

花生两种不同分化类型愈伤组织的差异表达基因分析

吴日连^{1,2}, 上官小霞¹, 吴翠翠¹, 夏芝¹, 张晓玲¹, 李换丽¹, 兰刚¹, 潘转霞¹, 侯保国¹, 吕贝贝¹, 李朋波¹

(¹山西农业大学棉花研究所, 运城 044000; ²山西农业大学农学院, 晋中 030800)

摘要: 组织培养是开展花生 (*Arachis hypogaea* L.) 遗传转化的重要环节, 然而, 花生胚性愈伤组织的分化受到基因型限制。本研究在花生遗传转化体系的建立过程中, 从 9 份种质资源中筛选出愈伤分化能力强的品种漯花 22 号, 并对漯花 22 号分化过程中的 T1 型愈伤 (易分化成苗的胚性愈伤)、T2 型愈伤 (难分化成苗的非胚性愈伤) 进行转录组测序分析 (以分化 0 d 的愈伤为对照, CK)。与 CK 相比, T1、T2 型愈伤中分别具有 1792 和 868 个差异表达基因 (DEGs, Differentially expressed genes)。GO 功能富集分析表明, T1 型的 DEGs 主要富集在分生组织和干细胞群维持等通路; T2 型的 DEGs 主要富集在苯丙烷生物合成和代谢途径等通路。蛋白质家族分析显示, T1、T2 型的 DEGs 包含 2459 个蛋白质编码基因, 其中细胞色素 P450 家族显著富集。通过蛋白质-蛋白质互作网络 (PPI, Protein-Protein Interaction) 分析, 挖掘到 5 个枢纽基因 *AhAE3ZZG*、*AhP17M1H*、*AhA6R79F*、*AhZFZ3ZQ* 和 *AhHMN99B*, 这些基因可能在促进花生胚性愈伤组织分化过程中起重要作用。本研究结果将为进一步探究影响花生胚性愈伤组织分化过程中的关键基因、解析花生愈伤分化形成再生植株的分子机理提供科学依据。

关键词: 花生; 子叶节; 愈伤分化; RNA-Seq; 蛋白基因

Transcriptome Analysis of Embryonic and Non-embryonic

Callus of Peanut

WU Rilian^{1,2}, SHANG-GUAN Xiaoxia¹, WU Cuicui¹, XIA Zhi¹, ZHANG Xiaoling¹, LI Huanli¹,
LAN Gang¹, PAN Zhuangxia¹, HOU Baoguo¹, LYU Beibei¹, LI Pengbo¹

(¹ Institute of Cotton Research, Shanxi Agricultural University, Yuncheng 044000, ² College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030800)

Abstract: Peanut (*Arachis hypogaea* L.) is the fourth largest oil crop in the world. Tissue culture is an important procedure in genetic transformation of peanut. However, the differentiation of peanut callus is restricted by genotype. In this study, Luohua 22, a cultivar with strong callus differentiation ability, was screened from 9 germplasm resources through establishing a peanut genetic transformation system. Transcription sequencing analyses were carried out using T1 callus (embryogenic callus prone to differentiate into seedlings), T2 callus (non-embryogenic callus difficult to differentiate into seedlings) during the differentiation process of Luohua 22, and callus at 0 day of differentiation was set as control (CK). Compared with CK, there were 1792 and 868 differentially expressed genes (DEGs) in T1 and T2 types of callus, respectively. The GO functional enrichment analysis showed that the DEGs in T1 type of callus were mainly enriched in the pathways of meristematic organization and stem cell population maintenance, while those in T2 type of callus were mainly enriched in the pathways of phenylpropane biosynthesis and metabolic pathway. Protein family analysis showed that DEGs in T1 and T2 type callus contained 2459 TFs, among which the cytochrome P450 family was significantly enriched.

收稿日期: 2025-01-18

网络出版日期:

URL:

第一作者研究方向为花生遗传育种, Email: wurilian5429@163.com

通信作者: 李朋波, 研究方向为作物遗传育种, Email: lipengbo@sxau.edu.cn

项目基金: 山西省科技重大专项揭榜挂帅项目 (202201140601025-4-03); 山西农业大学科技创新提升工程项目 (CXGC2023054); 山西农业大学棉花研究所博士基金项目 (SBSJJ2023-02)

Foundation projects: 'Leading the Charge with Open Competition' project of Shanxi Provincial Major Science and Technology programs (202201140601025-4-03); Technology innovation enhancement project of Shanxi Agricultural University (CXGC2023054); Doctoral fund project of institute of cotton research, Shanxi Agricultural University (SBSJJ2023-02)

By Protein-protein interaction network (PPI) analysis, five key genes, i.e., *AhAE3ZZG*, *AhP17M1H*, *AhA6R79F*, *AhZFZ3ZQ* and *AhHMN99B*, were mined, which might play important roles in promoting peanut callus differentiation. The results of this study would provide a scientific basis for further exploring the key genes affecting the differentiation process of peanut cotyledon node callus, and the subsequent analysis of the molecular mechanism of peanut callus differentiation to form regenerated plants.

Keywords: peanut; cotyledon node; callus differentiation; RNA-Seq; protein genes

花生 (*Arachis hypogaea* L.) 是重要的油料和蛋白质来源作物, 广泛用于食油、饲料、工业等领域^[1]。利用基因工程技术创制花生新型种质已经成为当下改良花生品种的重要手段。基因工程育种的关键在于高效遗传转化体系的建立, 采用组织培养为基础的农杆菌转化法是植物遗传转化的常用技术, 但组织培养过程常常受到植物基因型的影响。在大豆、木豆和鹰嘴豆等豆科作物基因编辑和遗传转化研究中发现, 只有部分特定品种再生能力和转化效率较高^[2-3]。在籼稻组织培养过程中发现, 不同基因型的愈伤组织褐变程度不同^[4]。玉米幼胚和陆地棉愈伤组织再生能力研究表明基因型是影响二者再生能力的关键因素^[5-6]。因此, 在单子叶和双子叶植物的遗传转化研究中, 大部分种质的基因型难以获得再生植株是一个普遍现象。在花生基因工程改良过程中, 也存在受基因型限制导致愈伤组织分化困难的问题^[7], 这极大限制了遗传转化和基因编辑手段开展花生分子遗传育种工作^[8]。

愈伤组织可分为胚性愈伤组织和非胚性愈伤组织两大类, 胚性愈伤组织是排列紧密, 具备较强胚胎发生潜能的细胞团, 这些细胞可再生成完整的植株。非胚性愈伤组织是一类不具备胚胎发生潜能的愈伤组织^[9]。植物组织培养过程中, 基因型、组培条件相同情况下生成了胚性愈伤组织与非胚性愈伤组织两种不同愈伤组织^[10]。植物分生组织的生长需要干细胞的参与。多功能干细胞是缓慢分裂的细胞, 在组织培养中, 可诱导愈伤分化成新的植株, 表观遗传调控、调节因子和植物激素信号等在植物分生组织和干细胞的发育、启动、保持和分化方向中起着至关重要的作用^[11]。研究表明, 众多调节因子直接或间接调控植物愈伤组织分化, 植物生长因子 AP2/ERF 家族具有调控植物胚胎发育、促进细胞增殖分化的功能, 可加快愈伤组织生长^[12]; 研究发现 *BABY BOOM (BBM)* 和 *WOX* 基因分别是影响棉花和玉米愈伤组织再生的关键基因^[6,13]; 在拟南芥中发现, 生长素响应因子 *ARF3* 可以通过抑制 *WUS* 基因的表达, 进而调控茎尖分生组织干细胞的发育^[14]; *LBD* 转录因子家族基因可能调控了玉米愈伤组织的形成^[15]。一些功能基因在愈伤组织的再生过程中起着重要的作用。*WRKY* 和 *bHLH* 等在棉花和小麦愈伤组织中显著富集, 揭示这些转录因子可能与棉花和小麦愈伤再生的调控有关^[16-17]。植物激素相关的转录因子是影响愈伤分化的重要因素。*yingKNOX* 的表达与细胞分裂素相关, *PeKNOXs* 参与了生长素的合成, 最终影响了植物细胞的分裂和伸长^[18]; 细胞色素 P450 (*CYP450*) 家族与植物生长激素相关, 是最大的酶蛋白家族^[19], *CYP76* 家族是 P450 家族的一员, 参与次生代谢物的生物合成, 含茉莉酸和光响应相关的元件^[20]; 生长素释放因子 *GRF* 被证实对小麦愈伤再生效率有促进作用^[21]。综上所述, 植物愈伤组织的分化过程受 AP2、P450 和 HLH 等多种相关通路中的转录因子家族调控。

目前,已有花生组织培养的相关报道,但其功能基因组学的研究还比较落后,关于花生愈伤组织分化机理的的相关报道较少^[1]。本研究在建立花生子叶节组织培养体系的过程中,筛选出了花生容易分化成苗的基因型,并进一步对易分化花生种质的不同愈伤组织进行转录组测序分析,旨在揭示花生子叶节愈伤组织分化的关键调控基因,为提升花生遗传转化效率提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选取漯花 22 号、花育 6313、花育 6808、皖花 18 号、豫花 174、汾花 8 号、晋花 10 号、鲁花 11、品质 P17-12 等共 9 个黄淮花生产区育成品种(系)为实验材料,以常用的组培品种白沙 1016 作为对照^[22],从中筛选容易分化的种质,用于愈伤生长表型鉴定和转录组分析。

1.2 组培与种质筛选

花生组织培养配方参照卢春生^[8]的报道。具体方法如下:挑选大小均匀、无病虫害、无污染、无破损的种子,在超净工作台上用 75%酒精消毒 2 min,再加入 30% H_2O_2 溶液进行消毒 30 min,无菌水清洗 5 次,倒入无菌水浸泡 20~22 h,获得无菌花生种子。将获得的无菌种子剥去种皮,置于发芽培养基(MS+2 mg/L 6-BA+30 g/L 蔗糖+7.5 g/L 琼脂)上,温度 28℃,黑暗条件下催芽 4 d 获得无菌苗。取胚根与胚轴总长为 3 cm 左右的无菌苗放于无菌培养皿,以子叶与胚轴的连接处为基准点进行切割,向下保留 3 mm 胚轴,向上保留 5 mm 子叶,垂直于连接点从两瓣子叶中间分割,去掉生长点获得子叶节。子叶节放置在愈伤诱导培养基(MS+4 mg/L 6-BA+0.5mg/L NAA+1 mg/L 2,4-D+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂)上诱导愈伤,每 14 d 继代培养一次,并适当分割愈伤组织,增加其接触培养基的面积,28 d 对具有不定芽的愈伤组织进行统计,42 d 后将愈伤组织转至分化培养基(MS+1 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA+30 g/L 蔗糖+8 g/L 琼脂)继续生长,56 d 对成苗的愈伤组织进行统计。将获得的再生苗放置在生根培养基(1/2 MS+0.2 mg/L NAA+30 g/L 蔗糖+7.5 g/L 琼脂)诱导生根 21 d,统计再生苗生根数。以上实验设置 3 次重复,利用 Excel 和 SPSS19.0 软件进行数据统计及分析,多重比较采用邓肯检验(Duncan's test)进行显著性分析。各统计参数计算公式如下:

愈伤组织分化率 = 分化出不定芽的愈伤组织个数/接种愈伤组织个数 $\times 100\%$

愈伤组织成苗率 = 成苗愈伤组织个数/接种愈伤组织个数 $\times 100\%$

再生苗生根率 = 生根植株个数/接种再生苗个数 $\times 100\%$

1.3 花生愈伤材料制备

以组培体系筛选出的漯花 22 号花生为实验材料,子叶节愈伤组织在分化培养基上培养 6~8 周,根据愈伤分化状态分为 2 种类型,T1 型愈伤为胚性愈伤,能分化成苗的愈伤,T2 型愈伤为非胚性愈伤,难分化成

苗的愈伤。以分化 0 d 的愈伤作为对照 (CK)，设置 2 次生物学重复，对花生子叶节诱导的 T1 和 T2 型愈伤及 CK 分别进行取样，用液氮速冻并于 -80℃ 保存备用。

1.4 RNA 提取和转录组数据分析

使用天根生化科技有限公司的 RNAPrep Pure 试剂盒提取花生愈伤组织总 RNA，利用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳 15 min 检测提取 RNA 的完整性，NanoDrop 2000c 型分光光度计检测 RNA 的质量和浓度。合格的 RNA 反转录后构建 cDNA 文库，使用二代测序仪 Illumina NovaSeq6000 进行双末端转录组测序，由北京诺禾致源科技股份有限公司完成。从 Ensembl Plants 数据库 (<https://plants.ensembl.org/>) 下载花生参考基因组序列。编写 Python 脚本筛选出目标基因的蛋白质序列进行后续分析。使用 FastQC 软件 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/>) 对测序数据的碱基质量和 GC 含量等进行评估，使用 Trimmomatic (v0.36) 软件对测序数据进行截断和过滤。用软件 STAR (v2.5.3.a) 构建花生参考基因组的索引文件，将过滤后的片段比对到花生参考基因组^[23]，比对模式为 End To End，2-pass mapping。使用 R 包 FactoMineR 对表达矩阵进行主成分分析 (principal component analysis, PCA)，并使用 R 包 ggplot2 进行可视化。使用 R 包 DESeq2 对数据进行差异表达基因 (DEGs) 分析，DEGs 的设定阈值为 $|\text{ADS}(\log_2 \text{Fold Change})| \geq 1.5$ ，矫正过后的 FDR (false discovery rate) < 0.05。使用 R 包 Mfuzz 将 DEGs 的 FPKM 值进行转录组的时序分析。

1.5 GO 和 KEGG 分析

使用 eggNOG-mapper 数据库 (<http://eggno-mapper.embl.de/>) 对本研究所涉及的基因进行 GO 和 KEGG 功能注释，使用 R 语言进行统计和可视化。

1.6 蛋白质家族聚类与互作网络 (PPI) 分析

通过 eggNOG-mapper 数据库 (<http://eggno-mapper.embl.de/>) 对 DEGs 进行蛋白家族聚类分析，基于数据库 AraNet2 (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>)，对 DEGs 的蛋白质-蛋白质互作网络 (Protein-protein interaction network, PPI) 进行预测，使用 R 包 ggraph 对蛋白家族及其潜在枢纽基因的调控网络进行可视化。

1.7 qRT-PCR 验证

在转录组测序分析的基础上，选取 7 个 DEGs 进行 qRT-PCR 分析，验证转录组数据的可靠性。以 $\beta\text{-Actin}$ 为内源基因对照^[24]，使用 Primer3.0 设计引物 (表 1)。反应体系中包含 2.0 μL cDNA、5 μL 2 $\times$ SYBR qPCR Master Mix、0.5 μL 的正、反向引物，加 ddH₂O 至 10.0 μL 混合。每个反应设 3 个生物学重复，3 次技术重复。通过 Bio-Rad CFX Maestro 进行实时荧光定量 PCR，使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因相对表达量，并用 GraphPad Prism 8 软件进行绘图分析，分析结果与测序结果进行对比检验转录组数据的可靠性。

表 1 本文所用引物

Table 1 Primers used for qRT-PCR

基因	正向引物序列 (5'→3')	反向引物序列 (5'→3')	退火温度℃
Genes	Forward primers (5'→3')	Reverse primers (5'→3')	Tm
<i>AhAE3ZZG</i>	AGAGAGCTGAGAGCCGCA	AGCGAGTCCAAAAAGGCCA	59.5
<i>AhPI7M1H</i>	CACATTGGTCAGGCCGGT	CGGTGTGGTCACTTGGCA	59.0
<i>AhA6R79F</i>	GGCGATGTTGTGCCGAAA	CGCAAGATCACCTCCCGG	59.5
<i>AhHMN99B</i>	TTCATGCAGGGATGCGCA	CCACGCCATCTGGGATCC	59.4
<i>AhZfZ3ZQ</i>	AGCGTGCAATTCGTCCACT	TGGCCGCTTTCTTCGTCT	59.2
<i>AhFN3HAQ</i>	TTCAGCGCATGGAGTCCC	GGTCCTCTGCTTGCGGAT	58.2
<i>AhXL9HTS</i>	CTGTGCTTTGTGATGCTGAGG	AGGTGTCCTGGAGCTAGCA	58.5
<i>β-Actin</i>	CAGGATTGCGCGTGATGATG	TCTGTTGGCCTTCGGGTTGAG	60.3

2 结果与分析

2.1 易分化种质筛选

通过组培筛选发现，在 9 个供试品种中，有 5 个品种的愈伤组织分化率高于对照品种白沙 1016，分别是漯花 22 号、花育 6313、汾花 8 号、豫花 174 和皖花 18 号。其中，漯花 22 号的愈伤组织分化率最高，其与对照品种的愈伤分化率存在显著差异；愈伤组织分化率低于对照的 4 个品种分别是鲁花 11 号、花育 6808、品质 P17-12 和晋花 10，这些品种的愈伤组织再生较困难，不适宜作为花生组织培养的来源材料。此外，有 3 个品种的外植体愈伤组织成苗率高于对照白沙 1016，其中，漯花 22 号的成苗率显著高于对照品种。在 9 个供试品种中，再生苗的生根率与对照品种之间无显著差异。通过以上试验，发现在 9 个供试花生品种中，漯花 22 号是最容易获得愈伤再生和成苗的种质材料（表 2），可用于花生组培遗传转化和功能基因研究。

表 2 不同花生品种愈伤分化表现

Table 2 Performance of different peanut varieties in healing differentiation.

品种名称	愈伤组织分化率(%)	愈伤组织成苗率(%)	再生苗生根率(%)
Name of accession	Callus differentiation rate	Callus seedling formation rate	Rooting rate of regenerated seedlings
漯花 22 号	36.07±7.17a	7.24±1.72a	69.03±2.36ab
花育 6313	27.56±11.01ab	1.91±1.5bc	67.41±13.46ab
汾花 8 号	25.18±3.67abc	4.16±1.65b	70.00±4.71ab
豫花 174	20.49±4.64bc	1.60±0.69bc	81.27±0.88a
皖花 18 号	19.45±1.99bc	3.51±1.99bc	71.04±3.24ab
鲁花 11 号	13.41±3.79bc	3.14±1.71bc	65.80±3.50ab
花育 6808	12.37±14.58bc	0.46±0.65c	67.18±13.14ab
品质 P17-12	11.94±9.91bc	2.06±0.58bc	73.38±7.35ab
晋花 10 号	11.88±8.68c	1.26±0.5bc	61.31±4.21b
白沙 1016 (CK)	18.91±1.66bc	2.67±0.54bc	69.45±3.93ab

不同小写字母表示不同花生品种间分化、成苗和生根在 0.05 水平的差异显著性

Different lowercase letters indicate significant differences in differentiation, seedling formation and rooting among different peanut varieties at 0.05 level

2.2 不同愈伤组织转录组测序

以本研究获得的易分化种质漯花 22 号为试验材料，研究中发现，在相同组培条件下，子叶节愈伤组织常常分化出形态差异明显的愈伤组织。从愈伤培养基转至分化培养基诱导分化（分化 0 d 愈伤，设为 CK，图 1A），生长 6~8 周后生成 2 种不同的愈伤形态，即 T1 型和 T2 型愈伤。T1 型愈伤组织生长状态较好，有浅绿色凸起点，随着愈伤的发育，凸起点颜色逐渐变深，能够分化出不定芽，最终能形成完整的植株（图 1B）；T2 型愈伤组织呈水渍化，愈伤颜色以白色为主，表层嵌合有淡褐色组织，最终变成分化能力差的水渍化或褐化的愈伤组织，难以形成再生植株（图 1C）。



A
花生子叶节在 MS 培养基中诱导愈伤分化；A:分化 0 d 的愈伤（CK）； B: T1 型愈伤； C: T2 型愈伤；
Peanut cotyledonary nodes in MS medium to induce callus differentiation; A: Callus at 0 day of differentiation (CK);
B: T1-type callus; C: T2-type callus;

图 1 漯花 22 号子叶节愈伤组织分化类型

Fig. 1 Types of cotyledonary node callus differentiation in Luohua 22

进一步取不同类型愈伤组织进行 RNA 测序并进行转录组数据分析。切除接头序列和低质量的测序片段，每个样品平均测序碱基量为 6 GB，获得的待分析的片段数量为 22061840–29190445 条，样品的总比对效率范围是 96.34%–98.00%，GC 含量>43%（表 3），表明转录组数据具有较高的质量。对 3 组样品转录组数据进行主成分分析（PCA, principal component analysis），结果显示 3 组样品（“CK”，“T1”和“T2”）在 PC2 方向分别呈现逐渐聚拢的趋势，其中 T1 聚拢趋势最为明显（图 2A）。对基因表达矩阵进行 Pearson 相关性分析，结果显示，2 个生物学重复样本内存在显著的相关性（相关性系数>0.85），说明在本研究中不同取样重复间转录组具有高度重现性（图 2B）。

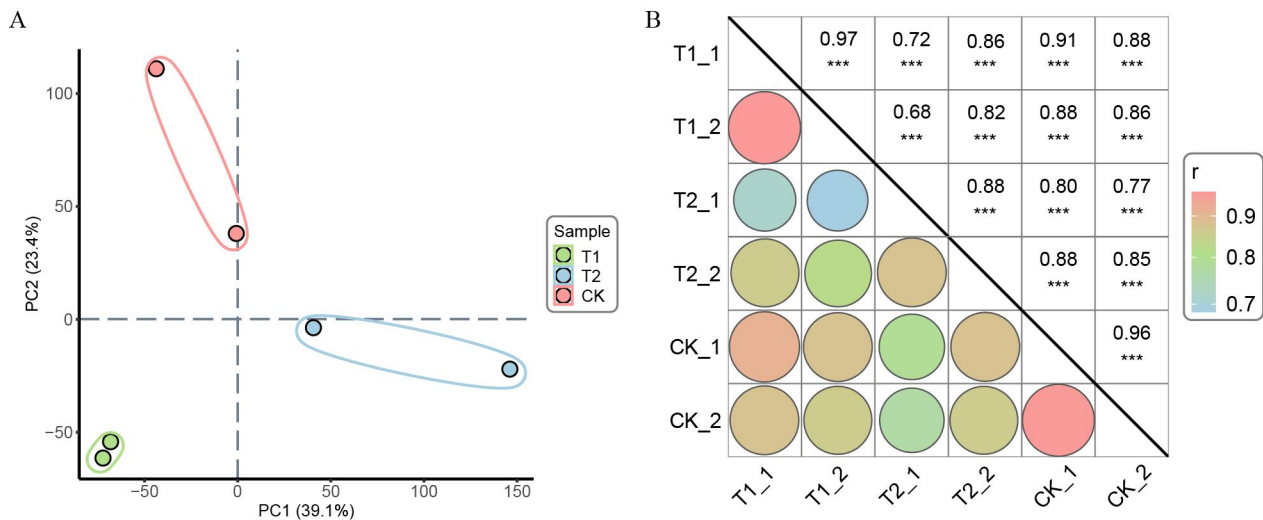
表 3 转录组数据质量统计

Table 3 Transcriptome Data Quality Statistics

测序样品	原始读数	有效数据读数	GC 含量(%)	总比对率(%)
Sample	Raw reads	Valid reads	GC content	Total mapping
T1-1	29389577	29190445	44	97.29
T1-2	28017876	27827331	44	98.00
T2-1	29060897	28879882	43	96.34
T2-2	26587489	26414541	44	97.54
CK-1	26023778	25855092	44	96.80
CK-2	22216695	22061840	44	97.46

T1-1、T1-2 代表 T1 型愈伤的 2 个生物学重复；T2-1、T2-2 代表 T2 型愈伤的 2 个生物学重复；CK-1、CK-2 代表分化 0 d 愈伤的 2 个生物学重复

T1-1, T1-2 represent 2 biological replicates of T1-type callus; T2-1, T2-2 represent 2 biological replicates of T2-type callus; CK-1, CK-2 represent 2 biological replicates of callus at 0 days of differentiation



A:主成分分析 (PCA) ; B:基因表达分布的分散热图

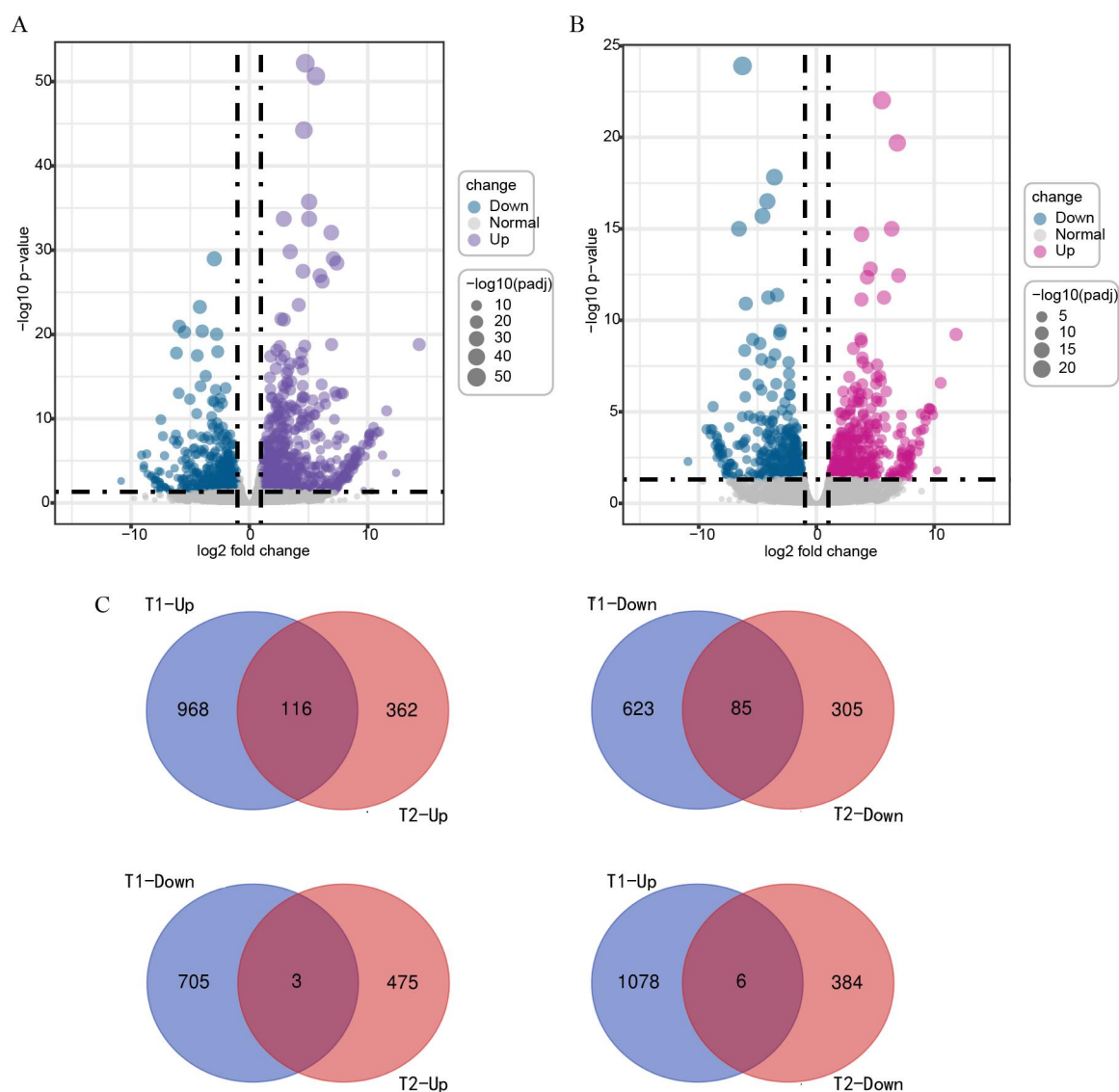
A: Principal Component Analysis (PCA) ; B: Dispersion heat map of gene expression distribution

图 2 样本数据相关性分析

Fig. 2 Correlation analysis of sample data

2.3 花生愈伤形成相关 DEGs 分析

利用 R 包 DESeq2 对 CK、T1 和 T2 型愈伤中转录本表达量进行分析，探究花生子叶节愈伤组织分化过程中基因的表达情况。结果显示，愈伤组织中上调的差异表达基因多于下调的基因；其中，T1 型愈伤组织中上、下调差异表达基因分别有 1084 和 708 个（图 3A），T2 型愈伤中上、下调差异表达基因分别有 478 和 390 个（图 3B）。从韦恩图分析可知，T1、T2 分别特有的上调基因为 968 个和 362 个，T1、T2 特有的下调基因分别有 623 个和 305 个；此外，有 6 个 DEGs 基因分别在 T1 上调、T2 下调，有 3 个 DEGs 基因分别在 T1 下调、T2 上调（图 3C）。由此可知，T1 型愈伤特有的 968 个差异基因可能促进了花生子叶节愈伤组织的发育正常，最终形成完整的植株；T2 型愈伤特有的 362 个差异表达基因可能与其愈伤组织的水渍化和褐化过程有关。T1 下调和 T2 上调 DEGs 间有 3 个共有基因，这些基因在 T1 型愈伤中下调可能具有缓解其对分化成苗的抑制作用，而在 T2 型愈伤中上调可能诱发花生子叶节愈伤发育为水渍化和褐化细胞组织，最终不能分化成苗。T1 上调和 T2 下调 DEGs 间有 6 个共有基因，其在 T1 型愈伤中上调表达可能起到促进分化成苗的作用，而在 T2 型愈伤中由于表达下调，不利于花生子叶节的分化成苗。



A、B：差异表达基因火山图；C 差异表达基因韦恩图

A, B: Differentially expressed genes detected by volcano plots; C: Differentially expressed genes detected by Wayne plots

图 3 不同愈伤分化差异表达基因数目统计

Fig. 3 Statistics on the number of differentially expressed genes for different callus differentiation

2.4 花生愈伤的 GO 功能富集分析

通过 GO 方法分析 DEGs，进一步筛选影响花生愈伤分化的候选基因。结果发现：T1 型愈伤上、下调 DEGs 富集的通路分别有 75 个和 62 个，T2 型愈伤上、下调 DEGs 富集的通路分别有 57 个和 35 个。将排在前 20 位的通路绘制 GO 通路图，综合两种类型愈伤通路发现，GO 富集到的 DEGs，主要参与生理过程中的生物调节和代谢过程，生物分子结合和信号激活，细胞组分和细胞发育等 3 大类通路（图 4）。T1 型愈伤上调 DEGs 主要富集的前 2 个通路分别是分生组织维持和干细胞群维持（图 4A），这些通路是 T1 型愈伤形成的关键通路。T2 型愈伤上调 DEGs 主要富集的前 2 个通路分别是苯丙烷生物合成和代谢过程（图 4C），表明苯丙烷代谢通路可能与花生子叶节愈伤组织水渍化或褐化有关。

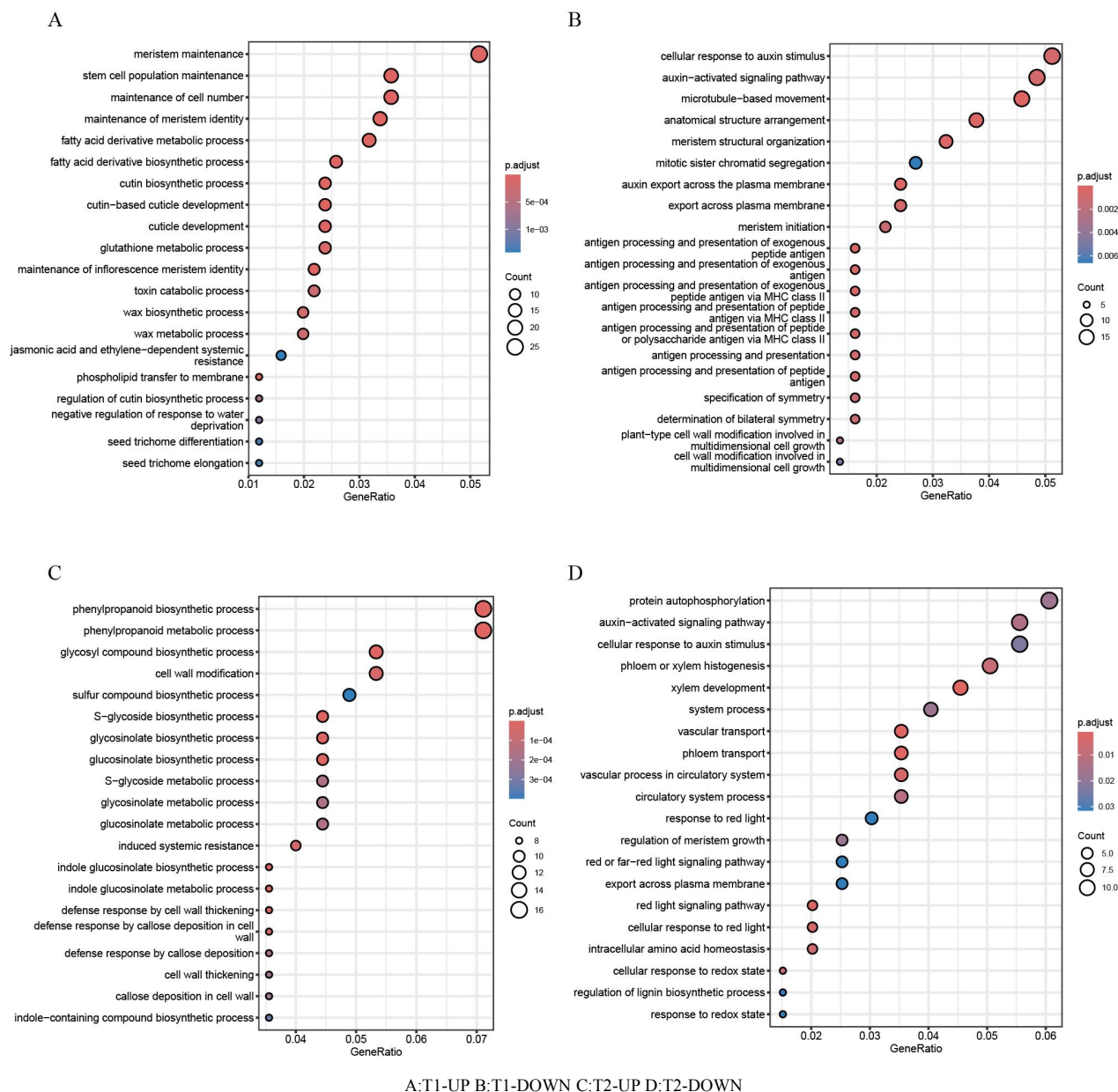


图 4 差异基因的 GO 通路注释和富集

Fig. 4 GO pathway annotation and enrichment of differential genes

在 GO 注释中分生组织维持通路富集的 DEGs 最多，干细胞群维持通路位居第二，说明分生组织维持和干细胞生长发育在花生愈伤组织分化过程中发挥重要作用。本研究通过对分生组织维持和干细胞群维持两个通路富集的上调 DEGs 进行分析，发现植物生长发育因子 MADS-box 基因家族有 8 个 DEGs 上调表达，AP2、KNOX 和 ARF 基因家族注释的 DEGs 有 1 个 DEGs 上调表达（表 4），表明有大量的 MADS-box 基因家族参与了花生愈伤分生组织和干细胞的分化过程，AP2、同源框蛋白、生长素响应因子等基因家族在这一过程中也起了重要作用。

表 4 分生组织维持和干细胞全能性维持相关 DEGs

Table 4 DEGs related to meristem maintenance and stem cell totipotency

基因编号	上调/下调	基因名称	注释
------	-------	------	----

Genes ID	Up/down	Genes name	Annotation
<i>Ah679QY2</i>	Up	<i>SOC1</i>	MADS-box protein
<i>AhH2N64Y</i>	Up	<i>SOC1</i>	MADS-box protein
<i>AhXL9HTS</i>	Up	<i>SOC1</i>	MADS-box protein
<i>AhP3T58Z</i>	Up	<i>SOC1</i>	MADS-box protein
<i>Ah679QY2</i>	Up	<i>SOC1</i>	MADS-box protein
<i>AhXL9HTS</i>	Up	<i>SOC1</i>	MADS-box protein
<i>AhP3T58Z</i>	Up	<i>SOC1</i>	MADS-box protein
<i>AhH2N64Y</i>	Up	<i>SOC1</i>	MADS-box protein
<i>AhN9UN2I</i>	Up	<i>AP2</i>	Floral homeotic protein APETALA
<i>AhFN3HAQ</i>	Up	<i>KNOX1, KNOX2</i>	homeobox protein
<i>AhA1HLZR</i>	Up	<i>ARF3</i>	Auxin response factors (ARFs)

为了进一步明确影响花生愈伤分化的候选基因，深入分析了 T1 和 T2 型愈伤的 DEGs。结果发现，在 T1 型愈伤中，生长调节因子（GRF, Growth Regulating Factor）和半胱氨酸的肽类激素（EPF, EPIDERMAL PATTERNING FACTOR）只有 1 个基因表达上调，侧生器官转录因子（LBD, Lateral organ boundaries domain）有 2 个基因表达上调；转录因子 MYB 家族中注释的 DEGs 有 3 个上调表达、1 个下调表达；WRKY 家族注释的 DEGs 有 5 个上调表达、3 个下调表达；赤霉素调控的 GASA 基因家族注释的 DEGs 有 4 个上调表达。苯丙类的生物合成会加速愈伤褐化，在 T2 型愈伤中，与苯丙类物质合成相关的 4-香豆酸辅酶 A 连接酶（4CL, 4-coumarate: coenzyme A ligase）中有 2 个 DEGs 上调表达、1 个 DEGs 下调表达（表 5）。通过上述分析，说明了 GRF、EPF、MYB、WRKY 和 GASA 等多个转录因子均参与了调控花生愈伤组织分化这一复杂的生物学过程。

表 5 愈伤形成相关 DEGs

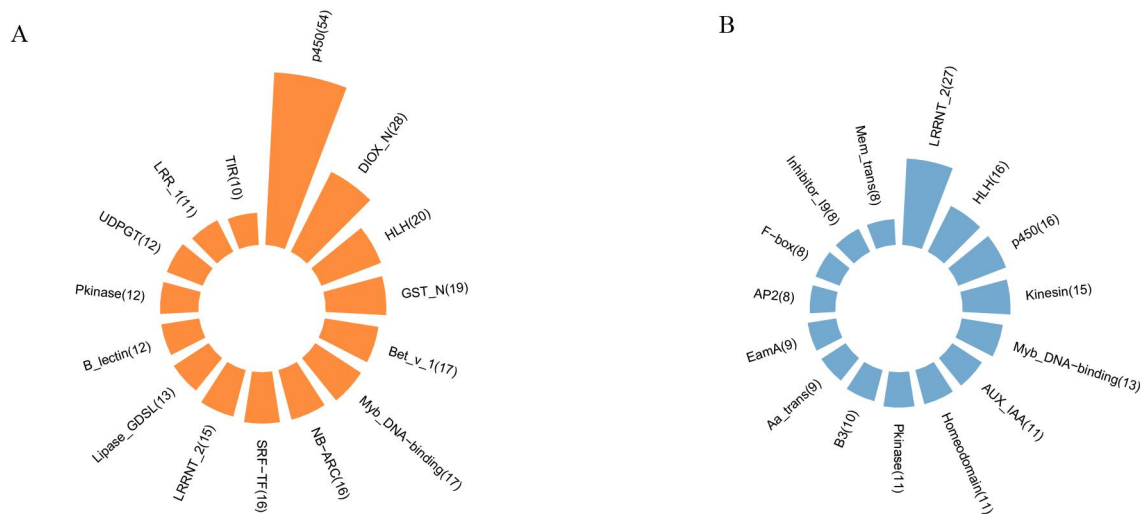
Table 5 DEGs associated with callus formation

基因编号	上调/下调	基因名称	注释
Genes ID	Up/down	Genes name	Annotation
<i>AhHK1F5C</i>	Up	<i>GRF1</i>	GRF1-interacting factor
<i>Ah79G9YV</i>	Up	<i>EPF</i>	EPIDERMAL PATTERNING FACTOR-like protein
<i>AhB5LLG6</i>	Up	<i>SMP_LBD</i>	Synaptotagmin-like mitochondrial-lipid-binding domain
<i>AhW7YV9U</i>	Up	<i>SMP_LBD</i>	Synaptotagmin-like mitochondrial-lipid-binding domain
<i>AhSI8X9Q</i>	Up	<i>GLK2</i>	transcription
<i>Ah4F3XVH</i>	Down	<i>PTL</i>	Trihelix transcription factor
<i>AhGDT5AY</i>	Up	<i>MYB108</i>	Transcription factor
<i>AhA9PKKK</i>	Up	<i>GLK2</i>	transcription
<i>AhJ0NZC0</i>	Up	<i>WRKY54</i>	WRKY transcription factor
<i>AhTET6YL</i>	Down	<i>WRKY13</i>	WRKY transcription factor
<i>Ah550C4N</i>	Up	<i>WRKY72</i>	WRKY transcription factor
<i>Ah77CZVH</i>	Up	<i>WRKY</i>	WRKY transcription factor
<i>AhK37UFQ</i>	Down	<i>WRKY20</i>	WRKY transcription factor
<i>Ah2G4BRW</i>	Up	<i>WRKY54</i>	WRKY transcription factor

<i>AhMYRR9C</i>	Up	<i>WRKY</i>	WRKY transcription factor
<i>AhKL0M69</i>	Down	<i>WRKY13</i>	WRKY transcription factor
<i>AhYB2114</i>	Up	<i>GASA</i>	Gibberellin regulated protein
<i>AhHQ8G2J</i>	Up	<i>GASA</i>	Gibberellin-regulated protein
<i>AhVES4LD</i>	Up	<i>GASA</i>	Gibberellin regulated protein
<i>AhRUJ0QA</i>	Up	<i>GASA</i>	Gibberellin regulated protein
<i>Ah35X8AA</i>	Down	<i>4CL1</i>	4-coumarate-coa ligase
<i>AhST1ALI</i>	Up	<i>4CL1</i>	4-coumarate-coa ligase
<i>AhNC09XL</i>	Up	<i>4CL1</i>	4-coumarate-coa ligase

2.5 愈伤形成相关 DEGs 蛋白质家族分析

蛋白酶和转录因子等在细胞分化和发育过程中扮演着重要调控角色，本研究从两种类型的愈伤共筛选出 2660 个 DEGs 进行蛋白质家族聚类分析，结果表明：2660 个 DEGs 中共有 2459 个蛋白质基因，其中 1446 个蛋白质基因上调表达，1013 个蛋白质基因下调表达（图 5）。上下调基因家族中共有的蛋白质家族主要包含了细胞色素 P450、螺旋—环—螺旋蛋白质（HLH）和 MYB-DNA 结合域等，三个家族中上调蛋白质基因多于下调蛋白质基因，这表明 T1、T2 型愈伤形成过程中 P450、HLH 和 MYB 等蛋白质家族起到了重要的影响作用。



A:上调表达的前 15 个蛋白质家族；B:下调表达的前 15 个蛋白质家族

A: Up-regulated expression of the first 15 protein families; B: Down-regulated expression of the first 15 protein families

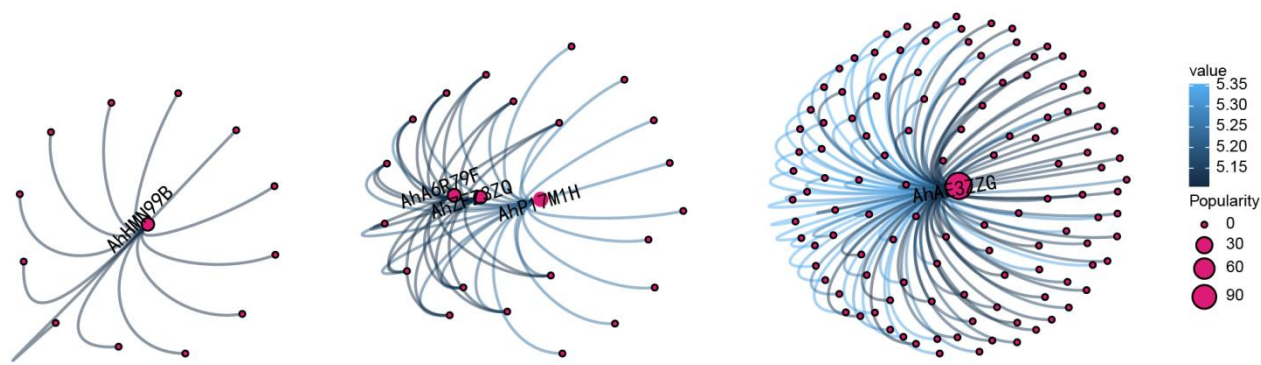
图 5 差异表达蛋白质家族分析

Fig. 5 Differentially expressed protein family analysis

2.6 DEGs 蛋白质互作网络（PPI）分析

本研究利用拟南芥 Arant2 数据库对不同花生子叶节愈伤组织分化过程中 DEGs 进行 PPI 分析，以网络中连接度排名前 5 的基因进行绘图，结果发现，PPI 筛选出的 5 个枢纽基因分别为 *AhAE3ZZG*、*AhP17MIH*、*AhA6R79F*、*AhZFZ3ZQ* 和 *AhHMN99B*，5 个枢纽基因互作的蛋白质数量依次是 117、24、14、13 和 13，表

明上述 5 个基因可能是花生子叶节愈伤的分化过程中的关键节点调控基因。*AhAE3ZZG* 是核糖体蛋白的 Ribosomal protein L30 (RPL30) 家族的成员, RPL30 家族通过影响蛋白质合成, 间接调控植物的生长和发育过程。*AhP17MIH*、*AhA6R79F* 和 *AhZFZ3ZQ* 是编码微管蛋白的 Tubulin 蛋白家族成员, 参与细胞分裂、运动和形态维持等生物过程。*AhHMN99B* 是液泡 ATP 酶的 V_ATPase_I 蛋白家族成员, V-ATPase 家族是植物细胞中主要的质子泵, 与生长、发育和形态建成等生理过程密切相关 (图 6)。



红点代表发生互作的蛋白质, 红点大小代表与其发生蛋白互作的蛋白质数量
线条颜色代表蛋白之间互作的权重的大小, 权重越大, 互作的程度越高。

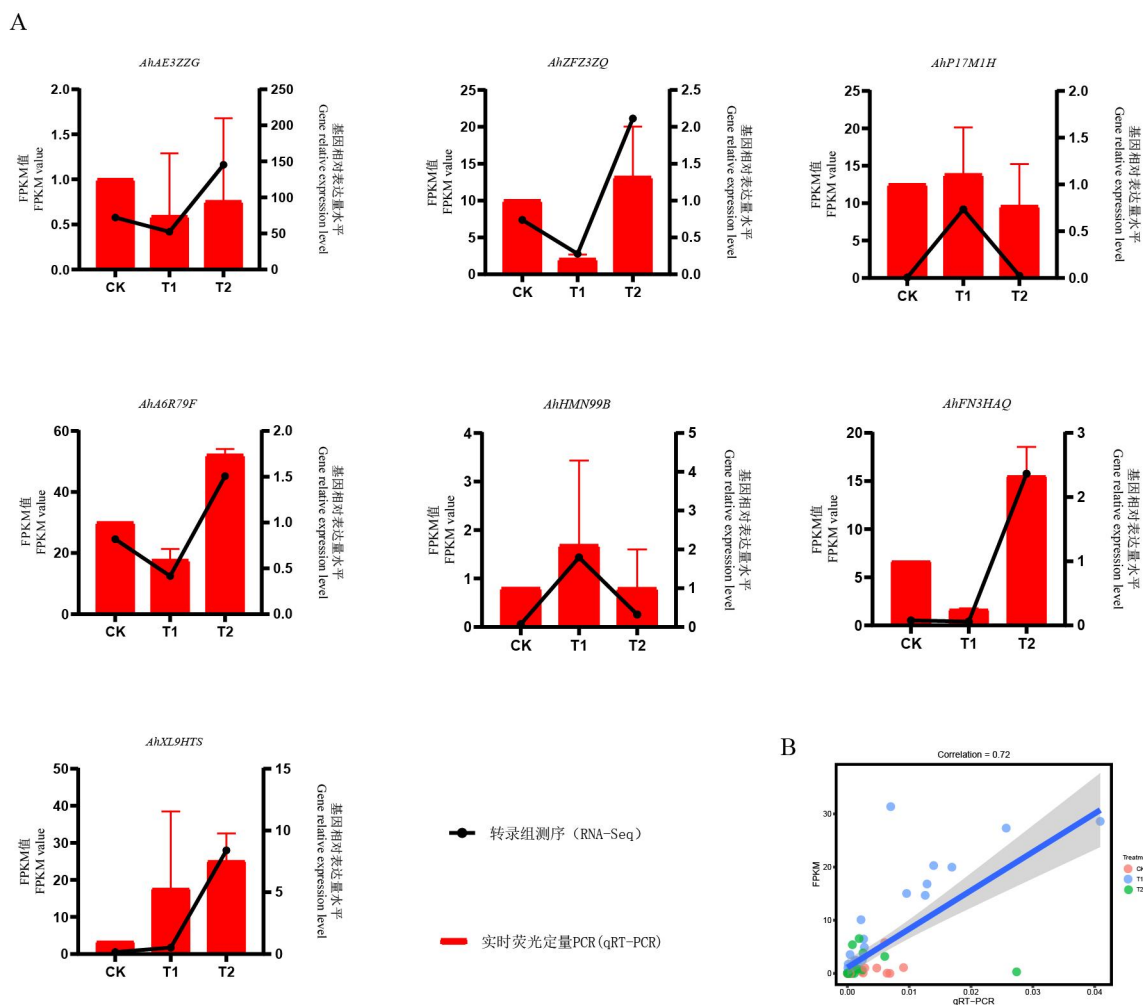
The red dots represent the proteins that interact, and the size of red dots represent the number of proteins that interact with them.

The color of the line represents the weight of the interaction between proteins, and the greater the weight, the higher the degree of interaction.

图 6 差异表达基因的蛋白质-蛋白质互作分析

Fig. 6 Protein-protein interaction analysis of differentially expressed genes

选取 5 个枢纽基因和 2 个 GO 富集通路中筛选出的与花生子叶节愈伤组织形成相关的差异表达基因, 进行 qRT-PCR 验证 (β -Actin 为内参基因)。结果表明, 部分差异基因 qRT-PCR 验证的基因相对表达水平与转录组测序的 FPKM 值变化趋势高度吻合 (图 7A)。对转录组测序 (RNA-Seq) 结果与实时荧光定量 qRT-PCR 结果进行相关性分析, 相关系数为 0.72 (图 7B), 说明转录组数据分析的结果准确反映了基因的表达水平。



CK: 分化 0 d 的愈伤, T1: T1 型愈伤, T2: T2 型愈伤

CK: Callus at 0 days of differentiation, T1: T1 type callus, T2: T2 type callus

A: 部分差异基因的 qRT-PCR 验证 B: RNA-Seq 与 qRT-PCR 结果的相关性分析

A: Validation of qRT-PCR of selected differential genes B: Correlation analysis of expression values based on RNA-Seq and qRT-PCR

图 7 差异基因 qRT-PCR 验证分析

Fig.7 Validation analysis of differential genes

3 讨论

3.1 基因型对花生愈伤分化的影响

基因型不同会导致花生愈伤组织分化率、成苗率存在一定差异^[7-8]。通过对 6 种肯尼亚花生的子叶节进行农杆菌转化, 转化率为 0~24%^[7]。本研究以 9 个花生品种为实验材料建立组培体系, 结果发现, 不同品种愈伤分化、成苗和生根的能力不同, 筛选出了易分化种质漯花 22 号, 其分化率、成苗率显著高于对照品种白沙 1016。本研究证实了基因型对花生组织培养及遗传转化具有重要的影响作用。

3.2 分生组织维持、干细胞群维持通路对愈伤分化的影响

表观遗传变异、基因表达的随机性和转录因子浓度等是同一基因型在相同条件下产生不同形态愈伤的重要因素^[25-26], 本研究在相同组织培养条件下, 漯花 22 号生成了 T1 和 T2 两种不同形态的愈伤组织, 揭示

了在花生组织培养中也存在基因序列没有发生改变,但可能发生了表观遗传、基因表达或转录因子调控等基因功能变化,这是两种类型愈伤形成的主要原因。本研究, T1 型愈伤 DEGs 富集最多的两个通路分别是分生组织、干细胞群维持。植物干细胞位于分生组织中。有研究表明,细胞分化及植株形成以分生组织为基础,分生组织的发育主要依赖于干细胞群体。愈伤组织是一种特殊的干细胞群体,可促进体细胞胚的形成,在体细胞胚的发生和发育过程中,分生组织与干细胞的形成起关键作用^[11]。因此,在花生中分生组织、干细胞群维持等生理过程和调控基因,是促进胚性愈伤分化的有利途径。

分生组织发育和干细胞形成,直接或间接受生长调节因子和植物激素等相关基因共同调控^[11]。本研究中,GO 注释中分生组织维持通路富集的 DEGs 最多,干细胞群维持通路位居第二,说明分生组织维持和干细胞生长发育在花生愈伤组织分化过程中发挥重要作用。大豆 MADS-box 转录因子直系同源物(Gm)AGL15 通过负向调节大豆中的生长素信号传导,影响下游调控基因来促进体细胞胚胎的发生^[27]。本研究通过对分生组织维持和干细胞群维持两个通路富集的 DEGs 进行分析发现,MADS-box 基因家族有 8 个 DEGs 上调表达,也证明了 MADS-box 转录因子能够通过促进花生分生组织和干细胞群的维持来促进愈伤组织的形成。生长素 IAA 可诱导 AP2 转录因子发挥作用。在玉米研究中 AP2 转录因子家族显著富集,可能在玉米愈伤发育中发挥关键作用^[13]。本研究中 1 个 AP2 转录因子上调表达,表明 AP2 转录因子参与了花生愈伤组织的形成。KNOX 家族是分生组织维持未分化状态和器官起始的重要家族^[28],通过调节植物分生组织来影响各种器官的发育^[29-30]。本研究中 KNOX 基因家族 DEGs 上调表达可能具有促进了花生愈伤组织分化的作用。本研究中生长素调节因子 ARF 基因家族有 1 个 DEGs 上调表达,而在拟南芥中 ARF 是愈伤组织表观遗传调控的关键基因家族^[31],由此表明 ARF 家族可能具有促进花生愈伤组织分化的作用。因此,MADS-box、AP2、KNOX 和 ARF 等转录因子可能通过分生组织维持通路和干细胞群维持通路,直接或间接参与了花生胚性愈伤组织分化的网络调控。

3.3 其他调节机制对愈伤分化的影响

MYB、WRKY 和 GASA 等转录因子与愈伤的发生相关,侧生器官转录因子 LBD 家族基因中的 *PheLBD12* 通过参与赤霉素(GA)代谢来调节水稻和花生的生长^[32-33]。在本研究中 LBD 家族有 2 个基因上调表达,推测其可能通过类似的途径促进花生愈伤组织的分化。在玉米中发现 WRKY 是影响玉米愈伤组织分化及体胚发生的关键基因^[15],本研究中发现愈伤组织全能性建立的关键因子 WRKY 分别有 5 个基因上调表达,从而表明了 WRKY 转录因子可能参与了花生胚性愈伤组织的形成。*GASA* 基因通过调节激素合成来促进烟草和棉花纤维的伸长^[34-35]。本研究中有 4 个 *GASA* 转录因子基因上调表达,说明在花生中 *GASA* 转录因子与植物激素调控相关。综上所述,WRKY 和 *GASA* 等转录因子可能通过影响 GA 等植物激素的合成和代谢,从而直接或间接地调控花生胚性愈伤组织的分化,最终影响愈伤组织形成完整植株。

本研究中 MYB 转录因子既有上调表达、又有下调表达（表 5）。已有研究表明，过表达 *GbMYBR1* 导致转基因拟南芥中与苯丙烷生物合成相关的多个基因转录水平下调，发现 *GbMYBR1* 直接与 bHLH 辅因子 GL3 相互作用抑制关键途径基因介导，对玉米愈伤的生长发育具有重要的调控作用^[15,36]。细胞色素 P450 家族参与苯丙烷类、赤霉素和细胞分裂素等物质的合成^[37,38]。已有研究证实了苯丙烷类物质是致使愈伤组织褐化的主要因素^[15]。本研究中花生 T2 型愈伤 DEGs 主要富集的通路是苯丙烷生物合成和代谢途径，苯丙类物质合成相关的 4-香豆酸辅酶 A 连接酶发生了表达变化。由此推测，在花生组织培养过程中苯丙烷代谢是细胞发生褐化的主要原因，最终导致 T2 型愈伤的凋亡。本研究通过 PPI 筛选出 5 个枢纽基因，分别属于核糖体蛋白_L30 家族、Tubulin 蛋白家族和 V_ATPase_I 蛋白家族等。核糖体蛋白 L30（RPL30）可调控植物细胞的有丝分裂^[39]。L30 家族的基因 *AhAE3ZZG* 互作的转录因子最多，表明核糖体蛋白 L30 家族对花生愈伤组织的形成具有重要调控作用。研究表明，在棉花中微管蛋白 β -tubulin 基因家族成员参与了纤维细胞的分裂，转运和生长^[40]。本研究筛选出的枢纽基因有 3 个属于 β -tubulin 基因家族，分别是 *AhPI7MIH*、*AhA6R79F* 和 *AhZF3ZQ*，推测 Tubulin 家族基因可能通过参与花生愈伤的蛋白网络调控，促进其愈伤细胞形态向 T1 型胚性愈伤组织生长。前人研究证明 V-ATPase 是植物细胞中主要的质子泵，可维持细胞膜酸碱平衡，为跨膜运输提供能量，参与生长、发育和形态发生等生理过程^[41]。本研究筛选出的枢纽基因 *AhHMN99B* 属于 V_ATPase_I 家族，表明 V_ATPase_I 家族的 *AhHMN99B* 基因能够为花生愈伤组织生长、发育和形态发生提供能量，维持生长过程中所需的酸碱度，最终促进胚性愈伤的生长。综上所述，MYB 和 P450 等家族，Tubulin 和 V_ATPase_I 等蛋白家族可能通过调控花生细胞的褐化、能量供应、调节细胞膜酸碱度等途径来影响愈伤组织的分化。

4 结论

本研究通过组织培养方式，以分化率和成苗率等为筛选指标，从 9 个花生品种中筛选出易分化种质漂花 22 号等 5 份种质资源。对最易分化成苗的漂花 22 号胚性愈伤和非胚性愈伤进行 RNA-Seq 分析，共筛选出 2660 个差异表达基因，差异基因主要参与分生组织维持、干细胞群维持和苯丙烷类物质生物合成、代谢等通路，其中直接或间接影响花生胚性愈伤组织分化的基因家族有 LBD、WRKY 和 AP2 等。通过蛋白家族注释和蛋白质-蛋白质互作网络分析，发现 5 个枢纽基因，这些基因分别属于 Ribosomal protein_L30 蛋白家族、Tubulin 和 V_ATPase_I 等蛋白家族，可能在花生胚性愈伤组织形成过程中发挥关键调控作用。本研究筛选出组培易分化种质，并初步揭示了花生子叶节愈伤组织分化过程的关键调控基因，可为提高花生胚性愈伤分化率及遗传转化研究提供科学依据。

参考文献

- [1] Zhang H, Tang Y Y, Yue Y L, Chen Y. Advances in the evolution research and genetic breeding of peanut. *Gene*. 2024, 916: 148425.

-
- [2] Song Z Y, Tian J L, Fu W Z, Li L, Lu L H, Zhou L, Shan Z H, Tang G X, Shou H X. Screening Chinese soybean genotypes for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation suitability. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*. 2013, 14 (4): 289-298.
- [3] Nivya V M, Shah J M. Recalcitrance to transformation, a hindrance for genome editing of legumes. *Frontiers in Genome Editing*. 2023, 5: 1247815.
- [4] Qiu L, Su J, Fu Y, Zhang K. Genetic and transcriptome analyses of callus browning in chaling common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.). *Genes*. 2023, 14 (12): 2138.
- [5] 张晓玲, 龙芸, 葛飞, 管中荣, 张晓祥, 王艳丽, 沈亚欧, 潘光堂. 玉米幼胚胚性愈伤组织再生能力相关性状遗传研究. *遗传*, 2017, 39 (02): 143-155.
- Zhang X L, Long Y, Ge F, Guan Z G, Zhang X X, Wang Y L, Shen Y, Pan G T. Genetic study on traits related to callus regeneration ability of maize embryonic callus. *Hereditas*, 2017, 39 (02): 143-155.
- [6] Kumar S, Ruggles A, Logan S, Mazarakis A, Tyson T, Bates M, Grosse C, Reed D, Li Z, Grimwood J, Schmutz J, Saski C. Comparative transcriptomics of non-embryogenic and embryogenic callus in semi-recalcitrant and non-recalcitrant upland cotton lines. *Plants*. 2021, 10 (9): 1775.
- [7] Limbua Purity G, Ngugi Mathew P, Oduor Richard O. Genetic transformability of selected Kenyan groundnut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes with IPT gene using cotyledonary node explants. *Advances in Agriculture*, 2022.
- [8] 卢春生, 廖福琴, 林芸. 不同组培方式对花生子叶离体组培获得再生苗影响的研究. *山西农业大学学报(自然科学版)*, 2014, 34 (03): 245-248.
- Lu C S, Liao F Q, Lin Y. Study on the effect of different tissue culture methods on the acquisition of regenerated seedlings from In vitro tissue culture of peanut cotyledons. *Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2014, 34 (03): 245-248.
- [9] Thomas Efferth. *Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures*. Engineering, 2019, 5 (1): 50-59.
- [10] Wen L, Li W, Parris S, West M, Lawson J, Smathers M, Li Z, Jones D, Jin S, Saski CA. Transcriptomic profiles of non-embryogenic and embryogenic callus cells in a highly regenerative upland cotton line (*Gossypium hirsutum* L.). *BMC Developmental Biology*. 2020, 20 (1): 25.
- [11] Müller-Xing R, Xing Q. The plant stem-cell niche and pluripotency: 15 years of an epigenetic perspective. *Frontiers in Plant Science*. 2022, 13: 1018559.
- [12] Chen B, Maas L, Figueiredo D, Zhong Y, Reis R, Li M, Horstman A, Riksen T, Weemen M, Liu H, Siemons C, Chen S, Angenent G C, Boutilier K. BABY BOOM regulates early embryo and endosperm development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 2022, 119 (25): e2201761119.
- [13] Zhang X, Wang Y, Yan Y, Peng H, Long Y, Zhang Y, Jiang Z, Liu P, Zou C, Peng H, Pan G, Shen Y. Transcriptome sequencing analysis of maize embryonic callus during early redifferentiation. *BMC Genomics*. 2019, 20 (1): 159.
- [14] Cheng Z J, Wang L, Sun W, Zhang Y, Zhou C, Su Y H, Li W, Sun T T, Zhao X Y, Li X G, Cheng Y, Zhao Y, Xie Q, Zhang X S. Pattern of auxin and cytokinin responses for shoot meristem induction results from the regulation of cytokinin biosynthesis by AUXIN RESPONSE FACTOR3. *Plant Physiology*. 2013, 161 (1): 240-51.
- [15] 贾思年, 魏倩涵, 苗蓉, 彭云玲, 刘允军. 玉米愈伤组织形成的转录组分析. *植物遗传资源学报*, 2023, 24 (04): 1151-1160.
- Jia S N, Wei Q H, Miao R, Peng Y L, Liu Y J. Transcriptome analysis of callus formation in maize. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2023, 24 (04): 1151-1160.
- [16] 葛梦杰, 张朝军, 栗战帅, 王小艳, 孙志茂, 陈柏志, 张迁, 乔凯凯, 马常凯, 曹晓聪, 吕娇艳, 王龙, 王艳文, 张茹佳, 聂君伟, 马启峰, 陈全家, 范术丽. 红光促进棉花胚性愈伤诱导的转录组分析. *分子植物育种*, 2024, 22 (06): 1774-1783.
- Ge M J, Zhang C J, Li Z S, Wang X Y, Sun Z M, Chen B Z, Zhang Q, Qiao K K, Ma C K, Cao X C, Lv J Y, Wang L, Wang Y W, Zhang R J, Nie J W, Ma Q F, Chen Q J, Fan S L. Transcriptome analysis of red light-promoted embryogenic callus induction in cotton. *Molecular Plant Breeding*, 2024, 22 (06):

1774-1783.

- [17] 楚宗丽, 张睿男, 李亮杰, 孙君艳, 王付娟, 周强, 全胜利. 小麦 WRKY 转录因子的鉴定及其在胚性愈伤组织形成中的表达分析. 麦类作物学报, 2021, 41 (12): 1469-1478.
- Chu Z L, Zhang R N, Li L J, Sun J Y, Wang F J, Zhou Q, Tong S L. Identification of WRKY transcription factors in wheat and their expression analysis in embryogenic callus formation. Journal of Triticeae Crops, 2021, 41 (12): 1469-1478.
- [18] Jiao Y, Tan J, Guo H, Huang B, Ying Y, Ramakrishnan M, Zhang Z. Genome-wide analysis of the KNOX gene family in moso bamboo: insights into their role in promoting the rapid shoot growth. BMC Plant Biology. 2024, 24 (1): 213.
- [19] Luo Y, Hu B, Ji H, Jing Y, Zhang G, Yan Y, Yang B, Peng L. Sequence characteristics, expression and subcellular localization of *PtCYP721A57* gene from cytochrome P450 family in *Polygala tenuifolia* Willd. PeerJ. 2024, 12: e18089..
- [20] Zhou M, Jiang Y, Liu X, Kong W, Zhang C, Yang J, Ke S, Li Y. Genome-Wide identification and evolution analysis of the *CYP76* subfamily in rice (*Oryza sativa*). International Journal of Molecular Sciences. 2023, 24 (10): 8522.
- [21] Debernardi JM, Tricoli DM, Ercoli MF, Hayta S, Ronald P, Palatnik JF, Dubcovsky J. A GRF-GIF chimeric protein improves the regeneration efficiency of transgenic plants. Nature Biotechnology. 2020, 38 (11): 1274-1279.
- [22] 李文静, 付留洋, 黄冰艳, 苗利娟, 石磊, 董文召, 臧新, 汤丰收, 张新友. 花生上胚轴愈伤组织诱导体系的建立与优化. 中国农学通报, 2016, 32 (21): 75-78.
- Li W J, Fu L Y, Huang B Y, Miao L J, Shi L, Dong W Z, Zang X, Tang F S, Zhang X Y. Establishment and Optimization of Callus Induction System for Peanut Epicotyls. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2016, 32 (21): 75-78.
- [23] Bertioli D J, Jenkins J, Clevenger J, Dudchenko O, Gao D, Seijo G, Leal-Bertioli S C M, Ren L, Farmer A D, Pandey M K, Samoluk S S, Abernathy B, Agarwal G, Ballén-Taborda C, Cameron C, Campbell J, Chavarro C, Chitikineni A, Chu Y, Dash S, El Baidouri M, Guo B, Huang W, Kim K D, Korani W, Lanciano S, Lui C G, Mirouze M, Moretzsohn M C, Pham M, Shin J H, Shirasawa K, Sinharoy S, Sreedasyam A, Weeks N T, Zhang X, Zheng Z, Sun Z, Froenicke L, Aiden E L, Michelmore R, Varshney R K, Holbrook C C, Cannon E K S, Scheffler B E, Grimwood J, Ozias-Akins P, Cannon S B, Jackson S A, Schmutz J. The genome sequence of segmental allotetraploid peanut *Arachis hypogaea*. Nature Genetics. 2019, 51 (5): 877-884.
- [24] Xue Q, Zhang X, Yang H, Li H, Lv Y, Zhang K, Liu Y, Liu F, Wan Y. Transcriptome and metabolome analysis unveil anthocyanin metabolism in pink and red testa of peanut (*Arachis hypogaea* L.). International Journal of Genomics. 2021: 5883901.
- [25] 韩贝, 孙思敏, 孙伟男, 杨细燕, 张献龙. 植物体细胞胚胎发生的分子机制. 作物学报, 2023, 49 (02): 299-309.
- Han B, Sun S M, Sun W N, Yang X Y, Zhang X L. Molecular Mechanisms of Somatic Embryogenesis in Plants. Acta Agronomica Sinica, 2023, 49 (02): 299-309.
- [26] Phillips R L, Kaepler S M, Olhoft P. Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1994, 91 (12): 5222-6.
- [27] Zheng Q, Zheng Y, Ji H, Burnie W, Perry S E. Gene regulation by the AGL15 transcription factor reveals hormone interactions in somatic embryogenesis. Plant Physiology. 2016 172 (4): 2374-2387
- [28] Bharathan G, Goliber T E, Moore C, Kessler S, Pham T, Sinha N R. Homologies in leaf form inferred from KNOX1 gene expression during development. Science. 2002, 296 (5574): 1858-1860.
- [29] Tsuda K, Maeno A, Otake A, Kato K, Tanaka W, Hibara K I, Nonomura K I. *YABBY* and diverged *KNOX1* genes shape nodes and internodes in the stem.

Science. 2024, 384 (6701): 1241-1247.

- [30] Li R, Wei Z, Li Y, Shang X, Cao Y, Duan L, Ma L. SKI-INTERACTING PROTEIN interacts with SHOOT MERISTEMLESS to regulate shoot apical meristem formation. *Plant Physiology*. 2022, 189 (4): 2193-2209.
- [31] Lee K, Park O S, Seo P J. *Arabidopsis* ATXR2 deposits H3K36me3 at the promoters of *LBD* genes to facilitate cellular dedifferentiation. *Science Signaling*. 2017, 10 (507): eaan0316.
- [32] Wu M, Wang Y, Zhang S, Xiang Y. A LBD transcription factor from moso bamboo, *PheLBD12*, regulates plant height in transgenic rice. *Plant Molecular Biology*. 2024, 114 (5): 95.
- [33] Wu C, Hou B, Wu R, Yang L, Lan G, Xia Z, Cao C, Pan Z, Lv B, Li P. Genome-Wide analysis elucidates the roles of AhLBD genes in different abiotic stresses and growth and development stages in the peanut (*Arachis hypogaea* L.). *International Journal of Molecular Sciences*. 2024, 25 (19): 10561.
- [34] Li Z, Gao J, Wang G, Wang S, Chen K, Pu W, Wang Y, Xia Q, Fan X. Genome-Wide identification and characterization of *GASA* gene family in *Nicotiana tabacum*. *Frontiers in Genetics*. 2022, 12: 768942.
- [35] Chen B, Sun Y, Tian Z, Fu G, Pei X, Pan Z, Nazir M F, Song S, Li H, Wang X, Qin N, Shang J, Miao Y, He S, Du X. *GhGASA10-1* promotes the cell elongation in fiber development through the phytohormones IAA-induced. *BMC Plant Biology*. 2021, 21 (1): 448.
- [36] Su X, Xia Y, Jiang W, Shen G, Pang Y. *GbMYBRI* from *Ginkgo biloba* represses phenylpropanoid biosynthesis and trichome development in *Arabidopsis*. *Planta*. 2020, 252 (4): 68.
- [37] He J, Chen Q, Xin P, Yuan J, Ma Y, Wang X, Xu M, Chu J, Peters RJ, Wang G. CYP72A enzymes catalyse 13-hydrolyzation of gibberellins. *Nature Plants*. 2019, (10): 1057-1065.
- [38] Kiba T, Mizutani K, Nakahara A, Takebayashi Y, Kojima M, Hobo T, Osakabe Y, Osakabe K, Sakakibara H. The trans-zeatin-type side-chain modification of cytokinins controls rice growth. *Plant Physiology*. 2023, 192 (3): 2457-2474.
- [39] Lin Y L, Chung C L, Chen M H, Chen C H, Fang S C. SUMO Protease SMT7 Modulates Ribosomal Protein L30 and Regulates Cell-Size Checkpoint Function. *Plant Cell*. 2020, 32 (4): 1285-1307
- [40] 党媛玥, 马建江, 杨书贤, 宋吉坤, 贾冰, 冯盼, 陈全家, 于霁雯. 棉花 β -tubulin 基因家族的鉴定及其在纤维发育中的表达. *中国农业科学*, 2023, 56 (23): 4585-4601.
- Dang Y Y, Ma J J, Yang S X, Song J K, Jia B, Feng P, Chen Q J, Yu J W. Identification of β -tubulin gene family and its expression in fiber development in cotton. *Scientia Agricultura Sinica*, 2023, 56 (23): 4585-4601.
- [41] Wang C, Xiang Y, Qian D. Current progress in plant V-ATPase: from biochemical properties to physiological functions. *Journal of Plant Physiology*. 2021, 266: 153525.