

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201410018

李金亭, 齐婉桢, 郭晓双, 等. 茉莉酸甲酯对牛膝生长及主要药用成分积累的影响[J]. 广西植物, 2015, 35(6):875—879

Li JT, Qi WZ, Guo XS, et al. Effects of methyl jasmonate on growth and major medicinal components accumulation of *Achyranthes bidentata*[J]. Guihaia, 2015, 35(6):875—879

茉莉酸甲酯对牛膝生长及主要药用成分积累的影响

李金亭*, 齐婉桢, 郭晓双, 王 灿, 张元昊, 王 迪, 苏换换

(河南师范大学 生命科学学院 河南省高校道地性中药保育及利用工程研究中心, 河南 新乡 453007)

摘 要: 不同浓度的外源茉莉酸甲酯(MeJA)对牛膝生长及其主要药用成分齐墩果酸和蜕皮甾酮均有不同的影响。该文采用不同浓度的 MeJA 分别浸种处理牛膝种子:0(对照)、0.1 mmol · L⁻¹(T1)、0.15 mmol · L⁻¹(T2)、0.2 mmol · L⁻¹(T3)、0.25 mmol · L⁻¹(T4),对照(CK)以同体积的蒸馏水浸泡。取浸种处理后生长培养 60 d 的牛膝植株,测定牛膝的株高、根长、地上及地下部分的生物量;取牛膝的叶及根, HPLC 法测定其齐墩果酸和蜕皮甾酮的含量,研究 MeJA 对牛膝生长及主要药用成分齐墩果酸和蜕皮甾酮积累的影响。结果表明:0.15 mmol · L⁻¹ MeJA 浸种处理,对牛膝生长及生物量的促进作用最佳,其株高、根长、地上部分鲜重及根鲜重分别比对照显著升高 43.9%、38.7%、26.4%、64.0%($P < 0.05$);0.15 mmol · L⁻¹ MeJA 处理,对牛膝的根和叶中齐墩果酸的积累作用最佳,分别比对照组显著增加了 114.3%和 60%($P < 0.05$);0.25 mmol · L⁻¹ MeJA 处理,对牛膝根中蜕皮甾酮的积累最佳,比对照高出 90.3%($P < 0.05$),却不利于根和叶中齐墩果酸的积累,并可抑制叶中蜕皮甾酮的形成。说明 0.15 mmol · L⁻¹ MeJA 浸种处理对牛膝的生长及其根和叶中齐墩果酸的积累作用最佳,并能显著促进根中蜕皮甾酮的积累,有利于牛膝药材产量和品质的提高。

关键词: 牛膝; 茉莉酸甲酯; 齐墩果酸; 蜕皮甾酮

中图分类号: Q946, R248.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2015)06-0875-05

Effects of methyl jasmonate on growth and major medicinal components accumulation of *Achyranthes bidentata*

LI Jin-Ting*, QI Wan-Zhen, GUO Xiao-Shuang, WANG Can,
ZHANG Yuan-Hao, WANG Di, SU Huan-Huan

(College of Life Sciences, Henan Normal University Engineering Technology Research Center of Nursing and Utilization of Genuine Chinese Crude Drugs, University of Henan Province, Xinxiang 453007, China)

Abstract: To study the effects of methyl jasmonate on the growth and the major medicinal components (oleanolic acid and ecdysterone) accumulation of *Achyranthes bidentata*, seeds of *A. bidentata* were soaked for 3 h by different concentrations (0, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 mmol · L⁻¹) of methyl jasmonate, and the control groups were soaked in the same volume of distilled water in this study. The determination of plant height, root length, fresh weight of aboveground and root of *A. bidentata* were done after 60 d. The contents of ecdysterone and oleanolic acid in roots and leaves of *A. bidentata* were determined by HPLC. The results showed that the 0.15 mmol · L⁻¹ MeJA treatment sample was beneficial for plant height, root length, fresh weight of aboveground and root. Compared with control, the biomass respectively be increased (43.9%, 38.7%, 26.4%, 64.0%, $P < 0.05$) observably. The 0.15 mmol · L⁻¹

收稿日期: 2014-10-11 修回日期: 2015-03-24

基金项目: 国家自然科学基金(81274076);河南省重点攻关项目(102102110109)。

作者简介: 李金亭(1962-),女,河南新乡人,硕士生导师,研究方向为药用植物学,(E-mail)Ljt66882004@126.com。

* 通讯作者

MeJA treatment sample was also beneficial for oleanolic acid accumulation in roots and leaves of *A. bidentata*. It had the highest amount respectively (114.3% and 60%, $P < 0.05$). The 0.25 mmol · L⁻¹ MeJA treatment sample was significantly promoted ecdysterone accumulation in roots, but inhibited oleanolic acid accumulation in roots and leaves and ecdysterone in leaves of *A. bidentata*. These results suggested that 0.15 mmol · L⁻¹ MeJA soaking was beneficial for the growth, oleanolic acid accumulation in roots and leaves, and would significantly promote ecdysterone accumulation in roots of *A. bidentata*, and be helpful to improve the quality and yield of medicinal materials.

Key words: *Achyranthes bidentata*; methyl jasmonate (MeJA); oleanolic acid; ecdysterone

牛膝(*Achyranthes bidentata*)为苋科牛膝属多年生草本植物,以干燥根入药,具有强筋骨、补肝肾、逐瘀通经等功效(中国药典,2010)。近年来随着人们对牛膝药材需求量的增加,人工栽培已成为其主要来源。但在人工栽培过程中,经常会受到干旱、病虫害等环境胁迫的影响而使产量降低,致使其主要药用成分牛膝皂苷及蜕皮甾酮等含量偏低,影响药材的产量和品质。目前国内外关于牛膝的研究主要集中于栽培、植物化学分析、药理学(李金亭等,2006)及结构与有效成分积累关系(Li *et al.*,2009)等方面。茉莉酸甲酯(MeJA)是许多植物体内产生的一种内源激素,在植物受到环境胁迫时能作为信号转导分子激发其防御基因的表达,从而诱导产生化学防御(王瑜等,2007),并可作为基因调控的诱导子或激活子,调控植物次生代谢产物的合成(Bonfill *et al.*,2011;Kim *et al.*,2005;Mangas *et al.*,2006;Kim *et al.*,2004)。外源 MeJA 可提高苦玄参的抗环境胁迫能力,缩短生育期,促进苦玄参的积累(谢阳姣等,2013),并能诱导丹参和曼陀罗毛状根中次生代谢产物的积累和释放(孙际薇等,2013;王学勇等,2007)。Sirvent *et al.*(2002)研究表明,在贯叶连翘小植株的生长过程中添加 200 μmol · L⁻¹ MeJA 既能显著提高金丝桃素类物质的含量,还能促进植株内贯叶金丝桃素含量的提高。在牛膝细胞悬浮培养过程中添加 0.6 mmol · L⁻¹ MeJA 可使蜕皮甾酮的产量比对照提高 2.6 倍(Wang *et al.*,2013)。MeJA 已广泛应用于促进药用植物次生代谢产物合成的研究,但在栽培牛膝中的应用研究甚少。因此,研究植物外源激素 MeJA 对牛膝主要药用成分的调控作用和改善植物生长发育中的次生代谢活动,从而改善其内在品质具有重要的理论意义和应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

牛膝种子由河南温县农科所提供,经河南师范

大学李金亭教授鉴定为苋科牛膝属植物的牛膝(*Achyranthes bidentata*)的种子。齐墩果酸和蜕皮甾酮对照品(纯度≥98%)购自南京春秋生物公司;MeJA 为分析纯,购至 Sigma 公司。

1.2 仪器

分析电子天平(精确度 0.0001 g),KQ-250B 型超声仪,安捷伦高效液相色谱仪(Agilent 1200LC)。

1.3 方法

先用 0.1% HgCl₂ 对牛膝种子消毒 3 min,蒸馏水漂洗 3 次,然后分别用 0(对照)、0.1(T1)、0.15(T2)、0.2(T3)、0.25(T4)mmol · L⁻¹ 的茉莉酸甲酯(MeJA)进行浸种处理 3 h,对照(CK)以同体积的蒸馏水浸泡。经 MeJA 浸泡后的种子再用蒸馏水冲洗 3 次,于 25 °C 恒温箱中暗催芽,待种子露白后,选择饱满露白一致的种子种植在高 8 cm、直径 8 cm 的塑料花盆中,基质为 1:1 的营养土和蛭石,置于 25 °C 温室中培养,14 h/d 光照。当苗高长至 3~5 cm 时进行间苗,每盆 2 株,每处理重复 5 盆。在生长期,根据生长的需要和外部环境条件定期浇灌霍格兰营养液或水,培养 60 d 后采收。将采收后的植物样品,先于 105 °C 杀青 10 min,然后于 60 °C 烘干,最后粉碎并过 60 目筛备用。

1.4 牛膝的生物学指标测定

测定株高、根长、地上及地下部分的生物量。

1.5 牛膝样品中齐墩果酸和蜕皮甾酮的测定

1.5.1 齐墩果酸的测定 样品制备:称取供试样品 0.5 g(每个样品 3 份),加甲醇 10 mL,超声提取 40 min,过滤去除残渣后用甲醇洗涤容器和残渣数次,于旋转蒸发仪减压浓缩至干。浓缩后样品加 10 mL 4 mol/L 盐酸,85 °C 水解 2 h,冷却后加 10 mL 氯仿,于 60 °C 回流萃取 2 次(每天 15 min),收集下层液并减压浓缩至干,用色谱纯甲醇定容至 3 mL,混匀后用微孔径为 0.22 μm 的滤膜过滤,并进行高效液相色谱测定。

色谱条件:色谱柱为反向碳 18 柱(4.6 × 250 mm),流动相为甲醇:水:冰醋酸(90:10:0.1);

流速 $0.6\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$,检测波长 210 nm ,进样量 $20\text{ }\mu\text{L}$,色谱图见图 1。

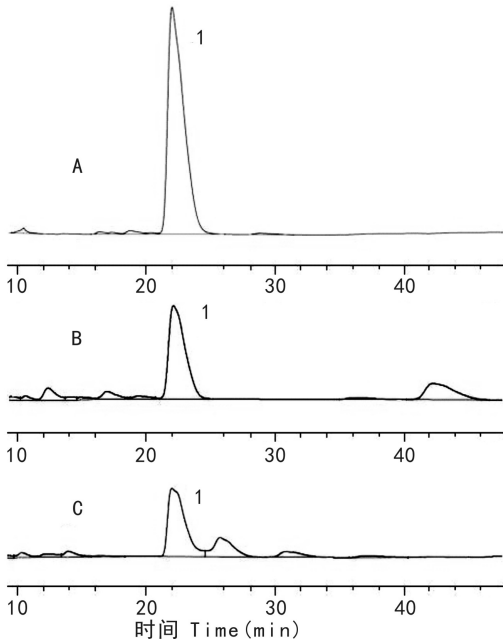


图 1 齐墩果酸的 HPLC 图谱
1. 齐墩果酸；A. 对照品；B. 根；C. 叶。

Fig. 1 HPLC Chromatograms of oleanolic acid

1. Oleanolic acid; A. Reference substances; B. Roots; C. Leaves.

1.5.2 蜕皮甾酮测定 蜕皮甾酮提取:精确称取样品 0.5 g (每样 3 份),加甲醇 10 mL ,超声提取 40 min ,滤去残渣,并用甲醇洗涤容器和残渣数次,旋转蒸发仪减压浓缩至干,加甲醇定容至 3 mL ,摇匀,过滤(滤膜孔径 $0.22\text{ }\mu\text{m}$)后进行高效液相色谱测定。

色谱条件:色谱柱为反向碳 18 柱($4.6\times 250\text{ mm}$);流动相为甲醇:水:冰醋酸($45:55:0.05$);流速 $0.9\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$,进样量 $20\text{ }\mu\text{L}$,检测波长为 248 nm ,色谱图见图 2。

1.6 数据处理

所有数据测定均重复 3 次,并进行方差分析,处理间的差异显著性用新复极差(Duncan's)检验。数据处理在 SPSS 和 Excel 软件系统下完成。

2 结果与分析

2.1 MeJA 对牛膝生物学性状的影响

由表 1 可知,与对照(CK)相比,经 MeJA 浸种处理后的牛膝幼苗,其株高、根长、地上部分鲜重及根鲜重均呈先增加后降低的趋势,当 MeJA 浓度为

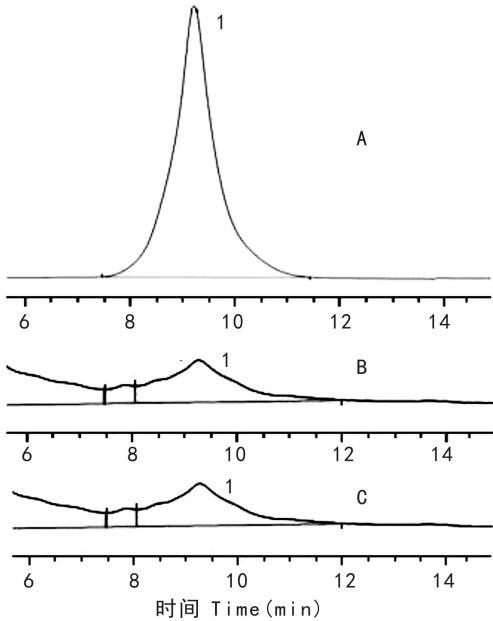


图 2 蜕皮甾酮的 HPLC 图谱

1. 蜕皮甾酮；A. 对照品；B. 根；C. 叶。

Fig. 2 HPLC Chromatograms of ecdysterone

1. Ecdysterone; A. Reference substances; B. Roots; C. Leaves.

表 1 MeJA 对牛膝生物学性状的影响

Table 1 Effects of methyl jasmonate on biological characteristics of *Achyranthes bidentata*

MeJA 处理 MeJA Treatment (mmol · L ⁻¹)	株高度 Plant height (cm)	根长 Root length (cm)	地上鲜重 Shoot fresh weight (g)	根鲜重 Root fresh weight (g)
0(CK)	6.58± 0.48(c)	9.23± 0.77(b)	0.72± 0.05(bc)	0.089± 0.007(b)
0.10(T1)	7.48± 0.33(b)	9.88± 0.94(b)	0.81± 0.07(ab)	0.092± 0.010(b)
0.15(T2)	9.47± 0.31(a)	12.80± 0.72(a)	0.91± 0.11(a)	0.146± 0.008(a)
0.20(T3)	7.68± 0.80(b)	9.67± 0.38(b)	0.66± 0.03(cd)	0.089± 0.007(b)
0.25(T4)	7.0± 0.12(bc)	9.60± 0.98(b)	0.56± 0.07(d)	0.074± 0.003(c)

注:同一列中的不同字母表示 Duncan's 试验 5% 水平差异显著,下同

Note: Different letters mean significant differences at 5% level at Duncan's test, the same below.

$0.15\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (T2)时,对牛膝生长及生物量的促进作用最好,其株高、根长、地上部分鲜重及根鲜重分别比对照显著升高 43.9% 、 38.7% 、 26.4% 、 64.0% ($P<0.05$)。可见,适当浓度的 MeJA 浸种能显著促进牛膝幼苗的生长。据报道(李红利等,2010),营养生长期及现蕾期喷施 MeJA 能使百合叶中 IAA 含量增加,从而促进其株高的增高。而谢阳姣等(2013)研究表明,喷施 MeJA 可抑制苦玄参株高,减少生物量的形成。汤日圣等(2002)认为 MeJA 处理

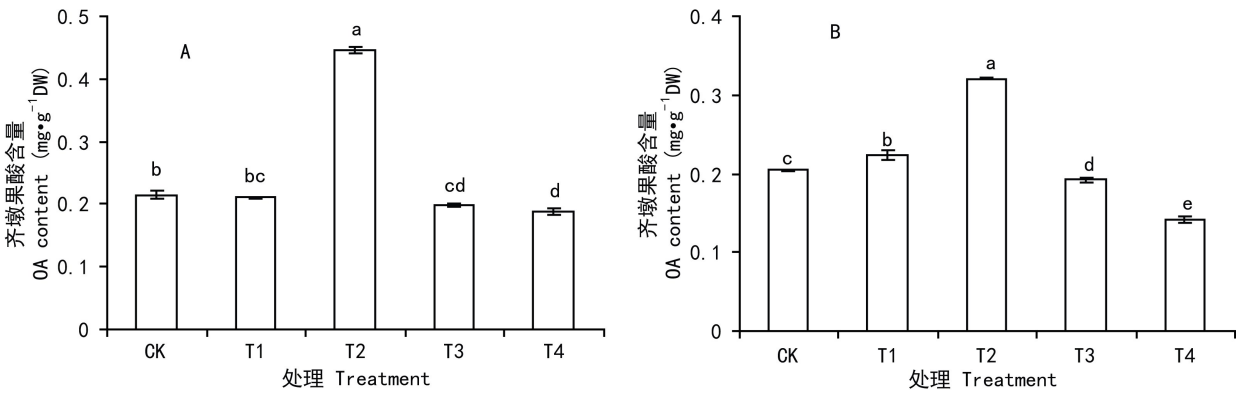


图 3 MeJA 对牛膝中齐墩果酸积累的影响 A. 根; B. 叶。

Fig. 3 Effects of methy jasmonate on oleanolic acid accumulation in *Achyranthes bidentata* BL. A. Roots; B. Leaves.

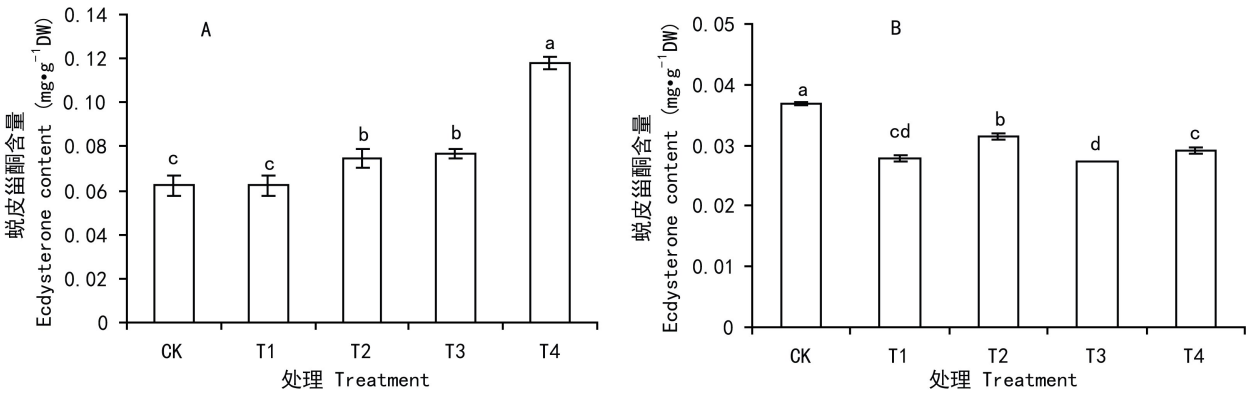


图 4 MeJA 对牛膝中蜕皮甾酮积累的影响 A. 根; B. 叶。

Fig. 4 Effects of methy jasmonate on ecdysterone accumulation in *Achyranthes bidentata* A. Roots; B. Leaves.

能抑制水稻幼苗生长。这可能是由于不同植物或同种植物的不同发育期用同种激素处理,其效果不同。

2.2 MeJA 对牛膝中齐墩果酸积累的影响

由图 3 可见,牛膝根和叶中齐墩果酸含量随 MeJA 浸种处理浓度的增加均呈先上升后下降的趋势,低浓度的 MeJA 浸种可促进齐墩果酸的积累,高浓度的 MeJA 浸种却抑制齐墩果酸的积累。当 MeJA 浓度为 0.15 mmol · L⁻¹ (T2) 时,牛膝根(图 3: A)及叶(图 3: B)中齐墩果酸的含量最高,分别比对照组增加了 114.3% 和 60% (P < 0.05)。此结果表明,以适当浓度的 MeJA 浸种,可促进齐墩果酸在牛膝根及叶中的积累。

2.3 MeJA 对牛膝中蜕皮甾酮积累的影响

由图 4 可知,MeJA 浸种对牛膝根和叶中蜕皮甾酮积累的影响完全相反。与 CK 相比,牛膝根中蜕皮甾酮含量随 MeJA 浓度的增加而增加,除 T1 外,均达显著水平,其中 0.25 mmol · L⁻¹ (T4) 处理牛膝根中蜕皮甾酮增幅最大,比对照高出 90.3% (图

4: A)。而 MeJA 处理对牛膝叶中蜕皮甾酮的效应不同于根,各浓度的 MeJA 浸种处理均使叶中蜕皮甾酮含量比对照显著下降(图 4: B)。这表明高浓度的 MeJA 浸种处理有利于根中蜕皮甾酮的积累,但不利于叶中蜕皮甾酮的积累。

3 讨论

茉莉酸甲酯对植物的生长发育具有广泛的作用,并能诱导多种次生代谢产物的形成(孙际薇等, 2013; 王学勇等, 2007)。牛膝中含有的皂苷类成分均为以齐墩果酸为苷元的三萜皂苷,三萜皂苷是牛膝中主要的有效药用成分之一。据报道(Bonfill *et al.*, 2011; Mangas *et al.*, 2006),茉莉酸甲酯可上调三萜类化合物合成基因的表达,从而促进三萜类物质的积累。前人多利用细胞悬浮培养研究茉莉酸甲酯对三萜类化合物合成的作用,本试验通过应用茉莉酸甲酯进行浸种处理,得到相似的结果,0.15

mmol · L⁻¹ (T2) MeJA 处理对牛膝的生长及其根和叶中齐墩果酸的积累作用最佳。由此表明, 茉莉酸甲酯不仅在细胞悬浮培养中对三萜化合物的合成具有促进作用, 浸种处理对牛膝根及叶中三萜类化合物的积累亦有促进作用。

植物体内不同次生代谢产物在合成、运输、积累等方面有一定的相关性, 同时又受到多种环境因素的影响, 存在着相对的独立性(杨蓓芬等, 2008)。本研究用不同浓度的 MeJA 浸种处理, 对牛膝根及叶中不同代谢产物的影响亦表现出了显著的差异。高浓度的 MeJA (T4) 浸种处理, 虽然有利于牛膝根中蜕皮甾酮的积累, 却不利于其根和叶中齐墩果酸的积累, 并可抑制叶中蜕皮甾酮的形成。植物蜕皮甾酮是一种天然甾体化合物, 具有多种生物活性, 也是牛膝中主要药用成分之一。MeJA 作为一种信号分子, 其生理效应是多方面的, 可诱导多种次生代谢产物合成积累, 但影响不同次生代谢产物的合成、运输、积累的最适浓度不同, 对同种植物不同组织器官的诱导作用也不相同。牛膝的叶是蜕皮甾酮的合成场所(李金亭, 2008), 0.25 mmol · L⁻¹ MeJA 浸种处理在一定程度上抑制了叶中蜕皮甾酮的合成, 但对其向根中的运输可能具有促进作用, 因此根中蜕皮甾酮的积累量反而增加, 其机理有待进一步研究。据报道, 一定浓度的 MeJA 可以通过上调 β -香树脂醇合酶基因的表达促进 2, 3-氧鲨烯的环化(Bonfill *et al.*, 2011), 从而促进三萜类化合物的合成。由于 2, 3-氧鲨烯的环化处于萜类和甾体类物质合成的分支点, 一定浓度的茉莉酸甲酯在促进三萜类化合物合成的同时, 对植物体内甾体类化合物的合成具有抑制作用(Mangas *et al.*, 2006), 本研究的结果证实了此观点。

综上所述, MeJA 作为一种信号分子, 对牛膝中三萜化合物和蜕皮甾酮的合成、运输、积累影响的最适浓度不同, 对牛膝不同组织器官的诱导作用也不相同。本研究结果表明, 0.15 mmol · L⁻¹ (T2) MeJA 浸种处理对牛膝的生长及其根和叶中齐墩果酸的积累作用最佳, 同时对根中蜕皮甾酮的积累也有显著的促进作用, 在一定程度上可提高牛膝药材的产量和品质。

参考文献:

Bonfill M, Mangas S, Moyano E, *et al.* 2011. Production of centellosides and phytosterols in cell suspension cultures of *Centella*

- asiatica* [J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, **104**:61—67
- Kim OT, Kim MY, Hong MH, *et al.* 2004. Stimulation of asiaticoside production from *Centella asiatica* whole plant cultures by elicitors [J]. *Plant Cell Rep*, **23**:339—344
- Kim OT, Kim MY, Huh SM, *et al.* 2005. Cloning of a cDNA probably encoding oxidosqualene cyclase associated with asiaticoside biosynthesis from *Centella asiatica* (L.) Urban [J]. *Plant Cell Rep*, **24**:304—311
- Li HL(李红利), Sun ZY(孙振元), Zhao LJ(赵梁军), *et al.* 2010. Effects of methyl jasmonate on growth and development of Oriental Lily(茉莉酸甲酯对东方百合生长发育的影响) [J]. *J Chin Agric Univ*(中国农业大学学报), **15**(1):25—30
- Li JT(李金亭), Hu ZH(胡正海). 2006. Advances in studies on biology and chemical constituents in *Radix Achyranthis Bidentatae*(牛膝类药材的生物学与化学成分的研究进展) [J]. *Chin Trad Herb Drugs*(中草药), **37**(6):952—956
- Li JT(李金亭). 2008. Studies on the correlation between the structural development of *Achyranthes bidentata* BL. and the accumulation of major medicinal components together with its forming of genuineness(牛膝结构和发育与主要药用成分积累关系及其道地性形成机制的研究) [D]. Xi'an(西安): Northwest University(西北大学)
- Li JT, Hu ZH. 2009. Accumulation and dynamic trends of triterpenoid saponin in vegetative organs of *Achyranthes bidentata* BL. [J]. *J Integr Plant Biol*, **51**(2):122—129.
- Mangas S, Bonfill M, Osuna L, *et al.* 2006. The effect of methyl jasmonate on triterpene and sterol metabolisms of *Centella asiatica*, *Ruscus aculeatus* and *Galphimia glauca* cultured plants [J]. *Phytochemistry*, **67**(8):2 041—2 049
- Sirvent T, Gibson D. 2002. Induction of hypericins and hyperforin in *Hperacum* L. in response to biotic and chemical elicitors [J]. *Physiol Mol Plant Pathol*, **60**(6):311—320
- State Pharmacopoeia Commission(国家药典委员会). 2010. People's Republic of China Pharmacopoeis(中华人民共和国药典) [M]. Beijing(北京): Chinese Medical Science and Technology Press(中国医药科技出版社)
- Sun JW(孙际薇), Zhang H(张鸿), Wang FY(王凤英), *et al.* 2013. Effects of methyl jasmonate on accumulation and release of main tropane alkaloids in liquid cultures of *Datura stramonium* hairy root(茉莉酸甲酯对曼陀罗毛状根中主要莨菪烷类生物碱成分积累和释放的影响) [J]. *Chin J Chin Mat*(中国中药杂志), **38**(11):1 712—1 718
- Tang RS(汤日圣), Wang H(王红), Cao XZ(曹显祖), *et al.* 2002. Effects of methyl jasmonate on the seed germinating and the growth of rice seedling(MeJA 对水稻种子萌发和秧苗生长的调控效应) [J]. *Acta Agron Sin*(作物学报), **28**(3):333—338
- Wang QJ, Zheng LP, Sima YH, *et al.* 2013. Methyl jasmonate stimulates 20-hydroxyecdysone production in cell suspension cultures of *Achyranthes bidentata* [J]. *Plant Omics J*, **6**(2):116—120
- Wang XY(王学勇), Cui GH(崔光红), Huang LQ(黄璐琦), *et al.* 2007. Effects of methyl jasmonate on accumulation and release of tanshinones in suspension cultures of *Salvia miltiorrhiza* hairy root(茉莉酸甲酯对丹参毛状根中丹参酮类成分积累和

(下转第 929 页 Continue on page 929)