

博士論文

炭酸塩ストレスが高等植物に与える影響と、  
植物の炭酸塩耐性機構に関する研究

小林 紫緒

# 目次

|   |    |
|---|----|
| 第一章 序論.....   | 4  |
| 第二章 炭酸塩ストレスが植物の根と酵母 <i>Δnhx1</i> 変異体の生育に与える影響.....                    | 7  |
| 2.1 緒論.....   | 7  |
| 2.2 材料と方法.....  | 7  |
| 2.2.1 供試植物の栽培法.....   | 7  |
| 2.2.2 根の液胞内 pH の測定.....   | 7  |
| 2.2.3 シロイヌナズナの根の液胞の観察.....  | 8  |
| 2.2.4 根のスベリン染色.....   | 8  |
| 2.2.5 酵母 <i>Δnhx1</i> 変異体の炭酸塩耐性試験.....                                | 8  |
| 2.3 結果.....   | 9  |
| 2.3.1 炭酸塩処理条件下の根の液胞内 pH.....  | 9  |
| 2.3.2 ストレス処理条件下のシロイヌナズナの根の液胞形態.....                                   | 10 |
| 2.3.3 ストレス処理条件下のイネ・ <i>P. tenuiflora</i> の根のスベリン染色.....               | 11 |
| 2.3.4 酵母 <i>Δnhx1</i> 変異体の炭酸塩感受性.....                                 | 13 |
| 2.4 考察.....   | 14 |
| 2.4.1 炭酸塩ストレスが植物の根の液胞に与える影響.....                                      | 14 |
| 2.4.2 炭酸塩処理条件下のスベリン蓄積.....  | 15 |
| 2.4.3 酵母 <i>Δnhx1</i> 変異体の炭酸塩感受性.....                                 | 16 |
| 第三章 イネと <i>P. tenuiflora</i> における水耕液中炭酸塩由来 <sup>13</sup> C の体内動態..... | 17 |
| 3.1 緒論.....   | 17 |
| 3.2 材料と方法.....  | 17 |
| 3.3 結果.....   | 17 |
| 3.4 考察.....   | 19 |
| 第四章 スズメノカタビラの炭酸塩耐性試験.....   | 20 |
| 4.1 緒論.....   | 20 |
| 4.2 材料と方法.....  | 20 |
| 4.3 結果.....   | 20 |
| 4.4 考察.....   | 25 |
| 第五章 RNA-seq 法による <i>P. tenuiflora</i> とスズメノカタビラの網羅的遺伝子発現解析.....       | 27 |
| 5.1 緒論.....   | 27 |
| 5.2 材料と方法.....  | 27 |
| 5.2.1 ストレス処理とサンプリング.....  | 27 |
| 5.2.2 RNA 抽出と cDNA ライブラリの作成.....                                      | 27 |
| 5.2.3 シーケンシングと <i>de novo</i> アセンブリおよびデータ解析.....                      | 28 |
| 5.2.4 リアルタイム RT-PCR 解析.....   | 30 |
| 5.2.5 コントロール条件下遺伝子発現の種間比較.....  | 31 |
| 5.3 結果.....   | 31 |
| 5.3.1 <i>de novo</i> アセンブリ.....                                       | 31 |
| 5.3.2 リードマッピングとアノテーション.....   | 34 |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 5.3.3      | リアルタイム RT-PCR 解析.....                             | 81        |
| 5.3.4      | コントロール条件下遺伝子発現の種間比較.....                          | 82        |
| <b>5.4</b> | <b>考察.....</b>                                    | <b>84</b> |
| 5.4.1      | RNA-seq 解析と <i>de novo</i> アセンブリ.....             | 84        |
| 5.4.2      | スズメノカタビラで炭酸塩ストレスによる発現変動が見られた遺伝子.....              | 85        |
| 5.4.3      | <i>P. tenuiflora</i> で炭酸塩ストレスによる発現変動が見られた遺伝子..... | 86        |
| 5.4.4      | コントロール条件下で遺伝子発現に種間差が見られた遺伝子.....                  | 87        |
| <b>第六章</b> | <b>総合考察.....</b>                                  | <b>88</b> |
| <b>第七章</b> | <b>摘要.....</b>                                    | <b>89</b> |
|            | 謝辞.....   | 90        |
|            | 参考文献.....   | 91        |

## 第一章 序論

農業生産をおびやかす環境問題のひとつに、塩類集積がある。塩類集積とは地下水に含まれていた塩類が地表付近に集積してくる現象を指し、地形や気候といった非人為的要因に、ときに不適切な灌漑や過放牧などの人為的要因が加わって引き起こされる。多くの地域では集積する塩は  $\text{NaCl}$  であり、作物にとって問題となるのは、高いイオン濃度による浸透圧ストレスと  $\text{Na}^+$ の毒性によるイオンストレスである[1]。 $\text{NaCl}$  に対する植物の耐性機構については比較的古くから研究が進んでおり、適合溶質の合成や  $\text{Na}^+$ の排出および液胞への隔離などが行われていることや、アブシシン酸や活性酸素種、 $\text{Ca}^{2+}$ などがシグナル伝達を担っていることなどが明らかになっている[1,2]。一方で、中国などの乾燥地域には、 $\text{NaCl}$ のほかに  $\text{NaHCO}_3$  や  $\text{CaCO}_3$ を多く含む炭酸塩類集積土壌が見られる（図1）。そこでは上記の浸透圧と  $\text{Na}^+$ に加え、高い pH と  $\text{HCO}_3^-$ および  $\text{CO}_3^{2-}$ がストレス要因となる。アルカリ塩とも呼ばれる炭酸塩が中性塩よりもはるかに低濃度で植物に対する生育阻害作用を持つことは知られているが、その詳細な毒性メカニズム、およびそれに対する植物の耐性機構については未だによくわかっていない。野生植物の中には炭酸塩類集積土壌にも生育することができるものがあり、それらと感受性植物の炭酸塩応答を比較することで、植物の炭酸塩耐性メカニズムの解明の糸口が得られることが期待される。



図1 中国黒龍江省に広がる炭酸塩類集積土壌。2009年10月撮影

炭酸塩ストレスおよび石灰土壌のストレスに関するこれまでの研究は、鉄欠乏との関連に着目したものが多く、 $\text{CaCO}_3$ を多く含む石灰土壌が作物にクロロシスを引き起こすことは古くから知られ、その原因が根圏や維管束における鉄の不溶化であることが明らかになっていた[3,4]。一方で、炭酸塩ストレスは単

なる鉄欠乏ストレスよりも強いクロロシスを引き起こすという研究報告がある[5]。炭酸塩類集積土壌では鉄のほかリンや亜鉛、銅なども欠乏すると考えられている[6]。また炭酸塩処理下の植物に見られる特徴として、有機酸の蓄積が知られている[7-9]。おそらく根圏から流入した過剰な  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$  が固定された結果であると考えられるが、これが炭酸塩ストレス条件下の根圏や細胞内の pH 調節、あるいは導管内での鉄輸送に寄与しているという説がある一方で[10,11]、逆に過剰に蓄積し適切に隔離されない場合に細胞にダメージを引き起こしているという説もある[12,13]。

*Puccinellia tenuiflora* (Griseb.) Scrib. et Merr. は中国黒龍江省松嫩平原（しょうのんへいげん）の炭酸塩類集積土壌に生育するイネ科の野生植物である。中性塩および炭酸塩への著しく高い耐性を持ち、その耐塩性機構に関する研究もさかんに行われている。細胞膜の高い  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  選択性により植物体内の  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  比を高く維持できること[14]、根への  $\text{Na}^+$  の流入を防ぐ能力が高いこと[15]、葉からワックスとともに  $\text{Na}^+$  を排出する機構を持っていること[16]などが *P. tenuiflora* の  $\text{Na}^+$  への耐性機構として挙げられている。また  $\text{NaCl}$  の存在下における高い光合成活性の維持に抗酸化酵素が関与しているという報告[17]や、アルカリ土壌で問題になる金属欠乏や pH の攪乱にクエン酸の合成・分泌によって対処しているという報告[11]がある。 $\text{K}^+$  や  $\text{Na}^+$  のトランスポーターなど、耐塩性と関連があるとみられる遺伝子のクローニングもいくつか試みられている[18-25]。発現遺伝子やタンパク質の網羅的な解析も試みられており、EST 解析[26-28]、マイクロアレイ解析[26,29]、プロテオーム解析[30]などにより、炭酸塩条件下の *P. tenuiflora* では代謝や転写調節、シグナル伝達、膜輸送などに関わる遺伝子やタンパク質の発現量に変動していることが明らかになっている。しかし、それらのうちのどれが *P. tenuiflora* の高い耐性の決め手となっているのかはまだわかっていない。



図2 *P. tenuiflora*。2009年10月、中国黒龍江省にて撮影

本研究では「炭酸塩ストレスとは何か、また耐性植物はどのようにしてそれに耐えるのか」という問いに答えるため、*P. tenuiflora* をはじめ同族の炭酸塩感受性種スズメノカタビラ (*Poa annua* L.)、およびモデル植物のシロイヌナズナとイネ、さらに酵母を用いて、これらの生物に炭酸塩が与える影響についてさまざまな視点から調べた。さらに *P. tenuiflora* とスズメノカタビラを用いて RNA-seq 解析を行い、両者の炭酸塩処理条件下におけるトランスクリプトームを比較した。

## 第二章 炭酸塩ストレスが植物の根と酵母 *Δnhx1* 変異体の生育に与える影響

### 2.1 緒論

著者の学部4年時の研究の結果、高濃度(300 mM)炭酸塩処理の条件下では、炭酸塩感受性植物のイネと耐性植物の *P. tenuiflora* に共通して根の液胞膜型  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger (NHX) の発現誘導が見られた。中性塩では炭酸塩処理時のように顕著には見られない現象であったため、著者は NHX の  $\text{Na}^+$  輸送能以外の機能、すなわち  $\text{H}^+$  輸送による pH の調節機能が炭酸塩処理条件下では重要な役割を持つのではないかと推測した。本章では、炭酸塩処理が根の細胞内 pH を攪乱するという仮説を検証すべく根の液胞内 pH の可視化を試みるとともに、炭酸塩が根の液胞の形態に及ぼす影響についてもシロイヌナズナを用いて調べた。また *P. tenuiflora* の根については、過去に「内皮のバリアによって  $\text{Na}^+$  の流入を防いでいる」という仮説が立てられたが[14]、そのバリアを実際に観察した例はまだないため、塩処理後のスベリン染色を行い、イネとの比較を行った。また、NHX の細胞レベルの炭酸塩耐性への関与の有無を調べるため、酵母 *Δnhx1* 変異体の炭酸塩耐性試験を行った。

### 2.2 材料と方法

#### 2.2.1 供試植物の栽培法

*P. tenuiflora* の種子は中国黒龍江省の炭酸塩類集積土壌で採種された。イネ (*Oryza sativa* L. 品種:日本晴) は東京大学大学院農学生命科学研究科附属生態調和農学機構において栽培・収穫された種子を使用し、スズメノカタビラの種子は宇都宮大学雑草科学研究センターの小笠原勝先生より分譲頂いた。イネと *P. tenuiflora* およびスズメノカタビラの種子は70%エタノールで5分振とう後、50%次亜塩素酸ナトリウムで15分振とう滅菌し、栽培には水道水または1/8×木村液(一部改変; 6 mg/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2 mg/l  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 8.2 mg/l  $\text{MgSO}_4$ , 2.3 mg/l  $\text{KNO}_3$ , 7.5 mg/l  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 3.1 mg/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 mg/l Fe-EDTA) を用いた。栽培はグロースチャンバー内で行い、チャンバー内は明期16時間(28°C)、暗期8時間(22°C)に設定した。

シロイヌナズナ(Col-0)は70%エタノールで5分、5%次亜塩素酸ナトリウムで15分の種子消毒を行い、栽培には1/4×ムラシゲ・スクーグ(MS)培地用混合塩類を含む水耕液を用いた。栽培はグロースチャンバー内で行い、チャンバー内は明期16時間、暗期8時間、温度は22°Cに保った。

#### 2.2.2 根の液胞内 pH の測定

液胞内 pH の可視化には5-CFDA, AM (5-Carboxyfluorescein Diacetate, Acetoxymethyl Ester; Life Technologies) を用いた。5-CFDA は pH 依存的に変化する488 nm 励起条件下での蛍光強度と、pH に関わらず一定な458 nm 励起条件下での蛍光強度の比をとることで、蛍光試薬の細胞内濃度の影響を排除して pH を見積もることができる蛍光試薬である。AM は5-CFDA を電気的に中性になるように構造を変化させたもので、細胞内へのローディングを容易にする。細胞内に取り込まれた5-CFDA AM は細胞内エステラーゼによる加水分解を受けてカルボキシフルオレセインとなり、細胞外に漏出しにくくなる。

*P. tenuiflora* とイネ、スズメノカタビラは種子滅菌後水道水で18日間 (*P. tenuiflora*; スズメノカタビラと

同時に行った実験では 11 日間)、5 日間 (イネ) または 11 日間 (スズメノカタビラ) 育てた後、0 または 25 mM NaHCO<sub>3</sub> を含む 1/8×木村液、または 25 mM NaCl + 10 mM HEPES を含む 1/8×木村液に KOH を加えて pH を 8.0 に調整した水耕液で一晩処理した。シロイヌナズナは種子消毒の後、1/4×MS 培地用混合塩類を含む水耕液で 9 日間育て、さらに 0 または 7.5 mM NaHCO<sub>3</sub> を含む 1/4×MS 水耕液、あるいは 7.5 mM NaCl + 10 mM HEPES に KOH を加え pH 8.0 に調整した水耕液で一晩処理した。処理後の植物体各 5 ~10 個体を水耕液ごと 1.5 ml チューブに移し、水耕液に終濃度が 5-50 μM となるように 5-CFDA AM を加え、1 時間以上処理した。染色後の根は洗浄後、共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV1000 (Olympus) で撮影を行った。488 nm と 458 nm の励起光条件下で 515-545 nm の蛍光を取得し、撮影した画像からそれぞれの波長における蛍光強度を ImageJ[31]を用いて測定し、その比を求めた。励起光強度と検出感度 (HV) は観察に十分なシグナルが検出でき、かつ飽和しない値である必要があり、染色効率等に応じてそれぞれ以下のように設定した；458nm 10%, HV 700 / 488nm 5%, HV 450 (*P. tenuiflora*)、458nm 5%, HV 500 / 488nm 5%, HV 450 (イネ、シロイヌナズナ)、458nm 10%, HV 600 / 488nm 5%, HV 350 (スズメノカタビラおよび図 3D の *P. tenuiflora*)。各画像について 2~11 細胞の蛍光強度を測定して平均値を求め、グラフには各画像の平均値を画像間で平均した値を示した。

### 2.2.3 シロイヌナズナの根の液胞の観察

観察にはシロイヌナズナの  $\gamma$ -TIP-GFP 過剰発現体 vac-gk を用いた[32]。 $\gamma$ -TIP はアクアポリンの一つである。1/4×MS 寒天培地 (0.8% agar) で 11 日間育てた後、5 mM NaCl、5 mM NaHCO<sub>3</sub> (pH 7.58) または 10 mM HEPES + KOH (pH 7.58) を含む 1/4×MS 培地、およびコントロール処理用の通常の 1/4×MS 培地で一晩水耕栽培し、システム生物顕微鏡 BX51 (OLYMPUS) および落射蛍光システム (OLYMPUS) を用いて観察した。

### 2.2.4 根のスベリン染色

イネと *P. tenuiflora* の種子を 50%次亜塩素酸ナトリウムで 15 分間消毒した後、水道水に浮かべたフロートに播種した。イネは播種 3 日後、*P. tenuiflora* は播種 12 日後に 50 mM NaCl または 50 mM NaHCO<sub>3</sub> (pH 8.3)、10 mM HEPES + KOH (pH 8.3) を含む、あるいは通常の 1/8×木村液に移植し、4 日間生育させた。スベリン染色には Fluorol Yellow 88 (FY ; Santa Cruz Biotechnology) を用いた。根全体の観察では、0.1% FY を含む乳酸にサンプリングした植物の根を切り取って漬け、70°C で 1 時間処理を行った[33]。根の断面の観察では、サンプリングした根を 5%寒天に包埋し、ビブラトームを用いて切片を作成した。イネの切片は 0.01% FY を含む乳酸中 70°C で 1 時間染色を行い、*P. tenuiflora* の切片はあらかじめ作製した染色液 (0.01% FY を含む PEG (平均分子量 400 Da) に入れて 90°C で 1 時間加熱した後に等量の 90% glycerol を加えたもの) を用いて室温で 1 時間染色した。観察はシステム生物顕微鏡 BX51 (OLYMPUS) と落射蛍光システム (OLYMPUS) を用いて行った。

### 2.2.5 酵母 $\Delta nhx1$ 変異体の炭酸塩耐性試験

酵母  $\Delta nhx1$  変異体 (*Nhx1* 遺伝子の欠損変異体 ; Accession no. Y04290) とその野生型親株 BY4741 は



EUROSCARF (<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/>) より取得した。プレートからコロニーを液体 YPD に取り、28°Cで一晩前培養した後、OD<sub>600</sub>=0.2 となるように希釈し、OD<sub>600</sub>=0.8 前後となるように 28°Cで本培養した。YPD を加えて OD をそろえた後、10 倍希釈系列を作成し、50 mM NaHCO<sub>3</sub>を加えた YPD 寒天培地 (2% agar、pH 7.08) または 50 mM NaCl + 10 mM HEPES に KOH を加えて 50 mM NaHCO<sub>3</sub>と同じ pH7.08 に合わせた YPD 寒天培地、あるいはコントロール用 YPD 寒天培地に 5 µl ずつ滴下して 28°Cで培養した。コントロールプレートと NaCl 処理プレートは 1 日後、NaHCO<sub>3</sub>処理プレートは 2 日後に撮影した。

## 2.3 結果

### 2.3.1 炭酸塩処理条件下の根の液胞内 pH

5-CFDA AM は細胞に取り込まれた後徐々に細胞質から液胞へ移行し、処理開始後 20 分ほどでほぼ液胞に見られるようになった (図 3E、F)。pH の測定結果を図 3A~D に示す。本来 5-CFDA は pH 既知の標準液を用いてカリブレーションを行うことで測定結果を pH 値として算出することが可能な試薬であり、本実験でもイオノフォア (ニゲリシンナトリウム) で根細胞内の pH を標準液に合わせて検量線を描くことが試みられたが、細胞内 pH を標準液 pH に合わせる事が難しく、断念した。そのため結果はコントロール処理時を 1 とした蛍光強度の比で表してあり、大きな値は pH が高いことを示す。総じて炭酸塩処理条件下ではコントロール条件に比べ液胞内 pH が高くなる傾向が見られた (図 3D を除き蛍光取得時の励起光強度と検出感度が植物種ごとに異なるため、値の種間比較はできない)。ただしイネやシロイヌナズナでは実験を繰り返しても常に pH 上昇の傾向が見られたのに対して、*P. tenuiflora* では同濃度の塩処理でも pH 上昇が見られる場合と見られない場合があった (図 3A、D)。なお、NaHCO<sub>3</sub>処理と同じ Na<sup>+</sup>濃度と pH になるように調整した NaCl+高 pH ストレス処理では、液胞内 pH の上昇が見られる場合と見られない場合があった (図 3 では植物種による違いがあるように見えるが、反復間の再現性は取れていない)。

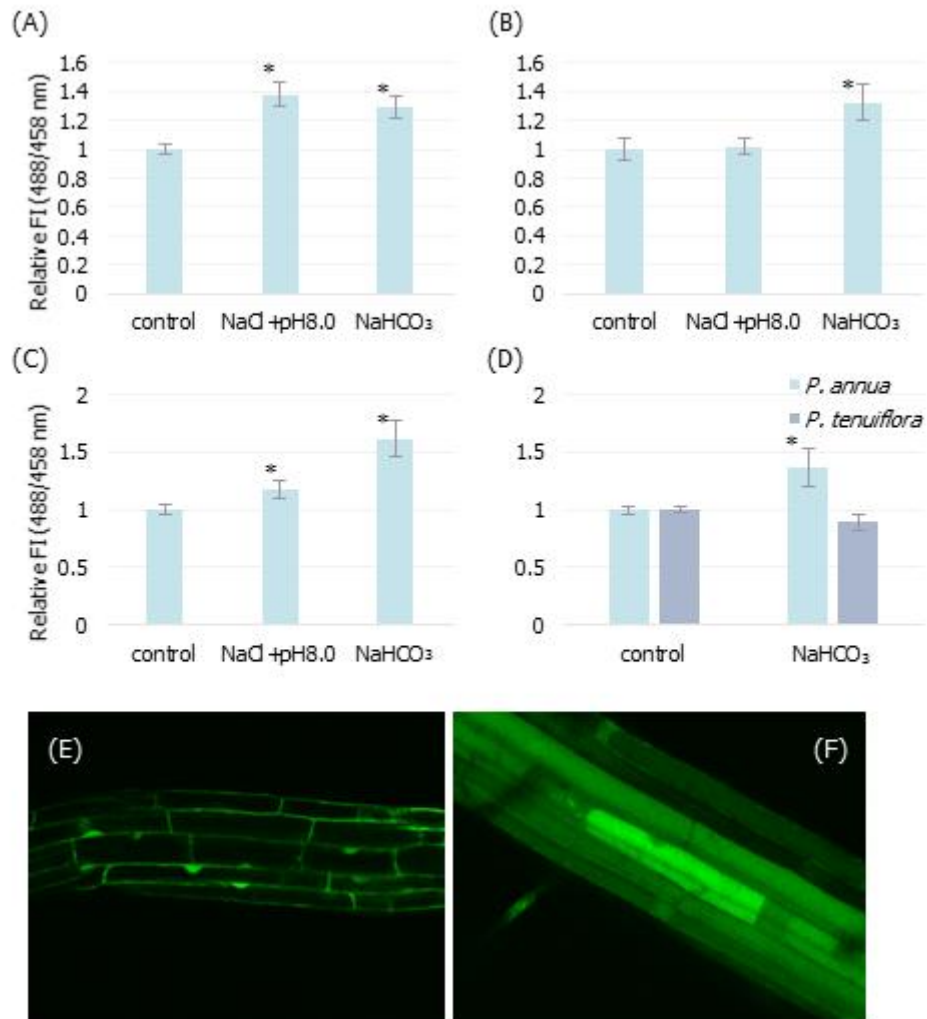


図3 塩処理条件下の *P. tenuiflora* (A)、イネ (B)、シロイヌナズナ (C)、スズメノカタビラおよび *P. tenuiflora* (D) の 5-CFDA の相対蛍光強度 (Relative Fluorescence Intensity) と実際の 5-CFDA AM による染色像 (E、F)。Relative FI は値が高いほど pH が高いことを示し、エラーバーは標準誤差を表す。\* $P < 0.05$ 、 $n = 3\sim 12$ 。染色開始 5~15 分程度はカルボキシフルオレセインの蛍光は主に核と細胞質に見られ (E)、その後液胞に移行する (F)。

### 2.3.2 ストレス処理条件下のシロイヌナズナの根の液胞形態

液胞膜マーカーとして  $\gamma$ -TIP-GFP を発現するシロイヌナズナを用いて、ストレス処理条件下の液胞の形態を観察した結果を図 4 に示す。5 mM NaCl および HEPES + KOH を用いた高 pH 処理ではコントロール条件と同様にほぼ一枚膜の液胞膜が観察されたが、5 mM NaHCO<sub>3</sub> 処理では、一晩で液胞の一部が粒状になる形態異常が観察された (図 4C)。その影響は根全体に見られたが、細胞の重なりがない根毛に特に目立って観察された (図 4E)。なお通常の根では、図 4D に見られるように根毛には一枚膜の液胞が入り込んでいた。

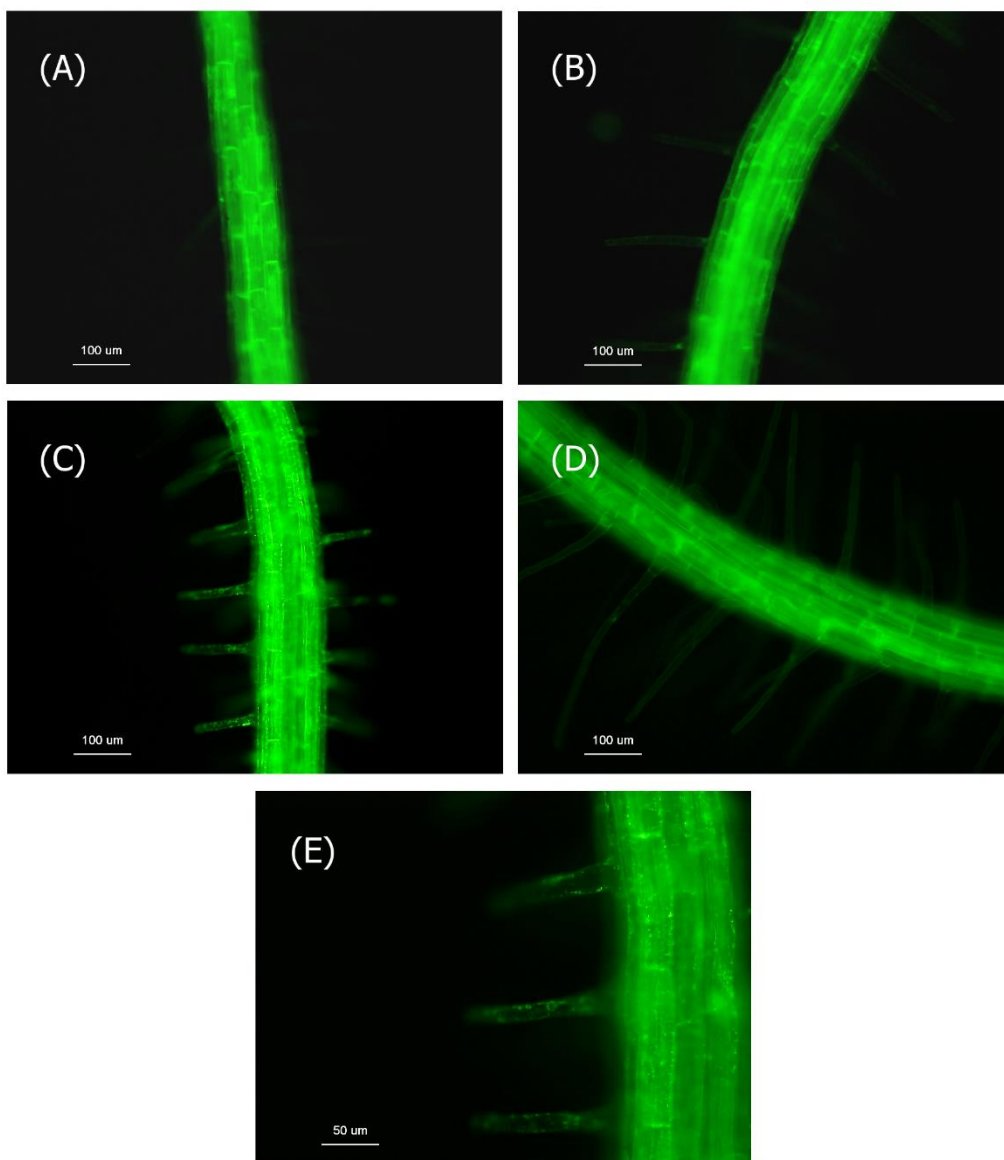


図4 液胞膜マーカー過剰発現シロイヌナズナ *vac-gk* の根の GFP 蛍光。コントロール処理 (A)、5 mM NaCl (B)、5 mM NaHCO<sub>3</sub> (pH 7.58 ; C)、10 mM HEPES + KOH (pH 7.58 ; D) を含む 1/4×MS 培地で一晩処理し、蛍光顕微鏡で観察した。E は C の拡大図。

### 2.3.3 ストレス処理条件下のイネ・*P. tenuiflora* の根のスベリン染色

根全体を染色・透明化して観察すると、非ストレス処理条件下のイネでは根端付近に FY による強い染色が見られた (図 5A)。また HEPES と KOH を用いて炭酸塩と同 pH (pH 8.3) にした高 pH 処理条件でも通常条件 (pH 5.8 程度) と同様の染色が見られた (図 5D)。他の実験における観察結果からも、イネにとってこの程度の高 pH はほとんどストレスにならないと考えられる。これらの条件ではスベリン染色は根端のほか、内皮および基部に近い根の外皮にも観察された。一方塩ストレス条件下では、根端の強い染色は消失し、代わりに根全体がうすく染色された。切片を作って観察した結果、この状態の根では外皮が染色されているのではないかと考えられた (図 7B)。*P. tenuiflora* では非ストレス条件下 (コントロール処理、高 pH 処理) では根端付近および基部に近い根の内皮に染色が見られ (図 6A、D)、塩ストレス条件下では内皮の染色がより根端側にも見られるようになった。*P. tenuiflora* の根切片の染色像は図 7C・D に示す。

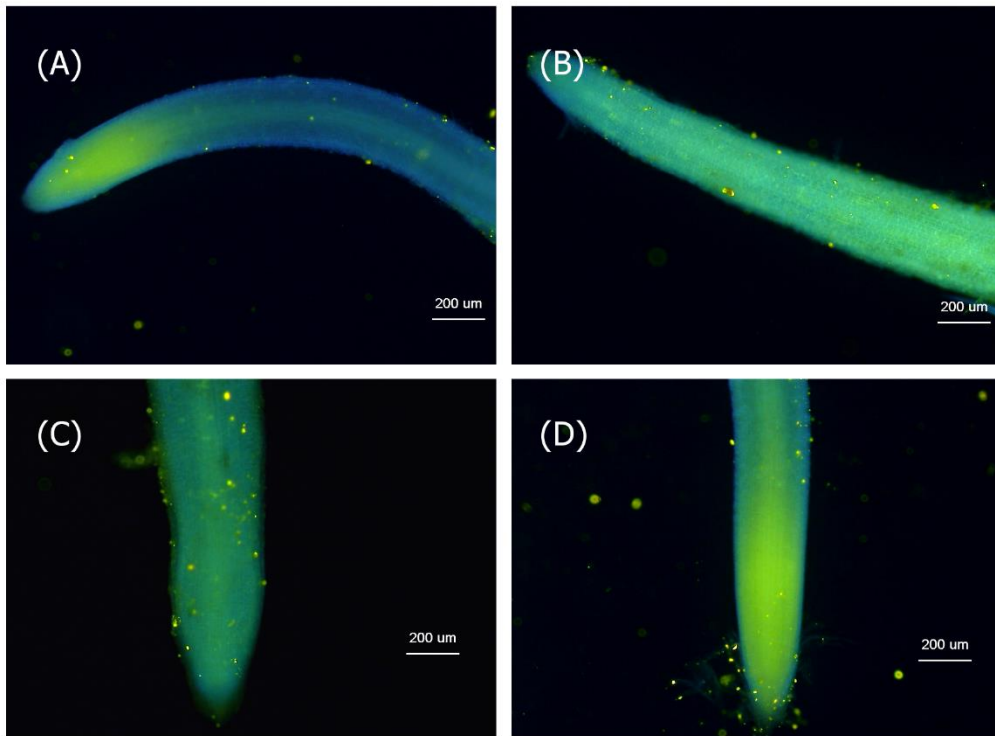


図5 イネの根のFY染色。(A) コントロール処理、(B) 50 mM NaCl、(C) 50 mM NaHCO<sub>3</sub> (pH 8.3)、(D) 10 mM HEPES + KOH (pH 8.3)。

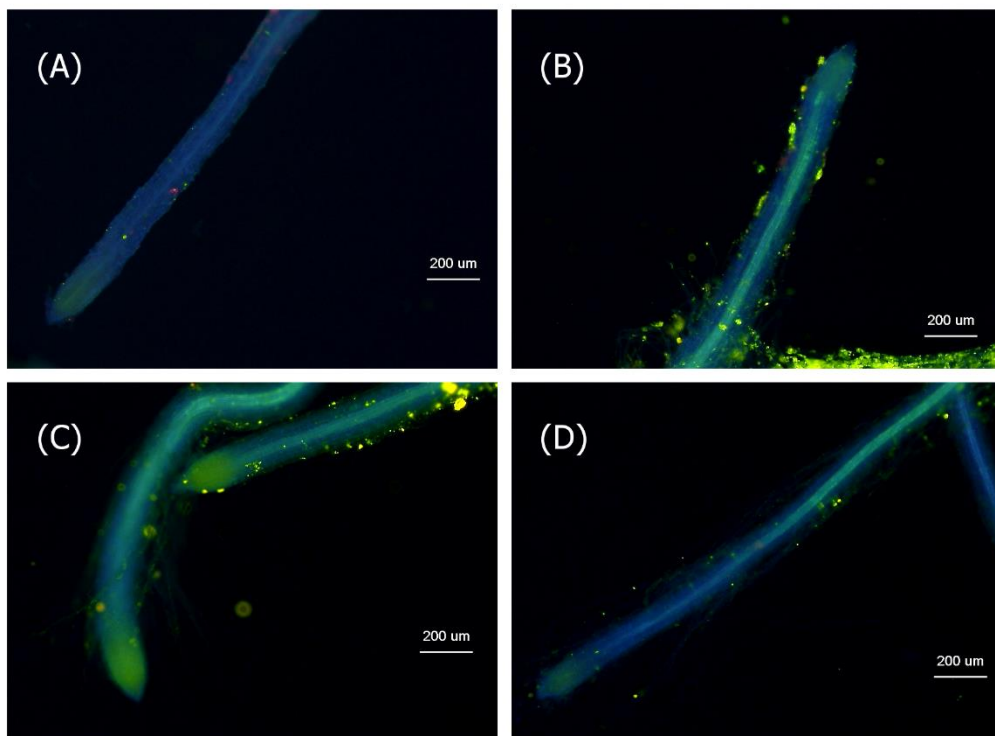


図6 *P. tenuiflora* の根のFY染色。(A) コントロール処理、(B) 50 mM NaCl、(C) 50 mM NaHCO<sub>3</sub> (pH 8.3)、(D) 10 mM HEPES + KOH (pH 8.3)。

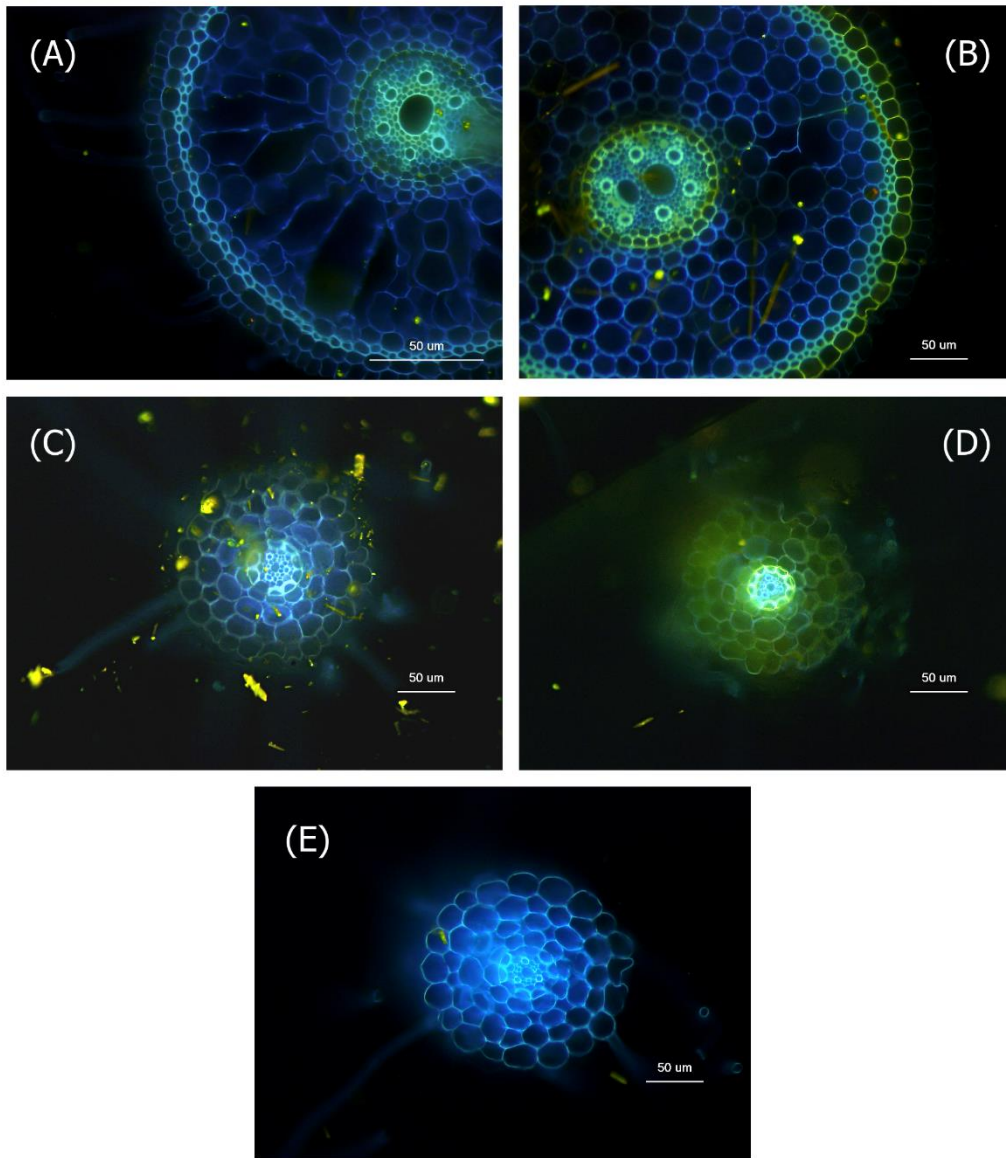


図7 イネおよび *P. tenuiflora* の根の横断面の FY 染色。(A) イネ、コントロール処理。(B) イネ、50 mM NaCl 処理。(C、D) *P. tenuiflora*、50 mM NaHCO<sub>3</sub> 処理。D の方が基部に近い部分。(E) は染色前の *P. tenuiflora* の根の横断面。

#### 2.3.4 酵母 *Δnhx1* 変異体の炭酸塩感受性

酵母 *Δnhx1* 変異体を 50 mM NaHCO<sub>3</sub> を含む培地で生育させると、コロニーの生える数には野生型 (BY4741) と大きな違いが見られないが、各コロニーの成長速度が遅くなることがわかった (図 8C)。一方で、50 mM NaCl+高 pH 処理ではその差は見られなかった (図 8B)。

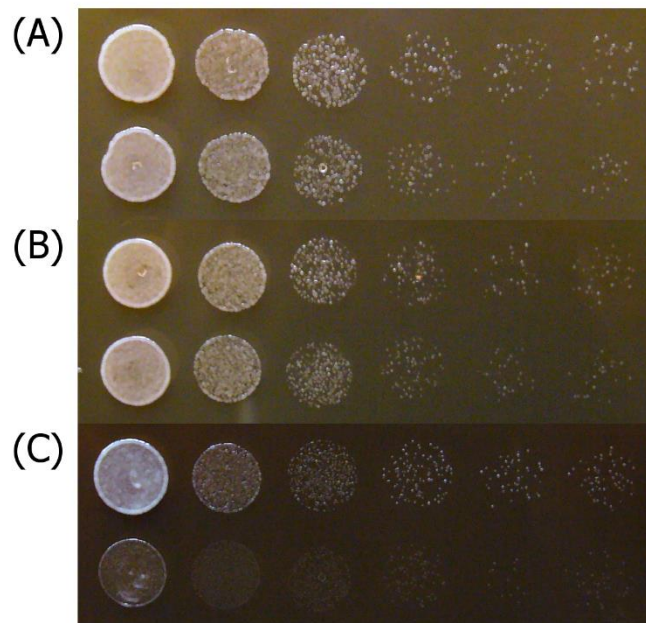


図8 酵母  $\Delta nhx1$  変異体の耐塩性試験。各パネル上段が野生型 (BY4741)、下段が  $\Delta nhx1$  変異体である。(A) コントロール、(B) 50 mM NaCl + 10 mM HEPES + KOH (pH 7.08) (C) 50 mM NaHCO<sub>3</sub>。

## 2.4 考察

### 2.4.1 炭酸塩ストレスが植物の根の液胞に与える影響

炭酸塩処理条件下では多くの供試植物で根の液胞内 pH の上昇が見られた (図 3A~D)。炭酸塩が細胞内 pH にもたらす影響については、①水耕液 pH の上昇による影響、②CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>によるバッファリング効果、③過剰な炭素源供給による代謝の攪乱 などの可能性が考えられる。NaCl + 高 pH 処理条件では多くの場合炭酸塩処理条件下ほどの液胞内 pH 上昇が見られなかったことから、①の寄与はそれほど大きくないと考えられる。②については、仮に CO<sub>2</sub> も HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> も自由に膜を通過できるとすると、細胞質や液胞の pH が H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ⇌ CO<sub>2</sub> + OH<sup>-</sup> の pKa である 6.4 に向かうと考えられ、通常条件の細胞質の pH が 7.5 前後、液胞内の pH が 5.8 前後とされていることから[34]、液胞がアルカリ化した今回の結果と整合する。ただし CO<sub>2</sub> は膜透過性を持ち、かつアクアポリンを介しても細胞膜を通過するとされている一方で[35,36]、HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> の膜通過には輸送体が必要であり[37]、その輸送体は高等植物ではまだ見つかっていない。③については、過去さまざまな植物を対象にしたストレス試験の結果、炭酸塩ストレスは植物の根に有機酸を蓄積させることがわかっている[7-9,38]。Lee らは嫌石灰植物の石灰 (CaCO<sub>3</sub>) 土壌感受性は過剰に蓄積したリンゴ酸を細胞内でうまく隔離できないことによるストレスに起因し、好石灰植物の耐性はリンゴ酸の蓄積能力の高さによるものであると考察した[12,13]。増加した有機酸のバッファリング能力が細胞質や液胞の pH に影響を及ぼしている可能性はある。

また液胞内 pH の上昇と植物の生育阻害との関係も不明である。液胞 pH 上昇は細胞質への有機酸の過剰蓄積や代謝の攪乱に対抗するために液胞-細胞質間でイオンがやり取りされた結果であってストレス要因ではない可能性もある。一方で液胞に存在するプロテアーゼの至適 pH が酸性であるため、液胞のアル

カリ化がタンパク質分解の抑制につながる例が知られており[39]、液胞 pH 上昇それ自体がストレスになるのかもしれない。細胞質 pH の測定が考察の一助になると考えられるが、細胞質はその容積の小ささから蛍光試薬によって pH を見積もることは困難であった。手法の工夫により細胞質やアポプラストの pH も測定し、pH 変化の全体像を明らかにすることができれば、個々の pH 変化が持つ意味をより正確に推測できると考えられる。なお *P. tenuiflora* は同じ塩処理条件でも液胞 pH の上昇が見られない場合があった。栽培時の意図しないストレス（染色時の機械的ストレス、栽培中に発生した微生物によるストレスなど）に対して *P. tenuiflora* やスズメノカタビラの根はイネに比べ脆弱であることが観察からわかっており、本実験の結果もそうした影響によるものである可能性がある。本来 pH 調節機能が働いて炭酸塩ストレス条件下でも低く維持できるはずの液胞 pH が他のストレスの影響で維持できず図 3A のように上昇してしまったのか、それとも図 3D の方が根のダメージの結果なのかを結論づけるには、栽培・染色方法から改めて検討し再試を行う必要がある。

液胞膜マーカーを過剰発現するシロイヌナズナを用いた観察の結果、 $\text{NaHCO}_3$  は 5 mM という低濃度で液胞形態に異常をもたらすことが明らかになった（図 4）。酵母では液胞形成に液胞前駆体内の酸性化が必要であることが知られており[40]、液胞前駆体内が液胞同様にアルカリ化されて液胞への融合が阻害された結果、多数の液胞前駆体が観察された可能性がある。一方で、本研究で観察されたものと似た液胞前駆体とみられる多数の小胞は過去に 75 mM NaCl で 6 時間処理したシロイヌナズナの培養細胞にも観察されており[41]、本研究でも不十分な種子滅菌等により根にカビが繁茂してしまった場合などに他の処理条件下でも局所的に粒状の液胞前駆体様構造が観察されたことから、一定以上の根へのストレスが液胞の断片化を引き起こすという可能性もある。したがって、5 mM NaCl では観察されない粒状の構造が 5 mM  $\text{NaHCO}_3$  で観察されたという事実は「炭酸塩は中性塩よりも強いストレスになる」ということを示す以上のことではない可能性もあり、ストレスと液胞の関係については今後、コントロールを適切に設定した詳細な検討が必要である。

#### 2.4.2 炭酸塩処理条件下のスベリン蓄積

50 mM NaCl と 50 mM  $\text{NaHCO}_3$  のスベリン蓄積への影響はよく似ており、かつイネと *P. tenuiflora* で同様の変化が見られたことから、「塩ストレスに対しては根全体にスベリンを蓄積する」という戦略が、少なくともイネ科植物の間には広く共有されていると考えられる（図 5、6）。過去の研究で *P. tenuiflora* では  $\text{Na}^+$  の流入抑制にバリアが寄与することが示唆されており[14]、本研究でも実際に塩ストレスで内皮のスベリン蓄積が広範囲に見られるようになったが、同様の応答はイネにも見られ、今回の観察の範囲ではこれが *P. tenuiflora* の耐塩性の決定的な要因であると考え根拠は得られなかった。ただし、きちんと結論づけるためには実際に内皮を通過する物質の透過速度等を測定する必要がある。なお *P. tenuiflora* はイネよりもはるかに小型であるため、個体あたりの蒸散速度も小さいと考えられ、それによる吸水速度の違いも根中心柱への塩の流入速度に影響すると考えられることにも留意すべきである。切片を用いた観察では、*P. tenuiflora* ではイネに見られたような外皮一層のきれいな染色像が得られなかったが、明瞭な像を撮影すること自体が難しく、この結果が植物の性質によるものなのか染色時のアーティファクトであるのかは判断

できなかった。

### 2.4.3 酵母 $\Delta nhx1$ 変異体の炭酸塩感受性

酵母の Nhx1 は植物の NHX1 同様液胞への  $\text{Na}^+$ の取り込みと液胞からの  $\text{H}^+$ 放出に関わっており、ハイグロマイシン耐性や酸性条件下での  $\text{Na}^+$ 耐性、浸透圧ストレス耐性に関与するほか、細胞内 pH の維持にも関わっていることが知られている[42–45]。本研究の結果、 $\Delta nhx1$  変異体は炭酸塩処理条件下でわずかに生育が遅れることが示された (図 8)。Nhx1 は細胞質の  $\text{Na}^+$ を液胞に隔離し無毒化する機能を持つが、炭酸塩と同濃度の NaCl 処理では野生型と変異体との間に耐性の差は見られなかったことから、 $\Delta nhx1$  変異体の炭酸塩感受性は  $\text{Na}^+$ に対するものではないと考えられる。またこの NaCl 処理時の pH は  $\text{NaHCO}_3$  処理にそろえてあったことから、変異体の感受性は高 pH や高 pH と  $\text{Na}^+$ の交互作用によるものでもないと結論づけられる。つまり  $\Delta nhx1$  は炭酸水素イオンに感受性である。Nhx1 が輸送する  $\text{H}^+$ は他の多くのトランスポーターによる共輸送や対抗輸送にも使われており、Nhx1 の欠損によって  $\text{H}^+$ や  $\text{Na}^+$ のみならず有機酸を含むさまざまな物質の輸送に影響が出た可能性がある。著者の学部 4 年時の研究ではイネと *P. tenuiflora* に 300 mM  $\text{NaHCO}_3$  という高濃度の炭酸塩ストレス処理を行った際、根で *NHX1* の遺伝子発現が強く誘導されたことから、植物においても炭酸塩による細胞内恒常性の攪乱に対する応答に *NHX1* が何らかの機能を持っていることが推測された[25]。しかしシロイヌナズナの *nhx1* 変異体の炭酸塩耐性は野生型と同程度であり、機能が冗長であるとされる *NHX2* との二重変異体は通常条件でも結実前に枯死してしまうため、耐性試験に用いることができなかった。



## 第三章 イネと *P. tenuiflora* における水耕液中炭酸塩由来 $^{13}\text{C}$ の体内動態

### 3.1 緒論

根圏に与えられた  $\text{HCO}_3^-$  および  $\text{CO}_3^{2-}$  は、根の細胞に取り込まれ、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) の働きで固定されると考えられている[46]。本研究では炭酸塩ストレス処理に用いる塩に  $\text{Na}_2^{13}\text{CO}_3$  を用い、根と地上部の炭素安定同位体比率を測定することによって、取り込まれた炭酸由来の炭素の動態に耐性植物の *P. tenuiflora* と感受性植物のイネの間で違いが見られるかどうかを調べた。

### 3.2 材料と方法

*P. tenuiflora* とイネの種子は滅菌後水道水に浮かべたフロートに播種し、イネは播種4日後、*P. tenuiflora* は播種12日後に1/8×木村液に移植し、以後イネは2~3日ごと、*P. tenuiflora* は7日ごとに水耕液を交換して栽培した。イネは播種9日後、*P. tenuiflora* は播種28日後に、コールド処理 (5 mM  $\text{NaHCO}_3$  + 7.9 mM  $\text{Na}_2^{12}\text{CO}_3$  を含む1/8×木村液) または安定同位体処理 (5 mM  $\text{NaHCO}_3$  + 7.9 mM  $\text{Na}_2^{13}\text{CO}_3$  を含む1/8×木村液) を開始した。炭酸塩処理時の水耕液の水面は流動パラフィンで覆い、水耕液と空気間の  $\text{CO}_2$  交換を抑えた。処理開始前および開始1、6、12、24時間後にサンプリングを行い、脱イオン水で3回洗浄後シュートと根に分けて $-80^\circ\text{C}$ に保存した。イネは各時点につき3個体×3反復、*P. tenuiflora* は10個体以上×3反復をサンプリングした。植物サンプルは3日間凍結乾燥させ、重量を測定した後粉碎し、0.2 mg ずつスズ箔に包んで炭素安定同位体比率を測定した。測定には FLASH 2000/ConFlo IV/DELTA V Advantage (Thermo Scientific) を用いた。

### 3.3 結果

イネ・*P. tenuiflora* とともに、根においては処理時間の経過とともに  $^{13}\text{C}$  濃度が上昇していた (図9)。一方で地上部においては、イネでは24時間後に  $^{13}\text{C}$  濃度の上昇が見られたのに対して、*P. tenuiflora* では  $^{13}\text{C}$  濃度の上昇は見られなかった。また安定同位体を含まないコールド処理ではいずれのサンプルでも  $^{13}\text{C}$  濃度の上昇は見られなかったことから、クロスコンタミネーションは起きていないと考えられた。

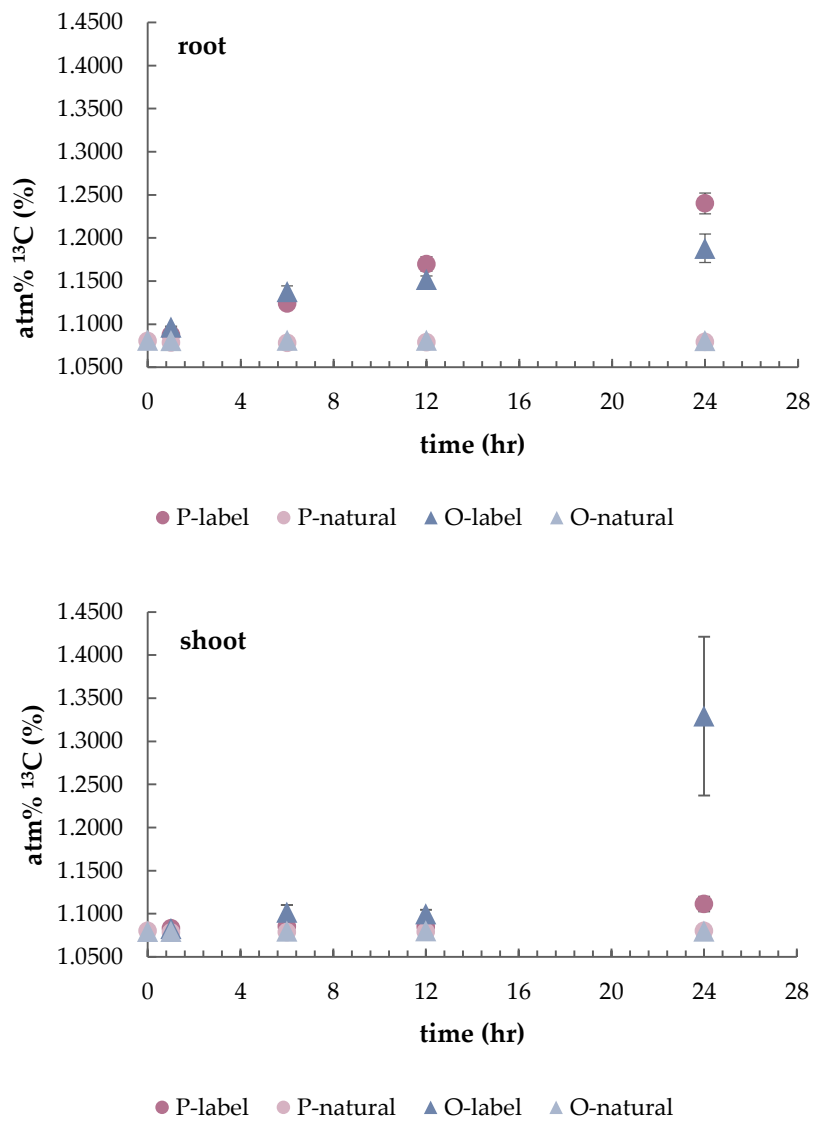


図9  $^{13}\text{C}$  を含む炭酸塩を処理した後のイネおよび *P. tenuiflora* の炭素安定同位体比率。上のグラフは地上部、下のグラフは根の結果を示す。「label」は安定同位体を含む炭酸塩による処理、「natural」はコールド処理を示す。値は3反復の平均値、エラーバーは標準偏差。

### 3.4 考察

いずれの植物種でも処理時間依存的に根における  $^{13}\text{C}$  濃度の上昇が見られたことから、やはり水耕液に含まれる  $\text{HCO}_3^-$  は何らかの形で植物体内に移行していることがわかった (図 9, "root")。イネでは地上部においても処理 24 時間目には  $^{13}\text{C}$  濃度の上昇が見られたことから、この時点ですでに水耕液中炭酸塩由来の炭素が地上に移行していることが明らかになった (図 9, "shoot")。導管液に溶存する  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$  またはその同化産物が地上部に移行していると推測される。トマトを用いた先行研究では  $^{14}\text{C}$  を含む  $\text{KHCO}_3$  の処理 72 時間後に根・地上部および葉で放射線量とリンゴ酸量が上昇し、根から取り込まれた  $\text{HCO}_3^-$  の少なくとも一部は同化産物として地上部にも蓄積していると考えられた[47]。一方で *P. tenuiflora* では処理 24 時間以内の  $^{13}\text{C}$  の地上への移行は見られなかった。根から流入した  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  を根で固定し、地上部へ移行させないメカニズムを持っている可能性がある。Guo らは炭酸塩処理条件下の *P. tenuiflora* では TCA 回路の最初の産物であるクエン酸含量が増加することを示し、根で合成された有機酸の一部は根圏に分泌されるのではないかと述べている[11]。一方で *P. tenuiflora* は植物体が小さいことから蒸散量が少なく、導管液による物質輸送は全体的にイネより遅いと考えられるため、24 時間以内に地上部への移行が見られなかったのはその影響である可能性も排除できない。 $^{13}\text{C}$  がどのような物質に変換されているかをより具体的に調べることができれば、この種間差の由来を考察することができると思う。

## 第四章 スズメノカタビラの炭酸塩耐性試験

### 4.1 緒論

スズメノカタビラ (*Poa annua* L.) は日本を含めた世界各地にみられる野生植物である。生育環境により一年草と多年草の両方のライフサイクルを持ち、主に駆除対象の雑草として研究の対象になる[48,49]。 *P. tenuiflora* の何がこの種を炭酸塩耐性たらしめているのかを調べるうえでは近縁な感受性種をコントロールとして用いることが望ましいが、*Puccinellia* 属は alkali grass と呼ばれ、これまでに知られている種はほぼアルカリ性の湿地や海岸沿いに生育し、アルカリ耐性を持っていると考えられる。そこで Quintanar らの系統解析の報告[50]を参考に同族異属のスズメノカタビラを選び、炭酸塩耐性試験を試みるとともに、水耕液 pH に植物体が与える影響について *P. tenuiflora* との比較を行った。

### 4.2 材料と方法

高濃度ストレス条件下での生育比較試験では、滅菌後の種子を水道水に浮かべたフロートに播種し、播種 9 日後の植物体を 0 mM または 300 mM NaCl、または 300 mM NaHCO<sub>3</sub> を含む 1/8×木村液に移植し、5 日間生育させたのち撮影した。実験は 2 回行い、同様の結果を得た。1 度目の結果を示してある。

低濃度ストレス条件下での根長・シュート長測定試験では、滅菌後の種子を 1/8×木村液を含む 0.8%寒天培地に播種し、播種 4 日後のスズメノカタビラおよび播種 9 日後の *P. tenuiflora* を各濃度の NaHCO<sub>3</sub> と 1/8×木村液を含む 0.8 %寒天培地に移植した。スズメノカタビラの方が生育が早いため、播種日をずらしてある。全生育期間を通して寒天培地プレートはグロースチャンバー内に垂直に置き、移植後 5 日目の植物体の総根長およびシュート長を測定した。

低濃度ストレス条件下での根の細胞死を観察するため、播種 12 日後のスズメノカタビラおよび播種 15 日後の *P. tenuiflora* を上述の根長・シュート長測定試験と同条件のプレートに移植後グロースチャンバーに一晩置いた。処理後、寒天培地上に置いたままの根に 3 μg/ml propidium iodide を含む 10 mM リン酸ナトリウムバッファーを滴下し、遮光してグロースチャンバー内で 1 時間染色を行い、システム生物顕微鏡 BX51 (OLYMPUS) および落射蛍光システム (OLYMPUS) を用いて蛍光を観察した。

水耕液 pH の測定試験では、滅菌後の種子を水道水で 9 日間水耕栽培した後、0 または 20 mM NaHCO<sub>3</sub> を含む 1/8×木村液に移植し、3 日後の水耕液 pH を測定した。測定には HORIBA pH meter F-22 を用いた。実験は 2 回行い、同様の結果を得た。1 度目の結果を示してある。

### 4.3 結果

*P. tenuiflora* は 300 mM NaHCO<sub>3</sub> 処理条件下でも 5 日間生存したのに対して、スズメノカタビラは同条件下で 5 日以内にほとんどが枯死した (図 10C)。一方 300 mM NaCl 処理条件下では、スズメノカタビラも 5 日間生存した (図 10B)。

プレート上でより低濃度の炭酸塩処理を行うと、両種とも 10 mM NaHCO<sub>3</sub> から根の伸長阻害が見られ

たが、*P. tenuiflora* の根が 40 mM でも伸長を続けたのに対し、スズメノカタビラの根は 40 mM  $\text{NaHCO}_3$  処理条件下では根端が黒くなり、生育が止まった (図 11A)。両種ともシュートの生育阻害は根に比べ軽微であった (図 11B)。

細胞膜と死細胞の核を染色する propidium iodide (PI) を用いて根の染色を行うと、両種ともに炭酸塩濃度の上昇とともに核が染色される細胞の割合が増加し、細胞死が起きていることを示した (図 12)。またこの細胞死はわずか一晩の処理で観察できた。死細胞の割合には同じ処理条件の同一種内でも個体差が見られたが、どの条件でも *P. tenuiflora* における細胞死の割合はスズメノカタビラよりも少なく、40 mM  $\text{NaHCO}_3$  処理でスズメノカタビラに見られたような根全体にわたる細胞死は、同条件下の *P. tenuiflora* の根には見られなかった。なお、黒変していた 40 mM  $\text{NaHCO}_3$  処理後のスズメノカタビラ根端部は顕微鏡下では細胞壁が不明瞭になり、明視野では粒状の構造が観察された (図 13C、E)。

これらの結果をもとに、第三章の RNA-seq 解析に用いる  $\text{NaHCO}_3$  濃度を、*P. tenuiflora* の根長に影響しつつもスズメノカタビラの根端を死なせない 20 mM に設定した。

また、水耕液 pH は炭酸塩ストレス条件下では種間差が見られなかったが、通常の水耕液で 3 日間生育させると、*P. tenuiflora* の方が高くなるという結果が得られた (図 14)。

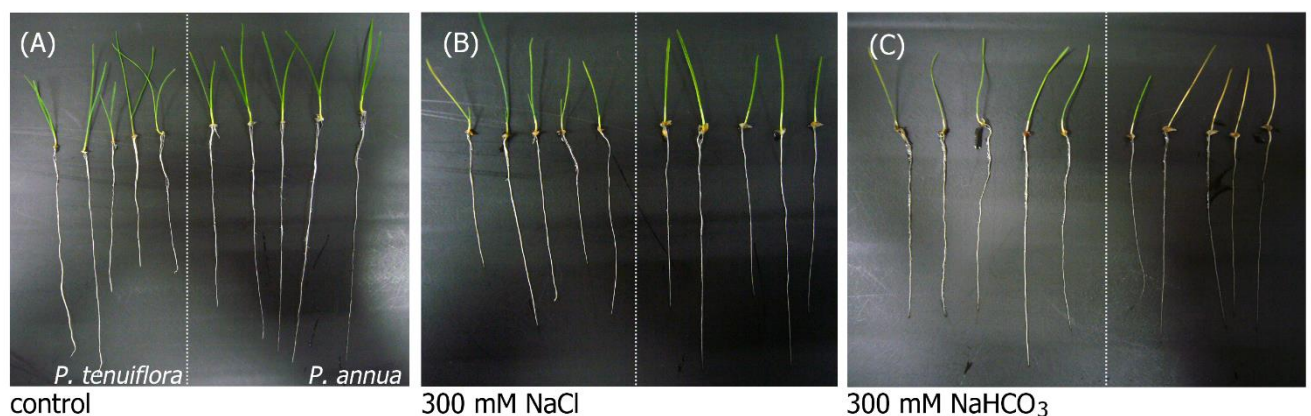
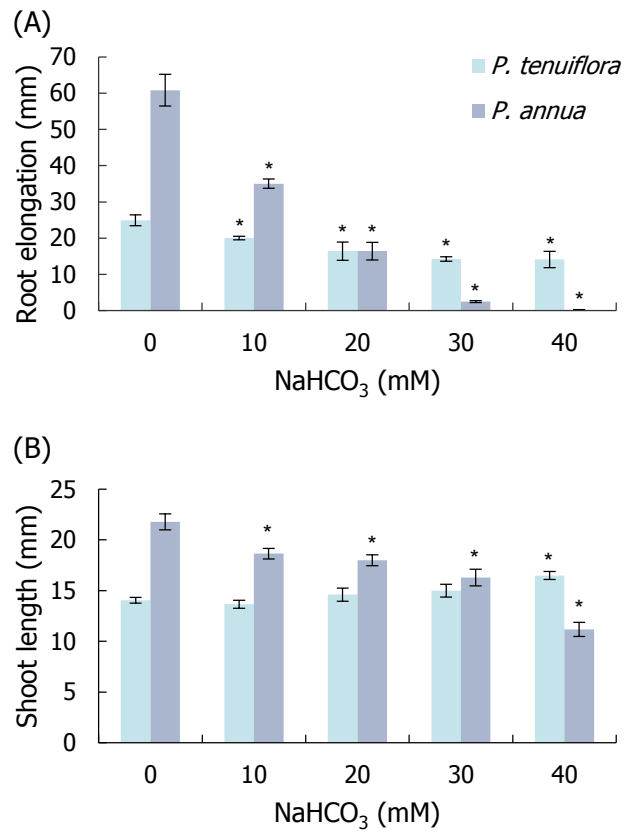


図 10 水耕栽培による高濃度炭酸塩耐性試験。播種 9 日後の植物体を 0 mM または 300 mM  $\text{NaCl}$ 、または 300 mM  $\text{NaHCO}_3$  を含む  $1/8 \times$  木村液に移植し、5 日間生育させたのち撮影した。

(A) コントロール処理、(B) 300 mM  $\text{NaCl}$ 、(C) 300 mM  $\text{NaHCO}_3$ 。それぞれ点線より左が *P. tenuiflora*、右がスズメノカタビラ。



**図 11** 寒天培地プレートを用いた低濃度炭酸塩耐性試験。処理開始 5 日目の側根を含めた根の伸長量 (A) およびシュート長 (B) を示す。プレート 3 枚の平均値を示してある。測定には各プレートから 7-10 個体の植物体を用いた。エラーバーは標準誤差を示す。\* $P < 0.05$

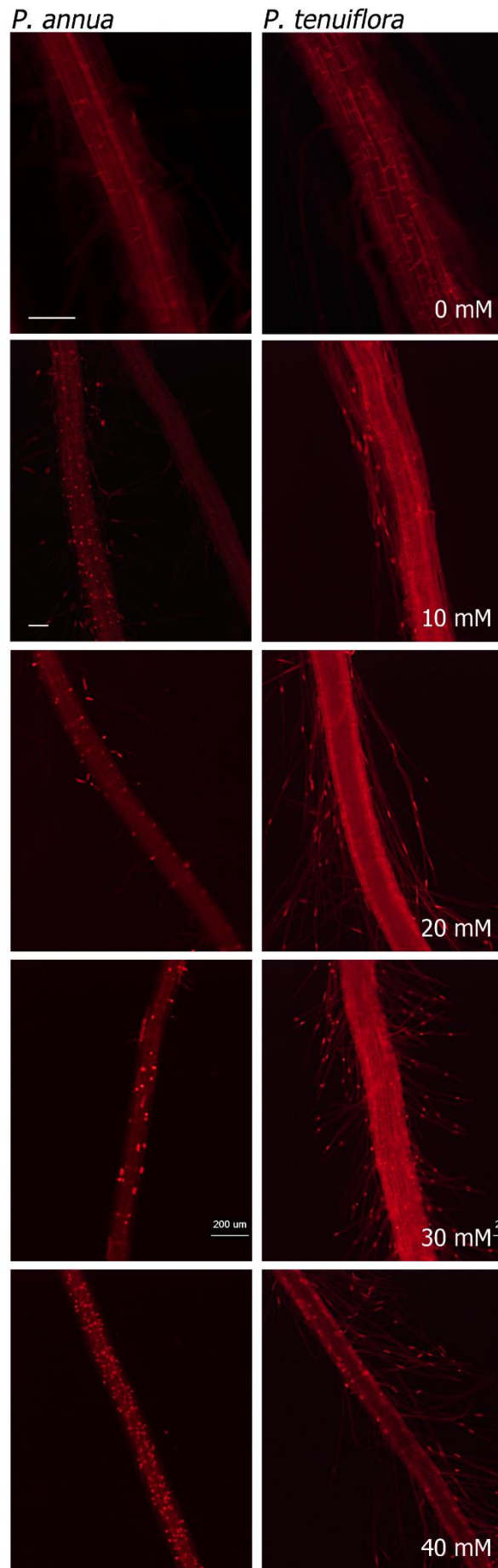
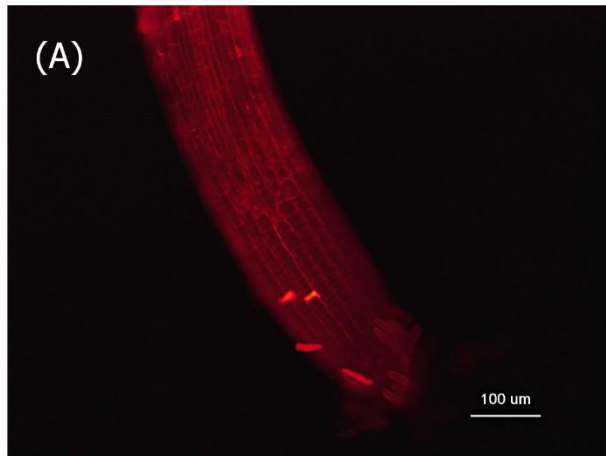


図 12 PI 染色。図 4 と同様の炭酸塩ストレス処理を一晩行った植物体を用いた。白いバーは 100  $\mu\text{m}$  を示す。0 mM の 2 枚の写真は同倍率、残りの写真はスズメノカタビラ 10 mM と同倍率である。

*P. annua*



*P. tenuiflora*

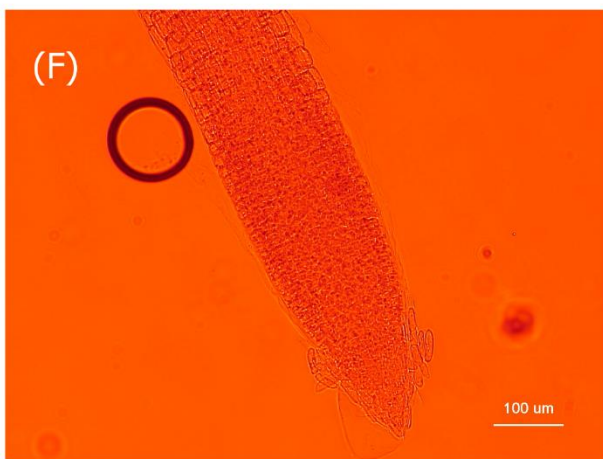
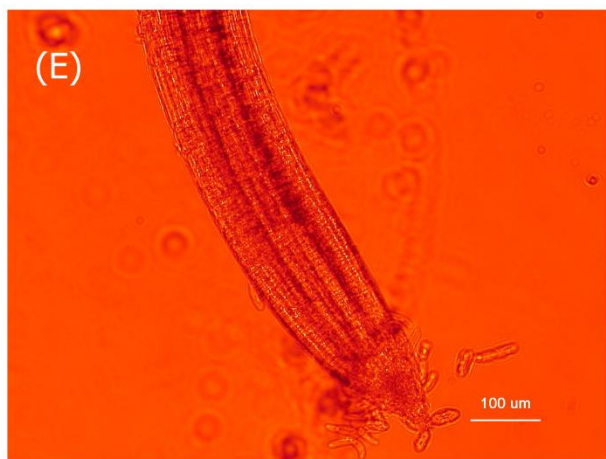
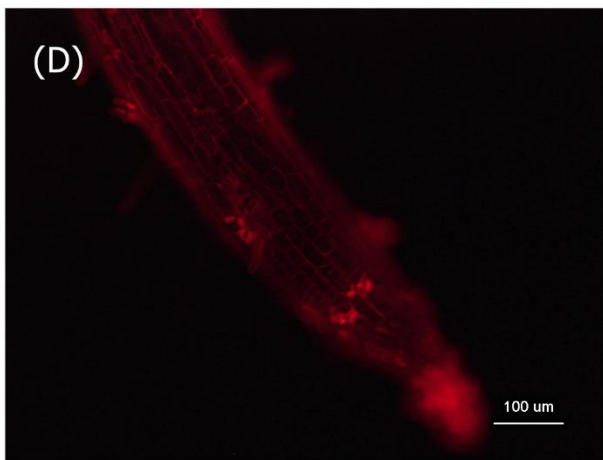
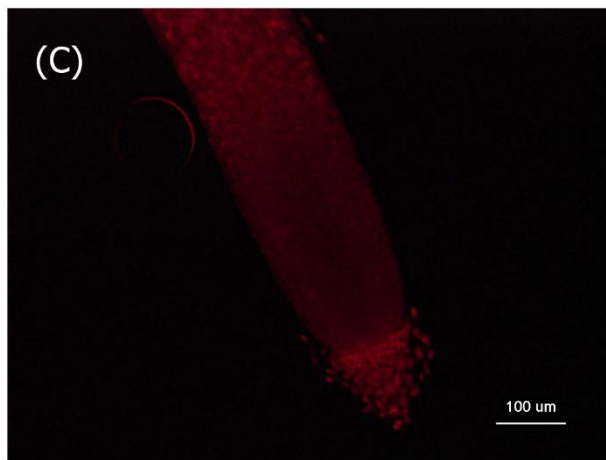
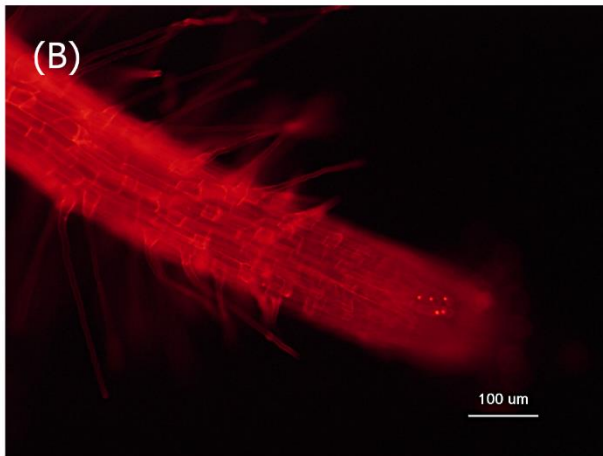


図13 根端部のPI染色像。(A)、(C)はスズメノカタビラ、(B)、(D)は*P. tenuiflora*。(A)と(B)はコントロール処理、(C)と(D)は40 mM  $\text{NaHCO}_3$ 処理後に染色・撮影した。(E)、(F)はそれぞれ(A)と(C)の明視野画像。



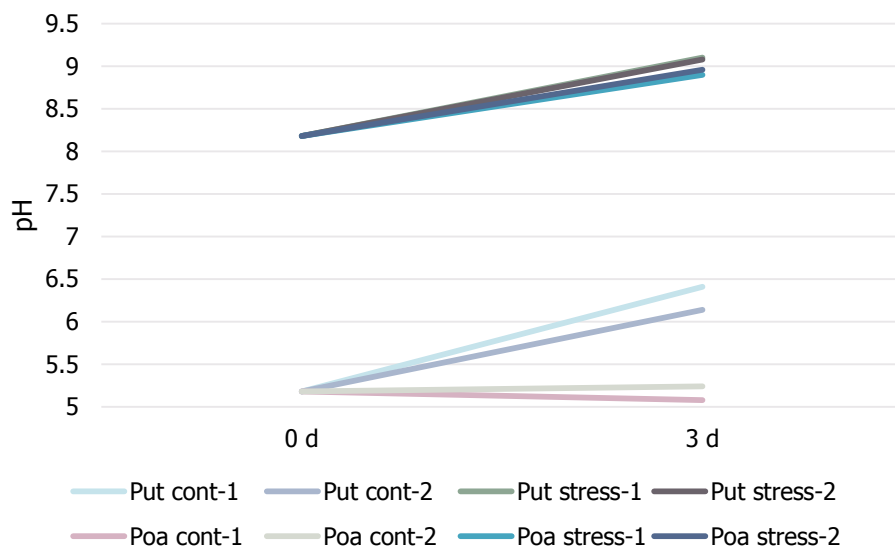


図 14 0 または 20 mM NaHCO<sub>3</sub> を含む 1/8×木村液で *P. tenuiflora* およびスズメノカタビラを生育させた試験の前後の水耕液 pH。Put は *P. tenuiflora*、Poa はスズメノカタビラを示し、数字はそれぞれひとつの栽培容器を示す。

#### 4.4 考察

スズメノカタビラは 300 mM NaHCO<sub>3</sub> 処理条件下で 5 日以内にほとんどの個体が枯死したことから、*P. tenuiflora* に比べて炭酸塩ストレス感受性が高いことがわかった (図 10C)。一方同濃度の NaCl 処理では、スズメノカタビラは外見上 *P. tenuiflora* に遜色ない程度の耐性を示した (図 10B)。この結果から NaCl と NaHCO<sub>3</sub> には異なる耐性機構が必要であることが推測され、またスズメノカタビラは前者への耐性のみを有していると考えられた。スズメノカタビラの根端には 40 mM NaHCO<sub>3</sub> 処理ですでに黒変と伸長停止が見られ (図 11、13)、また PI 染色により、スズメノカタビラの根では根端以外の細胞も炭酸塩ストレス処理により大きなダメージを受けていることが明らかになった (図 12)。一方で *P. tenuiflora* は 40 mM NaHCO<sub>3</sub> 処理条件下で根の伸長を続け、300 mM NaHCO<sub>3</sub> 処理条件下でも 5 日間生存したことから、植物の炭酸塩耐性には炭酸塩条件下で根を細胞レベルで保護する何らかの機構が重要であることが示唆された。

どちらの種でも、低濃度炭酸塩ストレス処理によってシュートの受けた生育阻害は根に比べ軽微であった (図 11)。これは炭酸塩処理によって根/シュート比が増大したとする過去の報告[51]や、シュートと根に同じように新鮮重や乾物重の減少が見られたとするイネ科植物の研究[9]とは矛盾する。これは植物の種間差を表すのかもしれない一方で、本実験においては炭酸塩処理が密閉したプレート内で行われ、培地の上方空間には培地中の炭酸塩に由来する CO<sub>2</sub> が豊富に含まれていたと考えられるため、これによる呼吸や光合成への影響がこの違いにつながったのかもしれない。

また水耕液 pH 測定の結果、*P. tenuiflora* は自ら水耕液の pH を上げる傾向にあることが示された (図 14)。その種間差が何によるかを明らかにすることは容易ではないが、後述する RNA-seq においてコントロール条件における遺伝子発現の種間比較を行った結果 (表 4)、*P. tenuiflora* では nitrate transporter、スズメノカタビラでは ammonium transporter の発現が高いという結果が得られたことは興味深い。植物に与える窒

素源を  $\text{NO}_3^-$  にすると根圏 pH は上昇し、 $\text{NH}_4^+$  にすると低下することが知られており [52,53]、これは細胞質のカチオン-アニオンバランスを維持するためと考えられている [54]。アルカリ性の土壌では硝化作用とアンモニアの揮発が早いため、窒素源がほぼ  $\text{NO}_3^-$  に限られていると考えられている [55]。今回用いた水耕液には  $\text{NO}_3^-$  と  $\text{NH}_4^+$  の両方が含まれているが、炭酸塩類集積土壌に適応した *P. tenuiflora* は  $\text{NO}_3^-$  を活発に吸収する機構を発達させているのかもしれない。さらに、アニオンバランスを維持するために  $\text{NO}_3^-$  吸収と同時に  $\text{OH}^-$  を細胞質から追い出す（あるいは  $\text{H}^+$  を吸収する；nitrate transporter は  $\text{H}^+$  と  $\text{NO}_3^-$  の共輸送を行っていると考えられている [56]）機構が *P. tenuiflora* では常に働いているとすると、細胞質 pH の上昇を抑えることになり、アルカリ性の炭酸塩土壌における生育に有利に働いている可能性がある。なお炭酸塩処理ではいずれの植物の水耕液でも pH の上昇が見られたが、これは  $\text{HCO}_3^- \rightarrow \text{CO}_2 + \text{OH}^-$  の変化の後に  $\text{CO}_2$  が空気中に放出されていったためと考えられる。植物の存在による水耕液 pH への影響は  $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{CO}_3/\text{HCO}_3^-$  のバッファリング能力により打ち消されてしまっているのかもしれない。

## 第五章 RNA-seq 法による *P. tenuiflora* とスズメノカタビラの網羅的遺伝子

### 発現解析

#### 5.1 緒論

野生植物を対象とした研究において、大量の情報を一度に得られる転写産物の網羅的解析（トランスクリプトーム解析）は有用なツールである。炭酸塩条件下でのトランスクリプトーム解析に関する報告は現在までにいくつかあり、炭酸塩耐性植物を対象とした研究には *Leymus chinensis*（羊草）を用いた EST 解析 [57]、*Tamarix hispida*（モンゴルヤナギ）の EST 解析および RNA-seq 解析 [58,59]、*Limonium bicolor*（イソマツ）のマイクロアレイ解析 [60] などがある。また炭酸塩感受性植物を対象とした研究にはツルマメのマイクロアレイ解析 [61]、トウモロコシの RNA-seq 解析 [62]、ミヤコグサのマイクロアレイ解析 [63]、アサの RNA-seq 解析 [64] などがある。しかしこれらのほとんどが単一の植物種・品種を解析対象としており、解析の結果観察された炭酸塩条件下における遺伝子発現変動が耐性植物と感受性植物に共通するものなのか、あるいは一方にしか見られない特徴なのかは明らかでない。処理条件や解析手法の違いから、論文間で比較を行うことも困難である。

*P. tenuiflora* のトランスクリプトーム解析に関する報告もすでに複数存在する [27–29]。しかし EST 解析またはマイクロアレイ解析が用いられてきたことから、検出できた転写産物はひとつの報告につき 5,000 個未満にとどまっている。近年さかんになった RNA-seq は次世代シーケンス技術を用いてサンプルから抽出した mRNA を網羅的に読む手法であるが、ゲノム配列などの情報が事前に必要ないうえ、EST 解析などの従来の手法に比べ多くの転写産物を一度に検出することができ、これまで検出できなかった転写産物の検出も可能になると期待される。本章では *P. tenuiflora* およびスズメノカタビラを用いた RNA-seq 解析により、炭酸塩ストレスに対する両種の遺伝子発現応答を解析した結果を述べる。さらに補足として、コントロール条件下における 2 種の遺伝子発現量の比較を試みる目的で、2 種に比較的近縁なモデル植物ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) の転写産物にそれぞれの種の通常条件処理で得られたリードをマッピングし、その発現量の比較を試みた結果を述べる。

#### 5.2 材料と方法

##### 5.2.1 ストレス処理とサンプリング

滅菌処理した *P. tenuiflora* およびスズメノカタビラの種子を水道水に浮かべたフロートに播種し、3~4 日ごとに水を交換しながら 19 日間生育させた。播種 19 日後の植物体を 0 または 20 mM NaHCO<sub>3</sub> を含む 1/8 × 木村液に移植し、48 時間後に収穫した。サンプリングは 3 反復 (biological replicates) とし、各反復につき 100 個体以上を収穫した。

##### 5.2.2 RNA 抽出と cDNA ライブラリの作成

サンプリングした植物体は根とシュートに分けて液体窒素で速やかに冷凍し、乳鉢と乳棒を用いて粉末

にした。粉末サンプルから製品プロトコールに従い RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いてトータル RNA を抽出し、トータル RNA から Dynabeads® DIRECT™ Micro Kit (Life Technologies) を用いて mRNA を単離した。mRNA は Ion Total RNA-seq Kit v2 (Life Technologies) の製品プロトコールにしたがって断片化し、逆転写および増幅を行い whole transcriptome ライブラリを作成した。各ステップにおいて、Agilent 2200 TapeStation と High Sensitivity RNA ScreenTape® および High Sensitivity D1000 ScreenTape® (Agilent Technologies) を用い断片化 RNA と増幅 cDNA の収量とサイズ分布を確認した。増幅 cDNA のサイズのピークが 200 bp に満たなかったライブラリ (一度目のランの全サンプル、二度目のランのスズメノカタビラ コントロール処理#2、*P. tenuiflora* コントロール#3 および *P. tenuiflora* ストレス処理#1) については、E-Gel® SizeSelect™ Agarose Gel (Life Technologies) を用いて 280 bp 前後の cDNA を抽出するサイズセレクションを行った。得られたライブラリについて、Ion OneTouch™ System および Ion PI™ Template OT2 200 Kit v3 (Life Technologies) を用い、template-positive な Ion PI™ Ion Sphere Particles を濃縮した。ライブラリの作成は同じサンプルセットを用いて 2 回行い、12 サンプルから 24 ライブラリを得た。

### 5.2.3 シーケンシングと *de novo* アセンブリおよびデータ解析

シーケンシングは製品プロトコールに従い、Ion Proton™ System と Ion PI™ Sequencing 200 Kit v3 (Life Technologies) を用いて行った。シーケンシング結果は FASTQ ファイルとして出力し、解析のため CLC Genomic Workbench 7.5 (CLC bio) へインポートした。CLC Genomic Workbench の Trimming ツールを用いてリードのトリミングを行い、クオリティスコア 0.05 未満の配列と 15 bp 未満のリードを除去した。一度目のランではこの段階で *de novo* アセンブリを行ったが、得られたコンティグの BLASTN 解析を行った結果、異なる転写産物由来の配列が誤ってひとつのコンティグにアセンブルされてしまう *trans chimera*[65] が多数含まれることが判明した。「発現変動転写産物」とし誤検出されてきたキメラの多くが rRNA とそれ以外の転写産物とのキメラであったことから、rRNA のコンタミネーションを減らすため、一度目のランでは粉末サンプルから直接 Dynabeads® DIRECT™ Micro Kit を用いて抽出していた mRNA を二度目のランではトータル RNA から単離した。これにより rRNA のコンタミネーションは大幅に減少したが、完全には除けなかった (表 1)。そのためシーケンシング後に SortMeRNA (ver. 1.99 beta, [66]) を用い、トリミング後のリードから rRNA と思われる配列の除去を行った。rRNA データベースにはソフトウェアに同梱されていた *silva-euk-18s-database-id95.fasta* および *silva-euk-28s-database-id95.fasta* を用い、リード長の下限値を 15 bp に設定するため “length of the sliding window” オプションを -L 14 に指定したほかはデフォルトの設定を用いた。rRNA を除いた後の配列は再び CLC Genomics Workbench にインポートした。一度目のランで得られたリードにも同様の処理を行い、2 ランで得た 24 ライブラリを合わせて植物種ごとに改めて *de novo* アセンブリを行った。アセンブリには CLC Genomics Workbench の De Novo Assembly ツールを用い、word size と bubble size はソフトによる自動設定 (その結果、スズメノカタビラと *P. tenuiflora* のそれぞれについて word size は 23 および 24 bp, bubble size は 108 および 119 bp となった) で行った。最短コンティグ長は 200 bp とし、コンティグの精度を上げるため、得られたコンティグに元のリードをマッピングし、結果に応じてコンティグの配列を更新した。マッピングに用いた設定は以下

の通りである： mismatch cost 2、 insertion cost 3、 deletion cost 3、 length fraction 0.8、 similarity fraction 0.95。発現量への PCR 増幅の影響を除くため CLC Genomics Workbench の Duplicate Read Removal plugin (ver. 1.0, beta) を用いてリードの duplicate の除去を行ったのち、CLC Genomics Workbench の RNA-Seq Analysis Tool を用いて、二度目のランで得たリードをコンティグにマッピングして遺伝子発現量の解析を行った。マッピングに用いた設定は以下の通りである： mismatch cost 2、 insertion cost 3、 deletion cost 3、 length fraction 0.8、 similarity fraction 0.8、 maximum number of hits for a read 10。得られた遺伝子発現量について、CLC Genomics Workbench の Empirical Analysis of DGE[67]ツールを用いてコントロール群とストレス処理群の間で比較を行った。また Reads per kilobase of exon per million mapped reads (RPKM) の計算も行った。EDGE test の結果コントロール群とストレス処理群の間で 2 倍以上 (FDR-corrected  $p$ -values < 0.05) の発現変動が見られた転写産物を「発現変動遺伝子」とし、これらについて BLASTX (BLAST+ ver. 2.2.30) と NCBI nr protein database (*taxid* 4479 のイネ科のみを抽出したもの) を用いたアノテーションを行った。Gene ontology (GO) 解析には Blast2GO (ver. 2.7.2; [68]) を用いた。rRNA 除去と duplicate 除去の結果は表 1 にまとめた。raw reads の FASTQ ファイルは DDBJ Sequence Read Archive に、発現変動が見られたコンティグの配列は DDBJ にそれぞれ登録した (BioProject ID: PRJDB322)。

表1 raw read、rRNA 除去後のリード、duplicate 除去後のリードの数。ライブラリ名中の数字は biological replicates を表す。

|         | Library name                               | Raw reads  | After trimming | After rRNA removal | After duplicate removal |
|---------|--|------------|----------------|--------------------|-------------------------|
| Trial 1 | <i>P. annua</i> control #1                 | 1,221,676  | 1,201,260      | 377,122            | 365,988                 |
|         | <i>P. annua</i> control #2                 | 1,326,619  | 1,297,889      | 636,339            | 618,198                 |
|         | <i>P. annua</i> control #3                 | 1,371,558  | 1,331,303      | 575,493            | 562,330                 |
|         | <i>P. annua</i> NaHCO <sub>3</sub> #1      | 6,309,444  | 5,485,722      | 3,014,428          | 2,804,851               |
|         | <i>P. annua</i> NaHCO <sub>3</sub> #2      | 4,485,250  | 4,061,710      | 1,891,144          | 1,798,961               |
|         | <i>P. annua</i> NaHCO <sub>3</sub> #3      | 12,398,809 | 11,594,592     | 5,869,987          | 5,405,662               |
|         | <i>P. tenuiflora</i> control #1            | 1,577,650  | 1,530,988      | 585,050            | 564,038                 |
|         | <i>P. tenuiflora</i> control #2            | 1,721,592  | 1,667,846      | 714,887            | 691,831                 |
|         | <i>P. tenuiflora</i> control #3            | 1,291,296  | 1,261,253      | 538,138            | 524,223                 |
|         | <i>P. tenuiflora</i> NaHCO <sub>3</sub> #1 | 2,361,633  | 2,195,966      | 1,313,286          | 1,239,410               |
|         | <i>P. tenuiflora</i> NaHCO <sub>3</sub> #2 | 13,744,215 | 12,175,016     | 6,715,728          | 6,069,658               |
|         | <i>P. tenuiflora</i> NaHCO <sub>3</sub> #3 | 12,779,944 | 11,844,012     | 6,109,852          | 5,554,015               |
| Trial 2 | <i>P. annua</i> control #1                 | 4,067,142  | 4,041,424      | 3,422,795          | 3,053,814               |
|         | <i>P. annua</i> control #2                 | 2,756,049  | 2,736,724      | 2,218,280          | 1,836,941               |
|         | <i>P. annua</i> control #3                 | 3,566,929  | 3,545,502      | 3,146,146          | 2,620,974               |
|         | <i>P. annua</i> NaHCO <sub>3</sub> #1      | 23,931,480 | 23,734,563     | 21,874,365         | 14,381,537              |
|         | <i>P. annua</i> NaHCO <sub>3</sub> #2      | 3,144,662  | 3,036,706      | 2,498,396          | 2,203,896               |
|         | <i>P. annua</i> NaHCO <sub>3</sub> #3      | 2,874,893  | 2,852,650      | 2,274,594          | 1,979,087               |
|         | <i>P. tenuiflora</i> control #1            | 3,311,254  | 3,287,158      | 2,878,206          | 2,440,290               |
|         | <i>P. tenuiflora</i> control #2            | 2,702,464  | 2,679,783      | 2,172,421          | 1,924,276               |
|         | <i>P. tenuiflora</i> control #3            | 1,474,054  | 1,427,478      | 1,191,040          | 1,080,375               |
|         | <i>P. tenuiflora</i> NaHCO <sub>3</sub> #1 | 2,972,086  | 2,876,671      | 2,489,945          | 2,186,153               |
|         | <i>P. tenuiflora</i> NaHCO <sub>3</sub> #2 | 3,506,956  | 3,471,033      | 2,881,652          | 2,593,260               |
|         | <i>P. tenuiflora</i> NaHCO <sub>3</sub> #3 | 2,360,628  | 2,339,598      | 2,029,696          | 1,765,696               |

#### 5.2.4 リアルタイム RT-PCR 解析

NaHCO<sub>3</sub> ストレスで発現変動していた遺伝子のいくつかを選び、リアルタイム RT-PCR 解析を行った。RNA-seq に用いたものと同じサンプルから RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いたトータル RNA の抽出を行い、High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit (Life Technologies) を用いて逆転写を行った。得られた cDNA を 20 倍希釈し、1 μl をリアルタイム PCR のテンプレートに用いた。PCR は SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNase H Plus) (TaKaRa) と StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いて各サンプルにつき 3 反復ずつ行い、内在性コントロールには *P. tenuiflora* の tubulin 遺伝子を用いた[20]。増幅に用いたプライマーは前項で得たコンティグをもとに増幅産物が 80~200 bp になるように設計し (表 2)、PCR サイクルは以下のように設定した：95°C (30 秒)、{95°C(5 秒) 60°C(30 秒)} ×40 サイクル。

表2 定量 RT-PCR に用いられたプライマーのリスト。

| Primer name  | Sequence              |
|--------------|-----------------------|
| Put_1383 FW  | CGTCGCCTTCATAGACATCA  |
| Put_1383 RV  | GGCACGATGAAGGTGGTACT  |
| Put_4625 FW  | GGGGATGATTTGTTACACACC |
| Put_4625 RV  | CATCTGCAGGGTACCAATCC  |
| Put_1357 FW  | GTGGCCGTGGTGATACTCTT  |
| Put_1357 RV  | GAAAATGAACTGCGTCAGCA  |
| Put_22802 FW | TCCAAATTATGAGGCACGCG  |
| Put_22802 RV | TTGCAGCTGTGTTCTTGTCC  |
| Put_2050 FW  | TTGGCTGGAGAATTTGATCC  |
| Put_2050 RV  | CCAGAGAACCGAAGTGGGTA  |
| Put_1973 FW  | CGTCATGCACTACCTCATGC  |
| Put_1973 RV  | AGCCTGTTGTGATCAGTCGA  |
| Put_11515 FW | TCGATGTGAATGATGCAGCG  |
| Put_11515 RV | GCAGGCCGTGAGAAAATGGTA |

### 5.2.5 コントロール条件下遺伝子発現の種間比較

5.2.3 で得られた2度目のランのコントロール条件のリードを同項と同様に処理して rRNA や PCR による重複を除き、CLC Genomics Workbench の RNA-seq Analysis Tool を用いて PlantGDB から得たミナトカモジグサの転写産物配列 ([http://www.plantgdb.org/download/Download/xGDB/BdGDB/Bdistachyon\\_192\\_transcript.fa.bz2](http://www.plantgdb.org/download/Download/xGDB/BdGDB/Bdistachyon_192_transcript.fa.bz2)) へのマッピングを行い、遺伝子発現量を求めた。マッピング条件は以下のように設定した； mismatch cost 2、insertion cost 3、deletion cost 3、length fraction 0.7、similarity fraction 0.8。得られた遺伝子発現量について、CLC Genomics Workbench の Empirical Analysis of DGE ツールを用いてスズメノカタビラと *P. tenuiflora* の間で比較を行った。EDGE test の結果スズメノカタビラと *P. tenuiflora* の間で2倍以上 (FDR-corrected  $p$ -values < 0.05) の発現量の差が見られた転写産物を「発現変動遺伝子」とした。なお EDGE test で算出される発現量は総リード数に対してノーマライズされている。2倍以上の差が見られた転写産物のうち一方の植物種でしか発現していなかったものについては、配列の類似度の違いにより一方の種のリードしかマッピングされなかったものである可能性が高いとして除去した。残った転写産物について BLASTX と NCBI nr protein database (*taxid* 4479 のイネ科のみを抽出したもの) を用いたアノテーションを行った。Gene ontology (GO) 解析には Blast2GO を用いた。

## 5.3 結果

### 5.3.1 *de novo* アセンブリ

同一のサンプルを用いた二度のランにより、*P. tenuiflora* とスズメノカタビラのそれぞれについて 29,619,901 リードと 47,700,089 リードが得られ、*de novo* アセンブリによりそれぞれ 77,329 本と 115,335 本のコンティグが得られた。*trans chimera* を避けるためにアセンブリ条件を厳しく設定した結果、比較的短

いコンティグが多数得られた。全コンティグを BLASTX 検索にかけた結果、最も類似度の高かった検索結果 (top BLASTX hits) の種分布を図 15 に示す。いずれの種についても最も多く top BLASTX hits に現れた生物種はタルホコムギ (*Aegilops tauschii*) であり、種分布は 2 種間で非常によく似ていた。



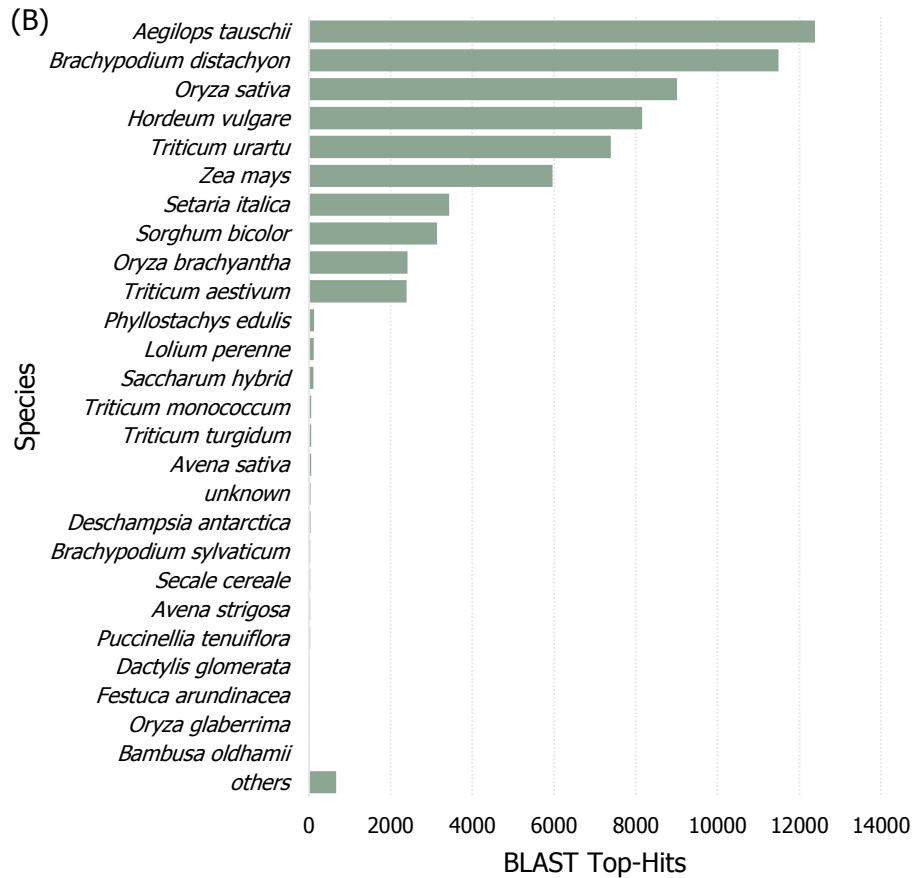
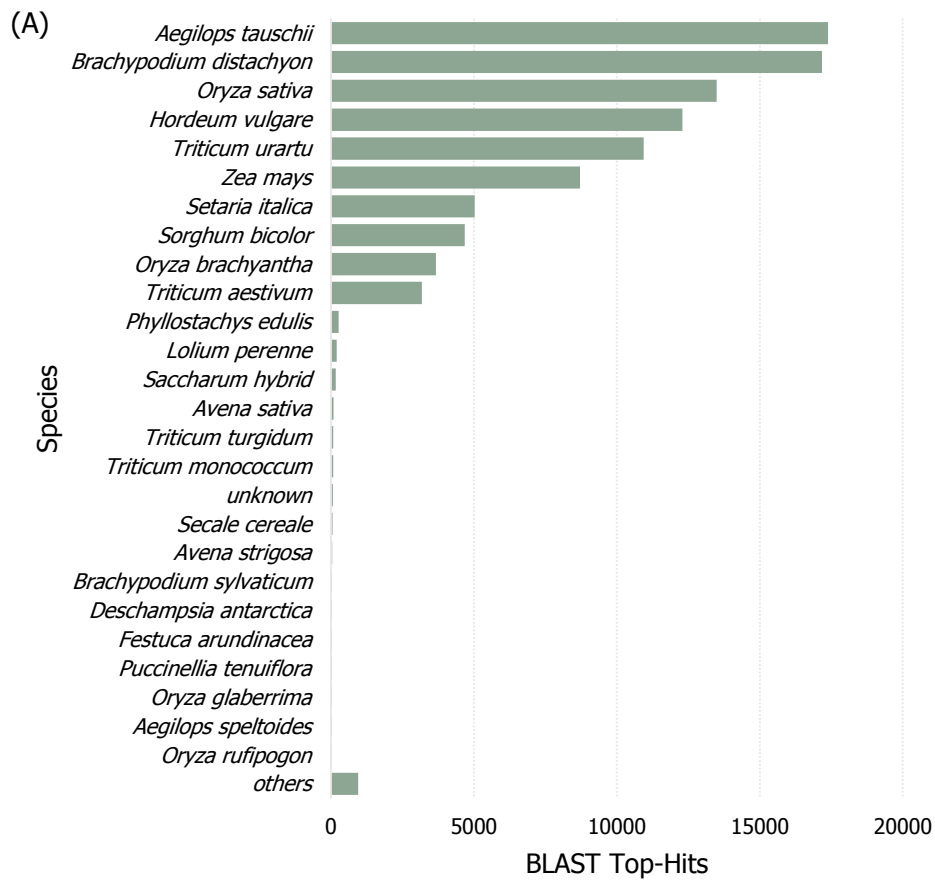


図 15 Top BLASTX hits の種分布。(A) スズメノカタビラ、(B) *P. tenuiflora*。

### 5.3.2 リードマッピングとアノテーション

二度目のランで得られた duplicate 除去後のリードをコンティグにマッピングすることで遺伝子発現量を算出し、得られた遺伝子発現量をコントロール処理サンプルと NaHCO<sub>3</sub> ストレス処理サンプルとの間で比較した。ストレス処理により 2 倍以上の発現変動が見られた転写産物は *P. tenuiflora* で 157 個、*P. annua* で 1,090 個あった (図 16A・B、表 3)。表 3 の Fold change (original values) とラベルされた列が表す RPKM で計算された発現変動幅の値において、 $\infty$  と  $-\infty$  はそれぞれストレス処理群でのみ、またはコントロール処理群でのみ検出された転写産物を表している。これらは実際に著しい発現変動をする遺伝子産物である可能性もあるが、コンティグのミスアセンブリによって検出されたアーティファクトである可能性もある。

発現変動した遺伝子については、BLASTX 検索と GO 解析を行った。BLASTX でヒットが得られた転写産物のうち 70~79 % には GO 解析でアノテーションがつけられ (図 16C・D)、3 つの GO term 内の 39 の functional group に分類された (図 16E・F)。糖や窒素の代謝に関連する発現変動遺伝子の一部を図 17 にまとめる。

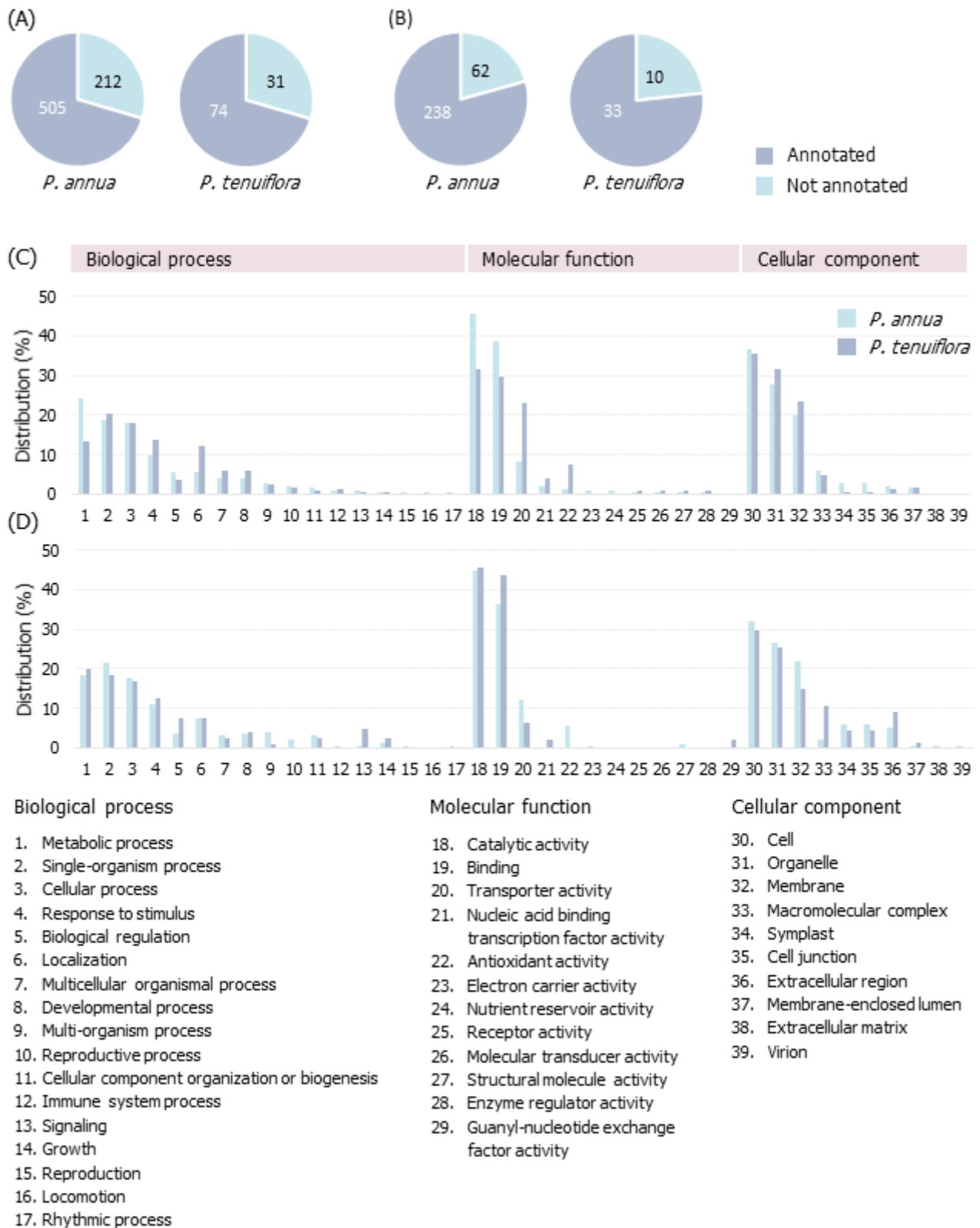


図 16 RNA-seq 解析結果の概略。(A)、(B) は  $\text{NaHCO}_3$  ストレス処理によって発現が変動した転写産物の数と、そのうち BLASTX で検索結果の得られたものの数。(A) スズメノカタビラ、(B) *P. tenuiflora*。(C)、(D) は BLASTX で検索結果が得られたコンティグのうち、Blast2GO でアノテーションされたものの割合。(C) 発現上昇遺伝子、(D) 発現抑制遺伝子。(E) と (F)、発現変動遺伝子の GO 解析の結果。(E) 発現上昇遺伝子、(F) 発現抑制遺伝子。

表3 RNA-seq解析の結果、発現変動が見られた遺伝子(2倍以上の発現変動、FDR-corrected  $p$ -value < 0.05)の一覧。Sequence desc.はBDA (Blast2GO Descriptor Annotator)によってつけられたアノテーションで、当該コンティグのすべてのBLAST hit description中に最も多く見られた単語を示す。Top hit ACCはBLAST top hitのアクセッション番号を示す。

(A) スズメノカタビラ・発現上昇

| Feature ID | Sequence desc.  | Contig |              | E-Value   | Experiment -    | EDGE test:      | EDGE test:  |
|------------|---|--------|--------------|-----------|-----------------|-----------------|-------------|
|            |   | length | Top hit ACC  |           | Fold Change     | Fold change     | FDR p-value |
|            |   |        |              | (original | (stress/control | (stress/control | correction  |
|            |   |        |              | values)   | )               | )               |             |
| Poa_100224 | calmodulin  | 314    | AAK13107     | 0.001817  | 27.6996         | 26.37984        | 0.043128    |
| Poa_100462 | low quality protein: f-box fbd lrr-repeat protein at1g51370-like      | 287    | XP_003576578 | 6.89907   | 39.82188        | 35.28166        | 0.011466    |
| Poa_100676 | s-adenosyl-l-homocysteine hydrolase                                   | 253    | AFW60834     | 1.12E-30  | ∞               | 82.05027        | 0.031902    |
| Poa_101361 | retrotransposon ty3-gypsy subclass                                    | 463    | XP_003563627 | 1.42E-24  | 9.755564        | 9.480466        | 0.001611    |
| Poa_102317 | peroxidase 2  | 272    | XP_008673964 | 0.068908  | 3.915565        | 4.002265        | 0.010219    |
| Poa_10237  | probable glutathione s-transferase gstu6-like                         | 1318   | XP_006649695 | 3.48E-87  | 2.614503        | 2.709569        | 0.022686    |
| Poa_1033   | cytochrome p450   | 402    | XP_002459492 | 1.70E-66  | 64.0215         | 65.23199        | 7.91E-33    |
| Poa_10339  | unnamed protein product   | 466    | CDM81441     | 4.32E-08  | 21.73712        | 22.10563        | 1.02E-18    |
| Poa_1034   | cytochrome p450   | 607    | XP_002459492 | 3.21E-112 | 22.39112        | 23.00512        | 7.85E-25    |
| Poa_103451 | wall-associated receptor kinase 5                                     | 200    | XP_004964206 | 1.24E-24  | ∞               | 90.0215         | 0.008342    |
| Poa_103670 | peroxidase 1  | 166    | EMS48320     | 4.47E-18  | 5.718414        | 5.89518         | 0.010714    |
| Poa_104283 | probable adp-ribosylation factor gtpase-activating protein agd14-like | 391    | XP_006651333 | 0.749817  | 3.880431        | 3.983248        | 0.000411    |
| Poa_10453  | purple acid phosphatase 22-like                                       | 216    | EMT26074     | 2.79E-33  | 24.76573        | 23.88751        | 0.009813    |
| Poa_10490  | crocetin glucosyltransferase 2-like                                   | 245    | BAJ85997     | 3.70E-41  | 25.91704        | 23.16846        | 6.24E-05    |
| Poa_10491  | crocetin glucosyltransferase 2-like                                   | 767    | EMS63799     | 2.19E-139 | 72.66012        | 66.39577        | 4.21E-17    |
| Poa_10598  | ent-kaurene synthase  | 605    | XP_003581651 | 3.48E-62  | 3.937159        | 4.048514        | 0.002379    |
| Poa_105982 | retrotransposon unclassified  | 354    | CAH66431     | 4.93E-25  | 610.8676        | 591.6638        | 2.69E-32    |

|            |   |      |              |           |          |          |          |
|------------|---|------|--------------|-----------|----------|----------|----------|
| Poa_106134 | disease resistance rpp13-like protein 1           | 264  | EMS53736     | 0.004006  | ∞        | 86.24181 | 0.018801 |
| Poa_10660  | cipk-like protein expressed                       | 1235 | XP_003562157 | 0         | 11.57985 | 11.2292  | 0.000335 |
| Poa_10678  | ap2-erebp transcription partial                   | 615  | EMT24923     | 2.51E-27  | 5.488548 | 5.497946 | 0.003273 |
| Poa_10681  | cytochrome p450                                   | 334  | XP_002459492 | 3.61E-61  | ∞        | 2519.511 | 1.12E-37 |
| Poa_10686  | chymotrypsin inhibitor-2                          | 296  | EMT00963     | 3.60E-17  | ∞        | 454.5259 | 3.28E-17 |
| Poa_10724  | pathogenesis-related protein 1                    | 384  | XP_004984905 | 2.10E-44  | 24.91597 | 24.4562  | 7.04E-13 |
| Poa_10737  | protein yls9-like                                 | 676  | AFW60415     | 1.53E-59  | 9.298309 | 9.639609 | 2.42E-07 |
| Poa_10738  | leucine rich repeat family expressed              | 207  | EEC68357     | 6.62102   | 10.55519 | 10.30889 | 0.010746 |
| Poa_10740  | crocetin glucosyltransferase 2-like               | 1322 | EMT29673     | 1.28E-120 | 4.336316 | 4.411919 | 0.007826 |
| Poa_10795  | crocetin glucosyltransferase 2-like               | 1054 | EMS56083     | 2.04E-144 | 15.01664 | 14.10978 | 0.000423 |
| Poa_1081   | abc transporter a family member 7-like isoform x4 | 981  | XP_003574455 | 3.99E-151 | 3.941034 | 4.071874 | 1.65E-05 |
| Poa_10916  | e3 ubiquitin-protein ligase sina-like 6           | 475  | EMS49581     | 9.79488   | 3.663961 | 3.717623 | 0.009743 |
| Poa_10919  | phosphate partial                                 | 260  | CAC69856     | 4.99E-27  | 36.37455 | 32.78155 | 3.15E-05 |
| Poa_10927  | abc transporter b family member 4-like            | 484  | EMS56139     | 7.75E-64  | ∞        | 86.12307 | 0.010606 |
| Poa_10941  | wall-associated receptor kinase 5                 | 348  | BAJ95069     | 1.12E-70  | 4.038187 | 4.179473 | 0.004311 |
| Poa_10947  | histone-lysine n-methyltransferase suvr5          | 315  | EMT24415     | 0.098089  | 15.42388 | 15.53291 | 6.17E-09 |
| Poa_11040  | mads-box transcription factor 27-like             | 446  | EMT04698     | 5.17E-65  | 6.906841 | 6.883091 | 0.003624 |
| Poa_11189  | high affinity nitrate transporter                 | 219  | EMS65308     | 7.34E-42  | 8.763506 | 8.639781 | 0.003189 |
| Poa_112    | protein translation factor sui1                   | 340  | XP_003568176 | 4.12E-22  | 2.573875 | 2.65335  | 0.047166 |
| Poa_11224  | abc transporter a family member 2-like            | 755  | XP_003574455 | 2.37E-133 | 2.724899 | 2.845535 | 0.025802 |
| Poa_11241  | premnaspirodiene oxygenase-like                   | 1034 | EMT28726     | 2.09E-121 | 4.090397 | 4.18463  | 0.002628 |
| Poa_1125   | atp-citrate synthase                              | 540  | EMT10257     | 3.21E-124 | 2.379247 | 2.464372 | 0.010869 |
| Poa_11285  | protein kinase superfamily protein                | 316  | EMT07274     | 2.60E-57  | 10.22397 | 10.34007 | 1.15E-09 |
| Poa_11293  | cytochrome b5                                     | 724  | XP_003569990 | 2.74E-33  | 259.1633 | 220.0876 | 8.18E-25 |
| Poa_11398  | denn domain-containing protein 5b                 | 407  | XP_003581337 | 1.61E-14  | ∞        | 81.22043 | 0.02115  |
| Poa_11399  | nbs-lrr type protein                              | 536  | XP_003581337 | 2.02E-15  | 25.04881 | 20.82103 | 0.030166 |
| Poa_114    | farnesyl pyrophosphate synthetase                 | 593  | EMT29151     | 7.87E-46  | 2.243462 | 2.308072 | 0.027542 |

|           |  |      |              |           |          |          |          |
|-----------|--|------|--------------|-----------|----------|----------|----------|
| Poa_11418 | nac domain-containing protein 100-like   | 944  | BAK02354     | 2.72E-126 | 3.569291 | 3.641811 | 0.011463 |
| Poa_11448 | n-acetyltransferase 9-like   | 284  | BAJ89267     | 1.32E-48  | 3.767104 | 3.864002 | 0.010701 |
| Poa_11553 | mate efflux family protein 5-like  | 587  | EMT22358     | 1.35E-63  | 3.371948 | 3.444006 | 0.021536 |
| Poa_11692 | phenylalanine ammonia-lyase  | 923  | BAF93189     | 3.77E-134 | 4.075018 | 4.210376 | 0.021536 |
| Poa_11705 | serine threonine-protein kinase nak  | 379  | EMT12556     | 1.20E-53  | 5.985299 | 6.00876  | 0.005879 |
| Poa_11807 | bifunctional monodehydroascorbate reductase and carbonic anhydrase nectarin-3-like | 832  | XP_003574630 | 1.77E-139 | 4.211424 | 4.322104 | 0.004403 |
| Poa_11964 | rop guanine nucleotide exchange factor 1   | 683  | ACL54801     | 5.47185   | 7.138706 | 7.080686 | 0.00547  |
| Poa_11973 | flavonoid 3 -monooxygenase-like  | 544  | AER39773     | 8.24E-106 | 9.802442 | 9.786529 | 3.34E-07 |
| Poa_11974 | flavonoid 3 -monooxygenase-like  | 387  | AER39773     | 2.37E-73  | 12.59597 | 12.90718 | 2.4E-11  |
| Poa_12026 | subtilisin-like protease   | 891  | XP_003572330 | 1.25E-109 | 94.5958  | 81.99136 | 3.76E-18 |
| Poa_12044 | calmodulin-binding expressed   | 220  | XP_006664085 | 1.04E-32  | 5.264985 | 5.36421  | 0.039664 |
| Poa_12057 | abc transporter b family member 4-like   | 828  | EMS46445     | 6.46E-141 | 7.338942 | 7.374351 | 0.001347 |
| Poa_12119 | lrr receptor-like serine threonine-protein kinase                                  | 235  | BAK01364     | 3.60E-11  | 17.49137 | 15.51466 | 0.024965 |
| Poa_12121 | adenosine 3-phospho 5-phosphosulfate transporter 1                                 | 752  | XP_003563693 | 4.26E-80  | 3.876142 | 3.984741 | 0.002382 |
| Poa_12197 | universal stress protein a-like  | 329  | AAP04431     | 3.23E-58  | 3.52402  | 3.562975 | 0.020887 |
| Poa_12214 | potassium channel skor   | 680  | XP_003560852 | 9.51E-118 | 6.426727 | 6.514674 | 3.69E-05 |
| Poa_12231 | hypothetical protein F775_18810  | 483  | EMT15469     | 2.29E-13  | ∞        | 104.8199 | 0.010805 |
| Poa_12298 | wall-associated receptor kinase 3  | 1761 | XP_003579135 | 0         | 3.838714 | 3.957919 | 0.008774 |
| Poa_12329 | partial  | 393  | EMS63997     | 1.74E-87  | 3.002485 | 3.102911 | 0.000849 |
| Poa_12372 | nad h-bispecific nitrate partial   | 445  | EMS60282     | 3.22E-99  | 18.79769 | 18.1475  | 1.35E-07 |
| Poa_12387 | anthocyanidin -o-glucosyltransferase-like  | 664  | XP_003567086 | 2.89E-136 | 5.046128 | 5.088949 | 0.008758 |
| Poa_12392 | PREDICTED: uncharacterized protein LOC100821464                                    | 645  | XP_003580322 | 1.84E-53  | 2.486967 | 2.554495 | 0.021962 |
| Poa_12469 | probable l-type lectin-domain containing receptor kinase -like                     | 697  | BAJ85369     | 3.29E-18  | 2.706968 | 2.765317 | 0.041983 |
| Poa_12479 | hsf transcription partial  | 655  | EMT31202     | 3.76E-95  | 3.003896 | 3.115428 | 0.040887 |
| Poa_12565 | hva22-like protein i-like  | 1085 | XP_003578887 | 8.24E-85  | 4.108556 | 4.190348 | 0.000309 |
| Poa_12799 | lysyl-trna synthetase  | 1081 | EMS63014     | 0         | 6.851887 | 6.922736 | 3.85E-07 |
| Poa_12863 | high affinity nitrate transporter  | 268  | AAC49532     | 2.59E-52  | 5.53399  | 5.545114 | 0.009913 |

|           |   |      |              |           |          |          |          |
|-----------|---|------|--------------|-----------|----------|----------|----------|
| Poa_12893 | protein transparent testa 12  | 316  | XP_003579578 | 5.39E-44  | 8.950925 | 8.94453  | 2.58E-05 |
| Poa_12907 | =-beta-bisabolene synthase-like   | 478  | XP_002461617 | 4.65E-65  | 103.7773 | 101.0572 | 2.43E-27 |
| Poa_12968 | l-type lectin-domain containing receptor kinase -like                     | 636  | XP_003576971 | 1.69E-64  | 2.589482 | 2.660993 | 0.021301 |
| Poa_1305  | importin alpha-2 subunit  | 843  | ADD65763     | 1.52E-139 | 3.589602 | 3.661512 | 0.008242 |
| Poa_13197 | probable beta- -galactosyltransferase 19-like                             | 973  | BAJ98376     | 0         | 3.025962 | 3.111987 | 0.004396 |
| Poa_13238 | probable lrr receptor-like serine threonine-protein kinase at3g47570-like | 696  | EMT09183     | 3.64E-106 | 6.644538 | 6.637101 | 0.020867 |
| Poa_13301 | nac transcription factor  | 812  | EMT10101     | 5.92E-37  | 3.229899 | 3.34188  | 0.000882 |
| Poa_13388 | disease resistance protein rga2   | 223  | EMS53587     | 0.68256   | 2.736013 | 2.773965 | 0.028275 |
| Poa_1342  | hypothetical protein TRIUR3_22325   | 217  | EMS66038     | 2.69E-27  | 9.419813 | 9.115025 | 0.009065 |
| Poa_1350  | membrane protein  | 413  | EMS67341     | 2.44E-16  | 7.382408 | 7.65619  | 1.78E-07 |
| Poa_13543 | valyl-trna synthetase   | 701  | EMT23835     | 2.87E-110 | 3.913988 | 3.961905 | 0.043111 |
| Poa_1358  | =-beta-bisabolene synthase-like   | 255  | XP_002461617 | 9.38E-42  | 8.31669  | 8.287811 | 0.024771 |
| Poa_1359  | (+)-delta-cadinene synthase isozyme c2                                    | 472  | XP_002461617 | 8.57E-61  | ∞        | 1532.354 | 9.69E-33 |
| Poa_1360  | (+)-delta-cadinene synthase isozyme c2                                    | 368  | XP_002461617 | 5.55E-77  | 218.9349 | 202.7281 | 1.07E-35 |
| Poa_13619 | pre-mrna cleavage complex 2 protein pcf11                                 | 285  | XP_003566931 | 1.86E-18  | 5.085945 | 5.059987 | 0.018731 |
| Poa_13629 | vacuolar-sorting receptor 6-like  | 473  | EMT21004     | 4.6774    | ∞        | 335.3697 | 1.27E-12 |
| Poa_1374  | protein   | 1176 | XP_003581462 | 1.11E-55  | 2.795532 | 2.858494 | 0.015634 |
| Poa_13796 | abc transporter b family member 4-like                                    | 732  | BAJ94394     | 3.71E-158 | 2.510001 | 2.570418 | 0.012471 |
| Poa_13805 | transposon en spm sub-class   | 304  | AAR01649     | 3.64573   | 3.490761 | 3.589777 | 0.005295 |
| Poa_13848 | hypersensitive-induced response protein                                   | 255  | NP_001056492 | 4.92E-50  | 2.9758   | 3.070444 | 0.000676 |
| Poa_13849 | hypersensitive-induced response protein                                   | 209  | AFA36490     | 2.17E-39  | 6.262586 | 6.440518 | 5.31E-09 |
| Poa_13944 | glutamate receptor  | 264  | EMS65474     | 1.81E-16  | 12.26968 | 11.65901 | 0.01612  |
| Poa_13955 | patatin group a-3   | 715  | EMT32376     | 3.22E-134 | 2.416444 | 2.519065 | 0.041708 |
| Poa_1398  | mate efflux family protein alf5-like                                      | 453  | EMS58348     | 1.21E-41  | 2.876054 | 2.970021 | 0.010372 |
| Poa_14050 | hypothetical protein F775_04802   | 353  | EMT21296     | 1.52115   | 7.64379  | 7.826185 | 8.91E-07 |
| Poa_1414  | acetyl- cytosolic 2   | 1087 | XP_003580738 | 0         | 2.315851 | 2.401003 | 0.041983 |
| Poa_14155 | non-lysosomal glucosylceramidase  | 365  | EMS49959     | 1.04E-43  | 3.861879 | 3.95146  | 7.23E-05 |

|           |  |      |              |           |          |          |          |
|-----------|--|------|--------------|-----------|----------|----------|----------|
| Poa_14226 | mads transcription partial   | 316  | NP_001288326 | 3.47E-36  | 5.424509 | 5.411066 | 0.034944 |
| Poa_14253 | subtilisin-like protease   | 248  | EMS63058     | 1.12E-46  | ∞        | 235.2594 | 3.47E-09 |
| Poa_14291 | =-like protein   | 1567 | XP_003576981 | 0         | 3.598132 | 3.663683 | 0.007655 |
| Poa_14370 | disease resistance response protein 206-like                             | 542  | NP_001058710 | 3.44E-30  | 7.524738 | 7.427693 | 0.01065  |
| Poa_14371 | disease resistance response protein 206-like                             | 709  | NP_001058710 | 3.58E-38  | 4.974089 | 5.093365 | 1.63E-05 |
| Poa_14400 | crocetin glucosyltransferase 2-like                                      | 343  | BAJ85997     | 4.21E-39  | 9.662748 | 9.31238  | 0.005267 |
| Poa_14401 | exonuclease family expressed   | 455  | XP_003573879 | 1.55E-71  | 7.258795 | 7.434635 | 4.93E-10 |
| Poa_1462  | terpene synthase   | 383  | XP_002461617 | 4.01E-45  | ∞        | 1656.024 | 1.33E-31 |
| Poa_1463  | terpene synthase   | 441  | XP_002461617 | 4.91E-60  | 365.9165 | 294.2864 | 3.96E-32 |
| Poa_14805 | uncharacterized kda  | 353  | EMT07515     | 3.66E-73  | 3.056117 | 3.128098 | 0.002935 |
| Poa_14809 | reticuline oxidase-like protein  | 502  | EMT13083     | 2.56E-99  | 2.611537 | 2.670966 | 0.010701 |
| Poa_1482  | =-beta-bisabolene synthase-like  | 438  | XP_002461617 | 7.62E-94  | 313.2943 | 273.9692 | 2.73E-31 |
| Poa_14852 | retrotransposon unclassified   | 221  | CAH67713     | 1.14E-08  | 12.88588 | 12.33823 | 0.000248 |
| Poa_1503  | harpin inducing protein  | 409  | AFW60411     | 1.73E-20  | ∞        | 1024.367 | 3.39E-24 |
| Poa_15034 | lipoygenase  | 456  | BAJ93891     | 6.15E-72  | 22.95941 | 21.57072 | 2.53E-06 |
| Poa_1504  | protein yls9-like  | 409  | AFW60411     | 1.90E-24  | 110.921  | 90.3556  | 5.46E-16 |
| Poa_15335 | wrky transcription factor 70   | 1039 | EMS68912     | 5.69E-75  | 3.190331 | 3.258783 | 0.004024 |
| Poa_15336 | probable wrky transcription factor 70-like                               | 1094 | EMS68912     | 1.26E-42  | 4.012907 | 4.092092 | 0.007079 |
| Poa_15403 | calmodulin-binding family protein  | 500  | EMT02285     | 8.22E-91  | 3.764697 | 3.868544 | 0.001332 |
| Poa_15474 | nbs-lrr partial  | 908  | EMS63949     | 8.69E-145 | 2.845334 | 2.906969 | 0.040698 |
| Poa_15494 | protein yls9-like  | 288  | AFW60411     | 2.84E-27  | 86.58422 | 84.38195 | 9.47E-24 |
| Poa_15502 | callose synthase 3-like  | 302  | XP_006649317 | 3.91E-49  | 2.875962 | 2.952341 | 0.015687 |
| Poa_1564  | vacuolar protein sorting 13c   | 641  | XP_003574966 | 9.97E-88  | 11.45576 | 11.42802 | 3.23E-06 |
| Poa_1567  | abc transporter a family member 7-like                                   | 1493 | XP_003572173 | 0         | 4.869525 | 5.03468  | 1.18E-05 |
| Poa_15731 | disease resistance protein rpm1  | 1509 | BAJ91719     | 6.93E-134 | 18.95552 | 18.52322 | 3.79E-10 |
| Poa_1578  | chymotrypsin inhibitor-2   | 485  | ABA98006     | 1.28E-18  | 19.2409  | 19.80319 | 4.09E-14 |
| Poa_15863 | probable leucine-rich repeat receptor-like protein kinase at5g49770-like | 624  | XP_003568234 | 6.50E-113 | 3.364536 | 3.437968 | 0.012299 |



|           |   |      |              |           |          |          |          |
|-----------|---|------|--------------|-----------|----------|----------|----------|
| Poa_1600  | indole-2-monooxygenase-like                   | 1286 | EMT18918     | 0         | 4.394943 | 4.491156 | 0.00016  |
| Poa_16003 | benzyl alcohol o-benzoyltransferase-like      | 232  | BAJ92444     | 6.70E-41  | 6.497773 | 6.520576 | 9.7E-05  |
| Poa_16047 | disease resistance protein rga1               | 1008 | BAJ98855     | 9.05E-50  | 5.144406 | 5.214672 | 0.006195 |
| Poa_16049 | probable glutathione s-transferase gstu6-like | 245  | XP_006661984 | 6.49E-38  | 4.355335 | 4.486231 | 3.14E-05 |
| Poa_16188 | condensin-2 complex subunit g2                | 329  | EMT03614     | 4.68065   | ∞        | 159.7511 | 2.33E-05 |
| Poa_16220 | uncharacterized protein LOC100274180          | 281  | NP_001142026 | 9.49613   | 2.946645 | 3.024756 | 0.024243 |
| Poa_16224 | o-methyltransferase                           | 291  | AAL57301     | 6.29E-30  | ∞        | 935.3569 | 1.11E-21 |
| Poa_16278 | protein srg1                                  | 542  | EMT27025     | 1.19E-103 | 26.87006 | 24.78295 | 2.25E-06 |
| Poa_16421 | cipk-like protein expressed                   | 796  | EMS55431     | 4.11E-171 | 3.954424 | 4.004378 | 0.020198 |
| Poa_16569 | spastin                                       | 344  | EMS51643     | 2.44E-22  | 4.539194 | 4.594135 | 0.000855 |
| Poa_16573 | secologanin synthase                          | 668  | XP_003566910 | 1.23E-129 | 3.639594 | 3.694678 | 0.011669 |
| Poa_16674 | chymotrypsin inhibitor-2                      | 360  | EMT00963     | 1.21E-29  | ∞        | 161.6993 | 1.25E-05 |
| Poa_16823 | =-beta-bisabolene synthase-like               | 319  | XP_002461617 | 5.69E-68  | ∞        | 729.6163 | 4.93E-24 |
| Poa_16919 | cytochrome p450                               | 1021 | EMT01872     | 3.15E-22  | 6.932606 | 7.314659 | 2.46E-05 |
| Poa_16982 | unnamed protein product                       | 434  | CDM82181     | 0.087169  | 3.08285  | 3.168521 | 0.021116 |
| Poa_17132 | e3 ubiquitin-protein ligase rglg2-like        | 355  | BAK07422     | 2.68E-80  | 2.410846 | 2.478793 | 0.008758 |
| Poa_17133 | mate efflux family protein 5-like             | 1089 | BAK07287     | 2.12E-145 | 7.661101 | 7.742921 | 1.37E-07 |
| Poa_17210 | potassium channel skor                        | 505  | AFW76881     | 2.07E-95  | 7.707831 | 7.913337 | 3.95E-09 |
| Poa_17214 | zinc finger-like                              | 447  | EAY99711     | 7.97E-17  | 13.01214 | 12.573   | 0.001077 |
| Poa_17235 | valyl-trna synthetase                         | 1164 | BAK00192     | 0         | 3.608507 | 3.679644 | 0.038206 |
| Poa_1732  | calmodulin                                    | 529  | XP_003559804 | 6.11E-66  | 3.775258 | 3.881359 | 0.006448 |
| Poa_17494 | wall-associated receptor kinase 5             | 260  | EMS55833     | 3.29E-36  | 10.27484 | 10.2073  | 0.000136 |
| Poa_1753  | peroxidase 12                                 | 563  | EMS47817     | 1.06E-12  | 6.59278  | 6.75947  | 0.000215 |
| Poa_17577 | isoflavone 2 -hydroxylase-like                | 681  | BAD27508     | 1.44E-95  | 9.631197 | 9.486469 | 0.000438 |
| Poa_17600 | =-beta-bisabolene synthase-like               | 291  | XP_002461617 | 1.14E-46  | ∞        | 1007.514 | 9.23E-29 |
| Poa_17663 | phenylalanine ammonia-lyase                   | 448  | XP_003575404 | 7.51E-90  | ∞        | 165.0623 | 1.01E-05 |
| Poa_17675 | methionyl-trna synthetase                     | 670  | BAJ96545     | 8.09E-147 | 4.298499 | 4.317149 | 0.026557 |

|           |  |      |              |           |          |          |          |
|-----------|--|------|--------------|-----------|----------|----------|----------|
| Poa_17719 | heading day 1  | 493  | AEP02820     | 3.52856   | 55.14423 | 53.02249 | 1.99E-19 |
| Poa_17738 | benzyl alcohol o-benzoyltransferase-like               | 854  | BAJ92444     | 1.45E-146 | 11.0522  | 11.36598 | 1.42E-08 |
| Poa_1776  | jasmonate-induced protein                              | 631  | BAK00987     | 1.58E-52  | 3.776501 | 3.913084 | 0.000664 |
| Poa_1778  | thioredoxin h-type                                     | 814  | XP_003562828 | 1.00E-103 | 2.178891 | 2.239406 | 0.041647 |
| Poa_17861 | nbs-lrr type rga                                       | 444  | AAZ99789     | 3.59723   | 44.013   | 40.992   | 1.31E-12 |
| Poa_17870 | glutamate receptor -like                               | 822  | XP_003560389 | 1.44E-132 | 4.770691 | 4.872123 | 0.001041 |
| Poa_17927 | patatin group a-3                                      | 327  | EMT32376     | 1.03E-63  | 4.233702 | 4.332889 | 1.84E-06 |
| Poa_18016 | serine threonine-protein kinase receptor               | 674  | EMT21923     | 2.71E-75  | 3.918518 | 4.030749 | 0.00638  |
| Poa_18085 | high affinity nitrate transporter                      | 676  | EMT29903     | 1.01E-129 | 214.2731 | 182.4372 | 3.03E-25 |
| Poa_18109 | glucan endo- -beta-glucosidase 13                      | 487  | BAJ90025     | 2.93E-53  | 2.936515 | 3.024798 | 0.031817 |
| Poa_18193 | probable nucleoredoxin 3                               | 493  | XP_003557743 | 2.75E-97  | 3.416086 | 3.524796 | 2.61E-05 |
| Poa_1820  | transmembrane bax inhibitor motif-containing protein 4 | 1233 | XP_003573853 | 9.52E-110 | 2.476596 | 2.531425 | 0.029707 |
| Poa_1830  | s-noroclaurine synthase 1-like                         | 676  | EMT32137     | 1.94E-94  | 57.03554 | 57.21312 | 9.62E-29 |
| Poa_18301 | nodulation protein h-like                              | 451  | XP_003557771 | 7.28E-66  | 5.150097 | 5.189693 | 0.025743 |
| Poa_18303 | high affinity nitrate transporter                      | 332  | EMS65309     | 3.73E-65  | 3.394856 | 3.451602 | 0.003025 |
| Poa_18572 | probable carboxylesterase 15-like                      | 567  | BAJ98632     | 9.98E-65  | 16.04853 | 15.77337 | 8.74E-09 |
| Poa_18600 | syntaxin-related protein                               | 465  | XP_004962863 | 7.86E-43  | 2.759146 | 2.828379 | 0.007031 |
| Poa_1864  | pathogenesis-related protein 1                         | 657  | EMS35686     | 1.15E-92  | 6.473113 | 6.659716 | 5.18E-10 |
| Poa_1865  | pathogenesis-related protein 1                         | 222  | EMS52854     | 6.50E-21  | 7.719597 | 7.74696  | 4.13E-05 |
| Poa_18897 | wrky dna binding domain containing expressed           | 938  | XP_003577134 | 1.26E-43  | 8.986902 | 8.693779 | 0.017177 |
| Poa_18921 | crocetin glucosyltransferase 2-like                    | 359  | EMT25766     | 1.32E-36  | 4.479205 | 4.54295  | 0.009474 |
| Poa_18943 | hva22-like protein i-like                              | 784  | XP_003578887 | 1.08E-101 | 8.555167 | 8.757588 | 1.3E-09  |
| Poa_18988 | cytochrome p450  | 427  | XP_002459492 | 3.72E-38  | 54.56248 | 54.49699 | 4.4E-24  |
| Poa_19072 | cysteine synthase                                      | 875  | XP_003571741 | 7.62E-130 | 7.20424  | 7.263579 | 5.28E-06 |
| Poa_1908  | valyl-trna synthetase                                  | 1274 | BAJ94816     | 0         | 3.451035 | 3.519743 | 0.003233 |
| Poa_19228 | subtilisin-like protease                               | 1306 | CDM80019     | 0         | 9.757449 | 9.35305  | 0.02103  |
| Poa_1928  | probable glutathione s-transferase gstu6-like          | 205  | EMT24482     | 6.65E-17  | 8.08337  | 8.150808 | 0.011579 |

|           |  |      |              |           |          |          |          |
|-----------|--|------|--------------|-----------|----------|----------|----------|
| Poa_19316 | protein far1-related sequence 5                                    | 348  | EMT20143     | 3.87573   | 3.740927 | 3.790751 | 0.002464 |
| Poa_19341 | nac domain-containing protein 100-like                             | 1067 | BAK02354     | 8.72E-127 | 7.658473 | 7.56117  | 0.000467 |
| Poa_19346 | hypothetical protein OsJ_13304                                     | 397  | EEE60269     | 7.12099   | 7.442941 | 7.463421 | 0.010454 |
| Poa_1935  | mloc_51546-like partial  | 1536 | XP_003570075 | 3.62E-162 | 8.199462 | 8.320248 | 1.58E-12 |
| Poa_19490 | transcription factor qsh-1   | 276  | ABD16036     | 1.29558   | 6.533645 | 6.527608 | 0.008185 |
| Poa_19577 | metal transporter nramp6-like                                      | 539  | BAJ95712     | 1.64E-94  | 2.867274 | 2.922524 | 0.026291 |
| Poa_19608 | protein yls9-like  | 783  | AFW60415     | 7.38E-58  | 11.35749 | 11.47598 | 9.87E-09 |
| Poa_1961  | leucine-rich repeat-containing protein 40                          | 1308 | ABB90553     | 0         | 20.13046 | 20.29591 | 6.94E-18 |
| Poa_1962  | leucine-rich repeat-containing protein 40                          | 1440 | ABB90553     | 0         | 36.18677 | 36.74058 | 7.76E-25 |
| Poa_1976  | kda protein  | 857  | BAK05416     | 6.79E-74  | 3.59146  | 3.664718 | 0.00151  |
| Poa_19808 | homeobox protein hox1a-like  | 263  | XP_006643655 | 0.005562  | 3.608773 | 3.657895 | 0.037816 |
| Poa_19905 | tpr domain containing expressed                                    | 311  | EEC81996     | 0.425583  | 30.6941  | 26.32478 | 0.023481 |
| Poa_1991  | leucine-rich repeat receptor-like protein kinase at2g19210-like    | 1336 | XP_003566695 | 1.37E-137 | 3.737897 | 3.85056  | 0.02044  |
| Poa_19910 | receptor-like serine threonine-protein kinase sd1-8-like isoform 1 | 202  | XP_003564365 | 5.96843   | 24.04378 | 22.0321  | 0.001772 |
| Poa_1994  | threonyl-trna synthetase   | 882  | XP_004968434 | 7.72E-177 | 6.752951 | 6.821269 | 1.73E-06 |
| Poa_20098 | peroxidase 12  | 500  | AAW52723     | 7.35E-12  | 5.776735 | 5.762757 | 0.015825 |
| Poa_2011  | receptor-like protein kinase feronia                               | 708  | EMT16871     | 6.07E-36  | 3.315853 | 3.375635 | 0.026757 |
| Poa_20163 | wrky dna binding domain containing expressed                       | 876  | EMT17792     | 6.33E-94  | 6.864658 | 7.001459 | 0.000262 |
| Poa_20243 | phenylalanine ammonia-lyase  | 1054 | CAA89007     | 0         | 2.754667 | 2.829969 | 0.025566 |
| Poa_20285 | unknown protein  | 206  | BAD81363     | 1.17E-08  | 9.859189 | 9.691063 | 0.013993 |
| Poa_20309 | probable l-type lectin-domain containing receptor kinase -like     | 1156 | EMT01800     | 1.31E-80  | 64.01735 | 38.21112 | 0.00613  |
| Poa_20363 | f-box lrr-repeat protein at5g02910-like                            | 230  | XP_006661397 | 0.658799  | ∞        | 164.7543 | 0.014912 |
| Poa_20369 | beta- insoluble isoenzyme 6-like                                   | 286  | BAJ76715     | 8.23E-13  | 4.035176 | 4.065108 | 0.005513 |
| Poa_20501 | partial  | 1132 | BAJ91632     | 0         | 19.39872 | 16.67536 | 0.024965 |
| Poa_20543 | high affinity nitrate transporter                                  | 329  | XP_003572550 | 7.28E-56  | 4.611546 | 4.725268 | 1.93E-06 |
| Poa_20565 | nadp-dependent oxidoreductase p1                                   | 314  | ABA93622     | 1.87065   | 21.38557 | 20.36014 | 0.000624 |
| Poa_20618 | n-acetyltransferase 9-like   | 576  | XP_003558602 | 2.86E-23  | 46.45469 | 42.49273 | 1.65E-12 |

|           |   |      |              |           |          |          |          |
|-----------|---|------|--------------|-----------|----------|----------|----------|
| Poa_20625 | hypothetical protein F775_14649                               | 967  | EMT12117     | 9.64E-89  | 43.89015 | 34.41053 | 0.000163 |
| Poa_20725 | Irr receptor-like serine threonine-protein kinase             | 839  | EMT06135     | 2.96E-142 | 6.967199 | 7.152506 | 2.88E-11 |
| Poa_20766 | wrky transcription factor partial                             | 245  | EMT22421     | 7.52E-38  | 6.818668 | 6.963755 | 0.000425 |
| Poa_20771 | ammonium transporter  | 976  | CDM85172     | 2.27E-92  | 3.393494 | 3.426725 | 0.039556 |
| Poa_20821 | high affinity nitrate transporter                             | 263  | XP_003572550 | 2.05E-38  | ∞        | 269.6622 | 1.34E-11 |
| Poa_2094  | cell division protein aaa atpase family                       | 268  | BAJ91409     | 1.52E-40  | 8.435517 | 8.512008 | 1E-06    |
| Poa_20971 | hypothetical protein TRIUR3_08765                             | 1003 | EMS65719     | 1.01E-85  | 12.01798 | 11.59259 | 0.019554 |
| Poa_2105  | phosphate transporter   | 1346 | AIB04040     | 0         | 2833.212 | 2059.082 | 7.85E-62 |
| Poa_2106  | phosphate transporter   | 340  | EMT15139     | 4.58E-57  | 7.342242 | 7.4178   | 0.011087 |
| Poa_21131 | PREDICTED: uncharacterized protein LOC102710000               | 380  | XP_006649343 | 0.468842  | 7.441943 | 7.614856 | 9.51E-08 |
| Poa_21150 | secologanin synthase-like                                     | 334  | ABR25532     | 1.15E-29  | 9.979305 | 9.791147 | 0.007583 |
| Poa_21156 | protein kinase superfamily protein                            | 547  | CDM84744     | 2.84E-86  | 3.588597 | 3.666367 | 0.006448 |
| Poa_21265 | protein   | 392  | BAJ97140     | 2.85E-55  | 3.028637 | 3.11963  | 0.011278 |
| Poa_21345 | mrp-like abc transporter                                      | 509  | BAJ96244     | 2.17E-96  | 3.290018 | 3.348266 | 0.027029 |
| Poa_21370 | exonuclease family expressed                                  | 582  | XP_003573879 | 2.36E-99  | 4.151854 | 4.278089 | 0.002935 |
| Poa_21374 | glutamate receptor -like                                      | 812  | BAK02419     | 1.49E-128 | 6.60491  | 6.679674 | 0.002216 |
| Poa_21429 | anthocyanidin -o-glucosyltransferase                          | 233  | EMT02135     | 1.52E-35  | 4.847613 | 4.942803 | 4.32E-07 |
| Poa_21498 | glutamate receptor -like                                      | 818  | EMS64003     | 1.06E-100 | 7.742035 | 7.585266 | 0.019435 |
| Poa_21583 | flavonoid 3 -monooxygenase-like                               | 429  | AER39772     | 5.12E-45  | 17.82463 | 17.87067 | 2.11E-13 |
| Poa_2160  | long chain acyl- synthetase 4-like                            | 557  | XP_003564297 | 8.20E-76  | 3.171407 | 3.241056 | 0.011297 |
| Poa_21600 | disease resistance rpp13-like protein 1-like                  | 1113 | CDM80557     | 4.55E-117 | 3.909691 | 3.97506  | 0.025543 |
| Poa_21627 | sulfite reductase   | 305  | XP_006657186 | 8.27E-29  | 3.256926 | 3.348192 | 0.00498  |
| Poa_21754 | low quality protein: ubiquitin-60s ribosomal protein l40-like | 462  | XP_003561800 | 2.04E-06  | 20.47865 | 20.4704  | 1.65E-12 |
| Poa_21859 | transcription factor iiiB 90 kda subunit-like                 | 244  | EMS55840     | 2.09E-42  | 24.15038 | 21.32051 | 0.023022 |
| Poa_21933 | wrky transcription factor 40                                  | 394  | BAJ90915     | 2.33E-68  | 22.28314 | 22.23006 | 2.53E-12 |
| Poa_22034 | hypothetical protein TRIUR3_19327                             | 360  | EMS63425     | 1.53134   | 14.6967  | 15.33017 | 2.69E-16 |
| Poa_22113 | calmodulin binding protein                                    | 697  | EMS63469     | 3.70E-134 | 4.2075   | 4.360685 | 0.007148 |

|           |  |      |              |           |          |          |          |
|-----------|--|------|--------------|-----------|----------|----------|----------|
| Poa_22267 | ribonuclease h protein at1g65750                   | 1065 | XP_002447837 | 1.91E-32  | 3.505356 | 3.572017 | 0.021301 |
| Poa_22321 | subtilisin-like protease-like                      | 199  | XP_004964076 | 5.44579   | 60.50568 | 60.25654 | 1.33E-12 |
| Poa_22354 | wrky dna-binding domain superfamily protein        | 341  | EMT19877     | 5.58E-53  | 11.44583 | 11.34057 | 0.001332 |
| Poa_22366 | delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase         | 251  | AFA26283     | 7.44E-50  | 3.589293 | 3.679063 | 0.001387 |
| Poa_22399 | b-cell receptor-associated protein 31-like         | 621  | XP_003563854 | 2.55E-11  | 5.908543 | 5.872976 | 0.037589 |
| Poa_2246  | hypothetical protein TRIUR3_20292                  | 596  | EMS61263     | 0.170377  | 22.94818 | 22.80971 | 7.25E-14 |
| Poa_22462 | phenylalanine ammonia-lyase                        | 313  | AAA50849     | 2.91E-61  | 6.924724 | 6.966947 | 0.006904 |
| Poa_22547 | high affinity nitrate transporter                  | 628  | EMS65307     | 6.90E-118 | 3.49052  | 3.536945 | 0.001312 |
| Poa_22743 | subtilisin-like protease                           | 390  | BAJ97332     | 3.89E-26  | 13.79864 | 12.61795 | 0.018138 |
| Poa_22795 | protein yabby 2-like                               | 1248 | XP_004982272 | 9.21565   | 9.918713 | 9.670297 | 0.01488  |
| Poa_228   | glucuronosyltransferase gut1                       | 910  | EMS63544     | 3.87E-04  | 3.254872 | 3.313924 | 0.046318 |
| Poa_2287  | mloc_74648-like partial                            | 913  | XP_008664689 | 1.77E-161 | 4.359488 | 4.478613 | 8.86E-09 |
| Poa_22977 | protein wir1a-like                                 | 514  | XP_004983593 | 5.47E-09  | ∞        | 248.9078 | 2.35E-09 |
| Poa_23109 | tubulin-specific chaperone c                       | 417  | EMS63337     | 0.613708  | 10.90223 | 10.37279 | 0.029707 |
| Poa_23141 | anthocyanin 3 -o-beta-glucosyltransferase          | 643  | ACD03249     | 9.16E-105 | 13.89853 | 13.28214 | 0.000681 |
| Poa_23271 | nitrate reductase                                  | 947  | P27967       | 0         | 4.898707 | 4.960849 | 0.015331 |
| Poa_23339 | terpene synthase 7                                 | 354  | XP_006651403 | 8.13E-43  | 104.6169 | 103.5093 | 2.63E-23 |
| Poa_23428 | probable carboxylesterase 15-like                  | 369  | BAJ98632     | 6.84E-24  | 9.719226 | 9.811128 | 7.42E-05 |
| Poa_23479 | actin depolymerization factor-like protein         | 701  | BAK01258     | 4.28E-41  | 4.427982 | 4.569201 | 0.000354 |
| Poa_2353  | bzip transcription partial                         | 467  | EEC84743     | 1.44E-34  | 3.783572 | 3.84513  | 0.019807 |
| Poa_2366  | e3 ubiquitin-protein ligase keg-like               | 1499 | EMT06228     | 0         | 2.96843  | 3.030212 | 0.000908 |
| Poa_2367  | mtn19-like protein                                 | 1322 | EMT06228     | 0         | 2.321461 | 2.36755  | 0.021301 |
| Poa_23893 | translocation protein sec63 homolog                | 373  | XP_004975250 | 1.0666    | ∞        | 95.94555 | 0.012299 |
| Poa_23919 | chalcone synthase                                  | 1274 | AHC07953     | 0         | 63.33442 | 35.96903 | 0.014517 |
| Poa_23973 | ent-kaurene synthase-like protein 3                | 338  | EMT15962     | 2.16355   | 8.435343 | 8.652693 | 0.000582 |
| Poa_24030 | f-box domain containing protein                    | 934  | BAK02480     | 7.51E-99  | 6.207193 | 6.168994 | 0.019199 |
| Poa_24079 | cysteine-rich receptor-like protein kinase 10-like | 904  | NP_001140610 | 7.89E-80  | 7.798503 | 7.634115 | 0.041983 |

|           |   |      |              |           |          |          |          |
|-----------|---|------|--------------|-----------|----------|----------|----------|
| Poa_2422  | cytochrome p450                                       | 323  | XP_002459491 | 1.24E-72  | 41.87794 | 40.74758 | 1.57E-12 |
| Poa_24258 | e3 ubiquitin-protein ligase rma1h1-like               | 295  | XP_004953239 | 1.39E-12  | 14.87295 | 13.9195  | 0.002096 |
| Poa_2445  | patatin group a-3                                     | 424  | EMT32376     | 2.30E-44  | 4.10291  | 4.21797  | 3.23E-06 |
| Poa_24485 | cysteine-rich receptor-like protein kinase 10-like    | 301  | EMS60698     | 1.52E-64  | 3.361257 | 3.448745 | 0.006087 |
| Poa_2465  | ring zinc finger and vwf domain family protein        | 2407 | XP_003580107 | 3.03E-43  | 18.33901 | 18.17706 | 1.3E-12  |
| Poa_2480  | phosphate transporter                                 | 642  | EMT15138     | 2.03E-80  | 179.2863 | 176.583  | 4.6E-46  |
| Poa_2482  | calmodulin-binding expressed                          | 1117 | XP_003575449 | 2.78E-100 | 2.853874 | 2.942769 | 0.019095 |
| Poa_2505  | premnaspirodiene oxygenase-like                       | 1904 | BAJ84852     | 0         | 42.11946 | 39.07731 | 3.98E-11 |
| Poa_2512  | calmodulin-binding expressed                          | 1161 | AFA26170     | 1.25E-79  | 3.671933 | 3.783192 | 0.035869 |
| Poa_25205 | peptide transporter ptr2-like                         | 209  | EMT20726     | 1.82E-36  | ∞        | 174.3607 | 7.28E-07 |
| Poa_25227 | polyamine oxidase                                     | 860  | EMS59492     | 4.81E-95  | 20.89519 | 19.76184 | 1.03E-06 |
| Poa_2526  | protein   | 1028 | BAJ84795     | 6.81E-144 | 3.194409 | 3.289988 | 0.000644 |
| Poa_25288 | l-type lectin-domain containing receptor kinase -like | 561  | BAJ97667     | 1.85E-71  | 3.295128 | 3.368686 | 0.009427 |
| Poa_25306 | somatic embryogenesis receptor kinase 2-like          | 861  | XP_003577543 | 7.39E-79  | 27.39092 | 22.57743 | 0.008196 |
| Poa_25626 | premnaspirodiene oxygenase-like                       | 540  | EMS50914     | 3.33E-38  | 39.49849 | 30.28855 | 0.00161  |
| Poa_25791 | probable wrky transcription factor 70-like            | 664  | EMT18619     | 3.24E-62  | 17.62194 | 16.62378 | 0.000136 |
| Poa_25942 | transposon en spm sub- expressed                      | 222  | XP_003563630 | 3.25E-12  | ∞        | 82.16352 | 0.014313 |
| Poa_26    | cytochrome p450                                       | 1038 | XP_002459491 | 5.79E-165 | 6.047273 | 6.208074 | 1.03E-06 |
| Poa_26026 | protein dyad-like                                     | 243  | DAA45922     | 2.34752   | 21.85408 | 20.09329 | 0.000293 |
| Poa_26086 | cinnamyl alcohol dehydrogenase 5                      | 359  | BAK01962     | 1.50E-42  | 3.630077 | 3.742338 | 0.015825 |
| Poa_26116 | ammonium transporter                                  | 478  | AAR87397     | 1.55E-70  | 3.786462 | 3.904148 | 0.006124 |
| Poa_2614  | ubiquitin fusion protein                              | 296  | XP_002460099 | 3.59E-43  | 16.89182 | 17.15279 | 5.66E-20 |
| Poa_26312 | hypothetical protein ZEAMMB73_188985                  | 461  | AFW60415     | 6.59E-08  | 9.227217 | 9.299041 | 6.06E-09 |
| Poa_2636  | retrotransposon unclassified                          | 1960 | ADB85290     | 0         | 3.422919 | 3.52179  | 0.001054 |
| Poa_26454 | pleiotropic drug resistance protein 4                 | 2195 | EMS61936     | 0         | 4.554488 | 4.63644  | 0.020487 |
| Poa_2668  | atp-dependent clp protease atp-binding subunit clpc   | 692  | EMT15938     | 6.62E-74  | 4.49394  | 4.464671 | 0.04739  |
| Poa_26693 | cysteine synthase                                     | 392  | XP_003571741 | 3.32E-64  | 13.4081  | 13.43879 | 3.95E-09 |

|           |   |      |              |           |          |          |          |
|-----------|---|------|--------------|-----------|----------|----------|----------|
| Poa_26806 | hypothetical protein F775_22960                         | 570  | EMT30994     | 0.23897   | 3.582887 | 3.701331 | 0.004418 |
| Poa_2683  | cytochrome b5   | 450  | XP_003569990 | 3.51E-09  | 20.31923 | 20.55518 | 2.43E-11 |
| Poa_26887 | serine threonine-protein kinase receptor                | 396  | EMT04146     | 9.64E-58  | 17.88822 | 16.88717 | 1.92E-05 |
| Poa_269   | heat shock protein 90                                   | 222  | AEY83982     | 3.24E-23  | 2.965594 | 2.997599 | 0.013415 |
| Poa_26910 | regulatory protein npr1                                 | 685  | BAJ87143     | 1.19E-83  | 5.673545 | 5.704285 | 0.02883  |
| Poa_26957 | peptide transporter ptr2                                | 354  | XP_006647794 | 1.67E-70  | 14.28211 | 14.24636 | 7.4E-07  |
| Poa_2706  | cipk-like protein expressed                             | 905  | XP_003562424 | 4.90E-144 | 7.508511 | 7.487732 | 0.006223 |
| Poa_27077 | casp-like protein os07g0442900-like                     | 377  | XP_003563200 | 6.38E-19  | 5.98449  | 6.169732 | 9.81E-05 |
| Poa_27135 | ankyrin repeat and sam domain-containing protein 6-like | 256  | EMT04788     | 1.35E-15  | 7.050716 | 7.044867 | 7.2E-05  |
| Poa_27190 | glutathione s-transferase                               | 358  | XP_003558122 | 2.62E-24  | 11.74035 | 11.33711 | 0.00557  |
| Poa_27212 | duf1618 domain containing family protein                | 261  | NP_001142378 | 0.013283  | ∞        | 226.84   | 2.05E-09 |
| Poa_2723  | translation initiation factor if-3                      | 433  | EMT31398     | 1.45E-26  | 37.45138 | 30.55903 | 8.74E-05 |
| Poa_27408 | flavonoid 3 -monooxygenase-like                         | 281  | EMT01785     | 9.59E-45  | 11.38184 | 11.5445  | 9.8E-10  |
| Poa_27409 | flavonoid 3 -monooxygenase-like                         | 281  | EMT01785     | 9.02E-45  | 46.79029 | 45.95415 | 1.36E-17 |
| Poa_2744  | aspartic proteinase nepenthesin-2                       | 709  | EMT19686     | 2.46E-87  | 7.503853 | 7.680434 | 1.22E-08 |
| Poa_27496 | ctp synthase  | 324  | ACN33856     | 1.95E-66  | 4.201573 | 4.258086 | 0.000721 |
| Poa_275   | cytochrome p450   | 1885 | XP_002459491 | 0         | 2.608578 | 2.686947 | 0.000728 |
| Poa_27624 | ring-h2 zinc finger protein                             | 304  | XP_002440845 | 2.27E-22  | 21.1157  | 18.29694 | 0.011087 |
| Poa_27625 | ring-h2 zinc finger protein                             | 285  | AAV24765     | 2.03E-21  | ∞        | 174.6877 | 2.2E-05  |
| Poa_27764 | PREDICTED: uncharacterized protein LOC100841607         | 339  | XP_003562244 | 1.5609    | 11.42391 | 11.41708 | 0.00122  |
| Poa_27777 | subtilisin-like protease                                | 627  | XP_003572336 | 4.23E-88  | 8.264732 | 8.412812 | 2.71E-10 |
| Poa_27960 | retrotransposon ty1-copia subclass                      | 690  | CAH67713     | 2.01E-132 | 5.322904 | 5.302001 | 0.040074 |
| Poa_28018 | heat shock protein sti-like                             | 420  | EMT28953     | 1.67E-77  | 31.6968  | 25.08531 | 0.0252   |
| Poa_28028 | protein transparent testa 12                            | 445  | XP_003561503 | 2.76E-87  | 4.011657 | 4.101254 | 0.000468 |
| Poa_28119 | high affinity nitrate transporter                       | 441  | EMT10645     | 1.21E-47  | 4.169554 | 4.242362 | 0.001876 |
| Poa_2819  | chymotrypsin inhibitor-2                                | 654  | EMT00963     | 1.06E-16  | 11.56918 | 11.04327 | 0.005887 |
| Poa_28190 | uncharacterized serine-rich isoform x2                  | 514  | XP_004962431 | 5.30E-11  | 21.60141 | 21.95499 | 6.53E-09 |

|           |   |      |              |           |          |          |          |
|-----------|---|------|--------------|-----------|----------|----------|----------|
| Poa_28215 | =-beta-bisabolene synthase-like                             | 956  | CDM85712     | 5.69E-141 | 47.86685 | 40.69268 | 3.2E-08  |
| Poa_28348 | secologanin synthase-like                                   | 1245 | XP_003566914 | 2.52E-172 | 16.83515 | 16.1981  | 8.91E-07 |
| Poa_28394 | disease resistance protein rga3-like isoform x1             | 511  | XP_004957882 | 4.37959   | 7.440804 | 7.512255 | 1.37E-05 |
| Poa_28422 | aspartic proteinase nepenthesin-2                           | 722  | EMS46216     | 1.08E-14  | 5.229202 | 5.248792 | 0.043774 |
| Poa_28456 | protein lutein deficient chloroplastic-like                 | 254  | XP_003580007 | 5.97E-24  | 4.71122  | 4.862964 | 0.010805 |
| Poa_2864  | retrotransposon unclassified                                | 1912 | EEC82503     | 1.82E-144 | 9.935054 | 10.24143 | 1.48E-13 |
| Poa_28652 | f-box family  | 808  | XP_003561039 | 2.64E-77  | 7.946942 | 7.822829 | 0.0158   |
| Poa_28656 | sarcosine oxidase   | 511  | BAJ99946     | 3.26E-83  | 7.5441   | 7.800155 | 0.000494 |
| Poa_28704 | elongation factor 1-gamma 2                                 | 1259 | ACA50518     | 3.28E-168 | 9.072002 | 8.881714 | 0.004235 |
| Poa_28725 | protein   | 963  | EMT24396     | 1.14E-112 | 11.03143 | 10.85127 | 0.000213 |
| Poa_28741 | indole-3-acetate beta-glucosyltransferase                   | 207  | NP_001052243 | 1.34E-32  | 21.68168 | 21.12829 | 1.66E-06 |
| Poa_28800 | subtilisin-like protease                                    | 823  | XP_003572336 | 2.02E-91  | 6.960811 | 6.945504 | 0.000145 |
| Poa_28812 | germin-like protein 12-4                                    | 304  | XP_003573398 | 3.04E-65  | 2.65979  | 2.756886 | 0.027579 |
| Poa_28849 | beta- -glucanase precursor                                  | 368  | EMT12505     | 1.27E-27  | 5.217402 | 5.192181 | 0.010927 |
| Poa_28906 | hypothetical protein F775_22410                             | 259  | EMT12285     | 8.81469   | 8.898436 | 9.049234 | 0.020358 |
| Poa_28908 | retrotransposon unclassified                                | 375  | XP_002437833 | 2.26854   | 21.42539 | 18.24747 | 0.046238 |
| Poa_2894  | cation h(+) antiporter 15-like                              | 2416 | XP_003579128 | 0         | 155.2471 | 134.9722 | 6.57E-24 |
| Poa_29070 | atp synthase subunit mitochondrial                          | 281  | EMT15573     | 6.61746   | ∞        | 331.4405 | 2.38E-14 |
| Poa_2910  | syntaxin-binding protein 5-like protein                     | 1876 | XP_003559744 | 3.27E-143 | 2.316438 | 2.382527 | 0.007081 |
| Poa_29117 | subtilisin-like protease                                    | 179  | EMS63058     | 2.54E-24  | ∞        | 115.4083 | 0.000903 |
| Poa_29134 | peroxisomal targeting signal 1 receptor                     | 529  | XP_003574713 | 2.53E-103 | 3.013302 | 3.07453  | 0.017229 |
| Poa_2917  | zinc finger (c3hc4-type ring finger)                        | 280  | BAC84396     | 2.94195   | ∞        | 620.2235 | 1.99E-20 |
| Poa_29178 | retrotransposon unclassified                                | 866  | EAZ36726     | 9.35E-49  | ∞        | 276.1635 | 1.12E-11 |
| Poa_2918  | pentatricopeptide repeat-containing-like protein            | 239  | EAY74183     | 5.90676   | 86.92922 | 77.46446 | 2.62E-19 |
| Poa_29184 | domain containing expressed                                 | 1003 | NP_001049808 | 1.02E-107 | 4.678174 | 4.760875 | 0.049512 |
| Poa_2934  | u4 u6 small nuclear ribonucleoprotein prp31-like isoform x1 | 973  | XP_003557630 | 3.79E-20  | 12.75077 | 13.13997 | 1.34E-24 |
| Poa_29347 | mitogen activated protein kinase 20-1                       | 448  | EMS62307     | 0.280286  | 31.92191 | 31.48401 | 5.2E-15  |



|           |   |      |              |           |          |          |          |
|-----------|---|------|--------------|-----------|----------|----------|----------|
| Poa_29479 | benzyl alcohol o-benzoyltransferase-like      | 217  | BAJ92444     | 2.03E-37  | 12.51444 | 12.34216 | 2.61E-06 |
| Poa_29496 | cytochrome p450                               | 240  | BAJ96611     | 6.41E-25  | ∞        | 158.083  | 0.000387 |
| Poa_2974  | cytochrome p450                               | 284  | XP_002459491 | 3.70E-56  | 11.2858  | 11.3575  | 8.7E-09  |
| Poa_29791 | e3 ubiquitin-protein ligase shprh             | 271  | EMS47206     | 2.28803   | 28.43272 | 27.83189 | 4.71E-13 |
| Poa_29806 | crocetin glucosyltransferase 2-like           | 390  | EMT25769     | 1.52E-49  | 5.717957 | 5.781081 | 0.009065 |
| Poa_29822 | homeobox protein hox-a4-like                  | 206  | XP_008666121 | 5.13578   | ∞        | 114.2218 | 0.006183 |
| Poa_2986  | =beta-bisabolene synthase-like                | 473  | XP_002461617 | 2.18E-90  | 91.64693 | 92.28745 | 1.4E-27  |
| Poa_29957 | zinc knuckle containing                       | 200  | XP_006660033 | 0.758095  | ∞        | 124.2657 | 0.000183 |
| Poa_3     | polyamine oxidase                             | 1477 | BAJ98538     | 0         | 9.316665 | 9.266757 | 0.000134 |
| Poa_30203 | glutamate receptor -like                      | 382  | BAK02419     | 8.70E-75  | 15.96775 | 15.61949 | 1.29E-08 |
| Poa_3025  | wir1b_wheat ame: full=protein wir1b           | 418  | EMT12363     | 0.007141  | 14.89299 | 15.06395 | 2.2E-13  |
| Poa_3026  | retrotransposon ty1-copia subclass            | 1271 | EEC76475     | 2.06E-59  | 6.659346 | 6.819444 | 3.79E-10 |
| Poa_3040  | secologanin synthase                          | 305  | XP_003569400 | 1.11E-42  | 4.201176 | 4.250339 | 0.013159 |
| Poa_30412 | aconitate cytoplasmic isoform x2              | 207  | XP_008670445 | 7.16617   | ∞        | 112.491  | 0.005466 |
| Poa_30618 | gnat transcription partial                    | 223  | XP_002468346 | 2.78E-06  | ∞        | 268.1136 | 7.43E-10 |
| Poa_3071  | pathogenesis-related protein                  | 254  | EAY83478     | 4.76E-04  | 70.63815 | 67.74444 | 9.49E-16 |
| Poa_30912 | pathogenesis-related protein 1                | 415  | ABX89061     | 4.32E-72  | 11.66684 | 11.6964  | 6.61E-05 |
| Poa_31195 | methionyl-trna synthetase                     | 434  | BAJ96634     | 1.35E-59  | 2.986644 | 3.033134 | 0.021643 |
| Poa_3123  | secologanin synthase                          | 320  | EMT22239     | 2.89E-04  | 3.156773 | 3.205656 | 0.026389 |
| Poa_3148  | secologanin synthase-like                     | 1121 | AAQ13548     | 3.37E-174 | 3.786664 | 3.886838 | 2.98E-06 |
| Poa_3149  | secologanin synthase-like                     | 1115 | EMS51353     | 0         | 6.864628 | 7.074442 | 1.68E-11 |
| Poa_31508 | e3 ubiquitin-protein ligase lin-2-like        | 231  | XP_006653705 | 4.33761   | ∞        | 133.8286 | 7.19E-05 |
| Poa_3160  | l-gulonolactone oxidase                       | 1387 | EMS48861     | 1.52E-138 | 5.316834 | 5.427438 | 1.72E-05 |
| Poa_3161  | l-gulonolactone oxidase                       | 1992 | XP_003571315 | 0         | 3.032069 | 3.129502 | 0.008489 |
| Poa_31693 | xa21-like protein                             | 226  | EAY91099     | 1.665     | 6.109091 | 6.087281 | 0.008758 |
| Poa_31694 | dnaj protein homolog 2-like                   | 279  | BAJ95181     | 0.329676  | ∞        | 174.6024 | 9.98E-07 |
| Poa_31914 | protein dehydration-induced 19 homolog 2-like | 517  | EMT29291     | 1.85E-26  | 5.127656 | 5.188845 | 0.01085  |

|           |  |      |              |           |          |          |          |
|-----------|--|------|--------------|-----------|----------|----------|----------|
| Poa_3198  | s-norcoclaurine synthase 1-like  | 637  | EMT08383     | 8.17E-97  | ∞        | 1123.458 | 1.94E-29 |
| Poa_32043 | protein lurp-one-related 15-like   | 468  | EMT07907     | 2.27E-64  | 12.64555 | 12.45752 | 0.001875 |
| Poa_32185 | pentatricopeptide repeat-containing protein chloroplastic-like                   | 270  | EMT01467     | 1.96763   | 3.358406 | 3.44901  | 0.000917 |
| Poa_32248 | mate efflux family protein 5-like  | 735  | EMT14550     | 4.12E-146 | 4.182224 | 4.22876  | 0.006183 |
| Poa_3239  | auxin-induced protein  | 1114 | BAK02817     | 0         | 4.723818 | 4.817613 | 3.8E-06  |
| Poa_3240  | seed maturation protein  | 931  | XP_003557631 | 1.25E-110 | 2.707687 | 2.787531 | 0.005566 |
| Poa_3264  | protein srg1   | 421  | XP_003564223 | 4.70E-70  | 3.518656 | 3.610828 | 0.018731 |
| Poa_3270  | e3 ubiquitin-protein ligase rglg2-like   | 350  | BAK07422     | 1.03E-58  | 3.03234  | 3.087191 | 0.006448 |
| Poa_3298  | e3 ubiquitin-protein ligase rglg2-like   | 350  | BAK07422     | 1.47E-54  | 2.741746 | 2.818302 | 0.001389 |
| Poa_3299  | e3 ubiquitin-protein ligase rglg2-like   | 411  | BAK07422     | 6.62E-55  | 3.676265 | 3.771524 | 2.64E-06 |
| Poa_3304  | abc transporter c family member 10   | 357  | EMT27565     | 5.35E-49  | 3.201527 | 3.282771 | 0.014997 |
| Poa_33327 | subtilisin-like protease   | 355  | EMS63058     | 9.90E-47  | ∞        | 162.938  | 2.28E-06 |
| Poa_33331 | hypothetical protein SORBIDRAFT_02g036920  | 401  | XP_002463060 | 4.1045    | 101.0538 | 84.05375 | 4E-13    |
|           | ids3_horvu ame: full=2 -deoxymugineic-acid 2 -dioxygenase ame: full=protein iron |      |              |           |          |          |          |
| Poa_33375 | deficiency-specific 3  | 312  | BAB07798     | 0.195503  | 2.548712 | 2.584758 | 0.042468 |
| Poa_33463 | pumilio homology domain family member 4  | 237  | EMT03195     | 6.85372   | 26.49139 | 24.0418  | 2.8E-05  |
| Poa_33518 | 1-phosphatidylinositol-3-phosphate 5-kinase                                      | 608  | EMT16171     | 3.48E-73  | 2.787813 | 2.842799 | 0.013216 |
| Poa_3355  | flavonol 3-sulfotransferase-like   | 390  | XP_003576818 | 6.80595   | 3.331597 | 3.401063 | 0.043295 |
| Poa_33632 | disulfide oxidoreductase monooxygenase oxidoreductase                            | 367  | XP_002461905 | 2.0217    | 68.12513 | 57.60117 | 1.93E-11 |
| Poa_33668 | anthocyanin 3 -o-beta-glucosyltransferase  | 753  | ACD03255     | 5.33E-96  | 13.54625 | 12.48429 | 0.032634 |
| Poa_33758 | lim domain and ring finger   | 584  | XP_003578033 | 8.19E-17  | 17.21181 | 15.04457 | 0.04433  |
| Poa_33812 | receptor-like protein kinase feronia   | 448  | XP_003568697 | 4.61E-44  | 5.872179 | 5.831875 | 0.007655 |
| Poa_33854 | germin-like protein 12-4   | 267  | EMS67056     | 3.73E-57  | 7.191629 | 7.304701 | 6.71E-05 |
| Poa_33980 | =beta-bisabolene synthase-like   | 836  | XP_002449569 | 8.90E-13  | 99.70835 | 87.61374 | 3.18E-19 |
| Poa_34087 | lecithin-cholesterol acyltransferase-like 1-like                                 | 482  | EMS52937     | 1.25E-105 | 3.017075 | 3.088469 | 0.035709 |
| Poa_34176 | serine threonine-protein kinase receptor   | 1624 | BAJ98102     | 0         | 3.902459 | 3.943732 | 0.02693  |
| Poa_34213 | valyl-trna synthetase  | 247  | NP_001050973 | 3.63E-42  | 9.785336 | 9.48627  | 0.008342 |

|           |  |      |              |           |          |          |          |
|-----------|--|------|--------------|-----------|----------|----------|----------|
| Poa_34347 | protein kinase   | 292  | DAA63673     | 6.64432   | 18.355   | 16.08527 | 0.035967 |
| Poa_34353 | anthocyanidin -o-glucosyltransferase-like                      | 233  | EMT02135     | 9.27E-36  | 5.735652 | 5.923236 | 0.003934 |
| Poa_34450 | harpin inducing protein  | 306  | CDM85111     | 1.07E-46  | 4.075835 | 4.185617 | 0.040336 |
| Poa_3449  | nac domain transcription factor superfamily protein isoform x1 | 910  | ADD10614     | 5.28E-146 | 2.420136 | 2.486054 | 0.040656 |
| Poa_34725 | isoflavone 2 -hydroxylase-like                                 | 944  | AAK38080     | 1.71E-161 | 5.017705 | 5.040625 | 0.003651 |
| Poa_34863 | peroxidase 12  | 410  | XP_003565403 | 5.65E-38  | 12.6475  | 13.03635 | 1.04E-12 |
| Poa_35103 | threonyl-trna synthetase                                       | 488  | CAC79651     | 2.70E-85  | 6.351689 | 6.212344 | 0.042397 |
| Poa_35307 | thaumatin-like protein   | 508  | ABA95416     | 0.547827  | 3.426548 | 3.536682 | 0.046238 |
| Poa_35333 | mevalonate kinase  | 479  | XP_004958043 | 6.62E-95  | 3.41617  | 3.511513 | 0.038613 |
| Poa_35364 | sec20 family protein   | 420  | XP_003568760 | 1.58E-52  | 5.112886 | 5.115997 | 0.005279 |
| Poa_3547  | high affinity nitrate transporter                              | 274  | EMS46094     | 5.92E-58  | ∞        | 1456.875 | 3.13E-36 |
| Poa_3548  | high affinity nitrate transporter                              | 880  | EMS46094     | 4.05E-169 | ∞        | 1430.102 | 1.37E-31 |
| Poa_35493 | cytochrome p450  | 833  | BAD27508     | 1.87E-31  | ∞        | 156.8947 | 1.69E-05 |
| Poa_35614 | ethylene-responsive transcription factor wri1-like             | 263  | XP_006663777 | 4.56541   | 6.518746 | 6.630935 | 0.008103 |
| Poa_3565  | TPA: hypothetical protein ZEAMMB73_268898                      | 348  | DAA56377     | 5.04841   | 10.56312 | 10.82258 | 3.57E-18 |
| Poa_35840 | serine threonine-protein kinase-like protein ccr3              | 348  | EEE52537     | 1.37E-31  | ∞        | 171.8257 | 5.13E-07 |
| Poa_35922 | anthocyanidin 3-o-glucosyltransferase                          | 242  | EMT33507     | 0.917106  | 10.13573 | 10.16572 | 6.38E-05 |
| Poa_35962 | cysteine proteinase ep-b 1-like                                | 1427 | XP_006657083 | 2.07E-150 | 19.70643 | 17.56627 | 0.001974 |
| Poa_360   | premnaspirodiene oxygenase-like                                | 1581 | XP_002459491 | 0         | 3.235815 | 3.344042 | 0.000183 |
| Poa_36020 | abc transporter b family member 19-like                        | 394  | XP_008676311 | 8.13E-09  | ∞        | 85.79084 | 0.017604 |
| Poa_36129 | germin-like protein 12-4                                       | 326  | BAK01981     | 5.80E-69  | 4.554122 | 4.632983 | 0.005211 |
| Poa_36219 | vacuolar atp synthase subunit c                                | 435  | EMT31457     | 1.02E-53  | 3.007083 | 3.110756 | 0.011769 |
| Poa_3624  | protein srg1   | 1024 | XP_003564220 | 6.96E-106 | 3.82854  | 3.915416 | 2.99E-06 |
| Poa_36289 | white pollen 1 chalcone synthase                               | 245  | EMT17907     | 1.42E-24  | 16.02283 | 15.83942 | 4.45E-09 |
| Poa_3640  | anthocyanidin -o-glucosyltransferase-like                      | 664  | XP_003567086 | 3.79E-138 | 4.063614 | 4.188133 | 0.001787 |
| Poa_36419 | 2-succinylbenzoate-- ligase                                    | 342  | EMT33660     | 1.20E-29  | ∞        | 171.9247 | 9.98E-07 |
| Poa_36539 | PREDICTED: uncharacterized protein LOC101757115 isoform X2     | 242  | XP_004957257 | 9.60514   | 6.057519 | 5.982409 | 0.013956 |

|           |  |      |              |           |          |          |          |
|-----------|--|------|--------------|-----------|----------|----------|----------|
| Poa_3656  | high affinity nitrate transporter  | 844  | EMS46094     | 1.25E-176 | ∞        | 1128.632 | 5.03E-30 |
| Poa_3657  | high affinity nitrate transporter  | 824  | EMS46094     | 7.19E-168 | 57.99537 | 53.20666 | 1.27E-16 |
| Poa_36573 | cytochrome p450 90a1-like  | 727  | CDM87114     | 6.83E-06  | 4.002685 | 4.103568 | 0.003125 |
| Poa_3683  | syntaxin-related protein   | 369  | XP_006655835 | 7.79E-55  | 4.355683 | 4.46595  | 0.000574 |
| Poa_3692  | mrp-like abc transporter   | 486  | EMT27565     | 8.66E-100 | 4.247598 | 4.336517 | 7.59E-06 |
| Poa_3693  | mrp-like abc transporter   | 561  | EMT27565     | 5.18E-119 | 2.714958 | 2.787633 | 0.033068 |
| Poa_37015 | high affinity nitrate transporter  | 426  | AAC49532     | 4.79E-75  | 8.454521 | 8.430867 | 1.73E-05 |
| Poa_37038 | bifunctional monodehydroascorbate reductase and carbonic anhydrase nectarin-3-like | 480  | BAK02152     | 1.26E-18  | 4.9405   | 5.023678 | 0.001973 |
| Poa_37260 | hypothetical protein F775_11873  | 218  | EMT23638     | 2.69813   | ∞        | 104.5182 | 0.016126 |
| Poa_37296 | eukaryotic translation initiation factor 6   | 475  | XP_003567346 | 5.15E-70  | 13.8417  | 13.46862 | 1.1E-05  |
| Poa_37736 | myb transcription factor   | 359  | XP_008664602 | 1.10E-51  | 3.758011 | 3.818678 | 0.001611 |
| Poa_37790 | serine threonine-protein kinase receptor   | 464  | XP_003578589 | 5.34E-95  | 4.678646 | 4.774092 | 0.009589 |
| Poa_38220 | sn1-specific diacylglycerol lipase alpha   | 303  | XP_002442664 | 1.46975   | 8.767713 | 8.722962 | 5.73E-05 |
| Poa_38269 | callose synthase 3-like  | 376  | EMT17187     | 2.82E-54  | 5.114511 | 5.10465  | 0.047267 |
| Poa_38326 | cytochrome p450 71d7   | 515  | XP_003572161 | 7.23E-66  | 56.59284 | 43.91495 | 7.92E-06 |
| Poa_38346 | serine threonine-protein kinase-like protein ccr4-like                             | 256  | XP_004980360 | 3.10323   | 4.457347 | 4.545876 | 0.004638 |
| Poa_38552 | na+ h+ antiporter  | 278  | AAAY42598    | 3.91E-55  | 3.037647 | 3.130182 | 0.030395 |
| Poa_38705 | u-box domain-containing protein 72-like  | 1399 | EEC67127     | 2.82E-07  | 4.684443 | 4.846079 | 0.000172 |
| Poa_38710 | probable lrr receptor-like serine threonine-protein kinase at1g56130-like          | 205  | EMT06735     | 3.79E-40  | 20.64066 | 18.82435 | 0.000784 |
| Poa_38732 | probable leucine-rich repeat receptor-like protein kinase at5g49770-like           | 326  | XP_003568234 | 2.28E-40  | 5.075227 | 5.14105  | 0.005765 |
| Poa_38748 | transposon en spm sub-class  | 621  | AAD27566     | 3.70E-76  | 9.384062 | 8.948874 | 0.038206 |
| Poa_38840 | pr17c precursor  | 489  | NP_001149395 | 5.73E-76  | 18.75685 | 16.66345 | 0.018084 |
| Poa_38877 | zinc finger protein 1-like   | 544  | BAJ85963     | 3.23E-37  | 7.965606 | 7.854192 | 0.047767 |
| Poa_38983 | glucan endo- -beta-glucosidase 13  | 471  | BAJ92697     | 2.77E-65  | 13.0859  | 12.52458 | 0.004801 |
| Poa_39015 | wat1-related protein at5g64700-like  | 236  | BAJ95663     | 2.63E-45  | ∞        | 224.9909 | 9.3E-09  |
| Poa_39018 | subtilisin-like protease   | 276  | EMS63058     | 1.90E-40  | ∞        | 229.2474 | 7.43E-10 |
| Poa_39106 | hypothetical protein F775_06922  | 491  | EMT10918     | 4.24E-12  | 5.704194 | 5.860566 | 0.005128 |

|           |   |      |              |           |          |          |          |
|-----------|---|------|--------------|-----------|----------|----------|----------|
| Poa_3913  | phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase chloroplastic                 | 357  | EMS61677     | 1.08E-04  | 6.923274 | 7.107591 | 2.21E-09 |
| Poa_39434 | lrr receptor-like serine threonine-protein kinase                         | 250  | EMT06652     | 2.04E-32  | 2.469042 | 2.523026 | 0.030501 |
| Poa_39493 | l-type lectin-domain containing receptor kinase -like                     | 409  | XP_003577940 | 6.41E-64  | 3.020132 | 3.094798 | 0.014918 |
| Poa_39640 | pentatricopeptide repeat-containing                                       | 235  | EMT02945     | 0.781127  | 17.70582 | 17.4136  | 2.74E-07 |
| Poa_3969  | hydroxymethylglutaryl- synthase   | 737  | XP_003558959 | 1.48E-132 | 5.15873  | 5.268203 | 1.03E-07 |
| Poa_39746 | sucrose-phosphatase 2   | 515  | BAJ97480     | 7.84E-82  | 7.510276 | 7.492718 | 0.037839 |
| Poa_40170 | subtilisin-like protease  | 357  | CDM84531     | 1.26E-24  | ∞        | 137.4047 | 0.00014  |
| Poa_40258 | predicted protein   | 251  | BAJ96653     | 2.02349   | 10.86759 | 10.64567 | 0.010643 |
| Poa_40603 | protein fam63b-like   | 458  | NP_001051636 | 2.88E-50  | 3.398114 | 3.477526 | 0.0252   |
| Poa_4061  | transposon en spm sub-class   | 1058 | XP_003570188 | 1.87138   | 16.16675 | 16.51443 | 2.77E-18 |
| Poa_4075  | desiccation-related protein pcc13-62-like                                 | 1323 | XP_003579663 | 0         | 8.36064  | 8.418839 | 1.1E-06  |
| Poa_40863 | pentatricopeptide repeat-containing protein at3g49730                     | 371  | BAJ97029     | 3.22878   | 9.141265 | 8.774921 | 0.013479 |
| Poa_4095  | mrp-like abc transporter  | 1148 | EMT27563     | 0         | 3.250618 | 3.320803 | 0.009173 |
| Poa_40988 | egg apparatus-1 protein   | 482  | XP_003559984 | 1.90E-16  | 13.37449 | 12.46946 | 0.008373 |
| Poa_41    | probable wrky transcription factor 70-like                                | 320  | XP_003561664 | 6.56E-32  | 9.094545 | 9.154761 | 4.08E-06 |
| Poa_4107  | abc transporter a family member 2-like                                    | 557  | BAK02604     | 1.35E-79  | 3.330826 | 3.408737 | 2.09E-05 |
| Poa_4108  | abc transporter a family member 2-like                                    | 590  | BAK02604     | 1.02E-84  | 2.757169 | 2.845708 | 0.002241 |
| Poa_41138 | protein wir1b-like  | 604  | EMS48959     | 1.48E-06  | 13.44758 | 13.66596 | 9.48E-11 |
| Poa_41186 | aluminum-activated malate transporter 10-like                             | 311  | EMT27755     | 1.19E-17  | 15.55401 | 15.15109 | 0.000152 |
| Poa_41544 | abc transporter c family member 10  | 257  | EMS51111     | 7.98E-47  | 5.147347 | 5.081615 | 0.030375 |
| Poa_41631 | cytochrome p450 71d7  | 499  | XP_003572161 | 1.60E-75  | 55.08301 | 42.93895 | 4.35E-05 |
| Poa_41670 | PREDICTED: uncharacterized protein LOC103651358                           | 215  | XP_008675197 | 1.01898   | 9.047991 | 8.721298 | 0.0219   |
| Poa_41724 | protein srg1  | 733  | BAJ89811     | 2.28E-77  | ∞        | 77.19143 | 0.026824 |
| Poa_41940 | probable lrr receptor-like serine threonine-protein kinase at1g56130-like | 200  | EMT06735     | 9.69E-35  | 6.209342 | 6.262573 | 0.001974 |
| Poa_41987 | snare-interacting protein keule   | 238  | BAJ86089     | 0.065941  | 25.75541 | 23.00553 | 0.001277 |
| Poa_42    | wrky transcription factor 70  | 328  | EMT13369     | 1.00E-11  | 16.7836  | 16.36413 | 2.1E-08  |
| Poa_42103 | mitochondrial chaperone bcs1-b  | 387  | EMT29803     | 1.90E-79  | 5.283594 | 5.325731 | 0.001383 |

|           |   |      |              |           |          |          |          |
|-----------|---|------|--------------|-----------|----------|----------|----------|
| Poa_4213  | hypothetical protein F775_22344                           | 510  | EMT31568     | 4.72E-15  | 2.756234 | 2.864656 | 0.01648  |
| Poa_42186 | PREDICTED: uncharacterized protein LOC100828448 isoform 2 | 309  | XP_003580008 | 1.36E-43  | 7.814981 | 7.798618 | 0.001061 |
| Poa_42468 | protein lurp-one-related 11-like                          | 422  | EMT05943     | 4.32E-28  | 9.104289 | 8.773734 | 0.023443 |
| Poa_42586 | lrr receptor-like serine threonine-protein kinase         | 240  | EMT08770     | 6.07E-04  | 15.59126 | 13.79729 | 0.034832 |
| Poa_42714 | =beta-bisabolene synthase-like                            | 587  | CDM85712     | 6.10E-110 | ∞        | 206.6886 | 1.6E-08  |
| Poa_42729 | protein transparent testa 12-like                         | 344  | BAJ90744     | 1.55E-54  | 12.92237 | 12.60762 | 0.001924 |
| Poa_42740 | glutamate receptor  | 270  | EMS65474     | 4.03E-17  | 31.83975 | 29.73688 | 7.16E-10 |
| Poa_42810 | calmodulin-binding family protein                         | 474  | EMT02285     | 1.83E-66  | 5.755045 | 5.883447 | 0.001315 |
| Poa_42851 | premnaspirodiene oxygenase-like                           | 547  | XP_003571033 | 1.65E-19  | 16.70023 | 15.33019 | 0.001146 |
| Poa_43    | wrky transcription factor 70                              | 212  | EMT13369     | 1.05E-17  | 7.900962 | 8.036973 | 0.002832 |
| Poa_4313  | patatin group a-3   | 271  | EMT32376     | 7.32E-49  | 2.906318 | 3.017956 | 0.046318 |
| Poa_4314  | patatin group a-3   | 379  | EMT12539     | 1.55E-31  | 4.780295 | 4.899561 | 2.46E-05 |
| Poa_43154 | germin a  | 545  | EMT33772     | 2.32E-28  | 10.45855 | 10.83416 | 0.000574 |
| Poa_43163 | dna repair and recombination rad54-like protein           | 420  | EMT17728     | 9.73646   | 7.143448 | 7.230873 | 0.006419 |
| Poa_43206 | cytokinin-o-glucosyltransferase 1                         | 501  | ACD03249     | 5.86E-91  | 26.41515 | 22.72526 | 0.007785 |
| Poa_43257 | probable metal-nicotianamine transporter ysl18-like       | 210  | EMT09795     | 1.25E-12  | ∞        | 135.9705 | 0.003572 |
| Poa_43367 | reverse transcriptase                                     | 437  | CAD41563     | 0.118702  | 8.861421 | 9.114974 | 0.000589 |
| Poa_43444 | atp binding protein                                       | 476  | ACG25367     | 0.735827  | 6.871784 | 6.78102  | 0.017469 |
| Poa_4363  | lectin-domain containing receptor kinase                  | 2132 | EMT08611     | 0         | 3.421983 | 3.476991 | 0.009639 |
| Poa_437   | nac domain-containing protein 21 22                       | 1006 | CBZ41153     | 1.95E-28  | 3.611612 | 3.713791 | 9.29E-06 |
| Poa_4370  | chymotrypsin inhibitor-2                                  | 368  | EMT00963     | 2.41E-29  | 41.03419 | 34.23717 | 1.61E-05 |
| Poa_43771 | retrotransposon unclassified                              | 467  | AAP53789     | 4.34E-14  | 41.75641 | 33.29593 | 0.000178 |
| Poa_43923 | transcription factor bhlh041                              | 293  | CDM84516     | 1.43E-19  | 13.01893 | 12.33985 | 0.001973 |
| Poa_4453  | thioredoxin h-type  | 475  | XP_003557743 | 1.71E-59  | 2.637907 | 2.718633 | 0.001957 |
| Poa_4469  | udp-glycosyltransferase 73c5-like                         | 234  | BAK05005     | 0.251627  | 22.80792 | 19.93656 | 0.010614 |
| Poa_4471  | flavin-containing monooxygenase 1                         | 1495 | XP_002446118 | 1.78E-110 | 8.777715 | 8.630423 | 0.000953 |
| Poa_44922 | calmodulin binding protein                                | 573  | EMS57146     | 2.62E-62  | 5.878675 | 5.941635 | 0.000136 |

|           |   |      |              |          |          |          |          |
|-----------|---|------|--------------|----------|----------|----------|----------|
| Poa_45382 | Thioredoxin-1   | 297  | EMT31114     | 4.6468   | 5.236474 | 5.284954 | 0.003058 |
| Poa_45545 | cytochrome p450   | 452  | CCP37680     | 9.07456  | ∞        | 88.3261  | 0.025534 |
| Poa_46560 | embryogenesis transmembrane                                   | 1526 | EMT03752     | 0        | 4.977859 | 4.97931  | 0.022164 |
| Poa_46656 | ubiquitin-60s ribosomal protein l40-like                      | 298  | XP_003567643 | 9.53E-62 | 19.30332 | 17.68571 | 0.001475 |
| Poa_46779 | lrr receptor-like serine threonine-protein kinase             | 356  | XP_003575729 | 2.63E-50 | 9.191412 | 8.804111 | 0.029197 |
| Poa_4683  | cinnamoyl- reductase 1-like                                   | 574  | BAJ98928     | 9.76E-82 | 2.380453 | 2.444315 | 0.020613 |
| Poa_47445 | retrotransposon unclassified                                  | 383  | BAC83789     | 0.030135 | 5.842478 | 5.981919 | 2.2E-05  |
| Poa_47767 | =-like protein  | 303  | EMS54911     | 6.57E-19 | 6.635419 | 6.640008 | 0.004024 |
| Poa_4809  | secologanin synthase  | 938  | BAK04696     | 1.62E-40 | 2.62021  | 2.705111 | 0.030747 |
| Poa_48262 | wrky dna-binding domain superfamily protein                   | 556  | EMT21551     | 1.44E-51 | 17.61315 | 16.80835 | 0.000235 |
| Poa_48557 | 40s ribosomal protein s19                                     | 561  | XP_004956361 | 4.20E-56 | ∞        | 97.58888 | 0.003939 |
| Poa_4880  | sesquiterpene cyclase   | 231  | XP_002449569 | 2.74E-10 | 66.35343 | 67.13656 | 2.27E-20 |
| Poa_4898  | flavonoid 3 -monooxygenase-like                               | 702  | AER39774     | 1.91E-56 | 14.19806 | 14.46744 | 3.1E-19  |
| Poa_49079 | mrp-like abc transporter                                      | 212  | CAP72293     | 1.36E-33 | 5.390588 | 5.410954 | 0.017569 |
| Poa_49230 | sulfotransferase domain containing expressed                  | 424  | EEE62868     | 7.3477   | ∞        | 96.16021 | 0.006815 |
| Poa_49306 | somatic embryogenesis receptor kinase 1                       | 311  | XP_002450798 | 2.43E-33 | ∞        | 122.5468 | 0.000992 |
| Poa_4980  | mads-box transcription factor 27-like                         | 423  | EMT19081     | 2.78E-57 | ∞        | 85.59997 | 0.009065 |
| Poa_50087 | af327046_11-cys peroxiredoxin                                 | 206  | AAG50024     | 2.5571   | 10.44726 | 10.04595 | 0.034384 |
| Poa_50138 | l-type lectin-domain containing receptor kinase -like         | 317  | NP_001058826 | 2.30E-47 | 9.174682 | 8.804607 | 0.02986  |
| Poa_50247 | exostosin-like 2 isoform x1                                   | 286  | XP_003578108 | 9.35E-12 | 5.336892 | 5.534651 | 0.001408 |
| Poa_50376 | receptor-like protein kinase                                  | 293  | EEC71916     | 7.42237  | ∞        | 89.43881 | 0.029951 |
| Poa_50783 | beta glucanase  | 206  | EMS51456     | 2.63E-38 | 3.478864 | 3.547031 | 0.025697 |
| Poa_51169 | protein tornado 1-like  | 386  | BAJ95391     | 0.300646 | 8.474529 | 8.255059 | 0.034042 |
| Poa_51354 | phosphoenolpyruvate phosphate translocator chloroplastic-like | 266  | XP_004960814 | 5.8078   | 19.4607  | 17.53944 | 0.009665 |
| Poa_51978 | retrotransposon unclassified                                  | 710  | AAP54937     | 2.20E-25 | 3.055956 | 3.156578 | 0.013263 |
| Poa_52292 | mrp-like abc transporter                                      | 231  | ABG45865     | 5.32E-43 | 7.148416 | 7.049672 | 0.005468 |
| Poa_52366 | germin-like protein 2-1                                       | 501  | NP_001053888 | 6.17E-12 | 4.767347 | 4.826684 | 0.009211 |

|           |  |      |              |           |          |          |          |
|-----------|--|------|--------------|-----------|----------|----------|----------|
| Poa_52425 | beta- -galactosyltransferase 20                                      | 284  | EMS66253     | 7.13E-16  | ∞        | 71.54316 | 0.042919 |
| Poa_52813 | seven in absentia domain family protein                              | 261  | NP_001060528 | 5.99E-29  | 28.80903 | 26.82603 | 2.53E-08 |
| Poa_52851 | cytochrome p450  | 296  | XP_004978933 | 3.76E-10  | 37.4966  | 34.48252 | 6.19E-09 |
| Poa_52908 | long chain acyl- synthetase 4-like                                   | 434  | XP_003569070 | 1.70E-32  | 7.265095 | 7.205616 | 0.001628 |
| Poa_53007 | pleiotropic drug resistance protein 5                                | 237  | XP_003561333 | 0.871456  | ∞        | 94.13442 | 0.010755 |
| Poa_53284 | probable glutathione s-transferase gstu6-like                        | 325  | EAY79285     | 1.34E-14  | 7.097426 | 7.299789 | 3.68E-05 |
| Poa_53398 | protein nrt1 ptr family -like isoform x3                             | 397  | XP_003570234 | 6.39E-15  | ∞        | 132.5692 | 5.47E-05 |
| Poa_53449 | predicted protein  | 551  | BAJ93898     | 0.012985  | 15.37719 | 14.07793 | 0.02103  |
| Poa_539   | probable carboxylesterase 15-like                                    | 497  | BAJ87262     | 1.77E-44  | 57.72556 | 56.82928 | 1.24E-21 |
| Poa_53921 | metacaspase-1-like   | 289  | BAJ98108     | 6.90E-46  | 5.645095 | 5.649598 | 0.004214 |
| Poa_540   | probable carboxylesterase 15-like                                    | 262  | XP_006655316 | 3.65E-36  | 45.58784 | 42.30327 | 1.31E-13 |
| Poa_54124 | probable flavin-containing monooxygenase 1-like                      | 303  | XP_004987142 | 6.51E-31  | ∞        | 103.5197 | 0.003246 |
| Poa_54393 | uridine 5 -monophosphate synthase-like                               | 250  | XP_002468298 | 0.402086  | ∞        | 98.29411 | 0.003147 |
| Poa_5484  | peroxidase 5-like  | 1015 | EMT27034     | 1.01E-20  | 11.48111 | 11.56604 | 3.31E-11 |
| Poa_54884 | peroxidase 12  | 446  | EMS56824     | 8.49E-58  | 4.739489 | 4.883206 | 2.96E-09 |
| Poa_5489  | brassinosteroid insensitive 1-associated receptor kinase 1 precursor | 674  | XP_003577543 | 7.07E-69  | 19.36627 | 17.56817 | 0.001712 |
| Poa_54956 | hypothetical protein TRIUR3_14836                                    | 282  | EMS51050     | 0.0136    | ∞        | 78.18637 | 0.027214 |
| Poa_54997 | peptide transporter-like   | 299  | NP_001047928 | 6.17E-20  | 99.83686 | 91.41094 | 2.32E-17 |
| Poa_551   | anthocyanidin -o-glucosyltransferase-like                            | 546  | XP_003567086 | 1.85E-52  | 4.724553 | 4.78662  | 0.00045  |
| Poa_55312 | cca trna nucleotidyltransferase 2 isoform x1                         | 360  | XP_008662527 | 6.61702   | 7.148028 | 7.31032  | 0.002012 |
| Poa_5532  | thioredoxin h-type   | 977  | AHL29285     | 6.46E-101 | 2.915118 | 2.979951 | 0.000227 |
| Poa_55347 | dentin sialophosphoprotein isoform x2                                | 273  | XP_003558635 | 2.12E-30  | 6.155701 | 6.098319 | 0.006448 |
| Poa_5560  | =beta-bisabolene synthase-like                                       | 381  | EMT24724     | 8.67E-43  | 48.20169 | 49.38178 | 1.11E-18 |
| Poa_5590  | peroxidase 51-like   | 325  | AAL34125     | 8.33E-28  | 2.608555 | 2.66182  | 0.011183 |
| Poa_5592  | blue copper protein  | 859  | EMT07779     | 3.52E-25  | 3.027202 | 3.082681 | 0.001892 |
| Poa_56066 | polyphenol oxidase   | 307  | AHZ59731     | 4.00707   | 3.269882 | 3.334181 | 0.008784 |
| Poa_56264 | cellulose synthase-like protein g2                                   | 365  | CDM81510     | 1.14E-17  | 12.87941 | 12.08676 | 0.016969 |



|           |   |      |              |           |          |          |          |
|-----------|---|------|--------------|-----------|----------|----------|----------|
| Poa_56498 | epimerase family protein                          | 184  | EMT17203     | 0.273954  | ∞        | 86.52119 | 0.030501 |
| Poa_56666 | protein   | 338  | XP_003580823 | 3.52E-45  | 9.330395 | 9.005486 | 0.039556 |
| Poa_568   | elongation factor 1-alpha                         | 425  | ABW20463     | 6.13E-93  | 2.334425 | 2.385145 | 0.01195  |
| Poa_5686  | resistance partial                                | 872  | EMT31046     | 6.00E-131 | 2.713642 | 2.783834 | 0.047496 |
| Poa_5691  | calmodulin  | 675  | EMS53836     | 7.66E-67  | 12.57259 | 12.18161 | 0.001478 |
| Poa_5692  | calmodulin  | 603  | EMS53836     | 1.08E-89  | 12.57077 | 12.55931 | 7.8E-07  |
| Poa_56961 | elongation factor 2                               | 593  | BAJ92215     | 2.74E-134 | 51.28948 | 38.18087 | 0.000566 |
| Poa_5732  | syntaxin-related protein                          | 312  | XP_006655835 | 4.15E-43  | 3.135447 | 3.199326 | 0.005765 |
| Poa_57651 | udp-glycosyltransferase 73c5-like                 | 500  | ACD03249     | 4.60E-85  | 11.15872 | 10.99285 | 0.030588 |
| Poa_57749 | lipxygenase                                       | 402  | BAJ91632     | 3.05E-67  | ∞        | 218.6952 | 5.89E-08 |
| Poa_57913 | hypothetical protein F775_26169                   | 287  | EMT23962     | 0.007253  | ∞        | 92.9801  | 0.011737 |
| Poa_58126 | tpa: wrky dna-binding domain superfamily protein  | 280  | ACD80373     | 1.77E-54  | 3.436811 | 3.500974 | 0.035731 |
| Poa_58387 | protein argonaute 4b-like                         | 165  | EEC75879     | 0.491164  | ∞        | 132.5557 | 0.011657 |
| Poa_58501 | serine threonine-protein kinase at3g07070-like    | 201  | XP_003576894 | 1.66754   | ∞        | 103.0141 | 0.005887 |
| Poa_58530 | 2og-fe oxygenase family expressed                 | 208  | XP_003568582 | 2.27E-40  | 4.745057 | 4.74629  | 0.023849 |
| Poa_5888  | hydroxyisourate hydrolase                         | 1286 | XP_003566327 | 0         | 2.919749 | 3.00475  | 0.021217 |
| Poa_58917 | udp-glycosyltransferase 82a1-like                 | 223  | XP_004955099 | 0.784295  | 21.90732 | 19.8838  | 0.005767 |
| Poa_59071 | probable cellulose synthase a catalytic subunit 2 | 374  | ACG25552     | 1.24E-06  | ∞        | 87.16078 | 0.031618 |
| Poa_59258 | cysteine-rich receptor-like protein kinase 10     | 236  | XP_003560125 | 8.45E-27  | 6.581779 | 6.520522 | 0.011457 |
| Poa_593   | nbs-lrr disease resistance protein homologue      | 323  | CAD45025     | 1.66062   | 17.96906 | 18.08574 | 5.53E-12 |
| Poa_59379 | wall-associated receptor kinase 3                 | 272  | EMT30697     | 4.32E-40  | ∞        | 171.354  | 5.73E-07 |
| Poa_596   | heat shock protein 90                             | 868  | ACX37414     | 2.99E-166 | 2.517073 | 2.618647 | 0.007889 |
| Poa_59768 | phenylalanine ammonia-lyase                       | 365  | EMT29667     | 3.72E-77  | 24.29799 | 22.04579 | 0.000259 |
| Poa_6009  | high affinity nitrate transporter                 | 464  | XP_003572550 | 1.83E-59  | 4.053106 | 4.152582 | 4.72E-05 |
| Poa_602   | mloc_74648-like partial                           | 1115 | EMS45818     | 0         | 4.160932 | 4.290444 | 1.22E-05 |
| Poa_60400 | receptor-like protein kinase hsl1-like            | 642  | XP_003567103 | 8.32E-51  | 7.483743 | 7.397179 | 0.026727 |
| Poa_60422 | glutathione s-transferase                         | 219  | EMS45505     | 2.02E-26  | ∞        | 189.9776 | 1.86E-05 |

|           |  |      |              |           |          |          |          |
|-----------|--|------|--------------|-----------|----------|----------|----------|
| Poa_60981 | probable wrky transcription factor 70-like                       | 290  | EMT18619     | 3.38E-30  | ∞        | 78.38777 | 0.033068 |
| Poa_6117  | phosphoenolpyruvate carboxykinase                                | 751  | CAR78920     | 3.92E-137 | 16.32091 | 16.67136 | 5.14E-16 |
| Poa_6170  | gda2 protein   | 542  | EMS65194     | 1.05E-32  | 3.187504 | 3.240534 | 0.01958  |
| Poa_6189  | cytochrome p450  | 454  | XP_002459492 | 1.20E-86  | 65.0169  | 65.24552 | 1.05E-26 |
| Poa_6224  | patatin group a-3  | 533  | EMT32376     | 2.87E-49  | 2.966988 | 3.06794  | 0.009427 |
| Poa_62381 | protein  | 214  | EMT22815     | 1.48E-43  | 5.472349 | 5.485965 | 0.026282 |
| Poa_6298  | mitochondrial chaperone bcs1-b                                   | 911  | EMS68880     | 3.39E-98  | 2.393151 | 2.460046 | 0.006114 |
| Poa_6299  | mitochondrial chaperone bcs1-b                                   | 921  | EMS68880     | 1.11E-98  | 2.873033 | 2.934245 | 0.001027 |
| Poa_6365  | cysteine proteinase ep-b 1-like                                  | 1032 | EMT11858     | 2.56E-141 | 27.81005 | 28.09506 | 1.17E-17 |
| Poa_6398  | mitochondrial transcription termination factor-like              | 380  | EEC80257     | 3.86508   | 3.155064 | 3.244858 | 0.030653 |
| Poa_6399  | polyubiquitin 2  | 317  | XP_003568630 | 2.38E-55  | 2.881509 | 2.944475 | 0.016126 |
| Poa_64289 | hypothetical protein OsJ_12929                                   | 236  | EAZ28889     | 0.102773  | 7.412386 | 7.203498 | 0.040042 |
| Poa_64328 | serine threonine-protein kinase-like protein ccr3                | 308  | XP_003577261 | 9.50E-17  | 19.04067 | 18.02255 | 0.001041 |
| Poa_65181 | calcium-transporting atpase plasma membrane-type-like isoform x2 | 363  | XP_008652882 | 0.979777  | ∞        | 74.74191 | 0.032769 |
| Poa_65245 | cytochrome p450 94a1-like  | 611  | EMT13171     | 3.34E-119 | 12.39139 | 11.7616  | 0.007885 |
| Poa_65520 | ribosomal protein l32  | 293  | YP_007026602 | 8.60E-24  | 103.421  | 98.02247 | 0.02173  |
| Poa_6562  | o-methyltransferase  | 348  | EMT30204     | 1.74E-18  | ∞        | 471.1922 | 3.74E-15 |
| Poa_6563  | o-methyltransferase  | 617  | EMT30204     | 5.82E-18  | 14.53704 | 14.3282  | 4.43E-05 |
| Poa_6568  | =beta-bisabolene synthase-like                                   | 319  | XP_002461617 | 2.67E-67  | ∞        | 1418.356 | 2.47E-31 |
| Poa_659   | protein  | 916  | EMT01663     | 2.28E-73  | 2.99461  | 3.115819 | 0.002292 |
| Poa_6637  | secologanin synthase-like  | 1201 | XP_003569408 | 3.47E-159 | 2.94276  | 3.041666 | 0.012549 |
| Poa_66530 | elongation factor 2  | 315  | EMT30630     | 5.59E-66  | 10.57307 | 9.992    | 0.030747 |
| Poa_6663  | benzyl alcohol o-benzoyltransferase-like                         | 206  | XP_003574156 | 9.51E-24  | 28.77467 | 25.84403 | 0.00105  |
| Poa_6665  | diphosphomevalonate decarboxylase                                | 520  | EMS47869     | 4.44E-94  | 2.594724 | 2.672559 | 0.010992 |
| Poa_66706 | OSJNBb0080H08.1  | 227  | CAE02377     | 8.86572   | ∞        | 180.2451 | 1.8E-05  |
| Poa_6713  | embryogenesis transmembrane                                      | 1350 | EMT16525     | 1.40E-36  | 2.334458 | 2.40006  | 0.024781 |
| Poa_6723  | autophagy-related protein 18h-like                               | 644  | EMT33426     | 5.64E-111 | 2.212003 | 2.265449 | 0.029586 |

|           |  |      |              |           |          |          |          |
|-----------|--|------|--------------|-----------|----------|----------|----------|
| Poa_6775  | high affinity nitrate transporter                                  | 956  | AAC49531     | 2.36E-145 | 2.603702 | 2.665175 | 0.002083 |
| Poa_68062 | peroxidase 12  | 344  | XP_003565403 | 2.90E-21  | 3.131669 | 3.226531 | 0.001475 |
| Poa_68317 | transposon mutator sub- expressed                                  | 253  | EMT24415     | 1.38E-18  | ∞        | 89.00042 | 0.007961 |
| Poa_6849  | glutamate dehydrogenase  | 557  | BAK00921     | 1.01E-118 | 3.23881  | 3.319605 | 3.41E-05 |
| Poa_68589 | tpa: homeodomain-like transcription factor superfamily protein     | 190  | EMS46537     | 9.75E-28  | ∞        | 81.06804 | 0.030667 |
| Poa_688   | abc transporter b family member 4-like                             | 1502 | EMS48422     | 0         | 83.21135 | 62.27278 | 1.06E-08 |
| Poa_68971 | retrotransposon unclassified                                       | 206  | ABA95320     | 0.003942  | ∞        | 117.3014 | 0.024243 |
| Poa_6903  | s-noroclaurine synthase 1-like                                     | 521  | EMT02785     | 1.19E-55  | 71.96673 | 71.1915  | 8.98E-30 |
| Poa_69210 | peroxidase 12  | 346  | BAJ96875     | 3.04E-09  | 7.374135 | 7.427119 | 2.95E-05 |
| Poa_69343 | leucine rich repeat family expressed                               | 258  | NP_001068382 | 0.975127  | ∞        | 80.88157 | 0.023195 |
| Poa_6939  | diphosphomevalonate decarboxylase                                  | 272  | EMS63646     | 1.96E-45  | 5.344758 | 5.469312 | 1.85E-08 |
| Poa_6941  | mitochondrial chaperone bcs1                                       | 1633 | EMS64027     | 0         | 2.735883 | 2.784261 | 0.030501 |
| Poa_6960  | s-noroclaurine synthase 1-like                                     | 507  | EMT02785     | 9.86E-72  | 60.72577 | 59.83621 | 8.77E-27 |
| Poa_70399 | protein far1-related sequence 5-like                               | 216  | XP_003563073 | 4.30E-29  | ∞        | 85.94556 | 0.00891  |
| Poa_70612 | nbs-ldr partial  | 258  | BAK04843     | 2.95E-22  | ∞        | 158.0922 | 0.000275 |
| Poa_7138  | probable nucleoredoxin 1-1-like                                    | 1526 | NP_001061767 | 3.63E-76  | 7.096989 | 6.990053 | 0.049913 |
| Poa_7139  | cell division protein aaa atpase family                            | 581  | BAJ98749     | 6.61E-94  | 3.507394 | 3.567797 | 0.011457 |
| Poa_7149  | phosphate transporter  | 555  | AAO72433     | 3.25E-114 | 91.94394 | 84.48719 | 3.23E-22 |
| Poa_71660 | protein srg1   | 497  | BAJ89811     | 1.00E-58  | 27.82468 | 21.74208 | 0.02693  |
| Poa_7174  | cytochrome p450  | 455  | XP_002459492 | 8.91E-92  | 42.18709 | 42.35392 | 1.73E-22 |
| Poa_72050 | nac domain-containing protein 8-like                               | 487  | XP_004978081 | 2.95499   | ∞        | 84.45759 | 0.024345 |
| Poa_72052 | PREDICTED: uncharacterized protein LOC100828184                    | 522  | XP_003566604 | 6.42E-14  | ∞        | 191.304  | 3.76E-07 |
| Poa_72172 | type i inositol- -trisphosphate 5-phosphatase 11                   | 257  | AFW62113     | 2.13995   | ∞        | 89.88341 | 0.02986  |
| Poa_72362 | replication protein a 70 kda dna-binding subunit b-like isoform x1 | 317  | XP_008657197 | 2.28E-11  | 4.168812 | 4.189267 | 0.046632 |
| Poa_72934 | homeodomain-like transcription factor superfamily protein          | 200  | EMT12709     | 6.22E-36  | 16.07533 | 14.72468 | 0.014143 |
| Poa_7311  | germin-like protein 12-4   | 416  | XP_004972687 | 2.31E-71  | 2.813349 | 2.879798 | 0.000624 |
| Poa_73137 | potassium channel kat3   | 305  | XP_003575785 | 2.20E-12  | 4.47865  | 4.55136  | 0.047836 |

|           |   |      |              |           |          |          |          |
|-----------|---|------|--------------|-----------|----------|----------|----------|
| Poa_74043 | peroxidase  | 350  | XP_002448820 | 6.62E-15  | 3.957911 | 4.124743 | 1.44E-05 |
| Poa_74069 | transducin wd-40 repeat protein family-like protein | 251  | EAZ03259     | 0.099143  | ∞        | 83.46669 | 0.038245 |
| Poa_74340 | probable glutathione s-transferase gstu6-like       | 228  | EMS56995     | 8.44E-20  | 4.897964 | 5.005037 | 0.011424 |
| Poa_7442  | harpin-induced protein                              | 326  | BAJ96015     | 2.85E-45  | 5.117497 | 5.234765 | 0.025035 |
| Poa_7450  | acetyl- cytosolic 1                                 | 408  | NP_001062685 | 3.08E-51  | 3.236774 | 3.331009 | 0.006176 |
| Poa_7498  | mitochondrial chaperone bcs1-b                      | 511  | BAJ98749     | 1.53E-86  | 3.032114 | 3.076431 | 0.01085  |
| Poa_7499  | nac transcription factor                            | 875  | EMT10101     | 6.51E-38  | 3.181342 | 3.288704 | 0.001957 |
| Poa_7567  | syntaxin-related protein                            | 562  | XP_003575826 | 2.44E-63  | 3.78104  | 3.894392 | 0.001062 |
| Poa_7604  | pathogenesis-related protein 1                      | 542  | EMT04930     | 2.60E-70  | 5.68732  | 5.855948 | 1.57E-10 |
| Poa_761   | abc transporter b family member 4-like              | 811  | BAJ94394     | 1.27E-175 | 159.1405 | 109.2428 | 6.23E-13 |
| Poa_76346 | predicted protein                                   | 314  | BAK03029     | 1.22528   | ∞        | 534.9122 | 0.007655 |
| Poa_7664  | potassium channel skor                              | 267  | XP_004965137 | 3.03E-47  | 4.780171 | 4.903005 | 0.047737 |
| Poa_7677  | flotillin-like protein 1-like                       | 913  | BAJ99634     | 4.64E-177 | 3.124638 | 3.222616 | 0.006415 |
| Poa_76770 | retrotransposon ty1-copia subclass                  | 432  | EMT19417     | 6.57E-24  | 3.936468 | 4.052632 | 0.019199 |
| Poa_76933 | abc transporter b family member 15-like             | 153  | XP_006653530 | 0.792879  | ∞        | 89.68961 | 0.027618 |
| Poa_7709  | nucleotide binding protein                          | 1517 | XP_004984829 | 0         | 22.84731 | 20.6999  | 0.00042  |
| Poa_77292 | anion transporter 7                                 | 370  | EMT28992     | 2.14E-21  | 4.384621 | 4.561281 | 0.010923 |
| Poa_774   | unknow protein                                      | 830  | EMT28906     | 5.36E-32  | 19.85527 | 19.14698 | 3.53E-08 |
| Poa_77938 | metal ion binding protein                           | 411  | EMT14475     | 3.78E-15  | 4.577806 | 4.666113 | 6.62E-07 |
| Poa_7821  | PREDICTED: uncharacterized protein LOC100831345     | 537  | XP_003569204 | 3.60E-05  | 51.86186 | 40.06496 | 4.1E-05  |
| Poa_784   | protein translation factor sui1                     | 1115 | ABX61094     | 1.30E-72  | 2.088238 | 2.15083  | 0.017021 |
| Poa_78520 | cytokinin-o-glucosyltransferase 2                   | 345  | BAJ85429     | 4.46E-24  | 35.3197  | 30.32061 | 0.000238 |
| Poa_7896  | hypothetical protein TRIUR3_16810                   | 938  | EMS53926     | 5.96E-18  | 6.406163 | 6.562666 | 1.87E-09 |
| Poa_79192 | flavin-containing monooxygenase 1                   | 289  | EMT12055     | 2.37E-44  | ∞        | 106.9369 | 0.013594 |
| Poa_794   | protein srg1  | 324  | XP_003564218 | 9.67E-58  | 7.977686 | 8.048023 | 1.19E-09 |
| Poa_79650 | nadh dehydrogenase subunit 4                        | 287  | P27572       | 4.88E-19  | 7.241145 | 7.090977 | 0.035441 |
| Poa_79689 | PREDICTED: uncharacterized protein LOC101775724     | 308  | XP_004953229 | 2.04181   | 26.52292 | 23.26979 | 0.00502  |

|           |  |      |              |           |          |          |          |
|-----------|--|------|--------------|-----------|----------|----------|----------|
| Poa_79875 | tpa: rin3 family protein                                       | 575  | XP_004971164 | 5.27E-17  | 15.40489 | 14.81415 | 5.41E-05 |
| Poa_8018  | unnamed protein product  | 272  | CDM86741     | 1.14E-16  | ∞        | 149.1495 | 3.54E-05 |
| Poa_8097  | protein yls9-like  | 675  | AFW60412     | 3.16E-05  | 21.40141 | 20.96807 | 2.23E-12 |
| Poa_8213  | wall-associated receptor kinase 3                              | 433  | EMS55833     | 5.54E-56  | 6.210086 | 6.194888 | 0.005887 |
| Poa_8236  | pathogenesis-related protein 1                                 | 346  | XP_003561717 | 2.24E-17  | 10.7246  | 10.83494 | 1.41E-07 |
| Poa_8350  | serine threonine-protein kinase-like protein at3g51990-like    | 1134 | XP_003568554 | 0.552764  | 4.794771 | 4.826193 | 0.02103  |
| Poa_8398  | zinc-binding protein   | 605  | BAJ90368     | 1.08E-92  | 3.348281 | 3.395426 | 0.032955 |
| Poa_84382 | signal recognition particle 54 kda protein 2-like              | 322  | EMS61887     | 1.14E-54  | ∞        | 101.373  | 0.011049 |
| Poa_84466 | calcium-dependent protein kinase                               | 344  | EEE66944     | 1.22072   | 15.56892 | 13.94485 | 0.030501 |
| Poa_85049 | probable glutathione s-transferase gstu6-like                  | 300  | XP_003574231 | 6.50E-15  | 3.486442 | 3.648111 | 0.016484 |
| Poa_85866 | 3-ketoacyl- thiolase peroxisomal-like                          | 454  | AFW74043     | 1.19E-17  | 2.968974 | 3.066702 | 0.00891  |
| Poa_8593  | patatin group a-3  | 315  | EMT18762     | 5.83E-35  | 6.331569 | 6.503209 | 8.86E-09 |
| Poa_8595  | patatin group a-3  | 546  | BAK02816     | 1.53E-96  | 3.839283 | 3.974874 | 0.027029 |
| Poa_86262 | neurofilament heavy polypeptide-like                           | 260  | XP_003576069 | 8.24E-22  | 13.04688 | 12.25077 | 0.025035 |
| Poa_86296 | chloroplast orf91  | 381  | YP_052735    | 1.38E-04  | 31.85406 | 30.05316 | 0.034275 |
| Poa_86496 | unknown  | 454  | ACF86111     | 6.41262   | 10.07339 | 9.747303 | 0.013758 |
| Poa_8684  | mrp-like abc transporter                                       | 1923 | EMS60544     | 0         | 3.129155 | 3.20462  | 0.000308 |
| Poa_876   | wpp domain-interacting protein 1-like                          | 1213 | BAK00431     | 1.05E-151 | 2.472281 | 2.536711 | 0.03797  |
| Poa_87913 | tpa: tify domain cct motif transcription factor family protein | 221  | XP_002461012 | 2.97E-04  | 2.904292 | 2.940975 | 0.026931 |
| Poa_88045 | mosc domain-containing protein mitochondrial-like              | 330  | XP_006661538 | 0.024161  | 40.66407 | 34.78958 | 2.21E-06 |
| Poa_88360 | protein wir1b-like   | 575  | BAJ88118     | 3.69E-07  | 5.003968 | 5.123461 | 4.22E-07 |
| Poa_88551 | rust resistance kinase lr10                                    | 216  | BAJ95981     | 2.18E-35  | ∞        | 86.61092 | 0.043573 |
| Poa_8857  | long chain acyl- synthetase 4-like                             | 280  | EMT00965     | 4.94E-58  | 3.838694 | 3.871645 | 0.048645 |
| Poa_8880  | hypothetical protein TRIUR3_21994                              | 719  | EMS46409     | 9.04E-04  | 55.58761 | 49.97929 | 1.34E-11 |
| Poa_88940 | phosphoenolpyruvate carboxykinase                              | 491  | EMT06834     | 3.98E-13  | 19.29514 | 19.24539 | 1.39E-08 |
| Poa_8927  | hydroxymethylglutaryl- synthase                                | 731  | NP_001170696 | 8.38E-129 | 3.238509 | 3.34063  | 0.000681 |
| Poa_8940  | phosphoenolpyruvate carboxykinase                              | 216  | CAR78952     | 8.69E-41  | 56.49699 | 53.99616 | 8.64E-21 |

|           |  |      |              |           |          |          |          |
|-----------|--|------|--------------|-----------|----------|----------|----------|
| Poa_8941  | phosphoenolpyruvate carboxykinase                        | 218  | CCB84876     | 3.01E-46  | ∞        | 933.315  | 3.45E-27 |
| Poa_895   | probable -trehalose-phosphate synthase                   | 1016 | NP_001061805 | 5.49E-175 | 4.20102  | 4.258895 | 0.004024 |
| Poa_898   | casein kinase i isoform delta-like protein               | 319  | EMT05276     | 1.24E-18  | 3.115985 | 3.195117 | 0.022658 |
| Poa_9     | =-beta-caryophyllene synthase                            | 1618 | XP_004972882 | 5.77E-180 | 8.158333 | 8.289723 | 7.06E-10 |
| Poa_90400 | terpene synthase 10                                      | 273  | XP_003571437 | 5.75E-33  | ∞        | 89.44306 | 0.012128 |
| Poa_9087  | subtilisin-like protease                                 | 332  | EMS63058     | 8.71E-52  | 27.92977 | 25.34959 | 0.000118 |
| Poa_90973 | retrotransposon ty1-copia subclass                       | 215  | AAR88589     | 1.41E-24  | ∞        | 157.4158 | 0.011063 |
| Poa_912   | secologanin synthase-like                                | 775  | XP_003566917 | 4.78E-113 | 4.884624 | 4.929169 | 0.03711  |
| Poa_9218  | cytochrome p450  | 428  | XP_002459492 | 8.95E-08  | 22.81346 | 23.12868 | 2.61E-12 |
| Poa_92280 | tmv resistance protein n-like                            | 340  | EMS47056     | 7.04E-31  | ∞        | 94.77706 | 0.038257 |
| Poa_924   | peroxidase 12  | 414  | BAJ96875     | 2.98E-45  | 2.768182 | 2.872222 | 0.003624 |
| Poa_9347  | potassium channel skor                                   | 309  | XP_003560852 | 1.14E-45  | 7.293728 | 7.361483 | 1.25E-07 |
| Poa_94    | protein root hair defective 3 homolog 1-like             | 1693 | XP_006664173 | 1.71E-21  | 2.652848 | 2.739253 | 0.000379 |
| Poa_94525 | disease resistance rpp13-like protein 1-like             | 620  | EMT30566     | 5.07E-34  | 4.999954 | 4.985393 | 0.025534 |
| Poa_9469  | protein binding protein                                  | 270  | BAJ89773     | 1.49E-61  | 3.387757 | 3.435856 | 0.011297 |
| Poa_94903 | dna polymerase zeta catalytic subunit-like               | 560  | XP_004958624 | 6.3611    | 5.630854 | 5.758613 | 4.24E-07 |
| Poa_9521  | subtilisin-like protease                                 | 327  | EMT05597     | 8.56E-31  | 6.145012 | 6.216347 | 3.11E-06 |
| Poa_95359 | elongation factor 1-alpha                                | 298  | BAJ99738     | 2.37E-23  | 5.098807 | 5.36992  | 0.006429 |
| Poa_95734 | cytochrome p450 76c2                                     | 290  | EMT09759     | 5.25094   | 10.89073 | 10.5918  | 0.008779 |
| Poa_9583  | disease resistance protein rpm1                          | 657  | EMT31045     | 6.82E-108 | 3.145945 | 3.251233 | 0.041689 |
| Poa_96094 | prohibitin- mitochondrial-like                           | 480  | XP_004952899 | 5.98E-51  | 7.385821 | 7.566112 | 1.25E-07 |
| Poa_9687  | -oxoglutarate 3-dioxygenase-like                         | 1036 | BAJ95938     | 2.19E-124 | 52.18426 | 44.49726 | 1.45E-08 |
| Poa_9713  | probable iron ascorbate oxidoreductase ddb_g0283291-like | 1129 | EMT15714     | 3.59E-99  | 4.185381 | 4.286882 | 0.00027  |
| Poa_9800  | adenosine kinase 2-like                                  | 922  | EMT25431     | 1.84E-104 | 3.863275 | 3.904712 | 0.007278 |
| Poa_9832  | phenylalanine ammonia-lyase                              | 903  | XP_003575404 | 0         | 3.173812 | 3.254859 | 0.006194 |
| Poa_9843  | probable nucleoredoxin 3                                 | 264  | AHL29285     | 4.79E-47  | 4.577297 | 4.735753 | 4.91E-05 |

## (B) スズメノカタビラ・発現抑制

| Feature ID | Sequence desc.  | Contig |              | E-Value   | Experiment -                     | EDGE test: -                    |                           |
|------------|---|--------|--------------|-----------|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------|
|            |   | length | Top hit ACC  |           | Fold Change<br>(original values) | Fold change<br>(stress/control) | FDR p-value<br>correction |
| Poa_100051 | nicotianamine synthase 3                              | 272    | EMT12509     | 2.70E-56  | -59.6159                         | -52.5227                        | 3.3E-09                   |
| Poa_10138  | metal transporter nramp6-like                         | 735    | NP_001045794 | 1.33E-70  | -7.18846                         | -6.86073                        | 1.31E-05                  |
| Poa_101509 | protein   | 295    | EMS45253     | 4.11E-49  | -16.7207                         | -14.2477                        | 0.0157                    |
| Poa_102048 | histone-lysine n-methyltransferase atx4-like          | 223    | XP_002442769 | 3.35E-31  | -∞                               | -157.174                        | 0.014603                  |
| Poa_10313  | lrr receptor-like serine threonine-protein kinase efr | 806    | EMS62309     | 1.40E-62  | -3.65455                         | -3.52883                        | 2.7E-05                   |
| Poa_10314  | lrr receptor-like serine threonine-protein kinase     | 365    | EMS62309     | 2.93E-43  | -3.95969                         | -3.82559                        | 0.000149                  |
| Poa_103427 | f-box domain containing protein                       | 239    | AAO62329     | 3.40607   | -8.0192                          | -7.47322                        | 0.00636                   |
| Poa_10646  | lrr receptor-like serine threonine-protein kinase     | 1585   | NP_001047429 | 0         | -2.86615                         | -2.76048                        | 0.017891                  |
| Poa_10692  | hypothetical protein F775_43930                       | 189    | EMT23219     | 0.059145  | -3.15128                         | -3.05883                        | 0.003834                  |
| Poa_107515 | protein zinc induced facilitator-like 1-like          | 368    | XP_004978595 | 8.48E-45  | -87.8238                         | -79.1759                        | 1.22E-20                  |
| Poa_107529 | protein kinase g11a                                   | 444    | DAA54886     | 3.36671   | -111.104                         | -45.1887                        | 0.027585                  |
| Poa_107649 | major facilitator superfamily expressed               | 350    | XP_006663794 | 1.53E-47  | -∞                               | -542.41                         | 2.73E-15                  |
| Poa_107725 | protein zinc induced facilitator-like 1-like          | 598    | EMT05811     | 2.81E-102 | -145.498                         | -110.51                         | 9.66E-19                  |
| Poa_107726 | protein zinc induced facilitator-like 1-like          | 605    | EMT28258     | 4.43E-111 | -48.1924                         | -44.6744                        | 1.42E-14                  |
| Poa_108272 | cytochrome p450 94a2-like                             | 219    | EAZ07031     | 1.15811   | -37.9458                         | -27.4615                        | 0.023388                  |
| Poa_108617 | photosystem ii 10 kda polypeptide                     | 277    | EMT17346     | 3.67E-29  | -∞                               | -91.6322                        | 0.007917                  |
| Poa_110089 | tyrosine-sulfated glycopeptide receptor 1             | 239    | BAK01608     | 0.517099  | -∞                               | -73.6213                        | 0.036941                  |
| Poa_11101  | high-affinity potassium transporter                   | 466    | XP_003579642 | 1.06E-87  | -2.74314                         | -2.65863                        | 0.003189                  |
| Poa_11436  | hypothetical protein TRIUR3_22787                     | 825    | EMS48859     | 5.03E-14  | -3.67647                         | -3.54263                        | 0.001332                  |
| Poa_11856  | lipxygenase   | 499    | EMT18292     | 7.20E-77  | -3.11947                         | -2.9946                         | 0.037816                  |
| Poa_11938  | cellulose synthase                                    | 427    | EMT30130     | 6.59E-49  | -3.99979                         | -3.80632                        | 0.009594                  |
| Poa_11998  | pleiotropic drug resistance protein 4                 | 946    | EMT16409     | 5.94E-153 | -5.04135                         | -4.81051                        | 0.003644                  |

|           |   |      |              |           |          |          |          |
|-----------|---|------|--------------|-----------|----------|----------|----------|
| Poa_12191 | thiazole biosynthetic enzyme thi4 family                                  | 444  | EMT30436     | 1.31E-100 | -2.49275 | -2.42146 | 0.022686 |
| Poa_12351 | retrotransposon unclassified  | 406  | NP_001169652 | 1.09E-20  | -9.26072 | -8.44627 | 0.025776 |
| Poa_12355 | pathogenesis-related protein 1  | 762  | NP_001049857 | 3.83E-78  | -7.13394 | -6.82997 | 3.9E-08  |
| Poa_12356 | pathogenesis-related protein 1  | 668  | NP_001049857 | 2.38E-76  | -22.6505 | -20.9884 | 2.62E-11 |
| Poa_12706 | sodium-dependent transporter yocs   | 428  | XP_003576032 | 2.10E-10  | -3.85086 | -3.72892 | 0.000624 |
| Poa_12707 | uncharacterized mitochondrial protein g00820-like                         | 200  | XP_004966794 | 2.41359   | -20.3408 | -18.0175 | 0.000168 |
| Poa_1275  | 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine expressed              | 880  | EMT31101     | 0         | -2.51345 | -2.44337 | 0.003823 |
| Poa_12809 | laccase-12 13-like  | 465  | NP_001241720 | 3.59E-53  | -3.10776 | -3.02544 | 0.005294 |
| Poa_12842 | plasma membrane atpase- partial   | 401  | ABN04099     | 5.71E-08  | -10.5194 | -9.95698 | 1.38E-07 |
| Poa_13081 | ammonium transporter  | 1008 | XP_004976182 | 4.18E-79  | -3.04509 | -2.93877 | 0.001838 |
| Poa_13481 | transmembrane 9 superfamily member 4-like                                 | 515  | NP_001241830 | 2.66E-91  | -2.45678 | -2.37797 | 0.022487 |
| Poa_1382  | cbl-interacting serine threonine-protein kinase 15                        | 324  | XP_003576032 | 8.18E-10  | -3.08029 | -2.99573 | 0.00443  |
| Poa_13985 | myosin-j heavy chain  | 337  | EMT26309     | 0.884671  | -3.19474 | -3.05786 | 0.037959 |
| Poa_1399  | alcohol dehydrogenase   | 393  | ACV87825     | 1.05E-89  | -2.48987 | -2.41063 | 0.035769 |
| Poa_14497 | pleiotropic drug resistance protein 4                                     | 966  | XP_003576430 | 1.18E-170 | -2.58769 | -2.50794 | 0.033592 |
| Poa_14521 | cral trio domain sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein | 542  | XP_003573065 | 7.70E-94  | -12.5634 | -11.8792 | 2.32E-05 |
| Poa_14573 | nicotianamine aminotransferase a-like                                     | 394  | EMS55745     | 4.08E-30  | -6.67687 | -6.33743 | 0.000496 |
| Poa_14889 | protein phosphatase 1 regulatory subunit ppra                             | 226  | EMT09914     | 5.86E-36  | -2.70485 | -2.61097 | 0.027029 |
| Poa_14915 | zinc finger (c3hc4-type ring finger) protein family-like                  | 628  | EMS46540     | 5.45E-119 | -3.42226 | -3.32991 | 0.015716 |
| Poa_14918 | histone h1flk   | 519  | EMT30281     | 2.08E-55  | -3.95092 | -3.84322 | 0.002083 |
| Poa_14919 | histone h1flk   | 531  | EMT30281     | 1.48E-73  | -4.09226 | -3.94514 | 0.000136 |
| Poa_15238 | flavonol- partial   | 524  | BAK00237     | 1.99E-88  | -2.87286 | -2.75737 | 0.040923 |
| Poa_15864 | mlo-like protein 1  | 1350 | EMT06538     | 1.56E-112 | -3.61146 | -3.47001 | 0.042634 |
| Poa_1637  | hypothetical protein TRIUR3_09976   | 325  | EMS52692     | 0.00901   | -3.43599 | -3.28938 | 0.009454 |
| Poa_16373 | beta-tubulin  | 345  | ACY01827     | 2.13E-68  | -3.75948 | -3.65015 | 2.84E-05 |
| Poa_16476 | hydroxyproline-rich glyco   | 876  | XP_003559660 | 5.56E-167 | -3.69734 | -3.58297 | 0.004016 |
| Poa_16506 | udp-glucose 6-dehydrogenase   | 344  | EMT21987     | 1.98E-73  | -4.78426 | -4.6091  | 0.00249  |



|           |   |      |              |           |          |          |          |
|-----------|---|------|--------------|-----------|----------|----------|----------|
| Poa_1657  | l-type lectin-domain containing receptor kinase -like             | 1784 | EMT11802     | 3.62E-156 | -4.67616 | -4.52612 | 4.26E-07 |
| Poa_16594 | peroxidase 2-like   | 602  | EMS52002     | 2.81E-82  | -3.37511 | -3.28623 | 0.001639 |
| Poa_16882 | solute carrier family 35 member f1-like                           | 221  | XP_003578425 | 1.22E-40  | -5.51408 | -5.26462 | 0.000348 |
| Poa_17036 | low quality protein: 14 kda proline-rich                          | 334  | XP_003562119 | 1.65206   | -3.62116 | -3.52314 | 0.003624 |
| Poa_1721  | aspartic proteinase nepenthesin-2                                 | 901  | EMS62120     | 1.47E-64  | -3.56954 | -3.47573 | 0.005258 |
| Poa_1722  | aspartic proteinase nepenthesin-2                                 | 480  | EMS62120     | 4.83E-64  | -3.76659 | -3.7496  | 0.04433  |
| Poa_17631 | ethylene receptor 1   | 189  | EMS67646     | 8.29E-06  | -4.1488  | -3.96394 | 0.037686 |
| Poa_18024 | alcohol dehydrogenase partial                                     | 341  | AAO24258     | 7.18E-77  | -2.20471 | -2.1376  | 0.028275 |
| Poa_18310 | lrr receptor-like serine threonine-protein kinase                 | 1040 | EMT10960     | 2.37E-130 | -3.89942 | -3.72629 | 0.018402 |
| Poa_18554 | mother of ft and partial  | 634  | EMT22254     | 2.50E-86  | -3.12786 | -3.04976 | 0.008374 |
| Poa_18621 | vacuolar atp synthase subunit c                                   | 212  | EMS67397     | 1.58005   | -3.31194 | -3.20212 | 0.000836 |
| Poa_18872 | tpa: cbl-interacting protein kinase family protein                | 433  | ACF85692     | 3.29E-76  | -3.02608 | -2.92445 | 0.029472 |
| Poa_19555 | protein wax2  | 189  | BAD23474     | 0.282153  | -4.60538 | -4.50205 | 0.002579 |
| Poa_19759 | origin recognition complex subunit 1                              | 323  | AFW76594     | 5.42E-59  | -4.36004 | -4.16302 | 0.00693  |
| Poa_19842 | 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine expressed      | 787  | XP_003561625 | 8.60E-114 | -2.5268  | -2.47704 | 0.029472 |
| Poa_19843 | 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine expressed      | 792  | XP_003561625 | 9.28E-114 | -2.50635 | -2.41582 | 0.029707 |
| Poa_1993  | probable cellulose synthase a catalytic subunit 5                 | 699  | BAJ07206     | 1.85E-50  | -2.62645 | -2.54994 | 0.005199 |
| Poa_2008  | root cap protein 1  | 279  | EMS46342     | 1.52E-42  | -7.30751 | -6.97144 | 0.006106 |
| Poa_20320 | protein farnesyltransferase subunit beta                          | 388  | XP_003574761 | 2.26E-19  | -4.73438 | -4.52435 | 0.016789 |
| Poa_2111  | receptor-like protein kinase hsl1                                 | 406  | BAJ87631     | 3.07E-55  | -6.11204 | -5.77954 | 0.001863 |
| Poa_21390 | small nuclear ribonucleoprotein sm d1                             | 199  | BAJ95947     | 1.84E-20  | -5.03764 | -4.85025 | 0.014944 |
| Poa_21699 | 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine expressed      | 495  | XP_003561625 | 2.21E-87  | -3.18533 | -3.09209 | 0.000153 |
| Poa_21856 | iron-phytosiderophore transporter                                 | 284  | ACC77193     | 1.43E-39  | -3.65511 | -3.50552 | 0.010554 |
| Poa_21857 | metal-nicotianamine transporter ysl6                              | 768  | ACK57536     | 7.80E-158 | -2.77841 | -2.68955 | 0.03484  |
| Poa_21888 | alanine--glyoxylate aminotransferase 2 homolog mitochondrial-like | 220  | XP_008676329 | 1.11E-43  | -3.0103  | -2.88824 | 0.011937 |
| Poa_22551 | udp-glucose 6-dehydrogenase                                       | 266  | AAM47595     | 7.85E-55  | -3.04558 | -2.96113 | 0.041426 |
| Poa_22577 | wrky transcription factor 35                                      | 248  | XP_002447031 | 3.01E-13  | -7.37416 | -6.87509 | 0.032869 |

|           |   |      |              |           |          |          |          |
|-----------|---|------|--------------|-----------|----------|----------|----------|
| Poa_2265  | glutamate decarboxylase                               | 881  | NP_001150761 | 6.84E-84  | -2.24739 | -2.18526 | 0.034156 |
| Poa_22915 | monosaccharide-sensing protein 2-like                 | 834  | EMS49950     | 0         | -3.02408 | -2.92689 | 0.006403 |
| Poa_22961 | reticuline oxidase-like protein                       | 384  | EMT08299     | 5.07E-50  | -2.6832  | -2.58448 | 0.04974  |
| Poa_24006 | atp synthase delta subunit family protein             | 275  | EMS48859     | 2.57E-15  | -2.93637 | -2.87375 | 0.008565 |
| Poa_24064 | glutamate synthase 1                                  | 286  | AGT29558     | 4.16E-39  | -3.01398 | -2.93881 | 0.048585 |
| Poa_24077 | beta-expansin 1a precursor                            | 597  | CAC40804     | 3.00E-83  | -8.69914 | -8.33424 | 3.15E-05 |
| Poa_24409 | l-type lectin-domain containing receptor kinase -like | 365  | XP_004963472 | 2.84773   | -5.48741 | -5.20705 | 0.041836 |
| Poa_2495  | high-affinity potassium transporter                   | 637  | XP_003579642 | 4.43E-113 | -3.23745 | -3.17184 | 0.008489 |
| Poa_2504  | peroxidase 2-like                                     | 400  | EMT07519     | 2.03E-43  | -2.69398 | -2.60109 | 0.010925 |
| Poa_2506  | high-affinity potassium transporter                   | 767  | XP_003579642 | 1.85E-173 | -3.18648 | -3.06951 | 0.002516 |
| Poa_2507  | high-affinity potassium transporter                   | 1288 | XP_003579642 | 0         | -2.90357 | -2.80444 | 0.007195 |
| Poa_25217 | abc transporter g family member 11-like               | 346  | EMT33103     | 2.72E-65  | -5.92909 | -5.69173 | 0.001188 |
| Poa_25244 | beta-glucosidase isozyme 2 precursor                  | 470  | EMT14734     | 6.28E-91  | -5.10521 | -4.89611 | 0.021487 |
| Poa_2570  | high-affinity potassium transporter                   | 467  | CAC14787     | 6.84E-78  | -2.60804 | -2.52979 | 0.004702 |
| Poa_25846 | monosaccharide-sensing protein 2-like                 | 315  | BAK00015     | 7.60E-42  | -6.8032  | -6.52249 | 5.04E-05 |
| Poa_25967 | probable folate-biopterin transporter 2-like          | 958  | EMS50413     | 4.80E-74  | -2.99274 | -2.89692 | 0.015072 |
| Poa_26395 | glutathione transferase                               | 376  | XP_003565017 | 1.50E-59  | -3.80175 | -3.70366 | 0.008606 |
| Poa_26723 | flavonol synthase flavanone 3-hydroxylase             | 520  | EMS56017     | 8.98E-46  | -3.52924 | -3.41929 | 0.010052 |
| Poa_27293 | remorin-like  | 488  | EMT04985     | 1.31E-36  | -3.39718 | -3.32134 | 0.027579 |
| Poa_28004 | peroxidase 2-like                                     | 257  | EMT11373     | 2.23E-43  | -3.89676 | -3.801   | 0.002896 |
| Poa_28209 | phospholipase d beta 1                                | 229  | EMS46791     | 3.94356   | -10.6712 | -9.74033 | 0.027793 |
| Poa_28401 | xyloglucan galactosyltransferase katamari1 homolog    | 255  | EMT26274     | 2.68E-41  | -7.21102 | -6.73168 | 0.02509  |
| Poa_28715 | protein   | 244  | EMT10546     | 5.15E-27  | -11.0717 | -10.2332 | 0.017714 |
| Poa_29056 | annexin d4-like                                       | 268  | EMT13324     | 3.39E-50  | -3.57577 | -3.43459 | 0.003628 |
| Poa_2947  | alcohol dehydrogenase                                 | 1376 | BAH84777     | 0         | -3.72288 | -3.62792 | 0.001391 |
| Poa_29495 | patellin family protein                               | 501  | XP_003564746 | 7.37E-67  | -3.19705 | -3.10258 | 0.012885 |
| Poa_2954  | nicotianamine aminotransferase a-like                 | 1078 | BAK03435     | 6.05E-167 | -4.00043 | -3.88041 | 0.003907 |

|           |  |      |              |           |          |          |          |
|-----------|--|------|--------------|-----------|----------|----------|----------|
| Poa_2955  | nicotianamine aminotransferase a-like                  | 1400 | EMT11157     | 1.41E-169 | -5.11515 | -4.9862  | 0.007079 |
| Poa_29843 | cortical cell-delineating protein precursor            | 333  | XP_003559027 | 2.80E-46  | -4.41511 | -4.29517 | 0.00041  |
| Poa_29848 | beta-expansin 1a precursor                             | 545  | CAC40804     | 2.87E-106 | -12.2484 | -11.6624 | 1.31E-05 |
| Poa_30362 | hypothetical protein TRIUR3_14546                      | 234  | EMS61590     | 1.19E-11  | -5.34309 | -5.16073 | 0.012965 |
| Poa_30595 | cinnamoyl- reductase                                   | 240  | AFD29890     | 3.51E-47  | -5.49947 | -5.18326 | 0.00891  |
| Poa_30736 | wall-associated kinase 2                               | 202  | EMS57824     | 1.69282   | -9.87983 | -9.31108 | 0.006796 |
| Poa_32034 | calmodulin-binding expressed                           | 352  | BAJ97236     | 7.89E-05  | -156.844 | -130.47  | 8.28E-22 |
| Poa_32091 | protein iq-domain 1-like                               | 424  | BAK04625     | 3.13E-31  | -3.54339 | -3.38255 | 0.042919 |
| Poa_3244  | tpa: protein kinase superfamily protein                | 447  | XP_008681095 | 2.74E-18  | -2.39898 | -2.3437  | 0.01052  |
| Poa_32802 | obtusifoliol 14-alpha demethylase                      | 1878 | XP_003573827 | 1.95E-177 | -3.57162 | -3.44003 | 0.005128 |
| Poa_32925 | gdsl esterase lipase at5g45910-like                    | 217  | EMT19408     | 1.96E-42  | -3.93909 | -3.75535 | 0.043296 |
| Poa_33022 | cysteine-rich receptor-like protein kinase 10-like     | 603  | XP_006651550 | 1.45E-78  | -11.7418 | -11.0797 | 7.58E-06 |
| Poa_33530 | type i inositol -trisphosphate 5-phosphatase cvp2-like | 432  | BAJ92304     | 2.33E-48  | -4.29964 | -4.08546 | 0.045066 |
| Poa_33750 | mdr-like abc transporter                               | 231  | CAD59586     | 0.111512  | -7.12665 | -6.73236 | 0.003802 |
| Poa_33963 | transposon en spm sub-class                            | 545  | XP_006648062 | 2.88E-73  | -3.44175 | -3.32136 | 0.014912 |
| Poa_34238 | subtilisin-like protease                               | 781  | XP_003581519 | 8.06E-95  | -7.11668 | -6.75066 | 0.000315 |
| Poa_3427  | ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 2                | 2007 | XP_003567423 | 2.81E-171 | -3.31967 | -3.22612 | 4.04E-05 |
| Poa_34849 | protein  | 264  | XP_003574643 | 4.40E-36  | -3.50959 | -3.37731 | 0.01648  |
| Poa_3500  | peroxidase 2-like                                      | 317  | EMS52002     | 1.03E-46  | -7.7172  | -7.35907 | 3.97E-08 |
| Poa_3676  | 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase 3      | 499  | EMT29532     | 1.55E-21  | -3.7069  | -3.57031 | 0.017909 |
| Poa_36815 | mate efflux family protein chloroplastic-like          | 1242 | BAJ61742     | 2.84E-162 | -7.13373 | -6.76981 | 0.000135 |
| Poa_36850 | wd repeat-containing protein 11-like                   | 274  | XP_004951954 | 4.46669   | -5.5728  | -5.40299 | 0.009946 |
| Poa_36883 | cellulose synthase-like 6                              | 417  | ACX85725     | 9.92E-59  | -4.09944 | -3.90197 | 0.016175 |
| Poa_37236 | glycogenin glucosyltransferase                         | 407  | XP_003572062 | 4.27E-23  | -3.07654 | -2.97378 | 0.030501 |
| Poa_3789  | tonoplast intrinsic protein                            | 269  | ACJ53709     | 7.50E-25  | -2.44043 | -2.36961 | 0.046819 |
| Poa_37984 | hypothetical protein ZEAMMB73_165023                   | 280  | AFW66436     | 0.00193   | -148.327 | -76.5108 | 2.62E-06 |
| Poa_38796 | o-methyltransferase zrp4                               | 469  | EMS57229     | 9.78E-33  | -37.6174 | -28.1858 | 0.001285 |

|           |  |      |              |           |          |          |          |
|-----------|--|------|--------------|-----------|----------|----------|----------|
| Poa_38833 | diacylglycerol kinase iota                                       | 224  | XP_003573410 | 1.82E-43  | -3.2944  | -3.16863 | 0.048711 |
| Poa_39069 | gdp-mannose dehydratase 2  | 464  | XP_003557227 | 3.83E-107 | -3.87087 | -3.74073 | 0.032756 |
| Poa_39929 | fasciclin-like arabinogalactan protein 11-like                   | 521  | XP_003565205 | 1.16E-69  | -3.31377 | -3.19543 | 0.014912 |
| Poa_40307 | probable carotenoid cleavage dioxygenase chloroplastic-like      | 203  | XP_006662219 | 2.72903   | -10.0457 | -9.68599 | 1.67E-06 |
| Poa_40361 | 2 -deoxymugineic-acid 2 -dioxygenase-like                        | 282  | EMT15108     | 6.86E-14  | -4.04551 | -3.9022  | 0.02044  |
| Poa_40362 | endo-beta- -glucanase  | 233  | EMS66848     | 4.05E-42  | -17.3203 | -16.2661 | 3.5E-09  |
| Poa_4050  | ammonium transporter   | 655  | AAS19467     | 5.38E-98  | -2.4784  | -2.39251 | 0.016689 |
| Poa_40704 | cipk-like protein expressed                                      | 366  | AEZ51507     | 5.99E-81  | -3.19929 | -3.09177 | 0.005062 |
| Poa_4093  | urea active transporter 1  | 957  | EMT22254     | 3.64E-138 | -3.62097 | -3.4946  | 0.000695 |
| Poa_4115  | protein  | 376  | BAJ90348     | 2.05E-67  | -6.69307 | -6.40484 | 1.73E-06 |
| Poa_41522 | stop1  | 1278 | EMS47263     | 7.32E-108 | -10.1124 | -9.44009 | 3.69E-05 |
| Poa_42050 | lysosomal beta glucosidase-like                                  | 220  | EMT13489     | 5.74E-45  | -5.87063 | -5.64078 | 0.001452 |
| Poa_4226  | phosphoenolpyruvate carboxylase                                  | 1405 | BAJ87123     | 0         | -2.12181 | -2.06934 | 0.046081 |
| Poa_42931 | membrane protein   | 324  | DAA45983     | 7.65E-16  | -2.92673 | -2.82799 | 0.025728 |
| Poa_43088 | nitrate transporter -like  | 815  | BAJ90348     | 2.41E-103 | -4.02209 | -3.91624 | 0.005765 |
| Poa_43545 | flavonol 4 -sulfotransferase                                     | 237  | XP_003565988 | 5.12E-13  | -3.92579 | -3.74525 | 0.025543 |
| Poa_43819 | nicotianamine aminotransferase a-like                            | 420  | EMT16655     | 4.31E-87  | -21.8379 | -20.4349 | 6.14E-09 |
| Poa_45224 | root cap protein 1   | 333  | EMT22610     | 9.99E-59  | -7.57429 | -7.28106 | 5.64E-05 |
| Poa_45363 | gdsl esterase lipase at5g45910-like                              | 464  | BAJ90990     | 2.02E-77  | -28.8313 | -24.086  | 0.000181 |
| Poa_46166 | vamp protein sec22   | 265  | EMS60577     | 3.49E-42  | -2.6276  | -2.53992 | 0.02693  |
| Poa_4680  | 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine expressed     | 267  | XP_003561625 | 2.34E-35  | -2.75611 | -2.69675 | 0.020158 |
| Poa_4689  | katanin p80 wd40 repeat-containing subunit b1 homolog isoform x5 | 205  | NP_001168310 | 1.86312   | -14.7854 | -13.6643 | 0.001863 |
| Poa_47266 | pollen-specific leucine-rich repeat extensin-like protein 1-like | 458  | XP_003566833 | 1.07E-76  | -4.04262 | -3.94009 | 0.000178 |
| Poa_47297 | serine threonine protein kinase                                  | 561  | EMT27064     | 8.99E-26  | -9.08787 | -8.60203 | 0.000109 |
| Poa_47682 | abc transporter g family member 11-like                          | 442  | EMS61063     | 3.34E-91  | -5.32887 | -5.12889 | 0.001545 |
| Poa_47857 | hypothetical protein ZEAMMB73_377764                             | 504  | AFW65148     | 1.68848   | -3.60467 | -3.50663 | 0.004705 |
| Poa_47991 | nitrate transporter -like  | 403  | EMT10378     | 2.23E-81  | -5.55842 | -5.28193 | 0.002446 |

|           |  |      |              |          |          |          |          |
|-----------|--|------|--------------|----------|----------|----------|----------|
| Poa_48279 | fatty acid 2-hydroxylase 1-like  | 321  | EMS68869     | 5.41E-30 | -4.54183 | -4.34089 | 0.004423 |
| Poa_48461 | bacterial-induced peroxidase precursor   | 534  | XP_003563782 | 2.60E-80 | -7.74683 | -7.49168 | 1.44E-07 |
| Poa_48761 | peroxidase 4-like  | 588  | EMT04570     | 3.60E-44 | -3.41055 | -3.32302 | 0.027807 |
| Poa_48872 | gdsl esterase lipase at5g45910-like  | 377  | XP_006654615 | 2.41E-46 | -8.50816 | -7.78391 | 0.04953  |
| Poa_49056 | hypothetical protein OsI_12061   | 193  | EAY90473     | 4.28338  | -169.04  | -101.847 | 1.33E-10 |
| Poa_49172 | tpa: rhicadhesin receptor  | 246  | DAA59773     | 0.422929 | -2.75483 | -2.67732 | 0.004316 |
| Poa_49245 | ternary complex factor mip1  | 224  | XP_004973908 | 1.54E-38 | -4.70387 | -4.46637 | 0.038379 |
| Poa_49308 | peroxidase 2-like  | 499  | EMT09747     | 2.32E-47 | -6.77509 | -6.28917 | 0.018338 |
| Poa_49396 | hypothetical protein F775_02628  | 315  | EMT16653     | 7.11E-28 | -3.73282 | -3.58379 | 0.040589 |
| Poa_49926 | root cap protein 1   | 211  | BAK00916     | 2.07E-25 | -13.0436 | -11.9518 | 0.001247 |
| Poa_5006  | wall-associated receptor kinase 2-like   | 1789 | XP_004973956 | 0        | -3.35302 | -3.26645 | 3.74E-06 |
| Poa_50378 | bifunctional monodehydroascorbate reductase and carbonic anhydrase nectarin-3-like | 356  | XP_003574630 | 7.75E-17 | -∞       | -83.6914 | 0.046382 |
| Poa_50611 | aspartic proteinase asp1   | 563  | BAJ98705     | 2.18E-90 | -3.0609  | -2.97049 | 0.014432 |
| Poa_51415 | major facilitator superfamily expressed  | 741  | XP_003577093 | 3.66E-72 | -30.8314 | -28.8133 | 2.29E-15 |
| Poa_51787 | uncharacterized acetyltransferase at3g50280-like                                   | 285  | BAJ93957     | 1.14E-24 | -5.76623 | -5.39593 | 0.043128 |
| Poa_51801 | upf0481 protein at3g47200-like   | 326  | EAZ06611     | 8.95E-30 | -12.6524 | -11.907  | 6.91E-08 |
| Poa_5211  | ribosome-inactivating protein  | 578  | AAX95113     | 5.66E-29 | -3.1225  | -3.03267 | 0.043774 |
| Poa_52528 | protein zinc induced facilitator-like 1-like                                       | 484  | EMT05811     | 1.29E-49 | -138.746 | -119.723 | 5.66E-20 |
| Poa_52529 | protein zinc induced facilitator-like 1-like                                       | 473  | EMT05811     | 1.12E-49 | -516.65  | -284.956 | 2.12E-20 |
| Poa_52732 | monosaccharide-sensing protein 2-like  | 509  | EMT28528     | 3.01E-31 | -38.1347 | -28.0714 | 0.004114 |
| Poa_53181 | flavonol synthase flavanone 3-hydroxylase  | 355  | EMT27219     | 5.13E-38 | -3.63797 | -3.50788 | 0.048318 |
| Poa_53712 | amino acid binding protein   | 278  | XP_003578696 | 6.48E-43 | -12.2139 | -10.8088 | 0.035467 |
| Poa_53722 | lysosomal beta glucosidase-like  | 383  | XP_004981774 | 8.06E-74 | -3.3803  | -3.25935 | 0.003562 |
| Poa_54467 | dna replication licensing factor mcm5-a-like                                       | 221  | EMS51670     | 2.97E-42 | -7.39964 | -6.92152 | 0.010992 |
| Poa_54522 | peroxidase 1-like  | 367  | BAJ93970     | 7.86E-13 | -131.918 | -59.8555 | 0.004405 |
| Poa_54523 | peroxidase 57-like   | 907  | BAJ93970     | 1.38E-92 | -8.17334 | -7.89793 | 3E-07    |
| Poa_54524 | peroxidase 57-like   | 406  | EMT23586     | 2.08E-21 | -8.32739 | -7.99252 | 1E-06    |

|           |  |      |              |           |          |          |          |
|-----------|--|------|--------------|-----------|----------|----------|----------|
| Poa_54525 | peroxidase 57-like                                     | 372  | XP_003572576 | 9.35E-43  | -16.1321 | -14.8653 | 0.000232 |
| Poa_55425 | nicotianamine aminotransferase a-like                  | 345  | Q9ST02       | 1.64E-49  | -37.4893 | -30.6108 | 5.48E-06 |
| Poa_55794 | serine threonine-protein kinase-like protein at1g28390 | 257  | EMT03726     | 6.03E-26  | -6.67593 | -6.22236 | 0.016761 |
| Poa_56231 | anaphase-promoting complex subunit 10                  | 249  | EMS68205     | 4.39E-42  | -44.0383 | -30.7753 | 0.005554 |
| Poa_56352 | nbs-lrr class disease resistance protein               | 426  | EMT30311     | 1.30E-21  | -4.44584 | -4.25884 | 0.024907 |
| Poa_56719 | ring-h2 finger protein at13f                           | 276  | XP_003566333 | 9.21E-19  | -5.31524 | -5.06064 | 0.002924 |
| Poa_57482 | blue copper protein                                    | 386  | XP_008653191 | 2.10E-48  | -9.98142 | -9.55402 | 2.61E-06 |
| Poa_57818 | actin  | 454  | ACD02024     | 1.14E-22  | -4.12376 | -3.95841 | 0.004705 |
| Poa_57852 | flavonol synthase flavanone 3-hydroxylase              | 245  | EMS56017     | 1.55E-45  | -3.89071 | -3.72802 | 0.046081 |
| Poa_57922 | aba 8 -hydroxylase                                     | 493  | EMT32327     | 2.04E-93  | -4.77976 | -4.56789 | 0.026246 |
| Poa_5798  | tubulin beta-1 chain-like                              | 845  | XP_003567397 | 5.18E-125 | -2.42755 | -2.36047 | 0.017128 |
| Poa_58054 | protein zinc induced facilitator-like 1-like           | 905  | XP_003577093 | 3.75E-71  | -58.5132 | -50.823  | 4.09E-16 |
| Poa_58055 | metal transporter nramp6-like                          | 322  | EEC72418     | 1.38E-49  | -17.5183 | -15.8768 | 2.99E-05 |
| Poa_58282 | protein chloroplastic-like                             | 668  | EEC74946     | 7.26E-19  | -37.0446 | -34.6086 | 7.97E-19 |
| Poa_58807 | endoglucanase 13-like                                  | 481  | EMT30441     | 6.91E-49  | -5.83329 | -5.64457 | 5.31E-05 |
| Poa_59122 | premnaspirodiene oxygenase-like                        | 870  | EMT07380     | 2.94E-134 | -16.6048 | -14.7151 | 0.004586 |
| Poa_59184 | chp-rich zinc finger                                   | 262  | EMS55283     | 1.42E-19  | -3.04544 | -2.94949 | 0.035586 |
| Poa_59216 | auxin-induced protein 5ng4                             | 613  | EMT15640     | 5.64E-64  | -32.453  | -25.9168 | 0.000535 |
| Poa_59419 | sulfate transporter                                    | 369  | AAA97952     | 6.23E-56  | -3.21616 | -3.12315 | 0.032502 |
| Poa_59979 | xyloglucan endotransglucosylase hydrolase protein 26   | 369  | CAC40809     | 1.83E-27  | -4.36999 | -4.27827 | 0.04739  |
| Poa_60441 | soluble inorganic pyrophosphatase                      | 214  | XP_003580869 | 4.90E-30  | -18.3989 | -17.257  | 1.55E-06 |
| Poa_61237 | protein  | 359  | CDM81932     | 5.19E-43  | -5.99645 | -5.77738 | 0.001045 |
| Poa_6167  | subtilisin-like protease sdd1-like isoform 2           | 618  | XP_003572330 | 5.33527   | -6.79722 | -6.44284 | 0.000557 |
| Poa_6256  | urea active transporter 1                              | 1096 | EMT22254     | 1.83E-160 | -2.54133 | -2.47393 | 0.039234 |
| Poa_6258  | tpa: cbl-interacting protein kinase family protein     | 302  | NP_001131525 | 7.10E-67  | -6.48548 | -6.17295 | 4.1E-05  |
| Poa_62707 | f-box lrr-repeat protein 17-like                       | 205  | EMT05507     | 2.49E-08  | -46.5319 | -42.7987 | 3.58E-19 |
| Poa_6290  | beta-tubulin   | 442  | CAM58981     | 7.45E-73  | -2.71051 | -2.63926 | 0.030103 |

|           |   |      |              |           |          |          |          |
|-----------|---|------|--------------|-----------|----------|----------|----------|
| Poa_63404 | cortical cell-delineating protein precursor                 | 357  | XP_003559027 | 2.04E-45  | -12.366  | -11.7495 | 1.14E-05 |
| Poa_63655 | uncharacterized membrane protein at1g06890-like             | 206  | XP_003575406 | 2.34E-40  | -4.39748 | -4.21473 | 0.005352 |
| Poa_63690 | s-norcochlorine synthase                                    | 876  | XP_003580488 | 6.84E-85  | -5.50946 | -5.32256 | 0.000136 |
| Poa_63840 | probable glycerophosphoryl diester phosphodiesterase 2-like | 558  | XP_003564349 | 4.68E-22  | -4.24559 | -4.12231 | 0.011457 |
| Poa_64057 | nicotianamine aminotransferase a-like                       | 325  | EMS57040     | 2.95E-49  | -10.2425 | -9.32824 | 0.027214 |
| Poa_64179 | disease resistance response protein 206                     | 461  | EMT08402     | 1.70E-26  | -12.5119 | -12.0695 | 2.1E-08  |
| Poa_64565 | aspartic proteinase nepenthesin-1-like                      | 563  | EMS50813     | 6.06E-51  | -4.64142 | -4.4403  | 0.002289 |
| Poa_64573 | beta-expansin 1a isoform x1                                 | 613  | XP_002468693 | 3.25E-25  | -4.46443 | -4.28047 | 0.047356 |
| Poa_64935 | nicotianamine synthase 3                                    | 1085 | EMT29866     | 2.68E-141 | -95.5764 | -90.3724 | 3.98E-37 |
| Poa_65764 | epoxide hydrolase 2   | 370  | CDJ26688     | 4.31E-67  | -4.8505  | -4.60303 | 0.005587 |
| Poa_6659  | subtilisin-like protease                                    | 405  | XP_003581117 | 9.06E-50  | -53.91   | -39.6982 | 1.24E-05 |
| Poa_6704  | high-affinity potassium transporter                         | 583  | XP_003579642 | 5.02E-113 | -2.49184 | -2.44714 | 0.020613 |
| Poa_67223 | protein zinc induced facilitator-like 1-like                | 908  | EMT00511     | 4.13E-144 | -17.4707 | -16.3745 | 3.64E-08 |
| Poa_67294 | xyloglucan endotransglycosylase                             | 220  | EMT02234     | 1.43E-36  | -10.6344 | -10.1837 | 2.24E-12 |
| Poa_67772 | nadp-dependant malate dehydrogenase                         | 386  | EMT21707     | 1.31E-81  | -∞       | -243.829 | 9.3E-08  |
| Poa_68405 | protein   | 846  | BAJ98037     | 1.81E-139 | -19.4546 | -16.9624 | 0.000659 |
| Poa_68636 | peroxidase 1-like   | 312  | XP_004987265 | 1.25E-17  | -24.754  | -22.8654 | 1.55E-08 |
| Poa_68898 | aquaporin   | 294  | EMS55627     | 3.75E-40  | -5.26466 | -5.01519 | 0.000681 |
| Poa_69225 | cellulase   | 365  | BAJ98829     | 7.07E-63  | -11.0356 | -10.4146 | 2.82E-07 |
| Poa_6953  | I-type lectin-domain containing receptor kinase -like       | 2673 | EMT19415     | 0         | -6.1946  | -6.03246 | 2.33E-09 |
| Poa_69964 | soluble inorganic pyrophosphatase                           | 415  | XP_003568370 | 1.59E-94  | -4.61299 | -4.50567 | 6.85E-05 |
| Poa_70356 | nicotianamine aminotransferase a-like                       | 342  | EMS57040     | 3.83E-50  | -10.347  | -9.79427 | 0.008567 |
| Poa_7047  | actin   | 838  | DAA51050     | 3.91E-115 | -3.30637 | -3.16153 | 0.002888 |
| Poa_7083  | hypothetical protein TRIUR3_14546                           | 502  | EMS61590     | 4.01E-07  | -6.7674  | -6.50177 | 1.41E-07 |
| Poa_72022 | adaptor-related protein complex ap- beta 2 subunit          | 314  | NP_001045546 | 4.1762    | -10.5037 | -9.74949 | 0.00401  |
| Poa_7224  | 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase 1-like      | 354  | NP_001062221 | 1.55E-75  | -3.65091 | -3.51012 | 0.00409  |
| Poa_72908 | flavin-containing monooxygenase yucca1-like                 | 379  | XP_003562041 | 1.53825   | -6.97853 | -6.59039 | 0.016242 |

|           |   |      |              |          |          |          |          |
|-----------|---|------|--------------|----------|----------|----------|----------|
| Poa_7296  | probable lrr receptor-like serine threonine-protein kinase at3g47570-like | 1143 | NP_001047431 | 4.73E-44 | -2.84825 | -2.75587 | 0.007655 |
| Poa_73550 | probable protein kinase at2g41970-like                                    | 230  | EMT07041     | 8.75E-42 | -13.9222 | -12.3639 | 0.006832 |
| Poa_73777 | protein zinc induced facilitator-like 1-like                              | 388  | XP_003577093 | 3.77E-17 | -39.955  | -36.6289 | 5.41E-16 |
| Poa_7418  | s-adenosylmethionine synthetase   | 567  | P50299       | 2.57E-86 | -2.64157 | -2.56253 | 0.016126 |
| Poa_742   | urea active transporter 1   | 337  | EMT22254     | 3.24E-58 | -3.04999 | -2.94433 | 0.009913 |
| Poa_7491  | 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine expressed              | 524  | XP_003561625 | 1.23E-84 | -2.99297 | -2.93539 | 0.001315 |
| Poa_75022 | peroxidase 57-like  | 249  | EMS35728     | 3.85E-31 | -18.285  | -15.6186 | 0.022736 |
| Poa_75732 | telomerase reverse transcriptase-like                                     | 283  | XP_004962614 | 1.56531  | -∞       | -118.632 | 0.002895 |
| Poa_75861 | carbonic anhydrase  | 349  | EMT13786     | 6.97E-32 | -4.08684 | -3.89537 | 0.021487 |
| Poa_7593  | peroxidase 2-like   | 419  | EMS60181     | 2.79E-74 | -4.14761 | -4.06362 | 0.017714 |
| Poa_76003 | protein ruptured pollen grain 1   | 289  | XP_003568735 | 1.50E-54 | -6.90701 | -6.4832  | 0.036082 |
| Poa_76039 | metal transporter nrat1-like  | 272  | NP_001045794 | 3.07E-50 | -32.6401 | -27.1144 | 0.00096  |
| Poa_76361 | peroxidase 1  | 368  | XP_006657392 | 1.36E-64 | -13.1341 | -12.4209 | 9.8E-07  |
| Poa_7649  | low affinity cationic amino acid transporter 2                            | 323  | XP_003576031 | 1.71E-14 | -2.50342 | -2.4219  | 0.005468 |
| Poa_7661  | lysosomal beta glucosidase-like   | 943  | XP_003559563 | 0        | -5.92263 | -5.69958 | 3.38E-05 |
| Poa_7712  | high-affinity potassium transporter                                       | 222  | XP_003579642 | 3.95E-33 | -3.09698 | -3.00324 | 0.011466 |
| Poa_7724  | wall-associated receptor kinase 2-like                                    | 467  | XP_004973956 | 2.27E-36 | -3.27957 | -3.18486 | 0.004426 |
| Poa_7747  | predicted protein   | 214  | BAK02132     | 0.010576 | -3.75519 | -3.65721 | 3.49E-05 |
| Poa_77669 | class iii peroxidase  | 392  | EMS56096     | 2.20E-45 | -9.6961  | -9.26945 | 1.85E-08 |
| Poa_77858 | siz1_orysja: full=ε3 sumo-protein ligase siz1                             | 336  | EEE63922     | 0.295279 | -4.14714 | -4.00024 | 0.003297 |
| Poa_78011 | =- glutaredoxin subgroup i  | 278  | Q0DAE4       | 0.001139 | -70.7182 | -36.5347 | 0.022282 |
| Poa_78759 | udp-rhamnose:rhamnosyltransferase 1-like                                  | 218  | EMT10636     | 1.71E-16 | -14.9072 | -13.084  | 0.011657 |
| Poa_79392 | PREDICTED: uncharacterized protein LOC102713785                           | 320  | XP_006645967 | 9.5614   | -4.02848 | -3.87161 | 0.014886 |
| Poa_79424 | phospholipid-transporting atpase 1  | 208  | XP_004973393 | 0.022143 | -6.90281 | -6.61461 | 0.001811 |
| Poa_79460 | peroxidase 1  | 397  | XP_004987265 | 1.59E-08 | -12.475  | -11.6289 | 1.08E-05 |
| Poa_80082 | peroxidase 57-like  | 224  | EMS35728     | 6.20E-25 | -45.3067 | -35.4968 | 0.046318 |
| Poa_80460 | subtilisin-like protease  | 203  | EMT21268     | 1.12E-24 | -48.7517 | -36.0137 | 0.007541 |



|           |  |      |              |           |          |          |          |
|-----------|--|------|--------------|-----------|----------|----------|----------|
| Poa_8118  | hydrophobic protein lti6a  | 419  | XP_006658870 | 3.70E-20  | -2.33396 | -2.26516 | 0.030501 |
| Poa_81525 | dehydrin 5   | 399  | AAC05923     | 4.80E-04  | -4.87102 | -4.63962 | 0.011201 |
| Poa_81809 | chalcone synthase  | 196  | P26018       | 6.51E-36  | -7.49744 | -6.97919 | 0.008565 |
| Poa_81879 | class iii peroxidase   | 334  | EMS56096     | 1.22E-45  | -12.0202 | -11.3905 | 1.22E-07 |
| Poa_82231 | 2 -deoxymugineic-acid 2 -dioxygenase-like                            | 159  | EMS56017     | 2.79E-19  | -15.1106 | -13.4275 | 0.008459 |
| Poa_82301 | PREDICTED: uncharacterized protein LOC103646020 isoform X2           | 275  | XP_008668982 | 9.27059   | -7.81148 | -7.28116 | 0.023382 |
| Poa_8265  | gdsl esterase lipase at5g55050-like                                  | 1407 | BAJ98244     | 3.93E-113 | -3.98116 | -3.83094 | 0.011457 |
| Poa_83065 | protein zinc induced facilitator-like 1-like                         | 792  | XP_003577093 | 5.01E-147 | -19.5947 | -18.4011 | 1.4E-10  |
| Poa_831   | pentatricopeptide repeat-containing protein mitochondrial-like       | 2061 | EMS54254     | 1.18E-148 | -2.64248 | -2.5528  | 0.031908 |
| Poa_8466  | cellulose synthase   | 612  | EMT23140     | 2.27E-113 | -3.62564 | -3.47764 | 0.011885 |
| Poa_85705 | peroxidase 2-like  | 217  | EMT09747     | 2.14E-24  | -79.5484 | -45.9238 | 0.026488 |
| Poa_86001 | pistil-specific extensin-like  | 380  | XP_004971692 | 1.59E-04  | -9.87324 | -9.1849  | 0.003495 |
| Poa_86171 | mitochondrial transcription termination factor-like                  | 219  | EMS61521     | 2.55E-28  | -46.8979 | -33.9717 | 0.00192  |
| Poa_87163 | wall-associated receptor kinase 5                                    | 376  | NP_001173858 | 2.14E-74  | -∞       | -81.7295 | 0.040513 |
| Poa_8768  | udp-n-acetylglucosamine--peptide n-acetylglucosaminyltransferase sec | 1269 | EMT16956     | 3.56E-12  | -5.12072 | -4.94482 | 0.00036  |
| Poa_8798  | initiation factor 2 subunit family expressed                         | 563  | Q9AYT7       | 8.29E-119 | -3.77172 | -3.63371 | 0.006419 |
| Poa_88224 | nicotianamine synthase 3   | 317  | EMT15795     | 5.68E-31  | -114.419 | -108.075 | 4.8E-34  |
| Poa_88994 | nac domain-containing protein 71-like                                | 293  | XP_002438721 | 0.637185  | -12.1984 | -11.2146 | 0.000215 |
| Poa_897   | soluble acid invertase   | 1161 | BAO09621     | 0         | -2.21296 | -2.16366 | 0.048945 |
| Poa_90322 | peroxidase 1   | 380  | XP_006657392 | 1.92E-68  | -21.8535 | -19.2928 | 5.64E-06 |
| Poa_90403 | nicotianamine synthase 2   | 529  | XP_003575104 | 1.02E-16  | -388.824 | -140.087 | 3.46E-08 |
| Poa_9099  | gdsl esterase lipase at5g45910-like                                  | 560  | XP_003564307 | 7.33E-95  | -2.31778 | -2.24382 | 0.037988 |
| Poa_9110  | pleiotropic drug resistance protein 4                                | 317  | EMS60397     | 1.29E-61  | -3.27243 | -3.18529 | 0.016857 |
| Poa_92027 | gdsl esterase lipase at5g45910-like                                  | 269  | BAK07773     | 1.58E-36  | -67.0906 | -35.6239 | 0.048493 |
| Poa_9414  | alcohol dehydrogenase  | 744  | XP_003577715 | 8.52E-96  | -2.38307 | -2.32995 | 0.032958 |
| Poa_9416  | wall-associated receptor kinase 2-like                               | 1650 | XP_004973956 | 0         | -3.54438 | -3.47163 | 0.000845 |
| Poa_94420 | ankyrin-like protein   | 273  | XP_004961596 | 4.65E-08  | -84.6711 | -44.3388 | 0.023382 |

|           |  |     |              |          |          |          |          |
|-----------|--|-----|--------------|----------|----------|----------|----------|
| Poa_9468  | nadph-dependent reductase              | 220 | XP_003562747 | 4.93E-40 | -2.42742 | -2.35013 | 0.038206 |
| Poa_94764 | c2c2-dof transcription partial         | 286 | XP_008674783 | 1.41046  | -11.2231 | -10.0587 | 0.034565 |
| Poa_95306 | nicotianamine synthase 3               | 321 | EMT12509     | 5.61E-68 | -163.087 | -142.994 | 8.64E-21 |
| Poa_96416 | burp domain-containing protein 14-like | 428 | XP_003575949 | 1.6855   | -9.32238 | -8.50463 | 0.04953  |
| Poa_9679  | protein casc3-like isoform x1          | 828 | EMS45999     | 1.92E-62 | -2.44309 | -2.36154 | 0.025534 |
| Poa_97083 | wall-associated receptor kinase 2-like | 508 | EMS68813     | 6.77E-09 | -7.07989 | -6.81677 | 0.007655 |
| Poa_97206 | systemin receptor sr160 precursor      | 506 | NP_001132345 | 2.93184  | -16.8564 | -14.6749 | 0.004214 |
| Poa_98462 | peroxidase 2                           | 262 | EMS57753     | 1.59E-37 | -9.59114 | -8.82723 | 0.018739 |

(C) *P. tenuiflora* · 発現上昇

| Feature ID | Sequence desc.                                 | Contig<br>length | Top hit ACC  | E-Value   | Experiment -                        | EDGE test -                                    | EDGE test -                                   |
|------------|--|------------------|--------------|-----------|-------------------------------------|--|---|
|            |  |                  |              |           | Fold Change<br>(original<br>values) | EDGE test -<br>Fold change<br>(stress/control) | FDR p-value<br>correction<br>(stress/control) |
| Put_10309  | restin homolog                                 | 569              | XP_006650327 | 2.47604   | 18.09337                            | 18.82228                                       | 9.93E-05                                      |
| Put_10418  | zinc transporter                               | 320              | XP_003561455 | 5.28E-45  | 5.560611                            | 5.744499                                       | 0.035647                                      |
| Put_10629  | mads-box transcription factor 27-like          | 317              | EMT04698     | 1.07E-57  | 34.71619                            | 35.4878  | 9.61E-16                                      |
| Put_10630  | wag-2 mads-box transcription partial           | 390              | EMT04698     | 2.95E-68  | ∞                                   | 298.5281                                       | 4.04E-08                                      |
| Put_10767  | unnamed protein product                        | 197              | CDM86991     | 1.97819   | 26.06369                            | 27.11581                                       | 3.68E-11                                      |
| Put_10879  | high affinity nitrate transporter              | 259              | EMS46094     | 4.03E-49  | ∞                                   | 609.2856                                       | 1.47E-14                                      |
| Put_109    | peroxidase 2-like                              | 861              | EMT09747     | 5.19E-91  | 3.509373                            | 3.662451                                       | 0.006575                                      |
| Put_11320  | phd-finger domain containing protein family    | 228              | XP_004969227 | 4.63432   | 5.673603                            | 5.902234                                       | 0.019249                                      |
| Put_11515  | carbonic anhydrase                             | 403              | BAK00501     | 7.68E-25  | 3.657451                            | 3.897485                                       | 0.006045                                      |
| Put_11568  | pathogenesis-related maize seed protein        | 443              | XP_002459696 | 1.87E-33  | 4.275797                            | 4.528602                                       | 0.004105                                      |
| Put_12169  | leucine-rich repeat-containing protein 40      | 261              | XP_003580452 | 1.17E-46  | ∞                                   | 2113.579                                       | 1.37E-24                                      |
| Put_1263   | protein aspartic protease in guard cell 2-like | 1128             | BAK02683     | 1.93E-140 | 13.72144                            | 14.18939                                       | 3.09E-09                                      |
| Put_1357   | high-affinity nitrate transporter -like        | 551              | EMT12905     | 1.77E-23  | 3.338816                            | 3.529937                                       | 0.002683                                      |

|           |   |      |              |           |          |          |          |
|-----------|---|------|--------------|-----------|----------|----------|----------|
| Put_1382  | phosphate transporter   | 856  | AAO72433     | 0         | 285.0185 | 292.5166 | 7.49E-42 |
| Put_1383  | phosphate transporter   | 423  | CAY56583     | 5.19E-61  | 25.74376 | 25.86809 | 3.51E-08 |
| Put_1504  | phosphate transporter   | 309  | EMT15139     | 1.45E-53  | 184.4848 | 179.7339 | 2.76E-27 |
| Put_16348 | elongation factor 1-beta  | 386  | XP_003562505 | 3.35E-07  | 20.40006 | 20.08028 | 1.57E-05 |
| Put_1659  | phosphoenolpyruvate carboxykinase   | 568  | EMT06834     | 6.68E-72  | 44.71064 | 45.91881 | 1.43E-20 |
| Put_16648 | subtilisin-like protease  | 817  | XP_003572336 | 9.15E-152 | 13.09178 | 13.32457 | 0.00442  |
| Put_17135 | hypothetical protein SORBIDRAFT_06g005430                                 | 153  | XP_002447593 | 4.42258   | ∞        | 150.6457 | 0.009613 |
| Put_17181 | PREDICTED: uncharacterized protein LOC100842201                           | 474  | XP_003581006 | 2.22E-08  | 7.071318 | 7.296657 | 0.000581 |
| Put_17516 | high affinity nitrate transporter   | 393  | EMS46094     | 1.75E-70  | ∞        | 491.4392 | 3.64E-12 |
| Put_18112 | abc transporter c family member 4   | 235  | EMT25776     | 4.3562    | ∞        | 198.1065 | 0.000158 |
| Put_18793 | alcohol dehydrogenase 1- partial  | 1045 | XP_004970806 | 1.74854   | 31.62864 | 28.48836 | 0.003701 |
| Put_1973  | phosphoenolpyruvate carboxykinase   | 385  | CAR78943     | 5.13E-53  | 7.115813 | 7.471438 | 6.57E-07 |
| Put_19797 | yt521-b-like family expressed   | 236  | ACD80368     | 0.001194  | ∞        | 181.8753 | 0.003823 |
| Put_2002  | stress responsive protein   | 411  | NP_001060666 | 6.62E-71  | 3.555839 | 3.692902 | 0.032636 |
| Put_2050  | boron transporter   | 1960 | EMT07454     | 0         | 3.415375 | 3.580807 | 0.01014  |
| Put_2064  | long chain acyl- synthetase 4-like  | 2048 | XP_003564297 | 0         | 4.754275 | 5.025639 | 2.29E-05 |
| Put_20795 | probable lrr receptor-like serine threonine-protein kinase at1g56130-like | 267  | EMT06735     | 1.94E-38  | 3.338159 | 3.485845 | 0.029457 |
| Put_20812 | probable lrr receptor-like serine threonine-protein kinase at1g56130-like | 226  | EMT06735     | 4.65E-30  | 4.091737 | 4.246493 | 0.036894 |
| Put_20932 | endonuclease exonuclease phosphatase family isoform x1                    | 233  | XP_008668886 | 1.46E-12  | ∞        | 138.1953 | 0.046038 |
| Put_20944 | xylosyltransferase 1  | 324  | BAJ85266     | 1.15E-26  | 23.22013 | 21.38433 | 0.033732 |
| Put_21216 | nodulin-related partial   | 555  | BAK02404     | 5.28E-79  | 17.10644 | 16.29774 | 0.017643 |
| Put_220   | sec12-like protein 2  | 720  | XP_003557449 | 8.09E-106 | 4.347036 | 4.574808 | 0.000933 |
| Put_2254  | nad h-bispecific nitrate partial  | 437  | EMS60282     | 1.07E-93  | 3.788265 | 3.966816 | 0.004788 |
| Put_22802 | nicotianamine aminotransferase a-like                                     | 373  | EMS57040     | 3.87E-68  | 4.431122 | 4.64976  | 0.007127 |
| Put_23185 | ring-h2 finger protein at1g63-like  | 524  | XP_002440845 | 1.55E-19  | 102.6874 | 85.06092 | 1.17E-08 |
| Put_23252 | high affinity nitrate transporter   | 330  | EMT29899     | 2.84E-60  | ∞        | 356.7169 | 3.14E-08 |
| Put_23374 | kinesin motor domain containing expressed                                 | 214  | NP_001067167 | 1.45806   | 22.3454  | 21.18029 | 0.02225  |

|           |   |      |              |           |          |          |          |
|-----------|---|------|--------------|-----------|----------|----------|----------|
| Put_23605 | leucine-rich repeat-containing protein 40     | 421  | EMT05493     | 3.62E-73  | 74.23659 | 76.8736  | 5.15E-22 |
| Put_2549  | peroxidase 2-like                             | 229  | EMT27120     | 5.42E-40  | 9.480448 | 10.27541 | 0.009321 |
| Put_2591  | protein                                       | 317  | EMT13848     | 1.85E-18  | 7.928073 | 8.525165 | 0.000114 |
| Put_26449 | subtilisin-like protease                      | 591  | BAJ97332     | 2.31E-77  | 16.44872 | 16.32008 | 0.004392 |
| Put_27091 | hypothetical protein SORBIDRAFT_10g000290     | 233  | XP_002436314 | 4.22556   | 6.401405 | 6.587315 | 0.00569  |
| Put_27129 | cell survival ced-4-interacting protein mac-1 | 378  | XP_003570471 | 3.74E-17  | ∞        | 317.367  | 4.17E-07 |
| Put_27318 | protein kinase domain containing expressed    | 289  | ABF96464     | 8.9867    | ∞        | 176.6951 | 0.032681 |
| Put_28098 | glutamate receptor                            | 331  | BAJ98439     | 1.47E-32  | 5.458445 | 5.705526 | 0.016099 |
| Put_28310 | hypothetical protein ZEAMMB73_986096          | 184  | AFW83464     | 1.89824   | ∞        | 137.3054 | 0.029238 |
| Put_28439 | sucrase-like protein                          | 285  | XP_008659398 | 1.96E-11  | ∞        | 234.4908 | 1.4E-05  |
| Put_29471 | subtilisin-like protease                      | 1042 | XP_003572336 | 0         | 19.35568 | 18.74064 | 0.001817 |
| Put_29774 | high affinity nitrate transporter             | 485  | EMS46094     | 1.14E-55  | ∞        | 407.6504 | 3.53E-11 |
| Put_30999 | nb-arc domain containing protein              | 236  | EEC79033     | 1.84664   | ∞        | 173.4193 | 0.003028 |
| Put_3245  | peroxidase 2-like                             | 229  | EMT27120     | 1.07E-40  | 6.040819 | 6.267917 | 0.000175 |
| Put_3248  | phosphate partial                             | 358  | CDJ80001     | 1.12E-34  | 9.171234 | 9.177102 | 0.031593 |
| Put_3268  | peroxidase 2-like                             | 378  | EMT27120     | 5.28E-47  | 34.03224 | 34.92333 | 9.42E-16 |
| Put_32774 | heat shock protein 90                         | 313  | 2XCM_A       | 1.11E-44  | ∞        | 133.2884 | 0.031593 |
| Put_3310  | high affinity nitrate transporter             | 263  | EMT29897     | 4.17E-29  | ∞        | 472.6729 | 6.65E-13 |
| Put_3311  | high affinity nitrate transporter             | 242  | EMT29900     | 7.72E-24  | ∞        | 283.0366 | 5.07E-06 |
| Put_3312  | high affinity nitrate transporter             | 516  | EMT29898     | 2.11E-103 | ∞        | 625.6321 | 1.71E-14 |
| Put_3325  | peroxidase 2-like                             | 445  | EMT27120     | 7.00E-65  | 11.48414 | 12.08057 | 1.39E-12 |
| Put_3326  | peroxidase 2-like                             | 412  | XP_003559904 | 3.59E-15  | 4.32449  | 4.462529 | 0.010875 |
| Put_33320 | Os03g0179200                                  | 201  | NP_001173286 | 3.42683   | ∞        | 228.7424 | 5.88E-05 |
| Put_3399  | sulfate transporter                           | 1317 | AGI96996     | 0         | 3.066068 | 3.205297 | 0.01828  |
| Put_3690  | serine threonine-protein kinase ht1           | 214  | XP_003570373 | 3.26482   | ∞        | 346.0122 | 3.96E-05 |
| Put_3703  | phosphatidylinositol synthase                 | 203  | XP_006650850 | 0.487484  | 7.919826 | 8.420688 | 0.001138 |
| Put_371   | phosphate transporter                         | 1182 | CAY56582     | 2.22E-65  | 116.8446 | 125.4879 | 4.43E-25 |

|           |   |      |              |           |          |          |          |
|-----------|---|------|--------------|-----------|----------|----------|----------|
| Put_4027  | thionin-like peptide  | 368  | BAC84689     | 2.41E-16  | 6.329915 | 6.822227 | 0.00152  |
| Put_42077 | l-type lectin-domain containing receptor kinase -like           | 284  | CDM86044     | 1.01E-40  | ∞        | 196.9061 | 0.000586 |
| Put_42095 | hypothetical protein ZeamMp158                                  | 407  | YP_588403    | 4.81E-07  | 24.00581 | 23.71894 | 3.04E-05 |
| Put_4365  | thionin-like peptide  | 217  | BAC84689     | 9.86E-12  | 47.51046 | 44.78236 | 1.09E-07 |
| Put_43971 | histone deacetylase hdt2-like                                   | 338  | AFW78881     | 6.14E-08  | ∞        | 148.7161 | 0.019249 |
| Put_4612  | mads-box transcription factor 27-like                           | 542  | EMT04698     | 1.29E-93  | 57.10577 | 52.42233 | 8.73E-09 |
| Put_4625  | metal-nicotianamine transporter ysl6                            | 2402 | EMT14354     | 0         | 3.547578 | 3.682113 | 0.036715 |
| Put_4654  | peroxidase 2  | 320  | EMT27077     | 3.94E-12  | 20.22313 | 20.18653 | 1.45E-06 |
| Put_48418 | pathogenesis-related maize seed protein                         | 243  | EMS62872     | 6.84E-14  | 7.339384 | 7.61511  | 0.000175 |
| Put_5497  | stress responsive protein                                       | 245  | NP_001060666 | 1.66E-34  | 5.379538 | 5.522649 | 0.008326 |
| Put_560   | beta purothionin  | 425  | EMS68449     | 4.27E-36  | 4.868847 | 5.129797 | 6.5E-05  |
| Put_5618  | protein lap1  | 1150 | EMT05493     | 1.74E-58  | 27.42377 | 27.93595 | 3.9E-12  |
| Put_5633  | dead-box atp-dependent rna helicase family protein              | 290  | ABS19813     | 4.62E-10  | 9.587274 | 9.721615 | 0.001168 |
| Put_57    | phosphate transporter   | 393  | EMS48796     | 1.56E-18  | 138.2336 | 144.7899 | 1.44E-39 |
| Put_5786  | nbs-lrr class disease resistance protein                        | 367  | EMT05493     | 1.82E-34  | ∞        | 922.8117 | 2.55E-20 |
| Put_58    | phosphate transporter   | 303  | AAO72433     | 2.21E-56  | 15.42474 | 16.16319 | 5.84E-15 |
| Put_5856  | phosphate transporter   | 331  | AIB04040     | 8.36E-55  | 51.32738 | 47.14785 | 4.77E-08 |
| Put_5926  | phosphate transporter   | 287  | CAC88705     | 3.59E-43  | 58.67544 | 59.5774  | 6.73E-11 |
| Put_6018  | high affinity nitrate transporter                               | 265  | EMS46094     | 3.80E-37  | ∞        | 846.8709 | 1.44E-18 |
| Put_6019  | high affinity nitrate transporter                               | 201  | EMT29900     | 1.04E-34  | ∞        | 261.9912 | 0.000117 |
| Put_60972 | probable glycosyltransferase at3g07620-like                     | 447  | EMT15698     | 5.67E-35  | 15.53339 | 15.52705 | 0.000439 |
| Put_62183 | predicted protein   | 196  | BAJ87692     | 9.85972   | ∞        | 155.3254 | 0.032244 |
| Put_6329  | endo- -beta-d-glucanase-like                                    | 841  | XP_003573587 | 6.16E-125 | 4.47224  | 4.779482 | 0.00442  |
| Put_6572  | phosphate transporter   | 209  | CAC88705     | 1.12E-39  | ∞        | 716.2266 | 3E-11    |
| Put_7021  | sucrase-like protein  | 750  | XP_003570471 | 3.28E-111 | 5.80697  | 6.077427 | 0.000645 |
| Put_762   | sulfate transporter   | 885  | EMT20444     | 9.10E-76  | 2.937966 | 3.109526 | 0.047494 |
| Put_763   | leucine-rich repeat receptor-like protein kinase at2g19210-like | 2821 | BAJ99700     | 0         | 3.303125 | 3.480167 | 0.012106 |

|          |  |      |              |           |          |          |          |
|----------|--|------|--------------|-----------|----------|----------|----------|
| Put_7722 | peroxidase 2-like                        | 324  | EMS57314     | 1.04E-29  | 21.96614 | 22.16624 | 8.68E-08 |
| Put_8059 | wrky transcription factor                | 951  | EMS47171     | 4.86E-105 | 8.249781 | 8.508932 | 0.009886 |
| Put_8221 | receptor-like protein kinase-like        | 1698 | BAK06643     | 0         | 8.441935 | 8.713879 | 0.001816 |
| Put_8295 | msp1 protein                             | 289  | XP_003578779 | 1.38E-48  | 4.033834 | 4.178423 | 0.037726 |
| Put_8533 | stress responsive protein                | 530  | XP_006650021 | 1.50E-63  | 4.297694 | 4.453873 | 0.001448 |
| Put_8752 | mads-box transcription factor 27-like    | 188  | EMT10914     | 5.50E-27  | 6.731716 | 6.938706 | 0.031927 |
| Put_8846 | subtilisin-like protease                 | 1220 | XP_003581342 | 1.84E-149 | 13.60342 | 13.74263 | 3.04E-05 |
| Put_8862 | subtilisin-like protease                 | 323  | XP_003572336 | 6.11E-56  | 14.22287 | 13.65466 | 0.040867 |
| Put_9405 | 39s ribosomal protein mitochondrial-like | 221  | EMT24150     | 1.46E-14  | ∞        | 145.4955 | 0.029457 |
| Put_9453 | sulfate transporter                      | 890  | EMS54294     | 0         | 3.057743 | 3.231253 | 0.024174 |
| Put_978  | protein                                  | 765  | EMT24396     | 3.06E-111 | 31.34691 | 31.36334 | 1.42E-11 |

(D) *P. tenuiflora* · 発現抑制

| Feature ID | Sequence desc.                                     | Contig length | Top hit ACC  | E-Value   | Experiment -                  | EDGE test -                  | EDGE test -                  |
|------------|--|---------------|--------------|-----------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|
|            |  |               |              |           | Fold Change (original values) | EDGE test - (stress/control) | FDR p-value (stress/control) |
| Put_10811  | auxin-induced protein 15a-like                     | 346           | EMT16846     | 2.85E-25  | -3.94631                      | -3.78051                     | 0.036715                     |
| Put_11118  | cipk-like protein expressed                        | 469           | AEZ51507     | 3.64E-108 | -8.29773                      | -7.88928                     | 7.07E-09                     |
| Put_11140  | tpa: cbl-interacting protein kinase family protein | 316           | ACF85692     | 3.33E-40  | -6.82082                      | -6.42681                     | 9.93E-05                     |
| Put_12058  | tpa: cbl-interacting protein kinase family protein | 207           | ACF85692     | 4.89E-34  | -10.4122                      | -9.85547                     | 0.023994                     |
| Put_1554   | cipk-like protein expressed                        | 264           | EMT32296     | 3.41E-47  | -10.5689                      | -10.1118                     | 1.97E-05                     |
| Put_1555   | cipk-like protein expressed                        | 366           | EMT32296     | 1.29E-46  | -3.90349                      | -3.73345                     | 0.012023                     |
| Put_17707  | sulfotransferase 17                                | 441           | EMT05139     | 4.89E-62  | -4.64848                      | -4.41974                     | 0.000529                     |
| Put_18181  | elongation factor 2                                | 212           | BAJ86872     | 1.72E-18  | -25.8957                      | -22.2173                     | 0.007724                     |
| Put_1889   | cytochrome p450 87a3-like                          | 293           | EMT08723     | 7.47E-30  | -3.96088                      | -3.77878                     | 0.011837                     |
| Put_28234  | enoyl- hydratase peroxisomal-like                  | 272           | XP_003578564 | 2.30E-24  | -∞                            | -146.73                      | 0.007572                     |

|           |  |      |              |          |          |          |          |
|-----------|--|------|--------------|----------|----------|----------|----------|
| Put_28278 | cell number regulator 2-like                         | 200  | EMT00654     | 5.92E-13 | -6.37909 | -6.00017 | 0.000114 |
| Put_28631 | sodium transporter                                   | 1177 | ACT21087     | 1.93E-83 | -8.65217 | -8.03517 | 0.008326 |
| Put_29635 | xyloglucan endotransglucosylase hydrolase protein 23 | 403  | CAA62847     | 4.00E-27 | -6.49959 | -5.94945 | 0.020609 |
| Put_29930 | anthocyanin 5-aromatic acyltransferase               | 309  | XP_003571423 | 2.23E-26 | -∞       | -137.381 | 0.022376 |
| Put_31641 | transposon mutator sub-class                         | 210  | BAK00356     | 2.62E-14 | -4.68353 | -4.35795 | 0.022088 |
| Put_32521 | cytochrome p450 716b1-like                           | 714  | XP_003563018 | 1.49E-76 | -3.9181  | -3.72289 | 0.040768 |
| Put_32593 | photosystem ii 10 kda polypeptide                    | 683  | EMT17346     | 2.26E-43 | -50.4423 | -44.9711 | 4.2E-11  |
| Put_40430 | 12-oxophytodienoic acid reductase                    | 282  | EMS58159     | 7.95E-58 | -5.89403 | -5.57199 | 0.006534 |
| Put_42575 | guanine-nucleotide-exchange protein                  | 221  | BAJ90517     | 1.28E-21 | -23.4219 | -20.0089 | 0.015539 |
| Put_43105 | btb poz and math domain-containing protein 2-like    | 646  | XP_003579321 | 3.78818  | -7.0004  | -6.6808  | 0.025331 |
| Put_46501 | xyloglucan endotransglycosylase                      | 275  | CAA62847     | 6.80E-45 | -6.94511 | -6.67447 | 0.027425 |
| Put_49047 | hypothetical protein OsJ_07716                       | 506  | EEE57473     | 2.44668  | -∞       | -138.929 | 0.017846 |
| Put_51098 | ent-kaurene synthase i                               | 275  | EMS54976     | 5.11E-53 | -∞       | -140.479 | 0.016808 |
| Put_52287 | wrky transcription factor                            | 621  | AAZ86537     | 4.03E-89 | -5.47646 | -5.14802 | 0.031952 |
| Put_55144 | protein phosphatase 2c 76                            | 222  | EMS53252     | 0.835935 | -∞       | -131.054 | 0.040197 |
| Put_59529 | ent-kaurene oxidase                                  | 248  | XP_003560645 | 4.41E-34 | -∞       | -167.714 | 0.005304 |
| Put_64999 | respiratory burst oxidase homolog protein b-like     | 229  | EMT17841     | 1.40162  | -∞       | -161.558 | 0.02059  |
| Put_65075 | pentatricopeptide repeat-containing protein          | 478  | EEE56309     | 2.43352  | -∞       | -207.56  | 0.000114 |
| Put_67256 | ribosome production factor 2 homolog                 | 961  | EMT00327     | 1.28E-19 | -4.96859 | -4.67259 | 0.015971 |
| Put_67691 | cytochrome p450 89a2-like                            | 213  | BAK00445     | 1.25E-28 | -∞       | -609.746 | 1.71E-12 |
| Put_69448 | agmatine coumaroyltransferase-2-like                 | 210  | BAJ87867     | 1.16E-17 | -∞       | -134.708 | 0.03381  |
| Put_70119 | ent-kaurene oxidase                                  | 216  | XP_003560644 | 1.28E-28 | -21.4165 | -19.7868 | 4.48E-05 |
| Put_70509 | carbamoyl-phosphate synthase small chain             | 279  | BAK05241     | 4.60E-16 | -∞       | -127.506 | 0.048625 |
| Put_70573 | heat shock cognate 70 kda protein                    | 437  | BAK02646     | 1.34E-56 | -∞       | -120.899 | 0.047891 |
| Put_73389 | hkt1 protein   | 597  | XP_002448492 | 2.04E-34 | -42.52   | -31.9956 | 0.037299 |
| Put_73474 | chlorophyll a-b binding chloroplastic                | 317  | EMS57503     | 8.09E-68 | -10.8889 | -10.38   | 0.011837 |
| Put_73571 | chlorophyll a-b binding chloroplastic                | 205  | EMS67016     | 2.62E-16 | -14.1667 | -13.1538 | 0.027425 |

|           |   |     |              |          |          |          |          |
|-----------|---|-----|--------------|----------|----------|----------|----------|
| Put_74395 | protein da1-related 1-like                                    | 248 | EEE53535     | 1.12E-04 | -∞       | -139.3   | 0.047623 |
| Put_74557 | vacuolar protein sorting-associated protein 24 homolog 1-like | 243 | XP_006649245 | 0.164624 | -∞       | -198.25  | 0.000114 |
| Put_74729 | tpa: hlh dna-binding domain superfamily protein               | 206 | DAA62214     | 3.53625  | -40.6858 | -34.6249 | 0.000198 |
| Put_75361 | reticuline oxidase-like                                       | 180 | EEC80786     | 1.97E-04 | -∞       | -132.585 | 0.026244 |
| Put_8271  | potassium channel akt1-like                                   | 227 | ADK93728     | 2.61E-46 | -∞       | -150.762 | 0.021522 |
| Put_8611  | pathogenesis-related maize seed protein                       | 624 | P35793       | 4.56E-75 | -6.48072 | -6.06551 | 0.006534 |



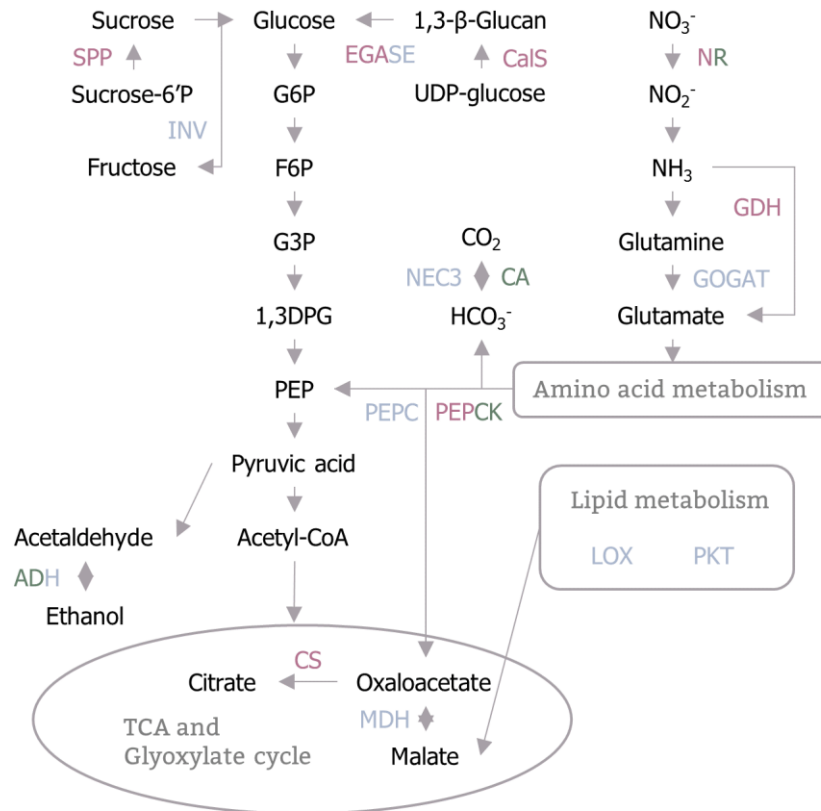


図17 糖・窒素代謝に関わる炭酸塩処理条件下発現変動遺伝子の概略。酵素略称の文字色はそれぞれ、ピンクはスズメノカタビラで発現上昇、緑は *P. tenuiflora* で発現上昇、青はスズメノカタビラで発現下降したことを示す。 *P. tenuiflora* で発現抑制されたものはこの図中には現れなかった。

ADH, alcohol dehydrogenase; CA, carbonic anhydrase; CalS, callose synthase 3; CS, citrate synthase; EGASE, endo-1,3-β-glucanase; GDH, glutamate dehydrogenase; GOGAT, glutamate synthase; LOX, lipoxygenase; PEPC, phosphoenolpyruvate carboxylase; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase; PKT, 3-ketoacyl CoA thiolase; SPP, sucrose phosphatase 2; INV, invertase; MDH, malate dehydrogenase; NEC3, bifunctional monodehydroascorbate reductase and carbonic anhydrase nectarin-3-like; NR, nitrate reductase

### 5.3.3 リアルタイム RT-PCR 解析

RNA-seq 解析で得られた結果を確認するため、発現変動が見られた遺伝子の一部についてリアルタイム PCR を使った定量 RT-PCR による発現解析を行った (図18)。RNA-seq とリアルタイム RT-PCR で測定した発現変動は同様の傾向を示した。

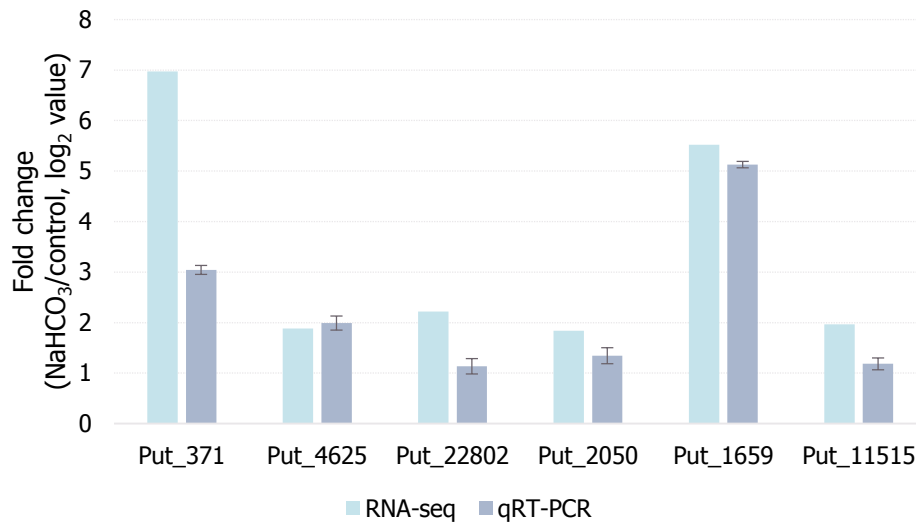
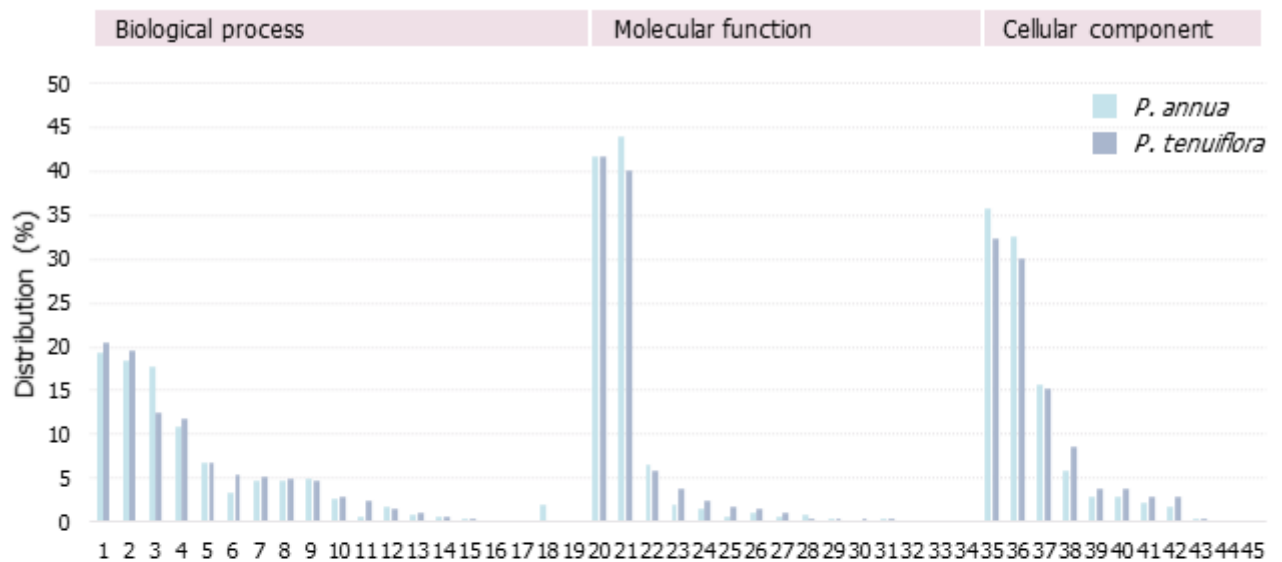


図 18 RNA-seq と qRT-PCR による遺伝子発現解析結果の比較。いずれも control 時の発現量を 1 としたときの、ストレス処理時の遺伝子発現変動量を  $\log_2$  値で示す。qRT-PCR 解析には *tubulin* に対する相対発現量を用いた。値は 3 反復の平均値を、エラーバーは標準誤差を示す。

### 5.3.4 コントロール条件下遺伝子発現の種間比較

「材料と方法」に示したマッピング条件において、トリミング後の *P. tenuiflora* のコントロール条件下発現リードのうち 53.76~55.26%、スズメノカタビラのリードのうち 51.30~55.74%がそれぞれミナトカモジグサ転写産物にマッピングされた。全 31,029 本のミナトカモジグサ転写産物のうち、*P. tenuiflora* の方に多かったものは 1,484、スズメノカタビラに多かったものは 1,334 あった。それら種間差が見られた転写産物について GO アノテーションを行った結果のまとめを図 19 に、また興味深いと思われたいくつかの遺伝子を表 4 に示す。



**Biological process**

1. Metabolic process
2. Cellular process
3. Single-organism process
4. Response to stimulus
5. Biological regulation
6. Cellular component organization or biogenesis
7. Multicellular organismal process
8. Developmental process
9. Localization
10. Multi-organism process
11. Reproduction
12. Signaling
13. Growth
14. Immune system process
15. Rhythmic process
16. Locomotion
17. Cell killing
18. Reproductive process
19. Biological adhesion

**Molecular function**

20. Binding
21. Catalytic activity
22. Transporter activity
23. Structural molecule activity
24. Nucleic acid binding transcription factor activity
25. Enzyme regulator activity
26. Antioxidant activity
27. Electron carrier activity
28. Molecular transducer activity
29. Receptor activity
30. Protein binding transcription factor activity
31. Nutrient reservoir activity
32. Guanyl-nucleotide exchange factor activity
33. Translation regulator activity
34. Metallochaperone activity

**Cellular component**

35. Cell
36. Organelle
37. Membrane
38. Macromolecular complex
39. Symplast
40. Cell junction
41. Membrane-enclosed lumen
42. Extracellular matrix
43. Virion
44. Extracellular matrix
45. Nucleoid

図 19 スズメノカタビラと *P. tenuiflora* のコントロール条件における遺伝子発現を比較した結果、発現量に 2 倍以上の差が見られた遺伝子の属する GO-term。

**表 4** コントロール条件の発現量に種間差が見られた転写産物のうち、興味深いと思われた一部のリスト。Feature ID はミナトカモジグサ転写産物の ID、Annotation は BDA (Blast2GO Descriptor Annotator) によってつけられたアノテーションで、当該コンティグのすべての BLAST hit description 中に最も多く見られた単語を示す。Fold change は *P. tenuiflora*/スズメノカタビラの発現量比であり、正の値は *P. tenuiflora* に、負の値はスズメノカタビラに多かったことを示す。

| Feature ID                          | Annotation  | Fold change<br>(EDGE test) |
|-------------------------------------|---|----------------------------|
| <b>More in <i>P. tenuiflora</i></b> |   |                            |
| Bradi1g46480.1                      | 2'-deoxymugineic-acid 2'-dioxygenase-like                 | 21.05                      |
| Bradi3g38580.1                      | 2-oxoglutarate/malate translocator, chloroplastic-like    | 2.77                       |
| Bradi3g33110.1                      | beta-expansin 1a precursor                                | 2.57                       |
| Bradi4g33340.1                      | caffeoyl-CoA O-methyltransferase                          | 6.00                       |
| Bradi4g17230.1                      | chalcone synthase   | 2.89                       |
| Bradi4g31380.1                      | flavonoid 3 -monooxygenase-like                           | 3.67                       |
| Bradi1g34220.1                      | HKT1 protein  | 12.13                      |
| Bradi3g57420.1                      | metal tolerance protein c3                                | 4.80                       |
| Bradi4g17380.1                      | Na <sup>+</sup> H <sup>+</sup> antiporter                 | 6.04                       |
| Bradi3g01250.1                      | high affinity nitrate transporter                         | 3.38                       |
| Bradi3g48840.1                      | phenylalanine ammonia-lyase                               | 2.50                       |
| Bradi1g68410.1                      | salt tolerant-related protein                             | 3.02                       |
| <b>More in <i>P. annua</i></b>      |   |                            |
| Bradi3g48950.1                      | ammonium transporter                                      | -2.49                      |
| Bradi3g39630.1                      | heat shock protein 90                                     | -2.11                      |
| Bradi3g50260.1                      | iron-phytosiderophore transporter protein yellow stripe 1 | -3.99                      |
| Bradi2g32890.1                      | major intrinsic protein                                   | -2.23                      |
| Bradi1g32640.1                      | metal transporter nramp6-like                             | -5.42                      |
| Bradi2g06220.1                      | metallothionein   | -7.29                      |
| Bradi3g12460.1                      | nadp-dependant malate dehydrogenase                       | -9.33                      |
| Bradi4g31960.1                      | nicotianamine aminotransferase a-like                     | -4.46                      |
| Bradi1g64487.1                      | nicotianamine synthase 2                                  | -11.40                     |
| Bradi1g42610.1                      | phosphate transporter                                     | -5.17                      |

## 5.4 考察

### 5.4.1 RNA-seq 解析と *de novo* アセンブリ

一度目の RNA-seq ランで得られたリードのアセンブリでは多数の *trans chimera* [65]が得られ、それらがその後の発現解析で「発現変動した」としてソフトウェアに誤検出されるケースが多くみられることがわかった。rRNA 量が多かったため、誤って rRNA とつなげられた mRNA がその量に引きずられて「高発現」していると検出されてしまったと考えられる。既存の RNA-seq 解析の報告において、rRNA removal tool や duplicate removal tool などのソフトウェアの使用はあまり一般的ではないが、今回の実験ではこれ

らの使用により rRNA のコンタミネーションや *trans chimera* による問題は大幅に改善された。アセンブリのパラメーターを厳しく設定することも *trans chimera* の減少に貢献したが、これは同時にコンティグがあまりつながらず、発現変動遺伝子の中に同一の top BLASTX hit を持つ多数の短いコンティグが検出される結果にもつながった。しかしこれは長いコンティグを作り mRNA の全長の情報を得たい場合や発現量の数値を厳密に知りたい場合には大きな問題であるが、本研究のように「発現変動遺伝子はどれか」という大まかな情報を得たい場合には、*trans chimera* に比べれば軽微な問題であると考えられる。また同一の top BLAST hit を得たコンティグにはオルソログやスプライズバリエーションが含まれている可能性もあるが、本研究の範囲ではこれらとアセンブリ時のアーティファクトとを区別することはできない。

#### 5.4.2 スズメノカタビラで炭酸塩ストレスによる発現変動が見られた遺伝子

スズメノカタビラでは *P. tenuiflora* に比べ発現変動遺伝子数のはるかに多かったことから、同濃度の  $\text{NaHCO}_3$  処理によってより強いストレスを受けていると考えられる (図 16A, B)。*glutathione S-transferase*、*disease resistance protein RPM1* などストレス耐性や防御メカニズムに関与する遺伝子に発現変動が見られた (表 3A)。また *flavonoid 3'-monooxygenase-like protein* や *anthocyanidin 5,3-O-glucosyltransferase-like protein* など二次代謝に関わる遺伝子なども発現誘導されたことから、炭酸塩耐性への二次代謝物の関与が示唆された。図 17 に示したように、*phosphoenolpyruvate carboxylase* (PEPC) と *malate dehydrogenase* (MDH) の発現が抑制され *citrate synthase* (CS) の発現が誘導されていたことは興味深い。これらの発現変動はすべて  $\text{HCO}_3^-$  がクエン酸回路に入った際の最初の合成産物であるオキサロ酢酸の量変動に関わっており、 $\text{HCO}_3^-$  過剰の影響を反映しているのかもしれない。

スズメノカタビラと *P. tenuiflora* の両種で共通して強い発現誘導が見られた遺伝子には *high affinity nitrate transporter*、*inorganic phosphate transporter*、*phosphoenolpyruvate carboxykinase* (PEPCK) などがあつた。 $\text{HCO}_3^-$  が  $\text{NO}_3^-$  含量におよぼす影響については増加と減少の両方が報告されており [9,46,69–72]、 $\text{HCO}_3^-$  が植物体のリン含量に及ぼす影響についても同様である [8,73]。*high affinity nitrate transporter* と *inorganic phosphate transporter* の炭酸塩ストレス条件下における役割は不明であるが、ミヤコグサを使った研究では、炭酸塩耐性品種でのみ発現誘導の見られる硝酸トランスポーターの存在が報告されている [63]。炭酸塩処理条件下における PEPCK の発現誘導は過去にも報告がある [61,74]。細胞内の  $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{CO}_3/\text{HCO}_3^-$  や有機酸のホメオスタシスに機能していると想像されるが、炭酸塩ストレス条件下で果たす役割はいまだ不明である。

スズメノカタビラのみで発現抑制された転写産物には、*iron-phytosiderophore transporter*、*nicotianamine aminotransferase A* (NAAT-A)、*nicotianamine synthase* (NAS) など鉄の吸収やホメオスタシスに関わる遺伝子のホモログが含まれていた (表 3B)。高 pH と  $\text{HCO}_3^-$  が根圏や植物体内のアポプラストに含まれる鉄を難溶化させるため、炭酸塩ストレスは植物に鉄欠乏によるクロロシスを引き起こすことが知られている [75–77]。NAAT と NAS は鉄キレーターであるムギネ酸類の合成に関与しており、オオムギの NAAT が鉄欠乏により誘導されること [78]、NAS の過剰発現がイネの高 pH 条件および鉄欠乏条件における生育を改善することなどが報告されている [79]。表 3B 中で *iron-phytosiderophore transporter* と書かれた「金属-ニコチアミン」錯体トランスポーターの YSL (yellow stripe 1-like) ファミリーは、金属とファイトシデロフ

オアの錯体を根圏から根細胞内に輸送する機能を持ち、18 遺伝子確認されているイネのホモログのうち OsYSL2 や OsYSL15 に関しては、鉄欠乏で発現誘導されることや欠損により鉄欠乏感受性が高まることが報告されている[80–82]。炭酸塩ストレス条件下における鉄欠乏の救済に重要な役割を持つはずの鉄獲得関連遺伝子が発現抑制される理由は不明だが、strategy I の鉄獲得機構を持つエンドウやトマト、シロイヌナズナでは、炭酸塩ストレス処理により鉄トランスポーターの *IRT1* や鉄キレートレダクターゼの *FRO* ファミリーなどの遺伝子発現が抑制される、あるいは鉄欠乏による誘導がかからなくなるという報告があり、これは炭酸塩とこれらの遺伝子の発現を制御する転写因子 *FER* の関与するシグナル伝達経路が何らかの相互作用をするためではないかと考察されている[83]。類似の現象が strategy II のスズメノカタビラでも起こっているのかもしれない。スズメノカタビラでは  $K^+$  や  $Na^+$  を輸送する *high-affinity potassium transporter*[84]などにも発現抑制が見られ、鉄以外のイオンについても炭酸塩によりホメオスタシスが影響されていることが示唆された。そのほかスズメノカタビラのみで発現抑制された遺伝子には *beta-expansin 1a precursor* や *cellulose synthase* などが含まれ、炭酸塩ストレス処理による根の伸長抑制の一部はこの発現抑制によるものである可能性が示された。

#### 5.4.3 *P. tenuiflora* で炭酸塩ストレスによる発現変動が見られた遺伝子

*P. tenuiflora* の炭酸塩ストレス処理条件下における発現変動転写産物数 (157 個) は、スズメノカタビラの 1,090 個に比べはるかに小さかった。過去にはマイクロアレイ解析において、耐塩性植物の *Thellungiella halophila* では塩ストレス処理による発現変動遺伝子数が感受性種のシロイヌナズナよりも小さかったことが報告され、それは *T. halophila* では通常条件でも耐性関連遺伝子の発現量が高いためであると考察されている[85]。また少なくとも耐塩性関連遺伝子のひとつ *salt overly sensitive 1 (SOS1)* に関してはその通常条件における遺伝子発現量の差はプロモーター配列によっていることが、シロイヌナズナと *Thellungiella* 属の 2 種 (いずれも耐塩性) との比較によって示された[86]。*P. tenuiflora* でも、特別な転写調節機構によりストレス耐性関連遺伝子の多くが通常条件でも恒常的に発現していたためにストレス処理による発現変動が見られなかった可能性がある。

スズメノカタビラでは炭酸塩ストレス条件下で発現抑制されていた Metal-nicotianamine transporter と NAAT-A は、*P. tenuiflora* では逆に発現が誘導されていた (表 3C)。鉄獲得に関わる遺伝子の発現応答の違いから、*P. tenuiflora* は炭酸塩ストレス条件下でより優れた鉄獲得能力を持つことが示唆される。代謝や防御関連の遺伝子は両方の植物種で発現が上昇しており、炭酸塩ストレス応答において重要な役割を持つと考えられるが、同じ代謝・防御関連でもそれぞれの植物種では異なる遺伝子が誘導されていたことから、それぞれ異なる代謝系や防御メカニズムが炭酸塩に対して応答していると考えられる。図 17 に示した代謝経路の範囲では、 $CO_2 + OH^- \rightleftharpoons HCO_3^-$  の反応を触媒する carbonic anhydrase (CA) の活性を持つ酵素が *P. tenuiflora* では発現誘導され、スズメノカタビラでは発現抑制されていた。これは細胞内ホメオスタシスの維持において非常に重要な意味を持つ可能性があるが、その影響を理解するには実際の代謝物の蓄積等に関してさらなるデータが必要である。

*P. tenuiflora* で発現が抑制されていた遺伝子には、これまでに炭酸塩以外のストレス応答への関与で報告

のある *cytochrome p450* ファミリーや *WRKY transcription factor* ファミリーに属する遺伝子が含まれた (表 3D)。表 3D に「salt transporter」として載っている *PutHKT2;1* は high-affinity Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>活性を持ち[20]、炭酸塩ストレス条件下のイオンホメオスタシスの維持に関与していると考えられる。

#### 5.4.4 コントロール条件で遺伝子発現に種間差が見られた遺伝子

*P. tenuiflora* では通常条件でもストレス耐性関連遺伝子が恒常的に発現しているのではないかという考察に基づき、本研究で得た RNA-seq の結果から通常条件における遺伝子発現の種間比較を試みた。本来ならばそれぞれのゲノムにマッピングするのが常道であると思われるが、本研究で用いた 2 種はいずれもゲノムが解読されていないため、モデル植物の中で 2 種に最も近いと思われたもののひとつであるミナトカモジグサの転写産物へのマッピングを試みた (ミナトカモジグサもゲノム配列はわかっていない)。5.2.3 でそれぞれの植物のコンティグにマッピングしたときの条件に比べて Length fraction と Similarity fraction の値を低く設定し、他種転写産物へのマッピングがある程度許容されるようにした結果、マッピングされたリードの全リードに占める割合は 5.2.3 でのコンティグへのマッピング時よりも 5~10%低い程度の値になった。「発現量」として算出される、各転写産物にマッピングされるリードの数は、リード数そのものの影響とともにマッピング効率の影響も受ける。たとえばある遺伝子の転写産物について、配列の *P. tenuiflora* のホモログへの類似度とスズメノカタビラのホモログへの類似度が著しく異なっていた場合、実際の発現量が同程度だとしても、対象転写産物へリードが多くマッピングされることにより *P. tenuiflora* の発現量の方が高く出ると考えられる。この点においてこの手法には重大な課題があり、今回の結果には多くの偽陽性が含まれると推測される。RT-PCR による結果の確認も試みられたが、相対定量の基準となるハウスキーピング遺伝子の選定が困難であるなどの課題があり、信頼できる結果を得ることができなかった。しかし表 4 に示したように、フェニルプロパノイドやフラボノイド合成系の遺伝子で種間差が見られたものはいずれも *P. tenuiflora* の方で発現が高く、*P. tenuiflora* では炭酸塩に誘導されていた鉄獲得関連遺伝子が軒並み通常条件ではスズメノカタビラのほうで発現量が高いという結果が出るなど、RNA-seq の結果に興味深い傾向は見られた。今後 2 種のゲノムを解読し改めてゲノムにマッピングするなどの方法により、RNA-seq は通常条件における遺伝子発現の種間比較にも威力を発揮することが期待される。

## 第六章 総合考察

この研究は、「炭酸塩ストレスとは何か、またそれに対する植物の耐性とは何か」を明らかにしたいという動機から始められた。根本には「炭酸塩ストレスとは高 pH の引き起こす鉄欠乏ストレスである」とする説への反発があった。著者の実験では、水耕液から鉄を抜く処理や高 pH 処理による生育阻害作用は炭酸塩ストレスによるものと比べ、はるかに軽微であるという結果が出たためである。しかし RNA-seq 解析は耐性種の *P. tenuiflora* で炭酸塩処理により発現誘導される遺伝子に鉄獲得関連遺伝子が多く含まれるという結果を示し、炭酸塩ストレス条件下での鉄獲得能力の重要性を改めて裏づけた。一方で、*P. tenuiflora* では炭酸塩ストレス処理による変動遺伝子数がスズメノカタビラに比べて大幅に小さかったという結果は、*P. tenuiflora* ではストレス耐性関連遺伝子が通常条件でも恒常的に発現していることを示唆している。つまり当初の最も大きな疑問であった「鉄欠乏以外の炭酸塩ストレスの影響とその耐性機構」は、本研究の実験デザインでは見るのが難しかった「通常条件の遺伝子発現の種間差」に隠されていると考えられる。本研究で明らかになった炭酸塩処理による液胞内 pH の上昇や酵母  $\Delta nhx1$  変異体の炭酸塩感受性、*P. tenuiflora* で炭酸塩由来の  $^{13}\text{C}$  のシュートへの移行が遅かったことや過去の研究報告を総合して考えると、やはり代謝の攪乱、およびそれによって生じたイオンや pH ホメオスタシスの攪乱がクリティカルなストレス要因であり、*P. tenuiflora* は流入する  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$  が代謝系に入ったあとにその代謝産物やカウンターアニオン/カチオンの量や局在をコントロールする能力が高いのではないかと著者は考察する。通常条件における遺伝子発現の絶対定量や  $\text{HCO}_3^-$  由来の炭素のより詳細な追跡により、今後その耐性メカニズムを解明していくことが可能なのではないかと考える。



## 第七章 摘要

作物の生育に適さない不良土壌のひとつである塩類集積土壌は、主に中性塩 (NaCl) が集積したものと、主に炭酸塩 (NaHCO<sub>3</sub>、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、CaCO<sub>3</sub>) が集積したものの2つに大別される。特に炭酸塩による植物の生育阻害は中性塩と比べても著しく強いことが知られているが、その生育阻害機構やそれに対する植物の耐性機構はあまりよくわかっていない。本研究は「炭酸塩ストレスとは何か、また耐性植物はどのようにしてそれに耐えるのか」という問いに答えることを目標に始められた。

中国東北部の炭酸塩類集積土壌に生育する炭酸塩耐性植物 *P. tenuiflora* および同族の炭酸塩感受性種スズメノカタビラ (*Poa annua* L.)、またモデル植物のシロイヌナズナとイネに炭酸塩ストレス処理を行い観察した結果、これらの植物では炭酸塩ストレスにより液胞内 pH が上昇することや、シロイヌナズナの根では低濃度炭酸塩ストレスにより液胞形態が異常になることが示され、炭酸塩はごく低濃度かつわずか一晚の処理で根細胞内ホメオスタシスに影響を及ぼすことが明らかになった。また根のスベリン染色による内皮のバリア構造のイネ-*P. tenuiflora* 間の比較が試みられたが、蛍光顕微鏡下では顕著な違いは観察されず、*P. tenuiflora* の耐性を決定づける要因とは断定できなかった。また酵母  $\Delta nhx1$  変異体が炭酸塩ストレス処理に対し野生型よりも感受性であることが明らかになり、液胞膜型 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 対抗輸送体の Nhx1 が少なくとも酵母においては細胞レベルの炭酸塩耐性に関与していることが示された。

また炭酸塩由来炭素の植物体内動態を調べるため炭素安定同位体を含む炭酸塩を根に与えた結果、<sup>13</sup>C の根への取り込みが炭酸塩感受性植物のイネと耐性植物の *P. tenuiflora* のいずれにおいても見られた一方、<sup>13</sup>C の地上部への移行はイネで 24 時間以内に見られたが *P. tenuiflora* においては見られなかったという結果が得られた。このことから、*P. tenuiflora* には炭酸イオンまたはその代謝産物を根に蓄積し、地上部への移行を抑えるメカニズムがあるのではないかと考えられた。

スズメノカタビラの炭酸塩耐性の強さに関して知見を得るため、炭酸塩ストレス処理条件下で *P. tenuiflora* との生育比較を行った結果、スズメノカタビラは中性塩には比較的強い耐性を持つ一方で炭酸塩に感受性であることが明らかになった。また *P. tenuiflora* は通常の水耕液の pH で生育させると水耕液 pH を上昇させたが、スズメノカタビラではその現象は見られなかった。これら 2 種の炭酸塩ストレス条件下での遺伝子発現を RNA-seq 解析により網羅的に解析したところ、耐性種の *P. tenuiflora* では発現変動遺伝子数が大幅に少なく、その少ない発現変動遺伝子の中には鉄獲得関連遺伝子が多く含まれるという結果が得られた。それらの鉄獲得関連遺伝子は *P. tenuiflora* で誘導される一方でスズメノカタビラでは発現抑制されており、炭酸塩ストレス耐性の種間差の一部を説明するのではないかと考えられた。

結論として本研究は炭酸塩処理のストレス要因は鉄欠乏であるという従来の説を一部支持した一方で、液胞内 pH や液胞形態の変化などそれのみでは説明の難しい現象が広く植物に見られることを明らかにし、その耐性の鍵は *P. tenuiflora* で非ストレス条件下でも恒常的に発現する遺伝子にあるのではないかと示唆した。

## 謝辞

本研究の計画・遂行、および結果の取りまとめにあたり親身なご指導を賜りました東京大学アジア生物資源環境研究センター高野哲夫教授に、心より感謝の意をお伝え申し上げます。

スズメノカタビラの種子は宇都宮大学雑草科学研究センターの小笠原勝教授より分譲頂きました。突然のお願いにも関わらず快く応じてくださった小笠原先生に、心より御礼申し上げます。

液胞内 pH の測定にあたり東京大学農学生命科学研究科栽培学研究室の共焦点顕微鏡を、また根の切片の作製にあたっては同研究科植物分子遺伝学研究室のビブラトームをお借りいたしました。快く受け入れてくださった経塚淳子准教授と堤伸浩教授、および栽培学研究室と植物分子遺伝学研究室のみなさまに厚く御礼申し上げます。

また炭素安定同位体比率の測定にあたっては、東京大学アジア生物資源環境研究センター樹木環境生理学研究室の則定真利子先生と、当時農学生命科学研究科附属生態調和農学機構の学術支援員でいらした上原直子さんの多大なご助力を賜りました。心より御礼申し上げます。

RNA-seq には実験計画の調整からサンプルの調製、シーケンシングから結果の解析に至るまで、農学生命科学研究科水圏生物工学研究室のみなさまの多大なご助力を賜りました。浅川修一教授と陳盈光さん、佐藤根妃奈さん、スタッフと学生のみなさまに心より感謝の意をお伝え申し上げます。また RNA-seq 結果の解析にはアジア生物資源環境研究センター樹木分子生態学研究室のコンピューターをお借りしました。練春蘭准教授と黒河内寛之先生、およびスタッフと学生のみなさまに心より御礼申し上げます。

研究に関してアドバイスを頂き、ディスカッションしてくださった中国東北林業大学アルカリ土壌生物資源環境研究センターの柳参奎先生と教員・学生のみなさま、アジア生物資源環境研究センターのみなさま、および農学生命科学研究科のみなさまに、この場をお借りして心より感謝の意をお伝え申し上げます。

本研究は JSPS 科研費 25・7241 の助成を受けたものです。

## 参考文献

1. Munns, R.; Tester, M. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2008**, *59*, 651–81.
2. Tuteja, N. Mechanisms of high salinity tolerance in plants. *Methods Enzymol.* **2007**, *428*, 419–38.
3. Lucena, J. J. Effects of bicarbonate, nitrate and other environmental factors on iron deficiency chlorosis. A review. *J. Plant Nutr.* **2000**, *23*, 1591–1606.
4. Mengel, K.; Geurtzen, G. Iron chlorosis on calcareous soils. Alkaline nutritional condition as the cause for the chlorosis. *J. Plant Nutr.* **1986**, *9*, 161–173.
5. Jelali, N.; Salah, I. Ben; M'sehli, W.; Donnini, S.; Zocchi, G.; Gharsalli, M. Comparison of three pea cultivars (*Pisum sativum*) regarding their responses to direct and bicarbonate-induced iron deficiency. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. **2011**, *129*, 548–553.
6. Javid, M.; Nicolas, M.; Ford, R. *Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations*; Shanker, A., Ed.; InTech, 2011.
7. Yang, X.; Römheld, V.; Marschner, H. Effect of bicarbonate on root growth and accumulation of organic acids in Zn-inefficient and Zn-efficient rice cultivars (*Oryza sativa* L.). *Plant Soil* **1994**, *164*, 1–7.
8. Guo, R.; Shi, L.; Ding, X.; Hu, Y.; Tian, S.; Yan, D.; Shao, S.; Gao, Y.; Liu, R.; Yang, Y. Effects of Saline and Alkaline Stress on Germination, Seedling Growth, and Ion Balance in Wheat. *Agron. J.* **2010**, *102*, 1252.
9. Alhendawi, R. A.; Römheld, V.; Kirkby, E. A.; Marschner, H. Influence of increasing bicarbonate concentrations on plant growth, organic acid accumulation in roots and iron uptake by barley, sorghum, and maize. *J. Plant Nutr.* **1997**, *20*, 1731–1753.
10. Rogers, E. E.; Wu, X.; Stacey, G.; Nguyen, H. T. Two MATE proteins play a role in iron efficiency in soybean. *J. Plant Physiol.* **2009**, *166*, 1453–9.
11. Guo, L. Q.; Shi, D. C.; Wang, D. L. The Key Physiological Response to Alkali Stress by the Alkali-Resistant Halophyte *Puccinellia tenuiflora* is the Accumulation of Large Quantities of Organic Acids and into the Rhizosphere. *J. Agron. Crop Sci.* **2010**, *196*, 123–135.
12. Lee, J.; Woolhouse, H. The relationship of compartmentation of organic acid metabolism to bicarbonate-ion sensitivity of root growth in calcicoles and calcifuges. *New Phytol.* **1971**, *70*, 103–111.
13. Lee, J. A.; Woolhouse, H. W. A Comparative study of bicarbonate inhibition of root growth in calcicole and calcifuge grasses. *New Phytol.* **1969**, *68*, 247–255.

14. Peng, Y.-H.; Zhu, Y.-F.; Mao, Y.-Q.; Wang, S.-M.; Su, W.-A.; Tang, Z.-C. Alkali grass resists salt stress through high [K<sup>+</sup>] and an endodermis barrier to Na<sup>+</sup>. *J. Exp. Bot.* **2004**, *55*, 939–49.
15. Wang, C.-M.; Zhang, J.-L.; Liu, X.-S.; Li, Z.; Wu, G.-Q.; Cai, J.-Y.; Flowers, T. J.; Wang, S.-M. *Puccinellia tenuiflora* maintains a low Na<sup>+</sup> level under salinity by limiting unidirectional Na<sup>+</sup> influx resulting in a high selectivity for K<sup>+</sup> over Na<sup>+</sup>. *Plant. Cell Environ.* **2009**, *32*, 486–96.
16. Guorong, S.; Yongzhen, P.; Hongbo, S.; Liye, C.; Xining, Z.; Haiyan, M.; Wenzhong, C.; Cunxu, W. Does *Puccinellia tenuiflora* have the ability of salt exudation? *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **2005**, *46*, 197–203.
17. Wang, Y.; Sun, G.; Suo, B.; Chen, G.; Wang, J.; Yan, Y. Effects of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and NaCl stresses on the antioxidant enzymes of chloroplasts and chlorophyll fluorescence parameters of leaves of *Puccinellia tenuiflora* (Turcz.) scribn.et Merr. *Acta Physiol. Plant.* **2007**, *30*, 143–150.
18. Ardie, S. W.; Liu, S.; Takano, T. Expression of the AKT1-type K(+) channel gene from *Puccinellia tenuiflora*, PutAKT1, enhances salt tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep.* **2010**, *29*, 865–74.
19. Ardie, S. W.; Nishiuchi, S.; Liu, S.; Takano, T. Ectopic expression of the K<sup>+</sup> channel β subunits from *Puccinellia tenuiflora* (KPutB1) and rice (KOB1) alters K<sup>+</sup> homeostasis of yeast and *Arabidopsis*. *Mol. Biotechnol.* **2011**, *48*, 76–86.
20. Ardie, S. W.; Xie, L.; Takahashi, R.; Liu, S.; Takano, T. Cloning of a high-affinity K<sup>+</sup> transporter gene PutHKT2;1 from *Puccinellia tenuiflora* and its functional comparison with OsHKT2;1 from rice in yeast and *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **2009**, *60*, 3491–502.
21. Bu, Y.; Sun, B.; Zhou, A.; Zhang, X.; Lee, I.; Liu, S. Identification and Characterization of a PutAMT1;1 Gene from *Puccinellia tenuiflora*. *PLoS One* **2013**, *8*, e83111.
22. Chang-Qing, Z.; Shunsaku, N.; Shenkui, L.; Tetsuo, T. Characterization of two plasma membrane protein 3 genes (PutPMP3) from the alkali grass, *Puccinellia tenuiflora*, and functional comparison of the rice homologues, OsLti6a/b from rice. *BMB Rep.* **2008**, *41*, 448–54.
23. Liu, H.; Zhang, X.; Takano, T.; Liu, S. Characterization of a PutCAX1 gene from *Puccinellia tenuiflora* that confers Ca<sup>2+</sup> and Ba<sup>2+</sup> tolerance in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *383*, 392–6.
24. Wang, X.; Yang, R.; Wang, B.; Liu, G.; Yang, C.; Cheng, Y. Functional characterization of a plasma membrane Na(+)/H (+) antiporter from alkali grass (*Puccinellia tenuiflora*). *Mol. Biol. Rep.* **2010**.
25. Kobayashi, S.; Abe, N.; Yoshida, K. T.; Liu, S.; Takano, T. Molecular cloning and characterization of plasma membrane- and vacuolar-type Na(+)/H (+) antiporters of an alkaline-salt-tolerant monocot, *Puccinellia tenuiflora*. *J. Plant Res.* **2012**.
26. Wang, Y.; Yang, C.; Liu, G.; Zhang, G.; Ban, Q. Microarray and suppression subtractive hybridization analyses of gene expression in *Puccinellia tenuiflora* after exposure to NaHCO<sub>3</sub>. *Plant Sci.* **2007**, *173*, 309–320.

27. Wang, Y.; Chu, Y.; Liu, G.; Wang, M.-H.; Jiang, J.; Hou, Y.; Qu, G.; Yang, C. Identification of expressed sequence tags in an alkali grass (*Puccinellia tenuiflora*) cDNA library. *J. Plant Physiol.* **2007**, *164*, 78–89.
28. Zhang, X.; Wei, L.; Wang, Z.; Wang, T. Physiological and molecular features of *Puccinellia tenuiflora* tolerating salt and alkaline-salt stress. *J. Integr. Plant Biol.* **2012**, *55*, 262–76.
29. Wang, Y.; Yang, C.; Liu, G.; Jiang, J. Development of a cDNA microarray to identify gene expression of *Puccinellia tenuiflora* under saline-alkali stress. *Plant Physiol.* **2007**, *45*, 567–76.
30. Yu, J.; Chen, S.; Wang, T.; Sun, G.; Dai, S. Comparative proteomic analysis of *Puccinellia tenuiflora* leaves under Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> stress. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 1740–62.
31. Abramoff, M. D.; Magalhaes, P. J.; Ram, S. J. Image processing with ImageJ. *Biophotonics Int.* **2004**, *11*, 36–42.
32. Nelson, B. K.; Cai, X.; Nebenführ, A. A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in *Arabidopsis* and other plants. *Plant J.* **2007**, *51*, 1126–36.
33. Lux, A.; Morita, S.; Abe, J.; Ito, K. An improved method for clearing and staining free-hand sections and whole-mount samples. *Ann. Bot.* **2005**, *96*, 989–96.
34. Gout, E.; Bligny, R.; Douce, R. Regulation of intracellular pH values in higher plant cells. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 13903–13909.
35. Uehlein, N.; Lovisolo, C.; Siefritz, F.; Kaldenhoff, R. The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO<sub>2</sub> pore with physiological functions. *Nature* **2003**, 425.
36. Katsuhara, M.; Hanba, Y. T. Barley plasma membrane intrinsic proteins (PIP Aquaporins) as water and CO<sub>2</sub> transporters. *Pflugers Arch.* **2008**, *456*, 687–91.
37. Gutknecht, J.; Bisson, M.; Tosteson, F. Diffusion of carbon dioxide through lipid bilayer membranes. Effects of carbonic anhydrase, bicarbonate, and unstirred layers. *J. Gen. Physiol.* **1977**, *69*, 779–794.
38. Raju, K. V.; Marschner, H.; Römheld, V.; Scientist, S.; Station, S. R. Effect of iron nutritional status on ion uptake, substrate pH and production and release of organic acids and riboflavin by sunflower plants. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkd.* **1972**, *132*, 177–190.
39. Tamura, K.; Shimada, T.; Ono, E.; Tanaka, Y.; Nagatani, A.; Higashi, S.; Watanabe, M.; Nishimura, M.; Hara-Nishimura, I. Why green fluorescent fusion proteins have not been observed in the vacuoles of higher plants. *Plant J.* **2003**, *35*, 545–555.
40. Ali, R.; Brett, C. L.; Mukherjee, S.; Rao, R. Inhibition of sodium/proton exchange by a Rab-GTPase-activating protein regulates endosomal traffic in yeast. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 4498–506.

41. Hamaji, K.; Nagira, M.; Yoshida, K.; Ohnishi, M.; Oda, Y.; Uemura, T.; Goh, T.; Sato, M. H.; Morita, M. T.; Tasaka, M.; Hasezawa, S.; Nakano, A.; Hara-Nishimura, I.; Maeshima, M.; Fukaki, H.; Mimura, T. Dynamic aspects of ion accumulation by vesicle traffic under salt stress in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* **2009**, *50*, 2023–33.
42. Nass, R.; Rao, R. Novel Localization of a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger in a Late Endosomal Compartment of Yeast: IMPLICATIONS FOR VACUOLE BIOGENESIS. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 21054–21060.
43. Nass, R.; Rao, R. The yeast endosomal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger, Nhx1, confers osmotolerance following acute hypertonic shock. *Microbiology* **1999**, *273*, 21054–21060.
44. Gaxiola, R. A.; Rao, R.; Sherman, A.; Grisafi, P.; Alper, S. L.; Fink, G. R. The Arabidopsis thaliana proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96*, 1480–1485.
45. Brett, C. L.; Tukaye, D. N.; Mukherjee, S.; Rao, R. The yeast endosomal Na<sup>+</sup> (K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> exchanger Nhx1 regulates cellular pH to control vesicle trafficking. *Mol. Biol. Cell* **2005**, *16*, 1396.
46. Westhuizen, M. M. v. d.; Cramer, M. D. The influence of elevated rhizosphere dissolved inorganic carbon concentrations on respiratory O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> flux in tomato roots. *J. Exp. Bot.* **1998**, *49*, 1977–1985.
47. Bialczyk, J.; Lechowski, Z. Absorption of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> by roots and its effect on carbon metabolism of tomato. *J. Plant Nutr.* **1992**, *15*, 293–312.
48. Mantia, J. M. *La Genomic analysis of life history traits, disease resistance and evolutionary origins of the greens-type Poa annua L.*; 2009.
49. Ellis, W.; Calder, D.; Lee, B. A diploid population of *Poa annua* L. from Australia. *Experientia* **1970**, *160*, 1960.
50. Quintanar, A.; Castroviejo, S.; Catalán, P. Phylogeny of the tribe Aveneae (Pooideae, Poaceae) inferred from plastid trnT-F and nuclear ITS sequences. *Am. J. Bot.* **2007**, *94*, 1554–69.
51. Paz, R. C.; Rocco, R. A.; Reinoso, H.; Menéndez, A. B.; Pieckenstein, F. L.; Ruiz, O. A. Comparative study of alkaline, saline, and mixed saline–alkaline stresses with regard to their effects on growth, nutrient accumulation, and root morphology of *lotus tenuis*. *J. Plant Growth Regul.* **2012**, *31*, 448–459.
52. Bravin, M. N.; Martí, A. L.; Clairotte, M.; Hinsinger, P. Rhizosphere alkalisation — a major driver of copper bioavailability over a broad pH range in an acidic, copper-contaminated soil. *Plant Soil* **2008**, *318*, 257–268.
53. Mengel, K.; Geurtzen, G. Relationship between iron chlorosis and alkalinity in *Zea mays*. *Physiol. Plant.* **1988**, *72*, 460–465.
54. Haynes, R. Active ion uptake and maintenance of cation-anion balance: A critical examination of their role in regulating rhizosphere pH. *Plant Soil* **1990**, *264*, 247–264.

55. Kosegarten, H. U. Apoplastic pH and Fe<sup>3+</sup> reduction in intact sunflower leaves. *Plant Physiol.* **1999**, *121*, 1069–1079.
56. Wang, Y.-Y.; Hsu, P.-K.; Tsay, Y.-F. Uptake, allocation and signaling of nitrate. *Trends Plant Sci.* **2012**, *17*, 458–67.
57. Jin, H.; Plaha, P.; Park, J. Y.; Hong, C. P.; Lee, I. S.; Yang, Z. H.; Jiang, G. B.; Kwak, S. S.; Liu, S. K.; Lee, J. S.; Kim, Y. A.; Lim, Y. P. Comparative EST profiles of leaf and root of *Leymus chinensis*, a xerophilous grass adapted to high pH sodic soil. *Plant Sci.* **2006**, *170*, 1081–1086.
58. Wang, C.; Gao, C.; Wang, L.; Zheng, L.; Yang, C.; Wang, Y. Comprehensive transcriptional profiling of NaHCO<sub>3</sub>-stressed *Tamarix hispida* roots reveals networks of responsive genes. *Plant Mol. Biol.* **2013**.
59. Gao, C.; Wang, Y.; Liu, G.; Yang, C.; Jiang, J.; Li, H. Expression profiling of salinity-alkali stress responses by large-scale expressed sequence tag analysis in *Tamarix hispida*. *Plant Mol. Biol.* **2008**, *66*, 245–58.
60. Wang, Y.; Ma, H.; Liu, G.; Xu, C.; Zhang, D.; Ban, Q. Analysis of gene expression profile of *Limonium bicolor* under NaHCO<sub>3</sub> stress using cDNA microarray. *Plant Mol. Biol. Report.* **2008**, *26*, 241–254.
61. Ying, G.; Yong, L.; Yan-Ming, Z.; Xi, B. Global transcriptome profiling of wild soybean (*Glycine soja*) roots under NaHCO<sub>3</sub> treatment. *BMC Plant Biol.* **2010**.
62. Zhang, L.-M.; Liu, X.-G.; Qu, X.-N.; Yu, Y.; Han, S.-P.; Dou, Y.; Xu, Y.-Y.; Jing, H.-C.; Hao, D.-Y. Early Transcriptomic Adaptation to Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> Stress Altered the Expression of a Quarter of the Total Genes in the Maize Genome and Exhibited Shared and Distinctive Profiles with NaCl and High pH Stresses. *J. Integr. Plant Biol.* **2013**, *55*, 1147–65.
63. Babuin, M. F.; Campestre, M. P.; Rocco, R.; Bordenave, C. D.; Escaray, F. J.; Antonelli, C.; Calzadilla, P.; Gárriz, A.; Serna, E.; Carrasco, P.; Ruiz, O. a; Menendez, A. B. Response to Long-Term NaHCO<sub>3</sub>-Derived Alkalinity in Model Lotus japonicus Ecotypes Gifu B-129 and Miyakojima MG-20: Transcriptomic Profiling and Physiological Characterization. *PLoS One* **2014**, *9*, e97106.
64. Yu, Y.; Huang, W.; Chen, H.; Wu, G.; Yuan, H.; Song, X.; Kang, Q.; Zhao, D.; Jiang, W.; Liu, Y.; Wu, J.; Cheng, L.; Yao, Y.; Guan, F. Identification of differentially expressed genes in flax (*Linum usitatissimum* L.) under saline-alkaline stress by digital gene expression. *Gene* **2014**.
65. Yang, Y.; Smith, S. a Optimizing de novo assembly of short-read RNA-seq data for phylogenomics. *BMC Genomics* **2013**, *14*, 328.
66. Kopylova, E.; Noé, L.; Touzet, H. SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 3211–7.
67. Robinson, M. D.; McCarthy, D. J.; Smyth, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 139–40.

68. Conesa, A.; Götz, S.; García-Gómez, J. M.; Terol, J.; Talón, M.; Robles, M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* **2005**, *21*, 3674–6.
69. Cramer, M. D.; Lewis, O. A. M.; Lips, S. H. Inorganic carbon fixation and metabolism in maize roots as affected by nitrate and ammonium nutrition. *Physiol. Plant.* **1993**, *89*, 632–639.
70. ZIONI, A.; Vaadia, Y.; Lips, S. Nitrate uptake by roots as regulated by nitrate reduction products of the shoot. *Physiol. Plant.* **1971**, *15*, 288–290.
71. Van der Merwe, C.; Cramer, M. Effect of enriched rhizosphere carbon dioxide on nitrate and ammonium uptake in hydroponically grown tomato plants. *Plant Soil* **2000**, *221*, 5–11.
72. Gao, Z.; Lips, S. Effects of increasing inorganic carbon supply to roots on net nitrate uptake and assimilation in tomato seedlings. *Physiol. Plant.* **1997**, *101*, 206–212.
73. Kolesch, H.; Oktay, M.; Höfner, W.; Hofner, W. Effect of iron chlorosis-inducing factors on the pH of the cytoplasm of sunflower (*Helianthus annuus*). *Plant Soil* **1984**, *82*, 215–221.
74. Gong, B.; Zhang, C.; Li, X.; Wen, D.; Wang, S.; Shi, Q.; Wang, X. Identification of NaCl and NaHCO<sub>3</sub> stress responsive proteins in tomato roots using iTRAQ-based analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, 1–6.
75. Mengel, K. Iron availability in plant tissues-iron chlorosis on calcareous soils. *Plant Soil* **1994**, *165*, 275–283.
76. Bavaresco, L.; Giachino, E.; Colla, R. Iron chlorosis paradox in grapevine. *J. Plant Nutr.* **1999**, *22*, 1589–1597.
77. Römheld, V. The chlorosis paradox: Fe inactivation as a secondary event in chlorotic leaves of grapevine. *J. Plant Nutr.* **2000**, *23*, 1629–1643.
78. Takahashi, M.; Yamaguchi, H.; Nakanishi, H.; Shioiri, T.; Nishizawa, N. K.; Mori, S. Cloning two genes for nicotianamine aminotransferase, a critical enzyme in iron acquisition (Strategy II) in graminaceous plants. *Plant Physiol.* **1999**, *121*, 947–56.
79. Lee, S.; Kim, Y.-S.; Jeon, U. S.; Kim, Y.-K.; Schjoerring, J. K.; An, G. Activation of Rice nicotianamine synthase 2 (OsNAS2) enhances iron availability for biofortification. *Mol. Cells* **2012**, *33*, 269–75.
80. Lee, S.; Chiecko, J. C.; Kim, S. a; Walker, E. L.; Lee, Y.; Guerinot, M. Lou; An, G. Disruption of OsYSL15 leads to iron inefficiency in rice plants. *Plant Physiol.* **2009**, *150*, 786–800.
81. Inoue, H.; Kobayashi, T.; Nozoye, T.; Takahashi, M.; Kakei, Y.; Suzuki, K.; Nakazono, M.; Nakanishi, H.; Mori, S.; Nishizawa, N. K. Rice OsYSL15 is an iron-regulated iron(III)-deoxymugineic acid transporter expressed in the roots and is essential for iron uptake in early growth of the seedlings. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 3470–9.



82. Koike, S.; Inoue, H.; Mizuno, D.; Takahashi, M.; Nakanishi, H.; Mori, S.; Nishizawa, N. K. OsYSL2 is a rice metal-nicotianamine transporter that is regulated by iron and expressed in the phloem. *Plant J.* **2004**, *39*, 415–24.
83. Lucena, C.; Romera, F.; Rojas, C. Bicarbonate blocks the expression of several genes involved in the physiological responses to Fe deficiency of Strategy I plants. *Funct. Plant Biol.* **2007**, *34*, 1002–1009.
84. Rodríguez-Navarro, A.; Rubio, F. High-affinity potassium and sodium transport systems in plants. *J. Exp. Bot.* **2006**, *57*, 1149–60.
85. Taji, T.; Seki, M.; Satou, M.; Sakurai, T. Comparative genomics in salt tolerance between Arabidopsis and Arabidopsis-related halophyte salt cress using Arabidopsis microarray. *Plant Physiol.* **2004**, *135*, 1697–1709.
86. Oh, D.-H.; Dassanayake, M.; Haas, J. S.; Kropornika, A.; Wright, C.; d'Urzo, M. P.; Hong, H.; Ali, S.; Hernandez, A.; Lambert, G. M.; Inan, G.; Galbraith, D. W.; Bressan, R. a; Yun, D.-J.; Zhu, J.-K.; Cheeseman, J. M.; Bohnert, H. J. Genome structures and halophyte-specific gene expression of the extremophile *Thellungiella parvula* in comparison with *Thellungiella salsuginea* (*Thellungiella halophila*) and Arabidopsis. *Plant Physiol.* **2010**, *154*, 1040–52.