

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201902019

王赛赛, 李锦, 祝建波. 三种植物线粒体基因低温差异表达比较分析 [J]. 广西植物, 2020, 40(8): 1140–1150.

WANG SS, LI J, ZHU JB. Comparative analysis of differential expression of mitochondrial genes in three plants at low temperature [J].

Guihaia, 2020, 40(8): 1140–1150.

三种植物线粒体基因低温差异表达比较分析

王赛赛, 李 锦, 祝建波*

(石河子大学, 新疆 石河子 832000)

摘 要: 线粒体作为植物细胞的能量代谢中心, 在植物响应逆境胁迫中有重要的作用。该研究基于雪莲 (*Saussurea involucrata*)、番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 和拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 三种不同低温耐受性植物的低温转录组。通过 blast 比对和数据库检索筛选相关物种的线粒体基因, 使用 PlantCARE 在线网站分析启动子, 使用 mega7 软件对系统发育树构建分析。结果表明: 通过差异表达基因筛选, 分别在雪莲、拟南芥、番茄中筛选出 2、24、15 个显著差异表达基因, 主要包括线粒体核糖体亚基和电子传递链各复合体亚基, 其中部分基因的低温差异表达情况如 *NAD1* 和 *NAD5*, 可能与植物的低温适应性有关; 通过表达模式的聚类分析, 雪莲与拟南芥在基因的表达模式上相对于番茄更为相近, 且不同类别的基因表达模式在不同物种间差异较大; 雪莲与其他菊科植物的呼吸链相关基因的蛋白序列具有很大差异, 与万年藓 (*Climacium dendroides*)、牛舌藓 (*Anomodon minor*) 等高山植物的进化距离较近。在整体上拟南芥、番茄和雪莲三种植物线粒体基因在低温响应上具有很大差异, 表明线粒体基因及其表达调控与植物的低温耐受性之间存在一定的关联性。

关键词: 低温耐受性, 植物, 线粒体基因, 表达模式

中图分类号: Q943 文献标识码: A

文章编号: 1000-3142(2020)08-1140-11

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Comparative analysis of differential expression of mitochondrial genes in three plants at low temperature

WANG Saisai, LI Jin, ZHU Jianbo*

(Shihezi University, Shihezi 832000, Xinjiang, China)

Abstract: As the energy metabolism center of plant cells, mitochondria play an important role in plant response to stress. To analyze difference in expression mode of mitochondria gene from the *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicon esculentum* and *Saussurea involucrata*, the differential expression genes (DEGs) was filtered in the three low temperature transcriptomes and comparison analysis was performed on the DEGs from three plants. All the mitochondria genes were fil-

收稿日期: 2019-04-27

基金项目: 国家自然科学基金(31360053); 国家转基因重大专项项目(2016ZX080005004-009) [Support by the National Natural Science Foundation of China (31360053); the National Science and Technology Major Project (2016ZX080005004-009)]。

作者简介: 王赛赛(1992-), 男, 河南商丘人, 硕士研究生, 研究方向为植物基因工程, (E-mail) 572879542@qq.com。

*通信作者: 祝建波, 博士, 研究员, 研究方向为植物基因工程, (E-mail) 274831213@qq.com。

tered through blast against the mitochondria genomes that was downloaded from the NCBI database. Promoter analysis was performed through PlantCARE online website and the mega software was used to phylogenetic tree construction. The results were as follows: In total, there were 2, 24 and 15 DEGs were found in *Saussurea involucrata*, *Arabidopsis thaliana* and *Lycopersicon esculentum*, and these genes were mainly focused on mitochondrial ribosomal and electron transfer chain complex subunits; A few genes were seemed to relate to the cold adaptation that the expression level was positive to the ability of cold tolerance of the three plants, especially for the *NAD1* and *NAD5* gene; Through cluster analysis of expression patterns, *Saussurea involucrata* and *Arabidopsis thaliana* were more similar in genes expression mode than *Lycopersicon esculentum*, and the expression mode of different genes had a quite difference between different plants; Further analysis on the conserved motif sequence of these genes, the sequences of *Saussurea involucrata* showed more close relationship with the alpine plants such as *Climacium dendroides* and *Anomodon minor* than the other compositae plants. In general, the mitochondrial genes had a quite difference on the sequence of conserved motif and expression mode under the cold condition between the *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicon esculentum* and *Saussurea involucrata*. It was concluded that the mitochondria genes and its expressional regulation could be implicated in the cold adaptation of plants.

Key words: low temperature tolerance, plants, mitochondrial gene, expression mode

植物线粒体通过氧化磷酸化提供生命活动所需的各种能量,在光呼吸代谢、C4 植物的光合作用和景天酸代谢(Picault et al., 2004)等途径中发挥着重要作用。线粒体的主要功能是进行三羧酸循环,通过电子传递链及氧化磷酸化合成 ATP,这里是物质彻底氧化分解的场所,为细胞内的各种生命活动提供能量。此外,线粒体还与细胞内众多代谢过程相关,如参与细胞内信号转导,调节细胞内氧化还原电位,调控基因表达、细胞凋亡等(Millar et al., 2011)。线粒体在植物响应逆境胁迫中有重要作用,在逆境胁迫下它们的形态结构和生理功能会发生明显的变化,在一定程度上可作为表征植物对逆境条件耐受性的依据(周宇飞等, 2013)。逆境胁迫会引起呼吸代谢的紊乱(Vanhoudt et al., 2011; Tula & Birch-Machin, 2013),造成活性氧的积累,过剩的 ROS 会诱导或加剧膜脂过氧化程度,导致脂质过氧化物水平迅速提高(Sairam & Srivastava, 2002),主要体现在线粒体膜和膜蛋白的损伤、线粒体蛋白质损伤、线粒体 DNA 损伤等(Rachel et al., 2005; Foyer & Noctor, 2010; 马晓蕾等, 2013)。通过对冷胁迫下植物线粒体蛋白组的研究发现,一些线粒体蛋白如线粒体电子传递链(mitochondrial electron transport chain, mETC)复合物 I-V、交替氧化酶(alternative

oxidase, AOX)、解偶联蛋白(uncoupling protein, UCP)等的表达水平受到冷或热胁迫的影响,预示着这些蛋白可能参与了植物对温度胁迫的响应过程(Yin et al., 2009; Qin et al., 2009; Tan et al., 2012)。但是,植物线粒体中存在有多条电子传递途径,低温胁迫对不同植物线粒体呼吸链的具体伤害位点也会不同(刘美君等, 2014)。如在对半耐寒植物豌豆(*Pisum sativum*)的蛋白组研究中,低温对其电子传递链复合物的影响较小,主要影响的是线粒体中 AOX 和 UCP 的丰度(Taylor et al., 2009);在对耐寒植物高山离子芥(*Chorispora bungeana*)研究中,低温对其线粒体的影响又出现不同,其线粒体中 AOX 和 UCP 含量变化较小,但呼吸链复合体的变化较高(常建锋, 2007)。这表明不同植物线粒体在应对低温胁迫时的响应机制有所不同,其响应机制可能与其低温耐受性之间存在某种关联。

本研究主要根据雪莲、拟南芥和番茄三种不同低温耐受性植物的低温转录组,筛选并比较其线粒体基因表达差异,来探索植物线粒体低温表达模式与低温耐受性之间的关系。通过对低温条件下,三种不同低温耐受性植物线粒体基因表达差异比较和不同低温耐受性植物间线粒体基因进化关系的对比,来分析不同低温耐受性植物间低

温响应机制和代谢水平的差异,以及通过响应冷胁迫的关键节点基因的序列差异,来探索不同低温耐受性植物间线粒体的低温表达模式的差别,为进一步研究植物线粒体冷胁迫响应机制和相关基因功能奠定理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 雪莲、番茄、拟南芥线粒体低温差异表达基因的抽取

雪莲转录本源数据(李锦等, 2017)的下载,以向日葵、菊花等菊科线粒体基因参照,与转录本进行比对,参照雪莲转录组注释文件,筛选出雪莲线粒体基因的低温差异表达量数据,编写 python 脚本并筛选其基因序列。番茄低温转录本数据(Barrero-Gil et al., 2016)的下载,以 NCBI 数据库中的番茄线粒体基因组为参考,从源数据中筛选出其线粒体基因的低温表达量数据。拟南芥低温转录组源数据(Vogel et al., 2005)下载,以拟南芥线粒体基因组(Sloan et al., 2018)为参考,筛选出拟南芥线粒体的低温差异表达量数据。

1.2 三种植物线粒体基因低温差异表达对比

根据三种植物的低温差异表达的线粒体基因表达量数据,使用 R 语言中的 pheatmap 包进行聚类分析,比较其低温线粒体基因表达差异,并分析差异表达基因分属的不同代谢通路,分析其代谢通路差异与低温胁迫之间的关系,主要从代谢通路的关键节点基因入手。

1.3 三种植物线粒体低温差异表达基因的验证

对以上筛选的部分线粒体低温差异表达基因进行实时荧光定量实验验证,检测其转录组数据的准确性。根据三种植物低温转录本的测定条件,分别对其进行低温处理,雪莲组培苗低温处理组为 4℃冷驯化 7 d, -2℃再处理 48 h,参照组为 4℃冷驯化 7 d,所用雪莲为生长 2 个月的组培苗;拟南芥低温处理组条件为 4℃处理 24 h,参照组条件为 18℃培养基中正常生长 2 周的拟南芥;番茄低温处理组条件为 10℃处理 48 h,参照组条件为 25℃正常生长 3 周的番茄栽培苗。分别提取其 RNA 并反转录为 cDNA,根据筛选出的三种植

物主要的低温差异表达基因序列,设计实时荧光定量检测引物(各基因的引物序列与内参基因引物表 1),进行 RT-qPCR 实验。分析三种植物的线粒体基因低温差异表达情况,是否与转录组中筛选的低温差异表达趋势一致。

1.4 三种植物的线粒体呼吸链基因的启动子分析

从筛选出的低温差异表达基因中,找到与呼吸链组成密切相关的基因,并获得其启动子序列(雪莲基因组由祝建波研究员提供,未发表),使用 PlantCARE (Lescot et al., 2002)在线网站分析其顺式作用原件,统计并分析呼吸链相关基因启动子中的顺式作用元件功能与数量。对含有低温响应元件的线粒体基因表达差异进行分析。

1.5 多种植物线粒体低温差异表达基因的进化关系分析

下载了 17 种拥有不同低温耐受性植物线粒体基因组序列,抗寒植物包括尖叶牛舌藓(*Anomodon attenuates*)、万年藓(*Climacium americanum*)、欧洲山杨(*Populus tremula*)、人参(*Panax ginseng*),耐寒植物有柴胡(*Bupleurum falcatum*)、蚕豆(*Vicia faba*)、沙冬青(*Ammopiptanthus mongolicus*),较耐寒植物有甘蓝(*Brassica oleracea*)、菊花(*Chrysanthemum boreale*)、向日葵(*Helianthus annuus*),以及不耐寒的天仙子(*Hyoscyamus niger*)、烟草(*Nicotiana attenuate*)、丹参(*Salvia miltiorrhiza*)、巨桉(*Eucalyptus grandis*)、辣椒(*Capsicum annuum*)、葡萄藻(*Botryococcus braunii*)、共球藻(*Trebouxioophyceae* sp.)。通过对不同适应温度的植物线粒体基因蛋白保守序列的比对与进化关系分析,来探索和讨论不同植物间在低温胁迫下的线粒体基因的作用与响应机制。首先使用 DNAMAN 对线粒体基因中响应低温的蛋白序列进行多序列比对,并使用 mega7 分析它们之间的进化关系与距离。主要探究其低温耐受性与线粒体差异表达基因序列相似性的关系。

2 结果与分析

2.1 三种植物低温差异表达线粒体基因筛选

从三种植物的转录本中共筛选出 32 个线粒体差异表达基因,雪莲 2 个,番茄 15 个,拟南芥 24

表 1 实时荧光定量实验所用的引物序列

Table 1 Primer sequences used in real-time fluorescence quantitative experiment

基因名称 Gene name	正向引物 (5'-3') Forward primer	反向引物 (5'-3') Reverse primer
<i>SikNAD1</i>	TGTACATAGCAGTTCCAGCTG	AAACGATCCCACTACATCAGG
<i>AtNAD1</i>	TCGAGTGAGATTGTCATGGC	GCTCGATTAGTTTCTGCTAGACG
<i>LeNAD1</i>	GGGCTCGATCTGGTTTAGTATC	CCGAGCTAATGATAGAGGCAAG
<i>SikNAD3</i>	CTGACTGCTATCTACGATGCG	CACTTTGTTTTCTCGCTCCTTG
<i>AtNAD3</i>	CTTTGATCCTACTCGGTGTTCC	AACGACTTCTGGCATCACC
<i>LeNAD3</i>	CTATTTAGTGATCAGCCCGCTAG	GGAAGGATCGAAACCACATTC
<i>SikNAD5</i>	TGGTGCTGTTGGGAAATCTG	ATCAAAGCGGATACTGGAGTG
<i>AtNAD5</i>	GTTGCGTATAATGTAAATCCCGTAG	GCAGGAACGATCTGACTAGAAAAG
<i>LeNAD5</i>	ATCGCATACTTGGTCACCTG	ACAATCAAAGCCGTAGGTGG
<i>SikRPS12</i>	TCAATGTCCCAGAAAGCAAG	CAAATTATGACCTTCGCCCG
<i>AtRPS12</i>	GATAAATGTCCCAGAAAACAGG	AATTATGACCTTCGCCCGG
<i>LeRPS12</i>	TCAATGTCCCAGAAAGCAAG	TTATGACCTTCGCCCTGGAATG
<i>SikRPL2</i>	TTTCTTGGCAGAGTCTTAGGC	TCTCCATTTCTTCACCATCG
<i>AtRPL2</i>	AACCTACCACGAACACCATC	ACTACATAAGCGGCCATCAG
<i>LeRPL2</i>	AAATCAACCACGACTACCCTC	CTACATAAGTCGCCATCCGTC
<i>SikRPL5</i>	CCAACGTTATGGAAAGTTCTGTG	TCGAAGCCCTTTTGTTGTTCTG
<i>AtRPL5</i>	ATTGGCTATGGAGATTCCGC	AGAGTGCTTTTGTCGTGCTAG
<i>LeRPL5</i>	AGTACCAAAGACAGCACCTTC	CTTTCTGTGTGAAGCCCTTTG
<i>SikATP6</i>	CCTCCACAGTTTACATCCTGG	GTGTGAGACTCTCAATATAGCCCG
<i>AtATP6</i>	CGAGAAGTGTGAGGCATTAAC	TTCTTGAAAGGCTTCCCCG
<i>LeATP6</i>	GGCCGGTCATAGTTACGTAAAG	GCTACACCTAATTCAGACCG
<i>SikCCB206</i>	CATTCTATTAGGGAGCCTGGTC	GAGGTACGAGAAAGGGTTGG
<i>AtCCB206</i>	CGTGTTTTCTGTGTTTTCCC	TGTGATTCCAAGAGCCGAAC
<i>LeCCB206</i>	TCGGCTCTTGAATCACATC	GGCAATGAAGTAGGTGAAGTGG
<i>SikCOB</i>	AGTAGGTTGGGTAGCTTTTGC	ATTCCGGTACAATATGAGGCG
<i>AtCOB</i>	TATTTCTACCGATCCATGCC	GTCGAAAACCTGAACTACGCAC
<i>LeCOB</i>	TATTTCTACCGATCCATGCC	GGGCGAAAACCTGAACTACG
<i>SikCOX1</i>	TTCTCATTTCTGCCTGGATTCTG	GAGCCCAAACAAGAAATCCAAG
<i>AtCOX1</i>	TCTTAGGGCTTTCAGGTATGC	CTGCTTAAAGTGATTGTTACGACC
<i>LeCOX1</i>	TGTATATTCCCATTTCTGCCTGG	GAGCCCAAACAAGAAATCCAAG
<i>SikCOX2</i>	CTTCTCATTTCTTATTTTGGTTTTCG	CATGAACAATCCTTTGCGGG
<i>AtCOX2</i>	ACCAGCCAAAACTCATCTACG	CAGCATCACATTTGACACCTG
<i>LeCOX2</i>	CTCATAGTTGGGCTGTACCTTC	GTTCCACAAATCTCACTGCAC
<i>SikGAPDH</i>	TAGCAAGGATGCTCCCATGTTCTGT	AAAGGAGCAAGGCAGTTGGTTGTG
<i>AtACTIN11</i>	CCACATGCTATTCTGCGTTTGGACC	CATCCCTTACGATTTACGCTCTGC
<i>LeACTIN</i>	TGTCCCTATTTACGAGGGTTATGC	AGTFAAATCACGACCAGCAAGAT

个。从表 2 可以看出,线粒体中低温差异表达基因主要为组成各呼吸链复合体的亚基和核糖体蛋白大小亚基基因,包括 *NAD*、*COB*、*COX*、*CCB*、*ATP6*、*RPS* 和 *RPL* 等。拟南芥低温差异表达基因有 24 个,主要包括呼吸链复合体 I 亚基基因 8 个,复合体 III 亚基基因 5 个,复合物 IV 亚基基因 2 个,核糖体亚基基因 8 个,1 个线粒体 mRNA 成熟酶 R 基因;番茄低温差异表达基因有 15 个,主要包括

表 2 三种植物低温条件下线粒体基因相对表达量 $\log_2$ FC

Table 2 Relative expression levels of mitochondrial genes in three plants at low temperature

基因名称 Gene name	相对表达量 $\log_2$ FC Relative expression $\log_2$ FC		
	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i>	雪莲 <i>Saussurea involucrata</i>
NADII 脱氢酶亚基 1(<i>NAD1</i> , NADII dehydrogenase subunit 1)	1.45	-1.79	0
NADII 脱氢酶亚基 9(<i>NAD9</i> , NADII dehydrogenase subunit 9)	0.93	0	0
NADII 脱氢酶亚基 6(<i>NAD6</i> , NADII dehydrogenase subunit 6)	-0.26	0	0
NADII 脱氢酶亚基 7(<i>NAD7</i> , NADII dehydrogenase subunit 7)	1.19	0	0
NADII 脱氢酶亚基 4(<i>NAD4</i> , NADII dehydrogenase subunit 4)	0.53	0	0
NADII 脱氢酶亚基 4L(<i>NAD4L</i> , NADII dehydrogenase subunit 4L)	-0.13	0	0
NADII 脱氢酶亚基 3(<i>NAD3</i> , NADII dehydrogenase subunit 3)	1.19	0	0
NADII 脱氢酶亚基 5(<i>NAD5</i> , NADII dehydrogenase subunit 5)	1.32	-1.3	0
核糖体蛋白小亚基 12(<i>RPS12</i> , 40S ribosomal protein S12)	1.19	1.35	0
核糖体蛋白小亚基 4(<i>RPS4</i> , 40S ribosomal protein S4)	1.45	1.56	0
核糖体蛋白小亚基 10(<i>RPS10</i> , Ribosomal protein S10)	0.93 (chr3)	1.66	0.00 (cpdna)
核糖体蛋白大亚基 2(<i>RPL2</i> , 60S Ribosomal protein L2)	0.79	1.36	0
核糖体蛋白大亚基 5(<i>RPL5</i> , 60S Ribosomal protein L5)	-1.32	1.28	0
核糖体蛋白小亚基 1(<i>RPS1</i> , Ribosomal protein S1)	0.66 (chr5)	1.27	0
核糖体蛋白大亚基 16(<i>RPL16</i> , Ribosomal protein L16)	1.19	1.2	0
核糖体蛋白小亚基 3(<i>RPS3</i> , Ribosomal protein S3)	-0.53	1.52	0
核糖体蛋白小亚基 7(<i>RPS7</i> , Ribosomal protein S7)	1.32	1.69 (cpdna)	0
核糖体蛋白大亚基 7(<i>RPL7</i> , Ribosomal protein L7)	0	1.44	0
类核糖体蛋白小亚基 12(Putative similar to ribosomal protein S12)	-1.59	0	0
类核糖体蛋白小亚基 13(<i>RPS13</i> , Ribosomal protein S13)	0.66 (chr1)	1.81	0
类核糖体蛋白小亚基 19(<i>RPS19</i> , Ribosomal protein S19)	1.19 (chr5)	1.26	0.00 (cpdna)
核糖体蛋白大亚基 10(<i>RPL10</i> , Ribosomal protein L10)	0.93 (chr1/5)	1.45	0
线粒体 mRNA 成熟酶 R(<i>MATR</i> , Maturase R)	1.19	0	0
ATP 合成酶 6(<i>ATP6</i> , ATP synthase 6)	0	0	-4.91
细胞色素 C 合成前体(CCB, Cytochrome C biogenesis protein precursor)	-0.79	0	0
细胞色素 C 合成前体(<i>CCB206</i> , Cytochrome C biogenesis orf206)	0.4	0	-4.26
细胞色素 C 合成前体 C 端(<i>CCB452</i> , Cytochrome C biogenesis orf452)	0.4	0	0
细胞色素 C 合成前体 N 端 1(<i>CCB382</i> , Cytochrome C biogenesis orf382)	0.26	0	0
细胞色素 C 合成前体 N 端 2(<i>CCB203</i> , Cytochrome C biogenesis orf203 protein)	0.79	0	0
细胞色素 b(<i>COB</i> , Apocytochrome b)	0	-1.08	0
细胞色素 c 氧化酶亚基 2(<i>COX2</i> , Cytochrome c oxidase subunit 2)	-0.13	0	0
细胞色素 c 氧化酶亚基 1(<i>COX1</i> , Cytochrome c oxidase subunit 1)	1.72	0	0

注: FC 表示低温条件下的相对表达量,即低温表达量/室温表达量;chr 表示该基因由染色体编码;cpdna 表示该基因由叶绿体基因组编码。

Note: FC indicates the relative expression level under low temperature conditions, chr indicates that the gene is encoded by the nuclear chromosome, and cpdna indicates that the gene is encoded by the chloroplast genome.

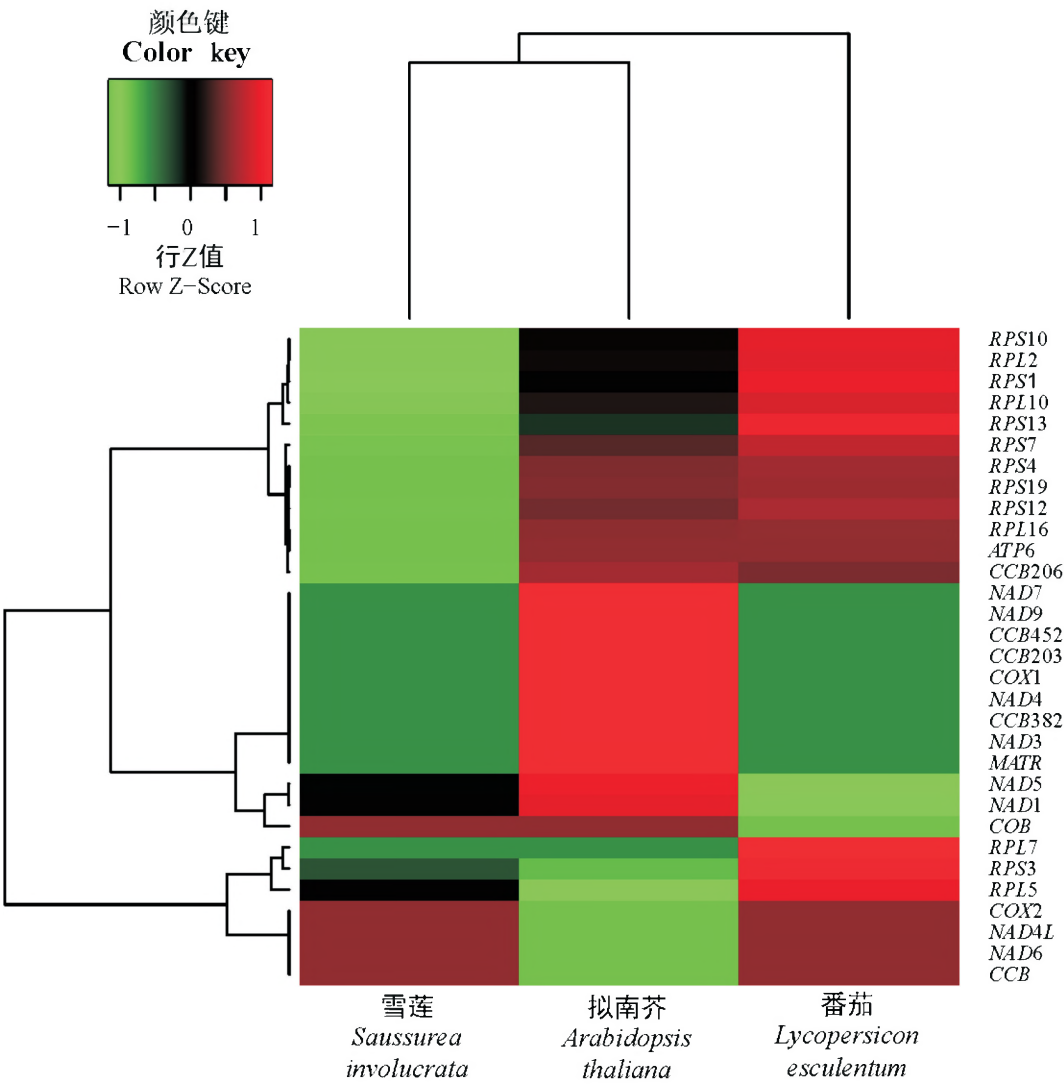


图 1 三种植物线粒体基因低温差异表达热图

Fig. 1 Low temperature differential expression heat map of three plant mitochondrial genes

呼吸链复合体 I 亚基基因 2 个,复合体 III 亚基基因 1 个,核糖体亚基基因 13 个;雪莲低温差异表达基因 2 个,均在呼吸链复合体上,其中复合体 III 亚基 1 个,复合体 IV 亚基基因 1 个。其中,低温差异表达上调基因中拟南芥主要为电子传递链复合体亚基基因,番茄为核糖体亚基基因,雪莲无上调表达基因。其中,雪莲线粒体下调基因 *CCB206* 和 *COB* 下调幅度较大,在拟南芥和番茄中均上调的线粒体基因,上调幅度均是番茄大于拟南芥。

2.2 三种植物线粒体低温差异基因相对表达量分析

通过三种植物低温差异表达热图,雪莲与拟

南芥相对于番茄在基因的表达模式上更为相近。在基因的表达聚类上,所有差异表达基因可分为 6 大类,从上到下分别为 6 类(图 1)。其中第一类和第二类主要是线粒体核糖体亚基基因,低温差异表达模式大致相似,按雪莲、拟南芥到番茄依次递增。第一类中雪莲不变,拟南芥上调较小,番茄上调程度最大;第二类中除核糖体亚基外,还有两个呼吸链复合体亚基基因 *ATP6* 和 *CCB206*,其低温差异表达与第一类相似,但拟南芥与番茄的低温差异表达程度差异不大,雪莲不变或显著下调,拟南芥和番茄均上调,且上调幅度一致。第五类也

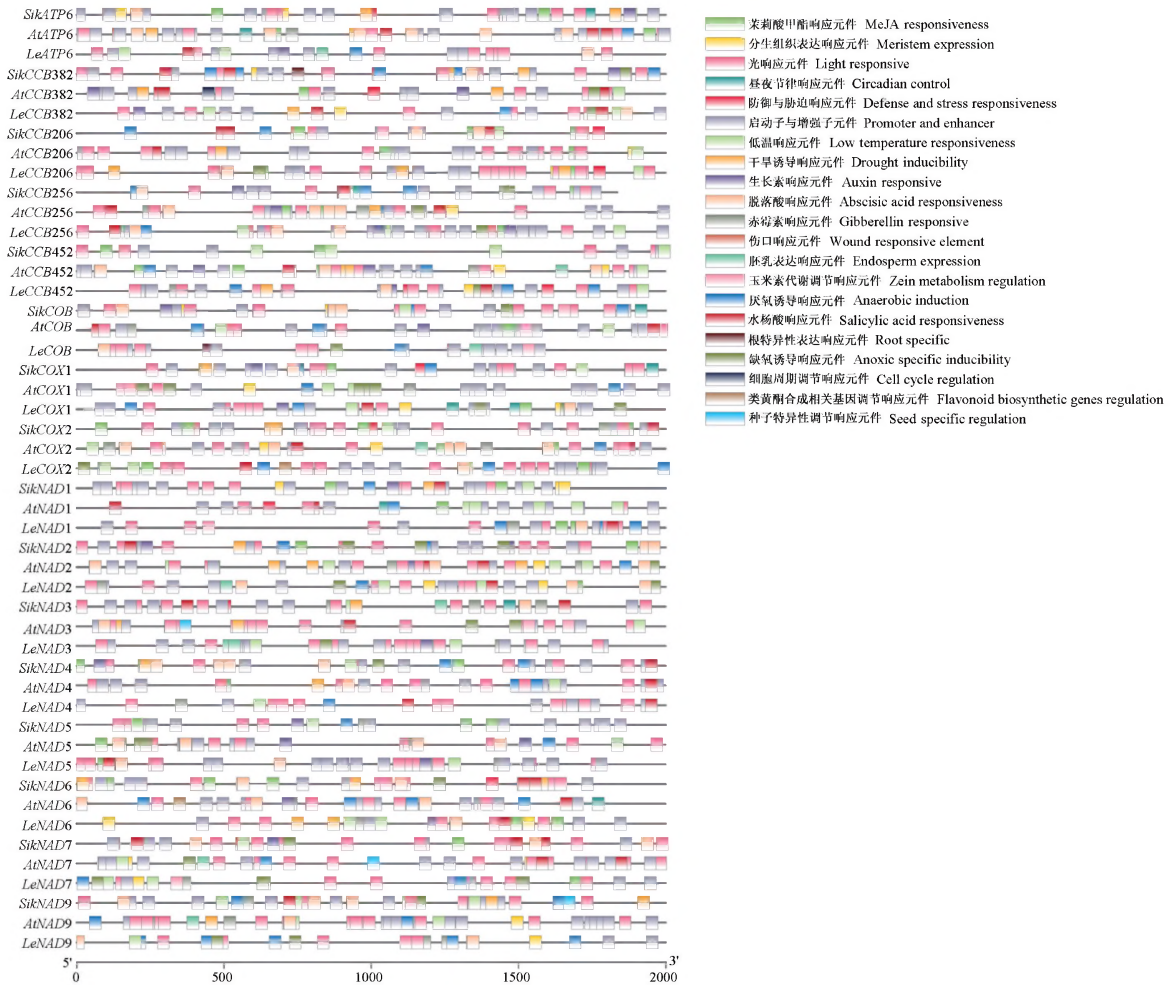


图 2 三种植物呼吸链相关线粒体基因启动子顺式作用元件分析
Fig. 2 Three plant mitochondrial respiratory chain-related gene's promoter analysis

是由核糖体亚基基因组成,表达模式与第一类和第二类有一定的相似性,其低温差异表达模式番茄同样是显著上调表达,雪莲与拟南芥不变或下调幅度较小。第三类、第四类和第六类主要为呼吸链复合体亚基基因。第三类低温差异表达为雪莲和番茄差异较小或不变,拟南芥上调程度最大;第四类低温差异表达按番茄、雪莲、拟南芥依次递增,番茄差异表达下调程度大,雪莲不变,拟南芥差异表达上调或不变;第六类低温差异表达为雪莲和番茄不变,拟南芥下调幅度较小。其中第一类、第二类和第四类的部分核糖体亚基基因的差异表达情况与其低温耐受性呈负相关。三种植物线粒体在低温表达模式均有差异,整体上雪莲与

拟南芥相较于番茄的低温表达模式更为相近,表明其耐受性与线粒体低温表达模式可能存在某种关联性。

2.3 三种植物的线粒体基因低温差异表达情况的验证

选取 *NAD1*、*NAD3*、*NAD5*、*RPS12*、*RPL2*、*RPL5*、*ATP6*、*COB*、*CCB206*、*COX1* 和 *COX2* 等 11 个线粒体基因进行低温表达差异检测,荧光定量 PCR 结果如表 3 所示,表中数据为根据各基因低温相对表达量(即 $2^{-\Delta\Delta CT}$)的差异程度分为不同的等级。雪莲线粒体基因低温处理后的差异表达基因数比低温转录组中的较多,但大部分基因表达量与转录组数据一致。在转录组数据中没有筛选

表 3 三种植物线粒体基因的低温实时
荧光定量 PCR 结果统计

Table 3 Results statistics of real-time fluorescence
quantitative PCR in three plants mitochondrial
genes at low temperature

基因名称 Gene name	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i>	雪莲 <i>Saussurea involucrata</i>
<i>NAD1</i>	+++	--	-
<i>NAD3</i>	+++	-	+
<i>NAD5</i>	+++	---	-
<i>RPS12</i>	++	++	-
<i>RPL2</i>	++	+++	-
<i>RPL5</i>	--	+++	-
<i>ATP6</i>	++	+++	---
<i>COB</i>	++	--	-
<i>CCB206</i>	++	-	---
<i>COX1</i>	--	+	+
<i>COX2</i>	++	+	+

注：+++表示该基因上调表达程度极显著，++表示上调表
达程度显著，+表示上调表达程度不显著；---表示下调表
达程度极显著，--表示下调表达程度显著，-表示下调程度不
显著。

Note: +++ indicates that the up-regulated expression of the gene
is very significant, ++ indicates that the up-regulated expression of
the gene is significant, + indicates that up-regulated expression of
the gene is not significant; --- indicates that the down-regulated
expression of the gene is very significant, -- indicates that the
down-regulated expression of the gene is significant, - indicates
that the down-regulated expression of the gene is not significant.

出变化的基因,在荧光定量验证中出现了变化,但
变化量不大,且重复实验中数据变化量不一致,使
用数据较好的一组,求平均值进行计算,会存在一
定的实验误差,当然也可能是由于转录组误差所
致,但其表达量变化不显著,仍可以进行相关分
析。但总体上三种植物的低温差异表达基因与转
录组数据一致,少数基因的相对表达量大小可能
有所出入,但表达量变化趋势没有变化。

2.4 三种植物的线粒体呼吸链基因的启动子分析

通过对三种低温差异表达基因的筛选,其中
与呼吸链相关的基因主要有 *NAD1*、*NAD2*、*NAD4*、
NAD5、*NAD6*、*NAD7*、*NAD9*、*ATP6*、*CCB382*、
CCB206、*CCB256*、*CCB452*、*COB*、*COX1* 和 *COX2*,
分别分析其启动子,启动子中的顺式作用元件种
类主要有光响应元件、缺氧与厌氧诱导响应元件、

茉莉酸甲酯响应元件、赤霉素响应元件、生长素响
应元件、脱落酸响应元件、水杨酸响应元件、防御
与胁迫响应元件、低温响应元件、细胞周期调节响
应元件、启动子和增强子区域中常见的响应元件
CAAT-box、GC-motif,核心启动子元件 TATA-box,
参与昼夜控制元件 circadian 等具有不同功能的顺
式作用原件。图 2 列出了呼吸链相关线粒体基因
的元件类型与数量。

由表 4 可知,低温响应元件 LTRE 和脱落酸响
应元件 ABRE 是基因低温诱导调控中的关键元
件。在雪莲中显著下调的 *ATP6* 和 *CCB206* 基因
的启动子中均包含 1 个 ABRE 和 0 个 LTRE 元件,
说明该 ABA 响应元件可能与其他逆境诱导有关。
拟南芥中低温显著上调的大多数基因均可发现其
启动子中包含 LTRE 或 ABRE,如 *NAD1*、*NAD5* 和
NAD9 等。但在拟南芥中 *NAD7* 作为显著低温上调
基因,其基因启动子区域却均未发现 LTRE 和
ABRE,说明该基因的低温诱导表达与其他诱导信
号关联。番茄中的 *NAD1* 和 *NAD5* 基因类似与雪
莲的 *ATP6* 和 *CCB206* 基因,均可发现 ABRE 元件
的存在。整体上,大多低温上调表达的基因均可
在其表达调控区域发现 LTRE 或 ABRE,说明线粒
体基因的表达受低温信号或相关激素信号的调
控,但这种调控模式在不同植物间具有很大差异。

2.5 不同温度适应性植物线粒体基因序列分析与
对比

通过 NCBI 根据不同适应温度,下载 17 种不
同温度适应性植物线粒体编码蛋白序列,进行多
序列分析,并构建系统发育进化树。由于植物线
粒体基因组主要编码部分呼吸链复合体 I-VI 亚
基基因,这些复合体亚基基因不仅序列上高度保
守,而且在数量上基本相同。所以各植物选择的
线粒体编码基因序列主要是由 *NAD1*、*NAD3*、
NAD5、*NAD7*、*NAD9*、*COB*、*CCB*、*COX1*、*RPS3*、*RPS5*
和 *RPL5* 等具有较高保守结构域的基因序列构成。
由图 3 可知,雪莲与菊花和向日葵虽同属一科,但
其序列相似度却不高,与其序列相似度较高的为
拟南芥、牛舌藓、万年藓、甘蓝和欧洲山杨。与雪
莲保守序列相似性较高的,除拟南芥与甘蓝外,其
他均分布在寒温带针叶林,且都具有抗寒特性,表

表 4 主要功能元件与统计

Table 4 Main function of the promoter element and statistics

基因名称 Gene name	功能元件及其数量 Responsive element function and quantity statistics					
	低温响应元件 Low temperature responsive element			脱落酸响应元件 Absciscic acid responsive element		
	雪莲 <i>Saussurea involucrata</i>	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i>	雪莲 <i>Saussurea involucrata</i>	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i>
<i>NAD1</i>	1	2	0	2	0	1
<i>NAD2</i>	0	2	0	1	2	2
<i>NAD3</i>	0	0	1	1	1	0
<i>NAD4</i>	0	0	1	5	1	0
<i>NAD5</i>	0	1	0	0	3	1
<i>NAD6</i>	0	1	2	2	1	1
<i>NAD7</i>	0	0	1	2	0	0
<i>NAD9</i>	3	1	1	1	1	1
<i>ATP6</i>	0	0	1	1	6	0
<i>CCB382</i>	0	0	0	0	0	1
<i>CCB206</i>	0	2	1	1	0	0
<i>CCB256</i>	0	0	0	1	1	2
<i>CCB452</i>	1	1	0	0	3	0
<i>COB</i>	0	1	0	2	0	2
<i>COX1</i>	1	2	0	1	0	1
<i>COX2</i>	0	1	3	0	1	1

明雪莲与其他植物的线粒体序列差异不仅体现在种属差异,还与其生长环境差异有关。高度保守的蛋白序列之间存在的差异,一定程度上与其所处环境压力有关。虽然雪莲、菊花、向日葵等同属菊科植物,但在进化关系上距离较远,与万年藓、牛舌藓、欧洲山杨等高山植物的进化距离较近,说明雪莲线粒体在高寒环境影响下,进化出自身适应该环境的机制,基因结构也与其他菊科植物产生较大差异。

3 讨论与结论

三种植物在低温下差异表达基因,主要集中在电子传递链各复合亚基和核糖体蛋白亚基基因。由于植物的低温响应机制特别复杂,本文只针对呼吸链相关基因低温表达差异与低温耐受性之间的关系。通过对呼吸链相关基因分析发现,其中番茄和拟南芥中 NADH 脱氢酶亚基基因差异表达最多,即拟南芥与番茄冷胁迫的影响主要是

依赖于 NADH 的呼吸受抑制程度较大,而依赖于琥珀酸的呼吸受抑制较轻,冷胁迫主要破坏呼吸链中复合体 I 的活性,复合体 I 低温下差异表达情况,对其低温耐受性有重要作用(Daniela et al., 2007)。拟南芥与番茄在调节依赖于 NADH 的电子传递途径时的差异,如 *NAD1*、*NAD5* 拟南芥中显著上调,而番茄显著下调,反映出拟南芥与番茄在冷胁迫上的耐受性差异。两种植物的电子传递链复合体 III、IV 亚基基因在冷胁迫下也具有不同的表达模式,该复合体同样在植物低温胁迫下具有重要作用,其表达上调有助于呼吸电子链的电子传递,有助于氧自由基的消耗,减少活性氧对细胞的损伤(Verrier et al., 2008; Rayapuram et al., 2008; Gaudet et al., 2011)。拟南芥和番茄该复合亚基基因的低温差异表达模式同样有区别,拟南芥中该复合亚基基因大多显著上调表达,番茄中下调表达或不变,如 *CCB*、*COX* 等基因在两种植物中的低温表达差异,这种表达差别同样是其低温耐受性差异的原因。雪莲的呼吸链相关基因

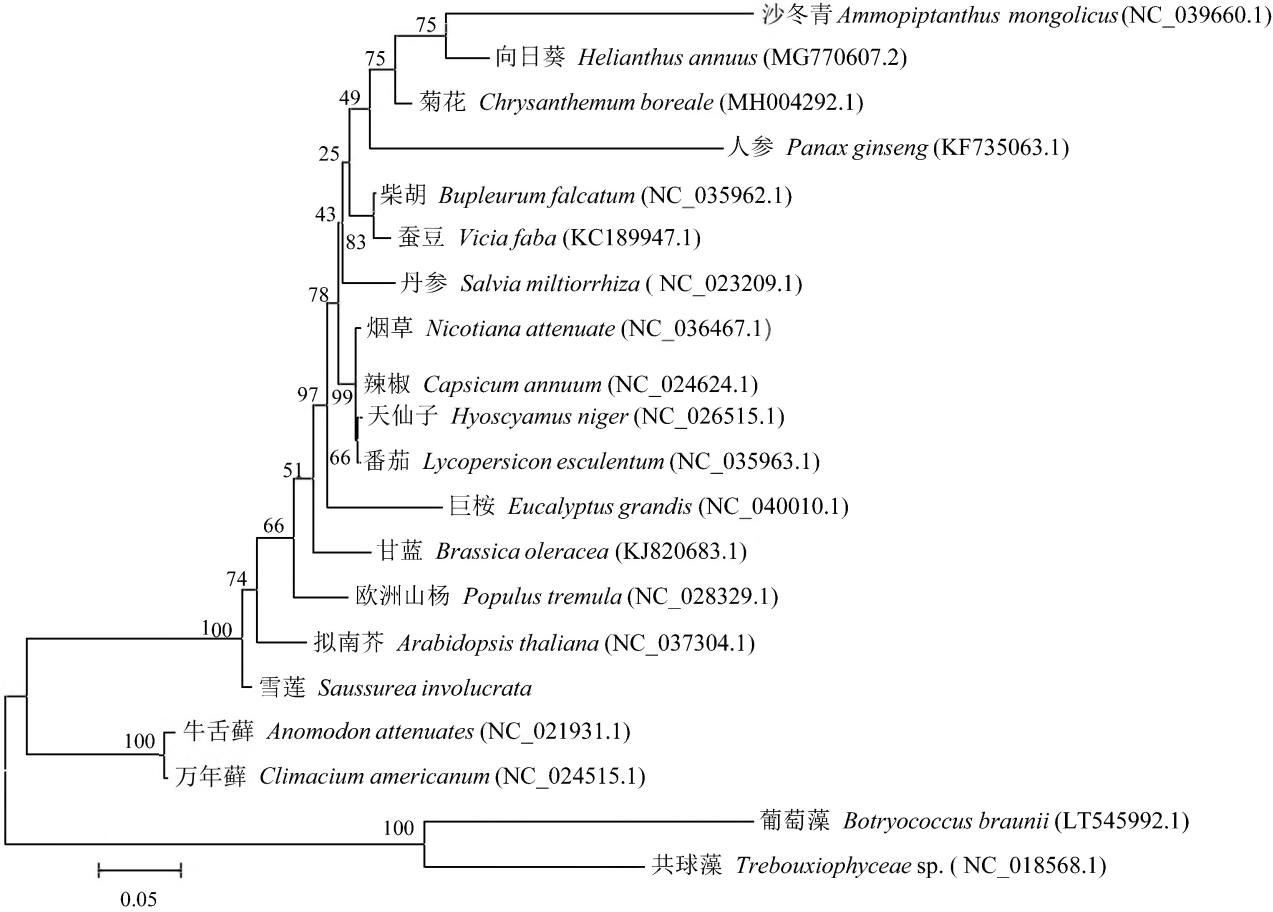


图 3 线粒体低温差异表达基因的进化分析

Fig. 3 Evolutionary analysis of differentially expressed genes in mitochondria at low temperature

的差异表达模式不同于其他两种植物,由于其较强的低温耐受性,复合体 I - IV 的大部分亚基基因均未受到低温伤害,只有复合体 IV、V 中的 *CCB* 和 *ATP6* 出现显著下调,冷胁迫主要影响的是其电子传递链的最后部分,通过控制能量代谢速率降低机体能量消耗和呼吸效率,来应对低温胁迫 (Jacoby et al., 2011)。三种植物在低温胁迫下表达模式和调控机制的差异,可能是形成其低温耐受性差异的一个原因。通过对呼吸链相关基因蛋白序列分析得出,虽然雪莲、菊花、向日葵等同属菊科植物,但在进化关系上距离较远,与万年藓、牛舌藓、欧洲山杨等高山植物的进化距离较近,雪莲与其他植物的线粒体序列差异不仅体现在种属差异,还与其生长环境差异有关。

通过以上对三种植物的线粒体差异表达基因

模式和基因表达聚类分析得出,雪莲与拟南芥相对于番茄在基因的表达模式上更为相近;不同冷耐受性植物线粒体之间的线粒体保守序列分析得出,虽然雪莲和菊花、向日葵等同属菊科植物,但在进化关系上距离较远,却与万年藓、牛舌藓和欧洲山杨等高山植物的进化距离较近,这一现象同样验证了一部分线粒体基因的低温差异表达与其自身冷耐受性相关联这一结论。

参考文献：

BARRERO-GIL J, HUERTAS R, RAMBLA JL, et al., 2016. Tomato plants increase their tolerance to low temperature in a chilling acclimation process entailing comprehensive transcriptional and metabolic adjustments [J]. Plant Cell & Environ, 39(10): 2303-2318.

CHANG JF, 2007. Characteristics of mitochondrial alternative

- electron transfer pathways in *Chorispora bungeana* under chilling stress [D]. Lanzhou: Lanzhou University. [常建锋, 2007. 高山离子芥线粒体交替途径介导的抗寒特征研究 [D]. 兰州: 兰州大学.]
- DANIELA V, ROSA ANNA V, MARIA CONCETTA DP, et al., 2007. In the early phase of programmed cell death in Tobacco Bright Yellow 2 cells the mitochondrial adenine nucleotide translocator, adenylate kinase and nucleoside diphosphate kinase are impaired in a reactive oxygen species-dependent manner [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1767 (1): 66–78.
- FOYER CH, NOCTOR G, 2010. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria [J]. *Physiol Plant*, 119(3): 355–364
- GAUDET P, LIVSTONE MS, THOMAS PD, et al., 2011. Phylogenetic-based propagation of functional annotations within the gene ontology consortium [J]. *Brief Bioinform*, 12(5): 449–462.
- JACOBY RP, TAYLOR NL, HARVEY M, 2011. The role of mitochondrial respiration in salinity tolerance [J]. *Trends Plant Sci*, 16(11): 614–623.
- LESCOT M, DÉHAIS P, THIJS G, et al., 2002. PlantCARE: a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences [J]. *Nucl Acids Res*, Database issue, 30(1): 325–327.
- LI J, YAN PY, QIAN FJ, et al., 2017. *Sasussured involucrata* transcriptome knowledge base [J]. *Chin Bull Bot*, 52(4): 530–538. [李锦, 严潘瑶, 钱飞箭, 等, 2017. 新疆天山雪莲转录组注解知识库 [J]. *植物学报*, 52(4): 530–538.]
- LIU MJ, SUN XJ, ZHANG ZS, et al., 2014. Quantitative research of plant mitochondrial respiration state and its application in plant biology [J]. *J Plant Physiol*, 50(1): 111–116. [刘美君, 孙学娟, 张子山, 等, 2014. 植物线粒体呼吸状态的研究方法及其在植物生物学中的应用 [J]. *植物生理学报*, 50(1): 111–116.]
- MA XL, ZHOU LJ, SUN MC, et al., 2013. Research advance on plant mitochondria complexes and its regulation on active oxygen species [J]. *J Anhui Agric Sci*, 41(19): 8095–8096. [马晓蕾, 周丽娟, 孙孟超, 等, 2013. 线粒体复合体及其对活性氧的调控研究进展 [J]. *安徽农业科学*, 41(19): 8095–8096.]
- MILLAR AH, WHELAN J, SOOLE KL, et al., 2011. Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants [J]. *Ann Rev Plant Biol*, 62(1): 79–104.
- PICAULT N, HODGES M, PALMIERI L, et al., 2004. The growing family of mitochondrial carriers in *Arabidopsis* [J]. *Trends Plant Sci*, 9(3): 138–146.
- QIN GZ, MENG XH, WANG Q, et al., 2009. Oxidative damage of mitochondrial proteins contributes to fruit senescence: A redox proteomics analysis [J]. *J Proteome Res*, 8(5): 2449–2462.
- RACHEL C, RYAN L, PARKER KL, et al., 2005. Stress-induced co-expression of alternative respiratory chain components in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Mol Biol*, 58(2): 193–212.
- RAYAPURAM N, HAGENMULLER J, GRIENENBERGER JM, et al., 2008. The three mitochondrial encoded CcmF proteins form a complex that interacts with CCMH and c-type apocytochromes in *Arabidopsis* [J]. *J Biol Chem*, 283(37): 25200–25208.
- SAIRAM RK, SRIVASTAVA GC, 2002. Changes in antioxidant activity in sub-cellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress [J]. *Plant Sci*, 162(6): 897–904.
- SLOAN DB, WU Z, SHARBROUGH J, 2018. Correction of persistent errors in *Arabidopsis* reference mitochondrial genomes [J]. *Plant Cell*, 30(3): 525–527.
- TAN YF, MILLAR AH, TAYLOR NL, 2012. Components of mitochondrial oxidative phosphorylation vary in abundance following exposure to cold and chemical stresses [J]. *J Proteome Res*, 11(7): 3860–3879.
- TAYLOR NL, TAN YF, JACOBY RP, et al., 2009. Abiotic environmental stress induced changes in the *Arabidopsis thaliana* chloroplast, mitochondria and peroxisome proteomes [J]. *J Proteomics*, 72(3): 367–378.
- TULAH AS, BIRCH-MACHIN MA, 2013. Stressed out mitochondria: the role of mitochondria in ageing and cancer focussing on strategies and opportunities in human skin [J]. *Mitochondrion*, 13(5): 444–453.
- VANHOUDT N, VANDENHOVE H, HOREMANS N, et al., 2011. Unraveling uranium induced oxidative stress related responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings, Part I: responses in the roots [J]. *J Environ Radioactiv*, 102(6): 630–637.
- VERRIER PJ, BIRD D, BO B, et al., 2008. Plant ABC proteins—A unified nomenclature and updated inventory [J]. *Trends Plant Sci*, 13(4): 151–159.
- VOGEL JT, ZARKA DG, THOMASHOW MF, et al., 2005. Roles of CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 41(2): 195–211.
- YIN GK, SUN HM, XIN X, et al., 2009. Mitochondrial damage in the soybean seed axis during imbibition at chilling temperatures [J]. *Plant Cell Physiol*, 50(7): 1305–1318.
- ZHOU YF, WANG DQ, LU ZB, et al., 2013. Impacts of drought stress on leaf osmotic adjustment and chloroplast ultrastructure of stay green sorghum [J]. *Chin J Appl Ecol*, 24(9): 2545–2550. [周宇飞, 王德权, 陆樟镛, 等, 2013. 干旱胁迫对持绿性高粱叶片渗透调节及叶绿体超微结构的影响 [J]. *应用生态学报*, 24(9): 2545–2550.]

(责任编辑 何永艳)