

金银花 *MLO* 家族全基因组序列鉴定及表达分析

李小丽^{1,2}, 魏丽³, 刘谦^{1,2}, 李佳^{1,2}, 张芳^{1,2}, 张永清^{1,2}, 蒲高斌^{1,2*}

(1. 山东中医药大学, 山东 济南 250355; 2. 山东省中药质量控制与全产业链建设协同创新中心, 山东 济南 250355; 3. 山东英才学院, 山东 济南 250100)

摘要: 通过全基因组测序获得金银花 *MLO* 家族候选基因 25 个。生物信息学分析发现, 该家族蛋白氨基酸数量为 137~846, 理论等电点在 5.02~9.50 之间, 富含碱性氨基酸, 有 1 个蛋白不含跨膜结构域, 其他蛋白为 3~10 个。亚细胞定位预测结果显示, 有 21 个蛋白定位于细胞膜上, 1 个定位于叶绿体。通过对金银花、小麦、拟南芥、番茄、普通烟草、林烟草和绒毛状烟草等物种的 133 个 *MLO* 蛋白构建系统发育树, 显示金银花 *MLO* 家族蛋白可分为 5 个亚组。组织特异性分析发现, 金银花 *MLO* 家族基因的表达具有明显的组织特异性。其中 8 个基因在叶中高表达, 2 个基因在茎中高表达, 2 个基因在花中高表达。接种白粉菌后, 有 4 个基因显著上调表达, 其中 *MLO14* 增加最多, 比对照提高了 2 000 多倍。本研究初步解析了金银花白粉病发生相关基因 *MLO* 的组成及表达情况, 为进一步利用 *MLO* 作为靶基因, 培育金银花抗白粉病新种质奠定了基础。

关键词: 金银花; *MLO* 蛋白; 白粉病; 生物信息学; 表达模式

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)10-2867-09

Genome-scale identification and expression analysis of *MLO* genes in *Lonicera japonica*

LI Xiao-li^{1,2}, WEI Li³, LIU Qian^{1,2}, LI Jia^{1,2}, ZHANG Fang^{1,2}, ZHANG Yong-qing^{1,2}, PU Gao-bin^{1,2*}

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 2. Shandong Provincial Collaborative Innovation Center for Quality Control and Construction of the Whole Industrial Chain of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 3. Shandong Yingcai University, Jinan 250100, China)

Abstract: Twenty-five candidate *MLO* genes of *Lonicera japonica* were obtained by whole genome sequencing. Bioinformatics analysis showed that the number of amino acids in the protein family ranged from 137 to 846, the theoretical isoelectric point ranged from 5.02 to 9.50, and it was rich in basic amino acids. One protein did not contain transmembrane domain, and the other proteins ranged from 3 to 10. The results of subcellular localization showed that 21 proteins were located on the cell membrane and 1 protein was located on the chloroplast. Phylogenetic trees were constructed from 133 *MLO* proteins of *Lonicera japonica*, *Triticum aestivum*, *Arabidopsis thaliana*, *Solanum lycopersicum*, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana sylvestris* and *Nicotiana tomentosiformis*. The results indicated that *MLO* family proteins of *Lonicera japonica* could be divided into five subgroups. Tissue specific analysis showed that the expression of *MLO* genes in *Lonicera japonica* had obvious tissue specificity. Among them, 8 genes were highly expressed in leaves, 2 genes in stems and 2 genes in flowers. Four genes were significantly upregulated after inoculation with powdery mildew, among which *MLO14* increased the most, which was more than 2 000 times higher than that of the control. In this study, the composition and expression of the *MLO* gene

收稿日期: 2021-05-14; 修回日期: 2021-06-15.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81872963); 中央本级重大增减支项目“名贵中药资源可持续利用能力建设” (2060302); 山东省高等学校优秀青年创新团队支持计划 (2019 KJE004); 山东省重大科技创新工程 (2019JZZY011020).

*通讯作者 E-mail: gbpu@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0717

related to the occurrence of powdery mildew of *Lonicera japonica* were preliminarily analyzed, which laid a foundation for the further use of *MLO* as a target gene to develop new germplasm resistant to powdery mildew of *Lonicera japonica*.

Key words: *Lonicera japonica*; *MLO* protein; powdery mildew; bioinformatics; expression pattern

金银花为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或带初开的花, 具有清热解毒、疏散风热的功效^[1]。近年来, 金银花的需求量大幅攀升, 种植面积逐年增加, 仅山东省就已经超过 65 万亩。白粉病是金银花产区的常见主要病害之一, 危害叶、花蕾和幼嫩枝条, 形成灰白色粉状霉层, 后期呈灰褐色坏死, 发病严重时导致叶片脱落、花蕾畸形和枝条枯死, 造成严重减产和品质降低^[2-5]。长期以来, 人们主要利用化学农药防治金银花白粉病。化学农药频繁使用导致的农药残留, 严重影响金银花的品质, 不符合中药材规范化种植的要求^[6]。而利用基因编辑技术培育抗病品种, 已成为防治病害的安全有效途径, 是植物病害防治研究的热点之一^[7-9]。

MLO (mildew resistance locus O) 家族基因是植物特有的“感病基因”, 普遍认为它对白粉病具有负调控作用, 被认为是研究植物广谱抗病性的最佳模式基因^[10,11]。无论在双子叶植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 还是单子叶植物大麦 (*Hordeum vulgare*) 上, 都有证据证明 *MLO* 突变体对白粉病菌具有广谱抗性, 在农作物白粉病育种方面具有重要的应用价值。1942年, Freisleben等^[12]首次使用 X 射线诱变了德国大麦品种 Haisa, 获得的突变体产生了对大麦白粉菌的广谱抗性, *MLO* 抗性从此为人们所了解。随后 Büschges等^[13]克隆了大麦的 *MLO* 基因, 并将其突变为隐性基因, 显著提高了大麦的抗白粉病能力。王延鹏等^[14]通过基因编辑, 同时敲除小麦基因组中 3 个 *MLO* 同源基因, 获得了高抗白粉病的突变体植株。Nekrasov等^[15]利用 CRISPR/Cas9 技术产生了对白粉病真菌病原体具有抗性的非转基因番茄品种 Tomelo。Michela等^[16]将 *MLO* 基因在番茄 *SIMLO* 突变体中过表达, 恢复了白粉病感病表型, 证实了 *MLO* 基因在白粉病发生过程中是必需的。Pessina等^[17]通过 RNA 干扰抑制 *MdMLO11* 和 *MdMLO19*, 降低了苹果对白粉病的易感性。Wan等^[18]利用 CRISPR/Cas9 技术编辑了两个葡萄 *MLO* 基因 *VvMLO3* 和 *VvMLO4*, 通过突变一个等位基因降低 *VvMLO3* 的表达显著提高了敏感葡萄品种对白粉病的抗性。可见, 通过 *MLO* 的下调表达, 可以显著提高突变体植株的抗病能力。关于金银花 *MLO* 基因的研究尚未见报道。

在金银花基因组测序的基础上, 本研究对已获

得的 25 个 *MLO* 家族候选基因进行了基础理化性质、亚细胞定位、系统发育、表达水平等分析, 找到了与白粉病发生密切相关的 *MLO* 基因, 为进一步利用 *MLO* 作为靶基因, 培育金银花抗白粉病新种质奠定了基础。

材料与方法

样品 金银花基因组测序选用的材料为山东中医药大学培育的金银花新品种“华金 6 号”。

试剂 多糖多酚植物 RNA 提取试剂盒 (RC401) (南京诺唯赞生物科技股份有限公司); SYBR Premix EX Taq™ (ROX) 和 RT 反转录试剂盒 (TaKaRa 公司); DNA 分子量 MakerDL2000 [天根生化科技 (北京) 有限公司]; 引物由铂尚生物技术 (上海) 有限公司负责合成。

仪器 CFX96 Touch Real-Time PCR 仪 (Bio-Rad 公司); 超微量核酸检测仪、凝胶成像仪 (GE 公司); 5424D 型高速离心机 (Eppendorf 公司)。

金银花 *MLO* 基因的获得 在金银花基因组测序的基础上, 通过基因注释、同源比对以及 PCR 克隆等方法鉴定、获得了 25 个 *MLO* 基因, 分别命名为 *MLO1*~*MLO25*。

金银花 *MLO* 蛋白理化性质分析 利用 ExPASy ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 对获得的金银花的 *MLO* 蛋白序列进行理化性质分析。利用 Cell-PLoc 2.0 在线工具 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi>) 对金银花 *MLO* 家族成员进行亚细胞定位分析。利用 TMHMM 在线分析工具 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 对金银花 *MLO* 蛋白的跨膜结构进行预测。利用钙调素结合蛋白 (CaMBP) 数据库 (http://calcium.uhnres.utoronto.ca/ctdb/pub_pages/search/index.htm) 对 *MLO* 蛋白进行 CaM 结合结构域预测。

金银花 *MLO* 家族进化分析 从 TAIR 数据库 (<http://www.arabidopsis.org/>) 下载拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) *MLO* 家族成员的蛋白全长序列, 从 NCBI 数据库获得小麦 (*Triticum aestivum*)、普通烟草 (*Nicotiana tabacum*)、林烟草 (*Nicotiana sylvestris*)、绒毛状烟草 (*Nicotiana tomentosiformis*) 的 *MLO* 家族成员的蛋

白全长序列,从 UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/uniprot/>) 下载番茄 (*Solanum lycopersicum*) MLO 家族成员的蛋白全长序列。利用 Clustal X 程序对以上 MLO 蛋白序列进行多序列比对,基于比对结果利用 MEGA X 软件采用邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建系统进化树,检验参数 (bootstrap) 设置为 1 000。

金银花 MLO 蛋白的保守位点和保守结构域分析 选择蛋白序列较为完整的 25 条 MLO 序列与普通烟草、拟南芥、番茄的 MLO 蛋白进行序列比对,利用 MEME 在线工具 (<http://meme-suite.org/tools/meme>) 对获得的金银花 MLO 家族成员的蛋白序列进行保守结构域分析,参数设置为: motif 长度限制在 6~50 个氨基酸残基范围内,识别的 motif 总数限制为 10 个。

金银花 MLO 基因表达分析 分别取生长旺盛的茎、叶和花,液氮迅速冷冻,于 -80 °C 保存备用。健康生长的“华金 6 号”金银花,进行白粉病接种实验。取新鲜的感染白粉病的金银花叶片,与正常的叶片摩擦,使其叶片下表面接触到白粉病菌,分别在接种后的 0、6、9、12、24 和 48 h 取叶片,液氮迅速冷冻,于 -80 °C 保存备用。

通过生物信息学分析,剔除跨膜结构域少或非膜定位的 MLO 蛋白 3 个,对剩余 22 个基因进行表达分析。根据 MLO 基因的 CDS 设计荧光定量特异引物,选用金银花 *Actin* 基因 (NTU60495) 为内参基因,并设计实时荧光定量 PCR 引物 (表 1)。采用 SYBR Green 法在实时荧光定量 PCR 仪上进行实时荧光定量 PCR 实验,每个组织设置 3 次生物学重复和 3 次实验重复,PCR 反应体系和反应程序参照 TaKaRa 定量 PCR 试剂盒说明书。分析 MLO 基因在金银花不同组织中的表达情况,相对表达量按照 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行计算。

结果与分析

1 金银花 MLO 蛋白的理化性质分析

由表 2 可知,金银花 MLO 家族蛋白的氨基酸数量在 130~846 之间,分子质量介于 14.25~96.79 kDa,其中 MLO5、MLO20 和 MLO24 三个蛋白较小,只有不到 300 个氨基酸,MLO14 最大,为 846 个氨基酸;蛋白质的理论等电点在 5.02~9.78 之间,除 MLO5、MLO9、MLO13、MLO23 和 MLO24 5 个蛋白以外,其他的蛋白质理论等电点都大于 7。蛋白稳定系数分析显示有 9 个 MLO 蛋白的不稳定系数小于 40,是稳定蛋白;16 个是不稳定蛋白。蛋白序列脂肪族氨基酸指数 (AI) 在 66.20~107.86 之间。疏水性分析结果表明,25 个金银花 MLO 蛋白中有 11 个疏水性为负值,属于亲水性蛋白,14 个金银花 MLO 蛋白的疏水性为正值,为疏水性

蛋白。

亚细胞定位的预测结果表明,大部分蛋白定位于细胞膜上,MLO5 定位于细胞核上,MLO19 和 MLO22 定位于细胞膜和叶绿体上,MLO20 定位在细胞膜、叶绿体、线粒体、细胞核、液泡 (表 2)。跨膜结构域预测发

Table 1 Primer sequence for real-time PCR

Primer name	Primer sequence (5' to 3')	Annealing temperature /°C
<i>Actin</i> -F	GGATGCTTATGTCGGTGATGAAG	57.77
<i>Actin</i> -R	TGTTGGCTTTAGGGTTGAGAGG	57.67
<i>MLO1</i> -F	TGTAGTAGGAATCAGCCAGTAATC	57.94
<i>MLO1</i> -R	AAACAGAACAAAGTGGATGAGGTAG	56.30
<i>MLO2</i> -F	ATCGGAGCCATTCTTGTTCAC	55.81
<i>MLO2</i> -R	TGTCACCGCCAGCACTATTC	57.45
<i>MLO3</i> -F	GAGGGTATGGGAAGATGAGGAC	59.54
<i>MLO3</i> -R	ATTGCGGAGTGTAAGGTAATCAG	55.99
<i>MLO4</i> -F	GCTCGCTTCTTCGTTTGGG	57.45
<i>MLO4</i> -R	CCGTGTAGTTGACAATGAATTATCG	56.30
<i>MLO6</i> -F	GCCAAGAAACACATCAAACAGAAC	56.15
<i>MLO6</i> -R	CCACCAACACCACCACCTC	59.48
<i>MLO7</i> -F	GCGAGAGAGGTAGTACAGAAGAG	59.55
<i>MLO7</i> -R	CTGGGTAACAAGAGCATACAAAGG	57.86
<i>MLO8</i> -F	CCGTTCATGTGGTTCCTTGTC	57.57
<i>MLO8</i> -R	CGCATTCATAAAGAGTGTGTAGTG	56.15
<i>MLO9</i> -F	GATTACAGCACAGAGGAGCATATTC	57.94
<i>MLO9</i> -R	GCCAAGAACGAACAAGAACC	57.57
<i>MLO10</i> -F	TCTCTGTTCTCACCGTTGTATTG	56.15
<i>MLO10</i> -R	CAAGCAGCAGCATAATGAATCC	55.81
<i>MLO11</i> -F	GTTCTTCACCTTATCCACTTCGC	57.77
<i>MLO11</i> -R	TTCCTACTTGCTTCTTCTCACAG	56.15
<i>MLO12</i> -F	CTACAAAGCGGCACTAATTCAG	57.77
<i>MLO12</i> -R	ACCAGCGAAGACACAGAAGC	57.45
<i>MLO13</i> -F	CGATGGACGACAATGATGATGATG	57.86
<i>MLO13</i> -R	GGACGAGGAGAAAGTGGAACC	59.52
<i>MLO14</i> -F	ACAAGACGCCGACTGTCTAC	57.32
<i>MLO14</i> -R	CTTCTCAACATTGGACCGATGG	57.67
<i>MLO15</i> -F	GTGAAAGAAGAGTTGATGCTGTTAG	56.30
<i>MLO15</i> -R	AAGTGCCGATAATGGGAAGTTG	55.81
<i>MLO16</i> -F	TGGCAAGAGAAGTAGTGGAGAAG	57.77
<i>MLO16</i> -R	AAGAGCGTACAGTGGTAAGGTG	57.67
<i>MLO17</i> -F	TCATCAACCATCAACTCATCTGC	55.99
<i>MLO17</i> -R	CGCTCGTCTCATTATCCGTATC	57.67
<i>MLO18</i> -F	GATGGCTCAACAAATACAAGACAG	56.15
<i>MLO18</i> -R	AAGGCGTAGAGAGGGAAAAGTG	57.57
<i>MLO19</i> -F	AGCAGAGCCAGAACATCACC	57.45
<i>MLO19</i> -R	ACCTTTAATCTCCCAAGCATCATC	56.15
<i>MLO20</i> -F	GACCTGCATTGGTGCTAGCAAG	55.71
<i>MLO20</i> -R	GGCTAAGCTTGCAAGTGGCATCG	56.62
<i>MLO21</i> -F	GGAAGAAACCAATGCGAAGAAC	55.99
<i>MLO21</i> -R	CCCGAATGATGTTTGTGAATTAGC	56.30
<i>MLO22</i> -F	TCATCAACCATCAACTCATCTGC	55.99
<i>MLO22</i> -R	CGCTCGTCTCATTATCCGTATC	57.67
<i>MLO25</i> -F	GAGAAGGGTGAGGTGGTGAAG	59.52
<i>MLO25</i> -R	TGTGTTACAAGGGCATAGAGAGG	57.77

Table 2 The prediction of physicochemical properties of MLO proteins in *Lonicera japonica*

Name	Number of amino acids	Molecular weight/Da	Isoelectric point	instability index	Aliphatic index	Hydrophilic index	Subcellular localization	Membrane spanning domain
MLO1	343	38 809.69	8.60	49.60	95.51	-0.087	Cell membrane	3
MLO2	484	55 213.98	9.04	40.31	96.03	-0.014	Cell membrane	5
MLO3	546	62 386.99	8.88	46.69	93.02	0.034	Cell membrane	7
MLO4	484	54 924.49	9.28	46.68	92.42	-0.052	Cell membrane	6
MLO5	137	14 251.83	5.45	32.71	66.20	-0.278	Nucleus	1
MLO6	346	39 615.88	9.46	57.66	82.80	-0.144	Cell membrane	4
MLO7	506	58 599.53	8.50	45.72	102.61	0.117	Cell membrane	7
MLO8	360	41 351.71	9.67	34.94	99.39	0.171	Cell membrane	5
MLO9	511	57 863.03	6.47	39.4	97.83	0.114	Cell membrane	6
MLO10	374	41 992.23	9.09	38.68	107.86	0.264	Cell membrane	5
MLO11	421	47 215.65	8.88	34.08	93.35	0.086	Cell membrane	6
MLO12	426	48 215.15	9.78	49.10	94.04	0.058	Cell membrane	5
MLO13	595	68 270.31	6.86	46.26	98.91	0.103	Cell membrane	6
MLO14	846	96 798.10	8.82	48.30	99.34	0.108	Cell membrane	10
MLO15	489	56 302.25	8.89	37.61	107.79	0.23	Cell membrane	7
MLO16	483	55 784.39	8.87	42.22	101.49	0.204	Cell membrane	6
MLO17	457	51 835.99	8.90	41.06	89.65	0.021	Cell membrane	6
MLO18	482	54 996.90	9.66	31.41	100.75	0.226	Cell membrane	7
MLO19	382	42 830.44	8.23	36.38	88.87	-0.19	Cell membrane, chloroplast	5
MLO20	275	31 193.18	8.73	41.93	86.51	-0.052	Cell membrane, chloroplast, mitochondrion, nucleus, vacuole	3
MLO21	412	47 744.57	9.30	47.48	89.42	-0.074	Cell membrane	4
MLO22	418	47 363.58	8.58	40.35	86.60	-0.093	Cell membrane, chloroplast	5
MLO23	518	58 780.95	5.02	32.98	82.49	-0.196	Cell membrane, chloroplast, cytoplasm	0
MLO24	160	17 618.39	5.95	48.77	94.50	0.065	Chloroplast	2
MLO25	348	40 325.87	9.64	63.51	86.21	-0.139	Cell membrane	4

现金银花 MLO 蛋白的跨膜结构域多数为 4~7 个, MLO14 最多为 10 个, MLO5、MLO23 和 MLO24 三个蛋白不含或只有 1 或 2 个跨膜结构域。对 25 个金银花 MLO 蛋白进行钙离子结合区预测, 仅有 MLO18 在 227 处有钙离子结合区。

2 金银花 MLO 蛋白的保守位点和保守结构域分析

MLO 蛋白相对比较保守, 图 1 可知金银花 MLO 蛋白的保守氨基酸位点分布大部分与文献报道的保守氨基酸位点一致, 在跨膜结构域 3 和跨膜结构域 4 之间的保守位点与烟草、番茄、拟南芥的不同, 金银花 MLO 蛋白缺少 F、Q、Y、R、F、F、Y 位点。MLO1、MLO6、MLO14 等 3 个蛋白具有肽结构域 I, MLO1、MLO6、MLO11、MLO14、MLO17、MLO22、MLO25 等 7 个蛋白在 C 末端具有肽结构域 II。

金银花 MLO 家族成员的保守结构域分析得到了 MLO 家族的保守结构域区段, 这个保守的区段共包含 10 个 motif (图 2)。这 10 个 motif 含有不同长度的氨基酸序列 (图 3)。有 2 条序列含有 10 个保守结构域, 4 条序列含有 9 个保守结构域, 8 条序列含有 8 个保守结构域, 2 条序列含有 7 个保守结构域, 1 条序列含有 6 个保守结构域, MLO23 没有保守结构域, MLO5 只含有 1 个

保守结构域。

3 金银花 MLO 蛋白的系统进化分析

系统进化分析表明 (图 4), 133 条 MLO 蛋白聚类形成 5 个亚组, 各亚组包含不同物种的蛋白数如表 3 所示。其中, 第 II 亚组包含蛋白数最多, 有 6 个金银花 MLO 蛋白, 第 I 亚组包含 4 个金银花 MLO 蛋白, 数量最少, 第 V 亚组包含 5 个金银花 MLO 蛋白。

4 金银花 MLO 基因表达水平分析

通过生物信息学分析, 剔除跨膜结构域少或非膜定位的 MLO 蛋白 3 个, 溶解曲线分析表明 (图 5), MLO20 的引物特异性较低, 故剔除该基因, 对剩余 21 个基因进行表达分析。本研究所用引物具有较高特异性, 满足实验要求。由图 6 可以发现, MLO9、MLO10、MLO11、MLO12、MLO13、MLO17、MLO18、MLO22、MLO25 在叶中高表达, MLO6、MLO15 在茎中高表达, MLO2、MLO19 在花中高表达。

接种白粉菌后, MLO14 变化最明显, 表达量显著上调, 在接种后 48 h 表达量最大, 比对照提高 2 000 多倍。MLO2、MLO15、MLO21 与对照相比也有明显变化, MLO2 表达量呈现先增加再减少的趋势, 接种后 24 h 表达量最达。MLO15 在接种后 9、24、48 h 表达量

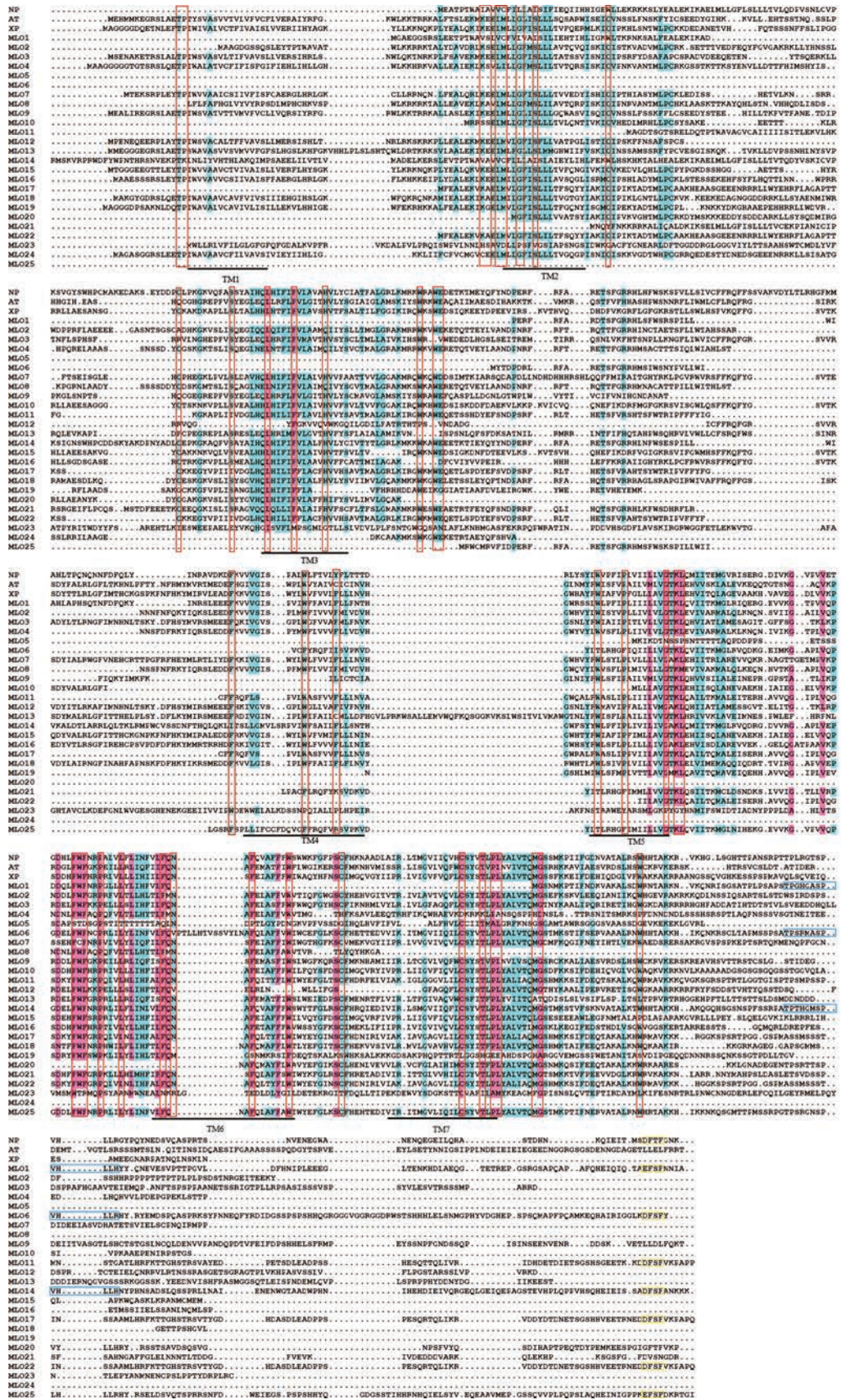


Figure 1 The alignment of MLO sequences in *Lonicera japonica*. (Red background homology > 75%, the blue background said homology > 50%, the red line boxes represent conservative amino acid sites, TM said transmembrane domain structure, the blue line box said peptide structure domainI, the yellow line said peptide structure domain II)

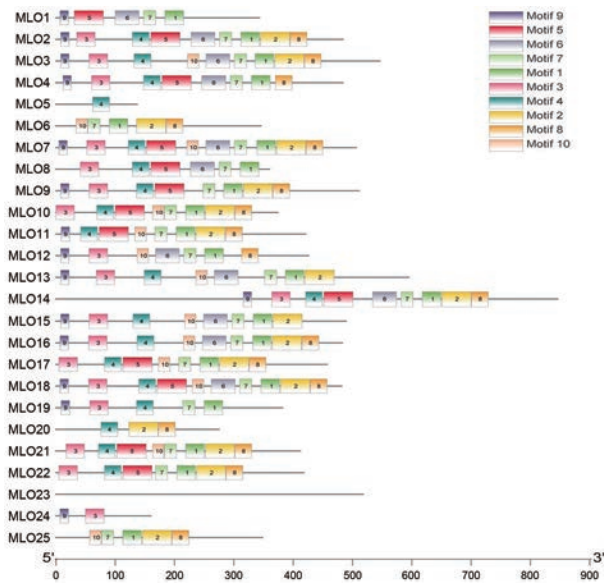


Figure 2 The analysis of motif composition of MLO proteins in *Lonicera japonica*

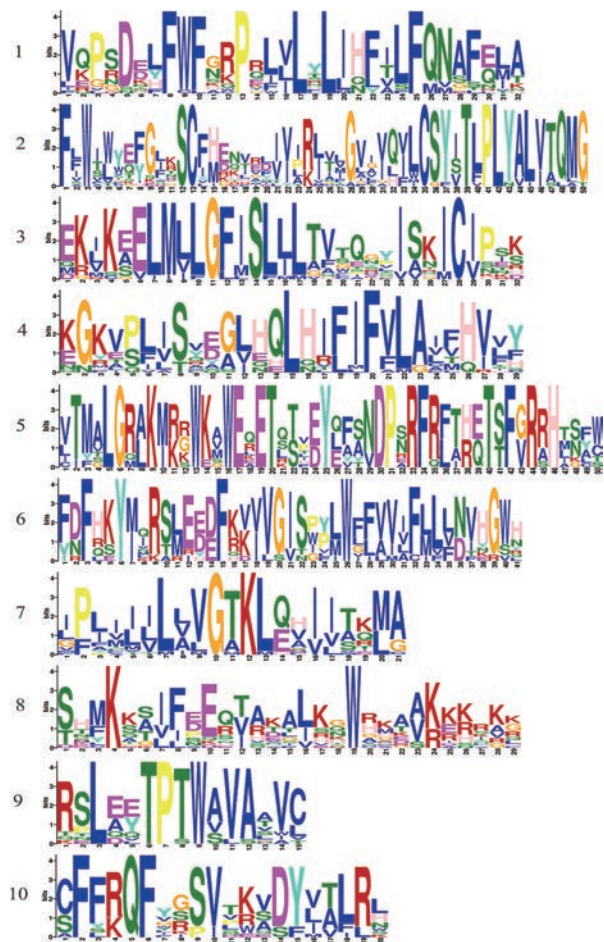


Figure 3 The analysis of amino acid sequences of the conserved motif blocks in *Lonicera japonica*. (This figure shows the motif sequence information in Figure 2. The height of the letter represents the conservatism of the amino acid; the higher the conservatism, the greater the conservatism.)

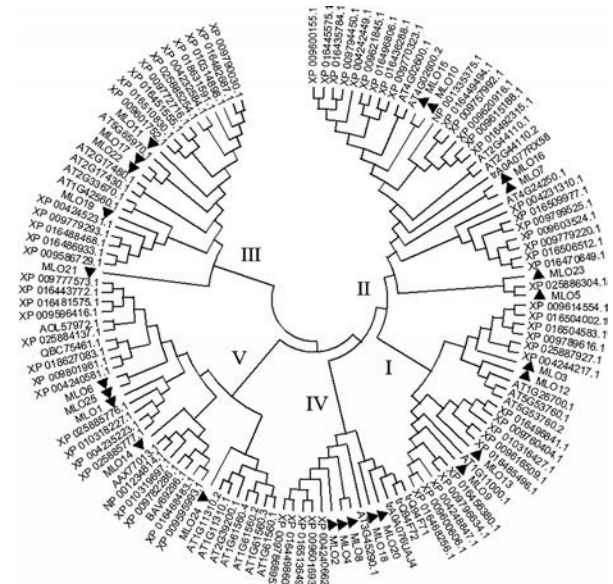


Figure 4 The phylogenetic tree of MLO proteins. ▲ represents the MLO protein in honeysuckle, and I, II, III, IV and V represent the different branches of MLO proteins

Table 3 The amount of MLO proteins in different species

The name of the species	Sum	Protein number				
		I	II	III	IV	V
<i>Lonicera japonica</i>	25	4	6	5	5	5
<i>Nicotiana sylvestris</i>	15	3	5	3	2	2
<i>Nicotiana tabacum</i>	29	6	10	5	4	3
<i>Nicotiana tomentosiformis</i>	15	3	4	3	2	2
<i>Solanum lycopersicum</i>	23	4	3	10	3	3
<i>Triticum aestivum</i> L.	4	0	1	0	3	0
<i>Arabidopsis thaliana</i>	22	4	5	5	1	7

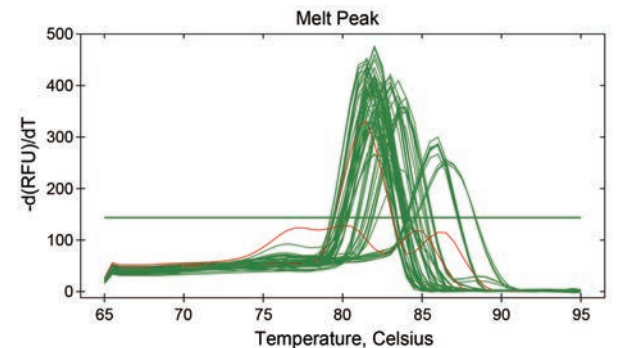


Figure 5 Melt diagram. The red curve shows the melting curve of *MLO20*

相差不大。*MLO21* 在接种后 9 h 表达量最大, 24 h 次之。其他基因无明显变化 (图 7)。

讨论

MLO 基因是一类单基因控制的隐性抗病基因, *MLO* 突变体具有对白粉菌广谱、高效且持久的抗性。本研究在金银花全基因组测序的基础上, 通过功能注

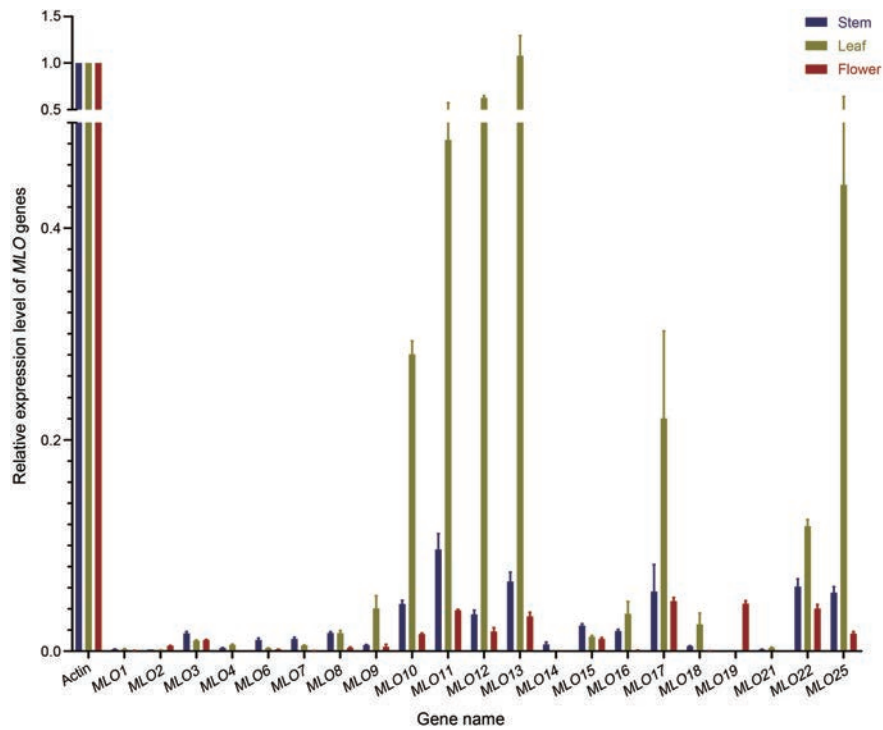


Figure 6 The relative expression levels of *MLO* genes in different tissues of *Lonicera japonica*. The relative expression level was calculated according to $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, $P < 0.05$

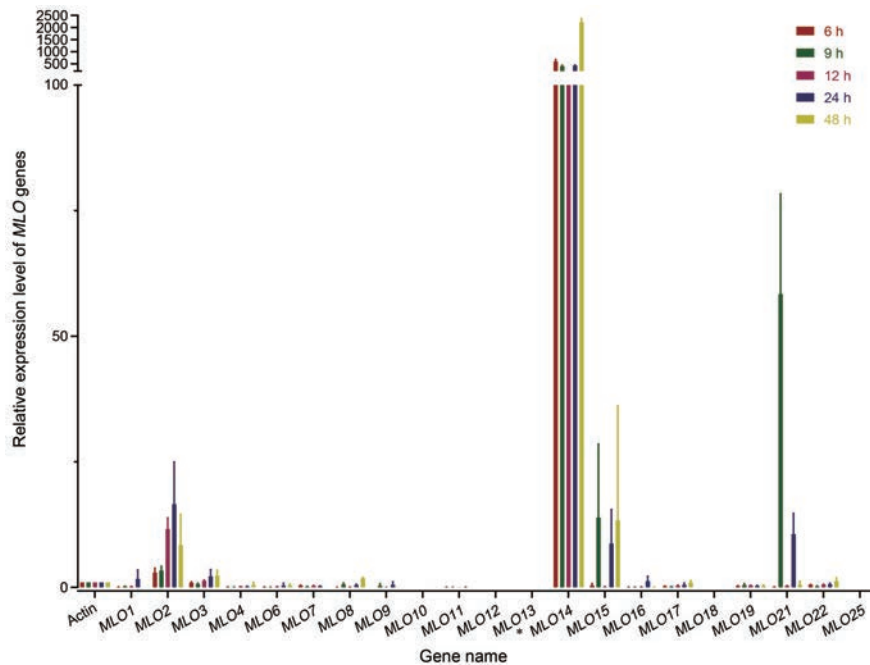


Figure 7 The relative expression levels of *MLO* genes in *Lonicera japonica* after powdery mildew inoculation. The relative gene expression was calculated by $2^{-\Delta\Delta CT}$ method with the expression level of powdery mildew at 0 h after inoculation as control, $P < 0.05$

释获得了该物种 25 个 *MLO* 家族全长 CDS 序列。生物信息学分析发现, *MLO5*、*MLO23* 和 *MLO24* 三个蛋白分子质量均小于多数已报道的 *MLO* 蛋白, 且跨膜结构域数量明显不足, 不具有 *MLO* 蛋白的典型特征, *MLO20* 的引物特异性不够。因此, 后期仅对筛选出的

21 个蛋白进行了深入研究。

研究认为, *MLO* 蛋白定位于细胞质膜上, 在白粉菌侵入的过程中, *MLO* 蛋白会逐渐聚集在白粉菌侵染位点的下方^[19-21]。这阻止了宿主细胞内吸器的形成和真菌的定殖, 这种阻力与乳头的形成有关^[22]。例如蕃

薇科植物的 82 个 MLO 蛋白中, 大多数分布于质膜中, 其次分布于内质网和液泡中, 还有少量分布于细胞核、线粒体和高尔基体中^[23-25]; 烟草的 29 个 MLO 蛋白均定位在细胞膜上^[26]; 月季的 19 个 MLO 蛋白均定位细胞膜上^[27]; 谷子的 12 个 MLO 蛋白大部分定位于细胞膜上, 少数位于细胞核和细胞质中^[28]。本研究获得的 21 个 MLO 蛋白均具有膜定位信号, 符合该家族的基本特征。

跨膜结构域是 MLO 蛋白膜定位所必需的, 过去一直认为其数量都是 7 个。但越来越多的研究发现 MLO 蛋白的跨膜结构域并不一致, 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^[29,30]。这种差异可能是由种间进化或不同物种自身特性决定的^[31]。本研究剔除了 4 个没有跨膜结构域或者数量小于 3 个的 MLO 蛋白。其余 21 个蛋白均具有 4 个以上的跨膜结构域。值得关注的是 MLO14, 有 10 个跨膜结构域。这是否暗示着该蛋白在白粉病发生过程中具有特殊的作用, 作者会在下一步的工作中重点关注。

MLO 蛋白在不同物种间十分保守, 且保守结构域越多, 其与白粉病的关系越密切。Panstruga^[32]提出 MLO 蛋白 C 端的肽结构域可能与植株对白粉病的敏感性相关。本研究发现, 金银花中有 3 个 MLO 蛋白具有肽结构域 I, 有 7 个 MLO 蛋白具有肽结构域 II, MLO1、MLO6 和 MLO14 同时具有这 2 个结构域。有趣的是, 不同于 MLO6, MLO14 在接种白粉病菌后显著上调表达, 推测其可能与金银花对白粉病的敏感性密切相关。对该基因的下调表达, 有可能会获得抗白粉病的金银花新种质。同时, 关于这两个肽结构域在 MLO 蛋白与病原菌互作中的作用也值得进一步深入研究。

作者贡献: 第一作者李小丽负责生物信息学分析、RNA 提取及论文撰写; 魏丽、刘谦开展基因的表达分析; 李佳、张芳和张永清参与实验材料的准备及数据分析; 通讯作者蒲高斌指导选题及方案实施, 并对论文进行了修改。

利益冲突: 本文所有作者之间不存在利益冲突。

References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 52, 230.
- [2] Chen ML, Liu HY, Li Q, et al. Effect of the occurrence degree of powdery mildew on the content of chlorogenic acid in *Lonicera japonica* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2006, 31: 846-847.
- [3] Yang F. Control effect of three fungicides against powdery mildew of *Lonicera japonica* Thunb [J]. J Anhui Agric (安徽农业学报), 2017, 45: 162-163+171.
- [4] Su GH, Ou SS, He YQ, et al. Analysis on influencing factors for *Lonicera japonica* withering in summer [J]. J Anhui Agric (安徽农业学报), 2016, 44: 37-39.
- [5] Yu L, She HL. Occurrence regularity and comprehensive control techniques of powdery mildew of honeysuckle [J]. Mod Rural Sci Technol (现代农村科技), 2012, 16: 29.
- [6] Ye GB, Zhuang QH, Zhu GY, et al. Situation of pesticide residues and development of pesticide products registered for *Lonicera Japonicae* Flos in China [J]. Pest Sci Admin (农药科学与管理), 2020, 41: 26-32.
- [7] Chen CR, He FZ, Liu MZ, et al. Application of expression quantitative trait loci analysis in pharmacogenomics [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2017, 52: 1203-1208.
- [8] Wang Y, Huang G, Yang H, et al. Advances on nonviral vectors of CRISPR/Cas9 system for genome editing [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2020, 55: 2606-2617.
- [9] Lu D, Li L, Deng XM. CRISPR/Cas9 and its application in drugs development [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2018, 53: 11-20.
- [10] Win KT, Zhang C, Lee S. Genome-wide identification and description of MLO family genes in pumpkin (*Cucurbita maxima* Duch.) [J]. Hort Environ Biotechnol, 2018, 59: 397-410.
- [11] Shi JL, Wan HJ, Zai WS, et al. Phylogenetic relationship of plant MLO genes and transcriptional response of MLO genes to *ralstonia solanacearum* in tomato [J]. Genes, 2020, 11: 487.
- [12] Freisleben R, Lein A. Über die auffindung einer mehlttauresistenten mutante nach röntgenbestrahlung einer anfälligen reinen linie von sommergerste [J]. Naturwissenschaften, 1942, 30: 608.
- [13] Büschges R, Hollricher K, Panstruga R, et al. The barley MLO gene: a novel control element of plant pathogen resistance [J]. Cell, 1997, 88: 695-705.
- [14] Wang Y, Cheng X, Shan Q, et al. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew [J]. Nat Biotechnol, 2014, 32: 947-951.
- [15] Nekrasov V, Wang C, Win J, et al. Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion [J]. Sci Rep, 2017, 7: 482.
- [16] Michela A, Stefano P, Domenico C, et al. Identification of candidate MLO powdery mildew susceptibility genes in cultivated Solanaceae and functional characterization of tobacco NtMLO1 [J]. Transgen Res, 2015, 24: 847-858.
- [17] Pessina S, Angeli D, Martens S, et al. The knock-down of the expression of MdMLO19 reduces susceptibility to powdery mildew (*Podosphaera leucotricha*) in apple (*Malus domestica*) [J]. Plant Biotechnol J, 2016, 14: 2033-2044.
- [18] Wan DY, Guo Y, Cheng Y, et al. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of VvMLO3 results in enhanced resistance to powdery mildew in grapevine (*Vitis vinifera*) [J]. Hort Res, 2020, 7: 116.

- [19] Bhat RA, Miklis M, Schmelzer E, et al. Recruitment and interaction dynamics of plant penetration resistance components in a plasma membrane microdomain [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102: 3135-3140.
- [20] Kim MC, Panstruga R, Elliott C, et al. Calmodulin interacts with MLO protein to regulate defence against mildew in barley [J]. *Nature*, 2002, 416: 447-451.
- [21] Panstruga R. Serpentine plant MLO proteins as entry portals for powdery mildew fungi [J]. *Biochem Soc Transact*, 2005, 33: 389-392.
- [22] Consonni C, Humphry ME, Hartmann HA, et al. Conserved requirement for a plant host cell protein in powdery mildew pathogenesis [J]. *Nat Genet*, 2006, 38: 716-720.
- [23] Xiang GS, Wang KJ, Yan HJ, et al. Bioinformatics analysis of MLO protein family in rosaceae plants [J]. *Gen Appl Biol (基因组学与应用生物学)*, 2018, 37: 2043-2059.
- [24] Qiu XQ, Wang QG, Jian GY, et al. Subcellular localization and functional analysis of powdery mildew resistance gene MLO in rose [J]. *Acta Hort Sin (园艺学报)*, 2017, 44: 933-943.
- [25] Zheng Z, Nonomura T, Appiano M, et al. Loss of function in MLO orthologs reduces susceptibility of pepper and tomato to powdery mildew disease caused by *Leveillula taurica* [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e70723.
- [26] Zhang XL, Zhang JS, Yu SZ, et al. Genome sequence identification and expression analysis of the NtMLO family in tobacco [J]. *Plant Physiol J (植物生理学报)*, 2019, 55: 1705-1720.
- [27] Stefan K, Lina P, Ralph P. Comprehensive phylogenetic analysis sheds light on the diversity and origin of the MLO family of integral membrane proteins [J]. *Gen Biol Evol*, 2016, 8: 878-895.
- [28] Liu BL, Sun Y, Hao QT, et al. Genome-wide identification and expression profile analysis of millet MLO family [J]. *J Nucl Agric Sci (核农学报)*, 2018, 32: 1492-1501.
- [29] Chen YB, Wang Y, Zhang HL. Genome-wide analysis of the mildew resistance locus o (*MLO*) gene family in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) [J]. *Plant Omics*, 2014, 7: 87-93.
- [30] Zhang XL, Zhang J, Lei B, et al. Research progress of plant MLO protein [J]. *Plant Physiol J (植物生理学报)*, 2018, 54: 1159-1171.
- [31] Chen L, Qiu XQ, Zhang H, et al. Bioinformatics analysis of MLO gene in different species [J]. *Southwest China J Agric Sci (西南农业学报)*, 2012, 25: 1302-1308.
- [32] Panstruga R. Discovery of novel conserved peptide domains by ortholog comparison within plant multi-protein families [J]. *Plant Mol Biol*, 2005, 59: 485-500.