

冷蒿抗氧化防御系统对机械损伤的响应

贾 丽¹, 刘盟盟¹, 张洪芹¹, 臧晓琳¹, 宝音陶格涛², 高 岩¹, 张汝民¹

(1. 浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 浙江 临安 311300; 2. 内蒙古大学 生命科学学院, 内蒙古 呼和浩特 010021)

摘要: 放牧对草地植物的直接影响包括动物的采食和践踏。为了探讨冷蒿 *Artemisia frigida* 的耐牧性, 采用人工机械损伤(轻度、中度和重度)的方式处理盆栽冷蒿地上枝叶, 分别测定冷蒿叶片和根系活性氧(ROS), 丙二醛(MDA), 抗坏血酸(AsA)和谷胱甘肽(GSH)质量摩尔浓度, 同时测定了抗氧化防御酶和抗坏血酸(AsA)-谷胱甘肽(GSH)循环酶活性的变化。结果表明: 随着机械损伤强度的增加, 冷蒿叶片超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)和过氧化氢(H_2O_2)质量摩尔浓度升高, 膜质过氧化增强; 超氧化物歧化酶(SOD), 过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)活性随机械损伤强度的增加而升高。在轻度和中度处理下, 冷蒿叶片中抗坏血酸过氧化物酶(APX), 脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR), 单脱氢抗坏血酸还原并(MDHAR)和谷胱甘肽还原酶(GR)活性增强, 抗氧化剂(AsA 和 GSH)的还原力(ρ_{AsA}/ρ_{DHA} 值和 ρ_{GSH}/ρ_{GSSG} 值)处于稳定平衡状态; 重度机械损伤下 AsA-GSH 循环效率显著降低($P \leq 0.05$)。冷蒿根系抗氧化防御系统对机械损伤也表现出明显的应激反应能力。综上所述, 机械损伤使冷蒿体内 ROS 质量摩尔浓度升高, 且冷蒿能够在不同程度的机械损伤下快速、有效地启动体内抗氧化防御系统, 清除体内过量的 ROS, 维持一定的 AsA-GSH 循环效率, 表现出较强的耐损伤能力。图 4 表 1 参 42

关键词: 植物学; 冷蒿; 抗氧化酶; 抗坏血酸-谷胱甘肽循环; 机械损伤; 活性氧类

中图分类号: S812.6; Q946

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2016)03-0462-09

Antioxidant defense system responses of *Artemisia frigida* to mechanical damage

JIA Li¹, LIU Mengmeng¹, ZHANG Hongqin¹, ZANG Xiaolin¹, Baoyintaogetao², GAO Yan¹, ZHANG Rumin¹

(1. The Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 2. College of Life Science, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, Inner Mongolia, China)

Abstract: To understand the effects of mechanical damage on the antioxidant defense system of *Artemisia frigida*, we analyzed the changes of reactive oxygen species (ROS) level, antioxidant enzyme activities, and ascorbate-glutathione (AsA-GSH) cycle efficiency under light, moderate, and heavy mechanical damage. Results showed that with a mechanical damage treatment, the $O_2^{\cdot-}$ production rate, H_2O_2 , and malondialdehyde (MDA) content increased significantly ($P \leq 0.05$) in leaves and roots of *A. frigida* and was significantly lower ($P \leq 0.05$) in roots than in leaves. Also, activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and peroxidase (POD) were significantly higher ($P \leq 0.05$) with the mechanical damage treatment compared to the control. The activities of ascorbate peroxidase (APX), monodehydroascorbate reductase (MDHAR), dehydroascorbate reductase (DHAR), and glutathione reductase (GR), as well as regenerating rates of AsA and GSH, and redox statuses (ratios of AsA/DHA and GSH/GSSG) with light and moderate mechanical damage were not signifi-

收稿日期: 2015-03-20; 修回日期: 2015-04-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31270756, 31470704); 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)项目(2014CB138805); “十二五”国家科技支撑计划项目(2011BAC07B01)

作者简介: 贾丽, 从事植物生理生态研究。E-mail: lnbx1986@163.com。通信作者: 张汝民, 教授, 博士, 从事植物生理生态研究。E-mail: ruminzhang@sohu.com

cantly different ($P \geq 0.05$) from the control; whereas compared to the control efficiency of the AsA-GSH cycle was significantly lower ($P \leq 0.05$) with heavy mechanical damage. The antioxidant defense system in roots of *A. frigida* also showed obvious stress in response to mechanical damage capacities. It was concluded that with light and moderate mechanical damage *A. frigida* had an efficient metabolism in the ascorbate-glutathione cycle, which rapidly scavenged H_2O_2 to alleviate the oxidative damage and, therefore, had a stronger tolerance to mechanical stress damage. [Ch, 4 fig. 1 tab. 42 ref.]

Key words: botany; *Artemisia frigida*; antioxidant enzyme; AsA-GSH cycle; mechanical damage; ROS

放牧是天然草地最主要的利用与管理方式,影响草地生态系统植被结构和功能^[1],并可能引起草地养分状况的变化,导致草地荒漠化和贫瘠化。适度放牧能够增加草地生态系统的生物多样性和生产力^[2],过度放牧是威胁草地生态系统生物多样性和生产力的主导因素,特别是在干旱和半干旱地区^[3-4]。放牧对草地植物最大的影响在于牲畜采食和践踏造成的机械损伤。诸多研究表明:机械损伤可导致植物体内活性氧类(reactive oxygen species, ROS)水平显著升高,抗氧化系统由于 ROS 的影响表现出不同的响应机制^[5-6]。ROS 是植物正常生长过程进行有氧代谢的副产物,受到生物胁迫或非生物胁迫时,打破植物体内 ROS 生成与清除之间的动态平衡引起 ROS 积累,导致植物受到伤害^[7-8]。过氧化氢(hydrogen peroxide, H_2O_2)和超氧阴离子自由基(superoxide radical, $O_2^{\cdot-}$)是最重要的 ROS,其中 $O_2^{\cdot-}$ 是形成其他 ROS 的前体,作为前体比其本身对植物的伤害更具有毒性^[9]。ROS 的积累可加速细胞膜质过氧化,使细胞内丙二醛(malondialdehyde, MDA)水平升高,抑制抗氧化酶活性和抗氧化剂的水平,破坏生物膜的结构和功能^[10]。同时,ROS 作为信号分子,介导植物体内抗氧化酶基因的表达,增强超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD),过氧化氢酶(catalase, CAT)和过氧化物酶(peroxidase, POD)活性消除 ROS 的影响^[11]。除此之外,适度的胁迫环境可以启动植物体内抗坏血酸-谷胱甘肽循环(ascorbate-glutathione cycle, AsA-GSH cycle)。该循环中的抗坏血酸(ascorbate, AsA)和谷胱甘肽(glutathione, GSH)相耦联起作用,有效清除由于逆境胁迫而过多产生的 ROS^[12-14]。以羊草 *Leymus chinensis* 和大针茅 *Stipa grandis* 为主的内蒙古草原典型草原,在连续多年过度放牧压力下均可退化演替为以冷蒿 *Artemisia frigida* 为主的单一优势种群^[15-17]。近年来,对冷蒿的研究集中在冷蒿挥发性有机化合物^[18]、群落结构特征^[19-20]以及对土壤低磷环境适应性^[21]等方面,关于冷蒿的耐牧抗损伤机制鲜见报道。本研究从生理生化的角度出发,拟解决以下问题:①揭示机械损伤后冷蒿体内 ROS 产生状况;②阐明机械损伤对冷蒿体内抗氧化酶活性和 AsA-GSH 循环的影响;③探讨冷蒿叶片和根系对机械损伤响应的差异及相关性。上述研究旨在揭示冷蒿在不同牧压下的耐损伤机制,探讨冷蒿在不同机械损伤下的适应对策;同时为退化草地恢复、草地生物多样性保护以及可持续发展利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 采样地概况

供试材料冷蒿采自内蒙古自治区锡林浩特毛登牧场内蒙古大学草地生态学研究基地,地理位置为 $44^{\circ}10'2''N$, $116^{\circ}28'56''E$, 海拔 1 160 m。全年平均气温为 $-0.4^{\circ}C$, 最冷月(1 月)平均温度 $-22.3^{\circ}C$, 最热月(7 月)平均气温 $18.8^{\circ}C$, $\geq 0^{\circ}C$ 年积温为 $2\,410.0^{\circ}C$, $\geq 10^{\circ}C$ 积温为 $1\,597.9^{\circ}C$, 无霜期 91 d, 植物生长期为 150 d 左右。年降水量为 365.6 mm, 降水多集中在 6-8 月, 占年降水量的 80% 左右。本研究区域主要草原植物为羊草, 糙隐子草 *Cleistogenes squarrosa*, 克氏针茅 *Stipa krylovii*, 大针茅, 防风 *Saposhnikovia divaricata*, 冷蒿, 瓣蕊唐松草 *Thalictrum petaloideum* 和阿尔泰狗娃花 *Heteropappus altaicus* 等。土壤为栗钙土。

1.2 试验材料处理

2014 年 6 月中旬在采样地选取自然条件下生长健壮的返青期冷蒿植株, 栽植于盛有采样地原土的花盆中(直径 18 cm, 高 20 cm), 1 丛·盆⁻¹。盆栽苗置于浙江农林大学实验室温室中, 自然光照, 相对湿度为 $30\% \pm 2\%$, 白天温度为 $(25 \pm 2)^{\circ}C$, 夜晚温度为 $(20 \pm 2)^{\circ}C$ 。缓苗生长 20 d 后进行实验处理。选取株高一致、生长良好、无病虫害冷蒿 12 盆, 随机分为 4 组, 为模拟动物采食对冷蒿的伤害, 试验

以剪刀损伤冷蒿地上枝叶的方式处理冷蒿植株,损伤冷蒿地上枝叶 1/4 为轻度、损伤 1/3 为中度、损伤 1/2 为重度、不作处理为对照。3 盆·处理⁻¹,独立重复 1 个·盆⁻¹。在处理 6 h 后,对冷蒿叶片和根系分别取样,地上部分剩余枝叶全部剪碎混匀后取样,根系用清水洗去附着土壤,再用蒸馏水冲洗擦干后将整个根系剪碎混匀后取样。样品用液氮速冻后放置于-80 ℃低温冰箱内保存。

1.3 方法

1.3.1 ROS 和 MDA 质量摩尔浓度测定 O_2^- 测定参照 SHAH 等^[14]的氮蓝四唑法;过氧化氢测定参照 RAI 等^[22]的方法;MDA 测定参照 HODGES 等^[23]的方法。

1.3.2 抗氧化酶活性测定 酶液提取方法:取 0.2 g 冷冻样品液氮研磨,加 5 mL 磷酸缓冲溶液(50 mmol·L⁻¹, pH 7.8)匀浆,10 000 g 离心 10 min(4 ℃)。上清液用于 SOD, POD 和 CAT 活性的测定。SOD 活性测定参照 GIANNOPOLITIS 等^[24]的方法;CAT 和 POD 活性测定参照 KUMARI 等^[25]的方法。

1.3.3 AsA 和 GSH 质量摩尔浓度测定 AsA 和 GSH 测定参照 RAI 等^[26]的方法。

1.3.4 AsA-GSH 循环相关酶活性测定 抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)活性测定参照 NAKANO 等^[27]的方法;谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)活性测定参照 SCHAEDEL 等^[28]的方法;单脱氢抗坏血酸还原酶(monodehydroascorbate reductase, MDHAR)活性测定参照 HOSSAIN 等^[29]的方法;脱氢抗坏血酸还原酶(dehydroascorbate reductase, DHAR)活性测定参照 DOULIS 等^[30]的方法。

1.4 数据处理

所有的数据均为 3 次重复的平均值±标准误差,利用 Origin 8 软件(美国 OriginLab 公司)进行统计分析和作图。统计方法采用 One-Way ANOVA 进行检验,并进行 Tukey 多重比较($P<0.05$)。采用 Two-Way ANOVA 分析冷蒿组织×机械损伤处理之间相互作用的影响。

2 结果与分析

2.1 机械损伤对冷蒿 O_2^- , 过氧化氢和 MDA 质量摩尔浓度影响

随着损伤程度的增加,冷蒿叶片中 O_2^- 水平逐渐升高,重度损伤下达到对照 2.1 倍(表 1);在中度和重度损伤下,冷蒿根系 O_2^- 水平分别为对照的 2.4 倍和 2.8 倍。冷蒿过氧化氢水平随着处理强度的增强而增加,在轻度、中度和重度处理下,冷蒿叶片过氧化氢水平与对照相比显著升高 21.0%, 27.8%和 41.7%;冷蒿根系过氧化氢水平在中度和重度处理下分别比对照显著增加 27.0%和 56.0%。在轻度、中度和重度处理下,冷蒿叶片的 MDA 摩尔质量浓度分别比对照显著增加 28.7%, 82.8%和 107.7%,冷蒿

表 1 机械损伤对冷蒿 O_2^- , 过氧化氢和 MDA 质量摩尔浓度的影响

Table 1 Effect of mechanical damage on O_2^- , H_2O_2 and MDA content in *Artemisia frigida*

植物组织	机械损伤	O_2^- /(A540)/(min ⁻¹ ·g ⁻¹)	过氧化氢/(μ mol·g ⁻¹)	MDA/(μ mol·g ⁻¹)
叶片	对照(未处理)	24.72±3.94 B	22.86±0.47 C	10.05±0.46 C
	轻度	29.17±0.93 B	27.67±1.01 B	12.93±0.53 B
	中度	43.89±3.94 A	29.23±0.67 AB	18.37±0.22 A
	重度	51.67±3.63 A	32.39±0.94 A	20.88±1.53 A
平方和	组间自由度	1 422.45	141.79	220.23
	组内自由度	88.31	4.97	4.54
根系	对照(未处理)	11.67±1.48 b	16.37±0.56 c	8.06±1.2 b
	轻度	19.17±0.44 b	18.39±0.17 bc	10.74±1.01 a
	中度	28.06±2.28 a	20.79±0.94 b	11.94±0.37 a
	重度	33.06±1.73 a	25.52±0.10 a	12.13±0.49 a
平方和	组间自由度	809.43	139.94	31.69
	组内自由度	118.17	37.25	9.01
	机械损伤的影响	**	**	**
	植物组织的影响	**	**	**
	植物组织与损伤的交互作用	不显著	不显著	**

说明:同列不同大写字母表示冷蒿叶片的差异显著性,同列的不同小写字母表示冷蒿根系的差异显著性。

根系MDA 摩尔质量浓度分别比对照增加 30.5%, 48.1%和 50.1%。从各处理间差异显著性分析结果来看, 轻度处理后, 冷蒿叶片 H_2O_2 和 MDA 摩尔质量浓度显著高于对照, 说明冷蒿在机械损伤影响下遭受了 ROS 的伤害; 冷蒿叶片的 O_2^- 水平与对照相比无显著差异, 可能是由于 O_2^- 非常活泼, 作为其他 ROS 的前体被转化。虽然冷蒿叶片和根系的 ROS 和 MDA 水平都随损伤程度的增加而升高, 但冷蒿叶片中 ROS 和 MDA 摩尔质量浓度在中度和重度损伤之间的差异不显著, 说明冷蒿的 ROS 产生被抑制。冷蒿根系的 ROS 和 MDA 摩尔质量浓度显著低于叶片。这可能是由于机械损伤直接作用于冷蒿叶片, 对根系的影响较小。

2.2 机械损伤对冷蒿抗氧化酶活性的影响

冷蒿的抗氧化酶活性随处理强度的增加而增强(图 1)。在轻度、中度和重度处理下, 冷蒿叶片 SOD 活性与对照相比差异显著, 分别为对照的 1.4, 2.3 和 3.4 倍; 轻度处理下, 冷蒿根系的 SOD 活性与对照相比无显著差异, 中度处理下根系 SOD 活性比对照显著增加 80.1%, 但与轻度相比差异不显著, 重度处理下根系 SOD 活性比对照显著增加 140.0%, 但与中度相比差异不显著(图 1A); 且在各个处理下, 冷蒿叶片的 SOD 活性显著高于根系, 这可能由于机械损伤直接作用于冷蒿叶片, 对叶片和根系的抗氧化系统影响有所差异造成的。

冷蒿的 CAT 活性变化总趋势是随处理强度的增大逐渐增强(图 1B)。但冷蒿叶片的 CAT 活性在轻度处理与对照之间差异不显著, 中度处理与轻度处理之间差异不显著, 重度处理与中度处理之间差异不显著; 冷蒿根系的 CAT 活性 3 个处理之间的差异均不显著; 叶片的 CAT 活性显著高于根系, 说明冷蒿叶片和根系的抗氧化系统对机械损伤的响应是不同的。

在轻度、中度和重度处理下, 冷蒿叶片的 POD 活性分别比对照增加 30.6%, 87.3%和 132.8%; 冷蒿根系 POD 活性分别比对照增加 59.7%, 87.8%和 116.7%(图 1C); 冷蒿叶片和根系在各个处理间差异显著, 增幅明显, 说明 POD 因机械损伤的刺激活性增强, 在消除过氧化氢中起重要的作用。

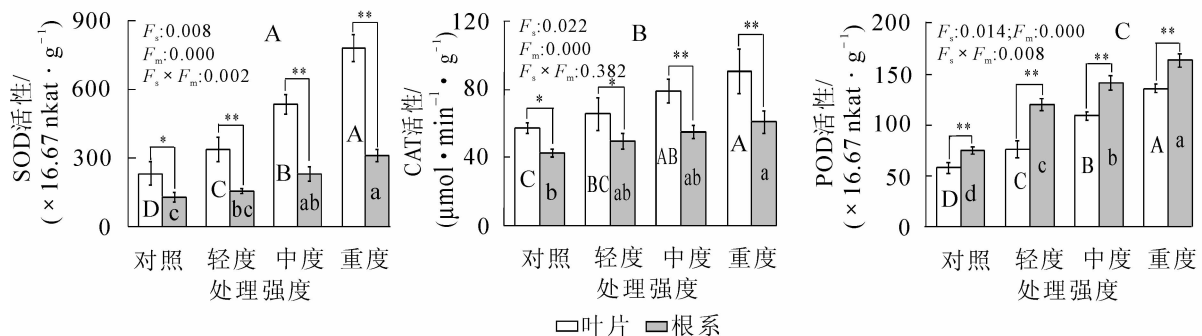


图 1 机械损伤对冷蒿抗氧化酶活性的影响

Figure 1 Effect of mechanical damage on activity of antioxidant enzymes in *Artemisia frigida*

2.3 机械损伤对冷蒿 AsA 水平的影响

冷蒿叶片和根系的 AsA 摩尔质量浓度随损伤程度的增加逐渐降低, 而脱氢抗坏血酸(dehydroascorbate, DHA)水平随机械损伤程度的增加逐渐增加, AsA/DHA 持续下降(图 2)。在重度处理下, DHA 摩尔质量浓度高于 AsA, $\rho_{\text{AsA}}/\rho_{\text{DHA}}$ 比对照降低 64.3%。在不同损伤程度下, 叶片的 DHA 摩尔质量浓度显著高于根系。

2.4 机械损伤对冷蒿 GSH 水平的影响

冷蒿叶片和根系的总谷胱甘肽水平随损伤程度的增加而缓慢增加(图 3)。轻度处理下, 冷蒿叶片 GSH 摩尔质量浓度与对照相比差异不显著, 中度处理下, 叶片 GSH 摩尔质量浓度与对照相比显著下降 23.3%; 与叶片不同, 冷蒿根系 GSH 水平在不同处理间的差异不显著。除对照外, 在轻度、中度和重度损伤强度下, 冷蒿叶片和根系之间的 GSH 水平差异不显著。冷蒿叶片的还原型谷胱甘肽(GSSG)摩尔质量浓度随机械损伤强度的增加而显著增加, 在轻度、中度和重度处理下分别为对照的 2.2, 3.6 和 3.7 倍, 差异显著; 冷蒿根系 GSSG 摩尔质量浓度重度处理下比对照显著增加 46.6%。随机械损伤强度的增

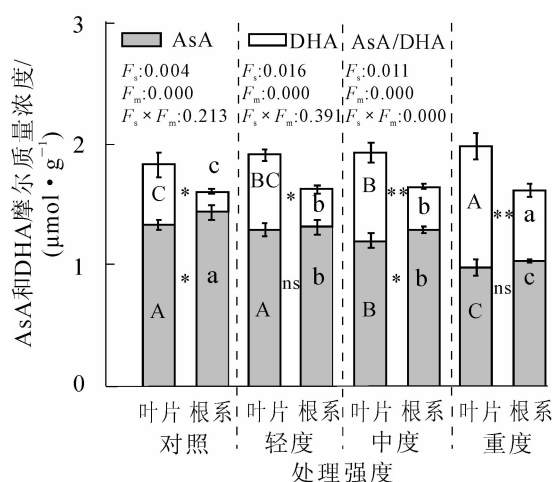


图2 机械损伤对冷蒿抗坏血酸水平的影响

Figure 2 Effect of mechanical damage on AsA content in *Artemisia frigida*

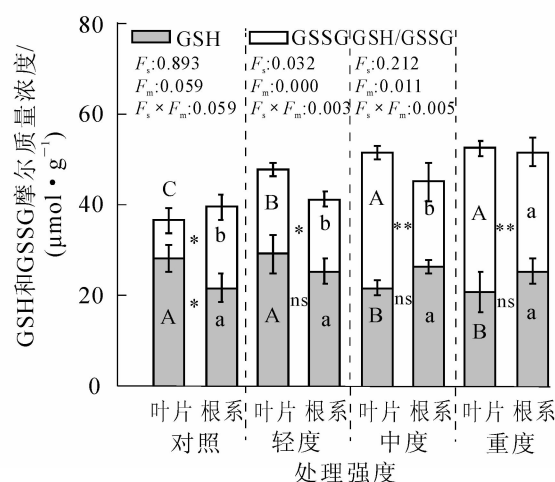


图3 机械损伤对冷蒿谷胱甘肽水平的影响

Figure 3 Effect of mechanical damage on GSH content in *Artemisia frigida*

加,在中度和重度处理下,冷蒿叶片与根系之间的GSSG摩尔质量浓度差异极显著。冷蒿叶片的 $\rho_{\text{GSH}}/\rho_{\text{GSSG}}$ 随机机械损伤强度的增加持续下降,在轻度、中度和重度处理下分别比对照降低56.8%,80.2%和82.2%,与轻度相比,中度和重度处理下的叶片 $\rho_{\text{GSH}}/\rho_{\text{GSSG}}$ 增幅明显减缓;冷蒿根系的 $\rho_{\text{GSH}}/\rho_{\text{GSSG}}$ 随机机械损伤强度的增加小幅增加后降低,重度处理下根系 $\rho_{\text{GSH}}/\rho_{\text{GSSG}}$ 比对照减少21.6%。根系的 $\rho_{\text{GSH}}/\rho_{\text{GSSG}}$ 在不同机械损伤强度之间差异不显著。

2.5 机械损伤对冷蒿AsA-GSH循环相关酶活性的影响

随着损伤处理程度增加,冷蒿叶片和根系的APX活性逐渐增加(图4A),在重度处理下与对照相比的增幅分别达到94.0%和132.8%;冷蒿叶片的APX活性显著高于根系。

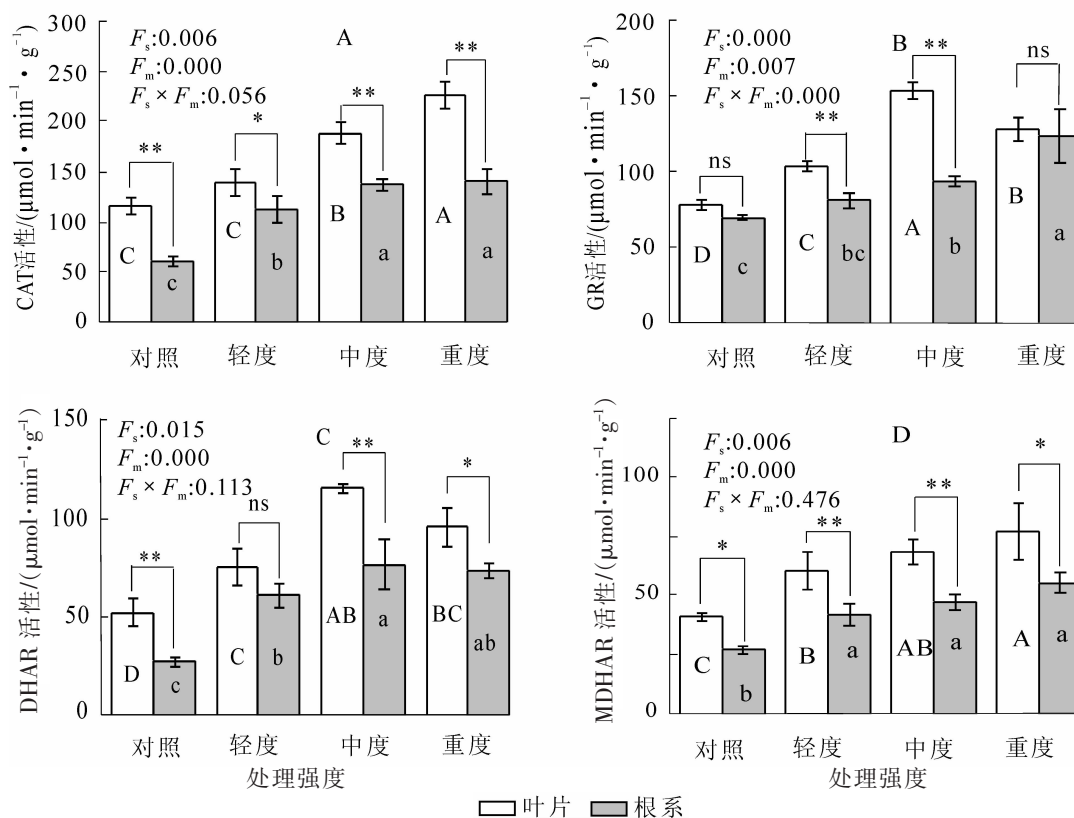


图4 机械损伤对冷蒿AsA-GSH循环相关酶活性的影响

Figure 4 Effect of mechanical damage on enzymes activity of AsA-GSH cycle in *Artemisia frigida*

冷蒿根系的 GR 活性随损伤程度的增加而增强(图 4B); 在中度处理下, 冷蒿叶片的 GR 活性高于其他处理, 与对照相比的增幅为 97.4%。在轻度和中度处理下, 叶片与根系之间的 GR 活性差异极显著; 重度处理下, 冷蒿叶片和根系之间的 GR 活性无显著差异。

在中度处理下, 冷蒿叶片和根系 DHAR 活性高于其他处理且差异极显著, 分别为对照的 1.3 倍和 1.9 倍(图 4C); 在重度处理下, 冷蒿叶片和根系的 DHAR 活性与对照相比增幅分别为 88.5%和 106.7%, 且叶片与根系之间差异显著。

随损伤程度的增加, 冷蒿叶片和根系的 MDHAR 活性逐渐升高(图 4D)。在重度处理下与对照相比的增幅分别为 88.5%和 106.7%, 冷蒿叶片的 MDHAR 活性显著高于根系。

3 讨论与结论

诸多研究表明: 机械损伤可导致植物体内 ROS 摩尔质量浓度显著升高, 抗氧化系统由于 ROS 的影响表现出不同的响应机制^[5-6]。胁迫往往使 ROS 和 MDA 摩尔质量浓度升高^[31], 抗氧化酶活性增强^[32]。冷蒿试验结果表明: 随机机械损伤强度的增加, 冷蒿体内 O_2^- 和 MDA 摩尔质量浓度升高, 冷蒿 SOD 酶活性逐渐增强, 由于 SOD 的作用, O_2^- 增幅明显减缓; 冷蒿体内过氧化氢水平随机机械损伤强度的增加逐渐升高, 过氧化氢的积累刺激冷蒿体内 CAT 和 POD 应激反应使活性增强, 由于酶系统的作用, 过氧化氢的增幅逐渐减缓。总之, 冷蒿在抗氧化酶防御系统作用下, 有效消除因机械损伤过量积累的 ROS, 使重度处理下的 ROS 水平与中度相比无显著差异。由于机械损伤处理直接作用于冷蒿的地上部分, 对叶片的抗氧化系统影响更大, 因此冷蒿叶片的 ROS 水平和酶活性明显高于根系。

维持细胞内较高的 ρ_{GSH}/ρ_{GSSG} 和 ρ_{AsA}/ρ_{DHA} 比值有利于维护植物体内的氧化还原环境, 减少胁迫所造成的 ROS 伤害^[33]。MAHALINGAM 等^[34]认为 AsA 再生系统受到胁迫产生 ROS 的不利影响, 导致 AsA 摩尔质量浓度下降。本试验表明: 随着机械损伤强度的增加, 冷蒿叶片中 AsA 和 GSH 摩尔质量浓度下降, DHA 和 GSSG 摩尔质量浓度上升, 与罗娅等^[35]研究结果一致; 在轻度和中度处理下, 冷蒿体内 ρ_{AsA}/ρ_{DHA} 与对照相比增幅不显著, 可能是因为冷蒿体内的 AsA 再生酶(MDHAR 和 DHAR)活性增加, 维持了 AsA 的摩尔质量浓度; 与李晓云等^[36]的研究结果相吻合。AsA-GSH 循环清除过氧化氢的能力依赖于 DHAR 和 GR 对还原型 AsA 和 GSH 库的维护作用^[37-38]。重度处理下, 冷蒿叶片 AsA 和 GSH 因清除过氧化氢而被消耗^[39]; 且冷蒿叶片 GR 和 DHAR 活性与中度处理相比有所下降, 不能提供充足 GSH 来减少 DHA, 使 ρ_{AsA}/ρ_{DHA} 降低。单长卷等^[40]研究认为, 严重胁迫下, 冰草叶片内 AsA-GSH 循环相关酶活性呈降低趋势。冷蒿根系 ρ_{AsA}/ρ_{DHA} 和 ρ_{GSH}/ρ_{GSSG} 在重度处理下显著高于叶片, 可能是由于 ROS 为了传递应激反应的信号而进行的精密调制并引导冷蒿根系 AsA-GSH 系统新平衡^[41-42], 因此在损伤胁迫下冷蒿根系 GSH 库在避免机械损伤中发挥更重要的作用。总之, 冷蒿体内的 AsA-GSH 循环通过增强相关酶活性维持抗氧化剂的再生, 在轻度和中度损伤胁迫下有效消除过氧化氢的同时保证细胞内氧化还原的平衡, 重度胁迫下由于根系 GSH 库的维护作用, 引导了冷蒿体内 AsA-GSH 系统新平衡。

综上所述, 随着机械损伤强度的增加, 冷蒿叶片中的 O_2^- 和过氧化氢摩尔质量浓度升高, MDA 摩尔质量浓度升高; 因机械损伤的刺激, 冷蒿叶片内的抗氧化防御酶活性逐渐增强; AsA-GSH 循环相关酶活性随机机械损伤强度的增加而增强, 通过维持非酶抗氧化剂 AsA 和 GSH 的再生, 保障冷蒿体内过氧化氢产生与消除之间的相对平衡; 冷蒿根系的抗氧化各项指标在机械损伤影响下的变化趋势与叶片相似, 但是变化幅度低于叶片。说明冷蒿可以在酶系统与非酶系统的共同作用下, 使 O_2^- 和过氧化氢摩尔质量浓度的增幅明显减缓, 有效消除机械损伤产生的 ROS 伤害, 具有较强的抗氧化能力。

4 参考文献

- [1] LI Yonghong, WANG Wei, LIU Zhongling, *et al.* Grazing gradient versus restoration succession of *Leymus chinensis* (Trin.) Tzvel. grassland in Inner Mongolia [J]. *Restor Ecol*, 2008, 16(4): 572 – 583.
- [2] McNAUGHTON S J. Grazing as an optimization process: grass-ungulate relationships in the Serengeti [J]. *Am Nat*, 1979, 113(5): 691 – 703.
- [3] AKIYAMA T, KAWAMURA K. Grassland degradation in China: methods of monitoring, management and restoration

- [J]. *Grassland Sci*, 2007, **53**(1): 1 – 17.
- [4] HAN J G, ZHANG Y J, WANG C J, *et al.* Rangeland degradation and restoration management in China [J]. *Range-land J*, 2008, **30**(2): 233 – 239.
- [5] 安钰, 沈应柏. 钙抑制剂对机械损伤胁迫下合作杨叶片活性氧代谢的影响[J]. 西北植物学报, 2011, **31**(9): 1823 – 1827.
- AN Yu, SHEN Yingbai. Effects of Calcium Inhibitors on reactive oxygen species metabolism in poplar leaves under mechanical damage stress [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 2011, **31**(9): 1823 – 1827.
- [6] 唐燕, 张继澍. 机械损伤对猕猴桃果实生理与膜脂过氧化的影响[J]. 中国食品学报, 2012, **12**(4): 140 – 145.
- TANG Yan, ZHANG Jishu. Influence of damages on kiwifruits of physiological index and membrane lipid peroxidation [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2012, **12**(4): 140 – 145.
- [7] GILL S S, TUTEJA N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2010, **48**(12): 909 – 930.
- [8] POLLE A. Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione-pathway in chloroplasts by metabolic modeling: Computer simulations as a step towards flux analysis [J]. *Plant Physiol*, 2001, **126**(1): 445 – 462.
- [9] WU Yuexuan, von TIEDEMANN A. Impact of fungicides on active oxygen species and antioxidant enzymes in spring barley (*Hordeum vulgare* L.) exposed to ozone [J]. *Environ Poll*, 2002, **116**(1): 37 – 47.
- [10] HEATH R L. Modification of the biochemical pathways of plants induced by ozone: what are the varied routes to change? [J]. *Environ Poll*, 2008, **155**(3): 453 – 463.
- [11] SHARMA P, JHA A B, DUBEY R S, *et al.* Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions [J]. *J Bot*, 2012, **2012**: 1 – 26.
- [12] RAO M V, HALE B A, ORMROD D P. Amelioration of ozone-induced oxidative damage in wheat plants grown under high carbon dioxide (role of antioxidant enzymes) [J]. *Plant Physiol*, 1995, **109**(2): 421 – 432.
- [13] ATHAR H R, KHAN A, ASHRAF M. Exogenously applied ascorbic acid alleviates salt-induced oxidative stress in wheat [J]. *Environ Exp Bot*, 2008, **63**(1): 224 – 231.
- [14] SHAH K, KUMAR R G, VERMA S, *et al.* Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings [J]. *Plant Sci*, 2001, **161**(6): 1135 – 1144.
- [15] 王伟, 刘钟龄, 郝敦元, 等. 内蒙古草原退化群落恢复演替的研究(I)退化草原的基本特征与恢复演替动力[J]. 植物生态学报, 1996, **20**(5): 449 – 459.
- WANG Wei, LIU Zhongling, HAO Duiyuan, *et al.* Research on the restoring succession of the degenerated grassland in Inner Mongolia(I) Basic characteristics and driving force for restoration of the degenerated grassland [J]. *Acta Phytoecol Sin*, 1996, **20**(5): 449 – 459.
- [16] 汪诗平, 李永宏, 王艳芬, 等. 不同放牧率对内蒙古冷蒿草原植物多样性的影响[J]. 植物学报, 2001, **43**(1): 89 – 96.
- WANG Shiping, LI Yonghong, WANG Yanfen, *et al.* Influence of different stocking rates on plant diversity of *Artemisia frigida* community in Inner Mongolia steppe [J]. *Acta Bot Sin*, 2001, **43**(1): 89 – 96.
- [17] 王伟, 刘钟龄, 郝敦元, 等. 内蒙古草原退化群落恢复演替的研究(II)恢复演替时间进程的分析[J]. 植物生态学报, 1996, **20**(5): 460 – 471.
- WANG Wei, LIU Zhongling, HAO Duiyuan, *et al.* Research on the restoring succession of the degenerated grassland in Inner Mongolia(II) Analysis of the restoring processes [J]. *Chin J Plant Ecol*, 1996, **20**(5): 460 – 471.
- [18] 左照江, 张汝民, 王勇, 等. 冷蒿挥发性有机化合物主要成分分析及其地上部分结构研究[J]. 植物生态学报, 2010, **34**(4): 462 – 468.
- ZUO Zhaojiang, ZHANG Rumin, WANG Yong, *et al.* Analysis of main volatile organic compounds and study of aboveground structures in *Artemisia frigida* [J]. *Chin J Plant Ecol*, 2010, **34**(4): 462 – 468.
- [19] 赵康, 宝音陶格涛. 季节性放牧利用对典型草原群落生产力的影响[J]. 中国草地学报, 2014, **36**(1): 109 – 115.
- ZHAO Kang, Baoyintaogetao. Effect of seasonal grazing use on productivity of grassland community [J]. *Chin J Grassland*, 2014, **36**(1): 109 – 115.
- [20] 李衍青, 孙英杰, 张铜会, 等. 科尔沁沙地不同演替阶段冷蒿群落的结构特征[J]. 应用生态学报, 2011, **22**(7): 1725 – 1730.

- LI Yanqing, SUN Yingjie, ZHANG Tonghui, *et al.* Structural characteristics of *Artemisia frigid* community at different succession stages in Horqin Sandy Land [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2011, **22**(7): 1725 – 1730.
- [21] 刘娜娜, 田秋英, 张文浩. 内蒙古典型草原优势种冷蒿和克氏针茅对土壤低磷环境适应策略的比较[J]. 植物生态学报, 2014, **38**(9): 905 – 915.
- LIU Nana, TIAN Qiuying, ZHANG Wenhao. Comparison of adaptive strategies to phosphorus-deficient soil between dominant species *Artemisia frigida* and *Stipa krylovii* in typical steppe of Nei Mongol [J]. *Chin J Plant Ecol*, 2014, **38**(9): 905 – 915.
- [22] RAI A C, SINGH M, SHAH K. Effect of water withdrawal on formation of free radical, proline accumulation and activities of antioxidant enzymes in ZAT12-transformed transgenic tomato plants [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2012, **61**(4): 108 – 114.
- [23] HODGES D M, DELONG J M, FORNEY C F, *et al.* Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds [J]. *Planta*, 1999, **207**(4): 604 – 611.
- [24] GIANNOPOLITIS C N, RIES S K. Superoxide dismutases(I) Occurrence in higher plants [J]. *Plant physiol*, 1977, **59**(2): 309 – 314.
- [25] KUMARI G J, REDDY A M, NAIK S T, *et al.* Jasmonic acid induced changes in protein pattern, antioxidative enzyme activities and peroxidase isozymes in peanut seedlings [J]. *Biol Plant*, 2006, **50**(2): 219 – 226.
- [26] RAI G K, RAI N P, RATHAUR S, *et al.* Expression of rd29A::AtDREB1A/CBF3 in tomato alleviates drought-induced oxidative stress by regulating key enzymatic and non-enzymatic antioxidants [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2013, **69**: 90 – 100.
- [27] NAKANO Y, ASADA K. HYDROGEN. Peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts [J]. *Plant Cell Physiol*, 1981, **22**(5): 867 – 880.
- [28] SCHAEDEL M, BASSHAM J A. Chloroplast glutathione reductase [J]. *Plant Physiol*, 1977, **59**(5): 1011 – 1012.
- [29] HOSSAIN M A, NAKANO Y, ASADA K. Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide [J]. *Plant Cell Physiol*, 1984, **25**(3): 385 – 395.
- [30] DOULIS A G, DEBIAN N, KINGSTON-SMITH A H, *et al.* Differential localization of antioxidants in maize leaves [J]. *Plant Physiol*, 1997, **114**(3): 1031 – 1037.
- [31] 陈善娜, 梁斌, 张蜀君, 等. 云南高原水稻幼苗的抗冷性与其活性氧清除系统的关系[J]. 云南植物研究, 1995, **17**(4): 452 – 458.
- CHEN Shanna, LIANG Bin, ZHANG Shujun, *et al.* The relationship between the cold resistance of rice seedlings in yunnan plateau and the scavenging systems of activated oxygen [J]. *Acta Bot Yunnan*, 1995, **17**(4): 452 – 458.
- [32] 高永生, 陈集双. 盐胁迫下镧对小麦幼苗叶片抗氧化系统活性的影响[J]. 中国稀土学报, 2005, **23**(4): 490 – 495.
- GAO Yongsheng, CHEN Jishuang. Effects of La³⁺ on antioxidant system in wheat seedling leaves under salt stress [J]. *J Chin Rare Earths*, 2005, **23**(4): 490 – 495.
- [33] ZENG Bin, WANG Feijuan, ZHU Cheng, *et al.* Effect of ascorbate-glutathione (AsA-GSH) cycle on Hg²⁺-tolerance in rice mutant[J]. *Acta Agron Sin*, 2008, **34**(5): 823 – 830.
- [34] MAHALINGAM R, JAMBUNATHAN N, GUNJAN S K, *et al.* Analysis of oxidative signalling induced by ozone in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant, Cell Environ*, 2006, **29**(7): 1357 – 1371.
- [35] 罗娅, 汤浩茹, 张勇. 低温胁迫对草莓叶片 SOD 和 AsA-GSH 循环酶系统的影响[J]. 园艺学报, 2007, **34**(6): 1405 – 1410.
- LUO Ya, THANG Haoru, ZHANG Yong. Effect of low temperature stress on activities of SOD and enzymes of ascorbate-glutathione cycle [J]. *Acta Horti Sin*, 2007, **34**(6): 1405 – 1410.
- [36] 李晓云, 王秀峰, 吕乐福, 等. 外源 NO 对铜胁迫下番茄幼苗根系抗坏血酸-谷胱甘肽循环的影响[J]. 应用生态学报, 2013, **24**(4): 1023 – 1030.
- LI Xiaoyun, WANG Xiufeng, LÜ Lefu, *et al.* Effects of exogenous nitric oxide on ascorbate-glutathione cycle in tomato seedlings roots under copper stress [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2013, **24**(4): 1023 – 1030.
- [37] HERNÁNDEZ J A, FERRER M A, JIMÉNEZ A, *et al.* Antioxidant Systems and O₂⁻/H₂O₂ production in the apoplast

- of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in Minor Veins [J]. *Plant Physiol*, 2001, **127**(3): 817 – 831.
- [38] DING Shunhua, LU Qingtao, ZHANG Yan, *et al.* Enhanced sensitivity to oxidative stress in transgenic tobacco plants with decreased glutathione reductase activity leads to a decrease in ascorbate pool and ascorbate redox state [J]. *Plant Mol Biol*, 2009, **69**(5): 577 – 592.
- [39] KUŹNIAK E, SKŁODOWSKA M. Differential implication of glutathione, glutathione-metabolizing enzymes and ascorbate in tomato resistance to *pseudomonas syringae* [J]. *J Phytopathol*, 2004, **152**(10): 529 – 536.
- [40] 单长卷, 韩蕊莲, 梁宗锁. 黄土高原冰草叶片抗坏血酸和谷胱甘肽合成及循环代谢对于旱胁迫的生理响应 [J]. 植物生态学报, 2011, **35**(6): 653 – 662.
- SHAN Changjuan, HAN Ruilian, LIANG Zongsuo. Responses to drought stress of the biosynthetic and recycling metabolism of glutathione and ascorbate in *Agropyron cristatum* leaves on the Loess Plateau of China [J]. *Chin J Plant Ecol*, 2011, **35**(6): 653 – 662.
- [41] FREI M, WISSUWA M, PARIASCA-TANAKA J, *et al.* Leaf ascorbic acid level-Is it really important for ozone tolerance in rice? [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2012, **59**: 63 – 70.
- [42] WANG Shuncaai, LIANG Dong, LI Chao, *et al.* Influence of drought stress on the cellular ultrastructure and antioxidant system in leaves of drought-tolerant and drought-sensitive apple rootstocks [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2012, **51**(2): 81 – 89.