



论文

与菌根真菌共生的兰科福建金线莲差异表达基因的筛选

李标^{①②}, 唐明娟^①, 唐坤^①, 赵丽芳^①, 郭顺星^{①*}^① 中国医学科学院药用植物研究所生物技术中心, 北京 100193;^② 重庆邮电大学生物信息学院, 重庆 400065

* 联系人, E-mail: sxguo2006@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-07-24; 接受日期: 2011-08-21

国家自然科学基金(批准号: 31070300, 31170314 和 31100265)、中国博士后基金(批准号: 20080440328)、重庆市自然科学基金(批准号: CSTC2008BB5410)和重庆市教委基金(批准号: KJ090504)资助项目

摘要 研究菌根真菌促进药用植物生长发育的分子作用机制在农业上有着十分重要的理论意义和实践意义. 本研究从野生福建金线莲(*Anoectochilus roxburghii*)根中分离出一株内生真菌 AR-18, 经鉴定为瘤菌属(*Epulorhiza* sp.)真菌; 将 AR-18 菌与福建金线莲组培苗接菌培养 60 天, 发现其根中能形成内生菌根并能显著地促进福建金线莲苗的生长. 为从与 AR-18 菌共生的福建金线莲中分离出差异表达基因, 本实验采用差异显示 PCR(DDRT-PCR)方法, 使用 3 条锚定引物和 5 条随机引物设计 15 个引物对, 从接菌组和对照组中共分离出 52 条差异显示条带, 其中有 9 条带能通过双引物重扩增显现. 再运用反式 Northern 点杂交进一步筛选, 发现其中 5 条上调表达基因, 包括: 编码尿磷酸核苷转移酶基因(*UPRTs*; EC 2.4.2.9)和 1 条假蛋白基因; 1 条下调表达基因, 编码氨基酸跨膜转运子; 1 条在接菌组中特异表达基因, 编码突变酶 *K(matK)*. 同时, 讨论了上述基因可能的功能, 尤其是 *UPRTs* 基因和 *matK* 基因与菌根真菌互作的功能. 本研究是福建金线莲植物在该领域的首次报道.

关键词福建金线莲
兰科菌根共生
瘤菌属
差异显示 PCR
基因筛选

福建金线莲(*Anoectochilus roxburghii*)是兰科的一种高位芽植物, 生长在土壤腐殖质较多、光线较弱、相对湿度大的阔叶林中^[1]. 在中国, 它被叫做“金药”的一种珍稀天然药的原料药植物, 具有保肝、防癌、抗氧化、抗炎等多种药理功效^[2]. 在中国及其他亚洲国家, 福建金线莲作为一味民间药被广泛用于治疗癌症、心血管、肺部和肝病以及小儿发育不良等^[3].

近年来, 因其生境遭到严重破坏, 野生资源被过度采挖, 加之具有繁殖率低、生长缓慢等特点, 福建

金线莲濒临灭绝境地^[4]. 在野生状态下, 所有兰科植物都与真菌共生^[5,6], 野生福建金线莲亦与内生真菌形成菌根共生关系. 筛选促进福建金线莲生长发育的益生菌, 研究它们的相互作用具有重大的理论意义, 而且探究其新的繁殖方式有利于保存其野生种质资源^[7].

本课题组从野生福建金线莲的根中成功分离出了一株内生真菌——AR-18, 为瘤菌属(*Epulorbiza* sp.)的一种真菌^[8]. 实验证明, 该菌可以提高 4 种酶的活率、产率和活性^[9], 增加植物芽和根的数量^[10], 促

英文版见: Li B, Tang M J, Tang K, et al. Screening for differentially expressed genes in *Anoectochilus roxburghii* (Orchidaceae) during symbiosis with the mycorrhizal fungus *Epulorhiza* sp. *Sci China Life Sci*, 2012, 55: 164–171, doi: 10.1007/s11427-012-4284-0

进福建金线莲试管苗的生长, 提高多糖和总黄酮含量^[5,11]. 这些结果表明, 福建金线莲的一些基因受菌根共生影响而差异表达. 寻找内生真菌影响下差异表达的基因, 可用几种基于 PCR 技术和方法分离鉴定这些基因^[12,13]. 因为 DDRT-PCR(differential display reverse transcription PCR)法可以通过比较分析 2 个以上的样本来对新的转录产物进行鉴定, 因此结合 DDRT-PCR 和微阵列分析可为了解药用植物与真菌的共生分子机制提供一个更加综合的探寻途径^[14,15]. 此外, DDRT-PCR 法具有优于其他方法的一些特点: 快速、简便、广泛应用, 对于低丰度 mRNA 表达具有良好的灵敏度, 且只需要少量的 RNA; 而且, 诱导和抑制基因可以同时被检测出来, 可以比较 2 个以上的样本^[16]. 本研究的目的是通过差异显示技术分离鉴定福建金线莲与菌根真菌共生差异表达的基因^[14,17,18]. 本研究将为更好地理解内生真菌促进福建金线莲生长发育的分子作用机制提供信息资料.

1 材料与方法

1.1 植物材料

所用福建金线莲试管苗为转接到改良 MS 培养基上的同一无性系^[19]. 所用培养基含 10% 活性炭、3% 蔗糖、0.8% 琼脂, pH 5.8. 温室中培养, 12 h/12 h、温度(24±1)℃、光照度 2000 Lx.

1.2 内生菌培养及形态鉴定

AR-18 菌保存在中国医学科学院&北京协和医学院药用植物研究所. 使用前将菌株接种于平皿麦麸培养基(1.5 g/L MgSO₄、麦麸 30 g/L、琼脂 14 g/L、KH₂PO₄ 3 g/L), 在(24±1)℃黑暗条件下活化 10~15 天, 生长良好的真菌用打孔器(直径 11 mm)打成菌片作为接种体备用. 挑选出真菌的菌丝并制作成水压片镜下观察. 通过菌落的轮廓、同心环以及气生菌丝的构造、气生菌丝颜色、菌落中心及背面的颜色、菌落的厚度和质地、念珠状细胞的性状和规格等可以鉴定为瘤菌属真菌^[20,21].

1.3 根部接菌及其共生结构观察

将福建金线莲组培苗移入改良的 MS 培养基上培养 10 天, 之后接入活化的内生真菌 AR-18 在 25℃ 下共培养. 取共培养第 60 天苗的作为接菌组, 相同

条件下不加菌培养的苗作为对照组^[22]. 分别收集 2 组苗, 去除根部, 剩余的组织迅速冷冻于-80℃保存.

与 AR-18 菌共生 60 天的根部被切成 3~7 mm 片段, 立即固定在甲醛-乙酸-50%乙醇固定液中, 脱水、石蜡包埋、切片机切片. 切片在水浴中缓慢加热, 并用番红 O-快绿法(Sigma Chemical Co.)染色 10 min. 之后将切片用蒸馏水漂洗并干燥^[23], 镜检、拍照.

1.4 RNA 提取和纯化

分别取接菌组和对照组的茎、叶组织各 1 g, 用改良 CATB 法^[24]提取总 RNA. 用 Hitachi 2000 分光光度计测定在 230, 260 和 280 nm RNA 的吸光度来评价其产量和质量. 凝胶 EB 染色, 紫外灯下检测其质量. RNA 在乙醇中-80℃保存备用. 总 RNA(20 μg)纯化: 用 40 U 无 RNA 酶(RNaseOUT™, Invitrogen USA)、1 U DNA 酶(DNase, Invitrogen USA)、20 mmol/L Tris-HCl(pH 8.4)、2 mmol/L MgCl₂、50 mmol/L KCl 室温放置 15 min, 再加入 1 μL EDTA(25 mmol/L)于 65℃温浴 10 min 以终止反应.

1.5 cDNA 第一链合成和 DDRT-PCR

cDNA 的合成在室温下进行. 每 20 μL 的反应体系中包含: 5.5 μL DEPC 水、5 μL(2 μg)无 DNA 的总 RNA、4 μL 5×第一链 buffer(GiBco-BRL)、2 μL 20 ng/μL 锚定引物 AAGC(dT₁₀)-M(M 为 A, G 或 C)(上海生工合成)、1 μL 30 U/μL RNasin (上海生工)和 1 μL 200 U/μL M-MLV Reverse Transcriptase(GiBco-BRL). 混合物先在室温下合成 10 min; 然后, 42℃水浴 50 min, 升温到 48℃再保温 30 min, 反应结束后将产物于 75℃、10 min 终止反应, 以钝化反转录酶, -20℃保存备用.

20 μL DDRT-PCR 反应体系包含: 2 μL 逆转录反应得到的 cDNA、0.5 μL dNTP(每种 10 mmol/L)、2 μL 10×PCR 缓冲液、1.2 μL 25 mmol/L MgCl₂、2 μL 20 ng/μL 随机引物、2 μL 锚定引物 H-T₁₀M(5'-AAG-CTTTTTTTTTT-3', M=A, G 或 C)(20 ng/μL)和 0.4 μL Taq 聚合酶(上海生工)、DEPC 水补充至 20 μL. PCR 程序: 94℃预热 5 min; 94℃ 30 s, 40℃ 2 min, 72℃ 1 min, 25 个循环; 94℃ 30 s, 50℃ 1 min, 72℃ 1 min, 10 个循环; 72℃再延伸 10 min. 挑选出 5 个随机引物(DD10, 5'-TGCTCCCGGCCGCAAGC-3'; DD20, 5'-TGCCGGAATTCTGGTCAT-3'; DD23, 5'-TGCTC-

CCGGCCGCCATGG-3'; DD34, 5'-TGCCGGAATTC-TGGTGAC-3'; DD60, 5'-TGCCGGAATTCGACT-GT-3'; 上海生工). 共筛选 15 个引物对.

1.6 凝胶电泳和重扩增

DDRT-PCR 样品与染料(甲酰胺、溴酚蓝、二甲苯蓝)混合, 95℃变性 10 min 后立即置于冰上, 6%变性聚丙烯酰胺上 60 W 电泳 4~6 h, PCR 产物银染检测^[25-27].

用锋利干净的刀片将差异显示的条带从凝胶上取下, 在室温下放入 20 μL 双蒸水中至少 10 min, 之后放入 90~100℃水浴 20 min. 13000 r/min 离心 20 s 后, 上清液转移到干净的离心管中, 提取出的 DNA 直接作为 PCR 反应模板^[18]. 提取出的 4 μL DNA 溶液放入 40 μL PCR 反应液中对切离的 cDNA 条带进行重扩增. 除了模板之外, 重扩增 PCR 混合物的组分与 DD-PCR(differential display PCR)一样, 重扩增程序为: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 50℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃再延伸 10 min. 取 10 μL 的重扩增 PCR 产物加 2 μL 上样缓冲液电泳检测, 以确保正确的片段被扩增.

1.7 反式 Northern 点杂交

取 20 μL 重扩增产物等量点到两套带正电荷的尼龙膜(Amersham Pharmacia, USA)上用于反式 Northern 点杂交. 反转录产物用作探针. 探针制备过程如下: 取 10 μg 经 DNase I 处理的 RNA 和 2 μL 锚定引物 oligo-dT₁₈ (20 μmol/L)于 0.5 mL EP 管中, 65℃变性 5 min 立即冰浴 2 min. 之后加入 1 μL 40 U RNaseOUT (Invitrogen, USA)、6 μL 5× First-Strand 缓冲液、3 μL 0.1 mol/L DTT、5 μL DIG DNA Labelling Mix(Roche, Germany)和 1 μL Superscript II, 在 42℃下反应 60 min, 之后 48℃再反应 30 min, 最后 70℃ 10 min 用于终止反应. 并用 DIG 试剂盒中的 Control DNA(Roche, Germany)做参照对两个探针进行定量.

1.8 差异显示 cDNA 片段的克隆

对经过反式 Northern 点杂交确认的阳性片段再次进行 PCR 扩增. 扩增产物经过 0.8%琼脂糖电泳后进行回收, 回收采用试剂盒收集(Yuanpinghao Biot-ech Co. Ltd, 北京). 将回收的 cDNA 片段与 pGEM-T

载体(Promega, USA)连接, 并克隆到大肠杆菌上. 被插入的大肠杆菌体质粒 DNA 用碱裂解法提取^[28]. 取 1~2 μL 的质粒 DNA 加入 0.5 μL 限制性内切酶 *EcoR* I, 50℃下反应 2~4 h, 然后室温下过夜. 插入的片段可通过 1.4%琼脂糖胶电泳检测或通过 PCR 扩增检测, 扩增的引物对和 PCR 条件同前.

1.9 DNA 测序和相似性分析

使用 QIAprep Spin Miniprep Kit(Qiagen, Germany)抽取质粒, 由上海 Bioasia 生物技术公司测序. 通过 BLAST 软件在 GenBank 库中进行序列同源性分析.

2 结果

内生真菌 AR-18 和福建金线莲组培苗共生 2~3 周即长出真菌菌丝, 并与植物根接触, 导致植物表面逐渐由绿色变为黄褐色(图 1A). 而且, 内生真菌 AR-18 明显促进福建金线莲的生长, 与对照组相比, 在共生的 35 天时间中接菌组重量增长了 10.3% (数据未显示).

瘤菌属真菌的鉴定主要依据其形态特征, 如菌落颜色、形状和念珠状细胞的大小^[29]. 在 PDA 培养基上, 菌落生长迅速, 在 25℃下培养 5 天直径即达到 7 cm. 菌落呈白色. 菌丝紧密排列, 但白色气生菌丝少有成熟的. 一些培养显示出少量的同心环(图 1B). 菌丝透明, 直径 2~7.5 mm, 表面上浮, 边缘在水下, 念珠状细胞呈现球形到圆柱形(图 1C). 因此, 形态学分析显示此内生真菌属于瘤菌属真菌.

取共生 60 天的菌根在光学显微镜下观察其结构, 显示它属于典型的兰科菌根^[30]. 菌丝侵入表皮之下的 3~4 层细胞中. 菌丝以菌丝结和分支的形式存在在外皮层细胞中, 即结成球状或呈碎片状存在于内皮层细胞中(图 1D). 与正常细胞相比, 部分皮层细胞发生质壁分离或核扩大.

用 15 个引物对金线莲接菌培养的 60 天的接菌组及其对照组分别进行了 DDRT-PCR 检测(图 2). 从中选出 52 个差异表达条带并切胶回收. 选择的主要依据是基于两组间条带的存在与否或同样大小条带显示的信号强弱来定. 为重扩增出胶回收的带, 重扩增 PCR 反应作了改变. DDRT-PCR 实验用对提取出的条带重扩增, 改变 PCR 反应, 能被双引物(锚定引物和随机引物)扩增的条带被选出作进一步研究, 其他只

能被锚定引物或随机引物扩增的切离条带被抛弃. 只有 9 个条带能同时被 2 种引物重扩增(图 3), 将其从琼脂糖胶中切离, 萃取出的 DNA 再进行反式 Northern 点杂交检测. 之后只剩下 7 个呈阳性反应的片段, 分别为: *AR-DD017*, *AR-DD019*, *AR-DD020*, *AR-DD023*, *AR-DD037*, *AR-DD044* 和 *AR-DD047*(图 4). 其中, 基因 *AR-DD017*, *AR-DD019*, *AR-DD037*, *AR-*

DD044 和 *AR-DD047* 在接 *AR-18* 菌共生的福建金线莲中呈上调表达, *AR-DD020* 呈下调表达, *AR-DD023* 在接菌组中呈差异表达. 将这 7 条差异表达基因片段克隆到 pGEM-T 载体上, 再通过相应的引物对扩增. 抽取含有靶序列克隆中的质粒进行测序.

以上 7 个克隆序列被测序, 序列结果提交 NCBI 数据库进行比对(表 1). 通过在 NCBI 数据库中与功

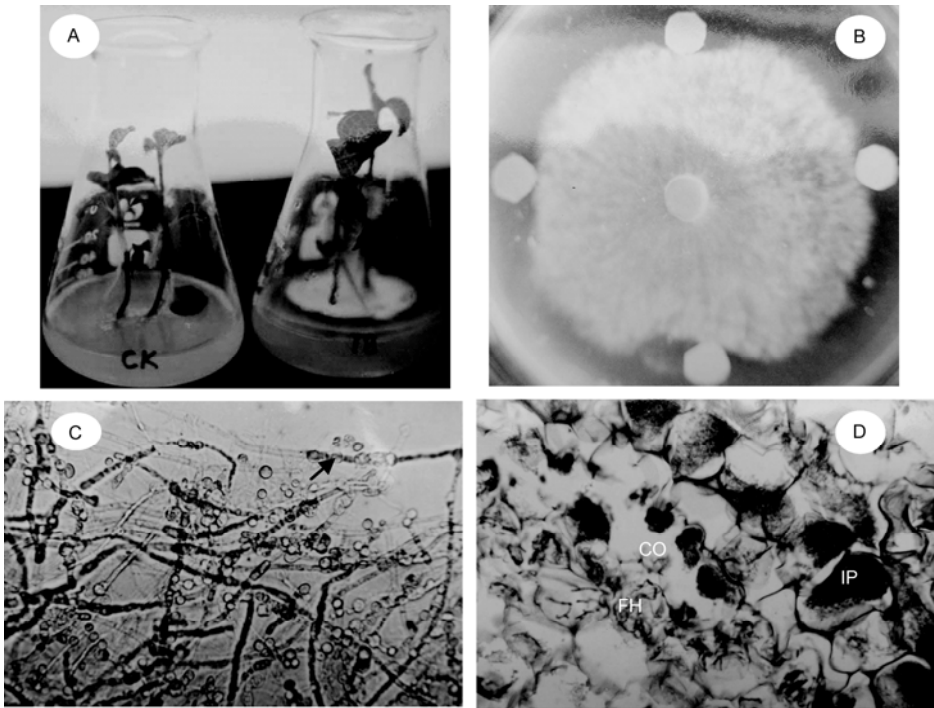


图 1 福建金线莲组培苗与瘤菌属菌根真菌 *AR-18* 共生培养 60 天的生长状态和组织结构

A: 对照组和接菌组组培苗; B: PDA 培养基上 25℃ 培养了 5 D 的 *AR-18* 菌落; C: 与福建金线莲共生培养 60 天后, 从菌根中提取的 *AR-18* 的菌丝, 以及带有轻微管状收缩念珠状细胞(箭头所示)(×224); D: 福建金线莲与 *AR-18* 菌共生的显微结构(×448); TP: 完整菌丝团; CO: 皮层细胞; FH: 真菌菌丝

表 1 福建金线莲差异显示 cDNA 片段在 NCBI 序列数据库中的序列分析

克隆编号	bp	GenBank EST 登录号	Blast 匹配序列	GenBank 中匹配 序列号	Blast 值	阳性值	
						(aa)	(%)
AR-017	410	GR410423	推测蛋白 (<i>Gibberella zeae</i>)	XP_391017	7.5	15/32	46
AR-019	347	GR410424	尿磷酸核苷转移酶 (<i>Ricinus communis</i>)	EEF32516.1	8e-23	99/122	81
AR-020	307	GR410425	氨基酸跨膜转运子 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	NP_177862.1	0.074	15/15	100
AR-023	311	GR410426	tRNA-Lys(trnK)基因和 突变酶 K (matK)推测基 因 (<i>Anoectochilus</i> <i>roxburghii</i>)	EU817409	2e-124	88/92	96%



图2 从福建金线莲对照组和接菌组 mRNA 中得到的部分差异显示条带

分别从福建金线莲对照组(没有接种真菌)和接菌组中提取总 RNA, 通过 5'随机引物和 3'锚定引物进行反转录和 PCR 扩增, 扩增的 cDNA 片段在 6%变性聚丙烯酰胺凝胶中分离. 箭头指示的是差异显示 cDNA 条带, 从胶中回收这些条带作进一步分析. 泳道 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 和 23 是从对照组得到的产物, 泳道 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 和 24 是从接菌组得到的产物; 泳道 1 和 2, 3 和 4, …… 23 和 24 等分别为相同的引物组合扩增的产物; 泳道 1~8 的引物组合分别是 H-T₁₀A 和 DD10, DD20, DD23, DD34 的组合; 泳道 9~16 的引物组合分别是 H-T₁₀G 和 DD10, DD20, DD23, DD34 的组合; 泳道 17~24 的引物组合分别是 H-T₁₀G 和 DD10, DD20, DD23, DD34 组合; M 为 DNA 标记物 DL2000

能已知的基因或蛋白质进行序列相似性比对, 发现以上的 7 个基因中有 3 个(*AR-DD037*, *AR-DD044* 和 *AR-DD047*)在基因库中找不到相似的序列, 可能是新基因. 在另外 2 个上调表达的基因中, *AR-DD019* 克隆基因与蓖麻(*Ricinus communis*)的尿磷酸核苷转移酶基因有较高的的同源性(相似度达 81%), 而 *AR-DD017* 克隆基因与玉米赤霉菌(*Gibberella zeae*)的假蛋白基因有较低的相似度(相似度为 46%). *AR-020* 克隆的部分 cDNA 序列与拟南芥的氨基酸跨膜转运子基因显示出 100%同源性. 差异表达基因

AR-DD023 与福建金线莲的 tRNA-Lys (*trnK*)基因和突变酶 K(matK)推测基因显示出 96%的同源性.

3 讨论

福建金线莲与内生真菌 AR-18 的形态学和显微结构显示, 在本实验的共生系统中植物和真菌形成了内生菌根. 本研究的观察结果与 Hadley 在紫花苞舌兰(*Spathoglottis plicata* Bl.)^[31]中观察到结果相似. 本研究寻找受内生真菌影响表达改变的基因, 从 52

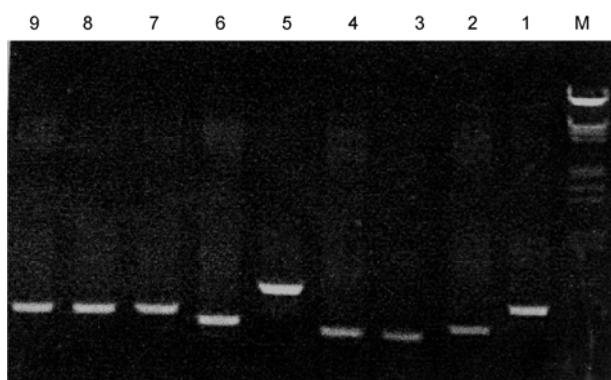


图 3 双引物重扩增的差异显示条带

泳道 1~9 显示的差异显示条带分别为: AR-DD17, AR-DD19, AR-DD20, AR-DD23, AR-DD44, AR-37, AR-DD47, AR-DD38 和 AR-DD40. M 为 DNA 标记物 DL2000

个条带中找到了 7 个这样的基因片段, 其中 5 个上调基因, 1 个下调基因和 1 个在接菌组中差异表达的基因. 与基因库中序列比对发现, 只有 4 个基因与库中已知基因有一定的同源性.

第一个片段 (AR-DD017) 为假蛋白基因. 将 AR-DD017 序列通过 BLASTN 和 BLASTX 比对分析, 发现它与已知的植物蛋白没有同源性, 而是一些真菌和动物如: 玉蜀黍赤霉 (*Gibberella zeae*)、发光杆菌 (*Photobacterium asymbiotica*)、海葵 (*Nematostella vectensis*)、斑胸草雀 (*Taeniopygia guttata*) 的假蛋白基因部分同源. 因而, 此蛋白在促进真菌诱导植物生长方面的具体功能尚不明确.

第二个片段 (AR-DD019) 为受 AR-18 菌诱导上调

表达的基因. 它编码尿磷酸核苷转移酶 (UPRTs; EC 2.4.2.9), 在植物中存在普遍同源性, 包括蓖麻 (*Ricinus communis*)、烟草 (*Nicotiana tabacum*)、玉米 (*Zea mays*) 和拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*). 尿磷酸核苷转移酶的作用是在催化尿嘧啶与磷酸核糖焦磷酸转化为单磷酸尿苷 (UMP) 的过程中捕获嘧啶碱基^[32]. UPRTs 被认为是一种不重要的节能型酶, 但最新发现其能捕获尿嘧啶, 这对植物发育十分重要^[33]. 尿嘧啶捕获能力的丧失将会使依赖光产生的淡绿色表型变为白色表型突变体, 表现为植株矮小的、失去产生可育性后代的功能. 在所有受分析的组织中, 除了气孔其质体的生物合成和淀粉粒的积聚都会受到影响^[33]. 在拟南芥中, 尽管单个核基因编码质体靶向蛋白, 但 UPP 几乎对所有 UPRT 的活性都起作用^[33,34]. 此前研究发现, 从兰科植物根中分离出的一些内生真菌对植物生长有显著的促进作用^[5,10]. 在本研究中, 与 AR-18 菌共生的福建金线莲, 其编码 UPRT 基因的表达提高了; 说明在菌根共生的福建金线莲中尿嘧啶捕获能力提高了, 促进了质体的生物合成. 以上数据显示内生真菌可能通过提高 UPRT 基因表达来促进福建金线莲的生长发育.

基因 (AR-DD020) 受 AR-18 菌的诱导而下调表达. 该基因与拟南芥的氨基酸跨膜转运基因的核酸序列具同源性. 在植物中, 氨基酸在很多代谢过程中起着重要作用, 如蛋白质合成、激素代谢、细胞生长、代谢能产生、核苷酸合成、氮代谢以及尿素生物合成^[35]. 在多细胞生物中, 许多含氮化合物在细胞间转运. 作

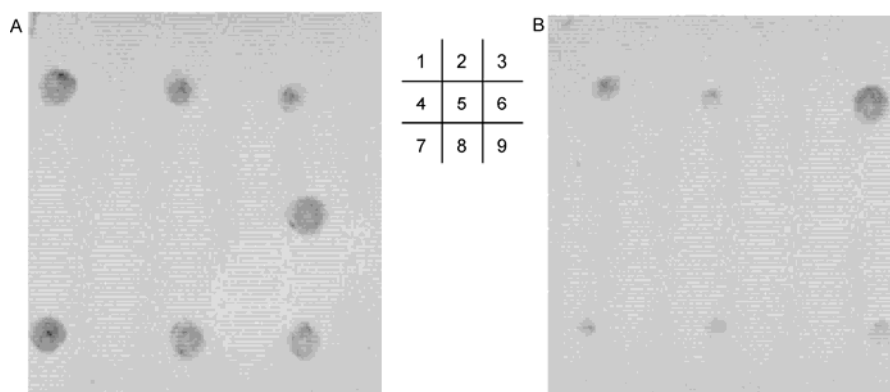


图 4 差异条带反式 Northern 点杂交

重扩增回收 cDNA 条带, 扩增产物均等地印迹到“材料和方法”所述的两张膜上; 膜分别与地高辛标记的对照组 (B) 和接菌组 (A) 总 RNA 合成来的 cDNAs 杂交. 点 1~9 分别是 AR-DD17, AR-DD19, AR-DD20, AR-DD38, AR-DD40, AR-23, AR-DD37, AR-DD44 和 AR-DD47

为这个过程的媒介, 氨基酸转运体在植物中发挥生理性作用. 许多研究都支持多种转运体的存在, 其在反应底物光谱、转运机制(如协同转运中离子的运用)以及组织特异性方面转运体是不同的^[36-38]. 同时, 氮代谢途径非常复杂: 一些反应在不同的细胞位点由多种酶催化, 而且已知的转运体隶属于 5 个族^[35,39]. 因此, 在 AR-18 菌作用下氨基酸跨膜转运子基因表达减弱, 说明内生真菌 AR-18 调控了整个转运机制中的一小部分, 从而控制一系列基因的转录.

第 4 个基因片段(AR-DD023)在 AR-18 菌的诱导下特异性表达. 通过序列比对可以预测它属于编码突变酶(matK)的推测蛋白基因, 在高等植物中由叶绿体 tRNA^{Lys} 内含子编码, 在非光合植物植物中由残余质体基因组中的 ORFs 编码. 这个酶的功能是将多个 II 型内含子进行拼接^[40]. 这些类似核突变酶蛋白可能被引入各细胞器中, 将 II 型内含子进行拼接或承担其他细胞功能. 由核内基因编码的突变酶可能调节着细胞器内基因的表达, 可以折射出流动的 II 型内含子演进为剪接型内含子这一步^[40,41]. 因为由突变酶基因编码的 II 型内含子存在于植物线粒体

和叶绿体基因组中, 很可能是核内突变酶基因的 ORFs 从细胞器转移到细胞核内, 这已从其他细胞器基因上得到证实^[42,43]. 因此, 核基因编码的突变酶潜在的功能是作为剪接细胞器内多种 II 型内含子的部分普通元件. 将 II 型内含子突变酶转至细胞核潜在的好处是便于调控细胞器基因的表达, 它是通过剪接一个或多个细胞器内含子连接到完整信号中来调节基因的表达, 以应对细胞能量变化和环境刺激^[44]. 与内生真菌共生促进植物生长发育的事实, 暗示真菌诱导植物生长变化可能是真菌运动蛋白与植物蛋白相互作用的结果.

总之, 以上概述了在福建金线莲与内生真菌 AR-18 共生下几个对福建金线莲生长起促进作用的可能基因, 被证实为对真菌作用敏感的新基因. 尽管考虑到本研究的有限性, 这些基因的准确功能还需要通过其全基因序列的表达才能鉴定, 但这些片段序列为鉴定福建金线莲完整基因组提供了一个有价值的补充, 为研究内生真菌与福建金线莲共生促生关系提供了新的分子资源. 结果也显示, 差异显示技术在分析内生菌促进兰科植物生长的分子机制研究方面是一种很有效的工具.

参考文献

- 何春年, 王春兰, 郭顺星, 等. 兰科开唇兰属植物的化学成分和药理活性研究进展. 中国药学杂志, 2004, 40: 81-84
- Huang L Y, Chen T W, Ye Z, et al. Use of liquid chromatography- atmospheric pressure chemical ionization-ion trap mass spectrometry for identification of oleanolic acid and ursolic acid in *Anoetochilus roxburghii* (wall.) Lindl. J Mass Spectrom, 2007, 42: 910-917
- Shi C C, Wu Y W, Lin W C. Scavenging of reactive oxygen species and inhibition of the oxidation of low density lipoprotein by the aqueous extract of *Anoetochilus formosanus*. Ameri J Chin Med, 2003, 31: 25-36
- 王雅俊, 孟志霞, 于雪梅, 等. 促进福建金线莲生长发育的内生真菌筛选研究. 中国药学杂志, 2009, 44: 976-979
- 陈晓梅, 郭顺星. 4 种内生真菌对金钗石斛无菌苗生长及其多糖和总生物碱含量的影响. 中国中药杂志, 2005, 30: 253-257
- Látalová K and Baláz M. Carbon nutrition of mature green orchid *Serapias strictiflora* and its mycorrhizal fungus *Epulorhiza* sp. Biol Plant, 2010, 54: 97-104
- 孟志霞, 郭顺星, 于雪梅, 等. 植物生长调节剂对福建福建金线莲丛生芽增殖的影响. 中国药学杂志, 2008, 43: 1777-1780
- 郭顺星, 陈晓梅, 于雪梅, 等. 福建金线莲菌根真菌的分离及其生物活性研究. 中国药学杂志, 2000, 35: 443-445
- 唐明娟, 孟志霞, 郭顺星, 等. 内生真菌对福建福建金线莲栽培及酶活性的影响. 中国药学杂志, 2008, 43: 890-893
- 高微微, 郭顺星. 三种内生真菌对铁皮石斛、福建金线莲生长影响的研究. 中草药, 2002, 33: 543-545
- 关璟, 王春兰, 郭顺星, 等. 真菌对福建福建金线莲总黄酮含量的影响. 中国药学杂志, 2008, 43: 1031-1032
- Chen D Y, Ding Y Z, Guo W Z, et al. Molecular cloning and characterization of a flower-specific class III peroxidase gene in *G. Hirsutum*. Mol Biol Rep, 2009, 36: 461-469
- Zhou B J, Wang X P, Wang Y J. cDNA cloning, expression, protein purification, and characterization of a novel glyoxal oxidase related gene from *Vitis pseudoreticulata*. Biol Plant, 2007, 51: 458-466
- Chen X Q, Wang C G, Zhang Y, et al. Identification and sequence analysis of cDNA fragments relative to ovary development of *Cymbidium hybridum* after pollination. Biol Plant, 2007, 51: 249-256
- Zhang J F, Turley R B, Stewart J M. Comparative analysis of gene expression between CMS-D8 restored plants and normal non-restoring fertile plants in cotton by differential display. Plant Cell Rep, 2008, 27: 553-561

- 16 Zhang F Y, Feng B, Li W, et al. Induction of tobacco genes in response to oligochitosan. *Mol Biol Rep*, 2007, 34: 35–40
- 17 Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of polymerase chain reaction. *Science*, 1992, 257: 967–971
- 18 Liang P, Pardee A B. Differential display methods and protocols. Totowa, New Jersey: Humana Press, 1997
- 19 Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 1962, 15: 473–497
- 20 Currah R S, Zettler L W, McInnis T M. *Epulorhiza inquilina* sp. nov. from *Platanthera* (Orchidaceae) and a key to *Epulorhiza* species. *Mycotaxon*, 1997, 61: 335–342
- 21 Zelmer C D, Currah R S. Symbiotic germination of *Spirantes lacera* (Orchidaceae) with a naturally occurring endophyte. *Lindleyana*, 1997, 12: 142–148
- 22 唐明娟, 孟志霞, 于雪梅, 等. 内生真菌对离体培养的福建福建金线莲生长的影响. *中草药*, 2008, 39: 1876–1880
- 23 Senthilkumar S, Krishnamurthy K V, John Britto S, et al. Visualization of orchid mycorrhizal fungal structures with fluorescence dye using epifluorescence microscopy. *Curr Sci*, 2000, 79: 1527–1528
- 24 Chang S J, Puryear J, Cairney J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol Bio Rep*, 1993, 11: 113–116
- 25 Zhang H, Zhang R, Liang P. Differential screening of differential display cDNA products by reverse Northern. *Method Mol Biol*, 1997, 85: 87–93
- 26 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术, 第二版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2000. 266–270
- 27 Liu W Q, Wang B C, Duan C R, et al. A method for isolating functional RNA from callus of *Dendrobium candidum* contained rich polysaccharides. *Colloids Surf B: Biointerfaces*, 2005, 42: 259–262
- 28 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor, 1989. 669–675
- 29 Ma M, Tan T K, Wong S M. Identification and molecular phylogeny of *Epulorhiza* isolates from tropical orchids. *Mycol. Res*, 2003, 107: 1041–1049
- 30 吴应详. 中国兰花, 第二版. 北京: 中国林业出版社, 1993. 255–256
- 31 Hadley G, Williamson B. Features of mycorrhizal infection in some Malayan orchids. *New Phytol*, 1972, 71: 1111–1118
- 32 Islam M R, Kim H, Kang S W, et al. Functional characterization of a gene encoding a dual domain for uridine kinase and uracil phosphoribosyltransferase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 2007, 63: 465–477
- 33 Mainguet S E, Gakière B, Majira A, et al. Uracil salvage is necessary for early *Arabidopsis* development. *Plant J*, 2009, 60: 280–291
- 34 Arsène-Ploetze F, Nicoloff H, Kammerer B, et al. Uracil salvage pathway in *Lactobacillus plantarum*: transcription and genetic studies. *J Bacteriol*, 2006, 188: 4777–4786
- 35 Wipf D, Ludwig U, Tegeder M, et al. Conservation of amino acid transporters in fungi, plants and animals. *Trends Biochem Sci*, 2002, 27: 139–147
- 36 Sagné C, Agulhon C, Ravassard P, et al. Identification and characterization of a lysosomal transporter for small neutral amino acids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 7206–7211
- 37 Fan R C, Peng C C, Xu X F, et al. Apple sucrose transporter SUT1 and sorbitol transporter SOT6 interact with cytochrome b5 to regulate their affinity for substrate sugars. *Plant Physiol*, 2009, 150: 1880–1890
- 38 Martí M C, Olmos E, Calvete J J, et al. Mitochondrial and nuclear localization of a novel pea thioredoxin: identification of its mitochondrial target proteins. *Plant Physiol*, 2009, 150: 646–657
- 39 Lam H G, Coschigano K, Schultz C, et al. Use of *Arabidopsis* mutants and genes to study amide amino acid biosynthesis. *The Plant Cell*, 1995, 7: 887–898
- 40 Mohr G and Lambowitz A M. Putative proteins related to group II intron reverse transcriptase/maturases are encoded by nuclear genes in higher plants. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31: 647–652
- 41 Mastroianni M, Watanabe K, White T B, et al. Group II intron-based gene targeting reactions in eukaryotes. *PLoS One*, 2008, 3: e3121
- 42 Palmer J D, Adams K L, Cho Y, et al. Dynamic evolution of plant mitochondrial genomes: mobile genes and introns and highly variable mutation rates. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 6960–6966
- 43 Daniela A, Katrin P, Jörg K, et al. Evolutionary origin of a plant mitochondrial group II intron from a reverse transcriptase/maturase-encoding ancestor. *J Plant Res*, 2006, 119: 363–371
- 44 Belhocine K, Mak A B, Cousineau B. Trans-splicing versatility of the LI.LtrB group II intron. *RNA*, 2008, 14: 1782–1790