

拟南芥抗凋亡突变体 *fbr136* 的分离鉴定与分析 *

孙姝兰^{1,2)}** 左建儒²⁾

(¹⁾华南师范大学生命科学院, 广州 510631; ²⁾中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101)

摘要 植物细胞程序性死亡 (programmed cell death, PCD) 在植物的生长发育进程以及防御生物与非生物胁迫的过程中具有重要的作用. Fumonisin B₁ (FB₁) 是一种真菌毒素, 是鞘脂生物合成途径中关键酶神经酰胺合酶 (ceramide synthase) 的竞争性抑制剂. FB₁ 在动植物细胞中均能够诱导 PCD. 为了探索植物 PCD 的机制, 通过筛选拟南芥抗 FB₁ 的突变体, 分离鉴定了 11 个 *fumonisin B₁ resistant (fbr)* 突变体. 遗传分析表明, 这些突变体分别是由 9 个相同或者不同的遗传座位突变造成的. 其中一个代表性的突变体 *fbr136* 进行了详细的表型分析和初步遗传定位. *fbr136* 对其他 PCD 诱导剂, 例如 H₂O₂ 或 paraquat 也表现出一定的抗性或耐受性, 而且在 *fbr136* 突变体中 FB₁ 不能正常诱导 *PR1* 基因的表达, 说明 *fbr136* 突变体 PCD 的发生可能受到阻碍. 硝基四唑 (Nitroblue tetrazolium, NBT) 染色表明, FB₁ 处理 *fbr136* 突变体后产生和积累活性氧 (reactive oxygen species) 比野生型植物显著降低, 暗示其抗凋亡表型可能与活性氧的产生有关. 推测 *FBR136* 可能是 FB₁ 在诱导 PCD 过程中, 从鞘脂含量变化到活性氧积累变化这一途径的一个重要的调控因子. *fbr136* 被定位于染色体 III 上, 与以往鉴定的抗 FB₁ 突变基因的定位都不同, 因此, *FBR136* 可能是 FB₁ 诱导 PCD 信号途径中的一个新基因.

关键词 拟南芥, 植物细胞程序性死亡, FB₁, *fbr136*, 鞘脂, 活性氧

学科分类号 Q3

植物细胞程序性死亡 (PCD), 在真核生物的正常生长发育以及对外界生物和非生物胁迫进行反应的过程中起到重要的调控作用^[1~6]. 对于植物尤其是对于拟南芥与病原菌相互作用的遗传研究, 使人们对植物 PCD 的机制有了比较深入的了解. 超敏感反应 (HR) 是病原菌侵染引发的一种常见的细胞程序性死亡形式, 其形态学变化与动物 PCD 具有许多相似的特征, 如细胞核皱缩、DNA 片段化等等. 活性氧和一氧化氮的形成以及 *PR* 基因的表达也是超敏感反应的重要特征, 而且超敏感反应的发生大多依赖于水杨酸 (salicylic acid, SA) 信号途径的介导^[3,6~9].

近年来, 许多非生物胁迫诱导植物 PCD 也得到了广泛的关注和研究, 包括近些年发现的两大类毒素, FB₁ 和 AAL 毒素^[10,11], 它们都对鞘脂的合成具有抑制作用. 用 FB₁ 处理的拟南芥叶片产生了类似于 HR 反应的病斑. 伴随着这种病斑的发生会产生活性氧、胍脂质和酚类物质的积累以及 *PR* 基因的表达. 说明 FB₁ 在拟南芥的叶片中能诱导类似于病原菌引起的 HR 反应, 由此, Stone 等^[12] 创建了一个非病原菌条件下诱导 PCD 的实验体系, 用以

筛选与 FB₁ 抗性相关的突变体.

目前关于 FB₁ 在植物中诱导 PCD 的机制还不清楚. 在拟南芥中 FB₁ 诱导的 PCD 依赖于光^[12], 并且需要茉莉酸 (jasmonic acid, JA)、SA 以及乙烯 (ethylene, ET) 几个激素信号转导途径的参与^[10]. FB₁ 引起 PCD 的这一过程可能十分复杂, 推测可能 FB₁ 通过抑制神经酰胺合酶的活性, 从而打破鞘脂代谢的平衡, 致使某些鞘脂含量增加, 经过一系列途径最终诱导植物或动物细胞产生凋亡^[13,14]. 最近在植物中有一些对 FB₁ 诱导 PCD 机制的研究进展. VPE (vacuolar processing enzyme) 是动物细胞 caspase-1 具有相似性的一种液泡处理酶. 拟南芥基因组中 4 个 VPE 都缺失的无义突变体对 FB₁ 不敏感, 而且 caspase-1 或者 VPE 的抑制剂都能解除 FB₁ 在野生型拟南芥中诱导细胞死亡的作用. Kuroyanagi 等^[15] 推测, 可能是因为 FB₁ 影响了神经

* 国家自然科学基金资助项目 (30330217 和 30221002).

** 通讯联系人.

Tel/Fax: 020-85216417, E-mail: sunsl@scau.edu.cn

收稿日期: 2007-07-05, 接受日期: 2007-08-26

酰胺合酶从而影响了液泡膜中鞘脂的组成, 再进一步诱发了由 VPE 介导的液泡崩溃. Stone 等^[12, 16]利用种子萌发对 FB₁ 的敏感性筛选得到 3 个突变体: *fbr1*、*fbr2* 和 *fbr6* (FB₁ resistant). 3 个突变体都表现出对 FB₁ 的抗性. 在 *fbr1* 和 *fbr2* 两个突变体中, FB₁ 诱导 PR 基因表达的能力有所改变, 并且对假单孢丁香菌 ES4326 的强毒菌株抗性增强. 其中 *fbr6* 突变体相应的野生型基因编码一个 SQUAMOSA promoter binding protein (SBP) domain 基因. 但是关于 *fbr6* 抗 FB₁ 的机制没有被阐明^[16]. 此外, 最近鉴定了一个编码翻译起始因子 5A-2 的 FBR12, 它作为 FB₁ 最诱导 PCD 信号途径中的一个元件, 可能是通过调节细胞分裂、细胞生长以及细胞死亡来调节植物生长发育的^[17].

虽然最近对 FB₁ 诱导植物 PCD 的研究取得了一些进展, 但是其信号传导过程及其机制还不清楚. Stone 等进行的 *fbr* 突变体筛选并未覆盖整个基因组, 我们大规模筛选 FB₁ 抗性突变体, 以期得到在 FB₁ 诱导的 PCD 过程中起重要作用的一些组分, 对 FB₁ 诱导的 PCD 信号途径有更加全面的了解. 在本文中, 我们通过筛选得到 11 个抗 FB₁ 的 *fbr* 突变体, 其中 *fbr136* 对 FB₁ 表现出很强的抗性, 因此我们对 *fbr136* 进行了详细的表型分析和初步遗传定位. 研究表明, *fbr136* 不仅对 FB₁ 具有很强的抗性, 而且对其他的 PCD 诱导剂, 例如 H₂O₂ 或 paraquat^[18, 19]也表现出一定的抗性或耐受性. 不仅如此, *fbr136* 突变体中, FB₁ 也不能正常诱导 PR 基因的表达, 说明 *fbr136* 突变体 PCD 的发生可能受到阻碍. 硝基四唑(NBT)染色表明, FB₁ 处理 *fbr136* 突变体后产生和积累活性氧比野生型植物显著降低, 证明活性氧是 FB₁ 诱导 PCD 过程中的关键作用因子, 而 *FBR136* 可能是在从鞘脂含量变化到活性氧积累变化这一途径的一个重要的调控因子. *fbr136* 被定位于染色体 III 上, 与以往鉴定的抗 FB₁ 突变基因的定位都不同, 因此 *FBR136* 可能是 FB₁ 诱导 PCD 信号途径中的一个新基因.

1 材料与方法

1.1 植物材料和生长条件

在本研究中, 我们使用了拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的两个生态型: Columbia-0 (Col-0) 和 Landsberg erecta (Ler). 拟南芥种子用 10% 次氯酸钠浸泡灭菌 10~15 min, 无菌水洗 3~4 次, 然后播于 MS^[20] 固体培养基上或者是含有不同浓度的

H₂O₂ 或 paraquat 的培养基上, 在 4℃ 处理 2~3 天后转移到培养间培养. 土壤培养则将装有种子的离心管中加入适量清水, 春化处理 2~3 天后播种于 1/2 B5 培养液浸泡过的蛭石上. 培养皿或蛭石中的植物生长条件为: 23℃, 连续光照或 16 h 光照, 光照强度为 80~120 μE·m⁻²·s⁻¹.

1.2 *fbr* 突变体的筛选

EMS 诱变的 M₂ 代种子 (Ler) 由中国科学院上海植物生理研究所黄海实验室惠赠, 利用该突变体库, 我们进行了 *fbr* 突变体的大规模筛选^[17]. 突变体库 10 个独立株系 (line) 为一组 (pool) 混合, 每一组取约 300 粒种子播在含有 0.75 μmol/L FB₁ (Sigma 公司) 的 MS 培养基上. 2~3 周后, 将存活的候选突变体转移到 MS 培养基上继续培养, 然后移土收获 M₃ 代种子. M₃ 代种子在同样条件下分析其对 FB₁ 的反应. 如果该突变体拥有对 FB₁ 稳定的抗性, 则被认为是真正的 *fbr* 突变体.

1.3 遗传分析和突变位点的定位

fbr136 的遗传背景为 Ler, 将其与野生型回交 2 次后产生的纯合突变体用作遗传分析、表型分析以及定位群体的构建. 遗传分析时将突变体与其野生型杂交, 观察其 F₁ 及 F₂ 代植株的表型及其分离比例以确定突变基因的遗传特性. 将遗传背景为 Ler 的突变体与另一生态型 Col-0 杂交, F₁ 代自交, 从 F₂ 代中选取具有突变表型的植株作为定位群体.

先用分离群体分组分析法 (bulk segregant analysis, BSA) 进行初步定位, 从作图群体中随机选取 94 单株, 分别取其等量 DNA 混匀作为模板 DNA 用 SSLPs 引物进行 PCR 扩增, 以野生型 Col、Ler 以及杂交的 F₁ 代植株 DNA 的 PCR 扩增产物作为对照, 所用琼脂糖凝胶浓度为 4%. 最先的连锁分析, 从拟南芥每条染色体上分别选用 3~4 个均匀分布的 SSLPs (simple sequence-linked polymorphic markers) 分子标记, 用不同的分子标记引物进行 PCR 扩增以分析这些植株的基因型. 找出与对照 PCR 产物相比, 其 Col 基因型 PCR 产物带减弱或者是没有的 SSLP, 然后用这个 SSLP 引物对这 94 个定位群体植株的 DNA 进行单株扩增, 通过连锁分析对突变位点进行初步定位. 最后根据 CEREON 提供的序列差异设计 InDels 标记进行精细定位.

1.4 超氧阴离子的检测

应用硝基四唑 (nitroblue tetrazolium, NBT) 染

色法检测了叶片中超氧阴离子 (O_2^-) 的积累^[2]. 野生型和 *fbr136* 植物在 MS 培养基上生长 3~4 周, 分别喷施约 2 ml 的水(对照)和 2 μ mol/L FB_1 溶液. 处理 24 h 后, 取叶片浸泡在 3 ml 含有 10 mmol/L 叠氮化钠 (NaN_3) 的 10 mmol/L 磷酸钾 (pH 7.8) 缓冲液 15~30 min. 然后取出放入含有 0.1% NBT 的磷酸钾缓冲液(同上)15~30 min, 在此过程中要加入 0.5 g/L 的 SOD 酶, 最后将叶片在 96% 酒精中脱色. O_2^- 的积累会导致叶片被染成蓝色.

1.5 RNA 印迹分析

拟南芥总 mRNA 按常规方法提取. 每个泳道取等量的 10~20 μ g RNA 样品进行 1% 甲醛变性琼脂糖胶电泳, 转移到杂交膜上 (STRATAGENE Duralon-UVTM Membrane), 于紫外线照射 2 min 交联. 用 ³²P 采用随机引物法标记探针进行杂交. PR1 杂交片段的扩增引物为 PR1F: 5' ATGAATTT-TACTGGCTATTCTCGA 3', PR1B: 5' TACATCC-TGCATATGATGCTCC 3'. 杂交之后用 2 $\times$ SSC, 0.1% SDS 洗液室温下洗膜 15 min, 再用 0.1 $\times$ SSC, 0.1% SDS 洗液, 55 $^{\circ}$ C 洗膜 30 min, 重复一次. 保鲜膜包好压片过夜, 然后用放射自显影或分子成像系统 (PhosphorImage Scanner; Molecular Dynamics) 检测探针杂交信号.

2 结 果

2.1 *fbr* (*FB1*-resistant mutant) 突变体的筛选、鉴定与等位分析

为了鉴定 FB_1 诱导的 PCD 途径中新的组分, 我们利用 EMS 诱变的 *Ler* 生态型拟南芥 M_2 代筛选 *fbr* 突变体. 由于不同的拟南芥生态型对 FB_1 抗性的差异, 因此在筛选之前, 我们检测了 *Ler* 生态型对不同浓度 FB_1 的反应. 将 *Ler* 生态型拟南芥播种在含有 0、0.05、0.5、1 μ mol/L FB_1 的 MS 培养基上, 22 天后观察 FB_1 对植物的影响 (图 1a). 0.05 μ mol/L FB_1 对植物的生长没有可见的影响; 当 FB_1 的浓度达到 0.5 μ mol/L 的时候, 叶片生长缓慢, 并且变黄; 当 FB_1 的浓度达到 1 μ mol/L 时, 幼苗在子叶张开后停止生长, 最后趋于死亡 (图 1a). 另外, FB_1 对 *Ler* 生态型根的伸长生长抑制作用不明显 (图 1a). 这些结果表明, FB_1 是以剂量依赖的方式抑制植物茎的生长. 因此, 突变体的筛选实验选用 0.75 μ mol/L FB_1 . 以 EMS 诱变的拟南芥 *Ler* 生态型的 M_2 作为筛选群体, 在第一轮筛选中, 筛选了 1 500 条株系的 M_2 群体, 约有 40 000 粒种

子, 最终得到了 130 个候选突变体. 通过第二轮筛选确认了 11 个突变体. 其中 *fbr106* 矮化并且在叶片上有病斑产生, 但是其对 FB_1 的抗性较弱, *fbr67* 有矮化表型, 但这种矮化表型与对 FB_1 抗性的表型有分离, 比例为 1:3, 其余的突变体在正常生长情况下形态学与野生型相比较没有明显的变化. 为了验证这些突变体是否是等位突变, 我们将所有的抗性突变体相互杂交. 对杂交 F_1 代植物抗 FB_1 的结果分析表明, *fbr136* 与 *fbr98* 为等位突变, *fbr57* 与 *fbr67* 为等位突变.

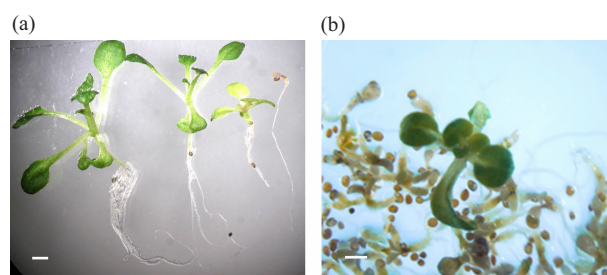


Fig. 1 FB_1 inhibits seedling growth

(a) Twenty-two-day-old *Arabidopsis Ler* seedlings grown on MS agar supplemented with 0, 0.05, 0.5 and 1 μ mol/L FB_1 . The scale bars represent 1 mm. Experiments were repeated 3 times. (b) Screen for putative *fbr* mutants. EMS mutagenized seeds were sowed directly on MS agar supplemented with 0.75 μ mol/L FB_1 . The green seedling represents a putative *fbr* mutant.

2.2 *fbr136* 的表型观察及其野生型基因的定位

fbr136 在正常生长条件下与野生型相比没有明显形态差异 (图 2a). 在不同的光照、温度下, *fbr136* 与野生型也具有相似的生长模式 (数据未显示). 但是 *fbr136* 对 FB_1 具有很强的抗性, *Ler* 野生型在 0.7 μ mol/L 的 FB_1 上其萌发与生长都受到很强的抑制, 而 *fbr136* 在 1 μ mol/L 的 FB_1 上也能够萌发并且生长的较好 (图 2b). 随着 FB_1 浓度的不断升高, *fbr136* 的生长也会受到明显的抑制甚至最终死亡.

将 *fbr136* 与 *Ler* 回交, 得到的 F_1 植株自交后单株收取 F_2 代种子. 当 F_2 代种子在 FB_1 培养基上萌发时, 大约有 1/4 的植株表现出对 FB_1 的抗性, 而其他的 3/4 则对 FB_1 敏感, 说明 *fbr136* 的表型是由单一核基因的隐性突变造成的. 将 *fbr136* 与 Col-0 生态型进行杂交, 得到 F_2 代定位群体. 选取 94 株 F_2 群体的抗性植株用 BSA (Bulk segregation analysis) 方法进行初步定位. 结果把 *FBR136* 位点初步定位于第三号染色体的下臂分子标记 CIW4 和

NGA6 之间. 在这段距离中寻找 Indels 分子标记, 把 *FBR136* 位点定位于 F18N11 和 T21J18 这 2 个距离 200 kb 左右的分子标记之间. 在 F18N11 和 T21J18 之间又选取 T21J18-2 分子标记进行连锁分析, 结果这 94 株抗性植株在 F18N11 与 T21J18-2 之间, T21J18 与 T21J18-2 之间都没有找到发生重组的植株. 说明 *FBR136* 位点与 T21J18-2 的紧密连锁.



Fig. 2 The *fbr136* mutant phenotype

(a) Twelve-day-old wild-type (left) and *fbr136* (right) seedlings grown on the MS agar. (b) Twelve-day-old wild-type (left) and *fbr136* (right) seedlings grown on an MS agar with the addition of 1 $\mu\text{mol/L}$ FB_1 . Experiments were repeated 5 times. The scale bars represent 1 mm.

2.3 *fbr136* 对其他 PCD 诱导试剂敏感性降低同时其防御基因表达水平降低

为了检验 *fbr136* 突变体对其他 PCD 的诱导因子以及非生物胁迫的反应, 我们进行了以下实验: 将 *fbr136* 播种于含有 4.5 mmol/L、5 mmol/L、6 mmol/L H_2O_2 或 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 、1 $\mu\text{mol/L}$ paraquat 的 MS 培养基上, 结果与野生型相比, *fbr136* 突变体都对这些试剂表现出抗性增强(图 3a, b). 因为 paraquat、 H_2O_2 以及 FB_1 都是 PCD 诱导因子, 而且都能在植物体内诱导 ROS 产生, 表明 *FBR136* 位点的突变可能导致了 ROS 介导的 PCD 信号途径不能正常转导, 因而造成 *fbr136* 突变体不仅仅对 FB_1 抗性增强, 而且对其他能够产生 ROS 的 PCD 诱导因子的抗性也增强.

因为 FB_1 在野生型拟南芥中能够诱导 *PR* 基因的表达, 所以我们检测了在 *fbr136* 突变体中, FB_1 诱导 *PR* 基因表达的能力是否发生了改变. 把生长 4 周的野生型与 *fbr136* 突变体进行喷洒 FB_1 溶液处理, 提取 mRNA 并进行 RNA 印迹分析. 如图 4 所

示, FB_1 处理之后, *PR1* 基因在野生型中受到 FB_1 诱导表达, 但是在 FB_1 处理的 *fbr136* 突变体中 *PR1* 基因的表达与野生型相比有所减弱. 这一结果暗示了 *fbr136* 突变体的表型与某些抗性基因的表达水平降低相关.

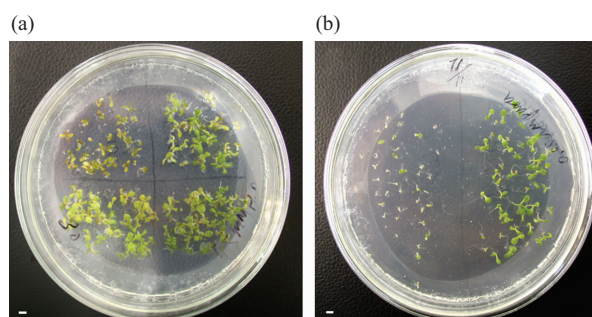


Fig. 3 *fbr136* mutants have reduced sensitivity to exogenous H_2O_2 and paraquat

(a) Effect of H_2O_2 on seedling growth of wild-type (upleft) and three lines of *fbr136* seedlings. All plants were grown for 14 days on the MS agar with the addition of 4.5 mmol/L H_2O_2 . (b) Effect of H_2O_2 on seedling growth of wild-type (left) and *fbr136*. All plants were grown for 12 days on the MS agar with the addition of 0.5 $\mu\text{mol/L}$ paraquat. The scale bars represent 2 mm.

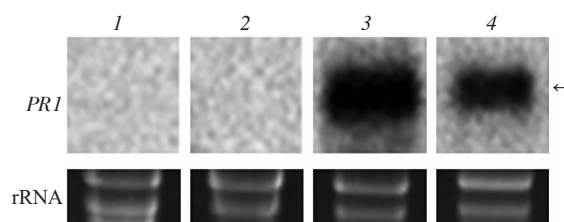


Fig. 4 The *PR1* gene expression is reduced in *fbr136* mutants

Northern blot were probed with a *PR1* cDNA fragment. Fifteen micrograms of RNA were used from 4 wild-type and *fbr136* seedlings treated with 0 (lane 1 and lane 2) or (lane 3 and lane 4) 2 $\mu\text{mol/L}$ FB_1 for 24 h. The reduced *PR1* transcript level in *fbr136* seedlings (lane 4) is indicated by an arrow.

2.4 *fbr136* 突变体不能正常积累 FB_1 诱导的 O_2^- 的产生

我们的结果显示, *fbr136* 不仅对 FB_1 具有很强的抗性, 而且对 paraquat 和 H_2O_2 也具有一定的抗性. 因此, 我们假设 *fbr136* 突变体对 PCD 诱导因子的抗性是由于不能正常产生 ROS 造成的. 由于硝基四唑(NBT)能够与 O_2^- (活性氧的一种分子形式) 反应, 从而在 O_2^- 产生处形成蓝色沉淀, 因此用

NBT 染色方法检测超氧阴离子 O_2^- 的积累情况. 在 FB_1 处理 24 h 的野生型植物叶片中, 可以观察到 NBT 与 O_2^- 相互作用形成的蓝色沉淀, 但在突变体的叶片中几乎观测不到表明 O_2^- 积累的蓝色沉淀 (图 5). 上述结果暗示, *fbr136* 突变体对 FB_1 的抗性可能是由于 ROS 的产生和积累受到抑制引起的.

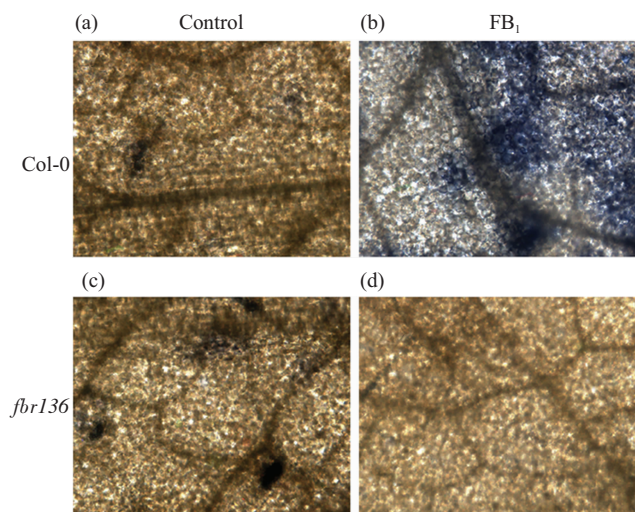


Fig. 5 No O_2^- accumulation is detected in *fbr136* mutants

Three-week-old wild-type and *fbr136* leaves were sprayed with water (control), 2 $\mu\text{mol/L}$ FB_1 for 24 h. Leaves were detached and stained with NBT (nitroblue tetrazolium). O_2^- accumulation was shown as blue precipitates. No O_2^- accumulation was detected when *fbr136* plants were treated with 2 $\mu\text{mol/L}$ FB_1 .

3 讨 论

PCD 在植物正常生长发育及对抗逆境环境过程中起到重要的调控作用. 病原菌侵染植物时, 在侵染部位或周围的细胞迅速产生死亡, 植物通过这样的方式可以限制病原菌, 从而控制病原菌的进一步侵染. FB_1 可以在植物中引发类似于病原菌侵染的 PCD 反应, 包括诱导病斑、ROS 和胍胍质的积累及 *PR* 基因表达等. 目前它已经成为研究非病原菌 (nonpathogenic conditions) 条件下诱导 PCD 的一种模式系统. 与病原菌诱导的 PCD 相比它避免了病原菌对被侵染植物的影响. 但是目前为止, 我们对 FB_1 在植物组织中作用的靶位及其引发的一系列反应诱导 PCD 产生的机制还不是很清楚.

为了清楚地了解 FB_1 诱导 PCD 产生的机制, 我们进行了抗 FB_1 的拟南芥突变体的筛选. 筛选得到的抗 FB_1 突变体, 其对 FB_1 的抗性可能是由于不

能与 FB_1 结合或者是不能转运 FB_1 引起, 也可能是因为 FB_1 靶位点的改变或缺失引起, 还有可能是因为在突变体中 PCD 信号转导途径的重要组分发生变化^[12]. *fbr136* 是其中分离鉴定的一个有代表性的 FB_1 抗性突变体, 它有效地抑制了 FB_1 诱导产生的 PCD 反应. 本文中所鉴定的 *fbr136* 突变体在从 MS 培养基中转到含有 2 $\mu\text{mol/L}$ FB_1 的培养基中时, 经过一段时间的培养在其叶片上会形成由死细胞组成的黄棕色斑点 (数据未显示), 说明 *fbr136* 突变体仍然具有对 FB_1 反应的能力. 另一方面, 当 FB_1 侵染植物的时候, 与野生型相比 *fbr136* 突变体 *PR1* 的表达水平明显下降. 而且 *fbr136* 突变体对其他一些 PCD 诱导剂也具有一定的抗性. 另外, Stone 等以前筛选得到的抗 FB_1 突变体以及本实验室筛选得到的一些突变体都表现不能诱导 PCD 发生的表型, 因此, 我们认为, *fbr136* 突变体的表型并不是由于 FB_1 信号感受过程的问题, 而是 FB_1 诱导的信号途径过程的一些调控因子的变化, 从而导致不能诱导 PCD 和抗病防御相关基因的表达. 所以, 可以预测编码 *fbr136* 的野生型等位基因不仅是 FB_1 诱导 PCD 的组分, 而且是 PCD 信号途径中的一个重要组成成分.

Stone 等利用种子萌发对 FB_1 的敏感性筛选得到 3 个突变体: *fbr1*、*fbr2* 和 *fbr6*. *fbr1* 和 *fbr2* 分别被定位到染色体 I 和染色体 V 上. 其中 *fbr6* 突变体相应的野生型基因已被克隆. 该基因编码一个位于染色体 I 的 SQUAMOSA promoter binding protein (SBP) domain 基因^[12, 16]. *FBR12* 编码一个位于染色体 I 的翻译起始因子 5A-2^[17]. 而 *fbr136* 被定位于染色体 III 上, 因此 *FBR136* 可能是 FB_1 诱导 PCD 信号途径中的一个新基因.

FB_1 处理可以导致某些鞘脂含量的变化, 进而诱导植物细胞产生凋亡. 鞘脂平衡的精细调节对于维持细胞生存来说是很重要的, 因为无论是减少或者是增加神经酰胺的含量都会促发细胞发生 PCD. *ACD11* 编码一个 sphingosine 转移酶, 拟南芥 *acd11* 突变体的细胞死亡加速^[22], 缺失编码神经酰胺激酶 *ACD5* 的突变体在发育晚期发生了类似凋亡的细胞死亡现象并且对病原菌更为敏感^[23], 这些都表明了鞘脂代谢与 PCD 的联系. 目前已有生化和分子证据表明 H_2O_2 参与了 AAL 毒素诱导 PCD 的信号转导途径^[24]. Stone 等的实验表明 FB_1 诱导 PCD 产生的同时也会伴随 ROS 的积累. 这些说明鞘脂含量的变化与 ROS 的积累有一定的联系. 既

抗真菌毒素又抗 aminotriazol 的 *AtrI* 突变体的分离, 进一步证实了鞘脂和 ROS 相互作用调控了植物的 PCD 过程^[25]. Aminotriazole 是一种除草剂, 它不可逆地失活了过氧化氢酶, 因此导致了植物叶绿体中 H_2O_2 增加. 在本文中鉴定的 *fbr136* 突变体不仅对 FB_1 具有抗性, 而且对其他产生 ROS 的试剂也具有一定的抗性, 进一步证明了鞘脂含量的变化与 ROS 积累的关系. 通过 NBT 染色实验得知, *fbr136* 突变体其 ROS 积累的能力发生了障碍, 不仅证明了鞘脂含量的变化与 ROS 积累的相互联系, 而且说明在 FB_1 诱导 PCD 的过程中, 可能是 ROS 作为鞘脂含量的变化引发的一个传递信号来诱导下游反应的. 因此克隆 *FBR136* 基因及分析其功能将会对阐明这一问题具有重要意义.

致谢 感谢梁岩博士悉心审阅和修改本文. 感谢中国科学院上海植物生理生态研究所黄海研究员提供拟南芥突变种子.

参 考 文 献

- Jacobson M D, Weil M, Raff M C. Programmed cell death in animal development. *Cell*, 1997, **88**(3): 347~354
- Golstein P, Ojcius D M, Young J D. Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol Rev*, 1991, **121**(1): 29~65
- Morel J-B, Dangl J L. The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death Differ*, 1997, **4**(8): 671~683
- Pennell R I, Lamb C. Programmed cell death in plants. *Plant Cell*, 1997, **9**(7): 1157~1168
- Jones A M. Programmed cell death in development and defense. *Plant Physiol*, 2001, **125**(1): 94~97
- Lam E, Kato N, Lawton M. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature*, 2001, **411** (6839): 848~853
- Richberg M H, Aviv D H, Dangl J L. Dead cells do tell tales. *Curr Opin Plant Biol*, 1998, **1**(6): 480~485
- Richael C, Gilchrist D. The hypersensitive response: A case of hold or fold?. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1999, **55**(1): 5~12
- Lam E. Controlled cell death, plant survival and development. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, **5**(4): 305~315
- Asai T, Stone J M, Heard J E, *et al.* Fumonisin B₁-induced cell death in arabidopsis protoplasts requires jasmonate-, ethylene-, and salicylate-dependent signaling pathways. *Plant Cell*, 2000, **12**(10): 1823~1836
- Spassieva S D, Markham J E, Hille J. The plant disease resistance gene *Asc-1* prevents disruption of sphingolipid metabolism during AAL toxin-induced programmed cell death. *Plant J*, 2002, **32** (4): 561~572
- Stone J M, Heard J E, Asai T, *et al.* Simulation of fungal-mediated cell death by fumonisin B₁ and selection of fumonisin B₁-resistant (*fbr*) *Arabidopsis* mutants. *Plant Cell*, 2000, **12**(10): 1811~1822
- Desai K, Sullards M C, Allegood J, *et al.* Fumonisin and fumonisin analogs as inhibitors of ceramide synthase and inducers of apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, 2002, **1585**(2-3): 188~192
- Wang E, Norred W P, Bacon C W, *et al.* Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *J Biol Chem*, 1991, **266**(22): 14486~14490
- Kuroyanagi M, Yamada K, Hatsugai N, *et al.* Vacuolar processing enzyme is essential for mycotoxin-induced cell death in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 2005, **280**(38): 32914~32920
- Stone J M, Liang X, Neel E R, *et al.* *Arabidopsis* AtSPL14, a plant-specific SBP-domain transcription factor, participates in plant development and sensitivity to fumonisin B₁. *Plant J*, 2005, **41**(5): 744~754
- Feng H Z, Chen Q G, Feng J, *et al.* Functional characterization of the *Arabidopsis* eukaryotic translation initiation factor 5A-2 that plays a crucial role in plant growth and development by regulating cell division, cell growth, and cell death. *Plant Physiol*, 2007, **114**(3): 1531~1545
- Pellinen R, Korhonen M-S, Tauriainen A A, *et al.* H_2O_2 activates cell death and defense gene expression in birch. *Plant Physiol*, 2002, **130** (2): 549~560
- Dodge A D. The mode of action of the bipyridylum herbicides, paraquat and diquat. *Endeavor*, 1971, **30**(111): 130~135
- Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*, 1962, **15** (4): 473~497
- Jabs T, Dietrich R A, Dangl J L. Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science*, 1996, **273**(5283): 1853~1856
- Brodersen P, Petersen M, Pike H M, *et al.* Knockout of *Arabidopsis accelerated-cell-death11* encoding a sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense. *Genes Dev*, 2002, **16**(4): 490~502
- Liang H, Yao N, Song J T, *et al.* Ceramides modulate programmed cell death in plants. *Genes Dev*, 2003, **17**(21): 2636~2641
- Gechev T S, Gadjev I Z, Hille J. An extensive microarray analysis of AAL-toxin-induced cell death in *Arabidopsis thaliana* brings new insights into the complexity of programmed cell death in plants. *Cell Mol Life Sci*, 2004, **61**(10): 1185~1197
- Gechev T S, Hille J. Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. *J Cell Biol*, 2005, **168**(1): 17~20

Identification and Characterization of The *Arabidopsis fumonisin B₁* resistant *fbr136**

SUN Shu-Lan^{1,2)**}, ZUO Jian-Ru²⁾

⁽¹⁾ College of Life Science, The South China Normal University, Guangzhou 510631, China ;

⁽²⁾ Institute of Genetics and Developmental Biology, The Chinese Academy of Science, Beijing 100101, China)

Abstract Plant programmed cell death (PCD) plays an important role in plant growth and development as well as defensive response against biotic and abiotic stresses. Fumonisin B₁ (FB₁) is a fungi toxin, which is a competitive inhibitor of ceramide synthase in *de novo* sphingolipid biosynthesis. FB₁ can induce PCD in both animal and plant cells. To dissect this pathway, a genetic screen for *fumonisin B₁* resistant (*fbr*) mutants, and identified 11 *fbr* mutants was carried out. Genetic analysis showed that these 11 mutants belonged to 9 complementary groups or genetic loci. Here a detailed phenotypic analysis of *fbr136* was reported. In addition to the resistance to FB₁, *fbr136* also showed resistance other PCD-inducing compounds, including H₂O₂ and paraquat. Furthermore, FB₁-induced *PR1* expression was reduced in *fbr136*, suggesting that a PCD pathway is likely impaired in the mutant. When stained with nitroblue tetrazolium (NBT), *fbr136* showed a reduced accumulation of reactive oxygen species (ROS) induced by FB₁. The *fbr136* mutation was roughly mapped onto chromosome III, where no other *fbr* mutants have been previously identified. It is proposed that FBR136 may act as an important regulator in a sphingolipid-mediated PCD pathway, involved in the generation of ROS.

Key words *Arabidopsis*, plant PCD, FB₁, *fbr136*, sphingolipids, ROS

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30330217, 30221002).

**Corresponding author.

Tel/Fax: 86-20-85216417, E-mail: sunsl@scnu.edu.cn

Received: July 5, 2007 Accepted: August 26, 2007