西北林学院学报 2020,35(2):64-71
Journal of Northwest Forestry University

doi:10.3969/j.issn.1001-7461.2020.02.09

NaCl 处理下茉莉酸甲酯对金叶银杏光合色素、抗氧化性及黄酮代谢的调控作用

袁斌玲[1,2],王瑞敏[1,2],陈 颖[1,2*],张 涛[1,2],陈燕琼[1,2],沈 瑒[1,2]

(1.南京林业大学 南方现代林业协同创新中心,江苏 南京 210037;2.南京林业大学 生物与环境学院,江苏 南京 210037)

摘 要:以金叶银杏幼苗为试验材料,通过 0、50(低盐)、150(高盐)mmol·L^{-1} NaCl 以及在 50、150 mmol·L^{-1} NaCl 下分别添加 500 μmol·L^{-1} 茉莉酸甲酯(MJ) 处理金叶银杏幼苗,研究 MJ 在 NaCl 处理下金叶银杏幼苗的生理响应及对黄酮苷元含量的调控作用。结果表明,2 个水平盐处理(50、150 mmol·L^{-1} NaCl) 及添加 MJ 处理后叶绿素含量降低,但低水平盐可促进类胡萝卜素的积累;低盐+MJ 处理可提高叶绿素 b 的含量。高盐处理可显著地提高丙二醛(MDA)含量、超氧歧化酶(SOD) 活性;高盐+MJ 能够显著地降低 MDA 含量、提高 SOD 酶活性,而低盐或低盐+MJ 处理上述指标变化不显著。2 个水平盐处理下苯丙氨酸解氨酶(PAL)、4-香豆酸辅酶 A 连接酶(4CL)以及肉桂醇脱氢酶(CAD)活性均有所提高,但 MJ 的添加并没有显著提高 4CL 和 CAD 的活性。低浓度盐处理在短期内(5 d)就可显著提高金叶银杏黄酮苷元和总黄酮的含量(比对照提高了 133.7%)但低盐+MJ 处理对黄酮苷元和总黄酮含量提高程度不大;高盐+MJ 处理可在长时间内(10~15 d)显著提高槲皮素(154.5%)和总黄酮的含量(132.1%)。本研究为盐胁迫、茉莉酸及黄酮代谢间的作用机制及银杏黄酮的代谢调控提供一定的理论基础和技术支持。

关键词:金叶银杏;NaCl 处理;茉莉酸甲酯(MJ)调控;生理响应;黄酮代谢

中图分类号:S718.43　　**文献标志码**:A　　**文章编号**:1001-7461(2020)02-0064-08

The Regulation of Methyl Jasmonate on Photosynthetic Pigments, Antioxidation and Flavonoid Metabolism in Golden-leaf *Ginkgo biloba* Seedlings under Salinity Treatment

YUAN Bin-ling[1,2], **WANG Rui-min**[1,2], **CHEN Ying**[1,2*], **ZHANG Tao**[1,2], **CHEN Yan-qiong**[1,2], **SHEN Yang**[1,2]

(1. *Collaborative Innovation Center of the Southern Modern Forestry*, *Nanjing Forestry University*, *Nanjing* 210037, *Jiangsu*, *China*; 2. *College of Biology and Environment*, *Nanjing Forestry University*, *Nanjing* 210037, *Jiangsu*, *China*)

Abstract: In this study, seedlings of a *Ginkgo biloba* cultivar "Golden-leaf" were treated by different concentrations of sodium chloride (50 mmol·L^{-1}, low level salinity group, LS; 150 mmol·L^{-1}, high level salinity group, HS) and combinations of NaCl and 500 μmol·L^{-1} methyl jasmonate (MJ) (LS+MJ, HS+MJ) to examine the physiological responses of the seedlings and regulation functions of the additives to the contents of leaf flovonoid, a group of bioactive components in the leaves of *G. biloba*. The results showed that the chlorophyll contents were lower than that of the control group under the two levels of salt treatments and NaCl+MJ treatments, however, the carotenoid content increased under the LS treatment, and the content of chlorophyll b increased under the LS+MJ treatment. The content of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) activity increased under HS treatment. The HS+MJ treatment could significantly reduce the MDA content, improve the SOD activity, while the LS+MJ treatment had no significant

收稿日期:2019-04-19　**修回日期**:2019-07-13

基金项目:国家自然科学基金(31770674);国家"十三五"重点研发计划课题(2017YFD0601301);江苏省高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)。

作者简介:袁斌玲,女,硕士在读,研究方向:植物抗性生理。E-mail:303769024@qq.com

* **通信作者**:陈 颖,女,教授,研究方向:植物资源与逆境生理。E-mail:chynjfu@163.com

effects on the above involved parameters. The activities of phenylalanine ammonialyase (PAL), 4-coumarate coenzyme A ligase (4CL) and the cinnamom-alcohol dehydrogenase (CAD) were all improved under two levels of salt treatment, however, the application of MJ did not significantly improve the activities of 4CL and CAD under HS treatment. The LS treatment could significantly increase the content of flavonoid glycosides and total flavonoids (133.7% higher than that in the control) in a shorter salt treatment period (5 days). However, the HS+MJ treatment could significantly increase the contents of flavonoid glycosides (154.5% higher) and total flavonoids 132.1% higher) in a longer treatment period (10－15 d). This study would provide a theoretical basis for researching the correlation of salinity, jasmonate and flavonoid metabolism and also provide technical support for the precise regulation of flavonoid metabolism in *Ginkgo* leaves.

Key words: golden-leaf *Ginkgo biloba*; NaCl treatment; methyl jasmonate regulation; physiological response; flavonoid metabolism

银杏，被称为“活化石”，是地球上最古老的树种之一，也是集科学研究、医药保健、观赏、生态防护、材用于一体的珍贵特色树种[1-2]。银杏叶中含有丰富的次生代谢产物，其中黄酮类、内酯类和银杏酸类最受人们关注。黄酮类化合物是银杏叶提取物中重要的活性成分，具有增强免疫力、抗氧化的作用，可用于血管疾病的防治[3]。

次生代谢产物是植物为适应环境而产生的胁迫防御物质，环境胁迫(如干旱和盐、UV-B、重金属处理等)都能促进次生代谢物的合成[4]，次生代谢物的增加反过来又增强了植物的耐逆性，因此适宜的环境胁迫既可以调控次生物质的代谢，又可增强植物的耐逆性，具有双重作用。如 50～100 mmol · L^{-1} NaCl 处理促进了苋菜(*Amaranthus tricolor*)黄酮类化合物的积累，而黄酮等化合物与苋菜叶的抗氧化性显著相关[5-6]，盐处理下野生大豆异黄酮的积累可能是适应盐渍环境的重要策略[6]；通过添加槲皮素可以降低盐胁迫下转基因烟草中的过氧化氢和超氧离子含量，提高抗盐性[7]；盐处理后大豆叶中黄酮的含量增加，同时也提高了大豆的耐盐性[8]。我们前文也发现 NaCl 能够提高银杏愈伤组织和悬浮细胞黄酮的含量，且黄酮的积累与细胞的抗氧化特性有关[2]。

植物激素茉莉酸类如茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MJ)在植物防御基因表达的信号转导过程中有重要作用，参入了植物种子萌发、抗逆性、抗氧化、成熟与衰老等多种生长发育过程，与植物次生代谢物的合成关系密切[9-10]。用茉莉酸处理大豆细胞悬浮液后发现细胞中异黄酮积累，且与黄酮代谢相关的 PAL 和 CHS 等酶基因表达增强。200 μmol · L^{-1} MJ 处理增加了人参根系内黄酮和总酚的含量[11]；用 100 μmol · L^{-1} MJ 对芽期苦荞进行叶面喷施处理，提高了叶片总黄酮含量[12]。茉莉酸甲酯作为一种调节剂可以缓解植物的抗盐性，如缓解水稻和棉花种子萌发时盐的抑制作用(0.25 μmol/L MJ)，提高了发芽率[13]。M. Q. Jiang[14]用 50 mmol · L^{-1} NaCl 和 100 μmol · L^{-1} MJ 同时对二倍体刺槐和四倍体刺槐进行处理，发现 MJ 可明显缓解由于盐胁迫造成的不良反应，并提高了抗氧化酶的活性。纵观目前的研究，主要是以盐和 MJ 单独处理作为刺激物促进次生代谢产物的积累为目的、或者研究 MJ 对盐胁迫的缓解效应。但是盐和 MJ 单独处理植物都可以提高其次生代谢物的积累，那么在盐胁迫存在的情况下，盐胁迫、茉莉酸甲酯、次生代谢物之间的关系是怎样的，盐与茉莉酸甲酯在怎样的情况下是共促进效应，怎样条件下成负相关等问题仍然不清楚。

金叶银杏是普通银杏的一个芽变品种，其差别在于金叶银杏叶片在春季和秋季 2 个季节为金黄色，具有很高的观赏价值[15]。但对金叶银杏叶片有效成分的研究至今未见报道。本研究以金叶银杏幼苗为试验材料，研究外施 MJ 在不同盐水平处理条件下对银杏幼苗生理代谢和黄酮积累的调控作用，以期为金叶银杏应用价值的进一步开发，探讨金叶银杏的耐盐性以及获得高含量的黄酮关键技术提供参考。

1　材料与方法

1.1　材料

金叶银杏种子采自南京林业大学下蜀实习林场。金叶银杏嫁接苗由南京林业大学银杏课题组培育而成，以普通银杏为砧木，用芽接方法繁殖，成活的芽当年生枝梢生长量 30～50 cm[15-16]。嫁接 2 a 后金叶银杏枝条开始结果，本研究以嫁接第 4 年后当年生金叶银杏种子为试验材料，秋季采集的种子处理后放入 4℃冰箱中保存备用。

1.2　苗木培育

次年 3 月份，将金叶银杏种子取出进行消毒处

理:用 20%'84'消毒液浸泡 20 min,自来水冲洗 3~4 次,再放入自来水中浸泡 24 h,使其充分吸胀,次日清洗后,放入容器中用保鲜膜封口,在 25℃恒温箱中催芽。期间每天用自来水冲洗 1 次,使种子始终处于湿润状态并防止霉菌产生。5 d 左右部分种子开始破口,胚根长出,待胚根突出种壳 1.0~1.5 cm 时,将种子种植于 11 cm×11 cm×9 cm、基质为营养土∶蛭石∶珍珠岩=2∶1∶1 的花盆内培养。

培养室条件:温度为 25℃左右,湿度 70%~80%,光照强度 160 μmol·m^{-2}·s^{-1},光照时间 14 h·d^{-1}。待幼苗生长 5 个月左右,叶片在 6~7 片时进行 NaCl 和茉莉酸甲酯(MJ)处理。

1.3 NaCl 及茉莉酸甲酯处理

选择生长均匀一致的金叶银杏幼苗作为本研究材料,每 6 株幼苗为 1 个处理,每个处理设定 3 个重复。NaCl、茉莉酸甲酯(MJ)处理设:(1)0 mmol·L^{-1}($NaCl_0$+MJ_0);(2)50 mmol·L^{-1} NaCl(低浓度:$NaCl_{50}$);(3)150 mmol·L^{-1} NaCl(高浓度:$NaCl_{150}$);(4) 50 mmol·L^{-1} NaCl+500 μmol·L^{-1} MJ($NaCl_{50}$+MJ_{500});(5)150 mmol·L^{-1} NaCl+500 μmol·L^{-1} MJ($NaCl_{150}$+MJ_{500})。为保持 NaCl 的浓度恒定,对处理每隔 5 d 定时、定量用盐溶液浇灌 1 次,共浇灌 3 次,并在花盆底放塑料托盘用于回收渗出来的盐溶液,过多的盐溶液重新倒入花盆中,使其保持盐处理状态。MJ 采用叶面喷施的方式与盐浇灌同时处理,分别对(4)、(5)处理组在 50、150 mmol·L^{-1} NaCl 处理的同时用含0.02%乙醇的茉莉酸甲酯溶液喷施叶片(至叶片滴水为度),为保持试验的一致性,对(1)、(2)、(3)处理组采用含0.02%乙醇的蒸馏水代替茉莉酸甲酯溶液喷施。分别于处理后 5、10、15 d 后采集不同处理苗木叶片进行生理指标的测定。

1.4 指标测定

光合色素、电导率、丙二醛(TCA 法)李合生[17];黄酮类化合物含量参照文献[18]用高效液相色谱(HPLC)测定:进样量 10 μL,流动相甲醇:0.4%磷酸(55∶45),流速 1.0 ml/min,检测波长 360 nm;柱温 30℃,用外标法计算黄酮类化合物的含量。以黄酮(槲皮素、山奈酚、异鼠李素)标准样品的浓度 C(mg/L)为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,得线性方程(相关系数都>0.999 0)。总黄酮醇苷的含量(mg·g^{-1} DW)=槲皮素含量×2.51+山奈酚含量×2.64+异鼠李素含量×2.39。

苯丙氨酸解氨酶、4-香豆酸辅酶 A 连接酶(4CL、肉桂醇脱氢酶(CAD)测定采用分光光度计法[19-21]。

1.5 数据处理及分析

采用 Excel 2013 进行数据处理,采用 SPSS 19.0软件对各处理进行单因素方差分析(Duncan 新复极法)。图中小写字母表示各处理间在 P<0.01 水平上的差异显著。

2 结果与分析

2.1 NaCl 处理下 MJ 对金叶银杏幼苗光合色素含量的影响

表 1 中,与对照相比,NaCl 和 MJ 对金叶银杏幼苗处理 10 d 后,除低浓度盐($NaCl_{50}$)处理的类胡萝卜素含量高于对照外,各处理的总叶绿素、叶绿素 a 及叶绿素 b 的含量都较对照显著降低。与各自对应的盐水平相比,低浓度盐添加 500 μmol·L^{-1} MJ 后总叶绿素含量有所提高,而高浓度盐($NaCl_{150}$)有所降低,但两者都没有达到显著性差异。

表 1 不同处理对金叶银杏幼苗光合色素含量的影响(10 d)

Table 1 Effects of different treatments on photosynthetic pigment content of 'Golden leaf' *Ginkgo biloba*

NaCl /(mmol·L^{-1})	茉莉酸甲酯 MJ /(mmol·L^{-1})	叶绿素 a /(μg·g^{-1})	叶绿素 b	叶绿素	类胡萝卜素	叶绿素 a/b	叶绿素/类胡萝卜素
0	0	590.3±28.0a	245.1±23.0a	835.3±15.1a	195.0±20.9b	2.41±0.3b	4.28±0.4a
50	0	434.7±5.2b	47.9±5.1c	482.6±6.4b	251.7±6.2a	9.15±0.5a	1.92±0.03c
50	500	350.0±14.1c	150.6±21.6b	500.6±15.0b	149.1±14.0c	2.36±0.4b	3.36±0.3b
150	0	285.9±15.6d	99.6±55.9bc	385.5±48.1c	155.7±31.7c	3.87±2.8b	2.48±0.7b
150	500	240.1±13.0e	103.3±45.5bc	343.4±32.4c	119.8±12.8c	2.86±1.8b	2.86±0.6b

注:不同英文字母表示处理间差异显著性(P<0.05)。下同。

2 种盐处理水平下添加 MJ 后都显著降低了叶绿素 a 含量(P<0.05),如 $NaCl_{50}$+MJ_{500}处理降低了 19.5%;而盐处理添加 MJ 后都相应地提高了叶绿素 b 的含量,其中 $NaCl_{50}$+MJ_{500}提高程度大,达 96.9%。低浓度盐处理可显著提高类胡萝卜素(Cx.c)的含量(高于对照),高浓度盐处理结果相反;但添加 MJ 处理都比对应的单独盐处理含量低,其中 $NaCl_{50}$+MJ_{500}处理降低显著(P<0.05)。与对照相比,低浓度盐处理显著地提高了叶绿素 a/b 的比值,其他处理差异都不显著;而各处理的总叶绿素/类胡萝卜素(Chl/Cx.c)都比对照低,特别是 $NaCl_{50}$处理,除比对照低外还显著地低于其他处理

的($P<0.05$)(表 1)。

2.2 NaCl 处理下 MJ 对金叶银杏超氧歧化酶活性和丙二醛含量的影响

在处理的 15 d 内，与对照相比，盐处理和添加 MJ 后都相应地提高了超氧歧化酶(SOD)酶活性，其中高浓度盐处理比低盐浓度处理 SOD 活性提高的程度大。与各自对应的盐处理相比，添加 MJ 后都显著地提高了 SOD 的活性，如在第 15 天时，$NaCl_{50}+MJ_{500}$ 比 $NaCl_{50}$ 的 SOD 酶活性提高了 24.1%，$NaCl_{150}+MJ_{500}$ 比 $NaCl_{150}$ 的 SOD 酶活性提高了 14.9%(图 1A)。

对于丙二醛(MDA)来讲，与对照相比，随着处理时间地延长，盐处理和盐处理添加 MJ 后都显著地增加了 MDA 的含量(第 15 天的 $NaCl_{150}+MJ_{500}$ 除外)，特别是第 10 天时高浓度盐处理的 MDA 比第 10 天对照增加了 135.3%。与各自对应的盐处理相比，添加 MJ 后，$NaCl_{50}+MJ_{500}$ 处理只有在第 10 天显著降低($P<0.05$)；而 $NaCl_{50}+MJ_{500}$ 处理在整个处理期内 MDA 含量都比 $NaCl_{50}$ 单独处理显著降低，甚至在第 15 天时接近对照水平(图 1B)。

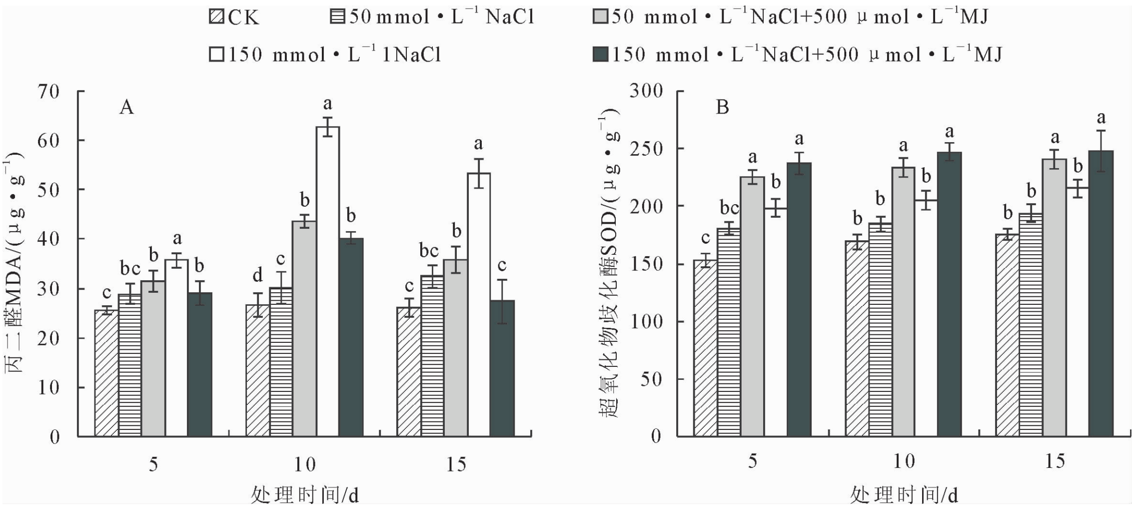

图 1　不同处理对金叶银杏幼苗 SOD 和 MDA 含量的影响

Fig. 1　Effects of different treatments on SOD activity and MDA content of ‘Golden leaf’ *Ginkgo biloba* L.

2.3 NaCl 处理下 MJ 对金叶银杏幼苗叶片 2 种抗氧化物质含量的影响

图 2 中，除 $NaCl_{150}$+MJ 处理的第 10 天和第 15 天外(与对照差异不显著)，其他各处理的抗坏血酸(AsA)含量都较对照显著下降($P<0.05$)，特别是第 10 天的高浓度盐处理其 AsA 含量最低比对照降低了 49.6%。与各自的单独盐处理相比，添加 MJ 后，都能显著提高 AsA 的含量(第 5 天低浓度盐处理除外)，如在第 15 天时，$NaCl_{150}$+MJ 处理的 AsA 含量比单独 $NaCl_{150}$ 处理提高了 63.8%，提高至对照水平(图 2A)。

相较于 AsA，谷胱苷肽(GSH)含量变化较为平缓，整个处理期内各处理的 GSH 都高于对照，但只有高浓度($NaCl_{150}$)处理的 GSH、$NaCl_{50}$+MJ(第 15 天)与对照有显著差异($P<0.05$)。与各自对应的盐处理相比，添加 MJ 后，$NaCl_{50}$+MJ 处理提高了 GSH 的含量，但高浓度($NaCl_{150}$)添加 MJ 后，GSH 含量出现下降($P<0.05$，图 2B)。

2.4 NaCl 处理下 MJ 对金叶银杏幼苗叶片 3 种黄酮苷元及总黄酮含量的影响

盐处理和盐+MJ 处理下金叶银杏叶片的槲皮素、山奈酚、异鼠李素 3 种黄酮苷元以及总黄酮含量的变化见表 2。与对照相比，在处理的第 5 天和第 10 天，各处理的 3 个黄酮苷元和总黄酮含量都出现显著地增加(除第 5 天、第 10 天 $NaCl_{150}+MJ_{500}$ 处理的异鼠李素、第 10 天 $NaCl_{150}$ 处理的槲皮素、第 10 天 $NaCl_{50}$ 处理的山奈酚除外)，如第 5 天 $NaCl_{50}$ 处理山奈酚的含量比对照提高了 210.1%，总黄酮比对照提高了 133.7%。与各自对应的盐处理相比，添加 MJ 后，$NaCl_{50}+MJ_{500}$ 与 $NaCl_{150}+MJ_{500}$ 在第 5 天时各黄酮苷元和总黄酮的含量都显著降低；而在第 10 天时，$NaCl_{50}+MJ_{500}$ 显著提高了山奈酚的含量，$NaCl_{150}+MJ_{500}$ 处理提高了山奈酚、槲皮素和总黄酮的含量，其中槲皮素的含量提高了 104.7%，总黄酮提高了 39.0%，呈显著水平($P<0.01$)。

随着时间的推移，处理第 15 天时单独盐处理的各黄酮苷元及总黄酮含量都开始低于对照，但低浓度盐($NaCl_{50}$)与对照之间差异不显著($P>0.01$)，高浓度盐与对照差异显著($P<0.01$)。与单独盐处理相比，添加 MJ 后各黄酮苷元和总黄酮含量都出现显著增加($NaCl_{50}+MJ_{500}$ 处理的山奈酚除外)，$NaCl_{150}+MJ_{500}$ 处理的特别显著，其槲皮素和总黄酮

分别比单独 $NaCl_{150}$ 处理提高了 154.5% 和 132.1%(表 2)。

2.5 NaCl 处理下 MJ 对对金叶银杏幼苗叶片黄酮代谢关键酶活性的影响

苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性的变化趋势如图 3A 所示,单独盐处理和盐处理添加 MJ 后都显著增加了 PAL 的活性($P<0.05$),但低浓度($NaCl_{50}$)和高浓度($NaCl_{150}$)在添加 MJ 后出现相反的表现,低浓度处理下增加,高浓度处理下降低,如第 10 天时,添加 MJ 后比单独盐处理 $NaCl_{150}$ 下降了 22.1%。4-香豆酸辅酶 A 连接酶(4CL)活性的整体变化趋势与 PAL 相似,也是与对照相比各处理都增加了 4CL 酶的活性。与各自对应的盐处理相比,低浓度($NaCl_{50}$)在添加 MJ 后 4CL 酶活性提高,而在高浓度下添加 MJ 后 4CL 酶活性降低了 7.5%(处理 15 d),总体来看 4CL 的变化幅度较 PAL 酶小。

对肉桂醇脱氢酶(CAD)来讲,与对照相比,高浓度($NaCl_{150}$)处理和高浓度下添加 MJ 后对 CAD 酶活性的影响不显著,而低浓度($NaCl_{50}$)和低浓度下添加 MJ 可显著增加其活性,且低浓度($NaCl_{50}$)添加 MJ 后 CAD 酶活性低于 $NaCl_{50}$ 盐处理的(图 3B、图 3C)。

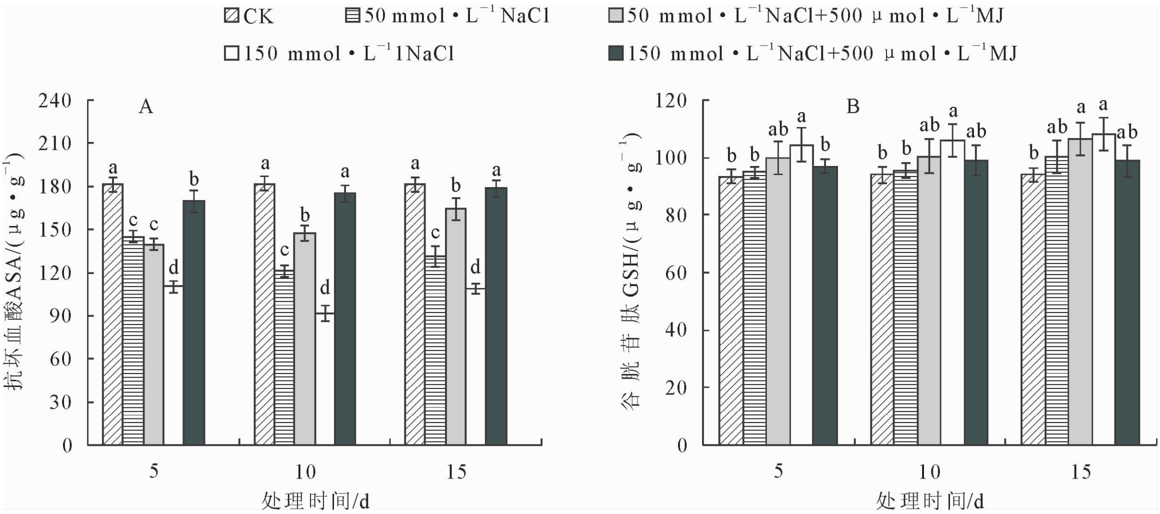

图 2 不同处理对金叶银杏幼苗抗坏血酸(AsA)与谷胱苷肽(GSH)含量的影响

Fig. 2 Effects of different treatments on AsA and GSH content of 'Golden leaf' *G. biloba*

表 2 不同处理对金叶银杏幼苗 3 种黄酮苷元含量的影响

Table 2 Effect of different treatments on flavonoids content of 'Golden leaf' *G. biloba*

时间 /d	NaCl /(mmol·L⁻¹)	茉莉酸甲酯 MJ /(μmol·L⁻¹)	山柰酚 /(μg·g⁻¹)	槲皮素 /(μg·g⁻¹)	异鼠李素 /(μg·g⁻¹)	总黄酮 /(mg·g⁻¹)
5	0	0	136.4±2.2c	229.8±5.1c	60.8±2.5c	1.08±0.01c
	50	0	423.1±8.7a	448.2±11.3a	120.4±9.8a	2.53±0.07a
	50	500	258.2±3.0bc	255.4±7.7b	105.1±5.7ab	1.57±0.04c
	150	0	273.6±4.8b	445.1±9.3a	99.9±8.5b	2.08±0.05b
	150	500	142.4±10.5c	241.6±10.7bc	57.2±2.6c	1.12±0.13c
10	0	0	198.4±10.6c	300.8±4.3c	88.9±12.7b	1.49±0.04c
	50	0	96.0±51.6d	345.2±11.8b	148.7±6.3a	1.48±0.17c
	50	500	224.8±5.1ab	316.2±6.6c	65.0±2.3b	1.54±0.03bc
	150	0	263.6±7.8ab	296.4±7.6c	137.0±2.7a	1.77±0.08b
	150	500	288.7±16.1a	606.8±16.7a	71.7±3.6b	2.46±0.09a
15	0	0	261.4±9.8ab	352.6±35.8c	79.3±6.2c	1.76±0.10bc
	50	0	250.6±11.3b	311.1±10.3c	86.1±2.4c	1.65±0.05c
	50	500	251.2±4.4b	397.8±6.8b	98.5±3.1b	1.90±0.23b
	150	0	167.4±4.2c	246.7±5.9d	55.5±1.8d	1.19±0.03d
	150	500	351.4±17.5a	628.1±5.1a	111.5±6.2a	2.77±0.05a

3 结论与讨论

盐胁迫下植物的外在形态和体内都会发生适应性变化[21-22],在本研究中,低浓度盐($NaCl_{50}$)和高浓度($NaCl_{150}$)盐处理金叶银杏叶片的叶绿素含量都较对照出现了下降,但低浓度盐处理叶绿素含量下

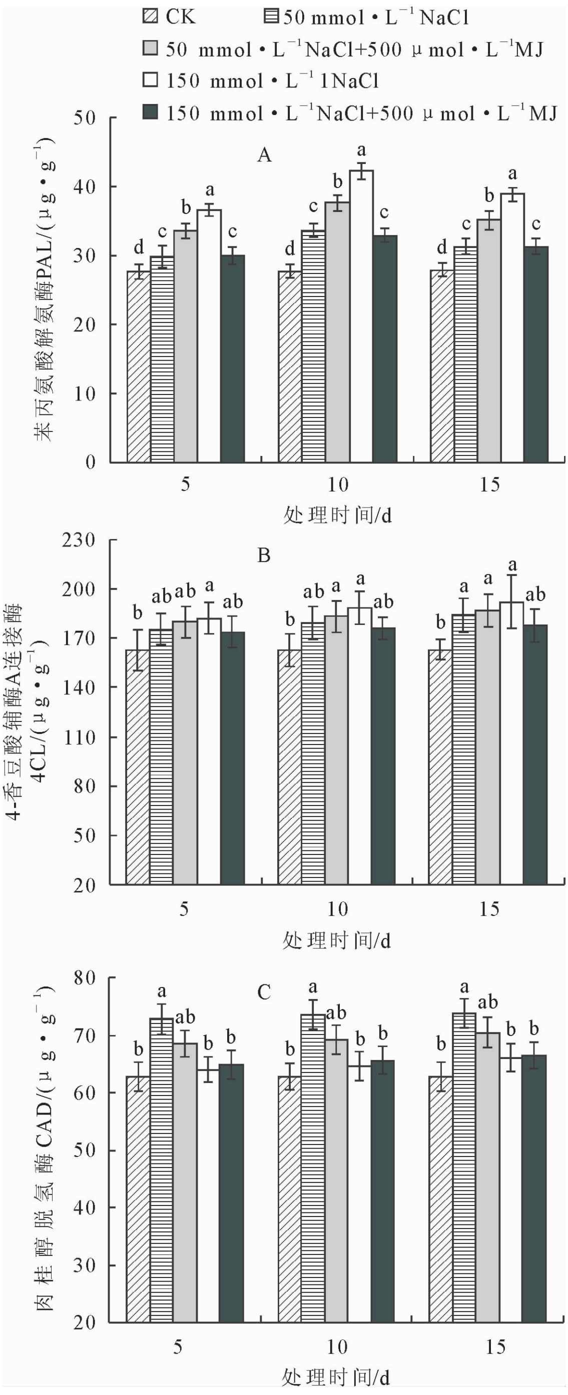

图 3　不同处理对金叶银杏幼苗苯丙氨酸解氨酶(PAL)、4-香豆酸辅酶 A 连接酶(4CL)和肉桂醇脱氢酶(CAD)含量的影响

Fig. 3　Effects of different treatments on PAL、4CL and CAD content of ‘Golden leaf’ *G. biloba*

降程度低于高浓度，这些结果在沙枣中也得到证实[23]，说明盐胁迫抑制了光合作用，影响到植物的正常生长[24]，但低浓度盐处理能够提高类胡萝卜素含量，因而可提高植物的抗氧化性，降低盐胁迫的伤害。盐处理添加 MJ 后，低盐水平能显著提高叶绿素 b 的含量，而高盐水平却降低了叶绿素 b 的含量，这说明 MJ 的调节作用与盐的浓度有关，在低浓度下添加 MJ 后叶绿素 b 含量的提高有利于吸收较强的蓝紫光，减轻盐胁迫的伤害，但高浓度盐对金叶银杏产生了较严重的伤害，MJ 的缓解效应就不能更好地体现。

盐处理打破了细胞内活性氧平衡，引起膜脂过氧化，MDA 含量的高低可反映逆境对生物膜的危害程度[4-5]。植物体内的 SOD 酶是抗氧化系统中清除超氧自由基的首要物质[25]。本研究发现，不论是单独盐处理还是盐处理后添加 MJ，都能提高金叶银杏幼苗叶片中 SOD 酶的活性，而且添加 MJ 后都较各自对应的盐处理 SOD 酶活性高，说明 MJ 能够有效减轻盐胁迫对金叶银杏造成的氧化胁迫，缓解盐胁迫的伤害。从 MDA 的水平来看可以证明这一点，盐处理后 MDA 含量增加，但高盐处理($NaCl_{150}$)添加 MJ 后 MDA 含量显著降低，甚至降低至对照水平，说明 MJ 能够减轻盐胁迫引起的膜脂过氧化，在高盐处理下效果好于低盐处理。MJ 降低盐胁迫 MDA 含量的结果在棉花和二色补血草(*Limonium bicolor*)中[26-27]也有相似的表现。另外，AsA-GSH 循环系统在抗氧化作用中起着重要的作用，可提高氧化酶的活性防止脂质过氧化[28-29]。本研究发现 2 个水平的盐处理都降低了 AsA 含量，但盐处理下添加 MJ 可显著提高 AsA 含量。2 个水平盐处理可增加 GSH 含量，但低浓度盐处理添加 MJ 增加 GSH 含量，高浓度盐处理添加 MJ 后结果相反，这些结果表明，盐处理对 AsA 的影响较大，盐胁迫降低了 AsA 的含量(低于对照)，但添加 MJ 后显著提高了 AsA 的水平，这可弥补由于盐胁迫引起的 AsA 含量降低而导致的活性氧清除能力的下降，而且这种弥补作用在高浓度盐添加 MJ 后的效果更好；而对于 GSH 来讲，MJ 的缓解效应更体现在低浓度盐添加 MJ 的处理当中。在对落叶冬青苗干旱处理时也发现，MJ 能够提高其 AsA 和 GSH 含量[30]，说明逆境情况下，MJ 提高植物的抗氧化能力途径是一致的。

盐处理会对植物造成胁迫伤害，但同时也能刺激次生代谢产物的合成[31]。黄酮类化合物具有良好的抗氧化性，通过清除植物体内的自由基，增强植物抵御逆境的能力[32]。黄酮类化合物通过苯丙烷类途径合成，其中 PAL、4CL 酶与黄酮化合物的合成呈一定的相关性，肉桂醇脱氢酶(CAD)是木质素特异合成途径中一类下游限速酶，与黄酮的代谢也息息相关[19-20,33-35]。本研究中，2 个盐处理水平都提高了 PAL 和 4CL 的酶活性，而且高浓度盐处理提高程度高于低浓度盐处理；但添加 MJ 处理后低浓度盐＋MJ，PAL、4CL 酶活性与单一盐处理相比有

所上升，但高浓度盐＋MJ，PAL、4CL 酶活性却低于NaCl 单独处理。低浓度盐和低浓度盐＋MJ 可显著提高 CAD 酶的活性，但高浓度盐和高浓度盐＋MJ 对 CAD 的影响不显著。这些现象说明 NaCl 和 MJ 处理在一定程度上激活金叶银杏的 PAL、4CL 和 CAD 酶活性，有利于黄酮类化合物的合成，从黄酮含量的变化可以看出这一点。单独用 2 种水平 NaCl 处理，短期内（5 d）就可显著地提高 3 种黄酮苷元和总黄铜的含量，低浓度盐处理总黄酮提高程度大，这与我们盐处理对银杏悬浮细胞黄酮含量的影响结果相似[2]。而盐处理添加 MJ 后，MJ 调控黄酮代谢的效果在短期内不明显，但在长时间（15 d）内，显著地增加了 3 个黄酮苷元和总黄酮的含量，特别是高浓度盐＋MJ 处理对槲皮素和总黄酮含量增加显著，这些结果表明，MJ 可在盐胁迫严重和胁迫时间较长时发挥调控作用，增加黄酮的含量，而黄酮含量的增加又反过来清除过多的自由基，缓解盐胁迫造成的氧化胁迫，增强金叶银杏的抗盐能力。这一结果与添加 MJ 可显著提高盐处理下的薄荷（*Mentha piperita*）中多酚类和花色素的含量以及罗勒（*Ocimum basilicum*）植物中的精油含量相类似[36-37]。

综上所述，不同水平盐处理（低盐 50 $mmol\cdot L^{-1}$，高盐 150 $mmol\cdot L^{-1}$ NaCl）及盐处理下添加 MJ，金叶银杏生理代谢出现不同的反应：低浓度盐（$NaCl_{50}$）处理在短期内就可显著提高金叶银杏黄酮苷元和总黄酮的含量；低浓度盐＋MJ 处理可显著提高叶绿素 b 的含量、SOD 酶活性和 AsA 的含量，但对黄酮苷元和总黄酮含量提高程度不大。高盐处理（$NaCl_{150}$）短期内也可提高黄酮苷元及总黄酮的含量，但高浓度盐＋MJ 处理后降低了光合色素的含量，显著提高 SOD 酶和 AsA 的含量，降低 MDA 的水平高，在长时间内可显著提高黄酮苷元和总黄酮的含量。本研究结果可为盐胁迫、茉莉酸、黄酮代谢之间的作用机制研究及提高银杏黄酮含量措施提供一定的理论基础和技术支持。

参考文献：

[1] ZHOU Q，MU K，XU M，*et al*. Variation in the concentrations of major secondary metabolites in *Ginkgo* leaves from different geographical populations [J]. Forests，2017，8(8)：266.

[2] 陈颖，罗永亚，邱娜菲，等. NaCl 处理对银杏悬浮培养细胞生长、耐盐性和黄酮积累的影响[J]. 南京林业大学学报：自然科学版，2015，39(6)：45-50.
CHEN Y，LUO Y Y，QIU N F，*et al*. Effects of NaCl treatment on the growth，salt tolerance and flavonoids accumulation in *Ginkgo biloba* suspension cells [J]. Journal of Nanjing Forestry University：Natural Sciences Edition，2015，39 (06)：45-50. (in Chinese)

[3] NI J，DONG L，JIANG Z，*et al*. Salicylic acid-induced flavonoid accumulation in *Ginkgo biloba* leaves is dependent on red and far-red light [J]. Industrial Crops and Products，2018，118：102-110.

[4] CHEN Y，YUAN B L，WEI Z H，*et al*. The ion homeostasis and ROS scavenging responses in 'NL895' poplar plantlet organs under *in vitro* salinity stress[J]. Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant，2018，54：318-331.

[5] SARKER U，OBA S. Salinity stress enhances color parameters，bioactive leaf pigments，vitamins，polyphenols，flavonoids and antioxidant activity in selected *Amaranthus* leafy vegetables[J]. Sci Food Agric，2019，99：2275-2284.

[6] 周三，周明，张硕，等. 盐生野大豆的异黄酮积累及其生态学意义[J]. 植物生态学报，2007，31(5)：930-936.
ZHOU S，ZHOU M，ZHANG S，*et al*. Isoflavone accumulation in wild soybean under saline conditions and its ecological significance[J]. Journal of Plant Ecology(Chinese Version)，2007，31 (5)：930-936. (in Chinese)

[7] CHEN S，WU F，LI Y，*et al*. Are critical factors in the regulation of flavonoid biosynthesis and are involved in salinity responsiveness? [J]. Front Plant Sci.，2019.

[8] YAN J，WANG B，JIANG Y，*et al*. Gm FNSII-controlled soybean flavone metabolism responds to abiotic stresses and regulates plant salt tolerance [J]. Plant and Cell Physiology，2014，55(1)：74-86.

[9] AHMAD P，RASOOL S，GUL A，*et al*. Jasmonates：multifunctional roles in stress tolerance [J]. Front Plant Sci.，2016(7)：813.

[10] RIEMANN M，DHAKAREY R，HAZMAN，*et al*. Exploring jasmonates in the hormonal network of drought and salinity responses[J]. Front Plant Sci.，2015(6)：1077.

[11] ALI M B，HAHN E，PAEK K，*et al*. Methyl jasmonate and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolics in *Panax ginseng* bioreactor root suspension cultures [J]. Moleculls，2007，12(3)：607-621.

[12] 雒晓鹏，朱冬寅，黄云吉. 茉莉酸甲酯对芽期苦养黄酮积累及相关基因表达的影响[J]. 基因组学与应用生物学，2015，34 (5)：1040-1046.
LUO X P，ZHU D Y，HUANG Y J. Effects of methyl jasmonate accumulation of flavonoids and related gene expression of buckwheat sprouts [J]. Genomics and Applied Biology，2015，34(5)：1040-1046. (in Chinese)

[13] 杨艺，常丹，王艳，等. 盐胁迫下茉莉酸(JA)及茉莉酸甲酯(MeJA)对棉花种子萌发及种苗生化特性的影响[J]. 种子，2015，34(1)：8-13，18.

[14] JIANG M Q，XU F L，PENG M. Methyl jasmonate regulated diploid and tetraploid black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) tolerance to salt stress [J]. Acta Physiologiae Plantarum，2016，38：106.

[15] 郁万文，祝遵凌，曹福亮. 金叶银杏半同胞子代无性系的叶色和色素含量变化及呈色机制分析[J]. 植物资源与环境学报，2016，25(1)：43-53.

[16] 王志勇，胡俊，潘小平. 安陆金叶银杏特性初报 [J]. 湖北林业

科技,2017,46(6):31-34.

[17] 李合生.植物生理生化实验原理和技术[M].北京:高等教育出版社,2000.

[18] CHEN Y,LIN F Z,YANG H,*et al*. Effect of varying NaCl doses on flavonoid production in suspension cells of *Ginkgo biloba*:relationship to chlorophyll fluorescence,ion homeostasis,antioxidant system and ultrastructure [J]. Acta Physiologiae Plantarum,2014,36(12):3173-3187.

[19] YUASUF N A,ANNUAR M S M,KHALID N,*et al*. Physical stress for overproduction of biomass and flavonoids in cell suspension cultures of *Boesenbergia rotunda*[J]. Acta Physiologiae Plantarum,2013,35(5):1713-1719.

[20] 陈雷,常丽,曹福亮.银杏叶黄酮类化合物含量及相关酶活性对温度和干旱胁迫的响应[J].西北植物学报,2013,33(4):755-762.

CHEN L,CHANG L,CAO F L. Effects of temperature and soil water deficit on the flavonoid content and activities of enzymes involved in *Ginkgo* leaves[J]. Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.,2013,33(4):755-762.(in Chinese)

[21] 杨佳鑫,李庆卫,刘玉霞,等. NaCl胁迫对梅花和山桃种子萌发及生理特性的影响[J].西北林学院学报,2018,33(2):94-99.

YANG J X,LI Q W,LIU Y X,*et al*. Effects of NaCl stress on the germination and physiological characteristics of *Prunus mume* and *Prunus davidiana* seeds[J]. Journal of Northwest Forestry University,2018,33(2):94-99.(in Chinese)

[22] HANNACHI S,VAN LABEKE M,*et al*. Salt stress affects germination,seedling growth and physiological responses differentially in egg plant cultivars (*Solanum melongena* L.)[J]. Scientia Horticulturae,2018,228:56-65.

[23] 贾婷婷,常伟,范晓旭,等.盐胁迫下AM真菌对沙枣苗木光合与叶绿素荧光特性的影响[J].生态学报,2018,38(4):1337-1347.

JIA T T,CHANG W,FAN X X,*et al*. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on photosynthetic and chlorophyll fluorescence characteristics in *Elaeagnus angustifolia* seedlings under salt stress[J]. Acta Ecologica Sinica,2018,38(4):1337-1347.(in Chinese)

[24] 赵海燕,魏宁,孙聪聪,等. NaCl胁迫对银杏幼树组织解剖结构和光合作用的影响[J].北京林业大学学报,2018,40(11):28-40.

ZHAO H Y,WEI N,SUN C C,*et al*. Effect of salt stress on anatomic structure of tissue and photosynthesis in *Ginkgo biloba* seedlings[J]. Journal of Beijing forestry university,2018,40(11):28-40.(in Chinese)

[25] HASANUZZAMAN M,OKU H,NAHAR K,*et al*. Nitric oxide-induced salt stress tolerance in plants:ROS metabolism,signaling,and molecular interactions[J]. Plant Biotechnology Reports,2018,12:77-92.

[26] 杨艺,常丹,王艳,等.盐胁迫下茉莉酸(JA)及茉莉酸甲酯(MeJA)对棉花种子萌发及种苗生化特性的影响[J].种子,2015,34(1):8-13.

[27] YUAN F,LIANG X,LI Y,*et al*. Methyl jasmonate improves tolerance to high salt stress in the recretohalophyte *Limonium bicolor*[J]. Functional Plant Biology,2019,46:82-92.

[28] RADY M O A,SEMIDA W M,ABD El-MAGEED T A,*et al*. Up-regulation of antioxidative defense systems by glycine betaine foliar application in onion plants confer tolerance to salinity stress[J]. Scientia Horticulturae,2018,240:614-622.

[29] 王慧慧,王晨,张明华,等.砧用南瓜幼苗对镉的耐性和积累能力的影响[J].西北植物学报,2018,38(12):2257-2266.

[30] 陈燕琼,沈玚,范佳露,等.茉莉酸甲酯对干旱及复水下落叶冬青苗叶片抗氧化水平的影响[J].南京林业大学学报:自然科学版,2018,42(6):35-43.

CHEN Y Q,SHEN Y,FAN J L,*et al*. The effects of methyl jasmonic acid on leaf antioxidative capacity of *Ilex verticillata* L. seedlings under drought and re-watering[J]. Journal of Nanjing Forestry University:Natural Sciences Edition,2018,42(6):35-43.(in Chinese)

[31] 向蓓蓓,朱晔荣,王文娟,等 盐胁迫对长春花愈伤组织生长及阿玛碱积累的影响[J].中草药,2011,42(1):167-170.

XIANG B B,ZHU Y R,WANG W J,*et al*. Effects of salt stress on growth and ajmalicine accumutation of *Catharanthus roseus* calli[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs,2011,42(1):167-170.(in Chinese)

[32] AGATI G,AZZARELLO E,POLLASTRI S,*et al*. Flavonoids as antioxidants in plants:location and functional significance [J]. Plant Science,2012,96:67-76.

[33] 刘冉,李燕,王雷,等.外源物质对红松多酚合成和防御酶活性的影响[J].西北林学院学报 2019,34(2):42-47.

LIU R,LI Y,WANG L,*et al*. Effects of exogenous substances on polyphenols synthesis and defence enzymes activites in adventitious buds of *Pinus koraiensis*[J]. Journal of Northwest Forestry University,2019,34(2):42-47.(in Chinese)

[34] 仇亮,朱胜琪,王永鑫.水芹肉桂醇脱氢酶基因的克隆与表达特性分析[J].西北植物学报,2018,38(6):1003-1009.

QIU L,ZHU S Q,WANG Y X. Cloning and expression characteristics analysis of OjCAD gene in *Oenanthe javanica*[J]. Acta Bot. Boreal-Occident Sin.,2018,38(6):1003-1009.(in Chinese)

[35] TOBIAS C,CHOE E. Structure of the cinnamy alcohol dehydrogenase gene family in rice and promoter activity of a member associated with lignification [J]. Planta,2005,

[36] KHALVANDI M,AMERIAN M,PIRDASHTI H,*et al*. Essential oil of peppermint in symbiotic relationship with *Piriformospora indica* and methyl jasmonate application under saline condition [J]. Industrial Crops & Products,2019,127:195-202.

[37] TALEBI M,MOGHADDAM M,PIRBALOUTI AG. Methyl jasmonate effects on volatile oil compounds and antioxidant activity of leaf extract of two basil cultivars under salinity stress [J]. Acta Physiologiae Plantarum,2018,40:34.