

拟南芥叶绿体分裂突变体 $pd137$ 的基因鉴定与分析

刘晓庆, 潘登, 贾宁, 沈鑫翌, 高宏波*

北京林业大学生物科学与技术学院, 北京100083

摘要: $pd137$ 是经甲基磺酸乙脂(ethyl methane sulphonate, EMS)诱变并通过筛选得到的一个拟南芥叶绿体分裂突变体。该突变体的叶绿体表型与野生型相比有很大差异: 叶绿体面积显著增大, 细胞中叶绿体数量明显减少。遗传分析显示 $pd137$ 的突变表型受隐性单基因控制。本研究通过遗传作图将该突变基因粗定位于拟南芥2号染色体的分子标记CH2-13.70和CH2-16.0区间内。该区间内已知的与叶绿体分裂相关的基因只有 $FtsZ2-1$ 。对 $FtsZ2-1$ 基因的测序结果显示 $pd137$ 突变体的 $FtsZ2-1$ 基因第505位碱基发生了无义突变, 使蛋白质翻译提前终止。该突变还严重影响了 $FtsZ2-1$ 基因的mRNA水平。转基因互补实验进一步验证了该突变体表型是由于 $FtsZ2-1$ 基因突变引起。本项工作为研究叶绿体分裂的机制提供了新材料和一些有用的线索。

关键词: 拟南芥; 叶绿体分裂; $FtsZ2-1$; 图位克隆

Genetic Mapping and Analysis of a Chloroplast Division Mutant $pd137$ in *Arabidopsis thaliana*

LIU Xiao-Qing, PAN Deng, JIA Ning, SHEN Xin-Zhao, GAO Hong-Bo*

College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract: An *Arabidopsis thaliana* chloroplast division mutant, *chloroplast division 137* ($pd137$), was obtained with an ethyl methane sulphonate (EMS) mutagenesis and mutant screening strategy. Compared with the wild type, $pd137$ showed an obviously different chloroplast phenotype. It has a much larger chloroplast size and a lower number of chloroplasts per cell than those in the wild type. Genetic analysis indicated that the mutant phenotype was controlled by a single recessive gene. $pd137$ was mapped to a region between molecular markers CH2-13.70 and CH2-16.0 on chromosome 2. In this region, $FtsZ2-1$ is the only identified gene which is involved in chloroplast division so far. DNA sequencing of the $FtsZ2-1$ gene in $pd137$ revealed a nonsense mutation at the 505th base. The mutation caused a premature translational termination of $FtsZ2-1$ protein and severely affected the mRNA level of $FtsZ2-1$ in $pd137$. Complementation experiment result confirmed that the chloroplast division defect of $pd137$ was due to the mutation in $FtsZ2-1$. Our study provides new material and some useful information for the study of chloroplast division.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; chloroplast division; $FtsZ2-1$; map-based cloning

叶绿体是植物进行光合作用的主要场所, 现在人们普遍认为它起源于内共生的蓝细菌(cyanobacterial) (Martin等2002)。叶绿体是一种双层膜结构的半自主性细胞器, 由前质体发育而来(Tanaka和Hanaoka 2012), 其分裂增殖方式主要为双元分裂。

叶绿体分裂是一个重要的细胞生物学过程。叶绿体分裂装置既保留了原核生物起源的分裂蛋白, 如 $FtsZ$ (Osteryoung和Vierling 1995)、MinD (Colletti等2000)、MinE (Itoh等2001)、ARC6 (Vitha等2003)、GC1 (Maple等2004), 又包含着来自真核宿主的分裂相关蛋白, 如ARC5 (Gao等2003)、FZL (Gao等2006)和PDV (Miyagishima等2006)。在叶

绿体分裂过程中, 分裂装置主要由三个环状结构构成: $FtsZ$ 环, 位于叶绿体基质, 其定位需要MinD、MinE和ARC3的协同作用(Maple和Moller 2007; Maple等2007; Fujiwara等2008; Zhang等2013); PD环(plastid-dividing ring) (Yoshida等2010), 主要位于叶绿体外膜外侧和内膜基质侧, 在红藻(*Cyanidioschyzon merolae*)的研究中发现外侧PD环是一种PDR1蛋白调控的聚糖类丝状体; Dynamin-ARC5蛋白环(Pyke 2010), 定位于叶绿体外膜外侧。

收稿 2014-02-18 修定 2014-04-10

资助 国家自然科学基金(31070162)。

* 通讯作者(E-mail: gaobjfu@yahoo.com; Tel: 010-62336496)。

不同于在原核生物中*FtsZ*基因多为单拷贝的情况(Lutkenhaus和Addinall 1997), 经过漫长进化, *FtsZ*在高等植物中分化成了两个亚家族: *FtsZ1*和*FtsZ2* (McAndrew等2001; Osteryoung和McAndrew 2001; Schmitz等2009)。虽然它们都保留着来自原核*FtsZ*蛋白与GTP结合、水解所需的重要氨基酸残基, 且共定位于叶绿体分裂环, 但它们的结构和在叶绿体分裂中所起的作用并不相同(Stokes和Osteryoung 2003; Smith等2010; TerBush和Osteryoung 2012)。在细菌中, *FtsZ*的核心结构域与ZipA、*FtsA*这两个分裂蛋白作用(Hale等2000; Potluri等2012; Yan等2000)。拟南芥的*FtsZ1*不含该核心结构域, 但它与ARC3相互作用(McAndrew等2008); 在*FtsZ2*家族中, 已发现的有*FtsZ2-1*和*FtsZ2-2*: *FtsZ2-1*的核心结构域与细菌的*FtsZ*类似, 并与质体分裂蛋白ARC6共同作用, 而在拟南芥中*FtsZ2-2*在与ARC6相互作用的功能上可以与*FtsZ2-1*互换(Schmitz等2009)。

本实验室对拟南芥进行EMS诱变处理并筛选到一个叶绿体分裂突变体*pd137*。该突变体的叶绿体形状不规则, 面积显著增大且单个叶肉细胞中所含叶绿体个数明显少于野生型。遗传分析表明该突变体为隐性单基因突变, 经研究发现它的*FtsZ2-1*基因发生了无义突变, 且互补实验结果也进一步表明了该突变体表型是由*FtsZ2-1*基因突变导致。我们对其进行了叶绿体表型、遗传鉴定、互补实验等分析, 并用RT-PCR技术对其*FtsZ2-1*基因的mRNA含量进行了分析。本研究为探究高等植物的叶绿体分裂调控机制及研究*FtsZ2-1*基因在分裂中的作用提供了有用的实验材料和线索。

材料与amp;方法

1 材料

1.1 植物材料

本实验所用植物材料为Landsberg erecta (Ler)和Columbia (Col)两种生态型的拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)。突变体*pd137*是用EMS诱变剂对野生型Col种子进行诱变处理, 随后对M₂代植物通过使用显微镜观察叶绿体表型筛选得到。

1.2 数据库

本实验所用数据信息来自TAIR (<http://www.arabidopsis.org/index.jsp>)和NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

arabidopsis.org/index.jsp)和NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

2 实验方法

2.1 植物种植和培养方法

拟南芥种子用75%乙醇浸泡3~5 min进行表面消毒, 用无菌水清洗3~5次, 点播于含1%琼脂的1/2MS固体培养基, 置于4 °C冰箱低温处理2~4 d后放入培养间。生长条件: 温度20~22 °C, 相对湿度约为60%, 光/暗周期为16 h/8 h, 光照强度为90~120 μmol·m⁻²·s⁻¹。

2.2 叶绿体表型观察与分析方法

植物材料选取及处理: 取在培养土中生长1个月左右的叶片, 浸泡于3.5%戊二醛中, 暗处理1 h。随后将戊二醛吸出, 加入1 mL 0.1 mol·L⁻¹ EDTA (pH 9.0), 55 °C水浴2 h, 4 °C保存, 观察时用OLYMPUS CX21光学显微镜。叶绿体表型照片采集及数据分析: 用北京睿智公司的MJ300C数码相机拍摄, 叶绿体面积、叶肉细胞面积及单个细胞中叶绿体个数的数据采集均用图像分析软件Image Analysis System 10.0。植物叶肉细胞的选取原则参照文献(Pan等2013)报道。

2.3 突变体遗传分析

以*pd137*突变体为母本, 野生型Ler为父本, 杂交得到F₁种子。将F₁种子于营养土中, 待植物生长2~3周后, 通过PCR及凝胶电泳技术检验其背景。F₁经自交得到F₂, 再将F₂种子种于1/2MS固体培养基, 观察其叶肉细胞的叶绿体表型并统计F₂群体中叶绿体表型异常与正常的分离情况, 确定其遗传性质, 用F₂代中叶绿体分裂突变体进行遗传定位分析。

2.4 突变体的粗定位

2.4.1 图位克隆群体的构建 用光学显微镜观察, 挑出F₂代植物中24株叶绿体表型异常的突变体植物, 单株粗提DNA, 每株取等体积混匀构建成一个DNA池, 作为粗定位PCR扩增的模板。

2.4.2 粗定位分子标记的选择及PCR扩增条件 根据拟南芥信息资源网(TAIR)上的数据库, 选用均匀分布于拟南芥5条染色体上的简单序列长度多态性(simple sequence length polymorphisms, SSLP)分子标记, 产物长度在100~200 bp之间, 且在Ler和Col之间有明显多态性的23个分子标记进行PCR扩

增。扩增条件为: 94 °C 预变性5 min, 94 °C 变性30 s, 53 °C 退火30 s, 72 °C 延伸30 s, 50个循环, 72 °C 5 min, 4 °C 保存。

2.5 突变体互补分析

以拟南芥野生型Col基因组DNA为模板, 以*FtsZ2-1-10*和*FtsZ2-1-11*为引物扩增*FtsZ2-1*基因片段。*FtsZ2-1-10*和*FtsZ2-1-11*引物序列分别为*FtsZ2-1-10*: 5'-CCTGGATCCCATCAGCACCGTAAATGTAGCT-3'; *FtsZ2-1-11*: 5'-CCTCCATGGCACAGTTGTTGCTGGTATATCGC-3'。PCR扩增产物经*Bam*HI和*Nco*I酶消化后克隆到双元载体3302Y3中, 将构建好的*FtsZ2-1-3302Y3*载体转化到农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)中, 用花序侵染法对拟南芥突变体*pd137*进行遗传转化, 对转化所得的种子用浓度为60 mg·L⁻¹的除草剂筛选, 随后用光学显微镜观察转基因植物的叶绿体表型。

2.6 突变体*FtsZ2-1*基因mRNA的RT-PCR分析

用BioTeke公司的通用植物总RNA提取试剂盒提取种子中4周左右的*pd137*及野生型Col植物叶片总RNA。以该RNA为模板, 用Fermentas公司的RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit做反转录, 进行cDNA的合成。反应体系为: 1 µg Total RNA, 1 µL 10 pmol·L⁻¹ oligo (dT), 用nuclease-free Water补至12 µL。将该反应体系混匀, 65 °C反应5 min。再往该体系中加入4 µL 5×Reaction Buffer, 1 µL RiboLock RNase Inhibitor (20 U·µL⁻¹), 2 µL 10 mmol·L⁻¹ dNTP Mix, 1 µL Revert Aid M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U·µL⁻¹), 混匀。将上述体系于42 °C反应60 min, 70 °C温育5 min终止反应。

将合成的cDNA进行4倍梯度稀释并以此为模板, RT-PCR检测突变体*pd137*中*FtsZ2-1*基因mRNA的表达量, 内参基因为*HTA9*和*PDV2* (Pan等2013)。*FtsZ2-1a*的扩增引物为*FtsZ2-1-aF*: 5'-CTCCATGGCAACTTACGTTTCACCG-3'; *FtsZ2-1-aR*: 5'-AGGATCTTGAGCTTGGCTTTG-3'; *FtsZ2-1b*的扩增引物为*FtsZ2-1-bF*: 5'-ACAGCTGTCTCTCAGTCTACTC-3'; *FtsZ2-1-bR*: 5'-GTTCCAAACAATTCCAGTGGCTC-3'; *PDV2*的扩增引物为*PDV2F*: 5'-GCTTGCTTCTTTACAG-AATCTAAGGC-3'; *PDV2R*: 5'-CCCATTTCG-CATCCGATTTCTTC-3'; *HTA9*的扩增引物为

HTA9F: 5'-GGTCTCCAGTTCACGTTGG-3'; *HTA9R*: 5'-CTCCTCATCTCCACGAATCGC-3'。其中, *FtsZ2-1a*、*FtsZ2-1b*分别表示*FtsZ2-1*基因突变位点的上、下游片段。PCR反应体系20 µL: 1 µL cDNA, 10 µL 2×Power Taq PCR MasterMix, 0.5 µmol·L⁻¹引物。扩增条件为: 94 °C 预变性5 min, 94 °C 变性30 s, 53 °C 退火30 s, 72 °C 延伸1 min, 30个循环, 72 °C 延伸5 min, 4 °C 保存。

实验结果

1 *pd137*的叶绿体表型异常

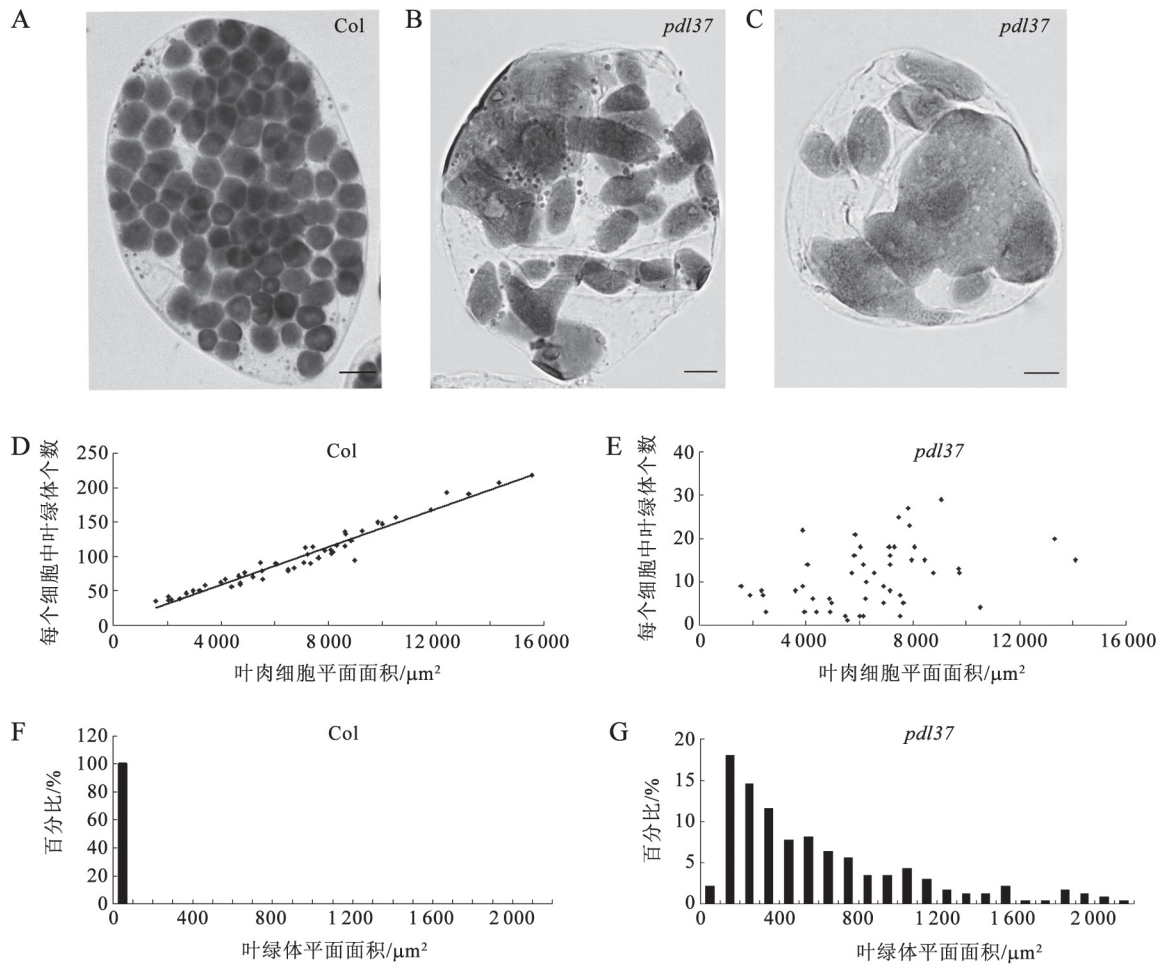
突变体*pd137*生长发育基本正常, 但在光学显微镜下观察可见其叶肉细胞中的叶绿体表型与野生型Col相比有明显差异。在野生型的叶肉细胞中, 叶绿体呈椭圆球形或球形(图1-A), 而在突变体*pd137*的叶肉细胞中, 叶绿体形状有的极不规则, 面积显著大于野生型(图1-B), 有的则接近椭圆球状, 大小与野生型近似(图1-C); 在野生型中, 叶绿体数目的多少与植物发育所处阶段有关, 细胞面积越大, 叶绿体数目越多(图1-D), 而在*pd137*中, 叶绿体个数与细胞面积呈分散分布, 无明显规律性(图1-E), 叶肉细胞中叶绿体仅有1~30个, 数目显著减少; 此外, 拟南芥野生型的单个叶绿体平面面积大小在100 µm²以内(图1-F), 而*pd137*的单个叶绿体平面面积差异很大, 有的大小与野生型相近, 有的平面面积增大且多集中在200~1 200 µm², 有的显著增大, 甚至达到2 200 µm² (图1-G)。

2 突变体的遗传鉴定

以突变体*pd137*为母本, 野生型Ler为父本, 杂交得到F₁。F₁植物叶绿体表型正常, 与野生型Col一致, 说明该突变性状为隐性。F₁自交所得F₂出现性状分离, 野生型表型与突变表型的分离比约为3:1。由卡方检验结果可知, 该卡方值低于临界值(表1), 符合孟德尔遗传定律, 说明*pd137*是受隐性单基因控制的突变体。

3 *pd137*的作图定位

我们对*pd137*突变体进行了粗定位。利用PCR技术及凝胶电泳分析发现, 该突变基因与拟南芥第2号染色体上的分子标记CH2-10.90、CH2-17.52连锁较紧密。随后, 我们在上述分子标记的区间内设计了CH2-13.70和CH2-16.0这两个分子标记, 分

图1 野生型Col与*pdl37*叶绿体表型分析Fig.1 Analysis of the chloroplast phenotype in wild-type (Col) and *pdl37*

A~C: 野生型Col与*pdl37*叶绿体表型对比, 细胞经固定处理, 图中标尺为10 μm; D~E: 野生型Col与*pdl37*叶肉细胞中叶绿体个数与细胞面积相关性对比; F~G: 野生型Col与*pdl37*叶绿体平面面积大小分布情况对比。

表1 突变体*pdl37*的遗传学分析Table 1 Genetic analysis of *pdl37*

杂交	代数	总植株数/株	植株数/株		χ^2
			野生型	突变体	
<i>pdl37</i> × Ler	F ₂	135	104	31	$\chi^2=0.298 < \chi^2_{(P=0.05)}=3.841$

析作图群体24株突变体植物分别与CH2-10.90、CH2-13.70、CH2-16.0和CH2-17.52这四个分子标记的连锁情况(图2-A)。在这24株突变体植物中, 有20株在CH2-10.90这个分子标记位点上为Col纯合子, 重组率为16.7%; 而在CH2-13.70和CH2-17.52这两个分子标记的位点为Col纯合子的均为21株, 重组率为12.5%。在CH2-16.0分子标记的位点为

Col纯合子的有22株, 重组率为8.3%。根据突变体在这4个分子标记上的重组率情况可知, 突变基因与CH2-13.70、CH2-16.0连锁较为紧密, 突变位点在两者之间, 且与CH2-16.0连锁最紧密。

4 *pdl37*突变体中*FtsZ2-1*基因的测序及分析

对CH2-13.70和CH2-16.0这两个分子标记所处区间进行分析发现, 在该区间内已知的与叶绿体分裂相关的基因只有*FtsZ2-1*(图2-B)。此外, *pdl37*的叶绿体表型与已报道的*FtsZ2-1*的T-DNA插入突变体表型较为相似(Schmitz等2009)。因此, 我们推测*pdl37*可能是*FtsZ2-1*基因存在突变。随后对该基因进行了PCR扩增及测序分析。对*FtsZ2-1*基因的测序分析结果(图3-A)显示, 在*pdl37*中, *FtsZ2-1*

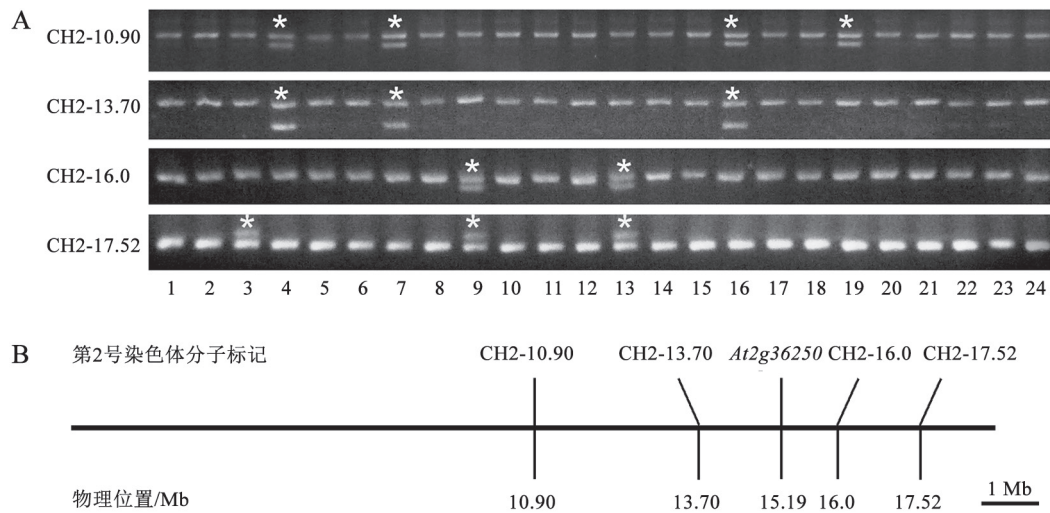


图2 *pd137*的粗定位

Fig.2 Rough mapping of *pd137*

A: 24株F₂植株中突变体的PCR分析结果, 突变基因与分子标记CH2-10.90、CH2-13.70、CH2-16.0和CH2-17.52的连锁情况分析, 其中在分子标记CH2-10.90、CH2-13.70和CH2-16.0的2条带中, 上边的一条带来自Col, 下边的一条带来自Ler, CH2-17.52的2条带中则是下边的条带来自Col, 上边的条带来自Ler, 星号表示突变体植株在相应的分子标记处是杂合的; B: *FtsZ2-1* (*At2g36250*)和分子标记在2号染色体上的位置。下面的数字表示物理位置。基因*FtsZ2-1*位于分子标记CH2-13.70和CH2-16.0之间。

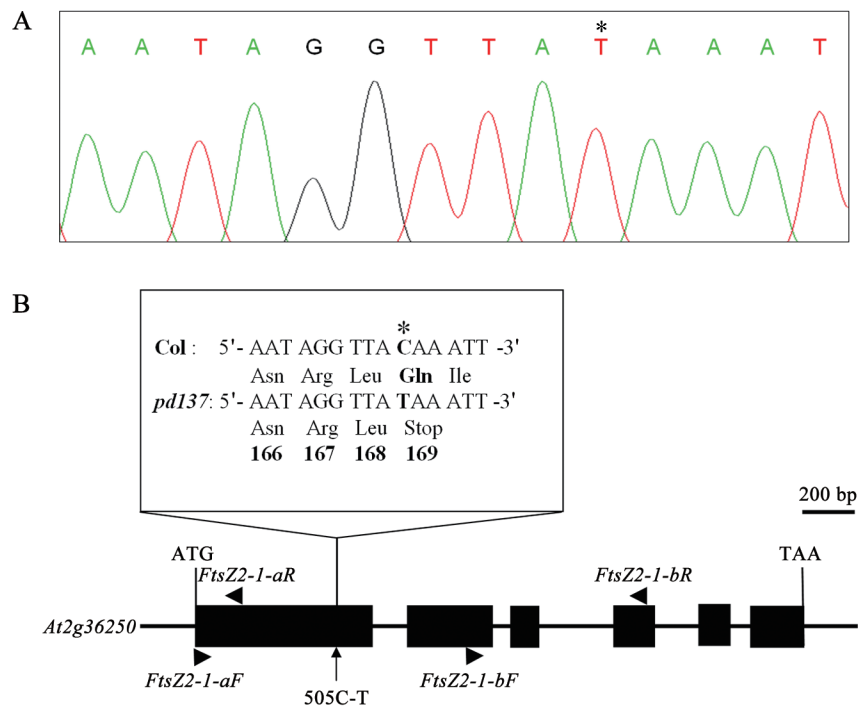


图3 *pd137*中*FtsZ2-1*基因的突变位点分析

Fig.3 Analysis of the mutation in the *FtsZ2-1* gene in *pd137*

A: *pd137*的*FtsZ2-1* (*At2g36250*)基因测序结果, 星号表示*pd137*的*FtsZ2-1*基因突变位点; B: 突变体*pd137*中碱基突变位点位置及*FtsZ2-1* (*At2g36250*)的基因结构。黑色框代表基因的外显子, 黑色框之间的直线代表基因的内含子, 星号表示与*pd137*突变位点对应的Col的*FtsZ2-1*基因位点。FZ2-1-aF、FZ2-1-aR、FZ2-1-bF、FZ2-1-bR表示RT-PCR所用引物。突变体*pd137*中*FtsZ2-1*基因的无义突变导致蛋白翻译过程提前终止。

基因的第505位碱基由胞嘧啶(C)突变为胸腺嘧啶(T), 导致*FtsZ2-1*基因第169位原本翻译谷氨酰胺的密码子CAA变为终止密码子TAA, 为无义突变(图3-B)。

5 *FtsZ2-1*基因可以互补*pd137*的叶绿体表型

为了进一步验证突变体*pd137*的叶绿体分裂异常表型是由于*FtsZ2-1*基因突变导致, 我们对其进行了互补验证实验。将野生型Col植物的*FtsZ2-1*

基因片段通过农杆菌花序侵染法转至突变体*pd137*中, 通过除草剂筛选得到转基因植物。结果显示, 转基因植物的叶绿体表型被恢复, 与野生型相似(图1-A和4-B)。*pd137*互补植物中, 叶肉细胞平面面积与叶绿体个数的比例关系与*pd137*差异极大而与野生型的比例差异不大, 该结果进一步证明了*pd137*的叶绿体表型是由*FtsZ2-1*基因的突变导致的。

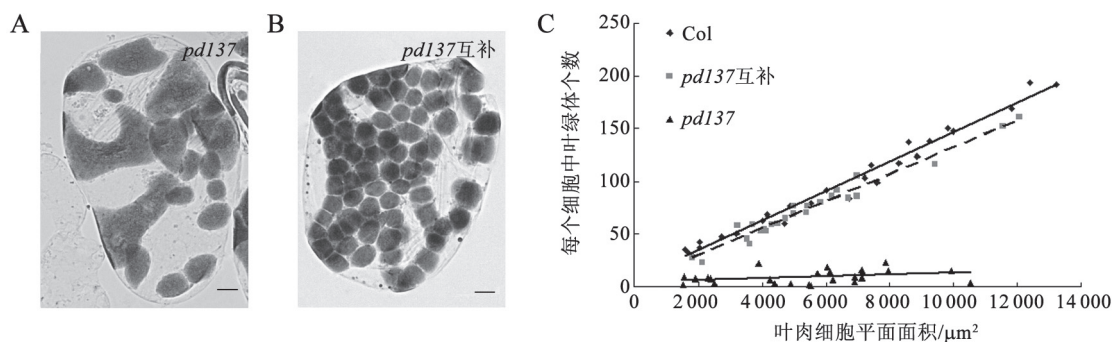


图4 野生型*pd137*与*pd137*转*FtsZ2-1*基因互补植物叶绿体表型分析

Fig.4 Analysis of the chloroplast phenotype of *pd137* and *pd137* complemented with a wild-type *FtsZ2-1* transgene

A、B: *pd137*与*pd137*转*FtsZ2-1*基因互补植物叶绿体表型对比, 图中标尺为10 μm; C: 野生型Col、*pd137*互补植株和*pd137*叶肉细胞中叶绿体个数与细胞面积相关性对比。

6 突变体的*FtsZ2-1*基因mRNA水平下降

已有研究表明, 无义突变介导的mRNA降解(nonsense-mediated mRNA decay, NMD)这种机制能识别并降解含有提前终止密码子(pre-mature translational termination codon, PTC)的转录产物, 使可能有毒害作用的截短蛋白表达受阻(Peltz等1993; Zhang和Maquat 1996)。由于NMD可以降解异常的mRNA, 我们利用RT-PCR技术对突变体*pd137*的*FtsZ2-1*基因的mRNA含量进行了相关实验分析(图5)。结果显示, 在突变体*pd137*中, 内参基因*PDV2*和*HTA9*的mRNA含量与野生型十分接近, 而*FtsZ2-1*基因的mRNA含量却明显低于野生型, 且突变位点上游片段*FtsZ2-1a*的mRNA含量明显低于突变位点下游片段*FtsZ2-1b*的mRNA含量, 这可能是由于突变对上游片段mRNA的稳定性影响更大, 因此上游片段mRNA的降解程度更严重。

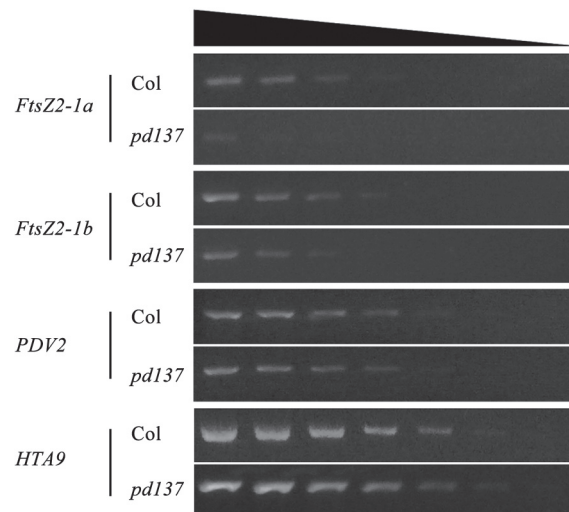


图5 *pd137*与野生型Col植物中*FtsZ2-1*基因的半定量RT-PCR分析

Fig.5 Semi-quantitative RT-PCR analysis of *FtsZ2-1* transcripts in *pd137* and wild-type (Col)

*FtsZ2-1a*和*FtsZ2-1b*分别表示*FtsZ2-1*基因突变位点上、下游2个不同的基因片段。*PDV2*和*HTA9*为2个内参基因。黑色三角形表示所用cDNA模板的稀释方向, 每次稀释的倍数为4倍。

讨 论

光合作用是生物界赖以生存的基础,也是地球碳氧循环的关键媒介,而叶绿体是植物进行光合作用的主要场所。拟南芥作为植物中的模式生物,深入研究其叶绿体分裂机制有重要意义。

本实验用EMS诱变拟南芥野生型Col种子并从M₂代中筛选得到一个叶绿体分裂表型与野生型有显著差异的突变体*pd137*。经光学显微镜对其叶绿体及叶肉细胞观察并分析,发现其与野生型的差异主要表现为:叶绿体形状不规则,单个叶绿体的面积差异极大,但绝大多数都大于野生型植物中的叶绿体;叶绿体在细胞中的排列和分布不规则;叶绿体个数多少与叶肉细胞面积大小没有明显相关性;叶肉细胞中的叶绿体平均个数远少于野生型。

本研究对该突变体进行了遗传分析,结果表明该突变体受隐性单基因控制。通过遗传作图,将该突变基因定位于拟南芥第2号染色体的CH2-13.70和CH2-16.0两个分子标记之间。该区间内已知的与叶绿体分裂相关基因只有*FtsZ2-1*,且*pd137*的叶绿体表型与已报道的*FtsZ2-1*基因的T-DNA插入突变体(Schmitz等2009)较为相似。因此,我们对*pd137*的*FtsZ2-1*基因进行了测序分析。结果表明,*pd137*的*FtsZ2-1*基因第505位碱基发生了一个由C到T的单碱基突变,编码第169个氨基酸的密码子变为终止密码子,为无义突变,*FtsZ2-1*蛋白翻译的过程被提前终止。随后通过互补实验,也证明了*pd137*的叶绿体表型是由于*FtsZ2-1*基因的突变导致。

已有研究表明,NMD是一种保守且有效的mRNA监控机制,可以选择性的消除含有PTC的mRNA。此外,NMD可以在适应性反应中降解转录产物参与细胞适应所处的微环境(Gardner 2010)。早在1979年就在酵母中发现含PTC的*Ura*基因突变体的mRNA半衰期显著降低(Exinger和Lacroute 1979)。在黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)、秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)以及哺乳动物中均发现NMD的存在(Anders等2003; Maquat 2005; Popp等2013)。无义突变对某些生物学功能会造成严重影响,一个医学中的经典例子是 β 地中海贫血症,该病是因为 β -血红蛋白基因的外显子发生了无

义突变,血红蛋白的 β 蛋白链合成受阻,进而导致严重的红细胞生成障碍, RNA印迹(Northern blot)显示突变体的mRNA水平极低(Baserga和Benz 1992)。为了探究在*pd137*中*FtsZ2-1*基因的无义突变对mRNA水平产生的影响,我们对其进行了RT-PCR分析,结果表明该突变降低了*FtsZ2-1*基因的mRNA水平,且突变位点上游的mRNA水平低于突变位点下游,这种现象的出现可能与突变位点对上游片段mRNA稳定性的影响比下游片段的更大有关。

此外,叶绿体的分裂增殖过程受多种途径调控,而在高等植物中可能存在某种补偿机制,能在发生某种突变时使其通过其它调控手段进行补偿,以保证其各项生理活动尽可能正常进行。在线粒体的研究中也发现在衰老的机体内,线粒体形态上常出现增大变形,嵴与基质减少甚至出现空泡现象(Figge等2012, 2013)。这种线粒体表型的变化可能是对衰老时器官功能负荷增加时的适应性肥大。在*pd137*中,突变体叶绿体数目远少于野生型,但其单个叶绿体面积却总体上大于野生型,这可能也是一种补偿机制调控的结果。

参考文献

- Anders KR, Grimson A, Anderson P (2003). SMG-5, required for *C. elegans* nonsense-mediated mRNA decay, associates with SMG-2 and protein phosphatase 2A. *EMBO J*, 22 (3): 641~650
- Baserga SJ, Benz EJ Jr (1992). Beta-globin nonsense mutation: deficient accumulation of mRNA occurs despite normal cytoplasmic stability. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 2935~2939
- Colletti KS, Tattersall EA, Pyke KA, Froelich JE, Stokes KD, Osteryoung KW (2000). A homologue of the bacterial cell division site-determining factor MinD mediates placement of the chloroplast division apparatus. *Curr Biol*, 10, 507~516
- Exinger F, Lacroute F (1979). Genetic evidence for the creation of a reinitiation site by mutation inside the yeast *ura 2* gene. *Mol Gen Genet*, 173 (1): 109~113
- Figge MT, Osiewacz HD, Reichert AS (2013). Quality control of mitochondria during aging: Is there a good and a bad side of mitochondrial dynamics? *Bioessays*, 35 (4): 314~322
- Figge MT, Reichert AS, Meyer-Hermann M, Osiewacz HD (2012). Deceleration of fusion-fission cycles improves mitochondrial quality control during aging. *PLoS Comput Biol*, 8 (6): e1002576
- Fujiwara MT, Hashimoto H, Kazama Y, Abe T, Yoshida S, Sato N, Itoh RD (2008). The assembly of the FtsZ ring at the mid-chloroplast division site depends on a balance between the activities of AtMinE1 and ARC11/AtMinD1. *Plant Cell Physiol*, 49 (3): 345~361

- Gao H, Kadirjan-Kalbach D, Froehlich JE, Osteryoung KW (2003). ARC5, a cytosolic dynamin-like protein from plants, is part of the chloroplast division machinery. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100 (7): 4328-4333
- Gao H, Sage TL, Osteryoung KW (2006). FZL, an FZO-like protein in plants, is a determinant of thylakoid and chloroplast morphology. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103 (17): 6759-6764
- Gardner LB (2010). Nonsense-mediated RNA decay regulation by cellular stress; implications for tumorigenesis. *Mol Cancer Res*, 8 (3): 295-308
- Hale CA, Rhee AC, de Boer PA (2000). ZipA-induced bundling of FtsZ polymers mediated by an interaction between C-terminal domains. *J Bacteriol*, 182: 5153-5166
- Itoh R, Fujiwara M, Nagata N, Yoshida S (2001). A chloroplast protein homologous to the eubacterial topological specificity factor MinE plays a role in chloroplast division. *Plant Physiol*, 127: 644-1655
- Lutkenhaus J, Addinall SG (1997). Bacterial cell division and the Z ring. *Annu Rev Biochem*, 66: 93-116
- Maple J, Fujiwara MT, Kitahata N, Lawson T, Baker NR, Yoshida S, Moller SG (2004). GIANT CHLOROPLAST 1 is essential for correct plastid division in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 4 (9): 776-781
- Maple J, Moller SG (2007). Plastid division: evolution, mechanism and complexity. *Ann Bot*, 99 (4): 565-579
- Maple J, Vojta L, Soll J, Moller SG (2007). ARC3 is a stromal Z-ring accessory protein essential for plastid division. *EMBO Rep*, 8 (3): 293-299
- Maquat LE (2005). Nonsense-mediated mRNA decay in mammals. *J Cell Sci*, 118 (9): 1773-1776
- Martin W, Rujan T, Richly E, Hansen A, Cornelsen S, Lins T, M Leister D, Stoebe B, Hasegawa M, Penny D (2002). Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99 (19): 12246-12251
- McAndrew RS, Froehlich JE, Vitha S, Stokes KD, Osteryoung KW (2001). Colocalization of plastid division proteins in the chloroplast stromal compartment establishes a new functional relationship between FtsZ1 and FtsZ2 in higher plants. *Plant Physiol*, 127 (4): 1656-1666
- McAndrew RS, Olson BJ, Kadirjan-Kalbach DK, Chi-Ham CL, Vitha S, Froehlich JE, Osteryoung KW (2008). *In vivo* quantitative relationship between plastid division proteins FtsZ1 and FtsZ2 and identification of ARC6 and ARC3 in a native FtsZ complex. *Biochem J*, 412 (2): 367-378
- Miyagishima SY, Froehlich JE, Osteryoung KW (2006). PDV1 and PDV2 mediate recruitment of the dynamin-related protein ARC5 to the plastid division site. *Plant Cell*, 18 (10): 2517-2530
- Osteryoung KW, McAndrew RS (2001). The plastid division machine. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 52: 315-333
- Osteryoung KW, Vierling E (1995). Conserved cell and organelle division. *Nature*, 376 (6540): 473-474
- Pan D, Shi Y, Liu X, Gao Y, Liu Z, Gao H (2013). Genetic mapping and isolation of two *arc3* alleles in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep*, 32 (1): 173-182
- Peltz SW, Brown AH, Jacobson A (1993). mRNA destabilization triggered by premature translational termination depends on at least three *cis*-acting sequence elements and one *trans*-acting factor. *Genes Dev*, 7 (9): 1737-1754
- Popp MW, Maquat LE (2013). Organizing principles of mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *Annu Rev Genet*, 47: 139-165
- Potluri LP, Kannan S, Young KD (2012). ZipA is required for FtsZ-dependent preseptal peptidoglycan synthesis prior to invagination during cell division. *J Bacteriol*, 194 (19): 5334-5342
- Pyke KA (2010). Plastid division. *AoB Plants*, 2010: plq016
- Schmitz AJ, Glynn JM, Olson BJ, Stokes KD, Osteryoung KW (2009). *Arabidopsis* FtsZ2-1 and FtsZ2-2 are functionally redundant, but FtsZ-based plastid division is not essential for chloroplast partitioning or plant growth and development. *Mol Plant*, 2 (6): 1211-1222
- Smith AG, Johnson CB, Vitha S, Holzenburg A (2010). Plant FtsZ1 and FtsZ2 expressed in a eukaryotic host: GTPase activity and self-assembly. *FEBS Lett*, 584 (1): 166-172
- Stokes KD, Osteryoung KW (2003). Early divergence of the *FtsZ1* and *FtsZ2* plastid division gene families in photosynthetic eukaryotes. *Gene*, 320: 97-108
- Tanaka K, Hanaoka M (2012). The early days of plastid retrograde signaling with respect to replication and transcription. *Front Plant Sci*, 3: 301
- TerBush AD, Osteryoung KW (2012). Distinct functions of chloroplast FtsZ1 and FtsZ2 in Z-ring structure and remodeling. *J Cell Biol*, 199 (4): 623-637
- Vitha S, Froehlich JE, Koksharova O, Pyke KA, van Erp H, Osteryoung KW (2003). ARC6 is a J-domain plastid division protein and an evolutionary descendant of the Cyanobacterial cell division protein Ftn2. *Plant Cell*, 15 (8): 1918-1933
- Yan K, Pearce KH, Payne DJ (2000). A conserved residue at the extreme C-terminus of FtsZ is critical for the FtsA-FtsZ interaction in *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun*, 270: 387-392
- Yoshida Y, Kuroiwa H, Misumi O, Yoshida M, Ohnuma M, Fujiwara T, Yagisawa F, Hirooka S, Imoto Y, Matsushita K et al (2010). Chloroplasts divide by contraction of a bundle of nanofilaments consisting of polyglucan. *Science*, 329 (5994): 949-953
- Zhang J, Maquat LE (1996). Evidence that the decay of nucleus-associated nonsense mRNA for human triosephosphate isomerase involves nonsense codon recognition after splicing. *RNA*, 2 (3): 235-243
- Zhang M, Schmitz AJ, Kadirjan-Kalbach DK, TerBush AD, Osteryoung KW (2013). Chloroplast division protein ARC3 regulates chloroplast FtsZ-ring assembly and positioning in *Arabidopsis* through interaction with FtsZ2. *Plant Cell*, 25 (5): 1787-1802