

## 巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*) *HbMlo7*基因克隆与表达分析

何海霞, 张宇\*, 王萌, 杨叶, 郑服丛

海南大学环境与植物保护学院, 海口570228

**摘要:** *Mlo*基因是一种植物防卫相关基因, 负调控植物白粉病抗性。为解析巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)中*Mlo*基因的结构与功能, 从橡胶树品种‘热研7-33-97’胶乳中扩增了一个*Mlo* cDNA序列, 将其命名为*HbMlo7*。该基因编码499个氨基酸, 分子量为56.85 kDa。蛋白结构分析发现, 该蛋白含有*Mlo*保守结构域, 有一个核定位信号和7个跨膜结构区域, 无信号肽。通过qRT-PCR发现*HbMlo7*基因主要在橡胶树树皮中表达, 其表达量在干旱、机械伤害和白粉菌侵染处理下显著上调。脱落酸(ABA)、乙烯利(ETH)、茉莉酸(JA)和过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)均能诱导橡胶树叶片中*HbMlo7*基因显著上调表达。研究认为*HbMlo7*是植物*Mlo*家族成员, 参与橡胶树的抗逆反应机制和植物激素信号传导途径。

**关键词:** 巴西橡胶树; 基因克隆; 生物信息学; 表达分析

*Mildew resistance locus o (Mlo)*基因是植物广谱高效抗病相关的一类基因。第一个*Mlo*基因是通过图位克隆的方法在大麦(*Hordeum vulgare* L.)中得到的, 其开放阅读框(open reading frame, ORF)序列编码60 kDa蛋白, 定位在质膜上, 具有7个跨膜螺旋区(Büsches等1997)。*Mlo*基因能够负向调控植物的防卫和细胞死亡(Devoto等1999; Kim等2002; Piffanelli等2002)。目前, 对*Mlo*基因的研究已经从开始的单子叶植物大麦延展到双子叶植物, 现已发现的*Mlo*同源基因达到137个左右(Consonni等2006; Elliott等2005; Kaufmann等2012; Kim和Hwang 2012; Shen等2012)。其中, 拟南芥[*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh]中有15个, 烟草(*Nicotiana tabacum* L.)中有1个(鄢晓勇等2012), 黄瓜(*Cucumis sativus* L.)中有14个(夏礼如和钱春桃2013), 葡萄(*Vitis vinifera* L.)中有17个(Feechan等2009), 高粱[*Sorghum bicolor* (L.) Moench]中有13个, 水稻(*Oryza sativa* L.)中有12个, 玉米(*Zea mays* L.)中有9个, 巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.)中有3个(覃碧等2013a, b; Qin等2015), 小麦(*Triticum aestivum* L.)和甜瓜(*Cucumis melo* L.)中各有3个(程鸿等2013)。

天然橡胶主要是由巴西橡胶树胶乳经加工而成。但外界因素如白粉病(powdery mildew)、干旱、机械伤害、植物激素和过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)等对橡胶树的生长过程均有一定的影响。白粉病作为橡胶树的主要病害, 对橡胶树的嫩叶、嫩芽、嫩梢和花序均能造成危害, 严重时对橡胶树的生长和产量均有显著影响, 从而造成较大的经济损失(刘静2010)。伤害和干旱会加重橡胶树各类病虫害的发生, 导致灾害预报和管理成本的进一步增加(李新梅

2010)。因此, 研究橡胶树*Mlo*基因家族成员的结构与功能有助于为橡胶树抗病分子辅助育种提供候选基因。本研究旨在利用*Mlo*基因具有保守序列的特征, 克隆获得橡胶树的*Mlo*基因, 并利用实时荧光定量PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)技术分析橡胶树*Mlo*基因在橡胶白粉菌(*Oidium heveae* B. A. Steinmann)、干旱、机械伤害、植物激素[脱落酸(abscisic acid, ABA)、乙烯利(ethephon, ETH)和茉莉酸(jasmonic acid, JA)]和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理下基因的表达情况, 为其在巴西橡胶树抗逆应用中提供理论参考。

## 材料与方法

### 1 实验材料

用海南大学环境与植物保护学院教学基地的巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.)无性系‘热研7-33-97’正常割胶的成龄树为材料, 进行*Mlo*基因克隆和不同组织的表达分析。用海南大学环境与植物保护学院实验基地种植的巴西橡胶树‘热研7-33-97’品种芽接苗为材料, 进行激素(ABA、ETH和JA)、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、干旱和机械伤害实验。白粉菌侵染实验使用海南大学环境与植物保护学院试验基地种植的巴西橡胶树GT1实生苗为材料。

### 2 实验方法

#### 2.1 总RNA的提取以及cDNA的合成

提取巴西橡胶树不同组织和处理样品中的

收稿 2016-03-10 修定 2016-05-16

资助 国家天然橡胶产业技术体系(CARS-34-GW8)、国家自然科学基金(31460197)、2015年海南省研究生创新科研项目(Hys2015-11)和海南省自然科学基金(314059)。

\* 通讯作者(E-mail: yuzhang\_rain@hainu.edu.cn)。

RNA, 参照庄海燕等(2010)的方法, 使用ThermoFisher Nanodrop 2000超微量核酸蛋白分析仪(Gene Company Limited, 上海)检测所提RNA的浓度和纯度, 再利用甲醛变性凝胶电泳检测RNA的完整性(朱家红2007)。将得到的高质量RNA依照RNA反转录试剂盒(RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas)方法合成cDNA。

## 2.2 橡胶树*Mlo7*基因克隆

根据GenBank上公布的拟南芥和大麦等物种的*Mlo*家族蛋白序列, 在橡胶树EST和转录组数据库中做blastx搜索同源的EST片段, 通过拼接得到橡胶树*Mlo*基因的cDNA序列。采用 Primer Premier 5.0 (PREMIER Biosoft, USA)软件设计基因特异引物*HbMlo7-F* (5'-ATAAATAAGTGCCCTGAAG-ACACAG-3')和*HbMlo7-R* (5'-CAAAGCAATTCT-GGAATATTAGCTC-3'), 用反转录得到的cDNA为模板, 扩增橡胶树胶乳中*Mlo7*的cDNA序列。

## 2.3 巴西橡胶树*HbMlo7*基因结构分析

使用NCBI ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)预测基因的编码区序列以及氨基酸序列, 再通过ExPASy ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)分析巴西橡胶树*Mlo7*蛋白的理化性质, 通过NCBI Conserved Domains数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)、SMART在线分析软件([http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set\\_mode.cgi?NORMAL=1](http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1))和TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)分析其结构域, 用SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)分析信号肽结构, 亚细胞定位使用PSORT Prediction (<http://psort.hgc.jp/form.html>)进行分析。最后在NCBI蛋白数据库中通过blastp搜索其他物种的*Mlo*同源蛋白并获取其序列, 利用DNAMAN 6.0 (Lynnon LLC., San Ramon, CA)软件进行序列比对。

## 2.4 巴西橡胶树*HbMlo7*基因表达分析

机械伤害处理采用Piffanelli等(2002)的方法, 采集处理前的叶片和处理0.5、1、2、6和12 h后的叶片。干旱处理采用Wang (2014)的方法, 在处理前采集芽接苗叶片作为处理0 d的样品, 当天上午10:00开始干旱处理, 第2天上午10:00采样作为处理1 d后的样品, 第3天上午10:00采样作为处理2 d

后的样品, 以此类推, 采集处理3、4、5、6、7、8、9和10 d后的样品。白粉菌侵染处理采用Wang等(2014b)的方法, 采集接种后白粉菌盛发期和后期的叶片作为材料, 根据伤害程度分为0、1、3、5和7级叶片, 进行表达分析。在芽接苗上分别喷施200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ABA、1.0% (V/V) ETH、200  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  JA和2% (V/V)  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 所有药剂用0.05% (V/V)乙醇进行溶解, 对照植株喷施0.05%乙醇水溶液, 收集处理前和处理完成后0.5、2、6、10、24、48和72 h的叶片, 将收集到的叶片置于 $-80^\circ\text{C}$ 冰箱保存备用(Qin等2015)。

根据*HbMlo7*序列设计qRT-PCR的引物*HbMlo7-QF* (5'-TAATGGGAGAAGTTGGTTACAT-CAT-3')和*HbMlo7-QR* (5'-TGTTTCAT-CAAATATTGCTTTCTTGA-3'), 以反转录的cDNA为模板, 橡胶树*HbACTIN* (F: 5'-GATGTGGATAT-CAGGAAGGA-3'; R: 5'-CATACTGCTTGGAG-CAAGA-3'), *Hb18sRNA* (F: 5'-GCTCGAAGAC-GATCAGATACC-3'; R: 5'-TTCAGCCTTGCGA-CCATAC-3')和*HbUBC4* (F: 5'-TCCTTATGA-GGGCGGAGTC-3'; R: 5'-CAAGAACCGCA-CTTGAGGAG-3')为内参基因引物序列, 利用qRT-PCR技术分析*HbMlo7*基因在不同组织和机械伤害、干旱、白粉菌、激素、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 处理下的表达模式(康桂娟等2014)。

## 2.5 统计分析

基因表达为2次生物重复和3次技术重复的平均值 $\pm$ 标准误。使用SAS 9.1.3软件进行统计分析。采用单因素方差分析和Duncan检验分析各处理下不同时间段之间的差异显著性。使用Origin 2015科技绘图软件和Adobe Photoshop CS5作图。

## 实验结果

### 1 巴西橡胶树*HbMlo7*基因克隆与生物信息学分析

从‘热研7-33-97’胶乳中克隆得到的*Mlo* cDNA全长为1 848 bp, 被命名为*HbMlo7*。经过分析, 该基因的ORF为1 500 bp, 编码由499个氨基酸组成的稳定性蛋白质(图1)。该蛋白的分子量为56.85 kDa, 等电点为9.21, 分子式为 $\text{C}_{2656}\text{H}_{4063}\text{N}_{671}\text{O}_{682}\text{S}_{17}$ , 总原子数为8 089。根据cDNA序列推导出该蛋白氨基酸组成与其他植物如胡杨*PeMlo1* (*Populus*

```

1 ATGGCGGAAGGAGGAACAACCTTGGAGTATACTCCTACATGGGTGGTCGCTGTTGTTTGCACGTGTTTTT
1 M A E G G T T L E Y T P T W V V A V V C T V F
70 GTGGTCATATCTCTTGCTGTTGAAAAGGTTCCCTTCACTATCTTGGCAAAGTTGTTGAAGAAAAAACCAG
24 V V I S L A V E R F L H Y L G K L L K K K N Q
139 AAACCCCTCTTCGAAAGCCTTGCAGAAGATCAAAGAAGAATTAATGCTTTTGGGGTTCATATCGCTGCTA
47 K P L F E A L Q K I K E E L M L L G F I S L L
208 CTGACTGTGTTCCAAGGTAGGATTACCTCAATCTGCATATCAGAGAAAGTTGGCTAATAAATGGCTACCT
70 L T V F Q G R I T S I C I S E K L A N K W L P
277 TGCAAGAAACAAATCAGACGCCACTGGTACTGCCCATTTTAAGGCCTTCTTCTTTCTTCCCTGGTGGG
93 C K N K S D A T G T A H F K A F F S F F P G G
346 TCTGCTCGTCGCTTCTAGCTGAGTCCCTGACTCCGCTCTTCTGTCAGCAAGGAAAGGTTCOAATT
116 S A R R L L A E S S D S A S S C S K G K V P I
415 TTATCTACAACCTGCATTGCATCATCTTCATATATTTATCTTTGTTCTAGCTTGTGTGCATGTGGTTTTT
139 L S T T A L H H L H I F I F V L A C V H V V F
484 TGTGCTCTAACCATACTTTTCGAAAGTGCAAAAGATAAGACAGTGGAAAGCACTGGGAAGATTCTGTCTCA
162 C A L T I L F G S A K I R Q W K H W E D S V S
553 AATAAGGAGTATGACATTGAAGAAGCAAAAAGCTCAAAGTTACACATGTTTCATGATCAGCATTTTATC
185 N K E Y D I E E A K S S K V T H V H D H D F I
622 AAGAACCAGGTTTCGGGGTATTGGAAAAAATTCTACTTGATGGGTTGGGTGCATTCACTTCTCAAGCAG
208 K N R F R G I G K N F Y L M G W V H S F F K Q
691 TTTTATGGGTCTATAAATAAATCTGATTATATCACATTGCGACTGGGCTTCATTATGACTCATTGCAGG
231 F Y G S I N K S D Y I T L R L G F I M T H C R
760 GGAAACCCAAAATTTAATTTTCAAGTACATGATGCGTGTCTTGAAGCTGACTTCAAGAAAGTTGTT
254 G N P K F N F H K Y M M R A L E A D F K K V V
829 GGAATAAGTTGGTATCTTTGGATATTTGTGTTGTTTTCTTGTCTGCTGAATGTTGCTGTTGGCCTGCT
277 G I S W Y L W I F V V F L L L N V A G W H A
898 TATTTCTGATCGCATTTCATCCCTTCACTTCTTACTAGCAGTGGTACTAAGTTGGAGCATATAATT
300 Y F W I A F I P F I L L L A V G T K L E H I I
967 ATCCAATTAGCCCATGAGGTTGCTGAGAAAACATGTAGCAGTTGAGGGGACTTGGTTGTTCAACCTTCT
323 I Q L A H E V A E K H V A V E G D L V V Q P S
1036 GATGATCACTTCTGGTTCCACAGACCTCGGATTGTTCTCATTTTGTCCACATCATCCTATTCCAAAAT
346 D D H F W F H R P R I V L I L I H I I L F Q N
1105 TCTTTTGAACCTGCAATTTTCTTCTGGATATGGGTACAATATGGTTTTGACTCCTGTATAATGGGAGAA
369 S F E L A F F F W I W V Q Y G F D S C I M G E
1174 GTTGGTTACATCATTCCAAGACTCATCATAGGGGCTTTCATCCAGTTCGTCTGCAGCTATAGTACCTTA
392 V G Y I I P R L I I G A F I Q F V C S Y S T L
1243 CCACTGTATGCAATTGTCACACAGATGGGAAGTTCAATCAAGAAAGCAATATTTGATGAACATATTCAA
415 P L Y A I V T Q M G S S F K K A I F D E H I Q
1312 GAGGGTCTTGTGTTGGGCTAAGCAGGCCAAAAAGAACAGTTCCTTAGAAAAGGCTGCTAATGGCTCT
438 E G L V G W A K Q A K K K T V L R K A A N G S
1381 AGCCAAGTTGGTCAAGGAGGATTCCCTCGGGCAGTCCGTGTTAACAAAAATAGGTTTCAGAGAGATCT
461 S Q V G H K E D S P G A V L L T K I G S E R S
1450 ACAACTGAAGAGAGAAAAGCAGGAGAGATTTTCGCAAGAAAACCTACCCCTGA
484 T T E E R K A G E I S Q E N Y P *

```

图1 *HbMlo7*基因编码区的核苷酸和推导氨基酸序列Fig.1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *HbMlo7* coding region

*euphratica* Oliv., XP\_011004548.1)、蓖麻RcMlo (*Ricinus communis* L., XP\_002533335.1)、麻风树 JcMlo1 (*Jatropha curcas* L., XP\_012081938.1)和杨树 PtMlo (*Populus trichocarpa* Torr. & Gray, XP\_006372313.1和XP\_006372312.1)氨基酸的相似性分别为80%、83%、84%、81%和80%(图2)。

用NCBI Conserved Domains分析发现, 该蛋白在4~470 aa之间存在一个Mlo超家族保守结构域(图3-A)。根据PSORT分析亚细胞定位发现该基因编码的蛋白在内质网膜、内质网囊腔、质膜和高尔基体中存在的几率分别是0.685、0.100、0.640和0.460, 表明其主要定位在内质网膜上(图3-B)。

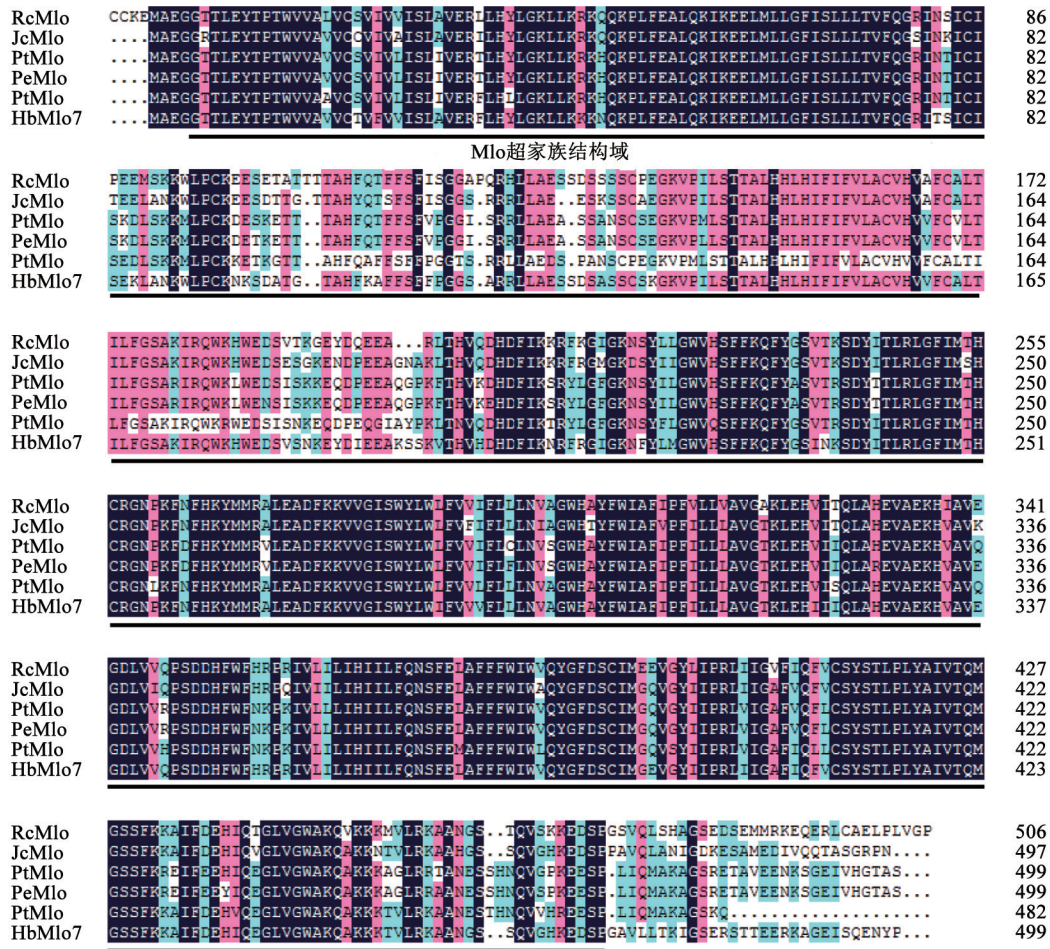


图2 橡胶树HbMlo7与其他植物Mlo蛋白序列多重比对

Fig.2 Multiple protein sequence alignment of HbMlo7 with other Mlo proteins

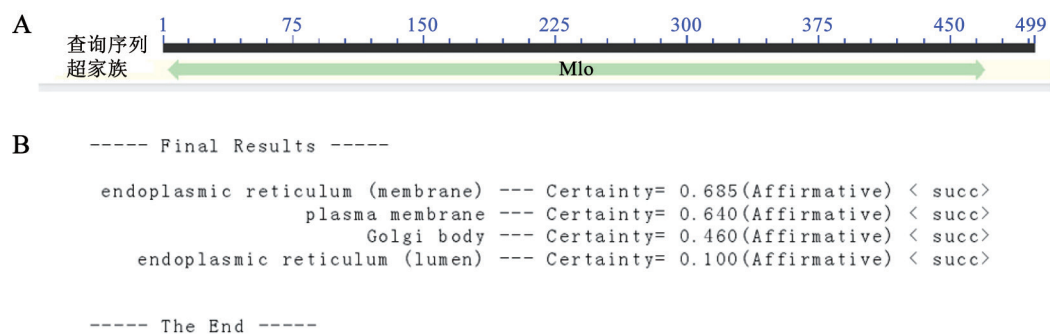


图3 HbMlo7蛋白的保守结构域和亚细胞定位分析

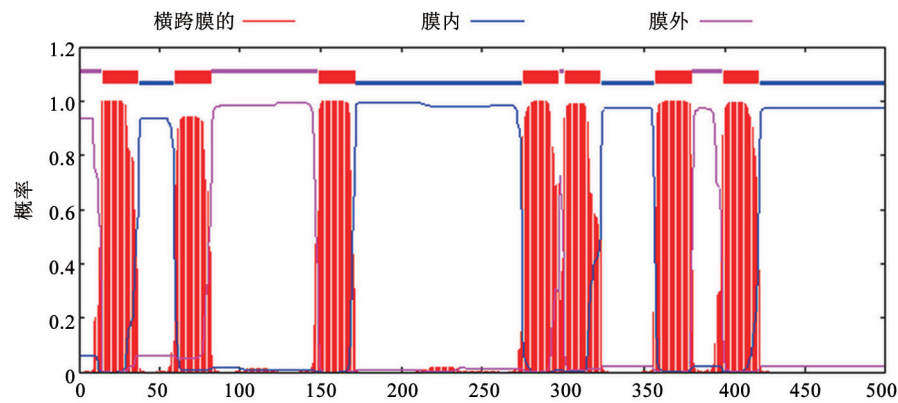
Fig.3 The analysis of the conserved domain and subcellular localization of HbMlo7 protein

如图4, 通过SMART和TMHMM Server v. 2.0分析发现该蛋白分别在15~37、60~82、149~171、275~297、301~323、357~379和399~421 aa处形成7次跨膜结构域。在对蛋白进行生物信息学分析

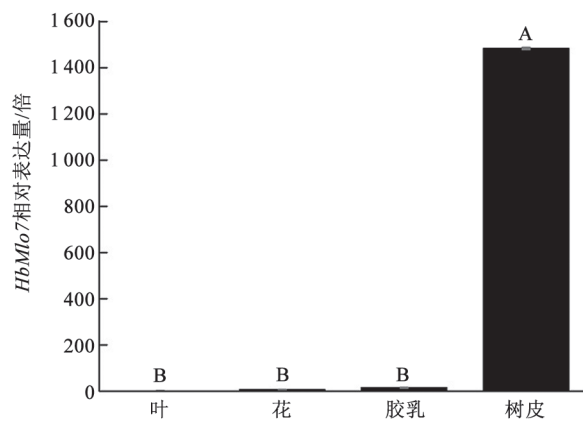
时还发现, 在485~494 aa间存在一个核定位信号(nuclear localization signal, NLS), 没有信号肽。

### 2 HbMlo7基因的表达分析

通过qRT-PCR数据分析发现, HbMlo7基因在

图4 *HbMlo7*蛋白的跨膜结构预测Fig.4 The prediction of transmembrane domains of *HbMlo7* protein

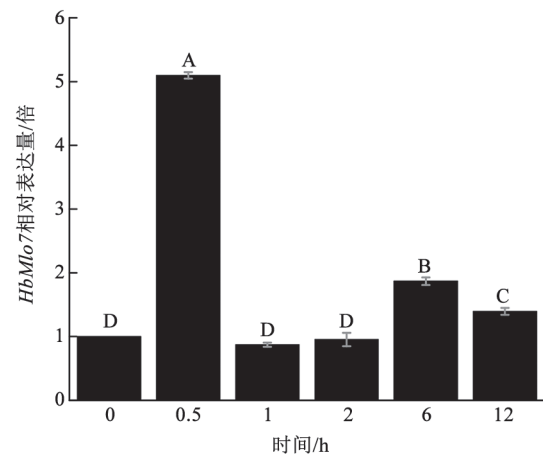
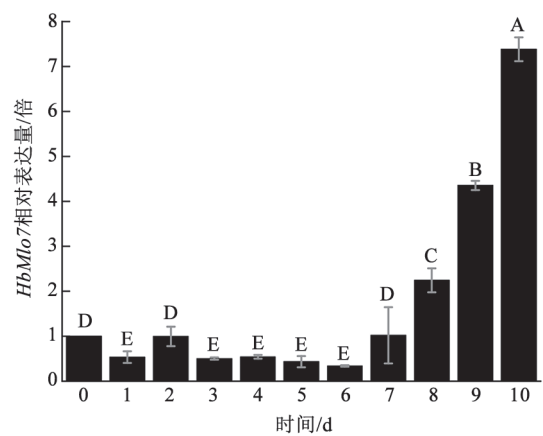
橡胶树不同组织中的表达情况如图5所示。*HbMlo7*基因在橡胶树的叶、花、胶乳和树皮中均有所表达,但在叶、花和胶乳中的表达量相对极低,树皮中的表达量则达到了叶的1 500倍左右,表明*HbMlo7*基因在橡胶树的各组织中是特异性表达,且主要作用于树皮中。

图5 *HbMlo7*基因在叶、花、胶乳和树皮中的表达分析Fig.5 Expression analysis of *HbMlo7* in leaf, flower, latex and bark

各柱形上用不同大写字母标识表示数据间差异极显著( $P < 0.01$ ),下同。

在经机械伤害处理的叶片中,*HbMlo7*基因的表达水平在处理0.5 h后显著上调,达到处理前的5.2倍,随后又立即显著下调到处理前水平,直到处理6 h后又有所上调。表明*HbMlo7*基因在橡胶树机械伤害的早期就起到调节作用(图6)。

干旱处理下,基因*HbMlo7*在处理1 d后便显著

图6 机械伤害处理下橡胶树叶片中*HbMlo7*基因的表达分析  
Fig.6 Expression analysis of *HbMlo7* in *H. brasiliensis* leaves under wounding treatment图7 橡胶树叶片中*HbMlo7*基因在干旱条件下的表达分析  
Fig.7 Expression analysis of *HbMlo7* in *H. brasiliensis* leaves after non-irrigation treatment

下调表达,直到处理8 d后干旱诱导该基因显著性上调表达。随着处理时间的延长, *HbMlo7*基因表达量持续显著性上调,至处理10 d后,该基因的表达水平达到处理前的7.2倍。说明*HbMlo7*基因参与橡胶树的干旱胁迫响应机制。

白粉菌侵染橡胶树后, *HbMlo7*基因的表达情况如图8所示。随着白粉菌侵染的加重, *HbMlo7*基因的表达量显著下调。在5级病害时,基因的表达量相对处理前下调了10倍。说明白粉菌侵染会导致*HbMlo7*基因表达的显著下降。

在 $H_2O_2$ 和不同激素的作用下,橡胶树*HbMlo7*基因的表达量均显著上调。如图9所示, *HbMlo7*基因在ABA、ETH、JA和 $H_2O_2$ 分别处理后的0.5 h表达量均显著上调。在ABA处理后0.5 h, *HbMlo7*基因在橡胶树中的表达量达到处理前的6倍;处理后72 h,表

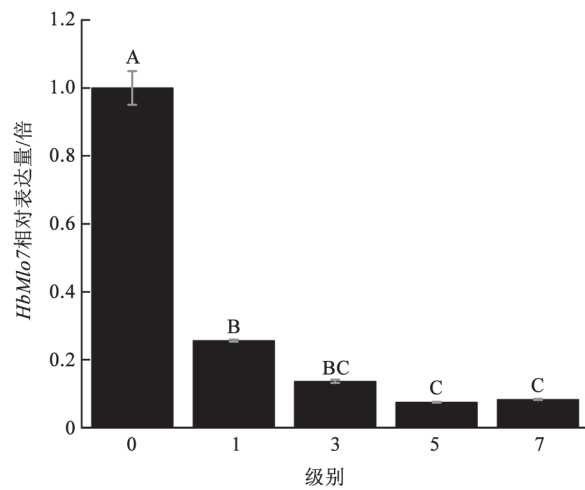


图8 橡胶树叶片中*HbMlo7*在白粉菌侵染下表达分析  
Fig.8 Expression analysis of *HbMlo7* in *H. brasiliensis* leaves under powdery mildew infection

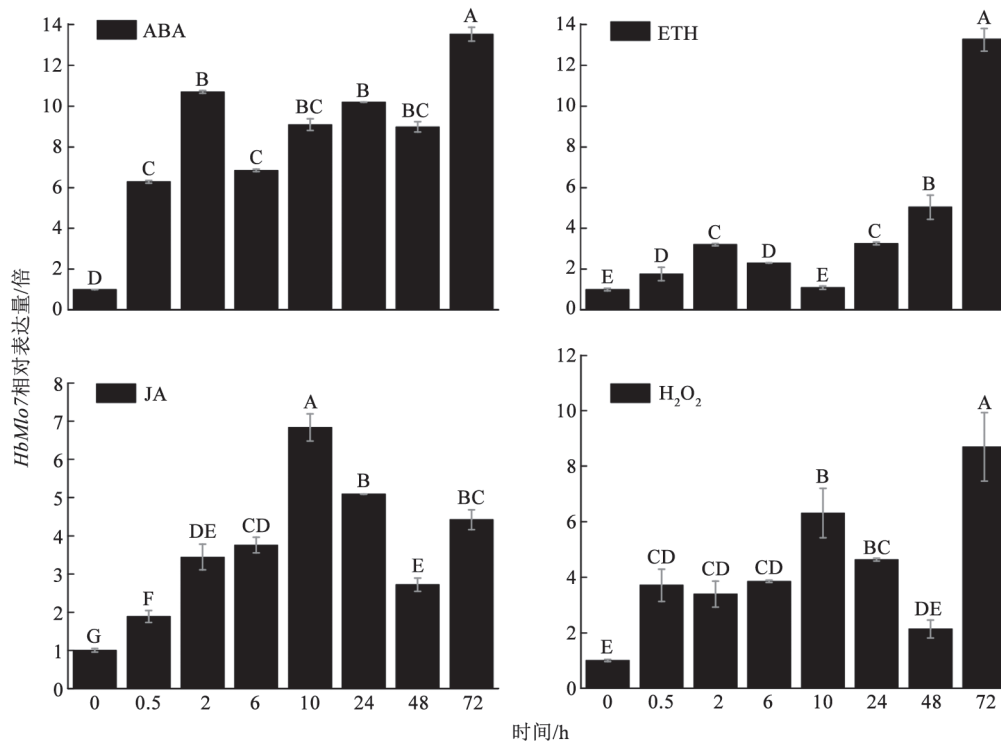


图9 不同激素和 $H_2O_2$ 处理下橡胶树叶片中*HbMlo7*基因的表达分析  
Fig.9 Expression analysis of *HbMlo7* in *H. brasiliensis* leaves under different hormones and  $H_2O_2$  treatments

达量是处理前的13倍。ETH作用下基因表达量变化规律同ABA相似,同样在处理72 h达到表达水平最高点。JA的处理过程中, *HbMlo7*基因在处理10 h达到表达量最高点,是处理前的7倍;随后,表达量持续下降,但仍高于处理前水平。用 $H_2O_2$ 处理

后0.5 h, *HbMlo7*基因表达量是处理前的3.8倍;随后持续稳定,直到处理后10 h再次显著上调;在处理72 h, *HbMlo7*基因表达量是处理前的8.5倍。由此可以看出, *HbMlo7*基因受激素和 $H_2O_2$ 的诱导显著上调表达,表明该基因参与激素信号传导过程。

## 讨 论

*Mlo*基因作为抗白粉病相关的一类基因, 在大麦(Büsches等1997)、拟南芥(Consonni等2006)和水稻、小麦(Elliott等2005)等植物抗病机制研究以及抗病育种中具有重要地位。Wang等(2014b)首次在六倍体小麦中对*Mlo*基因的3个拷贝同时进行了突变, 获得了对白粉病具有广谱抗性的小麦材料, 而在橡胶树中*Mlo*基因的相关报道还甚少。研究发现橡胶树*HbMlo7*基因编码的蛋白分子大小为56.85 kDa, 在大麦中克隆的第一个*Mlo*基因编码得到的蛋白分子大小为60 kDa。对*HbMlo7*蛋白的结构域预测分析显示, 该蛋白在4~470 aa之间存在一个*Mlo*超家族保守结构域, 而在这段保守结构域中存在7次跨膜结构域, 这与橡胶树*Mlo*家族中*HbMlo1* (Qin 2015)以及大麦*HvMlo*的结构相同(Devoto等1999), 但*HbMlo8* (登记号: AHF52923.1)和*HbMlo9* (登记号: AHF52924.1)分别在20~420和31~506 aa处存在8和9个跨膜结构域。同时发现橡胶树*HbMlo7*在485~494 aa存在一个NLS, 其蛋白定位与橡胶树的*HbMlo1*和蓖麻的*RcMlo1*和*RcMlo6*的相同(覃碧等2014), 主要定位在内质网膜上, 橡胶树*HbMlo9*、大麦*HvMlo*和大豆*GmMlo*蛋白则主要定位在细胞质膜上(Devoto等1999; Deshmukh等2014), 拟南芥*AtMlo5* (NP\_180923.1)定位在细胞质中, 橡胶树*HbMlo8*主要定位在叶绿体类囊体膜上。同橡胶树*HbMlo7*蛋白相同, 蓖麻、大麦、小麦、水稻和番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.)的*Mlo*蛋白都不存在N端信号肽结构(覃碧等2014), 橡胶树*HbMlo9*和拟南芥的3个蛋白*AtMlo7* (NP\_179335.3)、*AtMlo8* (NP\_565416.1)以及*AtMlo10* (NP\_201398.1)则具有N端信号肽。将橡胶树中克隆得到的*HbMlo7*基因推导的氨基酸序列与胡杨、蓖麻、麻风树和杨树*Mlo*基因的氨基酸序列进行比对分析发现, *HbMlo7*基因与麻风树的同源性达到84%。以上分析说明*HbMlo7*基因是植物*Mlo*家族成员。

巴西橡胶树作为热带经济植物, 很多外在因素都会对其生长有着调控作用。本研究利用qRT-PCR技术, 探究*HbMlo7*基因在橡胶树不同组织和生长过程中不同逆境条件下基因的表达量水平,

结果发现*HbMlo7*基因在橡胶树树皮中显著表达, 是叶片中的1 500倍, 说明*HbMlo7*基因在橡胶树中的表达具有组织特异性, 这与拟南芥*AtMlo7*基因和橡胶树*HbMlo1*基因的表达相似, *AtMlo7*基因主要在花粉粒中表达, 在其他组织中不表达或者表达量很低(Chen 2006), 橡胶树*HbMlo1*基因在橡胶树叶片中高度表达(Qin等2015)。在白粉菌侵染作用下, *HbMlo7*基因的表达水平显著下调, 但白粉菌对*HbMlo1*基因没有诱导作用。葡萄*VvMlo7*和*VvMlo13* (张小莹2015)、甜瓜叶片中*CmMlo2* (程鸿等2013)、月季(*Rosa chinensis* Jacq.) *RhMlo1*和*RhMlo2* (邱显钦2015)等大多数植物*Mlo*基因大多是随着白粉菌侵染的加重表达差异性显著上调或先上升后下降。本研究在机械伤害和干旱处理中发现, *HbMlo7*基因在两种逆境作用下均显著上调表达, 说明该基因在橡胶树逆境中有防卫调控作用。ETH能够提高橡胶产量(朱家红等2009), 但浓度过高时会刺激橡胶树死皮率的增加(张云霞等2006)。在ETH处理下, 橡胶树*HbMlo7*基因表达量显著上调, 在处理72 h时表达量达到处理前的13倍, 说明*HbMlo7*基因参与橡胶树ETH的信号传导过程, 进而调节ETH对橡胶的刺激和死皮的防控过程。ABA和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>在植物面临环境胁迫以及调节植物的生长发育等诸多生理过程中有着重要的作用(宋喜贵和余小平2010; 刘红娟等2008)。在ABA和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>作用下, *HbMlo7*基因的表达水平同ETH作用下的具有相同的变化规律, 推测*HbMlo7*基因参与植物体内ABA和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的信号传导过程, 以此影响橡胶树在逆境中的生长状况。有研究发现JA能够诱导橡胶树的乳管分化并促进橡胶生物合成(Zheng等2009; Tian等2010)。在本研究中, JA的处理使*HbMlo7*基因的表达水平先显著上调, 到达处理10 h, 基因显著下调表达, 说明*HbMlo7*基因同样参与JA对植物生长调节的信号传导途径。本研究为探究*HbMlo7*基因在橡胶树抗逆境反应机制和植物激素信号传导途径中的功能以及培育优质橡胶树品种提供了理论参考。

## 参考文献

- Büsches 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
- Chen Z, Hartmann HA, Wu MJ, Friedman EJ, Chen JG, Pulley M, Schulze-Lefert P, Panstruga R, Jones AM (2006). Expression analysis of the *AtMLO* gene family encoding plant-specific seven-transmembrane domain proteins. *Plant Mol Biol*, 60: 583–597
- Cheng H, Kong WP, He QW, Wang XW (2013). *CmMLO2*: a novel gene closely associated with the powdery mildew in melon. *Acta Horticult Sin*, 40 (3): 540–548 (in Chinese with English abstract) [程鸿, 孔维萍, 何启伟, 王晓巍(2013). *CmMLO2*: 一个与甜瓜白粉病感病相关的新基因. *园艺学报*, 40 (3): 540–548]
- 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
- 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 Genom*, 289: 345–359
- Devoto A, Piffanelli P, Nilsson IM, Wallin E, Panstruga R, von Heijne G, Schulze-Lefert P (1999). Topology, subcellular localization, and sequence diversity of the *Mlo* family in plants. *J Biol Chem*, 274 (49): 34993–35004
- Elliott C, Müller J, Miklis M, Bhat RA, Schulze-Lefert P, Panstruga R (2005). Conserved extracellular cysteine residues and cytoplasmic loop-loop interplay are required for functionality of the heptahelical *MLO* protein. *Biochem J*, 385 (1): 243–254
- Feechan A, Jermakow AM, Dry IB (2009). Grapevine *MLO* candidates required for powdery mildew pathogenicity? *Plant Signal Behav*, 4 (6): 522–523
- Kang G, Li Y, Zeng R (2014). Clone and expression of *HbNAC24* gene from *Hevea brasiliensis*. *Acta Bot Boreo-Occident Sin*, 34 (12): 2374–2381 (in Chinese with English abstract) [康桂娟, 黎瑜, 曾日中(2014). 巴西橡胶树 *HbNAC24* 基因克隆和表达分析. *西北植物学报*, 34 (12): 2374–2381]
- Kaufmann H, Qiu X, Wehmeyer J, Debener T (2012). Isolation, molecular characterization, and mapping of four rose *MLO* orthologs. *Front Plant Sci*, 3: 244
- 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 (5): 843–855
- Kim MC, Panstruga R, Elliott C, Müller J, Devoto A, Yoon HW, Park HC, Cho MJ, Schulze-Lefert P (2002). Calmodulin interacts with *MLO* protein to regulate defence against mildew in barley. *Nature*, 416 (6879): 447–451
- Li X (2010). Rubber tree management during drought period. *Fort World*, (5): 31 (in Chinese) [李新梅(2010). 干旱期橡胶树的管理. *致富天地*, (5): 31]
- Liu H, Liu Y, Liu L (2008). Progress of research on the influence of abscisic acid in plant resistance. *Biotechnol Bull*, (6): 7–9 (in Chinese with English abstract) [刘红娟, 刘洋, 刘琳(2008). 脱落酸对植物抗性影响的研究进展. *生物技术通报*, (6): 7–9]
- Liu J (2010). Recent advances in rubber powdery mildew research. *Trop Agric Sci Technol*, 33 (3): 1–5 (in Chinese with English abstract) [刘静(2010). 橡胶树白粉病的研究进展. *热带农业科技*, 33 (3): 1–5]
- Piffanelli P, Zhou F, Casais C, Orme J, Jarosch B, Schaffrath U, Collins NC, Panstruga R, Schulze-Lefert P (2002). The barley *MLO* modulator of defense and cell death is responsive to biotic and abiotic stress stimuli. *Plant Physiol*, 129 (3): 1076–1085
- Qin B, Wang M, Lin J, Zheng F, Zhang Y (2013a). Molecular cloning and sequence analysis of *HbMlo9* in *Hevea brasiliensis*. *Chin J Trop Agric*, 33 (8): 47–52 (in Chinese with English abstract) [覃碧, 王萌, 林雨见, 郑服丛, 张宇(2013a). 巴西橡胶树 *HbMlo9* 基因克隆及其序列特征分析. *热带农业科学*, 33 (8): 47–52]
- Qin B, Wang M, Liu Q, Zhang Y (2014). Identification and sequence characterization of *Mlo* gene family from the genome of *Ricinus communis* L. *Chin Agric Sci Bull*, 30 (15): 268–273 (in Chinese with English abstract) [覃碧, 王萌, 刘巧玲, 张宇(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, Xue S, Hu Z, Zheng F, Zhang Y (2013b). Cloning and sequence characterization of a *Mlo* gene in *Hevea brasiliensis* Mull. Arg. *Chin Agric Sci Bull*, 29 (31): 21–26 (in Chinese with English abstract) [覃碧, 王萌, 薛松, 胡中昀, 郑服丛, 张宇(2013b). 巴西橡胶树 1 个 *Mlo* 基因克隆及其序列特征分析. *中国农学通报*, 29 (31): 21–26]
- Qin B, Zheng F, Zhang Y (2015). Molecular cloning and characterization of a *Mlo* gene in rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *J Plant Physiol*, 175: 78–85
- Qiu X (2015). Cloning and functional analysis of powdery mildew resistance gene *Mlo* in rose (PhD thesis). Wuhan: Huazhong Agricultural University (in Chinese with English abstract) [邱显钦(2015). 月季抗白粉病基因 *Mlo* 的克隆和功能分析(博士论文). 武汉: 华中农业大学]
- Shen Q, Zhao J, Du C, Xiang Y, Cao J, Qin X (2012). Genome-scale identification of *MLO* domain-containing genes in soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Genes Genet Syst*, 87 (2): 89–98
- Song XG, She XP (2010). The generation and the role of hydrogen peroxide in plant. *J Lianyungang Teach Coll*, 12 (4): 99–103 (in Chinese with English abstract) [宋喜贵, 余小平(2010). 植物体内过氧化氢的产生及其生理作用. *连云港师范高等专科学校学报*, 12 (4): 99–103]
- Tian C, Ye F, Wang L, Deng Y, Dong Y, Wang X, Xu T, Lei T, Wang X (2010). Nitric oxide inhibits ghrelin-induced cell proliferation and ERK1/2 activation in GH3 cells. *Endocrine*, 38 (3): 412–416
- Wang LF (2014). Physiological and molecular responses to drought stress in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). *Plant Physiol Biochem*, 83: 243–249
- Wang LF, Wang M, Zhang Y (2014a). Effects of powdery mildew infection on chloroplast and mitochondrial functions in rubber tree. *Trop Plant Pathol*, 39 (3): 242–250
- Wang Y, Cheng X, Shan Q, Zhang Y, Liu J, Gao C, Oiu JL (2014b). Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol*, 32 (9): 947–952
- Wu X, Pan Z, Li P, Feng Y, Shen X (2012). Silicon cloning and sequence characteristics of a *Mlo* gene from *Nicotiana tabacum*.



- J Chengdu Univ-Nat Sci, 31 (2): 103–107 (in Chinese with English abstract). [郭晓勇, 潘智慧, 李萍, 封叶, 沈雪(2012). 一个烟草*Mlo*基因的电子克隆及其序列特性分析. 成都大学学报(自然科学版), 31 (2): 103–107]
- Xia L, Qian C (2013). Identification and bioinformatics analysis of *Mlo* gene family members in *Cucumis sativus* L. Jiangsu Agric Sci, 41 (2): 17–20 (in Chinese) [夏礼如, 钱春桃(2013). 黄瓜*MLO*型基因家族成员的鉴定及生物信息学分析. 江苏农业科学, 41 (2): 17–20]
- Zhang X (2015). Cloning and expression analysis of powdery mildew resistance-related gene *Mlo* and  $\gamma$ 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 $\gamma$ 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, Chen S, Deng Z (2006). Advances on the research of tapping panel dryness in *Hevea brasiliensis*. Chin J Trop Agric, 26 (5): 56–61, 65 (in Chinese with English abstract) [张云霞, 陈守才, 邓治(2006). 橡胶树死皮病研究进展. 热带农业科学, 26 (5): 56–61, 65]
- Zheng R, Duan C, Li X, Tian W, Nie Z (2009). Vacuolar-type inorganic pyrophosphatase located on the rubber particle in the latex is an essential enzyme in regulation of the rubber biosynthesis in *Hevea brasiliensis*. Plant Sci, 176 (5): 602–607
- Zhu J (2007). Cloning and expression analysis on of cysteine protease gene *HbCPI* from *Hevea brasiliensis* (Master's thesis). Danzhou: South China University of Tropical Agriculture (in Chinese with English abstract) [朱家红(2007). 巴西橡胶树半胱氨酸蛋白酶基因*HbCPI*的克隆与表达分析(硕士论文). 儋州: 华南热带农业大学]
- Zhu JH, Zhang QQ, Cai YB, Zhang ZL (2009). Cloning and expression analysis of vacuolar ATPase subunit F gene from *Hevea brasiliensis*. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 29 (6): 1079–1083 (in Chinese with English abstract). [朱家红, 张全琪, 蔡元保, 张治礼(2009). 巴西橡胶树液泡ATP酶F亚基基因克隆及表达. 西北植物学报, 29 (6): 1079–1083]
- Zhuang H (2010). Cloning and preliminary expression analysis stimulated by ethephon on aquaporin genes from *Hevea brasiliensis* (Master's thesis). Yangling: North West Agriculture and Forestry University (in Chinese with English abstract). [庄海燕(2010). 巴西橡胶树水通道蛋白基因cDNA的克隆及其在乙烯利刺激下表达的初步分析(硕士论文). 杨陵: 西北农林科技大学]

## Molecular cloning and characterization of *HbMlo7* gene in rubber tree (*Hevea brasiliensis*)

HE Hai-Xia, ZHANG Yu\*, WANG Meng, YANG Ye, ZHENG Fu-Cong

Environment and Plant Protection College, Hainan University, Haikou 570228, China

**Abstract:** Mildew resistance locus *o* (*Mlo*) is a defence-related gene in plant, which negatively regulates plant resistance to powdery mildew. To analyze the structure and function of *Mlo* gene in *Hevea brasiliensis*, we cloned a cDNA sequence of *Mlo* from latex of the rubber tree clone 'Reyan 7-33-97'. We defined it as *HbMlo7*. *HbMlo7* gene encoded 499 amino acids with a predicted molecular mass of 56.85 kDa. The protein structure analysis revealed that *HbMLO7* has one conserved domain of *Mlo*, one nuclear localization signal (NLS), seven transmembrane domains, and no signal peptide. Gene expression analysis by quantitative and reverse transcription PCR (qRT-PCR) indicated that *HbMlo7* expressed mainly in the bark of the rubber tree. The expression level of *HbMlo7* was induced by drought, wounding and powdery mildew infection. Abscisic acid (ABA), ethephon (ETH), jasmonic acid (JA) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) significantly upregulated *HbMlo7* gene expression in rubber tree leaves. The results suggest that *HbMlo7* is one of the members of *Mlo* family, and involved in response mechanisms of stress and signal transduction pathway of plant hormones in rubber tree.

**Key words:** *Hevea brasiliensis*; gene cloning; bioinformatics; expression analysis

Received 2016-03-10 Accepted 2016-05-16

This work was supported by the Natural Rubber Industry Technology System of China (Grant No. CARS-34-GW8), the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31460197), Graduate Innovative of Scientific Research Projects of Hainan Province in 2015 (Grant No. Hys2015-11), and the Natural Science Foundation of Hainan Province (Grant No. 314059).

\*Corresponding author (E-mail: yuzhang\_rain@hainu.edu.cn).