

# 玉米愈伤组织形成的转录组分析

贾思年<sup>1,2</sup>, 魏倩涵<sup>2</sup>, 苗 蓉<sup>2</sup>, 彭云玲<sup>1</sup>, 刘允军<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>甘肃农业大学农学院 / 省部共建干旱生境作物学国家重点实验室 / 甘肃省作物遗传改良与种质创新重点实验室, 兰州 730070;

<sup>2</sup>中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

**摘要:** 玉米遗传转化受体主要是未成熟幼胚, 经过组织培养形成胚性愈伤组织, 进而分化成苗。目前, 对玉米胚性愈伤组织形成的分子机理的了解还不深入。为了挖掘调控玉米胚性愈伤组织形成的基因, 本研究选取玉米自交系 CAL28×郑 58 的 F<sub>3</sub> 群体中不同表型的愈伤组织进行 RNA-seq 分析。与愈伤发生差的 II 型愈伤相比, 愈伤发生好的 I 型愈伤中共检测到 4419 个差异表达基因, 其中 1571 个基因上调, 2848 个基因下调。GO 富集分析结果表明, 差异表达基因主要富集在细胞过程、催化活性、细胞组分等通路中。KEGG 富集分析表明, 差异表达基因主要富集在苯丙烷生物合成途径和植物激素信号转导途径。在生长素早期响应基因中, 8 个 AUX/IAA 家族基因, 如 *IAA23*、*IAA33*、*IAA41*, 和 4 个 GH3 家族基因在 I 型愈伤中上调表达。差异显著基因中共有隶属 56 个转录因子家族的 2968 个转录因子, 其中与愈伤形成相关的 AP2、WOX 和 LBD 转录因子家族基因中的 *ZmEREB53*、*ZmEREB206*、*ZmEREB184*、*ZmLBD10*、*ZmLBD24*、*ZmLBD31*、*ZmLBD32*、*ZmWOX5b*、*ZmWOX9b* 等在 I 型愈伤中的表达量显著上调, 对这些靶标基因进行遗传操作有可能促进玉米愈伤组织形成。本研究发现的靶标基因具有较大的应用潜力, 研究结果也为解析玉米愈伤组织形成的分子机理提供了理论参考。

**关键词:** 玉米; 愈伤形成; 转录组测序; 激素信号转导; 转录因子

## Transcriptome Analysis of Maize Embryonic Calli

JIA Si-nian<sup>1,2</sup>, WEI Qian-han<sup>2</sup>, MIAO Rong<sup>2</sup>, PENG Yun-ling<sup>1</sup>, LIU Yun-jun<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>College of Agronomy, Gansu Agricultural University/State Key Laboratory of Aridland Crop Science/Gansu Key

Laboratory of Crop Improvement and Germplasm Enhancement, Lanzhou 730070; <sup>2</sup>Institute of Crop Sciences,

Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

**Abstract:** The immature embryos of maize are able to form embryogenic calli through tissue culture, and are usually used as explants in genetic transformation. The molecular mechanism in the process of maize embryonic callus formation remains fully illustrated. To reveal the candidate genes that are involved in the callus formation of maize, two types of calli (type I, well growth; type II, poor growth) from F<sub>3</sub> embryos of maize inbred line CAL28 × Zheng58 were harvested for the RNA-seq analysis. 4419 differentially expressed genes (DEGs) were revealed between two types, including 1571 up regulated genes and 2848 down regulated genes. GO enrichment analysis showed that DEGs were mainly enriched in the pathways such as cellular process, catalytic activity, and cell component. KEGG enrichment analysis showed that the enrichment of DEGs were mainly involved in phenylpropanoid biosynthesis and the plant hormone signal transduction pathway. Among the early auxin responses genes, eight AUX/IAA genes including *IAA23*, *IAA33*, *IAA41*, and four GH3 genes were upregulated in type I callus. A total of 2968 transcription factors belonging to 56 transcription factor families in DEGs were significantly enriched. The expression levels of *ZmEREB53*, *ZmEREB206*, *ZmEREB184*, *ZmLBD10*,

收稿日期: 2022-12-17 修回日期: 2023-02-22 网络出版日期: 2023-03-20

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20221217002>

第一作者研究方向为作物遗传育种, E-mail: jiasinian1@163.com

通信作者: 刘允军, 研究方向为玉米基因工程, E-mail: liuyunjun@caas.cn

彭云玲, 研究方向为玉米抗逆生理及分子生物学研究, E-mail: pengyunlingpyl@163.com

基金项目: 中国农业科学院农业科技创新工程

Foundation project: The Agricultural Science and Technology Innovation Program of Chinese Academy of Agricultural Sciences

*ZmLBD24*, *ZmLBD31*, *ZmLBD32*, *ZmWOX5b* and *ZmWOX9b*, which are from AP2, WOX and LBD transcription factor families, were significantly up-regulated in type I callus. Genetic manipulation of these target genes may possibly promote the formation of maize callus. Collectively, this study identified candidate DEGs with great application potential, which provide theoretical reference for deciphering the molecular mechanism of maize callus formation.

**Key words:** maize; callus formation; RNA-Seq; hormone signal transduction; transcription factor

玉米是我国重要的粮食作物、工业原料和饲料作物,但随着我国畜牧业和玉米加工业的发展,常规玉米遗传育种已经不能满足我国社会 and 经济发展需求。转基因育种提供了一种新的解决方案,可以赋予玉米品种新的性状,促进玉米产业方式升级。高效遗传转化技术是转基因育种的前提,目前,农杆菌转化法和基因枪法是玉米遗传转化主要采用的技术,一般需要愈伤组织培养和植株再生过程。在玉米遗传转化过程中,基因型是限制愈伤形成的主要因素<sup>[1-3]</sup>。目前,转化受体主要是使用未成熟的胚<sup>[4-6]</sup>,但只有少数的玉米自交系具有高效诱导愈伤的能力<sup>[7-8]</sup>。解析玉米愈伤形成的分子机理,将为提升玉米遗传转化效率提供理论支撑。

在拟南芥等双子叶植物中的研究表明生长素和细胞分裂素在诱导愈伤形成过程中必不可少,生长素响应因子(ARF)下游的*LBD16*、*LBD17*、*LBD18*和*LBD29*在拟南芥愈伤组织形成中发挥着重要作用,4个*LBD*基因异位表达可以促进拟南芥愈伤发生<sup>[9-11]</sup>。组蛋白去甲基化酶JM30通过与ARF7和ARF19形成ARFs-JM30复合物,对*LBD16*和*LBD29*启动子区H3K9me3去甲基化,激活*LBD16*和*LBD29*的转录,促进愈伤组织形成<sup>[12]</sup>。体细胞胚胎发生由生长素诱导的*WUSCHEL*(*WUS*)基因所调控<sup>[13-15]</sup>,*WOX5*主要的表达部位是拟南芥根干细胞区域,也在愈伤发生和植株再生中发挥重要作用<sup>[16]</sup>。B类拟南芥反应调节因子*ARR1*(*Arabidopsis response regulators 1*)基因的表达与细胞分裂素水平相关,过表达*ARR1*可以促进愈伤组织的形成<sup>[17]</sup>。*miR160*通过切割靶标基因*ARF10*,激活细胞分裂素响应因子*ARR15*的表达,抑制愈伤组织的形成<sup>[18]</sup>。在不含外源细胞分裂素的培养基中,过表达磷酸化结构域缺失的*ARR1*或*ARR21*基因可以直接诱导拟南芥愈伤组织的形成<sup>[19]</sup>。

目前对于玉米愈伤组织形成机理的研究相对较少,需要深入解析玉米愈伤形成机制。Armstrong等<sup>[20]</sup>通过回交转育将自交系A188的染色体片段导入到自交系B73和Mo17中,提高了B73和Mo17胚

性愈伤组织的形成和植株再生能力。Krakowsky等<sup>[21]</sup>利用H99和Mo17杂交后的125个重组自交系作为群体,鉴定到胚性愈伤诱导率相关的8个主效QTL和3个上位性QTL。张红伟等<sup>[22]</sup>利用自交系黄早四和Mo17为亲本组配群体,构建101个SSR标记的玉米遗传连锁图谱,鉴定出8个与胚性愈伤组织诱导率和植株再生频率相关的QTL。Salvo等<sup>[23]</sup>将WCIC与B73回交,通过表型和分子标记选择,鉴定到1个位于玉米3号染色体上与胚胎发生相关的QTL,并选育出1个胚胎发生和再生能力比B73高50多倍的双单倍体材料WCIC2。玉米基因组中有91个*SAUR*(Small auxin-up regulated RNA)基因<sup>[24]</sup>,Wang等<sup>[25]</sup>发现*ZmSAUR15*启动子区变异造成不同玉米自交系胚性愈伤组织诱导率差异,*ZmSAUR15*通过调控内源生长素IAA的合成负向调控玉米胚性愈伤组织的形成。

为了解析玉米愈伤发生的分子机理,本研究利用RNA-seq技术,对两个愈伤诱导能力差异较大的自交系CAL28和郑58构建的分离群体F<sub>3</sub>诱导的I型(愈伤生长好)、II型(无愈伤生成)愈伤进行转录组测序分析,鉴定到一些重要差异表达基因,研究结果将对解析玉米愈伤形成的分子机理提供重要理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本研究利用愈伤诱导能力好的自交系CAL28和愈伤诱导能力差的自交系郑58杂交,F<sub>1</sub>植株于2020年冬种植于海南三亚,2021–2022年在北京种植F<sub>2</sub>植株,取自交授粉后的F<sub>3</sub>果穗剥取幼胚,在诱导胚性愈伤组织培养基上继代3~4次(生长4~6周)后,对玉米幼胚生长表型进行鉴定。

### 1.2 玉米愈伤组织的诱导

取授粉后时间10~12 d的玉米穗,使用75%的酒精灭菌处理,去除玉米穗两端发育有差异的部位,在穗中间均匀取胚,幼胚大小约为1.2~1.5 mm。放置在NB培养基(4.1 g/L NB培养基(Phytotech,货号N492),1 mL/L 1000×维生素,0.7 g/L脯氨酸,0.5 g/L

酪蛋白, 10 g/L 葡萄糖, 20 g/L 蔗糖, 2 mg/L 2, 4-D, 10 mg/L 硝酸银, 3 g/L 植物凝胶) 中, 28 °C 暗培养 1 周后, 及时切除幼芽。每两周继代一次, 继代 2 至 3 次。此时部分幼胚形成愈伤, 生长状况较好。将诱导的愈伤分为 3 种类型, I 型(愈伤生长良好)、II 型(无愈伤生成)、III 型(部分愈伤生成)。取 I 型、II 型愈伤进行后续试验。

### 1.3 总 RNA 提取

分别取 30 个 I 型和 II 型愈伤进行混池, 共 3 个生物学重复, 使用天根生化科技有限公司的植物总 RNA 提取试剂盒(DP452)提取愈伤组织总 RNA。利用 1% 琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 2000c 型分光光度计检测 RNA 的质量及浓度。RNA 高通量测序由安诺优达基因科技(北京)有限公司建库及测序。测序平台为 Illumina NovaSeq 6000, 测序数据量为 6 G。

### 1.4 转录组数据分析

对原始数据进行处理, 过滤低质量 Reads, 去除接头污染的 Reads 以及含 N(高未知碱基)比例大于 5% 的 Reads。使用 HISAT2(转录本拼接比对的分层索引)将 Clean reads 比对到参考基因组 B73 RefGen\_v4(B73 RefGen\_v4-Genome-Assembly-NCBI)。利用 DESeq2 进行基因差异表达分析, 通过 FPKM (Fragments per kilobase per million mapped fragments) 值<sup>[26]</sup>计算基因的表达量, 同时将基因表达量小于 0.01 的视为不表达。差异基因筛选主要参考差异倍

数(Fold change 值)以及 q 值(矫正之后的 *p*-value 值)作为相关指标, 去除 I 型和 II 型两组中 FPKM < 2 的转录本, 使用 VENNY2.1.0(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)在线软件对 I 型和 II 型愈伤组织中特异表达的转录本进行分析, 同时选取  $|\log_2 \text{Fold change}| \geq 1$  和  $q < 0.05$  的差异基因作为显著差异基因。

### 1.5 GO 和 KEGG 富集分析

为了了解差异表达基因(DEGs, differentially expressed genes)的生物学功能, 本研究对差异显著基因进行了 Gene Ontology(GO)富集分析和 KEGG 分析, 应用超几何检验进行富集分析, 通过计算得到 *p*-value 值, 通过校正之后, 以 FDR < 0.05 为阈值, 找出差异表达基因中显著性富集的 GO 条目和代谢通路, 从而确定差异表达基因的生物学功能。

### 1.6 qRT-PCR 验证

为验证转录组测序的可信性, 随机选取 10 个差异显著基因进行验证, *GADPH*(Zm00001d049641)作为内源基因对照。使用 Primer 3.0 设计引物, 引物列表见表 1。将 1.0  $\mu\text{L}$  cDNA、10.0  $\mu\text{L}$  2 $\times$  SYBR qPCR Master Mix、0.4  $\mu\text{L}$  0.4  $\mu\text{mol/L}$  的正、反向引物、ddH<sub>2</sub>O 预混合至 20.0  $\mu\text{L}$  的反应体系中, 各设 3 个生物学重复, 3 个技术重复。使用荧光定量 7500PCR 系统进行实时荧光 PCR 分析, 以 2<sup>- $\Delta\Delta\text{Ct}$</sup>  方法计算基因的表达量。使用 EXCEL 对转录组测序数据及 qRT-PCR 进行相关性分析。

表 1 用于 qRT-PCR 分析的 10 个差异表达基因及其引物

Table 1 Primers used for qRT-PCR analysis of ten maize DEGs

引物名称 Primer name	正向引物(5'-3') Forward primer (5'-3')	反向引物(5'-3') Reverse primer (5'-3')
Zm00001d028195	GACTACCGATGAACCCGAGT	TTCCTGTTGCCTCTCCCAT
Zm00001d020627	GACCTCAACTACCCGTCCTT	CTTGCCGGCTTGACTCTAAC
Zm00001d035323	CCAATTGCCCCGCTCAAGAAA	CCTGATCTCTCTTGGCAGCT
Zm00001d020623	GCCGCTTTCTACAGTACCT	GCGGGATGATGGAGGAGG
Zm00001d020622	CTGGGTTGGTTTGTGGACTG	CATCATGACCACCACCGTTC
Zm00001d020620	GCAGGGAAGAAAAGGAGCAC	AGGCACTCGTCGATCTCTTT
Zm00001d020618	GTCATCTATCGCCCATCCCA	GCGTTGCGATCAGATCACTT
Zm00001d020617	CTCTCCGATATGCTGCCTGA	CACTGGAGTCTTGGATGGGT
Zm00001d020615	ATACACGGCCAAGACCTGAA	GCAGTCGTACGTGTGAAGAG
Zm00001d020614	AGCTGACCATCTTCTACGGC	ACTGTCGTGTGAAGGCCTAG
<i>GAPDH</i>	CCCTTCATCACCACGGACTAC	AACCTTCTTGGCACCACCT

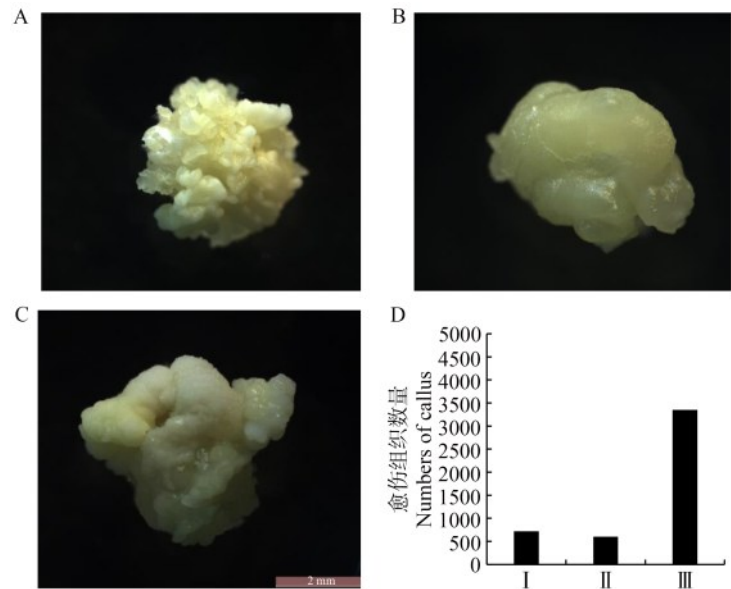
## 2 结果与分析

### 2.1 表型鉴定

自交系 CAL28 与郑 58 的幼胚愈伤发生能力具有明显差异, CAL28 $\times$ 郑 58 的 F<sub>3</sub> 幼胚诱导愈伤生成 3 种

不同的表型, I 型(愈伤生长良好)、II 型(无愈伤生成)、III 型(部分愈伤生成)。本研究共取 5000 个玉米幼胚, 在 NB 培养基上诱导愈伤组织形成。在诱导过程中, 249 个胚发生污染, 形成的 I 型、II 型愈伤数量分别为 720 和 600 个, III 型愈伤数量为 3351 个(图 1)。





玉米幼胚在NB培养基中诱导愈伤生成;A:I型愈伤;B:II型愈伤;C:III型愈伤;D:不同类型愈伤组织数量  
Callus was induced from maize embryos cultured on NB medium; A: Type I callus; B: Type II callus; C: Type III callus;  
D: Numbers of different types of callus

图1 CAL28×郑58 F<sub>3</sub>幼胚愈伤发生类型  
Fig.1 Callus formation of CAL28×Zheng58 F<sub>3</sub> embryos

2.2 转录组测序(RNA-seq)及分析

选取I型和II型愈伤,利用Illumina NovaSeq 6000进行转录组测序。测序共获得52.0 G数据量,Clean reads数量在41,308,494~80,526,076之间。Q30反应测序的碱基质量水平,6个样品的Q30平均为95.09%,表明测序质量良好。HISAT2将Clean

reads 比对到参考基因组B73 RefGen\_v4,其比对率均大于80%以上(表2)。利用FPKM计算差异显著基因的表达水平,利用spearman相关系数评估样本各个重复之间的相关性系数均高于0.9,表明测序数据的可重复性良好。

表2 转录组数据统计表

Table 2 Statistics of all the samples of sequencing data

样品 Sample	原始序列数 Raw reads	过滤后序列数 Clean reads	比对序列数 Mapped reads	未比对序列数 Unmapped reads	过滤Q30百分比(%) Clean Q30 bases rate	基因总数 Total gene number
I-1	43,892,928	41,308,494	37,512,326	3,796,168	95.10	29,467
I-2	51,276,054	47,596,956	40,316,465	7,280,491	94.87	29,091
I-3	48,142,508	45,440,942	41,309,275	4,131,667	94.45	29,232
II-1	47,081,186	44,782,888	39,157,345	5,625,543	94.92	29,391
II-2	86,039,832	80,526,076	72,712,609	7,813,467	95.37	30,231
II-3	70,264,984	64,305,656	57,970,103	6,335,553	95.09	30,012

I-1、I-2、I-3 代表I型愈伤的3个生物学重复;II-1、II-2、II-3 代表II型愈伤的3个生物学重复  
I-1, I-2, I-3 indicate the three biological repeats of type I calli; II-1, II-2, II-3 indicate the three biological repeats of type II calli

2.3 玉米愈伤形成相关差异显著基因分析

为了研究影响玉米愈伤形成基因的表达情况,利用FPKM计算基因的表达量,对I型、II型愈伤中转录本表达进行分析,转录本表达量小于0.01视为不表达。共有28,661个转录本表达,其中在I型愈伤中有912个基因特异性表达,II型愈伤中共有1600个基因特异性表达(图2A)。同时去除I型和II型两组中FPKM<2的转录本,设定筛选标准为

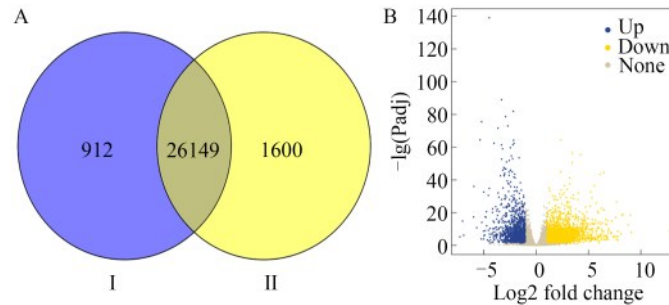
|log<sub>2</sub> Fold change|≥1 和 q<0.05 为差异显著基因的阈值。与II型愈伤相比,I型愈伤共有4419个差异表达基因,其中1571个基因上调,2848个基因下调,下调的基因数量大于上调基因的数量(图2B)。

2.4 qRT-PCR验证差异显著基因的可靠性

为了验证转录组测序的可靠性,随机选取10个参与不同生物学过程的差异显著基因进行qRT-PCR。检测在不同愈伤组织中基因的表达量,以I型

中基因的表达量为1,统计II型愈伤中各基因的相对表达,使用EXCEL软件分析RNA-seq的结果与qRT-PCR结果,结果表明 $R^2$ 大于0.9,RNA-seq的结

果与qRT-PCR结果一致,RNA-seq的结果可用于后续分析(图3)。

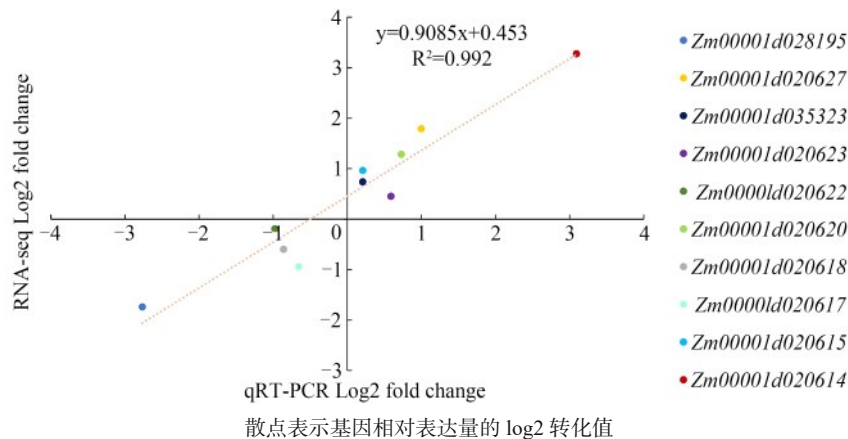


A: 转录本数目韦恩图; 数字表示I型和II型愈伤中特异转录本数量; B: 差异表达基因火山图

A: Venn diagram of unigene numbers; Numbers indicate the specific transcript numbers in type I and II callus tissue; B: Volcano map of DEGs

图2 愈伤中的转录本分析

Fig.2 Analysis of the transcripts in the calli



散点表示基因相对表达量的 log2 转化值

Scatter plots indicate the log2 transformed gene expression values

图3 差异显著基因的RNA-seq和qRT-PCR结果相关性分析

Fig.3 Correlation analysis of the expression changes of ten DEGs as revealed by RNA-seq and qRT-PCR

## 2.5 玉米愈伤形成相关差异显著基因的GO富集分析

基于注释基因库,将鉴定到的差异显著基因进行GO富集分析,发现生物过程中GO富集到的差异显著基因主要参与细胞过程(Cellular process)和代谢过程(Metabolic process)等。分子功能中GO富集到的差异显著基因主要参与催化活性(Catalytic activity),结合(Binding)等。在细胞组分中GO富集到的差异显著基因主要参与细胞组分(Cell part),细胞器合成(Organelle)等途径(图4)。这些显著富集GO条目,对玉米愈伤组织的形成机制有着重要的意义。

## 2.6 影响玉米愈伤形成差异显著基因的KEGG富集分析

为了挖掘影响玉米愈伤发生的候选基因,通过KEGG方法分析差异表达基因参与的生化代谢途

径,以明确差异显著基因在愈伤形成过程中的功能。差异显著基因主要富集在植物激素信号转导(Plant hormone signal transduction)、苯丙烷类生物合成(Phenylpropanoid biosynthesis)、异黄酮生物合成(Isoflavonoid biosynthesis)、牛磺酸和次牛磺酸代谢(Taurine and hypotaurine metabolism)及类胡萝卜素生物合成(Carotenoid biosynthesis)等5个代谢通路中,表明这些代谢通路可能是调控玉米愈伤形成的重要代谢途径(图5)。

**2.6.1 植物激素信号转导相关差异表达基因** 植物激素信号转导途径是差异显著基因富集数最多的途径,植物激素在植物体细胞胚诱导中发挥重要作用。在本研究中,共有87个差异显著基因参与植物激素信号转导途径,其中27个基因发生上调,60个基因发生下调,表明玉米愈伤发生与植物激素信号转导的关系密不可分。15个基因被注释为茉莉酸

ZIM 结构域蛋白(JAZ), 1 个呈上调表达, 14 个呈下调表达, 其中 *ZIM29*(Zm00001d014249) 表达量上调 4.50 倍。11 个基因注释为生长素响应蛋白(Aux/IAA), 8 个上调表达, 3 个呈下调表达, 其中 *IAA23*(Zm00001d016277)、*IAA33*(Zm00001d021279) 和 *IAA41*(Zm00001d

045203) 表达量分别上调 7.53、23.75 和 7.73 倍。9 个基因被注释为 SAUR 生长素响应家族, 均下调表达。4 个基因为生长素响应基因 GH3 家族, 均上调表达, 其中 *Zm00001d010697* 表达量上调 25.66 倍。

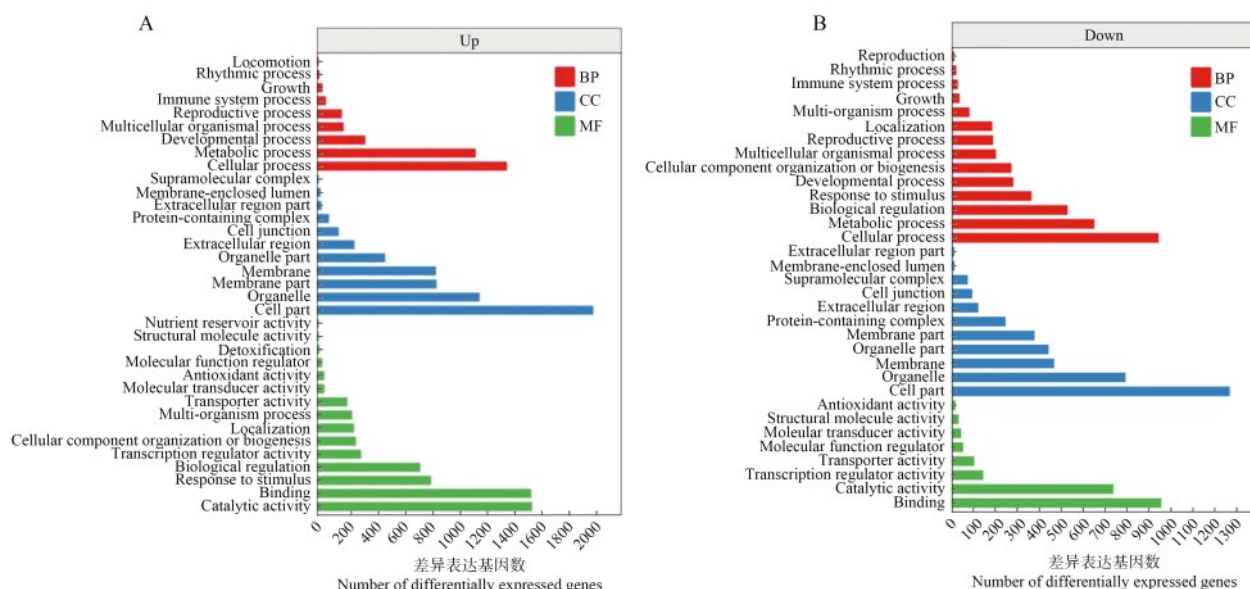
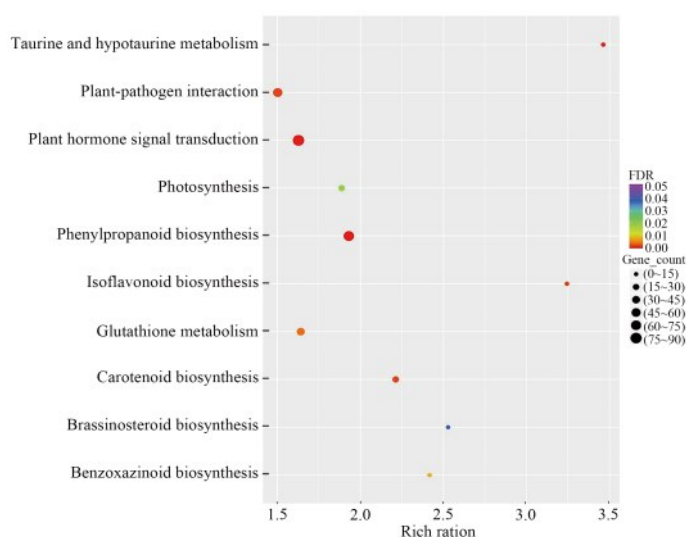


图4 差异显著基因的GO富集分析

Fig.4 Gene Ontology enrichment analysis of DEGs



仅列出前10个显著富集的KEGG pathway

Only top ten most enriched KEGG pathways are listed

图5 差异显著基因的KEGG富集分析

Fig.5 Enriched KEGG pathways of DEGs

**2.6.2 苯丙烷类生物合成途径相关差异表达基因**  
苯丙烷类生物合成途径是差异显著基因富集程度最高的代谢通路, 表明该调控途径对玉米胚性愈伤组织形成具有重要作用。有研究表明, 苯丙类的生物合成会加速愈伤褐化, 对愈伤生长和再次分化具

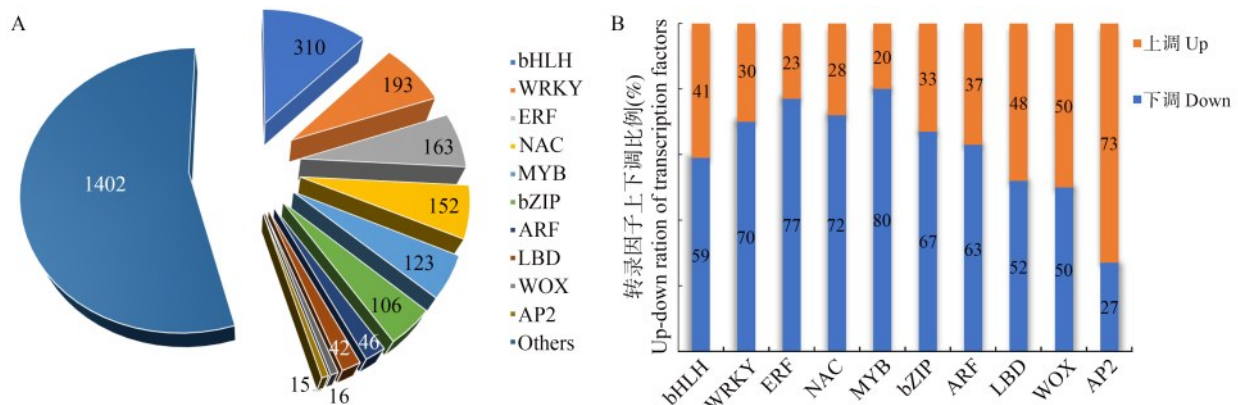
有负向调节作用<sup>[27]</sup>。本研究中有 69 个基因参与到苯丙烷的生物合成途径, 其中有 15 个基因发生上调、54 个基因发生下调。过氧化物酶(POD, peroxidase)中, 12 个上调表达, 30 个下调表达, 过氧化物酶 *PRX12* (Zm00001d002898) 和 *PX18* (Zm00001d002899) 表

达量上调均大于6.0倍;4-香豆酸辅酶A连接酶(4CL, 4-coumarate:coenzyme A ligase)中,1个上调表达,4个下调表达;肉桂酰辅酶A还原酶(CCR, cinnamoyl CoA reductase)中4个差异表达基因均呈下调表达;3个咖啡酰莽草酸酯酶(CSE, caffeoylshikimate esterase), 1个上调表达,2个下调表达;8个 $\beta$ -葡萄糖苷酶( $\beta$ -D-Glucosidase)、2个莽草酸羟基肉桂酰基转移酶(HCT, shikimate O-hydroxycinnamoyltransferase)、2个阿魏酸-5-羟化酶(F5H, ferulate 5-hydroxylase)、1个香豆酸-3-羟化酶(C3H, coumarin-3-hydroxylase)、1个肉桂醇脱氢酶(CAD, cinnamoyl alcohol dehydrogenase)均下调表达;松柏醛脱氢酶(coniferyl-aldehyde dehydrogenase)只有1个,呈上调表达。

## 2.7 愈伤形成相关转录因子的鉴定

差异显著基因中共有2968个转录因子,隶属56个转录因子家族,其中1093个上调,1875个下调。包括

310个bHLH(Basic helix-loop-helix)转录因子、193个WRKY转录因子、163个ERF(Ethylene responsive factor)、152个NAC(NAM, ATAF1/2, CUC1/2 NAC)、123个MYB(v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog)和46个ARF转录因子等(图6A)。进一步对差异表达转录因子上下调基因数目进行分析,发现73%AP2家族转录因子上调表达,27%下调表达,WOX转录因子家族差异表达基因上下调比例相同,其余下调差异表达基因均大于上调(图6B)。与愈伤形成相关的AP2、WOX和LBD等转录因子家族基因显著富集,其中*ZmLBD10*、*ZmLBD24*、*ZmLBD31*、*ZmLBD32*表达量均显著上调6.0倍以上;*ZmEREB53*(*ZmBBM2*)、*ZmEREB206*(*ZmBBM*)和*ZmEREB184*表达量分别上调8.18、9.04和9.76倍,*ZmEREB172*在II型愈伤中特异表达且表达量较高;*ZmWOX5b*、*ZmWOX9b*表达量上调均大于5.0倍(表3)。



A: 转录因子家族种类和数量; B: 转录因子上下调表达的比例

A: Pie chart showing the type and number of transcription factors; B: Up-down ratio of transcription factors

图6 差异表达转录因子分析

Fig.6 Analysis of the differentially expressed transcription factors

表3 AP2、LBD和WOX转录因子家族中重要基因的表达量变化

Table 3 Expression change of some genes belonging to AP2、LBD and WOX transcription factors

基因编号 Gene ID	基因注释 Gene annotation	基因表达量(平均) Gene expression (average)		上调/下调 Up/Down
		I	II	
<i>Zm00001d031796</i>	<i>ZmEREB172</i>	0	82.00	下调
<i>Zm00001d002025</i>	<i>ZmEREB24</i>	149.47	65.05	上调
<i>Zm00001d042492</i>	<i>ZmEREB53</i> ( <i>ZmBBM2</i> )	12.02	1.33	上调
<i>Zm00001d034204</i>	<i>ZmEREB184</i>	4.00	0.41	上调
<i>Zm00001d017207</i>	<i>ZmEREB206</i> ( <i>ZmBBM</i> )	54.30	6.64	上调
<i>Zm00001d027678</i>	<i>ZmLBD1</i>	6.89	2.87	上调
<i>Zm00001d028721</i>	<i>ZmLBD4</i>	7.76	2.37	上调
<i>Zm00001d033335</i>	<i>ZmLBD10</i>	3.46	0.54	上调
<i>Zm00001d043036</i>	<i>ZmLBD20</i>	6.82	1.82	上调
<i>Zm00001d051891</i>	<i>ZmLBD24</i>	11.16	1.81	上调
<i>Zm00001d038013</i>	<i>ZmLBD31</i>	8.58	0.77	上调
<i>Zm00001d038197</i>	<i>ZmLBD32</i>	2.95	0.49	上调



表3 (续)

基因编号 Gene ID	基因注释 Gene annotation	基因表达量(平均) Gene expression (average)		上调/下调 Up/Down
		I	II	
<i>Zm00001d047921</i>	<i>ZmLBD42</i>	7.76	2.37	上调
<i>Zm00001d029506</i>	<i>ZmLBD5</i>	22.44	153.82	下调
<i>Zm00001d038717</i>	<i>ZmLBD33</i>	10.34	251.78	下调
<i>Zm00001d010751</i>	<i>ZmLBD38</i>	4.64	129.69	下调
<i>Zm00001d047752</i>	<i>ZmLBD41</i>	1.78	3.37	下调
<i>Zm00001d047559</i>	<i>ZmWOX11</i>	1.80	4.03	下调
<i>Zm00001d042821</i>	<i>ZmWOX5b</i>	7.86	1.43	上调
<i>Zm00001d043937</i>	<i>ZmWOX9b</i>	2.67	0.53	上调

### 3 讨论

玉米转基因育种的困难之一是受体材料形成愈伤的能力<sup>[28]</sup>,目前只有少数玉米自交系可以高效诱导胚性愈伤组织的形成。本研究利用高通量RNA-seq技术对玉米自交系CAL28×郑58的F<sub>3</sub>幼胚诱导的I型、II型愈伤进行转录组测序。通过转录组分析玉米愈伤组织形成相关基因表达及基因调控路径和网络,以挖掘控制玉米愈伤组织形成的候选基因,有助于解析玉米愈伤组织形成的分子机理。

植物激素信号转导途径在愈伤组织形成中起着重要的调控作用,研究表明植物胚性细胞的发生受植物生长素、细胞分裂素、茉莉酸等激素信号共同调节<sup>[29-30]</sup>。通过调控内源生长素IAA的合成,可以影响生长素信号转导,从而调节玉米愈伤组织中胚性细胞的诱导<sup>[25]</sup>。拟南芥中细胞分裂素主要通过B型ARR转录因子的调控影响愈伤生成,过表达*ARR1*可以增强拟南芥愈伤组织的形成<sup>[17,31]</sup>。茉莉酸(JA)在伤口诱导植株再生中也发挥着重要的作用,JA可以激活*ERF109*和下游基因*CYCD6;1*,从而促进植株再生<sup>[32]</sup>。在本研究中,共有15个茉莉酸ZIM结构域蛋白基因差异性表达,*ZIM29*在I型愈伤中表达量上调4.50倍。植物信号转导途径在KEGG通路中显著富集,主要涉及参与生长素、细胞分裂素、茉莉酸等相关基因,表明激素信号的转导在玉米愈伤组织形成中发挥重要作用。

愈伤组织的褐化是组织培养体系中最大的阻碍,可能与POP(脯氨酰寡肽酶)和POD(过氧化物酶)酶活性相关<sup>[33-35]</sup>。在樟子松枝尖组织培养中发现POD的活性在培养期间开始增加,导致细胞膜的降解和叶绿素的减少,最终致使愈伤组织褐化后死亡<sup>[36]</sup>。胁迫诱导苯丙烷的生物合成<sup>[27,37]</sup>,愈伤中苯丙烷的生物合成基因显著富集是因为愈伤组织对胁迫的应激反应,阻碍愈伤组织的再生。本研

究中,苯丙烷类生物合成途径是KEGG富集数目最显著的途径,共有69个基因被注释。共有42个POD基因差异表达,12个上调表达,30个下调表达。过氧化物酶*PRX12*(*Zm00001d002898*)和*PX18*(*Zm00001d002899*)在I型愈伤表达量上调均大于6.0倍。本研究中,II型愈伤在后期继代中活性下降、易褐化且无新生组织生成,这可能与苯丙烷生物合成途径相关基因的表达水平相关。通过在培养基中添加相关诱导剂来调控相关基因的表达,有可能促进玉米愈伤的生长。

AP2、WOX、LBD等转录因子家族与愈伤的发生相关,在不添加外源激素的条件下,过表达AP2转录因子家族基因*ESR1*(Enhanced shoot regeneration 1)或*ESR2*,能够提高其对细胞分裂素的响应能力,从而诱导愈伤组织的形成<sup>[38]</sup>。在玉米中,AP2家族的转录因子*BBM*(Baby boom)或包含homeodomain结构域的转录因子*WUS*均能促进胚性愈伤组织的形成<sup>[29]</sup>。生长素IAA可以显著快速地诱导AP2转录因子*ZmBBM2*,过表达*ZmBBM2*可以促进玉米自交系愈伤组织的诱导和增殖<sup>[39]</sup>。本研究中,*ZmEREB53*(*ZmBBM2*)和*ZmEREB206*(*ZmBBM*)在I型愈伤中表达量显著升高,再次验证BBM转录因子在玉米愈伤发生中发挥重要作用。*WOX5*和*WOX11*(根尖分生组织调节基因)已经被证明在拟南芥和水稻愈伤组织发生中起重要的作用<sup>[31,40-41]</sup>。在本研究中,*ZmWOX5b*和*ZmWOX9b*表达量在I型愈伤中上调5.50和5.03倍,表明这2个WOX转录因子在玉米愈伤发生过程中发挥重要作用。LBD转录因子家族是触发生长素诱导愈伤组织形成的主要调节因子,*LBD29*也参与愈伤组织形成过程中细胞重编程的调节<sup>[42]</sup>。在本研究中,*ZmLBD10*、*ZmLBD24*、*ZmLBD31*和*ZmLBD32*在I型愈伤中表达量显著上调。上述结果表明,转录因子是植物生长发育重要的网络调控开关,在调控玉米愈伤发生中也发挥至关重要的



作用。

## 4 结论

本研究对I型(愈伤生长良好)和II型(无愈伤生成)愈伤组织进行RNA-Seq分析,筛选出差异表达基因4419个,其中上调表达基因1571个,下调表达基因2848个。通过功能注释和富集分析发现,差异基因主要参与植物激素信号转导、苯丙烷的生物合成等代谢通路。发现转录因子在愈伤诱导的过程中起着重要的调控作用,共有2968个转录因子参与愈伤组织发生的调控过程,其中AP2、WOX和LBD转录因子家族显著富集,可能在玉米愈伤发生中发挥关键作用。

## 参考文献

- [1] Tomes D T, Smith O S. The effect of parental genotype on initiation of embryogenic callus from elite maize (*Zea mays* L.) germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, 1985, 70(5): 505-509
- [2] Iwase A, Mita K, Nonaka S, Ikeuchi M, Koizuka C, Ohnuma M, Ezura H, Imamura J, Sugimoto K. WIND1-based acquisition of regeneration competency in *Arabidopsis* and rapeseed. *Journal of Plant Research*, 2015, 128(3): 389-397
- [3] Ishida Y, Hiei Y, Komari T. *Agrobacterium*-mediated transformation of maize. *Nature Protocols*, 2007, 2(7): 1614-1621
- [4] 朱晋云,许玉娟,杨丽萍,亢秀丽,孙毅,杜建忠.小麦组织培养再生系统及农杆菌介导的转基因技术研究. *植物遗传资源学报*, 2008(1): 84-89  
Zhu J Y, Xu Y J, Yang L P, Kang X L, Sun Y, Du J Z. Research on wheat tissue culture regeneration system and *agrobacterium*-mediated transgenic technology. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2008, 9(1): 84-89
- [5] 张红伟,张红梅,郑祖平,刘汉梅,刘亚娟,谭振波,陈刚.不同杂种优势类群玉米幼胚愈伤组织的诱导及植株再生特性的评价. *植物遗传资源学报*, 2004, 5(2): 117-122  
Zhang H W, Zhang H M, Zheng Z P, Liu H M, Liu Y J, Tan Z B, Chen G. Induction of callus and evaluation of plant regeneration characteristics of maize young embryo in different heterogeneous dominant taxa. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2004, 5(2): 117-122
- [6] 贾华岚,杜丽璞,胡琳.河南省新育成8个小麦品种(系)幼胚培养再生性能评价. *植物遗传资源学报*, 2017, 18(4): 728-733  
Jia H L, Du L P, Hu L. Evaluation of regenerative performance of young embryo culture of 8 newly bred wheat varieties (lines) in Henan province. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2017, 18(4): 728-733
- [7] Lowe K, La Rota M, Hoerster G, Hastings C, Wang N, Chamberlin M, Wu E, Jones T, Gordon-Kamm W. Rapid genotype "independent" *Zea mays* L. (maize) transformation via direct somatic embryogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2018, 54(3): 240-252
- [8] Ma L, Liu M, Yan Y, Qing C, Zhang X, Zhang Y, Long Y, Wang L, Pan L, Zou C, Li Z, Wang Y, Peng H, Pan G, Jiang Z, Shen Y. Genetic dissection of maize embryonic callus regenerative capacity using multi-locus genome-wide association studies. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 561
- [9] Fan M, Xu C, Xu K, Hu Y. LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN transcription factors direct callus formation in *Arabidopsis* regeneration. *Cell Research*, 2012, 22(7): 1169-1180
- [10] 刘同金,张晓雪,张晓辉,王海平,邱杨,宋江萍,李锡香.萝卜全基因组中LBD基因家族成员的鉴定与分析. *植物遗传资源学报*, 2019, 20(1): 168-178  
Liu T J, Zhang X X, Zhang X H, Wang H P, Qiu Y, Song J P, Li X X. Identification and analysis of LBD gene family members in radish whole genome. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2019, 20(1): 168-178
- [11] 孙亭亭,龚达平,张磊,陈雅琼,赵维,向小华,孙玉合.普通烟草LBD基因家族的全基因组序列鉴定与表达分析. *植物遗传资源学报*, 2016, 17(2): 316-325  
Sun T T, Gong D P, Zhang L, Chen Y Q, Zhao W, Xiang X H, Sun Y H. Genome-wide sequence identification and expression analysis of LBD gene family of common tobacco. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2016, 17(2): 316-325
- [12] Lee K, Park O S, Seo P J. JM30-mediated demethylation of H3K9me3 drives tissue identity changes to promote callus formation in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 2018, 95(6): 961-975
- [13] Schoof H, Lenhard M, Haecker A, Mayer K F, Jürgens G, Laux T. The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. *Cell*, 2000, 100(6): 635-644
- [14] Chatfield S P, Capron R, Severino A, Penttilä P A, Alfred S, Nahal H, Provart N J. Incipient stem cell niche conversion in tissue culture: Using a systems approach to probe early events in WUSCHEL-dependent conversion of lateral root primordia into shoot meristems. *Plant Journal*, 2013, 73(5): 798-813
- [15] Hecht V, Vielle-Calzada J P, Hartog M V, Schmidt E D, Boutilier K, Grossniklaus U, de Vries S C. The *Arabidopsis* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiology*, 2001, 127(3): 803-816
- [16] Sarkar A K, Luijten M, Miyashima S, Lenhard M, Hashimoto T, Nakajima K, Scheres B, Heidstra R, Laux T. Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature*, 2007, 446(7137): 811-814
- [17] Sakai H, Honma T, Aoyama T, Sato S, Kato T, Tabata S, Oka A. ARR1, a transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins. *Science*, 2001, 294(5546): 1519-1521
- [18] Liu Z, Li J, Wang L, Li Q, Lu Q, Yu Y, Li S, Bai M Y, Hu Y, Xiang F. Repression of callus initiation by the miRNA-directed interaction of auxin-cytokinin in *Arabidopsis thaliana*.

- Plant Journal, 2016, 87(4): 391-402
- [19] Tajima Y, Imamura A, Kiba T, Amano Y, Yamashino T, Mizuno T. Comparative studies on the type-B response regulators revealing their distinctive properties in the His-to-Asp phosphorelay signal transduction of *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiology, 2004, 45(1): 28-39
- [20] Armstrong C L, Romero-Severson J, Hodges T K. Improved tissue culture response of an elite maize inbred through backcross breeding, and identification of chromosomal regions important for regeneration by RFLP analysis. Theoretical Applied Genetics, 1992, 84(5-6): 755-762
- [21] Krakowsky M D, Lee M, Garay L, Woodman-Clíkeman W, Long M J, Sharopova N, Frame B, Wang K. Quantitative trait loci for callus initiation and totipotency in maize (*Zea mays* L.). Theoretical Applied Genetics, 2006, 113(5): 821-830
- [22] 张红伟, 刘亚娟, 郭晓琳, 张峰, 李建生, 谭振波, 陈刚. 玉米幼胚愈伤组织的诱导和植株再生的 QTL 分析. 作物学报, 2006, 32: 385-389
- Zhang H W, Liu Y J, Guo X L, Zhang F, Li J S, Tan Z B, Chen G. QTL Mapping for callus induction and plant regeneration in maize immature embryos. Acta Agronomica Sinica, 2006, 32: 385-389
- [23] Salvo S, Cook J, Carlson A R, Hirsch C N, Kaeppler M, Kaeppler H F. Genetic fine-mapping of a Quantitative Trait Locus (QTL) associated with embryogenic tissue culture response and plant regeneration ability in maize (*Zea mays* L.). Plant Genome, 2018, 11(2): 170111
- [24] 郭栋, 杜媚, 周宝元, 刘颖慧, 赵明. 玉米 SAUR 基因家族的鉴定与生物信息学分析. 植物遗传资源学报, 2019, 20(1): 90-99
- Guo D, Du M, Zhou B Y, Liu Y H, Zhao M. Identification and bioinformatics analysis of maize saur gene family. Journal of Plant Genetic Resources, 2019, 20(1): 90-99
- [25] Wang Y, He S, Long Y, Zhang X, Zhang X, Hu H, Li Z, Hou F, Ge F, Gao S, Pan G, Ma L, Shen Y. Genetic variations in ZmSAUR15 contribute to the formation of immature embryo-derived embryonic calluses in maize. Plant Journal, 2022, 109(4): 980-991
- [26] Guttman M, Garber M, Levin J Z, Donaghey J, Robinson J, Adiconis X, Fan L, Koziol M J, Gnirke A, Nusbaum C. Ab initio reconstruction of cell type-specific transcriptomes in mouse reveals the conserved multi-exonic structure of lincRNAs. Nature Biotechnology, 2010, 28(5): 503-510
- [27] Dixon R A, Paiva N L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. Plant Cell, 1995, 7(7): 1085-1097
- [28] Yadava P, Abhishek A, Singh R, Singh I, Kaul T, Pattanayak A, Agrawal P K. Advances in maize transformation technologies and development of transgenic maize. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 1949
- [29] Ikeuchi M, Sugimoto K, Iwase A. Plant callus: Mechanisms of induction and repression. Plant Cell, 2013, 25(9): 3159-3173
- [30] Lee B H, Johnston R, Yang Y, Gallavotti A, Kojima M, Travençolo B A, Costa Lda F, Sakakibara H, Jackson D. Studies of aberrant phyllotaxy mutants of maize indicate complex interactions between auxin and cytokinin signaling in the shoot apical meristem. Plant Physiology, 2009, 150(1): 205-216
- [31] Sang Y L, Cheng Z J, Zhang X S. Plant stem cells and *de novo* organogenesis. New Phytologist, 2018, 218(4): 1334-1339
- [32] Zhang G, Zhao F, Chen L, Pan Y, Sun L, Bao N, Zhang T, Cui C X, Qiu Z, Zhang Y, Yang L, Xu L. Jasmonate-mediated wound signalling promotes plant regeneration. Nature Plants, 2019, 5(5): 491-497
- [33] Haddon L, Northcote D H. Correlation of the induction of various enzymes concerned with phenylpropanoid and lignin synthesis during differentiation of bean callus (*Phaseolus vulgaris* L.). Planta, 1976, 128(3): 255-262
- [34] Yari Khosroushahi A, Naderi-Manesh H, Toft Simonsen H. Effect of antioxidants and carbohydrates in callus cultures of *taxus brevifolia*: Evaluation of browning, callus growth, total phenolics and paclitaxel production. Bioimpacts, 2011, 1(1): 37-45
- [35] He Y, Guo X, Lu R, Niu B, Pasapula V, Hou P, Cai F, Xu Y, Chen F. Changes in morphology and biochemical indices in browning callus derived from *Jatropha curcas* hypocotyls. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2009, 98(1): 11-17
- [36] Laukkanen H, Rautiainen L, Taulavuori E, Hohtola A. Changes in cellular structures and enzymatic activities during browning of Scots pine callus derived from mature buds. Tree Physiology, 2000, 20(7): 467-475
- [37] Wang X, Yang Z, Wang M, Meng L, Jiang Y, Han Y. The BRANCHING ENZYME1 gene, encoding a glycoside hydrolase family 13 protein, is required for *in vitro* plant regeneration in *Arabidopsis*. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2014, 117(2): 279-291
- [38] Banno H, Ikeda Y, Niu Q W, Chua N H. Overexpression of *Arabidopsis* ESR1 induces initiation of shoot regeneration. Plant Cell, 2001, 13(12): 2609-2618
- [39] Du X, Fang T, Liu Y, Huang L, Zang M, Wang G, Liu Y, Fu J. Transcriptome profiling predicts new genes to promote maize callus formation and transformation. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 1633
- [40] Sugimoto K, Temman H, Kadokura S, Matsunaga S. To regenerate or not to regenerate: Factors that drive plant regeneration. Current Opinion in Plant Biology, 2019, 47: 138-150
- [41] Hu B, Zhang G, Liu W, Shi J, Wang H, Qi M, Li J, Qin P, Ruan Y, Huang H, Zhang Y, Xu L. Divergent regeneration-competent cells adopt a common mechanism for callus initiation in angiosperms. Regeneration (Oxf), 2017, 4(3): 132-139
- [42] Xu C, Cao H, Xu E, Zhang S, Hu Y. Genome-Wide identification of *Arabidopsis* LBD29 target genes reveals the molecular events behind Auxin-induced cell reprogramming during callus formation. Plant Cell Physiology, 2018, 59(4): 744-755