

不同耐淹油菜品种的耐淹性生理差异

吕艳艳, 金岩, 付三雄, 戚存扣*

江苏省农业科学院经济作物研究所, 南京210014

摘要: 以甘蓝型油菜耐淹品系WR-4和不耐淹品系WR-24为材料, 研究淹水处理后两个品系的植株形态差异、植株可溶性糖和脯氨酸的含量以及SOD活性和MDA含量的变化差异。结果表明, WR-4植株根系发育良好, 有支细根发生, 淹水6 d后, WR-4的根长增加了9.4%, WR-24的根长没有明显增加; 淹水6 d+去水后3 d, WR-24的干重增长幅度明显低于WR-4; 淹水6 d+去水后1 d, WR-4叶片中可溶性糖的含量和脯氨酸的含量增加, 且高于WR-24; WR-4叶片中氧化产物MDA的含量去水后逐渐下降, 而WR-24中MDA含量仍在增加, 相当于对照的2倍。通过组织化学染色, WR-4叶片中积累的过氧化氢(H₂O₂)和超氧阴离子(O₂⁻)较WR-24少, 抗氧化酶SOD的活性明显高于WR-24。上述结果表明: 淹水胁迫下, WR-4通过增加可溶性糖及脯氨酸等渗透调节有机物的含量和及时启动抗氧化酶系统来恢复淹水伤害的能力显著高于不耐淹品系WR-24。

关键词: 甘蓝型油菜; 耐淹性; 生理差异; SOD; MDA

Physiological Differences of Different Waterlogging-Resistant *Brassica napus* L. under Waterlogging Stress

LÜ Yan-Yan, JIN Yan, FU San-Xiong, QI Cun-Kou*

Institute of Industrial Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China

Abstract: The morphological performance and physiological mechanism of *Brassica napus* under water stress were studied by waterlogging (submergence) treatment of the seedlings of waterlogging-resistant line WR-4 and waterlogging-susceptible line WR-24. The contents of soluble sugar and proline, and activities of SOD and MDA content in the seedlings were measured. Results showed that after submergence treatment, WR-4 performed a well-developed root system with more branch hair on the main root. The root length of WR-4 increased by 9.4% compared to control. The dry weight of WR-4 from 6 d submergence+3 d recovery treatment increased more than WR-24. The soluble sugar and proline content in leaf of WR-4 from 6 d submergence+1 d recovery treatment increased more than WR-24. Content of MDA in leaves of WR-4 decreased after 6 d submergence+1 d recovery, while that in WR-24 was increasing. Through histochemical staining, WR-4 accumulated less hydrogen peroxide (H₂O₂) and superoxide anion (O₂⁻) in leaves comparing to WR-24. And its SOD activity was significantly higher than WR-24. It indicated that WR-4, the waterlogging-resistant line showed a strong ability to restore damage resulting from water stress by increasing the content of soluble sugar and proline, and timely starting antioxidant enzyme system to defend against oxidative damage.

Key words: *Brassica napus* L.; waterlogging-resistant; physiological differences; SOD; MDA

油菜是重要的油料作物之一。我国油菜种植面积和产量约占世界的30%。我国长江流域为冬油菜主产区, 油菜种植面积占全国的70%左右。该区在油菜生长期、尤其在苗前期处于多雨季节, 加上特有的油菜-水稻的轮作方式, 导致油菜湿害严重(曾建军和时明芝2004; 谭筱玉等2011)。湿害是指土壤中的水分达到饱和形成的嫌气环境而导致植物的生长发育受到的危害(Jackson和Colmer 2005)。湿害影响植物的代谢, 在湿害胁迫下, 植物通过无氧呼吸产生的乙醇、乳酸等物质在植物体内的大量积累对植物自身会造成毒害; 其次打破

植物内部活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生与清除的平衡, ROS的大量积累会对植物造成氧化伤害; 第三, 湿害会影响植物体内源激素如乙烯(ethylene, ET)、脱落酸(abscisic acid, ABA)、细胞分裂素(cytokinin, CTK)的水平, 影响植物正常的生长发育; 另外, 湿害还会使植物对营养物质的吸收失调(Dennis等2000; Grichko和Glick 2001)。研究

收稿 2013-07-04 修定 2013-08-06
资助 国家油菜产业技术体系(CARS-13)和科技部支撑计划(2010-BAD01B10)。

* 通讯作者(E-mail: qckjaas@gmail.com; Tel: 025-84390372)。

表明,甘蓝型油菜的耐湿性基因型差异较大,存在广泛的遗传变异,大部分种质资源属于中等耐湿类型,只有少数为高耐湿类型(Ashraf和Mehmood 1990; 陈洁等2006)。因此选育耐湿性强的品种成为油菜育种的重要研究内容。

国内关于甘蓝型油菜湿害和耐湿性等方面的报导主要是对耐湿油菜品系的筛选和鉴定(陈洁等2006; 张雪花等2011)。李云等(2012)建立了一种油菜苗期耐淹性快速鉴定方法,认为用幼苗全淹处理6 d,去水后7 d的相对死苗率可作为幼苗耐淹性鉴定指标。张学昆等(2007)通过对耐湿和敏感型甘蓝型油菜苗期指标的测定,发现湿害胁迫下,耐湿基因型能显著增加渗透调节有机物的含量,同时能及时启动活性氧清除系统,降低膜脂过氧化能力,增强植株抵御湿害带来的缺氧胁迫能力,认为根系活力,植株总干重和脯氨酸含量等3项指标可以作为鉴定甘蓝型油菜幼苗的耐湿性指标。李玲等(2012)研究发现,外源施加ABA和油菜素内酯(brassinolide, BR)可以缓解油菜幼苗受到的湿害,而机理也是通过调节渗透有机物的含量和提高抗氧化酶的活性等途径来实现。另外,研究发现,油菜的耐湿性还和种子的颜色有关,种子颜色呈黑色的耐湿性较强,红色次之,黄色种子耐湿性较差(Zhang等2008)。

国外对不同作物耐湿相关基因以及启动子等调控元件的研究较多(Mohanty等2005)。在逆境胁迫下,植物中的一类转录因子AP2/ERF家族在抵御逆境胁迫时发挥着重要的作用,目前关于ERF在湿害胁迫中的功能研究也主要是集中于拟南芥、水稻等几种模式生物(Nakano等2006; Cao等2006; Zhuang等2011; Sharoni等2011),如水稻中的Sub1A,受湿害诱导表达,过量表达Sub1A的水稻,增强了对湿害的耐性(Xu等2006; Fukao等2006; Fukao和Bailey-Serres 2008)。而在油菜中关于ERF基因的发掘还存在很大的空间。Zou等(2013)通过DGE技术对淹水处理后的甘蓝型油菜进行转录组学分析,在表达上调的191个基因中,有18.6%属于转录调节因子,其中5个ERF家族基因受到上调,但是,在湿害胁迫下,ERF调节的下游功能基因包括哪些,ERF如何调节下游基因的表达,还需要更为深入的研究。

本文对已鉴定获得的耐淹和不耐淹甘蓝型油

菜品系幼苗淹水处理后形态、生理的指标变化及其差异进行研究,探索耐淹油菜的耐淹生理机制,为油菜相关耐淹基因的筛选和功能分析提供依据。

材料与方法

1 材料

甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)耐淹品系WR-4和不耐淹品系WR-24由江苏省农业科学院经济作物研究所油菜室提供。

2 方法

2.1 耐淹性鉴定试验材料的种植与淹水处理

将耐淹品系WR-4和不耐淹品系WR-24的种子置于培养皿中湿润的滤纸上催芽(25 °C, 36 h)。种子露白后播种于盛有营养土(有机质含量≥50%,氮、磷、钾含量≥2.5%)和蛭石(1:1)的穴盘中(长51 cm,宽24 cm,高6 cm),共(3穴×9排)27穴。每个材料播种3穴(3个重复),每穴播种25株。

子叶平展时定苗,每穴留苗20株。定苗后,将穴盘置于周转箱(长56 cm,宽40 cm,高16 cm)中进行淹水处理(全淹)。淹水深度:水面距幼苗顶部2 cm;淹水时间:6 d。淹水满6 d后,将穴盘从周转箱中取出(去水),在自然状态下进行恢复性生长,于去水后7 d统计各穴的存活率。存活率(%)=(存活苗数/总苗数)×100%。

2.2 植株形态和生理指标观察试验材料的种植与淹水处理

将WR-4和WR-24的种子置于培养皿中湿润的滤纸上催芽(25 °C, 36 h)。种子露白后播于盛有蛭石的盆钵(高8 cm,直径12 cm)中,每盆6株。子叶平展时,用1/2 Hogland营养液浇灌,以后每3 d浇灌一次。二叶期定苗,每盆留苗3株。

三叶期时,分单钵置于水桶(高21 cm,直径22 cm)中进行淹水处理。淹水深度:水面距幼苗顶部2 cm。共设4个处理:对照(CK,未进行淹水处理,于淹水当天取样);淹水6 d(T1);淹水6 d+去水后1 d(T2);淹水6 d+去水后3 d(T3)。每个处理设3个重复。

2.3 根长和植株干重测定

将植株从钵土中取出,尽量避免伤害到根系,用自来水冲洗、洗净,吸干表面水分,测定根长,并分别称量地上部和根系鲜重,然后于80 °C烘箱中烘干48 h,称量干重。

2.4 可溶性糖、脯氨酸及丙二醛(malondialdehyde, MDA)的测定

可溶性糖含量的测定采取蒽酮比色法; 脯氨酸含量的测定采取磺基水杨酸法; MDA含量按Heath和Packer (1968)方法测定。

2.5 蛋白提取及含量测定

将新鲜叶片或根系洗净, 吸干表面水分, 分别称取0.2 g, 于预冷的研钵中加入50 mmol·L⁻¹预冷的磷酸缓冲液(PBS)研磨, 4 °C, 12 000×g离心20 min, 上清液即为酶提取液, 蛋白含量测定采取Bradford (1976)方法。

2.6 酶活性测定

超氧化物歧化酶(superoxide, SOD)活性的测定采取氮蓝四唑光化还原法, 参照Giannopolitis和Ries (1977)文献进行测定。以氮蓝四唑光化还原反应50%抑制率所需的酶量作为一个酶活力单位(U)。3 mL反应体系中含50 mmol·L⁻¹磷酸缓冲液(pH 7.8)、13 mmol·L⁻¹甲硫氨酸(methionine, MET)、75 μmol·L⁻¹氯化硝基四氮唑兰(nitroblue terazdium, NBT)、2 μmol·L⁻¹核黄素、0.1 mmol·L⁻¹乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)、适量待测酶液。此反应混合液光照15 min (光强100 μmol·m⁻²·s⁻¹)后测560 nm处吸光值。

过氧化氢酶(catalase, CAT)活性的测定参照Aebi (1984)的方法进行。3 mL反应体系中含50 mmol·L⁻¹磷酸缓冲液(pH 7.0)、适量待测酶液以及10 mmol·L⁻¹ H₂O₂, 迅速测定3 min内A₂₄₀的连续变化值。消光系数为39.4 μmol·L⁻¹·cm⁻¹。

2.7 O₂⁻和H₂O₂的组织化学染色

处理后的植株叶片洗净后在3,3-二氨基联苯胺(3,3-diaminobenzidine, DAB)染液(0.1%, pH 5.8)中抽真空10 min, 然后置于室温、黑暗环境中静置24 h, 期间经常振荡, 叶片要分散开, 不要压在一起, 至褐色斑点出现, 用蒸馏水冲洗叶片, 加入适量95%的乙醇在80 °C水浴中进行脱色, 至叶片不含叶绿素, 脱色后观察。

同样处理的植株在氯化硝基四氮唑兰(nitroblue terazdium, NBT)染液(0.1%)中抽真空10 min, 置于室温、光照下反应, 直至出现紫色的斑点, 加入适量95%的乙醇在80 °C水浴中进行脱色, 至叶片不含叶绿素, 脱色后观察。

2.8 数据分析

采用SPSS13.0软件统计差异显著性。

实验结果

1 子叶平展期淹水6 d和去水后7 d WR-4和WR-24的植株形态和死苗率

淹水6 d处理且在去水后7 d, WR-24的多数植株干枯萎焉, 仅有少数植株新叶鲜绿; 而WR-4多数植株能维持生长, 虽然子叶枯萎, 但是真叶仍正常生长(图1)。统计结果(图2)显示, WR-4的存活率为75%, 而WR-24存活率仅为17.5%。表明WR-4幼苗期的耐淹能力显著高于WR-24。



图1 WR-4和WR-24淹水6 d和去水后7 d的植株形态
Fig.1 Morphology of WR-4 and WR-24 after 6 d submergence and 7 d recovery

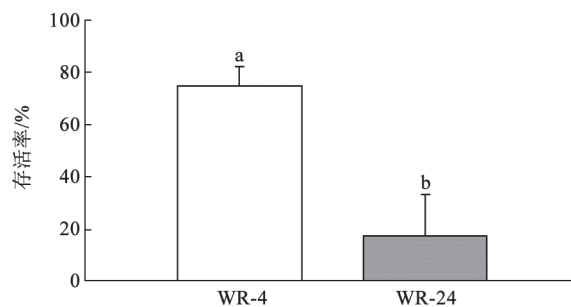


图2 WR-4和WR-24在淹水6 d和去水后7 d的存活率
Fig.2 Survival rate of WR-4 and WR-24 after 6 d submergence and 7 d recovery
不同品系柱形上有不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

2 三叶期淹水处理后WR-4和WR-24的植株形态以及干重和根长

对三叶期WR-4进行T3处理后, 植株形态上无明显的伤害, 叶片鲜绿色, 根系较为发达, 根系较粗, 且有较多支细根发生; 而WR-24的叶片萎焉、叶片出现部分缺绿呈透明状, 根系纤细且呈暗褐色(图3-A、B)。表明淹水胁迫下WR-4和WR-24地上部和根系均受到了不同程度的伤害, 但对WR-4

的伤害远轻于WR-24。另外, 在T1处理后, WR-4地上部和根系的干重比对照有所增加, 虽然增加的幅度较小; 而WR-24地上部和根系的干重在T1处理后几乎没有增加, 说明淹水6 d严重抑制了WR-24的生长。在T2处理后, 两个油菜品系地上部和根系的干重继续增加, 尤其在T3处理后, WR-4地上部和根系的干重相对于对照分别增加了135%和84.6%, 而WR-24的干重仅增加了31.9%和50%, 增长幅度明显低于WR-4, 两者差异显著(图4-A、B)。表明WR-4在淹水胁迫解除后, 恢复生长较快, 耐淹性强。同样, 在T1处理后, WR-4的根长相对于对照增加了9.4%, 而WR-24的根长几乎没有增加, 表明WR-24在淹水胁迫下, 根系生长受到了明显的抑制。T2和T3处理后, WR-4和WR-24的根长均没有增加(图4-C), 但是从形态来看(图3-A), T3处理后WR-4发生较多的支细根, 且根系变粗, 而WR-24根系纤细变黑, 可能WR-4通过增加支



图3 淹水6 d和去水后3 d WR-4和WR-24的植株形态

Fig.3 Morphology of WR-4 and WR-24 after 6 d submergence and 3 d recovery

A: 正常条件(CK)及淹水6 d+去水后3 d (T3)处理下WR-4和WR-24的地上部(上排)和根系(下排)形态; B: T3处理下WR-4和WR-24的叶片形态。

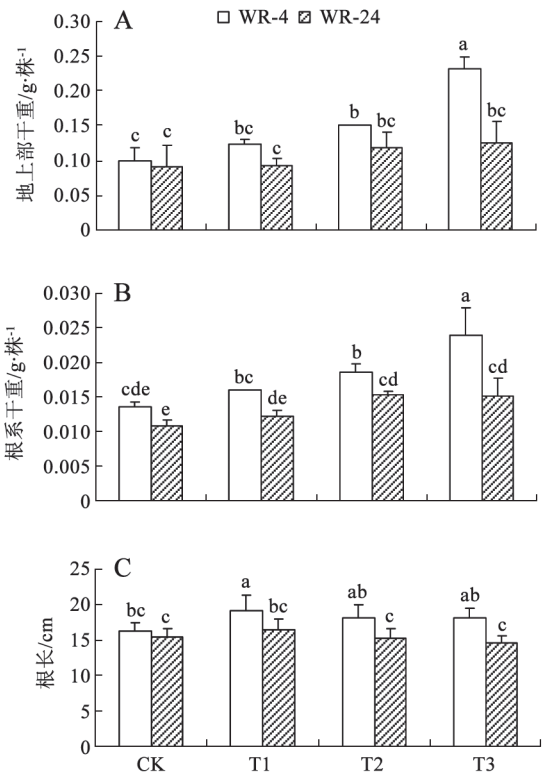


图4 淹水处理下WR-4和WR-24的植株干重和根长

Fig.4 Dry weight and root length of WR-4 and WR-24 after submergence treatment

CK: 未进行淹水处理; T1: 淹水6 d; T2: 淹水6 d+去水后1 d; T3: 淹水6 d+去水后3 d。不同品系和不同处理的柱形上有不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$), 下图同。

细根和根毛的发生来增强其耐淹性, 而WR-24对淹水的耐性相对较弱。

3 三叶期淹水处理后WR-4和WR-24中可溶性糖和脯氨酸含量的变化

在T1处理后, WR-4和WR-24的叶片和根系中可溶性糖的含量与对照相比均没有明显的变化。可能是由于淹水期间, 植株光合能力减弱, 产生有机物的速度降低, 而植株在受到淹水胁迫时, 代谢缓慢, 因此, 可溶性糖的含量变化不大。T2处理后, 两者叶片和根系中可溶性糖的含量均明显上升, 因为植株在淹水胁迫解除后, 需要恢复正常生长, 因此, 光合作用加强, 产生的可溶性糖含量增加, 其中, WR-4叶片中的可溶性糖的含量 $[0.079 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ (DW)}]$ 是WR-24 $[0.043 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ (DW)}]$ 的2倍。表明解除淹水胁迫后WR-4比WR-24能更有效地恢复生长。T3处理后, WR-4叶片中糖含量开始下降, 而WR-24叶片中糖含量仍有升高的趋势; WR-4和WR-24根系中糖含量均呈增加趋势, 这说明淹水胁迫对根系的伤害较大(图5), 此结果进一步表明解除淹水胁迫后WR-4通过增加糖含量来恢复生长的能力强于WR-24。两个品系叶片中脯氨酸含量在T1处理后显著上升, 其中WR-4叶片中脯氨酸的含量达 $0.22 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ (FW)}$, 约是对照的6倍, 而WR-24中脯氨酸含量仅为 $0.091 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ (FW)}$, 仅为对照的2倍

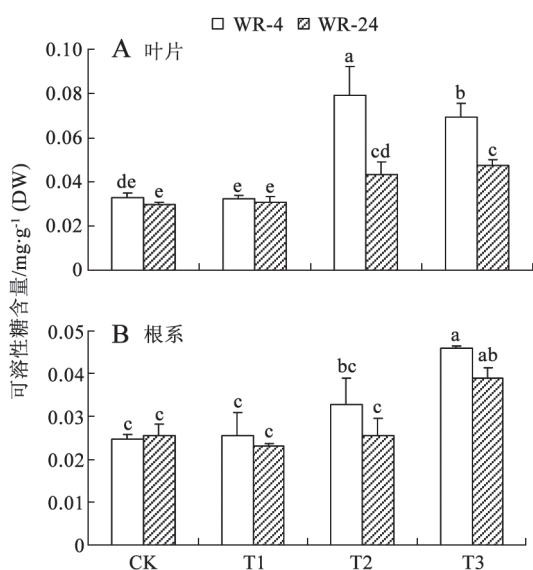


图5 淹水处理后WR-4和WR-24植株中的可溶性糖含量
Fig.5 Soluble sugar content of WR-4 and WR-24 after submergence treatment

(图6), 随着淹水胁迫解除(去水)后时间的延长, WR-4叶片中脯氨酸含量逐渐降低, 而WR-24脯氨酸含量依旧维持较高的水平, 两个品系根系中脯氨酸的含量与叶片中的趋势相同。此结果同样说明在受到淹水胁迫时WR-4的耐淹性和淹水胁迫解除(去水)后通过增加脯氨酸的含量启动修复伤害的能力均高于WR-24。

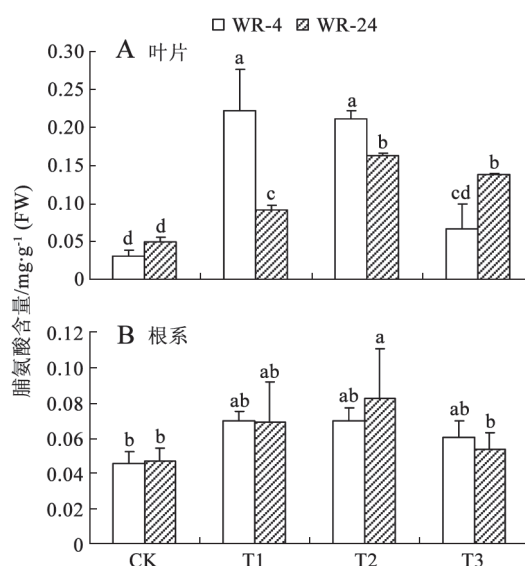


图6 淹水处理后WR-4和WR-24植株中的脯氨酸含量
Fig.6 Proline content of WR-4 and WR-24 after submergence treatment

4 三叶期淹水处理后WR-4和WR-24中MDA的含量变化

MDA是植物细胞膜脂受到氧化伤害的产物。WR-4和WR-24三叶幼苗期淹水处理后植株体内MDA的含量发生变化。T1处理后, 两个品系叶片中MDA的含量均有增加。WR-4叶片中MDA的含量是对照的1.4倍, WR-24叶片中MDA的含量为对照的1.5倍, 两者之间差异不显著。T2处理后, 两个品系叶片中MDA的含量差异显著。WR-4叶片中MDA含量开始下降, 下降幅度达 $10.9 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1} \text{ (FW)}$, 接近对照水平, 而WR-24中MDA含量仍在增加, 增加幅度达 $18.1 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1} \text{ (FW)}$, 相当于对照的2倍。T3处理后, WR-24叶片中的MDA含量仍维持较高的水平, 而WR-4维持在较低水平(图7-A)。T1处理后, 两个品系的根系MDA的含量均有所增加, T2处理后, WR-4根系中的MDA含量有所降低, 而

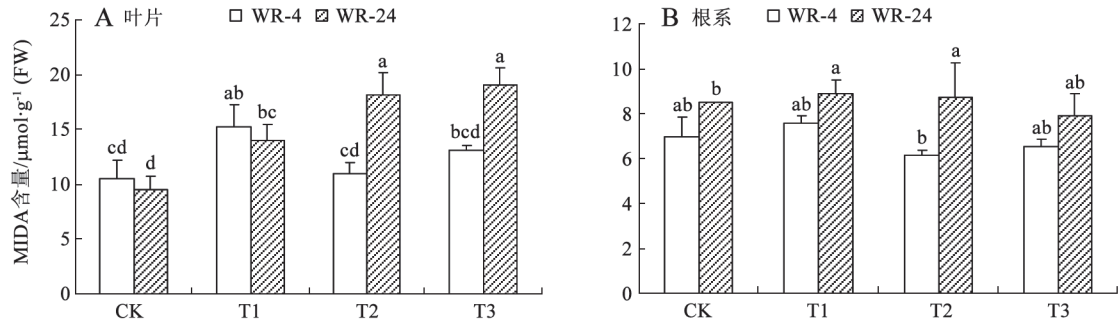


图7 淹水处理后WR-4和WR-24植株中的MDA含量

Fig.7 MDA content of WR-4 and WR-24 after submergence treatment

WR-24 MDA含量没有明显变化, T3处理后, WR-4根系中的MDA含量维持低水平, 而WR-24根系中的MDA含量维持在一个相对较高水平(图7-B)。上述结果表明, 淹水处理下WR-24受到的氧化伤害远远高于WR-4。

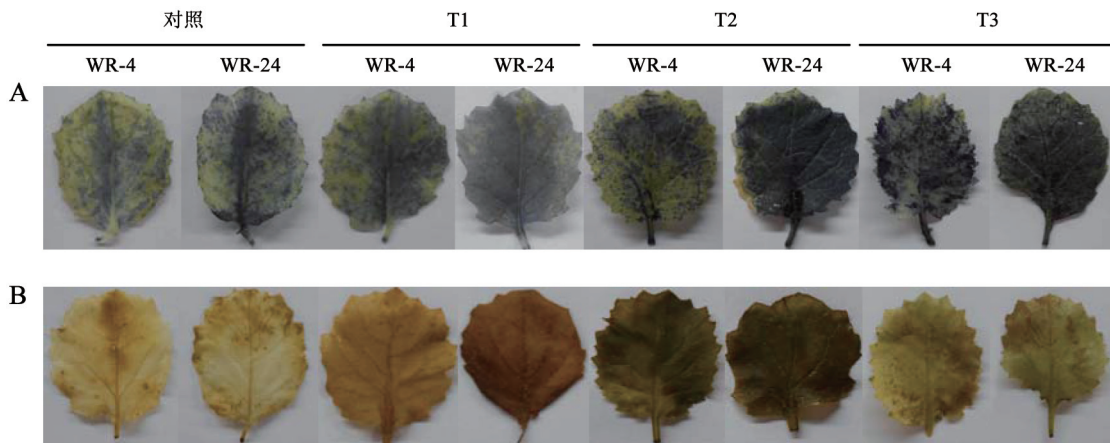
5 三叶期淹水处理后WR-4和WR-24植株叶片中 O_2^- 和 H_2O_2 的积累

对三叶期淹水处理幼苗应用NBT对植株体内的 O_2^- 进行组织化学染色(图8-A), 结果显示T1处理后, WR-4和WR-24叶片内紫色斑点相对于对照都有所增加; T2和T3两个处理后, WR-4和WR-24叶片内紫色斑点继续增加, 明显多于对照水平, 同时, WR-24整个叶片均被染成紫色, 而WR-4的紫色斑点未布满整个叶片, 表明WR-4叶片中氧化产物 O_2^- 产生的量明显少于WR-24。应用DAB对植株体内的 H_2O_2 进行组织化学染色结果(图8-B)显示, T1处理后, WR-4和WR-24叶片中褐色相对于对照显著

增加, 且WR-24染色明显深于WR-4; T2处理后, 两者叶片中均积累较多的 H_2O_2 , 说明两者均受到较大的氧化伤害; T3处理后, 两者 H_2O_2 的积累开始减少, 染色变浅, 但是两者之间没有显著的差异, 可能是因为 H_2O_2 在植株体内不稳定, 容易被抗氧化物所分解, 因此, 去水后3 d两者均能恢复正常生长, 所以差异不显著。通过染色结果, 说明淹水胁迫下, WR-24对 O_2^- 和 H_2O_2 的积累相对于WR-4较多, 受到淹水带来的氧化伤害明显高于WR-4, 而WR-4对于淹水带来的氧化伤害抗性更强。

6 三叶期淹水处理后WR-4和WR-24植株抗氧化酶的活性差异

三叶期淹水处理条件下, T1处理后WR-4和WR-24叶片中SOD的活性都有所增强, WR-4比对照增加了25%, 而WR-24比对照增加了50%。淹水逆境下, 植株受到氧化伤害越大, 需要启动的抗氧化酶活性越高, 可知, 淹水逆境下WR-4受到的氧化

图8 O_2^- (A)和 H_2O_2 (B)的NBT和DAB组织化学染色Fig.8 Histochemical localization of O_2^- (A) and H_2O_2 (B) by NBT and DAB staining, respectively

伤害低于WR-24。T2处理后, WR-4中SOD的活性降到对照水平, 为 $30.2 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ (蛋白), 而WR-24中SOD的活性虽然有所下降, 但依然高于对照。T3处理后, 两者叶片中SOD活性分别恢复到对照水平。T1和T2处理后, WR-4根系中SOD的活性分别为 35.28 和 $33.67 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ (蛋白), 比对照增强, 而WR-24根系中SOD的活性较低, 分别为 22.6 和 $18.9 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ (蛋白), 与对照相比呈下降趋势, 其中T2、T3处理后, SOD活性比对照明显降低。表明淹水胁迫下根系首先受到伤害, 而WR-24根系受到的伤害程度明显大于WR-4, 从而使根系活力下降, SOD活性也随之降低, 而WR-4所受到的相对较小的伤害可以通过增强抗氧化酶的活性来缓解(图9)。CAT可以将 H_2O_2 分解为水和氧气, 而T1处理后, 氧化伤害直接产生的 H_2O_2 以及由SOD催化 O_2^- 产生的 H_2O_2 使植株体内 H_2O_2 含量骤增, 消耗较多的抗氧化酶, 使植株体内蛋白酶浓度短时间降低, 因此, WR-4和WR-24叶片中CAT的活性都有所下降。T2处理后, 两者的CAT活性随之升高, 但是两者之间没有显著性差异, T3处理后, WR-4中CAT的活性稳定, 而WR-24中CAT活性开始下降, 且低于WR-4。在根系中, 各个处理下, WR-4和WR-24中CAT活性都呈不断下降趋势, 而且两者之间没有差异(图10), 原因可能是由于根系是淹水胁迫的首要伤害器官,

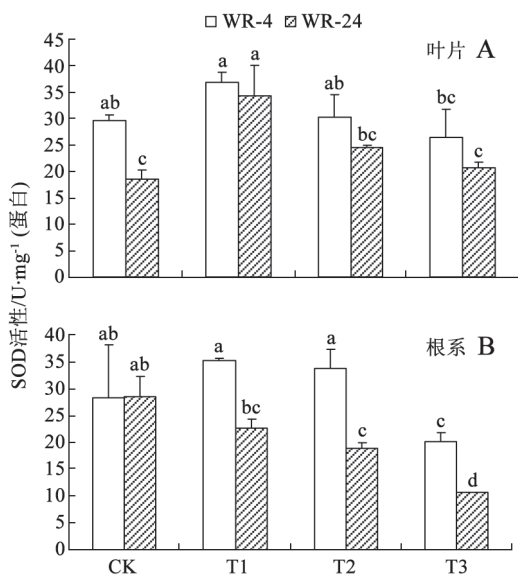


图9 淹水处理后WR-4和WR-24植株中的SOD活性
Fig.9 Activity of SOD of WR-4 and WR-24 after submergence treatment

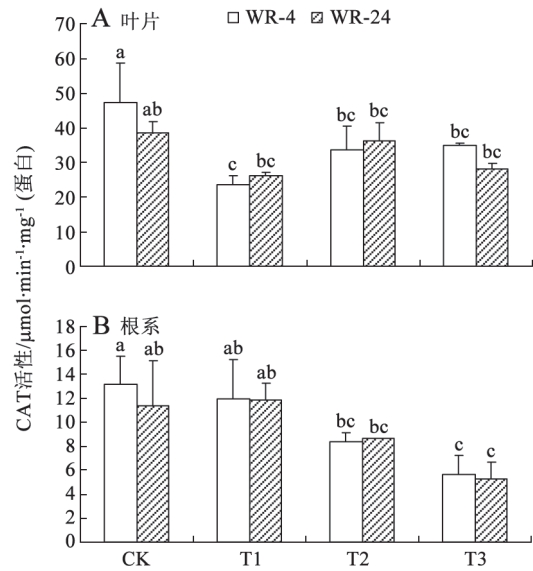


图10 淹水处理后WR-4和WR-24植株中的CAT活性
Fig.10 Activity of CAT of WR-4 and WR-24 after submergence treatment

受到的伤害较大, 因此根系活力降低而导致CAT活性降低。上述结果表明, 在受到相对较轻的伤害时, 不耐淹品系需要启动更多的酶活性来参与抗氧化防御, 而耐性品系受到的伤害相对较轻, 因此无需启动更多的抗氧化酶系统; 而在受到相对较大的伤害时, 耐性品系的抗氧化防御能力则明显高于不耐品系。

讨 论

目前国内油菜耐湿性研究主要集中在湿害对油菜的生理生化过程、产量和品质的影响以及耐湿油菜品种的鉴定和筛选等方面(张学昆等2007; 曾建军和时明芝2004; 谭筱玉等2011), 其中有些研究直接通过对种子淹水或缺氧处理来进行耐湿性鉴定(程勇等2010; 范其新等2005), 有些则通过对幼苗期进行缺氧处理来筛选耐湿材料(张学昆等2007; 张雪花等2011), 本实验室前期建立了油菜苗期耐淹性快速筛选的方法, 筛选出了耐淹品系WR-4和不耐淹品系WR-24(李云等2012), 在本研究中, 通过对三叶期幼苗进行淹水处理进一步分析两者的耐淹性差异。

首先对子叶平展期淹水6 d和去水后7 d的存活率进行统计, 结果表明WR-4的存活率为75%, 远远高于WR-24 17.5%的存活率, 说明了WR-4在子

叶期表现出耐淹性较强的特点。之后在两个油菜品系三叶幼苗期进行淹水处理, 植株形态上的变化可以反映出植物受到淹水伤害的程度(张学昆等2007)。通过形态上观察, WR-4在形态上没有受到明显的伤害, 其叶片鲜绿色、根系较为发达、且有较多不定根的发生等特点, 相对于WR-24出现老叶萎蔫凋落、新叶部分出现透明状、根系纤细且呈暗褐色等表现现象, 说明WR-24在淹水胁迫下, 地上部和根系均受到了较为严重的伤害, 而WR-4受到的伤害较轻。

MDA是由于植物衰老或在逆境条件下受到伤害后其组织或器官膜脂质发生过氧化反应而产生的。MDA的含量与植物逆境伤害有密切关系, 一般可作为植物受到氧化伤害的指标(Marnett 2002; Choudhary等2007)。在淹水6 d时, WR-24叶片和根系中MDA的含量随着淹水以及去水时间的延续而逐渐增加, 且明显高于耐淹油菜。说明不耐淹油菜在淹水处理下, 受到的膜脂过氧化伤害大于耐淹油菜, 而本研究中两者可溶性糖和脯氨酸的含量也同时说明了WR-4更能通过调节植株相应生理过程来增强其耐淹性。逆境条件下, 可溶性糖一方面可以通过调节渗透压来增强植物的耐逆性, 另一方面, 可以为植物提供能量。Qi等(2012)对两种生态型栎树的根系进行缺氧处理后, 通过DGE (digital gene expression)分析, 发现耐湿型栎树糖酵解中的 β -淀粉酶、丙酮酸激酶以及乙醇发酵途径中的乙醇脱氢酶等相关酶基因的表达上调, β -淀粉酶可以将淀粉转化为可溶性碳水化合物, 乙醇脱氢酶进一步将糖酵解产物转化为乙醇, 产生ATP。而植物在受到淹水带来的缺氧胁迫时, 有氧呼吸被抑制, 糖酵解及乙醇发酵成为植物产生能量的主要途径, 在相关酶基因表达上调时, 植株体内可溶性糖的含量升高。而脯氨酸亲水性强, 能稳定细胞内原生质胶体的代谢, 防止细胞脱水, 因此, 可溶性糖和脯氨酸的含量也可以作为植物耐逆性的生理指标(Sánchez等1998), 而本研究中, 淹水作为一种逆境胁迫, 同样使耐淹油菜可溶性糖和脯氨酸含量增加, 以增强抗逆能力, 其中WR-4可溶性糖和叶片中脯氨酸的含量相对于对照显著增加, 且明显高于WR-24。因此, 本研究中WR-4相对于WR-24, 植株受到的淹水伤害较轻, 这与耐淹油菜可以及时通过调节增加可溶性糖和脯氨酸的含量

等生理过程来参与对湿害的防御有着密切的关系, 而WR-24的抗逆能力则较弱。相关研究也分析了不同基因型植株在生理上表现出的不同耐湿能力(张雪花等2011; 张学昆等2007)。

湿害作为一种逆境胁迫, 同样会打破油菜活性氧产生与清除的平衡, 使植物体内积累大量的活性氧。通过染色发现, 淹水处理后, WR-4叶片中积累的 O_2^- 和 H_2O_2 明显低于WR-24, 说明WR-4受到的氧化伤害较WR-24轻, 而抗氧化酶系统在清除活性氧的过程中起着重要的作用(Hossain等2009; Kumutha等2009)。本研究中, 在淹水6 d, 去水后1 d和去水后3 d时, WR-4中SOD的活性明显高于WR-24。SOD是植物抗氧化防护的第一道防线, SOD可以将超氧阴离子自由基转化为过氧化氢和氧气, 结果表明WR-4启动SOD活性的能力大于WR-24。而CAT可以将过氧化氢分解为水和氧气, 但是CAT的活性在两者之间没有明显的差异, 因为不同品系植株在受到胁迫后的防御机制有所不同, 除了抗氧化酶系统, 像非酶系统如谷胱甘肽、抗坏血酸等也在抗氧化防御过程中起着一定的作用, WR-4可能通过其他途径将氧化产物过氧化氢分解。

另外, 植物在抗逆过程中的相关生理生化过程同时也是受到某些调控因子的调节作用, 相关研究通过DGE技术(Qi等2012; Provost等2012; Zou等2013)和双向电泳技术(Alam等2010)对黄瓜、不同生态型栎树、油菜、大豆等进行分析, 发现湿害等逆境胁迫下, 转录因子相关基因表达上调, 可能转录因子通过进一步调节下游基因的表达来抵御逆境胁迫带来的伤害。如烟草过量表达*JERF3*后, 渗透调节有机物、碳代谢相关酶、活性氧的产生与清除过程中的相关基因表达都有所上调, 共同参与到对逆境胁迫的防御过程中(Wu等2008)。因此, 本研究的后续研究拟以耐淹油菜WR-4为材料, 筛选耐淹相关功能基因, 希望能更详细的探明耐淹油菜的耐湿机制。

参考文献

- 陈洁, 张学昆, 谌利, 晁国红, 李加纳(2006). 甘蓝型油菜耐湿种质资源的快速筛选. 中国油料作物学报, 28 (2): 138-143
- 程勇, 顾敏, 丛野, 邹崇顺, 张学昆, 王汉中(2010). 淹水胁迫条件下甘蓝型油菜发芽期耐湿性的配合力分析. 中国农业科学, 43 (7): 1339-1345
- 范其新, 张学昆, 谌利, 李加纳(2005). 缺氧对甘蓝型黄籽与黑籽油

- 菜发芽的影响. 中国油料作物学报, 27 (3): 84~87
- 李玲, 李俊, 张春雷, 张树杰, 马霓, 李光明(2012). 外源ABA和BR在提高油菜幼苗耐渍性中的作用. 中国油料作物学报, 34 (5): 489~495
- 李云, 付三雄, 戚存扣(2012). 油菜苗期耐淹性快速筛选方法的建立及验证. 中国油料作物学报, 34 (3): 256~261
- 谭筱玉, 程勇, 郑普英, 张学昆, 周广生(2011). 油菜湿害及耐湿性机理研究进展. 中国油料作物学报, 33 (3): 306~310
- 曾建军, 时明芝(2004). 植物涝害生理研究进展. 聊城大学学报(自然科学版), 17 (3): 54~56
- 张学昆, 范其新, 陈洁, 李加纳, 王汉中(2007). 不同耐湿基因型甘蓝型油菜苗期对缺氧胁迫的生理差异响应. 中国农业科学, 40 (3): 485~491
- 张雪花, 李浩杰, 张锦芳, 蒲晓斌, 蒋俊, 牛应泽, 蒋梁材(2011). 甘蓝型油菜耐湿性初步评价和主成分分析. 中国油料作物学报, 33 (2): 98~103
- Alam I, Lee DG, Kim KH, Park CH, Sharmin SA, Lee H, Oh KW, Yun BW, Lee BH (2010). Proteome analysis of soybean roots under waterlogging stress at an early vegetative stage. J Biosci, 35 (1): 49~62
- Ashraf M, Mehmood S (1990). Effects of waterlogging on growth and some physiological parameters of four *Brassica* species. Plant Soil, 121: 203~209
- Aebi H (1984). Catalase *in vitro*. Method Enzymol, 105: 121~126
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 72: 248~254
- Cao YF, Song FM, Goodman RM, Zheng Z (2006). Molecular characterization of four rice genes encoding ethylene-responsive transcriptional factors and their expressions in response to biotic and abiotic stress. J Plant Physiol, 163: 1167~1178
- Choudhary M, Jetley UK, Khan MA, Zutshi S, Fatma T (2007). Effect of heavy metal stress on proline, malondialdehyde, and superoxide dismutase activity in the cyanobacterium *Spirulina platensis*-S5. Ecotox Environ Safe, 66 (2): 204~209
- Dennis ES, Dolferus R, Ellis M, Rahman M, Wu Y, Hoeren FU, Grover A, Ismond KP, Good AG, Peacock WJ (2000). Molecular strategies for improving waterlogging tolerance in plants. J Exp Bot, 51 (342): 89~97
- Fukao T, Xu K, Ronald PC, Bailey-Serres J (2006). A variable cluster of ethylene response factor-like genes regulates metabolic and developmental acclimation responses to submergence in rice. Plant Cell, 18: 2021~2034
- Fukao T, Bailey-Serres J (2008). Submergence tolerance conferred by *Sub1A* is mediated by SLR1 and SLRL1 restriction of gibberellin responses in rice. Proc Nat Acad Sci USA, 105: 16814~16819
- Giannopolitis CN, Ries SK (1977). Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. Plant Physiol, 59: 309~314
- Grichko VP, Glick BR (2001). Ethylene and flooding stress in plants. Plant Physiol Biochem, 39: 1~9
- Heath RL, Packer L (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch Biochem Biophys, 125: 189~198
- Hossain Z, López-Climent MF, Arbona V, Pérez-Clemente RM, Gómez-Cadenas A (2009). Modulation of the antioxidant system in citrus under waterlogging and subsequent drainage. J Plant Physiol, 166 (13): 1391~1404
- Jackson MB, Colmer TD (2005). Response and adaption by plants to flooding stress. Ann Bot, 96: 501~505
- Kumutha D, Ezhilmathi K, Sairam RK, Srivastava GC, Deshmukh PS, Meena RC (2009). Waterlogging induced oxidative stress and antioxidant activity in pigeonpea genotypes. Biol Plant, 53 (1): 75~84
- Marnett LJ (2002). Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. Toxicology, 181~182: 219~222
- Mohanty B, Krishnan SPT, Swarup S, Bajic VB (2005). Detection and preliminary analysis of motifs in promoters of anaerobically induced genes of different plant species. Ann Bot, 96: 669~681
- Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, Shinshi H (2006). Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice. Plant Physiol, 140: 411~432
- Provost GL, Sulmon C, Frigerio JM, Bodènès C, Kremer A, Plomion C (2012). Role of waterlogging-responsive genes in shaping interspecific differentiation between two sympatric oak species. Tree Physiol, 32: 119~134
- Qi XH, Xu XW, Lin XJ, Zhang WJ, Chen XH (2012). Identification of differentially expressed genes in cucumber (*Cucumis sativus* L.) root under waterlogging stress by digital gene expression profile. Genomics, 99: 160~168
- Sánchez FJ, Manzanares M, de Andres EF, Tenorio JL, Ayerbe L (1998). Turgor maintenance, osmotic adjustment and soluble sugar and proline accumulation in 49 pea cultivars in response to water stress. Field Crops Res, 59 (3): 225~235
- Sharoni AM, Nuruzzaman M, Satoh K, Shimizu T, Kondoh H, Sasaya T, Choi I, Omura T, Kikuchi S (2011). Gene structures, classification and expression models of the AP2/EREBP transcription factor family in rice. Plant Cell Physiol, 52 (2): 344~360
- Wu LJ, Zhang ZJ, Zhang HW, Wang XC, Huang RF (2008). Transcriptional modulation of ethylene response factor protein JERF3 in the oxidative stress response enhances tolerance of tobacco seedlings to salt, drought, and freezing. Plant Physiol, 148: 1953~1963
- Xu K, Xu X, Fukao T, Canlas P, Mashirang-Rodriguez R, Heuer S, Ismail AM, Bailey-Serres J, Ronald PC, Mackill DJ (2006). *Sub1A* is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice. Nature, 442: 705~708
- Zhang XK, Chen J, Chen L, Wang HZ, Li JN (2008). Imbibition behavior and flooding tolerance of rapeseed seed (*Brassica napus* L.) with different testa color. Genet Resour Crop Evol, 55: 1175~1184
- Zhuang J, Chen JM, Yao QH, Xiong F, Sun CC, Zhou XR, Zhang J, Xiong AS (2011). Discovery and expression profile analysis of AP2/ERF family genes from *Triticum aestivum*. Mol Biol Rep, 38: 745~753
- Zou XL, Tan XY, Hu CW, Zeng L, Lu GY, Fu GP, Cheng Y, Zhang XK (2013). The transcriptome of *Brassica napus* L. roots under waterlogging at the seedling stage. Int J Mol Sci, 14: 2637~2651