

茉莉酸甲酯对锁阳茎切口愈合及抗氧化酶活性的影响

段园园, 孙窗舒, 陈贵林*

内蒙古大学生命科学学院, 内蒙古自治区中蒙药材规范化生产工程技术研究中心, 呼和浩特010021

摘要: 为了研究茉莉酸甲酯(MeJA)对锁阳茎切口愈合及抗氧化酶活性的影响, 测定了锁阳茎3个部位的切口愈合能力(抗失水力)、多酚含量、褐变度以及苯丙氨酸解氨酶(PAL)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)及抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性随切口愈合时间的变化。结果表明, 外源MeJA处理明显提高了锁阳茎3个部位的抗失水力和多酚含量, 增强了PAL活性及抗氧化酶活性, 降低了其褐变度。从而加速了锁阳茎切口愈合, 减少失水也提高了其抗氧化能力, 进而增强锁阳茎抵抗机械损伤的能力。

关键词: 茉莉酸甲酯(MeJA); 锁阳; 切口愈合; 抗氧化酶

Effect of Methyl Jasmonate on Wound Healing and Antioxidant Enzyme Activities of Stem in *Cynomorium songaricum* Rupr.

DUAN Yuan-Yuan, SUN Chuang-Shu, CHEN Gui-Lin*

College of Life Sciences, The Good Agriculture Practice Engineering Technology Research Center of Chinese and Mongolian Medicine in Inner Mongolia, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China

Abstract: In order to study the effect of methyl jasmonate (MeJA) on wound healing and antioxidant enzyme activities of *Cynomorium songaricum* stem, we detected the changes of wound healing ability (resistance to deactivation hydraulic), polyphenol content, the degree of browning and phenylalanine ammonialyase (PAL), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) activities of three parts of *C. songaricum* stems with healing time. The results showed that, with healing days increases, exogenous MeJA treatment significantly increased the ability of resisting deactivation hydraulic and polyphenol content, enhanced PAL activity and antioxidant enzyme activities, and reduced the degree of browning of three parts of *C. songaricum* stems, which accelerated the wound healing of *C. songaricum* stem, reduced water loss and increased its antioxidant capacity, thus enhanced the ability of *C. songaricum* stem resisting to mechanical damage.

Key words: MeJA; *Cynomorium songaricum*; wound healing; antioxidant enzyme

当植物受到机械损伤时, 体内会发生一系列生理生化变化, 从而促进伤口愈合。伤口愈合是木栓化及相关的创伤周皮形成的过程。木栓化细胞及相关的疏水结构可抵抗真菌及细菌的侵入和防止水分的流失(Schreiber等2005)。苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonialyase, PAL)是苯丙烷途径的一个关键酶, 直接参与聚酚类物质的加聚和木质素的合成(Yao和Tian 2005)。研究发现, 随着草莓储存时间的增加, 果实中PAL活性及产生过氧化物的能力下降, 从而降低果实抵抗微生物侵袭的能力(Jiang和Joyce 2003)。而真菌和细菌的入侵以及块茎酚类物质的氧化又被公认为是引起块茎污染及褐变的主要原因。

茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)作为内源信号分子参与植物在机械伤害、病虫害等条

件下的抗逆反应, 特别是作为创伤信号分子的研究备受关注。在蚕豆(Liu等2002)、番茄(Orozco-Cardenas等2001)等作物中的研究表明, MeJA可以将创伤信息传递到植物体内的其它部位, 进而激发植物防御基因表达。植物在遭受逆境胁迫时, 其抗氧化防护能力会提高以使植物度过逆境(杨瑾等2011)。

锁阳是我国重要的中药和蒙药植物资源, 药食兼用, 可作补肾、助阳、益精和润肠药物(Ma等

收稿 2013-03-04 修定 2013-05-18

资助 国家科技支撑计划项目(2011BAI07B07)、内蒙古自然科学基金(2009MS0501)和内蒙古科技创新引导奖励资金项目(2010)。

* 通讯作者(E-mail: guilinchen61@163.com; Tel: 0471-4992577)。

2008)。锁阳中的多酚和多糖等有效成分具有明显的抗氧化活性(段园园等2012a)。Jin等(2012)的研究表明,从锁阳中分离纯化得到的单体具有较强的抗氧化和抗细菌(金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、霉菌、抗药性金黄色葡萄球菌: MARS)活性。基于锁阳以上特性有望将其开发成一种功能性食品,而锁阳产品加工过程中的主要问题是褐化,导致褐化的主要原因就是氧化。本课题组之前的研究(段园园等2012b)表明脱落酸有促进锁阳茎切口愈合并提高其抗氧化酶活性的作用。因此研究作为创伤信号因子的MeJA对新切锁阳茎生理生化变化的影响,对防止锁阳产品加工过程中的褐化以及锁阳保鲜具有借鉴作用。

材料与amp;方法

1 材料

锁阳(*Cynomorium songaricum* Rupr.)采自内蒙古鄂尔多斯市杭锦旗独贵特拉镇,经内蒙古大学生命科学学院生物系陈贵林教授鉴定。取30~50 cm长完整新鲜的锁阳,将锁阳茎分为茎上部、茎中部、茎下部3个部位(图1)。

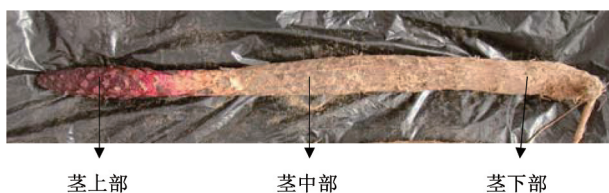


图1 锁阳的3个部位

Fig.1 Three parts of *C. songaricum*

2 方法

2.1 锁阳茎切口愈合能力的测定

切口愈合处理采用Kumar等(2010)和段园园等(2012b)的方法进行,将每个部位切成直径1.7 cm、厚3 mm的若干个小圆片,在 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的MeJA中浸泡5 min,对照组在蒸馏水中浸泡,然后将锁阳茎小片取出,置于放有湿滤纸的培养皿中进行切口愈合(每个培养皿放9片,每个处理3个培养皿),然后盖上盖。将培养皿置于培养箱中(23°C)暗培养4 d,期间保持滤纸的湿度在99%以上。已愈合的锁阳茎置于烘箱中脱水(45°C)并分别在0、10、20、40和80 min测定其重量的减少。以重

量的减少率即失水率表示切口愈合的程度。

2.2 锁阳茎多酚含量和褐变度的测定

多酚含量的测定采用福林酚法(姜依依等2012),根据标准曲线计算多酚含量,以mg(没食子酸)/g(粗提多酚)表示。

褐变度测定采用比色法(张默英和滕玉萍1992),以吸光度值来表示锁阳茎褐变程度的变化。

2.3 锁阳茎PAL活性和抗氧化酶活性的测定

PAL的提取采用Kumar等(2010)的方法,用Sugimoto等(2000)的方法检测上清液中的PAL活性,通过标准曲线换算样品中反式肉桂酸的浓度。PAL活性表示为每毫克蛋白质每分钟产生的反式肉桂酸的纳摩尔数。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性的测定采用氯化硝基四氮唑蓝(NBT)还原法(Jiang等2002a),以抑制NBT光化还原50%的酶液量为1个酶活力单位(U)。过氧化氢酶(catalase, CAT)的活力测定采用 H_2O_2 紫外吸收法(Jiang等2002b)。抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)活力测定采用紫外吸收法(Saruyama和Tanida 1995)。以上实验均设3次重复。

实验结果

1 MeJA对锁阳茎切口愈合能力的影响

切口愈合能力用抗失水力来表示,失水率越小表明其切口愈合能力越强,失水率越大表明其切口愈合能力越弱(Kumar等2010)。随脱水时间的增加,经MeJA处理的锁阳茎3个部位的失水率均明显低于对照组,并呈现出随脱水时间延长有差距加大的趋势(图1)。表明MeJA处理增强了锁阳茎的抗失水力,有利于加快切口愈合。同时,外源MeJA对锁阳茎上部切口愈合能力的增强作用比中部和下部的的大。

2 MeJA对锁阳茎多酚含量的影响

无论是MeJA处理还是对照组锁阳茎3个部位的多酚含量会迅速上升,在愈合第1天达到最高,随后又逐渐下降(图2)。经MeJA处理的锁阳茎3个部位的多酚含量均低于对照组。这表明MeJA处理明显降低了锁阳茎中多酚含量,从而减少了因过多的多酚积累而导致的褐化。

3 MeJA对锁阳茎褐变度的影响

锁阳茎浆汁吸光度的变化情况可以用来衡量锁阳茎褐变的程度。随着切口愈合时间的延长,

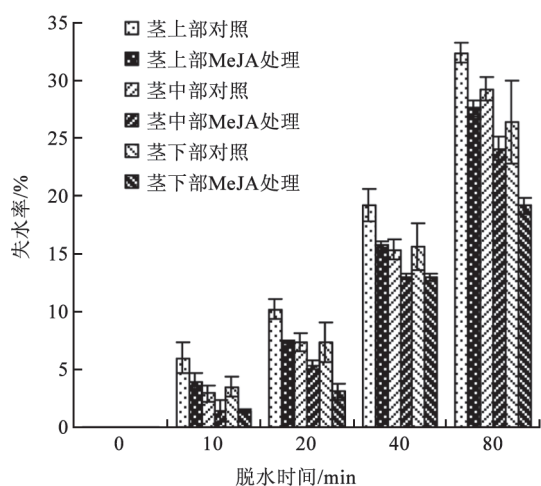


图1 MeJA对锁阳茎失水率的影响

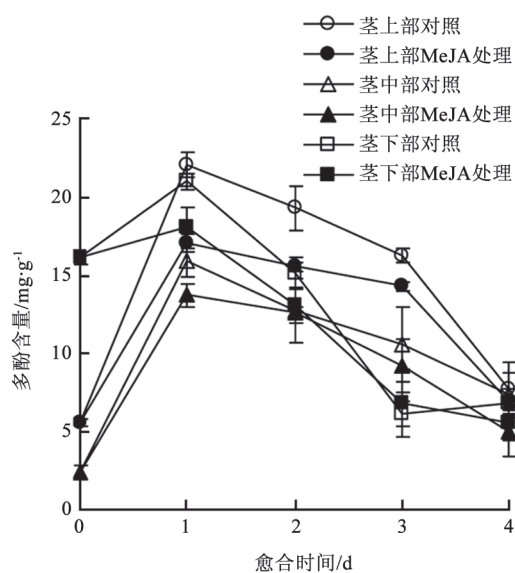
Fig.1 Effect of MeJA on fresh weight loss of *C. songaricum* stem

图2 MeJA对锁阳茎多酚含量的影响

Fig.2 Effect of MeJA on polyphenol content of *C. songaricum* stem

锁阳茎中酚类物质会不断被氧化, 导致锁阳茎3个部位不断褐化, 即褐变度不断升高。经MeJA处理的褐变度要明显低于对照的(图3)。这表明MeJA处理明显减弱了锁阳茎的褐变, 其中, 对照组中茎上部的褐变度要高于茎下部, 而茎下部高于茎中部。

4 MeJA对锁阳茎PAL活性的影响

图4可见, 除茎中部对照外, 其他处理的PAL活性均呈现先升高后降低的变化趋势, 经MeJA处理

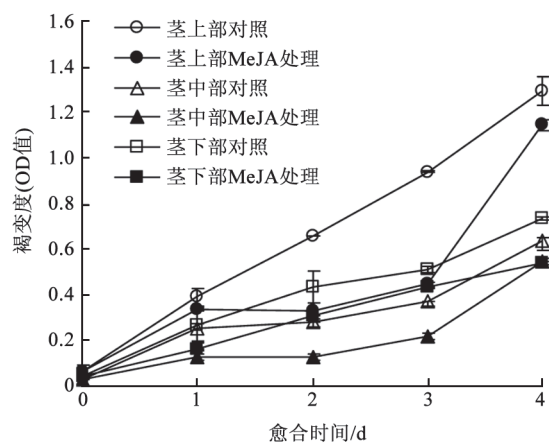


图3 MeJA对锁阳茎褐变度的影响

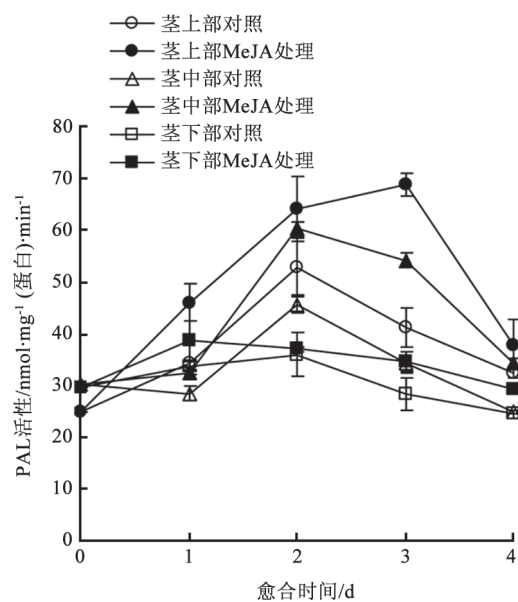
Fig.3 Effect of MeJA on degree of browning of *C. songaricum* stem

图4 MeJA对锁阳茎PAL活性的影响

Fig.4 Effect of MeJA on PAL activity of *C. songaricum* stem

的PAL活性均明显高于对照的。锁阳茎上中下3个部位PAL活性分别在第3、2、1天升至最高, 比对照的高40.2%、25.5%和12.9%。这表明MeJA处理明显增强了锁阳茎的PAL活性, 从而加速了切口愈合处的栓质化。

5 MeJA对锁阳茎抗氧化酶活性的影响

5.1 SOD活性

锁阳茎SOD活性均随愈合时间的增加而增加, 经MeJA处理的SOD活性明显高于对照组(图5)。

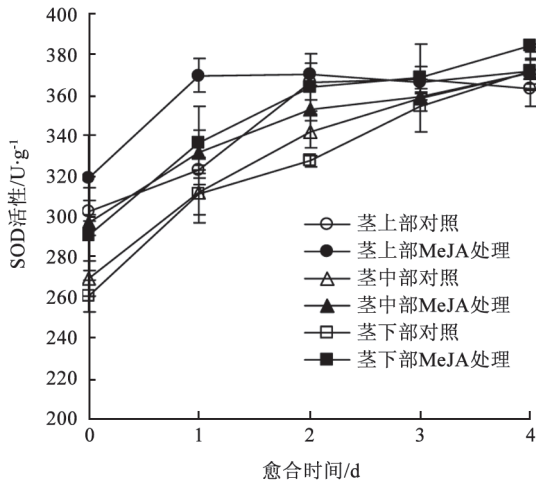


图5 MeJA对锁阳茎SOD活性的影响

Fig.5 Effect of MeJA on SOD activity of *C. songaricum* stem

MeJA处理的锁阳茎中部和茎下部的SOD活性变化一致, 都逐渐升高; 而茎上部SOD活性在愈合第1天迅速上升并达到高峰, 随后略有下降。这表明, MeJA处理明显增强了锁阳茎切口愈合期的SOD活性, SOD可对抗与阻断因氧自由基对细胞造成的损害, 并及时修复受损细胞, 从而提高了锁阳茎抗氧化的能力。

5.2 CAT活性

从图6来看, 锁阳茎3个部位CAT活性均呈现先上升后下降的变化趋势, MeJA处理的CAT活性明显高于对照的。愈合第2天, 各处理的CAT活性

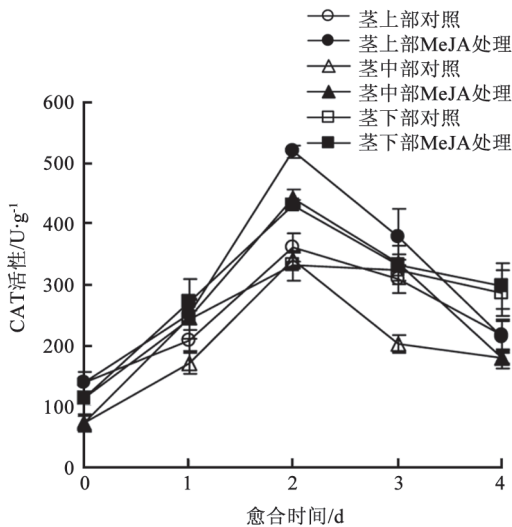


图6 MeJA对锁阳茎CAT活性的影响

Fig.6 Effect of MeJA on CAT activity of *C. songaricum* stem

均升至最高, MeJA处理的锁阳茎上中下3个部位的CAT活性分别比对照的高30.4%、22.9%和23.0%。这表明, MeJA处理明显增强了锁阳茎3个部位的CAT的活性, CAT活性的增强可加速分解切口处的过氧化氢, 使切口处的细胞免受氧化损伤。

5.3 APX活性

由图7可见, 随愈合时间的延长, 对照组和MeJA处理组的锁阳茎3个部位APX活性均呈现先升高后降低的变化趋势, 并都在第2天升至最高。MeJA处理的锁阳茎3个部位的APX活性均明显高于对照组。APX活性由大到小依次为茎上部、茎下部和茎中部。这表明MeJA处理明显增强了锁阳茎的APX活性。APX活性的升高进一步加速了锁阳茎分解过氧化氢, 从而有利于锁阳茎抵抗氧化损伤, 增强其抗氧化能力。

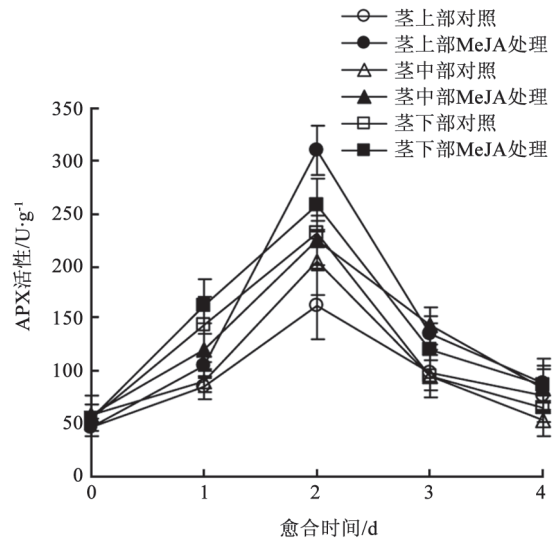


图7 MeJA对锁阳茎APX活性的影响

Fig.7 Effect of MeJA on APX activity of *C. songaricum* stem

讨论

植物应答创伤切口时产生封闭的木栓化细胞层和周皮, 以增强植物抗失水和抗微生物入侵的能力(Kumar等2010)。切口愈合后产生创伤周皮被认为是许多蔬菜水果采后所缺乏的, 然而切口处聚酚类物质及木质素的形成可有效的抵抗病原菌的入侵(Su等2011)。木质化过程包括聚酚醛类物质(poly phenolic substances, PPS)和聚芳香类物质(poly aromatic substances, PAS)的合成及积累于切

口相关的细胞壁上, 木质化的过程与木质素合成的过程相似也需要PAL的参与(Lapierre等1996)。PAL活性可由各种因素诱发, 如发病机理、昆虫啃食、创伤、暴露于低温之下(Dixon和Paiva 1995), 并在切口愈合过程中催化苯丙烷途径中的一步起着关键性作用(Kato等2000)。本课题组之前研究表明外源ABA处理锁阳茎, 明显提高了锁阳茎的切口愈合能力, 提高了PAL以及抗氧化酶类的活性(段园园等2012b)。外源MeJA处理提高了采后番茄果实的PAL和几丁质酶等的活性, 从而提高了番茄果实根霉果腐病抗病性(石慧等2008)。MeJA处理也可显著提高了百里香再生植株的PAL活性(杨宁等2012)。本文中锁阳茎经MeJA处理后的PAL活性提高, 失水率明显下降, 表明MeJA处理可能通过促进锁阳茎切口细胞木栓化以加速切口愈合从而抵抗失水。

通常认为酚类物质的氧化作用是导致果蔬褐变的主要原因。褐变程度的大小直接影响到果蔬的色泽和品质, 采后的褐变度均会随着储存时间的延长而升高。而机械损伤又加速了果蔬的褐化(Jung 2004)。研究表明草莓果实的褐变度与其酚类物质的含量之间呈负相关, 褐变度的改变量(即褐变反应速度)与其酚类物质的含量呈正相关(张默英和滕玉萍1992)。而大蕉的褐变速率与游离酚的含量呈负相关(白永亮等2012)。本文中锁阳茎褐变度随愈合时间延长而逐渐升高, 并呈现出茎上部>茎下部>茎中部的趋势, 这与3个部位多酚含量的高低差异一致。而多酚含量在愈合第1天迅速上升随后下降, 这可能是由于多酚在愈合初期参与切口愈合处的木栓化过程, 促进切口愈合, 随后又被氧化导致褐变度逐渐升高。

当植物受到逆境胁迫时, 体内活性氧增生, 从而诱导了抗氧化酶类活性的升高和抗氧化物质含量增加, 进而更加有效清除活性氧, 保护植物细胞免受伤害。当植物受到氮胁迫时抗氧化酶活性会升高(杨瑾等2011)。而MeJA处理可一定程度上提高拟南芥幼苗叶子(邹清成等2011)的SOD等抗氧化酶类的活性。Kumar等(2007)研究表明马铃薯块茎切口可诱导产生超氧化物, 超氧化物可促进愈合初期SPP和SPA的加聚反应从而促进愈合, 但过多的超氧化物会使茎受到氧化损伤。本文研究结

果显示, MeJA处理明显增强了锁阳茎的SOD、CAT和APX活性, 这可能促进了锁阳茎在切口愈合后期清除多余的超氧化物, 使切口处细胞免受氧化损伤, 从而提高其抗氧化能力。

总之, MeJA处理明显增强了锁阳茎3个部位的PAL活性以及抗氧化酶活性, 降低了多酚含量和褐变度。PAL活性升高可加速切口处形成木栓化的细胞层和周皮, 抗氧化酶活性升高可使切口处细胞免受氧化损伤, 因此MeJA处理既促进了锁阳茎切口愈合又提高了其抗氧化能力防止氧化损伤而且还减弱了其褐化。与之前ABA处理锁阳茎的研究结果相比较没有太大关联, 可能是由于MeJA和ABA是通过不同的途径调节锁阳茎抵抗切口。

参考文献

- 白永亮, 余铭, 袁根良, 杜冰, 鲁旺旺, 黄守耀, 杨公明(2012). 大蕉后熟期的褐变相关性及其褐变底物鉴定. 食品科学, 33 (04): 271~275
- 段园园, 马耀, 陈贵林(2012a). 锁阳中多酚和多糖抗氧化活性的比较. 中国现代中药, 14 (1): 43~46
- 段园园, 岳鑫, 陈贵林(2012b). 脱落酸对锁阳茎切口愈合及抗氧化酶活性的影响. 植物生理学报, 48 (3): 298~302
- 娄依依, 向铮, 陈瑞峰, 李丽丽, 高红昌, 李校堃(2012). 温莪术不同溶剂提取物体外抗氧化活性评价. 食品科学, 33 (3): 39~43
- 石慧, 励映聪, 罗云波, 朱本忠(2008). 外源茉莉酸甲酯处理对采后绿熟番茄果实根霉果腐病抗病性的影响. 食品科技, 5: 255~258
- 杨瑾, 王铭, 李涛, 李爱芬, 张成武(2011). 氮胁迫对雨生红球藻色素积累与抗氧化系统的影响. 植物生理学报, 47 (2): 147~152
- 杨宁, 李翠霞, 李志忠, 张继(2012). 诱导子对百里香再生植株中苯丙氨酸解氨酶活性的影响. 西北植物学报, 32 (2): 0330~0335
- 张默英, 滕玉萍(1992). 草莓酚类和褐变度的研究. 食品科学, 9: 9~13
- 邹清成, 朱开元, 刘慧春, 周江华, 马广莹(2011). 外源茉莉酸甲酯对非生物胁迫下蝴蝶兰幼苗叶绿素荧光和抗氧化指标的影响. 植物生理学报, 47 (9): 913~917
- Dixon RA, Paiva NL (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, 7: 1085~1097
- Jiang MY, Zhang JH (2002a). Involvement of plasmamembrane NADPH oxidase in abscisic acid and water-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings. *Planta*, 215: 1022~1030
- Jiang MY, Zhang JH (2002b). Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. *J Exp Bot*, 53: 2401~2410
- Jiang YM, Joyce DC (2003). ABA effects on ethylene production, PAL activity anthocyanin and phenolic contents of strawberry fruit. *Plant Growth Regul*, 39: 171~174
- Jin SW, Eerdun B, Doi A, Kuroda T, Zhang GX, Hatano T, Chen GL (2012). Polyphenolic constituents of *Cynomorium songaricum*

- Rupr. and antibacterial effect of polymeric proanthocyanidin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Agric Food Chem*, 60: 7297~7305
- Jung S (2004). Effect of chlorophyll reduction in *Arabidopsis thaliana* by methyl jasmonate or norflurazon on antioxidant systems. *Plant Physiol Biochem*, 42 (3): 225~231
- Kato M, Hayakawa Y, Hyodo H, Ikoma Y, Yano M (2000). Wound induced ethylene synthesis and expression and formation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase, ACC oxidase, phenylalanine ammonia-lyase and peroxidase in wounded mesocarp tissue of *Cucurbita maxima*. *Plant Cell Physiol*, 41 (4): 440~447
- Kumar GNM, Iyer S, Knowles NR (2007). Strboh a homologue of NADPH oxidase regulates wound-induced oxidative burst and facilitates wound-healing in potato tubers. *Planta*, 227: 25~36
- Kumar GNM, Lulai EC, Suttle JC, Knowles NR (2010). Age-induced loss of wound-healing ability in potato tubers is partly regulated by ABA. *Planta*, 232 (6): 1433~1445
- Lapierre C, Pollet B, Negrel J (1996). The phenolic domain of potato suberin: structural comparison with lignins. *Phytochemistry*, 42 (4): 949~953
- Liu X, Zhang SQ, Lou CH, Yu FY (2002). Effect of localized scorch on the transport and distribution of exogenous jasmonic acid in *Vicia faba*. *Acta Bot Sin*, 44 (2): 164~167
- Ma LJ, Chen GL, Jin SW, Wang CX (2008). The anti-aging effect and the chemical compositions of *Cynomorium songaricum* Rupr. *Acta Hort*, 765: 23~30
- Orozco-Cardenas ML, Narvaez Vasquez J, Ryan CA (2001). Hydrogenperoxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin and methyljasmonate. *Plant Cell*, 13: 179~191
- Saruyama H, Tanida M (1995). Effect of chilling on activated oxygen-scavenging enzymes in low temperature-sensitive and-tolerant cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci*, 109: 105~113
- Schreiber L, Franke R, Harmann K (2005). Wax and suberin development of native and wound periderm of potato (*Solanum tuberosum* L.) and its relation to peridermal transpirations. *Planta*, 220: 520~530
- Sugimoto M, Toyoda K, Ichinose Y, Yamada T, Shiraishi T (2000). Cytochalasin A inhibits the binding of phenylalanine ammonia-lyase mRNA to ribosomes during induction of phytoalexin in pea seedlings. *Plant Cell Physiol*, 41 (2): 234~238
- Su J, Tu K, Cheng L, Tu SC, Wang M, Xu HR, Zhan G (2011). Wound-induced H₂O₂ and resistance to *Botrytis cinerea* decline with the ripening of apple fruit. *Posth Biol Technol*, 62: 64~70
- Yao HJ, Tian SP (2005). Effects of a biocontrol agent and methyl jasmonate on postharvest diseases of peach fruit and the possible mechanisms involved. *J Appl Microbiol*, 98: 941~950