

## 研究报告

## Research Report

# 铝胁迫下八仙花 ABC 转运蛋白基因家族的鉴定与生物信息学分析

陈海霞\* 王暄 许璐

湖南农业大学园艺学院, 湖南省中亚热带优质花木繁育与利用工程技术研究中心, 长沙, 410128

\* 通信作者, chenhaixia@hunau.edu.cn

**摘要** ABC 转运蛋白是一类广泛存在于原核和真核生物中的跨膜运输蛋白, 参与植物信号转导、次生代谢物运输和非生物胁迫响应等过程。本研究基于八仙花转录组数据, 利用生物信息学分析方法对铝胁迫下 ABC 转运蛋白基因家族成员、理化性质、基因结构、系统发育以及基因表达模式进行分析。结果表明八仙花 ABC 转运蛋白基因家族包括 48 个成员, 分别属于 7 个亚家族, 其中 C 亚家族成员最多; 亚细胞定位结果显示 50% 的家族成员位于质膜上; 理化性质和结构域分析显示绝大多数为疏水性蛋白, 不同亚家族均具有特异的保守基序, 但是 motif1 和 motif2 存在所有八仙花 ABC 转运蛋白中; 将拟南芥 129 个 ABC 转运蛋白构建系统发育树, 这 48 个八仙花的 ABC 转运蛋白分别聚在拟南芥的 7 个 ABC 亚家族中。表达谱分析结果发现, 铝胁迫处理后 *HmABCA1*、*HmABCC1*、*HmABCC6*、*HmABCC14* 和 *HmABCD1* 基因在根部上调表达, 仅 *HmABCG1* 基因在叶片中上调表达。该研究结果为进一步研究八仙花 ABC 转运蛋白基因的耐铝功能和表达调控提供了参考。

**关键词** 八仙花; 耐铝性; ABC 转运蛋白基因; 生物信息学

## Identification and Bioinformatics Analysis of ABC Transporter Gene Family in Hydrangea under Aluminum Stress

Chen Haixia\* Wang Xuan Xu Lu

Horticulture College of Hunan Agricultural University, Hunan Mid-subtropical Quality Plant Breeding and Utilization Engineering Technology Research center, Changsha, 410128

\* Corresponding author, chenhaixia@hunau.edu.cn

DOI: 10.5376/mpb.cn.2020.18.0049

**Abstract** ABC transporters is a type of transmembrane transporters widely found in prokaryotes and eukaryotes. They are involved in plant signal transduction, secondary metabolite transport and abiotic stress response. According to the transcriptome data of Hydrangea, this study was proposed analyze the members of ABC transporter gene family, physical and chemical properties, gene structure, phylogeny and gene expression patterns under aluminum stress using bioinformatics method. The results showed that there were 48 members of ABC transporter gene family in Hydrangea, which belonged to 7 subfamilies respectively, among which the C subfamily had the most members; the subcellular localization results showed that 50% of the family members were located on the plasma membrane; the physical and chemical properties and domain analysis showed that most of the ABC transporters were hydrophobic proteins, and different subfamilies had specific conserved motifs, but motif1 and motif2 were all present in hydrangea ABC transporter; A phylogenetic tree was constructed with 129 ABC transporters of Arabidopsis

本文首次发表在《分子植物育种》上, 现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License, 协议对其进行授权, 再次发表与传播

收稿日期: 2020 年 11 月 4 日; 接受日期: 2020 年 11 月 4 日; 发表日期: 2020 年 11 月 4 日

引用格式: 陈海霞, 王暄, 许璐, 2020, 铝胁迫下八仙花 ABC 转运蛋白基因家族的鉴定与生物信息学分析, 分子植物育种 (网络版), 18(49): 1-12 (doi: 10.5376/mpb.cn.2020.18.0049) (Chen H.X., Wang X., and Xu L., 2020, Identification and bioinformatics analysis of ABC transporter gene family in hydrangea under aluminum stress, Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding (online)), 18(49): 1-12 (doi: 10.5376/mpb.cn.2020.18.0049))

*thaliana*, and 48 ABC transporters from *Hydrangea* were clustered into 7 subfamilies of *Arabidopsis thaliana* respectively. The expression profile analysis showed that the *HmABCA1*, *HmABCC1*, *HmABCC6*, *HmABCC14* and *HmABCD1* gene were upregulated in the root and *HmABCG1* gene were up-regulated in leaves after aluminum stress treatment. The results provide a reference for further study on aluminum tolerance and expression regulation of ABC transporter genes in *hydrangea*.

**Keywords** *Hydrangea macrophylla*; Aluminum tolerance; ABC transporter genes; Bioinformatics

ABC 转运蛋白(ATP-binding cassette transporters) 是一类广泛存在于原核及真核生物的跨膜运输蛋白,能利用 ATP 水解产生的能量将底物进行跨膜运输,其底物种类包括糖、氨基酸、蛋白质和金属离子等多种生物分子,参与多种生物过程,如植物激素运输、信号转导、细胞解毒、病毒防御以及抗原传递等(Wilkens, 2015; Aryal et al., 2016)。ABC 转运蛋白家族具有保守结构,典型结构是由 2 个核苷酸结合结构域(NBD)和 2 个跨膜结构域(TMD)组成,其中 NBD 结构域相对保守,行使 ATP 水解酶功能,为跨膜运输提供能量,而 TMD 是跨膜通道,其结构及序列具有底物的特异性(Lane et al., 2016)。

20 世纪 90 年代初,首先在拟南芥中发现第一个 ABC 转运蛋白 *AtABCB1*,继而从水稻、烟草和玉米等 20 多种植物中鉴定出 ABC 转运蛋白,同时对 ABC 转运蛋白跨膜运输,吸收转运养分离子的机制,以及抵抗非生物逆境胁迫的机理等方面开展研究。ABC 转运蛋白可以提高作物对高温、干旱、盐碱以及重金属等非生物胁迫的抗性。研究表明位于拟南芥根尖液泡膜及脉管系统的 ABCB 转运蛋白 *AtABCB27/AtTAP2*,将铝以螯合肽结合物的形式转运至液泡中隔离起来,从而提高植物耐铝能力(Larsen et al., 2007)。从水稻中鉴定的 *OsSTAR1* 和 *OsSTAR2* 是响应铝胁迫的 ABC 转运蛋白基因,转运 UDP-葡萄糖来限制铝积累和降低铝毒,另一个半分子转运蛋白 *OsALS1* 定位于液泡膜,编码铝转运蛋白(Huang et al., 2012),随后在玉米、甜高粱和紫花苜蓿等植物中鉴定了同源基因,均属于编码与铝毒胁迫相关的 ABC 转运蛋白(宋文静等, 2013; 梁亚男, 2018)。

八仙花是一种富集铝植物,铝处理几个月时间即可使叶片中铝的积累量达 5 mg/g 干重,叶片细胞中含铝量为 15.7 mmol/kg 鲜重,这些铝被根吸收后运至植物体与柠檬酸以 1:1 的摩尔比螯合成无毒的柠檬酸-铝复合物,因此认为八仙花中应该存在铝离子的吸收、转运和贮存系统。为了阐明蓝色八仙花呈色与铝离子转运的相关性,首先从蓝色八仙花花萼中分离鉴定出两个分别位于质膜和液泡膜上的铝

离子转运蛋白基因 *HmPALT1* 和 *HmVALT*,它们均属于水通道蛋白家族(Negishi et al., 2012);从蓝色花萼中克隆出的氨基酸通透酶家族基因 *HmPALT2*,定位于质膜,在植物体所有组织均表达,参与众多离子的运输,也能将铝离子从细胞外转运至胞液(Negishi et al., 2013)。因此,八仙花植株内响应铝胁迫和富集铝的分子机理一直是研究热点。转录组测序结果表明,铝胁迫后八仙花根系和叶片中均有编码 ABC 转运蛋白的基因上调表达,但是未进行 ABC 转运蛋白基因家族的系统研究,其基因功能也不清(Chen et al., 2015)。本研究以八仙花转录组测序数据为研究对象,在基因功能注释库中以 ABC 转运蛋白为关键词进行筛选,对获得的 ABC 转运蛋白进行鉴定和生物信息学分析,探讨 ABC 转运蛋白家族与抗铝毒之间的关系,以期对 ABC 转运蛋白基因家族的功能挖掘提供理论依据。

## 1 结果与分析

### 1.1 八仙花 ABC 转运蛋白的鉴定及理化性质分析

对八仙花转录组中 95 714 条基因簇以 ABC 转运蛋白为关键词在 GO、NR 和 KEGG 这 3 个数据库中进行搜索,共有 208 条基因簇被注释,它们分别属于 7 个 ABC 转运蛋白亚家族,即 ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF 和 ABCG。使用 SMART 对 208 个 ABC 转运蛋白进行结构域预测,选取具有保守 NBDs 结构域作为最终筛选指标,共筛选出 48 个具有 NBDs 结构域的八仙花 ABC 转运蛋白(表 1)。

利用在线软件 ProtParam 预测八仙花 ABC 转运蛋白基因家族编码蛋白质理化性质(表 1),48 个八仙花 ABC 转运蛋白长度在 195~1 895 aa 之间,分子量理论值为 21 413.55~104 980.71。理论等电点(pI)为 5.18~9.49,其中等电点小于 7 的有 28 个,为酸性蛋白质,其余 20 个为碱性蛋白质。不稳定系数分析表明,38 个蛋白的不稳定系数小于 40,为稳定蛋白质,其余 10 个为不稳定蛋白质。脂肪系数 80.4~111.16,平均值为 96.33,其中脂肪系数高于 100 的有 19 个,相对较高的脂肪系数可以维持蛋白质良好的稳定

表 1 八仙花 ABC 转运蛋白家族成员及理化性质分析

Table 1 The ABC transporter protein family members and physico-chemical analysis in *Hydrangea*

基因 Gene	转录组编号 Transcriptome code	NBD 结构域(aa) NBD domain (aa)	蛋白质长度(aa) Number of Amino acids (aa)	分子量(ku) Molecular weight (ku)	等电点 Theoretical pI	不稳定指数 Instability index	脂肪系数 Aliphatic index	总平均亲水系数 Grand average of hydropathicity	亚细胞定位 Subcellular localization
<i>HmABCA1</i>	c200548.graph_c1	595~774	774	84 773.43	5.75	37.89	102.83	0.129	质膜
<i>HmABCA2</i>	c210858.graph_c0	555~379	965	107 091.19	6.54	41.09	89.35	0.066	Plasma membrane 质膜
<i>HmABCA3</i>	c211005.graph_c0	589~771 1 497~1 684	1 895	210 905.64	7.33	36.75	99.14	0.121	Plasma membrane 质膜
<i>HmAABCBI</i>	c162347.graph_c1	416~610	635	68 490.99	9.00	28.99	104.30	0.123	Plasma membrane 质膜
<i>HmAABC2</i>	c196483.graph_c0	212~398	463	49 762.13	9.07	33.23	92.76	-0.088	Plasma membrane 线粒体
<i>HmAABC3</i>	c221727.graph_c0	110~296	383	40 962.45	5.57	46.04	90.44	-0.095	Mitochondrion 叶绿体
<i>HmAABCC1</i>	c156671.graph_c0	342~521 949~1 136	1 156	127 494.92	6.00	39.57	106.31	0.133	Chloroplast 质膜
<i>HmAABCC2</i>	c158016.graph_c0	671~852 1 293~1 478	1 509	169 341.89	8.64	35.36	105.11	0.161	Plasma membrane 质膜
<i>HmAABCC3</i>	c163586.graph_c0	642~825 1 266~1 459	1 625	182 946.00	7.94	43.69	105.87	0.078	Plasma membrane 质膜
<i>HmAABCC4</i>	c176480.graph_c0	549~742	775	86 007.39	5.58	36.45	102.53	0.113	Plasma membrane 质膜
<i>HmAABCC5</i>	c185684.graph_c0	652~825 1 260~1 452	1 480	165 230.03	8.51	38.38	104.22	0.180	Plasma membrane 质膜
<i>HmAABCC6</i>	c194263.graph_c0	38~163 587~779	797	88 147.70	6.37	37.12	99.11	0.132	Plasma membrane 质膜
<i>HmAABCC7</i>	c199439.graph_c0	245~428 912~1 098	1 131	124 928.99	6.90	39.02	100.08	-0.028	Plasma membrane 质膜
<i>HmAABCC8</i>	c201746.graph_c0	607~781 1 220~1 410	1 431	159 549.09	6.38	43.29	107.38	0.279	Plasma membrane 质膜
<i>HmAABCC9</i>	c206954.graph_c0	71~261 737~923	952	104 331.25	6.28	39.93	101.36	-0.028	Plasma membrane 线粒体
<i>HmAABCC10</i>	c209063.graph_c0	665~807	807	90 561.23	8.98	29.85	110.36	0.287	Mitochondrion 质膜
									Plasma membrane

续表 1

Continuing table 1

基因 Gene	转录组编号 Transcriptome code	NBD 结构域(aa) NBD domain (aa)	蛋白质长度(aa) Number of Amino acids (aa)	分子量(ku) Molecular weight (ku)	等电点 Theoretical pI	不稳定指数 Instability index	脂肪系数 Aliphatic index	总平均亲水系数 Grand average of hydropathicity	亚细胞定位 Subcellular localization
<i>HmA</i> BCC11	c209888.graph_c0	101~274 699~895	943	104 980.71	5.94	35.19	95.96	-0.046	质膜 Plasma membrane
<i>HmA</i> BCC12	c210623.graph_c0	658~831	1 105	124 382.84	8.86	36.53	111.16	0.270	质膜 Plasma membrane
<i>HmA</i> BCC13	c210746.graph_c1	288~478 918~1108	1 160	129 578.10	7.55	33.29	94.38	-0.019	质膜 Plasma membrane
<i>HmA</i> BCC14	c211816.graph_c0	422~601	1 232	136 954.82	8.24	41.23	100.99	0.143	质膜 Plasma membrane
<i>HmA</i> BCC15	c211939.graph_c0	1 022~1 214 612~786	1 453	163 353.08	8.66	37.59	107.54	0.146	质膜 Plasma membrane
<i>HmA</i> BCC16	c211964.graph_c0	1 224~1 415 636~809	1 480	164 840.23	6.23	37.08	105.45	0.186	质膜 Plasma membrane
<i>HmA</i> BCC17	c212580.graph_c0	1 256~1 441 655~828	1 509	168 549.07	7.16	40.71	105.06	0.104	质膜 Plasma membrane
<i>HmA</i> BCD1	c145066.graph_c1	1 284~1 476 187~365	447	50 591.64	5.67	41.37	86.82	-0.452	叶绿体 Chloroplast
<i>HmA</i> BCD2	c181610.graph_c0	489~680	710	81 049.43	8.89	39.08	97.73	-0.167	叶绿体 Chloroplast
<i>HmA</i> BCD3	c185390.graph_c0	110~302	422	46 660.23	5.26	38.56	80.40	-0.501	叶绿体 Chloroplast
<i>HmA</i> BCD4	c190425.graph_c0	473~657	661	75 060.47	9.49	35.88	100.14	-0.089	叶绿体 Chloroplast
<i>HmA</i> BCD5	c201208.graph_c0	99~291	352	39 600.73	5.18	32.30	86.68	-0.500	叶绿体 Chloroplast
<i>HmA</i> BCD6	c207731.graph_c5	121~370	380	42 868.70	5.35	44.70	90.32	-0.269	叶绿体 Chloroplast
<i>HmA</i> BCD7	c210535.graph_c1	471~650 1 126~1 328	1 338	149 587.46	9.21	41.02	102.88	-0.053	质膜 Plasma membrane
<i>HmA</i> BCE1	c143732.graph_c0	19~187	248	27 992.16	9.11	29.09	87.22	-0.334	质膜 Plasma membrane
<i>HmA</i> BCE2	c180499.graph_c1	101~292 369~497	497	55 436.49	8.09	29.75	98.83	-0.137	细胞质 Cytoplasm

续表 1

Continuing table 1

基因 Gene	转录组编号 Transcriptome code	NBD 结构域(aa) NBD domain (aa)	蛋白质长度(aa) Number of Amino acids (aa)	分子量(ku) Molecular weight (ku)	等电点 Theoretical pI	不稳定指数 Instability index	脂肪系数 Aliphatic index	总平均亲水系数 Grand average of hydrophaticity	亚细胞定位 Subcellular localization
<i>HmaABCE3</i>	c197794.graph_c0	206~375	457	51 409.11	6.31	35.03	90.22	-0.295	叶绿体 Chloroplast
<i>HmaABCE4</i>	c207506.graph_c0	102~297 374~543	607	68 563.02	8.08	34.88	88.93	-0.312	Nucleus 细胞核
<i>HmaABCF1</i>	c120618.graph_c0	1~170	195	21 413.55	9.18	33.39	91.49	-0.202	叶绿体 Chloroplast
<i>HmaABCF2</i>	c173288.graph_c1	58~232	252	27 894.75	6.03	35.11	93.97	-0.206	叶绿体 Chloroplast
<i>HmaABCF3</i>	c177935.graph_c1	53~195	201	21 912.13	5.48	52.05	98.46	-0.069	质膜 Plasma membrane
<i>HmaABCF4</i>	c183630.graph_c0	251~381	388	43 383.37	6.20	39.10	88.04	-0.321	细胞核 Nucleus
<i>HmaABCF5</i>	c192449.graph_c0	58~236	271	30 341.90	6.80	30.80	93.99	-0.284	叶绿体 Chloroplast
<i>HmaABCF6</i>	c202770.graph_c1	227~510	557	61 901.62	6.82	33.74	80.70	-0.452	叶绿体 Chloroplast
<i>HmaABCF7</i>	c203124.graph_c0	195~397 527~703	728	81 305.86	5.85	36.92	83.17	-0.625	叶绿体 Chloroplast
<i>HmaABCF8</i>	c203715.graph_c0	320~487	578	63 657.96	5.85	34.35	87.23	-0.174	细胞质 Cytoplasm
<i>HmaABCF9</i>	c204186.graph_c0	97~299 409~576	599	57 010.75	6.03	35.15	89.45	-0.321	叶绿体 Chloroplast
<i>HmaABCF10</i>	c205016.graph_c0	74~268 383~550	571	65 497.26	5.77	39.96	93.43	-0.393	叶绿体 Chloroplast
<i>HmaABCF11</i>	c208754.graph_c0	106~309	614	68 354.81	6.54	31.41	87.39	-0.387	叶绿体 Chloroplast
<i>HmaABCF12</i>	c210038.graph_c0	471~638 714~991	1 063	118 017.55	6.08	33.75	88.69	-0.354	细胞质 Cytoplasm
<i>HmaABCF13</i>	c211855.graph_c0	485~650 727~1 009	1 068	116 716.78	6.21	35.29	94.22	-0.211	叶绿体 Chloroplast
<i>HmaABCG1</i>	c187439.graph_c0	99~289	661	73 932.17	9.08	39.41	101.74	0.101	质膜 Plasma membrane

性,有助于在不同环境中发挥正常的功能。总平均亲水系数为 $-0.625\sim-0.287$ ,其中30个为负数,说明大多数为疏水性蛋白,且疏水程度存在差异。

通过对八仙花 ABC 转运蛋白基因家族进行亚细胞定位分析,发现在质膜、叶绿体、线粒体、细胞质及细胞核上均有分布。3个 ABCA 亚家族基因均位于质膜上;3个 ABCB 亚家族基因分别位于质膜、线粒体和叶绿体;17个 ABCC 亚家族基因大部分位于质膜,仅有1个位于线粒体;ABCD 亚家族基因中仅1个位于质膜,其余6个位于叶绿体;ABCE 亚家族的4个基因分别位于质膜、细胞质、叶绿体和细胞核;13个 ABCF 亚家族基因在质膜、细胞质、叶绿体

和细胞核均有分布;1个 ABCG 亚家族基因则位于质膜。因此,有50%的八仙花 ABC 转运蛋白基因位于质膜,其中94.1%的 ABCC 亚家族基因在质膜上,这与已知的植物 ABC 转运蛋白具有共性,说明 ABC 转运蛋白家族在功能上具有一定的保守性,且在跨膜物质运输和信息传递过程中发挥作用。

## 1.2 八仙花 ABC 转运蛋白系统发育分析

根据序列相似性作为基因亚家族分类依据,利用 ClustalW 软件对48个八仙花 ABC 转运蛋白序列构建系统进化树(图1),八仙花 ABC 转运蛋白家族成员可分成7个亚家族,其中 ABCC 亚家族含有的

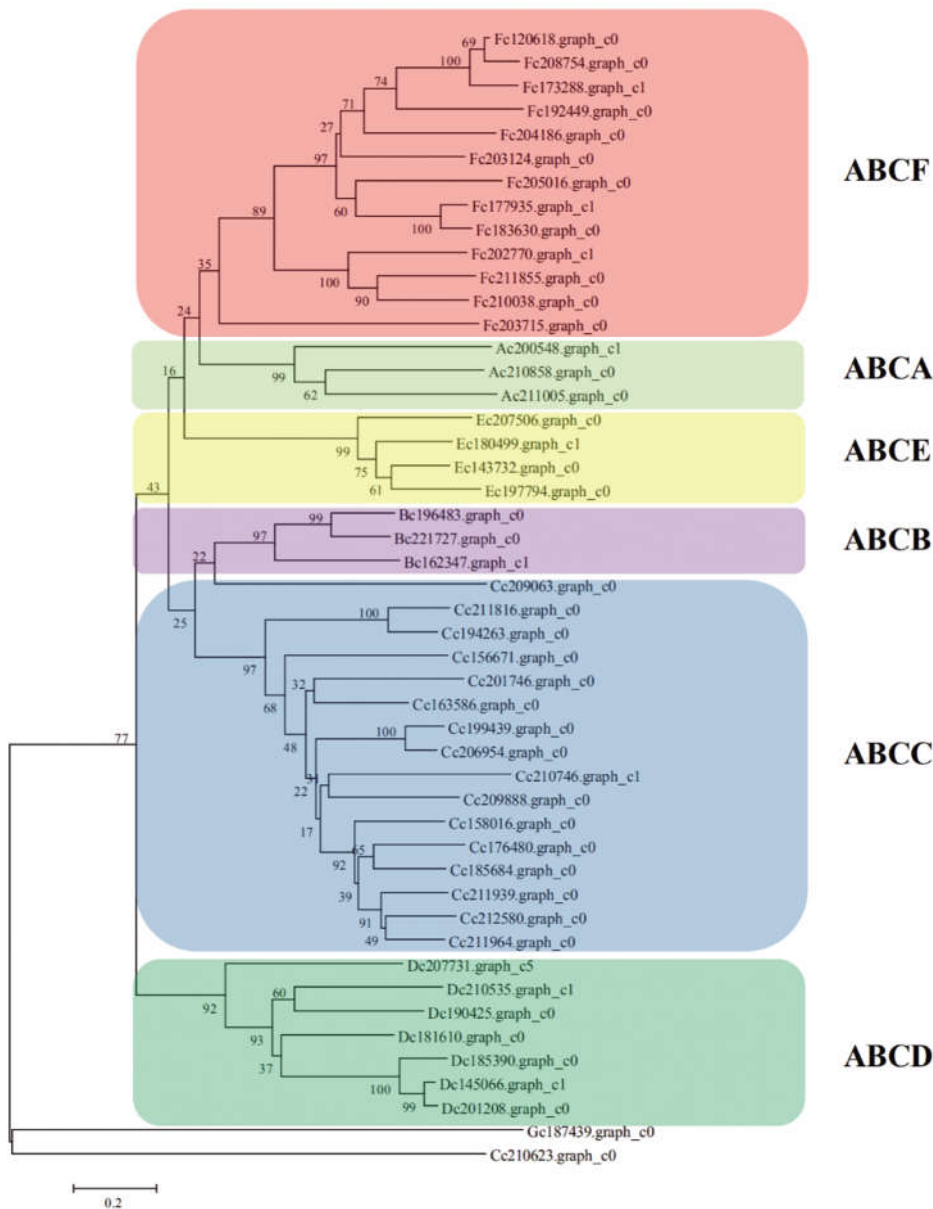


图1 八仙花 ABC 转运蛋白进化树

Figure 1 Evolution tree of ABC transporter in Hydrangea

蛋白成员最多达 17 个,其次是 ABCF 亚家族的蛋白成员为 13 个。ABCC 亚家族蛋白是全分子的 ABC 转运蛋白,在植物中参与众多的生理过程,包括维持细胞内平衡、金属解毒和转运谷胱甘肽扼合物等(Wilkens, 2015),在水稻和拟南芥基因组中已分别鉴定出 17 和 15 个 ABCC 转运蛋白成员,由此推测,在铝胁迫下八仙花 ABCC 转运蛋白可能参与了铝离子跨膜运输。八仙花 ABCB 和 ABCC 转运蛋白亚家族位于同一分支,推测这两个亚家族基因具有同源性。ABCF 亚家族中的蛋白属于可溶性 ABC 蛋白,具有两个核酸结构域,没有跨膜结构域,研究发现拟南芥中 *ABCF3* 基因在响应铝胁迫过程中发挥重要作用(李爽, 2018),因此,推测八仙花 ABCF 亚家族基因也可能参与响应铝胁迫过程。

为了进一步研究八仙花 ABC 转运蛋白家族成员的进化关系,利用拟南芥已公布的 129 条 ABC 蛋白序列与八仙花 48 条蛋白序列构建系统发育树(图 2),参考 Sanchez-Fernandez 等(2001)将拟南芥 129 条 ABC 转运蛋白归为 7 个亚家族,采用邻位连接法,这 48 个八仙花 ABC 转运蛋白也相应地聚类到 7 个亚家族。因此,依据系统发育树的位置可以初步鉴定八仙花 ABC 转运蛋白的功能。

### 1.3 八仙花 ABC 转运蛋白结构域与保守基序分析

利用 CD-search 对八仙花 ABC 蛋白结构域进行分析表明,每个蛋白都有一个或者两个高度保守的核苷酸结构域,部分亚家族含有数个跨膜结构域(图 3; 表 1)。具有两个核苷酸结构域的 ABC 转运蛋白有

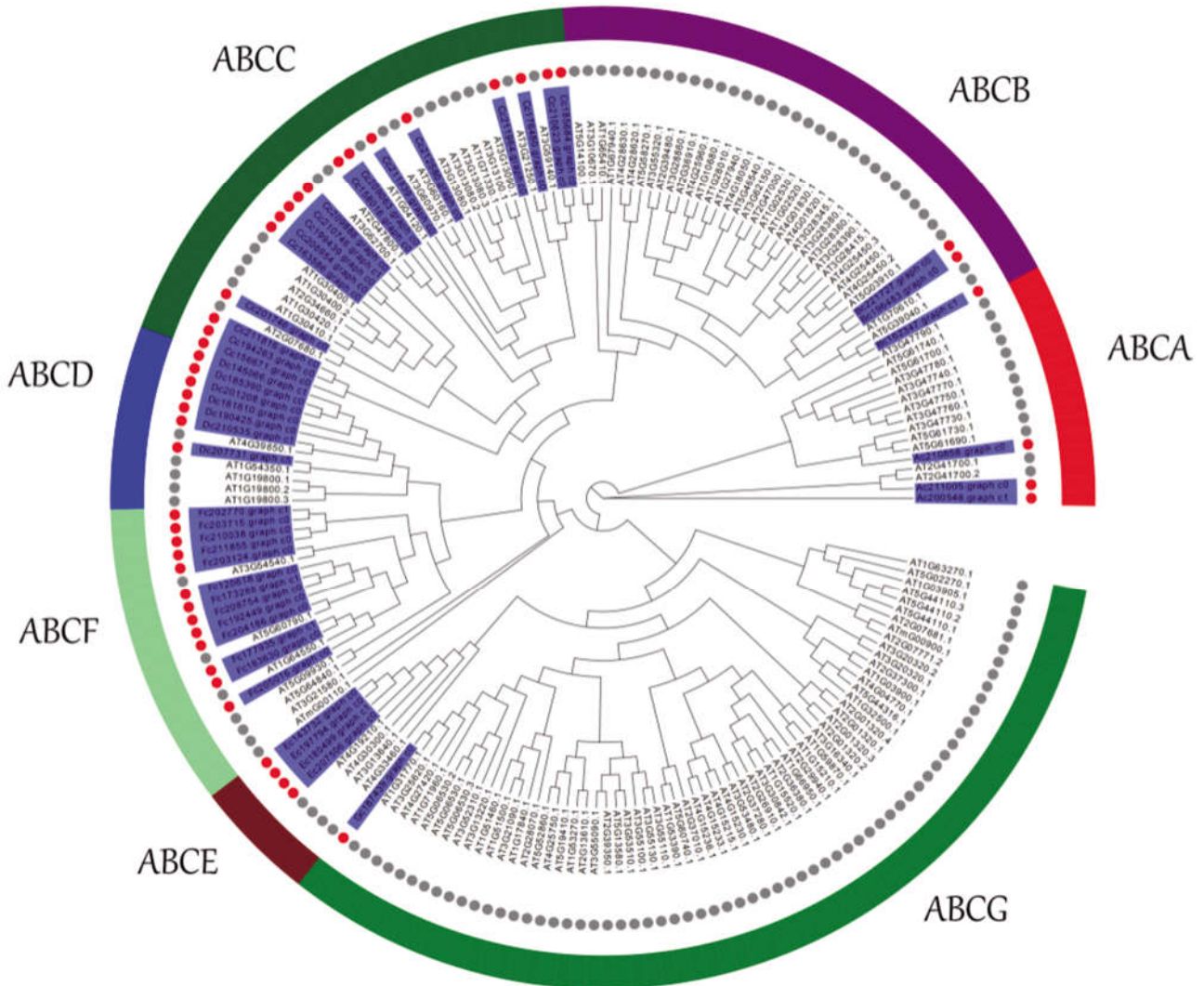


图 2 八仙花和拟南芥 ABC 转运蛋白的系统发育

注: 蓝底色为八仙花 ABC 转运蛋白

Figure 2 Phylogenetic tree of ABC transporter proteins from Hydrangea and Arabidopsis thaliana

Note: Shade blue: ABC transporters in Hydrangea



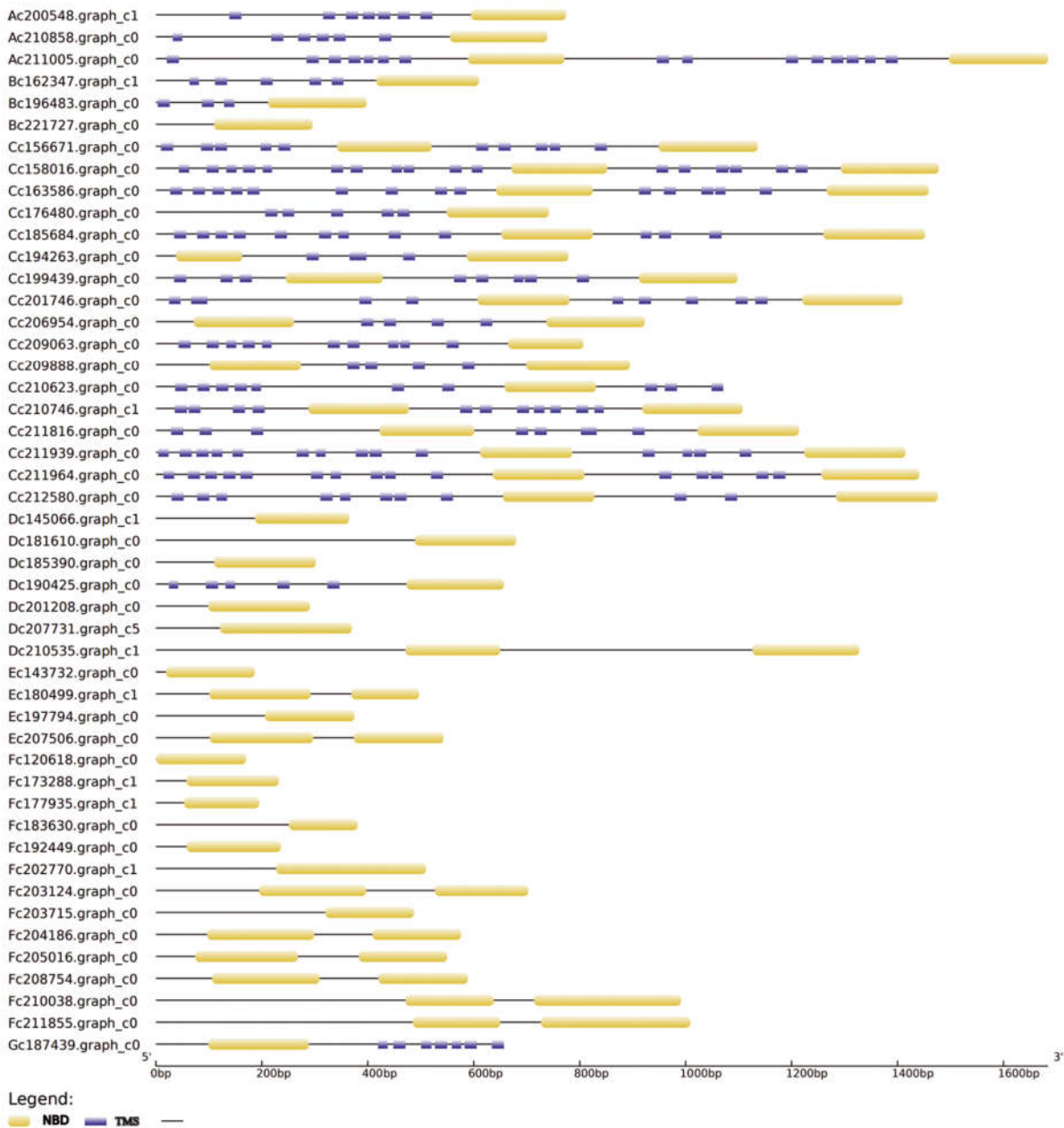


图3 八仙花 ABC 转运蛋白结构域分布

Figure 3 Domain distribution of ABC transporter family in Hydrangea

24个,其中14个属于ABCC亚家族,因C亚家族仅有全分子蛋白一种类型。ABCE亚家族和ABCF亚家族蛋白没有跨膜结构域,不发挥转运蛋白的功能,而是参与核糖体生物合成和翻译调控。

通过MEME在线软件对48个八仙花ABC转运蛋白进行保守基序预测,发现不同蛋白的保守基序数量不等,类型存在差异(图4)。八仙花ABC转运蛋白共有50个motif保守基序,其中motif1和motif2保守基序存在于所有的ABC转运蛋白中。Motif3和motif13出现28次,motif4出现27次,均分布于各亚家族。ABCB和ABCC亚家族共同含有Motif5~12、

16、19、23、25、27、29、30、36、39、41、44、47、49、50保守基序,因此推测两个亚家族具有同源性。Motif18、20、31、33、35、37、40、42、45、46、48分布在ABCF亚家族,motif21、28、34、38分布在ABCD亚家族,motif22、24、26、32、43分布在ABCE亚家族。聚在同一亚家族的motif保守基序组成相似,说明成员之间进化关系较近。不同的亚家族之间motif保守基序存在差异,motif出现频率越高说明保守程度越高。

#### 1.4 差异表达模式分析

为了分析ABC转运蛋白基因的表达模式,以未



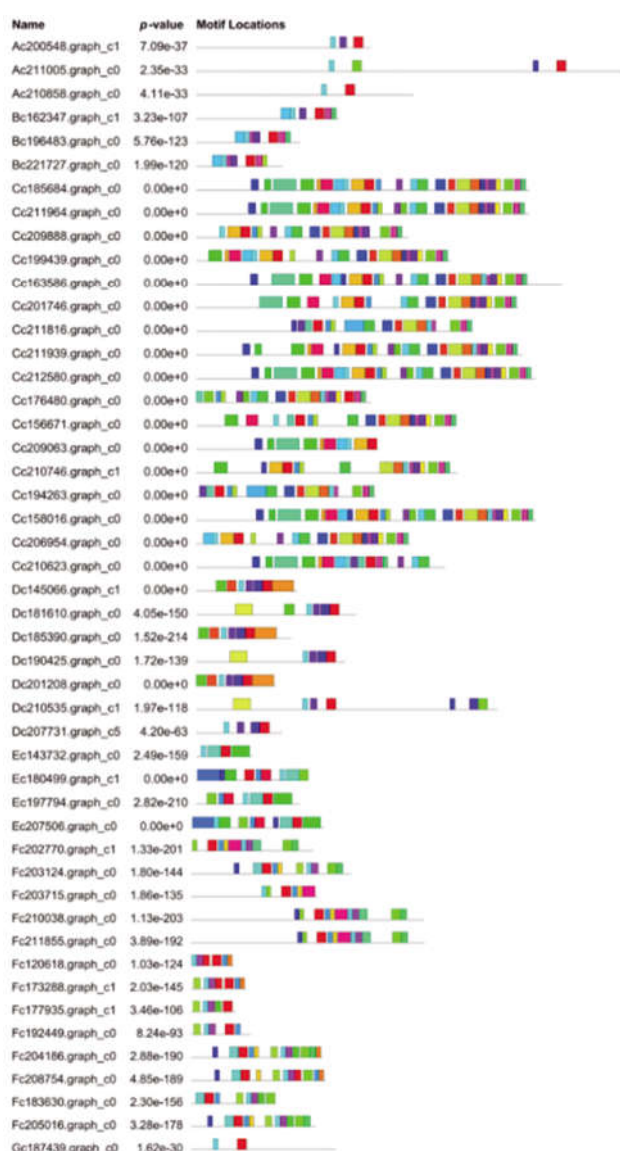


图4 八仙花 ABC 转运蛋白家族保守基序的分布

注: 不同颜色方块代表不同的保守基序

Figure 4 Distribution of conserved motifs of ABC transporter family in Hydrangea

Note: Different color squares represent different conservative motifs

进行铝胁迫处理为对照, 本试验筛选出铝胁迫 4 h 时八仙花根系和叶片转录组数据, 对 48 个 ABC 转运蛋白基因的表达结果进行分析, 使用 Pheatmap 软件对 48 个 ABC 转运蛋白基因在根部和叶中片的表达模式绘制热图(图 5), 所有转运蛋白基因在八仙花根部均有表达, 但是有 38 个基因在叶片微量表达或者不表达。与未进行铝胁迫处理的八仙花相比, 铝胁迫后根部有 12 个基因上调表达, 叶片仅有 1 个基因上调表达, 其中表达量有显著性差异的基因有 6 个(表 2), 分别是根部表达的 *HmABCA1*, *HmABCC1*, *HmABCC6*, *HmABCC14* 和 *HmABCD1*, 和在叶部表达是 *HmAB-*

*CG1*。因此认为主要由八仙花根部 ABC 转运蛋白基因响应铝胁迫, 参与铝离子的吸收、运输和贮藏。

## 2 讨论

本研究系统分析了八仙花 48 个 ABC 转运蛋白基因对铝胁迫的响应, 结果表明, 铝胁迫处理后不同基因在根部和叶片中表达量不一样, 根部是八仙花响应铝胁迫的主要部位。基于系统发育树分析将 48 个蛋白聚为 7 个亚家族, 并与拟南芥 ABC 转运蛋白的聚类结果基本一致, 说明八仙花与拟南芥的 ABC 转运蛋白具有很高的同源性, 这为八仙花 ABC 转运蛋白功能分析提供了参考依据。

通过分析八仙花和拟南芥 ABC 转运蛋白家族的进化关系, 发现 *HmABCA3* (c211005.graph\_c0) 与拟南芥 *AtABCA1/AtAOH1* (AT2G41700) 聚在一个分支; *HmABCA2* (c210858.graph\_c0) 与植物中编码一个定位于内质网的 ABC 转运体 *AtABCA9/AtATH15* 亲缘关系很近(Kim et al., 2013; 王晓珠等, 2017)。植物中亚家族 A 转运蛋白的功能研究较少, 根据同源性分析, 其在植物体中有脂质运输的功能。

植物中亚家族 B 蛋白功能多样, 主要参与生长素、次生代谢物和异源物质的运输, 包括抗多药性相关蛋白(MDR)、线粒体 ABC 转运蛋白(ATM)、重金属耐性蛋白(HMT)和抗原肽相关运载蛋白体(TAP)等。与八仙花 *HmABCB1* (c162347.graph\_c1) 处于同一分支的 *ABCB27/AtTAP2* (AT5G39040) 是编码位于液泡的 ABCB 转运蛋白, 基因产物可能对铝的螯合物在细胞内转运起重要作用, 是铝隔离机制的重要因素 (Larsen et al., 2007)。铝胁迫后, 八仙花 *HmABCB1* 在根部上调表达, 但是差异表达量并未达到显著性, 这可能与铝胁迫处理的浓度和时间有关。

亚家族 C 的原始成员是人类多种药物抗性相关蛋白 HsMRP1, 随后在植物中发现了 MRPs。MRP 不仅涉及细胞内脱毒反应和氧化胁迫抵抗, 还介导谷胱甘肽(GSH)结合物的转运。液泡膜上的 ABC 转运蛋白主要是 PRP 亚家族成员, 主要参与有毒物质的转运, 实现液泡对他们的隔离, 从而起到解毒作用。八仙花 *HmABCC4*、*HmABCC5*、*HmABCC12* (c176480.graph\_c0, c185684.graph\_c0, c210623.graph\_c0) 与拟南芥 *ABCC8/ATMRP6*、*ABCC10/ATMRP14* (AT3G5-9140.1, AT3G21250.1) 聚在同一分支, 目前有报道 *ATMRP14* 是异源生物跨膜转运蛋白, 而 *ATMRP6* 具有重要的解镉毒的作用(Gaillard et al., 2008)。与八仙花 *HmABCC15* (c211939.graph\_c0) 聚在一起的

表 2 在铝胁迫下差异表达的八仙花 ABC 转运蛋白基因

Table 2 Differential expression of ABC transporter gene in hydrangea under aluminum stress

基因	转录组编号	差异表达部位	log2FC	表达趋势
Gene	Transcriptome code	Differentially expressed site		Express trends
<i>HmABCA1</i>	Ac200548.graph_c1	根部 Root	3.377 822 103	上调 Up-regulation
<i>HmAACC1</i>	Cc211816.graph_c0	根部 Root	6.439 104 379	上调 Up-regulation
<i>HmAACC6</i>	Cc156671.graph_c0	根部 Root	5.820 422 296	上调 Up-regulation
<i>HmAACC14</i>	Cc194263.graph_c0	根部 Root	6.454 978 981	上调 Up-regulation
<i>HmABCD1</i>	Dc145066.graph_c1	根部 Root	3.895 680 120	上调 Up-regulation
<i>HmABCG1</i>	Gc187439.graph_c0	叶片 Leaf	1.993 847 525	上调 Up-regulation

*ABCC5/AtMRP5* (AT1G04120.1)参与保卫细胞中脱落酸和钙离子信号转导途径中离子通道的调控,帮助植物对抗干旱环境。与八仙花 *HmAACC8* (c201746.graph\_c0)关系相近的 *ABCC13/AtMRP11* (AT2G07680.1)的表达由赤霉素诱导,在萘乙酸、脱落酸和玉米素等影响下受抑制,在镉或过氧化氢的存在下,小麦幼苗根系 *ABCC13* 基因的差异表达,在缓解重金属产生的氧化胁迫中的起重要作用(Bhati et al., 2015)。*HmAACC1* (c156671.graph\_c0)、*HmAACC6* (c194263.graph\_c0)和 *HmAACC14* (c211816.graph\_c0)在进化树上聚为独立的分支,且它们均在铝胁迫后的表达量显著升高,推测它们参与了八仙花铝胁迫的响应,其响应铝胁迫机制需要进一步研究。

ABCD 亚家族为 PMP 亚族,也称为过氧化物酶体跨膜运输蛋白,拟南芥中仅有 *AtPMP1* 和 *AtPMP2* 两种,八仙花 ABCD 亚家族中 6 个基因都与 *ABCD1* (AT4G39850.1)聚在同一组,据报道 *ABCD1* 参与拟南芥根部葡萄糖调节的分生组织维持的生理过程(Huang et al., 2019)。铝胁迫过程中,根部受到伤害后发生一系列复杂的氧化应激反应,因此八仙花根部表达量显著上调的 *HmABCD1* (c145066.graph\_c1)基因功能值得进一步研究。

ABCG 亚家族是 NBD-TMD 反向序列结构域类型的转运子,包含 PDR 和 WBC 两种类型。有研究报道地毯草 *AcABCG1* 基因定位于细胞质膜上响应铝胁迫(李季肤等, 2019)。八仙花 *HmABCG1* (c187439.graph\_c0)与拟南芥 *AtABCG14* (AT1G31770.1)聚在同一分支上,*AtABCG14* 是细胞分裂素转运蛋白,不仅能调控拟南芥根部的生长发育,而且能介导细胞

分裂素运输调控抗旱反应的过程(Ko et al., 2013; Zhang et al., 2014)。因此,可以推测,铝胁迫发生后八仙花根尖受损,*HmABCG1* 基因上调表达,响应铝胁迫,其基因功能还需进一步研究。

### 3 材料与方法

#### 3.1 八仙花 ABC 转运蛋白基因家族成员的鉴定

用于鉴定八仙花 ABC 转运蛋白基因家族成员的数据为本课题组基于 Illumina 高通量测序平台获得的转录组测序数据(Chen et al., 2015)。由于尚无八仙花基因组信息,根据 NR 注释结果,以“ATP-binding cassette transporters”或“ABC”为关键词筛选八仙花 ABC 转运蛋白;然后利用 NCBI-blastp 程序将筛选出的序列与拟南芥、番木瓜和葡萄等 22 个物种的 ABC 转运蛋白基因家族进行比;再使用 SMART 在线数据库对以上基因进行保守结构域分析,剔除掉不含有 ABC 转运蛋白基因特征的序列,从而获得八仙花 ABC 转运蛋白基因转录本序列。参照拟南芥的 ABC 转运蛋白基因命名模式,以序列相似性为分类依据进行命名,相应对转录组数据库的 unigenes 进行重新编号。

#### 3.2 基本理化性质及结构域分析

利用 ProtParam 在线软件(<https://web.expasy.org/protparam/>)对八仙花 ABC 转运蛋白序列的分子量、等电点、不稳定系数、脂肪指数和疏水性等理化性质进行预测分析。使用 Plant-mPloc 在线软件(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant/>)进行蛋白的亚细胞

定位预测。利用 MEME 在线软件(<http://meme-suite.org/tools/meme>)进行蛋白保守基序分析,使用 CD-search 对 ABC 蛋白结构域进行预测,并绘制基因结构域图。

### 3.3 八仙花 ABC 转运蛋白基因家族系统进化树构建

选取鉴定出的八仙花 ABC 家族基因的氨基酸序列,使用 Mafft 软件对 ABC 蛋白进行多重序列比对,选择 Neighbor joining (NJ)邻位归并法,并构建进化树(MEGA7)。

### 3.4 拟南芥与八仙花 ABC 转运蛋白基因家族成员的比较研究

首先从 <https://www.arabidopsis.org/> 下载拟南芥氨基酸序列,再采用 Muscle 软件进行全局比对,使用 Iqtree 软件构建进化树,碱基替换模型为 LG+F+G4,最后使用 iTOL 软件对进化树进行着色。

### 3.5 表达模式分析

为了构建八仙花 ABC 转运蛋白基因在铝胁迫下不同组织的表达谱,分析 ABC 转运蛋白基因的组织表达特异性,从转录组数据库中获得基因未进行铝胁迫处理及胁迫处理 4 h 时,在根部和叶片中表达的 FPKM 值,最后使用 Pheatmap 软件绘制基因表达热图。

### 作者贡献

陈海霞和王暄是本研究的实验设计和实验研究的执行人,完成数据分析、论文初稿的写作;王暄和许璐参与实验设计、试验结果分析;陈海霞是项目的构思者及负责人,指导实验设计、数据分析、论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

### 致谢

本研究由国家自然科学基金项目(31201656)与湖南省自然科学基金项目(2017JJ3105)共同资助。

### 参考文献

Aryal B., Laurent C., and Geisler M., 2016, Correction: learning from each other: ABC transporter regulation by protein phosphorylation in plant and mammalian systems, *Biochemical Society Transactions*, 44(2): 663-673

Bhati K.K., Sharma S., Aggarwal S., Kaur M., Shukla V., Kaur J., Mantri S., and Pandey A.K., 2015, Genome-wide identifica-

tion and expression characterization of ABCC-MRP transporters in hexaploid wheat, *Front. Plant Sci.*, 6: 488

Chen H.X., Lu C.P., Jiang H., and Peng J.H., 2015, Global transcriptome analysis reveals distinct aluminum-tolerance pathways in the Al-accumulating species *hydrangea macrophylla* and marker identification, *PLoS One*, 10(12): e0144927

Gaillard S., Jacquet H., Vavasseur A., Leonhardt N., and Forestier C., 2008, AtMRP6/AtABCC6, an ATP-Binding Cassette transporter gene expressed during early steps of seedling development and up-regulated by cadmium in *Arabidopsis thaliana*, *BMC Plant Biol.*, 8: 22

Huang C.F., Yamaji N., Chen Z.C., and Ma J.F., 2012, A tonoplast-localized half-size ABC transporter is required for internal detoxification of aluminum in rice, *Plant J.*, 69: 857-867

Huang L., Yu L.J., Zhang X., Fan B., Wang F.Z., Dai Y.S., Qi H., Xie L.J., and Xiao S., 2019, Autophagy regulates glucose-mediated root meristem activity by modulating ROS production in *Arabidopsis*, *Autophagy*, 15(3): 407-422

Kim S., Yamaoka Y., Ono H., Kim H., Shim D., Maeshima M., Martinoia E., Cahoon E.B., Nishida I., and Lee Y., 2013, AtABCA9 transporter supplies fatty acids for lipid synthesis to the endoplasmic reticulum, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110(2): 773-778

Ko D., Kang J., Kiba T., Park J., Kojima M., Do J., Kim K.Y., Kwon M., Endler A., Song W.Y., Martinoia E., Sakakibara H., and Lee Y., 2014, *Arabidopsis* ABCG14 is essential for the root-to-shoot translocation of cytokinin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111(19): 7150-7155

Lane T.S., Rempe C.S., Davitt J., Staton M.E., Peng Y.H., Soltis D.E., Melkonian M., Deyholos M., Leebens-Mack, H J., Chase M., Rothfels C.J., Stevenson D., Graham S.W., Yu J., Liu T., Pires J.C., Edger P.P., Zhang Y., Xie Y.L., Zhu Y., Carpenter E., Wong G.K., and Jr C.N.S., 2016, Diversity of ABC transporter genes across the plant kingdom and their potential utility in biotechnology, *BMC Biotechnol.*, 16: 47

Larsen P.B., Cancel J., Rounds M., and Ochoa V., 2007, *Arabidopsis* ALS1 encodes a root tip and stele localized half type ABC transporter required for root growth in an aluminum toxic environment, *Planta*, 225(6): 1447-1458

Li J.F., Han J.R., Jia Y.D., Zhang L.Z., Wang W.Q., Wang Z.Y., and Chen Z.J., 2019, Cloning and expression analysis of *A cABCG1* in *Axonopus compressus*, *Caodi Xuebao (Acta Agrestia Sinica)*, 27(5): 1147-1153 (李季肤, 韩佳芮, 贾怡丹, 张郎织, 王文强, 王志勇, 陈志坚, 2019, 地毯草铝响应基因 *A-cABCG1* 的克隆与表达分析, *草地学报*, 27(5): 1147-1153)

Li S., 2018, The functional study of ABCF subfamily genes in *Arabidopsis thaliana*, University of Chinese Academy of Sciences, Supervisor: Xu J., pp.24-34 (李爽, 2018, 拟南芥

- ABCF 亚家族基因功能研究, 中国科学院大学, 导师: 徐进, pp.24-34)
- Liang Y.N., 2018, Functional analysis of SbSTAR1 and SbSTAR2 in sweet sorghum (*Sorghum bicolor* L.) under aluminum stress, Thesis for M.S., College of Plant Science, Jilin University, Supervisor: Yang Z.M. pp.36-45 (梁亚男, 2018, 铝胁迫下甜高粱 ABC 转运体 SbSTAR1、SbSTAR2 的功能分析, 硕士学位论文, 吉林大学植物科学学院, 导师: 杨振明, pp.36-45)
- Negishi T., Oshima K., Hattori M., and Yoshida K., 2013, Plasma membrane-localized Al-transporter from blue hydrangea sepals is a member of the anion permease family, *Genes to Cells*, 18: 341-352
- Negishi T., Oshima K., Hattori M., Kanai M., Mano S., Nishimura M., and Yoshida K., 2012, Tonoplast-and plasma membrane-localized aquaporin-family transporters in blue hydrangea sepals of aluminum hyperaccumulating plant, *PLoS One*, 7(8): e43189
- Sanchez-Fernandez R., Davies T.G.E., Coleman J.O.D., and Rea P.A., 2001, The *Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily, a complete inventory, *Journal of Biological Chemistry*, 276(32): 30231-30244
- Song W.J., Wang P.Q., Zhang B.Y., Yang Q.C., Cai B.J., Lai P., and Kang Y.H., 2013, *MsSTAR2* encodes a half-type ATP-binding cassette transporter protein that is induced by aluminum in *Medicago sativa* L., *Nongye Shengwu Jishu Xuebao (Journal of Agricultural Biotechnology)*, 21(5): 522-529 (宋文静, 王凭青, 张宝云, 杨青川, 蔡冰杰, 赖平, 康岳华, 2013, 紫花苜蓿铝激活半型 ABC 转运子基因 *MsATAR2* 的耐铝性分析, *农业生物技术学报*, 21(5): 522-529)
- Wang X.Z., Sun W.M., Ma Y.F., Han E.Q., Han L., Sun L.P., Peng Z.H., and Wang B.J., 2017, Research progress of Arabidopsis ABC transporter, *Zhiwu Shengli Xuebao (Plant Physiology Journal)*, 53(2): 133-144 (王晓珠, 孙万梅, 马义峰, 韩二琴, 韩丽, 孙丽萍, 彭再慧, 王邦俊, 2017, 拟南芥 ABC 转运蛋白研究进展, *植物生理学报*, 53 (2): 133-144)
- Wilkens S., 2015, Structure and mechanism of ABC transporters, *F1000 Prime Reports*, 7(14): 14-18
- Zhang K.W., Novak O., Wei Z.Y., Gou M.Y., Zhang X.B., Yu Y., Yang H.J., Cai Y.H., Strnad M., and Liu C.J., 2014, Arabidopsis ABCG14 protein controls the acropetal translocation of root-synthesized cytokinins, *Nat. Commun.*, 5: 3274