

Effect of *IrrE* Expression on the Physiology and Antioxidant Enzymes in *Brassica napus* L. under Natural Drought Stress

Qilin Dai¹, Juan Yang¹, Jinling Wang², Xuemei Zhong¹, Mingli Ma¹, Xucai Lv¹, Jin Wang³, Shizhang Du^{2*}

¹School of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang Sichuan

²Mianyang Normal College, Mianyang Sichuan

³Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing

Email: [*daiqilinmj@sina.com](mailto:daiqilinmj@sina.com)

Received: Oct. 6th, 2015; accepted: Oct. 24th, 2015; published: Oct. 29th, 2015

Copyright © 2015 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

The tolerant responses to drought stress in *IrrE*-transgenic *Brassica napus* L. and non-transgenic *Brassica napus* L. were studied. The results showed that water content in *IrrE*-transgenic and non-transgenic leaves of rapeseed gradually decreased with the drop of soil water content in pots during 0 - 35 d and their contents reached the minimum value after 35 d under natural drought conditions and then increased gradually after the restoration of water supply. The content of chlorophyll, soluble protein and malondialdehyde (MDA), and the SOD and POD activity in leaves of *Brassica napus* L. were increased gradually during 0 - 35 d and their contents reached the maximal value after 35 d under natural drought conditions and then decreased gradually after the restoration of water supply. But the water content, chlorophyll content, soluble protein content and the activity of peroxidase (POD) and superoxide dismutase (SOD) in leaves of transgenic *Brassica napus* L. were higher than those in non-transgenic *Brassica napus* L., while the content of malonaldehyde (MDA) in transgenic *Brassica napus* L. was lower than non-transgenic *Brassica napus* L. during 0 - 35 d under drought stress and the restoration of water supply. Therefore, the results from above indicated that *IrrE* as the transcription regulation factor, which was derived from the radiation resistant bacteria, was involved in the tolerance response of rape seedling to drought stress, and then enhanced the ability of drought tolerance.

Keywords

Drought Stress, *IrrE*-Transgenic *Brassica napus* L., Chlorophyll, Soluble Protein, MDA, Antioxidant Enzymes

*通讯作者。

自然干旱胁迫下*IrrE*基因对甘蓝型油菜生理生化变化的影响

代其林¹, 杨娟¹, 王金玲², 钟雪梅¹, 马明莉¹, 吕旭才¹, 王劲³, 杜世章^{2*}

¹西南科技大学生命科学与工程学院, 四川 绵阳

²绵阳师范学院, 四川 绵阳

³中国农业科学院生物技术研究所, 北京

Email: daiqilinmi@sina.com

收稿日期: 2015年10月6日; 录用日期: 2015年10月24日; 发布日期: 2015年10月29日

摘要

以转*IrrE*基因与非转基因甘蓝型油菜为材料, 在自然干旱条件下, 比较研究了转基因与非转基因油菜植株的干旱耐受性情况。结果表明, 在0-35 d的自然干旱情况下, 随着盆土中土壤含水量的逐渐降低, 转基因与非转基因油菜植株的叶片含水量(RWC)也逐渐下降, 35 d后他们的含水量降到最低, 恢复供水后, 其含量均逐渐上升。而油菜叶片的叶绿素含量、可溶性蛋白含量、丙二醛(MDA)含量、SOD和POD酶活性却逐渐上升, 恢复供水后, 他们的含量和酶活性均逐渐下降, 但在干旱胁迫和复水过程中, 转基因油菜叶片的含水量、叶绿素含量、可溶性蛋白含量、SOD和POD酶活性均高于非转基因油菜, 而丙二醛(MDA)含量始终低于非转基因的含量。说明来源于耐辐射奇球菌的转录调节因子*IrrE*, 参与了油菜幼苗对干旱胁迫的耐受性应答过程, 从而增强了植株的耐旱能力。

关键词

干旱胁迫, 转*IrrE*基因甘蓝型油菜, 叶绿素, 可溶性蛋白, 丙二醛, 抗氧化酶

1. 引言

干旱是影响植物生长和作物产量的重要逆境因子[1] [2]。据估计, 全球有 45% 以上的农业用地受到干旱的影响[3], 农作物的产量和收成急剧减少。干旱影响了植物代谢和生长发育, 引起植物体内发生一系列的生理生化反应, 严重时抑制植物生产和降低产量。干旱胁迫对作物的影响是多方面的, 可以表现在形态、生理、生化、产量等各个方面。很多研究者就作物的抗旱性问题进行了比较深入的探索, 得到了较好的研究成果, 对玉米[4]、水稻[5]、大豆[6]、小麦[7] [8]、花生[9]、甘薯[10]等作物进行了比较全面的抗旱性研究。在抗旱性研究中所建立的干旱条件多是人工控制的干旱或采用 PEG 渗透调节的方式, 在温室、培养箱或其他模拟环境中进行[11]-[13]。但在油菜抗旱性研究中, 多是采用 PEG 模拟干旱的方式进行的, 而在人工控制的干旱条件下进行的研究相对较少。

甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)属十字花科芸薹属植物, 是世界上最重要的油料作物之一, 也是中国第一大油料作物。但是, 我国油菜生产常因春旱和秋冬旱出现出苗不齐、出叶较慢、植株矮小等情况, 导致油菜产量及品质下降[14] [15], 从而限制了油菜的生产和产业发展。*IrrE* 基因是来源于耐辐射奇球菌(*Deinococcus radiodurans*)的全局性调控因子, 参与了基因表达调控过程, 与胁迫响应、能量代谢、转录调控、信号传递等密切相关[16]。我们前期的研究表明, *IrrE* 基因在大肠杆菌中异源表达能够提高菌株的

辐射抗性以及氧自由基清除能力,提高了大肠杆菌的抗盐胁迫、抗氧化胁迫以及抗高温胁迫的能力;将 *IrrE* 基因转入油菜中,结果显示转基因油菜植株能够在 350 mmol/L NaCl 处理下 6 周后正常开花结实,而对照非转基因油菜植株在相同处理 2 周后死亡[17]。本研究以转 *IrrE* 基因油菜 T₃ 代植株为试验材料,以非转基因油菜植株为对照,通过自然干旱的方式处理 0、14、21、28 和 35 d,然后复水,探讨在自然干旱胁迫下 *IrrE* 基因过表达对油菜植株相关生理生化的影响,为 *IrrE* 基因在油菜耐旱中的研究奠定基础。

2. 材料和方法

2.1. 材料

试验采用盆栽土培方式,地点为四川绵阳西南科技大学科技园。试用土壤取自西南科技大学农学试验基地,土壤类型为黄壤土。供试植物油菜种子为本实验室栽培保存的转 *IrrE* 甘蓝型油菜和非转基因甘蓝型油菜(波里马细胞质雄性不育恢复系 84100-18,由四川大学遗传实验室提供)。

2.2. 材料处理与培养

选取籽粒饱满、大小均匀、无病虫害的转 *IrrE* 基因油菜种子,用 75% 乙醇浸泡 30 s,2% 的 NaClO 溶液浸泡 8~10 min,无菌水冲洗 5~6 次。吸胀 12 h 后,置于 25℃ 光照培养箱中萌发 24 h,再用蒸馏水清洗萌发的种子 2~3 次。将萌发一致的种子插播在装有已灭菌石英砂的瓷盘中,浇上适量的 1/4 Hoagland 营养液,置于组织培养室培养(25 ± 1)℃,光照 12 h,每天补充营养液 2 次。待幼苗长到四叶期,提取叶片 DNA 进行常规 PCR 鉴定和实时定量 PCR 检测,用鉴定为阳性的植株进行后续实验。实验时,在各个花盆中装入等量的营养土(腐殖土:大田土 = 2:1),选择生长良好的,长势一致的 1 棵非转基因植株与 1 棵已鉴定为转基因的阳性植株移栽到同一个花盆中,共 30 次重复。常规管理一段时间,使其在自然条件下正常生长,待长到 6~8 叶时,统一浇足水分,以后不再浇水,并移至温室中。观察两组实验中幼苗的生长情况,并在干旱的不同时期用 RR-7730M 土壤湿度计进行土壤含水量的测定及采取叶片进行相关指标的测定[18]。

2.3. 叶片相对含水量的测定

叶片相对含水量(RWC)的测定采用鲜重法[19],称取植物叶样,精确称量鲜重 W_f ,将叶样浸没在水中 24 h 后,擦干叶片表面水分,精确称量饱和重 W_t ,最后将叶样在 105℃ 杀青 15 min,80℃ 烘至恒重,精确称量得到干重 W_d 。叶片相对含水量用以下公式计算:叶片相对含水量(%) = $(W_f - W_d)/(W_t - W_d) \times 100\%$ 。

2.4. 叶绿素含量测定

采用混合液(丙酮:无水乙醇 = 2:1)浸提法提取叶绿素[20],称取 0.1 g 植物叶片,剪成细丝后,放入加有 20 ml 混合液的三角瓶中,密封,4℃ 避光放置,直至叶片完全泛白。以混合液为对照,测定 OD663 和 OD645,用以下公式计算叶绿素含量:叶绿素总含量(mg/g) = $(20.2 \times A_{645} + 8.02 \times A_{663})V/1000 \times W$,其中 V 为提取液总体积;W 为叶片鲜重。

2.5. 叶片中可溶性蛋白质含量的测定

可溶性蛋白采用考马斯亮蓝 G250 法测定[21]。

2.6. 叶片丙二醛含量的测定

丙二醛(MDA)含量采用硫代巴比妥酸法测定[21]。

2.7. 粗酶液的提取

称取 2 g 植物叶片, 置于预冷的研钵中, 加入少量的石英砂和预冷的 4 mL 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 值 7.0, 含 1% PVP、0.1% 巯基乙醇)于冰浴上研磨成匀浆, 全部转入 5 mL 干净的离心管中, 于 4℃、13,000×g 离心 10 min, 将上清液分装至干净的 1.5 mL 离心管中, 保存于-20℃备用。

2.8. 抗氧化酶活性的检测

过氧化物酶(peroxidase, POD)活性采用愈创木酚法[9], 以每分钟 OD₄₇₀变化 0.01 为一个酶活性单位(U/(g·protein·min)); 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性检测采用氮蓝四唑(NBT)法[10], 以抑制 NBT 光还原 50% 作为一个酶活性单位(U/(g·protein·min)); 过氧化氢酶(Catalase, CAT)活性检测采用 H₂O₂ 法[11] [12], 以 25℃下 100 s 内在反应体系中分解 50% H₂O₂ 的酶量作为一个酶活性单位(U/(g·protein·min))。

3. 结果与分析

3.1. 转 *IrrE* 基因阳性植株的鉴定

用质粒抽提试剂盒提取大肠杆菌(*Escherichia coli*) *IrrE-DH5α* 中的质粒 DNA 作为 PCR 扩增的阳性对照, 以非转基因油菜的 DNA 为阴性对照。扩增反应中的引物为: 上游 CAACGTCATCCTCATCAACTC; 下游 TCCACCTCCGCCTTCATTT。扩增的目的片段大小为 398 bp。扩增程序为: 94℃变性 2 min, 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 35 个循环。扩增得到的 PCR 产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测(图 1)。与质粒 DNA 有相同条带的转基因植株为阳性植株, 可用于后续实验。

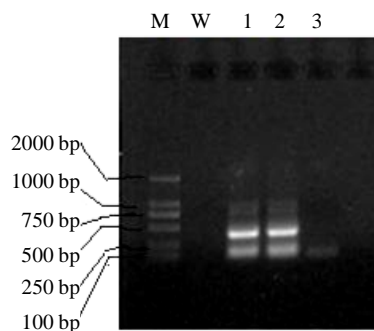
3.2. 自然干旱胁迫下叶片相对含水量的变化

在 0~35 d 的自然干旱条件下, 土壤的含水量逐渐下降, 从 85.23% 下降到 36.22%。与土壤含水量变化一样, 转基因与非转基因油菜的含水量也逐渐下降, 他们分别从 93.17%、92.20% 下降到 33.19% 和 26.31% (图 2)。当在 35 d 恢复供水, 土壤含水量几乎达到 100%, 恢复供水后第 7 d 和第 14 d 后土壤含水量分别为 79.83% 和 72.34%, 而转基因与非转基因油菜植株的叶片也逐渐恢复活力, 其含水量也相应升高。但在 0~35 d 的干旱过程中和恢复供水后, 转基因植株的含水量都略高于非转基因植株, 说明在干旱胁迫下 *IrrE* 基因能增强油菜植株的叶片含水量。

叶绿素是植物光合作用的主要物质基础, 其含量变化也是对逆境的一个反应指标。如图 3 所示, 在 0~35 d 的自然干旱条件下, 油菜植株的叶绿素含量都逐渐增大, 但在同一胁迫时期内, 转基因油菜的叶绿素含量比非转基因油菜的含量高。当干旱到第 35 d 时, 油菜植株处于终极状态, 叶片萎焉严重, 叶片中含水量降低到极致, 故而叶绿素含量较高; 当地 35 d 给植株恢复供水后, 植株的含水量逐渐增加, 叶片萎焉状态得到改善, 生理功能逐渐恢复, 故叶绿素含量呈下降趋势, 直至正常的叶绿素含量水平; 但恢复过程中, 转基因油菜植株的恢复能力要强于非转基因油菜。

3.3. 干旱胁迫对 MDA 含量的影响

干旱胁迫下, 植物的细胞膜结构遭到破坏, MDA 含量升高, MDA 的积累会对膜和细胞造成进一步的伤害, 其含量的高低反应了逆境条件下植物细胞膜的受损程度, MDA 含量越高, 说明植株受到的伤害越大[22]。随着干旱胁迫时间的延长, 两者 MDA 含量均呈上升趋势, 非转基因植株 MDA 上升幅度大于转基因植株。恢复供水后, 胁迫解除, MDA 含量均下降(图 4)。这说明了在自然干旱条件下, 转基因油菜植株的细胞膜受损程度低于非转基因植株。



注: M 为 DL2000 marker; W 为水; 1 为质粒; 2 为转基因植株; 3 为非转基因植株

Figure 1. PCR identification in transgenic *Brassica napus* L.

图 1. 转基因油菜植株 PCR 检测

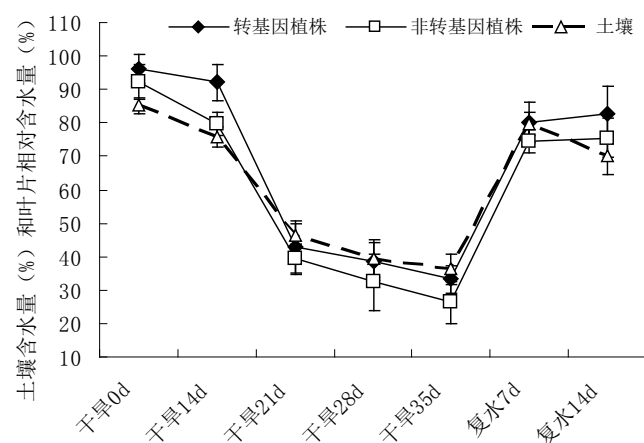


Figure 2. Change of the relative water content in the leaves of *Brassica napus* L. during drought stress and after restoration of water supply

图 2. 在干旱胁迫和胁迫后恢复供水后植株叶片含水量的变化

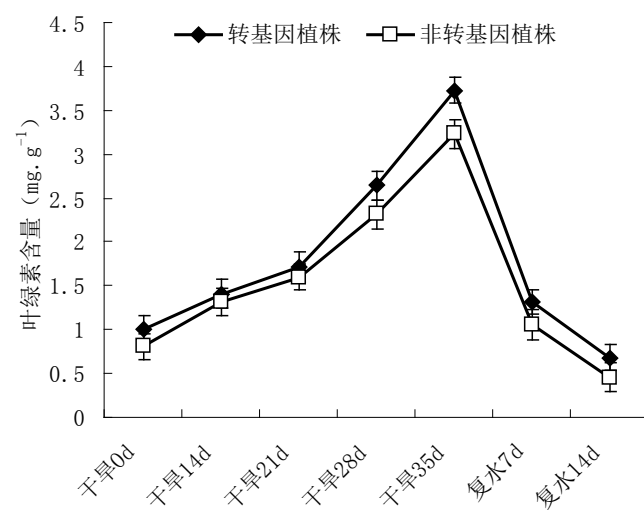


Figure 3. Change of the chlorophyll content in leaves of *Brassica napus* L. during different periods of drought stress

图 3. 不同胁迫时间内植株叶绿素含量差异

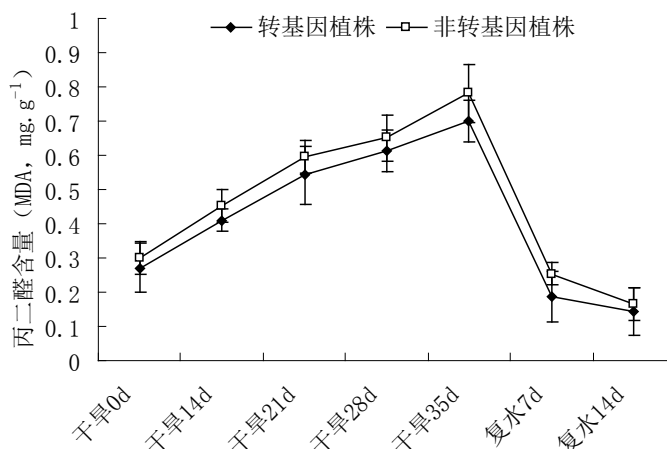


Figure 4. Change of the MDA content in leaves of *Brassica napus* L. during different periods of drought stress

图 4. 不同胁迫时间内植株 MDA 含量的变化

3.4. 干旱胁迫对可溶性蛋白含量的影响

可溶性蛋白是植物体内重要的渗透调节物质之一，起到一定的渗透调节作用。其含量变化可以反映植株受到外界非生物胁迫和病虫害等生物胁迫时细胞内蛋白质合成、变性及降解等多方面的信息，因此测定其含量是了解植物抗逆性的一个重要指标。干旱胁迫下，两者的可溶性蛋白含量呈现上升趋势，表明植株在胁迫时通过合成大量的渗透物质以适应外界逆境环境；但转基因油菜植株的可溶性蛋白含量略高于非转基因植株。恢复供水后，干旱胁迫解除，植株各项生理功能逐渐恢复，可溶性蛋白含量逐渐下降(图 5)。

3.5. 干旱胁迫对 SOD 和 POD 活性的影响

SOD 是生物体内防御氧化损伤的主要酶类，它能使植物体内的自由基处于平衡状态。POD 也是植物抗氧化系统的重要酶，它与植物的呼吸作用，光合作用及生长素的氧化等都有关系。自然干旱胁迫过程中，植株的 SOD 和 POD 活性都有所变化。随着胁迫时间的延长，油菜植株 SOD 和 POD 活性逐渐增大，胁迫到 35 d 时达到最大值，转基因和非转基因油菜植株的 SOD 分别达到 279.95 U/mg·protein 和 215.99 U/mg·protein，POD 的最大活性分别为 208.70 U/mg·protein 和 144.74 U/mg·protein。此时，油菜植株受损较严重，叶沿卷曲，叶片萎焉较严重，叶片发黄，脱落。复水后，植株的干旱胁迫逐渐解除，未脱落的叶片随着复水时间的延长逐渐恢复，表现为叶片吸水膨胀，萎焉状况明显得到改善。此时，由于植株体内活性氧物质的减少，植株的 SOD 和 POD 活性也有所下降。但在整个胁迫过程中，转基因油菜的 SOD 和 POD 活性水平均高于非转基因油菜的活性。

4. 讨论

作物对非生物胁迫如干旱的耐受性在植株个体水平和细胞水平上都是很复杂的[1] [23]。水分胁迫干扰了植物整体或部分生理生化过程，从而降低了植物的生长和产量[24] [25]。干旱首先使土壤中的含水量逐渐下降，从而改变了植物体内的相对含水量，而植物组织相对含水量反映了植物内水分亏缺的程度。本研究中，在自然干旱条件下，土壤含水量的降低是一个缓慢渐进的过程，在 0~14 d 时期甘蓝型油菜的含水量降低不明显，但在 14 d 后，随着胁迫时间的延长，干旱程度不断加深，土壤含水量、油菜含水量均显著下降，但在整个过程中转基因油菜叶片的相对含水量比非转基因油菜的要高。到 35 d 时，植株叶

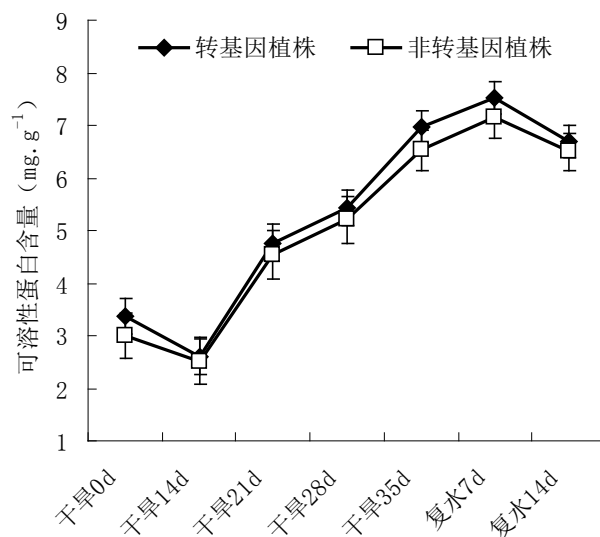


Figure 5. Change of the soluble protein content in leaves of *Brassica napus* L. during different periods of drought stress

图 5. 不同胁迫时间内植株可溶性蛋白含量的变化

片呈萎焉状态，伴有叶片卷曲。恢复供水后，油菜植株也逐渐恢复生长活力并长出新叶，但转基因油菜要先于非转基因油菜恢复生长活力并长出新叶，这可能是 *IrrE* 基因在直接或间接地通过调节叶片相对含水量来增加油菜的耐旱性。干旱胁迫引起 MDA 含量升高，说明膜脂发生的过氧化作用增强，对膜和细胞造成进一步的伤害，严重时使植物的细胞膜结构遭到破坏[15]。非转基因油菜植株中 MDA 的含量比转基因植株中的 MDA 含量高，这表明非转基因油菜植株比转基因油菜植株的质膜受损严重，这与超表达 *AVP1* 基因提高转基因百脉根的耐盐性和抗旱性的结果相一致[26]。

相应地，随着土壤和植物叶片含水量的变化，植物体内的叶绿素含量、可溶性蛋白含量以及 SOD 和 POD 活性也发生改变。在 0~35 d 的胁迫过程中，他们的含量和活性都随着土壤含水量的下降而逐渐升高，表明土壤和油菜叶片含水量的降低引起了干旱胁迫。干旱、盐渍等非生物胁迫和病虫害等生物胁迫都会影响细胞内蛋白质代谢的变化[25]，自然干旱胁迫也引起了可溶性蛋白含量的增加，而可溶性蛋白含量是植物体代谢过程中蛋白质损伤的重要指标，其变化可以反映细胞内蛋白质合成、变性及降解等多方面的信息[27]。同时，在本研究中，自然干旱胁迫也使叶绿素含量随着含水量的降低而减少，从而可能降低了植物的光合作用速率，与前人的研究结果一致[28] [29]。而水分亏缺是引起植物的光合作用速率降低的主要原因，其主要表现在于植物在受到水分亏缺时气孔关闭[30]-[33]、1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶的酶活性受到抑制[34]以及 ATP 的合成出现障碍[35]。植物遭受干旱等逆境胁迫时，植物光合作用和呼吸作用所产生的过多电子会在传递过程中产生大量的活性氧[36] [37]。过量的活性氧对植物产生严重的氧化伤害，为了减轻或免于受到氧化伤害，植物启动了自身的防御系统：活性氧清除酶系统和非酶系统。其中 SOD 和 POD 是清除活性氧酶系统中最重要酶类。本研究结果显示，在自然干旱胁迫下，油菜幼苗叶片中 SOD 和 POD 抗氧化酶的活性与植物抗氧化胁迫能力相关联，它们的活性高低可作为衡量植物抗逆性强弱的重要指标。由图 6 中的结果可知，油菜幼苗在受到干旱胁迫时，其 SOD 和 POD 活性都增加了，随着胁迫时间的延长和胁迫程度的加重，抗氧化酶活性逐渐增加，二者的酶活性 35 d 后时达到最高。但在整个过程中转基因油菜叶片的叶绿素含量、可溶性蛋白含量以及 SOD、POD 活性均比非转基因油菜的高，说明在干旱胁迫下，*IrrE* 基因是通过增加油菜叶片的叶绿素含量、可溶性蛋白含量以及 SOD、POD 活性来提高转基因油菜的抗旱能力。

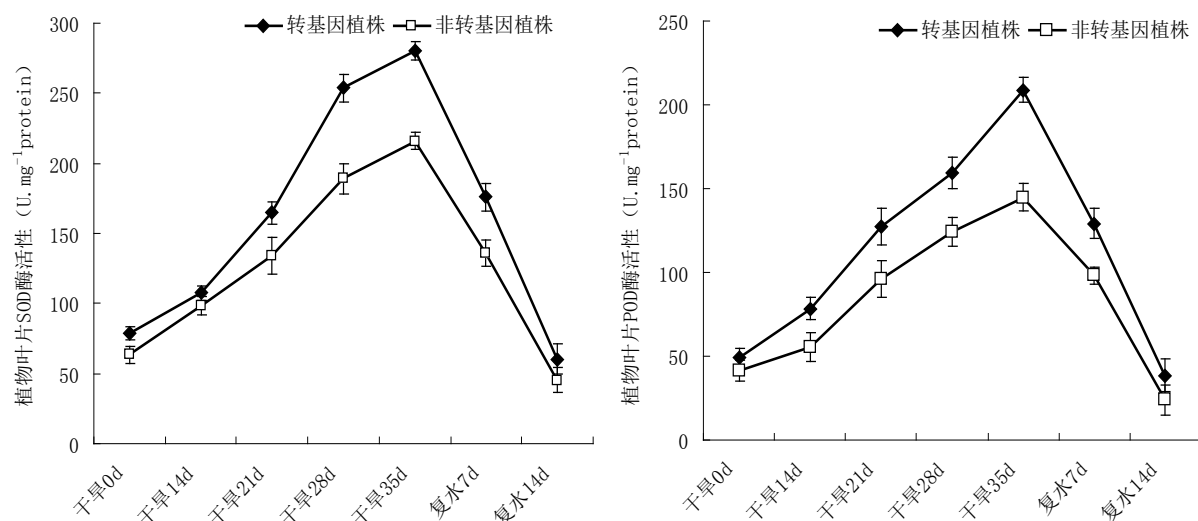


Figure 6. Changes of SOD and POD activity in leaves of *Brassica napus* L. during different periods of drought stress
图 6. 不同干旱胁迫时间内油菜植株 SOD 和 POD 活性变化

基金项目

本研究基金项目有：973 项目(2013CB733903)，863 项目(2012AA063503)，国家转基因专项(2014ZX0801201B)，农业部公益性行业科研专项(201103007)和西南科技大学博士研究基金(11zx7104)和四川省生物质资源利用与改性工程技术研究中心开展开放基金(编号：13zxs04)。

参考文献 (References)

- [1] Ashraf, M. and Harris, P.J. (2004) Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science*, **166**, 3-16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.10.024>
- [2] Akhka, A., Boutraa, T. and Alhejely, A. (2011) The rates of photosynthesis, chlorophyll content, dark respiration, proline and abscisic acid (ABA) in wheat (*Triticum durum*) under water deficit conditions. *International Journal of Agriculture and Biology*, **13**, 215-221.
- [3] Bot, A.J., Nachtergaele, F.O. and Young, A. (2000) Land resource potential and constraints at regional and country levels. World Soil Resources Reports 90, Land and Water Development Division, FAO, Rome.
- [4] 武斌, 李新海, 肖木辑, 等 (2007) 53 份玉米自交系的苗期耐旱性分析. *中国农业科学*, **4**, 665-676.
- [5] 王贺正, 马均, 李旭毅, 等 (2004) 水稻种质芽期抗旱性和抗旱性鉴定指标的筛选研究. *西南农业学报*, **5**, 594-599
- [6] 杨剑平, 陈学珍, 王文平, 等 (2003) 大豆实验室 PEG-6000 模拟干旱体系的建立. *中国农学通报*, **3**, 65-68.
- [7] 景蕊莲, 昌小平 (2003) 用渗透胁迫鉴定小麦种子萌发期抗旱性的方法分析. *植物遗传资源学报*, **4**, 292-296.
- [8] 王瑾, 刘桂茹, 杨学 (2006) PEG 胁迫下小麦再生植株根系特性与抗旱性的关系. *麦类作物学报*, **3**, 117-119.
- [9] 贺鸿雁, 孙存华, 杜伟, 等 (2006) PEG6000 胁迫对花生幼苗渗透调节物质的影响. *中国油料作物学报*, **1**, 76-78.
- [10] 张明生, 张丽霞, 戚金亮, 等 (2006) 甘薯品种抗旱适应性的主成分分析. *贵州农业科学*, **1**, 11-14.
- [11] 石大伟 (1984) 作物抗旱指标探讨. *干旱地区农业研究*, **2**, 54-63.
- [12] 胡荣海 (1986) 农作物抗旱鉴定方法和指标. *作物品种资源*, **4**, 36-39.
- [13] 黎裕 (1994) 植物的渗透调节与其它生理过程的关系及其在作物改良中的作用. *植物生理学通讯*, **5**, 377-385.
- [14] 王汉中 (2009) 中国油菜生产抗灾减灾技术手册. 中国农业科学技术出版社, 北京.
- [15] 朱宗河, 郑文寅, 张学昆 (2011) 甘蓝型油菜耐旱相关性状的主成分分析及综合评价. *中国农业科学*, **9**, 1775-1787.

- [16] Anderson, A.W. and Nordan, H.C. (1961) Taxonomy of a newly-isolated radiation-resistant micrococcus. *Bacteriological Proceedings*, 56.
- [17] Pan, J., Wang, J., Zhou, Z.F., et al. (2009) *IrrE*, a global regulator of extreme radiation resistance in *Deinococcus radiodurans*, enhances salt tolerance in *Escherichia coli* and *Brassica napus*. *PLoS ONE*, **4**, e4422. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0004422>
- [18] 曾兵, 张新全, 兰英, 等 (2009) 干旱胁迫下 12 份扁穗牛鞭草叶绿素含量和原生质膜相对透性比较研究. In: *中国草学会牧草育种委员会第七届代表大会论文集*, 中国草学会, 北京, 109-119.
- [19] 李莉, 韦翔华, 王华芳 (2007) 盐胁迫对烟草幼苗生理活性的影响. *种子*, **5**, 79-83.
- [20] 彭运生, 刘恩 (1992) 关于提取叶绿素方法的比较研究. *北京农业大学学报*, **3**, 247-250.
- [21] 李合生 (2000) 植物生理生化实验原理和技术. 高等教育出版社, 北京, 184-261.
- [22] 张宪政 (1996) 作物水分亏缺伤害生理研究概况. *沈阳农业大学学报*, **1**, 85-91.
- [23] Foolad, M.R., Subbiah, P., Kramer, C., Hargrave, G. and Lin, G.Y. (2003) Genetic relationships among cold, salt and drought tolerance during seed germination in an interspecific cross of tomato. *Euphytica*, **130**, 199-206. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1022871500583>
- [24] Ingram, J. and Bartels, D. (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **47**, 377-403. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.47.1.377>
- [25] Boutraa, T. (2010) Improvement of water use efficiency in irrigated agriculture: A review. *Journal of Agronomy*, **9**, 1-8. <http://dx.doi.org/10.3923/ja.2010.1.8>
- [26] 马廷臣, 余蓉蓉, 陈荣军, 等 (2010) PEG-6000 模拟干旱对水稻苗期根系形态和部分生理指标影响的研究. *中国农学通报*, **8**, 149-156.
- [27] 薛立, 薛晔, 任向荣, 等 (2009) PEG 模拟干旱条件下尾叶桉和枫香苗木的生理响应. *生态环境学报*, **2**, 614-620.
- [28] Beltrano, J. and Ronco, M.G. (2008) Improved tolerance of wheat plants (*Triticum aestivum* L.) to drought stress and rewatering by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus claroideum*: Effect on growth and cell membrane stability. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, **20**, 29-37. <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-04202008000100004>
- [29] Nikolaeva, M.K., Maevskaya, S.N., Shugaev, A.G. and Bukhov, N.G. (2010) Effect of drought on chlorophyll content and antioxidant enzyme activities in leaves of three wheat cultivars varying in productivity. *Russian Journal of Plant Physiology*, **57**, 87-95. <http://dx.doi.org/10.1134/S1021443710010127>
- [30] Sharkey, T.D. (1990) Water stress effects on photosynthesis. *Photosynthetica*, **24**, 651-656.
- [31] Cornic, G. (2000) Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture, not by affecting ATP synthesis. *Trends in Plant Science*, **5**, 187-188. [http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01625-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01625-3)
- [32] Lawlor, D.W. (2002) Limitations to photosynthesis in water stressed leaves: Stomata vs. metabolism and the role of ATP. *Annals of Botany*, **89**, 871-885. <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcf110>
- [33] De Souza, C.R., Maroco, J.P., Dos Santos, T.P., Rodrigues, M.L., Lopes, C., Pereira, J.S. and Chaves, M.M. (2005) Control of stomatal aperture and carbon uptake by deficit irrigation in two grapevine cultivars. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **106**, 261-274. <http://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2004.10.014>
- [34] Parry, M.A.J., Andralojc, P.J., Khan, S., Lea, P.J. and Keys, A.J. (2002) Rubisco activity: Effects of drought stress. *Annals of Botany*, **89**, 833-838. <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcf103>
- [35] Tezara, W., Mitchel, V., Driscul, S.P. and Lawlor, D.W. (2002) Effects of water deficit and its interaction with CO₂ supply on the biochemistry and physiology of photosynthesis in sunflower. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 1781-1791. <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erf021>
- [36] 汤章诚 (1984) 逆境条件下植物脯氨酸积累及其可能的意义. *植物生理学通讯*, **1**, 15-21.
- [37] Tambussi, E.A., Bartoli, C.G. and Beltrano, J. (2000) Oxidative damage to thylakoid proteins in water stressed leaves of wheat (*Triticum aestivum*). *Physiologia Plantarum*, **108**, 398-404. <http://dx.doi.org/10.1034/j.1399-3054.2000.108004398.x>