DOI: 10.3724/SP.J.1006.2021.04128

甘蔗 β -胡萝卜素异构酶基因家族的鉴定、定位和表达分析

黄 宁^{2,*} 惠乾龙¹ 方振名² 李姗姗² 凌 辉² 阙友雄¹ 袁照年^{1,*}

¹ 福建农林大学国家甘蔗工程技术研究中心, 福建福州 350002; ² 玉林师范学院农学院, 广西玉林 537000

摘 要: 独脚金内酯(strigolactones, SLs)是一种广泛存在、能够抑制植物分蘖或分枝的植物激素。 β -胡萝卜素异构酶(D27)是 SLs 合成中的关键酶,但是目前关于甘蔗 D27 基因家族的鉴定与分析鲜有报道。本研究通过挖掘甘蔗原始亲本之一的割手密种基因组数据鉴定了 5 个割手密种 D27 基因家族成员。系统进化树分析发现,割手密种 D27s 分处在 3 个不同系统发育分支,与高粱 D27s 高度同源。保守结构域预测揭示,割手密种 D27s 包含 β -胡萝卜素异构酶的典型结构域 Pfam: DUF4033。顺式元件分析结果显示,割手密种 D27s 主要参与调控激素和胁迫响应,以及植物生长发育等。基于甘蔗栽培种转录组数据分析发现,甘蔗割手密种 D27 基因家族成员(*Sspon.06G0012830-1A*)的同源基因同时参与甘蔗分蘖调控及黑穗病菌胁迫响应。在此基础上,我们克隆获得了甘蔗栽培种 ROC22 中的同源基因 cDNA 序列,命名为 *ScD27.1* (GenBank 登录号为 MT499895)。生物信息学分析结果显示,*ScD27.1* 编码 266 个氨基酸,其蛋白等电点为 8.91,分子量为 30.00 kD,是不稳定蛋白且定位于叶绿体。二级结构主要包括 α -螺旋和无规则卷曲,具有叶绿体转运肽,包含 4 个泛素化位点和 18 个磷酸化位点。qRT-PCR 表达分析表明,*ScD27.1* 基因受 ABA 及 H_2O_2 显著诱导表达,但对 MeJA、SA 胁迫响应不明显。亚细胞定位结果显示,*ScD27.1* 蛋白可能定位于细胞膜和叶绿体,参与细胞内膜泡运输或由液泡前体、胞内运输小泡分拣运输。以上研究表明,*ScD27.1* 基因可能参与黑穗病菌侵染诱导的甘蔗分蘖及 ABA 和 H_2O_2 相关信号通路。本研究为了解甘蔗 *ScD27.1* 蛋白在胞内运输和分蘖中的作用及其参与甘蔗-黑穗病菌互作提供一定的基础理论。

关键词: β -胡萝卜素异构酶; 基因家族; 生物信息学; 分蘖; 甘蔗黑穗病菌

Identification, localization and expression analysis of beta-carotene isomerase gene family in sugarcane

HUANG Ning^{2,*}, HUI Qian-Long¹, FANG Zhen-Ming², LI Shan-Shan², LING Hui², QUE You-Xiong¹, and YUAN Zhao-Nian^{1,*}

¹ National Engineering Research Center for Sugarcane, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China; ² College of Crop Science, Yulin Normal University, Yulin 537000, Guangxi, China

Abstract: Strigolactones (SLs), a class of plant hormones, exists widely in plants and involves in the regulation of plant tillering and environmental adaptation. β -carotene isomerase (D27) is a key enzyme for SLs synthesis, but there are few reports about the identification and analysis of D27 gene family in sugarcane. In this study, five members of D27 gene family from one of the original parent of modern sugarcane cultivars, *Saccharum spontaneum*, were analyzed. Phylogenetic tree analysis showed that these D27s from *S. spontaneum* was clustered into 3 different branches and were highly homologous to sorghum D27s. Conserved domain prediction revealed that D27s contained a typical domain of β -carotene isomerase, Pfam: DUF4033. The results of cis-element analysis showed that D27s mainly involved in the regulation of hormone response, plant growth and development, and stress response. Based on the transcriptomic data of the modern cultivated varieties, the expression analysis of the homologous transcripts of *Saccharum spontaneum* D27s showed that *Sspon.06G0012830-1A* was regulated at tillering stage and under *Sporisorium scitamineum* infection. Besides, the cDNA sequence of *Sspon.06G0012830-1A* was cloned from sugarcane cultivar ROC22 and named as *ScD27.1* (GenBank accession number: MT499895). Bioinformatics analysis indicated that *ScD27.1* en-

本研究由国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-170208)资助。

This study was supported by the China Agriculture Research System (CARS-170208).

* 通信作者(Corresponding authors): 黄宁, E-mail: hningch@ylu.edu.cn; 袁照年, E-mail: yzn05@sina.com

Received (收稿日期): 2020-06-15; Accepted (接受日期): 2020-09-13; Published online (网络出版日期): 2020-09-30.

URL: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20200930.1627.006.html>

coded an unstable protein of 266 amino acids with an isoelectric point of 8.91 and a molecular weight of 30.00 kD, and might be located in the chloroplast, containing chloroplast transit peptides, 4 ubiquitination sites and 18 phosphorylation sites. Its secondary structure mainly included alpha helix and random coils. qRT-PCR analysis demonstrated that *ScD27.1* was significantly induced by ABA and H_2O_2 and did not respond to MeJA and SA. Subcellular localization revealed that *ScD27.1* might be located in cell membrane and chloroplast and involved in the vesicle sorting or transported by sorting vesicle in plant cells. The results suggested that *ScD27.1* may involve in the tillering induced by *S. scitamineum* and signaling pathway of ABA and H_2O_2 . The present study provides a basic understanding of intracellular transport and tillering in sugarcane and the involvement of *ScD27.1* during sugarcane-*S. scitamineum* interaction.

Keywords: β -carotene isomerase; gene family; bioinformatics; tillering; *Sporisorium scitamineum*

分蘖或分枝是水稻、小麦、大麦和甘蔗等禾本科植物生长发育过程中普遍存在的一种发育生物学现象^[1-2], 也是一种影响作物产量的重要农艺性状, 通常受植物激素^[3-4]、生物胁迫^[5-6]及非生物胁迫调控^[7-8]。甘蔗是热带和亚热带地区重要的糖料作物, 蔗茎是糖分储藏和收获的重要部位, 获得更多有效分蘖茎, 能够提高甘蔗产量^[9]。甘蔗有效分蘖茎是由主茎地下基部未伸长节间的侧芽发育而来的成熟个体^[2]。当受黑穗病菌侵染后, 甘蔗分蘖增多、蔗茎变细, 蔗梢长出黑鞭, 引起其有效茎数及蔗茎中蔗糖含量严重下降, 最终导致甘蔗产量降低和品质变劣^[10]。

1966年, Cook等^[11]首次从棉花根系中分离得到一类萜类小分子化合物—独脚金内酯(strigolactones, SLs), 能够抑制植物分蘖或分枝^[12-13], 调控植物对各种生物和非生物胁迫的响应^[14]。 β -胡萝卜素异构酶(D27)可以产生独脚金内酯前体或中间产物, 调控独脚金内酯生物合成^[15]。据报道, 水稻^[16]和拟南芥^[15]中D27基因突变体均表现为分枝增多。小麦*TaD27*基因沉默突变体植株分蘖数增多, 而过表达小麦*TaD27*突变体植株分蘖数减少^[17]。

迄今, 关于甘蔗D27基因, 只有1篇基因克隆及其组织特异性和非生物胁迫下表达模式的报道^[18], 尚未见该基因家族鉴定在甘蔗中的研究报道。本研究首先在甘蔗原始亲本割手密种基因组中鉴定D27基因家族, 并进行生物信息学分析; 其后, 基于植物生长调节剂处理相关和受黑穗病菌侵染相关甘蔗栽培种转录组数据, 对甘蔗栽培种中与割手密种D27基因家族同源基因的表达模式进行分析; 最后, 筛选并克隆出1个同时参与分蘖和响应黑穗病菌胁迫的甘蔗栽培种D27基因, 并对该基因进行生物信息学分析, 多种胁迫下的表达定量和亚细胞定位分析。研究旨在为解析D27在甘蔗分蘖过程及与黑穗病菌互作过程中的作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 甘蔗割手密种 D27 基因家族鉴定

Waters等^[15]发现, 在91个真核生物D27蛋白序列中, 均包含1个功能未知的保守结构域DUF4033, 使用NCBI中的conserved domains工具检索发现包含该结构域的蛋白, 通过将反式- β -胡萝卜素异构成9-顺式- β -胡萝卜素, 参与SL的生物合成, 可使用DUF4033检索D27蛋白家族。以甘蔗原始亲本割手密种基因组的基因序列、蛋白序列及染色体位置信息为基础, 结合甘蔗栽培种转录组序列, 构建甘蔗基因家族鉴定模型。通过在线数据库(http://www.life.illinois.edu/ming/downloads/Spontaneum_genome/)^[19]下载甘蔗割手密种基因组相关信息。使用TBtools软件^[20]中的HMM检索(Simple HMM Search)工具, 以DUF4033为探针在割手密种基因组的蛋白序列中进行检索, 获得割手密种D27基因家族成员所编码的蛋白序列。同时利用DNAMAN软件中的多序列比对(multiple alignment)工具, 计算割手密种D27基因家族成员间氨基酸序列的相似性。最后分别通过TBtools软件^[20]中的基因位置可视化(Gene Location Visualize)工具和热图(Heatmap)工具绘制割手密种D27基因家族成员的染色体分布图和基因家族成员间氨基酸序列相似性热图。

1.2 甘蔗割手密种 D27 基因家族的生物信息学分析

1.2.1 系统进化树构建及结构域分析 使用interpro在线软件(<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>)检索DUF4033, 分别下载拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻(*Oryza sativa* subsp.)、高粱(*Sorghum bicolor*)、小米(*Setaria italica*)和玉米(*Zea mays*)中的D27s氨基酸序列, 同时利用MEGA7.0软件对甘蔗割手密种及其他5个物种中的D27s氨基酸序列进行多序列比对, 并使用最大似然法(Maximum Likelihood Method)

构建系统进化树 (Bootstrap = 1000)。使用 Smart search 在线工具 (http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1) 检索 6 个物种中 D27s 氨基酸序列的结构域, 并通过 TBtools 软件^[20] 中的基因结构查看(gene structure viewer)工具进行展示。

1.2.2 顺式元件预测 基于甘蔗割手密种基因组染色体位置信息, 使用 TBtools 软件^[20]中的 Gtf/Gff3 序列提取(Gtf/Gff3 sequences Extract)工具, 提取甘蔗割手密种 D27 基因家族成员 CDS 上游 2000 bp 的启动子序列, 将提取到的序列提交至 PlantCare (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)进行顺式元件预测。同时, 使用 TBtools 软件^[20] 中的生物序列查看(BioSequence viewer)工具对甘蔗割手密种 D27 基因家族成员的顺式元件进行可视化。

1.3 甘蔗栽培种 *ScD27.1* 基因的筛选与克隆

1.3.1 植物材料及处理 参考 Ling 等^[22]的方法培养甘蔗主要栽培品种 ROC22 组培苗, 分别使用 ABA ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$)、MeJA ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$)、SA (5 mmol L^{-1})和 H_2O_2 (500 mmol L^{-1}) 水溶液处理长势一致的组培苗, 并于 0 h 和 6 h 取整株组培苗作为样品, 保存于 -80°C 。

1.3.2 总 RNA 提取和 cDNA 合成 采用 TRIzol 法提取甘蔗总 RNA 后, 使用 DNaseI 对 RNA 样品进行处理, 同时使用 PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect for Real Time)合成 cDNA。

1.3.3 差异表达 *ScD27.1* 基因筛选 项目组前期研究发现, 甘蔗受 6-BA (6-benzylaminopurine, 2 mg L^{-1})和 DA-6 (Diethylaminoethylhexanoate, 10 mg L^{-1}) 共同诱导后分蘖增多, 同时前人研究表明, 黑穗病菌侵染导致甘蔗分蘖增多^[10], 说明植物生长调节剂 (6-BA 和 DA-6)和黑穗病菌均引起了甘蔗分蘖相关代谢途径调控基因的变化。因此, 本研究以甘蔗割手密种 D27 基因家族所编码的氨基酸序列为探针, 分别在 6-BA (2 mg L^{-1})和 DA-6 (10 mg L^{-1})共同诱导的甘蔗栽培种 ROC22 转录组 (数据未公布)和黑穗病菌胁迫的甘蔗栽培种 ROC22 和 YC05-179 转录组^[21]数据库中进行 tblastn 比对, 提取与甘蔗割手密种 D27 基因家族同源的甘蔗栽培种 D27 基因家族在 2 个转录组中的表达数据, 筛选 2 个转录组中均差异表达的甘蔗割手密种 D27 基因。

1.3.4 *ScD27.1* 基因的克隆和分析 以在 6-BA (2 mg L^{-1})和 DA-6 (10 mg L^{-1})共同诱导(数据未公布)

和黑穗病菌胁迫的甘蔗栽培种转录组^[21]中均差异表达的甘蔗割手密种 D27 基因 Sspon.06G0012830-1A 的序列作为参考设计 PCR 扩增引物 ScD27.1-F/R (表 1), 通过 ExTaq 酶(TaKaRa, 中国大连)在甘蔗栽培种 ROC22 整株组培苗 cDNA 中进行扩增, 扩增程序如下: 94°C 4 min; 94°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 1 min 30 s, 35 个循环; 72°C 10 min。目的片段 PCR 产物经过 Gel Extraction Kit (Omega, 中国北京) 纯化后连接至 pMD19-T 载体, 并转化大肠杆菌 DH5 α 进行 TA 克隆及测序。同时, 使用 ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 及 blastp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)分析测序结果。

1.4 甘蔗栽培种 *ScD27.1* 基因的表达分析

1.4.1 生物信息学分析 分别使用在线工具 ExPaSy (<http://web.expasy.org/protparam/>) 和 Prabi (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=NPSA/npsa_hnn.html)预测 ScD27.1 一级结构和二级结构; 同时使用 Plant-PLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant/>)、ProtComp 9.0 (<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=protcomppl&group=programs&subgroup=proloc>)和 WoLFPSORT (<https://wolfpsort.hgc.jp/>)工具预测 ScD27.1 亚细胞定位; 分别使用 TargetP-2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/index.php>)、UbPred (<http://www.ubpred.org/>) 和 NetPhos 3.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)对 ScD27.1 进行靶向肽类型、泛素化位点及磷酸化位点分析。

1.4.2 qRT-PCR 表达分析 参考甘蔗割手密种 D27 基因家族顺式元件预测结果, 分析参与植物生长发育和逆境响应的植物激素信号分子 ABA、MeJA、SA^[32-33]和 H_2O_2 ^[34]如何调控甘蔗 D27 基因的转录表达。使用 qRT-PCR 技术, 以 q-ScD27.1-F/R (表 1)为引物, CAC 和 CUL 为内参基因^[22], 分析 *ScD27.1* 基因在 ABA、MeJA、SA 和 H_2O_2 胁迫下的表达模式。为了获得准确基因相对表达分析结果, 在 3 倍梯度稀释的 ROC22 cDNA 样品中对 *ScD27.1* 基因的定量引物进行特异性扩增检测和扩增效率检测。基因的相对表达量计算及差异显著性分析分别使用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 算法^[23]和新复极差法 DPS (7.05)。qRT-PCR 反应体系及扩增程序均参照 SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒说明书。

1.4.3 亚细胞定位分析 参考 Gateway BP Clonase II Enzyme mix (Invitrogen, 美国加利福尼亚) 说明书, 以 pMD19-T-*ScD27.1* 质粒为模板,

G-ScD27.1-F/R (表 1) 为引物, 构建入门载体 pDONR-Zeo-*ScD27.1*。根据 Gateway LR Clonase II Enzyme mix (Invitrogen, 美国加利福尼亚) 说明书, 通过 LR 反应构建亚细胞定位载体 pFAST-R06-*ScD27.1*。将 pFAST-R06 和 pFAST-R06-*ScD27.1* 质粒分别转入农杆菌 GV3101 并涂板(含 $50\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ 壮观霉素和 $35\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ 利福平), 28 倒置培养 2 d 后, 进行菌液 PCR 鉴定。分别将含有 pFAST-R06 和 pFAST-R06-*ScD27.1* 质粒的农杆菌注射侵染烟草叶片表皮细胞(操作参考 Su 等^[24]), 48 h 后, 用 $16.5\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ 的渥曼青霉素(Wortmannin, Wort)处理烟草叶片, 并在 0 h 和 0.5 h 后^[25]通过激光共聚焦显微镜(Leica, 德国韦茨拉尔)观察烟草叶片表皮细胞^[26]。

表 1 引物列表
Table 1 List of primers

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')
ScD27.1-F	CTCGCAGCCTCACAAACGCGGGCGG
ScD27.1-R	TCTCAAGCCAACGGTCTCCTA
G-ScD27.1-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCCGTGCTTCCGCGACC
G-ScD27.1-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCGCCTGAAGTTTGGGACAGA
q-ScD27.1-F	GGGTGCTCAAGAAAT
q-ScD27.1-R	CTCGTTGGTGAAGAAGTC
CAC-F	ACAACGTCAGGCAAAGCAAA
CAC-R	AGATCAACTCCACCTCTGCG
CUL-F	TGCTGAATGTGTTGAGCAGC
CUL-R	TTGTCGCGCTCCAAGTAGTC

2 结果与分析

2.1 甘蔗割手密种 *D27* 基因家族鉴定

通过 HMM 共检索到 5 个具有完整 DUF4033 保守结构域的甘蔗割手密种 *D27* 序列, 分别为 Sspon.06G0012830-1A、Sspon.06G0012830-3C、Sspon.06G0016140-2C、Sspon.07G0014180-2B 和 Sspon.07G0014180-3C, 分别定位于 6A、6C、6C、7B、7C 染色体(图 1-A)。多序列比对结果显示, 甘蔗割手密种 *D27* 基因家族成员间的氨基酸序列一致性为 52.36%, 其中 Sspon.07G0014180-2B 与 Sspon.07G0014180-3C 一致性最高, 为 90.09%, Sspon.06G0016140-2C 与 Sspon.07G0014180-2B 一致性最低, 为 20.41% (图 1-B), 说明甘蔗割手密种 *D27* 基因家族氨基酸序列间差异较大。

图 1 甘蔗割手密种 *D27* 基因家族鉴定

Fig. 1 Genome wide identification of *D27* gene family in *Saccharum spontaneum*

A: 甘蔗割手密种 *D27s* 染色体分布; B: 甘蔗割手密种 *D27s* 氨基酸序列间相似性。

A: chromosomal location of *D27s* in *Saccharum spontaneum*; B: amino acid sequence similarity of *D27s* in *Saccharum spontaneum*.

2.2 甘蔗割手密种 *D27* 基因家族的生物信息学分析

2.2.1 系统进化树构建及结构域分析 使用甘蔗割手密种的 5 个 *D27s* 氨基酸序列与其他 5 个物种(拟南芥、水稻、高粱、小米及玉米)的 62 个 *D27s* 氨基酸序列共同构建系统进化树, 结果如图 2 所示。6 个物种的 *D27s* 蛋白聚类成 7 个系统发育分支, 定位于甘蔗割手密种 7B 染色体的 *Sspon.07G0014180-2B* 和 7C 染色体的 *Sspon.07G0014180-3C* 分布于分支 I, 定

位于 6A 染色体的 *Sspon.06G0012830-1A* 和 6C 染色体的 *Sspon.06G0012830-3C* 分布于分支 V, 定位于 6C 染色体的 *Sspon.06G0016140-2C* 分布于分支 VII, 并且甘蔗割手密种 *D27s* 与高粱 *D27s* 在系统发育分支中距离最近。Smart search 检索到的结构域包括 Pfam: DUF4033、Pfam: COesterase 和 Pfam: Abhydrolase_3 等, 说明 *D27* 基因家族除了包含典型的 Pfam: DUF4033 结构域外, 还可能包含其他结构域, 但这些结构域在进化过程中不保守。

图 2 基于甘蔗割手密种和其他 5 个物种 *D27s* 氨基酸序列的系统进化树及结构域分析
Fig. 2 Phylogenetic tree and domain analysis based on the amino acid sequences of *D27s* in *Saccharum spontaneum* and other 5 species
横坐标表示蛋白氨基酸序列的长度; 线条颜色表示所用到的物种(Species); 条码颜色表示蛋白的结构域(Domains).
The horizontal axis indicates the amino acid length of the proteins; the color line represents the protein from the different species; the color bar code represents the different domain of protein.

2.2.2 顺式元件预测 为了解甘蔗割手密种 *D27* 基因家族成员的调控功能, 使用 PlantCare 对甘蔗割手密种 *D27* 基因家族成员 CDS 上游 2000 bp 的启动子序列进行分析, 同时提取与胁迫响应/诱导相关的 14 类顺式元件(图 3)。其中与植物激素响应相关的顺式元件包括 ABA 响应元件、MeJA 响应元件、GA 响应元件和 SA 响应元件。与植物生长发育相关的顺式元件包括玉米醇溶蛋白代谢调控元件、分生组织表达调控元件、种子特异性调控元件和胚乳表达调控元件。与胁迫响应相关的顺式元件包括低温响应元件、厌氧诱导元件、光响应元件、

干旱诱导元件、防御和应激反应元件和伤害响应元件。甘蔗割手密种 *D27* 基因家族所有成员的启动子区均含有厌氧诱导元件、光响应元件、MeJA 响应元件和 GA 响应元件。*Sspon.06G0012830-3C* 和 *Sspon.06G0016140-2C* 的启动子区分别含有特有的种子特异性调控元件和胚乳表达调控元件。推测厌氧诱导元件、光响应元件、MeJA 响应元件和 GA 响应元件相关的反式作用因子可能可以结合到甘蔗割手密种 *D27* 基因家族启动子区, 从而受植物激素响应和胁迫诱导表且部分成员在特定组织器官中特异性表达。

图 3 甘蔗割手密种 *D27s* 顺式元件预测
Fig. 3 Prediction of *cis*-elements in *Saccharum spontaneum* *D27s*
横坐标表示的基因启动子区核苷酸长度; 条码颜色表示启动子区不同的顺式元件。
The horizontal axis indicates region nucleotide length of gene promoter; the color bar code represents the different *cis*-element in the promoter region.

2.3 甘蔗栽培种 *ScD27.1* 基因的筛选与克隆

2.3.1 差异表达 *ScD27.1* 基因筛选 经 tblastn 比对后, 甘蔗割手密种 *D27* 基因家族在植物生长调节剂诱导甘蔗栽培种 ROC22 分蘖转录组数据中存在 3 条相似性较高的序列, 分别为 c116894.graph_c0、c112688.graph_c0 和 c161113.graph_c0; 在甘蔗栽培种 ROC22 和 YC05-179 应答黑穗病菌感染转录组数

据中存在 3 条相似性较高的序列, 分别为 Sugarcane_Unigene.66941、Sugarcane_Unigene.58014 和 Sugarcane_Unigene.87626。D27s 序列间相似性详见表 2。
6-BA 和 DA-6 诱导甘蔗栽培种 ROC22 分蘖转录组中, *c112688.graph_c0* ($P = 0.006$)和 *c116894.graph_c0* ($P = 0.02$)经 6-BA 和 DA-6 处理后的表达量,

表 2 甘蔗割手密种与栽培种 *D27s* 间序列相似性
Table 2 Sequence similarity between *D27s* from *Saccharum spontaneum* and sugarcane cultivar

基因名称 Gene ID	6-BA 和 DA-6 共同诱导甘蔗栽培种 ROC22 分蘖转录组			甘蔗栽培种 ROC22 和 YC05-179 应答黑穗病菌感染转录组		
	Transcriptome of sugarcane cultivar ROC22 treated with 6-BA and DA-6			Transcriptome of sugarcane cultivar ROC22 and YC05-179 responding to <i>Sporisorium scitamineum</i> infection		
	c116894.graph_c0	c112688.graph_c0	c161113.graph_c0	Sugarcane_Unigene.66941	Sugarcane_Unigene.58014	Sugarcane_Unigene.87626
<i>Sspon.06G0012830-3C</i>	94.57			94.96		
<i>Sspon.06G0012830-1A</i>	97.93			98.34		
<i>Sspon.07G0014180-2B</i>		82.33			98.31	
<i>Sspon.07G0014180-3C</i>		80			82.42	
<i>Sspon.06G0016140-2C</i>			97.06			95.83

相对于对照组均显著性下调表达, 且在处理 20 d 时下调表达幅度最大, 分别为对照组的-0.54 和-0.42 倍(图 4-A)。受黑穗病菌侵染后, *Sugarcane_Unigene.58014* 在甘蔗抗黑穗病品种 YC05-179 和甘蔗感黑穗病品种 ROC22 中均无显著差异表达; 尽管 *Sugarcane_Unigene.66941* 在甘蔗抗黑穗病品种 YC05-179 受侵染后 48 h 和 120 h 的下调表达并不显著, 但其在感黑穗病品种 ROC22 受侵染后 48 h 和 120 h 的上调表达均达到显著水平($P = 0.01$) (图 4-B)。此外, 由于 *c161113.graph_c0* 和 *Sugarcane_Unigene.87626* 在转录组中的 FPKM 值均小于 0.2,

属于极低表达, 不符合数据分析要求。

综上所述, 与甘蔗割手密种 *D27* 基因家族中 *Sspon.06G0012830-1A* 相似性分别为 97.93% 和 98.34% 的甘蔗栽培种 *c116894.graph_c0* 和 *Sugarcane_Unigene.66941* (表 2) 分别在 6-BA 和 DA-6 共同诱导甘蔗栽培种 ROC22 分蘖转录组和甘蔗栽培种 ROC22 应答黑穗病菌侵染转录组中显著差异表达, 推测与甘蔗割手密种 *Sspon.06G0012830-1A* 同源的甘蔗栽培种 *D27* 基因同时参与甘蔗分蘖调控及黑穗病菌响应, 可用于下一步的研究。

图 4 不同转录组中甘蔗栽培种 *D27s* 基因的表达

Fig. 4 Expression of *D27s* gene in different transcriptome in sugarcane cultivar

A: 表达数据来源于 6-BA 和 DA-6 共同诱导甘蔗栽培种 ROC22 分蘖相关转录组; B: 表达数据来源于甘蔗栽培种 ROC22 和 YC05-179 应答黑穗病菌侵染转录组。X 轴表示出现在甘蔗转录组数据中的转录本序号; Y 轴表示相对于对照组而言, 转录本在处理组中的相对表达量, 其中*代表相对表达量显著差异($P < 0.05$)。

A: the transcriptomic data from 6-BA and DA-6 induced tillering in sugarcane cultivar ROC22; B: the transcriptomic data from sugarcane cultivar ROC22 and YC05-179 in response to *Sporisorium scitamineum* infection. X-axis represents the accession of transcript presenting in the sugarcane transcriptomic data, while Y-axis represents the relative expression of transcript in the treatment sample comparing to the control and the significantly different expression data ($P < 0.05$) was marked by the asterisk (*).

2.3.2 *ScD27.1* 基因克隆 根据琼脂糖凝胶电泳结果可知, PCR 扩增获得 1 条约 1127 bp 的特异条带(图 5-A)。PCR 产物经连接, 转化后进行测序分析。测序结果经 ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 分析表明, 克隆所得的基因长 1127 bp, 编码 266 个氨基酸(图 5-B)。经 blastp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 比对后发现, 其氨基酸序列与高粱 β -胡萝卜素异构酶 (GenBank 登录号为 XP_002444917.2) 相似性为 91.82%, 因此将该基因命名为甘蔗 β -胡萝卜素异构酶基因 (*ScD27.1*, GenBank 登录号为 MT499895)。

2.4 甘蔗栽培种 *ScD27.1* 基因的表达分析

2.4.1 生物信息学分析 生物信息学分析结果显示, 甘蔗栽培种 *ScD27.1* 编码 266 个氨基酸, 等电点为 8.91, 分子量为 30.00 kD, 属于不稳定蛋白。二级结构主要包括 α -螺旋和无规则卷曲(表 3)。甘蔗栽培种 *ScD27.1* 具有叶绿体转运肽可能定位于叶绿体, 包含 4 个泛素化位点和 18 个磷酸化位点(表 3)。

2.4.2 qRT-PCR 表达分析 *ScD27.1* 基因引物扩增效率为 1.026, 在 0.95~1.05 之间, 扩增曲线具有很好的相关性($R^2 = 0.9991$), 说明引物具有良好的扩增特异性(图 6-A)。受 MeJA 胁迫后, *ScD27.1* 基因的

图 5 甘蔗栽培种 *ScD27.1* 基因的克隆与测序

Fig. 5 Cloning and sequencing of *ScD27.1* gene in sugarcane cultivar

A: *ScD27.1* 基因的 RT-PCR 产物的琼脂糖电泳分析; M 代表 marker 100 bp-III DNA marker (Generay, 中国上海)。B: *ScD27.1* 基因的开放读码框(*, 终止密码子)及其编码氨基酸序列, 粗体部分为特异性引物在基因序列中的位置。

A: agrose electrophoretic analysis of RT-PCR product of *ScD27.1*; M: 100 bp-III DNA marker (Generay, Shanghai, China). B: the open reading frame of *ScD27.1* (*, stop codon) and its aa sequence; the sequence fragment complementary to primer is bolded.

表 3 生物信息学分析结果

Table 3 Result of bioinformatics analysis

生物信息学分析 Bioinformatics analysis		结果 Result
一级结构特性 Primary structure characteristics	氨基酸长度 Length of amino acids	266
	等电点 Theoretical pI	8.91
	分子量 Molecular weight (kD)	30.00
	不稳定系数 Instability index (II)	56.40
二级结构类型 Secondary structure types	α -螺旋 Alpha helix	30.08%
	延伸链 Extended strand	12.41%
	无规则卷曲 Random coil	57.52%
蛋白亚细胞定位 Protein subcellular location	Plant-Ploc 工具 Plant-Ploc tool	叶绿体 Chloroplast
	ProtComp 9.0 工具 ProtComp 9.0 tool	膜结合叶绿体 Membrane bound Chloroplast
	WoLFPSORT 工具 WoLFPSORT tool	叶绿体 Chloroplast
功能位点 Function sites	靶向肽类型 Type of targeting peptide	叶绿体转运肽 Chloroplast transit peptide
	泛素化位点 Ubiquitination sites	4
	磷酸化位点 Phosphorylation sites	18

表达量相对于对照组下调表达; 受 ABA、SA 及 H_2O_2 胁迫后, *ScD27.1* 基因的表达量相对于对照组上调表达, 并且在受 ABA 和 H_2O_2 胁迫后显著高于对照组, 分别为对照组的 5.37 倍和 4.60 倍(图 6-B)。推测 *ScD27.1* 基因受 ABA 及 H_2O_2 显著诱导表达, 但对 MeJA、SA 胁迫响应不明显。

2.4.3 亚细胞定位分析 烟草叶片表皮细胞亚细胞定位结果如图 7 所示, 空载 35S::GFP 定位于细胞膜及细胞核, 35S::ScD27.1::GFP 定位在细胞膜上, 胞内也出现了点状荧光, 如叶绿体。Wort 能够促进细胞内液泡前体或者运输小泡发生融合形成更大的膜泡结构^[25,27]。经过 Wort 处理 0.5 h 后观察发现, 空

图 6 *ScD27.1* 基因在不同胁迫下的表达

Fig. 6 Expression of *ScD27.1* gene under different stresses

A: *ScD27.1* 基因定量引物扩增效率曲线; B: *ScD27.1* 基因在 ABA、MeJA、SA 及 H₂O₂ 胁迫下的表达。*表示在 0.05 水平差异显著; 误差线代表各组的标准误差($n = 3$)。

A: the amplification efficiency curve of the primer pairs of *ScD27.1*; B: expression of *ScD27.1* gene under different stress of ABA, MeJA, SA, and H₂O₂. *: significant difference at the 0.05 probability level; the error bars represent the standard error of the group ($n = 3$).

载 35S::GFP 的定位未发生改变, 烟草叶片表皮细胞中未观察到具有绿色荧光的膜泡结构。然而, 尽管 35S::ScD27.1::GFP 的定位也未发生改变, 但在烟草叶片表皮细胞中可以观察到含有绿色荧光的膜泡结构, 因此, ScD27.1 可能定位于细胞膜和叶绿体, 并参与细胞内膜泡运输或由液泡前体、胞内运输小泡完成其在胞质内的分拣运输过程。

3 讨论

SLs 是一种广泛存在、能够抑制植物分蘖或分枝的植物激素^[12-13]。目前, 在拟南芥^[15]、水稻^[16]和小麦^[17]中均有关于 SLs 合成相关基因 *d27* 突变体中分蘖增多的报道, 说明 *D27* 基因能够通过抑制 SLs 合成来减少植物分蘖或分枝。本研究中, *ScD27.1* 在分蘖相关转录组中的转录本 c116894.graph_c0, 经 6-BA 和 DA-6 (具有促进分蘖功能) 处理后相对于对照组, 显著下调表达, 与前人研究结果相同^[15-17]。

SLs 除了在生长发育过程中起作用外, 还被认为能够响应病原菌侵染^[28]。番茄 SLs 合成相关基因 *Slccd8* 突变体对灰葡萄球菌和链格孢菌均更敏感^[29]。拟南芥 SLs 信号转导相关基因 *Atmax2* 突变体对果胶杆菌和假丁香单胞菌的敏感性增加, 但对灰葡萄球菌的敏感性不增加^[30]。拟南芥 SLs 生物合成(*max1*、*max3* 和 *max4*) 和信号转导(*max2*) 突变体对带化红球菌更加敏感^[31]。甘蔗 SLs 合成相关基因 *ScD27.1* 的同源基因 *Sugarcane_Unigene.66941* 在抗病品种中受黑穗病菌抑制表达, 在感病品种中受黑穗病菌诱导表达, 说明 *ScD27.1* 响应黑穗病菌侵染, 但其在甘蔗分蘖及甘蔗与黑穗病菌互作过程中的作用还需进一步试验验证。

ABA、MeJA 和 SA 作为重要的植物激素信号分

子, 不仅能够调控植物生长发育, 同时参与植物逆境反应^[32-33]。活性氧主要包括 O²⁻ 和 H₂O₂, 也是植物中一种重要的信号分子, 在植物受病原体侵染或其生长发育过程中发挥作用^[34]。*ScD27.1* 基因受 ABA、SA 及 H₂O₂ 胁迫后上调表达, 受 MeJA 胁迫后下调表达, 但 SA 及 MeJA 胁迫下差异表达不显著, 推测 *ScD27.1* 基因受 ABA 和 H₂O₂ 诱导表达, 不受 MeJA 和 SA 调控。Abuauf 等^[35]在 ABA 处理拟南芥侧根后对 *AtD27* 进行表达分析, 得到了相似的结果。苜蓿根系在营养缺乏条件下, 激发活性氧生成的 NADPH 氧化酶活性增强, SLs 合成相关基因 *MtCCD7*、*MtCCD8*、*MtD27* 基因上调表达^[36], 说明活性氧与 SLs 合成相关基因可能存在协同作用, 这与 *ScD27.1* 基因受 H₂O₂ 诱导表达的研究结果相似。真核生物中由转录因子等反式作用因子结合基因启动子区启动基因表达转录, 然而一般情况下反式作用因子常常形成同源或异源复合体行使其功能, 基因的表达往往不受单一顺式元件调控。因此, *ScD27.1* 基因的割手密同源基因启动子区域虽然具有 SA 和 MeJA 响应元件, 但 *ScD27.1* 也有可能在某些条件下不响应 SA 和 MeJA 的诱导表达。

D27 同源基因存在于藻类(蓝藻)和高等植物, 但不存在于动物或真菌中, 是一种植物特有蛋白^[16]。本研究首次从甘蔗割手密种基因组中鉴定出 *D27* 基因家族的 5 个成员, 并从甘蔗栽培种 ROC22 中克隆出 1 个同时参与分蘖和黑穗病菌胁迫响应的割手密种同源 *D27* 基因, 该甘蔗栽培种 *ScD27.1* 基因编码 266 个氨基酸。该蛋白等电点为 8.91, 分子量为 30.00 kD, 具有 DUF4033 结构域, 与已报道的编码 288 个氨基酸, 等电点为 5.04, 分子量为 71.58 kD, 具有 2 个锌指蛋白结构域的甘蔗 *D27* 基因^[18]同源性

图 7 ScD27.1 蛋白的亚细胞定位鉴定

Fig. 7 Identification of the subcellular location of ScD27.1 protein

A~F 为自然状态下蛋白亚细胞定位, 标尺为 10 μm ; G~L 为渥曼青霉素(wortmannin, 16.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$)处理后的蛋白亚细胞定位, 标尺为 15 μm 。

The figures from A to F indicate the cellular location of the protein under natural condition and the bar scale was 10 μm ; the figures from G to L indicate the cellular location of the protein under wortmannin (16.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) treatment and the bar scale was 15 μm .

为 31.40%, 推测 2 个甘蔗 *D27* 基因同属于甘蔗 *D27* 基因家族, 可能具有不同的生物学功能。目前关于 *D27* 亚细胞定位的报道较少, Waters 等^[16]发现, 拟南芥 *D27* 定位于质体, 水稻 *D27* 定位于叶绿体, 本研究中甘蔗 *ScD27.1* 定位于细胞膜和叶绿体。随着越来越多的 *D27s* 被发现, *D27* 的亚细胞定位研究将会更加深入。甘蔗割手密种 *D27* 基因家族顺式元件预

测结果显示, *D27s* 参与植物激素响应、生长发育调控及胁迫响应。其中关于 *D27* 参与 ABA、MeJA 和 SA 激素响应已在本研究中验证, 干旱胁迫^[37]、光胁迫^[38]和磷饥饿胁迫^[39]调控已有相关报道。进一步的研究中, SL 在低温胁迫^[40]、种子萌发^[41]和果实发育^[42]过程中的作用可作为 *D27s* 相关调控功能研究的参考。

4 结论

本研究首次鉴定出 5 个甘蔗割手密种 *D27* 基因家族成员, 并对其进行染色体定位、系统进化、结构域及顺式元件分析。其后, 筛选并克隆到 1 个在甘蔗分蘖转录组和甘蔗应答黑穗病侵染转录组中均差异表达的甘蔗栽培种 *ScD27.1* 基因。该基因编码 266 个氨基酸, 为等电点 8.91、分子量 30.00 kD 的不稳定蛋白, 二级结构主要包括 α -螺旋和无规则卷曲。表达分析显示, 该基因受 ABA 和 H_2O_2 诱导表达, 不受 MeJA 和 SA 调控。亚细胞定位明确了 *ScD27.1* 蛋白定位于细胞膜和叶绿体。以上结果不仅为解析甘蔗 *ScD27.1* 基因在信号传导机制及胁迫响应机制中的功能作用提供参考, 还为深入了解甘蔗受黑穗病菌侵染后的抗病机制与分蘖表型之间的关系研究提供新思路。

References

- [1] McSteen P, Leyser O. Shoot branching. *Annu Rev Plant Biol*, 2005, 56: 353–374.
- [2] 丘立杭, 范业庚, 罗含敏, 黄杏, 陈荣发, 杨荣仲, 吴建明, 李杨瑞. 甘蔗分蘖发生及成茎的调控研究进展. *植物生理学报*, 2018, 54: 192–202.
Qiu L H, Fan Y G, Luo H M, Huang X, Chen R F, Yang R Z, Wu J M, Li Y R. Advances of regulation study on tillering formation and stem forming from available tillers in sugarcane (*Saccharum officinarum*). *J Plant Physiol*, 2018, 54: 192–202 (in Chinese with English abstract).
- [3] 罗宝杰, 许俊旭, 丁艳锋, 李刚华, 刘正辉, 王绍华. 内源 CTK 和 IAA 平衡对水稻分蘖芽休眠与萌发的影响. *作物学报*, 2014, 40: 1619–1628.
Luo B J, Xu J X, Ding Y F, Li G H, Liu Z H, Wang S H. Effects of endogenous hormone balance on dormancy and germination of tiller bud. *Acta Agron Sin*, 2014, 40: 1619–1628 (in Chinese with English abstract).
- [4] Wu C Y, Trieu A, Radhakrishnan P, Kwok S F, Pennell R I. Brassinosteroids regulate grain filling in rice. *Plant Cell*, 2008, 20: 2130–2145.
- [5] 王宝祥, 江玲, 陈亮明, 卢百关, 王琦, 黎光泉, 樊继伟, 程遐年, 翟虎渠, 徐大勇. 水稻黑条矮缩病抗性资源的筛选和抗性 QTL 的定位. *作物学报*, 2010, 36: 1258–1264.
Wang B X, Jiang L, Chen L M, Lu B G, Wang Q, Li G Q, Fan J W, Cheng X N, Zhai H Q, Xu D Y. Screening of rice resources against rice black-streaked dwarf virus and mapping of resistant QTL. *Acta Agron Sin*, 2010, 36: 1258–1264 (in Chinese with English abstract).
- [6] 莫伟, 段美娟, 孙志忠, 丁佳, 余东, 孙学武, 盛夏冰, 谭炎宁, 袁贵龙, 袁定阳. 水稻白条纹叶突变体 *wsll* 的遗传分析及基因精细定位. *作物学报*, 2019, 45: 1050–1058.
Mo Y, Duan M J, Sun Z Z, Ding J, Yu D, Sun X W, Sheng X B, Tan Y N, Yuan G L, Yuan D Y. Genetic analysis and fine mapping of white stripe leaf mutant *wsll* in rice. *Acta Agron Sin*, 2019, 45: 1050–1058 (in Chinese with English abstract).
- [7] 蔡铁, 徐海成, 尹燕桦, 杨卫兵, 彭佃亮, 倪英丽, 徐彩龙, 杨东清, 王振林. 外源 IAA、GA₃ 和 ABA 影响不同穗型小麦分蘖发生的机制. *作物学报*, 2013, 39: 1835–1842.
Cai T, Xu H C, Yin Y P, Yang W B, Peng D L, Ni Y L, Xu C L, Yang D Q, Wang Z L. Mechanisms of tiller occurrence affected by exogenous IAA, GA₃, and ABA in wheat with different spike-types. *Acta Agron Sin*, 2013, 39: 1835–1842 (in Chinese with English abstract).
- [8] Lorenzo M, Assuero S G, Tognetti J A. Low temperature differentially affects tillering in spring and winter wheat in association with changes in plant carbon status. *Ann Appl Biol*, 2015, 166: 236–248.
- [9] Tena E, Mekbib F, Ayana A. Correlation and path coefficient analyses in sugarcane genotypes of Ethiopia. *Am J Plant Sci*, 2016, 7: 1498–1520.
- [10] Mehnaz S. Microbes—friends and foes of sugarcane. *J Basic Microbe*, 2013, 53: 954–971.
- [11] Cook C E, Whichard L P, Turner B, Wall M E, Egley G H. Germination of witchweed (*Striga lutea* Lour.): isolation and properties of a potent stimulant. *Science*, 1966, 154: 1189–1190.
- [12] Umehara M, Hanada A, Yoshida S, Akiyama K, Arite T, Takeda-Kamiya N, Magome H, Kamiya Y, Shirasu K, Yoneyama K, Kyoizuka J, Yamaguchi S. Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature*, 2008, 455: 195–200.
- [13] Gomez-Roldan V, Fermas S, Brewer P B, Puech-Pages V, Dun E A, Pillot J P, Letisse F, Matusova R, Danoun S, Portais J C, Bouwmeester H, Becard G, Beveridge C A, Rameau C, Rochange S F. Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature*, 2008, 455: 189–194.
- [14] Aliche E B, Screpanti C, Mesmaeker A D, Munnik T, Bouwmeester H J. Science and application of strigolactones. *New Phytol*, 2020, 227: 1001–1011.
- [15] Waters M T, Brewer P B, Bussell J D, Smith S M, Beveridge C A. The *Arabidopsis* ortholog of rice DWARF27 acts upstream of MAX1 in the control of plant development by strigolactones. *Plant Physiol*, 2012, 159: 1073–1085.
- [16] Lin H, Wang R, Qian Q, Yan M, Meng X, Fu Z, Yan C, Jiang B, Su Z, Li J, Wang Y. DWARF27, an Iron-containing protein required for the biosynthesis of strigolactones, regulates rice tiller bud outgrowth. *Plant Cell*, 2009, 21: 1512–1525.
- [17] Zhao B, Wu T T, Ma S S, Jiang D J, Bie X M, Sui N, Zhang X S, Wang F. *TaD27-B* gene controls the tiller number in hexaploid wheat. *Plant Biotechnol J*, 2020, 18: 513–525.
- [18] 吴转娣, 刘新龙, 刘家勇, 咎逢刚, 李旭娟, 刘洪博, 林秀琴, 陈学宽, 苏火生, 赵培方, 吴才文. 甘蔗独脚金内酯生物合成关键基因 *ScD27* 的克隆与表达分析. *作物学报*, 2017, 43: 31–41.
Wu Z D, Liu X L, Liu J Y, Zan F G, Li X J, Liu H B, Lin X Q, Chen X K, Su H S, Zhao P F, Wu C W. Cloning and expression analysis of key gene *ScD27* in strigolactones biosynthesis pathway. *Acta Agron Sin*, 2017, 43: 31–41 (in Chinese with English abstract).
- [19] Zhang J, Zhang X, Tang H, Zhang Q, Hua X, Ma X, Zhu F, Jones T, Zhu X, Bowers J, Wai C M, Zheng C, Shi Y, Chen S, Xu X, Yue J, Nelson D R, Huang L, Li Z, Xu H, Zhou D, Wang Y, Hu W,

- Lin J, Deng Y, Pandey N, Mancini M, Zerpa D, Nguyen J K, Wang L, Yu L, Xin Y, Ge L, Arro J, Han J O, Chakrabarty S, Pushko M, Zhang W, Ma Y, Ma P, Lv M, Chen F, Zheng G, Xu J, Yang Z, Deng F, Chen X, Liao Z, Zhang X, Lin Z, Lin H, Yan H, Kuang Z, Zhong W, Liang P, Wang G, Yuan Y, Shi J, Hou J, Lin J, Jin J, Cao P, Shen Q, Jiang Q, Zhou P, Ma Y, Zhang X, Xu R, Liu J, Zhou Y, Jia H, Ma Q, Qi R, Zhang Z, Fang J, Fang H, Song J, Wang M, Dong G, Wang G, Chen Z, Ma T, Liu H, Dhungana S R, Huss S E, Yang X, Sharma A, Trujillo J H, Martinez M C, Hudson M, Riascos J J, Schuler M, Chen L Q, Braun D M, Li L, Yu Q, Wang J, Wang K, Schatz M C, Heckerman D, Van Sluys M-A, Souza G M, Moore P H, Sankoff D, VanBuren R, Paterson A H, Nagai C, Ming R. Allele-defined genome of the autopolyploid sugarcane *Saccharum spontaneum* L. *Nat Genet*, 2018, 50: 1565–1573.
- [20] Chen C, Chen H, Zhang Y, Thomas H R, Frank M H, He Y, Xia R. Tbttools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Mol Plant*, 2020, 13: 1194–1202.
- [21] Ling H, Wu Q, Guo J, Xu L, Que Y. Comprehensive selection of reference genes for gene expression normalization in sugarcane by real time quantitative RT-PCR. *PLoS One*, 2014, 9: e97469.
- [22] Que Y, Su Y, Guo J, Wu Q, Xu L. A global view of transcriptome dynamics during *Sporisorium scitamineum* challenge in sugarcane by RNA-Seq. *PLoS One*, 2014, 9: e106476.
- [23] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) method. *Methods*, 2001, 25: 402–408.
- [24] Su L, Shan J X, Gao J P, Lin H X. *OsHAL3*, a blue light-responsive protein, interacts with the floral regulator Hd1 to activate flowering in rice. *Mol Plant*, 2016, 9: 233–244.
- [25] Wang J, Cai Y, Miao Y, Lam S K, Jiang L. Wortmannin induces homotypic fusion of plant prevacuolar compartments. *J Exp Bot*, 2009, 60: 3075–3083.
- [26] Wei T, Zhang C, Hong J, Xiong R, Kasschau K D, Zhou X, Carrington J C, Wang A. Formation of complexes at plasmodesmata for potyvirus intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO. *PLoS Pathog*, 2010, 6: e1000962.
- [27] Emans N, Zimmermann S, Fischer R. Uptake of a fluorescent marker in plant cells is sensitive to brefeldin A and wortmannin. *Plant Cell*, 2002, 14: 71–86.
- [28] Marek M. Strigolactones as part of the plant defence system. *Trends Plant Sci*, 2016, 21: 900–903.
- [29] Torres-Vera R, García J M, Pozo M J, López-Ráez J A. Do strigolactones contribute to plant defence? *Mol Plant Pathol*, 2014, 15: 211–216.
- [30] Piisilä M, Keceli M A, Brader G, Jakobson L, Jõesaar I, Sipari N, Kollist H, Palva E T, Kariola T. The F-box protein MAX2 contributes to resistance to bacterial phytopathogens in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol*, 2015, 15: 53.
- [31] Stes E, Depuydt S, De Keyser A, Matthys C, Audenaert K, Yoneyama K, Werbrouck S, Goormachtig S, Vereecke D. Strigolactones as an auxiliary hormonal defence mechanism against leafy gall syndrome in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot*, 2015, 66: 5123–5134.
- [32] Kunkel B N, Brooks D M. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr Opin Plant Biol*, 2002, 5: 325–331.
- [33] Asselbergh B, De Vleeschauwer D, Hofte M. Global switches and fine-tuning—ABA modulates plant pathogen defense. *Mol Plant Microbe Interact*, 2008, 21: 709–719.
- [34] Xia X J, Zhou Y H, Shi K, Zhou J, Foyer C H, Yu J Q. Interplay between reactive oxygen species and hormones in the control of plant development and stress tolerance. *J Exp Bot*, 2015, 66: 2839–2856.
- [35] Abuauf H, Haider I, Jia K P, Ablazov A, Mi J, Blilou I, Al-Babili S. The *Arabidopsis* DWARF27 gene encodes an all-trans-9-cis- β -carotene isomerase and is induced by auxin, abscisic acid and phosphate deficiency. *Plant Sci*, 2018, 277: 33–42.
- [36] Bonneau L, Huguet S, Wipf D, Pauly N, Truong H N. Combined phosphate and nitrogen limitation generates a nutrient stress transcriptome favorable for arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Medicago truncatula*. *New Phytol*, 2013, 199: 188–202.
- [37] Haider I, Andreo-Jimenez B, Bruno M, Bimbo A, Floková K, Abuauf H, Ntui V O, Guo X, Charnikhova T, Al-Babili S, Bouwmeester H J, Ruyter-Spira C. The interaction of strigolactones with abscisic acid during the drought response in rice. *J Exp Bot*, 2018, 69: 2403–2414.
- [38] Davidi L, Pick U. Novel 9-cis/all-trans β -carotene isomerases from plastidic oil bodies in *Dunaliella bardawil* catalyze the conversion of all-trans to 9-cis β -carotene. *Plant Cell Rep*, 2017, 36: 807–814.
- [39] van Zeijl A, Liu W, Xiao T T, Kohlen W, Yang W C, Bisseling T, Geurts R. The strigolactone biosynthesis gene DWARF27 is co-opted in rhizobium symbiosis. *BMC Plant Biol*, 2015, 15: 260.
- [40] Cooper J W, Hu Y, Beyyoudh L, Dasgan H Y, Kunert K, Beveridge C A, Foyer C H. Strigolactones positively regulate chilling tolerance in pea and in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ*, 2018, 41: 1298–1310.
- [41] Toh S, McCourt P, Tsuchiya Y. *HY5* is involved in strigolactone-dependent seed germination in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav*, 2012, 7: 556–558.
- [42] Wu H, Li H, Chen H, Qi Q, Ding Q, Xue J, Ding J, Jiang X, Hou X, Li Y. Identification and expression analysis of strigolactone biosynthetic and signaling genes reveal strigolactones are involved in fruit development of the woodland strawberry (*Fragaria vesca*). *BMC Plant Biol*, 2019, 19: 73.