

# 氮素和红蓝复合光配比对苋菜幼苗亚硝酸还原酶活性及其基因表达的影响

陈何 王乐 赵春丽 肖昉 郑友峰 刘生财\*

(福建农林大学 园艺植物生物工程研究所,福州 350002)

**摘要** 为了研究苋菜亚硝酸还原酶基因 *NiR* 对不同铵硝配比及红蓝复合光配比调控氮代谢的响应,采用 RT-PCR 结合 qRT-PCR 的方法从大红苋菜中克隆出一个 *NiR* 基因,命名为 *AtrNiR* (GenBank 登录号: MT374155),对其相对表达量进行分析,并测定材料 *NiR* 酶活性。结果表明:1)苋菜 *AtrNiR* 基因含一个 1 785 bp 开放阅读框,编码 594 个氨基酸;2)生物信息学分析表明,苋菜 *AtrNiR* 的蛋白分子式为  $C_{2937}H_{4692}N_{828}O_{873}S_{28}$ ,相对分子质量为 66.47 ku,*AtrNiR* 为亲水性较强的蛋白;3)系统进化树分析表明,苋菜 *AtrNiR* 蛋白序列与甜菜、藜麦和菠菜的 *NiR* 蛋白同源性最高,具有类似的功能;4)苋菜幼苗 *NiR* 酶含量分析表明,不同铵硝配比处理 3 d 时,硝态氮( $NH_4^+-N$ )与铵态氮( $NO_3^- -N$ )摩尔比值为 10:0 时 *NiR* 酶活性最高,处理 6 d 时, $NH_4^+-N$  与  $NO_3^- -N$  摩尔比值为 3:7 时 *NiR* 酶活性最高;不同红蓝光配比处理 3 d 时,红光(*Red*):蓝光(*Blue*)=2:8 处理下 *NiR* 酶活性最高,可见, $NO_3^- -N$  和蓝光能提高苋菜幼苗 *NiR* 酶活性;5)qRT-PCR 分析结果表明,不同铵硝配比处理 3 d 时, $NH_4^+-N$  与  $NO_3^- -N$  摩尔比值为 5:5 时 *AtrNiR* 表达量最高;不同红蓝复合光配比处理 3 d 时,*R*:*B*=2:8 处理下 *AtrNiR* 表达量最高。研究表明,适宜比例的氮素和红蓝复合光能提高 *AtrNiR* 转录水平,改善苋菜幼苗的氮代谢,为优质苋菜工厂化生产提供理论支撑。

**关键词** 苋菜;亚硝酸还原酶;酶活性;基因克隆;表达分析

中图分类号 Q943.2;S636.4

文章编号 1007-4333(2021)08-0061-11

文献标志码 A

## Effects of nitrogen and red and blue light on *NiR* enzyme activity and gene expression in *Amaranthus tricolor* L. seedlings

CHEN He, WANG Le, ZHAO Chunli, XIAO Fang, ZHEN Youfeng, LIU Shengcai\*

(Institute of Horticultural Plant Bioengineering, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract** To study the response of amaranth *NiR* gene to nitrogen metabolism regulated by different ammonium and nitrate ratio and red and blue composite light ratio, a *NiR* gene named *AtrNiR* (GenBank Accession no. MT374155) was cloned from Amaranth by RT-PCR combined with qRT-PCR, its relative expression was analyzed and the activity of *NiR* enzyme was measured. The results showed that 1) The *AtrNiR* gene contained an open reading frame of 1 785 bp in length, which encoded 595 amino acids; 2) Bioinformatics analysis indicated that the protein molecular formula of *AtrNiR* is  $C_{2937}H_{4692}N_{828}O_{873}S_{28}$ , with a relative molecular mass of 66.47 ku. It is a hydrophilic protein; 3) Phylogenetic tree analysis showed that the *AtrNiR* protein sequence has the highest homology with that of *Beta vulgaris* L., *Chenopodium quinoa* Willd. and *Spinacia oleracea* L. and has similar function; 4) The analysis of nitrite reductase content in Amaranth seedlings showed that the nitrite reductase activity is the highest when the molar ratio of  $NH_4^+ -N$  to  $NO_3^- -N$  was 10:0 at different ammonium nitrate ratios for 3 days. When the molar ratio of  $NH_4^+ -N$  to  $NO_3^- -N$  was

收稿日期:2020-10-19

基金项目:福建省自然科学基金项目(2018J01700);福建农林大学科技创新专项基金项目(CXZX2017174,CXZX2016118,CXZX201719)

第一作者:陈何,硕士研究生,E-mail:2442369895@qq.com

通讯作者:刘生财,副教授,主要从事园艺植物生物技术与品质代谢研究,E-mail:1215698900@qq.com

3 : 7, the nitrite reductase activity is the highest for 6 days. The nitrite reductase activity was the highest under the treatment of  $R : B = 2 : 8$  with different red and blue light ratios for 3 days. It can be seen that  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  and blue light can improve the NiR enzyme activity of amaranth seedlings; 5) qRT-PCR analysis showed that *AtrNiR* expression was highest when the molar ratio of  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  to  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  is 5 : 5 at different ammonium nitrate ratios for 3 days. The *AtrNiR* expression was the highest under the treatment of  $R : B = 2 : 8$  with different red and blue light ratios for 3 days. The results suggested that the nitrogen absorption and nitrogen metabolism of Amaranth, seedlings were improved by the appropriate ratio of nitrogen and red and blue combined light energy. The study provides theoretical support for the factory production of quality amaranth.

**Keywords** *Amaranthus tricolor* L.; nitrite reductase; enzyme activity; gene clone; expression analysis

苋菜 (*Amaranthus tricolor* L.) 是石竹目苋科苋属下的一年生草本植物, 茎叶茂盛, 在我国南北各地均有栽培, 是夏季的主要蔬菜之一, 苋菜不论茎叶还是种子均具有营养价值和药用价值<sup>[1]</sup>。为了保证苋菜周年生产, 可以利用光源植物工厂进行生产。而营养元素和光照是植物工厂最重要的 2 个调控因素<sup>[2]</sup>。氮素是植物生长发育所必须的基本营养元素之一, 在植物生长发育中发挥着重要作用, 直接影响蔬菜的产量和品质。硝态氮 ( $\text{NO}_3^-$ ) 和铵态氮 ( $\text{NH}_4^+$ ) 是植物吸收和利用的 2 种主要的无机氮素形态, 影响植物的氮素同化过程, 调控植物生长<sup>[3-4]</sup>。亚硝酸还原酶 (nitrite reductase, NiR) 是氮素同化途径的关键控制酶<sup>[5]</sup>。与硝酸还原酶 (nitrate reductase, NR) 相比较, 有关 NiR 的研究较少。Lahners 等<sup>[6]</sup>首先提出了玉米 NiR 分子结构。随后在菠菜、水稻、烟草、拟南芥、白菜和小麦等高等植物中均克隆出 NiR 基因<sup>[7-11]</sup>。此外, 光质对植物氮代谢关键酶表达调控也有着十分重要的作用, 在对水稻、番茄、黄瓜和烟草等作物的研究中发现<sup>[12-15]</sup>, 蓝光处理可提高植株 NiR 基因的相对表达量, 有效改善氮代谢, 进而促进其总氮升高; 而红光有利于提高植株碳水化合物含量, 能够促进植株茎粗和干鲜重<sup>[13]</sup>。近年来的研究发现红蓝组合光能够显著提高植物氮代谢相关酶活性和植株体内游离氨基酸含量<sup>[16]</sup>; 增加红蓝复合光中蓝光比例可增强苦瓜幼苗和桑树幼苗叶片氮代谢<sup>[17-18]</sup>。

但是目前对于不同红蓝复合光配比对氮代谢的影响更多集中于硝酸还原酶 (NR)、谷氨酰胺合成酶 (glutamine synthetase, GS) 及谷氨酸合成酶 (glutamate synthase, GOGAT) 这 3 种酶活性而对 NiR 酶活性的研究很少, 在转录水平上研究也多集中于 NR 和 NiR 基因, 本研究则从 NR、NiR、NRT 和 AMT 4 个基因来分析不同配比红蓝复合光对苋

菜氮代谢的影响。以苋菜幼苗为材料, 克隆了氮代谢关键基因 *AtrNiR* 基因, 测定了不同氮素形态配比处理后 NiR 酶的活性, 以及转录水平下 *AtrNiR* 基因的表达变化, 以此来确定最佳氮素形态配比; 在最佳氮配比条件下, 再进行红蓝复合光配比筛选, 为最适宜苋菜植物工厂的光环境参数<sup>[19]</sup>设计提供依据, 为将来进一步研究苋菜 *AtrNiR* 基因功能奠定基础, 同时改善因过量施肥所导致的硝酸盐和亚硝酸盐积累的污染<sup>[20]</sup>。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

本研究以‘大红’苋菜为材料, 试验材料由福建农林大学园艺植物生物工程研究所提供。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 材 料 处 理

将‘大红’苋菜种子均匀地播种于铺有 2 层滤纸的塑料培养皿上 (每个培养皿约 80 粒), 然后将培养皿随机分为 6 组, 每组 3 盘, 每个培养皿加入 5 mL 的蒸馏水, 放入光照培养室 (25 °C, 白光, 光照时间 12 h/d) 培养 7 d, 期间每个培养皿补充 200  $\mu\text{L}$  的蒸馏水, 保证滤纸的湿润。

然后向 5 个处理 N1~N5 (表 1) 的每个培养皿中加入 5 mL N 溶液, 以添加蒸馏水为对照 (CK)。之后将材料继续放入光照培养室培养, 将每 3 个培养皿材料作为一次重复用于取样, 分别在培养 3 和 6 d 时, 取样品的胚轴和子叶, 用液氮冻存并保存于 -80 °C 冰箱用于 NiR 酶活性测定、苋菜总 RNA 提取及 qRT-PCR 分析。为后续试验确实最佳氮配比。每种处理设置 3 次重复。

同样, 按照上述方法获得 7 d 苋菜幼苗后, 向每组培养皿加入 5 mL N3 (最佳氮配比) 溶液, 随即将材料分别放入不同红蓝复合光下培养, 培养条件设置  $R : B$  (即 *Red* : *Blue*) = 0 : 10 (116  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ )、

$R : B = 2 : 8$  ( $108 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ )、 $R : B = 4 : 6$  ( $148 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ )、 $R : B = 6 : 4$  ( $159 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ )、 $R : B = 8 : 2$  ( $171 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ )、 $R : B = 10 : 0$  ( $201 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ) 下培养,光照时间 12 h/d。将

每 3 个培养皿材料作为 1 次重复,在培养 3 d 取样品的胚轴和子叶,用液氮冻存并保存于  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱用于 NiR 酶活性测定及 qRT-PCR 分析。每种处理设置 3 次重复。

表 1 不同处理下 N 溶液的铵硝摩尔配比

Table 1 Ammonium and nitrate molar ratio of N solution under different treatment

处理 Treatment	铵态氮 : 硝态氮 $\text{NH}_4^+ - \text{N} : \text{NO}_3^- - \text{N}$	$\text{NH}_4^+ - \text{N}/$ (mmol/L)	$\text{NO}_3^- - \text{N}/$ (mmol/L)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/$ (mmol/L)	$\text{NaNO}_3/$ (mmol/L)
CK	0 : 0	0	0	0	0
N1	0 : 10	0	287.1	0	393.6
N2	3 : 7	84.8	200.4	310.9	274.7
N3	5 : 5	142.3	143.8	521.8	197.1
N4	7 : 3	202.9	87.2	744.0	119.5
N5	10 : 0	287.7	0	1 054.9	0

1.2.2 苋菜总 RNA 提取及 cDNA 合成

利用购买于北京百泰克生物技术有限公司的多糖多酚 RNA 提取试剂盒,提取苋菜材料总 RNA,提取后利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性,之后利用实验室的超微量分光光度计 (Thermo Electron Corp, USA) 检测提取出的苋菜 RNA 样品浓度,再利用 Gene Racer™ 试剂盒 (TaKaRa) 将提取出的苋菜材料总 RNA 反转录为 cDNA,用反转录出的 cDNA 进行 NiR 基因克隆。

1.2.3 苋菜 *AtrNiR* 基因的克隆

根据苋菜转录组数据库 (SRA: SSR924089-SSR924092),查找数据库中 *NiR* 基因序列片段,查找出后将其与 NCBI 中登录的 *NiR* 基因进行序列比对,找出具有完整 ORF 序列片段,利用 DNAMAN 软件设计苋菜 *NiR* 基因的 ORF 克隆引物(表 2)。参照 TaKaRa LA Taq 说明书进行 PCR 扩增,扩增后首先用琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物长度及完整性,随即将长度正确且完整的目的片段

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequence

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	用途 Description
<i>AtrNiR</i> -ORF-F	GATGGCTTCTCTCCAGTAAA	ORF 验证
<i>AtrNiR</i> -ORF-R	CGATTAGCTTACTGCTCTGC	ORF validation
qRT- <i>AtrNiR</i> -F	CTAGAGTGGAGGAAAGAGATGGG	qRT-PCR
qRT- <i>AtrNiR</i> -R	GACGGTGAAAGAGTCCAAGC	
qRT- <i>AtrNR</i> -F	GGCTGAAATCAACGCTCTTAAT	qRT-PCR
qRT- <i>AtrNR</i> -R	CGGAACATAGTGGAGAGGTACAG	
qRT- <i>AtrAMT</i> -F	CTCATCATGTCTTGCAACGC	qRT-PCR
qRT- <i>AtrAMT</i> -R	AGGTAGGTGGTGTGCGACGG	
qRT- <i>AtrNRT</i> -F	CGGCAGATACTACCAAGAAAGTTG	qRT-PCR
qRT- <i>AtrNRT</i> -R	CGGTTCCATTAAACACTGTGATC	
<i>EF1a</i> -F	GGGATGCTGGTATGGTGAA	qRT-PCR
<i>EF1a</i> -R	ACGGGTCATTTCTTCTTCTGAG	

切胶回收,之后通过 TA 克隆,挑取生成的阳性克隆进行摇菌,菌液浑浊后进行菌液 PCR 扩增,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后将菌液中有目的条带的样品送到北京六合华大基因科技有限公司进行测序。

#### 1.2.4 生物信息学分析

使用 ExPASy-Prot-param (<https://web.expasy.org/protparam>)、Plant-mPLOC (<https://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi>)、NCBI-CDS (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)、ExPASy-PROSITE 数据库 (<https://prosite.expasy.org>)、NetPhos 3.1 (<https://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos>)、PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>) 及 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 等在线软件预测编码蛋白的理化性质亚细胞定位、蛋白结构域、蛋白功能位点、蛋白质磷酸化位点、蛋白二级结构以及蛋白三级结构。使用 DNAMAN 软件进行苋菜 NiR 引物设计、序列拼接及比对,使用 MEGA-X 软件 Neighbor-Joining 法参数都设为默认值,构建 NiR 蛋白系统进化树。

#### 1.2.5 NiR 酶活性测定

按照苏州科铭生物技术有限公司的 NiR 酶试剂盒说明书,测定上述苋菜材料中酶的活性并进行计算。

#### 1.2.6 qRT-PCR 分析

在克隆出苋菜 *AtrNiR* 基因 ORF 基础上设计相对定量表达特异引物,并根据苋菜转录组数据库 (SRA:SSR924089-SSR924092) 设计植物氮代谢途径中的关键基因 *AtrNR* (nitrate reductase)、*AtrAMT* (ammonium transporter) 和 *AtrNRT* (nitrogen transporter) 相对定量表达特异引物 (表 2)。通过 qRT-PCR 检测不同处理下 *AtrNiR*、*AtrNR*、*AtrNRT* 和 *ArtAMT* 基因在上述材料中的表达情况。参照 SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒 (TaKaRa), qRT-PCR 反应体系为 20  $\mu$ L, 每个样品设置 3 次生物学重复,利用罗氏 LightCycler 480 仪器分别扩增 4 个基因及内标基因 *EF1a*,利用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法分别计算 4 个基因的相对表达量。

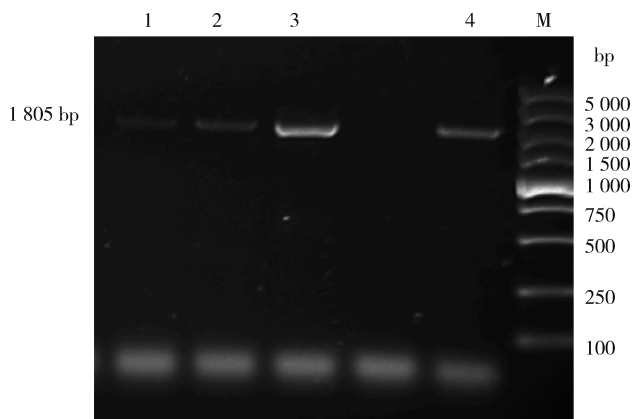
#### 1.2.7 数据分析

使用 Excel 2010 统计数据,使用 SPSS 22.0 分析数据差异显著性,使用 Origin 2017 绘制柱形图。

## 2 结果与分析

### 2.1 苋菜 *AtrNiR* cDNA 序列的克隆

以上述苋菜材料提取出的 cDNA 作为模板,通过苋菜转录组数据库信息筛选苋菜 *NiR* 基因 cDNA 片段来设计引物,进行 PCR 扩增验证 ORF (图 1)。最终获得苋菜 *NiR* 基因的 ORF 序列,命名为 *AtrNiR* (GenBank 登录号:MT374155)。苋菜 *AtrNiR* 基因 ORF 全长为 1 785 bp,编码 594 个氨基酸。



M, DNA 标准 DL 5 000; 1~4, *AtrNiR* 基因的扩增产物。

M, DL 5 000 DNA Marker; 1~4, products of *AtrNiR* gene.

图 1 苋菜 *AtrNiR* 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of *AtrNiR* gene

### 2.2 苋菜 *AtrNiR* 基因生物信息学分析

使用在线软件 ProtParam 预测苋菜 *AtrNiR* 基因编码蛋白质理化性质,发现 *AtrNiR* 蛋白分子式为  $C_{2937}H_{4692}N_{828}O_{873}S_{28}$ ,相对分子质量为 66.47 ku,理论等电点为 6.00,总原子数为 9 358,总平均疏水指数为 -0.316,可以得知 *AtrNiR* 是亲水性蛋白。使用 NCBI-CDS 及 PROSITE 预测蛋白结构域及功能位点,发现该蛋白含有 1 个保守结构域,即 PLN02431 superfamily (图 2),也就是 ferredoxin-nitrite reductase,功能位点位于序列的中后位置。使用 PSORT 预测亚细胞定位,发现该蛋白 65.2% 可能性位于线粒体 (mitochondrial),21.7% 可能性位于细胞核 (nuclear) 以及 13.0% 可能性位于细胞质 (cytoplasmic)。使用在线软件 PSIPRED 预测 *AtrNiR* 蛋白二级结构,发现该蛋白二级结构是以无规则卷曲和  $\alpha$ -螺旋为主,分别占 43.03% 和 36.81%。利用 SWISS-MODEL 预测蛋白三级结构,发现该模型是以菠菜 *NiR* 作为结构基础建模,两者序列一致性达 91.68% (图 3)。通过 MEGA-X

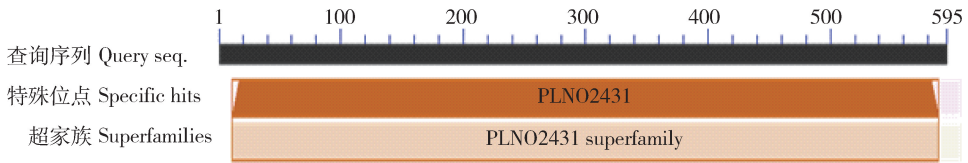


图 2 苋菜 AtrNiR 蛋白氨基酸序列保守结构域检索

Fig. 2 Conservative domain search of amino acid sequence of AtrNiR

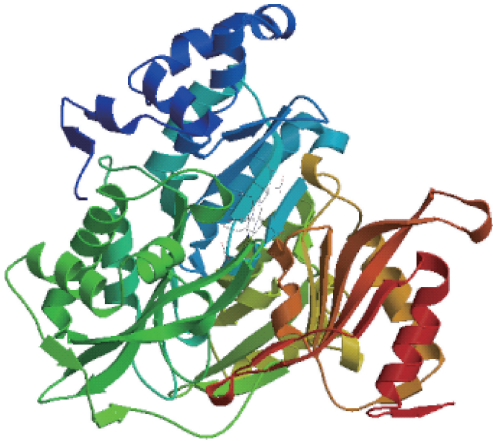


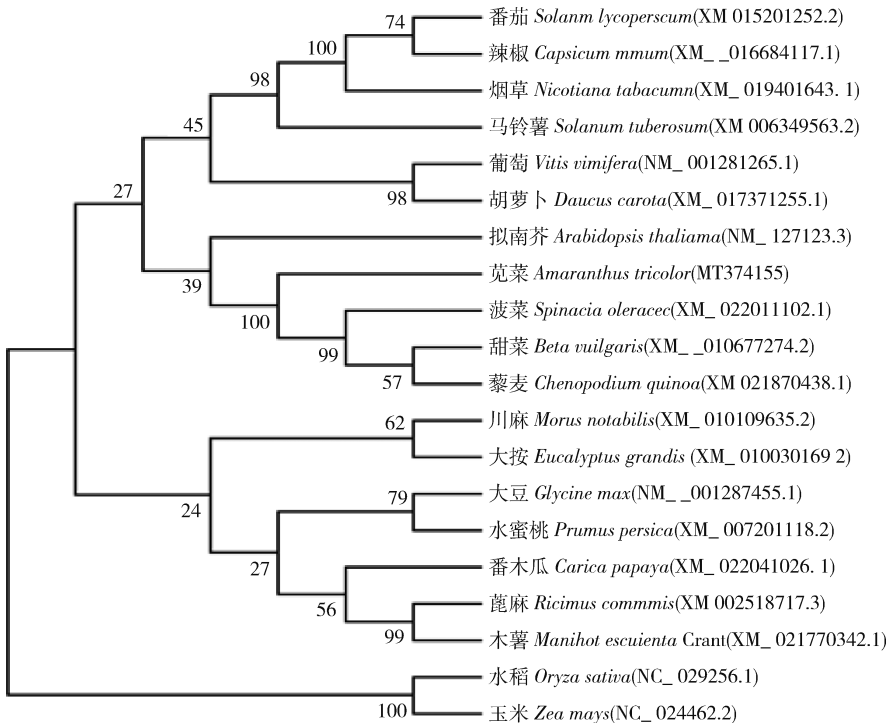
图 3 预测的苋菜 AtrNiR 三维结构

Fig. 3 Predicted three-dimensional structure of amaranth AtrNiR

将苋菜 AtrNiR 蛋白与 NCBI 中登录的 20 种植物的 NiR 蛋白作进化树分析发现,20 种 NiR 蛋白分为 5 个分支,苋菜 AtrNiR 与拟南芥、菠菜、甜菜及藜麦的 NiR 蛋白聚为 1 个分支(图 4)。

### 2.3 不同处理对苋菜幼苗中 NiR 酶活性的影响

不同铵硝配比 N 溶液处理 3 d 后,苋菜幼苗 NiR 酶活性最高的是 N5 溶液处理,与对照组相比有显著差异,最低的是 N2 溶液处理,与 CK 有极显著差异,但是 N2,N3 和 N4 处理之间 NiR 酶活性没有显著差异(图 5(a))。不同铵硝配比 N 溶液处理 6 d 后,苋菜幼苗 NiR 酶活性最高的是 N2 溶液处理,除 N1 溶液处理,其它 N 溶液处理的苋菜幼苗 NiR 酶活性含量高与对照组相比显示出极显著差异,此时苋菜幼苗 NiR 酶活性含量随着 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 配

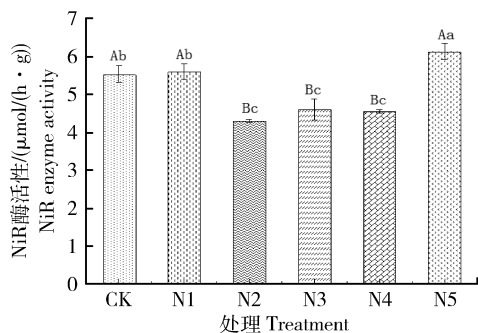


分支上的数值表示 1 000 次重复抽样符合聚类的百分数。

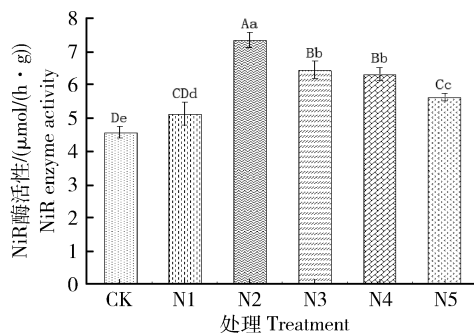
The number on the branch represents the percentage of 1 000 repeated samples in accordance with the clustering.

图 4 AtrNiR 蛋白系统进化树

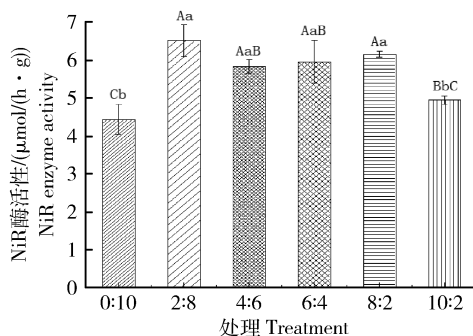
Fig. 4 Phylogenetic tree for AtrNiR protein



(a) 不同铵硝配比处理3 d后苋菜幼苗NiR酶活性  
(a) Nitrite reductase activity of amaranth seedlings is treated with different ammonium and nitrate ratio for 3 days



(b) 不同铵硝配比处理6 d后苋菜幼苗NiR酶活性  
(b) Nitrite reductase activity of amaranth seedlings is treated with different ammonium and nitrate ratio for 6 days



(c) 相同铵硝配比不同红蓝光配比处理3 d后苋菜幼苗NiR酶活性  
(c) Nitrite reductase activity of amaranth seedlings was treated with the same ammonium and nitrate ratio and different red and blue ratio for 3 days

CK~N5 表示不同铵硝摩尔配比(0:0, 0:10, 3:7, 5:5, 7:3, 10:0)。不同大写字母表示 0.01 水平差异极显著,不同小写字母表示 0.05 水平差异显著。下同。

CK~N5 represents different ammonium and nitrate molar ratio (0:0, 0:10, 3:7, 5:5, 7:3, 10:0). Different uppercase letters indicate extremely significant difference at 0.01 level, and different lowercase letters indicate significant difference at 0.05 level. The same below.

图5 不同处理下苋菜幼苗中NiR酶活性

Fig. 5 Nitrite reductase activity of amaranth seedlings under different treatments

比的增加呈现先上升后下降趋势(图5(b))。当相同铵硝配比(N3溶液)不同红蓝复合光配比下处理3 d,苋菜幼苗NiR酶活性含量最高的处理是R:B=2:8,以全蓝光为对照,不同红蓝光配比处理下的苋菜幼苗NiR酶含量都与对照有着极显著差异,但是除对照外,不同红蓝光配比处理间苋菜幼苗NiR酶含量差异不明显(图5(c)),可能是因为处理3 d时间过短。

## 2.4 不同处理对*AtrNiR*、*AtrNR*、*AtrNRT*和*AtrAMT*基因在苋菜幼苗表达量的影响

当苋菜幼苗在不同铵硝配比的N溶液处理3 d后,*AtrNiR*和*AtrNR*表达量最大的都是N3溶液处理,表达量最低的都是N5溶液处理(图6(a)和(b)),说明N3溶液处理对苋菜幼苗氮代谢有最大促进作用,以此确定了N3是后续研究不同红蓝光配比处理的最佳氮配比条件。经过不同铵硝配比N

溶液处理后,*AtrAMT*基因表达量与CK相比均呈现极显著下降(图6(c));而*AtrNRT*基因在N1处理下相对表达量最高,与CK相比有极显著差异,随着N溶液中 $\text{NH}_4^+$ -N配比的增加,*AtrNRT*基因表达量呈现先上升后下降的趋势,其中N4和N5溶液处理下*AtrNRT*基因表达量的差异不显著(图6(d))。

向苋菜幼苗培养皿中加入N3溶液,以全蓝光(R:B=0:10)为对照,苋菜幼苗经过不同红蓝光配比处理3 d后,4个基因在R:B=0:10和R:B=2:8处理下的基因相对表达量均较高且与其它4个处理有极显著差异。对*AtrNiR*和*AtrNRT*基因而言,R:B=2:8处理下基因相对表达量最高,与CK相比均有极显著差异(图7(a)和(d));对*AtrNR*和*AtrAMT*基因而言,全蓝光(R:B=0:10)处理下基因相对表达量最高,与其它处理相比有极显著差异(图7(b)和(c))。

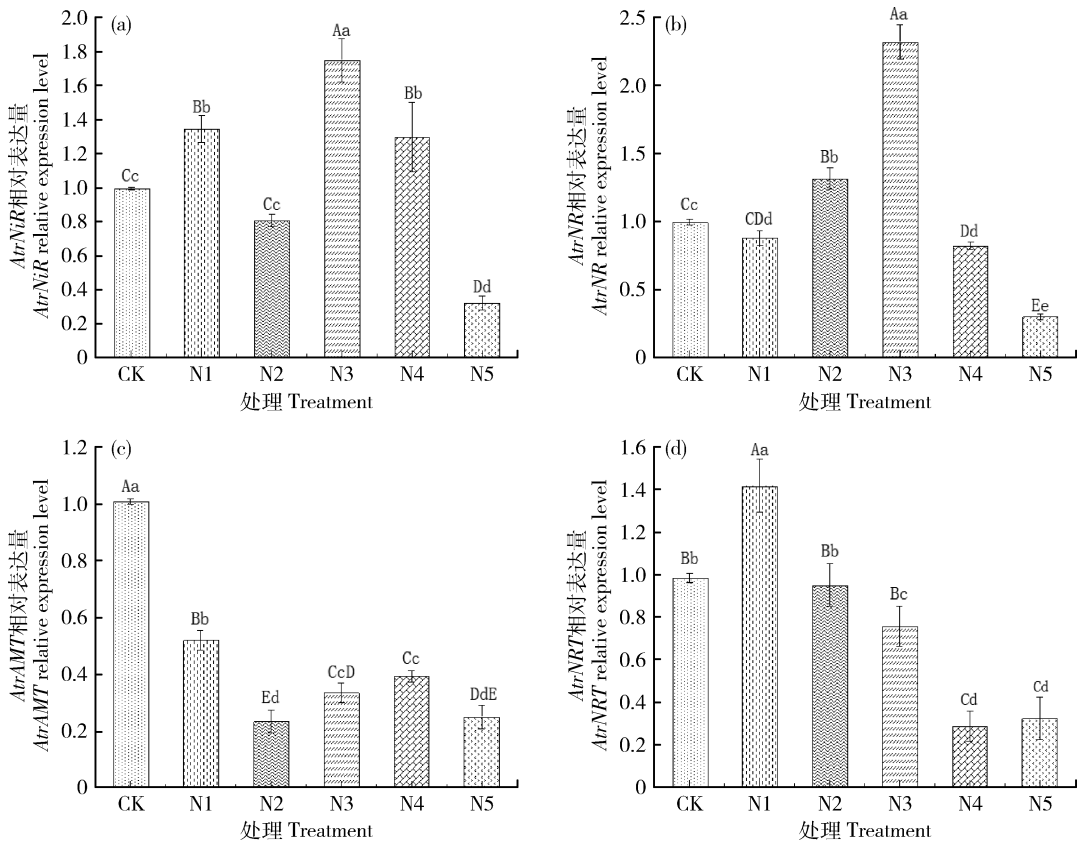


图 6 不同铵硝配比处理 3 d 后 *AtrNiR*(a)、*AtrNR*(b)、*AtrAMT*(c)和 *AtrNRT*(d)基因的相对表达量

Fig. 6 Relative expression of *AtrNiR* (a), *AtrNR* (b), *AtrAMT* (c) and *AtrNRT* (d) genes in 3 days treated with different ammonium and nitrate ratio

### 3 讨论与结论

#### 3.1 苋菜 *AtrNiR* 基因分析

本研究通过克隆首次在苋菜中获得了 *NiR* 基因的 ORF 序列,命名为 *AtrNiR* 并在 NCBI 上提交,得到 GenBank 登录号:MT374155。生物信息学分析及进化树分析表明,苋菜 *AtrNiR* 编码的蛋白属于氮代谢相关蛋白,其氨基酸序列具有完整 *NiR* 结构,与其他物种 *NiR* 蛋白具有高度相似性。与苋菜 *AtrNiR* 蛋白亲缘关系最近的是菠菜、甜菜和藜麦的 *NiR* 蛋白,并且和石竹目植物及拟南芥聚为一个分支<sup>[21]</sup>。以上结果表明苋菜 *AtrNiR* 属于 *NiR* 家族,与其它植物中的 *NiR* 蛋白具有类似的功能,在生物进化过程中是保守的<sup>[22]</sup>。

#### 3.2 不同氮素形态对比对苋菜 *NiR* 酶活性及 *AtrNiR* 基因相对表达量的影响

在高等植物叶片中,从  $\text{NO}_2^-$  到  $\text{NH}_4^+$  的同化通过电子供体铁氧还蛋白在叶绿体中由 *NiR* 完

成<sup>[23]</sup>。在本研究中,不同氮素配比处理 3 d 后 *NiR* 酶活性在 N5 处理下最高,这与前人研究结果不一致,可能是处理时间不一致,*NiR* 受到高浓度  $\text{NH}_4^+-\text{N}$  的短时诱导,活性提高;随着处理时间增加,高浓度  $\text{NH}_4^+-\text{N}$  会抑制 *NiR* 活性,同时  $\text{NO}_3^- -\text{N}$  对 *NiR* 有促进作用<sup>[24]</sup>。当处理 6 d 时,*NiR* 酶活性在 N2 处理下最高,说明不同氮素配比下的 *NiR* 酶活性比单一氮素下的更高,植物中 *NiR* 的基因表达规律会受到各种内在和外在因素的影响。对于不同氮素配比处理 3 d 后基因表达结果,*AtrNiR* 与 *AtrNR* 都在 N3 处理下表达量最高,说明 NR 与 *NiR* 存在共促进和共抑制现象,二者是内在的偶联关系<sup>[25]</sup>,*AtrNR* 在 N3 处理下表达量最高且随着  $\text{NH}_4^+ -\text{N}$  配比的增加基因相对表达量呈现先上升后下降的趋势,这与孙敏红等<sup>[26]</sup>在枳橙幼苗中的研究结果一致。但是不同氮素形态对比下处理 3 d 苋菜 *NiR* 酶活性与 *AtrNiR* 基因变化趋势不一致,可能是因为本研究只是克隆和定量分析了苋菜

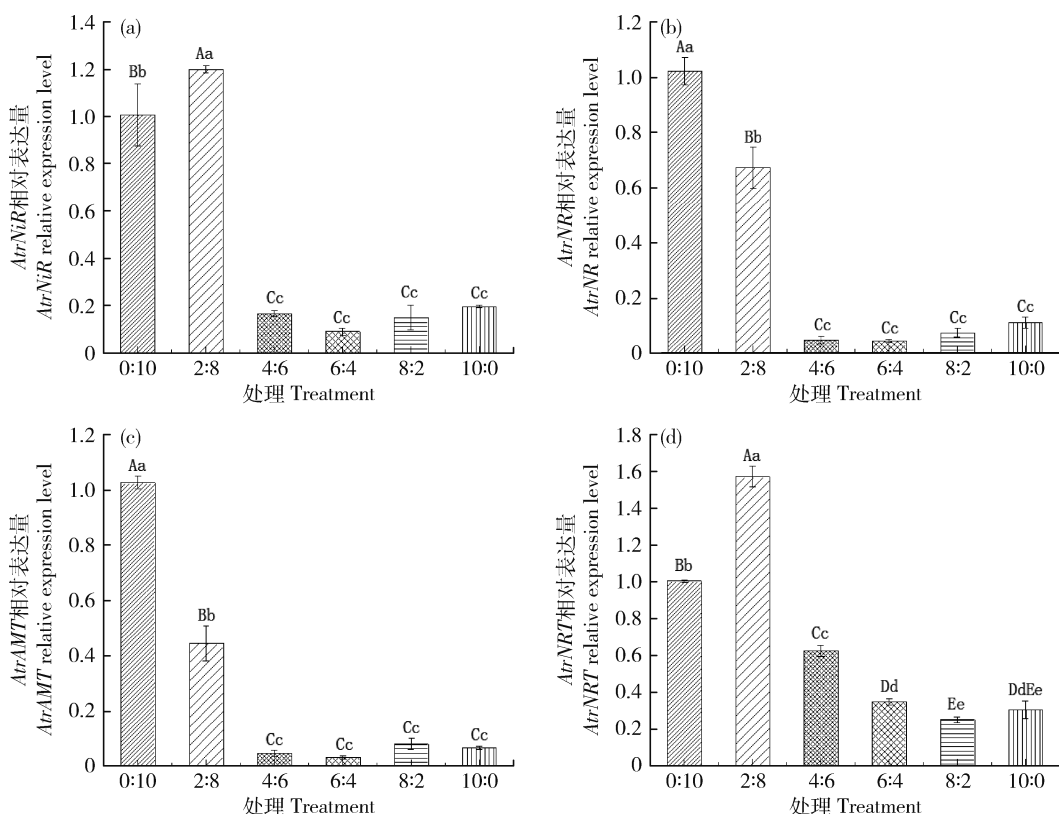


图7 不同红蓝光配比(R:B)处理3 d后 *AtrNiR*(a)、*AtrNR*(b)、*AtrAMT*(c)和 *AtrNRT*(d)基因的相对表达量

Fig. 7 The relative expression of *AtrNiR* (a), *AtrNR* (b), *AtrAMT* (c) and *AtrNRT* (d) genes under different red and blue ratios treatment for 3 days

*NiR* 基因家族其中 1 个成员, 还有其他成员起到了协同或者相互抑制作用。有研究发现, 参与茶氨酸合成途径中相关基因家族不同成员在茶树不同组织及发育时期也存在明显表达差异<sup>[27]</sup>, 因此对于苋菜 *NiR* 酶活性可能也是受整个 *NiR* 基因家族表达影响, 而不是单一 *NiR* 基因影响, 所以在本研究中 *AtrNiR* 基因表达变化趋势与酶活性不一致, 这还需要进一步研究。

### 3.3 不同红蓝光配比对苋菜 *NiR* 酶活性及 *AtrNiR* 基因相对表达量的影响

光是植物生长发育重要环境因子之一, 植株体内合成氨基酸和蛋白质的主要途径是植物氮代谢, 增加红蓝复合光中蓝光比例可促进植株的氮代谢<sup>[12-15]</sup>。*NiR* 是氮同化过程中第二个关键酶, 从本研究结果可以看出, 不同红蓝复合光可显著提高苋菜幼苗 *NiR* 酶活性且远高于单一蓝光和红光处理, 说明红蓝复合光能够提升苋菜中将  $\text{NO}_2^-$  同化为  $\text{NH}_4^+$  的能力, 这与王丽伟<sup>[28]</sup> 在番茄幼苗中的结果相一致。在本研究中, 在  $R:B=0:10$  与  $R:B=2:8$

处理下, *AtrNiR*、*AtrAMT*、*AtrNR* 与 *AtrNRT* 的相对表达量都远高于其他处理, 可以说明氮代谢相关基因受蓝光影响更大, 增加复合光中蓝光比例能够提高苋菜氮代谢基因的转录水平, 改善苋菜氮代谢, 提升苋菜品质。在红蓝复合光处理下 *AtrNiR* 和 *AtrNRT* 相对表达量高于单一蓝光, 而 *AtrNR* 和 *AtrAMT* 刚好相反, 变化趋势不一致说明氮代谢相关基因转录水平的表达虽然受红蓝复合光调节, 但是红蓝复合光对植株氮代谢部分基因转录水平的调节可能有着一个相对滞后的过程<sup>[28]</sup>。

有研究表明 *NiR* 对氮同化及  $\text{NO}$  生产这 2 个决定植物生长速率因素有着关键作用<sup>[29]</sup>, 在获得苋菜 *AtrNiR* 基因后, 研究苋菜 *NiR* 基因结构, 以及其在不同处理下的表达特性, 可整体认识苋菜氮素初级同化, 为后续更加全面分析 *NR*、*NiR*、*AMT* 及 *NRT* 等氮代谢关键基因间的相互作用奠定基础。环境参数改变会导致植物代谢性状显著变化<sup>[30]</sup>, 红光和蓝光处理能促进植物生长以及代谢物积累<sup>[31-32]</sup>。本研究结果表明, 合适的铵硝配比和红蓝



复合光配比可以显著提高苋菜幼苗相关氮代谢酶活性和氮代谢基因相对表达量。通过后续进一步研究可以提高苋菜对氮的吸收利用效率,改善苋菜幼苗氮代谢,促进总氮升高,有助于后续更深入研究苋菜的氮代谢调节机制,同时为基因操作培育苋菜氮高效利用品种提供分子生物学理论依据<sup>[33]</sup>,对苋菜植物工厂环境参数设计及建立也具有重要的科学指导意义。

## 参考文献 References

- [1] 陈家兰, 赵春丽, 王晓, 郑友峰, 赖钟雄, 刘生财. 苋菜 AmSPL 基因家族转录组鉴定及表达分析[J]. 中国农业大学学报, 2020, 25(12): 19-29  
Chen J L, Zhao C L, Wang X, Zheng Y F, Lai Z X, Liu S C. Transcriptome-wide identification and expression analysis of AmSPL family members in *Amaranthus tricolor* L[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2020, 25(12): 19-29 (in Chinese)
- [2] 张玉彬, 刘文科, 杨其长, 查凌雁, 周成波, 邵明杰, 王奇, 李宝石, 吴启保. 采收前 LED 红蓝光连续照射对水培生菜品质的提升作用[J]. 中国农业气象, 2020, 41(7): 436-445  
Zhang Y B, Liu W K, Yang Q C, Zha L Y, Zhou C B, Shao M J, Wang Q, Li B S, Wu Q B. Improvement effects of red and blue LED continuous lighting before harvest on quality of hydroponic lettuce[J]. *Chinese Journal of Agrometeorology*, 2020, 41(7): 436-445 (in Chinese)
- [3] 汪建飞. 营养液不同铵硝比对菠菜产量和品质影响的机理研究[D]. 南京:南京农业大学, 2007  
Wang J F. Mechanisms and effects of  $\text{NH}_4^+ - \text{N}/\text{NO}_3^- - \text{N}$  ratio in nutrient solution on growth and quality of spinach (*Spinacia oleracea* L) [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2007 (in Chinese)
- [4] 匡鹤凌. 氮素水平对喜树生长、生理及喜树碱产量的影响[D]. 南京:南京林业大学, 2016  
Kuang H L. Influence of nitrogen levels on the growth and camptothecin content of camptotheca acuminata seedlings[D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2016 (in Chinese)
- [5] 刘晓嵩. 硝态氮和甘氨酸态氮供应下菠菜氮素吸收与代谢差异研究[D]. 上海:上海交通大学, 2016  
Liu X S. Nitrogen uptake and metabolism of spinach (*Spinacia oleracea* L) under nitrate or glycine supply[D]. Shanghai: Shanghai Jiaotong University, 2016 (in Chinese)
- [6] Lahners K, Kramer V, Back E, Privalle L, Rothstein S. Molecular cloning of complementary DNA encoding maize nitrite reductase[J]. *Plant Physiology*, 1988, 88(3): 741-746
- [7] Seith B, Schuster C, Mohr H. Coaction of light, nitrate and a plastidic factor in controlling nitrite-reductase gene expression in spinach[J]. *Planta*, 1991, 184(1): 74-80
- [8] Polcyn W, Luciński R. Effect of N oxyanions on anaerobic induction of nitrate reductase in subcellular fractions of *Bradyrhizobium* sp (Lupinus)[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2009, 95(2): 159-164
- [9] Michelle M. Dose M H S K. The ferredoxin-binding site of ferredoxin: nitrite oxidoreductase[J]. *Plant Physiol*, 1997, 3(114): 1047-1053
- [10] 孙菲菲, 蒋芳玲, 侯喜林, 李英, 杨学东. 白菜亚硝酸还原酶基因 BcNiR 的克隆及表达分析[J]. 园艺学报, 2009, 36(10): 1511-1518  
Sun F F, Jiang F L, Hou X L, Li Y, Yang X D. Molecular cloning and characterization of nitrite reductase gene BcNiR from non-heading Chinese cabbage [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2009, 36(10): 1511-1518 (in Chinese)
- [11] 余茂云, 陈朵朵, 冯晨, 杜丽璞, 叶兴国. 小麦亚硝酸还原酶基因及调控序列克隆、定位和表达分析[J]. 作物学报, 2011, 37(1): 28-39  
She M Y, Chen D D, Feng C, Du L P, Ye X G. Isolation, chromosome assignment, and expression assay of nitrite reductase gene and regulatory sequence in wheat [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2011, 37(1): 28-39 (in Chinese)
- [12] 郭银生, 谷艾素, 崔瑾. 光质对水稻幼苗生长及生理特性的影响[J]. 应用生态学报, 2011, 22(6): 1485-1492  
Guo Y S, Gu A S, Cui J. Effects of light quality on rice seedlings growth and physiological characteristics[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2011, 22(6): 1485-1492 (in Chinese)
- [13] 孙娜, 魏珉, 李岩, 王秀峰, 杨凤娟, 史庆华. 光质对番茄幼苗碳氮代谢及相关酶活性的影响[J]. 园艺学报, 2016, 43(1): 80-88  
Sun N, Wei M, Li Y, Wang X F, Yang F J, Shi Q H. Effects of light quality on carbon and nitrogen metabolism and enzyme activities in tomato seedlings[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2016, 43(1): 80-88 (in Chinese)
- [14] 唐大为, 张国斌, 张帆, 潘香梅, 郁继华. LED 光源不同光质对黄瓜幼苗生长及生理生化特性的影响[J]. 甘肃农业大学学报, 2011, 46(1): 44-48  
Tang D W, Zhang G B, Zhang F, Pan X M, Yu J H. Effects of different LED light qualities on growth and physiological and biochemical characteristics of cucumber seedlings [J].

- Journal of Gansu Agricultural University*, 2011, 46(1): 44-48 (in Chinese)
- [15] 史宏志, 韩锦峰, 远彤, 官春云. 红光和蓝光对烟叶生长、碳氮代谢和品质的影响[J]. 作物学报, 1999, 25(2): 215-220  
Shi H Z, Han J F, Yuan T, Guan C Y. Effects of red and blue light proportion on leaf growth, carbon-nitrogen metabolism and quality in tobacco[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 1999, 25(2): 215-220 (in Chinese)
- [16] 吴根良, 郑积荣, 李许可. 不同 LED 光源对设施越冬辣椒果实品质和产量的影响[J]. 浙江农林大学学报, 2014, 31(2): 246-253  
Wu G L, Zheng J R, Li X K. Effect of different LED sources on the quality and yield of overwintering pepper in the greenhouse[J]. *Journal of Zhejiang A & F University*, 2014, 31(2): 246-253 (in Chinese)
- [17] 秦永梅, 韩凤英, 杨慧, 刘敏. 光质对苦瓜幼苗形态建成及碳氮代谢的影响[J]. 中国瓜菜, 2020, 33(7): 24-27, 55  
Qin Y M, Han F Y, Yang H, Liu M. Effects of light quality on morphogenesis and carbon and nitrogen metabolism of bitter melon seedlings[J]. *China Cucurbits and Vegetables*, 2020, 33(7): 24-27, 55 (in Chinese)
- [18] 胡举伟, 代欣, 宋涛, 杨晓云, 王庆菊, 孙广玉. 红蓝光配比对桑树幼苗碳、氮代谢和内源激素的影响[J]. 草业科学, 2018, 35(10): 2489-2499  
Hu J W, Dai X, Song T, Yang X Y, Wang Q J, Sun G Y. Effect of different proportions of red and blue light on carbon-nitrogen metabolism and endogenous hormones in mulberry seedlings[J]. *Pratacultural Science*, 2018, 35(10): 2489-2499 (in Chinese)
- [19] 林魁. 叶用莴苣设施水培适宜光照模式的研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2018  
Lin K. Investigation of suitable lighting modes for *Lactuca sativa* L in protected hydroponic cultivation [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2018 (in Chinese)
- [20] 曾彦达, 石晓艳, 马凤鸣. 甜菜亚硝酸还原酶(NiR)基因的克隆与分析[J]. 东北农业大学学报, 2012, 43(1): 77-82  
Zeng Y D, Shi X Y, Ma F M. Cloning and analysis of NiR gene in sugar beet [J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2012, 43(1): 77-82 (in Chinese)
- [21] 赵春丽, 王晓, 潘羽飞, 彭丽云, 赖钟雄, 刘生财. 莧菜 AtGAI 基因克隆及表达分析[J]. 西北植物学报, 2019, 39(2): 199-209  
Zhao C L, Wang X, Pan J F, Peng L Y, Lai Z X, Liu S C. Cloning and expression analysis of AtGAI gene in *Amaranthus tricolor* L[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2019, 39(2): 199-209 (in Chinese)
- [22] 马秀玲, 陈晓平. 菠菜亚硝酸还原酶(NiR)基因的克隆与生物信息分析[J]. 食品与发酵科技, 2013, 49(4): 28-30  
Ma X L, Chen X P. The molecular cloning and bioinformatics analysis of nitrate reductase *Spinacia oleracea* L[J]. *Food and Fermentation Technology*, 2013, 49(4): 28-30 (in Chinese)
- [23] 王剑, 李炳锐, 李晓鹏, 朱旭东, 朱传根, 贾海锋. 利用葡萄糖氮代谢基因的表达评价不同氮肥肥效[J]. 园艺学报, 2016, 43(1): 1-14  
Wang J, Li B R, Li X P, Zhu X D, Zhu C G, Jia H F. Evaluation of N fertilizers effects based on the expression of N metabolic genes[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2016, 43(1): 1-14 (in Chinese)
- [24] 杜永成, 王玉波, 范文婷, 盖志佳, 于敦爽, 谷维, 张俐俐, 马凤鸣. 不同氮素水平对甜菜硝酸还原酶和亚硝酸还原酶活性的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2012, 18(3): 717-723  
Du Y C, Wang Y B, Fan W T, Gai Z J, Yu D S, Gu W, Zhang L L, Ma F M. Effect of nitrogen fertilization on nitrate reductase and nitrite reductase activities of sugar beet [J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2012, 18(3): 717-723 (in Chinese)
- [25] 刁志伟, 于雪, 王玉波, 李彩凤, 盖志佳, 张翼飞, 马凤鸣. 甜菜硝酸还原酶和亚硝酸还原酶偶联调节的研究[J]. 核农学报, 2014, 28(1): 138-145  
Diao Z W, Yu X, Wang Y B, Li C F, Gai Z J, Zhang Y F, Ma F M. Study on nitrate reductase and nitrite reductase coupling regulation of sugar beet [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2014, 28(1): 138-145 (in Chinese)
- [26] 孙敏红, 卢晓鹏, 曹雄军, 李静, 熊江, 谢深喜. 不同氮素形态培养对枳橙幼苗硝酸还原酶活性及相关基因表达的影响[J]. 果树学报, 2017, 34(4): 410-417  
Sun M H, Lu X P, Cao X J, Li J, Xiong J, Xie S X. Effect of different forms of nitrogen on the activity of nitrate reductase and expression of the relative genes in *Citrus sinensis* × *Poncirus trifoliata* [J]. *Journal of Fruit Science*, 2017, 34(4): 410-417 (in Chinese)
- [27] 陈琪, 孟祥宇, 江雪梅, 于淑伟, 宛晓春. 茶树茶氨酸代谢相关基因表达组织特异性分析[J]. 核农学报, 2015, 29(7): 1285-1291  
Chen Q, Meng X Y, Jiang X M, Yu S W, Wan X C. Tissue specificity expression analysis of theanine metabolism pathway related genes in *Camellia sinensis* [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2015, 29(7): 1285-1291 (in Chinese)
- [28] 王丽伟, 李岩, 辛国凤, 魏珉, 杨其长, 米庆华. 红蓝光质对番茄幼苗氮水平和代谢关键酶及基因表达的影响[J]. 园艺学

- 报, 2017, 44(4): 768-776
- Wang L W, Li Y, Xin G F, Wei M, Yang Q C, Mi Q H. Effects of red and blue light quality on nitrogen levels, activities and gene expression of key enzymes involved in nitrogen metabolism from leaves of tomato seedlings[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2017, 44(4): 768-776 (in Chinese)
- [29] Costa-Broseta Á, Castillo M, León J. Nitrite Reductase 1 is a target of nitric oxide-mediated post-translational modifications and controls nitrogen flux and growth in *Arabidopsis* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(19): 1-13
- [30] Viršilė A, Brazaitytė A, Vaštakaitė-Kairienė V, Miliauskienė J, Jankauskienė J, Novičkovas A, Laužikė K, Samuolienė G. The distinct impact of multi-color LED light on nitrate, amino acid, soluble sugar and organic acid contents in red and green leaf lettuce cultivated in controlled environment [J]. *Food Chemistry*, 2019, 310(9): 125799
- [31] Lobiuc A, Vasilache V, Pintilie O, Stoleru T, Burducea M, Oroian M, Zamfirache M M. Blue and red LED illumination improves growth and bioactive compounds contents in acyanic and cyanic *Ocimum basilicum* L microgreens [J]. *Molecules*, 2017, 22(12): E2111
- [32] 孙建瑞, 赵君峰, 符丹丹, 王大红. 不同光质对衣藻 (*Chlamydomonas* sp 212) 生长及油脂积累的影响 [J]. *应用与环境生物学报*, 2020, 26(4): 1016-1022
- Sun J R, Zhao J F, Fu D D, Wang D H. Effects of different lights on the growth and lipid accumulation of *Chlamydomonas* sp 212 [J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2020, 26(4): 1016-1022 (in Chinese)
- [33] 张芬, 王丽鸳, 成浩, 韦康, 胡娟, 张成才, 刘圆, 吴立赞, 李海琳. 茶树亚硝酸还原酶基因 CsNiR 的克隆及表达分析 [J]. *园艺学报*, 2016, 43(7): 1348-1356
- Zhang F, Wang L Y, Cheng H, Wei K, Hu J, Zhang C C, Liu Y, Wu L Y, Li H L. Molecular cloning and expression analysis of nitrite reductase gene CsNiR in tea plant [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2016, 43(7): 1348-1356 (in Chinese)

责任编辑: 董金波