



过表达 *IbOr* 基因甘薯增强抗旱性的生理机制

陈晓丽^{1,2},李红兵²,王林林^{1,2},李孟洁²,李雨霖²,郭尚洙³,邓西平^{2*}

(1 西北农林科技大学 生命科学学院,陕西杨陵 712100;2 中国科学院水利部水土保持研究所 黄土高原土壤侵蚀与旱地农业国家重点实验室,陕西杨陵 712100;3 韩国生命工学研究院,韩国大田)

摘要:以超表达甘薯橙色基因(*IbOr*)的转基因甘薯(TS)以及非转基因甘薯(NT)为实验材料,通过15%聚乙二醇6000(PEG-6000)模拟干旱条件,研究转基因与非转基因甘薯幼苗在水分胁迫不同时间的光合系统,膜脂过氧化及抗氧化防御系统中主要指标的变化情况,探讨转基因甘薯耐旱性的生理机制。结果显示:(1)随PEG-6000胁迫时间延长,甘薯叶片的叶绿素、类胡萝卜素含量及其叶片净光合速率、气孔导度、胞间CO₂浓度、蒸腾速率都显著降低,但转基因株系降低幅度小于非转基因植株。(2)在正常供水和水分胁迫下,超表达 *IbOr* 基因甘薯叶片中O₂⁻、MDA含量均低于非转基因甘薯,即转基因甘薯具有较低的活性氧水平且脂膜受损伤较小。(3)PEG-6000胁迫24 h后,甘薯叶片中SOD、POD酶活性均增加,48 h达到最大值,且转基因甘薯中2种酶活性显著高于非转基因甘薯。研究表明,过表达 *IbOr* 基因可以有效减轻甘薯在水分胁迫条件下受损害的程度,且可能主要通过提高甘薯的抗氧化胁迫能力来完成。

关键词:转基因甘薯;水分胁迫;光合系统;抗氧化系统

中图分类号:Q789

文献标志码:A

Overexpression of *IbOr* Gene Confers Enhanced Tolerance to Water Stress in Sweet Potato (*Ipomoea batatas* L.)

CHEN Xiaoli^{1,2}, LI Hongbing², WANG Linlin^{1,2}, LI Mengjie²,
LI Yulin², KWAK-Sangsoo³, DENG Xiping^{2*}

(1 College of Life Science, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 State Key Laboratory of Soil Erosion and Dry Land Farming on the Loess Plateau, Institute of Soil and Water Conservation, Chinese Academy of Sciences and Ministry of Water Resources, Yangling, Shaanxi 712100, China; 3 Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon, Korea)

Abstract: Transgenic and non-transgenic sweet potatoes were used as experimental material under 15% PEG-6000 simulated water stress condition. Response of lipid peroxidation, photosynthetic and antioxidative system during water stress in transgenic sweet potato lines (TS) overexpressing *IbOr* and non-transgenic line (NT), were studied to explore the physiological mechanism of transferring gene increase the drought stress tolerance of sweet potato. The results showed that: (1) As water stress time extended, chlorophyll, carotenoids, photosynthetic parameters such as: Photosynthetic net rate (P_n), Stomatal conductance (G_s), Intercellular CO₂ concentration (C_i), Transpiration rate (T_r) in TS lines and NT plants decreased obviously, while, transgenic sweet potato lines keep higher level than that of NT plants. (2) O₂⁻ and malondialdehyde (MDA) contents of NT were higher than that of TS under normal condition and water stress. The results indicate that transgenic lines have lower reactive oxygen species (ROS) level and smaller lipid membrane damage than that of NT plants. (3) After 24 h water stress, the activities of SOD and POD enzyme increased, and 48 h later, the enzyme activities reached the maximum, while, which in TS lines

收稿日期:2014-10-16;修改稿收到日期:2015-01-05

基金项目:国家重点基础研究发展计划(2015CB150402);国家自然科学基金(51479189);西北农林科技大学科研启动基金(Z109021304)

作者简介:陈晓丽(1990—),女,在读硕士研究生,主要从事植物水分生理生态研究。E-mail:chenxiaoli4125@163.com

*通信作者:邓西平,博士,教授,博士生导师,主要从事植物水分生理生态研究。E-mail:dengxp@ms.iswc.ac.cn

is significantly higher than that in NT plants. So we can conclude that overexpression *IbOr* gene could effectively reduce damage degree of sweet potato under the condition of water stress. The tolerance to water deficit may be achieved mostly by improving the antioxidant ability of sweet potato.

Key words: transgenic sweet potato; water stress; photosynthetic system; antioxidative system

正常条件下,植物细胞中产生的活性氧与其清除系统保持平衡,而当环境胁迫长期作用于植株,产生的活性氧超出了活性氧清除系统的能力时,就会引起活性氧累积产生氧化伤害,从而使细胞功能失常,机体出现各种自由基综合症。植物体在长期进化过程中也相应地形成了酶促和非酶促两大类保护系统,酶促保护系统包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽硫转移酶等,非酶促系统主要包括一些抗氧化剂如抗坏血酸(Vc)、类胡萝卜素(Car)、花青素(Anthocyanins)和谷胱甘肽(GSH)等,它们的协调作用赋予植物体以清除活性氧的能力,减轻或避免活性氧对细胞造成伤害,从而表现出对氧化胁迫的抗性。

甘薯富含次生代谢产物,尤其是抗氧化化合物包括花青素、类胡萝卜素和维生素 C^[1]。橙色薯肉甘薯品种富含类胡萝卜素。类胡萝卜素在高等植物中参与光合作用,一方面阻止激发态叶绿素分子的激发能从反应中心向外传递;另一方面,它也保护叶绿素分子免遭光氧化损伤。另外,类胡萝卜素作为ABA合成的前体,也是人类饮食中维生素A的主要来源^[2]。橙色基因(orange, *Or*)的发现提供了改良作物类胡萝卜素含量的新手段,*Or*基因是在菜头呈橘黄色的花椰菜中发现的天然半显性突变,能使原本不积累类胡萝卜素的组织如菜头、茎髓、叶子基部等大量积累类胡萝卜素^[3-4]。*Or*基因编码一个定位于质体富含半胱氨酸的Dna J类似蛋白。正如花椰菜的*Or*蛋白—热休克蛋白(HSP),作为分子伴侣可调控质粒。例如,番茄HSP21可保护光合体系Ⅱ免受氧化胁迫,促进叶绿体转换成有色体,进而导致类胡萝卜素积累^[5]。从橙肉甘薯分离的橙色基因(*IbOr*)通过提高类胡萝卜素生物合成基因的表达水平来增加类胡萝卜素的积累^[6]。转*Or*基因的土豆块茎和拟南芥花序都表现出类胡萝卜素含量升高的现象,说明*Or*基因在改良作物的类胡萝卜素含量方面具有广泛的应用前景^[7]。

甘薯是中国主要的农作物之一,已有许多文献指出水分胁迫下甘薯的旱害与氧化胁迫有关^[8-10]。干旱胁迫能诱导过量活性氧的产生^[11],导致植物体内活性氧积累,从而对植物的细胞结构和生理代谢

产生严重的危害,进而使植物遭受生理损害。本实验通过室内水培实验检验PEG-6000模拟的干旱胁迫下,过表达 *IbOr* 基因甘薯是否通过提高自己的抗氧化能力来增强其对干旱胁迫的抗性。

1 材料和方法

1.1 实验材料

供试材料紫肉甘薯SZM及过表达 *IbOr* 基因的2个转基因株系(Or207, Or210)由韩国生命工学研究院提供,其中转基因株系由包含花椰菜花叶病毒35S启动子的pGWB11植物表达载体构建得到pGWB11-*IbOr*,进而转化SZM获得。从盆栽植株中剪取五叶一心苗移入1/2 Hoagland溶液中,散射光照强度为200 μmol·m⁻²·s⁻¹,室温为20~30℃,室内水培15~20 d。

1.2 水分胁迫处理

参照张明生等^[9]的实验结果,将水培15~20 d的培养苗转入含15%聚乙二醇(PEG-6000)的1/2 Hoagland培养液中进行轻度水分胁迫处理,溶液水势(ψ_{ww})约为-0.44 MPa,分别于胁迫3、6、24、48和72 h后取样测定各项指标。对照材料用不含PEG-6000的1/2 Hoagland溶液培养。

1.3 测定指标及方法

1.3.1 叶绿素含量 叶绿素含量的测定采用丙酮提取方法。称取甘薯叶片鲜样约0.2 g,置于研钵中用液氮迅速研磨成粉状,用5 mL 80%丙酮分3次(2、2和1 mL)冲洗研钵使粉末充分浸泡于丙酮中,避光4℃放置2 h,每0.5 h振荡1次。2 h后将丙酮提取液于4 000×g离心20 min,取上清液,稀释4倍后分别测定470、663、646 nm 3个波长下的吸光值OD₄₇₀、OD₆₆₃和OD₆₄₆,据此计算叶绿素a(Ca)、叶绿素b(Cb)、叶绿素(CT)和类胡萝卜素(Cx. c)的含量,公式如下:

$$Ca = 12.21 OD_{663} - 2.81 OD_{646}$$

$$Cb = 20.13 OD_{646} - 5.03 OD_{663}$$

$$CT = Ca + Cb = 17.32 OD_{646} - 7.18 OD_{663}$$

$$Cx. c = (1 000 OD_{470} - 3.27 Ca - 104 Cb) / 229$$

1.3.2 光合指标 净光合速率、蒸腾速率、气孔导度和胞间CO₂浓度的测定使用美国Li-COR公司

生产的 Li-6400 气体交换光合测定系统,采用开放式气路,测定条件为(28±2)℃,空气CO₂浓度(500±10)μmol·m⁻²·s⁻¹,光照强度(500±1)μmol·m⁻²·s⁻¹。

1.3.3 活性氧含量 超氧阴离子(O₂^{·-})含量的测定参照王爱国等^[12]的方法,所不同的是样品提取液为pH 7.8 的磷酸缓冲液,其中含有 20 mmol/L EDTA-Na 和 2 mmol/L 盐酸羟胺^[13]。

1.3.4 丙二醛含量 丙二醛(MDA)含量测定按照赵世杰等^[14]的方法。

1.3.5 抗氧化酶活性 SOD 和 POD 活性的测定参照高俊风^[15]编写的实验指导书。

以上各生化指标均用倒 3、倒 4 叶混合样进行测定,每个处理重复 3 次,光合作用参数每个处理测定 3 个不同的叶片。实验结果取 3 次测定的平均值,表示为平均值±标准差。

1.4 数据统计分析

差异显著性分析采用 SPSS 16.0 软件完成。

2 结果与分析

2.1 水分胁迫对甘薯幼苗光合色素含量的影响

在受到干旱胁迫时,植物叶绿体受损,叶绿素含量降低,从而影响到光合作用效率。如图 1 所示,转基因甘薯(Or207 和 Or210)和非转基因甘薯(SZM)幼苗叶片叶绿素 a 含量在 15% PEG-6000 处理下均开始下降,并在胁迫 24 h 后二者无显著差异;随胁迫时间增加,非转基因甘薯和转基因株系 Or210 叶绿素 a 含量持续降低,而另一株系 Or207 反而略有增加,但仍始终低于胁迫前(CK)水平;在干旱胁迫 48 和 72 h 后,转基因甘薯叶绿素 a 含量显著高于非转基因甘薯,Or207 株系又显著高于 Or210 株系(图 1,A)。同时,在水分胁迫条件下,转基因和非转基因甘薯幼苗叶片叶绿素 b 含量随胁迫时间的变化趋势与叶绿素 a 的表现大致相同(图 1,B)。另外,在正常供水条件下,2 个转基因甘薯株系类胡萝卜素含量显著高于非转基因甘薯。水分胁迫 24 h 后,转基因株系类胡萝卜素含量下降,非转基因甘薯类胡萝卜素含量略有上升,二者含量几乎相等;随胁迫时间增加,转基因和非转基因甘薯类胡萝卜素含量都有所下降,然而转基因株系的类胡萝卜素含量仍显著高于非转基因甘薯,Or207 株系又显著高于 Or210 株系(图 1,C)。以上结果说明在水分胁迫条件下,转基因甘薯幼苗光合色素含量显著高于非转基因甘薯,从而提高其光合作用效率。

2.2 水分胁迫对甘薯幼苗叶片净光合速率及有关参数的影响

图 2 显示,各类甘薯幼苗叶片净光合速率(P_n)在水分胁迫 24 h 后均明显下降,但进一步延长胁迫时间,转基因甘薯 P_n 小幅降低,非转基因甘薯 P_n 反而稍有增加,但仍低于转基因甘薯 P_n (图 2,A);各类甘薯幼苗叶片气孔导度(G_s)在水分胁迫后同样大幅下降,然后趋于稳定,在胁迫 24 和 48 h 后,转基因甘薯 G_s 仍高于非转基因甘薯(图 2,B);同时,转基因甘薯叶片蒸腾速率(T_r)在无水分胁迫时显著高于非转基因甘薯,在水分胁迫条件下,各类甘薯 T_r 均明显大幅度降低,但转基因株系蒸腾速率仍显著高于非转基因植株(图 2,D)。另外,与以上指标变化类似,各类甘薯株系幼苗胞间 CO₂ 浓度(C_i)在受到水分胁迫后也均明显降低,但转基因株系 C_i 显著低于非转基因甘薯(图 2,C)。以上结果说明在水分胁迫条件下,各类甘薯幼苗的光合作用均受到抑制,但转基因甘薯的抑制程度低于非转基因甘薯。

2.3 水分胁迫对甘薯叶片 O₂^{·-} 和 MDA 含量的影响

O₂ 接受一个电子后形成 O₂^{·-},O₂^{·-} 是活性氧自

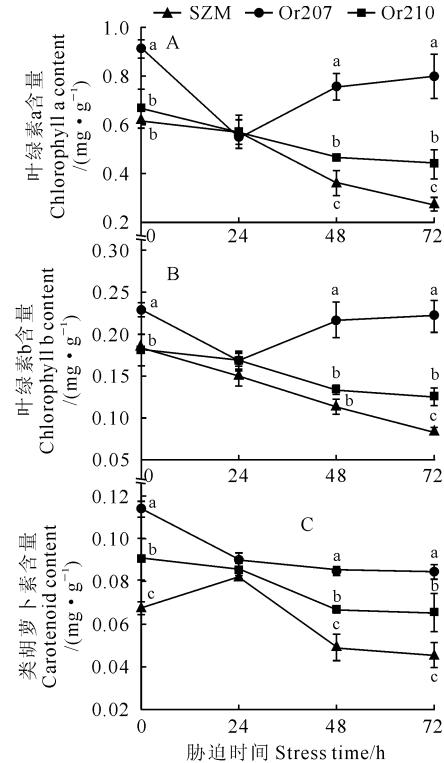


图 1 水分胁迫下甘薯幼苗叶片光合色素含量的变化
Or207 和 Or210 为转 *IbOr* 基因株系,SZM 为非转基因株系;下同

Fig. 1 The photosynthetic pigment contents in leaves of sweet potato seedling under water deficit
Or207 and Or210 are transgenic lines, while
SZM non-transgenic line; The same as below

由基的一种,是所有氧自由基的前身,其大量积累会对细胞产生氧化伤害,使生物体生物膜的结构及功能受到损伤,引起核酸和蛋白质变性等,从而对细胞及组织产生多种生物学效应。由图 3,A 可见,转基因和非转基因甘薯幼苗叶片 O_2^- 含量均随水分胁迫时间的增加而不断提高,但胁迫后不同时间转基因甘薯 O_2^- 含量均低于非转基因甘薯,尤其是胁迫 24 h 后,转基因甘薯 O_2^- 含量显著低于非转基因甘薯,表明转基因株系积累了较少的活性氧自由基前身。

同时,丙二醛(MDA)是脂质过氧化的最终产物,其含量反映植物细胞受环境胁迫等伤害的程度。由图 3,B 可知,各类甘薯幼苗叶片中 MDA 含量在水分胁迫后均随胁迫时间的延长而不断增加,表明植株受伤害的程度不断加深;然而,相比于非转基因植株,转基因植株在正常供水和水分胁迫后均保持了较低的 MDA 含量,如胁迫 48 h 后,非转基因甘

薯株系 MDA 含量约为转基因甘薯株系的 1.5 倍。这说明转基因甘薯对水分胁迫的适应性较强,受活性氧攻击的损伤较轻。

2.4 水分胁迫对甘薯幼苗叶片 SOD 和 POD 活性的影响

抗氧化酶系统极易受到环境胁迫的影响,同时也是反映植物对环境胁迫耐受程度的重要指标。其中,超氧化物歧化酶(SOD)是抵御活性氧伤害的第一道防线,它可以将 O_2^- 异化为 H_2O_2 。而过氧化物酶(POD)可在逆境或衰老初期表达,清除 H_2O_2 。POD 广泛存在于植物体内不同组织中,它作为活性较高的适应性酶,能够反映植物生长发育的特点、体内代谢状况以及对外界环境的适应性。图 4,A 表明,在正常水分条件下,转基因甘薯幼苗叶片 SOD 活力稍高于非转基因甘薯,但差异不明显;PEG 模拟干旱胁迫 24 h 后,转基因和非转基因甘薯幼苗叶

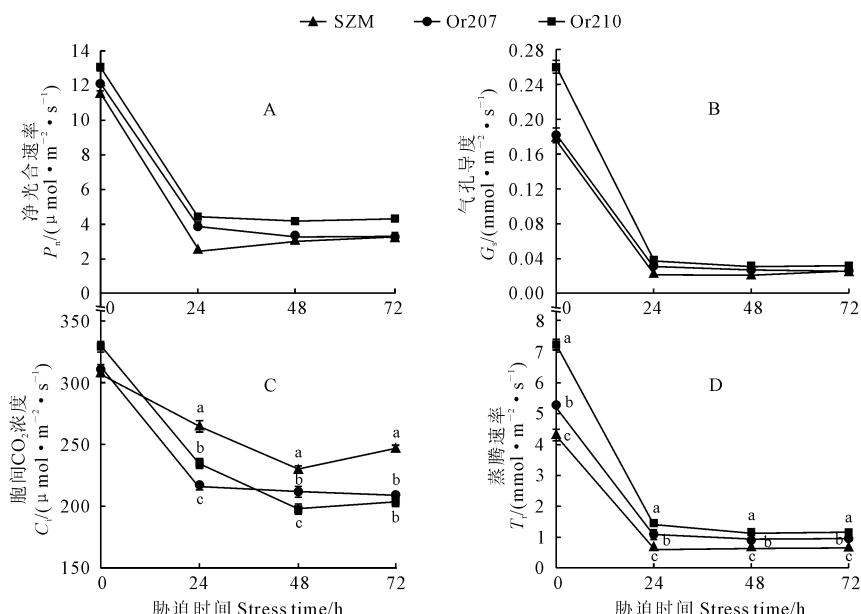


图 2 水分胁迫下甘薯幼苗叶片光合参数的变化

Fig. 2 The photosynthetic parameters in leaves of sweet potato seedling under water deficit condition

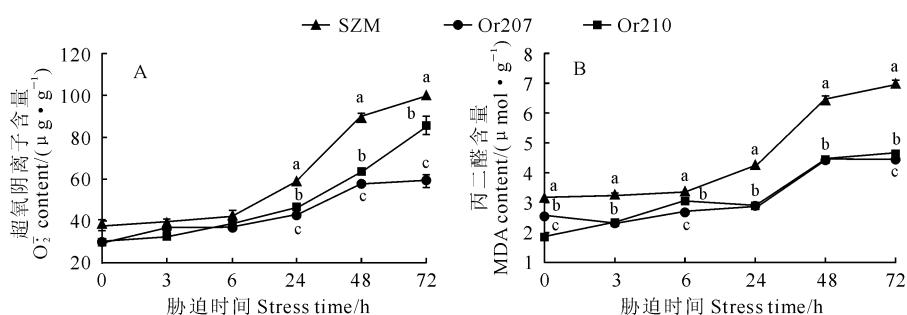


图 3 水分胁迫下甘薯幼苗叶片 O_2^- 和 MDA 含量的变化

Fig. 3 The superoxide anion and malondialdehyde content in leaves of sweet potato seedling under water deficit condition

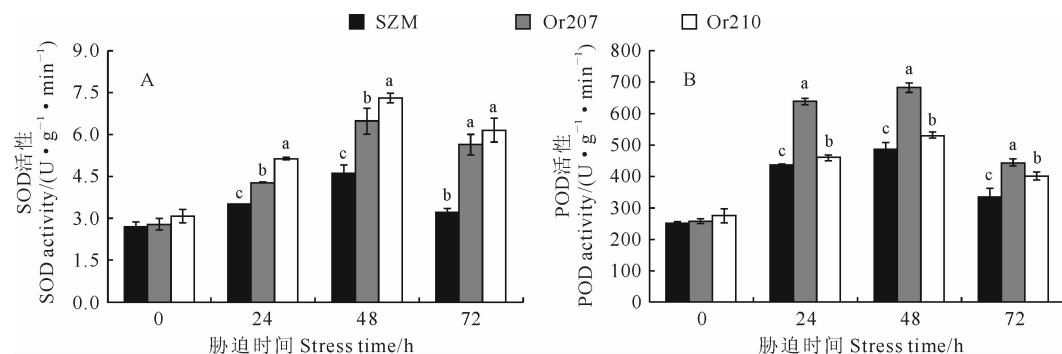


图4 水分胁迫下甘薯幼苗叶片SOD和POD活性的变化

Fig. 4 The SOD and POD activities in leaves of sweet potato seedling under water deficit condition

片SOD活性均升高,胁迫48 h后,甘薯幼苗叶片SOD活性达到最高,但转基因甘薯株系SOD活性显著高于非转基因甘薯;随着胁迫时间的延长,SOD活性均有所降低,但转基因甘薯株系幼苗SOD活性降低幅度较小,仍显著高于非转基因甘薯。同时,在正常水分条件下,转基因甘薯与非转基因甘薯幼苗叶片POD活性无显著差别,但在水分胁迫24 h后,转基因甘薯幼苗POD活性显著高于非转基因甘薯,特别是转基因甘薯株系Or207在胁迫后POD活性约为胁迫前的2.5倍;与SOD活性变化趋势相似,胁迫48 h后,甘薯幼苗POD活性达到最大;胁迫72 h后,POD活性均有所降低,但仍高于胁迫前水平(图4,B)。这说明水分胁迫可以诱导甘薯幼苗叶片SOD和POD活性提高,相比于非转基因植株,转基因株系幼苗酶活性的增强更明显,从而使得转基因甘薯幼苗具有更强的抗氧化能力。

3 讨论

作物叶绿素含量的高低是反映其光合能力的重要指标之一,叶绿素的含量往往直接影响着光合作用的速率和光合产物的形成,最终影响作物产量和品质的提高^[16-17]。通常情况下,水分胁迫会对植物的叶绿体造成一定的损伤,降低叶片中叶绿素的含量,从而降低植物的光合速率,导致光合功能迅速衰退。本实验结果显示:转基因甘薯叶片中叶绿素和类胡萝卜素含量在水分胁迫后明显下降,但转基因株系的含量显著高于非转基因甘薯,表明水分胁迫对转基因株系光合能力的损伤要小于非转基因甘薯。可见,过表达IbOr基因增强了甘薯对水分胁迫的耐受能力,其可能通过保持较高的叶绿素和类胡萝卜素水平,延缓叶片光合功能来实现。同时,在水分胁迫条件下,甘薯叶片P_n、G_s、C_i和T_r也都明显下降,但转基因株系的P_n、G_s和T_r都高于非转基

因甘薯,表明在水分胁迫条件下转基因甘薯由于具有较高的叶绿素和类胡萝卜素含量及气孔导度,因而保持了高于非转基因甘薯的光合和蒸腾能力,反映了在干旱条件下由于转基因甘薯具有生理代谢上的优势,因此对干旱表现出了较强的耐性。在水分胁迫后,非转基因甘薯保持了较高的胞间CO₂浓度(C_i),这可能由于非转基因甘薯叶绿素和类胡萝卜素含量显著降低,光合能力严重受损,胞间CO₂无法及时消耗,因而累积造成。

水分胁迫能导致超氧阴离子(O₂⁻)、羟基(·OH)、过氧化氢(H₂O₂)和单线氧(¹O₂)等活性氧的积累^[18],为适应干旱胁迫,一些植物已演化出一套适应机制和策略,如通过调节气孔开度、调节细胞渗透压以及启动抗氧化防御系统等来使植物免受干旱的伤害。植物中活性氧的清除主要由抗氧化酶系和抗氧化物质承担^[18],迄今已有通过导入活性氧清除酶基因,来人为提高水分胁迫下植物体内自由基清除酶的活性^[19],从而提高植物对水分胁迫的耐受能力的报告。本实验中过表达IbOr基因甘薯类胡萝卜素积累能力得到增强,从而提高了其自由基清除能力。类胡萝卜素含量较高能通过清除活性氧(ROS)或与其他抗氧化剂如维生素E、C协同作用来增加对非生物胁迫的抵抗^[20]。本研究结果表明,水分胁迫24 h后,转基因甘薯植株O₂⁻含量显著低于非转基因甘薯,与其同期SOD和POD活性显著高于非转基因甘薯相互对应,表明转基因甘薯在水分胁迫后能保持较低的O₂⁻水平,是由于其具有更高的SOD和POD活性以及更高水平的类胡萝卜素含量及时清除了过量产生的活性氧。

在水分胁迫条件下,植物细胞内活性氧大量积累,诱发膜脂过氧化反应,产生MDA,细胞膜的结构和功能遭到破坏,对细胞造成不可逆的伤害,甚至引起细胞死亡^[21]。本实验发现,非转基因甘薯叶片

中MDA含量在胁迫后各时间点都显著高于转基因植株,说明其受到的伤害大,而转基因植株受到的氧化伤害相对较小。这是由于转基因植株具有较低水平的O₂⁻含量,加之转基因株系由于具有较高的SOD和POD活性,保持了较低水平的活性氧,从而受到的氧化伤害要小一些。另外,类胡萝卜素派生

物ABA可以作为植物非生物胁迫信号,通过类胡萝卜素抗氧化活性和ABA增加的协调作用,参与多种胁迫反应,提高转基因甘薯的抗氧化能力^[20]。因此,转基因甘薯增强了对水分胁迫的耐受能力主要是通过抗氧化能力的提高来实现的。

参考文献:

- [1] YOSHINAGA M,YAMAKAWA O,NAKATANI M.Genotypic diversity of anthocyanins content and composition in purple-fleshed sweet potato[J].*Breeding Sci.*,1999,**49**(1):43—47.
- [2] TANAKA Y,SASAKI N,OHMIYA A.Biosynthesis of plant pigments:anthocyanins,betalains and carotenoids[J].*The Plant Journal*,2008,**54**(4):733—749.
- [3] CRISP P,WALKEY D G A,BELLMAN E,*et al*.A mutation affecting curd colour in cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *Botrytis* D C)[J].*Euphytica*,1975,**24**(1):173—176.
- [4] LU S,VAN ECK J,ZHOU X,*et al*.The cauliflower *Or* gene encodes a DnaJ cysteine-rich domain-containing protein that mediates high-levels of beta-carotene accumulation[J].*Plant Cell*,2006,**18**(12):3 594—3 605.
- [5] NETA-SHARIR I,ISAACSON T,LURIE S,*et al*.Dual role for tomato heat shock protein 21:protecting photosystem II from oxidative stress and promoting color changes during fruit maturation[J].*Plant Cell*,2005,**17**(6):1 829—1 838.
- [6] KIM S H,AHN Y O,AHN M J,*et al*.Cloning and characterization of an Orange gene that increases carotenoid accumulation and salt stress tolerance in transgenic sweet potato cultures[J].*Plant Physiology and Biochemistry*,2013,**70**(9):445—454.
- [7] LOPEZ A B,VAN ECK J,CONLIN BJ,*et al*.Effect of the cauliflower *Or* transgene on carotenoid accumulation and chromoplast formation in transgenic potato tubers[J].*Journal of Experimental Botany*,2008,**59**(2):213—223.
- [8] HE B(何冰),XU H Y(许鸿源),*et al*.Effects of drought stress on the permeability of plasma membrane and anti-oxidation enzymes of the leaves of sweet potato[J].*Journal of Guangxi Agricultural University*(广西农业大学学报),1997,**16**(4):287—290(in Chinese).
- [9] ZHANG M SH(张明生),TAN F(谈峰),ZHANG Q T(张启堂).Physiological indices of rapid identification for sweet potato drought resistance and selection of PEG concentration[J].*Journal of Southwest China Normal University*(Nat. Sci. Edi.)*(西南师范大学学报·自然科学版)*,1999,**24**(1):74—80(in Chinese).
- [10] LI W Q(李文卿),PAN Y G(潘延国),KE Y Q(柯玉琴),*et al*.Effects of soil water stress on metabolism of active oxygen in leaves of sweet potato seedling[J].*Fujian Journal of Agricultural Sciences*(福建农业学报),2000,**15**(4):45—50(in Chinese).
- [11] JIANG M,ZHANG J.Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves[J].*Journal of Experimental Botany*,2002,**53**(379):2 401—2 410.
- [12] WANG A G(王爱国),LUO G H(罗广华).Quantitative relation between the reaction of hydroxylamine and superoxide anion radicals in plants[J].*Plant Physiology Communications*(植物生理学通讯),1990,**26**(6):55—57(in Chinese).
- [13] ZHANG R X(张荣锐),XU X M(许晓明),DAI X B(戴新宾),*et al*.Decline of photosynthetic function and its relation with active oxygen in a rice mutant with low chlorophyll b content[J].*Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*(植物生理与分子生物学学报),2003,**29**(2):104—108(in Chinese).
- [14] ZHAO SH J(赵世杰),XU CH CH(许长成),ZOU Q(邹琦),*et al*.Improvements of method for measurement of malondialdehyde in plant tissues[J].*Plant Physiology Communications*(植物生理学通讯),1994,**30**(3):207—210(in Chinese).
- [15] 高俊风.植物生理实验指导[M].西安:世界图书出版公司,2000:137—202.
- [16] 胡恒觉,黄高宝.新型多熟种植研究[M].兰州:甘肃科学技术出版社,1999:49—210.
- [17] YOU J H(由继红),LU J M(陆静梅),YANG W J(杨文杰).Effects of Ca²⁺ on photosynthesis and related physiological indexes of wheat seedlings under low temperature stress[J].*Acta Agronomica Sinica*(作物学报),2002,**28**(5):693—696(in Chinese).
- [18] JIANG M Y(蒋明义),JING J H(荆家海),WANG SH T(王韶唐).Water stress and membrane-lipid peroxidation in plants[J].*Journal of Northwest A&F University*(Nat. Sci. Edi.)*(西北农业大学学报·自然科学版)*,1991,**19**(2):88—93(in Chinese).
- [19] ZENG SH H(曾淑华),ZHAO ZH X(赵正雄),QIN P(覃鹏),*et al*.Effects of water logging on some physiological and biochemical indexes of transgenic tobacco(*Nicotiana tabacum* L.) lines with superoxide dismutase or peroxidase gene[J].*Plant Physiology Communications*(植物生理学通讯),2005,**41**(5):603—606(in Chinese).
- [20] KIM S H,AHN Y O,AHN M J,*et al*.Down-regulation of β-carotene hydroxylase increases β-carotene and total carotenoids enhancing salt stress tolerance in transgenic cultured cells of sweet potato[J].*Phytochemistry*,2012,**74**(2):69—78.
- [21] WANG W B,KIM Y H,LEE H S,*et al*.Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt an drought stresses[J].*Plant Physiology and Biochemistry*,2009,**47**(7):570—577.