

李梦倩, 樊继德, 葛洁, 等. 大蒜全基因组 *ABCB* 基因鉴定及表达分析[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(12): 2207-2218.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2024.12.003

大蒜全基因组 *ABCB* 基因鉴定及表达分析

李梦倩, 樊继德, 葛洁, 杨青青, 陆新娟, 赵永强, 刘灿玉, 张碧薇, 刘光杨, 杨艳, 杨峰

(江苏徐淮地区徐州农业科学研究所, 江苏 徐州 221121)

摘要: 为探究生长素转运蛋白 *ABCB* 基因(*AsaABCB*)在大蒜体细胞胚发生过程中的作用机理,以徐蒜6号为试验材料,采取生物信息学方法,对大蒜 *AsaABCB* 基因家族成员进行全基因组鉴定,并利用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)技术进行胚发育过程中 *AsaABCB* 家族基因表达模式分析。结果表明,大蒜中共存在 17 个 *AsaABCB* 基因,定位在 7 条染色体上,在系统进化树上可分为 5 个亚组。*AsaABCB* 基因编码的氨基酸数量为 545~1 379 个,相对分子量为 59 627.17~152 864.21,理论等电点为 5.72~9.34。*AsaABCB4*、*AsaABCB6*、*AsaABCB15* 蛋白定位于细胞膜和细胞质中,其余 *AsaABCB* 蛋白仅定位于细胞膜。17 个 *AsaABCB* 基因的启动子区存在 196 个光反应元件、48 个茉莉酸反应调控元件、26 个脱落酸反应元件及 12 个生长素响应元件。11 个 *AsaABCB* 家族基因在大蒜胚性愈伤组织(EC)阶段相对表达量较高,5 个 *AsaABCB* 家族基因在愈伤组织(CA)阶段表达量较高,这表明该家族基因可能主要调控大蒜体细胞胚发育过程中 EC 和 CA 的形成与发育。本研究结果为深入探索大蒜体细胞胚发育过程中 *AsaABCB* 基因的功能奠定基础。

关键词: 大蒜; *ABCB* 基因家族; 体细胞胚

中图分类号: Q786;S633.4

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2024)12-2207-12

Genome-wide identification and expression analysis of *ABCB* genes in garlic(*Allium sativum* L.)

LI Mengqian, FAN Jide, GE Jie, YANG Qingqing, LU Xinjuan, ZHAO Yongqiang, LIU Canyu, ZHANG Biwei, LIU Guangyang, YANG Yan, YANG Feng

(Xuzhou Institute of Agricultural Sciences of the Xuhuai District of Jiangsu Province, Xuzhou 221121, China)

Abstract: In order to explore the mechanism of auxin transporter *ABCB* gene (*AsaABCB*) in the process of somatic embryogenesis of garlic, the whole genome of garlic *AsaABCB* gene family members was identified by bioinformatics method. The expression pattern of *AsaABCB* family genes during embryo development was analyzed by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) using Xusuan 6 as experimental material. The results showed that there were 17 *AsaABCB* genes in garlic, which were located on seven chromosomes and could be divided into five subgroups. The number of amino acids encoded by *AsaABCB* gene was 545~1 379, the relative molecular weight was 59 627.17~152 864.21, and the theoretical isoelectric point was 5.72~9.34. *AsaABCB4*, *AsaABCB6* and *AsaABCB15* proteins were localized in the cell membrane and cytoplasm, and the remaining *AsaAB-*

CB proteins were only localized in the cell membrane. There were 196 light response elements, 48 jasmonic acid response elements, 26 abscisic acid response elements and 12 auxin response elements in the promoter region of 17 *AsaABCB* genes. The relative expression levels of 11 *AsaABCB* family genes were higher in the embryogenic callus (EC) stage of garlic, and the expression levels of five *AsaABCB* family

收稿日期: 2024-03-07

基金项目: 徐州市农业科学院科研基金项目(XM2023009); 徐州市政策引导类计划(产学研合作)项目(KC22452); 国家现代农业产业技术体系项目(CARS-24-A-07)

作者简介: 李梦倩(1996-), 女, 河南鹤壁人, 硕士, 研究实习员, 主要从事大蒜育种研究。(E-mail) limengqian1014@163.com

通讯作者: 杨峰, (E-mail) xz-yangfeng@163.com

genes were higher in the callus (CA) stage, indicating that the family genes may mainly regulate the formation and development of EC and CA during the development of garlic somatic embryos. The results of this study lay a foundation for further exploring the function of *AsaABCB* genes during garlic somatic embryo development.

Key words: garlic; *ABCB* gene family; somatic embryo

大蒜(*Allium sativum* L.)是一种百合科葱属多年生草本植物,营养成分丰富,是药食兼用蔬菜,具有重要的经济和药用价值^[1-2]。大蒜花形态建成对温度较为敏感,高温环境下,大蒜配子体发育异常,受精过程受阻,常导致大蒜花粉不育,因此在生产上通常利用无性繁殖的方式进行种植。但无性繁殖方式不仅影响大蒜的产量和品质,制约大蒜新品种选育,还降低了中国大蒜产品在国际市场上的竞争优势^[3]。体细胞胚具有遗传稳定性好、繁殖系数高和再生个体整齐等优点^[4],被认为是育种过程中的重要试验材料,也是良好的遗传转化受体^[5-6]。目前关于大蒜体细胞胚发育与调控的分子机理研究较少,导致体细胞胚的优势不能充分发挥作用。大蒜基因组测序工作的完成,使研究大蒜体细胞胚发育的分子调控机理成为可能^[7]。

生长素是诱导体细胞胚发生的重要因子,而生长素转运蛋白在介导生长素进入组织或细胞的过程中起重要作用。在外源生长素的作用下,生长素转运蛋白通过调节植物组织或细胞中内源生长素的分布,从而调控体细胞胚的发生^[8-9]。Márquez-López等^[10]研究发现体细胞胚的形成不仅与生长素的积累量有关,还与生长素在外植体中的分布相关。Su等^[11]发现细叶百合体细胞胚诱导过程中,边缘细胞会随着环境中生长素的减少从而积累自身生长素含量。目前,拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)^[12]、水稻(*Oryza sativa* L.)^[13]、葡萄(*Vitis vinifera* L.)^[14]、玉米(*Zea mays* L.)^[15]、高粱(*Sorghum bicolor* L.)^[16]、大豆[*Glycine max* (L.) Merr.]^[17]等植物中生长素转运的调控机理得到了研究。生长素转运主要以主动运输形式进行,运输过程中除需要 ATP (Adenosine triphosphate) 外,还需要特殊的转运载体,如生长素内流载体蛋白(AUX1/LAX)^[18]、输出载体蛋白(PIN)和 ABCB 蛋白^[19-20]。

ABCB 蛋白隶属 ATP 结合盒蛋白(ABC)家族的 B 亚家族,其成员多为膜结合蛋白,在激素、糖类和次生代谢物的跨膜运输中扮演着重要的角色^[21-22]。ABC 蛋白的保守结构域为核苷酸结合结

构域(Nucleotide-binding domain, NBD) (PF00005),由 Walker A 序列、Walker B 序列、ABC 特征基序、H 环和 Q 环等 5 个保守基序组成^[23]。除 NBD 外,ABC 转运蛋白还包含跨膜结构域(Transmembrane domain, TMD) (PF00664)^[24]。ABC 家族蛋白在植物中主要有全分子转运蛋白、半分子转运蛋白和可溶性蛋白 3 种存在形式^[25]。一般情况下,全分子转运蛋白包含 2 个 NBD 和 2 个 TMD,半分子转运蛋白包含 1 个 NBD 和 1 个 TMD,可溶性蛋白仅包含 1 个 NBD,而 ABCB 亚家族蛋白中不包含可溶性蛋白^[26]。一些 ABCB 亚家族成员已被证实参与生长素的转运^[27]。Jenness 等^[28]研究结果显示,拟南芥 *AtABCB21* 基因能够调控子叶、根韧皮部和叶片中的生长素水平,促进生长素向顶输送。

目前,拟南芥^[12]、水稻^[13]、大白菜^[29]、山核桃^[30]、毛竹^[31]等作物 *ABCB* 基因家族的全基因组分析已经完成,而大蒜 *AsaABCB* 基因家族的鉴定和表达分析还比较缺乏。本研究利用大蒜基因组测序数据^[7],对大蒜 *AsaABCB* 基因家族进行鉴定,明确大蒜 *AsaABCB* 基因的结构、染色体定位、启动子元件及基因编码的蛋白质理化性质、跨膜区域、进化树及亚细胞定位,并对体细胞胚发育过程中 *AsaABCB* 基因的表达特征进行分析,旨在为深入研究大蒜体细胞胚发生过程中 *AsaABCB* 基因的作用以及体细胞胚的培育和调控提供基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料与处理

供试大蒜品种为徐蒜 6 号,保存于江苏徐淮地区徐州农业科学研究所。B₅ 培养基、MS 培养基和 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)购自北京索莱宝科技有限公司,呋喃甲氨基嘌呤(KT)购自上海麦克林生化科技股份有限公司。在 B₅ 培养基中添加 2,4-D 和 KT,得到 2,4-D 含量为 2 mg/L、KT 含量为 0.5 mg/L 的 B₅ 培养基,再在上述培养基中添加琼脂和蔗糖得到蔗糖含量为 30 g/L、琼脂含量为 7 g/L 的培养基,用于愈伤组织和胚性愈伤组织的诱导培养。在 MS 培养基中添加 2,4-D 和 KT,得到 2,4-D 含量为

1 mg/L、KT 含量为 0.5 mg/L 的 MS 培养基,再在上述培养基中添加琼脂和蔗糖得到蔗糖含量为 30 g/L、琼脂含量为 7 g/L 的培养基,用于体细胞胚的诱导培养。

以大蒜鳞茎盘为外植体(EX),利用添加 2,4-D 和 KT 的 B₅ 培养基在 25 ℃ 的培养箱中暗培养 60 d,在培养 10 d 和 60 d 时取样得到愈伤组织(CA)和胚性愈伤组织(EC)。然后转入添加 2,4-D 和 KT 的 MS 培养基中继续培养 60 d,得到体细胞胚(SE)。每次取样 0.1 g,3 次重复,取样得到的外植体(EX)、愈伤组织(CA)、胚性愈伤组织(EC)和体细胞胚(SE)样品液氮冻存后置于-80 ℃ 冰箱存放。

1.2 试验方法

1.2.1 *AsaABCB* 基因鉴定 根据大蒜基因组数据^[7],构建 *AsaABCB* 基因编码的氨基酸序列本地数据库,同时以拟南芥的 *AtABCB* 蛋白氨基酸序列(<https://www.arabidopsis.org/>)和水稻的 *OsABCB* 蛋白氨基酸序列作为参考(<https://www.uniprot.org/>)。通过 Pfam 数据库(<https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/pfam/>)查找并下载保守结构域为 ABC 转运结构域(PF00005)和 ABC 跨膜结构域(PF00664)的 HMM 格式文件,利用 HMMER 3.0 软件在大蒜基因组中寻找 *AsaABCB* 基因,然后将候选 *AsaABCB* 基因编码的所有蛋白质氨基酸序列上传到 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)数据库,进一步验证候选基因编码的蛋白质中是否存在 ABC 转运结构域和 ABC 跨膜结构域,剔除缺少 ABC 转运结构域、ABC 跨膜结构域及氨基酸序列小于 300 编码的候选基因。最后结合 NCBI CDD 数据库,进一步确定大蒜 *AsaABCB* 家族基因成员。*AsaABCB* 蛋白理化性质分析使用在线软件 Expasy(<https://web.expasy.org/protparam/>),亚细胞定位预测使用在线软件 Cell-PLoc 2.0(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>),*AsaABCB* 蛋白跨膜区分析使用在线软件 TMHMM2(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)。

1.2.2 *AsaABCB* 基因系统进化树构建 以拟南芥和水稻的 *ABCB* 蛋白氨基酸序列作为参考,使用 MEGA 11 软件对候选 *AsaABCB* 蛋白的氨基酸序列进行系统进化树分析,采用最大似然法(ML, Maximum Likelihood)构建系统进化树,Bootstrap 设置为 1 000,其他参数为默认值。

1.2.3 *AsaABCB* 基因结构、保守基序分析与染色体定位 利用 MEME(<https://meme-suite.org/tools/meme>)软件对 17 个 *AsaABCB* 基因的保守基序进行分析,利用 TBtools 软件对 *AsaABCB* 基因的染色体位置、基因结构和保守基序分布情况进行图片绘制。

1.2.4 *AsaABCB* 基因启动子顺式作用元件预测 根据大蒜基因组数据,提取 17 个 *AsaABCB* 基因起始位点上游 2 000 bp 的序列,利用在线软件 PlantCARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)对其进行启动子元件分析,利用 TBtools 软件将其可视化。

1.2.5 *AsaABCB* 基因对大蒜 6 号体细胞胚发育的调控和表达分析 取冷冻保存的外植体(EX)、愈伤组织(CA)、胚性愈伤组织(EC)和体细胞胚(SE)4 种不同状态下的样品,液氮环境下研磨成粉末,利用柱式植物总 RNA 抽提纯化试剂盒[生工生物(上海)工程股份有限公司产品]提取大蒜 6 号的总 RNA,利用反转录试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司产品)合成 cDNA。利用 Primer 6.0 软件设计引物(表 1),引物由生工生物(上海)工程股份有限公司合成。以 *AsACTIN* 为内参基因,利用 SGExcel Universal SYBR qPCR Mix 试剂盒[生工生物(上海)工程股份有限公司产品]和实时荧光定量 PCR 系统进行扩增反应。反应体系为:10 μL SGExcel Universal SYBR qPCR Mix,7.2 μL 无菌去离子水,正向引物和反向引物各 0.4 μL,以及 2 μL cDNA。反应程序为:95 ℃ 预变性 30 s;95 ℃ 变性 15 s,60 ℃ 退火/延伸 30 s,40 个循环。设 3 个生物学重复,利用 $-2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因的相对表达量。

1.3 数据处理

利用 Excel 2007 和 IBM SPSS Statistics 27.0 软件对试验数据进行统计和分析,利用 Duncan's 法进行处理间差异显著性分析($P < 0.05$),利用 TBtools 软件进行图片绘制。

2 结果与分析

2.1 大蒜 *AsaABCB* 基因家族成员的鉴定及其编码的蛋白质基本理化性质

大蒜全基因组中共鉴定出 17 个 *AsaABCB* 基因,其编码的蛋白质氨基酸数量为 545~1 379,相对分子量为 59 627.17~152 864.21,理论等电点为 5.72~9.34。其中 *AsaABCB4*、*AsaABCB6*、*AsaAB-*

CB13、AsaABCB17 不稳定指数大于 40,为不稳定性蛋白。AsaABCB17 总平均亲水性指数为负数,为亲水性蛋白,其他均为疏水性蛋白。亚细胞定位预测结果表明,AsaABCB4、AsaABCB6、AsaABCB15 3 个

蛋白质定位于细胞膜和细胞质,其他 14 个蛋白质仅定位于细胞膜(表 2)。跨膜区域预测发现 17 个 AsaABCB 蛋白都具有跨膜区域,但跨膜区域的数量各不相同(图 1)。

表 1 qRT-PCR 引物信息
Table 1 Primer information for qRT-PCR

基因名称	基因号	正向引物 (5'→3')	反向引物 (5'→3')
<i>AsaABCB1</i>	Asa0G00966.1	TGGAAGCACAACTACAGACATAGC	AGCGGTTAGGTTTCATTGGGTTTC
<i>AsaABCB2</i>	Asa0G05181.1	GGAAGCACCACCTAGCAAGTC	GCCTACAATCATCAGAAGCACATC
<i>AsaABCB3</i>	Asa0G05182.1	ATGCGGTCGGAAGTATAAGAACAG	CTCCAAAGCCAATGCCACTAATAAG
<i>AsaABCB4</i>	Asa2G05686.1	ATGATGAGTTGCTTGGATTGAATGG	ATCTGAAATGTTGCTGGCTCTTTG
<i>AsaABCB5</i>	Asa3G03189.1	ATCAGTATAGCACAGGAGCAGATG	CCAAGAGCACCTAATACAGCATAAG
<i>AsaABCB6</i>	Asa3G04644.1	TAGAGGTATCGTGTGGATTATTACTG	GTCTGTGAACACTTGGCTAACTATG
<i>AsaABCB7</i>	Asa3G04774.1	GCATACCCAACAAGACCTCAAATTC	ACATCCACTCATTCAGCGATTTC
<i>AsaABCB8</i>	Asa4G00446.1	GCTGTTCTTGTGTTTATGGGATAG	CAGTGCGGATGGCTCTTAGTG
<i>AsaABCB9</i>	Asa4G03059.1	GTAACAGGAACAATAATGGAGAAGAAGG	TCTAGCCACAAGTGGCCACATC
<i>AsaABCB10</i>	Asa4G04258.1	AATCCTCGCTGCTTCTGAATCTG	CGCTCTCCTACTATCGTATCATAACC
<i>AsaABCB11</i>	Asa4G06201.1	GCTTGGCTATTCAATTCTGCTAGTG	AGAGTTCTCCAGTTCGTGTACATC
<i>AsaABCB12</i>	Asa5G00162.1	GTGCTCAGTGCCGTTCTATCC	GAAGAAGTGCTGTATGGTGTGAATAG
<i>AsaABCB13</i>	Asa5G04056.1	AATGCCCACGACTTCATAAGCG	TTTGTCCACCTGATAGCTGCAC
<i>AsaABCB14</i>	Asa6G05384.1	CCTGGCGATTGTCATATTGTTCTC	ATCTCATCTTTGCTGCTTGTCTTTTC
<i>AsaABCB15</i>	Asa6G05496.1	CCGACCTGATAACCTGATACTACG	ATCCGCTGCTTCCTACCAATG
<i>AsaABCB16</i>	Asa7G01711.1	TGGTGGAAGCAAAGTGAAGTCG	ATTACGCCTCCTTGAAGTGC
<i>AsaABCB17</i>	Asa8G04380.1	TTGGTTCAGGAAGCACTTGATAATATG	GTCGATAGTCTATGAGCAACAGTTATG
<i>AsaACTIN</i>		TCCTAACCGAGCGAGGCTACAT	GGAAGCACTTCTGGGCACC

表 2 大蒜 *AsaABCB* 家族基因编码的蛋白质理化性质
Table 2 Physicochemical properties of proteins encoded by garlic *AsaABCB* family genes

基因名称	基因号	编码的蛋白质					
		氨基酸数量	相对分子量	理论等电点	不稳定指数	总平均亲水性指数	亚细胞定位
<i>AsaABCB1</i>	Asa0G00966.1	1 217	134 026.53	8.29	36.73	0.118	细胞膜
<i>AsaABCB2</i>	Asa0G05181.1	651	70 587.42	8.69	27.54	0.065	细胞膜
<i>AsaABCB3</i>	Asa0G05182.1	545	59 627.17	8.92	33.24	0.199	细胞膜
<i>AsaABCB4</i>	Asa2G05686.1	1 365	150 912.11	5.72	45.48	0.154	细胞膜、细胞质
<i>AsaABCB5</i>	Asa3G03189.1	1 159	126 193.65	8.43	39.49	0.090	细胞膜
<i>AsaABCB6</i>	Asa3G04644.1	1 379	152 864.21	6.03	47.40	0.055	细胞膜、细胞质
<i>AsaABCB7</i>	Asa3G04774.1	1 230	134 876.77	8.53	33.11	0.094	细胞膜
<i>AsaABCB8</i>	Asa4G00446.1	735	80 912.84	9.34	32.63	0.017	细胞膜
<i>AsaABCB9</i>	Asa4G03059.1	687	76 826.77	8.83	37.75	0.072	细胞膜
<i>AsaABCB10</i>	Asa4G04258.1	1 191	128 230.74	7.93	30.00	0.181	细胞膜
<i>AsaABCB11</i>	Asa4G06201.1	633	68 202.87	8.70	32.23	0.133	细胞膜
<i>AsaABCB12</i>	Asa5G00162.1	1 320	144 330.45	6.87	37.74	0.064	细胞膜
<i>AsaABCB13</i>	Asa5G04056.1	966	105 129.82	8.33	43.72	0.042	细胞膜
<i>AsaABCB14</i>	Asa6G05384.1	1 261	138 325.09	8.93	35.34	0.144	细胞膜
<i>AsaABCB15</i>	Asa6G05496.1	1 201	131 103.43	8.87	39.15	0.095	细胞膜、细胞质
<i>AsaABCB16</i>	Asa7G01711.1	643	70 245.52	8.39	29.65	0.224	细胞膜
<i>AsaABCB17</i>	Asa8G04380.1	776	84 804.21	6.88	40.43	-0.016	细胞膜

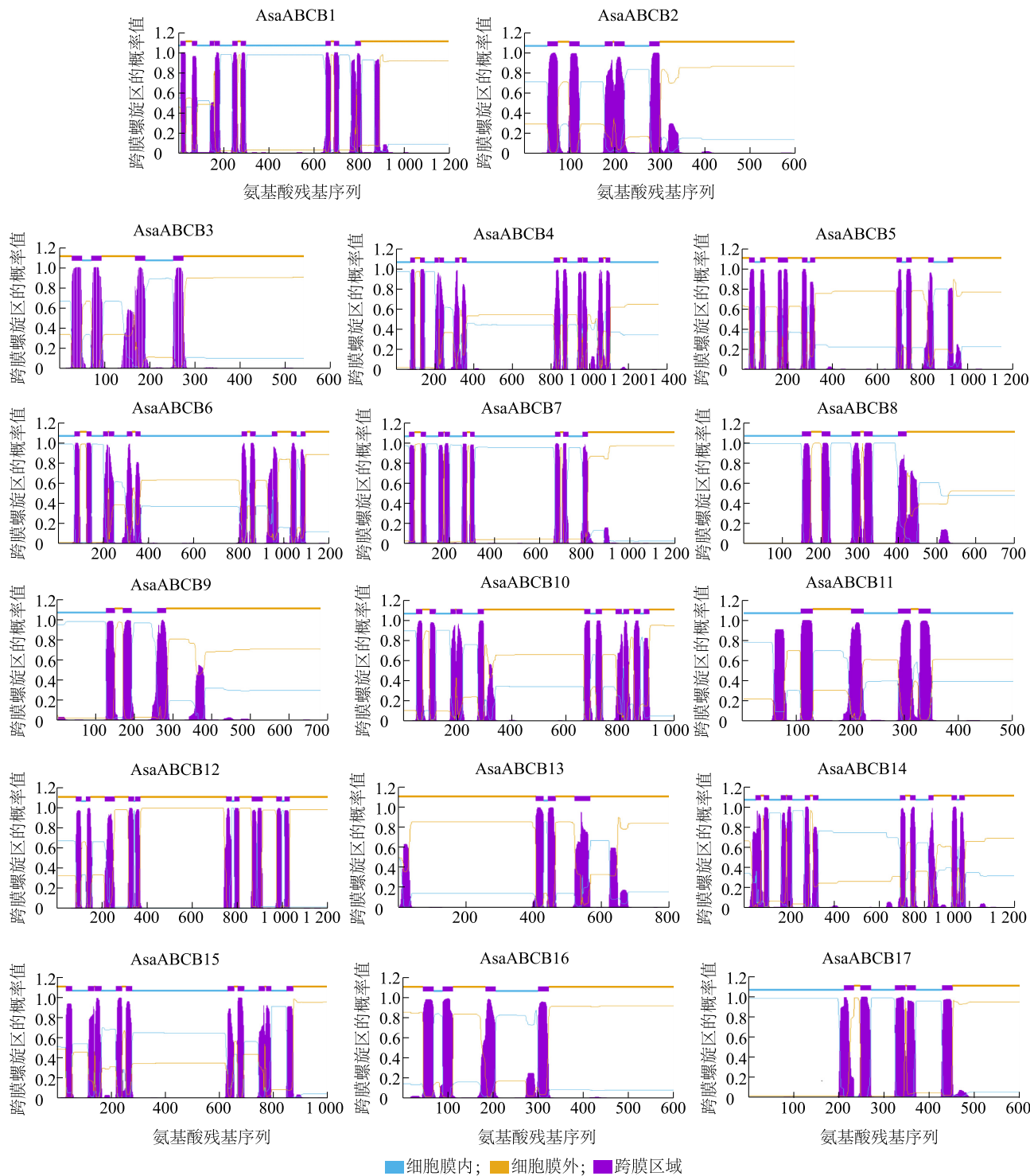


图1 大蒜 *AsaABCB* 蛋白跨膜区域预测
Fig.1 Predicted transmembrane regions of garlic *AsaABCB* proteins

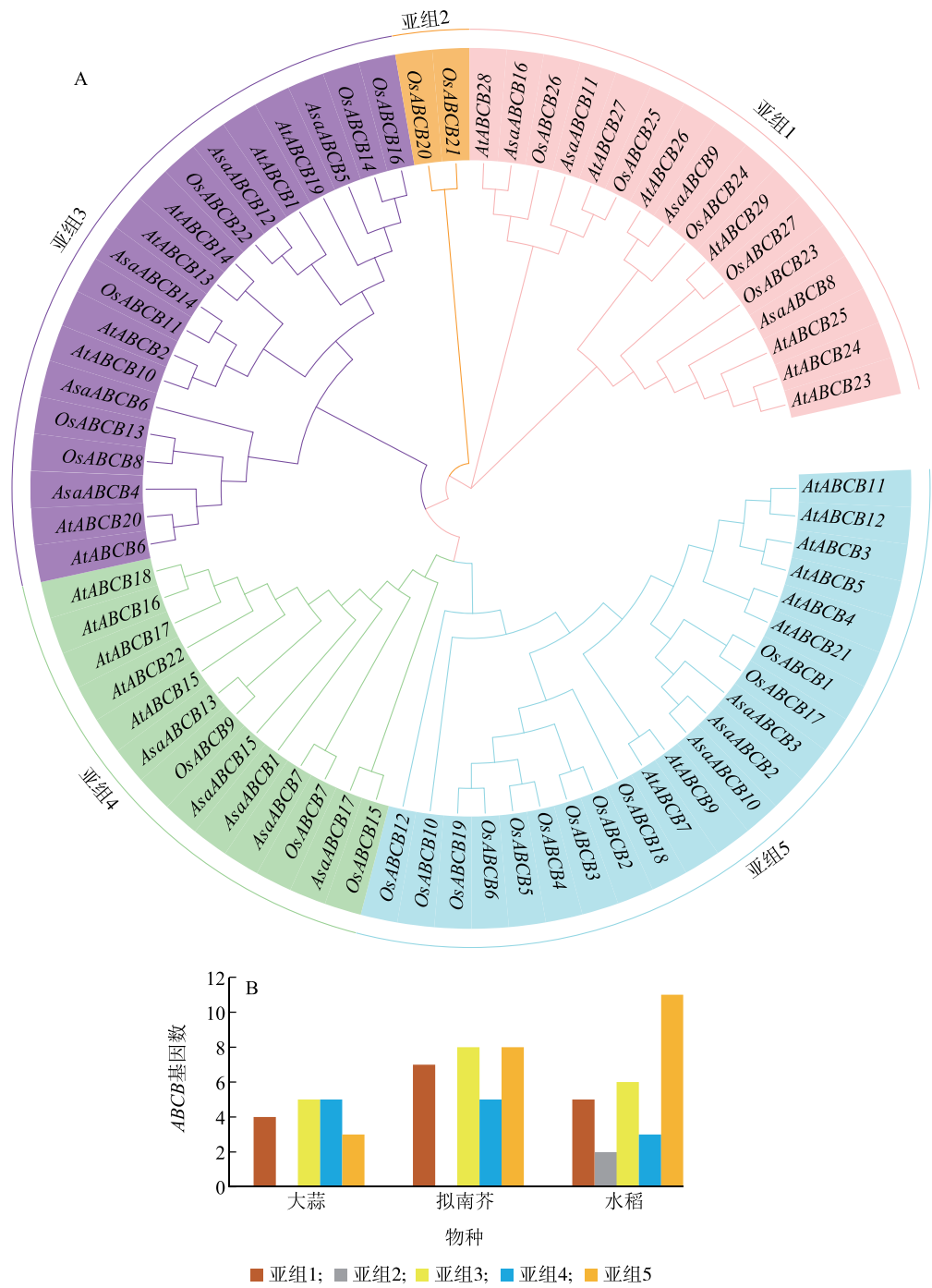
2.2 大蒜 *AsaABCB* 家族系统进化树

大蒜、水稻和拟南芥中编码具有 ABC 转运蛋白保守结构域(PF00005)和跨膜结构域(PF00664)蛋白质的 *ABCB* 基因构建的系统发育进化树如图 2 A 所示。根

据进化关系的远近,大蒜、水稻和拟南芥的 *ABCB* 基因可以分为 5 个亚组(亚组 1~亚组 5),其成员数量分别为 16 个、2 个、19 个、13 个、22 个(图 2B)。除亚组 2 外,其他亚组均含有 *AsaABCB* 家族成员。亚组 1 含

AsaABCB8、*AsaABCB9*、*AsaABCB11*、*AsaABCB16* 4 个 *AsaABCB* 基因;亚组 3 含 *AsaABCB4*、*AsaABCB5*、*AsaABCB6*、*AsaABCB12*、*AsaABCB14* 5 个 *AsaABCB* 基因;亚组 4

含 *AsaABCB1*、*AsaABCB7*、*AsaABCB13*、*AsaABCB15*、*AsaABCB17* 5 个 *AsaABCB* 基因;亚组 5 含 *AsaABCB2*、*AsaABCB3*、*AsaABCB10* 3 个 *AsaABCB* 基因。



AtABCB1 ~ *AtABCB28*、*OsABCB1* ~ *OsABCB27* 和 *AsaABCB1* ~ *AsaABCB17* 分别为拟南芥、水稻和大蒜的 *ABCB* 基因。
图 2 大蒜、水稻和拟南芥中 72 个 *ABCB* 家族成员系统进化分析
Fig.2 Phylogenetic analysis of 72 *ABCB* family members in garlic, rice and *Arabidopsis thaliana*

2.3 大蒜 *AsaABCB* 基因染色体定位
大蒜 *AsaABCB* 基因的染色体定位预测结果如

图 3 所示。14 个 *AsaABCB* 家族基因定位在大蒜基因组 7 条染色体上, 另外 3 个基因 *AsaABCB1*、

AsaABCB2、*AsaABCB3* 未能定位在大蒜的 8 条染色体上,因此将其所在位置命名为 0 号染色体。其中 *AsaABCB8*、*AsaABCB9*、*AsaABCB10*、*AsaABCB11* 4 个基因定位在 4 号染色体上, *AsaABCB5*、*AsaABCB6*、

AsaABCB7 3 个基因定位在 3 号染色体上, 2 号、7 号、8 号染色体各有 1 个家族基因, 1 号染色体上没有 *AsaABCB* 基因。

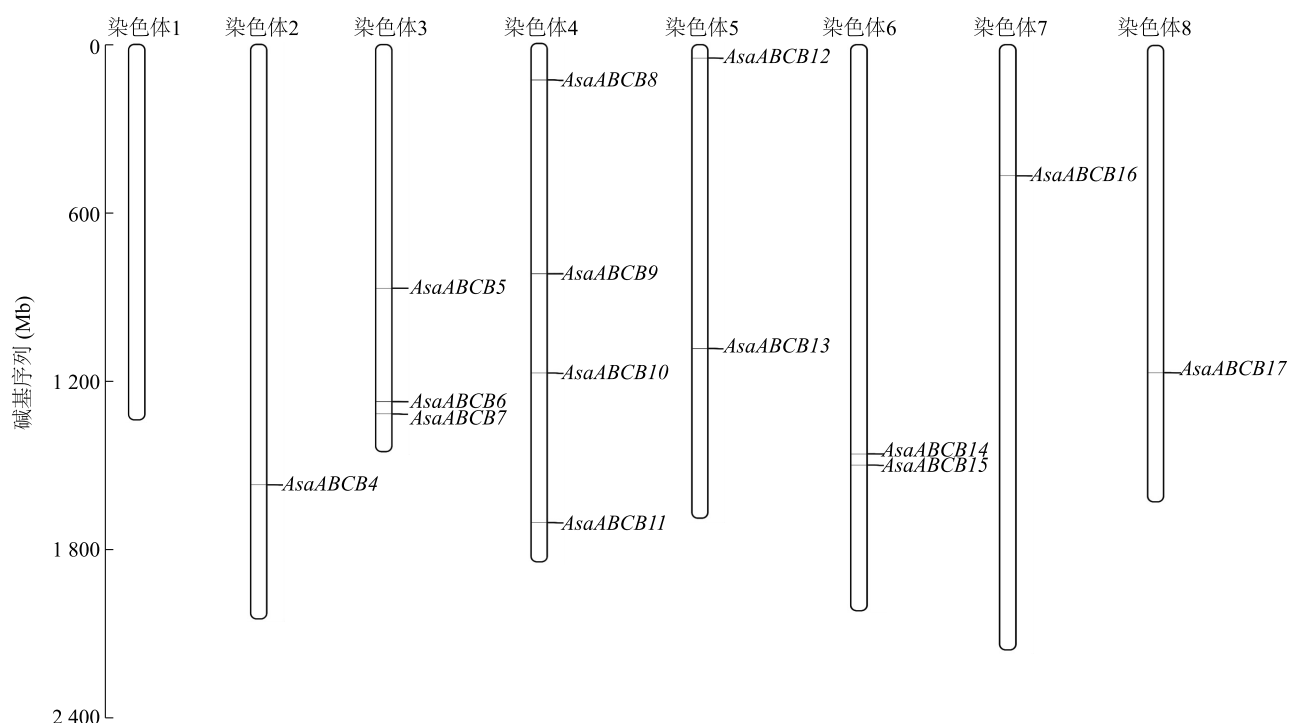


图3 大蒜 *AsaABCB* 家族成员在染色体上的定位

Fig.3 The localization of *AsaABCB* family members on chromosomes in garlic

2.4 大蒜 *AsaABCB* 蛋白的保守基序及结构域

大蒜 *AsaABCB* 蛋白的保守基序预测结果如图 4A 所示。从图中可以看出,大蒜 *AsaABCB* 蛋白中共鉴定出 6 种保守基序。除 *AsaABCB3*、*AsaABCB8*、*AsaABCB16* 外,其他 *AsaABCB* 蛋白均包含全部的 6 种保守基序,且其位置一致,表明这 14 个蛋白质的保守性较强。*AsaABCB3* 蛋白没有保守基序 6 (Motif 6), *AsaABCB8* 蛋白和 *AsaABCB16* 蛋白没有保守基序 2 (Motif 2)。

所有 *AsaABCB* 蛋白均含有 TMD 结构域和 NBD 结构域,且排列顺序为 TMD-NBD (图 4 B),这说明本研究鉴定得到的 17 个蛋白质均为大蒜 *AsaABCB* 蛋白。其中, *AsaABCB1*、*AsaABCB4*、*AsaABCB5*、*AsaABCB6*、*AsaABCB7*、*AsaABCB10*、*AsaABCB12*、*AsaABCB14* 和 *AsaABCB15* 9 个成员含有 2 个 TMD 和 2 个 NBD,属于全分子转运蛋白。*AsaABCB2*、*AsaABCB3*、*AsaABCB8*、*AsaABCB9*、*AsaABCB11*、*AsaABCB16* 6 个成员被鉴定为半分子转运蛋白,含

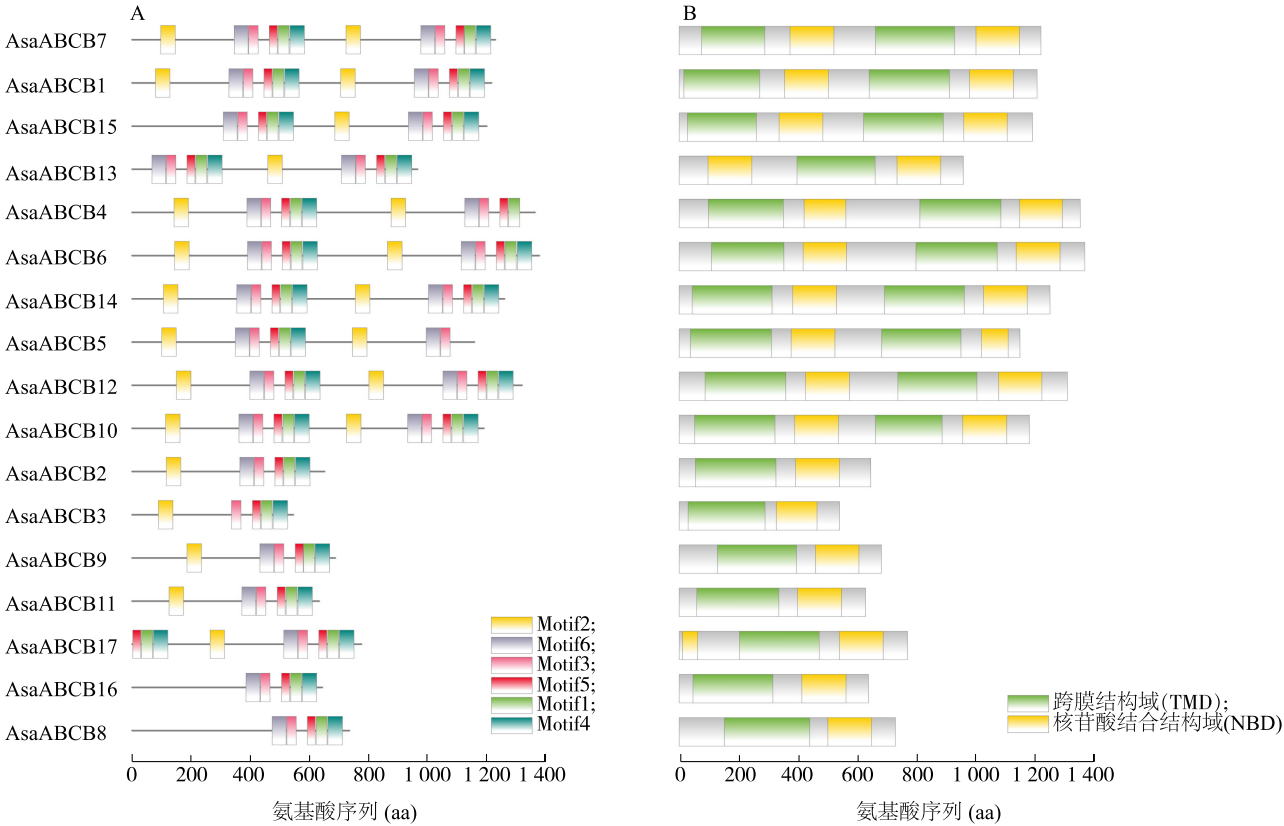
有 1 个 TMD 和 1 个 NBD 结构域。*AsaABCB13* 和 *AsaABCB17* 蛋白的结构域排列顺序为 NBD-TMD-NBD,与传统意义上的全分子蛋白和半分子蛋白不同。

2.5 大蒜 *AsaABCB* 基因结构

大蒜 *AsaABCB* 基因结构可视化结果如图 5 所示。从图中可以看出,17 个大蒜 *AsaABCB* 基因含有 3~20 个外显子, *AsaABCB8* 基因的外显子数量最多,为 20 个; *AsaABCB17* 基因的外显子数量最少,仅 3 个。

2.6 大蒜 *AsaABCB* 基因顺式作用元件

大蒜 *AsaABCB* 基因启动子区的顺式作用元件分布如图 6 所示。从图 6 中可以看出,大蒜 *AsaABCB* 基因启动子区含量最多的顺式作用元件是光反应元件,共 196 个,各家族基因中均存在;与植物生长发育相关元件有 5 种,包括玉米蛋白质代谢调节元件、胚乳表达元件、昼夜节律控制元件、细胞周期调控元件、种子特异性调节元件,数量分别为 11 个、5 个、4 个、1 个、1 个;与胁迫相关的元件有厌氧调节



A: AsaABCB 蛋白保守基序分布。B: AsaABCB 蛋白保守结构域分布。

图 4 大蒜 AsaABCB 蛋白的保守基序及结构域分析

Fig.4 Conservative motif and domain analysis of AsaABCB protein in garlic

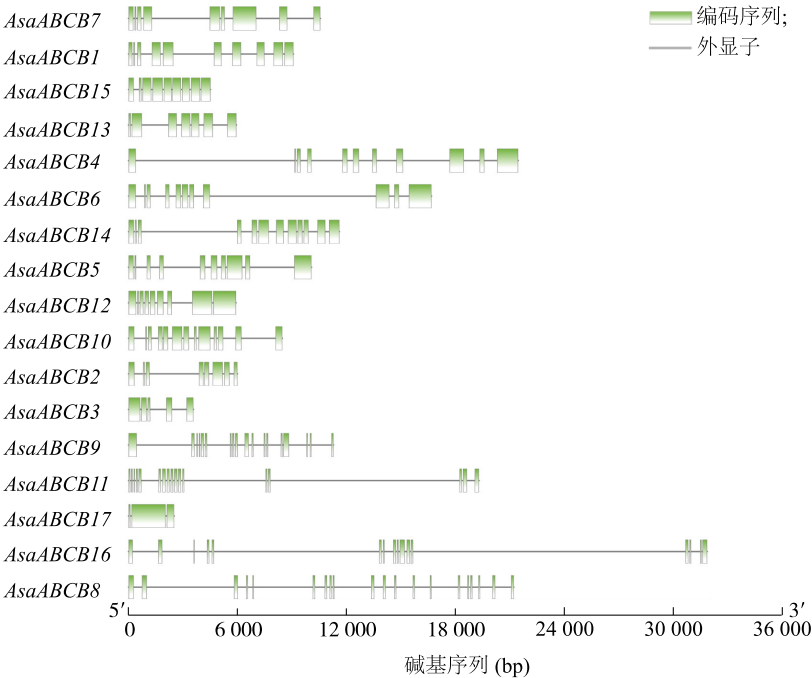
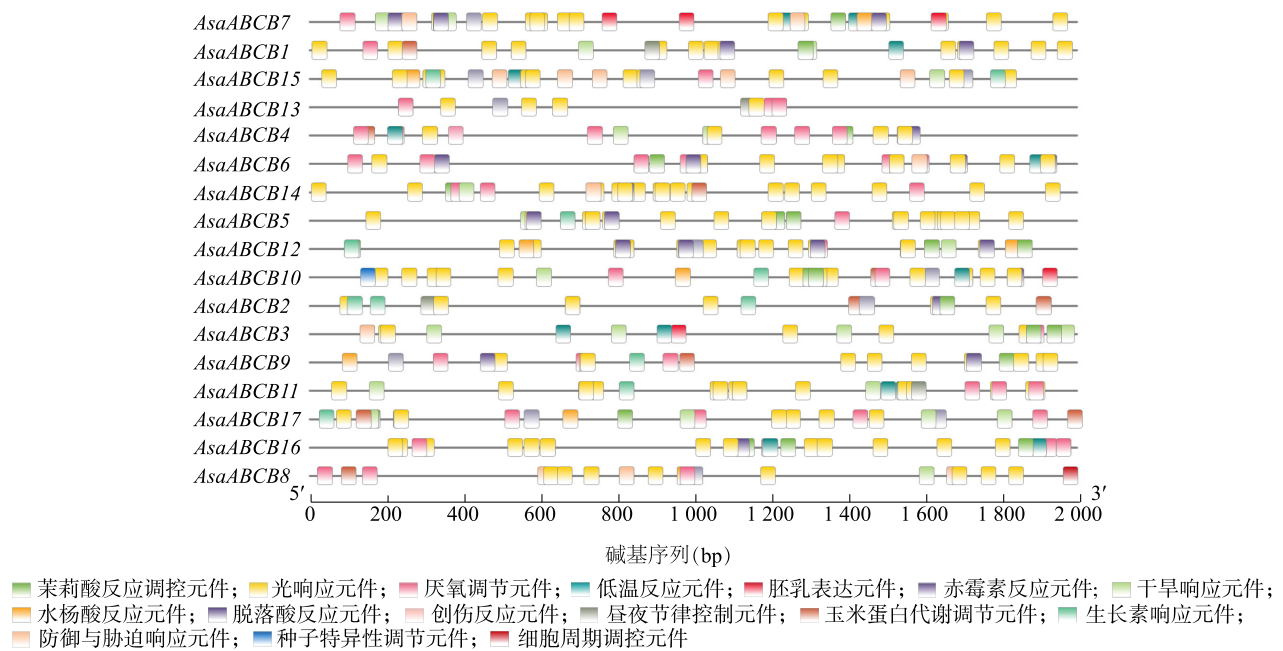


图 5 大蒜 AsaABCB 家族基因结构

Fig.5 Structure of AsaABCB family genes in garlic

图6 大蒜 *AsaABCB* 家族基因启动子顺式作用元件分布Fig.6 Distribution of *cis*-acting elements in garlic *AsaABCB* family genes

元件、干旱响应元件、低温反应元件、防御与胁迫响应元件、创伤反应元件 5 种,数量分别为 43 个、23 个、13 个、13 个和 1 个。激素相关元件中,茉莉酸反应调控元件、脱落酸反应元件、生长素响应元件和赤霉素反应元件较多,数量分别为 48 个、26 个、12 个和 12 个,分别存在于 13 个、11 个、8 个和 9 个 *AsaABCB* 家族基因中。生长素响应元件主要存在于 *AsaABCB2* 和 *AsaABCB15* 基因的启动子区,数量分别为 4 个和 2 个,*AsaABCB5*、*AsaABCB9*、*AsaABCB10*、*AsaABCB11*、*AsaABCB12*、*AsaABCB17* 等基因各有 1 个生长素响应元件。此外,大蒜 *AsaABCB* 基因启动子区还存在 8 个水杨酸反应元件。

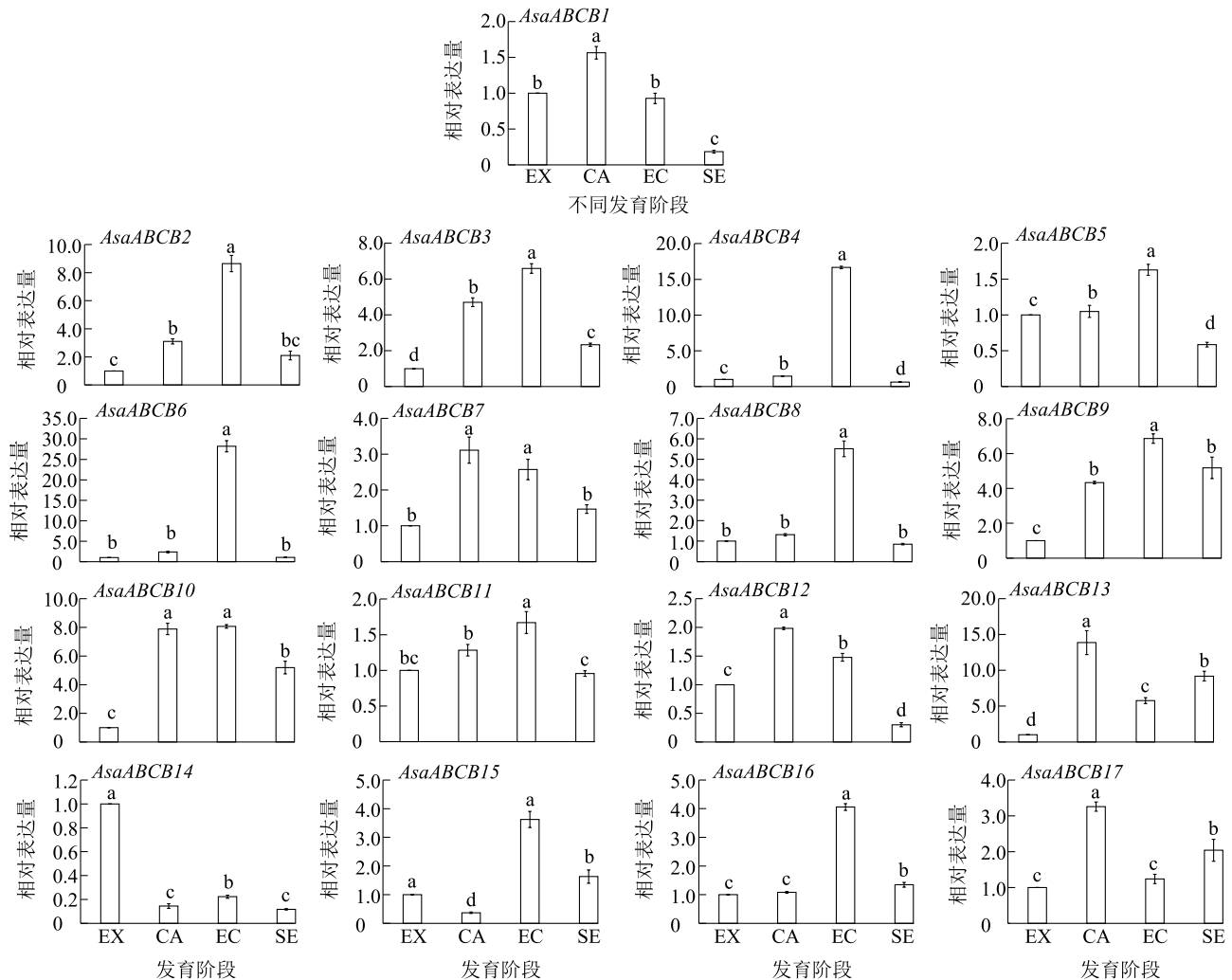
2.7 大蒜 *AsaABCB* 家族基因在体细胞胚发生过程中的表达模式

大蒜体细胞胚发生过程中,*AsaABCB* 家族成员表达模式如图 7 所示。大蒜体细胞胚发生过程中,除 *AsaABCB13*、*AsaABCB14*、*AsaABCB15* 和 *AsaABCB17* 基因外,其他 13 个成员相对表达量均呈先上升再下降的趋势。*AsaABCB2*、*AsaABCB3*、*AsaABCB4*、*AsaABCB5*、*AsaABCB6*、*AsaABCB8*、*AsaABCB9*、*AsaABCB10*、*AsaABCB11*、*AsaABCB15*、*AsaABCB16* 11 个基因在胚性愈伤组织阶段的相对表达量最高,*AsaABCB1*、*AsaABCB7*、*AsaABCB12*、*AsaABCB13*、

AsaABCB17 5 个基因在愈伤组织阶段相对表达量最高,而 *AsaABCB14* 基因在外植体阶段相对表达量最高。除 *AsaABCB13*、*AsaABCB17* 基因外,其他 15 个基因在体细胞胚发育阶段的相对表达量均比胚性愈伤组织阶段有所下调。

3 讨论

大蒜基因组测序的完成^[7],为开展全基因组关联分析,建立稳定高效的大蒜遗传转化体系以及基因功能验证等提供了可能。目前对大蒜 *WOX*^[32]、*NAC*^[33]、*NCED*^[34]、*WRKY*^[35] 等基因家族的鉴定已有研究。*ABCB* 作为三大转运蛋白质之一,与 *PIN* 和 *AUX1/LAX* 协同调控植物生长素的极性运输^[36]。本试验以拟南芥和水稻的 *ABCB* 蛋白氨基酸序列作为参考,对大蒜 *AsaABCB* 基因家族进行全基因组生物信息学分析,共鉴定出 17 个同源性较高的 *AsaABCB* 候选基因。系统进化分析将其分为 5 个亚组,大蒜 *ABCB* 基因系统进化分析结果与拟南芥^[12] 和 水稻^[13] 类似,表明不同物种间 *ABCB* 同源基因在进化过程中高度保守。染色体定位图谱显示,*AsaABCB6* 与 *AsaABCB7*、*AsaABCB14* 与 *AsaABCB15* 位置几乎重合,推测其可能存在串联重复现象。串联重复是由非同源重组产生的,这种方式形成的重复基因在染色体位



EX:外植体;CA:愈伤组织;EC:胚性愈伤组织;SE:体细胞胚。柱上不同小写字母表示处理间差异显著($P < 0.05$)。

图7 体细胞胚发生过程中大蒜 *AsaABCB* 家族基因的表达模式

Fig.7 Expression pattern of garlic *AsaABCB* family genes during somatic embryogenesis

置上非常接近,串联重复事件在生物进化中起着重要的作用^[37],水稻 *ABCB* 家族基因中也有类似串联重复事件发生^[13]。

拟南芥中 *AtABCB21* 通过调节部分组织的生长素浓度参与植株的向光性运动^[28],且在植物生长素浓度较高时充当输出载体蛋白角色,在生长素浓度较低时发挥内流载体蛋白作用^[38]。徐艳霞^[39]研究发现 *OsABCB14* 编码水稻中的一个生长素输入载体。对 *PhABCB* 基因家族在毛竹节间发育过程中的表达水平研究发现,*PhABCB7* 等 8 个基因在次生细胞壁(SCW)发育过程中显著上调,而生长素是影响 SCW 发育的重要调节因子^[31]。本研究发现,大蒜 *AsaABCB* 家族成员的启动子顺式作用元件中光反应元件最多,存在于每 1

个 *AsaABCB* 家族基因中,植物生长发育元件有 5 种,胁迫相关元件有 5 种,激素相关元件有 5 种。生长素响应元件主要存在于 *AsaABCB2* 和 *AsaABCB15* 基因。

在植物体细胞胚形成和发育过程中,生长素起重要调控作用。番木瓜(*Carica papaya*)体细胞胚诱导过程中,生长素内流载体蛋白(AUX1/LAX)家族成员表达量上调^[10]。宋胜利^[40]研究发现,细叶百合体细胞胚发生过程中,*LpABCB21* 和 *LpPILS7* 的相对表达量显著上调。本试验研究结果表明,在大蒜胚性愈伤组织阶段,*AsaABCB2* 等 11 个家族基因表达量最高;在大蒜愈伤组织阶段,*AsaABCB1* 等 5 个家族基因表达量最高;在体细胞胚阶段,*AsaABCB1* 等 15 个家族成员表达量均降低。因此 *AsaABCB* 家

族基因可能主要调控大蒜愈伤组织和胚性愈伤组织的形成与发育,这可能是由于生长素转运过程非常快,在体细胞胚诱导前期,生长素转运基因就完成了对外源生长素的转运及细胞内的分布^[28],而在后期体细胞胚发育阶段仅需少量特异的生长素转运基因介导,这一结论与细叶百合体细胞胚发育过程研究结果一致^[40]。

4 结论

本研究共鉴定出 17 个大蒜 *AsaABCB* 家族基因,同时对其基因结构、表达模式及编码的蛋白质理化性质、跨膜结构域等进行生物信息学分析。结果表明, *AsaABCB* 家族基因在进化过程中高度保守。启动子区存在多种与植物激素相关的元件,其中茉莉酸反应调控元件、脱落酸反应元件和生长素响应元件较多。大蒜 *AsaABCB* 家族基因主要在大蒜愈伤组织和胚性愈伤组织发育过程中起作用。本研究结果为进一步探讨 *AsaABCB* 基因调控大蒜体细胞胚发生机制提供有力支撑。

参考文献:

- [1] 刘晓雪,程智慧. 大蒜种质超低温保存及脱毒技术研究进展[J]. 中国蔬菜,2013(2):12-19.
- [2] 刘世琦. 蔬菜栽培学简明教程[M]. 北京:化学工业出版社,2007.
- [3] 葛洁,杨峰,陆信娟,等. 温度对大蒜花形态建成和花粉活力的影响[J]. 江苏农业学报,2024,40(7):1297-1304.
- [4] XU K, CHANG Y, LIU K, et al. Regeneration of *solanum nigrum* by somatic embryogenesis, involving frog egg-like body, a novel structure[J]. PLoS One,2017,9(6):e98672.
- [5] LOYOLA V, VICTOR M, OCHOA A, et al. Somatic embryogenesis. An overview[M]. Switzerland:Springer International Publishing,2016:1-8.
- [6] ZIMMERMAN J L. Somatic embryogenesis:a model for early development in higher plants[J]. The Plant Cell,1993,5(10):1411-1423.
- [7] SUN X, ZHU S, LI N, et al. A chromosome-level genome assembly of garlic (*Allium sativum* L.) provides insights into genome evolution and allicin biosynthesis[J]. Molecular Plant,2020,13(9):1328-1339.
- [8] FUJIMURA T. Carrot somatic embryogenesis. A dream come true[J]. Plant Biotechnology Reports,2014,8(1):23-28.
- [9] EVA Z, S A M, YANG H B, et al. Auxin transporters-why so many[J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology,2010,2(3):a001552.
- [10] MÁRQUEZ-LÓPEZ R E, PÉREZ-HERNÁNDEZ C, KU-GONZÁLEZ Á, et al. Localization and transport of indole-3-acetic acid during somatic embryogenesis in *coffea canephora*. [J]. Protoplasma,2018,255(2):695-708.
- [11] SU Y H, ZHANG X S. Auxin gradients trigger de novo formation of stem cells during somatic embryogenesis[J]. Plant Signaling Behavior,2009,4(7):574-576.
- [12] SANCHEZ F R, DAVIES T G E, COLEMAN J O D, et al. The *Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily, a complete inventory[J]. The Journal of Biological Chemistry,2001,276(32):30231-30244.
- [13] 徐杏,邱杰,徐扬,等. 水稻 *ABCB* 转运蛋白基因的分子进化和表达分析[J]. 中国水稻科学,2012,26(2):127-136.
- [14] ÇAKIR B, KILICKAYA O. Whole-genome survey of the putative ATP-binding cassette transporter family genes in *Vitis vinifera*[J]. PLoS One,2017,8(11):e78860.
- [15] PANG K, LI Y, LIU M, et al. Inventory and general analysis of the ATP-binding cassette (ABC) gene superfamily in maize (*Zea mays* L.)[J]. Gene,2013,526(2):411-428.
- [16] OLAWUYI O J, OLOGIDI C G. Genomic survey of ATP-binding Cassette(ABC)transporters in *Sorghum bicolor*(L.) Moench[J]. Journal of Agronomy and Crop Science,2018,1(1):102.
- [17] ECHAI C, EWANG Y, EVALIYODAN B, et al. Comprehensive analysis of the soybean (*Glycine max*) *GmLAX* auxin transporter gene family[J]. Frontiers in Plant Science,2016,7:282.
- [18] SWARUP R, PERET, BENJAMIN. AUX/LAX family of auxin influx carriers-an overview[J]. Frontiers in Plant Science,2012,3(225):225.
- [19] MACIEK A, JIRI F. PIN-dependent auxin transport:action, regulation, and evolution[J]. Plant Cell,2015,27(1):20-32.
- [20] XU X Y, LIU Y, CHEN T S, et al. The B subfamily of plant ATP binding cassette transporters and their roles in auxin transport[J]. Biologia Plantarum,2014,58(3):401-410.
- [21] DO THT, MARTINOIA E, LEE Y. Functions of ABC transporters in plant growth and development[J]. Current Opinion in Plant Biology,2018,41:32-38.
- [22] HIGGINS C F. ABC transporters:from microorganisms to man[J]. Annual Review of Cell Biology,1992,8(1):67-113.
- [23] HIGGINS C F, LINTON K J. The ATP switch model for ABC transporters[J]. Nature Structural Molecular Biology,2004,11(10):918-926.
- [24] JOSY B T, ALBERT G, JAN D S. Structural diversity of ABC transporters[J]. The Journal of General Physiology,2014,143(4):419-435.
- [25] VERRIER J P, BIRD D, BURLA B, et al. Plant ABC proteins-a unified nomenclature and updated inventory[J]. Trends in Plant Science,2008,13(4):151-159.
- [26] ZHU W X, MEI S W, FENG M Y, et al. Research progress of ABC transporters in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Physiology Journal,2017,2:4-15.
- [27] MARKUS G, BIBEK A, MARTIN D D, et al. A critical view on

- ABC transporters and their interacting partners in auxin transport [J]. *Plant Cell Physiology*, 2017, 58(10):1601-1614.
- [28] JENNESS K M, CARRARO N, PRITCHARD A C, et al. The Arabidopsis ATP-binding cassette transporter *ABCB21* regulates auxin levels in cotyledons, the root pericycle, and leaves[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10:806.
- [29] 于晓丽, 陈超妍, 吴雪宁, 等. 大白菜 *ABCB/PGP* 基因家族的鉴定与分析[J]. *南方农业*, 2021, 15(6):1-4, 17.
- [30] YANG Y, HUANG Q, WANG X, et al. Genome-wide identification and expression profiles of *ABCB* gene family in Chinese hickory (*Carya cathayensis* Sarg.) during grafting[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2021, 168:477-487.
- [31] QUE F, ZHU Y, LIU Q, et al. Genome-wide identification, expansion, evolution, and expression analysis reveals *ABCB* genes important for secondary cell wall development in Moso Bamboo (*Phyllostachys edulis*) [J]. *Agronomy*, 2023, 13(7):1-18.
- [32] 董新玉, 邓 浪, 张亚春, 等. 大蒜全基因组 *WOX* 基因家族鉴定及密码子使用偏性分析[J]. *西南农业学报*, 2022, 35(2):285-293.
- [33] 闫艺薇, 田 洁. 大蒜 *AC* 基因家族的鉴定与低温表达分析[J]. *中国农业科技导报*, 2023, 25(4):67-76.
- [34] 袁晓戈, 李 富, 张雪钰, 等. 大蒜全基因组 *NCED* 基因鉴定与功能初探[J]. *中国蔬菜*, 2023(3):47-56.
- [35] YANG Q Q, YANG F, ZHAO Y Q, et al. Genome-wide identification and functional characterization of *WRKY* transcription factors involved in the response to salt and heat stress in garlic (*Allium sativum* L.) [J]. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2021, 35(1):1956-1966.
- [36] 贺祯媚, 李东明, 齐艳华. 植物 *ABCB* 亚家族生物学功能研究进展[J]. *植物学报*, 2019, 54(6):688-698.
- [37] 刘海静, 田 星, 王 露, 等. 毛果杨多聚半乳糖醛酶抑制蛋白家族 *PtPGIP* 的生物信息学分析[J]. *山西农业科学*, 2023, 51(8):852-860.
- [38] YOSHIHISA K, KAZUYOSHI T, MASAFUMI H, et al. Arabidopsis *ABCB21* is a facultative auxin importer/exporter regulated by cytoplasmic auxin concentration [J]. *Plant Cell Physiology*, 2012, 53(12):2090-2100.
- [39] 徐艳霞. *OsABCB14* 参与水稻生长素转运及铁平衡[D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
- [40] 宋胜利. 细叶百合体细胞胚发生过程中 *LpABCB21* 和 *LpPILS7* 功能初步解析[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2020.

(责任编辑: 石春林)