

不同温度对苋菜光合特性及光合作用 相关基因表达的影响

郑友峰¹, 陈家兰¹, 肖 昉¹, 安子贤¹, 李宜轩¹, 赖钟雄¹, 牟建梅², 刘生财^{1,①}

(1. 福建农林大学园艺植物生物工程研究所, 福建 福州 350002; 2. 苏州市农业科学院, 江苏 苏州 215000)

摘要:以苋菜(*Amaranthus tricolor* Linn.)品种‘苏苋1号’(‘Suxian No. 1’)为试验材料,比较了不同温度[25℃(对照)、20℃、15℃和10℃]处理下苋菜株高以及叶片中甜菜色素含量、叶绿素含量和叶绿素荧光参数的变化,并探究了温度对苋菜光合特性及光合作用相关基因表达的影响。结果显示:处理3和6d的苋菜株高以及叶片中甜菜色素和叶绿素含量随着温度降低呈现降低的趋势,叶片的PS II最大光化学效率(F_v/F_m)、PS II实际光量子产额[$Y(II)$]、相对电子传递速率($rETR$)、非光化学淬灭系数(qN)和调节性能量耗散的量子产量[$Y(NPQ)$]总体呈现波动降低的趋势,非调节性能量耗散的量子产量[$Y(NO)$]呈现波动升高的趋势;其中,15℃和10℃处理下苋菜的株高以及叶片中甜菜色素和叶绿素含量极显著低于对照,10℃处理下叶片的 F_v/F_m 、 $Y(II)$ 、 $rETR$ 、 qN 和 $Y(NPQ)$ 值总体极显著低于对照, $Y(NO)$ 值则极显著高于对照。qRT-PCR结果显示:总体上看,苋菜叶片 *AtrPPCK*、*AtrPEPC*、*AtrMDH*、*AtrNADP-MDH*、*AtrNAD-ME*、*AtrNADP-ME* 和 *AtrPPDK* 基因的相对表达量在多数温度下处理3和6d与对照有显著差异;温度较低(10℃)会抑制除了 *AtrPPCK* 基因外的其他基因的表达,随着处理时间延长,基因相对表达量略有回升。相关性分析结果显示:温度与处理3和6d苋菜的株高以及叶片中甜菜色素含量、叶绿素含量和多数叶绿素荧光参数呈极显著或显著相关。综合分析结果显示:低温会降低苋菜的叶绿素含量,破坏光合系统,抑制光合作用相关基因的表达,从而降低甜菜色素含量,抑制苋菜生长。

关键词: 苋菜; 温度; 甜菜色素含量; 光合特性; 光合作用相关基因

中图分类号: Q945.78; Q948.11; S636.4 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2022)05-0050-08
DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2022.05.06

Effects of different temperatures on photosynthetic characteristics and expression of photosynthesis-related genes in *Amaranthus tricolor* ZHENG Youfeng¹, CHEN Jialan¹, XIAO Fang¹, AN Zixian¹, LI Yixuan¹, LAI Zhongxiong¹, MOU Jianmei², LIU Shengcai^{1,①} (1. Institute of Horticultural Plant Bioengineering, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Suzhou Academy of Agricultural Sciences, Suzhou 215000, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2022, 31(5): 50-57

Abstract: Taking cultivar ‘Suxian No. 1’ of *Amaranthus tricolor* Linn. as test material, variations of plant height and betalain content, chlorophyll content, and chlorophyll fluorescence parameters of leaf of *A. tricolor* under different temperature [25℃ (the control), 20℃, 15℃, and 10℃] treatments were compared, and effects of temperature on photosynthetic characteristics and photosynthesis-related genes were investigated. The results show that plant height and contents of betalain and chlorophyll in leaf of *A. tricolor* treated for 3 and 6 d show a tendency to decrease with the decrease of temperature, maximum photochemical efficiency of PS II (F_v/F_m), effective quantum yield of PS II [$Y(II)$], relative electron

收稿日期: 2022-01-10

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(2018J01700); 福建农林大学经济作物种业工程服务队项目(11899170125)

作者简介: 郑友峰(1995—),男,福建宁德人,硕士研究生,主要从事设施园艺生产理论与技术的研究。

①通信作者 E-mail: 1215698900@qq.com

引用格式: 郑友峰, 陈家兰, 肖 昉, 等. 不同温度对苋菜光合特性及光合作用相关基因表达的影响[J]. 植物资源与环境学报, 2022, 31(5): 50-57.

transport rate ($rETR$), nonphotochemical quenching coefficient (qN), and quantum yield of regulated energy dissipation [$Y(NPQ)$] of leaf show a fluctuation decrease tendency in general, and quantum yield of non-regulated energy dissipation [$Y(NO)$] shows a fluctuation increase tendency; in which, plant height and contents of betalain and chlorophyll in leaf of *A. tricolor* under 15 °C and 10 °C treatments are extremely significantly lower than those of the control, F_v/F_m , $Y(II)$, $rETR$, qN , and $Y(NPQ)$ values of leaf under 10 °C treatment are extremely significantly lower than those of the control, while $Y(NO)$ value is extremely significantly higher than that of the control. The qRT-PCR result shows that the relative expression levels of *AtrPPCK*, *AtrPEPC*, *AtrMDH*, *AtrNADP-MDH*, *AtrNAD-ME*, and *AtrNADP-ME*, and *AtrPPDK* genes in leaf of *A. tricolor* under most temperature treatments for 3 and 6 d are significantly different from those of the control in general; relatively low temperature (10 °C) can suppress expression of all genes except *AtrPPCK* gene, and with the elongation of treatment time, relative expression levels of genes slightly elevate. The correlation analysis result shows that temperature shows extremely significant or significant correlations with plant height, contents of betalain and chlorophyll, and most chlorophyll fluorescence parameters of leaf of *A. tricolor* treated for 3 and 6 d. The comprehensive analysis result shows that low temperature will decrease the chlorophyll content of *A. tricolor*, impair the photosynthetic system, suppress the expression of photosynthesis-related genes, and thus decrease the betalain content and inhibit the growth of *A. tricolor*.

Key words: *Amaranthus tricolor* Linn.; temperature; betalain content; photosynthetic characteristics; photosynthesis-related gene

苋菜 (*Amaranthus tricolor* Linn.) 为苋科 (Amaranthaceae) 苋属 (*Amaranthus* Linn.) 一年生 C_4 草本植物, 耐热不耐寒, 主要次生代谢产物甜菜色素具有较高的营养价值和药用价值^[1,2]。苋菜生长的适宜温度为 23 °C ~ 27 °C, 20 °C 以下生长缓慢, 10 °C 以下种子发芽困难^[3]。

温度是影响植物生长和次生代谢产物合成的重要因素。低温胁迫使植物基因表达水平和细胞结构改变, 物质交换减少, 水分代谢失调, 叶片萎蔫, 严重的可导致植株死亡^[4-6]。植物光合作用对温度变化较为敏感, 低温导致植物叶绿素合成减少, 光合作用受到抑制, 从而影响植物生长发育^[7,8]。例如: 低温胁迫下小麦 (*Triticum aestivum* Linn.) 和玉米 (*Zea mays* Linn.) 的叶绿素荧光参数下降, 叶绿素含量降低, 光合作用减弱^[9,10]。高粱 [*Sorghum bicolor* (Linn.) Moench] 通过光合作用相关基因的下调表达来响应叶绿素荧光参数及叶绿素含量的下降^[11]。

目前, 关于温度对苋菜影响的研究主要在种子萌发和组培苗生长方面^[12,13], 对于温度调控苋菜光合作用的机制尚不明确, 研究通过控制温度提高苋菜的光合作用, 进而增加苋菜的产量及甜菜色素的含量, 对于指导苋菜的栽培和生产具有重要的意义。鉴于此, 本试验以苋菜品种‘苏苋1号’ (‘Suxian No. 1’) 为材料, 研究不同温度处理对苋菜株高、甜菜色素含量、叶绿素含量、叶绿素荧光参数和光合作用相关基

因表达的影响, 探究温度调控苋菜光合作用的机制, 以为温度调控苋菜生长提供一定的理论参考。

1 材料和方法

1.1 材料

试验材料为苋菜品种‘苏苋1号’种子, 由苏州市农业科学院提供; 试验基质为泥炭土, 由潍坊达轩商贸有限公司提供。将饱满的种子播撒于直径 12 cm 的盆中, 每盆 30 粒, 共 40 盆。置于恒温培养室中, 光照强度 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、光照时间 $16 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 、温度 $(25 \pm 1) \text{ } ^\circ\text{C}$, 间苗后每盆留 7 或 8 株培养至三叶一心。将材料随机分 4 组, 转入不同温度 [$25 \text{ } ^\circ\text{C}$ (对照)、 $20 \text{ } ^\circ\text{C}$ 、 $15 \text{ } ^\circ\text{C}$ 、 $10 \text{ } ^\circ\text{C}$] 的恒温光照培养箱中, 光照强度 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、光照时间 $16 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 。在不同温度下处理 3 和 6 d 后, 分为 2 组。一组进行暗处理, 用于叶绿素荧光参数测定; 另一组每种处理随机取 10 株苋菜成熟叶片约 5 g, 混合后从中取 30 份, 每份 0.1 g。取 3 份叶片用于叶绿素含量测定, 其余叶片液氮预冷后放于 $-80 \text{ } ^\circ\text{C}$ 保存、备用。

1.2 方法

1.2.1 株高的测定 采用直尺 (精度 0.1 cm) 测量苋菜株高 (根部至顶端第 1 枚叶片叶柄间的距离), 每个处理测量 30 株, 结果取平均值。

1.2.2 甜菜色素含量的测定 参照王晓^[14]的方法提

取甜菜色素,取3份0.1 g 苋菜叶片用液氮磨成粉末,按料液比($m:V$)1:30加入无水乙醇,4℃静置30 min,8 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 室温离心10 min,弃上清液,再按料液比($m:V$)1:30加入双蒸水,4℃静置30 min,8 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 室温离心10 min,取上清液,用UV-900紫外可见分光光度计(上海元析仪器有限公司)在波长538 nm处测定甜菜红素的吸光值,在波长465 nm处测定甜菜黄素的吸光值,并根据文献[14]中的方法计算甜菜黄素和甜菜红素的含量。

1.2.3 叶绿素含量和叶绿素荧光参数的测定 参考张秀君等^[15]的方法提取叶绿素,取3份0.1 g 苋菜叶片置于10 mL体积分数95%乙醇中浸泡24 h,取上清液,用UV-900紫外可见分光光度计分别在波长665和649 nm处测定叶绿素的吸光值,并根据文献[15]中的方法计算叶绿素a和叶绿素b的含量。

不同处理的苋菜植株暗处理0.5 h后,每盆选择高度一致、部位相同的苋菜叶片1枚,在黑暗环境下,利用IMAGING-PAM叶绿素荧光成像系统(德国Walz公司)测定苋菜叶片的PS II最大光化学效率(F_v/F_m)、非调节性能量耗散的量子产量 $[Y(NO)]$ 、PS II实际光量子产额 $[Y(II)]$ 、相对电子传递速率($rETR$)、非光化学淬灭系数(qN)和调节性能量耗散的量子产量 $[Y(NPQ)]$ 6个叶绿素荧光参数。每个处理3盆(即3次重复)。

1.2.4 qRT-PCR 用天漠植物RNA提取试剂盒(北京天漠科技开发公司)提取叶片RNA;用Hifair[®] III 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR逆转录试剂盒(上海翊圣生物科技有限公司)进行反转录;参照Hieff[®] qPCR SYBR[®] Gree Master Mix试剂盒(上海翊圣生物科技有限公司)进行混样。qRT-PCR扩增程序为:95℃预变性30 s;95℃变性30 s、59℃退火20 s、72℃延伸20 s,共45个循环。根据C_p值(crossing point)和溶解曲线检测结果的完整性。

根据苋菜转录组数据库(SRA登录号SSR924089-SSR924092)筛选出参与光合作用的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶激酶(PPCK)、磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)、苹果酸脱氢酶(MDH)、NAD-苹果酸脱氢酶(NAD-MDH)、NAD-苹果酸酶(NAD-ME)、NADP-苹果酸酶(NADP-ME)和丙酮酸磷酸双激酶(PPDK)的基因,通过NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)比对确定ORF区,用DNAMAN 9.0软件设计引物(表1),由福州博尚生物技术有限公司合成。

表1 用于苋菜基因表达的引物序列

Table 1 Primer sequences used for gene expression of *Amaranthus tricolor* Linn.

引物 Primer	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	退火温度/℃ Annealing temperature
RT-AtrMDH-F	GCATCAACCTCAAATCCAGA	59
RT-AtrMDH-R	TACAATCAGCAGCAACACCA	
RT-AtrNADP-ME-F	ACGTGTACGGTGAAGATTGT	56
RT-AtrNADP-ME-R	AGAAGACCCGCTAAATAGTG	
RT-AtrNADP-MDH-F	CTTCTGGGATTTGCTGTTCT	57
RT-AtrNADP-MDH-R	CGGTTGTCATCTTCTCCAT	
RT-AtrPPCK-F	CTCCTTCTTGACGACGATAT	55
RT-AtrPPCK-R	CGGAGGAAATTATACGGTCA	
RT-AtrNAD-ME-F	CTACTTCAGAAGGTCAATCGT	55
RT-AtrNAD-ME-R	CCTCAAGTCAGCCATAAATC	
RT-AtrPPDK-F	GTGAGACCCTTAGATCAGAT	58
RT-AtrPPDK-R	GAGACCAAAGCCATGACAGT	
RT-AtrPEPC-F	GATGCTTTGTTGCTTGATCG	59
RT-AtrPEPC-R	CAAGCTGGTTATCATGGTTC	
EF1a-F	GGGATGCTGGTATGGTGAA	59
EF1a-R	ACGGGTCATTTCTTCTTGAG	

1.3 数据统计和分析

使用EXCEL 2016进行数据统计;根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[16]计算基因相对表达量;使用SPSS 22.0软件,采用多重比较进行差异显著性分析,并进行Pearson相关性分析;使用Origin 2017软件绘图。

2 结果和分析

2.1 不同温度对苋菜株高的影响

不同温度对苋菜株高的影响见表2。结果显示:处理3和6 d的苋菜株高随着温度降低呈现降低的趋势。处理3 d, 15℃和10℃处理下的苋菜株高均

表2 不同温度对苋菜株高的影响($\bar{X} \pm SD$)

Table 2 Effect of different temperatures on plant height of *Amaranthus tricolor* Linn. ($\bar{X} \pm SD$)

温度/℃ Temperature	不同处理时间的株高/cm ¹⁾ Plant height at different treatment times ¹⁾	
	3 d	6 d
25(CK)	13.67±0.31Aa	15.40±0.30Aa
20	13.20±0.30ABab	14.10±0.36Bb
15	12.77±0.25BCbc	13.07±0.35Cc
10	12.30±0.26Cc	12.37±0.21Cd

¹⁾ 同列中不同大写和小写字母分别表示差异极显著($P < 0.01$)和显著($P < 0.05$) Different uppercases and lowercases in the same column indicate the extremely significant ($P < 0.01$) and significant ($P < 0.05$) differences, respectively.

极显著低于 25 °C (对照); 处理 6 d, 20 °C、15 °C 和 10 °C 处理下的苋菜株高均极显著低于对照。同一处理温度下, 处理 6 d 的苋菜株高均高于处理 3 d, 但随着温度降低, 幼苗生长逐渐受到抑制, 10 °C 处理下的苋菜植株已经基本停止生长。

2.2 不同温度对苋菜叶片中甜菜色素含量的影响

不同温度对苋菜叶片中甜菜色素含量的影响见表 3。结果显示: 处理 3 和 6 d 的苋菜叶片中甜菜色素 (甜菜红素和甜菜黄素) 含量随着温度降低呈现降低的趋势。处理 3 d, 20 °C 处理下叶片中甜菜黄素含量显著低于 25 °C (对照), 15 °C 和 10 °C 处理下叶片中甜菜色素含量均极显著低于对照; 处理 6 d, 20 °C 处理下叶片中甜菜红素含量极显著低于对照, 15 °C 和 10 °C 处理下叶片中甜菜色素含量均极显著低于对照。随着处理时间的延长, 不同温度处理下叶片中甜菜色素含量明显升高。

2.3 不同温度对苋菜叶片中叶绿素含量和叶绿素荧光参数的影响

不同温度对苋菜叶片中叶绿素含量的影响见表 4, 对苋菜叶片叶绿素荧光参数的影响见表 5。

结果 (表 4) 显示: 处理 3 和 6 d 的苋菜叶片中叶

绿素 (叶绿素 *a* 和叶绿素 *b*) 含量随着温度降低呈现降低的趋势, 且 15 °C 和 10 °C 处理下叶片中叶绿素含量总体极显著低于 25 °C (对照)。随着处理时间的延长, 15 °C 和 10 °C 处理下叶片中叶绿素含量明显降低。

结果 (表 5) 显示: 总体上看, 随着温度降低, 处理 3 和 6 d 的苋菜叶片的 PS II 最大光化学效率 (F_v/F_m)、PS II 实际光量子产额 [$Y(II)$]、相对电子传递速率 ($rETR$)、非光化学淬灭系数 (qN) 和调节性能量耗散的量子产量 [$Y(NPQ)$] 呈现波动降低的趋势, 非调节性能量耗散的量子产量 [$Y(NO)$] 呈现波动升高的趋势, 且 10 °C 处理下叶片的 F_v/F_m 、 $Y(II)$ 、 $rETR$ 、 qN 和 $Y(NPQ)$ 值极显著低于对照, $Y(NO)$ 值则极显著高于对照。随着处理时间的延长, 不同温度处理下叶片的叶绿素荧光参数变化不明显。

2.4 不同温度对苋菜叶片光合作用相关基因表达的影响

不同温度对苋菜叶片光合作用相关基因相对表达量的影响见表 6。结果显示: 总体上看, 随着温度降低, 处理 3 d 的苋菜叶片 *AtrPPCK* 基因的相对表达量呈现先降低后升高的趋势, *AtrPEPC* 和 *AtrNADP-*

表 3 不同温度对苋菜叶片中甜菜色素含量的影响 ($\bar{X} \pm SD$)¹⁾

Table 3 Effect of different temperatures on betalain content in leaf of *Amaranthus tricolor* Linn. ($\bar{X} \pm SD$)¹⁾

温度/°C Temperature	处理 3 d 的甜菜色素含量/(mg · g ⁻¹) Betalain content at treatment for 3 d		处理 6 d 的甜菜色素含量/(mg · g ⁻¹) Betalain content at treatment for 6 d	
	甜菜红素 Betacyanin	甜菜黄素 Betaxanthin	甜菜红素 Betacyanin	甜菜黄素 Betaxanthin
25 (CK)	0.522±0.022Aa	0.104±0.004Aa	0.587±0.008Aa	0.139±0.003Aa
20	0.514±0.019Aa	0.094±0.006Ab	0.536±0.012Bb	0.131±0.006Aa
15	0.439±0.002Bb	0.084±0.002Bc	0.483±0.019Cc	0.116±0.005Bb
10	0.391±0.002Cc	0.076±0.002Bd	0.443±0.018Cd	0.101±0.005Cc

¹⁾ 同列中不同大写和小写字母分别表示差异极显著 ($P < 0.01$) 和显著 ($P < 0.05$) Different uppercases and lowercases in the same column indicate the extremely significant ($P < 0.01$) and significant ($P < 0.05$) differences, respectively.

表 4 不同温度对苋菜叶片叶绿素含量的影响 ($\bar{X} \pm SD$)¹⁾

Table 4 Effect of different temperatures on chlorophyll content in leaf of *Amaranthus tricolor* Linn. ($\bar{X} \pm SD$)¹⁾

温度/°C Temperature	处理 3 d 的叶绿素含量/(mg · g ⁻¹) Chlorophyll content at treatment for 3 d		处理 6 d 的叶绿素含量/(mg · g ⁻¹) Chlorophyll content at treatment for 6 d	
	叶绿素 <i>a</i> Chlorophyll <i>a</i>	叶绿素 <i>b</i> Chlorophyll <i>b</i>	叶绿素 <i>a</i> Chlorophyll <i>a</i>	叶绿素 <i>b</i> Chlorophyll <i>b</i>
25 (CK)	24.45±0.22Aa	12.21±0.54Aa	24.66±0.41Aa	12.31±0.40Aa
20	24.18±0.34Aa	11.95±0.58ABa	24.13±0.67ABa	11.94±0.77Aa
15	23.40±0.07Bb	10.66±0.33ABb	22.61±0.52Bb	9.81±1.06Bb
10	22.67±0.22Cc	10.19±0.96Bb	22.53±0.45Bb	8.95±0.31Bb

¹⁾ 同列中不同大写和小写字母分别表示差异极显著 ($P < 0.01$) 和显著 ($P < 0.05$) Different uppercases and lowercases in the same column indicate the extremely significant ($P < 0.01$) and significant ($P < 0.05$) differences, respectively.

表5 不同温度对苋菜叶片叶绿素荧光参数的影响($\bar{X}\pm SD$)¹⁾Table 5 Effect of different temperatures on chlorophyll fluorescence parameters of leaf of *Amaranthus tricolor* Linn. ($\bar{X}\pm SD$)¹⁾

温度/℃ Temperature	处理3 d的叶绿素荧光参数 Chlorophyll fluorescence parameter at treatment for 3 d					
	F_v/F_m	Y(NO)	Y(II)	rETR	qN	Y(NPQ)
25(CK)	0.627±0.005Aa	0.307±0.006Bb	0.517±0.005Ab	4.517±0.057Aa	0.481±0.010Aa	0.178±0.005Aa
20	0.630±0.005Aa	0.305±0.018Bb	0.538±0.009Aab	4.783±0.076Aa	0.464±0.005Aa	0.167±0.006Aa
15	0.615±0.019Aa	0.290±0.012Bb	0.549±0.012Aa	4.683±0.305Aa	0.478±0.012Aa	0.166±0.010Aa
10	0.521±0.020Bb	0.418±0.019Aa	0.442±0.020Bc	3.967±0.076Bb	0.408±0.020Bb	0.140±0.009Bb
温度/℃ Temperature	处理6 d的叶绿素荧光参数 Chlorophyll fluorescence parameter at treatment for 6 d					
	F_v/F_m	Y(NO)	Y(II)	rETR	qN	Y(NPQ)
25(CK)	0.638±0.014Aa	0.298±0.005Bb	0.548±0.024Aa	4.848±0.179Aa	0.445±0.023BCb	0.161±0.013Aab
20	0.636±0.014Aa	0.272±0.007Bb	0.542±0.028Aa	4.739±0.220Aa	0.500±0.023ABa	0.178±0.013Aa
15	0.608±0.009Aa	0.273±0.007Bb	0.548±0.031Aa	4.786±0.219Aa	0.535±0.028Aa	0.179±0.008Aa
10	0.437±0.031Bb	0.480±0.032Aa	0.368±0.031Bb	2.967±0.057Bb	0.425±0.027Cb	0.148±0.011Ab

¹⁾ F_v/F_m : PS II最大光化学效率 Maximum photochemical efficiency of PS II; Y(NO): 非调节性能量耗散的量子产额 Quantum yield of non-regulated energy dissipation; Y(II): PS II实际光量子产额 Effective quantum yield of PS II; rETR: 相对电子传递速率 Relative electron transport rate; qN: 非光化学淬灭系数 Nonphotochemical quenching coefficient; Y(NPQ): 调节性能量耗散的量子产额 Quantum yield of regulated energy dissipation. 同列中不同大写和小写字母分别表示差异极显著($P<0.01$)和显著($P<0.05$)。Different uppercases and lowercases in the same column indicate the extremely significant ($P<0.01$) and significant ($P<0.05$) differences, respectively.

表6 不同温度对苋菜叶片光合作用相关基因相对表达量的影响($\bar{X}\pm SD$)¹⁾Table 6 Effect of different temperatures on relative expression levels of photosynthesis-related genes of leaf of *Amaranthus tricolor* Linn. ($\bar{X}\pm SD$)¹⁾

温度/℃ Temperature	处理3 d的基因相对表达量 Relative expression level of gene at treatment for 3 d						
	<i>AtrPPCK</i>	<i>AtrPEPC</i>	<i>AtrMDH</i>	<i>AtrNADP-MDH</i>	<i>AtrNAD-ME</i>	<i>AtrNADP-ME</i>	<i>AtrPPDK</i>
25(CK)	1.022±0.057Bb	0.996±0.041Bb	1.008±0.060Aa	0.957±0.080Bb	0.971±0.030Aa	0.967±0.041Aa	1.030±0.076Aa
20	0.478±0.079Dd	1.196±0.076Aa	0.489±0.002Bb	1.617±0.034Aa	0.619±0.037Bb	0.750±0.049Bb	0.667±0.011Bb
15	0.688±0.037Cc	1.175±0.094Aa	0.269±0.015Cc	0.555±0.031Cc	0.425±0.017Cc	0.484±0.035Cc	0.601±0.040BCb
10	1.485±0.047Aa	0.722±0.005Cc	0.137±0.005Dd	0.461±0.016Cd	0.186±0.004Dd	0.494±0.027Cc	0.489±0.017Cc
温度/℃ Temperature	处理6 d的基因相对表达量 Relative expression level of gene at treatment for 6 d						
	<i>AtrPPCK</i>	<i>AtrPEPC</i>	<i>AtrMDH</i>	<i>AtrNADP-MDH</i>	<i>AtrNAD-ME</i>	<i>AtrNADP-ME</i>	<i>AtrPPDK</i>
25(CK)	0.975±0.096Bb	1.078±0.068Cc	1.071±0.067Bb	1.016±0.015Bb	1.016±0.018Bb	0.986±0.023Aa	1.057±0.080Bc
20	0.929±0.036Bb	1.936±0.015Bb	1.786±0.040Aa	1.235±0.122Aa	1.304±0.018Aa	0.821±0.108Ab	1.412±0.056Aa
15	0.669±0.046Cc	2.609±0.038Aa	0.729±0.032Cc	0.959±0.006Bb	0.812±0.017Cc	0.458±0.070Bc	1.296±0.029Ab
10	1.985±0.140Aa	0.857±0.007Dd	0.391±0.004Dd	0.532±0.013Cc	0.271±0.010Dd	0.468±0.010Bc	0.619±0.021Cd

¹⁾ *AtrPPCK*: 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶激酶基因 Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase gene; *AtrPEPC*: 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因 Phosphoenolpyruvate carboxylase gene; *AtrMDH*: 苹果酸脱氢酶基因 Malate dehydrogenase gene; *AtrNADP-MDH*: NADP-苹果酸脱氢酶基因 NADP-malate dehydrogenase gene; *AtrNAD-ME*: NAD-苹果酸酶基因 NAD-malic enzyme gene; *AtrNADP-ME*: NADP-苹果酸酶基因 NADP-malic enzyme gene; *AtrPPDK*: 丙酮酸磷酸双激酶基因 Pyruvate orthophosphate dikinase gene. 同列中不同大写和小写字母分别表示差异极显著($P<0.01$)和显著($P<0.05$)。Different uppercases and lowercases in the same column indicate the extremely significant ($P<0.01$) and significant ($P<0.05$) differences, respectively.

MDH 基因的相对表达量呈现先升高后降低的趋势, *AtrMDH*、*AtrNAD-ME*、*AtrNADP-ME* 和 *AtrPPDK* 基因的相对表达量呈现降低的趋势。20℃、15℃和10℃处理下叶片 *AtrMDH*、*AtrNAD-ME*、*AtrNADP-ME* 和 *AtrPPDK* 基因的相对表达量均极显著低于25℃(对照), 10℃处理下叶片 *AtrPPCK* 基因的相对表达量极显著高于对照, 10℃处理下叶片的 *AtrPEPC* 和 *AtrNADP-MDH* 基因的相对表达量均极显著低于对

照。随着温度降低, 处理6 d的苋菜叶片 *AtrPPCK* 基因的相对表达量也呈先降低后升高的趋势, *AtrPEPC*、*AtrMDH*、*AtrNADP-MDH*、*AtrNAD-ME* 和 *AtrPPDK* 基因的相对表达量呈现先升高后降低的趋势, *AtrNADP-ME* 基因的相对表达量呈现先降低后略有升高的趋势; 10℃处理下叶片的 *AtrPPCK* 基因的相对表达量极显著高于对照, 其他5个基因的相对表达量均极显著低于对照。

总体上看,6个基因在多数温度下处理3和6 d均与对照有显著差异;温度较低(10 ℃)会抑制除了*AtrPPCK*基因外的其他基因的表达,随着处理时间延长,基因相对表达量略有回升。

2.5 苋菜各指标与温度的相关性分析

苋菜株高和生理生化指标与温度的相关系数见表7。结果显示:温度与处理3和6 d的株高、甜菜红

素含量、甜菜黄素含量、叶绿素*a*含量和叶绿素*b*含量以及PS II最大光化学效率均呈极显著正相关,与非调节性能量耗散的量子产额呈显著负相关,与处理3 d的非光化学淬灭系数和调节性能量耗散的量子产额呈极显著正相关,与处理6 d的PS II实际光量子产额和相对电子传递速率呈极显著正相关。

表7 苋菜株高和生理生化指标与温度的相关系数¹⁾

Table 7 Correlation coefficient of plant height, physiological and biochemical indexes of *Amaranthus tricolor* Linn. with temperature¹⁾

指标 Index	处理3 d的相关系数 Correlation coefficient at treatment for 3 d										
	<i>h</i>	C1	C2	C3	C4	F_v/F_m	$Y(NO)$	$Y(II)$	<i>rETR</i>	<i>qN</i>	$Y(NPQ)$
温度 Temperature	0.911 **	0.942 **	0.958 **	0.957 **	0.823 **	0.806 **	-0.677 *	0.542	0.571	0.734 **	0.842 **
指标 Index	处理6 d的相关系数 Correlation coefficient at treatment for 6 d										
	<i>h</i>	C1	C2	C3	C4	F_v/F_m	$Y(NO)$	$Y(II)$	<i>rETR</i>	<i>qN</i>	$Y(NPQ)$
温度 Temperature	0.968 **	0.975 **	0.952 **	0.841 **	0.896 **	0.832 **	-0.698 *	0.741 **	0.778 **	0.060	0.253

¹⁾ *h*: 株高 Plant height; C1: 甜菜红素含量 Betacyanin content; C2: 甜菜黄素含量 Betaxanthin content; C3: 叶绿素*a*含量 Chlorophyll *a* content; C4: 叶绿素*b*含量 Chlorophyll *b* content; F_v/F_m : PS II最大光化学效率 Maximum photochemical efficiency of PS II; $Y(NO)$: 非调节性能量耗散的量子产额 Quantum yield of non-regulated energy dissipation; $Y(II)$: PS II实际光量子产额 Effective quantum yield of PS II; *rETR*: 相对电子传递速率 Relative electron transport rate; *qN*: 非光化学淬灭系数 Nonphotochemical quenching coefficient; $Y(NPQ)$: 调节性能量耗散的量子产额 Quantum yield of regulated energy dissipation. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

3 讨论和结论

3.1 低温对苋菜生长及甜菜色素含量的影响

设施大棚是保证苋菜进行周年有效生产的主要方式之一,可在一定程度上缓解低温伤害,但也存在不足之处,如没有加温设施的棚室昼夜温差过大,对植物生长有更大伤害,也可能因覆盖棚体影响光照,对苋菜生长产生其他影响^[1]。温度作为影响植物生长的重要环境因子,低温环境下植物的生长发育受到抑制,表现出苗弱、生长迟缓、萎蔫皱缩、失绿黄化、产量降低等^[17]。如狗牙根[*Cynodon dactylon* (Linn.) Persoon]的生长速率随着温度降低呈显著降低的趋势^[18];低温胁迫下苜蓿(*Medicago sativa* Linn.)幼苗植株较弱,生长缓慢,长期低温甚至会导致幼苗死亡^[19]。本研究中,苋菜株高随着温度的降低而降低,在15 ℃和10 ℃处理3 d时受到显著抑制,随着处理时间的延长,20 ℃处理6 d的苋菜生长速度也受到显著抑制,10 ℃处理6 d的苋菜基本停止生长。相关性分析结果显示:株高与温度呈极显著正相关。说明温度较低(15 ℃和10 ℃)会抑制苋菜的生长,长期处于20 ℃时苋菜的生长也会受到抑制。

温度也是影响植物次生代谢的重要因子^[20]。苋菜主要次生代谢产物甜菜色素的合成也受到温度的调控,当温度低于20 ℃时甜菜色素的合成受到抑制^[21]。本研究结果显示:苋菜叶片中甜菜色素含量随着温度降低而降低,15 ℃和10 ℃处理3和6 d叶片中甜菜色素含量均极显著低于25 ℃(对照)。相关性分析结果显示:甜菜红素含量和甜菜黄素含量与温度均呈极显著正相关。说明温度较低(15 ℃和10 ℃)会降低苋菜叶片中甜菜色素的含量,15 ℃和10 ℃均不利于甜菜色素的合成与积累。

3.2 低温对苋菜光合作用及相关基因表达的影响

叶绿素是植物叶绿体内参与光合作用的重要色素^[22]。低温会破坏叶绿体结构,使叶绿素合成受到抑制,从而影响植物光合作用^[23]。如海滨雀稗(*Paspalum vaginatum* Swartz)在低温胁迫下叶绿素含量明显降低^[24];秋石斛(*Dendrobium* spp.)的叶绿素含量随着温度降低和处理时间延长呈现逐渐降低的趋势^[25]。本文中,处理3和6 d的苋菜叶片中叶绿素含量均随着温度降低而降低,15 ℃和10 ℃处理下叶片中叶绿素含量均显著低于25 ℃(对照)。相关性分析结果显示:叶绿素*a*含量和叶绿素*b*含量与温度均呈极显著正相关。说明温度较低(15 ℃和10 ℃)

不利于苋菜叶绿素的合成,降低叶绿素含量,且随着处理时间延长,其对叶绿素含量的抑制效果更明显。

植物叶绿素荧光参数受抑制的程度与环境胁迫的程度呈显著相关,利用叶绿素荧光技术可以检测出叶绿体对温度变化的响应^[26]。低温条件下 PS II 受到抑制,导致植物的 PS II 光化学效率和电子传输能力降低,并且植物的相对净光合速率(Pn)与 PS II 最大光化学效率(F_v/F_m)和 PS II 实际光量子产额[Y(II)]等呈显著正相关^[27,28]。在多刺绿绒蒿(*Meconopsis horridula* Hook. f. et Thoms)和彩叶草[*Coleus scutellarioides* (Linn.) Benth.]的研究中发现,低温下其 F_v/F_m 值、Y(II)值、相对电子传递效率($rETR$)显著降低,而 qN 值随着温度的降低先升高后降低,调节性能量耗散的量子产量[Y(NPQ)]和非调节性能量耗散的量子产量[Y(NO)]则逐渐升高^[29,30]。本研究结果显示:处理3和6 d,20℃和15℃处理下苋菜叶片的叶绿素荧光参数总体与对照无显著差异,10℃处理下叶片的 F_v/F_m 、Y(II)、 $rETR$ 、 qN 和 Y(NPQ)值总体显著低于对照,仅 Y(NO)值显著高于对照。相关性分析结果显示:Y(NO)值与温度呈显著负相关,而 F_v/F_m 、Y(II)、 $rETR$ 、 qN 和 Y(NPQ)值与温度在不同处理时间呈极显著正相关。说明20℃和15℃对苋菜的叶绿素荧光参数影响不大,而10℃处理会引起苋菜叶绿素荧光参数的显著变化,推测可能是较低温度(10℃)下苋菜的叶绿体结构被破坏,叶绿素含量降低,导致光合系统受损^[7,31]。

在植物 C_4 光合作用途径中,PPCK 先将 PEPC 去磷酸化,再由 PEPC 催化磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)与 CO_2 反应生成草酰乙酸(OAA),经 MDH 和 NADP-MDH 将草酰乙酸催化生成苹果酸,然后由 NAD(P)-ME 催化苹果酸生成丙酮酸,再由 PPDK 将丙酮酸催化重新形成 CO_2 受体 PEP^[32-36]。光合作用途径中酶的活性极易受到温度的影响,如水稻(*Oryza sativa* Linn.)^[37,38]、甘蔗(*Saccharum officinarum* Linn.)^[39]、拟南芥[*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.]^[40] 和柳枝稷(*Panicum virgatum* Linn.)^[41] 的光合作用酶活性在低温下显著下降。处理3和6 d,苋菜光合作用相关基因的表达也受到温度的调控。qRT-PCR 结果显示:不同温度处理下苋菜 *AtrPPCK*、*AtrPEPC*、*AtrMDH*、*AtrNADP-MDH*、*AtrNAD-ME*、*AtrNADP-ME* 和 *AtrPPDK* 基因的相对表达量总体与对照存在显著

差异,并且较低温度(10℃)抑制除了 *AtrPPCK* 基因外其他基因的表达。此外,随着温度的降低 *AtrPPCK* 基因的相对表达量先降低后升高,而 *AtrPEPC* 基因的相对表达量则先升高后降低。推测随着温度的降低,苋菜在20℃和15℃条件下 *AtrPPCK* 基因的表达受到抑制,对 PEPC 的去磷酸化作用减弱,使得 *AtrPEPC* 基因上调表达;而在10℃环境下 *AtrPPCK* 基因的表达增加,提高了对 PEPC 的去磷酸化作用, *AtrPEPC* 基因的表达受到抑制^[42,43]。因此,温度通过影响 PPCK 对 PEPC 的去磷酸化作用,可作为温度调控植物光合作用的方式之一。

综上所述,低温可能通过降低苋菜的叶绿素含量,破坏光合系统,抑制光合作用相关基因的表达,从而降低苋菜主要次生代谢产物甜菜色素的积累,最后导致植株的生长受到抑制。由于众多的代谢通路参与与到苋菜的光合作用途径,因此,对于低温引起光合作用基因差异表达的调控机制还有待深入了解,基因功能还需进一步验证。

参考文献:

- [1] 汪李平. 长江流域塑料大棚苋菜栽培技术[J]. 长江蔬菜, 2019(8): 17-21.
- [2] 黄欢, 胡慧霞, 姜联合, 等. 植物甜菜色素的研究进展[J]. 生物学通报, 2014, 49(8): 1-4.
- [3] 程稼秋. 苋菜栽培技术[J]. 特种经济动植物, 2015, 18(12): 39-40.
- [4] 林莉莉, 胡安琪, 陈钢, 等. 杉木 *CIWRKY44* 基因克隆及其表达特性分析[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2022, 46(1): 203-209.
- [5] 沈丹, 杨莉, 胡威, 等. 柑橘胁迫响应基因 *WRKY47* 的克隆与表达分析[J]. 江苏农业学报, 2021, 37(1): 129-138.
- [6] 薛爽, 饶丽莎, 左丹丹, 等. 植物低温胁迫响应机理的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(33): 17-19, 48.
- [7] DING Y L, SHI Y T, YANG S H. Advances and challenges in uncovering cold tolerance regulatory mechanisms in plants[J]. New Phytologist, 2019, 222: 1690-1704.
- [8] LIU Z Y, JIA Y X, DING Y L, et al. Plasma membrane CRPK1-mediated phosphorylation of 14-3-3 proteins induces their nuclear import to fine-tune CBF signaling during cold response [J]. Molecular Cell, 2017, 66: 117-128.
- [9] 葛君, 刘震. 低温胁迫对拔节期小麦光合色素、光合参数及叶绿素荧光特性的影响[J]. 山西农业科学, 2021, 49(11): 1253-1256.
- [10] 曹梦可. 玉米耐寒能力分级及低温对苗期玉米光合生理机制的影响[D]. 长春: 吉林农业大学农学院, 2016: 28.
- [11] 邵文静, 张今杰, 盖胜男, 等. 低温胁迫下高粱幼苗叶片生理变化及相关基因表达分析[J]. 农业生物技术学报, 2021, 29

- (5): 857-870.
- [12] 黄倩茹, 张爱冬, 查丁石, 等. 不同温度处理对苋菜种子萌发和幼苗生长的影响[J]. 长江蔬菜, 2021(16): 13-15.
- [13] 赵春丽, 陈家兰, 王乐, 等. 温度对苋菜幼苗中甜菜色素含量及其相关基因表达的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2020, 26(6): 1484-1489.
- [14] 王晓. 红蓝复合光对苋菜幼苗甜菜色素合成及 *Cryptochrome* 基因表达的影响[D]. 福州: 福建农林大学园艺学院, 2020: 9.
- [15] 张秀君, 孙钱钱, 乔双, 等. 菠菜叶绿素提取方法的比较研究[J]. 作物杂志, 2011(3): 57-60.
- [16] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [17] 乌凤章, 王贺新, 徐国辉, 等. 木本植物低温胁迫生理及分子机制研究进展[J]. 林业科学, 2015, 51(7): 116-128.
- [18] 舒必超, 杨勇, 刘雪勇, 等. 低温胁迫对狗牙根生理及基因表达的影响[J]. 草业学报, 2018, 27(11): 106-119.
- [19] 高茜, 徐洪雨, 李振松, 等. 低温胁迫对紫花苜蓿种子萌发的影响[J]. 草原与草坪, 2020, 40(4): 34-39, 46.
- [20] 许永华, 卫宝瑞, 佐月, 等. 低温影响药用植物次生代谢产物积累研究进展[J]. 分子植物育种, 2022, 20(5): 1708-1715.
- [21] 赵春丽, 王晓, 潘君飞, 等. 苋菜 *AtGAI* 基因克隆及表达分析[J]. 西北植物学报, 2019, 39(2): 199-209.
- [22] FROMME P, MELKOZERNOV A, JORDAN P, et al. Structure and function of photosystem I; interaction with its soluble electron carriers and external antenna systems[J]. *FEBS Letters*, 2003, 555: 40-44.
- [23] 任延靖, 郭怡婷, 赵孟良. 植物应答低温胁迫的研究进展[J]. 分子植物育种, 2020, 18(14): 4775-4781.
- [24] 宋文学, 朱俊飞, 高佩然, 等. 低温驯化对海滨雀稗抗寒生理的影响[J]. 草学, 2021(5): 19-25, 33.
- [25] 陆顺教, 何嘉琦, 易双双, 等. 秋石斛‘三亚阳光’中苗低温胁迫生理响应研究及耐寒指标筛选[J]. 热带作物学报, 2021, 42(1): 116-122.
- [26] 李钦夫, 李征明, 纪建伟, 等. 叶绿素荧光动力学及在植物抗逆生理研究中的应用[J]. 湖北农业科学, 2013, 52(22): 5399-5402.
- [27] PAREDES M, QUILES M J. The effects of cold stress on photosynthesis in *Hibiscus* plants[J]. *PLOS ONE*, 2015, 10(9): e0137472.
- [28] 刘蕾蕾, 纪洪亭, 刘兵, 等. 拔节期和孕穗期低温处理对小麦叶片光合及叶绿素荧光特性的影响[J]. 中国农业科学, 2018, 51(23): 4434-4448.
- [29] 黄鸿, 屈燕, 侯祯丹, 等. 低温胁迫对3种绿绒蒿幼苗叶绿素荧光特性的影响[J]. 西南农业学报, 2020, 33(7): 1474-1479.
- [30] 王兆, 刘晓曦, 郑国华. 低温胁迫对彩叶草光合作用及叶绿素荧光的影响[J]. 浙江农业学报, 2014, 27(1): 49-56.
- [31] 宋婷, 张谧, 高吉喜, 等. 快速叶绿素荧光动力学及其在植物抗逆生理研究中的应用[J]. 生物学杂志, 2011, 28(6): 81-86.
- [32] 王家佳, 张利莉, 钱雪, 等. *GsPPCK1* 和 *GsPPCK3* 基因转化苜蓿及其耐碱性分析[J]. 塔里木大学学报, 2014, 26(2): 20-31.
- [33] 崔晓慧. 苹果 *MdmMDH* 和 *MdNADP-MDH-like* 基因的功能分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学园艺学院, 2021: 1.
- [34] 黄瑶, 李贺, 包博闻, 等. 沙棘苹果酸代谢关键基因 *ME* 的克隆与生物信息学分析[J]. 分子植物育种, 2022, 20(5): 1470-1476.
- [35] 姜奇彦, 牛凤娟, 胡正, 等. 植物丙酮酸磷酸双激酶研究进展[J]. 生物技术进展, 2015, 5(4): 272-278.
- [36] 徐明怡, 柴春荣, 钟海秀, 等. 植物光合碳同化途径关键酶基因研究[J]. 黑龙江科学, 2016, 7(10): 1-4, 7.
- [37] 罗璇, 郭彤, 胡银岗. 小麦和谷子 C_4 光合途径关键酶活性及其与光合和蒸腾的关系[J]. 麦类作物学报, 2014, 34(8): 1083-1091.
- [38] ZHOU H, LIU S K, YANG C P, et al. Expression, purification and characterization of *Oryza sativa* L. NAD-malic enzyme in *Escherichia coli* [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2011, 10(63): 13943-13950.
- [39] DU Y C, NOSE A, WASANO K. Effects of chilling temperature on photosynthetic rates, photosynthetic enzyme activities and metabolite levels in leaves of three sugarcane species[J]. *Plant, Cell and Environment*, 1999, 22: 317-324.
- [40] BEGARA-MORALES J C, SÁNCHEZ-CALVO B, GÓMEZ-RODRÍGUEZ B, et al. Short-term low temperature induces nitrooxidative stress that deregulates the NADP-malic enzyme function by tyrosine nitration in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Antioxidants*, 2019, 8: 448.
- [41] HALTER M C. Evaluation of the over-expression of a *Miscanthus × giganteus* PPK (C4ppdk1) in switchgrass (*Panicum virgatum*) for improved cold temperature C_4 photosynthesis[D]. Knoxville: University of Tennessee, 2014: 10.
- [42] 肖小虎, 隋金蕾, 戚继艳, 等. 巴西橡胶树 *PPCK* 基因家族成员的鉴定和表达分析[J]. 热带作物学报, 2016, 37(11): 2164-2169.
- [43] 袁秀云, 许申平, 张燕, 等. 蝴蝶兰一个 C_3 型 *PEPC* 基因的克隆及其低温胁迫下的表达分析[J]. 分子植物育种, 2020, 18(4): 1069-1076.

(责任编辑: 郭严冬)