生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):122-133

亚麻荠*CsFAD*基因家族鉴定及α-亚麻酸合成关键基因*CsFAD3.3*的功能分析

高慧玲[1] 贾峥嵘[1] 薛金爱[2] 宋亚楠[2] 贾小云[3*] 李润植[2*]
（1.山西农业大学高粱研究所,榆次 030600；2.山西农业大学农学院,太谷 030800；3.山西农业大学生命科学学院,太谷 030800）

摘 要： 【目的】亚麻荠（*Camelina sativa* (L.) Crantz）是一种具有开发潜力的十字花科油料作物，其种子油富含不饱和脂肪酸。脂肪酸脱氢酶（fatty acid desaturase, FAD）是催化不饱和脂肪酸合成的关键酶，鉴定亚麻荠*CsFAD*基因家族并解析关键基因*CsFAD3.3*在α-亚麻酸（α-linolenic acid, ALA）合成中的功能，可为亚麻荠种子油脂品质改良提供理论支撑。【方法】利用全基因组数据结合生物信息学方法，对亚麻荠*CsFAD*基因进行系统鉴定，分析其染色体分布、系统发育关系、基因结构和保守基序；结合转录组和RT-qPCR数据分析基因的组织表达模式；采用亚细胞定位验证CsFAD3.3的细胞定位；通过转基因亚麻荠和烟草进行功能验证。【结果】共鉴定54个*CsFAD*基因，不均匀地分布在20条染色体上。系统发育树分析将其划分为6个亚家族，与基因结构和保守基序相一致。表达谱分析显示，*CsFAD*基因在不同的亚组中表达模式不相同，但在同一亚家族的表达模式一致，其中CsFAD3亚家族成员（尤其*CsFAD3.3*）主要在种子中表达。亚细胞定位证实CsFAD3.3定位于内质网。功能验证显示，过表达*CsFAD3.3*显著提高亚麻荠种子中ALA含量。此外，*CsFAD3.3*在本氏烟草（*Nicotiana benthamiana*）中的瞬时表达与在普通烟草（*N. tabacum*）中的稳定遗传转化，分别显著提升了叶片及转基因种子中的ALA含量。【结论】CsFAD3.3定位于内质网，是亚麻荠ALA合成的关键限速酶。过表达*CsFAD3.3*基因显著提高了亚麻荠种子、烟草叶片及烟草种子中的ALA含量，证实了其功能的保守性。

关键词： 亚麻荠；*FAD*基因家族；*CsFAD3.3*基因；表达模式分析；功能验证；α-亚麻酸
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2025-1058

Genome-wide Identification of the *CsFAD* Gene Family in *Camelina sativa* and Functional Characterization of the Key Gene *CsFAD3.3* Involved in α-linolenic Acid Biosynthesis

GAO Hui-ling[1] JIA Zheng-rong[1] XUE Jin-ai[2] SONG Ya-nan[2] JIA Xiao-yun[3*] LI Run-zhi[2*]
（1. *Sorghum Research Institute, Shanxi Agricultural University, Yuci* 030600; 2. *College of Agronomy, Shanxi Agricultural University, Taigu* 030800; 3. *College of Life Sciences, Shanxi Agricultural University, Taigu* 030800）

Abstract: 【Objective】*Camelina sativa* (L.) Crantz is a cruciferous oilseed crop with great development potential and its seed oil is rich in unsaturated fatty acids. Fatty acid desaturases (FADs) are key enzymes that catalyze the biosynthesis of unsaturated fatty acids. The identification of the *CsFAD* gene family in camelina and the functional characterization of the key gene *CsFAD3.3* involved in α-linolenic acid (ALA) biosynthesis may provide theoretical support for improving the oil quality of camelina seeds. 【Method】 Genome-wide data combined with bioinformatics approaches were used to identify the *CsFAD* gene family in camelina and to analyze chromosomal distribution, phylogenetic relationships, gene structures, and conserved motifs. Transcriptome data and RT-qPCR were employed to examine tissue-specific expression patterns. Subcellular localization assays were conducted to determine the localization of CsFAD3.3, and transgenic camelina and tobacco were generated for functional validation. 【Result】 A total of 54 *CsFAD* genes were identified, unevenly distributed across 20 chromosomes.

收稿日期：2025-10-03
基金项目：山西省博士毕业生来晋工作奖励经费科研项目（SXBYKY2024105），山西农业大学博士科研启动项目（2024BQ65），山西省基础研究计划（自由探索类）项目（202503021212177），国家自然科学基金项目（32201722）
*通信作者：李润植 rli2001@126.com，贾小云 jiaxiaoyun@sxau.edu.cn

Phylogenetic analysis classified them into six subfamilies, consistent with conserved structures and motif features. Expression profiling showed that *CsFAD* genes exhibited diverse expression patterns across different subgroups but similar patterns within the same subfamily. Notably, members of the CsFAD3 subfamily, especially *CsFAD3.3*, were predominantly expressed in seeds. Subcellular localization confirmed that CsFAD3.3 was located in the endoplasmic reticulum. Functional assays demonstrated that overexpression of *CsFAD3.3* significantly increased ALA content in camelina seeds. Moreover, both the transient expression in *N. benthamiana* leaves and the stable transformation in *N. tabacum* seeds demonstrated that *CsFAD3.3* could significantly enhance ALA accumulation in recipient leaves and transgenic seeds, respectively. 【Conclusion】 CsFAD3.3 is localized in the endoplasmic reticulum and functions as a key rate-limiting enzyme for ALA biosynthesis in camelina. Overexpression of *CsFAD3.3* significantly increased ALA content in camelina seeds, tobacco leaves, and tobacco seeds, confirming its functional conservation.

Keywords: *Camelina sativa* (L.) Crantz; *FAD* gene family; *CsFAD3.3* gene; expression pattern analysis; functional validation; α-linolenic acid

亚麻荠（*Camelina sativa* (L.) Crantz）作为一种新兴的非粮油料作物，凭借其较强的环境适应性（如耐旱、耐寒、低水肥需求）和抗病虫害能力，高度契合了现代农业低碳、环保、高效的发展需求，因而近年来备受关注[1-3]。亚麻荠种子含油量高达35%-50%，其中不饱和脂肪酸占比超过90%，主要成分为α-亚麻酸（C18:3Δ9, 12, 15, 31%-40%）、亚油酸（C18:2Δ9, 12, 20%-25%）和油酸（C18:1Δ9, 15%-20%）[4-6]。值得注意的是，亚麻荠种子中α-亚麻酸含量显著高于传统油料作物如大豆（*Glycine max*, 7%-10%）[7]和甘蓝型油菜（*Brassica napus*，约9%）[8]，使其在功能性油脂开发与生物基材料合成领域展现出独特优势。然而，亚麻荠脂肪酸代谢调控网络，尤其是关键限速酶的分子机制尚未完全阐明，这严重制约了该物种的定向遗传改良与工业化应用进程。

植物体内不饱和脂肪酸的合成主要由脂肪酸去饱和酶（fatty acid desaturase, FAD）家族催化。该家族根据其功能与亚细胞定位可分为*FAD4*、*FAD2/FAD6*、*FAD3/FAD7/FAD8*、*ADS*、*SLD*和*DES* 6个不同的亚家族。FAD成员通过在脂肪酸链特定位置引入双键，将饱和脂肪酸转化为不饱和脂肪酸，从而直接控制植物体内脂肪酸的不饱和程度与各组分比例，进而可通过影响膜的流动性及稳定性来提高植株的抗逆性[9-11]。大多数FAD蛋白中包含3个高度保守的组氨酸基序，这些基序对维持其催化活性至关重要[12]。在FAD成员中，ω-3脱氢酶是催化生成α-亚麻酸的关键酶。其中，FAD7和FAD8定位于叶绿体，在植物响应低温等环境胁迫中发挥非冗余作用[13]。而定位于内质网的FAD3，则是催化亚油酸（C18:2）转化为α-亚麻酸（α-linolenic acid, ALA）的关键酶，其活性与种子发育后期的油脂累积阶段高度协同，直接决定种子油中ALA的积累水平[14]。自拟南芥*FAD3*基因被成功克隆以来[15]，其同源基因已相继在大豆[16]、紫苏[17]等作物中得到克隆与验证。转基因研究进一步证实，*FAD3*的表达水平与种子中ALA含量呈显著正相关。近年来，基因编辑技术的应用为油脂组分定向改良提供了有力工具，例如，通过CRISPR-Cas9技术编辑亚麻荠*CsFAD2*基因，成功将其种子油中单不饱和脂肪酸含量提升至80%以上[18]。值得注意的是，亚麻荠作为一种异源六倍体植物，其基因组的复杂性导致*CsFAD*基因家族可能存在多个拷贝及功能分化现象。然而，目前相关研究多局限于单基因功能验证，缺乏在全基因组层面对该家族的系统演化分析及调控网络整合。

为此，本研究以亚麻荠SC-N16为材料，对*CsFAD*基因家族进行全基因家族鉴定，并分析其系统进化、基因结构及共线性关系。在此基础上，进一步聚焦于ALA合成关键候选基因*CsFAD3.3*，通过与内质网标记共定位明确其在内质网分布，并利用亚麻荠过表达与烟草异源表达体系验证其生物学功能。本研究旨在揭示多倍化事件对亚麻荠*CsFAD*基因家族扩张与分化的影响，并确认*CsFAD3.3*在ALA合成中的核心作用，以期为创制高ALA亚麻荠新种质提供关键靶基因，同时为解析多倍体作物的油脂代谢提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究使用的亚麻荠（SC-N16）、本氏烟草（*Nicotiana benthamiana*）、普通烟草（*N. tabacum*）由山西农业大学分子农业与生物能源研究所提供并种植。采集亚麻荠根、茎、叶、花，以及开花后10、20、30和40 d的种子，液氮速冻后于-80 ℃保存，用于后续分析。

1.2 方法

1.2.1 *CsFAD*家族成员的鉴定及蛋白序列特征分析 以拟南芥TAIR数据库（https://www.arabidopsis.org/）中20条AtFAD蛋白序列为参考，通过BlastP（e-value<1e-10，identity≥30%）在亚麻荠基因组数据库中检索同源基因，获得候选CsFAD蛋白序列。从PFAM数据库（http://pfam.xfam.org/）下载FA_desaturase结构域（PF00487）的隐马尔可夫模型（HMM）文件，利用HMMER3.3.2软件在亚麻荠基因组二次鉴定（e-value<1.0）。通过SMART数据库（https://smart.embl-heidelberg.de/）验证候选基因结构域完整性，剔除不完整序列。下载筛选后基因的CDS、基因组及蛋白序列，基于系统发育树拓扑结构和染色体定位结果，对54个*CsFAD*基因进行命名。用ExPasy-ProtParam工具（https://web.expasy.org/protparam/）分析蛋白分子量、理论等电点、氨基酸组成及不稳定指数等理化性质。

1.2.2 亚麻荠*CsFAD*家族的结构、染色体定位和共线性分析 运用MEME（http://meme-suite.org/）分析保守基序（最大motif数设为10），利用NCBI-CDD数据库（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/docs/cdd_search.html）分析保守结构域。使用MEGA7软件对CsFAD蛋白序列进行多序列比对和邻接法（neighbor-joining）聚类分析，由TBtools软件可视化分析结果。依据基因位置信息，用TBtools绘制*CsFAD*基因染色体定位图。通过TBtools的One Step MCScanX分析基因重复事件，使用Dual Systeny Plotter分析亚麻荠与拟南芥、白菜*FAD*基因的共线性关系，并基于*Ka*/*Ks*计算模块分析基因对选择压力（*Ka*/*Ks*>1为正选择，*Ka*/*Ks*<1为纯化选择，*Ka*/*Ks*=1为中性选择）。

1.2.3 亚麻荠CsFAD家族的系统发育树分析 采用ClustalW对拟南芥20个AtFAD和亚麻荠54个CsFAD蛋白序列进行多序列比对。使用MEGA7软件，采用邻接法构建进化树（模式“Poisson correction”，缺口设置“Complete Deletion”，校验参数Bootstrap=1 000）。

1.2.4 亚麻荠*CsFAD*基因启动子顺式作用元件分析 通过TBtools从亚麻荠基因组gff文件中提取各*CsFAD*基因上游2 000 bp启动子序列，通过PlantCARE（http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/）进行顺式作用元件分析，利用TBtools进行可视化。

1.2.5 亚麻荠*CsFAD*基因表达模式分析 基于eFP网站（http://bar.utoronto.ca/efp_Camelina/cgi-bin/efpWeb.cgi）获取亚麻荠不同组织及种子发育阶段的RNA-seq数据。利用TBtools分析*CsFAD*基因的转录水平，并绘制表达热图。用EASYspin Plus Plant RNA Kit植物RNA快速提取试剂盒进行RNA提取，采用TransScript® Uni All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR（One-Step gDNA Removal）反转录试剂盒进行cDNA获取及YBR® Premix Ex Taq™ II定量分析试剂盒进行RT-qPCR分析。以*CsActin*为内参基因，使用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算基因相对表达量。引物采用NCBI的Primer-BLAST（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/）设计（附表1）。

1.2.6 CsFAD3.3的亚细胞定位 基于亚麻荠*CsFAD3.3*基因的编码序列（CDS）设计克隆引物（附表1）。以开花后20 d种子cDNA为模板，PCR扩增不含终止密码子的CsFAD3.3 CDS序列，克隆至pCAMBIA1300载体中，构建由CaMV35S启动子驱动的CsFAD3.3-GFP融合表达载体。利用液氮冻融法将该载体和内质网定位Marker载体（35S::NES::mCherry）转化农杆菌。将携带两种载体的农杆菌（1∶1的体积比）共侵染本氏烟草叶片，暗培养3 d后利用激光共聚焦显微镜观察GFP荧光。

1.2.7 过表达*CsFAD3.3*转基因亚麻荠的培育与鉴定 采用冻融法将重组质粒CsFAD3.3-pCAMBIA1303转化农杆菌GV3101。参照Floral-dip法[19]转化亚麻荠：收集对数期农杆菌，重悬于转化缓冲液（1/2 MS培养基，5%蔗糖，0.02% Silwet L-77），调整OD_{600}=0.8。于盛花期将亚麻荠花序完全浸没于菌液中30 s，覆盖保鲜膜保湿并黑暗处理24 h后转入正常光照培

养。收获T_0代种子，在含50 μg/mL潮霉素的1/2 MS培养基上筛选获得T_1代阳性苗。连续3代在含潮霉素的1/2 MS培养基上筛选获得T_3代纯合株系。选取3株T_3代转基因株系及野生型（WT）植株，采集成熟种子经冷冻干燥后，采用氯仿-甲醇法提取总脂[20]；使用气相色谱（GC，Agilent 7890B，氢火焰检测器，HP-88色谱柱100 m×0.25 mm×0.20 μm）分析脂肪酸组成，以十七烷酸甲酯（C17:0）为内标计算各脂肪酸相对含量。

1.2.8　本氏烟草瞬时表达　采用冻融法将重组质粒CsFAD3.3-pCAMBIA1303转化农杆菌GV3101，挑取农杆菌单菌落于LB液体培养基（含卡那霉素）中振荡培养至对数期，离心收集菌体。使用侵染缓冲液（含10 mmol/L $MgCl_2$、10 mmol/L MES及150 μmol/L乙酰丁香酮）重悬并调整OD_{600}至0.6–0.8。室温避光静置2 h后，用无针头注射器自叶片背部侵染生长4–5周的本氏烟草。接种后植株于25 ℃正常光照培养48–72 h，采集叶片用于ALA含量测定。

1.2.9　过表达*CsFAD3.3*转基因烟草的培育与鉴定　采用叶盘转化法[20]转化普通烟草：将CsFAD3.3-pCAMBIA1303转化农杆菌GV3101，侵染预培养2 d的烟草叶片外植体。共培养（28 ℃，3 d）后在含潮霉素和头孢霉素的筛选培养基诱导抗性芽，切芽至生根培养基（1/2 MS+头孢霉素）获得完整植株并移栽。提取T_0代植株DNA进行PCR验证，收获种子并连续筛选至获得T_3代纯合株系，选取3株T_3代转基因株系及野生型种子，经冷冻干燥后，采用与亚麻荠相同的方法测定总脂含量及脂肪酸组分。

2　结果

2.1　全基因组鉴定获得54个亚麻荠*CsFAD*基因家族成员

基于拟南芥20个AtFAD蛋白序列，通过BlastP同源检索并结合PFAM和SMART数据库的结构域验证，在亚麻荠基因组中共鉴定出54个*CsFAD*家族成员（附表2）。这些CsFAD蛋白的氨基酸长度介于114（CsADS17）–923（CsADS1）之间，预测分子量为13.360 kD（CsADS17）–108.550 kD（CsADS1）。其等电点（pI）分布在5.22（CsADS1）–10.34（CsADS19）；除CsADS12（pI 5.22）为酸性蛋白（pI<7）外，其余53个均为碱性蛋白（pI>7）。不稳定指数分析显示，58%的CsFAD蛋白属于不稳定蛋白。疏水性分析表明，CsDES1.2、CsDES1.3、CsDES1.4、CsSLD1.1、CsSLD1.2、CsSLD1.3和CsADS17等7个成员为疏水蛋白，其余47个为亲水蛋白。跨膜结构域预测显示，除CsADS12、CsADS19、CsFAD4.1-CsFAD4.5蛋白无跨膜结构域外，其余47个CsFAD蛋白均含有2–10个跨膜结构域。

为了阐明*CsFAD*基因家族的序列结构特征，基于其蛋白序列构建系统发育树，并比较了保守基序（motif）、结构域及基因结构（图1）。系统进化分析显示，*CsFAD*家族划分为6个亚家族：*CsADS*、*CsSLD*、*CsDES*、*CsFAD4*、*CsFAD2*/*CsFAD6*（*ω6*）和*CsFAD3*/*CsFAD7*/*CsFAD8*（*ω3*）。保守基序分析（共10个基序）显示，同一亚家族成员通常由相同的基序组成，而不同亚家族间则存在显著差异。例如，motif 8在除*CsADS*外的所有亚家族中普遍存在；*ω3*和*CsFAD2*亚家族共享motif 5/6/8/9/10；*CsFAD6*亚家族与*CsFAD2*相比缺失motif 9；而*CsDES*和*CsSLD*亚家族除motif 8外，分别特有motif 5和motif 6；*CsFAD4*亚家族仅含motif 8；*CsADS*亚家族中，除*CsADS12*/*16*/*17*/*19*外，基本上都含有motif 1–5及motif 7。保守结构域分析表明，*ω-3*和*CsADS*亚家族属于膜结合FADS_like超基因家族；*CsFAD2*属于PLN02505家族；*CsFAD6*属于PLN02598家族；*CsDES*属于PLN02579超基因家族；*CsSLD*属于Delta-FAD-like家族；*CsFAD4*属于TMEM189_B域超基因家族。基因结构分析发现，*ω-3*基因含8个外显子和7个内含子，*CsFAD2*基因在外显子和内含子的结构上存在明显的差异，这可能表明*CsFAD2*基因之间可能行使不同的功能。*CsFAD6.3*含有12个外显子；*CsFAD6.1*和*CsFAD6.2*均含有10个外显子；*CsDES*基因均含2个外显子；除了*CsSLD2.3*和*CsFADA4.3*含有2个外显子外，其余的*CsSLD*基因和*CsFAD4*基因均含有1个外显子。以上结果表明，*CsFAD*基因家族在保守基序、结构域及基因结构上的特征与其系统进化关系高度吻合，共同揭示了该家族的演化路径与功能分化。

2.2　*CsFAD*基因家族的系统发育及扩张机制分析

为解析*CsFAD*基因家族的进化起源，构建亚麻荠与拟南芥FAD蛋白的系统发育树。结果显示（图2），亚麻荠*CsFAD*家族成员与拟南芥高度同源，

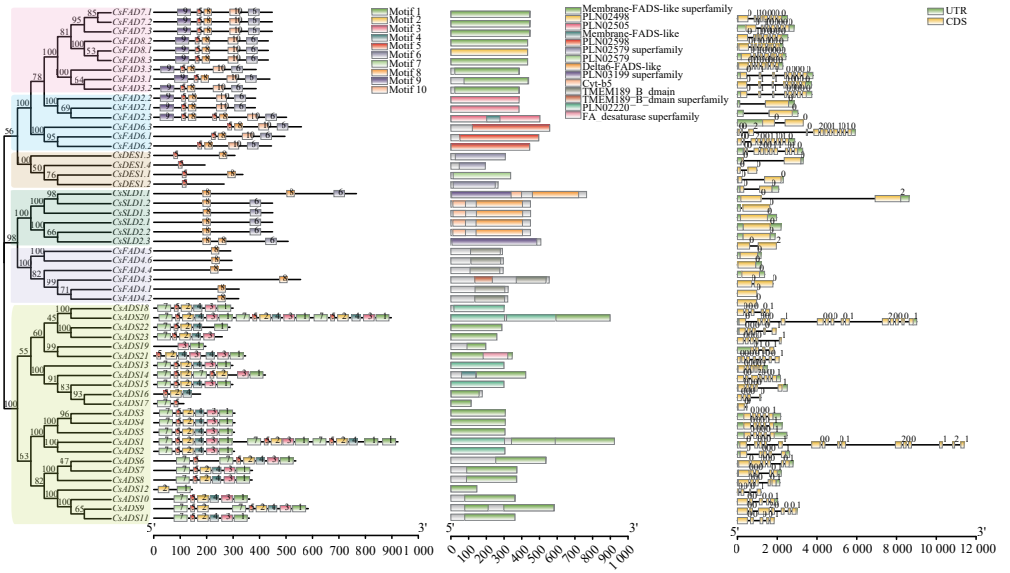


图1 亚麻荠*CsFAD*基因家族的系统发育树、基序、保守结构域和基因结构

Fig. 1 Phylogenetic tree, motif, conserved domain and gene structure of *CsFAD* gene family in camelina

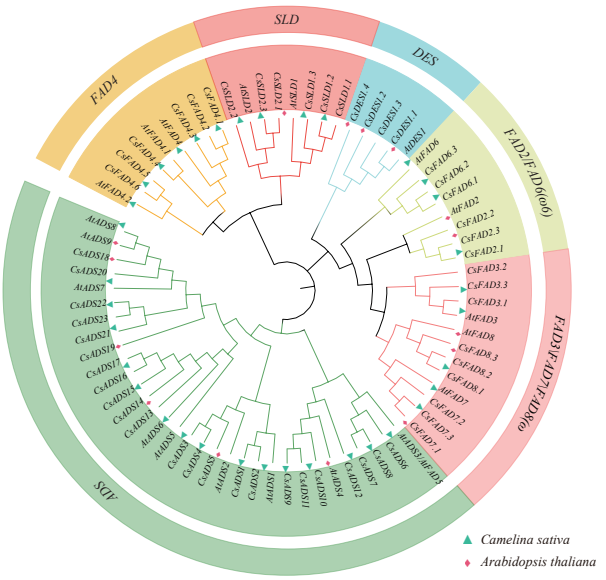


图2 亚麻荠*CsFAD*基因家族的进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *CsFAD* gene family in camelina

聚类为6个进化亚组，而且绝大多数*AtFAD*基因在亚麻荠中均对应存在3个同源拷贝，这一扩张模式充分体现了亚麻荠异源六倍体基因组在进化过程中发生的基因三倍化特征。

染色体定位分析（图3）显示，54个*CsFAD*基因在亚麻荠的20条染色体上呈不均匀分布。其中，17号染色体上的基因分布最多，共6个；而4、6和20号染色体上均仅含1个成员。进一步观察发现，在17号染色体上有一个明显的基因簇，该区域密集分布着6个*CsFAD*基因，这为串联重复驱动该基因家族的局部扩增提供了直接的基因组学证据。

为探究其扩张机制，进行共线性分析。物种内共线性分析（图4，附表3）鉴定到6对由串联重复产生的基因对（*CsADS15*/*CsADS16*、*CsADS10*/*CsADS12*、*CsADS2*/*CsADS18*、*CsADS18*/*CsADS22*、*CsADS22*/*CsADS21*、*CsADS14*/*CsADS17*），以及70对源于片段复制的*CsFAD*基因。表明串联重复和片段复制均参与了*CsFAD*基因家族的扩张，但片段复制的贡献更为显著，可能是驱动该家族扩张的主要机制。物种间共线性分析（图5）表明，亚麻荠与拟南芥间存在1 201个同源区块（包含81 245个共线性基因对，占比72.04%），与白菜间存在2 864个同源区块（包含84 845个共线性基因对，占比68.01%）。在此基础上，共鉴定出41个*CsFAD*基因与15个*AtFAD*基因形成60对直系同源基因（图5-A），29个*CsFAD*基因与41个*BrFAD*基因形成123对直系同源基因（图5-B）。值得注意的是，*CsFAD*基因与白菜间的共线性程度高于拟南芥，推测与亚麻荠和白菜均经历过3次全基因组复制事件有关。此外，对所有鉴定的*CsFAD*

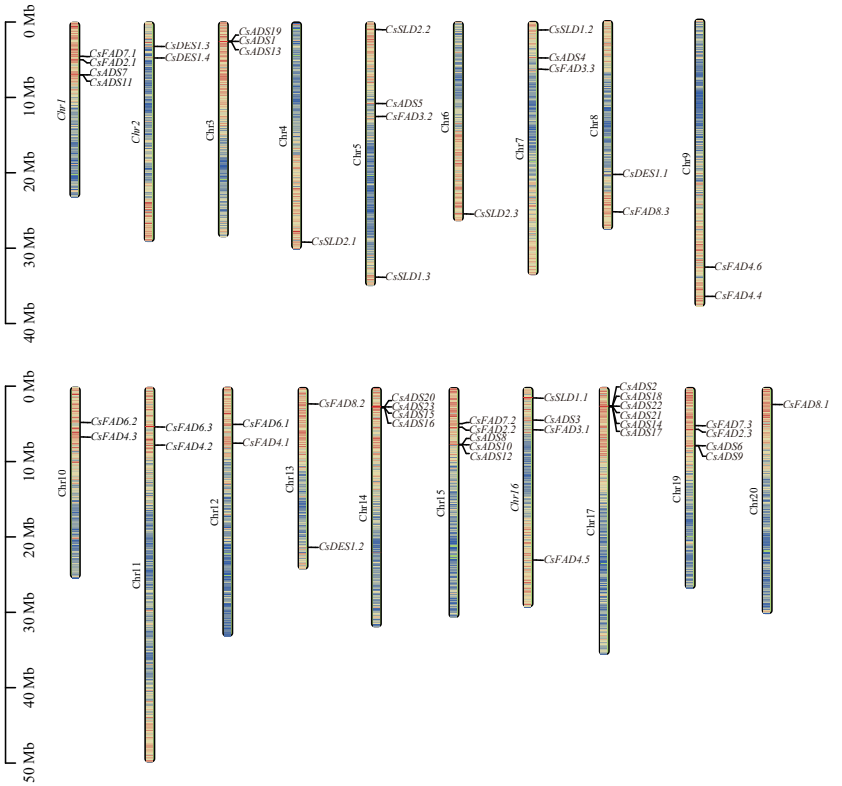


图3　亚麻荠*CsFAD*基因家族染色体定位

Fig. 3　Chromosome mapping of *CsFAD* gene family in camelina

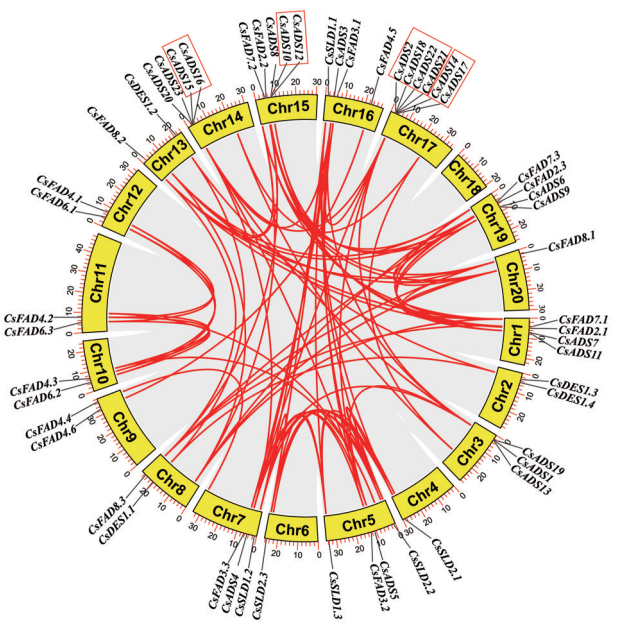


图4　亚麻荠*CsFAD*基因的种内共线性分析

Fig. 4　Intraspecific synteny analysis of *CsFAD* genes in camelina

直系同源基因对进行选择压力分析。结果显示（附表3），所有*CsFAD*同源基因对的非同义替换率（*Ka*）与同义替换率（*Ks*）比值（*Ka*/*Ks*值）均小于0.5，提示该家族在进化过程中受到了强烈的纯化选择，功能趋于保守。

根据亚麻荠基因组注释信息，亚麻荠基因组可分为3个异源亚基因组：Cs-G1亚组（Chr4、Chr11、Chr13、Chr15、Chr16、Chr17）、Cs-G2亚组（Chr6、Chr7、Chr8、Chr10、Chr14、Chr18、Chr19）以及Cs-G3亚组（Chr1、Chr2、Chr3、Chr5、Chr9、Chr12、Chr20）。据此，将54个*CsFAD*基因重新定位至上述3个亚基因组，并对其分布特征进行统计分析。结果显示（附表4），Cs-G1、Cs-G2和Cs-G3亚基因组分别包含20、16和18个*CsFAD*基因，整体分布较为均衡。进一步的*Ka*/*Ks*比值分析表明，6个亚家族的平均*Ka*/*Ks*值均小于1（范围0.23–0.46），表明所有成员均受到纯化选择压力。具体而言，*ω-6*亚家族（*CsFAD2/6*）的平均*Ka*/*Ks*值最低（0.046 5），

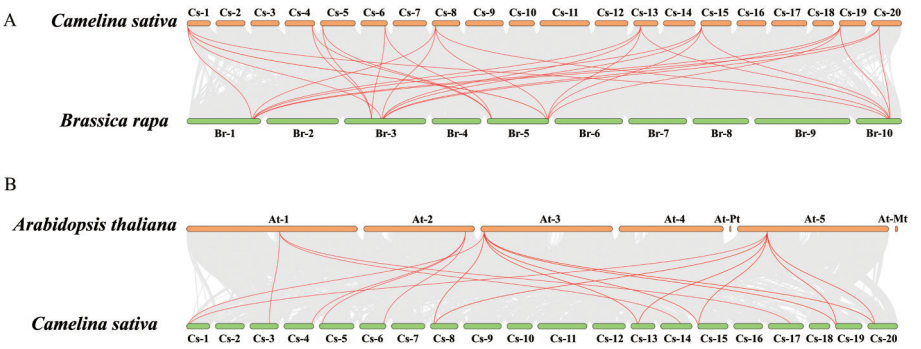


图5 亚麻荠与拟南芥(A)、白菜(B)*FAD*基因的共线性分析

Fig. 5 Synteny analysis of *FAD* genes between *Camelina sativa*, *Arabidopsis thaliana* (A), and *Brassica rapa* (B)

受选择约束最强；*ω-3*亚家族（*CsFAD3/7/8*）为0.165 1，*CsSLD*为0.141 5，*CsADS*为0.245 0，*CsFAD4*为0.251 6；而*CsDES*亚家族最高（0.403 8），说明其受到相对较弱的选择压力、分化速率较快。

2.3 *CsFAD*基因启动子顺式作用元件分析

基因功能往往与基因上游转录因子结合位点的顺式调控元件密切相关，利用PlantCARE数据库对*CsFAD*基因起始密码子上游2 000 bp启动子区域进行顺式作用元件分析。结果（图6）发现，*CsFAD*启动子富含多种功能元件，包括光响应元件（如G-box、box4、Sp1、GT1-motif）、激素响应元件（如赤霉素响应元件p-box、水杨酸响应元件TCA-element、生长素响应元件TGA-element、脱落酸响应元件ABRE）以及逆境胁迫响应元件（如低温响应元件LTR、干旱诱导元件MBS、厌氧诱导响应元件ARE）。这表明*CsFAD*基因的表达可能受光信号和多种激素调控。此外，41个*CsFAD*基因的启动子中鉴定到种子特异性调控元件，暗示这些基因参与种子发育调控。35个*CsFAD*基因启动子含有低温胁迫响应元件，绝大多数*CsFAD*基因（>90%）的启动子含有干旱胁迫响应元件，表明*CsFAD*基因可能广泛参与植物对低温、干旱等非生物胁迫的应答。综上，*CsFAD*启动子元件的多样性，暗示其参与复杂多样的生物学过程及信号通路响应。

2.4 *CsFAD*基因的转录表达模式

亚麻荠种子油富含ALA，为探究*CsFAD*基因表达模式与种子中ALA积累的关系，分析其在亚麻荠12个不同组织中的表达谱。结果显示（图7），*CsFAD*基因的表达具有显著的组织特异性，且同一亚家族成员普遍呈现相似的表达模式。*ω-6*亚家族成

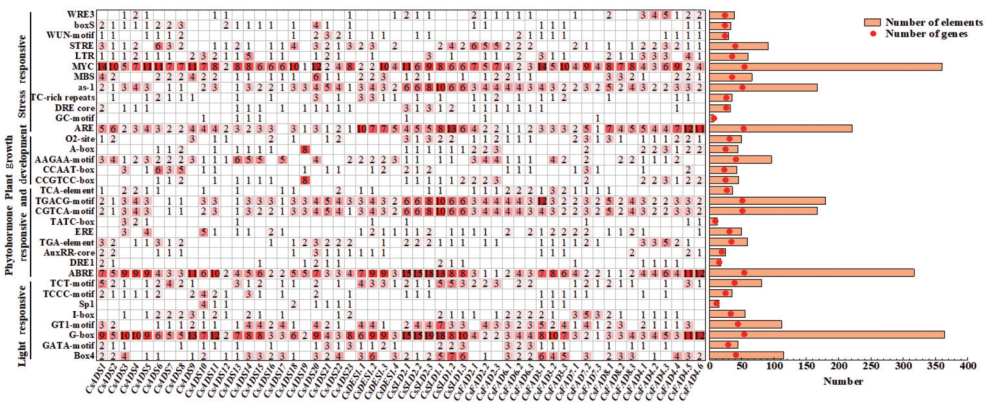


图6 亚麻荠*CsFAD*启动子序列顺式作用元件

Fig. 6 *Cis*-element analysis in camelina *CsFAD* promoter sequences

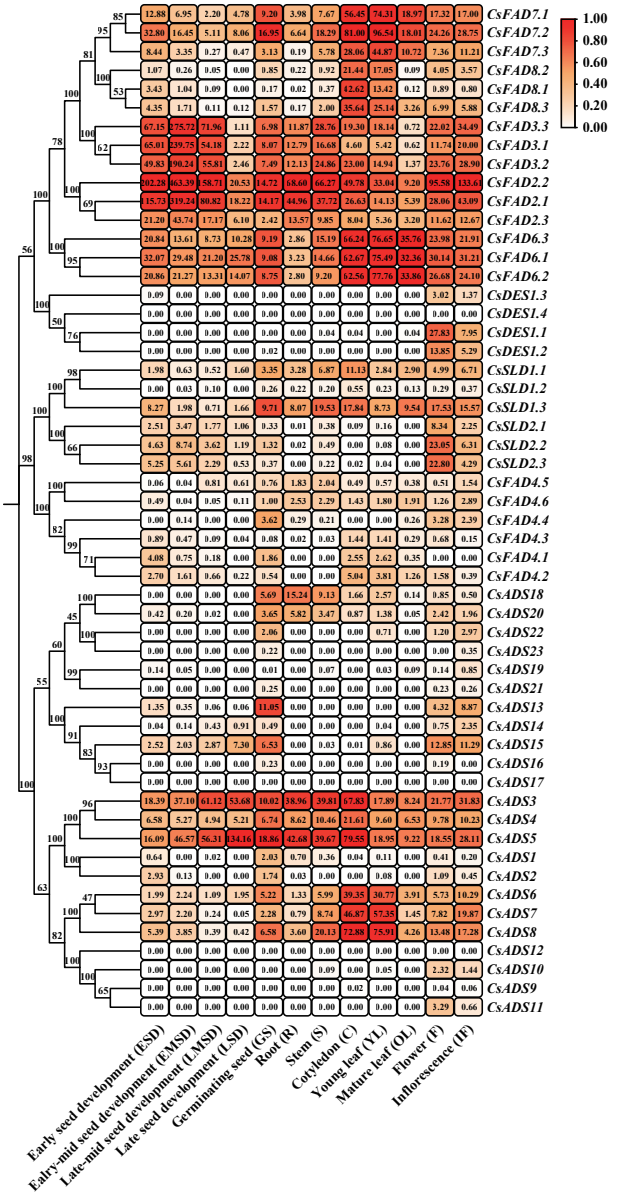


图7　亚麻荠*CsFAD*基因家族成员在不同组织及种子发育阶段的表达热图

Fig. 7　Expression heatmap of *CsFAD* family genes across various tissues and seed developmental stages in camelina

员在种子中特异性高表达，尤其是*CsFAD2.1*与*CsFAD2.2*，表明它们是催化种子中亚油酸合成的关键基因。*CsFAD6*则主要在营养器官（叶和花）中表达。在*ω-3*亚家族中，*CsFAD7*和*CsFAD8*基因在叶片中的表达量高，而*CsFAD3*主要在种子中表达，尤其是在开花后20 d的种子中表达量最高。进一步通过RT-qPCR对*CsFAD3*基因进行验证，结果与转录组数据高度一致（图8-A）。值得注意的是，在3个*CsFAD3*拷贝中，*CsFAD3.3*在种子中的表达水平显著高于*CsFAD3.1*和*CsFAD3.2*，并与种子油脂快速积累时期高度吻合（图8-B）。这些表达特征表明，CsFAD3.3是促进亚麻荠种子中ALA合成的核心成员，而不同亚家族成员的组织特异性表达则共同构成了亚麻荠不同器官中不饱和脂肪酸组成的代谢基础。

2.5　CsFAD3.3蛋白的亚细胞定位

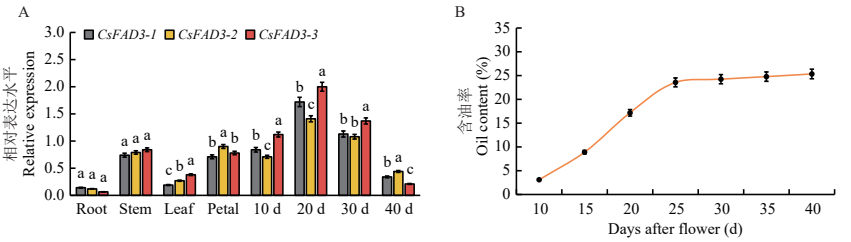
为明确CsFAD3.3蛋白的亚细胞定位，在本氏烟草叶片的表皮细胞中共表达CsFAD3.3-GFP融合蛋白（由CaMV35S启动子驱动）与内质网定位Marker（35S::ER::mCherry）。激光共聚焦显微镜观察显示（图9），CsFAD3.3-GFP的绿色荧光信号与内质网Marker的红色荧光信号（mCherry）高度重叠（呈现黄色），表明CsFAD3.3蛋白定位于内质网。

2.6　过表达*CsFAD3.3*改变亚麻荠种子含油量及其脂肪酸组成

为探究*CsFAD3.3*在亚麻荠种子中的生物学功能，构建*CsFAD3.3*基因的植物过表达载体，并利用花序侵染法成功转化亚麻荠。对随机选取的3株独立过表达（OE）纯合株系的成熟种子进行分析发现，过表达株系种子油脂含量较野生型（WT）显著提高约17.4%（图10-A），更重要的是，脂肪酸组成分析显示，过表达株系种子中的ALA含量相较于WT显著提升了约18.33%（图10-B）。这一功能获得性遗传证据充分证实，CsFAD3.3是促进亚麻荠种子油脂与ALA协同积累的关键功能基因。。

2.7　异源表达*CsFAD3.3*改变烟草油脂含量及其脂肪酸组成

为在异源系统中验证CsFAD3.3功能，分别进行烟草瞬时表达与稳定遗传转化分析。对瞬时表达的叶片及3株独立T_3代纯合转基因（OE）株系种子的分析表明，转基因烟草叶片总脂含量较野生型（WT）显著提高2.76%（图11-A）；而转基因种子的总脂含量显著提高7.56%（图11-C）。此外，在烟草中异源表达*CsFAD3.3*也可以使烟草叶片和种子中的脂肪酸脱饱和程度发生显著改变。与WT相比，过



采用RT-qPCR分析*CsFAD3*基因在根、茎、叶、花和开花后10、20、30和40 d种子的表达模式。以*CsActin*基因为内参基因，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法计算相对表达量。数据来源于3次生物学重复，以均值±标准差表示（n=3）。采用单因素方差分析（ANOVA）后进行Tukey事后检验，不同小写字母表示组间差异显著（P<0.05），下同

The expression patterns of *CsFAD3* genes in roots, stems, leaves, petals, and seeds at 10, 20, 30, and 40 days after flowering (DAF) were analyzed by RT-qPCR. *CsActin* was used as the internal reference gene, and the relative expression levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Data represent the mean ± standard deviation (SD) from three biological replicates (n=3). One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test was performed to evaluate significant differences among groups, and different lowercase letters indicate statistically significant differences (P<0.05), the same below

图8 *CsFAD3*基因在不同组织及种子发育阶段的表达谱（A）以及亚麻荠种子发育过程中油含量的动态变化（B）

Fig. 8 Expression profiles of *CsFAD3* gene in different tissues and seed developmental stages (A) as well as dynamic changes in oil content during seed development of camelina (B)

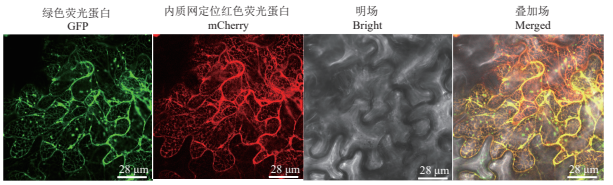


图9 CsFAD3.3蛋白的亚细胞定位

Fig. 9 Subcellular localization of the CsFAD3.3 protein

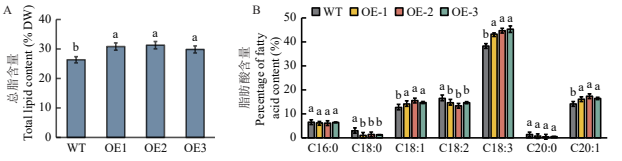


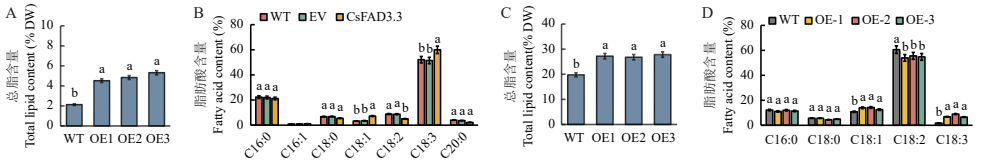
图10 过表达*CsFAD3.3*基因在亚麻荠种子中总脂含量（A）及脂肪酸成分（B）分析

Fig. 10 Analysis of total lipid content (A) and fatty acid composition (B) in camelina seeds overexpressing *CsFAD3.3*

表达*CsFAD3.3*烟草叶片和种子中的C18:3的含量显著提高（图11-B，D）。这一异源系统中的功能性互补实验充分证实，CsFAD3.3是一个能够同时增强油脂积累并特异性促进ALA合成的关键酶。

3 讨论

本研究在异源六倍体油料作物亚麻荠中系统鉴定了54个*CsFAD*基因，其非均匀染色体分布及扩增模式（如*ω-3*亚家族含9个成员）与亚麻荠基因组的3套同源亚基因组结构高度吻合，表明全基因组复制（WGD）事件是该家族扩张的主要驱动力；而随后的串联与片段复制进一步丰富了成员多样性。这种扩张模式与棉花、小麦等多倍体作物中*FAD*家族的



A、B：瞬时表达*CsFAD3.3*的烟草叶片总脂含量（A）及脂肪酸组分比例（B）；C、D：稳定转基因烟草种子中的总脂含量（C）及脂肪酸组分比例（D）

A, B: Total lipid content (A) and fatty acid composition (B) in tobacco leaves with transient expression of *CsFAD3.3*. C, D: Total lipid content (C) and fatty acid composition (D) in seeds of stable transgenic tobacco

图11 *CsFAD3.3*在烟草叶片瞬时表达及种子过表达体系中的功能验证

Fig. 11 Functional validation of *CsFAD3.3* through transient expression in tobacco leaves and stable overexpression in tobacco seeds

进化机制一致[21-23]，为亚麻荠适应复杂环境及油脂合成通路的功能冗余与分化提供了遗传基础。系统发育、保守基序及基因结构的综合分析共同支持将*CsFAD*划分为6个亚家族，其进化上的保守性为同源基因的功能推断提供了可靠分子框架。

基因的表达模式是解析其生物学功能的关键线索[24]，本研究通过RNA-seq分析，揭示了*CsFAD*各亚家族成员在亚麻荠不同器官中的功能分化：*CsFAD2.1*和*CsFAD2.2*在种子中高表达，与其主导亚油酸积累的功能相符[25-26]；*CsFAD6*在光合组织（叶/花）中高表达，暗示其可能参与膜脂修饰[27]；*CsFAD4.5*和*CsFAD4.6*基因在茎中高表达，鉴于FAD4是已知的唯一催化反式双键的去饱和酶[28]，暗示孢子体中的反式脂肪酸可能在茎中富集或通过茎运输；而*CsFAD3.3*在种子发育关键期（开花后20 d）的表达峰值与油脂快速积累同步，且符合牡丹、番茄等油料作物中*FAD3*表达与ALA积累的正相关规律[29-30]，表明该调控机制具有普遍的保守性。功能验证结果从体内和异源系统两个层面，共同确立了*CsFAD3.3*的核心功能：在亚麻荠中过表达*CsFAD3.3*可显著提升ALA含量和总脂含量；在烟草中异源表达*CsFAD3.3*同样提高叶片与种子中ALA水平与总脂含量，表明该基因功能的跨物种保守性。这一结果与拟南芥、番茄、大豆、牡丹等物种中*FAD3*的功能研究结论相呼应[30-33]。值得注意的是，本研究揭示了*CsFAD3.3*过表达所带来的“ALA比例与总油脂含量双增”现象，提示其可能通过影响前体代谢或下游酶（如ACC1、DGAT1）间接调控碳流分配。未来研究可结合代谢组学与关键酶活性分析，系统解析该间接效应的分子机制。

尽管本研究在基因家族鉴定及核心成员功能解析方面取得了进展，但仍存在局限。首先，关于*CsFAD*基因的调控网络解析仍停留在预测阶段。虽然启动子分析预测*CsFAD*基因可能受光、非生物胁迫及种子发育信号调控[13, 34-35]，且表达谱也显示*CsFAD7/8*在叶中高表达可能与低温响应相关[13]，但这些调控关系的实验证据仍待充实，上游转录因子及其作用网络尚未解析。其次，*CsFAD3.3*的表达高峰与油脂积累期同步，但缺乏同批次样品中ALA含量的直接测定与严格的统计学关联分析，使得“表达驱动合成”的因果链条有待进一步验证。此外，亚细胞定位方面，未来可结合游离GFP对照及免疫电镜技术，对其内质网定位进行更精确确认，从而全面解析该基因的功能与调控网络。

基于此，未来研究可从以下几个方面深入：首先，利用酵母单杂交、EMSA及ChIP-qPCR等技术，鉴定直接调控*CsFAD3.3*的关键转录因子，解析其响应环境与发育信号的分子机制；其次，在种子发育过程中同步进行转录组、靶基因表达量及脂肪酸组分的动态监测，直接计算并验证其表达与产物积累的相关性；最后，探索*CsFAD3.3*与油脂合成关键酶基因（如*DGAT1*）的协同效应，为利用多基因聚合策略改良亚麻荠油脂品质提供新思路。

综上所述，本研究系统解析了亚麻荠*CsFAD*基因家族的进化特征与表达模式，不仅强化了对FAD3功能保守性的认知，还挖掘并验证了*CsFAD3.3*在协同提升油脂品质与产量中的关键作用。这些发现为通过分子设计定向改良亚麻荠及同类油料作物的油脂品质奠定了重要的理论与基因资源基础。

4　结论

在亚麻荠中系统鉴定出54个*CsFAD*基因，将其划分为6个亚家族。*CsFAD3.3*定位于内质网中并在种子发育期特异性高表达，是催化ALA合成的关键基因。在亚麻荠和烟草中过表达*CsFAD3.3*均能显著提高种子中的ALA与总油脂含量，验证了其功能的保守性。

文章所有附表数据请点击链接获取（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260413164820_NewsFile_75.pdf）。

参考文献

[1] 李飞飞, 魏悦, 于立芹, 等. 亚麻荠植株营养及功能成分质量评价 [J]. 湖北农业科学, 2023, 62(7): 126-129, 162.
Li FF, Wei Y, Yu LQ, et al. Quality evaluation of nutritional and functional components in *Camellia sativa* plants [J]. Hubei Agric Sci, 2023, 62(7): 126-129, 162.

[2] 苑丽霞, 毛雪, 高昌勇, 等. 新型工业油料作物亚麻荠: 从基因组到代谢工程 [J]. 植物生理学报, 2015, 51(8): 1204-1216.
Yuan LX, Mao X, Gao CY, et al. New type of industrial oilseed crop *Camelina sativa*: from genome to meta-bolic engineering [J].

Plant Physiol Commun, 2015, 51(8): 1204-1216.

[3] Yuan LX, Li RZ. Metabolic engineering a model oilseed *Camelina sativa* for the sustainable production of high-value designed oils [J]. Front Plant Sci, 2020, 11: 11.

[4] Sydor M, Kurasiak-Popowska D, Stuper-Szablewska K, et al. *Camelina sativa*. Status quo and future perspectives [J]. Ind Crops Prod, 2022, 187: 115531.

[5] Neupane D, Lohaus RH, Solomon JKQ, et al. Realizing the potential of *Camelina sativa* as a bioenergy crop for a changing global climate [J]. Plants, 2022, 11(6): 772.

[6] Arshad M, Mohanty AK, Van Acker R, et al. Valorization of *Camelina* oil to biobased materials and biofuels for new industrial uses: a review [J]. RSC Adv, 2022, 12(42): 27230-27245.

[7] Bukowski MR, Goslee S. Climate-based variability in the essential fatty acid composition of soybean oil [J]. Am J Clin Nutr, 2024, 119(1): 58-68.

[8] 尚丽平, 梁佩萱, 曹小东, 等. 甘蓝型油菜亚麻酸含量性状QTL定位与候选基因分析 [J]. 西北农业学报, 2025, 34(1): 24-34.
Shang LP, Liang PX, Cao XD, et al. QTL mapping and candidate gene identification for C18: 3 content in *Brassica napus* L [J]. Acta Agric Boreali Occidentalis Sin, 2025, 34(1): 24-34.

[9] Zhu SS, Zhu ZY, Wang HR, et al. Characterization and functional analysis of a plastidial *FAD6* gene and its promoter in the mesocarp of oil palm (*Elaeis guineensis*) [J]. Sci Hortic, 2018, 239: 163-170.

[10] Lu JY, Chen XY, Li JX, et al. Whole-genome identification of the flax fatty acid desaturase gene family and functional analysis of the *LuFAD2.1* gene under cold stress conditions [J]. Plant Cell Environ, 2025, 48(3): 2221-2239.

[11] Saini R, Kumar S. Genome-wide identification, characterization and *in-silico* profiling of genes encoding FAD (fatty acid desaturase) proteins in chickpea (*Cicer arietinum* L.) [J]. Plant Gene, 2019, 18: 100180.

[12] Berestovoy MA, Pavlenko OS, Goldenkova-Pavlova IV. Plant fatty acid desaturases: role in the life of plants and biotechnological potential [J]. Biol Bull Rev, 2020, 10(2): 127-139.

[13] Román Á, Hernández ML, Soria-García Á, et al. Non-redundant contribution of the plastidial FAD8 ω-3 desaturase to glycerolipid unsaturation at different temperatures in *Arabidopsis* [J]. Mol Plant, 2015, 8(11): 1599-1611.

[14] Liu YH, Du ZL, Li Y, et al. Improving linolenic acid content in rapeseed oil by overexpression of *CsFAD2* and *CsFAD3* genes [J]. Mol Breed, 2024, 44(2): 9.

[15] Arondel V, Lemieux B, Hwang I, et al. Map-based cloning of a gene controlling omega-3 fatty acid desaturation in *Arabidopsis* [J]. Science, 1992, 258(5086): 1353-1355.

[16] Li Z, Wang Y, Yu LL, et al. Overexpression of the purple *Perilla* (*Perilla frutescens* (L.)) *FAD3a* gene enhances salt tolerance in soybean [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(13): 10533.

[17] Pham AT, Shannon JG, Bilyeu KD. Combinations of mutant *FAD2* and *FAD3* genes to produce high oleic acid and low linolenic acid soybean oil [J]. Theor Appl Genet, 2012, 125(3): 503-515.

[18] Lee KR, Jeon I, Yu HM, et al. Increasing monounsaturated fatty acid contents in hexaploid *Camelina sativa* seed oil by *FAD2* gene knockout using CRISPR-Cas9 [J]. Front Plant Sci, 2021, 12: 702930.

[19] Liu XJ, Brost J, Hutcheon C, et al. Transformation of the oilseed crop *Camelina sativa* by *Agrobacterium*-mediated floral dip and simple large-scale screening of transformants [J]. Vitro Cell Dev Biol Plant, 2012, 48(5): 462-468.

[20] Gao HL, Xue JN, Yuan LX, et al. Systematic characterization of CsbZIP transcription factors in *Camelina sativa* and functional analysis of CsbZIP-A12 mediating regulation of unsaturated fatty acid-enriched oil biosynthesis [J]. Int J Biol Macromol, 2024, 270 (Pt 1): 132273.

[21] Kagale S, Koh C, Nixon J, et al. The emerging biofuel crop *Camelina sativa* retains a highly undifferentiated hexaploid genome structure [J]. Nat Commun, 2014, 5: 3706.

[22] Feng JY, Dong YT, Liu W, et al. Genome-wide identification of membrane-bound fatty acid desaturase genes in *Gossypium hirsutum* and their expressions during abiotic stress [J]. Sci Rep, 2017, 7: 45711.

[23] Hajiahmadi Z, Abedi A, Wei H, et al. Identification, evolution, expression, and docking studies of fatty acid desaturase genes in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. BMC Genomics, 2020, 21(1): 778.

[24] Inoue M, Horimoto K. Relationship between regulatory pattern of gene expression level and gene function [J]. PLoS One, 2017, 12(5): e0177430.

[25] Sun DQ, Quan WZ, Wang D, et al. Genome-wide identification and expression analysis of fatty acid desaturase (*FAD*) genes in *Camelina sativa* (L.) Crantz [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(23): 14550.

[26] Hutcheon C, Ditt RF, Beilstein M, et al. Polyploid genome of *Camelina sativa* revealed by isolation of fatty acid synthesis genes [J]. BMC Plant Biol, 2010, 10: 233.

[27] Dong CJ, Cao N, Zhang ZG, et al. Characterization of the fatty acid desaturase genes in cucumber: structure, phylogeny, and expression patterns [J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0149917.

[28] Horn PJ, Smith MD, Clark TR, et al. PEROXIREDOXIN Q stimulates the activity of the chloroplast 16: $1^{\Delta 3trans}$ FATTY ACID DESATURASE4 [J]. Plant J, 2020, 102(4): 718-729.

[29] Zhang QY, Yu R, Sun DY, et al. Comparative transcriptome analysis reveals an efficient mechanism of α-linolenic acid in tree peony seeds [J]. Int J Mol Sci, 2018, 20(1): 65.

[30] Yin DD, Xu WZ, Shu QY, et al. Fatty acid desaturase

3 (*PsFAD3*) from *Paeonia suffruticosa* reveals high α-linolenic acid accumulation [J]. Plant Sci, 2018, 274: 212-222.

[31] Puttick D, Dauk M, Lozinsky S, et al. Overexpression of a FAD3 desaturase increases synthesis of a polymethylene-interrupted dienoic fatty acid in seeds of *Arabidopsis thaliana* L [J]. Lipids, 2009, 44(8): 753-757.

[32] Domínguez T, HernÁndez ML, Pennycooke JC, et al. Increasing ω-3 desaturase expression in tomato results in altered aroma profile and enhanced resistance to cold stress [J]. Plant Physiol, 2010, 153(2): 655-665.

[33] Flores T, Karpova O, Su XJ, et al. Silencing of *GmFAD3* gene by siRNA leads to low alpha-linolenic acids (18: 3) of fad3-mutant phenotype in soybean [*Glycine max* (Merr.)] [J]. Transgenic Res, 2008, 17(5): 839-850.

[34] Yuan SW, Wu XL, Liu ZH, et al. Abiotic stresses and phytohormones regulate expression of *FAD2* gene in *Arabidopsis thaliana* [J]. J Integr Agric, 2012, 11(1): 62-72.

[35] Wang CT, Xu YN. The 5′ untranslated region of the FAD3 mRNA is required for its translational enhancement at low temperature in *Arabidopsis* roots [J]. Plant Sci, 2010, 179(3): 234-240.

（责任编辑　李楠）