

转酵母 *gsh I* 基因拟南芥的抗旱生理机制分析

李 莉¹, 陈庆富¹, 王华芳²

(1. 贵州师范大学 生命科学院, 贵州 贵阳 550001; 2. 北京林业大学 生物科学与技术学院, 北京 100083)

摘要:以转 *gsh I* 基因拟南芥为试验材料, 测定干旱胁迫下转基因植株的 GSH 含量、MDA 含量和相对电导率, 同时测定谷胱甘肽还原酶 (GR)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化氢酶 (CAT) 活性, 研究酵母 *gsh I* 基因的功能, 分析转基因拟南芥的抗旱生理机制。结果表明: 干旱胁迫下, 转基因植株和对照的 GSH 含量都有所增加, 但转基因植株增加更多, 干旱诱导了对照和转基因植株 GSH 的合成, *gsh I* 基因的表达提高了转基因植株中合成 GSH 的水平。转基因植株中 GR 活性比对照的高得多, 提高了 GSH/GSSG 比率, 使氧化态 GSH 得到还原, 干旱启动了 GSH 的再生系统。转基因植株叶片相对含水量变化不明显 (与对照相比), 但 MDA 含量和相对电导率增加幅度均低于对照植株, 转基因植株提高了膜系统的稳定性 (抗氧化作用)。干旱胁迫下, 对照和转基因植株 SOD 和 CAT 活性均下降, 但没有明显差异, 表明 GSH 与 SOD、CAT 对活性氧的清除机制不同。

关键词: *gsh I* 基因; 拟南芥; 转基因; 耐旱性; 生理生化指标

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2014)01-0007-07

Analysis of Physiological Mechanism of *gsh I* Transgenic *Arabidopsis thaliana*

LI Li¹, CHEN Qing-fu¹, WANG Hua-fang²

(1. College of Life Science, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China;

2. College of Biological Science and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: Using the transgenic *gsh I* gene *Arabidopsis thaliana* as materials, the contents of GSH and MDA, the electrolyte leakage (EL) and the activities of GR, SOD and CAT in the transgenic plants were measured to study the function of *gsh I* gene and analyze physiological mechanisms of transgenic *Arabidopsis thaliana*. The contents of GSH increased in both transgenic and control plants when the plants were subjected to drying treatment, however, the GSH production rate was higher in transgenic plants than that in control plants. GSH synthesis is induced in both transgenic and control plants with drought stress, but the *gsh I* gene expression in the transgenic plants enhanced GSH synthesis level. The activity of GR in transgenic plants was higher than that in control plants. GR activity increases leads to a higher ratios of GSH to GSSG in transgenic plants and oxidative GSH is reduced. GSH regeneration system is launched with drought stress. The leaves water content did not show obvious differences in changes between the transgenic and control plants with drought stress. However, the MDA contents and electrolyte leakage (EL) (Conductivity) increased in both transgenic and control plants, but those of the transgenic plants was slower than those of control plants. The transgenic plants improved the stability of the membrane system (Antioxidation). The activities of SOD and CAT decreased in both transgenic and control plants, but did not show obvious differences. GSH is different from SOD and CAT in eliminating ROS.

Key words: *gsh I* gene; *Arabidopsis thaliana*; Transgene; Drought tolerance; Physiological and biochemical index

我国是一个干旱、半干旱面积占到国土面积 1/2 的国家, 盐渍地面积也超过 1/3, 对植物的生长和分布产生重要的影响, 因此, 提高植物对干旱等逆境胁迫

的适应能力至关重要。

前人对植物抗旱已做了很多相关的研究^[1-3], 目前培育抗旱品种成为研究的主流。除了传统的育

收稿日期: 2013-10-19

基金项目: 贵州省自然科学基金项目 (黔科合 [J] 2009-2091); 国家自然科学基金项目 (31260115); 贵州师范大学博士启动基金项目

作者简介: 李 莉 (1975-), 女, 山西大同人, 副教授, 博士, 主要从事植物生理生化研究。

种方法以外,利用转相关抗旱基因来提高植物抗旱性也有大量研究^[4-6]。正常代谢情况下,植物细胞也会产生各种活性氧(Reactive oxygen species, ROS)分子,受逆境胁迫时,体内会产生过量的各种 ROS,如:超氧离子、单离子氧、 H_2O_2 和 OH^- 等^[7]。活性氧的增加导致膜脂过氧化和丙二醛含量的增加,使膜系统正常功能受到破坏,影响植物正常的生长发育^[8-9]。植物体内清除活性氧系统主要由抗氧化酶系统和抗氧化物质组成。表达 Cu/Zn-SOD 和 APX 的转基因甘薯^[10]、表达拟南芥 Fe-SOD 的转基因烟草^[11]、表达番茄 Cu/Zn-SOD 的转基因烟草^[12] 抵抗干旱引起的氧化胁迫能力均得到增强。抗氧化物质谷胱甘肽含量的高低与植物对各种环境胁迫的忍耐程度有密切关系。还原型谷胱甘肽是胞内代谢过程和植物遭受氧化胁迫时产生的过氧化物的最有效清除剂之一。Guo 等^[13] 对水稻根部饲喂 AsA 和其合成的前体(D-glucose 和 L-galactono- γ -lactone) 均能提高 AsA 含量,从而提高水稻抗低温胁迫和抗氧化的能力。Wu 等^[14] 发现,提高 AsA 和 GSH 的含量能提高柑桔的抗氧化和抗旱能力。因此,提高植物中 GSH 的含量,对于增强植株抗氧化能力是有可能的,也是提高植物耐旱性的有效途径之一。谷胱甘肽在生物体内具有很多重要的生理功能^[15-16]。GSH 的生物合成是由酶 GSH I、GSH II 催化的,其中 GSH I 是限速酶^[17-18]。研究表明,在氧胁迫、热激、低温及 Zn^{2+} 环境中,酵母细胞中 *gsh I* 基因的转录水平及 GSH I 活性均升高^[19-20]。将植物暴露在镉、铜的环境中,能够诱导 GSH I 的转录^[21]。Bittsánszky 等^[22] 将大肠杆菌 *gsh I* 基因转入毛白杨中,发现转基因毛白杨的抗重金属 Zn^{2+} 胁迫能力明显增强。

前人在干旱胁迫与抗氧化酶活性的关系研究已有大量报道^[14,23-26],但是对抗氧化物质研究则相对较少。本研究构建酵母 *gsh I* 植物表达载体,用改进的 Dip 法^[27] 转化拟南芥,获得转 *gsh I* 基因拟南芥植株,对转基因植株进行耐旱生理测试,探讨酵母 *gsh I* 基因的抗旱生理功能,水分胁迫下转基因拟南芥谷胱甘肽抗氧化系统的保护作用机制,旨在为改良植物耐旱性提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 转基因材料获得

用 *Xba* I 和 *Sma* I 分别双酶切重组质粒 pGSGI-2 (贵州师范大学植物遗传育种研究所构建含酵母 *gsh I* 基因重组质粒) 和载体 pBI121, 构建重组质粒 pBSGI; Dip 法^[25] 浸染拟南芥花序,将 pBSGI 重组

质粒通过农杆菌介导转化拟南芥。在直径 10 cm 的培养皿中铺 4 层滤纸,加 20 mL 1/2 Hoagland 营养液,加终浓度卡那霉素 50 mg/L。种子在冰箱中 4 °C 春化后,播种于培养皿中,每天添加少量蒸馏水。2~3 周后,将存活幼苗移入土中栽培。转基因植株用 PCR、Southern Blotting 和 Northern Blotting 方法检测并鉴定。

将收获到的转基因拟南芥 f329 种子,用抗生素筛选后,移植到盛有泥炭土:珍珠岩为 3:1 的基质的塑料盆中,于温室内培养,自然光照,生长 4~5 周以后,选取生长一致的植株,进行 PCR 检测。再进行试验干旱处理,浇透水后,以停止浇水造成土壤逐步干旱,当叶片开始出现萎蔫时(第 4~5 天)取倒 2 叶进行相关的酶活及生理测定,以野生型拟南芥植株及非干旱处理作为对照。每个处理重复至少 3 次。

1.2 谷胱甘肽(GSH)含量的测定

根据曾韶西和王以柔^[28]的方法测定 GSH 含量。

1.3 相对含水量的测定

参照 Zhou 等^[29]的方法测定相对含水量。

1.4 相对电导率的测定

参照李锦树等^[30]的方法测定相对电导率。

1.5 丙二醛(MDA)含量的测定

参照赵世杰等^[31]的方法测定 MDA 含量。

1.6 超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定

取 0.3 g 叶片加入 3 mL 50 mmol/L 磷酸缓冲液(含 1% 的聚乙烯吡咯环酮, pH 值 7.8) 研磨成匀浆, 4 °C 10 000 r/min 离心 20 min, 取上清定容至 3 mL。按 Giannoplitis 和 Ries^[32] 的方法测定酶活性; 3 mL 反应体系中含甲硫氨酸 13 μ mol/L、氯化硝基四氮唑蓝(Nitrotetrazolium blue, NBT) 63 μ mol/L、核黄素 13 μ mol/L、磷酸缓冲液(50 mmol/L, pH 值 7.8) 50 μ L, 加入适量的酶液于 80 μ mol/($m^2 \cdot s$) 日光灯下照光 10 min。以不加入酶液的(用磷酸缓冲液代替)试管为最大光化还原管,用磷酸缓冲液做空白管(用缓冲液代替 NBT),测定 560 nm 的吸光值。以抑制 NBT 还原 50% 所需的酶量为 1 个酶活力单位。

1.7 过氧化氢酶(CAT)活性的测定

酶液提取同 SOD, 根据 Chance 和 Maehly^[33] 的方法略作改动。3 mL 反应体系中含 0.15% H_2O_2 1 mL, 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 值 7.0) 1.9 mL, 加入酶液 100 μ L 启动反应,记录 240 nm 下 1 min 内吸光值的变化。根据 H_2O_2 的摩尔消光系数为 39.4 mmol/(L · cm) 计算酶活性。

1.8 谷胱甘肽还原酶(GR)活性的测定

按 Zhang 和 Kirkham^[34]的方法测定 GR 活性。

取 0.5 g 叶片在 8 mL 冰冷的 25 mmol/L 磷酸缓冲液(含 1% PVP, 0.2 mmol/L EDTA, pH 值 7.8)中研磨, 4 ℃ 12 000 r/min 离心 15 min, 上清液用于测定 GR 活性。1 mL 反应体系中含 0.1 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 值 7.8), 1 mmol/L EDTA, 0.2 mmol/L NADPH, 1 mmol/L GSSG 和 0.15 mL 酶提取液。以 340 nm 吸光值表示, NADPH 摩尔消光系数为 6.2 mmol/(L · cm)。

2 结果与分析

2.1 转基因拟南芥筛选与分子检测

用 *Xba* I 和 *Sma* I 分别双酶切了重组质粒 pGSGI-2 和载体 pBI121 后, 构建并筛选重组质粒 pBSGI-5、7、15、16、21、23 和 24, 重组质粒结构见图 1。以野生型拟南芥植株作为阴性对照, 以转基因拟南芥的基因组 DNA 为模板, 利用特异性引物 LP1 (5'-TACATCTAGAAGAATAAAATGGGACTC-3') 和 LP2 (5'-ACAACCCGGGTAAAAGGAGTTTAAC-3'),

PCR 检测结果表明, 在野生型拟南芥对照(图 2-A)中没有扩增出目的带, 在筛选后的转基因植株中扩增出一条约 2.1 kb 的目的带, 初步确定目的基因 *gsh I* 导入拟南芥中。以野生型拟南芥植株作为阴性对照, 将图 2 所示 PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳分离后, 将 DNA 转移到尼龙膜上杂交检测。试验结果如图 2-B 所示, PCR 产物均可以与探针杂交, 呈现深褐色条带, 表明 PCR 产物与目的基因同源。

Southern 杂交结果(图 2-C)显示, 转基因拟南芥 f329、s32 中均检测到与目的基因同源的核酸序列, 而野生型拟南芥没有检测到该信号, 进一步说明转基因拟南芥的基因组中整合了目的基因。Northern 杂交可以在转录水平检测到转基因植株中外源基因的表达情况。对转基因拟南芥 f329、s32 的 Northern 杂交分析表明(图 2-D), 在阴性对照没有出现杂交信号的前提下, 转基因拟南芥 f329、s32 的泳道上有淡淡的条带, 说明外源基因在转基因植株中有一定的表达。

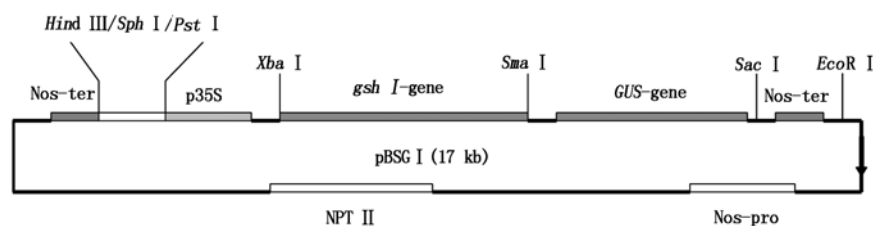


图 1 重组质粒结构

Fig. 1 The structure of recombinant plasmid

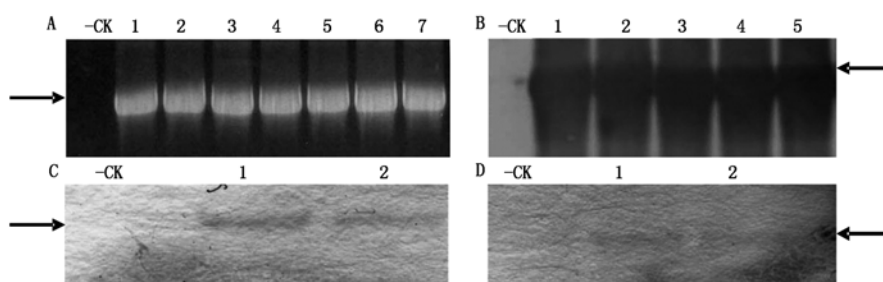


图 2 转基因拟南芥目的基因 PCR(A)、PCR-Southern(B)、Southern 杂交(C)和 Northern(D)杂交鉴定

Fig. 2 Identification of target DNA fragment in transgenic plants by PCR(A), PCR-Southern(B), Southern Blotting(C) and Northern Blotting(D)

2.2 转 *gsh I* 基因拟南芥对谷胱甘肽(GSH)含量的影响

从图 3 的结果可知, 转酵母 *gsh I* 基因的植株的叶片 GSH 含量(以鲜质量计)无论是在正常生长条件下, 还是受干旱胁迫的条件下, GSH 含量都比野生型的高, 其中正常条件下, 比对照增加了 24.9%, 干旱胁迫时比对照增加了 30.9%。植株受干旱胁迫后, 无论是转基因植株还是野生型的 GSH 含量都有增加, 只是转基因植株的增加量多些。这可能是 *gsh I* 基因在叶片内表达增多的结果。

2.3 干旱对谷胱甘肽还原酶(GR)活性的影响

从图 4 可知, 无论是转基因还是非转基因植株, GR 活性(以鲜质量计)在干旱处理后比处理前升高, 转基因植株比非转基因植株 GR 活性升高的更为明显, 因此 GR 活性的增高可能与干旱胁迫中 GSH 的需求量有关。植物在逆境条件下通过提高 GR 的活性来清除过多的活性氧, 使植物的耐逆性增强。Kornyeyev 等^[35]也发现这种情况, 通过转基因方法提高了棉花中的 GR 活性, 使棉花在低温和强光胁迫的条件下, 比对照有更高的抗性。

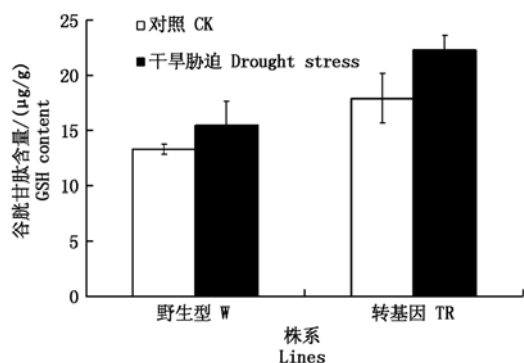


图3 转基因拟南芥与野生型的叶片谷胱甘肽含量比较

Fig.3 Comparing of GSH content between transgenic *Arabidopsis thaliana* leaves and wild type

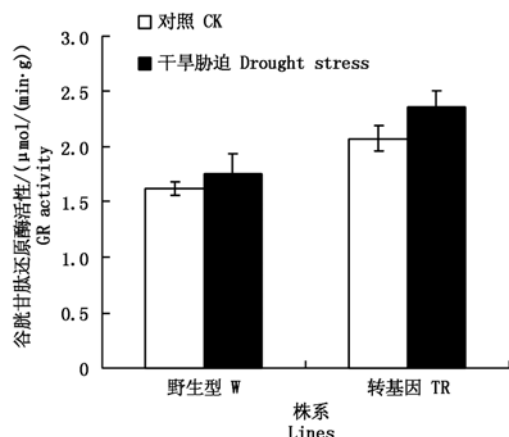


图4 干旱胁迫对拟南芥叶片谷胱甘肽还原酶活性的影响

Fig.4 Effect of drought stress on GR activity of *Arabidopsis thaliana* leaves

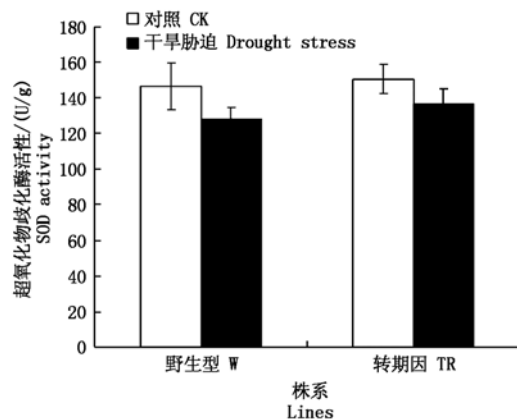


图5 干旱胁迫对拟南芥叶片超氧化物歧化酶活性的影响

Fig.5 Effect of drought stress on SOD activity of *Arabidopsis thaliana* leaves

2.4 干旱对超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响

从图5中可知,干旱胁迫降低SOD的活性(以鲜质量计),无论是转基因还是非转基因植株,受干旱胁迫后,SOD活性都在下降,受干旱处理前转基因植株与野生型之间SOD的活性差异不大,受干旱胁迫后,活性降低,转基因与野生型没有明显的差异。

2.5 干旱对过氧化氢酶(CAT)活性的影响

CAT主要起到分解 H_2O_2 的作用,清除过多的

H_2O_2 在细胞内积累。从图6的结果可知,在非干旱胁迫的条件下,转基因与非转基因植株间的CAT活性(以鲜质量计)没有差异,受干旱胁迫后,都使CAT活性下降,其中转基因植株下降还更大些,但与对照相比,也是没有明显差异的。CAT活性降低,可能影响了对 H_2O_2 的分解能力,说明了转 $gsh I$ 基因后对植株的CAT活性并没有大的影响。

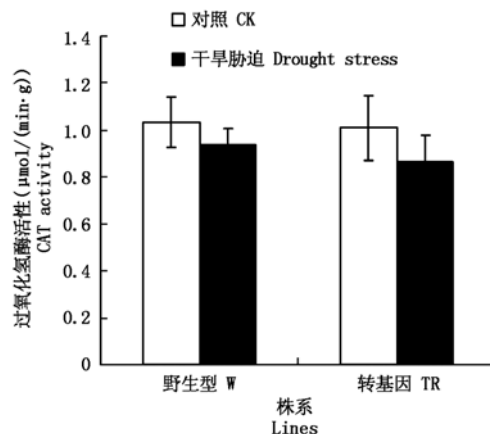


图6 干旱胁迫对拟南芥叶片过氧化氢酶活性的影响

Fig.6 Effect of drought stress on CAT activity of *Arabidopsis thaliana* leaves

2.6 干旱对相对含水量的影响

从图7的结果可知,在非胁迫的条件下,转基因与野生型之间的相对含水量差异并不大,当受干旱胁迫后,叶片相对含水量都在下降,其中野生型下降更大些,与对照相比下降了14.1%,而转基因植株的相对含水量下降了7.2%。说明了转基因植株比野生型有更强的保水能力,能保持相对较高的含水量。在干旱胁迫的条件下,相对高的含水量对植物的生存是十分重要的。

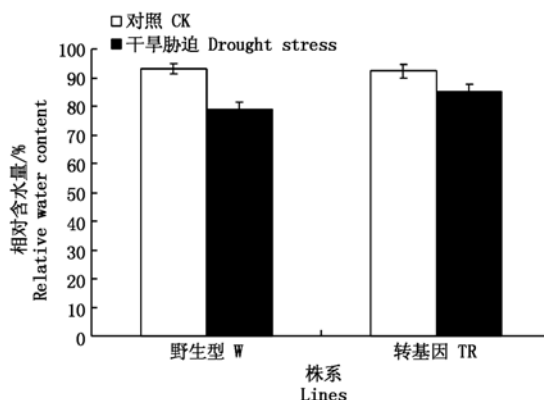


图7 干旱胁迫对拟南芥叶片相对含水量的影响

Fig.7 Effect of drought stress on relative water content of *Arabidopsis thaliana* leaves

2.7 干旱对丙二醛(MDA)含量的影响

从图8的结果可知,干旱胁迫使叶片的MDA含量(以鲜质量计)增加,说明了膜脂氧化的程度增大,膜脂过氧化产物MDA含量增多,受干旱胁迫后

野生型比对照增加了 1.13 倍,而转基因植株只比对照增加了 0.77 倍,说明了转基因植株膜脂过氧化的程度较小,过氧化产物 MDA 含量只占野生型的 69.7%。

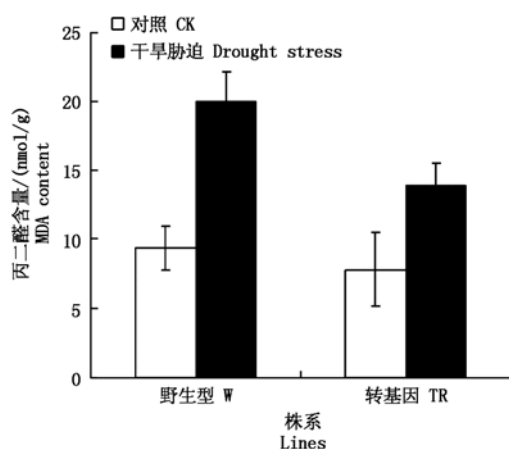


图 8 干旱胁迫对拟南芥叶片丙二醛含量的影响

Fig. 8 Effect of drought stress on MDA content of *Arabidopsis thaliana* leaves

2.8 干旱对相对电导率的影响

如图 9 所示,干旱处理使相对电导率升高,在处理 3 d 后,野生型和转基因植株的相对电导率开始明显升高,表明其质膜透性增大。但是转基因植株增加量没有野生型的大。正常条件下,野生型和转基因植株的叶片相对电导率分别是 13.24% 和 10.85%,当受干旱胁迫后,增加到 44.94% 和 33.80%,说明了野生型受干旱胁迫后质膜透性变大,细胞内物质外渗量增多,叶片的相对电导率增加。这与 MDA 含量增加的结果是一致的,说明膜脂过氧化加大,导致细胞膜完整性受损,相对电导率增多。但是转基因植株 MDA 含量较低,相对电导率也比野生型的小些。

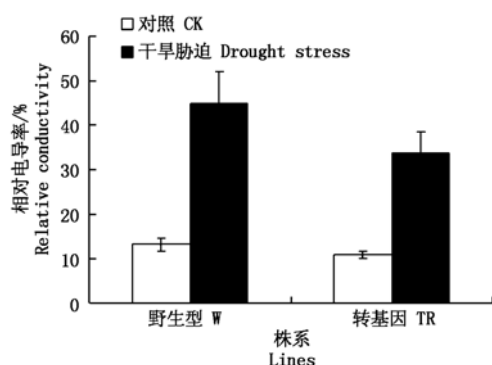


图 9 干旱胁迫对拟南芥叶片相对电导率的影响

Fig. 9 Effect of drought stress on relative conductivity of *Arabidopsis thaliana* leaves

3 讨论与结论

植物生长过程中受到干旱胁迫,体内会积累过量活性氧(Reactive oxygen species, ROS)分子,主要

有超氧根阴离子(O_2^-)、氢氧根离子(OH^-)、羟自由基($\cdot OH$)、过氧化氢(H_2O_2)等^[36]。植株清除活性氧主要通过抗氧化酶(SOD、CAT、POD、APX 等)和抗氧化物质(抗坏血酸和 GSH),当产生的活性氧超出活性氧清除系统的能力所及时,就会产生氧化伤害。

抗氧化物质清除活性氧的方式是由 AsA-GSH 循环(抗坏血酸-谷胱甘肽)和 GR 组成。AsA-GSH 循环系统可直接清除活性氧,也可以通过产生非酶抗氧化剂降低细胞内活性氧水平^[37],抑制膜脂过氧化作用减缓植物衰老^[38],增加自身防御功能。本研究表明,酵母的 *gsh I* 基因在拟南芥内表达后,增加了植株体内 GSH 的合成量,增强了植物清除活性氧的能力,提高对干旱胁迫的耐受性。

还原性谷胱甘肽(GSH)是过氧化氢的清除剂,是防止细胞损伤的重要物质。GSH 可直接清除 H_2O_2 ,也可以通过 GR 和 APX 共同清除 H_2O_2 ,修复自由基造成的损伤,防止膜脂过氧化的伤害。王子华等^[39]研究也说明了提高玫瑰切花的 GSH 含量,能提高相对含水率,提高抗氧化胁迫的能力。Reddy 等^[40]在 Mulberry (*Morus alba*)中也发现,提高 GR 的活性,能提高 GSH/GSSG 的比率,从而提高了植株抗氧化和保水能力。Türkan 等^[41]对 2 种抗旱能力不同的植物研究表明,抗干旱性强的品种,GR 活性也强,能保持高的 GSH/GSSG 比率。因此,提高植株内 GSH 含量就有可能提高抗氧化能力,从而增强植株的抗旱性。本研究表明,酵母的 *gsh I* 基因在拟南芥内表达后,虽然 SOD 和 CAT 活性下降,但是清除活性氧的途径可能通过 GR 活性的提高,使植物体内的 GSH 含量提高,使 GSH/GSSG 维持较高的比值,也激活了 AsA-GSH 循环途径使 APX 活性得以提高。

张怡等^[42]研究表明,刺槐(*Robinia pseudoacacia*)在干旱胁迫的条件下,可以通过提高抗氧化酶活性,从而提高抗干旱性。本试验表明,拟南芥受干旱胁迫后,无论是转基因还是野生型叶片的 SOD 和 CAT 的活性都在下降,这与 Gong 等^[43]在小麦(*Triticum aestivum*)上研究得到的结果是一致的。SOD 和 CAT 活性下降,可能引起活性氧的积累,导致膜脂过氧化程度加剧^[24],这与本试验发现 MDA 含量增加和导致相对电导率升高是一致的。在 SOD 和 CAT 活性下降的同时,GR 活性增加,对于保证高的 GSH/GSSG 比值有重要的意义,因为 GR 能将 GSSG 还原成 GSH,也为光反应提供了充足的 $NADP^+$ 的供应,保证了光反应产生的 NADPH 能正常进行。本试验结果发现,转基因植株的 GR 活性

要比对照高得多,可能与 GSH 含量增加有关,GSH 含量增加导致了 GSSG 含量也相应地提高,这样就有可能更多的 GSSG 还原成 GSH,从而更能有效地清除活性氧的伤害。

耐旱性试验表明:与野生型拟南芥植株相比,转 *gsh I* 基因拟南芥叶片的 GSH 含量和 GR 活性无论在正常条件,还是胁迫条件下都有所提高,胁迫条件下提高得更多,同时转基因拟南芥的保水能力增强,这使转基因植株具有更强的抵御干旱的能力。干旱胁迫下转基因拟南芥 CAT、SOD 活性下降,MDA 含量和相对电导率下降,说明转 *gsh I* 基因植株主要通过增强 GSH 合成能力,维持 GSH/GSSG 高比值,激活 AsA-GSH 循环途径来清除活性氧。

参考文献:

- [1] 王华芳,张建华,梁建生,等. 木本植物根系及木质部汁液 ABA 对土壤干旱信息的感应[J]. 科学通报,1999,44(19):2053-2058.
- [2] 徐兴友,张凤娟,龙 茹. 6 种野生耐旱花卉幼苗叶片脱水和根系含水量与根系活力对干旱胁迫的反应[J]. 水土保持学报,2007,21(1):180-184.
- [3] 杨国虎,罗湘宁,王承莲. 不同生育时期干旱对玉米杂交种性状的影响[J]. 玉米科学,2004,S2(专刊):23-26.
- [4] 梁 峥,马德钦,汤 岚,等. 菠菜甜菜碱醛脱氢酶基因在烟草中的表达[J]. 生物工程学报,1997,13(3):236-240.
- [5] Ashraf M, Athar H R, Harris P J C, *et al.* Some prospective strategies for improving crop salt tolerance[J]. *Advances in Agronomy*, 2008, 97:45-110.
- [6] 张双喜,徐兆师,张改生,等. 转 W16 小麦抗旱新品系的创制及抗旱生理机制分析[J]. 中国农业科学,2011,44(24):4971-4979.
- [7] Wise R R, Naylor A W. Chilling-enhanced photooxidation, the peroxidative destruction of lipid during chilling injury to photosynthesis and ultrastructure [J]. *Plant Physiology*, 1987, 83(2):272-277.
- [8] Anderson M D, Prasad T K, Stewart C R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings[J]. *Plant Physiology*, 1995, 109(4):1247-1257.
- [9] Rao M V, Paliyath G, Ormrod D P. Ultraviolet-B and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Physiology*, 1996, 110(1):125-136.
- [10] 李 筠,邓西平,郭尚洙,等. 转铜/锌超氧化物歧化酶和抗坏血酸过氧化物酶基因甘薯的耐旱性[J]. 植物生理与分子生物学学报,2006,32(4):451-457.
- [11] Van C W, Willekens H. Elevated levels of superoxide dismutase protect transgenic plants against ozone damage [J]. *Bio-Technology*, 1994, 12(2):165-168.
- [12] Perl A, Perl T R. Enhanced oxidative-stress defense in transgenic potato expressing tomato Cu, Zn superoxide dismutases [J]. *Theor Appl Genet*, 1993, 85(5):568-576.
- [13] Guo Z, Tan H, Zhu Z. Effect of intermediates on ascorbic acid and oxalate biosynthesis of rice and in relation to its stress resistance [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2005, 43(10):955-962.
- [14] Wu Q S, Xia R X, Zou Y N. Reactive oxygen metabolism in mycorrhizal and non-mycorrhizal citrus (*Poncirus trifoliata*) seedlings subjected to water stress [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2006, 163(11):1101-1110.
- [15] Meister A. Methods for the selective modification of glutathione metabolism and study of glutathione transport [J]. *Methods Enzymol*, 1985, 113:571-585.
- [16] Inoue Y, Kimura A. *Advances in microbial physiology* [M]. London: Academic Press, 1995.
- [17] Kistler M, Maier K, Eckardt S F. Genetic and biochemical analysis of glutathione-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Mutagenesis*, 1990, 5(1):39-44.
- [18] Noctor G, Gomez L, Vanacker L. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling [J]. *J EXP BOT*, 2002, 53(372):1283-1304.
- [19] Sugiyama K, Izawa S, Inoue Y. The Yap1p-dependent induction of glutathione synthesis in heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(20):15535-15540.
- [20] Zhang L, Onda K, Imai R, *et al.* Growth temperature downshift induces antioxidant response in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 307(2):308-314.
- [21] Xiang C B, Oliver D J. Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 1998, 10(9):1539-1550.
- [22] Bittsnszky A, Kmives T, Gullner G. Ability of transgenic poplars with elevated glutathione content to tolerate zinc (2+) stress [J]. *Environment International*, 2005, 31(2):251-254.
- [23] Khanna C R, Selote D S. Acclimation to drought stress generates oxidative stress tolerance in drought-resistant than susceptible wheat cultivar under field conditions [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2007, 60(2):276-283.
- [24] Bai L P, Sui F G, Ge T D, *et al.* Effect of soil drought

- stress on leaf water status, membrane permeability and enzymatic antioxidant system of maize [J]. *Pedosphere*, 2006, 16(3): 326 – 332.
- [25] 杨振兴, 周怀平, 关春林, 等. 作物对水分胁迫的生理响应研究进展[J]. *山西农业科学*, 2011, 39(11): 1220 – 1222, 1238.
- [26] 孙侨南, 李进才, 王月梅, 等. 干旱胁迫对黄瓜幼苗光合及活性氧代谢的影响[J]. *天津农业科学*, 2010, 16(4): 5 – 7.
- [27] Clough S J, Bent A F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 1998, 16(6): 735 – 743.
- [28] 曾韶西, 王以柔. 低温对黄瓜幼苗子叶光合强度和叶绿素荧光的影响[J]. *植物生理学通讯*, 1989, 25(4): 12 – 15.
- [29] Zhou B Y, Gou Z F, Liu Z L. Effects of abscisic acid on antioxidant systems of *Stylosanthes guianensis* (Aublet) Sw. under chilling stress [J]. *Crop Science*, 2005, 45(2): 599 – 605.
- [30] 李锦树, 王洪春, 王文英, 等. 干旱对玉米透性和膜脂的影响[J]. *植物生理学报*, 1983, 9(3): 223 – 228.
- [31] 赵世杰, 许长成, 邹 琦, 等. 植物组织中丙二醛测定方法的改进[J]. *植物生理学通讯*, 1994, 30(3): 207 – 210.
- [32] Giannopolitis C N, Ries S K. Superoxide dismutase: Occurrence in higher plants [J]. *Plant Physiology*, 1977, 59(2): 309 – 314.
- [33] Chance B, Maehly A C. Assay of catalases and peroxidases [J]. *Methods in Enzyme*, 1955, 2: 764 – 755.
- [34] Zhang J X, Kirkham M B. Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings [J]. *Plant Physiol*, 1996, 132(3): 361 – 373.
- [35] Korniyev D, Logan B A, Payton P, *et al.* Enhanced photochemical light utilization and decreased chilling-induced photoinhibition of photosystem II in cotton over-expressing genes encoding chloroplast-targeted antioxidant enzymes [J]. *Physiol Plant*, 2001, 113(3): 323 – 331.
- [36] Jung S. Variation in antioxidant metabolism of young and mature leaves of *Arabidopsis thaliana* subjected to drought [J]. *Plant Science*, 2004, 166(2): 459 – 466.
- [37] Noctor G, Foyer C H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1998, 49: 249 – 279.
- [38] 张建光, 李英丽, 邸 葆, 等. 外源物质处理对高温胁迫下苹果果实抗氧化能力的影响 [J]. *华北农学报*, 2004, 19(3): 55 – 58.
- [39] 王子华, 金基石, 高俊平. 谷胱甘肽提高月季切花失水胁迫耐性与 GR 活性的关系 [J]. *园艺学报*, 2006, 33(1): 89 – 94.
- [40] Reddy A, Ramachandra, Chaitanya K V, *et al.* Differential antioxidative responses to water stress among five mulberry (*Morus alba* L.) cultivars [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2004, 52(1): 33 – 42.
- [41] Türkan İ, Bor M, Özdemir F, *et al.* Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress [J]. *Plant Science*, 2005, 168(1): 223 – 231.
- [42] 张 怡, 罗晓芳, 沈应柏. 土壤逐渐干旱过程中刺槐新品种苗木抗氧化系统的动态变化 [J]. *浙江林学院学报*, 2005, 22(2): 166 – 169.
- [43] Gong H J, Zhu X Y, Chen K M, *et al.* Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in pots under drought [J]. *Plant Science*, 2005, 169(2): 313 – 321.