小麦中一个PDR型ABC转运蛋白基因的克隆和特征分析

尚毅, 肖进, 马璐琳, 王海燕, 亓增军, 陈佩度, 刘大钧*, 王秀娥*

南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室, 细胞遗传研究所, 南京 210095

浙江省农业科学院作物与核技术利用研究所, 杭州 310021

* 联系人, E-mail: xiuwei@njau.edu.cn; djliu@njau.edu.cn

2009-03-21 收稿, 2009-06-06 接受

国家自然科学基金(批准号: 30330380)、高等学校创新引智计划(批准号: B08025)、国家高技术研究发展计划(编号: 2006AA10Z1F6)、江苏省自然科学基金重点项目(批准号: BK2006720)、国家转基因生物新品种培育科技重大专项(编号: 2009ZX08002-001B)及美国 McKnight 基金 CCRP 资助项目

摘要 脱氧血腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)在小麦赤霉病发病过程中起重要作用, 是一种毒性因子. 禾谷镰刀菌的侵染能力依赖于其产生 DON 的能力, 抗病品种能显著降低病穗组织中 DON 的含量. 本研究利用 Affymetrix 小麦基因组芯片, 对抗赤霉病小麦品种望水白经 DON 诱导后的穗组织基因表达特点进行了分析, 结果发现, 一个编码 PDR 型转运蛋白的 EST 受 DON 诱导后上调表达 45 倍. 根据该 EST 设计引物筛选小麦基因组 TAC 文库, 得到一个包含该基因的 TAC 单克隆. 利用染色体 walking 对该单克隆测序, 用 Softberry 软件进行基因预测, 根据预测基因的 5' 和 3' 非翻译区设计引物, 从 DON 诱导的小麦望水白穗组织 cDNA 中克隆出该转运蛋白基因. 该基因组全长 7377 bp, 包含 19 个外显子, CDS 长度为 4308 bp, 编码长 1435 aa 且分子量 161 kD 的蛋白. 蛋白序列比对表明, 该基因属于 PDR 蛋白家族, 命名为 *TaPDR1* (*Triticum aestivum* *Pleiotropic Drug Resistance*). 利用一套中国春缺体-四体系将 *TaPDR1* 基因定位在小麦 5A 染色体上. 半定量 RT-PCR 表明, *TaPDR1* 在望水白穗中受 DON 和禾谷镰刀菌诱导表达, 表明其参与了植物抗病防御反应. 该基因在望水白感病突变体中低水平表达, 进一步证明 *TaPDR1* 与赤霉病抗性有关. *TaPDR1* 的表达不受与生物胁迫相关的激素(JA 和 SA)和非生物胁迫因子(热、冷、伤害和 NaCl)的诱导, 但受到 Al^{3+} 和游离 Ca^{2+} 的诱导表达, 推测 $[Ca^{2+}]_i$ 介导了 *TaPDR1* 的表达信号.

关键词

普通小麦

脱氧血腐镰刀菌烯醇(DON)

ABC 转运蛋白

PDR

小麦赤霉病(FHB)是一种由禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)引起的世界性病害, 该病发生后不仅降低作物产量, 而且病麦粒中含有多种危害人、畜健康的单端孢霉族毒素(trichothecene toxins), 影响粮食品质^[1]. 其中脱氧血腐镰刀菌烯醇(DON)是粮食中最

普遍的一类毒素^[2], 它可以抑制真核生物细胞DNA、RNA和蛋白质合成, 抑制线粒体的功能, 抑制细胞分裂, 改变细胞膜透性. 此外DON在小麦赤霉病发病过程中还作为一种毒性因子发挥重要作用^[3]. Boddu 等人^[4,5]报道, 禾谷镰刀菌在侵染寄主初期为活体营

引用格式: 尚毅, 肖进, 马璐琳, 等. 小麦中一个 PDR 型 ABC 转运蛋白基因的克隆和特征分析. 科学通报, 2009, 54: 2500~2507

Shang Y, Xiao J, Ma L L, et al. Characterization of a PDR type ABC transporter gene from wheat (*Triticum aestivum* L.). Chinese Sci Bull, 2009, 54, doi: 10.1007/s11434-009-0553-0

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2009-54-17-2500>

养型, 然后转向坏死营养阶段, 其产生和积累的 DON 等单族毒素在转变过程中起重要作用。Mesterhazy 等人^[6]研究表明, 禾谷镰刀菌的侵染能力依赖于其产生 DON 的能力, FHB 的田间发病程度与麦粒或病穗组织中 DON 含量之间有极显著的相关性, DON 单独处理即可引起较典型的赤霉病症状。抗病品种能显著地降低病穗中 DON 的含量, 因而具有不同 FHB 抗性的品种其籽粒中 DON 含量也有很大的差别^[7,8]。自发现抗病品种能够阻止 DON 毒素合成或促使其降解之后, 在这方面做了很多研究工作, 目前已经发现了一些和抗毒素或降解毒素积累相关的基因, 如具有降解 DON 功能的小麦乙酰基转移酶基因^[9]、具有耐 DON 功能的水稻核糖体蛋白基因 L3(RPL3)^[10]和小麦中核糖体蛋白基因 L3(RPL3)^[11]、具有降解 DON 功能的拟南芥 UDP-葡萄糖基转移酶基因 *DOG1*^[12]和具有转运 DON 功能的酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) ABC 转运蛋白基因 *ScPDR5*^[12,13]。研究表明, 位于小麦 3BS 上的抗赤霉病和抗 DON 的主效 QTL (*FHB1*)对 DON 的抗性有贡献^[14~17], 它可能是通过编码或调控 DON 脱毒基因实现对 DON 的抗性^[18]。由于小麦抗 DON 是个复杂的数量性状, 而且小麦抗赤霉病和抗 DON 的机理还不清楚, 所以鉴定一些新的与小麦抗 DON 反应密切相关的基因显得尤为重要。

小麦地方品种望水白是到目前公认的抗赤霉病性最好、抗性最稳定、DON 含量也很低的一个品种^[19~21]。在望水白中已经鉴定并定位了一些与赤霉病抗性和 DON 抗性相关的主效 QTL, 如 *FHB1*^[16,22,23]。本研究利用 Affymetrix 小麦基因芯片对望水白经 DON 诱导后穗组织基因表达特点进行了分析, 结果发现, 小麦中的一个 PDR 型 ABC 转运蛋白基因受到 DON 的诱导上调表达, 我们从望水白中克隆出这个转运蛋白基因, 该基因不但受到 DON 和禾谷镰刀菌的诱导表达, 还受到 *FHB1* 的调控, 显示该基因在抗赤霉病中发挥作用。

1 材料与方法

() 材料。抗赤霉病小麦品种望水白、望水白感赤霉病突变体(该突变体是从快中子处理的望水白后代群体中获得的, 表现稳定的感赤霉病特性, 突变体的获得和鉴定结果将另文发表)、感赤霉病小麦品种 Alondra's 和小麦品种中国春的缺体-四体系列、小

麦基因组 TAC 文库等均由本实验室提供。

() *TaPDR1* 基因的克隆。根据小麦芯片杂交结果信息上调表达的探针所对应的 EST (BQ161629) 序列设计特异引物 SH49S (5'-ACTTTGACAACAAC-CGACAG-3')和 SH49A (5'-GCATTAAGCACGATTTC-3'), 筛选小麦基因组 TAC 文库。以该 TAC 文库为模板进行 PCR 反应。反应体系为: TAC 文库菌液 2 μ L, 10 μ mol/L SH49S 引物和 SH49A 引物各 0.5 μ L; 10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μ L; 2.5 mmol/L dNTP 2.0 μ L; 25 mmol/L Mg^{2+} 1.5 μ L; 5 U/ μ L *Taq* 聚合酶 0.2 μ L, 加水至总体积 25 μ L。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C, 3 min; 94 $^{\circ}$ C, 30 s, 55 $^{\circ}$ C, 45 s, 72 $^{\circ}$ C, 50 s, 33 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物用 8% PAGE 胶电泳, 银染检测, 对筛选到的阳性单克隆提取质粒并用染色体步行法对单克隆测序。用 Softberry 软件(<http://www.softberry.com>)对序列进行结构分析。根据序列预测结果, 在目标基因的 5'和 3'非翻译区各设计一对引物 CPDR1S (5'-CACG-GATCCACAGACAGGCACAGAAAGA-3')和 CPDR1A (5'-AAACCCGGGTTGACAACAACCGACAGA-3'), 从 DON 诱导的望水白穗组织 cDNA 中扩增。反应体系: 5 μ L cDNA 模板; 10 μ mol/L CPDR1S 引物和 CPDR1A 引物各 2 μ L, 2 $\times$ GC 缓冲液 25 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 8 μ L, 5 U/ μ L *Taq* 聚合酶 0.5 μ L, 加水至总体积 50 μ L。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C, 3 min; 94 $^{\circ}$ C, 30 s, 58 $^{\circ}$ C, 45 s, 72 $^{\circ}$ C, 4 min, 33 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物构建到 pGEM-T 载体(Promega 公司), 筛选到的阳性单克隆菌斑进行扩大培养后提取质粒 DNA 并测序。

() 半定量 RT-PCR 分析。(1) DON 和禾谷镰刀菌处理幼穗。小麦望水白、望水白感病突变体和 Alondra's 幼穗期(正常条件大田中生长)用 DON 水溶液(100 mg/L)和禾谷镰刀菌孢子(50 μ L)对幼穗进行单花滴注法接种, 于接种后不同时间段分别取幼穗, 液氮中保存待用。(2) SA, JA, 热, 冷和伤害处理叶片。小麦望水白种子经 75%乙醇表面消毒 30 s 后, 以 10%次氯酸钠消毒 10 min, 无菌水洗 3 次, 黑暗条件下发芽 2 d, 转入 16 h 光照/8 h 黑暗光周期下生长, 每天换新鲜的无菌水, 生长 2 周后对叶片分别进行以下处理: 叶面喷施 1 mmol/L SA 或 0.1 mmol/L JA, 取处理后不同时间段的叶片, 液氮中保存待用; 取生长 2 周的幼苗, 分别转移到 40 $^{\circ}$ C 的人工气候箱中处理 1 h 或 4 $^{\circ}$ C 的人工气候

箱中处理, 取处理后不同时间段的叶片, 液氮中保存待用; 取生长 2 周的幼苗, 对叶片进行机械伤害, 取处理后不同时间段的叶片, 液氮中保存待用. (3) NaCl 处理根. 将正常生长 3 d 的望水白幼苗, 转入 300 ng/mL 的 DON 溶液中处理不同时间段后取根, 液氮中保存待用. (4) Al^{3+} 和 Ca^{2+} 处理根. 望水白种子经 75% 乙醇表面消毒 30 s 后, 以 10% 次氯酸钠消毒 10 min, 无菌水洗 3 次, 于 0.5 mmol/L CaCl_2 溶液(pH 4.5)、黑暗条件下发芽 2 d, 转入 16 h 光照/8 h 黑暗光周期下生长, 每天换新鲜的 0.5 mmol/L CaCl_2 溶液(pH 4.5), 生长 3 d 后, 分别换成包含 0, 10, 20, 50, 100 和 200 $\mu\text{mol/L}$ AlCl_3 的 0.5 mmol/L CaCl_2 溶液(pH 4.5)和 0.05 mmol/L CaCl_2 溶液(pH 4.5), 取处理 6 h 的根, 液氮中保存待用. (5) RT-PCR. 提取备用材料的 RNA, 用 AMV Reverse Transcriptase XL (TaKaRa 公司) 反转录成 cDNA. 以 cDNA 为模板, SH49S 和 SH49A 为引物、管家基因 *Tubulin* 为内参(扩增 *Tubulin* 基因的引物为 *tubulin* F: 5'-CTCATCACAGGCAAGG- AA-GAT-3' 和 *tubulin* R: 5'-TTAAGGTAAGTGTAGGT-TGGG-3')进行 RT-PCR, 分析 *TaPDR1* 的表达情况. 反应体系: 2 μL cDNA 为模板, 10 $\mu\text{mol/L}$ SH49S 引物和 SH49A 引物各 0.5 μL , 10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μL ; 2.5 mmol/L dNTP 2 μL ; 25 mmol/L Mg^{2+} 1.5 μL ; 5 U/ μL *Taq* 聚合酶 0.2 μL , 加水至总体积 25 μL . 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$, 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$, 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$, 50 s, 28 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min. 扩增 *Tubulin* 基因的引物退火温度为 53 $^{\circ}\text{C}$, 其他条件相同.

() 系统进化树构建. 使用 MEGA4^[24] 软件以邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统发生树. 系统树中分支的置信水平用自引导值(Bootstrap test)估计,

重复 1000 次.

() 染色体定位. 用一套普通小麦品种中国春的空体-四体材料基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 对 *TaPDR* 在小麦中进行染色体定位, 染色体定位使用的引物为 SH49S 和 SH49A.

2 结果和分析

2.1 *TaPDR1* 基因的克隆

根据小麦芯片杂交中上调 45 倍的探针所对应的 EST(BQ161629: 一个 ABC 转运蛋白同源基因)序列设计特异引物 SH49S 和 SH49A, 筛选小麦基因组 TAC 文库, 对筛选到的阳性单克隆菌斑进行扩大培养后提取质粒 DNA 并测序, 用 Softberry 软件进行预测, 根据预测基因的 5'和 3'非翻译区设计引物, 从 DON 诱导的小麦望水白穗组织 cDNA 中克隆出这个转运蛋白基因, 其基因组全长 7377 bp, 含 19 个外显子, CDS 长度为 4308 bp, 编码一个 1435 aa 且分子量 161 kD 的蛋白(图 1). 用该基因的蛋白序列在 NCBI 上进行结构域比对, 该基因属于 PDR 亚家族(图 2), PDR 转运蛋白的结构特征是核酸结构域(nucleotide binding domains)比跨膜结构域(transmembrane domains)更接近序列的 N 端, 所以把该基因定名为 *TaPDR1*(*Triticum aestivum* Pleiotropic Drug Resistance), *TaPDR1* 的 cDNA 和基因组序列在 GenBank 上的登录号分别为 FJ185035 和 FJ858380.

2.2 同源性比较

植物 PDR 基因分为 5 个族^[25], *TaPDR1* 属于第 4 族(图 3). 与 *TaPDR1* 同源性最近的是水稻的 *OsPDR3*, *OsPDR4* 和 *OsPDR5*, 氨基酸一致性分别为 79%, 71% 和 68%, 该基因与拟南芥的 *AtPDR6* 和 *AtPDR11* 均有

图 1 *TaPDR1* 的基因组组织结构

图 2 *TaPDR1* 蛋白的结构域

图3 植物PDR基因的系统进化

三角形表示已经有功能报道的转运蛋白，圆圈表示本实验克隆的基因

61%的氨基酸一致性。到现在为止，未见上述水稻和拟南芥的同源基因相关功能研究的报道，烟草的 *NpPDR2* 是这一族中唯一有功能研究的基因 [26]。 *NpPDR2* 和 *TaPDR1* 具有 61% 的氨基酸一致性，与其他的PDR基因不同， *NpPDR2* 在叶片中不被任何一种与生物或非生物胁迫反应相关的激素所诱导，而且通过RNA干扰，阻止 *NpPDR2* 的表达，未观察到植物出现任何不同的表型。所以，这一族PDR基因在植物体中的功能尚不明了。

2.3 *TaPDR1* 在小麦染色体上的定位

利用引物 SH49S 和 SH49A 在一套普通小麦品种中国春的缺体-四体材料的基因组 DNA 中扩增，对 *TaPDR1* 进行染色体定位。结果表明，在缺失 4A、5A 和 5D 染色体的材料中各缺失了一条扩增带(图4)。根据 TAC 克隆测序的结果可知，引物 SH49S 和 SH49A 可从 *TaPDR1* 的基因组序列上扩增出 269 bp 大小的片段，这与 5A 上缺失的片段大小一致，所以将 *TaPDR1* 定位于 5A 染色体上。小麦是一个异源六倍体，许多基

因在 3 个染色体组上都有相同的拷贝，如图所示， *TaPDR1* 基因也有 3 个拷贝，但在 DON 诱导的小麦穗部 cDNA 中也只扩增出一条 269 bp 大小的片段，而没有检测到另外的两个片段，表明在小麦多倍体形成时，发生了遗传二倍体化，另两个拷贝不再表达或者发生了功能趋异化，不参与 DON 的抗性。

图4 *TaPDR1* 的中国春缺体-四体和染色体定位

箭头所指为 *TaPDR1* 定位的染色体

2.4 *TaPDR1* 诱导表达分析

() DON 和禾谷镰刀菌对 *TaPDR1* 的诱导。 *TaPDR1* 的表达受到 DON 的诱导，在抗感品种中均有表达，但表达模式不同(图 5)。在抗病品种望水白

图5 *TaPDR1* 的表达在抗感品种中受到 DON 的诱导
(a) 望水白; (b) Alondra's

中, 经 DON 诱导后 6~12 h *TaPDR1* 的表达水平达到高峰, 然后开始缓慢下降; 而在感病品种 Alondra's 中, 直到接种后 12 h 表达才达到高峰。

TaPDR1 同样可被禾谷镰刀菌所诱导表达, 望水白在接种禾谷镰刀菌 48 h 可以检测到 *TaPDR1* 的表达 (图 6)。据报道, 在接种禾谷镰刀菌 36 h 后可以检测到 DON^[27], 所以推测 *TaPDR1* 在抗赤霉病中的功能更多是与 DON 相关。 *FHB1* 是定位于望水白 3BS 染色体 0.78~0.87 区段一个抗赤霉病和抗 DON 的主效 QTL, 我们利用本实验室鉴定的一个该区段缺失的感病突变体分析 *TaPDR1* 和 *FHB1* 的关系, 结果发现, 接种禾谷镰刀菌后感病突变体中 *TaPDR1* 的表达模式与在抗病野生型中明显不同, 望水白接种禾谷镰刀菌 48 h 后, *TaPDR1* 的表达达到最高, 而在突变体中, *TaPDR1* 的表达一直很弱, 没有检测到强烈上调 (图 6), 据此推测 *TaPDR1* 与赤霉病或 DON 抗性有关。最近报道的小麦中一个 PDR 型的 ABC 转运蛋白基因与 *TaPDR1* 有 46% 的氨基酸一致性, 该基因可以持久抵抗多种小麦真菌病害, 包括抗叶锈病的 *Lr34*、抗条锈病的 *Yr18*、抗白粉病的 *Pm38* 以及抗干叶尖的 *Ltn1*, 是一个多效基因^[28], 由此可见小麦 PDR 基因在抗真菌性病害中发挥重要的作用。

图6 *TaPDR1* 的表达受到禾谷镰刀菌的诱导
(a) 望水白; (b) 感病突变体

() *TaPDR1* 不被 SA 和 JA 以及其他胁迫诱导。植物 PDR 基因广泛参与了植物对外界环境中生物和非生物胁迫的应答^[25], 但本研究表达谱显示, *TaPDR1* 的表达不受到与生物胁迫相关的激素 (如 JA 和 SA)、非生物胁迫因子 (如热、冷、伤害和 NaCl) 的诱导 (结果未显示)。这一结果与 *NpPDR2* 的表达谱相同^[26]。拟南芥 *AtPDR6*

仅在根中表达, 在幼苗中受到表油菜素内酯, 2,4-D, NaCl, CdCl₂, 11 低光照和 4 黑暗的诱导, 但不受放线酮和 ABA 的诱导。但 *AtPDR11* 不在根、茎、叶、花和幼苗中表达^[29]。这些结果表明第 4 族的 PDR 基因具有不同的生物学功能。

() *TaPDR1* 受到 Al³⁺ 和 [Ca²⁺]_i 的诱导。 *TaMDR1* 是小麦根中一个受铝诱导的基因^[30], 在本实验的芯片结果中发现, *TaMDR1* 也上调表达, 表明 *TaMDR1* 可能与 DON 抗性有关。为了研究是否 *TaPDR1* 同样也受到铝的诱导, 本研究利用 Al³⁺ 和 [Ca²⁺]_i 对小麦根进行了诱导, 结果表明, *TaPDR1* 受到 Al³⁺ 和 [Ca²⁺]_i 降低的诱导表达 (图 7)。这一结果表明, *TaPDR1* 可能是 *TaMDR1* 的功能同源基因, 就像酵母的 *PDR5* 基因被认为是人类 *MDR1* 基因的功能同源基因^[31]。

图7 Al³⁺ 和 [Ca²⁺]_i 对小麦根中 *TaPDR1* 的诱导

在新鲜的 0.5 mmol/L CaCl₂ (pH 4.5) 溶液中生长 3 d 后分别换成: I, 0.5 mmol/L CaCl₂ 溶液; II, 0.05 mmol/L CaCl₂ 溶液; 1~6: 含 0, 10, 20, 50, 100 和 200 mmol/L AlCl₃ 的 0.5 mmol/L CaCl₂ 溶液, 诱导 6 h

Ca²⁺ 是细胞内的第二信使, 涉及到细胞对外界生物和非生物胁迫反应信号的传导。细胞受到外源激素 (JA 或 SA) 或非生物胁迫 (热、冷、伤害和 NaCl) 处理时, [Ca²⁺]_i 就会增加^[32~37]。而且这些处理均不能诱导 *TaPDR1* 的表达。相反, 由于 Al 是钙离子通道的抑制剂, 受到 Al 胁迫时使 [Ca²⁺]_i 降低; 当细胞外的 [Ca²⁺]_i 降低也会使 [Ca²⁺]_i 降低; 虽然在植物中没有 DON 和钙离子通道关系的报道, 但在动物中发现 DON 对心肌细胞的钙离子通道有抑制作用^[38,39], 推测在植物中 DON 处理也会使 [Ca²⁺]_i 降低。而且这 3 种处理均可以诱导 *TaPDR1* 的表达。因此推测 [Ca²⁺]_i 可能介导了 *TaPDR1* 表达的信号传导。

3 讨论

ATP 结合结构域 (ATP-binding cassette, ABC) 转运蛋白是一类跨膜运输蛋白, 是目前已知最大、功能最广

泛的蛋白家族, 此类蛋白的共同点是序列上含有ABC。大多数ABC转运蛋白都能利用水解ATP释放的能量直接转运底物, 其中包括肽、糖、脂、重金属螯合物、多糖、生物碱、类固醇、无机离子和谷胱苷肽结合物等多种化合物。因为ABC转运蛋白在原核和真核生物中与一些重要的生理过程, 如细菌的耐药性、囊性纤维化和肿瘤细胞的抗药性等密切相关, 所以引起了人们的广泛关注^[25,29,40,41]。PDR转运蛋白亚家族是ABC转运蛋白家族中的一种新的拓扑构型(NBD-TMD)₂, 是植物和真菌中特有的一种转运蛋白^[25]。

在植物PDR基因中, 有功能报道的基因主要在第1族中, 水生植物浮萍(*Spirodella polyrhiza*)的*SpTUR2*是植物中第一个鉴定的PDR基因^[42], *SpTUR2*的表达受ABA以及冷和盐胁迫的诱导, 表明其在非生物胁迫中的作用^[42,43]。另两个参与非生物胁迫的是水稻中的*OsPDR9*^[44]和拟南芥中的*AtPDR12*^[45], 在根中*OsPDR9*的表达受到渗透、盐和缺氧胁迫的强烈诱导。其他一些因素, 如重金属(Cd, Zn)和氧化还原的不平衡同样会增强*OsPDR9*的表达。*AtPDR12*的表达受到Pb的强烈诱导, 敲除了*AtPDR12*的植株与野生型相比, 在含有Pb的营养剂中生长差且体内Pb含量高。相反, 过量表达*AtPDR12*的植株, 体内Pb含量低, 表现很强的抗Pb能力。从烟草细胞系中克隆的*NpPDR1*基因表现对一种从烟草属植物叶表面发现的二萜-香紫苏醇的抗性^[46], 诱导*NpPDR1*的表达可以使细胞获得分泌香紫苏内酯的能力, *NpPDR1*可以在叶表皮毛中表达, 其表达可被JA和SA诱导, 表明*NpPDR1*涉及次生代谢物的分泌, 在植物防御中发挥一定作用^[47]。香紫苏醇还可以诱导*SpTUR2*和*AtPDR12*的表达^[25,48]。现有更多的实验表明*NpPDR1*的这些同源基因可能与生物胁迫和植物防御反应有关。

*NpPDR2*是在烟草中克隆的, 属于PDR第4族, 其转录物存在于根和成熟的花中, 定位于传导组织中。在花中, *NpPDR2*只在授粉后的花柱中表达。*NpPDR2*不被与生物和非生物胁迫相关的激素诱导表达, 也不被灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)诱导表达。沉默*NpPDR2*的植株未发现任何包括花期的表型变化, 表明*NpPDR2*不是生殖过程必须的^[27]。本研究克隆的*TaPDR1*的表达也不受到JA和SA及非生物胁迫因子(如热、冷、伤害和NaCl)的诱导, 这与*NpPDR2*的表达模式相同。但*TaPDR1*的表达受到DON和禾谷

镰刀菌的诱导, 表明第4族PDR基因确实参与到生物胁迫和植物的防御。香紫苏醇是一种二萜化合物, 被认为是第1族PDR转运蛋白的底物, DON是一种倍半萜化合物, 可能就是第4族PDR转运蛋白的底物, 这对进一步鉴定第4族PDR转运蛋白功能有重要的作用。

PDR5转运蛋白首先是在酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中被发现, 与抗真菌性药物的代谢有关, 是作为排出胞内有毒化合物的泵, 可以将真菌产生的细胞毒素排出体外, 减少对细胞的毒害, 是一种重要的抗病蛋白。酵母*PDR5*基因的突变体对禾谷镰刀菌产生的细胞毒素DON比野生型更为敏感, 显示了PDR5蛋白在抗DON中的作用^[12]。小麦*TaPDR1*基因的表达受到DON和禾谷镰刀菌的诱导, 在抗病品种中*TaPDR1*的表达要比在感病品种中表达早, 并且表达量高。由于现在所有报道的PDR转运蛋白均定位在质膜上, 通过软件预测*TaPDR1*也定位在质膜上, 所以推测*TaPDR1*可能将真菌毒素DON或DON脱毒产物从细胞中排出, 减少DON对细胞的毒害, 从而获得对DON和赤霉病的抗性。其他的转运蛋白可能负责向液泡中运输, 因为一些其他的ABC转运蛋白如*TaMDR1*也在本研究所获得的芯片杂交结果中被发现上调表达。

*TaPDR1*除了受到DON和禾谷镰刀菌的诱导表达外, 还受到Al³⁺和游离Ca²⁺的诱导表达。我们推测: () *TaPDR1*没有涉及到铝害, *TaPDR1*受到Al³⁺的诱导表达是因为铝抑制了钙离子通道, 使细胞内[Ca²⁺]_i下降, 诱发了*TaPDR1*表达信号; () *TaPDR1*既涉及到DON的抗性, 又对Al害有反应。

动物中发现, DON抑制心肌细胞的钙离子通道使[Ca²⁺]_i下降^[38,39], DON对细胞的最初伤害是抑制了细胞膜上的钙离子通道。这对禾谷镰刀菌浸染过程有重要的生理意义, Ca²⁺是细胞内的第二信使, 广泛参与了细胞抗病的信号传导。外源施加JA和SA都可以使[Ca²⁺]_i增加, 但DON抑制[Ca²⁺]_i的增加, 干扰了抗病信号的传导。另外, Ca²⁺是细胞膜和细胞壁的重要组成部分, 钙的亏缺会导致细胞膜和细胞壁的降解, 这对禾谷镰刀菌菌丝的入侵是很有益的。小麦对禾谷镰刀菌的感知和识别在抗感品种中是有明显差异的, 也同样表现在DON的差异上, Ca²⁺涉及到对DON抗性的信号传导, 这也可能就是赤霉病抗性

的信号传导.

有报道认为, 位于小麦3BS染色体上的抗赤霉病和抗DON的主效QTL *FHB1* 可能就是通过编码或调控*UGTs*基因来实现对DON的抗性^[18], 但迄今为止这

个主效QTL *FHB1* 还没有被鉴定. 本研究克隆的*TaPDR1*的表达模式在望水白感病突变体中与在野生型望水白中明显不同, 显示这个主效QTL *FHB1* 可能更像一个调控基因.

参考文献

- Windels C E. Economic and social impacts of *Fusarium* head blight: Changing farms and rural communities in the Northern Great Plains. *Phytopathology*, 2000, 90: 17—21[DOI]
- McMullen M P, Jones R, Gallenberg D. Scab of wheat and barley: A re-emerging disease of devastating impact. *Plant Dis*, 1997, 81: 1340—1348[DOI]
- Rocha V, Ansari K, Doohan F M. Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells. *Food Add Contamants*, 2005, 22: 369—378[DOI]
- Boddu J, Cho S, Kruger W M, et al. Transcriptome analysis of the Barley-*Fusarium graminearum* interaction. *Mol Plant Microbe Interact*, 2006, 19: 407—417[DOI]
- Boddu J, Cho S, Muehlbauer G J. Transcriptome analysis of trichothecene-induced gene expression in Barley. *Mol Plant Microbe Interact*, 2007, 20: 1364—1375[DOI]
- Mesterhazy A. Types and components of resistance to *Fusarium* head blight. *Plant Breed*, 1995, 114: 377—386[DOI]
- Miller J D, Young J C, Sampson D R. Deoxynivalenol and *Fusarium* head blight resistance in spring cereals. *Phytopathology*, 1985, 113: 359—367
- Miller J D, Arnison P G. Degradation of deoxynivalenol by suspension cultures of the *Fusarium* head blight resistant wheat cultivar Frontana. *Can J Plant Pathol*, 1986, 8: 147—150
- Alexander N J, McCormick S P, Hohn T M. TRI12, a trichothecene efflux pump from *Fusarium sporotrichioides*. Gene isolation and expression in yeast. *Mol Gen Genet*, 1999, 261: 977—984[DOI]
- Harris L J, Gleddie S C. A modified *Rp13* gene from rice confers tolerance of *Fusarium graminearum* mycotoxin deoxynivalenol to transgenic tobacco. *Physiol Mol Plant Pathol*, 2001, 58: 173—181[DOI]
- Lucyshyn D, Busch B L, Abolmaali S, et al. Cloning and characterization of the ribosomal protein L3 (*RPL3*) gene family from *Triticum aestivum*. *Mol Gen Genet*, 2007, 277: 507—517
- Poppenberger B, Berthiller F, Lucyshyn D, et al. Detoxification of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 2003, 278: 47905—47914[DOI]
- Rogers B, Decottignies A, Kolaczowski M, et al. The pleiotropic drug ABC transporters from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biotechnol*, 2001, 3: 207—214
- Somers D J, Fedak G, Savard M. Molecular mapping of novel genes controlling *Fusarium* head blight resistance and deoxynivalenol accumulation in spring wheat. *Genome*, 2003, 46: 555—564[DOI]
- Chen J, Griffey C A, Maroof M A S, et al. Validation of two major quantitative trait loci for *Fusarium* head blight resistance in Chinese wheat line W14. *Plant Breed*, 2006, 125: 99—101[DOI]
- Ma H X, Zhang K M, Gao L, et al. Quantitative trait loci for resistance to *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation in Wangshuibai wheat under field conditions. *Plant Pathol*, 2006, 55: 739—745[DOI]
- Jiang G L, Dong Y, Shi J R, et al. QTL analysis of resistance to *Fusarium* head blight in the novel wheat germplasm CJ 9306. II. Resistance to deoxynivalenol accumulation and grain yield loss. *Theor Appl Genet*, 2007, 115: 1043—1052[DOI]
- Lemmens M, Scholz U, Berthiller F, et al. The ability to detoxify the mycotoxin deoxynivalenol colocalizes with a major quantitative trait locus for *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Mol Plant Microbe Interact*, 2005, 18: 1318—1324[DOI]
- 仝增军, 裴自友, 韩航如, 等. 利用 DON test-HPLC 检测小麦镰刀菌毒素 DON 含量的差异. *南京农业大学学报*, 2005, 28: 6—10
- 张凯鸣, 马鸿翔, 陆维忠, 等. 小麦赤霉病与 DON 积累的抗性及其相关 SSR 位点差异. *作物学报*, 2006, 32: 1788—1795
- 陈怀谷, 蔡志祥, 陈飞, 等. 不同小麦品种抗赤霉病性类型和抗毒素积累能力分析. *植物保护学报*, 2007, 34: 32—36
- Lin F, Kong Z X, Zhu H L, et al. Mapping QTL associated with resistance to *Fusarium* head blight in the Nanda2419 X Wangshuibai population. . Type resistance. *Theor Appl Genet*, 2004, 109: 1504—1511[DOI]
- Yu J, Bai G H, Zhou W, et al. Mapping QTLs for different types of resistance to *Fusarium* head blight in Wangshuibai. *Proceedings of the 2005 National Fusarium Head Blight Forum*, 2005. 96

- 24 Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 2007, 24: 1596—1599[DOI]
- 25 Crouzet J, Trombik O, Frayse A S, et al. Organization and function of the plant pleiotropic drug resistance ABC transporter family. *FEBS Lett*, 2006, 580: 1123—1130[DOI]
- 26 Trombik T, Jasinski M, Crouzet J, et al. Identification of a cluster IV pleiotropic drug resistance transporter gene expressed in the style of *Nicotiana glauca*. *Plant Mol Biol*, 2008, 66: 165—175[DOI]
- 27 Kang Z, Buchenauer H. Immunocytochemical localization of *Fusarium* toxins in infected wheat spikes by *Fusarium culmorum*. *Phyiol Mol Plant Pathol*, 1999, 55: 275—288[DOI]
- 28 Krattinger S G, Lagudah E S, Spielmeier W, et al. A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. *Sci Exp*, 2009, 323: 1360—1363
- 29 van den Brle S, Smart C C. The plant PDR family of ABC transporters. *Planta*, 2002, 216: 95—106[DOI]
- 30 Sasaki T, Ezaki B, Matsumoto H. A gene encoding multidrug resistance (MDR)-like protein is induced by aluminum and inhibitors of calcium flux in wheat. *Plant Cell Physiol*, 2002, 43: 177—185[DOI]
- 31 Kolaczowski M, van der Rest M, Cybularz-Kolaczowska A, et al. Anticancer drugs, ionophoric peptides and steroids as substrates of the yeast multidrug transporter Pdr5p. *J Biol Chem*, 1996, 271: 31543—31548[DOI]
- 32 Knight H, Trewavas A J, Knight M B. Calcium signaling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant J*, 1997, 12: 1067—1078[DOI]
- 33 Knight H, Trewavas A J, Knight M R. Cold calcium signaling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. *Plant Cell*, 1996, 8: 489—503
- 34 Knight M R, Anthony KC, Steven M S, et al. Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature*, 1991, 352: 524—526[DOI]
- 35 Gong M, Luit A H, Knight M R, et al. Heat “shock” induced changes in intracellular level in tobacco seedling in reaction to thermotolerance. *Plant Physiol*, 1998, 116: 429—437[DOI]
- 36 Kenton P, Mur L A J, Draper J. A requirement for calcium and protein phosphatase in the jasmonate-induced increase in tobacco leaf acid phosphatase specific activity. *J Exp Bot*, 1999, 50: 1331—1341[DOI]
- 37 Chinnusamy V, Schumaker K, Zhu J. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signaling in plants. *J Exp Bot*, 2004, 55: 225—236
- 38 彭双清, 杨进生. 镰刀菌毒素 DON 对心肌细胞膜电位的影响及钙的保护效应. *中华预防医学杂志*, 2003, 37: 423—425
- 39 彭双清, 杨进生. 镰刀菌毒素脱氧雪腐镰刀菌烯醇对心肌细胞 Ca^{2+} 通道的阻滞作用. *中国预防医学杂志*, 2004, 5: 241—243
- 40 Snchez-Fernndez R, Davies T G S, Coleman J O, et al. The *Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily: A complete inventory. *J Biol Chem*, 2001, 276: 30231—30244[DOI]
- 41 Martinoia E, Klein M, Geisler M, et al. Multifunctionality of plant ABC transporters: More than just detoxifiers. *Planta*, 2002, 214: 345—355[DOI]
- 42 Smart, C C, Fleming A J. Hormonal and environmental regulation of a plant PDR5-like ABC transporter. *J Biol Chem*, 1996, 271: 19351—19357[DOI]
- 43 van den Brle S, Muller A, Fleming A J, et al. The ABC transporter SpTUR2 confers resistance to the antifungal diterpene sclareol. *Plant J*, 2002, 30: 649—662[DOI]
- 44 Moons A. OsPDR9, which encodes a PDR-type ABC transporter, is induced by heavy metals, hypoxic stress and redox perturbations in rice roots. *FEBS Lett*, 2003, 553: 370—376[DOI]
- 45 Lee M, Lee K, Lee J, et al. AtPDR12 contributes to lead resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2005, 138: 827-836[DOI]
- 46 Jasinski M, Stukkens Y, Degand H, et al. A plant plasma membrane ATP binding cassette-transporter is involved in antifungal terpenoid secretion. *Plant Cell*, 2001, 13: 1095—1107
- 47 Stukkens Y, Bultreys A, Grec S, et al. NpPDR1, a pleiotropic drug resistance-type ATP-binding cassette transporter from *Nicotiana glauca*, plays a major role in plant pathogen defense. *Plant Physiol*, 2005, 139: 341—352[DOI]
- 48 Campbell E J, Schenk P M, Kazan K, et al. Pathogen-responsive expression of a putative ATP-Binding Cassette transporter gene conferring resistance to the diterpenoid sclareol is regulated by multiple defense signaling pathways in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2003, 133: 1272—1284[DOI]