

茉莉酸甲酯对艾纳香活性成分、抗氧化酶活力以及内源激素含量的影响

白琳^{1,2}, 官玲亮^{2*}, 陈松笔^{2*}, 庞玉新², 王凯², 陈振夏², 王鸿发², 梁一彪², 谭湘杰²

1. 黑龙江八一农垦大学农学院, 黑龙江 大庆 163319

2. 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所 农业部华南作物基因资源与种质创制重点开放实验室 海南省艾纳香工程技术研究中心, 海南 儋州 571737

摘要: 目的 研究艾纳香植株不同叶位叶片中4种内源激素含量和3种抗氧化酶活性以及L-龙脑的含量与诱导剂的浓度、采样时间之间的规律。方法 以0.01、0.10、1.00、10.00 mmol/L的茉莉酸甲酯(MeJA)作为外源诱导剂,艾纳香不同叶位的叶片(嫩叶、成熟叶、老叶)为实验对象,以生长素(IAA)、脱落酸(ABA)、赤霉素(GA₃)、玉米素(ZT)4种内源激素含量和过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)3种抗氧化酶的活力以及活性成分L-龙脑的含量作为检测指标。结果 1.00 mmol/L的MeJA对L-龙脑的积累效果较好;不同浓度的MeJA诱导下,抗氧化酶的变化比较复杂。对于POD来说,除了10.00 mmol/L MeJA浓度处理下的艾纳香3个叶位的叶片中其含量低于对照外,其他浓度处理下,POD在72 h均显著高于对照($P < 0.05$)。对于CAT来说,10.00 mmol/L MeJA诱导下,艾纳香3个叶位叶片其含量在24 h时达到最高,之后随着时间的推移,CAT活力极速下降。在其他浓度处理下,嫩叶和老叶中的CAT酶活力在72 h,显著低于对照,而在成熟叶中除了0.10 mmol/L MeJA处理,均在72 h时高于对照。对于SOD来说,除了1.00 mmol/L MeJA处理的3个叶位的叶片在48 h之后,SOD含量均高于对照,且与对照组有显著差异($P < 0.05$)外,其余浓度处理下的SOD均低于对照。低浓度的MeJA(≤ 0.10 mmol/L)可以促进艾纳香叶片中的IAA、GA₃和ZT的积累,而高浓度的MeJA(≥ 10.00 mmol/L)促进ABA的积累。结论 艾纳香植株在外源MeJA(1.00 mmol/L)诱导下可以促进活性成分积累,为其栽培生产提供理论依据。

关键词: 茉莉酸甲酯; 艾纳香; 抗氧化酶; 生长素; 脱落酸; 赤霉素; 玉米素

中图分类号: R282.21

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)01-0203-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.01.030

Effects of methyl jasmonate on active components, anti-oxidant enzyme activities and endogenous hormone content in *Blumea balsamifera*

BAI Lin^{1,2}, GUAN Ling-liang², CHEN Song-bi², PANG Yu-xin², WANG Kai², CHEN Zhen-xia², WANG Hong-fa², LIANG Yi-biao², TAN Xiang-jie²

1. Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China

2. Hainan Provincial Engineering Research Center for *Blumea balsamifera*, Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement in Southern China, Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou 571737, China

Abstract: Objective To study the regulation among the content of L-borneol and four endogenous hormones and the activity of three anti-oxidant enzymes in *Blumea balsamifera* leaves located at different leaf positions and the concentration of inducer and the sampling time. **Methods** Methyl Jasmonate (MeJA) of 0.01 mmol/L, 0.10 mmol/L, 1.00 mmol/L, and 10.00 mmol/L was chosen for exogenous inducer in this experiment. The leaves of *B. balsamifera* located at different leaf positions (tender leaves, mature leaves, aged leaves) were experimental materials. The active content of L-borneol, the content of four endogenous hormones of auxin (IAA), abscisic acid (ABA), gibberellic acid (GA₃), and zeatin (ZT), and the activity of three antioxidant enzymes of peroxidase (POD), catalase (CAT), and superoxide dismutase (SOD) were detection indexes. **Results** The results showed that the effect of 1.00 mmol/L

收稿日期: 2018-04-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31870317); 海南省自然科学基金资助项目(817263); 中国热带农业科学院基本科研业务费专项资金资助项目(1630032018029)

作者简介: 白琳(1993—),女,硕士研究生,研究方向为药用植物种质资源评价及次生代谢调控。Tel: 18184664933 E-mail: 2456061468@qq.com

*通信作者 陈松笔,博士生导师,主要从事木薯蛋白质组学和作物遗传育种研究。E-mail: songbichen@catas.cn

官玲亮,博士,副研究员,主要从事药用植物种质资源评价及次生代谢调控研究。E-mail: gllgirl123@163.com

MeJA on the accumulation of L-borneol was good. The changes of anti-oxidant enzymes induced by different concentrations of MeJA were complex. For the content of POD, except that the *B. balsamifera* leaves treated with 10.00 mmol/L MeJA were lower than that in the control, POD were significantly higher than those of the control ($P < 0.05$) at 72 h in other conditions. Under the induction of 10.00 mmol/L MeJA, the CAT content of the *B. balsamifera* leaves at three leaf positions was highest at 24 h, and the activity of CAT was decreased rapidly over time. Under the MeJA treatments of other concentrations, the activities of CAT in young leaves and old leaves were significantly lower than those in the control at 72 h, but higher than those in the control at 72 h except for the treatment of 0.1 mmol/L MeJA in mature leaves. The content of SOD in the three leaf positions was lower than the control except that the *B. balsamifera* leaves treated with 1 mmol/L MeJA was significantly higher than that of the control after 48 h. The rest of the concentration of superoxide dismutase were lower than the control. Low concentration of MeJA (≤ 0.10 mmol/L) could promote the accumulation of IAA, GA₃, and ZT in leaves of *B. balsamifera*, whereas the high concentration of MeJA (≥ 10.00 mmol/L) could promote the accumulation of ABA. **Conclusion** Under the induction of exogenous MeJA (1.00 mmol/L), *B. balsamifera* can promote the accumulation of active ingredients, providing a theoretical basis for its cultivation and production.

Key words: methyl jasmonate; *Blumea balsamifera* L. DC.; anti-oxidant enzyme; endogenous hormone; abscisic acid; gibberellic acid; zeatin

艾纳香 *Blumea balsamifera* L. DC. 又名大风艾、冰片艾,为菊科艾纳香属多年生木质草本植物,被列为十大苗药之一,主要分布在我国海南、贵州、广西、广东、云南、台湾等地。艾纳香也是提取天然冰片(艾片)的主要来源。现代药理学研究证实,艾纳香中的 L-龙脑具有抗炎、抗氧化、镇痛、促进药物吸收、提神醒脑等作用,并且在精致艾片过程中所产生的艾油具有扩张血管、降低血压、抑制交感神经的作用,因而被广泛应用于医药行业^[1]。同时,因艾油有独特的气味,也被广泛应用于香料及化妆品等行业。

以茉莉酸(jasmonic acid, JA)和茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)为代表的茉莉素类物质(jasmonates, JAs)是一种常见的植物生长调节剂,广泛存在于自然界中,在植物损伤信号防御反应中起着重要的作用。通过研究 MeJA 对茶树^[2]、丹参^[3]、番茄^[4]、水稻^[5]等多种高等植物次生代谢产物和抗逆性的影响表明,MeJA 对提高作物的品质和增强抗逆反应等方面具有显著的作用。因此,目前已将 MeJA 作为常用的外源生长调节剂,在大田栽培生产过程中广泛应用。植物内源激素是指植物体内自身代谢产生的调控生长发育的物质,目前科学界公认的 6 大类植物激素有生长素(auxins)、赤霉素(gibberellins, GA)、细胞分裂素类(cytokinins, CK)、乙烯(ethylene)、脱落酸(abscisic acid, ABA)、油菜素甾醇类(brassinosteroids, BRs)^[6],其作用在于调控植物的生长发育来提高作物的产量,改善作物的品质^[7]。植物通过抗氧化酶系统来清除新陈代谢过程中以及外界逆境胁迫下产生的活性氧,对维持其正常生长具有重要的作用。抗氧化酶系统中控制植物体内

活性氧积累的最主要的酶有过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)3种。其与植物的呼吸作用、光合作用及生长素的氧化等都有密切关系,在植物生长发育的过程中,其活性不断发生变化,因此测定这3种酶的活性可以反映出某一时期植物体内代谢水平的变化^[8]。

目前,关于外源喷 MeJA 对艾纳香植株内激素和抗氧化酶影响的研究较少。本实验以不同浓度的 MeJA 作为外源生长调节剂,外源诱导艾纳香植株不同叶位的叶片,测定诱导后不同时间段内,不同叶位叶片中 L-龙脑含量以及 4 种内源激素含量和 3 种抗氧化酶活性,以期揭示 MeJA 对促进 L-龙脑积累的机制,为艾纳香的高产栽培技术提供理论依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

艾纳香栽培于海南省儋州市中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所南药种质资源圃,经中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所庞玉新研究员鉴定为艾纳香 *Blumea balsamifera* L. DC.,用于实验的对象为艾纳香长势良好的不同叶位的叶片。

1.2 试剂与仪器

L-龙脑对照品(Alfa Aesar,质量分数>98.0%);醋酸乙酯(广州友联化学试剂有限公司,分析纯);去离子水、MeJA(Sigma公司,质量分数>99.9%)、pH值分别为6.0、7.0、7.8的标准磷酸缓冲液(东莞市思博电子材料有限公司);甲硫氨酸(上海Macklin生化有限公司);愈创木酚、核黄素以及氮蓝四唑均为北京Solarbio生命科学公司产品;H₂O₂、EDTA-Na₂均为国产分析纯试剂。

2 方法

2.1 试剂配制与样品处理

2.1.1 试剂配制 根据其他文献中人工生长调节剂在药用植物诱导中所选取的浓度^[9-10], MeJA 浓度均配制为 10.00、1.00、0.10、0.01 mmol/L 的溶液, 具体配制方法: 由商品包装给出的密度与相对分子质量可以计算出 MeJA 原液与欲配制浓度的定量关系。分别准确移取 MeJA 原液 1 090.00、109.00、10.90、1.09 μL 于 500 mL 量瓶内, 再分别加入 2 μL 聚山梨酯 20, 最后用去离子水定容至刻度, 摇匀后即得到浓度分别为 10.00、1.00、0.10、0.01 mmol/L 的溶液, 装入干净的喷壶中待用, 分别贴上标签。

2.1.2 样品处理 选择田间生长状况良好的艾纳香单株进行无性繁殖, 获得艾纳香田间表现基本一致的植株, 分为 2 组, 一组用 4 个浓度梯度的 MeJA 溶液进行叶面均匀喷施处理, 做好标记。另一组用去离子水进行叶面喷施作为空白对照。进行 3 次重复实验, 考察实验结果的相对稳定性与可重复性。根据艾纳香叶片所在叶位和生理状态的不同, 叶片被分为嫩叶(植株顶端未完全展开, 颜色略显黄白色的叶片)、成熟叶(植株中部, 完全长大、颜色深绿的叶片)、老叶(植株下方, 叶缘发黄卷曲的叶片) 3 种类别, 分别考察不同叶位的叶片中的抗氧化酶活性和内源激素对艾纳香叶片中 *L*-龙脑积累的响应特性。根据课题组前期预试验表明, 对艾纳香外源喷施这 2 种人工生长调节剂后, 在 24~72 h 差异表现较为明显, 为此, 本实验选取从处理结束后第 24、48、72 小时进行采样。

2.2 *L*-龙脑含量测定

由于 *L*-龙脑具有易挥发性, 为了减少采样后 *L*-龙脑的损失以减小实验误差, 每次采集的叶片样本均及时处理。将采集的艾纳香叶片迅即置于研钵中加液氮研磨成粉, 精密称取研磨粉末 2 g, 用醋酸乙酯超声提取法进行挥发油提取, 并定容滤过, 备用。样品的检测: 主要采用气相色谱法测定 *L*-龙脑含量。色谱条件为 HP-5 石英毛细管色谱柱(30 m \times 0.32 mm, 0.25 μm); 以 80 $^{\circ}\text{C}$ 为起始温度, 保持 2 min, 然后以 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 100 $^{\circ}\text{C}$, 再以 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 200 $^{\circ}\text{C}$; 进样口温度 220 $^{\circ}\text{C}$; FID 检测器温度为 240 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 0.6 μL , 不分流。

2.3 酶活力测定

2.3.1 酶的提取 称取艾纳香新鲜叶片 0.5 g, 剪

碎置于预冷的研钵中, 先加入 1 mL pH 值为 7.8 的磷酸缓冲液进行研磨, 待完全磨碎之后再加入 4 mL pH 值为 7.8 的磷酸缓冲液匀浆, 之后倒入 5 mL 离心管中以 4 000 r/min 离心 15 min, 上清液即是酶的粗提液。酶液储存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。

2.3.2 POD 活力测定 取 100 mL pH 值为 6.0 的磷酸缓冲液, 加入 0.5 mL 的愈创木酚原液和 1 mL 30%的 H_2O_2 , 混合均匀即得到反应液。取 27 支试管, 每支试管分装 3 mL 反应液, 逐个加入 50 μL 的酶液, 在 470 nm 波长处测定吸光度(A)值, 每 30 秒记录 1 次, 测 2 min。POD 酶活力单位计算: 以每分钟内 A_{470} 变化 0.01 为一个 POD 活力单位(U_{POD})。

$$U_{\text{POD}} = \Delta A_{470} \times V_0 / (m V_1 \times 0.01 t)$$

ΔA_{470} 是反应时间内 A_{470} 值的变化; V_0 是酶粗提液的体积; V_1 是测定时酶的体积; m 是新鲜叶片的质量; t 是测定总时间; 经过算式的合并化简, $U_{\text{POD}} = \Delta A_{470} \times 10\ 000$

2.3.3 CAT 活力测定 测定步骤 取 200 mL pH 为 7.0 的磷酸缓冲液, 加入 310 μL 30%的 H_2O_2 , 混合均匀即得反应液。取 27 支试管, 每支试管分装 3 mL 反应液, 逐个加入 50 μL 的酶液, 在 240 nm 波长处测定紫外 A_{240} 值, 每隔 5 s 记录 1 次, 共测定 30 s。CAT 酶活力单位计算: 以每分钟 A_{240} 减少 0.01 为一个酶活力单位(U_{CAT})。

$$U_{\text{CAT}} = \Delta A_{240} \times V_0 / (m V_1 \times 0.01 t)$$

ΔA_{240} 是反应时间内 A 值的变化; V_0 是酶粗提液的体积; V_1 是测定时酶的体积; m 是新鲜叶片的质量; t 是测定总时间; 经过算式的合并化简, $U_{\text{CAT}} = \Delta A_{240} \times 4\ 000$

2.3.4 SOD 活力测定 测定步骤 按照表 1 配制各组反应液。其中对照组不加酶液(阴暗处理), 用于调零。对照组(光照处理)为最大光化还原组, 然后将各管放在 4 000 lx 光照培养箱中光照处理 20 min, 在 560 nm 波长处测定 A_{560} 值。SOD 酶活力单位计算: 以抑制 NBT 光化还原反应 50% 作为一个活力单位(U_{SOD})。

$$U_{\text{SOD}} = (A_{\text{ck}} - A_{\text{E}}) \times V / (0.5 \times A_{\text{ck}} \times W \times V_t)$$

A_{ck} 是光照对照 A 值; A_{E} 是样品 A 值; V 是酶液总体积; W 是新鲜样品质量; V_t 是测定对酶液的实际用量; 通过对公式合并化简, $U_{\text{SOD}} = 400 \times (A_{\text{ck}} - A_{\text{E}}) / A_{\text{ck}}$

2.4 内源激素含量测定

参考文献报道方法^[11-13], 将采集的叶片 1.0 g 于研钵中, 加入约 0.5 g 石英砂, 加入 2 mL 提取液(80%甲醇, 内含有 BHT 和 PVPP), 冰浴研磨至粉

表 1 SOD 测定反应液的配制

Table 1 Preparation of reaction solution for SOD determination

试剂名称	对照 (阴暗) 组/mL	对照 (光照) 组/mL	样品组/mL
缓冲液 (pH=6)	1.50	1.50	1.50
Met (130 mmol·L ⁻¹)	0.30	0.30	0.30
氮蓝四唑 (NBT)	0.30	0.30	0.30
EDTA-Na ₂ (100 μmol·L ⁻¹)	0.30	0.30	0.30
蒸馏水	0.25	0.25	0.25
酶液	0	0	0.50
核黄素 (20 μmol·L ⁻¹)	0.30	0.30	0.30

末状, 全部转入 10 mL 离心管中, 4 °C 提取 10 h, 4 000 r/min 离心 15 min, 取上清液放入 C₁₈ 萃取柱滤过, 然后放入真空离心浓缩干燥器浓缩, 加入稀释液定容至 1 mL, 备用。

将上述制备液采用酶联免疫法分别进行生长素 (IAA)、脱落酸 (ABA)、赤霉素 (GA₃) 和玉米素 (ZT) 含量测定。ELISA 试剂盒由北京方程生物技术有限公司提供, 按其说明书进行操作。

2.5 数据处理

实验数据分析采用 Microsoft Excel 2003 和 SPSS 20.0 统计分析软件。

3 结果与分析

3.1 不同浓度的 MeJA 对艾纳香叶片中 L-龙脑含量的影响

由表 2 可知, 不同浓度的 MeJA 对 L-龙脑积累的影响。总体来看不同浓度的 MeJA 均能促进艾纳香叶片中 L-龙脑的积累。除了 10 mmol/L

MeJA 处理外, 其他浓度处理下艾纳香 3 个叶位的叶片中 L-龙脑积累量随着时间推移呈逐渐上升趋势, 尤其浓度为 1 mmol/L 的 MeJA 的处理效果最好, 在 72 h 时 3 个叶位的叶片均达到 L-龙脑积累的最大值, 分别为 3.346、3.043、2.044 mg/g, 且与对照有显著差异。由此可见, 1 mmol/L 的 MeJA 处理对艾纳香叶片中 L-龙脑的积累有较大影响。

3.2 不同浓度的 MeJA 对艾纳香叶片中内源激素含量的影响

由表 3 可知, 不同浓度 MeJA 处理, 对艾纳香不同叶位中 IAA、ABA、GA₃ 和 ZT 积累具有不同程度的影响。当 MeJA 浓度为 0.1 mmol/L 时, 艾纳香老叶中 IAA 含量在 24 h 达到最高, 显著高于对照组 ($P < 0.05$)。在成熟叶中, 0.1 mmol/L 的 MeJA 处理下 IAA 含量在 48 h 时达最高值, 而其他浓度 MeJA 均不同程度地抑制了嫩叶中 IAA 含量, IAA 含量随浓度的升高而降低。

除 10 mmol/L 外的其他 MeJA 浓度处理下, 嫩叶中 ABA 含量均显著低于对照 ($P < 0.05$)。10 mmol/L MeJA 处理嫩叶后 24 h, 其 ABA 含量显著高于对照。浓度为 0.01 mmol/L MeJA 处理艾纳香成熟叶和老叶后, 其叶片中的 ABA 含量均在 72 h 时显著高于对照 ($P < 0.05$)。浓度为 10 mmol/L MeJA 处理艾纳香成熟叶后, 其 ABA 含量在 24 h 达最大值, 之后迅速减少, 72 h 时最低。

表 2 MeJA 处理后艾纳香叶片中 L-龙脑的含量

Table 2 L-borneol content of *B. balsamifera* leaves after treatments of MeJA

MeJA 浓度/(mmol·L ⁻¹)	采样时间/h	L-龙脑/(mg·g ⁻¹)		
		嫩叶	成熟叶	老叶
0.01	24	1.258 ± 0.114 B	0.950 ± 0.183 B	0.852 ± 0.370
	48	1.788 ± 1.024 AB	1.542 ± 0.388 AB	1.483 ± 0.516
	72	2.016 ± 0.469 AB	1.689 ± 0.658 AB	1.730 ± 0.681
0.10	24	1.736 ± 0.511 AB	1.369 ± 0.151 AB	0.931 ± 0.081
	48	1.860 ± 0.592 AB	1.548 ± 0.318 AB	1.472 ± 0.851
	72	2.058 ± 0.300 AB	1.537 ± 0.685 AB	1.813 ± 0.890
1.00	24	1.307 ± 0.202 B	0.876 ± 0.136 B	0.750 ± 0.128
	48	1.464 ± 0.542 AB	1.999 ± 0.620 AB	1.510 ± 0.946
	72	3.346 ± 0.281 A	3.043 ± 0.759 A	2.044 ± 0.655
10.00	24	1.553 ± 0.439 AB	1.229 ± 0.113 AB	0.900 ± 0.045
	48	2.017 ± 1.173 AB	1.790 ± 0.954 AB	1.012 ± 0.415
	72	1.416 ± 0.439 AB	1.169 ± 0.308 AB	1.203 ± 0.111
对照		1.163 ± 0.297 B	0.925 ± 0.159 B	0.650 ± 0.130

大写字母表示 $P < 0.05$ 水平下显著差异, 下同; 老叶在各浓度处理下没有发生显著变化

Capital letters in table indicate significant differences at $P < 0.05$ levels, same as below; old leaves did not change significantly under various concentrations

表 3 MeJA 处理后艾纳香叶片中 IAA、ABA、GA₃ 和 ZT 含量
Table 3 IAA, ABA, GA₃, and ZT content of *B. balsamifera* leaves after treatments of MeJA

MeJA 浓度/ (mmol·L ⁻¹)	采样时 间/h	IAA/(ng·g ⁻¹)			ABA/(ng·g ⁻¹)		
		嫩叶	成熟叶	老叶	嫩叶	成熟叶	老叶
0.01	24	689.27±0.33 D	187.28±0.24 IJ	311.74±0.67 EFG	12.61±0.25 C	9.89±0.09 D	15.42±0.20 AB
	48	206.43±0.12 GH	1 359.96±1.92 A	2 093.17±1.81 A	10.06±0.02 C	6.29±0.22 D	7.63±0.02 B
	72	739.12±0.33 C	302.75±0.35G H	439.90±0.47 D	6.43±0.01 C	26.97±0.02 B	18.72±0.00 A
0.10	24	342.99±0.17 F	673.72±0.01 C	683.27±0.02 C	12.65±0.01 C	14.23±0.00 CD	11.85±0.02 AB
	48	1 400.00±1.26 B	1 071.85±1.03 B	352.38±0.40 EF	8.33±0.19 C	3.79±0.16 E	3.57±0.09 C
	72	1 544.99±0.96 A	51.73±0.04 K	627.86±0.55 C	6.54±0.01 C	4.77±0.21 D	6.71±0.01 B
1.00	24	250.01±0.43 G	218.23±0.26 HJ	356.16±0.65 E	9.63±0.12 C	25.16±0.17 BC	12.85±0.00 AB
	48	124.76±0.11	586.56±0.67 D	142.08±0.30 I	6.16±0.00 C	9.97±0.07 D	8.85±0.13 B
	72	146.19±0.15 F	537.47±0.92 DF	1 071.85±1.32 B	9.63±1.23 C	12.65±0.01 D	5.59±0.12 B
10.00	24	220.62±0.45 G	153.83±0.08 J	226.23±0.31 GHI	46.19±0.06 A	35.75±0.28 A	12.75±0.37 AB
	48	130.00±0.33 F	15.36±0.06 K	132.65±0.08 I	24.83±0.35 B	10.10±0.14 D	10.23±0.07 AB
	72	165.20±0.14 HF	170.26±0.01 J	198.69±0.22 HI	24.63±0.19 B	4.80±0.36 D	5.92±0.07 B
对照		712.22±0.90 C	449.14±0.29 FG	278.96±0.14 FGH	17.59±0.17 BC	7.22±0.06 D	11.30±0.03 AB

MeJA 浓度/ (mmol·L ⁻¹)	采样时 间/h	GA ₃ /(ng·g ⁻¹)			ZT/(ng·g ⁻¹)		
		嫩叶	成熟叶	老叶	嫩叶	成熟叶	老叶
0.01	24	13.17±0.03 ABC	4.17±0.11 AB	22.35±0.05 A	2.02±0.06 DE	1.38±0.02 DE	10.05±0.26 CD
	48	18.82±0.06 AB	0.61±0.01 B	10.67±0.00 B	26.34±0.05 BC	39.60±0.05 B	12.45±0.01 BCD
	72	19.27±0.46 A	2.21±0.24 AB	7.80±0.58 BC	6.38±0.03 CDE	24.60±0.22 C	49.00±0.00 A
0.10	24	2.60±0.23 D	2.74±0.14 AB	10.13±0.36 BC	0.26±0.08 E	0.12±0.00 C	0.22±0.06 D
	48	0.25±0.01 D	0.16±0.02 B	4.31±0.06 BC	0.13±0.04 E	0.16±0.37 C	2.74±0.13 D
	72	1.05±0.02 D	0.39±0.01 B	21.95±0.56 A	0.21±0.03 E	0.68±0.06 E	1.40±0.12 D
1.00	24	5.49±0.01 CD	5.12±0.02 AB	1.34±0.14 BC	44.74±0.00 A	74.23±0.02 A	19.64±0.07 BC
	48	0.66±0.08 D	1.18±0.38 B	0.40±0.00 C	1.82±0.04 DE	0.16±0.01 E	0.37±0.00 D
	72	0.66±0.03 D	0.96±0.29 B	0.69±0.11 BC	0.10±0.01 E	0.81±0.67 E	0.25±0.01 D
10.00	24	3.99±0.09 CD	4.61±0.09 AB	6.34±0.21 BC	13.24±0.12 CDE	27.63±0.23 BC	44.27±0.04 A
	48	1.42±0.01 D	2.82±0.00 AB	0.32±0.05 C	16.34±0.06 BCD	21.02±0.08 C	25.30±0.13 B
	72	0.18±0.16 D	3.24±0.47 AB	0.36±0.02 C	29.88±0.04 B	0.08±0.13 E	0.14±0.44 D
对照		8.02±0.03 BCD	12.21±0.24 A	1.71±0.05 BC	5.51±0.03 CDE	1.01±0.11 E	0.57±0.01 D

除了 0.01 mmol/L 外, 其他浓度的 MeJA 处理艾纳香嫩叶后, GA₃ 含量均低于对照。0.01 mmol/L MeJA 处理嫩叶后 72 h, 其叶片中 GA₃ 达到含量的最大值。在成熟叶中, 不同浓度 MeJA 对 GA₃ 的积累均有不同程度的抑制作用。而 0.01 mmol/L MeJA 处理老叶后 24 h, GA₃ 积累量显著增加 ($P<0.05$)。

对于叶片中的 ZT 含量来说, 不同浓度的 MeJA 对艾纳香不同叶位叶片中 ZT 含量的积累均有不同程度的促进作用。1 mmol/L MeJA 处理促进艾纳香成熟叶在 24 h 时, ZT 含量达到最大值。从表 3 可见, 不同浓度的 MeJA 处理对于艾纳香叶片中内源激素积累量的影响不同, 其中以浓度为 0.01 mmol/L 的 MeJA 的效果较好。

3.3 不同浓度的 MeJA 对艾纳香叶片中抗氧化酶活性的影响

不同浓度 MeJA 对艾纳香不同叶位叶中 POD、CAT 和 SOD 的活力有显著影响 (表 4)。其中, 10

mmol/L 的 MeJA 处理下艾纳香各叶片中 POD 的活性均显著低于对照组 ($P<0.05$), 尤其对老叶中 POD 的活性影响严重, 酶活力单位最低时达到 1 000 U/(min·g) 以下。0.01 mmol/L 和 0.10 mmol/L 的 MeJA 诱导的成熟叶和老叶在 24 h 时 POD 的活性低于对照; 但随着时间的推移, POD 活性逐渐升高, 在 72 h 各叶位叶片中 POD 活性均显著高于对照组 ($P<0.05$); 而嫩叶在这 2 种浓度诱导下表现为, 在 48 h 时 POD 活力最低, 在 72 h 时酶活力显著高于对照 ($P<0.05$)。从总体来看, 1 mmol/L 的 MeJA 有诱导艾纳香叶片 POD 活性增高的作用, 这种作用在嫩叶中相对较弱, 在成熟叶中最明显, 3 个时段的样本中酶活力均高于对照组。在老叶中, 1 mmol/L 的 MeJA 在处理后的变化, 酶活力呈现先增强后减弱, 然后增强的趋势。

对 CAT 而言, 根据艾纳香叶位的不同, 对不同浓度的 MeJA 的诱导表现出不同的抑制或促进作用。

表 4 MeJA 处理后艾纳香叶片中 POD、CAT 和 SOD 的活性

Table 4 POD, CAT, and SOD activities of *B. balsamifera* leaves after treatments of MeJA

MeJA 浓度/ (mmol·L ⁻¹)	采样时 间/h	POD(U·min ⁻¹ ·g ⁻¹)			CAT(U·min ⁻¹ ·g ⁻¹)			SOD(U·g ⁻¹)		
		嫩叶	成熟叶	老叶	嫩叶	成熟叶	老叶	嫩叶	成熟叶	老叶
0.01	24	4 747.00±1.24 BCDE	5 213.00±0.71 CDE	2 988.00±1.01 C	1 78.80±0.25 BC	1 25.20±0.11 C	1 15.20±0.01 BC	2 58.50±0.02 B	2 32.50±0.01 CD	2 58.50±0.35 AB
	48	4 249.00±0.91 CDE	5 454.00±0.96 C	3 122.00±0.96 C	1 79.60±0.47 BC	1 81.60±0.01 AB	1 28.80±0.08 ABC	201.00±0.02 CD	194.00±0.06 DE	1 78.50±0.02 BCD
	72	5 931.00±0.97 A	5 968.00±0.80 B	3 423.00±0.82 B	1 72.40±1.28 BC	1 87.20±0.02 AB	1 29.20±0.85 ABC	234.50±0.01 BC	244.50±0.00 BC	237.90±0.05 AB
0.10	24	5 122.00±0.82 BC	4 931.00±0.58 E	1 208.00±0.72 EF	168.80±0.00 BC	92.40±0.01 C	83.20±0.78 C	233.50±0.05 BC	179.50±0.05 DE	144.50±0.01 CD
	48	4 844.00±1.01 BCD	5 299.00±0.34 CD	2 542.00±0.36 D	177.60±0.01 BC	119.60±0.09 C	136.80±0.18 ABC	189.50±0.01 CD	201.00±0.67 CD	89.00±0.45 D
	72	5 853.00±0.62 A	5 823.00±0.75 B	3 963.00±0.83 A	181.20±0.02 AB	129.20±0.00 C	105.20±0.13 BC	303.50±0.09 A	189.50±0.07 DE	141.50±0.02 CD
1.00	24	5 236.00±0.41 B	6 012.00±1.01 B	4 122.00±1.51 A	134.40±0.01 C	124.80±0.02 C	128.80±1.19 ABC	239.00±0.07 BC	194.00±0.04 DE	207.50±0.03 ABC
	48	4 988.00±0.82 BC	6 854.00±0.86 A	2 978.00±0.48 C	195.20±0.24 AB	141.60±0.03 BC	151.20±0.03 AB	294.50±1.34 A	288.50±0.34 AB	239.00±0.21 AB
	72	4 523.00±0.54 CDE	5 966.00±0.88 B	4 020.00±0.13 A	169.20±0.03 BC	146.40±0.00 BC	88.00±0.02 C	306.00±0.01 A	300.50±0.00 A	284.50±0.33 A
10.00	24	3 080.00±0.75 EF	4 799.00±1.15 E	1 225.00±0.33 EF	272.00±0.22 A	199.60±0.34 A	170.00±0.56 A	122.50±0.04 DE	189.40±0.23 DE	206.00±0.50 ABC
	48	3 988.00±0.82 DE	4 123.00±0.94 F	1 354.00±0.70 DE	275.20±0.00 A	169.20±0.4A BC	141.60±0.03 AB	160.90±0.0 CDE	139.90±0.22 E	189.40±0.04 BC
	72	2 971.00±0.21 F	4 988.00±0.87 DE	931.00±0.16 F	228.40±0.05 AB	155.20±0.1A BC	112.40±0.01 BC	118.40±0.01 E	14.00±0.00 DE	202.50±0.01 ABC
对照		4 832.00±0.24 BCD	5 332.00±0.47 CDE	3 336.00±1.29 B	212.80±0.03 AB	132.80±0.09 C	134.40±0.31 ABC	283.50±0.56 A	239.50±1.21 BC	253.50±0.32 AB

在成熟叶，0.01 mmol/L 的 MeJA 诱导后，CAT 活力随时间推移而逐渐增强，到第 72 小时 CAT 活力达最高，显著高于对照组 ($P<0.05$)，而这种变化趋势在嫩叶和老叶中不显著。10 mmol/L 的 MeJA 处理艾纳香嫩叶后，第 24、48 小时 CAT 活力被诱导增强，显著高于对照组的酶活力。其余 3 个浓度 MeJA 处理艾纳香嫩叶，CAT 的活力均低于对照组。在成熟叶中，10 mmol/L 的 MeJA 在处理后的第 24 小时 CAT 活力有显著增强，之后逐渐下降，但总体上仍表现为高于对照组。

不同浓度 MeJA 处理过的艾纳香叶片中 SOD 活力变化主要表现为 1 mmol/L 的 MeJA 在处理之后 24 h 内，艾纳香不同叶位叶片中的 SOD 活性均稍低于对照，之后第 48、72 小时，酶活力逐渐升高，至第 72 小时酶活力达最大，显著高于对照组。其余浓度的 MeJA 对艾纳香不同叶位叶片中的 SOD 活力均表现为抑制，其中嫩叶和成熟叶对 10 mmol/L MeJA 的响应较强烈。0.1 mmol/L 的 MeJA 对老叶中 SOD 的抑制作用最强。另外，低浓度的 MeJA (≤ 0.1 mmol/L) 对 SOD 活性的影响随时间推移而逐渐减弱。

4 讨论

次生代谢是植物生命活动过程中产生的，可以通过一些生物因素和非生物因素的诱导使其大量产生。*L*-龙脑作为艾纳香主要的萜类次生代谢产物，也是艾纳香重要的药用活性成分，提高其含量对于

艾纳香的药用价值有着重要的意义。有研究表明，外源喷施 0.1 mmol/L MeJA 诱导，可以使鱼腥草单萜升高，MeJA 浓度越高，反而对鱼腥草单萜的产生有抑制作用，并且高浓度的 MeJA 会对植物造成氧化胁迫^[9]。另外，研究还发现，单萜因其具有活泼的不饱和双键，有较强的抗氧化能力，可作为一种抗氧化因子清除由逆境胁迫诱导产生的过量活性氧 (reactive oxygen species, ROS)^[14]，本实验通过外源喷施不同浓度的 MeJA 来观察 *L*-龙脑、内源激素以及抗氧化酶含量的变化，结果表明 1 mmol/L 的 MeJA 对于艾纳香叶片中的 *L*-龙脑积累的效果较好。可能是由于随着时间的推移 1 mmol/L MeJA 诱导下艾纳香叶片中 SOD 含量增加，在 SOD 的作用超氧负离子转化为一种常见的活性氧分子 H₂O₂，再由 CAT 和 POD 消除^[15]，但是随着时间的推移，1 mmol/L MeJA 诱导下艾纳香叶片中 CAT 和 POD 虽然有所增加但不太明显，ROS 产生与清除的动态平衡遭到破坏，总体表现出抗氧化酶清除活性氧的能力降低，促进了 ROS 以 H₂O₂ 形式积累，因此，艾纳香植株体通过促进 *L*-龙脑等萜类物质的大量积累来降低这种氧化胁迫造成的伤害。

本研究中，低浓度的 MeJA (≤ 0.1 mmol/L) 可以促进于艾纳香叶片中的 IAA、GA₃ 和 ZT 的积累，而高浓度的 MeJA (≥ 10 mmol/L) 对于 ABA 的积累有效果。对于植物来说 IAA 可以推迟叶片衰老，促进叶片扩大，GA₃ 可以抑制成熟和器官衰老，延

缓叶片衰老, ZT 作为一种天然的游离态细胞分裂素广泛存在于植物体内, 具有促进细胞分裂, 延缓植物衰老的作用, 而 ABA 主要合成于处在休眠状态和将要脱落的器官中, 主要作用抑制植株生长, 另外, ABA 可以增强植物的抗逆性^[7]。低浓度的 MeJA (≤ 0.1 mmol/L) 可使艾纳香体内的激素含量发生显著的变化, 进而调控艾纳香植株的生长。高浓度的 MeJA (≥ 10 mmol/L) 一方面增加了 ABA 含量, 促进了艾纳香植株的衰老, 另一方面对艾纳香植株产生胁迫, 产生大量的 ABA 来减少对植株的胁迫伤害。

参考文献

- [1] 李 璞, 陈宇琼, 黄火强. 艾纳香化学成分与药理活性研究进展 [J]. 实用中医内科杂志, 2012, 26(10): 3-6.
- [2] 施 江. 外源茉莉酸甲酯诱导对茶树鲜叶次生代谢产物的影响 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2014.
- [3] 李文渊, 高 伟, 赵 静, 等. 基于茉莉酸甲酯诱导的丹参毛状根酚酸类成分次生代谢机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(1): 13-16.
- [4] 于萌萌, 申 琳, 生吉萍. 茉莉酸甲酯诱导采后番茄果实抗病的作用 [J]. 食品科学, 2012(9): 11-15.
- [5] 吴莹莹, 黄凤宽, 韦素美, 等. 茉莉酸甲酯诱导水稻后对褐飞虱的抗性研究 [J]. 广西农业科学, 2008(4): 474-477.
- [6] 路文静. 植物生理学 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2011.
- [7] 段 娜, 贾玉奎, 徐 军, 等. 植物内源激素研究进展 [J]. 中国农学通报, 2015, 31(2): 159-165.
- [8] 王学奎. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 第 2 版. 北京: 高等教育出版社, 2006.
- [9] 徐应文. 鱼腥草单萜次生代谢研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2012.
- [10] 侯 凯. 川白芷资源评价与植物激素对其生长发育和产量品质的影响 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2013.
- [11] 刘世红, 李平生, 陈国华, 等. 橡胶树老幼态芽内源激素差异分析 [J]. 中国热带农业, 2015, 66(5): 51-54.
- [12] 杜 娟, 郭华春. 马铃薯品种中甸红实生种子发芽率和内源激素水平的相关性分析 [J]. 云南农业大学学报 2015, 30(2): 198-202.
- [13] Zeng Q Q, Chen H B, Lu C H, *et al.* An optimized HPLC procedure for analyzing endogenous hormones in different organs of litchi [J]. *J Fruit Sci*, 2006, 23(1): 145-148.
- [14] Loreto F. Distribution of isoprenoid emitters in the *Quercus* genus around the world: Chemo-taxonomical implications and evolutionary considerations based on the ecological function of the trait [J]. *Perspect Plant Ecol*, 2002, 5(3): 185-192.
- [15] 付晓莹, 郭慧敏, 丛 微, 等. 外源 H₂O₂ 对黄芩次生代谢调控及道地质量形成机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2017, doi: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20171030.009.