

DOI:10.13332/j.1000-1522.20190157

转录组分析氧化胁迫对毛白杨悬浮细胞生长发育的影响

尹 玢 陆 海

(北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083)

摘要:【目的】毛白杨是多年生木本植物, 由于其固着的生长模式, 毛白杨存在长期承受胁迫的可能性。氧化胁迫是常见的非生物胁迫方式, 在多个物种中均有不同程度的研究, 然而以毛白杨为材料在转录水平的研究目前鲜有报道。通过转录组数据探究活性氧平衡的打破对毛白杨悬浮细胞生长发育的影响。【方法】本研究对毛白杨悬浮细胞系进行 H₂O₂ 胁迫处理, 通过激光共聚焦显微镜和转录组测序技术(RNA-Seq), 观察、分析了线粒体的形态学和基因表达量的差异。【结果】通过对转录组数据的分析得到了 806 个显著差异基因($P < 0.001$ 且 $|\log_2\text{ratio}| > 1$), 其中 449 个差异基因下调, 357 个差异基因上调。这些差异基因涉及细胞分裂、细胞分裂素的激活、赤霉素调控以及磷酸化途径。通过线粒体特异性染料并使用激光共聚焦显微镜观察氧化胁迫条件下毛白杨线粒体的形态学, 结果表明氧化胁迫下线粒体以蠕虫状为主。【结论】通过分析氧化胁迫条件下细胞转录组数据, 在 RNA 水平揭示了氧化胁迫对植物细胞生长发育的影响, 为植物的应激反应和生长发育研究提供了理论基础。

关键词: 毛白杨; 活性氧; 悬浮细胞; 生长发育; 转录组测序

中图分类号: S718.43; S792.117; Q943.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-1522(2019)09-0090-09

引文格式: 尹玢, 陆海. 转录组分析氧化胁迫对毛白杨悬浮细胞生长发育的影响[J]. 北京林业大学学报, 2019, 41(9):90-98. Yin Bin, Lu Hai. Effects of oxidative stress on growth and development of suspension cells of *Populus tomentosa* by transcriptome analysis[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2019, 41(9): 90-98.

Effects of oxidative stress on growth and development of suspension cells of *Populus tomentosa* by transcriptome analysis

Yin Bin Lu Hai

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

Abstract: [Objective] *Populus tomentosa* is a perennial woody plant. Because of its fixed growth pattern, *P. tomentosa* may under long-term stress. Oxidative stress is a common way of abiotic stress, which has been studied in many researches. However, there are few reports on the transcriptional level of *P. tomentosa* as a material. The transcriptome data were used to investigate the effects of breaking the balance of reactive oxygen species (ROS) on the growth and development of suspension cells of *P. tomentosa*. [Method] In this study, the suspension cell lines of *P. tomentosa* were treated with hydrogen peroxide. The morphological and gene expression differences of mitochondria were observed and analyzed by confocal laser microscopy and transcriptome sequencing (RNA-Seq). [Result] Through the analysis of transcriptome data, 806 differentially expressed genes ($P < 0.001$ and $|\log_2\text{ratio}| > 1$) were identified, of which 449 differentially expressed genes were down-regulated and 357 differentially expressed genes were up-regulated. These differential genes involve cell division, cytokinin activation, gibberellin regulation and phosphorylation pathways. Mitochondrial morphology of *P. tomentosa* under oxidative stress was observed using

收稿日期: 2019-03-22 修回日期: 2019-05-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(31500161)。

第一作者: 尹玢, 博士生。主要研究方向: 树木分子生物学。Email: yb891110@sina.com 地址: 100083 北京市海淀区清华东路 35 号北京林业大学生物科学与技术学院。

责任作者: 陆海, 教授, 博士生导师。主要研究方向: 树木分子生物学。Email: luhai1974@bjfu.edu.cn 地址: 同上。

本刊网址: <http://j.bjfu.edu.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

mitochondrial specific dyes and laser confocal microscopy. The results showed that the mitochondria were mostly vermiform under oxidative stress. [Conclusion] By analyzing cell transcriptome data under oxidative stress, the effects of oxidative stress on plant growth and development were revealed at RNA level, which provided a theoretical basis for the study of plant stress response and growth and development.

Key words: *Populus tomentosa*; reactive oxygen species (ROS); suspension cell lines; growth and development; RNA-Seq

活性氧(ROS)是由于氧分子成为电子受体被还原而产生的,这一现象在细胞的生命周期中不可避免。活性氧包括超氧化物阴离子自由基、羟基自由基和过氧化氢等。活性氧产生于不同亚细胞结构中,可以产生严重的氧化伤害。然而,植物细胞也有一系列抗氧化机制能够清除过量的活性氧,从而避免细胞的生物分子遭受影响^[1]。近年来,很多研究重新评估了活性氧的作用,“氧化胁迫”逐渐被引申为“氧化信号”^[2-5]。这意味着活性氧除了是一个有害物质以外也是植物细胞信号网络的重要组成部分,植物利用这个信号网络完成生长发育和应对环境的改变^[1-3]。因此,活性氧的含量在植物细胞中需要保持平衡,过多的活性氧产生氧化伤害,过少的活性氧则使信号通路受到影响。

正常情况下,植物细胞内的活性氧水平是被一个庞大的抗氧化系统精确调控的。例如,在模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中有至少152个基因控制细胞内的抗氧化机制。这些基因被认为调控了不同亚细胞结构的活性氧产生和清除的速率,进而维持细胞的氧化防御和信号传递能力^[6]。然而生物胁迫和非生物胁迫的介入能够引起植物细胞内活性氧水平的爆发,植物的生长发育也会因此受到影响。例如:病虫害、紫外线、金属离子、化学物质、环境毒素、高温和低温等^[7-9]。与动物趋利避害的本能不同,固着生长模式的植物在面临胁迫时则采取防御适应的方式。其中,多年生的木本植物存在长期承受生物或非生物胁迫的可能性,因此搞清楚胁迫造成的活性氧水平紊乱对植物生长发育的影响是十分必要的。目前,很多研究都已证明活性氧平衡对维持细胞活性和保障生长发育异常重要^[10-14],但是,以毛白杨为对象,在基因的表达调控水平却并没有进一步的解释。

近年来,随着转录组测序技术(RNA-Seq)的不断完善,在转录水平揭示基因的表达调控趋势已经成为可能。植物悬浮细胞系具有生长快速、易获取、重复性好等优势,被广泛应用于细胞生物学、生物化学、生理学检测以及分子生物学等研究。而对于RNA-Seq来说,由于实验所需的植物样品较多,悬浮细胞无疑是良好的实验材料。本研究以毛白杨悬浮

细胞为材料,在H₂O₂处理的条件下,通过RNA-Seq分析并解释了氧化胁迫对植物细胞生长发育的影响。同时,通过激光共聚焦显微镜观察了两种处理条件下线粒体的形态差异并进行了定量统计,为深入研究氧化胁迫对植物生长发育的影响奠定了理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与培养基

实验所用野生型毛白杨无菌幼苗来自本实验室保存。转录组测序所使用的毛白杨悬浮细胞由无菌幼苗叶片的愈伤组织诱导而来。MS培养基添加1.0 mg/L和6-苄基腺嘌呤(6-BA),0.1 mg/L萘乙酸(NAA)。

1.2 野生型毛白杨悬浮细胞系的诱导

1.2.1 毛白杨叶片愈伤组织的诱导

取本实验室保存的毛白杨无菌幼苗的叶片,切成小块并接种于MS + 1.0 mg/L 2,4-D + 5 g/L琼脂 + 30 g/L蔗糖的固体培养基上诱导愈伤组织。培养25 d后,发育良好的淡黄色愈伤组织作为悬浮细胞系建立的初始材料。

1.2.2 毛白杨野生型悬浮细胞系的建立

取生长旺盛的愈伤组织接种在液体MS培养基中,24 h避光振荡培养。悬浮培养初期的液体培养基为MS + 1.5 mg/L 2,4-D + 30 g/L蔗糖,14 d继代1次。在继代过程中,先将悬浮培养的细胞静置0.5 h,随后轻轻摇动致使部分细胞重悬,吸取重悬的优质细胞至新鲜液体培养基继续培养。培养初期的细胞在3次继代后成为稳定的悬浮细胞系,此后7 d继1次,培养基为MS + 0.8 mg/L 2,4-D + 30 g/L蔗糖。

1.3 过氧化氢(H₂O₂)和抗坏血酸(AsA)处理野生型毛白杨悬浮细胞

储备液浓度10 mol/L的H₂O₂直接向毛白杨悬浮细胞系中滴加,至终浓度10 mmol/L避光振荡培养3 h,室温,140 r/min。

储备液浓度为100 mmol/L的AsA向毛白杨悬浮细胞系中滴加,终浓度为1 mmol/L,避光振荡培养3 h,室温,140 r/min。

1.4 转录组测序和差异基因的筛选

1.4.1 样品测序和数据处理

将野生型毛白杨悬浮细胞作为对照组, H₂O₂ 处理的野生型毛白杨悬浮细胞作为实验组样品进行后续的转录组分析。我们将样品和对照组通过液氮速冻 10 min 后交由诺禾致源进行文库制备、转录组测序和数据质检的分析。(1)文库制备和质检:总 RNA 提取后通过 Nanodrop 检测纯度, 并使用 Qubit 对浓度进行定量。总 RNA 检测合格后, 通过 Oligo(dT)进行 PCR 富集并获得 cDNA 文库。随后使用 Qubit 进行文库定量, 使用 Agilent 2100 检测文库质量是否合格。(2)转录组测序: 测序平台是 Illumina Genome Analyzer(HiSeq™ 2000; Illumina, San Diego, CA); 原始数据(raw data)经过初步筛选后获得高质量的过滤后数据(clean data), 并与毛果杨(*Populus trichocarpa*)的参考基因组进行匹配, 使用软件为 SOAPaligner; 基因的表达水平通过定位到基因组区域或基因外显子区的测序序列的计数来计算, 即每一百万个片段中来自某一基因每 1 000 bp 长度的片段数量(FPKM)^[15]。相关转录组测序数据已经上传 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE110273>), 登录号码(accession number) GSE110273。

1.4.2 差异基因筛选

野生型(WT)和 H₂O₂ 处理的野生型(WTH)中基因的表达水平确定后, 通过 WTH vs. WT 的比较, 分析 H₂O₂ 处理所带来的差异基因的变化, 筛选标准为校正 P 值 < 0.001 且 $|\log_2\text{ratio}| > 1$ 。

1.4.3 差异基因 GO (Gene Ontology) 功能富集分析
对已筛选的差异基因进行 GO 功能富集分析, 筛选标准为 $P < 0.005$ 。

1.5 激光共聚焦显微镜观察线粒体形态

1.5.1 激光共聚焦显微镜观察线粒体

激光共聚焦显微镜的使用型号为 Leica TCS-SP8, 线粒体荧光染料为 MitoTracker Red CMXRos (Invitrogen), 线粒体荧光信号的激发波长为 578 nm, 吸收峰在 580 ~ 620 nm。所有样品通过 409 油浸镜倒置观察。线粒体的形态学定量统计基于 200 个不同细胞。

1.5.2 MitoTracker Red CMXRos 染色

将待染的毛白杨悬浮细胞孵育在含有终浓度 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 染料的缓冲液(0.3 mmol/L 蔗糖、5 mmol/L TES、5 mmol/L MgCl₂)中, 室温避光孵育 30 min^[16]。静置 2 min 后弃上清并加入无染料的缓冲液, 重悬细胞 2 min, 重复 3 次以完成背景清洗。

2 结果与分析

2.1 转录组分析

2.1.1 显著差异表达基因的分析

转录组测序原始数据的基本情况见表 1, 评估合格可用。本研究采用表达差异倍数和统计学的方法进行结果筛选, 筛选对象为以野生型毛白杨悬浮细胞(WT)为对照组, 经过 H₂O₂ 处理(WTH)的野生型毛白杨悬浮细胞为实验组, 与 WT 比较的结果(WTH vs. WT)。筛选标准为校正 P 值 < 0.001 且 $|\log_2\text{ratio}| > 1$ 。如图 1 所示, 相比于 WT, WTH 共有

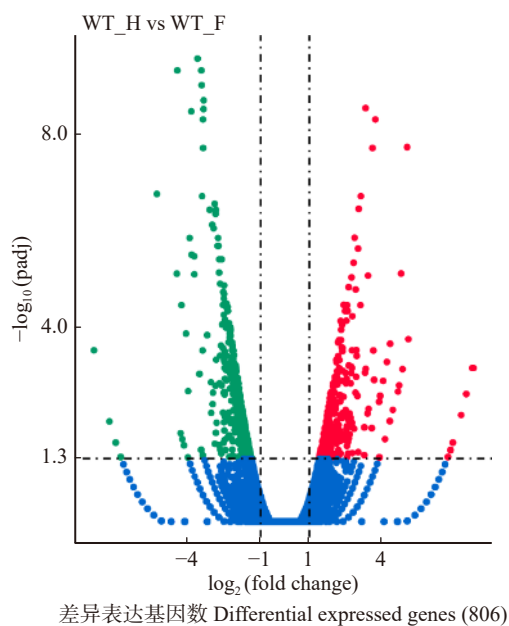
表 1 转录组测序数据的清本情况

Tab. 1 Details of transcriptome data

样品名称 Sample name	WT	WTH
原始序列数据 Raw reads	55 304 398	55 500 942
过滤后数据 Clean reads	53 555 976	53 151 550
转化数据 Clean bases (G)	8.03	7.97
误码率 Error rate/%	0.02	0.02
Q20/%	96.45	95.55
Q30/%	91.46	89.70
G和C数量占总碱基百分比 GC content/%	44.15	44.11
FPKM Interval (0 ~ 1)	18 797 (45.16%)	18 519 (44.49%)
FPKM Interval (1 ~ 3)	3 648 (8.76%)	3 559 (8.55%)
FPKM Interval (3 ~ 15)	9 969 (23.95%)	10 037 (24.11%)
FPKM Interval (15 ~ 60)	6 850 (16.46%)	7 118 (17.10%)
FPKM Interval (> 60)	2 360 (5.67%)	2 391 (5.74%)

注: WT, 野生型; WTH, 过氧化氢处理的野生型; Q20, 测序质量质控值大于20的碱基数所占比; Q30, 测序质量质控值大于30的碱基数所占比; FPKM Interval, 每百万fragments中来自某一基因每千碱基长度的fragments数目, 按照不同表达水平区间统计。Notes: WT, wild type; WTH, wild type treated with hydrogen peroxide; Q20, percentage of the bases with a quality value larger than 20; Q30, percentage of the bases with a quality value larger than 30; FPKM Interval, expected number of fragments per kilobase of transcript sequence per millions base pairs sequenced.

806 个显著差异基因, 其中 449 个基因下调, 357 个基因上调(图 1)。



x 轴为差异倍数。y 轴为校正后的 P 值。红点表示显著差异基因中上调的基因, 绿点表示显著差异基因中下调的基因, 蓝点表示不显著差异的基因。x, fold change. y, P -adjusted value. Red dots indicate significantly up-regulated differentially expressed genes, green dots indicate significantly down-regulated differentially expressed genes. Blue dots indicate non-significantly differentially expressed genes.

图 1 差异表达基因火山图

Fig. 1 Volcano map of differentially expressed genes

2.1.2 GO 功能富集分析

在显著差异基因的基础上, 本研究根据对这些差异基因进行了 GO 功能分类分析。GO 功能富集词条总计 180 个 ($P < 0.005$), 其中生物学过程 (biological process) 占总数的 62%, 细胞组成部分 (cellular component) 占总数的 17%, 分子功能 (molecular function) 占总数的 21%(图 2)。

为了对 GO 富集结果进行深入分析, 本研究还分别分析了上调和下调基因的 GO 功能富集。上调基因的 GO 富集词条共计 140 个 ($P < 0.005$), 显著

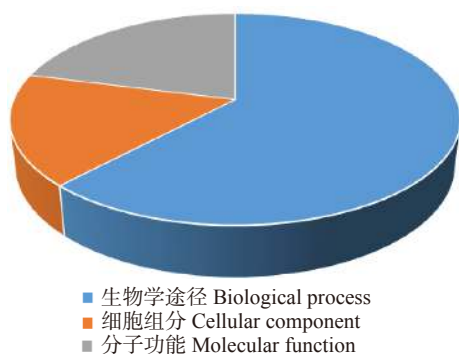


图 2 显著差异基因 GO 功能分布

Fig. 2 GO function enrichment of DEGs

性富集结果中以生物学途径分类主要包括转移酶活性(18 个基因)、蛋白质修饰(8 个基因)、泛素蛋白连接酶活性(5 个基因)、细胞周期调控(9 个基因)、细胞壁大分子代谢过程(11 个基因)等。以细胞组成部分分类包括光系统(9 个基因)、细胞骨架蛋白(46 个基因)、膜结构(11 个基因)等。以分子功能分类包括糖基水解酶活性(43 个基因)、泛素蛋白转移酶活性(18 个基因)等(图 3)。

下调基因的 GO 富集词条共计 40 个 ($P < 0.005$), 显著性富集结果中以生物学途径分类主要包括肽酶活性调控(20 个基因)、木葡聚糖代谢过程(5 个基因)、水解酶活性调控(5 个基因)、氧化还原过程(44 个基因)等; 以细胞组成部分分类包括质外体(27 个基因)、质膜(12 个基因)、细胞壁(11 个基因)等; 以分子功能分类包括木葡聚糖转移酶活性(6 个基因)、天冬氨酸类肽链内切酶活性(18 个基因)、氧化还原酶活性(46 个基因)等(图 4)。

2.1.3 H_2O_2 处理对毛白杨悬浮细胞基因表达水平的影响

为了研究 H_2O_2 处理对毛白杨悬浮细胞基因表达水平的影响, 本研究分析了野生型(WT)和 H_2O_2 处理的野生型(WTH)悬浮细胞其基因表达的水平, 结果如图 1 所示。

研究表明, UDP-葡萄糖基转移酶与有丝分裂有关并强烈地诱导细胞分裂^[17]。在我们的结果中, 下调的差异基因有一系列 UDP-葡萄糖基转移酶 (UDP-glycosyltransferases; POPTR_0007s01610, POPTR_0006s04680, POPTR_0001s31100, POPTR_0001s31140, POPTR_0016s01820, POPTR_0016s01610, POPTR_0015s05670, POPTR_0006s05450, POPTR_0016s01780)(表 2), 因此 H_2O_2 处理抑制了这些基因的表达。植物生长激素赤霉素 (Gibberellin) 在非生物应激响应中处于核心地位, 赤霉素水平的降低和信号传导被证明有助于限制植物在多种胁迫下的生长^[18]。在本研究中, 赤霉素相关基因显著下调 (POPTR_0005s26040, POPTR_0002s02410, POPTR_0001s30500)(表 2), 这与以往的研究是一致的。此外有研究表明, 细胞分裂素核苷 5'-磷酸磷酸核糖水解酶 (Cytokinin riboside 5'-monophosphate phosphoribohydrolase) 直接参与了细胞分裂素的激活, 这个基因的表达量受到干扰时细胞分裂素的稳态发生改变^[19]。在我们的研究结果中, 毛白杨细胞分裂素核苷 5'-磷酸磷酸核糖水解酶 (POPTR_0005s27030) 显著下调, 这表明外源 H_2O_2 的胁迫使细胞内细胞分裂素稳态发生改变(表 2)。

由于氧化胁迫能够不同程度的诱导细胞程序化

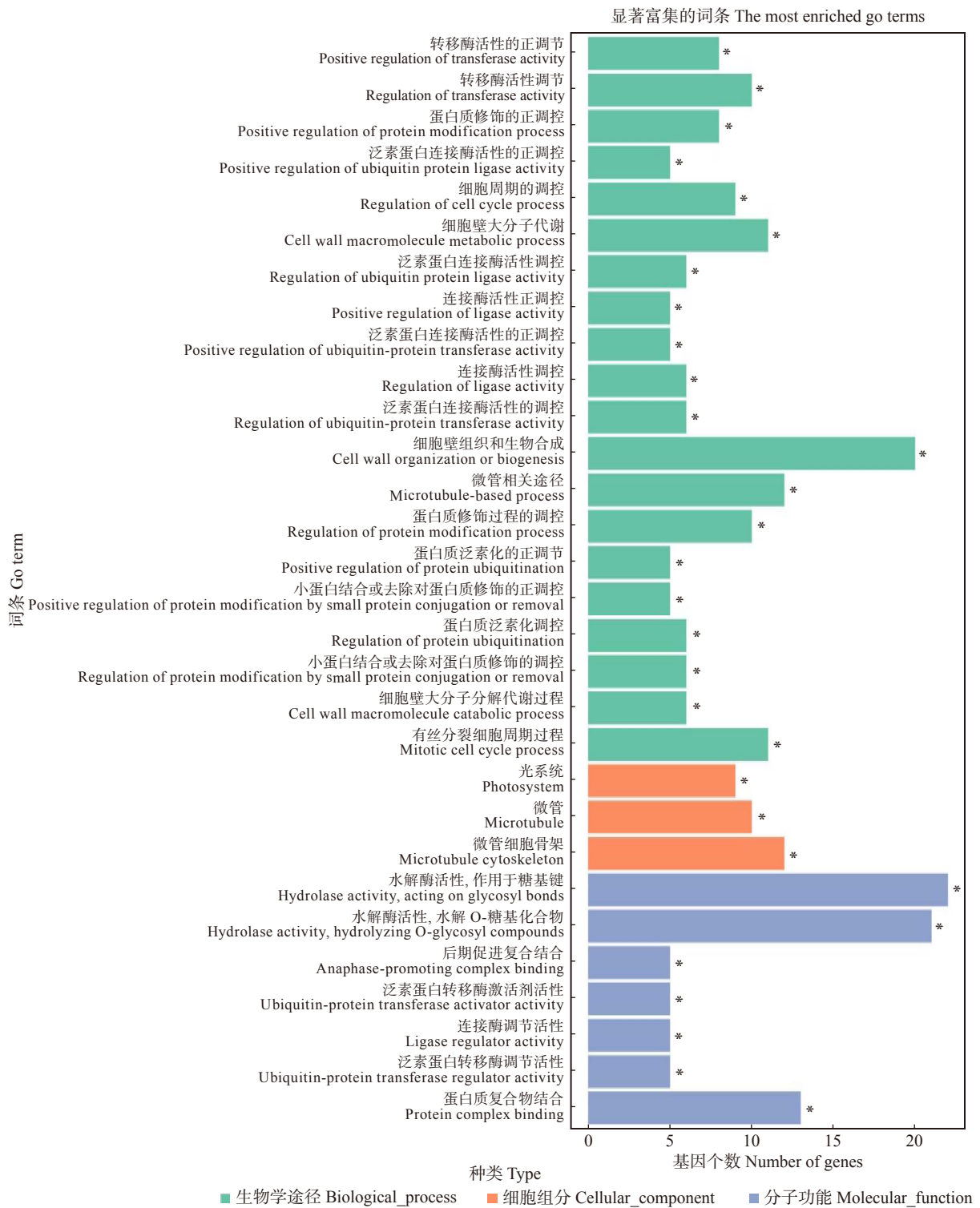


图 3 上调差异基因 GO 功能富集

Fig. 3 GO function enrichment of up-regulation DEGs

死亡(PCD), 而线粒体是 PCD 的关键控制点^[20], 因此我们在转录组数据中对线粒体相关功能进行了表达量的分析。我们的结果表明, 大量与磷酸酶有关的基因显著下调(POPTR_0001s06070, POPTR_0003s02480, POPTR_0012s14700, POPTR_0019s10030, POPTR_0008s05950, POPTR_0010s20720, POPTR_0003s02940, POPTR_0008s20130), 这表明线粒体的

功能受到外源 H₂O₂ 的影响而显著下降(表 2)。

总的来说, 氧化胁迫对植物生长发育产生影响, 是由于线粒体功能、细胞分裂、赤霉素含量以及细胞分裂素含量受到影响而产生的。

2.2 线粒体形态学观察

由于转录组数据中与细胞分裂、线粒体功能有关的基因显著下调, 这意味着线粒体的功能因此受

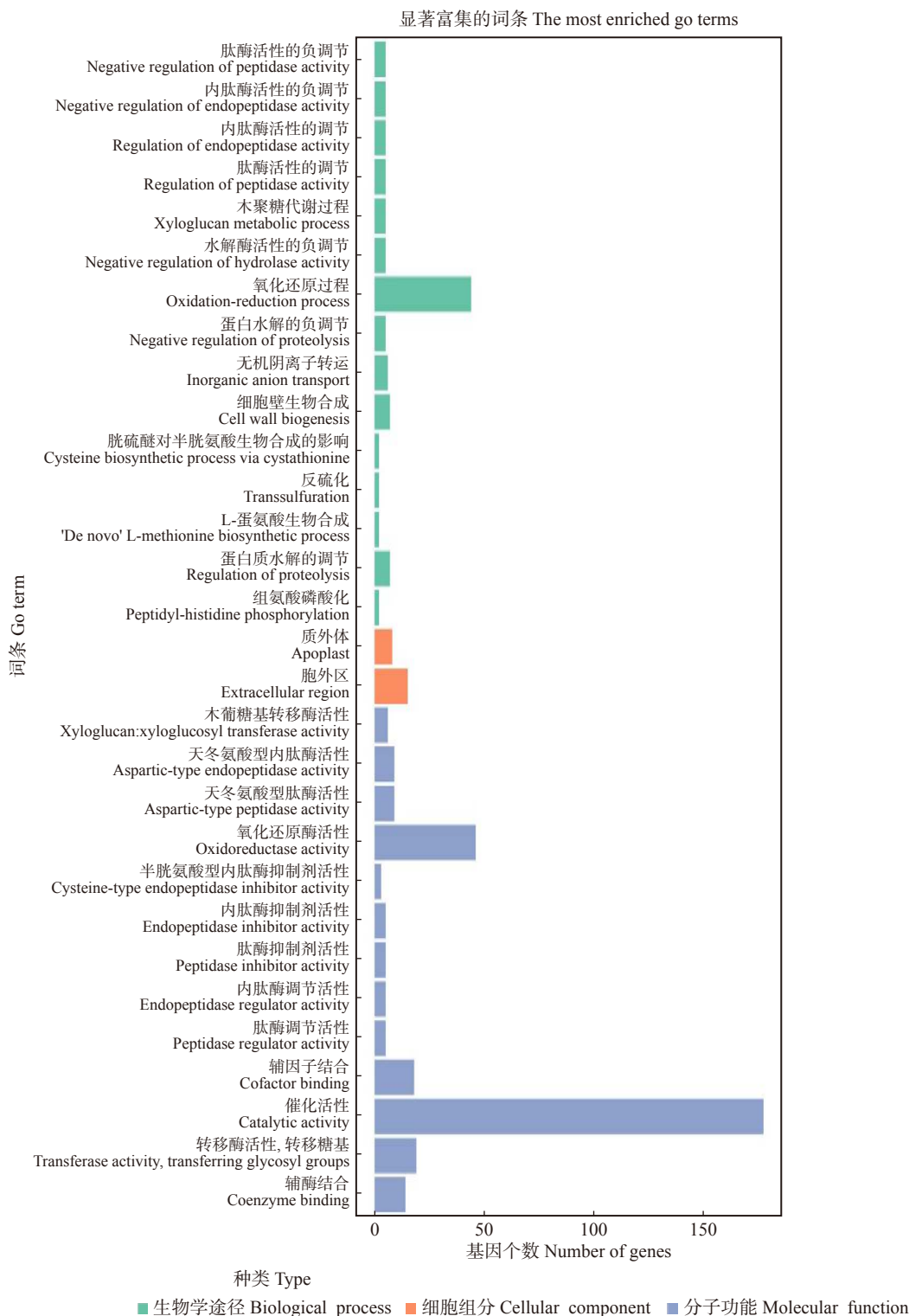


图 4 下调差异基因 GO 功能富集

Fig. 4 GO function enrichment of down-regulation DEGs

到损伤进而影响了细胞的 PCD 程度, 而线粒体形态学与其功能有密切联系^[21], 因此本研究通过激光共聚焦显微镜 (CLSM) 对线粒体的形态学进行了观察, 以期进一步验证我们的观点。

线粒体基于功能的好坏区分为 4 种形态: 点状 (Punctiform)、蠕虫状 (Vermiform)、巨大型 (Giant)、扩散型 (Diffuse)^[22]。而这 4 种线粒体形态可以通过

线粒体特异性荧光染料 MitoTracker Red CMXRos 在激光共聚焦显微镜下被观察到。点状线粒体呈现点状或棒状并均匀分布在细胞质中; 蠕虫状线粒体通常呈现明显的伸长, 同时形成聚集体; 巨大型线粒体相比于点状线粒体其体积明显增大, 聚集成簇; 扩散型线粒体的膜系统在此基础上进一步弥散, 有彻底分解的趋势^[21]。全部 4 种线粒体在 WT 和 WTH

表2 部分表达差异基因的功能分析

Tab. 2 Functional analysis of differentially expressed genes

基因ID Gene ID	Log ₂ X	P值 P value	描述 Description
POPTR_0007s01610	-6.747 351	0.000 857	UDP-glucosyltransferase
POPTR_0006s04680	-2.620 479	0.000 660	UDP-glucosyltransferase
POPTR_0001s31100	-2.468 582	0.000 053	UDP-glucosyltransferase
POPTR_0001s31140	-2.256 589	0.000 003	UDP-glucosyltransferase
POPTR_0016s01820	-2.123 790	0.000 004	UDP-glucosyltransferase
POPTR_0016s01610	-1.896 713	0.000 034	UDP-glucosyltransferase
POPTR_0015s05670	-1.837 034	0.000 211	UDP-glucosyltransferase
POPTR_0006s05450	-1.828 310	0.000 210	UDP-glucosyltransferase
POPTR_0016s01780	-1.736 171	0.000 083	UDP-glucosyltransferase
POPTR_0005s26040	-3.920 826	0.000 001	Gibberellin regulated protein
POPTR_0002s02410	-3.852 437	0.000 001	Gibberellin regulated protein
POPTR_0001s30500	-2.510 387	0.000 080	Gibberellin regulated protein
POPTR_0005s27030	-2.205 589	0.000 019 1	Cytokinin riboside 5'-monophosphate phosphoribohydrolase
POPTR_0001s06070	-4.445 984	0.000 001	Metallo-dependent phosphatase
POPTR_0003s02480	-2.184 144	0.000 001	Metallo-dependent phosphatase
POPTR_0012s14700	-2.024 093	0.000 003	Trehalose-phosphatase
POPTR_0019s10030	-1.738 044	0.000 131	Protein phosphatase 2C
POPTR_0008s05950	-1.639 843	0.000 127	Protein phosphatase 2C
POPTR_0010s20720	-1.555 082	0.000 512	Protein phosphatase 2C
POPTR_0003s02940	-1.540 729	0.000 242	Pyridoxal phosphate phosphatase
POPTR_0008s20130	-1.479 330	0.000 421	Pyridoxal phosphate phosphatase

中均有所观察和记录,结果表明,在WT中,点状、蠕虫状、巨大型和扩散型线粒体分别占85%、11%、2%、2%;而WTH中则是9%、74%、2%、15%(图5)。这表明正常情况下WT以点状线粒体为主,而外源H₂O₂处理后点状线粒体显著减少,取而代之的是蠕虫状和扩散型线粒体。这进一步说明了氧化胁迫对线粒体功能造成了损伤。除此之外,本研究还添加外源AsA稀释细胞内的H₂O₂水平,结果表明,WT经过AsA处理后(WTA)点状线粒体相比WT出现频率更高,这表明H₂O₂水平与线粒体结构和功能有密切联系(图5)。

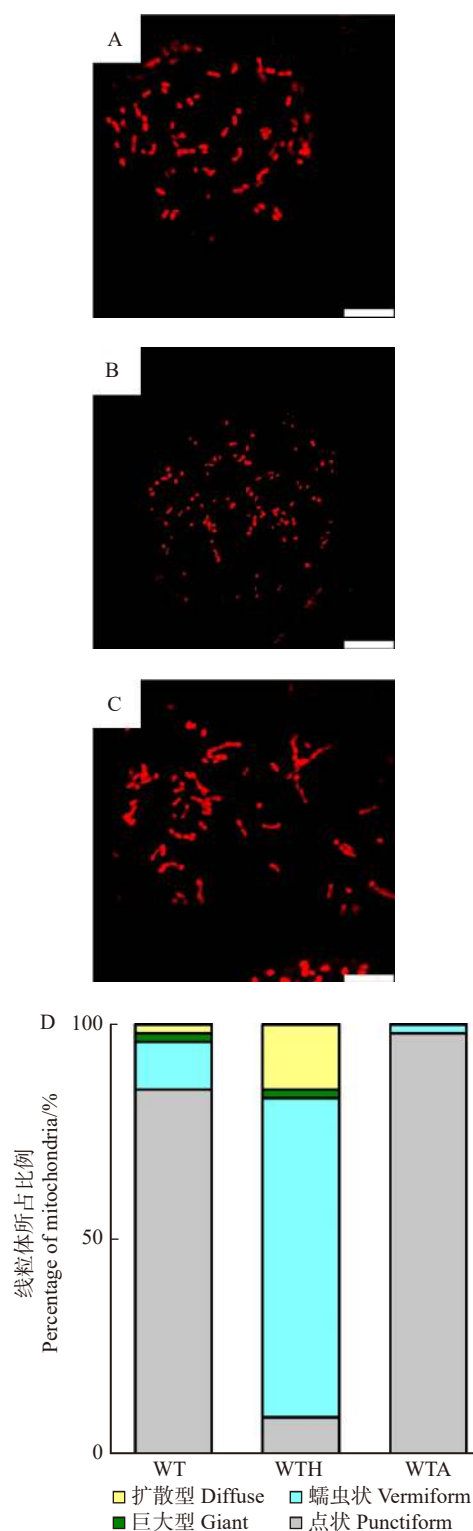
3 结论与讨论

氧化胁迫是自然界极其普遍的非生物胁迫,虽然造成氧化胁迫的方式有很多种,但本质是要产生活性氧并开始一系列氧化还原反应,最终对植物细胞造成氧化损伤的。高等植物应对氧化胁迫主要依赖其复杂的活性氧调控系统抵消伤害,然而在这过程中过量的活性氧依然会产生一定程度的氧化损伤并影响植物的生长发育。

本研究的结果表明,H₂O₂处理后的毛白杨悬浮细胞(WTH)相比于正常生长的毛白杨悬浮细胞(WT)在转录水平发生了显著差异,大部分差异基因

与线粒体功能有关。同时,我们还通过激光共聚焦显微镜观察了毛白杨细胞的线粒体在H₂O₂处理前后的形态学变化,进一步佐证了氧化胁迫条件下线粒体功能的缺失。线粒体是植物细胞内非常重要的细胞器,是能量代谢的中心。尽管高等植物存在叶绿体也可以提供能量,但是木本植物还有很多非光合作用组织并依赖线粒体提供ATP。另外,线粒体除了氧化磷酸化途径外还是细胞程序化死亡(PCD)的关键控制点,在细胞PCD开始前,线粒体率先接受PCD信号并释放细胞色素C等细胞凋亡因子。多个研究表明,氧化胁迫对于多种植物都会产生氧化伤害进而影响生长发育过程^[23-27]。这与我们的结果是一致的,本研究在转录水平揭示了氧化胁迫抑制磷酸酶活性并导致线粒体功能发生异常。因为呼吸链由多个呼吸复合物构成,在这之中,呼吸复合物I、II、III是质子泵并决定着线粒体膜内外的电位差^[28]。磷酸酶活性的异常会导致电子传递链功能缺失,进而影响线粒体的膜电位差,使得线粒体的膜通透性改变、功能逐渐丧失,进而影响了细胞的PCD和生长发育过程。

有丝分裂是真核细胞主要增殖的方式,也是维持个体正常生长发育、保证物种连续性和稳定性的关键。本研究中,外源H₂O₂处理导致有丝分裂相关



A、B、C 分别是野生型细胞在未处理条件下线粒体形态(WT)、野生型细胞在 AsA 处理条件(1 mmol/L, 3 h)下线粒体形态(WTA)、野生型细胞在 H₂O₂ 处理条件(10 mmol/L, 3 h)下线粒体形态(WTH); D 是基于 200 个不同细胞的形态学定量统计。A, mitochondrial morphology of wild type cells under untreated conditions (WT). B, mitochondrial morphology of wild type cells under AsA treatment (1 mmol/L, 3 h) (WTA). C, mitochondrial morphology of wild type cells under H₂O₂ treatment (10 mmol/L, 3 h) (WTH). D, quantitative statistics based on 200 cells.

图5 线粒体形态学

Fig. 5 Mitochondrial morphology

基因显著下调,这很可能诱发有丝分裂过程的异常进而导致生长迟缓、细胞老化等现象。

激素是植物生长发育过程中必不可少的控制者,例如生长素参与细胞壁的形成和核酸代谢,进而促进植物生长;以及细胞分裂素参与细胞有丝分裂,诱导芽的形成和生长。根据我们的结果,细胞分裂素的上游激活基因细胞分裂素核苷 5'-磷酸核糖水解酶(Cytokinin riboside 5'-monophosphate phosphoribohydrolase)显著下调,这表明在激素水平的细胞分裂调控同样受到外源 H₂O₂ 的抑制,进而影响了生长发育过程。根据最近的研究,赤霉素类的植物激素不但通过控制细胞伸长来调节植物生长发育,而且在非生物应激反应中起核心作用。本研究中,氧化胁迫导致赤霉素基因显著下调,这表明赤霉素对非生物胁迫的应激仍属于轻度激素调节范畴,其作用不足以抵消过量的氧化伤害,进一步证实了植物细胞的活性氧清除仍需要其复杂的抗氧化系统作为支撑。而激素调节仍旧以控制植物生长发育为主,面对非生物胁迫时的作用不够显著。

参 考 文 献

- [1] Del Río L A. ROS and RNS in plant physiology: an overview[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(10): 2827-2837.
- [2] Foyer C H, Noctor G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context[J]. *Plant, Cell and Environment*, 2005, 28(8): 1056-1071.
- [3] Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, et al. ROS signaling: the new wave?[J]. *Trends in Plant Science*, 2011, 16(6): 300-309.
- [4] Inzé A, Vanderauwera S, Suzuki N, et al. A subcellular localization compendium of hydrogen peroxide-induced proteins [J]. *Plant, Cell and Environment*, 2012, 35(2): 308-320.
- [5] Baxter A, Mittler R, Suzuki N. ROS as key players in plant stress signaling[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(5): 1229-1240.
- [6] Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, et al. Reactive oxygen gene network of plants[J]. *Trends in Plant Science*, 2004, 9(10): 490-498.
- [7] Dat J, Vandenabeele S, Vranová E, et al. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses[J]. *Cell and Molecular Life Science*, 2000, 57(5): 779-795.
- [8] Moller I M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species[J]. *Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology*, 2001, 52: 561-591.
- [9] Caverzan A, Passaia G, Rosa S B, et al. Plant responses to stresses: role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection[J]. *Genetics and Molecular Biology*, 2012, 35(4): 1011-1019.
- [10] Considine M J, Foyer C H. Redox regulation of plant development[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2014, 21: 1305-

- 1326.
- [11] Davletova S, Rizhsky L, Liang H, et al. Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2005, 17(1): 268–281.
- [12] Van Breusegem F, Dat J F. Reactive oxygen species in plant cell death[J]. *Plant Physiology*, 2006, 141: 384–390.
- [13] Foreman J, Demidchik V, Bothwell J H, et al. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth[J]. *Nature*, 2003, 422: 442–446.
- [14] Gapper C, Dolan L. Control of plant development by reactive oxygen species[J]. *Plant Physiology*, 2006, 141(2): 341–345.
- [15] Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2009, 10(1): 57–63.
- [16] Lord C E, Wertman J N, Lane S, et al. Do mitochondria play a role in remodelling lace plant leaves during programmed cell death?[J]. *BMC Plant Biology*, 2011, 11(1): 102.
- [17] Woo H H, Orbach M J, Hirsch A M, et al. Meristem-localized inducible expression of a UDP-glycosyltransferase gene is essential for growth and development in pea and alfalfa[J]. *The Plant Cell*, 1999, 11(12): 2303–2315.
- [18] Colebrook E H, Thomas S G, Phillips A L, et al. The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2014, 217: 67–75.
- [19] Mortier V, Wasson A, Jaworek P, et al. Role of LONELY GUY genes in indeterminate nodulation on *Medicago truncatula*[J]. *New Phytologist*, 2014, 202(2): 582–593.
- [20] Hengartner M O. The biochemistry of apoptosis[J]. *Nature*, 2000, 407: 770–776.
- [21] Wang Y, Li Y, Xue H, et al. Reactive oxygen species-provoked mitochondria-dependent cell death during ageing of elm (*Ulmus pumila* L.) seeds[J]. *Plant Journal*, 2015, 81(3): 438–452.
- [22] Deheshi S, Dabiri B, Fan S, et al. Changes in mitochondrial morphology induced by calcium or rotenone in primary astrocytes occur predominantly through ros-mediated remodeling[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2015, 133(5): 684–699.
- [23] Chapman J M, Muhlemann J K, Gayomba S R, et al. RBOH-dependent ROS synthesis and ROS scavenging by plant specialized metabolites to modulate plant development and stress responses[J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2019, 32(3): 370–397.
- [24] Ali I, Jan M, Wakeel A, et al. Biochemical responses and ultrastructural changes in ethylene insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana* subjected to bisphenol A exposure[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2017, 144: 62–71.
- [25] Luria G, Rutley N, Lazar I, et al. Direct analysis of pollen fitness by flow cytometry: implications for pollen response to stress[J]. *Plant Journal*, 2019, 98: 942–952.
- [26] Stavridou E, Michailidis M, Gedeon S, et al. Tolerance of transplastomic tobacco plants overexpressing a theta class glutathione transferase to abiotic and oxidative stresses[J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 9 (2019–01–11) [2019–02–01]. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2018.01861/full>.
- [27] Araniti F, Costas-Gil A, Cabeiras-Freijanes L, et al. Rosmarinic acid induces programmed cell death in *Arabidopsis* seedlings through reactive oxygen species and mitochondrial dysfunction [J/OL]. *PLoS One*, 2018,13 (2018–12–26) [2018–12–10]. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0208802>.
- [28] Shadel G S, Horvath T L. Mitochondrial ROS signaling in organismal homeostasis[J]. *Cell*, 2015, 163: 560–569.

(责任编辑 赵 勃
责任编辑委 刘桂丰)