

白木香茎中内源茉莉酸类和倍半萜类物质对机械伤害的响应

张争^{1,2}, 杨云², 魏建和^{1,2,*}, 孟慧², 汪孟曦^{1,3}, 韩晓敏^{1,4}, 隋春¹

(¹中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 濒危药材繁育国家工程实验室, 北京 100193; ²中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所海南分所, 海南省南药资源保护与开发重点实验室, 海南万宁 571533; ³哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究中心药物研究所, 哈尔滨 150076; ⁴燕山大学环境与化学工程学院, 河北秦皇岛 066004)

摘要: 为揭示伤害信号——茉莉酸类(JAs)对倍半萜可能的调控作用,以3年生白木香[*Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg]树苗为试材进行机械伤害和外施茉莉酸甲酯(MeJA)处理,测定其茎中内源JAs和倍半萜含量。结果表明,机械伤害处理1h后,内源JAs含量显著增加,随后迅速下降;伤害处理24h后又略有小幅升高。伤害处理诱导白木香产生3种倍半萜(δ -愈创木烯、 α -愈创木烯和 α -葑草烯)且含量随着伤害时间延长而增多。外源MeJA处理也能够诱导产生相同种类的倍半萜且诱导强度大于伤害处理。伤害早期(1h)内源JAs含量升高和伤害后期(48h)倍半萜含量增多是植物启动相应的防御反应和抵御伤害胁迫的重要机制。

关键词: 白木香; 茉莉酸类; 倍半萜; 机械伤害

中图分类号: S 567.1⁺9

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X(2013)01-0163-06

Response of Endogenous Jasmonates and Sesquiterpenes to Mechanical Wound in *Aquilaria sinensis* Stem

ZHANG Zheng^{1,2}, YANG Yun², WEI Jian-he^{1,2,*}, MENG Hui², WANG Meng-xi^{1,3}, HAN Xiao-min^{1,4}, and SUI Chun¹

(¹Institute of Medicinal Plant Development, National Engineering Laboratory for Breeding of Endangered Medicinal Materials, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China; ²Hainan Branch of Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Hainan Provincial Key Laboratory of Resources Conservation and Development of Southern Medicine Wanning, Hainan 571533, China; ³Drug Research Institute of Life Science and Environment Science, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China; ⁴College of Environmental & Chemical Engineering, Yanshan University, Qinhuangdao, Hebei 066004, China)

Abstract: To confirm the function of jasmonates (Jas) in induction of sesquiterpenes, three-year-old

收稿日期: 2012-09-07; **修回日期:** 2012-12-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(31000136, 81173481, 31100220); 北京市自然科学基金项目(6102024); 教育部新世纪优秀人才支持计划项目(2008); ‘十二五’国家科技支撑计划项目(2011BAI01B07); 高等学校博士学科点专项科研基金项目(20091106120009); 海南省中药现代化专项项目(2010ZY001); 海南省重大科技研发专项(ZDZX20100006); 海南省中药现代化专项资金项目(2012ZY002)
通信作者 Author for correspondence (E-mail: wjianh@263.net)

Aquilaria sinensis (Lour.) Gilg saplings were used as materials in treatments of mechanical injury and exogenous MeJA. The contents of endogenous JAs and sesquiterpenes were detected by GC-MS, separately. The results showed that after 1 h wound treatment endogenous JAs content increased significantly, then decreased rapidly; after 24 h the contents of JAs have a slight elevation. Endogenous JAs content increased rapidly and reached a maximum at 1h, and then decreased rapidly. A second slight increase in JAs level was observed at 24 h after wound treatment. Wound induced the production of three sesquiterpenes (δ -guaiene, α -guaiene and α -humulene), and the contents increased with the time prolonged. Similarly, exogenous MeJA application also induced the production of three same sesquiterpenes, while the inducement intensity of MeJA was better than wound. It is thus suggested that JAs burst in the early-stage and sesquiterpenes biosynthesis in late-stage response to wound may constitute an important mechanism by which plant starts the related defense reaction and adapts to wound stress.

Key words: *Aquilaria sinensis*; jasmonates; sesquiterpenes; mechanical wound

国产沉香为瑞香科植物白木香 [*Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg] 含有树脂的木材, 主要含有倍半萜和 2-(2-苯乙基) 色酮类成分 (中华人民共和国药典编委会, 2010)。国产沉香是重要的中药材, 同时也是具有世界性需求的日用化工、宗教和文化需求产品 (张争 等, 2012)。

白木香是一种典型的伤害诱导型药用植物, 其只有在伤害等胁迫条件下才能够在其伤口周围木质部内产生倍半萜等沉香类物质, 但是何种伤害信号诱导沉香倍半萜生物合成以及相关途径尚不清楚。茉莉酸类化合物 (Jasmonates, JAs) 调节植物的生长和发育, 特别是作为内源伤害信号分子参与植物对生物胁迫 (真菌或细菌侵染及昆虫啃食) 防御反应和对非生物胁迫 (伤害、盐胁迫、高温、低温、水淹、干旱等) 逆境的应答 (Koo & Howe, 2009)。

研究表明, 在生物或非生物胁迫条件下, 植物体内 JAs 含量显著增加 (王文艳 等, 2012), 这些物质通过激活植物体内相应的防御基因 (汪开拓 等, 2012), 使植物产生各种类型的化学防御物质, 包括倍半萜类、单萜类、双萜类、黄酮类和生物碱类等次生代谢产物 (Zhao et al., 2005)。日本学者已证实将 MeJA 加入至沉香属植物悬浮细胞中能够诱导产生沉香倍半萜前体物质 α -愈创木烯 (α -guaiene)、 α -葎草烯 (α -humulene) 和 δ -愈创木烯 (δ -guaiene) (Ito et al., 2005; Okudera & Ito, 2009)。因此, 研究伤害后白木香内源 JAs 和倍半萜含量变化, 对了解伤害防御机制以及 JAs 调控倍半萜合成机理具有重要意义。

本试验中以白木香的茎为试材, 研究了伤害处理后茎中内源 JAs 和倍半萜含量的动态变化, 期为 JAs 诱导白木香结香的机理研究及其作为防御激活因子在诱导白木香产生沉香中的应用提供理论依据, 也为研究快速、高效白木香促使结香技术奠定一定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

2009 年 4 月 20—22 日, 在海南省海口市演丰镇选取 3 年生栽培白木香 (*Aquilaria sinensis*) 树苗 (次生木质部已完全分化) 用于全断杆机械伤害处理和未处理对照, 试验设定 3 个重复。

用灭菌剪刀剪去白木香幼苗树冠, 保留 20 cm 高的茎。分别于伤害后 0.15、0.5、1、2、6、12、24 和 48 h 从伤害面向下剪取长度 1 cm 茎段, 去除树皮后立即用液氮冷冻, 保存于 -80°C , 用于测

定内源 JAs 含量。按照上述取样方法, 分别于伤害后 6、12、24 和 48 h 剪取 1 cm 茎段用于倍半萜含量测定。

2010 年 9 月 15—17 日, 在海南省万宁市兴隆镇选取 3 年生栽培白木香树苗分别用于外施茉莉甲酯处理和对照无菌 ddH₂O 处理, 试验设定 3 个重复。

在距地面 20 cm 茎上用脱脂棉缠绕长度 1 cm 的茎, 将 0.4 mL 10 mmol · L⁻¹ 茉莉酸甲酯(MeJA) 滴在脱脂棉上, 用 Parafilm 膜缠绕严密。同时用无菌 ddH₂O 处理作为对照。分别于处理后 6、12、24 和 48 h, 剪取对照及 MeJA 处理的 1 cm 茎段, 去除树皮后立即用液氮冷冻, 保存于 -80 °C, 用于测定倍半萜含量。

1.2 JAs 与沉香倍半萜含量测定方法

白木香内源 Jas 含量测定参照 Zhang 等 (2008) 方法进行。

准确称取上述处理样品 0.5 g, 加入 1 mg 抗氧化剂二乙基二硫代氨基甲酸钠 (DDTC) 和 200 ng 9,10-二氢茉莉酸 (DHJA) 内标, 80% 冷甲醇低温研磨成匀浆, -20 °C 过夜。次日过滤, 滤液反复冻融 3 次, 化冻后离心, 上清液用非水溶性 PVP (聚乙烯吡咯烷酮) 搅拌, 搅匀后放置 10 min, 抽滤, 滤液调 pH 值至 2.5 ~ 3.0 后用乙酸乙酯萃取 3 次, 合并萃取液, 35 °C 真空浓缩去除乙酸乙酯相。

用甲醇溶解蒸发瓶内的残留物, 过 C18 Cep-Pak 小柱, 对已经浓缩的样品进行甲酯化处理后, 转移入毛细管中, 待上 GC-MS 仪 (Trace 2000-Voyager, Finnigan, Thermo-Quest) 分离鉴定。GC 分析条件: 色谱柱 DB-17-MS 石英毛细管柱 (30 m × 0.32 mm × 0.25 μm, Finnigan 公司)。载气为氦气, 流速 0.8 mL · min⁻¹。色谱柱采用程序升温, 起始温度 50 °C, 以 20 °C · min⁻¹ 升至 200 °C 后再以 10 °C · min⁻¹ 升至 280 °C; 280 °C 进样, 无分流。采用质谱: EI: 70 eV, 从 m/z 30 ~ 500 全扫描, 每 0.4 s 扫描 1 次。

根据面积比等于浓度比的关系, 求出内源茉莉酸的含量。由于茉莉酸测定中的内标是二氢茉莉酸, 计算茉莉酸含量时需要根据二者间的关系进行如下公式换算: 茉莉酸 N_{JA} = (0.1542 × A₂₂₄/A₂₂₆ + 0.0146) × N_{DHJA}。N_{DHJA} 代表二氢茉莉酸的浓度, A₂₂₄ 和 A₂₂₆ 分别代表茉莉酸 (224 m/z) 和二氢茉莉酸 (226 m/z) 的峰面积。

白木香茎中沉香倍半萜含量测定参照 Chen 等 (2011) 方法进行。

准确称取上述处理样品 0.5 g, 液氮研磨成粉状, 转入 10 mL 顶空瓶中, 马上用硅树脂的盖子密封盖好。进样前用活化的固相萃取头 (100 μm 聚二甲基硅氧烷, Supelco) 50 °C 萃取 30 min 后进行 GC-MS 分析。样品被进样到气质联用仪 Varian 450GC-300MS 中分离鉴定。

GC 分析条件: 色谱柱 VF-5MS 石英毛细管柱 (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm, Varian 公司)。载气为氦气, 流速 1.0 mL · min⁻¹。色谱柱采用程序升温, 起始温度 50 °C, 以 10 °C · min⁻¹ 升至 155 °C 后再以 8 °C · min⁻¹ 升至 280 °C; 280 °C 进样, 无分流。采用质谱: EI: 70 eV, 从 m/z 50 ~ 500 全扫描, 每 0.4 s 扫描 1 次。各峰所得质谱通过检索 NIST 08 标准质谱图库和文献 (Ito et al., 2005) 报道综合鉴定化合物。

2 结果与分析

2.1 机械伤害对白木香茎中内源 JAs 含量的影响

如图 1 所示, 未做机械伤害处理的白木香茎中的 Jas 的含量很少, 约为 5.0 ng · g⁻¹ FW。机械伤

害处理 0.15 h 后茎中 JAs 含量无明显变化; 0.5 h 后 JAs 含量迅速升高, 1 h 后达到最大值 103.4 $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$; 之后迅速下降, 6 h 后恢复至对照水平; 至处理后 24 h, JAs 含量又有所升高, 并持续至处理结束。

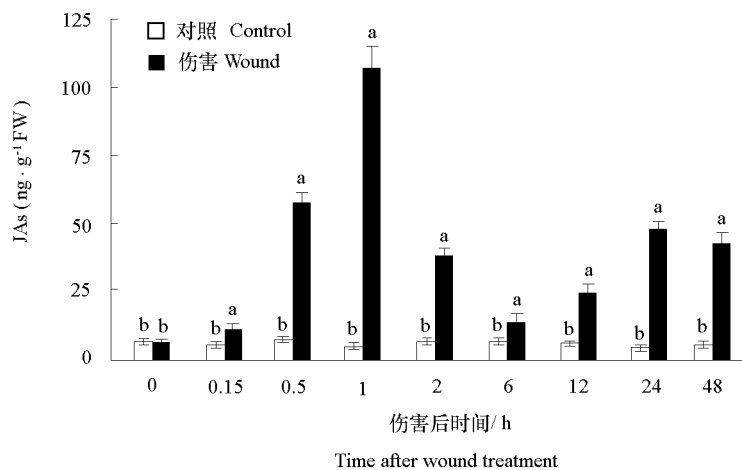


图 1 伤害处理对白木香茎内源 JAs 含量的影响

Fig. 1 Effects of mechanical wound on JAs content in stem of *Aquilaria sinensis*

2.2 机械伤害对白木香茎中倍半萜含量的影响

利用 GC - MS 技术测定了机械伤害处理后白木香茎中沉香倍半萜前体物质 δ -愈创木烯 (δ -guaiene)、 α -愈创木烯 (α -guaiene) 和 α -葎草烯 (α -humulene) 含量的变化, 结果如图 2 所示。对照白木香茎中不产生这 3 种倍半萜, 伤害的白木香茎中这 3 种倍半萜随着伤害时间延长含量不断积累增多, 其中 δ -愈创木烯 (δ -guaiene) 积累速度最快, 至伤害后 48 h 含量最高, α -愈创木烯 (α -guaiene) 其次, α -葎草烯 (α -humulene) 含量最低。对照未检测到倍半萜成分。

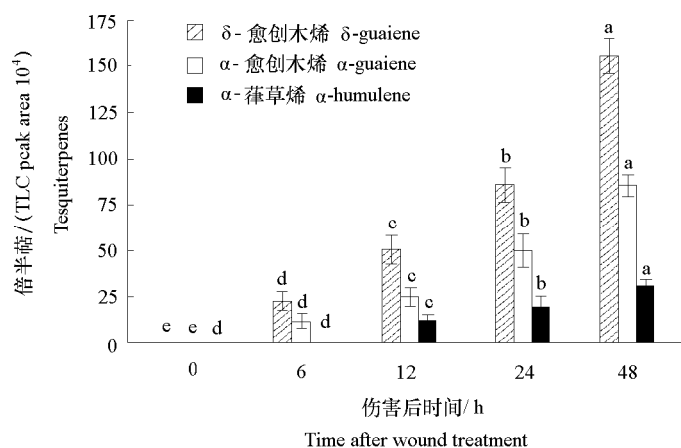


图 2 伤害处理对白木香 3 种倍半萜含量的影响

Fig. 2 Effects of mechanical wound on three sesquiterpenes content in stem of *Aquilaria sinensis*

2.3 外源 MeJA 处理对白木香茎中倍半萜含量的影响

为明确 JAs 是否对倍半萜具有诱导作用, 通过外施 MeJA 处理白木香茎, 并利用 GC - MS 技术

测定了处理后白木香茎中 δ -愈创木烯 (δ -guaiene)、 α -愈创木烯 (α -guaiene) 和 α -葎草烯 (α -humulene) 含量的动态变化。

结果如图 3 所示, 外施 MeJA 能够诱导白木香茎中产生这 3 种倍半萜, 而且 MeJA 诱导的倍半萜含量多于伤害处理。水处理对照未检测到倍半萜成分。

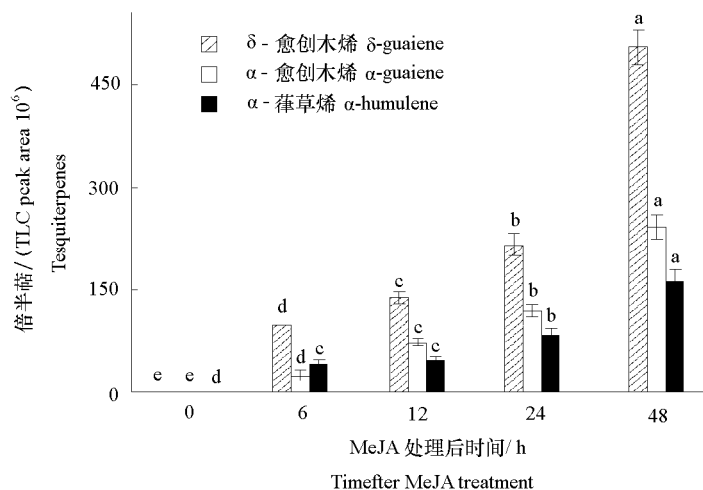


图 3 外施 MeJA 处理对 3 种倍半萜含量的影响

Fig. 3 Effects of exogenous MeJA application on three sesquiterpenes content in stem of *Aquilaria sinensis*

3 讨论

伤害导致植物产生早期未知信号, 并被植物细胞膜表面的模式识别受体 (pattern-recognition receptors, PRRs) 所识别, 经过未知的作用机制, 这种识别激活了 JA 和 JA-异亮氨酸的源头合成。JA-异亮氨酸启动了 SCF^{COI1}/26 蛋白酶体介导的 JAZ 蛋白的降解, 从而解除 JAZ 蛋白对防御反应相关转录因子的阻遏, 最终实现植物防御基因的表达 (Koo & Howe, 2009)。本研究中以 9, 10-二氢茉莉酸 (DHJA) 为内标利用 GC-MS 技术测定伤害处理 48 h 后白木香茎内源 JAs 含量的动态变化, 结果显示伤害后白木香茎中 JAs 含量迅速升高, 伤害 1 h 后达到最大值且增加了近 20 倍。研究结果显示切断茎干的机械伤害导致白木香茎中 JAs 爆发, 而 Jas 大量产生通常被认为是植物早期防御反应。

另外, JAs 作为内源伤害信号分子能够植物防御基因倍半萜合酶基因大量表达, 促使植物倍半萜快速合成积累。本研究首次将 MeJA 外施到白木香茎, 与伤害处理相同, MeJA 也能够诱导白木香从头合成倍半萜 δ -愈创木烯、 α -愈创木烯和 α -葎草烯, 且 MeJA 诱导的倍半萜含量多于伤害处理, 说明 MeJA 处理较伤害处理诱导强度大。野生沉香中愈创木醇 (guaiol) 是重要成分之一, 占其挥发油总量 10% 以上。而 δ -愈创木烯和 α -愈创木烯可能为愈创木醇的底物。因此, 揭示伤害诱导白木香产生倍半萜的生物学调控机制将有助于研发稳定、高效的人工伤害诱导白木香结香技术。

“伤害诱导白木香防御反应结香假说”认为, 物理、化学伤害及真菌侵染均可诱导白木香产生防御反应, 产生具有抑菌活性的防御性物质——沉香倍半萜和 2-(2-苯乙基) 色酮类化合物 (沉香的主要化学成分) (张争 等, 2010)。这些防御性物质与细胞其他组分复合形成的导管填充物堵塞了次生木质部的导管, 形成含有树脂的木材——沉香, 以抵御外界物理、化学伤害或真菌侵染对白

木香的进一步损伤(张争等, 2010)。

本文的结果表明, 伤害导致白木香防御反应中早期伤害信号内源 JAs 含量升高和随后倍半萜类防御物质含量增多, 外源 MeJA 的处理也能诱导白木香产生相同种类的倍半萜类物质且数量远远高于伤害, 本研究结果为“伤害诱导白木香防御反应结香假说”提供了有力证据。从时间和空间变化规律分析, 伤害可能诱导了伤害信号分子 JAs 合成基因的转录和转译, 合成积累大量 JAs, 进而启动了沉香倍半萜合成途径, 诱导沉香倍半萜合成与积累。进一步开展相关分子机理的研究将为揭示伤害诱导白木香结香的分子机制和合成途径提供科学的数据。

References

- Chen H Q, Yang Y, Wei J H, Zhang Z, Chen H J. 2011. Comparison of compositions and antimicrobial activities of essential oils from chemically stimulated agarwood, wild agarwood and healthy *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg trees. *Molecules*, 16 (6): 4884 - 4896.
- Chinese Pharmacopoeia Commission. 2010. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (Vol 1). Beijing: China Medical Science Press. (in Chinese)
- 中华人民共和国药典编委会. 2010. 中华人民共和国药典(第一部). 北京: 中国医药科技出版社.
- Ito M, Okimoto K, Yagura T, Honda G. 2005. Induction of sesquiterpenoid production by methyl jasmonate in *Aquilaria sinensis* cell suspension culture. *Journal of Essential Oil Research*, 17: 175 - 180.
- Koo A J, Howe G A. 2009. The wound hormone jasmonate. *Phytochemistry*, 70 (13 - 14): 1571 - 1580.
- Okudera Y, Ito M. 2009. Production of agarwood fragrant constituents in *Aquilaria calli* and cell suspension cultures. *Plant Biotechnology*, 26: 307 - 315.
- Wang Kai-tuo, Zheng Yong-hua, Tang Wen-cai, Li Ting-jun, Zhang Qing, Shang Hai-tao. 2012. Effects of methyl jasmonate treatment on levels of nitric oxide and hydrogen peroxide and phytoalexin synthesis in postharvest grape berries. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (8): 1559 - 1566. (in Chinese)
- 汪开拓, 郑永华, 唐文才, 李廷君, 张 卿, 尚海涛. 2012. 茉莉酸甲酯处理对葡萄果实 NO 和 H₂O₂ 水平及植保素合成的影响. *园艺学报*, 39 (8): 1559 - 1566.
- Wang Wen-yan, Yue Lin-xu, Zhang Yan-yi, Chu Jian-qing, Zhang Xiao-ying, Fang Jing-gui. 2012. Cloning of several important genes involved in grapevine SA and JA signaling pathways and their response to exogenous signals. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (5): 817 - 827. (in Chinese)
- 王文艳, 岳林许, 张演义, 初建青, 张晓莹, 房经贵. 2012. 葡萄 SA 和 JA 信号转导重要基因克隆及其对外源信号应答分析. *园艺学报*, 39 (5): 817 - 827.
- Zhang F J, Jin Y J, Xu X Y, Lu R C, Chen H J. 2008. Study on the extraction, purification and quantification of jasmonic acid, abscisic acid and indole-3-acetic acid in plants. *Phytochemical Analysis*, 19 (6): 560 - 567.
- Zhang Zheng, Yang Yun, Wei Jian-he, Meng Hui, Sui Chun, Chen Huai-qiong. 2010. Advances in studies on mechanism of agarwood formation in *Aquilaria sinensis* and its hypothesis of agarwood formation induced by defense response. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 41 (1): 156 - 159. (in Chinese)
- 张 争, 杨 云, 魏建和, 孟 慧, 隋 春, 陈怀琼. 2010. 白木香结香机制研究进展及其防御反应诱导结香假说. *中草药*, 41 (1): 156 - 159.
- Zhang Zheng, Gao Zhi-hui, Wei Jian-he, Xu Yan-hong, Li Ying, Yang Yun, Meng Hui, Sui Chun, Wang Meng-xi. 2012. The mechanical wound transcriptome of three-year-old *Aquilaria sinensis*. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 47 (8): 1 - 6. (in Chinese)
- 张 争, 高志晖, 魏建和, 徐艳红, 李 滢, 杨 云, 孟 慧, 隋 春, 汪孟曦. 2012. 三年生白木香机械伤害转录组学研究. *药学报*, 47 (8): 1 - 6.
- Zhao J, Davis L C, Verpoorte R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23 (4): 283 - 333.