

## 桉树焦枯病菌 ABC 转运蛋白的鉴定与分析

刘宏毅<sup>1</sup>, 陈全助<sup>2</sup>, 叶小真<sup>2\*</sup>, 陈慧洁<sup>1</sup>, 李慧敏<sup>1</sup>, 冯丽贞<sup>1</sup>

(1. 福建农林大学林学院, 福建 福州 350002; 2. 福建农林大学金山学院 福建 福州 350002)

**摘要:** [目的] 利用生物信息学方法探讨 ABC 转运蛋白在桉树焦枯病菌对桉树侵染过程中的解毒作用, 为揭示桉树焦枯病致病机制奠定基础。 [方法] 本文利用 BLAST、HMMER、Pfam 数据库、TCDB 数据库在全基因组内对桉树焦枯病菌的 ABC 转运蛋白进行鉴定和分类, 并通过 ProtCamp 和 IBS 分别进行亚细胞定位和结构域图绘制, 依据同源性对其功能进行推测分析。 [结果] 表明: 桉树焦枯病菌共有 70 个 ABC 转运蛋白, 它们分属于 8 个亚族。71% 的转运蛋白位于细胞膜, 10% 位于液泡, 其余部分位于线粒体、过氧化物酶体、内质网等内膜系统上。桉树焦枯病菌 ABC 转运蛋白包含全分子、四分之三分子、半分子及四分之一分子。根据同源性推测桉树焦枯病菌 ABC 转运蛋白与 MDR、PDR、HMT、MPE、STE、P-FAT 等几种转运蛋白具有较高相似性, 同时还与核糖体合成、翻译、过氧化物酶体合成的 ABC 转运蛋白具有较高相似性。 [结论] 桉树焦枯病菌 ABC 转运蛋白除作为外排泵转运外源化学物质、疏水性化学物质等物质。还参与细胞代谢、翻译、核糖体的合成、mRNA 的输出、 $\beta$  氧化, 并通过为辅酶 Q 的辅助因子增强呼吸代谢等多项生命活动为桉树焦枯病菌的侵染提供能量。

**关键词:** 桉树; 桉树焦枯病菌; ABC 转运蛋白; 结构域; 亚细胞定位

中图分类号: S763.7

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2017)04-0685-08

## Identification and Analysis of ABC Transporter in *Calonectria pseudoreteauidii*

LIU Hong-yi, CHEN Quan-zhu, YE Xiao-zhen, CHEN Hui-jie, LI Hui-min, FENG Li-zhen

(1. Forestry College, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China;

2. Jinshan College, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China)

**Abstract:** [Objective] Using bioinformatics method to investigate the detoxification of ABC transporters in *Calonectria* during the process infecting *Eucalyptus*, and to provide references for revealing the pathogenic mechanism of *Calonectria*. [Method] Using BLAST, HMMER, Pfam database, TCDB database to indentify and classify the ABC transporter of *Calonectria* within the whole genome, and to predict subcellular localization and the domain structure scheme with ProtCamp and IBS, respectively. [Result] *Calonectria* has a total of 70 ABC transporters, which belong to 8 subfamilies. 71% of the transporters are located in the cell membrane, 10% in the vacuole, and the rest in the mitochondria, peroxisome, endoplasmic reticulum and other endometrial systems. *Calonectria* ABC transporter has 4 types of molecules, contains full-size molecules, 3/4 molecules, half molecules and 1/4 molecules. According to the homology it is estimate that *Calonectria* ABC transporters has high similarity with MDR, PDR, HMT, MPE, STE, P-FAT and other transporters. It also has high similarity with the ABC transporters related to the synthesis of ribosome, translation and synthesis of peroxisome. [Conclusion] The ABC transporter of *Calonectria pseudoreteauidii* can transport exogenous chemicals, hydrophobic chemical molecules. It is also involved in cell metabolism, translation, ribosome synthesis, the export of mRNA, beta-oxidation, and provide energy for infecting as a co-factor of coenzyme Q.

收稿日期: 2016-07-14

基金项目: 福建省财政厅项目(K81150002、K81139238、K8112004A)

作者简介: 刘宏毅(1990—),男,硕士研究生.主要从事森林病理学研究. E-mail: fjliahongyi@126.com

\* 通讯作者: 叶小真,女,讲师.主要从事森林病理学研究. E-mail: lisayxz@163.com

**Keywords:** *Eucalyptus*; *Calonectria* leaf blight; ABC transporter; domain; subcellular localization

ABC 转运蛋白 (ATP-binding cassette transporters) 组成了已知转运蛋白家族中最大的超家族,它是由含 NBD (Nucleotide-binding domain)、TMD (Transmembrane domain)、NTE (N-terminal extension) 等结构域的蛋白共同组成的<sup>[1-2]</sup>。ABC 转运蛋白具有跨膜结构域,可作为转运肽、糖、脂、重金属螯合物等有机物的膜整合蛋白来行使其功能<sup>[3]</sup>。根据 ABC 转运蛋白所含有结构域的类型和数量等因素,将其分为 ABCA-ABCI 等九个亚族<sup>[4]</sup>。不同亚族的功能及所处的亚细胞位置等存在一定的差异。ABC 转运蛋白广泛存在于动物、植物、真菌、细菌等生物中,不同生物间 ABC 转运蛋白数量存在较大的差异<sup>[5]</sup>。ABC 转运蛋白在抗真菌毒素或转运细胞毒素的过程中起着重要作用<sup>[6]</sup>。目前已知,ABC 转运蛋白在保护人类血脑屏障不受外源化学物质或有毒代谢产物影响等作用;在植物中参与病原微生物应答、重金属调节、次生代谢产物运输以及植物生长等过程;在真菌中具有分泌性信息素、合成铁硫蛋白、保护病原真菌不受细胞抗真菌毒素的影响及核糖体合成等功能<sup>[7-9]</sup>。病原真菌在侵入植物寄主的过程中,需要这些转运蛋白帮助克服寄主产生的抗真菌化合物或细胞毒素对自身的毒害作用<sup>[10]</sup>。

桉树焦枯病 (*Calonectria* leaf blight) 是热带和亚热带地区桉树种植区危害最为严重的病害之一,严重威胁桉树产业的发展<sup>[11]</sup>。桉树焦枯病菌是由丽赤壳属 (*Calonectria*) 真菌引起的病害,其无性态为帚梗柱孢属 (*Cylindrocladium*) 真菌<sup>[12]</sup>。据统计 *Calonectria* 现有集群 13 个,共 71 种,其中 *C. pseudoreteaudii* 是福建省内发现最早、分布最广、致病力最强的病原菌株<sup>[13-15]</sup>。桉树富含次生代谢物质,包括类黄酮类和鞣质等酚类化合物以及萜烯、萜烯醇等挥发性化感物质,这些物质有利于桉树抵御虫害、病害等有害生物的侵袭<sup>[16]</sup>。课题组前期研究也表明桉树叶片中多酚类物质含量、黄酮类化合物含量、多酚氧化酶活性水平及其同工酶谱带均与桉树对焦枯病抗性成正相关<sup>[17]</sup>。有鉴于此,本文在课题组前期已对桉树焦枯病菌 (*Ca. pseudoreteaudii*) 的全基因组进行测序的基础上,通过生物信息学方法对桉树焦枯病菌 ABC 转运蛋白进行鉴定及分类,并进一步进行亚细胞定位预测和系统进化分析等,旨在明确 ABC 转运蛋白在焦枯病菌对桉树侵染过程中所起

的作用,为揭示桉树焦枯病菌致病机制提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株及全基因组测序

供试菌株为 *Ca. pseudoreteaudii* YA51,由福建农林大学森林保护研究所于福建永安桉树焦枯病危害区采集分离获得<sup>[12]</sup>。该菌株全基因组测序和组装委托给北京诺禾致源生物信息科技有限公司 (Novogene) 完成, GeneBank Assembly accession: MOCD00000000.1。

### 1.2 ABC 转运蛋白的鉴定分类

采用 HMMER 软件 (<http://hmmer.org/>) 所提供的 hmmsearch 功能,将 Pfam30.0 数据库 (<http://pfam.xfam.org>) 中下载蛋白结构域的隐马可夫 (HMM, Hidden Markov Model) 模型与导入的桉树焦枯病菌蛋白序列进行比对, E 值设定为  $1e-5$ , 其余参数为默认参数。将筛选出的结果导入 Pfam 在线数据库进行比对,最终根据 HUGO 系统分类法进行分类。

### 1.3 ABC 转运蛋白保守结构域分析

采用 InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) 在线分析对桉树焦枯病 ABC 转运蛋白进行结构域预测,用 IBS (Illustrator for Biological Sequences, <http://ibs.biocuckoo.org/>) 绘制其结构域。

### 1.4 ABC 转运蛋白功能分析

将桉树焦枯病 ABC 转运蛋白与 TCDB (Transporter Classification Database, <http://www.tcdb.org/>) 数据库进行 Blastp 比对, E 值设定为  $1e-50$ 。

### 1.5 ABC 转运蛋白亚细胞结构定位分析

采用 ProComp9.0 在线工具 (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>) 进行亚细胞结构定位预测。

### 1.6 系统进化树构建

通过 MEGA7.0 软件对 ABC 转运蛋白氨基酸序列进行 MUSCLE 比对,进一步通过临近法 (Neighbour-joining method) 构建系统发育树, Bootstrap 值设置为 1000 次,并采用 Poisson 模型。

## 2 结果与分析

### 2.1 桉树焦枯病菌 ABC 转运蛋白的鉴定与分类

通过 Hmmer 与 Pfam 比对获得具有 ABC 转运蛋

白结构域的原始数据,总共在桉树焦枯病菌中鉴定出 70 个 ABC 转运蛋白,约占总编码蛋白数量的 0.49% (表 1)。这些基因广泛分散于不同的桉树焦枯病菌基因组支架 (Scaffod) 上。稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*) 含有 50 个 ABC 转运蛋白,约占总编码蛋白数量的 0.32%; 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 含有 29 个 ABC 转运蛋白,约占总编码蛋白数量的 0.46%; 禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum*) 中含有 58 个 ABC 转运蛋白,约占总编码蛋白数量的 44%, 其总量均低于桉树焦枯病菌 (表 1)<sup>[9,18]</sup>。根

表 1 桉树焦枯病菌、稻瘟病菌、酿酒酵母和禾谷镰刀菌 ABC 转运蛋白的比较分析

Table 1 Comparatively analysis of ABC transporter in *C. pseudoreteaudii*, *M. grisea*, *S. Cerevisiae* and *F. graminearum*

菌种 Fungal species	ABCA	ABCB	ABCC	ABCD	ABCE	ABCF	ABCG	ABC1	ABC 转运蛋白占比 Percent of ABC transporter		
									ABC 总数 Total ABCs	基因总数 Total genes	占比 Percent/%
									桉树焦枯病菌 <i>C. pseudoreteaudii</i>	1	20
稻瘟病菌 <i>M. grisea</i>	2	19	10	2	1	5	8	1	50	15 488	0.32
酿酒酵母 <i>S. Cerevisiae</i>	0	4	6	3	1	5	10	1	29	6 275	0.46
禾谷镰刀菌 <i>F. graminearum</i>	1	14	16	2	1	5	19	0	58	13 313	0.44

## 2.2 桉树焦枯病菌 ABC 转运蛋白结构特点

桉树焦枯病菌 ABC 转运蛋白结构域如图 1 所示,其分别由全分子、四分之三分子、半分子及四分之一分子组成。其中,四分之一分子仅存在于 ABC1 亚族,其结构域为 UbiB; ABCA 亚族为全分子,其结构域为 (TMD-NBD)<sub>2</sub>, 其跨膜结构域与其他亚族不同的是在前两个螺旋之间额外多一个大环; ABCB 亚族存在全分子及半分子,其结构域分别为 (TMD-NBD)<sub>2</sub> 和 TMD-NBD。ABCC 亚族通常为全分子,但是在桉树焦枯病菌中预测出较为特殊的半分子及四分之三分子; ABCE 及 ABCF 亚族的结构域均有两个 NBD 结构域,前者具有 RLI 结构域,后者在两个 NBD 中间存在一个延伸结构域 (Extension domain); 此外, ABCG 亚族的结构域为与除 ABC1 亚族外的其余亚族反向拓扑,其结构域为 (NBD-TMD)<sub>2</sub>, 还存在部分半分子。其中,最为特殊的半分子为 CpABCG20, 其结构域为 TMD-NBD, 与 ABCB 等亚族的结构域较为相似,但其却与裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 的 ABCG 转运蛋白相似高达 73.5%, 我们推测其可能为假基因或与测序拼接错误导致编码蛋白序列的预测出错有关。

## 2.3 功能预测

Blastp 比对结果如表 3 所示,桉树焦枯病菌 ABC 转运蛋白各亚族功能具有多样性,参与焦枯病菌定殖过程中的各项生理活动。其中,ABCA 转运

据 HUGO (Human Genome Organization) 系统分类法,将其划分为 ABCA (1, 1.4%)、ABCB (20, 29%)、ABCC (15, 21%)、ABCD (2, 2.8%)、ABCE (1, 1.4%)、ABCF (3, 4.3%)、ABCG (24, 34%)、ABC1 (4, 5.7%) 8 个亚族 (表 2), 并进行系统命名。其中, ABCG 亚族为桉树焦枯病菌最大的 ABC 转运蛋白亚族,其数量远高于酿酒酵母与稻瘟病菌,说明该亚族存在明显的扩张。桉树焦枯病菌 ABC 转运蛋白的分类与稻瘟病菌的大致相同,都具有 ABC1 亚族,酿酒酵母和禾谷镰刀菌中并没有 ABC1 亚族。

蛋白与稻瘟病菌 (*M. oryzae*) Abc4 相似性达到了 55%, 我们推测其可能参与抗真菌药物及 Na<sup>+</sup> 的转运; 桉树焦枯病菌共有 20 个 ABCB 转运蛋白,分为 4 类,分别含有 13 个多药耐药性转运蛋白 (MDR, Multidrug Resistance Transporter)、5 个重金属转运蛋白 (HMT, Heavy Metal Transporter)、1 个线粒体肽转运蛋白 (MPE, Mitochondrial Peptide Exporter) 及 1 个性信息素转运蛋白 (STE, The a-Factor Sex Pheromone Exporter); 桉树焦枯病菌 ABCC 转运蛋白的预测功能主要为药物耦合转运蛋白 (DCT, Drug Conjugate Transporter); 桉树焦枯病菌 ABCD 与酿酒酵母 ABCD 转运蛋白 Pxa1p 和 Pxa2p 相似性为 30%~40%, 其可能作为异源二聚体合成完整的过氧化物酶体,并参与脂肪酸的  $\beta$  氧化。桉树焦枯病菌 ABCE 转运蛋白与酿酒酵母 ABCE (Rli1p) 相似性高达 73%, 其可能主要参与核糖体的合成和翻译的起始; 桉树焦枯病菌 CpABCF3 与酿酒酵母中 ABCF (Arb1p) 转运蛋白的相似度高达 73%, 其余两个相似度仅在 30% 左右。因此, CpABCF3 可能与 40S 和 60S 核糖体的合成有关; ABCG 转运蛋白主要为多效耐药性有关 (PDR, Pleiotropic Drug Resistance), 除参与药物转运外,还参与多种脂质分子的易位。桉树焦枯病菌 ABC 转运蛋白除 CpABCG8 外,与禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum*) ABCG 转运蛋白 (FgABC1) 的相似度均达到 30%, 其中, CpABCG9 与其相似度达到

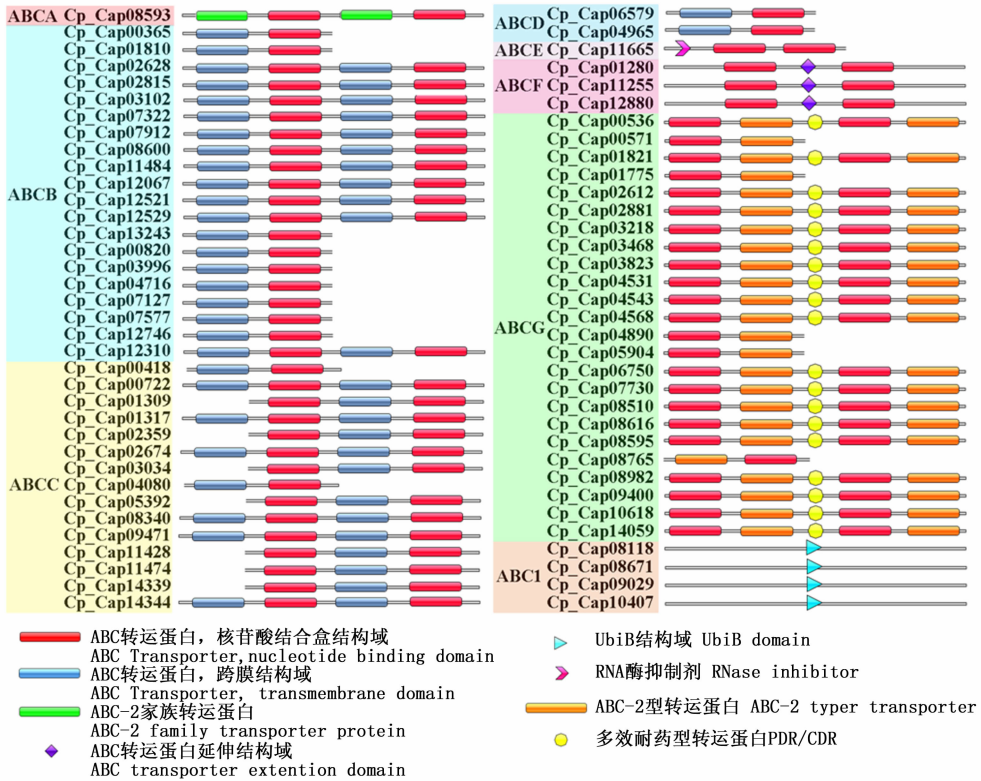


图1 桉树焦枯病菌 ABC 转运蛋白结构域

Fig. 1 Domain of ABC transport in *C. pseudoretaudii*

73%。此外,还含有部分半分子 ABCG 转运蛋白又被称为 WBC (White-brown complex),其在真菌中的功能仍然未知;桉树焦枯病菌 ABC1 转运蛋白 CpABC1\_1 蛋白与酵母 ABC1 蛋白 (P27697) 的相似度为 54%,CpABC1\_2 蛋白没有相似度,其余两个的相似度在 30% 左右,说明 CpABC1\_1 蛋白可能为辅酶 Q 的重要辅助因子。

#### 2.4 亚细胞结构定位分析

亚细胞结构定位预测如表 2 所示,桉树焦枯病菌 ABC 转运蛋白的亚细胞结构具有多样性,广泛分布于细胞膜、线粒体、内质网、等膜系统上。其中,ABCA 亚族位于线粒体膜;ABCB 亚族分别位于内质网(1,5%)、线粒体(4,20%)、液泡(1,5%)、细胞膜(14,70%);ABCC 亚族分别位于液泡膜(3,20%),细胞膜(11,73%),内质网膜(1,7%);ABCD 亚族位于过氧化物酶体上;ABCE 亚族位于细胞膜上,ABCF 亚族位于核膜及细胞质基质中;ABCG 亚族分别位于细胞膜(23,96%),内质网膜(1,4%);ABCI 亚族均位于线粒体上。桉树焦枯病菌 ABC 转运蛋白 71% 的转运蛋白位于细胞膜、10% 位于液泡,其余部分位于线粒体、过氧化物酶体、内质网等内膜系

统上。与已知 ABC 转运蛋白的亚细胞结构相符,各亚族间的亚细胞结构具有共性,这表明桉树焦枯病菌 ABC 转运蛋白在功能上具有一定的保守性。

#### 2.5 系统进化分析

采用 MEGA 软件构建的 neighbor-join 系统进化树(图 2)显示,桉树焦枯病菌 ABC 转运蛋白分为 6 个亚群。其中,ABCE 与 ABCD 处于同一个亚群,说明其进化关系较为接近。同理,ABCF 亚族与 ABCA 亚族的进化关系较为接近。ABCA 亚族、ABCF 亚族与 ABCG 亚族的结构域各不相同,却处在同一分支上,说明这 3 个亚族的进化关系却较为接近。其余 5 个亚族的进化关系相当。

### 3 讨论

基于桉树焦枯病菌 *Ca. pseudoretaudii* 的基因组测序数据,本文对桉树焦枯病菌 ABC 转运蛋白进行全基因组水平鉴定与分类,共获得 70 个 ABC 转运蛋白,约占总编码蛋白数量的 0.49%。根据 ABC 转运蛋白的结构域及保守序列的相似性将这些转运蛋白分为 8 个亚族。此外,稻瘟病菌、禾谷镰刀菌、桉树焦枯病菌 ABC 转运蛋白的总数均大于酿酒酵

表2 桉树焦枯病菌 ABC 转运蛋白分类及亚细胞定位分析

Table 2 Classification and subcellular localization of ABC transporter in *C. pseudoreteaudii*

亚家族 Subfamily	基因号 Gene ID	命名 Name	长度 Length/aa	亚细胞定位* Subcellular localization	亚家族 Subfamily	基因号 Gene ID	命名 Name	长度 Length/aa	亚细胞定位* Subcellular localization
ABCA	Cp_Cap08593	CpABCA1	1 621	PM	ABCC	Cp_Cap14344	CpABCC15	1 429	PM
ABCB	Cp_Cap00365	CpABCB1	798	EM	ABCD	Cp_Cap06579	CpABCD1	722	P
ABCB	Cp_Cap01810	CpABCB2	1 390	PM	ABCD	Cp_Cap04965	CpABCD2	656	P
ABCB	Cp_Cap02628	CpABCB3	1 277	PM	ABCE	Cp_Cap11665	CpABCE1	609	PM
ABCB	Cp_Cap02815	CpABCB4	1 211	PM	ABCF	Cp_Cap01280	CpABCF1	743	N
ABCB	Cp_Cap03102	CpABCB5	1 127	PM	ABCF	Cp_Cap11255	CpABCF2	752	CY
ABCB	Cp_Cap07322	CpABCB6	1 190	PM	ABCF	Cp_Cap12880	CpABCF3	621	CY
ABCB	Cp_Cap07912	CpABCB7	1 207	PM	ABCG	Cp_Cap00536	CpABCG1	1 457	PM
ABCB	Cp_Cap08600	CpABCB8	1 285	PM	ABCG	Cp_Cap00571	CpABCG2	635	PM
ABCB	Cp_Cap11484	CpABCB9	1 327	PM	ABCG	Cp_Cap01821	CpABCG3	1 439	PM
ABCB	Cp_Cap12067	CpABCB10	1 152	PM	ABCG	Cp_Cap01775	CpABCG4	701	PM
ABCB	Cp_Cap12521	CpABCB11	1 304	PM	ABCG	Cp_Cap02612	CpABCG5	1 468	PM
ABCB	Cp_Cap12529	CpABCB12	1 254	PM	ABCG	Cp_Cap02881	CpABCG6	1 433	PM
ABCB	Cp_Cap13243	CpABCB13	492	M	ABCG	Cp_Cap03218	CpABCG7	1 491	PM
ABCB	Cp_Cap00820	CpABCB14	1 048	V	ABCG	Cp_Cap03468	CpABCG8	1 348	PM
ABCB	Cp_Cap03996	CpABCB15	714	M	ABCG	Cp_Cap03823	CpABCG9	1 492	PM
ABCB	Cp_Cap04716	CpABCB16	838	M	ABCG	Cp_Cap04531	CpABCG10	755	PM
ABCB	Cp_Cap07127	CpABCB17	830	PM	ABCG	Cp_Cap04543	CpABCG11	1 369	PM
ABCB	Cp_Cap07577	CpABCB18	910	PM	ABCG	Cp_Cap04568	CpABCG12	611	PM
ABCB	Cp_Cap12746	CpABCB19	788	M	ABCG	Cp_Cap04890	CpABCG13	1 080	EM
ABCB	Cp_Cap12310	CpABCB20	1 427	PM	ABCG	Cp_Cap05904	CpABCG14	636	PM
ABCC	Cp_Cap00418	CpABCC1	554	V	ABCG	Cp_Cap06750	CpABCG15	1 507	PM
ABCC	Cp_Cap00722	CpABCC2	1 549	V	ABCG	Cp_Cap07730	CpABCG16	1 476	PM
ABCC	Cp_Cap01309	CpABCC3	1 382	PM	ABCG	Cp_Cap08510	CpABCG17	1 544	PM
ABCC	Cp_Cap01317	CpABCC4	1 556	PM	ABCG	Cp_Cap08616	CpABCG18	1 504	PM
ABCC	Cp_Cap02359	CpABCC5	1 340	PM	ABCG	Cp_Cap08595	CpABCG19	1 221	PM
ABCC	Cp_Cap02674	CpABCC6	1 709	PM	ABCG	Cp_Cap08765	CpABCG20	543	PM
ABCC	Cp_Cap03034	CpABCC7	1 486	V	ABCG	Cp_Cap08982	CpABCG21	1 399	PM
ABCC	Cp_Cap04080	CpABCC8	505	PM	ABCG	Cp_Cap09400	CpABCG22	1 472	PM
ABCC	Cp_Cap05392	CpABCC9	1 313	PM	ABCG	Cp_Cap10618	CpABCG23	1 420	PM
ABCC	Cp_Cap08340	CpABCC10	1 460	PM	ABCG	Cp_Cap14059	CpABCG24	1 301	PM
ABCC	Cp_Cap09471	CpABCC11	1 493	PM	ABC1	Cp_Cap08118	CpABC1_1	383	M
ABCC	Cp_Cap11428	CpABCC12	1 550	PM	ABC1	Cp_Cap08671	CpABC1_2	694	M
ABCC	Cp_Cap11474	CpABCC13	1 463	PM	ABC1	Cp_Cap09029	CpABC1_3	497	M
ABCC	Cp_Cap14339	CpABCC14	1 464	EM	ABC1	Cp_Cap10407	CpABC1_4	440	M

\* 代表预测的蛋白双定位情况, M 代表线粒体膜 EM 代表内质网, V 代表液泡, PM 代表细胞膜, P 代表过氧化物酶体, S 代表分泌蛋白, N 代表细胞核, CY 代表细胞质。

表3 桉树焦枯病菌 ABC 转运蛋白各亚族功能预测

Table 3 Predicted of subfamily function of ABC transporter in *C. pseudoreteaudii*

亚家族 Subfamily	功能 Function	数量 Amounts
ABCA	转运植物毒素及药物 (Transport phytotoxin and drug)	1
	多药耐药性转运蛋白 (Multidrug Resistance Exporter, MDR)	13
ABCB	重金属转运蛋白 (Heavy Metal Transporter, HMT)	5
	线粒体肽转运蛋白 (Mitochondrial Peptide Exporter, MPE)	1
	性信息素转运蛋白 (The a-Factor Sex Pheromone Exporter, STE)	1
ABCC	药物耦合转运蛋白 (Drug Conjugate Transporter, DCT)	15
ABCD	过氧化物酶体脂肪酰基辅酶 A 转运蛋白 (Peroxisomal Fatty Acyl CoA transporter, P-FAT)	2
ABCE	核糖体合成及翻译 (Synthesis and translation of ribosome)	1
ABCF	40s 和 60s 核糖体合成 (Synthesis of 40s and 60s ribosome)	3
ABCG	多效耐药性转运蛋白 (Pleiotropic Drug Resistance, PDR)	24
ABC1	辅酶 Q 辅助因子 (Cofactor of CoQ)	4

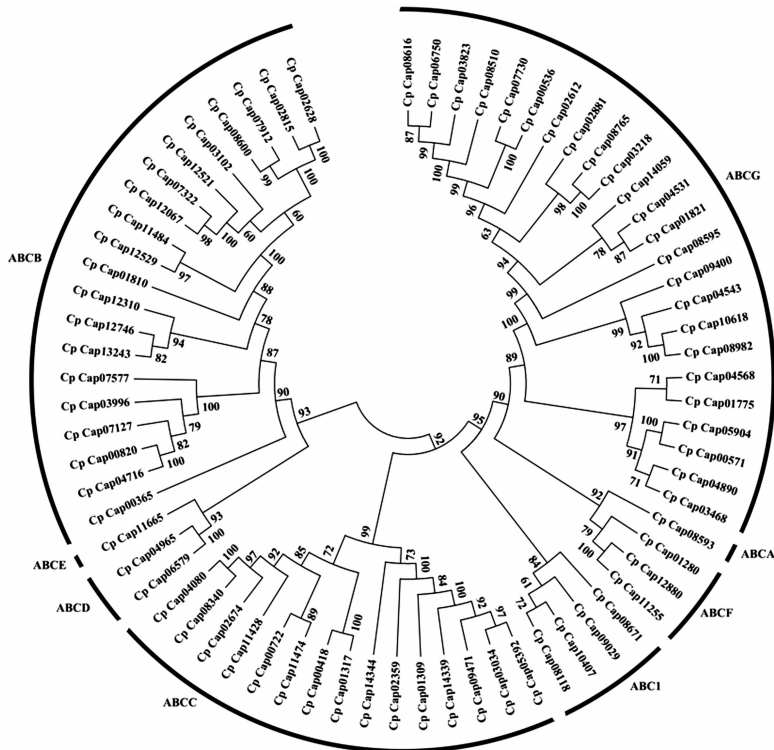


图2 桉树焦枯病菌 ABC 转运蛋白系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic analysis of ABC transport in *C. pseudoreteaudii*

母,这可能与这三种病原菌在侵染寄主过程中需要适应更为复杂的环境有关,包括寄主分泌的抗真菌次生代谢产物等。这种扩张现在在焦枯病菌上尤为明显,这与桉树富含次生代谢产物的特性密切相关。

转运蛋白在病原菌侵染过程中起着重要的作用,其通过细胞膜、细胞器膜运输病原菌在侵染过程中所需的营养物质、信号分子和寄主植物分泌的抗真菌毒素等,ABC 转运蛋白在其中扮演尤为重要的角色。真菌中,ABCA 转运蛋白的数量极少,酿酒酵母中不含有 ABCA 转运蛋白(表 1),在稻瘟病菌(*M. oryzae*)及 *Botryotinia fuckeliana* 中分别发现两个 ABCA 转运蛋白<sup>[9]</sup>。稻瘟病菌的 ABCA(ABC4)转运蛋白被验证为与其致病性和附着孢的生成有关<sup>[19]</sup>。桉树焦枯病菌中含有 1 个 ABCA 转运蛋白(表 3),与 ABC4 相似性达到 55%,我们推测其可能与焦枯病菌的致病性存在密切联系;桉树焦枯病菌中共含有 13 个 MDR 转运蛋(表 3),其主要与病原菌对药物的抗性机制有关。研究表明,赤霉菌(*Gibberella pulicaris*)MDR 转运蛋白(ABCB 亚族)Gpabc1 参与转运马铃薯产生的抗真菌毒素,使其能够抵御马铃薯块茎产生的抗真菌毒素日奇素等的毒害作用<sup>[20]</sup>。

除此之外,灰霉菌(*Botrytis cinerea*)BeatrB 转运蛋白、构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)AtrB 转运蛋白均与病原菌的致病性有关<sup>[21-22]</sup>。桉树焦枯病菌共含有 5 个 HMT 转运蛋白(表 3),其主要与重金属物质的转运有关。例如,*Botryotinia fuckeliana* 的 HMT 蛋白(ABCb 蛋白)参与转运铁载体肽分解产物<sup>[23]</sup>。

桉树焦枯病菌 ABCC 转运蛋白的预测功能主要为药物耦合转运蛋白(DCT, Drug conjugate transporter),与细胞内毒性化合物的转运有着密切联系,它可将毒性化合物转运至液泡中储存或转运至细胞外<sup>[9]</sup>。暗示着桉树焦枯病菌 ABCC 转运蛋白可能参与焦枯病菌到解毒作用的过程中。稻瘟病菌(*M. Oryzae*)DCT 转运蛋白(ABCC 亚族)MoABC5 参与转运水稻叶片产生的植物毒素,说明其与病原菌对抗真菌毒素的应答存在联系<sup>[24]</sup>。

桉树焦枯病菌中共含有 24 个 PDR 转运蛋白(表 3),PDR 转运蛋白除参与药物转运外,还参与多种脂质分子的易位。研究表明,指状青霉菌(*Penicillium digitatum*)中共有 5 个 ABCG 转运蛋白,其在抑霉唑的作用下发生上调表达<sup>[25]</sup>。禾谷镰刀菌(*F. graminearum*)的 PDR 转运蛋白(ABCG 亚族)

FgABC1 与抗真菌化合物苯霜灵的转运密切相关,将其编码基因敲除后,导致病原菌对苯霜灵的敏感性增加<sup>[26]</sup>。除此之外,酿酒酵母 ABCG(Snq2p, Pdr5p, Pdr10p, Pdr11p, Pdr15p) 通过输出多种疏水性分子来实现其多效耐药性<sup>[27]</sup>。酿酒酵母 ABCG(Pdr11p, Aus1p) 转运蛋白还与固醇类物质的摄入及厌氧生活有关<sup>[28]</sup>。桉树焦枯病菌 ABCG 转运蛋白与已知 ABCG 转运蛋白的功能具有较高的相似度,我们推测其与转运抗真菌化合物、脂类、固醇类等疏水分子存在密切联系。

桉树焦枯病菌中含有大量与抗真菌毒素转运有关的蛋白,包括 13 个 MDR 转运蛋白、15 个 DCT 转运蛋白、24 个 PDR 转运蛋白(表 3),约占桉树焦枯病菌 ABC 转运蛋白的 67%,这说明尽管桉树可通过增加多酚类化合物及黄酮类物质等抗真菌毒素提高抗焦枯病的能力,但焦枯病菌则通过 ABC 转运蛋白和 MFS(Major facilitator superfamily)等其他转运蛋白家族的协同作用,将细胞毒素转运到特定的细胞器中储存或分泌到细胞外,减少抗真菌次生代谢产物对病原菌的毒害作用。此外 ABCD、ABCE、ABCF、ABC1 转运蛋白还参与多项生命活动,包括细胞代谢、翻译、核糖体的合成、mRNA 的输出和  $\beta$  氧化等。这些功能在功能在酿酒酵母等真菌中已获得广泛验证<sup>[29-32]</sup>。

## 4 结论

ABC 转运蛋白在焦枯病菌侵染桉树的过程中可能发挥着多重作用。MDR、PDR、DCT 转运蛋白可作为外排泵将焦枯菌中的桉树抗真菌次生代谢物质排到胞外、转运外源化学物质、疏水性化学分子等。还可通过 HMT 转运蛋白转运重金属化学物质。此外 ABCD、ABCE、ABCF、ABC1 转运蛋白还参与多项生命活动,包括细胞代谢、翻译、核糖体的合成、mRNA 的输出、 $\beta$  氧化和通过为辅酶 Q 的辅助因子增强呼吸代谢来为焦枯病菌的侵染提供能量等。桉树焦枯病菌 ABC 转运蛋白的分类、鉴定、功能预测、结构域分析和亚细胞定位预测可为后期 ABC 转运蛋白的功能验证提供参考,为弄清 ABC 转运蛋白在焦枯病菌致病机制中所起作用奠定基础。

## 参考文献:

[1] Rees D C, Johnson E, Lewinson O. ABC transporters: the power to change. [J]. Nat Rev Mol Cell Biol. 2009, 10(3): 218-227.  
[2] Hollenstein K, Dawson R J, Locher K P. Structure and mechanism

of ABC transporter proteins. [J]. Curr Opin Struct Biol. 2007, 17(4): 412-418.  
[3] Theodoulou F L. Plant ABC transporters. [J]. Biochim Biophys Acta. 2000, 1465(1-2): 79-103.  
[4] Vasilio V, Vasilio K, Nebert D W. Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. [J]. Hum Genomics. 2009, 3(3): 281-290.  
[5] Dassa E, Bougie P. The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. [J]. Res Microbiol. 2001, 152(3-4): 211-229.  
[6] Stefanato F L, Abou-Mansour E, Buchala A, et al. The ABC transporter BeatrB from Botrytis cinerea exports camalexin and is a virulence factor on Arabidopsis thaliana. [J]. Plant J. 2009, 58(3): 499-510.  
[7] Mahringer A, Fricker G. ABC transporters at the blood-brain barrier. [J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2016, 12(5): 499-508.  
[8] Xie X, Wang G, Yang L, et al. Cloning and characterization of a novel Nicotiana tabacum ABC transporter involved in shoot branching. [J]. Physiol Plant. 2015, 153(2): 299-306.  
[9] Kovalchuk A, Driessen A J. Phylogenetic analysis of fungal ABC transporters. [J]. BMC Genomics. 2010, 11: 177.  
[10] Agrios G N. Plant pathology[M]. 5th ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2004: 922.  
[11] Booth T H, Jovanovic T, Old K M, et al. Climatic mapping to identify high-risk areas for Cylindrocladium quinqueseptatum leaf blight on eucalypts in mainland South East Asia and around the world. [J]. Environ Pollut. 2000, 108(3): 365-372.  
[12] 陈全助,陈慧洁,郭文硕,等. 桉树焦枯病菌(Calonectria pseudoreteaudii)生物学特性测定[J]. 福建林学院学报. 2014, 34(4): 328-332.  
[13] Chen S F, Lombard L, Roux J, et al. Novel species of Calonectria associated with Eucalyptus leaf blight in Southeast China. [J]. Personia. 2011, 26: 1-12.  
[14] Chen Q, Guo W, Feng L, et al. Transcriptome and proteome analysis of Eucalyptus infected with Calonectria pseudoreteaudii. [J]. J Proteomics. 2015, 115: 117-131.  
[15] Lombard L, Crous P W, Wingfield B D, et al. Phylogeny and systematics of the genus Calonectria. [J]. Stud Mycol. 2010, 66: 31-69.  
[16] Tian L W, Xu M, Li Y, et al. Phenolic compounds from the branches of Eucalyptus maidenii. [J]. Chem Biodivers. 2012, 9(1): 123-130.  
[17] 冯丽贞,陈全助,郭文硕,等. 桉树的次生代谢及其对焦枯病抗性的关系[J]. 中国生态农业学报. 2008(02): 426-430.  
[18] Paumi C M, Chuk M, Snider J, et al. ABC transporters in Saccharomyces cerevisiae and their interactors: new technology advances the biology of the ABCC (MRP) subfamily. [J]. Microbiol Mol Biol Rev. 2009, 73(4): 577-593.  
[19] Gupta A, Chattoo B B. Functional analysis of a novel ABC transporter ABC4 from Magnaporthe grisea. [J]. FEMS Microbiol Lett. 2008, 278(1): 22-28.

- [20] Fleissner A, Sopalla C, Weltring K M. An ATP-binding cassette multidrug-resistance transporter is necessary for tolerance of *Gibberella pulicaris* to phytoalexins and virulence on potato tubers. [J]. Mol Plant Microbe Interact. 2002, 15(2): 102 – 108.
- [21] Stefanato F L, Abou-Mansour E, Buchala A, et al. The ABC transporter BeatrB from *Botrytis cinerea* exports camalexin and is a virulence factor on *Arabidopsis thaliana*. [J]. Plant J. 2009, 58(3): 499 – 510.
- [22] Andrade A C, Del S G, Van Nistelrooy J G, et al. The ABC transporter AtrB from *Aspergillus nidulans* mediates resistance to all major classes of fungicides and some natural toxic compounds. [J]. Microbiology. 2000, 146 (Pt 8): 1987 – 1997.
- [23] Kragl C S M E M. The *Aspergillus fumigatus* ABC transporter AbcB is involved in excretion of siderophore breakdown product. [Z]. Edinburgh, Scotland, UK; 2008130.
- [24] Kim Y, Park S Y, Kim D, et al. Genome-scale analysis of ABC transporter genes and characterization of the ABCC type transporter genes in *Magnaporthe oryzae*. [J]. Genomics. 2013, 101(6): 354 – 361.
- [25] Sun X, Ruan R, Lin L, et al. Genomewide investigation into DNA elements and ABC transporters involved in imazalil resistance in *Penicillium digitatum*[J]. Fems Microbiology Letters, 2013, 348(1): 11 – 8.
- [26] Gardiner D M, Stephens A E, Munn A L, et al. An ABC pleiotropic drug resistance transporter of *Fusarium graminearum* with a role in crown and root diseases of wheat. [J]. FEMS Microbiol Lett. 2013, 348(1): 36 – 45.
- [27] Balzi E, Goffeau A. Yeast multidrug resistance: the PDR network. [J]. J Bioenerg Biomembr. 1995, 27(1): 71 – 76.
- [28] Wilcox L J, Balderes D A, Wharton B, et al. Transcriptional profiling identifies two members of the ATP-binding cassette transporter superfamily required for sterol uptake in yeast. [J]. J Biol Chem. 2002, 277(36): 32466 – 32472.
- [29] Hettema E H, Van Roermund C W, Distel B, et al. The ABC transporter proteins Pat1 and Pat2 are required for import of long-chain fatty acids into peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. [J]. EMBO J. 1996, 15(15): 3813 – 3822.
- [30] Dong J, Lai R, Nielsen K, et al. The essential ATP-binding cassette protein RLII functions in translation by promoting preinitiation complex assembly. [J]. J Biol Chem. 2004, 279(40): 42157 – 42168.
- [31] Dong J, Lai R, Jennings J L, et al. The novel ATP-binding cassette protein ARB1 is a shuttling factor that stimulates 40S and 60S ribosome biogenesis. [J]. Mol Cell Biol. 2005, 25(22): 9859 – 9873.
- [32] Do T Q, Hsu A Y, Jonassen T, et al. A defect in coenzyme Q biosynthesis is responsible for the respiratory deficiency in *Saccharomyces cerevisiae* abc1 mutants. [J]. J Biol Chem. 2001, 276(21): 18161 – 18168.

(责任编辑:崔 贝)