作物学报 ACTA AGRONOMICA SINICA 2023, 49(7): 1882–1894 http://zwxb.chinacrops.org/
ISSN 0496-3490; CN 11-1809/S; CODEN TSHPA9 E-mail: zwxb301@caas.cn

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2023.24172

油莎豆耐盐性评估及盐胁迫下幼苗根系转录组学分析

王会伟 张向歌 李春鑫 许欣然 胡海燕 朱雅婧 王 艳 张新友*

河南省农业科学院经济作物研究所, 河南郑州 450002

摘 要: 油莎豆是一种综合利用价值高的新型经济作物, 抗逆性极强, 具有在盐渍化土壤上种植发展的潜力。为明确其耐盐特性, 本研究设置 5 个 NaCl 浓度(0、0.3%、0.6%、0.9%和 1.2%), 分析了 NaCl 胁迫对油莎豆茎豆萌发和幼苗生长过程中形态和生理指标的影响。结果表明, 在 0.3%和 0.6% NaCl 胁迫下, 茎豆发芽率、幼苗根长和苗高受影响程度较小; 根系中膜受损程度指标物丙二醛(MDA)和氧化胁迫物过氧化氢(H_2O_2)的含量增加不显著, 而渗透调节物甜菜碱(GB)、脯氨酸(Pro)的含量和抗氧化酶超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)的活性显著提高, 整体上受到的盐胁迫伤害较小。而在 0.9%和 1.2% NaCl 胁迫下, 盐胁迫伤害十分明显, 茎豆萌发和幼苗生长受到严重的抑制。为进一步鉴定油莎豆耐盐相关基因, 利用 RNA-seq 技术检测了 0、0.3%和 0.6% NaCl 胁迫下油莎豆根系的基因表达情况。通过基因差异表达分析、加权基因共表达网络分析(WGCNA)以及 GO 富集分析发现, 24 个主要与氧化还原、跨膜转运、几丁质水解相关的 GO terms 显著富集, 涉及了 15 个显著上调表达基因。其中, *DN23985_c0_g1*、*DN2960_c0_g1*、*DN8384_c1_g1* 分别编码玉米黄质环氧酶、L-抗坏血酸过氧化物酶、谷胱甘肽转移酶, 具有抗氧化作用, 参与抗氧化调节; *DN21785_c1_g1* 和 *DN6596_c0_g1* 二者均编码氨基酸转运蛋白, 可能通过积累氨基酸类小分子(如 Pro)而增强渗透调节; *DN14393_c0_g1* 编码几丁质酶, 能够水解几丁质而促进植物应对胁迫响应。本研究明确了油莎豆在 0.6%及以下浓度 NaCl 胁迫时具有较好的耐盐性, 并进一步筛选出耐盐相关基因, 为油莎豆在盐渍化土壤的种植和耐盐品种的培育提供了重要的参考。

关键词: 油莎豆; 耐盐性; NaCl 胁迫; 转录组学; 耐盐相关基因

Evaluation of salt tolerance in *Cyperus esculentus* and transcriptomic analysis of seedling roots under salt stress

WANG Hui-Wei, ZHANG Xiang-Ge, LI Chun-Xin, XU Xin-Ran, HU Hai-Yan, ZHU Ya-Jing, WANG Yan, and ZHANG Xin-You*

Industrial Crop Research Institute, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, Henan, China

Abstract: *Cyperus esculentus* is a new industrial crop with the high comprehensive utilization value, which is a strongly resistant to stresses and has a great potential to grow in saline soil. In order to clarify its salt tolerance, five NaCl concentrations (0, 0.3%, 0.6%, 0.9%, and 1.2%) were set in this study to analyze the effects of NaCl stress on morphological and physiological indexes during germination and seedling growth. The results showed that the germination percentage, root length, and seedling height were less affected under 0.3% and 0.6% NaCl stresses. Meanwhile, the contents of indicator of membrane damage degree, malondialdehyde (MDA), and oxidative stress substance, hydrogen peroxide (H_2O_2), did not increase significantly. However, the contents of osmoregulation substances [glycine betaine (GB), and proline (Pro)] and the activities of antioxidant enzymes [super-

本研究由国家重点研发计划项目(2019YFD1002600), 河南省重大科技专项项目(211100110100)和河南省农业科学院优秀青年科技基金项目(2022YQ19)资助。

This study was supported by the National Key Research and Development Project (2019YFD1002600), the Henan Major Science and Technology Project (211100110100), and the Excellent Youth Science and Technology Fund of Henan Academy of Agricultural Sciences (2022YQ19).

* 通信作者(Corresponding author): 张新友, E-mail: haasz@126.com

第一作者联系方式: E-mail: whuiweiw@163.com

Received (收稿日期): 2022-08-01; Accepted (接受日期): 2022-10-10; Published online (网络出版日期): 2022-10-24.

URL: https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20221021.1703.008.html

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

oxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), and catalase (CAT)] were significantly increased, and the damage of salt stress was less on the whole. However, under 0.9% and 1.2% NaCl stresses, the salt stress injury was very obvious and the germination and seedling growth of *Cyperus esculentus* were severely inhibited. In order to further identify the genes related to salt tolerance, RNA-seq technology was used to detect the gene expression in roots under 0, 0.3%, and 0.6% NaCl stresses. 24 GO terms mainly related to oxidoreduction, transmembrane transport, chitin hydrolysis was significantly enriched, among which 15 significantly up-regulated genes were involved, through gene differential expression analysis, weighted gene co-expression network analysis (WGCNA), and GO enrichment analysis. Among them, *DN23985_c0_g1*, *DN2960_c0_g1*, and *DN8384_c1_g1* encoded zeaxanthin epoxidase, L-ascorbate peroxidase, and glutathione S-transferase, respectively, which had antioxidant effects and participated in antioxidant regulation. Both *DN21785_c1_g1* and *DN6596_c0_g1* encoded amino acid transporters, which may enhance osmoregulation by accumulating small amino acid molecules such as Pro. *DN14393_c0_g1* encoded chitinase, which hydrolyzed chitin and promoted plant response to stress. In this study, it was confirmed that *Cyperus esculentus* had a good salt tolerance under 0.6% or less NaCl stress, and the salt-tolerance related genes were further screened out, which provided an important reference for the cultivation in saline soil and the breeding of salt-tolerant varieties.

Keywords: *Cyperus esculentus*; salt tolerance; NaCl stress; transcriptomics; salt-tolerance related gene

土壤盐渍化已成为影响植物生长和农业生产的主要非生物胁迫, 是世界范围内主要的环境问题之一[1-3]。我国土壤盐渍化形势十分严峻, 各类盐渍化土壤总面积达到约 0.99 亿公顷, 约占全国土地面积的 1/3 [4]。盐渍化土壤中盐分过多, 会产生盐害作用, 严重影响农作物的生长及产量[5]。由于缺乏适宜种植的耐盐性作物品种, 大面积的盐渍化土壤无法有效利用, 对我国农业生产造成巨大损失, 甚至会影响到我国的经济发展和粮食安全。

油莎豆(*Cyperus esculentus*)是一种优质、高产、综合利用价值高的油、粮、牧、饲多用新型经济作物。原产北非及地中海沿岸一带, 广泛栽培于西班牙、意大利、南非、南美、前苏联等地; 1960 年由中国科学院植物研究所从保加利亚引入我国试种成功, 近年来在我国新疆、内蒙古、广西、湖南、湖北、河北、河南等地已开始种植[6-8]。油莎豆单位面积产油量是大豆的 4~5 倍、油菜的 2~3 倍; 油莎豆油清亮醇香, 不饱和脂肪酸总量达 80%以上, 是已知植物油中“维生素 E 含量之王”, 油质优良; 油莎豆淀粉和糖分的含量超过 50%, 是优质酿酒原料, 豆粕可替代粮食作为酿酒原料[7]。大力发展油莎豆产业不仅能有效缓解食用油巨大消费需求和有限自给率的主要矛盾, 还可以部分缓解酿酒产业大量消耗原粮的问题。油莎豆以茎豆无性繁殖为主, 适应性强, 耐旱、耐涝、耐贫瘠、耐盐碱, 具有在盐渍化土壤上种植的潜力[8], 有望成为一种盐渍化土壤改良和边际土地利用的优良作物。因此, 开展油莎豆耐盐特性和耐盐分子机制的研究具有重要意义。

盐胁迫主要破坏植物细胞内离子稳态和平衡, 产生渗透胁迫和离子毒害[9]。其次, 当过多的盐离子进入植物体内, 会影响酶的活性以及蛋白的功能等, 使细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平会急剧增加; 如果 ROS 不能被及时清除, 将诱导细胞膜发生脂过氧化作用, 产生大量的终产物丙二醛(malondialdehyde, MDA), 同时破坏细胞膜结构, 对植物造成各种次生毒害[10]。为了应对盐胁迫, 植物尤其是耐盐性植物激活了多种耐受机制, 减少吸收、增加外排或者将盐离子区隔化在液泡中以降低其在细胞质中的浓度[11]; 同时还会增加某些渗透调节物如可溶性糖(soluble sugar, SS)、脯氨酸(proline, Pro)和甜菜碱(glycine betaine, GB)的合成, 调节细胞渗透平衡[12]; 另外, 植物还有 ROS 清除系统, 增强超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(peroxidase, POD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)等活性, 清除过量积累的 ROS, 减少次生氧化毒害[13]。

植物抵抗盐胁迫而产生的各种生理生化反应涉及到一系列的相关基因[14]。不同植物对于盐胁迫的耐受程度不同, 其根本原因在于其是否具备相关基因、相关基因是否表达以及相关基因表达是否过量。高通量 RNA 测序分析(RNA-seq)是一种功能强大的全基因组转录谱鉴定和差异基因表达分析技术, 已被广泛用于检测多种植物在盐胁迫下的基因表达, 如在大麦[15]、甘薯[16]、油菜[17]和拟南芥[18]等植物中, 鉴定出一系列的耐盐相关基因。这些研究表明, 大量的耐盐相关基因参与了氧化还原、渗透调节、离子转运和激素信号转导等生物学过程。这些耐盐相关基因的鉴定将进一步为耐盐机制解析奠定基础。

种子萌发和幼苗生长是植物生命的开始, 也是其整个生命周期中最重要、最脆弱的阶段[19-20]。在盐渍化环境中, 植物能否顺利通过幼苗期, 在一定程度上能够反映其耐盐能力[21-22]。盐渍化土壤以含有较高浓度的盐离子尤其是 Na^+和 Cl^-为主

要特征[23-25]，因而 NaCl 可作为耐盐性评价的胁迫剂[26-29]。本研究以 NaCl 溶液模拟盐渍化环境，通过对油莎豆茎豆萌发和幼苗生长过程中形态指标和生理指标的测定，了解其耐盐特性，并借助 RNA-seq 技术对其耐盐相关基因进行挖掘，初步解析其中的耐盐机制，以期为油莎豆在盐渍化土壤的栽培种植和耐盐品种的培育提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为圆粒型豫油莎 2 号(Yuyousha 2, YYS2)和长粒型豫油莎 3 号(Yuyousha 3, YYS3) 2 个不同类型的油莎豆品种，均由河南省农业科学院经济作物研究所选育。

1.2 耐盐性评估

1.2.1 盐胁迫下油莎豆茎豆的发芽率和耐盐指数测定 本研究设置 5 个不同质量浓度 NaCl 处理：0 (CK)、0.3%、0.6%、0.9%和 1.2%，模拟盐胁迫。每个油莎豆品种选取大小均匀的茎豆 1500 粒，用 10%次氯酸钠溶液消毒 10 min，无菌水冲洗干净后备用。将每个品种的 300 粒茎豆分别放入 5 个处理中进行浸种(3 d)，每天更换一次相应的处理溶液。将吸涨的茎豆转移至沙土育苗盘(8×16 孔)中进行发芽，每个品种每个处理设 3 次重复，每个重复 100 粒，每天喷洒一次处理溶液(3 L)，喷洒之前用清水(3 L)喷洒冲洗。沙培 7 d 后，观察与统计茎豆发芽情况，测定发芽率和耐盐指数。发芽率(%)=(n/N)×100，公式中：n 为最终正常发芽数，N 为供试茎豆总数；耐盐指数(%)=(处理发芽率/对照发芽率)×100。

1.2.2 盐胁迫下油莎豆幼苗生长发育观察 将以上 5 个处理溶液作为培养液，选取沙培 7 d 后对照中长势一致的油莎豆进行水培培养，每个品种每个处理设 3 次重复，每个重复 15 株。培养 3 d 后，观察幼苗生长情况，测量所有幼苗的苗高和根长。幼苗苗高为茎豆芽眼以上至顶部叶尖的长度；幼苗根长为茎豆芽眼以下最长根的长度。

1.2.3 盐胁迫下发油莎豆幼苗根系生理指标测定 将以上水培(5 个处理溶液)培养 3 d 的油莎豆幼苗根系(相同处理下每个重复的 15 株混样)用液氮速冻，并于–80℃保存备用。参考《现代植物生理学实验指南》，采用试剂盒(南京陌凡生物科技有限公司)测定各处理幼苗根系的 MDA、过氧化氢(H_2O_2)含量以及 CAT、SOD、POD 活性；采用雷氏盐沉淀法测定 GB 含量；采用茚三酮比色法测定 Pro 含量；采用蒽酮法测定 SS 含量。在进行以上不同生理指标测定时，每个处理检测 3 次重复。

以上试验所需材料均于河南省农业科学院人工气候室进行种植。光照 14 h, 30℃；黑暗 10 h, 28℃。各处理中, 3 个重复的平均值作为该指标的表型值。利用 WPS 2021 软件进行数据整理和计算，利用 IBM SPSS 25 软件进行各个性状的多重比较分析，采用最小显著性差异法(LSD)在 5%水平上进行显著性判定。

1.3 转录组学分析

1.3.1 RNA 提取与测序 根据耐盐性评估结果，选取耐盐性好的 NaCl 处理下(包括对照)的油莎豆根系进行总 RNA 提取(TaKaRa RNA 提取试剂盒)，每个处理 3 个重复(上述–80℃保存备用样品)。利用琼脂糖凝胶电泳分析 RNA 降解程度，Qubit 荧光计精确定量 RNA 浓度，以及 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测 RNA 完整性。质检合格后，通过 Oligo (dT)磁珠富集总 RNA 中带有 polyA 结构的 mRNA，采用离子打断的方式，将 mRNA 打断到长度 300 bp 左右的片段，以此构建 mRNA 文库。基于 Illumina HiSeq 测序平台，对这些文库进行 150 bp 双末端测序，数据量约为 6 Gbp。

1.3.2 转录本拼接及功能注释分析 采用 Cutadapt 去除测序原始数据(Total Reads)中 3'端带接头的序列以及低质量读数，获得质控后读数(Clean Reads)。由于油莎豆目前没有参考基因组信息，需要从头(*De Novo*)组装转录本。利用 Trinity 软件对 Clean Reads 进行 *De Novo* 拼接组装，得到转录本。提取每个基因下最长的转录本作为该基因的参考序列，称为非冗余基因(Unigene)。基于 NR (NCBI non-redundant protein sequences)、Swiss-Prot、GO (Gene Ontology)、KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome)数据库对 Unigene 进行比对功能注释分析。

1.3.3 基因差异表达分析 利用转录组表达定量软件 RSEM，以 Unigene 转录本序列为参考，分别将每个样品的 Clean Reads 比对到参考序列上。然后统计每个样品比对到每一个基因上的 Reads 数目，并计算每个基因的 FPKM 值(即表达量)。基于 FPKM 值，计算 Pearson 相关系数，检验各处理重复样品间表达水平的相似性。采用 DESeq 对各处理间基因表水平达进行差异分析，筛选差异表达基因(Differentially expressed gene, DEG)的条件为：表达差异倍数|$\log_2$

Fold Change| > 1, 显著性 $P < 0.05$。

1.3.4 *加权基因共表达网络分析*　加权基因共表达网络分析(Weighted gene co-expression network analysis, WGCNA)能够快速地筛选出与样本特征相关的基因共表达模块。将各处理幼苗根系相关差异显著的生理指标作为样本特征值进行 WGCNA, 筛选出盐胁迫下生理指标变异显著相关的基因共表达模块。随后, 对模块基因和差异表达基因进行 Venn 分析, 筛选出共有基因, 作为潜在的耐盐相关基因。

1.3.5 *GO 富集分析*　基于潜在的耐盐相关基因的 GO term, 对每个 term 的基因列表和基因数目进行计算, 然后通过超几何分布方法计算 P 值, 筛选出耐盐相关基因显著富集的 GO term (与整个基因组背景相比, $P < 0.05$)。根据 GO 富集结果(分子功能 MF), 通过 Rich factor、FDR 值和富集到此 GO Term 上的基因个数来衡量富集的程度。Rich factor 越大, 表示富集的程度越大。FDR 一般取值范围为 0~1, 越接近于零, 表示富集越显著。

2　结果与分析

2.1　不同浓度 NaCl 胁迫对油莎豆茎豆萌发的影响

在不同浓度 NaCl 胁迫下, 随着 NaCl 浓度的升高, 油莎豆茎豆的发芽速度及发芽率呈逐渐下降趋势(图 1-A, B)。在 0.3% NaCl 浓度下, 豫油莎 2 号(Yuyousha 2, YYS2)和豫油莎 3 号(Yuyousha 3, YYS3)茎豆的发芽率分别为 94.33%和 88.33%, 略低于 CK (96.33%和 92.67%); 在 0.6% NaCl 浓度下, YYS2 和 YYS3 茎豆的发芽率分别为 75.30%和 69.67%, 均较 CK 呈现明显地下降, 但均超过了 50%; 在 0.9% NaCl 浓度下, 发芽率急剧下降, YYS2 为 44.67%、YYS3 为 31.67%, 均低于 50%; 在 1.2% NaCl 浓度下, 茎豆发芽受到严重抑制, 发芽率进一步降低, YYS2 和 YYS3 茎豆的发芽率分别仅为 31.67%和 15.33%。同时, 对不同浓度 NaCl 胁迫下的茎豆耐盐指数进行分析, 从 0.3%到 1.2%的 NaCl 浓度下, 油莎豆茎豆的耐盐指数逐渐下降, YYS2 茎豆的耐盐指数依次为 97.92%、78.20、46.37%和 32.87%, YYS3 茎豆的耐盐指数依次为 95.32%、75.18%、34.17%和 15.92% (图 1-B), 可以看出在 0.3%和 0.6% NaCl 浓度下油莎豆茎豆的耐盐指数相对较高。表明, 油莎豆具有一定的耐盐能力, 在 0.3%和 0.6% NaCl 浓度下受到的盐胁迫伤害不明显, 茎豆发芽率下降程度相对较小; 在 0.9%和 1.2% NaCl 浓度下受到的盐胁迫伤害明显, 已经严重影响发芽率。

2.2　不同浓度 NaCl 胁迫对油莎豆幼苗生长的影响

由图 2 可知, NaCl 胁迫对油莎豆幼苗的生长具有抑制作用, 随着 NaCl 浓度增大, 油莎豆幼苗的根长和苗高受到的影响越明显。在 0.3%、0.6%、0.9%、1.2% NaCl 浓度下, 苗高和根长显著小于对照($P < 0.05$); 并且, 随着 NaCl 浓度增大, 幼苗的苗高和根长受抑制程度逐渐增加(表 1)。相对而言, 在 0.3%和 0.6% NaCl 浓度下幼苗的苗高和根长均显著大于在 0.9%和 1.2% NaCl 浓度下幼苗的苗高和根长(0.6% NaCl 浓度下 YYS3 的根长除外), 而且在 0.3%和 0.6% NaCl 浓度下幼苗叶片没有出现明显的枯黄现象(图 2-A, B), 表明油莎豆在 0.6% NaCl 浓度以下幼苗生长受到的影响相对较小, 而在 0.9% NaCl 浓度以上幼苗生长受到严重抑制。

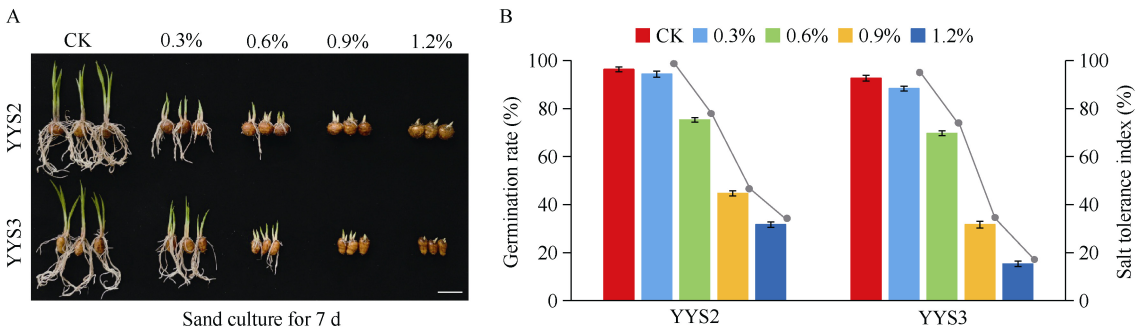


图 1　不同浓度 NaCl 胁迫对油莎豆茎豆萌发的影响

Fig. 1　Effects of different NaCl concentrations on germination of *Cyperus esculentus* tubers

A: 不同浓度 NaCl 胁迫下油莎豆茎豆的萌发形态。B: 不同浓度 NaCl 胁迫下油莎豆茎豆的发芽率及耐盐指数。标尺为 2 cm。YYS2: 豫油莎 2 号; YYS3: 豫油莎 3 号。

A: germination morphology of *Cyperus esculentus* tubers under NaCl stress with different concentrations. B: the germination rate and salt tolerance index of *Cyperus esculentus* tubers under NaCl stress with different concentrations. Bar: 2 cm. YYS2: Yuyousha 2; YYS3: Yuyousha 3.

表 1 NaCl 胁迫对两个油莎豆品种幼苗苗高和根长的影响

Table 1 Effects on seedling height and root length of two *Cyperus esculentus* varieties under NaCl stress

NaCl 胁迫处理 NaCl stress treatment	苗高 Seedling height (cm)		根长 Root length (cm)	
	豫油莎 2 号 Yuyousha 2	豫油莎 3 号 Yuyousha 3	豫油莎 2 号 Yuyousha 2	豫油莎 3 号 Yuyousha 3
0 (CK)	18.00 ± 1.16 a	15.75 ± 1.25 a	16.56 ± 1.37 a	19.28 ± 1.68 a
0.3%	15.26 ± 1.08 b	13.53 ± 1.17 b	14.16 ± 1.12 b	17.54 ± 1.34 b
0.6%	14.65 ± 0.96 b	13.56 ± 0.85 b	13.53 ± 1.03 c	14.56 ± 1.23 c
0.9%	12.92 ± 1.12 c	11.50 ± 1.23 c	12.85 ± 0.93 d	13.26 ± 1.08 c
1.2%	10.93 ± 0.84 d	9.75 ± 0.99 d	8.92 ± 0.78 e	9.58 ± 0.93 d

同列数据不同字母代表某个品种某一性状在不同 NaCl 胁迫间差异显著($P < 0.05$)。

Different letters in the same column represent significant difference at $P < 0.05$.

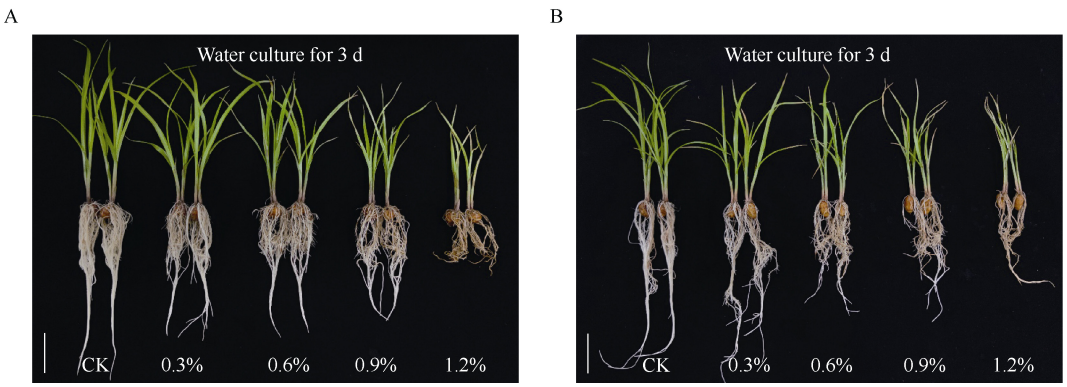


图 2 不同浓度 NaCl 胁迫对油莎豆幼苗生长的影响

Fig. 2 Effects of different NaCl concentrations on seedling growth of *Cyperus esculentus*

A: 不同浓度 NaCl 胁迫下 YYS2 幼苗生长特征。B: 不同浓度 NaCl 胁迫下 YYS3 幼苗生长特征。标尺为 5 cm。YYS2: 豫油莎 2 号; YYS3: 豫油莎 3 号。

A: the characteristics of seedling growth of YYS2 under NaCl stress with different concentrations. B: the characteristics of seedling growth of YYS3 under NaCl stress with different concentrations. Bar: 5 cm. YYS2: Yuyousha 2; YYS3: Yuyousha 3.

2.3 NaCl 胁迫下油莎豆幼苗根系生理指标变化分析

盐胁迫下, 植物幼苗根系会直接、快速地产生一些列的生理变化, 包括胁迫毒害反应(如 MDA、H_2O_2)以及渗透调节(如 SS、GB、Pro)、抗氧化酶防御(如 SOD、POD、CAT)等。对不同浓度 NaCl 胁迫下油莎豆幼苗根系的 MDA、H_2O_2、SS、GB、Pro、SOD、POD、CAT 进行测定。随着 NaCl 浓度升高, 膜受损程度指标物 MDA 和氧化胁迫物 H_2O_2 含量逐渐增加; 与 CK 相比, 0.3%和 0.6%NaCl 浓度下 MDA 和 H_2O_2 含量增加幅度较小, 0.9%和 1.2% NaCl 浓度下 MDA 和 H_2O_2 含量急剧增加(图 3-A, B)。随着 NaCl 浓度升高, 渗透调节物 SS、GB 和 Pro 均表现出先增后减的趋势(图 3-C~E)。相比之下, 不同 NaCl 浓度下 SS 含量变化程度较小(图 3-C); GB 和 Pro 含量在 0.3%和 0.6% NaCl 浓度下大幅度增加, 而在 0.9%和 1.2% NaCl 浓度下又均呈现出现下降趋势(图 3-D, E)。同样, 随着 NaCl 浓度升高, 抗氧化酶 SOD、POD、CAT 的活性呈现出先增后减的趋势, 在 0.6% NaCl 浓度下 3 种酶的活性达到最高(图 3-F~H)。表明, 油莎豆幼苗根系在 0.3%和 0.6% NaCl 浓度胁迫下, 膜受损程度指标物 MDA 和氧化胁迫物 H_2O_2 含量增加较少, 而渗透调节物 GB 和 Pro 的含量迅速增加, 以及抗氧化酶 SOD、POD、CAT 的活性大幅度提高, 在一定程度上缓解盐胁迫毒害反应而具有较好的耐盐性。另外, YYS2 和 YYS3 之间除 MDA 外其他生理指标均存在显著性差异, YYS2 根系中 Pro 的含量和 POD 的活性在不同 NaCl 浓度胁迫下均高于 YYS3, 而 H_2O_2、SS 的含量和 CAT 的活性则相反, 表明 2 个油莎豆品种之间耐盐能力存在差异。

2.4 NaCl 胁迫下油莎豆幼苗根系转录组测序

油莎豆在 0.3%和 0.6% NaCl 浓度下表现出较好的耐盐性, 并且 YYS2 耐盐指数略高于 YYS3。为从转录水平分析油莎豆耐盐性的内在分子机制, 本研究对 0 (CK)、0.3%和 0.6% NaCl 浓度下 YYS2 的幼苗根系进行了高通量转录组测序。所得数据经质量评估及过滤后, 各样品的 Q20 和 Q30 均在 97%和 93%以上; Clean reads 的比对率均在 92.0 以上(表 3)。通

过对 Clean reads 从头组装和注释分析，共获得 30,191 个具有注释信息的 Unigene (表 3)，并以此计算每个基因的表达量。另外，对样品间基因表达量进行相关性分析，结果显示各处理重复样品之间相关系数较高(图 4)。表明，本研究中转录组测序数据质量较高、样品间重复性较好，适用于进一步分析。

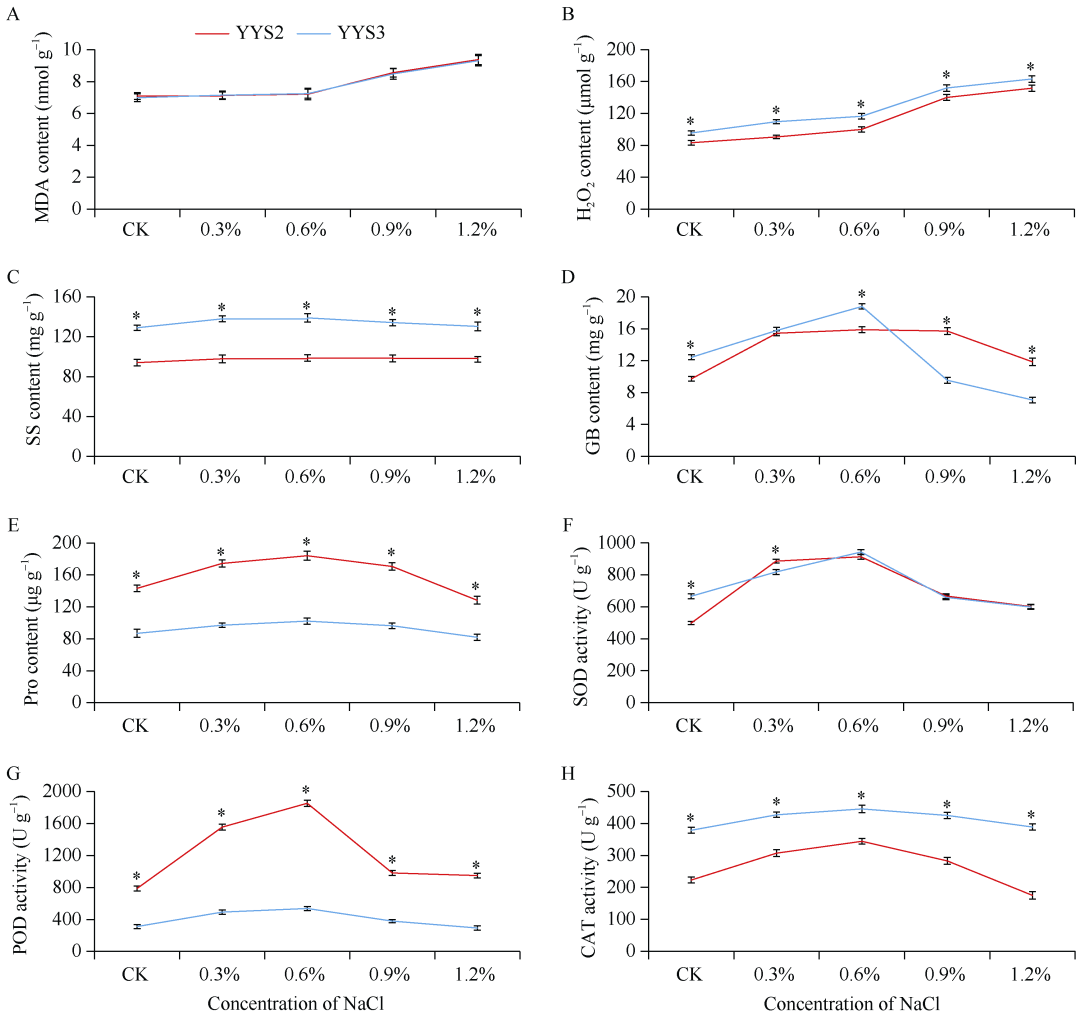


图 3　不同浓度 NaCl 胁迫下油莎豆幼苗根系生理指标变化

Fig. 3　Variation of physiological indexes of *Cyperus esculentus* roots under different NaCl concentrations

*表示指标在 YYS2 和 YYS3 之间存在显著差异($P < 0.05$)。YYS2: 豫油莎 2 号; YYS3: 豫油莎 3 号。

* represents significant difference at $P < 0.05$. YYS2: Yuyousha 2; YYS3: Yuyousha 3.

表 3　转录组测序数据统计分析

Table 3　Statistic analysis of transcriptome sequencing data

处理 Treatment	测序总读数 Total reads number	质控后读数 Clean reads number	比对率 Mapped ratio (%)	Q20 碱基百分比 Q20 (%)	Q30 碱基百分比 Q30 (%)	非冗余基因数 Unigene number
CK-1	46,067,738	42,556,954	92.37	97.55	93.77	30,191
CK-2	42,308,034	39,254,802	92.78	97.71	94.06	
CK-3	50,830,434	47,129,824	92.71	97.59	93.79	
0.3%-1	57,271,072	53,011,182	92.56	97.70	93.93	
0.3%-2	43,325,228	40,182,946	92.74	97.76	94.00	
0.3%-3	52,217,758	48,377,604	92.64	97.48	93.43	
0.6%-1	43,209,368	40,018,352	92.61	97.59	93.73	
0.6%-2	46,496,392	43,155,836	92.81	97.52	93.58	
0.6%-3	41,707,820	38,775,376	92.96	97.39	93.37	

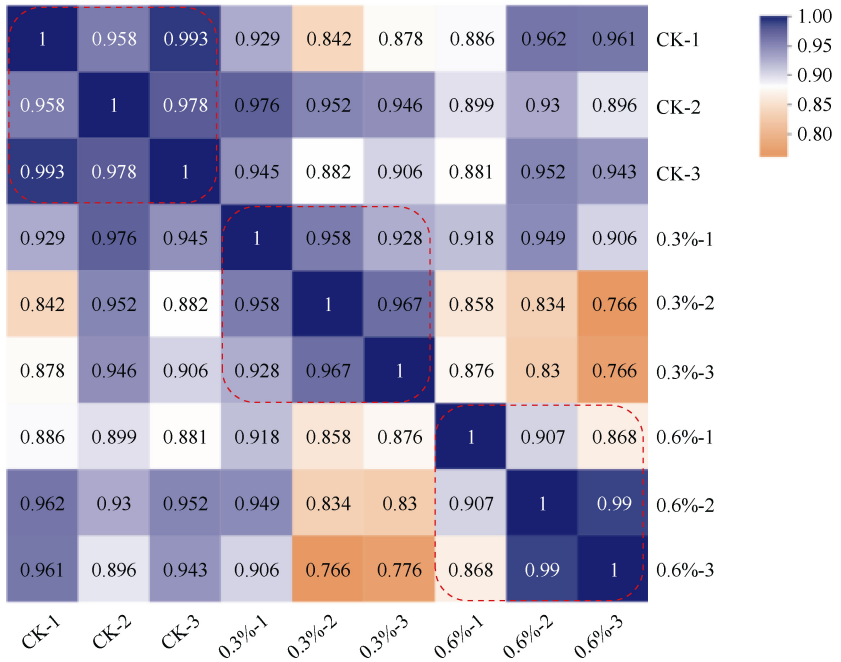


图 4 重复样品间基因表达量的相关性分析

Fig. 4 Correlation analysis of gene relative expression levels among duplicate samples

红框表示同一处理下的 3 个重复。Red box represents three replicates under the same treatment.

2.5 NaCl 胁迫下差异表达基因的鉴定

以 CK 为对照，在 0.3% NaCl 浓度处理下共产生了 2643 个差异表达基因，其中有 471 个基因上调表达，2172 个基因下调表达；在 0.6% NaCl 浓度处理下共产生了 3460 个差异表达基因，其中有 840 个基因上调表达，2620 个基因下调表达(图 5-A)。随着 NaCl 浓度增加，差异表达基因数目也明显上升，表明基因表达变异幅度变大。通过 Venn 分析，2 组之间(0.3% vs CK 和 0.6% vs CK)鉴定出 1926 个共有差异表达基因，其中 226 个基因上调表达，1700 个基因下调表达(图 5-B)，而这些共有的差异表达基因中包含油莎豆耐盐相关基因。

2.6 基于 WGCNA 的耐盐相关基因筛选

在 0.3%和 0.6% NaCl 浓度胁迫下，GB、Pro、SOD、POD、CAT 积极参与耐盐响应，在一定程度上能够反映其耐盐能力。基于 GB 和 Pro 的含量及 SOD、POD、CAT 的活性进行 WGCNA，结果鉴定出 21 个表达高度相关的基因集模块(图 6-A)，其中黄色模块(Yellow module)基因与甜菜碱 GB、脯氨酸 Pro、抗氧化酶 SOD、POD、CAT 均显著相关，是与油莎豆耐盐能力紧密关联的基因集。通过 Venn 分析(图 6-B)，从黄色模块基因集中筛选到 110 个在 0.3% 和 0.6% NaCl 浓度胁迫下共有的差异表达基因，而这些基因可能是油莎豆潜在的耐盐相关基因。

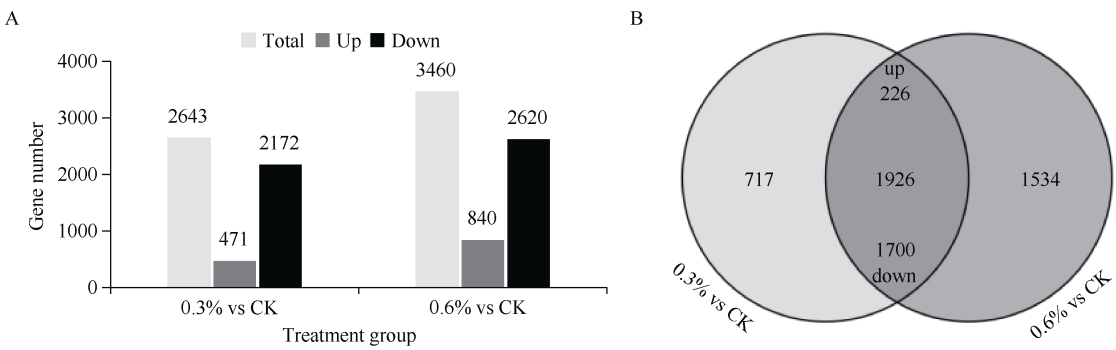


图 5 不同浓度 NaCl 胁迫下基因差异表达分析

Fig. 5 Differential relative expression level of genes under different concentrations of NaCl stress

A: 不同处理组(0.3% vs CK 和 0.6% vs CK)差异表达基因数目; B: 不同处理组间差异表达基因的维恩分析。

A: the number of DEGs in different treatment groups (0.3% vs CK and 0.6% vs CK); B: Venn analysis of DEGs between different treatment groups.

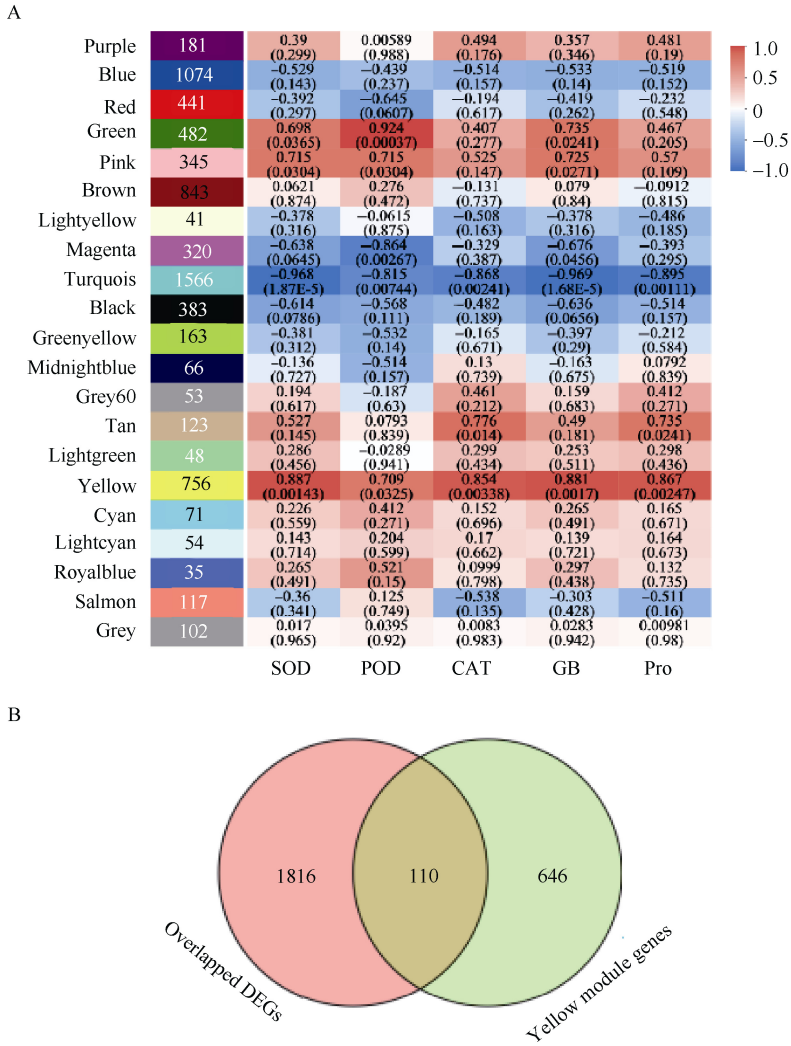


图 6　耐盐相关基因的筛选

Fig. 6　Screening of salt tolerance-related genes

A: 基于超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化物酶(CAT)、甜菜碱(GB)和脯氨酸(Pro)的 WGCNA。每行代表一个模块，每列代表一种性状；矩形框中上方数字代表模块与性状之间的相关系数，括号内数字为相应的 *P* 值。B: 不同处理间共有的差异表达基因和耐盐相关的黄色模块基因之间的维恩分析。

A: the WGCNA based on superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT), glycine betaine (GB), and proline (Pro). Each row represents a module and each column represents a trait; the correlation coefficient and the corresponding *P*-value are shown in each rectangular box. B: Venn analysis between the overlapped DEGs and the salt tolerance-related yellow module genes.

2.7　耐盐相关基因的 GO 富集分析

根据 MF 对以上筛选出的潜在耐盐相关基因进行 GO 富集分析，发现 24 个 GO terms 被显著富集(图 7-A)，主要与氧化还原(如 GO: 0016688、GO: 0033741 等)、跨膜转运(如 GO: 0015171、GO: 0046943 等)、几丁质水解(如 GO: 0008061、GO: 0004568)等相关(图 7-A, B)。这些被显著富集的 GO Terms 共包含了 15 个显著上调表达基因(图 7-B)，其中 10 个基因与氧化还原相关，如 *DN23985_c0_g1* 编码玉米黄质环氧酶、*DN2960_c0_g1* 编码 L-抗坏血酸过氧化物酶、*DN8384_c1_g1* 编码谷胱甘肽转移酶；3 个基因与跨膜转运相关，如 *DN21785_c1_g1* 编码赖氨酸-组氨酸转运蛋白、*DN6596_c0_g1* 编码氨基酸转运蛋白；另外，1 个基因 *DN14393_c0_g1* 编码几丁质酶，1 个基因 *DN4115_c0_g1* 编码翻译起始因子。这些基因的功能必定与盐胁迫下植物生理生化调节相对应，盐胁迫下积极响应以提高油莎豆的耐盐能力。

3　讨论

植物幼苗期是对外界环境最敏感的阶段，此时期的耐盐性尤为重要，是评估耐盐性强弱的关键[30-31]。

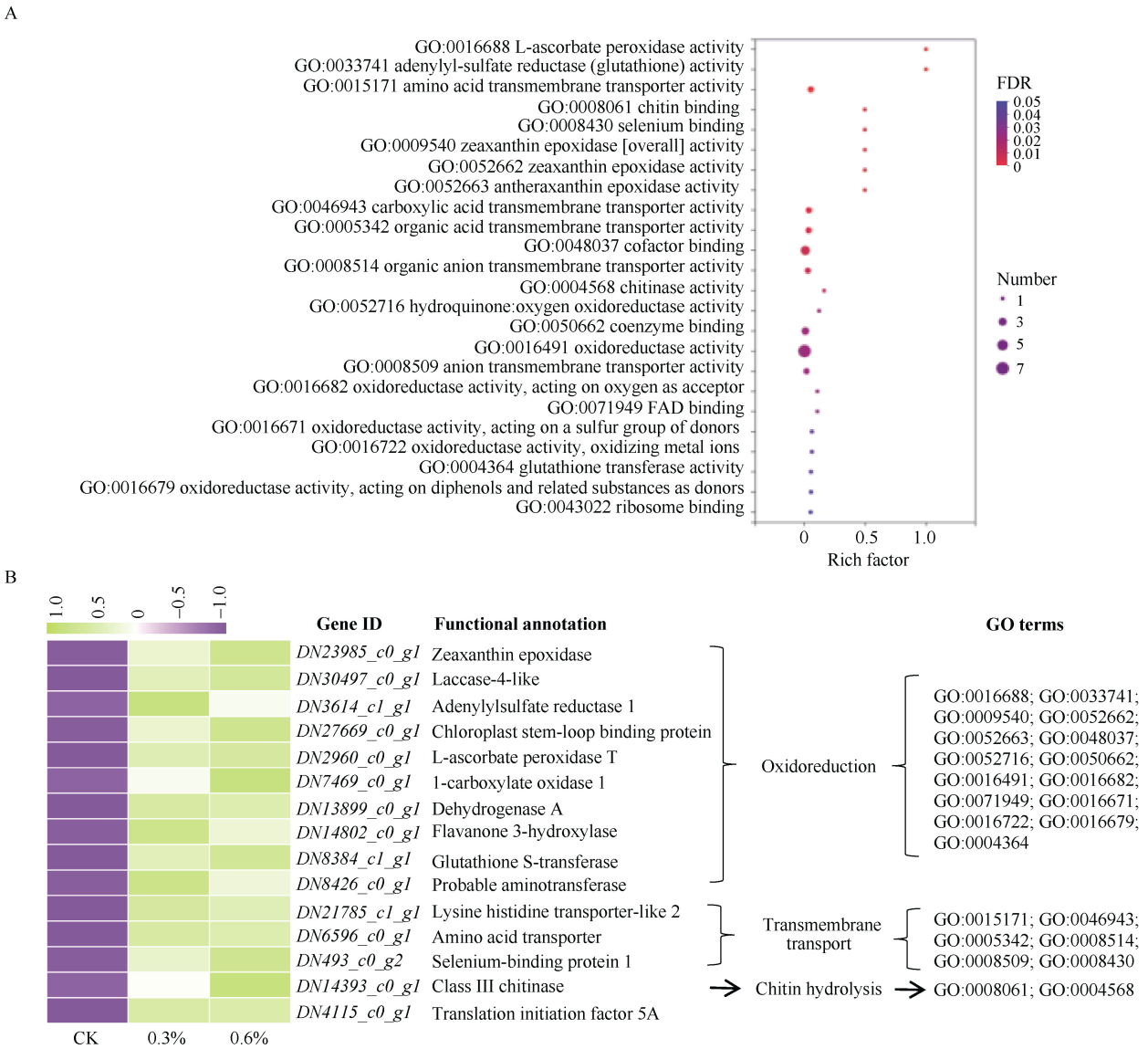


图 7 耐盐相关基因的 GO 富集分析

Fig. 7 GO enrichment analysis of salt tolerance-related genes

A: 基于 MF 的 GO 富集气泡图。B: 显著富集 GO terms 中所有基因的表达分析及功能注释。

A: the bubble diagram of GO enrichment based on MF (molecular function). B: the relative expression level and functional annotation of all genes in significantly enriched GO terms.

许多研究均以发芽率、发芽势、发芽指数、苗高、根长等幼苗期性状为重要指标，进行耐盐性评估[32-34]。本研究为了评估油莎豆的耐盐特性，分析了不同浓度 NaCl 胁迫对油莎豆茎豆萌发和幼苗生长的影响。结果发现，在 0.3%和 0.6% NaCl 胁迫下，油莎豆发芽率、苗高和根长变化程度相对较小，盐胁迫伤害不明显；而在 0.9%和 1.2% NaCl 胁迫下，其茎豆萌发和幼苗生长受到严重的抑制，盐胁迫伤害十分明显。

盐胁迫下，植物细胞内正常的代谢平衡被打破，产生了大量的 ROS，如超氧阴离子(O_2^-)、H_2O_2、羟自由基(HO^-)等，这些 ROS 直接或间接地启动膜脂过氧化进程，破坏细胞膜完整性；而 MDA 是膜脂过氧化的主要产物，其含量的高低在一定程度上可以反映膜脂过氧化的程度，进而间接的反映膜的受损伤程度[35]。因而，细胞内 ROS 和 MDA 含量的变化能够间接地反映盐胁迫下的盐毒害程度以及相应的耐盐性。有研究表明，耐盐性强的品种具有较强的 O_2^- 和 H_2O_2 清除能力，能够有效减少盐胁迫下 ROS 积累及细胞膜损伤[36]。本研究中，在 0.3%和 0.6% NaCl 胁迫下油莎豆幼苗根系的 MDA 和 H_2O_2 含量稍微增加，而 0.9%和 1.2% NaCl 胁迫下 MDA 和 H_2O_2

含量大幅度增加, 意味着油莎豆根系在 0.3%和 0.6% NaCl 胁迫下能够有效的清除 ROS 而减少细胞膜损伤, 进而使油莎豆受到的盐胁迫伤害不明显。实际上, 针对盐胁迫带来的危害, 植物(尤其是耐盐性植物)会通过体内一系列的生理生化调节来适应或减弱这些危害而能继续生长, 主要包括渗透调节、ROS 清除等[37-39]。同样, 本研究发现油莎豆的耐盐能力与渗透调节物 GB 和 Pro 的含量及 ROS 清除体系抗氧化酶 SOD、POD、CAT 的活性密切正相关, 在 0.3%和 0.6% NaCl 胁迫下迅速增加, 而在 0.9%和 1.2% NaCl 胁迫下又逐渐降低。综上所述, 油莎豆具有一定的耐盐能力, 有潜力成为一种应用价值巨大的耐盐性作物。另外, 许多研究表明植物耐盐性受基因型控制, 不同基因型品种的耐盐性可能存在显著差异[40-42]。本研究中, 2 种不同类型的油莎豆品种(圆粒型 YYS2 和长粒型 YYS3)在不同浓度 NaCl 胁迫下呈现出一定差异的萌发状态, 如 YYS2 茎豆萌发过程中的发芽率和耐盐指数始终高于 YYS3; 而且, NaCl 胁迫下 YYS2 和 YYS3 之间许多生理指标均存在显著性差异, 尤其是 YYS2 根系中 Pro 的含量和 POD 的活性显著高于 YYS3, 说明 YYS2 比 YYS3 具有更强的耐盐性。因而, 可以通过对大量油莎豆资源的耐盐性评估及鉴定, 筛选出耐盐性更强的种质资源, 为油莎豆在不同程度盐渍化土壤中种植提供材料保障。

植物的耐盐性一般由一系列耐盐相关基因调控, 盐胁迫下迅速响应, 抵抗盐毒害反应[43]。在 0.3%和 0.6% NaCl 胁迫下, 油莎豆表现出较小的盐毒害反应, 其体内一些耐盐相关基因必然迅速响应, 表达水平发生显著变化。本研究利用 RNA-seq 技术检测了 0、0.3%和 0.6%NaCl 胁迫下油莎豆根系的基因表达情况。基因差异表达分析显示, 盐胁迫下大量基因下调表达, 可能与胁迫毒害反应相关; 而少量基因呈现上调表达, 可能与耐盐响应相关。WGCNA 可以用来鉴定出高度协同变化且与表型密切关联的基因集, 被广泛应用于发育调控机制、生物和非生物胁迫响应机制等研究中关键调控因子的挖掘[44-45]。本研究通过 WGCNA 鉴定出 1 个与油莎豆耐盐能力紧密关联的基因集, 并以此从差异表达基因中筛选出 110 个潜在的油莎豆耐盐相关基因。GO 富集显示, 这些基因显著富集于氧化还原、跨膜转运、几丁质水解等相关过程, 与大量其他植物盐胁迫相关研究的结果相似[15-18]。

实际上, 大部分耐盐基因与其盐胁迫下生理生化调节对应, 主要包括离子转运相关基因、渗透调节相关基因、抗氧化相关基因等[46-48]。本研究中, 显著富集的 GO terms 涉及了 15 个显著上调表达基因, 响应盐胁迫。其中, *DN23985_c0_g1*、*DN2960_c0_g1*、*DN8384_c1_g1* 分别编码玉米黄质环氧酶、L-抗坏血酸过氧化物酶、谷胱甘肽转移酶, 具有抗氧化作用, 能够有效清除细胞内的 ROS, 参与抗氧化调节[49-51]。因而可以推断, 盐胁迫下油莎豆 L-抗坏血酸过氧化物酶的活性及谷胱甘肽的含量会大幅度增加, 与本研究已检测到活性增加的 POD、SOD、CAT 协同进行抗氧化调节。其次, *DN21785_c1_g1* 和 *DN6596_c0_g1* 二者均编码氨基酸转运蛋白, 可能与细胞内氨基酸积累相关, 而许多研究表明盐胁迫下植物体内一些氨基酸类小分子(如 Pro)的积累可以通过渗透调节进而增强耐盐性[52-53]; 与此一致的是, 本研究发现在 0.3%和 0.6% NaCl 胁迫下 Pro 的含量显著增加。另外, *DN14393_c0_g1* 编码几丁质酶, 而在植物中几丁质酶属于一种防御蛋白, 能够水解几丁质, 一旦受到某些胁迫, 酶活性提高, 从而促进了植物对胁迫的响应[54], 在植物的耐盐过程中发挥了重要作用[55-56]。因而, 盐胁迫下这些基因显著上调表达, 参与油莎豆相应的抗氧化调节和渗透调节等, 增强其耐盐能力。

4　结论

本研究检测了不同浓度 NaCl 胁迫下油莎豆茎豆萌发和幼苗生长过程中形态和生理指标的变化, 明确油莎豆具有一定的耐盐能力, 在 0.6%及以下浓度 NaCl 胁迫时受到的伤害不明显。基于 RNA-seq, 通过基因差异表达分析、WGCNA 以及 GO 富集分析, 鉴定到 15 个可能的油莎豆盐胁迫相关基因, 主要与抗氧化、氨基酸跨膜转运和几丁质水解相关, 盐胁迫下显著上调表达从而使油莎豆受到的盐胁迫伤害较小。本研究为油莎豆在盐渍化土壤的种植提供了重要参考, 并为进一步的耐盐分子机制解析和耐盐品种培育奠定了基础。

致谢: 感谢中国农业科学院作物科学研究所李洪杰研究员在本研究试验设计和文章撰写中给予大力帮助。

References

[1] Zhu J K. Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci*, 2001, 6: 66–71.
[2] Shrivastava P, Kumar R. Soil salinity: a serious environmental

issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi J Biol Sci*, 2015, 22: 123–131.

[3] 姚荣江, 杨劲松, 刘广明. 东北地区盐碱土特征及其农业生物治理. 土壤, 2006, 38: 256–262.
Yao S J, Yang J S, Liu G M. Characteristics and agro-biological management of saline-alkalized land in Northeast China. *Soils*, 2006, 38: 256–262 (in Chinese with English abstract).

[4] 俞仁培, 陈德明. 我国盐渍土资源及其开发利用. 土壤通报, 1999, 30: 158–159.
Yu R P, Chen D M. The development and utilization of saline soil resources. *Chin J Soil Sci*, 1999, 30: 158–159 (in Chinese with English abstract).

[5] 张英虎, 沈会权, 周春霖, 栾海业, 臧慧, 乔海龙, 陈健, 陶红, 陈和. 大麦种质资源株高和耐盐性分析. 江苏农业科学, 2018, 46(19): 56–58.
Zhang Y H, Shen H Q, Zhou C S, Luan H Y, Zang H, Qiao H L, Chen J, Tao H, Chen H. Analysis on plant height and salt tolerance of barley germplasm resources. *Jiangsu Agric Sci*, 2018, 46(19): 56–58 (in Chinese with English abstract).

[6] 杨帆, 朱文学. 油莎豆研究现状及展望. 粮食与油脂, 2020, 33(7): 4–6.
Yang F, Zhu W X. Research status and prospect of *Cyperus esculentus*. *Grains Oils*, 2020, 33(7): 4–6 (in Chinese with English abstract)..

[7] 王瑞元, 王晓松, 相海. 一种多用途的新兴油料作物——油莎豆. 中国油脂, 2019, 44(1): 1–4.
Wang R Y, Wang X S, Xiang H. A new multiuse oil crops—*Cyperus esculentus*. *China Oils Fats,* 2019, 44(1): 1–4 (in Chinese).

[8] 刘玉兰, 王小宁, 舒垚, 马宇翔. 不同产地油莎豆性状及组成分析研究. 中国油脂, 2020, 45(8): 125–129.
Liu Y L, Wang X N, Shu Y, Ma Y X. Character and composition of *Cyperus esculentus* from different origins. *China Oils Fats*, 2020, 45(8): 125–129 (in Chinese with English abstract).

[9] Ghoulam C, Foursy A, Fares K. Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar cultivars. *Environ Exp Bot*, 2002, 47: 39–50.

[10] 张相锋, 杨晓绒, 焦子伟. 植物耐盐性评价研究进展及评价策略. 生物学杂志, 2018, 35(6): 91–94.
Zhang X F, Yang X R, Jiao Z W. Research progress of salt tolerance evaluation in plants and tolerance evaluation strategy. *J Biol*, 2018, 35(6): 91–94 (in Chinese with English abstract).

[11] 徐涵, 郭容芳, 张玉苗, 李蓉, 肖学宸, 曹子谊, 王姗姗, 张可轩, 陈晓慧, 陈晓东, 陈裕坤, 叶炜, 叶开温, 林玉玲, 赖钟雄. 植物耐盐性: 演化和盐基因组学. 热带作物学报, 2020, 41: 1979–1989.
Xu H, Guo R F, Zhang Y M, Li R, Xiao X C, Cao Z Y, Wang S S, Zhang K X, Chen X H, Chen X D, Chen Y K, Ye W, Ye K W, Lin Y L, Lai Z X. Plant halotolerance: evolution and halogenomics. *Chin J Trop Crops*, 2020, 41: 1979–1989 (in Chinese with English abstract).

[12] 张晓婷, 王雪松, 贾文飞, 徐振彪, 王颖, 吴林. 植物在盐处理下的研究进展. 北方园艺, 2021, (6): 137–143.
Zhang X T, Wang X S, Jia W F, Xu Z B, Wang Y, Wu L. Research progress of plants under salt treatment. *Northern Hortic*, 2021, (6): 137–143 (in Chinese with English abstract).

[13] Gupta B, Huang B. Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. *Int J Genomics*, 2014, 2014: 701596–701614.

[14] Zhao C, Zhang H, Song C, Zhu J K, Shabala S. Mechanisms of plant responses and adaptation to soil salinity. *Innovation*, 2020, 1: 100017.

[15] Yousefirad S, Soltanloo H, Ramezanpour S S, Nezhad K Z, Shariati V. The RNA-seq transcriptomic analysis reveals genes mediating salt tolerance through rapid triggering of ion transporters in a mutant barley. *PLoS One*, 2020, 15: e0229513.

[16] Luo Y, Reid R, Freese D, Li C B, Watkins J, Shi H Z, Zhang H Y, Loraine A, Song B H. Salt tolerance response revealed by RNA-seq in a diploid halophytic wild relative of sweet potato. *Sci Rep*, 2017, 7: 9624.

[17] Yong H Y, Zou Z W, Kok E P, Kwan B H, Chow K, Nasu S, Nanzyo M, Kitashiba H, Nishio T. Comparative transcriptome analysis of leaves and roots in response to sudden increase in salinity in *Brassica napus* by RNA-seq. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 467395.

[18] Shen X Y, Wang Z, Song X, Xu J, Jiang C, Zhao Y, Ma C, Zhang H. Transcriptomic profiling revealed an important role of cell wall remodeling and ethylene signaling pathway during salt acclimation in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 2014, 86: 303–317.

[19] Barbieri G, Stefanello R, Menegaes J, Munareto J, Nunes U. Seed germination and initial growth of quinoa seedlings under water and salt stress. *J Agric Sci*, 2019, 11(15): 153.

[20] 申吴燕, 吐尔逊娜依·热依木, 雪热提江·麦提努日, 邓婷婷, 黄长福, 王梦, 马伊王利, 麻浩. 12 种植物萌发期耐盐性筛选. 新疆农业科学, 2020, 57: 1912–1920.
Shen W Y, Tuerxunnayi R, Xueretijiang M, Deng T T, Huang C F, Wang M, Ma Y L, Ma H. Selection of salt tolerance of 12 forage species in Xinjiang during germination period. *Xinjiang Agric Sci*, 2020, 57: 1912–1920 (in Chinese with English abstract).

[21] 郝雪峰, 高惠仙, 燕平梅, 李晓春, 李珊珊. 盐胁迫对大豆种子萌发及生理的影响. 湖北农业科学, 2013, 52: 1263–1266.
Hao X F, Gao H X, Yan P M, Li X C, Li S S. Effects of salt stress on seed germination and physiology of soybean. *Hubei Agric Sci*, 2013, 52: 1263–1266 (in Chinese with English abstract).

[22] 张相锋, 杨晓绒, 焦子伟. 植物耐盐性评价研究进展及评价策略. 生物学杂志, 2018, 5(6): 91–94.
Zhang X F, Yang X R, Jiao Z W. Advances and strategies of salt tolerance evaluation in plants. *J Biol*, 2018, 5(6): 91–94 (in Chinese with English abstract).

[23] 付恩光, 刘宏伟, 马震, 郭旭. 山东寿光北部地区土壤盐渍化特征与现状评价. 地质调查与研究, 2016, 39: 300–304.
Fu E G, Liu H W, Ma Z, Guo X. Characteristics and status assessment of soil salinization in the northern Shouguang area, Shandong province. *Geol Surv Res*, 2016, 39: 300–304 (in Chinese with English abstract).

[24] 张俊华, 贾萍萍, 孙媛, 贾科利. 基于高光谱特征的盐渍化土壤不同土层盐分离子含量预测. 农业工程学报, 2019, 35(12): 106–115.
Zhang J H, Jia P P, Sun Y, Jia K L. Prediction of salinity ion content in different soil layers based on hyperspectral data. *Trans CSAE*, 2019, 35(12):106–115 (in Chinese with English abstract).

[25] 高宗军, 任晓辉, 安永会, 吴玺, 赫明浩, 刘久潭. 黑河中游明花乡北部盐渍化地区土壤盐分特征分析. 北方园艺, 2020, (21): 71–79.
Gao Z J, Ren X H, An Y H, Wu X, He M H, Liu J T. Analysis of soil salinity characteristics in salinized areas of northern Minghua township in the middle reaches of Heihe River. *Northern Hortic*, 2020, (21): 71–79 (in Chinese with English abstract).

[26] 唐晓倩, 刘广全. NaCl 胁迫对圆柏幼苗生长和离子吸收及分配的影响. 西北植物学报, 2017, 37: 1372–1380.
Tang X Q, Liu G Q. Effects of NaCl stress on the growth, ion absorption and distribution of *Juniperus chinensis* seedlings. *Acta Bot Boreali-Occident Sin*, 2017, 37: 1372–1380 (in Chinese with English abstract).

[27] 王亦菲, 杜志钊, 马运涛, 许建华, 余飞宇, 陆瑞菊, 刘成洪, 陈志伟. NaCl 预处理对糯玉米发芽期耐盐性的影响. 上海农业学报, 2020, 36(3): 20–24.
Wang Y F, Du Z Z, Ma Y T, Xu J H, Yu F Y, Lu R J, Liu C H, Chen Z W. Effects of seed pretreatments with different NaCl concentrations on salt tolerance in two waxy maize varieties under different salt stresses at germination stage. *Acta Agric Shanghai*, 2020, 36(3): 20–24 (in Chinese with English abstract).

[28] 杨春葆, 原红军. NaCl 胁迫西藏青稞芽期幼苗根系生长特性及其耐盐性分析. 广东农业科学, 2021, 48(2): 26–32.
Yang C B, Yuan H J. Analysis of root growth characteristics and salt resistance of Tibetan highland barley at bud stage under NaCl stress. *Guangdong Agric Sci*, 2021, 48(2): 26–32 (in Chinese with English abstract).

[29] 陈敏, 李海云, 吕福堂. 植物耐盐性研究进展. 聊城大学学报(自然科学版), 2011, 24(3): 47–50.
Chen M, Li H Y, Lyu F T. Research advances in mechanisms of plant salinity tolerance. *J Liaocheng Univ* (Nat Sci Edn), 2011, 24(3): 47–50 (in Chinese with English abstract).

[30] 邵桂花. 大豆种质资源耐盐性田间鉴定方法. 作物杂志, 1986, (3): 36–37.
Shao G H. Field identification method for salt tolerance of soybean germplasm resources. *Crops*, 1986, (3): 36–37 (in Chinese with English abstract).

[31] 姚佳, 刘信宝, 郭米山, 王晓彤, 曹冲, 李志华. 不同浓度 NaCl 胁迫对扁蓿豆苗期生长及生理指标的影响. 草地学报, 2014, 22: 564–571.
Yao J, Liu X B, Guo M S, Wang X T, Cao C, Li Z H. Effects of different NaCl concentrations on the growth and physiological indexes of *Melilotoides ruthenica* seedlings. *Acta Agrest Sin*, 2014, 22: 564–571 (in Chinese with English abstract).

[32] 周璐璐, 伏兵哲, 许冬梅, 陈丽萍, 吴小娟, 高雪芹. 盐胁迫对沙芦草萌发特性影响及耐盐性评价. 草业科学, 2015, 32: 1252–1259.
Zhou L L, Fu B Z, Xu D M, Chen L P, Wu X J, Gao X Q. Effects of salt stress on germination characteristics of *Agropyron mongolicum* and salt-tolerance evaluation. *Pratacult Sci*, 2015, 32: 1252–1259 (in Chinese with English abstract).

[33] 杨宏伟, 刘文瑜, 沈宝云, 李朝周. NaCl 胁迫对藜麦种子萌发和幼苗生理特性的影响. 草业学报, 2017, 26(8): 146–153.
Yang X W, Liu W Y, Shen B Y, Li C Z. Seed germination and physiological characteristics of *Chenopodium quinoa* under salt stress. *Acta Pratacult Sin*, 2017, 26(8): 146–153 (in Chinese with English abstract).

[34] 慈敦伟, 张智猛, 丁红, 宋文武, 符方平, 康涛, 戴良香. 花生苗期耐盐性评价及耐盐指标筛选. 生态学报, 2015, 35: 805–814.
Ci D W, Zhang Z M, Ding H, Song W W, Fu F P, Kang T, Dai L X. Evaluation and selection indices of salinity tolerance in peanut seedling. *Acta Ecol Sin*, 2015, 35: 805–814 (in Chinese with English abstract).

[35] 孟繁昊, 王聪, 徐寿军. 盐胁迫对植物的影响及植物耐盐机理研究进展. 内蒙古民族大学学报(自然科学版), 2014, 29: 315–318.
Meng F H, Wang C, Xu S J. Advances in research on effects of salt stress on plant and the mechanism of plant salt tolerance. *J Inner Mongolia Univ Nationalities* (Nat Sci Edn), 2014, 29: 315–318 (in Chinese with English abstract).

[36] 王聪, 朱月林, 杨立飞, 杨恒山. NaCl 胁迫对菜用大豆种子膨大过程中抗氧化系统及渗透调节物质的影响. 西北植物学报, 2012, 32: 297–305.
Wang C, Zhu Y L, Yang L F, Yang H S. Effects of NaCl stress on antioxidant system and osmotic regulation substances during seed filling period. *Acta Bot Boreali-Occident Sin*, 2012, 32: 297–305 (in Chinese with English abstract).

[37] 任丽丽, 任春明, 赵自国. 植物耐盐性研究进展. 山西农业科学, 2010, 38(5): 87–90.
Ren L L, Ren C M, Zhao Z G. Research advances in plant salt-tolerance. *J Shanxi Agric Sci*, 2010, 38(5): 87–90 (in Chinese with English abstract).

[38] 宋丹, 张华新, 耿来林, 刘涛, 白淑兰. 植物耐盐种质资源评价及耐盐生理研究进展. 世界林业研究, 2006, 19(3): 27–32.
Song D, Zhang H X, Geng L L, Liu T, Bai S L. Advances in assessment of salt tolerance and physiological mechanism in plants. *World For Res*, 2006, 19(3): 27–32 (in Chinese with English abstract).

[39] Qi W C, Zhang L, Xu H B, Wang L, Jiao Z. Physiological and molecular characterization of the enhanced salt tolerance induced by low-dose gamma irradiation in *Arabidopsis* seedlings. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 450: 1010–1015.

[40] 王军, 李筠, 王龙, 任立凯, 刘耀鸿, 迟铭, 浦汉春. 不同基因型小麦品种(系)耐盐性筛选. 江苏农业科学, 2009, (3): 77–79.
Wang J, Li Y, Wang L, Ren L K, Liu Y H, Chi M, Pu H C. Screening of salt tolerance of wheat varieties (lines) of different genotypes. *Jiangsu Agric Sci*, 2009, (3): 77–79 (in Chinese with English abstract).

[41] 辛承松, 罗振, 孔祥强, 王江伟. 不同基因型陆地棉亲本及其杂交后代的耐盐性差异. 棉花学报, 2011, 23: 235–240.
Xin C S, Luo Z, Kong X Q, Wang J W. Salt tolerant variation among parents of different genotype upland cotton and their hybrids. *Cotton Sci*, 2011, 23: 235–240 (in Chinese with English abstract).

[42] Shi Y L, Zhang R, Wu X P, Meng Z G, Guo S D. Cloning and characterization of a somatic embryogenesis receptor-like kinase gene in cotton (*Gossypium hirsutum*). *J Integr Agric*, 2012, 11: 898–909.

[43] Chinnusamy V, Jagendorf A, Zhu J K. Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Sci*, 2005, 41: 437–448.

[44] 李佩婷, 赵振丽, 黄潮华, 黄国强, 徐良年, 邓祖湖, 张玉, 赵

新旺. 基于转录组及 WGCNA 的甘蔗干旱响应调控网络分析. 作物学报, 2022, 48: 1583–1611.
Li P T, Zhao Z L, Huang C H, Huang G Q, Xu L N, Deng Z H, Zhang Y, Zhao X W. Analysis of drought responsive regulatory network in sugarcane based on transcriptome and WGCNA. *Acta Agron Sin*, 2022, 48: 1583–1600 (in Chinese with English abstract).

[45] 韩尚玲, 霍轶琼, 李辉, 韩华蕊, 侯思宇, 孙朝霞, 韩渊怀, 李红英. 基于 WGCNA 发掘谷子穗部类黄酮合成途径调控关键基因. 作物学报, 2022, 48: 1645–1657.
Han S, Huo Y Q, Li H, Han H R, Hou S Y, Sun Z X, Han Y H, Li H Y. Identification of regulatory genes related to flavonoids synthesis by weighted gene correlation network analysis in the panicle of foxtail millet. *Acta Agron Sin*, 2022, 48: 1645–1657 (in Chinese with English abstract).

[46] 金伊楠, 许自成, 张环纬, 王发展, 陈思昂, 熊亚南, 魏烁果. 烟草盐胁迫与耐盐相关基因的研究进展. 中国烟草学报, 2018, 24(6): 112–118.
Jin Y N, Xu Z C, Zhang H W, Wang F Z, Chen S A, Xiong Y N, Wei S G. Research progress on salt stress of and salt-resistance-related genes in tobacco. *Acta Tabac Sin*, 2018, 24(6): 112–118 (in Chinese with English abstract).

[47] 郑崇珂, 窦玉慧, 解丽霞, 谢先芝. 水稻耐盐相关基因的研究进展. 分子植物育种, 2017, 15: 4411–4422.
Zheng C K, Dou Y H, Xie L X, Xie X Z. Research progress on the genes related to salt tolerance in rice. *Mol Plant Breed*, 2017, 15: 4411–4422 (in Chinese with English abstract).

[48] 赖伟, 何鹏, 徐明远, 陈梁海, 刘世强, 杨寅桂. 黄瓜耐盐性与耐盐相关基因的研究进展. 中国蔬菜, 2020, (6): 16–22.
Lai W, He P, Xu M Y, Chen L H, Liu S Q, Yang Y G. Research progress on cucumber salt tolerance and salt tolerance related genes. *China Vegetables*, 2020, (6): 16–22 (in Chinese with English abstract).

[49] 张秋玉. 盐胁迫下番茄玉米黄质环氧化酶基因与光保护关系的研究. 山东农业大学硕士学位论文, 山东泰安, 2012.
Zhang Q Y. Analysis of the Relationship between *LeZE* and Photoprotection under Salt Stress. MS Thesis of Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong, China, 2012 (in Chinese with English abstract).

[50] 孙卫红, 李风, 束德峰, 董新纯, 杨秀梅, 孟庆伟. 转番茄正义抗坏血酸过氧化物酶基因提高烟草耐盐能力. 中国农业科学, 2009, 42: 1165–1171.
Sun W H, Li F, Shu D F, Dong X C, Yang X M, Meng Q W. Tobacco plants transformed with tomato sense *LetAPX* enhanced salt tolerance. *Sci Agric Sin*, 2009, 42: 1165–1171 (in Chinese with English abstract).

[51] 戚元成, 张慧, 赵彦修. 植物谷胱甘肽转移酶和盐胁迫. 山东师范大学学报(自然科学版), 2002, (2): 71–75.
Qi Y C, Zhang H, Zhao Y X. Plant glutathione S-transferases and salt stress. *J Shandong Norm Univ* (Nat Sci Edn), 2002, (2): 71–75 (in Chinese with English abstract).

[52] 杨晓慧, 蒋卫杰, 魏珉, 余宏军. 植物对盐胁迫的反应及其抗盐机理研究进展. 山东农业大学学报(自然科学版), 2006, (2): 302–305.
Yang X H, Jiang W J, Wei M, Yu H J. Review on plant response and resistance mechanism to salt stress. *J Shandong Agric Univ* (Nat Sci Edn), 2006, (2): 302–305 (in Chinese with English abstract).

[53] Deinlein U, Stephan A B, Horie T, Luo W, Xu G, Schroeder J I. Plant salt-tolerance mechanisms. *Trends Plant Sci*, 2014, 19: 371–379.

[54] 王志英, 张福丽, 王占斌. 小黑杨转几丁质酶基因及酶活性. 林业科学, 2010, 46(2): 147–151.
Wang Z Y, Zhang F L, Wang Z B. Transformation of chitinase gene into *Populus simonii* × *P. nigra* and chitinase activity of transgenic plants. *Sci Silvae Sin*, 2010, 46(2): 147–151 (in Chinese with English abstract).

[55] 周桦楠, 孙思凡, 杨颖慧, 聂楠, 何绍贞, 刘庆昌, 翟红. 甘薯几丁质酶基因 *IbChi* 的克隆及其耐盐性分析. 分子植物育种, 2022, 20: 2812–2820.
Zhou H N, Sun S F, Yang Y H, Nie N, He S Z, Liu Q C, Zhai H. Cloning and salt tolerance analysis of chitinase gene *IbChi* from sweet-potato. *Mol Plant Breed*, 2022, 20: 2812–2820 (in Chinese with English abstract).

[56] 周洁, 黄婧. 柳树几丁质酶基因 *SlChi* 的克隆和功能验证. 分子植物育种, 2018, 16: 8013–8021.
Zhou J, Huang J. Cloning and functional identification of chitinase gene *SlChi* in *Salix*. *Mol Plant Breed*, 2018, 16: 8013–8021 (in Chinese with English abstract).