



植物遗传资源学报

Journal of Plant Genetic Resources

ISSN 1672-1810, CN 11-4996/S

《植物遗传资源学报》网络首发论文

题目：全基因组鉴定普通菜豆 WOX 基因及出愈率相关分析
作者：叶宗茂，谢迅，侯思宇，武晶
DOI：10.13430/j.cnki.jpgr.20241104001
收稿日期：2024-11-04
网络首发日期：2025-01-10
引用格式：叶宗茂，谢迅，侯思宇，武晶. 全基因组鉴定普通菜豆 WOX 基因及出愈率相关分析[J/OL]. 植物遗传资源学报.
<https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20241104001>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

全基因组鉴定普通菜豆 *WOX* 基因及出愈率 相关分析

叶宗茂¹, 谢迅¹, 侯思宇¹, 武晶²

(¹山西农业大学农学院, 太谷 030801; ²中国农业科学院作物科学研究所/作物基因资源与育种全国重点实验室, 北京 100081)

摘要: 出愈率是影响遗传转化效率的关键因素, *WOX* 基因能促进细胞增值和芽分化。本研究对普通菜豆 *WOX* 基因家族进行了全基因组鉴定, 鉴定到 18 个普通菜豆 *WOX* 基因, 编码 177-847 个氨基酸, 其蛋白序列均包含保守的 HD 结构域, 亚细胞定位于细胞核中, 启动子主要含有“分生组织形成相关”及“生长素反应相关”的顺式作用元件。并与绿豆、大豆和拟南芥 *WOX* 基因家族成员, 进行了共线性和系统进化树分析, 124 个 *WOX* 基因可分为三大类群, 四个物种间的 *WOX* 同源基因受纯化选择作用。通过筛选了不同浓度 6-BA 和 2,4-D 激素配比的培养基, 成功建立了两个普通菜豆品种愈伤组织诱导体系。通过转录组结合 qRT-PCR 分析, 鉴定到 8 个 *WOX* 差异表达基因, 其中 *PvWOX1/15/16* 基因与出愈率显著相关。qRT-PCR 验证了这 3 个基因表达模式与转录组结果一致。以上结果表明 *PvWOX1/15/16* 基因可作为潜在的靶基因用于普通菜豆遗传转化的研究。

关键词: 普通菜豆; *WOX* 基因; 愈伤组织; 转录组

Whole Genome Identification of *WOX* Gene Family and Related to Callus Induction in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.)

YE Zongmao¹, XIE Xun¹, HOU Siyu¹, WU Jing^{2,3}

(¹ College of Agronomy, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801; ² Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences/National Key Laboratory of Crop Gene Resources and Breeding, Beijing 100081)

Abstract: The genome sequencing of common bean has been completed, however, research on its important genetic traits and genetic transformation remains in early stages. This study systematically analyzed the *WOX* gene family in common bean, identifying 18 *WOX* genes that encode proteins ranging from 177-847 aa. These proteins contain homeodomain conserved domains, and are subcellularly localized in the cell nucleus. The promoter mainly contains cis-acting elements related to meristem formation and auxin response. A collinearity and phylogenetic tree analysis was conducted with the members of the *WOX* gene family in mung bean, soybean and *Arabidopsis thaliana*. The 124 *WOX* genes can be divided into three major groups, and the *WOX* homologous genes among the four species are subject to purifying selection. Through screening the media with different concentrations of 6-BA and 2,4-D hormone ratios, the callus induction systems of two common bean varieties were successfully established. Through transcriptome combined with qRT-PCR analysis, 8 differentially expressed *WOX* genes were identified, among which the *PvWOX1/15/16* genes were significantly correlated with the callus

收稿日期: 2024-11-04

第一作者研究方向为杂粮分子育种, E-mail: 13460284571@163.com

通信作者: 武晶, 研究方向为食用豆种质资源鉴定评价, E-mail: wujing@caas.cn;

侯思宇, 研究方向为杂粮分子育种, E-mail: siyuhou@sxau.edu.cn

基金项目: 国家食用豆产业技术体系 (CARS-08); 山西省重大科技专项揭榜挂帅项目 (202101140601027) .

Foundation projects: China Agriculture Research System -Food Legumes (CARS-08); The Grand Science and Technology Special Projects in Shanxi Province (202101140601027).

formation rate. qRT-PCR verified that the expression patterns of these 3 genes were consistent with the transcriptome results. The above results indicate that the PvWOX1/15/16 genes can be used as potential target genes for the research of genetic transformation in common bean.

Key words: common bean; WOX gene; callus induction; transcriptome analysis

普通菜豆 (Common bean, *Phaseolus vulgaris* L.), 原产于中美洲和南美洲的一年生草本植物, 别名芸豆、四季豆, 是世界上种植面积最广泛的食用豆类之一^[1], 普通菜豆是人类植物蛋白摄入的主要来源之一, 如: 提供了布隆迪和卢旺达地区人口 15% 的蛋白和 30% 卡路里需求^[2]。据 2023 年 FAO 统计数据, 普通菜豆全球种植面积约 3775 万公顷, 产量达 2850 万吨, 亚洲占全球产量的 50%, 中国产量仅次于印度和巴西 (<https://www.fao.org/faostat>)。普通菜豆籽粒具有高蛋白、低脂肪等特性, 且富含钙、磷、镁、铁、锌、硒等各种矿物质营养物质, 是矿物质营养比较全面的食用豆类之一^[3]。当前, 普通菜豆新品种的选育主要还是常规系统选育、诱变育种及杂交育种等, 品种选育周期长, 更新速度慢, 亟待提升育种水平。相比传统育种, 新兴的基因编辑及基因组选择育种技术能够对一个或多个优良目标性状进行遗传改良, 缩短育种周期和降低人工成本^[4]。尽管普通菜豆再生体系与遗传转化体系已经取得一些进展, 但其遗传转化和再生率非常低^[5], 并且基因型、外植体来源以及再生条件等因素仍限制其应用^[6]。

普通菜豆遗传转化常用的方法有农杆菌介导法和基因枪法介导两种, 已被证实对胭脂碱型、章鱼碱型和农杆菌敏感的农杆菌敏感, 几乎没有获得完整植株的研究, 大多研究仅获得了表达报告基因的子叶、胚轴、叶片^[7]等。基因枪法介导相比较农杆菌介导法更加简便, 转化率和可控度较高, 但是同样具有一定的限制性, 如在植物基因组中拷贝数高易引起基因沉默、转移 DNA 分子量一般不高于 10 kb 等^[8]。因此, 挖掘与菜豆愈伤组织出愈率及胚胎发生相关的基因资源, 对于提升离体再生及遗传转化效率非常重要。据报道, 一些涉及胚胎发育相关基因激活或关闭调控植物离体再生效率, 如: *WUSCHEL* (*WUS*)、*LEC2*、*PGA37*、*BBM* 等基因, 是诱导植物愈伤组织形成的主要内在因子^[9]。其中, *WUSCHEL* 相关的同源异型盒 (*WUSCHEL-HOMEODOMAIN*, *WOX*) 是一类植物特异的转录因子家族, *WUS* 基因能够促进体细胞向胚性细胞的转变, 使其外植体可以不需要外源植物激素刺激就能获得大量体细胞胚^[10]。*WUS* 基因家族序列典型特征是包含 Homeobox (HB) 蛋白, Homeobox (HB) 蛋白是由 65 个氨基酸残基构成 DNA 结合结构域, 其同源异型结构域 (homeodomain, HD) 属于锌指蛋白 (ZIP) 超家族。而调节真核生物生长发育的关键因子是 HD 结构域蛋白^[11]。在拟南芥中有 15 个 *WOX* 基因, 是潜在调控真核生物生长发育的重要因子^[12]。过表达 *TaWOX5* 基因在小麦愈伤组织中, 显著增加了遗传转化效率, 减少了基因型的依赖^[13]。同时, 发现单独或协同表达 *WOX* 和 *BBM* 基因有效的促进了玉米 (*Zea mays* L.)、水稻 (*Oryza sativa* L.)、高粱 (*Sorghum bicolor* L.)、大麻 (*Cannabis sativa* L.)、咖啡 (*Coffea arabica*) 和拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 等植物的细胞增值和芽分化, 更容易提升遗传转化效率^[14]。

本研究拟比较两个普通菜豆品种出愈率及出愈时间的差异基因表达特征, 全基因组鉴定普通菜豆 *WOX* 基因家族成员, 分析其成员的核酸和蛋白序列、功能结构域及顺式作用元件, 挖掘与普通菜豆愈伤诱导相关的 *WOX* 基因, 构建 *WOX* 基因作为核心基因的蛋白互作网络, 以期筛选到影响普通菜豆愈伤组织出愈效率的关键基因, 为建立普通菜豆高效再生和遗传转化体系提供可利用的基因资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料普通菜豆品种为龙 17-3965 (L3965) 和龙 10 (L10), 由黑龙江农业科学院

作物资源研究所提供。龙 10 属于中熟型品种，生育期 92 d，株高 52 cm，种皮黑色，籽粒椭圆形，百粒重 21 g；龙 17-3965 属于中熟型品种，生育期 91 d，株高 80 cm，种皮黑色，籽粒肾型，百粒重 17.9 g。

1.2 愈伤组织的诱导及继代培养

以菜豆无菌苗下胚轴为外植体材料，进行愈伤组织诱导。取饱满一致的种子，使用 75% 酒精消毒 30 s 两次，无菌水清洗两次，再用 5% 次氯酸钠消毒 20 min，用无菌水清洗后置于滤纸上晾干，晾干后的种子接种于培养基中，培养于 25 °C，光照强度 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ，16 h 光照/8 h 黑暗条件下。下胚轴长至 3 cm 以上，切取 0.5–1 cm 小段作为外植体用于愈伤组织培养。将下胚轴接种于 MS+2, 4-D (1、2、3、4 mg/L) +6-BA (0.2、0.4、0.6 mg/L) 培养基中，采用正交试验设计，共 12 种培养基组合，三组重复，每组接种 40 个外植体，暗条件下培养。挑选出愈率高的培养基组合，分别取 L3965 和 L10 在第 1 d (天)、15 d、30 d 长势良好且一致的愈伤组织，每组三次生物学重复，迅速放入液氮冷冻，-80 °C 超低温冰箱保存，作为后续转录组测序材料。

出愈率计算公式为：出愈率 (%) = 产生愈伤组织的外植体数/接种的外植体数 \times 100%

表 1 愈伤诱导培养基试验设计组合

Table 1 The test of callus induction medium combination

激素配比组合 Combination ID	2,4-二氯苯氧乙酸 (mg/L) 2, 4-D	6-苄基腺嘌呤 (mg/L) 6-BA
M1	1	0.2
M2	2	0.2
M3	3	0.2
M4	4	0.2
M5	1	0.4
M6	2	0.4
M7	3	0.4
M8	4	0.4
M9	1	0.6
M10	2	0.6
M11	3	0.6
M12	4	0.6

1.3 RNA 样品提取、转录组测序数据处理和分析

使用 RNAPrep Pure Plant Kit (Tiangen Biotech Co., LTD, Beijing, China) 提取样品总 RNA。使用 Nano Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc, MA, USA) 测定 RNA 浓度和纯度。使用 Agilent Bioanalyzer 2100 系统 (Agilent Technologies Inc, CA, USA) 的 RNA Nano 6000 检测试剂盒，评估 RNA 完整性。所有样品均由北京百迈客公司进行转录组测序分析，获得原始 Reads 测序数据进行严格的质量控制，首先去除含有接头的 Reads，再去除低质量的 Reads，其包括去除 N 的比例大于 10% 的 Reads 以及去除质量值 $Q \leq 10$ 的碱基数占整条 Read 的 50% 以上的 Reads。利用 HiSat2 (<http://ccb.jhu.edu/software/hisat2/index.shtml>) 和 TopHat2 将所得到的过滤 Reads 与普通菜豆参考基因组进行比对；利用 StringTie 对对比上的 reads 进行组装，采用 FPKM 值衡量基因表达水平。将 $\text{Log}_2|\text{FoldChange}| \geq 2$ 且 $\text{FDR} < 0.01$ 作为差异基因筛选标准。比对 (Gene ontology, <http://www.geneontology.org/>) 数据库，将差异基因进行基因 GO 功能分类，并参照 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, <https://www.kegg.jp>) 数据库对每个分组的差异基因集。利用 Pearson 相关性算法，TBtools 软件可视化，计算出愈率与差异表达基因和转录因子的相关性及 *p-Value*。

表 2 qRT-PCR 引物设计

Table 2 qRT-PCR primer design

引物名称 Primer name	正向引物(5'-3') Forward sequences (5'-3')	反向引物(5'-3') Revered sequences (5'-3')	退火温度 (°C) Annealing temperature	扩增长度(bp) Amplification
---------------------	--	--	--	---------------------------

Phvul.001G023600 (PvWox1)	GGAGATGCTGTATAGAGG	GAGTACGAGGACTATGAG	56.6	188
Phvul.009G012200 (PvWox15)	GGTTCCAGAACAGAAGAG	GATCCTATGAGGTGATGATG	58.6	170
Phvul.009G066960 (PvWox16)	GTGAAGAGGAGGAACATAG	GGAAGAGTACAGATCAGAG	57.5	192
β -actin (Phvul.011G064500)	GAAGTTCTCTTCCAACCATCC	TTTCCTTGCTCATTCTGTCCG	60.1	200

1.4 反转录及 qRT-PCR 分析

使用 Prime ScriptTM Reagent Kit 试剂盒 (TaKaRa, RR037A, Japan) 对样品 RNA 进行反转录; 使用 NCBI 公共数据库网站在线引物设计 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) qRT-PCR, 由上海生工生物工程有限公司合成; 使用 Ultra SYBR Mixture (Low ROX) 试剂盒 (北京康为试剂生物科技有限公司, CW2601M, 中国) 进行 qRT-PCR 检测。以 β -actin (Gene ID: Phvul.011G064500) 作为内参基因, 所有测试样品设置 3 次生物学重复, 并通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算基因相对表达量, 使用 TBtools 子程序 HeatMap Illustrator 绘制表达量热图。

1.5 普通菜豆 WOX 基因家族成员鉴定及蛋白质理化性质分析

从 TAIR 网站在线获取拟南芥的 15 个 WOX 基因家族成员蛋白序列。在 Phytozome 数据库 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/search-results/0ce888e7-6857-45ae-9506-068ec08863a2>) 下载普通菜豆蛋白序列、基因组 gff 和基因组注释文件, 从 Pfam 数据库中下载 WOX 基因隐马尔可夫模型 (PF00046)。以拟南芥 WOX 基因蛋白序列为种子序列, 与普通菜豆全基因组数据库注释的蛋白质序列进行 BLAST, 使用建立的隐马尔可夫模型序列谱对普通菜豆蛋白序列进行双向检索, 设置 E-value 值为 0.0001, 获得候选基因核酸和蛋白序列。候选 WOX 基因蛋白序列提交至 CBICDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>, <http://smart.embl-heidelberg.de>) 网站, 进行保守结构域的鉴定和筛选, 设置 E-value 值小于 0.0001。利用 Cell-PLoc 网站 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>) 预测分析 18 个普通菜豆 WOX 家族成员蛋白理化性质。利用在线网站 WoLF PSORT (<https://wolffpsort.hgc.jp/>) 预测 WOX 基因的亚细胞定位。从 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库搜索并获得大豆 (*Glycine max* L.) 和绿豆 (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) 的 WOX 基因家族成员序列信息。

1.6 普通菜豆 WOX 基因家族成员启动子顺式作用元件及系统进化树分析

采用 PIANCARE 数据库 (<http://bioinformatics.psb.gent.ebooks/iantcare/html>) 预测分析 WOX 基因启动子元件, 使用 TBtools 子程序 gene structure viewer 可视化分析上述结果。进一步使用 Clustal X 软件进行多重序列比对分析, 随后利用 MEGA X 软件基于邻近法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建普通菜豆、拟南芥、绿豆和大豆 WOX 基因家族成员的系统进化树。利用 Batch sequence search (<http://pfam.xfam.org/search#tabview=tab1>) 在线分析 WOX 基因的保守结构域特征, 并利用 TBtools 软件可视化保守结构域信息。

1.7 普通菜豆 WOX 基因家族共线性、进化压力及蛋白互作网络分析

使用 TBtools 的子程序 Multiple Synteny Plot 将普通菜豆、拟南芥和大豆的 WOX 基因共线性结果可视化, 同时利用 TBtools 的子程序 Simple Ka/Ks Calculator 对进化压力进行分析, 获得共线性基因的非同义替换率 (Ka)、同义替换率 (Ks) 和 Ka/Ks 比值。利用 SYRING (<https://cn.string-db.org>) 网站, 以普通菜豆 WOX 差异表达基因为种子序列, 构建 WOX 基因蛋白互作网络, Cytoscape 软件进行可视化分析。

2 结果与分析

2.1 普通菜豆 WOX 基因家族成员鉴定、序列特征及遗传进化分析

为进一步了解普通菜豆 WOX 基因家族成员序列特征, 通过全基因组序列的鉴定分析, 鉴定出 18 个 WOX 基因, 根据其在染色体上的位置依次命名为 PvWOX1–PvWOX18

(附图 1)。理化性质分析结果表明, 18 个 *WOX* 基因成员编码氨基酸数目范围为 177–847 aa, 相对分子量范围为 20555.8–93061.32 Da, 理论等电点 (pI) 范围为 5.12–9.26。亚细胞定位预测分析, 18 个 *WOX* 基因成员均定位于细胞核内, 无明显的信号肽特征信息出现 (附表 1)。蛋白二级结构预测分析, 其中 15 个 *WOX* 基因编码的蛋白以无规则卷曲为主, 占比 47.69%–72.59%, 其次是 α 螺旋、延伸链和 β 转角; 3 个 *WOX* 基因编码的蛋白以 α 螺旋为主, 占比范围 41.27%–41.81%, 其次是无规则卷曲、延伸链和 β 转角。HD 保守结构域分析, 结果表明, 第一个螺旋结构域保守氨基酸残基为 Q, L, Y; 第二个螺旋结构域保守氨基酸残基为 P, I, L; 第三个螺旋结构域氨基酸残基为 V, W, F, Q, N, R; 仅有 *PvWOX1/4/6/7/14/16* 含有保守的 WUS-box 基序 (保守氨基酸为 T, L, L, F, P)。以上结果分析表明, 所鉴定 18 个基因均属于保守的 *WOX* 基因家族成员 (图 1)。

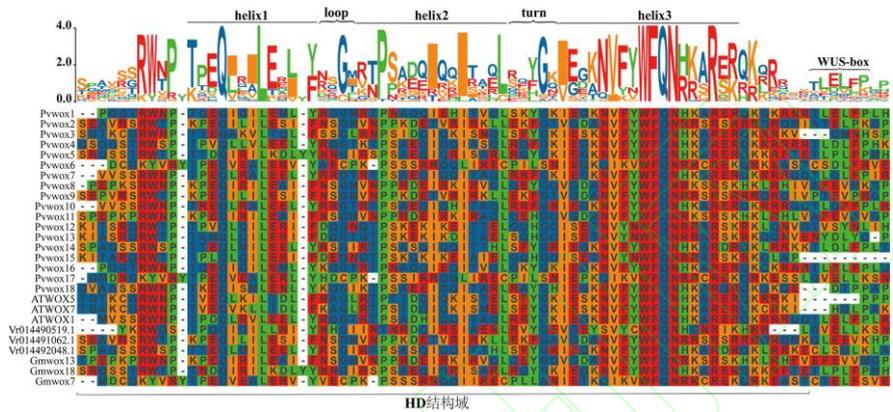


图 1 普通菜豆 (*Pv*) *WOX* 基因家族成员保守结构域序列特征分析

Fig.1 Analysis of the conserved domain characteristics of the *WOX* gene family in common bean

基因组共线性分析表明 (图 2), 分别有 11/14/16 个普通菜豆 *WOX* 基因与拟南芥、绿豆和大豆同源 *WOX* 基因具有共线性。其中 11 个普通菜豆 *PvWOX* 基因 (位于 1、2、4、6、9、10 和 11 号染色体) 分别与位于拟南芥 1、2、3 和 5 号染色体的 15 个基因存在共线性关系; 14 个 *PvWOX* 基因 (位于 1、2、4、6、7、8、9、10 和 11 号染色体) 分别与绿豆 2、4、5、6、7、8、9 号染色体上 24 个基因存在共线性关系。16 个 *PvWOX* 基因分别与大豆 2、4、5、6、7、8、10、11、12、13、14、15、17、18 和 20 号染色体上共计 45 个基因存在共线性关系。选择压力分析, 发现两两物种间所有 *WOX* 同源基因对的 K_a/K_s 值 < 1 , 表明 *WOX* 基因家族成员在普通菜豆、拟南芥、大豆及绿豆之间是相对保守的, 受纯化选择作用。

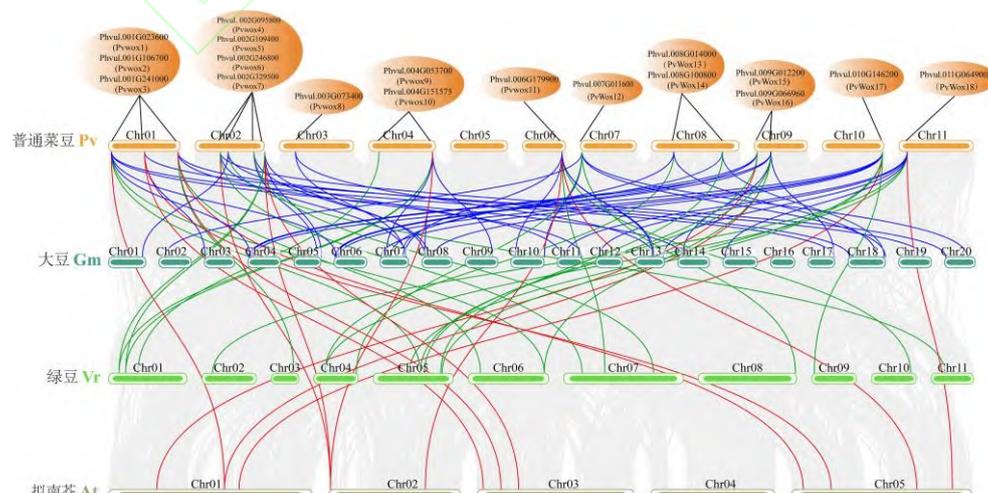
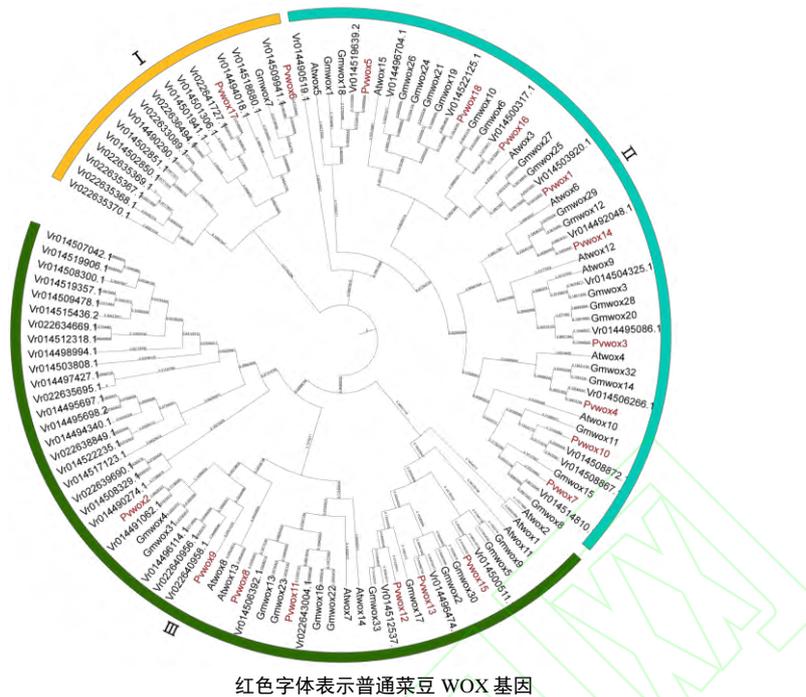


图 2 普通菜豆 (*Pv*) *WOX* 基因家族、大豆 (*Gm*)、绿豆 (*Vr*) 和拟南芥 (*At*) 共线性分析

Fig. 2 Collinearity analysis of *WOX* gene family across common bean, soybean, mung bean and Arabidopsis



红色字体表示普通菜豆 *WOX* 基因
The red font indicates the *WOX* gene of common bean, and the yellow
图 3 拟南芥、普通菜豆、大豆 *WOX* 蛋白系统进化树分析

Fig.3 Phylogenetic tree analysis of *WOX* protein in Arabidopsis, common bean, mung bean and soybean

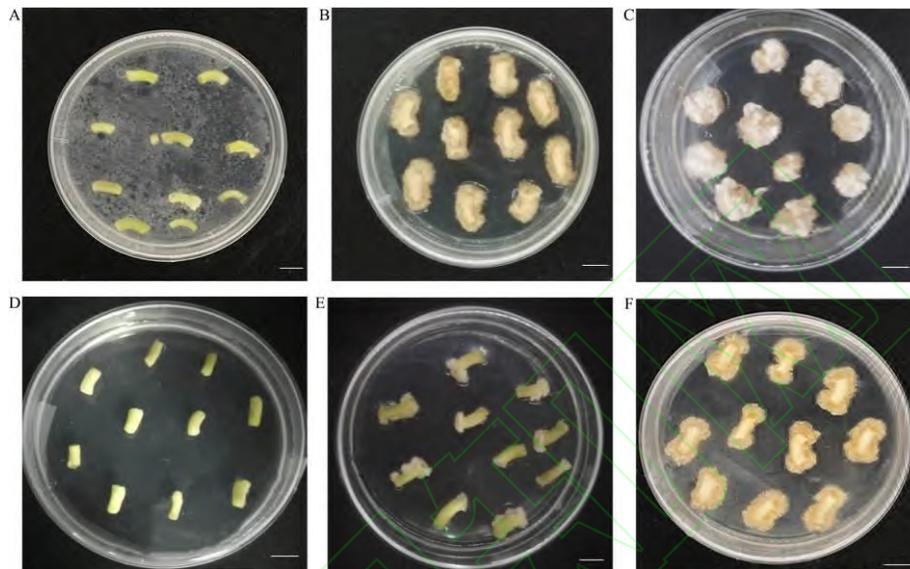
系统进化树分析表明（图 3）：来源于普通菜豆、大豆、绿豆和拟南芥 4 个物种的 124 个 *WOX* 基因可划分为 3 大类群。其中第一类群共包含 18 个 *WOX* 基因（普通菜豆 2 个），其中 *PvWOX6* 基因分别与 *Vr014509941.1* 和 *GmWOX7* 聚为一类，*PvWOX17* 与 *Vr022641727.1* 聚为一类，未与拟南芥同源基因聚为一类；第二类群包含 50 个 *WOX* 基因（普通菜豆 9 个），其中普通菜豆 *PvWOX1/3/4/5/7/10/14/16/18* 分别与拟南芥同源基因 *AtWOX3/12/9/4/5/6/10/15* 聚为一类；与 13 个绿豆和 20 个大豆 *WOX* 基因亲缘关系最近；第三类群包含 56 个 *WOX* 基因，21 个绿豆 *WOX* 基因单独聚为一个亚类，而 7 个普通菜豆与 7 个拟南芥、9 个绿豆和 12 个大豆 *WOX* 基因聚为另一个亚类，其中普通菜豆 *PvWOX2/8/9/11/12/13/15* 基因分别与拟南芥 *AtWOX8/13/7/14/1/2/11* 同源基因聚为一类。

顺式作用元件分析表明，18 个 *WOX* 基因成员启动子序列共预测到 28 个顺式作用元件，包含分生组织形成、生长素反应、光响应、胚乳及种子发育、赤霉素响应、茉莉酸甲酯及 *MYB* 转录因子等相关调控元件。其中 *PvWOX3/8/17* 特有“胚乳发育”顺式作用元件；*PvWOX1* 特有“种子发育”顺式作用元件；*PvWOX3/8/15/17/18* 含有分生组织特异性激活有关的顺式作用元件。结果暗示，上述 *WOX* 基因成员可能与胚乳或种子发育、分生组织形成及激素响应等密切相关（附图 2）。蛋白质三维空间结构结合系统进化树分析，三大类群菜豆 *WOX* 基因全部成员均具有 HD 保守结构域，不同基因成员的蛋白空间三维结构存在明显差异，尤其是第一大类群 2 个普通菜豆 *WOX* 基因除包含保守的 HD 结构域之外，还存在多个螺旋转角螺旋结构域，第二类和第三类群的普通菜豆 *WOX* 基因除保守 HD 结构域之外，还存在 1-2 个螺旋和转角结构域。结果暗示，不同聚类群包含的普通菜豆 *WOX* 基因家族成员，除了具有保守的生物学功能外，可能还存在功能分化（附图 3）。

2.2 普通菜豆下胚轴愈伤组织诱导体系的建立

为了进一步挖掘与普通菜豆愈伤组织发生相关的 *WOX* 基因，本研究建立了两个普通菜豆品种下胚轴愈伤组织发生系统。结果表明，不同激素配比组合诱导普通菜豆下胚轴愈

伤组织发生的效率具有明显差异，两个普通菜豆基因型下胚轴愈伤组织发生所响应不同激素配比组合也存在明显差异（图4）。L3965在M11培养基组合出愈率最低，达23.33%；组合M5出愈率最高，达78.33%，与其他11个处理组合存在显著差异，即1 mg/L 2, 4-D+0.4 mg/L 6-BA。L10在M12培养基组合出愈率最低，达20%；在组合M9出愈率最高，达85%，与其他11个处理组合存在显著性差异，即1 mg/L 2, 4-D+0.6 mg/L 6-BA（图5）。其中，L3965基因型出愈率时间最短，在第15天已有明显大量的愈伤组织形成，而L10仍然处于组织分化的初级阶段；同时，在第30天L3965愈伤组织致密紧实，有明细的白色组织形成，具备脱分化进入胚性愈伤组织的形态。

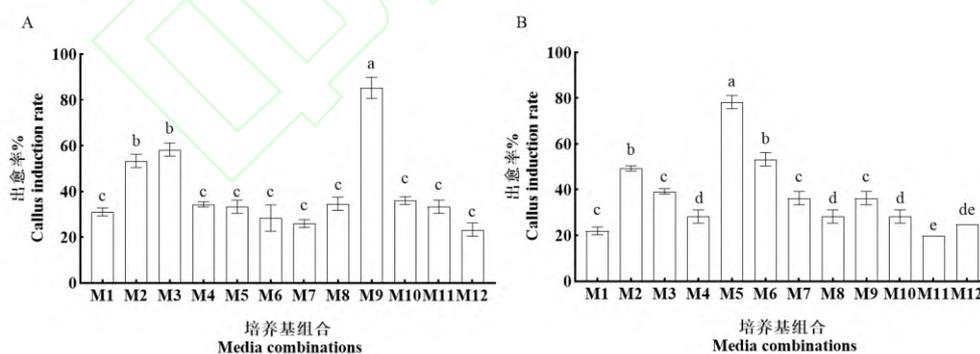


A、B、C 分别表示 L3965 下胚轴外植体诱导处理 1d、15d 和 30d；D、E、F 分别表示 L10 下胚轴外植体诱导处理 1d、15d 和 30d；标尺=1 cm

a, b, c represent callus induced from the hypocotyl explant of L3965 at 1st, 15th and 30th day; d, e, f represent callus induced from the hypocotyl explant of L10 at 1st, 15th and 30th day; Bar=1cm.

图4 不同诱导时期下胚轴外植体愈伤组织生长形态

Fig.4 Callus induced from hypocotyl explants in two common bean genotypes at three distinct time points



A: L10 不同培养基组合下普通菜豆下胚轴外植体出愈率, B: L3965 不同培养基组合下普通菜豆下胚轴外植体出愈率；图中不同字母表示在 $P<0.05$ 水平上差异显著；下同

A: Callus induction rate of two common bean genotypes across twelve L10 medium combinations , B: Callus induction rate of two common bean genotypes across twelve L3965 medium combinations ; the different letter indicated significant difference at $P<0.05$ level ;

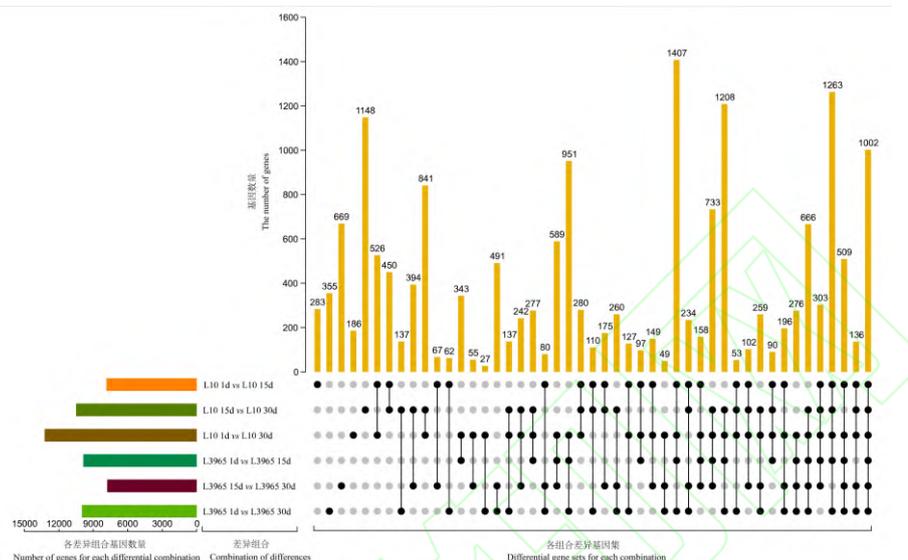
The same as below

图5 不同培养基组合下普通菜豆下胚轴外植体出愈率

Fig.5 Callus induction rate of two common bean genotypes across twelve medium combinations

2.3 转录组测序数据质控及差异表达基因数量分析

本研究针对 2 个普通菜豆基因型愈伤组织形成的 3 个时期，共计 18 个组织样品进行真核有参转录组测序，共获得 125.01 Gb Clean Data 数据，每个样品平均获得 5.72 Gb Clean Data 数据，Q30 碱基百分比平均达 94.78% 以上。原始数据经过滤得到的 Clean Data 占原始 Reads 数据的比例和 Q30 占比均大于 90%，说明转录组测序数据质量较高。同时，主成分分析结果显示各样本及生物学重复之间具有较好的稳定性和区分度，QC 样本测定评估数据稳定性好，以上结果说明可以进行下一步的差异表达基因分析（附图 4）。



黑色点表示在当前比较组合中差异基因集，连线表示前后两个或多个比较组合中共有的差异基因集；所有差异表达基因集组合均为前者比较后者

Black dots: DEGs set in the current comparison group; Line: Common DEGs sets in the previous and subsequent two or more comparison groups. All combinations of differentially expressed gene sets are the former compared to the latter.

图 6 比较转录组分析普通菜豆愈伤组织不同诱导时期的差异表达基因集

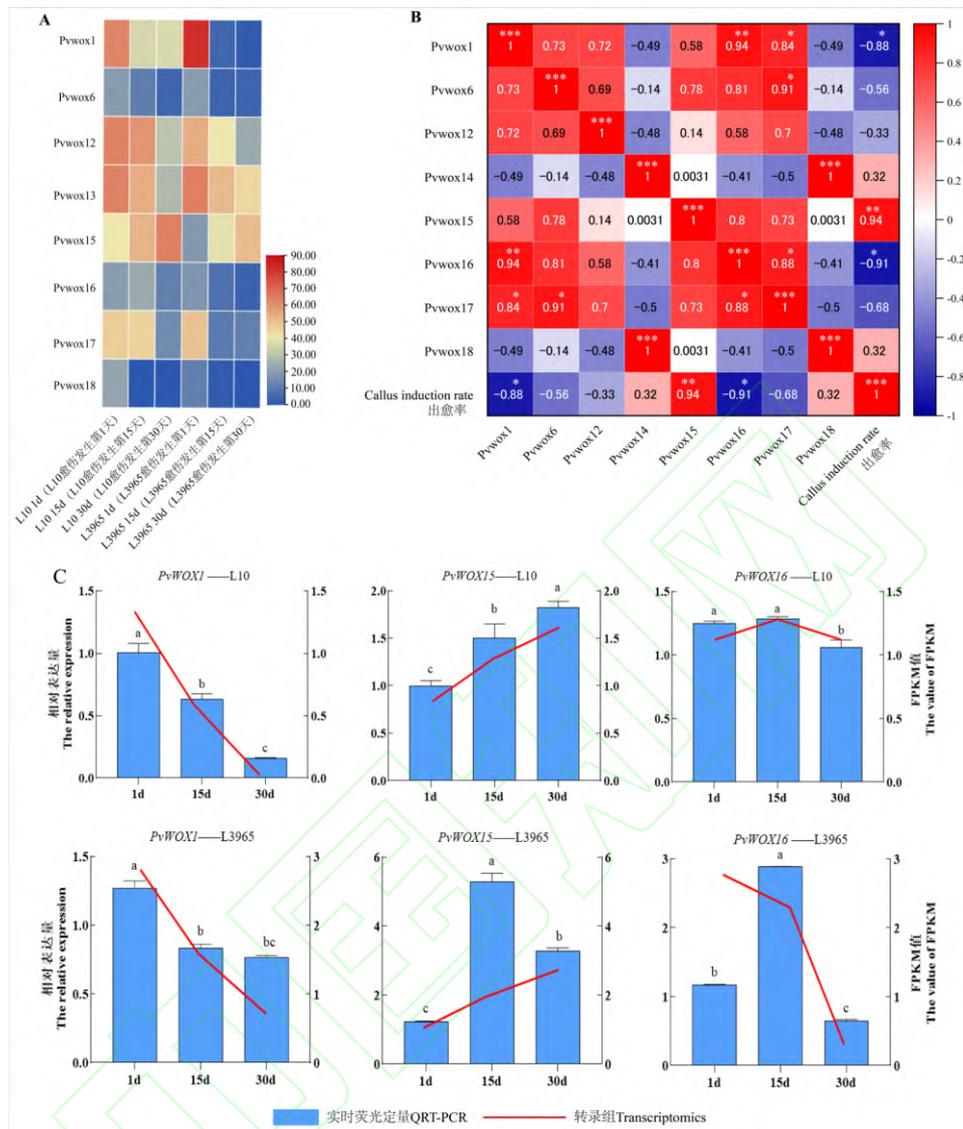
Fig.6 Comparative transcriptome analysis of DEG sets in common bean callus at three induction periods

两两组合比较分析结果表明（图 6），6 个比较组合共鉴定到 18,236 个差异基因；其中 L10-1d vs L10-15d，鉴定到 3,554 个表达上调基因和 4,305 个表达下调基因；L10-1d vs L10-30d，鉴定出上调和下调表达的基因数分别为 4,536 个和 5,128 个；L3965-1d vs L3965-15d 组合，鉴定到 4,358 个表达上调和 5,514 个表达下调基因；L3965-1d vs L3965-30d，鉴定到表达上调 4,319 个和表达下调 5,676 个基因。各组合差异表达基因交集分析，6 个组合共有 1,002 个差异表达基因；每个组合特有的差异表达基因数量分别为 283（L10-1d vs L10-15d）、1148（L10-15d vs L10-30d）、186（L10-15d vs L10-30d）、669（L3965-15d vs L10-30d）和 335（L3965-1d vs L3965-30d）。

2.4 差异表达基因 KEGG 富集、表达模式、相关性分析及 qRT-PCR 验证

为进一步揭示差异表达基因所参与的生理生化过程、代谢和信号转导途径，分别对 L10-1d vs L10-30d、L10-15d vs L10-30d、L3965-1d vs L3965-30d 与 L3965-15d vs L3965-30d 组合共有和特有的差异表达基因集（445、1407、614 和 928 个基因）进行 KEGG 富集分析。结果表明：L10-1d vs L10-30d 与 L10-15d vs L10-30d 差异表达基因，主要富集在核糖体（Ribosome）、植物激素信号转导（Plant hormone signal transduction）、植物-病原体互作通路（Plant-pathogen interaction）和 MAPK 信号通路-植物（MAPK signaling pathway-plant）等代谢途径。而 L3965-1d vs L3965-30d 与 L3965-15d vs L3965-30d 差异表达基因，主要富集在碳代谢（Carbon metabolism）、植物激素信号转导（Plant hormone signal

transduction)、苯丙烷类物质生物合成(Phenylpropanoid biosynthesis)等通路(附图5)。结果暗示植物激素信号转导通路对普通菜豆茎段愈伤组织诱导过程可能起作用。



A: *PvWOXs* 基因在两个普通菜豆品种不同出愈率时间的表达模式, 其中色阶变化值表示基因表达量的高低; B: *PvWOXs* 基因与出愈率相关性热图; C: qRT-PCR 验证 *PvWOX1/15/16* 基因转录本相对表达量; *, **和***分别表示在 $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 和 $P<0.001$ 水平上差异显著; 小写字母表示在 $P<0.05$ 水平上差异显著

A: The expression pattern of *PvWOXs* gene during the callus induction formation periods for two common bean varieties; the color level change value indicates the level of gene expression; B: The correlation heatmap illustrating the relationship between *PvWOXs* and callus induction rate; C: The relative expression patterns of FPKM value for 3 *WOX* gene identified through qRT-PCR; * and ** indicated significant difference at $P<0.05$ and $P<0.01$ $P<0.001$ levels, respectively; the different letter indicated significant difference at $P<0.05$ level

图7 差异表达 *wox* 基因表达量热图、相关性分析及 qRT-PCR 验证

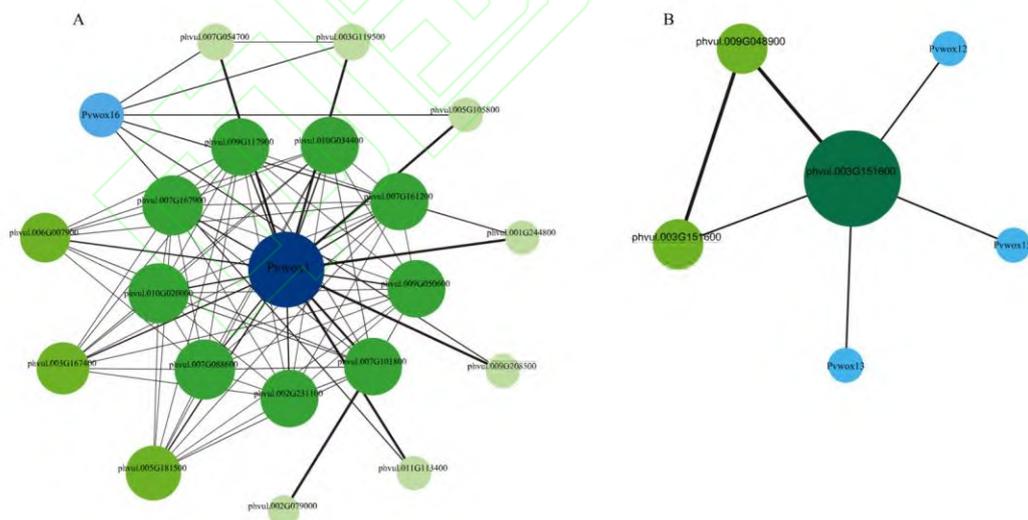
Fig.7 Expression pattern analysis of differentially expressed *WOX* genes, correlation studies and qRT-PCR validation

针对富集的差异表达基因进行转录因子鉴定分析, 结果共鉴定到 12 个 *AUX/IAA*、5 个 *bZIP*、7 个 *AP2/ERF*、3 个 *GH3*、4 个 *bHLH*、3 个 *BES1/BZR1*、7 个 *WRKY* 及 8 个 *WOX* 基因; 其中 6 个 *WOX* 基因在两个普通菜豆基因型愈伤组织形成时表达均下调, 而

PvWOX15 均表达上调, *PvWOX16* 基因仅在 L10-15d 时表达上调 (图 7A)。进一步相关性分析表明, 出愈率与 *PvWOX15* 基因表达量显著正相关, 相关系数为 0.94; 与 *PvWOX1/16* 基因表达量显著负相关, 相关系数为 -0.88 和 -0.91 (图 7B)。为了验证转录组数据的准确性, 选取与出愈率相关的 3 个 *WOX* 基因进行 qRT-PCR 验证, 其相对表达量与转录组数据有一致的表达趋势。与对照 (1d) 相比, *PvWOX1* 基因在 L10-30 d 和 L3965-30 d 相对表达量均下调, 达 6.2 和 3.1 倍; *PvWOX15* 基因在 L10-30 d 和 L3965-30 d 相对表达量均上调, 分别达 1.8 和 3.4 倍; *PvWOX16* 在 L10-15d 和 L3965-15 d 相对表达量上调 1.1 和 2.3 倍, 而在 L10-30d 和 L3965-30d 相对表达量下调 1.4 和 1.7 倍 (图 7C)。同时我们发现, *PvWOX15/16* 相对表达量在 L3965-15d 远高于 L10-15d, 达 1.6-3.5 倍, 暗示这 2 个基因可能与 L3965 出愈时间较短有关。综上所述, *PvWOX1/15/16* 基因表达与普通菜豆愈伤组织出愈率相关, 可能影响不同基因型下胚轴外植体出愈的时间和愈伤组织状态。

2.5 差异表达 *WOX* 基因互作蛋白分析

图 8 所示, 进一步对 *PvWOX1/15/16* 三个差异基因进行蛋白互作分析, 根据权重值和连通性分为两类, 一类包括 *PvWOX1* (Phvul.001G023600) 和 *PvWOX16* (Phvul.009G066960); 其中 *PvWOX1* 与 Phvul.003G167400 (含泛素化结构域蛋白 BRIZ1)、Phvul.005G181500 (含 BRAP2 结构域蛋白)、Phvul.007G088600 (含 PA 蛋白酶相关结构域)、Phvul.002G231100 (磷脂酰甘油磷酸酶) 和 phvul.009G050600 (输入蛋白亚基, KPNB1) 等 18 个蛋白互作。*PvWOX16* 与 Phvul.007G054700 (未知蛋白)、Phvul.003G119500 (细胞壁关联蛋白激酶)、Phvul.005G105800 (含 DUF 结构域蛋白)、Phvul.011G113400 (含 DUF 结构域蛋白)、Phvul.009G208500 (LRR 受体丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶) 和 Phvul.001G244800 (紫杉二烯-5 α -醇-O-乙酰转移酶) 6 个蛋白互作, 分别注释到 RNA 转运、信号转导、泛素化、甘油磷脂代谢以及植物昼夜节律调节等 KEGG 代谢通路; 另一类 *PvWOX15* 仅与 Phvul.003G151600 蛋白存在互作关系, 该基因编码超长链醛脱氢酶, 涉及角质、木质素和蜡质的生物合成途径。



A: Pvwox1 和 Pvwox 16 蛋白互作网络; B: Pvwox15 蛋白互作网络; 直线粗细代表互作强度, 圆大小代表互作基因数量

A: Protein interaction network analysis of Pvwox1 and Pvwox 16; B: Protein interaction network analysis of Pvwox 15; the linear roughness represents the interaction intensity, and the circle size represents the number of interacting genes

图 8 差异表达 *WOX* 基因蛋白互作网络

Fig.8 Protein interaction network analysis of three differentially expressed *WOX* genes

3 讨论

WOX 基因家族 (WUSCHEL-related homeobox) 是植物界里普遍存在的、包含保守的 HD 结构域的一类转录因子, 典型的 HD 结构域是由 60 个氨基酸残基组成螺旋-环-螺旋-转角-螺旋的蛋白结构域^[15]。模式植物拟南芥中包含 15 个 WOX 基因, 主要涉及胚胎发生、干细胞维持和器官形成等生物学功能。最早利用 *wus* 拟南芥突变体阐明了 WUSCHEL 基因具有维持茎端分生组织干细胞稳态的生物学功能^[16]。AtWOX5/6 生物学功能涉及维持根静止中心胚胎干细胞形态和胚珠发育过程^[17]。水稻中, 拟南芥 AtWOX11 同源基因 OsWOX11 能够激活根冠的分化和生长^[18]。已有大量物种针对 WOX 基因家族进行全基因组鉴定, 如: 陆地棉 39 个、高粱 11 个、玉米 21 个、水稻 13 个、小麦 42 个、大豆 33 个 WOX 基因, 并解析了部分 WOX 基因与干细胞分化和器官发育的功能^[19]。为了挖掘普通菜豆基因组中调控分生组织形成和器官发生相关的 WOX 基因, 本研究从普通菜豆基因组中共鉴定出 18 个 WOX 基因, 其基因数量大于拟南芥, 小于绿豆和大豆, 这可能与普通菜豆参考基因组(泛基因组大小, 770Mb)小于绿豆 (Weilv-9, T2T 基因组大小为 500Mb) 和大豆 (ZH13, T2T 基因组大小为 1007 Mb) 有关^[20-23]。序列特征、多序列比对结合系统进化树分析表明, 普通菜豆 WOX 基因家族成员定位于细胞核, 编码氨基酸数量及理论等电点的变化幅度较大, 均包含保守的 HD 结构域, 与大豆直系同源基因亲缘关系最近; 值得注意的是 PvWOX6/17 基因仅与大豆和绿豆同源基因聚为一类, 而在拟南芥中没有直系同源基因。基因组共线性分析表明, 普通菜豆与大豆 WOX 直系同源基因的数量最多, 进一步证实了普通菜豆与大豆的遗传亲缘关系最近。上述结果暗示, 相比拟南芥, 豆科物种的 WOX 基因存在大量基因复制事件, 尤其是绿豆和大豆, 这也与基因组的大小有关, 豆科植物的 WOX 直系同源基因具有保守且多样性的生物学功能。

近年来, 已有一些物种报道了愈伤组织和体细胞胚诱导相关 WOX 基因的鉴定和功能解析。拟南芥中 WOX5/7/13 基因是诱导愈伤组织和器官再生的关键转录因子, 协同调控细胞壁修饰酶基因的表达, 促进生长素积累及增强细胞分裂素敏感度, 有助于提高愈伤组织和器官再生效率^[24]。紫花苜蓿里报道了拟南芥直系同源基因 WOX9-1 与体细胞胚发生相关, 特异在体细胞胚阶段激活, 并增加了体细胞胚的发生频率, 同时提升了与体细胞胚发生相关的 2 个 MADS 基因的表达水平^[25]。大豆愈伤组织转录组分析, 揭示了大部分差异表达基因主要富集在生长素信号转导、细胞分裂、DNA 重组、次生代谢和胁迫响应相关的 GO 分类里, KEGG 主要富集在苯丙烷类、MAPK 信号和植物病原菌互作等通路; 挖掘到 23 个 AUX/IAA (生长素)、10 个 IPT (细胞分裂素) 和 5 个 BR 激素关键组分相关基因, 及 178 个 MYB、141 个 NAC、128 个 WRKY 和 99 个 bZIP 转录因子; 同样鉴定出 17 个 WOX 基因表达涉及细胞分裂和增值, 尤其是 8 个大豆中与拟南芥 WOX1/4/5/7 为直系同源的基因表达上调与愈伤组织诱导正相关, 而与 WOX11/12 的直系同源基因 *Glyma.03G007600* 和 *Glyma.19G118400* 表达下调与愈伤组织诱导负相关^[26]。本研究中利用转录组联合普通菜豆愈伤组织诱导率进行相关分析, 结果发现大部分差异表达基因主要富集在激素信号通路、植物病原菌互作、苯丙烷类及 MAPK 信号等 KEGG 代谢通路, 与大豆愈伤组织转录组分析结果十分一致; 同时鉴定到 13 个 AUX/IAA、5 个 bZIP、3 个 GH3、4 个 bHLH、3 个 BES1/BRZ1、7 个 AP2/ERF、8 个 WRKY 和 8 个 WOX 基因与愈伤组织诱导相关, 相比大豆愈伤组织转录组分析中挖掘到相关差异表达基因的数量较少, 这可能与两者基因大小有关。8 个 WOX 差异表达基因中, PvWOX15/18 基因表达上调, 其他基因表达下调; 与愈伤组织诱导率相关性最高的 WOX 基因为 PvWOX1/15/16, 且 PvWOX1/16 与拟南芥 WOX3 直系同源, PvWOX15 与拟南芥 WOX1/2/11 直系同源, 遗传聚类为同一分支。根据文献报道, 过表达拟南芥 WOX1 导致分生组织发生异常及破坏了多胺

代谢稳态，而 *WOX2* 和 *WOX3* 受到 *Leafy Cotyledon2(LEC2)* 基因的调控，在体细胞胚胎发生过程中起到重要的作用^[16-17]。因此，根据以上结果，我们推测与拟南芥 *WOX1/2/3* 同源的 *PvWOX1/15/16* 基因可能在普通菜豆愈伤组织形成的过程中起到重要的作用。此外，蛋白互作网络分析表明，*PvWOX1* 与酪蛋白激酶 II- α 亚基存在互作关系，而酪蛋白激酶 II- α 亚基与水稻光周期敏感性有关^[27]，*PvWOX15* 与 *RF2b* 存在互作关系，而过表达 *RF2b* 可提高水稻东格鲁杆状病毒的抗性^[28]，*PvWOX15* 与 *LRR* 受体丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (*LRRK*) 存在互作，而 *LRRK* 主要参与体细胞发生的信号传导^[29]，结果暗示这 3 个互作基因可能涉及到光信号传导和细胞壁代谢相关通路。综上所述，*PvWOX1/15/16* 基因可能是潜在的普通菜豆愈伤组织诱导相关的关键基因，可作为进一步构建共表达遗传转化系统建立的靶基因，提高普通菜豆的遗传转化效率和器官再生频率。

4 结论

成功建立了两个普通菜豆品种愈伤组织诱导系统。基于比较转录组分析，涉及愈伤组织诱导相关的基因和转录调节因子主要富集在糖代谢、植物激素信号转导等通路。共鉴定出来源于 11 条染色体的 18 个普通菜豆 *WOX* 基因，具有典型的 HD 和 WUS-box 结构域特征。出愈率与差异表达基因相关性分析，鉴定到 8 个 *WOX* 差异表达基因。其中 3 个 *WOX* 基因与拟南芥 *WOX1/2/3* 同源且聚为一类，结果暗示 *PvWOX1/15/16* 基因的差异表达可能参与调控愈伤组织形成相关基因的表达，从而促进愈伤组织形成。综上所述，本研究鉴定到 3 个普通菜豆 *WOX* 基因与愈伤组织形成相关，可作为潜在的靶基因用以提升普通菜豆愈伤组织发生频率及遗传转化效率。

参考文献

- [1] Elena B, Domenico R, Elisa B, Monica R, Maria L M, Tania G, Debora S, Laura N, Giovanna A, Roberto P. Beans (*Phaseolus* ssp.) as a model for understanding crop evolution. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 722
- [2] McConnell M, Mamidi S, Lee R, Chikara S, Rossi M, Papa R, McClean P. Syntenic relationships among legumes revealed using a gene-based genetic linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 2010,121(6):1103-1116
- [3] Chávez-Mendoza C, Sánchez E. Bioactive compounds from Mexican varieties of the common bean (*Phaseolus vulgaris*): Implications for health. *Molecules*, 2017; 22(8):1360
- [4] Baloglu MC, Celik A Y, Baloglu P, Yildiz AB, Türkölmez N and Özden Ç Y. Gene-editing technologies and applications in legumes: progress, evolution, and future prospects. *Frontiers in Genetics*, 2022, 13:859437
- [5] Phillip M C, Paula C, Bruce H, Jorge S, Roger F. D, Jerry S. Susceptibility of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to agrobacterium infection: transformation of cotyledonary and hypocotyl tissues. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1991, 24: 131-138
- [6] Pacheco R, Estrada-Navarrete G, Solis-Miranda J, Nava N, Juárez-Verdayes M, Ortega-Ortega Y A, Quinto C. Comprehensive, improved protocol for generating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) transgenic hairy roots and their use in reverse-genetics studies. *PLoS ONE*, 2024, 19(2): e0294425
- [7] M. Veltcheva, D. Svetleva, Sp. Petkova, A. Perl. In vitro regeneration and genetic transformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)—problems and progress. *Scientia Horticulturae*, 2005,107(1):2-10
- [8] EISSA E. Genetic transformation of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) calli by biolistic gun and via agrobacterium tumefaciens. *Egyptian Journal of Genetics and Cytology*, 2013, 42(1):1-20
- [9] Yang X Y, and Zhang X L. Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2010, 29(1): 36-57
- [10] Jha P, Ochatt S J. and Kumar V. WUSCHEL: a master regulator in plant growth signaling. *Plant Cell Reports*, 2020, 39:431-444
- [11] Sloan J, Hakenjos J P, Gebert M, Ermakova O, Gumiero A, Stier G, Wild K, Sinning I and Lohmann J U. Structural basis for the complex DNA binding behavior of the plant stem cell regulator WUSCHEL. *Nature Communications*, 2020,11: 2223

- [12] Breuninger H, Rikirsch E, Hermann M, Ueda M, and Laux T. Differential expression of WOX genes mediates apical-basal axis formation in the arabidopsis embryo. *Developmental Cell*, 2008, 14(6): 867-876
- [13] Wang K, Shi L, Liang X N, Zhao P, Wang W X, Liu J X, Chang Y N, Hiei Y, Yanagihara C Z, Du L P, Ishida Y and Ye, X G. The gene TaWOX5 overcomes genotype dependency in wheat genetic transformation. *Nature Plants*, 2022, 8(2), 110-117
- [14] Zhang, X., Zong, J., Liu, J., Yin, J. and Zhang, D. Genome-wide analysis of WOX gene family in rice, sorghum, maize, arabidopsis and poplar. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2010, 52: 1016-1026
- [15] Sarkar AK, 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: 811-814
- [16] Mayer KF, Schoof H, Haecker A, Lenhard M, Jurgens G, Laux T. Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the arabidopsis shoot meristem. *Cell*, 1998, 95: 805-815
- [17] Nardmann J, Zimmermann R, Durantini D, Kranz E, Werr W. WOX gene phylogeny in Poaceae: A comparative approach addressing leaf and embryo development. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24: 2474-2484
- [18] Zhao Y, Hu Y, Dai M, Huang L, Zhou D. The WUSCHEL-related homeobox gene WOX11 is required to activate shoot-borne crown root development in rice. *Plant Cell*, 2009, 21: 736-748
- [19] Kamiya N, Nagasaki H, Morikami A, Sato Y, Matsuoka M. Isolation and characterization of a rice WUSCHEL-type homeobox gene that is specifically expressed in the central cells of a quiescent center in the root apical meristem. *The Plant Journal*, 2003,35: 429-441
- [20] Wu J, Wang L F, Fu J J, Chen J B, Wei S H, Zhang S L, Zhang J, Tang Y S, Chen M L, Zhu J F, Lei L, Geng Q H, Liu C L, Wu L, Li X M, Wang X L, Wang Q, Wang Z L, Xing SL, Zhang H K, Blair M W, Wang S M. Resequencing of 683 common bean genotypes identifies yield component trait associations across a north-south cline. *Nature Genetics*, 2020, 52, 118-125
- [21] Cortinovis G, Vincenzi L, Anderson R, Marturano G, Marsh J I, Bayer P E, Rocchetti L, Frascarelli G, Lanzavecchia G, Pieri A, Benazzo A, Bellucci E, Di Vittori V, Nanni L, Ferreira Fernández J J, Rossato M, Aguilar O M, Morrell P L, Rodriguez M, Gioia T, Neumann K, Alvarez Diaz J C, Gratiás A, Klopp C, Bitocchi E, Geoffroy V, Delledonne M, Edwards D, Papa R. Adaptive gene loss in the common bean pan-genome during range expansion and domestication. *Nature Communications*, 2024,15(1):6698
- [22] Jia K, Li G, Wang L, Liu M, Wang Z, Li R, Li L, Xie K, Yang Y, Tian R, Chen X, Si Y, Zhang X, Song F, Li L, Li N. Telomere-to-telomere, gap-free genome of mung bean (*Vigna radiata*) provides insights into domestication under structural variation. *Horticulture Research*, 2024;uhae337
- [23] Zhang C, Xie L, Yu H, Wang J, Chen Q, Wang H. The T2T genome assembly of soybean cultivar ZH13 and its epigenetic landscapes. *Molecular Plant*, 2023,16(11):1715-1718
- [24] Yang Y, Liu CF, Yu Y, Ran GP, Zhai N, Pi LM. WUSCHEL RELATED HOMEBOX5 and 7 maintain callus development by promoting cell division in Arabidopsis, *Plant Science*, 2024, 346:112-133
- [25] Tvorogova VE., Fedorova YA., Potsenkovskaya EA., Kudriashov AA., Efremova EP., Kvitkovskaya VA., Wolabu TW., Zhang F, Tadege M., Lutova LA. The WUSCHEL-related homeobox transcription factor *MtWOX9-1* stimulates somatic embryogenesis in *Medicago truncatula*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2019, 138(3): 517-527
- [26] Park JS, Choi Y, Jeong MG, Jeong YI, Han JH and Choi HK. Uncovering transcriptional reprogramming during callus development in soybean: insights and implications. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14: 1239917
- [27] Eri O, Yuji T, Takuji S, Masahiro Y, Takeshi I. The role of casein kinase II in flowering time regulation has diversified during evolution. *Plant Physiology*, 2010, 152(2): 808-820
- [28] Dai SH, Wei XP, Alfonso AA., Pei, LP, Duque UG, Zhang ZH, Babb GM, Beachy RN. Transgenic rice plants that overexpress transcription factors RF2a and RF2b are tolerant to rice tungro virus replication and disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 2008,105(52): 21012- 21016
- [29] de Oliveira SM, Romano E, Yotoko KSC, Tinoco MLP, Dias Bárbara BA, Aragão FJL. Characterization of the cacao somatic embryogenesis receptor-like kinase (*SERK*) gene expressed during somatic embryogenesis. *Plant Science*, 2005, 168(3): 723-729

