

核桃油酸脱氢酶基因 *JrFAD2* 的克隆及表达分析

敬丹, 骆翔, 陈利娜, 夏小丛, 杨选文, 李好先, 王企, 曹尚银*

(中国农业科学院郑州果树研究所, 郑州 450009)

摘要:【目的】测定并分析不同核桃品种核仁脂肪酸成分, 克隆核桃 *FAD2* 基因, 探究其在核桃不饱和脂肪酸合成中的作用。【方法】采用气相色谱-质谱联用的方法对 20 份核桃种质资源核仁的脂肪酸组分进行测定并对各组分间的相对含量进行计算及分析; 基于核桃全基因组注释信息, 通过实时荧光定量 PCR 技术对核桃油酸脱氢酶 *FAD2* 基因在高、低亚油酸品种间的表达模式进行分析; 通过 RT-PCR 技术扩增 *JrFAD2* 基因的 CDS 序列, 对其进行结构分析, 并利用农杆菌介导的瞬时表达系统选用带有 GFP 标签的 pBI121 载体构建 35S::*JrFAD2* 重组表达载体, 利用激光共聚焦显微镜观察核桃 *FAD2* 在本氏烟草叶表皮细胞中的表达。【结果】20 份核桃资源核仁脂肪酸主要组分为亚油酸、油酸、硬脂酸和棕榈酸, 其中不饱和脂肪酸高达 90%。实时荧光定量 PCR 结果显示, 高亚油酸品种及低亚油酸品种的油酸脱氢酶 *FAD2* 基因的表达模式具有差异。其中 *WALNUT_00011902-RA* 在 3 个高亚油酸品种的表达量均显著高于低亚油酸品种。选择 *WALNUT_00011902-RA* 作为目标基因进行克隆, 得到长度为 1 152 bp 的 *JrFAD2* 基因的 CDS 序列, 编码 383 个氨基酸, 含有 ω -6 脂肪酸去饱和酶的功能结构域, 属于 Membrane-FADS-like 超家族。系统进化分析发现, 核桃 *FAD2* 与大豆、油桐 *FAD2* 的亲缘关系较近。亚细胞定位结果显示, 核桃 *FAD2* 定位于细胞质。【结论】*JrFAD2* 基因可能在核桃不饱和脂肪酸合成过程中对亚油酸的合成及油酸和亚油酸的比例具有促进和调控作用。

关键词: 核桃; 脂肪酸; *FAD2*; 基因克隆; 亚细胞定位

中图分类号:S665.4

文献标志码:A

文章编号:1009-9980(2020)10-1475-12

Cloning and expression analysis of oleate dehydrogenase gene *JrFAD2* in walnut

JING Dan, LUO Xiang, CHEN Lina, XIA Xiaocong, YANG Xuanwen, LI Haoxian, WANG Qi, CAO Shangyin*

(Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009, Henan, China)

Abstract:【Objective】Walnut (*Juglans regia* L.) is an economically important nut tree in China with a long history of cultivation and a wide range of distribution. It is rich in fatty acids of which about 90% are unsaturated fatty acids which are essential nutrients for the people. The degree of unsaturated fatty acids is one of the important indexes to determine the quality of the oil in walnut for the characteristics of lowering cholesterol in the body of human. The research on the mechanism of unsaturated fatty acid formation in walnut has also become a hotspot. The composition of the fatty acids in walnut and key genes related to high unsaturated fatty acid synthesis are of great significance for studying the synthesis of unsaturated fatty acids and optimizing the distribution ratio of fatty acids. As a critical enzyme in the lipid biosynthetic pathway, the fatty acid desaturase 2 (*FAD2*) takes part in the desaturated conversion of oleic acid (18:1) to linoleic acid (18:2). Currently, the *FAD2* gene has been deeply studied in other plants, but it has not been reported in walnut. In this study, we cloned the walnut *FAD2* gene to explore its role in the synthesis of unsaturated fatty acids in walnut in order to provide a basis for the analysis of the synthesis mechanism of high unsaturated fatty acid in walnut.【Methods】The components and rela-

收稿日期:2019-09-05 接受日期:2020-06-02

基金项目:国家科技基础工作重点项目(2012FY110100);中国农业科学院科技创新工程专项(CAAS-ASTIP-2019-ZFRI)

作者简介:敬丹,女,在读硕士研究生,研究方向为果树遗传育种。Tel:18848966597, E-mail:18848966597@163.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel:13937192127, E-mail:s.y.cao@163.com

tive contents of fatty acids of the 20 walnut cultivars were determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). High linoleic acid varieties and low linoleic acid varieties were used as materials, and the expression patterns of the fatty acid desaturase 2 (*FAD2*) in high and low linoleic acid varieties were analyzed by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) based on the whole genome annotation information of walnut. The CDS sequence of the *JrFAD2* gene was amplified by RT-PCR and its structure was analyzed by NCBI. MEGA7 was employed to build the phylogenetic tree of the *FAD2*. The expression vector 35S::*JrFAD2* was constructed by pBI121 vector with GFP tag through *Agrobacterium*-mediated transient expression system, and the expression of the walnut *FAD2* in the epidermal cells of tobacco leaves was observed by using laser con-focal microscope.【Results】The fatty acids of the 20 walnut varieties were mainly composed of linoleic acid, oleic acid, stearic acid and palmitic acid, of which unsaturated fatty acids were up to 90%. The content of linoleic acid was the highest, its average value was 58.63%, and its coefficient of variation was the smallest, 10.4%. The variation range of oleic acid was 24.17%-48.27%, and the coefficient of variation was the largest, 21.18%. There were some differences in the expression levels of the *FAD2* in the high linoleic acid varieties and the low linoleic acid varieties, the expression level of the *WALNUT_00002632-RA* in high linoleic acid varieties ‘Daihui’ and ‘Zhengduan 15’ was significantly higher than those in the three low linoleic acid varieties ($p \leq 0.05$), but there was no significant difference between ‘Zha 343’ and low linoleic acid varieties. The difference of the *WALNUT_00027620-RA* between ‘Daihui’ and the low linoleic acid varieties was significant. The expression level of the *WALNUT_00011902-RA* in the three high linoleic acid varieties was all significantly higher than those of the low linoleic acid varieties. The *WALNUT_00011902-RA* was selected as the gene to clone, and the CDS sequence of the *JrFAD2* gene with a length of 1 152 bp was obtained, which codes for 383 amino acids, contains the functional domain of omega-6 fatty acid desaturase, and belongs to Membrane-FADS-like Super family. The *JrFAD2* in walnut had higher similarity with the *FAD2* in the other plants, and it was speculated that they had similar structure and function. Phylogenetic analysis showed that the walnut *JrFAD2* was closely related to the *Vernicia fordii FAD2* and the soybean *FAD2*. The results of subcellular localization showed that the walnut *FAD2* emitted fluorescence signal in the cytoplasm, which was presumed to be mainly located in the cytoplasm.【Conclusion】The fatty acids of walnut were mainly composed of linoleic acid, oleic acid, stearic acid and palmitic acid. The critical gene *JrFAD2* in walnut may promote and regulate the synthesis of linoleic acid and the ratio of oleic acid and linoleic acid during the synthesis of the unsaturated fatty acids.

Key words: Walnut; Fatty acids; *FAD2*; Gene cloning; Subcellular localization

脂肪酸是植物膜脂和种子贮藏脂肪的主要组分,是植物主要的能量来源^[1]。自然界中多种脂肪酸具有重要的生理作用,其中不饱和脂肪酸对维持生命体正常活动具有重要意义,是人体不可或缺的营养物质。它可分为单不饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸,研究表明,单不饱和脂肪酸人体内可自我合成,而部分多不饱和脂肪酸人体自身不能自行合成,需从富含多不饱和脂肪酸的食物中获得,其中主要来自于植物油^[2]。核桃(*Juglans regia L.*)为胡桃科胡桃属木本植物,是世界上重要的油料树种之一,与

油桐、油茶、乌柏并称我国四大木本油料树种^[3]。作为重要的木本油料树种,核桃因富含不饱和脂肪酸而被推荐为世界各地人类健康饮食的重要资源^[4]。随着人们生活水平的提升及核桃应用领域的不断扩大,人们对植物油脂要求日益提高,对核桃油的需求量也在逐年增加,作为决定油脂品质的重要指标且因其较好的食用价值、营养价值,核桃脂肪酸的不饱和程度受到了广大研究者的青睐。

植物中不饱和脂肪酸的合成是在复杂的多酶复合体催化条件下完成的,主要有初步合成和进一步

去饱和两个过程。首先是在质体中生成不同链长的饱和脂肪酸,如十八碳饱和脂肪酸-硬脂酸(18:0),硬脂酸在硬脂酰-ACP去饱和酶(Stearoyl-ACP desaturase, SAD)的催化作用下生成单不饱和脂肪酸-油酸(18:1),随后油酸在油酸脱氢酶(Oleate dehydrogenase, FAD2)的催化作用下生成多不饱和脂肪酸-亚油酸,此酶属于 ω -6脂肪酸去饱和酶,这是产生多不饱和脂肪酸的关键步骤^[5-7]。由此可见FAD2可能是调控亚油酸含量及单不饱和脂肪酸与多不饱和脂肪酸比例的关键因子。

目前,对脂肪酸代谢过程的研究已深入到分子水平,研究者利用基因工程技术从植物体中克隆与脂肪酸合成的相关基因,利用转基因技术验证基因功能,初步对脂肪酸代谢通路进行了研究。其中关于高等植物十八碳脂肪酸去饱和代谢过程中参与代谢相关酶及编码基因的研究最为深入。1994年Okuley等^[8]在拟南芥中发现编码油酸脱氢酶(FAD2)的重要基因*FAD2*,随后研究人员相继从油菜、花生、大豆、玉米等农作物以及橄榄、油桐等木本油料树种中克隆得到了*FAD2*基因,序列比对发现该基因在不同物种中具有高度同源性^[9]。Hernández^[10]在橄榄中克隆得到了*OepFAD2-1*和*OepFAD2-2*两个基因,结构分析发现这两个基因均含有组氨酸保守区结构、跨膜结构和C末端内质网保守结构。Salimonti等^[11]对这两个基因进一步分析发现,其对生长过程中胚的油酸及亚油酸含量具有一定影响。Xue等^[12]从紫苏中克隆出2个*FAD2*基因并对其进行了表达分析,发现在紫苏不同组织中这两个基因的表达量具有差异,其中种子中表达量最高,花和芽中也有表达,但低于种子。此外,利用转基因技术分析*FAD2*基因功能也在多种植物中得到了验证,Schwartzbeck等^[13]通过抑制*FAD2*的活性使玉米油的油酸含量从25%上升到64%。在甘蓝型油菜和大豆中对*FAD2*基因进行反义抑制,甘蓝型油菜及大豆的油酸含量提高至85%^[14]。在花生中对*FAD2*基因进行反义抑制,可使花生中油酸和亚油酸的比值提升^[15]。

以上研究表明,*FAD2*基因对调节植物油酸、亚油酸含量具有关键作用,但核桃中还未有相关报道。因此,对核桃的*FAD2*基因进行克隆并分析,对研究核桃不饱和脂肪酸具有重要意义。笔者以核仁为材料,对20份核桃种质资源的脂肪酸含量进行了

测定,同时在核桃中克隆出*JrFAD2*基因,通过生物信息学方法揭示其序列特征,并通过实时荧光定量PCR(Real-time fluorescent quantitative PCR, qRT-PCR)及亚细胞定位对其进行初步分析,旨在为研究核桃不饱和脂肪酸合成的分子机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料为生长健壮、均匀的7 a(年)生核桃,以株距2 m、行距4 m栽植于中国农业科学院郑州果树研究所干果课题组试验基地,采用常规栽培方法进行管理。

1.2 方法

1.2.1 20份核桃资源脂肪酸成分及含量的测定有以下步骤:(1)材料的获取。试验于2018—2019年进行,以‘扎343’‘薄丰’‘岱辉’等20份核桃资源为试验对象,取单株不同方位果实10个,取其核仁充分混匀后置于-80℃超低温冰箱保存。每个品种取3个不同单株,样品分开保存。每个生物学重复设3次技术重复。

(2)核桃油的提取。称取粉碎至米粒大小的烘干核桃仁5~10 g,放入离心管中,按照1:10的比例加入石油醚(沸程:30~60℃),40℃水浴条件下超声萃取30 min得到萃取液,50℃水浴条件下旋转蒸除除去石油醚,得核桃油备用^[16-17]。

(3)核桃脂肪的甲酯化及脂肪酸的测定。取0.05 g核桃油加入到试管中,加入2 mL 0.8 mol·L⁻¹的KOH-甲醇溶液,涡旋后70℃水浴20 min,冷却后加入2 mL 1 mol·L⁻¹的HCl-甲醇溶液,涡旋30 s后于70℃水浴加热20 min,待其冷却后再加入4 mL正己烷,涡旋1 min后离心,取上清液过0.22 μm有机相滤膜,上机测试。

仪器型号为安捷伦7980 B-5977 B,色谱柱为HP-5 MS;采用仪器程序,进样量1 μL,分流比20:1,进样口温度270℃,柱箱初始温度为130℃,升温速率15℃·min⁻¹,上升到280℃,保持5 min。传输线温度280℃。质谱条件为溶剂延迟4 min,scan模式,扫描范围为50~500 m/z。由于每种脂肪酸甲酯响应相似,通过数据库(NIST)检索比对定性,通过峰面积比确定各类脂肪酸所占百分比。利用SPSS(version 17.0)软件对测得的脂肪酸数据进行聚类分析(聚类方法:组间连接;聚类距离:Euclidean距

离)。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 采用多糖多酚植物总RNA提取试剂盒(TIANGEN)提取核仁总RNA, 使用TIANGEN公司的TIANscript RT Kit进行cDNA

第一链的合成,方法参照说明书进行。根据核桃参考基因组^[18]数据库中的油酸脱氢酶FAD2基因序列,使用Primer5.0设计引物,以核桃18S rRNA作为内参基因^[19](表1)。

表1 本研究中所用引物
Table 1 Primers used in this study

基因 Gene	引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	用途 Purpose
<i>Jr18S rRNA</i>	<i>Jr18S rRNA-F</i>	GGTCAATCTTCTCGTCCCTT	核桃内参引物
	<i>Jr18S rRNA-R</i>	TCGCATTCGCTACGTTCTT	Internal primer of walnut
<i>WALNUT_00011902-RA</i>	<i>W00011902-F</i>	TGAATCTGGCAGTCTGAAGC	荧光定量引物
	<i>W00011902-R</i>	AAACAAACATAGGAGAATGAGTGG	Fluorescent quantitative PCR primer
<i>WALNUT_00002632-RA</i>	<i>W00002632-F</i>	TCGTCAACAAGAGTGAAGAAC	荧光定量引物
	<i>W00002632-R</i>	GAGAATGAGCGGAAGAGGGAA	Fluorescent quantitative PCR primer
<i>WALNUT_00027620-RA</i>	<i>W00027620-F</i>	AAGCGAGTTCCCCACACAAAG	荧光定量引物
	<i>W00027620-R</i>	GGAAGAGAGAGGCTAGTGCGAG	Fluorescent quantitative PCR primer
<i>JrFAD2</i>	<i>JrFAD2-F</i>	ta <u>TCTAGA</u> ATGGGTGCCGGTGGCCGAAT	表达载体构建引物
	<i>JrFAD2-R</i>	gc <u>GGATC</u> CCTCACAGCTTGTGTTGTACC	Primer of expression vector construction

注:F表示上游引物,R表示下游引物,划线部分表示双酶切位点。

Note: F represents the upstream primer, R represents the reverse primer, and the underlined part represents double enzyme cutting sites.

以反转录生成的cDNA为模板,使用荧光定量PCR仪(Roche 480, SYBR Green I)进行实时荧光定量PCR。每一个PCR反应均设置3次重复。反应体系为:SYBR Green Real-time PCR Master Mix(2×)10 μL,上、下游引物各1 μL(10 μmol·L⁻¹),cDNA模板2 μL,加灭菌蒸馏水补至20 μL。反应程序为:95 °C 5 min;95 °C 10 s,59 °C 10 s,72 °C 10 s,45个循环。

相对表达量的计算采用2^{-ΔΔCt}法^[20]。利用SPSS(version17.0)软件进行方差分析。

1.2.3 目的片段的扩增与鉴定 结合荧光定量结果,选择*JrFAD2*(*WALNUT_00011902-RA*)进行克隆。PCR扩增采用KOD-Plus-Neo高保真聚合酶进行扩增。反应体系为:10×PCR buffer for KOD-Plus-Neo 5 μL,2 mmol·L⁻¹ dNTPs 5 μL,25 mmol·L⁻¹MgSO₄ 3 μL,KOD-Plus-Neo 1 μL,模板cDNA 2 μL,上、下游引物(10 mmol·L⁻¹)各1 μL,ddH₂O补至体积为50 μL。PCR反应程序为:94 °C 2 min;98 °C 15 s,58 °C 30 s,68 °C 1 min,34个循环;68 °C 7 min;4 °C保存。PCR产物用1.5%的琼脂糖进行检测,然后进行凝胶回收纯化(TIANGEN,琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒)。将回收产物连接到擎科的Pcloning007-T载体上,连接产物转化至大肠杆菌DH5α感受态中,挑取阳性克隆测序验证,测序委托河南尚亚生物技术有限公司完成。

1.2.4 基因序列及氨基酸序列分析 利用DNAMAN软件分析克隆所得基因的核苷酸序列及不同物种间同源基因的氨基酸序列;使用NCBI的Domains & Structures数据库进行CD-Search分析核桃FAD2的结构域;通过NCBI网站下载其他物种FAD2基因序列,用MEGA7.0本地软件邻接法构建系统进化树。

1.2.5 表达载体的构建及亚细胞定位 选用带有GFP标签的pBI121载体构建35S::*JrFAD2*重组表达载体,限制性酶切位点选用*Xba* I /*Bam* H I,双酶切位点用下划线标出(表1)。在核桃FAD2基因的ORF(Open reading frame)两端分别引入酶切位点*Xba* I (TCTAGA)与*Bam* H I (GGATCC),使用TAKARA的限制性内切酶进行双酶切后连接到表达载体pBI121上。

亚细胞定位以本氏烟草作为载体。将构建好的重组载体质粒转化至农杆菌GV3101(唯地)中,后将带有目的基因*JrFAD2*重组表达载体的农杆菌菌液,28 °C摇床培养至OD₆₀₀为0.6~0.8,4 000 r·min⁻¹离心10 min,倒掉废液,加入注射重悬液(10 mmol·L⁻¹MgCl₂,10 mmol·L⁻¹ MES,pH 5.6;高温高压灭菌后,加入200 μmol·L⁻¹乙酰丁香酮)重悬菌体至重悬后的OD₆₀₀为0.8左右,室温静置2~3 h,取培养好的健康的本氏烟草进行注射,同时以仅有pBI121-GFP空载体的农杆菌菌液接种本氏烟草作为对照。将注射

的烟草黑暗培养24 h,光照培养箱(温度24 °C;光照时间15 h,黑暗时间9 h)培养2~3 d后采用激光共聚焦显微镜在激发波长488 nm下观察烟草叶表皮细胞中荧光蛋白的表达和分布情况^[21]。

2 结果与分析

2.1 20份核桃资源核仁主要脂肪酸成分及相对含量

本试验20个核桃品种的主要脂肪酸组分及相对含量的测定结果见表2。不同核桃品种其主要脂肪酸组分均含有亚油酸、油酸、硬脂酸和棕榈酸4种主要脂肪酸,具有一定的稳定性特征。核桃脂肪酸

组分以亚油酸和油酸为主,二者均为不饱和脂肪酸,其中多不饱和脂肪酸-亚油酸相对含量最高,占总脂肪含量的50%以上,单不饱和脂肪酸-油酸相对含量次之,二者相对含量高达脂肪酸总量的90%。20个核桃品种中,棕榈酸的相对含量为4.22%~7.65%,平均值为5.65%,不同核桃品种间棕榈酸的变异系数为13.45%;亚油酸的相对含量为44.46%~64.75%,平均值58.64%,20份核桃资源中亚油酸的变异系数最小,为9.89%;油酸相对含量的变化范围为24.10%~46.86%,平均值为30.64%,在不同品种间的变异系数最大,为19.98%;硬脂酸的相对含量为3.51%~6.97%,平均为4.72%,在不同核桃品种中,其变异系

表2 不同核桃品种的脂肪酸组分及相对含量

Table 2 Fatty acids composition and relative content of different walnut varieties

%

序号 Order	品种 Variety	棕榈酸 Palmitic acid	亚油酸 Linoleic acid	油酸 Oleic acid	硬脂酸 Stearic acid
1	中短18号 Zhongduan 18	5.68±0.51	62.64±0.42	26.97±0.25	4.41±0.32
2	契可 Chico	6.11±1.17	61.25±0.79	27.61±0.61	4.73±0.58
3	中短16号 Zhongduan 16	5.01±0.75	60.65±0.40	27.50±0.40	6.60±0.36
4	中核15号 Zhonghe 15	6.34±0.98	57.68±0.53	30.00±0.69	5.73±0.48
5	温185 Wen 185	5.70±0.83	58.98±0.33	30.76±0.69	4.27±0.34
6	周口店1号 Zhoukoudian 1	5.43±0.74	64.75±0.41	25.42±0.41	4.12±0.33
7	哈特利 Hartley	5.86±1.57	55.21±1.35	32.99±1.77	5.28±1.10
8	清香 Qingxiang	7.65±1.00	57.59±0.79	30.00±0.84	4.45±0.59
9	中核短枝 Zhongheduanzhi	6.19±0.83	53.69±0.12	35.78±0.89	4.06±0.28
10	京861 Jing 861	5.58±0.75	56.42±0.25	33.48±0.64	4.28±0.17
11	高岭4号 Gaoling 4	4.70±0.66	44.46±0.82	46.86±1.26	3.68±0.22
12	中核丰 Zhonggefeng	5.97±1.05	45.71±0.78	43.26±1.82	4.77±0.38
13	宋房西 Songfangxi	6.04±1.05	62.78±1.42	24.10±0.56	6.97±0.73
14	岱辉 Daihui	5.65±0.96	64.56±1.15	24.60±0.66	4.91±0.69
15	扎343 Zha 343	5.44±0.76	64.62±0.77	25.89±0.38	3.51±1.36
16	新中核短枝 Xinzhongheduanzhi	5.17±0.72	57.26±0.43	32.54±0.50	4.87±0.23
17	薄丰 Baofeng	4.22±1.01	55.29±0.52	35.65±2.04	4.10±0.60
18	极早丰 Jizaofeng	6.13±0.88	63.71±1.21	26.22±0.53	3.61±0.56
19	郑短15号 Zhengduan 15	5.86±0.69	63.83±0.38	24.72±0.19	5.33±0.18
20	辽1 Liao 1	4.31±0.90	61.62±0.31	28.56±1.18	4.74±0.50
平均值 Average		5.65±0.76	58.64±5.80	30.64±6.12	4.72±0.91
变异系数 Variable coefficient		13.45	9.89	19.98	19.37

数仅次于油酸,为19.37%。

为进一步综合分析这20份核桃资源的脂肪酸种类及相对含量,利用MEGA7.0对其进行聚类分析,结果如图1。在距离系数为25及11时产生了较明显的分组,一共分为A、B、C 3组(图1)。其中A组包括‘岱辉’‘郑短15号’‘扎343’等10个核桃品种,B组包括‘哈特利’‘中核短枝’‘薄丰’等8个品

种,C组包括‘中核丰’及‘高岭4号’。对3组的各项脂肪酸数据进行综合比较发现,A组10份核桃品种的亚油酸平均含量高于B组,B组高于C组,而3组的油酸含量正好与之相反,此外,3组间的棕榈酸及硬脂酸含量未有明显差异(表3)。

2.2 核桃油酸脱氢酶*FAD2*基因的表达模式分析

从NCBI中下载其他植物*FAD2*保守序列并利

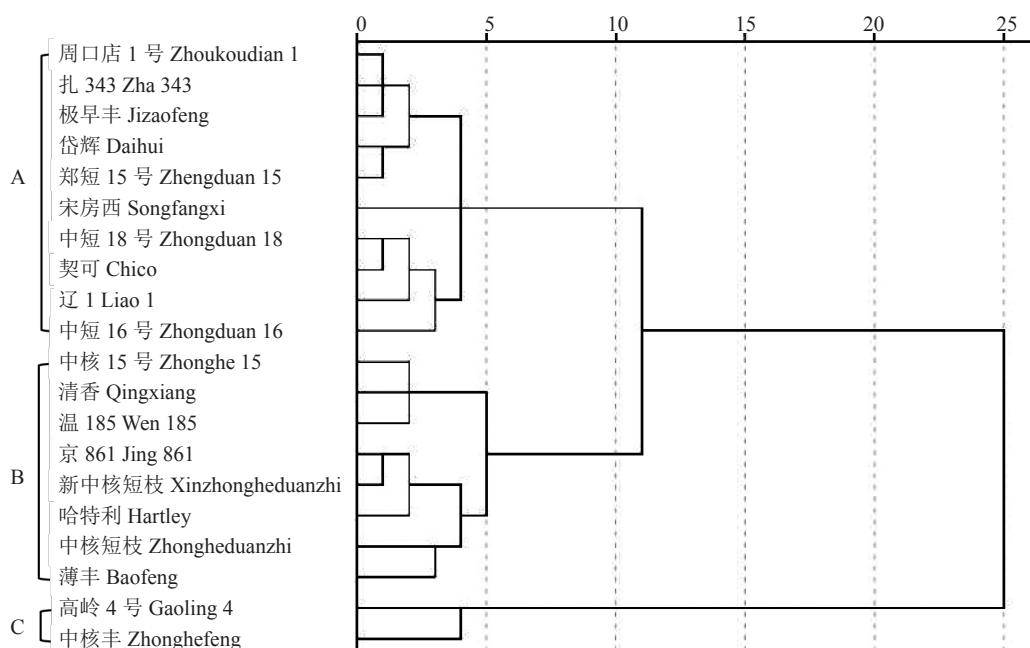


图 1 20 份核桃的聚类分析

Fig. 1 Cluster analysis of 20 walnut samples

表 3 不同聚类组间脂肪酸数据

Table 3 Fatty acids between different clustering groups

%

分组 Group	棕榈酸 Palmitic acid	亚油酸 Linoleic acid	油酸 Oleic acid	硬脂酸 Stearic acid
A (n=10)	5.57±0.56	63.04±1.49	26.16±1.48	4.89±1.15
B (n=8)	5.83±0.98	56.52±1.71	32.65±2.31	4.63±0.61
C (n=2)	5.34±0.89	45.09±0.88	45.06±2.55	4.23±0.77

用本地BLAST与核桃参考基因组进行比对分析,最终从核桃参考基因组中查找出3个油酸脱氢酶FAD2基因,基因ID分别为:WALNUT_00011902-RA、WALNUT_00002632-RA及WALNUT_00027620-RA。其中WALNUT_00011902-RA CDS长度为1 152 bp,编码383个氨基酸,WALNUT_00002632-RA CDS长度为1 149 bp,编码382个氨基酸,WALNUT_00027620-RA CDS长度为1 167 bp,编码388个氨基酸。三者氨基酸序列同源性高,相似率达85%,比对结果见图2。

基于测定的生理数据,从中选出亚油酸含量具有显著差异的高亚油酸品种‘岱辉’‘郑短15号’‘扎343’以及低亚油酸品种‘高岭4号’‘薄丰’‘京861’作为试验材料,利用荧光定量PCR技术对3个油酸脱氢酶FAD2基因进行表达模式分析,发现高、低亚油酸品种间FAD2表达水平存在差异,如图3所示。其中WALNUT_00002632-RA在高亚油酸品种‘岱

辉’及‘郑短15号’的表达水平显著高于3个低亚油酸品种($p \leq 0.05$),但‘扎343’与低亚油酸品种之间该基因表达水平无差异显著性(图3-A);WALNUT_00027620-RA在高亚油酸品种‘岱辉’的表达量与低亚油酸品种之间具有差异显著性,且在‘岱辉’中的基因表达水平最高(图3-B);WALNUT_00011902-RA在3个低亚油酸品种间的表达水平较低,3个高亚油酸品种的表达量均显著高于低亚油酸品种(图3-C)。

2.3 核桃FAD2的克隆

基于荧光定量结果,选择WALNUT_00011902-RA进行克隆,并将其命名为JrFAD2。将PCR产物进行琼脂糖凝胶回收后得到该基因的CDS长度为1 152 bp(图4-A),编码383个氨基酸,其序列及推导的氨基酸序列如图4-B所示。

2.4 FAD2基因序列分析及进化树构建

不同植物的FAD2具有较高的同源性,利用DANMAN7.0将核桃JrFAD2基因编码的氨基酸序列与其他物种同源基因的氨基酸序列进行比对,发现核桃FAD2与GeneBank中已公布的拟南芥、烟草、油菜、蓖麻、大豆、花生、橄榄等一系列物种的FAD2氨基酸序列高度同源,相似率最高达84%,其中与木本油料树种油桐、乌桕、麻风树等同源性较高,相似率分别为84.6%、82.25%、81.46%,且与油料

<i>WALNUT_00002632-RA</i>	MGAGAQMTVV...NKSEEQKATLQRVPHTKPPFTLSQIKK	37
<i>WALNUT_00027620-RA</i>	MGAGGRMTALPTANKSDQSDRPLKRVPHTKPPFTLSQIKK	40
<i>WALNUT_00011902-RA</i>	MGAGGRMVAAP..LTPSKSESGSLKRVPHSKPPFTLSQVKK	38
Consensus	mgag m s l rvph kppftlsq kk	
<i>WALNUT_00002632-RA</i>	A ₁ PPHCFQRSLFRSFSYVAYDLFFAFLFYIATSY.FHLL	76
<i>WALNUT_00027620-RA</i>	A ₁ PPHCFQRSVYRSFSYVYVYDLALASLFLYIATNYLIHHL	80
<i>WALNUT_00011902-RA</i>	A ₁ VPHCFQRSVLHSFSYVYVYDFAITSIIFYIATNY.FHLL	77
Consensus	a pphcfqrs sfsyv yd f yiat y h l	
<i>WALNUT_00002632-RA</i>	FHP.LSYFAWPIYWTLQGQILTGWVIAHECGHHAFSDYQ	115
<i>WALNUT_00027620-RA</i>	FHQILLSYFAWPIYWISQGCVLTGWVIAHECGHHAFSDYQ	120
<i>WALNUT_00011902-RA</i>	FQP.LSYFAWPIYWIIQGCVLTGWVIAHECGHHAFSDYQ	116
Consensus	p lsy awpiw qgc ltg wviahecgghafsdq	
<i>WALNUT_00002632-RA</i>	WVDDTVGLVLHSALLVPYFSWKISHRRHHSNTGSLERDEV	155
<i>WALNUT_00027620-RA</i>	WLDLIVGFIILHSGLLVPYFSWKYSHCRRHHSNTGSLERDEV	160
<i>WALNUT_00011902-RA</i>	LIIDDIVGLILHSFLLVPYFSWKYSHCRRHHSNTGSLERDEV	156
Consensus	dd vg l hs llvpypfswk sh rhhsntgslerdev	
<i>WALNUT_00002632-RA</i>	FVPKPKTKMPWYSKYENNNPPGRVITLILVTLITLGWPPLYLAF	195
<i>WALNUT_00027620-RA</i>	FVPKKKKSSICWYSKYENNNPPGRVITLIAITLITLGWPPLYLTF	200
<i>WALNUT_00011902-RA</i>	FVPKKKKSSIFWYSKYENNNPPGRVITLIAITLITLGWPPLYLTL	196
Consensus	fvpk k wysky nnppgrv tl tl lgwpoly	
<i>WALNUT_00002632-RA</i>	NVSGRPYDREFACHYDPYGPPIYSVRELIQIYISDAGIEFAT	235
<i>WALNUT_00027620-RA</i>	NVSGRPYDCEASHYDPYGPPIYSDRQRLQIYISDAGVIAVF	240
<i>WALNUT_00011902-RA</i>	NVSGRPYDREFASHYNPYGPPIYTDRQRFQIYISDAGVIAVS	236
Consensus	nvsgrpyd fa hy pygpiy r r qiyisdag a	
<i>WALNUT_00002632-RA</i>	IYLISAAAMAKGLAWLVCVYGVPLLIVNGFLVITTYLQHTH	275
<i>WALNUT_00027620-RA</i>	YCLYRLAMAKGLAWLVCITYGGPLLIVNGFLVITFLQHTH	280
<i>WALNUT_00011902-RA</i>	YCLYRLAMVKGLMWVICITYGVPLLIVNGFLVITFLQHTH	276
Consensus	y ly am kgl w c yg pll vngflv it lqht	
<i>WALNUT_00002632-RA</i>	PSLPHYDSSEWDWLKGALATAADR DYGVLNKV FHNITDTHV	315
<i>WALNUT_00027620-RA</i>	PSLPHYDSEWDWLKGALSTVDRDYGVLNKI FHNITDTHV	320
<i>WALNUT_00011902-RA</i>	PSLPHYDSSEWDWLKGALATVDRDYGVLNKI FHNITDTHV	316
Consensus	pslphyds ewdw gal t drdyg lnk fhnitdthv	
<i>WALNUT_00002632-RA</i>	AHHLFSTMPHYHAMEATKAIPILGEYYRFDGTSFYKAMW	355
<i>WALNUT_00027620-RA</i>	AHHLFSTMPHYHAMEATKAIPILGDYYQFDGTFIYKA-TW	360
<i>WALNUT_00011902-RA</i>	AHHLFSTMPHYHAMEATKAIPILGDYYQFDGTPVYKAMW	356
Consensus	ahhlfstmphyhameatkaipilg yy fdgt yka w	
<i>WALNUT_00002632-RA</i>	REAKECIYVEPDEGAPS KGVFWYQKK	381
<i>WALNUT_00027620-RA</i>	REAKECIYVEPDEGGAGSKGVFWYANK	387
<i>WALNUT_00011902-RA</i>	REAKECIYVEPDEG.GOSKGVFWYNNK	382
Consensus	reakec yvepddeg skgvfwy k	

图2 核桃油酸脱氢酶*FAD2*基因序列比对Fig. 2 Sequence alignment of oleate dehydrogenase *FAD2* gene in walnut

作物大豆的相似率为82%，与模式植物拟南芥*FAD2*的相似率为76.5%，由此推测它们在结构与功能上相似(表4)。

利用NCBI的Domains & Structures中的CD-Search对得到的核桃*FAD2*氨基酸序列进行保守结构域分析，结果显示核桃*FAD2*氨基酸序列含有 ω -6脂肪酸去饱和酶的功能结构域，属于Membrane-FADS-like超家族，是可结合在细胞膜上的保守结构域(图5)。此外对拟南芥、油桐、油茶、油菜等植物的*FAD2*氨基酸序列进行结构域分析，发现均具有 ω -6脂肪酸去饱和酶的保守结构域。

进一步将拟南芥、烟草、油菜、蓖麻、大豆、花生、橄榄等15种植物*FAD2*蛋白氨基酸序列与核桃*FAD2*用MEGA7.0软件构建系统发育树，分析其亲缘关系。从进化上可看出，这些物种在遗传进化上主要分为2大类，麻风树、油桐、乌柏、蓖麻、大豆、核桃、亚麻、拟南芥、欧洲油菜、油茶、橄榄、烟草亲缘关系较近，聚为一类，其中核桃与大豆的亲缘关系较为接近；而花生、陆地棉、芝麻及珙桐属于第2类，亲缘关系较近(图6)。

2.5 核桃*FAD2*的亚细胞定位

将35S::*JrFAD2*转化至GV3101农杆菌中，注射

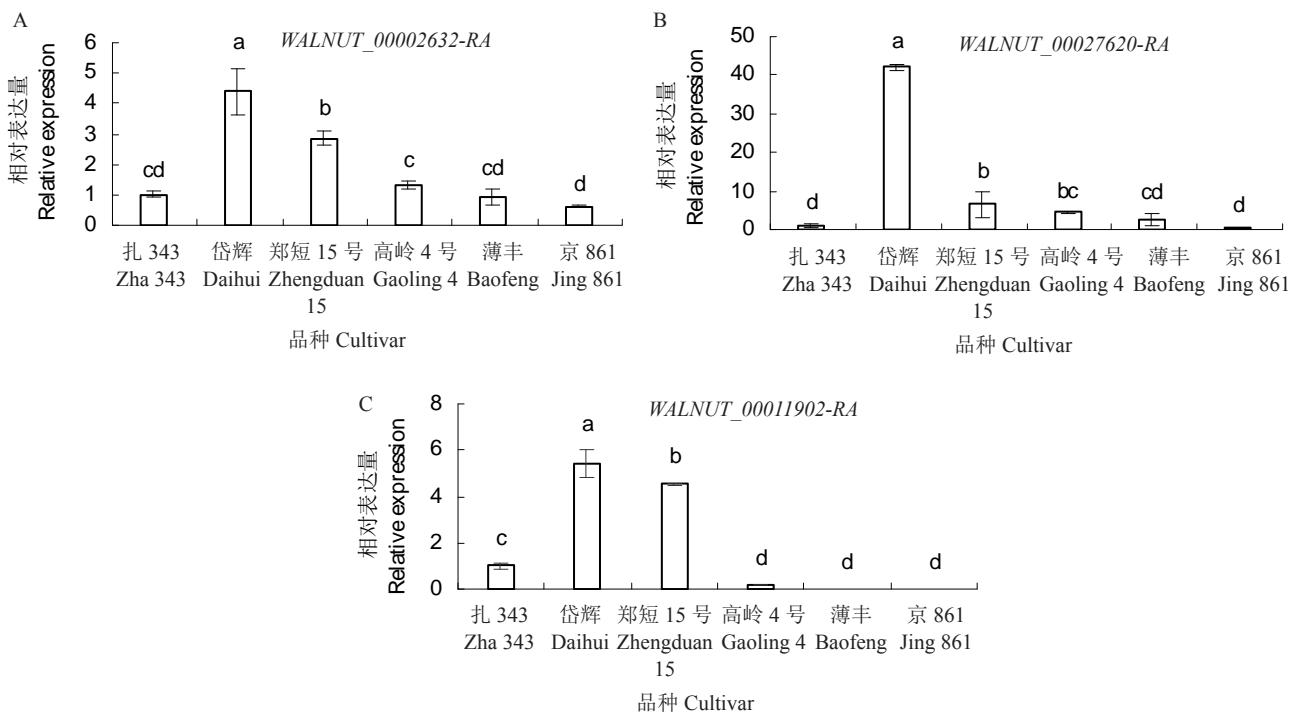


图3 核桃油酸脱氢酶FAD2基因表达模式分析

Fig. 3 Analysis of oleate dehydrogenase FAD2 expression in walnut

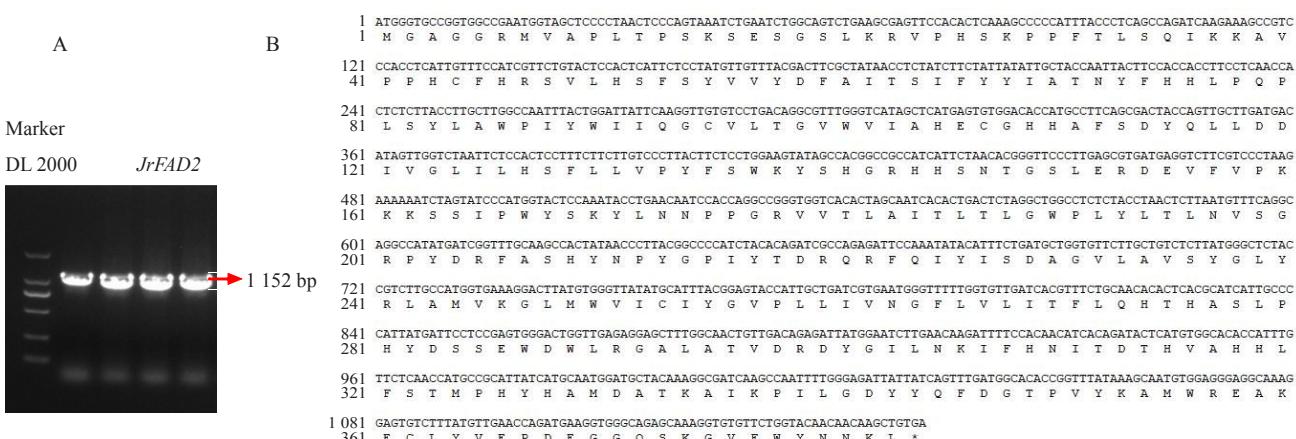


图4 核桃FAD2基因PCR扩增产物电泳检测及其氨基酸序列

Fig. 4 PCR product and amino acid sequence of JrFAD2 in walnut

表4 核桃FAD2与其他植物FAD2氨基酸序列比对结果

Table 4 Amino acid sequences alignment results of FAD2 between walnut and other plants

物种 Species	与核桃FAD2序列相似率 Sequence similarity to walnut FAD2/%	物种 Species	与核桃FAD2序列相似率 Sequence similarity to walnut FAD2/%
芝麻 <i>Sesamum indicum</i> L.	78.85	油桐 <i>Vernicia fordii</i>	84.60
油茶 <i>Camellia oleifera</i> Abel.	80.16	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i> L.	78.91
亚麻 <i>Linum usitatissimum</i> L.	76.76	甘蓝型油菜 <i>Brassica napus</i>	77.34
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	76.50	乌柏 <i>Sapium sebiferum</i> L.	82.25
麻风树 <i>Jatropha curcas</i> L.	81.46	陆地棉 <i>Gossypium hirsutum</i> Linn.	74.87
花生 <i>Arachis hypogaea</i> Linn.	74.41	珙桐 <i>Davidia involucrata</i> Baill.	80.16
橄榄 <i>Canarium album</i>	76.76	蓖麻 <i>Ricinus communis</i> L.	81.72
大豆 <i>Glycine max</i>	81.98		

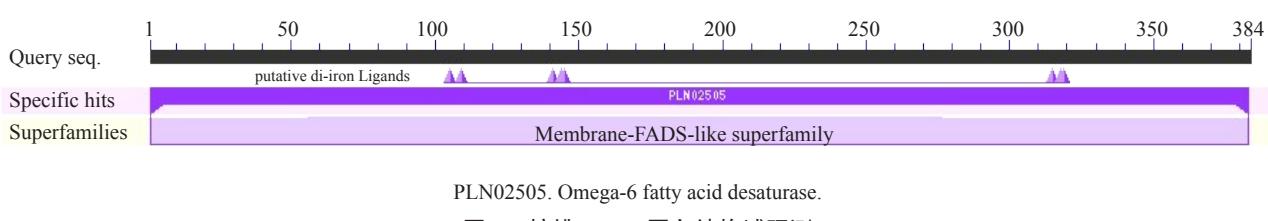


图5 核桃FAD2蛋白结构域预测

Fig. 5 Prediction of FAD2 protein domain structure in walnut

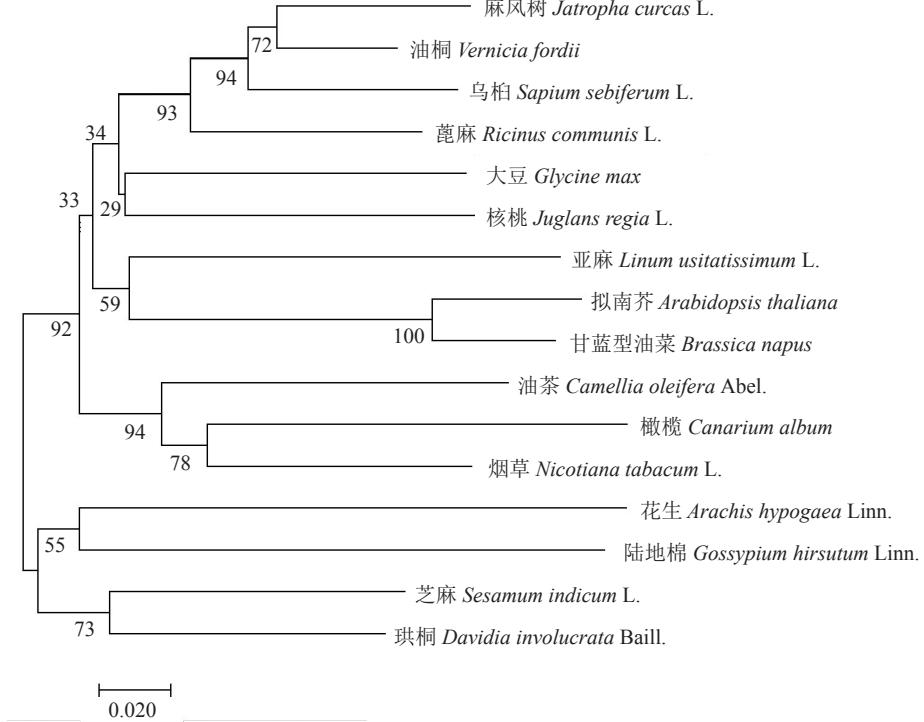


图6 核桃FAD2与其他植物FAD2进化分析

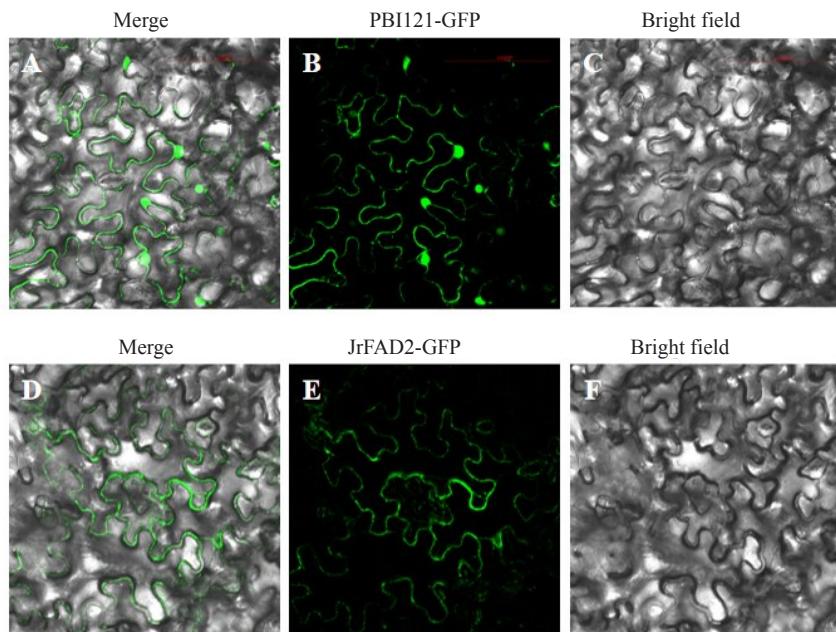
Fig. 6 Phylogenetic analysis of FAD2 between walnut and other plants

本氏烟草叶表皮细胞,生长3 d后在激光共聚焦显微镜下观察叶片荧光表达情况,发现核桃FAD2与pBI121-GFP在烟草叶表皮细胞均成功表达(图7)。其中pBI121在细胞质及细胞核中发出荧光信号,而FAD2在细胞质中发出荧光信号,结合该基因的结构域预测结果,说明该基因为结构基因,FAD2主要定位于细胞质。

3 讨论

核桃为我国重要的木本油料树种,栽培历史悠久,种植区域广泛。不同的脂肪酸组分及含量使核桃油脂品质存在差异,因此脂肪酸作为决定油脂品质的重要指标成为了不同专业学者的研究焦点。利用核桃品种性状的稳定性可鉴定出优良核桃品种,研究其脂肪酸组分的稳定性,对培育核桃优良品种

具有重要意义。目前关于核桃脂肪酸的相关研究主要集中于脂肪酸组成等生理数据的测定和分析方面。笔者测定了不同核桃品种的脂肪酸组分及含量,发现核仁脂肪酸主要组分为亚油酸、油酸、硬脂酸和棕榈酸,各组分相对含量平均值的大小依次为:亚油酸>油酸>棕榈酸>硬脂酸,且不饱和脂肪酸-油酸及亚油酸的含量高达90%,这与李群等^[22]的研究结果保持一致。肖良俊等^[23]、刘华英等^[24]分别对云南、新疆的核桃品种脂肪酸组分及含量进行测定与分析,发现主要脂肪酸种类均为油酸、亚油酸、硬脂酸和棕榈酸。本研究的测定分析结果支持前人的研究,即在不同生长环境下的核桃品种脂肪酸组分具有一定的稳定性特征。此外不饱和脂肪酸部分组分显示出较大变异,20份不同核桃品种中油酸变异系数最大,亚油酸的变异系数最小,可能是亚油酸在核



A 为 B 与 C 的重叠图像;B 为 pBI121-GFP 载体在本生烟草叶表皮细胞的定位;C 为 A、B 视野明场视场;D 为 E 与 F 的重叠图像;E 为核桃 JrFAD2-GFP 绿色荧光融合蛋白在本氏烟草叶表皮细胞中的定位。绿色荧光激发光为 488 nm。

A is the overlapping image of B and C; B is the localization of pBI121-GFP in leaf epidermal cells of tobacco; C is bright field of A and B; D is the overlapping image of E and F; E is the localization of JrFAD2-GFP green fluorescent protein in leaf epidermal cells of tobacco. The green fluorescence excitation light was 488 nm.

图 7 核桃 *FAD2* 蛋白亚细胞定位

Fig. 7 Subcellular localization of *FAD2* in walnut

仁中含量较高、稳定性较好的原因。但不同品种间的亚油酸含量也具有一定的差异,如‘扎343’和‘薄丰’,分别聚类到高亚油酸组(A)及低亚油酸组(B),二者均由新疆实生核桃园中选出,但亚油酸含量产生差异。李国和等^[25]分析了四川不同产地核桃脂肪酸含量的变化,发现年平均气温、海拔、1月平均气温等生态因子对油酸及亚油酸的合成影响较大,其含量随年平均气温及1月平均气温的降低而增加。王滑等^[26]研究发现西藏不同居群核桃核仁脂肪酸各项参数在居群内遗传变异是其变异的主要来源,由此推测‘扎343’‘薄丰’等不同品种间脂肪酸含量的差异可能与生态因子及遗传变异有关。对不同品种间脂肪酸成分及含量进行比较发现,当一个核桃品种的亚油酸含量较高时,其油酸含量就相对较低,这20份核桃资源均存在此种现象,可为育种工作提供参考。

拟南芥 *FAD2* 的突变体植株中表达的 *FAD2* 基因可以补充突变体植株的脂肪酸表型,这说明拟南芥 *FAD2* 基因对于其脂肪酸的成分具有一定的调控作用^[9],但核桃中并未进行相关研究。本研究克隆

获得了核桃的 *FAD2* 基因序列,相关研究表明植物的 *FAD2* 是一个膜整合蛋白^[27],用 NCBI Conserved domains CD-Search 对核桃 *FAD2* 氨基酸序列的结构域进行预测,结果显示该基因属于 Membrane-FADS-like 超家族,含有脂肪酸去饱和酶的功能结构域,这与赵娜等^[28]的研究成果一致。同时笔者发现拟南芥、油菜、油茶等已经被报道功能的植物 *FAD2* 氨基酸序列具有相同结构域,但不同物种该基因的跨膜区数目存在差异^[28],跨膜区数目对该酶的功能是否产生影响还未见相关报道。此外对克隆所获得的基因氨基酸序列进行比对发现,核桃 *JrFAD2* 与其他植物的同源基因具有高度相似性,笔者推测核桃的 *FAD2* 与其他植物的同源基因具有相似的功能,也初步说明了 *JrFAD2* 可能参与调控脂肪酸的合成。对不同物种的 *FAD2* 进行系统发育分析发现,核桃与木本油料树种油桐、乌桕、麻风树等的相似度较高,分别为 84.6%、82.25%、81.46%,且与油料作物大豆的相似度为 82%,亲缘关系较为接近。

研究表明 *FAD2* 基因编码的油酸脱氢酶(*FAD2*)能够催化油酸转化为亚油酸,是脂肪酸代谢通路的

关键酶^[29]。为进一步验证JrFAD2功能,对其进行了亚细胞定位观察。结果显示,FAD2在细胞质中发出荧光信号,结合其结构域的预测结果,证明了该基因为结构基因,推测其编码油酸脱氢酶,可能是影响脂肪酸代谢通路中亚油酸形成及油酸和亚油酸比例的关键基因。但在脂肪酸代谢通路中具体怎样发挥作用目前尚未明确,下一步工作将通过转基因技术进一步验证其功能,这对于研究核仁不饱和脂肪酸合成的分子机制及核桃品质育种具有重要意义。

4 结 论

核桃脂肪酸的种类及不饱和程度是决定油脂品质的重要指标,本研究发现20份核桃资源核仁的主要脂肪酸种类为亚油酸、油酸、棕榈酸和硬脂酸,其中多不饱和脂肪酸-亚油酸含量最高。此外JrFAD2在高亚油酸品种中的表达水平高于低亚油酸品种,且具有显著差异,可能在脂肪酸代谢过程中起到促进亚油酸形成的作用。

参考文献 References:

- [1] TAO F, ZHU S W, FAN J, CHENG B J. Cloning and sequence analysis of maize *FAD2* gene[J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2006, 32(6): 649-656.
- [2] 林杰. 不饱和脂肪酸的生理功能及其应用进展[J]. 广东化工, 2013, 40(6): 92-93.
LIN Jie. Unsaturated fatty physiologic function and its application progress[J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2013, 40(6): 92-93.
- [3] 谢禄山, 谭晓风, 张琳, 龙洪旭. 油桐种子 *FAD2* 基因全长 cDNA 序列分析[J]. 经济林研究, 2012, 30(2): 1-9.
XIE Lushan, TAN Xiaofeng, ZHANG Lin, LONG Hongxu. Analysis of full-length cDNA sequence of *FAD2* gene in *Vernicia fordii* seeds[J]. *Economic Forest Research*, 2012, 30(2): 1-9.
- [4] 刘玲, 陈朝银. 核桃功能研究进展[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(27): 13227-13228.
LIU Ling, CHEN Chaoyin. Recent progress on the function of walnut[J]. *Anhui Agricultural Science*, 2009, 37(27): 13227-13228.
- [5] HUANG J Q, ZHANG T, ZHANG Q X, CHEN M, WANG Z J, ZHENG B S, XIA G H, YANG X Y, HUANG C Y, HUANG Y J. The mechanism of high contents of oil and oleic acid revealed by transcriptomic and lipidomic analysis during embryogenesis in *Carya cathayensis* Sarg.[J]. *BMC Genomics*, 2016, 17(1): 113.
- [6] 曹福亮, 王欢利, 郁万文, 程华. 高等植物脂肪酸去饱和酶及编码基因研究进展[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2012, 36(2): 125-132.
- [7] CAO Fuliang, WANG Huanli, YU Wanwen, CHENG Hua. Progress of research on fatty acid desaturase and their coding genes in higher plant[J]. *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Science Edition)*, 2012, 36(2): 125-132.
- [8] CHAPMAN K D, OHLROGGE J B. Compartmentation of triacylglycerol accumulation in plants[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(4): 2288-2294.
- [9] OKULEY J, LIGHTNER J E, FELDMANN K A, YADAV N. *Arabidopsis FAD2* gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid synthesis[J]. *The Plant Cell*, 1994, 6(1): 147-158.
- [10] LI L Y, WANG X L, GAI J Y, YU D Y. Molecular cloning and characterization of a novel microsomal oleate desaturase gene from soybean[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2007, 164(11): 1516-1526.
- [11] HERNÁNDEZ M L, MANCHA M, MARTÍNEZ-RIVAS J M. Molecular cloning and characterization of genes encoding two microsomal oleate desaturases (FAD2) from olive[J]. *Phytochemistry*, 2005, 66(12): 1417-1426.
- [12] SALIMONTI A, ZELASCO S, LOMBARDO L, PERRI E, MICALI S. Mutation scanning of two oleate desaturase (FAD2) encoding genes in *Olea europaea* L. by high resolution melting [C]//Proceedings of the 4th International Conference on 'Olive Culture and Biotechnology of Olive Tree Products' OLIVE-BIOTEQ. Chania, Greece, 2011: 111-116.
- [13] XUE Y F, ZHANG X C, WANG R, CHEN B J, JIANG J Y, WIN A, CHAI Y R. Cloning and expression of *Perilla frutescens FAD2* gene and polymorphism analysis among cultivars[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2017, 39(3): 84.
- [14] SCHWARTZBECK J L, JUNG S, ABBOTT A G, MOSLEY E, LEWIS S, PRIES G L, POWELL G L. Endoplasmic oleoyl-PC desaturase references the second double bond[J]. *Phytochemistry*, 2001, 57(5): 643-652.
- [15] PATEL M, JUNG S, MOORE K, POWELL G L, AINSWORTH C, ABBOTT A. High-oleate peanut mutants result from a MITE insertion into the *FAD2* gene[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 108(8): 1492-1502.
- [16] JUNG S, POWELL G L, MOORE K, ABBOTT A. The high oleate trait in the cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) II. Molecular basis and genetics of the trait[J]. *Molecular and General Genetics*, 2000, 263(5): 806-811.
- [17] 王华. 超声波法提取长柄扁桃仁油脂的工艺优化[J]. 当代化工, 2018, 47(6): 1185-1187.
WANG Hua. Process optimization of extracting oil from *amygdalus pedunculata* seed with ultrasonic method[J]. *Contemporary Chemical Industry*, 2008, 47(6): 1185-1187.
- [18] 赵志刚. 山核桃仁油中脂肪酸组成的分析及评价[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(6): 2473-2474.
ZHAO Zhigang. Analysis and Evaluation on fatty acids composition of oil from *Macadamia integrifolia* seeds[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2009, 37(6): 2473-2474.

- tion of hickory nut oil[J]. Anhui Agricultural Science, 2009, 37(6): 2473-2474.
- [18] MARTÍNEZ-GARCÍA P J, CREPEAU M W, PUIU D, NEALE D B. The walnut (*Juglans regia*) genome sequence reveals diversity in genes coding for the biosynthesis of non-structural polyphenols[J]. The Plant Journal, 2016, 87(5): 507-532.
- [19] 李雪,潘学军,张文娥,张睿,陈静.核桃内参基因实时荧光定量PCR表达稳定性评价[J].植物生理学报,2017,53(9): 1795-1802.
LI Xue, PAN Xuejun, ZHANG Wene, ZHANG Rui, CHEN Jing. Stability evaluation of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in walnut[J]. Plant Physiology Journal, 2017, 53(9): 1795-1802.
- [20] LIVAK K J, SCHMITTGEN T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [21] 徐宗昌,孔英珍.普通烟草CESA基因家族成员的鉴定、亚细胞定位及表达分析[J].遗传,2017,39(6): 512-524.
XU Zongchang, KONG Yingzhen. Genome-wide identification, subcellular localization and gene expression analysis of the members of CESA gene family in common tobacco[J]. Hereditas, 2017, 39(6): 512-524.
- [22] 李群,张倩茹,尹蓉,王贤萍,胡晓军,高忠东,段泽敏.不同核桃品种脂肪酸组分的化学计量学分析[J].中国农学通报,2017,33(18): 141-149.
LI Qun, ZHANG Qianru, YIN Rong, WANG Xianping, HU Xiaoju, GAO Zhongdong, DUAN Zemin. Chemometrics analysis of fatty acid composition of different walnut varieties[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2017, 33(18): 141-149.
- [23] 肖良俊,张雨,吴涛,宁德鲁,毛云玲.云南紫仁核桃脂肪酸含量及营养评价[J].中国油脂,2014,39(9): 94-97.
XIAO Liangjun, ZHANG Yu, WU Tao, NING Delu, MAO Yun-
- ling. Fatty acid content and nutritional evaluation of Yunnan purple kernel walnut[J]. China Oils and Fats, 2014, 39(9): 94-97.
- [24] 刘华英,刘俊霞,包东东,张锐利.新疆野核桃油脂肪酸组成分析[J].中国油脂,2012,37(9): 78-79.
LIU Huaying, LIU Junxia, BAO Dongdong, ZHANG Ruili. Fatty acid composition of wild walnut oil in Xinjiang [J]. China Oils and Fats, 2012, 37(9): 78-79.
- [25] 李国和,杨冬生,胡庭兴.四川省不同产地核桃脂肪酸含量的变化[J].林业科学,2007,43(5): 36-41.
LI Guohe, YANG Dongsheng, HU Tingxing. Changes in fatty acid content of walnut in different production areas of Sichuan province[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2007, 43(5): 36-41.
- [26] 王滑,潘刚,马庆国,裴东.西藏不同居群核桃核仁中脂肪酸成分的含量变化[J].经济林研究,2015,33(3): 126-129.
WANG Hua, PAN Gang, MA Qingguo, PEI Dong. Varieties of fatty acid contents in kernels from different walnut populations of Tibet[J]. Nonwood Forest Research, 2015, 33(3): 126-129.
- [27] NAYERI F D, YARIZADE K. Bioinformatics study of delta-12 fatty acid desaturase 2 (FAD2) gene in oilseeds[J]. Molecular Biology Reports, 2014, 41(8): 5077-5087.
- [28] 赵娜,张媛,李秋琦,李茹芳,郭惠红.文冠果FAD2的序列与功能分析[J].北京林业大学学报,2015,37(2): 87-93.
ZHAO Na, ZHANG Yuan, LI Qiuqi, LI Rufang, GUO Huihong. Sequence and functional analysis of FAD2 gene from *Xanthoceras sorbifolia* seeds[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2015, 37(2): 87-93.
- [29] 刘盼.芝麻油酸代谢相关基因的克隆及功能分析[D].北京:中国农业科学院,2017.
LIU Pan. Cloning and functional analysis of genes involved in sesame oleic acid metabolism in Sesame[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2017.

欢迎订阅2021年《果农之友》

全彩版印刷科普性期刊,更直观、更逼真、更生动、更丰富!选发全新实用技术,荟萃果业科技信息,传播果业成功范例,引导果农发家致富。曾获河南省一级科普期刊、河南省自然科学期刊二十佳提名期刊、全国农业优秀期刊等荣誉称号,连续多年入选河南省农家书屋重点出版物推荐目录(最多时年增加发行量30万册)。被中国知网、万方数据、维普资讯等收录。月刊,大16开,56页码,每月1日出版,每期定价4元,全年48元,邮发代号:36-225。全国各地邮局均可

订阅,也可随时汇款至编辑部订阅。

电话:0371-65330925(编辑部) 65330949(广告部)

E-mail: guonongzhiyou@caas.cn

网址: www.guonongzhiyou.cn

地址:河南省郑州市未来路南端郑州

果树研究所

邮编:450009



扫描二维码关注公众号
获取更多精彩内容