

CmMLO2: 一个与甜瓜白粉病感病相关的新基因

程 鸿^{1,*}, 孔维萍¹, 何启伟², 王晓巍¹

(¹甘肃省农业科学院蔬菜研究所, 农业部园艺作物生物学与种质创制西北地区科学观测实验站, 兰州 730070; ²山东省农业科学院蔬菜研究所, 济南 250100)

摘要: 通过 RT-PCR 方法从甜瓜中克隆得到白粉病感病相关基因 *CmMLO2* 的 cDNA 序列, GenBank 登录号为 FJ713542。该基因 ORF 全长 1 713 bp, 可编码由 570 个氨基酸组成的蛋白质, 具有 7 个跨膜螺旋结构, 属于典型的跨膜蛋白。RT-PCR 结果表明, *CmMLO2* 主要在甜瓜叶片中表达, 具有组织特异性。在受到白粉病菌胁迫时 *CmMLO2* 表达显著上调, 表明 *CmMLO2* 很有可能与白粉病发病有关。构建 RNAi 表达载体 pFGC1008-*CmMLO2* 后, 利用叶盘转化法转化甜瓜, 获得了 PCR 阳性植株, 白粉病接种鉴定结果表明, 转化植株对白粉病具有抗性, 证明通过 ihpRNAi 敲除 *CmMLO2*, 可以获得对白粉病具有抗性的甜瓜材料。

关键词: 甜瓜; 白粉病; *MLO*; 基因表达; 遗传转化

中图分类号: S 652

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2013) 03-0540-09

CmMLO2: A Novel Gene Closely Associated with the Powdery Mildew in Melon

CHENG Hong^{1,*}, KONG Wei-ping¹, HE Qi-wei², and WANG Xiao-wei¹

(¹Institute of Vegetable, Gansu Academy of Agricultural Science, Lanzhou Research Station of Horticultural Crop Biology and Germplasm Enhancement, Ministry of Agriculture, P. R. China, Lanzhou 730070, China; ²Institute of Vegetable, Shandong Academy of Agricultural Science, Jinan 250100, China)

Abstract: The full-length cDNA sequence of the *MLO* gene was cloned via RACE-PCR from muskmelon (*Cucumis melo* L.), and was designated as *CmMLO2* (GenBank Accession No. FJ713542). The gene is 1 713 bp long and encodes a 570-amino acid peptide with a seven-transmembrane domain topology, and is a typical transmembrane protein. Its expression pattern was analyzed using quantitative real-time PCR after the melon leaf was infected with powdery mildew. The results indicate that *CmMLO2* is mainly expressed in melon leaves in a tissue-specific distribution. Moreover, *CmMLO2* may play a crucial role in the pathogenesis of powdery mildew. After the efficiency of dsRNA constructs were examined via pFGC1008-*CmMLO2* were introduced into *Agrobacterium tumefaciens* and transformed into melon wild type with the methods of *Agrobacterium*-mediated leaf disc transformation. The material of broad-spectrum powdery mildew resistance against *P. xanthii* in muskmelon was obtained by ihpRNAi-mediated knock-down of *CmMLO2*.

收稿日期: 2012-09-01; 修回日期: 2013-01-06

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30960237); 农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室项目

* E-mail: chengjn@yeah.net

Key words: melon; powdery mildew; *MLO*; gene expression; genetic transformation

MLO 基因可以对植物的抗病过程起负调控作用,在一定程度上相当于植物的“感病”基因,它的突变或缺失能够发生类似非寄主的识别反应,导致植物产生对病原菌所有已知小种的广谱抗性 (Panstruga, 2005)。因此,这类基因在改善植物抗性方面具有更大的潜力和应用前景。20 世纪 70 年代,在欧洲,科学家利用理化诱变的方法获得了具有 *mlo* 隐性突变的广谱抗白粉病菌的大麦品种。大麦 *mlo* 基因是最早获得的、也是目前唯一在生产上得到大规模利用的具有广谱抗性的基因,具有 *mlo* 基因的大麦不但能够抵抗已知所有的 30 多个大麦白粉病菌生理小种,而且抗性水平极高 (Freialdenhoven et al., 1996; Büschges, 1997),反应型为免疫或者接近免疫 (Piffanelli et al., 2002)。

一般认为野生的 *MLO* 基因可能对细胞坏死具有负调控作用,即抑制细胞坏死 (Kim et al., 2002)。与植物-微生物互作相符合, *MLO* 表达受生物和非生物胁迫刺激所诱导。Devoto (1999) 利用 N-端糖基化突变扫描和 Mlo-Lep 融合蛋白技术,发现大麦品种 *ingrid* 的 *MLO* 蛋白拥有 7 个跨膜螺旋结构和 1 个羧基端长尾,羧基端长尾结构类似于动物的 G-蛋白偶联受体 (GCRP),并凭借该结构定位于质膜上;其 N 端位于膜外, C 端位于膜内。平均而言, *MLO* 家族成员之间有 45% 的同源性, 70% 的相似性。这些蛋白序列平均 15% 位于胞外, 25% 位于质膜上, 60% 位于胞质内。另外, *MLO* 家族成员只有 N 端、C 端和胞外第 1 环区域的序列长度上存在差异。

近年来关于 *MLO* 基因的研究主要局限于大麦 (Jørgensen, 1992)、小麦和水稻 (Liu & Zhu, 2008) 等单子叶植物,除了拟南芥 (Chen et al., 2006),在双子叶植物上的研究报道很少。作者已经从甜瓜中克隆了一个 *MLO* 基因,定名为 *CmMLO1*,该基因在受白粉病诱导后,表达量没有发生明显变化 (Cheng et al., 2012)。因此推断甜瓜中可能还存在与白粉病较为密切的其他基因。

甜瓜生产中白粉病发生普遍 (Cheng et al., 2009),近年来研究者在瓜类白粉病分子育种研究方面主要开展了相关的标记挖掘 (张桂华等, 2004) 和 cDNA 文库的构建工作 (齐晓花等, 2010)。本研究中试图克隆甜瓜新的 *MLO* 基因,然后利用信息生物学方法和荧光定量 Real-time PCR 技术研究甜瓜在受到白粉病胁迫下 *MLO* 的表达模式,通过构建具有发夹结构的 RNAi 干扰载体,转化易感白粉病的甜瓜材料,以期提高甜瓜对白粉病的抗病能力。

1 材料与方法

1.1 植物材料

甜瓜材料为对白粉病感病的厚皮网纹甜瓜‘雪里华’,为高代自交系。于 2010 年 4 月将种子播种于兰州市皋兰县什川节能日光温室,幼苗长到三叶一心时,采用压片接种法 (Cheng et al., 2009) 接种白粉病菌,叶片保湿,分别在 0、24、48、60、72 h 后用直径为 10 mm 的叶片打孔器取样,一般 3 d 后可见打孔叶片出现白色粉斑时表明接种成功,用液氮冷冻样品后保存于 -70 °C 备用。在甜瓜生长期分别采集根、子叶、茎、真叶、花及幼果,用液氮冷冻,保存于 -70 °C 用于组成型表达分析。

1.2 甜瓜 *CmMLO2* 基因的克隆

Trizol 法提取叶片总 RNA (参照北京天根 Trizol 试剂盒的说明)。SmartTM RACE cDNA Amplification Kit 合成 cDNA (方法参照 Clontech 试剂盒说明)。

根据拟南芥、大麦等作物 *MLO* 的保守序列,设计引物 P28F: 5'-CA[C/T]CAGCTGCA[C/T/G]AT

[A/C/T]TTCATCTT-3', P28R: 5'-CCCATCTGAGT[A/T/GA]C[A/T/G]AG[T/A/C/G]GC[A/G/C]TA-3'。以甜瓜叶片 cDNA 为模板扩增中间片段。反应体系为 25 μ L。反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。1.2%琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物, 离心柱型琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(北京天根)回收 PCR 产物。回收的 PCR 产物与 PGEM-T easy vector (Promega) 连接, 转化大肠杆菌 TOP10, 菌落在含有 X-gal 和 IPTG 的平板上进行蓝白斑筛选, 分别挑选若干白斑菌落提取质粒, 通过质粒 DNA 酶切和 PCR 鉴定后克隆的 PCR 产物由北京博尚生物技术有限公司测序。

根据中间片段测序结果分别设计 5'RACE 和 3'RACE 的特异引物。M3'GSP: 5'-GGTTGTTTCC ATCAGCGAATTGA-3', M5'GSP: 5'-CAATGAATCCATGTCTCAGTGTC-3'。采用 Clontech 的 SMATR 技术, 通过 RACE 方法分别获得 5'RACE 和 3'RACE 的序列, 拼接后得到 cDNA 全长序列。设计引物, L28F: 5'-GCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAG-3', L28R: 5'-GTATTTGCTGCTGCCCTGTAC ATGA-3'。以 cDNA 第一链为模板, PCR 扩增获得全长 cDNA。

1.3 *CmMLO2* 的表达分析

定量分析在 BIO-RAD iQ5 Real-Time PCR 仪上进行, 采用 TaKaRa 试剂盒 DRR041 SYBR Premix Ex Tag TM, 在冰上操作, 保持试剂活性。定量分析引物 E28F: 5'-CTTGCCTTCTTTGCTTGG-3', E28R: 5'-TCTTCTTGGCGGAGTGGT-3'。扩增产物大小为 280 bp。利用甜瓜 β -actin 基因作为参照基因 (GenBank Acc: AY859055)。扩增引物 A1: 5'-TGCCCAGAAGTTCTATTCCAGC-3', A2: 5'-CATAGTTGAACCACCACTGAGGAC-3'。扩增产物大小为 147 bp。反应结束后利用 iQ5 内置软件进行统计分析作图。

组成型表达分析取甜瓜根、茎、叶片、花及幼果的等量总 RNA 各 2 μ g 进行第一链 cDNA 的合成。各取 1 μ L 作为模板进行 PCR 反应: 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 25~30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。1.2%琼脂糖凝胶电泳。

1.4 *CmMLO2* 干扰载体的构建及对甜瓜的遗传转化

利用 RNAi 在线设计软件, 确定 *CmMLO2* 的 +324 到 +690 共 367 bp 为最终靶标。通过 PCR 方法在目标片段的 5'端和 3'端分别加上酶切位点 *Spe* I -*Asc* I 和 *Swal*-*Bam*H I。引物: M3428R1: 5'-TAACTAGTGGCGCGCCAACAGTCGTCTTAGACTTC-3', M3428R2: 5'-GCGGATCCATTAAAT AACAAACAATCCAGAGGG-3'。利用酶切及连接技术分两次插入到 RNAi 表达盒 pFGC1008, 完成 ihpRNAi 干扰载体 pFGC1008-*CmMLO2* 的构建。

利用农杆菌介导的甜瓜叶盘转化方法 (Galperin et al., 2003) 获得转化植株。

1.5 转化植株的抗白粉病鉴定

甜瓜白粉病菌接种采用离体叶盘接种法。接种前用 4 $^{\circ}$ C 无菌水将叶片上的孢子配制成 10^5 个 \cdot mL⁻¹ 的孢子悬浮液。取 10 μ L 孢子悬浮液接种于叶片正面。在 20 $^{\circ}$ C、RH > 80%、12 h 光暗交替的条件下培养, 分别取 12 h、1 d、2 d、3 d、5 d 和 7 d 样品进行染色观察。

考马斯亮蓝组织透明染色: 将接菌后不同时间的甜瓜叶片浸泡在 0.15%三氯乙醇 - 三氯甲烷 (75:25, 体积比) 溶液中, 70 $^{\circ}$ C 恒温水浴 30 min 以上, 直至叶片脱色, 用清水冲洗后在 0.15%三氯乙酸和 0.6%考马斯亮蓝 R-250 (溶于 99%甲醇中) 混合液 (1:1, 体积比) 中, 分别染色 5、10、15、20 和 30 min, 取出后用清水冲净, 贮存于冰乙酸/甘油/水 (5:20:75, 体积比) 混合液中, 观察时以水为浮载剂, 叶面朝上在光学显微镜下观察染色效果。

2 结果与分析

2.1 *CmMLO2* 基因的克隆

通过设计兼并引物 P4F 和 P4R, 从甜瓜 cDNA 中扩增得到了 800 bp 左右的片段, 用 Blast 软件将获得的 cDNA 序列与大麦、拟南芥等的 *MLO* 序列进行比对, 发现所得序列片段与拟南芥、大麦的相似度分别为 55.3% 和 47.2%。进一步通过 RACE 技术扩增出了基因全长, 命名为 *CmMLO2* (Genbank Accession Number: FJ713542), 其开放读码框 (ORF) 长度为 1 713 bp, 它所编码的跨膜蛋白 *CmMLO2* 由 570 个氨基酸组成。分子量约 65 kD。

利用在线跨膜结构预测工具 TOPCONS (<http://topcons.cbr.su.se/>) 对获得的 *CmMLO2* 编码的蛋白质进行跨膜结构的初步分析。预测结果表明, 该蛋白有 *MLO* 家族典型特征, 具有 7 个跨膜结构 (图 1)。

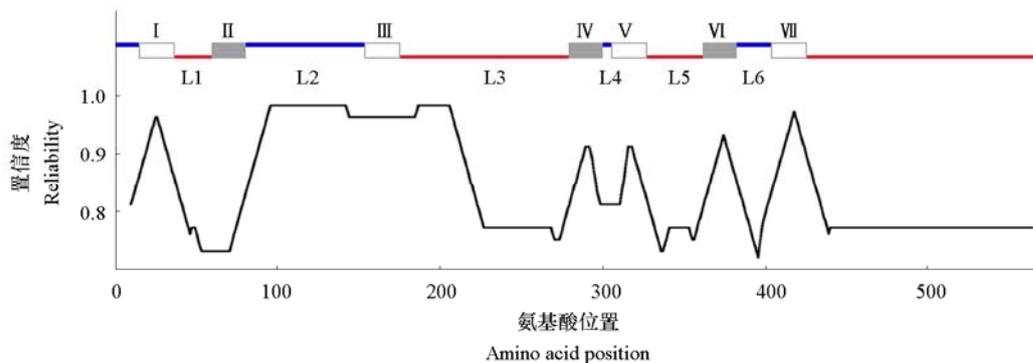


图 1 *CmMLO2* 的拓扑结构预测

矩形代表一个疑似跨膜螺旋的疏水性片段, 红线描述 NH_2 端胞外的位置, 蓝线描述羧基端细胞内的位置, L1~L6 为 loop 环, I~VI 表示疏水片段的位置。

Fig. 1 Predicted topology of *CmMLO2*

The rectangle represents a possible transmembrane helix formed by a hydrophobic fragment; The red line describes the extracellular location of the NH_2 terminal; The blue line describes intracellular location of the COOH terminal; L1 - L6 are the loop rings; I - VI represents the position of the hydrophobic segments.

用 DNAMAN 软件进行氨基酸序列同源性比较发现, *CmMLO2* 编码的氨基酸多肽和拟南芥 *AtMLO2* (ACC No: AF369563)、*AtMLO6* (ACC No: AF369567)、*AtMLO12* (ACC No: AF369573), 大麦 *HvMLO* (ACC No: Z83848) 等的 *MLO* 同源性大约在 58%、54%、53%、48% 左右, 具有 7-TM 跨膜结构的基本特征, 在 *CmMLO2* 的 C 末端有一个 D-F-S-F 四肽结构序列, 在可能的跨膜区域 (TM1 ~ TM7) 保守性较高 (图 2)。

通过构建蛋白系统进化树 (图 3), 进一步分析甜瓜 *CmMLO2* 与拟南芥 *MLO* 类似蛋白的遗传进化关系, 甜瓜的 *CmMLO2* 和拟南芥的 *AtMLO2*、*AtMLO6*、*AtMLO12* 和大麦 *HvMLO* 的距离较近, 同属于 *MLO* 第一亚家族, 但是与作者之前已经克隆得到的 *CmMLO1* (Cheng et al., 2012) 关系较远。

	TM1	TM2	
AtMLO2	..MADQVKERTLEETS	..TWA VAVVCFVLLFTS	IVLHSHSIEKIKETWEKPKKRAALFEALEKVKAEMLMLGFI SLLLTI GCP. PISNICHSQKVA STMH 93
AtMLO6	..MADQVKEKTEETS	..TWA VAVVCFVLLFTS	IVLHSHSIEKIKESWEKPKKRAALFEALEKVKAEMLMLGFI SLLLTI GCG. YISNICHEKNIAASMH 93
AtMLO12	...MAIKERSHEEPT	..TWA VAVVCFVLLFTS	IMLHGFLEFIECHWEKPKKRAALFEALEKVKAEMLMLGFI SLLLVVLCPT. PVSPTCHERNIAATWH 91
HvMLO	MSKKGVPARPEEPT	..SVA VAVVFAAVLVLS	NLMHGLEKLECHHQHHKRAALFEALEKVKAEMLMLVGEI SLLLVVTCDFPIAICHSEPAALVMW 96
CmMLO2	..MAEOGTQRTEETS	..TWA VAVVCFVLLVVIS	IFLHSHVIELTERWLEKRAALFEALEKVKAEMLMLGFI SLLLTI VGD. AVTCTICWSEKELATWTL 94
TM3			
AtMLO2	PCSAEEAAKYGK	..KADAGKKIDGDKPGRRL	LLELAES...YIHRRLSLAKGYDKCAEKGVAFVVSAYGI
AtMLO6	PCSAEEAAKYGK	..KADVFEKEDE...EENLRKLLQLVDS	...LIPRRSLAKGYDKCAEKGVAFVVSAYGM
AtMLO12	PCSNHQEIAKYGK	..DYIDLDDG.....RKIL	LECFDSNDFYSRRNLA
HvMLO	PCKRG...TERR	PSRYVDYQEE
CmMLO2	PCAAR...AKASV	..KVAKNS.....RLR	LLEFLDP...DYGSRRI
TM4			
AtMLO2	IKKRTWKSWEEET	RTIEYOYNSNDEE	REFRFRDTS
AtMLO6	TKKRRNKKWE	DET	RTIEYOYNSHDEE
AtMLO12	TKKRWKSWEEET	RTIEYOYANDDEE	REFRFRDTS
HvMLO	LKKRTWKWEE	DET	TSLIEYOYANDDEE
CmMLO2	TKKSKWKWEE	DET	RTIEYOYVNDDEE
TM5			
AtMLO2	SHEDKFTVVIS	..FVAVLELLTNSY	ELRSYLWLEFELFVAVLL
AtMLO6	SLBEDKFTVVIS	..FVAVLELLTNTN	GLNSYLWLEFELFVAVLL
AtMLO12	SLBEDFTVVIS	..FVAVLELLTNTN	GLNSYLWLEFELFVAVLL
HvMLO	SMBDDKFTVVIS	..FVAVLELLTNTN	GLNSYLWLEFELFVAVLL
CmMLO2	SLBEDKFTVVIS	..FVAVLELLTNTN	GLNSYLWLEFELFVAVLL
TM6			
AtMLO2	LVLFTNAFCLARF	..FASSTYEFNINNG	DEESTAVVIRLVV
AtMLO6	LVLFTNAFCLARF	..FASSTYEFGLKNG	DEESRVVIVIRIS
AtMLO12	LVLFTNAFCLARF	..FASSTYEFGLKNG	DEESRVVIVIRIS
HvMLO	LTLFQNAFQARF	..VATFGLKNG	DEETQIGLSIMKVVV
CmMLO2	FVLFQNAFCLARF	..AVTFRWRC	DEQRIDIAIRLS
TM7			
AtMLO2	...HSGSNT	..FSSSRPT	..FSGSSP
AtMLO6	...TSESTT	..FSSSRPT	..FSGSSP
AtMLO12	...HSGSNT	..FSSSRPT	..FSGSSP
HvMLO	LMAQMGDAT	..FSR	..ESSF
CmMLO2	...NPDST	..FSSSRPT	..FSGSSP
AtMLO2	LASVELPP...IR	...TSKSLR	..ESF
AtMLO6	SSVELPPGPGQ	IR	..TQHEI
AtMLO12	ASVREEK...EIVEH	...VKVDLS	..ET
HvMLO	ASSSALEA.....	..DIPSA	..ES
CmMLO2	TRFARPHQ.....	..EITRS	..ES

图 2 甜瓜 CmMLO2 和其他 MLO 氨基酸序列同源性比较

参照大麦 MLO (Devoto, 1999) 的拓扑结构, 在序列上下的横线标示了 7-TM 跨膜位置 (TM1 ~ TM7)。方框中显示大麦同源的 C 末端 D/E-F-S/T-F 四肽结构序列。

Fig. 2 Alignments of the deduced amino acid of CmMLO2 and other MLOs sequences.

Positions of the seven transmembrane regions (TM1 through TM7) in-ferred from the experimentally determined topology of barley Mlo (Devoto, 1999) are indicated by bars above and below the sequences. The C-terminal D/E-F-S/T-F tetra-peptide sequence, one of several motifs characteristic of barley Mlo orthologs is boxed.

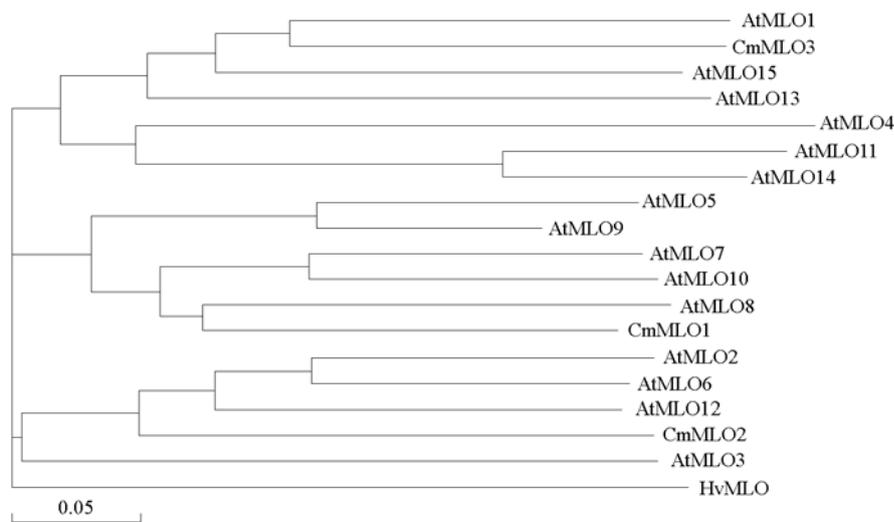


图 3 拟南芥和甜瓜的 MLO 氨基酸序列的系统进化树

Fig. 3 A neighbor-joining phylogenetic tree of Arabidopsis MLOs and CmMLOs

2.2 *CmMLO2* 的 RT-PCR 分析

提取甜瓜不同组织中的总 RNA, 以甜瓜中的 β -actin 基因作为内参照, 进行 RT-PCR 分析。结果表明, *CmMLO2* 在甜瓜的根、茎、子叶、真叶、花、及幼果中均有表达, 但是在叶片中的表达量较高, 在根、茎、子叶、花及幼果中表达量相对较低 (图 4); 因此确定, 甜瓜 *CmMLO2* 基因属于组织特异性表达模式。

在受到白粉病菌侵染情况下, 甜瓜叶片中 *CmMLO2* 在白粉病接种 60 h 后其表达量增加近 10 倍, 在 72 h 时后表达量略微下降 (图 5), 表明 *CmMLO2* 基因可能和白粉病发病有关。

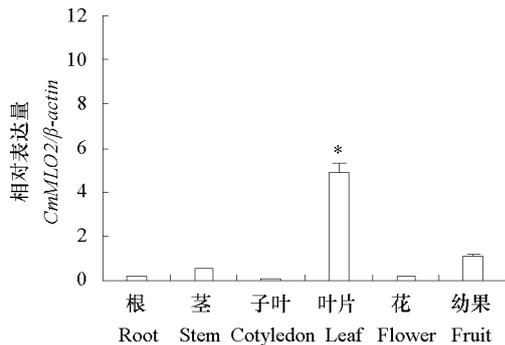


图 4 *CmMLO2* 在甜瓜组织中的相对表达水平

* 基于 *t* 测验的 ($P < 0.05$) 显著水平。

Fig. 4 RT-PCR analysis of the expression of *CmMLO2* genes in different tissues

Bar marked with * were significantly ($P < 0.05$) different based on a *t*-test.

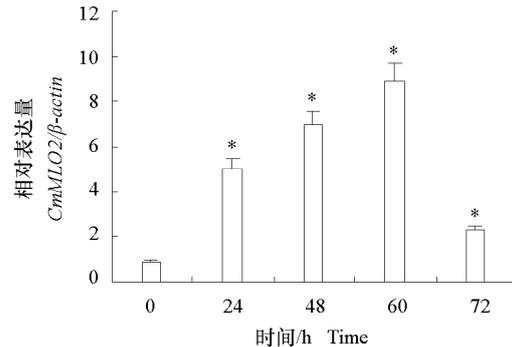


图 5 甜瓜叶片受白粉病诱导后 *CmMLO2* 的相对表达水平

* 基于 *t* 测验的 ($P < 0.05$) 显著水平。

Fig. 5 The expression of *CmMLO2* in leaves after induced with powdery mildew

Bar marked with * were significantly ($P < 0.05$) different based on a *t*-test.

2.3 转化植株 T_0 代的获得及 PCR 鉴定

经过上游表达载体的设计构建, 以及下游转化体系的建立、转化品系的筛选鉴定等一系列步骤后, 获得 T_0 代植株。对转化苗提取 DNA 检测, 以野生型为对照, 进行 PCR 初步筛选, 获得两株阳性植株。

取转基因植株进行 PCR 鉴定 (图 6), 根据所用引物, 扩增出 672 bp 大小产物, 扩增片段大小和预期相符; 野生型对照未有扩增产物。

图 7 显示了从不定芽诱导、伸长、生根及移栽的过程。甜瓜子叶的不定芽诱导率较高, 但是多芽似乎最后发展成为不定叶或叶状体原基, 所以相对成苗率较低。

2.4 转化 T_0 植株接种白粉病病菌的鉴定

转化植株和野生型组培苗在玻璃瓶中驯化 1 周后, 同时移栽到人工气候室, 转化植株很快抽生卷须, 生长势较野生型弱。雄花出现较早。叶色叶形没有明显差异 (图 8)。

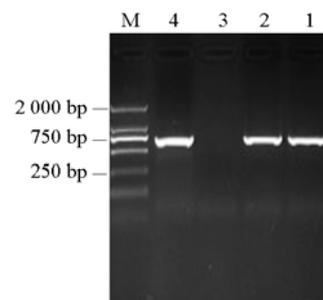


图 6 转基因植株的 PCR 鉴定

1、2: 转化植株; 3: 野生型对照; 4: 质粒; M: DNA 标准分子量。

Fig. 6 Identification of transgenic melon plant with PCR

1, 2: Transgenic plant; 3: Wild-type;

4: Plasmid; M: DNA marker.

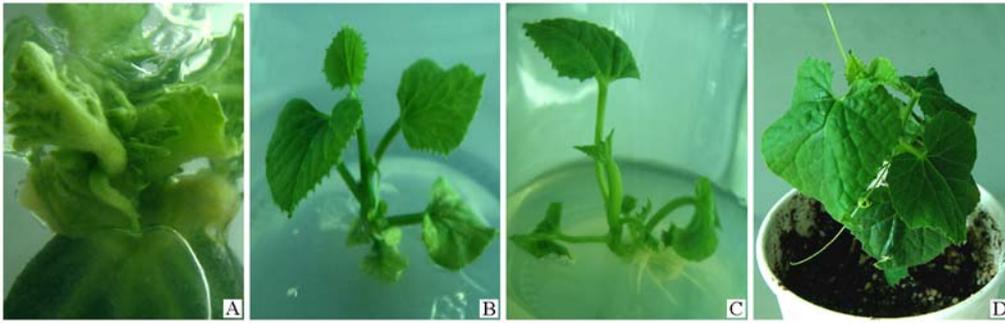


图 7 pFGC1008-CmMLO2 转化不定芽的诱导 (A)、伸长 (B)、生根 (C) 和移栽 (D)

Fig. 7 Adventitious buds (A), elongation (B), root regeneration (C) and culture of pFGC1008-CmMLO2 plants (D)



图 8 转化植株 (Trans) 和野生型植株 (WT) 的表型

Fig. 8 Phenotype of transgenic plant (Trans) and wild-type (WT)

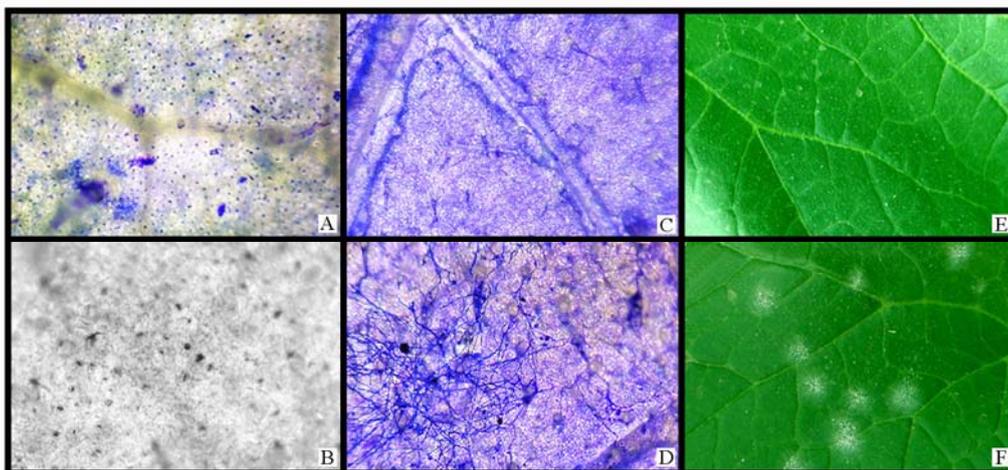


图 9 考马斯亮蓝法检测白粉病侵染

A: 转化株接种白粉病; B: 野生型接种白粉病; C: 转化株接种后 12 h; D: 野生型接种后 12 h; E: 3 d 后转化株叶片;
F: 3 d 后野生型叶面白粉菌斑。

Fig. 9 Morphological structures of *P. santhii* observed by comassie brilliant blue staining

A: Transformants were inoculated with powdery mildew; B: Wild-type inoculated with powdery mildew; C: Transformants were inoculated after 12 h; D: Wild-type were inoculated after 12 h; E: Transformation leaves inoculated after 3 d; F: Wild-type leaves inoculated after 3 d.

对野生型及转化植株接种白粉病菌,利用考马斯亮蓝法染色,菌体被染成深蓝色,转化植株(图 9, A)和野生型(图 9, B)在接种 12 h 后分生孢子开始萌发,3 d 时,转化植株初生芽管没有长出菌丝(图 9, C),而野生型植株的出生芽管和菌丝都清晰可见(图 9, D)。7 d 以后,转化植株叶表面未见白粉菌斑(图 9, E),在野生型叶表面出现分散的褪绿斑点,在褪绿斑点上很快长出成堆的白粉状霉层(图 9, F),出现了明显的白粉病症状。说明转化植株在敲除 *CmMLO2* 基因后,获得了对白粉病菌的抗性。

3 讨论

自从 *MLO* 基因在大麦中被发现以来(Jørgensen, 1992),人们陆续在很多作物中发现了 *MLO* 基因,而原核生物、酵母和动物中均未发现该类基因的存在,说明 *MLO* 是植物所特有(Kim et al., 2002)。根据已有研究成果,*MLO* 在许多作物里呈家族形式,具有多个家族成员,其中拟南芥中有 15 个家族成员(Devoto et al., 2003),在玉米中发现至少有 9 个,在水稻中有 12 个家族成员(Liu & Zhu, 2008),因此推测 *MLO* 在甜瓜里也存在家族基因。在以往的研究过程中,在甜瓜上克隆出了 *CmMLO1* 基因(Cheng et al., 2012),在本研究中,再次克隆了甜瓜的第二个 *MLO* 基因,推导的氨基酸编码的 *MLO* 蛋白均具有跨膜结构,满足 *MLO* 基因的基本特征;系统进化分析表明,*CmMLO2* 和拟南芥 *MLO* 基因的同源性在 53% ~ 58% 左右,这说明 *CmMLO2* 可能是甜瓜 *MLO* 基因家族中的另一重要成员。

前人研究发现,大麦 *MLO* 蛋白对于白粉病菌成功穿过细胞壁至关重要(Freialdenhoven et al., 1996),在拟南芥中,同样存在和白粉病关系密切的 *MLO* 基因,已有研究发现 *AtMLO2*、*AtMLO6* 和 *AtMLO12* 与白粉病发病关系最为密切,*AtMLO2/AtMLO6/AtMLO12* 的三突变体可以对白粉病菌的很多生理小种免疫(Consonni et al., 2006)。在 *CmMLO1* 表达分析中发现,*CmMLO1* 和白粉病发病关系并不明显,其主要与非生物胁迫有关(Cheng et al., 2012),本试验结果表明,*CmMLO2* 与拟南芥的 *AtMLO2*、*AtMLO6*、*AtMLO12* 的遗传距离最近,与 *CmMLO1* 的遗传距离较远,暗示 *CmMLO2* 可能与 *AtMLO2*、*AtMLO6*、*AtMLO12* 具有类似的基因功能。*CmMLO1* 在甜瓜的根、茎、子叶、真叶、花、及幼果中均有表达,但是在各组织中的表达量差别不明显(Cheng et al., 2012),本试验中 *CmMLO2* 在叶片中的表达量较高,在根、茎、子叶、花及幼果中表达量相对较低,说明甜瓜 *CmMLO2* 基因属于组织特异性表达模式。在受到白粉病胁迫 60 h 后,*CmMLO2* 表达量显著上调,说明 *CmMLO2* 蛋白与白粉病的侵染具有密切联系,*CmMLO2* 的高量表达是白粉病菌侵染所必须的,推测 *CmMLO2* 属于感病基因。

利用构建的 *ihpRNAi* 干扰载体,转化感病的厚皮甜瓜子叶,诱导不定芽再生植株途径,获得了甜瓜转化植株,PCR 结果分析表明, *pFGC1008-CmMLO2* 已经整合到基因组。对转化植株进行白粉病接种鉴定,考马斯亮蓝染色结果表明,转化植株叶片表面未见白粉病菌丝生长。*RNAi* 植株没有出现明显的生理缺陷。利用 *RNAi* 技术靶向敲除 *CmMLO2* 后,感病甜瓜材料对白粉菌产生了抗性。

References

- Büsches R. 1997. The barley *Mlo* gene: A novel control element of plant pathogen resistance. *Cell*, 88: 695 - 705.
- Chen Z, Hartmann H A, Wu M J, Friedman E J, Chen J G, Pulley M, Schulze-Lefert P, Panstruga R, Jones A M. 2006. Expression analysis of the *AtMLO* gene family encoding plant-specific seven-transmembrane domain proteins. *Plant Mol Biol*, 60: 583 - 597.
- Cheng Hong, He Qi-wei, Huo Yu-meng, Hou Li-xia, Lü Jun-fen. 2009. Molecular cloning, characterization and expression analysis of *CmAPX*. *Mol*

- Biol Rep, 36 (6): 1531 - 1537.
- Cheng Hong, Kong Wei-ping, Liu Dong-shun, Su Yong-quan, He Qi-wei. 2012. Molecular cloning and expression analysis of *CmMLO1* in melon. Mol Biol Rep, 39 (2): 1903 - 1907.
- Consonni C, Humphry M E, Hartmann H A, Livaja M, Durner J, Westphal L, Vogel J, Lipka V, Kemmerling B, Schulze-Lefert P, Somerville S C, Panstruga R. 2006. Conserved requirement for a plant host cell protein in powdery mildew pathogenesis. Nat Genet, 38: 716 - 720.
- Devoto A. 1999. Topology, subcellular localization, and sequence diversity of the *Mlo* family in plants. J Biol Chem, 274: 34993 - 35004.
- Devoto A, Hartmann H A, Piffanelli P, Elliott C, Simmons C, Taramino G, Goh C S, Cohen F E, Emerson B C, Schulze-Lefert P, Panstruga R. 2003. Molecular phylogeny and evolution of the plant-specific seven-transmembrane *MLO* family. J Mol Evol, 56: 77 - 88.
- Freialdenhoven A, Peterhansel C, Kurth J, Kreuzaler F, Schulze-Lefert P. 1996. Identification of genes required for the function of Non-Race-Specific *mlo* resistance to powdery mildew in barley. Plant Cell, 8: 5 - 14.
- Galperin M, Patlis L, Ovadia A, Wolf D, Zelcer A, Kenigsbuch D. 2003. A melon genotype with superior competence for regeneration and transformation. Plant Breeding, 122: 66 - 69.
- Jørgensen J H. 1992. Discovery, characterization and exploitation of *Mlo* powdery mildew resistance in barley. Euphytica, 63: 141 - 152.
- Kim M, Panstruga R, Elliott C, Müller J, Devoto A, Yoon H, Park H, Cho M, Schulze-Lefert P. 2002. Calmodulin interacts with MLO protein to regulate defence against mildew in barley. Nature, 416: 447 - 450.
- Liu Qing-po, Zhu Hui-qing. 2008. Molecular evolution of the *MLO* gene family in *Oryza sativa* and their functional divergence. Gene, 409: 1 - 10.
- Panstruga R. 2005. Serpentine plant MLO proteins as entry portals for powdery mildew fungi. Biochem Soc Trans, 33: 389 - 392.
- Piffanelli P, Zhou F, Casais C, Orme J, Jarosch B, Schaffrath U, Collins N, Panstruga R, Schulze-Lefert P. 2002. The barley MLO modulator of defense and cell death is responsive to biotic and abiotic stress stimuli. Plant Physiology, 129: 1076 - 1085.
- Qi Xiao-hua, Luo Jing-jing, Mouammar Alfandi, Ma Wei, Xu Qiang, Chen Xue-hao. 2010. Construction of cucumber leaf cDNA library analysis of expressed sequence tag. Acta Horticulturae Sinica, 37 (6): 931 - 938. (in Chinese)
- 齐晓花, 罗晶晶, Mouammar Alfandi, 马威, 徐强, 陈学好. 2010. 黄瓜抗白粉病品系 cDNA 文库构建及 EST 分析. 园艺学报, 37 (6): 931 - 938.
- Zhang Gui-hua, Du Sheng-li, Wang Ming, Ma De-hua. 2004. AFLP markers of cucumber powdery mildew resistance-related gene. Acta Horticulturae Sinica, 31 (2): 189 - 192. (in Chinese)
- 张桂华, 杜胜利, 王鸣, 马德华. 2004. 与黄瓜抗白粉病相关基因连锁的 AFLP 标记的获得. 园艺学报, 31 (2): 189 - 192.

征 订

欢迎订阅《园艺学报》

《园艺学报》是中国园艺学会和中国农业科学院蔬菜花卉研究所主办的学术期刊,创刊于1962年,刊载有关果树、蔬菜、观赏植物、茶及药用植物等方面的学术论文、研究报告、专题文献综述、问题与讨论、新技术新品种以及园艺研究动态与信息,适合园艺科研人员、大专院校师生及农业技术推广部门专业技术人员阅读参考。

《园艺学报》是中文核心期刊,被英国《CAB文摘数据库》、美国CA化学文摘、日本CBST科学技术文献速报、俄罗斯AJ文摘杂志、CSCD中国科学引文数据库等多家数据库收录。《园艺学报》荣获第三届国家期刊奖及“中国精品科技期刊”、“中国权威学术期刊”、“新中国60年有影响力的期刊”、“中国国际影响力优秀学术期刊”等称号。

根据“中国学术期刊影响因子年报(2011版)”,《园艺学报》复合总被引频次为11630,期刊综合总被引频次5317,复合影响因子1.780,期刊综合影响因子1.124。

《园艺学报》为月刊,每月25日出版。每期定价40元,全年480元。国内外公开发售,全国各地邮局办理订阅,国内邮发代号82-471,国外发行由中国国际图书贸易总公司承办,代号M448。漏订者可直接寄款至编辑部订购。编辑部地址:北京市海淀区中关村南大街12号中国农业科学院蔬菜花卉研究所《园艺学报》编辑部;

邮政编码:100081;电话:(010)82109523。E-mail:yuanyixuebao@126.com。网址: <http://www.ahs.ac.cn>。