

# 烤烟伸根期生理特性对干旱胁迫的响应及其抗旱性评价

童文杰<sup>1</sup>, 邓小鹏<sup>1</sup>, 谢 贺<sup>1</sup>, 王飞兵<sup>2</sup>, 马二登<sup>1</sup>, 李军营<sup>1</sup>,  
晋 艳<sup>1</sup>, 徐照丽<sup>1</sup>, 宋振伟<sup>3\*</sup>

(1.云南省烟草农业科学研究院, 昆明 650021; 2.淮阴工学院生命科学与食品工程学院, 江苏淮安 223003; 3.中国农业科学院作物科学研究所, 农业部作物生理生态重点实验室, 北京 100081)

**摘 要:**针对西南地区春末夏初干旱频发的现状,以抗旱性不同的烤烟品种红花大金元(红大,抗旱性强)和云烟 87(云 87,抗旱性弱)为材料,采用防雨旱棚池栽的方式,对烤烟伸根期进行相同灌溉定额不同灌溉时间处理,分析不同干旱胁迫对烤烟抗逆基因表达、抗旱生理生化、烟叶色素含量、烟叶光合特征等的影响。结果表明:受干旱胁迫影响,烤烟叶绿素 a、叶绿素 b、叶绿素 a+b、叶绿素 a/b、类胡萝卜素、叶片含水量、蒸腾速率、气孔导度和净光合速率均呈下降趋势,SOD 活性、胞间 CO<sub>2</sub> 浓度、脯氨酸含量、可溶性糖含量、丙二醛含量与 *NiSOD*、*NiPOD*、*NiCAT*、*NiP5CS*、*NiLEA5*、*NiNCED1* 相对表达量呈上升趋势。烤烟伸根期干旱胁迫破坏叶绿体脂膜结构,降低烟叶光合色素含量,进而由非气孔因素限制导致烤烟净光合速率下降。烤烟通过渗透调节和自由氧清除两种方式减缓干旱胁迫对烤烟伸根期生长发育的影响。干旱胁迫下 *NiP5CS*、*NiLEA5* 和 *NiNCED1* 等控制 ABA、脯氨酸合成的基因上调表达,增加烟叶脯氨酸含量,降低液泡渗透势,减少烟叶失水。同时干旱胁迫使 *NiSOD*、*NiPOD*、*NiCAT* 基因上调表达,增强抗氧化酶活性,消除烤烟体内因干旱胁迫产生的自由氧。主成分分析得到三个主成分,累计贡献率达到 91.3%,其中脯氨酸、SOD 活性、可溶性糖、*NiSOD*、*NiPOD*、*NiCAT*、*NiP5CS* 和 *NiLEA5* 被划分为第一主成分,叶绿素 a、叶绿素 b、叶绿素 a+b、叶绿素 a/b 和类胡萝卜素被划分为第二主成分,净光合速率和叶片含水量被划分为第三主成分。红大抗旱性主成分得分 4.608,比云 87 高 40.8%。第一主成分“烤烟抗旱生理生化与基因表达因子”的变化与烤烟品种抗旱性密切相关,在烤烟抗旱育种时可作为烤烟伸根期抗旱性鉴定的主要鉴定指标,第二主成分“烟叶光合色素因子”和第三主成分“烤烟光合速率与叶片水势因子”可作为次要鉴定指标。

**关键词:**烤烟;伸根期;干旱胁迫;生理特性;抗旱性

**doi:** 10.13304/j.nykjdb.2017.0850

中图分类号:S572      文献标识码:A      文章编号:1008-0864(2018)06-0028-13

## Responses of Physiological Characteristics of Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) to Drought Stress at Root Extending Stage and Drought Resistances Evaluation

TONG Wenjie<sup>1</sup>, DENG Xiaopeng<sup>1</sup>, XIE He<sup>1</sup>, WANG Feibing<sup>2</sup>,  
MA Erdeng<sup>1</sup>, LI Junying<sup>1</sup>, JIN Yan<sup>1</sup>, XU Zhaoli<sup>1</sup>, SONG Zhenwei<sup>3\*</sup>

(1.Yunnan Academy of Tobacco Agricultural Sciences, Kunming 650021; 2.School of Life Science and Food Engineering, Huaiyin Institute of Technology, Huaian Jiangsu 223003; 3.Key Laboratory of Crop Physiology and Ecology, Ministry of Agriculture; Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

**Abstract:** Aiming at the situation of frequent drought in late spring and early summer in southwest areas, this paper adopted the method of rain proof drought shed installation and carried out a pool-culture experiment with same irrigation quota but different irrigation times, taking Honghuadajinyuan (Hongda) with strong drought resistance and

收稿日期:2017-12-05; 接受日期:2018-01-11

基金项目:云南省烟草公司科技计划项目(2016YN05, 2017YN06)资助。

作者简介:童文杰,助理研究员,博士,主要从事烟草栽培研究。E-mail: tongwenjie0716@163.com。\* 通信作者:宋振伟,副研究员,博士,主要从事农田生态研究。E-mail: songzhenwei@caas.cn

Yunyan 87 (Yun 87) with weak drought resistance as materials. The paper also analyzed the effects of different drought stress on tobacco characteristics, such as expression of drought resistant gene, physiological-biochemical traits of drought resistance, pigment content of tobacco leaf, photosynthetic of tobacco leaf, etc.. The results showed that chlorophyll a, chlorophyll b, chlorophyll a+b, chlorophyll a/b, carotenoid, leaf water content, transpiration rate, stomatal conductance and net photosynthetic rate tended to decrease under drought stress. And intercellular carbon dioxide concentration, proline, superoxide dismutase activity, soluble sugar, malondialdehyde content, and relative expressions of *NtSOD*, *NtPOD*, *NtCAT*, *NtP5CS*, *NtLEA5*, *NtNCED1* tended to increase under drought stress. Membrane lipids of chloroplast was effected and photosynthetic pigment content of tobacco leaf was decreased under drought stress at root extending stage, which lead to net photosynthetic rate decreased by non-stomatal factors. The effects of drought stress on tobacco growth and development at root extending stage were mitigated by osmotic adjustment and free oxygen removal. The relative expressions of *NtP5CS*, *NtLEA5*, *NtNCED1*, which regulated ABA and proline, were up-regulated under drought stress by raising proline content in tobacco leaf, and decreasing vacuole osmotic potential and leaf water loss. Meanwhile, the relative expressions of *NtP5CS*, *NtLEA5*, *NtNCED1* were up-regulated under drought stress by strengthening activities of antioxidant enzymes, and removing free oxygen produced by drought stress. Three major components were obtained by principal component analysis. The cumulative contribution rate reached 91.3%, of which proline, superoxide dismutase activity, soluble sugar, *NtSOD*, *NtPOD*, *NtCAT*, *NtP5CS* and *NtLEA5* were divided into the first major component; chlorophyll a, chlorophyll b, chlorophyll a+b, chlorophyll a/b and carotenoid were divided into the second major component; Net photosynthetic rate and leaf water content were divided into the third major component. The major component of drought resistance in Hongda gained 4.608 score, which was 40.08% higher than that of Yun 87. These indicators could be used as the principal indicators to identify the drought resistance of tobacco at root extending stage when breeding drought-tolerant tobacco varieties. The second major component including photosynthetic pigment index and third major component including net photosynthetic rate and leaf water content could be used as the secondary indicators.

**Key words:** tobacco; root extending stage; drought stress; physiological characteristics; drought resistance

以大气温度升高和季节性干旱、冷害、干热风等极端气候频发为特征的全球气候变化已成不争事实,严重威胁到全球农业的可持续发展<sup>[1,2]</sup>。深入了解作物对干旱胁迫的响应特征与适应机制,不仅有助于抗旱品种的选育,而且对作物抗旱减灾及高产稳产的耕作栽培技术调整具有十分重要的意义<sup>[3]</sup>。近年来,国内外学者对玉米<sup>[4]</sup>、大豆<sup>[5]</sup>、大麦<sup>[6]</sup>、高粱<sup>[7]</sup>以及能源植物<sup>[8]</sup>的抗旱性进行了系统研究。干旱导致作物生理性脱水,进而造成作物呼吸、光合系统的紊乱及细胞膜透性损坏和代谢失调,最终造成作物生长抑制、萎蔫、局部坏死或全株死亡<sup>[3,9]</sup>。提高作物对水分胁迫的抗性有利于增强作物抵御干旱的能力,而胁迫抗性能力与作物抗逆基因表达、抗逆生理生化等密切相关,并且是在长期的遗传变异与自然选择条件下逐步形成的。渗透调节和抗氧化系统在作物干旱胁迫响应及其适应过程中发挥着重要的作用。其中,渗透调节即作物体内通过积累脯氨酸、可溶性糖、甜菜碱、无机离子等提高细胞液浓度,降低渗透势来保持作物体内水分。同时,作物通过增加体内保护酶活性来清除因干旱胁迫产生的活性氧。在这些保护酶中,超氧化物歧化酶

(superoxide dismutase, SOD)发挥了重要作用,它可将氧自由基( $O_2^-$ )转化为  $H_2O_2$ ,再由过氧化氢酶(catalase, CAT)和过氧化物酶( peroxidase, POD)将  $H_2O_2$  转化为  $H_2O$  和  $O_2$ <sup>[10]</sup>。干旱胁迫下,植物体内抗氧化酶的合成受 *NtSOD*、*NtPOD*、*NtCAT* 等抗逆基因的调控,不同作物品种抗氧化酶活性增加的程度有较大差异。

烤烟是我国西南地区重要的经济作物,受全球气候变化影响,烤烟生产抗旱移栽与栽后抗旱管理在西南烟区已成常态<sup>[11]</sup>。选育抗旱品种是降低干旱条件下烤烟产量损失的主要途径,也是当前烤烟抗旱研究的热点领域之一。前人研究表明,干旱胁迫下烤烟幼苗存活率、光合色素降低,叶片水含量胁迫指数、相对电导率、丙二醛(malonaldehyde, MDA)含量、脯氨酸和可溶性糖含量增加<sup>[12]</sup>,叶片 SOD、CAT、POD 活性增强<sup>[13,14]</sup>,叶片净光合速率、气孔导度和蒸腾速率下降,胞间  $CO_2$  浓度提高<sup>[15]</sup>,叶片 *NtSOD*、*NtPOD*、*NtCAT*、*NtP5CS*、*NtLEA5*、*NtNCED1* 等抗逆基因表达上调<sup>[16]</sup>。西南地区春末夏初干旱频发,此时正值烤烟伸根期,但是目前对烤烟抗旱性的研究主要集中于烤烟种子萌发和烤烟苗期抗旱性鉴定或

采用单一的生理指标研究抗旱性,而对伸根期烤烟干旱胁迫响应机制的系统性研究还鲜见报道。另外,西南地区烤烟生产多分布于丘陵山地上,该地区农业灌水资源极度有限,生产上主要通过兴修水窖的方式进行储水。水窖储水资源极为有限,在保障烤烟移栽定根水和缓苗水后如何高效利用有限的水资源进行烤烟抗旱生产已成为亟待破解的难题。在此背景下,本研究以两种不同抗旱性的烤烟品种为研究对象,分析不同灌溉时间对烟叶光合特征与色素含量、植株抗旱生理生化活性以及烤烟抗逆基因表达的影响,在此基础上采用主成分分析法综合与定量评价烤烟的抗旱性。通过分析抗旱水不同灌溉时间对烤烟抗逆基因表达及抗逆生理生化变化的特征,揭示烤烟抗旱机理,建立烤烟伸根期抗旱性评价指标体系,以期为烤烟抗旱品种的选育以及干旱环境下烤烟稳产、优质耕作栽培调控提供理论依据和技术指导。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选择红花大金元(红大)和云烟 87(云 87)为

供试材料,种子由玉溪中烟种子责任公司提供。上述两品种生育期相近,但抗旱性存在显著差异,其中红大为高抗旱品种,而云 87 为对干旱敏感的品种,采用基质漂浮育苗方法培育烟苗。

1.2 试验方法

试验于 2016 年在云南省烟草农业科学研究院玉溪市红塔区研和试验基地(24°14'N、102°30'E)旱棚进行。试验区海拔 1 643 m,年平均气温 15.9℃,年平均降水量 918.4 mm,年日照时数 2 072.4 h。试验基地抗旱池之间采用混凝土浇筑进行隔离,避免相邻旱池之间的土壤水分与养分相互渗透,每个旱池面积为 23.90 m<sup>2</sup>(4.15 m×5.76 m),顶部为轨道式移动遮雨棚,干旱胁迫期降雨时遮挡,其余时间自然光照,可有效控制旱棚内土壤水分。旱池内土壤为云南典型砂质红壤,试验开始前耕层土壤(0~20 cm)理化性状如表 1 所示。试验包括 7 个处理,采用随机区组排列,3 次重复,其中,全生育期无干旱胁迫为对照(CK),每 5 d 灌水一次,每次 2.0 L/株;处理组(T1~T6)在浇完定根水和提苗肥水后均仅浇一次抗旱水,浇水时间分别为移栽后 10 d、15 d、20 d、25 d、30 d 和 35 d,灌溉量 2.0 L/株,具体灌溉方案见表 2。

表 1 试验地耕层土壤理化性状

Table 1 Topsoil physical and chemical properties at experimental site.

土层(cm) Soil layer(cm)	pH	有机质(g/kg) Organic matter (g/kg)	水解氮(mg/kg) Hydrolyzable N (mg/kg)	有效磷(mg/kg) Available P (mg/kg)	速效钾(mg/kg) Rapid available K (mg/kg)	Cl <sup>-</sup> (mg/kg)
0~20	7.8	8.63	85.1	45.8	88.0	87.78

表 2 不同处理灌溉时间与灌溉量

Table 2 Irrigation time and quantity of different treatments under drought experiment.

灌溉用途 Irrigation usage	移栽后天数(d) Days after transplant(d)	灌溉量(L/株) Quantity (L/plant)						
		对照 CK	T1	T2	T3	T4	T5	T6
定根水 Root water	0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
提苗水 Recovering water	5	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	10	2.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	15	2.0	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0
抗旱水 Drought resistance water	20	2.0	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0
	25	2.0	0.0	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0
	30	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	0.0
	35	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0

于 2016 年 5 月 2 日采用膜上大苗移栽方式,移栽前旋耕整地,起垄理墒打塘,垄高 25 cm,烤烟株行距分别为 0.5 m 和 1.2 m。移栽时拌塘穴施复合肥(N:P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:K<sub>2</sub>O=10:12:18) 150 kg/hm<sup>2</sup>,移栽当天覆盖地膜,掏苗后浇定根水 2.0 L/株,用干土覆盖烟塘膜口。移栽后 5 d 兑水浇施复合肥(N:P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:K<sub>2</sub>O=10:12:18) 150 kg/hm<sup>2</sup>和硼锌肥 3 kg/hm<sup>2</sup>,浇提苗水 1.0 L/株。各处理的病虫害防治及其他田间管理措施保持一致,并参照云南省优质烟叶生产管理辦法执行。

1.3 测定项目与方法

1.3.1 叶绿素含量 移栽后 40 d 取代表性烟株顶部第三片完全展开叶,去除叶脉后剪碎、混匀,每处理称取 3 份 0.2 g 样品,加入 2 mL 80%丙酮(分析纯,西陇化工有限公司)和少量 CaCO<sub>3</sub>、石英砂,充分研磨后将匀浆转移入离心管,并以 2 mL 80%丙酮清洗研钵后转入离心管中,5 000 r/min离心 15 min。取上清液定容至 25 mL 容量瓶,置于暗处保存。用紫外分光光度计(DU800, Beckman, USA)在 664 nm、648 nm 和 470 nm 波长下测定吸光度,根据 Lichtenthaler 的修正公式计算叶绿素 a、叶绿素 b、叶绿素总量、叶绿素 a/b 和类胡萝卜素含量<sup>[17]</sup>。

1.3.2 烤烟光合特性 移栽后 40 d 的上午 9:00 ~11:00,根据柯学等<sup>[18]</sup>方法利用 LI-6400XT 便携式光合仪(LI-COR, Lincoln, USA)测定烤烟叶片净光合速率( $P_n$ )、蒸腾速率( $T_r$ )、气孔导度( $G_s$ )

以及胞间 CO<sub>2</sub>浓度( $C_i$ )等指标。使用仪器自带的光源并将测定光强统一设定为 1 200 μmol/m<sup>2</sup>·s, CO<sub>2</sub>浓度为 400±10 ppm,流速为 400 μmol/s。每处理选取生长较为一致的代表性烟株 3 株,标记烟株顶部第三片完全展开叶,每叶片以 3 次读数的平均值作为测定值。

1.3.3 烤烟抗旱生理生化 移栽后 40 d 每处理标定生长较为一致的代表性烟株 3 株,选取烟株顶部第三片完全展开叶作为供试样品进行测定。

①叶片含水量:将叶片鲜样置于恒温箱中 105℃杀青 15 min,之后在 75℃下烘干至恒重,计算叶片含水量<sup>[12]</sup>。

叶片含水量=(1-DW/FW)×100%

其中,DW 为叶片干重(g),FW 为叶片鲜重(g)。

②丙二醛(MDA)含量:采用硫代巴比妥酸(TBA,分析纯,上海国药集团)比色法测定<sup>[19]</sup>。

③脯氨酸(Pro)含量:采用茚三酮(分析纯,上海宝曼生物科技有限公司)比色法测定<sup>[20]</sup>。

④可溶性糖含量:采用蒽酮(分析纯,上海迈坤化工有限公司)比色法测定<sup>[21]</sup>。

⑤超氧化物歧化酶(SOD)活性:采用四氮唑蓝(NBT,分析纯,合肥博美生物科技有限公司)光化还原法测定<sup>[21]</sup>。

1.3.4 烤烟抗逆基因 Real-time PCR 移栽后 40 d每处理标定生长较为一致的代表性烟株 3 株,选取烟株顶部第三片完全展开叶作为供试样品,选取6个抗逆生理活性相关基因(表3)进行

表 3 烤烟干旱相关基因荧光定量 PCR 特异性引物  
Table 3 Specific primers of tobacco drought-related genes used in quantitative RT-PCR.

基因名 Gene name	登录号 Accession No.	引物序列(5'-3') Primer sequences(5'-3')
<i>NtP5CS</i>	HM854026	F: CTGATGGAAGATTAGCACTTGG R: CTCCTACAGCACCTGAAGTC
<i>NtLEA5</i>	AF053076	F: TTGAATCTGGGGTTTTGGTT R: GGAAGCATTGACGAGCTAGG
<i>NtNCED1</i>	NM_001326185	F: AAGAATGGCTCCGCAAGTTA R: GCCTAGCAATTCCAGAGTGG
<i>NtSOD</i>	AF034630	F: CTCCTACCGTCGCCAAAT R: GCCCAACCAAGAGAACCC
<i>NtCAT</i>	U07627	F: AGGTACCGCTCATTACACACC R: AAGCAAGCTTTTGACCCAGA
<i>NtPOD</i>	AB044154	F: CTTGGAACACGACGTTTCCTT R: TCGCTATCGCCATTCTTTCT
<i>NtUbiquitin</i>	AB026056	F: TCCAGGACAAGGAGGCTAT R: CATCAACAACAGGCAACCTAG



Real-time PCR 分析。利用 TRIZOL(Invitrogen)试剂提取烤烟样品总 RNA,经 DNaseI(Promega)处理后,取 2  $\mu\text{g}$  RNA 作为模板,采用 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit(Fermentas)进行反转录,合成第一链 cDNA,之后采用荧光定量 PCR 分析干旱胁迫过程中,6 个胁迫响应基因在不同处理中的相对表达量。以 *NtUbiutin* 基因为内参基因,特异性引物根据已报道的烟草逆境胁迫相关基因设计<sup>[16]</sup>,引物序列详见表 3。采用 Bio-Rad iQ5 实时定量 PCR 仪(ABI 7500,USA)进行扩增。反应结束后分析荧光值变化曲线和融解曲线。将  $C_T$  值导入 Microsoft Excel 2007 中,按照公式  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ <sup>[22]</sup> 计算目的基因的相对表达量。

**1.3.5 生物量千重** 移栽后 40 d 通过挖掘法选取各处理三棵代表性烟株,清水洗净后放入烘箱,105℃ 杀青 30 min,60℃ 烘干至恒重,称量不同处理烤烟地上部和地下部生物量千重。

## 1.4 数据分析与统计

采用 Microsoft Excel 2007 和 SPSS 18.0 软件进行数据处理、统计分析和主成分分析,不同处理间的显著性( $P<0.05$ )检验采用 LSD 法。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同灌溉时间对烟叶色素含量的影响

叶绿素是植物进行光合作用的物质基础,烤烟叶绿素含量与干旱胁迫的持续时间和胁迫程度紧密相关。前期干旱背景下,不同灌溉时间处理对烟叶色素含量有显著影响(图 1)。红大、云 87 对照组叶绿素 a、叶绿素 b、叶绿素总量、叶绿素 a/b 和类胡萝卜素含量均高于处理组。与对照相比,红大处理组叶绿素 a 含量降低了 12.2%~39.3%,云烟 87 处理组叶绿素 a 含量降低了 12.2%~52.1%。红大处理组叶绿素 a 含量以 T6>T5>T4>T3>T2>T1 顺序排列,云 87 处理组叶绿素 a 含量以 T5>T6>T4>T3>T2>T1 顺序排列。移栽后 40 d,处理组间叶绿素 b 含量、叶绿素总量、叶绿素 a/b、类胡萝卜素含量与叶绿素 a 含量有相似规律,即整体上浇灌抗旱水后持续时间短的 T4、T5、T6 处理要高于持续时间长的 T1、T2、T3 处理。

### 2.2 不同灌溉时间对烟叶光合特征的影响

光合作用是植物生长发育最重要的生理过

程,该过程对干旱胁迫非常敏感。前期干旱背景下,相同灌溉定额不同灌溉时间处理对烤烟净光合速率、气孔导度、胞间  $\text{CO}_2$  浓度、蒸腾速率有显著影响(图 2)。红大、云 87 对照组净光合速率、气孔导度、蒸腾速率均极显著高于处理组,而胞间  $\text{CO}_2$  浓度却低于处理组。与对照相比,红大处理组叶片净光合速率、气孔导度、蒸腾速率分别降低了 44.9%~63.1%、61.0%~77.6%、50.6%~74.6%,云烟 87 处理组叶片净光合速率、气孔导度、蒸腾速率分别降低了 42.9%~77.6%、59.9%~85.2%、57.8%~82.3%。

### 2.3 不同灌溉时间对烤烟抗逆生理生化的影响

图 3 为不同处理下烤烟生理指标变化特征。由图 3 可以看出,相同试验处理下红大叶片脯氨酸、可溶性糖含量显著高于云 87,处理组烟叶脯氨酸、可溶性糖含量显著高于对照组;处理组中以 T6 处理脯氨酸、可溶性糖含量为最高,且极显著高于其他处理,其次为 T5 处理;在 T1、T2、T3 和 T4 处理中脯氨酸和可溶性糖含量又以 T3 处理为最高。从 SOD 变化特征来看,相同试验处理下红大烟叶的 SOD 活性显著高于云 87,处理组烟叶 SOD 活性显著高于对照组;其中, T6 处理 SOD 活性为最高,其次为 T5 处理,在 T1、T2、T3 和 T4 处理中 SOD 活性又以 T3 处理为最高。从叶片含水量来看,相同试验处理下红大叶片含水量显著高于云 87,表明红大在干旱逆境条件下有较强的抗脱水能力;此外,处理组中叶片含水量以 T3 处理为最高,表明移栽后 20 d 浇灌抗旱水可增强烟叶抗脱水能力。从丙二醛(MDA)变化特征来看,相同试验处理下红大烟叶的 MDA 含量均低于云 87,表明红大烟叶在相同逆境条件下细胞膜脂过氧化程度低于云 87;处理组中烟叶 MDA 含量以 T3 处理为最低,表明移栽后 20 d 浇灌抗旱水可降低细胞膜脂过氧化程度,有助于烤烟更好地适应干旱环境。

### 2.4 不同灌溉时间对烤烟抗逆基因表达特征的影响

前期干旱背景下,相同灌溉定额不同灌溉时间处理对烤烟抗旱基因表达特征有显著影响(图 4)。图 4 显示相同试验处理红大叶片 *NtSOD*、*NtPOD*、*NtCAT*、*NtP5CS*、*NtLEA5*、*NtNCED1* 基因相对表达量显著高于云 87,这从基因水平反

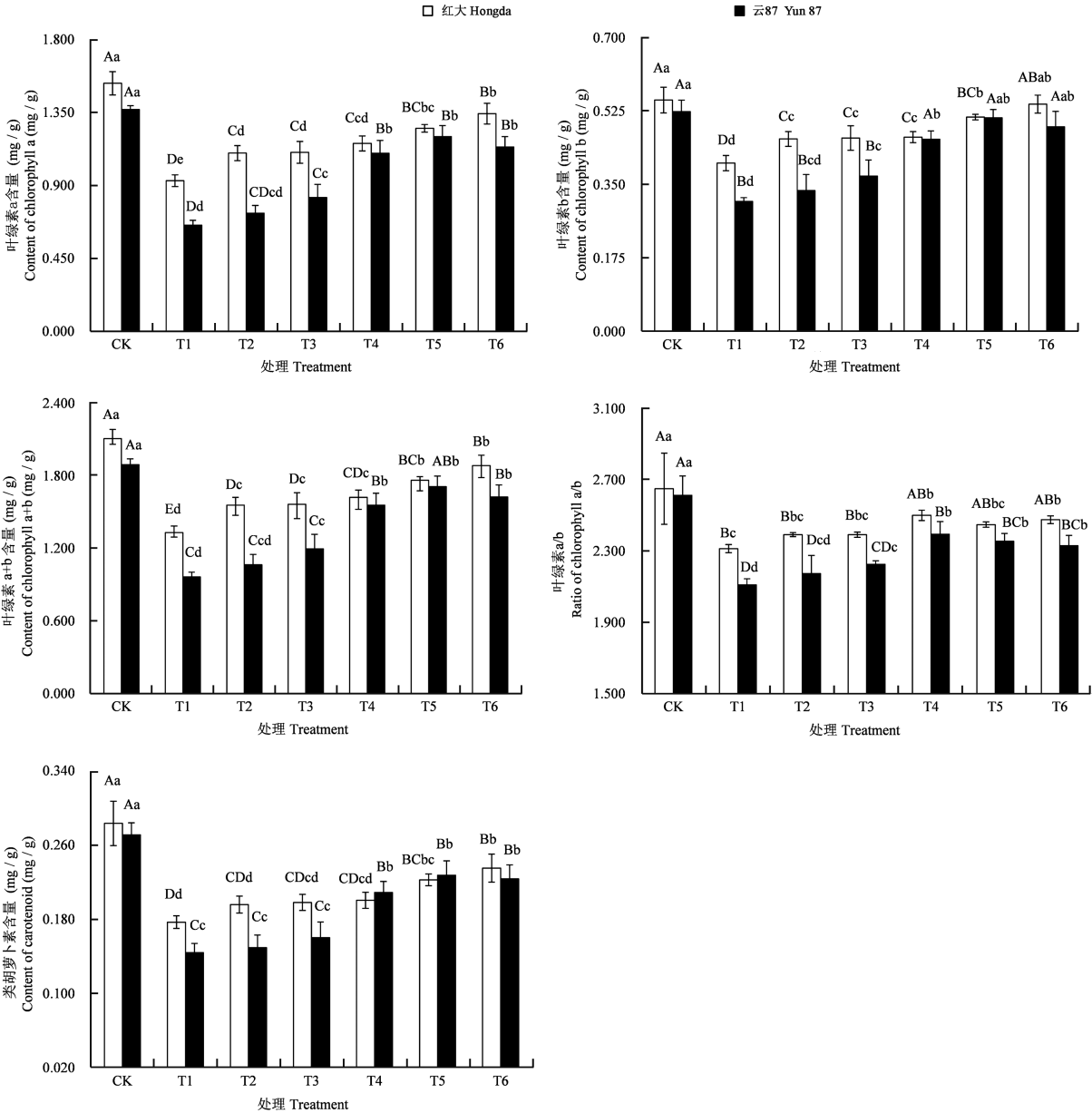


图 1 不同灌溉时间对烤烟光合色素的影响

Fig.1 Effect of different irrigation time on tobacco photosynthetic pigment content.

注:不同大小写字母分别表示同品种不同处理间  $P<0.01$  和  $P<0.05$  水平差异显著。  
Note; Different uppercase and lowercase letters mean significant differences between different treatments for the same variety at  $P<0.01$  and  $P<0.05$  levels, respectively.

应了红大抗旱性强于云 87。同一品种处理组叶片 *NtSOD*、*NtPOD*、*NtCAT*、*NtP5CS*、*NtLEA5*、*NtNCED1* 基因相对表达量显著高于对照组,反映出 T1~T6 处理组均处于受旱状态。

烤烟 *NtSOD*、*NtPOD*、*NtCAT* 基因参与 SOD、POD、CAT 等抗氧化酶活性的调控,与烤烟通过消除自由基防止脂膜过氧化而达到抗旱效果有紧密

关联。图 4 表明,处理组中以 T6 处理三个基因相对表达量为最高,其次为 T5 处理。在 T1、T2、T3 和 T4 处理中三个基因相对表达量又以 T3 处理为最高。

烤烟 *NtLEA5* 基因控制 LEA 蛋白的合成,该蛋白具有保护细胞膜结构稳定性、使变性蛋白质复性的功能。*NtNCED1* 基因调控烟叶 ABA 含

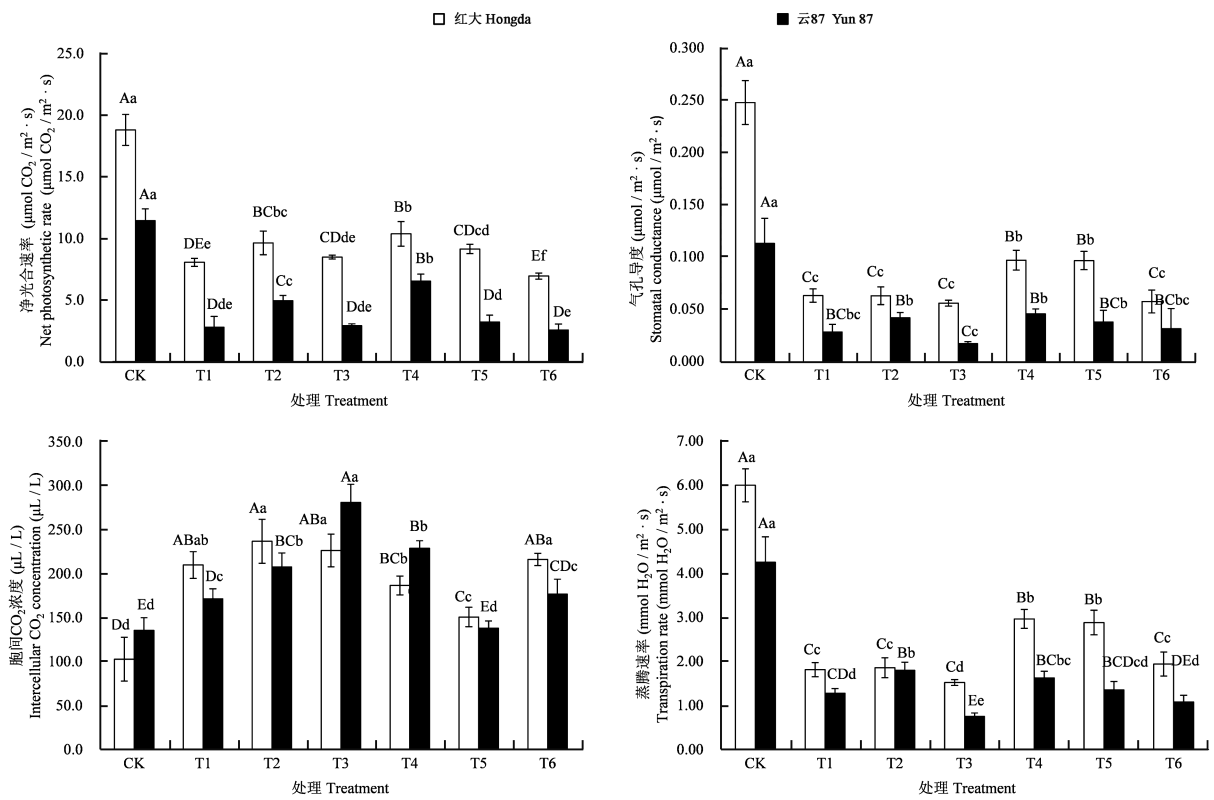


图 2 不同灌溉时间对烤烟光合生理特征的影响

Fig.2 Effect of different irrigation time on tobacco photosynthetic characteristics.

注:不同大小写字母分别表示同品种不同处理间  $P < 0.01$  和  $P < 0.05$  水平差异显著。  
Note: Different uppercase and lowercase letters mean significant differences between different treatments for the same variety at  $P < 0.01$  and  $P < 0.05$  levels, respectively.

量,而 ABA 含量的增加会诱导 *NtP5CS* 基因和 *NtLEA5* 基因的上调表达,进而调控脯氨酸含量,对烤烟渗透调节起关键作用。图 4 表明,处理组中以 T6 处理 *NtP5CS*、*NtLEA5*、*NtNCED1* 基因相对表达量最高,且极显著高于其他处理,其次为 T5 处理。在 T1、T2、T3 和 T4 处理中 *NtP5CS*、*NtLEA5*、*NtNCED1* 基因相对表达量同样以 T3 处理为最高。

2.5 烤烟生物量与各指标的相关性分析

2.5.1 不同灌溉时间对烤烟生物量的影响 前期干旱背景下,相同灌溉定额不同灌溉时间处理对烤烟生物量积累有显著影响。表 4 研究表明,红大地上部、地下部、单株生物量干重均显著高于云 87,说明红大抗旱性强于云 87。对照 CK 地上部、地下部、单株生物量干重高于各处理,且达到极显著水平 ( $P < 0.01$ )。不同处理烤烟地上部、地下部生物量具有协同效应,红大地上部、地下部生

物量干重以  $T3 > T5 > T2 > T4 > T6 > T1$  顺序排列,云 87 地上部、地下部生物量干重以  $T3 > T5 > T4 > T2 > T6 > T1$  顺序排列。从整株生物量干重看,红大、云 87 处理组中均以 T3 处理生物量干重为高,分别达到对照生物量干重的 73.5% 和 56.0%,表明前期持续干旱且区域抗旱水资源紧缺的条件下,移栽后 20 d 浇灌 2.0 L/株抗旱水有助于烤烟抗旱生产。

2.5.2 烤烟单株生物量与各指标的相关性分析

对移栽后 40 d 烤烟抗旱指标和单株生物量进行相关性分析,结果表明受旱条件下烤烟单株生物量 ( $Y$ ) 与叶绿素 a ( $X1$ )、叶绿素 a+b ( $X3$ )、叶绿素 a/b ( $X4$ )、类胡萝卜素 ( $X5$ )、净光合速率 ( $X6$ )、气孔导度 ( $X7$ )、蒸腾速率 ( $X9$ ) 和叶片含水量 ( $X14$ ) 呈极显著正相关关系,与 MAD 含量 ( $X13$ ) 呈极显著负相关关系,与叶绿素 b ( $X2$ ) 呈显著正相关关系 (表 5)。因此,干旱胁迫下,要提高烤烟单株生物量,就要提高叶绿素 a、叶绿素 b、

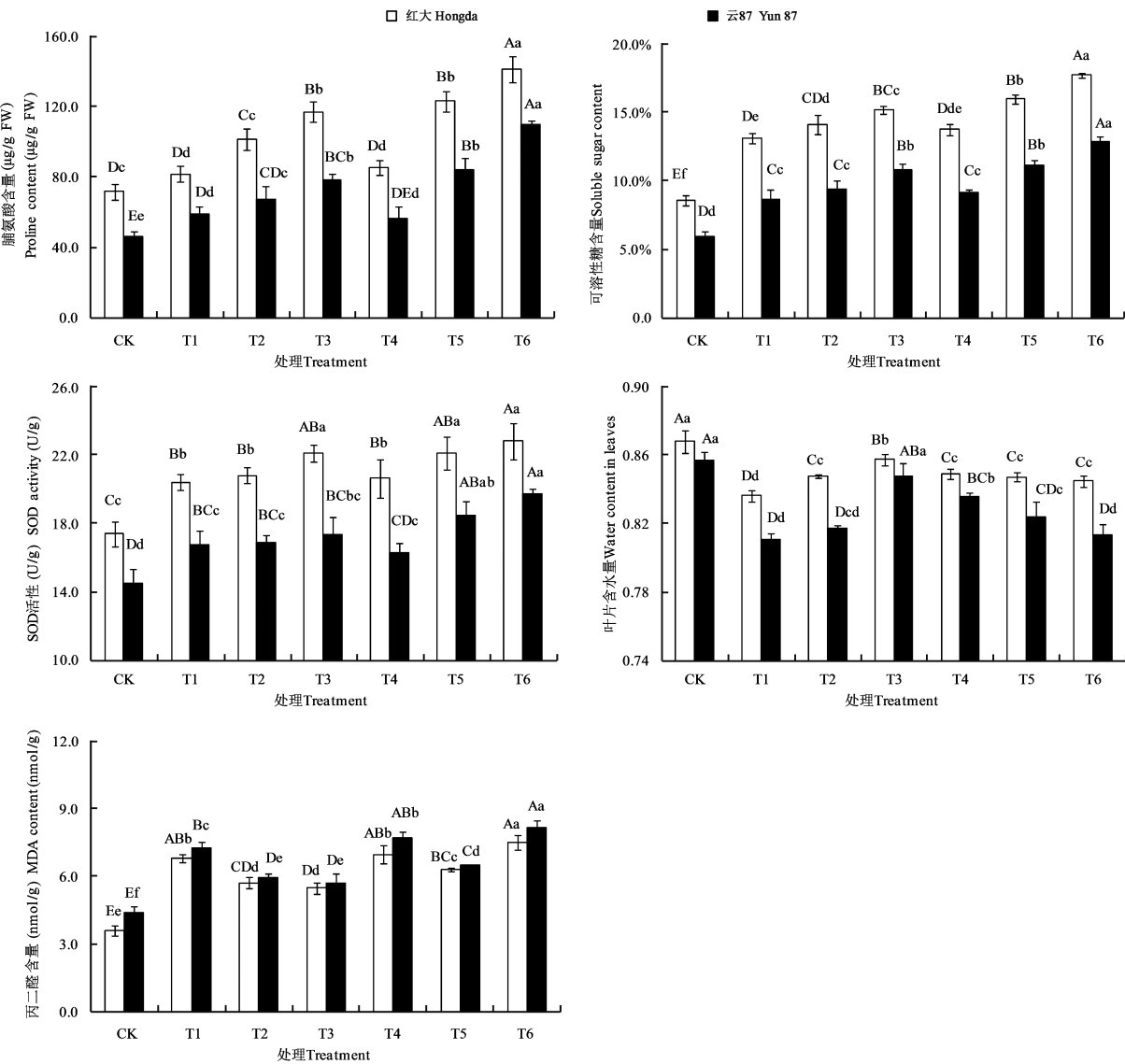


图 3 不同灌溉时间对烤烟抗旱生理特征的影响

Fig.3 Effect of different irrigation time on tobacco physiological characteristics under drought stress.

注:不同大小写字母分别表示同品种不同处理间  $P<0.01$  和  $P<0.05$  水平差异显著。  
Note: Different uppercase and lowercase letters mean significant differences between different treatments for the same variety at  $P<0.01$  and  $P<0.05$  levels, respectively.

叶绿素 a+b、叶绿素 a/b、类胡萝卜素、净光合速率、气孔导度和蒸腾速率,同时降低烟叶 MAD 含量。

2.6 烤烟抗旱指标筛选与抗旱性评价

2.6.1 烤烟抗旱指标筛选 采用主成分分析法对烤烟抗旱指标进行了筛选。从表 6 可以看出,主成分分析特征值中 3 个主成分累计贡献率达到 91.254%,可用这 3 个主成分对烤烟抗旱性进行概括分析。决定第一主成分大小的主要是脯氨

酸、SOD、可溶性糖、 $NiSOD$ 、 $NiPOD$ 、 $NiCAT$ 、 $NiP5CS$  和  $NiLEA5$ ,它们反映了原始数据信息量的 43.792%,这几个指标主要与烤烟抗旱生理生化和抗逆基因表达相关,可把第一主成分称为“抗旱生理生化与基因表达因子”;第二主成分主要包括叶绿素 a、叶绿素 b、叶绿素 a+b、叶绿素 a/b 和类胡萝卜素,它们反映了原始数据信息量的 37.992%,这几个指标主要与烟叶光合色素相关,可把第二主成分称为“烟叶光合色素因子”;第三



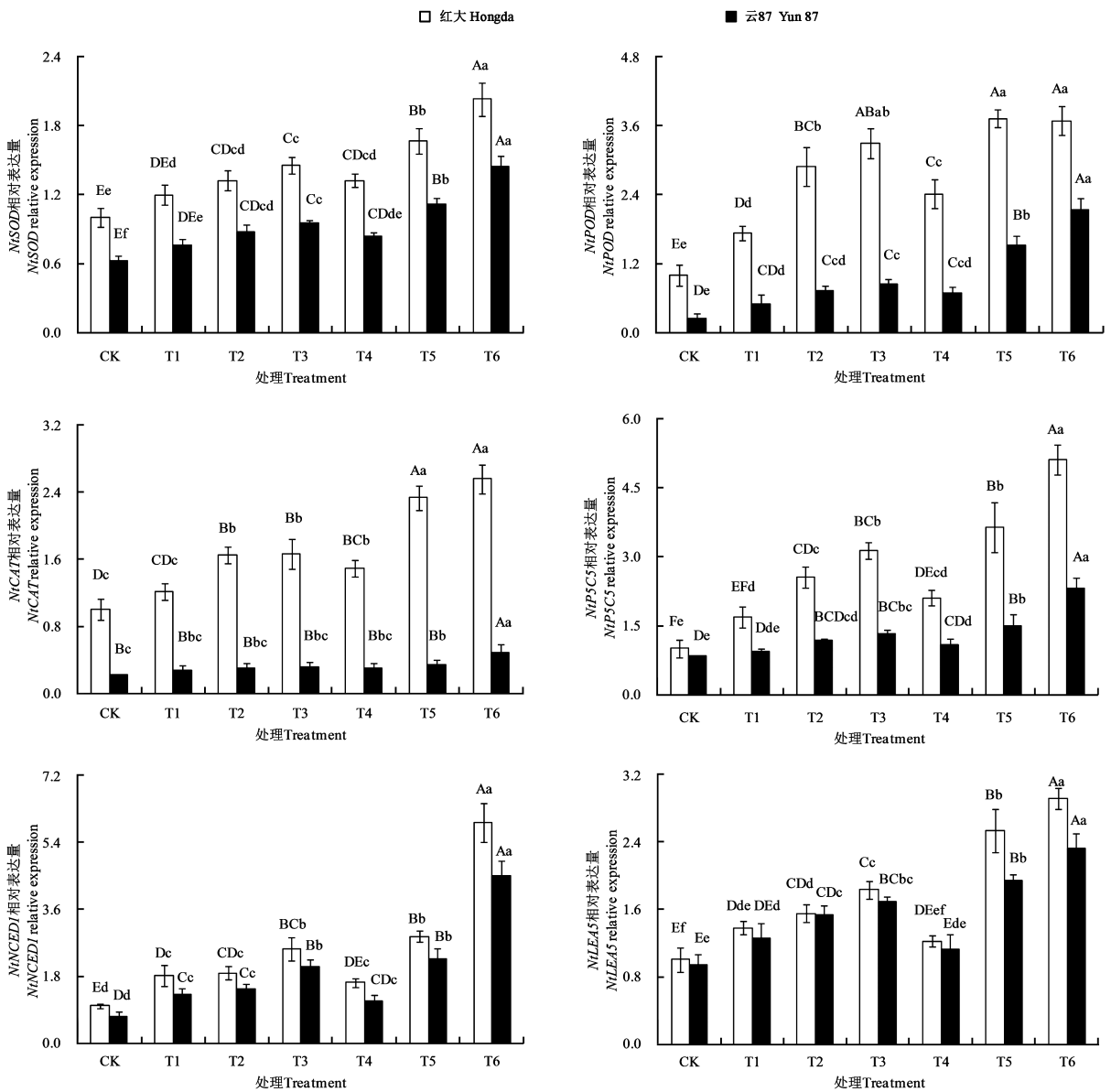


图 4 不同灌溉时间对烤烟典型抗旱基因相对表达量的影响

Fig.4 Effect of different irrigation time on relative expression of drought resistance genes.

注:不同大小写字母分别表示同品种不同处理间  $P<0.01$  和  $P<0.05$  水平差异显著。  
Note: Different uppercase and lowercase letters mean significant differences between different treatments for the same variety at  $P<0.01$  and  $P<0.05$  levels, respectively.

主成分主要包括净光合速率和叶片含水量,它们反映了原始数据信息量的 8.928%,这两个指标主要与烤烟光合作用和叶片水势相关,可把第三主成分称为“烤烟光合速率与叶片水势因子”。因此烤烟抗旱性评价指标体系可以“抗旱生理生化与基因表达因子”为主要鉴定指标,以“烟叶光合色素因子”和“烤烟光合速率与叶片水势因子”为次要鉴定指标。

2.6.2 烤烟抗旱性综合评价 先将红大、云 87

各生理指标相对值的平均数与主成分 1、2、3 特征向量的乘积累加,然后用贡献率与累加之和相乘进行加权,最后将同一种品种各个生理指标加权值相加,得出两个烤烟品种的主成分综合得分,得分越高表明烤烟的抗旱性越强。结果显示,红大、云 87 主成分得分分别为 4.608、3.272,红大主成分得分比云 87 高 40.831%,表明前期干旱背景下红大抗旱性强于云 87。

表 4 不同灌溉时间对烤烟生物量的影响

Table 4 Effects of different irrigation times on tobacco biomass.

品种 Variety	部位 Part	生物量(g/株) Biomass(g/plant)						
		CK	T1	T2	T3	T4	T5	T6
红大 Hongda	地上部 Aboveground	17.03 Aa	5.49 De	9.19 Cd	12.65 Bb	8.75 Cd	10.83 BCc	8.84 Cd
	地下部 Underground	1.73 Aa	0.57 Cd	0.74 Ccd	1.13 Bb	0.69 Ccd	0.84 Cc	0.64 Cd
	整株 Whole plant	18.75 Aa	6.06 De	9.93 Cd	13.78 Bb	9.45 Cd	11.68 BCc	9.48 Cd
云 87 Yun 87	地上部 Aboveground	14.98 Aa	3.39 De	4.41 CDde	8.34 Bb	4.94 CDcd	6.11 Cc	3.88 Dde
	地下部 Underground	1.63 Aa	0.40 Dd	0.49 CDd	0.96 Bb	0.55 CDd	0.76 BCc	0.42 Dd
	整株 Whole plant	16.62 Aa	3.80 De	4.90 CDde	9.30 Bb	5.48 CDcd	6.87 Cc	4.30 Dde

注:同行中不同大小写字母分别表示同品种不同处理间  $P<0.01$  和  $P<0.05$  水平差异显著。  
Note:Different capital and lowercase letters in the same row mean significant differences between different treatments for the same variety at  $P<0.01$  and  $P<0.05$  levels, respectively.

表 5 干旱胁迫下烤烟单株生物量与各抗旱指标的相关系数

Table 5 Correlation coefficient between biomass per plant and drought resistance index of tobacco underdrought stress.

指标 Index	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7
Y	0.722 **	0.606 *	0.704 **	0.806 **	0.701 **	0.832 **	0.791 **
	X8	X9	X10	X11	X12	X13	X14
	0.208	0.798 **	0.034	0.003	-0.080	-0.842 **	0.833 **
	X15	X16	X17	X18	X19	X20	
	0.029	0.121	0.295	0.077	-0.192	-0.198	

注: \* 和 \*\* 分别表示  $P<0.01$  和  $P<0.05$  水平显著相关。  
Note: \* and \*\* indicate significant correlation at  $P<0.01$  and  $P<0.05$  levels (2-tailed), respectively.

表 6 各指标主成分的特征向量及贡献率

Table 6 Eigen vector and percentage of accumulated contribution of principal components.

指标 Index	主成分 1	主成分 2	主成分 3
	Component 1	Component 2	Component 3
叶绿素 a Chlorophyll a	0.243	0.914 *	0.283
叶绿素 b Chlorophyll b	0.344	0.903 *	0.125
叶绿素 a+b Chlorophyll a+b	0.257	0.918 *	0.256
叶绿素 a/b Chlorophyll a/b	0.138	0.822 *	0.490
类胡萝卜素 Carotenoid	0.076	0.958 *	0.205
净光合速率 Net photosynthetic rate	-0.002	0.517	0.828 *
气孔导度 Stomatal conductance	-0.111	0.634	0.677
胞间 CO <sub>2</sub> 浓度 Intercellular carbon dioxide concentration	0.286	-0.748	-0.037
蒸腾速率 Transpiration rate	-0.215	0.667	0.645
脯氨酸 Proline	0.970 *	0.089	-0.127
SOD 活性 Superoxide dismutase activity	0.963 *	-0.052	0.046
可溶性糖 Soluble sugar	0.983 *	-0.097	-0.045
丙二醛 Malondialdehyde content	0.299	-0.258	-0.751
叶片含水量 Leaf water content	0.146	0.275	0.879 *
NtSOD	0.975 *	0.157	-0.104
NtPOD	0.971 *	0.078	0.063

续表Continued			
指标 Index	主成分 1 Component 1	主成分 2 Component 2	主成分 3 Component 3
<i>NtCAT</i>	0.909 *	0.117	0.316
<i>NtP5CS</i>	0.967 *	0.111	-0.076
<i>NtLEA5</i>	0.804 *	0.098	-0.479
<i>NtNCED1</i>	0.781	0.174	-0.504
特征值 Eigen value	8.760	7.758	1.733
贡献率 Contribution rate	43.798%	38.791%	8.665%
累计贡献率 Cumulative contribution rate	43.798%	82.589%	91.254%

注：\* 表示某指标在各因子中的最大绝对值。  
Note: \* means the biggest absolute value of each index in all factors.

3 讨论

光合色素是植物光合作用的载体,叶绿素对光能的吸收、转换和利用起着重要作用。叶绿素 a 可将光能转化为化学能,叶绿素 b 和类胡萝卜素可将其所吸收的光能传递给叶绿素 a,推动光化学过程,促进光合产物的生成。叶绿素 a/b 反映捕光色素复合体 II (LHC II) 在所有含叶绿素的结构中所占比例,该比值高说明捕光能力强<sup>[23]</sup>。本研究表明,红大、云 87 的 T4、T5、T6 处理叶绿素 a 含量高于 T1、T2、T3 处理,且叶绿素 b、叶绿素 a+b、叶绿素 a/b、类胡萝卜素也有相似规律,这可能与不同处理浇灌抗旱水后持续时间的长短有关。长时间干旱胁迫下植物体内会累积大量自由氧,使细胞膜脂过氧化损伤加剧,进而影响叶绿体膜结构,导致植物光合性能下降,这与陈征等<sup>[15]</sup>和黄承建等<sup>[24]</sup>的研究结果相一致。

光合作用是植物进行同化代谢积累的基础,干旱胁迫下植物光合作用降低主要受两个因素限制。一是气孔因素限制,干旱胁迫初期首先是气孔关闭以减少蒸腾作用,进入气孔的 CO<sub>2</sub> 浓度减少,不能满足植物体光合作用的要求,导致植物光合作用下降。二是非气孔因素限制,由于叶绿体活性和核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶活性下降,核酮糖二磷酸羧化酶再生能力降低,导致叶片光合作用能力受挫<sup>[25~27]</sup>。Huseynova 等<sup>[28]</sup>认为当 G<sub>s</sub> 与 C<sub>i</sub> 同时下降时,P<sub>n</sub> 下降则主要归咎于气孔限制因素,而本研究中 2 个烤烟品种伸根期受干旱胁迫后处理组 G<sub>s</sub> 显著低于对照 CK,而 C<sub>i</sub> 高于对照 CK,表明此时烤烟光合速率下降的原因可能是由

非气孔因素限制导致。植物通过蒸腾作用降低叶片温度,本研究发现,相同处理条件下,红大 T<sub>4</sub> 高于云 87,而红大 P<sub>n</sub> 显著高于云 87,说明在干旱条件下红大仍可以通过蒸腾作用降低叶片温度,同时维持一定的净光合速率,这可能是红大在干旱环境下凸显出优势表现的原因之一。

渗透调节和抗氧化酶活性增强是植物应对干旱胁迫响应的重要方式。干旱条件下植物细胞内积累一些可溶性物质来进行渗透调节,这些渗透调节物质包括可溶性糖、游离氨基酸、脯氨酸等,而且植物抗旱性越强,渗透调节物质积累量越大<sup>[13,28]</sup>。烤烟 *NtP5CS*、*NtLEA5*、*NtNCED1* 基因共同参与烤烟干旱胁迫响应,调控相关抗性物质的合成代谢。干旱胁迫会诱使 *NtNCED1* 基因上调表达,*NtNCED1* 基因控制烟叶 ABA 含量,而 ABA 含量的增加会诱导 *NtP5CS* 基因和 *NtLEA5* 基因的上调表达,进而调控脯氨酸含量,其作用机制是干旱胁迫→*NtNCED1*→ABA→*NtP5CS*、*NtLEA5*→脯氨酸<sup>[10]</sup>。本研究表明,相同试验处理红大烟叶脯氨酸含量、*NtP5CS*、*NtLEA5*、*NtNCED1* 基因相对表达量均显著高于云 87,这很好地从渗透调节的角度,同时从基因表达水平和植物生理水平说明了红大抗旱性强于云 87。

干旱胁迫下,植物体内会产生过量的 ROS,而 ROS 是高度活跃的并有毒性,会损伤蛋白质、脂类、碳水化合物和 DNA,最终导致氧化胁迫<sup>[29]</sup>。植物体内有一套由 SOD、POD、CAT 等组成抗氧化酶防御系统,该系统可有效清除植物体内因干旱胁迫而剧烈增长的活性氧离子,防止脂膜过氧化,植物抗旱性越强,SOD 等抗氧化酶活性越强<sup>[30~32]</sup>。烤烟 *NtSOD*、*NtPOD*、*NtCAT* 基因分

别参与烤烟体内 *SOD*、*POD*、*CAT* 的合成调控。脯氨酸可以作为一种有效的 ROS 清除剂来清除单线态氧和羟基氧<sup>[33]</sup>。本研究表明,相同试验处理红大烟叶 *NtSOD*、*NtPOD*、*NtCAT* 基因相对表达量和 *SOD* 活性均显著高于云 87,这可能与红大较多的脯氨酸积累进而激活 ROS 清除系统,引起 ROS 清除基因的系统上调表达有关。这很好地从自由氧清除的角度,同时从植物生理水平和基因表达水平说明了红大耐旱性强于云 87。

另外,本研究 T1~T6 处理组中以 T6 处理脯氨酸、可溶性糖含量最高,且极显著高于其他处理,其次为 T5 处理。处理组 *SOD* 活性大小规律与脯氨酸和可溶性糖相类似。同时,烟叶 *NtSOD*、*NtPOD*、*NtCAT*、*NtP5CS*、*NtLEA5*、*NtNCED1* 基因相对表达量也是以 T6 处理为最高,T5 处理排第二位。这可能与不同处理浇灌抗旱水后持续时间的长短有关,干旱处理结束时即移栽后 40 d,T6 处理正处浇抗旱水后第 5 d,T5 处理正处浇抗旱水后第 10 d,这俩处理浇完抗旱水后的天数低于其他处理。白鹏等<sup>[3]</sup>和谢小玉等<sup>[34]</sup>研究均表明,随着干旱胁迫时间的拉长植物体内脯氨酸、可溶性糖含量等渗透调节物质和 *SOD*、*POD*、*CAT* 等抗氧化酶活性呈先升高后降低趋势。

已有研究表明烤烟伸根期干旱胁迫会对大田烤烟生长发育的抑制效应具有滞后性且不可逆转<sup>[34]</sup>。本研究发现,烤烟伸根期干旱胁迫对烤烟地上部、地下部干物质积累有显著影响。主成分分析有利于通过少数几个主成分来揭示多个变量间的内部结构,即从原始变量中导出少数几个主成分并尽可能多地保留原始变量的信息,且彼此间互不相关<sup>[35]</sup>。本研究基于主成分分析方法,筛选得到 3 个主成分,累计贡献率超过 85%,因此,可用这 3 个主成分对烤烟抗旱性进行概括分析<sup>[36]</sup>。其中第一主成分“抗旱生理生化与基因表达因子”主要包括脯氨酸含量、*SOD* 活性、可溶性糖含量及 *NtSOD*、*NtPOD*、*NtCAT*、*NtP5CS* 和 *NtLEA5* 表达量,与汪志威等<sup>[37]</sup>研究结果较为一致,在烤烟抗旱育种时可作为烤烟伸根期抗旱性鉴定的主要鉴定指标,第二主成分“烟叶光合色素因子”和第三主成分“烤烟光合速率与叶片水势因子”可作为次要鉴定指标。本研究结果可为抗旱性鉴定指标体系构建和抗旱品种选育和筛选提供借鉴。

## 参 考 文 献

- [1] Teixeira E I, Fischer G, Van Velthuisen H, *et al.* Global hot-spots of heat stress on agricultural crops due to climate change [J]. *Agric. Forest Meteorol.*, 2013, 170: 206-215.
- [2] Trnka M, Rotter R P, Ruiz-Ramos M, *et al.* Adverse weather conditions for European wheat production will become more frequent with climate change [J]. *Nat. Climate Change*, 2014, 4(7): 637-643.
- [3] 白鹏,冉春艳,谢小玉.干旱胁迫对油菜薹期生理特性及农艺性状的影响[J].*中国农业科学*, 2014, 47(18): 3566-3576.
- [4] Kumar B, Guleria S K, Khanorkar S M, *et al.* Selection indices to identify maize (*Zea mays* L.) hybrids adapted under drought-stress and drought-free conditions in a tropical climate [J]. *Crop Pasture Sci.*, 2016, 67(10): 1087-1095.
- [5] Fenta B A, Beebe S E, Kunert K J, *et al.* Field phenotyping of soybean roots for drought stress tolerance [J]. *Agron. J.*, 2014, 4(3): 418-435.
- [6] Hasanuzzaman M, Shabala L, Brodribb T J, *et al.* Assessing the suitability of various screening methods as a proxy for drought tolerance in barley [J]. *Funct. Plant Biol.*, 2017, 44(2): 253-266.
- [7] Ongom P O, Volenec J J, Ejeta G. Selection for drought tolerance in sorghum using desiccants to simulate post-anthesis drought stress [J]. *Field Crops Res.*, 2016, 198: 312-321.
- [8] Liu Y, Zhang X, Tran H, *et al.* Assessment of drought tolerance of 49 switchgrass (*Panicum virgatum*) genotypes using physiological and morphological parameters [J]. *Biotechnol. Biofuels*, 2015, 8(1): 152-163.
- [9] Lipiec J, Doussan C, Nosalewicz A, *et al.* Effect of drought and heat stresses on plant growth and yield: A review [J]. *Int. Agrophys.*, 2013, 27(4): 463-477.
- [10] Wang F B, Zhu H, Chen D H, *et al.* A grape bHLH transcription factor gene, *VvbHLH1*, increases the accumulation of flavonoids and enhances salt and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell Tiss. Org.*, 2016, 125: 387-398.
- [11] Xie H, Yang D H, Yao H, *et al.* iTRAQ-based quantitative proteomic analysis reveals proteomic changes in leaves of cultivated tobacco (*Nicotiana tabacum*) in response to drought stress [J]. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 2016, 469: 768-775.
- [12] 盛业龙,王莎莎,许美玲,等.应用隶属函数法综合评价不同烤烟品种苗期抗旱性[J].*南方农业学报*, 2014, 45(10): 1751-1758.
- [13] Sheng Y L, Wang S S, Xu M L, *et al.* Comprehensive evaluation on drought resistance of flue-cured tobacco varieties at seedling stage by subordinate function values analysis [J]. *J. South Agric.*, 2014, 45(10): 1751-1758.
- [13] 李晓青,荆月婷,冯全福,等. PEG 模拟干旱胁迫对不同烤烟品种生理特性的影响[J].*中国烟草科学*, 2016, 37(3): 15-21.
- [13] Li X Q, Jing Y T, Feng Q F, *et al.* Effects of drought stress simulated by PEG on physiological characteristics in different

- flue-cured tobacco cultivars [J]. *Chin. Tob. Sci.*, 2016, 37 (3): 15–21.
- [14] Yang G Y, Yu L L, Zhang K M, *et al.*. A ThDREB gene from *Tamarix hispida* improved the salt and drought tolerance of transgenic tobacco and *T. hispida* [J]. *Plant Physiol. Bioch.*, 2017, 113: 187–197.
- [15] 陈征, 许嘉阳, 范艺宽, 等. 不同烤烟品种幼苗形态结构及光合参数对干旱胁迫响应机制的差异[J]. *中国生态农业学报*, 2016, 24(11): 1508–1520.
- Chen Z, Xu J Y, Fan Y K, *et al.*. Response of morphological structure and photosynthetic parameters to water deficit in four flue-cured tobacco cultivar seedlings [J]. *Chin. J. Eco-Agric.*, 2016, 24(11): 1508–1520.
- [16] Sun J T, Hu W, Zhou R, *et al.*. The *Brachypodium distachyon* *BdWRKY36* gene confers tolerance to drought stress in transgenic tobacco plants [J]. *Plant Cell Rep.*, 2015, 34: 23–35.
- [17] Lichtenthaler H K. Chlorophyll fluorescence signatures of leaves during the autumnal chlorophyll breakdown [J]. *J. Plant Physiol.*, 1987, 131(1/2): 101–110.
- [18] 柯学, 李军营, 李向阳, 等. 不同光质对烟草叶片生长及光合作用的影响[J]. *植物生理学报*, 2011, 47 (5): 512–520.
- Ke X, Li J Y, Li X Y, *et al.*. Effects of different light quality on growth and photosynthesis of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves [J]. *Acta Phytophysiol. Sin.*, 2011, 47(5): 512–520.
- [19] 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*, 1991, 30(3): 207–210.
- Zhao S J, Xu C C, Zou Q, *et al.*. Improvements of method for measurement of malondialdehyde in plant tissues [J]. *Plant Physiol. Comm.*, 1991, 30(3): 207–210.
- [20] Bates L S, Waldren R P, Teare I D. Rapid determination of free proline for water-stress studies [J]. *Plant Soil*, 1973, 39 (1): 205–207.
- [21] Yang Y F, Guan S K, Zhai H, *et al.*. Development and evaluation of a storage root-bearing sweetpotato somatic hybrid between *Ipomoea batatas* (L.) Lam. and *I. triloba* L [J]. *Plant Cell Tiss. Org.*, 2009, 99(1): 83–89.
- [22] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method [J]. *Nat. Protoc.*, 2008, 3: 1101–1108.
- [23] 谢立勇, 孙雪, 赵洪亮, 等. FACE 条件下水稻生育后期剑叶光合色素含量及产量构成的响应研究[J]. *中国生态农业学报*, 2015, 23(4): 425–431.
- Xie L Y, Sun X, Zhao H L, *et al.*. Responses of flag-leaf photosynthetic pigments at late growth stage and rice yield components to elevated CO<sub>2</sub> under FACE system [J]. *Chin. J. Eco-Agric.*, 2015, 23(4): 425–431.
- [24] 黄承建, 赵思毅, 王龙昌, 等. 干旱胁迫对苧麻叶绿素含量的影响[J]. *中国麻业科学*, 2012, 34(5): 208–212.
- Huang C J, Zhao S Y, Wang L C, *et al.*. Effect of drought stress on chlorophyll contents in ramie [J]. *Plant Fiber Sci. Chin.*, 2012, 34(5): 208–212.
- [25] Lauteri M, Haworth M, Serraj R, *et al.*. Photosynthetic diffusional constraints affect yield in drought stressed rice cultivars during flowering [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9 (9): e109054.
- [26] Kovačević J, Kovačević M, Cesar V, *et al.*. Photosynthetic efficiency and quantitative reaction of bread winter wheat to mild short-term drought conditions [J]. *Turk. J. Agric. For.*, 2013, 37(4): 385–393.
- [27] Zhou S S, Li M J, Guan Q M, *et al.*. Physiological and proteome analysis suggest critical roles for the photosynthetic system for high water-use efficiency under drought stress in *Malus* [J]. *Plant Sci.*, 2015, 236: 44–60.
- [28] Huseynova I M, Rustamova S M, Suleymanov S Y, *et al.*. Drought-induced changes in photosynthetic apparatus and antioxidant components of wheat (*Triticum durum* Desf.) varieties [J]. *Photosynth. Res.*, 2016, 130(1–3): 215–223.
- [29] Gill S S, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants [J]. *Plant Physiol. Bioch.*, 2010, 48(12): 909–930.
- [30] Horváth E, Pál M, Szalai G, *et al.*. Exogenous 4-hydroxybenzoic acid and salicylic acid modulate the effect of short term drought and freezing stress on wheat plants [J]. *Biol. Plantarum*, 2007, 51: 480–487.
- [31] Xue L L, Anjum S A, Wang L C, *et al.*. Influence of straw mulch on yield, chlorophyll contents, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activities of soybean under drought stress [J]. *J. Food Agric. Environ.*, 2011, 9: 694–699.
- [32] 施钦, 殷云龙, 王芝权, 等. 中山杉及其父母本幼苗对干旱胁迫和复水的响应[J]. *应用生态学报*, 2016, 27(11): 3435–3443.
- Shi Q, Yin Y L, Wang Z Q, *et al.*. Response in cuttings of *Taxodium hybrid* “Zhongshanshan” and their parents to drought and re-hydration [J]. *Chin. J. Appl. Ecol.*, 2016, 27(11): 3435–3443.
- [33] Alia, Mohanty P, Matysik J. Effect of proline on the production of singlet oxygen [J]. *Amino Acids*, 2001, 21(2): 195–200.
- [34] 谢小玉, 马仲炼, 白鹏, 等. 辣椒开花结果期对干旱胁迫的形态与生理响应[J]. *生态学报*, 2014, 34(13): 3797–3805.
- Xie X Y, Ma Z L, Bai P, *et al.*. The morphological and physiological responses of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) to drought stress with different intensity during blossom and fruit period [J]. *Acta Ecol. Sin.*, 2016, 27(11): 3797–3805.
- [35] 王军, 谢玉华, 刘兰, 等. 不同生育期水分亏缺对烤烟干物质积累与代谢酶活性的影响[J]. *中国农学通报*, 2016, 32(4): 33–37.
- Wang J, Xie Y H, Liu L, *et al.*. Effect of water stress on biomass accumulation and metabolic enzyme activities during different growth stages of flue-cured tobacco [J]. *Chin. Agric. Sci. Bull.*, 2016, 32(4): 33–37.
- [36] He X Q. Methods of modern statistical analysis and application [M]. Beijing: Renmin University of China Press, 1998.
- [37] 汪志威, 刘仁祥, 石妙妙, 等. 基于称重法的烟草伸根期抗旱性鉴定[J]. *西南农业学报*, 2016, 29(4): 959–965.
- Wang Z W, Liu R X, Shi M M, *et al.*. Drought resistance of tobacco seedlings identified by weighting method at root extending stage [J]. *Southwest China J. Agric. Sci.*, 2016, 29 (4): 959–965.