

油茶 KAS 基因家族的鉴定及表达分析

刘晓霞, 喻子昊, 敬辉扬, 熊凯峰, 覃佐东*

湖南科技学院化学与生物工程学院/湖南省生物质资源综合利用工程技术研究中心, 湖南永州 425199

摘要: β -酮脂酰 ACP 合成酶 (beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase, KAS) 是植物脂肪酸生物合成过程中的关键酶系。为探究 KAS 在油茶种子成熟和油脂积累中的作用, 本研究通过生物信息学方法对 CoKAS 基因家族成员进行鉴定, 分析其理化性质、染色体定位、亚细胞定位、二级结构、进化关系、保守基序、启动子顺式作用元件, 并采用 RT-qPCR 技术分析油茶果实油脂快速积累期的表达模式。结果表明: 鉴定出的 14 个 CoKAS 家族成员分布在 7 条染色体上, 相对分子质量在 1.13~5.15 kDa 之间, 且大部分为酸性稳定蛋白。除 CoKAS II-2 定位于线粒体和叶绿体外, 其余均定位于叶绿体。系统发育分析显示 CoKAS 基因被分为 3 个亚类, 同一亚类成员的基因结构和保守基序具有相似性。CoKAS 基因家族成员的启动子区域富含与生长发育、光响应、激素诱导和胁迫应答相关的顺式作用元件。通过表达分析发现, 大部分 CoKAS 基因在油茶种子油脂快速积累期的表达量较高。此外, 在油茶果实成熟过程中, CoKAS 与 CoMYB 基因家族间存在有较强相关性的成员。本研究结果为深入解析 CoKAS 基因在油茶油脂生物合成中的调控机制提供理论基础。

关键词: 油茶; CoKAS 基因家族; 生物信息学; 表达分析

中图分类号: S794.4

文献标志码: A

Identification and Expression Profile Analysis of KAS Gene Family in *Camellia oleifera*

LIU Xiaoxia, YU Zihao, JING Huiyang, XIONG Kaifeng, QIN Zuodong*

College of Chemistry and Bioengineering, Hunan University of Science and Engineering / Hunan Engineering Technology Research Center for Comprehensive Development and Utilization of Biomass Resources, Yongzhou, Hunan 425199, China

Abstract: Beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase (KAS) is the key enzyme system in plant fatty acid biosynthesis. In order to investigate the function of the KAS gene family in the maturation and oil accumulation of *Camellia oleifera*, this study used bioinformatics methods and analyzed their physicochemical properties, chromosomal localization, sub-cellular localization, secondary structure, phylogenetic trees, conserved motifs, promoter cis-acting elements, and RT-qPCR to analyze the expression patterns in the oil rapid accumulation stage of *C. oleifera*. The findings indicated that 14 *Camellia oleifera* KAS family members were distributed on seven chromosomes with relative molecular masses between 1.13 kDa and 5.15 kDa, and most of them were acid-stabilized proteins. Except for CoKAS II-2, which was localized in mitochondria and chloroplasts, all of them were localized in chloroplasts. Phylogenetic analysis revealed that CoKAS was divided into three subclasses, with similarities in structure and conserved motifs among KAS family numbers in the same subfamily. The promoter regions of the CoKAS gene family members were enriched with the cis-acting elements growth and development-related, light response, hormone induction, and adversity response. Expression analysis revealed that most of the CoKAS genes were highly expressed during the oil rapid accumulation stage. In addition, it was found a strong correlation between the members of the CoKAS and CoMYB gene families during fruit ripening in *C. oleifera*. The findings would provide a theoretical basis for comprehensively analyzing the function of CoKAS genes.

收稿日期 2024-07-23; 修回日期 2024-08-19

基金项目 湖南省自然科学基金项目 (No. 2024JJ7188); 湖南省教育厅科学研究项目 (No. 23C0354); 湖南科技学院科学研究项目 (No. 23XKY07)。

作者简介 刘晓霞 (1989—), 女, 硕士, 实验师, 研究方向: 天然产物的开发及其生物合成调控。*通信作者 (Corresponding author): 覃佐东 (QIN Zuodong), E-mail: dong6758068@163.com。

Keywords: *Camellia oleifera*; CoKAS gene family; bioinformatics; expression analysis

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.01.002

β -酮脂酰 ACP 合成酶 (beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase, KAS) 是植物脂肪酸从头合成过程中碳链延伸的关键酶系, 催化脂酰基-CoA 或脂酰基-ACP 分子之间 C-C 键形成^[1]。该酶由 N 端和 C 端蛋白结构域组成, 活性位点位于这 2 个结构域之间。N 端结构域包含参与二聚体形成的结构和活性位点半胱氨酸残基, 与 C 端结构域的氨基酸残基协同作用, 实现底物的识别、催化反应及产物的释放^[2]。在植物中, 已鉴定出 KAS I、KAS II 和 KAS III 三种 KAS 亚型, 它们各司其职, 共同协作完成脂肪酸链的延伸。KAS III 是脂肪酸合成起始阶段的限速酶, 以乙酰 CoA 和丙二酰 CoA 为底物, 合成乙酰乙酰-ACP^[3-4]。KAS II 则主要负责将棕榈酸 (C16:0-ACP) 延伸为硬脂酸 (C18:0-ACP), 调控 C16 与 C18 脂肪酸的比例^[5]。KAS I 能特异性地识别 C4 至 C16 长度的酰基-ACP, 并促进其碳链的延伸^[6]。利用 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术下调棉花种子中 *ghKAS2* 基因的表达, 可以显著提高棉籽中棕榈酸 (C16:0) 的含量, 并使其性状稳定遗传给后代, 同时不影响种子的发芽率^[5]。水稻 *OsKASI-2* 基因的敲除导致细胞膜脂肪酸的不饱和度降低, 进而增强了水稻对低温的敏感性, 影响其抗寒能力^[6]。在拟南芥中, 过表芝麻 *SiKASI* 可导致绒毡层细胞中油脂的异常积累, 并与一种腺苷三磷酸结合盒转运蛋白 (ABC transporter) 相互作用, 从而调控花粉的发育^[7]。此外, 将麻风树 *JcKASIII* 基因过表达于野生型以及 *KASI* 或 *KASII* 基因敲低的拟南芥突变体中, 构建转基因植株, 结果表明其种子油组成发生显著性变化^[8]。综上表明, KAS 基因家族成员在植物生长发育和胁迫应答中起着重要的作用。

油茶 (*Camellia oleifera*) 是中国特有的优质木本油料树种, 广泛分布于长江流域至华南地区的山地丘陵, 具有重要的经济和生态价值^[9]。油茶籽油含高达 80% 以上的不饱和脂肪酸 (主要为油酸和亚油酸)^[10], 营养丰富, 已被联合国粮农组织列为重点推广的健康型高级食用油。然而, 现有油茶林产率较低, 导致茶油价格居高不下, 严重限制了油茶产业的健康发展。油脂积累是油茶籽品质形成的关键环节, 揭示其分子机制对于

培育高产优质油茶品种具有重要意义。本研究基于油茶果实不同发育时期的转录组数据, 鉴定 CoKAS 基因家族成员, 并对其理化性质、系统进化关系、共线性、启动子序列、基因结构和表达模式等进行系统分析, 为进一步研究油茶 KAS 基因家族的功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 油茶 CoKAS 家族成员鉴定

从 NCBI 数据库中下载油茶种子发育不同时期段的转录组数据 (SRA 登录号: PRJNA668531), 油茶全基因组序列信息从 GitHub (https://github.com/Hengfu-Yin/CON_genome_data) 数据库中获取, 利用 Hisat2 和 StringTie 软件获得转录本信息。从 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>) 中下载拟南芥 KAS 蛋白序列, 采用 blast-2.15.0+ 搜索其在油茶中的同源序列, 阈值为 $1e-10$ 。从 Pfam (<http://pfam-legacy.xfam.org/>) 数据库中下载 KAS 结构域 PF00109 (N 端) 和 PF02801 (C 端) 的 hmmr 文件; 使用 hmmer 3.4 软件对油茶 KAS 家族成员进行初步筛选, 参数设置默认。选取上述 2 组结果共有的序列, 采用 NCBI 数据库中的 ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 在线工具预测候选序列的开放阅读框 (open reading frame, ORF)。通过 NCBI CD-Search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>)、SMART (<https://smart.embl.de/>) 和 InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) 在线软件确定 CoKAS 家族成员, 根据染色体定位信息进行命名。

利用 ExPASy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 在线软件对油茶 CoKAS 的基本理化性质进行分析。利用 SOPMA (https://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 在线软件预测 CoKAS 的二级结构。利用 CELLO v.2.5 (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>) 在线软件分析 CoKAS 的亚细胞定位。

1.2 CoKAS 系统发育树构建

利用 MEGA-X 软件中 Muscle 算法对 CoKAS 和 AtKAS 蛋白序列进行多序列比对, 使用邻近法 (neighbor-joining method, NJ) 构建系统进化树,

bootstrap 值设置为 1000。

1.3 CoKAS 基因结构分析

利用 MEME (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) 在线软件分析蛋白的保守基序 (motif), 设定基数为 10, 其他为默认参数。根据 CoKAS 基因家族的注释文件, 利用 GSDS 2.0 (<https://gsds.gao-lab.org/>) 在线软件进行基因结构的可视化分析。

1.4 CoKAS 启动子序列分析

利用 TBtools 软件提取 CoKAS 基因转录起始位点 (ATG) 上游 2000 bp 的启动子序列, 利用 PlantCARE (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 在线软件预测其顺式作用元件, 利用 R 软件包对数据进行可视化分析。

1.5 CoKAS 基因在果实发育不同时期的表达模式分析

CoKAS 基因家族成员的表达量以每千个碱基的转录每百万映射读取的 fragments (fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments, FPKM) 计算。根据 LI 等^[11]鉴定的 CoMYB (*Camellia oleifera* myeloblastosis) 家族成员筛选出亚细胞定位于细胞核的 MYB 蛋白, 采用 R 软件包进行 CoKAS 和 CoMYB 相关性分析及数据可视化分析。

1.6 RT-qPCR 分析

选取湘林 210#油茶油脂快速积累期的种子, 分别在授粉后 256 d (S1)、275 d (S2)、303 d (S3)、330 d (S4) 采集样品, 每组 3 个生物学重复。根据候选 CoKAS 基因的 CDS 序列, 通过 NCBI 的 Primer3 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome) 在线软件设计引物 (表 1)。采用 TRNzol 法提取总 RNA, 使用 FastKing cDNA 第一链合成试剂盒 (KR116) 进行反转录, 合成 cDNA。以 EF1a2 为内参, 利用 SuperReal PreMix Plus (SYBR Green) 进行 RT-qPCR, CoKAS 基因的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算, 分别采用 SPSS 25.0 和 origin 2020 软件进行数据处理和制图。

2 结果与分析

2.1 CoKAS 家族成员的特征分析

通过结合 hmmer 和 blast 方法, 在油茶果实的转录组数据中共鉴定到 14 个 CoKAS 基因家族成员, 包括 4 个 KAS I、6 个 CoKAS II 和 4 个 CoKAS

表 1 油茶 KAS 家族成员的引物序列

Tab. 1 Primers sequence for CoKAS family

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')
EF1a2	CGTTATCGTTGCCTC TGCTC	GCGTTATGTTTTCTT GTTTTGTC
CoKAS I-1	ATGGGTCTCGTCTCC GTCTT	GGGTAGGGAATTTGG ACGCA
CoKAS I-3	GCATCACTCACATTG ACCGC	TGCAGTAGCGAAGG CAATCA
CoKAS II-3	TGAGAAGAACAATG GCGGCT	CACGTCGTTTCCAAG CACTG
CoKAS II-5	GGCATAGCTGGTGCT TGTTT	GTCGCTTGCTTGCTC TCAAC
CoKAS II-6	CTGGGGATTGGCAG AGGTT	ATCCACCAGAAGCTC CAAGC
CoKAS III-1	CGAGTACCCAGGCTT GTCAG	GGATCCCAGTGCGA ACAGAT
CoKAS III-2	CGAGTACCCAGGCTT GTCAG	GGATCCCAGTGCGA ACAGAT
CoKAS III-3	AAGGCTGGTCTCACT TCGTC	AGAAATGACCCGCTC TGGTG

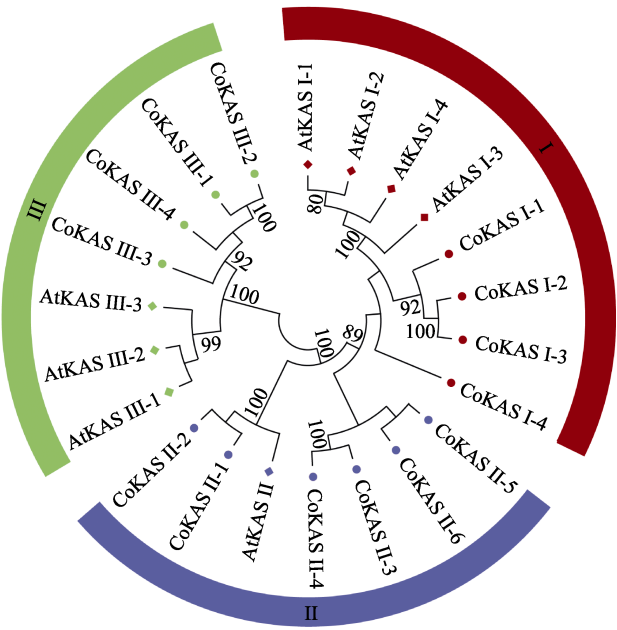
III (表 2), 它们不均匀地分布在油茶的 7 条染色体上, 其中 KAS I 的 4 个家族成员均分布在 4 号染色体上。理化性质分析揭示, 这些蛋白家族成员中氨基酸数量超过 400 个的成员占 78.57%, 其中相对分子质量最小的为 1.13 kDa, 最大的为 5.15 kDa。理论等电点在 4.54~8.89 之间, 大部分为酸性蛋白。不稳定系数在 32.01~43.96 之间, 大部分为稳定蛋白。所有 CoKAS 蛋白的脂溶性指数均未超过 100, 其中有 9 个蛋白亲水指数小于 0, 说明 64.29% 是脂溶性亲水蛋白。在 CoKAS 蛋白的二级结构中, 占比最高的是无规则卷曲, 为 44.07% (CoKAS I-2)~38.75% (CoKAS III-3); 占比最低的是 β 转角, 以 CoKAS I-4 的 9.35% 为最高。亚细胞定位分析显示, 除 CoKAS II-2 定位于线粒体和叶绿体外, 其余均定位于叶绿体。

2.2 CoKAS 蛋白系统进化关系分析

采用 NJ 法构建油茶和拟南芥 KAS 基因家族成员氨基酸序列系统发育树, 结果表明, 相对于 KAS 蛋白亚家族 III, 家族 I 和 II 之间的亲缘关系更为接近 (图 1)。在第 II 进化支中, 除了 AtKAS II 与 CoKAS II-1/2 处于同一进化亚支外, CoKAS II-3/4/5/6 在该分支中被独立分离出来。而在第 I 和 III 进化支中, CoKAS 与 AtKAS 家族成员分别属于不同的进化亚支。综上所述, 油茶中存在与拟南芥 KAS 进化关系较近的同源 KAS 蛋白, 同时 2 个物种间也存在明显分化的 KAS 蛋白。

表 2 CoKAS 家族成员基本信息
Tab. 2 Basic information of CoKAS family

基因名称 Gene name	染色体 Chromosome	氨基酸 数量 Number of amino acids	分子质量 Molecular weight /kDa	等电点 pI	不稳定 系数 Instability index	脂肪族 指数 Aliphatic index	水合平均值 GRAVY grand average of hydro- phobicity	二级结构 Secondary structure/%				亚细胞定位 Subcellular localization
								α-螺旋 Alpha helix	β-转角 Beta turn	无规则卷曲 Random coil	延伸链 Extended strand	
CoKAS I-1	4	442	4.72	6.33	38.01	81.70	-0.164	35.07	6.56	43.44	14.93	Chloroplast
CoKAS I-2	4	481	5.15	8.70	32.67	77.75	-0.178	33.06	6.65	44.07	16.22	Chloroplast
CoKAS I-3	4	476	5.10	8.89	32.92	78.36	-0.180	34.66	6.72	43.70	14.92	Chloroplast
CoKAS I-4	4	107	1.13	4.54	42.35	80.37	-0.160	33.64	9.35	42.99	14.02	Chloroplast
CoKAS II-1	9	475	5.08	6.35	41.57	81.83	-0.056	35.37	5.89	44.00	14.74	Chloroplast
CoKAS II-2	2	241	2.53	6.13	35.97	83.15	0.011	35.27	5.81	44.40	14.52	Chloroplast Mitochondrion
CoKAS II-3	2	479	5.12	8.88	38.76	85.18	-0.137	38.00	6.26	40.71	15.03	Chloroplast
CoKAS II-4	10	458	4.88	8.00	41.06	85.04	-0.117	37.34	5.68	42.23	13.76	Chloroplast
CoKAS II-5	10	402	4.27	6.98	39.41	77.24	-0.143	38.06	7.21	39.55	15.17	Chloroplast
CoKAS II-6	14	318	3.34	6.20	32.01	82.89	-0.013	36.79	7.55	38.99	16.67	Chloroplast
CoKAS III-1	15	405	4.26	5.56	38.26	89.56	0.037	28.40	8.51	39.51	23.95	Chloroplast
CoKAS III-2	14	394	4.13	5.41	38.72	88.86	0.024	27.16	8.38	40.36	24.11	Chloroplast
CoKAS III-3	14	400	4.24	6.24	43.96	91.25	0.003	28.25	9.00	38.75	24.00	Chloroplast
CoKAS III-4	15	400	4.24	6.53	43.96	91.97	0.022	26.50	9.00	40.50	24.00	Chloroplast



图中数值表示自展支持率大于 75%。
The numbers in the graph indicate that the bootstrap confidence value is greater than 75%.

图 1 油茶和拟南芥 KAS 蛋白系统进化关系

Fig. 1 Phylogenetic trees of KAS family members between *C. oleifera* and *Arabidopsis thaliana*

2.3 CoKAS 家族基因结构、保守结构域和保守基序分析

为探究 CoKAS 家族成员基因的结构特征,对

其外显子与内含子的组成进行分析。结果揭示 CoKAS 家族成员间基因结构的多样性,内含子数量在 1~13 之间,尤其 CoKAS II-1/2 的内含子数量高达 13。在同一亚族内,成员之间的外显子-内含子结构呈现出较高的相似性,如 CoKAS III 亚族所有成员所含 7 个内含子的位置大体一致(图 2A)。这些发现表明,亚家族间基因结构的差异化可能与新功能的演化紧密相关。通过保守结构域分析发现,所有成员均展现出 KAS 蛋白的典型特征,包含有 cond_enzymes 结构域,而 PLN02326 是 CoKAS III 亚家族特有的保守结构域(图 2B)。CoKAS 家族成员的 motif 从 2 到 10 个不等,其中 motif 1/2/6 基序组成了 KAS 基因家族典型的保守区域(图 2C,图 2D)。motif 1 具备还原酶活性 FabB 区域,存在于所有的 CoKAS 蛋白中;除 CoKAS I-4 外,CoKAS 家族所有成员均含有 motif 2 基序;而 motif 6 基序仅在 CoKAS I/II 亚家族中被发现。CoKAS I 和 II 两个亚家族成员间 motif 的空间分布、类型和数量具有较高的一致性,但与 CoKAS III 家族成员存在一定的差异。然而,在 CoKAS I 和 II 两个亚家族中,也有个别成员如 CoKAS I-4 和 CoKAS II-2 的 motif 数量相对缺失,这可能与基因串联重复过程中碱基的丢失有关。

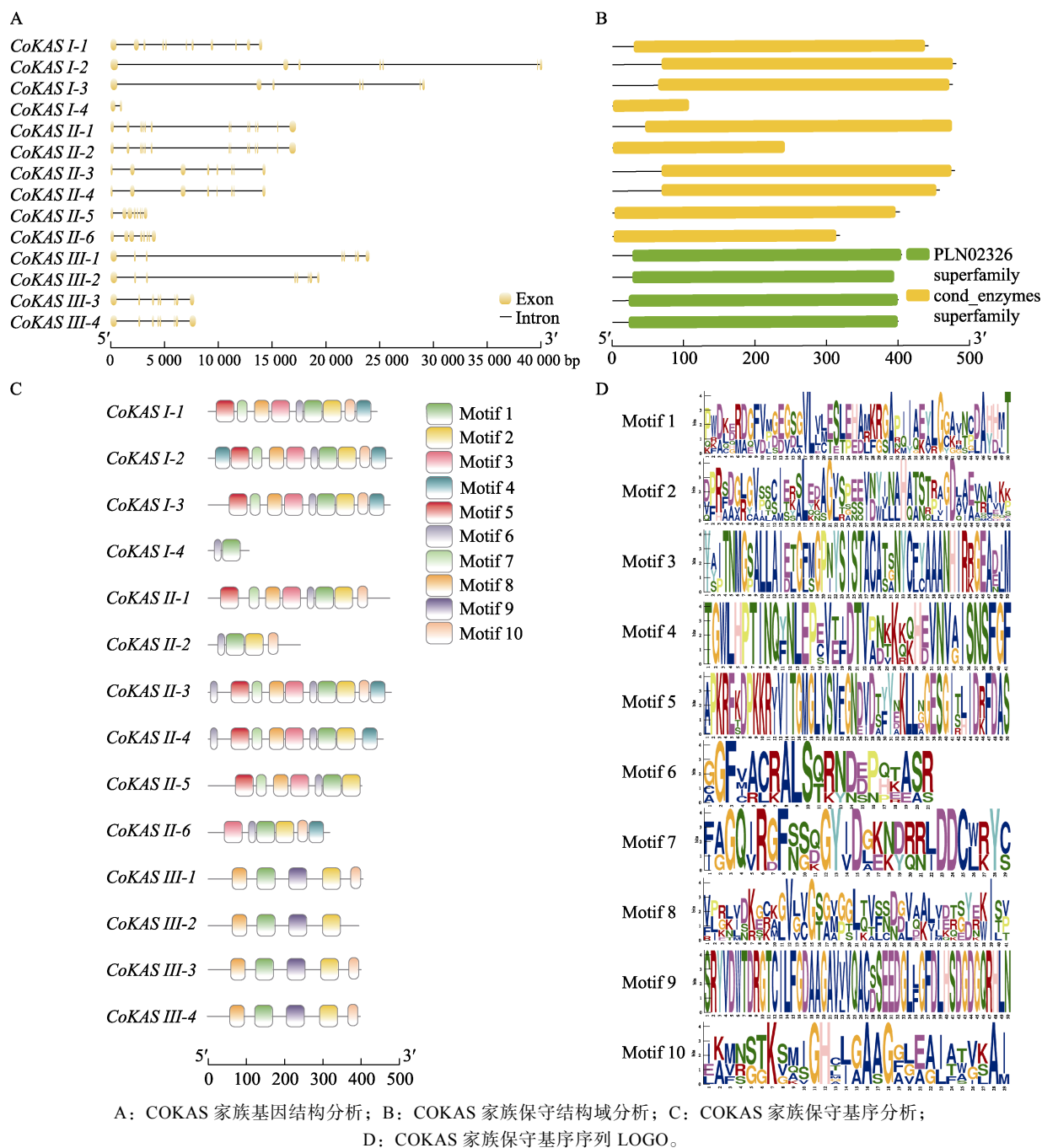


图 2 CoKAS 家族基因结构、保守结构域和保守基序分析

Fig. 2 Gene structure, conserved structural domains, and motif analysis of CoKAS family

2.4 CoKAS 启动子顺式作用元件分析

通过对 CoKAS 家族基因启动子上游 2000 bp 序列的顺式作用元件进行分析, 鉴定到大量与生长发育、激素、光及逆境响应相关的顺式作用元件 (图 3)。在所有的生长发育响应元件中, 数量最多的是所有成员都具有的 MYB 和 MYC 转录因子结合位点。CoKAS 启动子序列含有 3~22 个光调控和响应元件, 其中 85.71% 的成员具有 Box 4

元件。CoKAS 启动子序列含有 7~18 个胁迫响应元件, 除 CoKAS I-3 外, 其他成员都含有响应厌氧诱导的 ARE 元件。CoKAS 家族成员主要对赤霉素、乙烯、茉莉酸甲酯、水杨酸和生长素产生响应, 其中 71.43% 成员对赤霉素有响应, 78.57% 成员对乙烯有响应。综上所述, CoKAS 在油茶生长发育、激素诱导、光诱导和逆境胁迫响应等生物学过程中可能发挥着重要的作用。

Growth and development response element	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	A-box
	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	3	CARE
	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	2	0	1	7	CAT-box
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	F-box
	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	GCN4_motif
	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3	HD-Zip 1
	5	4	8	5	7	20	8	8	6	11	4	4	4	4	98	MYB
	6	3	5	5	3	6	8	8	5	6	4	3	6	3	71	MYC
	1	3	1	1	1	2	0	0	0	0	0	0	1	0	9	O2-site
	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	re2f-1
Light response element	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	5	ACE
	0	0	0	0	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0	4	AE-box
	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	AT1-motif
	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	5	ATCT-motif
	4	1	1	0	3	2	2	2	5	0	8	6	7	8	49	Box 4
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	4	Box II
	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	4	chs-CMA1a
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	chs-Unit 1 m1
	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	GA-motif
	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	Gap-box
	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	6	GATA-motif
	0	3	5	1	0	0	1	1	2	0	8	8	0	0	29	G-Box
	2	1	3	0	0	0	1	1	2	1	2	2	0	0	15	GT1-motif
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	GTGGC-motif
	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	3	I-box
	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	L-box
	1	0	2	0	1	0	0	0	1	0	0	0	2	1	8	Sp1
	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	TCCC-motif
	1	0	1	2	2	0	2	2	0	0	1	1	2	2	16	TCT-motif
	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	MRE
Hormone response element	0	3	7	3	0	0	1	1	1	0	12	12	0	0	40	ABRE
	0	1	2	0	1	0	1	1	0	2	0	0	0	2	10	CGTCA-motif
	2	3	1	0	1	0	4	4	1	0	1	2	2	4	25	ERE
	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	GARE-motif
	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	P-box
	0	2	3	1	1	0	1	1	0	0	2	3	1	1	16	TCA-element
	0	1	2	0	1	0	1	1	0	2	0	0	0	2	10	TGACG-motif
Adversity response element	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3	1	0	0	5	TGA-element
	0	3	0	2	1	0	2	2	0	0	0	1	1	1	13	AAGAA-motif
	4	4	0	6	1	2	3	3	5	1	4	5	1	1	40	ARE
	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	DRE1
	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	5	DRE core
	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	GC-motif
	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	HD-Zip 3
	1	3	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	7	LTR
	2	4	4	4	1	2	0	0	1	0	4	3	1	1	27	STRE
	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	9	TC-rich repeats
	0	1	1	2	1	2	0	0	0	1	1	1	1	1	12	W box
	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	7	WRE3
	2	1	2	0	0	2	0	0	0	1	0	0	2	3	13	WUN-motif
	0	0	0	0	0	3	1	1	0	2	0	0	0	0	7	MBS
	CoKAS I-1	CoKAS I-2	CoKAS I-3	CoKAS I-4	CoKAS II-1	CoKAS II-2	CoKAS II-3	CoKAS II-4	CoKAS II-5	CoKAS II-6	CoKAS III-1	CoKAS III-2	CoKAS III-3	CoKAS III-4	Total	

图 3 油茶 CoKAS 家族成员启动子顺势作用元件

Fig. 3 Cis-acting elements in promoters of CoKAS family members

2.5 油茶果实发育过程中 CoKAS 基因的表达模式

基因的表达对其功能的发挥起着至关重要的作用。为研究 CoKAS 基因在油茶油脂合成中的功

能，构建了 CoKAS 基因家族成员在果实不同发育时期的表达谱（图 4）。除 CoKAS III 亚族外，第 I 和 II 亚族均有成员在油茶果实整个发育阶段的表达量较低，其中第 II 亚族的比例最大，占全

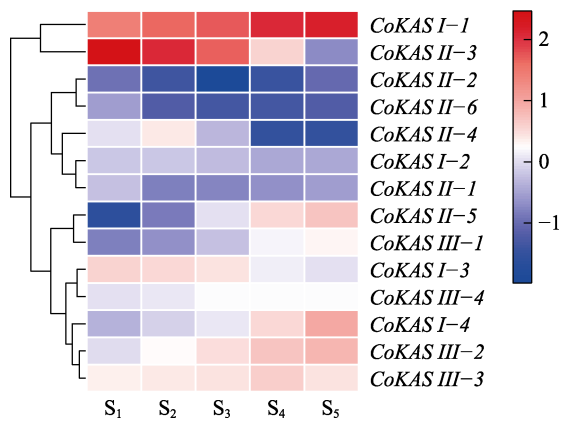
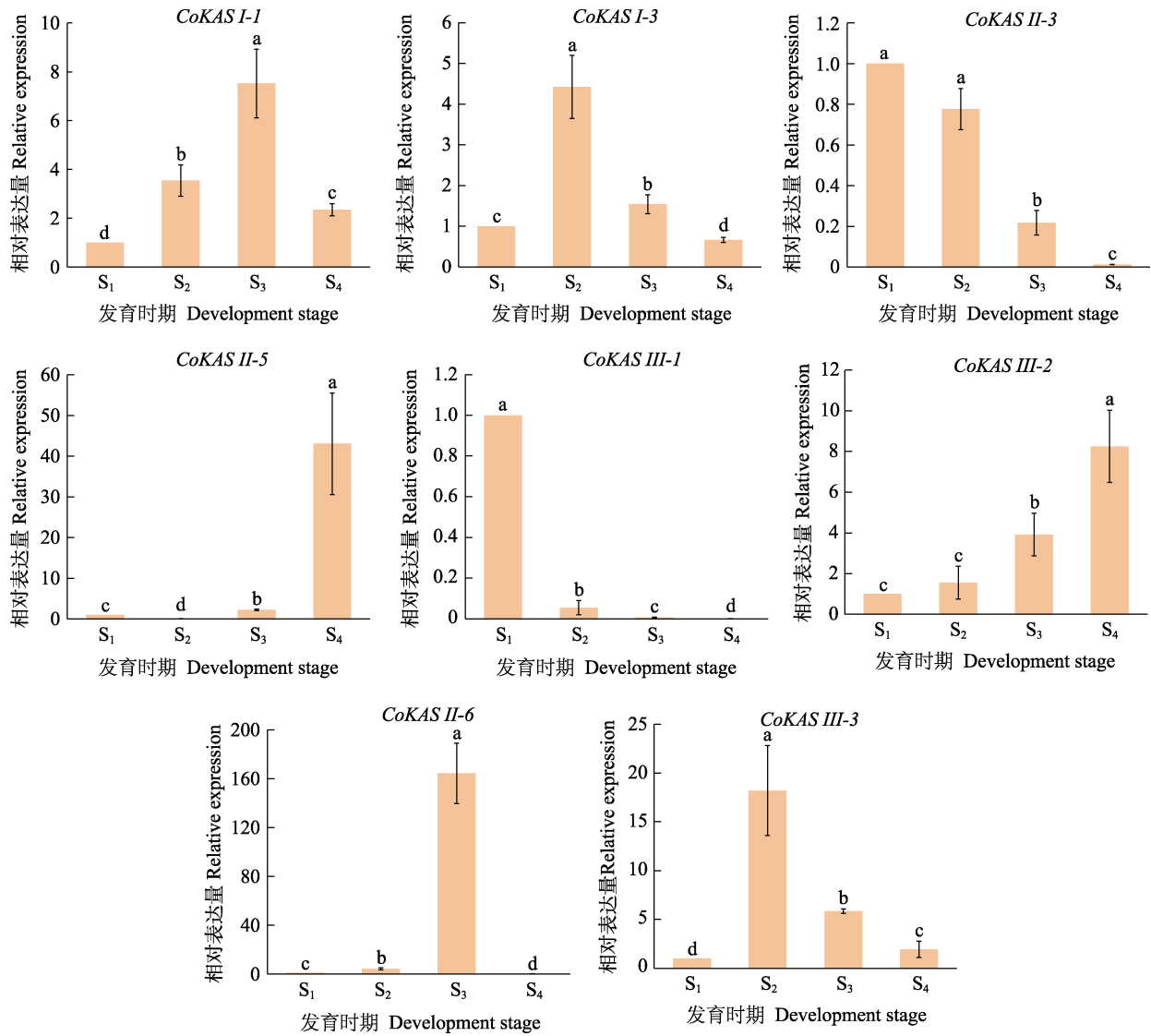


图 4 油茶 CoKAS 基因在油茶果实不同发育时期的表达模式

Fig. 4 Expression patterns of CoKAS genes at five different stages of seed development

部基因的 66.67%。随着油茶果实的成熟,有 6 个 CoKAS 基因家族成员的表达趋势与种子油含量逐渐增加趋势相同^[12],但 *CoKAS II-3* 的表达模式却呈现出相反的趋势。另外,有 2 个基因在 T3 阶段高表达, *CoKAS I-3* 的表达量先上升后下降,而 *CoKAS III-4* 的表达量先上升后保持不变。这些结果表明,CoKAS 基因家族在油茶果实油脂积累过程中可能发挥着重要的作用。为深入探讨 CoKAS 基因在油茶种子油脂累积过程中的功能,本研究通过 RT-qPCR 技术,对 8 个 CoKAS 基因在湘林 210# 油茶种子油脂快速累积期的表达水平进行了检测。结果显示,其中 5 个 CoKAS 基因的表达与转录组测序数据基本一致(图 5)。此外,除 CoKAS



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference among treatments ($P < 0.05$).

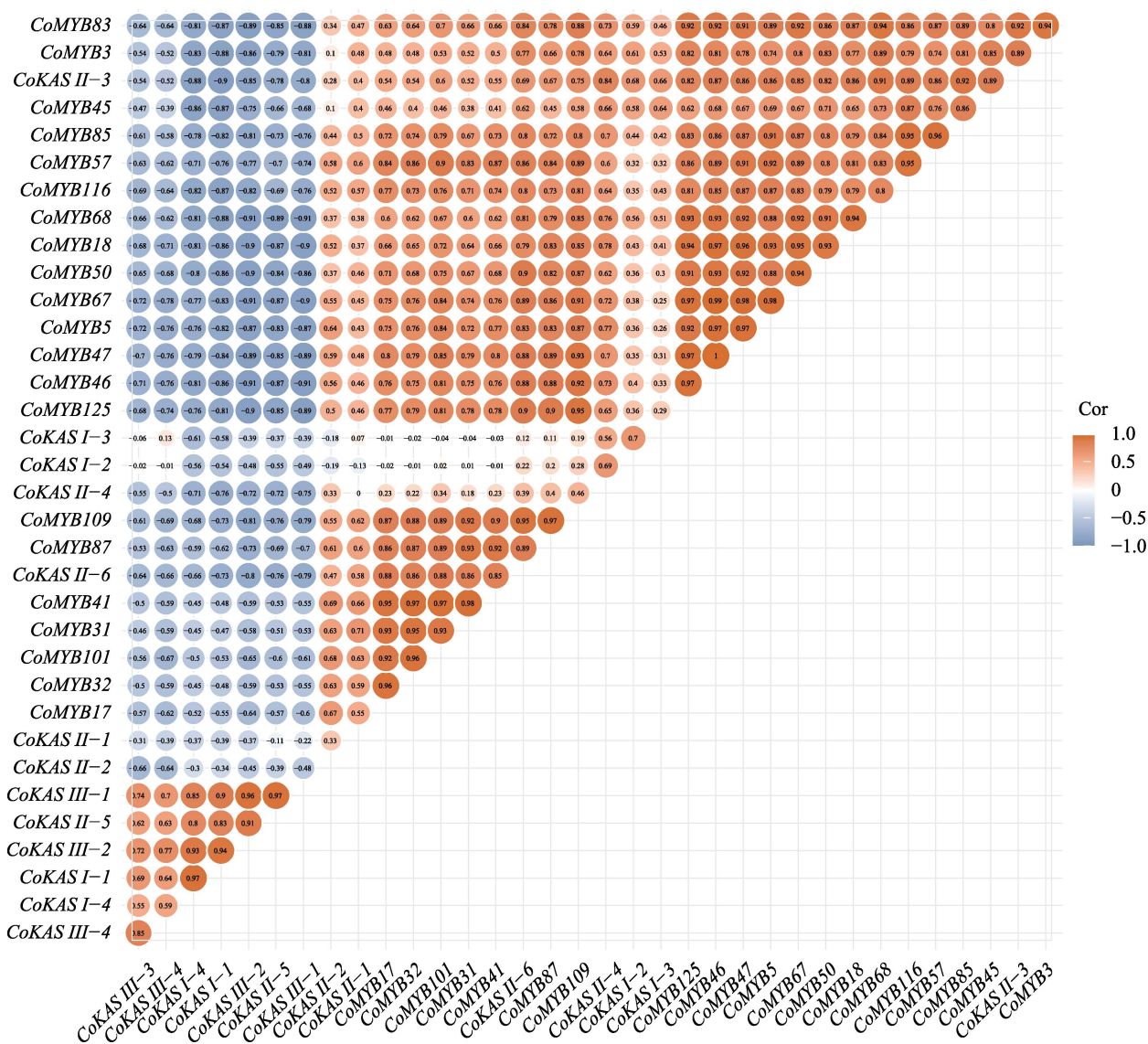
图 5 油脂快速累积期 CoKAS 基因家族成员表达分析

Fig. 5 Analysis of expression patterns of CoKAS gene family members in oil rapid accumulation stage

III-1 基因表现出相反的表达趋势外, *CoKAS II-5* 和 *CoKAS II-6* 基因在早期阶段呈现出与转录组分析结果不一致的表达模式,但在后期逐渐趋于一致。这种差异可能是由于湘林 210#与华硕 2 个油茶品种间基因组变异或发育调控机制的不同所致。

由图 3 可知, *CoKAS* 启动子中含有 4~20 个转录因子 MYB 的结合位点,这表明该家族成员可能更容易受到 MYB 的调控。为探索 *CoMYB* 转录因子和 *CoKAS* 家族成员的结合情况,本研究对定位于细胞核的 124 个 *CoMYB* 与 14 个 *CoKAS* 进行了关联分析,并计算了 Pearson 相关系数(图 6)。结果显示,有 7 个 *CoKAS* 家族成员可能受

到 21 个转录因子 *CoMYB* 的调控,其中 *CoKAS II-6* 的转录因子 *CoMYB* 最多,高达 13 个。*CoMYB46* 能调控除 *CoKAS I-4* 外的其他 6 个成员基因的表达,而 *CoMYB85* 仅调控 *CoKAS II-3* 的表达。此外,还发现不同 *CoKAS* 基因家族成员可能同时受多种 *CoMYB* 的调控,例如 *CoMYB18*、*CoMYB46*、*CoMYB68*、*CoMYB83* 与 *CoKAS I-1*、*CoKAS II-3*、*CoKAS II-5*、*CoKAS III-1*、*CoKAS III-2* 都具有较强的相关性($|r| \geq 0.85$),除 *CoKAS II-3* 外,其他成员为负相关。以上结果表明, *CoMYB* 可能通过多样的调控网络调节 *CoKAS* 基因的表达。



颜色越深和圆圈越大表明二者之间的相关性越强。

Deeper colors and larger circles indicate a greater correlation between the two.

图 6 油茶 *CoKAS* 与转录因子 *CoMYB* 表达的相关性分析

Fig. 6 Correlation analysis of expression of *CoKAS* and transcription factors *CoMYB*

3 讨论

KAS 作为脂肪酸合酶的关键组成部分, 是一种高度保守的酶, 广泛存在于地球上的几乎所有生命体中。其家族成员已在多种植物中被鉴定出来, 并在植物的发育转变和环境响应中发挥着重要的作用^[5, 7-8]。然而, 关于油茶 KAS 基因家族成员的鉴定及其功能的研究却鲜有报道。本研究采用同源性比对的方法, 成功鉴定到 14 个 CoKAS 家族成员, 它们定位在油茶的 7 条染色体上。CoKAS 蛋白同一亚族内的理化性质和二级结构相近, 这可能与其功能的保守性有关。亚细胞定位结果显示, 14 个 CoKAS 中有 13 个定位于叶绿体, 这与叶绿体是脂肪酸合成的主要场所相符^[13]。而只有 CoKAS II-2 定位于线粒体和叶绿体, 这可能与其作为双重定位酶的特性有关, 它参与线粒体中的脂质合成, 尽管这些脂质只占总脂质的一小部分, 但它们在调节植物生长和发育方面发挥了重要作用^[14-15]。在进化关系上, 油茶与拟南芥的 KAS 同被分为 3 个亚类, 不同分支行使的功能各异。通过对 CoKAS 家族成员的基因结构进行分析发现, 同一亚族成员的外显子-内含子数量及分布、结构域和保守基序特征相似, 这可能与同一亚族 CoKAS 成员的生物学功能相似有关。基因的进化过程中会出现内含子增加或缺失现象^[16], 这可能是导致个别基因 (CoKAS I-1、CoKAS II-1、CoKAS II-2 和 CoKAS I-4) 外显子-内含子结构发生变异的原因。

启动子区的顺式作用元件对基因表达具有至关重要的调控作用^[17]。油茶 CoKAS 家族基因的启动子区富集大量生长发育相关、光响应、激素诱导和胁迫应答元件, 表明 CoKAS 基因功能多样, 能参与不同的生物学过程。乙烯是调控植物生长与发育的关键激素, 一方面乙烯可作为内源调节剂刺激植物分生组织生长和胚乳分裂^[18]; 另一方面, 过量的乙烯则抑制分生组织扩张和胚乳细胞分裂速率^[19]。研究发现, 超长链脂肪酸 (very-long-chain fatty acids, VLCFAs) 能通过增强乙烯生物合成促进植物分生组织的伸长^[20]。过表达 *OskasI* 也能使拟南芥根伸长, 而缺乏 *KAS I* 时会显著降低种子中脂肪酸的水平^[21]。此外, *KAS I* 在植物的种子、根、花和幼苗中均有表达^[22]。在根中, *KAS I* 主要在分生组织、伸长区和成熟区的维管束中表达。在子叶胚发育的早期阶段, 胚乳细胞迅速增殖, 且乙烯生物合成的关键酶 1-氨基

环丙烷-1-羧酸合成酶 (ACC 合成酶) 和 *KAS I* 基因表现出较高的表达水平。然而, 在子叶胚发育的后期, 高浓度的乙烯会促进胚乳细胞程序性死亡, 与此同时, *KAS I* 的表达水平有所下降^[22-23]。本研究观察到, CoKAS I-2 和 CoKAS I-3 在油茶种子发育过程中的表达量呈现先上升后下降的趋势, 其中 CoKAS I-2 的表达量相对较低。A-box 和 GCN4_motif 这 2 个参与分生组织 (CoKAS I-2) 和胚乳 (CoKAS I-3) 特异性表达的元件, 仅在 CoKAS I 亚族成员的启动子区域被发现, 且这些基因包含乙烯响应元素。据此推测, CoKAS I-2 和 CoKAS I-3 可能通过调节乙烯信号途径, 分别参与油茶根系的生长和种子胚乳的发育, 而乙烯对 CoKAS I 基因家族的表达具有负向调控作用。

在植物种子的灌浆中期至末期, 光照强度的增加导致种子中亚油酸、棕榈酸和亚麻酸含量上升, 而油酸含量则相应降低。然而, 在灌浆末期至成熟期, 随着光照强度的逐步减弱, 油酸含量开始逐渐增加, 与此同时, 亚油酸、棕榈酸和亚麻酸含量则呈现出下降趋势^[24]。研究揭示, 在植物种子的灌浆阶段, 高强度光照可能对种子质量和产量产生负面影响。相比之下, 适宜的遮光处理能有效提高种子重量, 并增加不饱和脂肪酸含量, 特别是油酸^[25-26]。本研究进一步发现, 油茶 CoKAS 基因家族成员的启动子区域含有众多光响应元件, 并在灌浆末期表达水平显著变化的成员较多, 推测 CoKAS 基因家族在光信号调控油茶种子油脂积累和脂肪酸组成中起到关键作用。MYB 在植物生长发育及胁迫响应中扮演着至关重要的角色。大量的证据证实, MYB 转录因子在植物体内油脂积累的过程中起着关键作用。例如, 麻风树中的 *JcMYB1* 能够直接促进脂肪酸合成的关键酶二酰基甘油酰基转移酶 1 (diacylglycerol acyltransferase1, DGAT1) 的表达, 从而增加油脂含量^[27]。油桐中, *VfMYB36* 的过量表达能够显著增强拟南芥中与油脂合成相关的基因 *AtWRI*、*AtENO1*、*AtBCCP1*、*AtKAS1*、*AtKCS11* 和 *AtPAL2* 的活性, 导致种子中亚麻酸和总油量的提升^[28]。然而, 在脂质代谢中, MYB 转录因子更常见的角色是作为抑制因子。在拟南芥种子的脂质生物合成过程中, MYB89 通过直接结合启动子位点抑制 *WRI1* 和 *KAS1* 的表达, 并间接抑制 *L1L* 等关键基因的活性, 从而负向调控油脂的合成^[29]; MYB76 则通过增强脂肪酸降解酶相关基因的表达来实现

对脂肪酸的负向调控^[30]; 而 *MYB118* 则通过调控成熟相关基因的活性来抑制胚乳中油脂的合成^[31]。在本项研究中, CoKAS 家族成员基因的启动子区域含有多个 MYB 结合位点, 通过基因表达关联性分析, 发现 CoKAS 与 CoMYB 家族成员间存在高度相关性, 其中大部分呈现负相关性。上述结果表明, CoMYB 可能通过与 CoKAS 基因启动子区的顺式作用元件结合, 从而调控油茶种子中油脂积累和脂肪酸组成。

4 结论

本研究基于油茶果实不同发育阶段的转录组数据, 系统鉴定了 14 个 CoKAS 基因家族成员, 这些基因分布于 7 条染色体上。通过系统进化分析, CoKAS 基因被分为 3 个亚类, 同一亚类成员的基因结构和保守基序高度保守。在 CoKAS 基因家族成员的启动子区域, 鉴定到大量与生长发育、光响应、激素信号转导和胁迫响应相关的顺式作用元件。此外, 表达模式分析显示, 大部分 CoKAS 基因家族成员在油茶果实快速积累油脂期表达量显著上调。进一步的共表达网络分析表明, CoKAS I-1、CoKAS II-3、CoKAS II-5、CoKAS III-1 和 CoKAS III-2 与 CoMYB 转录因子家族成员存在显著的相关性。这些结果为深入解析 CoKAS 基因在油茶籽油生物合成中的调控机制提供理论基础。

参考文献

- [1] BELD J, BLATTI J L, BEHNKE C, MENDEZ M, BURKART M D. Evolution of acyl-ACP thioesterases and β -ketoacyl-ACP synthases revealed by protein-protein interactions[J]. Journal of Applied Phycology, 2014, 26: 1619-1629.
- [2] PATTERSON E I, NANSON J D, ABENDROTH J, BRYAN C, SANKARAN B, MYLER P J, FORWOOD J K. Structural characterization of β -ketoacyl ACP synthase I bound to platencin and fragment screening molecules at two substrate binding sites[J]. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2020, 88(1): 47-56.
- [3] GONZÁLEZ-MELLADO D, VON WETTSTEIN-KNOWLES P, GARCÉS R, MARTÍNEZ-FORCE E. The role of β -ketoacyl-acyl carrier protein synthase III in the condensation steps of fatty acid biosynthesis in sunflower[J]. Planta, 2010, 231: 1277-1289.
- [4] ABBADI A, BRUMMEL M, SPENER F. Knockout of the regulatory site of 3-ketoacyl-ACP synthase III enhances short-and medium-chain acyl-ACP synthesis[J]. The Plant Journal, 2000, 24(1): 1-9.
- [5] LIU Q, WU M, ZHANG B, SHRESTHA P, PETRIE J, GREEN A G, SINGH S P. Genetic enhancement of palmitic acid accumulation in cotton seed oil through RNAi down-regulation of *ghKAS2* encoding β -ketoacyl-ACP synthase II (KASII)[J]. Plant Biotechnology Journal, 2017, 15(1): 132-143.
- [6] ZHANG L, WANG S Y, BAI B, CHEN Y J, XIANG Z P, CHEN C, KUANG X M, YANG Y Z, FU J, CHEN L B, MAO D D. OsKASI - 2 is required for the regulation of unsaturation levels of membrane lipids and chilling tolerance in rice[J]. Plant Biotechnology Journal, 2024: 1-16.
- [7] ZHOU T, YANG Y X, LI T Y, LIU H Y, ZHOU F, ZHAO Y Z. Sesame β -ketoacyl-acyl carrier protein synthase I regulates pollen development by interacting with an adenosine triphosphate-binding cassette transporter in transgenic *Arabidopsis*[J]. Physiologia Plantarum, 2021, 173(3): 1048-1062.
- [8] YU N, XIAO W F, ZHU J, CHEN X Y, PENG C C. The *Jatropha curcas KASIII* gene alters fatty acid composition of seeds in *Arabidopsis thaliana*[J]. Biologia Plantarum, 2015, 59: 773-782.
- [9] 张坤昌, 涂攀峰, 黄润生, 廖柏勇, 吕宇宙, 李永泉. 不同施肥组合对油茶生长和营养的影响[J]. 热带作物学报, 2024, 45(2): 340-350.
ZHANG K C, TU P F, HUANG R S, LIAO B Y, LYU Y Z, LI Y Q. Effects of different fertilizer combinations on growth and nutrition of *Camellia oleifera*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2024, 45(2): 340-350. (in Chinese).
- [10] 沈军, 邱智敏, 余玉云, 李志真, 陈伟, 陈世品. 油茶籽成熟过程中油脂代谢的蛋白质组学分析[J]. 植物生理学报, 2023, 59(7): 1398-1406.
SHEN J, QIU Z M, YU Y Y, LI Z Z, CHEN W, CHEN S P. Proteomic analysis of lipid metabolism in *Camellia oleifera* seeds during maturation[J]. Plant Physiology Journal, 2023, 59(7): 1398-1406. (in Chinese).
- [11] LI S J, HUANG H, MA X J, HU Z K, LI J Y, YIN H F. Characterizations of MYB transcription factors in *Camellia oleifera* reveal the key regulators involved in oil biosynthesis[J]. Horticulturae, 2022, 8(8): 742.
- [12] GONG W F, SONG Q L, JI K, GONG S F, WANG L K, CHEN L, ZHANG J, YUAN D Y. Full-length transcriptome from *Camellia oleifera* seed provides insight into the transcript variants involved in oil biosynthesis[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(49): 14670-14683.
- [13] HÖLZL G, DÖRMANN P. Chloroplast lipids and their bio-

- synthesis[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2019, 70: 51-81.
- [14] ZHOU Y H, YU H Y, TANG Y P, CHEN R, LUO J Y, SHI C M, TANG S, LI X, SHEN X Y, CHEN R F, ZHANG Y Y, LU Y G, YE Z B, GUO L, OUYANG B. Critical roles of mitochondrial fatty acid synthesis in tomato development and environmental response[J]. *Plant Physiology*, 2022, 190(1): 576-591.
- [15] GUAN X, OKAZAKI Y, ZHANG R, SAITO K, NIKOLAU B J. Dual-localized enzymatic components constitute the fatty acid synthase systems in mitochondria and plastids[J]. *Plant Physiology*, 2020, 183(2): 517-529.
- [16] 凡超, 杨杰, 陈蓉, 刘伟, 向旭. 荔枝 HSP70 家族鉴定及其响应非生物胁迫的表达[J]. *生物工程学报*, 2024, 40(4): 1102-1119.
- FAN C, YANG J, CHEN R, LIU W, XIANG X. Identification and expression analysis of the HSP70 gene family under abiotic stresses in *Litchi chinensis*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2024, 40(4): 1102-1119. (in Chinese).
- [17] 姚馨怡, 赵佳莹, 胡素影, 李娴, 庞群群, 俞振明. 铁皮石斛 SAPK 基因家族鉴定及表达模式分析[J]. *生物工程学报*, 2024, 40(4): 1195-1210.
- YAO X Y, ZHAO J Y, HU S Y, LI X, PANG Q Q, YU Z M. Identification and expression profiling of SAPK gene family members in *Dendrobium officinale*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2024, 40(4): 1195-1210. (in Chinese).
- [18] LOVE J, BJÖRKLUND S, VAHALA J, HERTZBERG M, KANGASJÄRVI J, SUNDBERG B. Ethylene is an endogenous stimulator of cell division in the cambial meristem of *Populus*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106(14): 5984-5989.
- [19] YANG J C, ZHANG J H, WANG Z Q, LIU K, WANG P. Post-anthesis development of inferior and superior spikelets in rice in relation to abscisic acid and ethylene[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57(1): 149-160.
- [20] ZHANG X B, WANG Y, WANG X W, ZHU Z, ZHANG X F, JIA L Q, LI Y Y, TIAN W J, CHEN H Y, ZHU X Y, HE G G, SANG X C. A very - long - chain fatty acid synthesis gene, *SD38*, influences plant height by activating ethylene biosynthesis in rice[J]. *The Plant Journal*, 2022, 112(4): 1084-1097.
- [21] DING W, LIN L, ZHANG B T, XIANG X B, WU J, PAN Z C, ZHU S H. *OsKASI*, a β -ketoacyl-[acyl carrier protein] synthase I, is involved in root development in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Planta*, 2015, 242: 203-213.
- [22] WU G Z, XUE H W. *Arabidopsis* β -ketoacyl-[acyl carrier protein] synthase I is crucial for fatty acid synthesis and plays a role in chloroplast division and embryo development[J]. *The Plant Cell*, 2010, 22(11): 3726-3744.
- [23] GALLIE D R, YOUNG T E. The ethylene biosynthetic and perception machinery is differentially expressed during endosperm and embryo development in maize[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2004, 271: 267-281.
- [24] SONG Q, JI K, MO W J, WANG L K, CHEN L, GAO L, GONG W F, YUAN D Y. Dynamics of sugars, endogenous hormones, and oil content during the development of *Camellia oleifera* fruit[J]. *Botany*, 2021, 99(8): 515-529.
- [25] HAN C J, WANG Q, ZHANG H B, WANG S H, SONG H D, HAO J M, DONG H Z. Light shading improves the yield and quality of seed in oil-seed peony (*Paeonia ostii* Feng Dan)[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2018, 17(7): 1631-1640.
- [26] GAUTHIER M, PELLET D, MONNEY C, HERRERA J M, ROUGIER M, BAUX A. Fatty acids composition of oilseed rape genotypes as affected by solar radiation and temperature[J]. *Field Crops Research*, 2017, 212: 165-174.
- [27] KHAN K, KUMAR V, NIRANJAN A, SHANWARE A, SANE V A. *JcMYB1*, a *Jatropha* R2R3MYB transcription factor gene, modulates lipid biosynthesis in transgenic plants[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2019, 60(2): 462-475.
- [28] CAO Y P, FAN T T, WANG L H, ZHANG L, LI Y L. Large-scale analysis of putative Euphorbiaceae R2R3-MYB transcription factors identifies a MYB involved in seed oil biosynthesis[J]. *BMC Plant Biology*, 2023, 23(1): 145.
- [29] LI D, JIN C G, DUAN S W, ZHU Y N, QI S H, LIU K G, GAO C H, MA H L, ZHANG M, LIAO Y C, CHEN M G. *MYB89* transcription factor represses seed oil accumulation[J]. *Plant Physiology*, 2017, 173(2): 1211-1225.
- [30] DUAN S W, JIN C Y, LI D, GAO C H, QI S H, LIU K G, HAI J B, MA H L, CHEN M G. *MYB76* inhibits seed fatty acid accumulation in *Arabidopsis*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 251917.
- [31] BARTHOLE G, TO A, MARCHIVE C, BRUNAUD V, SOUBIGOU-TACONNAT L, BERGER N, DUBREUCQ B, LEPINIEC L, BAUD S. *MYB118* represses endosperm maturation in seeds of *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2014, 26(9): 3519-3537.