

银杏褐化与非褐化愈伤组织的转录组分析

徐奇 杨晓明 汪贵斌 曹福亮

摘要:【目的】本研究利用环境扫描电子显微镜和高通量测序技术对银杏愈伤组织进行细胞结构观察与转录组测序,以探索愈伤组织的褐化机理。【方法】利用环境扫描电子显微镜对银杏褐化和非褐化的愈伤组织进行细胞结构观察,并对银杏褐化和非褐化的愈伤组织进行转录组测序,利用 DESeq2 筛选差异表达基因,借助 GO、KEGG 等生物信息学分析手段探索基因功能。【结果】扫描电镜显示非褐变的愈伤组织细胞排列均匀,褐变愈伤组织的细胞表现出紊乱,排列松散无序。转录组测序共发现有 275 和 153 个基因上调和下调表达;GO 分析结果显示这些基因在细胞过程、代谢过程、定位、薄膜部分、细胞部分、细胞器、催化活性、结合和转运蛋白活性等分类中显著富集;KEGG 分析结果显示这些基因在苯丙烷生物合成、角质、软木质和蜡的生物合成、类黄酮生物合成以及植物-病原菌相互作用通路中显著富集,苯丙烷代谢途径中 *PAL* 和 *CCR* 基因上调表达;转录因子分析发现相较于非褐化愈伤组织,褐化愈伤组织中 *MYB*、*AP2* 和 *NAC* 等转录因子表达量上调,*HD-ZIP* 下调。【结论】褐变愈伤组织的细胞排列松散甚至破裂,不能继续生长。差异表达基因显著富集在苯丙烷代谢途径,*PAL* 和 *CCR* 基因上调表达增加了酚酸的合成与代谢,推测苯丙烷生物代谢途径部分基因表达量上调导致酚酸类化合物的积累,可能是银杏愈伤组织褐化的主要原因。本研究通过扫描电镜观察和转录组测序,为解析银杏愈伤组织褐化的分子机制奠定基础。

关键词: 银杏; 愈伤组织; 褐化与非褐化; 转录组; 差异表达基因

Transcriptome Analysis of Browning and Non-browning Callus of *Ginkgo biloba*

Abstract: 【Objective】 In this study, environmental scanning electron microscopy and high-throughput sequencing technology were used to observe the cell structure of *Ginkgo biloba* callus and sequence the transcriptome to explore the browning mechanism of callus. 【Method】 Using environmental scanning electron microscope to observe the cell structure of the browned and non-browning callus of *Ginkgo biloba*, and sequence the transcriptome of the browned and non-browning callus of *Ginkgo biloba*, and use DESeq2 to screen the differentially expressed genes. Use GO, KEGG and other bioinformatics analysis methods to explore gene functions. 【Result】 Scanning electron microscopy showed that the cells of the non-browning callus were evenly arranged, and the cells of the browning callus were disordered and arranged loosely and disorderly. Transcriptome sequencing found that there were 275 and 153 genes up-regulated and down-regulated; GO analysis results showed that these genes are classified in cellular processes, metabolic processes, localization, membrane parts, cell parts, organelles, catalytic activities, binding and transport protein activities, etc. Significant enrichment; KEGG analysis results show that these genes are significantly enriched in phenylpropane biosynthesis, keratin, soft wood and wax biosynthesis, flavonoid biosynthesis, and plant-pathogen interaction pathways. *PAL* and *CCR* in the phenylpropane metabolism pathway Gene up-regulated expression; transcription factor analysis found that compared with non-browning callus, the expression of *MYB*, *AP2* and *NAC* and other transcription factors in browned callus was up-regulated, and *HD-ZIP* was down-regulated. 【Conclusion】 The cell arrangement of the browned callus is loose or even broken, and cannot continue to grow. Differentially expressed genes are significantly enriched in the phenylpropane metabolic pathway. The up-regulation of *PAL* and *CCR* genes increases the synthesis and metabolism of phenolic acid. It is speculated that the up-regulation of some genes in the phenylpropane biological metabolic pathway leads to the accumulation of phenolic acids, which may be due to the accumulation of phenolic acids. The main cause of browning of wounded tissue. This study lays the foundation for analyzing the molecular mechanism of *Ginkgo* callus browning through scanning electron microscopy observation and transcriptome sequencing.

Keywords: *Ginkgo biloba*; Callus; Browning and non-browning; Transcriptome; Differentially expressed gene

银杏(*Ginkgo biloba* L.)是中生代孑遗树种,兼具观赏、经济、药用价值(李月娣, 2017)。植物组织培养技术可以快速繁殖银杏,然而在银杏的组织培养过程中极易产生褐变,褐变将引起外植体的死亡和再生失败。张明文(2003)利用银杏胚、子叶、茎段等外植体研究银杏的植物组织培养,结果表明褐化严重影响芽或根的诱导率。

在植物组织培养过程中发生的褐变大多为酶促褐变,引起褐变的酶主要为多酚氧化酶,其底物主要为酚类化合物(于守超等, 2004)。酚类物质是影响褐变的主要原因之一(毛沛琪等, 2018),在葡萄(Dai et al., 2015)、核桃(颜才植等, 2015)、梨(刘杰等, 2008)等植物的研究中都已证明。酚酸的主要生物合成途径即为苯丙烷类代谢途径(陈建业, 2005)。在木本植物的组织培养过程中褐化现象普遍存在,李树丽(2014, 江苏

农业科学, 42(1): 44-46)通过对中华红叶杨(*Populus euramericana* cv. *Zhonghuahongye*)的研究发现, 适当的降低无机盐的浓度以及适当增加活性炭或琼脂的用量可以降低组培过程中的褐化率。许继飞(2006)通过对欧美杨 108 (*Populus Euramericana* 108)再生体系的研究发现较低浓度的蔗糖有利于减轻褐化。为了探究抑制银杏愈伤组织褐化的条件, 前人(王俊焱等, 2019; 喻娜, 2020)从外植体种类、生长状况、培养基配方等方面进行了研究; 但鲜有从转录组分析的角度出发讨论愈伤组织褐化的机理, 关于银杏愈伤组织褐化过程中的基因表达变化规律尚未揭示。

本研究将不同褐变程度的愈伤组织作为试验材料, 绿色愈伤组织为对照组(CK), 褐化愈伤组织为实验组(GB), 利用转录组测序技术, 筛选出银杏组培过程中愈伤组织褐变的相关基因, 并进行表达分析, 为探究褐变的分子机理奠定基础, 进而为在分子水平有效降低银杏组织培养的褐化率提供理论依据。

1 材料及方法

1.1 银杏材料及处理

银杏果于 2019 年 10 月采集于南京林业大学。将白果洗净后用 75% (v/v)乙醇浸泡 30 s, 再用 2%次氯酸钠消毒 15 min, 后用无菌水清洗。将消毒完成的白果切开, 取出胚接种在 DCR 培养基上, 培养基中加入 20 g/L 麦芽糖, 2.5 g/L 结冷胶, 2 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L BA, 0.5 mg/L KT, 10 mg/L VC, 0.45 g/L 谷氨酰胺, 0.5 g/L 肌醇, 0.5 g/L 水解蛋白, pH 为 5.3。培养条件保持在(25±1) °C 的完全黑暗环境中, 10 d 后将愈伤组织转移至光培。诱导 30 d 后, 愈伤组织没有出现褐化, 诱导 60 d 后愈伤组织褐化。

1.2 环境扫描电子显微镜

将非褐化和褐化的愈伤组织分别取样, 首先用 4%的戊二醛溶液固定(4 °C, 12 h), 再用 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液清洗 3 次, 每次 20 min。其次分别使用 30%、50%、70%、90%、95%、100%乙醇进行脱水, 每次 15 min, 再用无水乙醇连续脱水 3 次, 每次 20 min。然后转入醋酸异戊酯, 其中乙酸异戊酯:乙醇为 1:2、1:1、2:1、1:0 混合溶液, 每隔 15 min 置换 1 次。接着将样品置于 Quorum K850 临界点干燥仪中干燥, 再将样品用导电胶粘台, 使用 Hitachi E-1010 离子溅射仪喷金镀膜, 最后将处理好的样品置于美国 F EI Quanta 200 型环境扫描电镜(配置:英国 OXFORD Inca X-act 能谱仪)下观察。

1.3 测序数据质控、序列比对分析及转录本组装

将诱导 30 d 后的非褐化愈伤组织以及诱导 60 d 后褐化的愈伤组织分别混样, 取样后立即放入液氮冷冻, 再将样品转移到-80 °C 冰箱保存。RNA 的提取、质控、建库及转录组的二代测序均由上海美吉生物医药科技有限公司完成。使用 fastx_toolkit_0.0.14 (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/download.html) 软件进行原始数据质控。质控数据统计使用 SeqPrep (<https://github.com/jstjohn/SeqPrep>)和 Sickle(<https://github.com/najoshi/sickle>)软件。质量剪切完成后, 对质控后的数据再次进行统计以及质量评估。

在进行序列比对分析时, 使用 TopHat2 (<http://tophat.cbcb.umd.edu/>)和 HISAT2 (<http://ccb.jhu.edu/software/hisat2/index.shtml>) 软件。利用 StringTie (<http://ccb.jhu.edu/software/stringtie/>)将高质量的序列(reads)比对到银杏基因组上(<http://gigadb.org/dataset/100613>), 进行组装拼接。

1.4 功能注释、差异表达分析及转录因子分析

将转录本与六大数据库(NR, Swiss-Prot, Pfam, EggNOG, GO 和 KEGG)进行比对, 全面获得注释信息并对各数据库注释情况进行统计。使用基于负二项分布的 DESeq2 (<http://bioconductor.org/packages/stats/bioc/DESeq2>)软件对 raw counts 进行分析, 基于一定标准化处理和筛选条件获得比较组间表达差异的基因, 默认参数: p-adjust < 0.05 & |log2FC|>=1(p-adjust 表示经 FDR 矫正过后的 P 值, FC 表示两个样品的表达比率)。最后采用数据库 Plant TFDB (http://plantfdb_v4.cbi.pku.edu.cn/)对基因进行转录因子分析。

2 结果与分析

2.1 银杏愈伤组织的形态观察

生长 30 d 后的绿色的愈伤组织以及生长 60 d 后褐化的愈伤组织的外观形态和扫描电镜结果显示(图 1)，非褐变和褐变愈伤组织细胞的外观存在明显差异。在非褐变愈伤组织中多数细胞排列均匀、紧密，具备继续生长的潜力；而在褐变愈伤组织中细胞分布紊乱、松散，甚至部分细胞出现破裂，趋向于死亡。

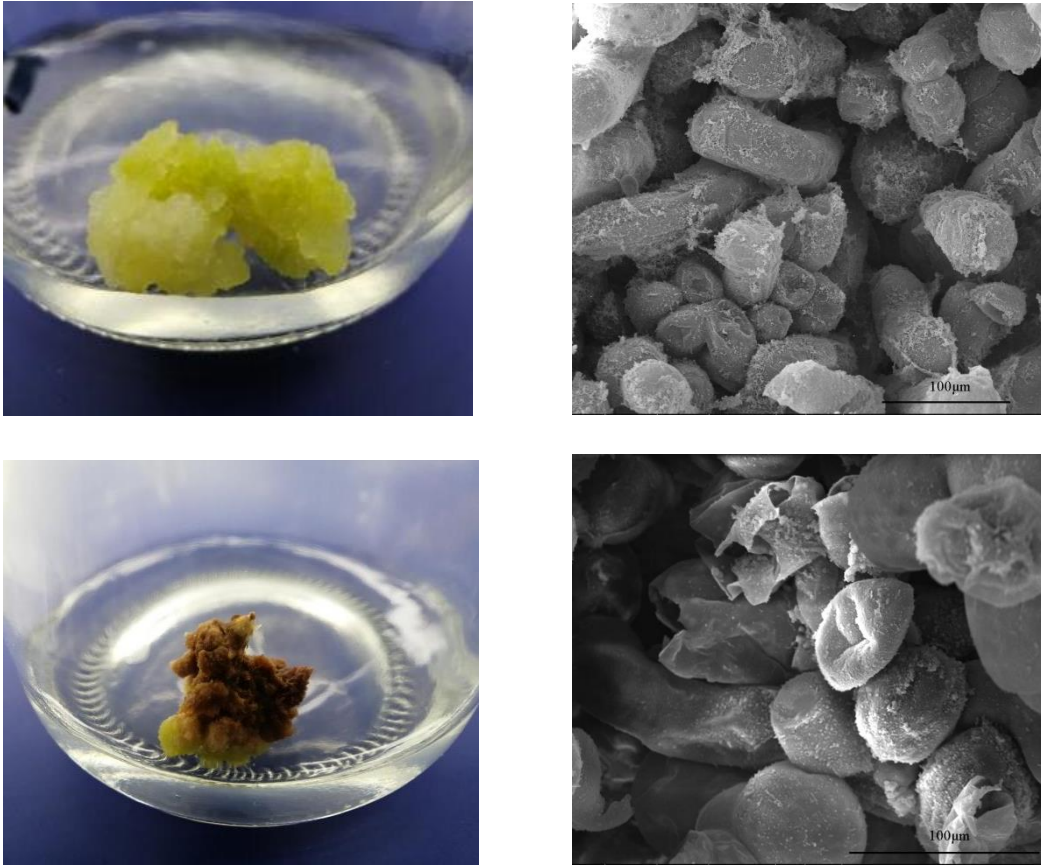


图 1 银杏褐化与非褐化愈伤组织的形态观察

注: A: 生长 30 d 的绿色愈伤组织的形态图; B: 生长 30 d 的绿色愈伤组织的环境扫描电镜图; C: 生长 60 d 的褐化愈伤组织的形态图; D: 生长 60 d 的褐化愈伤组织的环境扫描电镜图

Figure 1 The morphological observation on browning and non-browning callus of *Ginkgo biloba*

Note: A: Morphology of green callus growing for 30 days; B: environmental scanning electron microscopy of green callus growing for 30 days; C: Morphology of Browning callus after 60 days of growth; D: Environmental scanning electron microscopy of Browning callus grown for 60 days

2.2 银杏测序结果和组装

通过高通量测序技术平台 Illumina 对 6 个样品进行转录组分析, 获得了 45.66 Gb Clean Data, 各样品 Clean Data 均超过 6.41 Gb, 其中 GC 含量百分比超过 45.47%, Q30 碱基百分比超过 91.51%。利用 String Tie 软件对测序的 reads 片段进行组装, 获得了 65 096 个转录本, 其中转录本长度小于 200 bp 的有 1332 条, 数目最少, 大于 1 800 bp 的转录本数目最多, 有 20 424 条(图 2)。

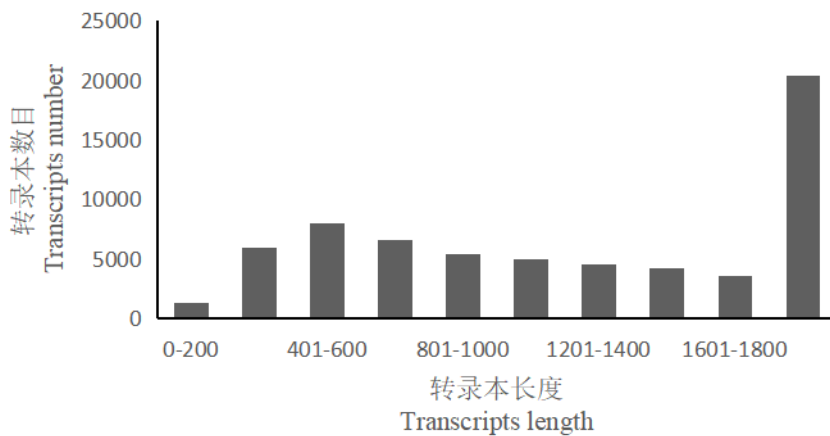


图 2 银杏转录本长度分布
Figure 2 Length distribution of *Ginkgo biloba* transcripts

2.3 银杏转录组功能注释

将银杏转录组组装后的基因和转录本与六大数据库(GO, EggNOG, KEGG, NR, Pfam 和 Swiss-Prot)进行比对, 统计分析基因和转录本的功能信息和数据库注释情况。表达的基因在各数据库的注释情况结果显示(图 3): 注释到 GO 数据库的基因数量为 22 922 个(74.88%), 注释到 KEGG 数据库的基因数量为 11 294 个(36.78%), 注释到 COG 数据库的基因数量为 24 492 个(79.77%), 注释到 NR 数据库的基因数量为 26 783 个(87.23%), 注释到 Swiss-Prot 数据库的基因数量为 21 432 个(69.80%), 注释到 Pfam 数据库的基因数量为 18 271 个(59.50%), 总基因数目为 30 705 个, 注释到数据库的基因总数目为 27 014, 占总基因数目的 87.98%。

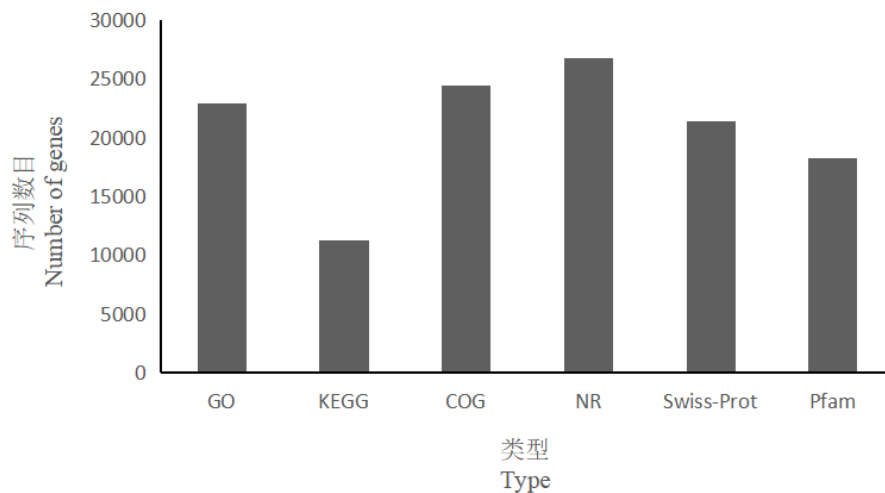


图 3 功能注释统计
Figure 3 Function annotation statistics

2.4 表达量差异统计

基于基因的 Read Counts 数据进行基因差异表达分析, 鉴定差异表达基因结果显示(图 4), 共有 275 个基因上调表达, 而有 153 个基因下调表达。最多差异表达基因发生在“苯丙烷生物合成”途径, 其中 *Gb_37311*、*Gb_30322*、*Gb_27961*、*Gb_08374* 等 16 个基因上调表达, *Gb_06019*、*Gb_26239*、*Gb_35939*、*Gb_28539* 等 9 个基因下调表达; 在该途径中, 苯丙氨酸氨裂解酶(*PAL*, EC4.3.1.24)以及肉桂酰辅酶 A 还原酶(*CCR*, EC1.2.1.44)上调表达, 反式肉桂酸 4-单加氧酶(*CYP73A*, EC1.14.14.91)下调表达。过氧化物酶(EC1.11.1.7)、莽草酸羟基肉桂酰转移酶(*HCT*, EC2.3.1.133)、β-葡萄糖苷酶(EC3.2.1.21)和肉桂醇脱氢酶(*CAD*, EC1.1.1.195)等基因表达量均发生改变。

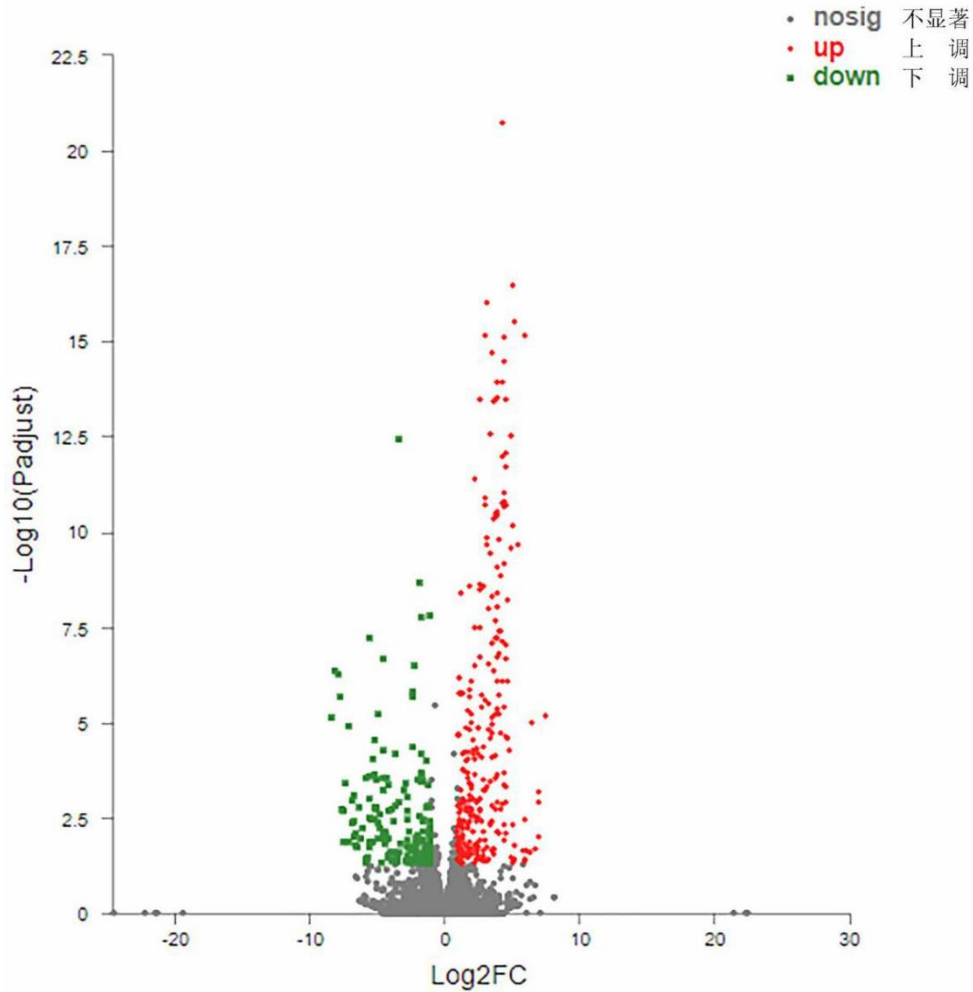


图4 表达量差异统计
Figure 4 Statistics of expression difference

2.5 银杏差异表达基因的GO注释及分类

银杏差异表达基因的GO功能注释分析的结果显示(图5), 428个基因共获得1196个GO功能注释。1196个功能注释属于生物过程、分子功能、细胞组分这3个主要GO类别。在这3个类别中, 生物过程共有319个功能注释, 占有所有功能注释的26.67%; 分子功能共有440个功能注释, 占有所有功能注释的36.79%; 细胞组分共有437个功能注释, 占有所有功能注释的36.54%。这3个类别又可分为20个功能亚类, 生物过程有8个亚类, 细胞组分有7个亚类, 分子功能有5个亚类。生物过程中占优势的GO项是: 细胞过程(95, 29.78%)、代谢过程(91, 28.53%)和定位(37, 11.60%)。细胞成分前3位分别是薄膜部分(161, 36.84%)、细胞部分(118, 27.00%)和细胞器(66, 15.10%)。在分子功能类中, 主要涉及催化活性(218, 49.55%)、结合(179, 40.68%)和转运蛋白活性(22, 5.00%)。银杏的GO功能注释分析结果显示差异表达基因多集中在代谢过程、细胞过程、细胞器、膜部件、细胞组分、膜部件、结合和催化等类别中, 提示这些基因差异表达可能对愈伤的褐化过程有积极的影响。

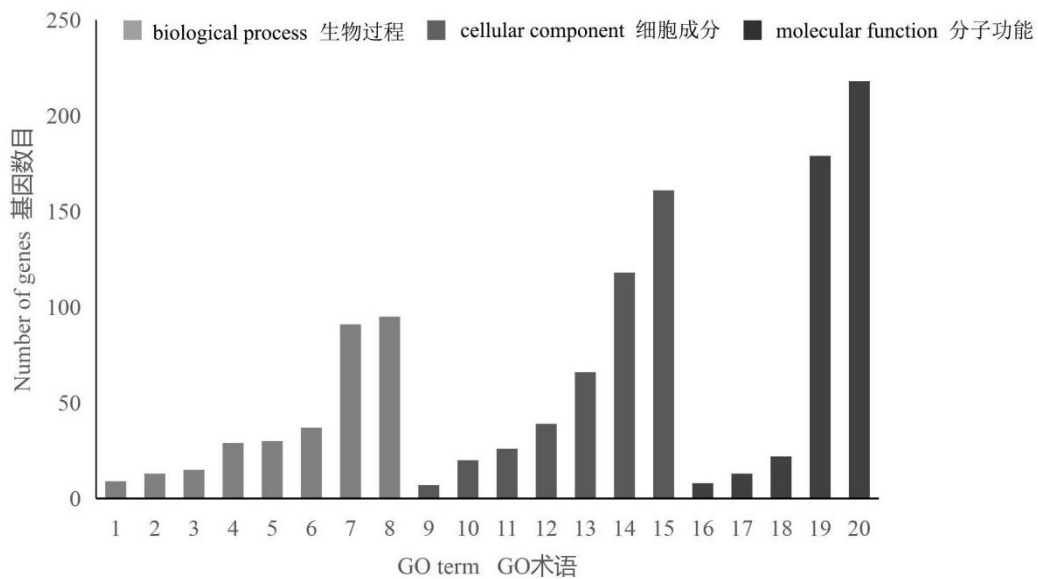


图 5 银杏差异表达基因的 GO 功能注释

注: 1: 生殖过程; 2: 发展过程; 3: 细胞成分组织或生物发生; 4: 生物调节; 5: 对刺激的反应; 6: 本地化; 7: 代谢过程; 8: 细胞过程; 9: 细胞连接; 10: 细胞器部分; 11: 胞外区; 12: 膜; 13: 细胞器; 14: 细胞组分; 15: 膜部件; 16: 转录调节活性; 17: 抗氧化活性; 18: 转运活性; 19: 结合; 20: 催化活性

Figure 5 GO functional annotation of differentially expressed genes in *Ginkgo biloba*

Note: 1: Reproductive process; 2: Developmental process; 3: Cellular component organization or biogenesis; 4: Biological regulation; 5: Response to stimulus; 6: Localization; 7: Metabolic process; 8: Cellular process; 9: Cell junction; 10: Organelle part; 11: Extracellular region; 12: Membrane; 13: Organelle; 14: Cell part; 15: Membrane part; 16: Transcription regulator activity; 17: Antioxidant activity; 18: Transporter activity; 19: Binding; 20: Catalytic activity

2.6 银杏差异表达基因的 KEGG 功能分析

对银杏的差异表达基因进行 KEGG 功能富集分析结果显示(图 5), 188 个差异基因在 51 条 KEGG 代谢通路上富集, 在前 19 条 KEGG 代谢通路上显著富集的有: 苯丙烷生物合成(25 个), 角质、软木质和蜡的生物合成(15 个), 类黄酮生物合成(11 个), 脂肪酸延长(6 个), 氰胺氨基酸代谢(8 个), 芪类化合物、二芳基庚烷和姜醇的生物合成(6 个), 泛醌和其他萜类醌的生物合成(6 个), 淀粉和蔗糖代谢(10 个), 脂肪酸的生物合成(6 个), 植物-病原菌相互作用(11 个), 单萜类生物合成(5 个), 苯丙氨酸代谢(3 个), 甘油磷脂代谢(4 个), ABC 转运蛋白(4 个), 过氧化物酶体(4 个), 酪氨酸代谢(3 个), 油菜素内酯生物合成(2 个), 甘油脂代谢(3 个), 半胱氨酸和蛋氨酸代谢(4 个)。其中, 苯丙烷生物合成占比最多, 为 18.38%, 其次是角质、软木质和蜡的生物合成, 占比为 11.03%, 类黄酮生物合成以及植物-病原菌相互作用分别占比 8.09%。而油菜素内酯生物合成占比最少, 仅有 1.47%。KEGG 功能富集分析结果表明代谢通路中的苯丙烷生物合成与银杏愈伤组织的褐化紧密相关。

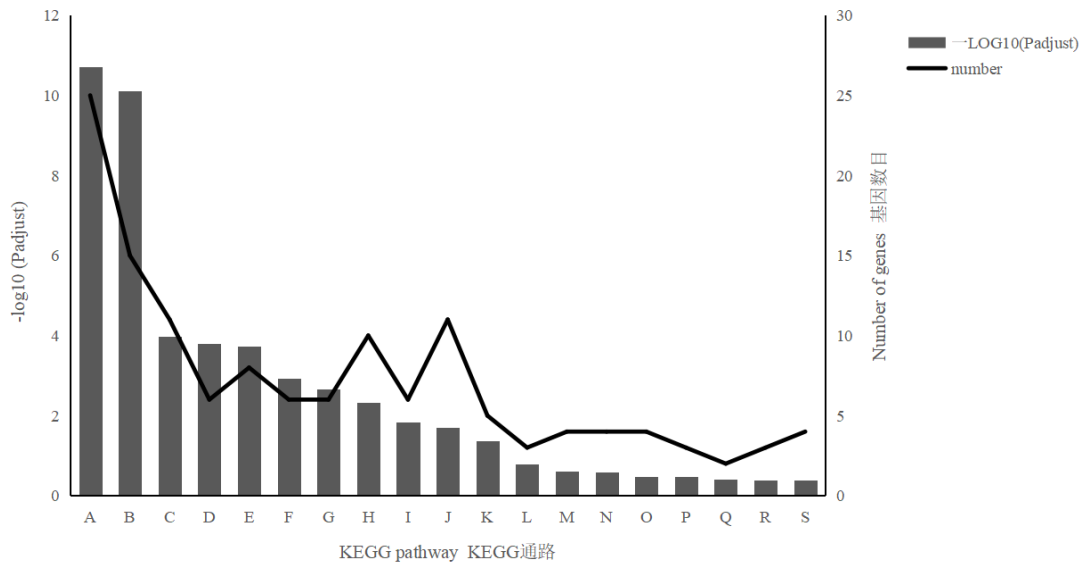


图 5 银杏差异表达基因的 KEGG 功能分析

注: A: 苯丙烷生物合成; B: 角质, 软木质和蜡的生物合成; C: 类黄酮生物合成; D: 脂肪酸延长; E: 氰胺基酸代谢; F: 芪类化合物, 二芳基庚烷和姜醇的生物合成; G: 泛醌和其他萘类醌的生物合成; H: 淀粉和蔗糖代谢; I: 脂肪酸的生物合成; J: 植物-病原菌相互作用; K: 单萜类生物合成; L: 苯丙氨酸代谢; M: 甘油磷脂代谢; N: 转运蛋白; O: 过氧化物酶体; P: 酪氨酸代谢; Q: 油菜素内酯生物合成; R: 甘油脂代谢; S: 半胱氨酸和蛋氨酸代谢

Figure 5 KEGG functional analysis of differentially expressed genes in *Ginkgo biloba*

Note: A: Phenylpropanoid biosynthesis; B: Cutin, suberine and wax biosynthesis; C: Flavonoid biosynthesis; D: Fatty acid elongation; E: Cyanoamino acid metabolism; F: Stilbenoid, diarylheptanoid and gingerol biosynthesis; G: Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis; H: Starch and sucrose metabolism; I: Fatty acid biosynthesis; J: Plant-pathogen interaction; K: Monoterpenoid biosynthesis; L: Phenylalanine metabolism; M: Glycerophospholipid metabolism; N: ABC transporters; O: Peroxisome; P: Tyrosine metabolism; Q: Brassinosteroid biosynthesis; R: Glycerolipid metabolism; S: Cysteine and methionine metabolism

2.7 转录因子分析

将差异表达基因进行转录因子分析, 一共鉴定了 10 个转录因子家族, 涉及 17 个差异表达基因(表 1)。其中 MYB 家族 4 个, NAC 家族 3 个, AP2 家族和 HD-ZIP 家族各 2 个, TCP、C2H2、WRKY、SRS、HSF 以及 LBD (AS2/LOB) 家族仅涉及 1 个差异表达基因的变化。MYB、NAC 和 AP2 转录因子在褐化情况下基本全部上调表达, HD-ZIP 转录因子全部下调表达。结果表明这些转录因子的表达受银杏愈伤组织褐化的调控。

表 1 转录因子表达量与调节方式

Tab. 1 Expression and regulation of transcription factors

基因编号	基因家族	CK 组基因平均表达	GB 组基因平均表达	调节方式
Gene ID	Gene family	CK average FPKM	GB average FPKM	Regulate
Gb_3488	MYB	1.30	12.13	上调 Up
Gb_1311	MYB	0.55	8.39	上调 Up
Gb_0511	MYB	21.31	10.46	下调 Down
Gb_0188	MYB	0.03	0.89	上调 Up
Gb_3504	NAC	3.23	7.67	上调 Up
Gb_3254	NAC	0.65	4.57	上调 Up
Gb_0137	NAC	4.51	12.74	上调 Up
Gb_1813	AP2	0.22	2.18	上调 Up

7	Gb_1193	AP2	0.40	10.87	上调 Up
2	Gb_1886	HD-ZIP	2.37	0.08	下调 Down
0	Gb_1603	HD-ZIP	2.36	0.13	下调 Down
8	Gb_2952	TCP	0.05	1.00	上调 Up
3	Gb_2179	C2H2	52.55	21.71	下调 Down
0	Gb_1936	WRKY	0.02	0.77	下调 Down
2	Gb_1182	SRS	23.95	54.34	上调 Up
8	Gb_1175	HSF	9.39	3.03	下调 Down
5	Gb_1082	LBD (AS2/ LOB)	20.74	78.25	上调 Up

3 讨论

关于褐色愈伤组织的形态结构有较多的文献报道。He 等(2009)研究麻风树下胚轴棕褐色愈伤组织发现,细胞在褐变愈伤组织中是松散和不均匀的。Kaewubon 等(2015)研究发现鸽子兰花褐化的愈伤组织中,明显地出现细胞排列无序,表现出褐变,细胞中的细胞器完全无组织,质体出现降解和萎缩,膜功能障碍,细胞膜通透性增加并出现离子泄漏。Laukkanen 等(2000)研究发现,与绿色愈伤组织相比,苏格兰松的黄棕色愈伤组织表现出较厚的细胞壁和细胞质的缺失。这些结果与本研究所观察到的结果一致,褐化最终会导致细胞的死亡,阻碍愈伤组织进一步生长发育。

本文对银杏褐化与非褐化的愈伤组织进行了转录组分析,银杏差异表达基因的 GO 功能注释的结果显示分子功能类中的催化活性占比较大说明酶通过催化酚类物质形成醌而导致了褐化的发生,细胞成分中薄膜部分、细胞部分以及细胞器占比较大,说明褐化会对银杏愈伤组织的细胞生长产生影响,褐化过程中愈伤组织所出现的细胞壁加厚以及细胞器发生降解等现象,与细胞部分以及细胞器相关的基因差异表达息息相关,是通过基因差异表达来响应褐化逆境,最终将褐化结果体现在细胞形态上。

在植物体内,苯丙烷合成代谢的一般途径为:苯丙氨酸利用苯丙氨酸解氨酶(PAL)脱氨转化为肉桂酸,再经过肉桂酸-4-羟化酶(C4H)转化为阿魏酸、对香豆酸、芥子酸等酚酸。酚酸经过 4-香豆酰辅酶 A 连接酶(4CL)、甲基转移酶(OMT)等酶形成绿原酸、咖啡酸等,或经过 CoA 酯形成类黄酮、木质素等(Weisshaar and Jenkins, 1998)。苯丙烷类代谢途径中,苯丙氨酸通过 PAL 和 CYP73A 转化为对香豆酸,再通过一系列酶转化为咖啡酸等酚酸,随后通过 4CL 和 CCR 代谢为相应的醛(Kumar and Trivedi, 2018)。作为植物苯丙烷代谢过程中的关键酶和限速酶, PAL 与合成次生代谢物息息相关。水果在接受紫外处理后的 PAL 活性提高,从而影响酚酸类物质的含量(Ghaouth et al., 2003)。Wang 等(2009)研究发现茉莉酸甲酯处理杨梅后 PAL 的活性以及花色苷、类黄酮、总酚酸等化合物的含量均提高。Shivashankar 等(2015)研究发现耐瓜蝇的佛手瓜中 PAL 的活性以及木质素、对香豆酸的含量更高,体现了苯丙烷代谢的酶和代谢产物与佛手瓜的抗性相关。Solecka 和 Kacperska (2003)研究发现 PAL 的专一性抑制剂氨基茛磷酸通过抑制 PAL 的活性,从而降低酚酸类物质的含量以及植物对逆境的抗性。本研究的转录组分析结果显示 PAL 基因在褐化的银杏愈伤组织中上调,表明 PAL 基因的上调表达可导致次生代谢产物的增加,以及酚类物质的积累,进而有可能导致愈伤组织的褐化。同时,CCR 基因也在褐化的愈伤组织中上调表明对香豆酸、咖啡酸等酚酸的代谢增加,这可能导致醛的积累,使得愈伤组织发生褐化。因此,银杏的愈伤组织生长过程中,苯丙烷生物合成积累了酚类等次生代谢产物,通过增加代谢积累醛类物质,可能致使愈伤组织发生褐变,苯丙烷代谢途径部分基因的上调表达是影响愈伤组织褐化的主要原因。

对差异表达基因中的转录因子分析,结果显示 MYB、NAC、HD-ZIP、AP2 家族的转录因子较多,这些转录因子在响应逆境胁迫以及影响次生代谢产物含量等方面已有许多研究。番茄被转入天山雪莲 MYB

转录因子 *sikP* 基因后类黄酮的含量增加(张尧等, 2018)。龙胆 *GtMYBP3* 和 *GtMYBP4* 通过激活黄酮醇合成相关基因的表达, 使得幼苗中的黄酮醇含量显著增加(Nakatsuka et al., 2012)。水稻 R2R3-MYB 类转录因子 OsC1 通过上调花青素合成相关基因的表达, 从而提高花青素的合成(何亚飞等, 2018)。苜蓿中编码 HD-ZipI 蛋白的 *MtHB1* 基因通过调控根的表面积介导发育适应性胁迫响应, 提高耐盐性(Ariel et al., 2010)。超表达 *AhNAC3* 的烟草特异性响应对水分胁迫, *AhNAC3* 清除过氧化物的含量, 进而提高了烟草的耐旱能力(Liu et al., 2013)。转录因子具有合成或积累次生代谢产物花色苷、生物碱以及黄酮等化合物的功能(Gharari et al., 2020; Paul et al., 2020), 也体现了组织褐化与自身次生代谢产物的积累存在相关性。虽然鲜有与褐化直接相关的研究, 但是可以根据已有研究推测愈伤组织在褐化过程中诱导了 MYB、NAC、HD-ZIP、AP2 等转录因子的表达, 转录因子通过与蛋白互作, 调控基因表达等不同方式交叉调控, 形成多基因、多信号途径的复杂网络参与了愈伤组织褐化的形成。

植物在组织培养过程中的褐变是一个复杂的过程, 其中涉及多种分子调控机制。本研究对于银杏褐化与非褐化的愈伤组织进行转录组分析, 揭示了褐化和非褐化银杏愈伤组织差异表达基因及差异代谢通路, 为今后通过基因调控抑制银杏愈伤组织的褐化进而促进愈伤组织的再生奠定理论基础。

参 考 文 献

- Ariel F., Diet A., Verdenaud M., Gruber V., Frugier F., Chan R., and Crespi M., 2010, Environmental regulation of lateral root emergence in *Medicago truncatula* requires the HD-Zip I transcription factor HB1, *Plant Cell*, 22(7): 2171-2183.
- 陈建业, 2005, 葡萄酒中酚酸及葡萄果实苯丙烷类代谢途径研究, 博士学位论文, 中国农业大学, 导师: 黄卫东, pp.2-3. (Chen J.Y., 2005, Study on the phenolic acids in wines and phenylpropanoid metabolism in grape berries, Dissertation for Ph.D., China Agricultural University, Supervisor: Huang W.D., pp.2-3.)
- Dai L.M., Zhou Q., Li R.M., Du Y.J., He J., Wang D., Cheng S.Y., Zhang J.X., and Wang Y.J., 2015, Establishment of a picloram-induced somatic embryogenesis system in *Vitis vinifera* cv. chardonnay and genetic transformation of a stilbene synthase gene from wild-growing *Vitis* species, *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.*, 121(2): 397-412.
- Ghaouth A.E., Wilson C.L., and Callahan A.M., 2003, Induction of chitinase, beta-1,3-Glucanase, and phenylalanine ammonia lyase in peach fruit by UV-C treatment, *Phytopathology*, 93(3): 349-355.
- Gharari Z., Bagheri K., Danafar H., and Sharafi A., 2020, Enhanced flavonoid production in hairy root cultures of *Scutellaria bormmuelleri* by elicitor induced over-expression of *MYB7* and *FNS1/2* genes, *Plant Physiol. Biochem.*, 148: 35-44.
- He Y., Guo X.L., Lu R., Niu B., Pasapula V., Hou P., Cai F., Xu Y., and Chen F., 2009, Changes in morphology and biochemical indices in browning callus derived from *Jatropha curcas* hypocotyls, *Plant Cell Tissue and Organ Cult.*, 98(1): 11-17.
- 何亚飞, 许梦洁, 李霞, 2018, 干旱条件下 DCMU 对高表达转 *C₄-pepc* 水稻的花青素合成基因及其相关信号的影响, *中国生态农业学报*, 26(3): 409-421.
- (He Y.F., Xu M.J., and Li X., 2018, Effects of DCMU on anthocyanin synthesis genes and its related signals in *C₄-pepc* gene overexpressed rice under drought conditions, *Zhongguo Shengtai Nongye Xuebao (Chinese Journal of Eco-Agriculture)*, 26(3): 409-421.)
- Kaewubon P., Hutadilok-Towatana N., da Silva J.A., and Meesawat U., 2015, Ultrastructural and biochemical alterations during browning of pigeon orchid (*Dendrobium crumenatum* Swartz) callus, *Plant Cell Tissue and Organ Cult.*, 121(1): 53-69.
- Kumar S., and Trivedi P.K., 2018, Glutathione s-transferases: role in combating abiotic stresses including arsenic detoxification in plants, *Front. Plant Sci.*, 9: 751.
- Laukkanen H., Rautiainen L., Taulavuori E., and Hohtola A., 2000, Changes in cellular structures and enzymatic activities during browning of Scots pine callus derived from mature buds, *Tree Physiol.*, 20(7): 467-475.
- 李月娣, 2017, 银杏价值及其产业现状分析, *长春大学学报*, 27(2): 32-37.
- (Li Y.D., 2017, Analysis on value of *Ginkgo biloba* and its industry status, *Changchun Daxue Xuebao (Journal of Changchun University)*, 27(2): 32-37.)
- 刘杰, 张希, POU DYAL Bharat Kumar, 张玉星, 董祯, 史青纯, 2008, 梨外植体组培褐变的影响因子及预防措施, *果树学报*, 25(5): 727-731.

- (Liu J., Zhang X., POUDYAL B.K., Zhang Y.X., Dong Z., and Shi Q.C., 2008, Studies on factors affecting browning of pear explants *in vitro* and anti-browning measures, *Guoshu Xuebao (Journal of Fruit Science)*, 25(5): 727-731.)
- Liu X., Liu S., Wu J.L., Zhang B.Y., Li X.Y., Yan Y.C., and Li L., 2013, Overexpression of *Arachis hypogaea* NAC 3 in tobacco enhances dehydration and drought tolerance by increasing superoxide scavenging, *Plant Physiol. Biochem.*, 70: 354-359.
- 毛沛琪, 李厚华, 李媛, 曹志秀, 韩美玲, 张延龙, 2018, 硝酸银对‘凤丹’牡丹愈伤组织褐变过程中酚类物质及相关酶活性的影响, *西北林学院学报*, 33(6): 83-88.
- (Mao P.Q., Li H.H., Li A., Cao Z.X., Han M.L., and Zhang Y.L., 2018, Effects of silver nitrate on phenolics and related enzyme activity in callus browning process of tree peony (*Paeonia ostii* 'Feng dan'), *Xibei Linxueyuan Xuebao (Journal of Northwest Forestry University)*, 33(6): 83-88.)
- Nakatsuka T., Saito M., Yamada E., Fujita K., Kakizaki Y., and Nishihara M., 2012, Isolation and characterization of GtMYBP3 and GtMYBP4, orthologues of R2R3-MYB transcription factors that regulate early flavonoid biosynthesis, in geranium flowers. *J. Exp. Bot.*, 63(18): 6505-6517.
- Paul P., Singh S.K., Patra B., Liu X., Pattanaik S., and Yuan L., 2020, Mutually regulated AP2/ERF gene clusters modulate biosynthesis of specialized metabolites in plants, *Plant Physiol.*, 182(2): 840-856.
- Shivashankar S., Sumathi M., Krishnakumar N.K., and Rao V.K., 2015, Role of phenolic acids and enzymes of phenylpropanoid pathway in resistance of chayote fruit (*Sechium edule*) against infestation by melon fly, *Bactrocera cucurbitae*, *Ann. Appl. Biol.*, 166(3): 420-433.
- Solecka D., and Kacperska A., 2003, Phenylpropanoid deficiency affects the course of plant acclimation to cold, *Physiol. Plantarum*, 119(2): 253-262.
- 王俊焱, 董金金, 刘伟, 曹福亮, 汪贵斌, 王义强, 2019, 银杏愈伤组织生长、褐化与黄酮积累研究, *生物技术通报*, 35(2): 16-22.
- (Wang J.Y., Dong J.J., Liu W., Cao F.L., Wang G.B., and Wang Y.Q., 2019, Research on the growth, browning and flavonoid accumulation of *Ginkgo biloba* callus, *Shengwu Jishu Tongbao (Biotechnology Bulletin)*, 35(2): 16-22.)
- Wang K.T., Jin P., Cao S.F., Shang H.T., Yang Z.F., and Zheng Y.H., 2009, Methyl jasmonate reduces decay and enhances antioxidant capacity in Chinese bayberries, *J. Agric. Food Chem.*, 57(13): 5809-5815.
- Weissshaar B., and Jenkins G.I., 1998, Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 1(3): 251-257.
- 许继飞, 2006, 欧美杨 108 再生体系的优化及转天花粉蛋白基因的研究, 硕士学位论文, 东北林业大学, 导师: 邹莉, 王志英, pp.20-21.
- (Xu J.F., 2006, Optimize on populus *Euramericana* 108 regeneration system and study on TCS gene transformation, Thesis for M.S., Northeast Forestry University, Supervisors: Zou L., and Wang Z.Y., pp.20-21.)
- 颜才植, 叶发银, 赵国华, 2015, 食品中多酚形态的研究进展, *食品科学*, 36(15): 249-254.
- (Yan C.Z., Ye F.Y., and Zhao G.H., 2015, A review of studies on free and bound polyphenols in foods, *Shipin Kexue (Food Science)*, 36(15): 249-254.)
- 喻娜, 2020, 银杏组织培养中幼茎尖外植体抗褐化培养条件的优化, *分子植物育种*, 18(18): 6135-614.
- (Yu N., 2020, Optimization on anti-browning culture conditions of young stem tip explants in tissue culture of *Ginkgo biloba*, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 18(18): 6135-6142.)
- 于守超, 赵兰勇, 王芬, 韩鹏, 宫海涛, 2004, 植物组织培养过程中外植体褐变机理研究进展, *山东林业科技*, (5): 61-63.
- (Yu S.C., Zhao L.Y., Wang F., Han P., and Gong H.T., 2004, Research progress on mechanism of explant changing to brown in plant tissue culture, *Shandong Linye Keji (Journal of Shandong Forestry Science and Technology)*, (5): 61-63.)
- 张明文, 2003, 建立银杏遗传转化受体系统的研究, 硕士学位论文, 浙江大学, 导师: 陈力耕, pp.29-31.
- (Zhang M.W., 2003, Studies on establishing *Ginkgo* regeneration system *in vitro* suitable for genetic transformation, Thesis for M.S., Zhejiang University, Supervisor: Chen L.G., pp.29-31.)
- 张尧, 李忠晴, 张丽, 王爱英, 祝建波, 2018, 天山雪莲 *sikP* 基因提高番茄类黄酮含量的研究, *西南农业学报*, 31(6): 1143-1147.
- (Zhang Y., Li Z.Q., Zhang L., Wang A.Y., and Zhu J.B., 2018, Research of *Saussurea involucreata* MYb transcription factor *sikP* genes to improve contents of flavonoids, *Xinan Nongye Xuebao (Southwest China Journal of Agricultural Sciences)*, 31(6): 1143-1147.)