作物学报 ACTA AGRONOMICA SINICA 2026, 52(5): 1326−1340 http://zwxb.chinacrops.org/
ISSN 0496-3490; CN 11-1809/S; CODEN TSHPA9 E-mail: zwxb301@caas.cn

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2026.55065

花生 WOX 基因家族的全基因组分析及不定芽再生候选基因的鉴定

谷春苗[1,2] 王润凤[1] 黄 璐[1] 刘 浩[1] 鲁 清[1] 李海芬[1] 李少雄[1] 何双呈[1] 洪彦彬[1] 陈小平[1] 谭 斌[2,*] 余倩霞[1,*]

[1] 广东省农业科学院作物研究所 / 广东省农作物遗传改良重点实验室 / 国家油料作物改良中心南方花生分中心, 广东广州 510640; [2] 华南农业大学农学院, 广东广州 510640

摘 要: WOX 转录因子家族在植物干细胞稳态维持和器官发生过程中发挥关键调控作用。花生(*Arachis hypogaea* L.)作为重要的油料作物, 其遗传转化受到植株再生能力的严重制约。本研究在“伏花生”全基因组中鉴定到 20 个 *WOX* 基因, 对其进行系统进化、蛋白结构、共线性和顺式作用元件分析, 并利用转录组数据解析其在不同组织及不定芽再生过程中的表达模式。系统进化分析将花生 *WOX* 基因分为远古支、中间支和 WUS 支。所有成员均含有典型的同源结构域(homeodomain, HD), 其中, WUS 支部分成员还具有 WUS-box 和 EAR 基序。共线性分析表明, *AhWOX7*、*AhWOX12* 和 *AhWOX14* 分别与拟南芥 *WUS*、*WOX5* 以及大豆再生相关基因 *GmWOX18* 为直系同源关系。表达谱分析显示, 这些直系同源基因的表达水平较低, 而远古支成员 *AhWOX13* 和 *AhWOX20* 在不定芽再生各阶段中均呈现持续高表达模式。进一步的启动子分析发现, *AhWOX13* 和 *AhWOX20* 启动子区富含分生组织发育相关的顺式作用元件, 且其与拟南芥芽再生正调控因子 *WOX14* 为直系同源。综上所述, 本研究通过全基因组分析系统鉴定了花生 WOX 基因家族, 并综合多项分析筛选出 *AhWOX13* 和 *AhWOX20* 作为调控花生器官再生的重要候选基因。该发现为通过基因工程手段提高花生遗传转化效率奠定了理论基础。

关键词: 花生; WOX 转录因子; 全基因组分析; 器官再生; *AhWOX13*; *AhWOX20*

Genome-wide analysis of the WOX gene family and identification of candidate genes for adventitious shoot regeneration in peanut

Gu Chun-Miao[1,2], Wang Run-Feng[1], Huang Lu[1], Liu Hao[1], Lu Qing[1], Li Hai-Fen[1], Li Shao-Xiong[1], He Shuang-Cheng[1], Hong Yan-Bin[1], Chen Xiao-Ping[1], Tan Bin[2,*], and Yu Qian-Xia[1,*]

[1] Crops Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences / Guangdong Provincial Key Laboratory of Crop Genetic Improvement / South China Peanut Sub-Centre of National Centre of Oilseed Crops Improvement, Guangzhou 510640, Guangdong, China; [2] College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, Guangdong, China

Abstract: The WUSCHEL-related homeobox (WOX) transcription factor family plays central roles in maintaining stem cell homeostasis and regulating organogenesis in plants. Genetic transformation of peanut (*Arachis hypogaea* L.), a globally important oilseed crop, remains severely limited by low regeneration efficiency. Here, we conducted a genome-wide identification and

本研究由广东省农业科学院协同创新中心项目(XTXM202203), 国家自然科学基金项目(32401893), 广东省基础与应用基础研究基金项目(2024A1515010511), 广东省农业科学院作物研究所所长基金/广东省农作物遗传改良重点实验室开放基金项目(202505, 202604), 广东省农业科学院科技人才引进专项资金项目(R2024YJ-YB1002)和广东省农业科学院现代种业创新能力提升工程项目资助。

This study was supported by the Project of Collaborative Innovation Center of GDAAS (XTXM202203), the National Natural Science Foundation of China (32401893), the Guangdong Basic and Applied Basic Research Foundation (2024A1515010511), the Foundation of Director of Crop Research Institute of Guangdong Academy of Agriculture Sciences/Open Fund of Guangdong Provincial Key Laboratory of Crop Genetic Improvement (202505, 202604), the Special Fund Project for the Introduction of Scientific and Technological Talents of the Guangdong Academy of Agricultural Sciences (R2024YJ-YB1002), and the Modern Seed Industry Innovation Capability Enhancement Project of Guangdong Academy of Agricultural Sciences.

* 通信作者(Corresponding authors): 余倩霞, E-mail: yuqianxia@gdaas.cn; 谭斌, E-mail: tanbin@scau.edu.cn

第一作者联系方式: E-mail: 2512444617@qq.com

Received (收稿日期): 2025-10-20; Accepted (接受日期): 2026-02-27; Published online (网络出版日期): 2026-03-04.

URL: https://link.cnki.net/urlid/11.1809.S.20260303.1655.002

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

characterization of *WOX* genes in the peanut cultivar ‘Fuhuasheng’ to pinpoint candidates potentially involved in organ regeneration and to provide a basis for overcoming regeneration-related constraints in peanut transformation. We identified 20 *WOX* genes and systematically analyzed their phylogenetic relationships, conserved domains, collinearity, and promoter features, and then profiled their expression across tissues and during adventitious shoot regeneration using transcriptome data. Phylogenetic analysis clustered the *AhWOX* genes into three clades (ancient, intermediate, and WUS). All AhWOX proteins contained a conserved homeodomain (HD), and several WUS-clade members also carried the WUS-box and EAR motifs. Collinearity analysis indicated that *AhWOX7*, *AhWOX12*, and *AhWOX14* are orthologs of *Arabidopsis thaliana WUS* and *WOX5* and of the soybean regeneration-related gene *GmWOX18*, respectively. However, these orthologs showed only low expression, whereas the ancient-clade genes *AhWOX13* and *AhWOX20* were consistently highly expressed across all stages of adventitious shoot regeneration. Promoter analysis revealed enrichment of *cis*-elements associated with meristem activity, and phylogenetic evidence suggested that *AhWOX13* and *AhWOX20* are orthologous to *AtWOX14*, a reported positive regulator of shoot regeneration. Collectively, our results highlight *AhWOX13* and *AhWOX20* as promising candidates for improving regeneration capacity in peanut, providing a framework to enhance peanut transformation and accelerate functional genomics and trait engineering in oilseed crops.
Keywords: *Arachis hypogaea* L.; WOX transcription factors; whole-genome analyses; organ regeneration; *AhWOX13*; *AhWOX20*

WOX (WUSCHEL-related homeobox)是一类在植物中高度保守的转录因子, 调控植物的分生组织功能、胚胎模式形成和器官形成[1-2]。WUS (WUSCHEL)作为该家族的核心成员, 对于维持拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)茎顶端分生组织和花分生组织中的干细胞稳态具有至关重要的作用[3]。系统发育分析揭示, 拟南芥中共有 15 个 WOX 家族成员, 分为 3 个进化分支, 包括 WUS 支(WUS、WOX1-7)、中间支(WOX8、9、11 和 12)和远古支(WOX10、13 和 14) [4-5]。除共享的同源结构域(homeodomian, HD)外, 各分支具有不同的保守基序组合, 提示功能分化[4-5]。其中, “远古支”包含绿藻和苔藓中的 WOX 蛋白[4]; 进化中最年轻的“WUS 分支”为被子植物所特有, 含有与转录抑制功能相关的 WUS-box 和 EAR 基序, 多数成员参与分生组织发育调控[6]; 而“中间分支”则位于二者之间。研究表明, 茎干细胞维持功能仅能被 WUS 分支内的同源蛋白替代或部分替代, 而其他 2 个分支的蛋白无法实现此功能[6]。

在植物组织培养过程中, 有限的再生能力常导致基因型依赖及转化效率低下的问题。基于对细胞全能性转录因子调控植物再生机制的深入理解, 通过过量表达某些参与干细胞维持与器官发生的关键基因, 可显著提高遗传转化效率和植株再生率[7]。WOX 家族基因的过量表达已被证明能够有效提升多种模式植物和难转化作物的转化效率, 相关研究在各试验体系中得到广泛验证[8-9]。共表达玉米(*Zea mays* L.) *WUS2* 和 AP2/ERF 家族基因 *BBM* (*BABY BOOM*), 可显著提高多种单子叶作物的遗传转化效率, 特别是在传统上难以转化的玉米自交系中, 实现了高达 40%以上的转化率, 且成功拓展至以成熟种子和叶片等为外植体的转化体系中, 从而基本克服了基因型依赖性限制[8-10]。此外, 利用小麦(*Triticum aestivum* L.) *WUS* 同源基因 *TaWOX5*, 研究人员成功突破了小麦遗传转化中的基因型限制。该基因的过量表达还能显著提高小黑麦(*Triticosecale* Wittmack)、黑麦(*Secale cereale* L.)、大麦(*Hordeum vulgare* L.)、一粒小麦(*T. monococcum* L.)以及玉米的再生能力与遗传转化效率[11]。在大豆(*Glycine max* L.)中过量表达 *GmWOX18* 可显著促进不定芽的再生[12]。此外, *WUS* 和 *WOX5* 也被应用在发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)介导的遗传转化体系中, 成功促进苹果(*Malus pumila* Mill.)和猕猴桃(*Actinidia chinensis* Planch.)等果树的转基因毛状根再生出芽, 突破了基因型限制所带来的转化瓶颈[13]。

花生(*Arachis hypogaea* L.)是我国重要的油料和经济作物。传统育种方法如系统育种、杂交与诱变育种, 常因优异资源缺乏和种间杂交不亲和等问题, 进展缓慢。转基因和 CRISPR 基因编辑等生物技术已成为作物品种改良与新种质创制的重要手段[14-15]。然而, 花生遗传转化体系仍存在效率低、稳定性差的问题, 严重制约了基因功能研究和转基因育种进程。提高再生能力是实现高效遗传转化的关键。本研究通过生物信息学和表达模式分析, 筛选花生 WOX 家族中调控再生的关键基因, 为建立高效稳定的花生遗传转化体系提供基础, 推动花生功能基因验证与遗传改良研究。

1　材料与方法

1.1　植物材料及培养条件

本研究中使用的花生品种“粤油 901”由广东省农业科学院作物研究所保存并提供。

不同器官转录组取样: “粤油 901”花生植株种植于广东省农业科学院白云试验基地(23°23′N, 113°25′E), 并进行常规田间管理。为最大限度地减少日间生理波动的影响, 所有组织样本均于晴朗日上午 09:00 至 11:00 之间采集。其中, 根、茎、叶样本采集自幼苗期(播种后 15 d); 花序采集自开花期(播种后 40 d); 果针和荚果样本分别采集自花后 3 、10 、30 和 50 d。每个器官样本均设置 3 个生物学重复。

不定芽直接器官再生转录组取样: 对“粤油 901”花生种子进行表面清洁并浸泡吸胀; 加入 15% NaClO 及 1~2 滴 Tween-20, 振荡 10 min 进行表面消毒; 使用无菌水漂洗 5 次以上。于超净工作台中剥离种皮, 取胚中段作为外植体; 将外植体接种于芽诱导培养基(shoot induction media, SIM)培养 14 d 获得 S1 阶段(芽诱导)材料; 继续在 SIM 培养基中培养 14 d 获得 S2 阶段(芽再生)材料; 最后将再生外植体转移至芽伸长培养基(elongation media, EM)中培养 14 d, 获得 S3 阶段(芽伸长)材料。各培养基组成为: SIM: MS_{B5} + 4 mg L^{-1} 6-BA + 1 mg L^{-1} 2,4-D + 300 mg L^{-1} Timentin; EM: MS_{B5} + 2 mg L^{-1} 6-BA + 300 mg L^{-1} Timentin。在 25℃、16 h 光照/8 h 黑暗条件下培养, 采集上述 3 个阶段的再生芽材料。

上述采集的材料均经液氮速冻后置于–80℃超低温冰箱中保存, 用于后续 RNA 提取及转录组测序分析。

1.2 试验方法

1.2.1 *AhWOX* 基因的全基因组鉴定及理化性质分析 为鉴定花生中 WOX 基因家族成员, 从 NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)下载了花生全基因组序列, 通过 Tair (https://www.arabidopsis.org/)、PlantTFDB (http://planttfdb.gao-lab.org/)网站下载了 15 个拟南芥 *WOX* 基因的蛋白序列以及大豆、蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula* L.)的 *WOX* 基因序列。利用 TBtools 中的程序 Simple HMM Search 将拟南芥与“伏花生”的蛋白序列进行比对, 同时利用 TBtools 上的另一个程序 Two Seqence Files, 再次进行比对, 通过 Venn (Up to Six Sets)取 2 次对比的交集。将获取到的蛋白序列提交至 NCBI 保守域数据库(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/)和 SMART (http://smart.embl.de/)网站中对候选序列的蛋白结构进行分析, 剔除不含完整同源异型结构域的候选序列。对于筛选到的具有多个高同源性基因的 *WOX* 基因成员, 依据比对注释文件, 选取同源性最高的基因, 最终在“伏花生”中筛选到 20 个 *WOX* 同源基因。另外, 通过 ExPASy ProtParam (https://web.expasy.org/protparam/)在线工具分析花生 WOX 蛋白的氨基酸序列长度(aa)、相对分子量(MW)和等电点(pI)等。

1.2.2 *AhWOX* 基因的二级结构、亚细胞定位及信号肽分析 通过 Plant-mPLoc (http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/)在线网站对该家族蛋白进行亚细胞定位分析。使用 SOPMA 在线网站(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/)和 SignalIP5.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)对 WOX 蛋白的 α 螺旋、β 折叠、延伸链等二级结构以及信号肽进行预测。

1.2.3 *AhWOX* 基因系统发育树的构建 使用 MEGA-X 进行花生 WOX 基因家族系统发育树构建[16]。序列比对后的矩阵用于系统进化树分析, 利用邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统进化树(设置参数 Bootstrap 检验值为 1000)。进化树的美化使用在线软件 iTOL (Interactive Tree Of Life, https://itol.embl.de/)完成[17]。

1.2.4 AhWOX 蛋白序列的比对分析 利用 MEGA-X 软件进行多重序列比对分析, 将花生的 20 个 *WOX* 基因和拟南芥的 15 个 *WOX* 基因的蛋白序列进行比对输出 FASTA 格式文件, 导入 GeneDoc (https://github.com/karlnicholas/GeneDoc/) 软件中, 进行格式调整。

1.2.5 *AhWOX* 基因染色体定位与共线性分析

WOX 基因的染色体位置通过基因组注释文件确定。基因共线性采用 TBtools 软件中 One Step MCScanX-Super Fast 程序进行分析[18]。将拟南芥和花生 2 个物种的注释文件和基因组文件导入到程序中, 得到 collinearity、ctl、gff 文件, 将这些文件导入到子程序 Dual Systeny Plot 中, 得到物种间的共线图。图片美化均在 Adobe Illustrator 2022 软件完成。

1.2.6 *AhWOX* 基因保守结构域分析 保守结构域(motif)的预测通过 MEME 在线网站(http://meme-suite.org/tools/meme)完成[19]。预测的 motif 数目设置为 8, 宽度范围设置为 6~50 aa。

1.2.7 *AhWOX* 基因结构和保守蛋白基序分析

基因结构从基因注释文件中检索得出。外显子和内含子的位置以及保守结构域的可视化通过 TBtools 软件完成[18]。通过 NCBI Batch CD-Search Tool 在线分析花生 WOX 蛋白结构域位置信息, 利用 TBtools 工具 Biosequence structure illustrator 选项中的 Visualize NCBI CDD Domain Pattern 功能进行绘

图[20], 使用 Adobe Illustrator 2022 软件进行美化。

1.2.8　*AhWOX* 基因顺式作用元件分析及表达模式分析　使用 TBtools 软件对 *WOX* 基因的启动子序列(翻译起始位点上游 2000 bp)进行提取, 并通过在线程序 PlantCARE (http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/)对启动子区域的顺式作用元件进行鉴定[21]。顺式作用元件的可视化通过 TBtools 软件完成。花生不同组织中 *WOX* 基因的 FPKM 转录组表达数据的热图绘制通过 Chiplot (https://www.chiplot.online/)在线网站完成。

2　结果与分析

2.1　AhWOX 基因家族成员的鉴定和理化性质分析

通过对栽培花生品种“伏花生”基因组的系统分析, 共鉴定得到 20 个花生 WOX 基因家族成员。根据其在染色体上的物理位置, 将这些基因依次命名为 *AhWOX1*~*AhWOX20* (表 1)。这些基因不均匀地分布在 13 条染色体上。其中, A03、A04、B05、A06、B06、A07 和 A10 各定位到 2 个 *WOX* 基因成员, 而其他染色体上均含有 1 个成员(图 1)。

对花生 *WOX* 基因编码区(CDS)及其编码蛋白的理化性质分析显示, CDS 长度范围为 537~1317 bp, 相应的氨基酸序列长度为 179~439 aa; 预测的蛋白质相对分子量(MW)介于 20,855.13~49,850.69 Da 之间; 理论等电点(pI)差异较大, 分布于 5.60~9.33 之间, 其中, 11 个成员(55%)的 pI 低于 7.0, 表明其为酸性蛋白; 20 个 WOX 基因家族成员预测的蛋白质不稳定系数介于 49.95~74.57 之间, 均高于 40.00, 提示其均为不稳定蛋白。

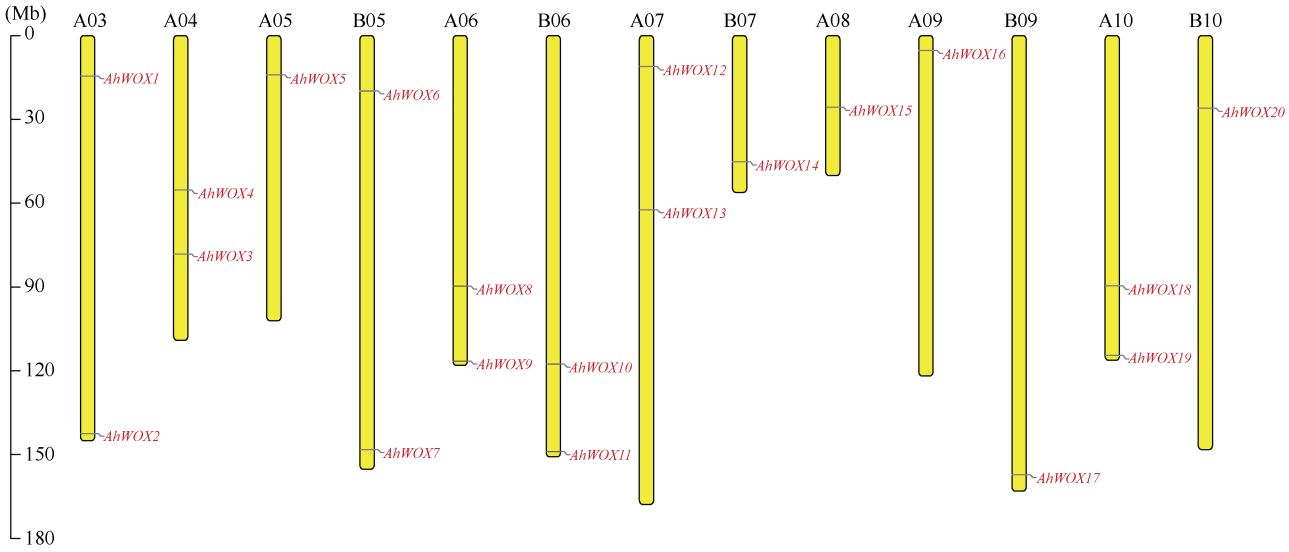

图 1　花生 *WOX* 基因染色体定位
Fig. 1　Chromosomal locations of *AhWOX* genes

表 1　花生 *WOX* 基因信息
Table 1　Information on *AhWOX* genes

基因名称 Gene name	基因 ID Gene ID	长度 Length (aa)	染色体 Chromosome	开始位置 Star position	终止位置 End position
AhWOX1	*Ahy_A03g011488*	401	A03	14,491,191	14,492,590
AhWOX2	*Ahy_A03g016753*	200	A03	142,512,908	142,513,594
AhWOX3	*Ahy_A04g020136*	323	A04	78,189,782	78,192,818
AhWOX4	*Ahy_A04g019792*	215	A04	55,238,247	55,240,007
AhWOX5	*Ahy_A05g022810*	347	A05	14,046,129	14,048,423
AhWOX6	*Ahy_B05g075392*	439	B05	19,841,969	19,844,638
AhWOX7	*Ahy_B05g079209*	318	B05	148,228,908	148,230,519
AhWOX8	*Ahy_A06g028998*	300	A06	89,670,321	89,672,632
AhWOX9	*Ahy_A06g030929*	266	A06	118,036,844	118,039,951

(续表 1)

基因名称 Gene name	基因 ID Gene ID	长度 Length (aa)	染色体 Chromosome	开始位置 Star position	终止位置 End position
AhWOX10	*Ahy_B06g083919*	300	B06	117,635,639	117,637,889
AhWOX11	*Ahy_B06g086001*	266	B06	148,960,091	148,962,906
AhWOX12	*Ahy_A07g031977*	185	A07	11,112,362	11,113,803
AhWOX13	*Ahy_A07g034885*	209	A07	62,388,478	62,390,165
AhWOX14	*Ahy_B07g087876*	179	B07	45,201,513	45,203,128
AhWOX15	*Ahy_A08g039190*	219	A08	25,686,795	25,687,605
AhWOX16	*Ahy_A09g041836*	284	A09	5,327,753	5,330,289
AhWOX17	*Ahy_B09g099603*	284	B09	157,166,629	157,169,190
AhWOX18	*Ahy_A10g049711*	215	A10	89,597,798	89,599,459
AhWOX19	*Ahy_A10g051148*	376	A10	114,531,481	114,532,699
AhWOX20	*Ahy_B10g102300*	274	B10	26,023,581	26,027,881
基因名称 Gene name	基因 ID Gene ID	链 Strand	相对分子量 RMW (Da)	等电点 pI	不稳定指数 Instabily index
AhWOX1	*Ahy_A03g011488*	+	44,316.56	6.80	60.50
AhWOX2	*Ahy_A03g016753*	–	23,159.70	6.66	56.99
AhWOX3	*Ahy_A04g020136*	–	36,596.33	7.76	62.52
AhWOX4	*Ahy_A04g019792*	+	24,591.58	9.03	73.38
AhWOX5	*Ahy_A05g022810*	–	39,262.28	6.34	63.17
AhWOX6	*Ahy_B05g075392*	+	49,850.69	6.76	57.23
AhWOX7	*Ahy_B05g079209*	+	35,298.14	6.05	61.66
AhWOX8	*Ahy_A06g028998*	–	32,587.91	6.22	67.01
AhWOX9	*Ahy_A06g030929*	+	29,704.75	9.00	70.92
AhWOX10	*Ahy_B06g083919*	–	32,436.79	6.22	65.73
AhWOX11	*Ahy_B06g086001*	+	29,623.76	9.02	70.20
AhWOX12	*Ahy_A07g031977*	+	21,596.91	6.42	57.42
AhWOX13	*Ahy_A07g034885*	+	23,794.98	5.60	57.22
AhWOX14	*Ahy_B07g087876*	–	20,855.13	6.52	58.05
AhWOX15	*Ahy_A08g039190*	–	25,238.48	9.33	74.57
AhWOX16	*Ahy_A09g041836*	–	32,661.66	7.10	52.06
AhWOX17	*Ahy_B09g099603*	–	32,621.68	7.73	49.95
AhWOX18	*Ahy_A10g049711*	–	24,522.13	7.15	59.23
AhWOX19	*Ahy_A10g051148*	–	41,392.34	8.90	57.03
AhWOX20	*Ahy_B10g102300*	+	30,993.53	5.91	58.09

pI: isoelectric point; RMW: relative molecular weight.

2.2 系统进化分析

本研究使用邻接法对 2 个栽培花生品种(“伏花生”和“Tifrunner”)、拟南芥、蒺藜苜蓿及大豆共 114 个 *WOX* 基因的全长氨基酸序列进行多序列比对与系统发育分析(图 2)。结果表明, 所有 *WOX* 基因可分为 3 个进化枝: 远古支(ancient clade)、中间支(intermediate clade)和 WUS 支(WUS clade), 分别包含 24、25 和 65 个成员。在栽培花生品种“伏花生”中鉴定出的 20 个 *WOX* 基因分布于这 3 个进化枝中。其中, WUS 支的数量最多, 包括 *AhWOX2*/*3*/*4*/*5*/*6*/*7*/*9*/*11*/*12*/*14*/*15*/*18* 共 12 个成员; 远古支与中间支各含 4 个成员, 分别为 *AhWOX13*/*16*/*17*/*20* 与 *AhWOX1*/*8*/*10*/*19*。另一个栽培种“Tifrunner”中, *AhWOX10* 发生丢失, 仅保留 19 个 *WOX* 基因成员。

进一步的系统发育关系显示, *AhWOX12*、*AhWOX14* 和 *AhWOX18* 与拟南芥 *AtWOX5* 直系同源, 而 *AhWOX7* 与 *AtWUS* 以及大豆再生相关基因 *GmWOX18* (*Glyma.11G076500*)直系同源。值得注意

的是, 近期研究表明, 拟南芥 AtWOX14 是调控芽再生的一个关键正调控因子; 本研究中, *AhWOX13* 和 *AhWOX20* 与 *AtWOX14* 显示出较近的同源关系。推测这些基因可能与花生中不定芽再生相关。整体上, 花生 *WOX* 基因与同为豆科的大豆和蒺藜苜蓿中的同源基因亲缘关系最近, 且所有亚家族中均包含拟南芥、大豆和蒺藜苜蓿的代表成员。这一拓扑结构表明, WOX 基因家族的主要亚家族分化事件可能发生于拟南芥与豆科植物物种分化之前, 暗示该家族在核心双子叶植物中具有古老的起源与较高的进化保守性。

从基因数量上看, 花生作为异源四倍体物种, 其 *WOX* 基因总数(20 个)少于大豆(33 个), 但略多于拟南芥和蒺藜苜蓿(15 个)。这一结果表明, 花生 WOX 基因家族在进化过程中可能并未发生大规模基因扩张, 甚至出现了部分基因丢失, 暗示该基因家族在花生中可能具有较高的功能保守性或受到较强的进化约束。

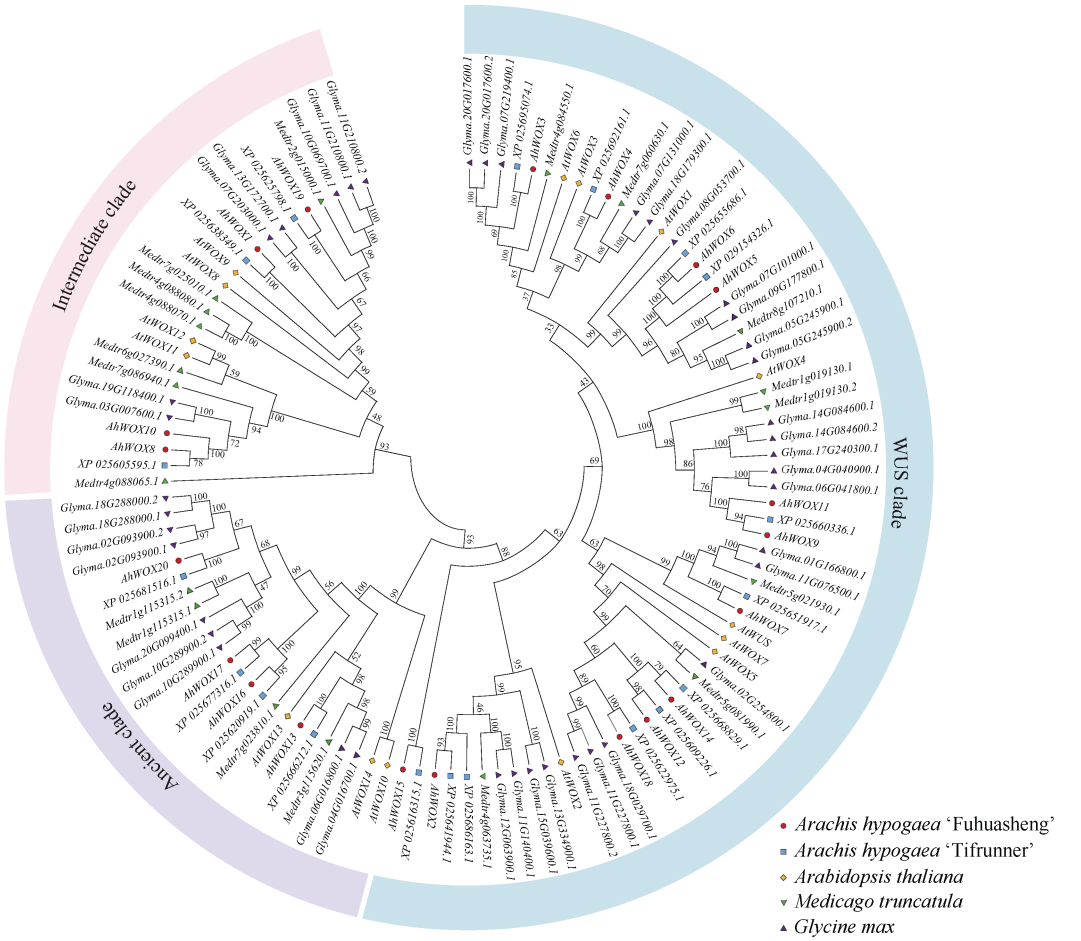

图 2　花生、拟南芥、大豆与蒺藜苜蓿 WOX 基因家族的系统发育分析

Fig. 2　Phylogenetic analysis of WOX gene family members in *Arachis hypogaea*, *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, and *Medicago trancatula*

2.3　AhWOX 蛋白结构域和蛋白二级结构分析

本研究对花生与拟南芥 WOX 蛋白的氨基酸序列进行了比对, 并对其功能保守的结构域和基序进行了系统分析(图 3)。结果显示, 花生 WOX 蛋白均包含典型的螺旋-环-螺旋-转角-螺旋(helix-loop-helix-turn-helix)的同源结构域(HD) (图 3-A)。在 helix 1 区段中, Q 和 L 残基高度保守; helix 2 中最保守的残基为 P、I 和 L; 而 helix 3 则包含 7 个保守残基(N、V、W、F、Q、N 和 R)。值得注意的是, helix 2 中的 P、I 和 L 以及 helix 3 中的 F 和 Q 是除 Gehring 等[22]已报道的残基之外新鉴定到的保守位点。此外, 在 helix 3 中存在一个高度保守基序(NVFYWFQN), 仅远古进化支中的基因发生了单一的氨基酸替换(Y 被替换成 H 或 N) (图 3-B)。除了 HD 结构域, WUS

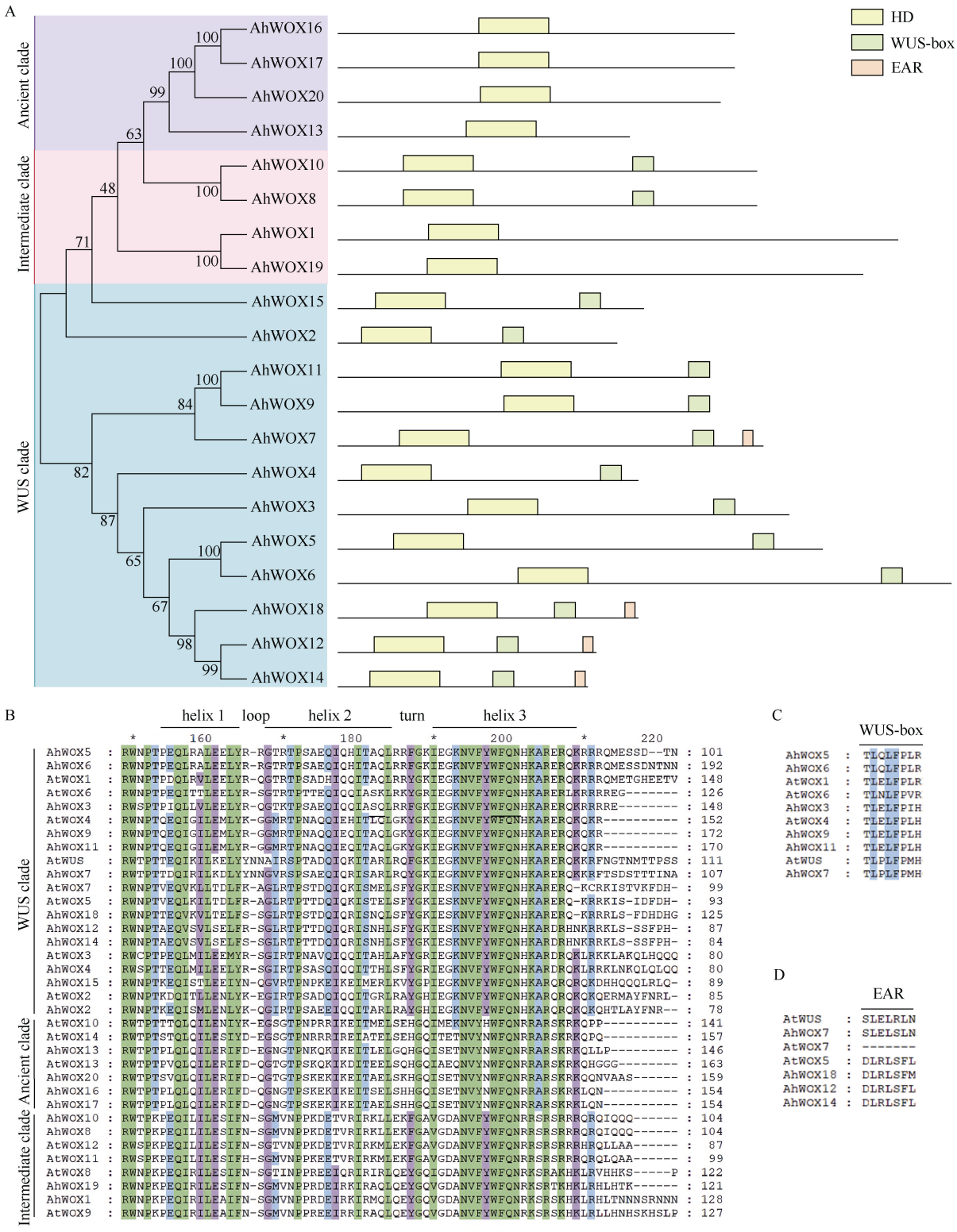

图 3 花生 WOX 基因家族蛋白保守结构域与基序分析

Fig. 3 Conserved domains and motif analysis of AhWOX gene family proteins

A: 花生 WOX 转录因子保守结构域组成示意图; B: 花生与拟南芥 WOX 蛋白同源结构域(HD)的多序列比对, 绿色框表示保守(100%)的氨基酸残基, 紫色框表示 80%以上保守性, 蓝色框表示 60%以上保守性; C: WUS-box 基序的序列比对; D: EAR 抑制基序的序列比对。

A: schematic representation of conserved domain architectures of peanut WOX transcription factors; B: multiple sequence alignment of the homeodomain (HD) of WOX proteins from peanut and *A. thaliana*, green boxes indicate fully conserved (100%) amino acid residues, purple boxes indicate > 80% conservation, and blue boxes indicate > 60% conservation; C: sequence alignment of the WUS-box motif; D: sequence alignment of the EAR repression motif.

支的6个AhWOX成员还包含WUS-box基序(图3-A), 其典型序列为 T-L-X-L-F-P-X-X (X 代表任意氨基酸) (图 3-C)。该基序与干细胞特性及花分生组织大小相关, 通常赋予 WOX 蛋白转录抑制功能。进一步分析发现, 在 WUS 支的 AhWOX7、AhWOX12、AhWOX14 和 AhWOX18 羧基末端均含有乙烯响应因子(ethylene response factor, ERF)相关的 EAR 抑制基序(图 3-A), 其特征序列为 L-[ER]-L-[RS]-[LF]。其中, AhWOX7 与 AtWUS 的 EAR 基序高度保守, 仅存在一个氨基酸的差异(图 3-D)。

利用Plant-mPLoc在线工具对花生WOX蛋白序列进行二级结构分析(表 2), 结果显示, 20 个花生 WOX 蛋白的二级结构以无规则卷曲为主, 其比例介于 63.64% (AhWOX13)至 83.96% (AhWOX7)之间; α-螺旋的比例在 10.22% (AhWOX1)到 31.34% (AhWOX17)之间; β-转角(1.15%~4.67%)和延伸链(2.19%~10.33%)占比较低, 其中, AhWOX5 的 β-转角比例最低(1.15%), AhWOX10 的延伸链比例最高(10.33%)。所有 WOX 蛋白被预测均定位于细胞核中。通过 SignalP 5.0 服务器对蛋白序列进行信号肽预测, 除 AhWOX19 显示极低信号肽概率(0.008%)外, 其他成员均无信号肽预测结果, 表明该家族蛋白普遍不具有信号肽序列。

2.4 *AhWOX* 基因结构分析

本研究对该家族所有成员的内含子-外显子组成进行了系统分析(图 4)。结果显示, 花生 WOX 家族基因的结构较为简单且紧凑, 外显子数量介于 2 至 4 个, 变异范围较窄, 内含子数量则为 1 至 3 个, 这与其他植物中 WOX 家族基因的特征基本一致。具体而言, 9 个基因(*AhWOX2*、*AhWOX4*、*AhWOX8*、*AhWOX10*、*AhWOX12*、*AhWOX14*、*AhWOX15*、*AhWOX18* 和 *AhWOX19*)含有 2 个外显子; 另外 9 个基因(*AhWOX1*、*AhWOX5*、*AhWOX7*、*AhWOX9*、*AhWOX11*、*AhWOX13*、*AhWOX16*、*AhWOX17* 和 *AhWOX20*)含有 3 个外显子; 而 *AhWOX3* 和 *AhWOX6* 则含有 4 个外显子, 为家族中结构最为复杂的成员。

表 2　花生 WOX 蛋白二级结构、亚细胞定位及信号肽分析

Table 2　Predicted secondary structure, subcellular localization, and signal peptides of AhWOX proteins

蛋白名称 Protein name	α-螺旋 Alpha helix (%)	延伸链 Extended strand (%)	β-转角 Beta turn (%)	无规则卷曲 Random coil (%)	亚细胞定位 Subcellular location	信号肽 Signal peptide (%)
AhWOX1	10.22	9.23	2.99	77.56	Nucleus	0
AhWOX2	16.50	8.00	4.50	71.00	Nucleus	0
AhWOX3	16.10	3.10	1.55	79.26	Nucleus	0
AhWOX4	20.47	3.72	2.33	73.49	Nucleus	0
AhWOX5	15.56	6.05	1.15	77.23	Nucleus	0
AhWOX6	13.44	4.10	1.37	81.09	Nucleus	0
AhWOX7	11.32	2.83	1.89	83.96	Nucleus	0
AhWOX8	11.67	9.00	4.00	75.33	Nucleus	0
AhWOX9	16.17	2.63	2.63	78.57	Nucleus	0
AhWOX10	13.33	10.33	4.67	71.67	Nucleus	0
AhWOX11	15.41	3.01	2.63	78.95	Nucleus	0
AhWOX12	24.32	3.24	2.70	69.73	Nucleus	0
AhWOX13	31.10	2.39	2.87	63.64	Nucleus	0
AhWOX14	26.26	2.79	2.79	68.16	Nucleus	0
AhWOX15	17.35	4.11	2.74	75.80	Nucleus	0
AhWOX16	20.42	4.23	1.76	73.59	Nucleus	0
AhWOX17	31.34	2.46	1.76	64.44	Nucleus	0
AhWOX18	30.70	3.26	2.33	63.72	Nucleus	0
AhWOX19	10.64	8.78	2.39	78.19	Nucleus	0.0008
AhWOX20	25.18	2.19	1.82	70.80	Nucleus	0

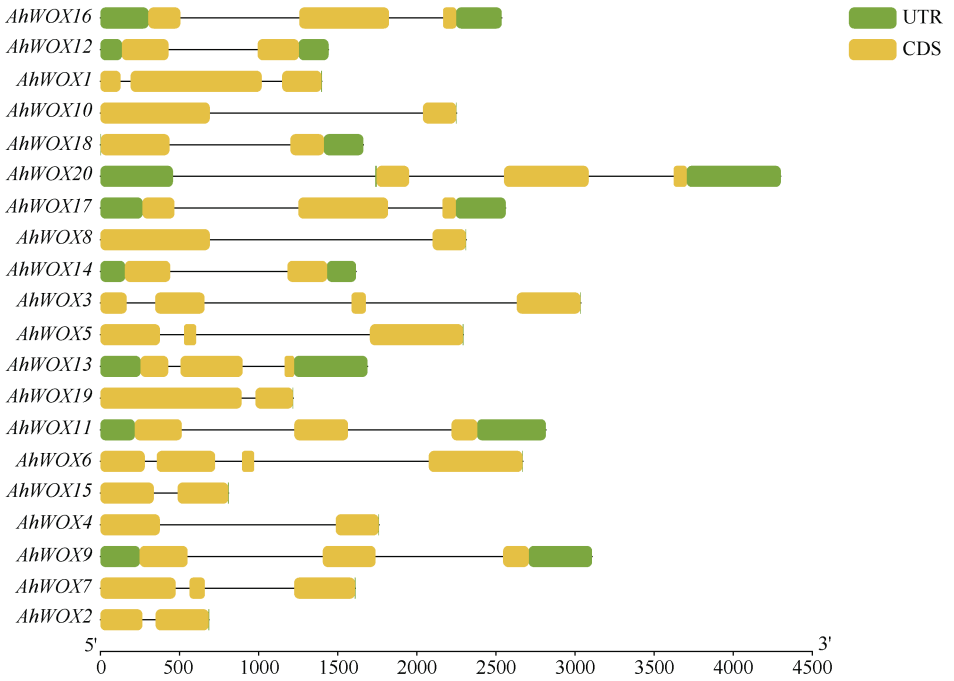

图 4 花生 *WOX* 基因结构分析
Fig. 4 Gene structure analysis of *AhWOX* genes

2.5 *AhWOX* 基因共线性分析

本研究对花生、拟南芥和大豆的 *WOX* 基因进行物种间的共线性分析(图 5)。结果表明，花生与拟南芥 *WOX* 基因之间存在 18 对共线性同源基因，与大豆之间存在 51 对共线性同源基因(表 3)。其中，*AhWOX12* 和 *AhWOX14* 与 *AtWOX5* 存在共线性关系，而 *AhWOX7* 与 *AtWUS* 共线，提示它们为直系同源基因，可能在进化中保留了保守功能。值得注意的是，*AhWOX7* 还与大豆中已知功能基因 *GmWOX18* (*Glyma.11G076500*)共线，该基因已被报道参与促进不定芽再生过程[12]。上述共线性关系表明，*AhWOX12*、*AhWOX14* 和 *AhWOX7* 可能在花生中同样承担干细胞稳态维持和器官再生相关的生物学功能，为进一步研究其功能提供了进化遗传学依据。

表 3 花生 *WOX* 基因与大豆、拟南芥之间的共线性分析
Table 3 Collinearity analysis of *AhWOX* genes with *WOX* genes in soybean and *Arabidopsis*

花生 *Arachis hypogaea*	大豆 *Glycine max*	拟南芥 *Arabidopsis thaliana*
AhWOX1	*Glyma.07G203000*, *Glyma.13G172700*	*AtWOX8* (*AT5G45980*), *AtWOX9* (*AT2G33880*)
AhWOX2	*Glyma.11G140400*, *Glyma.12G063900*, *Glyma.13G334900*, *Glyma.15G039600*	*AtWOX2* (*AT5G59340*)
AhWOX3	*Glyma.07G219400*, *Glyma.20G017600*	—
AhWOX4	*Glyma.07G131000*, *Glyma.18G179300*	—
AhWOX5	*Glyma.09G177800*	—
AhWOX6	*Glyma.07G101000*, *Glyma.09G177800*	—
AhWOX7	*Glyma.01G166800*, *Glyma.11G076500*	*AtWUS* (*AT2G17950*)
AhWOX8	*Glyma.03G007600*, *Glyma.19G118400*	*AtWOX11* (*AT3G03660*), *AtWOX12* (*AT5G17810*)
AhWOX9	*Glyma.06G041800*, *Glyma.04G040900*, *Glyma.14G084600*, *Glyma.17G240300*	*AtWOX4* (*AT1G46480*)
AhWOX10	*Glyma.03G007600.1*, *Glyma.19G118400.1*	*AtWOX11* (*AT3G03660*), *AtWOX12* (*AT5G17810*)
AhWOX11	*Glyma.06G041800*, *Glyma.04G040900*, *Glyma.14G084600*, *Glyma.17G240300*	—
AhWOX12	*Glyma.02G254800*, *Glyma.11G227800*, *Glyma.18G029700*	*AtWOX5* (*AT3G11260*), *AtWOX7* (*AT5G05770*)

(续表 3)

花生 *Arachis hypogaea*	大豆 *Glycine max*	拟南芥 *Arabidopsis thaliana*
AhWOX13	*Glyma.04G016700*	*AtWOX14* (*AT1G20700*)
AhWOX14	*Glyma.02G254800*, *Glyma.11G227800*, *Glyma.18G029700*	*AtWOX5* (*AT3G11260*), *AtWOX7* (*AT5G05770*)
AhWOX15	*Glyma.11G140400*, *Glyma.12G063900*, *Glyma.13G334900*, *Glyma.15G039600*	*AtWOX2* (*AT5G59340*)
AhWOX16	*Glyma.10G289900*, *Glyma.02G093900*, *Glyma.18G288000*, *Glyma.20G099400*	—
AhWOX17	*Glyma.10G289900*, *Glyma.02G093900*, *Glyma.18G288000*, *Glyma.20G099400*	—
AhWOX18	*Glyma.02G254800*, *Glyma.11G227800*, *Glyma.18G029700*	*AtWOX7* (*AT5G05770*)
AhWOX19	*Glyma.07G203000*, *Glyma.13G172700*	*AtWOX8* (*AT5G45980*), *AtWOX9* (*AT2G33880*)
AhWOX20	—	—

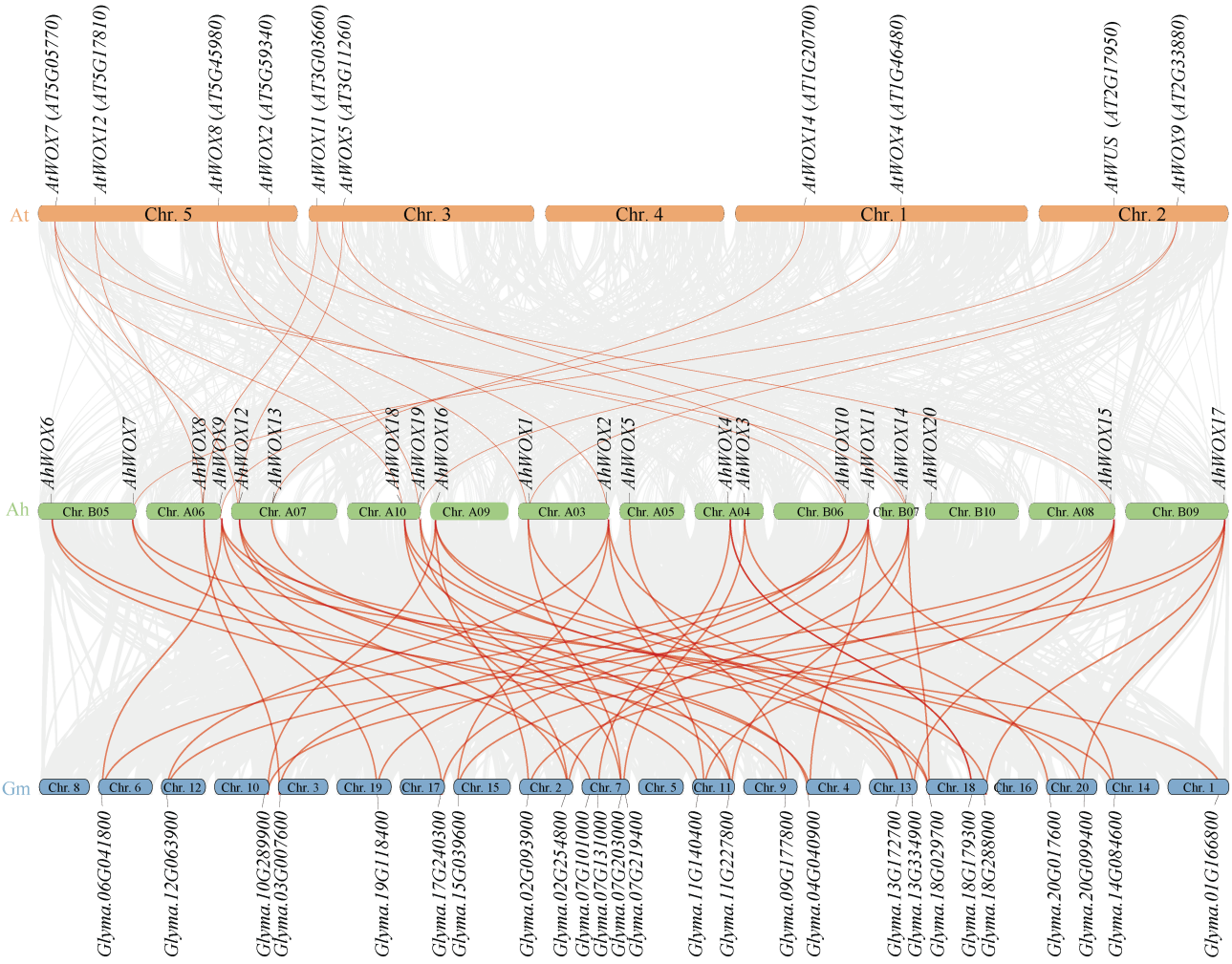

图 5　花生、拟南芥及大豆 WOX 基因家族的基因组共线性分析

Fig. 5　Genomic synteny analysis of WOX gene families in peanut, *Arabidopsis*, and soybean

2.6　*AhWOX* 基因启动子区域顺式作用元件分析

利用 PlantCARE 数据库对花生 *WOX* 基因转录起始位点上游 2000 bp 的启动子序列进行顺式作用元件(*cis*-regulatory elements, CREs)分析(图 6)。结果表明, 在 20 个花生 *WOX* 基因启动子区域共鉴定出 404 个 CREs。根据其参与的生物过程, 这些 CREs 可大致分为 4 大类: 光响应(231 个, 占比 57%)、植物激素(76 个)、生长发育(49 个)和胁迫反应(48 个)。

其中，光响应 CREs 数量最为丰富且分布广泛，包括 Box 4、GT1-motif、G-Box、MRE 和 GATA-motif 等关键元件，表明其调控的 *WOX* 基因表达可能具有光依赖性。除光响应元件外，还鉴定出多种与生长发育调控相关的特异性 CREs，包括参与分生组织表达的 CAT-box (存在于 *AhWOX1*、*AhWOX8*、*AhWOX10*、*AhWOX13*、*AhWOX16*、*AhWOX17*、*AhWOX18* 和 *AhWOX20* 中);含有 CAT-box 元件的 8 个基因很可能参与分生组织属性决定和器官再生。此外还发现调控胚乳表达的 GCN4_motif (存在于 *AhWOX1*、*AhWOX2*、*AhWOX3*、*AhWOX4*、*AhWOX13*、*AhWOX16* 和 *AhWOX17* 中)；仅存在于 *AhWOX18* 启动子区、参与根特异性调控的 Motif I；参与种子特异性调控的 RY-element (存在于 *AhWOX1*、*AhWOX2*、

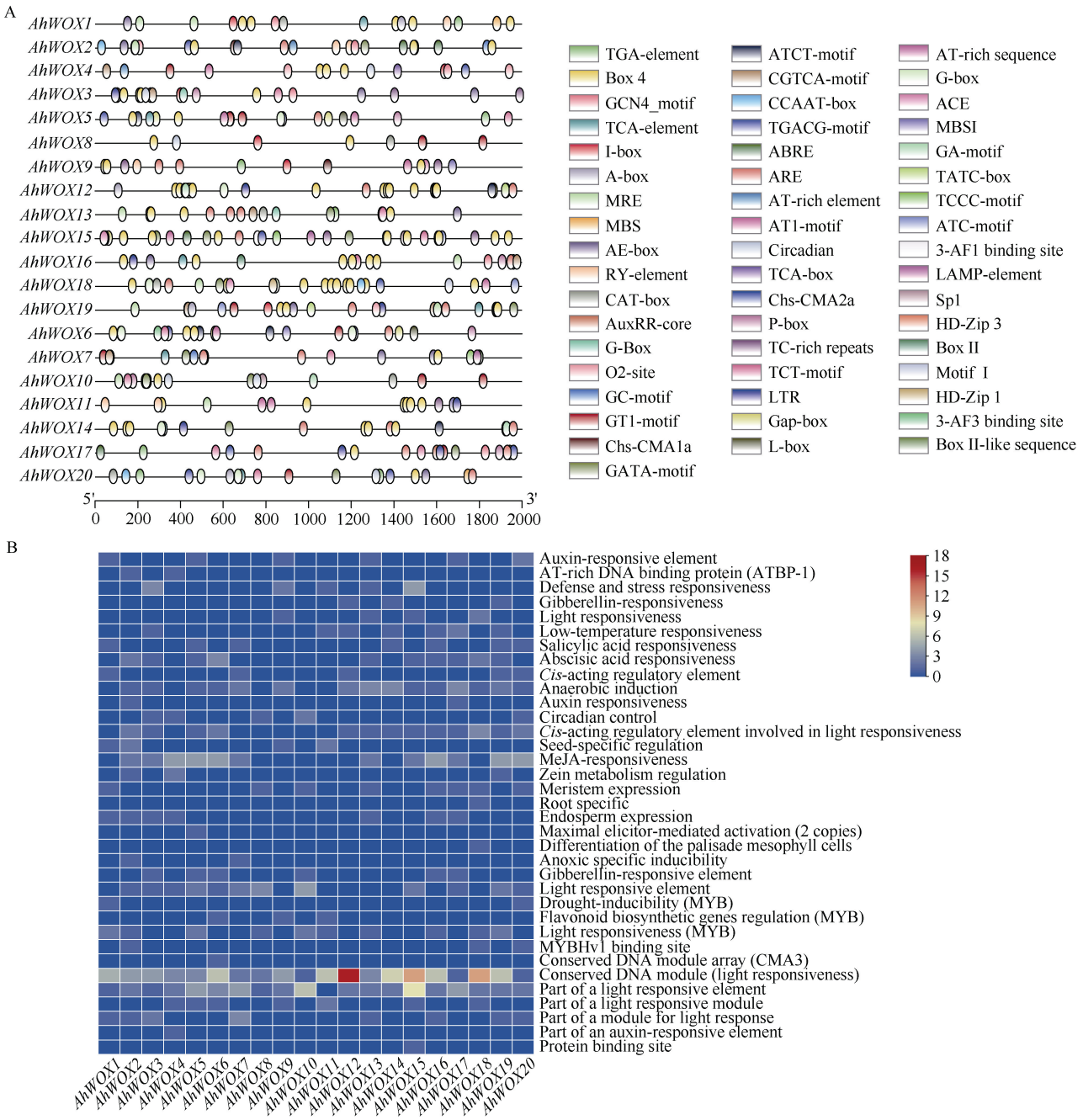

图 6 花生 *WOX* 基因启动子顺式作用元件分析

Fig. 6 *Cis*-regulatory element analysis of *AhWOX* gene promoters

A: 花生 *WOX* 基因启动子区域顺式作用元件分布示意图; B: 花生 *WOX* 基因中不同类型顺式作用元件数量统计热图。

A: schematic distribution of *cis*-regulatory elements in the promoter regions of *AhWOX* genes; B: heatmap showing the counts of different *cis*-element types in *AhWOX* promoters.

AhWOX9 和 *AhWOX11* 中); 以及参与代谢调控的 O2-site (存在于 *AhWOX2*、*AhWOX4* 和 *AhWOX19* 中)。值得注意的是, *AhWOX1* 和 *AhWOX2* 同时含有胚乳表达(GCN4_motif)和种子特异性(RY-element) CREs, 提示这 2 个基因可能在花生生殖发育过程中发挥重要作用。在非生物胁迫响应 CREs 中, 缺氧响应元件 AREs 最为丰富(27 个, 占胁迫响应元件的 56.25%)。此外, 还鉴定出响应防御与应激的 TC-rich repeats、响应低温的 LTR 以及响应干旱的 MBS 等其他与胁迫相关的元件。

2.7 *AhWOX* 基因在不同器官及再生芽诱导过程中的表达模式分析

本研究选取了不同发育时期的根(root)、茎(stem)、叶(leaf)、花序(florescence)、果针(peg)和荚果(pod)进行转录组测序。表达谱分析结果显示, *AhWOX20* 在所有检测器官中均呈现出较高的表达水平, 尤其在根组织中表达最为显著; 其同源基因 *AhWOX13* 除在成熟荚果中表达较低外, 在其他器官中均有一定程度的表达。*AhWOX16* 和 *AhWOX17* 在果针和发育阶段的荚果中表达较高, 其中, *AhWOX16* 在花序中也表现出显著表达。此外, *AhWOX9* 和 *AhWOX11* 在果针中也有一定表达。除上述 6 个 *WOX* 基因外, 其他花生 *WOX* 基因在各组织器官中的表达水平普遍较低(图 7)。

WOX 基因在植物干细胞维持、胚胎建成及器官发生等发育过程中发挥关键调控作用。为探究 *WOX* 基因在直接器官再生过程中的表达模式, 本研究以花生胚中段作为外植体进行组织培养和不定芽诱导试验, 分别于芽诱导(S1)、芽再生(S2)和芽伸长(S3) 3 个阶段进行取样, 对 20 个 *WOX* 基因的表达模式进行了系统分析(图 8-A)。结果表明, *AhWOX13*、*AhWOX20*、*AhWOX9* 和 *AhWOX11* 在不定芽再生的整个过程中均有表达, 且在芽诱导阶段表达量显著升高, 提示这 4 个基因可能是花生 WOX 基因家族中参与干细胞维持与器官再生的主要成员。*AhWOX16* 和 *AhWOX17* 在 3 个时期中也检测到较低水平的表达。而其他 14 个 *WOX* 基因则几乎不表达(图 8-B)。

综上所述, 在花生植株生长发育及器官再生过程中均表达较高的基因有 *AhWOX9* 和 *AhWOX11* (属于 WUS 支)、*AhWOX13* 和 *AhWOX20* (属于远古进化支)。此外, *AhWOX16* 与 *AhWOX17* 在特定组织中也被检测到高表达, 但其在芽再生过程中的表达量显著低于前述基因。

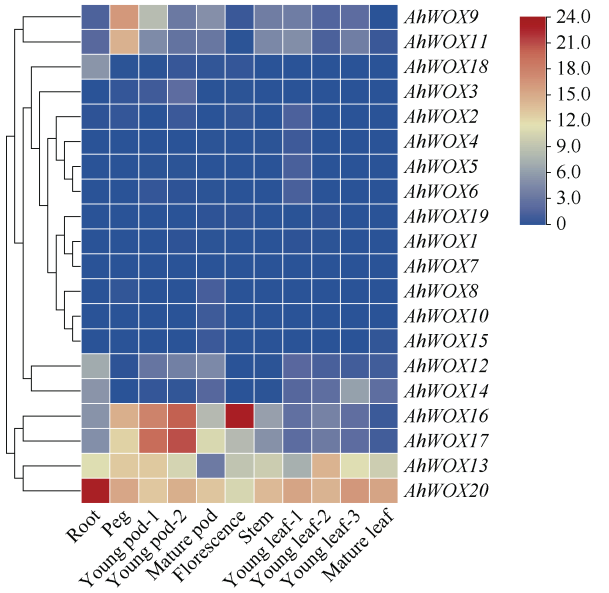

图 7　花生 WOX 基因家族成员在不同组织器官中的表达热图

Fig. 7　Expression heatmap of AhWOX gene family members across tissues and organs of *A. hypogaea*

荚果分为幼果与成熟荚果, 叶分为幼叶与成熟叶。Young pod-1、Young pod-2 代表幼果的 2 个不同发育时期(花后 10 d、30 d); Young leaf-1、Young leaf-2、Young leaf-3 代表幼叶的 3 个不同发育时期(叶长为 1.5、2.0 和 3.0 cm)。

Pods were classified as young or mature, and leaves as young or mature. Young pod-1 and Young pod-2 represent two developmental stages of young pods (10 d and 30 d after flowering); Young leaf-1, Young leaf-2, and Young leaf-3 represent three developmental stages of young leaves (leaf lengths of 1.5, 2.0, and 3.0 cm).



(图 8)

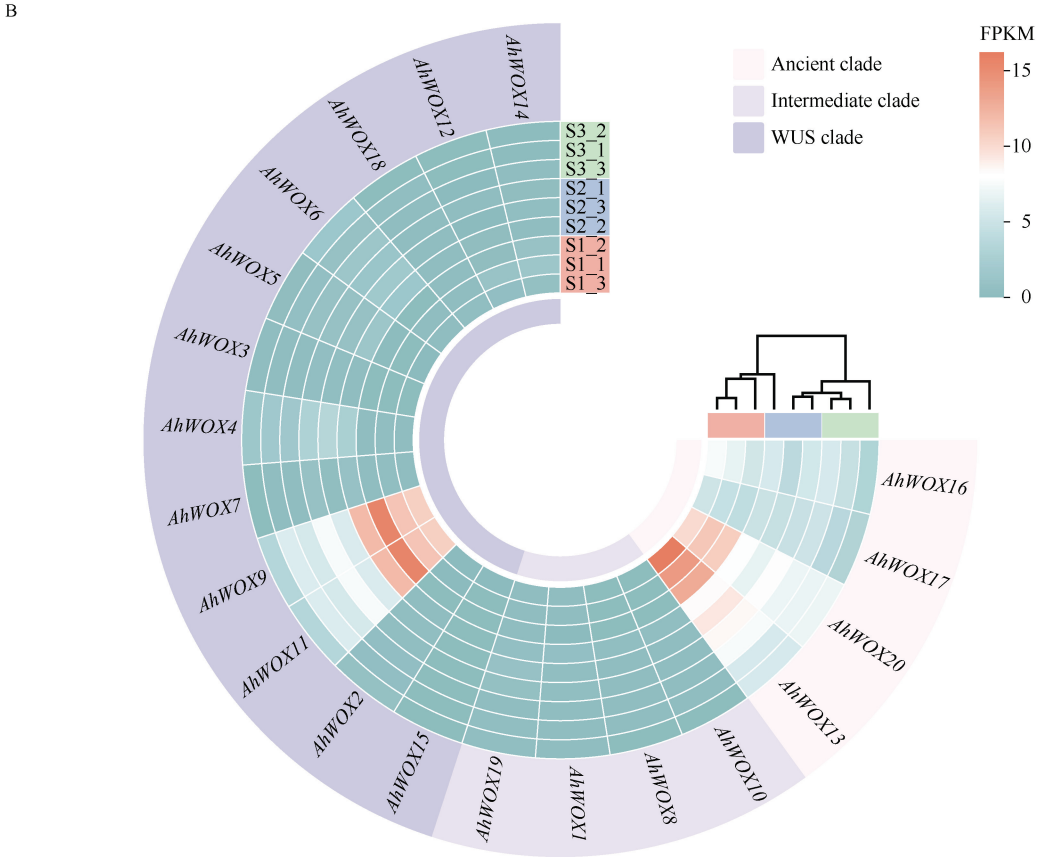

图 8 花生不定芽再生过程中 *WOX* 基因的表达模式

Fig. 8 Expression patterns of *AhWOX* genes during adventitious bud regeneration

A: 花生中胚轴不定芽再生的 3 个阶段: 芽诱导(S1)、芽再生(S2)和芽伸长(S3); 比例尺: 1 mm。B: *AhWOXs* 在不定芽再生不同阶段的表达模式热图分析, 每个阶段包含 3 个生物学重复。

A: three stages of adventitious shoot regeneration from peanut mesocotyl explants: bud induction (S1), bud regeneration (S2), and bud elongation (S3); scale bar = 1 mm. B: heatmap of *AhWOX* expression across regeneration stages, each stage includes three biological replicates.

3 讨论

WOX 家族基因是种子植物特有的一类转录调控因子, 在维持干细胞特性、调控器官发生及参与植物生长发育与逆境反应中发挥关键作用[23-24]。目前, *WOX* 基因在系统进化和功能方面的研究已在拟南芥、小麦、水稻、玉米和大豆等多种作物中广泛开展, 但花生中的相关报道仍较为有限[12,25-28]。与此同时, 花生遗传转化长期受限于低效率和高基因型依赖性。近年来, 基于 *WOX* 基因(*AtWUS* 和 *AtWOX5* 及其直系同源基因)过表达的遗传转化体系被证实可显著提高转化效率, 突破基因型限制, 展现出良好的应用前景[29-30]。因此, 系统解析花生 *WOX* 基因功能, 对突破花生遗传转化瓶颈、推动其遗传改良具有重要意义。

本研究基于对花生品种“伏花生”全基因组同源比对分析[31], 共鉴定到 20 个花生 *WOX* 基因, 不均匀地分布于 13 条染色体上(图 1 和表 1)。这些基因均编码核定位蛋白, 含有典型的 HD 结构域, 空间构象为螺旋-环-螺旋-转角-螺旋, 与水稻、高粱、玉米和马尾松等物种中已知的 WOX 转录因子结构特征一致[5,32]。该结构域中的 α-螺旋可嵌入 DNA 大沟, 通过识别特定序列调控下游基因表达, 进而参与发育过程的调控[4]。进一步分析显示, WUS 支的所有成员及中间支的 AhWOX8 和 AhWOX10 均含有典型的 WUS-box 基序; 而 WUS 支的 AhWOX7、AhWOX12、AhWOX14 和 AhWOX18 还具备 EAR motif, 其蛋白结构与 AtWUS 和 AtWOX5 高度相似(图 3)。系统进化和共线性分析结果共同表明, *AhWOX12* 和 *AhWOX14* 与 *AtWOX5* 直系同源, *AhWOX7* 与 *AtWUS* 以及大豆再生相关基因 *GmWOX18* (*Glyma.11G076500*)直系同源[12] (图 2、图 5 和表 3)。

然而, 表达分析显示上述与 *AtWUS*/*AtWOX5* 直系同源的候选基因在花生不同组织及不定芽再生过

程中表达水平普遍较低。相反, 远古支的 *AhWOX13*、*AhWOX16*、*AhWOX17*、*AhWOX20* 以及 WUS 支的 *AhWOX9* 和 *AhWOX11*, 在根、果针、幼果、花序等器官以及再生芽诱导过程中均有不同程度的表达(图 7), 暗示花生 WOX 基因家族成员可能已发生功能分化。

启动子顺式作用元件分析进一步揭示, 20 个 *WOX* 基因启动子区共包含 404 个作用元件(图 6)。其中, Box 4、G-Box、ARE 和 GT1-motif 出现频率最高, 推测其可被 bZIP、WRKY 等转录因子识别。这些元件广泛参与植物的光信号转导、种子发育、激素应答(如茉莉酸)以及逆境响应等过程[33-35], 表明花生 *WOX* 基因的功能可能受到相应生理途径的精密调控。值得注意的是, *AhWOX13*、*AhWOX16* 和 *AhWOX17* 的启动子区同时具备分生组织表达相关元件和胚乳表达相关元件, 提示它们在胚性细胞分化与分生组织形成中可能具有重要功能。

除经典再生相关基因外, 近期研究表明, AtWOX14 作为芽再生的关键正调控转录因子, *AtWOX14* 过表达可显著增强再生能力, 而在其突变体中则再生受限[36-37]。本研究中, *AhWOX13*、*AhWOX20* 与 *AtWOX14* 同源关系较近, 且在不定芽再生各阶段均持续高表达, 结合其启动子特征, 提示该基因可能在花生芽再生过程中发挥关键作用(图 8)。因此, *AhWOX13* 和 *AhWOX20* 可作为提高花生遗传转化效率的重要候选基因。后续研究可通过构建过表达载体, 深入验证其功能, 为建立高效、广适的花生遗传转化体系提供新路径。

4　结论

本研究对花生 WOX 转录因子家族进行了系统鉴定与分析, 共识别出 20 个花生 *WOX* 基因。通过对其系统进化关系、蛋白结构、表达模式及启动子顺式作用元件的综合分析, 揭示该家族成员在花生中可能发生了功能分化。本研究不仅鉴定到与拟南芥 *WUS* 和 *WOX5* 直系同源、在干细胞维持中起关键作用的基因, 更重要的是, 发现了与拟南芥芽再生正调控因子 *AtWOX14* 同源且在不定芽再生过程中持续高表达的 *AhWOX13* 和 *AhWOX20*。结合其启动子中含有分生组织发育相关元件的特点, *AhWOX13* 和 *AhWOX20* 被确立为调控花生器官再生的关键候选基因。本研究为克服花生遗传转化中植株再生效率低的瓶颈提供了重要的理论依据与基因资源; 后续通过对 *AhWOX13* 和 *AhWOX20* 进行功能验证, 有望为建立高效的花生遗传转化体系开辟新途径。

References

[1] Nardmann J, Reisewitz P, Werr W. Discrete shoot and root stem cell-promoting *WUS*/*WOX5* functions are an evolutionary innovation of angiosperms. Mol Biol Evol, 2009, 26: 1745–1755.

[2] Haecker A, Groβ-Hardt R, Geiges B, et al. Expression dynamics of *WOX* genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. Development, 2004, 131: 657–668.

[3] Laux T, Mayer K F X, Berger J, et al. The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. Development, 1996, 122: 87–96.

[4] van der Graaff E, Laux T, Rensing S A. The WUS homeobox-containing (WOX) protein family. Genome Biol, 2009, 10: 248.

[5] Zhang X, Zong J, Liu J H, et al. Genome-wide analysis of WOX gene family in rice, sorghum, maize, *Arabidopsis* and poplar. J Integr Plant Biol, 2010, 52: 1016–1026.

[6] Dolzblasz A, Nardmann J, Clerici E, et al. Stem cell regulation by *Arabidopsis WOX* genes. Mol Plant, 2016, 9: 1028–1039.

[7] Jiang Y L, Liu S Y, An X L. Functional mechanisms and the application of developmental regulators for improving genetic transformation in plants. Plants, 2024, 13: 2841.

[8] Lowe K, Wu E, Wang N, et al. Morphogenic regulators *Baby boom* and *Wuschel* improve monocot transformation. Plant Cell, 2016, 28: 1998–2015.

[9] Mookkan M, Nelson-Vasilchik K, Hague J, et al. Selectable marker independent transformation of recalcitrant maize inbred B73 and sorghum P898012 mediated by morphogenic regulators *BABY BOOM* and *WUSCHEL2*. Plant Cell Rep, 2017, 36: 1477–1491.

[10] Wang N, Ryan L, Sardesai N, et al. Leaf transformation for efficient random integration and targeted genome modification in maize and sorghum. Nat Plants, 2023, 9: 255–270.

[11] Wang K, Shi L, Liang X N, et al. The gene *TaWOX5* overcomes genotype dependency in wheat genetic transformation. Nat Plants, 2022, 8: 110–117.

[12] Hao Q N, Zhang L, Yang Y Y, et al. Genome-wide analysis of the WOX gene family and function exploration of GmWOX18 in soybean. Plants, 2019, 8: 215.

[13] Liu L, Qu J H, Wang C Y, et al. An efficient genetic transformation system mediated by *Rhizobium rhizogenes* in fruit trees based on the transgenic hairy root to shoot conversion. Plant Biotechnol J, 2024, 22: 2093–2103.

[14] 李希陶, 刘耀光. 基因组编辑技术在水稻功能基因组和遗传改良中的应用. 生命科学, 2016, 28: 1243–1249.
Li X T, Liu Y G. Genome editing technology for functional genomics and genetic improvement in rice. Chin Bull Life Sci, 2016, 28: 1243–1249 (in Chinese with English abstract).

[15] 张茂林, 王娟, 严佳丽, 等. 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑片段敲除技术创制玉米多样化等位变异. 山东农业科学, 2024, 56(9): 1–5.
Zhang M L, Wang J, Yan J L, et al. Engineering diversified allelic variation in maize by fragment knockout using CRISPR/Cas9

genome editing. Shandong Agric Sci, 2024, 56(9): 1–5 (in Chinese with English abstract).

[16] Kumar S, Stecher G, Li M, et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Mol Biol Evol, 2018, 35: 1547–1549.

[17] Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. Nucleic Acids Res, 2019, 47: W256–W259.

[18] Chen C J, Chen H, Zhang Y, et al. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. Mol Plant, 2020, 13: 1194–1202.

[19] Bailey T L, Boden M, Buske F A, et al. MEME Suite: tools for motif discovery and searching. Nucleic Acids Res, 2009, 37: W202–W208.

[20] 唐桂英, 彭振英, 徐平丽, 等. 花生 AhARF 基因家族鉴定与表达分析. 中国油料作物学报, 2020, 42: 1100–1110.
Tang G Y, Peng Z Y, Xu P L, et al. Genome-wide identification and expression analysis of auxin response factor gene family in *Arachis hypogaea* L. Chin J Oil Crop Sci, 2020, 42: 1100–1110 (in Chinese with English abstract).

[21] Lescot M, Déhais P, Thijs G, et al. PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences. Nucleic Acids Res, 2002, 30: 325–327.

[22] Gehring W J, Müller M, Affolter M, et al. The structure of the homeodomain and its functional implications. Trends Genet, 1990, 6: 323–329.

[23] 冯珊珊, 王璐, 周益, 等. WOX 家族基因调控植物生长发育和非生物胁迫响应的研究进展. 生物技术通报, 2023, 39(5): 1–13.
Feng S S, Wang L, Zhou Y, et al. Research progresses on WOX family genes in regulating plant development and abiotic stress response. Biotechnol Bull, 2023, 39(5): 1–13 (in Chinese with English abstract).

[24] 王迪, 张晓宇, 宋宇鑫, 等. 细胞全能性转录因子调控植物组培再生的分子机制研究进展. 生物技术通报, 2024, 40(6): 23–33.
Wang D, Zhang X Y, Song Y X, et al. Advances in the molecular mechanisms of plant tissue culture and regeneration regulated by totipotency-related transcription factors. Biotechnol Bull, 2024, 40(6): 23–33 (in Chinese with English abstract).

[25] Wang W F, Li G, Zhao J, et al. DWARF TILLER1, a WUSCHEL-related homeobox transcription factor, is required for tiller growth in rice. PLoS Genet, 2014, 10: e1004154.

[26] Liu B B, Wang L, Zhang J, et al. *WUSCHEL-related Homeobo*x genes in *Populus tomentosa*: diversified expression patterns and a functional similarity in adventitious root formation. BMC Genom, 2014, 15: 296.

[27] Oshchepkova E A, Omelyanchuk N A, Savina M S, et al. Systems biology analysis of the *WOX5* gene and its functions in the root stem cell niche. Russ J Genet Appl Res, 2017, 7: 404–420.

[28] 郑玲, 冯梦园, 韩建明. 玉米 WOX 家族基因的鉴定与分析. 玉米科学, 2019, 27(3): 16–22.
Zheng L, Feng M Y, Han J M. Identification and analysis of WOX family genes in maize. J Maize Sci, 2019, 27(3): 16–22 (in Chinese with English abstract).

[29] Ge X Y, Xu J T, Yang Z E, et al. Efficient genotype-independent cotton genetic transformation and genome editing. J Integr Plant Biol, 2023, 65: 907–917.

[30] Zhong H, Li C B, Yu W J, et al. A fast and genotype-independent *in planta Agrobacterium*-mediated transformation method for soybean. Plant Commun, 2024, 5: 101063.

[31] Chen X P, Lu Q, Liu H, et al. Sequencing of cultivated peanut, *Arachis hypogaea*, yields insights into genome evolution and oil improvement. Mol Plant, 2019, 12: 920–934.

[32] Wang D B, Qiu Z M, Xu T, et al. Identification and expression patterns of WOX transcription factors under abiotic stresses in *Pinus massoniana*. Int J Mol Sci, 2024, 25: 1627.

[33] Eulgem T, Rushton P J, Robatzek S, et al. The WRKY superfamily of plant transcription factors. Trends Plant Sci, 2000, 5: 199–206.

[34] Jakoby M, Weisshaar B, Dröge-Laser W, et al. bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. Trends Plant Sci, 2002, 7: 106–111.

[35] Licausi F, Giorgi F M, Zenoni S, et al. Genomic and transcriptomic analysis of the AP2/ERF superfamily in *Vitis vinifera*. BMC Genom, 2010, 11: 719.

[36] Wang J, Tan M F, Wang X N, et al. WUS-RELATED HOMEOBOX 14 boosts *de novo* plant shoot regeneration. Plant Physiol, 2023, 192: 748–752.

[37] Jiang G X, Li Z W, Ding X C, et al. WUSCHEL-related homeobox transcription factor SlWOX13 regulates tomato fruit ripening. Plant Physiol, 2024, 194: 2322–2337.