

山核桃油体蛋白 *oleosin* 基因家族 鉴定和表达模式分析

董茗秀, 易芳, 胡帅, 高燕丽*

(浙江农林大学·省部共建亚热带森林培育国家重点实验室, 浙江临安 311300)

摘要:【目的】探讨山核桃中 *oleosin* 基因家族表达模式, 筛选响应油脂合成的关键 *oleosin* 基因。【方法】以山核桃 (*Carya cathayensis*) 和薄壳山核桃 (*Carya illinoensis*) 为研究对象, 利用生物信息学方法鉴定 *oleosin* 基因家族成员, 分析其蛋白的理化性质、保守基序; 解析基因结构、启动子区域顺式作用元件; 预测 *oleosin* 基因的系统进化关系; 探究 *oleosin* 基因在胚发育不同阶段的表达模式及亚细胞定位。【结果】山核桃和薄壳山核桃基因组中分别鉴定到 7 个和 8 个含“脯氨酸结”保守基序 PX₅SPX₃P 的 *oleosin* 基因家族成员, 这些基因所编码的蛋白分子质量 14.54~17.51 ku; 启动子区域顺式作用元件分析显示, *oleosin* 基因家族成员均含有响应光周期、逆境胁迫和激素应答等相关的顺式作用元件; 系统进化分析显示 15 个 *oleosin* 基因家族成员主要分布在 U-Oleosin、SL-Oleosin 和 SH-Oleosin 3 个亚家族; 转录组数据显示, 山核桃 7 个 *oleosin* 基因在胚发育不同阶段均表现出不同程度上调表达, 其中 CCA0520S0025 和 CCA0791S0002 在山核桃胚油脂迅速增长阶段基因表达量显著上调; 荧光定量 PCR 结果显示, 山核桃 *oleosin* 基因 CCA0520S0025 和 CCA0791S0002 响应 ABA 和低温胁迫, 同时亚细胞定位分析表明山核桃 CCA0520S0025 和 CCA0791S0002 蛋白均定位于油体。【结论】山核桃和薄壳山核桃 *oleosin* 基因家族成员均具有相似的基因结构与保守基序, 亲缘关系较近, 另外山核桃 CCA0520S0025 和 CCA0791S0002 可能在油脂合成过程中发挥重要作用。

关键词: 山核桃; 薄壳山核桃; *Oleosin* 基因; 生物信息学; 亚细胞定位

中图分类号: S664.1

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2023)01-0035-13

Identification and expression profile analysis of *oleosin* gene family in Chinese hickory and pecan

DONG Mingxiu, YI Fang, HU Shuai, GAO Yanli*

(Zhejiang A & F University/State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: 【Objective】Lipid droplet (LD) plays an essential role in seed germination. Oil body proteins (*oleosin*) are a kind of proteins localized on the surface of LD, which participates in the regulation of LD biogenesis, morphology homeostasis, and stabilization. Chinese hickory (*Carya cathayensis*) is an arbor with high oil content in its embryo. However, the molecular mechanism of high oil accumulation in hickory embryos remains unclear. This study aimed to systematically investigate the *oleosin* genes in the Chinese hickory and analyze their expression patterns. 【Methods】Based on the Pfam database, the *oleosin* genes in Chinese hickory (*C. cathayensis*) and pecan (*C. illinoensis*) were identified and characterized in this study. Then, gene structures and conserved motifs were analyzed by TBtools, and the *cis*-acting elements of *oleosin* gene promoter regions were performed using the Plant CARE database, and phylogenetic analysis of *oleosin* gene family from *C. cathayensis*, *C. illinoensis*, *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, *Arachis hypogaea* and *Brassica napus* were conducted using MEGA 7.0 software (Bootstrap=1000). Moreover, the expression patterns during different developmental stages of the em-

收稿日期: 2022-04-14 接受日期: 2022-09-06

基金项目: 浙江农林大学科研发展基金(2021FR012, 2020KJ001)

作者简介: 董茗秀, 女, 硕士, 主要从事植物分子生物学研究。Tel: 13186989859; E-mail: 3174079878@qq.com

*通信作者 Author for correspondence. E-mail: gaoyanli.025@163.com

bryo were analyzed. Furthermore, subcellular localization of oleosin proteins was conducted. **【Results】** The results showed that seven and eight *oleosin* genes containing a conserved domain “proline knot” were identified in Chinese hickory and pecan, respectively. The oleosin protein molecular weights ranged from 14.54 to 17.51 ku, and the isoelectric point of oleosin protein ranged from 9.33 to 10.36. The gene structure analysis showed that all members of the *oleosin* genes in hickory and pecan contained one exon but not intron. Four conserved motifs were found in the *oleosin* gene family. Based on the analysis of the conserved motifs, CCA0791S0002, CIL0938S0150 and CIL0252S0009 might share a similar function. The results of multiple amino acid sequence alignment showed that oleosin proteins of hickory and pecan contained a typical and highly conserved “proline knot”-PX5SPX3P-. The “proline knot” domain is a special structure in the oil body, and it is responsible for oil body localization. Lots of *cis*-acting elements were found in the upstream 2000 bp of the *oleosin* genes, including gibberellin (GA), abscisic acid (ABA), MeJA, and a variety of environmental stresses, indicating that the signals of abiotic stress and hormones might regulate *oleosin* genes expression. According to the phylogenetic analysis result, all *oleosins* genes were clustered into the U-Oleosin, SL-Oleosin, and SH-Oleosin subgroups. The SL-Oleosin is the largest subgroup, accounting for about 1/2 of the *oleosin* gene members of hickory and pecan. In the SL-Oleosin subgroup, the *oleosin* genes of hickory and pecan were distributed in two branches. CCA0791S0002, CIL0938S0150 and CIL0252S0009 were classified into one branch, and CCA0520S0025, CIL1494S0045, CCA0779S0183 and CIL0922S0190 were classified into another branch. In the U-Oleosin subgroup, the *oleosin* genes of hickory and pecan were also distributed in two branches: CCA0674S0096 and CIL0212S0015 clusters were distributed in the same branch, while only CIL1212S0020 distributed in another branch. In the SH-Oleosin branch, three *oleosin* genes in hickory and two *oleosin* genes in pecan were clustered to one branch. Moreover, the expression patterns of the *oleosin* genes at different stages of embryo development in hickory (S1, S2, S3, S4 and S5) were analyzed using the transcriptome database. The results showed that the *oleosin* genes were highly expressed during the different developmental stages of the embryo. CCA0674S0096, CCA0779S0183, CCA0514S0208 and CCA0520S0025 had the same expression trend, which could be classified into one group. The expression trends of CCA0791S0002, CCA0656S0072 and CCA0656S0074 could be clustered into one category. Compared with the S1 stage, all *oleosin* genes were up-regulated at different stages of embryo development. The mRNA expression levels of CCA0656S0072 and CCA0656S0074 were significantly up-regulated from S4 to S5 stage. The mRNA expression level of CCA0520S0025 and CCA0791S0002 significantly increased from S2 to S3 stage. It was noted that the oil content continuously raised during the developing process of the embryo and showed a sharp increase from S2 to S3. The qRT-PCR analysis results showed that CCA0520S0025 and CCA0791S0002 were responded to ABA and low-temperature stress. Most *oleosin* genes showed an up-regulated expression trend under the ABA treatment. Three genes (CCA0791S0002, CCA050S0025 and CCA0779S0183) reached peak expression 2 h after the ABA treatment, and CCA0656S0074 showed a continuous up-regulation after the ABA treatment, and two genes (CCA0514S0208 and CCA0674S0096) showed a down-regulation 6 h after the ABA treatment, and then reached the peak 12 h after the treatment. Under the low-temperature stress, CCA0791S0002, CCA0520S0025 and CCA0514S0208 showed an up-regulated expression 2 h, 4 h and 6 h after the treatment, respectively. Finally, the pBI221-UBQ10-CCA0520S0025-GFP and pBI221-UBQ10-CCA0791S0002-GFP expression vectors were completed. The subcellular localizations were performed through transient expression using protoplasts isolated from the *Arabidopsis* suspension culture

cells. And the results showed that CCA0520S0025 and CCA0791S0002 were colocalized with AtOLEO2-RFP, an *Arabidopsis* oil body gene. 【Conclusion】 The *oleosin* gene family of Chinese hickory and pecan had similar gene structure and conserved motifs. In addition, CCA0520S0025 and CCA0791S0002 might play an important role in the oil accumulation in hickory embryo.

Key words: Chinese hickory; Pecan; *Oleosin* gene; Bioinformatics; Subcellular localization

油脂是生物体能量代谢的主要来源,在生物膜合成、能量稳定、信号转导等方面发挥重要作用^[1-2]。植物细胞中油脂以三酰甘油(Triacylglycerol, TAG)的形式合成于内质网,通过出芽的形式存储于特定细胞器油体(Lipid Droplet, LD)中。油体主要由三酰甘油(TAG)、磷脂(Phospholipid)和内嵌蛋白(Intrinsic proteins)组成。TAG是植物种子中能量存储的有效形式之一,可以为种子萌发和幼苗初期生长提供必要的能量^[3]。由亲水性的磷酸基团和疏水性的酰基团组成的磷脂是油体生物膜结构的主要组分,内嵌蛋白则主要负责维持油体的结构稳定性。油体表面的内嵌蛋白包括油体蛋白(Oleosin, OLEO),油体钙蛋白(Caleosin, CLO)、甾醇蛋白(Steroleosin, SLO)和油体相关蛋白(Lipid Droplet Associated Proteins, LDAP)等^[4]。油体蛋白最早在绿藻中被发现,是油体含量最丰富的膜蛋白,约占种子总蛋白的8%^[5-7]。随着分子生物学技术的快速发展,目前拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[8]、油菜(*Brassica napus*)^[9]、大豆(*Glycine max*)^[10]和芝麻(*Sesamum indicum*)^[11]等物种中的油体蛋白均被研究。不同物种中 *oleosin* 基因具有相似的理化性质:蛋白相对分子质量为15~26 ku,蛋白结构包含1个疏水环区,具体由3个脯氨酸残基和1个丝氨酸残基(-PX₅SPX₃P-)组成的“脯氨酸结”^[4],该结构域对油体蛋白靶向定位到油体至关重要^[12-13]。

Oleosin是种子油体表面表达丰度最高的蛋白,另外发现 *oleosin* 也定位于花粉的表面和茸毛层^[14]。目前在拟南芥中鉴定到16个 *oleosin* 蛋白,其中5个主要在种子中表达,8个在花药中表达,以及3个同时在种子和花药中表达,其中在种子中表达的 *oleosin* 蛋白主要功能是调节油体大小和影响种子萌发^[2]。研究发现, *oleosin* 蛋白在种子干燥过程中对油体的稳定性和融合有一定的影响;另外在种子越冬阶段, *oleosin* 蛋白调控油体大小和种子活力,在种子萌发过程中 *oleosin* 蛋白调控脂质代谢^[2]。拟南芥 *AtOle1* 基因敲除后,突变体种子油体形态异常,

油体异常积累,导致种子萌发延缓^[15]。水稻中过表达黄豆 *oleosin* 基因,转基因水稻籽粒中油体蛋白数量增多、体积变小,种子含油量显著增加,但三酰甘油的脂肪酸组成并未发生变化,表明油体大小与总含油量呈负相关^[16]。拟南芥 *ole1 ole2* 双突变体中,发现种子细胞中具有不规则且增大的含油结构,同时,油体蛋白可通过防止低温自吸胀过程中油体的异常融合,提高种子细胞活力^[17]。 *oleosin* 基因可以维持油体的大小和结构的稳定性,影响脂类物质的积累,从而调节植物种子的含油量^[18],并且种子活力可能与含油量相关^[19]。由此可见,油体蛋白 *oleosin* 在种子生长发育过程中具有重要作用。

山核桃(*Carya cathayensis*),也称中国山核桃,属于胡桃科山核桃属,主要分布于浙江和安徽一带^[20],已有500多年的种植历史^[21]。薄壳山核桃(*Carya illinoensis*),也属于胡桃科山核桃属,是世界著名的胡桃科坚果树种,原产于美国^[22]。山核桃与薄壳山核桃分别是东亚和北美洲东部的胡桃科山核桃属代表,也是胡桃科山核桃属中仅有的两种商业栽培的树种^[21]。山核桃的坚果较小,外壳较硬,而且缺乏对非生物胁迫如高温、洪水、干旱和盐碱的耐受性,极大地限制了山核桃全世界范围内的商业化种植^[21]。山核桃与薄壳山核桃含油量都高达70%,其中饱和和脂肪酸占90%以上^[23],且具有补脑、降低血脂、预防心脑血管疾病等功效^[24]。笔者以商业栽培山核桃属坚果树种的2个代表(山核桃与美国山核桃)为研究对象,根据已公开发表的 *oleosin* 基因家族,主要包括保守基序、系统进化、启动子区域顺式作用元件、表达模式及亚细胞定位研究等方面,为进一步筛选山核桃 *oleosin* 候选基因并进行功能分析提供一定的参考依据。

1 材料和方法

1.1 *Oleosin* 基因鉴定

通过拟南芥数据库 TAIR (<https://www.arabidop->

sis.org)获取拟南芥 *oleosin* 基因家族蛋白序列,作为参照序列,通过BioEdit进行本地BlastP从山核桃以及薄壳山核桃数据库(<https://ngdc.cnec.ac.cn/databasecommons/database/id/4151>)中获取 *oleosin* 蛋白序列,利用Pfam数据库(<https://pfam.xfam.org>)筛选包含 *oleosin* 结构域的蛋白序列。

1.2 *Oleosin* 蛋白的理化性质分析

利用 ProtParam (<https://web.expasy.org/prot-param>)数据库分析山核桃和薄壳山核桃 *oleosin* 蛋白理化性质,并且利用 WoLF PSORT (<https://wolfpsort.hgc.jp>)在线工具进行亚细胞定位预测分析。

1.3 *Oleosin* 蛋白保守基序和系统进化分析

山核桃与薄壳山核桃 *oleosin* 蛋白保守基序分析参考徐胤等^[25]的方法。利用 MEME Suite 5.4.1 (<https://meme-suite.org/meme/doc/meme.html>)对山核桃和薄壳山核桃 *oleosin* 蛋白保守基序进行分析,最后利用 TBtools 软件进行优化。利用 DNAMAN 软件对 *oleosin* 基因家族氨基酸序列进行多重比对分析。通过 Uniprot(UniProt)数据库下载油菜、花生 (*Arachis hypogaea*)和大豆的 *oleosin* 蛋白序列,结合已获得的拟南芥、山核桃、薄壳山核桃 *oleosin* 蛋白序列,利用 MEGA 7.0 软件通过邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统进化树,校对参数 Bootstrap 设置为 1000,进一步利用 Evolview (<https://www.evolgenius.info/evolview-v2>)在线工具进行优化。

1.4 *Oleosin* 基因家族启动子区域顺式作用元件分析

利用 TBtools 软件从山核桃和薄壳山核桃基因组中导出 *oleosin* 基因上游 2000 bp 启动子区域序列,然后利用 Plant CARE (<https://bioinformatics.psib.ugent.be/webtools/plantcare/html>)预测山核桃和薄壳山核桃 *oleosin* 蛋白启动子区域顺式作用元件。

1.5 山核桃 *oleosin* 基因在胚发育不同阶段的表达模式分析

为了研究山核桃 *oleosin* 基因在胚发育不同阶段的表达丰度,利用 NCBI Short Read Archive database (SRA) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/>)获得山核桃胚发育不同阶段转录组数据(检索号为 PRJ-NA687050)^[26],获得 *oleosin* 基因 RPKM (Reads Per Kilobase Per Million Mapped Reads) 数值,利用 MEV4.9.0 绘制热图。

1.6 低温胁迫及 ABA 处理下山核桃 *oleosin* 基因的表达模式分析

研究材料为浙江农林大学张启香教授课题组已成功诱导的山核桃愈伤组织。每个愈伤培养皿直径为 90 mm,高度为 20 mm,培养皿中愈伤个数平均为 9 个。3 个愈伤培养皿为 1 个重复。每个处理 3 个重复。对生长状况良好的山核桃愈伤组织进行 4 °C 低温和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA 处理,并分别在处理 0、2、4、6、8 和 12 h 后取 0.5 g 愈伤组织,液氮速冻,利用 Trizol 法^[27]提取 RNA,并反转录合成 cDNA,用于后续 qRT-PCR 检测。反转录试剂盒(PrimeScriptT-MRTreagent Kit, RR047A)和 TB green 试剂(RR820A)购于 TaKaRa 公司。

利用 Primer Primer 5 软件设计山核桃 *oleosin* 基因序列的特异性定量引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,以山核桃 *CCARF* 基因为内参基因(具体引物序列如下表 1)。基因相对表达量计算采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法。

1.7 山核桃 *oleosin* 蛋白亚细胞定位分析

载体与试剂:pBI221-UBQ10-GFP 载体由笔者所在实验室保存;DNA 聚合酶(Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase, P505)购于南京诺唯赞生物科技有限公司;琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒(E.Z.

表 1 荧光定量 PCR 引物序列
Table 1 primer sequence of qPCR

基因名称 Gene name	正向引物(5'-3') Forward Primer(5'-3')	反向引物(5'-3') Reverse Primer(5'-3')
CCA0791S0002	CACTCTCGTACCCGTCTTCG	GCTTTGTGTGCTCGAGTTGC
CCA0514S0208	ATCCTTGGGTCTTGGCGTC	CCTGTGCACCAGAGATGCTG
CCA0520S0025	GTCCAAAGTCCCAGAGAGGC	CCGAGCTCAAAAATCCAGCG
CCA0656S0074	ATTCAGTCTGTCTCGTCCC	ATTTGTGCCGCCCCAGG
CCA0674S0096	CGATCCTAGTCCCGGTAGGT	CACAAACTGCCCGTACTCCT
CCA0779S0183	GGTCCAAAGTCCCAAGGAGG	GAAGACCCGGGATAGCGATG
CCARF	TGTGGTTGAAGCTAGGGATG	GCGTTGACGGAGTGAGTG

N.A.[®] Gel Extraction Kit, OMEGA) 购于南京百思禾生物科技有限公司; 质粒小提试剂盒 (TIANGEN[®] Mini Plasmid Kit) 购于天根生化科技(北京)有限公司; 限制性内切酶 QuickCut™ *Xba* I 和 QuickCut™ *Bam*H I 与 T4 DNA 连接酶均购于 TaKaRa 公司; 质粒测序由北京擎科生物技术有限公司完成。

用 SnapGene 软件分别在山核桃 *oleosin* 基因 CCA0520S0025 和 CCA0791S0002 的 CDS 序列两端设计引物 (CCA0520S0025-F: GGGTCTAGAAATGTCTGATCACTCAAGGCCATTG, CCA0520S0025-R: GGGGATCCCTGTCTCCTCCCTCTTGGGC, CCA0791S0002-F: GGGTCTAGAAATGGCCGAGAACCAACAGCA 和 CCA0791S0002-R: GGGGGATCCGCTGTGCACCAGAGACAT)。引物下划线的为酶切位点 *Xba* I (TCTAGA) 和 *Bam*H I (GGATCC)。利用 Trizol 法^[27] 提取山核桃胚 RNA, 利用反转录试剂盒 (TRAN, 北京, P30702) 获得 cDNA。以 cDNA 为模板, 用 CCA0520S0025-F 与 CCA0520S0025-R 和 CCA0791S0002-F 与 CCA0791S0002-R 引物对山核桃 *oleosin* 基因 CCA0520S0025 和 CCA0791S0002 的 CDS 序列进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 50 μ L: 2 \times Phanta Max Buffer 25 μ L, 10 μ mol \cdot L⁻¹ 正反向引物各 2 μ L, 10 mmol \cdot L⁻¹ dNTP 1 μ L, 模板 cDNA 4 μ L, ddH₂O 15 μ L, Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 1 μ L。PCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。利用琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒回收目的基因片段。利用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Bam*H I 对 pBI221-UBQ10-GFP 载体与回收的目的基因片段进行双酶切。通过酶切连接的方法, 构建表达载体 pBI221-UBQ10-CCA0520S0025-GFP 和 pBI221-UBQ10-CCA0791S0002-GFP, 经测序验证正确后, 提取质粒。

拟南芥悬浮细胞瞬时转化体系参考 Zeng 等^[28] 的方法。将培养 5 d 的拟南芥悬浮细胞转至 50 mL 离心管中, 1000 r \cdot min⁻¹ 离心 2 min, 弃上清液, 加入酶解液置于 25 $^{\circ}$ C 摇床解离 2 h 后, 750 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min, 弃上清液, 加入 2 倍的 EP Buffer 重悬细胞, 750 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min, 2 次重复, 吸取 500 μ L 拟南芥悬浮细胞至电击杯, 加入一定浓度的质粒, 如 pBI221-UBQ10-CCA0520S0025-GFP 和 pBI221-UBQ10-CCA0791S0002-GFP 分别与 AtOLEO2-RFP

(拟南芥 *oleosin* 基因) 共转化, 静置 5~10 min, 以 130 V 和 1000 μ F 电压电击后, 加入 2 mL TEX Buffer 重悬细胞, 倒入 35 mm 培养皿置于 25 $^{\circ}$ C 培养 12 h。利用激光共聚焦显微镜 (Leica TCS SP8) 观察亚细胞定位情况, 具体分析山核桃 *oleosin* 基因与拟南芥 *oleosin* 标志基因 AtOLEO2 的亚细胞共定位情况, 绿色荧光 (GFP) 接收波长范围为 488~510 nm, 红色荧光 (RFP) 接收波长范围为 532~588 nm。试验所用的拟南芥 *oleosin* 基因 (AtOLEO2-RFP) 质粒由笔者所在实验室保存。

2 结果与分析

2.1 *Oleosin* 基因家族成员鉴定及理化性质分析

以拟南芥 *oleosin* 基因^[29] 作为参照, 在山核桃和薄壳山核桃基因组中分别鉴定到 7 个和 8 个具有脯氨酸发卡结构域的 *oleosin* 基因, 进一步利用 ProtParam 软件对 15 个 *oleosin* 蛋白的理化性质进行分析。结果显示 (表 2), 山核桃和薄壳山核桃 *oleosin* 基因编码 139~166 个氨基酸; 蛋白质分子质量为 14.54~17.51 ku; 等电点范围为 9.33~10.36, 蛋白不稳定系数介于 28.71~63.13 之间, 脂肪系数为 88.86~112.11, 平均亲水性介于 0.098~0.467 之间。对亚细胞定位进行预测, 结果发现, CCA0520S0025、CCA0779S0183、CIL1212S0020、CIL0938S0150 可能定位于叶绿体, CCA0514S0208 和 CIL0009S0029 可能定位于液泡膜, 其余 9 个山核桃 *oleosin* 蛋白可能定位于细胞质膜。综上, 山核桃与薄壳山核桃的蛋白质分子质量均小于 25 ku, 具有较高的等电点和脂肪系数, 即山核桃和薄壳山核桃具有相似的理化性质。

2.2 *Oleosin* 蛋白质保守结构域及启动子顺式作用元件分析

通过氨基酸多重序列比对, 发现山核桃和薄壳山核桃 *oleosin* 蛋白都具有一个典型的且高度保守的“脯氨酸结”基序 (图 1-A), 即包含 1 个丝氨酸残基和 3 个脯氨酸残基, 可简化为 PX₅SPX₃P, 该结构是油体中特有的结构。对山核桃与薄壳山核桃 *oleosin* 基因结构分析, 发现 *oleosin* 基因家族成员均含有一个外显子, 无内含子。山核桃与薄壳山核桃 *oleosin* 蛋白保守基序分析显示, 山核桃和薄壳山核桃 15 个 *oleosin* 基因均包含 motif 1、motif 2、motif 3 和 motif 4 基序, 推测该 4 个基序在 *oleosin* 蛋白序列中高度保

表 2 山核桃和薄壳山核桃 *oleosin* 基因家族成员理化特征分析Table 2 Analysis of protein characterization of *oleosin* genes family members in *Carya cathayensis* and *Carya illinoensis*

物种 Species	基因 ID Gene ID	氨基酸长度 Amino acid length/aa	分子质量 Molecular weight/ku	等电点 PI	不稳定系数 Instability index	脂肪系数 Aliphatic index	平均亲水性 Grand average of hydropathi-city	亚细胞定位 Subcellular localization
山核桃 <i>Carya cathayensis</i>	CCA0674S0096	147	15.675 40	9.57	29.04	112.11	0.467	细胞质膜 Plasma membrane
	CCA0514S0208	148	15.722 50	9.51	41.45	107.50	0.411	液泡膜 Vacular membrane
	CCA0656S0072	139	14.580 11	9.83	38.59	107.41	0.422	细胞质膜 Plasma membrane
	CCA0656S0074	139	14.592 16	9.83	37.98	110.22	0.459	细胞质膜 Plasma membrane
	CCA0791S0002	156	16.192 86	10.27	34.76	94.55	0.263	细胞质膜 Plasma membrane
	CCA0520S0025	154	16.223 00	10.28	55.85	105.84	0.147	叶绿体 Chloroplast
	CCA0779S0183	140	14.536 04	10.13	62.88	102.50	0.224	叶绿体 Chloroplast
薄壳山核桃 <i>Carya illinoensis</i>	CIL1212S0020	156	16.948 69	9.33	41.54	98.91	0.408	叶绿体 Chloroplast
	CIL0212S0015	147	15.728 48	9.47	28.71	105.51	0.401	细胞质膜 Plasma membrane
	CIL0252S0009	156	16.163 84	10.36	40.16	92.12	0.204	细胞质膜 Plasma membrane
	CIL0009S0029	140	14.646 01	9.98	36.90	106.00	0.341	液泡膜 Vacular membrane
	CIL1494S0045	154	16.237 98	10.28	50.19	102.01	0.131	细胞质膜 Plasma membrane
	CIL0940S0119	139	14.558 04	9.80	32.75	107.41	0.389	细胞质膜 Plasma membrane
	CIL0938S0150	166	17.505 37	9.93	40.70	88.86	0.098	叶绿体 Chloroplast
CIL0922S0190	140	14.583 18	10.36	63.13	109.50	0.274	细胞质膜 Plasma membrane	

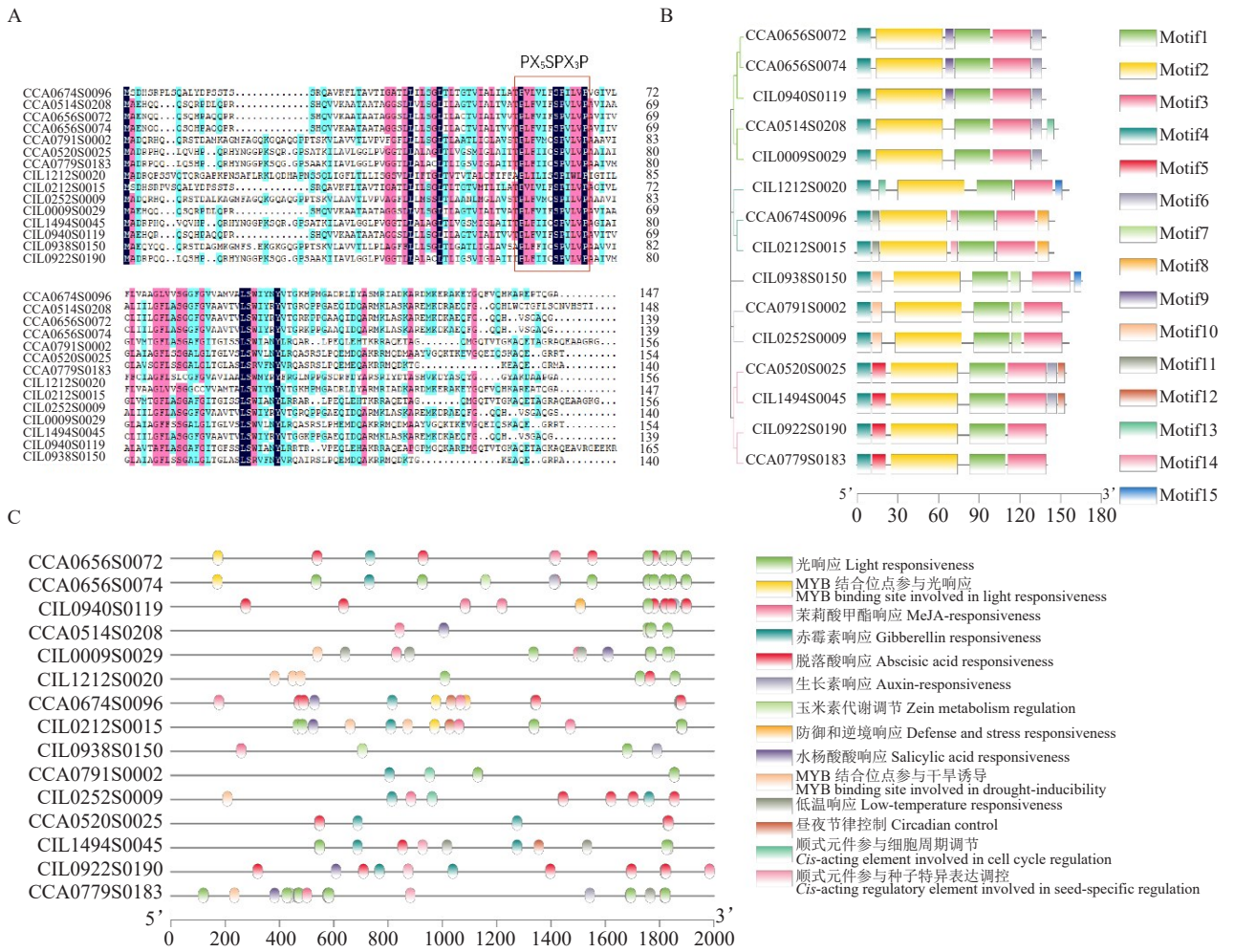
守;从基序结构和基序位置来看,CIL0938S0150、CCA0791S0002与CIL0252S0009的基序位置相似,而CIL0938S0150蛋白序列存在额外的motif 15基序,可能具有特异性的功能;类似的,CCA0656S0072、CCA0656S0074与CIL0940S0119 3个蛋白具有一致的保守基序,暗示蛋白结构和功能可能相似(图1-B)。

通过PlantCARE在线工具对山核桃和薄壳山核桃 *oleosin* 基因启动子顺式作用元件进行功能预测。结果发现山核桃和薄壳山核桃 *oleosin* 基因启动子均含有激素响应和胁迫响应元件。在山核桃和薄壳山核桃中分别有5个和7个 *oleosin* 基因启动子中含有MeJA响应元件、分别有5个和4个 *oleosin* 基因启动子中含有GA响应元件、分别有5个和6个 *oleosin* 基因启动子中含有ABA响应元件。除了CCA0520S0025、CIL0922S0190和CIL0252S0009

外,其余 *oleosin* 基因均含有光周期响应元件。同时发现 CCA0779S0183、CIL0009S0029、CIL1212S0020、CIL0212S0015与CIL0252S0009启动子中含有干旱响应元件。CCA0779S0183、CIL0009S0029与CIL1494S0045启动子中含有低温响应元件(图1-C)。在15个 *oleosin* 基因启动子中均检测到应对环境变化和激素信号相关的顺式作用元件,因此推测山核桃和薄壳山核桃 *oleosin* 基因响应逆境及激素信号而参与调控植物生长发育。

2.3 *Oleosin* 基因家族系统发育进化分析

利用MEGA7.0软件对山核桃(7个)和薄壳山核桃(8个)、拟南芥(17个)、油菜(17个)、花生(17个)和大豆(14个)的 *oleosin* 基因进行系统进化分析。结果表明,以上80个基因可划分为4个亚家族,包括T-Oleosin、U-Oleosin、SH-Oleosin和SL-Oleosin(图2)。山核桃与薄壳山核桃15个 *oleosin* 基因分布



A. 山核桃和薄壳山核桃 *oleosin* 蛋白多重序列比对;B. 山核桃和薄壳山核桃 *oleosin* 基因家族成员的蛋白质保守基序;C. 山核桃和薄壳山核桃 *oleosin* 基因启动子顺式作用元件。

A. Multiple sequence alignment of *oleosin* in *Carya cathayensis* and *Carya illinoensis*; B. Protein conserved motifs of *oleosin* gene family members in *Carya cathayensis* and *Carya illinoensis*; C. The promoter *cis*-acting elements in the *oleosin* gene in *Carya cathayensis* and *Carya illinoensis*.

图1 山核桃和薄壳山核桃 *oleosin* 蛋白保守基序和启动子顺式作用元件分析

Fig. 1 Analysis of conserved motif and the promoter *cis*-acting elements of *oleosin* protein in *Carya cathayensis* and *Carya illinoensis*

在 U-Oleosin, SH-Oleosin, SL-Oleosin 3 个亚家族。SL-Oleosin 是最大亚族分支,约占山核桃和薄壳山核桃 *oleosin* 基因成员的 1/2。在 SL-Oleosin 亚家族中,山核桃和薄壳山核桃 *oleosin* 基因分布在 2 个分支中,CCA0791S0002、CIL0938S0150 与 CIL0252S0009 处于同一分支,亲缘关系最近。另一分支中 CCA0520S0025 与 CIL1494S0045、CCA0779S0183 和 CIL0922S0190 汇聚。在 U-Oleosin 亚家族中,山核桃和薄壳山核桃 *oleosin* 基因同样分布在 2 个分支中,CCA0674S0096 和 CIL0212S0015 聚在同一分支,亲缘关系最近;CIL1212S0020 分布在另

一支中,未发现亲缘关系较近的山核桃 *oleosin* 基因。在 SH-Oleosin 分支中,山核桃与薄壳山核桃 *oleosin* 基因聚在同一分支,亲缘关系较近,先与花生和大豆 *oleosin* 基因汇聚在一个分支,最后与十字花科的油菜和拟南芥 *oleosin* 基因汇聚在一起。

2.4 山核桃 *oleosin* 基因在胚发育不同阶段的表达模式分析

利用山核桃胚发育不同阶段转录组数据库,分析 *oleosin* 基因在胚发育不同阶段(S1、S2、S3、S4、S5)的表达模式(图3)。从 *oleosin* 基因表达水平分

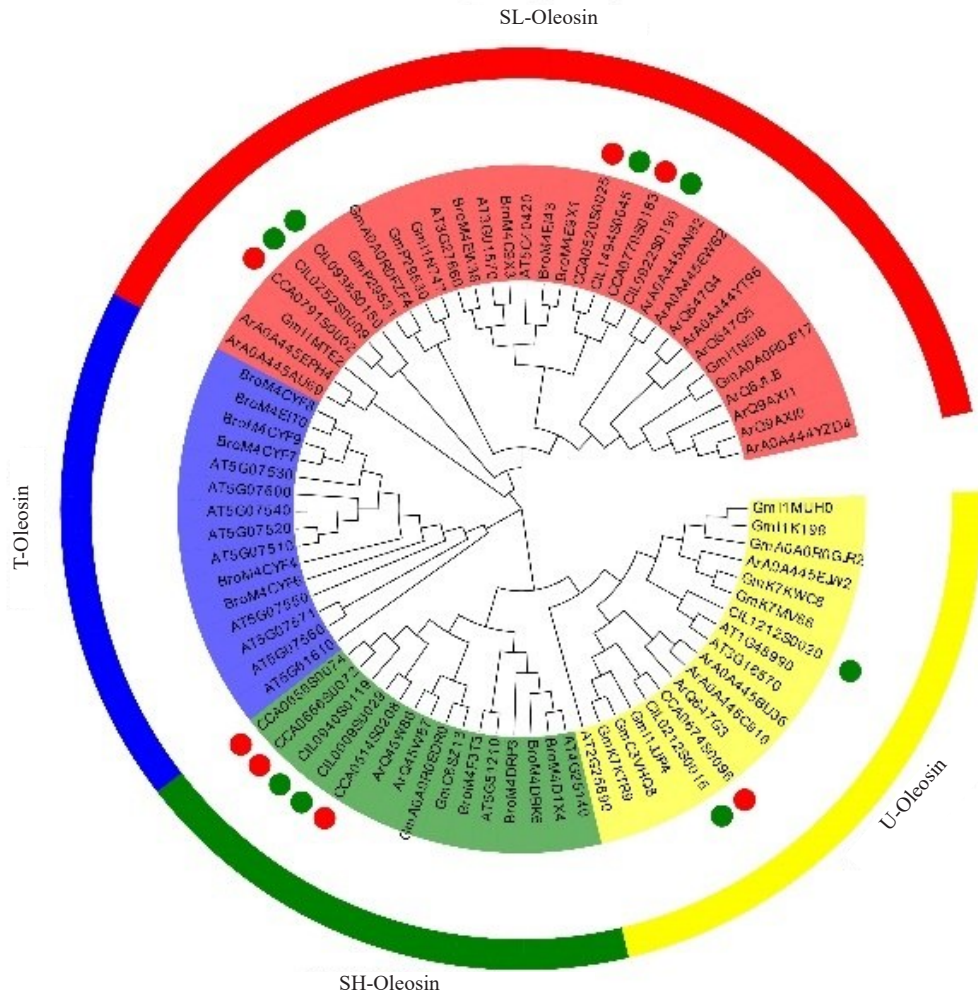


图 2 山核桃、薄壳山核桃、拟南芥、大豆、花生和油菜 oleosin 基因系统进化分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of oleosin genes family in *Carya cathayensis*, *C. illinoensis*, *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, *Arachis hypogaea* and *Brassica napus*

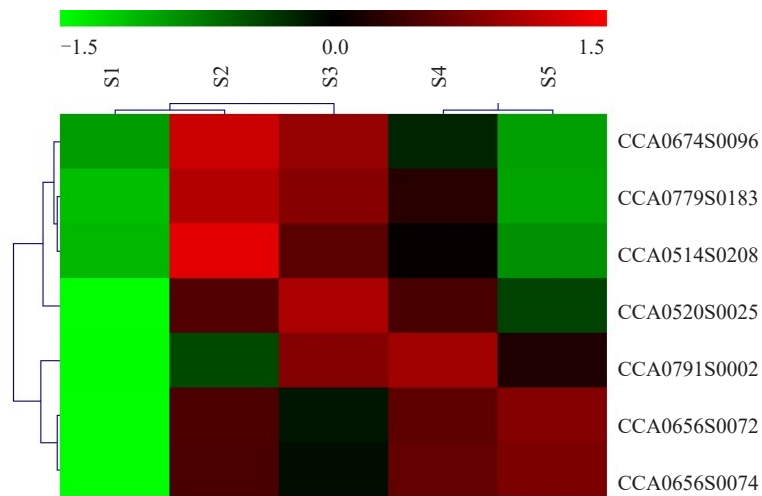


图 3 山核桃 oleosin 基因在胚不同发育阶段的表达模式

Fig. 3 Expression pattern of oleosin genes family in the embryo during different developmental stages of *Carya cathayensis*

析,CCA0674S0096、CCA0779S0183、CCA0514S0208 与 CCA0520S0025 表达趋势一致可聚为一类; CCA0791S0002、CCA0656S0072 与 CCA0656S0074 表达趋势一致可聚为一类。从山核桃胚发育阶段分析,*oleosin* 基因表达模式在胚发育的S1、S2和S3阶段可聚为一类,S4和S5阶段可聚为一类。

相对S1时期,山核桃 *oleosin* 基因在胚发育不同阶段均呈现不同程度的上调表达;在 CCA0656S0072 与 CCA0656S0074 中 *oleosin* 基因在 S5 阶段显著上调表达;S2 到 S3 阶段, CCA0520S0025 和 CCA0791S0002 中 *oleosin* 基因表

达量显著增加,因此推测 *oleosin* 基因在胚发育不同阶段具有功能多样性。

2.5 山核桃 *oleosin* 基因在 ABA 处理与低温胁迫下的表达模式分析

山核桃 *oleosin* 基因启动子区域含有 1 个至多个不等的 ABA 响应元件和低温胁迫响应相关元件。挑选山核桃 6 个 *oleosin* 基因,利用 qRT-PCR 分析 ABA 和低温胁迫条件下的基因表达模式。结果显示(图 4-A),在 ABA 处理条件下,山核桃 *oleosin* 基因均呈现出上升表达趋势。CCA0791S0002、CCA050S0025、CCA0514S0208 和

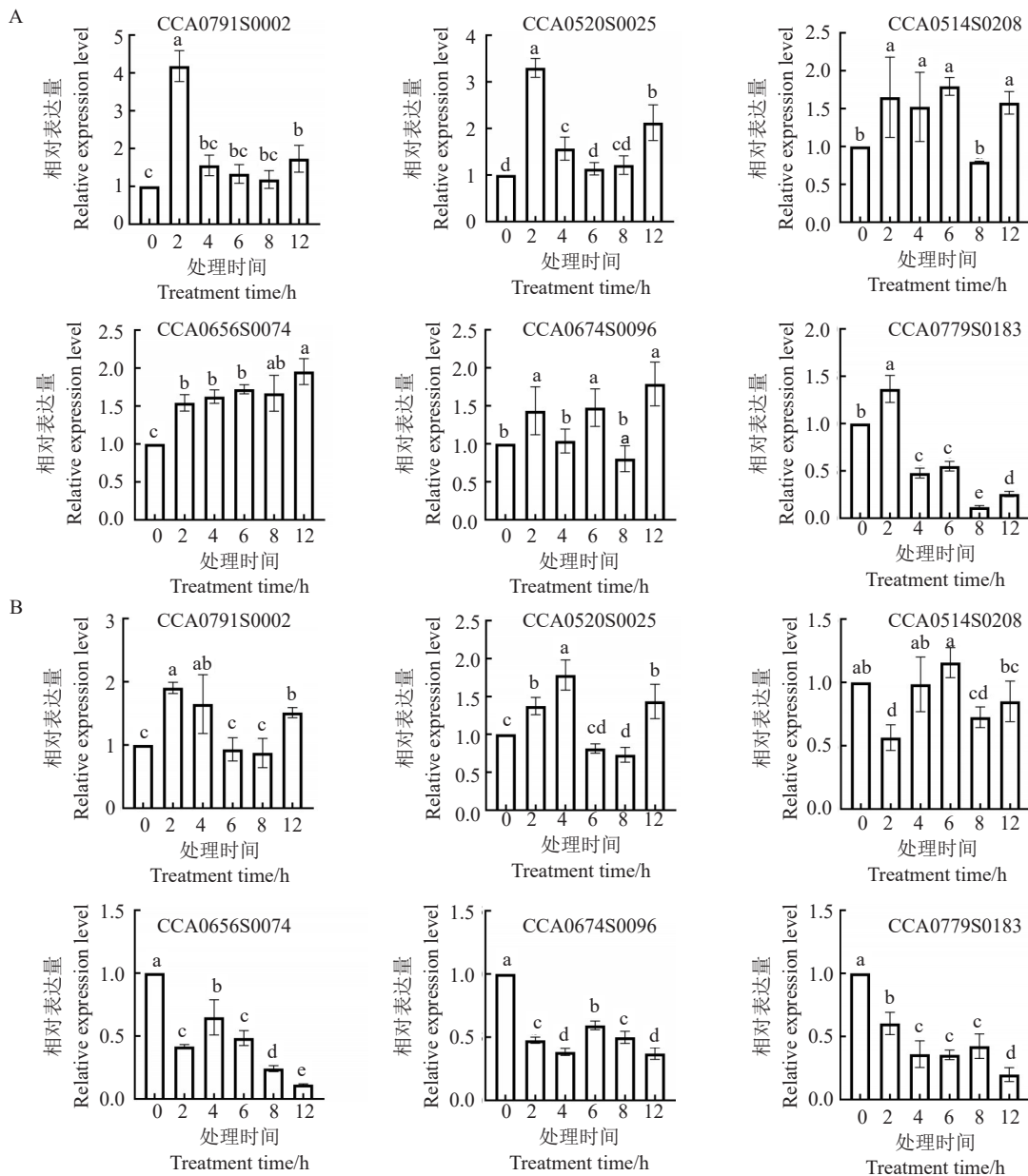


图 4 山核桃 *oleosin* 基因在 ABA 和低温胁迫处理下的表达模式

Fig. 4 Expression patterns of *Carya cathayensis oleosin* genes under ABA and low-temperature treatments

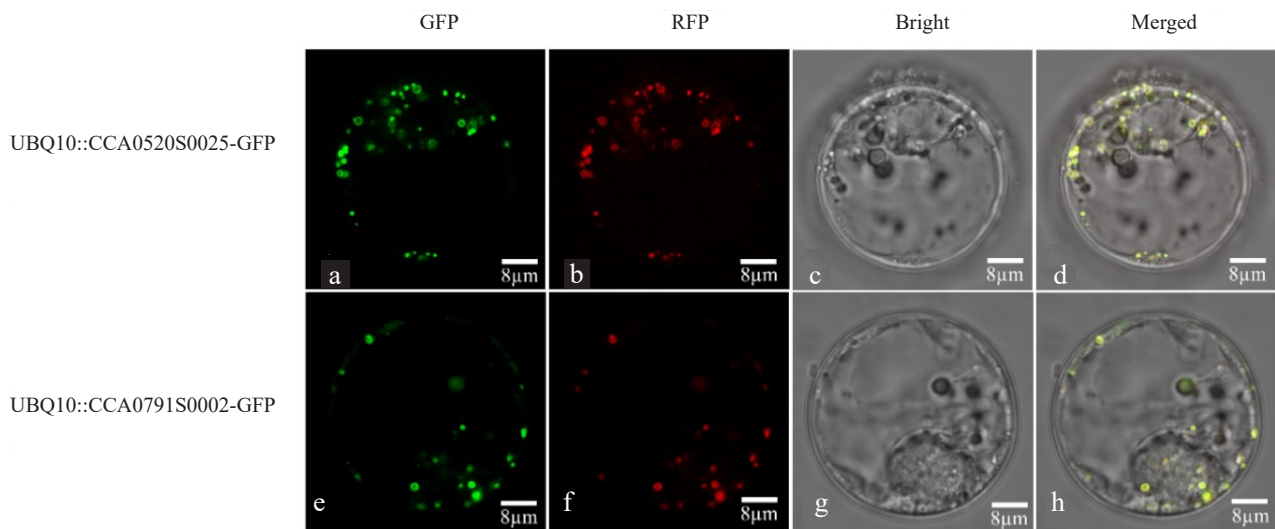
CCA0674S0096 基因表达模式相近,呈现上升趋势,CCA0791S0002和CCA050S0025均在ABA处理2 h达到表达峰值;CCA0656S0074在ABA处理后呈现持续上升趋势,表达量在处理12 h后达到最高值;CCA0779S0183在ABA处理4 h后出现下降表达趋势,表达量在2 h达到表达峰值。

在低温胁迫处理条件下,山核桃 *oleosin* 基因表达呈现出3种不同的表达模式(图4-B),分别呈现上升趋势(CCA0791S0002和CCA0520S0025)、先下降后上升再下降的双峰表达趋势(CCA0514S0208)以及下降表达趋势(CCA0656S0074、CCA0674S0096和

CCA0779S0183)。

2.6 Oleosin 蛋白亚细胞定位分析

为进一步研究 *oleosin* 蛋白的亚细胞定位,分别构建融合 GFP 标签的 *oleosin* 蛋白 CCA0520S0025 和 CCA0791S0002 瞬时转化表达载体 (pBI221-UBQ10-CCA0520S0025-GFP 和 pBI221-UBQ10-CCA0791S0002-GFP)(图5)。利用拟南芥悬浮细胞瞬时转化体系,以拟南芥 AtOLEO2-RFP 为阳性对照,观察 *oleosin* 蛋白的亚细胞定位情况。结果发现 CCA0520S0025-GFP 和 CCA0791S0002-GFP 均与 AtOLEO2-RFP 共定位,且都定位于油体,表明



a, e. GFP 荧光场; b, f. 油体蛋白 AtOLEO2-RFP 荧光场; c, g. 明场; d, h. 明场与荧光场叠加; a~d. CCA0520S0025-GFP 在拟南芥原生质体中瞬时表达情况; e~h. CCA0791S0002-GFP 在拟南芥原生质体瞬时表达情况; 比例尺 8 μm 。

a, e. GFP fluorescence field; b, f. Lipid droplet marker RFP fluorescence field; c, g. Bright field; d, h. Merged with GFP and RFP. a-d. Colocalization of CCA0520S0025-GFP with Arabidopsis OB marker protein AtOLEO2-RFP; e-h. Colocalization of CCA0791S0002-GFP with Arabidopsis OB marker protein AtOLEO2-RFP; Bar. 8 μm .

图5 CCA0520S0025 和 CCA0791S0002 亚细胞定位

Fig. 5 Subcellular localization of CCA0520S0025 and CCA0791S0002 in the *Carya cathayensis*

CCA0520S0025 和 CCA0791S0002 均是油体蛋白。

3 讨论

本研究从山核桃和薄壳山核桃基因组中分别鉴定到7个和8个含有完整开放阅读框的 *oleosin* 基因。目前已从拟南芥和油菜基因组中分别鉴定到了17个和48个 *oleosin* 基因^[29]。在四倍体棉种陆地棉 (*Gossypium hirsutum*) 和巴巴登棉 (*Gossypium barbadense*) 中分别鉴定出25个和24个 *oleosin* 基因,而在二倍体棉种树木棉 (*Gossypium arboreum*) 和雷蒙地棉 (*Gossypium raimondii*) 中分别鉴定出12个和

13个 *oleosin* 基因^[30]。相对于油菜 *oleosin* 蛋白序列末端的高度可变性,导致其理化性质存在一定差异性,属于两亲性蛋白^[29]。通过理化性质分析发现,山核桃和薄壳山核桃 *oleosin* 蛋白属于碱性蛋白。源自于不同物种的油体蛋白可划分为6大类谱系:P-Oleosin, U-Oleosin, SL-Oleosin, SH-Oleosin, T-Oleosin 和 M-Oleosin^[4, 6]。其中 M-Oleosin 存在于花椰菜^[31-32], T-Oleosin 仅存在于十字花科物种, P-Oleosin 主要分布于绿藻,是 U-Oleosin 的来源, P-Oleosin 可进一步进化为 SL-Oleosin 和 SH-Oleosin^[4]。通过系统进化分析, CIL12125S0020、AT3G18570 和

AT1G48990 聚在同一分支,亲缘关系较近,推测具有相似的生物学功能。同时发现,CCA0656S0072与CCA0656S0074、CCA0520S0025与CIL149480045、CCA0779S0183与CIL092280190的蛋白序列、基因结构及进化上较为相近,分别可归类为山核桃与薄壳山核桃的同源蛋白。

油体蛋白 *oleosin* 是存在于油体表面的一类重要蛋白,在油体形成、油体形态稳定性、种子萌发及响应逆境胁迫等方面具有重要调控作用^[33]。油体蛋白 *oleosin* 调控油体形成。研究发现,墨西哥鳄梨中油体蛋白 PaOle1 是中果皮特有的,与果实成熟相关,在青果期高表达,并且与果实含油量相关^[34]。在山核桃胚发育过程中,胚含油量在 S1 到 S5 阶段不断增加,其中 S2 到 S3 阶段为快速积累阶段^[26]。分析发现山核桃 *oleosin* 基因在胚发育不同阶段也呈现上调表达趋势,其中 CCA0520S0025 和 CCA0791S0002 在 S2 到 S3 阶段的表达量显著上调,推测在胚发育含油量快速积累阶段发挥重要作用。油体蛋白 *oleosin* 调控油体大小与脂肪酸含量。在烟草中过表达油用芍药 *PoOle17.5* 基因,烟草种子百粒质量和脂肪酸含量显著增加^[18];在拟南芥中超表达油菜 *oleosin* 基因 (*BnaOLE1- BnaOLE4*),除 *BnaOLE1* 外,转基因拟南芥种子的油体均显著大于野生型;同时发现转基因拟南芥株系脂肪酸组成改变,主要表现为亚油酸含量增加而花生酸含量降低^[29]。

油体蛋白 *oleosin* 响应逆境胁迫。研究发现,甘蓝型油菜经 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ JA 处理后,*oleosin* 基因表达量增高^[35];在干旱状态下,野生型拟南芥经 ABA 和山梨醇处理后,*oleosin* 基因表达量增高^[36];高粱 (*Sorghum bicolor*)^[37] *oleosin* 基因通过调节膜渗透性,可参与 ABA 响应; $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 处理拟南芥 *AtSAG* 突变体时,*OLE2* 基因的表达量显著上升^[38]。油体蛋白能维持低温胁迫下油体的完整性,进而提高种子的抗寒力,保证种子经过低温胁迫后仍然能正常萌发^[17]。研究发现,在油体蛋白缺失的突变体中,油体蛋白水平影响了种子的发芽和耐冻性;拟南芥单突变体种子 *ole1* 和 *ole2* 在低温处理后,萌发率降低;双突变体种子 *ole1ole2* 和 *ole1ole3* 经过 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温处理后加快了油体的融合,使种子出现致死现象^[16]。在拟南芥 *oleosin1* 突变体中超表达饲用高粱 *oleosin* 基因 (*SbOle*) 并进行冷冻处理,结果发现超表

达 *SbOle* 基因植株提高了拟南芥的发芽率^[39]。

综上所述,油体蛋白 *oleosin* 在油体形成、种子萌发以及逆境胁迫中发挥重要作用,对于山核桃 *oleosin* 蛋白功能分析是下一步重要工作内容,特别是 CCA0520S0025 和 CCA0791S0002 响应山核桃油脂积累,响应 ABA 以及低温诱导,可能参与调控山核桃种子形成含油量积累、种子萌发等生物学过程。

4 结 论

对山核桃和薄壳山核桃基因组中 *oleosin* 基因家族成员进行了基因结构分析;系统进化分析,发现 *oleosin* 基因家族成员主要分布在 U-Oleosin、SL-Oleosin 和 SH-Oleosin 3 个亚家族;顺式作用元件分析,结果显示 *oleosin* 基因家族成员可能参与逆境胁迫和激素调控。荧光定量 PCR 结果表明山核桃 *oleosin* 基因 CCA0520S0025 和 CCA0791S0002 响应 ABA 和低温胁迫。基于转录组数据分析表明 *oleosin* 基因家族成员在山核桃胚发育过程中发挥重要作用。亚细胞定位分析进一步表明 CCA0520S0025 和 CCA0791S0002 蛋白均定位于油体,可能在油脂合成过程中发挥重要作用。

参考文献 References:

- [1] 陈镇,李秀丽,陈法志. 植物油体合成及功能研究进展[J]. 世界科技研究与发展,2021,43(2):182-191.
CHEN Zhen, LI Xiuli, CHEN Fazhi. Research progress on biological synthesis and biological function in plant oil body[J]. World Sic-Tech R&D, 2021, 43(2):182-191.
- [2] SHAO Q, LIU X F, SU T, MA C L, WANG P P. New insights into the role of seed oil body proteins in metabolism and plant development[J]. Front in Plant Science, 2019, 10: 1568.
- [3] CHAPMAN K D, DYER J M, MULLEN R T. Biogenesis and functions of lipid droplets in plants: thematic review series: Lipid droplet synthesis and metabolism: from yeast to man[J]. Journal of Lipid Research, 2012, 53(2):215-226.
- [4] HUANG A. Plant lipid droplets and their associated proteins: Potential for rapid advances[J]. Plant Physiology, 2018, 176(3): 1894-1918.
- [5] CAPUANO F, BEAUDOIN F, NAPIER J A, SHEWRY P R. Properties and exploitation of oleosins[J]. Biotechnology Advances, 2007, 25(2):203-206.
- [6] 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[J]. Plant Physiology, 2015, 169(1):453-470.
- [7] DERUYFFELAERE C, BOUCHEZ I, MORIN H, GUILLOT A,

- MIQUEL M, FROISSARD M, CHARDOT T, D'ANDREA S. Ubiquitin-mediated proteasomal degradation of oleosins is involved in oil body mobilization during post-germinative seedling growth in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell Physiology*, 2015, 56(7):1374-1387.
- [8] ROUX E, BAUMBERGER S, AXELOS M A, CHARDOT T. Oleosins of *Arabidopsis thaliana*: expression in *Escherichia coli*, purification, and functional properties[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(16):5245-5249.
- [9] KEDDIE J S, HYUBNER G, SLOCOMBEI S P, JARVIS R P, CUMMINS I, EDWARDS E W, SHAW C H, MURPHY D J. Cloning and characterisation of an oleosin gene from *Brassica napus*[J]. *Plant Molecular Biology*, 1992, 19(3):443-453.
- [10] XU M Y, LIU D H, LI G Q. Cloning of soybean 24 kDa oleosin gene and its transient expression as a carrier for foreign protein[J]. *Agricultural Sciences in China*, 2004, 3(5):321-329.
- [11] TAI S S, CHEN M C, PENG C C, TAEN J T. Gene family of oleosin isoforms and their structural stabilization in sesame seed oil bodies[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2002, 66(10):2146-2153.
- [12] 睦顺照, 祝钦泷, 郑丽, 郭余龙, 李名扬, 裴炎. 植物蛋白 oleosin 及其在植物基因工程中的应用[J]. *中国生物工程杂志*, 2003(6):17-21.
- SUI Shunzhao, ZHU Qinlong, ZHENG Li, GUO Yulong, LI Mingyang, PEI Yan. Plant oleosin and their application on plant gene engineering[J]. *China Biotechnology*, 2003(6):17-21.
- [13] VAN ROOIJEN G J H, MOTONEY M M. Plant seed oil-bodies as carriers for foreign proteins[J]. *Bio-Technology*, 1995, 13(1):72-77.
- [14] KIM H U, HSIEH K, RATNAYAKE C, HUANG A H. A novel group of oleosins is present inside the pollen of *Arabidopsis*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(25):22677-22684.
- [15] SILOTO R, FINDLAY K, LOPEZ-VILLALOBOS A, YEUNG E, CORY N, MOLONEY M. The accumulation of oleosins determines the size of seed oilbodies in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2006, 18(8):1961-1974.
- [16] 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[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2013, 126(9):2289-2297.
- [17] SHIMADA T L, SHIMADA T, TAKAHASHI H, FUKAO Y, HARA-NISHIMURA I. A novel role for oleosins in freezing tolerance of oilseeds in *Arabidopsis thaliana*[J]. *The Plant Journal*, 2008, 55(5):798-809.
- [18] ZHAO D Q, LI T T, LI Z Y, SUN J, TAO J. Characteristics of *Paeonia ostii* seed oil body and OLE17.5 determining oil body morphology[J]. *Food Chemistry*, 2020, 319:126548.
- [19] GU J W, HOU D L, LI Y H, CHAO H B, ZHANG K, WANG H, XIANG J, RABOANATAHIRY N, WANG B S, LI M T. Integration of proteomic and genomic approaches to dissect seed germination vigor in *Brassica napus* seeds differing in oil content[J]. *BMC Plant Biology*, 2019, 19(1):21.
- [20] 邓杨勇, 高龙军. 山核桃产业发展现状及对策[J]. *现代农业科技*, 2020(8):91-92.
- DENG Yangyong, GAO Longjun. Development situation and countermeasures of hickory industry[J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2020(8):91-92.
- [21] HUANG Y J, XIAN L H, ZHANG Z R, ZHANG R, WANG Z J, HUANG C Y, HUANG R, LUAN Y M, FAN T Q, WANG J H, SHEN C, ZHANG S M, WANG X W, RANDALL J, ZHENG B S, WU J S, ZHANG Q X, XIA G H, XU C M, CHEN M, ZHANG L S, JIANG W K, GAO L Z, CHEN Z D, LESLIE C A, GRAUKE L J, HUANG J Q. The genomes of pecan and Chinese hickory provide insights into *Carya evolution* and nut nutrition[J]. *Gigascience*, 2019, 8(5):giz036.
- [22] 吕秋菊, 沈月琴, 高宇列, 黄坚钦. 山核桃产业的发展过程、动因及展望[J]. *浙江农林大学学报*, 2012, 29(1):97-103.
- LÜ Qiuju, SHEN Yueqin, GAO Yulie, HUANG Jianqin. Development process, agents and prospect of hickory industry[J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2012, 29(1):97-103.
- [23] 黄春颖, 黄有军, 吴建峰, 黄仁, 栾雨濛, 张深梅, 王正加, 张启香, 黄坚钦. SAD 和 FAD 家族基因调控山核桃不饱和脂肪酸组分配比[J]. *园艺学报*, 2018, 45(2):250-260.
- HUANG Chunying, HUANG Yuojun, WU Jianfeng, HUANG Ren, LUAN Yumeng, ZHANG Shenmei, WANG Zhengjia, ZHANG Qixiang, HUANG Jianqin. SAD and FAD genes regulate the ratio of unsaturated fatty acid components in *Carya cathayensis*[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2018, 45(2):250-260.
- [24] 郭传友, 黄坚钦, 方炎明. 山核桃研究综述及展望[J]. *经济林研究*, 2004(1):61-63.
- GUO Chuanyou, HUANG Jianqin, FANG Yanming. Review and perspective of research on *Carya cathayensis*[J]. *Non-wood Forest Research*, 2004(1):61-63.
- [25] 徐胤, 胡秋涛, 侯丹, 鲁海雯, 林新春. 毛竹 NCED 基因家族的全基因组鉴定及表达分析[J]. *农业生物技术学报*, 2021, 29(6):1061-1072.
- XU Ying, HU Qiutao, HOU Dan, LU Haiwen, LIN Xinchun. Genome-wide identification and expression analysis of NCED gene family in *Phyllostachys edulis*[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2021, 29(6):1061-1072.
- [26] HUANG C Y, LI Y, WANG K T, XI J W, XU Y F, SI X L, PEI D, LYU S H, XIA G H, WANG J H, LI P P, YE H Y, XING Y L, WANG Y G, HUANG J Q. Analysis of lipidomics profile of *Carya cathayensis* nuts and lipid dynamic changes during embryonic development[J]. *Food Chemistry*, 2022, 370:130975.
- [27] CONNOLLY M A, CLAUSEN P A, LAZAR J G. Preparation of RNA from plant tissue using trizol[J]. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(1):pdb.prot4105.
- [28] ZENG Y L, JI C Y, LIN Y S, JIANG L W. Transient expression

- of fluorescent fusion proteins in *Arabidopsis protoplasts*[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2021, 2200: 157-165.
- [29] CHEN K, YIN Y T, LIU S, GUO Z Y, ZHANG K, LIANG Y, ZHANG L N, ZHAO W G, CHAO H B, LI M T. Genome-wide identification and functional analysis of oleosin genes in *Brassica napus* L.[J]. *BMC Plant Biology*, 2019, 19(1): 294.
- [30] YUAN Y C, CAO X Z, ZHANG H J, LIU C Y, ZHANG Y X, SONG X L, GAI S P. Genome-wide identification and analysis of oleosin gene family in four cotton species and its involvement in oil accumulation and germination[J]. *BMC Plant Biology*, 2021, 21(1): 569.
- [31] HUANG C Y, HUANG A H C. Unique motifs and length of hairpin in oleosin target the cytosolic side of endoplasmic reticulum and budding lipid droplet[J]. *Plant Physiology*, 2017, 174(4): 2248-2260.
- [32] FANG Y, ZHU R L, MISHLER B. Evolution of oleosin in land plants[J]. *PloS One*, 2014, 9(8): e103806.
- [33] HUANG A H C. Oil bodies and oleosins in seeds[J]. *Annual Review of Plant Physiology*, 1992, 43: 177-200.
- [34] SANCHEZ-ALBARRCHEZ F, SUAREZ-RODRIGUEZ L M, RUIZ-HERRERA L F, LOPEZ-MEZA J E, LOPEZ-GOMEZ R. Two oleosins expressed in the mesocarp of native Mexican Avocado, key genes in the oil content[J]. *Plant Foods Human Nutrition*, 2021, 76(1): 20-25.
- [35] HAYS D B, WILEN R W, SHENG C, MOLONEY M M, PHARRIS R P. Embryo-specific gene expression in microspore-derived embryos of *Brassica napus*. An interaction between abscisic acid and jasmonic acid1, 2[J]. *Plant Physiology*, 1999, 119(3): 1065-1072.
- [36] TAKAHASHI S, KATAGIRI T, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K. An Arabidopsis gene encoding a Ca²⁺-binding protein is induced by abscisic acid during dehydration[J]. *Plant Cell Physiology*, 2000, 41(7): 898-903.
- [37] BUCHANAN C D, LIM S, SALZMAN R A, KAGIAMPAKIS I, MORISHIGE D T, WEERS B D, KLEIN R R, PRATT L H, CORDONNIER-PRATT M M, KLEIN P E, MULLETT J E. Sorghum bicolor's transcriptome response to dehydration, high salinity and ABA[J]. *Plant Molecular Biology*, 2005, 58(5): 699-720.
- [38] CHEN C T, WU C A, MIAO J M, LEI Y X, ZHAO D X, SUN D, YANG G D, HUANG J G, ZHENG C C. Arabidopsis SAG protein containing the MDN1 domain participates in seed germination and seedling development by negatively regulating ABI3 and ABI5[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(1): 35-45.
- [39] 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[J]. *Planta*, 2021, 254(5): 97.