

doi:10.11733/j.issn.1007-0435.2026.07.006

引用格式:吴倩,赵雅茹,曹克璠,等.基于生理与转录组学的高加索三叶草耐寒性分析[J].草地学报,2026,34(7):2403—2414

WU Qian, ZHAO Ya-ru, CAO Ke-fan, et al. Physiological Changes and Transcriptomic Analysis of Caucasian Clover under Low Temperature Stress[J]. Acta Agrestia Sinica, 2026, 34(7):2403—2414

基于生理与转录组学的高加索三叶草耐寒性分析

吴倩¹, 赵雅茹², 曹克璠¹, 马一鸣¹, 索媛¹, 李舒宁¹, 齐海波¹, 王明玖^{1*}

(1. 内蒙古农业大学草业学院/草地资源教育部重点实验室, 内蒙古呼和浩特 010011;

2. 内蒙古正时生态农业(集团)有限公司, 内蒙古呼和浩特 010010)

摘要:本研究以耐寒性强的多年生牧草高加索三叶草(*Trifolium ambiguum* M. Bieb.)为材料,以20℃正常生长的幼苗为对照(CK),设置4℃低温胁迫2 h, 6 h和12 h共3个处理,测定各时期高加索三叶草的生理指标,并对CK与胁迫12 h的植株进行转录组测序,解析其幼苗期在低温胁迫下的生理反应与适应机制。结果表明,4℃处理下,植株通过提高抗氧化酶(过氧化物酶、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶)活性及渗透调节物质(可溶性蛋白、可溶性糖、游离脯氨酸)含量,有效清除活性氧,减轻了膜脂过氧化损伤,从而增强其抗寒能力。转录组分析显示,4℃处理12 h后共鉴定到15 428个差异表达基因,其中8909个基因上调,6519个基因下调。其中类黄酮生物合成通路与MAPK信号通路被显著激活;类黄酮通路上游关键基因查尔酮合成酶和查尔酮异构酶显著上调,促进了抗氧化物质(木犀草素、芹菜素、异黄酮)的合成;MAPK通路中MEKK1等基因的表达升高,表明低温信号通过磷酸化级联反应进行转导。其研究结果为解析高加索三叶草耐寒性提供了理论依据。

关键词:高加索三叶草;低温胁迫;生理指标;差异基因

中图分类号:S541.2

文献标识码:A

文章编号:1007-0435(2026)07-2403-12

Physiological Changes and Transcriptomic Analysis of Caucasian Clover under Low Temperature Stress

WU Qian¹, ZHAO Ya-ru², CAO Ke-fan¹, MA Yi-ming¹, SUO Yuan¹, LI Shu-ning¹,
QI Hai-bo¹, WANG Ming-jiu^{1*}

(1. College of Grassland Science, Inner Mongolia Agricultural University/Key Laboratory of Grassland Resource of Ministry of Education, Hohhot, Inner Mongolia 010011, China; 2. Inner Mongolia Zhengshi Ecological Agriculture (Group) Co., Ltd., Hohhot, Inner Mongolia 010010, China)

Abstract: This study investigated the physiological and molecular mechanisms underlying the cold tolerance of Caucasian clover (*Trifolium ambiguum* M. Bieb.), a perennial forage known for its strong hardiness. Seedlings grown at 20℃ served as the control (CK), and low-temperature stress (4℃) was applied for 2, 6, and 12 h. Physiological indicators were measured at each time point, and transcriptome sequencing was conducted on the control and 12 h-stressed plants. The results indicated that under 4℃, the plants enhanced their cold tolerance by significantly increasing the activities of antioxidant enzymes (peroxidase, catalase, and superoxide dismutase) and the levels of osmoregulatory substances (soluble protein, soluble sugar, and free proline). This coordinated response effectively scavenged reactive oxygen species and mitigated membrane lipid peroxidation, as evidenced by reduced malondialdehyde accumulation. Transcriptome analysis identified 15 428 differentially expressed genes (DEGs) after 12 h of cold stress, with 8909 up-regulated and 6519 down-regulated. Key pathways were significantly activated, including the flavonoid biosynthesis pathway, where the up-regulation of

收稿日期:2025-08-21;修回日期:2025-10-14

基金项目:国家自然科学基金项目“蒙农三叶草1号结瘤固氮机理及根瘤菌多样性研究”(31960353);“蒙农三叶草1号花期延长及其调控机理研究”(32160334)资助

作者简介:吴倩(1999-),女,汉族,内蒙古丰镇人,硕士研究生,主要从事草地资源生态与管理研究,E-mail: 15548302887@163.com;

*通信作者 Author for correspondence, E-mail: wangmj_0540@163.com

pivotal upstream genes (CHS and CHI) facilitated the synthesis of antioxidant compounds such as luteolin, apigenin, and isoflavones. Concurrently, the MAPK signaling pathway was induced, highlighted by the increased expression of genes like *MEKK1*, suggesting that cold signals are transduced via a phosphorylation cascade. These findings provide crucial insights into the molecular basis of cold adaptation in Caucasian clover.

Key words: *Trifolium ambiguum*; Low temperature stress; Physiological parameters; DGEs

植物体内各类生理与生化过程依赖于适宜且稳定的温度环境。低温胁迫作为一种常见的非生物逆境因子,对植物的生长、发育及分布格局产生着深远影响^[1-2]。低温环境会在植物生理层面引发一系列连锁反应,从细胞的微观结构到植株整体的生理功能均受到影响。在细胞水平,低温首先破坏细胞膜的稳定性^[3],致使膜脂相变,流动性降低,进而引发膜脂过氧化作用加剧,丙二醛(Malondialdehyde, MDA)含量显著增加,膜的完整性遭到破坏,细胞内物质交换受阻^[4]。低温促使植物体内活性氧代谢失衡,超氧阴离子、过氧化氢等活性氧物质大量积累,对生物大分子如蛋白质、核酸等造成氧化损伤。为应对这一逆境,植物往往启动抗氧化防御系统,保护酶活性在低温初期往往会升高,以清除过量的活性氧,维持细胞内氧化还原平衡^[5]。从渗透调节角度来看,低温诱导植物细胞内可溶性糖(Soluble sugar, SS)、可溶性蛋白(Soluble protein, SP)和脯氨酸(Proline, Pro)等渗透调节物质积累,降低细胞渗透势,增强细胞吸水保水能力,防止细胞脱水^[6-7]。在分子水平,植物在遭受低温胁迫时,会迅速感知外界信号并激活一系列与低温响应相关的基因,合成特定的功能蛋白质,调控关键代谢物的合成与积累^[8]。

鉴于上述低温胁迫对植物的普遍影响,深入研究具有突出抗寒特性的物种,对于揭示其独特的适应策略与进化机制显得尤为重要。高加索三叶草(*Trifolium ambiguum* M. Bieb.)是豆科车轴草属多年生牧草,原产于高加索山地,广泛分布于俄罗斯、格鲁吉亚和亚美尼亚等寒冷地区,因其优异的耐寒性和生态适应能力而备受关注^[9-10]。高加索三叶草能够通过营养繁殖实现种群扩展,适应性强,可耐受多种土壤类型与逆境胁迫^[11],在内蒙古等北方地区能够正常越冬^[12]。高加索三叶草的根系发达,主要由密集的根蘖和主根组成^[13],这种结构使其在严寒环境中具有良好的生存能力^[14]。其幼苗期作为对环境胁迫最为敏感的发育阶段,如何通过快速启动生理与分子应答以抵御低温伤害的机制尚不明确。本研究通过分析高加索三叶草幼苗在低温胁迫

下关键生理指标的动态变化规律,并结合转录组分析,旨在鉴定早期低温响应的核心功能基因和通路,从生理与分子层面揭示其对低温胁迫的响应机制。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料是由内蒙古农业大学培育的高加索三叶草品种‘蒙农三叶草1号’(品种登记号: N010),所用种子于2022年采自内蒙古农业大学牧草研究基地。本试验的研究材料是在20℃条件下培养28 d的‘蒙农三叶草1号’幼苗。

1.2 植物材料培养与处理

种子经表面消毒(75%乙醇浸泡1 min,无菌水冲洗3次)后,置于铺有无菌滤纸的培养皿中,加入5 mL无菌水,于20℃黑暗条件下催芽2 d。随后将培养皿转移至人工气候箱,在20℃、光强80 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (光照:黑暗=16 h:8 h)、湿度(70%±5%)的条件下培养至萌发。

选取生长一致的萌发幼苗,移栽至7 cm×7 cm的育苗盆中,每盆定植12株。栽培基质为蛭石与营养土按1:1比例混合。将所有育苗盆置于智能型恒温培养箱(ARC-36VL-LT,美国PERCIVAL公司)中培养,环境条件与萌发期一致。培养期间采用定量灌溉,每48 h每盆浇水50 mL,直至盆底有水渗出,以避免水分胁迫。幼苗培养28 d后,选择健康、长势一致的个体进行低温处理。

1.3 实验设计与样品采集

本研究采用完全随机设计。以20℃正常生长的幼苗为对照(CK),设置4℃低温胁迫2 h, 6 h, 12 h共3个处理,每处理(含CK)均种植20盆。处理结束后,从每个处理的20个育苗盆中各随机选取5株幼苗,每株取相同部位的叶片混合,形成一个生物学重复样本。用于生理指标测定:每个处理共获得3个独立的混合样本(即3个生物学重复),每个样本

由100株幼苗(20盆×每盘5株)的叶片组成。用于转录组测序:将CK和低温胁迫12 h的样本另取6个独立的混合样本(与生理测定样本平行制备),每个样本同样由100株幼苗的叶片混合而成,以确保样品的代表性。取样后立即用液氮速冻,并保存于-80℃超低温冰箱备用。

1.4 测定指标与方法

1.4.1 生理指标的测定方法 生理指标测定参考史树德等主编的《植物生理学实验指导》^[15]中的方法,即MDA含量的测定采用硫代巴比妥酸法;叶绿素(Chlorophyll, Chl)含量的测定采用分光光度计法;SP含量的测定采用考马斯亮蓝法;SS含量的测定采用蒽酮法;Pro含量的测定采用茚三酮法;超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)活性的测定采用氮蓝四唑法;过氧化物酶(Peroxidase, POD)活性的测定采用愈创木酚法;过氧化氢酶(Catalase, CAT)活性的测定采用比色法。

1.4.2 转录组测序 基于本试验的研究目的,选择胁迫12 h进行转录组测序。该时期植株正处于从主动防御向被动损伤过渡的关键时期,有助于深入解析高加索三叶草应对持续低温胁迫的分子适应机制及其耐受极限。样品标记如下:对照组为GA、低温胁迫处理12 h为GD。将低温保存的高加索三叶草叶片进行有参转录组测序,设置3个生物学重复。对低温处理12 h后高加索三叶草叶片进行RNA提取后,建立cDNA文库,再利用高通量测序平台进行测序。使用软件fastp(<https://github.com/OpenGene/fastp>)对原始测序数据进行质量控制与过滤处理,具体质控步骤及顺序如下:(1)去除reads中的接头序列,去除由于接头自连等原因导致没有插入片段的reads;(2)将序列末端(3'端)低质量(质量值小于20)的碱基修剪掉,如剩余序列中仍然有质量值小于10则将整条序列剔除,否则保留;(3)去除含N比率超过10%的reads;(4)舍弃去adapter及质量修剪后长度小于20 bp的序列。使用软件HiSat2(<http://ccb.jhu.edu/software/hisat2/index.shtml>)将质控后的原始数据,与参考基因组比对(本研究所使用的高加索三叶草参考基因组由本实验室首次完成组装,基于PacBio HiFi与Hi-C测序策略构建,最终组装大小为4.79 Gb,Contig

N50为1.27 Mb, Scaffold N50为9.22 Mb。共预测获得219 391个蛋白编码基因。获得用于后续转录本组装、表达量计算等的mapped reads;使用DESeq2(<http://bioconductor.org/packages/stats/bioc/DESeq2/>)软件筛选不同处理间的差异表达基因(DEGs),筛选条件设置为以 $FDR < 0.05$ & $|\log_2FC| \geq 1$ 的read count数据。并进行GO和KEGG功能注释统计,利用GO数据库(<http://geneontology.org/>),对差异表达基因进行GO注释。利用KEGG数据库(<https://www.genome.jp/kegg/>),可将基因按照参与的pathway通路或行使的功能分类。对差异表达基因进行KEGG注释。使用软件Goatools(<https://github.com/tanghaibao/GOatools>)进行GO富集分析,使用方法为Fisher精确检验。为控制计算的假阳性率使用4种多重检验方法(Bonferroni, Holm, Sidak和false discovery rate)对P值进行了校正,通常情况下,当经过校正的P值(P_{FDR}) < 0.05 时,认为此GO功能存在显著富集情况。使用Python scipy软件包(<https://scipy.org/install/>)进行KEGG富集分析,计算原理同GO功能富集分析,使用Fisher精确检验进行计算。为控制计算假阳性率,采用BH(FDR)方法进行多重检验,经过校正的P值(Corrected P-Value)以0.05为阈值,满足此条件的KEGG通路定义为在差异表达基因中显著富集的KEGG通路。

1.4.3 实时荧光定量(qRT-PCR)分析 实时荧光定量PCR差异基因引物序列为表1。本实验的实时荧光定量PCR分析试验选用ACTB作为内参基因。cDNA合成采用北京索莱宝科技的EasyScript™ First Strand cDNA Synthesis Kit,以1 μg总RNA为模板进行反转录;qRT-PCR检测使用该公司BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, High ROX)试剂盒,反应程序设置退火温度为55~60℃(根据引物T_m值优化),循环数为40次。基因相对表达量通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行计算,数据以均值±标准差表示,并采用SPSS Statistics 27进行统计分析。

1.4 数据统计分析

使用Excel 2021进行数据的整理,SPSS 27.0进行方差分析,Origin 2021进行绘图。

表 1 qRT-PCR 验证转录组数据的引物序列

Table 1 Primers for qRT-PCR validation of transcriptome data

基因 Gene	正向引物(5'-3') Forward Primer(5'-3')	反向引物(5'-3') Reverse Primer(5'-3')
evm.TU.ctg8606.6	CTGAAACCAAGCTTGATAAC	TGCAGTCAAGTTCATCACTT
evm.TU.ctg6266.44	ATGAATCCTCTTGACCTTGA	GCTCACTTTTATTGATGATA
evm.TU.ctg6590.287	AACCTTCCTTACCTCTTCCA	TCAAAATGAAGTAGATGAGT
evm.TU.ctg10969.32	ATGTGTAAAGTTTCAAACCTT	TCACCTGACTAATTCTTGAAGC
evm.TU.ctg4819.34	GCTTCATCATTTTCTTTGCA	TTAATTCCTTTCCTCTCTTGTA
ACTB	ATGGAAGCTGCTGGAAGGTG	CGTTGCCAATGGTGATGAC

2 结果与分析

2.1 低温胁迫对高加索三叶草幼苗生理指标的影响

由图1可知,低温胁迫下,高加索三叶草CAT,POD和SOD活性随胁迫时间延长呈先激活后衰退趋势。其中CAT活性在胁迫6 h达到峰值,为 $80.92 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$,较CK显著提高46.30%(图1A)。POD活性在2 h和6 h分别较对照升高18.80%与30.43%(图1B)。SOD活性在6 h升至峰值 $286.78 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$,较CK提高10.28%(图1C)。胁迫12 h,3种酶活性均出现显著下降,其中CAT、POD与SOD活性分别较对照降低16.73%,14.37%,14.37%。随低温胁迫时间延长,高加索三叶草叶的MDA含量呈持续上升趋势(图1D)。胁迫2 h,6 h和12 h时,MDA含量较CK分别提高12.69%,19.74%,29.65%($P < 0.05$)。这一动态变化趋势与前期发现的抗氧化酶活性在胁迫后

期(12 h)受到显著抑制的现象相一致。

低温胁迫下,3种渗透调节物质(Pro,SP,SS)含量均显著积累,但在响应时间与强度上存在差异,反映出植株在不同胁迫阶段的渗透调节策略。Pro含量呈先升后降趋势,在6 h达到峰值 $82.56 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,较CK显著上升(图1E),胁迫12 h时含量仍显著高于CK,但较6 h有所回落,提示长期低温可能导致能量资源重新分配,脯氨酸合成能力受限。SP含量在胁迫2 h,6 h,12 h均高于CK,分别较CK显著上升8.09%,10.16%,4.65%(图1F),在胁迫12 h时增幅回落,说明长期胁迫可能因能量与碳骨架供应受限,抑制了蛋白质的持续合成。SS含量在胁迫过程中呈现明显波动,胁迫6 h达到峰值,较CK显著升高34.80%(图1G)。胁迫12 h,SS含量虽仍高于对照,但增幅回落至4.84%,反映持续低温可能限制了糖代谢的持续活跃。

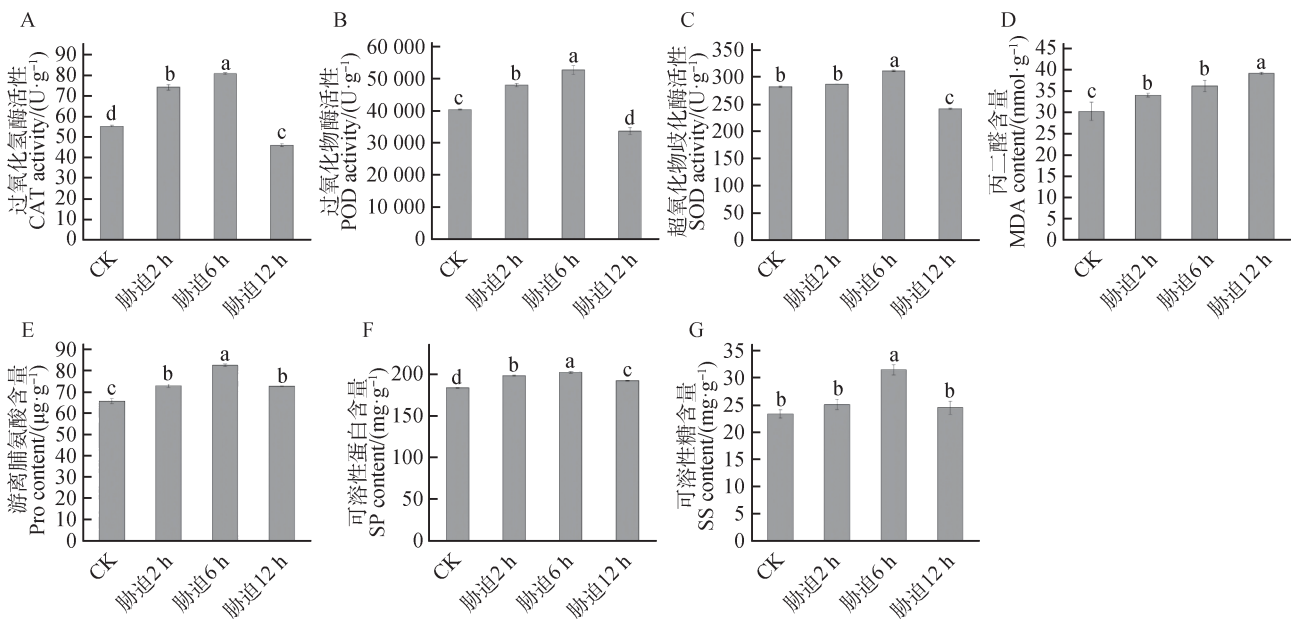


图1 高加索三叶草低温胁迫下生理指标的变化

Fig. 1 Changes in physiological indicators of *T. ambigua* under cold stress

注: A为过氧化氢酶活性; B为过氧化物酶活性; C为超氧化物歧化酶活性; D为丙二醛含量; E为游离脯氨酸含量; F为可溶性蛋白含量; G为可溶性糖含量。柱上具有相同字母表示处理间差异不显著($P > 0.05$)

Note: A, Activity of catalase (CAT); B, Activity of peroxidase (POD); C, Activity of superoxide dismutase (SOD); D, Content of malondialdehyde (MDA); E, Content of free proline (Pro); F, Content of soluble protein (SP); G, Content of soluble sugar (SS). The same letters on the top of the bars are not significantly different ($P > 0.05$)

2.2 低温胁迫 12 h 下高加索三叶草幼苗的转录组学分析

2.2.1 测序数据质量分析 对 6 个高加索三叶草样品进行 RNA-seq 测序,高加索三叶草样品对照组标记为 GA,低温胁迫处理 12 h 的样品标记为 GD。

测序共获得 40.95 Gb 的高质量 Clean reads,各样品的数据量均不低于 6.25 Gb, Q_{30} 碱基的占比均在 95.69% 以上。结果表明,测序数据质量高,所有样品的测序数据质量均符合后续差异表达分析的标准要求(表 2)。

表 2 高加索三叶草低温胁迫下 6 个样品的测序结果统计

Table 2 Sequencing results of six samples of *T. ambiguum* under low temperature stress

样本 Sample	清洁读数 Clean reads/Gb	清洁碱基 Clean bases/Gb	错误率 Error rate/%	Q_{30} 比例 $Q_{30}/\%$	GC 含量 GC content/%
GA ₁	50 691 292	7 605 065 302	0.0120	96.06	41.78
GA ₂	42 102 044	6 322 583 679	0.0122	95.69	41.82
GA ₃	48 723 060	7 307 645 563	0.0121	95.75	41.85
GD ₁	41 665 384	6 249 856 090	0.0120	95.99	41.63
GD ₂	44 195 568	6 623 572 442	0.0120	95.98	41.64
GD ₃	45 615 960	6 841 163 227	0.0120	96.01	41.63

2.2.2 实时定量 PCR 验证 为验证 RNA-seq 数据的可靠性,采用 qRT-PCR 技术对高加索三叶草在低温胁迫条件下关键代谢通路中部分 DEGs 进行随机选取

并进行表达验证。实验结果显示,qRT-PCR 与 RNA-seq 数据在基因表达趋势上高度一致(图 2A-B),表明本次转录组测序数据具有良好的准确性与可信度。

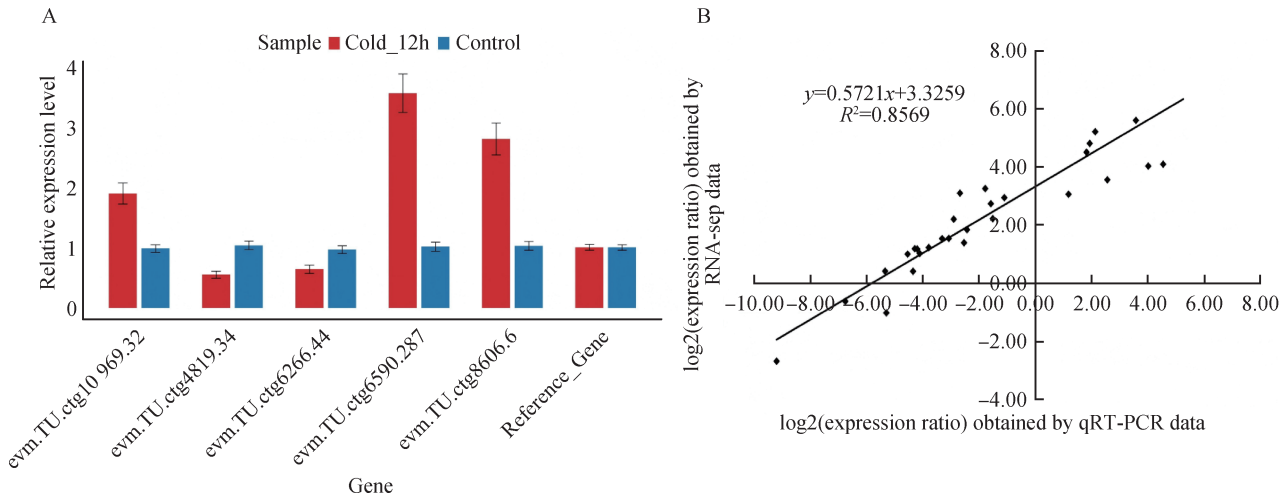


图 2 高加索三叶草 DEGs qRT-PCR 验证

Fig. 2 qRT-PCR validation of differentially expressed genes in *T. ambiguum*

2.2.3 差异表达基因筛选 以 $|FC| \geq 1$, $FDR < 0.05$ 为筛选标准,对 GA 和 GD 中的基因进行鉴定,共获得 15 428 个 DEGs,其中上调基因 8909 个,下调基因 6519 个(图 3)。

2.2.4 差异基因 GO 功能富集分析 对 GA 和 GD 中的 DEGs 进行 GO 富集分析,发现低温胁迫下的 DEGs 主要富集于生物学过程(Biological process, BP)、分子功能(Molecular function, MF)和细胞组分(Cellular component, CC)3 大类别(图 4)。

GO 富集分析结果表明,高加索三叶草对低温胁迫的响应是一个涉及多层次的协同适应过程。在 BP 中 DEGs 显著富集于非生物刺激的响应

(Response to abiotic stimulus)、节律过程(Rhythmic process)、对光刺激的响应(Response to light stimulus)、对辐射的响应(Response to radiation);生物节律的调控(Regulation of circadian rhythm)等条目的富集,揭示了生物钟系统在优化防御响应时机中的重要作用。在 MF 中,DEGs 主要富集在转移酶活性(Transferase activity)、催化活性(Catalytic activity)。Delta8-鞘脂去饱和酶活性(Delta8-sphingolipid desaturase activity)条目的富集,提示植物通过增加膜脂不饱和度来维持细胞膜在低温下的流动性,这是高加索三叶草增强其结构抗寒性的核心分子机制之一。DEGs 在 CC 中核糖体前体复合物

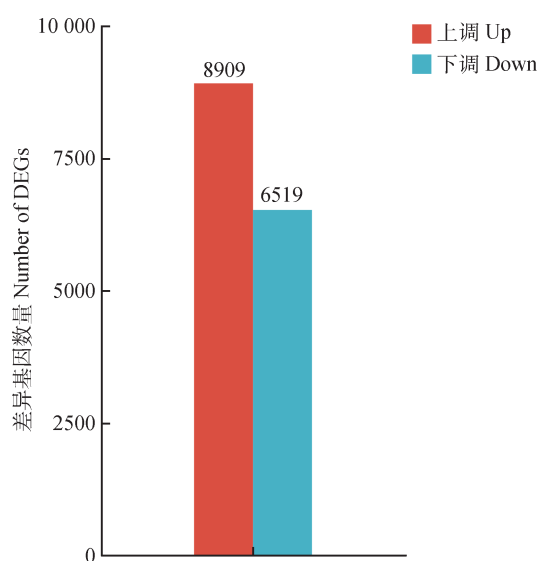


图 3 高加索三叶草的差异基因表达数目

Fig. 3 Differential gene expression in *T. ambiguum*

(Preribosome)的富集表明植物为大规模合成胁迫响应蛋白进行了翻译层面的产能准备。这些结果解释了高加索三叶草从信号感知、节律调控到生理执行的多维度适应策略。

对上调DEGs进行的GO富集分析表明,这些基因在BP、MF和CC 3个类别中均显著富集于特定条目(图5A)。上调DEGs被显著富集到非生物刺激的响应(Response to abiotic stimulus)和核糖体前体复合物(Preribosome)等条目。高加索三叶草在低温胁迫下激活了核糖体生物合成过程,这可能是为满足应激蛋白合成所需的翻译能力而采取的一种主动适应性调控。

对下调DEGs进行GO富集分析结果表明,其显著富集的条目主要分布在BP和MF类别中(图5B)。BP类别中,下调DEGs显著富集于淀粉代谢相关过程,淀粉颗粒形成(Starch granule initiation)、 α -葡聚糖代谢过程的调控(Regulation of alpha-glucan metabolic process)。在信号传导方面,细胞分裂素激活信号通路的负调控(Negative regulation of cytokinin-activated signaling pathway)、一氧化氮代谢过程(Nitric oxide metabolic process)、一氧化氮生物合成过程(Nitric oxide biosynthetic process)呈现显著富集。MF类别中,富集最显著的是硝酸还原酶活性(Nitrate reductase (NADPH) activity)。

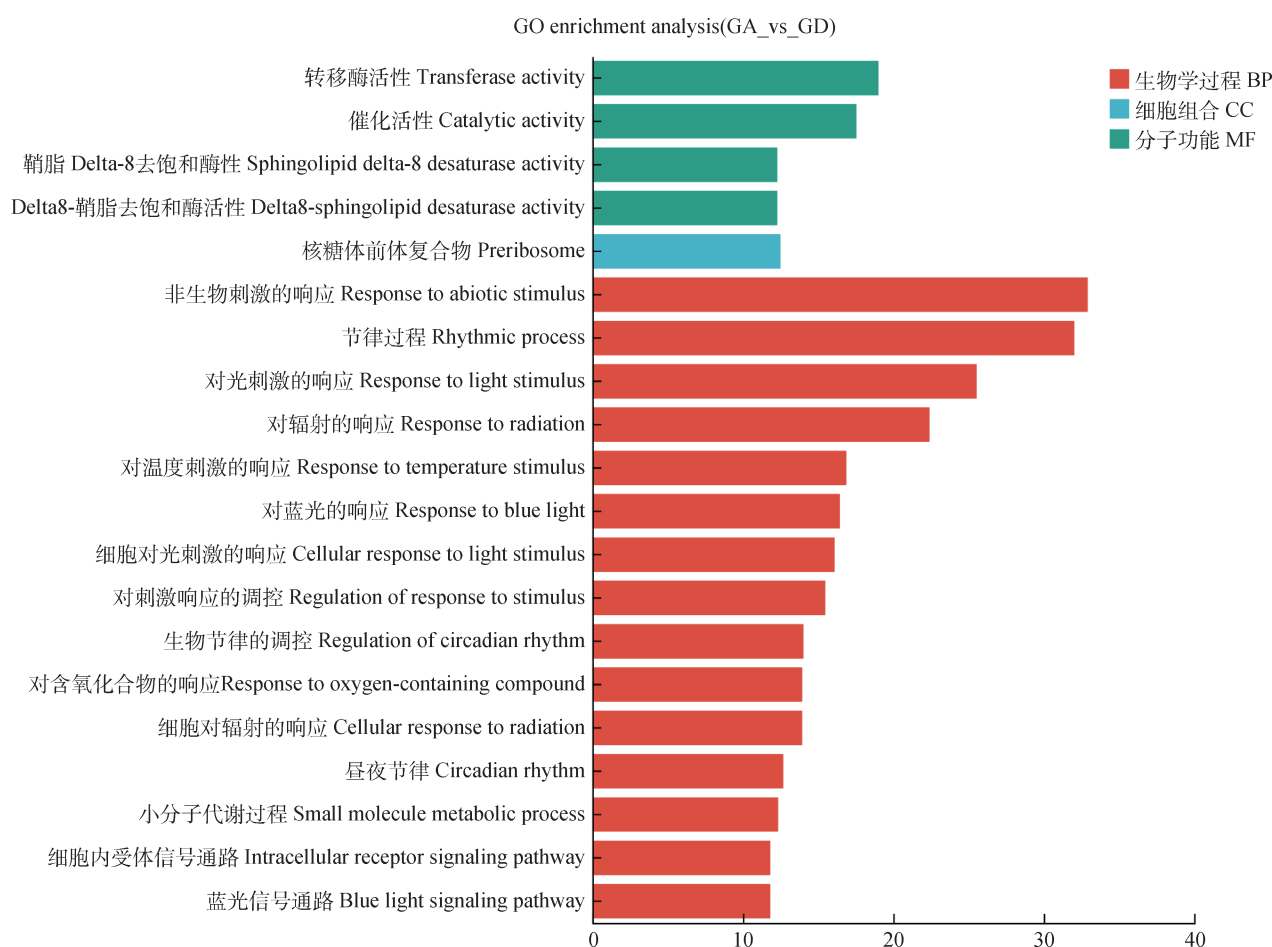


图 4 高加索三叶草差异表达基因的GO功能富集图

Fig. 4 GO functional enrichment map of differentially expressed gene in *T. ambiguum*

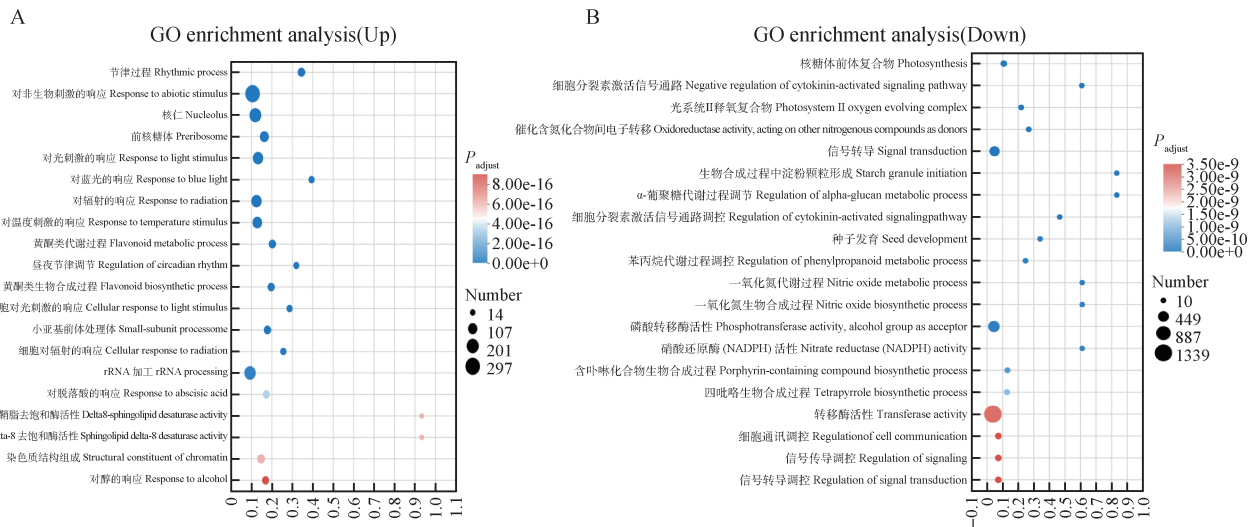


图 5 高加索三叶草差异表达上调(A)和下调基因(B)的GO功能富集图

Fig. 5 GO functional enrichment map of the differentially expressed up-regulated and down-regulated in gene *T. ambigua*

2.2.5 差异基因KEGG通路分析 对DEGs按照KEGG中通路类型进行分类,主要分为有机体系(Organismal systems)、代谢(Metabolism)、基因信息处理(Genetic information processing)、环境信息处理(Environmental information processing)4大类(图6)。

DEGs富集在排名较前的通路根据核心功能可分为信号感知与转导、抗氧化与氧化还原稳态、次级代谢与防御物质合成、能量与初级代谢重编程、生长抑制与防御资源调配5类。植物MAPK信号通路(MAPK signaling pathway-plant)、磷脂酰肌醇信号系统(Phosphatidylinositol signaling system)、肌醇磷酸代谢(Inositol phosphate metabolism)作为信号感知与转导功能主要的富集通路,是启动所有后续反应的起点。谷胱甘肽代谢(Glutathione metabolism)、黄酮类生物合成(Flavonoid biosynthesis)、抗坏血酸和醛糖酸代谢(Ascorbate and aldarate metabolism)等通路的核心功能为抗氧化与氧化还原稳态。谷胱甘肽代谢是核心的酶促抗氧化系统,能直接清除过氧化物;黄酮类化合物和抗坏血酸是重要的非酶抗氧化剂,能够中和自由基,保护细胞结构免受氧化损伤。

KEGG富集分析表明,上调通路包括植物昼夜节律(Circadian rhythm-plant)、黄酮类生物合成(Flavonoid biosynthesis)、植物-病原体互作(Plant-pathogen interaction)、莨菪烷、哌啶和吡啶类生物碱生物合成(Tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis)、谷胱甘肽代谢(Glutathione metabolism)、植物MAPK信号通路(MAPK signaling pathway-plant)等通路(图7A)。植物MAPK信号通路

(MAPK signaling pathway-plant)被低温胁迫显著激活。该通路的激活是植物感知并转导低温信号的关键步骤,它通过磷酸化级联反应调控下游转录因子的活性,进而启动一系列保护性功能基因的表达,是协调植物整体抗寒反应的核心调控网络。在抗氧化方面,黄酮类生物合成和谷胱甘肽代谢通路的协同激活尤为关键。前者通过增强重要的非酶抗氧化剂——黄酮类物质的合成,后者通过提升核心的酶促抗氧化系统——谷胱甘肽代谢的功能,共同应对活性氧积累。这一分子层面的协同防御体系的建立,为缓解低温引发的氧化胁迫、减轻如MDA积累等膜脂过氧化损伤提供了机制性解释。

下调通路包括卟啉代谢(Porphyrin metabolism)、植物激素信号转导(Plant hormone signal transduction)、光合作用-天线蛋白(Photosynthesis-antenna proteins)、氮代谢(Nitrogen metabolism)等通路(图7B)。光合作用-天线蛋白(Photosynthesis-antenna proteins)通路显著下调表明在低温胁迫下,高加索三叶草可能通过抑制光捕获复合物的合成来减少光能吸收,从而避免因光合电子传递链受阻而加剧的光氧化损伤。

2.2.6 低温胁迫下类黄酮生物合成通路的转录组响应 为解析低温胁迫对高加索三叶草次生代谢的调控机制,对类黄酮生物合成通路进行了深入分析。该通路中多个关键酶基因的表达水平发生了显著变化,表明低温胁迫对类黄酮生物合成的影响比较大(图8)。

通路的上游步骤被显著激活。查尔酮合成酶(CHS)编码基因表达被极显著诱导($\text{Log}_2\text{FC} > 4$),

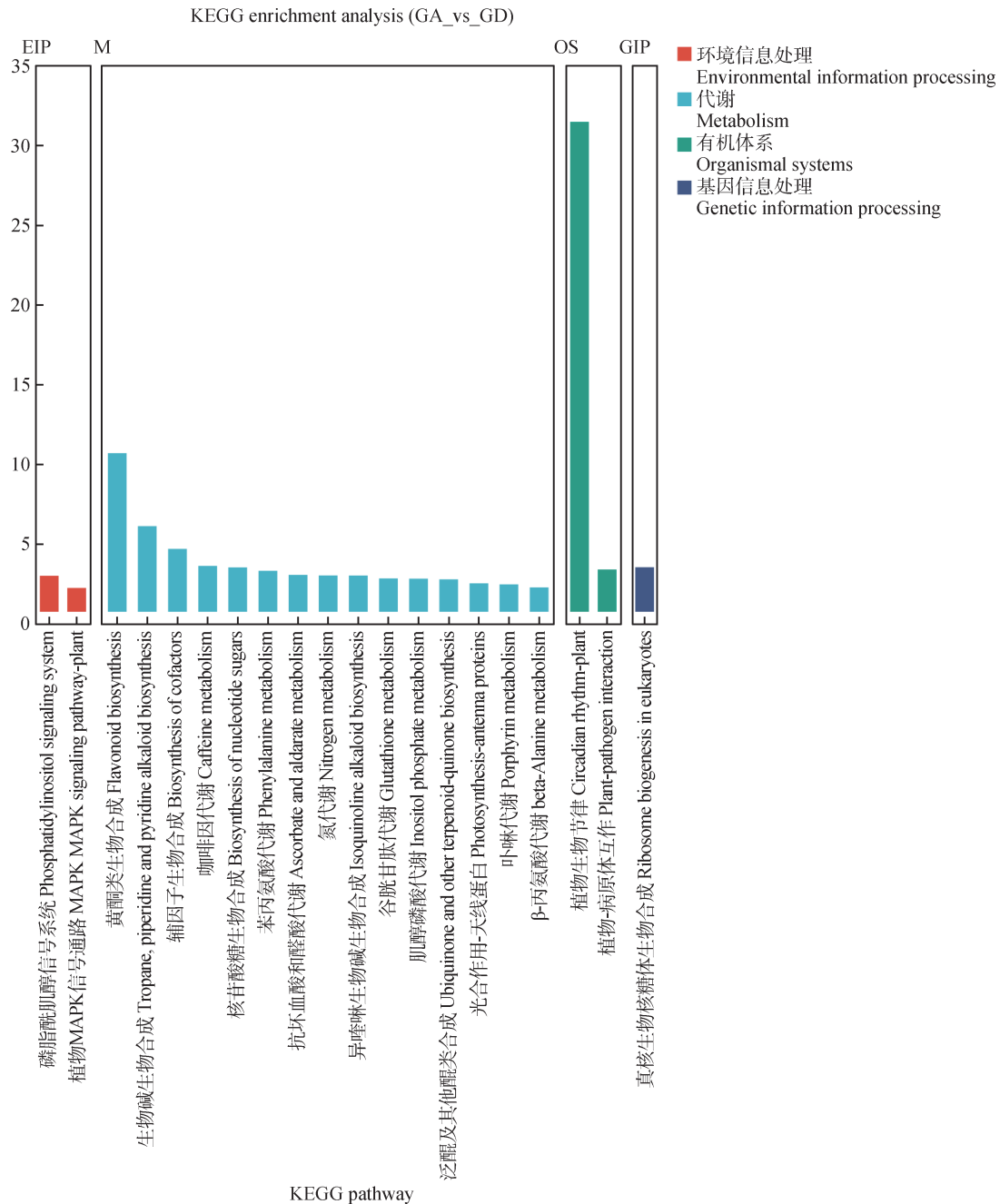


图 6 高加索三叶草 DEGs 的 KEGG 富集的柱状图

Fig. 6 KEGG enrichment histogram of *T. ambiguum*

为下游各类黄酮化合物的合成提供了充足的底物基础,查尔酮异构酶(CHI, E5.5.1.6)基因呈现高表达,保障了柚皮素等核心黄酮骨架的稳定形成。下游分支通路则呈现差异化调控模式,代谢流向发生明显偏移。在以柚皮素为共同前体的黄酮醇与黄酮合成路径中,黄酮醇 3-羟化酶(F3H)基因显著上调,促进二氢山奈酚(DHK)和二氢槲皮素(DHQ)的积累。多个细胞色素 P450 家族基因的黄酮合酶(*CYP75B1*)与异黄酮合酶(*CYP93B2*)基因

被强烈诱导。该调控模式共同表明,代谢流可能更多导向木犀草素等黄酮类物质的合成,而非山奈酚与槲皮素等黄酮醇途径。值得注意的是,黄酮醇合成的关键酶 FLS(黄酮醇合酶)基因的表达并未发生显著变化,这从侧面支持了代谢流向黄酮途径偏移的假设。以甘草素为前体的异黄酮合成途径也被特异性激活,其关键酶基因 *CYP93B2* 表达急剧上升,高加索三叶草在低温胁迫下可能通过增强异黄酮合成以应对逆境。

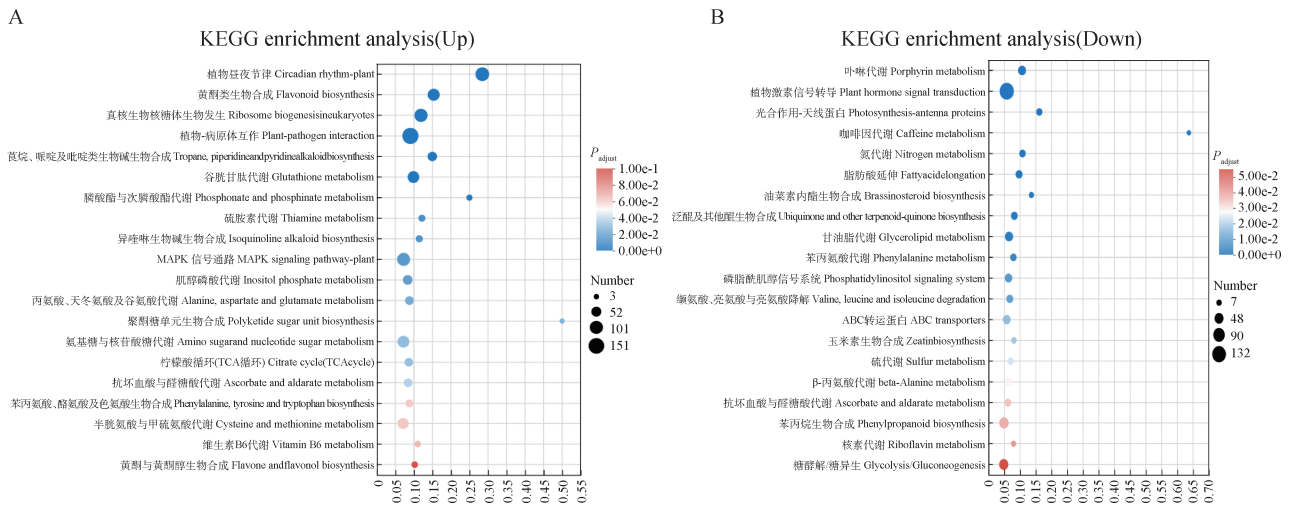


图 7 高加索三叶草上调(A)和下调(B)DEGs的KEGG富集的气泡图

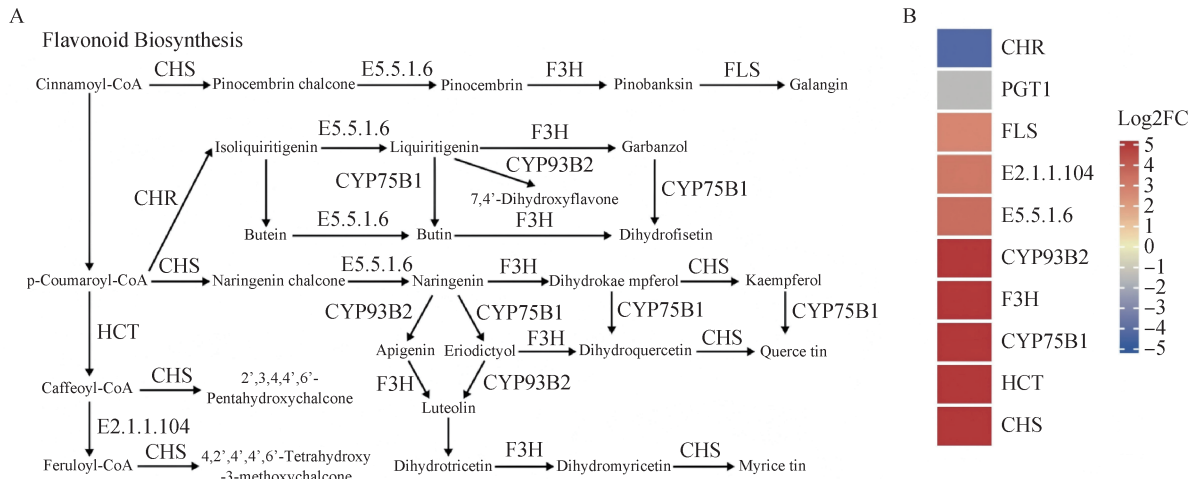
Fig. 7 Bubble plot of KEGG enrichment analysis for up-regulated(A) and down-regulated(B) DEGs in *T. ambiguum*

图 8 高加索三叶草低温胁迫下类黄酮生物合成通路(A)和基因表达量图(B)

Fig. 8 The flavonoid biosynthesis pathway(A) and gene expression levels(B) in *T. ambiguum* under cold stress

2.2.7 低温胁迫下植物 MAPK 信号传导通路的转录组响应 为阐明低温胁迫下细胞内的信号转导机制,本研究对植物 MAPK 信号传导通路进行了具体分析。结果显示,MAPK 级联通路中多个关键组分的基因表达受低温胁迫显著调控,表明该通路在低温信号传递中起核心作用(图 9)。

MAPK 级联的上游信号转导环节被激活,其中 MAPKKK 家族成员 *MEKK1* 等基因显著上调,表明低温信号可能通过未知膜受体启动了级联反应的上游事件。在核心级联通路中,胁迫信号主要汇聚于 MKK4/5-MPK3/6 与 MKK2-MPK4 两条分支通路。MKK4/5 和 MPK3/6 基因均被强烈诱导,该模块在调控活性氧代谢和防御基因表达中

具有重要作用,参与低温胁迫响应的 MKK2-MPK4 模块也被激活,表明植物可能通过该通路实现对非生物胁迫的交叉适应。下游转录调控因子亦呈现显著表达变化,MPK3/6 下游的 *WRKY22* 和 *VIP1* 等关键转录因子基因表达发生改变,这些因子可进一步调控病程相关蛋白及细胞壁修饰基因的表达。

低温胁迫通过激活 MEKK1-MKK4/5-MPK3/6 及 MEKK1-MKK2-MPK4 等多条 MAPK 信号分支,构建了复杂的细胞内信号网络。该通路可能通过磷酸化修饰下游转录因子,协同调控一系列胁迫响应基因的转录表达,最终介导高加索三叶草对低温环境的适应性响应。

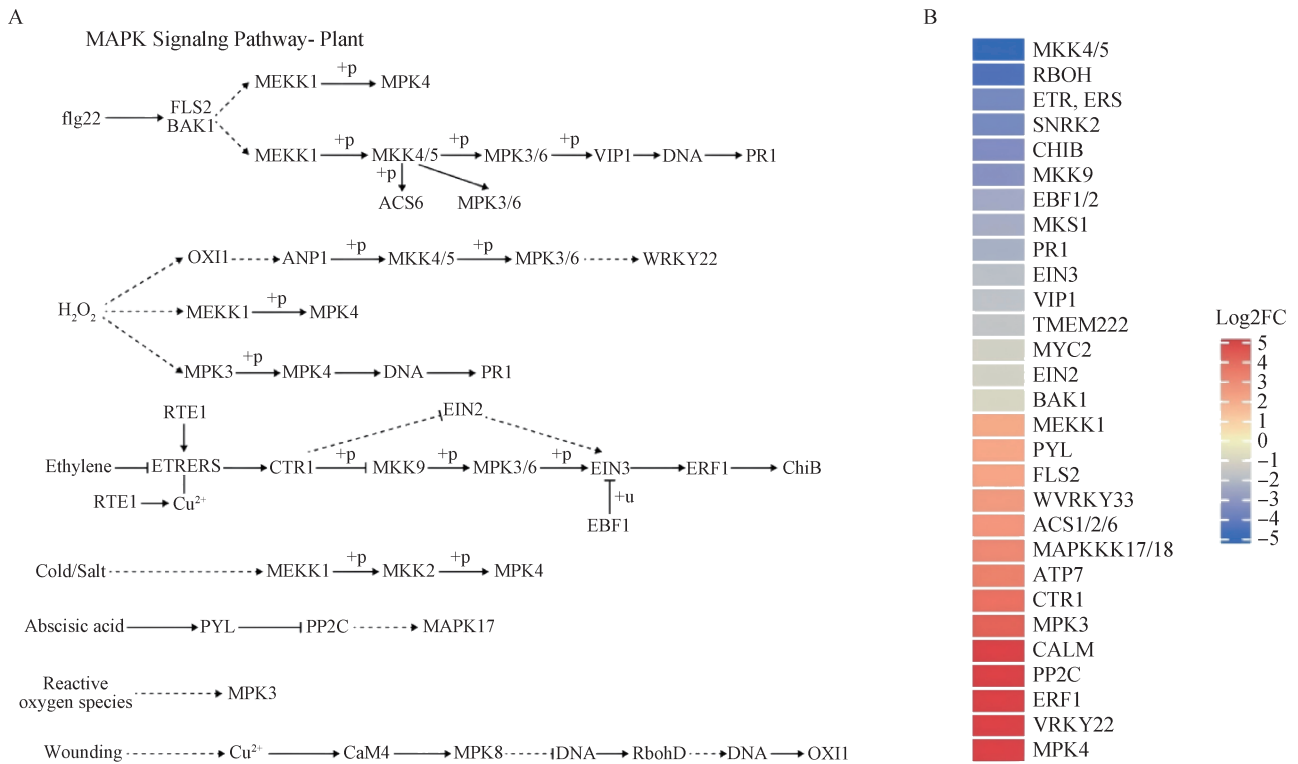


图9 高加索三叶草低温胁迫下植物MAPK信号传导通路(A)和基因表达量图(B)

Fig. 9 The MAPK signaling pathway(A) and gene expression levels(B) in *T. ambigua* under cold stress

3 讨论

3.1 低温胁迫对植物生理的影响

CAT, POD和SOD是抗氧化酶系统中的核心成分,能够有效清除细胞内积累的过量自由基,在维持植物正常生理功能及增强其逆境抵御能力方面发挥了关键作用^[16]。在本研究中,高加索三叶草叶片中CAT, POD和SOD活性均呈先升后降趋势,表明其在胁迫初期能迅速启动酶促防护系统以维持细胞稳态。随胁迫加剧,酶活性显著下降,可能与ROS爆发导致酶蛋白自身氧化失活有关,致使清除能力衰退。抗氧化酶响应模式在不同物种间既存在共性也有特异性。本研究与温日宇等人^[17]对藜麦(*Chenopodium quinoa*)幼苗的研究均观察到SOD活性呈先升后降,表明该初级清除机制在应对ROS爆发时具有一定保守性。高加索三叶草POD活性表现为同步下降,而藜麦则呈持续上升,反映二者在过氧化物清除策略上存在差异,高加索三叶草可能更倾向于“快速响应-逐步衰减”的生理策略,其持续耐受力相对有限。MDA含量的升高通常意味着生物膜受到的损伤加剧,植物的抗寒能力降低^[18]。MDA含量持续上升并于12 h达峰值,揭示膜脂过氧化损伤随胁迫时间延长而不断加剧,且其变化趋势与3种抗氧化酶活性呈显著负相关,

说明长期低温已超出其抗氧化系统的调节能力,导致活性氧代谢失衡。MDA的持续积累趋势与高婷婷等人^[19]对白三叶(*T. repens*)研究的结果一致,说明膜系统损伤可能是该属植物响应低温的共同特征,而高加索三叶草在12 h时更为显著的MDA积累则可能体现其特有的低温敏感性。

在低温胁迫下,植物通过合成大量的保护性物质调节细胞渗透压,来维持细胞膜的稳定性^[20]。SP, SS, Pro是重要的渗透调节物质,其含量的积累与植物抗寒性呈显著的正相关^[21]。本研究中,高加索三叶草的渗透调节物质(SP, SS, Pro)含量均在低温胁迫过程中呈现先升后降的动态变化。杨艳婷^[22]研究越冬期时的扁蓊豆时发现,扁蓊豆根部的SP, Pro含量在光照16 h(10℃),黑暗8 h(4℃)的环境下显著升高。王敏等人^[23]研究紫花苜蓿的抗寒性时发现SP, SS, Pro的含量均呈现先上升后下降的趋势。3种豆科植物渗透调节物质在低温下的变化说明植物在胁迫初期通过积极积累渗透物质以维持渗透平衡与膜结构稳定。随胁迫延长至12 h,各物质含量下降,反映持续低温已导致代谢功能受损、合成受限或消耗增加,揭示其抗寒性不仅取决于渗透物质的初始积累能力,更依赖于持续胁迫下资源分配与代谢稳态的维持能力。

3.2 低温胁迫对植物转录组学的影响

转录组分析揭示,高加索三叶草在低温胁迫12 h后产生大量DEGs(8909个上调,6519个下调)。基于本研究转录组数据分析,高加索三叶草在低温胁迫下呈现出典型的代谢与信号转导协同响应特征。KEGG富集分析结果表明,DEGs显著富集于类黄酮生物合成通路与植物MAPK信号通路,反映出该物种在转录层面启动了多层次、系统性的抗寒调控机制。

已有研究表明,类黄酮的生物合成基因与植物低温耐受性增强密切相关^[24]。本研究中,上游关键限速酶基因(*CHS*和*CHI*)均被显著诱导表达,这不仅证实了该通路的全面启动,也为下游黄酮、异黄酮等具有抗氧化与膜保护功能的次生代谢物合成奠定了基础。在冀北杨的转录组研究中^[25],也发现类黄酮相关途径中多个关键基因在低温刺激下表达水平显著上调,支持了类黄酮积累是植物增强低温耐受性的保守策略之一。植物MAPK信号通路则介导了与非生物胁迫响应相关的多种信号传递过程^[26]。在信号转导层面,MAPK信号通路的富集至关重要。MAPKKK家族成员*MEKK1*等基因的上调,表明低温信号通过磷酸化级联反应被感知与转导,进而可能调控下游一系列抗逆相关基因的表达。

高加索三叶草通过协同激活MAPK信号通路与类黄酮生物合成,构建了一个从信号感知到代谢执行的整合分子网络。该网络不仅强化了活性氧清除与膜稳定性维持等生理功能,也体现了其在转录层面应对低温胁迫的高效适应策略,为其抗寒机制的深入解析提供了理论依据。

4 结论

本研究通过对高加索三叶草低温胁迫响应的系统分析,揭示了其从生理适应到转录调控的多层次耐寒机制。在生理层面,植株通过提高抗氧化酶(CAT, POD, SOD)活性和渗透调节物质(SP, SS, Pro)含量,有效缓解了膜脂过氧化损伤(MDA的积累)。在分子层面,转录组分析显示低温胁迫12 h诱导了大规模基因表达重编程,DEGs显著富集于类黄酮生物合成和MAPK信号通路。类黄酮通路上游关键基因(查尔酮合成酶、查尔酮异构酶)的显著上调促进了抗氧化物质的合成,MAPK通路中

*MEKK1*等基因的激活,表明低温信号通过磷酸化级联反应进行转导。

参考文献

- [1] 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
ZHENG Y F, CHEN J L, XIAO F, et al. Effects of different temperatures on photosynthetic characteristics and expression of photosynthesis-related genes in amaranth[J]. Journal of Plant Resources and Environment, 2022, 31(5):50-57
- [2] 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(4):1690-1704
- [3] 熊辉岩,段瑞君,王瑞生. 冷驯化影响越冬作物光合特性和株型特征的生理基础与分子机制的研究进展[J]. 作物杂志, 2017, (4):21-26
XIONG H Y, DUAN R J, WANG R S. Advances in physiological basis and molecular mechanisms of cold acclimation affecting photosynthetic characteristics and plant type characteristics in overwintering crops[J]. Crops, 2017, (4):21-26
- [4] 项洪涛,郑殿峰,何宁,等. 植物对低温胁迫的生理响应及外源脱落酸缓解胁迫效应的研究进展[J]. 草业学报, 2021, 30(1):208-219
XIANG H T, ZHENG D F, HE N, et al. Research progress on physiological responses of plants to low temperature stress and mitigation effects of exogenous abscisic acid[J]. Acta Pratacul-turae Sinica, 2021, 30(1):208-219
- [5] 黄丽芳,龙宇宙,李金芹,等. 低温胁迫对小粒种咖啡幼苗生理特性的影响[J]. 中国农业科技导报, 2023, 25(2):60-67
HUANG L F, LONG Y Z, LI J Q, et al. Effects of low temperature stress on physiological characteristics of *Coffea arabica* L. seedlings[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2023, 25(2):60-67
- [6] 韦霞霞,李玉梅,李彦彪,等. 葡萄抗寒性与韧皮部糖分及内源激素积累的相关性[J]. 西北农业学报, 2021, 30(3):386-394
WEI X X, LI Y M, LI Y B, et al. Correlation between cold resistance and phloem sugar content and endogenous hormone accumulation in grape[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2021, 30(3):386-394
- [7] 杨航宇,刘长仲. 低温胁迫对4种卫矛属植物抗寒生理指标的影响[J]. 草原与草坪, 2020, 40(2):92-98
YANG H Y, LIU C Z. Effects of low temperature stress on cold resistance physiological indexes of four *Euonymus* plants[J]. Grassland and Turf, 2020, 40(2):92-98
- [8] TAN H Q, HUANG H T, TIE M M, et al. Transcriptome profiling of two asparagus bean (*Vigna unguiculata* subsp. sesquipedalis) cultivars differing in chilling tolerance under cold stress[J]. PLoS One, 2017, 11(3):e0151105
- [9] SHEAFFER C C, MARTEN G C. Kura clover forage yield,

- forage quality, and stand dynamics [J]. Canadian Journal of Plant Science, 1991, 71(4): 1169-1172
- [10] TOWNSEND C E. Phenotypic diversity for agronomic characters and frequency of self-compatible plants in *Trifolium ambiguum* [J]. Canadian Journal of Plant Science, 1970, 50(3): 331-338
- [11] SPEER G S, ALLINSON D W. Kura clover (*Trifolium ambiguum*): Legume for forage and soil conservation [J]. Economic Botany, 1985, 39(2): 165-176
- [12] 殷秀杰. 高加索三叶草在内蒙古地区适应性和利用价值研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2004: 5-9
- YIN X J. Study on adaptability and utilization value of *Trifolium ambiguum* M. Bieb. in Inner Mongolia [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2004: 5-9
- [13] MARSHALL A H, RASCLE C, ABBERTON M T, et al. Introgression as a route to improved drought tolerance in white clover (*Trifolium repens* L.) [J]. Journal of Agronomy and Crop Science, 2001, 187(1): 11-18
- [14] NGUYEN T D, ANDREWS M, LEY T W S, et al. Caucasian clover (*Trifolium ambiguum*) specific rhizobia persist in low and high fertility soils in the South Island of New Zealand [J]. New Zealand Journal of Agricultural Research, 2020, 63(3): 332-340
- [15] 彭新, 石凤翎, 付娜娜. 野火球叶片色素和多酚类物质含量与叶色参数的关系 [J]. 草地学报, 2023, 31(7): 2005-2011
- PENG X, SHI F L, FU N N. Relationship between pigment, polyphenol contents and leaf color parameters in *Trifolium lupinaster* leaves [J]. Acta Agrestia Sinica, 2023, 31(7): 2005-2011
- [16] 庄得凤, 王成, 包金花, 等. 低温胁迫下单瓣黄刺玫抗氧化酶活性及相关基因表达 [J]. 东北林业大学学报, 2023, 51(4): 89-92
- ZHUANG D F, WANG C, BAO J H, et al. Antioxidant enzyme activities and related gene expressions of *Rosa xanthina* F. normalis under low temperature stress [J]. Journal of Northeast Forestry University, 2023, 51(4): 89-92
- [17] 温日宇, 刘建霞, 李顺, 等. 低温胁迫对不同藜麦幼苗生理生化特性的影响 [J]. 种子, 2019, 38(5): 53-56
- WEN R Y, LIU J X, LI S, et al. Effects of low temperature stress on physiological and biochemical characteristics of different quinoa seedlings [J]. Seed, 2019, 38(5): 53-56
- [18] 孙予璐, 李建东, 孙备, 等. 不同品种紫花苜蓿主要抗寒生理指标对低温的响应 [J]. 沈阳农业大学学报, 2017, 48(5): 591-596
- SUN Y L, LI J D, SUN B, et al. Response of main cold resistance physiological indexes of different alfalfa varieties to low temperature [J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2017, 48(5): 591-596
- [19] 高婷婷, 毛培春, 田小霞, 等. 10个白三叶品种苗期耐寒性评价 [J]. 草业科学, 2014, 31(9): 1724-1731
- GAO T T, MAO P C, TIAN X X, et al. Evaluation of cold tolerance of 10 white clover varieties at seedling stage [J]. Pratacultural Science, 2014, 31(9): 1724-1731
- [20] 吴宇欣, 蔡昌杨, 唐诗蓓, 等. 植物响应低温的生长发育及分子机制研究进展 [J]. 江苏农业科学, 2023, 51(19): 1-9
- WU Y X, CAI C Y, TANG S B, et al. Research progress on growth, development and molecular mechanisms of plants in response to low temperature [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2023, 51(19): 1-9
- [21] 苏李维, 李胜, 马绍英, 等. 葡萄抗寒性综合评价方法的建立 [J]. 草业学报, 2015, 24(3): 70-79
- SU L W, LI S, MA S Y, et al. Establishment of a comprehensive evaluation method for grape cold resistance [J]. Acta Prataculturae Sinica, 2015, 24(3): 70-79
- [22] 杨艳婷. 扁蓿豆的碳氮代谢规律及其对低温胁迫的响应 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2022: 105-106
- YANG Y T. Carbon and nitrogen metabolism patterns of *Medicago ruthenica* and its response to low temperature stress [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2022: 105-106
- [23] 王敏, 李莉, 贾蓉, 等. 10种紫花苜蓿在低温胁迫下的生理特性及耐寒性评价 [J]. 草业学报, 2024, 33(6): 76-88
- WANG M, LI L, JIA R, et al. Physiological characteristics and cold tolerance evaluation of 10 alfalfa varieties under low temperature stress [J]. Acta Prataculturae Sinica, 2024, 33(6): 76-88
- [24] LIU Y, TIKUNOV Y, SCHOUTEN R E, et al. Anthocyanin biosynthesis and degradation mechanisms in solanaceous vegetables: A Review [J]. Frontiers in Chemistry, 2018, 6: 52
- [25] LI Y T, ZHANG J, WANG S J, et al. Integrative transcriptomic and metabolomic analyses reveal the flavonoid biosynthesis of *Pyrus hopeiensis* flowers under cold stress [J]. Horticultural Plant Journal, 2023, 9(3): 395-413
- [26] CHEN Y, CHEN L, SUN X M, et al. The mitogen-activated protein kinase kinase MKK2 positively regulates constitutive cold resistance in the potato [J]. Environmental and Experimental Botany, 2022, 194: 104702

(责任编辑 付 宸)