脂肪酸调控棉花体细胞胚胎发生能力

魏喜^{1,2†}, 王晔^{2†}, 耿梦涵^{1,2†}, 陈艳丽², 袁佳辰^{2,3}, 喻红霞^{2,4}, 李佳宁^{1,2}, 王照寒^{1,2},
王书成^{1,2}, 王鹏², 葛晓阳^{2,3*}, 李付广^{1,2*}

1. 棉花生物学国家重点实验室河南师范大学基地, 新乡 453000;

2. 中国农业科学院棉花研究所, 棉花生物学国家重点实验室, 安阳 455000;

3. 郑州大学农学院, 郑州 450000;

4. 华中农业大学植物科学技术学院, 武汉 430070

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: gexiaoyang@caas.cn; aylifug@caas.cn

收稿日期: 2021-08-06; 接受日期: 2021-10-30; 网络版发表日期: 2021-12-10

国家自然科学基金(批准号: 31701476)资助

摘要 愈伤和胚性愈伤组织是植物再生过程中细胞发生命运转变的关键时期, 棉花的愈伤组织和胚性愈伤组织的状态直接决定棉花体细胞胚胎发生的能力. 本研究选取高分化材料ZM24的愈伤组织和胚性愈伤组织, 以及难分化材料TM-1的愈伤组织和ZM24胚性愈伤组织同时期的TM-1愈伤组织进行转录组和代谢组分析, 发现脂肪酸延伸通路中的基因KCS和KCR在TM-1和ZM24的愈伤组织、TM-1的ZM24胚性愈伤组织同时期的TM-1愈伤组织中均呈现较低的表达水平, 而在ZM24胚性愈伤组织中表达水平显著增加, 暗示KCS和KCR的表达水平调控愈伤转变成胚性愈伤的能力. 测定ZM24和TM-1的20天愈伤组织中的脂肪酸含量, 发现TM-1中脂肪酸总含量和各种脂肪酸含量均显著高于ZM24, 可能暗示TM-1和ZM24愈伤细胞形态、愈伤增殖及分化能力差异是由脂肪酸含量差异引起的. 过表达陆地棉Gh_KCSI3基因抑制愈伤组织的形成, 证实KCSI3通过增加脂肪酸含量负调控愈伤起始和增殖. 预测调控Gh_KCSI3表达的体胚发生相关的转录因子, 有助于解析棉花体胚发生调控通路. 本研究明确了脂肪酸对棉花体细胞胚胎发生的调控作用, 为通过调控脂肪酸优化棉花体细胞胚胎发生能力奠定基础.

关键词 脂肪酸合成, 脂肪酸延伸, 愈伤, 胚性愈伤组织, 棉花体细胞胚胎发生

棉花是一种重要的油料作物和天然纤维作物, 棉花产业在全球社会经济中占有重要地位. 我国人口众多, 耕地资源有限, 棉花产量和纤维品质受各种逆境的影响^[1]. 在“不与人争粮, 不与粮争地”的棉花科研发展思路的指导下, 为了提高产量和品质, 利用基因工程

和基因编辑技术验证棉花基因的功能, 加速棉花转基因育种, 从而弥补传统育种方式的不足^[2]. 棉花体细胞胚胎发生在基因功能验证和创制优异转基因棉花材料中占有重要地位.

棉花体细胞胚胎发生是进行棉花转基因遗传改良

引用格式: 魏喜, 王晔, 耿梦涵, 等. 脂肪酸调控棉花体细胞胚胎发生能力. 中国科学: 生命科学, 2022, 52: 461–475

Wei X, Wang Y, Geng M H, et al. Fatty acids modulate the potential of somatic embryogenesis in cotton (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2022, 52: 461–475, doi: [10.1360/SSV-2021-0287](https://doi.org/10.1360/SSV-2021-0287)

的主要途径。然而受基因型的严重限制, 大部分棉花品种基本上都不能通过农杆菌介导的方法进行遗传转化, 只有少数棉花品种才能作为理想的受体材料, 如ZM24, YZ1等。棉花的体细胞胚胎发生是间接的, 要经历愈伤时期、胚性愈伤时期、胚状体时期和再生棉花幼苗四个时期^[3]。其中, 棉花外植体经过脱分化形成愈伤组织和再分化形成胚性愈伤组织(embryogenic callus, EC)的细胞命运转变直接决定棉花体细胞胚胎发生的能力和周期。为了提高体细胞胚胎发生能力并缩短周期, 科学家围绕植物组织培养体系优化和体细胞胚胎发生命运转变的关键功能基因的挖掘开展一系列研究。《Science》杂志公布了125个最具挑战性的科学问题, 其中植物细胞的全能性, 特别是植物体细胞胚胎发生的分子机制被列为最重要的25个科学问题之一, 这个科学之谜备受科学家的关注^[4]。植物再生的基础是细胞的全能性和多能性。培养基的固体和液体状态直接影响植物再生, 烟草组织在固体培养基上会发生不规则生长, 而浸没在液体培养基上会诱导芽发生^[5]。培养基中腺嘌呤、激动素和生长素之间的平衡直接决定外植体不定芽和不定根的产生^[6]。外植体感知伤口信号、环境信号和激素等的刺激后, 生长素会被极性运输到具有干细胞属性的区域, 包括茎尖分生组织(shoot apical meristem, SAM)、根尖分生组织(root apical meristem, RAM)和维管形成层(vascular cambium, VCAM), 促进干细胞命运的转变。SAM干细胞的分子调控主要以WUS-CLV3(WUSCHEL-CLAVATA3)的负反馈调节为中心维持芽尖分生组织干细胞的稳态^[7,8]。GRAS家族的转录因子基因HAM(HAIRY MERISTEM)下调表达后导致分生组织发育终止, 说明HAM与WUS协同参与维持SAM干细胞的活性^[9]。HAM与WUS共同调控CLV3的表达, WUS直接与CLV3的启动子结合, 激活CLV3的转录, 相反, CLV3也可抑制WUS的表达, 形成一个反馈调节, HAM限定CLV3在SAM的表达位置, 调控SAM干细胞的活性^[10]。研究表明, STM(SHOOT MERISTEMLESS)通过与WUS相互作用形成复合体, 进一步增强WUS与CLV3启动子的结合强度, 同时激活其表达, 从而增强茎尖分生组织干细胞的活性; 另外, STM的表达反过来依赖WUS的表达, WUS直接激活STM的表达, 确保STM作为干细胞增效因子的功能^[11]。根尖分生组织干细胞的分子调控主要通过WOX5^[12], GRAS家族的两个成员SHORTROOT(SHR)和SCARE-

CROW(SCR)^[13], ETHYLENE RESPONSE FACTOR (ERF)家族的ERF109, ERF114和ERF115共同维持RAM干细胞的活性^[14]。根尖分生组织的干细胞最终形成不定根需要经过四个命运转变过程。首先, 生长素信号直接激活WUSCHEL RELATED HOMEODOMAIN 11 (WOX11), 使形成层的干细胞命运转变为不定根创始细胞, 启动根发育程序, WOX11的突变导致根的再生能力减弱, 过表达WOX11则促进不定根的再生^[15]; 其次, 不定根创始细胞转变为根原基细胞, 在这一命运转变的过程中, WOX11激活WOX5/7和LBD16(LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN16)的表达; 然后根原基命运转变为RAM, 此时具有根原基属性的LBD16将退出表达, WOX5/7将被限制在根尖干细胞微环境区; 最后就是成熟根尖的形成^[16,17]。与通过愈伤组织-芽/根再生技术实现植物的再生不同, 棉花等植物通过组织培养诱导胚胎发生, 最终形成再生植株。LEC1(LEAFY COTYLEDON1)和LEC2(LEAFY COTYLEDON2)蛋白是最早发现的能诱导体细胞胚产生的转录因子^[18,19]。异位表达AP2/ERF转录因子中的BBM(BABY BOOM)能在没有外源激素的情况下使离体拟南芥幼苗的真叶诱导出体细胞胚^[20]。

激素在细胞命运转变的过程中发挥重要作用。生长素、细胞分裂素、乙烯、茉莉酸、赤霉素等通过激活关键转录因子基因来启动细胞命运的转变^[21~24]。棉花再生主要通过体细胞胚胎发生获得再生植株, 愈伤诱导是棉花再生的第一步, 愈伤起始发生在中柱鞘细胞。脂肪酸调控中柱鞘细胞形成愈伤组织的能力, 超长链脂肪酸含量降低会增强中柱鞘细胞形成愈伤组织的能力。超长链脂肪酸作为信号分子通过抑制中柱鞘细胞分生能力关键基因ALF4的表达来调控愈伤组织的形成, 而不是依赖于生长素调控侧根发生的IAA14信号通路^[25]。但迄今为止还没有脂肪酸调控中柱鞘细胞愈伤组织形成的分子机制和调控网络的报道。棉花维管形成层不易取材, 研究起步晚, 转化体系的建立相对困难, 用来做转化的棉花品种严格受基因型的限制, 其维管形成层干细胞功能基因和分子调控网络还有待深入研究。

本研究主要集中在高分化棉花材料ZM24和难分化材料TM-1的棉花体细胞胚胎发生过程中命运转变的两个关键时期的愈伤组织和胚性愈伤组织, 通过转录组和代谢组数据分析发现, 脂肪酸合成和延伸过程中的相关基因在棉花体细胞胚胎发生命运转变的关键

时期发挥重要作用. 脂肪酸及激素含量测定表明, TM-1和ZM24在愈伤组织时期脂肪酸含量和生长素含量以及细胞分裂素含量存在差异, 过表达*Gh_KCS13*明显抑制愈伤组织的形成, 说明脂肪酸与激素在调控棉花体细胞胚胎发生能力方面发挥重要作用. 本研究为棉花中柱鞘干细胞命运转变和棉花体细胞胚胎发生调控网络的挖掘奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 植物材料和生长条件

所用材料ZM24和TM-1由中国农业科学院棉花研究所转基因课题组提供, ZM24和TM-1基因组重测序结果见本课题组生物信息与分子设计中心构建的棉花资源和网络数据库网站(Gossypium Resource And Network Database, <http://grand.cricaas.com.cn/home>), 相关成果发表在*Nature Communications*^[26].

棉花种子的挑选、脱绒以及棉花无菌苗的培养基和培养条件参照本实验室之前的研究^[3]. 棉花*Gh_KCS13*(*Gh_A01G1563*)转基因过表达材料的获得依托转基因课题组棉花规模化转基因技术平台.

1.2 实验设计

将培养7天的TM-1和ZM24无菌苗下胚轴用无菌刀片切成长度为5~7 mm的小段放置在愈伤组织诱导培养基上(callus induction medium, CIM)诱导愈伤组织的形成, 然后在胚性愈伤诱导培养基上(embryogenic callus differentiation medium, ECDM)诱导分化成胚性愈伤组织. 由于TM-1无法获得胚性愈伤, 取ZM24胚性愈伤同时期的TM-1愈伤作为TM-1的“胚性愈伤”进行分析. 统计TM-1和ZM24的胚性愈伤分化率, 测定TM-1和ZM24陆地棉材料20天愈伤组织中的脂肪酸、生长素和细胞分裂素含量. 观察*Gh_KCS13*过量表达对体胚发生的影响.

1.3 广泛靶向代谢组和转录组分析

选择棉花难分化材料TM-1和易分化材料ZM24 20天的愈伤组织和对应的胚性愈伤组织用作广泛靶向代谢组和转录组的分析. 为了保证转录组和代谢组数据的准确性, 取样时按照随机取样的原则, 将取出的愈伤组织和胚性愈伤组织分别混合均匀后, 迅速用液氮冷冻处理, 分别设置3个生物学重复. 广泛靶向代谢组和转录组联合分析由迈特维尔生物科技有限公司(武汉)完成. 利用*Gossypium hirsutum* (AD1, upland cotton), NAU assembly数据库进行比对分析.

1.4 棉花内源生长素和细胞分裂素含量的测定

准确称量1.0 g已在液氮中研磨粉碎的愈伤组织于玻璃试管中; 向粉末中加入10 mL异丙醇/盐酸提取缓冲液, 4℃震荡30 min; 加入20 mL二氯甲烷, 4℃震荡30 min; 4℃, 15871×g离心5 min, 取下层有机相; 避光, 以氮气吹干有机相, 用400 μL甲醇(0.1%甲酸)溶解; 过0.22 μm滤膜, 进HPLC-MS/MS检测. 吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)标准品和玉米素(Zeatin)标准品购自Sigma-Aldrich公司(美国). 本实验以异丙醇/水/盐酸提取方法提取样品中植物内源激素, 以安捷伦1290高效液相色谱仪串联AB公司Qtrap6500质谱仪(南京)测定植物内源激素生长素(IAA)和细胞分裂素(Zeatin). 采用ESI-HPLC-MS/MS方法对植物激素进行定量分析. 以安捷伦1290高效液相色谱仪分离样品物质, 以电喷雾电离(electrospray ionization, ESI)为离子源, 经多通道检测(multiple reaction monitoring, MRM)模式扫描, 即同时进行多个选择离子监测(selected ion monitoring, SIM)模式扫描. 该模式常用于检测目标化合物, 灵敏度高, 但缺乏进一步的物质结构信息. 本实验严格控制液质检测条件(表1), 并通过标准曲线法对待测物定量.

1.5 脂肪酸含量的测定

脂肪酸含量的测定以国标(GB 5009.168-2016)中

表 1 植物激素质子化或去质子化的选择反应监测条件([M+H]⁺或[M-H]⁻)

Table 1 Selective response monitoring conditions for protonation or deprotonation of plant hormones ([M+H]⁺ or [M-H]⁻)

物质名称	极性	母离子(m/z)	子离子(m/z)	解簇电压(V)	碰撞能量(V)
IAA	+	176.2	129.8/102.9	65	12/42
Zeatin	+	220.4	136.0/147.9	92	22/16

的外标法——水解法提取ZM24和TM-1愈伤组织中的脂肪酸,以trace GC ultra气相色谱仪(钟鼎生物,南京)测定样品中脂肪酸组分.具体方法如下:首先需要购买37种脂肪酸甲酯标准品,色谱纯级别的甲醇(CH_3OH)和正庚烷($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$).配制试剂: 8.3 mol/L的盐酸溶液,等体积的乙醚和石油醚混合液,2%的氢氧化钠甲醇溶液,2 mol/L的氢氧化钾甲醇溶液和饱和氯化钠溶液.详细的操作流程见国标GB 5009.168-2016.

2 结果

2.1 脂肪酸调控棉花愈伤组织的增殖及其分化能力

前人研究发现,超长链脂肪酸通过抑制拟南芥中柱鞘细胞形成愈伤的能力来调控拟南芥的再生能力^[25].为了研究脂肪酸是否对棉花体细胞胚胎发生能力有显著影响,本实验从陆地棉高分化材料和难分化材料中选择具有代表性的ZM24和TM-1用作研究.杨召恩等人^[26]使用PacBio SMART long read和高通量染色体捕获(high-through chromosome conformation capture, Hi-C)技术对陆地棉ZM24和TM-1的基因组进行组装,从基因组水平上解析导致陆地棉ZM24和TM-1不同分化能力的机制,为更准确地定量ZM24和TM-1中基因的表达水平提供了保障.

体式显微镜下观察TM-1和ZM24的20天愈伤组织,发现两种棉花产生的愈伤表型相似(图1A和E),继代培养后ZM24的愈伤分化成胚性愈伤组织(图1B),而TM-1还是处于愈伤组织状态,没有转变为胚性愈伤组织(图1F),但愈伤组织的颜色变为深绿色,愈伤的质地更紧实.ZM24的胚性愈伤组织分化率明显高于TM-1的分化率(图1I).在扫描电镜下观察ZM24和TM-1的20天愈伤组织,与TM-1的愈伤组织相比,ZM24的愈伤组织细胞更饱满,成簇状分布,增殖更明显(图1C, D和G, H).值得注意的是, TM-1的20天愈伤组织中总脂肪酸含量明显高于ZM24(图1J),推测TM-1和ZM24愈伤细胞形态、愈伤增殖及分化能力的差异可能是由脂肪酸含量差异引起的.

2.2 脂肪酸生物合成通路基因的表达和脂质代谢物含量

已有研究结果表明, *KCSI* 基因调控中柱鞘细胞愈伤组织的形成^[25], 暗示超长链脂肪酸在愈伤组织诱导

中的重要作用.为了进一步明确脂肪酸是否是造成ZM24和TM-1不同分化程度的原因,本研究分别选择ZM24和TM-1的20天愈伤组织、ZM24的胚性愈伤组织和同一时期TM-1的愈伤组织用来进行转录组和代谢组分析.

转录组分析结果表明,脂肪酸从头合成过程中相关基因的转录水平在ZM24和TM-1的愈伤及胚性愈伤组织中存在明显差异(图2A).脂肪酸生物合成通路过程中,乙酰辅酶A(Acetyl)在脂肪酸合成酶(fatty acid synthase, FAS)的作用下生成月桂酰基载体蛋白(C12:0-ACP),继续在FAS的作用下生成棕榈酰基载体蛋白(C16:0-ACP),FAS在脂肪酸的合成中占有重要地位.愈伤组织时期,ZM24和TM-1中脂肪酸合成酶基因FAS(Gh_A05G3863)都呈现出高表达;而在胚性愈伤时期,FAS表达水平降低,但ZM24中的表达水平高于TM-1(图2A).FAT分为FATA和FATB两个亚族,调控月桂酸(C12:0)和棕榈酸(C16:0)的合成,与各自的愈伤组织相比,ZM24和TM-1胚性愈伤时期FATA基因(Gh_D06G0571, Gh_A06G0514, Gh_D07G0034和Gh_A07G0026)和FATB基因(Gh_A08G0436, Gh_A08G1740, Gh_D08G2090和Gh_D08G0524)均呈现出高表达水平,且在ZM24的胚性愈伤组织中表达水平最高.然而在C16:0 alcohol的合成中FAR基因的表达量很低(图2A).

对愈伤组织和胚性愈伤组织的代谢物进行分析,发现ZM24的胚性愈伤组织中脂质总含量最高,其次是ZM24愈伤、TM-1愈伤和TM-1“胚性愈伤”(图2B).ZM24的胚性愈伤中脂肪酸含量最高,其次是ZM24愈伤、TM-1“胚性愈伤”和TM-1愈伤(图2C).代谢组测定的脂肪酸包括短链和长链脂肪酸,实际测定的脂肪酸以长链脂肪酸为主(图1J和2C).在TM-1和ZM24愈伤组织和胚性愈伤组织中的脂质-甘油糖酯含量基本上无差异(图2D).但是胚性愈伤组织时期ZM24中的甘油磷脂含量显著高于TM-1,暗示甘油磷脂与分化有关(图2E).上述结果说明,脂肪酸合成相关基因和脂质代谢物含量与愈伤组织和胚性愈伤组织的发育密切相关.

2.3 脂肪酸延伸通路基因的表达

脂肪酸是植物生长发育的必需物质,同时又是其

图 1 ZM24和TM-1的愈伤和胚性愈伤的表型及愈伤中脂肪酸含量。A: ZM24外植体20天愈伤的表型。ZM24下胚轴在CIM上培养20天诱导愈伤的形成; B: ZM24胚性愈伤的表型, 将在CIM上诱导的25~30天的ZM24愈伤组织转移到胚性愈伤组织诱导培养基上诱导胚性愈伤的形成; C: 在CIM上诱导20天的ZM24愈伤组织的扫描电镜表型; D: 在CIM上诱导20天的ZM24愈伤组织的扫描电镜放大表型; E: TM-1 20天愈伤的表型, TM-1下胚轴在CIM上培养20天诱导愈伤的形成; F: ZM24胚性愈伤组织同时期的TM-1愈伤表型, 将在CIM上诱导25~30天的TM-1愈伤组织转移到胚性愈伤组织上诱导胚性愈伤的形成; G: 在CIM上诱导20天的TM-1愈伤组织的扫描电镜表型; H: 在CIM上诱导20天的TM-1愈伤组织的扫描电镜放大表型; I: TM-1和ZM24的胚性愈伤分化率; J: TM-1和ZM24愈伤组织中总脂肪酸含量。TM-1和ZM24外植体在CIM上诱导20天的愈伤组织用来测定总脂肪酸的含量。★代表最大值, ▲代表平均值, ●代表最小值。设置三个生物学重复, 通过 t 检验确定显著性, *代表差异显著($P<0.05$), **代表差异极显著($P<0.01$)

Figure 1 Phenotype and fatty acid content of ZM24 and TM-1 callus cells and embryogenic callus cells. A: Phenotype of 20-day callus of ZM24 explant. ZM24 hypocotyl explants were cultured on CIM for 20 d to induce callus formation; B: phenotype of ZM24 embryogenic callus. 25–30-day-old ZM24 callus cells induced on CIM were transferred to embryogenic callus induction medium to induce embryogenic callus formation. C and D: SEM micrograph of ZM24 callus induced on CIM for 20 d under lower (C) and higher (D) magnification; E: phenotype of 20-day callus of TM-1 explant. TM-1 hypocotyl explants were cultured on CIM for 20 d to induce callus formation. F: Callus phenotype of ZM24 embryogenic callus contemporaneous with TM-1. 25–30-day-old TM-1 callus cells induced on CIM were transferred to embryogenic callus induction medium to induce embryogenic callus formation. G and H: SEM micrograph of TM-1 callus induced on CIM for 20 d under lower (G) and higher (H) magnification; I: embryogenic callus differentiation rate of TM-1 and ZM24 explants; J: total fatty acid content of TM-1 and ZM24. TM-1 and ZM24 explants were induced to form 20-day callus cells on CIM, and their total fatty acid content was determined. The star represents the maximum, the triangle represents the average, and the circle represents the minimum ($n=3$ biological replicates). Significance was determined by Student's t -test. *, $P<0.05$; **, $P<0.01$

他糖脂和磷脂合成的原料, 经常被修饰、衍生、酯化和聚合生成其他生物活性产品。脂肪酸的延伸在其他物质的合成中占有重要地位。脂肪酸延伸过程中的基因ACC, KCS, CER2, KCR, HCD在TM-1和ZM24的

愈伤和胚性愈伤中差异表达(图3)。超长链脂肪酸的延伸是将从头合成的脂肪酸运输到内质网上进行碳链的延长。在这个过程中, 丙二酰辅酶A和中长链脂酰辅酶A发生缩合反应, 在 β -酮脂酰辅酶A合成酶

图 2 脂肪酸生物合成通路基因的表达和脂质代谢物含量。A: 脂肪酸生物合成通路基因在TM-1和ZM24愈伤组织时期和胚性愈伤组织时期表达情况; B: 在TM-1和ZM24愈伤组织时期和胚性愈伤组织时期的代谢组学中的脂质总含量; C: 在TM-1和ZM24愈伤组织时期和胚性愈伤组织时期的代谢组学中的脂肪酸含量; D: 在TM-1和ZM24愈伤组织时期和胚性愈伤组织时期的代谢组学中的甘油糖酯含量; E: 在TM-1和ZM24愈伤组织时期和胚性愈伤组织时期的代谢组学中甘油磷脂的总含量。★代表最大值, ▲代表平均值, ●代表最小值。设置三个生物学重复, 通过*t*检验确定显著性, *代表差异显著($P<0.05$), **代表差异极显著($P<0.01$)

Figure 2 Gene expression and lipid metabolite content of fatty acid biosynthesis pathway. A: Expression of fatty acid biosynthesis pathway genes in TM-1 and ZM24 during the callus period and embryogenic callus stages of TM-1 and ZM24; B: total lipid content at the callus and embryogenic callus stages of TM-1 and ZM24; C: fatty acid content at the callus and embryogenic callus stages of TM-1 and ZM24; D: glycerolipid content at the callus and embryogenic callus stages of TM-1 and ZM24; E: glycerophospholipid content at the callus and embryogenic callus stages of TM-1 and ZM24. The star represents the maximum, the triangle represents the average, and the circle represents the minimum ($n=3$ biological replicates). Significance was determined by Student's *t*-test. *, $P<0.05$; **, $P<0.01$

图 3 脂肪酸延伸通路基因在TM-1和ZM24的愈伤组织时期和胚性愈伤组织时期的表达

Figure 3 Expression of fatty acid extension pathway genes in the callus and embryonic callus stages of TM-1 and ZM24

(3-keto-acyl-CoA synthase, KCS)催化下生成碳链延伸两个碳的 β -酮脂酰辅酶A和二氧化碳;接着在 β -酮脂酰辅酶A在 β -酮脂酰辅酶A还原酶(3-keto-acyl-CoA reductase, KCR)、 β -羟脂酰辅酶A脱水酶(3-hydroxy-acyl-CoA dehydratase, HCD)和反式-2-烯脂酰辅酶A还原酶(*trans* 2,3-enoyl-CoA reductase, ECR)催化下生成碳链延长两个碳的脂酰辅酶A,循环继续延伸,合成超长链脂肪酸^[27]. KCS是催化脂肪酸延伸的第一步,是超长链脂肪酸合成的限速酶. KCS和KCR在ZM24胚性愈伤中

的表达量较高,而在ZM24的愈伤组织, TM-1愈伤组织和“胚性愈伤”组织中表达水平较低(图3),推测KCS和KCR调控的超长链脂肪酸在调控愈伤分化成胚性愈伤方面发挥重要作用.

2.4 ZM24和TM-1愈伤组织中脂肪酸含量的分析

为了尽可能多地测出脂肪酸含量,本实验购买37种脂肪酸甲酯标准品对各种脂肪酸的含量进行测定(表2),然而只检测到6种脂肪酸:棕榈酸(图4A)、硬脂

图4 愈伤组织中长链脂肪酸的含量. ZM24和TM-1愈伤组织时期的棕榈酸含量(A), 硬脂酸含量(B), 油酸含量(C); 亚油酸含量(D), 花生油酸含量(E); 二十碳三烯酸含量(F). 设置三个生物学重复, 通过*t*检验确定显著性, *代表差异显著($P<0.05$), **代表差异极显著($P<0.01$)

Figure 4 Long-chain fatty acid content in callus cells. Content of palmitic acid (A), stearic acid (B), oleic acid (C), linoleic acid (D), arachidic acid (E), eicosatrienoic acid (F) at the callus stage of ZM24 and TM-1. $n=3$ biological replicates in all cases. Significance was determined by Student's *t*-test. *, $P<0.05$; **, $P<0.01$

酸(图4B)、油酸(图4C)、亚油酸(图4D)、花生油酸(图4E)、二十碳三烯酸(图4F). 这6种不同脂肪酸在TM-1愈伤组织时期的含量明显高于ZM24的含量(图4), 而且检测到的这6种脂肪酸都是长链脂肪酸, 其中TM-1愈伤组织中油酸含量略高于ZM24, 差异不显著; TM-1愈伤组织中花生油酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、二十碳三烯酸的含量均显著高于ZM24, 说明TM-1愈伤组织中总脂肪酸含量高是由各种脂肪酸含量也高造成的.

2.5 ZM24和TM-1愈伤组织中生长素和细胞分裂素含量的分析

生长素和细胞分裂素对棉花体细胞胚胎发生的意义重大, 在细胞命运的转变过程发挥重要作用^[16]. 对愈伤组织中的内源生长素和细胞分裂素含量进行测定, ZM24中内源生长素IAA的含量远远高于TM-1中内源生长素的含量, 且差异极显著(图5A), 而TM-1的内源细胞分裂素Zeatin与ZM24中的含量没有差异(图5B). ZM24愈伤组织中内源生长素与细胞分裂素的比率比TM-1愈伤组织中内源生长素与细胞分裂素的比率高, 并且差异显著(图5C). 生长素合成基因*GhYUC4* (*Gh_D03G1753*)和*GhYUC10*在ZM24胚性愈伤组织时期高表达, 在TM-1和ZM24的愈伤组织时期和TM-1胚性愈伤组织时期低表达甚至不表达(图5D和E), 说明胚性愈伤时期生长素的合成与YUC4和YUC10相关, 而愈伤组织时期生长素的合成不依赖于YUC4和YUC10, 而是由其他生长素合成基因调控. 内源细胞分裂素合成基因*GhIPT2*在ZM24胚性愈伤组织时期的表达量与其他时期相比是最高的(图5F), 推测*GhIPT2*的高表达促进ZM24胚性愈伤的产生.

2.6 过表达*Gh_KCS13*抑制愈伤组织的增殖

为了进一步确定脂肪酸对棉花体细胞胚胎发生过程中愈伤组织和胚性愈伤组织的影响, 本实验构建超长链脂肪酸延伸限速酶(KCS)的过表达载体, 并且通过农杆菌浸染的方法转化ZM24, 获得过表达*Gh_KCS13* (*Gh_A01G1563*)的转基因棉花. 将*Gh_KCS13*转基因棉花的种子脱绒, 获得无菌苗^[3], 下胚轴切段在愈伤诱导培养基上诱导愈伤组织的形成.

与转化空载体的植株相比, 过表达*Gh_KCS13*抑制愈伤组织的增殖(图6A), 过表达陆地棉*Gh_KCS13*的愈伤鲜重显著降低(图6B), 说明*Gh_KCS13*负调控愈伤组

织的增殖. 为了进一步确定KCS13调控棉花愈伤增殖的分子网络, 本实验利用植物转录因子数据库(<http://plantfdb.gao-lab.org/>)对可能调控*Gh_KCS13*的转录因子进行预测, 发现与体细胞胚胎发生有关的转录因子BBM, PLT3, ARF2, BES1, ARR11, LBD6, WOX13和WOX11可能与*Gh_KCS13*互作来调控棉花体细胞胚胎发生(图6C).

3 讨论

棉花遗传转化依赖于棉花体细胞胚胎发生途径, 提高棉花的遗传转化能力有助于基因功能验证, 开展棉花基因编辑研究和棉花优良品种培育. 为加速棉花体细胞胚胎发生调控基因的挖掘、调控机制的研究及转化体系的优化, 国内外科学家相继组装了一系列高质量的棉花基因组. 2012年, 喻树迅、王俊和朱玉贤等课题组在*Nature Genetics*上公布了二倍体棉花雷蒙德氏棉(*Gossypium raimondii*)的基因组草图^[28]; 2014年, 喻树迅、李付广、王俊和朱玉贤等课题组完成了二倍体棉花-亚洲棉(*Gossypium arboreum*)全基因组测序及图谱绘制^[29]; 2015年, 喻树迅、李付广、朱玉贤等课题组和张天真、郭旺珍、陈增建等课题组同时完成了陆地棉TM-1(*Gossypium hirsutum*)的全基因组测序和图谱绘制, 相关成果均发表在*Nature Biotechnology*上^[30,31]; 在随后的5年内, 李付广、杜雄明、张天真、马峙英和张献龙等课题组在棉花遗传驯化、起源和分化等方面开展研究, 利用三代测序组装技术、Hi-C染色体挂载技术以及光学图谱组装了高质量的参考基因组, 通过分析棉花群体材料之间基因组的结构变异, 挖掘纤维发育、抗病等性状的遗传基础, 奠定了中国棉花基因组研究的国际领先地位^[32-38]. 棉花是典型的木本植物, 棉花基因组时代的到来, 为棉花成为木本植物的模式植物奠定坚实的基础. 提高棉花的遗传转化效率、打破棉花遗传转化的基因型限制将有助于棉花成为木本植物的模式植物.

棉花体细胞胚胎发生过程涉及各种生物大分子的合成及运输、信号转导和能量变化等, 是一个十分复杂的动态变化过程, 而且棉花又是异源四倍体作物, 基因组庞大且基因功能高度冗余, 导致棉花体细胞胚胎发生研究进展缓慢^[39]. 棉花的遗传转化严重受棉花基因型的限制, 陆地棉高分化材料ZM24和难分化材

表 2 棉花愈伤组织时期测定的脂肪酸种类

Table 2 Types of fatty acids in cotton callus

脂肪酸简称	中文名	甲酯类型
C4:0	酪酸	丁酸甲酯
C6:0	羊油酸	己酸甲酯
C8:0	羊脂酸	辛酸甲酯
C10:0	羊蜡酸	癸酸甲酯
C11:0	十一酸	十一碳酸甲酯
C12:0	月桂酸	十二碳酸甲酯
C13:0	椰油酸	十三碳酸甲酯
C14:0	肉豆蔻酸	十四碳酸甲酯
C14:1	肉豆蔻脑酸	顺-9-十四碳一烯酸甲酯
C15:0	十五烷酸	十五碳酸甲酯
C15:1	十五烯酸	顺-10-十五碳一烯酸甲酯
C16:0	棕榈酸	十六碳酸甲酯
C16:1	棕榈油酸	顺-9-十六碳一烯酸甲酯
C17:0	十七碳酸	十七碳酸甲酯
C17:1	十七烯酸	顺-10-十七碳一烯酸甲酯
C18:0	硬脂酸	十八碳酸甲酯
C18:1n9t	反式油酸	反-9-十八碳一烯酸甲酯
C18:1n9c	油酸	顺-9-十八碳一烯酸甲酯
C18:2n6t	反亚油酸	反,反-9,12-十八碳二烯酸甲酯
C18:2n6c	亚油酸	顺,顺-9,12-十八碳二烯酸甲酯
C20:0	花生酸	二十碳酸甲酯
C18:3n6	亚麻酸	顺,顺,顺-6,9,12-十八碳三烯酸甲酯
C20:1	花生油酸	顺-11-二十碳一烯酸甲酯
C18:3n3	亚麻酸	顺,顺,顺-9,12,15-十八碳三烯酸甲酯
C21:0	二十一碳酸	二十一碳酸甲酯
C20:2	11,14-二十碳二烯酸	顺,顺-11,14-二十碳二烯酸甲酯
C22:0	山嵛酸	二十二碳酸甲酯
C20:3n6	二十碳三烯酸	顺,顺,顺-8,11,14-二十碳三烯酸甲酯
C22:1n9	芥油酸	顺-13-二十二碳一烯酸甲酯
C20:3n3	顺11,14,17-二十碳三烯酸	顺11,14,17-二十碳三烯酸甲酯
C20:4n6	花生四烯酸甲酯	顺-5,8,11,14-二十碳四烯酸甲酯
C23:0	二十三碳酸	二十三碳酸甲酯
C22:2	顺13,16-二十二碳二烯酸	顺13,16-二十二碳二烯酸甲酯
C24:0	木蜡酸	二十四碳酸甲酯
C20:5n3	二十碳五烯酸	顺-5,8,11,14,17-二十碳五烯酸甲酯
C24:1	顺-15-二十四碳一烯酸	顺-15-二十四碳一烯酸甲酯
C22:6n3	DHA	顺-4,7,10,13,16,19-二十二碳六烯酸甲酯

料TM-1的胚性愈伤组织分化率的差异(图1I)可能与脂肪酸的总含量,特别是长链脂肪酸的含量差异密切相关

关(图1I和4).过表达超长链脂肪酸延伸限速酶基因 *Gh_KCS13*(图6A和B)抑制棉花体细胞胚胎发生过程

图 5 内源生长素和细胞分裂素含量以及合成基因的表达水平. A: 内源生长素IAA含量; B: 内源细胞分裂素Zeatin的含量; C: 内源生长素和细胞分裂素的比值; D: 生长素合成基因*GhYUC4*的表达量; E: 生长素合成基因*GhYUC10*的表达量 (*Gh_D11G0612*和*Gh_A11G0528*是*GhYUC10*的两个拷贝); F: 细胞分裂素合成基因*GhIPT2*的表达量. 设置三个生物学重复, 通过*t*检验确定显著性, *代表差异显著($P<0.05$), **代表差异极显著($P<0.01$)

Figure 5 Endogenous auxin and cytokinin levels and expression levels of biosynthetic pathway genes. A: Endogenous auxin (IAA) content; B: endogenous cytokinin (Zeatin) content; C: ratio of endogenous auxin to cytokinin; D: expression levels of the auxin synthesis gene *GhYUC4*; E: expression levels of the auxin synthesis gene *GhYUC10* (*Gh_D11G0612* and *Gh_A11G0528* are duplicate copies of the *GhYUC10* gene); F: expression levels of the cytokinin synthesis gene *GhIPT2*. $n=3$ biological replicates in all cases. Significance was determined by Student's *t*-test. *, $P<0.05$; **, $P<0.01$

图6 过表达*Gh_KCSI3*抑制愈伤组织的形成. A: 过表达*Gh_KCSI3*的愈伤组织表型; B: 过表达*Gh_KCSI3*愈伤鲜重(随机选择5块愈伤的重量之和); C: 调控*Gh_KCSI3*表达的体胚发生相关的转录因子. ★代表最大值, ▲代表平均值, ●代表最小值. 设置三个生物学重复, 通过*t*检验确定显著性, *代表差异显著($P<0.05$), **代表差异极显著($P<0.01$).

Figure 6 Overexpression of *Gh_KCSI3* inhibits callus formation. A: Phenotype of callus cells overexpressing *Gh_KCSI3*; B: fresh weight of calluses overexpressing *Gh_KCSI3* and controls (reported as the sum of the weights of five randomly selected callus cells); C: a transcription factor associated with somatic embryogenesis regulates *Gh_KCSI3* expression. The star represents the maximum, the triangle represents the average, and the circle represents the minimum ($n=3$ biological replicates). Significance was determined by Student's *t*-test. *, $P<0.05$; **, $P<0.01$.

中愈伤组织的形成,这与前人的研究结果一致:超长链脂肪酸基因*KCSI*通过抑制拟南芥中柱鞘细胞形成愈伤组织的能力,抑制拟南芥的再生能力^[25]. ZM24愈伤组织细胞中内源生长素含量明显高于TM-1愈伤组织中生长素的含量(图5A), ZM24愈伤组织中生长素含量与细胞分裂素含量的比率明显高于TM-1愈伤组织中的比率(图5C),推测合适的生长素和细胞分裂素比例有利于棉花愈伤的起始和增殖^[40],愈伤生长后期生长素与细胞分裂素含量比率的减少有利于愈伤分化成胚性愈伤^[41].生长素和细胞分裂素合成基因在胚性愈伤中优势表达(图5D~F)促进生长素和细胞分裂素的合成,这些信号可能激活*WOX11/12*,*WOX5*,*LBD16*,*ERF115*和*WUS*的表达^[15,16,22],进而调控细胞命运的转

变. TM-1和ZM24在愈伤和胚性愈伤组织时期的脂肪酸合成和延伸通路中基因的表达水平、脂肪酸组含量、胚性愈伤分化能力和生长素与细胞分裂素含量等均存在差异,同时ZM24和TM-1在基因组水平上存在较多的结构变异^[26],揭示了棉花体细胞胚胎发生的复杂性^[42],暗示脂肪酸与生长素、细胞分裂素相互作用共同调控棉花愈伤组织的形成和分化.

利用转录因子数据库对调控*Gh_KCSI3*基因表达的转录因子进行预测,发现了8种与体细胞胚胎发生密切相关的转录因子,它们分别是BBM, PLT3, ARF2, BES1, ARR11, LBD6, WOX13和WOX11,推测这些体胚发生相关的转录因子可能通过调控*Gh_KCSI3*的表达调控棉花体细胞胚胎发生能力.

参考文献

- 1 Han H J. Effects of climatic-ecologic factors on cotton yield and fibre quality (in Chinese). *Sci Agric Sin*, 1991, 24: 23–29 [韩慧君. 气候生态因素对棉花产量与纤维品质的影响. 中国农业科学, 1991, 24: 23–29]
- 2 Zhang T Z. Present status and prospect of molecular breeding for cotton fiber qualities (in Chinese). *Cotton Sci*, 2000, 6: 321–326 [张天真. 棉花

纤维品质分子育种的现状及展望. 棉花学报, 2000, 6: 321–326]

- 3 Wei X, Wang Q H, Ge X Y, et al. Effects of different red and blue ratios on the somatic embryogenesis and plant regeneration of cotton (in Chinese). *Sci Agric Sin*, 2019, 52: 19–31 [魏喜, 王倩华, 葛晓阳, 等. 不同红蓝配比的光质对棉花体细胞胚胎发生和植株再生的影响. *中国农业科学*, 2019, 52: 19–31]
- 4 Vogel G. How does a single somatic cell become a whole plant? *Science*, 2005, 309: 86
- 5 Skoog F. Growth and organ formation in tobacco tissue cultures. *Am J Bot*, 1944, 31: 19–24
- 6 Skoog F, Miller C O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp Soc Exp Biol*, 1957, 11: 118–130
- 7 Traas J. Molecular networks regulating meristem homeostasis. *Mol Plant*, 2018, 11: 883–885
- 8 Xin W, Wang Z, Liang Y, et al. Dynamic expression reveals a two-step patterning of WUS and CLV3 during axillary shoot meristem formation in *Arabidopsis*. *J Plant Physiol*, 2017, 214: 1–6
- 9 Zhou Y, Liu X, Engstrom E M, et al. Control of plant stem cell function by conserved interacting transcriptional regulators. *Nature*, 2015, 517: 377–380
- 10 Zhou Y, Yan A, Han H, et al. HAIRY MERISTEM with WUSCHEL confines CLAVATA3 expression to the outer apical meristem layers. *Science*, 2018, 361: 502–506
- 11 Su Y H, Zhou C, Li Y J, et al. Integration of pluripotency pathways regulates stem cell maintenance in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117: 22561–22571
- 12 Liu B, Wang L, Zhang J, et al. *WUSCHEL*-related *Homeobox* genes in *Populus tomentosa*: diversified expression patterns and a functional similarity in adventitious root formation. *BMC Genomics*, 2014, 15: 296
- 13 Cui H, Levesque M P, Vernoux T, et al. An evolutionarily conserved mechanism delimiting shr movement defines a single layer of endodermis in plants. *Science*, 2007, 316: 421–425
- 14 Kong X, Tian H, Yu Q, et al. PHB3 maintains root stem cell niche identity through ROS-responsive AP2/ERF transcription factors in *Arabidopsis*. *Cell Rep*, 2018, 22: 1350–1363
- 15 Liu J, Sheng L, Xu Y, et al. *WOX11* and *12* are involved in the first-step cell fate transition during *de novo* root organogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2014, 26: 1081–1093
- 16 Hu X, Xu L. Transcription factors *WOX11/12* directly activate *WOX5/7* to promote root primordia initiation and organogenesis. *Plant Physiol*, 2016, 172: 2363–2373
- 17 Chen X, Cheng J, Chen L, et al. Auxin-independent *NAC* pathway acts in response to explant-specific wounding and promotes root tip emergence during *de novo* root organogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2016, 170: 2136–2145
- 18 Lotan T, Ohto M, Yee K M, et al. *Arabidopsis* *LEAFY COTYLEDON1* is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell*, 1998, 93: 1195–1205
- 19 Stone S L, Kwong L W, Yee K M, et al. *LEAFY COTYLEDON2* encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 11806–11811
- 20 Boutilier K, Offringa R, Sharma V K, et al. Ectopic expression of *BABY BOOM* triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *Plant Cell*, 2002, 14: 1737–1749
- 21 Xu J, Hofhuis H, Heidstra R, et al. A molecular framework for plant regeneration. *Science*, 2006, 311: 385–388
- 22 Heyman J, Cools T, Vandenbussche F, et al. *ERF115* controls root quiescent center cell division and stem cell replenishment. *Science*, 2013, 342: 860–863
- 23 Zhang G, Zhao F, Chen L, et al. Jasmonate-mediated wound signalling promotes plant regeneration. *Nat Plants*, 2019, 5: 491–497
- 24 Efroni I, Mello A, Nawy T, et al. Root regeneration triggers an embryo-like sequence guided by hormonal interactions. *Cell*, 2016, 165: 1721–1733
- 25 Shang B, Xu C, Zhang X, et al. Very-long-chain fatty acids restrict regeneration capacity by confining pericycle competence for callus formation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 5101–5106
- 26 Yang Z, Ge X, Yang Z, et al. Extensive intraspecific gene order and gene structural variations in upland cotton cultivars. *Nat Commun*, 2019, 10: 2989
- 27 Haslam T M, Kunst L. Extending the story of very-long-chain fatty acid elongation. *Plant Sci*, 2013, 210: 93–107
- 28 Wang K, Wang Z, Li F, et al. The draft genome of a diploid cotton *Gossypium raimondii*. *Nat Genet*, 2012, 44: 1098–1103

- 29 Li F, Fan G, Wang K, et al. Genome sequence of the cultivated cotton *Gossypium arboreum*. *Nat Genet*, 2014, 46: 567–572
- 30 Li F, Fan G, Lu C, et al. Genome sequence of cultivated Upland cotton (*Gossypium hirsutum* TM-1) provides insights into genome evolution. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 524–530
- 31 Zhang T, Hu Y, Jiang W, et al. Sequencing of allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L. acc. TM-1) provides a resource for fiber improvement. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 531–537
- 32 Wang M, Tu L, Lin M, et al. Asymmetric subgenome selection and *cis*-regulatory divergence during cotton domestication. *Nat Genet*, 2017, 49: 579–587
- 33 Fang L, Wang Q, Hu Y, et al. Genomic analyses in cotton identify signatures of selection and loci associated with fiber quality and yield traits. *Nat Genet*, 2017, 49: 1089–1098
- 34 Ma Z, He S, Wang X, et al. Resequencing a core collection of upland cotton identifies genomic variation and loci influencing fiber quality and yield. *Nat Genet*, 2018, 50: 803–813
- 35 Du X, Huang G, He S, et al. Resequencing of 243 diploid cotton accessions based on an updated A genome identifies the genetic basis of key agronomic traits. *Nat Genet*, 2018, 50: 796–802
- 36 Wang M, Tu L, Yuan D, et al. Reference genome sequences of two cultivated allotetraploid cottons, *Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense*. *Nat Genet*, 2019, 51: 224–229
- 37 Hu Y, Chen J, Fang L, et al. *Gossypium barbadense* and *Gossypium hirsutum* genomes provide insights into the origin and evolution of allotetraploid cotton. *Nat Genet*, 2019, 51: 739–748
- 38 Huang G, Wu Z, Percy R G, et al. Genome sequence of *Gossypium herbaceum* and genome updates of *Gossypium arboreum* and *Gossypium hirsutum* provide insights into cotton A-genome evolution. *Nat Genet*, 2020, 52: 516–524
- 39 von Arnold S, Sabala I, Bozhkov P, et al. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 2002, 69: 233–249
- 40 Dong H Z, Jiao G L, Chen Z X. The effect of 2,4-D and KT on cotton culture (in Chinese). *Acta Agric Boreali-Sin*, 1993, 3: 89–93 [董合忠, 焦改丽, 陈志贤. 2,4-D, KT对棉花愈伤组织的诱导和体细胞胚胎发生的影响. *华北农学报*, 1993, 3: 89–93]
- 41 Yu Y, Liu C L, Ma Z Y, et al. Embryogenic callus induction and plant regeneration from “CCR124” (in Chinese). *Acta Bot Boreali-Occident Sin*, 2004, 24: 306–310 [于娅, 刘传亮, 马峙英, 等. 陆地棉中棉所24胚性愈伤组织的诱导及植株再生. *西北植物学报*, 2004, 24: 306–310]
- 42 Ge X Y. Studies on the developmental omics of somatic embryos and the regulation of JA and ABA in cotton (in Chinese). Dissertation for Doctoral Degree. China Agricultural University, 2016 [葛晓阳. 棉花体细胞胚发育组学分析及JA和ABA调控的研究. 博士学位论文. 中国农业大学, 2016]

Fatty acids modulate the potential of somatic embryogenesis in cotton

WEI Xi^{1,2}, WANG Ye², GENG MengHan^{1,2}, CHEN YanLi², YUAN JiaChen^{2,3}, YU HongXia^{2,4},
LI JiaNing^{1,2}, WANG ZhaoHan^{1,2}, WANG ShuCheng^{1,2}, WANG Peng²,
GE XiaoYang^{2,3} & LI FuGuang^{1,2}

1 Henan Normal University Research Base of State Key Laboratory of Cotton Biology, Xinxiang 453000, China;

2 State Key Laboratory of Cotton Biology, Institute of Cotton Research of CAAS, Anyang 455000, China;

3 School of Agricultural Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China;

4 Colleg of Plant Science & Technology of Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Callus and embryogenic callus are the key stages of cell fate transformation during plant regeneration. The status of callus and embryogenic callus directly determines the ability of somatic embryogenesis of cotton. Callus cells and embryogenic callus cells (EC) of the highly differentiated material ZM24 and the difficult-to-differentiate material TM-1 were generated and selected for transcriptome and metabolome analysis. The fatty acid extension pathway genes *KCS* and *KCR* showed low expression levels in ZM24 and TM-1 callus and in TM-1 ECs, but showed high expression levels in ZM24 EC, suggesting that the expression levels of *KCS* and *KCR* modulate the potential of callus cells developing into ECs. When we measured the fatty acid content in the 20-day-old ZM24 and TM-1 callus cells, we found that the total fatty acid content and the content of individual fatty acid in TM-1 were significantly higher than those in ZM24, indicating that the differences in callus morphology, callus proliferation, and differentiation ability between TM-1 and ZM24 are correlated with changes in fatty acid content. Overexpression of the *Gh_KCS13* gene inhibits callus formation, confirming that *KCS13* negatively regulates callus initiation and proliferation by increasing fatty acid content. Transcription factors related to somatic embryogenesis are predicted to regulate the expression of *Gh_KCS13*, providing potential insights into the regulation of cotton somatic embryogenesis. This study has clarified the function of fatty acids in cotton somatic embryogenesis, laying a foundation for optimizing this process through regulating levels of fatty acids.

fatty acid synthesis, fatty acid extension, callus, embryonic callus, somatic embryogenesis in cotton

doi: [10.1360/SSV-2021-0287](https://doi.org/10.1360/SSV-2021-0287)