

doi: 103969/j.issn.0490-6756.2016.11.037

细胞自噬在植物应答盐胁迫中的作用研究

朱峰^{1,2}, 简伟¹, 邓星光¹, 林宏辉¹

(1. 四川大学生命科学学院, 成都 610064; 2. 扬州大学园艺与植物保护学院, 扬州 225009)

摘要: 本研究以模式植物拟南芥为材料, 利用生理学和遗传学手段分析了盐胁迫下细胞自噬基因和活性氧(ROS)变化的相关性. 结果表明野生型拟南芥 Col-0 在遭受盐胁迫处理 3d 表现了叶片漂白的症状并且会诱导 ROS 的产生和积累了大量的细胞死亡. 荧光定量 PCR 实验表明盐胁迫会诱导细胞自噬相关基因的表达, 细胞自噬参与了调控植物的防御机制来响应盐胁迫. 进一步的实验表明拟南芥细胞自噬突变体 *atg 2* 和 *atg 5* 在遭受盐胁迫处理 3d 表现了更加严重的叶片漂白症状并且积累大量的细胞死亡和 ROS. 初步表明细胞自噬主要是通过调控 ROS 的产生来应答盐胁迫.

关键词: 细胞自噬; 活性氧; 盐胁迫; 拟南芥

中图分类号: Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2016)06-1403-06

Study the effect of autophagy in plants response to salt stress

ZHU Feng², JIAN Wei¹, DENG Xing-Guang¹, LIN Hong-Hui¹

(1. College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China;

2. College of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: In this study, the relationship between autophagy related genes and reactive oxygen species (ROS) production was analyzed using physiological and genetic methods in model plant *Arabidopsis*. The results suggest that the leaves were photo-bleached, ROS production was induced and abundant cell death was accumulated in *Arabidopsis* wild-type Col-0 seedlings after 3 days salt stress. Quantitative real-time PCR analysis indicated that the expression of autophagy related genes were induced during salt stress. Autophagy participate in regulation defense mechanism in response to salt stress. Further studies suggest that the leaves were seriously photo-bleached, abundant cell death and ROS were accumulated in two *Arabidopsis* autophagy mutant seedlings (*atg 2* and *atg 5*) after 3 days salt stress. The results suggest that autophagy primarily regulate the ROS production in response to salt stress.

Keywords: Autophagy; Reactive oxygen species (ROS); Salt stress; *Arabidopsis*

1 引言

植物在生长发育过程中经常会遭受到营养缺乏等环境胁迫, 细胞内完善的蛋白降解机制对于维持细胞稳态和应答环境胁迫是必要的. 植物体内主

要有两条蛋白降解途径, 一条是通过泛素/26S蛋白酶体途径对细胞内一些短周期的、或结构异常的蛋白进行特异性的降解^[1]; 另外一条主要是通过细胞自噬途径降解蛋白, 它能够对细胞内长寿命的蛋白或者功能异常的细胞器进行大批量的降解, 其降

收稿日期: 2015-12-01

基金项目: 国家自然科学基金(91417305, 31470342, 31500209); 国家重点基础研究发展计划(973计划)(2015CB150100)

作者简介: 朱峰(1985-), 男, 博士, 讲师, 主要研究方向为植物病理与分子生物学. E-mail: zhufeng@yzu.edu.cn

通讯作者: 林宏辉. E-mail: hhl@scu.edu.cn

解蛋白的效率远远高于泛素/蛋白酶体途径. 细胞自噬是指细胞分解细胞质等自身构成成分的现象. 首先一些异常蛋白或细胞器被双层膜结构的自噬小泡包裹后送至液泡中进行降解^[2]. 细胞自噬主要有 3 种形式, 巨自噬 (macroautophagy), 微自噬 (microautophagy), 分子伴侣介导的自噬 (chaperone-mediated autophagy)^[3]. 细胞自噬在各种生命活动中发挥着重要作用, 比如它可以加速细胞内的新陈代谢, 或者在细胞处于饥饿状态时从分解产物中获得能量. 在动物研究中, 虽然大多数研究成果证明细胞自噬是细胞生存的负调控因子, 但是人们已经开始认识到细胞自噬也是细胞的一种生存策略^[4]. 在植物中, 细胞自噬与植物度过营养危机和叶子的衰老有关^[4]. 最近的研究发现, 细胞自噬可以清除氧胁迫下细胞内被氧化的蛋白^[5].

研究表明植物细胞自噬在应答非生物胁迫起着非常关键的作用^[6-9]. 例如一些非生物胁迫会诱导细胞自噬的发生, 从而调控相应生理生化机制来抵抗相关胁迫^[9]. 有研究表明活性氧 (ROS) 可能参与介导诱导细胞自噬应答非生物胁迫^[5,8]. 但也有研究表明 ROS 可能没有参与介导诱导细胞自噬应答非生物胁迫^[6]. 盐胁迫是限制粮食产量和物种分布的一个十分重要的因子. 它可以影响植物一系列的生理过程, 从种子萌发到植物发育^[10-16]. 另外, 盐胁迫主要影响植物的光合作用, 以及光合反应途径上的代谢过程^[14-16]. 在盐胁迫条件下, 降低叶绿体基质容量、诱导产生 ROS, 都被认为是抑制光合作用的关键因素. 因此本研究拟开展探讨细胞自噬调控 ROS 的积累来应答盐胁迫的机制.

2 材料与方法

2.1 材料

野生型拟南芥 (Col-0) 和细胞自噬突变体 *atg 2* 和 *atg 5* 种子购置拟南芥生物资源中心 (Arabidopsis Biological Resource Center).

2.2 方法

2.2.1 生长条件 种子播种在营养土中, 浇灌适当的水分, 然后放于温室中培养. 其中温室中的培养条件为: 温度 25℃, 光照时间 16h, 黑暗时间 8h, 光照强度 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. 待培养 3~4w 出现 4~5 片真叶后, 选择长势大体一致的幼苗备用.

2.2.2 盐胁迫处理 对上述三种拟南芥 Col、*atg 2* 和 *atg 5* 进行盐胁迫处理. 将拟南芥幼苗放入 160 mM 的 NaCl 溶液中, 分别处理 3d 和 5d.

2.2.3 活性氧染色 通过 NBT 和 DAB 染色分别对超氧离子和过氧化氢进行检测. 具体可参考 Zhu 等人^[17]的方法.

2.2.4 电导率的测定 电导率表示水的导电性即水的电阻的倒数, 通常用它来表示水的纯净度. 具体可参考 Cao 等人^[18]的方法.

2.2.5 RNA 提取和荧光定量 PCR 检测 选取拟南芥幼苗提取总 RNA^[19]. 荧光定量 PCR 扩增使用 TaKaRa 公司的 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒, 每个循环扩增的目的基因片段通过 SYBR-green I 荧光来检测, Ct 值用于检测目标基因的起始拷贝数, 目标基因的相对含量通过相对 Ct 值来表示, 每组试验重复三次. *Actin* 基因作为内参基因. 荧光定量 PCR 反应引物序列见表 1.

表 1 荧光定量 PCR 引物

Tab. 1 Primers used for Real-time PCR analysis

ATG2	At3G19190	AATGTAATGGTAACGCCTCC	TGACTGCGAAACCTTGT
ATG5	At5g17290	AGAACCCGAAAGACCA	CTCAACAGGGCGATTA
ATG8	AT4G21980	GGCAAGGATGAGTGAA	AACCCAAAGGAAAGA
ATG18a	AT3G62770	AGGGTGTGGTTCTATG	TGGACCGTTCCTTTGT
<i>Actin</i>	At2g37620	CATCAGGAAGGACTGTACGG	GATGGACCTGACTCGTCATAC

3 结果与分析

3.1 盐胁迫对拟南芥表型及生理的影响

植物在遭受到非生物胁迫如干旱胁迫、冷胁迫、盐胁迫等就会改变自身的生理生化反应, 启动相应的防御机制来抵抗这些非生物胁迫. 我们利用

160 mM 的 NaCl 溶液处理 Col-0 幼苗 3 天, 使用蒸馏水作为对照. 结果显示 NaCl 溶液处理后, 与对照相比 Col-0 表现出了胁迫的症状, 叶片有明显的漂白现象 (图 1A). 电导率检测结果显示用 NaCl 溶液处理的 Col-0 中电导率的含量是对照组的 2.29 倍 (图 1B). 这些结果表明 Col-0 在遭受盐胁迫

胁迫处理后积累了大量的死亡细胞. 植物在遭受到非生物胁迫会诱导活性氧(ROS)来应答这些非生物胁迫. ROS是一种重要的信号分子,在调节植物应答非生物胁迫的防御反应起着非常重要的作用. 为了分析这一过程是否有 ROS 的参与,分别利用 NBT 和 DAB 染色检测盐胁迫处理的 Col-0 叶片

中 ROS 的变化. NBT 染色显示 NaCl 溶液处理的 Col-0 中超氧离子的含量显著升高(图 1C). 同样 DAB 染色显示 NaCl 溶液处理的 Col-0 中过氧化氢的含量显著升高(图 1D). 以上结果显示 Col-0 在遭受盐胁迫处理后会诱导 ROS 的产生.

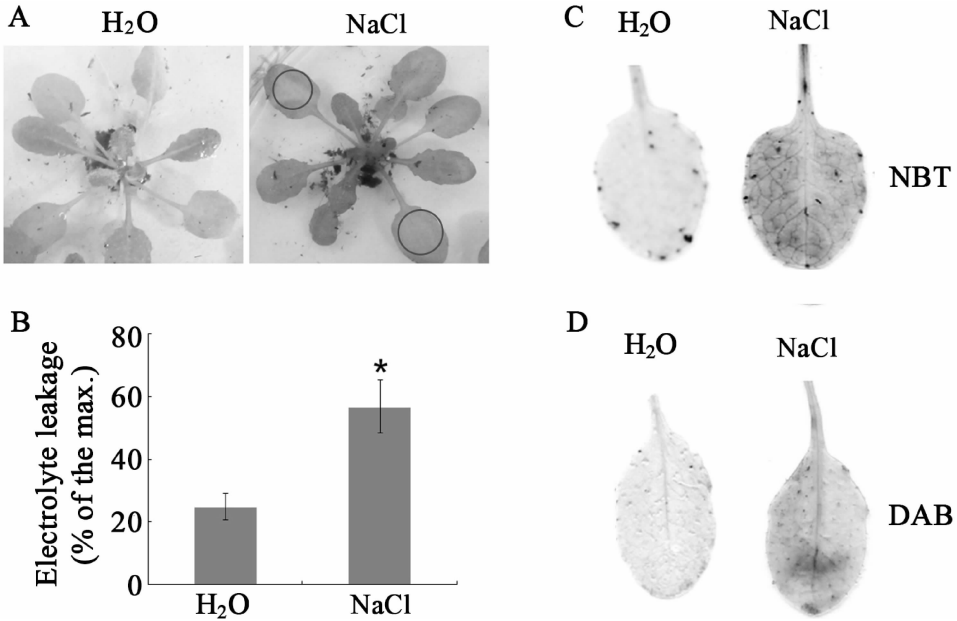


图 1 NaCl 胁迫对拟南芥 Col-0 幼苗的表型及生理的影响

A. 盐胁迫对 Col-0 表型的影响; B. 盐胁迫对 Col-0 电导率的影响, * 表示差异显著($P < 0.05$); C. NBT 染色; D. DAB 染色
Fig. 1 Effect of salt stress on the phenotype and physiological change of Arabidopsis Col-0 seedlings

3.2 盐胁迫诱导细胞自噬基因的表达

已有的研究表明植物细胞自噬在应答非生物胁迫起着非常关键的作用^[6,7]. 为了探究植物细胞自噬相关基因是否参与盐胁迫应答,我们利用荧光定量 PCR 的方法检测了 ATG2, ATG5, ATG8, ATG18a 基因的表达量,结果如图 2 所示盐胁迫处理后,Col-0 中的细胞自噬相关基因的表达被诱导(图 2). 其中盐胁迫处理 3d 后 ATG2, ATG5, ATG8, ATG18a 基因的表达量分别是对照组的 2.2、1.9、2.7、2.8 倍,盐胁迫处理 5 天后 ATG2, ATG5, ATG8, ATG18a 基因的表达量分别是对照组的 4.1、4.2、5.2、5.9 倍(图 2). 这一结果说明盐胁迫能诱导细胞自噬基因的表达.

3.3 盐胁迫对拟南芥细胞自噬突变体的表型及生理的影响

为了进一步探讨细胞自噬是怎样调控植物的防御机制来响应盐胁迫,我们利用 160 mM 的 NaCl 溶液处理拟南芥细胞自噬突变体 *atg 2* 和 *atg 5*. 结果表明这三种拟南芥在遭受盐胁迫处理

后都表现出了胁迫症状,叶片有不同程度的漂白现象(图 3A) *atg 2* 和 *atg 5* 突变体在经过盐胁迫处理后表现出更加严重的胁迫症状,叶片的漂白现象更加严重(图 3A). 这就说明了细胞自噬突变体对于盐胁迫的抗性明显减弱,缺少细胞自噬相关基因就会使植物对盐胁迫变得更加敏感. 然后我们检测了这三种拟南芥在遭受盐胁迫后电导率的变化. 结果表明这三种拟南芥在遭受盐胁迫处理后电导率的含量都有所升高(图 3B). *atg 2* 和 *atg 5* 在经过盐胁迫处理后电导率的含量比 Col-0 中更高(图 3B). 说明了 *atg 2* 和 *atg 5* 在经过盐胁迫处理后积累了更多的细胞死亡,展示了更加严重的胁迫症状.

3.4 细胞自噬突变体在遭受盐胁迫处理后活性氧的变化

利用 160 mM 的 NaCl 溶液处理 Col-0、*atg 2* 和 *atg 5* 幼苗 3d,检测这三种拟南芥的 ROS 的变化. NBT 染色显示这三种拟南芥在遭受盐胁迫处理后超氧离子的含量都有所升高(图 4). 与 Col-0 相比, *atg 2* 和 *atg 5* 在经过盐胁迫处理后超氧

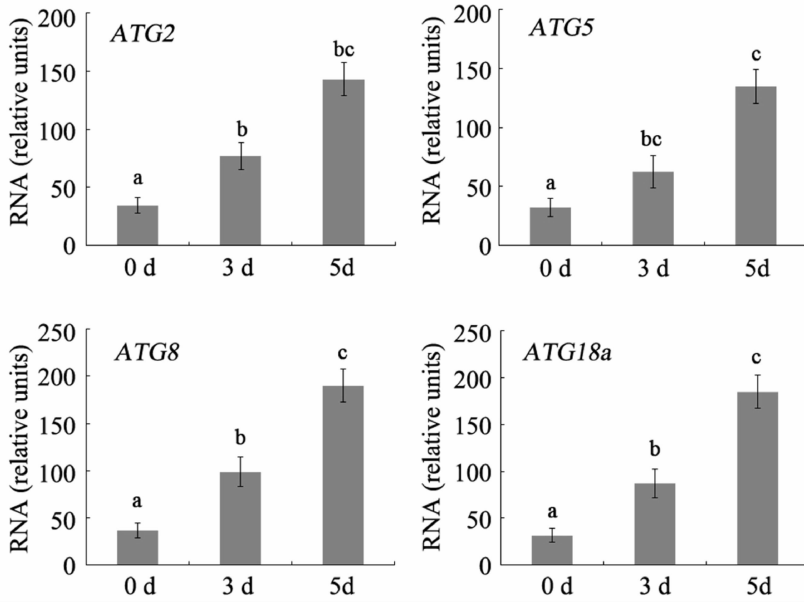


图 2 荧光定量 PCR 检测盐胁迫下细胞自噬相关基因 *ATG2*, *ATG5*, *ATG8*, *ATG18a* 的表达
不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)
Fig. 2 Quantitative real-time PCR analysis the expression of autophagy related genes *ATG2*, *ATG5*, *ATG8*, *ATG18a* during salt stress

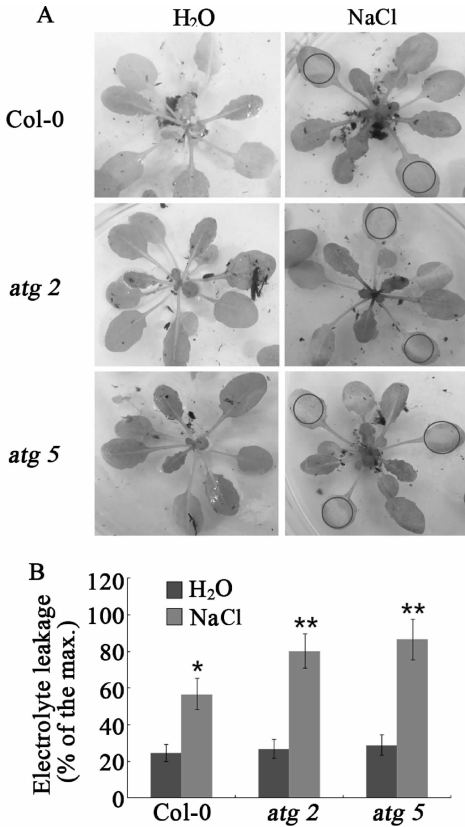


图 3 盐胁迫对拟南芥细胞自噬突变体的表型(A)及电导率(B)的影响
*表示差异显著 ($P < 0.05$); **表示差异极显著 ($P < 0.01$)
Fig. 3 Effect of salt stress on the phenotype (A) and electrolyte leakage (B) of Arabidopsis autophagy mutant seedlings *atg 2* and *atg 5*

离子的含量显著升高(图 4). 同样 DAB 染色表明这三种拟南芥在遭受盐胁迫处理后过氧化氢的含量都有所升高(图 4). *atg 2* 和 *atg 5* 在经过盐胁迫处理后过氧化氢的含量比 Col-0 经过盐胁迫处理后更高(图 4). 综上所述,我们的结果表明了植物缺少细胞自噬在遭受盐胁迫处理后会积累大量的 ROS,表现了严重的胁迫症状,抗性显著减弱. 说明了细胞自噬可以调控植物的 ROS 的产生来应答盐胁迫.

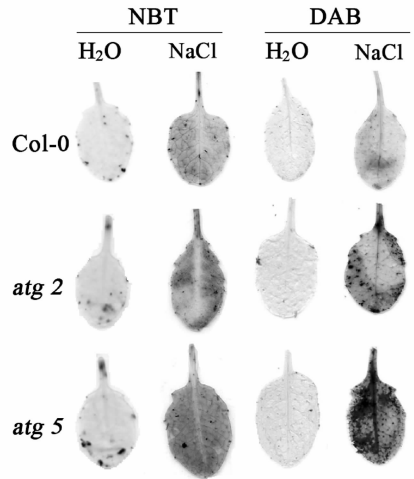


图 4 盐胁迫对拟南芥细胞自噬突变体的活性氧积累的影响
Fig. 4 Effect of salt stress on the ROS accumulation of Arabidopsis autophagy mutant seedlings *atg 2* and *atg 5*

4 讨论

植物在遭受到非生物胁迫如干旱胁迫、冷胁迫、盐胁迫等就会改变自身的生理生化反应,启动相应的防御机制来抵抗这些非生物胁迫^[20].我们的结果表明了拟南芥在遭受盐胁迫处理后表现了胁迫症状,叶片有漂白现象.这说明了拟南芥在遭受到盐胁迫处理后可能改变了自身的生理生化反应,启动相应的防御机制来抵抗盐胁迫.另外通过检测电导率的含量发现拟南芥在遭受盐胁迫处理后电导率的含量上升,说明了植物在遭受盐胁迫处理后质膜通透性发生了改变,植物积累了大量的死亡细胞.植物在遭受到非生物胁迫会诱导 ROS 来应答这些非生物胁迫.ROS 是一种重要的信号分子,在调节植物应答非生物胁迫的防御反应起着非常重要的作用^[21-22].盐胁迫会造成细胞氧化损伤,造成 ROS 和氧化蛋白的积累^[23].我们的结果表明拟南芥在遭受盐胁迫处理后会诱导 ROS 的产生.

研究表明植物细胞自噬在应答非生物胁迫起着非常关键的作用^[24].例如一些非生物胁迫会诱导细胞自噬的发生,从而调控相应生理生化机制来抵抗相关胁迫.细胞自噬具有清除氧化蛋白、调控 ROS 水平的作用,细胞自噬很可能与高盐胁迫应答有关.之前有报道某些 ATG 基因,如拟南芥 *AtATG8* 和水稻 *O_sATG10b* 基因参与到盐胁迫的反应当中^[7,9].植物遭受氧化胁迫后,细胞自噬可以降解液泡中的被氧化的蛋白,将拟南芥细胞自噬相关基因 *AtATG18a* 沉默后,植物降解氧化蛋白的能力就减弱了^[5,8].Bassham 等人研究细胞自噬在氧化胁迫中的作用,发现高盐和渗透胁迫可以激活细胞自噬,*AtATG18a* 的表达也会被诱导上升.细胞自噬缺陷的 *AtATG18a* RNAi 植株对这两种胁迫变得敏感^[6].我们的结果表明了盐胁迫处理会诱导细胞自噬的发生,从而调控相应生理生化机制来抵抗盐胁迫,细胞自噬参与了调控植物的防御机制来响应盐胁迫.我们的结果进一步表明了细胞自噬在调控植物的防御机制来响应盐胁迫与调控 ROS 的产生有关.细胞自噬突变体在经过盐胁迫处理后表现更加严重的胁迫症状,叶片的漂白现象更加严重.这就说明了拟南芥细胞自噬突变体对于盐胁迫的抗性显著减弱.缺少细胞自噬植物的抗性就会减弱,进一步说明了细胞自噬在植物应答盐胁迫响应起着非常重要的作用.通过电导率测量的实验表明了细胞自噬突变体在经过盐胁迫处理后积

累了更多的细胞死亡,展示了更加严重的胁迫症状.最后 ROS 检测实验表明了植物缺少细胞自噬在遭受盐胁迫处理后会积累大量的 ROS,表现了严重的胁迫症状,缺乏抗性.研究表明 *AtATG18a* RNAi 植株中氧化蛋白和 ROS 都高于野生型植株,这就暗示了细胞自噬可以降解氧化蛋白,负责细胞内自身产生的 ROS 胁迫^[8].还有研究也表明了细胞自噬可以调控细胞内 ROS 的产生,拟南芥细胞自噬突变体 *atg2*、*atg5* 中的 ROS 水平上升,证实了细胞自噬能够负调控体内 ROS 的产生^[25].综上所述我们的结果表明细胞自噬可能通过负调控植物的 ROS 的产生来应答盐胁迫.

参考文献:

- [1] Smalle J, Vierstra R D. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, 55: 555.
- [2] Klionsky D J, Emr S D. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation [J]. *Science*, 2000, 290: 1717.
- [3] Massey A, Kiffin R, Cuervo A M. Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36: 2420.
- [4] Bassham D C. Plant autophagy-more than a starvation response. *Curr Opin Plant Biol*, 2007, 10: 587.
- [5] Xiong Y, Contento A L, Nguyen P Q, *et al.* Degradation of oxidized proteins by autophagy during oxidative stress in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 2007, 143: 291.
- [6] Liu Y, Xiong Y, Bassham, D C. Autophagy is required for tolerance of drought and salt stress in plants [J]. *Autophagy*, 2009, 5: 954.
- [7] Slavikova S, Ufaz S, Avin-Wittenberg T, *et al.* An autophagy-associated Atg 8 protein is involved in the responses of Arabidopsis seedlings to hormonal controls and abiotic stresses [J]. 2008, *J Exp Bot*, 59: 4029.
- [8] Xiong Y, Contento A L, Bassham D C. Disruption of autophagy results in constitutive oxidative stress in Arabidopsis [J]. *Autophagy*, 2007, 3: 257.
- [9] Shin J H, Yoshimoto K, Ohsumi Y, *et al.* Os-ATG10b, an autophagosome component, is needed for cell survival against oxidative stresses in rice [J]. *Mol Cells*, 2009, 27: 67.
- [10] 黄立华, 梁正伟. 不同钠盐胁迫对高冰草种子萌发的影响[J]. *干旱区资源与环境*, 2007, 21: 173.

- [11] 王素平, 郭世荣, 李璟, 等. 盐胁迫对黄瓜幼苗根系生长和水分利用的影响[J]. 应用生态学报, 2006, 17: 1883.
- [12] 段九菊, 郭世荣, 康云艳, 等. 盐胁迫对黄瓜幼苗根系生长和多胺代谢的影响[J]. 应用生态学报, 2008, 19: 57.
- [13] Wang Y N, Zhang W S, Li K X, *et al.* Salt-induced plasticity of root hair development is caused by ion disequilibrium in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Res*, 2008, 121: 87.
- [14] 韩亚琦, 唐宇丹, 张少英, 等. 盐胁迫抑制制榭栎 2 变种光合作用的机理研究[J]. 西北植物学报, 2007, 27: 583.
- [15] 林莺, 李伟, 范海, 等. 海滨锦葵光合作用对盐胁迫的响应[J]. 山东师范大学学报, 2006, 21: 118.
- [16] Flexas J, Bota J, Galmés J, *et al.* Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress [J]. *Physiol Plant*, 2006, 127: 343.
- [17] Zhu F, Zhang P, Meng Y F, *et al.* Alpha-momorcharin, a RIP produced by bitter melon, enhances defense response in tobacco plants against diverse plant viruses and shows antifungal activity in vitro [J]. *Planta*, 2013, 237: 77.
- [18] Cao Y, Zhang Z W, Xue L W, *et al.* Lack of salicylic acid in *NahG* *Arabidopsis* protects plants against moderate salt stress [J]. *Z Naturforsch c*, 2009, 64: 231.
- [19] 孙炎锋, 吕东, 王丽, 等. 13-脂氧合酶在拟南芥叶片衰老中的作用分析[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2013, 50: 1391.
- [20] 滕中秋, 付卉青, 贾少华, 等. 邓玉林植物应答非生物胁迫的代谢组学研究进展[J]. 植物生态学报, 2011, 35: 110.
- [21] Wrzaczek M, Brosché M, Kangasjärvi J. ROS signaling loops—production, perception, regulation [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2013, 16: 575.
- [22] Baxter A, Mittler R, Suzuki N. ROS as key players in plant stress signaling [J]. *J Exp Bot*, 2014, 65: 1229.
- [23] Tsugane K, Kobayashi K, Niwa Y, *et al.* A recessive *Arabidopsis* mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification [J]. *Plant Cell*, 1999, 11: 1195.
- [24] 王燕, 刘玉乐. 细胞自噬研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2010, 32: 677.
- [25] Yoshimoto K, Jikumaru Y, Kamiya Y, *et al.* Autophagy negatively regulates cell death by controlling NPR1-dependent salicylic acid signaling during senescence and the innate immune response in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2009, 21: 2914.