



NaHCO₃ 胁迫对甘蓝型油菜幼苗生长的影响及其耐盐候选基因预测

陶顺仙, 张 燕, 李 萍, 燕佳琦, 徐爱遐, 黄 镇

(西北农林科技大学 农学院, 陕西杨凌 712100)

摘 要 为研究甘蓝型油菜耐碱性盐机制,以甘蓝型油菜耐盐品系‘2205’与敏感品系‘1423’为试验材料,通过人工模拟碱性盐胁迫,研究 NaHCO₃ 对甘蓝型油菜幼苗生理的影响及耐盐相关基因的表达量变化,分析耐盐生理指标与基因表达量的相关性,初步预测耐盐候选基因。结果表明:随着碱性盐 NaHCO₃ (75 mmol/L NaHCO₃)胁迫时间的延长,幼苗叶片的电导率、抗氧化酶(SOD、POD)活性、渗透调节物质(脯氨酸、可溶性蛋白和可溶性糖)质量分数逐渐上升,且耐盐品系‘2205’的抗氧化酶活性、渗透调节物质质量分数高于盐敏感品系‘1423’,而电导率低于盐敏感品系‘1423’。6个耐盐相关基因的表达量分析表明, *Bna17410D* 和 *Bna12880D* 基因的表达量在耐盐与敏感品系中呈现先上升后下降的趋势,其余均表现为一直上升的趋势。相关性分析表明, *Bna00850D* 在两品系中与大部分耐盐相关指标的变化呈显著相关性,因此推测 *Bna00850D* 可能为甘蓝型油菜耐碱性盐的候选基因。

关键词 甘蓝型油菜; NaHCO₃ 胁迫; 生理指标; 基因表达; 候选基因

中图分类号 S635.03; Q78

文献标志码 A

文章编号 1004-1389(2019)12-1978-09

近年来,日益严重的土壤盐碱化对作物生产产生严重影响,盐碱胁迫显著降低了作物的生产力^[1-4]。根据粮农组织(FAO)的数据,世界上至少有6%的土地受到盐碱的影响,2.3亿hm²的灌溉土地中有4500万hm²受盐碱的胁迫^[5]。改良盐碱地和种植耐盐碱作物均被用于缓解土地盐碱化这一世界难题,而后者被认为是最为经济可行和最有效的方法。作物耐盐性研究发现,甘蓝型油菜中存在一些耐盐性的种质资源,是改良盐碱地的重要作物。此外,中国油菜主产区油菜播种面积也呈现逐年下滑的趋势^[6-9],急需在中国北方以及沿海地区增加油菜的播种面积^[10],但是这些地区存在大量的盐碱地,因此必须解决油菜在盐碱地正常生长的问题。

研究表明,当植株遭受盐碱胁迫时,细胞膜的原生质收缩而产生内拉外张的应力,脂质层会被拉破,使细胞膜丧失选择性,引起细胞内的电解质和非电解质大量外渗,从而破坏细胞内外离子平衡,幼苗细胞膜的受损程度与盐碱胁迫强度密切

相关^[11]。渗透调节也是逆境生理适应的主要机制之一,植物通过合成大量的小分子物质,如脯氨酸、可溶性糖和可溶性蛋白,帮助细胞维持一定的膨胀压力,确保光合作用、呼吸作用、细胞代谢和其他生命活动的正常运行^[12-13]。植物还通过体内酶保护系统(SOD、POD、CAT)来维持植物体内活性氧(ROS)的平衡,避免ROS的积累,有效减轻ROS对植物细胞的损伤^[14]。

从已有的油菜耐盐研究来看,多以NaCl胁迫作为处理方式,以Na⁺离子代谢、耐盐性相关基因的分子生物学及盐胁迫信息传导等为主要研究方向。但是大部分的盐碱土壤中不仅存在盐离子,还存在OH⁻离子,碱对植物生长的影响往往要大于盐离子的影响^[15]。如果单纯的研究中性盐对植物的影响,其研究所取得成果很难有效应用于生产中,因此很有必要研究植物对碱性盐胁迫的响应机制,目前甘蓝型油菜该方面的研究并不多。因此,本试验通过人工模拟碱性盐胁迫,对甘蓝型油菜苗期耐盐性相关生理指标进行测定,

收稿日期:2019-05-06 修回日期:2019-06-24

基金项目:国家重点研发计划(2016YED0100202)。

第一作者:陶顺仙,女,在读硕士,研究方向为油菜遗传育种及分子生物学。E-mail:2240288474@qq.com

通信作者:黄 镇,男,博士,副教授,研究方向为油菜遗传育种及分子生物学。E-mail:171832611@qq.com

研究其变化规律。同时利用 qRT-PCR 技术研究耐盐相关基因的表达量变化,分析生理指标和基因表达量的相关性,初步确定甘蓝型油菜抗碱性盐可能的候选基因。本试验将为甘蓝型油菜耐碱性盐育种及耐碱性盐机理的深入研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 植物材料、碱胁迫处理和取样

选取籽粒饱满、大小一致的耐盐品系‘2205’和敏盐品系‘1423’种子在 25 °C 下催芽 4 d,光周期为 12 h,然后将其移入基质。在受控条件下[16 h 光照(25 °C)/8 h 黑暗(20 °C)循环;光照度

为 10 000 lx,相对湿度 60%~90%],幼苗长到三叶期左右移入到含有 75 mmol/L NaHCO₃ 营养液中处理 0、12、24 h(2 个品系胁迫前后的表型见图 1),分别取叶片于 2 mL 试管,每个品系在各个时间取样,3 次重复。将收集的幼嫩叶片立即放在液氮中冷冻,在-80 °C 下储存用于生理指标测定以及基因表达量分析。

1.2 耐盐相关基因的表达量分析

根据已经公布的甘蓝型油菜基因注释,在甘蓝型油菜数据库(<http://www.genoscope.cns.fr/brassic napus/data/>)中选择 6 个与植物耐盐相关的基因,见表 1。

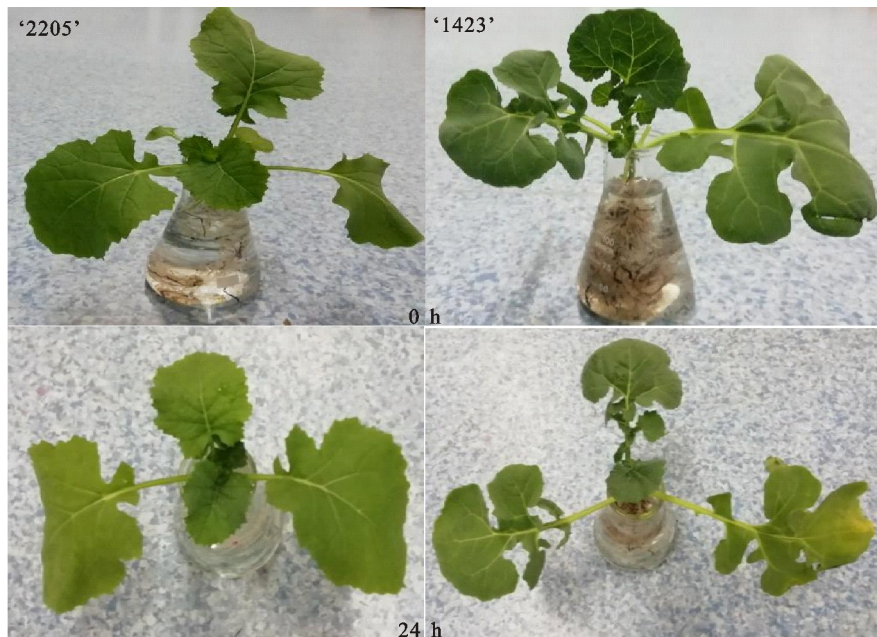


图 1 NaHCO₃ 胁迫(0 h、24 h)对甘蓝型油菜幼苗表型的影响

Fig. 1 Effects of NaHCO₃ stress on phenotype of *Brassica napus* L. seedlings

表 1 基因编号及 GO 注释

Table 1 Genes number and GO annotation

基因编号 Gene ID	GO 注释 GO Term	GO 编号 GO ID
<i>Bna24820D</i>	蔗糖代谢过程;响应盐胁迫 Sucrose metabolic process;response to salt stress	GO:0005985;GO:0009651
<i>Bna17410D</i>	响应寒冷、干旱和盐胁迫 Response to cold/water deprivation /salt stress	GO:0009409;GO:0009414;GO:0009651
<i>Bna12880D</i>	响应盐胁迫 Response to salt stress	GO:0009651
<i>Bna00850D</i>	响应盐胁迫 Response to salt stress	GO:0009651
<i>Bna19240D</i>	响应盐胁迫 Response to salt stress	GO:0009651
<i>Bna23780D</i>	响应干旱、盐胁迫 Response to water deprivation /salt stress	GO:0009414;GO:0009651

为了研究 6 个耐盐基因在碱性盐 NaHCO₃ 胁迫下的表达模式,采用 RT-qPCR 方法检测

NaHCO₃ 胁迫后这些基因在耐盐品系‘2205’和敏盐品系‘1423’中不同时间点(0、12、24 h)的相

对表达量。具体方法如下:用 Primer 5.0 设计特异性引物,引物由上海生工合成。根据天根生化科技有限公司 RNA 提取试剂盒提取不同时间点幼嫩叶片中的总 RNA,检测完整性和浓度,然后按照天根 FastQuant RT 试剂盒合成 cDNA。以甘蓝型油菜为内参,cDNA 链为模板,参照 SYBR Green RT-PCR 说明书进行实时荧光定量检测。每个样品进行 3 个技术重复,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对表达量的计算。

1.3 相关生理指标的测定

1.3.1 细胞膜透性 参考文献[16],将各个时间点的叶片用自来水洗净并擦干,然后用打孔器打取 9 个圆叶片,然后放入加有 10 mL 去离子水的试管中,振荡 12 h,测其浸泡液电导率 S1,再将试管封口置沸水浴中 20 min,冷却至室温,摇匀后测其煮沸后浸泡液电导率 S2,每个处理 3 个重复。

1.3.2 可溶性糖、可溶性蛋白和脯氨酸质量分数及 SOD 和 POD 活性 取各个时间点油菜幼苗的叶片 0.2 g,液氮研磨,1 mL (pH=7.8) 磷酸提取液二次研磨,2 mL+2 mL 磷酸提取液进行冲洗到 10 mL 离心管中。4 °C、12 000 r/min 离心 30 min,上清液为待测液,每个处理 3 个重复。采用茚三酮比色法测定脯氨酸质量分数^[16],蒽酮法测定可溶性糖质量分数^[17],考马斯亮蓝法测定可溶性蛋白质质量分数^[17],氮蓝四唑还原法测定 SOD 活性^[17],愈创木酚显色法测定 POD 活性^[17]。

1.4 数据处理与分析

使用 SPSS 20.0 和 Microsoft Excel 2016 软件对 NaHCO₃ 处理后每个时间点的生理参数和基因表达量进行多重比较 (LSD) 和相关性分析。

2 结果与分析

2.1 NaHCO₃ 胁迫后甘蓝型油菜幼苗耐盐基因表达量分析

如图 2 所示,在 NaHCO₃ 胁迫后 0、12、24 h, *Bna23780D*、*Bna00850D*、*Bna12880D*、*Bna17410D* 基因在耐盐品系‘2205’的表达量高于敏盐品系‘1423’,而 *Bna24820D* 基因在耐盐品系‘2205’的表达量低于敏盐品系‘1423’; *Bna19240D* 基因在 NaHCO₃ 胁迫早期(0 h、12 h),耐盐品系表达量高于敏盐品系,胁迫后期(24 h)敏盐品系表达量高于耐盐品系。其中, *Bna17410D* 和

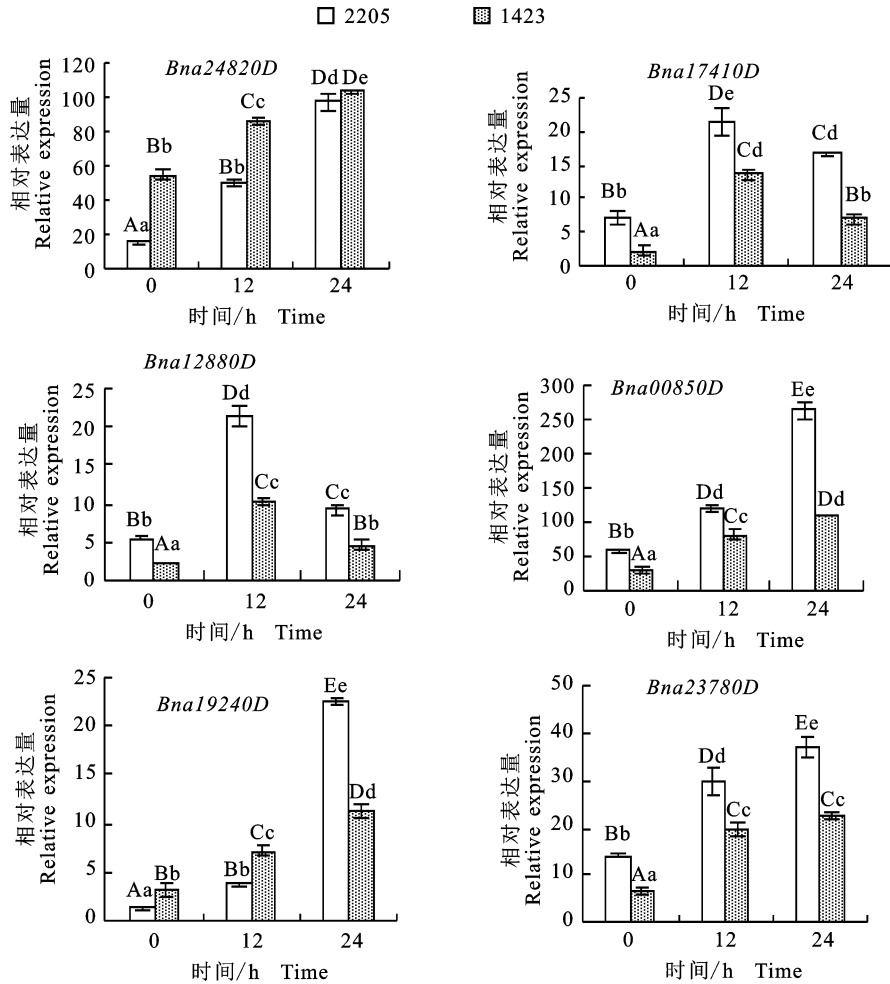
Bna12880D 基因的表达量呈现先上升后下降的趋势,在 NaHCO₃ 处理 12 h 后,基因表达量达到最大; *Bna19240D*、*Bna23780D*、*Bna24820D*、*Bna00850D* 基因呈现一直上升的趋势,在 NaHCO₃ 处理 24 h 后表达量达到最大。

2.2 碱性盐 NaHCO₃ 胁迫下甘蓝型油菜幼苗的生理反应

2.2.1 细胞膜对油菜耐碱性盐(NaHCO₃)的反应分析 如图 3 所示,在 NaHCO₃ 处理后,两品系的电导率均升高,而敏盐品系‘1423’的上升趋势更为明显,12 h 后与对照的差异达到显著水平,24 h 后达到极显著水平。在耐盐品系中,NaHCO₃ 处理 12 h、24 h 后,耐盐品系‘2205’的电导率与对照相比显示出无显著差异,这表明 NaHCO₃ 胁迫下敏盐品系‘1423’幼苗的膜损伤更为严重。

2.2.2 抗氧化酶对油菜耐碱性盐(NaHCO₃)的反应分析 图 4 的结果表明 NaHCO₃ 胁迫下,两品系幼苗叶片的 SOD、POD 活性随着时间的延长呈升高的趋势,在 24 h 均达到最大值。碱性盐 NaHCO₃ 处理 12 h、24 h 后,耐盐品系‘2205’幼苗叶片的 SOD 活性分别显著升高了 60% 和 1 倍,而敏盐品系‘1423’的 SOD 活性分别增加了 34% 和 43%,这表明 NaHCO₃ 胁迫下同一时间点耐盐品系‘2205’的 SOD 活性高于敏盐品系‘1423’。此外,NaHCO₃ 处理 12 h、24 h 后,耐盐品系‘2205’幼苗叶片的 POD 活性较 0 h 分别升高 18% 和 35%,而敏盐品系‘1423’的 POD 活性增加了 12.6% 和 28%,这表明 NaHCO₃ 胁迫下同一时间点耐盐品系 POD 活性也高于敏盐品系。以上结果说明,耐盐品系‘2205’的耐 NaHCO₃ 能力强于敏盐品系‘1423’,而且 SOD 酶活性对碱性盐 NaHCO₃ 胁迫更为敏感。

2.2.3 渗透调节物质对油菜耐碱性盐(NaHCO₃)的反应分析 图 5 结果表明,NaHCO₃ 处理后,耐盐与敏盐品系叶片的脯氨酸质量分数随着时间的增加呈升高的趋势,24 h 时均达到最大值,耐盐品系‘2205’与对照相比增加 1.8 倍,敏盐品系‘1423’脯氨酸质量分数增加了 53%,其与对照差异达到极显著或显著水平。如图 6 所示,2 种油菜幼苗叶片的可溶性蛋白质质量分数随着 NaHCO₃ 胁迫时间的增加而略有升高,NaHCO₃ 处理 12 h 后,耐盐品系‘2205’中溶性蛋白质质量分数升高了 3.7%,同时敏盐品系升高了 4.5%,均



大写字母表示在 1% 水平上差异显著,小写字母表示在 5% 水平上差异显著,下同 Uppercase letters indicate significant difference at 1% level,lowercase letters indicate significant difference at 5% level,the same below

图 2 NaHCO₃ 胁迫下甘蓝型油菜叶片耐盐基因的表达分析

Fig. 2 Expression analysis of salt-tolerant genes in *Brassica napus* L. leaves under NaHCO₃ stress

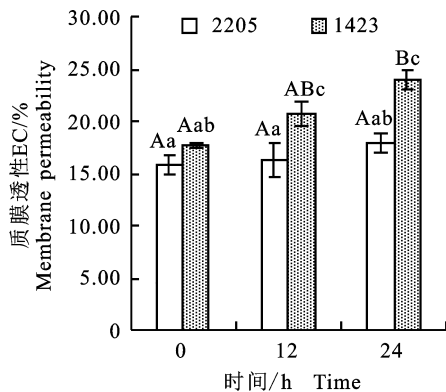


图 3 不同时间点甘蓝型油菜品系叶片的质膜透性

Fig. 3 Leaf membrane permeability at different times in the *Brassica napus* L. cultivars

与对照无显著差异;胁迫 24 h 后,耐盐品系与敏盐品系中的可溶性蛋白质质量分数分别升高 22.4%和 11.2%,其与对照差异分别达到极显著

或显著水平。如图 7 所示,在 NaHCO₃ 处理后,两品系的可溶性糖质量分数均升高,而耐盐品系‘2205’的上升趋势更为明显,24 h 后与对照的差异达到极显著水平,可溶性糖的质量分数增加了 1 倍。在敏盐品系中,NaHCO₃ 处理 24 h 后,叶片中可溶性糖质量分数与对照相比极显著增加 37.6%,差异也达到极显著水平。图 5、图 6 和图 7 结果均表明 NaHCO₃ 胁迫激活了植物体内渗透调节物质对逆境的生理反应。

2.3 甘蓝型油菜逆境基因相对表达量与耐碱性盐相关生理指标的相关性分析

为了初步判断所选基因是否为耐碱性盐候选基因,笔者利用 SPSS 20.0 软件分析耐盐与敏盐品系在 NaHCO₃ 胁迫后 0、12、24 h 幼苗叶片中耐盐基因表达量与电导率、抗氧化物酶(SOD、POD)活性、脯氨酸、可溶性蛋白以及可溶性糖

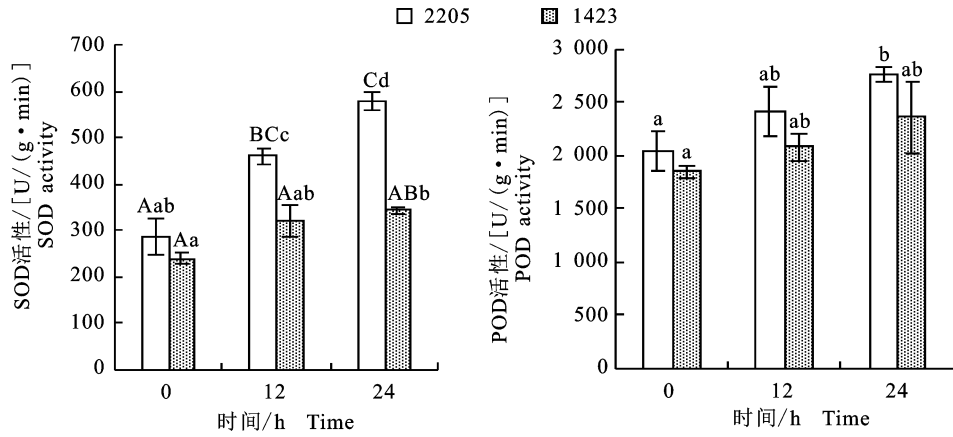


图 4 NaHCO₃ 胁迫下甘蓝型油菜幼苗叶片 POD 和 SOD 活性

Fig. 4 POD and SOD enzyme activity in leaves of *Brassica napus* L. seedlings under NaHCO₃ stress

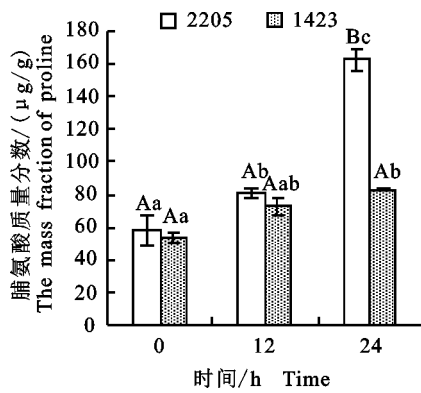


图 5 NaHCO₃ 胁迫下甘蓝型油菜幼苗叶片脯氨酸质量分数

Fig. 5 Mass fraction of soluble proline in leaves of *Brassica napus* L. seedlings under NaHCO₃ stress

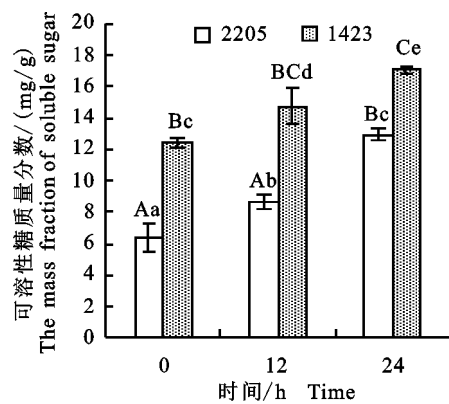


图 7 NaHCO₃ 胁迫下甘蓝型油菜幼苗叶片可溶性糖质量分数

Fig. 7 Mass fraction of soluble sugar in leaves of *Brassica napus* L. seedlings under NaHCO₃ stress

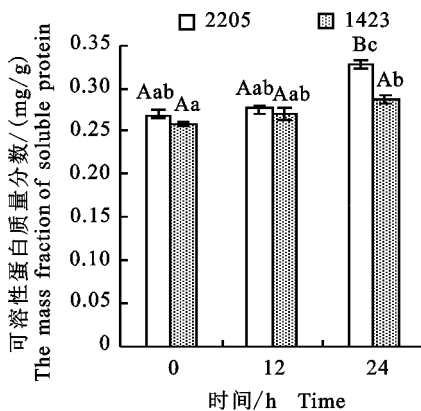


图 6 NaHCO₃ 胁迫下甘蓝型油菜幼苗叶片可溶性蛋白质量分数

Fig. 6 Mass fraction of soluble protein in leaves of *Brassica napus* L. seedlings under NaHCO₃ stress

质量分数的相关性。如表 2 所示, *Bna12880D* 和 *Bna17410D* 基因的表达与两品系的各生理指标的变化不存在相关性; *Bna23780D* 基因的表达量与敏盐品系‘1423’的超氧化物歧化酶(SOD)活性呈极显著正相关, *Bna24820D* 基因的表达量与敏盐品系‘1423’的质膜透性(EC)存在显著相关性, 与可溶性糖质量分数呈极显著正相关。 *Bna19240D* 基因和 *Bna00850D* 基因的表达与两品系的逆境生理指标存在相关性, 其中 *Bna19240D* 的表达量与耐盐品系‘2205’的可溶性蛋白质量分数存在显著相关, 与敏盐品系‘1423’中质膜透性(EC)和脯氨酸(Pro)质量分数的变化呈显著相关性; *Bna00850D* 基因的表达量与两品系中大部分生理指标的变化都存在相关性, 与耐盐品系‘2205’中的质膜透性(EC)和可溶

性糖(SS)质量分数呈显著正相关,与敏盐品系‘1423’中的抗氧化酶(SOD、POD)活性、脯氨酸(Pro)质量分数的变化存在显著相关性。根据此

结果,初步推断 *Bna00850D* 基因可能是甘蓝型油菜耐碱性盐 NaHCO₃ 的一个候选基因。

表 2 耐盐基因表达量与电导率、抗氧化酶(SOD 和 POD)活性、渗透调节物质(Pro、SS 和 SP)质量分数间的相关关系

Table 2 Correlation between salt-tolerant genes expression and stress physiology related indexes

品系 Cultivar		<i>Bna19240D</i>	<i>Bna23780D</i>	<i>Bna00850D</i>	<i>Bna12880D</i>	<i>Bna17410D</i>	<i>Bna24820D</i>
2205	SOD	0.865	0.994	0.946	0.333	0.731	0.981
	SP	0.999*	0.838	0.99	-0.132	0.341	0.962
	POD	0.906	0.981	0.971	0.25	0.669	0.994
	EC	0.993	0.871	0.997*	-0.067	0.402	0.978
	SS	0.97	0.926	0.999*	0.06	0.514	0.996
	Pro	0.994	0.869	0.997	-0.072	0.397	0.976
1423	SOD	0.799	0.999**	0.984*	0.586	0.676	0.637
	SP	0.837	0.893	0.961*	0.19	0.303	0.631
	POD	0.815	0.915	0.970*	0.246	0.358	0.603
	EC	0.999**	0.769	0.841	0.23	0.313	0.965*
	SS	0.934	0.583	0.648	0.209	0.263	0.997**
	Pro	0.957*	0.938	0.970*	0.427	0.519	0.853

注:“**”表示在 1% 水平上显著相关;“*”表示在 5% 水平上显著相关。

Note:“**” is significantly correlated at 1% level;“*” significant correlation at 5% level.

3 讨论与结论

很多研究已经证实土壤中含有 CO₃²⁻, HCO₃⁻ 将会导致土壤 pH 升高,植物将会受到盐和高 pH 双重胁迫,在高 pH 下,植物通过有机酸的合成来适应高 pH 的环境,这也是和中性盐胁迫不同的地方^[18]。有研究表明,碱性盐的胁迫比中性盐严重,各品系对 NaCl、Na₂CO₃ 和 NaHCO₃ 的耐受力也不同^[12,19-21]。土壤盐碱度过高时,最初以渗透胁迫的形式限制植物的生长,这是由于土壤中高浓度的盐碱降低了植物对水分的吸收,从而引发一系列细胞和代谢过程,然后离子积累刺激植物体内活性氧的产生,对植物组织造成伤害^[22-23]。

本试验研究了碱性盐 NaHCO₃ 胁迫后叶片生理指标的变化,这将为甘蓝型油菜耐碱性盐分子机理的研究提供生理参考依据。质膜透性可以用来反映细胞膜损伤的程度^[24],植株遭受非生物胁迫时,细胞内的电解质和非电解质大量外渗,使浸泡液的电导率有所增加。在本研究中碱性盐 NaHCO₃ 胁迫后甘蓝型油菜幼苗叶片的电导率升高,胁迫时间越久,细胞膜损伤越严重,敏盐品系‘1423’幼苗的膜损伤更为严重,这与刘自刚

等^[25]研究 NaCl 胁迫对白菜型冬油菜种子萌发和幼苗生理的影响的结果大致相同。植物体内通过积累脯氨酸、可溶性蛋白和可溶性糖等一些渗透调节物质来抵抗盐碱胁迫^[25-27]。本试验中,随着 NaHCO₃ 处理时间的延长,2 种甘蓝型油菜幼苗叶片中脯氨酸、可溶性蛋白和可溶性糖质量分数增加,而且耐盐品系中渗透调节物质(Pro、SP)的质量分数高于敏盐品系,这可能是耐盐品系保持较良好的胞内生理状态,有效地抵抗了盐碱胁迫引起的水分胁迫。其次,在植物细胞所能忍受的活性氧范围内,植物也能够通过活性氧清除系统抵御碱性盐胁迫^[28],NaHCO₃ 胁迫诱导甘蓝型油菜幼苗叶片抗氧化酶(SOD、POD)活性的升高,SOD 活性对碱性盐 NaHCO₃ 胁迫更为敏感,这些表明 SOD 和 POD 是该甘蓝型油菜品系碱胁迫下清除活性氧的重要酶类,在黄瓜和西瓜耐碱性盐 NaHCO₃ 的研究中也有类似的结果^[20,29]。

其他一些植物耐盐研究探究了盐胁迫下燕麦^[30]和胡杨^[31]叶片中生理指标以及耐盐相关基因表达量的变化趋势,结果发现生理指标的变化与基因表达量的变化密切相关,从而推测这些基因影响了对应生理指标的变化,因此可以通过这种方法初步推测哪些耐盐基因是甘蓝型油菜耐碱

性盐 NaHCO_3 可能的候选基因。本试验将甘蓝型油菜数据库中的 6 个耐盐基因在碱性盐胁迫下进行表达量分析, *Bna23780D*、*Bna00850D*、*Bna12880D*、*Bna17410D* 基因在耐盐品系‘2205’的表达量高于敏盐品系‘1423’,而 *Bna24820D* 基因在耐盐品系‘2205’的表达量低于敏盐品系‘1423’。对 6 个基因相对表达量与生理指标的进行相关性分析, *Bna00850D* 基因的表达量与两品系中大部分生理指标的变化都存在相关性,因此初步推断 *Bna00850D* 基因可能是甘蓝型油菜耐碱性盐 NaHCO_3 的候选基因,同时有研究表明,植物体内的谷胱甘肽在抵抗各种胁迫(冷害、干旱)的过程中起重要作用,而 *Bna00850D* 基因可能通过调节线粒体内的羟基谷胱甘肽水解酶活性(GO:0004416)、谷胱甘肽硫酯酶活性(GO:0047951)以及硫双加氧酶活性(GO:0050313)对盐胁迫做出反应(GO:0009651)^[32]。*Bna00850D* 基因是否是甘蓝型油菜耐碱性盐 NaHCO_3 的候选基因,最终需要对 *Bna00850D* 基因进行功能验证,该工作目前正在西北农林科技大学农学院油菜遗传及分子育种实验室进行。

参考文献 Reference:

- [1] 秦光蔚,陈爱晶,徐汉亿,等.耐盐植物和盐土农业研究进展[J].农业开发与装备,2013(2):1-2.
QIN G W, CHEN A J, XU H Y, *et al.* Research progress in salt-tolerant plants and saline soil agriculture[J]. *Agriculture Development & Equipment*, 2013(2):1-2.
- [2] 朱孔志,吴明昊,申玉香,等.不同油菜品系在盐碱地的耐盐性鉴定及筛选[J].浙江农业科学,2018,59(8):1354-1356.
ZHU K ZH, WU M H, SHEN Y X, *et al.* Identification and screening of salt tolerance of different rape varieties in saline-alkali lands[J]. *Zhejiang Agricultural Sciences*, 2018, 59(8):1354-1356.
- [3] TUYEN D D, LAL S K, XU D H. Identification of a major QTL allele from wild soybean(*Glycine soja* Sieb. & Zucc.) for increasing alkaline salt tolerance in soybean[J]. *Theoretical & Applied Genetics*, 2010, 121(2):229-236.
- [4] XU D, TUYEN D D. Genetic studies on saline and sodic tolerances in soybean[J]. *Breeding Science*, 2012, 61(5):559-565.
- [5] PARIHAR P, SINGH S, SINGH R, *et al.* Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies; a review. [J]. *Environmental Science & Pollution Research*, 2015, 22(6):4056-4075.
- [6] 官春云.湖南省油菜种植面积下降令人忧[J].湖南农业,2007(1):4.
GUAN CH Y. The decline in rapeseed planting area in Hunan province is worrying[J]. *Hunan Agriculture*, 2007(1):4.
- [7] 程玉家.油菜产业发展的问题与对策[J].江苏农村经济,2008(8):70.
CHENG Y J. Problems and countermeasures of rape industry development[J]. *Jiangsu Rural Economy*, 2008(8):70.
- [8] 陈莎莎.长江流域油菜生产规模效益研究[D].武汉:华中农业大学,2017.
CHEN SH SH. Study on the scale effect of rapeseed production in the Yangtze River Basin[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2017.
- [9] 马世杰,周可金.安徽省油菜机械化生产的现状与对策建议[C]//中国作物学会—2015年学术年会.安徽合肥:安徽农业大学,2015.
MA SH J, ZHOU K J. Current status and countermeasures of mechanized production of rapeseed in Anhui Province [C]//China Crop Society-2015 Academic Annual Meeting. Anhui Hefei: Anhui Agricultural University, 2015.
- [10] 龙卫华.油菜发芽期耐盐评价、筛选与盐胁迫下根转录组分析[D].北京:中国农业科学院,2015.
LONG W H. Salt tolerance evaluation and screening of rapeseed during germination and root transcriptome analysis under salt stress[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2015.
- [11] 高红明,吴晓霞,张彪,等. Na_2CO_3 胁迫下星星草幼苗活性氧及保护酶活性的变化[J].植物研究,2006,26(3):308-312.
GAO H M, WU X X, ZHANG B, *et al.* Changes of active oxygen and protective enzyme activities in puccinellia tenuiflora seedlings under Na_2CO_3 stress[J]. *Bulletin of Plant Research*, 2006, 26(3):308-312.
- [12] 汪月霞,索标,赵会杰,等. Na_2CO_3 胁迫对芦荟幼苗叶片叶绿体保护酶和渗透调节物质的影响[J].西北植物学报,2010,30(11):40-46.
WANG Y X, SUO B, ZHAO H J, *et al.* Effects of Na_2CO_3 stress on chloroplast protective enzymes and osmotic adjustment substances in leaves of aloe seedlings[J]. *Acta Botanica Sinica*, 2010, 30(11):40-46.
- [13] 邹琦.植物生理学实验指导[M].北京:中国农业出版社,2003.
ZOU Q. Experimental Guidance of Plant Physiology[M]. Beijing, China Agriculture Press, 2003.
- [14] SHINOZAKI K, YAMAGUCHI SHINOZAKI K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance [J]. *Journ of Experimental Botany*, 2007, 58(2):221.
- [15] 王宁,曹敏建,王君,等. NaCl 和 $\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{NaHCO}_3$ 对玉米种子萌发及幼苗生长的影响差异研究[J].作物杂志,2009(4):52-56.
WANG N, CAO M J, WANG J, *et al.* Study on the effects of NaCl and $\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{NaHCO}_3$ on maize seed germination and seedling growth[J]. *Crops*, 2009(4):52-56.
- [16] 李合生.植物生理生化实验原理和技术[M].北京:高等教育出版社,2000.

- 育出版社, 2000.
- LI H SH. Principles and Techniques of Plant Physiological and Biochemical Experiments[M]. Beijing: Higher Education Press, 2000.
- [17] 曹翠玲, 麻鹏达. 生理学教学实验指导[M]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学出版社, 2016.
- CAO C L, MA P D. Physiological Teaching Experiment Guidance[M]. Yangling Shaanxi: Northwest A&F University Press, 2016.
- [18] 石德成, 尹尚君, 杨国会, 等. 碱胁迫下耐碱植物星星草体内柠檬酸特异积累现象[J]. 植物学报, 2002, 44(5): 537-540.
- SHI D CH, YIN SH J, YANG GUO HUI, *et al.* Citric acid accumulation in an alkali tolerant plant puccinellia tenuiflora under alkaline stress [J]. *Plant Journal*, 2002, 44(5): 537-540.
- [19] 石德成, 殷立娟. 盐(NaCl)与碱(Na₂CO₃)对星星草胁迫作用的差异[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 1993(2): 144-149.
- SHI D CH, YIN L J. The Difference of salt(NaCl) and alkali(Na₂CO₃) on stargrass[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 1993(2): 144-149.
- [20] 张丽平, 王秀峰, 史庆华, 等. 黄瓜幼苗对氯化钠和碳酸氢钠胁迫的生理响应差异[J]. 应用生态学报, 2008, 19(8): 1854-1859.
- ZHANG L P, WANG X F, SHI X F, *et al.* Differences of physiological responses of cucumber seedlings to NaCl and NaHCO₃ stress[J]. *Journal of Applied Ecology*, 2008, 19(8): 1854-1859.
- [21] 卢艳敏, 苏长青, 李会芬. 不同盐胁迫对白三叶种子萌发及幼苗生长的影响[J]. 草业学报, 2013, 22(4): 123-129.
- LU Y M, SU CH Q, LI H F. Effects of different salt stress on seed germination and seedling growth of white clover [J]. *Acta Pratacultura Sinica Sinica*, 2013, 22(4): 123-129.
- [22] WANG J, ZHU J, ZHANG Y, *et al.* Comparative transcriptome analysis reveals molecular response to salinity stress of salt-tolerant and sensitive genotypes of indica rice at seedling stage [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 2085.
- [23] MUNNS R, TESTER M. Mechanisms of salinity tolerance [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2008, 59(1): 651-681.
- [24] WANG S M, ZHANG J L, FLOWERS T J. Low-affinity Na⁺ uptake in the halophyte *Suaeda maritima*[J]. *Plant Physiology*, 2007, 145(2): 559-571.
- [25] 刘自刚, 王志江, 方 圆, 等. NaCl 胁迫对白菜型冬油菜种子萌发和幼苗生理的影响[J]. 中国油料作物学报, 2017, 39(3): 351-359.
- LIU Z G, WANG ZH J, FANG Y, *et al.* Effects of NaCl stress on seed germination and seedling physiology of winter rape in Chinese cabbage[J]. *Chinese Journal of Oil Crops*, 2017, 39(3): 351-359.
- [26] XIA LI, XIUFENG Y, TAO Y U. Effects of water stress on protective enzyme activities and lipid peroxidation in *Phellodendron amurense* seedlings [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2005, 16(12): 2353.
- [27] LIU F R, CHEN H Y, Liu Y, *et al.* Changes in solute content of different tomato genotypes under salt stress [J]. *Acta Photophysiological Sinica*, 2004, 30(1): 99.
- [28] 何 森, 王 欢, 徐鹏飞, 等. 荻幼苗对复合盐碱胁迫的生理响应[J]. 西北植物学报, 2016, 36(3): 506-514.
- HE M, WANG H, XU P F, *et al.* Physiological response of alfalfa seedlings to complex saline-alkali stress [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2016, 36(3): 506-514.
- [29] 苗 丽, 巩 彪, 王秀峰, 等. 西瓜品系对 NaHCO₃ 胁迫的生理响应差异[J]. 新疆农业科学, 2014, 51(6): 1097-1105.
- MIAO L, GONG B, WANG X F, *et al.* Differences in physiological responses of watermelon varieties to NaHCO₃ stress [J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2014, 51(6): 1097-1105.
- [30] 高彩婷, 刘景辉, 徐寿军, 等. 燕麦盐胁迫响应基因的差异表达与生理响应的关系[J]. 西北植物学报, 2015, 35(7): 1385-1393.
- GAO C T, LIU J H, XU SH J, *et al.* Relationship between differential expression and physiological response of salt stress response genes in oats [J]. *Northwest Botanical Journal of China*, 2015, 35(7): 1385-1393.
- [31] 罗永亚. 胡杨试管芽苗对盐胁迫的生理响应及基因表达[D]. 南京: 南京林业大学, 2016.
- LUO Y Y. Physiological response and gene expression of tuber seedlings of *Populus euphratica* to salt stress [D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2016.
- [32] 麦维军, 王 颖, 梁承邨, 等. 谷胱甘肽在植物抗逆中的作用[J]. 广西植物, 2005, 25(6): 570-575.
- MAI W J, WANG Y, LIANG CH Y, *et al.* The role of glutathione in plant stress resistant [J]. *Guangxi Plant*, 2005, 25(6): 570-575.

Effects of NaHCO₃ Stress on Growth of *Brassica napus* Seedlings and Prediction of Candidate Genes Related to Salt Tolerance

TAO Shunxian, ZHANG Yan, LI Ping, YAN Jiaqi, XU Aixia and HUANG Zhen

(College of Agronomy, Northwest A&F University, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract In order to study the mechanism of the alkali salt tolerance in *Brassica napus* L., a salt-tolerant line '2205' and a salt-sensitive line '1423' were used as the experimental materials. The physiological indexes and the expression of salt tolerance related genes in seedlings of *B. napus* were measured under the artificial simulated alkaline salt stress (75 mmol/L NaHCO₃), and the correlation analysis between them was used to predict the candidate genes. The results showed that the electrical conductivity, antioxidant enzymes (SOD and POD) activity, osmotic adjustment substances (proline, soluble protein and soluble sugar) in the leaves of seedlings increased with the prolongation of alkaline salt stress. The salt-tolerant line '2205' had higher activities of antioxidant enzymes and contents of osmotic adjustment substances, and lower electrical conductivity than the salt-sensitive line '1423'. The expression of *Bna17410D* and *Bna12880D* among six salt tolerance related genes increased firstly, and then decreased in both materials, while the expression of other genes showed a rising trend. The correlation analysis indicated that *Bna00850D* expression was closely correlated with most indicators related to salt tolerance in both materials, therefore, *Bna00850D* might be a candidate gene related to alkaline salt tolerance in *B. napus*.

Key words *Brassica napus* L.; NaHCO₃ stress; Physiological indexes; Gene expression; Candidate genes

Received 2019-05-06

Returned 2019-06-24

Foundation item The National Key R&D Program (No. 2016YED0100202).

First author TAO Shunxian, female, master student. Research area: rapeseed genetic breeding and molecular biology. E-mail: 2240288474@qq.com

Corresponding author HUANG Zhen, male, Ph. D, associate professor. Research area: rapeseed genetic breeding and molecular biology. E-mail: 171832611@qq.com

(责任编辑: 成敏 Responsible editor: CHENG Min)