

外源 ABA 对藜麦种子萌发及 ABA 相关基因表达的影响

陈 凡¹, 丰 扬¹, 王仕玉², 郭凤根^{1*}, 龙雯虹², 刘正杰¹

(1 云南农业大学 农学与生物技术学院, 昆明 650201; 2 云南农业大学 园林园艺学院, 昆明 650201)

摘 要: 穗发芽会导致藜麦籽粒产量和品质严重受损, 而脱落酸(ABA)与种子萌发和休眠密切相关。该研究以易穗发芽的‘大黑藜 3’(BBQ3)、“白藜 6”(WQ6)和抗穗发芽的‘小黑藜 1’(SBQ1)和‘白藜 4’(WQ4)为试验材料, 在种子萌发 3 d 内施加不同浓度 ABA 和氟啶酮(FL), 探究 ABA 和 FL 对两种粒色藜麦种子萌发、ABA 含量以及 ABA 合成基因 *NCED*、裂解基因 *8'OH* 和信号转导基因 *ABI3* 表达的影响。结果表明: (1) 各藜麦种子萌发均受到各浓度外源 ABA 抑制, 并以 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度效果最佳, 同时受到外源低浓度 FL 促进, 且施用 $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度即可; 外源 ABA 和 FL 处理的 SBQ1 和 WQ4 发芽率降低和升高幅度分别小于 BBQ3 和 WQ6。 (2) 对照组 SBQ1 和 WQ4 种子内源 ABA 含量分别显著高于 BBQ3 和 WQ6; 外源 ABA 处理可显著提高藜麦种子内源 ABA 含量, 且 WQ4 显著高于 WQ6, 种皮略厚的 SBQ1 内源 ABA 含量显著低于 BBQ3; 外源 FL 处理下 4 份材料种子内源 ABA 含量均有所下降, 但只有 SBQ1 达到显著水平。 (3) 对照组中, SBQ1 和 WQ4 萌发种子中 *NCED*、*8'OH*、*ABI3* 基因的表达量分别高于 BBQ3 和 WQ6; 外源 ABA 处理下, SBQ1 萌发种子中 *NCED* 和 *ABI3* 表达量在 12 h 才显著上调, BBQ3 的 3 个基因表达量均在 6 h 时就显著上调, 同时 WQ4 的 3 个基因表达量上调时间也迟于 WQ6; 在外源 FL 处理下, SBQ1 中 3 个基因表达量均上调, 但 *NCED* 表达量明显低于 *8'OH*, BBQ3 中 *NCED* 和 *ABI3* 的表达量下调, *8'OH* 表达量显著上调; FL 对 WQ4 中 *NCED* 和 *8'OH* 的表达主要起抑制作用, 对 *ABI3* 无显著调控作用, 而对 WQ6 中 *8'OH* 基因表达的促进作用高于 *NCED* 基因。 (4) 黑藜和白藜中种子发芽率、ABA 含量与 *NCED*、*ABI3* 基因的表达量均显著相关。研究发现, 抗穗发芽藜麦材料种子发芽率低于易穗发芽材料, ABA 含量高于易穗发芽材料; 外源 ABA 可显著抑制种子萌发, 且易穗发芽藜麦材料对 ABA 的敏感性高于抗穗发芽材料, ABA 敏感性高材料的相关基因表达对 ABA 的响应早于其他材料; FL 对种子萌发有促进作用, 但可能不是直接通过抑制 *NCED*、*ABI3* 的表达和促进 *8'OH* 的表达来调控 ABA 合成, 而是通过影响其他关键结合位点进行调控。

关键词: 藜麦; 种子萌发; 脱落酸; 氟啶酮; ABA 相关基因

中图分类号: Q945.34; Q789 文献标志码: A

Effects of Exogenous ABA on Seed Germination and Expression of ABA Related Genes in *Chenopodium quinoa*

CHEN Fan¹, FENG Yang¹, WANG Shiyu², GUO Fenggen^{1*}, LONG Wenhong², LIU Zhengjie¹

(1 College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2 College of Horticulture and Landscape, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: Preharvest sprouting (PHS) could cause serious damage to grain yield and quality of quinoa, and the abscisic acid (ABA) is closely related to seed germination and seed dormancy. In this study two sam-

收稿日期: 2022-07-08; 修改稿收到日期: 2022-11-21

基金项目: 国家自然科学基金(31960417)

作者简介: 陈 凡(1997-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向为基因资源的挖掘与利用。E-mail: 2738747147@qq.com

* 通信作者: 郭凤根, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事植物资源的评价与利用研究。E-mail: yngfg@sina.cn

ples susceptible to PHS such as BBQ3 and WQ6 and two resources unsusceptible to PHS namely SBQ1 and WQ4 were used as experimental materials. Within 3 days of seed germination, they were applied with different concentrations of ABA and fluridone (FL) to explore its impacts on the germination of two-color quinoa seeds, ABA content and the expression of ABA synthesis gene *NCED*, lysis gene *8'OH* and signal transduction gene *ABI3*. The results showed as follows: (1) the application of different exogenous ABA concentrations had inhibitory effects on the seed germination of all quinoa materials, and the $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ concentration had the best effect. Low exogenous FL concentration had a promotion effect on the seed germination of all quinoa materials and the $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ concentration was the best. After the ABA and FL were applied, the germination rate of SBQ1 and WQ4 decreased and increased respectively less than BBQ3 and WQ6. (2) The endogenous ABA content of SBQ1 and WQ4 seeds in the control group was significantly higher than that of BBQ3 and WQ6 seeds, which was consistent with the results of PHS resistance and seed germination. The treatment of exogenous ABA could significantly increase the endogenous ABA content of quinoa seeds, and the ABA content of WQ4 seeds was significantly higher than that of WQ6 seeds, the endogenous ABA content of SBQ1 with slightly thicker pericarp was significantly lower than that of BBQ3. The endogenous ABA content in seeds of the four materials decreased after exogenous FL treatment, only SBQ1 reached a significant level, which was consistent with the results of seed germination. (3) In the control group, the expression levels of *NCED*, *8'OH* and *ABI3* genes of SBQ1 and WQ4 unsusceptible to PHS was respectively higher than those of BBQ3 and WQ6 susceptible to PHS. After exogenous ABA treatment, the expression levels of *NCED* and *ABI3* genes of SBQ1 were significantly up-regulated at 12 h, the expression levels of the three genes of BBQ3 were significantly up-regulated at 6 h, and the expression levels of the three genes of WQ4 were also up-regulated later than that of WQ6. Under exogenous FL treatment, the expression levels of three genes of SBQ1 were all up-regulated, but the expression levels of *NCED* were significantly lower than that of *8'OH*, the expression levels of *NCED* and *ABI3* of BBQ3 were down-regulated, and the expression levels of *8'OH* were significantly up-regulated. FL mainly inhibited the expression of *NCED* and *8'OH* of WQ4, but had no significant regulatory effect on *ABI3*, while the promotion effect of FL on *8'OH* gene expression was higher than that on *NCED* gene in WQ6. (4) The results of correlation analysis showed that seed germination rate and ABA content were significantly correlated with the expression levels of *NCED* and *ABI3* genes in black quinoa and white quinoa. The results showed that the germination rate of quinoa unsusceptible to PHS was lower than that of materials susceptible to PHS, and the ABA content was higher than that of materials susceptible to PHS. Exogenous ABA could significantly inhibit seed germination, and the sensitivity of materials susceptible to PHS to ABA was higher than that of materials unsusceptible to PHS, and the expression of related genes in materials with high ABA sensitivity showed earlier response to ABA than other materials. FL can promote seed germination, but it may not directly regulate ABA synthesis by inhibiting *NCED*, *ABI3* expression and promoting *8'OH* expression, but by affecting other key binding sites.

Key words: quinoa; seed germination; abscisic acid; fluridone; ABA related genes

藜麦(*Chenopodium quinoa* Willd.)为苋科藜属一年生双子叶植物,起源于南美洲安第斯山区^[1]。穗发芽(preharvest sprouting, PHS)是指作物生长至采收期时,在遭逢连续的阴雨天后,种子在田间穗上萌发的现象。藜麦穗发芽消耗了种子中的营养物质,使其品质严重下降^[2]。种子休眠和穗发芽具有复杂且密切的关系,由许多基因和环境因素共同控制^[3]。

大量研究表明种子萌发和休眠主要受脱落酸(ABA)控制^[4-5]。ABA生物合成、代谢和信号转导相关基因可能起到重要调控作用。有研究通过不同浓度外源ABA处理杂交水稻种子时,发现种子萌

发受到明显抑制^[6],用外源ABA处理藜麦种子时,外源ABA浓度越高,对种子萌发抑制效果越显著^[7],但是ABA调控藜麦种子萌发和休眠的分子机制有待进一步研究。氟啶酮(FL)为ABA生物合成抑制剂,赵程等^[8]和王华磊等^[9]研究发现,不同浓度氟啶酮处理肉苕蓉种子可显著提高种子的发芽率,这表明氟啶酮可干预ABA的积累,从而影响种子休眠,但其在藜麦中相关研究还鲜见报道。

*NCED*基因是ABA合成的关键基因,主要限制植物组织中ABA合成的速率,首先在玉米ABA缺失突变体VP14中克隆出来^[10-11]。目前*NCED*

基因已经在拟南芥、鳄梨、葡萄和越橘等多种物种中克隆出来^[12-15]。8'-羟化酶是催化 ABA 裂解的主要酶,该酶由 CYP707A 家族基因编码合成并与 ABA 合成相关酶共同参与植物内源 ABA 水平的调控^[16]。大多数参与 ABA 代谢的基因主要是通过对拟南芥 ABA 缺失突变体的表征来确定的,有研究发现 CYP707A 基因在种子发育过程中起着重要作用^[17]。在烟草中超表达菜豆 CYP707A 基因后,植株中 ABA 含量降低^[18]。目前,已在番茄^[16]等多个物种中克隆得到该基因。ABA 相关转录因子 ABI3/VP1 在绿色植物中广泛存在,是包含 B3 结构域的转录因子^[19]。ABI3 具有种子特异性表达,大多数 ABI3 需要脱落酸才能激活^[20-21],这表明 ABI3 在种子萌发中的关键作用,且主要起到负调控作用。有研究表明,表达 *AfVP1* 基因的转基因小麦胚胎对外源 ABA 的反应增强,对穗发芽的敏感性降低^[22]。

据推测,打破种子休眠伴随着 ABA 含量或敏感性的降低。由于藜麦的重要营养价值和巨大经济价值,研究其种子萌发过程中 ABA 的调控机制可能有助于我们理解穗发芽背后的机制。本研究统计了 4 份藜麦材料在 ABA 和 FL 处理下的种子发芽率等指标,对参与藜麦种子萌发过程中 ABA 生物合成、分解代谢和信号转导的相关基因表达量进行检测,分析了种子 ABA 含量、种子发芽率和 ABA 相关基因表达量的相关性,讨论了 ABA 含量和 ABA 相关基因表达对藜麦种子萌发的影响,预测了调控藜麦种子穗发芽的 ABA 关键基因,以期对藜麦穗发芽分子机制的研究提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材 料

依据前期藜麦穗发芽抗性评价结果^[23],本试验选择黑、白藜麦材料 4 份,‘小黑藜 1’(SBQ1)和‘白藜 4’(WQ4)抗穗发芽强,‘大黑藜 3’(BBQ3)和‘白藜 6’(WQ6)抗穗发芽弱。试验种子于 2021 年 10 月 30 日采集于香格里拉市小中甸镇团结村。将采集的种子放入尼龙网袋,置于室内通风阴凉处保存。脱落酸(ABA)(纯度 98%)和氟啶酮(FL)(纯度 99%)购自昆明傲雪商贸有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 处理设置及脱落酸和氟啶酮处理溶液的配制

FL 为 ABA 合成抑制剂,故设计了蒸馏水对照、外源 ABA 和外源 FL 三组处理的实验方案,但

由于实际处理中与 ABA 相同浓度梯度的 FL 对藜麦种子萌发无促进作用,在实验过程中增加了 2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ FL 的处理,而该处理下 FL 的促进作用不显著,且随着浓度的增加反而抑制种子萌发,故没有加入复合处理实验。因此,依据预备试验结果,本研究共设置对照(蒸馏水)、脱落酸(4 个浓度水平)和氟啶酮(5 个浓度水平)等共计 10 个处理。先分别配制浓度为 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的脱落酸(ABA)和氟啶酮(FL)母液,再依次稀释为工作液。10 种处理液分别为:(1)蒸馏水;(2)5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA;(3)10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA;(4)25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA;(5)50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA;(6)2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ FL;(7)5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ FL;(8)10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ FL;(9)25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ FL;(10)50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ FL。

1.2.2 种子萌发试验

选取优质、饱满的藜麦种子,置于 50 mL 离心管中,用 3% 的次氯酸钠表面消毒 5 min 后用蒸馏水漂洗 5 次,然后吸干种子表面的水分,将种子置于铺有滤纸的培养皿中,每皿 50 粒;分别加入 5 mL 外源 ABA、FL 系列工作液和蒸馏水(对照),重复 3 次。培养皿置于温度为 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 3 d,每天定时给培养皿补充相应浓度的激素工作溶液。于培养 3 h、6 h、9 h、12 h、24 h、48 h 和 72 h 共 7 个时间点统计种子的发芽数,以胚根突破种皮 1 mm 为发芽标准;3 d 后统计种子发芽数并计算发芽率、发芽势和发芽指数等指标。

$$\text{发芽率} = \frac{\text{萌发种子数}}{\text{供试种子数}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{发芽势} = \frac{9 \text{ h 时发芽种子数}}{\text{供试种子数}} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{发芽指数} = \frac{K \times n_1 + \dots + 2 \times n_{(k-1)} + 1 \times n_k}{K \times N} \quad (3)$$

式中:K 表示试验总次数,N 表示用于萌芽的籽粒总数, $n_1 \sim n_k$ 分别表示第 1 次至第 k 次每次所萌芽的籽粒数。以上测定均重复 3 次^[24-26]。

1.2.3 种子 ABA 含量测定

通过种子萌发实验确定 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 和 2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ FL 进行后续实验。在 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 浓度下,6 h 时 SBQ1 基本没有发芽、WQ4 发芽率也很低;12 h 及以后,穗发芽抗性弱的材料却又基本全部发芽,故选择能够体现差异的 9 h 来测定 ABA 含量。将发芽 9 h 种子分别从 ABA、FL 工作液和蒸馏水中取出并清洗,吸干水分,称取 0.1 g 鲜样加入 1 mL PBS (pH7.4)充分研磨至匀浆,4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 000 $\times g$ 离心 20 min,运用植物激素脱落酸(ABA)ELISA 检测试剂盒测定发芽种子内的 ABA 含量。

表 1 目的基因实时定量 PCR 引物信息

Table 1 Information of primers for qRT-PCR of target genes

基因 ID Gene ID	上游引物 Forward primer (5'→3')	下游引物 Reverse primer (5'→3')
XM_021893846.1	GTCCACAGAAAGTGCTTCTAAG	AACAACCTCCTCACCTTCTCATG
XM_021863178.1	CAACAACAACAACCCAATCAC	CTCAACCATATCCAACGCGG
XM_021879907.1	TCAAGCTCGCCATCTAAGGTAT	TGCTTGCCACAAAACACATGG
XM_021911759.1	TCGTCTTGCCCAAGAAGGAAG	AATGTCTTCCATGGCGATAGGG

1.2.4 ABA 相关基因表达量检测 分别将发芽 6 h、9 h、12 h 的种子从 ABA、FL 工作液和蒸馏水中取出并清洗,除去水分后立即在液氮中冷冻,并储存在 -80°C 供下一步实验。从 NCBI 中下载已公布的高等植物 *NCED*、*8'OH* 和 *ABI3* 基因序列和藜麦全基因组序列,在本地 Blast 中进行比对得到藜麦中 3 个基因的参考序列,并根据参考序列设计引物,引物序列见表 1。以藜麦 *β -actin-1 (ACT-1)* 基因为内参基因,使用 SYBR Green 法在 ABI 7500 PCR 仪上检测 *NCED*、*8'OH* 和 *ABI3* 基因在施加外源 ABA 后 6 h、9 h、12 h 三个阶段的表达量;具体操作步骤参照 TaKaRa 公司荧光定量试剂盒说明书。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算基因相对表达量。

1.2.5 数据分析 运用 Excel 软件记录并计算数据的平均值及标准偏差;使用 Prism 8 软件作图;采用 SPSS 20.0 软件对数据进行方差分析和 Duncan 多重比较。

2 结果与分析

2.1 外源脱落酸和氟啶酮对藜麦种子萌发的影响

2.1.1 发芽率 图 1 显示,在黑藜中,‘大黑藜 3’ (BBQ3) 对照在 6 h 开始发芽,在 12 h 内发芽率便达到 100%;而‘小黑藜 1’ (SBQ1) 对照在 9 h 开始发芽,接近 24 h 发芽率才达到 100%,BBQ3 发芽时间显著早于 SBQ1,与前期穗发芽抗性评价结果一致。在白藜中,两份白藜对照均在 6 h 开始发芽,但‘白藜 6’ (WQ6) 的发芽率显著高于‘白藜 4’ (WQ4),且 WQ6 在 9 h 内发芽率便达到 100%,而 WQ4 在接近 12 h 发芽率才达到 100%,WQ6 发芽时间显著早于 WQ4,符合前期穗发芽抗性评价结果。同时,不同浓度的 ABA 对 4 份藜麦种子萌发均起到抑制作用,且 ABA 浓度越高抑制效果越明显,当 ABA 浓度大于 $25\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时极显著抑制藜麦的萌发,故选取 $25\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA 进行后续实验。与对照相比, $25\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA 浓度处理 6

~12 h 内 WQ4、WQ6、BBQ3 种子萌发率分别下降 5%~94%、33%~97%、22%~88%,在 9~24 h 内 SBQ1 种子萌发率下降 6%~85%。另外,FL 为 ABA 抑制剂,低浓度的 FL 对藜麦种子发芽起到促进作用,当其浓度大于 $5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时反而抑制种子发芽,故选取具有促进效果的 $2.5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FL 进行后续实验。与对照相比, $2.5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FL 浓度处理 6~12 h 内 WQ4、WQ6、BBQ3、SBQ1 种子萌发率分别上升 8.7%~0.7%、22.7%~0.7%、13%~6.7%、2%~9%,且只有 SBQ1 随着时间推移种子萌发率先升高后降低,其他藜麦材料的发芽率均逐渐降低。

2.1.2 发芽势 图 2 显示,BBQ3、WQ4、WQ6 的发芽势在施加不同浓度 ABA 时均受到明显抑制,并随着 ABA 浓度的增加逐渐降低,施加 $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 ABA 后,WQ4 的发芽势由对照的 88.67% 降至 0;抗穗发芽的 SBQ1 发芽势在不同 ABA 浓度下均最低,在蒸馏水处理时便只有 6%,施加 ABA 后发芽势均为 0。同时,在 FL 浓度为 $2.5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,BBQ3、WQ4、WQ6 的发芽势降低,随着 FL 浓度的增加,这 3 份藜麦材料的发芽势均有所升高,BBQ3 在 $25\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FL 时的发芽势比对照升高了 30.7%;SBQ1 发芽势在 FL 浓度为 $2.5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时升高,后随着 FL 浓度的增加逐渐降低。以上结果表明 ABA 抑制各藜麦种子萌发,且浓度越高抑制程度越严重,而 FL 对种子萌发有一定的促进作用,能缓解 ABA 的抑制作用。

2.1.3 发芽指数 在 $0\sim 50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA 处理下,4 份藜麦材料的发芽指数均表现出持续快速下降趋势,并以 SBQ1 最低,BBQ3 最高,在 $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA 时分别为 1.8 和 25.5,两份黑藜材料间发芽指数差异明显(图 3);但发芽指数在两份抗性不同的白藜材料间差异不明显。同时,4 份藜麦的发芽指数在低浓度 FL ($2.5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理下有上升趋势,但当 FL 浓度继续升高时反而均呈现缓慢

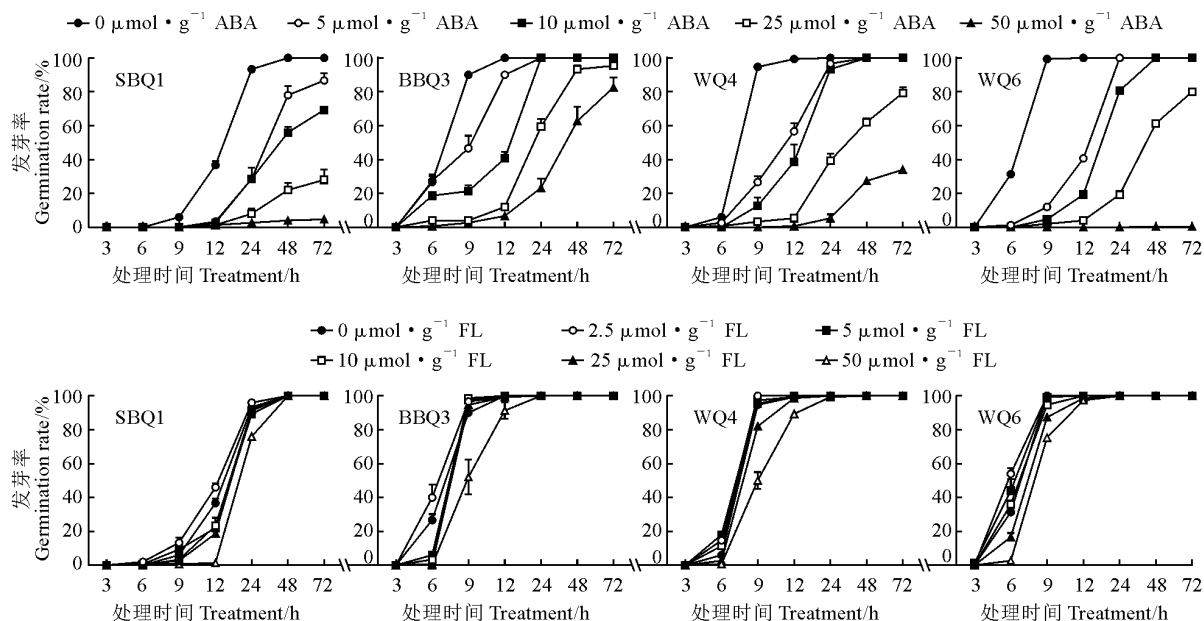


图 1 3 d 内不同浓度激素处理后 4 份藜麦种子的发芽率

Fig. 1 Seed germination rate of four quinoa materials after treated by different concentration hormones in 3 days

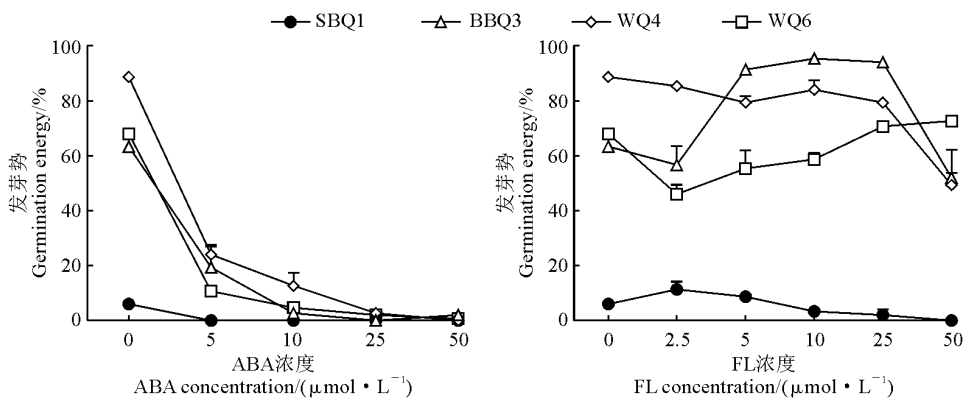


图 2 不同浓度激素处理 9 h 时 4 份藜麦种子的发芽势

Fig. 2 Seed germination energy of four quinoa materials after treated with different concentration hormones at 9 hours

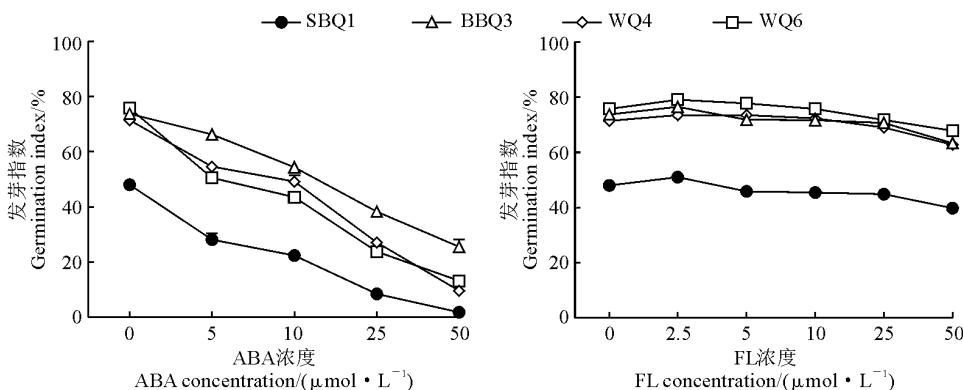


图 3 3 d 内不同浓度激素处理后 4 份藜麦种子的发芽指数

Fig. 3 Germination index of four quinoa materials after treated by different concentration hormones in 3 days

下降趋势;材料间相比较,发芽指数以 SBQ1 最低, BBQ3 最高,但在两份白藜材料间始终差异不明显。

在本研究观测的 3 d 内,4 份藜麦材料于对照条

件下种子发芽率均可达到 100%,说明所取藜麦材料的种子活力高,实验具有可靠性。在施加外源 ABA 后,黑藜在 6 h 便对 ABA 做出响应,而白藜

WQ6 和 WQ4 分别在 9 h 和 12 h 时才做出响应,说明不同穗发芽抗性的藜麦材料对外源 ABA 敏感性存在着一定的差异,推测穗发芽抗性弱的 BBQ3 和 WQ6 对 ABA 敏感性分别低于抗性强的 SBQ1 和 WQ4。

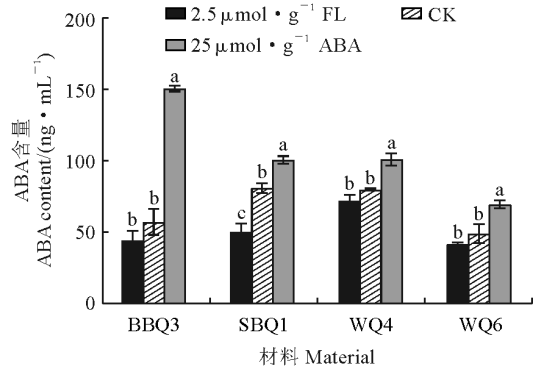
2.2 外源脱落酸和氟啶酮对藜麦种子 ABA 含量的影响

经外源 ABA 处理后,4 份藜麦材料种子的 ABA 含量均比对照显著上升,但不同穗发芽抗性的藜麦材料内源 ABA 含量有所差异,穗发芽抗性强的材料(SBQ1、WQ4)明显高于相应的抗性弱材料(BBQ3、WQ6);在 FL 处理后,各藜麦材料种子 ABA 含量均比对照不同程度下降,但仅 SBQ1 降幅达到显著水平(图 4),与种子萌发的变化趋势达到一致。说明施加外源 ABA 会使种子内源 ABA 含量显著上升,从而抑制种子萌发,FL 可能在一定程度上通过降低种子 ABA 含量来促进萌发。

2.3 脱落酸和氟啶酮处理对藜麦 ABA 相关基因转录表达水平的影响

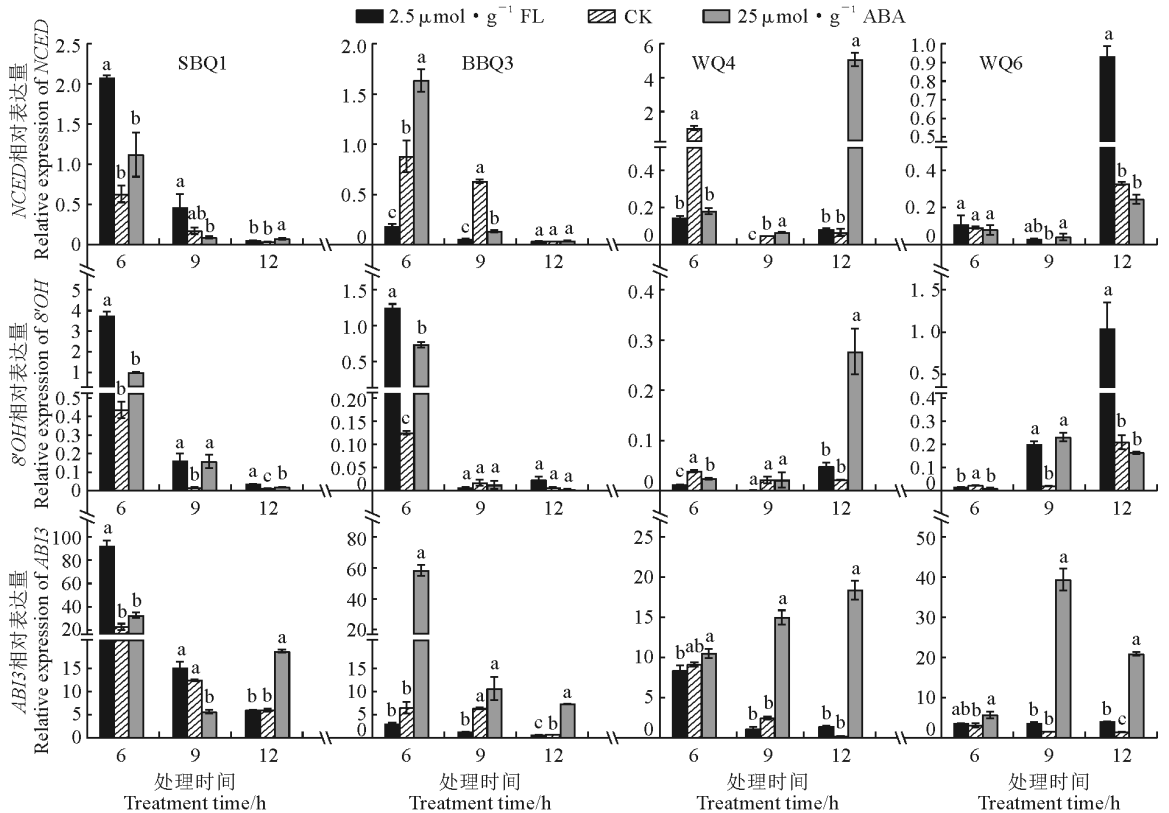
2.3.1 脱落酸合成基因 *NCED* 两份黑藜材料中脱落酸合成基因 *NCED* 的表达量在各个处理下均

随着种子萌发时间的延长而逐渐降低(图 5)。与对照相比,外源 ABA 处理的两份黑藜材料 *NCED* 的表达量在 6 h、12 h 时均上调,在 9 h 时均下调,且 BBQ3 在 6 和 9 h 上下调幅度显著,而 SBQ1 在 12 h 上调幅度显著。施加外源 FL 后 6~12 h 内,SBQ1



不同小写字母表示不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)
图 4 激素处理 9 h 时藜麦种子中 ABA 含量
Different lowercase letters show significant differences among different treatments ($P < 0.05$)

Fig. 4 The content of ABA in the seeds of quinoa materials after hormone treatment for 9 h



不同小写字母表示同期不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)

图 5 不同处理下藜麦 ABA 相关基因表达量分析

Different lowercase letters within same stage show significant differences among different treatments ($P < 0.05$)

Fig. 5 Analysis of different treatments on expression levels of ABA related genes

的 *NCED* 表达量均上调,且在 6 h 时显著上调;而 BBQ3 的 *NCED* 的表达量均下调,且在 6~9 h 内显著下调。同时,两份白藜材料中 *NCED* 基因的表达量均随着萌发时间先降低后又升高。施加外源 ABA 后,与对照相比,WQ4 中 *NCED* 的表达量在 6 h 时显著下调,在 9~12 h 内显著上调;WQ6 中 *NCED* 的表达量在 6 h 时没有变化,在 9 h 时显著下调,在 12 h 时微量上调。施加外源 FL 后,WQ4 的 *NCED* 的表达量在 6~9 h 内显著下调,在 12 h 时微量上调;WQ6 的 *NCED* 的表达量在 6~12 h 内均上调,且在 12 h 时显著上调。

2.3.2 脱落酸裂解基因 *8'OH* 随着种子萌发时间的推移,两份黑藜材料中脱落酸裂解基因 *8'OH* 的表达量逐渐降低(图 5)。施加外源 ABA 后,与对照相比,两份黑藜材料中 *8'OH* 的表达量在 6 h 时均上调,且 BBQ3 显著上调;SBQ1 中 *8'OH* 的表达量在 9~12 h 时均显著上调,而 BBQ3 在此期间均下调。施加外源 FL 后,黑藜麦 SBQ1 的 *8'OH* 的表达量在 6~12 h 内均显著上调,而 BBQ3 的 *8'OH* 表达量在 6 h 显著上调,在 9~12 h 内先下调后上调,但变化都不显著。白藜在施加外源 ABA 后,WQ4 的 *8'OH* 表达量在 6~12 h 内逐渐升高,并在 12 h 时比对照显著上调,而 WQ6 的 *8'OH* 表达量在 9 h 时显著上调;白藜在施加外源 FL 后,WQ4 的 *8'OH* 表达量在 6 h 时显著下调,后逐渐上升,在 12 h 时显著上调,而 WQ6 的 *8'OH* 表达量在 6 h 时显著下调,在 9~12 h 均显著上调。

2.3.3 脱落酸信号转导基因 *ABI3* 黑藜在施加外源 ABA 后,与对照相比,SBQ1 中脱落酸信号转导基因 *ABI3* 的表达量在 6 h 时上调,在 9 h 时显著下调,而在 12 h 显著上调;BBQ3 中 *ABI3* 表达量在 6~12 h 均显著上调,但呈现逐渐降低趋势(图 5)。黑藜在施加外源 FL 后,SBQ1 的 *ABI3* 表达量在 6 h 时显著上调,在 9~12 h 时微量上调;BBQ3 的

ABI3 表达量在 6~12 h 内均下调且逐渐降低。白藜在施加外源 ABA 后,WQ4 的 *ABI3* 表达量在 6~12 h 均上调,且在 9~12 h 均显著上调;WQ6 的 *ABI3* 表达量在 6~12 h 均显著上调,并呈先增加后降低的趋势。白藜在施加外源 FL 后,WQ4 的 *ABI3* 的表达量在 6~9 h 内微量下调,在 12 h 时微量上调;WQ6 的 *ABI3* 表达量在 6~12 h 内均微量上调。

综合以上分析可知,对照组中,抗穗发芽的 SBQ1 和 WQ4 中 *NCED*、*8'OH* 和 *ABI3* 基因表达量在种子萌发 6 h 时分别高于相应的穗发芽敏感的 BBQ3 和 WQ6;后随着种子萌发时间的推移,内源 ABA 含量降低,基因表达量整体呈降低趋势。同时,就 *ABI3* 基因的表达而言,对照组穗发芽抗性强的材料 SBQ1 和 WQ4 的表达量在 6~12 h 内均显著高于抗性弱的 BBQ3 和 WQ6,说明 *ABI3* 基因显著表达材料种子休眠性更强;与对照相比,藜麦种子经外源 ABA、FL 处理后显著促进或者抑制 ABA 合成、代谢和信号转导相关基因的表达,只是在不同藜麦材料中出现时间有差异,说明 ABA 相关基因对外源 ABA 和 FL 产生了响应,种子萌发与休眠可能与基因之间复杂的调控有关。另外,在 4 份藜麦材料的对照中,ABA 合成基因 *NCED* 和裂解基因 *8'OH* 的表达量均显著低于转录因子 *ABI3*,推测 *ABI3* 基因在种子萌发过程中起到关键作用。

2.4 藜麦种子 ABA 含量和发芽率与 ABA 相关基因转录表达水平关系

对 4 份藜麦材料种子的 ABA 含量、发芽率和 ABA 相关基因的转录水平进行相关性分析,结果(表 2)表明,4 份藜麦材料的内源 ABA 含量与种子发芽率极显著负相关;种子 *NCED* 基因的表达水平在黑藜中与其 ABA 含量极显著负相关,与其发芽率极显著正相关,而在白藜中则与其 ABA 含量极显著正相关,与发芽率显著负相关;4 份藜麦材料中,种子 *ABI3* 基因的表达水平均与 ABA 含量显著

表 2 ABA 含量、发芽率和基因转录表达水平间的相关系数

Table 2 Correlation coefficients among ABA content, germination and relative gene transcription level

测定指标 Measurement index	黑藜材料 Black quinoa material				白藜材料 White quinoa material			
	发芽率 Germination rate	<i>NCED</i>	<i>8'OH</i>	<i>ABI3</i>	发芽率 Germination rate	<i>NCED</i>	<i>8'OH</i>	<i>ABI3</i>
ABA 含量 ABA content	-1.000**	-0.974**	-0.716	0.994*	-0.995*	0.999**	0.038	0.892*
发芽率 Germination rate		0.989**	-0.027	-0.996**		-0.839*	-0.057	-0.866*

注:**表示在 0.01 水平(双侧)上显著相关,而*表示在 0.05 水平(双侧)上显著相关

Note: ** indicate correlation is significant at the 0.01 level, while * indicates correlation is significant at the 0.05 level

正相关,与发芽率显著负相关。该结果进一步说明 *ABI3* 基因在藜麦种子萌发与休眠中起负调控作用。

3 讨论

藜麦因其营养价值高而被认为是一种重要的作物^[27]。藜麦产量损失的一个主要原因是穗发芽。Nonogaki 等^[28]的研究说明通过植物激素预防穗发芽的可能性。有研究表明,穗发芽的主要影响因素是 ABA 和 ABI 介导的信号转导^[29],且穗发芽与种子萌发和休眠密切相关。许多植物激素,如 ABA、GA 和 IAA 等都与种子萌发和休眠调控有关^[30],而 ABA 起到重要作用^[31]。抑制萌发的 ABA 和促进萌发的赤霉素之间的相互拮抗调节是决定萌发的基础^[4]。因此,种子萌发是多激素调控的结果,了解植物激素介导的种子休眠机理和探索藜麦中穗发芽的关键调节基因非常必要。在本研究中,外源 ABA 处理的藜麦种子发芽明显延缓,表明 ABA 对藜麦种子休眠释放具有抑制作用,与王德领等^[7]、张诗悦等^[32]的研究结果一致。但是,本研究中 FL 不能显著加速藜麦种子的发芽,推测 FL 对种子萌发的作用受到其他因素的影响。在对照组中,穗发芽抗性材料 SBQ1 种子的 ABA 含量高于抗性弱的 BBQ3,且 SBQ1 的发芽率也显著低于 BBQ3;白藜材料中也表现出类似规律。在藜麦种子萌发过程中,种子内源 ABA 含量与它们的发芽率极显著负相关,推测种子萌发与休眠受到 ABA 的调控,但也与激素之间的相对含量有关。

迄今,藜麦中与穗发芽关联的 ABA 相关基因的研究较少,ABA 合成、代谢和信号转导途径相关基因在种子萌发过程中的调控机制仍需探索。Wu 等证明了 ABA 对藜麦种子萌发的抑制作用,并确定了与 ABA 相关的调控种子萌发的一些差异表达基因^[2]。在小黑麦中,穗发芽敏感性不同品种测得的 ABA 含量差异可能是由 *TsNCED1* 的差异表达造成的^[33]。在拟南芥中,*NCED9* 被证明参与了种子发育过程中 ABA 含量的调节^[4]。在本研究中,外源 ABA 处理藜麦种子后,*NCED* 基因表达量均表现出显著上调,只是在品种间表现出上调时间的差异,且 *NCED* 基因的表达量与 ABA 含量和发芽率均显著相关,说明了 *NCED* 基因在种子萌发中的关键作用。因此,*NCED* 基因在种子中的表达水平可以作为评价藜麦不同材料对穗发芽敏感性的一个

标准。同时,内源 ABA 水平受激素的生物合成和分解代谢的调节,*8'*-羟化酶是该过程的关键分解代谢酶^[15]。本研究中,外源 ABA 处理后 4 份藜麦种子中 *8'OH* 基因表达量出现差异表达趋势;虽然该基因的表达量与 ABA 含量和发芽率没有呈现显著相关性,推测它可能在 ABA 分解代谢途径中有更关键的作用,具体机理有待进一步探索。另外,有研究表明,生长素激活表达 *ABI3*,从而影响种子发育^[34],生长素信号抑制因子 *IAA8* 通过下调拟南芥中的 *ABI3* 表达从而促进种子萌发^[35]。在本研究中,对照组 SBQ1 种子的 *ABI3* 基因表达量在 6~12 h 内均显著高于 BBQ3, WQ4 均显著高于 WQ6;外源 ABA 处理后,SBQ1 种子中 *ABI3* 基因表达量呈先降低后升高趋势, BBQ3 中与对照相比均显著上调, WQ4 和 WQ6 中 *ABI3* 基因表达量与对照相比也均显著上调,且 WQ6 中上调幅度更大。除此之外, *ABI3* 基因的表达量与 ABA 含量显著正相关,与发芽率均显著负相关。这些结果表明, ABA 对 *ABI3* 有正调控作用,随着种子萌发进程的加深, ABA 敏感性降低^[36]。在不同藜麦材料之间观察到的 ABA 水平的差异以及种子对 ABA 的敏感性可能对藜麦种子的休眠和对穗发芽的敏感性有显著影响。氟啶酮为 ABA 生物合成抑制剂,但氟啶酮处理组 SBQ1 中 ABA 相关基因的表达水平高于 ABA 处理组,这与龚安慧等^[37]的研究结果相似,推测藜麦种皮可能对种子萌发有一定阻碍作用,或许 FL 已经进入种子并产生作用,但由于种皮阻碍,胚根无法立即突破种皮,从而产生 FL 促进种子萌发作用不显著但藜麦种子 ABA 含量降低且基因表达量显著变化的现象。另外,氟啶酮可能不是直接通过抑制 *NCED*、*ABI3* 的表达和促进 *8'OH* 的表达来调控 ABA 合成,而是通过影响其他关键结合位点进行调控,其中关键机理还有待研究。

因此,在藜麦种子萌发过程中,4 份藜麦材料种子中 ABA 含量的差异可能主要由 *NCED* 和 *ABI3* 基因的差异表达造成。推测 ABA 生物合成途径 (*NCED*)、ABA 分解代谢途径 (*8'OH*) 和 ABA 信号转导途径 (*ABI3*) 的每个基因都参与了藜麦种子萌发各个阶段 ABA 含量的调节,但由于基因之间复杂的调控网络与信号转导,造成 4 份藜麦穗发芽抗性不同,从而影响种子萌发进程。本研究的结果将为培育耐穗发芽的藜麦品种提供宝贵的资源,并为穗发芽相关基因的功能验证奠定基础。

参考文献:

- [1] VEGA-GÁLVEZ A, MIRANDA M, VERGARA J, *et al.* Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), an ancient Andean grain: A review[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2010, **90**(15): 2 541-2 547.
- [2] WU Q, BAI X, WU X Y, *et al.* Transcriptome profiling identifies transcription factors and key homologs involved in seed dormancy and germination regulation of *Chenopodium quinoa* [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2020, 151: 443-456.
- [3] MCGINTY E M, MURPHY K M, HAUVERMALE A L. Seed dormancy and preharvest sprouting in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) [J]. *Plants* (Basel, Switzerland), 2021, **10**(3): 458.
- [4] ABLEY K, FORMOSA-JORDAN P, TAVARES H, *et al.* An ABA-GA bistable switch can account for natural variation in the variability of *Arabidopsis* seed germination time[J]. *ELife*, 2021, 10.
- [5] NONOGAKI H. A repressor complex silencing ABA signaling in seeds? [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2020, **71**(10): 2 847-2 853.
- [6] 张 雪, 杨洪坤, 郑 亭, 等. 外源 ABA 对两粒色小麦品种穗发芽及品质的影响[J]. *中国农业科学*, 2020, **53**(23): 4 750-4 763.
- ZHANG X, YANG H K, ZHENG T, *et al.* Effects of exogenous ABA on pre-harvest sprouting resistance and quality of white and red wheat cultivars[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2020, **53**(23): 4 750-4 763.
- [7] 王德领, 庄东英, 蒋润枝, 等. 外源 ABA 对藜麦种子萌发的影响[J]. *中国种业*, 2022, (2): 93-96.
- WANG D L, ZHUANG D Y, JIANG R Z, *et al.* Effects of exogenous ABA on seed germination of quinoa [J]. *China Seed Industry*, 2022, (2): 93-96.
- [8] 赵 程, 郭晔红, 赵阳武, 等. 氟啶酮赤霉素协同诱导对肉苁蓉种子发芽率的影响[J]. *甘肃农业大学学报*, 2018, **53**(4): 54-58.
- ZHAO C, GUO Y H, ZHAO Y W, *et al.* Effects of fluridone and gibberellin co-induction on seed germination rate of *Cistanche deserticola* [J]. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2018, **53**(4): 54-58.
- [9] 王华磊, 郭玉海, 翟志席, 等. 氟啶酮对管花肉苁蓉种子萌发影响的研究[J]. *中国中药杂志*, 2006, (19): 1 638-1 639.
- WANG H L, GUO Y H, ZHAI Z X, *et al.* The research on effects of fluridone on seed germination of *Cistanche tubulosa* [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2006, (19): 1 638-1 639.
- [10] TAN B C, SCHWARTZ S H, ZEEVAART J A, *et al.* Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, **94**(22): 12 235-12 240.
- [11] 董映伶, 肖旭腾, 张 敏, 等. 环割对葡萄 *VvNCED* 基因的表达和果实成熟的影响[J]. *核农学报*, 2022, **36**(7): 1 339-1 349.
- DONG Y L, XIAO X T, ZHANG M, *et al.* Effect of girdling on the expression of *VvNCEDs* and fruit ripening in grapes[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2022, **36**(7): 1 339-1 349.
- [12] CHERNYS J T, ZEEVAART J A. Characterization of the 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase gene family and the regulation of abscisic acid biosynthesis in avocado[J]. *Plant Physiology*, 2000, **124**(1): 343-353.
- [13] KARPPINEN K, HIRVELÄ E, NEVALA T, *et al.* Changes in the abscisic acid levels and related gene expression during fruit development and ripening in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) [J]. *Phytochemistry*, 2013, 95: 127-134.
- [14] TAN B C, JOSEPH L M, DENG W T, *et al.* Molecular characterization of the *Arabidopsis* 9-*cis* epoxycarotenoid dioxygenase gene family[J]. *The Plant Journal*, 2003, **35**(1): 44-56.
- [15] RODRIGO M J, ALQUEZAR B, ZACARÍAS L. Cloning and characterization of two 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase genes, differentially regulated during fruit maturation and under stress conditions, from orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2006, **57**(3): 633-643.
- [16] SAITO S, HIRAI N, MATSUMOTO C, *et al.* *Arabidopsis* CYP707As encode (+)-abscisic acid 8'-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid[J]. *Plant Physiology*, 2004, **134**(4): 1 439-1 449.
- [17] OKAMOTO M, KUWAHARA A, SEO M, *et al.* CYP707A1 and CYP707A2, which encode abscisic acid 8'-hydroxylases, are indispensable for proper control of seed dormancy and germination in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2006, **141**(1): 97-107.
- [18] YANG S H, ZEEVAART J A. Expression of ABA 8'-hydroxylases in relation to leaf water relations and seed development in bean [J]. *The Plant Journal*, 2006, **47**(5): 675-686.
- [19] 刘长菊, 杨杉杉, 孙 鸽, 等. 植物 ABI3 转录因子研究进展 [J]. *曲阜师范大学学报(自然科学版)*, 2021, **47**(3): 99-105.
- LIU C J, YANG S S, SUN G, *et al.* Research progress of plant ABI3 transcription factor[J]. *Journal of Qufu Normal University (Natural Science)*, 2021, **47**(3): 99-105.
- [20] KOORNNEEF M, LÉON-KLOOSTERZIEL K M, SCHWARTZ S H, *et al.* The genetic and molecular dissection of abscisic acid biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 1998, **36**(1): 83-89.
- [21] MÖNKE G, SEIFERT M, KEILWAGEN J, *et al.* Toward the identification and regulation of the *Arabidopsis thaliana* ABI3 regulon[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, **40**(17):

- 8 240-8 254.
- [22] GRAEBER K, LINKIES A, MÜLLER K, *et al.* Cross-species approaches to seed dormancy and germination; Conservation and biodiversity of ABA-regulated mechanisms and the Brassicaceae DOG1 genes [J]. *Plant Molecular Biology*, 2010, **73**(1/2): 67-87.
- [23] 毛 琪. 藜麦穗发芽抗性的评价及其解剖学和生理生化机制研究[D]. 昆明: 云南农业大学, 2021.
- [24] 呼风兰. 5种植物激素对黑豆种子萌发的影响[J]. *种子*, 2019, **38**(6): 95-99.
HU F L. Effect of five plant hormones on seed germination of black bean[J]. *Seed*, 2019, **38**(6): 95-99.
- [25] 赵 桃, 刘英华, 邓光兵, 等. 青稞穗发芽抗性测定方法的评价[J]. *应用与环境生物学报*, 2009, **15**(3): 380-384.
ZHAO T, LIU Y H, DENG G B, *et al.* Assessment of methods used in testing preharvest sprouting resistance in hullless barley[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental*, 2009, **15**(3): 380-384.
- [26] 毛 琪, 晏兴珠, 王仕玉, 等. 30份藜麦资源的穗发芽抗性评价[J]. *种子*, 2021, **40**(10): 62-66.
MAO Q, YAN X Z, WANG S Y, *et al.* Evaluation of panicle germination resistance of 30 quinoa resources[J]. *Seed*, 2021, **40**(10): 62-66.
- [27] DEMIR B, BILGIÇLI N. Utilization of quinoa flour (*Chenopodium quinoa* Willd.) in gluten-free pasta formulation; Effects on nutritional and sensory properties[J]. *Food Science and Technology International*, 2021, **27**(3): 242-250.
- [28] NONOGAKI M, NONOGAKI H. Prevention of preharvest sprouting through hormone engineering and germination recovery by chemical biology[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, **8**: 90.
- [29] LEE Y J, PARK S Y, KIM D, *et al.* Differential expression analysis of phytohormone-related genes of Korean wheat (*Triticum aestivum*) in response to preharvest sprouting and abscisic acid (ABA) [J]. *Applied Sciences*, 2021, **11**(8): 3 562.
- [30] SHU K, LIU X D, XIE Q, *et al.* Two faces of one seed; hormonal regulation of dormancy and germination[J]. *Molecular Plant*, 2016, **9**(1): 34-45.
- [31] HAO Y, HONG Y, GUO H, *et al.* Transcriptomic and metabolomic landscape of quinoa during seed germination[J]. *BMC Plant Biology*, 2022, **22**(1): 237.
- [32] 张诗悦, 曹 婧, 李晓荣, 等. 外源激素 ABA 对藜和灰绿藜种子萌发的影响[J]. *新疆农业科学*, 2015, **52**(8): 1 497-1 504.
ZHANG S Y, CAO J, LI X R, *et al.* Effect of exogenous hormone ABA on seed germination of *Chenopodium album* and *C. glaucum* [J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2015, **52**(8): 1 497-1 504.
- [33] FIDLER J, ZDUNEK-ZASTOCKA E, PRABUCKA B, *et al.* Abscisic acid content and the expression of genes related to its metabolism during maturation of triticale grains of cultivars differing in pre-harvest sprouting susceptibility [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2016, **207**: 1-9.
- [34] LIU X, ZHANG H, ZHAO Y, *et al.* Auxin controls seed dormancy through stimulation of abscisic acid signaling by inducing ARF-mediated ABI3 activation in *Arabidopsis* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, **110**(38): 15 485-15 490.
- [35] HUSSAIN S, KIM S H, BAHK S, *et al.* The auxin signaling repressor IAA8 promotes seed germination through down-regulation of ABI3 transcription in *Arabidopsis* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, **11**: 111.
- [36] 佐 月, 许永华. 种子萌发过程中 GA 与 ABA 的作用机制研究进展[J]. *分子植物育种*, 2021, **19**(18): 6 221-6 226.
ZUO Y, XU Y H. Research progress on the mechanism of GA and ABA during seed germination [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2021, **19**(18): 6 221-6 226.
- [37] 龚安慧, 郑 伟, 周 涛, 等. 太子参醛氧化酶基因克隆及表达分析[J]. *中药材*, 2018, **41**(1): 43-48.
GONG A H, ZHENG W, ZHOU T, *et al.* Cloning and expression analysis on abscisic acid aldehyde oxidase gene in *Pseudostellaria heterophylla* [J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2018, **41**(1): 43-48.

(编辑:裴阿卫)