

王江英, 葛金涛, 邵小斌, 等. 筛选白花油茶胚性愈伤组织诱导成苗的关键激素通路及相关基因[J]. 江苏农业学报, 2025, 41(3): 599-614.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2025.03.019

筛选白花油茶胚性愈伤组织诱导成苗的关键激素通路及相关基因

王江英, 葛金涛, 邵小斌, 朱朋波, 孙明伟, 赵统利, 汤雪燕

(连云港市农业科学院休闲农业研究室, 江苏 连云港 222000)

摘要: 植物激素在植物无性繁殖器官再生中发挥着关键作用, 本研究探究白花油茶再生过程中激素调控机理, 为加速山茶属植物再生及遗传转化提供理论基础。本研究采用综合代谢组学-转录组学分析方法, 筛选出白花油茶胚性愈伤组织诱导及分化成苗 5 个阶段(S1~S5)中植物激素相关的差异代谢物(DAMs)和编码关键代谢酶的差异表达基因(DEGs)。液相色谱-质谱(LC-MS)分析结果显示, 在S1~S5 共获得 51 种激素相关差异代谢物; 通过 Illumina HiSeq 测序, 共发现与植物激素相关的 54 个差异表达基因, 其中 21 个差异表达基因作用于植物激素信号转导通路中, 33 个差异表达基因参与激素合成代谢。此外, KEGG 富集分析结果表明, 在白花油茶植物再生过程中, 相比于其他激素, 生长素、细胞分裂素和水杨酸的调控作用较为明显, 激素含量分析结果表明, 生长素和水杨酸的平均含量分别高达细胞分裂素的 18.81 倍和 201.94 倍, 而赤霉素等其他激素仅为细胞分裂素的 2%~27%; 同时差异表达基因也显著表达在生长素、细胞分裂素和水杨酸的合成途径中。研究以上 3 种激素合成途径中的 DAMs 和 DEGs 之间的通路关系发现, 在 KEGG 通路中共富集到 8 种差异代谢物, 包括吲哚、L-色氨酸、色胺、吲哚-3-乙酸、玉米素核苷、反式-玉米素-9- β -葡萄糖苷、异戊烯腺嘌呤核苷、L-苯丙氨酸; 18 个差异表达基因, 包括 *ALDH*、*TAA1*、*COMT*、*IPT*、*TRIT1*、*CKX*、*PAT* 和 *PAL* 等。对其他内源激素的进一步分析结果表明, 赤霉素、脱落酸和茉莉酸在油茶再生过程中含量较低, 生长素和水杨酸平均含量分别高达赤霉素的 757 倍和 8130 倍; 同时 KEGG 富集了 15 个差异表达基因, 包括 *KAO*、*GA2ox*、*ZEP* 及 *OPR* 等, 这些基因在再生过程中与 *ALDH* 等 18 个基因发挥着相互作用。

关键词: 油茶; 植物激素; 植株再生; 代谢组; 转录组; 差异代谢物; 差异表达基因

中图分类号: S794.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2025)03-0599-16

Screening of key hormone pathways and related genes for the induction of plantlets from embryogenic callus of *Camellia oleifera*

WANG Jiangying, GE Jintao, SHAO Xiaobin, ZHU Pengbo, SUN Mingwei, ZHAO Tongli, TANG Xueyan

(Leisure Agriculture Laboratory of Lianyungang Academy of Agricultural Sciences, Lianyungang 222000, China)

Abstract: Plant hormones are crucial for the regeneration of plant's asexual reproductive organs. The purpose of this study is to explore the mechanism of hormone regulation in the regeneration process of *Camellia oleifera*, and to provide a theoretical basis for accelerating the regeneration and genetic transformation of *Camellia* plants. In this research, an integrated metabolomic-transcriptomic analysis was employed to screen out the plant hormone-related differential accumulated metabolites

(DAMs) and differentially expressed genes (DEGs) encoding key metabolic enzymes in five stages (S1, S2, S3, S4, S5) of embryogenic callus induction and differentiation into seedlings of *Camellia oleifera*. The results of liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analysis showed that a total of 51 hormone-related differential metab-

收稿日期: 2024-04-30

基金项目: 连云港市财政专项(QNJ2104)

作者简介: 王江英(1984-), 女, 江苏泰州人, 博士, 副研究员, 主要从事花卉分子育种研究。(E-mail) wangjiangying3401@163.com

通讯作者: 汤雪燕, (E-mail) 3202txy@163.com

olites were obtained from S1 to S5. Through Illumina HiSeq sequencing, a total of 54 differentially expressed genes related to plant hormones were found, of which 21 differentially expressed genes acted on plant hormone signal transduction pathways, and 33 differentially expressed genes were involved in hormone synthesis and metabolism. In addition, the results of KEGG enrichment analysis indicated that the regulation of auxin, cytokinin and salicylic acid was more obvious than that of other hormones in the regeneration process of *Camellia oleifera*. The results of hormone content analysis revealed that the average contents of auxin and salicylic acid were as high as 18.81 times and 201.94 times of cytokinin, respectively, while the average contents of other hormones such as gibberellin were only 2%–27% of the average content of cytokinin. At the same time, the differentially expressed genes were also significantly expressed in the synthesis pathways of auxin, cytokinin and salicylic acid. By studying the pathway relationships between DAMs and DEGs in the above three hormone synthesis pathways, it was found that eight differential metabolites (such as indole, *L*-tryptophan, tryptamine, indole-3-acetic acid, zeatin nucleoside, *trans*-zeatin-9- β -glucoside, isopentenyladenosine, *L*-phenylalanine) and 18 differentially expressed genes (*ALDH*, *TAA1*, *COMT*, *IPT*, *TRIT1*, *CKX*, *PAT* and *PAL*, etc.) were enriched in the KEGG pathway. Further analysis of other endogenous hormones showed that the contents of gibberellin, abscisic acid and jasmonic acid were low in the regeneration process of *Camellia oleifera*, and the average contents of auxin and salicylic acid were as high as 757 times and 8 130 times of gibberellin. At the same time, KEGG enriched 15 differentially expressed genes, including *KAO*, *GA2ox*, *ZEP* and *OPR*. These genes interacted with 18 genes such as *ALDH* during regeneration.

Key words: *Camellia oleifera*; plant hormones; plant regeneration; metabolome; transcriptome; differential accumulated metabolites; differentially expressed genes

油茶 (*Camellia oleifera*) 是重要的经济油料植物^[1],其中白花油茶是中国栽培的主要种类,广泛分布于中国温暖地带,长江以南各省均有种植,长江以北气候较暖的局部地区亦有分布^[2]。油茶植株再生一般有 2 种途径,器官发生和体细胞胚状体发生^[3],其中通过体细胞胚状体发生途径形成的再生植株变异性小,遗传性状稳定^[4]。油茶与很多山茶科植物一样,外植体直接产生不定芽的形态器官分化较难,不易获得再生植株。因此体细胞胚状体发生途径是一条更高效稳定的植株再生途径,然而在此过程中选择合适外植体、营养物质和激素配比以及控制适宜的培养条件,才能成功诱导出再生植株,其中激素配比起着至关重要的作用^[5]。

植物的生长发育受多种激素相互协调的作用^[6],目前广泛使用的外源激素主要有生长素(AUX)、细胞分裂素(CK)及赤霉素(GA)。外源激素传递脱分化、再分化等发育信号,通过内源激素启动细胞再生,影响器官发生和体细胞胚形成^[7]。因此外源激素的配比是植物再生成功的重要前提,同时植物激素有关的再生促进基因对植株再生也尤为关键。AUX 参与细胞分裂、伸长生长、根的诱导发生等过程。Atta 等^[8]研究发现,AUX 启动木质部中柱鞘细胞分裂,从而诱导愈伤组织生根;AUX 调节芽再生促进基因 *CUC2* 的表达,促进愈伤组织再生形成完整茎^[9-10];胚胎调节基因 *LEC1* 和 *LEC2* 促进 AUX 合成基因 *YUCs*、*TAA1*

和 *IAA30* 的表达,调节 AUX 的合成和信号转导,从而诱导体细胞胚发生^[11-12]。CK 能够加速细胞分裂,对细胞分化和形态发生具有重要作用,外源 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)诱导拟南芥胚性愈伤组织形成原胚团,继代培养发育成完整植株^[13];AP2/ERF 转录因子家族成员芽再生促进因子(ESR)参与 CK 信号通路,可直接激活细胞周期蛋白 *CYCD1*,促进愈伤组织形成,也可通过 CK 促进细胞周期重启的靶蛋白 *CYCD3* 诱导拟南芥愈伤组织形成^[14-15]。另外,CK 通过反应调节剂基因 *ARR* 的介导激活诱导芽再生的关键基因 *WUS*,促进茎顶端分生组织的形成,从而诱导出不定芽^[16-17]。GA 主要促进植物茎的生长和诱导芽的形成,研究发现,过量表达赤霉素氧化酶基因 *GA20ox* 和 *GA3ox* 能够激发体内 GA 活性,加快植株生长^[18-19];在芍药离体培养时发现,赤霉素 3(GA3)诱导不定芽发生率较高^[20],丛生芽被诱导前在培养基中添加 GA3 有助于暴马丁香植株生长^[21]。另外,植物激素中脱落酸(ABA)、茉莉酸(JA)、水杨酸(SA)、乙烯(ETH)、独脚金内酯(SL)和油菜素内酯(BR)在植物体内如何调节其生长发育^[22]近年来也被广泛研究。

外植体的再生过程受多种激素互作调控,仅仅研究外源激素种类或含量不足以全面揭示外植体生长过程中激素的作用机制。还需要进一步探究外源激素与内源激素及相关基因之间的表达关系,以及多种激素

间的互作影响。李玉珠等^[23]发现再生基因在遗传转化中具有显著提高再生效率和转化效率的作用,过表达 *CUC1* 和 *CUC2* 后,拟南芥遗传转化效率提高了 10.0 倍^[24];细胞分裂素合成基因 *IPT* 转化烟草和莴苣后,遗传转化效率分别提高 24.3 倍和 6.6 倍^[25]。本研究拟以白花油茶未成熟果实为材料,采集脱毒后的无菌种胚、愈伤组织、胚状体所含的不定芽、丛生芽体、再生幼苗为样本,进行转录组学和代谢组学测定,筛选关键的植物激素种类并鉴定相关差异代谢物和差异基因。

1 材料与方法

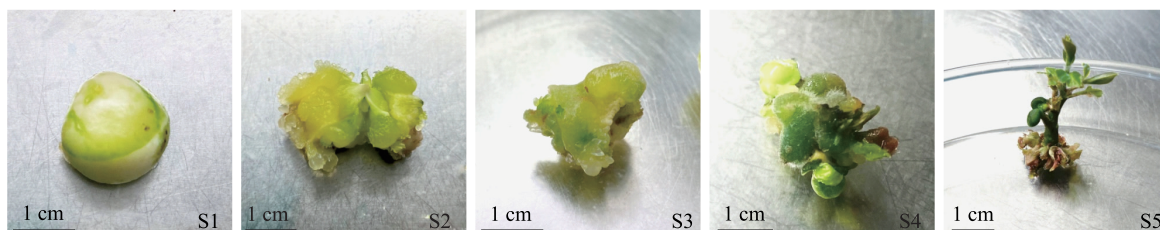
1.1 试验材料

试验材料为白花油茶,果实采集地点为连云港市南云台山白花油茶种植区域,采集时间为 2023 年 9 月 14 日,选择生长健壮、表面无病斑的果实。

1.2 样本准备

选取白花油茶胚性愈伤组织诱导成苗过程中的 5 种材料(S1~S5)为测试样本(图 1),其中样本培育步骤

参照白花油茶胚性愈伤组织诱导及植株再生的方法^[26],具体步骤为:将消毒后的幼胚在 MS 空白培养基上脱毒培养 15 d(S1),接种到 MS+0.50 mg/L 2,4-D+2.00 mg/L 6-苄氨基嘌呤(6-BA)培养基上进行胚性愈伤组织诱导,每 15 d 继代 1 次,采集培养 45 d 的胚性愈伤组织材料(S2),外表呈黄绿色松脆颗粒状。培养 30 d 后的胚性愈伤组织连带未脱分化的外植体,一起转移接种至 MS+0.20 mg/L 萘乙酸(NAA)+1.00 mg/L 6-BA 培养基上进行胚状体诱导,每 30 d 转接 1 次,共转接 3 次,采集培养 60 d 的体细胞胚材料(S3),包含球形、心形、鱼雷状和子叶状等多种形状的幼嫩组织,颜色为黄绿色至鲜绿色,外表光泽。体细胞胚及下面的附着组织一同转接至 MS+2.25 mg/L 6-BA+0.50 mg/L NAA 培养基上,20 d 后产生不定芽,分别采集培养 45 d 的丛生芽(S4)和培养 75 d 的幼芽(S5)。所用培养基成分及培养条件参考王江英等^[26]的研究结果。所有样品材料于超净工作台中采集后进行液氮速冻,-80℃ 保存备用。



S1:幼胚在 MS 空白培养基上脱毒培养 15 d;S2:愈伤组织在 MS+0.50 mg/L 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)+2.00 mg/L 6-苄氨基嘌呤(6-BA)培养基上培养 45 d;S3:体细胞胚在 MS+0.20 mg/L 萘乙酸(NAA)+1.00 mg/L 6-BA 培养基上诱导 60 d;S4:体细胞胚及下面的附着组织在 MS+2.25 mg/L 6-BA+0.50 mg/L NAA 培养基上不定芽诱导 45 d;S5:体细胞胚及下面的附着组织在 MS+2.25 mg/L 6-BA+0.50 mg/L NAA 培养基上培养 75 d 的幼芽。

图 1 油茶胚性愈伤组织诱导成苗过程

Fig.1 The process of inducing seedlings from embryogenic callus of *Camellia oleifera*

1.3 代谢物提取及内源激素测定

将 S1、S2、S3、S4 和 S5 样品组织研磨至粉末状,称取 50 mg,分别加入 10 μ L 质量浓度为 100 ng/mL 的内标混合溶液,1 mL 提取剂(甲醇:水:甲酸=15:4:1,体积比),混匀;涡旋 10 min 后,在 4℃ 低温下,于 12 000 r/min 离心 5 min,取上清液至新的离心管中进行浓缩;浓缩后用 100 μ L 的 80% 甲醇进行复溶,用 0.22 μ m 滤膜过滤,置于进样瓶中,通过液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)的方法测定 7 种内源激素,包括生长素(AUX)、细胞分裂素(CK)、赤霉素(GA)、脱落酸(ABA)、乙烯(ETH)、茉莉酸(JA)和水杨酸(SA)。以上激素的提取和代谢组学测定由武汉迈特维尔生物科技有限公司完成。

1.4 文库构建及转录组测序

分别提取 S1、S2、S3、S4 和 S5 样品组织的总 RNA,质检后利用 NEBNext® Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module 进行 mRNA 捕获,通过 NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina 构建文库,使用 Beckman Agencourt AMPure XP beads 进行文库纯化,使用 TruSeq PE Cluster Kit V4 完成 cBOT 自动成簇,最后通过 TruSeq SBS Kit v4-HS 进行 HiSeq 测序^[27]。以上文库构建和转录组测序均由苏州金唯智生物科技有限公司完成。

1.5 实时荧光定量 PCR 验证

利用实时荧光定量 PCR 验证转录组测序的准确性,挑选 8 个差异表达基因设计引物,以 *EF1a1*(延伸

因子基因)为内标基因(所用引物见表 1),生物学试验 重复 3 次。运用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算求得差异基因的表达量。

表 1 本研究所用引物序列及用途

Table 1 The sequences and applications of the primers used in this study

基因	基因编号	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
IAA	TRINITY_DN86576_c0_g2_i1	CTTTACAATCGGGCAATGTG	GCAAGAGTCTGTGAACATTTTC
TAAI	TRINITY_DN86636_c4_g4_i4	CTTCAAGTATGCTCGTGAGATG	GCTCTGCTCATTACCTTGTG
A-ARR	TRINITY_DN67838_c1_g1_i1	TTGTATGCCAGGAATGACTG	CGTCCGATTGTTTGAGAGG
CKX	TRINITY_DN75136_c0_g1_i1	CGTGAAGCACTATTTGCCC	GGCACTATTGATGCCGAATG
DELLA	TRINITY_DN85472_c2_g1_i4	GGGATCCAATGCATTCAAGC	TCTGAGGAATGGCTTGCCAA
KAO	TRINITY_DN86948_c0_g1_i1	CCTGGAAATGAGCTTGCGAA	TGTGGTAAGTACATCACACG
ABF	TRINITY_DN50292_c1_g1_i1	CAGAGACTGCCTCCAATATC	CGTAAGGAACTGGTGATGACC
TGA	TRINITY_DN91618_c8_g3_i7	CCAACATTGATCACAACAGG	CCTGGTGAACAAAGCCTTC
EF1a1	/	GCAAGAAGGGTGCCAACTG	ACCAAACAACCGACCTACGA

1.6 转录组和代谢组联合分析

基于植物激素生物合成通路差异表达基因和差异代谢物的筛选结果,将转录组和代谢组的分析结果映射在基因与基因组数据库(KEGG)图上,进一步分析基因和代谢物之间的关联。

1.7 数据处理与分析

利用 Excel 2021 和 SPSS 21.0 软件处理分析数据,进行差异显著性分析,通过 Prism 9 软件作图。

2 结果与分析

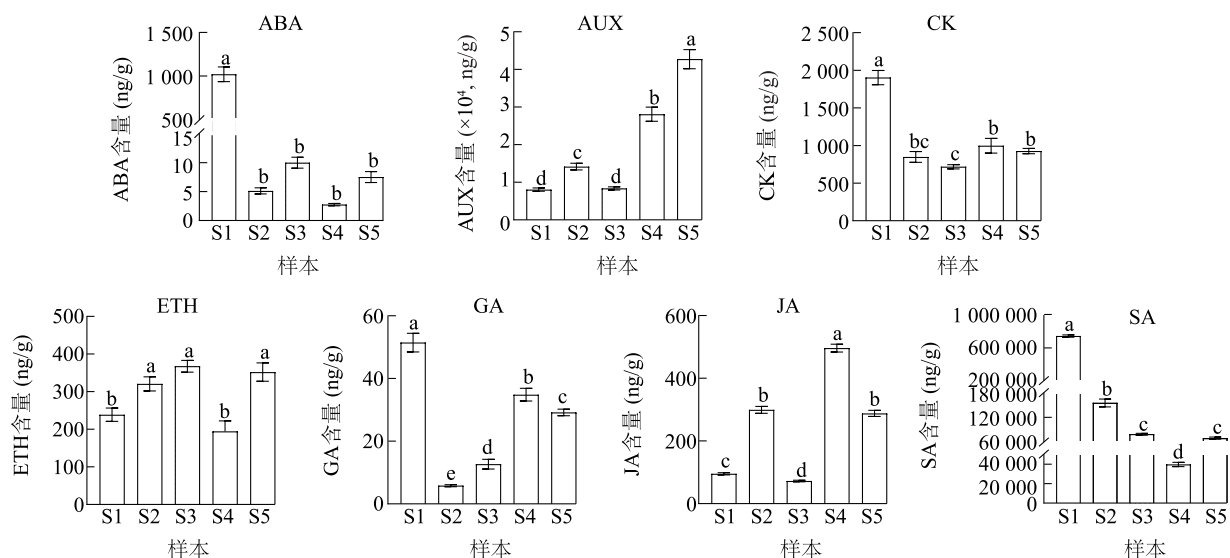
2.1 内源激素的测定

内源赤霉素测定结果(图 2)显示,在胚性愈伤组织诱导成苗的过程中,7 种内源激素的含量均发生变化,其中 AUX 和 SA 含量较高,显著高于 CK、ABA、ETH、JA 的含量,而 GA 含量则较低。分析发现 AUX 和 SA 的平均含量分别达到 CK 平均含量的 18.81 倍和 201.94 倍,而 ABA、ETH、JA 和 GA 的平均含量仅为 CK 平均含量的 19%、27%、23%和 2%。另外通过对 7 种激素的表达模式进行分析,发现随着诱导时间的增加,ABA、CK、SA 含量总体呈下调趋势;AUX、JA 含量总体呈上调趋势;而 ETH 含量先上调,在 S3 时达到最高,在 S4 时下降至最低,在 S5 时又上升;GA 含量在 S1 时最高,随着愈伤组织诱导发生,含量骤减,之后在不定芽诱导和幼苗生长过程中 GA 含量又获得恢复。由此可以推测,在油茶胚状体愈伤组织诱导成苗过程中 7 种植物激素均参与调控,但作用不一,AUX、SA、CK 和 ABA 起主导作用,可能参与细胞的分裂和生长,而 GA 含量相对于其他几种激素含量较低,可能在不定芽诱导后

幼苗生长期才参与调控。

2.2 代谢组学分析

2.2.1 内源激素的共表达网络分析 如图 3a 所示,在 5 个样本中检测到 7 类内源性激素共 51 种代谢物,其中 ABA 包含 2 种,AUX 包含 11 种,CK 包含 23 种,ETH 包含 1 种,GA 包含 3 种,JA 和 SA 分别包含 7 种和 4 种。进一步分析发现,在 ABA 类中只检测出 ABA 和脱落酸葡萄糖酯(ABA-ald)含量发现变化,随着愈伤组织诱导发生,ABA 含量逐渐增加,S3 达到最高,但随着不定芽诱导又下降,到小苗生长期稍恢复;在 AUX 类中吲哚(Indole)和 L-色氨酸(Trp)的含量显著高于其他 9 种代谢物;在 CK 类中 6-苄基氨基-7-B-D-吡喃葡萄糖基嘌呤(BAP7G)和 6-苄氨基-9-(A-D-吡喃葡萄糖基)嘌呤(BAP9G)的含量较高,其中 BAP7G 含量在 S1 最高,随着愈伤组织产生后含量下降;在 ETH 类中只检测出 1-氨基环丙烷羧酸(ACC),其含量在 S3 最高;在 GA 类中检测出 3 个代谢物,分别为赤霉素 3(GA3)、赤霉素 9(GA9)和赤霉素 19(GA19),其中 GA3 呈下降的趋势,而 GA9 和 GA19 的含量在 S1~S3 中检测为 0,说明在胚性愈伤组织诱导和体细胞胚形成过程中几乎没有额外的赤霉素产生,而随着不定芽诱导分化成苗时,才形成少许 GA 以促进芽体和幼苗的伸长生长。同时在 JA 类中 JA 和茉莉酸-异亮氨酸(JA-ILE)含量变化趋势一致,S2 增加最显著;最后在 SA 类中 L-苯丙氨酸(Phe)的含量极显著高于水杨酸-2-O-β-葡萄糖苷(SAG)、水杨酸甲酯 O-β-葡萄糖苷(MeSAG)和 SA 含量,变化趋势基本一致,其中 Phe 在 S1 的含量高达其余 3 个代谢物



ABA:脱落酸;AUX:生长素;CK:细胞分裂素;ETH:乙烯;GA:赤霉素;JA:茉莉酸;SA:水杨酸。不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。S1~S5 见图 1 注。

图 2 7 种内源激素含量

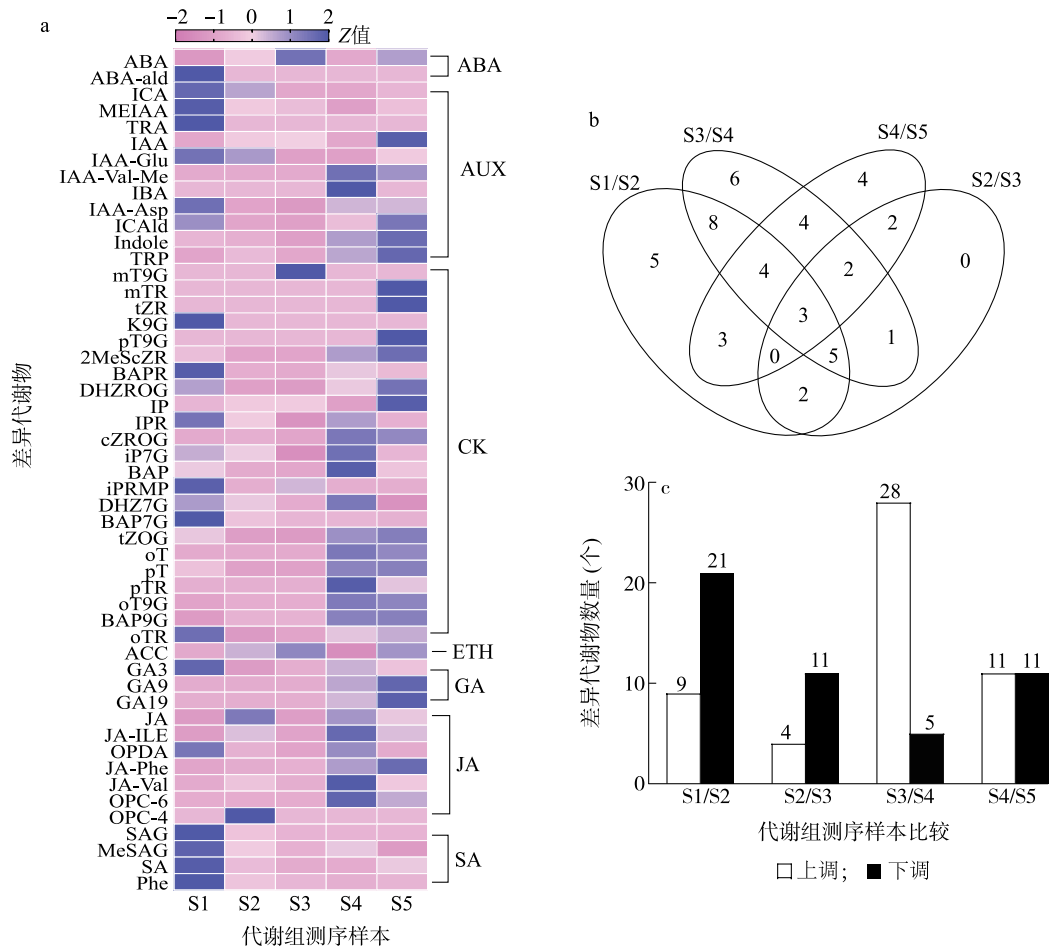
Fig.2 The contents of seven endogenous hormones

的 1 000~17 000 倍,可以推测在油茶幼胚成苗过程中 Phe 的作用显著。

在 51 种代谢物中,有 49 种代谢物在 S1~S5 样本中表现出显著的含量差异,包括 46 种特异差异代谢物和 3 种共同差异代谢物(图 3b),其中 S1 与 S2 的比较、S2 与 S3 的比较、S3 与 S4 的比较、S4 与 S5 的比较中分别有 30 种、15 种、33 种、22 种差异代谢物,上调和下调的代谢物数量如图 3c 所示。在 4 组比较中,S1 与 S2 的比较和 S2 与 S3 的比较中下调差异代谢物数量高于上调差异代谢物,而 S3 与 S4 的比较中的上调差异代谢物数量显著大于下调差异代谢物,S4 与 S5 的比较中上下调差异代谢物数量一致。这可能有两个原因,第一,幼胚在进行愈伤组织诱导和体细胞胚形成中内源正向激素逐渐被消耗;第二,不定芽诱导分化成苗过程中正向激素含量迅速上升,负向激素含量下调,以维持植株内源激素的平衡。

2.2.2 差异代谢物 KEGG 富集分析 KEGG 富集分析结果(图 4)显示,S1 与 S2 的比较、S2 与 S3 的比较、S3 与 S4 的比较和 S4 与 S5 的比较分别富集了 20 条、6 条、16 条和 7 条代谢途径,其中参与植物激素合成的代谢途径则为 7 条、4 条、6 条和 5 条。图 4a 显示植物激素信号转导、类胡萝卜素生物合成、 α -亚麻酸代谢、苯丙氨酸代谢、二萜生物合成、玉米素生物合成和色氨酸代谢富集在 S1 与 S2 的比较;

二萜生物合成、 α -亚麻酸代谢、玉米素生物合成、植物激素信号转导富集在 S2 与 S3 的比较(图 4b);二萜生物合成、色氨酸代谢、玉米素生物合成、植物激素信号转导、 α -亚麻酸代谢、类胡萝卜素生物合成富集在 S3 与 S4 的比较(图 4c);类胡萝卜素生物合成、植物激素信号转导、玉米素生物合成、二萜生物合成、色氨酸代谢富集在 S4 与 S5 的比较(图 4d)。分析发现,植物激素信号转导、二萜生物合成和玉米素生物合成是共同显著富集的代谢途径,植物激素信号转导参与多种激素的合成,而二萜生物合成则为 GA 合成、玉米素生物合成成为 CK 合成的上游途径;类胡萝卜素生物合成和色氨酸代谢途径分别参与 ABA 和 AUX 合成前体物质的生成,富集在 S1 与 S2 的比较、S3 与 S4 的比较和 S4 与 S5 的比较中; α -亚麻酸代谢则参与 JA 合成,富集在 S1 与 S2 的比较、S2 与 S3 的比较和 S3 与 S4 的比较中;苯丙氨酸代谢只富集在 S1 与 S2 的比较中,参与 SA 的合成。由此可以看出,油茶幼胚进行愈伤组织诱导时(S1~S2),多种植物激素参与调控,启动细胞再生;随着体细胞胚的形成(S2~S3),ABA 和 AUX 合成的相关途径变化不明显,而不定芽的诱导(S3~S4)中 ABA 和 AUX 的含量又逐渐增高,参与细胞生长和器官形成。JA 参与 S1~S4 的过程,分化成苗后便不再参与幼苗的生长。另外,二萜生物合成途径存在



a: 5 个生长阶段不同代谢产物的热图。代谢物含量标准化后的数值大小以不同颜色填充显示 (蓝色表示高含量, 粉色表示低含量)。ABA: 脱落酸; AUX: 生长素; CK: 细胞分裂素; ETH: 乙烯; GA: 赤霉素; JA: 茉莉酸; SA: 水杨酸; ABA: 脱落酸; ABA-ald: 脱落酸葡萄糖酯; ICA: 吲哚-3-甲酸; MEIAA: 吲哚-3-乙酸甲酯; TRA: 色胺; IAA: 吲哚-3-乙酸; IAA-Glu: 吲哚乙酸-谷氨酸; IAA-Val-Me: 吲哚乙酸-缬氨酸甲酯; IBA: 吲哚-3-丁酸; IAA-Asp: 吲哚乙酸-天冬氨酸; ICAld: 吲哚-3-甲醛; Indole: 吲哚; TRP: L-色氨酸; mT9G: 3-[(9-β-D-吡喃葡萄糖基-9H-嘌呤-6-基)氨基]甲基苯酚; mTR: N-(3-羟基苄基)腺苷; tZR: 反式玉米素; K9G: 呋喃甲基腺嘌呤-9-葡萄糖苷; pT9G: 4-[(9-β-D-吡喃葡萄糖基-9H-嘌呤-6-基)氨基]甲基苯酚; 2MeScZR: 2-甲基顺式玉米素核苷; BAPR: 6-苄基腺苷; DHZROG: 双氢玉米核苷-O-糖苷; IP: N-6-异戊烯腺嘌呤; IPR: 异戊烯腺嘌呤核苷; cZROG: 顺式玉米核苷-O-糖苷; iP7G: 异戊烯腺嘌呤-7-葡萄糖苷; BAP: 6-苄基腺嘌呤; iPRMP: N-6-异戊烯基腺苷 5'-单磷酸酯; DHZ7G: 双氢玉米素-7-糖苷; BAP7G: 6-苄基氨基-7-B-D-吡喃葡萄糖基嘌呤; tZOG: 反式-玉米素-9-β-葡萄糖苷; oT: 6-(2-羟基苄基氨基)嘌呤; pT: 4-[(9H-嘌呤-6-基氨基)甲基]苯酚; pTR: N-(4-甲氧基苄基)-腺苷; oT9G: 2-[(9-B-D-吡喃葡萄糖基-9H-嘌呤-6-基)氨基]甲基苯酚; BAP9G: 6-苄基氨基-9-(A-D-吡喃葡萄糖基)嘌呤; oTR: 6-(2-羟基苄基)氨基嘌呤核苷; ACC: 1-氨基环丙烷羧酸; GA3: 赤霉素 3; GA9: 赤霉素 9; GA19: 赤霉素 19; JA: 茉莉酸; JA-ILE: 茉莉酸-异亮氨酸; OPDA: 12-氧-植物二烯酸; JA-Phe: 茉莉酸-苯丙氨酸; JA-Val: 茉莉酸-缬氨酸; OPC-6: 氧化戊烯基环戊烷己酸; OPC-4: 氧化戊烯基环戊烷丁酸; SAG: 水杨酸-2-O-β-葡萄糖苷; MeSAG: 水杨酸甲酯 O-β-葡萄糖苷; SA: 水杨酸; Phe: L-苯丙氨酸。b: 差异代谢物维恩图分析。c: 上调和下调差异代谢物的数量。S1/S2: S1 与 S2 的比较; S2/S3: S2 与 S3 的比较; S3/S4: S3 与 S4 的比较; S4/S5: S4 与 S5 的比较。S1~S5 见图 1 注。Z 值为标准分数, 差异代谢物的个数与平均数的差再除以标准差。

图 3 白花油茶胚性愈伤组织诱导成苗过程中内源激素分析

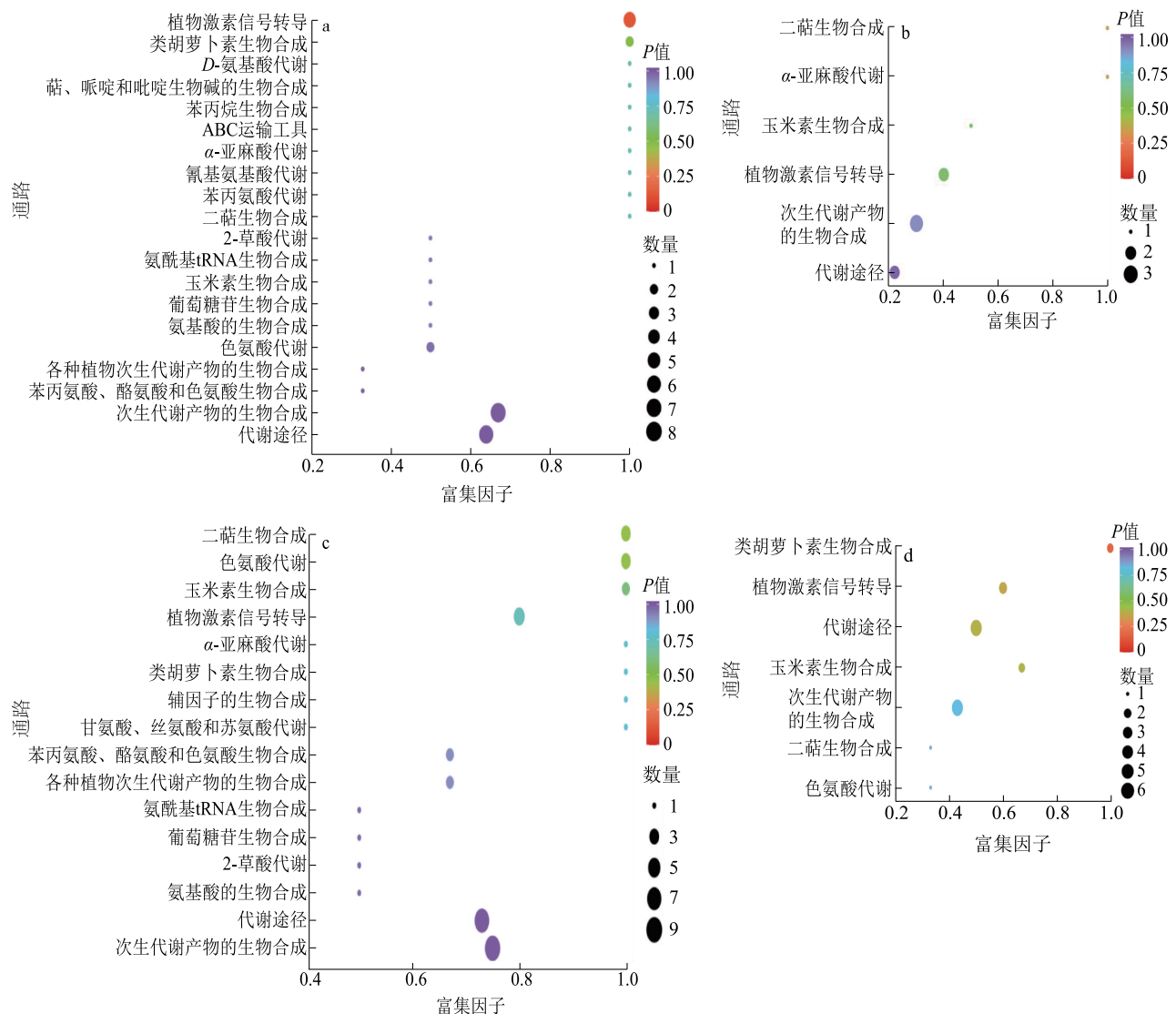
Fig.3 Endogenous hormone analysis during induction of embryogenic callus in *Camellia oleifera*

于整个发育时期,但富集到的代谢物数量则较少。

2.3 转录组学分析

2.3.1 差异表达基因分析 在 S1、S2、S3、S4、S5 样本组织中,发现了特异的和共同的差异表达基因,共发现 13 336 个差异表达基因,包括 13 215 个特异差异表

达基因和 121 个共同差异表达基因。比较发现 S1 与 S2 的比较、S2 与 S3 的比较、S3 与 S4 的比较和 S4 与 S5 的比较中分别有 6 670 个、3 432 个、4 160 和 4 331 个差异表达基因 (图 5a)。上调和下调的差异表达基因的数量如图 5b 所示。在 4 个比较中, S1 与 S2 的比较



a; S1 与 S2 的比较 KEGG 富集气泡图; b; S2 与 S3 的比较 KEGG 富集气泡图; c; S3 与 S4 的比较 KEGG 富集气泡图; d; S4 与 S5 的比较 KEGG 富集气泡图。点的大小表示富集到差异代谢物的个数,点的颜色表示 P 值,越红表示富集越显著。S1~S5 见图 1 注。 P 为假定值。

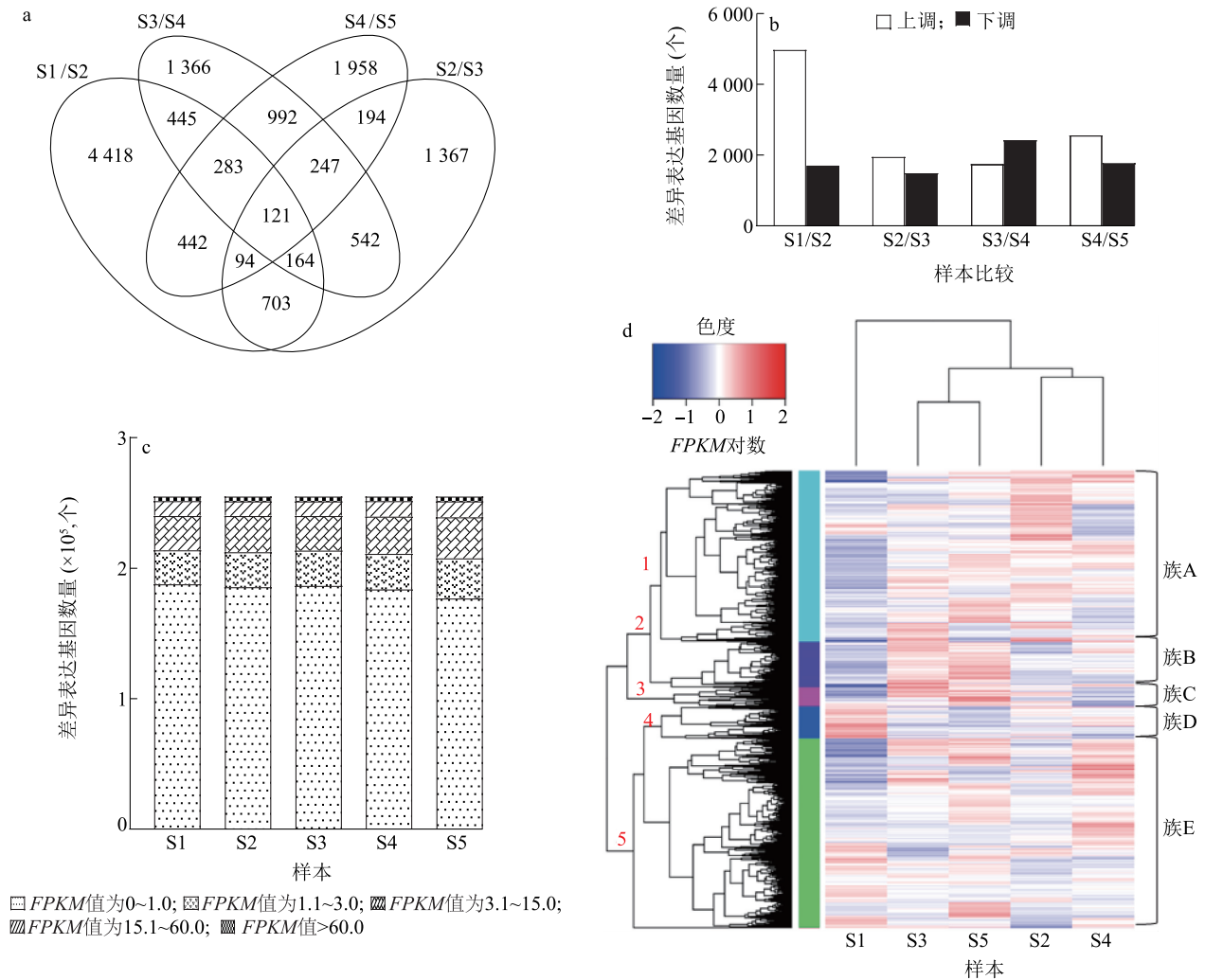
图 4 差异代谢产物 KEGG 富集分析

Fig.4 KEGG enrichment analysis of differential accumulated metabolites

中上调差异表达基因数量显著大于 S2 与 S3 的比较、S3 与 S4 的比较和 S4 与 S5 的比较,这可能是由于内源激素的变化引起的,幼胚愈伤组织诱导过程中植物激素含量变化较大。另外,根据基因表达水平对 4 个比较中差异表达基因进行了聚类。根据 $FPKM$ (每千个碱基的转录每百万映射读取的片段数)值将 5 个文库中的基因表达水平分为极高($FPKM > 60.0$)、高($FPKM$ 为 15.1~60.0)、中($FPKM$ 为 3.1~15.0)、低($FPKM$ 为 1.1~3.0)和极低($FPKM$ 为 0~1.0)5 类(图 5c)。其中差异表达基因中占比最大的是极低表达基因,占比最小的是极高表达基因。此外,通过层

次聚类分析将 13 336 个差异表达基因划分为 A、B、C、D、E 5 个簇(图 5d)。

2.3.2 差异表达基因 KEGG 功能分析 将差异表达基因进行 KEGG 通路注释分析,结果(图 6)表明,白花油茶胚性愈伤组织诱导及分化成苗过程中激素相关差异表达基因在玉米素生物合成、苯丙氨酸代谢、 α -亚麻酸代谢和色氨酸代谢等代谢途径显著富集,其中玉米素生物合成、苯丙氨酸代谢、 α -亚麻酸代谢富集在 S1 与 S2 的比较中(图 6a),玉米素生物合成、苯丙氨酸代谢富集在 S2 与 S3 的比较中(图 6b),S3 与 S4 的比较富集了植物激素信号转导、玉



a: 差异基因数量维恩图; b: 文库中差异表达基因的数量; c: 差异表达基因的 FPKM 值分布; FPKM: 每千个碱基的转录每百万映射读取的片段数量; d: 差异表达基因的聚类分析。S1~S5 见图 1 注。以 $\lg(\text{FPKM}+1)$ 值聚类, 红色表示高表达基因, 蓝色表示低表达基因。从蓝色到红色表示基因表达量逐渐增加。S1/S2、S2/S3、S3/S4、S4/S5 见图 3 注。

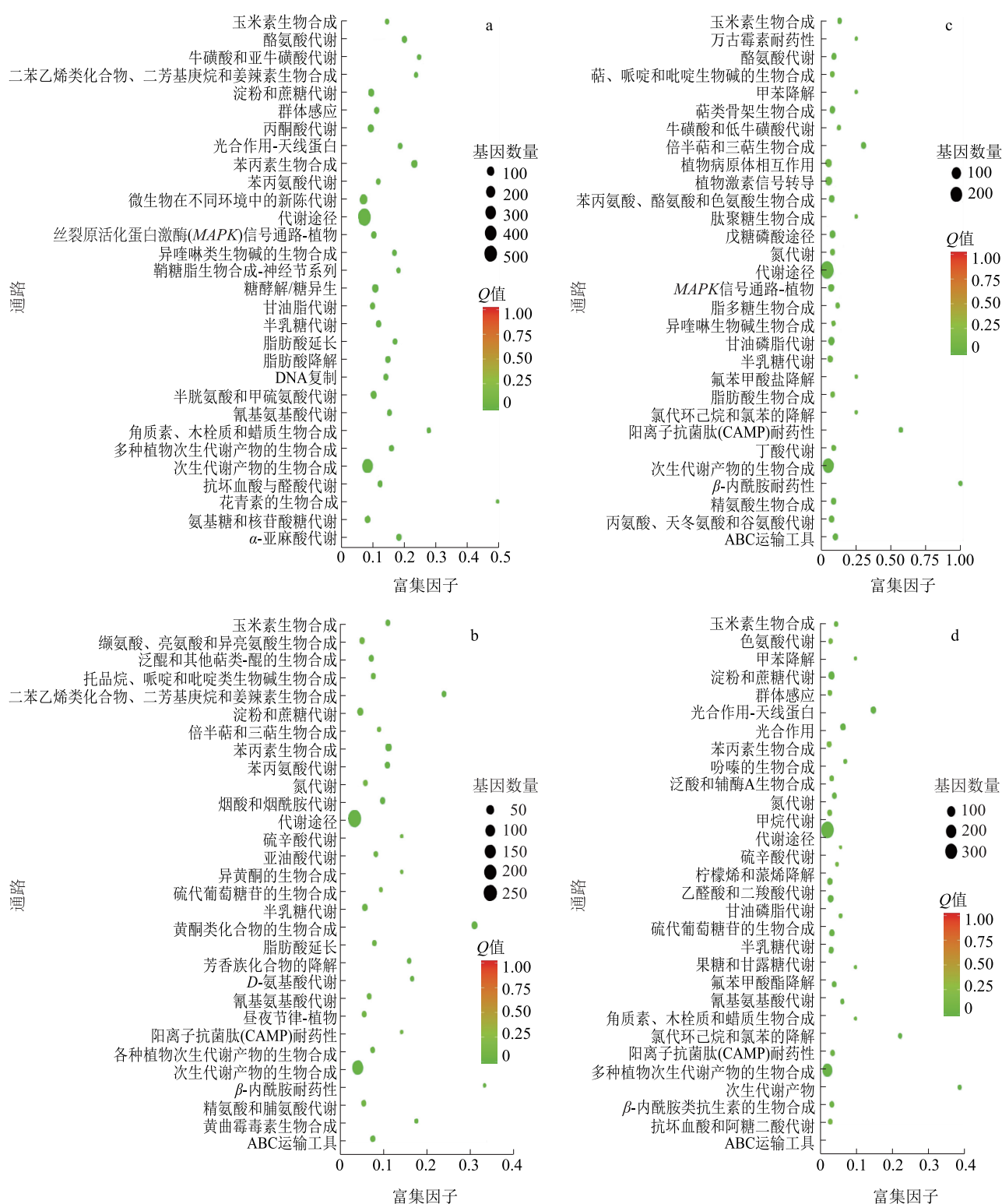
图 5 差异表达基因的表达谱分析

Fig.5 Expression profiling of differentially expressed genes

米素生物合成(图 6c), 而 S4 与 S5 的比较则富集了玉米素生物合成和色氨酸代谢(图 6d)。分析发现, 在 S1~S5 阶段, CK 促进细胞分裂和形态建成; SA 在 S1~S3 阶段, 调控愈伤组织形成和体细胞胚的诱导; 在 S4~S5 阶段, 不定芽成苗时 AUX 起着关键作用。因此, 比对差异代谢物的 KEGG 分析结果(图 4), 可以发现, 7 种植物激素除 ETH 以外, ABA、JA、SA、GA、CK 和 AUX 在白花油茶愈伤组织诱导及分化成苗过程中, 均起着不同的调控作用, 而这些激素合成的差异表达基因则显著表达在 CK、SA 和 AUX 的合成途径中。由此可以推测, 在白花油茶植物再生体系建立的过程中, CK、SA 以及 AUX 的调控作

用更强, 相关差异表达基因的表达水平变化也较显著。

2.3.3 激素相关差异表达基因筛选 为了探索关键的生长调节剂如何与油茶胚性愈伤组织诱导及分化成苗过程相关, 我们检测了与激素相关的差异表达基因在此过程中的表达模式。KEGG 富集分析结果显示, 油茶以幼胚为外植体的再生体系主要受 6 种激素代谢途径的相互调节, 共筛选出 54 个差异表达基因, 包括 21 个作用于植物激素信号转导通路中的差异表达基因(图 7a)、33 个参与激素合成代谢的差异表达基因(图 7b)。其中上游合成代谢途径包括色氨酸代谢(5 个差异表达基因)、玉米素生物合成(3 个差异



a; S1 与 S2 的比较 KEGG 富集气泡图; b; S2 与 S3 的比较 KEGG 富集气泡图; c; S3 与 S4 的比较 KEGG 富集气泡图; d; S4 与 S5 的比较 KEGG 富集气泡图。点的大小表示富集到差异表达基因个数, 点的颜色对应于不同的 Q 值范围。 Q 值为衡量一组基因标记在区分两个或多个类别时的价值。S1~S5 见图 1 注。

图 6 差异表达基因 KEGG 富集分析

Fig.6 KEGG enrichment of differentially expressed genes

表达基因)、二萜生物合成(2 个差异表达基因)、类胡萝卜素生物合成(4 个差异表达基因)、 α -亚麻酸代谢(4 个差异表达基因)、苯丙氨酸代谢(3 个差异表达基因),下游合成代谢途径分别为生长素代谢(8 个差异表达基因)、细胞分裂素代谢(5 个差异表达基因)、赤霉素生物合成(2 个差异表达基因)、脱落酸生物合成(6 个差异表达基因)、茉莉酸代谢(7 个差异表达基因)和水杨酸代谢(5 个差异表达基因)。

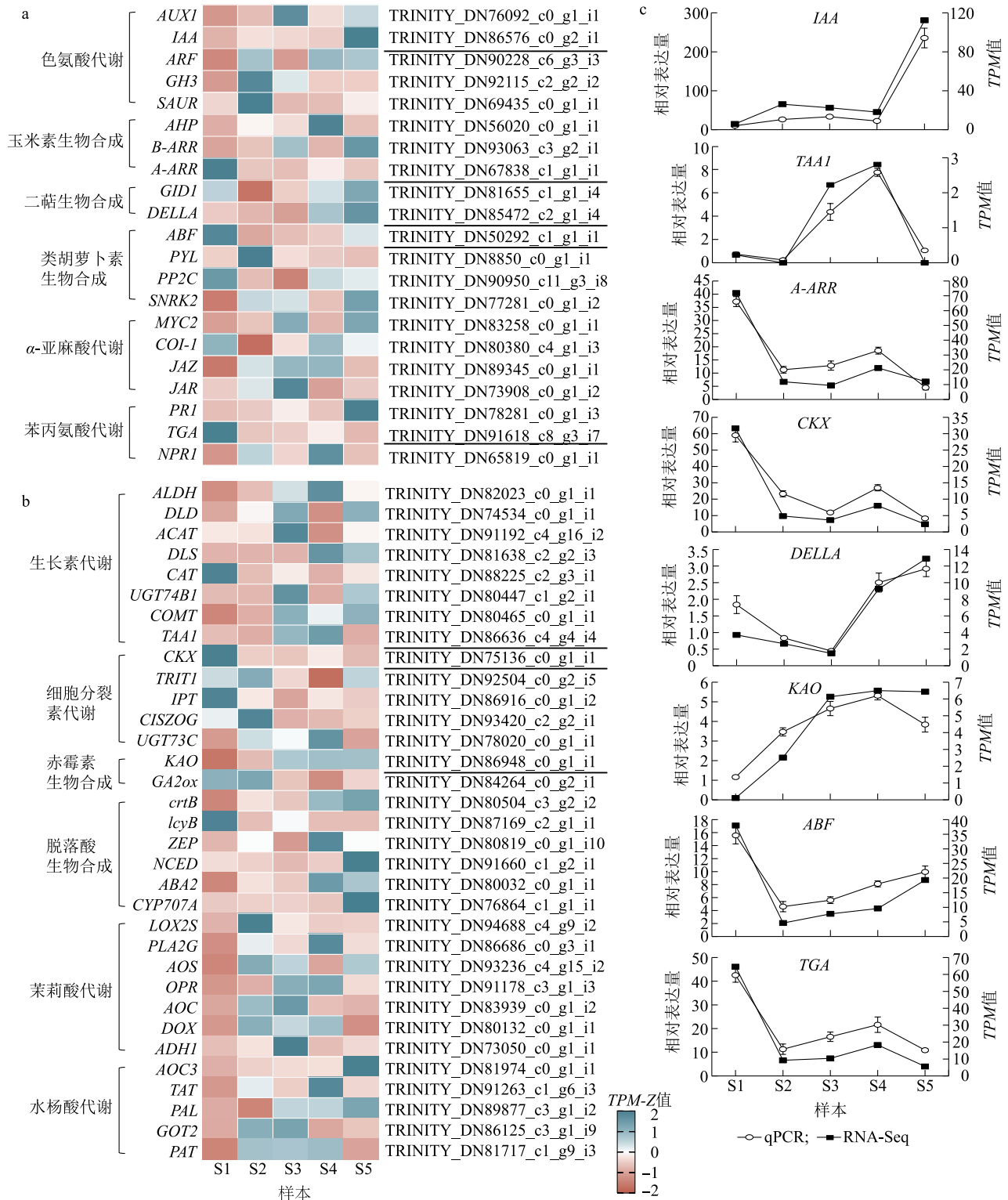
从差异表达基因热图(图 7a 和图 7b)可以看出,在色氨酸代谢途径中生长素基因(*AUX1*)、吲哚乙酸基因(*IAA*)表达量变化总体呈现上调趋势,而糖苷水解酶基因(*GH3*)和生长素上调小 RNA 基因(*SAUR*)在幼胚 S1 阶段含量较低,随着 S2 阶段愈伤组织的形成表达量骤增,随后含量又降低;在生长素代谢过程中,乙醛脱氢酶基因(*ALDH*)、皂苷合成酶基因(*DLS*)、生长素合成酶基因(*TAA1*)在 S1~S4 阶段基本呈上调表达,二氢硫辛酰胺脱氢酶基因(*DLD*)、乙酰辅酶 A 乙酰转移酶基因(*ACAT*)、尿苷二磷酸糖基转移酶基因(*UGT74B1*)、咖啡酸 *O*-甲基转移酶基因(*COMT*) 在体细胞胚诱导的 S3 阶段表达量最高,而生长素转运蛋白酶基因(*CAT*)在 S1 阶段表达量最高,总体呈现下调表达。在玉米素生物合成途径中,组氨酸磷酸转移蛋白基因(*AHP*)和 B 型反应调节剂基因(*B-ARR*)总体上调表达,而 A 型反应调节剂基因(*A-ARR*)表达趋势则相反;在细胞分裂素代谢中,细胞分裂素氧化脱氢酶基因(*CKX*)、tRNA 异戊基转移酶基因(*TRIT1*)、异戊烯基转移酶基因(*IPT*)和顺式玉米素 *O*-糖基转移酶基因(*CISZOG*) 在 S1 阶段表达量较高,参与调控细胞分裂促进愈伤形成;而糖基转移酶基因(*UGT73C*)的表达趋势与 *AHP* 相似,在不定芽诱导(S4 阶段)时含量急剧上升,参与芽的形态建成。在二萜生物合成和赤霉素生物合成中,筛选获得的差异表达基因较少,其中赤霉素不敏感矮化基因 1(*GID1*)、转录调控因子基因(*DELLA*)和贝壳杉烯酸氧化酶基因(*KAO*)正向调控,主要在 S3~S4 阶段促进不定芽诱导及植株生长,而 GA2-氧化酶基因(*GA2ox*)则负反馈调控。类胡萝卜素生物合成和脱落酸生物合成途径中共筛选出 10 个差异表达基因(DEGs),其中脱落酸反应元件结合因子(*ABF*)、脱落酸受体基因(*PYL*)、2C 型蛋白磷酸酶基因(*PP2C*)和番茄红素 β -环化酶基因(*lycB*) 总体呈下调表达,而蔗糖非醇

解型蛋白激酶基因(*SNRK2*)、欧文氏菌八氢番茄红素合成酶基因(*crtB*)、玉米黄质环化酶基因(*ZEP*)、9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧酶基因(*NCED*)、*ABA2* 和 8'-羟化酶编码基因(*CYP707A*) 则整体呈上调表达。 α -亚麻酸代谢和茉莉酸代谢途径中,筛选的 11 个 DEGs 主要调控 S2~S4 阶段的组织发育过程。苯丙氨酸代谢中的病程相关蛋白基因(*PR1*)、非表达病程相关蛋白基因(*NPR1*)以及水杨酸代谢过程中丙二烯氧化物环化酶基因(*AOC3*)、酪氨酸转氨酶基因(*TAT*)、苯丙氨酸解氨酶基因(*PAL*) 整体呈上调表达,而碱性区/亮氨酸拉链基序 bZIP 转录因子基因(*TGA*) 则下调表达,天冬氨酸转氨酶基因(*GOT2*)和棕榈酰转移酶基因(*PAT*) 主要作用于 S2~S4 阶段的调控。

2.3.4 转录组的实时荧光定量 PCR 验证 选择 8 个差异表达基因,通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)测定这些基因在 S1~S5 的表达水平。结果(图 7c)显示,这 8 个差异表达基因的相对表达水平与其 TPM 值(每百万次读取中的转录本数)极显著相关($P < 0.01$),Pearson 相关系数分别为 0.994、0.968、0.946、0.970、0.934、0.908、0.983 和 0.984。由此可以说明,转录组测序获得的基因差异表达结果可靠。

2.4 植物激素转录组学和代谢组学整合分析

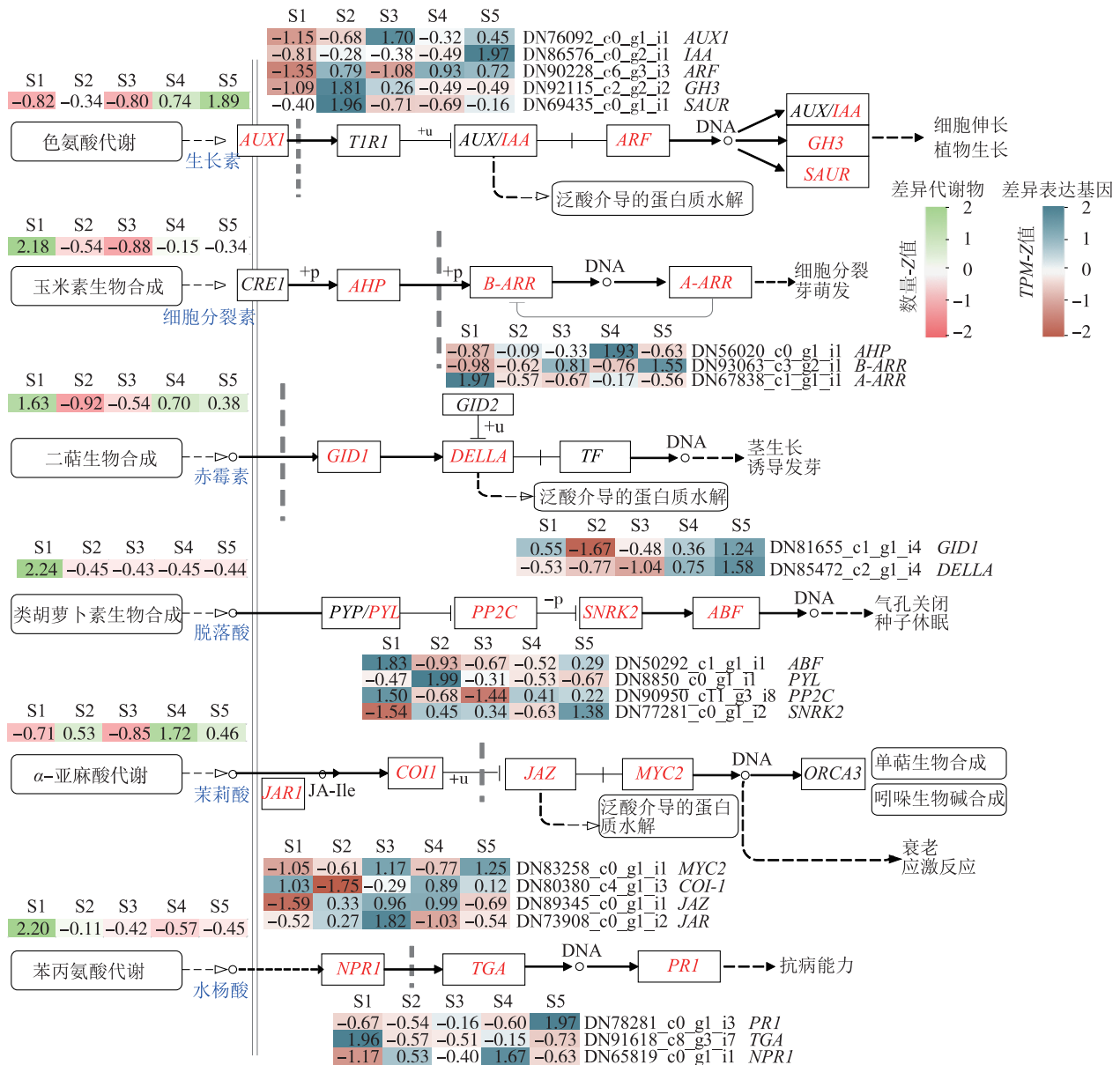
为了更好地了解内源激素在胚性愈伤组织诱导及分化成苗过程中的差异积累发生的分子机制,本研究通过转录组学与代谢组学联合分析多种激素中差异代谢物(DAMs)和差异表达基因(DEGs)之间的通路关系(图 8)。植物激素信号转导通路分析结果显示,在胚性愈伤组织诱导成苗阶段 KEGG 通路中共富集了 6 种激素类差异代谢物和 21 个差异表达基因(图 8)。基于差异表达基因的 KEGG 分析结果,在白花油茶植物再生体系建立的过程中,CK、SA 以及 AUX 的调控作用更强,相关差异表达基因的表达水平变化也较显著。因此,我们进一步对生长素、细胞分裂素和水杨酸合成途径进行分析,发现在 KEGG 通路中共富集到 8 种差异代谢物,包括吲哚(Indole)、L-色氨酸(Trp)、色胺(TrA)、吲哚-3-乙酸(IAA)、玉米素核苷(iZR)、反式-玉米素-9- β -葡萄糖苷(iZOG)、异戊烯腺嘌呤核苷(IPR)、L-苯丙氨酸(Phe);18 个差异表达基因,包括 *ALDH*、*TAA1*、*COMT*、*IPT*、*TRIT1*、*CKX*、*PAT* 和 *PAL* 等(图 9)。



a: 植物激素信号传导过程中相关差异表达基因表达模式热图; b: 植物激素合成途径中相关差异表达基因表达模式热图; c: 通过 RNA-Seq 和 qPCR 分析比较 *IAA*、*TAA1*、*A-ARR*、*CKX*、*DELLA*、*KAO*、*ABF* 和 *TGA* 的表达模式。图中空心圆表示 qPCR 值, 黑色方块表示 RNA-Seq 的 TPM (每百万次读取中的转录本数) 值。TPM-Z 表示将 TPM 值转换为 Z 值; Z 值见图 3 注。S1~S5 见图 1 注。右侧字符代表差异表达基因的基因编号, 下划线表示 qPCR 验证所选择的 8 个差异表达基因的基因编号, 具体见表 1。

图 7 激素相关基因的鉴定和表达分析

Fig.7 Identification and expression analysis of hormone-related genes



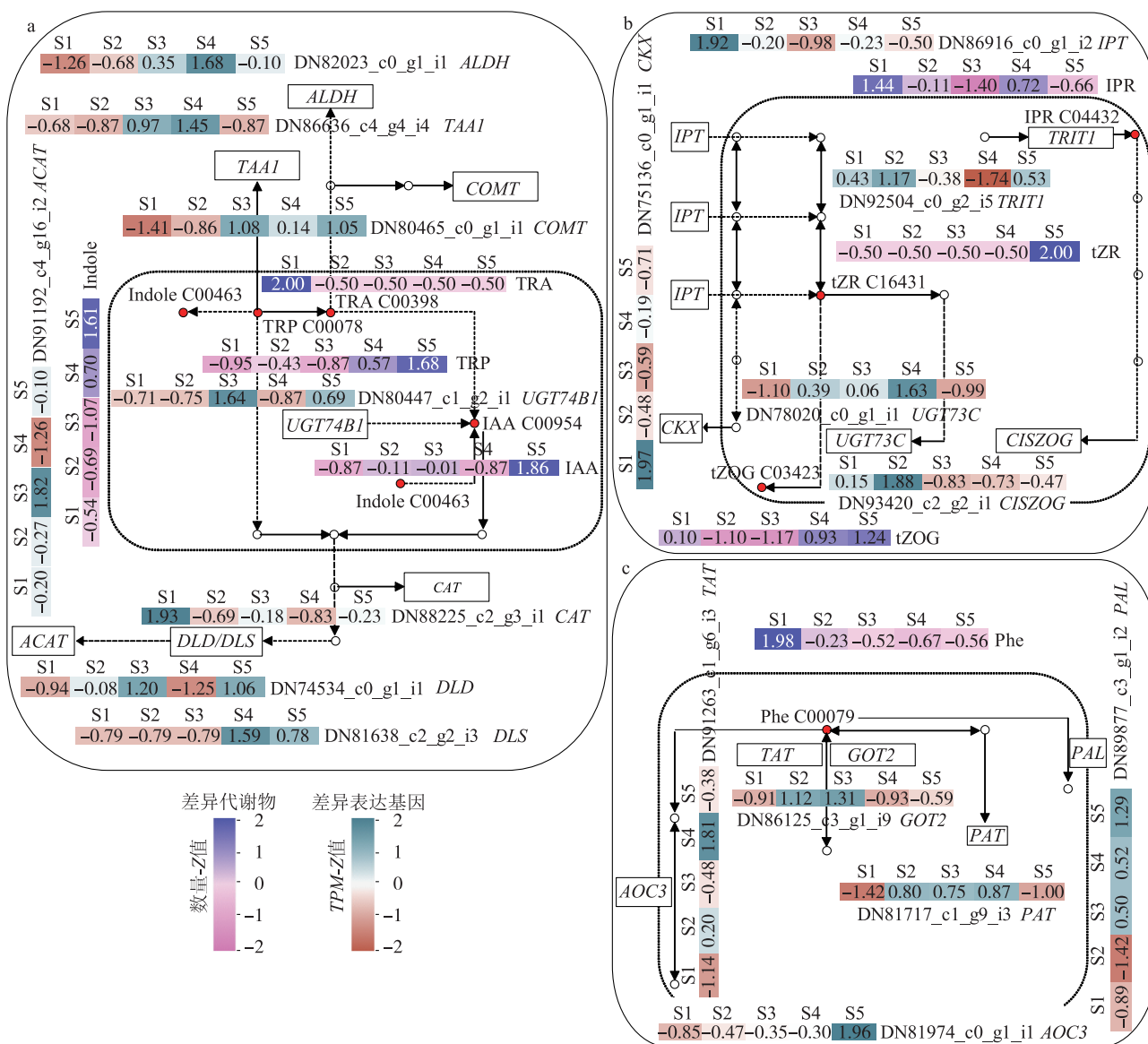
DAMs: 差异代谢物。DEGs: 差异表达基因。热图显示了 DAMs 和 DEGs 的表达水平。绿色和蓝色代表高表达水平, 而粉色和铁红色代表低表达水平。S1~S5 见图 1 注。AUX1: 生长素基因; TIR1: 运输抑制剂响应蛋白基因 1; IAA: 吲哚乙酸基因; ARF: 生长素响应因子基因; GH3: 糖苷水解酶基因; SAUR: 生长素上调小 RNA 基因; CRE1: 细胞分裂素受体基因; AHP: 组氨酸磷酸转移蛋白基因; B-ARR: B 型反应调节剂基因; A-ARR: A 型反应调节剂基因; GID1: 赤霉素不敏感矮化基因 1; GID2: 赤霉素不敏感矮化基因 2; DELLA: 转录调控因子基因; TF: 赤霉素转录因子基因; PYP: 叶黄素酯合成基因; PYL: 脱落酸受体基因; PP2C: 2C 型蛋白磷酸酶基因; SNRK2: 蔗糖非酵解型蛋白激酶基因; ABF: 脱落酸反应元件结合因子; JAR1: 茉莉酸-氨基酸合成酶基因 1; COI1: 冠菌素不敏感蛋白基因 1; JAZ: 茉莉酸 ZIM 结构域蛋白基因; MYC2: 髓细胞组织增生蛋白基因 2; ORCA3: 茉莉酸转录组调控因子基因; NPR1: 非表达病程相关蛋白基因; TGA: 碱性区/亮氨酸拉链基序 bZIP 转录因子基因; PR1: 病程相关蛋白基因; TMP-Z 值见图 7 注。Z 值见图 3 注。

图 8 白花油茶再生过程中激素代谢途径及代谢物和基因的差异分析

Fig.8 Analysis of hormone metabolic pathways and differences in metabolites and genes during regeneration of *Camellia oleifera*

整合通路分析结果发现, 激素合成差异代谢物和差异基因在 S1~S5 中表现出不同的积累模式, 其中激素 AUX、GA、JA 含量总体呈上升趋势, 差异表达基

因 IAA、ARF、GID1、DELLA、PR1 调控趋势基本与之一致; CK、ABA 和 SA 含量在 S1 阶段最高, 促进细胞分裂和愈伤形成, 调控差异基因 A-ARR、ABF、PP2C 和



a: 色氨酸代谢途径; b: 玉米素生物合成的途径; c: 苯丙氨酸代谢途径。DAMs: 差异代谢物。DEGs: 差异表达基因。热图显示了 DAMs 和 DEGs 的表达水平。紫色和蓝色代表高表达水平, 玫红色和铁红色代表低表达水平。S1~S5 见图 1 注。方框中的黑色字体为 DEGs; 红心圆为 DAMs。ALDH: 乙醛脱氢酶基因; TAA1: 生长素合成酶基因; COMT: 咖啡酸 O-甲基转移酶基因; UGT74B1: 尿苷二磷酸糖基转移酶基因; CAT: 生长素转运蛋白酶基因; ACAT: 乙酰辅酶 A 乙酰转移酶基因; DLD: 二氢硫辛酰胺脱氢酶基因; DLS: 皂苷合成酶基因; IPT: 异戊烯基转移酶基因; TRIT1: tRNA 二甲基转移酶基因; CKX: 细胞分裂素氧化脱氢酶基因; UGT73C: 糖基转移酶基因; CISZOG: 顺式玉米素 O-糖基转移酶基因; PAL: 苯丙氨酸解氨酶基因; TAT: 酪氨酸转氨酶基因; GOT2: 天冬氨酸转氨酶基因; PAT: 棕榈酰转移酶基因; AOC3: 丙二烯氧化物环化酶基因; Indole: 吲哚; TRA: 色胺; TRP: L-色氨酸; IAA: 吲哚-3-乙酸; IPR: 异戊烯腺嘌呤核苷; tZR: 反式玉米素; tZOG: 反式-玉米素-9 β -葡萄糖苷; Phe: L-苯丙氨酸。TPM-Z 值、TPM 值见图 7 注。Z 值见图 3 注。

图 9 3 种主要的激素途径中代谢物和基因的差异分析

Fig.9 Differential analysis of metabolites and genes in three major hormonal pathways

TA 在 S1~S2 阶段下调表达, 3 种差异代谢物与 4 个差异表达基因表达趋势一致, 呈正相关表达 (图 8)。图 9a 中显示, 代谢物 TRP 在 S1 含量最低, 随着愈伤组织形成逐渐增加, 基本与 Indole 含量正相关, 与 TRA 含量负相关; 另外, Indole 和 UGT74B1 参与 IAA

的合成。在色氨酸代谢中, TRP 调控 TAA1 的表达, TRA 与 ALDH 和 COMT 的表达相关, TRP 和 IAA 共同作用于差异基因 CAT、DLD/DLS 和 ACAT 的表达。进一步分析玉米素生物合成途径, 在 KEGG 通路中发现差异表达基因 IPT 与 CKX 相互调控, 同时参与 tZR

的合成以及反向调控 *iZOG* 的表达水平;随着 *TRIT1* 表达水平发生变化, *IPR* 含量变化趋势则与之基本一致, *Phe* 负反馈调控 *CISZOG* 的表达(图 9b)。最后对苯丙氨酸代谢途径的研究结果显示,在 KEGG 通路中发现了差异代谢物 *Phe*,在 S1~S4 过程中其含量逐渐减少,而它所调控的 *PAL*、*PAT*、*TAT*、*GOT2* 和 *AOC3* 表达则基本呈上调趋势,说明 *Phe* 在此过程中起着负反馈调控作用(图 9c)。

对其他内源激素的进一步分析结果表明,在油茶再生过程中 ABA 和 JA 的激素平均含量较低,GA 平均含量则最低, AUX 和 SA 的平均含量分别高达 GA 的 757 倍和 8 130 倍,而 CK 的平均含量也分别高达 ABA 和 JA 的 5 倍和 4 倍。这 3 种激素含量较低,发挥的调控作用不如 CK、SA 以及 AUX 显著。KEGG 通路上富集了包括 *GID1*、*DELLA*、*PYL*、*PP2C* 和 *JAR1* 等差异表达基因,这些差异表达基因参与信号转导(图 8),同时与 *KAO*、*GA2ox*、*ZEP* 及 *OPR* 等 15 个差异表达基因共同调控 GA、ABA 和 JA 的合成。这些差异表达基因在再生过程中与 CK、SA 以及 AUX 合成过程中的 18 个差异表达基因共同发挥作用,具体作用机制有待下一步研究。

3 讨论

油茶与很多山茶科植物一样,外植体直接产生不定芽的形态器官较难,不易获得再生植株,在遗传转化过程中成功率极低,最终转基因成功的也极少,仅茶树(*Camellia sinensis*)通过农杆菌介导成功获得转基因植株^[28]。因此建立有效的再生体系是山茶属植物遗传育种的前提之一。植物外植体形态不同,体内激素水平也存在差异,导致外源激素对其作用不一,因此成功诱导外植体形成再生植株,激素的变化起着至关重要的作用^[5, 29]。

本研究通过代谢组学技术对油茶胚性愈伤组织诱导成苗过程中的相关激素含量进行定性和定量分析,发现在胚性愈伤组织诱导成苗的过程中,7 种激素含量均发生变化,其中 AUX、SA、CK 和 ABA 含量变化显著,而 GA 含量较低。转录组测序结果中 KEGG 功能分析结果表明,7 种植物激素除 ETH 外,ABA、JA、SA、GA、CK 和 AUX 均参与调控,而这些激素合成的差异表达基因则显著表达在 CK、SA 和 AUX 的合成途径中。代谢组学和转录组学整合分析发现,在油茶胚性愈伤组织诱导及分化成苗时,AUX、CK 和

SA 起主要调控作用,ABA、JA、GA 次之,而 ETH 在此过程中调控作用不明显。相关研究结果表明,AUX 和 CK 促进细胞生长及分裂,它们共同决定着植物组织和器官的再生方式和再生结果^[30-31]。添加外源 AUX 和 CK 通过激活特定发育程序增强了体外再生反应;伤口信号的响应是植物再生的前提,SA 作为伤口响应激素对启动细胞再生具有重要的调控作用^[30-31];GA 主要促进植物茎的伸长^[6]。

参与调控油茶再生的激素有多种,目前这些激素合成的关键差异代谢物和差异表达基因尚不明确。本研究在 5 种样本中共检测到 51 种激素类差异代谢物和 13 336 个差异表达基因,KEGG 通路富集分析结果表明,较多的差异代谢物和差异表达基因显著富集到植物激素信号转导、类胡萝卜素生物合成、 α -亚麻酸代谢、苯丙氨酸代谢、二萜生物合成、玉米素生物合成和色氨酸代谢通路。国少旭等^[32]对盐肤木非胚性与胚性愈伤诱导组织进行 KEGG 富集分析发现,差异表达基因在苯丙烷类生物合成、植物信号转导和苯丙氨酸代谢等途径显著富集。

KEGG 富集分析结果显示,油茶以幼胚为外植体的再生体系主要受 6 种激素代谢途径的相互调节,共筛选出 54 个差异表达基因,其中 21 个作用于植物激素信号转导通路中,在信号转导途径中 *IAA*、*ARF*、*AHP*、*B-ARR*、*GID1*、*DELLA*、*SNKR2*、*MYC2*、*JAZ*、*PR1* 和 *NPR1* 在不定芽诱导及分化成苗生长过程中起正向调控作用。同时 *AUX1*、*ARF*、*GH3*、*SAUR*、*PYL*、*JAR* 等主要促进愈伤组织诱导及胚状体的形成,有研究发现 *SAUR15* 是 AUX 诱导的负调控因子,敲除 *Zm-SAUR15* 可加速玉米胚性愈伤组织诱导的形成,转化效率提高 5 倍^[33],本研究 *SAUR* 在油茶胚性愈伤组织诱导中也为反向调控。最后 *A-ARR*、*ABF*、*PP2C* 和 *TGA* 在幼胚期表达量较高,对相关激素合成步骤中的所有下游反应都有着一定的影响。此外,33 个差异表达基因参与了激素的合成,其中在 KEGG 通路中,我们对 AUX、CK 和 SA 的合成途径进行差异代谢物和差异表达基因的联合分析结果表明,在 KEGG 通路中共富集到 8 种差异代谢物和 18 个差异表达基因。

在色氨酸代谢途径中,随着胚性愈伤组织的诱导,TRP 基本呈现递增趋势,催化 *TAA1* 的表达;同时激活下游 TRA 和 Indole 的生成,催化 *ALDH*、*COMT* 和 *IAA* 的表达,进而促进 IAA 含量的增加,促进愈伤组织的形成和胚状体的生长。有研究结果显

示, *TAA1* 和 *IAA30* 的表达调节 AUX 的合成, 从而促进体细胞胚的发生^[11-12]。在玉米素合成途径中, *A-ARR* 和 *IPT* 的表达趋势与 CK 含量变化一致, 在 S1 幼胚期含量最高, 诱导细胞的分裂, 促进愈伤组织形成; 而 *B-ARR* 的表达趋势则相反。CK 通过 *WOX5* 和 *B-ARR12* 抑制 *A-ARR* 表达, 愈伤组织诱导培养基 (CIM) 上诱导的愈伤组织对 CK 响应敏感性的增强可使细胞获得多能性^[34]。Zubo 等^[17] 研究发现, CK 通过 *ARR* 的介导激活 *WUS*, 从而促进芽顶端分生组织的形成, 从而诱导出不定芽。*IPT* 是 CK 合成基因, 在愈伤组织诱导过程中上调表达, 促进愈伤组织形成^[35-36]。另外, 研究发现 CK 诱导愈伤组织形成的关键组分是 *B-ARR*, 创伤响应基因 *WIND* 通过上调 *B-ARR* 的表达水平激活 CK 生物合成途径, 促进愈伤组织诱导^[14, 37]。SA 可促进植物细胞的分裂和伸长, 从而增加外植体的大小, 在本研究中信号转导基因 *PR1*、*NPR1* 和 SA 的生物合成基因 *AOC*、*TAT* 等在愈伤组织诱导时上调表达, 暗示 SA 在油茶再生过程起正向调控作用, 这与金钱树扦插过程中 SA 对根部愈伤组织诱导的作用相似^[38]。

本研究以白花油茶幼胚为外植体进行胚性愈伤组织诱导和分化成苗, 在此基础上分别进行代谢组学和转录组学分析, 筛选出关键的植物激素种类及鉴定了相关差异代谢物类别和含量, 阐释了调控油茶胚性愈伤组织再生的分子机制及再生促进基因, 研究结果有助于进一步提高遗传转化效率。

参考文献:

- [1] 王 瑞, 陈永忠, 王湘南, 等. 油茶组培苗高效增殖体系的建立 [J]. 中南林业科技大学学报, 2015, 35(10): 40-43.
- [2] 陈永忠, 杨小胡, 彭邵峰, 等. 我国油茶良种选育研究现状及发展策略 [J]. 林业科技开发, 2005, 19(4): 1-4.
- [3] 曹孜义, 刘国民. 实用植物组织培养技术教程 [M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 2003: 9-12.
- [4] ROSA Y, BELLO C, DORNELAS M. Species-dependent divergent responses to *in vitro* somatic embryo induction in *Passiflora* spp. [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2015, 120(1): 69-77.
- [5] NORDINE A, TLEMCANI C R, EI-MESKAOUI A. Regeneration of plants through somatic embryogenesis in *Thymus hyemalis* Lange, a potential medicinal and aromatic plant [J]. In Vitro Cellular & Development Biology-Plant, 2014, 50(1): 19-25.
- [6] 段 娜, 贾玉奎, 徐 军, 等. 植物内源激素研究进展 [J]. 中国农学通报, 2015, 31(2): 159-165.
- [7] 王小菁, 陈 刚. 植物生长调节剂在植物组织培养中的应用 [M]. 2 版. 北京: 化学工业出版社, 2010.
- [8] ATTA R, LAURENS L, ELODIE B D, et al. Pluripotency of *Arabidopsis* xylem pericycle underlies shoot regeneration from root and hypocotyl explants grown *in vitro* [J]. The Plant Journal, 2009, 57(4): 626-644.
- [9] KAREEN A, DURGAPRASAD K, SUGIMOTO K, et al. *PLETHORA* genes control regeneration by a two-step mechanism [J]. Current Biology, 2015, 25(8): 1017-1030.
- [10] PINON V, PRASAD K, GRIGG S P, et al. Local auxin biosynthesis regulation by *PLETHORA* transcription factors controls phyllotaxis in *Arabidopsis* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013, 110(3): 1107-1112.
- [11] BRAYBROOK S A, HARAD J J. LECs go crazy in embryo development [J]. Trends in Plant Science, 2008, 13(12): 624-630.
- [12] HORSTMAN A, LI M F, HEIDMANN I, et al. The BABY BOOM transcription factor activates the LEC1-ABI₃-FUS3-LEC2 network to induce somatic embryogenesis [J]. Plant Physiology, 2017, 175(2): 848-857.
- [13] TOONEN M A J, HENDRIKS T, SCHMIDT E D L, et al. Description of somatic-embryo-forming single cells in carrot suspension cultures employing video cell tracking [J]. Planta, 1994, 194(4): 565-572.
- [14] RIOU-KHAMLICHI C, HUNTLEY R, JACQMARD A, et al. Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin [J]. Science, 1999, 283(5407): 1541-1544.
- [15] IKEDA Y, BANNO H, NIU Q W, et al. The enhancer of shoot regeneration 2 gene in *Arabidopsis* regulates cup-shaped cotyledon 1 at the transcriptional level and controls cotyledon development [J]. Plant & Cell Physiology, 2006, 47(11): 1443-1456.
- [16] WANG J, TIAN C H, ZHANG C, et al. Cytokinin signaling activates *WUSCHEL* expression during axillary meristem initiation [J]. The Plant Cell, 2017, 29(6): 1373-1387.
- [17] ZUBO Y O, BLAKLEY I C, YAMBURENKO M V, et al. Cytokinin induces genome-wide binding of the type-B response regulator ARR10 to regulate growth and development in *Arabidopsis* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017, 114(29): E5995-E6004.
- [18] HUANG Y, WANG X, GE S, et al. Divergence and adaptive evolution of the gibberellin oxidase genes in plants [J]. BMC Evolutionary Biology, 2015, 15(1): 207-221.
- [19] WANG J Y, WU B, LI J Y, et al. Overexpression and silent expression of *CrGA20ox1* from *Camellia reticulata* 'Hentiangao' and its effect on morphological alterations in transgenic tobacco plants [J]. Plant Breeding, 2018, 137(6): 903-911.
- [20] 张庆瑞, 孙建洲, 任凝辉, 等. 芍药组织培养技术研究 [J]. 河南农业科学, 2006, 35(4): 88-90.
- [21] 高朋飞. 层积时间和赤霉素浓度对暴马丁香组织培养的影响 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2022: 24-30.
- [22] 黎 家, 李传友. 新中国成立 70 年来植物激素研究进展 [J].

- 中国科学:生命科学,2019,49(10):1227-1281.
- [23] 李玉珠,余江弟,丁菲菲,等. 植物遗传转化中体细胞再生的分子机制及应用研究进展[J]. 草业学报,2024,33(2):197-210.
- [24] DAIMON Y, TAKABE K, TASAKA M. The CUP-SHAPED COTYLEDON genes promote adventitious shoot formation on calli[J]. Plant & Cell Physiology,2003,44(2):113-121.
- [25] KUNKEL T, NIU Q W, CHAN Y S, et al. Inducible isopentenyl transferase as a high-efficiency marker for plant transformation [J]. Nature Biotechnology,1999,17(9):916-919.
- [26] 王江英,汤雪燕,葛金涛,等. 白花油茶胚性愈伤诱导及植株再生[J]. 浙江农业科学,2023,64(4):841-845.
- [27] 王江英,朱朋波,汤雪燕,等. 外源赤霉素诱导矮生山茶恨天高植株生长的转录组分析[J]. 江苏农业学报,2020,36(1):47-56.
- [28] MONDAL T K, BHATTACHARYA A, AHUJA P S. Transgenic tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze cv. Kangra Jat] plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos [J]. Plant Cell Reports,2001,20(8):712-720.
- [29] 谢从华,柳俊. 植物细胞工程[M]. 北京:高等教育出版社,2004:24-39.
- [30] FATTORINI L, HAUSE B, GUTIERREZ L, et al. Jasmonate promotes auxin-induced adventitious rooting in dark-grown *Arabidopsis thaliana* seedlings and stem thin cell layers by a cross-talk with ethylene signalling and a modulation of xylogenesis [J]. BMC Plant Biology,2018,18(1):182.
- [31] TRAN S, ISON M, FERREIRA-DIAS N C, et al. Endogenous salicylic acid suppresses de novo root regeneration from leaf explants [J]. PLoS Genetics,2023,19(3):e1010636.
- [32] 国少旭,徐子莲,田亚丽,等. 盐肤木非胚性愈伤组织与胚性愈伤组织的比较转录组分析[J/OL]. 分子植物育种,2023:1-12. [2024-03-01]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230801.1405.005.html>.
- [33] WANG Y L, HE S J, LONG Y, et al. Genetic variations in *Zm-SAUR15* contribute to the formation of immature embryo-derived embryonic calluses in maize [J]. The Plant Journal,2022,109(4):980-991.
- [34] HIGUCHI M, PISCHKE M S, MÄHÖNEN P, et al. In planta functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2004,101(23):8821-8826.
- [35] IKEUCHI M, OGAWA Y, IWASE A, et al. Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms [J]. Development,2016,143(9):1442-1451.
- [36] IKEUCHI M, IWASE A, RYMEN B, et al. Wounding triggers callus formation via dynamic hormonal and transcriptional changes [J]. Plant Physiology,2017,175(3):1158-1174.
- [37] IWASE A, MITSUDA N, KOYAMA T, et al. The AP2/ERF transcription factor WIND1 controls cell dedifferentiation in *Arabidopsis* [J]. Current Biology,2011,21(6):508-514.
- [38] 何文英,张欢,胡明华,等. 基于转录组的金钱树扦插激素相关基因差异表达分析[J/OL]. 分子植物育种,2023:1-15. [2024-03-01]. <http://link.cnki.net/urlid/46.1068.S.20230822.1438.006>.

(责任编辑:陈海霞)