脱落酸负调控拟南芥对白粉菌的穿透后抗性

肖翔^{1,2†}, 程曦^{1,2†}, 尹康权¹, 李华丽¹, 邱金龙^{1*}

1. 中国科学院微生物研究所, 植物基因组学国家重点实验室, 北京 100101;

2. 中国科学院大学, 北京 100049

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: qiujl@im.ac.cn

收稿日期: 2017-05-08; 接受日期: 2017-06-02; 网络发表日期: 2017-09-09

中国科学院战略性先导科技专项(批准号: XDB11030500)和国家自然科学基金(批准号: 31071673)资助

摘要 脱落酸(ABA)在植物抗病反应中发挥重要的作用, 而其如何调控植物与活体营养型病原真菌的相互作用还不清楚. 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) ABA合成缺陷型突变体*aba2-1*和*aba3-1*对活体营养型病原真菌白粉菌(*Golovinomyces cichoracearum*)的抗性增强. 外源ABA处理能够增加拟南芥对白粉菌的感病性. ABA受体组分的突变体*abi1-1*和*abi2-1*对白粉菌的抗性表型与ABA合成缺陷型突变体相似, 而ABA信号转导下游组分的突变体*abi3-1*, *abi4-1*和*abi5-1*对白粉菌的抗性表型却与野生型相似. 显微观察发现, 在ABA合成缺陷型突变体中白粉菌侵染的穿透前和穿透过程都没有受到影响, 但其穿透后菌丝的生长及分生孢子的产量都受到抑制. 另外, 还发现水杨酸和MPK3参与了ABA对白粉病抗性的调控. 综上所述, 本研究结果显示, ABA可能通过拮抗水杨酸抗病信号通路来负调控拟南芥对白粉菌的穿透后抗性.

关键词 脱落酸, 白粉菌, 活体营养型真菌, 抗病反应, 水杨酸

在自然环境中分布着数量众多的病原菌, 它们对植物的生长发育造成严重威胁. 为了生存, 植物进化出复杂精细的信号调控机制来识别和抵御病原菌的侵染. 植物激素水杨酸(salicylic acid, SA)、茉莉酸(jasmonic acid, JA)以及乙烯(ethylene, ET)作为重要的信号分子调控植物的抗病反应^[1]. 近年来, 脱落酸(abscisic acid, ABA)也被发现在植物抵御病原菌的过程中起着重要作用^[1].

ABA调控植物的生长发育以及非生物胁迫响应的功能已得到非常广泛的研究^[2,3]. PYR/PYL/RCAR-PP2C-SnRK2被鉴定为ABA信号转导的核心组分, 它们作为ABA的胞质受体, 以ABA依赖的方式解除PP2C

对蛋白激酶SnRK2的抑制^[4,5]. 其中两个PP2C蛋白磷酸酶ABI1和ABI2是ABA信号途径中重要的负调控因子. 而ABI1和ABI2下游的效应蛋白ABI3, ABI4和ABI5, 分别属于B3家族、AP2家族和bZIP家族的转录因子, 相应的突变体*abi3-1*, *abi4-1*和*abi5-1*在种子萌发过程中对ABA不敏感并且在幼苗期还存在一些ABA响应缺陷表型^[6-8].

越来越多的研究表明, ABA在调控植物对生物胁迫响应中同样发挥重要作用^[9]. 外源ABA处理减弱了番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.)对腐生型真菌灰霉菌(*Botrytis cinerea*)的抗病性, 而番茄ABA合成缺陷型突变体则对灰霉菌的抗病性增强^[10]. 在拟南芥

引用格式: 肖翔, 程曦, 尹康权, 等. 脱落酸负调控拟南芥对白粉菌的穿透后抗性. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 949–959, doi: 10.1360/N052017-00108
英文版见: Xiao X, Cheng X, Yin K Q, et al. Abscisic acid negatively regulates post-penetration resistance of *Arabidopsis* to the biotrophic powdery mildew fungus. Sci China Life Sci, 2017, 60: 891–901, doi: 10.1007/s11427-017-9036-2

(*Arabidopsis thaliana*)与活体营养型卵菌(*Peronospora parasitica*)的互作中也得到了类似的结果^[11]。这些结果表明,ABA负调控植物的抗病过程。研究发现,ABA主要通过拮抗SA和JA/ET信号途径来发挥其在生物胁迫响应中的功能^[12,13]。然而,番茄ABA合成缺陷型突变体*sitiens*对*Botrytis cinerea*和*Dicellaea dadantii*抗性的增强主要是由于表皮细胞细胞壁的增厚和ROS产生增加而导致的^[10,14,15]。此外,也有研究发现ABA正调控植物对一些病原菌的防卫反应。ABA通过影响拟南芥表皮细胞胼胝质沉积而正调控对腐生型病原菌*Alternaria brassicicola*和*Plectosphaerella cucumerina*的抗性^[16-18]。ABA正调控植物对腐生型卵菌*Pythium irregular*的抗病性并不依赖胼胝质沉积,而主要影响JA的生物合成^[19]。所以,ABA能正调控或负调控植物抗病反应,这在很大程度上取决于侵染的病原菌的生活方式^[12,13]。ABA调控植物抗病反应的作用机制复杂多样,需要更广泛的研究去阐明。

白粉菌是一种专性寄生的活体营养型植物病原真菌,宿主包括约上万种不同的植物^[20]。对白粉菌侵染拟南芥的细胞生物学过程已有详细描述。白粉菌的孢子一旦成功附着到宿主表面,一系列穿透前的事件便开始发生,包括孢子的萌发、萌发管的伸长和附着胞的生成。随后,附着胞上会形成穿透钉,对宿主表皮细胞施加巨大的机械压力以便穿透角质层和细胞壁,成功的穿透导致宿主细胞膜内陷,并在细胞内形成一个吸取养份的结构,这个结构称之为吸器。吸器形成之后,穿透后的事件也陆续产生,次级菌丝开始在叶片表面扩增,新的附着胞产生并穿透表皮细胞,进一步发育出次级吸器。最后,分生孢子的产生标志着白粉菌生活史的完成^[21,22]。

迄今为止,ABA对拟南芥与白粉菌互作的调控尚未见报道。本文从拟南芥ABA合成缺陷型突变体*aba2-1*及*aba3-1*入手,研究了ABA在拟南芥与白粉菌互作中的功能。本课题组发现,ABA通过抑制SA抗病信号通路来负调控拟南芥对白粉菌的穿透后抗性,进一步研究发现MPK3也参与了该调控过程。

1 材料与方法

1.1 植物材料与植物激素的处理

本研究中所用的拟南芥突变体*aba2-1*, *aba3-1*,

abi4-1, *eds1-2*, *mpk3-1*(SALK_151594), *mpk6-2*(SALK_073907)和*pad4-1*突变体为Col-0生态型背景^[7,23-27]; *abi1-1*, *abi2-1*和*abi3-1*突变体为Ler-0生态型背景^[6,28,29]; *abi5-1*突变体为Ws-0生态型背景^[8]。通过遗传杂交获得纯合双突变体植株用于实验分析。植物置于16 h光照/8 h黑暗, 22℃, 湿度为75%的温室中生长。

将溶解在无水乙醇中的25 mmol/L ABA(*cis-trans* isomer; Sigma, 美国)母液用含0.01% Silwet-77的重蒸水稀释成80 μmol/L的工作溶液。采用外源喷施的方法将ABA工作溶液均匀地喷施到6周大小的植物上,将植物保持在80%~90%的高湿环境中,4 h后用于接种白粉菌。

1.2 白粉菌接种和孢子计数

白粉菌(*Golovinomyces cichoracearum*)UCSC1菌株在拟南芥*NahG*植株上进行扩繁,在接种14~21天后收集其分生孢子用于接种^[30]。接种时,将6周大小的拟南芥置于接种箱(1.2 m高的纸箱)底部,利用吹风机将分生孢子吹入接种箱内。新接种的植物静置1 h后,移至生长室中生长。

孢子计数的方法参照之前文献中的报道^[31],并略加修改。接种6天后,每种基因型植物收集8份叶片样品(每份约500 mg)至离心管中,加入10 mL H₂O,在漩涡混合仪上以最大速度涡旋1 min,将孢子从植物叶片上完全洗脱下来,然后用神奇滤布(Merck)过滤孢子悬浮液至新离心管中。4000×g离心15 min,沉淀下来的孢子用1 mL H₂O进行重悬,并在光学显微镜下利用血细胞计数板对白粉菌孢子进行计数。得到的数值用相应样品的叶片重量进行标准化。实验结果重复3次并采用Student's *t*-test进行显著性差异分析。

1.3 组织化学染色和光学显微观察

真菌结构的考马斯亮蓝染色方法参照之前文献报道^[32],并略加改进。拟南芥叶片在接种后不同时间点收集样品,脱色处理后的叶片放在乳酸/甘油(乳酸:甘油:水, 1:1:1, 体积比)溶液中保存。染色时,将叶片置于0.6%的考马斯亮蓝R-250(Sigma)染液中浸泡7 s,重蒸水冲洗叶片,之后将染色的叶片平铺在载玻片上,用50%的甘油封片,用BX51光学显微镜(Olympus, 日本)进行显微观察并拍照。实验重复2次,每次重复中同一

基因型植物在每个时间点上的数据至少来源于8个不同的样本。

台盼蓝染色观察真菌结构及细胞死亡参照之前文献报道^[33]。将收集的叶片浸泡在台盼蓝染液中,煮沸5 min。用水合氯醛溶液对染色的叶片进行室温脱色过夜。脱色后的叶片平铺在50%的甘油中直接制片。用BX51光学显微镜进行显微观察并拍照。

1.4 总RNA提取和实时荧光定量PCR分析

利用TRIzol试剂(Invitrogen, 美国)提取植物的总RNA。DNase I 处理后的RNA样品用PrimeScript™ RT试剂盒(TaKaRa, 日本)根据说明书进行反转录。实时荧光定量PCR反应分析参照之前文献报道^[34], 使用SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa)在CFX96荧光定量PCR仪(Bio-Rad, 美国)进行PCR反应。基因的相对表达量根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 公式计算方法利用CFX Manager Software软件(Bio-Rad), 进行计算分析。实验中以ACTIN 2(AT3G18780)为内参基因。实时荧光定量PCR反应所使用的引物见网络版附表1。

2 结果与分析

2.1 ABA负调控拟南芥对白粉菌的抗性

为了研究ABA在拟南芥与白粉菌互作中的功能, 对ABA合成缺陷型突变体*aba2-1*和*aba3-1*接种白粉菌致病菌株UCSC1的分生孢子并观察感病症状。野生型拟南芥对白粉菌表现出明显的感病症状, 接种8天后, 叶片上可观察到密集生长的白粉菌。与之相反, *aba2-1*和*aba3-1*突变体叶片上生长的白粉菌显著减少(图1A)。通过统计接种6天后的分生孢子数量对白粉菌的生长情况进行量化。与前面的结果一致, *aba2-1*和*aba3-1*突变体上的分生孢子数相比野生型显著减少, 表明*aba2-1*和*aba3-1*突变体对白粉菌的抗性增强(图1B)。显微观察进一步证实, *aba2-1*和*aba3-1*突变体上分生孢子的数目显著少于野生型(图1C)。此外, 在野生型、*aba2-1*和*aba3-1*突变体的叶片上都没有观察到明显的细胞死亡(图1C)。这些数据表明, ABA缺乏导致拟南芥对白粉菌的抗性增强。进一步研究*aba*突变体对白粉菌的抗病表型是否由于ABA缺乏直接造成的。如图1D所示, 外源ABA处理能够在很大程度上恢复*aba2-1*和*aba3-1*突变体对白粉菌的感病性。有趣的

是, 外源ABA处理同样能够增强野生型对白粉菌的感病性, 但这种增强幅度相比*aba*突变体稍小(图1D)。这些数据表明ABA负调控拟南芥对白粉菌的抗性。

2.2 ABA核心信号转导组分的突变体而非下游信号转导组分的突变体对白粉菌表现出增强的抗性

对拟南芥ABA不敏感型突变体*abi1-1*, *abi2-1*, *abi3-1*, *abi4-1*和*abi5-1*同样接种白粉菌UCSC1的分生孢子并观察感病症状。ABA核心信号转导组分突变体*abi1-1*和*abi2-1*对白粉菌同样表现出增强的抗性(图2A和B)。外源ABA处理只能部分恢复*abi1-1*和*abi2-1*突变体对白粉菌的感病性(图2C)。与ABA合成缺陷型突变体和ABA核心信号转导组分突变体相反, ABA下游信号转导组分突变体*abi3-1*, *abi4-1*, *abi5-1*与它们相应的野生型的发病表型并没有明显差异(图2A), 在接种6天后都产生了大量的分生孢子(图2B)。同时, 对*abi3-1*, *abi4-1*, *abi5-1*突变体和它们相应的野生型进行外源ABA处理, 接种分生孢子后, 这些突变体与它们相应的野生型表现出相似表型(图2C)。这些结果表明, ABA调控植物对白粉菌的抗性可能依赖于ABA的受体组分而非经典的ABA下游信号转导途径。

2.3 ABA合成缺陷型突变体对白粉菌的穿透后抗性增强

为了探究ABA如何调控对白粉菌的防御反应, 对白粉菌在拟南芥叶片上的侵染及发育过程进行观察分析。在*aba3-1*突变体和野生型植株上, 白粉菌孢子的萌发率及萌发管的平均长度均无显著差异(表1)。通过统计宿主细胞中形成的吸器来确定白粉菌的穿透率, 发现在野生型和*aba3-1*突变体上孢子的穿透率都能够达到80%左右, 没有显著差别(表1)。以上结果表明, ABA没有影响拟南芥对白粉菌的穿透前和穿透抗性。进一步通过考马斯亮蓝染色对白粉菌侵染后12 h至6天的菌丝生长及分生孢子产生进行了观察及统计。如图3A所示, *aba3-1*突变体叶片上形成的单菌落明显小于野生型叶片上的。与此相一致, 在*aba3-1*突变体上的单菌落的菌丝总长也显著低于野生型上的(图3B)。接种后的第4天, 白粉菌在突变体及野生型植物上菌丝的生长差异更为显著。此时, 野生型植物上白粉菌孢子在生长过程中通过分支形成了大量的次级菌丝, 次级菌丝上形成了可侵入到植物表皮细胞的次级萌

图1 ABA合成缺陷突变体接种白粉菌的表型分析

A: 6周大小的拟南芥植物(Col-0, *aba2-1*和*aba3-1*)接种白粉菌, 8天后对植物进行拍照; B: 植物接种6天后的孢子数量统计来量化白粉菌在叶片上的生长情况。误差线表示SD($n=4$)。星号表示在统计学上具有显著性差异(**: $P<0.01$; t -test); C: 植物接种6天后的叶片进行台盼蓝染色来观察白粉菌的生长情况, Bars=200 μm ; D: ABA预处理对白粉菌侵染植物的影响。植物在接种前24 h用80 $\mu\text{mol/L}$ 的ABA溶液或水(对照)进行喷施。接种6天后的孢子数量统计来量化白粉菌在叶片上的生长情况。误差线表示SD($n=4$)。星号表示与ABA处理后野生型植物上的孢子数量相比在统计学上具有显著性差异(**: $P<0.01$; t -test)

表1 白粉菌在Col-0和*aba3-1*突变体叶片上的发育情况^{a)}

植物	发育阶段		
	萌发管长度 (μm) [*]	萌发率(%) ^{**}	穿透率(%) ^{***}
Col-0	13.0 $\pm$ 3.0	95.6 $\pm$ 0.6	79.9 $\pm$ 1.9
<i>aba3-1</i>	13.0 $\pm$ 2.6	95.6 $\pm$ 1.2	78.2 $\pm$ 1.3

a) *: 测量接种12 h后萌发管的长度。数值为50个样品的 $\bar{x}\pm\text{SD}$;

** : 统计接种1天后孢子的萌发率。数值为3次重复实验的 $\bar{x}\pm\text{SD}$;

*** : 统计接种1天后孢子的穿透率。数值为3次重复实验的 $\bar{x}\pm\text{SD}$

发管。而*aba3-1*突变体上菌丝分支的形成明显减少(图3A和C)。接种5天后, 在*aba3-1*突变体植物和野生型植物上都开始产生分生孢子, 但*aba3-1*突变体上的分生孢子数量显著少于野生型(图3D)。这些结果表明, ABA负调控拟南芥对白粉菌的穿透后抗性。

2.4 SA参与ABA缺乏所诱导的拟南芥对白粉菌的抗性

SA在调控拟南芥对白粉菌的穿透及穿透后抗性中发挥重要作用^[35]。为了确定SA是否参与ABA缺乏所诱导的拟南芥对白粉菌的抗性, 首先检测了野生型和*aba3-1*突变体植物中SA响应基因(*PR1*, *PR2*, *PR5*,

SID2, *PAD4*和*EDS1*)的转录水平。如图4A所示, 这些SA响应基因在*aba3-1*突变体中的转录水平显著高于野生型植物。此外, 这些基因的表达在野生型和*aba3-1*突变体植物中都会受白粉菌侵染强烈诱导, 并在接种5天后达到峰值, 而且这些基因在*aba3-1*突变体中的转录水平仍高于野生型植物。由于外源ABA处理可以恢复拟南芥对白粉菌的感病性, 进一步检测了外源ABA处理后野生型及*aba3-1*突变体中SA响应基因转录水平的变化。有趣的是, 外源ABA处理后, SA响应基因在*aba3-1*突变体中的表达水平恢复至野生型相似水平(图4A)。

EDS1和PAD4是SA抗病信号通路中的重要组分。为了进一步确定SA在ABA缺乏所诱导的对白粉菌抗性中的功能, 将*eds1-2*与*pad4-1*分别与*aba3-1*杂交, 并对所获得的双突变体植物进行白粉菌接种实验。如图4B所示, *pad4-1/aba3-1*及*eds1-2/aba3-1*双突变体与*aba3-1*相比, 其植物上白粉菌的生长明显增加, 所产生的分生孢子数也显著升高。虽然这些双突变植物对白粉菌的感病性显著恢复, 但其感病程度还是低于其亲本植物*pad4-1*和*eds1-2*(图4C和D)。综上数据, 表明SA防御途径参与了ABA缺乏所诱导的对白粉菌的抗性。

图 2 ABA不敏感突变体接种白粉菌的表型分析

A: 6周大小的ABA不敏感突变体植物以及它们相应的野生型植物(Ler-0, Col-0和WS)接种白粉菌, 8天后对植物进行拍照. 植物接种6天后的叶片进行台盼蓝染色观察单菌落的生长情况. Bars=200 μ m; B: 植物接种6天后的孢子数量统计来量化白粉菌在叶片上的生长情况. 误差线表示SD($n=4$). 星号表示与野生型植物上的孢子数量相比在统计学上具有显著性差异(**: $P<0.01$; t -test); C: ABA预处理对白粉菌侵染植物的影响. 植物在接种前24 h用80 μ mol/L的ABA溶液或水(对照)进行喷施. 接种6天后的孢子数量统计来量化白粉菌在叶片上的生长情况. 误差线表示SD($n=4$). 星号表示与ABA处理后野生型植物上的孢子数量相比在统计学上具有显著性差异(**: $P<0.01$; t -test)

图3 白粉菌在 $aba3-1$ 突变体植物上的发病进程

A: 白粉菌在野生型和 $aba3-1$ 突变体植物上发病进程的显微观察. 接种后不同时间点的植物叶片进行考马斯亮蓝染色观察真菌的结构. 接种6天后的植物叶片进行台盼蓝染色观察完整的单菌落生长情况(右下角). Bars=50 μ m; B: 植物接种后第2, 3和4天的单菌落总菌丝长度的统计. 误差线表示SD($n=20$); C: 植物接种后第2, 3和4天的单菌落菌丝分支数的统计. 误差线表示SD($n=20$); D: 植物接种后不同时间点的孢子数量统计来量化白粉菌在叶片上的生长情况. 误差线表示SD($n=4$)

2.5 MPK3参与ABA缺乏所诱导的拟南芥对白粉菌的抗性

促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)级联调控多种激素拮抗或协同介导的植物抗病反应^[36]. MPK3和MPK6是两个主要的MAPK成员, 正调控SA抗病信号通路^[37]. 为了探究MAPK级联在拟南芥对白粉菌抗性中的功能. 首先检测了野生型和 $aba3-1$ 突变体植物中MPK3和MPK6的转录水平.

如图5A所示, 白粉菌接种前和接种后, $aba3-1$ 突变体中MPK3的转录水平都显著高于野生型, 而MPK6的转录水平并没有显著变化(图5A). 随后, 通过杂交获得 $mpk3-1/aba3-1$ 和 $mpk6-2/aba3-1$ 双突变体并对其进行了白粉菌接种实验, 发现 $mpk3-1/aba3-1$ 双突植物上白粉菌的产孢量显著高于其亲本 $aba3-1$ 突变体, $mpk6-2/aba3-1$ 却表现出了与 $aba3-1$ 突变体相似的产孢量(图5B~D). 但是, $mpk3-1/aba3-1$ 的感病性并没有恢复至与野生型

图 4 SA参与ABA缺乏所诱导的对白粉菌抗性

A: 实时荧光定量PCR检测ABA或水(对照)处理的野生型和*aba3-1*突变体植物的SA响应基因的转录水平。6周大小的植物在ABA处理后用于接种白粉菌,在接种后的指定时间收集植物叶片。进行3次实验重复,以*ACTIN2*作为内参。水处理后的野生型在接种前基因的表达水平设定为“1”。误差线表示SD; B: 6周大小的拟南芥植物(Col-0, *pad4-1*, *eds1-2*, *aba3-1*, *pad4-1/aba3-1*和*eds1-2/aba3-1*)接种白粉菌,8天后对植物进行拍照(上排)。植物接种6天后的叶片进行台盼蓝染色观察单菌落的生长情况(下排)。Bars=200 μm; C和D: 植物接种6天后的孢子数量统计来量化白粉菌在叶片上的生长情况。误差线表示SD($n=4$)。星号表示在统计学上具有显著性差异(**: $P<0.01$; t -test)

图5 MPK3而非MPK6参与了ABA缺乏所诱导的对白粉菌的抗性

A: 实时荧光定量PCR检测野生型和*aba3-1*突变体植物中MPK3和MPK6的表达水平。实验重复3次, 以*ACTIN2*作为内参。误差线表示SD。星号表示与野生型植物中基因表达水平相比在统计学上具有显著性差异(*: $P < 0.05$; t -test); B: 6周大小的拟南芥植物(Col-0, *mpk3-1*, *mpk6-2*, *aba3-1*, *mpk3-1/aba3-1*和*mpk6-2/aba3-1*)接种白粉菌, 8天后对植物进行拍照(上两排)。植物接种6天后的叶片进行台盼蓝染色观察单菌落的生长情况(下两排)。Bars=200 μ m; C和D: 植物接种6天后的孢子数量统计来量化白粉菌在叶片上的生长情况。误差线表示SD($n=4$)。星号表示在统计学上具有显著性差异(**: $P < 0.01$; t -test)

和*mpk3-1*突变体相似的水平(图5C)。这些结果表明, MPK3调控ABA缺乏所诱导的对白粉菌的抗性。

3 讨论

ABA在植物抗病反应中的功能在很大程度上取决于侵染的病原菌的生活方式^[12,13]。目前, 对ABA如何调控植物于活体营养型病原真菌的互作还了解甚少。本研究发现, ABA负调控拟南芥对白粉菌的穿透后抗

性, 并且这种抗性至少部分依赖SA, 进一步研究发现MPK3也参与了ABA缺乏所诱导的对白粉菌的抗性。

当白粉菌突破植物的穿透前和穿透抗性进入植物细胞内部, 植物细胞便亟需启动一系列积极的防御反应来阻止其进一步侵染。植物细胞会设法阻止吸器的营养摄取, 其中最有效的途径是超敏反应(hypersensitive reaction, HR)引发的侵染细胞的死亡。最近有研究表明, 超敏反应与植物对白粉菌的穿透后抗性存在密切

联系^[38]. 然而, 植物对白粉菌的数量抗性通常并不伴随叶片侵染部位的细胞坏死, 表明植物对白粉菌的穿透后抗性并不局限于过敏反应^[39]. 此外, 使用激光显微切割已经鉴定了在*Golovinomyces orontii*侵染部位表达的拟南芥基因. 对接种5天后(代表穿透后阶段)的样品的转录组进行分析, 共鉴定出67个转录因子, 其中大部分调控植物的防御反应、非生物胁迫反应、细胞周期调控和生长素信号通路^[40]. 虽然植物对白粉菌的穿透后抗性的一些有效防御反应得到了初步阐明, 但参与这个过程许多因子仍不清楚. 本研究首次证明了ABA负调控拟南芥对白粉菌的穿透后抗性.

ABA合成缺陷突变体表现对白粉菌抗性增强, 而外源ABA处理可以恢复这些突变体对白粉菌的感病性(图1), 表明*aba*突变体对白粉菌的抗病表型是由于ABA而非其他的代谢物所造成的. ABA负调控植物抗病反应在其他一些植体系也有报道, 如植物与活体营养型病原菌*Phytophthora parasitica*和植物与半活体营养型病原菌*Pseudomonas syringae*的互作^[11,41]. 拟南芥ABA信号转导通路突变体对白粉菌的感病性分析表明, ABA核心信号转导组分突变体*abi1-1*和*abi2-1*对白粉菌感病性降低, 而ABA信号转导下游组分突变体*abi3-1*, *abi4-1*和*abi5-1*对白粉菌的感病性没有发生变化(图2). 这些结果表明, ABA合成基因和ABA核心转导组分基因参与了拟南芥对白粉菌的抗性, 而这种抗性不依赖于经典的ABA下游信号转导通路. 然而, ABA合成缺陷突变体*aba1-1*对*P. parasitica*的抗性增强, 但*abi1-1*突变体*P. parasitica*的抗性没有改变^[11]. 与此相似, 高温下*aba1-6*及*aba2-1*突变体中R蛋白介导的抗病反应明显增强, 而*abi1-1*及*abi4-1*突变体的抗性却没有改变^[42]. 因此, ABA调控对不同病原菌的抗性很可能是通过不同信号转导组分, 以此来保持信号传递

的特异性.

植物与病原菌互作的结果很大程度上受到植物激素之间相互作用及协调平衡的影响. *pad4-1/aba3-1*及*eds1-2/aba3-1*双突变植物对白粉菌的感病性显著高于*aba3-1*突变体, 表明SA途径在ABA缺乏诱导的白粉菌抗性中发挥功能(图4C和D). 同时, SA途径标志基因的转录水平在*aba3-1*突变体中显著提高, 而外源ABA处理则抑制了被白粉菌诱导的SA途径标志基因的表达, 表明ABA拮抗SA防御途径来负调控拟南芥对白粉菌的抗性. 基于基因表达比较分析, Mohr和Cahill^[43]拟南芥与*P. syringae*互作中提出了SA和ABA之间存在拮抗关系并有详尽描述. 本研究进一步证明, 在拟南芥与白粉菌互作中, SA和ABA以同样拮抗方式调控抗病反应. 然而, 尽管*pad4-1/aba3-1*和*eds1-2/aba3-1*双突变植物对白粉菌的感病性显著提高, 但其感病程度仍低于*eds1-2*及*pad4-1*亲本植物, 表明可能还存在不依赖SA的途径调控ABA缺乏所诱导的白粉菌抗性.

本研究进一步发现, MPK3参与了ABA缺乏所诱导的白粉菌抗性, 而MPK6并未参与该过程. 虽然MPK3和MPK6存在功能冗余, 但许多研究表明它们在防卫反应中的作用并不完全重叠. 例如, MPK3在BTH诱导的防卫反应过程中发挥重要作用, 而MPK6在这个过程中所起的作用却很小^[37]. 此外, MPK6对激发子诱导的防卫反应至关重要, 而它对真菌病原菌*B. cinerea*的植物基础抗性却非必需. 与此相对, MPK3的缺失影响了植物对*B. cinerea*的基础抗性, 但对激发子诱导的防卫反应却没有显著影响^[44].

综上所述, 本研究提供的多方面证据支持ABA可能通过拮抗SA信号通路来负调控拟南芥对活体营养型白粉菌的穿透后抗性, 而对于其拮抗的机制尚需要进一步的工作进行深入阐述.

参考文献

- Pieterse C M J, Van der Does D, Zamioudis C, et al. Hormonal modulation of plant immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2012, 28: 489–521
- Xiong L, Schumaker K S, Zhu J K. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell*, 2002, 14: S165–S183
- Liang C, Chu C. Towards understanding abscisic acid-mediated leaf senescence. *Sci China Life Sci*, 2015, 58: 506–508
- Cutler S R, Rodriguez P L, Finkelstein R R, et al. Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annu Rev Plant Biol*, 2010, 61: 651–679
- Ma X, Mo B X, Cao X F. New players in ABA signaling: identification of PUB12/13 involved in degradation of ABA co-receptor ABI1. *Sci China Life Sci*, 2015, 58: 1173–1174
- Giraudat J, Hauge B M, Valon C, et al. Isolation of the *Arabidopsis* *ABI3* gene by positional cloning. *Plant Cell*, 1992, 4: 1251–1261

- 7 Finkelstein R R, Wang M L, Lynch T J, et al. The *Arabidopsis* abscisic acid response locus *ABI4* encodes an APETALA 2 domain protein. *Plant Cell*, 1998, 10: 1043–1054
- 8 Finkelstein R R, Lynch T J. The *Arabidopsis* abscisic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell*, 2000, 12: 599–610
- 9 Mauch-Mani B, Mauch F. The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Curr Opin Plant Biol*, 2005, 8: 409–414
- 10 Audenaert K, De Meyer G B, Höfte M M. Absciscic Acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. *Plant Physiol*, 2002, 128: 491–501
- 11 Mohr P G, Cahill D M. Absciscic acid influences the susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Peronospora parasitica*. *Funct Plant Biol*, 2003, 30: 461–469
- 12 Asselbergh B, De Vleeschauwer D, Höfte M. Global switches and fine-tuning—ABA modulates plant pathogen defense. *Mol Plant Microbe Interact*, 2008, 21: 709–719
- 13 Ton J, Flors V, Mauch-Mani B. The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends Plant Sci*, 2009, 14: 310–317
- 14 Asselbergh B, Curvers K, Franca S C, et al. Resistance to *Botrytis cinerea* in sitiens, an abscisic acid-deficient tomato mutant, involves timely production of hydrogen peroxide and cell wall modifications in the epidermis. *Plant Physiol*, 2007, 144: 1863–1877
- 15 Curvers K, Seifi H, Mouille G, et al. Absciscic acid deficiency causes changes in cuticle permeability and pectin composition that influence tomato resistance to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol*, 2010, 154: 847–860
- 16 Ton J, Mauch-Mani B. β -amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *Plant J*, 2004, 38: 119–130
- 17 Flors V, Ton J, van Doorn R, et al. Interplay between JA, SA and ABA signalling during basal and induced resistance against *Pseudomonas syringae* and *Alternaria brassicicola*. *Plant J*, 2008, 54: 81–92
- 18 Garcia-Andrade J, Ramírez V, Flors V, et al. *Arabidopsis ocp3* mutant reveals a mechanism linking ABA and JA to pathogen-induced callose deposition. *Plant J*, 2011, 67: 783–794
- 19 Adie B A T, Pérez-Pérez J, Pérez-Pérez M M, et al. ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2007, 19: 1665–1681
- 20 Schulze-Lefert P, Vogel J. Closing the ranks to attack by powdery mildew. *Trends Plant Sci*, 2000, 5: 343–348
- 21 Tucker S L, Talbot N J. Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol*, 2001, 39: 385–417
- 22 Hükelhoven R, Panstruga R. Cell biology of the plant-powdery mildew interaction. *Curr Opin Plant Biol*, 2011, 14: 738–746
- 23 Glazebrook J, Rogers E E, Ausubel F M. Isolation of *Arabidopsis* mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening. *Genetics*, 1996, 143: 973–982
- 24 Falk A, Feys B J, Frost L N, et al. EDS1, an essential component of R gene-mediated disease resistance in *Arabidopsis* has homology to eukaryotic lipases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 3292–3297
- 25 Bittner F, Oreb M, Mendel R R. ABA3 is a molybdenum cofactor sulfuryase required for activation of aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 2001, 276: 40381–40384
- 26 González-Guzmán M, Apostolova N, Bellés J M, et al. The short-chain alcohol dehydrogenase ABA2 catalyzes the conversion of xanthoxin to abscisic aldehyde. *Plant Cell*, 2002, 14: 1833–1846
- 27 Alonso J M, Stepanova A N, Leisse T J, et al. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 2003, 301: 653–657
- 28 Gosti F, Beaudoin N, Serizet C, et al. ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling. *Plant Cell*, 1999, 11: 1897–1910
- 29 Merlot S, Gosti F, Guerrier D, et al. The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. *Plant J*, 2001, 25: 295–303
- 30 Delaney T P, Uknes S, Vernooij B, et al. A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science*, 1994, 266: 1247–1250
- 31 Weßling R, Panstruga R. Rapid quantification of plant-powdery mildew interactions by qPCR and conidiospore counts. *Plant Methods*, 2012, 8: 35
- 32 Göllner K, Schweizer P, Bai Y, et al. Natural genetic resources of *Arabidopsis thaliana* reveal a high prevalence and unexpected phenotypic plasticity of *RPIW8*-mediated powdery mildew resistance. *New Phytol*, 2008, 177: 725–742
- 33 Frye C A, Innes R W. An *Arabidopsis* mutant with enhanced resistance to powdery mildew. *Plant Cell*, 1998, 10: 947–956
- 34 Guo W, Zuo Z, Cheng X, et al. The chloride channel family gene *CLC*d** negatively regulates pathogen-associated molecular pattern (PAMP)-triggered immunity in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, 2014, 65: 1205–1215

- 35 Lipka V, Dittgen J, Bednarek P, et al. Pre- and postinvasion defenses both contribute to nonhost resistance in *Arabidopsis*. [Science](#), 2005, 310: 1180–1183
- 36 Tena G, Boudsocq M, Sheen J. Protein kinase signaling networks in plant innate immunity. [Curr Opin Plant Biol](#), 2011, 14: 519–529
- 37 Beckers G J M, Jaskiewicz M, Liu Y, et al. Mitogen-activated protein kinases 3 and 6 are required for full priming of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. [Plant Cell](#), 2009, 21: 944–953
- 38 Wen Y, Wang W, Feng J, et al. Identification and utilization of a sow thistle powdery mildew as a poorly adapted pathogen to dissect post-invasion non-host resistance mechanisms in *Arabidopsis*. [J Exp Bot](#), 2011, 62: 2117–2129
- 39 Rubiales D, Niks R E, Carver T L, et al. Prospects for exploitation of disease resistance from *Hordeum chilense* in cultivated cereals. *Hereditas*, 2001, 135: 161–169
- 40 Chandran D, Inada N, Hather G, et al. Laser microdissection of *Arabidopsis* cells at the powdery mildew infection site reveals site-specific processes and regulators. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2010, 107: 460–465
- 41 Mosher S, Moeder W, Nishimura N, et al. The lesion-mimic mutant *cpr22* shows alterations in abscisic acid signaling and abscisic acid insensitivity in a salicylic acid-dependent manner. [Plant Physiol](#), 2010, 152: 1901–1913
- 42 Mang H G, Qian W, Zhu Y, et al. Abscisic acid deficiency antagonizes high-temperature inhibition of disease resistance through enhancing nuclear accumulation of resistance proteins SNC1 and RPS4 in *Arabidopsis*. [Plant Cell](#), 2012, 24: 1271–1284
- 43 Mohr P G, Cahill D M. Suppression by ABA of salicylic acid and lignin accumulation and the expression of multiple genes, in *Arabidopsis* infected with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. [Funct Integr Genomics](#), 2007, 7: 181–191
- 44 Galletti R, Ferrari S, De Lorenzo G. *Arabidopsis* MPK3 and MPK6 play different roles in basal and oligogalacturonide- or flagellin-induced resistance against *Botrytis cinerea*. [Plant Physiol](#), 2011, 157: 804–814