



# 基于转录组学的拟南芥 *AtNDX* 下游潜在靶基因挖掘与分析

王洁瑶, 马蓉, 邢孔丫, 柯丽萍, 华学军

(浙江理工大学生命科学与医药学院, 杭州 310018)

**摘要:** 植物线粒体在受到环境胁迫时会产生逆向信号, 通过调节核基因的表达来协调植物生长和抗逆的平衡, 但其内在作用机制还有待深入研究。首先对拟南芥 *SSR1* 基因突变体 (*ssr1-2*)、*ssr1-2* 抑制子 (*sus3*)、*sus3* 回补株系 (*sus3C*) 及野生型 *Wassilewskija* (*WS*) 植株的根进行转录组测序; 其次利用主成分分析和 Pearson 相关系数评估转录组数据之间的相关性, 绘制差异表达基因的火山图和相关性聚类分析热图; 最后结合 KEGG 和 GO 分析, 筛选同时受线粒体胁迫和 *AtNDX* 调控的基因, 分析 *AtNDX* 在线粒体胁迫下调控植物生长发育的作用机制。结果表明: 4 个材料的高通量测序数据重复性好, 且 *ssr1-2* 与 *sus3C* 高度相关, *sus3C* 能互补 *sus3* 抑制子突变造成的影响; 筛选到线粒体胁迫下受 *AtNDX* 负调控的基因有 288 个, 受 *AtNDX* 正调控的基因有 178 个; 利用实时荧光定量 PCR 技术对筛选出的 15 个在线粒体胁迫下受 *AtNDX* 调控的潜在下游靶基因进行了验证, 发现这些基因均在植物生长发育和细胞代谢过程中发挥重要作用。该结果表明, *AtNDX* 通过调控根系发育和细胞代谢相关基因的表达参与线粒体逆向信号的响应和植物生长发育调节, 为深入解析植物线粒体在平衡生长发育和胁迫响应中的作用提供了重要线索。

**关键词:** 拟南芥; 转录组; *AtNDX*; 下游靶基因; 线粒体胁迫

**中图分类号:** Q756

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1673-3851(2025)09-0646-10

**引文格式:** 王洁瑶, 马蓉, 邢孔丫, 等. 基于转录组学的拟南芥 *AtNDX* 下游潜在靶基因挖掘与分析[J]. 浙江理工大学学报(自然科学), 2025, 53(5): 646-655.

**Reference Format:** WANG Jieyao, MA Rong, XING Kongya, et al. Mining and analysis of potential target genes downstream of *AtNDX* in *Arabidopsis thaliana* based on transcriptomics[J]. Journal of Zhejiang Sci-Tech University, 2025, 53(5): 646-655.

## Mining and analysis of potential target genes downstream of *AtNDX* in *Arabidopsis thaliana* based on transcriptomics

WANG Jieyao, MA Rong, XING Kongya, KE Liping, HUA Xuejun

(College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** Plant mitochondria produce retrograde signals under environmental stress to regulate nuclear gene expression and coordinate the balance between growth and stress resistance, yet the underlying mechanisms remain poorly understood. First, we performed transcriptome sequencing on roots of *Arabidopsis SSR1* mutants (*ssr1-2*), *ssr1-2* suppressor (*sus3*), *sus3* complemented line (*sus3C*), and *Wassilewskija* (*WS*) wild-type plants. Second, principal component analysis (PCA) and Pearson correlation coefficients were used to assess the correlations among transcriptomic data, followed by generating volcano plots and cluster heatmaps of differentially expressed genes (DEGs). Finally, by integrating KEGG and GO analyses, genes simultaneously regulated by mitochondrial stress and *AtNDX*

收稿日期: 2025-01-22 网络出版日期: 2025-05-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(32170307)

作者简介: 王洁瑶(1998—), 女, 贵州人, 硕士研究生, 主要从事植物抗逆分子机制方面的研究。

通信作者: 华学军, E-mail: xjhua@zstu.edu.cn; 柯丽萍, E-mail: keliping@zstu.edu.cn

were screened to elucidate the mechanistic role of *AtNDX* in modulating plant growth and development under mitochondrial stress. The results showed that the high-throughput sequencing data of the four materials exhibited good reproducibility, with *ssr1-2* and *sus3C* displaying a high correlation, and *sus3C* was able to complement the effects caused by the suppressor mutation in *sus3*. A total of 288 genes were identified as being negatively regulated by *AtNDX* under mitochondrial stress, while 178 genes were positively regulated. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) validated 15 candidate downstream target genes of *AtNDX*, all of which play critical roles in plant growth and cellular metabolism. Our findings demonstrate that *AtNDX* modulates mitochondrial retrograde signaling and plant development by regulating root development and metabolic pathways, providing key insights into how plant mitochondria balance growth and stress adaptation.

**Key words:** *Arabidopsis thaliana*; transcriptome; *AtNDX*; downstream target gene; mitochondrial stress

## 0 引言

线粒体是细胞的“能量工厂”和代谢中心,在植物响应体内生长发育信号和体外环境因子刺激的平衡中起着非常重要的调控作用<sup>[1-3]</sup>。线粒体功能的正常行使需要线粒体基因和核基因编码蛋白的协同作用。在受到外界环境刺激的时候,线粒体会产生信号并传递给细胞核,通过调节核基因的表达方式和水平,来协调植物生长和抗逆的平衡。这种由线粒体向细胞核的信号传递被称为线粒体逆向信号(Mitochondria retrograde signaling, MRS)传递<sup>[4-5]</sup>。

MRS 传递依赖于 3 类分子,即线粒体胁迫释放的信号分子(Retrograde signal)、信号的传递蛋白(Transducer)以及核内受 MRS 调控的转录因子,由这些转录因子诱导或抑制一系列下游靶基因来调控植物生长与抗逆的平衡。目前研究发现,活性氧、钙离子、水杨酸以及线粒体能量代谢与氧化还原状态的动态变化,均可作为重要的信号分子参与细胞核与线粒体间的信息交流<sup>[6-7]</sup>。研究者也鉴定了一些信号的传递蛋白和细胞核内被调节的转录因子,如传递蛋白 Cyclin-dependent kinase E1<sup>[8-9]</sup>,转录因子 ABI4<sup>[10]</sup>、Myb29<sup>[11]</sup>和 WRKY15<sup>[12]</sup>。尽管关于线粒体逆向信号的研究日益增多,且已鉴定并克隆了若干参与调节线粒体与细胞核间信号交流的关键调控元件,但关于植物线粒体逆行信号如何具体调控生长发育的报道仍然较为匮乏。

本课题组前期鉴定了一个植物特有的含有 Tetra-trico-peptide repeat (TPR) 结构域的线粒体蛋白。该线粒体蛋白受核基因 *SSR1* 编码,其基因敲除突变体 *ssr1-1* 中线粒体中铁硫蛋白活性下降,线粒体功能受损,表现出明显的短根表型,并对渗透胁迫表现出超敏感性<sup>[13-15]</sup>,并获得一个根长部分恢

复的抑制子 *sus3* (*suppressor of ssr1-2 3*),其编码产物为 homeobox 蛋白家族的 *AtNDX*<sup>[15-16]</sup>。Homeobox 转录因子在植物生长发育中发挥着非常重要的作用,广泛参与细胞分裂和器官的发育<sup>[17-18]</sup>以及逆境胁迫响应<sup>[19-20]</sup>。拟南芥中 *AtNDX* 是一个单拷贝的负调控因子,已有研究表明该转录因子可以通过维持异染色质化介导对基因转录的抑制<sup>[21-23]</sup>。例如, *AtNDX* 在 *FLOWERING LOCUS C (FLC)* 的 3' 端与单链 DNA 结合,调控 *FLC* 和它的反义链编码的长链非编码 RNA *COOLAIR* 的表达,参与开花时间的调控<sup>[21]</sup>。 *AtNDX* 直接结合 *ABI4* 的下游序列,并与多梳抑制复合体 1 中的 *RING1A* 和 *RING1B* 直接相互作用,共同介导 *ABI4* 的 H2A 单泛素化修饰,抑制 *ABI4* 的表达,负调控 ABA 信号转导途径<sup>[22]</sup>。但关于 *AtNDX* 是否参与线粒体逆向信号的响应及其对植物生长发育的具体影响,相关研究未见报道。

本文以 *SSR1* 基因突变体 (*ssr1-2*)、*ssr1-2* 抑制子 (*sus3*)、*sus3* 回补株系 (*sus3C*) 及其野生型 *Wassilewskija (WS)* 为转录组测序的材料,通过转录组数据挖掘拟南芥中 *AtNDX* 基因在线粒体胁迫下调控的下游靶基因,并利用实时荧光定量 PCR 技术进行验证,分析这些 *AtNDX* 潜在下游靶基因的功能,为深入解析植物线粒体在平衡生长发育和胁迫响应中的作用机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

突变体 *ssr1-2* 购自拟南芥种质资源中心 (Versailles Arabidopsis stock center, <https://publiclines.versailles.inrae.fr/>), *sus3* 是本课题组筛选到的能抑制 *ssr1-2* 短根表型的抑制子, *sus3C*

为在 *sus3* 基础上转入 *AtNDX* 获得的互补株系。由于 *ssr1-2* 是拟南芥 WS 背景下的突变体,本文使用的对照为拟南芥 WS 野生型。

## 1.2 无菌苗培养

选取约 200 粒饱满拟南芥种子,用 75%乙醇消毒 1 min,5%次氯酸钠溶液灭菌 15 min,无菌水冲洗 6 次,播种至 Murashige and Skoog(MS)固体培养基上,在 4 °C 冰箱放置 1~3 d 后移至光照培养箱中培养,生长条件为 22 °C、16/8 h 光照/黑暗。

## 1.3 总 RNA 提取

分别收集在 MS 固体培养基上培养 10 d 的 WS、*ssr1-2*、*sus3* 和 *sus3C* 株系幼苗根部,在液氮中冷冻后迅速磨成粉末,利用植物总 RNA 提取试剂盒进行总 RNA 的提取,具体操作方法见 FastPure Plant Total RNA Isolation 试剂盒说明书 RC401-01(南京诺维赞生物技术有限公司)。提取的 RNA 用超微量分光光度计 BioDrop DUO<sup>+</sup>(BioDrop Ltd., Cambridge, UK)进行浓度以及纯度检测。

## 1.4 转录组分析

分别取 1 μg 上述 4 个株系幼苗根部新鲜抽提

的 RNA 送至杭州联川生物公司进行转录组测序,每个株系 4 个重复,一共 16 个样品。测序所得数据使用联川转录组数据分析云平台(<https://www.omicstudio.cn>)进行分析,并使用 Venny 2.1.0(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)绘制 Venn 图。

## 1.5 实时荧光定量 PCR

分别取 1 μg 上述各样品新鲜抽提的 RNA,利用 FastKing cDNA 合成试剂盒 KR116(北京天根生物技术有限公司)进行反转录,具体操作方法见试剂盒说明书。实时荧光定量 PCR(Quantitative real-time, RT-qPCR)参照 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix(南京诺唯赞生物技术有限公司)试剂盒说明书进行,反应体系为 10 μL,反应程序为:预变性 95 °C、3 min;循环反应 95 °C、10 s,60 °C、15 s,72 °C、30 s;熔解曲线 95 °C、1 min,60 °C、30 s,95 °C、30 s。实时荧光定量 PCR 所用引物直接根据候选靶基因 qPrimerDB(<https://biodb.swu.edu.cn/qprimerdb/>)上查到的定量 PCR 引物序列进行合成,*AtACTIN* 为内参基因,引物序列见表 1。

表 1 实时荧光定量 PCR 所用引物

引物名称	序列(5'-3')	引物名称	序列(5'-3')
<i>AtACTIN</i> -q-F	AGCACTTGCACCAAGCAGCATG	<i>AT1G06120</i> q-F	CGGTATATCGACTAATCTCAGCA
<i>AtACTIN</i> -q-R	ACGATTCTGGACCTGCCTCATC	<i>AT1G06120</i> q-R	AGGACTATGTGGGTCACGGT
<i>AT1G02575</i> q-F	CGTTGTGGCAGTGACCTTTG	<i>AT4G22666</i> q-F	GCTTGCAAGTCTCGTCTTCG
<i>AT1G02575</i> q-R	CCGTAACCACCACCACAAGA	<i>AT4G22666</i> q-R	TTCCGTGGGCCACTATAAGC
<i>AT1G65570</i> q-F	TTGCCCTGGCGATTCTTCTT	<i>AT5G65800</i> q-F	AAGCAGCCATGAAAGGCTCA
<i>AT1G65570</i> q-R	ATCTCTGTGGCCGATGTTCC	<i>AT5G65800</i> q-R	CCATGAAACCCGAAAACCC
<i>AT5G46890</i> q-F	ACCCACTTGTAAGACGCT	<i>AT1G19900</i> q-F	TACACCGGAGTGCTTTTCCC
<i>AT5G46890</i> q-R	TTTGAAACCAGATGGAACC	<i>AT1G19900</i> q-R	CTTTCGCCGAGTCGTAACCT
<i>AT5G46900</i> q-F	ACGTTGTCCTAAACCATTTGTGG	<i>AT2G05070</i> q-F	ATTTGGCTGATCCTGTGGCT
<i>AT5G46900</i> q-R	AGGCACATTTCAAACAAAGTTGATA	<i>AT2G05070</i> q-R	CATGTGATTTTACTCTTGCCA
<i>AT3G60120</i> q-F	AGCATCCAACAAGCCATCCA	<i>AT4G13770</i> q-F	AGATCGCCGGTTACGACATC
<i>AT3G60120</i> q-R	TAACCGGCGTTCCATTACACA	<i>AT4G13770</i> q-R	ACTCGTAGTCCGTGCCTTTG
<i>AT1G65860</i> q-F	CTCAACTGGATCGCGGAAGA	<i>AT3G58990</i> q-F	AAACTGAAACCGCTCGGTGA
<i>AT1G65860</i> q-R	TCTGGGTGGGAGACCATTCT	<i>AT3G58990</i> q-R	ATCATGCCGGCTTTTCTTGC
<i>AT1G16410</i> q-F	CCCTGGACTAGGTTCGTAACC	<i>AT4G12030</i> q-F	TCTGACTCAAACGAGCTGTATC
<i>AT1G16410</i> q-R	GTCGACCGGTGCTAAACGAG	<i>AT4G12030</i> q-R	ACAAAGTACCTTGGCTTGAACC

## 2 结果与分析

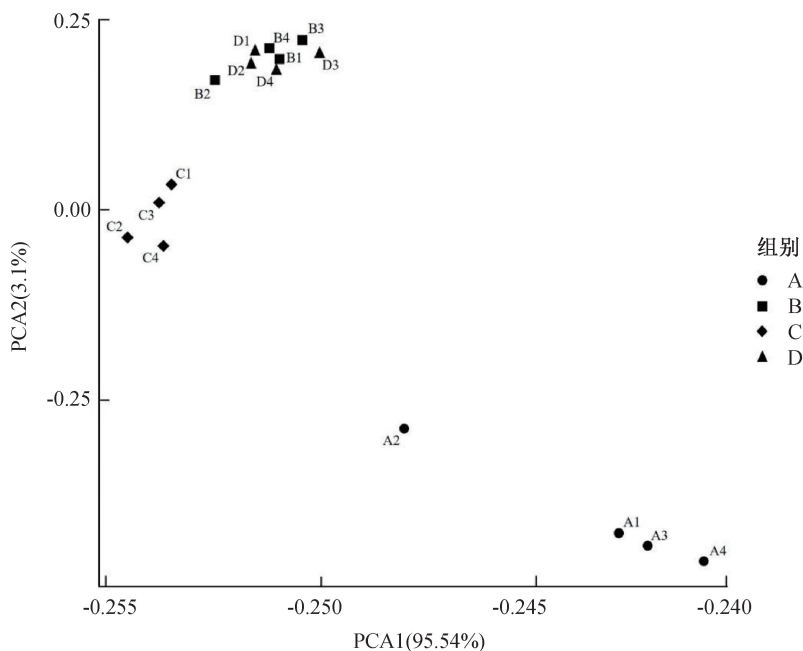
### 2.1 转录组测序数据分析

为了评估样品各个重复之间测序数据的一致性,通过主成分分析(Principal component analysis, PCA)对 WS、*ssr1-2*、*sus3* 以及 *sus3C* 株系的转录组测序数据进行分析,结果如图 1 所示。图 1 显示:

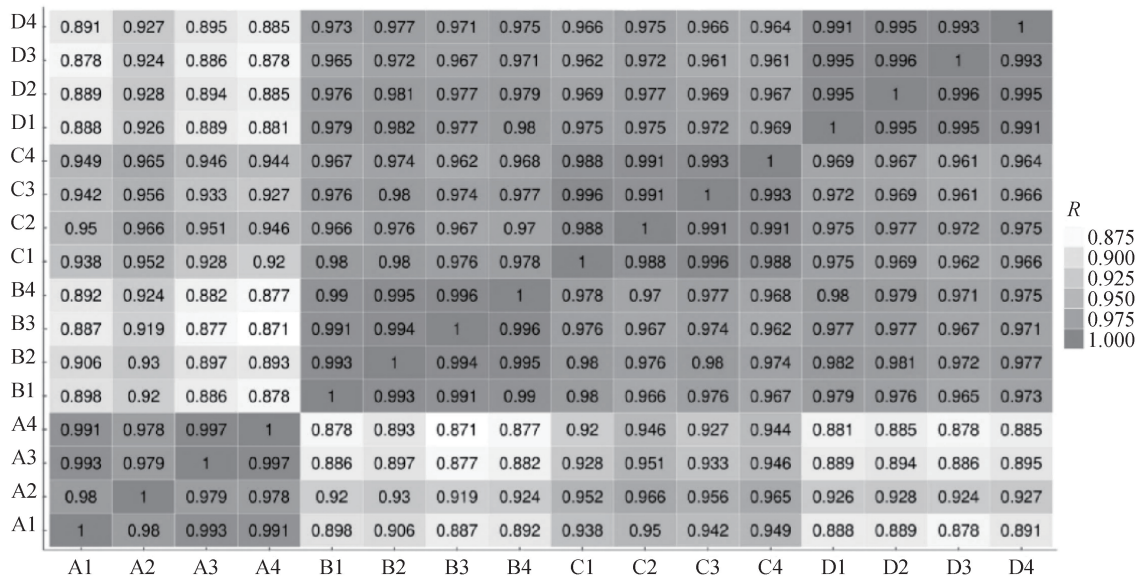
同一样品的 4 个重复基本聚集在一起,说明结果的重复性较好。图 1 中点 A 是野生型 WS,点 B 是 *ssr1-2*,点 C 是 *sus3*,点 D 是 *sus3C*。WS 中有一个点比较离群(点 A2),误差相对较大;*ssr1-2* 的四个点(点 B)和 *sus3C* 的 4 个点(点 D)聚在一起。Pearson 相关系数分析与主成分分析结果相似,除 A2 外,其他每个样本的多个重复之间相关系数均在

0.988 以上;B 和 D 的相关系数也都在 0.965 以上。结果表明测序数据总体上重复性较好,A2 误差较大,后续分析中予以剔除;B(*ssr1-2*)和 D(*sus3C*)的

高度相关性表明 *sus3C* 很好地互补了 *sus3* 抑制子突变造成的影响。



(a) 主成分分析



(b) Pearson 相关系数分析

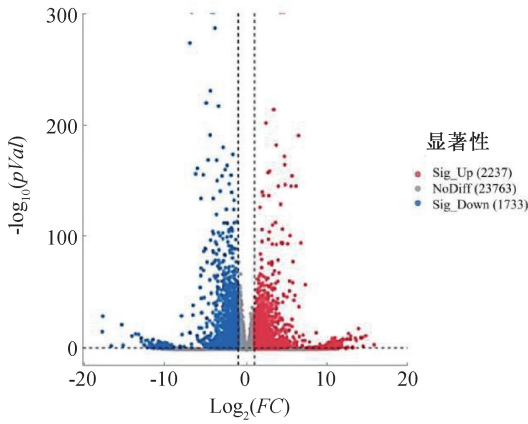
图 1 转录组测序数据主成分分析和 Pearson 相关系数分析

注:颜色深浅表示两样本的相关性系数大小。颜色越深,系数越接近于 1,即表示相关性越大;颜色越浅,相关性越小。

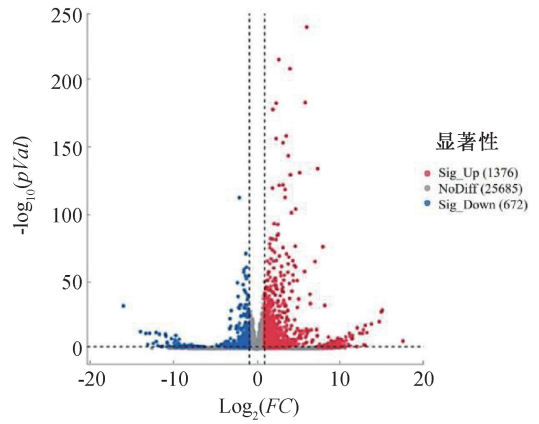
## 2.2 基因差异表达分析

以基因差异倍数  $|\log_2 FC| \geq 1$  且  $p < 0.05$  作为标准,比较了不同组合间的差异表达基因,结果如图 2 所示。图 2 显示:*ssr1-2* 与 WS 相比较,上调基因 2237 个,下调基因 1733 个(见图 2(a));*sus3* 与 *ssr1-2* 相比较,上调的基因 1376 个,下调基因 672 个(见图 2(b));*sus3C* 与 *sus3* 相比较,上调基因 760

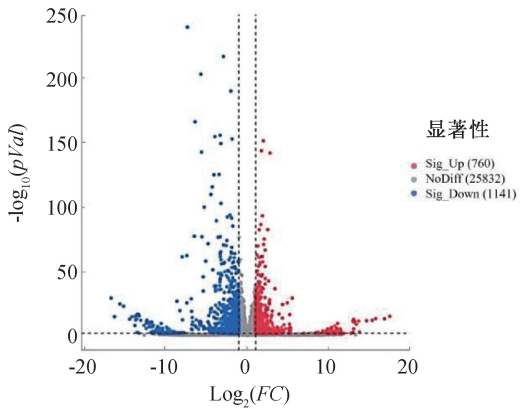
个,下调基因 1141 个(见图 2(c));*sus3* 与 WS 相比较,上调基因 1829 个,下调基因 803 个(见图 2(d))。其中,*ssr1-2* 与 WS 之间的差异表达是由于 *ssr1-2* 基因突变导致,*sus3* 与 *ssr1-2* 之间的基因表达差异是由线粒体胁迫下 *ssr1-2* 抑制子的突变(即 *AtNDX* 基因突变)导致,二者之间上调与下调基因数目差异较大,表明二者通过不同途径影响基因表



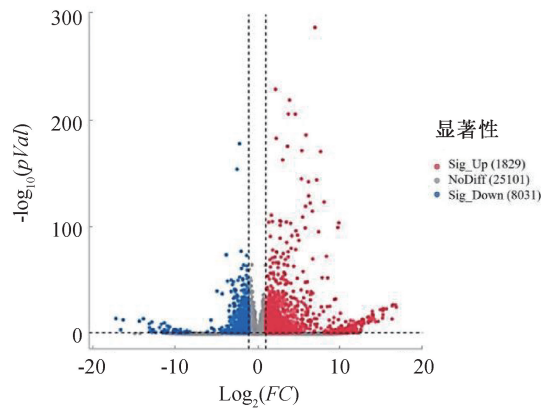
(a) *ssr1-2*相对于WS差异表达基因火山图



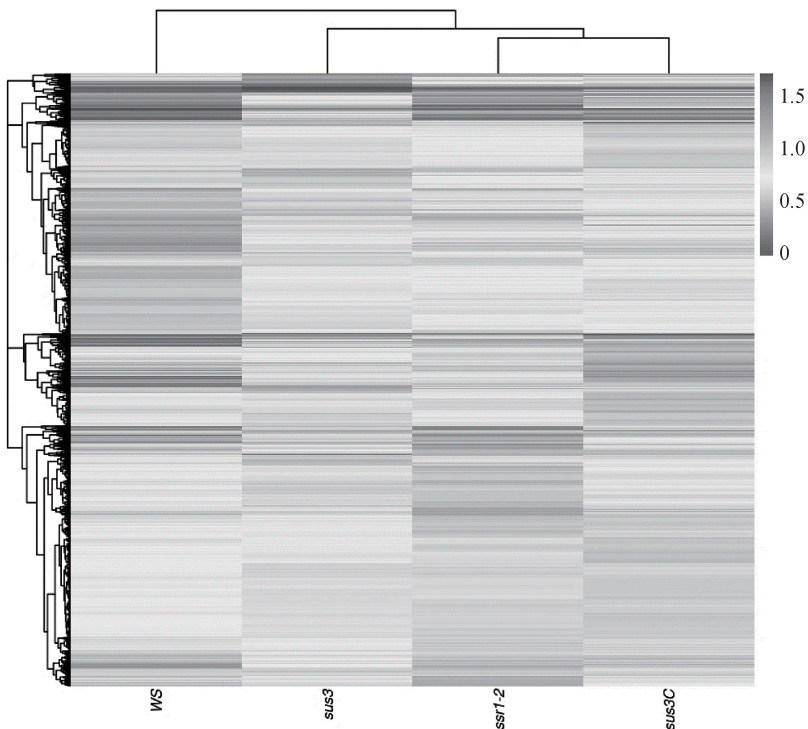
(b) *sus3*相对于*ssr1-2*差异表达基因火山图



(c) *sus3C*相对于*sus3*差异表达基因火山图



(d) *sus3*相对于WS差异表达基因火山图



(e) 差异表达基因相关性聚类热图

图2 差异表达基因火山图和相关性聚类分析热图

注:图2(e)中横坐标为样本,纵坐标为差异表达基因。不同颜色表示不同的基因表达水平,深颜色表示高表达基因,浅颜色表达低表达基因。数据归一化处理为标准化法。

达。而 *sus3C* 与 *sus3* 及 *sus3* 与 *ssr1-2* 这两组比较中,非差异表达基因数量相当,差异表达基因数也基本相同,表明 *sus3C* 互补了绝大多数 *AtNDX* 基因突变产生的差异。另外,*sus3* 与 *WS* 之间的差异表达基因数量显著低于 *ssr1-2* 与 *WS* 之间的差异基因数,表明 *sus3* 中抑制子 *AtNDX* 的突变恢复了部分 *ssr1-2* 突变引起的基因表达差异。进一步对上述筛选出的差异表达基因进行聚类分析发现 *ssr1-2* 和 *sus3C* 的相似性最高(见图 2(e)),与 *ssr1-2* 突变相一致。

*AtNDX* 作为一个维持异染色质化的负调控转录因子,能够抑制下游靶基因的转录<sup>[23]</sup>,*ssr1-2* 突变体背景下 *AtNDX* 很可能作为一个负调控转录因子调控与根生长发育相关的基因表达,也有可能正调控与根生长发育相关的基因。本文分析了 *WS* vs

*ssr1-2*、*sus3* vs *ssr1-2* 和 *sus3* vs *sus3C* 差异表达基因中共同上调和下调的基因,筛选在 *ssr1-2* 背景下,表达受 *AtNDX* 负调控和正调控的基因,结果用 Venn 图表示(见图 3)。图 3(a)中前者比后者为上调,图 3(b)中前者比后者为下调。由图 3 可知:突变体 *ssr1-2* 中线粒体功能受损,*WS* vs *ssr1-2* 的差异表达体现了线粒体损伤引起核基因表达变化;*sus3* 为 *ssr1-2* 与 *atndx* 的双突变,*sus3C* 互补了 *sus3* 中的 *atndx* 突变,*sus3* vs *ssr1-2* 和 *sus3* vs *sus3C* 均能体现 *atndx* 突变导致基因表达变化,这 3 组数据共有的差异表达基因同时受到线粒体胁迫和 *AtNDX* 的调控,3 组数据中表达量均上调的基因皆有可能受 *AtNDX* 负调控,共有 288 个,表达量均下调的 178 个基因均有可能受 *AtNDX* 正调控。

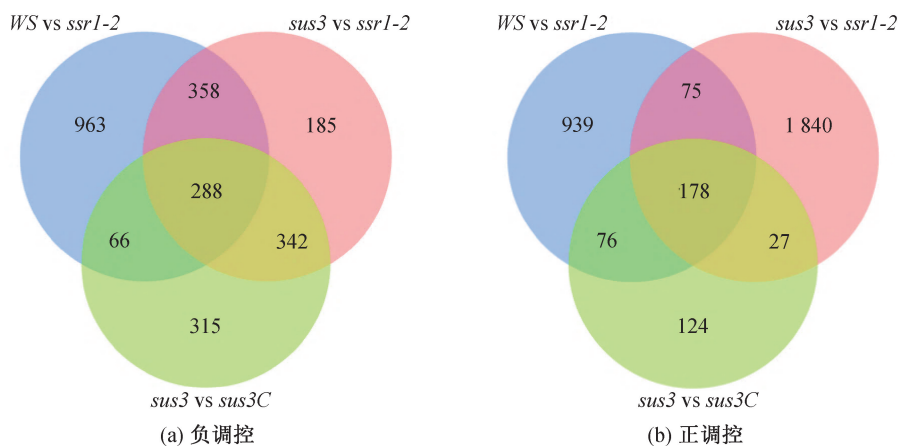


图 3 *ssr1-2* 背景下受 *AtNDX* 调控的基因的 Venn 图

## 2.3 KEGG 及 GO 分析

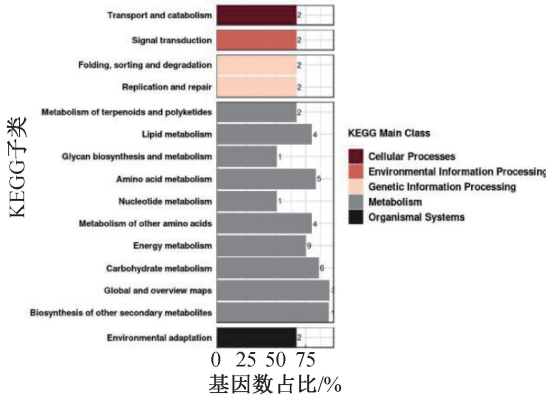
对筛选出的 *ssr1-2* 背景下受 *AtNDX* 负调控的 288 个基因和正调控的 178 个基因进行 Kyoto encyclopedia of genes and genomes(KEGG)分析和 Gene ontology(GO)分析,结果如图 4 所示。图 4(a)和图 4(b)显示:受 *AtNDX* 负调控和正调控的基因均主要富集于代谢通路,如糖代谢(Carbohydrate metabolism)、氨基酸代谢(Amino acid metabolism)和次生代谢产物的生物合成途径(Biosynthesis of other secondary metabolites)等;而在信号传导途径,受 *AtNDX* 负调控的基因显著高于正调控的基因。由图 4(c)和图 4(d)可知:在 *AtNDX* 负调控基因中,在生物学过程中以转录调控(Regulation of transcription, DNA -templated)功能的丰度最高;在分子功能上,在蛋白结合(Protein binding)、金属离子结合(Metal ion binding)和水解酶活性(Hydrolase activity)过程丰度较高;在细胞组分上,膜(Membrane)和膜组成成

分(Integral component of membrane)丰度较高;且 *AtNDX* 正调控基因与负调控基因功能富集相似,生物学过程中转录调控丰度最高,但在受调控的基因数量上显著低于负调控;在分子功能上,蛋白结合、金属离子结合和水解酶活性 3 个领域富集基因数量显著低于负调控基因数,这些结果为解析 *AtNDX* 下游基因的功能提供了线索。

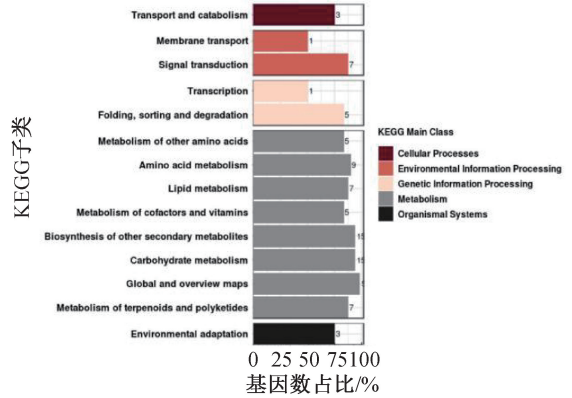
*ssr1-2* 突变体对表型的影响主要体现在根部生长受阻<sup>[13]</sup>,本文分析与根发育及其他生长发育相关的基因。根据 KEGG 和 GO 富集程度、差异倍数和差异显著性( $P < 0.05$ )等条件,在上述 288 个受 *AtNDX* 负调控的基因中筛选到 8 个与根系发育和次级代谢相关的基因(见表 2);在 178 个受 *AtNDX* 正调控的基因中筛选到 7 个参与植物生长发育过程的相关基因(见表 3)。由表 2—表 3 可知:15 候选基因均参与植物生长发育过程,负调控基因主要参与拟南芥根部、细胞壁及其他组织发育,而正调控基因主要参与硫代谢和光合作用过程,其中,

*AT5G65800* 编码 ACC 合酶 5(ACS5),通过调节乙烯生物合成影响发育<sup>[24]</sup>; *AT1G19900* (*RUBY*)编码乙二醛氧化酶相关蛋白(GalOx),该类蛋白是半乳糖氧化酶活性所必需的,能促进种皮表皮细胞的黏

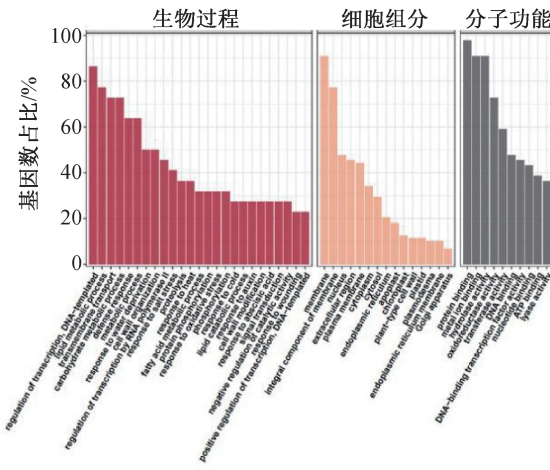
附<sup>[25]</sup>; *AT1G16410* 编码细胞色素 p450 79f1 蛋白(CYP79F1),该基因突变体表现出叶片皱缩和维管束形成缓慢,表明其在维管束发育中起重要作用<sup>[26]</sup>。



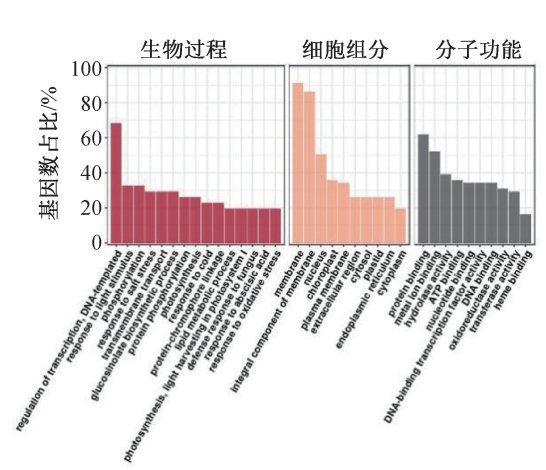
(a) 受*AtNDX*负调控基因的KEGG分析



(b) 受*AtNDX*正调控基因的KEGG分析



(c) 受*AtNDX*负调控基因的GO分析



(d) 受*AtNDX*正调控基因的GO分析

图4 *ssr1-2* 背景下受 *AtNDX* 调控的基因的 KEGG 分析和 GO 分析

表2 在 *ssr1-2* 背景下受 *AtNDX* 负调控的 8 个基因

基因名称	GO 聚类分析	基因注释
<i>AT1G02575</i>	根发育/细胞壁组织或生物发生/组织发育	跨膜蛋白
<i>AT1G65570</i>	根发育	果胶裂解酶的超家族蛋白
<i>AT5G46890</i>		双功能抑制子/脂质转运蛋白
<i>AT5G46900</i>	组织发育/根发育	双功能抑制子/脂质转运蛋白
<i>AT1G06120</i>	组织发育/细胞壁组织或生物发生	脂肪酸去饱和酶家族蛋白
<i>AT4G22666</i>	组织发育/根发育	双功能抑制子/脂质转运蛋白
<i>AT5G65800</i>	组织发育	ACC 合酶 5
<i>AT1G19900</i>	细胞壁组织或生物发生	乙二醛氧化酶相关蛋白

表3 在 *ssr1-2* 背景下受 *AtNDX* 正调控的 7 个基因

基因名称	GO 聚类分析	基因注释
<i>AT2G05070</i>	光系统 I 中的光合作用/光收获	光系统 II 光收获复合蛋白
<i>AT3G60120</i>	硫化物代谢过程	$\beta$ -葡糖苷酶 27
<i>AT1G65860</i>	硫化物代谢/生物合成过程	黄素单加氧酶硫代葡萄糖苷 S-加氧酶
<i>AT1G16410</i>	硫化物代谢/生物合成过程	细胞色素 p450 79f1
<i>AT4G13770</i>	硫化物代谢/生物合成过程	细胞色素 P450,83 家族, A 亚家族
<i>AT3G58990</i>	硫化物代谢/生物合成过程	异丙基苹果酸异构酶
<i>AT4G12030</i>	硫化物代谢/生物合成过程	胆汁酸转运蛋白 5

### 2.4 候选下游靶基因相关性分析

为了确认所筛选的 15 个在 *ssr1-2* 背景下受 *AtNDX* 影响的基因在 4 株系中表达水平的相关性,对其进行了皮尔逊相关性分析,结果如图 5 所示。图 5 显示:候选基因在 *WS/sus3* 和 *ssr1-2/*

*sus3C* 两对株系中表达水平呈现出较高的正相关,在 *WS*、*sus3* 分别与 *ssr1-2*、*sus3C* 呈负相关。*WS*、*sus3* 与 *ssr1-2*、*sus3C* 之间的完全呈现出负相关,说明筛选出来的基因符合预期,并且符合所提出的表达模式。

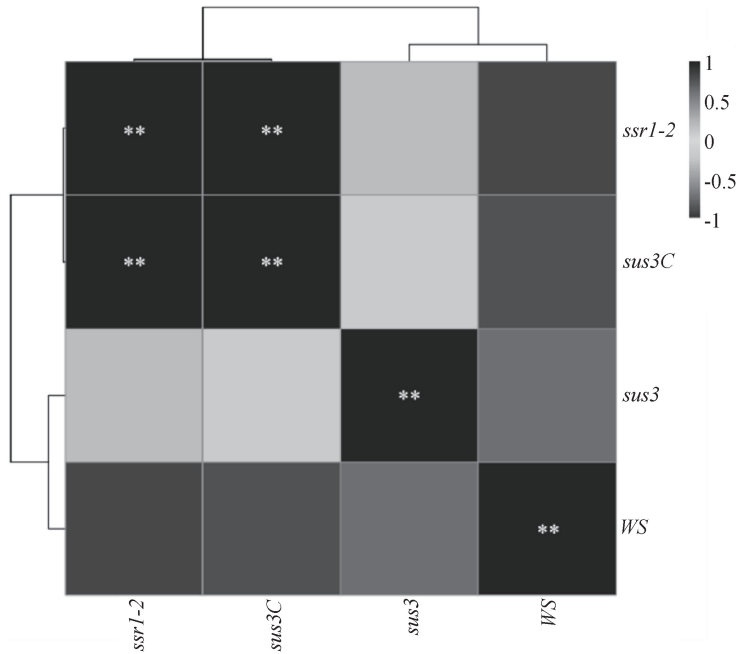


图 5 候选基因表达水平的皮尔逊相关性分析

注:“\*\*”表示 2 个变量显著相关。颜色越深说明 2 个变量间相关程度更大;颜色越浅说明 2 个变量间相关程度越小。

### 2.5 候选基因的表达水平检测

为了验证候选下游靶基因表达水平受线粒体胁迫及 *AtNDX* 表达的影响,利用实时荧光定量对候

选基因在 *WS*、*ssr1-2*、*sus3* 和 *sus3C* 株系中表达水平进行鉴定,结果如图 6 和图 7 所示。图 6 显示:以野生型 *WS* 为对照,受 *AtNDX* 负调控的 8 个基因

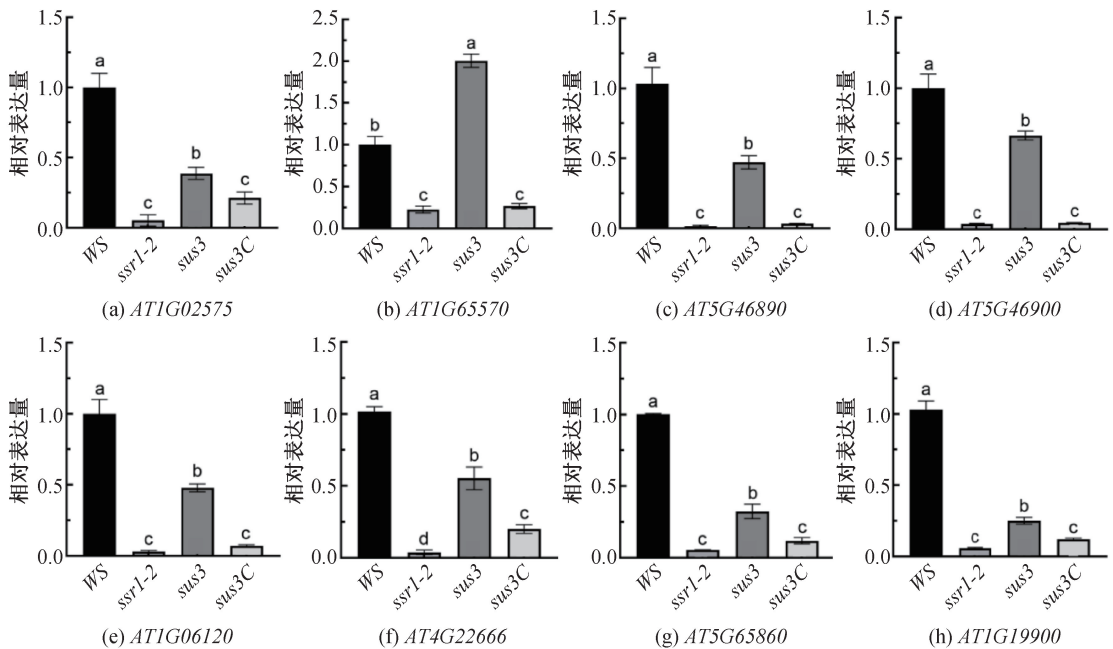


图 6 *ssr1-2* 背景下受 *AtNDX* 负调控的潜在下游靶基因的表达分析

注:字母 a、b、c 表示显著性,不同字母表示差异具有统计学显著性;显著性检验为 Duncan's multiple range test,  $P < 0.05$ 。

在 *ssr1-2* 中表达量均显著下降,表明这些基因在接收到线粒体胁迫的逆向信号后表达下调;它们在 *sus3* 中表达量较 *ssr1-2* 显著升高,在 *sus3C* 中表达量较 *sus3* 又显著下降,表明这些基因在线粒体胁迫下的表达与 *AtNDX* 的表达量呈显著的负相关。

图 7 表明:与野生型 WS 相比,受 *AtNDX* 正调控的 7 个候选基因在 *ssr1-2* 中表达量均显著升高,表明这些基因在接收到线粒体胁迫的逆向信号后表达上调;它们在 *sus3* 中表达量较 *ssr1-2* 显著降低,在 *sus3C* 中表达量较 *sus3* 又显著升高,表明这些基因在线粒体胁迫下的表达与 *AtNDX* 的表达量呈

显著的正相关。综上所述,本文筛选到的这 15 个基因均为 *AtNDX* 的潜在下游靶基因,其中 8 个基因的表达受线粒体逆向信号抑制,同时受 *AtNDX* 的负调控;7 个基因受线粒体逆向信号诱导表达,同时受 *AtNDX* 的正调控。这些基因同时受线粒体逆向信号和 *AtNDX* 的调控,并在植物生长发育和细胞代谢中起重要作用,表明 *AtNDX* 参与线粒体逆向信号的响应和植物生长发育调节。在此基础上进一步研究 *AtNDX* 对靶基因的调控作用及其参与调控根部发育的分子机制,有助于深入解析植物线粒体在平衡生长发育和胁迫响应中的作用。

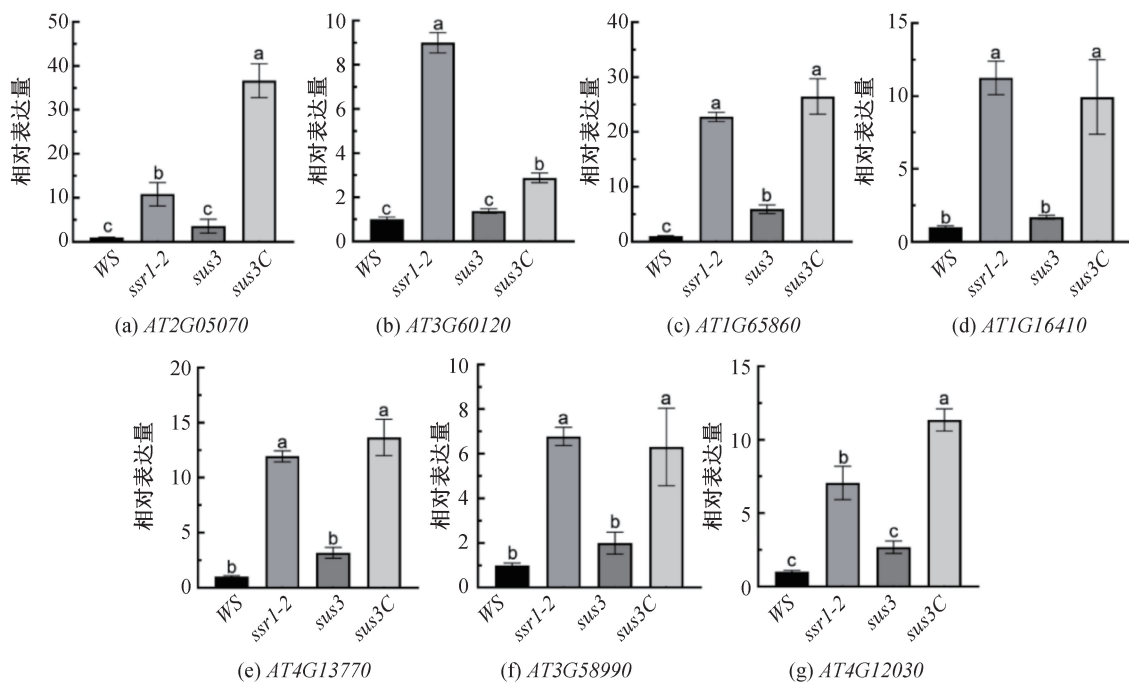


图 7 *ssr1-2* 背景下受 *AtNDX* 正调控的潜在下游靶基因的表达分析

注:字母 a、b、c 表示显著性,不同字母表示差异具有统计学显著性;显著性检验为 Duncan's multiple range test,  $P < 0.05$ 。

### 3 结论

本文通过对拟南芥 *Wassilewskija* (WS) 野生型、*SSR1* 基因突变体 (*ssr1-2*)、*ssr1-2* 抑制子 (*sus3*) 和 *sus3* 回补株系 (*sus3C*) 根部的转录组分析,筛选 *ssr1-2* 背景下 *AtNDX* 的潜在下游靶基因并利用实时荧光定量 PCR 进行验证,主要结论如下:

a) 样品间高通量测序数据重复性好, *ssr1-2* 与 *sus3C* 之间差异表达基因相关性高,表明 *sus3C* 互补了 *sus3* 抑制子突变造成的影响。

b) 筛选到线粒体胁迫下受 *AtNDX* 调控的基因 466 个,其中 288 个受 *AtNDX* 负调控,178 个受 *AtNDX* 正调控。

c) 荧光定量 PCR 验证了 15 个 *AtNDX* 调控的

潜在下游靶基因,其中 8 个基因受线粒体逆向信号抑制,同时受 *AtNDX* 的负调控;7 个基因受线粒体逆向信号诱导,并受 *AtNDX* 的正调控。

### 参考文献:

- [1] Noctor G, Paeppe R D, Foyer C H. Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants[J]. Trends in Plant Science, 2007, 12 (3): 125-134.
- [2] Sweetlove L J, Fait A, Nunes-Nesi A, et al. The mitochondrion: An integration point of cellular metabolism and signalling[J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2007, 26(1): 17-43.
- [3] Millar A H, Whelan J, Soole K L, et al. Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2011, 62: 79-104.

- [4] Cagin U, Enriquez J A. The complex crosstalk between mitochondria and the nucleus; What goes in between[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2015, 63: 10-15.
- [5] Wang Y, Selinski J, Mao C, et al. Linking mitochondrial and chloroplast retrograde signalling in plants [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B. Biological Sciences, 2020, 375(1801): 20190410.
- [6] Jones A W E, Yao Z, Vicencio J M, et al. PGC-1 family coactivators and cell fate; roles in cancer, neurodegeneration, cardiovascular disease and retrograde mitochondria-nucleus signalling[J]. Mitochondrion, 2012, 12(1): 86-99.
- [7] Granat L, Hunt R J, Bateman J M. Mitochondrial retrograde signalling in neurological disease[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B. Biological Sciences, 2020, 375(1801): 20190415.
- [8] Ng S, Giraud E, Duncan O, et al. Cyclin-dependent kinase E1 (CDKE1) provides a cellular switch in plants between growth and stress responses[J]. Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(5): 3449-3459.
- [9] Blanco N E, Guinea-Diaz M, Whelan J, et al. Interaction between plastid and mitochondrial retrograde signalling pathways during changes to plastid redox status [J]. Philosophical transactions of the Royal Society of London. B. Biological Sciences, 2014, 369(1640): 20130231.
- [10] Giraud E, Van Aken O, Ho L H M, et al. The transcription factor ABI4 is a regulator of mitochondrial retrograde expression of alternative oxidase 1a [J]. Plant Physiology, 2009, 150(3): 1286-1296.
- [11] Zhang X, Ivanova A, Vandepoele K, et al. The transcription factor MYB29 is a regulator of alternative oxidase 1a[J]. Plant Physiology, 2017, 173(3): 1824-1843.
- [12] Vanderauwera S, Vandenbroucke K, Inzé A, et al. AtWRKY15 perturbation abolishes the mitochondrial stress response that steers osmotic stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(49): 20113-20118.
- [13] 蔡圆圆, 夏季奔奔, 应文涵, 等. 拟南芥线粒体蛋白突变体 *ssr1-2* 表型的详细鉴定与分析[J]. 植物研究, 2023, 43(3): 421-431.
- [14] Zhang M, Wang C, Lin Q, et al. A tetratricopeptide repeat domain-containing protein SSR1 located in mitochondria is involved in root development and auxin polar transport in *Arabidopsis* [J]. Plant Journal, 2015, 83(4): 582-599.
- [15] Han H L, Liu J, Feng X J, et al. SSR1 is involved in maintaining the function of mitochondria electron transport chain and iron homeostasis upon proline treatment in *Arabidopsis* [J]. Journal of Plant Physiology, 2021, 256: 153325.
- [16] Feng X, Hu Y, Xie T, et al. Plant-specific cochaperone SSR1 affects root elongation by modulating the mitochondrial iron-sulfur cluster assembly machinery[J]. PLoS Genetics, 2025, 21(2): e1011597.
- [17] Wang Y, Henriksson E, Söderman E, et al. The *Arabidopsis* homeobox gene, *ATHB16*, regulates leaf development and the sensitivity to photoperiod in *Arabidopsis* [J]. Developmental Biology, 2003, 264(1): 228-239.
- [18] Venglat S P, Dumonceaux T, Rozwadowski K, et al. The homeobox gene *BREVIPEDICELLUS* is a key regulator of inflorescence architecture in *Arabidopsis* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(7): 4730-4735.
- [19] Shu Y, Tao Y, Wang S, et al. GmsSBH1, A homeobox transcription factor gene, relates to growth and development and involves in response to high temperature and humidity stress in soybean[J]. Plant Cell Reports, 2015, 34(11): 1927-1937.
- [20] Ejaz M, Bencivenga S, Tavares R, et al. *Arabidopsis Thaliana* HOMEBOX GENE 1 controls plant architecture by locally restricting environmental responses[J]. Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America, 2021, 118(17): e2018615118.
- [21] Sun Q, Csorba T, Skourti-Stathaki K, et al. R-loop stabilization represses antisense transcription at the *Arabidopsis FLC* locus[J]. Science, 2013, 340(6132): 619-621.
- [22] Zhu Y, Hu X, Duan Y, et al. The *Arabidopsis* nodulin homeobox factor *AtNDX* interacts with *AtRING1A/B* and negatively regulates abscisic acid signaling[J]. The Plant Cell, 2020, 32(3): 703-721.
- [23] Karányi Z, Mosolygó-L Á, Feró O, et al. NODULIN HOMEBOX is required for heterochromatin homeostasis in *Arabidopsis* [J]. Nature Communications, 2022, 13(1): 5058.
- [24] Chae H S, Faure F, Kieber J J. The *eto1*, *eto2*, and *eto3* mutations and cytokinin treatment increase ethylene biosynthesis in *Arabidopsis* by increasing the stability of ACS protein[J]. The Plant Cell, 2003, 15(2): 545-559.
- [25] Šola K, Gilchrist E J, Ropartz D, et al. RUBY, a putative galactose oxidase, influences pectin properties and promotes cell-to-cell adhesion in the seed coat epidermis of *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2019, 31(4): 809-831.
- [26] Reintanz B, Lehnen M, Reichelt M, et al. Bus, a bushy *Arabidopsis CYP79F1* knockout mutant with abolished synthesis of short-chain aliphatic glucosinolates[J]. The Plant Cell, 2001, 13(2): 351-367.