

药用植物铁皮石斛 ABC 转运蛋白基因的鉴定及其差异表达分析

阎波, 刘思思, 陈娟*, 郭顺星*

(中国医学科学院、北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193)

摘要: ABC 转运蛋白 (ATP-binding cassette transporters) 是一类普遍存在于原核生物和真核生物中的跨膜转运蛋白, 在植物次生代谢物质的转运与积累、植物激素运输、脂质代谢、外源毒素的解毒、植物抗病等方面都起着关键作用。本研究基于铁皮石斛基因组和转录组数据, 初步鉴定了 88 个铁皮石斛 ABC 转运蛋白, 并预测了其功能及亚细胞定位。这些蛋白分为 ABCA-ABCI 等 7 个亚家族, 包括 4 个 ABCA、19 个 ABCB、12 个 ABCC、3 个 ABCD、9 个 ABCF、37 个 ABCG 和 4 个 ABCI, 主要定位在细胞质膜、液泡及高尔基体上。结合转录组数据比较分析了铁皮石斛种子无菌及接菌共生萌发过程中 ABC 转运蛋白表达模式。结果表明 ABCB 和 ABCG 蛋白家族部分成员在种子接菌共生萌发过程中显著差异上调表达。荧光实时定量 PCR 结果显示, 与无菌萌发相比, 2 个 ABCG-PDR 基因和 2 个 ABCB11 基因在铁皮石斛种子接菌共生萌发组中显著高表达 (fold change ≥ 10.0)。基于蛋白同源性分析, 预测这些蛋白主要参与了脱落酸、生长素等激素的运输, 暗示这些蛋白在铁皮石斛种子萌发及与微生物相互作用过程中发挥重要作用。

关键词: 铁皮石斛; 共生萌发; ABC 转运蛋白; 基因表达

中图分类号: R931

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 07-1177-13

Identification and differential expression analysis of ABC transporter gene from medicinal plant *Dendrobium officinale*

YAN Bo, LIU Si-si, CHEN Juan*, GUO Shun-xing*

(Institute of Medicinal Plant Development, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: ABC transporters (ATP-binding cassette transporters) are a family of trans-membrane transport proteins, which are ubiquitous in prokaryotes and eukaryotes. They are functionally involved in the transport and accumulation of plant secondary metabolites, phytohormone transport, lipid metabolism, exogenous toxins detoxification, plant disease and other aspects. Based on the genome and transcriptome data of *Dendrobium officinale*, 88 ABC transporters were preliminarily identified in *D. officinale* and their functions and subcellular localization were predicted. These proteins are divided into seven subfamilies, ABCA-ABCI, including 4 ABCA, 19 ABCB, 12 ABCC, 3 ABCD, 9 ABCF, 37 ABCG and 4 ABCI, which are mainly located in plasma membrane, vacuole and Golgi apparatus. Comparative transcriptomic analysis of ABC protein expression profile between asymbiotic and symbiotic germination of *D. officinale* show that some members of ABCB and ABCG proteins are highly expressed during seed germination inoculated fungi. qPCR validated that 2 ABCB11 and 2 ABCG-PDR are significantly up-regulated in symbiotic assay compared to asymbiotic germination (fold change

收稿日期: 2018-02-01; 修回日期: 2018-04-04.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573527, 81573526); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程经费资助项目 (2017-I2M-3-013).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-57833240, E-mail: kibchenjun@126.com;

Tel / Fax: 86-10-57833231, E-mail: sxguo1986@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0117

≥10.0). These proteins are mainly involved in abscisic acid and auxin transport, suggesting that these proteins play an important role in the germination of *D. officinale* seed and in the interaction with microorganisms.

Key words: *Dendrobium officinale*; symbiotic germination; ABC transporter; gene expression

ABC 转运蛋白 (ATP-binding cassette transporters) 是一类普遍存在于原核生物和真核生物中的跨膜转运蛋白,也是生物体内最大、功能最广泛的蛋白家族之一。ABC 转运蛋白有 3 种结构类型,包括全分子转运蛋白、半分子蛋白及可溶性转运蛋白^[1]。全分子 ABC 转运蛋白具有两个核苷酸结合结构域 (nucleotide-binding domain, NBD) 和两个跨膜结构域 (transmembrane domain, TMD), 而半分子转运蛋白只含有 1 个跨膜结构域和 1 个核苷酸结合结构域,第三种结构类型是没有跨膜结构域,只有核苷酸结合结构域,也称可溶性蛋白类型。大多数 ABC 转运蛋白都能与腺苷三磷酸 (ATP) 结合并通过水解 ATP 释放能量从而调控物质的跨膜运输^[2]。植物 ABC 转运蛋白在植物次生代谢物质的转运与积累、植物激素运输、脂质代谢、外源毒素的解毒、植物抗病等方面都起着关键作用^[3]。近年来,越来越多的 ABC 转运蛋白基因在水稻、拟南芥、烟草和豆科百脉根等模式植物中被鉴定^[4, 5], 已经成为植物次生代谢工程重点研究的方向之一。

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 是兰科 (Orchidaceae) 石斛属 (*Dendrobium*) 多年生附生型草本植物,具有极高的药用价值,为历版《中华人民共和国药典》收录的正品石斛之一,以新鲜或干燥的茎入药,具有益胃生津、滋阴清热等功效。铁皮石斛含有多糖、甘露糖、生物碱及联苕类化合物,具有抗肿瘤、抗氧化及抗血小板凝集等作用^[6]。

铁皮石斛具有兰科植物独特的生物学特性,即在自然条件下种子萌发和幼苗的分化、生长发育乃至成年植株的繁殖整个生活史都离不开真菌^[7]。大量的研究表明,在兰科植物与真菌的共生互作过程中,真菌能有效的促进其种子萌发,提高种子萌发率和幼苗成活率,增强铁皮石斛对病原真菌的抗性以及增加其活性成分如多糖及生物碱的含量等^[8, 9]。然而,有关真菌有效作用的机制尚不清楚。早期的实验证明,真菌在与兰科种子及根建立共生关系后,通过转运作用或自身消解为植物提供碳水化合物等养分,同时促进植物对土壤水分及矿物质的吸收和利用^[10]。本课题组前期利用转录组和蛋白质组学技术分析了铁皮石斛种子接菌共生萌发过程中的分子机制,揭示了真菌促进石斛种子萌发主要是改变了宿主植物

的代谢,提高或提早了与碳水化合物、脂代谢及激素代谢相关基因的表达^[11]。植物与微生物相互作用过程中,涉及复杂的营养物质和信号交换,转运蛋白在这个过程中扮演重要角色。铁皮石斛中含有丰富的次生代谢产物,这些物质在调控植物与其共生的真菌间的关系中发挥重要作用。一些植物激素如赤霉素、脱落酸、生长素、独脚金内酯等在植物与共生真菌互作过程中的信号识别起关键作用^[12–14]。已有研究证实 ABC 转运蛋白在植物病原微生物应答、植物与微生物共生互作中营养物质的转运、调节重金属以及次生代谢物运输甚至是参与植物激素及外源化学物质的转运方面发挥重要功能^[15]。目前,已经在水稻中鉴定了 123 个,拟南芥中鉴定了 127 个,豆科百脉根中鉴定了 89 个,在烟草及油菜中均开展了 ABC 转运蛋白的研究^[16],但兰科植物 ABC 转运蛋白的鉴定和预测鲜有报道^[17]。在铁皮石斛菌根共生研究中,已有的工作主要集中在对菌根共生信号转导相关基因的克隆和表达分析^[18, 19],而对 ABC 转运蛋白在铁皮石斛与微生物互作过程中的作用未见报道。因此,了解铁皮石斛 ABC 转运蛋白基因家族的组成及其在真菌与植物共生互作过程中的表达,对进一步揭示其在植物次生代谢产物积累及与微生物互作过程中营养物质的转运方面显得尤为重要。本文基于近期已经报道的铁皮石斛基因组和本课题组前期已经测序的铁皮石斛种子共生萌发的转录组数据,鉴定了铁皮石斛植物中 ABC 转运蛋白并探讨其功能,这不仅对铁皮石斛代谢物质的转运和积累的研究奠定基础,更重要的是为解析兰科植物与真菌共生机制的研究提供参考依据。

材料与方法

铁皮石斛的基因组数据库及转录组数据库 铁皮石斛参考基因组数据来自 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra?linkname=bioproject_sra_all&from_uid=269320^[20], 转录组数据来自中国医学科学院药用植物研究所真菌室自测且已保存在 NCBI 和 SRA 数据库 (登记号: PRJNA279934) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/?term=PRJNA279934>)^[11]。铁皮石斛成熟蒴果采自浙江金华石斛人工种植的山林和大棚。促铁皮石斛种子萌发的

优势菌种——胶膜菌属真菌 *Tulasnella* sp. “S6” 为本实验室保存。选取未萌发种子 (0 级)、无菌萌发 (1/2MS 培养基) 和共生萌发 (OMA 培养基) 不同萌发级别的种子 2、3、4 级 (种子吸水膨胀并撑破种皮为 2 级, 定义为萌发; 出现顶端分生组织即原球茎为 3 级; 顶端分生组织继续伸长并弯曲为 4 级)^[21] 以及非共生下的真菌菌丝, 采用 RNA 提取试剂盒 RNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany) 提取以上样品的总 RNA, 检测 RNA 质量、纯度和完整性送至深圳华大基因公司在 IlluminaHiSeq2000 测序平台上进行测序。原始序列经过滤后进行后续的生物信息学分析, 以铁皮石斛基因组^[20]做参考进行序列的组装、功能注释及表达分析。转录本表达量差异 (fold change) ≥ 2.0 , FDR (false discovery rate) < 0.001 定义为差异表达基因。

铁皮石斛 ABC 转运蛋白的鉴定 从转运蛋白数据库 TCBD (the transporter classification database)^[22] 中下载所有转运蛋白 (transporter) 基因数据, 在铁皮石斛基因组中进行 Blast 同源序列搜索 (E-值小于 10^{-5}) 以确定铁皮石斛 ABC 转运蛋白候选基因, 根据数据库中的基因注释对鉴定为候选转运蛋白基因进行分类。分类和命名方法以国际上通用的 ABC 转运蛋白系统即人类基因组 ABC 转运蛋白分类和命名方法为主^[23], 并结合植物 ABC 蛋白分类^[24]。ABC 家族蛋白多序列排序采用在线 Mafft 软件 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>), 系统发育树构建采用 MrBayes 3.0 软件^[25], 核苷酸替代模型通过 jmodeltest^[26] 估算出最优模型为 GTR+I+G 模型, 运行 6 个马尔可夫链 (MarkovChain Monte Carlo process), 共运行 2 000 000 代, 每 100 代抽样 1 次, 计算各分支的可信度, 后验概率 (posterior probability) 值 $\geq 95\%$ 标于系统树分支上。

ABC 转运蛋白结构域分析及亚细胞定位预测 采用在线软件 HMMER (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/search/hmmsearch>) 进行 ABC 转运蛋白结构域的分析; 亚细胞结构定位预测采用在线工具 ProComp9.0 (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=pcompb&group=programs&subgroup=proloc>) 及 WoLF PSORT(<https://wolfsort.hgc.jp/>)。

铁皮石斛 ABC 转运蛋白的表达分析 基于 RNA-Seq 转录组数据, 本研究比较分析了 ABC 转运蛋白基因在铁皮石斛种子无菌萌发或共生萌发组内相邻萌发阶段的表达模式; 以及在相同萌发阶段下, 无菌和共生萌发组样品中的表达差异, 筛选出参

与铁皮石斛种子接菌共生萌发的差异表达转运蛋白。蛋白表达的层次聚类分析及作图采用软件 Genesis 1.7.7.27^[27]。

实时荧光定量 PCR 验证基因表达 基于转录组数据分析结果, 选取了 5 个在铁皮石斛种子共生萌发过程中显著上调表达的 ABC 转运蛋白基因经 qPCR 验证其表达。将铁皮石斛无菌和接菌共生萌发各级别 (0、1~2、3、4 级) 的种子样品提取总 RNA, 用试剂盒 iScript™ cDNA synthesis Kit (Bio-rad) 反转录为 cDNA。qPCR 引物设计采用 Primer 3.0 在线软件, 引物由金唯智生物科技有限公司合成。qPCR 反应以铁皮石斛 EF-1 α 为内参基因, 在罗氏 lightCycler 480PCR 仪 (Roche Applied, USA) 上进行, 反应条件是 95 °C 3 min, 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 40 个循环。PCR 扩增反应设置 3 个生物学重复和 3 个技术重复。数据分析采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算基因相对表达量^[28]。

结果与讨论

1 ABC 转运蛋白的鉴定

本文从铁皮石斛基因组中一共鉴定了 88 个 ABC 转运蛋白, 分为 ABCA-ABCI, 共 7 个蛋白家族 (表 1)。其中 ABCG 蛋白共 37 个, 占比最高 (42%), 其次是 ABCB 蛋白 19 个, 占总 ABC 转运蛋白的 20.45%, ABCC 蛋白 12 个 (13.63%), ABCF 蛋白 9 个 (10.22%), ABCA、ABCI 家族蛋白各 4 个, ABCD 家族蛋白 3 个。ABCH 和 ABCE 蛋白家族成员在铁皮石斛中未发现。从结构上看, 88 个蛋白中, 19 个为全分子转运蛋白 (TMD-NBD-TMD-NBD), 21 个为半分子转运蛋白 (TMD-NBD/NBD-TMD2), 37 个为可溶性转运蛋白 (NBD/NBD-NBD)。全分子转运蛋白最大包含 1 601 个氨基酸 (Dendrobium_GLEAN_10107384), 最小包含 1 021 个氨基酸 (Dendrobium_GLEAN_10086877)。ABCG 已知是植物中最大的 ABC 蛋白家族, 在铁皮石斛中发现 37 个, 其中 14 个蛋白属多效耐药性转运蛋白 (pleiotropic drug resistance protein, PDR)。

2 ABC 转运蛋白系统发育分析

基于 ABC 蛋白结构域核苷酸结合区域 (NBD) 构建的系统发育树将 88 个 ABC 转运蛋白划分成 7 个亚家族 (图 1)。ABCA-ABCD 均形成一个独立的分支, ABCG 中的 PDR 单独成 2 个 100% 支持率的亚支。然而, 注释为 ABCI 的 4 个蛋白被聚类成两个分支, PEQU_06417-D1 和 Dendrobium_GLEAN_10077411 聚在一个分支 (PP = 100), Dendrobium_GLEAN_10131109

Table 1 Classification, function and subcellular localization of 88ABC transporter of medicinal plant *D. officinale*. PM: Plasma membrane; ER: Endoplasmic reticulum; Ch: Chloroplast; N: Nucleus; M: Mitochondrial; V: Vacuole; Cy: Cytoplasmic

Gene ID	Length /aa	Topology (Hmmer)	Subcellular localization	TCDB database (Subject_id)	Nr accession number	Classification
ABCA (4)						
Dendrobium_GLEAN_10101513	578	TMD-NBD	PM	gnl TC-DB Q9F2Y8 3.A.1.105.13	XP_009410753.1	ABC transporter A family member 7-like
Dendrobium_GLEAN_10095497	838	NBD	PM	gnl TC-DB Q7AKK4 3.A.1.105.14	XP_009386971.1	ABC transporter A family member 1
Dendrobium_GLEAN_10078892	533	NBD	ER	gnl TC-DB Q7AKK4 3.A.1.105.14	XP_009410752.1	ABC transporter A family member 2
Dendrobium_GLEAN_10047236	753	TMD-NBD	ER	gnl TC-DB Q9A0K0 3.A.1.105.7	XP_008776307.1	ABC transporter A family member 2-like
ABCB (19)						
Dendrobium_GLEAN_10049008	610	NBD	Ch	gnl TC-DB Q9XUJ1 3.A.1.210.7	XP_008787683.1	ABC transporter B family member 29
Dendrobium_GLEAN_10096529	380	NBD	PM	gnl TC-DB P60752 3.A.1.106.1	XP_009414924.1	ABC transporter B family member 11-like
Dendrobium_GLEAN_10053732	810	TMD-NBD	M	gnl TC-DB Q9WYC3 3.A.1.135.5	XP_008793410.1	ABC transporter B family member 25
Dendrobium_GLEAN_10038800	367	NBD-TMD	PM	gnl TC-DB Q9NRK6 3.A.1.201.17	XP_008789538.1	LOW QUALITY PROTEIN
Dendrobium_GLEAN_10065036	1 353	TMD-NBD-TMD-NBD	PM	gnl TC-DB A4QD95 3.A.1.106.4	XP_008784383.1	ABC transporter B family member 19
Dendrobium_GLEAN_10087838	217	NBD	V	gnl TC-DB Q90Z35 3.A.1.201.9	XP_008778485.1	ABC transporter B family member 25
Dendrobium_GLEAN_10086876	116	NBD	V	gnl TC-DB B0Y3B6 3.A.1.201.10	XP_006645785.1	ABC transporter B family member 21-like
Dendrobium_GLEAN_10086877	1 021	TMD-NBD-TMD-NBD	PM	gnl TC-DB M1VAN7 3.A.1.201.21	XP_009414924.1	ABC transporter B family member 11-like
Dendrobium_GLEAN_10065663	593	NBD	PM	gnl TC-DB Q4Q4W3 3.A.1.210.12	XP_008784383.1	ABC transporter B family member 19
Dendrobium_GLEAN_10055032	752	TMD-NBD-NBD-TMD	PM	gnl TC-DB P36619 3.A.1.201.18	XP_006602428.1	ABC transporter B family member 15-like
Dendrobium_GLEAN_10043995	1 345	TMD-NBD-TMD-NBD	PM	gnl TC-DB M1VAN7 3.A.1.201.21	XP_008795733.1	ABC transporter B family member 20-like
Dendrobium_GLEAN_10040496	1 103	TMD-NBD-TMD-NBD	PM	gnl TC-DB Q9NRK6 3.A.1.201.17	XP_008800115.1	ABC transporter B family member 2-like
Dendrobium_GLEAN_10038798	421	TMD-NBD	PM	gnl TC-DB Q0WML0 3.A.1.201.8	XP_008800555.1	ABC transporter B family member 1-like
Dendrobium_GLEAN_10007070	310	NBD	PM	gnl TC-DB M1VAN7 3.A.1.201.21	XP_009414924.1	ABC transporter B family member 11-like
Dendrobium_GLEAN_10121101	1 340	TMD-NBD-TMD-NBD	PM	gnl TC-DB Q9NUT2 3.A.1.201.22	XP_008794734.1	ABC transporter B family member 20-like
Dendrobium_GLEAN_10110397	659	NBD-TMD-NBD	PM	gnl TC-DB Q0WML0 3.A.1.201.8	XP_008776904.1	ABC transporter B family member 9-like
Dendrobium_GLEAN_10107402	538	TMD-NBD	PM	gnl TC-DB M1VAN7 3.A.1.201.21	XP_008810360.1	ABC transporter B family member 4-like
Dendrobium_GLEAN_10107406	613	NBD-TMD-NBD	PM	gnl TC-DB Q0WML0 3.A.1.201.8	XP_009414924.1	ABC transporter B family member 11-like
Dendrobium_GLEAN_10085480	1 251	TMD-NBD-TMD-NBD	–	gnl TC-DB Q9NUT2 3.A.1.201.22	XP_008779540.1	putative multidrug resistance protein
ABCC (12)						
Dendrobium_GLEAN_10095542	1 358	TMD-NBD-TMD-NBD	–	gnl TC-DB Q96J65 3.A.1.208.29	XP_008811726.1	ABC transporter C family member 8
Dendrobium_GLEAN_10091907	1 074	TMD-NBD-TMD	PM	gnl TC-DB O88269 3.A.1.208.1	XP_008784678.1	ABC transporter C family member 15
Dendrobium_GLEAN_10075293	785	TMD-NBD	PM	gnl TC-DB Q10185 3.A.1.208.16	XP_008777748.1	ABC transporter C family member 15
Dendrobium_GLEAN_10050743	316	NBD	PM	gnl TC-DB Q7YR74 3.A.1.208.30	XP_006655858.1	ABC transporter C family member 13-like
Dendrobium_GLEAN_10050744	626	NBD-TMD	PM	gnl TC-DB Q9C8G9 3.A.1.208.20	XP_008803707.1	ABC transporter C family member 13
Dendrobium_GLEAN_10026419	372	NBD		gnl TC-DB Q96J65 3.A.1.208.29	XP_008803707.1	ABC transporter C family member 13

Continued

Gene ID	Length /aa	Topology (Hmmer)	Subcellular localization	TCDB database (Subject_id)	Nr accession number	Classification
Dendrobium_ GLEAN_10109493	761	TMD-NBD	PM, V	gnl TC-DB Q88269 3.A.1.208.1	XP_008800825.1	ABC transporter C family member 14-like
Dendrobium_ GLEAN_10040589	1 462	TMD-NBD-TMD-NBD	PM, V	gnl TC-DB P14772 3.A.1.208.18	XP_008792061.1	ABC transporter C family member 3-like
Dendrobium_ GLEAN_10107384	1 601	TMD-NBD-TMD-NBD	PM, V	gnl TC-DB Q09428 3.A.1.208.4	XP_008798685.1	ABC transporter C family member 10-like
Dendrobium_ GLEAN_10089997	1 117	NBD-TMD-NBD	PM, V	gnl TC-DB Q96J66 3.A.1.208.13	XP_009408267.1	ABC transporter C family member 2-like
Dendrobium_ GLEAN_10058487	741	TMD-NBD	PM, V	gnl TC-DB Q5T3U5 3.A.1.208.31	XP_008796397.1	ABC transporter C family member 5
Dendrobium_ GLEAN_10029154	247	NBD	V	gnl TC-DB Q96J65 3.A.1.208.29	XP_009421234.1	ABC transporter C family member 10
ABCD (3)						
Dendrobium_ GLEAN_10017830	202	NBD	N, M	gnl TC-DB Q8XE58 3.A.1.107.3	XP_008787282.1	ABC transporter D family member 2
Dendrobium_ GLEAN_10130787	573	NBD-TMD2	N, M	gnl TC-DB Q03024 3.A.1.110.4	XP_008781581.1	ABC transporter D family member 1-like
Dendrobium_ GLEAN_10092249	455	NBD	N, Cy	gnl TC-DB Q5V9R8 3.A.1.5.22	XP_008787282.1	ABC transporter D family member 2
ABCF (9)						
Dendrobium_ GLEAN_10025955	342	NBD	-	gnl TC-DB P37774 3.A.1.3.10	XP_008811580.1	ABC transporter F family member 5-like
Dendrobium_ GLEAN_10029179	325	NBD	-	gnl TC-DB P68187 3.A.1.1.1	XP_008811580.1	ABC transporter F family member 5-like
Dendrobium_ GLEAN_10035285	301	NBD	-	gnl TC-DB A1JLH0 3.A.1.10.5	XP_008811580.1	ABC transporter F family member 5-like
Dendrobium_ GLEAN_10015469	301	NBD	-	gnl TC-DB P39115 3.A.1.121.3	XP_008811580.1	ABC transporter F family member 5-like
Dendrobium_ GLEAN_10035284	352	NBD-NBD	-	gnl TC-DB A8GDS6 3.A.1.14.16	XP_009404064.1	ABC transporter F family member 5-like
Dendrobium_ GLEAN_10056219	183	NBD	Ch	gnl TC-DB A8GZV2 3.A.1.132.5	AIU41659.1	ABC transporter family protein
Dendrobium_ GLEAN_10066736	500	NBD-NBD	Cy	gnl TC-DB Q52900 3.A.1.132.2	XP_010241809.1	ABC transporter F family member 1
Dendrobium_ GLEAN_10047638	731	NBD-NBD	Cy	gnl TC-DB B8F898 3.A.1.3.28	XP_008778513.1	ABC transporter F family member 3
Dendrobium_ GLEAN_10086093	709	NBD-NBD	Cy	gnl TC-DB P07109 3.A.1.3.29	XP_009419619.1	ABC transporter F family member 4
ABCG (37)						
Dendrobium_ GLEAN_10008876	177	NBD	-	gnl TC-DB P51533 3.A.1.205.12	XP_008777276.1	ABC transporter G family member 11-like
Dendrobium_ GLEAN_10085999	662	NBD-TMD2	PM	gnl TC-DB Q949G3 3.A.1.205.21	XP_009397435.1	ABC transporter G family member 14
Dendrobium_ GLEAN_10061126	705	NBD-TMD2	Cy	gnl TC-DB Q9XIE2 3.A.1.205.9	XP_009400415.1	ABC transporter G family member 11-like
Dendrobium_ GLEAN_10058167	632	NBD-TMD2	PM	gnl TC-DB Q8X0Z3 3.A.1.205.6	XP_008803363.1	ABC transporter G family member 23
Dendrobium_ GLEAN_10055867	1 088	NBD	PM	gnl TC-DB O81016 3.A.1.205.16	XP_009396592.1	ABC transporter G family member 28-like
Dendrobium_ GLEAN_10142667	589	NBD-TMD2	PM	gnl TC-DB A9SCA8 3.A.1.204.11	XP_008791250.1	ABC transporter G family member 10
Dendrobium_ GLEAN_10048472	810	NBD	PM	gnl TC-DB A4HWI7 3.A.1.204.6	XP_008787546.1	ABC transporter G family member 28-like
Dendrobium_ GLEAN_10041679	739	NBD-TMD2	V	gnl TC-DB Q24367 3.A.1.205.20	XP_008777932.1	ABC transporter G family member 6
Dendrobium_ GLEAN_10040821	530	NBD-TMD2	PM	gnl TC-DB Q9H172 3.A.1.204.20	XP_010094714.1	ABC transporter G family member 11
Dendrobium_ GLEAN_10037982	610	NBD-TMD2	PM	gnl TC-DB O81016 3.A.1.205.16	XP_009409037.1	ABC transporter G family member 4-like
Dendrobium_ GLEAN_10032761	663	NBD-TMD2	PM	gnl TC-DB Q949G3 3.A.1.205.21	XP_009383524.1	ABC transporter G family member 25-like

Continued

Gene ID	Length /aa	Topology (Hmmer)	Subcellular localization	TCDB database (Subject_id)	Nr accession number	Classification
Dendrobium_ GLEAN_10028654	736	NBD-TMD2	V	gnl TC-DB P78577 3.A.1.205.7	XP_008810525.1	ABC transporter G family member 6-like
Dendrobium_ GLEAN_10028239	386	NBD	PM	gnl TC-DB Q02785 3.A.1.205.3	XP_009414604.1	ABC transporter G family member 5-like
Dendrobium_ GLEAN_10019851	302	NBD	PM	gnl TC-DB Q9H172 3.A.1.204.20	XP_008811977.1	ABC transporter G family member 7
Dendrobium_ GLEAN_10019795	758	NBD-NBD-TMD2	PM	gnl TC-DB Q8X0Z3 3.A.1.205.6	XP_008790946.1	ABC transporter G family member 15-like
Dendrobium_ GLEAN_10124931	500	NBD	Ch	gnl TC-DB P43071 3.A.1.205.4	XP_008810525.1	ABC transporter G family member 6-like
Dendrobium_ GLEAN_10104987	1 155	NBD-TMD2-TMD2-TMD2	PM	gnl TC-DB P33302 3.A.1.205.1	XP_008806677.1	ABC transporter G family member 11-like
Dendrobium_ GLEAN_10098547	654	NBD-TMD2	PM	gnl TC-DB Q949G3 3.A.1.205.21	XP_008797781.1	ABC transporter G family member 26
Dendrobium_ GLEAN_10096791	664	NBD-TMD2	PM	gnl TC-DB P78595 3.A.1.205.5	XP_008781545.1	LOW QUALITY PROTEIN
Dendrobium_ GLEAN_10033793	279	NBD	N	gnl TC-DB P41820 3.A.1.205.11	XP_008776879.1	ABC transporter G family member 3
Dendrobium_ GLEAN_10003117	230	NBD	Cy	gnl TC-DB A8WEV1 3.A.1.204.7	XP_009396695.1	ABC transporter G family member 28-like
Dendrobium_ GLEAN_10017378	223	NBD	N	gnl TC-DB Q9XIE2 3.A.1.205.9	XP_008790946.1	ABC transporter G family member 15-like
Dendrobium_ GLEAN_10107858	899	TMD2-NBD-TMD2	PM	gnl TC-DB I0DHI9 3.A.1.204.15	EMS49680.1	ABC transporter family protein
Dendrobium_ GLEAN_10140588	757	TMD2-NBD	PM	gnl TC-DB P25371 3.A.1.204.9	XP_002278313.2	ABC transporter G family member 29-like
Dendrobium_ GLEAN_10137115	622	NBD-TMD2	Ch	gnl TC-DB I0DHI9 3.A.1.204.15	XP_009407636.1	pleiotropic drug resistance protein 6
Dendrobium_ GLEAN_10063525	427	NBD	N	gnl TC-DB P78595 3.A.1.205.5	XP_008795450.1	pleiotropic drug resistance protein 3-like
Dendrobium_ GLEAN_10046242	159	NBD	N	gnl TC-DB G7LE38 3.A.1.204.16	XP_008805401.1	LOW QUALITY PROTEIN
Dendrobium_ GLEAN_10053865	820	PDR-NBD-TMD2	PM	gnl TC-DB Q9H172 3.A.1.204.20	XP_009401806.1	pleiotropic drug resistance protein 3-like
Dendrobium_ GLEAN_10122649	723	TMD2-PDR-NBD-TMD2	PM	gnl TC-DB Q9UNQ0 3.A.1.204.2	XP_008791552.1	pleiotropic drug resistance protein 12-like
Dendrobium_ GLEAN_10063267	425	TMD2-PDR-NBD	Ch	gnl TC-DB Q08409 3.A.1.205.15	XP_008804599.1	pleiotropic drug resistance protein 12-like
Dendrobium_ GLEAN_10083925	1 513	NBD-TMD2-PDR-NBD-TMD2	PM	gnl TC-DB P40550 3.A.1.205.8	XP_009415905.1	pleiotropic drug resistance protein 4-like
Dendrobium_ GLEAN_10071279	1 447	NBD-TMD2-PDR-NBD-TMD2	PM	gnl TC-DB Q6FUR1 3.A.1.205.13	XP_008775867.1	pleiotropic drug resistance protein TUR2-like
Dendrobium_ GLEAN_10062268	947	TMD2-PDR-NBD-TMD2	PM	gnl TC-DB Q08409 3.A.1.205.15	XP_003632800.1	pleiotropic drug resistance protein 1-like
Dendrobium_ GLEAN_10046245	917	TMD2-PDR-NBD	PM	gnl TC-DB Q6FUR1 3.A.1.205.13	XP_008805401.1	LOW QUALITY PROTEIN
Dendrobium_ GLEAN_10032126	1 024	NBD-TMD2-PDR-NBD	PM	gnl TC-DB Q08409 3.A.1.205.15	XP_010270957.1	pleiotropic drug resistance protein 3-like
Dendrobium_ GLEAN_10137132	787	TMD2-PDR-NBD-TMD2	PM	gnl TC-DB Q08409 3.A.1.205.15	XP_008795450.1	pleiotropic drug resistance protein 3-like
Dendrobium_ GLEAN_10101484	1 418	TMD2-PDR-NBD-TMD2	PM	gnl TC-DB P40550 3.A.1.205.8	XP_009385804.1	putative pleiotropic drug resistance protein 7
ABCI (4)						
Dendrobium_ GLEAN_10131109	393	NBD	Cy	gnl TC-DB P69874 3.A.1.11.1	XP_009391519.1	ABC transporter I family member 20
PEQU_06417-D1	174	NBD	Ch	gnl TC-DB P16676 3.A.1.6.1	XP_009403113.1	ABC transporter I family member 11
Dendrobium_ GLEAN_10077411	248	NBD	Cy	gnl TC-DB O32169 3.A.1.24.2	XP_003570349.1	ABC transporter I family member 19-like
Dendrobium_ GLEAN_10077405	200	NBD	N	gnl TC-DB D5AQY6 3.A.1.23.7	XP_008810273.1	ABC transporter I family member 19-like

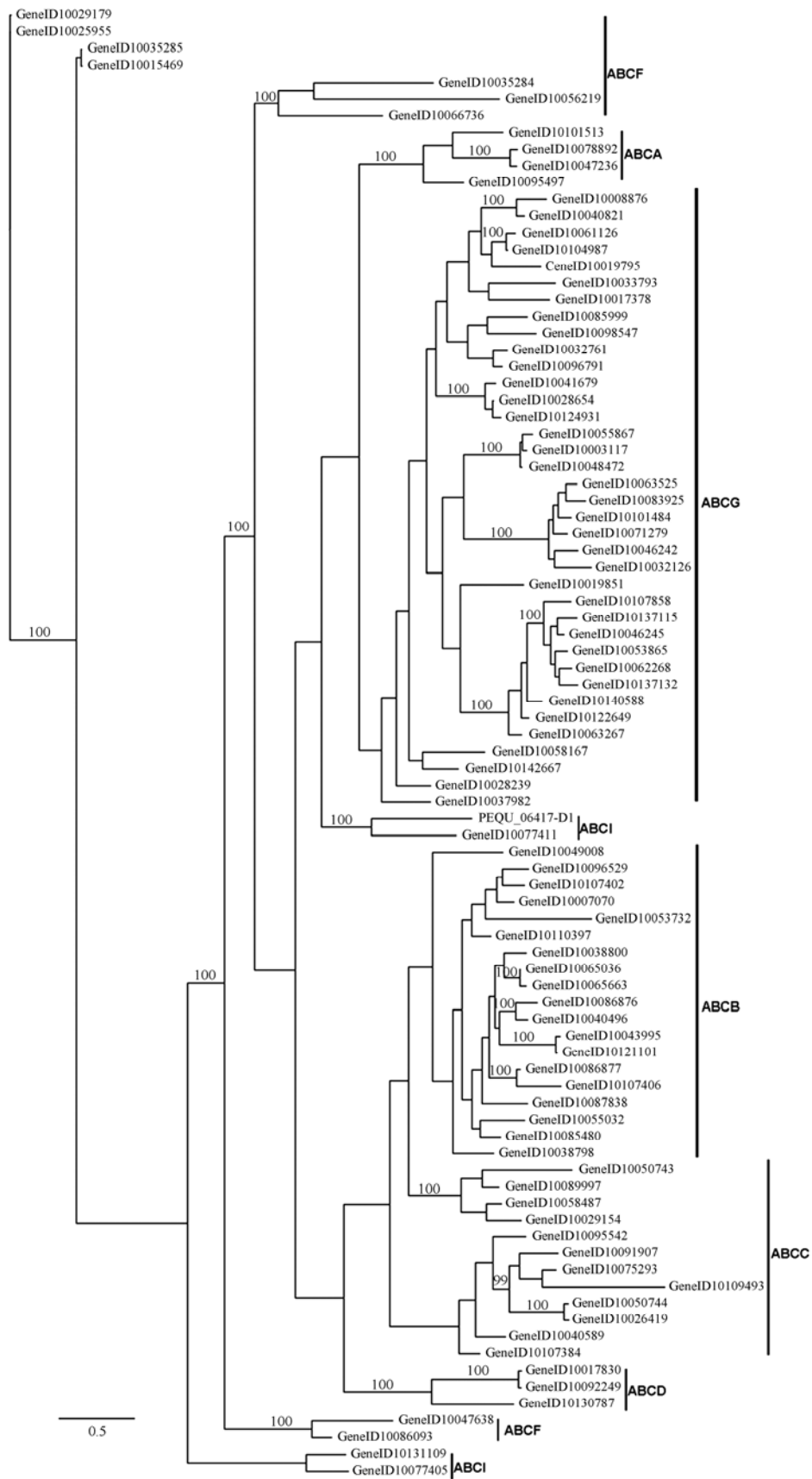


Figure 1 Phylogenetic relationship of 88 ABC transporters in *D. officinale*. Amino acid sequences of nucleotide-binding domains (NBDs) were aligned using Mafft and subjected to a majority tree by Mrbayes 3.0. Numbers above the branches indicate $\geq 95\%$. The end of the branch indicates the gene ID

和 *Dendrobium_GLEAN_10077405* 聚在一支。同样, ABCF 家族的 9 个蛋白也被分成 4 个小分支, 其中 2 支有 100% 的后验概率。

3 铁皮石斛 ABC 转运蛋白功能预测及亚细胞定位

为进一步理解铁皮石斛 ABC 转运蛋白各家族成员的潜在功能, 本文分别对各亚家族成员进行了功能预测。

铁皮石斛中鉴定的 4 个 ABCA 蛋白中, 2 个是半分子转运蛋白 (*Dendrobium_GLEAN_10101513*; *Dendrobium_GLEAN_10047236*), 分别含有 578 个和 751 个氨基酸; 另外两个蛋白属可溶性转运蛋白 (其 NBD 和 TMD 存在于不同的多肽上), 预测的功能属于药物输出 (the drug exporter-1)。Blastp 比对结果显示其与小果野蕉 (*Musa acuminata* subsp. *malaccensis*)、海枣 (*Phoenix dactylifera*) 及烟草 (*Nicotianatabacum*) 的 ABCA7 有 79%~85% 的相似性。植物中的 ABCA7 的功能尚不明确, ABCA7 在人体上已鉴定为与阿尔茨海默病 (AD) 相关^[29]。

ABCB 亚家族已知是植物 ABC 转运蛋白中的第二大亚家族。拟南芥和水稻中分别鉴定了 22 个和 24 个, 在铁皮石斛中, 鉴定了 19 个 ABCB 亚家族蛋白, 大致分为 5 类, 其中多药耐药性蛋白 (multidrug resistance protein, MDR) 占 15 个, 重金属转运蛋白及脂转运蛋白各 2 个。全分子转运蛋白 *Dendrobium_GLEAN_10055032* 与小兰屿蝴蝶兰 (*Phalaenopsis equestris*) 转运蛋白有同源性, *Dendrobium_GLEAN_10086877* 和 *Dendrobium_GLEAN_10107406* 与水稻和拟南芥的 ABCB4 家族成员有同源性。拟南芥 *AtABCB4* 被认为是生长素输入/输出蛋白, 可能参与了生长素的极性运输^[30]。

铁皮石斛中一共鉴定了 12 个 ABCC 家族蛋白, 包括 3 个全分子转运蛋白 (*Dendrobium_GLEAN_10095542*; *Dendrobium_GLEAN_10040589*; *Dendrobium_GLEAN_10107384*)、4 个半分子转运蛋白、3 个可溶性转运蛋白和 2 个 3/4 分子转运蛋白。最大的蛋白包含 1 601 个氨基酸, 最小的蛋白包含 247 个氨基酸。这些蛋白与水稻中的 ABCC3、ABCC8、ABCC10、ABCC13、ABCC14、ABC15 以及烟草中的 ABCC2 有同源性。已知拟南芥同源蛋白 *AtABCC2*、*AtABCC10* 是与病原菌反应相关蛋白。人类 ABCC 家族蛋白主要是多药耐药相关蛋白 (multidrug resistance associated protein, MRP), 在植物中, ABCC 蛋白主要参与细胞内的解毒作用、叶绿素代谢物的运输以及离子通道的调节等^[2]。

铁皮石斛中发现 3 个 ABCD 亚家族蛋白, 其中 2 个蛋白 (*Dendrobium_GLEAN_10017830*; *Dendrobium_GLEAN_10092249*) 与兰科蝶兰属的 ABCD2 关系近缘 (序列相似性分别为 72% 和 75%)。而 *Dendrobium_GLEAN_10130787* 编码的 ABCD 转运蛋白与水稻、玉米、棉花的 ABCD1 关系较近。拟南芥 *AtABCD1* 蛋白是过氧化物酶体吸收底物分子以进行氧化反应和乙醛酸循环所必须的, *AtABCD1* 基因突变后, 会导致种子不萌发或者不育^[31]。从亚细胞定位来看, 铁皮石斛的 3 个 ABCD 亚家族蛋白多定位在细胞核和线粒体上, 可能具有类似拟南芥 *AtABCD1* 的功能, 尚待进一步研究。

铁皮石斛基因组中共鉴定了 9 个 ABCF 亚家族蛋白, 而在拟南芥和水稻基因组中分别鉴定了 5 个。研究表明, 植物中的 ABCF 蛋白一般无跨膜结构域 (TMD), 含有两个 NBD 区域。铁皮石斛 ABCF 家族蛋白同样具有这样的特点。Blastp 分析显示铁皮石斛 ABCF 蛋白与水稻、兰科蝶兰属 ABCF5、拟南芥 ABCF4 存在较高的氨基酸序列相似性。然而, 目前有关植物中的 ABCF 蛋白的功能尚不清楚。

ABCG 蛋白家族是植物 ABC 转运蛋白中最大的亚家族, 拟南芥和水稻中分别包含 44 及 51 个成员。在铁皮石斛中发现 37 个该家族成员, 其中 14 个蛋白为多效耐药性型转运蛋白 (the pleiotropic drug resistance family, PDR)、23 个蛋白鉴定为果蝇色素转运蛋白 (the eye pigment precursor transporter, EPP)。Blastp 比对分析表明这些蛋白与水稻 ABCG49、拟南芥 *AtABCG32*、*AtABCG19*、*AtABCG11* 等蛋白有同源性。已知拟南芥 ABCG19 可以转运抗生素, 为转基因工程中必需的选择性标记基因提供新的基因来源。ABCG11 参与角质层与蜡质组分的跨膜运输, 也可能参与了植物激素细胞分裂素的运输, ABCG32 在转运角质前体物质方面发挥重要作用, 而 ABCG40 与 ABCG25 分别参与植物细胞脱落酸 (abscisic acid, ABA) 的吸收与外排, 对于植物迅速、有效地响应逆境胁迫具有重要作用^[32]。关于 ABCG 蛋白转运功能研究较多, 现已明确其在植物器官发育、表皮角质层形成、激素运输、次生代谢产物分泌、抵抗生物和非生物胁迫以及植物与微生物互作方面具有重要作用。

铁皮石斛 4 个 ABCI 蛋白均没有跨膜结构域, 仅有 1 个核苷酸结合结构域, 蛋白同源性比较分析显示其与兰科蝶兰属 ABCI19 和 ABCI20 有较高的序列相似性, 其功能预测可能参与饱和或不饱和的寡半乳糖醛酸苷转运 (TCDB 3.A.1.11.1)。

4 ABC 转运蛋白在铁皮石斛种子各萌发级别中的表达模式

基于 RNA-Seq 转录组数据, 所有分析的 88 个 ABC 转运蛋白在铁皮石斛种子不同萌发阶段 (未萌发种子为 C0, 无菌萌发 2 级 A1, 3 级 A2, 4 级 A3; 共生萌发 2 级 S1, 3 级 S2, 4 级 S3) 的差异表达分析如图 2 所示。首先, 这些蛋白在铁皮石斛种子无菌及共生萌发的早期阶段有相似的表达模式; 其次, ABC 转运蛋白各亚家族有多样的表达模式, 每个亚家族均有成员在无菌或共生萌发的不同阶段差异表达。比如 4 个 ABCG 蛋白 (Dendrobium_GLEAN_10058167; Dendrobium_GLEAN_10041679; Dendrobium_GLEAN_10037982; Dendrobium_GLEAN_10028239) 和 2 个 ABCB 蛋白 (Dendrobium_GLEAN_10086877; Dendrobium_GLEAN_10038800) 在种子无菌和共生萌发的早期阶段 (萌发 2 级, 种皮破裂, 萌发启动) 相对未萌发的种子, 均呈现差异上调表达, 而且在共生萌发 3 级 (原球茎形成) 依旧持续表达, 尽管表达量没有早期阶段高, 但在无菌萌发启动后续的阶段, 这些蛋白的表达量不明显。在无菌和共生萌发早期表达量最高的 3 个蛋白是 ABCC (Dendrobium_GLEAN_10109493) 和 ABCG (Dendrobium_GLEAN_10058167; Dendrobium_GLEAN_10041679) 家族成员, 相比未萌发的种子, 这 3 个蛋白编码基因在种子萌发启动阶段是高表达的 (fold change > 100), 表明其可能参与铁皮石斛的种子萌发过程。这 3 个蛋白与多种植物 ABCC14、ABCG23、ABCG6 具有较高的蛋白序列同源性。此外, 1 个 ABCF 蛋白 (Dendrobium_GLEAN_10029179) 和 1 个 ABCG 蛋白 (Dendrobium_GLEAN_10040821) 在无菌萌发的早期阶段差异上调表达, 但是在相同级别的共生萌发中没有表达, 而是延后到苗发育阶段, 显示出显著的差异上调表达。无菌萌发条件下的原球茎形成阶段 (萌发至 2~3 级), 3 个 ABCB 蛋白 (Dendrobium_GLEAN_10107402; Dendrobium_GLEAN_10107406; Dendrobium_GLEAN_10086876)、1 个 ABCF 蛋白 (Dendrobium_GLEAN_10035284) 和 2 个 ABCG 蛋白 (Dendrobium_GLEAN_10032126; Dendrobium_GLEAN_10008876) 是显著上调表达。其中 Dendrobium_GLEAN_10035284、Dendrobium_GLEAN_10086876 和 Dendrobium_GLEAN_10107402 三个蛋白同样也在接菌共生的原球茎阶段上调表达。这些蛋白与已知的多种植物的 ABCB11、ABCB21、ABCB4、ABCF5、ABCG3 和 ABCG11 蛋白序列有同源性。

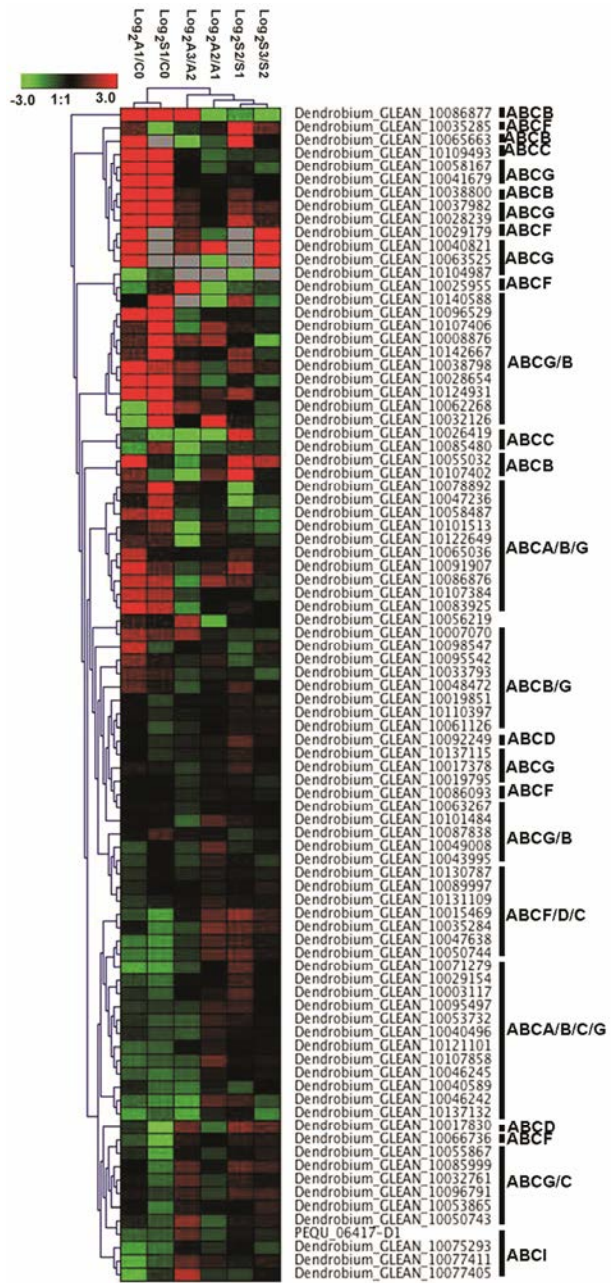


Figure 2 Differential expression of ABC transporters at adjacent development stage during asymbiotic or symbiotic germination of *D. officinale*. The codes on the right are the gene ID numbers of the 88 ABC transporters in *D. officinale*. Heat map was conducted on a log₂ fold change. Red indicates the up-regulated gene; green indicates the down-regulated gene; black represents no significant expression change; grey represents missing data. C0 represents ungerminated seed; A1, A2, and A3 represent developmental stage 2, stage 3, and stage 4 in asymbiotic germination, and S1, S2, and S3 represent stage 2, stage 3, and stage 4 in symbiotic germination, respectively

5 ABC 转运蛋白在铁皮石斛种子共生萌发过程中的表达模式

对比无菌萌发, 88 个 ABC 转运蛋白在共生萌发阶段的表达模式分析见图 3。ABCB 和 ABCG 蛋白

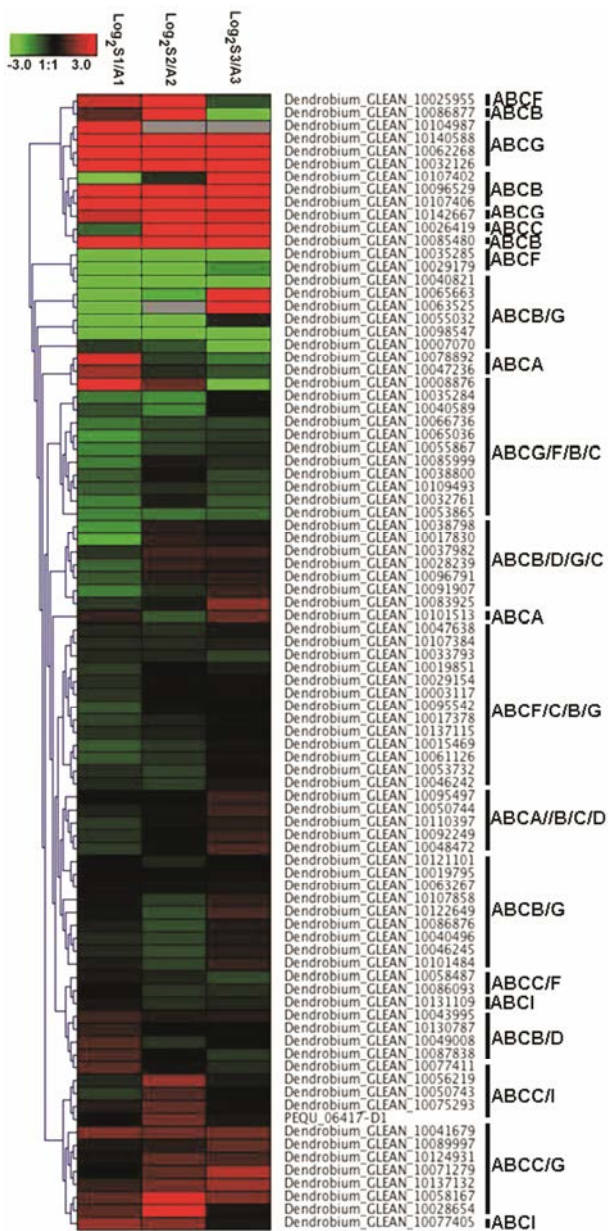


Figure 3 Expression profiles of 88 ABC transporters between asymbiotic and symbiotic germination of *D. officinale* seeds. The codes on the right are the gene ID numbers of the 88 ABC transporters in *D. officinale*. Heat map was conducted on a log2 fold change. Red indicates the up-regulated gene; green indicates the down-regulated gene; black represents no significant expression change. A1, A2 and A3 represent developmental stage 2, stage 3 and stage 4 in asymbiotic germination, and S1, S2 and S3 represent stage 2, stage 3 and stage 4 in symbiotic germination

家族成员在铁皮石斛种子接菌共生萌发中显著上调表达, 如 3 个 ABCB (*Dendrobium_GLEAN_10096529*; *Dendrobium_GLEAN_10107406*; *Dendrobium_GLEAN_10085480*)、6 个 ABCG (*Dendrobium_GLEAN_10140588*; *Dendrobium_GLEAN_10058167*; *Dendrobium_GLEAN_10142667*; *Dendrobium_GLEAN_10041679*; *Dendrobium_GLEAN_10062268*; *Dendrobium_GLEAN_10032126*)

蛋白在接菌共生萌发的整个过程均显著上调表达。除此之外, ABCC 蛋白家族成员 (*Dendrobium_GLEAN_10056219*; *Dendrobium_GLEAN_10050743*; *Dendrobium_GLEAN_10075293*) 在接菌共生萌发中原球茎形成阶段 (3 级) 显著上调表达, 在其他阶段, 相比无菌萌发其表达没有明显差异。ABCB (*Dendrobium_GLEAN_10065663*) 和 ABCG 蛋白 (*Dendrobium_GLEAN_10063525*) 在共生萌发成苗阶段 (4 级) 显著上调。2 个 ABCA 蛋白 (*Dendrobium_GLEAN_10078892*; *Dendrobium_GLEAN_10047236*) 则主要在共生萌发早期阶段显著上调表达。ABC 转运蛋白在种子无菌和共生萌发过程中的表达分析表明, ABCB 和 ABCG 家族成员主要参与了种子萌发及在种子萌发过程中与微生物的相互作用, 而 ABCA、ABCC 及 ABCF 亚家族也有部分蛋白参与该过程。

6 qPCR 验证 ABC 转运蛋白基因在铁皮石斛种子萌发中的差异表达

铁皮石斛转录组数据分析表明, ABCG 和 ABCB 蛋白在铁皮石斛种子无菌及接菌共生萌发过程中表达模式最多样, 且在种子萌发不同阶段差异表达的蛋白数量最多。qPCR 结果 (图 4) 显示, ABCG 和 ABCB 转运蛋白相关基因在无菌及接菌共生萌发不同级别间均有表达, 且相对表达量存在差异。以未萌发的种子 (0 级) 为参照样本, 显示 ABCB 蛋白 (*Dendrobium_GLEAN_10096529*) 和 ABCG 蛋白 (*Dendrobium_GLEAN_10062268*; *Dendrobium_GLEAN_10032126*; *Dendrobium_GLEAN_10140588*) 基因在种子共生萌发中持续上调表达并且在成苗阶段表达量最高, 与图 3 中分析结果一致, 确定这些基因在铁皮石斛种子接菌共生萌发过程中发挥重要作用, 下一步工作将对这几个候选蛋白基因做进一步的基因功能验证。

ABC 转运蛋白已知在所有生物体中普遍存在且功能多样, 参与植物激素、脂质、糖类、无机盐、重金属、次生代谢物等分子的跨膜运输。ABCB 和 ABCF 亚家族蛋白已报道主要参与植物的解毒和抗逆境胁迫过程。因此, 在农作物的改良方面有很好的应用^[1]。此外, ABC 转运蛋白在植物与微生物相互作用过程中以及病原菌侵染过程中均起着重要的作用。半分子 ABC 转运蛋白 ABCG 家族成员 STR1 和 STR2 是菌根建立不可或缺的调控蛋白^[33]。

植物与真菌相互作用过程中, 需要持续不断的营养和信号交换, 而 ABC 转运蛋白是转运蛋白家族中最大的一个分支, 且在植物和真菌中都存在。ABC 转运蛋白在菌根共生关系的建立过程的关键作用最

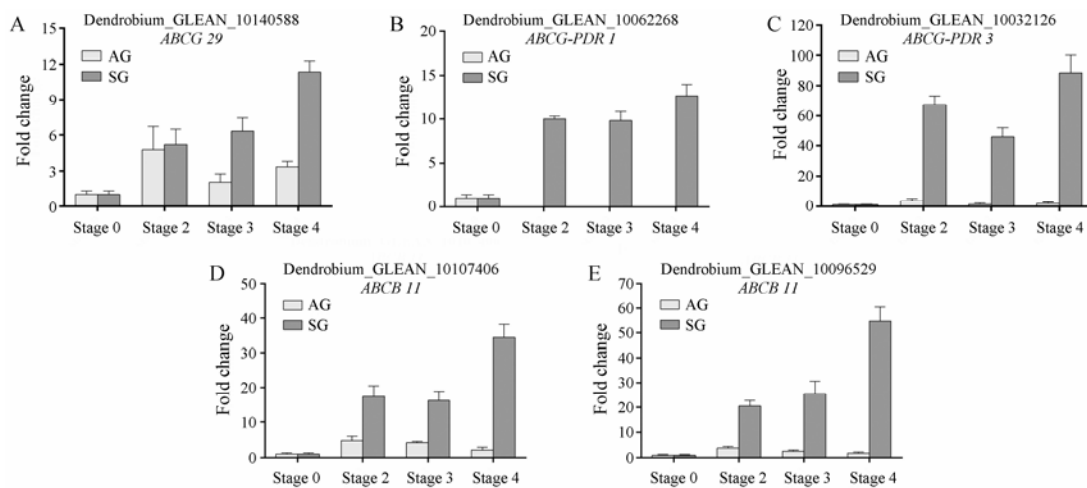


Figure 4 Expression patterns of ABCG and ABCB transporter genes using qPCR analysis. Stage 0 represents ungerminated seed; Stage 2, stage 3, stage 4 represent seed developmental stage 1–2, stage 3 and stage 4; AG: Asymbiotic germination; SG: Symbiotic germination

近已经被阐释^[34]。铁皮石斛种子接菌共生萌发是一个非常复杂的过程, 不仅涉及到种子萌发、发育成苗的过程, 还涉及了植物与真菌相互识别, 建立共生联系的过程。转录组数据分析表明, ABCC (Dendrobium_GLEAN_10109493) 和 ABCG (Dendrobium_GLEAN_10058167; Dendrobium_GLEAN_10041679) 蛋白无论是无菌还是共生萌发条件下, 都在种子启动萌发阶段差异上调表达。在铁皮石斛种子萌发不同阶段及无菌和接菌共生萌发不同处理组之间, ABCB、ABCG 及 ABCF 家族成员均表现出表达变化差异, 表明这些蛋白可能参与了铁皮石斛生长、发育及与微生物互作过程。在铁皮石斛种子萌发不同阶段, 与未萌发的种子相比, 3 个最高差异表达的蛋白 ABCC (Dendrobium_GLEAN_10109493) 和 ABCG (Dendrobium_GLEAN_10058167; Dendrobium_GLEAN_10041679) 蛋白序列比对分析显示它们与多种植物 ABCC14 或 ABCC4 有同源性。ABCC 亚家族成员的功能主要集中在对重金属的解毒, 但拟南芥 AtABCC1 和 AtABCC2 也能介导 ABA-GE 的运输, 参与细胞内 ABA 的动态平衡^[35], 因此推测高表达的铁皮石斛中的 ABCC 蛋白可能具有类似的功能, 参与 ABA 的动态平衡, 进而影响种子萌发过程。

ABCG 转运蛋白在植物器官发育、表皮角质层形成、激素运输、次生代谢产物分泌、抵抗生物和非生物胁迫以及植物与微生物互作方面具有重要作用^[32]。种子萌发的整个过程中, 2 个高表达的 ABCG 蛋白 (Dendrobium_GLEAN_10058167; Dendrobium_GLEAN_10041679) 与烟草、小兰屿蝴蝶兰等多种植物 ABCG23、ABCG6 或 ABCG1 蛋白有同源性, 但是有

关这两个蛋白功能的研究较少。相对无菌萌发, 在铁皮石斛种子接菌共生萌发阶段, ABCA、ABCB、ABCG、ABCF 蛋白家族成员显著上调表达。已知铁皮石斛共生萌发阶段高表达的 ABCB 蛋白与拟南芥 ABCB19 同源, 拟南芥 ABCB19 主要参与植物生长素的运输。铁皮石斛种子萌发过程中, 植物激素是一个主要的内源调控因子, 而且植物激素作为信号分子和植物与微生物的共生信号之间存在交互作用。与脱落酸和生长素运输相关的 ABC 蛋白在铁皮石斛种子萌发过程中的高表达, 暗示这些蛋白参与了铁皮石斛种子萌发和生长发育等重要过程。

综上, 对铁皮石斛 88 个 ABC 转运蛋白中, 两大亚类 ABCB 和 ABCG 中的部分成员通过功能预测和蛋白编码基因在种子萌发过程中的表达分析, 预测了它们可能参与了生长素、脱落酸等植物激素的运输, 进而调控了种子的萌发及与微生物的相互作用。有关这些基因的确切的功能将在后续的工作中进一步的验证。

References

- [1] Lane TS, Rempe CS, Davitt J, et al. Diversity of ABC transporter genes across the plant kingdom and their potential utility in biotechnology [J]. BMC Biotechnol, 2016, 16: 47.
- [2] Wang XZ, Sun WM, Ma Y, et al. Research progress of ABC transporters in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Physiol J (植物生理学报), 2017, 53: 133–144.
- [3] Verrier PJ, Bird D, Bo B, et al. Plant ABC proteins – a unified nomenclature and updated inventory [J]. Trends Plant Sci, 2008, 13: 151–159.

- [4] Garcia O, Bouige P, Forestier C, et al. Inventory and comparative analysis of rice and *Arabidopsis* ATP-binding cassette (ABC) systems [J]. *J Mol Biol*, 2004, 343: 249–265.
- [5] Xie XD. Identification and Functional Characterization of *Nicotiana Tabacum* ABC Transporters Involved in the Transport of Secondary Metabolites (烟草 ABC 转运蛋白家族鉴定及次生代谢物质转运的功能研究) [D]. Chongqing: Chongqing University, 2014.
- [6] Tang H, Zhao T, Sheng Y, et al. *Dendrobium officinale* Kimura et Migo: a review on its ethnopharmacology, phytochemistry, pharmacology, and industrialization [J]. *Evid-Based Compl Alt*, 2017, 2017: 7436259. DOI: 10.1155/2017/7436259.
- [7] Selosse MA, Boullard B, Richardson D. Noël Bernard (1874–1911): orchids to symbiosis in a dozen years, one century ago [J]. *Symbiosis*, 2011, 54: 61–68.
- [8] Li Q, Ding G, Li B, et al. Transcriptome analysis of genes involved in dendrobine biosynthesis in *Dendrobium nobile* Lindl. infected with mycorrhizal fungus MF23 (*Mycenasp.*) [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 316.
- [9] Wang H, Fang H, Wang Y, et al. *In situ* seed baiting techniques in *Dendrobium officinale* Kimura et Migo and *Dendrobium nobile* Lindl.: the endangered Chinese endemic *Dendrobium* (Orchidaceae) [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2011, 27: 2051–2059.
- [10] Kuga Y, Sakamoto N, Yurimoto H. Stable isotope cellular imaging reveals that both live and degenerating fungal pelotons transfer carbon and nitrogen to orchid protocorms [J]. *New Phytol*, 2014, 202: 594–605.
- [11] Chen J, Liu S, Kohler A, et al. iTRAQ and RNA-Seq analyses provide new insights into regulation mechanism of symbiotic germination of *Dendrobium officinale* seeds (Orchidaceae) [J]. *J Proteome Res*, 2017, 16: 2174.
- [12] Stec N, Banasiak J, Jasiński M. Abscisic acid – an overlooked player in plant-microbe symbioses formation? [J]. *Acta Biochim Pol*, 2016, 63: 53.
- [13] Foo E, Mcadam EL, Weller JL, et al. Interactions between ethylene, gibberellins, and brassinosteroids in the development of rhizobial and mycorrhizal symbioses of pea [J]. *J Exp Bot*, 2016, 67: 2413–2424.
- [14] Lópezráez JA, Shirasu K, Foo E. Strigolactones in plant interactions with beneficial and detrimental organisms: the yin and yang [J]. *Trends Plant Sci*, 2017, 22: 527–537.
- [15] Kovalchuk A, Kohler A, Martin F, et al. Diversity and evolution of ABC proteins in mycorrhiza-forming fungi [J]. *BMC Evol Biol*, 2015, 15: 1–19.
- [16] Yan C, Duan W, Lyu S, et al. Genome-wide identification, evolution, and expression analysis of the ATP-binding cassette transporter gene family in *Brassica rapa* [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 349.
- [17] Li YM, Lei GP, Yan YG, et al. Molecular cloning and expression analysis of two genes encoding F family ATP-binding cassette transporters in *Dendrobium officinale* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2017, 48: 3153–3159.
- [18] Li Yi, Zhang N, Shen X, et al. Identification and expression analysis of four CIPKs genes from a rare and medicinal plant, *Dendrobium officinale* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 304–312.
- [19] Zhang G, Li Y, Hu B, et al. Isolation and differential expression of novel MAP kinase gene DoMPK4 in *Dendrobium officinale* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2014, 49: 1076–1083.
- [20] Yan L, Wang X, Liu H, et al. The genome of *Dendrobium officinale* illuminates the biology of the important traditional Chinese orchid herb [J]. *Mol plant*, 2015, 8: 922–934.
- [21] Stewart SL, Zettler LW, Minso J, et al. Symbiotic germination and reintroduction of *Spiranthes brevilabris* Lindley, an endangered orchid native to Florida [J]. *Selbynan*, 2003, 24: 64–70.
- [22] Saier MH, Reddy VS, Tsu BV, et al. The transporter classification database (TCDB): recent advances [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44: D372–D379.
- [23] Dean M, Hamon Y, Chimini G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily [J]. *Genome Res*, 2001, 11: 1156.
- [24] Sánchezfernández R, Davies TG, Coleman JO, et al. The *Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily, a complete inventory [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 30231–30244.
- [25] Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes 3: bayesian phylogenetic inference under mixed models [J]. *Bioinformatics*, 2003, 19: 1527–1574.
- [26] Santorum JM, Darriba D, Taboada GL, et al. Jmodeltest.org: selection of nucleotide substitution model on the cloud [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30: 1310–1311.
- [27] Sturn A, Quackenbush J, Trajanoski Z. Genesis: cluster analysis of microarray data [J]. *Bioinformatics*, 2002, 18: 207–208.
- [28] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Method*, 2001, 25: 402–408.
- [29] Vasquez JB, Simpson JF, Harpole R, et al. Alzheimer's disease genetics and ABCA7 splicing [J]. *J Alzheimers Dis*, 2017, 59: 233–241.
- [30] Kaneda M, Schuetz M, Lin BS, et al. ABC transporters coordinately expressed during lignification of *Arabidopsis*

- stems include a set of ABCBs associated with auxin transport [J]. *J Exp Bot*, 2011, 62: 2063–2077.
- [31] Baker A, Carrier DJ, Schaedler T, et al. Peroxisomal ABC transporters: functions and mechanism [J]. *Biochem Soc Trans*, 2015, 43: 959–965.
- [32] Zhang J, Chen MC, Ma Q, et al. Review of advances in the study of plant ABCG transporter [J]. *Acta Pratacult Sin (草业学报)*, 2015, 24: 180–188.
- [33] Gutjahr C, Radovanovic D, Geoffroy J, et al. The half-size ABC transporters STR1 and STR2 are indispensable for mycorrhizal arbuscule formation in rice [J]. *Plant J*, 2012, 69: 906–920.
- [34] Shabani L, Sabzalian MR, Mostafavi PS. *Arbuscular mycorrhiza* affects nickel translocation and expression of ABC transporter and metallothionein genes in *Festucaarundinacea* [J]. *Mycorrhiza*, 2015, 26: 67–76.
- [35] Burla B, Pfrunder S, Nagy R, et al. Vacuolar transport of abscisic acid glucosyl ester is mediated by ATP-binding cassette and proton-antiport mechanisms in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2013, 163: 1446–1458.