

# 核基因突变引起的拟南芥菜叶片花斑及其机制

傅汀 王丽辉 林伟强 钱野 王君晖\*

(浙江大学生命科学院, 杭州 310028)

**摘要** 细胞核基因突变引起的植物叶片花斑, 是研究细胞器(特别是叶绿体)和细胞核之间信息交流的重要材料, 也在园艺科学上有重要的应用价值。综述了拟南芥菜 *IM*、*VAR1*、*VAR2*、*CHM*、*CUE1*、*PAC*、*ATD2* 和 *VAR3* 等 8 个细胞核基因突变后引起的叶片花斑, 主要包括这些基因所编码的蛋白质以及它们突变以后引起花斑的机制。

**关键词** 拟南芥菜; 花斑; 突变体; 质体; 线粒体

所谓植物叶片的花斑(variegation)表型, 指的是叶片的一些区域是黄色或白色, 而另一些区域是正常的绿色<sup>[1]</sup>。在园林绿化中, 叶片花斑是一种经常可以观察到的遗传现象, 主要由基因突变、嵌合体、转座、病毒感染等几种方式引起。从基因突变的发生过程讲, 可以是自发突变, 也可以是诱发突变。从基因突变的发生部位讲, 可以是细胞质基因突变, 也可以是核基因突变。

叶绿体内的基因突变引起花斑的机制已经比较清晰了。高等植物的一个叶肉细胞含有多个叶绿体, 每个叶绿体含有几十到一百多个拷贝的环状 DNA。如果其中的一个或几个环状 DNA 发生突变, 在以后的 DNA 复制和新叶绿体形成中, 大体上就会产生三种叶绿体, 一种含有正常 DNA, 决定绿色; 一种含有突变 DNA 决定白色; 还有一种是混合 DNA, 决定黄色。

细胞核基因突变引起花斑的机制比较难解释, 因为每个细胞的基因型是一样的。本文重点介绍细胞核基因突变引起拟南芥菜叶片花斑及其机制。进行这种类型的花斑研究, 其科学意义在于: (1) 了解质体、线粒体和细胞核三者之间的信息交流过程和协调工作机制; (2) 了解叶绿体生物发生的精细过程<sup>[2]</sup>。拟南芥菜的叶绿体只有 100 多个基因, 但它里面的蛋白质至少有 4000 多个, 这是因为在生物的长期进化过程中, 质体的大部分基因转移进入了核中, 只有一小部分它自己保留着。基因在细胞核和质体间的分散现象, 以及两者基因拷贝数的一致, 就需要有一个机制去协调核中叶绿体基因和质体自身基因的表达, 使叶绿体蛋白质的最终组成和丰度有条不紊<sup>[3,4]</sup>。

## 1 IMMUTANS 基因

*IMMUTANS* 基因突变引起的拟南芥菜叶片花斑是目前研究得最深入的一种叶片花斑。Rédei<sup>[5,6]</sup>最早发现了这种花斑并在后来为它命名, 在拉丁文中, *IMMUTANS* 是不可变的意思。该基因被定位在拟南芥第 4 号染色体上 *CER2* 和 *AG* 两个标记之间。

*IMMUTANS* 蛋白是细胞核编码给质体的末端氧化酶, 参与电子传递和氧化还原状态的调节<sup>[7-9]</sup>。突变体的白色部分有很少的类胡萝卜素和很多的八氢番茄红素(类胡萝卜素的前体)。八氢番茄红素去饱和酶(phytoene desaturase, *PDS*)负责催化八氢番茄红素向类胡萝卜素的转化。在突变体的白色部分, *PDS* 蛋白失去活性, 而在绿色部分, *PDS* 具有活性。因此, 白色叶片和白色部分的产生机制是: *IMMUTANS* 蛋白缺少导致叶绿体内氧化还原不正常, 从而导致 *PDS* 失活; *PDS* 失活导致类胡萝卜素缺失, 类胡萝卜素缺失导致叶绿素光氧化; 细胞核感受到叶绿体的逆境, 关掉了叶绿素合成基因的表达, 影响了叶绿体的生物发生, 最终叶片白化<sup>[10]</sup>。

最近, *IMMUTANS* 蛋白已经被体外表达和提纯, 发现它有醌氧化酶活性<sup>[11]</sup>。研究表明, 它在叶绿体呼吸(光呼吸和暗呼吸)代谢中也有重要作用<sup>[11]</sup>。关于 *IMMUTANS* 基因已经有两种突变体, 分别称之为 *im1-1* 和 *im1-2*<sup>[8,9]</sup>。图 1 是我们实验室得到的第三种突变体, 称之为 *im1-3*。

收稿日期: 2005-01-04 接受日期: 2005-03-01

国家自然科学基金资助项目(No.30470923)

\* 通讯作者。Tel: 0571-88273325, Fax: 0571-88051629, E-mail:

junhuiwang@zju.edu.cn

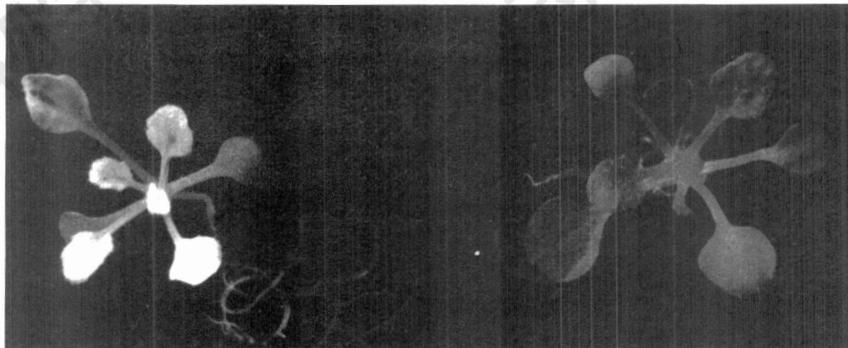


图1 拟南芥菜 *immutans* 突变体

左图为 *im1-3*，右图为野生型。本实验室自己材料。

番茄的 *GHOST* 基因与拟南芥 *IMMUTANS* 基因具有同源性。*ghost* 突变番茄表现出叶片的光漂白特征，并且在花和果实中有类胡萝卜素缺少的特征<sup>[7,12]</sup>。

## 2 *VAR1* 基因和 *VAR2* 基因

*var1* 和 *var2* (*yellow variegated 1, 2*) 花斑突变体最早是在拟南芥菜组织培养中获得的<sup>[13]</sup>，突变体含有很多不正常的质体并出现绿黄白花斑。*VAR1* 基因被定位在拟南芥第 5 号染色体上，由 5 个外显子组成，cDNA 全长为 2115 bp<sup>[14]</sup>。*VAR2* 基因被定位在拟南芥第 2 号染色体上，由 5 个外显子组成，cDNA 全长为 2088 bp<sup>[15,16]</sup>。它们都与细菌 FtsH 蛋白 (ATP 依赖的金属蛋白质酶) 有高度的同源性。这些蛋白质含有 2 个跨膜区，1 个锌结合区和 6 个与蛋白酶活性相关的保守区。

*VAR1* 基因的表达与光照条件有十分密切的关系。经过实验<sup>[16]</sup>，人们发现野生型拟南芥的植株在不同的光照强度下经过 12 h 的照射，它们的 *VAR1* mRNA 含量是不同的。*VAR1* mRNA 的含量会随着光照强度的增加而增加。当光照强度从 10 升高到每秒 150  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ，*VAR1* 的转录水平大约有 3 倍的增幅。与此相对，当光照强度达到每秒 350  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$  时，反而产生抑制效应，这可能与拟南芥是喜阴植物有关。与光依赖表达模式相一致，人们发现拟南芥在黑暗环境中 *VAR1* 的转录水平就明显减少。*VAR2* 仅在植株的绿色部分有表达，而且它的表达也受到光照的调控，这就暗示了 *VAR2* 在黄化质体到叶绿体的转变过程中起到了作用<sup>[15,16]</sup>。

*VAR2* 蛋白被定位在叶绿体内的类囊体膜上，它的突变，导致类囊体功能不正常，从而影响叶绿

体的生物发生<sup>[15,16]</sup>。进一步的研究表明，*VAR2* 蛋白在类囊体膜上光系统 II 的修复循环中起作用，重点是负责降解光氧化了的 D1 蛋白，从而保证光合作用的正常开展<sup>[17]</sup>。在突变体中，光系统 II 的光损伤不能被修复，细胞核感知到叶绿体的氧化损伤后，关掉了叶绿体生物合成的相关基因，导致叶片失绿。制作了 *VAR1* 和 *VAR2* 蛋白的特异抗体，免疫沉淀实验表明，*VAR1* 蛋白和 *VAR2* 蛋白可以组成复合体，共同调节类囊体的功能；*VAR2* 蛋白还可以组成同源多聚体<sup>[17]</sup>。

关于 *VAR1* 基因，目前已经有 3 种突变体<sup>[14]</sup>。关于 *VAR2* 基因，目前至少有 10 种突变体，分别命名为 *var2-1* 到 *var2-10*。它们突变在同一基因的不同位置，表现出不同的花斑程度，是深入研究该基因功能的重要材料<sup>[2]</sup>。

## 3 其他花斑基因

拟南芥 *chm1-1* 和 *chm1-2* (*chloroplast mutator*) 突变体最早是在 1973 年发现的<sup>[18]</sup>。后来又发现了它的第三种和第四种突变体<sup>[19,20]</sup>。研究表明，*CHM* 是细胞核编码给线粒体的 DNA 稳定蛋白，与酵母的 *Msh1p* 有同源性<sup>[1]</sup>。*CHM* 基因突变后，线粒体基因组就会发生大规模不正常重组和缺失突变，使线粒体的基因表达异常和功能受损；线粒体功能不正常后，被细胞核感知，关掉了与叶绿素合成相关的基因，最终产生白化表型<sup>[19,20]</sup>。*CHM* 蛋白也与细菌的 *MutS* 蛋白有同源性<sup>[21]</sup>。*MutS* 在细菌中是负责错配修复和 DNA 重组的。另有研究表明，玉米 *ncs* (*non-chromosomal stripe*) 突变体的花斑原理同于拟南芥 *chm* 突变体的花斑原理<sup>[22]</sup>。

拟南芥 *cue1* (*CAB underexpression*) 突变体的叶肉

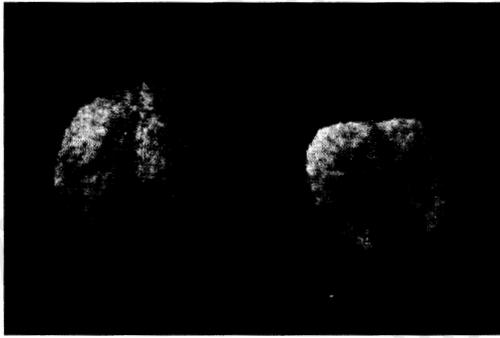


图2 拟南芥菜的 *cue1* 突变体

左图为野生型叶片, 右图为 *cue1-7* 叶片。本实验室自己材料。

组织呈亮黄色, 叶脉呈绿色(图2)。目前文献报道的 *cue1* 突变体共有6个。*Cab* 基因(chlorophyll a/b binding protein, 叶绿素 a/b 结合蛋白)以及其他若干个光合作用相关基因的表达, 在叶肉细胞中是降低的, 在叶脉细胞中是正常的<sup>[23]</sup>。突变体对红光和蓝光的响应不正常, 说明该基因在去黄化(从暗培养转为光培养)中具有重要作用<sup>[23]</sup>。基因克隆表明, *CUE1* 是细胞核编码给叶绿体的磷酸烯醇式丙酮酸转运体, 定位在叶绿体内膜上<sup>[24]</sup>。*CUE1* 基因突变后, 在叶绿体的基质中, 磷酸烯醇式丙酮酸就少了, 莽草酸途径就削弱了, 从而, 芳香类氨基酸和芳香类氨基酸衍生的次生代谢物质的合成就减少了, 最终引起叶绿体内酚类抗氧化剂合成的不足, 促进了叶绿体的降解, 同时, 氧化损伤也诱导了细胞核下调光合作用相关的基因<sup>[24, 25]</sup>。后来的研究表明, *cue1* 表型也可能与叶脉不能正常产生类苯丙醇代谢相关的信号分子有关<sup>[25, 26]</sup>。

拟南芥 *pac* (*pale cress*) 突变体叶绿体含量严重减少, 但细胞核还在表达一些叶绿体基因<sup>[27]</sup>。目前, 关于 *PAC* 共有两种突变体, 其中一种是 T-DNA 插入突变体, 它是不育的<sup>[28]</sup>。研究表明, 细胞分裂素可以减轻 *pac* 突变体的白化表型<sup>[28]</sup>。另外, *pac* 突变体中类胡萝卜素含量和脱落酸含量降低, 造成种子发芽率降低和幼苗脱水敏感<sup>[29]</sup>。研究分析认为, *PAC* 可能作用于叶绿体 mRNA 的稳定性, 该基因突变后, 叶绿体内一些 mRNA 寿命变短(降解变快), 一些与叶绿体早期生物发生有关的蛋白质不能大量合成, 从而导致叶绿体的不正常和叶片的白化<sup>[30]</sup>。

*atd2*(glutamine 5-phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase 2-deficient) 是一种 T-DNA 插入突变

引起的花斑。*ATD2* 编码谷氨酰胺 5-磷酸核糖焦磷酸转酰胺酶<sup>[31]</sup>。由于它是嘌呤生物合成的第一个酶, 它的突变导致叶绿体生物发生的异常。关于该基因的研究报道不多。

最近, 通过转座子标签法, 克隆了拟南芥的 *var3* 基因<sup>[32]</sup>。*VAR3* 蛋白的分子量为 89.5 kDa, 有两个保守区, 一个是 PHD 区(plant homeodomain), 另一个是锌指区。酵母双杂交实验表明, *VAR3* 能与 *NCED4*(多烯链/类胡萝卜素双氧化酶)相互作用。*VAR3* 和 *NCED4* 都是叶绿体基质蛋白, 提示着它们是在叶绿体基质中参与叶绿体生物发生的调节<sup>[32]</sup>。前面讲到的 *VAR1* 和 *VAR2* 是在类囊体膜上工作的。关于 *VAR3* 的其他报道不多。

#### 4 小结

从已经报道的8个花斑基因所编码的蛋白质看, 有1个是细胞核编码给线粒体的蛋白质, *CHM*; 有7个是细胞核编码给叶绿体的蛋白质, 其中又可细分成3类, 叶绿体膜蛋白(*IMMUTANS*, *CUE1*), 叶绿体基质蛋白(*PAC*, *ATD2*, *VAR3*), 类囊体膜蛋白(*VAR1*, *VAR2*)。目前, 对突变体表型和蛋白质功能分析开展的较多, 但有许多工作等待进一步开展。(1)启动子功能研究。将这些基因的启动子接上报告基因以后, 导入拟南芥菜, 精细分析基因的工作部位, 深入认识基因表达调控的规律。(2)双突变体研究。将花斑突变体相互杂交, 从后代中选出双突变体, 从双突变体的表型和生理生化特征来分析花斑基因之间的相互作用(上位作用, 互补作用等), 以便更进一步认识花斑的机制。(3)已经分别在番茄和玉米中发现了 *IMMUTANS* 和 *CHM* 的同源基因。其余6个基因在非模式生物中的情况, 以及这8个基因在园艺实践上的应用, 也是一个很重要的研究方向。

作为模式植物, 拟南芥菜的叶片花斑研究是所有植物中最深入的。上述8个花斑基因都是近段时间人们已经克隆的基因。正在克隆的突变体还有网格状叶片(*reticulata*, *re*)和维管相关细胞的差别发育(*differential development of vascular associated cells*, *dov*)<sup>[1,2]</sup>。我们受国家自然科学基金资助, 正在研究一个新的拟南芥花斑突变体。

#### 参考文献 (References)

- [1] Sakamoto W. *Genes Genet Syst*, 2003, 78: 1

- [2] Rodermel S. *Arabidopsis* variegation mutants. In: Somerville C et al. (eds) *The Arabidopsis Book*, American Society of Plant Biologists, 2002, 1
- [3] 钱野等. *细胞生物学杂志*, 2004, **26**: 98
- [4] Gray JC et al. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2003, **358**: 135
- [5] Rédei GP. *Science*, 1963, **139**: 767
- [6] Rédei GP. *Annu Rev Genet*, 1975, **9**: 111
- [7] Wetzel CM et al. *Plant J*, 1994, **6**: 161
- [8] Wu D et al. *Plant Cell*, 1999, **11**: 43
- [9] Carol P et al. *Plant Cell*, 1999, **11**: 57
- [10] Rodermel S. *Trends Plant Sci*, 2001, **6**: 471
- [11] Aluru MR et al. *Physiol Plant*, 2004, **120**: 4
- [12] Josse EM et al. *Plant Physiol*, 2000, **123**: 1427
- [13] Martínez-Zapater JM. *J Hered*, 1993, **84**: 138
- [14] Sakamoto W et al. *Genes Cells*, 2002, **7**: 769
- [15] Chen M et al. *Plant J*, 2000, **22**: 303
- [16] Takechi K et al. *Plant Cell Physiol*, 2000, **41**: 1334
- [17] Sakamoto W et al. *Plant Cell*, 2003, **15**: 2843
- [18] Rédei GP. *Mutat Res*, 1973, **18**: 149
- [19] Martínez-Zapater JM et al. *Plant Cell*, 1992, **4**: 889
- [20] Sakamoto W et al. *Plant Cell*, 1996, **8**: 1377
- [21] Abdelnoor RV et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 5968
- [22] Newton K et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, **83**: 7363
- [23] Li H et al. *Plant Cell*, 1995, **7**: 1599
- [24] Streatfield SJ et al. *Plant Cell*, 1999, **11**: 1609
- [25] Voll L et al. *Plant J*, 2003, **36**: 301
- [26] Knappe S et al. *Plant J*, 2003, **36**: 411
- [27] Reiter RS et al. *Plant Cell*, 1994, **6**: 1253
- [28] Grevelding C et al. *Mol Gen Genet*, 1996, **251**: 532
- [29] Holding DR et al. *Annals Bot*, 2000, **86**: 953
- [30] Meurer J et al. *Mol Gen Genet*, 1998, **258**: 342
- [31] Leon P et al. *Plant Mol Biol*, 1998, **49**: 453
- [32] Nasted H et al. *J Cell Sci*, 2004, **117**: 4807

## Variegation and Its Mechanism in *Arabidopsis* Leaves Induced by Mutation of Nuclear Genes

Ting Fu, Li-Hui Wang, Wei-Qiang Lin, Ye Qian, Jun-Hui Wang\*  
(College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310028, China)

**Abstract** Variegation induced by mutation in nuclear genes is a powerful tool to study interactions between organelle (especially the chloroplast) and nucleus. It is also of great interests for horticultural sciences. Leaf variegation resulted from mutation of 8 *Arabidopsis* nuclear genes, *IMMUTANS*, *VARI1*, *VAR2*, *CHM*, *CUE1*, *PAC*, *ATD2* and *VAR3*, has been reviewed. Proteins encoded by these genes and variegation mechanisms related to these genes were presented.

**Key words** *Arabidopsis*; variegation; mutant; plastid; mitochondria

Received: January 4, 2005 Accepted: March 10, 2005

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30470923)

\*Corresponding author. Tel: 86-571-88273325, Fax: 86-571-88051629, E-mail: junhuiwang@zju.edu.cn