnology, 29(4): 754-68.
- Li C Q, Hu L Z, Que B B, *et al.* 2021. Expression profiles of genes involved in fatty acid and lipid biosynthesis in developing seeds of *Paeonia ostii*. Genes Genomics, 43(8): 885-96.
- Li Q, Shao J, Tang S, *et al.* 2015. Wrinkled1 accelerates flowering and regulates lipid homeostasis between oil accumulation and membrane lipid anabolism in *Brassica napus*. Frontiers in plant science, 6: 1015.
- Liang S H, Yang R N, Dong C W, *et al.* 2015. Physicochemical properties and fatty acid profiles of *Elaeagnus mollis* Diels nut oils. Journal of oleo science, 64(12): 1267-72.
- Liao Y, Smyth G K, Shi W. 2014. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. Bioinformatics, 30(7): 923-30.
- Lin Z H, Tillement O, Blanchin M-G, *et al.* 2017. The design and fabrication of beta sensor system for in situ diffusion tests in mudstone in France. Applied Radiation Isotopes, 125: 134-8.

- Liu B, Sun Y, Wang X, *et al.* 2022. Identification and Functional Characterization of Acyl-ACP Thioesterases B (GhFatBs) Responsible for Palmitic Acid Accumulation in Cotton Seeds. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21): 12805.
- Liu Q, Singh S P, Green A G. 2002. High-Stearic and High-Oleic Cottonseed Oils Produced by Hairpin RNA-Mediated Post-Transcriptional Gene Silencing. *Plant Physiology*, 129(4): 1732-43.
- Love M I, Huber W, Anders S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology*, 15(12): 1-21.
- Ma Q Y, Wang Y X, Li S S, *et al.* 2023. Ribosome footprint profiling enables elucidating the systemic regulation of fatty acid accumulation in *Acer truncatum*. *BMC biology*, 21(1): 1-14.
- McKeon T A, Stumpf P. 1982. Purification and characterization of the stearyl-acyl carrier protein desaturase and the acyl-acyl carrier protein thioesterase from maturing seeds of safflower. *Journal of Biological Chemistry*, 257(20): 12141-7.
- Niu J, An J, Wang L, *et al.* 2015. Transcriptomic analysis revealed the mechanism of oil dynamic accumulation during developing Siberian apricot (*Prunus sibirica* L.) seed kernels for the development of woody biodiesel. *Biotechnology for biofuels*, 8(1): 1-15.
- Patel M, Jung S, Moore K, *et al.* 2004. High-oleate peanut mutants result from a MITE insertion into the *FAD2* gene. *Theoretical Applied Genetics*, 108: 1492-502.
- Periappuram C, Steinhauer L, Barton D L, *et al.* 2000. The plastidic phosphoglucomutase from *Arabidopsis*. A reversible enzyme reaction with an important role in metabolic control. *Plant physiology*, 122(4): 1193-9.
- Ramaprasad T R, Srinivasan K, Baskaran V, *et al.* 2006. Spray-dried milk supplemented with α -linolenic acid or eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid decreases HMG Co A reductase activity and increases biliary secretion of lipids in rats. *Steroids*, 71(5): 409-15.
- Rawsthorne S. 2002. Carbon flux and fatty acid synthesis in plants. *Progress in lipid research*, 41(2): 182-96.
- Riechmann J L, Meyerowitz E M. 1998. The AP2/EREBP family of plant transcription factors. *Biological chemistry*, 379: 633-46.
- Schmittgen T D, Livak K J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols*, 3(6): 1101-8.
- Schwartzbeck J L, Jung S, Abbott A G, *et al.* 2001. Endoplasmic oleoyl-PC desaturase references the second double bond. *Phytochemistry*, 57(5): 643-52.
- Seyhan F, Ozay G, Saklar S, *et al.* 2007. Chemical changes of three native Turkish hazelnut varieties (*Corylus avellana* L.) during fruit development. *Food Chemistry*, 105(2): 590-6.
- Tiwari G J, Liu Q, Shreshtha P, *et al.* 2016. RNAi-mediated down-regulation of the expression of *OsFAD2-1*: effect on lipid accumulation and expression of lipid biosynthetic genes in the rice grain. *BMC plant biology*, 16(1): 1-13.
- To A, Joubès J, Barthole G, *et al.* 2012. WRINKLED transcription factors orchestrate tissue-specific regulation of fatty acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 24(12): 5007-23.
- Unver T, Wu Z, Sterck L, *et al.* 2017. Genome of wild olive and the evolution of oil biosynthesis. *Genome of wild olive and the evolution of oil biosynthesis*, 114(44): E9413-E22.
- Velasco L, Fernández-Martínez J, García-Ruiz R, *et al.* 2002. Genetic and environmental variation for tocopherol content and composition in sunflower commercial hybrids. *The Journal of Agricultural Science*, 139(4): 425-9.
- Vinutha T, Bansal N, Kumari K, *et al.* 2017. Comparative analysis of tocopherol biosynthesis genes and its transcriptional regulation in soybean seeds. *J Agric Food Chem*, 65(50): 11054-64.
- Wang C X, Duan Z H, Fan L P, *et al.* 2019a. Supercritical CO₂ fluid extraction of *Elaeagnus mollis* Diels seed oil and its antioxidant ability. *Molecules*, 24(5): 911.
- Wang S, Fan Y, Du S, *et al.* 2022. PtaERF194 inhibits plant growth and enhances drought tolerance in poplar. *Tree Physiology*, 42(8): 1678-92.
- Wang X J, Liang H Y, Guo D L, *et al.* 2019b. Integrated analysis of transcriptomic and proteomic data from tree peony (*P. ostii*) seeds reveals key developmental stages and candidate genes related to oil biosynthesis and fatty acid metabolism. *Horticulture Research*, 6.
- Wang Y F, Zhao J, Chen H, *et al.* 2021. Molecular cloning and characterization of long-chain acyl-CoA synthetase 9 from the mesocarp of African oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Scientia Horticulturae*, 276: 109751.
- Wu X L, Liu Z H, Hu Z H, *et al.* 2014. BnWRI1 coordinates fatty acid biosynthesis and photosynthesis pathways during oil accumulation in rapeseed. *Journal of integrative plant biology*, 56(6): 582-93.
- Wu Y, Yuan W Q, Han X, *et al.* 2020b. Integrated analysis of fatty acid, sterol and tocopherol components of seed oils obtained from four varieties of industrial and environmental protection crops. *Industrial Crops and Products*, 154: 112655.
- Xiong B, Li Q, Yao J, *et al.* 2023. Transcriptome and UPLC-MS/MS reveal mechanisms of amino acid biosynthesis in sweet orange 'Newhall' after different rootstocks grafting. *Frontiers in Plant Science*, 14: 1216826.

- Yeap W C, Lee F C, Shabari Shan D K, *et al.* 2017. WRI 1-1, ABI 5, NF-YA 3 and NF-YC 2 increase oil biosynthesis in coordination with hormonal signaling during fruit development in oil palm. *The Plant Journal*, 91(1): 97-113.
- Yuan J H, Jiang S J, Jian J B, *et al.* 2022a. Genomic basis of the giga-chromosomes and giga-genome of tree peony *Paeonia ostii*. *Nature Communications*, 13(1): 7328.
- Yuan Y C, Sun H, Wang X, *et al.* 2022b. Transcriptome of *Paeonia ostii* developing seeds revealed transcriptional factors, mRNAs and LncRNAs related to fatty acid synthesis and accumulation. *Industrial Crops Products*, 188: 115670.
- Zhao L, Zhang B, Huang H, *et al.* 2023. Metabolomic and transcriptomic analyses provide insights into metabolic networks during cashew fruit development and ripening. *Food chemistry*, 404: 134765.
- Zhao N, Zhang Y, Li Q, *et al.* 2015. Identification and expression of a stearyl-ACP desaturase gene responsible for oleic acid accumulation in *Xanthoceras sorbifolia* seeds. *Plant Physiology Biochemistry*, 87: 9-16.
- Zheng Y, Jiao C, Sun H, *et al.* 2016. iTAK: a program for genome-wide prediction and classification of plant transcription factors, transcriptional regulators, and protein kinases. *Molecular plant*, 9(12): 1667-70.
- Zheng Y, Ren N, Wang H, *et al.* 2009. Global identification of targets of the *Arabidopsis* MADS domain protein AGAMOUS-Like15. *The Plant Cell*, 21(9): 2563-77.