

膜荚黄芪不同外植体来源愈伤组织蛋白质 差异表达分析

梁旺利¹, 孙雯¹, 李晶晶¹, 高丽凡¹, 颜子怡¹, 周婷¹,
王玲霞^{1,2}, 杨淑娟¹, 梁文裕^{1,2}

(1 宁夏大学 生命科学学院, 宁夏 银川 750021; 2 林木资源高效生产全国重点实验室, 宁夏 银川 750021)

[摘要] **【目的】**探究膜荚黄芪不同外植体诱导的愈伤组织差异蛋白质表达规律,揭示其与不定芽分化及活性成分合成相关分子调控机制,为膜荚黄芪离体再生体系优化及活性成分高效合成提供理论依据。**【方法】**以幼叶、幼茎和下胚轴为外植体诱导愈伤组织进行了 DIA-Ultra 定量蛋白质组学检测,筛选差异表达蛋白进行功能注释;利用 RT-qPCR 和 Western blot 技术验证蛋白质组学结果;结合生理学分析检测关键代谢途径酶活性及物质含量。**【结果】**下胚轴来源愈伤组织呈多结节丛生状,可诱导不定芽,幼叶和幼茎来源愈伤组织则未见不定芽分化。蛋白质组学共鉴定到 1 603 个差异表达蛋白(DEPs),幼叶来源与下胚轴来源愈伤组织相比,共鉴定到 997 个 DEPs,幼茎来源与下胚轴来源愈伤组织相比,共鉴定到 716 个 DEPs。GO 与 KEGG 富集结果表明,差异表达蛋白与光合作用、苯丙烷类生物合成、淀粉和蔗糖代谢及植物激素信号转导等通路密切相关。下胚轴来源愈伤组织中光合作用与木质素合成相关蛋白(酶)显著下调,而类黄酮合成与蔗糖代谢相关蛋白(酶)上调,同时内源 IAA 和 ABA 含量升高,激素信号关键组分表达上调。RT-qPCR 和 Western blot 验证结果与蛋白质组数据高度一致。**【结论】**下胚轴来源愈伤组织通过抑制光合作用与木质素合成、激活黄酮类物质积累、增强蔗糖代谢及激素信号转导,构建了有利于不定芽分化的代谢与分子微环境。

[关键词] 膜荚黄芪;外植体;愈伤组织诱导;差异表达蛋白

[中图分类号] Q943.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2027)03-0156-14

Differential protein expression of calli from different explants of *Astragalus membranaceus*

Liang Wangli¹, Sun Wen¹, Li Jingjing¹, Gao Lifan¹, Yan Ziyi¹, Zhou Ting¹,
Wang Lingxia^{1,2}, Yang Shujuan¹, Liang Wenyu^{1,2}

(1 School of Life Sciences, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021, China;

2 State Key Laboratory of Efficient Production of Forest Resources, Yinchuan, Ningxia 750021, China)

Abstract: 【Objective】 This study aims to investigate the differential protein expression patterns in calli induced from different explants of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge., and to elucidate the molecular regulatory mechanisms associated with adventitious shoot differentiation and bioactive compound biosynthesis, thereby providing a theoretical basis for optimizing the *in vitro* regeneration system of *A. membranaceus* and achieving efficient biosynthesis of its bioactive constituents. **【Method】** Calli induced from young leaves, young

[收稿日期] 2026-03-25 **[修回日期]** 2026-05-06

[基金项目] 宁夏回族自治区重点研发计划重点项目(2024BEG02037);宁夏大学 2024 年大学生创新创业训练计划自治区级项目(S202410749070)

[作者简介] 梁旺利(1997—),女,宁夏固原人,在读博士,主要从事植物资源保护与利用研究。E-mail:lw12090197695@163.com

[通信作者] 梁文裕(1969—),男,宁夏中卫人,教授,博士,主要从事植物资源保护与利用研究。E-mail:liang_wy@nxu.edu.cn

stems, and hypocotyls were subjected to DIA-Ultra quantitative proteomic profiling to screen differentially expressed proteins for functional annotation. The proteomic data were validated using RT-qPCR and Western blotting. Additionally, physiological assays were conducted to measure the enzymatic activities of core metabolic pathways and the contents of relevant metabolites. 【Result】 Calli derived from hypocotyls exhibited a multi-lobed, clustered morphology and were capable of adventitious bud induction, whereas no adventitious bud differentiation was observed in calli derived from young leaves or young stems. Proteomic analysis identified a total of 1 603 differentially expressed proteins (DEPs). Specifically, 997 DEPs were found between leaf-derived and hypocotyl-derived callus, and 716 DEPs were detected between stem-derived and hypocotyl-derived callus. GO and KEGG enrichment analyses revealed that these DEPs were closely associated with pathways including photosynthesis, phenylpropanoid biosynthesis, starch and sucrose metabolism, and plant hormone signal transduction. In hypocotyl-derived calli, proteins and enzymes involved in photosynthesis and lignin biosynthesis were significantly downregulated, whereas those related to flavonoid biosynthesis and sucrose metabolism were up-regulated. Additionally, endogenous contents of IAA and ABA increased, and key components of hormone signaling pathways showed increased expression. The results of RT-qPCR and Western blotting validation were highly consistent with the proteomic data. 【Conclusion】 Hypocotyl derived calli establish a metabolic and molecular microenvironment conducive to adventitious bud differentiation by inhibiting photosynthesis and lignin synthesis, activating flavonoid accumulation, and enhancing sucrose metabolism and hormone signal transduction.

Key words: *Astragalus membranaceus*; explant; callus induction; differentially expressed proteins

膜荚黄芪 [*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.] 是我国重要的传统药用植物, 其根作为中药“黄芪”使用, 富含黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷等多种具有显著药理活性的次生代谢产物, 在临床上广泛应用于免疫调节、抗疲劳及心血管保护等领域^[1-2]。然而受野生资源日益枯竭、栽培周期长及环境依赖性强等因素限制, 仅依靠传统种植难以满足日益增长的药用需求。因此建立高效稳定的组织培养与再生体系, 不仅有助于实现种质资源的快速繁殖和遗传改良, 也为在可控条件下深入解析其活性成分的合成与调控机制提供重要平台^[3]。近年来, 研究者利用子叶、叶片、幼茎及下胚轴等多种外植体诱导愈伤组织, 发现外植体类型对愈伤组织诱导效率及后续再生能力具有显著影响。田雨等^[4]以幼茎为外植体, 在 MS+1.0 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA 培养基中获得 97% 的愈伤诱导率和 96% 的植株再生分化效率。郭生虎等^[5]发现, 下胚轴来源的愈伤组织诱导丛生芽分化率高达 91.6%, 但再生苗诱导生根效果较差, 生根率最高仅为 62.6%。李晶晶等^[6]研究得出, 幼茎可在 5 d 内直接诱导不定芽, 30 d 内形成健壮再生苗, 显著缩短成苗周期。但由幼叶和幼茎诱导形成的愈伤组织通常难以进一步分化出不定芽, 而以下胚轴为外植体所获得的愈伤组织则表现出更强的器官发生能力, 可

高效再生不定芽^[2], 说明不同来源的愈伤组织在生理状态及分子调控网络上可能存在显著差异。尽管目前对造成愈伤组织分化能力差异的分子机制尚不明确, 但据前人研究提示, 植物激素信号转导、类黄酮和苯丙烷类生物合成过程可能在调控愈伤组织分化过程中发挥关键作用^[7-9]。然而这些通路是否在膜荚黄芪不同外植体诱导的愈伤组织蛋白水平上出现差异表达, 以及其他潜在的关键调控因子或代谢途径是否发挥作用, 仍有待深入解析。为此, 本研究以膜荚黄芪幼叶、幼茎和下胚轴为外植体诱导获得的愈伤组织为材料, 采用 DIA-Ultra 高通量蛋白质组学技术, 比较 3 种来源愈伤组织中差异蛋白质表达规律, 旨在从蛋白质组学水平揭示不同外植体来源愈伤组织在再生潜能差异背后的分子基础, 为优化膜荚黄芪的组织培养体系、深入理解其体细胞器官发生的调控机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

采集宁夏六盘山地区分布的野生膜荚黄芪成熟的种子, 经林木资源高效生产全国重点实验室朱强研究员鉴定为野生膜荚黄芪。将膜荚黄芪成熟种子用流水冲洗 30 min, 然后在超净台中用无菌水洗涤 3~4 次, 75% 酒精浸泡 30 s, 15% NaClO 消毒

15 min,再次用 75% 酒精浸泡 30 s,无菌水洗涤 3~4 次,无菌滤纸吸干水分后接种于 MS 培养基(MS 4.74 g/L,蔗糖 30 g/L,琼脂 15 g/L,pH 5.8)。设置培养箱温度为 $(23\pm 1)^{\circ}\text{C}$,光照强度为 3 000 lx,光照时间为 12 h 进行培养,10 d 后获得下胚轴,20 d 后获得幼叶、幼茎。

1.2 试验方法

1.2.1 膜荚黄芪不同外植体愈伤组织诱导 取膜荚黄芪幼叶切成 0.5 cm^2 块状,幼茎和下胚轴切成 0.7 cm 的段,分别接种至添加 6-BA(1.0 mg/L)、NAA(0.5 mg/L)和 TDZ(0.2 mg/L)的 MS 培养基上诱导愈伤组织(每瓶接种 4 个外植体),设置培养箱温度为 $(23\pm 1)^{\circ}\text{C}$,光照强度为 3 000 lx,光照时间为 12 h 进行培养,60 d 后获得愈伤组织。

1.2.2 蛋白质提取 取 3 g 愈伤组织置于预冷的研钵中,加入液氮充分研磨;然后加入 4 倍体积蛋白提取液,超声裂解;再加入等体积的 Tris-饱和酚(pH 8.0), 4°C 、7 000 r/min 离心 10 min,取酚层并加入 5 倍体积乙酸铵饱和的甲醇溶液中, -20°C 沉淀过夜,蛋白沉淀用甲醇、含 β -巯基乙醇的丙酮(体积分数为 0.02%)、丙酮依次洗涤,于 -20°C 冷冻干燥得到蛋白质干粉,并进行蛋白质定量和 SDS-PAGE 凝胶电泳^[10]。

1.2.3 蛋白质酶解与肽段制备 将蛋白提取物溶于含 8 mol/L 尿素的 100 mmol/L TEAB 缓冲液中进行变性处理;经 10 mmol/L DTT 在 37°C 还原 30 min,随后在室温避光条件下用 50 mmol/L IAA 进行烷基化修饰;用 50 mmol/L 碳酸氢铵稀释蛋白质,加入胰蛋白酶(Promega 公司),按 50:1 比例于 37°C 过夜消化;将消化后的肽段经 C18 StageTip 柱脱盐后,使用 Nanodrop One 仪器(Thermo Fisher Scientific)于 OD_{280} 测定浓度。取适量肽段,使用 Vanquish Neo UHPLC system(Thermo Scientific)进行色谱分离,肽段分离后用 Orbitrap Astral 质谱仪(Thermo Scientific)进行 DIA 质谱分析。

1.2.4 DIA 质谱分析 将分离后的样品肽段加载至 50 cm Low-Load $\mu\text{PAC}^{\text{TM}}$ Neo 色谱柱(Thermo Scientific),流速 $2.2\text{ }\mu\text{L}/\text{min}$ 。流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液,B 为含 0.1% 甲酸的 80% 乙腈溶液。洗脱梯度总时长 8 min:0~0.1 min(4%→6%B),0.1~1.1 min(6%→12%B),1.1~4.3 min(12%→25%B),4.3~6.1 min(25%→45%B),6.1~6.5 min(45%→99%B),6.5~8.0 min(维持 99%B)。

质谱采集采用数据非依赖采集(DIA)模式:一级全扫描范围 m/z 380~980,分辨率 240 000,自动增益控制(AGC)目标值设为 500%,最大注入时间 5 ms;二级扫描覆盖 m/z 150~2 000,隔离窗口 2 m/z ,AGC 目标值 500%,注入时间 3 ms,归一化碰撞能量(NCE)固定为 25。全扫描以 Profile 模式记录,MS/MS 谱图以 Centroid 模式输出,循环周期为 0.6 s。

1.2.5 数据库检索与定量 通过软件 DIA-NN(v1.8.1)合并所有质谱数据,完成 DIA 质谱数据的数据库检索及蛋白 DIA 定量分析。参考数据库为膜荚黄芪自建库(Unigene.fa.transdecoder.fasta)。设置参数为:最大漏切数为 1;固定修饰为半胱氨酸氨基甲酰甲基化;可变修饰包括 N 端乙酰化与甲硫氨酸氧化(最多 1 个/肽段);肽段长度限定为 7~30 个氨基酸,电荷态 +1 至 +4,子离子(m/z)150~2 000。结果在肽段-谱图匹配(PSM)和蛋白水平分别进行过滤。蛋白质与肽段的错误发现率(FDR)阈值设定为 0.01,随后进行 t 检验分析。差异表达蛋白的鉴定基于各蛋白丰度的变化。筛选差异蛋白质的标准为差异倍数(fold change,FC) ≥ 1.5 (上调表达)或 ≤ 0.67 (下调表达)且 $P < 0.05$ ^[11]。

1.2.6 生物信息学分析 使用 complex heatmap 软件包(基于 R 语言 3.4 版本),对样品和蛋白质表达两个维度进行分类,并对肽段进行聚类分析。通过 Blast2GO 工具(<https://www.blast2go.com/b2ghome>)对差异表达蛋白质进行基因本体(GO)分析(参考数据库:<https://www.geneontology.org>);利用京都基因与基因组百科全书(KEGG)数据库(<https://www.genome.jp/kegg/>)对富集的代谢通路进行注释,富集显著性通过 Fisher 精确检验评估,并采用 Benjamini-Hochberg 方法校正多重检验, $P < 0.05$ 视为显著富集。

1.2.7 差异表达蛋白基因的 RT-qPCR 分析 为验证蛋白质组学结果,并评估差异表达蛋白在膜荚黄芪不同外植体来源愈伤组织中的转录水平变化,本研究基于差异倍数显著性和蛋白质功能注释信息,随机选择了 6 个参与光合作用、苯丙烷类生物合成、淀粉和蔗糖代谢及植物激素信号通路的基因进行 RT-qPCR 分析。根据各基因的 CDS 序列,利用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物(表 1)。RT-qPCR 反应程序设置如下: 95°C 预变性 10 min;随后进行 41 个循环,每循环包括 95°C 变性 30 s 和

60 ℃退火/延伸 1 min。基因相对表达水平采用 标准化。
2^{-ΔΔC_t}方法^[12]进行计算,以 *Actin* 作为内参基因进行

表 1 RT-qPCR 扩增基因的引物序列
Table 1 Gene primer sequences for RT-qPCR

基因名称 Gene name	引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')
<i>Actin</i>	Actin-F	ACCTTCAATGTTCCCGCTATG
	Actin-R	CAAAGCGTAACCCTCGTAGAT
<i>4CL2</i>	4CL2-F	ACCCGCCAATCCTCTCTCTC
	4CL2-R	TGGTTGATCGGTAGGTGATT
<i>CAD1</i>	CAD1-F	CAAAAAAGCTGTTAGCTGATAC
	CAD1-R	GCAACGTTGATTCAAATATCAA
<i>PsaD</i>	PsaD-F	GCTTCTGTCTTTTCCTCTCCAG
	PsaD-R	CCTCCACACTTCATCACATTGC
<i>TMK1</i>	TMK1-F	GCTTCTTTGGTGCCCTCCACAT
	TMK1-R	CAGTTGGACATATTTGCTGAATTC
<i>SUS5</i>	SUS5-F	GCTTCTTTGGTGCCCTCCACAT
	SUS5-R	CAGTTGGACATATTTGCTGAATTC
<i>INV</i>	INV-F	GCTTCTACCTCAAGTTCAGCTTTG
	INV-R	CATTGTAAATGATTTCTATGTTAAATAAG

1.2.8 差异表达蛋白的 Western blot 验证 选取蛋白质组学鉴定到的差异表达蛋白 RbcL 进行 Western blot 验证。提取 3 组不同外植体来源愈伤组织总蛋白,经 SDS-PAGE 分离后转膜,封闭液封闭后用 TBST 多次清洗,使用特异性兔抗 RbcL 单克隆抗体(瑞士 Agrisera 公司,货号 ARS-AS03 037)过夜孵育,再用 HRP-Goat Anti-Rabbit 二抗(武汉三鹰生物技术有限公司,货号 RGAR001)结合,采用 ECL 化学发光法显影,以 β-actin 为内参。

1.2.9 愈伤组织酶活性及物质含量检测 称取 0.2 g 愈伤组织,加入预冷的提取缓冲液(含 1%PVP 和 0.1%Triton X-100),冰浴匀浆后于 4 ℃离心(12 000 r/min,15 min),收集上清液用于检测。

肉桂酰辅酶 A 连接酶(cinnamate-CoA ligase, 4CL)、查尔酮合成酶(chalcone synthase, CHS)、黄酮醇合成酶(flavonol synthase, FLS)和肉桂酰辅酶 A 还原酶(cinnamoyl-CoA reductase, CCR)活性采用 ELISA 试剂盒(购自江苏晶美生物科技有限公司)进行检测,结果以 U/g 表示。

ABA 和 IAA 含量采用高效液相色谱法(HPLC)测定:样品用甲醇提取,过滤后进样分析,以标准曲线法定量,结果以 ng/g 表示。每组设 3 个生物学重复。

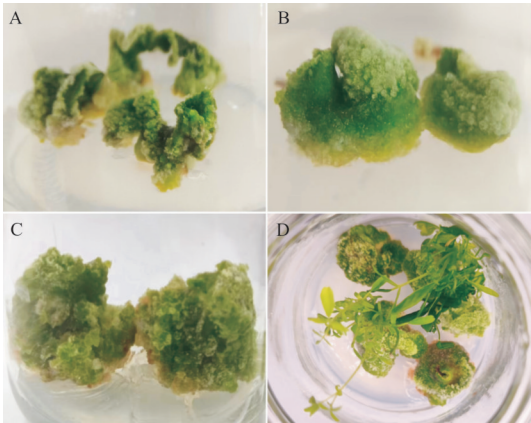
1.3 数据处理

使用 SPSS 26、Origin 2018、Excel、GraphPad Prism(10.1.2)和 R(v4.x)等软件进行数据处理、方差分析及图表绘制。

2 结果与分析

2.1 膜荚黄芪不同外植体来源愈伤组织诱导

膜荚黄芪幼叶诱导的愈伤组织呈深绿色至墨绿色,且组织结构疏松不规则(图 1-A);幼茎诱导的愈伤组织整体颜色为翠绿色,中心略显淡绿或半透明,组织结构呈致密球状,质地较硬(图 1-B);下胚轴诱导的愈伤组织呈翠绿色或黄绿色,组织结构疏松,呈多结节丛生状(图 1-C),且可成功诱导出不定芽(图 1-D)。



A. 幼叶诱导愈伤组织;B. 幼茎诱导愈伤组织;C. 下胚轴诱导愈伤组织;D. 下胚轴来源愈伤组织诱导不定芽。
A. Calli induced from young leaves;B. Calli induced from young stems;C. Calli induced from hypocotyls;D. Adventitious buds differentiated from hypocotyl-derived calli.

图 1 膜荚黄芪不同外植体诱导的愈伤组织及不定芽
Fig. 1 Calli and adventitious buds induced from different explants of *A. membranaceus*

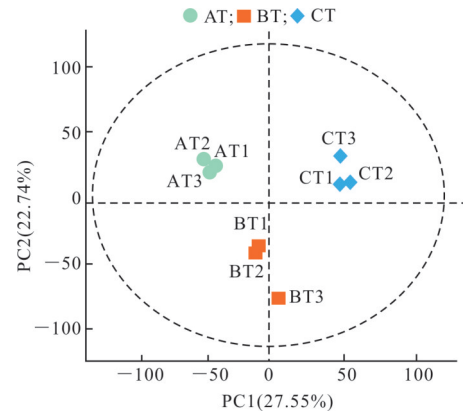
2.2 膜荚黄芪不同外植体来源愈伤组织蛋白质组学分析

对不同外植体诱导 3 种愈伤组织的蛋白质组学结果进行主成分分析(PCA),结果如图 2 所示。由图 2 可见,AT 组(幼叶来源)样本聚类紧密,位于左上区域;BT 组(幼茎来源)样本聚集于中心偏下位置;CT 组(下胚轴来源)样本则明显分布在右侧,与其他两组形成明显分离,说明不同外植体来源的愈伤组织在整体蛋白质表达谱上存在显著差异,尤其以 CT 组与 AT、BT 组之间差异最突出。

2.3 膜荚黄芪不同外植体来源愈伤组织差异表达蛋白分析

对不同外植体诱导的愈伤组织进行蛋白质差异表达分析,共筛选得到 1 603 个 DEPs,从幼茎与幼叶诱导的愈伤组织中鉴定到 646 个 DEPs,从下胚轴与幼叶诱导的愈伤组织中鉴定到 997 个 DEPs,从下胚轴与幼茎诱导的愈伤组织中鉴定到 716 个 DEPs,从幼叶、幼茎与下胚轴诱导的愈伤组织中共同鉴定到 50 个 DEPs(图 3-A)。AT vs BT 组中鉴定到 344 个 DEPs 上调,302 个 DEPs 下调;AT vs

CT 组中鉴定到 495 个 DEPs 上调,502 个 DEPs 下调;BT vs CT 组中鉴定到 348 个 DEPs 上调,368 个 DEPs 下调(图 3-B)。

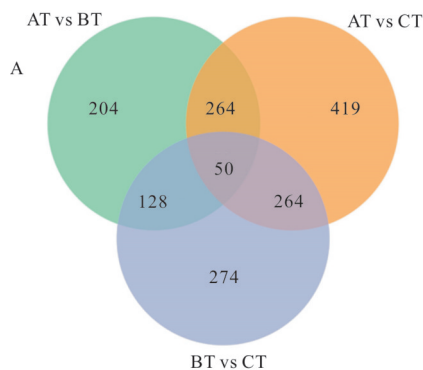


AT. 幼叶诱导的愈伤组织;BT. 幼茎诱导的愈伤组织;CT. 下胚轴诱导的愈伤组织。下同。

AT. Calli induced from young leaves;BT. Calli induced from young stems;CT. Calli induced from hypocotyls. The same below.

图 2 膜荚黄芪不同外植体诱导的愈伤组织蛋白质组学数据 PCA 分析

Fig. 2 PCA of proteomic data from calli induced by different explants of *A. membranaceus*



A. 差异表达蛋白数目 Venn 图;B. 差异表达蛋白数目柱状图。

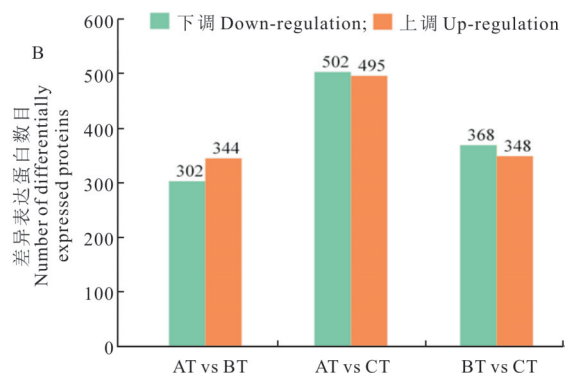
A. Venn diagram of DEP counts;B. Bar graph of DEP counts.

图 3 膜荚黄芪不同外植体来源愈伤组织差异表达蛋白分析

Fig. 3 Differentially expressed proteins in calli induced from different explants of *A. membranaceus*

2.4 膜荚黄芪不同外植体来源愈伤组织 DEPs 的层次聚类分析

对不同外植体诱导的膜荚黄芪愈伤组织中差异表达蛋白进行层次聚类分析,结果见图 4。由图 4-A 可以看出,所有样本按照组别明显聚为三类,同一组内的 3 个生物学重复样本聚集在一起,表明试验重复性良好;AT、BT 和 CT 3 组间聚类关系清晰,表明不同外植体来源显著影响了愈伤组织的蛋白质表达模式。聚类结果识别出多个差异表达蛋白簇:部分蛋白在 AT 组中呈高表达,在 BT 和 CT 组中表达较低;部分蛋白在 BT 组中特异性高表达;



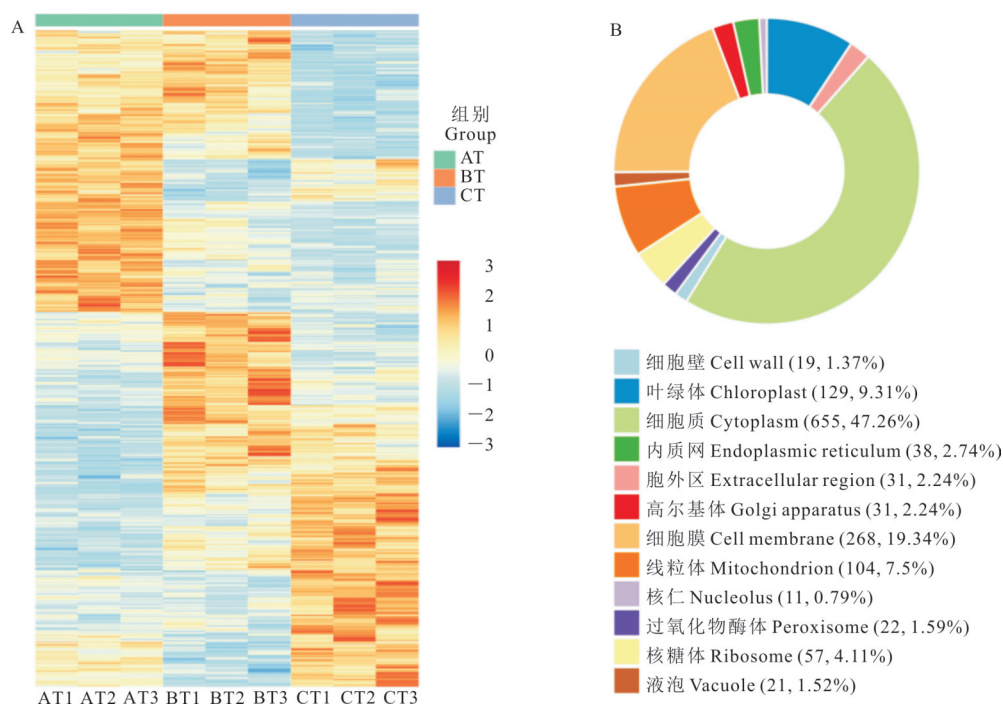
另有部分蛋白在 CT 组中表达水平明显高于 AT 和 BT 组。这些差异表达蛋白的聚类模式提示,AT、BT、CT 3 组在蛋白质组学水平具有显著的生物学差异。

2.5 膜荚黄芪不同外植体来源愈伤组织 DEPs 的亚细胞定位

对膜荚黄芪不同外植体诱导愈伤组织中 DEPs 的亚细胞定位进行分析,结果(图 4-B)显示,DEPs 广泛分布于多个细胞器和细胞结构中。细胞质(cytoplasm)是 DEPs 最主要的定位区域,共包含 655 个蛋白,占总数的 47.26%;其次为细胞膜(cell mem-

brane),含268个蛋白,占总数的19.34%;129个蛋白(占总数的9.31%)定位于叶绿体中,表明光合作用相关功能在愈伤组织中仍具有一定活性。此外,线粒体(mitochondrion)定位蛋白数量为104个(占总数的7.5%),参与能量代谢过程;核糖体(ribosome)和内质网(endoplasmic reticulum)蛋白数量分别为57个(占总数的4.11%)和38个(占总数的2.74%),提示蛋白质合成与加工机制在细胞响应过程中发挥重要作用。其他定位包括,细胞壁(cell wall)(蛋白数量19(下同),占总数的1.37%)、高尔

基体(golgi apparatus)(31,占总数的2.24%)、胞外区(extracellular region)(31,占总数的2.24%)、过氧化物酶体(peroxisome)(22,占总数的1.59%)、核仁(nucleolus)(11,占总数的0.79%)及液泡(vacuole)(21,占总数的1.52%)等。膜荚黄芪不同外植体诱导形成的愈伤组织中DEPs不仅定位于核心代谢与合成场所,也广泛分布于信号传递、物质运输和细胞结构维持相关的细胞器中,反映出不同外植体诱导的愈伤组织在多维度细胞功能上存在显著调控差异。



A. DEPs层次聚类分析;B. 亚细胞定位分析。

A. Hierarchical clustering of DEPs; B. Subcellular localization of DEPs.

图4 膜荚黄芪不同外植体来源愈伤组织DEPs层次聚类和亚细胞定位分析

Fig. 4 Hierarchical clustering and subcellular localization of DEPs in calli induced from different explants of *A. membranaceus*

2.6 膜荚黄芪不同外植体来源愈伤组织DEPs的GO富集分析

膜荚黄芪不同来源愈伤组织间DEPs的GO功能富集分析结果(图5)显示,DEPs主要注释到三大类生物学范畴:生物过程(biological process, BP)、分子功能(molecular function, MF)和细胞组分(cellular component, CC)。在AT vs BT比较组中(图5-A),DEPs主要参与光合作用、碳水化合物、多糖代谢及细胞壁构建和能量前体生成等生物过程;在细胞组分上显著定位于类囊体、光合膜、光系统等相关结构;分子功能以氧化还原酶活性、过氧化物酶活性、催化活性及多种糖苷水解和转移酶活性为

主。在AT vs CT和BT vs CT比较组中(图5-B、C),DEPs显著富集于光合作用、碳水化合物及多糖代谢等基础代谢活动,其中BT vs CT组DEPs还富集于细胞壁组织与生物发生、活性氧及过氧化氢的代谢与清除,以及对氧化和一般胁迫的响应;在细胞组分上,这些蛋白主要定位于叶绿体、类囊体膜、光系统I/II、光合膜,以及质膜和细胞外围;分子功能以氧化还原酶活性、过氧化物酶活性、催化活性、糖苷键水解酶活性、抗氧化活性、四吡咯结合及铜离子结合能力为主,提示这些DEPs在光合作用、叶绿素相关代谢、细胞壁重塑、次生代谢及氧化还原调控等过程中发挥关键作用。

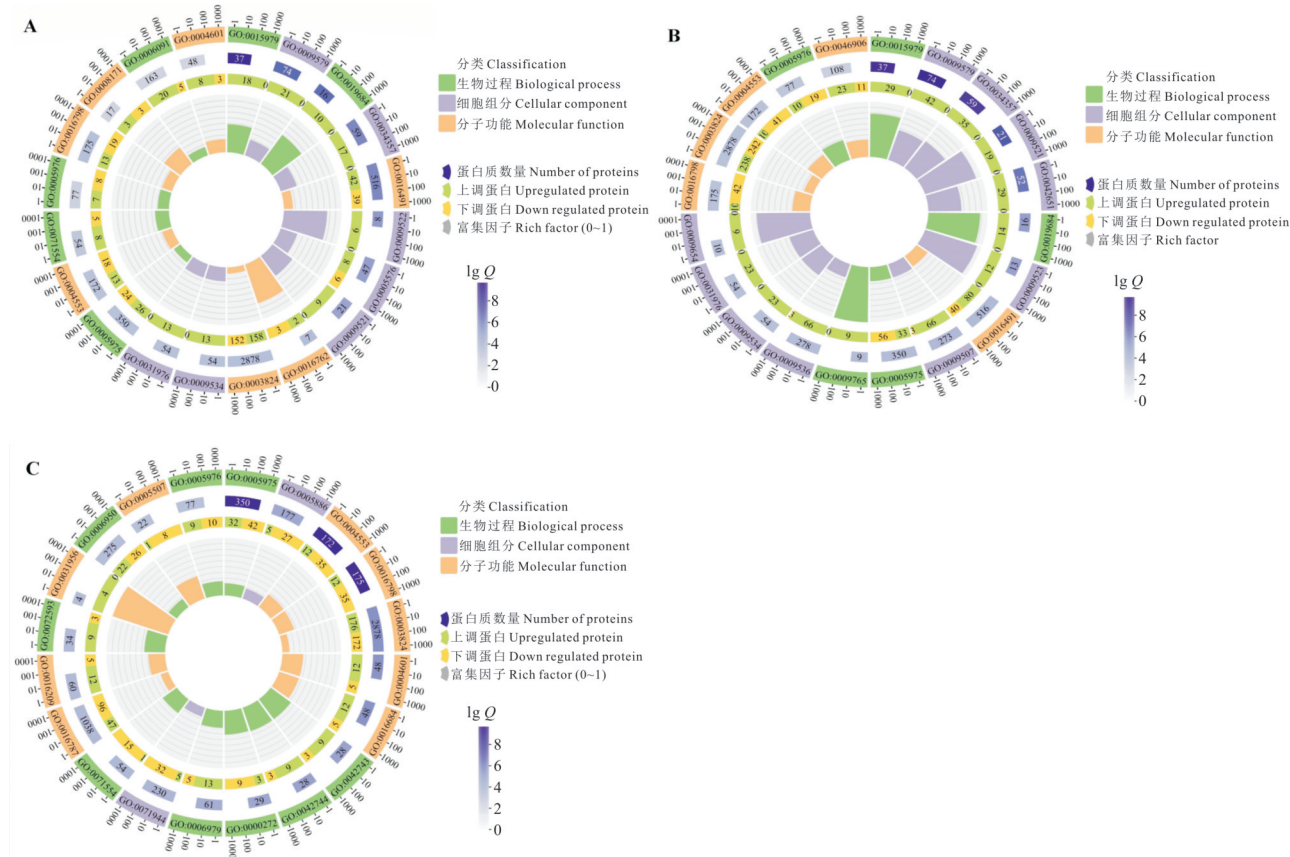


图5 膜荚黄芪不同外植体来源愈伤组织DEPs的GO富集

Fig. 5 GO enrichment of DEPs in calli induced from different explants of *A. membranaceus*

2.7 膜荚黄芪不同外植体来源愈伤组织DEPs的

KEGG富集分析,结果见图6。

KEGG富集分析

对膜荚黄芪不同来源愈伤组织DEPs进行

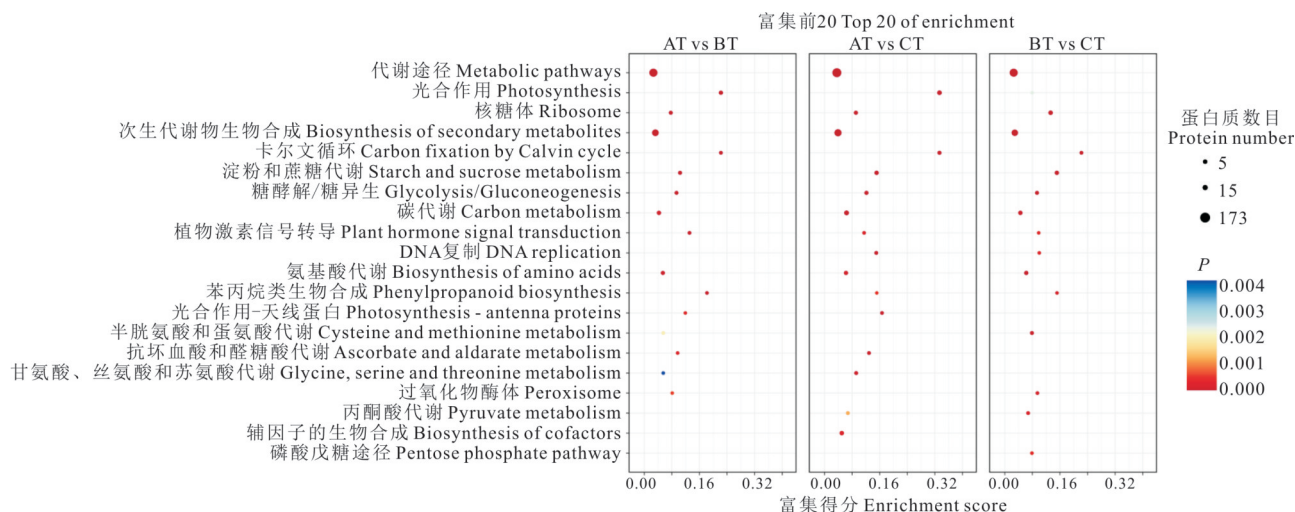


图6 膜荚黄芪不同外植体来源愈伤组织DEPs的KEGG富集

Fig. 6 KEGG enrichment of DEPs in calli induced from different explants of *A. membranaceus*

由图6可以看出,在所有比较组中,代谢途径均为富集DEPs数目最多的通路,同时部分DEPs聚集

于多个核心生物学过程,包括光合作用、核糖体、次生代谢物生物合成、氨基酸代谢、卡尔文循环、淀粉

表 2 (续) Table 2(continued)

代谢途径 Pathways	登录号 Accession	蛋白注释 Protein description	蛋白名称 Protein name	AT vs BT		AT vs CT		BT vs CT	
				<i>P</i> 值 <i>P</i> value	差异倍数 FC	<i>P</i> 值 <i>P</i> value	差异倍数 FC	<i>P</i> 值 <i>P</i> value	差异倍数 FC
光合作用 Photosynthesis	TRINITY_DN1646_c0_g1.p1	psbP 样蛋白 1 psbP-like protein 1	PsbP			0.000 1	1.913 0		
	TRINITY_DN9586_c0_g1.p2	叶绿素 a-b 结合蛋白 Chlorophyll a-b binding protein	LHCB			0.005 6	2.257 0		
	TRINITY_DN9813_c0_g1.p1	ATP 合酶 δ 链 ATP synthase delta chain	atpD			0.016 9	2.795 3		
淀粉和蔗糖 代谢 Starch and sucrose metabolism	TRINITY_DN5503_c0_g2.p1	假定蛋白 TSUD211880 Hypothetical protein TSUD211880	TSUD211880	0.001 0	77.182 6	0.017 8	0.369 4	0.003 1	0.004 9
	TRINITY_DN12404_c0_g1.p1	葡聚糖内切-1,3- β -葡萄糖苷酶 4 Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 4	EGLC4			0.003 3	0.473 5	0.004 3	0.404 4
	TRINITY_DN154_c0_g1.p1	蔗糖合成酶 5 Sucrose synthase 5	SUS5			0.025 3	0.631 6	0.013 2	0.510 1
	TRINITY_DN2765_c0_g2.p1	β -葡萄糖苷酶 beta-glucosidase	BGL12			0.001 1	0.554 7	0.001 0	0.546 7
	TRINITY_DN12138_c0_g1.p1	β -呋喃果糖苷酶 beta-fructofuranosidase	INV			0.019 2	0.165 7	0.038 2	0.303 4
	TRINITY_DN3349_c0_g1.p1	β -淀粉酶 7 亚型 X2 beta-amylase 7 isoform X2	BAM7-X2					0.031 2	0.431 1
	TRINITY_DN1792_c3_g1.p1	内切葡聚糖酶 24 Endoglucanase 24	EG24			0.041 6	0.446 2	0.024 9	0.493 3
	TRINITY_DN2984_c0_g2.p1	脱落酸受体 Abscisic acid receptor	PYL9			0.002 6	0.390 8		
植物激素信号 转导 Plant hormone signal transduction	TRINITY_DN14528_c0_g1.p1	受体蛋白激酶 Receptor protein kinase	TMK1			0.000 9	0.550 3	0.000 5	0.592 2
	TRINITY_DN1292_c0_g1.p1	吲哚-3-乙酰胺合成酶 Putative indole-3-acetic acid-amido synthetase	GH3.1	0.018 1	0.202 9			0.027 0	4.452 2
	TRINITY_DN1211_c0_g1.p1	油菜素内酯相关受体激酶 1 亚型 C Brassinosteroid insensitive 1-associated receptor kinase 1 isoform C	BAK1-C	0.010 3	1.851 8				
	TRINITY_DN9828_c0_g1.p1	生长素反应蛋白 21 auxin-responsive protein 21	SAUR21	3.138 2E-05	2.037 5	0.000 2	1.918 5		
	TRINITY_DN9647_c0_g1.p1	色氨酸氨基转移酶相关蛋白 2 Tryptophan aminotransferase-related protein 2	TAR2	0.001 2	7.337 7	0.000 2	691.245		

由表 2 可以看出,在苯丙烷类生物合成通路中共鉴定到 8 个差异表达蛋白,CT 组中 4CL2 表达水平显著高于 AT 和 BT 组,查尔酮合成酶 2(CHS2)、查尔酮还原酶(CHR)、咖啡酰莽草酸酯酶样亚型 X1(CSE)及反-肉桂酸 4-单加氧酶(C4H)等关键酶蛋白表达水平显著高于 BT 组;木质素合成相关蛋白 CCR 在 CT 组中显著低于 BT 组,而 CAD1 的表达量在 CT 组中则显著低于 AT 和 BT 组,提示不同来源愈伤组织通过调控苯丙烷类代谢流的分配来维持各自有利于或不利于器官发生的生理状态。在光合作用通路中共鉴定到 11 个差异表达蛋白,CT 组中 LHCB1.2、CAB13、PsaD 和 PsaO 等光系统 I/II 核心蛋白的表达水平显著低于 AT 和 BT

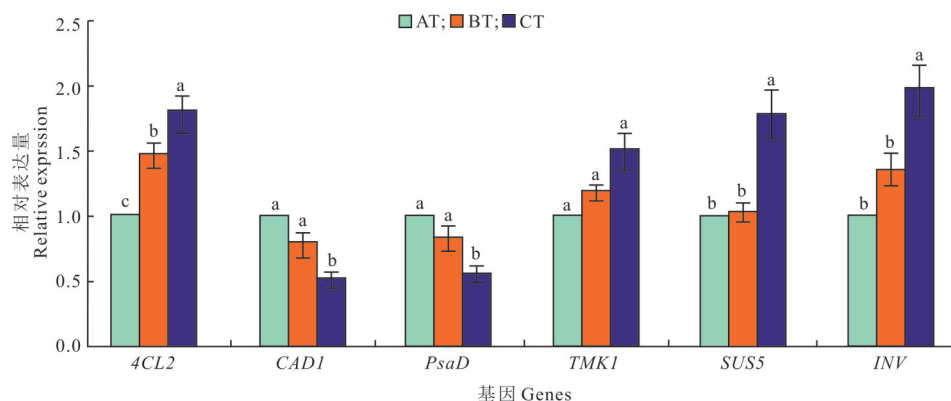
组,OEE1、PsbP、Psb27、LHCB 和 atpD 的表达水平在 CT 组中较 BT 组进一步降低,表明下胚轴来源愈伤组织光合系统发育受到明显抑制。在植物激素信号转导通路中显著富集到 6 个差异表达蛋白,与 CT 组相比,生长素反应蛋白 21(SAUR21)、色氨酸氨基转移酶相关蛋白 2(TAR2)和吲哚-3-乙酰胺合成酶(GH3.1)在 AT 或 BT 组中显著上调,脱落酸受体(PYL9)和受体蛋白激酶(TMK1)在 AT 或 BT 组中显著下调,说明植物激素信号转导途径广泛参与不同来源愈伤组织的继续分化。此外,共鉴定到 7 个与淀粉和蔗糖代谢相关的差异表达蛋白,包括 β -葡萄糖苷酶(BGL12)、 β -淀粉酶 7 亚型 X2(BAM7-X2)、蔗糖合成酶 5(SUS5)和 β -呋喃果糖

苷酶(INV)等,在CT组中均呈高表达,说明下胚轴来源愈伤组织具有更强的碳水化合物降解与转化能力,与其不定芽分化能力紧密相关。

2.9 膜荚黄芪不同外植体来源愈伤组织DEPs相关基因表达分析

对随机选取的关键代谢通路中重要DEPs相关基因进行RT-qPCR分析,结果(图7)显示,所有基因的表达趋势与蛋白质组学数据基本一致,表明测序结果可靠。参与苯丙烷类生物合成和蔗糖代谢

基因 *4CL2*、*TMK1*、*SUS5*、*INV* 的相对表达量在下胚轴来源的愈伤组织中均处于较高水平;而与木质素代谢和光合作用相关基因 *CAD1*、*PsaD* 的相对表达量则在幼叶和幼茎来源愈伤组织中具有较高水平,且与下胚轴来源的差异显著。上述结果表明,不同外植体来源的愈伤组织在关键功能蛋白的基因表达水平上存在明显差异,进一步证实了外植体类型对愈伤组织蛋白质表达特征具有一定影响。



组间不同小写字母表明存在显著差异 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters above the bars indicate significant differences ($P < 0.05$).

图7 膜荚黄芪不同外植体来源愈伤组织DEPs相关基因的相对表达量

Fig. 7 Relative expression levels of DEP-related genes in calli induced from different explants of *A. membranaceus*

2.10 膜荚黄芪不同外植体来源愈伤组织DEPs的Western blot验证

Western blot验证结果(图8)显示,RbcL在幼叶和幼茎来源愈伤组织中的表达水平高于下胚轴来源愈伤组织,与定量蛋白质组学研究结果趋势一致,进一步支持了蛋白质组学数据的准确性。

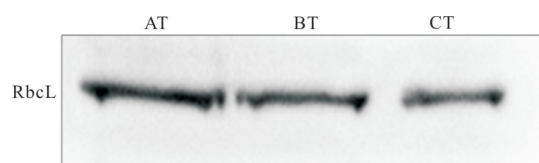


图8 膜荚黄芪不同来源愈伤组织中RbcL表达水平的Western blot分析

Fig. 8 Western blot analysis of RbcL expression levels in calli induced from different explants of *A. membranaceus*

2.11 膜荚黄芪不同外植体来源愈伤组织酶活性及物质含量分析

通过检测关键代谢途径酶活性发现,下胚轴来源愈伤组织中4CL和CHS活性高于幼叶和幼茎来源愈伤组织;而下胚轴来源愈伤组织中FLS和CCR活性显著低于幼叶和幼茎来源愈伤组织,幼叶和幼茎来源愈伤组织中FLS和CCR活性整体维持在较高水平,但二者无显著差异(图9)。激素含量分析

显示,下胚轴来源愈伤组织中ABA和IAA含量均最高,显著高于幼叶和幼茎来源愈伤组织,幼茎来源愈伤组织中ABA和IAA含量虽略高于幼叶来源愈伤组织,但二者无显著性差异(图9)。这一结果表明,下胚轴愈伤组织具有更有利于细胞脱分化与器官发生的内源激素环境。

3 讨论

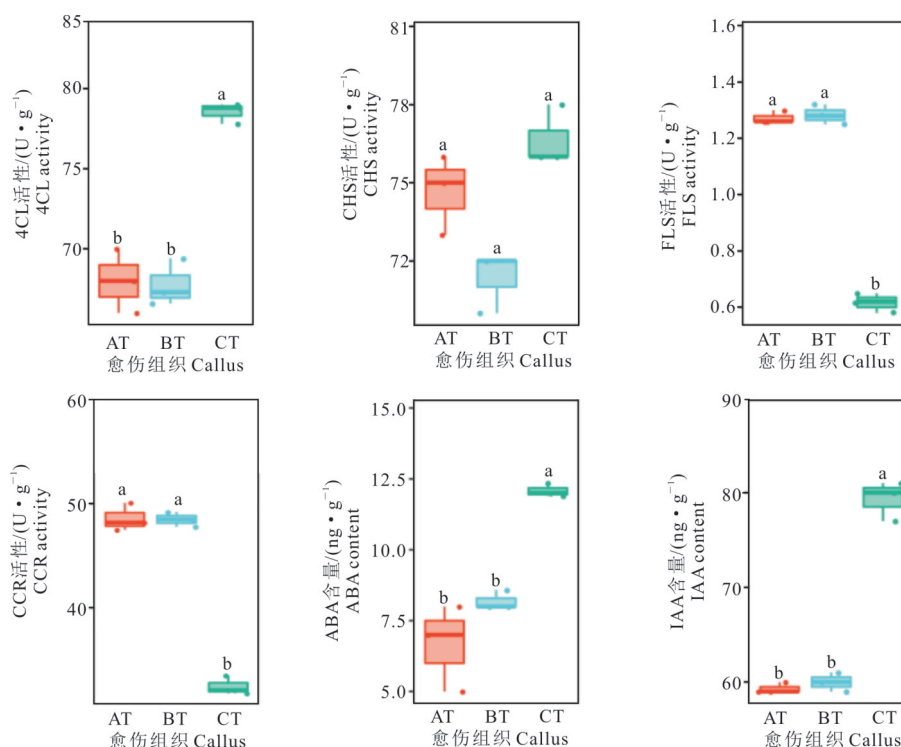
在植物组织培养体系中,外植体的组织来源是决定愈伤组织诱导效率及其后续器官分化潜能的关键因素^[13]。本研究基于高通量蛋白质组学技术,比较了膜荚黄芪幼叶、幼茎及下胚轴3种外植体来源愈伤组织的蛋白质表达谱,共鉴定出1 603个DEPs。功能富集分析表明,这些DEPs显著富集于多个核心生物学过程与代谢通路,包括光合作用、苯丙烷类生物合成、淀粉和蔗糖代谢及植物激素信号转导等,为解析不同外植体来源愈伤组织诱导不定芽分化差异奠定了分子基础。

3.1 光合作用相关DEPs参与膜荚黄芪不同来源愈伤组织分化

在传统组织培养实践中,愈伤组织的“绿化”常

被经验性地视为其具备器官发生潜力的标志。然而近期研究揭示,光合活性本身并非再生的直接驱动力。Song 等^[14]在番茄研究中发现,真正具有芽原基活性的细胞自身几乎不表达光合作用相关基因,而是被一圈由光诱导产生的、富含光合蛋白的“叶肉薄壁组织样细胞”所包围。这些细胞通过光合作用产糖,激活邻近芽原基中的 TOR 信号通路,间接促进再生^[15]。在水稻(*Oryza sativa*)愈伤组织研究中发现,光合作用、糖代谢及氨基酸代谢相关基因在多能性愈伤组织中被显著抑制^[16]。甜菊(*Stevia rebaudiana*)愈伤组织细胞在脱分化过程中,其叶绿体光合片层会逐渐降解消失^[17],说明愈伤组织若过早或大范围转向光合自养分化,往往意味着多数细胞已脱离分生状态,难以维持器官发生潜能^[14,16]。本研究发现,膜荚黄芪下胚轴来源愈伤组织中,光合作用相关蛋白表达普遍下调;LHCB1.2、CAB13、PsaD 和 PsaO 的表达水平显著低于幼叶和幼茎来源愈伤组织,OEE1、PsbP、Psb27、LHCB 和 atpD 的

表达水平较幼茎来源进一步降低,表明下胚轴愈伤组织的光合系统发育或功能活性明显减弱,相比之下,幼叶和幼茎来源的愈伤组织中这些蛋白显著高表达,说明幼叶和幼茎来源愈伤组织具有更高的光合活性,这种增强的光合作用可能有两个潜在意义:一是为后续不定芽的再生过程积累必要的能量物质;二是提示其中大部分细胞可能已具备光合自养能力。据文献^[2]报道,幼叶和幼茎虽易于诱导愈伤组织,且诱导速度明显快于下胚轴,却难以分化形成不定芽,因此本研究中幼叶和幼茎来源的愈伤组织细胞在离体培养条件下可能大范围地向光合自养方向分化,这些愈伤组织中已有相当比例的细胞启动了类似于叶肉细胞的分化程序,虽然仍能通过脱分化进行增殖,但其中真正具有多能性、能有效响应器官发生信号的细胞比例相对较低。相比之下,下胚轴来源愈伤组织的光合蛋白表达水平较低,这可能暗示其细胞群体中保留了更高比例的分生组织样细胞,更易维持异养、分生状态。



组间不同小写字母表明存在显著差异($P < 0.05$)

Different lowercase letters indicate significant differences among groups ($P < 0.05$).

图9 膜荚黄芪不同外植体来源愈伤组织中酶活性及物质含量分析

Fig. 9 Enzyme activities and metabolite contents in calli induced from different explants of *A. membranaceus*

3.2 苯丙烷类生物合成相关 DEPs 参与膜荚黄芪不同来源愈伤组织分化

苯丙烷类代谢途径是植物次生代谢中最为重要的通路之一,其代谢产物不仅参与木质素、类黄

酮等结构物质和功能性成分的合成,中间或终产物还可作为信号分子,调控细胞分化与组织器官发生过程,尤其是在愈伤组织向不定芽转化过程中具有关键作用^[18-19]。C4H是苯丙素途径中的首个关键细

胞色素P450单加氧酶,催化反式肉桂酸转化为对香豆酸,后者经4CL转化为羟基肉桂酰-CoA,为木质素和类黄酮的合成提供前体^[20-21]。本研究发现,膜荚黄芪下胚轴来源愈伤组织中,苯丙烷类生物合成途径关键酶4CL2的蛋白表达水平及活性均显著高于幼叶和幼茎来源愈伤组织,C4H蛋白表达水平也显著高于幼叶来源愈伤组织,表明该组织中苯丙烷类代谢途径的起始阶段更为活跃,有利于调控下游多种化合物的合成与积累,下胚轴来源愈伤组织可能对诱导不定芽分化具有更大优势。

查尔酮合成酶作为类黄酮合成途径的起始关键酶,其活性在银杏(*Ginkgo biloba*)愈伤组织中显著升高,有助于类黄酮富集,进而提升植物的再生能力^[19]。瑞香狼毒(*Stellera chamaejasme*)愈伤组织诱导不定芽过程与总黄酮累积量紧密相关^[22]。本研究发现,下胚轴来源愈伤组织中CHS活性高于幼叶和幼茎来源愈伤组织,且蛋白质组学数据显示CHS2与CHR的表达水平均明显高于幼茎来源愈伤组织,该结果与银杏中的研究结果相似,表明下胚轴愈伤组织更有利于查尔酮及类黄酮前体的积累,从而促进不定芽再生。植物异黄酮-2'-羟化酶(I2'H)可促进类黄酮积累,对植物愈伤组织的发生及其不定芽分化具有积极影响^[8-9,23]。本研究发现,相较于幼叶来源愈伤组织,下胚轴来源愈伤组织中I2'H表达上调,可能对不定芽生成有促进作用。在胡桃楸(*Juglans sigillata*)中,二氢黄酮醇4-还原酶(DFR)的表达促进了类黄酮积累,有利于不定芽分化^[24],DFR和FLS共同竞争二氢黄酮醇底物^[25]。本研究中,下胚轴来源愈伤组织中FLS具有更低的表达水平和活性,推测其与DFR竞争二氢黄酮醇底物的能力更弱,这导致底物通量可能更倾向于DFR介导的类黄酮及下游产物积累,因此下胚轴来源愈伤组织更易诱导不定芽。

木质素的生物合成是由胚胎再生过程中环境应激反应引起的,导致胚胎愈伤组织褐变,阻碍胚胎愈伤组织再生^[26]。木质素的减少,使玉米(*Zea mays*)胚性愈伤组织易维持在柔软松散的生长状态,更适合传代培养和分化,相反木质素含量高,表面坚硬光滑,不易传代培养和分化^[27]。已有研究表明,CCR和CAD表达增加了转基因杨树(*Populus alba*×*P. glandulosa*)愈伤组织的木质素含量^[28]。本研究发现,膜荚黄芪下胚轴来源愈伤组织中木质素合成关键酶CAD1蛋白及基因表达水平均显著低

于幼叶和幼茎来源愈伤组织,同时CCR蛋白表达量和活性显著低于幼茎来源愈伤组织,幼叶和幼茎来源愈伤组织中CCR活性相近且维持在较高水平,说明下胚轴来源愈伤组织可能通过调整CAD1和CCR的表达及活性,减少木质素积累,从而维持组织柔软松散的状态,有利于不定芽分化;相反,幼叶和幼茎来源愈伤组织中木质素沉积较多,使组织结构致密,影响不定芽形成。

3.3 植物激素信号转导相关DEPs参与膜荚黄芪不同来源愈伤组织分化

植物激素信号传导与植物胚的形成有关^[8,29]。在愈伤组织诱导的早期阶段,高水平的内源性IAA可能会响应启动愈伤组织的形成和扩增,在晚期阶段高水平的ABA则诱导器官生成^[7]。植物生长素和ABA信号可能会影响蔗糖代谢,从而触发水稻愈伤组织的芽再生^[30]。研究表明,高浓度生长素能够通过TIR1/AFBs信号途径转录激活促进愈伤组织多能性的建立^[31],同时诱导细胞壁松弛,协同驱动芽原基的起始与分化^[32]。TMK是生长素信号转导的关键激酶。已有研究证实,TMK1介导的非经典生长素信号通路,通过激活下游MKK4/5-MPK3/6级联反应调控细胞分裂模式和细胞命运转变^[3]。本研究发现,与幼叶和幼茎来源愈伤组织相比,下胚轴来源愈伤组织中IAA含量和TMK蛋白表达水平较高,推测可能激活生长素信号通路,有利于分化不定芽。GH3家族酶通过将植物组织内游离IAA共轭为无活性形式,调控局部生长素稳态^[33]。在本研究中,幼叶来源愈伤组织中GH3.1高表达可能导致游离IAA迅速失活,无法建立驱动器官发生的必要浓度梯度,而下胚轴来源愈伤组织中GH3.1的低表达则保障了充足的生长素信号输出,为不定芽生成作准备,这与本研究检测到的高IAA含量结果相一致。PYL作为ABA信号通路的核心正调控因子,其高表达增强了细胞对ABA的感知能力^[34]。脱落酸与脱落酸受体PYL蛋白结合形成复合体,抑制PP2C的活性,从而释放SnRK2,激活脱落酸信号通路。在本研究中,下胚轴来源愈伤组织中ABA含量显著高于幼叶和幼茎来源愈伤组织,且PYL9在下胚轴来源愈伤组织中上调表达,促进ABA信号转导,有利于下胚轴来源愈伤组织再生潜能增强。除此之外,本研究还鉴定到一些与激素信号感知、转导及细胞伸长密切相关的蛋白,如BAK1-C、SAUR21和TAR2等在3组愈伤组织中呈现不同程

度的上(下)调表达,这些蛋白的协同差异表达,进一步表明植物激素合成、感知与下游响应的精细调控在膜荚黄芪愈伤组织向不定芽分化过程中发挥关键作用。

3.4 淀粉和蔗糖代谢相关 DEPs 参与膜荚黄芪不同来源愈伤组织分化

糖和能量代谢通过提供能量与碳骨架,支撑细胞分裂与活性决定,在胚胎发育中发挥关键作用^[35]。淀粉和蔗糖代谢作为植物碳同化产物转化与储存的核心途径,由淀粉合成/降解酶、蔗糖合成酶和蔗糖酶等协同调控,为生长发育供能^[36]。甘蔗(*Elaeis guineensis*)和玉米的胚性愈伤组织形成与淀粉和蔗糖代谢密切相关^[37]。在蔗糖代谢途径中,SUS催化蔗糖与UDP生成果糖和尿苷二磷酸葡萄糖(UDPG),而INV则将蔗糖水解为葡萄糖和果糖;胼胝质合酶能够催化合成 β -1,3-葡聚糖,随后被葡聚糖内切-1,3- β -D-葡萄糖苷酶(EGLC)水解为D-葡萄糖。研究表明,SUS在布兰氏龙竹(*Dendrocalamus brandisii*)愈伤组织芽分化过程中主导碳水化合物降解,且水稻中蔗糖的高效摄取与代谢可促进愈伤组织启动及新芽形成^[30,38]。本研究发现,SUS5、INV和EGLC4在下胚轴来源愈伤组织中显著上调,可能增强蔗糖分解,促进D-葡萄糖、果糖及其他中间产物的积累,有利于不定芽分化。另外,本研究还鉴定到BAM7-X2、BGL12和内切葡聚糖酶24(EG24)的表达水平在幼茎和下胚轴来源愈伤组织中存在显著差异,表明淀粉代谢整体在愈伤组织诱导不定芽分化过程中具有一定影响。

4 结 论

本研究比较了膜荚黄芪幼叶、幼茎和下胚轴来源愈伤组织的蛋白质表达谱,共鉴定出6 503个可信蛋白,3组间两两比较共筛选出1 603个DEPs。不同外植体显著影响愈伤组织的蛋白质组成与功能特征,下胚轴诱导的愈伤组织表现出独特的分子优势:其光合作用相关蛋白及木质素合成关键酶(如CAD1、CCR)表达显著下调,CCR活性最低,有利于维持疏松多结节的形态,并保留更多分生样细胞;同时苯丙烷类生物合成途径中4CL2、CHS蛋白表达水平最高,对应4CL和CHS活性也最强,而FLS活性最低,表明代谢流倾向于类黄酮前体积累。蔗糖代谢(如SUS5、INV)以及植物激素信号转导(如TMK1、PYL9)相关蛋白显著上调,IAA和

ABA含量高于其他两组,有利于构建不定芽分化的能量供给及激素微环境。相比之下,幼叶和幼茎来源的愈伤组织因高表达光合蛋白和木质素合成酶,细胞趋向于光合自养或结构硬化,再生潜能受限。综上所述,本研究从蛋白质组学层面阐明了外植体类型调控膜荚黄芪愈伤组织再生能力的分子基础,为优化其组织培养体系、定向调控不定芽及活性成分合成提供了重要的理论参考。

[参考文献]

- [1] Durazzo A, Nazhand A, Lucarini M, et al. *Astragalus* (*Astragalus membranaceus* Bunge): botanical, geographical, and historical aspects to pharmaceutical components and beneficial role [J]. *Rendiconti Lincei Scienze Fisiche e Naturali*, 2021, 32(3): 625-642.
- [2] 李晶晶. 膜荚黄芪组织培养及愈伤组织褐化的结构及代谢组分析[D]. 银川:宁夏大学, 2025.
Li J J. Tissue culture of *Astragalus membranaceus* and structural and metabolome analysis of callus browning [D]. Yinchuan: Ningxia University, 2025.
- [3] 高英. 茶树组培茎段和叶片脱分化与再分化的表观遗传学机制[D]. 杭州:浙江大学, 2019.
Gao Y. Epigenetic mechanism associated with the dedifferentiation and redifferentiation of stem and leaf during tissue culture of tea plant [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2019.
- [4] 田雨, 高高新, 张秀娟, 等. 蒙古黄芪与膜荚黄芪愈伤组织诱导及再生植株体系的建立[J]. *分子植物育种*, 2022, 20(15): 5080-5087.
Tian Y, Gao X X, Zhang X J, et al. Establishment of callus induction and plant regeneration system of *astragalus mongolicus* and *Astragalus membranaceus* [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2022, 20(15): 5080-5087.
- [5] 郭生虎, 陈虞超, 李明, 等. 膜荚黄芪愈伤组织诱导及植株再生体系的建立[J]. *分子植物育种*, 2020, 18(18): 6122-6126.
Guo S H, Chen Y C, Li M, et al. Tissue culture and plantlet regeneration system establishment of *Astragalus membranaceus* (fisch.) bunge [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2020, 18(18): 6122-6126.
- [6] 李晶晶, 冉盼, 王佳, 等. 膜荚黄芪组织培养及植株再生体系的建立[J]. *北方园艺*, 2024(14): 109-115.
Li J J, Ran P, Wang J, et al. Tissue culture and establishment of regeneration system of *Astragalus membranaceus* [J]. *Northern Horticulture*, 2024(14): 109-115.
- [7] Huang W L, Lee C H, Chen Y R. Levels of endogenous abscisic acid and indole-3-acetic acid influence shoot organogenesis in callus cultures of rice subjected to osmotic stress [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2012, 108(2): 257-263.
- [8] Imin N, Goffard N, Nizamidin M, et al. Genome-wide transcriptional analysis of super-embryogenic *Medicago truncatula* explant cultures [J]. *BMC Plant Biology*, 2008, 8: 110.

- [9] Chen J, Yuan H, Zhang L, et al. Cloning, expression and purification of isoflavone-2'-hydroxylase from *Astragalus membranaceus* Bge. Var. *mongolicus* (Bge.) Hsiao [J]. Protein Expression and Purification, 2015, 107: 83-89.
- [10] Li X X, Wang L X, Wang M, et al. Global analysis of protein succinylation modification of *Nostoc flagelliforme* in response to dehydration [J]. Journal of Proteomics, 2021, 237: 104149.
- [11] Chen F Q, Ha X, Gao R, et al. Integrated ion, hormone, and proteomic analyses reveal the mechanisms of drought resistance in alfalfa (*Medicago sativa*) [J]. BMC Plant Biology, 2026, 26(1): 490.
- [12] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [13] 于雯静, 杨雪, 章英才, 等. 唐古特大黄不同外植体诱导愈伤组织的基因差异表达分析 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2026, 54(7): 159-169.
- Yu W J, Yang X, Zhang Y C, et al. Differential gene expression analysis of callus induced from different explants of *Rheum tanguticum* [J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2026, 54(7): 159-169.
- [14] Song X H, Guo P R, Xia K K, et al. Spatial transcriptomics reveals light-induced chlorenchyma cells involved in promoting shoot regeneration in tomato callus [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2023, 120(38): e2310163120.
- [15] Lee K, Seo P J. *Arabidopsis* TOR signaling is essential for sugar-regulated callus formation [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2017, 59(10): 742-746.
- [16] Shim S, Kim H K, Bae S H, et al. Transcriptome comparison between pluripotent and non-pluripotent calli derived from mature rice seeds [J]. Scientific Reports, 2020, 10: 21257.
- [17] 谢绍萍, 欧阳学智, 汪德耀. 甜菊组织培养物中叶绿体的超微结构与脱分化 [J]. 热带亚热带植物学报, 1995, 3(1): 41-48.
- Xie S P, Ouyang X Z, Wang D Y. Chloroplast ultrastructure and dedifferentiation in tissue cultures of *Staevia rebaudiana* bertonii [J]. Journal of Tropical and Subtropical Botany, 1995, 3(1): 41-48.
- [18] Zhu X T, Zhu H J, Ji W, et al. Callus induction and transcriptomic analysis of *in vitro* embryos at different developmental stages of peony [J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 1046881.
- [19] Lu Z G, Zhu L K, Lu J K, et al. Rejuvenation increases leaf biomass and flavonoid accumulation in *Ginkgo biloba* [J]. Horticulture Research, 2022, 9: uhab018.
- [20] Khatri P, Chen L, Rajcan I, et al. Functional characterization of Cinnamate 4-hydroxylase gene family in soybean (*Glycine max*) [J]. PLoS One, 2023, 18(5): e0285698.
- [21] Tang Y H, Liu F, Mao K Q, et al. Cloning and characterization of the key 4-coumarate CoA ligase genes in *Boehmeria nivea* [J]. South African Journal of Botany, 2018, 116: 123-130.
- [22] 黄嘉琦, 赵越, 孙凤阳, 等. 瑞香狼毒不定芽生长过程黄酮类和香豆素类成分累积研究 [J]. 中草药, 2013, 44(10): 1328-1333.
- Huang J Q, Zhao Y, Sun F Y, et al. Accumulation of flavonoids and coumarins during adventitious bud growth in *Stellera chamaejasme* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2013, 44(10): 1328-1333.
- [23] 季佳童, 张宏娇, 尹文兵. 植物糖基转移酶的功能表征及类黄酮糖苷的微生物生产 [J]. 微生物学报, 2025, 65(8): 3671-3685.
- Ji J T, Zhang H J, Yin W B. Functional characterization of plant glycosyltransferases and microbial production of flavonoid glycosides [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(8): 3671-3685.
- [24] Chen J Y, Li W W, Zhang W, et al. Combined transcriptional and metabolomic analysis of flavonoids in the regulation of female flower bud differentiation in *Juglans sigillata* Dode [J]. BMC Plant Biology, 2025, 25(1): 168.
- [25] Meng X Y, Li Y Q, Zhou T T, et al. Functional differentiation of duplicated flavonoid 3-O-glycosyltransferases in the flavonol and anthocyanin biosynthesis of *Freesia hybrida* [J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 1330.
- [26] Tetreault H M, Scully E D, Gries T, et al. Overexpression of the Sorghum bicolor SbCCoAOMT alters cell wall associated hydroxycinnamoyl groups [J]. PLoS One, 2018, 13(10): e0204153.
- [27] Liu B B, Shan X H, Wu Y, et al. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of embryogenic and non-embryogenic calli derived from a maize (*Zea mays* L.) inbred line Y423 [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(12): 4004.
- [28] Yu M, Zhuo R Y, Lu Z C, et al. Molecular insights into lignin biosynthesis on cadmium tolerance: morphology, transcriptome and proteome profiling in *Salix matsudana* [J]. Journal of Hazardous Materials, 2023, 441: 129909.
- [29] 代力强, 李天娇, 齐运鸿, 等. 玉米自交系胚性愈伤组织再生的转录组分析 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2026, 54(2): 11-23.
- Dai L Q, Li T J, Qi Y H, et al. Transcriptome analysis of embryogenic callus regeneration in maize inbred line [J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2026, 54(2): 11-23.
- [30] Lee S T, Huang W L. Cytokinin, auxin, and abscisic acid affects sucrose metabolism conduce to *de novo* shoot organogenesis in rice (*Oryza sativa* L.) callus [J]. Botanical Studies, 2013, 54(1): 5.
- [31] Ma J, Li Q, Zhang L, et al. High auxin stimulates callus through SDG8-mediated histone H3K36 methylation in *Arabidopsis* [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2022, 64(12): 2425-2437.
- [32] Zhao Y D. Essential roles of local auxin biosynthesis in plant development and in adaptation to environmental changes [J]. Annual Review of Plant Biology, 2018, 69: 417-435.