

研究报告 Original Papers

烟草*NtMLO5a*和*NtMLO5b*基因克隆和表达分析张孝廉^{1,2}, 张吉顺^{1,2}, 郭玉双², 雷波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: 为研究MLO基因在烟草(*Nicotiana tabacum*)中的特性与功能, 本研究采用同源克隆方法从烟草中克隆到*NtMLO5a*和*NtMLO5b*两个基因。序列分析表明, 烟草*NtMLO5a*和*NtMLO5b*基因开放阅读框全长均是1 794 bp, 均编码597个氨基酸的蛋白, 相对分子质量均为68 kDa, 等电点则分别为9.27和9.21。不同物种中MLO蛋白进化分析表明*NtMLO5a*和*NtMLO5b*蛋白与辣椒(*Capsicum annuum*)和野生番茄(*Solanum pennellii*)的MLO蛋白高度相似。实时荧光定量PCR结果显示, 烟草‘K326’的*NtMLO5a*和*NtMLO5b*基因在根、茎、叶中均有表达, 且在根中的表达水平最高, 在花中只检测到*NtMLO5b*基因表达。白粉病、干旱和低温胁迫均提高了*NtMLO5b*基因的表达, 接种白粉病48 h后和低温处理24 h后, *NtMLO5b*基因的表达量达到各自的最高值, 分别为处理前的2.5倍和13.52倍; 干旱处理后, *NtMLO5b*基因的表达持续上升, 8 d后为处理前的7.54倍。白粉病和干旱对*NtMLO5a*基因表达量没有明显影响; 低温处理12 h后其表达量达到最大值, 是处理前的13.72倍。

关键词: 烟草; *NtMLO*; 基因克隆; 表达分析

白粉病菌是一种专性寄生菌, 可以侵染包括烟草(*Nicotiana tabacum*)在内的多种植物, 在植株发病早期很难观察到发病症状, 然而在适宜条件下白粉病可迅速蔓延造成大规模病害, 增加了其防治的困难。烟草是叶用经济作物, 白粉病的发生严重影响其产量和品质, 目前, 烟草白粉病的防治主要以化学防治为主, 不仅会造成农残超标, 还会带来环境污染等问题。

MLO蛋白最早在大麦(*Hordeum vulgare*)中发现, 是一个植物特有的跨膜蛋白家族, 涉及多种细胞代谢过程。MLO基因发生功能缺失性突变后, 成为遗传上呈隐性的*mlo*基因, 可使大麦等植物获得抗白粉病的能力(Büschges等1997; Panstruga 2005), 但其作用机制仍不明确。目前已经在植物中发现众多MLO基因家族成员, 研究表明, 已知MLO基因家族的功能主要有在植物免疫中发挥作用(Bai等2008; Consonni等2006; Panstruga 2005)、参与花粉管发育(Kessler等2010; Yi等2014)、调节根系形态(Chen等2009; Bidzinski等2014)等, 但目前多数MLO蛋白的功能仍然未知。

MLO蛋白通常包含7个跨膜结构域, C端位于膜内, N端位于膜外, 包含一个钙调蛋白结合结构域。

已经发现MLO蛋白家族有7个分枝, 其中第IV分枝上的MLO全部发现于单子叶植物, 而第V~VII分支上MLO蛋白仅在双子叶植物中发现。与植物白粉病抗性相关的MLO蛋白主要分布在第IV和第V分支上, 例如拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) AtMLO2、AtMLO6和AtMLO12, 番茄(*Solanum lycopersicum*) SIMLO1, 大麦HvMLO等(Kusch等2016)。烟草属于异源四倍体植物, MLO基因家族的成员众多, 除报道的*NtMLO1*和*NtMLO2*是烟草白粉病抗性的负调控因子外(Appiano等2015; Fujimura等2016), 烟草中其他MLO基因的特征和功能尚不明确。鉴于此, 本研究采用同源克隆方法从烟草中成功克隆了*NtMLO5a*和*NtMLO5b*基因, 并分析了这两个基因在烟草不同组织和不同胁迫处理下表达量的变化, 以期对烟草白粉病抗性基因挖掘及MLO基因的功能研究提供参考。

收稿 2018-11-21 修订 2019-02-18

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(dgzhaod@gzu.edu.cn)。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用材料为烟草(*Nicotiana tabacum* L.) ‘K326’, 种子由贵州省烟草科学研究院提供。采用漂浮育苗法育苗, 温室培养至5~6片真叶时将幼苗移栽至含有基质的花盆中培养。

分别取生根期幼苗的根、茎和开花期的叶片和花, 液氮迅速冷冻, 于-80°C保存备用。待幼苗长至7~8片真叶时进行不同胁迫处理。白粉病处理: 接种用的白粉病菌来源于温室保存和繁殖病菌用的染病烟草植株; 取新鲜的感病烟草叶片, 将叶片上新鲜的白粉病孢子均匀抖落在待接种烟株上, 分别在接种的0、24、48和72 h后取叶片。低温处理: 将烟苗转移至低温光照培养箱中, 设置光/暗周期12 h/12 h、温度4°C、湿度60%, 分别在处理的0、4、8、12、24和48 h后取叶片。干旱处理: 用5%的聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG) 6000模拟干旱, 在处理的0、1、2、4和8 d后取叶片。将上述处理的叶片置于液氮中迅速冷冻, 于-80°C保存备用, 每个处理设置3次重复。

1.2 DNA、RNA提取和cDNA第一链合成

所有烟草组织在液氮中磨成粉末。DNA和总RNA提取分别参照Axygen公司的植物基因组DNA提取试剂盒和总RNA提取试剂盒的说明书进行, 参照TaKaRa公司反转录试剂盒说明书进行反转录合成cDNA第一链。

1.3 *NtMLO*基因的克隆及测序

以番茄(*Solanum lycopersicum* L.) *MLO3*基因

全长编码区(coding sequence, CDS)序列(NCBI登记号: KU759517.1)为信息探针, 利用NCBI烟草EST数据库比对, 根据获得的序列设计引物MLO-F1和MLO-R1 (表1), 分别以烟草‘K326’的cDNA和基因组DNA为模板, 使用NEB公司的KOD Fx高保真酶进行烟草*MLO*基因的CDS序列和全长基因组序列的PCR扩增。利用天根胶回收试剂盒对PCR产物进行胶回收后, 连入pGEM-T载体, 转化大肠杆菌 [*Escherichia coli* (Mig.) Cast. & Chalm.] DH5 α , 挑取阳性克隆送去上海捷瑞公司测序。

1.4 生物信息学分析

在NCBI网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上BLASTp进行蛋白预测, 利用Specialized BLAST (CDD search)进行保守域分析。选择其他物种中相似性较高的*MLO*序列18条用MEGA 5.0构建系统进化树, 采用邻接法(neighbor-joining)作图, 重复次数为1 000。在蛋白生物信息学网站(<http://www.expasy.org/proteomics>)上对*NtMLO*蛋白进行理化性质、亲/疏水性、跨膜结构及二级结构预测和分析。

1.5 *NtMLO*基因的表达分析

根据*NtMLO5a*和*NtMLO5b*的cDNA序列设计荧光定量特异引物2对(表1), 同时选用烟草*Actin*基因(NTU60495)为内参基因, 并设计定量PCR引物Ref-RT-F和Ref-RT-R (表1)。采用SYBR Green法在ABI Vii7实时荧光定量PCR仪上进行定量PCR实验, 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。对熔解曲线、扩增效率和相关系数进行分析, 选取特异性好、扩增效率接近1的引物进行实验, 分析

表1 引物序列及预期片段大小

Table 1 Sequences of primers and preproduction lengths

引物名称	引物序列(5→3')	退火温度/°C	扩增片段长度/bp
MLO5-F	ATGGCTGGTGGTGGAGGTG	60.8	1 974
MLO5-R	TTCCGGCTCGTATGTTGTGTG	61.7	
MLO5a-F1	CTGAAGACTCGTCTGAGCAACAC	59.2	275
MLO5a-R1	TCGGTATTCAGCTGTTTTGGTTT	60.9	
MLO5b-F1	AGAAGATTCGTCGGAGCAACAC	60.9	275
MLO5b-R1	ATGGTACTCAGCTGTTTTGGTTTC	59.7	
Ref-RT-F	CAAGGAAATCACCGCTTGG	60.6	106
Ref-RT-R	AAGGGATGCGAGGATGGA	58.1	

*NtMLO5a*和*NtMLO5b*基因在烟草不同组织中及白粉病菌接种后不同时间点的表达情况。将茎中和白粉病接种前的叶片的相对表达量分别设置为1, 其余组织中相对表达量按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行计算。

2 实验结果

2.1 *NtMLO5*基因克隆

以烟草‘K326’叶片的cDNA为模板进行PCR扩增, 获得与预期片段大小(1 794 bp)相当的条带(图1)。同时, 以‘K326’叶片的基因组DNA为模版进行PCR扩增获得6 500 bp大小的片段(图1)。测序获得的两条*NtMLO5*序列, 并将这两条序列在Sol网站上进行Blastx比对, 发现这两条序列与前人报道的*NtMLO5*的一致性最高, 其中*NtMLO5a*达99%; 分别命名为*NtMLO5a*和*NtMLO5b*。

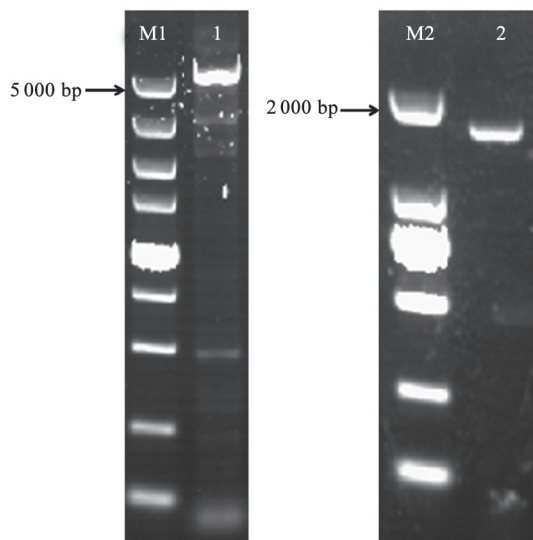


图1 烟草*NtMLO5*基因PCR扩增结果

Fig.1 The PCR amplification results of *NtMLO5* genes from *N. tabacum*

1泳道为*NtMLO5*的基因组PCR产物, M1为DL5000 marker; 2泳道为*NtMLO5*基因的CDS扩增产物, M2为DL2000 marker。

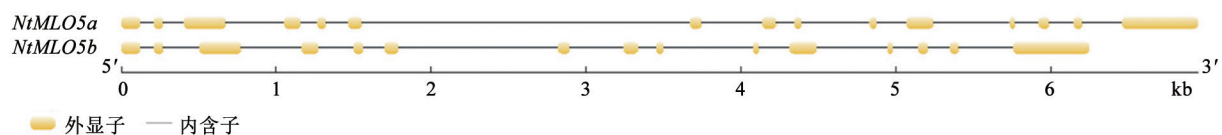


图2 *NtMLO5a*和*NtMLO5b*基因结构示意图

Fig.2 The gene structure schematic diagrams of *NtMLO5a* and *NtMLO5b*

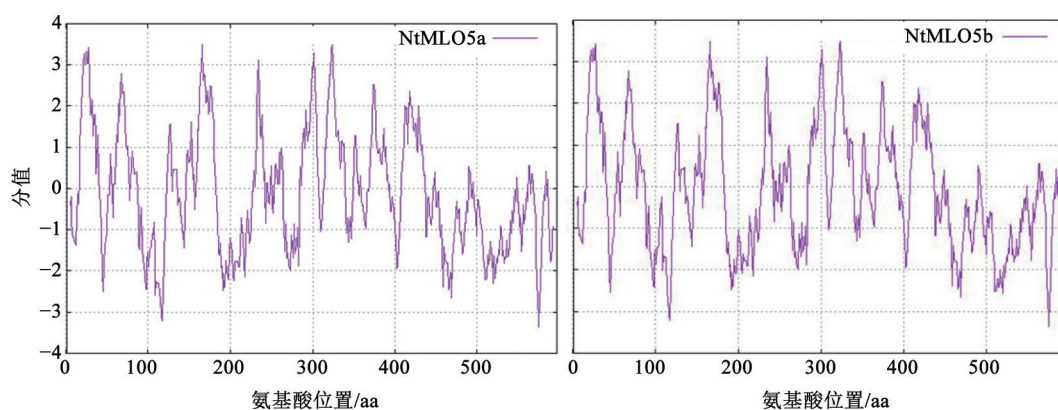
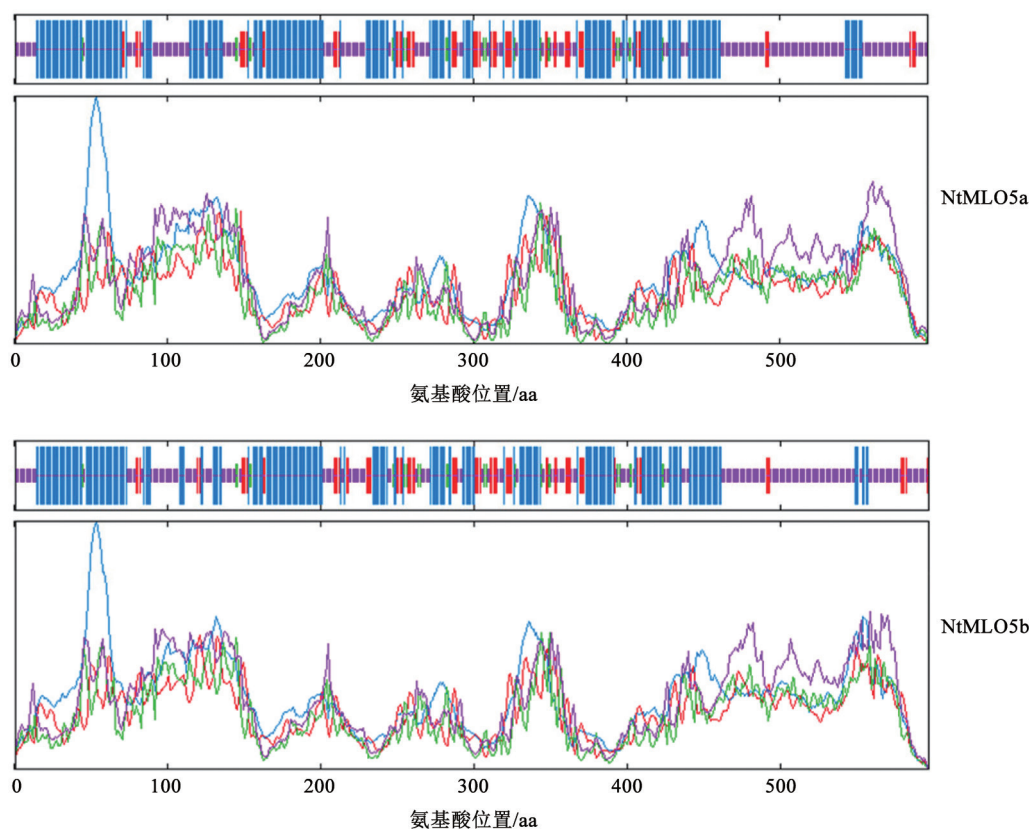
为分析*NtMLO5a*和*NtMLO5b*基因结构, 将其cDNA序列与克隆获得的基因组序列进行比较, 结果显示*NtMLO5a*和*NtMLO5b*基因都包含15个外显子和14个内含子(图2)。将*NtMLO5b*基因和蛋白的序列提交到NCBI数据库, GenBank登记号为MH392276。

2.2 生物信息学分析

用ProtParam工具预测*NtMLO5a*和*NtMLO5b*编码蛋白的基本理化性质, 发现这两个蛋白都含有597个氨基酸, *NtMLO5a*和*NtMLO5b*的分子式分别为 $C_{3108}H_{4793}N_{843}O_{835}S_{21}$ 和 $C_{3113}H_{4792}N_{844}O_{838}S_{19}$, 相对分子质量分别为68 001.65和68 058.59, 等电点(pI)分别为9.27和9.21, 它们的水溶液在280 nm处的消光系数分别约为103 860和105 350, 这两个蛋白的不稳定系数分别为54.63和55.17, 都为不稳定蛋白; 脂肪系数分别是91.42和91.74, 平均亲水系数分别为-0.096和-0.113, 均具有亲水性。进一步在ExPASy网站上利用ProtScale软件对*NtMLO5a*和*NtMLO5b*蛋白亲/疏水性进行分析, 结果显示这两个蛋白多肽链的第575位分值最低, 为-3.367; 第323位分值最高, 为3.522 (图3)。总体上看其亲水性氨基酸多于疏水性氨基酸, 可初步推测*NtMLO5a*和*NtMLO5b*蛋白都为亲水蛋白。

利用SOPMA软件对*NtMLO5a*和*NtMLO5b*蛋白的二级结构进行预测, 结果如图4所示: *NtMLO5a*蛋白的 α 螺旋占43.38%, 延伸链占11.22%, β 转角占3.52%, 无规则卷曲占41.88%; *NtMLO5b*蛋白的 α 螺旋占40.37%, 延伸链占12.06%, β 转角占4.02%, 无规则卷曲占43.55%。

利用在线分析软件SignalP 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)对*NtMLO5a*和*NtMLO5b*蛋白的信号肽进行预测, *C*值(用来区分是否为剪切位点, 最高峰值为剪切位点后的第一个氨基酸)、*S*值(用来区分相应位置是否为信号肽区域)和*Y*值(*C*值

图3 *NtMLO5a*和*NtMLO5b*蛋白亲/疏水性预测Fig.3 Analyses of hydrophilicity/hydrophobicity of *NtMLO5a* and *NtMLO5b*图4 *NtMLO5a*和*NtMLO5b*蛋白二级结构预测Fig.4 Prediction for secondary structures of *NtMLO5a* and *NtMLO5b*

蓝色代表 α 螺旋, 红色代表延伸链, 绿色代表 β 转角, 紫色代表无规则卷曲。

和 S 值的几何平均数, 用于避免多个高分 C 值对结果的影响)都很小(图5), 说明这两个蛋白都不存在信号肽。利用SubLoc 1.0在线软件(<http://www.bio->

[info.tsinghua.edu.cn/SubLoc/](http://www.bio-info.tsinghua.edu.cn/SubLoc/))对*NtMLO5a*和*NtMLO5b*蛋白进行亚细胞定位, 结果显示这两个蛋白可能都位于细胞膜上。

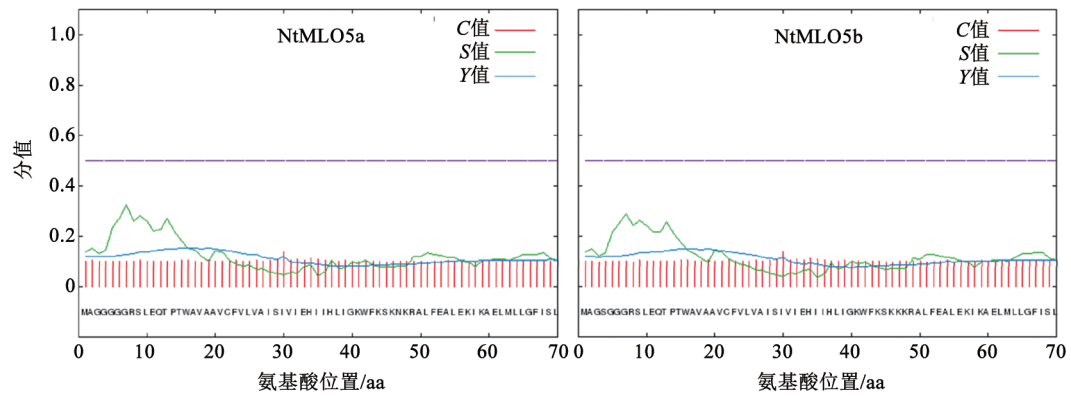


图5 NtMLO5a和NtMLO5b蛋白的信号肽预测

Fig.5 Prediction for the signal peptide of NtMLO5a and NtMLO5b

在ExPASy网站使用NetPhoS 2.0 server对NtMLO5a和NtMLO5b蛋白序列的磷酸化位点进行预测,结果表明NtMLO5a蛋白有38个丝氨酸(serine)、17个苏氨酸(threonine)和2个酪氨酸(tyrosine)磷酸化

位点(图6); NtMLO5b蛋白有41个丝氨酸、16个苏氨酸和2个酪氨酸磷酸化位点(图6)。蛋白磷酸化是重要的蛋白质翻译后修饰方式,参与植物的生长发育、细胞周期、信号转导以及抗病抗逆过程。

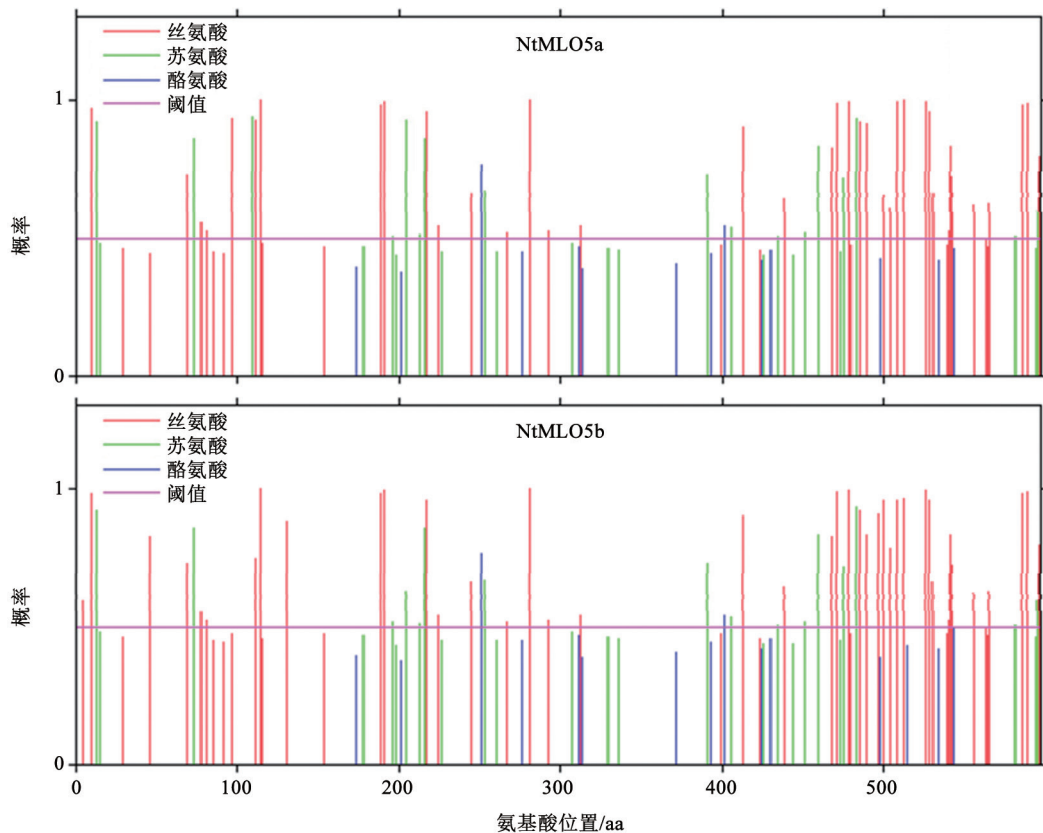


图6 NtMLO5a和NtMLO5b蛋白磷酸化位点预测

Fig.6 Prediction for phosphorylation sites in NtMLO5a and NtMLO5b sequences

NtMLO5a和NtMLO5b蛋白可能被丝氨酸蛋白激酶、苏氨酸蛋白激酶和酪氨酸蛋白激酶激活,从而调控二级响应基因的表达。

通过TMHMM对NtMLO5a和NtMLO5b蛋白的跨膜结构域进行预测,发现NtMLO5a和NtMLO5b都含有7个跨膜结构域(图7)。

2.3 序列比对

在NCBI数据库中使用Protein Blast程序对NtMLO5a和NtMLO5b蛋白进行保守区域检索,发现该蛋白包含一个mlo结构域,属于MLO亚家族,该基序很可能具有重要功能。经过蛋白同源检索,发现来自不同植物物种的MLO蛋白有很高的相似性,NtMLO5a和NtMLO5b与烟草NtMLO1和NtMLO2蛋白序列覆盖度为80%~100%,序列一致性为78%~

98%。NtMLO5a与烟草野生种林烟草(*N. sylvestris*)的一致性为99%,与绒毛状烟草(*N. tomentosiformis*)的一致性为98%; NtMLO5b与林烟草的一致性为97%,与绒毛状烟草的一致性为99%,推测NtMLO5a来源于林烟草,而NtMLO5b来源于绒毛状烟草。

烟草NtMLO5a和NtMLO5b蛋白与茄科植物番茄、马铃薯(*S. tuberosum*)具有98%~100%的序列覆盖度和92%~95%的序列一致性,与锦葵科植物棉花(*Gossypium* spp.)序列一致性最高,为98%,但序列覆盖度较低,为90%,综上可以看出烟草NtMLO5a和NtMLO5b与番茄、马铃薯MLO蛋白相似度最高。选择部分序列相似性较高、功能注释明确或有文献报道的MLO蛋白序列,利用Clustal X进行序列比对(图8),发现这两个蛋白具有保守的7

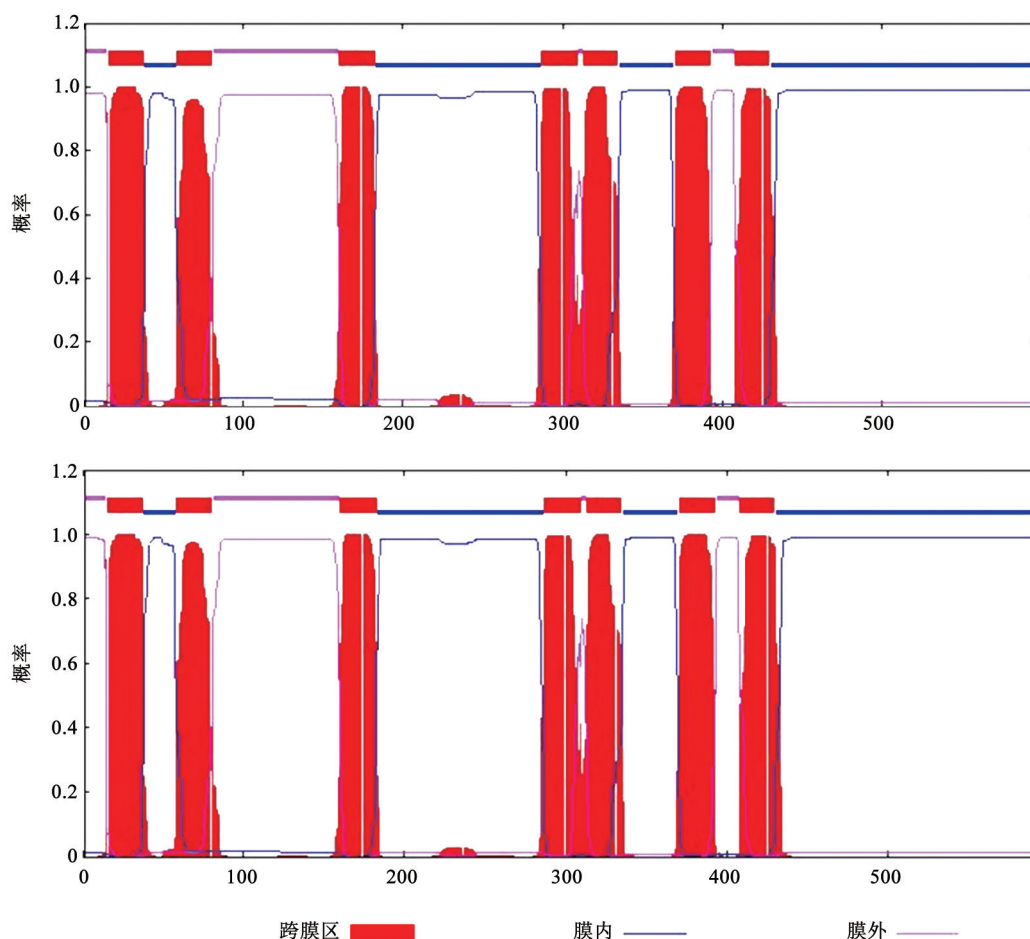


图7 NtMLO5a和NtMLO5b蛋白跨膜结构域预测

Fig.7 Prediction for transmembrane structures of NtMLO5a and NtMLO5b

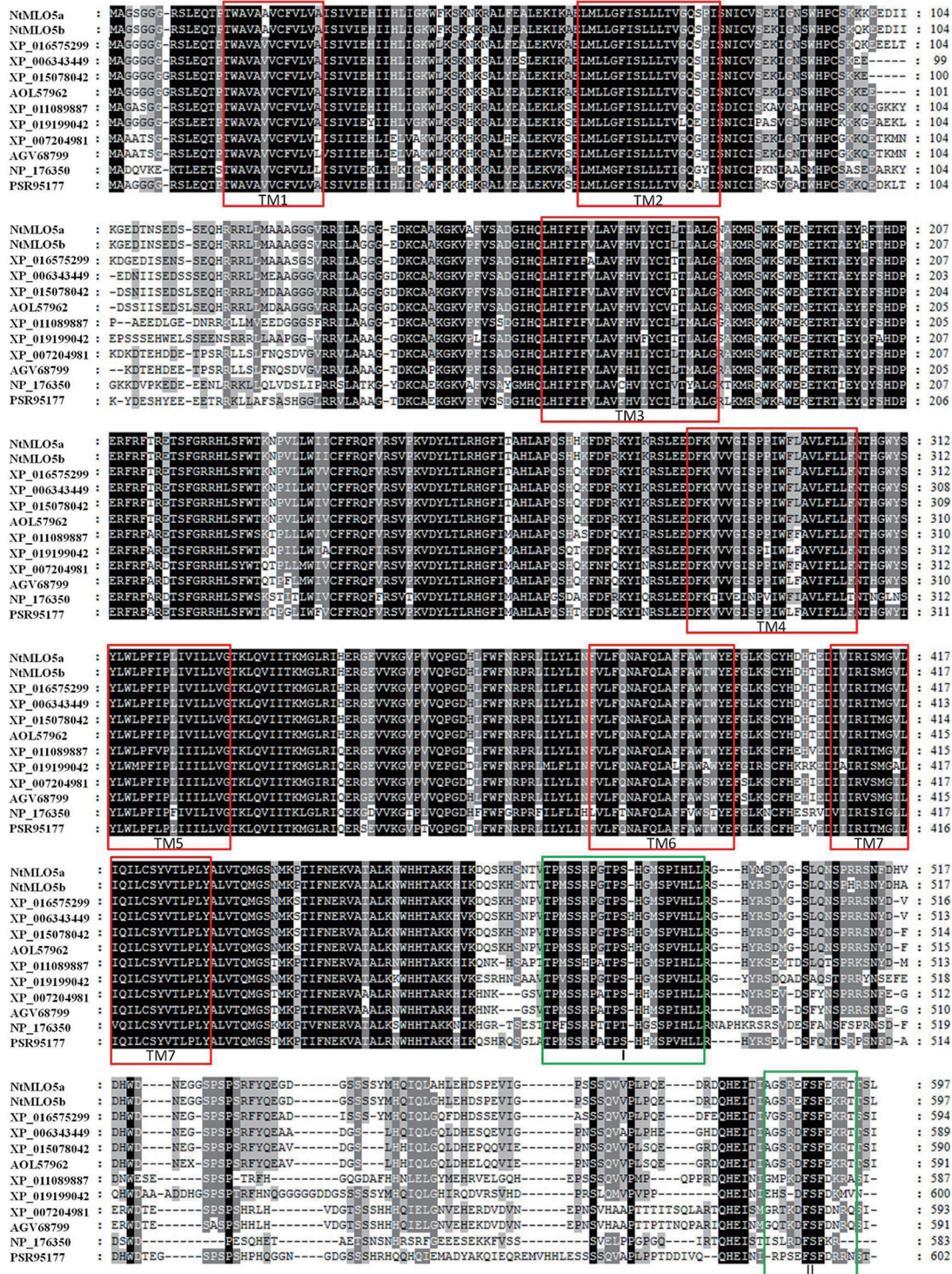


图8 不同植物MLO蛋白序列同源性比较

Fig.8 Alignment of MLO proteins from different plants

基因编号对应的物种: XP_016575299, 辣椒; XP_006343449, 马铃薯; XP_015078042, 野生番茄; AOL57962, 番茄; XP_011089887, 芝麻; XP_019199042, 牵牛花; XP_007204981, 碧桃; AGV68799, 杏; NP_176350, 拟南芥; PSR95177, 猕猴桃。

个跨膜结构域,在C端有两个功能域I和II。用MEGA 5.0进行系统进化树的绘制(图9),结果可以看出,烟草和马铃薯、番茄MLO序列处于同一分枝上,这和烟草、马铃薯、番茄同属茄科植物的亲缘关系一致。

2.4 *NtMLO5a*和*NtMLO5b*基因表达特性分析

通过实时荧光定量PCR检测*NtMLO5a*和*NtMLO5b*基因在烟草‘K326’各组织中的表达量,发现*NtMLO5a*基因在花中不表达,在其余各组织中均有表达,在根中表达量最高(图10);*NtMLO5b*基因在各组织中均有表达,在根中表达量最高,整体表现为根>种子>茎>叶片>花。

为了研究*NtMLO5a*和*NtMLO5b*基因对不同胁迫处理的响应情况,检测了这两个基因在接种白粉病、干旱、低温处理下的表达情况,由图10可以看出,接种白粉病48~72 h后,*NtMLO5b*基因的表达量升高,为接种前的2~2.5倍;在干旱处理2 d后,

*NtMLO5b*基因的表达量开始升高,处理8 d后的表达量达到处理前的7.54倍。而*NtMLO5a*基因的表达量在接种白粉病和干旱处理后没有显著差异。低温处理后,*NtMLO5a*和*NtMLO5b*基因的表达量均呈现先上升后下降的趋势,*NtMLO5a*在处理12 h后达到最大值,为处理前的13.72倍;*NtMLO5b*在处理24 h后达到最大值,为处理前的13.52倍。

3 讨论

*MLO*是植物所特有且广泛存在的基因家族,不同植物中的*MLO*家族成员数差异较大,小麦(*Triticum aestivum*)中包含7个*MLO*基因(Konishi等2010),大麦中包含11个*MLO*基因(International Barley Genome Sequencing Consortium 2012),水稻(*Oryza sativa*)中包含12个*MLO*基因(Liu和Zhu 2008),拟南芥中包含15个*MLO*基因(Chen等2006),陆地棉(*G. hirsutum*)和大豆(*Glycine max*)中*MLO*基因数量较

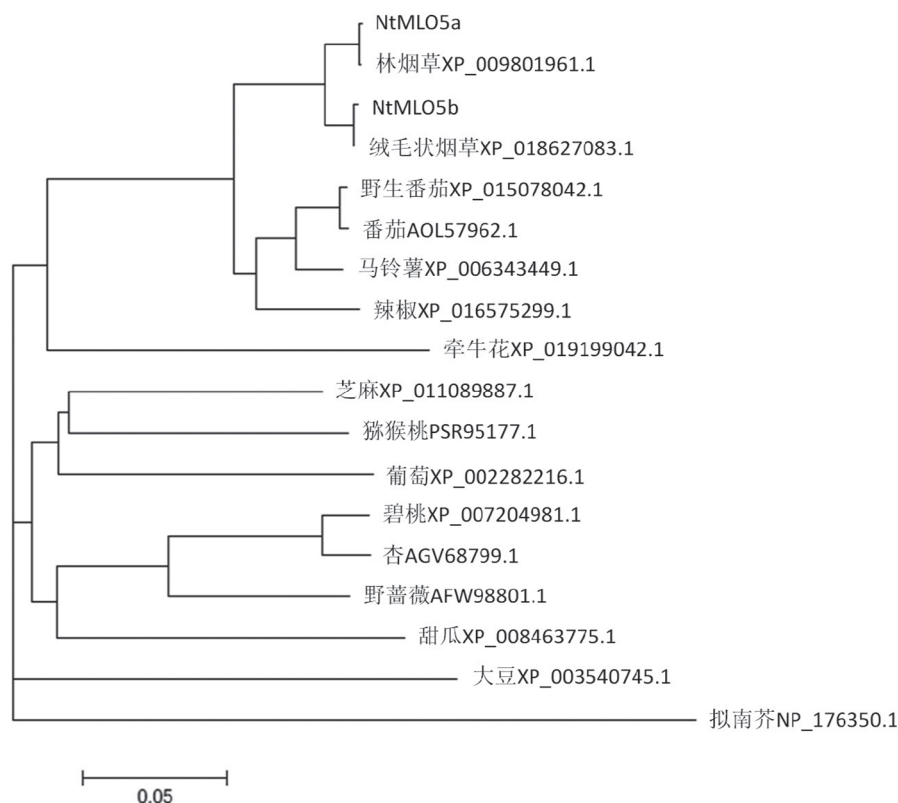
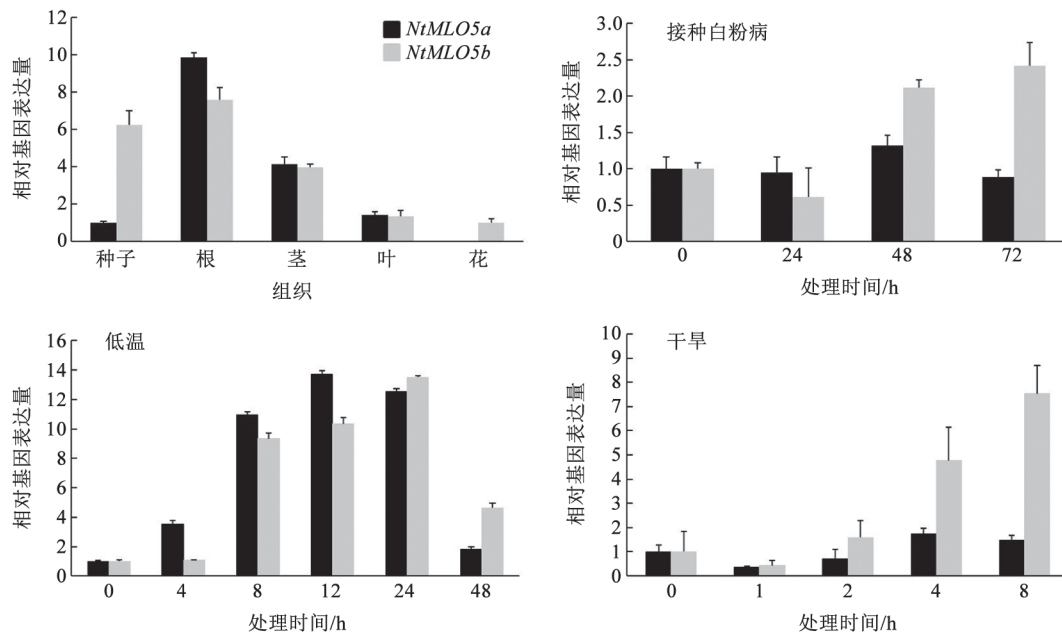


图9 *NtMLO5a*和*NtMLO5b*系统进化分析

Fig.9 Phylogenetic analysis of *NtMLO5a* and *NtMLO5b*

图10 *NtMLO5a*和*NtMLO5b*在烟草中表达情况Fig.10 Relative expression levels of *NtMLO5a* and *NtMLO5b* in *N. tabacum*

多, 分别包含38和39个(Wang等2016), 但其中多数 *MLO* 基因的功能尚不明确。目前, 烟草中除2个 *MLO* 基因与白粉病抗性相关外(Fujimura等2016), 其他 *MLO* 基因的特征和功能均未知。本研究从烟草中克隆到的2个 *MLO* 基因都包含15个外显子和14个内含子, 所编码的蛋白均包含一个 *MLO* 结构域, 且有7个跨膜结构域, 证明属于 *MLO* 家族。

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* 蛋白位于第IV分支上(Kusch等2016)。烟草属于双子叶植物, 进化分析发现本文克隆的两个 *MLO* 基因编码的蛋白都位于第V分支上, 与番茄和马铃薯 *MLO* 蛋白相似度最高。白粉病诱导下, *NtMLO5b* 基因的表达量明显升高, 而 *NtMLO5a* 基因的表达量没有明显差异, 推测 *NtMLO5b* 基因可能在烟草白粉病抗性中发挥重要作用。此外, *NtMLO5b* 基因的表达还受到低温和干旱的诱导, 而 *NtMLO5a* 基因响应低温诱导, 不响应干旱诱导。

拟南芥中 *AtMLO2*、*AtMLO6*、*AtMLO12* 是大麦 *MLO* 的同源基因, 均与拟南芥白粉病抗性相关, 其中 *AtMLO2* 发挥主要作用, *AtMLO6* 和 *AtMLO12* 对

白粉病敏感性的贡献次之(Vogel和Somerville2000; Consonni等2006)。烟草为异源四倍体, 可能存在基因功能冗余现象。虽然已有研究证明 *NtMLO1* 和 *NtMLO2* 基因是烟草白粉病抗性的负调控因子, 但烟草中可能还存在其他发挥作用的 *MLO* 基因。本研究克隆的 *NtMLO5a* 和 *NtMLO5b* 可能分别来源于林烟草和绒毛状烟草, 且 *NtMLO5b* 基因受到白粉病菌的诱导, 推测其为烟草白粉病抗性相关基因, 目前 *NtMLO5b* 的功能作用仍在进一步研究中。

参考文献(References)

- 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 In*, 21 (1): 30–39
- 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

- 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
- 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
- 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
- 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
- International Barley Genome Sequencing Consortium (2012). A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature*, 491 (7426): 711–716
- Kessler SA, Shimosato-Asano H, Keinath NF, et al (2010). Conserved molecular components for pollen tube reception and fungal invasion. *Science*, 330: 968–971
- 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
- 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
- Liu Q, Zhu H (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
- Vogel J, 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
- Yi J, An S, An G (2014). *OsMLO12*, encoding seven transmembrane proteins, is involved with pollen hydration in rice. *Plant Reprod*, 27: 169–180

Cloning and expression analysis of mildew locus O genes *NtMLO5a* and *NtMLO5b* from *Nicotiana tabacum*

ZHANG Xiao-Lian^{1,2}, ZHANG Ji-Shun^{1,2}, GUO Yu-Shuang², LEI Bo², ZHAO De-Gang^{1,3,*}

¹Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region (Ministry of Education), 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 the Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China in Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550006, China

Abstract: In order to study the characteristic and function of MLO in tobacco (*Nicotiana tabacum*), we cloned two *MLO* genes from tobacco 'K326' by homologous cloning technology. *NtMLO5a* and *NtMLO5b* both have an 1 794 bp open reading frame (ORF), encoding 597 amino acids. The putative protein molecular weight of *NtMLO5a* is 68 kDa and its theoretical isoelectric point is 9.27. The putative protein molecular weight and theoretical isoelectric point of *NtMLO5b* is 68 kDa and 9.21, respectively. Evolution analysis result suggests *NtMLO5a* and *NtMLO5b* have the nearest genetic relationship with *Capsicum annuum* and *Solanum pennellii* MLOs. Real-time PCR result shows that *NtMLO5a* and *NtMLO5b* expressed in the roots, stems, and leaves of tobacco 'K326', with the highest expression level in roots, but in flower only the transcript of *NtMLO5b* was detected. *NtMLO5b* expression can be induced by different stresses. The expression level peaks at 48 h after powdery mildew inoculation and 24 h after low temperature treatment, 2.5 and 13.52 folds than the level at 0 h, respectively. While the expression level of *NtMLO5b* kept on rising during 0–8 d after drought treatment, up to 7.54 fold at 8 d than 0 d. Expression level of *NtMLO5a* showed no significant difference after powdery mildew and drought treatments, but low temperature can induce *NtMLO5a* expression and the maximum (13.72 fold) appeared at 12 h after treatment.

Key words: tobacco; *NtMLO*; gene cloning; expression analysis

Received 2018-11-21 Accepted 2019-02-18

This work was supported by Technology 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).