

梨BAHD家族基因的鉴定 及石细胞分化相关成员的筛选

库尔班·吐松¹, 艾沙江·买买提^{1*}, 巴音克西克²

¹新疆农业科学院园艺作物研究所·新疆园艺作物基因组与遗传改良重点实验室, 乌鲁木齐 830091;

²新疆巴音郭楞蒙古自治州科技开发交流中心, 新疆库尔勒 841000

摘要:【目的】在全基因组水平鉴定梨酰基辅酶A依赖型酰基转移酶(BAHD)家族基因,系统分析其在果实发育过程中的生物学功能,并筛选出与梨果实石细胞分化相关的BAHD家族成员。【方法】以Pfam转移酶家族蛋白质结构模型(PF02458)和模式植物HCT基因为参考,通过BAHD家族的保守基序HXXXD和DFGWG来鉴定梨BAHD家族基因,并结合梨果实不同发育时期和粗皮果转录组数据初步筛选BAHD家族中与石细胞分化相关的成员。【结果】从梨(*Pyrus bretschneideri* ‘Dangshansu’)基因组中共筛选得到了92个转移酶基因,其中的81个基因含有BAHD家族保守基序。这81个基因不均匀地分布在梨的15条染色体上,其中14个基因在基因组上有串联关系,15个基因有共线性关系。通过分析梨果实石细胞分化关键时期与粗皮果转录表达谱发现,19个BAHD家族基因在库尔勒香梨果实中表达丰度较高,且在石细胞分化时期及粗皮果中差异性表达,分别为木质素(4个基因)、香豆素(1个基因)、表皮蜡(1个基因)、木栓质(6个基因)和叶绿性挥发物(2个基因)合成酶相关基因,及油菜素内酯(3个基因)和黄酮类(1个基因)修饰相关酶编码基因以及1个功能未知基因。【结论】部分BAHD家族成员在库尔勒香梨果实发育过程中可能参与木质素、香豆素、表皮蜡及木栓质的生物合成,同时还参与黄酮类及挥发性物质的修饰过程。

关键词: 梨;果实;石细胞;基因组;转录组;BAHD家族

中图分类号: S661.2

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2021)12-2021-13

Identification of pear BAHD superfamily genes and screening of stone cell differentiation related members

Kuerban·Tusong¹, Aisajan·Mamat^{1*}, Bayinkexike²

¹Institute of Horticultural Crops, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Horticultural Crop Genome and Genetic Improvement in Xinjiang, Urumqi 830091, Xinjiang, China; ²Science and Technology Development Exchange Center of Xinjiang Bayingol Mongolian Autonomous Prefecture, Korla 841000, Xinjiang, China

Abstract: 【Objective】Kuerlexiangli pear (*Pyrus sinkiangensis* Yü) is a native species of Xinjiang Autonomous Region, northwest China. The fruit is known for its unique aroma, juicy flesh and crisp texture. The formation of rough-skin has been affecting external and internal quality of Kuerlexiangli pear fruits, and becoming more common in recent years. With regular fruits, the stone cells are unperceivable. The rough-skin, also called “hard-end”, is a physiological disorder, in which mild symptoms can be observed only at the calyx end of pear fruits. But in severe cases, most of the fruit surface can be covered with rough-skin. The increased stone cell content is one of the main factors that cause the formation of rough-skinned fruits at later stage of fruit development. However, the molecular mechanisms of differentiation of stone cells and formation of rough-skin on pear fruits are still not fully understood. The BAHD superfamily genes participate in many biological processes through the modification of metabolites during plant metabolism, including lignin biosynthesis. The lignin is one the main components of stone cells which commonly present in fruits of all *Pyrus* species. Therefore, the aim of this study is

收稿日期: 2021-04-25

接受日期: 2021-08-05

基金项目: 国家自然科学基金(31760565); 新疆维吾尔自治区公益性科研院所基本科研业务经费资助项目(KY2020113)

作者简介: 库尔班·吐松, 男, 博士, 主要从事生物信息学研究。Tel: 13565940147, E-mail: kurban910@163.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 13659959134, E-mail: 103326533@qq.com

to systemically investigate BAHD superfamily genes on pear genome, and thoroughly analyze their expression profiles at key stages of stone cell differentiation during pear fruit development and in rough-skinned phenotype, so as to obtain the potential BAHD members that are related to the stone cell differentiation in pear fruits. **【Methods】**The pfam structural model of transferase family proteins (PF02458) and *HCT* genes from model plants were used as references to identify the BAHD family genes in the pear genome. Based on conserved domains of this superfamily (HXXXD and DFGWG), the BAHD members were reconfirmed. Then the transcriptome analysis were performed on the fruit samples that were collected at three developmental stages (20, 50 and 80 days after flowering, DAF), representing initial, late and stationary stage of stone cell differentiation, respectively, and on rough-skinned and normal fruits at mature stage to identify the members of BAHD superfamily genes that may participate in the process of the stone cell differentiation in Kuerlexiangli pear fruits. **【Results】**A total of 92 transferase family genes were identified on the genome of *Pyrus bretschneideri* ‘Dangshansu’, among which the 81 genes contained the typical conserved motifs of BAHD superfamily. These genes were unevenly distributed on the 15 chromosomes of *P. bretschneideri*. The duplication analysis showed that among the pear BAHD superfamily genes, 14 of which were located in tandem on same chromosomes, and 15 of which had collinearity on the pear genome. The transcriptome analysis showed that 19 BAHD superfamily genes were expressed in Kuerlexiangli pear fruits with higher abundance, and they were also differentially expressed at key stages of stone cell differentiation in Kuerlexiangli pear fruits. Among of them, four lignin synthetic genes (*LOC103945380*, *LOC103964288*, *LOC103955861* and *LOC103945376*) were up-regulated at critical period of stone cell differentiation, and two of them (*LOC103955861* and *LOC103945376*) were also up-regulated in rough-skinned fruits at mature stage; one gene (*LOC103944254*) related to the coumarin biosynthesis was up-regulated at the initial stage of stone cell differentiation and in rough-skinned fruits; one gene (*LOC103954416*) encoded the enzyme that participated in the synthesis of long chain fatty acids of cuticular wax, which was up-regulated in samples from 20 DAF and rough-skinned fruits; six genes (*LOC103949999*, *LOC103944336*, *LOC103949890*, *LOC103951983*, *LOC103951985* and *LOC103938506*) encoded suberin synthetic enzymes, all of them were up-regulated at least one critical stage of stone cell differentiation during fruit development, and two of them (*LOC103951983* and *LOC103951985*) were up-regulated in rough-skinned fruits; two genes (*LOC103955585* and *LOC103963251*) encoded the enzymes that related to the synthesis of green leaf volatile (GLV), and both of them were up-regulated during the fruit development and in rough-skinned phenotype; other four genes (*LOC103961715*, *LOC103963031*, *LOC103958630* and *LOC103945860*) encoded the modifying enzymes of brassinolide and flavonoids. **【Conclusion】**The differentially expressed members of BAHD superfamily genes with higher abundance in Kuerlexiangli pear fruits not only participated in the process of synthesizing lignin, coumarin, cuticular wax and suberin to promote the differentiation of stone cells and the formation of rough-skin, but also encoded the modifying enzymes of flavonoids and volatile compounds. Lignin, coumarin, cuticular wax and suberin are the main components of secondary cell walls and epicarp of pear fruits. The flavonoids and volatiles are crucial for the regulation or maintaining the proper amount of reactive oxygen species (ROS) in pear fruits that are necessary for the oxidative linkage of cell wall monomers during the secondary thickening of cell walls of parenchyma cells to form the stone cells and rough-skin. In sum, the results of this study illustrate that some BAHD superfamily candidates participate in the formation of stone cells in pear fruits, which to some extent enlightens the fact that the formation of rough-skin is induced by abiotic stresses.

Key words: Pear; Fruit; Stone cell; Genome; Transcriptome; BAHD family

植物BAHD酰基转移酶家族是分别由在加州野花(*Clarkia breweri*)^[1-2]、三花龙胆(*Gentiana triflora*)^[3-4]、康乃馨(*Dianthus caryophyllus*)^[5]和长春花(*Catharanthus roseus*)^[1,6]中发现的4种酰基转移酶的首写字母命名,具有HXXXD和DFGWG这2种共同保守基序(motif)^[7]。HXXXD基序位于转移酶的催化中心,参与催化反应。DFGWG基序离酶活性中心比较远,但是在酶的催化功能中是必备的^[8]。其中苯甲醇O-乙酰基转移酶(benzylalcohol O-acetyltransferase, BEAT)催化产生挥发性乙酸苜酯^[1-2],花青素O-羟基肉桂酰基转移酶(anthocyanin O-hydroxycinnamoyltransferase, AHCT)催化花青素的合成^[3-4],N-羟基肉桂酰邻氨基苯甲酰基转移酶(anthraniolate N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase, HCBT)催化植物抗毒素葱酰胺的合成^[5],脱乙酰文多灵-4-O-乙酰基转移酶(dwacetylindoline-4-O-acetyltransferase, DAT)与生物碱(文多灵)的合成有关^[1,6]。此外,BAHD家族成员莽草酸羟基肉桂酰基转移酶(hydroxycinnamoyl transferase, HCT)参与木质素的合成^[9-10]。在苯丙氨酸途径,羟基肉桂酸被转化为相应的硫酸酯后,HCT将其作为底物进入木质素合成特意途径,最终生成木质素,在植物木质素合成过程中起着重要作用。*HCT*基因的下调或沉默导致植株严重矮化,并积累大量的黄酮类物质^[10-11]。

库尔勒香梨(*Pyrus sinkiangensis* Yü),蔷薇科梨属新疆梨系统,是新疆的特色果树之一。其果实具有香气独特、多汁及质地酥脆等特点。近年来,粗皮果的形成是库尔勒香梨果实整体品质下降的重要原因之一。香梨粗皮果的果面凹凸不平,呈橘皮状,比较粗糙,是一种生理疾病,发病率通常在20%以上,

轻者症状只发生在萼端,重者可遍及大部分果面。石细胞的增多是粗皮果形成的主要原因^[12]。梨果实石细胞由薄壁细胞的细胞壁次生加厚形成^[13-15],主要由纤维素、半纤维素和木质素等成分组成^[16-17]。为了系统研究BAHD家族基因在梨果实发育及石细胞分化过程中的生物学功能,笔者在本研究中以转移酶结构模型及模式植物*HCT*基因序列为参考,在全基因组水平鉴定梨BAHD家族基因,并对其进行基因结构、染色体定位和共线性分析,最终结合库尔勒香梨果实发育不同阶段及粗皮果样本转录组数据,分析得到果实发育及石细胞分化相关的BAHD家族基因。研究对于了解BAHD家族基因在果实发育过程中的生物学功能、筛选石细胞形成过程中的关键基因以及调控库尔勒香梨果实的石细胞含量具有重要的意义。

1 材料和方法

1.1 材料

试验材料采自库尔勒市阿瓦提乡哈拉亚尕奇村20年生香梨树(*P. sinkiangensis* Yü),分别采集花后20、50和80 d果实,石细胞分化旺盛期及后期(20和50 d)每个重复取大小均匀的15个果实,石细胞分化结束期(80 d)作为对照,每个重复取大小均匀的10个果实,取果皮下面2 mm的果肉,放入磨样机(IKA A11,德国)用液氮研磨成粉末状,存于-80 °C冰箱中备用。另外,成熟期(9月10日)取30个正常果(对照组)和30个粗皮果(处理组),果肉和果皮分开,立即使用液氮进行冷冻,保存在-80 °C的冰箱中,以便后续试验使用。所有试验材料均含3个生物学重复(图1)。



A 和 B 分别代表果实成熟期的正常果和粗皮果。

A and B represent the regular and rough-skinned fruits at mature stage, respectively.

图1 库尔勒香梨果实

Fig. 1 Fruits of Kuerlexiangli pear

1.2 方法

1.2.1 梨BAHD家族基因的筛选 从蔷薇科基因组数据库(<https://www.rosaceae.org>)下载梨(*Pyrus bretschneideri*)基因组相关数据。分别下载拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和烟草(*Nicotiana tabacum*)HCT基因AT5G48930和Q8GSM7。Pfam数据库(<http://pfam.xfam.org>)中下载转移酶家族蛋白质结构HHM模型(PF02458),利用HMMER3软件(3.3版本)对梨基因组数据进行结构域扫描。将拟南芥和烟草HCT基因序列与梨基因组数据进行比对,将同时包含转移酶蛋白家族结构域($E\text{-value}<1e^{-10}$)并比对到模式植物HCT基因($E\text{-value}<1e^{-10}$)的序列鉴定为梨BAHD家族基因。

1.2.2 系统发育树构建、基因结构与motif分析 利用MUSCLE软件(3.8.31版本)对梨BAHD家族全长氨基酸序列进行多序列比对,利用Web Logo软件(<https://weblogo.berkeley.edu>)计算家族结构域保区对应位置氨基酸残基的分布。利用分子进化遗传分析软件(molecular evolutionary genetics analysis, MEGAX)建立BAHD家族基因的无根NJ(neighbor-joining)系统发育树。在建树过程中进行1000次重复的Bootstrap分析。通过基因组注释信息调取梨BAHD家族基因结构,并利用基因结构显示服务器(gene structure display server, GSDS)进行可视化分析。利用MEME软件(<https://meme-suite.org/meme>)识别BAHD家族氨基酸序列的motif,参数设为最多识别motif数为20,宽度为6到200个氨基酸,其他因素均设为默认。

1.2.3 染色体定位及共线性分析 利用BLAST软件(2.9.0+版本)在梨基因组中搜索BAHD家族的同源性序列($E\text{-value}<1e^{-5}$)。分析结果作为输入文件,利用MCScanX软件分析共线性链。利用Circos软件(0.69-6版本)对该家族基因染色体定位,同时进行共线性关系的可视化分析。

1.2.4 BAHD家族基因的差异表达分析 为了分析BAHD家族在不同发育阶段库尔勒香梨正常果实和粗皮果中的表达规律,分别收集库尔勒香梨果实发育不同时期样本,成熟期正常果和粗皮果的果皮与果肉样本转录组(RNA-seq)数据(NCBI数据库SRA登录号:PRJNA588520和PRJNA628874)^[12, 18]。测序数据(raw reads)以fastq格式存储。通过质量控制,利用hisat2软件(2.0.5版本)有效读序(clean

reads)比对梨参考基因组。基于计算每百万reads中来自于某外显子每千碱基长度的片段数(fragments per kilobase of exon model per million reads mapped, FPKM)来校准和计算各基因在不同样本中的表达丰度。利用DESeq软件进行RNA-seq差异表达分析,利用Gplots软件(3.3.1版本)的heatmap.2函数对差异表达BAHD家族基因在不同发育期和成熟期粗皮果中的表达模式进行可视化分析。

1.2.5 BAHD家族基因顺式作用元件分析 利用TBtools软件(1.068版本)从梨基因组获取BAHD家族基因编码区(CDS)上游2000 bp序列。利用PlantCARE软件(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html>)分析上游区顺式作用元件。

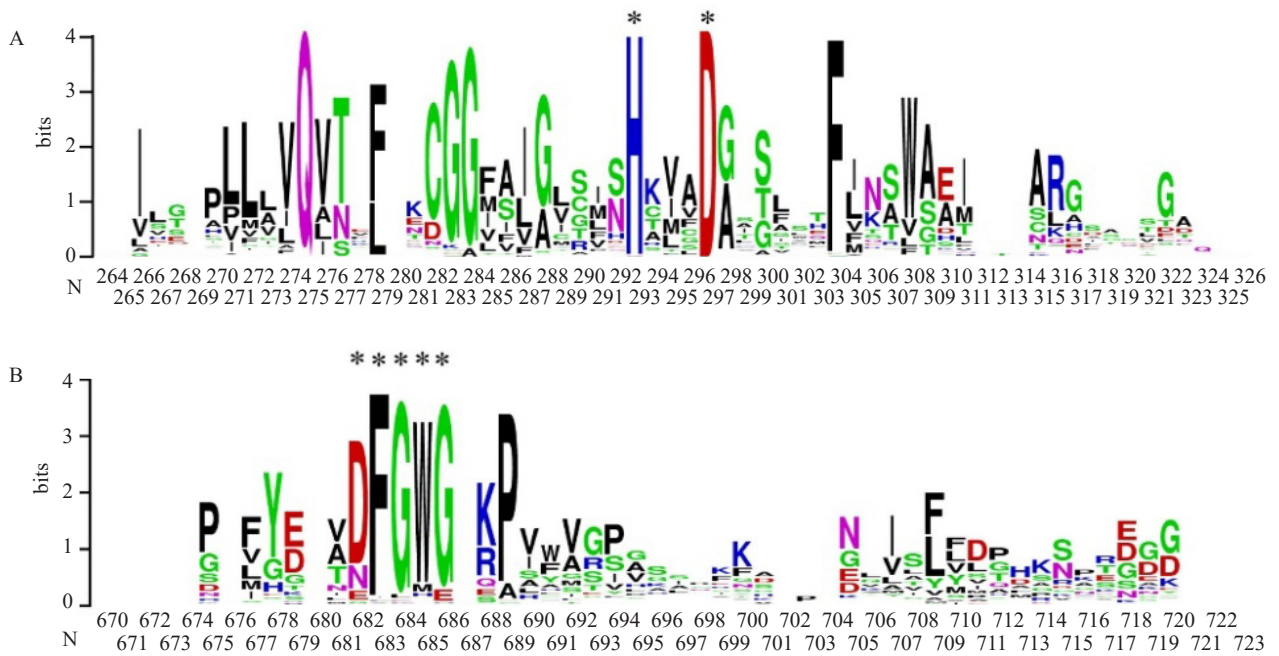
2 结果与分析

2.1 全基因组水平筛选梨BAHD家族基因

为了鉴定梨BAHD家族基因,首先利用转移酶家族隐马尔可夫模型(hidden markov model, HMM)对梨基因组进行搜索得到92个基因。接着,将这92个基因与拟南芥和烟草的HCT基因进行BLAST比对发现,有81个基因与模式物种HCT基因具有较高的同源性。最后,利用BASALT软件(<http://www.proteinguru.com>)对所筛选的81个梨BAHD家族基因进行HXXXD基序搜索,发现上述81个基因均含此基序。通过Web Logo软件进行可视化分析,发现大部分基因同时包含高度保守的DFGWG基序(图2)。

2.2 梨BAHD家族基因结构与保守基序

利用MUSCLE软件,对分析得到的81个梨BAHD家族基因与模式植物HCT基因(AT5G48930和Q8GSM7)进行多序列比对,并建立系统发育树,进行基因结构及保守基序分析(图3)。结果显示,梨BAHD家族基因分别聚类到进化树的8个分支(图3-A),其中分支I包括30个基因。除基因LOC103929111和LOC103944272之外,其余28个基因无内含子结构并具有相同保守基序的类似排列顺序(图3-B~C),说明这些基因的亲缘关系较近^[19]。分支II包括11个基因,其中6个基因含1个内含子结构,分支成员保守基序有一定的差异。分支III包括3个基因,其中2个具有1个内含子结构,同时有同样基序的相同排列方式。分支IV包括2个基因,包含2个内含子及排列顺序相同的基序。分支V包



A 和 B 分别代表在梨 BAHD 家族多序列比对 776 个氨基酸位点中间区域及 C-末端的保守 HXXXD 和 DFGWG 基序。

A and B represent HXXXD and DFGWG motif at the central and the C terminal region of 776 compared amino acid residual position of BAHD superfamily in pear genome.

图 2 梨 BAHD 家族基因 HXXXD 和 DFGWG 保守基序

Fig. 2 HXXXD and DFGWG conserved motifs of pear BAHD superfamily

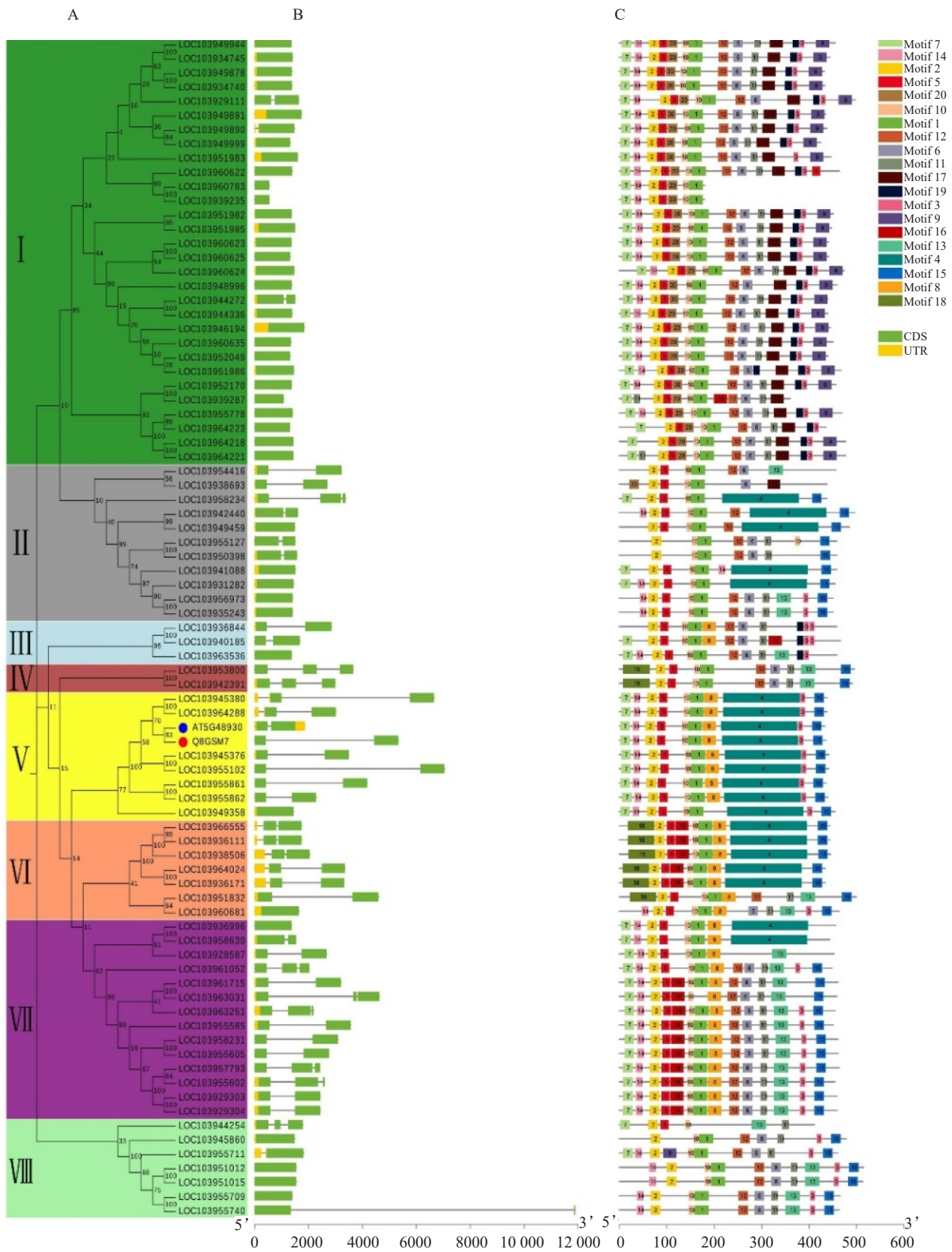
括 9 个基因,其中 8 个基因(除基因 *LOC103949358*)具有 1 个内含子结构及相同排列的共同基序。值得关注的是,该分支上的基因 *LOC103945380* 和 *LOC103964288* 与拟南芥和烟草 *HCT* 基因的亲缘关系最近,BLAST 结果表明其蛋白质序列一致性(identity)在 80% 以上。分支 VI 包含 7 个基因,其中 6 个基因(除 *LOC103960681*)包含 1 个内含子结构及排列顺序相同的共同保守基序。分支 VII 包含 14 个基因,其中 13 个基因具有 1 个或 2 个内含子结构,大部分基因具有排列顺序相似的共同基序结构。类似于分支 I,分支 VIII 中大部分基因(除基因 *LOC103944254*)无内含子结构,但是 2 个分支成员保守基序有一定的差异。

2.3 梨 BAHD 家族基因的染色体定位及共线性

梨基因组注释信息表明,6 个 BAHD 家族基因(*LOC103929303*、*LOC103929304*、*LOC103935243*、*LOC103939235*、*LOC103941436* 和 *LOC103942391*)尚未定位到对应的染色体上,其他基因分别在 15 条染色体上不均匀分布,8 号和 13 号染色体上无 BAHD 家族基因的分布(图 4)。基因组上基因的复制导致基因家族的产生,这是真核生物基因组进化

的特征之一^[20]。串联基因一般由染色体重组产生,在同一个染色体上形成相邻旁系同源基因^[21]。研究表明,梨 BAHD 家族中 14 个基因有串联关系(tandem duplication)。其中,*LOC103951983* 和 *LOC103951982* 基因串联在 5 号染色体上;*LOC103960623*、*LOC103960624*、*LOC103960625* 和 *LOC103960635* 基因串联在 10 号染色体上;*LOC103950398* 和 *LOC103955127* 基因串联在 15 号染色体上;*LOC103949891*、*LOC103949890*、*LOC103949944* 和 *LOC103949878* 基因串联在 16 号染色体上;*LOC103929303* 和 *LOC103929304* 基因串联在未组装成染色体的 scaffold 上(图 4)。

此外,15 个 BAHD 家族基因间在基因组上有共线性关系(collinearity)。1 号染色体上的 *LOC103936996* 基因与 7 号染色体上的 *LOC103958630* 基因之间有共线性关系;6 号染色体上的 *LOC103964024* 基因与同一条染色体上的 *LOC103936171* 基因有共线性关系;9 号染色体上的 *LOC103955711* 和 *LOC103955740* 基因有共线性关系;12 号染色体上的 *LOC103949459* 基因与 7 号染色体上的 *LOC103942440* 基因有共线性关系;15 号

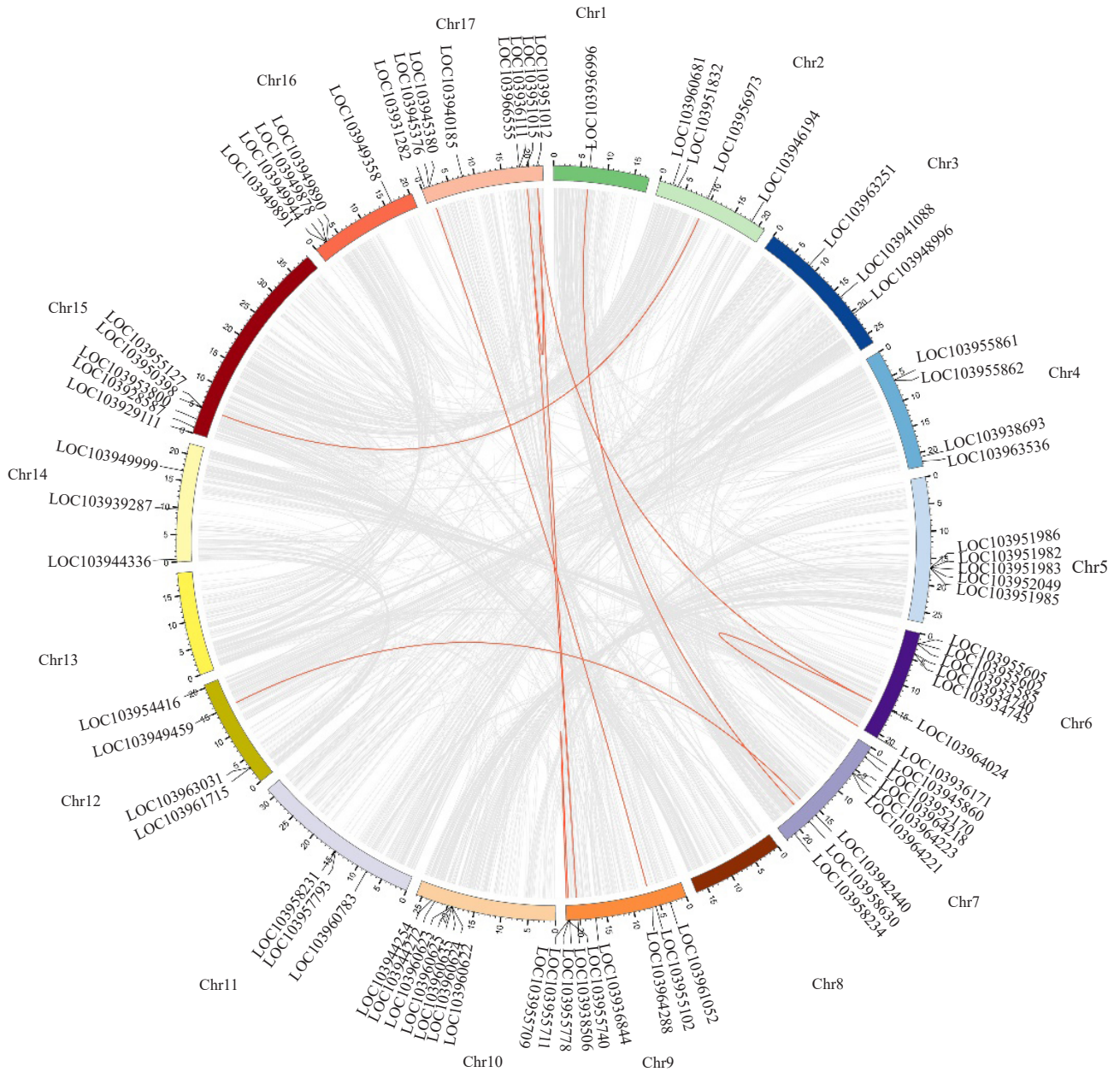


A、B 和 C 分别为梨 BAHD 家族基因的系统发育树、基因结构及氨基酸序列基序。

A, B and C represents a phylogenetic tree, gene structures and conserved motifs of BAHD superfamily genes in pear.

图 3 梨 BAHD 家族基因分析

Fig. 3 Analytical view of the pear BAHD superfamily genes



蓝色基因 id 为同一条染色体上的串联基因, 红色线条表示 BAHD 家族基因之间的共线性关系, 灰色线条表示基因组中的共线性关系。

The gene id in blue color represents the tandem genes on the same chromosome, the red line represents the collinearity between the genes of BAHD transferase superfamily, and the gray line represents the collinearity between genes on whole genome.

图 4 梨 BAHD 家族基因的染色体定位及其共线性关系

Fig. 4 Chromosome localization and collinearity of BAHD transferase superfamily genes in pear

染色体上的 *LOC103950398* 基因与 2 号染色体上的 *LOC103956973* 基因有共线性关系; 17 号染色体上的 *LOC103936111* 和 *LOC103966555* 基因分别与同一条染色体和 6 号染色体上的 *LOC103966555* 和 *LOC103964024* 基因有共线性关系。值得关注的是, 17 号染色体上的另外 3 个基因 (*LOC103945376*、*LOC103966555* 和 *LOC103936111*) 与其同源染色体 (9 号染色体) 上的 *LOC103964288*、*LOC103938506*

和 *LOC103938506* 基因有共线性关系 (图 4)。

2.4 BAHD 家族基因在库尔勒香梨果实中的差异性表达

本文收集了分别处于石细胞分化旺盛期、后期以及结束期的库尔勒香梨果实的 RNA-seq 数据^[18]。由于成熟期粗皮果的产生与石细胞的分化密切相关, 因此也收集了果实成熟期 (120 d) 粗皮果和正常果的转录组数据^[12]。RNA-seq 分析结果表明, 在果

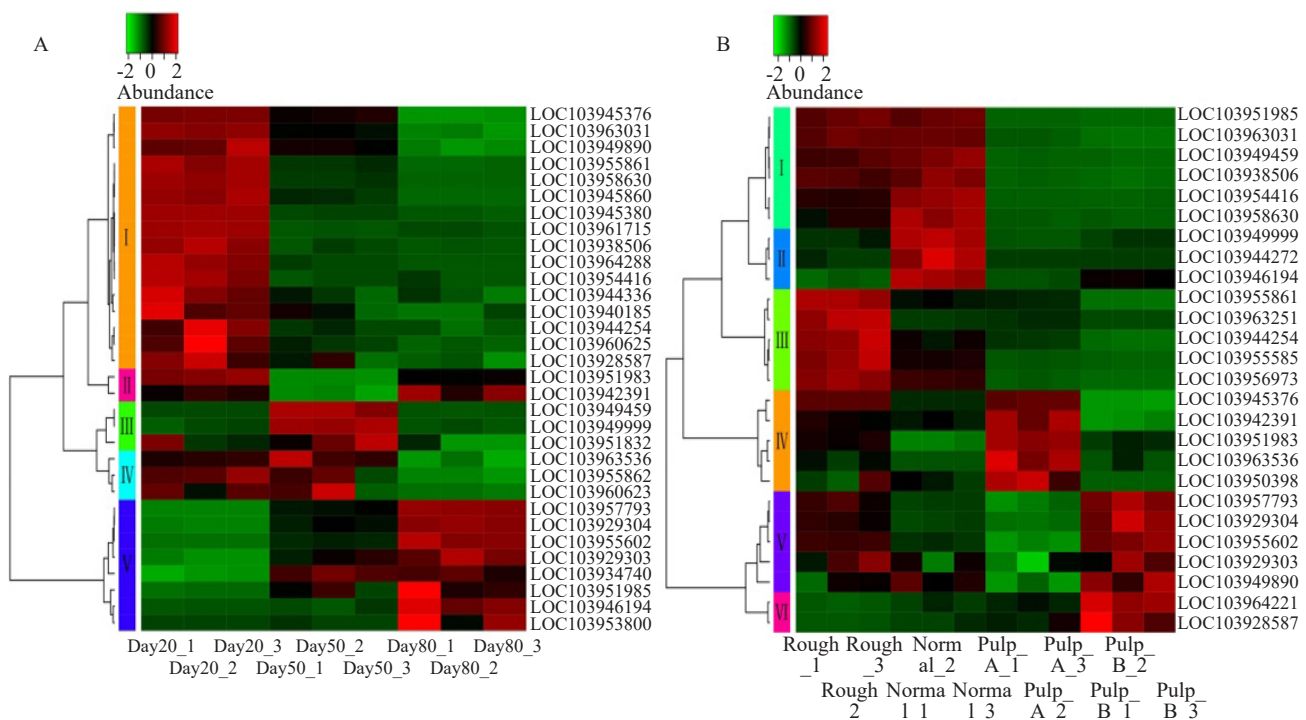
实发育不同时期有32个BAHD家族成员具有差异性表达(图5-A),26个BAHD家族成员在粗皮果中差异性表达(图5-B)。

石细胞分化不同时期差异性表达BAHD家族基因的表达模式可分为5类(图5-A)。第I类含有16个基因,在石细胞分化旺盛期在梨果实中上调表达,其中 *LOC103945860*、*LOC103944336*、*LOC103961715*、*LOC103963031*、*LOC103949890*、*LOC103958630*、*LOC103938506*、*LOC103954416*、*LOC103944254*、*LOC103945380*、*LOC103964288*、*LOC103955861* 和 *LOC103945376* 基因有较高的表达丰度。第II类含有2个基因,在石细胞分化后期下调表达。第III类含有3个基因,在果实发育后期上调表达,其中 *LOC103949999* 和 *LOC103949459* 的表达丰度较高。IV类含有3个基因,在石细胞分化旺盛期及后期上调表达。第V类含8个基因,在石细胞分化旺盛期显著下调表达。

BAHD家族成员在香梨粗皮果果皮和果肉样本中的表达模式可分为6种(图5-B)。第I类含有6个基因,主要在粗皮果果皮中具有较高的表达量,其中 *LOC103938506* 和 *LOC103954416* 基因同时在粗皮果果肉及石细胞分化旺盛期也有显著上调。第II类含有3个基因,它们在粗皮果果皮中下调表达。第III类含有5个基因,在粗皮果果皮和果肉中均显著上调表达,其中 *LOC103944254* 和 *LOC103955861* 基因在石细胞分化旺盛期也显著上调表达。第IV类含5个基因,主要在粗皮果果肉中有较高的表达量,其中 *LOC103945376* 基因在石细胞分化过程也是上调表达。第V类和第VI类分别包含5个和2个基因,其中第V类在粗皮果果肉中下调表达,第VI类基因在粗皮果果皮和果肉中均为下调表达。

2.5 库尔勒香梨差异性表达BAHD家族基因的功能预测

梨果实石细胞分化旺盛期,后期以及粗皮果中



A 显示梨果实发育不同时期的差异性表达 BAHD 家族基因,Day20、Day50 和 Day80 分别代表果实花后发育天数(20,50 和 80 d)。B 显示成熟期粗皮果和正常果果皮和果肉中的差异表达 BAHD 家族基因,Rough 和 Normal 分别代表粗皮果和正常果的果皮,Pulp_A 和 Pulp_B 分别代表粗皮果和正常果的果肉。

Fig. A shows the differentially expressed BAHD family genes at different stages of pear fruit development, Day20, Day50 and Day80 represent the 20, 50 and 80 days after flowering respectively. Fig. B shows the differential expressed BAHD family genes in pulps and peels of the rough-skinned and normal fruit at mature stage. Rough and Normal represent the peels of rough and regular pear fruits respectively, Pulp_A and Pulp_B represent the flesh of rough and regular fruits respectively.

图5 梨 BAHD 家族基因在果实发育不同时期和粗皮果中的差异性表达

Fig. 5 Differential expression of BAHD transferase superfamily at different stages of fruit development and in rough-skinned fruits of pear

共有 39 个 BAHD 家族基因差异性表达,其中 19 个基因具有较高的表达丰度(每组中至少在 1 个样本的 *FPKM* 值 > 1)。为了进一步讨论上述基因在石细胞分化及粗皮果形成过程中的生物学功能,首先将这 19 个基因与拟南芥 BAHD 家族基因进行比对。结果表明,这 19 个梨基因分别比对到 10 个拟南芥 BAHD 家族基因 (*AT1G03940*, *AT1G28680*, *AT2G40230*, *AT3G03480*, *AT3G26040*, *AT4G24510*, *AT5G01210*, *AT5G17540*, *AT5G41040* 和 *AT5G48930*) 中^[22](表 1)。在此基础上,构建这 19 个基因与植物 BAHD 家族 5 大类酰基转移酶系统发育树(图 6)。其中,1 个基因(*LOC103945860*)聚类为 BAHD 家族的第 I 类,2 个基因(*LOC103949459* 和 *LOC103954416*)聚类为第 II 类,5 个基因(*LOC103949999*, *LOC103949890*, *LOC103951983*, *LOC103944336* 和 *LOC103951985*)聚类为第 III 类,4 个基因(*LOC103963031*, *LOC103961715*, *LOC103955585* 和 *LOC103963251*)聚类为第 V - i 类,7 个基因(*LOC103944254*, *LOC103958630*, *LOC103938506*, *LOC103955861*, *LOC103945376*,

LOC103945380 和 *LOC103964288*) 聚类为第 V - iii 类。植物 BAHD 家族中,每一类酰基转移酶催化不同类型的生物学反应。第 I 类酰基转移酶参与花青素的修饰,第 II 类参与植物表皮蜡脂肪酸长链的合成,第 III 类 BAHD 成员在乙酰辅酶 A 的辅助下以醇类为底物转移酰基,第 IV 类参与类酰胺的合成,第 V - i 类参与挥发性物质的合成,第 V - ii 类参与紫杉醇的合成,第 V - iii 类参与羟基肉桂酰奎宁酸/莽草酸酯的合成^[1]。

2.6 梨 BAHD 家族差异表达基因的顺式作用元件

以拟南芥和心叶烟(*Nicotiana glutinosa*)顺式作用元件为参考,对 19 个差异性表达梨 BAHD 家族基因上游 2000 bp 区进行分析,共发现 2504 个顺式作用元件,主要属于 12 种顺式作用元件(图 7)。其中,启动子与增强子区普通元件 CAAT-box 和核心启动子元件 TATA-box 的数量最多,分别占总元件位点的 39.86% 和 34.04%。剩余还包括 MYB 结合位点(10.06%)、脱落酸反应顺式作用元件 ABRE(3.86%)、激活元件 As-1(3.46%)、胁迫响应元件 STRE(2.75%)、光响应元件 G-box(1.69%)、创伤响应元

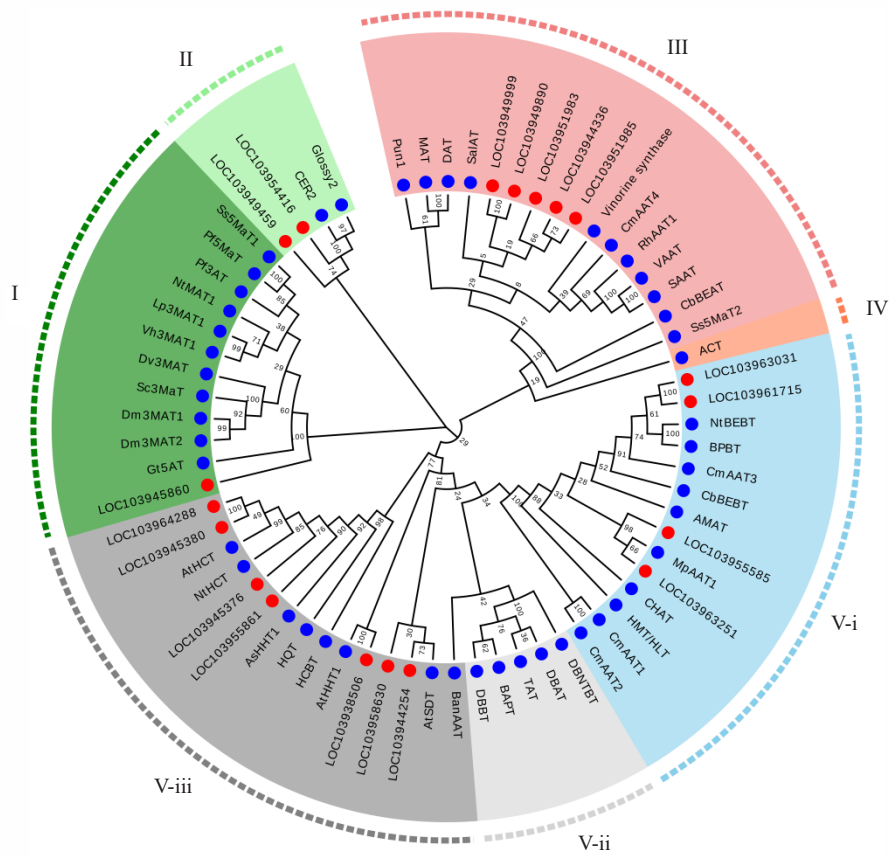
表 1 梨石细胞分化关键时期和粗皮果中上调表达的(LogFC>1)BAHD 家族基因

Table 1 Up-regulated (LogFC>1) BAHD superfamily genes at key stages of stone cell differentiation and in rough-skinned fruits of pear

白梨 <i>P. bretschneideri</i>	拟南芥 <i>A. thaliana</i>	基因名称 Gene name	同源性 Identity/%	E 值 E-value	得分 Score
基因号 Gene ID	基因号 Gene ID				
<i>LOC103945860</i>	<i>AT1G03940</i>	<i>3AT1</i>	34.97	1.51E-86	273
<i>LOC103944254</i>	<i>AT1G28680</i>	<i>COSY</i>	52.93	7.34E-164	468
<i>LOC103958630</i>	<i>AT2G40230</i>		60.35	0	518
<i>LOC103955585</i>	<i>AT3G03480</i>	<i>CHAT</i>	48.06	7.93E-133	390
<i>LOC103963251</i>	<i>AT3G03480</i>	<i>CHAT</i>	46.99	4.90E-132	389
<i>LOC103951983</i>	<i>AT3G26040</i>		41.76	2.94E-115	345
<i>LOC103949890</i>	<i>AT3G26040</i>		38.96	3.64E-103	314
<i>LOC103944336</i>	<i>AT3G26040</i>		40.32	6.92E-101	308
<i>LOC103949999</i>	<i>AT3G26040</i>		38.22	3.04E-98	301
<i>LOC103951985</i>	<i>AT3G26040</i>		38.24	2.41E-97	299
<i>LOC103954416</i>	<i>AT4G24510</i>	<i>CER2</i>	25.80	8.35E-25	106
<i>LOC103949459</i>	<i>AT5G01210</i>		69.31	0	639
<i>LOC103961715</i>	<i>AT5G17540</i>		58.75	0	515
<i>LOC103963031</i>	<i>AT5G17540</i>		57.88	5.74E-176	501
<i>LOC103938506</i>	<i>AT5G41040</i>	<i>HHT1</i>	72.89	0	657
<i>LOC103964288</i>	<i>AT5G48930</i>	<i>HCT</i>	79.59	0	724
<i>LOC103955861</i>	<i>AT5G48930</i>	<i>HCT</i>	64.32	0	557
<i>LOC103945380</i>	<i>AT5G48930</i>	<i>HCT</i>	79.59	0	729
<i>LOC103945376</i>	<i>AT5G48930</i>	<i>HCT</i>	70.84	0	650

注:表中基因在每组中至少在一样本里表达丰度值(*FPKM*) > 1。

Note: The gene expression value (*FPKM*) > 1 at least in one sample of each group in this Table.



系统发育树中，黑色点表示 D'Auria^[1]鉴定的 BAHD 家族 5 类酰基转移酶，红色点表示梨 BAHD 家族基因。

In the phylogenetic tree, the black dots represent the genes 5 major clades of BAHD superfamily that identified by D'Auria^[1], the red dots represent the BAHD superfamily genes in pear.

图 6 功能已知 BAHD 家族及库尔勒香梨差异表达 BAHD 家族基因系统发育树

Fig. 6 Neighbor-joining phylogeny of functionally characterized BAHD transferases and differentially expressed BAHD members in Kuerlexiangli pear

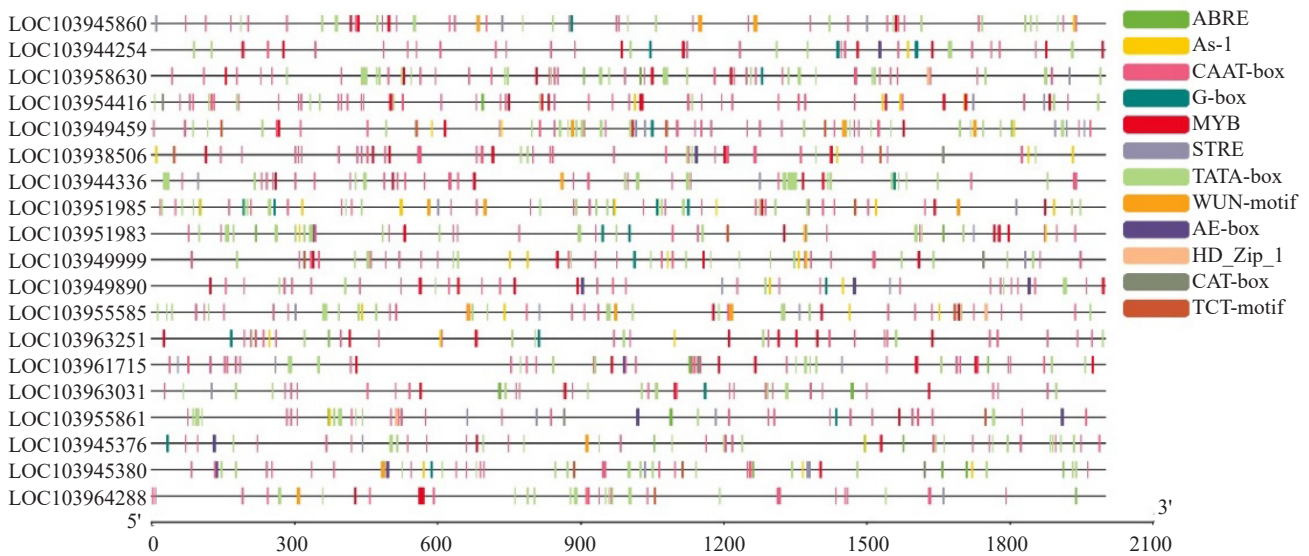


图 7 差异性表达梨 BAHD 家族基因上游区顺式作用元件

Fig. 7 Cis-regulatory elements on the upstream of differentially expressed BAHD superfamily genes in pear

件 WUN-motif (1.45%)、光响应元件部分 TCT-motif (1.13%)及激活元件 AE-box(0.97%)等。此外,还发现一些分生组织表达相关的调控元件 CAT-box (0.48%)和栅栏状叶肉细胞分化相关元件 HD_Zip_1 (0.24%)。值得关注的是,上述 19 个 BAHD 家族基因都含有 MYB 作用元件,其元件结构包括 MYB 结合位点(TAAGT, TAACCA, CAACCA 和 CAA-CAG)、MYB 识别位点(CCGTTG)、干旱诱导 MYB 结合位点(CAAGT)、光响应 MYB 作用元件(AACCTAA)以及类黄酮生物合成基因调控相关 MYB 作用元件(AAAAAAC(G/C)GTTA 和 TTTT-TACGGTTA)。

3 讨论

酰基转移酶在植物代谢过程中通过修饰代谢物的极性、挥发性、化学稳定性及生物活性来参与多种生物学过程^[1]。本研究分析得到的 19 个差异基因中, *LOC103945860* 基因与拟南芥 *AT1G03940* 基因(编码 *At3AT1*)具有较高的同源性。拟南芥中 3AT1 参与花青素和黄酮类物质的酰基化修饰过程,提高二者在溶液中的稳定性^[23]。花青素和类黄酮物质不仅是有显色功能,还是植物体内重要的抗氧化物质^[23]。石细胞分化旺盛期(20 d), *LOC103945860* 基因显著上调表达,之后其表达量逐渐下降。石细胞的分化实质就是细胞凋亡过程,而细胞凋亡本身是为维持内环境稳定,更好地适应生存环境而主动争取的死亡过程。因此,在梨果实发育过程中, *LOC103945860* 基因的上调表达可能与其在石细胞分化旺盛期所产生的多余超氧自由基清除有关。另外, 2 个基因(*LOC103954416* 和 *LOC103949459*)分别与拟南芥 *AT4G24510*(编码 *CER2*)和 *AT5G01210* 基因具有同源性。其中, *AtCER2* 主要参与 C28 脂肪酸链的延伸^[24],而脂肪酸是表皮蜡的主要成分,跟角质一起组成陆地植物的外表皮,不仅防止植物体受生物及非生物胁迫的影响^[25],而且参与抗旱胁迫的信号传导过程^[26]。 *LOC103954416* 基因不仅在果实石细胞分化关键时期上调表达,在粗皮果果肉中也显示为上调,这表明该基因在梨中参与果实外表皮的形成过程。粗皮果中, *LOC103954416* 基因的上调表达可能促进表皮蜡的生物合成,导致果实表皮的加厚,从而在干旱季节防止果实进一步失水,这说明库尔勒香梨粗皮果的形成可能与包括干旱等非生

物胁迫相关^[12]。目前尚未见 *AT5G01210* 基因或其同源基因功能研究的相关报道。另外, *LOC103961715* 和 *LOC103963031* 基因与拟南芥 *At5G17540* 基因具有同源性。该基因主要通过酰化油菜素内酯(brassinolide, BL)调节 BL 的内稳态,进而调控植物的抗逆性^[27], *LOC103955585* 和 *LOC103963251* 基因与拟南芥 *AT3G03480* 基因的同源性较高。 *AT3G03480* 基因(*CHAT*)主要参与绿叶性挥发物(green leaf volatiles, GLV) (*Z*)-3-己烯-1-乙酸酯的合成^[28]。BL 和 GLV 都是与植物抗逆性相关的活性物质。BL 参与植物体叶片的发育、茎的伸长、木质部分化及衰老等过程^[29-30],而 GLV 主要通过亚麻酸和亚油酸的降解产生,在脂质氧化酶的作用下产生过氧化氢^[31-32]。过氧化氢在细胞凋亡和分化过程中起到关键信号分子的作用。这些物质合成相关基因在粗皮果果皮和果肉中均显著上调表达,说明这些基因可能介导逆境下产生活性氧来参与粗皮果形成过程。

除了蜡质,木栓质(suberin)也是外表皮和细胞次生壁的重要组成成分之一^[33]。拟南芥中, *AT3G26040* 基因被推测可能参与木栓质的生物合成^[34]。笔者在本研究中发现, 5 个梨基因(*LOC103949999*、*LOC103944336*、*LOC103949890*、*LOC103951983* 和 *LOC103951985*)与 *AT3G26040* 基因具有较高的同源性。前期研究发现,苹果中 *AT3G26040* 基因的直系同源基因(*MDP0000729533* 和 *MDP0000391122*)与果锈的形成有关^[34]。本研究中, *LOC103944336* 基因在石细胞分化早期上调表达, *LOC103949999* 基因在石细胞分化后期上调表达,而位于同一条染色体上的 *LOC103951983* 和 *LOC103951985* 基因在木质化的粗皮果中上调表达。这些研究结果表明,这些基因可能通过调控蜡质和木栓质的合成来参与梨果实石细胞分化及粗皮果的形成过程,但其调控机制有待进一步研究。

笔者在本文中还发现 7 个梨基因与植物 BAHD 家族第 V-iii 类酰基转移酶聚为一类。第 V-iii 类酰基转移酶主要参与羟基肉桂酰奎宁酸/莽草酸酯的合成,其中 *LOC103955861*、*LOC103945376*、*LOC103945380* 和 *LOC103964288* 基因与拟南芥 *AT5G48930* 基因有高度同源性。 *AT5G48930* 基因在拟南芥中编码 HCT,在木质素合成过程中,以肉桂酸辅酶类为底物,参与木质素的合成^[10]。这 4 个基因在果实中的表达规律与木质素和石细胞的变化规

律相一致,其 *HCT* 基因在粗皮果中也显著上调表达。聚类到这个分支的另外 2 个基因 (*LOC103944254* 和 *LOC103938506*) 分别与拟南芥 *AT1G28680* 和 *AT5G41040* 基因具有较高的同源性,在拟南芥中分别与香豆素和木栓质的生物合成相关^[35-36]。与 *HCTs* 一样, *LOC103944254* 和 *LOC103938506* 基因在石细胞分化旺盛期以及粗皮果的果皮和果肉中也是上调表达,说明梨果实中香豆素和木栓质的积累也与石细胞的分化密切相关。

前期研究表明,角质层、木栓质和木质素合成相关酰基转移酶基因,如 *ASFT* (*HHT1*) 和 *HCT* 基因的表达受 *MYB* 家族转录因子的调控^[37-39]。本研究表明,果实发育期及粗皮果中显著上调的与木栓质合成相关基因 (*LOC103938506*) 上游区含有干旱诱导 *MYB* 结合位点 *CAACTG* 和光响应 *MYB* 作用元件 *AACCTAA*, 木质素合成相关基因 (*LOC103955861*) 上游区含有黄酮生物合成基因调控相关 *MYB* 作用元件 *TTTTTACGGTTA*。

4 结 论

利用梨基因组数据,在全基因组水平总鉴定含有该家族保守基序 *HXXXD* 和 *DFGWG* 的 81 个 *BAHD* 家族基因,并对其基因结构和染色体分布进行分析。通过转录组分析发现 19 个 *BAHD* 家族成员在果实石细胞分化关键时期以及粗皮果果皮和果肉中显著性上调表达。进一步分析发现,这些差异基因分别编码与木质素、香豆素、表皮层成分(蜡和木栓质)合成与修饰的相关的酰基转移酶以及油菜素内酯和黄酮类合成及修饰相关酰基转移酶等,另外还包括一些挥发性物质合成相关酰基转移酶。其中,木栓质 (*LOC103938506* 基因) 和木质素 (*LOC103955861* 基因) 合成相关基因具有干旱诱导、光响应及黄酮类合成相关的 *MYB* 作用元件,可能受 *MYB* 转录因子的表达调控。

参考文献 References:

- [1] D' AURIA J C. Acyltransferases in plants: a good time to be *BAHD*[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2006, 9(3): 331-340.
- [2] DUDAREVA N, D'AURIA J C, NAM K H, RAGUSO R A, PITCHERSKY E. Acetyl-CoA: benzylalcohol acetyltransferase: an enzyme involved in floral scent production in *Clarkia breweri*[J]. *Plant Journal*, 1998, 14(3):297-304.
- [3] FUJIWARA H, TANAKA Y, YONEKURA-SAKAKIBARA K, FUKUCHI-MIZUTANI M, NAKAO M, FUKUI Y, YAMAGUCHI M, ASHIKARI T, KUSUMI T. cDNA cloning, gene expression and subcellular localization of anthocyanin 5-aromatic acyltransferase from *Gentiana triflora*[J]. *Plant Journal*, 1998, 16(4): 421-431.
- [4] FUJIWARA H, TANAKA Y, FUKUI Y, ASHIKARI T, YAMAGUCHI M, KUSUMI T. Purification and characterization of anthocyanin 3-aromatic acyltransferase from *Perilla frutescens*[J]. *Plant Science*, 1998, 137(1):87-94.
- [5] YANG Q, REINHARD K, SCHILTZ E, MATERN U. Characterization and heterologous expression of hydroxycinnamoyl/benzoyl-CoA: anthranilate N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase from elicited cell cultures of carnation, *Dianthus caryophyllus* L.[J]. *Plant Molecular Biology*, 1997, 35(6): 777-789.
- [6] ST-PIERRE B, LAFLAMME P, ALARCO A M, DE LUCA V. The terminal O-acetyltransferase involved in vindoline biosynthesis defines a new class of proteins responsible for coenzyme A-dependent acyl transfer[J]. *Plant Journal*, 1998, 14(6): 703-713.
- [7] MOLINA I, KOSMA D. Role of HXXXD-motif/BAHD acyltransferases in the biosynthesis of extracellular lipids[J]. *Plant Cell Reports*, 2015, 34(4):587-601.
- [8] EL-SHARKAWY I, MANRIQUEZ D, FLORES F B, REGAD F, BOUZAYEN M, LATCHE A, PECH J C. Functional characterization of a melon alcohol acyl-transferase gene family involved in the biosynthesis of ester volatiles. Identification of the crucial role of a threonine residue for enzyme activity[J]. *Plant Molecular Biology*, 2005, 59(2):345-362.
- [9] HOFFMANN L, MAURY S, MARTZ F, GEOFFROY P, LEGRAND M. Purification, cloning, and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(1):95-103.
- [10] HOFFMANN L, BESSEAU S, GEOFFROY P, RITZENTHALER C, MEYER D, LAPIERRE C, POLLET B, LEGRAND M. Silencing of hydroxycinnamoyl-coenzyme a shikimate/quinate hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis[J]. *Plant Cell*, 2004, 16(6): 1446-1465.
- [11] SHADLE G, CHEN F, SRINIVASA R M S, JACKSON L, NAKASHIMA J, DIXON R A. Down-regulation of hydroxycinnamoyl CoA: shikimate hydroxycinnamoyl transferase in transgenic alfalfa affects lignification, development and forage quality[J]. *Phytochemistry*, 2007, 68(11): 1521-1529.
- [12] MAMAT A, TUSONG K, XU J, WANG J. Identification of metabolic pathways related to rough-skinned fruit formation in Korla pear[J]. *Scientia Horticulturae*, 2021, 9(3):e10908.
- [13] LU G, LI Z, ZHANG X, WANG R, YANG S. Expression analysis of lignin-associated genes in hard end pear (*Pyrus pyrifolia* Whangkeumbae) and its response to calcium chloride treatment conditions[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2014, 34(2): 251-262.

- [14] CAO Y, HAN Y, LI D, LIN Y, CAI Y. Systematic analysis of the 4-coumarate: coenzyme a ligase (4CL) related genes and expression profiling during fruit development in the Chinese pear[J]. *Genes*, 2016, 7(10):89.
- [15] WANG Y, ZHANG X, YANG S, WANG C, LU G, WANG R, YANG Y, LI D. Heterogenous expression of *Pyrus pyrifolia* *PpCAD2* and *PpEXP2* in tobacco impacts lignin accumulation in transgenic plants[J]. *Gene*, 2017, 637: 181-189.
- [16] BRAHEM M, RENARD C M, GOUBLE B, BUREAU S, LE BOURVELLEC C. Characterization of tissue specific differences in cell wall polysaccharides of ripe and overripe pear fruit[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 156: 152-164.
- [17] MAMAT A, AYUP M, ZHANG X, MA K, MEI C, YAN P, HAN L, WANG J. Pulp lignification in Korla fragrant pear[J]. *European Journal of Horticultural Science*, 2019, 84(5):263-273.
- [18] MAMAT A, TUSONG K, XU J, YAN P, MEI C, WANG J. Integrated transcriptomic and proteomic analysis reveals the complex molecular mechanisms underlying stone cell formation in Korla pear[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 7688.
- [19] MA C, ZHANG H, LI J, TAO S, QIAO X, KORBAN S S, ZHANG S, WU J. Genome-wide analysis and characterization of molecular evolution of the *HCT* gene family in pear (*Pyrus bretschneideri*) [J]. *Plant Systematics and Evolution*, 2017, 303(1):71-90.
- [20] FRIEDMAN R, HUGHES A L. Pattern and timing of gene duplication in animal genomes[J]. *Genome Research*, 2001, 11(11): 1842-1847.
- [21] FREELING M. Bias in plant gene content following different sorts of duplication: tandem, whole-genome, segmental, or by transposition[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2009, 60:433-453.
- [22] YU X H, GOU J Y, LIU C J. BAHD superfamily of acyl-CoA dependent acyltransferases in *Populus* and *Arabidopsis*: bioinformatics and gene expression[J]. *Plant Molecular Biology*, 2009, 70(4):421-442.
- [23] LUO J, NISHIYAMA Y, FUELL C, TAGUCHI G, ELLIOTT K, HILL L, TANAKA Y, KITAYAMA M, YAMAZAKI M, BAILEY P, PARR A, MICHAEL A J, SAITO K, MARTIN C. Convergent evolution in the BAHD family of acyl transferases: identification and characterization of anthocyanin acyl transferases from *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Journal*, 2007, 50(4):678-695.
- [24] HASLAM T M, MANAS-FERNANDEZ A, ZHAO L, KUNST L. *Arabidopsis* ECERIFERUM2 is a component of the fatty acid elongation machinery required for fatty acid extension to exceptional lengths[J]. *Plant Physiology*, 2012, 160(3): 1164-1174.
- [25] MLLER C. Plant-insect interactions on cuticular surfaces[M]. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2007: 398-417.
- [26] WANG Z Y, XIONG L, LI W, ZHU J K, ZHU J. The plant cuticle is required for osmotic stress regulation of abscisic acid biosynthesis and osmotic stress tolerance in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2011, 23(5): 1971-1984.
- [27] ZHU W, WANG H, FUJIOKA S, ZHOU T, TIAN H, TIAN W, WANG X. Homeostasis of brassinosteroids regulated by DRL1, a putative acyltransferase in *Arabidopsis*[J]. *Molecular Plant*, 2013, 6(2):546-558.
- [28] D'AURIA J C, PICHERSKY E, SCHAUB A, HANSEL A, GERSHENZON J. Characterization of a BAHD acyltransferase responsible for producing the green leaf volatile (Z)-3-hexen-1-yl acetate in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Journal*, 2007, 49(2): 194-207.
- [29] CLOUSE S D, SASSE J M. BRASSINOSTEROIDS: Essential regulators of plant growth and development[J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1998, 49: 427-451.
- [30] YANG C J, ZHANG C, LU Y N, JIN J Q, WANG X L. The mechanisms of brassinosteroids' action: from signal transduction to plant development[J]. *Molecular Plant*, 2011, 4(4): 588-600.
- [31] HATANAKA A. The biogenesis of green odour by green leaves[J]. *Phytochemistry*, 1993, 34(5): 1201-1218.
- [32] MATSUI K. Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2006, 9(3):274-280.
- [33] GRACA J, SANTOS S. Suberin: a biopolyester of plants' skin[J]. *Macromolecular Bioscience*, 2007, 7(2): 128-135.
- [34] LASHBROOKE J, AHARONI A, COSTA F. Genome investigation suggests *MdSHN3*, an APETALA2-domain transcription factor gene, to be a positive regulator of apple fruit cuticle formation and an inhibitor of russet development[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(21):6579-6589.
- [35] VANHOLME R, SUNDIN L, SEETSO K C, KIM H, LIU X, LI J, DE MEESTER B, HOENGENAERT L, GOEMINNE G, MORREEL K, HAUSTRAETE J, TSAI H H, SCHMIDT W, VANHOLME B, RALPH J, BOERJAN W. COSY catalyses trans-cis isomerization and lactonization in the biosynthesis of coumarins[J]. *Nature Plants*, 2019, 5(10): 1066-1075.
- [36] MOLINA I, LI-BEISSON Y, BEISSON F, OHLROGGE J B, POLLARD M. Identification of an *Arabidopsis* feruloyl-coenzyme a transferase required for suberin synthesis[J]. *Plant Physiology*, 2009, 151(3): 1317-1328.
- [37] ZHONG R, LEE C, ZHOU J, MCCARTHY R L, YE Z H. A battery of transcription factors involved in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2008, 20(10):2763-2782.
- [38] ZHOU J, LEE C, ZHONG R, YE Z H. MYB58 and MYB63 are transcriptional activators of the lignin biosynthetic pathway during secondary cell wall formation in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2009, 21(1): 248-266.
- [39] ZHANG P, WANG R, YANG X, JU Q, LI W, LU S, TRAN L P, XU J. The R2R3-MYB transcription factor AtMYB49 modulates salt tolerance in *Arabidopsis* by modulating the cuticle formation and antioxidant defence[J]. *Plant Cell and Environment*, 2020, 43(8): 1925-1943.