

综述 Reviews

植物MLO蛋白研究进展

张孝廉^{1,2}, 张吉顺^{1,2}, 雷波², 余婧², 赵德刚^{1,3,*}¹贵州大学生命科学学院/农业生物工程研究院, 贵州省农业生物工程重点实验室, 山地植物资源保护与种质创新省部共建教育部重点实验室, 贵阳550025²贵州省烟草科学研究院, 烟草行业分子遗传重点实验室, 贵阳550081³贵州省农业科学院, 农业部DUS中心贵阳分中心, 贵阳550006

摘要: Mildew resistance locus O (MLO)蛋白是植物特有的一类蛋白家族, 其中的部分成员是白粉病菌成功侵染寄主植物的必要因子。一个或多个MLO基因的功能缺失突变可赋予植物对白粉病菌广谱且持久的抗性, *mlo*介导的白粉病抗性在抗病育种中发挥了重要作用。植物中的MLO蛋白可以分为7个亚家族, 除了参与植物与白粉病菌的互作外, 不同亚家族的MLO蛋白还有很多其他功能。本文对MLO蛋白的特征、分类、功能进行了归纳, 介绍了植物与白粉病抗性相关的*mlo*突变体特征及抗病机制, 并对MLO基因的功能、作用机理研究及其在植物抗病育种中利用应注意的问题进行了讨论。

关键词: 植物; MLO蛋白; 白粉病; *mlo*抗性

近年来, 植物白粉病的发生面积不断扩大, 严重影响了粮食作物、园艺作物及经济作物的产量和品质。培育和使用抗病品种是目前防治植物白粉病最经济、有效和安全的途径。从基因角度入手, 研究白粉病抗性相关基因的分子机理, 利用分子生物学手段改良主栽品种的白粉病抗性具有重要的理论和实践价值。目前, 已鉴定出大量的白粉病抗病相关基因, 并对这些基因的结构、功能和演化途径进行了较深入的研究(Xiao等2005; Shen等2007; Dong等2017; Zou等2018), 这些基因为培育新的抗病品种提供了遗传材料(Tang等2005; Chandran等2010; Riaz等2013)。

在过去40年, 对白粉病抗性相关的mildew resistance locus O (MLO)蛋白进行了大量研究, 成功地应用在了抗病育种中。Freisleben和Lein (1942)通过X射线诱变处理大麦(*Hordeum vulgare*)品种‘Haisa’, 发现了第一个抗大麦白粉病禾本科布氏白粉菌(*Blumeria graminis*)的突变体*mlo*。1997年, 大麦中的MLO基因被成功克隆, 进一步研究发现, 它编码一种植物特有的膜蛋白, 涉及多种细胞代谢过程, 该基因发生功能缺失突变后, 成为遗传上呈隐性的*mlo*基因, 从而提高了大麦抗白粉病的能力(Büschges等1997; Panstruga 2005)。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、小麦(*Triticum aestivum*)、水稻(*Oryza sativa*)等植物中也陆续分离到了MLO家族

基因, 并在多种植物中证实了MLO基因是与白粉病相关的感病基因, 例如大麦*HvMLO*、番茄(*Solanum lycopersicum*) *SIMLO1*和拟南芥*AtMLO2*、*AtMLO6*、*AtMLO12*这些基因的突变可以使植物获得对白粉病的广谱抗性(Consonni等2006; Pavan等2011), 从而引起了人们的高度关注和兴趣, 进行了较为系统和深入的研究。MLO家族基因除了参与植物与白粉病菌的互作外, 不同亚家族的基因还有很多其他功能。本文对MLO蛋白的特征、分类、功能等进行了归纳, 总结了*mlo*突变体的特征及抗病机制, 并对MLO基因在植物抗病育种中的应用及注意事项等进行了讨论。

1 MLO基因家族

MLO是一个重要的植物特有基因家族, 目前在原核生物、酵母和动物中均未发现该类基因的存在(Büschges等1997; Consonni等2006; Panstruga 2005), 在大麦、小麦、水稻、玉米(*Zea mays*)等单子叶植物和拟南芥、番茄、大豆(*Glycine max*)、黄瓜(*Cucumis sativus*)等双子叶植物中都有报道(表1)。

收稿 2018-04-09 修定 2018-07-10

资助 中国烟草总公司贵州省公司科技项目(201605和201606)、国家转基因生物新品种培育重大专项(2016ZX08010003-009)和贵州省高层次创新型人才培养项目[黔科合人才(2016)4003号]。

* 通讯作者(dgzhaoh@gzu.edu.cn)。

表1 已报道植物中MLO基因家族情况
Table 1 Reported MLO gene family in plant species

物种		基因数量	参考文献
拉丁文名	中文名		
<i>Arabidopsis thaliana</i>	拟南芥	15	Chen等2006
<i>Brachypodium distachyon</i>	二穗短柄草	12	Ablazov和Tombuloglu 2015
<i>Medicago truncatula</i>	蒺藜苜蓿	16	Deshmukh等2017
<i>Glycine max</i>	大豆	39	Deshmukh等2014
<i>Cicer arietinum</i>	鹰嘴豆	14	Deshmukh等2017
<i>Cajanus cajan</i>	木豆	18	Deshmukh等2016
<i>Phaseolus vulgaris</i>	菜豆	20	Deshmukh等2016
<i>Citrullus lanatus</i>	西瓜	14	Iovieno等2015
<i>Cucumis melo</i>	甜瓜	16	Iovieno等2015
<i>Cucurbita pepo</i>	西葫芦	18	Iovieno等2015
<i>Cucumis sativus</i>	黄瓜	14	Zhou等2013
<i>Hordeum vulgare</i>	大麦	11	International Barley Genome Sequencing Consortium 2012
<i>Triticum aestivum</i>	小麦	7	Konishi等2010
<i>Zea mays</i>	玉米	13	Devoto等2003
<i>Oryza sativa</i>	水稻	12	Liu和Zhu 2008
<i>Solanum lycopersicum</i>	番茄	16	Chen等2014
<i>Nicotiana benthamiana</i>	本氏烟	26	Bombarely等2012
<i>Nicotiana tabacum</i>	栽培烟草	15	Appiano等2015
<i>Solanum tuberosum</i>	马铃薯	13	Appiano等2015
<i>Gossypium raimondii</i>	雷蒙德氏棉	22	Wang等2016
<i>Gossypium arboreum</i>	亚洲棉	17	Wang等2016
<i>Gossypium hirsutum</i>	陆地棉	38	Wang等2016
<i>Vitis vinifera</i>	葡萄	17	Feechan等2008
<i>Malus pumila</i>	苹果	28	Pessina等2014
<i>Prunus persica</i>	桃	21	Pessina等2014
<i>Fragaria vesca</i>	草莓	23	Pessina等2014

2 MLO蛋白特征

已有研究表明, MLO蛋白定位于质膜上, 具有完整的7个跨膜结构域(transmembrane domain, TM), N末端处于细胞外, C末端处于细胞内(Devoto等1999), 在C端含有一个钙调素结合结构域(calmodulin-binding domain, CaMBD) (Devoto等2003; Elliott等2005)。其拓扑结构和亚细胞定位与动物中的G蛋白偶联受体(G-protein coupled receptors, GPCRs)较为相似(Temple和Jones 2007)。

2.1 MLO蛋白的保守位点

Elliott等(2005)对拟南芥、大麦、小麦、水稻、玉米和小立碗藓中分离的共38个MLO蛋白的氨基酸序列进行了保守性分析, 发现有30个氨基酸残基具有保守性。深入分析番茄MLO蛋白家族的结构, 发现这30个保守氨基酸的保守性达到92% (Zheng等2016), 马铃薯(*Solanum tuberosum*)、烟草(*Nicotiana*

tabacum)和茄子(*Solanum melongena*)等其他茄科植物MLO蛋白的这些氨基酸残基也非常保守(Appiano等2015)。对植物不同物种的338个MLO蛋白序列分析发现, 所有MLO蛋白都存在保守的多肽基序, 说明不同MLO功能的分化与特定基序有关(图1)。对蔷薇科植物MLO家族的研究发现, 这30个氨基酸的保守性不同, 苹果(*Malus pumila*)的MLO蛋白中有14~30个氨基酸保守, 桃子(*Prunus persica*)有23~30个, 草莓(*Fragaria vesca*)有18~30个(Pessina等2014)。闫沛喆等(2017)对芸薹属的71个MLO蛋白的保守结构域进行分析, 发现4个物种中的MLO蛋白含有一个长度为464个氨基酸的共有序列, 有52个氨基酸残基在71个MLO蛋白中具有保守性, 推测这段保守的氨基酸序列可能是MLO的主要功能序列。

2.2 MLO蛋白的结构域

过去一直认为MLO蛋白是一个植物特有的

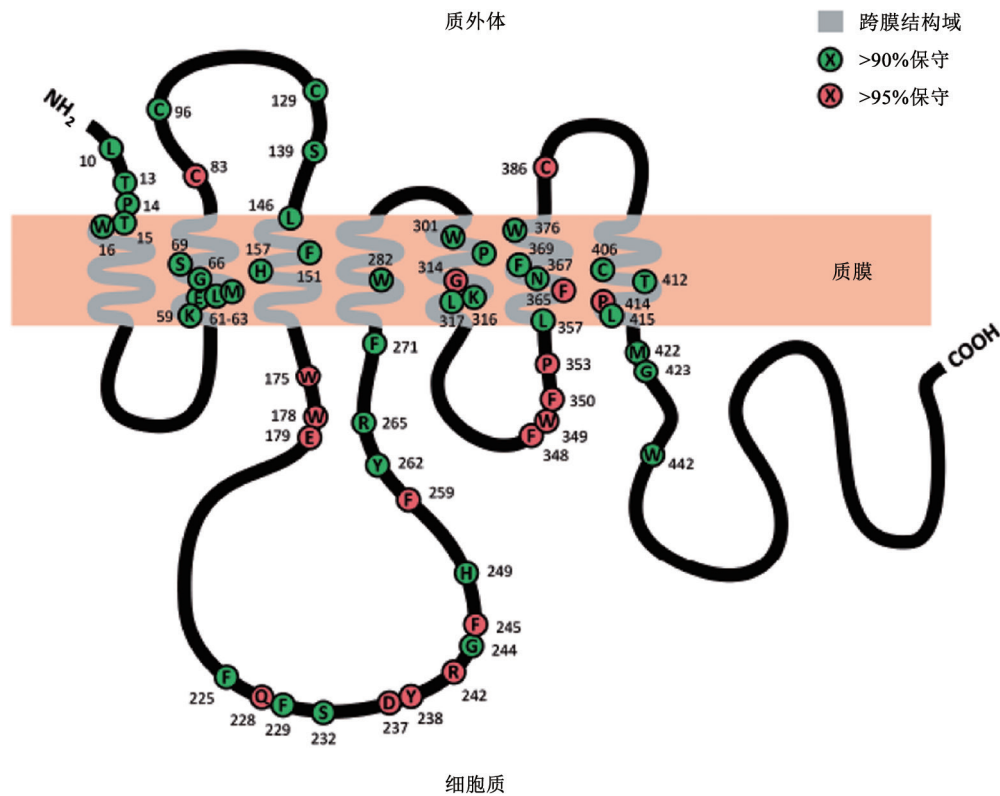


图1 有胚植物MLO蛋白的保守氨基酸

Fig.1 Conserved amino acids in embryophyte MLO proteins

在所有陆生植物MLO蛋白中保守性>90%的氨基酸为绿色, >95%的为红色, 引自Kusch等(2016)并略有改动。

7-TM蛋白, 但是越来越多的研究发现MLO蛋白的跨膜结构域并不都是7个, 并且低等植物和高等植物的MLO蛋白之间存在着较大差异, 低等植物MLO蛋白的跨膜结构域少于5个, 而高等植物一般有4~8个跨膜结构域(Chen等2014)。在二穗短柄草(*Brachypodium distachyon*)中, 11个MLO蛋白都具有7个跨膜结构域(Ablazov和Tombuloglu 2015), 而木薯(*Manihot esculenta*) MLO蛋白有4~8个(覃碧等2013), 蓖麻(*Ricinus communis*) MLO蛋白有6~7个(覃碧等2014), 苹果MLO蛋白有3~8个, 桃子MLO蛋白有4~8个, 草莓MLO蛋白有2~8个(Pessina等2014), 大豆MLO蛋白有4~10个(Deshmukh等2014), 木豆(*Cajanus cajan*) MLO蛋白有6~10个, 菜豆(*Phaseolus vulgaris*) MLO蛋白有7~10个(Deshmukh等2016), 雷蒙德氏棉(*Gossypium raimondii*) MLO蛋白有4~8个, 亚洲棉(*G. arboreum*) MLO蛋白有2~8个, 陆地棉(*G. hirsutum*) MLO蛋白有2~8个(Wang等2016), 黄瓜MLO蛋白的跨膜结构域数量差异较大, 从1个(CsMLO10)到9个(CsMLO07)不

等。由此可以看出, 只有部分MLO蛋白的跨膜结构域数量是保守的, 有些MLO有一个甚至多个跨膜结构域的缺失或者额外跨膜结构域的插入(Zhou等2013)。不同MLO蛋白的C末端长度和氨基酸序列都有很大的差异(Devoto等2003), 长度从31到172个氨基酸不等。

研究发现MLO蛋白在接近C末端的位置是一个保守的CaMBD, 有约10~35个氨基酸残基(Kim等2002a, b)。Ca²⁺在调节植物防御反应的过程中发挥重要作用, 很多研究都发现植物受到病原菌感染时细胞内Ca²⁺水平迅速升高(Xu和Heath 1998; Blume等2000)。钙调素是一种重要的Ca²⁺结合蛋白, 在钙信号传递途径中发挥重要作用(Yang和Poovaiah 2003)。目前已经鉴定出大麦、水稻、二穗短柄草、蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)、木豆、菜豆等多种植物的MLO蛋白都包含CaMBD (Ablazov和Tombuloglu 2015; Deshmukh等2016, 2017; International Barley Genome Sequencing Consortium 2012; Liu和Zhu 2008)。Kim和Hwang (2012)发现钙调素

以Ca²⁺依赖的方式与辣椒(*Capsicum annuum*)中CaMLO2蛋白的CaMBD结合。

部分MLO蛋白C端还包含另外两个保守性结构域, 肽结构域I (peptide domain I)包含保守的丝氨酸和苏氨酸残基, 而肽结构域II包含D/E-F-S/T-F保守基序, 这两个保守结构域可能与植物对白粉病敏感性相关(Feechan等2008; Panstruga 2005)。

2.3 MLO蛋白的GPCRs特征

植物MLO蛋白的拓扑结构和亚细胞定位与动物中的GPCRs较为相似(Temple和Jones 2007), GPCRs在感受外界刺激以及通过与之偶联的G蛋白触发下游效应过程中起作用(Bockaert和Pin 1999)。植物MLO蛋白是一种不依赖异源三聚体G蛋白来传输信号的7-TM蛋白(Brzostowski和Kimmel 2001)。Kim等(2002a)证明异源三聚体G蛋白的 α 亚基在MLO功能或mlo抗性中没有发挥作用。同样, 对拟南芥中MLO4和MLO11的研究也发现MLO蛋白的功能与GPCRs无关(Chen等2009), 然而Lorek等(2013)的研究表明拟南芥Atmlo2介导的白粉病抗性受到异源三聚体G蛋白G β 和G γ 亚基的调节。

3 MLO蛋白家族的分类及演化

3.1 MLO蛋白家族的分类

MLO蛋白在不同物种间十分保守, 在进化过程中, MLO蛋白家族被分为若干个亚家族, 但是不同的研究结果并不完全一致, 多数研究将该蛋白分为7个亚家族(Jiwan等2013; Zhou等2013; Acevedo-Garcia等2014), 也有研究将其分为4、5、6甚至8个亚家族(Feechan等2008; Devoto等2003; Deshmukh等2014; Pessina等2014)。Kusch等(2016)对22个陆生植物物种的338个MLO蛋白进行了聚类分析, 结果将MLO蛋白家族分为7个分枝。所有单子叶植物的MLO蛋白全部分布在I~IV分支上, 在V~VII分支上没有单子叶植物的MLO蛋白。该研究中总计包含11个双子叶植物物种, 其中有6个没有第IV分支的MLO蛋白。双子叶植物中所有已知的与白粉病相关的MLO蛋白都位于第V分支上, 而单子叶植物中与白粉病相关的MLO蛋白则位于第IV分枝上(Kusch等2016)。总之, 参与白粉病互作的MLO蛋白似乎仅限于第V和第IV分枝上(Berg等2017; Appiano等2015), 这两个分枝上的蛋白在C末端有一个特异的四肽基序(Panstruga等2005)。

3.2 MLO基因家族的演化

Devoto等(2003)指出MLO基因家族的起源至少是在陆生植物进化的早期。Iovieno等(2015)通过密码子演化分析揭示了葫芦科MLO基因家族演化中通常是负选择发挥作用, 但也有一些MLO区段是在正选择下形成的。通过被子植物MLO蛋白的演化分析发现单子叶植物和双子叶植物MLO蛋白演化的保守模式具有分支特异性, 其中许多MLO可能是负选择的结果(Appiano等2015)。在双子叶植物中, MLO基因的数量与基因组大小和染色体数量之间呈显著正相关, 而单子叶植物中却没有很强的相关性。双子叶植物中MLO基因数量的增加是由于第V~VII分支的演化造成, 而不是植物进化过程中基因组加倍的结果(Kusch等2016)。莢藜苜蓿和鹰嘴豆(*Cicer arietinum*)中MLO蛋白的非同义突变频率(ka)/同义突变频率(ks)分析结果显示这两个物种中MLO演化是在强烈的负选择下进行的(Deshmukh等2015)。芸薹属的MLO蛋白中没有发现拟南芥MLO3和MLO9基因的同源基因, 并且所有的MLO基因都发生了不同程度的扩张(闫沛喆等2018)。

4 MLO基因的功能

4.1 白粉病感病性中的作用

目前已经在植物中发现众多MLO基因家族成员, 但大多数MLO蛋白的功能仍然未知。研究表明, MLO基因家族的某些成员使植物易受白粉菌的侵染, 这些成员被称为“感病因子”。1992年, 首先在大麦中证明了mlo基因在白粉病抗性中的作用(Jørgensen 1992)。随着分子生物学的迅速发展, 研究者通过自然遗传变异或靶基因沉默技术, 发现番茄(Bai等2008)、拟南芥(Consonni等2006)、烟草(Appiano等2014)、野蔷薇(*Rosa multiflora*) (Qiu等2015)、茄子(Bracuto等2017)、小麦(Acevedo-Garcia等2016)、矮牵牛(*Petunia hybrida*) (Jiang等2016)等植物中某个或多个特定MLO基因的突变能够引发对白粉病的广谱抗性, 可能是由于白粉菌需要利用MLO蛋白侵入寄主植物细胞(Panstruga 2005; Panstruga和Schulze-Lefert 2003), 因此, MLO基因的缺失或者突变会导致白粉病菌孢子不能进入植物细胞壁(Panstruga 2005)。

MLO蛋白位于细胞质膜上, 但是在白粉菌侵

入的过程中MLO蛋白会在质膜上重新分布, 逐渐聚集在白粉病菌侵染位点下方(Bhat等2005)。利用黄色荧光蛋白(yellow fluorescent protein, YFP)标记MLO蛋白, 发现在不接种白粉病的情况下, 大多数的MLO蛋白位于表皮细胞的周围, 膜内和核膜上也检测到了该蛋白, 而接种白粉病后, MLO蛋白迅速聚集到附着胞下方(Bhat等2005)。MLO蛋白对白粉病的负调控作用涉及到两个独立的渗透抗性通路(Underwood和Somerville 2008), 第一个通路由突触融合蛋白PEN1/ROR2介导, 该蛋白在调控囊泡运输过程中发挥作用(Collins等2003), 并且MLO和ROR2蛋白之间存在直接的互作关系(Pans-truga 2005)。糖基水解酶PEN2和ABC转运体PEN3参与了第二个通路, 这两个蛋白分别产生和分泌真菌毒素(Lipka等2005; Stein等2006)。植物受到白粉病菌侵染时, 侵染位点下方会沉积大量含有 β -葡聚糖细胞壁聚合物的胍胍质(Skou 1982; Skou等1984), 白粉病菌侵染大麦*mlo*突变体所沉积的细胞壁附着物的数量和面积比野生型的要大(Stolzenburg等1984)。此外, MLO基因与植物防御反应相关基因共表达, 推测MLO基因在植物免疫中发挥作用(Humphry等2010)。

4.2 植物花粉管发育中的作用

利用MLO基因启动子启动GUS报告基因, 发现大多数第III分支上的MLO基因都在拟南芥发育器官表达(Chen等2006)。该分支上的AtMLO7基因突变会导致拟南芥的育性降低, 并且助细胞中花粉管会过度生长(Kessler等2010)。在花粉管到达助细胞前, NTA (AtMLO7)蛋白在高尔基体相关区室内积累, 从而在花粉管接纳中发挥作用(Jones等2017)。此外, 水稻中也发现OsMLO12基因是花粉粒与亲和性柱头接触后的花粉水合作用所必需的(Yi等2014), 因此, 推测第III分支上的MLO蛋白可能是被子植物受精过程中配子体功能的一个关键调节因子。为了研究其他MLO蛋白是否在生殖细胞间信号转导和物质传递中发挥作用, Davis等(2017)通过MLOpro::gMLO-GUS载体来定位不同MLO基因在花器官中的表达, 结果发现不同分枝上的MLO可能都参与了拟南芥的生殖生长。

4.3 调节植物根系的形态

位于第I分枝上的AtMLO4和AtMLO11基因突

变会导致拟南芥不正常的根部形态, 触碰刺激下, 根会发生严重的卷曲, 但这一表型可以通过增加营养来缓解。Atmlo4和Atmlo11的单突变体根卷曲形式相似, 而Atmlo4 Atmlo11双突变体根的卷曲程度并没有增加(Chen等2009)。而该分支上与AtMLO4和AtMLO11亲缘关系最近的AtMLO14似乎没有参与这一过程, 因为无论是Atmlo14单突变体还是Atmlo4 Atmlo11 Atmlo14三突变体都没有观察到根卷曲程度增加的表型(Chen等2009; Bidzinski等2014)。

4.4 MLO基因的其他功能

有很多研究分析了不同MLO基因表达的组织特异性(Zheng等2016; Deshmukh等2017)。这些研究无一例外都发现不同分支上的MLO基因在不同组织中的表达量差异较大, 而且有很多MLO基因的表达会受到各种生物和非生物胁迫的影响(Nguyen等2016; Wang等2016)。大麦在受到白粉病菌或稻瘟病菌的侵染以及机械损伤和叶片衰老的过程中, MLO基因的表达都会增加, 说明MLO参与了植物细胞的死亡保护, 以及生物和非生物胁迫过程(Piffanelli等2002)。辣椒CaMLO2基因的表达受到脱落酸(abscisic acid, ABA)和干旱的诱导, 通过病毒诱导的基因沉默(virus-induced gene silencing, VIGS)辣椒中的CaMLO2或者在拟南芥中异位表达CaMLO2基因都证明了该基因是一个ABA信号的负调节因子, 说明CaMLO2基因与干旱胁迫有关(Lim和Lee 2013)。在甜瓜(Cucumis melo)中发现了14个MLO蛋白, 实时荧光定量PCR结果显示14个CmMLO基因表达存在组织特异性, 说明它们在可能发育的不同过程中发挥作用, 且这14个CmMLO基因的表达在干旱胁迫下都表现出上调, 13个在盐胁迫下表现出上调, 10个在高温胁迫下表现出上调, 4个在冷胁迫下表现出上调, 12个在ABA胁迫下表现出上调, 说明甜瓜中MLO基因可能参与了不同的非生物胁迫过程(Howlader 2017)。此外, CaMLO2基因还与细菌和卵菌等生物胁迫有关(Kim和Hwang 2012)。

5 与植物白粉病抗性相关的mlo

5.1 mlo的白粉病抗性水平

野生型MLO基因不同于一般的R基因, 它的存在使大麦对白粉病菌表现感病, 而当大麦MLO基

因突变为隐性*mlo*基因时,这个突变体对白粉病菌表现出非小种专化性抗性(Büschges等1997)。40多年来*mlo*大麦品种在农业生产上的成功应用表明这种由*MLO*基因控制的广谱抗性是持久的(Lyngkjær和Carver 2000)。除了大麦,很多植物中都发现了这类自然发生的*mlo*抗性突变体,这些突变体*MLO*等位基因的变异位点不同,且存在氨基酸的替换、插入、丢失或移码突变等多种形式(Bai等2008; Humphry等2011; Berg等2015; Fujimura等2016),这就说明了*MLO*基因在自然条件下容易发生突变,*mlo*抗性在植物中是非常普遍的。早在60年前就报道了豌豆(*Pisum sativum*) *PsMLO1*基因功能缺失突变体*er1*抗白粉病,在豌豆抗白粉病育种中得到了广泛应用(Harland 1948; Humphry等2011; Pavan等2011)。与拟南芥和大麦中*mlo*突变体一样,番茄*ol-2*突变体(*SIMLO1*发生突变)表现出广谱抗病性(Bai等2008)。

同源基因往往存在功能冗余的现象,*MLO*基因也是如此,拟南芥*AtMLO2*、*AtMLO6*和*AtMLO12*是大麦*MLO*的同源基因。*AtMLO2* (即*PMR2*基因)的T-DNA插入转基因株系和化学诱变株系揭示了3个*MLO*基因对植物与白粉病菌互作的影响差异,*AtMLO2*发挥主要作用,*AtMLO6*和*AtMLO12*对白粉病敏感性的贡献次之(Vogel和Somerville 2000)。正是这种基因“不平等遗传冗余”现象,导致不同*mlo*突变体的白粉病抗性水平存在差异。因此,用肉眼观察拟南芥*mlo2*突变体是抗白粉病的,但是由于宿主细胞侵入和真菌菌落的建立,微观上仍保持部分敏感性。*mlo2 mlo6*双突变体抗性增加,*mlo2 mlo6 mlo12*三突变体完全免疫,类似于大麦*mlo*植株的表型(Consonni等2006)。烟草*NtMLO1*和*NtMLO2*基因也存在功能冗余现象,将这两个基因分别在抗病烟草‘kokubu’中过表达都会恢复至野生型的感病水平,在烟草中这两个基因的单突变体仍表现出感病,双突变体则表现完全抗病(Fujimura等2016)。通过在番茄*mlo*突变体中过表达黄瓜*CsaMLO*基因和接种白粉病前后基因转录水平分析,发现*CsaMLO8*对白粉病感病性发挥主要作用,而*CsaMLO1*和*CsaMLO11*发挥次要作用(Berg等2017)。利用TALENs和CRISPR/Cas9技术同时突变小麦3个*TaMLO1*同源基因可以是小麦获得白粉病完全抗性,而仅突变掉A、B或D基因组中的

一个或者两个*MLO*基因可以部分提高白粉病抗性(Acevedo-Garcia等2017)。通过片段插入缺失敲除掉*TaMLO-A1*、*TaMLO-B1*和*TaMLO-D1*同样也可使小麦获得白粉病完全抗性(Wang等2014)。

5.2 *mlo*的多效性表型

由于目前野生型*MLO*基因的功能还不明确,*mlo*突变体在抗病育种中的应用就存在一定的风险。越来越多的研究发现,有些植物中*MLO*基因的突变不仅会影响白粉病抗性水平,还伴随一些其他表型。大麦*mlo*突变体存在自发的叶肉细胞死亡,即使没有受到病原菌的侵染,也会形成局部的坏死细胞斑,从而引起成株期叶尖变黄的表型(Wolter等1993)。研究发现白粉病菌试图穿透的位点下的叶肉细胞局部死亡,导致肉眼可见的坏死性叶斑(Piffanelli等2002)。与大麦*mlo*植株相似,*Atmlo2*突变体表现出早衰、成熟莲座叶枯萎以及在非侵染叶片中自发胼胝质沉积。*mlo*突变体表现出叶片早衰可能是内源解除调控生理机制的进一步结果,其特征是叶肉细胞自发死亡和未成熟的叶绿素衰退,导致肉眼可见的叶片失绿和坏死(Piffanelli等2002; Wolter等1993)。然而,在番茄(Bai等2008)和烟草(Fujimura等2016)中都发现*mlo*抗性植株与野生型植株的其他农艺性状没有显著差异。豌豆(Humphry等2011) *er1*突变体和苹果(Pessina等2016) *mlo*突变体似乎也没有这些不良的表型,这些差异的原因还有待进一步探索。

*MLO*基因突变可以使植物获得对白粉病持久的广谱抗性,但是似乎对大多数其他病原菌都不具有抗病性。有研究指出大麦*mlo*突变体对半寄生稻瘟病菌更加敏感,这与病菌侵染后叶片叶绿体的增加有关(Jarosch等1999)。后来又有研究发现此突变体对麦根腐平脐蠕孢菌更加敏感,并且死体营养型真菌禾谷镰孢菌在大麦穗部的繁殖增加。在田间,镰刀菌和柱隔孢菌对*mlo*突变体和野生型大麦植株的侵染似乎没有差异(Hofer等2015)。对拟南芥*mlo2 mlo6 mlo12*三突变体接种不同的病原菌,发现其对丁香假单胞菌和尖孢镰刀菌的抗性不变或者降低,而对炭疽病菌的抗性增加(Acevedo-Garcia等2017)。

5.3 *mlo*介导的抗病机制

在很多植物中都能利用*MLO*基因突变来创制抗白粉病的材料,但*mlo*抗病的分子机理目前还不

十分清楚。从*mlo*突变体首次发现至今的40多年时间里, 研究者从不同途径入手, 试图证明*mlo*可能的抗病机制。

5.3.1 通过调控钙信号

目前有很多研究推测或证明了钙调素结合蛋白在植物免疫反应中发挥重要作用(Poovaiah等2013; Yuan等2017)。在MLO蛋白的C末端有一个钙调蛋白结合区, 使MLO蛋白可与钙调蛋白结合, 作为第二信使来为下游途径传递信号(Stein和Somerville 2002)。研究发现大麦CaM蛋白与MLO蛋白的CaMBD结合后可以提高MLO蛋白的活性, 大麦MLO蛋白与钙调蛋白的互作是对大麦白粉病菌完全敏感所必需的(Kim等2002), 且在病菌入侵植物阶段, 二者互作增强(Bhat等2005)。对大麦胚芽鞘外源施用Ca²⁺可部分抑制*mlo*抗性(Bayles和Aist 1987)。细胞内外Ca²⁺水平似乎可以调节MLO蛋白的功能和*mlo*突变体的抗性。通过酵母双杂交系统筛选水稻钙调素结合蛋白过程中发现了水稻MLO蛋白(Liu和Zhu 2008), 在辣椒中也发现了MLO蛋白与CaCaM1蛋白的互作(Kim和Hwang 2012)。CaM蛋白与MLO蛋白的CaMBD结合是MLO蛋白的一个共同特征, 但是目前还不清楚MLO蛋白调节CaM的精确机制。

5.3.2 通过调控细胞结构

早期人们认为*mlo*抗性主要是抗机械性入侵, 因为*mlo*抗性表现在可以有效地阻止白粉病菌入侵寄主细胞, 且该类突变体会形成大量的乳突(Kusch和Panstruga 2017)。不同植物物种的乳突成分存在差异, 其中胼胝质、水解酶类和酚类物质被认为与乳突抗性有关(Koga等1980)。有研究指出*mlo*抗性依赖于侵染钉下方的植物细胞形成细胞壁沉积物(Stolzenburg等1984)。*mlo*突变体的一个微观可见的特征是细胞壁加厚, 在没有任何病原菌侵染或者其他各种胁迫的条件下, 在成熟叶片中可以检测到包含胼胝质的分离沉积物(Wolter等1993)。

5.3.3 通过调控下游基因

很多研究利用转录组测序来寻找MLO的下游调控基因, Kuhn等(2017)分析了拟南芥*mlo2 mlo6 mlo12*突变体接种白粉病后差异表达基因, 发现许多防御相关的转录本增加, 且茉莉酸(jasmonic acid, JA)/乙烯(ethylene, ETH)响应基因转录水平升高得

更迅速, 说明JA/ET依赖的转录程序被激活。*PMR4/GSL5*对*mlo2*突变体表型有一定的影响。*mlo2 pmr4*突变体并没有展现出自发的胼胝质沉积(*mlo2*中情况相反), 但是对白粉病的抗性不变(Consonni等2010)。与大麦*ror2*突变体类似, 拟南芥*pen1*突变体部分抑制*mlo2*抗性。此外, PEN2和PEN3都参与了白粉病的非寄主抗性, 是*mlo2*抗性所必需的(Consonni等2006)。拟南芥*Atmlo2 pen1*、*Atmlo2 pen2*和*Atmlo2 pen3*双突变体对白粉病抗性水平恢复至野生型水平, 但只有*Atmlo2 pen2*没有自发胼胝质沉积和早衰表型(Consonni等2006)。大麦BI-1 (BAX inhibitor 1)响应白粉病菌侵染表达, 在大麦*mlo*细胞中局部过表达BI-1可恢复对白粉病的敏感性至野生型水平, 说明细胞死亡的调节是*mlo*抗性的另一个关键方面(Hückelhoven 2003)。

5.3.4 通过调控激素水平

用ABA、ETH、JA、水杨酸(salicylic acid, SA)等不同激素处理棉花, 几乎所有MLO基因的表达受到诱导或者抑制(Wang等2016)。*mlo2 mlo6 mlo12*突变体也过度积累SA, 但是在SA、JA或者ETH合成中受到影响的突变体并不改变*mlo2*抗性水平(Consonni等2006)。此外, *mlo2*突变体随年龄增长, 植物抗毒素和吲哚类硫苷的稳态水平升高。因此, CYP79B2/CYP79B3编码两个功能冗余的单加氧酶, 是这些基于色氨酸的复合物合成所必需的, CYP79B2/CYP79B3的突变恢复了*mlo2*基因型植物的感病性(Consonni等2010)。

6 展望

6.1 *mlo*突变体的获得

自然突变是*mlo*突变体的一个重要来源, 并在育种和农业生产中得到了广泛应用。第一个发现的*mlo*自然突变体是埃塞俄比亚大麦地方品种(Freisleben和Lein 1942)。黄瓜(Berg等2015)、豌豆(Humphry等2011; Pavan等2011; Sun等2016a, b)、苹果(Pessina等2017)、烟草(Fujimura等2016)和番茄(Bai等2008)等植物中都发现了不同类型的*mlo*自然突变体, 说明自然发生的地方品种和品系都有可能是*mlo*突变体的丰富来源。

另一个可广泛利用的*mlo*突变体来源是化学或者辐射诱变。一些拟南芥*mlo*突变株系就是由甲基磺酸乙酯(EMS)诱变而来的(Consonni等2006; Vogel和Somerville 2000)。通过定向诱导基因组局

部突变(TILLING)技术将诱变与*MLO*基因突变体高通量表型鉴定相结合,形成一种在复杂基因组中检测*mlo*突变体的快速有效的非转基因方法。例如,通过此方法同时突变小麦中*TaMLO1*同源基因(A1、B1、D1)产生的一些突变体组合白粉病抗性增加(Acevedo-Garcia等2017)。

目标植物中候选*MLO*基因沉默或敲除是另一个经常使用的方法。番茄、辣椒中利用瞬时VIGS系统沉默*MLO*基因,证明了*SIMLO1*、*CaMLO1*和*CaMLO2*是负责白粉病感病性的基因(Bai等2008; Zheng等2013)。VIGS和其他RNAi技术在小麦和一些蔷薇科植物,如苹果、葡萄、玫瑰和草莓中得到了进一步利用(Jiwan等2013; Pessina等2016)。最近植物精准基因组编辑也在植物白粉病抗病中得到了应用。TALENs技术已成功应用于小麦3个*TaMLO1*同源基因的同时突变,通过片段插入缺失敲除掉*TaMLO-A1*、*TaMLO-B1*和*TaMLO-D1*可使植物获得白粉病完全抗性(Wang等2014)。并且,在该研究中还利用CRISPR/Cas9来靶向3个*TaMLO*以获得抗白粉病的小麦。Nekrasov等(2017)利用CRISPR/Cas9技术编辑*SIMLO1*基因,快速(10个月内)获得抗白粉病的非转基因番茄植株。

上述例子很好地说明了*mlo*突变体可以从很多资源中通过不同的实验方法获得,根据不同实验要求可以选择不同的方法,包括自然突变体、诱变、基因沉默和基因组编辑。

6.2 *MLO*基因应用中应注意的问题

*MLO*基因突变似乎是一个防治植物白粉病的有效方法,但是该基因在应用的过程中仍然存在一些需要注意的问题:

(1)靶标基因的保守区域。研究发现*MLO*蛋白有一些结构域和氨基酸是十分保守的,往往这些结构域或者氨基酸的突变会造成*MLO*蛋白功能的完全丧失。在利用基因敲除和基因编辑对植物进行改良时,可以将靶标设计在保守区域内,或者针对保守氨基酸进行定点突变。

(2)基因功能冗余的问题。很多植物中*MLO*基因都有多个同源基因,并且存在不平等遗传冗余的现象。因此,在利用*MLO*基因突变创制抗病材料时,需要首先明确在目标植物物种中对白粉病感病性发挥作用的*MLO*基因有几个,如果能同时将这几个*MLO*基因突变掉,即可获得完全抗白粉

病的材料。如果不能,就要明确发挥主要作用的是哪个,发挥次要作用的是哪些,重点针对发挥主要作用的*MLO*基因进行抗性改良。

(3)关注*MLO*基因对其他表型的影响。在进行材料创制之前,要通过转基因来明确目标植物中的*MLO*基因对其他表型的作用,分析这些表型对改良材料的重要性,例如叶用蔬菜和烟草对叶片的品质要求较高,如果*MLO*基因突变植株存在叶片细胞壁加厚、成分改变或者早衰等不良表型,就要慎重使用*MLO*基因来改良材料。

(4)注意*mlo*抗性的隐性遗传特点。由于*mlo*介导的白粉病抗性呈隐性遗传,利用常规手段进行品种选育和改良,每一代都需要进行自交并对后代进行表型鉴定来确定是否携带该隐性基因,造成其抗性较易丢失,此时,可根据*mlo*突变特点开发功能性分子标记用于辅助选择,可显著加快选育和改良进度。此外,经过改良的材料在留种过程中必须要严格自交。如果控制不严格,有*MLO*基因型的杂入,就会恢复感病表型。尤其是在多倍体植物中,往往有多基因控制的*mlo*抗性,只要有其中一个正常*MLO*基因的存在就会完全或者部分恢复白粉病感病性。

6.3 *MLO*基因的分子机理有待深入探索

然而,在对*MLO*基因加以利用的同时,许多关于*MLO*基因作用的分子机理问题还有待于解答。例如:(1)在没有白粉病菌侵染的情况下,正常*MLO*蛋白的生化活性和功能是什么?*MLO*基因突变后,胼胝质的积累增加,那么*MLO*蛋白与PEN2(糖基水解酶)之间如何相互作用来调控胼胝质的形成或降解?是否还需要其他蛋白的参与?(2)*mlo*的防御途径是什么(什么阻止了真菌的发病)?为什么*mlo*抗性如此持久?(3)为什么有些物种的*mlo*突变体表现出一些不良表型?*MLO*蛋白中是否存在控制这些不良表型的特异位点?我们如何在获得白粉病抗性的同时,避免不良表型的出现?这些问题可能是未来几年亟待解决的问题,只有解决这些问题,我们才能清楚*MLO*蛋白在植物与白粉病菌互作中的功能,为植物白粉病抗性品种培育提供理论基础和技术支撑。

参考文献(References)

Ablazov A, Tombuloglu H (2015). Genome-wide identifica-

- tion of the mildew resistance locus *O* (*MLO*) gene family in novel cereal model species *Brachypodium distachyon*. *Eur J Plant Pathol*, 145 (2): 239–253
- Acevedo-Garcia J, Gruner K, Reinstädler A, et al (2017). The powdery mildew-resistant *Arabidopsis mlo2 mlo6 mlo12* triple mutant displays altered infection phenotypes with diverse types of phytopathogens. *Sci Rep*, 7 (1): 9319
- Acevedo-Garcia J, Kusch S, Panstruga R (2014). Magical mystery tour: MLO proteins in plant immunity and beyond. *New Phytol*, 204 (2): 273–281
- Acevedo-Garcia J, Spencer D, Thieron H, et al (2017). *mlo*-based powdery mildew resistance in hexaploid bread wheat generated by a non-transgenic TILLING approach. *Plant Biotechnol J*, 15 (3): 367–378
- Appiano M, Pavan S, Catalano D, et al (2015). Identification of candidate *MLO* powdery mildew susceptibility genes in cultivated Solanaceae and functional characterization of tobacco *NtMLO1*. *Transgenic Res*, 24 (5): 847–858
- Bai Y, Pavan S, Zheng Z, et al (2008). Naturally occurring broad-spectrum powdery mildew resistance in a central American tomato accession is caused by loss of *Mlo* function. *Mol Plant Microbe Interact*, 21 (1): 30–39
- Bayles CJ, Aist JR (1987). Apparent calcium mediation of resistance of an *ml-o* barley mutant to powdery mildew. *Physiol Mol Plant Pathol*, 30: 337–345
- Berg JA, Appiano M, Bijsterbosch G (2017). Functional characterization of cucumber (*Cucumis sativus* L.) Clade V *MLO* genes. *BMC Plant Biol*, 17: 80
- Berg JA, Appiano M, Martínez MS, et al (2015). A transposable element insertion in the susceptibility gene *CsaMLO8* results in hypocotyl resistance to powdery mildew in cucumber. *BMC Plant Biol*, 15: 243
- Bhat RA, Miklis M, Schmelzer E, et al (2005). Recruitment and interaction dynamics of plant penetration resistance components in a plasma membrane microdomain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102 (8): 3135–3140
- Bidzinski P, Noir S, Shahi S, et al (2014). Physiological characterization and genetic modifiers of aberrant root thigmomorphogenesis in mutants of *Arabidopsis thaliana* *MILDEW LOCUS O* genes. *Plant Cell Environ*, 37: 2738–2753
- Blume B, Nürnberger T, Nass N, et al (2000). Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *Plant Cell*, 12 (8): 1425–1440
- Bockaert J, Pin JP (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J*, 18 (7): 1723–1729
- Bombarely A, Rosli HG, Vrebalov J, et al (2012). A draft genome sequence of *Nicotiana benthamiana* to enhance molecular plant-microbe biology research. *Mol Plant Microbe Interact*, 25: 1523–1530
- Bracuto V, Appiano M, Ricciardi L, et al (2017). Functional characterization of the powdery mildew susceptibility gene *SmMLO1* in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Transgenic Res*, 26 (3): 323–330
- Brzostowski JA, Kimmel AR (2001). Signaling at zero G: G-protein-independent functions for 7-TM receptors. *Trends Biochem Sci*, 26 (5): 291–297
- Büschges R, Hollricher K, Panstruga R, et al (1997). The barley *Mlo* gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell*, 88: 695–705
- Chandran D, Inada N, Hather G, et al (2010). Laser microdissection of *Arabidopsis* cells at the powdery mildew infection site reveals site-specific processes and regulators. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107: 460–465
- Chen Y, Wang Y, Zhang H (2014). Genome-wide analysis of the mildew resistance locus (*MLO*) gene family in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Plant Omics J*, 7: 87–93
- Chen Z, Hartmann HA, Wu MJ, et al (2006). Expression analysis of the *AtMLO* gene family encoding plant-specific seven-transmembrane domain proteins. *Plant Mol Biol*, 60: 583–597
- Chen Z, Noir S, Kwaaitaal M, et al (2009). Two seven-transmembrane domain MILDEW RESISTANCE LOCUS *O* proteins cofunction in *Arabidopsis* root thigmomorphogenesis. *Plant Cell*, 21: 1972–1991
- Collins NC, Thordal-Christensen H, Lipka V, et al (2003). SNARE-protein-mediated disease resistance at the plant cell wall. *Nature*, 425 (6961): 973–977
- Consonni C, Bednarek P, Humphry M, et al (2010). Tryptophan-derived metabolites are required for antifungal defense in the *Arabidopsis mlo2* mutant. *Plant Physiol*, 152: 1544–1561
- Consonni C, Humphry ME, Hartmann HA, et al (2006). Conserved requirement for a plant host cell protein in powdery mildew pathogenesis. *Nat Genet*, 38: 716–720
- Davis TC, Jones DS, Dino AJ, et al (2017). *Arabidopsis thaliana* *MLO* genes are expressed in discrete domains during reproductive development. *Plant Reprod*, 30 (4): 185–195
- Deshmukh R, Singh VK, Singh BD (2014). Comparative phylogenetic analysis of genome-wide *Mlo* gene family members from *Glycine max* and *Arabidopsis thaliana*. *Mol Genet Genomics*, 289: 345–359
- Deshmukh R, Singh VK, Singh BD (2016). Comparative analysis of genome-wide *Mlo* gene family in *Cajanus cajan* and *Phaseolus vulgaris*. *Genetica*, 144 (2): 229–241
- Deshmukh R, Singh VK, Singh BD (2017). Mining the *Cicer arietinum* genome for the mildew locus *O* (*Mlo*) gene family and comparative evolutionary analysis of the *Mlo* genes from *Medicago truncatula* and some other plant species. *J Plant Res*, 130 (2): 239–253
- Devoto A, Hartmann HA, Piffanelli P, et al (2003). Molecular phylogeny and evolution of the plant-specific seven-trans-

- membrane MLO family. *J Mol Evol*, 56: 77–88
- Devoto A, Piffanelli P, Nilsson IM, et al (1999). Topology, subcellular localization, and sequence diversity of the Mlo family in plants. *J Biol Chem*, 274: 34993–35004
- Dong X, Zhao Y, Ran X, et al (2017). Overexpression of a new chitinase gene *EuCHIT2* enhances resistance to *Erysiphe cichoracearum* DC. in tobacco plants. *Int J Mol Sci*, 18 (11): 2361–2366
- Elliott C, Müller J, Miklis M, et al (2005). Conserved extracellular cysteine residues and cytoplasmic loop–loop interplay are required for functionality of the heptahelical MLO protein. *Biochem J*, 385: 243–254
- Feechan A, Jermakow AM, Torregrosa L, et al (2008). Identification of grapevine *MLO* gene candidates involved in susceptibility to powdery mildew. *Funct Plant Biol*, 35 (12): 1255–1266
- Freisleben R, Lein A (1942). Über die Auffindung einer mehltaresistenten Mutante nach Röntgenbestrahlung einer anfälligen reinen Linie von Sommergerste. *Naturwissenschaften*, 30 (40): 608
- Fujimura T, Sato S, Tajima T, et al (2016). Powdery mildew resistance in the Japanese domestic tobacco cultivar Kokubu is associated with aberrant splicing of *MLO* orthologues. *Plant Pathol*, 65: 1358–1365
- Harland SC (1948). Inheritance of immunity to mildew in Peruvian forms of *Pisum sativum*. *Heredity*, 2: 263–269
- Hofer K, Linkmeyer A, Textor K, et al (2015). *MILDEW LOCUS O* mutation does not affect resistance to grain infections with *Fusarium* spp. and *Ramularia collo-cygni*. *Phytopathology*, 105: 1214–1219
- Howlader J, Park JI, Kim HT, et al (2017). Differential expression under *Podosphaera xanthii* and abiotic stresses reveals candidate *MLO* family genes in *Cucumis melo* L. *Trop Plant Biol*, 10 (4): 151–168
- Hückelhoven R, Dechert C, Kogel KH (2003). Overexpression of barley BAX inhibitor 1 induces breakdown of *mlo*-mediated penetration resistance to *Blumeria graminis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100 (9): 5555–5560
- Humphry M, Bednarek P, Kemmerling B, et al (2010). A regulon conserved in monocot and dicot plants defines a functional module in antifungal plant immunity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107 (50): 1896–1901
- Humphry M, Reinstädler A, Ivanov S, et al (2011). Durable broad-spectrum powdery mildew resistance in pea *erl* plants is conferred by natural loss-of-function mutations in *PsMLO1*. *Mol Plant Pathol*, 12: 866–878
- International Barley Genome Sequencing Consortium (2012). A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature*, 491: 711–716
- Iovieno P, Andolfó G, Schiavulli A, et al (2015). Structure, evolution and functional inference on the *Mildew Locus O* (*MLO*) gene family in three cultivated *Cucurbitaceae* spp. *BMC Genomics*, 16: 1112
- Jarosch B, Kogel KH, Schaffrath U (1999). The ambivalence of the barley *Mlo* locus: mutations conferring resistance against powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) enhance susceptibility to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant Microbe Interact*, 12: 508–514
- Jiang P, Chen Y, Wilde HD (2016). Reduction of *MLO1* expression in petunia increases resistance to powdery mildew. *Sci Hortic*, 201: 225–229
- Jiwan D, Roalson EH, Main D, et al (2013). Antisense expression of peach mildew resistance locus *O* (*PpMlo1*) gene confers cross-species resistance to powdery mildew in *Fragaria* × *ananassa*. *Transgenic Res*, 22: 1119–1131
- Jones DS, Yuan J, Smith BE, et al (2017). *MILDEW RESISTANCE LOCUS O* function in pollen tube reception is linked to its oligomerization and subcellular distribution. *Plant Physiol*, 175: 172–185
- Jørgensen JH (1992). Discovery, characterization and exploitation of Mlo powdery mildew resistance in barley. *Euphytica*, 63: 141–152
- Kessler SA, Shimosato-Asano H, Keinath NF, et al (2010). Conserved molecular components for pollen tube reception and fungal invasion. *Science*, 330: 968–971
- Kim DS, Hwang BK (2012). The pepper *MLO* gene, *CaMLO2*, is involved in the susceptibility cell-death response and bacterial and oomycete proliferation. *Plant J*, 72: 843–855
- Kim MC, Lee SH, Kim JK, et al (2002a). Mlo, a modulator of plant defense and cell death, is a novel calmodulin-binding protein. Isolation and characterization of a rice Mlo homologue. *J Biol Chem*, 277: 19304–19314
- Kim MC, Panstruga R, Elliott C, et al (2002b). Calmodulin interacts with MLO protein to regulate defence against mildew in barley. *Nature*, 416: 447–451
- Koga H, Mayama S, Shishiyama J (1980). Correlation between the deposition of fluorescent compounds in papillae and resistance in barley against *Erysiphe graminis hordei*. *Can J Bot*, 58: 536–541
- Konishi S, Sasakuma T, Sasanuma T (2010). Identification of novel *Mlo* family members in wheat and their genetic characterization. *Genes Genet Syst*, 85: 167–175
- Kuhn H, Lorek J, Kwaaitaal M, et al (2017). Key components of different plant defense pathways are dispensable for powdery mildew resistance of the *Arabidopsis mlo2 mlo6 mlo12* triple mutant. *Front Plant Sci*, 8: 1006
- Kusch S, Panstruga R (2017). *mlo*-based resistance: an apparently universal “weapon” to defeat powdery mildew disease. *Mol Plant Microbe Interact*, 30 (3): 179–189
- Kusch S, Pesch L, Panstruga R (2016). Comprehensive phylogenetic analysis sheds light on the diversity and origin of the MLO family of integral membrane proteins. *Genome*

- Biol Evol, 8 (3): 878–895
- Lim CW, Lee SC (2013). Functional roles of the pepper MLO protein gene, *CaMLO2*, in abscisic acid signaling and drought sensitivity. *Plant Mol Biol*, 85: 1–10
- Liu Q, Zhu H (2008). Molecular evolution of the *MLO* gene family in *Oryza sativa* and their functional divergence. *Gene*, 409: 1–10
- Lorek J, Griebel T, Jones AM, et al (2013). The role of *Arabidopsis* heterotrimeric G-protein subunits in MLO2 function and MAMP-triggered immunity. *Mol Plant Microbe Interact*, 26 (9): 991–1003
- Lyngkjær MF, Carver TLW (2000). Conditioning of cellular defence responses to powdery mildew in cereal leaves by prior attack. *Mol Plant Pathol*, 1 (1): 41–49
- Nekrasov V, Wang C, Win J, et al (2017). Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. *Sci Rep*, 7: 482
- Nguyen VNT, Vo KTX, Park H, et al (2016). A systematic view of the *MLO* family in rice suggests their novel roles in morphological development, diurnal responses, the light-signaling pathway, and various stress responses. *Front Plant Sci*, 7: 1413
- Panstruga R (2005). Serpentine plant MLO proteins as entry portals for powdery mildew fungi. *Biochem Soc Trans*, 33: 389–392
- Panstruga R, Schulze-Lefert P (2003). Corruption of host seven-transmembrane proteins by pathogenic microbes: a common theme in animals and plants? *Microbes Infect*, 5: 429–437
- Pavan S, Schiavulli A, Appiano M, et al (2011). Pea powdery mildew *er1* resistance is associated to loss-of-function mutations at a *MLO* homologous locus. *Theor Appl Genet*, 123: 1425–1431
- Pessina S, Angeli D, Martens S, et al (2016). The knock-down of the expression of *MdMLO19* reduces susceptibility to powdery mildew (*Podosphaera leucotricha*) in apple (*Malus domestica*). *Plant Biotechnol J*, 14 (10): 2033–2044
- Pessina S, Palmieri L, Bianco L, et al (2017). Frequency of a natural truncated allele of *MdMLO19* in the germplasm of *Malus domestica*. *Mol Breeding*, 37: 7
- Pessina S, Pavan S, Catalano D, et al (2014). Characterization of the *MLO* gene family in Rosaceae and gene expression analysis in *Malus domestica*. *BMC Genomics*, 15: 618
- Piffanelli P, Zhou F, Casais C, et al (2002). The barley MLO modulator of defense and cell death is responsive to biotic and abiotic stress stimuli. *Plant Physiol*, 129 (3): 1076–1085
- Poovaiah BW, Du L, Wang H, et al (2013). Recent advances in calcium/calmodulin-mediated signaling with an emphasis on plant-microbe interactions. *Plant Physiol*, 163 (2): 531–542
- Qin B, Wang M, Liu Q, et al (2014). Identification and sequence characterization of *Mlo* gene family from the genome of *Ricinus communis* L. *Chin Agr Sci Bull*, 30 (15): 268–273 (in Chinese with English abstract) [覃碧, 王萌, 刘巧玲等(2014). 蓖麻基因组*Mlo*基因家族成员的鉴定及其序列特征分析. *中国农学通报*, 30 (15): 268–273]
- Qin B, Wang M, Liu QL, et al (2013). Identification and sequence characterization of *Mlo* gene family from the genome of *Manihot esculenta* Crantz. *Plant Physiol J*, 49 (10): 1057–1062 (in Chinese with English abstract) [覃碧, 王萌, 刘巧玲等(2013). 木薯*Mlo*基因家族成员的鉴定及其序列特征分析. *植物生理学报*, 49 (10): 1057–1062]
- Qiu X, Wang Q, Zhang H, et al (2015). Antisense *RhMLO1* gene transformation enhances resistance to the powdery mildew pathogen in *Rosa multiflora*. *Plant Mol Biol Rep*, 33: 1659–1665
- Riaz S, Boursiquot JM, Dangl GS, et al (2013). Identification of mildew resistance in wild and cultivated central Asian grape germplasm. *BMC Plant Biol*, 13: 149
- Shen QH, Saijo Y, Mauch S, et al (2007). Nuclear activity of MLA immune receptors links isolate-specific and basal disease-resistance responses. *Science*, 315: 1098–1103
- Skou JP (1982). Callose formation responsible for the powdery mildew resistance in barley with genes in the *ml-o* locus. *J Phytopathol*, 104 (1): 90–95
- Skou JP, Jørgensen JH, Lilholt U (1984). Comparative studies on callose formation in powdery mildew compatible and incompatible barley. *Phytopath Z*, 109 (2): 147–168
- Stein M, Dittgen J, Sánchez-Rodríguez C, et al (2006). *Arabidopsis* PEN3/PDR8, an ATP binding cassette transporter, contributes to nonhost resistance to inappropriate pathogens that enter by direct penetration. *Plant Cell*, 18 (3): 731–746
- Stein M, Somerville S (2002). MLO, a novel modulator of plant defenses and cell death, binds calmodulin. *Trends Plant Sci*, 7 (9): 379–380
- Stolzenburg MC, Aist JR, Israel HW (1984). The role of papillae in resistance to powdery mildew conditioned by the *ml-o* gene in barley. I. Correlative evidence. *Physiol Plant Pathol*, 25: 337–346
- Sun S, Deng D, Wang Z, et al (2016a). A novel *er1* allele and the development and validation of its functional marker for breeding pea (*Pisum sativum* L.) resistance to powdery mildew. *Theor Appl Genet*, 129: 909–919
- Sun S, Fu H, Wang Z, et al (2016b). Discovery of a novel *er1* allele conferring powdery mildew resistance in Chinese pea (*Pisum sativum* L.) landraces. *PLoS ONE*, 11: e0147624
- Tang D, Christiansen KM, Innes RW (2005). Regulation of plant disease resistance, stress responses, cell death, and ethylene signaling in *Arabidopsis* by the EDR1 protein

- kinase. *Plant Physiol*, 138: 1018–1026
- Temple BRS, Jones AM (2007). The plant heterotrimeric G-protein complex. *Annu Rev Plant Biol*, 58: 249–266
- Underwood W, Somerville SC (2008). Focal accumulation of defences at sites of fungal pathogen attack. *J Exp Bot*, 59 (13): 3501–3508
- Vogel JP, Somerville S (2000). Isolation and characterization of powdery mildew-resistant *Arabidopsis* mutants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 1897–1902
- Wang X, Ma Q, Dou L, et al (2016). Genome-wide characterization and comparative analysis of the *MLO* gene family in cotton. *Plant Physiol Biochem*, 103: 106–119
- Wang Y, Cheng X, Shan Q, et al (2014). Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol*, 32 (9): 947–952
- Wolter M, Hollricher K, Salamini F, et al (1993). The *mlo* resistance alleles to powdery mildew infection in barley trigger a developmentally controlled defence mimic phenotype. *Mol Gen Genet*, 239: 122–128
- Xiao S, Calis O, Patrick E, et al (2005). The atypical resistance gene, *RPW8*, recruits components of basal defence for powdery mildew resistance in *Arabidopsis*. *Plant J*, 42: 95–110
- Xu H, Heath MC (1998). Role of calcium in signal transduction during the hypersensitive response caused by basidiospore-derived infection of the cowpea rust fungus. *Plant Cell*, 10 (4): 585–597
- Yan PZ, Zhou S, Li XH, et al (2017). Genome-wide comparative analysis of *MLO* related genes in *Brassica* lineage. *Chin J Oil Crop Sci*, 39 (6): 729–736 (in Chinese with English abstract) [闫沛喆, 周索, 李雪辉等(2017). 全基因组水平上芸薹属*Mlo*抗病基因的比较分析. *中国油料作物学报*, 39 (6): 729–736]
- Yang T, Poovaiah BW (2003). Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants. *Trends Plant Sci*, 8 (10): 505–512
- Yi J, An S, An G (2014). *OsMLO12*, encoding seven transmembrane proteins, is involved with pollen hydration in rice. *Plant Reprod*, 27: 169–180
- Yuan P, Jauregui E, Du L, et al (2017). Calcium signatures and signaling events orchestrate plant–microbe interactions. *Curr Opin Plant Biol*, 38: 173–183
- Zheng Z, Appiano M, Pavan S, et al (2016). Genome-wide study of the tomato *SIMLO* gene family and its functional characterization in response to the powdery mildew fungus *Oidium neolycopersici*. *Front Plant Sci*, 7: 380
- Zheng Z, Nonomura T, Appiano M, et al (2013). Loss of function in *Mlo* orthologs reduces susceptibility of pepper and tomato to powdery mildew disease caused by *Leveillula taurica*. *PLoS ONE*, 8 (7): e70723
- Zhou SJ, Jing Z, Shi JL (2013). Genome-wide identification, characterization, and expression analysis of the *MLO* gene family in *Cucumis sativus*. *Genet Mol Res*, 12: 6565–6578
- Zou S, Wang H, Li Y, et al (2018). The NB-LRR gene *Pm60* confers powdery mildew resistance in wheat. *New Phytol*, 218: 298–309

Research progress of MLO proteins in plants

ZHANG Xiao-Lian^{1,2}, ZHANG Ji-Shun^{1,2}, LEI Bo², YU Jing², ZHAO De-Gang^{1,3,*}

¹Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region (Ministry of Education), Guizhou Key Laboratory of Agro-bioengineering, Institute of Agro-bioengineering / College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China

²Molecular Genetics Key Laboratory of China Tobacco, Guizhou Academy of Tobacco Science, Guiyang 550081, China;

³Guiyang Station for DUS Testing Center of New Plant Varieties of MOA, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550006, China

Abstract: Mildew resistance locus O (MLO) is a plant-specific protein family, some of which are essential factors for the powdery mildew successfully infection. Loss-of-function mutation of one or more *MLO* genes can confer the host plants durable broad-spectrum resistance to powdery mildew. *mlo*-based resistance has been successfully employed in plant resistance breeding. Plant MLO proteins can be divided into 7 subfamilies. In addition to the plant-powdery mildew interaction, MLOs from different subfamilies may have different functions. This review introduces the characteristic, categorization and function of MLO proteins, as well as the features and possible resistance mechanisms of *mlo* mutant. At last, we discuss the function mechanism of MLO proteins, the utilization of *MLO* genes in the plant disease resistance breeding and the problems we should pay attention to.

Key words: plant; MLO protein; powdery mildew; *mlo* resistance

Received 2018-04-09 Accepted 2018-07-10

This work was supported by Technological Program of Guizhou Tobacco (201605 and 201606), National Major Project of Science and Technology for Cultivation of New Genetically Modified Breeds (2016ZX08010003-009), and Guizhou Top Level Innovation Talents Cultivation Project [(2016)4003].

*Corresponding author (dgzhao@gzu.edu.cn).