

# An Arogenate Dehydratase Regulates Powdery Mildew Resistance and Salt Response in *Arabidopsis*

Haifei Liang<sup>1,2\*</sup>, Meicong Wang<sup>2,3\*</sup>, Daqing Chen<sup>1</sup>, Yongqing Li<sup>2,3#</sup>

<sup>1</sup>Zhongkai College of Agricultural Engineering, Guangzhou Guangdong

<sup>2</sup>Key Laboratory of South China Agricultural Plant Molecular Analysis and Genetic Improvement and Guangdong Provincial Key Laboratory of Applied Botany, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou Guangdong

<sup>3</sup>University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing

Email: lianghaifei@scbg.ac.cn, daqingchen@vip.sina.com, #liyongqing@scbg.ac.cn

Received: Aug. 28<sup>th</sup>, 2018; accepted: Sep. 10<sup>th</sup>, 2018; published: Sep. 18<sup>th</sup>, 2018

## Abstract

Powdery mildew is a plant pathogen with a wide range of hosts, which causes great loss in agricultural production. Plant defense against powdery mildew is well known to be salicylic acid (SA)-dependent. However, activation of SA pathway is often accompanied by growth defect and yield penalty. Here we have an *Arabidopsis* mutant *pmr5*, which shows a perfect SA-independent powdery mildew resistant phenotype. To figure out the molecular mechanism of this defense and to find the key regulators in this pathway, we isolated a *pmr5* suppressor, *pmr5; ps8*, in which a mutation in *ps8* fully suppresses *pmr5* resistance. By combining traditional map-based cloning and modern mapping-by-sequencing approaches, we found a mutation in *ADT2* (*Arogenate Dehydratase 2*) is responsible for the *pmr5; ps8* susceptible phenotype. *ADT2*, as a key regulator of phenolalanin biosynthesis, is reported to be involved in salt stress response and anthocyanin accumulation. This is the first report of *ADT2* involvement in pathogen defense. The finding of key regulators of SA-independent defense pathways can facilitate breeding of powdery mildew-resistant crops without yield loss. *ADT2* also provides a possibility for breeding multiple-resistant crops.

## Keywords

Powdery Mildew, Mapping by Sequencing, Arogenate Dehydratase, Salt Stress

# 一个阿罗酸脱水酶调控拟南芥对白粉病的抗性 及盐胁迫响应

梁海菲<sup>1,2\*</sup>, 王美丛<sup>2,3\*</sup>, 陈大清<sup>1</sup>, 李勇青<sup>2,3#</sup>

\*共同第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 梁海菲, 王美丛, 陈大清, 李勇青. 一个阿罗酸脱水酶调控拟南芥对白粉病的抗性及其盐胁迫响应[J]. 农业科学, 2018, 8(9): 1092-1098. DOI: 10.12677/hjas.2018.89160

<sup>1</sup>仲恺农业工程学院, 广东 广州

<sup>2</sup>中国科学院华南植物分子分析与遗传改良重点实验室及广东省应用植物学重点实验室, 广东 广州

<sup>3</sup>中国科学院大学, 北京

Email: lianghaifei@scbg.ac.cn, daqingchen@vip.sina.com, #liyongqing@scbg.ac.cn

收稿日期: 2018年8月28日; 录用日期: 2018年9月10日; 发布日期: 2018年9月18日

## 摘要

白粉病是一种具有广泛宿主的病害, 每年给农业生产造成巨大损失。植物对白粉病的抗性主要由水杨酸途径介导, 而水杨酸途径的激活常伴随严重的生长缺陷及作物减产。拟南芥 $pmr5$ 突变体是一个不依赖于水杨酸途径的抗白粉病突变体,  $pmr5$ ,  $ps8$ 为其回复突变体, 表现为感病表型。为了解析 $pmr5$ 突变体抗病机制, 寻找下游关键基因, 我们采用传统图位克隆与全基因组测序辅助的图位克隆的方法克隆 $ps8$ 突变, 发现一个阿罗酸脱水酶 $ADT2$  (*Arogenate Dehydratase 2*)的突变造成了 $pmr5;ps8$ 的感病表型。前人报道 $ADT2$ 作为苯丙氨酸合成途径的一个重要基因, 调控植物对盐胁迫响应和花青素的积累等多个生物学过程。本研究首次发现 $ADT2$ 也参与抗病调控。找到不依赖于水杨酸途径的抗白粉病关键基因, 有助于培育不依赖于水杨酸途径的抗病作物, 力争在抗病的前提下避免作物减产, 同时培育多抗作物。

## 关键词

白粉病, 全基因组测序辅助的图位克隆, 阿罗酸脱水酶, 盐胁迫

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

白粉病是一种常见病害, 其病原菌的宿主包括小麦这种主粮作物, 也包括橡胶、油菜、葡萄、黄瓜、花卉等重要的经济作物, 每年给农业生产造成巨大损失[1]。白粉菌是一种强制性的活体营养型病原, 只侵染活体植物的表皮细胞, 从寄主细胞汲取营养, 抑制寄主细胞抗病途径的激活, 从而完成自己的生长周期[2]。

$MLO$  (*MILDEW LOCUS O*)基因编码, 一类高度保守的蛋白, 定位于细胞质膜上, 可能参与抗白粉病早期反应。大麦  $MLO$  基因对大麦白粉病的抗性具有广谱性, 这种抗性可能与植物体内囊泡运输过程有关[3]。小麦  $MLO$  蛋白在抗白粉病中的机理与大麦极为相似[4]。程鸿克隆了甜瓜同源基因  $CmMlo2$ , 并发现该基因的表达受到白粉病侵染影响, 而转  $Mlo2$  的转基因甜瓜则具有抗白粉病表型[5]。此外, 使用一些诱导剂处理作物, 可诱导抗病性的生理生化机制, 从而达到抗病高产的目的。如使用低聚糖素可以提高橡胶树对白粉病的抗性[6]; 而大黄酚和矽处理都可以激活黄瓜对白粉病的抗性[7] [8]。

Col-0 对白粉菌(*G. cichoracearum*)的侵染十分敏感[9]。白粉菌是一类强制性活体营养型病原菌, 植物体内的水杨酸途径介导了对这一类白粉菌的抗性[10]。然而水杨酸途径的激活, 通常伴随各种生长缺陷、细胞死亡、产量降低等表型, 在很多情况下不适合作为植物抗病育种的首选策略。植物对病原菌的抗性是一个复杂的过程, 不依赖于水杨酸的白粉菌抗性研究仍然很少。前期各国研究人员对拟南芥突变体进

行筛选, 获得了一系列抗病突变体。一类是以 *edr* (*enhanced disease resistance*) 系列突变体为代表, 白粉菌的侵染激活水杨酸途径, 从而产生抗性[11]。另一类以 *pmr* (*powdery mildew resistance*) 系列突变体为代表, 其抗性不依赖于水杨酸途径。这一类突变体由加州大学伯克利分校的 Shauna Somerville 实验室获得。通过对 Col-0 进行 EMS 诱变, 获得了一系列不依赖于水杨酸途径的抗白粉病的突变体[12]。其中一个突变体为 *pmr5*, 其对白粉病抗性不仅不依赖于水杨酸途径, 同时也不依赖于另一传统的抗病途径茉莉酸/乙烯途径。因此, *pmr5* 介导了一个新的抗病途径[13]。为了解析这个途径, 前期 Shauna Somerville 教授实验室对 *pmr5* 进行了二次 EMS 诱变, 获得了一系列回复突变体, 称为 *ps* (*pmr5 suppressor*) 突变体, 这些回复突变体回复了野生型 Col-0 对白粉病的敏感表型, 且同时具有两个突变, 一个是 *pmr5* 突变, 另一个是未知的 *ps* 突变。这些 *ps* 突变可能是影响 *pmr5* 抗性的关键。克隆这些 *ps* 突变, 可能找到调控 *pmr5* 中对白粉病抗性起关键作用的基因, 从而解析这一抗病新途径。

*ps* 突变体 *ps8*, 发现一个阿罗酸脱水酶 *ADT2* (*Arogenate Dehydratase 2*) 的突变, 使得 *pmr5; ps8* 呈现对白粉病的感病表型, 说明一个正常功能的 *ADT2* 是 *pmr5* 突变体呈现抗病表型的必要条件, 因此 *ADT2* 是调控植物抗白粉病途径的一个关键的正调控因子。之前有报道发现作为苯丙氨酸合成途径的关键基因[14]及花青素合成的重要因子[15], *ADT2* 也参与了植物对盐胁迫的响应, 一个 *adt2-D* 显性突变造成了植物对盐胁迫的抗性[16]。有趣的是, *ps8* 单突变体以及 *pmr5; ps8* 双突变体都对盐胁迫敏感, 而这里 *ps8* 包含一个 *adt2* 的隐性突变, 其结果与前人报道可以互相印证。综上所述, *ADT2* 作为一个抗白粉病途径的正调控因子, 同时也是抗盐途径的正调控因子, 可以作为多抗作物育种的候选基因。

## 2. 材料与方 法

### 2.1. 实验材料

本实验所用拟南芥野生型有突变体的野生型 Col-0 和做图位克隆的 *Ler*。突变体有 *pmr5*, *pmr5; ps8*, *pad4-1* (CS3806) 和 *adt2* (CS853046)。所有拟南芥均生长于 21℃, 16 小时光照 8 小时黑暗的环境。健康的 4 周大植株浇灌 250 mM NaCl 水溶液用于盐处理。白粉菌为 *Golovinomyces cichoracearum*, 在生长条件相同但隔离的生长箱培养, 在 4 周大的 Col-0 或 *pad4-1* 叶片上生长, 每周继代一次。

### 2.2. 白粉菌侵染

白粉菌在 4 周大小健康的 Col-0 或者 *pad4-1* 植株上生长 7~10 天左右, 作为菌源接种需要检测的 4 周大健康植株。若仅是观察感、抗病表型, 可以直接取带有菌源的叶片摩擦待接种的叶片, 7~10 天后观察感、抗病表型。若需要定量分析, 则将待接种的植株放在高约 1.2 米的接种箱底部, 用吹风机将菌源植物叶片的孢子吹到箱体内, 静置 30 分钟即可。

### 2.3. 利用基因组测序的图位克隆 Mapping by sequencing (MBS)

运用混合分组分析(BSA, bulk segregant analysis)的原理, 对混合的 168 株图位克隆群体样品提取总基因组 DNA, 进行全基因组测序(X), 测序结果与原 Col-0 基因组对比, 根据孟德尔遗传定律, 进行 BSA 分析, 找到与性状紧密连锁的突变区域, 并对整个区域所有的突变点在原 *pmr5* 中测序, 找到仅存在于 *pmr5; ps8* 但不存在于 *pmr5* 中的突变点, 作为候选突变。候选突变中在基因编码区且造成氨基酸突变、可变剪切等突变的基因作为首选的候选基因, 用于后续验证。

### 2.4. 台盼蓝染色

取接种白粉菌 5 天后的叶片, 加入台盼蓝染液, 沸水煮 2 分钟, 室温静置 30 分钟后倒掉染色液, 再

用清水漂洗 2~3 次。倒干水分，加入水合氯醛脱色液，室温脱色 12 小时，使用清水漂洗 3 次，加入 50% 甘油浸没过叶片，可用于白粉菌的镜检及定量分析。

取染色后的叶片，腹面向上压片，显微镜下观察，统计 12 个以上分生孢子梗所产生的孢子。每个样品进行至少 3 个生物学重复。

### 3. 结果与讨论

#### 3.1. *pmr5* 的回复突变体 *pmr5; ps8*

*pmr5* 具有对白粉病极强的抗性，且有生长缺陷表型，表现为植株矮小[13]。加州大学伯克利分校的 Shauna Somerville 教授课题组对 *pmr5* 突变体进行了 EMS 二次诱变，找到一系列回复突变体，其中一个隐性回复突变体 *pmr5; ps8* 不仅仅回复了对白粉病的敏感，且同时回复了 *pmr5* 突变体的生长缺陷表型，其生长形态更接近 Col-0 野生型(图 1)。后来我们分离了 *ps8* 单突变体，并对其一并进行表型检测。由于许多抗病相关突变体同时参与了抗非生物胁迫，因此我们测试了干旱胁迫和盐胁迫。干旱胁迫处理未发现明显表型(数据未显示)。我们分别用 150 mM、200 mM 和 250 mM 氯化钠处理植株，发现 *ps8* 和 *pmr5; ps8* 突变体都呈现敏感表型，以 250 mM 氯化钠处理表型最为明显。使用 250 mM 的氯化钠处理植株，4 天后即可观察到 *ps8* 单突变体和 *pmr5; ps8* 都对盐的胁迫非常敏感，*ps8* 单突变体叶片开始变黄，而 *pmr5; ps8* 已经接近死亡。同时我们发现 *pmr5* 对盐胁迫不敏感，其表型与野生型一致，因此该盐敏感表型可能来自于 *ps8* 基因突变(图 2)。

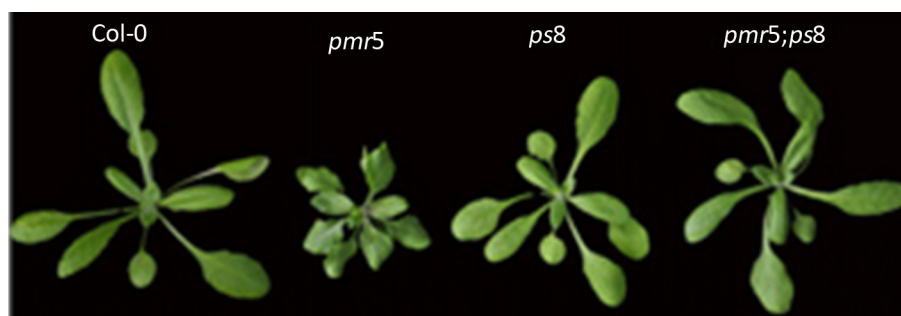


Figure 1. Growth morphology of the mutants  
图 1. 各种突变体的生长表型

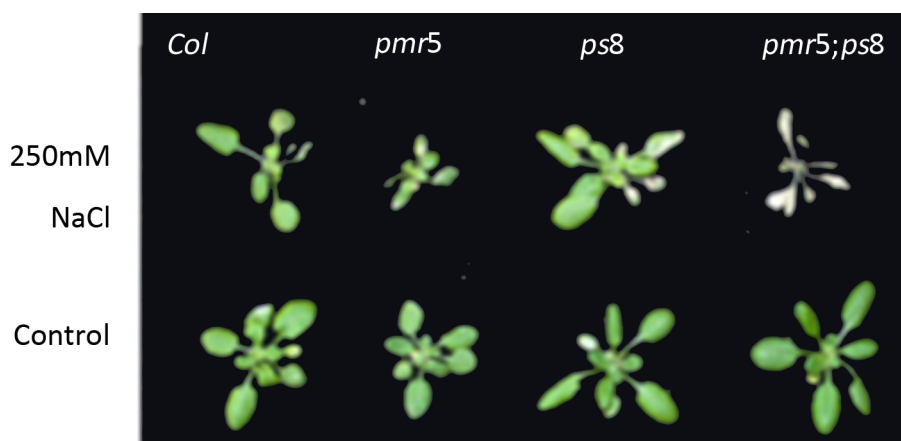


Figure 2. Salt stress test  
图 2. 盐胁迫测试



### 3.2. 图位克隆的群体构建

取纯合的 *pmr5*; *ps8* 突变体(Col-0 背景), 将其与 *Ler* 杂交, F2 后代提取 DNA, 鉴定为 *pmr5* 纯合子的植株 90 株, 自交后获得 F3 代植株, 选取其中生长表型接近野生型的植株共 168 株, 并做白粉菌抗性检测, 发现全部对白粉菌敏感, 因此这 168 棵植株即为 *pmr5*; *ps8* 双突变体, 可用于图位克隆。

### 3.3. 传统图位克隆结合全基因组测序辅助的图位克隆

利用这 168 株图位克隆群体, 我们对 *pmr5*; *ps8* 突变体进行了传统的图位克隆。BSA (bulk segregant analysis)分析表明该突变点位于三号染色体长臂。在此区域选取不同的多态性标记进行基因型检测, 将 *ps8* 突变点粗略定位于 GAPC 和 *nga126* 之间(图 3)。

运用混合分组分析(BSA, bulk segregant analysis)的原理, 随机选取 150 株图位克隆群体样品提取总基因组 DNA, 进行全基因组测序(平均测序深度 30X), 测序结果与原 Col-0 基因组对比, 根据孟德尔遗传定律, 进行 BSA 分析, 找到与性状紧密连锁的突变区域, 与传统图位克隆所得区域完全一致(图 3), 且全基因组测序给出了该区域所有可能的突变位点。

### 3.4. 候选基因检测

由于 *pmr5* 突变体也来源于 EMS 诱变, 其本身可能含有大量的无关突变点, 这些无关突变点, 也同样存在于 *pmr5*; *ps8* 双突变体中。在 *pmr5* 单突变体内对候选区域所有的突变点进行测序检测, 找到只存在于 *pmr5*; *ps8* 突变体而不存在于 *pmr5* 单突变体内的突变点。候选突变点中在基因编码区且造成氨基酸突变、可变剪切等突变的基因作为首选的候选基因, 用于后续验证。其中有一个符合要求的突变点位于

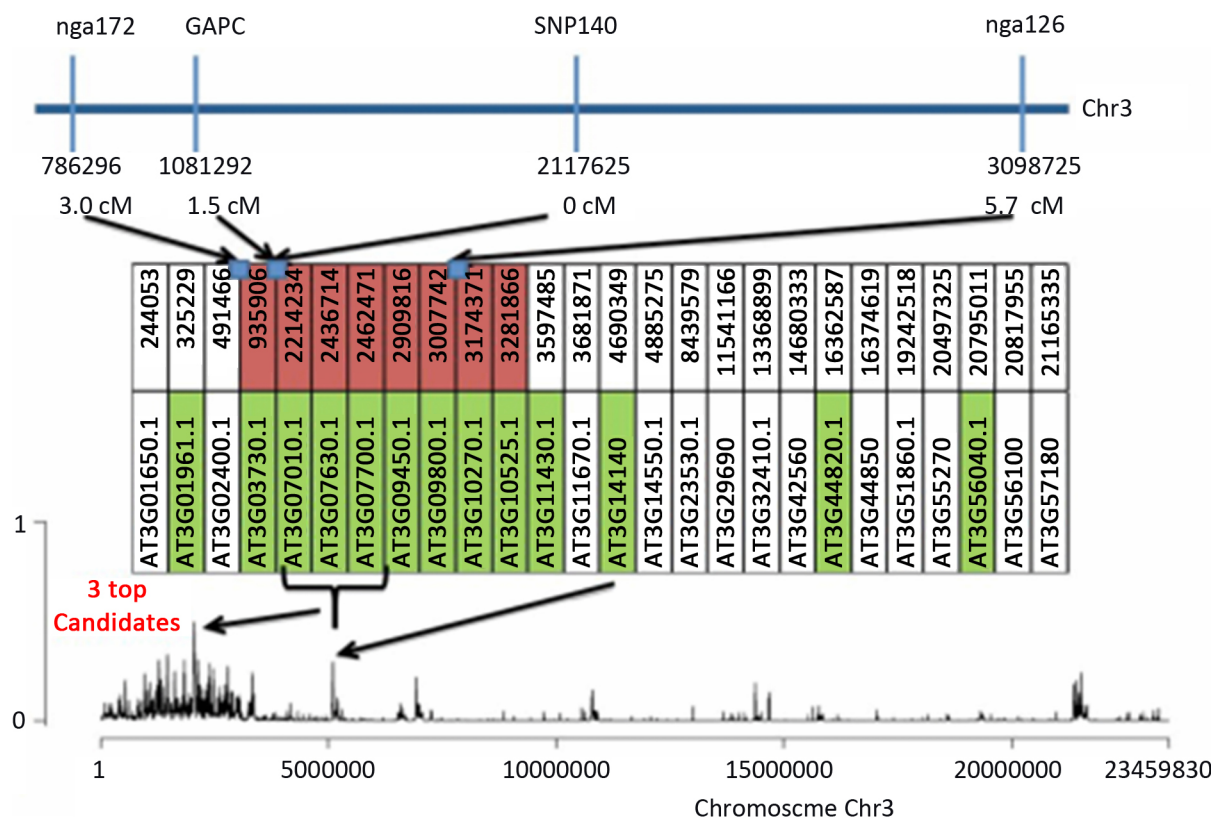
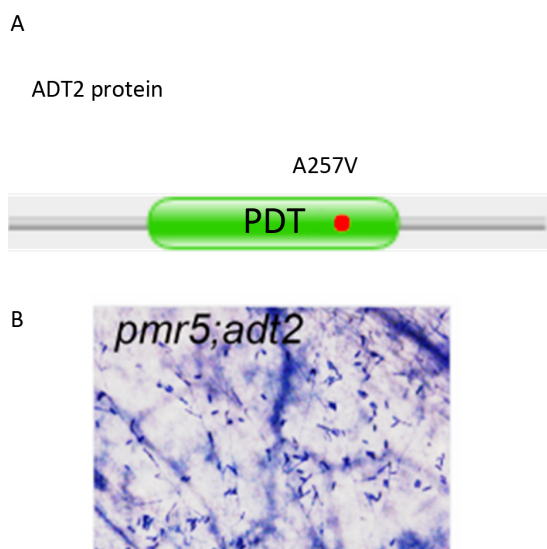


Figure 3. Mapping of *ps8* mutation  
图 3. *ps8* 的图位克隆



**Figure 4.** Complementation test  
**图 4.** 互补实验验证候选基因 *ADT2* 即为 *PS8*

*ADT2* 基因编码区, 将 257 位氨基酸由丙氨酸突变为缬氨酸(图 4A)。将 *ADT2* 蛋白序列放到 pfam 软件分析, 蛋白结构示意图见图 4A。pfam 预测 *ADT2* 蛋白有一个 PDT (Prephenate dehydratase) 结构域(图 4A 绿色部分), 红点标注 *ps8* 中的突变位点, 位于该结构域中, 可能破坏了该结构域的正常功能, 造成功能缺失。已经发表的该基因的研究表明, *adt2-D* 突变体(一个功能增强型突变体)能抗盐胁迫, 与 *ps8* 突变体(一个功能缺失型突变体)表型相反。因此将 *ADT2* 列为 *ps8* 候选基因。由于正常的 *ps8* 基因功能应该是 *pmr5* 突变体呈现抗病表型的关键, 因此 *pmr5; ps8* 双突变体呈现感病表型。如果 *ADT2* 就是 *ps8*, 那么 *pmr5; adt2* 双突变体也应该呈现感病表型。我们在 ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center) 购买了 *adt2* 突变体, 与 *pmr5* 杂交, 获得 *pmr5; adt2* 纯合双突变体, 白粉菌侵染 7 天后, 对其进行台盼蓝染色, 结果显示在图 4B 中。图中可见大量孢子生长, *pmr5; adt2* 纯合双突变体呈感病表型(图 4B)。因此证实 *ADT2* 即为 *ps8*。

综上所述, 我们克隆了一个 *pmr5* 的回复突变体 *ps8*, 编码 *ADT2* 的基因在此突变体中发生突变, 将 *pmr5* 的抗病表型回复为同野生型类似的感病表型。*ADT2* 是一个阿罗酸脱水酶, 本研究为第一个证实该基因参与抗病的报道。

*ADT2* 参与原生代谢(苯丙氨酸的合成), 表明其对植物正常生长发育的重要性。*ADT2* 同时参与次生代谢(花青素合成), 而花青素作为一种抗氧化剂, 在植物应答各种胁迫中起重要作用。相应的, 该基因的功能获得型突变体 *adt2-D* 呈现抗盐表型, 而功能缺失型突变体则呈现盐敏感表型, 说明该基因参与了植物的盐胁迫响应。本研究则首次证实 *ADT2* 是植物不依赖于水杨酸的抗白粉病途径的一个关键基因。因此, *ADT2* 可以作为候选基因, 筛选抗病、抗盐的多抗作物。

## 致 谢

感谢美国加州大学伯克利分校 Shauna Somerville 教授提供的 *pmr5* 和 *pmr5; ps8* 突变体种子。感谢中国科学院遗传与发育生物学研究所唐定中研究员课题组赠送的白粉菌种(*Golovinomyces cichoracearum*)。

## 基金项目

国家自然科学基金面上项目拟南芥中抗白粉病新途径相关基因的克隆与功能鉴定(项目编号 3127039)和广东省应用植物学重点实验室开放课题(AB2018028)。

## 参考文献

- [1] Glawn, D.A. (2008) The Powdery Mildews: A Review of the World's Most Familiar (Yet Poorly Known) Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, **46**, 27-51. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.46.081407.104740>
- [2] Micali, C., Gollner, K., Humphry, M., Consonni, C. and Panstruga, R. (2008) The Powdery Mildew Disease of Arabidopsis: A Paradigm for the Interaction between Plants and Biotrophic Fungi. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, **6**, e0115. <https://doi.org/10.1199/tab.0115>
- [3] Panstruga, R. (2005) Serpentine Plant MLO Proteins as Entry Portals for Powdery Mildew Fungi. *Biochemical Society Transactions*, **33**, 389-392. <https://doi.org/10.1042/BST0330389>
- [4] Yu, L., Niu, J.S., Cheng, P.D., et al. (2005) Cloning, Physical Mapping and Expression Analysis of a Wheat *Mlo*-Like Gene. *Journal of Integrative Plant Biology*, **47**, 214-222. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2005.00030.x>
- [5] 程鸿. 甜瓜 *APX* 和 *Mlo* 基因的克隆与功能分析[D]: [博士学位论文]. 山东: 山东农业大学, 2009.
- [6] 单家林, 肖倩苑, 等. 低聚糖素诱导橡胶树抗白粉病作用机制初探[J]. 亚热带植物科学, 2005, 34(1): 31-32.
- [7] 任红敏, 王树桐, 等. 大黄酚诱导黄瓜抗白粉病机制研究[C]//中国植物保护学会. 中国植物保护学会学术年会论文集: 2010 年卷. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2010.
- [8] 魏国强, 朱祝军, 钱琼秋, 李娟. 硅对黄瓜白粉病抗性的影响及其生理机制[J]. 植物营养与肥料学报, 2004, 10(2): 202-205.
- [9] Adam, L., Ellwood, S., Wilson, I., Saenz, G., Xiao, S., Oliver, R.P., Turner, J.G. and Somerville, S. (1999) Comparison of *Erysiphe cichoracearum* and *E. cruciferarum* and a Survey of 360 *Arabidopsis thaliana* Accessions for Resistance to These Two Powdery Mildew Pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interact*, **12**, 1031-1043. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1999.12.12.1031>
- [10] Frye, C.A. and Innes, R.W. (1998) An Arabidopsis Mutant with Enhanced Resistance to Powdery Mildew. *Plant Cell*, **10**, 947-956. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.6.947>
- [11] Tang, D., Ade, J., Frye, C.A. and Innes, R.W. (2005) Regulation of Plant Defense Responses in Arabidopsis by EDR2, a PH and Start Domain-Containing Protein. *Plant Journal*, **44**, 245-257. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02523.x>
- [12] Vogel, J. and Somerville, S. (2000) Isolation and Characterization of Powdery Mildew-Resistant *Arabidopsis* Mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 1897-1902. <https://doi.org/10.1073/pnas.030531997>
- [13] Vogel, J.P., Raab, T.K., Somerville, C.R. and Somerville, S.C. (2004) Mutations in *PMR5* Result in Powdery Mildew Resistance and Altered Cell Wall Composition. *Plant Journal*, **40**, 968-978. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02264.x>
- [14] Chao, M.H., Corea, O.R.A., et al. (2007) Phenylalanine Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: Identification and Characterization of Arogenate Dehydratases. *Journal of Biological Chemistry*, **282**, 30827-30835. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702662200>
- [15] Chen, Q.B., Man, C., Li, D.N., Tan, H.J., Xie, Y. and Huang, J.R. (2016) Arogenate Dehydratase Isoforms Differentially Regulate Anthocyanin Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant*, **9**, 1609-1619. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.09.010>
- [16] Huang, T., Tohge, T., Lytovchenko, A., Fernie, A.R. and Jander, G. (2010) Pleiotropic Physiological Consequences of Feedback-Insensitive Phenylalanine Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, **63**, 823-835. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04287.x>

**知网检索的两种方式：**

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>  
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2164-5507，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>  
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：[hjas@hanspub.org](mailto:hjas@hanspub.org)