

Mlo基因在葡萄抗白腐病中作用的研究

贾云飞^{1,2}, 张国海¹, 刘崇怀², 樊秀彩², 姜建福², 孙海生², 张颖^{2,*}

¹河南科技大学林学院, 河南洛阳471023; ²中国农业科学院郑州果树研究所, 郑州450009

摘要: Mlo转录因子是植物抗病反应中一类重要的负调控因子。试验通过对葡萄(*Vitis vinifera*) VvMlo基因家族成员的基本特征、基因结构、染色体位置、蛋白结构进行分析, 结合其他作物已报道的抗病相关Mlo基因构建系统进化树, 推断与葡萄抗病机制相关的Mlo基因。另以抗病刺葡萄(*V. davidii*)品种‘刺葡萄0943’和感病葡萄(*V. vinifera*)品种‘美人指’为材料, 分析不同材料Mlo基因的表达量, 获得对白腐菌黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)有响应的Mlo基因。结果显示: 抗白粉病的拟南芥Mlo基因(*AtMlo2*、*AtMlo6*、*AtMlo12*)、番茄(*Solanum lycopersicum*) *SlMlo1*基因以及葡萄Mlo基因(*VvMlo3*、*VvMlo6*、*VvMlo9.1*、*VvMlo13.1*、*VvMlo13.2*、*VvMlo17*)聚在第IV组。第IV组中的‘刺葡萄0943’和‘美人指’Mlo基因在接种白腐菌后有不同响应。此外, 在白腐菌侵染过程中, 第VI组中*VvMlo15*的表达量明显高于*VdMlo15*, 且在整个接菌过程中*VvMlo15*对白腐菌侵染有响应, *VdMlo15*对白腐菌几乎无响应。*VvMlo15*的基因结构、蛋白结构、分子质量、等电点、跨膜结构等特点也与第IV组中的*VvMlo*基因特点更相似。综合推测, *VdMlo15*在葡萄抗白腐病方面可能具有重要作用。

关键词: ‘刺葡萄0943’; Mlo基因家族; 生物信息学; 白腐菌

葡萄(*Vitis vinifera*)属于葡萄科(Vitaceae)葡萄属, 为多年生木本藤蔓植物, 是一种栽培价值很高且栽培面积很广的果树。然而, 随着葡萄产业的发展, 葡萄病害已成为减少葡萄产量、降低葡萄品质的一个极为重要的因素。世界上已知的葡萄病害大约有30多种, 其中白腐病是严重危害葡萄生产的四大病害之一, 是世界性的真菌病害, 每年因该病造成产量损失20%~50%, 严重年份达到80%以上(刘长远等1999)。因此, 如何提高葡萄自身抗病性是葡萄生产中亟需解决的问题。

植物与病原物互作的遗传基础构成了植物抗病的遗传基础(张德水等1999)。高等植物可通过在体内累积病程相关蛋白(pathogenesis-related proteins)以应对真菌、细菌、病毒等微生物的入侵及机械损伤造成的伤害。在过去的20年中, 有关植物抗病的研究主要侧重于抗病机理的挖掘。目前, 已从各植物体中克隆得到70多个抗病基因(resistance gene, R基因), 其中NBS-LRR类基因是R基因中最大的一个家族, LRR是蛋白间相互作用的一种典型结构(Chisholm等2006; Martin等2003)。它能够识别相应的无毒病原体(avirulence pathogen, Avr)的基因产物, 与过敏反应(hypersensitive reaction, HR)相结合引发宿主细胞的防御反应, 造成细胞的程序性死亡(Jones和Dangl 2006; Bari和Jones 2006)。

感病基因(susceptible gene, S基因)途径的提出(Engler等2005)颠覆性地改变了研究者的认知, 并为抗病育种提供了新的思路。S基因的基础是大

多数病原体会和它们的寄主建立一种互作模式, 通过与病原体之间的互作促进其传播(van Schie和Takken 2014)。因此, 其中一部分宿主基因对于病原体是必不可少的。例如, 寄主植物S基因是病原菌成功侵染、定殖和发育所必须的, 它可以促进寄主对病原菌的识别和渗透, 寄主的负调节防御或对病原体的代谢和结构起重要作用(van Schie和Takken 2014)。S基因在隐性遗传中会出现基因沉默现象, 从而使其功能丧失, S基因突变后, 植物获得广谱的抗病性, 该基因也就转变成为广谱抗病基因(Pavan等2010; Eckardt 2002; Panstruga和Schulze-Lefert 2003)。

Mlo (*mildew resistance locus o*)基因是一类为大家所熟知的S基因。Mlo蛋白是植物中特有的蛋白, 含有7个跨膜结构域(transmembrane domain, TM)和1个位于C端的钙调蛋白结合域(calmodulin-binding domain, CaMBD) (Devito等2003; Elliott等2005)。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, Mlo基因在大麦中成功克隆,

收稿 2017-03-16 修定 2017-08-01

资助 国家自然科学基金青年基金(31201599)、国家葡萄技术产业体系项目(CARS-30)、中国农业科学院创新工程项目(CAAS-ASTIP-2015-ZFRI)、中央级科研院所基本科研业务费专项(1610192016202)和“十二五”国家科技支撑计划课题(2013BAD01B04-20)。

* 通讯作者(E-mail: zhangying05@caas.cn)。

进一步研究发现,它是一种植物特有的膜蛋白,涉及多种细胞代谢过程,该基因发生功能丧失性突变后,成为遗传上呈隐性的*Mlo*基因,从而提高了其抗白腐病的能力(Büschges等1997; Panstruga 2005)。从拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)等多种双子叶植物和小麦(*Triticum aestivum*)、水稻(*Oryza sativa*)等单子叶植物中也分离到了*Mlo*家族基因,并在大麦、番茄(*Solanum lycopersicum*)和拟南芥中证实*Mlo*基因是与白粉病相关的隐性S基因,且大麦*HvMlo*基因的突变体,番茄*SlMlo1*基因的突变体,拟南芥*AtMlo2*、*AtMlo6*、*AtMlo12*基因的三突变体以及豌豆(*Pisum sativum*) *PsMLO1*对禾本科布氏白粉菌具有广谱抗性(李凡等2005; Nsonni等2006; Pavan等2011)。

近年来,国内外研究人员围绕R基因和S基因对葡萄抗病机理开展了广泛研究。张颖等(2013)研究发现,‘刺葡萄0943’中*NBS6*和*NB7*两个R基因在葡萄抗白腐病方面有一定的作用。Qiu等(2015)在圆叶葡萄(*V. rotundifolia*)中发现*REN*和*RUN*两个抗白粉病R基因家族。Feechan等(2009)从‘霞多丽’葡萄中鉴定出与白粉病相关的*Mlo* S基因。系统发育分析表明,6个葡萄*VvMlo*基因(*VvMlo3*、*VvMlo4*、*VvMlo6*、*VvMlo9*、*VvMlo13*和*VvMlo17*)同拟南芥*AtMlo2*、*AtMlo6*、*AtMlo12*及番茄*SlMlo1*基因位于同一分支,这几个基因是导致植株感染白粉病的S基因(Feechan等2009; Dry等2009)。张小莹(2015)利用白粉菌侵染华东葡萄(*V. pseudoreticulata*)后发现,*VpMlo6*和*VpMlo7*基因的表达有明显的上调。利用白粉菌侵染葡萄‘佳利酿’后,发现*VvCMlo3*、*VvCMlo6*、*VvCMlo7*、*VvCMlo8*、*VvCMlo11*、*VvCMlo13*六个基因呈现不同的表达模式,其中*VvCMlo6*、*VvCMlo7*、*VvCMlo11*基因明显受到白粉菌的调控(王晏青2016)。

目前,在葡萄抗病机理研究中,有关葡萄抗白腐病的研究相对较少,其中抗白腐病S基因的研究更是鲜有报道。本试验通过对葡萄*Mlo*基因家族成员的结构进行分析,同时结合其他作物已报道的抗病相关*Mlo*基因构建系统进化树,进一步以抗病品种‘刺葡萄0943’和感病品种‘美人指’为试材,通过转录组测序分析不同材料中*Mlo*基因家族的表达。通过以上结果进行综合分析,探讨在葡萄抗白腐病中发挥作用的*Mlo*基因,以期为进一步

挖掘葡萄抗白腐病关键*Mlo*基因以及葡萄抗病育种提供理论依据。

材料与方法

1 葡萄*Mlo*基因家族成员的检索及鉴定

以转录组数据中所测的葡萄(*Vitis vinifera* L.) *Mlo*序列为依据,从葡萄基因组数据库(http://plants.ensembl.org/Vitis_vinifera/Info/Index)中找到并下载17条*VvMlo*蛋白序列,随后再利用候选的*VvMlo*蛋白为检索序列,在该数据库中进行Blastp搜索,共获得15条与已鉴定的*VvMlo*蛋白同源的拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.] *Mlo*蛋白(*AtMlo1*~*15*)序列。此外,以候选的*VvMlo*蛋白为检索序列,从NCBI中Blastp获得与其相关的大麦(*Hordeum vulgare* L.)、小麦(*Triticum aestivum* L.)以及番茄(*Solanum lycopersicum* L.)的*Mlo*蛋白序列(*HvMlo*、*TaMlo1*~*3*、*SlMlo1*)。利用在线工具Conserved Domain Search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)对获得的葡萄*Mlo*型基因家族成员的氨基酸序列进行鉴定,检测是否含有*Mlo*保守结构域。

采用SMART在线分析软件(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)分析蛋白的结构(Letunic等2004),采用TMHMM Server v. 2.0软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)分析蛋白跨膜结构域,采用钙调蛋白目标数据库(http://calcium.uhnres.utoronto.ca/ctdb/pub_pages/search/index.htm)对葡萄可能的抗病相关*Mlo*蛋白进行CaM结合结构域预测,采用ExpASy (http://www.expasy.ch/tools/pi_tppl.thml)进行蛋白的分子质量和等电点的预测。

2 葡萄*Mlo*家族的染色体定位和基因组结构分析

从葡萄基因组数据库查到17个*VvMlo*基因在染色体上的定位,并采用Map Inspect软件绘制定位图。从葡萄基因组数据库下载葡萄*VvMlo*基因内含子和外显子分布数据的文件,利用在线基因结构显示系统(GSDS 2.0, <http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)绘制基因结构示意图。

3 葡萄*Mlo*基因家族成员系统进化树的构建

利用葡萄*Mlo*基因家族成员以及模式植物拟南芥、番茄和大麦*Mlo*基因的蛋白序列构建系统进化树,以分析*Mlo*基因家族成员的进化关系。首先使用MEGA 7.0软件的Clustal程序对氨基酸序列进行多重序列联配,将Clustal多序列联配的结果输

出到MEGA 7.0软件中, 利用MEGA 7.0软件用邻接法构建系统进化树, 并利用bootstrap法检验1 000次对这些进化树进行置信度分析。

4 葡萄*Mlo*基因家族的亚细胞定位及高级结构预测分析

采用在线软件WoLF PSORT (<http://www.gen-script.com/wolf-psort.html>)对17个*VvMlo*基因进行亚细胞定位预测分析。采用在线软件GOR 4 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html)预测蛋白二级结构。

5 葡萄接种白腐菌后*Mlo*转录组数据分析

从中国农业科学院郑州果树研究所国家果树种质郑州葡萄圃取感病葡萄(*V. vinifera*)品种‘美人指’和抗病刺葡萄[*Vitis davidii* (Rom. Caill.) Foex]品种‘刺葡萄0943’成龄健康叶片, 分别接种白腐菌黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium* Burd-sall), 分对照(0 h)、初侵染(12 h)、侵染后(36 h)三个时期采样, 通过转录组测序, 分析不同时期两个品种不同*Mlo*基因的表达状况。转录组数据借助北京诺禾致源生物信息科技有限公司的高通量测序平台获得。本次测序设置两个生物学重复。

实验结果

1 葡萄*Mlo*基因家族成员的鉴定及其序列特征分析

将葡萄基因组中17条*Mlo*序列进行统计分析(表1), 17个*Mlo*基因的编码序列(coding sequence, CDS)长度分布为1 290~2 504 bp, 其中*VvMlo17*的CDS最短(1 290 bp), *VvMlo13.1*的CDS最长(2 504 bp)。 *VvMlo*蛋白长度在349 aa (*VvMlo17*)与699 aa (*VvMlo13.1*)之间。蛋白分子质量、等电点差异较大: 蛋白分子质量从39 953.99 Da (*VvMlo17.1*)至78 395.69 Da (*VvMlo13.1*), 理论等电点从6.87 (*VvMlo17.1*)至9.68 (*VvMlo12*), 说明17个*VvMlo*蛋白呈现显著的酸碱性和差异。进一步对17个*VvMlo*基因的编码蛋白结构进行分析发现, 这些*Mlo*蛋白均具有一个*Mlo*保守结构域, 包含多个跨膜结构, 跨膜次数为4 (*VvMlo17.1*)至9 (*VvMlo13.1*)次, 其中7个蛋白具有7个跨膜结构。研究表明, *Mlo*蛋白是一类钙结合蛋白, 具有CaMBD, 而且CaMBD能够提高*Mlo*蛋白的活性(Kim等2002), 因此, 采用钙调蛋白目标数据库对葡萄*Mlo*蛋白进行CaM结合结构域的预测: 17个葡萄*Mlo*蛋白均有钙离子结合区

表1 葡萄全基因组*Mlo*基因家族成员的基本特征

Table 1 Basic characteristics of *Mlo* gene family in the whole genome of grapevine

| 基因 | 登记号 | CDS长度/bp | 蛋白长度/aa | 等电点 | 分子质量/Da | 跨膜结构域 | 钙离子结合区域 |
|--------------------|-------------------|----------|---------|------|-----------|-------|--|
| <i>VvMlo1</i> | VIT_00s0227g00140 | 1 687 | 482 | 8.98 | 55 256.97 | 7 | VERFLHFLGKYLKKK、 GLVGWAQKA |
| <i>VvMlo3</i> | VIT_08s0040g02170 | 1 687 | 482 | 8.98 | 67 264.04 | 7 | IITKMGLRIQERG |
| <i>VvMlo4</i> | VIT_12s0035g02190 | 1 354 | 446 | 8.47 | 51 456.54 | 7 | HWRKSAIVSWM |
| <i>VvMlo6</i> | VIT_18s0122g00930 | 1 641 | 546 | 8.51 | 58 871.35 | 7 | KRRRSLIHA |
| <i>VvMlo9.1</i> | VIT_12s0028g02970 | 1 434 | 472 | 9.18 | 44 802.12 | 6 | VFTERVAKGLRHWWSA |
| <i>VvMlo9.2</i> | VIT_07s0031g02240 | 1 934 | 563 | 9.09 | 63 971.94 | 7 | KVLHRVKGWFTERR |
| <i>VvMlo12</i> | VIT_06s0004g03120 | 1 527 | 461 | 9.68 | 45 046.74 | 5 | VARMALK LKDKN |
| <i>VvMlo13.1</i> | VIT_06s0004g03100 | 2 504 | 699 | 9.67 | 78 395.69 | 9 | TKMGLRIQERG |
| <i>VvMlo13.2</i> | VIT_13s0019g04070 | 1 905 | 545 | 8.02 | 62 689.01 | 7 | GSWLARRNKRALYEAL |
| <i>VvMlo14</i> | VIT_19s0014g02980 | 1 961 | 563 | 9.07 | 64 610.06 | 8 | FRQFGRSVV |
| <i>VvMlo15</i> | VIT_05s0094g01570 | 1 009 | 506 | 9.17 | 57 882.62 | 7 | LGAEERILHYAGKYLKK、 IFGGAKIRQWKHW、 YRGGVKGIGNLRGWVR |
| <i>VvMlo16</i> | VIT_12s0035g00260 | 1 707 | 568 | 8.65 | 65 185.56 | 5 | IFSMWFVVQW LKK |
| <i>VvMlo17</i> | VIT_04s0023g03610 | 1 290 | 349 | 9.04 | 62 124.79 | 7 | GSWLKGRHRRA |
| <i>VvMlo17.1</i> | VIT_13s0019g04060 | 1 743 | 539 | 6.87 | 39 953.99 | 4 | IKIYSWRRW |
| <i>VvMlo-like1</i> | VIT_18s0122g00910 | 1 598 | 528 | 7.15 | 60 005.55 | 7 | KVLHLVGFQRRR、 YSAITMALGRLKTRAW |
| <i>VvMlo-like2</i> | VIT_08s0040g02180 | 1 922 | 517 | 9.38 | 60 001.49 | 7 | VLTMALGRLKMRRWS |
| <i>VvMlo-like3</i> | VIT_18s0122g00930 | 1 641 | 546 | 9.27 | 61 549.49 | 7 | RWIVAF FRQFFA |

域, 其中*VvMlo15*有3个钙离子结合区域, *VvMlo1*和*VvMlo-like1*有两个钙离子结合区域, 其他的*Mlo*蛋白含有一个钙离子结合区域。

2 葡萄*Mlo*基因家族成员在染色体上的分布

葡萄*Mlo*基因家族成员在葡萄的19条染色体上的定位分析如图1所示, 其中12号染色体上分布最多, 包括*VvMlo4*、*VvMlo9.1*、*VvMlo16*三个基因; 6、8、13、18号染色体均包含两个*Mlo*基因, 6号染色体上分布的为*VvMlo13.1*、*VvMlo12*, 8号染色体上分布的为*VvMlo3*、*VvMlo-like2*, 13号染色体上分布的为*VvMlo13.2*、*VvMlo17*, 18号染色体上分

布的为*VvMlo-like1*、*VvMlo-like3*; 4、5、7、10号染色体分别包含一个*Mlo*基因, 依次为*VvMlo17.1*、*VvMlo15*、*VvMlo9.2*、*VvMlo6*; *VvMlo1*在19条染色体中无法定位到。

3 葡萄*Mlo*基因家族的基因组结构分析

对葡萄*Mlo*基因结构的分析结果表明, 总体上17个*VvMlo*基因的外显子在整个基因结构中分布较为分散且所占比例较小, 外显子个数为11 (*VvMlo17.1*)至16 (*VvMlo-like2*、*VvMlo9.2*)不等, 多数为14~15个, 共包含12个基因(图2)。与*VvMlo*基因的系统进化树相结合发现, 虽然不同*VvMlo*基因的外

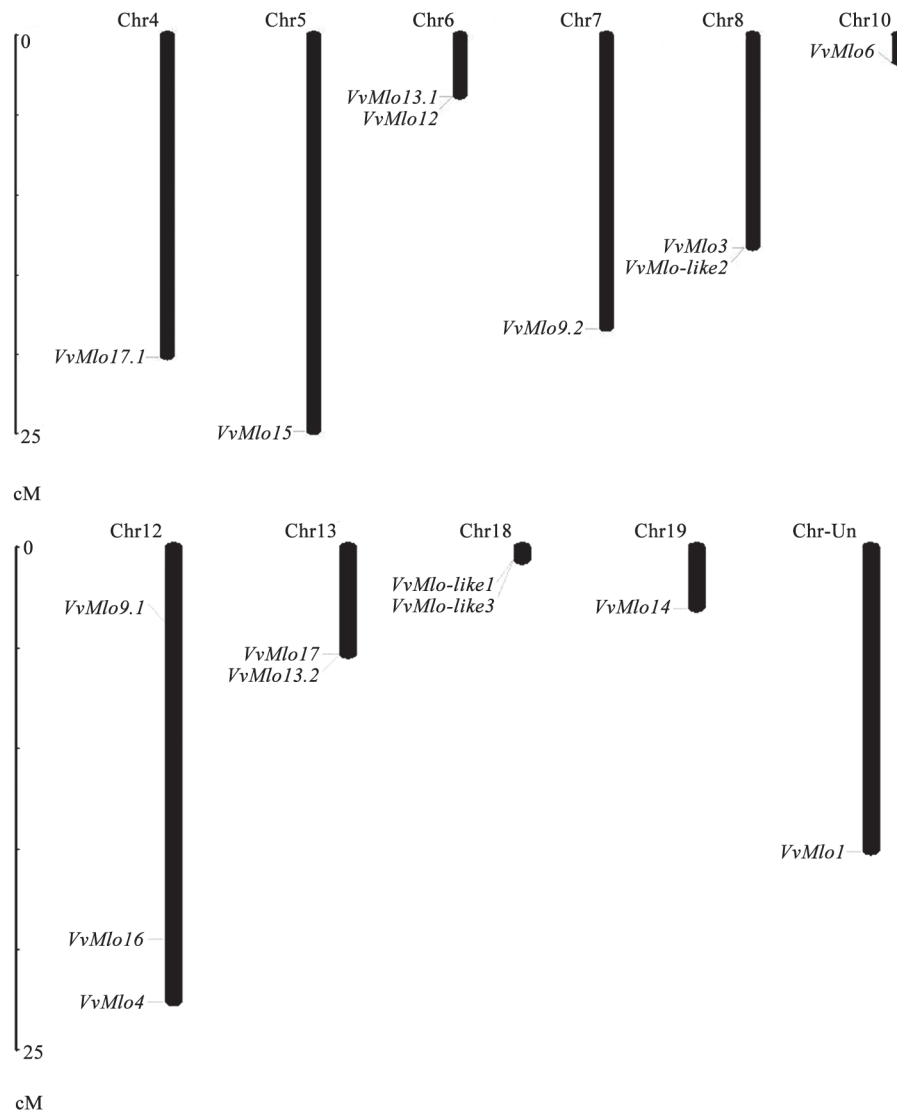
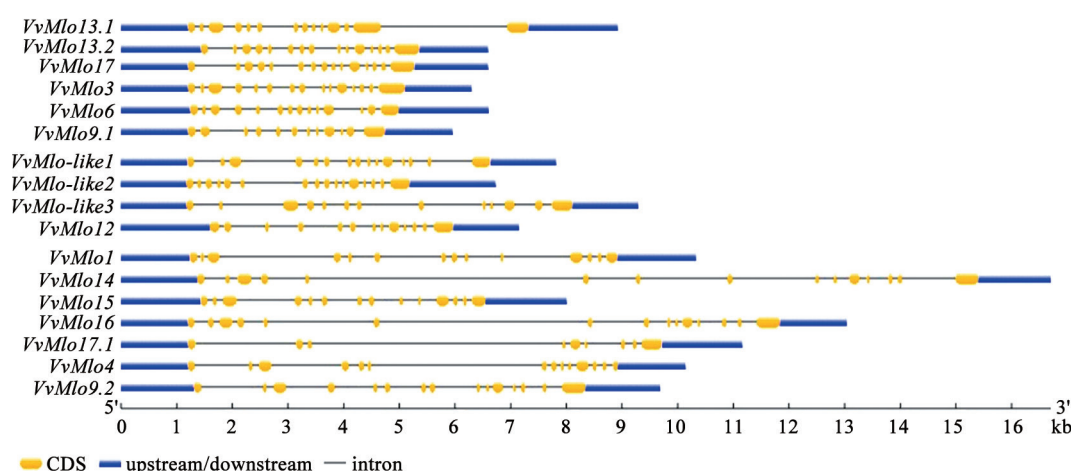


图1 葡萄*Mlo*基因在染色体上的分布
Fig.1 Chromosome location of *Mlo* genes in grapevine
左侧刻度表示染色体长度; Chr: 染色体。

图2 *VvMlo*基因结构Fig.2 The structures of *VvMlo* genes

CDS (黄色): 编码区; upstream (蓝色): 上游非编码区; downstream (蓝色): 下游非编码区; intron (灰色): 内含子区域。

显子和内含子长度有差异, 但基因的亲缘关系越接近, 它们的基因结构就越相似, 例如 *VvMlo17* 和 *VvMlo13.2* 都包含15个外显子且每个外显子的长度和位置几乎完全相同。

4 葡萄 *Mlo* 基因家族成员的系统进化关系分析

为揭示葡萄 *Mlo* 基因家族成员之间的进化关系及与其他已知 *Mlo* 基因的关系, 本研究先用 MEGA 7.0 中的 ClustalX 对葡萄 *VvMlo1~17*、拟南芥基因组所有 *Mlo* 成员 (*AtMlo1~15*)、大麦 *HvMlo*、小麦 *TaMlo1~3* 以及番茄 *SIMlo1* 共37个基因的编码蛋白进行多重序列比对, 并用 MEGA 7.0 软件构建系统进化树, 表明可将所有葡萄 *Mlo* 基因家族成员分为六类 (I~VI) (图3)。其中第IV类中的 *VvMlo3*、*VvMlo6*、*VvMlo9.1*、*VvMlo13.1*、*VvMlo13.2*、*VvMlo17* 和双子叶植物拟南芥以及番茄中已知的抗白粉病基因 *AtMlo2*、*AtMlo6*、*AtMlo12*、*SIMlo1* 聚在一起。第II类中, *VvMlo-like3* 同禾本科植物已知的大麦抗病基因 (*HvMlo*) 和小麦的抗白粉病基因 (*TaMlo1~3*) 聚在一起。因此, 可以推测, 第II类和第IV类可能是植物 *Mlo* 抗白粉病成员的类群。 *VvMlo3*、*VvMlo6*、*VvMlo9.1*、*VvMlo13.1*、*VvMlo13.2*、*VvMlo17* 和 *VvMlo-like2* 可能在葡萄的抗病途径中发挥作用。

5 葡萄 *Mlo* 基因亚细胞定位预测

对17个 *Mlo* 基因进行亚细胞定位预测, 从得分情况 (如表2) 发现17个基因的表达部位差异很大。

其中 *VvMlo1*、*VvMlo4*、*VvMlo9.1*、*VvMlo13.2*、*VvMlo15* 在细胞质中表达的得分最高, 说明这五个基因可能在细胞质中表达; *VvMlo17*、*VvMlo14*、*VvMlo-like1* 这三个基因可能在膜中表达; *VvMlo3*、*VvMlo13.1*、*VvMlo16*、*VvMlo-like2*、*VvMlo-like3* 这五个基因在叶绿体中表达的可能性较大; *VvMlo6*、*VvMlo12*、*VvMlo17.1* 这三个基因在细胞核中表达的可能性最大; *VvMlo14* 在细胞质和膜蛋白中表达的得分相同, 说明 *VvMlo14* 在两者中均有可能表达。

6 葡萄 *Mlo* 基因蛋白高级结构分析

由表3可知, *VvMlo* 蛋白主要以 α 螺旋和无规则卷曲为主、延伸链为辅所构成。其中 *VvMlo1*、*VvMlo12*、*VvMlo14*、*VvMlo-like1* 蛋白的 α 螺旋结构数量最多, 其次为无规则卷曲结构, 延伸链结构数量相对较少。其余13种 *VvMlo* 蛋白的无规则卷曲结构数目最多, 其次为 α 螺旋结构, 延伸链数目最少。

7 抗白腐病品种‘刺葡萄0943’和感病品种‘美人指’的 *Mlo* 表达差异分析

根据抗病品种‘刺葡萄0943’和感病品种‘美人指’接种白腐菌后不同时期表达量绘制热图 (图4)。从图中可以看出, 在初侵染阶段, 即从侵染前 (接菌前0 h) 到初侵染 (接菌后12h) 过程中, ‘刺葡萄0943’和‘美人指’中的 *Mlo1*、*Mlo-like2*、*Mlo13.1* 的表达量同时下调, 两者 *Mlo14* 的表达量同时上调; *VvMlo12*、*VvMlo13.2*、*VvMlo17.1* 的表达量上调,

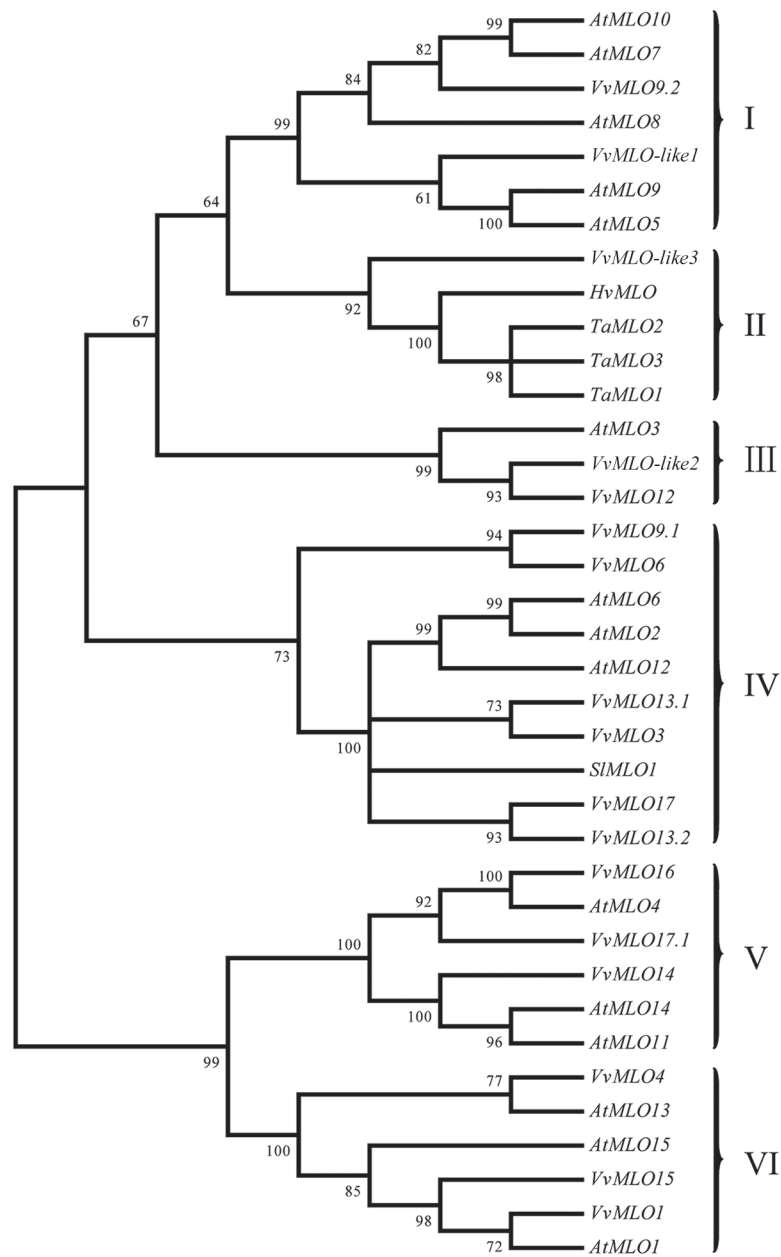


图3 葡萄和拟南芥Mlo基因家族成员及其他已知功能Mlo基因的系统进化关系分析

Fig.3 The unrooted neighbor-joining phylogenetic tree of Mlo genes in grapevine, *A. thaliana* and other plants

进化树中每个结点上的数值表示bootstrap重抽样1 000次进行置信度分析得到的置信值。At: 拟南芥; Hv: 大麦; Sl: 番茄; Ta: 小麦; Vv: 葡萄。根据蛋白结构的相似性将几个物种Mlo基因分为I~VI六组。

VdMlo12、*VdMlo13.2*、*VdMlo17.1*的表达量下调;
*VvMlo6*的表达量小幅下调, *VdMlo6*的表达量小幅
上调; *VvMlo3*的表达量小幅下调, *VdMlo3*的表达量
几乎不变; *VvMlo15*的表达量几乎不变, *VdMlo15*的
表达量小幅上调。整个侵染过程中, 即从初侵染
(接菌前0 h)到侵染后(接菌后36 h) ‘刺葡萄0943’和

‘美人指’中Mlo1、Mlo3、Mlo6、Mlo12、Mlo13.1、
Mlo17、*Mlo-like2*都整体呈下调趋势; *Mlo9.2*和
*Mlo14*都整体呈上调趋势; *VdMlo17.1*整体呈下调
趋势, *VvMlo17.1*整体呈上调趋势; *VdMlo13.2*整体
呈下调趋势, *VvMlo13.2*几乎不变; *VdMlo15*几乎不
变, *VvMlo15*整体呈下调趋势。

表2 葡萄*Mlo*基因亚细胞定位预测
Table 2 Subcellular location prediction of *VvMlo* genes

| 基因 | 细胞质 | 膜 | 液泡 | 内质网 | 叶绿体 | 细胞核 | 细胞外基质 | 线粒体 |
|--------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|-----|
| <i>VvMlo1</i> | 6 | 3 | 2.5 | 2.5 | — | — | — | — |
| <i>VvMlo3</i> | 2 | 2.5 | 1 | 1 | 4 | 1 | 1 | — |
| <i>VvMlo4</i> | 4 | 3 | 3 | 2 | 1 | — | — | — |
| <i>VvMlo6</i> | 2 | 2 | — | — | — | 10 | — | — |
| <i>VvMlo9.1</i> | 8 | 1 | — | — | 1 | 3 | — | — |
| <i>VvMlo9.2</i> | — | 4 | — | — | 3 | 4 | 1 | 1 |
| <i>VvMlo12</i> | — | 3 | — | — | — | 6 | — | 3.5 |
| <i>VvMlo13.1</i> | — | 3 | 3 | — | 4 | 3 | — | — |
| <i>VvMlo13.2</i> | 4 | 3 | — | 2 | 1 | 1 | — | — |
| <i>VvMlo14</i> | 4 | 4 | — | — | 1 | 2 | — | 2 |
| <i>VvMlo15</i> | 4 | 3 | 1.5 | 3.5 | 1 | — | — | — |
| <i>VvMlo16</i> | 4 | 3 | 1 | — | 5 | — | — | — |
| <i>VvMlo17</i> | 1 | 7 | 2 | 2 | 1 | — | — | — |
| <i>VvMlo17.1</i> | 2 | 2.5 | — | — | — | 8 | — | — |
| <i>VvMlo-like1</i> | 4 | 5 | — | 1.5 | — | 1 | — | — |
| <i>VvMlo-like2</i> | 2 | 3 | — | — | 7 | 1 | — | — |
| <i>VvMlo-like3</i> | 1 | 1 | 2 | — | 5 | 2 | — | — |

表中数值表示*Mlo*基因在该部位可能表达的得分情况, 分值越高表示在该部位表达的可能性越高。

表3 葡萄*Mlo*基因各二级结构比例(%)
Table 3 Proportion (%) of secondary structures in *VvMlo* genes

| 基因 | α 螺旋 | 延伸链 | 无规则卷曲 | 基因 | α 螺旋 | 延伸链 | 无规则卷曲 |
|------------------|-------------|-------|-------|--------------------|-------------|-------|-------|
| <i>VvMlo1</i> | 40.25 | 25.31 | 34.44 | <i>VvMlo14</i> | 40.50 | 20.25 | 39.25 |
| <i>VvMlo3</i> | 30.19 | 21.44 | 48.37 | <i>VvMlo15</i> | 34.19 | 23.91 | 41.90 |
| <i>VvMlo4</i> | 36.77 | 26.01 | 37.22 | <i>VvMlo16</i> | 31.69 | 26.58 | 41.73 |
| <i>VvMlo6</i> | 32.35 | 21.37 | 46.27 | <i>VvMlo17</i> | 30.24 | 20.41 | 49.35 |
| <i>VvMlo9.1</i> | 30.67 | 29.38 | 39.95 | <i>VvMlo17.1</i> | 31.23 | 17.19 | 51.58 |
| <i>VvMlo9.2</i> | 33.04 | 21.67 | 45.29 | <i>VvMlo-like1</i> | 40.91 | 18.37 | 40.72 |
| <i>VvMlo12</i> | 41.24 | 19.85 | 38.92 | <i>VvMlo-like2</i> | 31.91 | 26.11 | 41.97 |
| <i>VvMlo13.1</i> | 33.05 | 20.74 | 46.21 | <i>VvMlo-like3</i> | 36.26 | 17.58 | 46.15 |
| <i>VvMlo13.2</i> | 27.34 | 23.30 | 49.21 | | | | |

讨 论

*Mlo*蛋白是植物特有的蛋白, 包含7个跨膜结构域和C-末端的钙调素结合域, 参与调节大麦白粉病病原菌的侵染, 以及其他农作物中其他病原体的侵染机制(Islam和Yun 2016)。研究表明, *Mlo*基因调控大麦与不同病原菌互作其作用是不同的, 尽管大麦*mlo*突变体对活体寄生的白粉菌表现出极强的抗病性, 但对死体寄生的稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)和小麦根腐病菌平脐蠕孢菌(*Bipolaris sorokiniana*)的侵染表现出高感甚至超感现象(Jarosch等1999)。然而, *mlo*突变体对同是腐生营

养型的病原菌细极链格孢菌(*Alternaria tenuissima*)的抗病性增强(罗臻等2009)。本研究通过对抗病品种‘刺葡萄0943’和感病品种‘美人指’接种白腐菌后转录组数据中*Mlo*基因的表达情况进行分析, 获得对白腐菌有响应的*Mlo*基因。通过对葡萄*Mlo*基因家族成员的基本特征、基因结构、染色体位置、蛋白结构进行分析, 另将其序列特征分析结果与拟南芥、番茄、大麦、小麦抗病*Mlo*基因聚类分析结果相结合, 推断出葡萄中抗白腐病相关的*Mlo*基因。陈玲(2012)研究发现, 高等植物含跨膜结构域4~8个, 但大多数为7个跨膜结构域。对葡萄*Mlo*基因家族成员之间的序列特征进行分析

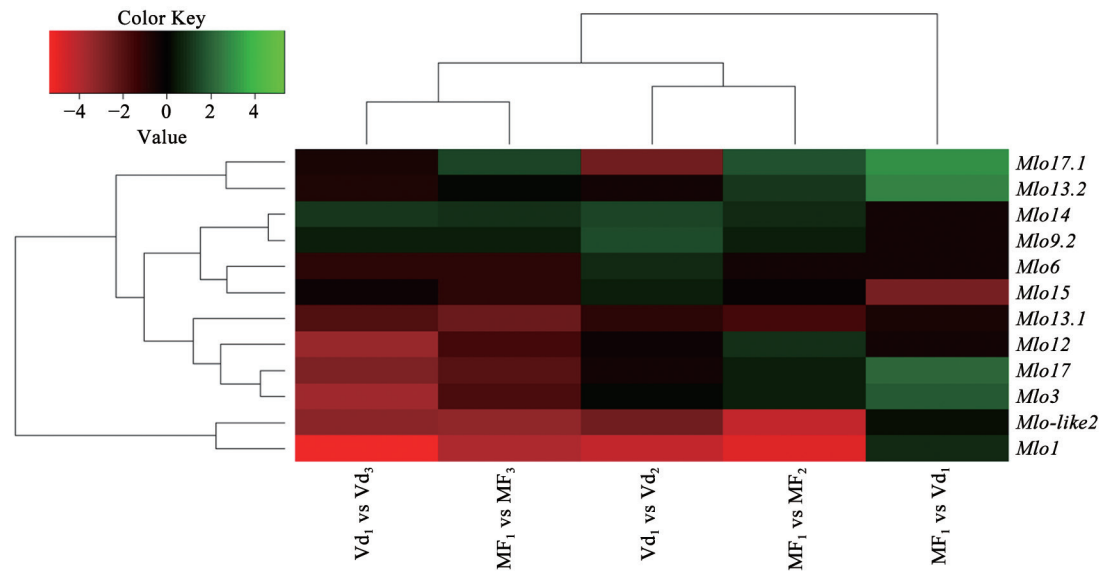


图4 ‘刺葡萄0943’和‘美人指’接种白腐菌后Mlo表达量差异

Fig.4 Different expression patterns of ‘*Vitis davidii* 0943’ and ‘Manicure Finger’ Mlo genes under white-rot fungi inoculation

Vd₁、Vd₂、Vd₃分别为‘刺葡萄0943’接种0、12、36 h的表达量, MF₁、MF₂、MF₃分别为‘美人指’接种0、12、36 h的表达量, M_i vs N_j取值为 $\log_2(N_j/M_i)$, 如MF₁ vs Vd₁取值为 $\log_2(Vd_1/MF_1)$ 。Color Key的数字标尺表示表达量的高低, 从红色到绿色表达量逐渐增高; Value表示将所有数值通过均一化, 使其符合均值为0、方差为1的标准正态分布。

发现, 除VvMlo13.1含有9个跨膜结构, 其余VvMlo蛋白包含4~8个跨膜结构, 其中7个VvMlo蛋白包含7个跨膜结构, 与陈玲研究结果相似。不同VvMlo基因结构也存在较大的差异, 但亲缘关系越接近, 基因结构越相似。与进化树的聚类结果及生物信息学分析相结合, 我们发现在葡萄抗白腐菌转录组测序中, 用白腐菌侵染后, ‘美人指’和‘刺葡萄0943’中表达量变化显著的Mlo基因中一部分和抗白粉病的拟南芥Mlo基因 (*AtMlo2*、*AtMlo6*、*AtMlo12*) 及番茄SIMlo聚在第IV类, 如VvMlo3、VvMlo6、VvMlo13.1、VvMlo13.2、VvMlo17。而且这五个Mlo基因的跨膜结构域都在7个或7个以上, 分子质量相对于其他组较大, 最小的为58 871.35 Da (VvMlo6), 等电点在8.51以上。VvMlo1和VvMlo15聚在第VI类, 其分子质量、等电点及跨膜结构域的特点和第IV类的特点相似。

第VI组中的VvMlo15在白腐菌侵染中整体呈下调趋势, 而VdMlo15几乎不变, 说明VvMlo15在白腐菌侵染中较为敏感, VdMlo15则刚好相反。已有研究表明, Mlo蛋白是一类钙结合蛋白, 具有CaMBD, 而且CaMBD能够提高Mlo蛋白的活性 (Panstruga和Schulze-Lefert 2003)。我们分析的葡萄Mlo蛋白均含有此区域, 其中葡萄Mlo15蛋白含

有3个钙离子结合区域。王晏青(2016)通过酵母双杂交试验, 验证了华东葡萄‘白河-35-1’ VpMlo7蛋白与CaM蛋白互作。因此, 接下来我们也会通过TA克隆及功能验证等一系列手段来验证VdMlo15在葡萄抗白腐病中的作用。

参考文献

- Bari R, Jones JDG (2009). Role of plant hormones in plant defense responses. *Plant Mol Biol*, 69: 473–488
- Büschges R, Hollricher K, Panstruga R, Simons G, Wolter M, Frijters A, van Daelen R, van der Lee T, Diergaarde P, Groenendijk J, et al (1997). The barley Mlo gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell*, 88 (5): 695–705
- Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124 (4), 803–814
- Consonni C, Humphry ME, Hartmann HA, Livaja M, Durner J, Westphal L, Vogel J, Lipka V, Kemmerling B, Schulze-Lefert P, et al (2006). Conserved requirement for a plant host cell protein in powdery mildew pathogenesis. *Nat Genet*, 38 (6): 716–720
- Devito A, Hartmann HA, Piffanelli P, Elliott C, Simmons C, Taramino G, Goh CS, Cohen FE, Emerson BC, Schulze-Lefert P, et al (2003). Molecular phylogeny and evolution of the plant-specific seven-transmembrane MLO family. *J Mol Evol*, 56: 77–88
- Dry IB, Feechan A, Anderson C, Jermakow AM, Bouquet A, Adam-Blondon AF, Thomas MR (2010). Molecular strategies to enhance the genetic resistance of grapevines to powdery mildew.

- Aust J Grape Wine Res, 16: 94–105
- Eckardt NA (2002). Plant disease susceptibility genes? Plant Cell, 14 (9): 1983–1986
- Elliott C, Müller J, Miklis M, Bhat RA, Schulze-Lefert P, Panstruga (2005). Conserved extracellular cysteine residues and cytoplasmic loop–loop interplay are required for functionality of the heptahelical MLO protein. Biochem J, 385: 243–254
- Engler JA, Favery B, Engler G, Abad P (2005). Loss of susceptibility as an alternative for nematode resistance. Curr Opin Biotech, 16 (2): 112–117
- Feechan A, Jermakow AM, Torregrosa L, Panstruga R, Dry IB (2009). 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 mehlauresistenten Mutante nach Röntgenbestrahlung einer anfälligen reinen Linie von Sommergerste. Naturwissenschaften, 30 (40): 608
- Islam MZ, Yun HK (2016). Characterization of nine Mlo family genes and analysis of their expression against pathogen infections in *Vitis flexuosa*. Euphytica, 211 (3): 379–394
- 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 In, 12 (6): 508–514
- Jones JDG, Dangl JL (2006). The plant immune system. Nature, 444 (7117): 323–329
- Kim MC, Lee SH, Kim JK, Chun HJ, Choi MS, Chung WS, Moon BC, Kang CH, Park CY, Yoo JH, et al (2002). 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 (22): 19304–19314
- Letunic I, Copley RR, Schmidt S, Ciccarelli FD, Doerks T, Schultz J, Ponting C, Bork P (2004). SMART 4.0: towards genomic data integration. Nucleic Acids Res, 32: D142–D144
- Li F, Hu DW, Chen F, Cui XF (2005). Prokaryotic expression, antibody preparation and cell chemical analysis of *TaMlo3* in Wheat. Acta Biol Exp Sin, 38 (6): 550–554 (in Chinese with English abstract) [李凡, 胡东维, 陈锋, 崔晓峰(2005). 小麦*TaMlo3*基因的原核表达、抗体制备及细胞化学分析. 实验生物学报, 38 (6): 550–554]
- Liu C, Zhao K, Wang K, Bai J (1999). Redesignation of the causal agent of grape white rot in China. Acta Phytopathol Sin, 29 (2): 174–176 (in Chinese with English abstract) [刘长远, 赵奎华, 王克, 白金铠(1999). 我国葡萄白腐病菌分类地位的重新确定研究. 植物病理学报, 29 (2): 174–176]
- Luo Z, Zhang JZ, Hu DW (2009). Cytological examination on interactions between Mlo near-isogenic lines of barley and their leaf blight pathogen, *Alternaria tenuissima*. Acta Phytopathol Sin, 39 (1): 36–42 (in Chinese with English abstract) [罗臻, 张敬泽, 胡东维(2009). 大麦Mlo近等基因系与叶枯病菌互作的细胞学研究. 植物病理学报, 39 (1): 36–42]
- Martin GB, Bogdanove AJ, Sessa G (2003). Understanding the functions of plant disease resistance proteins. Annu Rev Plant Biol, 54: 23–61
- Nsonni C, Humphry ME, Hartmann HA, Livaja M, Durner J, Westphal L, Vogel J, Lipka V, Kemmerling B, Schulze-Lefert P, et al (2006). Conserved requirement for a plant host cell protein in powdery mildew pathogenesis. Nat Genet, 38 (6): 716–720
- 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 in animals and plants? Microbes Infect, 5: 429–437
- Pavan S, Jacobsen E, Visser RGF, Bai Y (2010). Loss of susceptibility as a novel breeding strategy for durable and broad-spectrum resistance. Mol Breeding, 25: 1–12
- Pavan S, Schiavulli A, Appiano M, Marcotrigiano AR, Cillo F, Visser RGF, Bai YL, Lotti C, Ricciardi L (2011). Pea powdery mildew *er1* resistance is associated to loss-of-function mutations at a *MLO* homologous locus. Theor Appl Genet, 123 (8): 1425–1431
- Qiu W, Feechan A, Dry I (2015). Current understanding of grapevine defense mechanisms against the biotrophic fungus (*Erysiphe necator*), the causal agent of powdery mildew disease. Hortic Res, 2: 41–46
- van Schie CCN, Takken FLW (2014). Susceptibility genes 101: how to be a good host. Annu Rev Phytopathol, 52: 306–307
- Wang Y (2016). Cloning and function analysis *Mlo* gene related to powdery mildew resistance in grapevine (Master's thesis). Yangling: Northwest A&F University (in Chinese with English abstract) [王晏青(2016). 葡萄抗白粉病相关基因*Mlo*的克隆与功能研究(硕士论文). 杨陵: 西北农林科技大学]
- Zhang X (2015). Cloning and expression analysis of powdery mildew resistance-related gene *Mlo* and γ VPE in Chinese wild *Vitis pseudoreticulata* (Master's thesis). Yangling: Northwest A&F University (in Chinese with English abstract) [张小莹(2015). 中国野生华东葡萄抗白粉病相关基因*Mlo*和 γ VPE的克隆与表达分析(硕士论文). 杨陵: 西北农林科技大学]
- Zhang Y, Li F, Liu CH, Fan XC, Sun HS, Jiang JF, Zhang GH (2013). Isolation and Identification of NBS-LRR resistance gene analogs sequences from *Vitis davidii*. Sci Agr Sin, 46 (4): 780–789 (in Chinese with English abstract) [张颖, 李峰, 刘崇怀, 樊秀彩, 孙海生, 姜建福, 张国海(2013). 中国野生刺葡萄抗白腐病NBS-LRR类抗病基因同源序列的分离与鉴定. 中国农业科学, 46 (4): 780–789]

Study on the function of resistance to white rot of *Mlo* genes in grapevine

JIA Yun-Fei^{1,2}, ZHANG Guo-Hai¹, LIU Chong-Huai², FAN Xiu-Cai², JIANG Jian-Fu², SUN Hai-Sheng², ZHANG Ying^{2*}

¹College of Forestry, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471023, China; ²Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009, China

Abstract: *Mlo* transcription factor is an important negative regulator of plant disease resistance. Through the analysis of the basic characteristics, genetic structure, chromosome location and putative protein structure of the family members of grapevine (*Vitis vinifera*) *VvMlo* genes and the reported *Mlo* genes related to the disease resistance, this study aims at establishing a phylogenetic tree and inferring *Mlo* genes which relates to grapevine resistance mechanism. In addition, this experiment analyzed the expression of *Mlo* in resistant cultivar ‘*Vitis davidii* 0943’ and susceptible cultivar ‘Manicure Finger’, and through this the wanted *Mlo* genes were obtained, which can respond to *Phanerochaete chrysosporium*. The results show that 6 *VvMlo* genes (*VvMlo3*, *VvMlo6*, *VvMlo9.1*, *VvMlo13.1*, *VvMlo13.2* and *VvMlo17*) were grouped into the group IV which contains *Mlo* genes of known function in disease resistance, such as *Arabidopsis thaliana* *Mlo* genes (*AtMlo2*, *AtMlo6* and *AtMlo12*) and *Solanum lycopersicum* *SlMlo1* gene. *Mlo* genes of ‘*Vitis davidii* 0943’ and ‘Manicure Finger’ in the group IV had different responses to white rot. Furthermore, the expression of *VvMlo15* was significantly higher than *VdMlo15* during the infection of white rot. In the whole process of fungal infection, *VvMlo15* had strong response to white rot infection, while *VdMlo15* had a little. The characteristics of the genetic structure, protein structure, molecular mass, isoelectric point and transmembrane structure of *VvMlo15* are more similar to those of *VvMlo* genes in group IV. It can be speculated that *VdMlo15* plays an important role in the resistance to white rot of grape.

Key words: ‘*Vitis davidii* 0943’; *Mlo* gene family; bioinformatics; white-rot fungus

Received 2017-03-16 Accepted 2017-08-01

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31201599), China Agriculture Research System (Grant No. CARS-30), the Agricultural Science and Technology Innovation Program (Grant No. CAAS-ASTIP-2015-ZFRI), Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund (Grant No. 1610192016202), and National Key Technology Research and Development Program (Grant No. 2013BAD01B04-20).

*Corresponding author (E-mail: zhangying05@caas.cn).