

沙棘种子形成发育过程中油脂合成积累 关键基因的表达分析

丁 健^{1,2}, 阮成江^{1*}, 单金友², 关 莹²

(1 大连民族大学 资源植物研究所, 辽宁大连 116600; 2 黑龙江省农业科学院 浆果研究所, 黑龙江绥化 152200)

摘 要:为探讨沙棘种子油脂积累与相关基因表达的关系,以不同发育期间(6月25日、7月6日、7月17日、7月28日、8月8日和8月19日)的近缘高油品系‘新俄3号’和低油品系‘绥棘1号’种子为试材,利用氯仿甲醇法测定含油率,采用实时荧光定量PCR方法分析限速酶基因的表达模式,验证各基因在天然高低油种子间的表达差异。结果表明:(1)除7月17日外,其他时期‘新俄3号’的种子含油率均高于‘绥棘1号’;7月6日~7月28日期间油脂迅速积累,而且‘新俄3号’种子含油率增速大于‘绥棘1号’。(2)油脂迅速积累期的GPD1基因高表达,可能通过促进3-磷酸甘油合成进而加速‘新俄3号’种子油脂高积累;油脂积累过程中DGAT1和DGAT2基因在‘新俄3号’种子中的表达量一直高于‘绥棘1号’。研究认为,GPD1、DGAT1和DGAT2基因可能与‘新俄3号’种子油脂的相对高积累有关。本研究结果为进一步深入验证沙棘油脂合成限速酶基因功能奠定基础。

关键词:沙棘;含油率;油脂合成;基因表达

中图分类号:Q945.4;Q786

文献标志码:A

Expression of Key Genes Involved in Lipid Biosynthesis and Accumulation during Seeds Formation and Development in *Hippophae rhamnoides*

DING Jian^{1,2}, RUAN Chengjiang^{1*}, SHAN Jinyou², GUAN Ying²

(1 Institute of Plant Resources, Dalian Nationalities University, Dalian, Liaoning 116600, China; 2 Institute of Berries, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Suining, Heilongjiang 152200, China)

Abstract: To explore the relationship between lipid biosynthesis and relevant gene expression in sea buckthorn seeds, we harvested the developing seeds of the line ‘Xin’e 3’ with high oil content and the line ‘Suiji 1’ with low oil content as experimental materials on June 25, July 6, 17, 28, August 8 and 19. These two lines had closed genetic relationship. The oil content in seeds was determined by the method of chloroform methanol, and the expression profiles of GPD1, DGAT1 and DGAT2 genes involved in lipid biosynthesis were tested using real-time quantitative PCR. The results showed that: (1) the oil content in the seeds of ‘Xin’e 3’ was higher than that in ‘Suiji 1’ except for July 17. The rapid accumulations of seed lipid of these two lines were during July 6 to 28, and the increasing rates in ‘Xin’e 3’ were higher than that in ‘Suiji 1’; (2) the high expression of GPD1 gene occurred in the period of rapid lipid accumulation, which may speed up lipid biosynthesis in ‘Xin’e 3’ seeds through promoting the biosynthesis of glycerol-3-phosphate. The expression levels of DGAT1 and DGAT2 genes in line ‘Xin’e 3’ were higher than that in

收稿日期: 2016-05-16; 修改稿收到日期: 2016-07-12

基金项目: 国家自然科学基金(31570681)

作者简介: 丁 健(1983—), 男, 在读博士研究生, 助理研究员, 主要从事资源植物开发利用与遗传育种研究。E-mail: mervyntin2901@aliyun.com

* 通信作者: 阮成江, 教授, 主要从事木本油料种质创新与开发利用研究。E-mail: ruan@dlnu.edu.cn

line ‘Suiji 1’ during lipid accumulation. Thus, *GPD1*, *DGAT1* and *DGAT2* genes may be associated with the high accumulation of lipid in ‘Xin’e 3’ seeds. These results provided scientific bases for validating the function of genes encoding for rate-limiting enzymes involved in sea buckthorn lipid biosynthesis and accumulation.

Key words: *Hippophae rhamnoides*; oil content; lipid biosynthesis; gene expression

沙棘(*Hippophae rhamnoides* L.)为胡颓子科(Elaeagnaceae)沙棘属多年生灌木或小乔木,其果实油脂中高积累的 omega-3、omega-6 和 omega-7 脂肪酸,在预防和治疗癌症、冠心病和胃肠疾病等方面具有显著疗效^[1]。但较低的含油率(种子为 7%~11%,鲜果肉为 1%~5%)制约了沙棘油的高效开发和利用^[2-3],目前关于沙棘种子油脂合成积累机制的研究较少,其中的关键基因及代谢途径尚未清晰^[4]。

沙棘油脂的主要成分是甘油三酯(triacylglycerols, TAG),其含量与种子含油率密切相关^[2,5]。TAG 以 3-磷酸甘油(glycerol-3-phosphate, G3P)为骨架,在内质网上连续组装来自于细胞溶质的 acyl-CoA 脂肪酸而成^[6],而 G3P 是由糖酵解的中间产物磷酸二羟丙酮(dihydroxyacetone phosphate, DHAP)被 3-磷酸甘油脱氢酶还原而来^[7],*GPD1*(glycerol-3-phosphate dehydrogenase)是 3-磷酸甘油脱氢酶的编码基因,它在碳水化合物和脂类代谢中起关键作用^[8],是脂类合成的限速酶^[9]。Vigeo-las 等^[7,10]研究发现注射甘油到油菜(*Brassica napus* L.)种子中可提高 G3P 和 TAG 含量,随后,在油菜中异位表达酵母 *GPD1* 基因,发现其表达量增加 2 倍可使 G3P 水平增加 3~4 倍,种子含油率提高 40%,而且 G3P 含量与种子油脂积累存在协同关系。因此,*GPD1* 基因可能是影响沙棘种子含油率的重要基因。以 G3P 为初始底物的 Kennedy 途径是植物种子 TAG 合成的主要途径,即 G3P 经 3-磷酸甘油酰基转移酶(glycerol-3-phosphate acyltransferase, GPAT)和溶血磷脂酸酰基转移酶(lysophosphatidic acid acyltransferase, LPAAT)酰基化生成磷酸酯(phosphatidic acid, PA),然后 PA 经磷酸水解酶(phosphohydrolase)脱磷酸化为二酰甘油(diacylglycerol, DAG),最后经二酰甘油转移酶(diacylglycerol acyltransferases, DGAT)酰化为 TAG^[11]。DGAT 是影响脂类积累的限速酶^[12-13],在许多植物体中编码 2 类非同源的 DGAT 基因(*DGAT1* 和 *DGAT2*)^[14-15]。有研究发现 *DGAT1* 基因突变体可限制野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的 TAG 合成,而过量表达 *DGAT1* 基因可增加种子含油率 11%~28%^[13]。而 *DGAT2* 基

因在 TAG 合成过程中具有使 DAG 特异结合某些特殊脂肪酸的作用,如油桐(*Vernicia fordii*)中的桐油酸(eleostearic acid),其为一种十八碳三烯酸^[16]。Chen 等^[17]将油桐的 *VfDGAT2* 基因导入红酵母(*Rhodotorula glutinis*)和拟南芥中,发现 *VfDGAT2* 基因表达量与总脂肪酸含量线性相关。因此,*DGAT1* 和 *DGAT2* 基因也可能与沙棘种子油脂形成有密切关系。

本研究以高油品系‘新俄 3 号’和低油品系‘绥棘 1 号’种子为试材,分析不同时期的种子含油率,并研究 *GPD1*、*DGAT1* 和 *DGAT2* 基因表达模式及其在高低油种子中的表达差异,揭示高低油种子的油脂积累与相关限速酶基因的关系,这可为深入验证沙棘油脂合成限速酶基因功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材 料

以 2 个蒙古沙棘亚种‘新俄 3 号’(‘Xin’e 3’)和‘绥棘 1 号’(‘Suiji 1’)为试验材料,二者间基于 ISSR 标记分析的遗传相似系数为 0.756^[18],果实分别于 2015 年 6 月 25 日、7 月 6 日、7 月 17 日、7 月 28 日、8 月 8 日和 8 月 19 日采自黑龙江省农业科学院浆果研究所。各品系样品采自 3 株无性繁殖植株的多个部位,同植株果实混合,用锡纸包裹后置于液氮中速冻。样品运抵大连民族大学资源植物研究所,保存于-80℃冰箱备用。

1.2 方 法

1.2.1 种子含油率测定 采用氯仿甲醇法^[2,19-20]

测定不同时期沙棘种子含油率:冷冻干燥的种子粉末转移至玻璃试管中,加入甲醇和氯仿(均为色谱纯, Honeywell 公司)漩涡混匀后超声 30 min,上清液转移到新试管中,残渣用氯仿甲醇(体积浓度百分比 2:1)再次提取,合并的上清液加入其 1/4 体积的氯化钾溶液(质量浓度 0.88%),收集下层液至玻璃样品瓶中,挥发至恒重。含油率(%)=($m_1 - m_2$)/ $m \times 100$; m_1 为油脂和玻璃样品瓶的质量(g); m_2 为玻璃样品瓶的质量(g); m 为干燥样品粉末的质量(g),3 次重复。

表 1 荧光定量 RT-PCR 引物

Table 1 Primers for qRT-PCR used in this study

基因名称 Gene name	蛋白名称 Protein name	引物序列 Primer sequence(5'→3')		扩增长度 Fragment length/bp
		上游 Forward	下游 Reverse	
UBQ5	泛素蛋白 5 Ubiquitin 5	GGCGAGTTTGACCTTCTTCTT	CCACCTTGTTCTTCGTCTCC	103
GPD1	甘油-3-磷酸酰脱氢酶 1 Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1	AATCAACCGGACCAATGAAA	CATGTTTGCATCCTTTGCTG	106
DGAT1	二酰甘油酰基转移酶 1 Diacylglycerol acyltransferase 1	GCTGGTAGCATAATGTTGGTG	AGGGAGATGTCCAACCCAAT	102
DGAT2	二酰甘油酰基转移酶 2 Diacylglycerol acyltransferase 2	TCTTCTGGGGATTGTTTGGA	CAAAGTGACCATGTGCCTCA	132

1.2.2 荧光定量 RT-PCR 检测 参照柱式植物总 RNA 抽提纯化试剂盒(上海生物工程公司)方法提取沙棘种子总 RNA,根据 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒(大连宝生物公司)方法合成第一链 cDNA^[21]。

本研究前期构建了沙棘种子、果肉、叶、茎和根转录组,获得了大量的功能基因注释以及差异表达基因信息。利用筛选获得的目的基因片段和 PrimerQuest 在线软件设计特异引物(表 1)。参照 SYBR Premix Ex Taq™ II(Tli RNaseH Plus)试剂盒(大连宝生物公司)方法和 ABI7500 Real time PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司)推荐程序进行 qRT-PCR^[11],以沙棘 UBQ5 为内参基因^[4],采用 2^{-ΔΔCt}方法分析目的基因相对表达量^[22]。实验 3 次重复。

1.2.3 数据统计分析 利用 SPSS 20.0 软件进行单因素方差分析和 LSD 法进行差异性检验,采用 Excel2010 进行作图。

2 结果与分析

2.1 沙棘种子形成发育过程中含油率的动态变化

与 6 月 25 日相比,7 月 6 日后种子明显增大(图 1),8 月 8 日后种子体积减小,6 月 25 日~8 月 8

日期间种子和果实颜色变化明显。除 7 月 17 日外,其他 5 个时期的‘新俄 3 号’种子含油率均高于‘绥棘 1 号’(图 2)。6 月 25 日~7 月 6 日期间含油率的下降,可能与‘绥棘 1 号’和‘新俄 3 号’种子未发育完全及多糖和蛋白质的积累有关^[23]。7 月 6 日~7 月 17 日为‘绥棘 1 号’的油脂迅速积累期,‘新俄 3

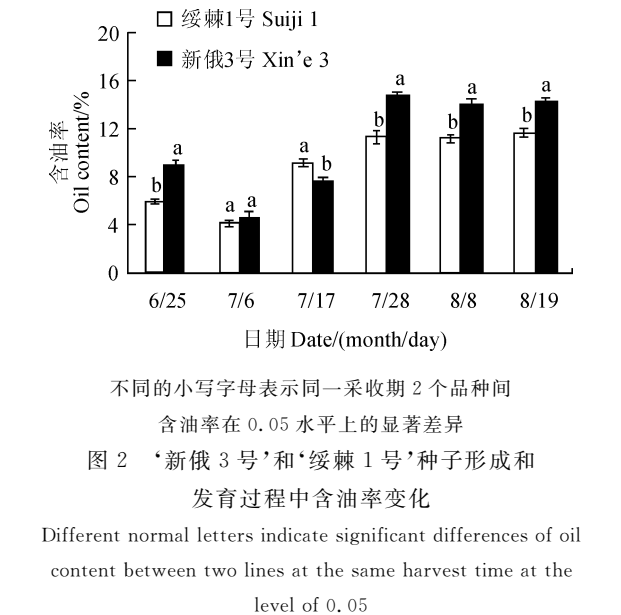
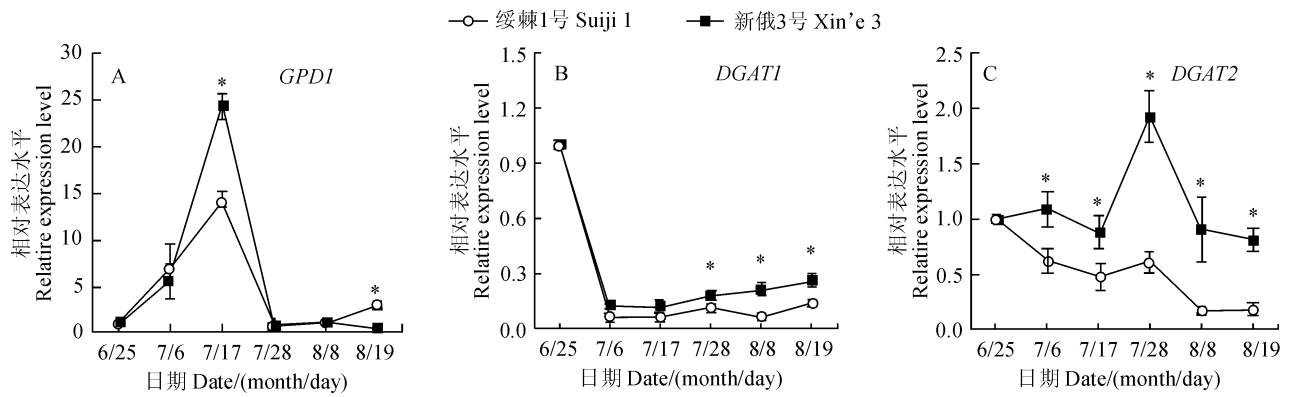


Fig. 2 Changes of oil contents in the seeds of lines ‘Suiji 1’ and ‘Xin’e 3’ during seed formation and development



图 1 品系‘新俄 3 号’和‘绥棘 1 号’果实和种子形态和颜色变化
Fig. 1 Shape and color of fruits and seeds of lines ‘Suiji 1’ and ‘Xin’e 3’



* 表示同一采收期 2 个品种间的基因相对表达量在 0.05 水平上的显著差异

图 3 GPD1、DGAT1 和 DGAT2 基因在‘新俄 3 号’和‘绥棘 1 号’种子中的表达差异

* indicates significant differences of gene relative expression level between the two lines on the same harvest time at the level of 0.05

Fig. 3 Differences of GPD1, DGAT1 and DGAT2 genes expression in seeds between the line ‘Suiji 1’ and ‘Xin’e 3’

号’为 7 月 17 日~7 月 28 日,且‘绥棘 1 号’更早进入油脂积累稳定期。7 月 28 日后‘新俄 3 号’的种子含油率是‘绥棘 1 号’的 1.2~1.3 倍(图 2)。

2.2 GPD1、DGAT1 和 DGAT2 基因表达分析

‘新俄 3 号’和‘绥棘 1 号’的 GPD1 基因表达量在 7 月 17 日达峰值(图 3,A),且‘新俄 3 号’的峰值显著高于‘绥棘 1 号’(约 1.6 倍)。GPD1 基因催化合成 G3P,油菜的 G3P 含量达峰值后的第 5~15 天,其种子油脂含量才开始迅速上升至峰值^[10]。‘新俄 3 号’的种子含油率在 7 月 28 日达峰值(图 2),滞后于 GPD1 表达量峰值 11 d。

7 月 6 日后‘新俄 3 号’和‘绥棘 1 号’开始形成完整的种子结构,‘新俄 3 号’的 DGAT1 和 DGAT2 基因表达量一直高于‘绥棘 1 号’(图 3,B、C);而且在 7 月 28 日~8 月 19 日期间达显著差异水平,与这一期间的‘新俄 3 号’种子含油率显著高于‘绥棘 1 号’相一致。尤其,‘新俄 3 号’的种子含油率(图 2)和 DGAT2 基因表达量均在 7 月 28 日达峰值(图 3,C)。

3 讨 论

沙棘种子油脂中亚油酸和亚麻酸比值符合健康食用油的国际标准(1:1~4:1)^[2,24],但较低的产量限制了沙棘油的开发利用。本研究考察了不同时期沙棘高低油种子的含油率,其变化趋势与麻疯树、油菜和芝麻相似^[25-27]。沙棘在 4 月末~5 月初授粉后以营养生长为主,且种子结构不完整,需要脂类参与其结构发育^[28],这可能与发育初期含油率下降有关。6 月 25 日~7 月 28 日期间,相对较高 GPD1 基因表达量,为 TAG 的合成积累更多初始底物 G3P^[7],进而提升种子含油率。在 Vigeolas 等^[10]向

油菜种子注射外源甘油的实验中,G3P 含量并未迅速上升,而且油脂含量高峰滞后于 G3P 高峰 15 d。本研究中含油率的变化也滞后于 GPD1 基因表达量的变化,6 月 25 日~7 月 6 日期间‘绥棘 1 号’的 GPD1 基因表达量高于‘新俄 3 号’,可能促进‘绥棘 1 号’积累了更多 G3P,使 7 月 17 日的含油率高于‘新俄 3 号’;随后‘新俄 3 号’的 GPD1 基因表达量超过‘绥棘 1 号’且达峰值(7 月 17 日),促使‘新俄 3 号’的含油率在 7 月 28 日达峰值且显著高于‘绥棘 1 号’,而且在油脂积累稳定期两个品系的种子含油率相差 1.2~1.3 倍,与 GPD1 基因表达量峰值相差倍数相近(1.6 倍)。因此,推测 GPD1 基因可促进沙棘种子油脂合成。近年来,在麻疯树(*Jatropha curcas* L.)和印加果(*Plukenetia volubilis* L.)种子中也发现 GPD 基因表达量与 TAG 含量变化相关^[21,25]。

‘新俄 3 号’的 GPD1 和 DGAT2 基因在油脂迅速积累期间均呈现出明显的表达量高峰,且显著高于‘绥棘 1 号’,表明 GPD1 和 DGAT2 基因在种子发育期间的高表达可能促进油脂高积累。发育期的印加果 GPD1 和 DGAT2 基因表达量也呈明显的单峰曲线变化规律,且与油脂合成相关^[21]。DGAT1 和 DGAT2 基因具有促进脂肪酸参与 TAG 组装的作用^[11]。‘新俄 3 号’种子的 DGAT1 和 DGAT2 基因表达量在 7 月 6 日~8 月 19 日期间均高于‘绥棘 1 号’,可催化更多 DAG 转化为 TAG,进而使种子含油率高于‘绥棘 1 号’。发育期文冠果胚的油脂积累与 XsDGAT1 和 XsDGAT2 基因表达模式相关,与非转基因植株相比,异源表达文冠果 XsDGAT1 和 XsDGAT2 基因的拟南芥种子油脂含量分别提高 71.6(20.3%)和 30.9 μg/mg(8.8%)^[11]。不同

物种和组织对 *DGAT1* 和 *DGAT2* 基因的响应程度存在一定差异,而它们对沙棘种子含油率的影响程度还需要进一步验证。‘绥棘 1 号’和‘新俄 3 号’有相近的遗传关系,均为中国自主选育的蒙古沙棘亚种实生子代,‘绥棘 1 号’在黑龙江选育,而‘新俄 3 号’选育自辽宁,父本的差异也可能是导致‘绥棘 1 号’种子含油率低于‘新俄 3 号’的原因。有研究表明沙棘种子油脂含量受父本基因型影响,而父本基因型通过改变 C_{18} 脂肪酸(尤其亚麻酸)比例来影响 TAG^[29],亚麻酸(十八碳三烯酸)是沙棘种子中的主要脂肪酸^[2]。Li 等^[16]发现油桐中有催化桐油酸(十八碳三烯酸)与 TAG 特异结合的 *DGAT2* 基因。吴永美等^[30]将猫爪草(*Doxantha unguis-cati*)的 $\Delta 9D$ (delta-9 desaturase)基因(催化棕榈酸去饱和为棕榈油酸)和对棕榈油酸有特异选择性的 *DGAT* 酶基因在大豆中共表达发现,大豆体细胞胚的棕榈油酸含量上升到 19%,比单独转化 $\Delta 9D$ 基因高 7%。因此在后续研究中获得对亚麻酸有特异选择性的 *DGAT* 基因对进一步解析沙棘种子油脂合成

积累机理具有重要意义。

阮成江等^[31]研究表明 TAG 的生物合成与“源基因”和“汇基因”相关,同时调控 *GPD1* 关键限速酶基因(源基因)和 *DGAT* 关键酶基因(汇基因)可提高植物种子含油量,二者的相互作用机制对提高油脂产量和品质具有重要作用。随后有学者将脂肪酸的生物合成为“推”,将脂肪酸组装合成 TAG 形容为“拉”,在烟草中瞬时共表达拟南芥的 *WRI1* 和 *DGAT1* 基因可产生协同作用,转基因烟草的干叶 TAG 含量可提高约 100 倍(2.48%),是转化单一基因的 5 倍左右^[32]。Chen 等^[17]将油桐的 *Vf-FAD2* 和 *VfDGAT2* 基因融合导入红酵母和拟南芥中,发现它们具有协同促进不饱和脂肪酸积累的作用,且可获得更高含量的 $C_{18:3}$ (红酵母中提高 174%,拟南芥中提高 14.6%)。沙棘种子油脂生物合成途径复杂,同时涉及到果肉油脂的合成,这些结构基因和调节基因对沙棘种子油脂积累的影响正在进一步的研究验证之中。

参考文献:

[1] CENKOWSKI S, YAKIMISHEN R, PRZYBYLSKI R, *et al.* Quality of extracted sea buckthorn seed and pulp oil[J]. *Canadian Biosystems Engineering*, 2006, **48**(3): 9-16.

[2] YANG B R, KALLIO H. Fatty acid composition of lipids in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries of different origins[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, **49**(4): 1 939-1 947.

[3] RUAN C J, RUMPUNEN K, NYBOM H. Advances in improvement of quality and resistance in a multipurpose crop: sea buckthorn[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2013, **33**(2): 126-144.

[4] FATIMA T, SNYDER C L, SCHROEDER W R, *et al.* Fatty acid composition of developing sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berry and the transcriptome of the mature seed [J]. *Plos One*, 2012, **7**(4): e34099.

[5] YANG B R, KALLIO H. Analysis of Triacylglycerols of seeds and berries of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) of different origins by mass spectrometry and tandem mass spectrometry[J]. *Lipid*, 2006, **41**(4): 381-392.

[6] RAMLI U S, BAKER D S, QUANT P A, *et al.* Use of control analysis to study the regulation of plant lipid biosynthesis[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2002, **30**(6): 1 043-1 046.

[7] VIGEOLAS H, WALDECK P, ZANK T, *et al.* Increasing seed oil content in oil-seed rape (*Brassica napus* L.) by over-expression of a yeast glycerol-3-phosphate dehydrogenase under the control of a seed-specific promoter[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2007, **5**(3): 431-441.

[8] 张 霞, 张 桦, 张富春. 盐胁迫下盐穗木甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因的表达与亚细胞定位分析[J]. 西北植物学报, 2015, **35**(7): 1 283-1 288.

[9] ZHANG X, ZHANG H, ZHANG F C. Subcellular localization and expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from *Halostachys caspica* under salt stress[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2015, **35**(7): 1 283-1 288.

[10] REMIZE F, BARNAVON L, DEQUIN S. Glycerol export and glycerol-3-phosphate dehydrogenase, but not glycerol phosphatase, are rate limiting for glycerol production in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Metabolic Engineering*, 2001, **3**(4): 301-312.

[11] VIGEOLAS H, GEIGENBERGER P. Increased levels of glycerol-3-phosphate lead to a stimulation of flux into triacylglycerol synthesis after supplying glycerol to developing seeds of *Brassica napus* L. in planta[J]. *Planta*, 2004, **219**(5): 827-835.

[12] GUO H H, WANG T T, LI Q Q, *et al.* Two novel diacylglycerol acyltransferase genes from *Xanthoceras sorbifolia* are responsible for its seed oil content[J]. *Gene*, 2013, **527**(1): 266-274.

[13] ZHENG P, ALLEN W B, ROESLER K, *et al.* A phenylalanine in DGAT is a key determinant of oil content and compo-

- sition in maize[J]. *Nature Genetics*, 2008, **40**(3): 367-372.
- [13] JAKO C, KUMAR A, WEI Y D, *et al.* Seed-specific over-expression of an *Arabidopsis* cDNA encoding a diacylglycerol acyltransferase enhances seed oil content and seed weight [J]. *Plant Physiology*, 2001, **126**(2): 861-874.
- [14] CASES S, SMITH S J, ZHENG Y, *et al.* Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis[J]. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, **95**(22): 13 018-13 023.
- [15] KROON J T M, WEI W X, SIMON W J, *et al.* Identification and functional expression of a type 2 acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase (*DGAT2*) in developing castor bean seeds which has high homology to the major triglyceride biosynthetic enzyme of fungi and animals[J]. *Phytochemistry*, 2006, **67**(23): 254-259.
- [16] LI R, YU K, HILDEBRAND D F. *DGAT1*, *DGAT2* and *PDAT* expression in seeds and other tissues of epoxy and hydroxy fatty acid accumulating plants[J]. *Lipids*, 2010, **45**(2): 145-157
- [17] CHEN Y C, CUI Q Q, XU Y J, *et al.* Effects of tung oilseed *FAD2* and *DGAT2* genes on unsaturated fatty acid accumulation in *Rhodotorula glutinis* and *Arabidopsis thaliana*[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2015, **290**(4): 1 605-1 613.
- [18] DING J, RUAN C J, BAO Y H, *et al.* Analysis of genetic relationships in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) germplasm from China and other countries using ISSR markers[J]. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 2015, **90**(6): 599-606.
- [19] CHRISTIE W W. Fatty acids and lipids; Structures, extraction and fractionation into classes[M]// Christie W W. Gas Chromatography and Lipids. Glasgow, UK: The Oily Press Ltd., 1989: 11-42.
- [20] VUORINEN A L, MARKKINEN N, KALPIO M, *et al.* Effect of growth environment on the gene expression and lipids related to triacylglycerol biosynthesis in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) berries[J]. *Food Research International*, 2015, **77**(3): 608-619.
- [21] WANG X J, LIU A Z, Expression of genes controlling unsaturated fatty acids biosynthesis and oil deposition in developing seeds of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) [J]. *Lipids*, 2014, **49**(10): 1 019-1 031.
- [22] SCHMITTGEN T D, LIVAK K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method[J]. *Nature Protocols*, 2008, **3**(6): 1 101-1 108.
- [23] BOREK S, PUKACKA S, MICHALSKI K, *et al.* Lipid and protein accumulation in developing seeds of three lupine species; *Lupinus luteus* L., *Lupinus albus* L., and *Lupinus mutabilis* Sweet [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2009, **60**(12): 3 453-3 466.
- [24] WALL R, ROSS R P, FITZGERALD G F, *et al.* Fatty acids from fish; the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids[J]. *Nutrition Reviews*, 2010, **68**(5): 280-289.
- [25] XU R H, WANG R L, LIU A Z. Expression profiles of genes involved in fatty acid and triacylglycerol synthesis in developing seeds of *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.) [J]. *Bio-mass and Bioenergy*, 2011, **35**(5): 1 683-1 692.
- [26] HU Y P, WU G, CAO Y L, *et al.* Breeding response of transcript profiling in developing seeds of *Brassica napus* [J]. *BMC Molecular Biology*, 2009, 10:49.
- [27] 李晓丹, 肖 玲, 吴 刚, 等. 芝麻种子发育过程中脂肪酸积累模式的研究[J]. 中国油料作物学报, 2008, **30**(1): 84-89.
- LI X D, XIAO L, WU G, *et al.* Accumulation pattern of fatty acids during the seed development of sesame (*Sesamum indicum* L.) [J]. *Chinese Journal Oil Crop Sciences*, 2008, **30**(1): 84-89.
- [28] BAUD S, BOUTIN J P, MIQUEL M, *et al.* An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2002, **40**(2): 151-160.
- [29] OOMAH B D, 土小宁, 陆 海. 沙棘油脂[J]. 国际沙棘研究与开发, 2005, **3**(3): 1-10, 14.
- OOMAH B D, TU X N, LU H. Sea buckthorn lipid[J]. *Global Sea buckthorn Research and Development*, 2005, **3**(3): 1-10, 14.
- [30] 吴永美, 毛 雪, 王书建, 等. 植物 ω -7 脂肪酸的系统代谢工程[J]. 植物学报, 2011, **46**(5): 575-585.
- WU Y M, MAO X, WANG S J, *et al.* Systematic metabolic engineering of ω -7 fatty acids in plants[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2011, **46**(5): 575-585.
- [31] 阮成江, 李 群. 基因调控种子含油量研究进展及生物柴油用海滨锦葵遗传改良策略[J]. 可再生能源, 2008, **26**(4): 35-40.
- RUAN C J, LI Q. Status of oil content control in seed by genetic regulation and the strategy for improving the gene of *Kosteletzkya* for biodiesel production[J]. *Renewable Energy Resources*, 2008, **26**(4): 35-40.
- [32] VANHERCKE T, EI TAHCHY A, SHRESTHA P, *et al.* Synergistic effect of *WRI1* and *DGAT1* coexpression on triacylglycerol biosynthesis in plants[J]. *FEBS Letters*, 2013, **587**(4): 364-369.

(编辑:宋亚珍)