

Yang Zhou University
M.S. Master Dissertation

**Effects of Different Treatments on Plant Secondary
Metabolites of Dominant Pastures in Inner Mongolia
Grassland**

Candidate: Fei Yuan

Advisor: Prof. Shengmei Yang

Major: Cell Biology

College of Bioscience & Biotechnology, Yangzhou University

May, 2013

不同处理对内蒙古草原优势牧草 次生代谢产物含量的影响



研究生：袁 飞

导 师：杨生妹 教授

中 文 摘 要

内蒙古草原是我国最大的畜牧业生产基地，对我国社会经济有着举足轻重的影响。但是，近年来随着生产力发展，人类对草地不合理开发利用，过度放牧使草地退化，草原生态环境日益恶化，鼠害肆虐、沙尘暴等危害日益加剧，降雨增加也在一定程度上对内蒙古草原生态环境造成影响。本研究以我国内蒙古锡林郭勒草原的优势牧草：克氏针茅 (*Stipa krylovii* Roshev)、羊草 (*Leymus chinensis*)、糙隐子草 (*Cleistogenes squarrosa*) 以及苔草 (*Carex tristachya*) 为研究对象，进行人工模拟增雨、放牧以及添加鼠饲料处理，测定其中总酚、简单酚、单宁和缩合单宁含量变化的规律，探讨环境变化对牧草次生化合物代谢的影响；以人工种植的幼嫩羊草为研究对象，进行动物啃食、剪叶损伤以及剪叶后涂抹动物唾液处理，测定处理 1 小时、1 天、5 天以及 10 天后其酚类物质和 6-MBOA 含量的变化，比较不同损伤形式诱导的酚类物质和 6-MBOA 含量的变化差异及其时序性变化规律，探讨动物唾液在植物化学防御反应中的诱导作用，为动植物协同进化的机制研究提供理论依据。主要研究结果如下：

1、增雨处理下不同牧草中酚类物质含量变化规律有所不同。大增雨处理下，针茅简单酚含量较对照组显著减少 ($P<0.05$)。羊草经小增雨处理，总酚、简单酚、单宁以及缩合单宁含量均显著大于对照组 ($P<0.05$)；经大增雨处理，单宁含量显著大于对照组 ($P<0.05$)。苔草在大增雨处理下缩合单宁含量较对照组显著增加 ($P<0.05$)。增雨处理对隐子草酚类物质的含量均无显著影响。

2、不同放牧强度对针茅和隐子草酚类物质含量的影响并不显著，但羊草经放牧处理，总酚和单宁含量较对照组均显著增加 ($P<0.05$)，且与放牧程度成正比。苔草在轻牧处理下缩合单宁含量较对照组显著增加 ($P<0.05$)，重牧处理下简单酚含量较对照组显著增加 ($P<0.05$)。

3、围栏中投放鼠饲料，对针茅、隐子草和苔草中酚类物质含量的影响并不显著，但即使羊草中总酚的含量显著减少 ($P<0.05$)。

4、三种损伤处理对人工种植羊草的酚类物质含量有不同影响。处理 1 小时后，剪处

理使羊草总酚、简单酚和单宁含量较对照组显著增加 ($P<0.05$), 但啃食组的简单酚和缩合单宁含量明显降低 ($P<0.05$)。处理 1 天后, 剪处理组缩合单宁含量与涂处理组和啃食组总酚、单宁以及缩合单宁含量均低于对照 ($P<0.05$)。处理 5 天后, 与对照组相比, 剪处理组总酚、简单酚和单宁含量显著增加 ($P<0.05$), 但涂处理组总酚、单宁和缩合单宁含量及啃食组总酚和单宁含量显著降低 ($P<0.05$)。处理 10 天后, 剪处理组和啃食组缩合单宁含量、涂处理组总酚、单宁以及缩合单宁含量均显著降低 ($P<0.05$)。重复测量方差分析显示, 剪处理组酚类物质含量显著大于涂处理组和啃食组 ($P<0.05$), 而涂处理组和啃食组没有显著差异。

5、三种损伤处理对人工种植羊草 6-MBOA 含量有也影响。处理 1 小时后, 仅涂处理组的 6-MBOA 明显升高。剪处理和涂处理 1 天、5 天和 10 天后羊草中 6-MBOA 一直高于对照 ($P<0.05$)。啃食 1 天、5 天后 6-MBOA 含量也明显升高, ($P<0.05$), 但 10 天后已无明显变化。重复测量方差分析显示, 剪处理组和啃食组羊草中 6-MBOA 含量无显著差异, 而涂处理组羊草中 6-MBOA 含量显著高于剪处理组和啃食组 ($P<0.05$)。

综上所述, 牧草在增雨处理下, 各自的酚类物质表现出不同变化趋势, 这与植物当时体内各酚类物质所占的比例有关。放牧处理会诱导羊草和苔草产生并积累酚类物质, 以抵御植食性动物的取食。添加鼠类食物使羊草中总酚的含量显著减少, 表明减缓取食压力会降低牧草次生化合物的合成。

剪叶、啃食以及涂抹唾液处理在短时间内都会导致人工种植羊草酚类物质含量降低, 但剪处理组和啃食组中酚类物质含量变化存在显著差异, 而涂处理组和啃食组的结果相似, 证明机械损伤和动物啃食会引起羊草不同的防御反应, 动物唾液可能是关键因素; 三种处理均能诱导羊草 6-MBOA 含量显著增加, 但是影响程度不同, 且不同时间段表现出不同的影响效应, 表明动物唾液可能是诱导羊草 6-MBOA 大量合成的一个主要因素。

关键词: 增雨; 放牧; 添加食物; 酚类物质; 6-MBOA

Effects of Different Treatments on Plant Secondary Metabolites of Dominant Pastures in Inner Mongolia Grassland

M.S. Candidate: Fei Yuan

Advisor: Prof. Shengmei Yang

Abstract

Inner Mongolia grassland is the largest animal husbandry production base in China. It plays an important role in our societal economy. However, in recent years, with the development of the productive forces, this grassland has become degraded under unreasonable utilization and overgrazing. The ecological environment of the grassland is deteriorating, rodents are overrun, dust storms and other hazards are increasing. What's more, the global warming and increased rainfall have also affected the ecological environment of Inner Mongolia grassland to some extent. So, in this study, some dominant pastures in Inner Mongolia, such as *Stipa krylovii* Roshev, *Leymus chinensis*, *Cleistogenes squarrosa* and *Carex tristachya* were used to analyse the impact of water addition, food amount and grazing on the content of their total phenols, simple phenol, tannins and CT(Condensed Tannins); Then, the planted *Leymus chinensis* was used to explore the sequential effect of mechanical damaged, *Microtus brandti* attack or daubing saliva of *Microtus brandti* after mechanically damaged on the content of phenolic compounds and 6-MBOA (6-methoxybenzoxazolinone) 1h, 1d, 5d or 10d after three treatments. The purpose of this study was to elucidate the influence of environment or wound on the metabolite of second compounds and the role of animal saliva in the plant chemical defense response. The result would provide evidence for co-evolution between animal and plant. The results were as follows.

1. Water addition resulted in different variation of content of phenolic compounds in different pastures. There was no significant change of the content of any of phenolic compounds in *Cleistogenes squarrosa* after all kinds of water addition. Under moderate watering, the simple phenol of *Stipa krylovii* Roshev decreased ($P<0.05$), but the tannins in *Leymus*

chinensis and *Carex tristachya* increased significantly ($P<0.05$). And the content of total phenols、 simple phenol, tannins and CT in *Leymus chinensis* were significantly higher than control group ($P<0.05$) under light watering.

2. Grazing had no significant effect on the content of phenolic compounds in both of *Stipa krylovii* Roshev and *Cleistogenes squarrosa*. However, with the increase of grazing intensity, the content of total phenols and tannins in *Leymus chinensis* were significantly higher than in control group ($P<0.05$). In *Carex tristachya*, the content of CT was significantly increased with light grazing ($P<0.05$), and the content of simple phenol was significantly increased with moderate grazing ($P<0.05$).
3. Providing fodder for the rodents in the field where the grasses grew didn't change the content of phenolic compounds in *Stipa krylovii* Roshev, *Cleistogenes squarrosa* and *Carex tristachya*. However, the content of total phenols was significantly reduced ($P<0.05$) in *Leymus chinensis* after fodder providing.
4. Three kinds of wound treatments had different effects on phenolic compounds in planted *Leymus chinensis*. The content of total phenols, simple phenol and tannins of cutting group was significantly higher than control ($P<0.05$), but the simple phenols and CT of grazing group was lower than control ($P<0.05$) 1h after treatments. One day after treatments, all of the total phenols, tannins and CT in daubing and grazing group were significantly lower than control , as well as CT in cutting group ($P<0.05$). Then, 5 days later, cutting increased total phenols, simple phenol and tannins in this grass ($P<0.05$), while daubing reduced its total phenols, tannins and CT ($P<0.05$), and grazing decreased its phenols and tannins ($P<0.05$). Finally, it was found that the amount of CT in cut and grazed plant, as well as the total phenols, tannins and CT in daubed plant was much lower than control 10 days after treatments ($P<0.05$). The Repeated Measures results have shown that the content of phenolic compounds of cutting group were significantly higher than daubing and grazing group ($P<0.05$), and there were no significant difference between grazing group and daubing group.
5. Wound also induced different change of 6-MBOA in planted *Leymus chinensis*. One hour after treatment, only the plants in daubing group had higher level of 6-MBOA immediately. The content of 6-MBOA of cutting and daubing group became significantly higher 1d , 5d

and 10d after treatments ($P<0.05$), same as the 6-MBOA of grazing group on 1st day and in 5th day after treatments ($P<0.05$). But there was no significant change of 6-MBOA in grazing group in 10th day after treatments. The Repeated Measures results showed that there was no significant difference of 6-MBOA between cutting and grazing group, while the content of 6-MBOA of daubing group were significantly higher than other two groups ($P<0.05$).

In summary, in field, the content of phenolic compounds in these pastures in Inner Mongolia varied differently to the change of water addition, maybe it was caused by the difference of proportion of phenolic compounds in them. Grazing could increase the content of phenolic compounds of *Stipa krylovii* Roshev and *Carex tristachya* significantly, this would be benefit to their resistance to the feeding of herbivorous animals followed. Providing fodder to rodents made the content of total phenols of *Leymus chinensis* decrease significantly, this meant that the pastures would reduce the syntheses of second metabolite when the grazing pressure they faced was abated.

Acutely, all of cutting, daubing and grazing could reduce the phenolic compounds of planted *Leymus chinensis*. But the response of cutting group was different from that of grazing and daubing group, which proved that, in this plant, the defense reaction induced by mechanical damage was much different from that caused by animal. Maybe the animal saliva was a key reason of this change; the difference of the increase of 6-MBOA among three treatments also suggested that animal saliva be the main factor to stimulate the plant to produce more 6-MBOA.

Key words: water addition; grazing; providing fodder; phenolic compounds; 6-MBOA

目 录

中文摘要	I
英文摘要	III
目录	VI
1 文献综述	1
1.1 动植物协同进化理论	1
1.1.1 植食性动物与植物之间的协同进化模式	1
1.1.2 协同进化对植物的影响	2
1.1.3 协同进化对动物的影响	3
1.2 植物次生代谢产物的定义及其种类	4
1.2.1 植物多酚及其研究现状	5
1.2.2 6-MBOA 简介及其研究进展	6
1.3 内蒙古草原简介	7
1.3.1 内蒙古草原的气候特征	7
1.3.2 内蒙古草原的植被概况	8
1.3.2.1 克氏针茅简介以及研究现状	8
1.3.2.2 羊草简介以及研究现状	9
1.3.2.3 糙隐子草简介及其研究现状	9
1.3.2.4 苔草简介及其研究现状	10
1.4 本研究的目的与意义	10
2 材料与方法	11
2.1 实验仪器	11
2.2 实验试剂	12
2.3 主要试剂配制	12
2.4 次生代谢产物的测定方法	13

2.4.1 单宁标准曲线的测定.....	13
2.4.2 总酚含量的测定.....	14
2.4.3 简单酚和单宁含量的测定.....	15
2.4.4 缩合单宁含量的测定.....	15
2.4.5 6-MBOA 含量的测定	15
2.4.6 数据处理以及统计分析.....	18
2.5 研究内容	18
2.5.1 不同处理后内蒙古草原优势牧草中次生代谢产物含量的测定.....	18
2.5.2 不同损伤处理后人工种植羊草中次生代谢产物含量的测定.....	19
2.5.2.1 羊草 6-MBOA 含量的测定.....	19
2.5.2.2 羊草总酚、简单酚、单宁以及缩合单宁含量的测定.....	19
3 结果	20
3.1 不同处理对内蒙古草原优势牧草次生代谢产物含量变化的影响	20
3.1.1 增雨处理对各牧草次生代谢产物含量的影响.....	20
3.1.1.1 增雨处理对针茅各次生化合物含量的影响	20
3.1.1.2 增雨处理对羊草各次生化合物含量的影响	21
3.1.1.3 增雨处理对隐子草各次生化合物含量的影响	21
3.1.1.4 增雨处理对苔草各次生化合物含量的影响	22
3.1.2 放牧处理对各牧草次生代谢产物含量的影响.....	23
3.1.2.1 放牧处理对针茅各次生化合物含量的影响	23
3.1.2.2 放牧处理对羊草各次生化合物含量的影响	24
3.1.2.3 放牧处理对隐子草各次生化合物含量的影响	25
3.1.2.4 放牧处理对苔草各次生化合物含量的影响	26
3.1.3 添加食物对各牧草次生代谢产物含量变化的影响.....	27
3.1.3.1 添加食物对针茅各次生化合物含量变化规律	27
3.1.3.2 添加食物对羊草各次生化合物含量变化规律	28
3.1.3.3 添加食物对隐子草各次生化合物含量变化规律	29

3.1.3.4 添加食物对苔草各次生化合物含量变化规律	30
3.2 不同损伤对人工种植羊草次生代谢产物含量变化的影响	31
3.2.1 不同损伤对羊草总酚含量变化的影响	31
3.2.2 不同损伤对羊草简单酚含量变化的影响	32
3.2.3 不同损伤对羊草单宁含量变化的影响	33
3.2.4 不同损伤对羊草缩合单宁含量变化的影响	33
3.2.5 不同损伤对羊草 6-MBOA 含量变化的影响	34
4 讨论	35
4.1 增雨处理对牧草酚类物质含量的影响	36
4.2 放牧处理对牧草酚类物质含量的影响	36
4.3 添加食物处理对牧草酚类物质含量的影响	37
4.4 不同损伤对人工种植羊草中酚类物质含量的影响	38
4.5 不同损伤对人工种植羊草中 6-MBOA 含量的影响	38
5 结论	39
参考文献	40
致 谢	48
扬州大学学位论文原创性声明和版权使用授权书	49

1 文献综述

1.1 动植物协同进化理论

在生物的进化过程中,生物间形成的相互关系,是物种赖以生存的根本,也是维护稳定环境的基础。认识和掌握物种间的相互关系,是生物科学研究领域的重要研究内容,也是实现社会可持续发展的需要。协同进化是相互作用的物种之间的互惠进化(王深柱和钦俊德,2007)。生物之间,特别是植物与植食性动物之间的协同进化已经成为生物进化、生态、遗传等学科关注的问题(王德利,2004)。

1.1.1 植食性动物与植物之间的协同进化模式

植物和植食性动物是生态系统中的两个重要组成部分。植物位于食物链的最底层,通过光合作用来产生营养物质以维持整个生态系统。动物直接或者间接以植物为食,植物面对自然选择压力,演化出了一系列防御机制(Jermy, 1980)。Swain等(1979)认为,恐龙的灭绝很可能是由于不能识别生物碱,在白垩纪晚期采食了富含生物碱的被子植物中毒,从而导致其灭绝。Brattsten(1992)提出,大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)行动迟缓有可能是因为采食了富含氰类化合物的箭竹(*Sinarundinaria nitida*),引起脑部长期缺氧所致。

Mode(1958)在研究植物与真菌性病原菌基因相互作用的种群遗传学模型中首次提出了协同进化(co-evolution)一词,但真正具有里程碑意义的协同进化理论是Ehrlich和Raven在研究粉蝶与植物之间相互作用时提出来的(Ehrlich and Raven, 1964)。这一理论倍受各生物学领域学者的关注。Thompson等(1989)提出了成对协同进化(pair wise coevolution)概念,指的是相互作用的两个或两个以上物种的相互适应反应;也可以指一个物种的性状因为另一物种性状的反应而进化,而后一物种这一性状本身又可作为前一物种性状反应而进化。描述捕食者和猎物,植食性动物和植物以及寄生者和宿主的协同进化基本上都属于这种模式,这种模式也称为专性协同进化(specific coevolution)。Futuyma(1989)建立了扩散协同进化(diffuse coevolution)理论。扩散协同进化解释了在生态学特征相近的两类物种中,一类物种对于另一类物种选择的互惠适应(reciprocal adaptation)。在漫长的协同进化过程中,很多植食性昆虫的食物选择使得禾本科植物产生了次生化合物,然而一些昆虫则通过进化,来适应禾本科植物形成的次生化合物。虽然扩散协同进化普遍存在于自然界中,但尚未对其进行详尽的描述。还有一些学者提出了躲避-辐射协同进化(escaperadical coevolution)概念、多样性协同进化(diversifying coevolution)

概念、平行分枝进化 (parallel cladogenesis) 概念、互惠进化概念等等。各国的学者对协同进化现象进行了深入研究, 并提出了协同进化的定义, 即一个物种的个体行为受到另一个物种的个体行为的影响而产生的两个物种在进化过程中发生的变化。

自然界中, 生态系统中的主要生物成分动物和植物之间的关系, 体现在它们之间相互制约与相互依存的协同进化。在环境的选择压力下, 一方面植物为了逃避各类植食性动物的采食而形成防御性的形态结构和生理生态适应机制; 而另一方面, 动物为了能尽可能多的获得食物和满足营养需求, 通过优化其采食以提高适合度。动物对植物的选择, 虽然受到多种因素如种间斗争、天敌等的影响, 但是起决定性作用的是植物的理化性质。在植物的理化性质中, 目前认为差异最大, 对植食性动物其决定性影响的是植物含有的种类繁多的次生代谢产物。它们具有种属特异性, 使植物产生特有的气味和味道, 影响动物或其他有机体的行为和生长 (Jaremo et al., 1999)。目前对于动植物之间协同进化的研究, 从研究对象来看, 主要集中在下列四个系统:

(1) 昆虫传粉系统——传粉是植物实现繁殖, 动物获得营养的过程。在自然界中, 百分之八十以上被子植物的传粉是由动物, 特别是昆虫完成的 (Li, 2001)。

(2) 昆虫诱导植物反应系统——昆虫采食植物后, 便能迅速诱导植物启动防御机制, 促使植物产生挥发性化合物或次生化合物 (Williams and Whithan, 1986; Ryan, 2001)

(3) 种子散布系统——被子植物多数以种子进行扩散繁殖。如果这一过程有昆虫、鸟类和大型植食性动物 (包括啮齿类动物) 等动物作为媒介, 就存在对种子本身形态、生理以及数量的选择 (Howe and Westley, 1986)

(5) 大型植食性动物与植物反应系统——目前关于牛、马、羊等对草本植物和木本植物的采食而引起的植物生理特征及动物行为适应对策的研究越来越多。虽然他们之间的相互关系受到一定的人为影响, 但是依然有很高的科研价值 (McNanghton, 1976; McNanghton, 1984; Paige, 1992; Strauss et al., 1999)。

1.1.2 协同进化对植物的影响

在自然界中, 任何一种植物一方面要与周围其他植物竞争营养、水分以及阳光, 另一方面还要受到微生物的感染以及植食性动物的采食。因此, 每种植物都应具有有效的防御机制, 以保证其自身的生存和繁殖 (Janzen, 1979)。植物为了防止植食性动物的采食, 不仅形成了坚硬的角质层、针、刺、钩等进行物理防御, 延长植食性动物的觅食时间, 降低植食性动物的觅食效率, 还能通过化学防御, 即产生次生物质来抑制动物的采食, 影响动物的消化、代谢以及生长等生理生态特征 (Harborne, 1991; David et al., 1997)。在植

食性动物和植物相互作用的过程中,植物的化学防御更为有效。对于植物的化学防御机制提出来的假设有:

(1) 低营养假设——植物通过降低营养成分含量或者提高次生化合物含量来降低自身质量,从而躲避降低植食性动物的采食 (Lundberg, 1990)。

(2) 可利用性资源假设——植物的质量型防御和数量型防御主要是由环境中的可利用资源所决定的。当环境资源有限时,植物形成以氮为基础的次生化合物,即质量型防御物质 (Coley, 1985)。

(3) 诱导防御假设——植食性动物的采食作用使得受损植物形成了物理防御和化学防御 (Baldwin, 1983; Karban and Myers, 1989)。

(4) 最优防御假设——植物体的防御进化与防御分配可以使得植物体的适合度达到最大,在动物采食的条件下,植物可以根据自身组织受损伤程度,以及受损伤的组织对植物适合度的重要性程度,来分配化学防御投入。自然界中,植物幼嫩组织比成熟组织含有更高的次生物质 (Herms and Mattson, 1992)。

(5) 生长分化平衡假说——植物组织中资源的分配是有差异的,正在生长的植物组织比已经分化的组织具有更高含量的防御性物质。不过,植物组织具有重新分配资源的特性,已分化的组织可以将防御性物质输送到生长组织。

1.1.3 协同进化对动物的影响

(1) 动物的行为适应

在自然界中,植食性动物在采食植物的过程中,会选择能满足其对营养因子需求的植物,与此同时也会摄入一定量的植物次生化合物。这些植物次生化合物不仅能影响动物的消化和代谢,还会影响植食性动物的食物选择和觅食行为。Tahvanainen 等 (1985) 发现,山地兔 (*Lepus timidus*) 喜欢采食植物次生化合物含量较低的幼嫩柳树枝叶,厌食次生化合物含量较高的老枝条,山地兔对柳树枝条的摄入量与枝条中酚类化合物的含量呈负的相关关系。Laycock (1988) 和 Harborne (1991) 认为植物含有的次生化合物使之具有特殊的口味。单宁酸有涩味,而类黄酮和生物碱则具有苦味。因此,植食性动物可根据植物的口味调整各类食物的摄入量,来降低植物次生化合物的相对摄入量。Provenza (1996) 等人研究认为,动物能将食物口味和食物摄入后的反馈加以联系,通过采食行为的改变来调整对各类食物的相对摄入量。

(2) 动物的生理适应

植食性动物能在其消化道将植物次生化合物形成络合物,从而降低其对动物的毒害作

用。有学者研究发现,小家鼠食用单宁酸食物 4d 以后,实验个体的腮腺重量比对照组增加了七倍,且唾液量增加(Freeland, 1985)。Brett (1994) 等人指出,植物次生化合物在动物消化道内可与其他物质形成非共价络合物,从而使其灭活或活性降低。而络合物活性低,难以被动物吸收,可经粪便排出体外(Hagerman, 1988; Hagerman and Robbins, 1993)。另外,植物次生化合物的化学性质随着环境温度、pH 等的改变而改变。动物可以通过改变自身消化道的环境来改变植物次生化合物的化学性质,以降低其作用。动物还可以通过过敏反应来防为自身,研究表明动物通常会避食引起过敏反应的物质(李俊年等, 2002)。

1.2 植物次生代谢产物的定义及其种类

植物的新陈代谢可以分为初生代谢(Primary metabolism)和次生代谢(Secondary metabolism),他认为初生代谢物是存在在所有植物中并能维持细胞必需生命活动。而植物次生代谢产物(Plant secondary metabolites, PSMs)是由植物初生代谢派生而来的,它是植物中一大类对于细胞生命活动或生长发育非必需的,但具有特殊生理功能的小分子有机化合物。次生代谢是植物在漫长的进化过程中对生态环境适应的结果,近来的研究发现,PSMs 并非可有可无,它在植物生命活动的许多方面都起着重要作用。随着 PSMs 在医药、食品、轻化工等领域的广泛应用,其种类、代谢途径和代谢机理等相关问题也越来越受到研究者的关注。

PSMs 通常在植物体内含量不等,并且有自己独特的代谢途径,PSMs 的产生和分布通常会有种属、器官、组织以及生长发育期的特异性。PSMs 种类繁多,化学结构迥异,目前已知的已达万余种。到目前为止,PSMs 的分类方法主要有一下三种:①根据化学结构分类,PSMs 可以分为酚类、萜类以及含氮化合物类这三大类;②根据结构特征和生理作用分类,PSMs 可以分为抗生素(植保素)、生长激素、维生素、色素、生物碱以及植物毒素等种类;③根据生物合成的起始分子不同分类,PSMs 可以分为萜类、生物碱、苯丙环类及其衍生物等种类。下面按第一种分类方法对 PSMs 进行概述。

(1) 酚类化合物

酚类化合物广泛地存在于苔藓、地钱、高等植物和微生物中,它主要包括黄酮类、简单酚类以及醌类等等。黄酮类是以苯色酮环为基础的具有 C_6 、 C_3 、 CH_6 结构的酚类化合物。根据三碳结构的氧化程度又可以分为花色苷类、黄酮类、黄酮醇类以及黄烷酮类等。简单酚类是含有一个被羟基取代苯环的化合物,它分布于植物的各种组织器官中,很多简单酚类化合物在植物防御中起重要作用,还有些成分具有调节植物生长的作用。醌类则是由苯式多环烃碳氢化合物(萘、蒽等)衍生的芳香二氧化合物,是植物主要呈色因子之一。

根据其环系统的不同又可以分为苯醌、萘醌和蒽醌。部分醌类具有抗菌抗癌等功效。

(2) 萜类化合物

萜类化合物是由异戊二烯单元组合成的化合物及其衍生物(肖崇厚, 1991), 所以也称为异戊间二烯化合物、萜烯类化合物或萜烯。根据所含异戊二烯的数目, 萜类化合物可以分为单萜、双萜、三萜和多萜, 其中由两个异戊二烯单元构成的萜称为单萜, 三个异戊二烯单元构成的萜称为倍半萜, 由四个异戊二烯单元构成的萜称为双萜, 其余依此类推。植物萜类广泛分布于植物的初生代谢和次生代谢以及微生物中。

(3) 含氮化合物类

绝大多数含氮化合物都是由普通氨基酸合成的, 主要包括生物碱、胺类、非蛋白氨基酸等等, 大多具有防御作用。生物碱是广泛存在于植物中的一类含氮次生化合物, 分子结构中有多种含氮杂环, 是一些药用植物的主要有效成分。胺类是 NH_3 中的 H 被不同基团被取代后的产物, 通常是由氨基酸脱羧基或醛转氨而产生。胺类广泛存在与植物中, 通常存在于花中, 具有臭味。非蛋白氨基酸是指那些不用来组成植物蛋白的氨基酸, 多存在于豆科植物中, 通常具有一定的毒性。因其和蛋白质氨基酸结构相似, 易被混入植物蛋白, 多数是代谢拮抗物。

1.2.1 植物多酚及其研究现状

植物多酚(Plant polyphenol), 又叫植物单宁(Vegetable Tannin), 是广泛存在于植物体内的一类多元酚类化合物。它是植物在进化过程中次生代谢产生的抑制防御性化合物, 是植物与环境相互作用的产物(史志诚, 1987)。单宁(Tannin)的相对分子量一般在 500~3000Da 之间, 它广泛存在于植物的叶片、表皮、未成熟的果子种皮以及一些受伤部分。根据单宁的结构特征, 将其分为水解单宁(Hydrolysable Tannin, HT)和缩合单宁(Condensed Tannin, CT)两大类。水解单宁是指由糖与有机酸聚合形成的低聚物, 其相对分子质量为 500~3000Da。水解单宁经酶或酸处理后可水解为单糖、没食子酸或逆没食子酸(何洪英等, 2001)。水解单宁具有很强的极性, 溶于水, 可与蛋白质分子中亲核基团形成共价结合, 形成不溶性复合物, 也可和金属离子等结合形成沉淀。缩合单宁化学结构相对复杂些, 是由黄酮类化合物缩合而成, 其相对分子质量为 1900-28000Da, 它结构较稳定, 一般不能水解, 但在酸性醇溶液中加热可水解生成花色素, 如花色素。缩合单宁骨架上不含糖, 有大量的酶参与缩合单宁的缩合过程, 在该过程中, 先形成二聚体, 再形成三聚体、四聚体或更高聚合物。天然单宁大多数属于缩合单宁(Upadhyaya, 1985)。

植物单宁含有丰富的羟基和羧基, 能与蛋白质反应产生沉淀从而降低饲料的消化率

(Birbal et al., 2003; Haslam, 1988)。对于牲畜来说,单宁会使饲料产生不良的味觉,从而影响家畜的采食量(Upadhyaya, 1985)。当饲料中单宁的含量较高时,会影响牲畜对蛋白质、纤维素、淀粉以及脂肪的消化,从而降低饲料的营养价值。单宁还能破坏菌膜组织,键合金属离子,降低微生物对硫的利用率,使微生物无法正常繁殖,减少了瘤胃微生物的数量,最终影响瘤胃的正常发酵功能(周明, 1996)。通常动物选择食物时,出现单宁中毒的可能性很小,口感和厌食效应可以调整动物的采食取向。但是当高单宁含量的食物是动物的唯一选择时,则会有中毒的可能,严重时甚至会引起牲畜死亡。有研究表明,美国和澳大利亚牲畜的死亡率与多酚的摄取一定关系。此前,单宁一直被作为饲料的抗营养因子研究,但后来的大量研究表明,饲料中含有一定量的单宁对动物(特别是反刍动物)亦有营养作用。单宁能与植物性饲料中的蛋白质结合,降低了该蛋白在瘤胃中的溶解度和表面活性,可以避免被瘤胃微生物迅速降解,从而提高蛋白质利用效率,而且还能降低瘤胃中泡沫的稳定性,防止臌胀病的发生(Rumbaugh, 1985; 刘志鹏等, 2003)。

1.2.2 6-MBOA 简介及其研究进展

6-MBOA 是 6-甲氧基-2-苯噁唑啉酮(6-methoxybenzoxazolinone)的简称。Koyama 等人(1995)首次从薏苡(*Coix lachryma*)根组织中发现并提取了 6-MBOA。之后,许多学者便开始对该化合物进行了研究。起初,科学家一直将 6-MBOA 作为植物的防御性化学物质来研究(Wahlroos et al., 1958; Klun et al., 1966; Argandona et al., 1981; 蒋金炜, 1986)。后来有科学家开始进行 6-MBOA 定量研究,Epstein 等(1986)研究了实验室条件下新鲜发芽的冬麦中 6-MBOA 含量变化规律,发现长时间光照和高温会减少冬麦中 6-MBOA 含量,苗龄越大,6-MBOA 含量越少。直到 Sanders 等(1981)发现 6-MBOA 能够启动山地田鼠的繁殖后,生态学家才开始对植物组织中 6-MBOA 的特性及其对动物繁殖的作用进行了大量的研究。

(1) 国外研究现状

上世纪 80 年代以前,发现了 6-MBOA 及其在植物中的特性,并研究了含有它的绿色植物对动物的繁殖作用。在放牧条件下,受损伤的植物组织所含的糖苷会被水解酶迅速水解为葡萄糖和配基(DIMBOA),但由于 DIMBOA 极不稳定,转而就会被降解为 6-MBOA(Klun et al., 1966)。

上世纪 80 年代,科学家们在实验室和野外条件下对 6-MBOA 促进动物繁殖的作用进行了一系列研究。Sanders 等(1981)对山地田鼠腹膜注射从小麦幼苗中提取的 6-MBOA, 24h 后,观察发现其卵泡数量增多,卵巢重量显著增大,且山地田鼠子宫重量对 6-MBOA

各种注射剂量具有不同的反应。

上世纪 90 年代, 学者们重点探讨了 6-MBOA 在动物亲代母体和子代间的传递过程。Frandsen 等 (1993) 对山地田鼠妊娠期和哺乳期 6-MBOA 的信息传递进行了系统研究, 结果表明, 山地田鼠 6-MBOA 繁殖信息传递的时期为妊娠期和哺乳期。

迄今为止, 有关 6-MBOA 信息传递及其作用机制的研究已有很多报道。Sanders 等 (1981) 的研究表明 6-MBOA 对切除卵巢的雌性山地田鼠没有作用, 因而可以推测 6-MBOA 不直接具有雌激素的功能。Grobner 等 (1987) 认为 6-MBOA 能促进繁殖, 是因为它具有与褪黑素结构相似, 能作用于褪黑素的受体, 阻碍褪黑素起作用, 且能够调控激素调节系统从而降低褪黑素的浓度, 使褪黑素不起抑制性腺的作用, 6-MBOA 通过卵巢间接作用于兔子宫。Rodríguez-DeLara 等 (2007) 经研究发现 6-MBOA 的作用位点是卵巢或垂体而不是松果体, 而且在雌兔哺乳期具有抗催乳素的作用。

(2) 国内研究现状

刘季科等 (1991) 对 6-MBOA 在北美田鼠亚科啮齿动物营养生态学中的研究进展进行了综述。刘力宽等 (1998) 综述了 6-MBOA 对植食性哺乳动物繁殖作用研究的国外进展。

总的说来, 有关 6-MBOA 的研究主要集中在 6-MBOA 对植食性动物的影响方面, 而植食性动物对植物中 6-MBOA 含量的影响以及不同植物中 6-MBOA 含量的时序性变化规律却鲜有报道。

1.3 内蒙古草原简介

1.3.1 内蒙古草原的气候特征

草原气候的共同特点是大陆性较强, 降水量较少, 气温的日较差和年较差都比较大。作为我国最大的草场和天然牧场, 内蒙古草原有着它独特的气候特征。内蒙古草原属于温带草原, 它是亚欧大陆温带草原生态系统重要组成部分之一。由于内蒙古草原的中东部受到东亚季风气候的影响, 而西部属于内陆气候, 因此内蒙古草原降水量自东向西、自南向北逐渐减少。受东亚季风气候的影响, 内蒙古地区的降水主要集中在夏季。因此, 在夏季, 有了水和热, 使得牧草生长较快。但是内蒙古草原的年降水量较少, 且变率大, 使得牧草产量很不稳定。内蒙古草原的年平均气温基本呈现南高北低的趋势, 且年较差很大, 夏季短促, 冬季严寒漫长, 无霜期短。内蒙古草原气候的另一个特点是太阳辐射强, 日照时数多。该地区全年太阳的总辐射量达 $4800\sim 6400\text{MJ}/\text{m}^2$, 是我国光能最丰富的地区之一。另外, 内蒙古草原多风, 尤其是在春季, 风沙天气特别多 (陈素华等, 2005)。

1.3.2 内蒙古草原的植被概况

特定的地理位置和复杂的气候条件,造就了地带性的草原植被。在本研究所在地锡林郭勒草原的植被组成中,主要是多年生丛生禾草,其次是根茎禾草,还有苔草类、葱类以及一些多年生杂类草。在大兴安岭西南角、锡林郭勒东部和东南部海拔 1300m 以上的高丘陵坡地以及火山锥体的坡麓地段,植被类型为以贝加尔针茅为建群的草甸草原,该地区地势高,年降水量约为 400mm,气候冷湿,湿润度 0.4~0.7 (中国科学院内蒙古宁夏综合考察队,1985)。草层高度约 50cm,盖度约 60%-70%,每平方约有植物 29-39 种。主要建群种和优势种有贝加尔针茅 (*Stipa baicalensis*)、羊草 (*Leymus chinensis*)、冰草 (*Agropyron cristatum*)、菊叶委陵菜 (*Potentilla acaulis*)、线叶菊 (*Folifolium sibiricum*) 等。而在锡林郭勒中部和西部,海拔在 1250m 以下的台地、丘陵宽谷以及塔拉上,则是以大针茅 (*Stipa grandis*)、克氏针茅 (*Stipa krylovii* Roshev) 和蒿类、羊草和小禾草为主体的典型草原 (陈佐忠等,2000)。

下面对研究区锡林郭勒草原的几种优势牧草作简单介绍。

1.3.2.1 克氏针茅简介以及研究现状

克氏针茅是多年生密丛型旱生禾草,是亚洲中部典型草原植被的主要建群种之一。在内蒙古草原上,克氏针茅一般在 4 月下旬开始返青,7 月末开始抽穗,到 8 月上旬开花,同月下旬陆续结果,9 月下旬植株开始枯黄。克氏针茅喜暖,抗旱,分布范围极广,在我国的内蒙古中东部、东北的辽河平原、华北北部、青藏高原、黄土高原以及新疆均有分布 (韩冰等,2010)。

克氏针茅是内蒙古草原植物的竞争优势者,近年来,许多学者以其为研究对象进行了不同科学领域和不同层次的研究。在草原上,影响针茅生长的主要因素就是水热因素和放牧干扰,有学者对此进行了研究。徐朋君等 (2006) 比较研究了大针茅、克氏针茅、短花针茅 (*Stipa breviflora* Griseb) 三种针茅的种子萌发特性,发现这三种针茅种子萌发的最适温度有差异。王艳芳等 (2006) 研究了内蒙古锡林郭勒草原五个地区的克氏针茅,分子比较了它们的超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD)、丙二醛 (MDA)、脯氨酸 (Pro) 等抗性生理指标,研究表明随着降水量的减少,克氏针茅中的 MDA 减少,而游离 Pro 含量和保护酶活性增加,在生理方面表现出了对环境的适应性,从而解释了克氏针茅有较强的耐旱能力的原因。贾美清等 (2009) 研究了内蒙古草原不同地理位置种群的克氏针茅种子对渗透胁迫响应,研究结果表明,不同种群克氏针茅种子的耐旱能力不同,它与生境有着密切关系,越是来自干旱地区的种子,其耐旱能力越是强。不少学者对放牧压力下克氏

针茅的适应性做了许多研究。白永飞等(1999)调查了牧压梯度对克氏针茅上涨和繁殖的影响,研究表明,长期过度放牧会使得克氏针茅株丛发生破碎和小型化,中度放牧干扰能保持克氏针茅的株丛大小以及生殖枝-营养枝比例适中。张昊等(2005)把放牧导致退化的克氏针茅群落作为对象,研究其种群的生殖数量、重量和生殖分配对水分变化的响应,结果表明随着水分的减少,生殖分配减少。

1.3.2.2 羊草简介以及研究现状

羊草,别名碱草,在系统上分类属于禾本科大麦族赖草属,多年生根茎禾草(王克平,1987)。羊草是亚欧大陆草原重要建群种之一,具有耐寒、耐旱、耐盐碱等特点,主要分布在我国的东北松嫩平原以及内蒙古高原,在河北、河南、陕西、山西、宁夏、青海、甘肃、新疆等地也均有分布。另外,羊草营养价值高,适口性良好,有牧草之王的美称,它既可作为草原区重要的野生优良牧草,又可作为建立人工草地和治理盐碱化草地的理想草种(王策箴,1981;王克平,1984)。

迄今为止,已有不少学者对羊草进行了生物学各个方面的研究,包括生态学、解剖学、抗性(主要集中在抗盐碱方面)、遗传育种等等。生态学方面,潘庆民等(2004)对羊草根茎中的贮藏性碳水化合物进行了研究,结果表明羊草根茎中的贮藏性碳水化合物主要包括果聚糖、蔗糖、葡萄糖、果糖和甘露糖醇;氮素添加量会显著影响羊草根茎中的贮藏性碳水化合物含量;氮素的添加时期也会显著影响羊草根茎中的贮藏性碳水化合物含量。解剖生物学方面,卫星等(2004)对羊草受精过程以及胚与胚乳的早期发育进行了研究,结果表明,羊草从授粉到合子分裂约为20小时,双受精作用属于有丝分裂前配子融合类型;其胚胎发育属于紫菀型,而胚乳发育属于核型胚乳。抗性方面,周婵等(2003)研究测定了NaCl、Na₂CO₃以及混合盐碱胁迫下灰绿、黄绿两个类型羊草植株含水率和水势等水分指标,结果表明两种羊草含水率和水势有显著差异;灰绿型羊草抗盐碱能力比黄绿型强。

1.3.2.3 糙隐子草简介及其研究现状

糙隐子草(*Cleistogenes squarrosa*)又名兔子毛,属多年生密丛小型旱生禾草,在地理成分上属于亚欧草原种,广泛分布于亚欧草原区,在我国,主要分布于东三省、内蒙古、河北、山西、甘肃、新疆等地。糙隐子草在东北和内蒙古草原,一般4月中旬返青,8月中旬盛花期,9月下旬开始枯黄。其生态分布十分广泛,从森林草原带到荒漠带都可以看到它的踪影,但它在草原带的分布是最广泛的。因此,它是适应性最强的牧草之一。

到目前为止,已有不少关于糙隐子草的报道。汪诗平等(2003)研究了气候变化和放牧活动对糙隐子草种群的影响,结果表明,随着气候变暖,糙隐子草种群生物量以及其在

种群中的比例都有所上升,而放牧加快了这一过程;在放牧使得土壤贫瘠的条件下,糙隐子草的养分利用率较高。马红彬(2008)研究了不同放牧强度下荒漠草原糙隐子草、芒草等五种牧草叶片 Pro、MDA、根系可溶性糖(WSS)、还原糖的含量以及 SOD、POD 和过氧化氢酶(CAT)三种保护酶活性的变化,结果表明,随着放牧强度的增加,荒漠草原的这五种牧草各生理指标均有不同程度的变化。沈洋等(2012)使用不同温度、不同浓度 KNO₃ 溶液以及预冷等处理,对糙隐子草等四种禾草种子进行打破休眠和促进萌发的研究,结果表明,糙隐子草发芽率低主要原因是种子活力低,用 KNO₃ 溶液处理能够显著提高其种子的生活率和发芽率。

1.3.2.4 苔草简介及其研究现状

苔草(*Carex tristachya*)是苔草属莎草科禾草,多年生旱生根茎型草本植物。一般生长于山地的阳坡,半阳坡。常常与针茅(*Stipa capillata*)、沟羊茅(*Festuca valesiaca*)和蒿属植物,一起组成了干草园或荒漠群落。草原苔草地下部分非常发达,地下生物量比地上生物量高,这也是它耐寒、耐旱、耐贫瘠的原因之一。苔草春季萌发早,5月开花,6月结果,秋季可以再生。在我国,苔草主要分布在东北、西北、华北和西南高山地区。

到目前为止,学者们关于苔草已经开展了许多不同领域的研究。在生理生态学方面,苔草属植物多生活在季节性积水的地方,忍耐着每年一次的淹水和干旱(Svejcar and Riegel, 1998)。它具有在水分不足的土壤中生存的特殊机制,包括增加气孔敏感度,减小气体的交换率,通过叶片衰老和脱落的方式来减小地上生物量,还能在根内形成通气组织或细胞间隙(Fagerstedt, 1992),使根系向通气性良好的地方生长(Bernard and Fiala, 1986),以增加自身养分运输,促进水和营养物质吸收,调节光合作用速率以及气孔导度等(Steed et al, 2002)。在种群遗传学方面,苔草属植物具有高度无性生殖的特性,长期以来一直被认为遗传水平较低(Mosquin, 1966)。Stenström(2001)分析了亚欧大陆北极沿岸4个莎草种群内的遗传变异,结果表明,种群内遗传变异与纬度有关,而与气候因素无关。

1.4 本研究的目的与意义

我国是一个草地面积广阔的国家,草地面积约四亿公顷,大概占到了国土面积的41%,内蒙古草原位居我国五大草原之首。随着生产力发展,人口数量增加,人们对草地的利用强度逐渐加大,且人类对草地不合理利用开发,使得现象越来越严重,加上气候因素,我国已有90%可利用天然草地发生了不同程度的退化。随着天然草地的日益减少,牲畜量的日益增加,用于放牧的天然草地还将进一步退化。草地的退化使得草原的生态环境日益

恶化，鼠害肆虐、气候旱化、沙尘暴等危害日益加剧。本研究选择的地点位于以我国内蒙古锡林郭勒草原东部的毛登牧场。本研究通过对草原上设置的围栏进行放牧、人工模拟降雨以及添加鼠饲料处理，测定该地优势牧草中重要的防御性次生代谢物——酚类物质含量变化的动态规律，探究不同放牧强度、不同降雨量以及添加食物对草原植被的影响，为提高这些牧草的利用率提供基础数据，为维护草原生态系统的稳定提供部分资料，从而为我国草原畜牧业的进一步发展提供可行方案，最终达到改良内蒙古草原，促进草原的可持续发展的目的。

不少学者研究发现，不同损伤形式诱导下植物体内的防御反应也存在差异，机械损伤、动物啃食能否诱导相同的防御反应，机械损伤能否完全替代动物啃食？本研究以人工种植的幼嫩羊草为研究对象，进行动物啃食、剪叶损伤以及剪叶后涂抹动物唾液处理，测定处理后 1 小时、1 天、5 天以及 10 天后其酚类物质含量的变化规律，确定幼嫩羊草面对动物啃食采取的化学防御短期效应，探究机械损伤和动物啃食能否导致相同的防御反应，并进一步探讨引起这种化学防御应答机制是否与动物的唾液有关，为解释羊草和植食性动物之间的协同进化理论提供新的资料。

6-MBOA 在国外已有不少研究，但多数研究都是针对促进植食性哺乳动物繁殖以及其具体机制而展开的，有关植食性动物对植物中 6-MBOA 含量影响以及其时序性变化规律的研究不多。本研究建立了高效液相色谱（High Performance Liquid Chromatography, HPLC）法测定 6-MBOA 含量的方法，为今后测定植物中 6-MBOA 含量提供了更加简便，更加精确的方法。本文研究不同处理对羊草中 6-MBOA 含量的影响及其时序性变化规律，为验证 6-MBOA 是草原植食性动物的繁殖启动因子假说提供理论依据。

2 材料与方法

2.1 实验仪器

仪器型号及名称	生产厂家
FA2004 电子天平	上海精密科学仪器有限公司
Delta 320 pH 计	METTLER TOLEDO
大功率恒温磁力搅拌器	常州国华电器有限公司
移液器	德国 Eppendorf
XW-80A 旋涡混合器	上海精科实业有限公司
KQ-500B 型超声波清洗器	江苏昆山市超声仪器有限公司

752N 紫外可见分光光度计	上海精密科学仪器有限公司
SHA-B 数显恒温振荡器	常州国华电器有限公司
粉碎机	天津泰斯特仪器有限公司
Agilent 1200 高效液相色谱仪工作站	安捷伦科技有限公司

2.2 实验试剂

化学试剂	生产厂家
单宁酸（分析纯，250g）	天津光复精细化工研究所
丙酮（分析纯，500mL）	国药集团化学试剂有限公司
Folin-Ciocalteu（福林）试剂（分析纯，50 mL）	北京鼎国昌盛生物技术有限公司
正丁醇（分析纯，500mL）	天津科密欧化学试剂有限公司
无水碳酸钠（分析纯，500g）	国药集团化学试剂有限公司
硫酸铁铵（分析纯，500g）	天津科密欧化学试剂有限公司
聚乙烯吡咯烷酮 PVP（分析纯，100g）	国药集团化学试剂有限公司
6-甲氧基-2-苯噁唑啉酮（色谱纯，250mg） (6-Methoxy-2(3H)-benzoxazolinone, 6-MBOA)	Alfa Aesar（天津）化学有限公司
盐酸（分析纯，500mL）	中国恒利制剂厂出品
柠檬酸（分析纯，500g）	上海苏懿化学试剂有限公司
TRIS-base（分析纯，500g）	SIGMA 公司
甲醇（色谱纯，4L）	国药集团化学试剂有限公司
乙腈（色谱纯，500mL）	国药集团化学试剂有限公司
异丙醇（分析纯，500mL）	上海苏懿化学试剂有限公司
哇哈哈纯净水	杭州哇哈哈集团有限公司

2.3 主要试剂配制

70%丙酮溶液：量取 700 mL 丙酮加入 300 mL 蒸馏水，并充分混匀即得。

Folin-Ciocalteu(1N)：准确量取 2N Folin-Ciocalteu 试剂加入等体积蒸馏水混合而成，保存在棕色瓶中，存放温度为 4℃，一般为金黄色，变成橄榄绿后不可使用。

20%Na₂CO₃ 溶液：准确称取 40g 无水 Na₂CO₃ 粉末，溶于 150 mL 蒸馏水中，定容至

200mL（需要注意的是，在定容的过程中要边加蒸馏水变混匀）。

单宁酸标准液：精确称取 25mg 单宁酸于 25mL 容量瓶中，加适量蒸馏水，超声溶解混匀，再加蒸馏水定容至 25mL，并用蒸馏水稀释 10 倍（现配现用）。

丁醇-盐酸试剂：准确量取 950mL 正丁醇，加入 50mL 浓 HCl（37%），混匀即可。

混合铁试剂（即 2N HCl 中含有 20%硫酸铁铵）：精确量取 16.6mL 浓 HCl 于容量瓶中，加蒸馏水定容至 100mL，得 2N HCl。准确称取 2g 硫酸铁铵溶于 2N HCl，混浴即可，配好的溶液需保存在棕色瓶中。

流动相 A：准确称取 TRIS-base 2.967g、柠檬酸 1.6812g，加适量超纯水搅拌溶解，调 PH 至 7.0，加超纯水定容至 1L，过水系 0.45μm 微孔滤膜。

流动相 B：精确量取甲醇 800mL 加乙腈 200mL，混匀，过有机系 0.45μm 微孔滤膜。

润洗液（10%异丙醇溶液）：准确量取 50mL 异丙醇，加超纯水定容至 500mL，过水系 0.45μm 微孔滤膜。

2.4 次生代谢产物的测定方法

2.4.1 单宁标准曲线的测定

按表 1 配制各浓度的标准液，并按表 1 加入相应的 1N Folin-Ciocalteu 试剂和 20%Na₂CO₃ 溶液，混匀，测 725nm 处的吸光值，重复五次，所得平均值如表 4 所示。

表 1 单宁酸标准液的配制方法

Table 1 Preparations of standard solutions for tannic acid

编号 Number	单宁酸溶液/mL Tannic acid solution	蒸馏水/mL Distilled water	福林试剂/mL Folin reagent	Na ₂ CO ₃ 溶液/mL Sodium carbonate solution	单宁酸/μg Tannic acid
1	0	0.50	0.25	1.25	0
2	0.02	0.48	0.25	1.25	2
3	0.04	0.46	0.25	1.25	4
4	0.06	0.44	0.25	1.25	6
5	0.08	0.42	0.25	1.25	8
6	0.10	0.40	0.25	1.25	10

表 2 单宁酸标准品浓度与吸光度的关系
Table 2 The relationship between absorbance and tannic acid standard concentration

编号	浓度 (μg/mL)	吸光值 (A ₇₂₅)
1	0	0
2	1	0.071
3	2	0.151
4	3	0.244
5	4	0.334
6	5	0.418

用 Excel2010 对表 2 中的数据作图，得单宁酸的标准曲线的回归方程为： $y = 0.085x - 0.0094$ （其中 y 是吸光值， x 是单宁酸标准液的浓度）， $R^2=0.9982$ ，结果表明，对照品在 0-5μg/mL 的浓度范围内与吸光度呈良好的线性，如图 1。

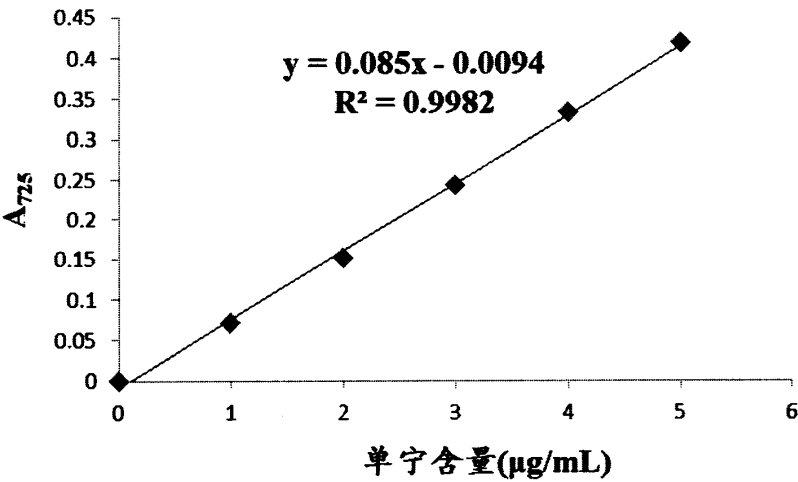


图 1 单宁标准曲线
Fig. 1 The standard curve of tannic acid

2.4.2 总酚含量的测定

将草原带回的草样放在 80℃烘箱 24h 后，用高能粉碎机粉碎成细小粉末，并用封口袋编号保存。

(1) 提取液的制备

准确称取草样粉末 0.1g 于 10 mL 离心管中，加入 5 mL 70%丙酮溶液，在室温下超声

处理 20min (10min 一次, 中间间隔 5min), 4℃, 3000rpm 离心 10min, 取上清保存在 4℃冰箱中。

(2) 总酚含量的测定

取 0.05mL 提取液于 2mL EP 管中, 加 0.45mL 蒸馏水, 然后加入 0.25mL 福林试剂, 再加入 1.25mL Na₂CO₃ 溶液, 混匀, 在恒温振荡器上 30℃振荡 30min 后, 用 752N 紫外可见分光光度计测 725nm 波长下的吸光度值, 根据标准曲线计算总酚含量。

2.4.3 简单酚和单宁含量的测定

(1) 简单酚含量的测定

准确称取 PVP 0.08g 于 2mL EP 管中, 加入 0.8mL 蒸馏水, 然后快速涡旋混合, 待 PVP 完全溶解以后, 加入 0.8mL 提取液, 涡旋 EP 管, 在 4℃下静置 15min 后, 再次涡旋, 接着 3000rpm 离心 15min, 取 0.5mL 上清于另一 2mL EP 管中, 加入 0.25mL 福林试剂, 再加入 1.25mL Na₂CO₃ 溶液, 混匀, 在恒温振荡器上 30℃振荡 30min 后, 3000rpm 离心 10min, 测定上清液 725nm 波长下的吸光度值, 根据标准曲线计算简单酚含量。

(2) 单宁含量的测定

单宁的含量=总酚的含量-简单酚的含量

2.4.4 缩合单宁含量的测定

精确量取 0.5mL 提取液于玻璃试管中, 加入 3.0mL 丁醇-盐酸试剂和 0.1mL 的混合铁试剂。用保鲜膜封住试管口, 并在保鲜膜上扎孔, 沸水浴 60min, 冷却至室温, 测定其在 550nm 处的吸光度值, 记作 A₅₅₀。若所测植物的 A₅₅₀ 大于 0.6, 需用 70%丙酮按一定倍数稀释提取液, 重新测定。缩合单宁含量的计算公式如下:

缩合单宁当量=(A₅₅₀×78.26×稀释因子)/Kg 鲜物质

(注: 稀释因子: 0.5mL/提取液用量)

2.4.5 6-MBOA 含量的测定

(1) 色谱条件

色谱柱: Alltima™C₁₈ 柱 (250mm×4.6mm, 5μm),

柱温: 26℃,

流速: 1.0mL/min,

流动相: (A) 49mM tris • base+16mM 柠檬酸; (B) 甲醇: 乙腈 (4:1),

梯度洗脱程序: 0~30min 8%~80%B, 30~33min 80%~8%B,

进样量: 20 μ L,

检测波长为: 288nm。

(2) 标准品溶液的制备

精确称取 6-MBOA 标准品 5.9mg, 溶于 10mL 50% 甲醇, 配制成质量浓度为 0.59mg/mL 的标准品母液, 摇匀, 过有机系 0.45 μ m 微孔滤膜, 备用。图 2 标准品的 HPLC 图谱。

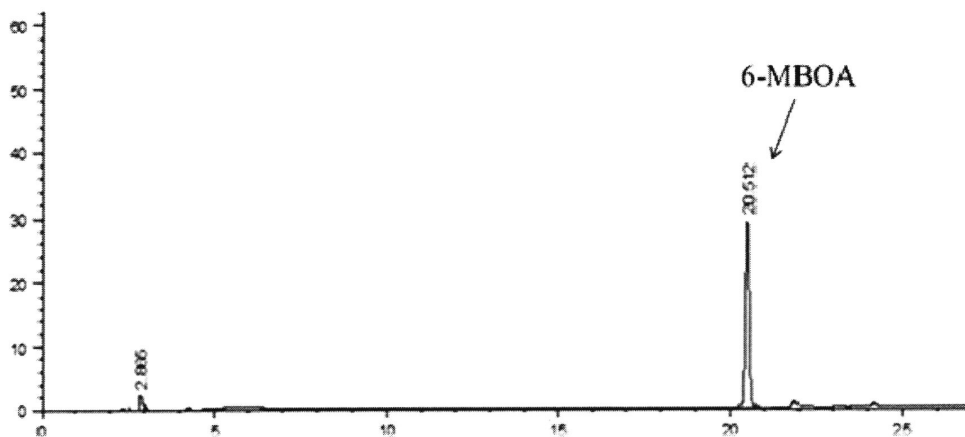


图 2 6-MBOA 标准品 HPLC 图谱

Fig. 2 The HPLC chromatogram of 6-MBOA

(3) 样品溶液的制备

称取羊草幼苗地上部分 0.5g, 剪碎置于研钵中, 加 5mL 超纯水研磨成浆, 移至离心管中, 静置 12h, 沸水浴 15min, 冷却后 10000rpm 离心 10min, 取上清液, 过水系 0.45 μ m 微孔滤膜, 备用。图 3 为羊草样品的 HPLC 图谱。

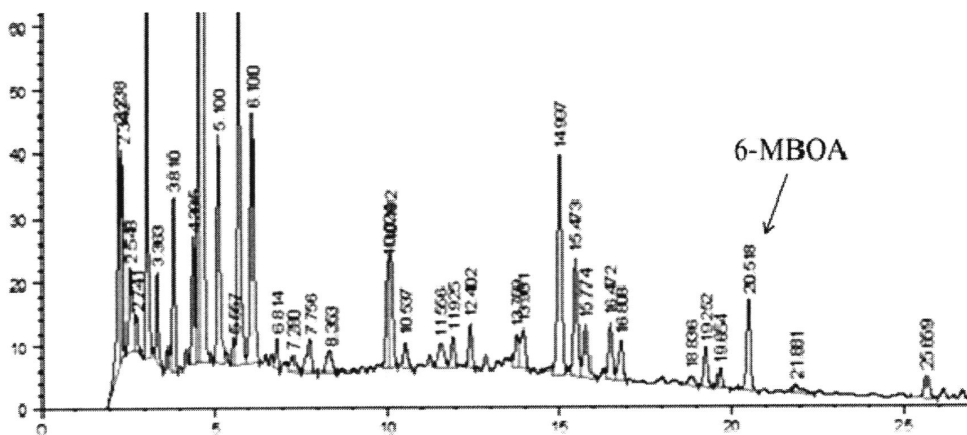


图 3 羊草样品 HPLC 图谱

Fig. 3 The HPLC chromatogram of sample (*Leymus chinensis*)

(4) 线性关系考察

精密量取 6-MBOA 标准品溶液适量, 用 50% 甲醇准确稀释成 0.59 $\mu\text{g/mL}$ 、2.95 $\mu\text{g/mL}$ 、5.9 $\mu\text{g/mL}$ 、11.8 $\mu\text{g/mL}$ 、23.6 $\mu\text{g/mL}$ 、47.2 $\mu\text{g/mL}$ 的系列标准品稀释液, 取各稀释液进样 20 μL , 记录峰面积。以峰面积为纵坐标, 进样量 (μg) 为横坐标, 求得 6-MBOA 的回归方程为 $y=48.635x+8.1549$, $r^2=0.9999$, 6-MBOA 在 0.0118~0.944 μg 范围内呈良好的线性关系, 如图 4。

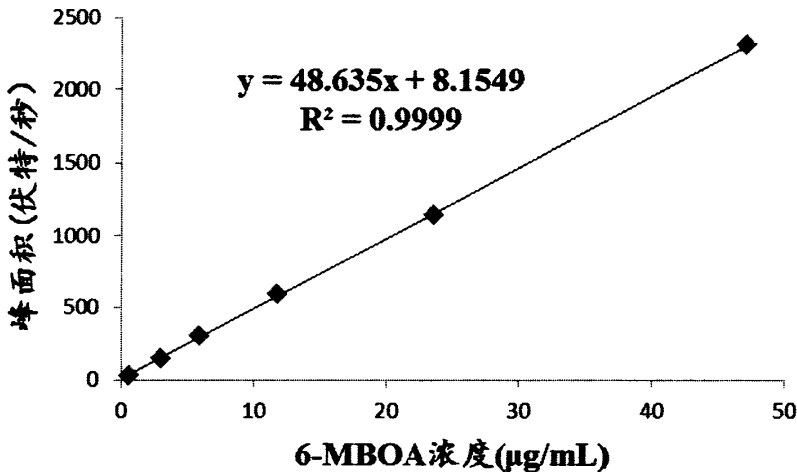


图 4 6-MBOA 标准曲线

Fig. 4 The standard curve of tannic acid

(5) 精密度试验

精密吸取同一标准品溶液, 进样 5.9 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的标准品溶液, 进样 20 μL , 连续进 5 次, 记录峰面积, 测得 6-MBOA 标准品峰面积的平均值为 298.68, 相对标准偏差 RSD 为 0.91% ($n=5$), 结果表明仪器的精密度良好。

(6) 稳定性试验

现配 6-MBOA 标准品溶液 72 $\mu\text{g/mL}$, 分别在 0h、1h、4h、12h、24h 进样 20 μL , 记录峰面积, 求得 6-MBOA 标准品峰面积平均值为 3407.21, 相对标准偏差 RSD 为 1.30% ($n=5$), 结果表明 6-MBOA 在 24h 内稳定性良好。

(7) 重复性实验

取相同苗龄, 相同长势的羊草 5 份, 每份 0.5g, 按照 (3) 的方法制备样品溶液 5 份, 进样 20 μL , 测得该羊草样品中 6-MBOA 的平均含量为 200.20 $\mu\text{g/g DM}$, 计算得 RSD 为 1.29%, 结果表明该方法的重复性良好。

(8) 回收率试验

精密吸取 150μL 按照 (3) 的方法制备样品溶液 9 份, 分别加入 80μL、100μL、120μL 浓度为 2.95μg/mL 的 6-MBOA 标准品溶液各三份, 混匀, 进样 20μL, 记录峰面积, 进行计算, 结果如表 3。

表 3 6-MBOA 加样回收率实验
Table 3 The average recoveries of 6-MBOA

编号	原样量(ng)	加标量(ng)	检测量(ng)	回收率(%)	RSD(%)
1	26.636	20.522	45.372	96.21	0.69
2	27.051	20.522	45.690	96.04	
3	27.898	20.522	45.993	94.99	
1	26.556	23.600	47.001	93.71	0.91
2	27.676	23.600	47.359	92.36	
3	26.662	23.600	47.212	93.93	
1	23.905	26.222	50.299	100.34	0.54
2	23.860	26.222	49.822	99.48	
3	23.811	26.222	49.707	99.35	

2.4.6 数据处理以及统计分析

采用软件 SPSS16.0 对实验数据进行处理, 利用 One-Way ANOVA、Repeated Measures、Independent-Samples T Test 等方法对不同处理组的差异进行比较, 确定不同处理对各牧草中不同次生代谢物含量的影响。并采用 Excel 结合 Sigmaplot 作图。

2.5 研究内容及方案

2.5.1 不同处理后内蒙古草原优势牧草中次生代谢产物含量的测定

选择一片草地分成 A、B、C、D 四个区, 每个区再分成 6 个 60m×80m 围栏, 记作 A₁~A₆、B₁~B₆、C₁~C₆、D₁~D₆。随机将 24 个围栏分成 6 组, 一组作为对照组, 其余五组进行小增雨、大增雨、轻牧、重牧、添加食物 5 种不同处理。其具体做法是: 小增雨: 每个围栏每个月浇水两次, 每次浇水 40t; 大增雨: 每个围栏每个月浇水两次, 每次浇水 80t; 轻牧: 每月放牧半天, 每次放牧 40 头羊; 重牧: 每月放牧一天, 每次放牧 40 头羊; 添加食物: 每周向围栏中添加一定量的鼠饲料。采集各围栏中的优势牧草: 针茅、羊草、隐子

草以及苔草，采集时间为 2012 年 5 月~2012 年 9 月。将采集的牧草放于信封中保存，并在信封上记录下围栏编号、牧草名称以及采集日期。按照 2.4.1 至 2.4.2 所述方法测定牧草中的总酚、简单酚、单宁以及缩合单宁含量，每个围栏的草样重复 4 次，求平均值并分析讨论。

2.5.2 不同损伤处理后人工种植羊草中次生代谢产物含量的测定

2.5.2.1 羊草 6-MBOA 含量的测定

将羊草种子（由内蒙古锡林格勒盟锡林浩特市毛登牧场提供）撒在湿润纱布上，于黑暗培养箱中催芽 48h，待种子露白后，选取长势一致的种子进行种植。随机将 36 个小样方分成 4 组，分别记作对照组、啃食处理组、剪处理组以及涂抹唾液组。对照组：不做任何处理。啃食处理组：将底空的大鼠笼子架在羊草上，将饥饿处理过 24h 的布氏田鼠（从锡林郭勒草原草原带回）置于笼子中，每个笼子放一只，任其自由啃食羊草 1 小时。剪处理组：剪去羊草地上部分 50%左右。涂抹唾液组：剪去羊草地上部分 50%左右，用蘸过生理盐水的棉签于布氏田鼠口中蘸取唾液，然后涂抹在剪过的羊草伤口处。待羊草发芽后第 7 天，做以上处理，处理后 1 小时、1 天、5 天以及 10 天分别采集适量羊草样品，按照 2.4.5 所述的方法制备好样品提取液，-20℃保存，备用。

2.5.2.2 羊草总酚、简单酚、单宁以及缩合单宁含量的测定

羊草的种植以及处理组别同上，待羊草发芽后第 15 天后做同上处理，处理后 1 小时、1 天、5 天和 10 天，分别采集适量羊草样品，按照 2.4.1 至 2.4.2 所述方法测定牧草中的总酚、简单酚、单宁以及缩合单宁含量。

3 结果

3.1 不同处理对内蒙古草原优势牧草次生代谢产物含量变化的影响

3.1.1 增雨处理对各牧草次生代谢产物含量的影响

3.1.1.1 增雨处理对针茅各次生化合物含量的影响

增雨处理后测定内蒙古锡林郭勒草原针茅中总酚、简单酚、单宁以及缩合单宁含量。对结果进行重复测量方差分析可得，大增雨处理会使得针茅中简单酚的含量显著减少 ($P<0.05$), 而对针茅中其他次生化合物含量的变化没有显著影响。利用 One-Way ANOVA 方差分析可得，5 月份小增雨处理的针茅中的总酚、简单酚、单宁以及缩合单宁含量均显著高于对照组 ($P<0.05$) (图 5)，7 月份至 9 月份增雨处理会使得针茅中总酚、简单酚、单宁含量有不同程度的降低，但是 9 月份大增雨处理后的针茅中单宁含量则显著升高了 ($P<0.05$) (图 5 C)。

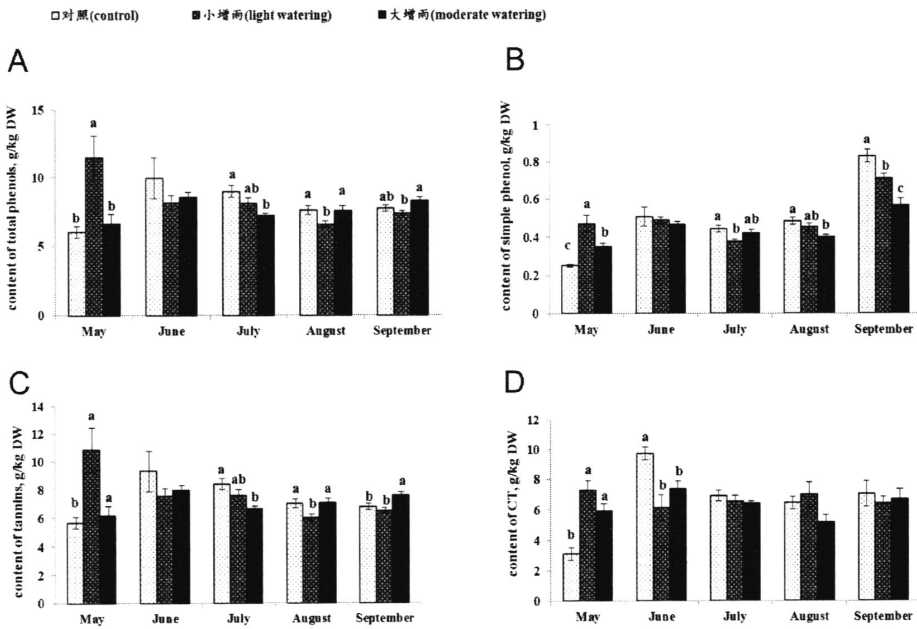


图 5 增雨对针茅中各酚类物质含量的影响

Fig. 5 The effect of water addition on the content of phenolic compounds in *Stipa krylovii* Roshev

A: 总酚(total phenols); B: 简单酚(simple phenol); C: 单宁(tannins); D: 缩合单宁(CT).

没有标字母的数据表示没有显著差异，标有不同字母的数据表示差异显著或极显著(No letter marked over the column means no significant difference between them and the different superscript letter marked over the column means significant difference at 0.05 level)

3.1.1.2 增雨处理对羊草各次生化合物含量的影响

小增雨处理下的羊草的总酚、简单酚、单宁以及缩合单宁含量均显著增加 ($P<0.05$), 大增雨处理下的羊草仅单宁的含量显著增加了 ($P<0.05$), 而总酚、简单酚以及缩合单宁的含量均无显著变化。

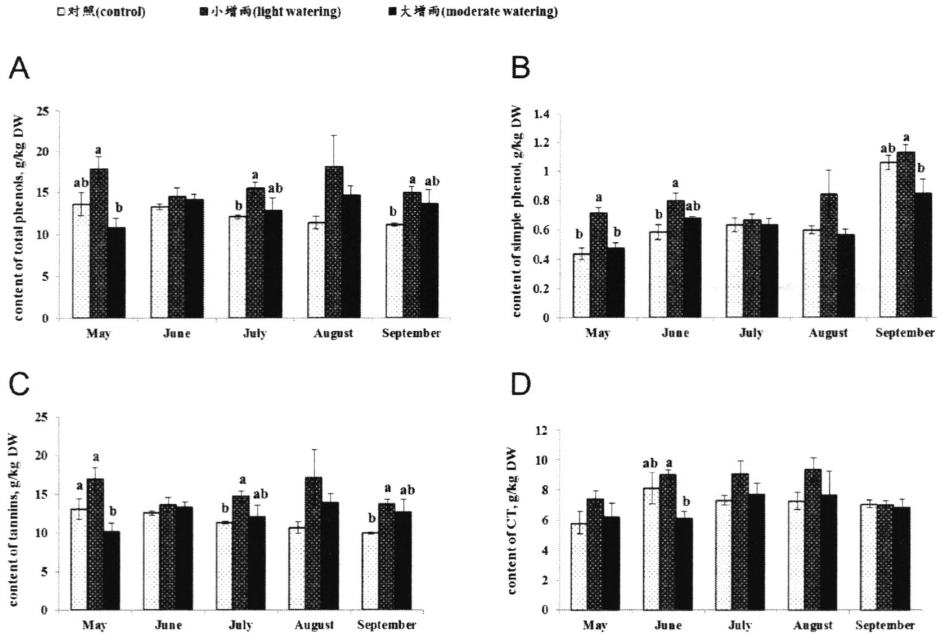


图 6 增雨对羊草中各酚类物质含量的影响

Fig. 6 The effect of water addition on the content of phenolic compounds in *Leymus chinensis*

A: 总酚(total phenols); B: 简单酚(simple phenol); C: 单宁(tannins); D: 缩合单宁(CT).

没有标字母的数据表示没有显著差异, 标有不同字母的数据表示差异显著或极显著(No letter marked over the column means no significant difference between them and the different superscript letter marked over the column means significant difference at 0.05 level)

3.1.1.3 增雨处理对隐子草各次生化合物含量的影响

隐子草中各次生化合物含量变化均无显著差异。经 One-Way ANOVA 方差分析可以得出, 5 月份, 小增雨处理使得隐子草的总酚、简单酚、单宁以及缩合单宁含量都显著增加 ($P<0.05$) (图 7)。8 月份, 大增雨处理会使得隐子草中总酚和单宁的含量显著增加 ($P<0.05$) (图 7 A C)。

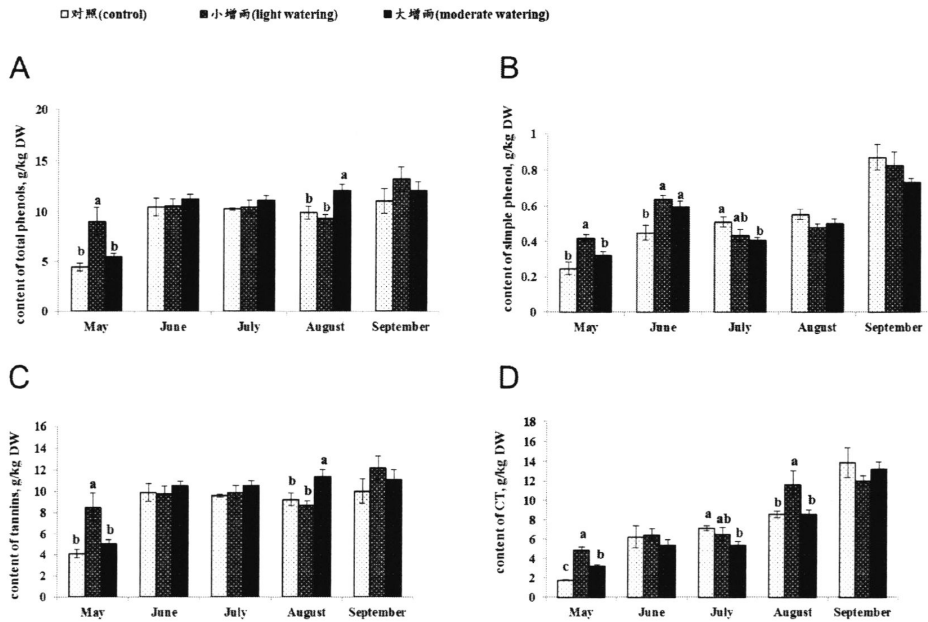


图 7 增雨对隐子草中各酚类物质含量的影响

Fig. 7 The effect of water addition on the content of phenolic compounds in *Cleistogenes squarrosa*

A: 总酚(total phenols); B: 简单酚(simple phenol); C: 单宁(tannins); D: 缩合单宁(CT).

没有标字母的数据表示没有显著差异, 标有不同字母的数据表示差异显著或极显著(No letter marked over the column means no significant difference between them and the different superscript letter marked over the column means significant difference at 0.05 level)

3.1.1.4 增雨处理对苔草各次生化合物含量的影响

大增雨处理会使苔草中的缩合单宁含量显著增加 ($P<0.05$), 对苔草中其他次生化合物含量的影响并不显著。小增雨对苔草的中总酚、简单酚、单宁以及缩合单宁含量变化均无显著影响。经 One-Way ANOVA 方差分析可得, 7 月份, 小增雨和大增雨处理都会使得苔草中的总酚和单宁含量显著增加 ($P<0.05$) (图 8 A C), 大增雨还会使得苔草中缩合单宁含量显著增加 ($P<0.05$) (图 8 D)。

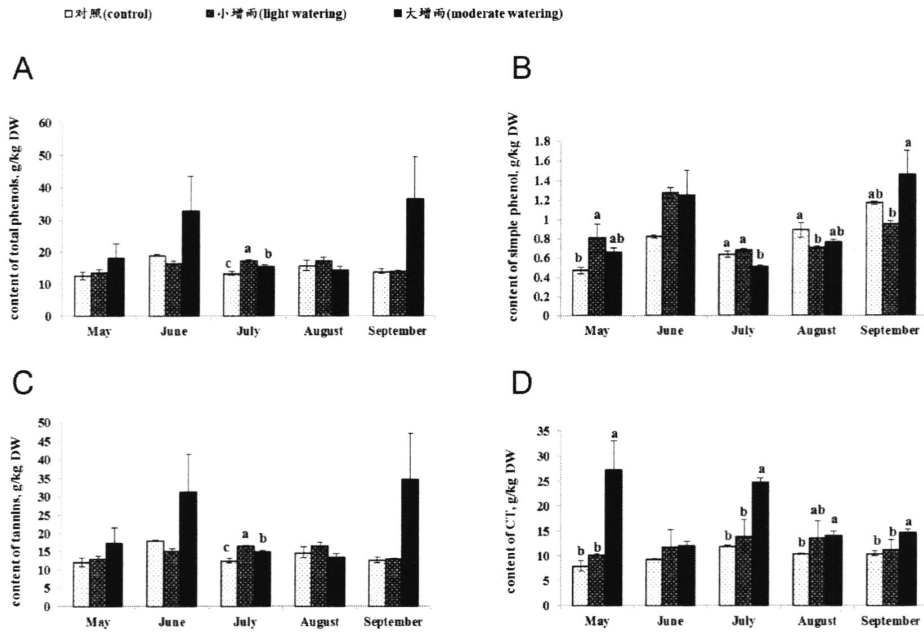


图 8 增雨对苔草中各酚类物质含量的影响

Fig. 8 The effect of water addition on the content of phenolic compounds in *Carex tristachya*

A: 总酚(total phenols); B: 简单酚(simple phenol); C: 单宁(tannins); D: 缩合单宁(CT).

没有标字母的数据表示没有显著差异, 标有不同字母的数据表示差异显著或极显著(No letter marked over the column means no significant difference between them and the different superscript letter marked over the column means significant difference at 0.05 level)

3.1.2 放牧处理对各牧草次生代谢产物含量的影响

3.1.2.1 放牧处理对针茅各次生化合物含量的影响

对内蒙古锡林郭勒草原设置的围栏进行轻度放牧和重度放牧后, 测定针茅中的总酚、简单酚、单宁以及缩合单宁含量。采用重复测量方差分析可知, 放牧处理对针茅中各次生化合物含量的影响并不显著。利用 One-Way ANOVA 方差分析可以得出, 5 月份, 轻牧和重牧都会使得针茅中简单酚和缩合单宁含量显著增加 ($P<0.05$) (图 9 B D)。而 6 月份, 针茅中的总酚、单宁和缩合单宁含量在轻牧的处理下都显著降低 ($P<0.05$) (图 9 A C D); 9 月份, 重牧处理使针茅中的总酚、简单酚以及单宁含量显著降低 ($P<0.05$) (图 9 A B C)。

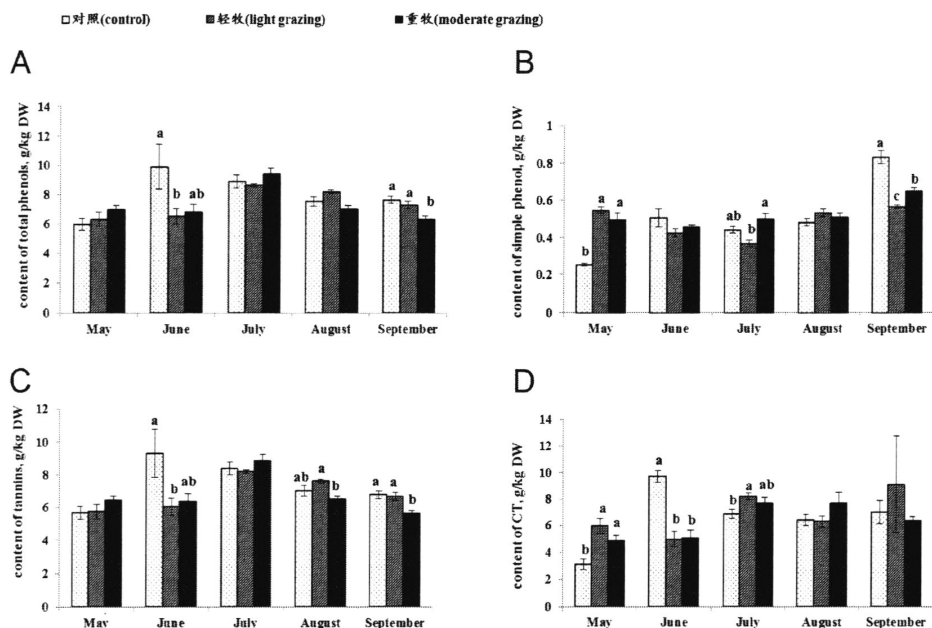


图 9 放牧对针茅中各酚类物质含量的影响

Fig. 9 The effect of grazing on the content of phenolic compounds in *Stipa krylovii* Roshev

A: 总酚(total phenols); B: 简单酚(simple phenol); C: 单宁(tannins); D: 缩合单宁(CT).

没有标字母的数据表示没有显著差异, 标有不同字母的数据表示差异显著或极显著(No letter marked over the column means no significant difference between them and the different superscript letter marked over the column means significant difference at 0.05 level)

3.1.2.2 放牧处理对羊草各次生化合物含量的影响

轻牧处理下羊草中的总酚和单宁含量显著增加 ($P<0.05$), 重牧处理下羊草中总酚和单宁的含量较对照组显著增加 ($P<0.01$)。对羊草中其他次生化合物含量的影响并不显著。经 One-Way ANOVA 方差分析可得, 轻牧处理使得 5 月份羊草中的简单酚含量显著增加 ($P<0.05$) (图 10 B), 使得 5 月和 7 月份羊草的缩合单宁含量显著增加 ($P<0.05$) (图 10 D)。重牧处理会使得 5、6 月份羊草中简单酚的含量显著增加 ($P<0.05$) (图 10 B), 也会显著增加 8 月份羊草中缩合单宁的含量 ($P<0.05$) (图 10 D)。

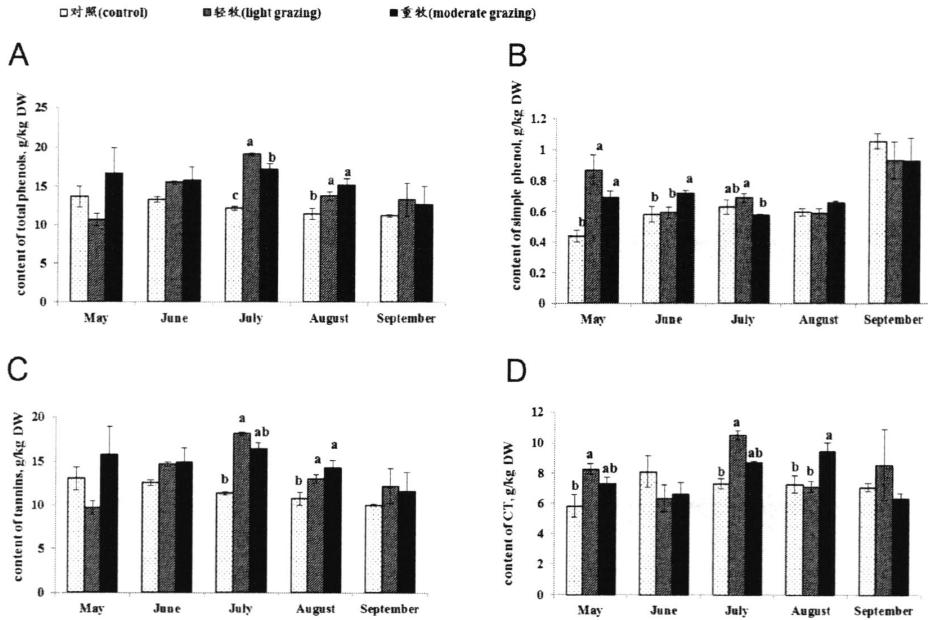


图 10 放牧对羊草中各酚类物质含量的影响

Fig. 10 The effect of grazing on the content of phenolic compounds in *Leymus chinensis*

A: 总酚(total phenols); B: 简单酚(simple phenol); C: 单宁(tannins); D: 缩合单宁(CT).

没有标字母的数据表示没有显著差异, 标有不同字母的数据表示差异显著或极显著(No letter marked over the column means no significant difference between them and the different superscript letter marked over the column means significant difference at 0.05 or 0.01 level)

3.1.2.3 放牧处理对隐子草各次生化合物含量的影响

不同放牧强度对隐子草各次生化合物含量变化均无显著差异。经 One-Way ANOVA 方差分析可以得出, 轻牧处理使得 5 月份隐子草中的简单酚和缩合单宁显著增加 ($P<0.05$) (图 11 B D), 使 9 月份羊草中的简单酚显著降低 ($P<0.05$) (图 11 B)。5 月份, 重牧处理使得隐子草的总酚、简单酚、单宁以及缩合单宁含量都显著增加 ($P<0.05$) (图 11), 9 月份, 重牧处理使得隐子草中简单酚和缩合单宁的含量显著降低 ($P<0.05$) (图 11 B D)。

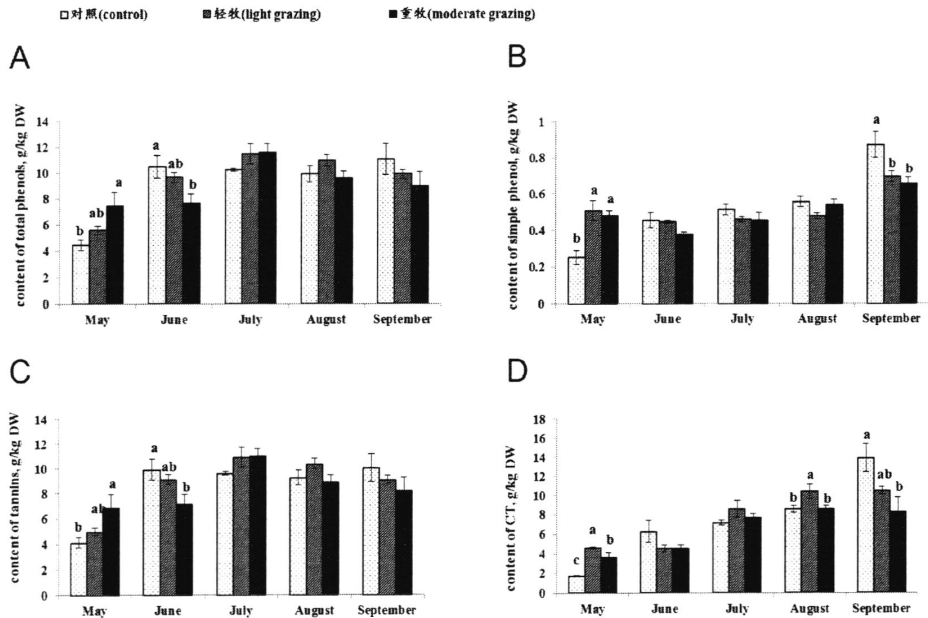


图 11 放牧对隐子草中各酚类物质含量的影响

Fig. 11 The effect of grazing on the content of phenolic compounds in *Cleistogenes squarrosa*

A: 总酚(total phenols); B: 简单酚(simple phenol); C: 单宁(tannins); D: 缩合单宁(CT).

没有标字母的数据表示没有显著差异, 标有不同字母的数据表示差异显著或极显著(No letter marked over the column means no significant difference between them and the different superscript letter marked over the column means significant difference at 0.05 level)

3.1.2.4 放牧处理对苔草各次生化合物含量的影响

轻牧处理会使得苔草中的缩合单宁含量显著增加 ($P<0.05$), 对苔草中其他次生化合物含量的影响并不显著。重牧处理会使得苔草中简单酚含量显著增加 ($P<0.05$), 对苔草中其他次生化合物含量的影响并不显著。经 One-Way ANOVA 方差分析可得出, 6 月份, 重牧处理使苔草中的总酚和单宁含量显著降低 ($P<0.05$) (图 12 A C)。7 月份, 重牧处理显著增加了草中的总酚和单宁含量。9 月份, 轻牧和重牧都会使苔草中总酚和单宁含量显著增加 ($P<0.05$) (图 12 A C)。

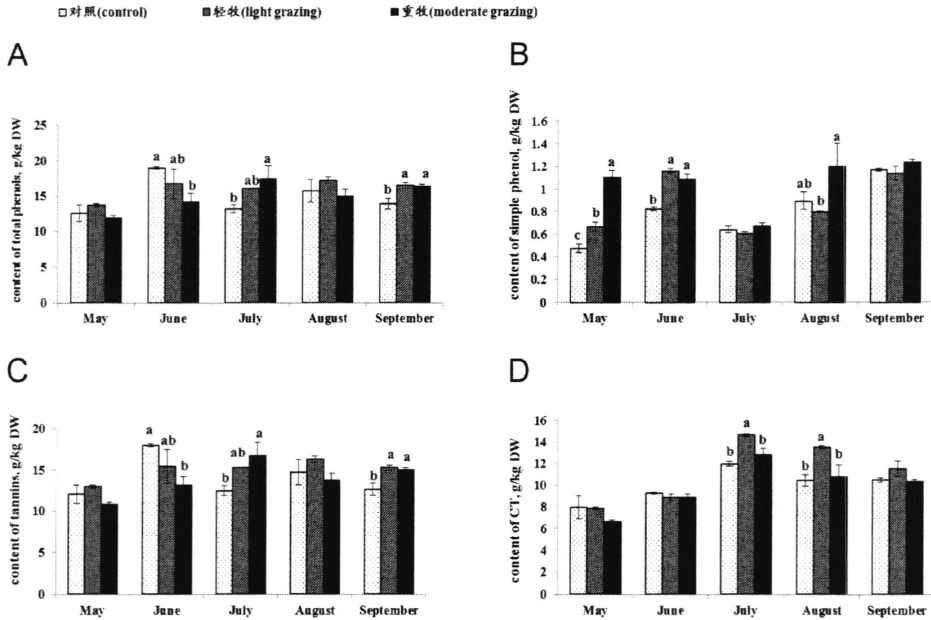


图 12 放牧对苔草中各酚类物质含量的影响

Fig. 12 The effect of grazing on the content of phenolic compounds in *Carex tristachya*

A: 总酚(total phenols); B: 简单酚(simple phenol); C: 单宁(tannins); D: 缩合单宁(CT).

没有标字母的数据表示没有显著差异, 标有不同字母的数据表示差异显著或极显著(No letter marked over the column means no significant difference between them and the different superscript letter marked over the column means significant difference at 0.05 level)

3.1.3 添加食物对各牧草次生代谢产物含量变化的影响

3.1.3.1 添加食物后针茅各次生化合物含量的变化规律

向内蒙古锡林郭勒草原实验指定围栏中添加鼠饲料, 测定针茅中总酚、简单酚、单宁以及缩合单宁含量。所得结果用重复测量方差分析可知, 添加食物对针茅中这四种次生化合物含量变化均无显著影响。经 Independent-Samples T Test 分析可知, 5 月份添加食物处理会显著增加针茅中简单酚和单宁含量 ($P<0.05$) (图 13 B C)。而 6 月份添加食物处理则会显著降低针茅中总酚的含量 ($P<0.05$) (图 13 A)。同样的, 9 月份添加食物处理会显著降低针茅中总酚、简单酚和单宁的含量 ($P<0.05$) (图 13 A B C)。

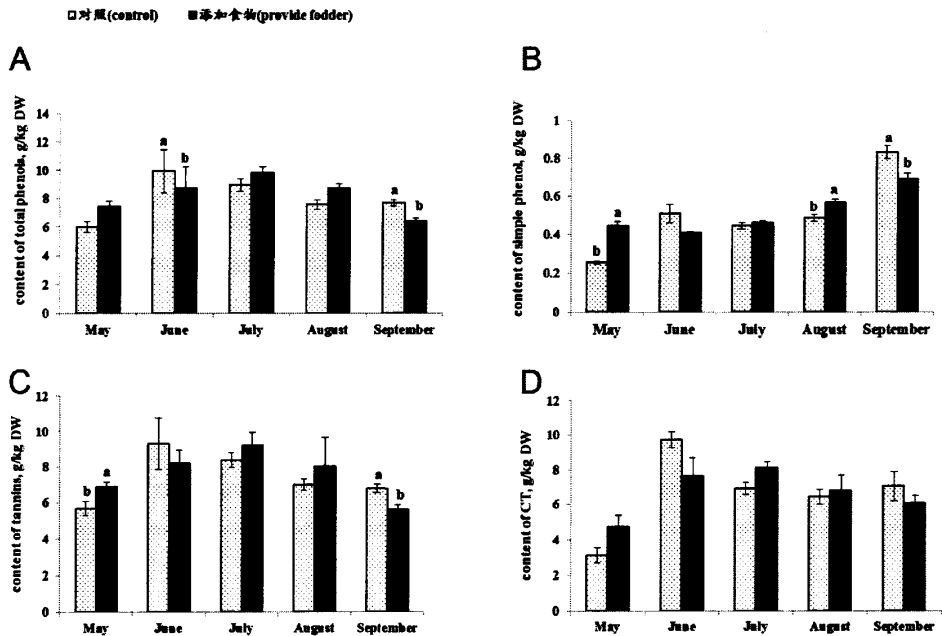


图 13 添加食物对针茅中各酚类物质含量的影响

Fig. 13 The effect of providing fodder on the content of phenolic compounds in *Stipa krylovii* Roshev

A: 总酚(total phenols); B: 简单酚(simple phenol); C: 单宁(tannins); D: 缩合单宁(CT).

没有标字母的数据表示没有显著差异，标有不同字母的数据表示差异显著或极显著(No letter marked over the column means no significant difference between them and the different superscript letter marked over the column means significant difference at 0.05 level)

3.1.3.2 添加食物后羊草各次生化合物含量的变化规律

添加食物处理会使羊草中的总酚含量显著降低 ($P<0.05$), 对羊草中其他酚类物质含量影响并不显著。

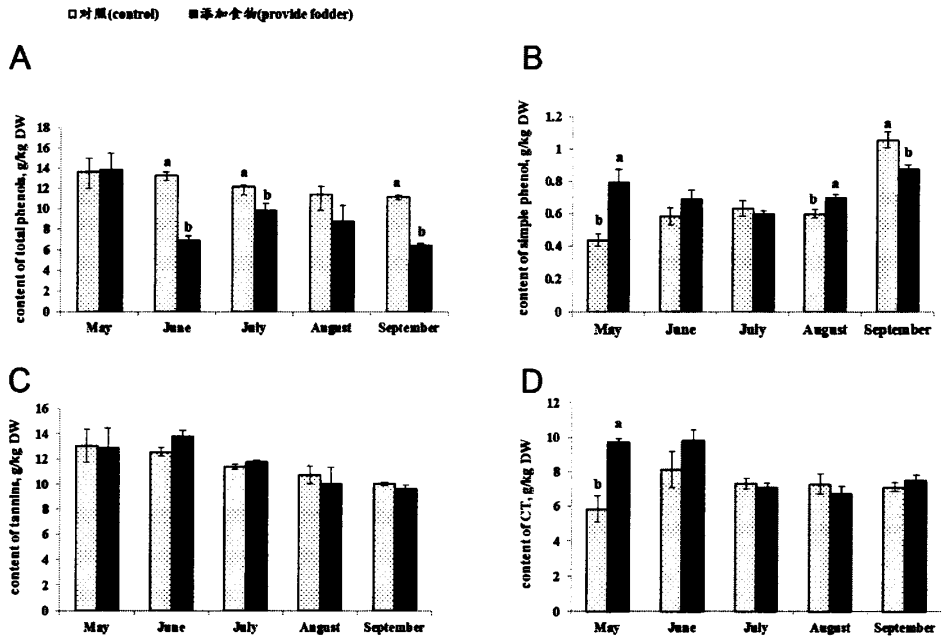


图 14 添加食物对羊草中各酚类物质含量的影响

Fig. 14 The effect of providing fodder on the content of phenolic compounds in *Leymus chinensis*

A: 总酚(total phenols); B: 简单酚(simple phenol); C: 单宁(tannins); D: 缩合单宁(CT).

没有标字母的数据表示没有显著差异，标有不同字母的数据表示差异显著或极显著(No letter marked over the column means no significant difference between them and the different superscript letter marked over the column means significant difference at 0.05 level)

3.1.3.3 添加食物后隐子草各次生化化合物含量的变化规律

添加食物对隐子草中这四种次生化化合物含量变化均无显著影响。Independent-Samples T Test 分析可知,5 月份添加食物处理会显著增加隐子草中简单酚含量($P<0.05$)(图 15 B)。而 7 月份添加食物处理则会显著降低隐子草中总酚和单宁的含量 ($P<0.05$) (图 15 A C)。

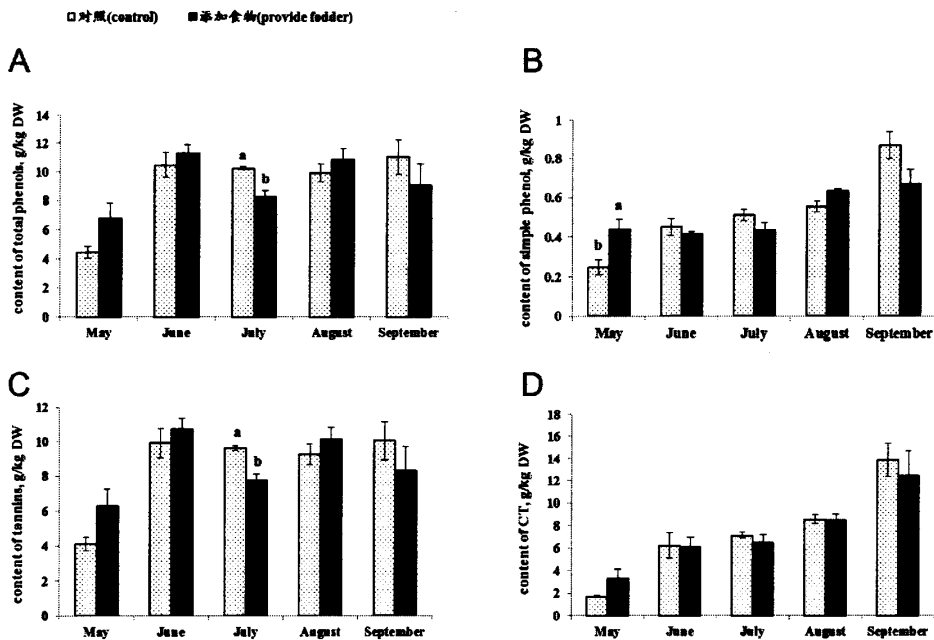


图 15 添加食物对隐子草中各酚类物质含量的影响

Fig. 15 The effect of providing fodder on the content of phenolic compounds in *Cleistogenes squarrosa*

A: 总酚(total phenols); B: 简单酚(simple phenol); C: 单宁(tannins); D: 缩合单宁(CT).

没有标字母的数据表示没有显著差异, 标有不同字母的数据表示差异显著或极显著(No letter marked over the column means no significant difference between them and the different superscript letter marked over the column means significant difference at 0.05 level)

3.1.3.4 添加食物后苔草各次生化合物含量的变化规律

添加食物处理对苔草中总酚、简单酚、单宁以及缩合单宁含量均无显著影响。经 Independent-Samples T Test 分析可知, 5 至 7 月份, 处理组简单酚含量显著高于对照组 ($P<0.05$), 9 月份处理组缩合单宁含量显著低于对照组 ($P<0.05$)。

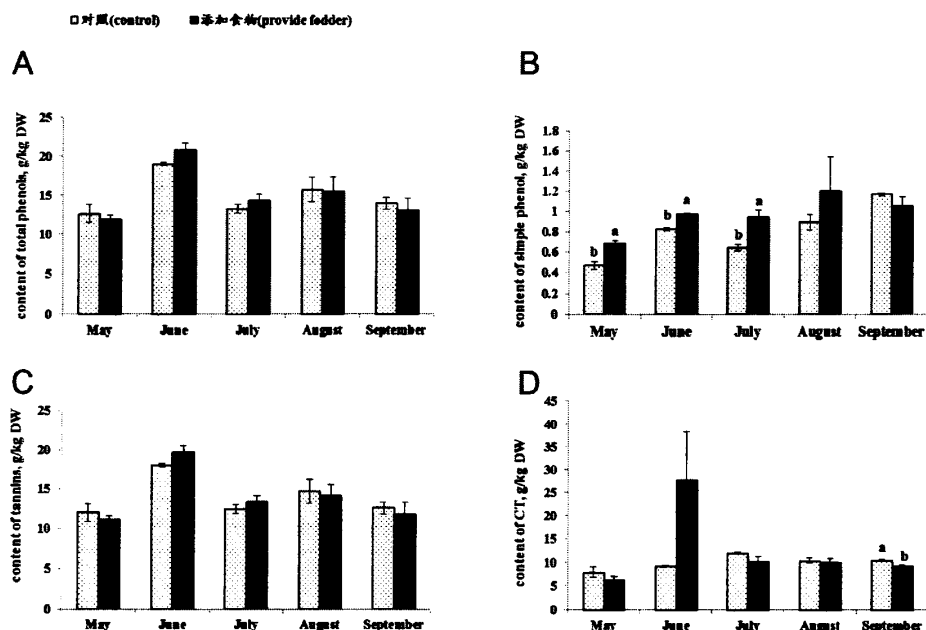


图 16 添加食物对苔草中各酚类物质含量的影响

Fig. 16 The effect of providing fodder on the content of phenolic compounds in *Carex tristachya*

A: 总酚(total phenols); B: 简单酚(simple phenol); C: 单宁(tannins); D: 缩合单宁(CT).

没有标字母的数据表示没有显著差异, 标有不同字母的数据表示差异显著或极显著(No letter marked over the column means no significant difference between them and the different superscript letter marked over the column means significant difference at 0.05 level)

3.2 不同损伤对人工种植羊草次生代谢产物含量变化的影响

3.2.1 不同损伤对羊草总酚含量变化的影响

对人工种植的羊草进行剪处理、涂处理和啃食处理, 分别于 1 小时、1 天、5 天以及 10 天后测定其总酚含量。One-Way ANOVA 方差分析显示, 剪处理组在处理 1h 和 5d 显著低于对照组 ($P<0.05$) (图 18), 涂处理组在处理 1 天、5 天和 10 天后显著低于对照组 ($P<0.05$) (图 18), 啃食组在处理 1 天、5 天显著低于对照组 ($P<0.05$) (图 18)。重复测量方差分析显示, 剪处理组总酚含量显著高于对照组 ($P<0.05$), 涂处理组和啃食组显著低于对照组 ($P<0.05$), 剪处理组总酚含量显著高于涂处理组和啃食组 ($P<0.05$), 涂处理组和啃食组没有显著差异。

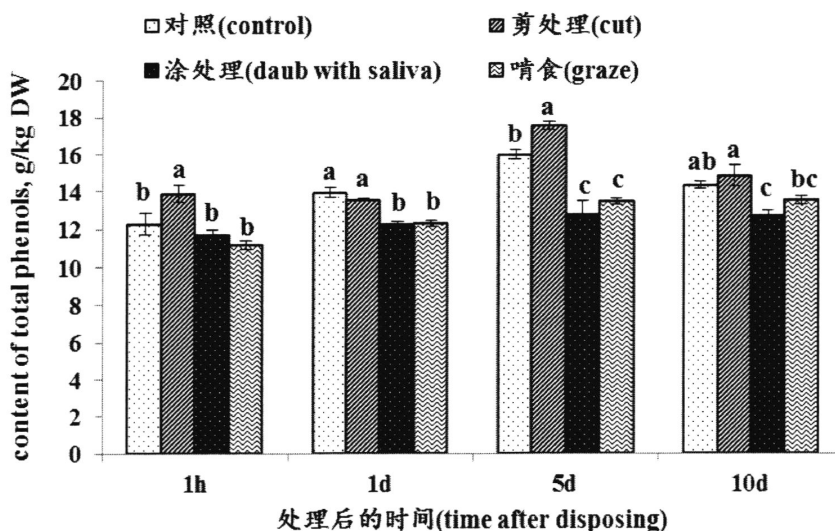


图 17 不同损伤处理对羊草中总酚含量的影响

Fig. 17 Effects of wounding treatments on the content of total phenols in *Leymus chinensis*

注：标有相同字母的数据表示没有显著差异，标有不同字母的数据表示差异显著或极显著(The same superscript letter marked over the column means no significant difference between them and the different superscript letter marked over the column means significant difference at 0.05 level)

3.2.2 不同损伤对羊草简单酚含量变化的影响

与对照组相比，剪处理组简单酚处理 1 小时和 5 天后均显著升高 ($P<0.05$) (图 19)，啃食处理组在处理 1 小时后显著降低 ($P<0.05$) (图 19)，其他时间段则与对照组无显著差异。涂处理组与对照组相比，均没有显著差异。重复测量方差分析显示，剪处理组简单酚含量显著高于对照组 ($P<0.05$)，涂处理组显著低于对照组 ($P<0.05$)，啃食组与对照组没有显著差异。剪处理组显著高于涂处理组和啃食组 ($P<0.05$)，涂处理组和啃食组无显著差异。

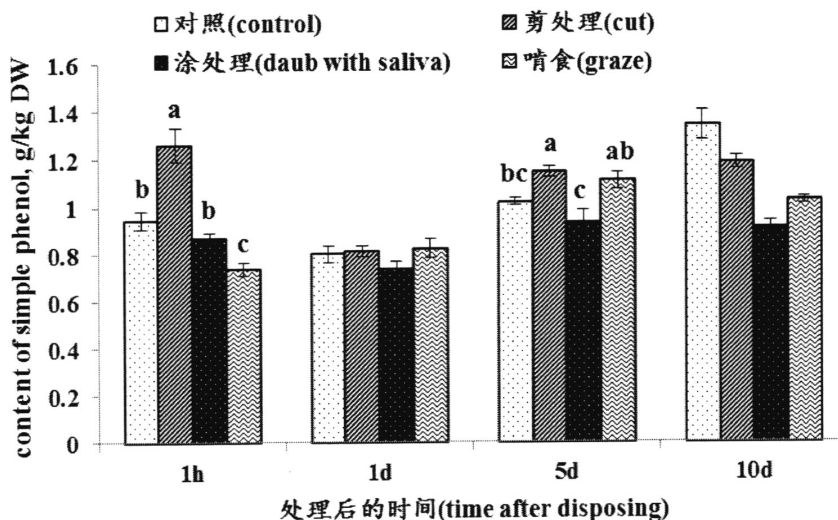


图 18 不同损伤处理对羊草中简单酚含量的影响

Fig. 18 Effects of wounding treatments on the content of simple phenols in *Leymus chinensis*

注：标有相同字母的数据表示没有显著差异，标有不同字母的数据表示差异显著或极显著(The same superscript letter marked over the column means no significant difference between them and the different superscript letter marked over the column means significant difference at 0.05 level)

3.2.3 不同损伤对羊草单宁含量变化的影响

处理后 1 小时，剪处理组单宁含量较对照组显著升高 ($P<0.05$) (图 20)；处理后 1 天，涂处理组和啃食处理组单宁含量较对照组显著降低 ($P<0.05$) (图 20)；处理后 5 天，剪处理组的单宁含量显著升高，而涂处理组和啃食处理组的单宁含量显著降低 ($P<0.05$) (图 20)；处理后 10 天，涂处理组单宁含量显著低于对照组 ($P<0.05$) (图 20)。重复测量方差分析显示，剪处理组单宁含量显著高于对照组 ($P<0.05$)，啃食组和涂处理组单宁含量显著低于对照组 ($P<0.05$)，剪处理组显著高于涂处理组和啃食组 ($P<0.05$)，啃食组和涂处理差异不显著。

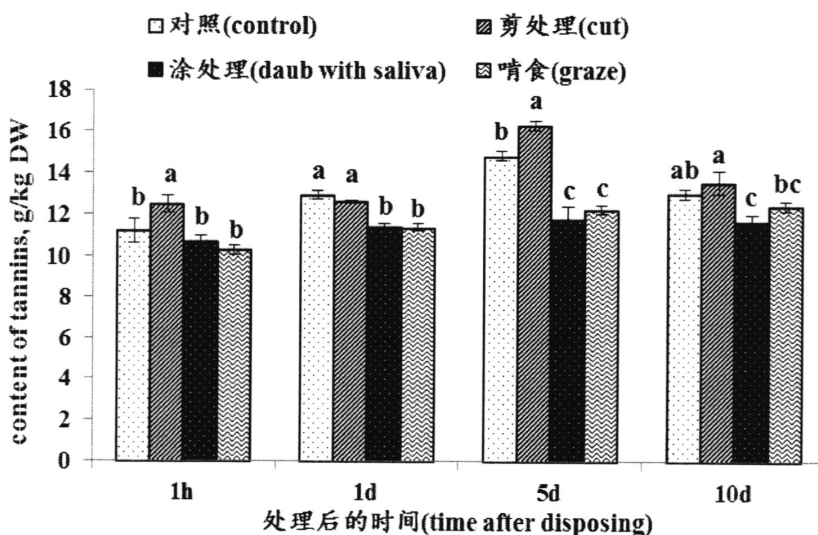


图 19 不同损伤处理对羊草中单宁含量的影响

Fig. 19 Effects of wounding treatments on the content of tannins in *Leymus chinensis*

注：标有相同字母的数据表示没有显著差异，标有不同字母的数据表示差异显著或极显著(The same superscript letter marked over the column means no significant difference between them and the different superscript letter marked over the column means significant difference at 0.05 level)

3.2.4 不同损伤对羊草缩合单宁含量变化的影响

分别对羊草做剪处理、涂处理以及啃食处理后，测定羊草中缩合单宁含量。所得结果经 One-Way ANOVA 方差分析可得到，处理后 1 小时，啃食处理组缩合单宁显著低于对照组 ($P<0.05$) (图 21)；处理后 1 天，三种处理的缩合单宁含量都显著低于对照组 ($P<0.05$) (图 21)；处理后 5 天，涂处理组和啃食处理组缩合单宁含量显著低于对照组，而剪处理

组缩合单宁含量与对照组没有差异；处理后 10 天，三种处理的缩合单宁含量都显著低于对照组 ($P<0.05$) (图 21)。重复测量方差分析显示，三个处理组缩合单宁含量都显著低于对照组 ($P<0.05$)，剪处理组显著高于啃食组和涂处理组 ($P<0.05$)，涂处理组显著高于啃食组 ($P<0.05$)。

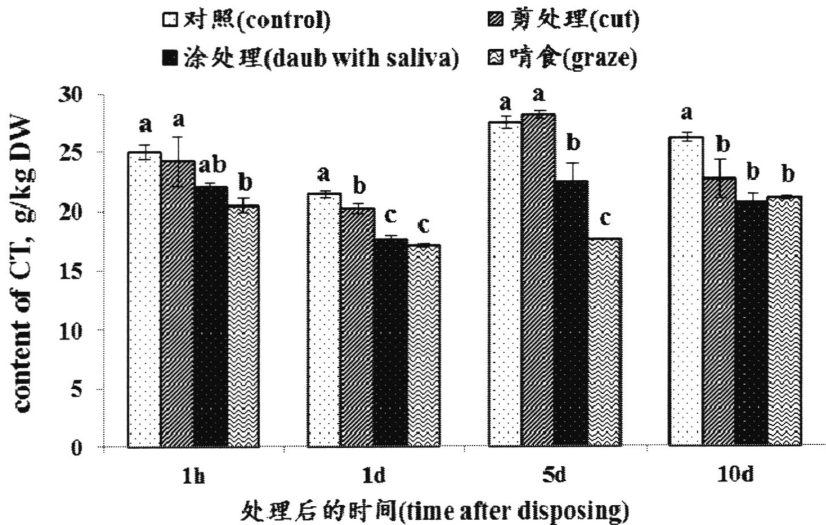


图 20 不同损伤处理对羊草中缩合单宁含量的影响

Fig. 20 Effects of wounding treatments on the content of CT in *Leymus chinensis*

注：标有相同字母的数据表示没有显著差异，标有不同字母的数据表示差异显著或极显著(The same superscript letter marked over the column means no significant difference between them and the different superscript letter marked over the column means significant difference at 0.05 level)

3.2.5 不同损伤对羊草 6-MBOA 含量变化的影响

分别对室内种植的羊草做剪叶处理、啃食处理以及涂处理，用 HPLC 法测定羊草中 6-MBOA 含量。经 One-Way ANOVA 方差分析可得到，处理后 1 小时，仅涂处理组 6-MBOA 含量显著升高 ($P<0.05$)，而剪处理组和啃食处理组 6-MBOA 含量与对照组没有显著差异。处理 1 天和 5 天后，三个处理组的 6-MBOA 含量都显著高于对照组 ($P<0.05$)。处理 10 天后，涂处理和剪处理组 6-MBOA 含量均显著增加 ($P<0.05$)，但啃食组已经没有变化。重复测量分析法显示，三个处理组 6-MBOA 含量都显著高于对照组 ($P<0.05$)，其中剪处理组和啃食组没有显著差异，涂处理组显著高于剪处理组和啃食组 ($P<0.05$)。

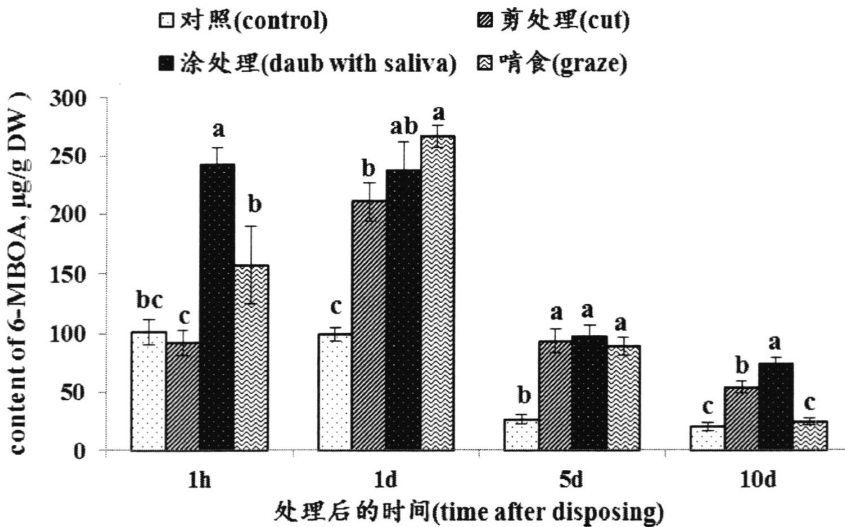


图 21 不同损伤处理对羊草中 6-MBOA 含量的影响

Fig. 21 Effects of wounding treatments on the content of 6-MBOA in *Leymus chinensis*

注：标有相同字母的数据表示没有显著差异，标有不同字母的数据表示差异显著或极显著(The same superscript letter marked over the column means no significant difference between them and the different superscript letter marked over the column means significant difference at 0.05 level)

4 讨论

曾经，人们一直都认为植物次生代谢产物对维持生命有机体的基本过程没有直接影响，并非为植物生命活动所必需。但是，根据生物进化的原理，植物消耗一定的物质和能量来产生次生代谢产物，那么后者肯定有其存在的价值。事实证明，有些次生代谢产物确实为植物生命活动所必需（Kutchan, 2001）；有些次生代谢产物则能提高植物对环境的适应性；也有一些植物次生代谢产物能增强植物的抗病性等等。其中，最重要的作用是抵御天敌的侵袭，即植物在防御昆虫和植食性动物的采食过程中，次生代谢产物的合成能够有效地阻止植食性动物采食。酚类物质是植物次生代谢产物中的一个大家族，在植物受到外界伤害时会在其体内产生并积累（Dixon and Paiva, 1995），这类物质不仅对植食性动物和病原菌有直接的防御作用，还能够增加细胞壁的力度（Agrawal et al., 1999; Matsu et al., 2004; 程智慧等, 2008; 李宁等, 2005）。本研究测定了 4 种牧草中总酚、简单酚、单宁以及缩合单宁这四种酚类物质含量，结果表明，不做任何处理的各牧草中酚类物质的含量高低为：总酚>单宁>缩合单宁>简单酚。这一研究结果与文亦蒂（2009）所研究的豆科饲用灌木中酚类物质动态变化的结果是一致的。

近年来，由于全球气候变暖及人为超载放牧等影响，内蒙古草原已经出现大范围退化，草地的生产力以及生物多样性明显下降。本研究以内蒙古锡林郭勒草原四种优势牧草：针

茅、羊草、隐子草以及苔草为研究对象,进行人工模拟增雨,不同强度放牧以及添加饲料处理,然后测定它们所含总酚、简单酚、单宁以及缩合单宁四种酚类物质的含量。

4.1 增雨处理对牧草次生代谢产物含量的影响

如今,全球温室效应严重,各地降雨量普遍增加。相关气象数据表明,在过去的五十年里,亚洲中部干旱地区的降水量显著增加(Qian and Zhu, 2001)。有预测表明,我国西北干旱地区的降水量将逐渐增加(施雅风等, 2003; Xuejie, 2001),尤其是春夏季降水将增多(徐利岗等, 2009),这将会引起土壤水分的时空动态变化(Jackson et al, 2001; 潘颜霞和王新平, 2007)和植物生理生态特征的改变。为了探究降雨量的增加是否会对内蒙古草原优势牧草产生影响,本研究对指定围栏进行人工模拟降雨处理,设置了小增雨和大增雨两个浓度梯度,测定其中酚类物质的含量变化情况。研究表明,增雨处理下不同牧草中酚类物质含量变化规律有所不同。针茅在大增雨处理下,简单酚含量显著减少了,说明简单酚对大增雨处理较敏感,其含量和降雨强度成反比例关系。该研究结果与Bruijnzeel等(1993)的结果是一致的,他们在研究中发现生长在干旱土壤中的植被的酚类物质含量远高于水分充足条件下的植被。小增雨处理下,羊草中的总酚、简单酚、单宁以及缩合单宁含量均显著大于对照组,大增雨处理下羊草中仅缩合单宁含量显著大于对照组。这一结果与王红星等(2007)的研究结果不一致,他们的研究表明,干旱胁迫下植物组织中的单宁等次生代谢产物常常增加,以提高植物的抗性。结果表明羊草中总酚、简单酚、单宁对小增雨处理更为敏感,缩合单宁含量与增雨量呈正相关,这可能与不同酚类物质的生理生态作用有关。但是他研究发现单宁含量与土壤含水量呈负相关。苔草在大增雨的处理下缩合单宁含量也显著增加了,与刘松(2007)的研究结果一致,他在对极端干旱环境下植物体内多酚类物质含量的研究中也发现,缩合单宁含量与土壤中的含水量呈正相关,当土壤中含水量较大时,缩合单宁生成量将增加。王艳等(2009)研究也发现有河水灌溉的胡杨叶片中总酚显著含量降低,缩合单宁含量显著升高。在隐子草中,增雨处理对其酚类物质的含量均无显著影响,说明隐子草中的酚类物质的合成受水分条件的影响不显著,也许正因为如此,才使得隐子草有较强的适应性,从森林草原带到荒漠带都可以看到它的踪影。

4.2 放牧处理对牧草次生代谢产物含量的影响

放牧一直是天然草地的主要利用方式,也是影响草地生态系统的重要因素。作为一种典型的人为干扰,放牧不但可以直接改变草地的形态特征,还能改变草地的生产力和草种结构(Hobbs, 1991),从而影响草地的循环系统以及草场演替方式(Reategui, 1999),

另外, 过度放牧还会使草地成为不健康的生态系统(康乐和马世骏, 1990)。关于放牧对草地的影响, 研究报道得较多, 成果也较多。邵玉琴等(2011)比较研究了不同放牧强度下锡林郭勒典型草原土壤微生物数量的影响, 研究表明适当的放牧可增加土壤中微生物的数量而过度放牧会导致土壤中微生物数量明显减少。董全民等(2012)研究了放牧对小蒿草草甸生物量和补偿效应等的影响, 结果显示不同放牧强度对暖季草场地上生物量有显著影响, 适度放牧更有利于暖季草地产生超补偿生长。本研究则探讨了不同放牧强度对牧草中酚类物质含量的影响, 结果显示不同放牧强度对针茅中酚类物质含量的影响并不显著, 一方面可以说明针茅中酚类物质含量对放牧处理不敏感, 另一方面也能说明针茅是一种耐牧的牧草。羊草经放牧处理, 总酚和单宁含量都显著增加, 且与放牧程度成正比。这一研究结果可以解释植物与植食性动物的协同进化, 当羊草受到植食性动物啃食, 就会诱导植物体内产生一系列防御反应, 比如产生对动物有毒害作用的次生化合物, 来有效地阻止植食性动物的进一步采食。动物的取食经验使得动物能增强对事物的识别能力, 避免或减少采食对其有毒害作用的事物。其中酚类物质是植物次生代谢产物中一类非常重要的化学防御物质, 当羊草受到外来伤害, 酚类物质就会在其体内产生并积累。酚类物质能够提高植物对环境的适应性, 抵御植食性动物的侵袭能力, 从而提高植物的竞争力。由于不同酚类物质在植物体内所含比例不同, 因此表现出不同的趋势。这一研究结果与胡增辉等人(2009)的研究结果一致。虽然用重复测量方差分析得隐子草的酚类物质含量与放牧处理的相关性不显著, 但经 One-Way ANOVA 方差分析得出放牧处理后, 5 月份隐子草酚类物质的含量是显著增加的, 而到了 9 月份隐子草酚类物质的含量显著降低。该结果可以说明隐子草在返青期有较强的化学防御性, 即返青期, 当隐子草面对植食性动物的啃食会大量合成具有防御性的酚类物质。苔草在轻牧处理下缩合单宁含量显著增加。缩合单宁可以通过降低蛋白质以及纤维的可消化性, 产生毒性来阻止植食性动物的采食(Owen-Smith, et al., 1993; Hagerman, et al., 1992), 因此, 缩合单宁被认为是酚类物质中抵御动物采食的主要有效成分。

4.3 添加食物处理对牧草次生代谢产物含量的影响

多位学者研究得出, 植物在受到植食性动物或者昆虫侵害的时候会诱导产生酚类物质, 使酚类物质积累从而达到抵御外界伤害的目的。为了进一步验证这一结果, 本研究向围栏中放置一定量的饲料, 减少植食性动物对牧草的采食, 然后检测酚类物质的含量变化。结果表明, 添加食物处理对针茅、隐子草和苔草酚类物质含量的影响并不显著。添加食物后, 羊草中总酚的含量显著减少, 说明添加食物处理的确能够缓解植食性动物对羊草的取

食压力,从而使得羊草中的起防御作用的总酚含量减少。

4.4 不同损伤对人工种植羊草中酚类物质含量的影响

对实验室条件下种植的羊草经行剪处理、涂处理和啃食处理后检测酚类物质含量所得结果表明,剪处理组和啃食组酚类物质含量变化存在显著差异,说明羊草面对机械损伤和动物啃食发生的防御应答反应不同,涂处理组和啃食组的结果相似,可以推测动物唾液是造成机械损伤与动物啃食间酚类物质含量变化差异的关键因素。相似的,胡增辉等(2009)研究发现,合作杨(*Populus simonii* × *P. pyramidalis* ‘Opera 8277’)叶片在机械损伤和舞毒蛾取食诱导下酚类物质含量变化有差异,在机械损伤伤口涂抹舞毒蛾口腔分泌物与舞毒蛾取食诱导下酚类物质含量变化相似。但是本研究人工种植的羊草经三种处理后酚类物质含量都是降低的,这与剪叶以及昆虫取食处理均能诱导缩合单宁含量的增加的结果(袁红娥,2008)不同。引起这一现象的可能原因是羊草在刚受到外界损伤时,短时间内酚类物质还没有来得及合成,说明植物通过合成次生代谢产物来抵御外界损伤时需要一定的时间。

4.5 不同损伤对人工种植羊草中 6-MBOA 含量的影响

6-MBOA 是苯并噁嗪类物质(benzoxazinoid, Bx)中的一员,苯并噁嗪类物质是一类广泛存在于禾本科植物中的次生代谢产物,它具有广谱抗病抗虫性。到目前为止的研究发现 6-MBOA 仅存在于玉米和小麦等一些禾本科幼苗中,经大量实验筛选得知新鲜羊草幼苗中含有 6-MBOA,这也是首次在牧草中发现 6-MBOA。本研究的结果可知,对照组羊草中 6-MBOA 含量的时序性变化是随着苗龄的增加而降低的,该研究结果与 Epstein 等(1986)研究结果一致。机械损伤可以诱导羊草在 1 天后合成大量 6-MBOA。啃食组 6-MBOA 含量经历了先增加后降低的过程,首先可以说明 6-MBOA 也是羊草体内的一种防御性化学物质,而且在羊草被动物啃食过后,6-MBOA 能够在 24 小时内大量合成,随后又会被降解。陈汝民(1999)在研究中也得到了类似的结论,外来的伤害刺激可以诱导植物体内的 6-MBOA 含量增高。涂处理能够持续引起羊草 6-MBOA 含量增加,可能的原因是机械损伤加上涂抹动物唾液能高效且持续诱导羊草合成 6-MBOA。重复测量方差分析显示机械损伤和植食性动物啃食对羊草中 6-MBOA 含量影响没有显著差异,而涂处理组和啃食组有显著差异,造成这一结果的原因可能是动物唾液能够诱导羊草大量合成 6-MBOA,且诱导效应与唾液量有一定关系。涂处理组在羊草伤口处涂抹的唾液量高于剪处理组和啃食组,因此出现了上述结果。

5 结论

(1) 增雨处理会引起羊草和苔草中的酚类物质含量显著增加, 使针茅中简单酚含量显著下降, 说明不同植物对增雨处理的反应不尽相同, 这与植物自身的性质相关; 同一植物中不同的酚类物质对水分的响应不同, 这与不同酚类物质的生理生态作用有关。放牧处理会引起羊草和苔草中酚类物质含量显著增加, 表明植物面对动物采食后诱导产生了化学防御物质, 这也很好的诠释了动植物协同进化中的诱导防御假设。添加食物处理使得羊草中总酚含量显著降低, 在一定程度上缓解植食性动物对牧草的采食压力。

(2) 三种损伤处理下, 酚类物质的含量都有所降低, 表明羊草经三种损伤后短期内酚类物质含量是降低的。剪处理组羊草中酚类物质含量显著高于涂处理组和啃食组, 涂处理组和啃食组无显著差异, 证明机械损伤和动物啃食会引起羊草不同的防御反应, 且动物唾液是一个关键因素; 三种处理均能诱导羊草 6-MBOA 含量显著增加, 但是影响程度不同, 且不同时间段表现出不同的影响效应, 动物唾液可能是诱导羊草 6-MBOA 大量合成一个主要因素。

参考文献

- Agrawal A A, Tuzun S, Bent E. Inducible plant defenses against pathogens and herbivores: biochemistry, ecology, and agriculture[M]. St Paul, MN: *American Phytopathological Society Press*, 1999: 137-166.
- Argandona V H, Niemeyer H M, Corcuera L J. Effect of content and distribution of hydroxamic acids in wheat on infestation by the aphid *Schizaphis graminum*[J]. *Phytochemistry*, 1981, 20: 673-679.
- Baldwin I T, Schultz J C. Rapid changes in tree leaf chemistry induced by damage: evidence for communication between plants[J]. *Science*, 1983, 227: 227-229.
- Bernard J M, Fiala K. Distribution of standing crop of living and dead roots in three wetland *Carex species*[J]. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 1986, 113: 1-5.
- Birbal singh, Tejk Bhat, Bhupinder singh. Potential therapeutic applications of some anti-nutritional plant secondary metabolites[J]. *Agric.Food Chem.*, 2003.51: 5579-5597.
- Brattsten L B. Metabolic defenses against plant allelochemicals[J]. *Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites*, 1992, 2: 175-242.
- Brett A D, Hagerman A E, Barrett W. Role of condensed tannin on salivary tannin- binding proteins, bioener-getics and nitrogen digestibility in *Mictotus pnnsy lvanicus*[J]. *Mamm.*, 1994, 75: 880-889.
- Bruijnzeel L A, Waterloo M J, Proctor J, Kuiters A T, Kotterink B. Hydrological observations in montane rain forests on Gunung Silam, Sabah, Malaysia, with special reference to theMassenerhebung'effect[J]. *Journal of Ecology*, 1993: 145-167.
- Coley P D, Bryant J P, Chapin F S. Resource availability and plant antiherbivore defense[J]. *Science*, 1985, 230: 895-899.
- David R, Nelson W L, Roy L Y. Effect of tannins on galliform cecad Partitionin[J]. *Physiological zoology*, 1997, 70(2): 175-180.
- Dixon R A, Paiva N L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism[J]. *Plant Cell*, 1995, 7: 1085-1097.
- Ehrlich P R, Raven P H. Butterflies and Plants: a study in coevolution[J]. *Evolution*, 1964, 18: 586-608.
- Epstein W W, Rowsemitt C N, Berger P J, Negus N C. Dynamics of

- 6-methoxybenzoxazolinone in winter wheat[J]. *Journal of chemical ecology*, 1986, 12(10): 2011-2020.
- Fagerstedt K V. Development of aerenchyma in roots and rhizomes of *Carex rostrata* (Cyperaceae) [J]. *Nordic Journal of Botany*, 1992, 12: 115-120.
- Frandsen T C, Boyd S S, Negus P J. Maternal transfer of the 6-MBOA chemical signal in *Microtus montanus* during gestation and lactation[J]. *Can J Zool*, 1993, 71: 1799-1803.
- Freeland M J, Calcott P H, Geiss D P. All elochemicals, minerals, and herbivore population size. *Biochem[J]. Syst.Ecol.*, 1985, 13: 195-206.
- Futuyma D J. Speciation trends and the role of species in macroevolution[J]. *The American Naturalist*, 1989, 134(2): 318-321.
- Grobner M A, Cheeke P R, Patton N M. The effect of 6-methoxybenzoxazolinone (6-MBOA) on ovarian and uterine weights in non-parous rabbits[J]. *Appl. Rabbit Res*, 1987, 3: 222-226.
- Harborne J B. Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids[M]. *University press. Oxford*. 1991.
- Hagerman A E. Extraction of tannin from fresh and reserved leaves[J]. *chem. ecol.*, 1988, 14(2) : 453-461.
- Hagerman A E, Robbins C T, Weerasuriya Y, Willson T C, McArthur C. Tannin chemistry in relation to digestion[J]. *Journal of range management*, 1992: 57-62.
- Hagerman A E, Robbins C T. Specificity of tannin-binding salivary proteins relation to diet selection by mammals[J]. *Zool.*, 1993, 71:628-633.
- Haslam E. Plant polyphenols and chemical defense a reappraisal [J]. *Chem.Ecol.*1988, 14(10): 1189-1805.
- Hermes D A, Mattson W J. The dilemma of plants: to grow or defend[J]. *The Quarterly Review Biology*, 1992, 67: 283-335.
- Howe H F, Westley L C. Ecology of pollination and seed dispersal[M]. In: *Plant Ecology*, London: Blackwell Scientific Publications. 1986.
- Hobbs R J. Disturbance of a precursor to weed invasion in native vegetation[J]. *Plant Protection Quarterly*, 1991,(6): 99-104.
- Janzen D H. New horizons in the biology of plant defenses. In: Rosenthal G A, Janzen D H eds.

- Herbivores: Their interaction with secondary plant metabolites[M]. *Academic Press, New York*, 1979.
- Jaremo J, Tuomi J, Nilsson P. Plant adaptation to herbivory: Mutualistic versus antagonistic coevolution[J]. *Oikos*, 1999, 84(2): 313-321.
- Jermey T. Insect-host-Plant relationship coevolution or sequential evolution[J]? *Symposium Biologica Hungarica*, 1976, 16: 109-113.
- Jackson R B, Carpenter S R, Dahm C N, McKnight D M, Naiman R J, Poster S L and Running S W. Water in a changing world[J]. *Ecological applications*, 2001, 11(4): 1027-1045.
- Karban R, Myers J H. Induced plant responses to herbivory[J]. *Annual Review of ecology Systematics*, 1989, 20: 331-348.
- Klun J A, Brindley T A. Role of 6—methoxybenzoxazolinone in inbred resistance of host plant (maize) to first brood larvae of European corn borer[J]. *Econ Entomol*, 1966, 59: 711-718.
- Koyama T, Yamotota M, Kubota K. Constituents of *Coix lachryma* (jibi)[J]. *Pharm Soc (Japan)*, 1955, 76:1077.
- Kutchan T M. Ecological arsenal and developmental dispatcher: The paradigm of secondary metabolism[J]. *Plant Physiology*, 2001, 125: 58-60.
- Laycock W A, Young J A, Uerckert D N. Ecologicalstatus of Poisonous plants on rangelands[M]. In: L F. James M H. Ralphs and D B. Nielson eds. *The ecology of economic impact of poisonous plants on Livestock production*. 1988. 27-42.
- Li S W. *Ecological Biological Chemistry*[M]. Beijing: Beijing University Press. 2001.
- Lundberg P. Low nutritive quality as a defense against optimally foraging herbivores[J]. *The American Naturalist*, 1990, 135(4): 547-562.
- Matsu K S, Sano Y, Koike T. Chemical and Physical defense in early and late leaves in three heterophyllous birch species native to Northern Japan[J]. *Annal. Bot.*, 2004, 93: 141-147.
- McNaughton S J. Serengeti migratory wildebeest: facilitation of energy flow by grazing[J].*Science*, 1976, 191:92-94.
- McNaughton S J. Grazing lawns: Animals in herds, plant form, and Coevolution[J]. *Amerlcan Naturalist*, 1984, 124(6): 63-899.
- Mode C J. A mathematical model for the coevolution of obligate parasites and their hosts[J]. *Evol.* 1958, 12: 158-165.

- Mosquin T. Reproductive specialization as a factor in the evolution of the Canadian flora[M]. In: Taylor R L, Ludwig R A. The Evolution of Canada's Flora. Toronto: University of Toronto Press, 1966, 43-45.
- Owen-Smith N, Robbinsand C T, Hagerman A E. Browse and browsers: Interactions between woody plants and mammalian herbivores[J]. *Trends in ecology & evolution*, 1993, 8(5): 158-160.
- Paige K N. Overcompensation in response to mammalian herbivory: From mutualistic to antagonistic interactions[J]. *Ecology*, 1992, 73(6): 2076-2085.
- Provenza F A. Acquired aversions as the basis for varied diets of ruminant s foraging on rangelands[J]. *Anim. Sci.*, 1996, 74: 2010-2020.
- Rodríguez-DeLara R, Herrera-Corredor C A, Fallas-López M, Rangel-Santos R, Mariscal-Aguayo V, Martínez-Hernandez P A, García-Muniz J G. Influence of supplemental dietary sprouted wheat on reproduction in artificially inseminated doe rabbits[J]. *Animal reproduction science*, 2007, 99(1): 145-155.
- Qian W, Zhu Y. Climate change in China from 1880 to 1998 and its impact on the environmental condition[J]. *Climatic Change*, 2001, 50(4): 419-444.
- Rumbaugh M D. Breeding bloat-safe cultivars of bloat causing legumes[J]. *Proceedings of the Trilateral Workshop*, 1985, 238-245.
- Reategui K. Persistence of mixed pastures with different pasture management system on clay[J]. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 1999, 72(3): 16-24.
- Ryan C A. Night moves of pregnant moths[J]. *Nature*, 2001, 410:530-531.
- Sanders E H, Gardner P D, Berger P J, Negus N C. 6-MBOA: A plant derivative that stimulatates reproduction in *Microtus ontanus*[J]. *Science*, 1981, 214: 67-69.
- Steed J E, Dewald L E, Kolb T E. Physiological and growth responses of riparian sedge transplants to groundwater depth[J]. *Internation Journal of Plant Science*, 2002, 163(6): 925-936.
- Stenström A, Jonsson B O, Jónsdóttir I S. Genetic variation and clonal diversity in four clonal sedges (*Carex*) along the Arctic coast of Eurasia[J]. *Molecular Ecology*, 2001, 10(2): 497-513.
- Strauss S Y, Siemens D H, Decher M B. Ecological costs of plant resistance to herbivores in the

- currency of pollination[J]. *Evolution*, 1999, 53(4): 1105-1113.
- Svejcar T J, Riegel G M. Spatial pattern of gas exchange for montane moist meadow species[J]. *Journal of Vegetation Science*, 1998: 9(1): 85-94.
- Swain C G, Powell A L, Sheppard W A, Morgan C R. Mechanism of the Cannizzaro reaction[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1979, 101(13): 3576-3583.
- Tahvanainen J E, Helle R, Lavola A. Phenolic compounds of willow bark as deterrents against feeding by mountain hare[J]. *Oecologia*, 1985, 65: 319-323.
- Thompson P M, Fedak M A, McConnell B J, Nicholas K S. Seasonal and sex-related variation in the activity patterns of common seals (*Phoca vitulina*)[J]. *Journal of Applied Ecology*, 1989: 521-535.
- Tompson L D, Mcqueen R E, and Reichardt P B, Trenholm D G, Curran W J. Factors influencing choice of balsam fir[J]. *Oecologia*, 1989, 81: 506-513.
- Upadhyaya R S. Some nutritional And clinical observations in sheep fed Khejri (*prosopis cineraria*) [J]. *Indian J. Anim. Nutu.*, 1985, 2: 47-48.
- Wahlroos O, Virtanen A I. On the antifungal effect of benzoxazolinone and 6-methoxybenzoxazolinone[J]. *Fusarium nivale*, 1958, 12: 124-128.
- Williams A G, Whithan T G. Premature leaf abscission: an induced plant defense against gall aphid[J]. *Ecology*, 1986, 67: 1619-1627.
- Xuejie G, Zongci Z, Yihui D, Ronghui H and Giorgi F. Climate change due to greenhouse effects in China as simulated by a regional climate model[J]. *Advances in Atmospheric Sciences*, 2001, 18(6): 1224-1230.
- 白永飞, 李德新, 许志信. 牧压梯度对克氏针茅生长和繁殖的影响[J]. *生态学报*, 1999, 19(7): 479-484.
- 陈素华, 宫春宁. 内蒙古草原气候特点与草原生态类型区域划分[J]. *气象科技*, 2002, 33(4): 340-344.
- 陈佐忠, 汪诗平. 中国典型草原生态系统[M]. 北京: 科学出版社. 2000, 9-22.
- 陈汝民. 6-甲氧基-2-苯并咪唑酮 (MBOA) 分布不均匀是引起玉米胚芽鞘向光性运动的主[J]. *植物学报: 英文版*, 1999, 41(3): 296-300.
- 程智慧, 佟飞, 金瑞. 大蒜秸秆水浸液的抑菌作用和抑菌成分初步分析[J]. *西北植物学报*, 2008, 28(2): 324-330.

- 董全民, 赵新全, 马玉寿, 施建军, 王彦龙, 李世雄, 杨时海, 王柳英, 盛丽. 放牧对小嵩草草甸生物量及不同植物类群生长率和补偿效应的影响[J]. 生态学报, 2012, 32(9): 2640-2650.
- 李宁, 关文强, 段双科. 葡萄采后致病病原菌鉴定及侵染[J]. 保鲜与加工, 2005, 5(3): 37-39.
- 韩冰, 赵萌莉, 杨劼, 删丹, 韩国栋. 内蒙古高原克氏针茅种群的生态分化[J]. 中国草地学报, 2010, 32(4): 17-22.
- 何洪英. 单宁的生理活性[J]. 饮料工业, 2001, 4(5): 19-21.
- 胡增辉, 杨迪, 沈应柏. 不同损伤形式诱导合作杨叶片中酚类物质含量的差异[J]. 西北植物学报, 2009, 29(2): 332-337.
- 贾美清, 高玉葆. 内蒙古中东部草原不同地理种群克氏针茅种子萌发对渗透胁迫的响应[J]. 天津师范大学学报, 2009, 29(4): 67-7.
- 蒋金炜, 黄翠虹, 闫凤鸣. 苯并噁嗪类化合物研究进展[J]. 昆虫学报, 1986, 322:172-173.
- 康乐, 马世骏. 生态系统的恢复与重建[J]. 现代生态学透视. 北京: 科学出版社, 1990, 300-308.
- 李俊年, 刘季科. 植食性哺乳动物与植物协同进化研究发展[J]. 生态学报, 2002, 22(12): 2187-2193.
- 刘季科, 王溪, 刘伟. 北美田鼠亚科啮齿动物营养生态学研究进展[J]. 兽类学报, 1991, 11(3): 226-235.
- 刘力宽, 刘季科, 苏建平. 6-MBOA 对植食性小哺乳类繁殖作用的研究进展[J]. 兽类学报, 1998, 18(1): 60-67.
- 刘志鹏, 杨青川, 胡天明. 抗腹胀病紫花苜蓿研究进展[J]. 四川草原, 2003(5): 7
- 刘松. 极端干旱环境下植物体内多酚类物质含量及其对逆境的响应研究[D]. 北京林业大学, 2007.
- 马红彬. 不同放牧强度对荒漠草原几种牧草一些生理指标的影响[J]. 干旱地区农业研究. 2008, 26(2): 79-84.
- 潘庆民, 白永飞, 韩兴国, 张丽霞. 羊草根茎的贮藏碳水化合物及对氮素添加的响应[J]. 植物生态学报, 2004, 28(1): 53-55.
- 潘颜霞, 王新平. 荒漠人工植被区浅层土壤水分空间变化特征分析[J]. 中国沙漠, 2007, 27(2): 250-256.

- 沈洋, 刘芳, 李青丰, 苏红田, 张义. 4种禾草种子发芽条件的筛选研究[J]. 草地学报, 2012, 20(1): 70-75.
- 史志诚. 单宁生物活化理论及其应用[J]. 江北农业大学学报, 1987, 17(1): 27-32.
- 施雅风, 沈永平, 李栋梁, 张国威, 丁永建, 胡汝骥, 康尔泗. 中国西北气候由暖干向暖湿转型的特征和趋势探讨[J]. 第四纪研究, 2003, 23(2): 152-164.
- 邵玉琴, 杨桂霞, 崔宇新, 辛小平, 刘钟龄, 戴雅婷, 赵吉. 锡林郭勒典型草原不同放牧强度下土壤微生物数量的分布特征[J]. 中国草地学报, 2011, 33(2): 63-67.
- 王策箴. 羊草内部结构及其细胞学研究[J]. 中国草原, 1981, (2): 41-45.
- 王克平. 羊草物种分化研究Ⅱ 试验地种群对比[J]. 中国草原, 1987, 1: 48-52.
- 王克平. 羊草物种分化研究Ⅰ 野生种群的考察[J]. 中国草原, 1984, 2: 32-36.
- 王深柱, 钦俊德. 昆虫与植物的协同进化: 寄主植物-铃夜蛾-寄主蜂相互作用[J]. 昆虫知识, 2007, 44(3): 311-319.
- 王德利. 植物与草食动物之间的协同适应及进化[J]. 生态学报, 2004, 24(11): 2641-2548.
- 王艳芳, 韩冰, 张占雄. 锡林郭勒草原克氏针茅抗旱生理变化的研究[J]. 草业科学, 2006, 23(2): 22-26.
- 王红星, 乔传英, 古红梅. 影响植物次生代谢产物形成的因素[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(35): 1137-1137.
- 王艳, 李俊清, 谭志刚, 阿木古郎, 白彤. 虫害及水分条件对胡杨 (*Populus euphratica*) 叶片中酚类物质及氮含量的影响[J]. 中国农学通报, 2009, 25(12): 69-74.
- 汪诗平, 王艳芬, 陈佐忠. 气候变化和放牧活动对糙隐子草种群的影响[J]. 植物生态学报, 2003, 27(3): 337-343.
- 卫星, 申家恒. 羊草受精作用及其胚与胚乳早期发育的观察[J]. 西北植物学报, 2004, 24(1): 31-37.
- 文亦蒂, 曹国军, 樊江文, 毛华明, 罗富成. 6种豆科饲用灌木中酚类物质动态变化与体外消化率的关系[J]. 草业学报, 2009(1): 32-38.
- 肖崇厚. 中药化学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991, 323-374.
- 徐朋君, 赵钢, 王波等. 种针茅种子萌发特性及幼苗生长的研究[J]. 中国草地学报, 2006, 28(1): 41-44.
- 徐利岗, 周宏飞, 梁川, 吴安琪. 中国北方荒漠区降水多时间尺度变异性研究[J]. 水利学报, 2009, 40(8): 1002-1011.

- 袁红娥. 叶损伤诱导兴安落叶松针叶中缩合单宁与酚酸的时序变化[D]. 东北林业大学, 2008.
- 周婵, 杨允菲. 松嫩平原两种趋异类型羊草实验种群对盐碱胁迫的水分响应[J]. 草业学报, 2003, 12(1): 65-68.
- 周明. 单宁对动物营养代谢的影响[J]. 中国饲料, 1996, 11: 23-24.
- 中国科学院内蒙古宁夏综合考察队. 内蒙古植被[M]. 北京: 科学出版社, 1985, 1-9; 572-602.
- 张昊, 李鑫, 姜凤和, 林国辉, 杜丽华. 水分对克氏针茅和冷蒿生殖生长的影响[J]. 草地学报, 2005, 13(2): 106-110.

致 谢

光阴如梭，硕士研究生的学习生活即将结束，三年的学习生活使我受益匪浅，倍感充实。经历三年的努力，硕士论文终于完稿，在此，我谨向所有关心、爱护和帮助过我的老师、同学以及亲友致以最诚挚的谢意和最美好的祝福。

本论文是在导师杨生妹教授的悉心指导下完成的。从选题、实验到论文材料的整理、修改的每个环节，都凝聚了恩师无数心血和汗水。三年的学习生活，导师倾心教授，她渊博的学识，深厚的人文修养，严谨的治学态度都深深的影响着我，她大气的胸怀和谦和的为人也时刻感染着我，激励我不断的成长成才。同时，也衷心地感谢她的先生魏万红教授，感谢他这三年来在学习和生活上无微不至的关怀，在此，学生向你们衷心道声：“谢谢你们！”

感谢戴鑫老师对论文的指导。从实验的设计、文献的查阅、方法的改进以及数据的处理，到论文的撰写，戴老师都给予我莫大的帮助，在此表示衷心的感谢！

感谢谢虹老师，她在实验上毫不保留地悉心教导我，在生活上也常常给予许多帮助，在此，我要向你表示最诚挚的谢意与祝福。

感谢动物组殷宝法老师、杨凤萍老师、王爱勤老师、李世平老师和叶满红老师在实验期间、论文撰写和修改期间给予的无私的帮助和指导。

感谢邹昭枝硕士、蒋巍硕士、张婷婷硕士、陆巍硕士、王书莉硕士、张磊硕士以及袁杭硕士在我学习和实验期间给予我的帮助和支持；感谢石佳、何颖、吕慧、蒋婷婷、郝中湜等同学三年对我的爱护、包容和帮助，谢谢你们陪伴我度过愉快的研究生生活；感谢刘慧萍、刘倩、韩美、董君焰、孙振、张宾、尚国珍、孔舒舒、吴晓颖等学弟学妹在学习和生活中给我的许多鼓励和支持。值此论文的付梓之际，对以上提及以及未提及的老师、同学等给予我的关心和帮助，一并表示衷心的感谢。

最后，我要特别感谢在我求学生涯中一直默默关心支持我的父母、家人和朋友，是他们在精神上、物质上对我无微不至的关怀，是他们给予我面对困难，战胜困难的信心和勇气，使我得以顺利完成学业，愿你们永远健康快乐！

袁飞

2013.4

扬州大学学位论文原创性声明和版权使用授权书

学位论文原创性声明

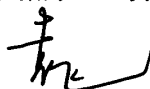
本人声明：所呈交的学位论文是在导师指导下独立进行研究工作所取得的研究成果。除文中已经标明引用的内容外，本论文不包含其他个人或集体已经发表的研究成果。对本文的研究做出贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本声明的法律结果由本人承担。

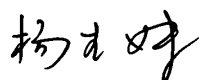
学位论文作者签名： 

签字日期：2013 年 6 月 6 日

学位论文版权使用授权书

本人完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留并向国家有关部门或机构送交学位论文的复印件和电子文档，允许论文被查阅和借阅。本人授权扬州大学可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同时授权中国科学技术信息研究所将本学位论文收录到《中国学位论文全文数据库》，并通过网络向社会公众提供信息服务。

学位论文作者签名： 

导师签名： 

签字日期：2013 年 6 月 6 日

签字日期：2013 年 6 月 6 日