

沙芥叶片活性氧和抗坏血酸对干旱胁迫的响应

庞杰, 郝丽珍*, 张凤兰, 赵鹏, 杨忠仁

内蒙古农业大学农学院, 内蒙古自治区野生特有蔬菜种质资源与种质创新重点实验室, 呼和浩特010019

摘要: 本文以沙生蔬菜——沙芥为材料, 研究干旱胁迫下其叶片内活性氧和抗坏血酸的积累规律和相互关系, 为沙生植物干旱胁迫下叶片内活性氧积累和利用提供理论依据, 也为植物干旱胁迫下抗坏血酸调控机制研究提供新的思路。结果表明, 随着土壤相对含水量的下降, 沙芥叶片内AsA、DHA、总AsA、HO·、 P_n 、 G_s 含量均呈下降的趋势, 而 O_2^- 、 H_2O_2 和MDA含量呈上升趋势; 同时总AsA与HO·含量极显著正相关, 与 H_2O_2 显著正相关, 与 O_2^- 显著负相关, DHA与HO·显著相关。

关键词: 干旱胁迫; 沙芥; 活性氧; 抗坏血酸

The Response of Active Oxygen Species and Ascorbic Acid in *Pugionium cornutum* (L.) Gaertn. Leaves to Drought Stress

PANG Jie, HAO Li-Zhen*, ZHANG Feng-Lan, ZHAO Peng, YANG Zhong-Ren

College of Agronomy, Inner Mongolia Agricultural University, Inner Mongolia Autonomous Region Key Laboratory of Wild Peculiar Vegetable Germplasm Resource and Germplasm Enhancement, Huhhot 010019, China

Abstract: The dynamic change of active oxygen species (ROS) and AsA content in *Pugionium cornutum* (L.) Gaertn. leaves and possible correlation between them under drought stress were analyzed, which would provide basis for understanding the accumulation and utilization of ROS and new idea for the regulation mechanism of ascorbic acid of psammophytes under drought. The results showed that the content of AsA, DHA, total AsA, HO·, P_n and G_s of *Pugionium cornutum* (L.) Gaertn. decreased, while the content of O_2^- , H_2O_2 and MDA increased, along with the decrease of the soil relative water content. The correlation between ascorbic acid and several active oxygen species, such as HO·, H_2O_2 and O_2^- were very significantly positive, significantly positive and significantly negative, respectively, and significant correlation between HO· and DHA were also observed.

Key words: drought stress; *Pugionium cornutum* (L.) Gaertn.; ROS; AsA

随着全球变暖和局部地区干旱的加剧, 水分已成为荒漠地区植被恢复的主要限制因素, 深入探讨代表性植物在干旱条件下信号传递过程对植物抗逆研究有着重要的意义(李芳兰等2009)。在漫长的进化过程中, 植物为了适应恶劣环境形成了不同的信号传递网络(Divi等2010; Seo等2009; Sharp和LeNoble 2002; Yang等2003), 活性氧物质和抗坏血酸都是其中重要的中间体。活性氧(reactive oxygen species, ROS)是植物体有氧能量代谢的副产物(Lee等2012), 包括单线态氧(1O_2)、过氧化氢(H_2O_2)、羟自由基(HO·)和超氧阴离子(O_2^-)等(Mittler等2004)。在正常状态下植物体内活性氧产生和清除机制是动态平衡的, 但是该平衡状态会被一些逆境条件影响, 如干旱等(Lee等2012), 从而造成活性氧物质在植物体内的积累。早期的研究认为, 活性氧在逆境下的积累, 会造成植物体不可逆转的损伤(Apel和Hirt 2004)。然而近年来越来越

越多的证据表明活性氧是植物在逆境下的重要的信号物质(Miller等2010), 其可以通过调节促分裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)来调控具体的转录因子和蛋白激酶来增强植物的抗旱性(Thapa等2011; Tsugama等2012)。

抗坏血酸(ascorbic acid, AsA)作为一种重要的非酶类活性氧清除剂(Wheeler等1998), 主要被用来清除HO·和单线态氧(Akashi等2004), 同时AsA也是一些重要活性氧清除酶的辅酶, 还是植物激素、次生代谢产物合成和一些氨基酸残基羟基化

收稿 2012-11-02 修定 2012-12-20

资助 公益性行业(农业)科研专项(201203004)、国家自然科学基金(31160393、30860174和30260067)、内蒙古科技攻关项目(20050305和20060202)和内蒙古自然科学基金(2011BS0305和20080404MS0305)。

* 通讯作者(E-mail: Haolizhen_1960@163.com; Tel: 0471-4318467)。

过程的重要前体物质(刘永立等2006)。虽然关于AsA合成路径已有大量报道(刘永立等2006),但关于其合成调控机制研究却较少(Bartli等2005),尤其是在逆境条件下,AsA作为植物体的重要调节物质,其合成的多少直接关系到植物抗旱的一系列的生理生化反应。AsA可以清除植物体产生的活性氧物质,而活性氧物质是否可以影响抗坏血酸含量不得而知。

沙芥[*Pugionium cornutum* (L.) Gaertn.]为十字花科(Cruciferae)沙芥属(*Pugionium* Gaertn.)二年生草本植物,是中国的特有种(赵一之1999)。其生长于干旱、半干旱地区的固定和半固定沙丘上,是一种典型的沙生植物(Yu等2008),在防风固沙方面具有重要的生态价值。沙芥在漫长的进化中形成了可以适应沙漠干旱环境的生理生化机制,而在该机制中几种活性氧物质积累规律及活性氧物质含量和AsA含量之间的相互关系未见报道。因此本研究以沙生植物沙芥为材料,研究了干旱胁迫下,沙芥叶片内几种活性氧物质和AsA的积累情况及相互之间的关系,试图阐明沙芥在干旱胁迫下沙芥叶片内活性氧物质积累规律和其对AsA含量的影响。为沙生植物干旱条件下活性氧利用提供理论依据,也为植物干旱条件下AsA调控机制研究提供新的思路。

材料与方法

1 试验材料

沙芥[*Pugionium cornutum* (L.) Gaertn.]种子来自内蒙古自治区鄂尔多斯市毛乌素沙地周边。用2%次氯酸钠消毒10 min,培养皿中催芽,将发芽的种子播在装有600 g基质(沙子:腐熟的厩肥=4:1)的苗钵(12.5 cm×12.5 cm)中,每钵含9粒种子。取装有相同基质未播种的苗钵10盆,测定田间持水量(water holding capacity, WHC)。从播种到试验开始前,采用称重法保持苗钵内土壤含水量为70%~80% WHC (Hsiao 1973)。

2 实验设计

试验于植株6叶期开始,每钵保留大小一致、粗壮均匀的幼苗6株待用。试验采用完全随机设计,根据土壤含水量确定干旱胁迫程度。在试验开始前一天傍晚称重后灌水至70%~80% WHC,次

日开始试验,自然干旱。每天早晨7:00取样,每次取样后随机排列剩余苗钵。每天取4盆作为一个处理进行试验。取样首日作为对照。实验在内蒙古农业大学科技园区遮雨棚内进行。

3 测定指标及方法

AsA、DHA、总AsA采用Kampfenkel等(1995)的方法。HO·采用2-脱氧核糖法(王爱国和罗广华1995; Scopfer等2001)。H₂O₂采用四氯化钛法(Patterson等1984)。O₂⁻采用盐酸羟胺法(李忠光和龚明2005)。叶片含水量和土壤相对含水量采用烘干法。净光合速率(net photosynthetic rate, P_n)和气孔导度(stomatal conductance, G_s)采用Li-6400便携式光合仪测定,流速为500 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$,叶室温度为30 °C,测试选取晴天上午9:00~11:00进行,目标叶片为第3、4叶。

4 数据处理

采用SPSS19.0软件进行单因素Duncan检验方差分析和两变量Pearson correlation coefficient (单侧)相关性分析。

实验结果

1 干旱胁迫下沙芥叶片含水量、净光合速率、气孔导度的变化

如表1所示,随着土壤相对含水量下降,叶片含水量、净光合速率(P_n)、气孔导度(G_s)均呈下降的趋势。整个过程叶片含水量降幅近25%。土壤含水量从77.18%下降到15.82% WHC,叶片含

表1 干旱胁迫下沙芥叶片含水量、净光合速率、气孔导度的变化(平均数±标准误)

土壤含水量/%	叶片含水量/%	净光合速率/ $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	气孔导度/ $\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$
77.18	93.19±2.07 ^A	18.9±0.3 ^A	0.629±0.521 ^A
65.09	92.23±1.58 ^{AB}	18.7±0.3 ^A	0.645±0.564 ^A
38.68	91.72±1.41 ^{AB}	16.8±0.5 ^{AB}	0.504±0.378 ^A
15.82	92.69±2.26 ^{AB}	13.7±0.8 ^B	0.189±0.019 ^B
15.22	90.83±1.58 ^B	13.6±0.2 ^B	0.178±0.632 ^B
12.24	87.75±0.92 ^C	13.1±0.7 ^B	0.123±0.297 ^B
10.73	68.24±1.11 ^D	10.9±0.1 ^C	0.094±0.016 ^C

同一列中不同字母表示极显著差异水平($P<0.01$),表2、3同。

水量下降差异不显著($P<0.01$); 土壤含水量从15.22%下降到10.73% WHC, 叶片含水量之间差异极显著($P<0.01$)。土壤含水量从77.18%下降到38.68% WHC时, 沙芥叶片 P_n 和 G_s 下降均未达到极显著水平($P<0.01$); 土壤含水量从15.82%到12.24% WHC时沙芥叶片 P_n 和 G_s 差异不显著, 极显著($P<0.01$)低于土壤含水量从77.18%到38.68% WHC时, 极显著高于($P<0.01$)土壤含水量为10.73% WHC时。

表2 干旱胁迫下沙芥叶片抗坏血酸含量的变化(平均数±标准误)

Table 2 The dynamic change of leaf AsA in *Pugionium cornutum* (L.) Gaertn. seedlings under drought stress (mean±SE)

土壤含水量/%	抗坏血酸/mg·g ⁻¹ (DW)	脱氢抗坏血酸/mg·g ⁻¹ (DW)	总抗坏血酸/mg·g ⁻¹ (DW)
77.18	60.92±2.34 ^A	6.00±2.47 ^A	66.92±2.54 ^A
65.09	51.90±3.17 ^{BC}	2.41±1.24 ^B	54.31±3.37 ^{BC}
38.68	48.16±1.10 ^C	1.68±0.65 ^B	49.84±1.38 ^C
15.82	54.70±2.29 ^B	3.06±0.76 ^{AB}	57.76±2.56 ^B
15.22	55.68±2.30 ^B	2.73±0.29 ^{AB}	58.41±2.29 ^B
12.24	41.14±2.63 ^D	3.07±0.97 ^{AB}	44.21±2.67 ^D
10.73	12.74±2.11 ^E	0.55±0.23 ^B	13.29±2.23 ^E

3 干旱胁迫下沙芥叶片几种活性氧及丙二醛含量的变化

随着土壤相对含水量下降, O_2^- 呈先下降后上升的趋势。土壤含水量为65.09% WHC时 O_2^- 含量最低($P<0.01$); 土壤含水量从12.24%到10.73% WHC之间, O_2^- 含量间差异不显著, 却极显著高于其他含水量($P<0.01$)。

随着土壤含水量下降, $HO\cdot$ 呈下降的趋势, 在土壤含水量为77.18% WHC $HO\cdot$ 含量极显著高于其他处理($P<0.01$); 从65.09%到12.24% WHC时 $HO\cdot$ 含量差异不显著($P<0.01$), 10.73% WHC时 $HO\cdot$ 含量极显著低于其他处理($P<0.01$)。

随着土壤相对含水量下降, H_2O_2 含量呈先上升后下降的过程, 从15.82%到12.24% WHC间 H_2O_2 含量差异不显著, 却极显著高于其他处理($P<0.01$), 在10.73% WHC时极显著的低于其他各处理($P<0.01$)。

随着土壤含水量下降, MDA含量呈先上升后下降的趋势, 在土壤含水量为12.24% WHC时最高, 在土壤含水量为10.73% WHC时极显著低于其他各处理($P<0.01$)。

2 干旱胁迫下沙芥叶片抗坏血酸含量的变化

如表2所示, 随着土壤相对含水量的下降, 沙芥叶片AsA和总AsA含量变化呈倒S型曲线, 土壤含水量从77.18%到38.68% WHC, 沙芥叶片内2种抗坏血酸含量呈下降的趋势。15.82%和15.22% WHC时2种抗坏血酸差异不显著, 12.24%和10.73% WHC时2种抗坏血酸极显著下降($P<0.01$)。DHA在土壤含水量77.18% WHC时极显著高于其他处理($P<0.01$), 其余各含水量差异不显著。

4 干旱胁迫下各因素间的相关性分析

如表3所示, 共55对相关分析, 显著($P<0.05$)相关17对, 其中正相关11对, 负相关6对; 极显著($P<0.01$)相关12对, 其中正相关10对, 负相关2对。说明各项指标之间相互联系较为紧密。土壤含水量仅与 $HO\cdot$ 、 O_2^- 、 P_n 和 G_s 存在相关, 叶片含水量与土壤含水量、DHA含量、 G_s 无相关性, 与其余各项指标均相关。总AsA与3种ROS之间均存在相关性, 其绝对值由大到小的顺序为: $HO\cdot > H_2O_2 > O_2^-$ 。DHA与 $HO\cdot$ 显著正相关($P<0.01$) $r=0.879$ 。三种活性氧物质中, $HO\cdot$ 与各指标均为负相关, 与 O_2^- 达到显著水平($P<0.05$) $r=-0.778$, 与 H_2O_2 为达到显著水平, $HO\cdot$ 与 H_2O_2 之间未达到显著水平。 P_n 与叶片含水量、AsA及总AsA相关, 与土壤含水量和 $HO\cdot$ 极显著相关($P<0.01$), 与 O_2^- 极显著负相关($P<0.01$)。 G_s 与 O_2^- 显著负相关($P<0.05$), 与 $HO\cdot$ 显著相关($P<0.05$), 与土壤含水量和 P_n 极显著相关($P<0.01$)。

讨 论

1 干旱胁迫下沙芥叶片内活性氧物质产生机制

逆境条件下植物活性氧产生的原因可能是过

表3 干旱胁迫下沙芥叶片几种活性氧物质含量和丙二醛含量变化(平均数±标准误)

Table 3 The dynamic change of several active oxygen species and MDA content of *Pugionium cornutum* (L.) Gaertn. under drought stress (mean±SE)

土壤含水量/%	超氧阴离子/ $\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)	羟自由基/ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)	过氧化氢/ $\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)	丙二醛/ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)
77.18	0.194±0.006 ^{ABC}	29.083±1.194 ^A	0.148±0.006 ^{AB}	17.86±1.36 ^{AB}
65.09	0.139±0.005 ^C	20.384±1.356 ^B	0.111±0.003 ^B	17.54±1.66 ^{AB}
38.68	0.178±0.003 ^{BC}	14.219±1.468 ^B	0.119±0.007 ^B	15.38±1.28 ^B
15.82	0.205±0.007 ^{AB}	13.597±1.160 ^B	0.172±0.017 ^A	18.07±1.79 ^{AB}
15.22	0.237±0.005 ^{AB}	12.449±1.186 ^B	0.188±0.007 ^A	22.66±1.24 ^{AB}
12.24	0.253±0.008 ^A	14.388±1.598 ^B	0.165±0.013 ^A	32.05±1.65 ^A
10.73	0.255±0.009 ^A	1.635±0.116 ^C	0.035±0.001 ^B	3.43±0.86 ^C

表4 干旱胁迫下各因素间的相关性分析

Table 4 The correlation analysis between all elements under drought stress

	土壤含水量	叶片含水量	抗坏血酸	脱氢抗坏血酸	总抗坏血酸	超氧阴离子	羟自由基	过氧化氢	丙二醛	净光合速率
叶片含水量	0.474									
抗坏血酸	0.518	0.968**								
脱氢抗坏血酸	0.592	0.626	0.729*							
总抗坏血酸	0.537	0.958**	0.998**	0.772*						
超氧阴离子	-0.706*	-0.803*	-0.703*	-0.431	-0.693*					
羟自由基	0.851**	0.770*	0.808*	0.879**	0.834**	-0.778*				
过氧化氢	-0.032	0.792*	0.805*	0.590	0.803*	-0.367	0.462			
丙二醛	-0.489	-0.907**	-0.675	0.042	-0.582	0.200	-0.234	0.404		
净光合速率	0.950**	0.689*	0.686*	0.570	0.691*	-0.861**	0.882**	0.165	-0.575	
气孔导度	0.963**	0.544	0.541	0.442	0.545	-0.790*	0.788*	-0.032	-0.608	0.979**

**：在0.01水平(单侧)上显著相关；*：在0.05水平(单侧)上显著相关。

度还原了叶绿体(Mittler等2004)或线粒体(Davidson和Schiestl 2001)电子传递链中的氧原子,或者是膜脂过氧化反应(Bhattacharjee 2005)。对苹果(Liu等2012)、青甘杨(Lei等2006)、万寿菊(Tian等2012)等研究发现,随着干旱胁迫增加,植物体内的 O_2^- 和 H_2O_2 含量均大量增加,且耐旱型体内的活性氧积累低于不耐旱型。本文结果与之一致,随着干旱胁迫增加,沙芥叶片内 O_2^- 和 H_2O_2 含量呈增加趋势,含量低于苹果(Liu等2012)。本研究发现,沙芥叶片中 O_2^- 含量与 P_n 极显著负相关($P<0.01$),与 G_s 显著负相关($P<0.05$),与MDA含量不相关,表明沙芥叶片内的 O_2^- 可能来源于线粒体或叶绿体,而非膜脂过氧化反应。沙芥叶片内 H_2O_2 含量与 P_n 、 G_s 、MDA及几种活性氧之间无相关性,可能是由于沙芥在干旱胁迫下 H_2O_2 的产生机制与其他植物有差异,具体原因有待于进一步研究。

HO·是目前已知的氧化性最强的活性氧物质,

反应性极强,几乎可以和所有细胞成分发生反应,对机体危害极大(赵保路1999)。前人认为HO·有两种可能的产生途径(Bhattacharjee2005),一种是叶绿体和线粒体中电子传递链上的电子溢出还原了氧原子(Mittler等2004; Davidson和Schiestl 2001; Bhattacharjee 2005),本文结果发现沙芥叶片内HO·含量与 P_n 和 G_s 均相关,沙芥叶片内HO·可能来自这一途径。另一种是Halliwell (1982)在动物和微生物体内发现在一个低的AsA环境下铁盐及螯合铁盐可以催化 O_2^- 和 H_2O_2 生成HO·。本文发现,随着干旱胁迫增加,沙芥叶片中AsA含量也下降,处在一个较低水平,HO·含量与 O_2^- 含量负相关($P<0.05$),与 H_2O_2 含量无相关性,可能沙芥叶片内HO·产生路径不同于动物和微生物,有待进一步研究。刘玉英等(2006)研究发现茶树在干旱胁迫下HO·含量呈上升的趋势,沙芥与之相反,即随着干旱的加重,沙芥叶片内HO·含量呈下降的趋势,这

可能是沙芥能够适应沙漠环境的一个原因, 在干旱胁迫下避免产生强氧化性的活性氧物质, 降低氧化损伤的危害。

2 干旱胁迫下沙芥叶片内活性氧含量对AsA含量的影响

AsA是在清除活性氧的重要物质(刘永立等2006)。前人发现, 在植物体内AsA与 H_2O_2 反应生成水、MDA和DHA (Apel和Hirt 2004), 本文结果表明MDA、DHA含量与 H_2O_2 无相关相关性, 这与其研究结果不同, 可能AsA不是沙芥叶片在干旱胁迫下清除 H_2O_2 的主要物质, 杨冬艳(2005)研究结果表明, 干旱胁迫下沙芥叶片内几种 H_2O_2 清除酶呈先上升后下降的趋势。

Lei等(2006)研究发现 H_2O_2 和 O_2^- 可以作为第二信使, 诱导抗氧化系统如AsA含量的增加。本文发现, 沙芥叶片内 H_2O_2 含量与AsA含量显著正相关($P<0.05$), 这与其研究结果一致。而 O_2^- 含量与AsA含量显著负相关, 与Lei等(2006)研究结果不一致, 具体原因有待进一步研究。

生物体内并没有直接清除 $HO\cdot$ 的酶类, 其清除主要依靠非酶类抗氧化剂如AsA等(Akashi等2004), 本文发现干旱胁迫下沙芥叶片 $HO\cdot$ 含量与DHA含量极显著正相关($P<0.01$), 可能在沙芥叶片内 $HO\cdot$ 能够发生类似 H_2O_2 的氧化反应, 即 $HO\cdot$ 氧化AsA产生DHA的反应过程。同时 $HO\cdot$ 含量与AsA含量也存在相关性, 且 $HO\cdot$ 与AsA之间的相关性大于 O_2^- 和 H_2O_2 与AsA的相关性, 然而目前研究中仅在胚芽鞘、胚根、根生长及种子萌发等方面有 $HO\cdot$ 发挥信号作用的报道(Apel和Hirt 2004)。 $HO\cdot$ 是否也具有第二信使的作用, 是否也能诱导抗氧化系统如AsA含量的增加有待进一步研究。因此关于 $HO\cdot$ 与AsA在沙芥叶片相互作用应成为今后研究的一个重要方向。

参考文献

李芳兰, 包维楷, 吴宁(2009). 白刺花幼苗对不同强度干旱胁迫的形态与生理响应. 生态学报, 29 (10): 5406~5416
李忠光, 龚明(2005). 植物中超氧阴离子自由基测定方法的改进. 云南植物研究, 27 (2): 211~216
刘永立, 胡海涛, 兰大伟(2006). 维生素 C 的生物合成及其基因调控研究进展. 果树学报, 23 (3): 431~436
刘玉英, 王三根, 徐泽, 胡翔, 邓敏(2006). 不同茶树品种干旱胁迫下抗氧化能力的比较研究. 中国农学通报, 22 (4): 264~268
王爱国, 罗广华(1993). 羟自由基启动下的脱氧核糖降解及其产物

的TBA反应. 生物化学与生物物理进展, 20: 150~152
杨冬艳(2005). 干旱胁迫下沙芥(*P. cornutum*)与斧翅沙芥(*P. dolabratum*)幼苗生理生化应答反应及机理探讨[学位论文]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 20~23
赵一之(1999). 沙芥属的分类校正及其区系分类. 内蒙古大学学报(自然科学版), 30 (2): 197~199
赵保路(1999). 氧自由基和天然抗氧化剂. 北京: 科学出版社, 11~12
Akashi K, Nishimura N, Ishida Y, Yokota A (2004). Potent hydroxyl radical-scavenging activity of drought-induced type-2 metallothionein in wild watermelon. Biochem Biophys Res Commun, 323: 72~78
Apel K, Hirt H (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annu Rev Plant Biol, 55: 373~399
Bartli CG, Guiamet JJ, Kiddle G, Pastori GM, Cagon RD, Theodoulou FL, Foyer CH (2005). Ascorbate content of wheat leaves is not determined by maximal L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH) activity under drought stress. Plant Cell Environ, 28: 1073~1081
Bhattacharjee S (2005). Reactive oxygen species and oxidative burst: roles in stress, senescence and signal transduction in plants. Curr Sci, 89 (7): 1113~1121
Davidson JF, Schiestl RH (2001). Mitochondrial respiratory electron carriers are involved in oxidative stress during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol, 21: 8483~8489
Divi UK, Rahman T, Krishna P (2010). Brassinosteroid-mediated stress tolerance in *Arabidopsis* shows interactions with abscisic acid, ethylene and salicylic acid pathways. BMC Plant Biol, 10: 151
Halliwell B (1982). Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts is a feasible source of hydroxyl radicals *in vivo*. Biochem J, 205 (2): 461~463
Hsiao TC (1973). Plant responses to water stress. Ann Rev Plant Physiol, 24: 519~570
Kampfenkel K, Van MM, Inzè D (1995). Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. Anal Biochem, 225: 165~167
Lee S, Seo PJ, Lee HJ, Park CM (2012). A NAC transcription factor NTL4 promotes reactive oxygen species production during drought-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. Plant J, 70 (5): 831~844
Lei YB, Yin CY, Li CY (2006). Differences in some morphological, physiological, and biochemical responses to drought stress in two contrasting populations of *Populus przewalskii*. Physiol Plant, 127: 182~191
Liu B, Li M, Cheng L, Liang D, Zou YJ, Wang F (2012). Influence of rootstock on antioxidant system in leaves and roots of young apple trees in response to drought stress. Plant Growth Regul, 67: 247~256
Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler R (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. Plant Cell Environ, 33: 453~467
Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004). Reactive oxygen gene network of plants. Trends Plant Sci, 9: 490~498

- Partterson BD, Mackae EA, Ferguson IB (1984). Estimation of hydrogen peroxide in plant esteract using Titanium (IV). *Anal Biochem*, 139: 487~492
- Scopfer P, Plachy C, Flahry G (2001). Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radical, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellin, and abscisic acid. *Plant Physiol*, 125: 1591~1602
- Seo PJ, Xiang F, Qiao M, Park JY, Lee YN, Kim SG, Lee YH, Park WJ, Park CM (2009). The MYB96 transcription factor mediate abscisic acid signaling during drought stress response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 151: 275~289
- Sharp RE, LeNoble ME (2002). ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *J Exp Bot*, 53: 33~37
- Thapa G, Dey M, Sahoo L, Panda SK (2011). An insight into the drought stress induced alterations in plants. *Biol Plant*, 55 (4): 603~613
- Tian ZG, Wang F, Zhang WE, Liu CM, Zhao XM (2012). Antioxidant mechanism and lipid peroxidation patterns in leaves and petals of marigold in response to drought stress. *Hortic Environ Biotech*, 53 (3): 183~192
- Tsugama D, Liu S, Takano T (2012). Drought-induced activation and rehydration-induced inactivation of MPK6 in *Arabidopsis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 426 (4): 626~629
- Wheeler GL, Jones MA, Smirnoff N (1998). The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature*, 393: 365~369
- Yang JC, Zhang JH, Wang ZQ, Zhu QS, Liu LJ (2003). Involvement of abscisic acid and cytokinins in the senescence and remobilization of carbon reserves in wheat subjected to water stress during grain filling. *Plant Cell Environ*, 26: 1621~1631
- Yu QS, Zhang DY, Wan DS, Xu HY, Zhao CM (2008). Development of microsatellite DNA loci for *Pugionium dolabratum* (Brassicaceae), an endangered psammophyte. *Conserv Genet*, 9: 1019~1022