

滇重楼丛枝菌根与次生代谢产物甾体皂苷的关系初探

周浓^{1*}, 邹亮², 王光志³, 姜北¹

(1. 大理学院药学院, 云南 大理 671000; 2. 成都大学生物产业学院, 成都 610106;
3. 成都中医药大学药学院, 成都 610075)

[摘要] 目的: 考察滇重楼根际丛枝菌根真菌的侵染率、孢子密度与其次生代谢产物甾体皂苷含量的相关性。方法: 采用 Phillips 和 Hayman 染色法挑选滇重楼丛枝菌根, 采用 Gendemann 湿筛倾析法获得 AMF 孢子并进行计数。同时, 采用 HPLC 测定滇重楼中 4 种甾体皂苷(重楼皂苷, , ,)的含量。结果: 滇重楼根际丛枝菌根真菌侵染率与其孢子密度呈显著的正相关, 而侵染率、孢子密度与其根茎总甾体皂苷含量呈一定的正相关。结论: 丛枝菌根真菌是影响滇重楼活性成分含量的重要因素。

[关键词] 滇重楼; 丛枝菌根真菌; 丛枝菌根; 侵染率; 孢子密度; 甾体皂苷

[中图分类号] R282.71 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)16-0085-04

Primary Explore to Relation of Arbuscular Mycorrhizae and its Secondary Metabolite Steroidal Saponin in *Paris polyphylla*

ZHOU Nong^{1*}, ZOU Liang², WANG Guang-zhi³, JIANG Bei¹

(1. College of Pharmacy, Dali University, Dali 671000, China;

2. College of Biological Industry, Chengdu University, Chengdu 610106, China;

3. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the correlation between the content of its secondary metabolites, steroidal saporins and the infection ratio and spore density of arbuscular mycorrhizal fungi of *P. polyphylla*. **Method:** By Phillips and Hayman staining, the arbuscular mycorrhizal of *P. polyphylla* were selected, and by Gendemann's Wet-screening method, the AMF spores were obtained and counted. Meanwhile, content of four steroidal saporins (paris saporin, , ,) were determined by HPLC. **Result:** Through mathematic model analysis, the infection ratio showed conspicuous positive correlation with the spore density of mycorrhizal structures of *P. polyphylla*, while the infection ratio and spore density showed some positive correlation with the total steroidal saporin content in the rhizome. **Conclusion:** Arbuscular mycorrhizal fungi may be an important factor which affect the content of active moiety in *P. polyphylla*.

[Key words] *Paris polyphylla*; arbuscular mycorrhizal fungi; arbuscular mycorrhizal; propagulum density; infection; steroidal saponin

滇重楼系百合科植物云南重楼 *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* 的干燥根茎^[1], 为《中国药典》收载的常用中药材, 具有抗癌、止血、镇痛、镇静等生物活

性, 应用广泛^[2]。在云南, 重楼又是一些著名中成药云南白药、宫血宁胶囊、楼莲胶囊等的主要原料之一, 每年仅云南省的用量就达数百吨, 市场需求量较大。由于长期掠夺式的采挖, 资源日益减少, 重楼的工业药用原料严重紧缺, 现已列为云南省 30 种稀缺濒危天然药物之一^[3]。

在自然界中, 丛枝菌根真菌 (arbuscular mycorrhizal fungi, AMF) 是一类非常重要的土壤微生物

[收稿日期] 20100726(004)

[基金项目] 云南省教育厅科研项目(09Y0361); 大理市科技局项目(2009SF08)

[通讯作者] * 周浓, Tel: 0872-2257411, E-mail: erhaizn@126.com

物,可与 80% 以上的陆生植物结合形成互利共生体^[4]。滇重楼土壤中丛枝菌根真菌侵染滇重楼是自然现象,对滇重楼共生真菌资源进行调查,发现了 4 属 24 种真菌能与滇重楼发生共生关系,形成 AM^[5]。AM 的形成能促进植物对营养元素的吸收和生长发育,提高植物的产量和品质,增强植物的抗病性和抗逆性,促进药用植物有效成分的合成,克服植物的连作障碍,降低植物对重金属的吸收等方面起重要作用^[6-11]。

到目前为止,关于滇重楼根际 AMF 定植与根茎甾体皂苷含量变化的相关关系的研究尚未见报道。本实验旨在通过调查不同产地滇重楼根际 AMF 的定植情况和测定其根茎中甾体皂苷含量的变化,研究二者的变化规律、分析相关关系。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪, DAD 检测器, Agilent 1100 色谱工作站; DM-BA300-B 生物显微镜(Motic), SMZ-168 体视显微镜(Motic), 显微图像采集与分析系统(Motic), TDL-40B 台式离心机(上海安亭科学仪器厂), KQ5200DB 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), W2018 型恒温水浴锅(上海申生科技有限公司), SZ-93 自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂), AE240 天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司), 350 目标准检验筛(浙江上虞市肖金筛具厂)。

1.2 试剂 乙腈为色谱纯;氢氧化钾、过氧化氢溶液、浓盐酸、苯酚、乳酸、甘油、锥虫蓝、聚乙二醇、碘、水合氯醛、碘化钾、苯胺蓝(水溶)、蔗糖、福尔马林、冰醋酸、无水乙醇、甲醇、正丁醇均为分析纯,水为重蒸水。

1.3 药品 2008 年 7 月在大理地区 10 个不同的滇重楼分布区进行多点采集,采集滇重楼根系及根际土,每个采集点按 5 点取样法选取 5 株样品,除去 5 cm 厚的表层土后,采集滇重楼根际 5 ~20 cm 的滇重楼根系及根际土,装入塑料袋内注明标签,密封带回。根样清水洗净后剪成 1 cm 长根段置于标准固定液 FAA 固定;土样风干后装入塑料袋中于 4℃ 冰箱保存。

重楼皂苷对照品购自中国药品生物制品检定所,批号分别为 111590-200402, 111591-200402, 111592-200402, 111593-200402。

样品由大理学院药学院生药学教研室马晓匡教

授鉴定为百合科植物云南重楼 *P. polyphylla* 的干燥根茎。

2 方法

2.1 菌根侵染率计算公式 采用 Phillips 和 Hayman 的染色方法^[12],进行根样的染色,在显微镜下观察菌根形态,并统计根段中菌根菌侵染根段数,计算菌根菌侵染率。菌根侵染率计算公式:每个样品在显微镜下镜检 100 个 1 cm 长的根段,观察其中的 AM 真菌结构,并用网格交叉法计算根系菌根侵染率^[13]。侵染率 = 侵染根根段数 / 被检查的根段总数 × 100%。

2.2 AMF 的分离与计数 取 20 g 土样按 Gendemann^[14] 的湿筛倾析法进行 AMF 孢子的分离,体视显微镜观察计数,3 次重复。

2.3 滇重楼中甾体皂苷的含量测定 色谱条件及系统适用性: ZorbaxSB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱;流动相乙腈-水(40:60);体积流量 1.0 mL·min⁻¹;柱温 30℃;检测波长 203 nm。理论塔板数按重楼皂苷峰计算不低于 4 000。

对照品溶液制备:分别精密称取在 40℃ 减压干燥 2 h 的重楼皂苷对照品适量,用甲醇制成每 1 mL 各含 0.236 4, 0.081 0, 0.042 4, 0.040 2 mg 的溶液,即得。

供试品溶液制备:取滇重楼药材粉末(过三号筛)约 0.500 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 30 mL,放置过夜,超声处理(功率 200 W,频率 40 kHz) 30 min,放冷,过滤,取滤液在水浴锅上蒸干,残留物用 20 mL 水溶解,分别用水饱和的正丁醇 20, 10, 10 mL 萃取,合并正丁醇萃取液,置水浴锅上蒸干后用甲醇溶解定容至 10 mL,备用。

2.4 数据处理 应用统计分析软件 SPSS 13.0,进行方差分析(ANOVA)和相关分析。

3 结果与分析

3.1 滇重楼根际 AMF 生态特征

3.1.1 滇重楼根际 AMF 侵染率变化动态 测定不同产地滇重楼 AMF 侵染率,其变化动态如图 1 所示。结果表明:不论在自然环境,还是人工栽培条件下,滇重楼均有 AM 存在,侵染率在 35.3% ~ 98.6%,平均 70.7%;云龙县漕涧镇、鹤庆县黄坪镇、大理市喜州镇花甸坝药材场(野生)和宾川县宾居镇的侵染率比较接近,而大理学院校园最低,云龙县漕涧镇固东平村 1 组 2 号最高。

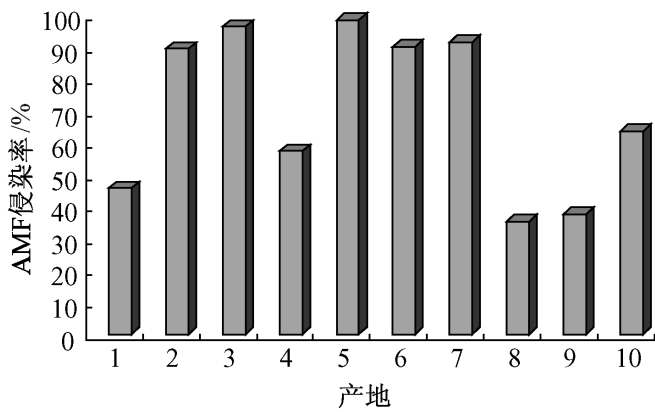


图 1 不同产地滇重楼根际 AMF 侵染率变化动态

在 10 个不同立地条件采集的样品, 均有菌根侵染, 且全部属于 AM 类型。AMF 侵染宿主滇重楼的根系并形成典型的 Paris-type 丛枝, 即 AM 真菌在根内的侵染结构主要为菌丝圈, 它们在根皮层从一个细胞直接进入另一个细胞, 丛枝从菌丝圈上产生。

3.1.2 滇重楼根际 AMF 孢子数变化动态 测定滇重楼根际土壤中 AMF 孢子数, 结果如图 2 所示。结果表明: 不同产地滇重楼根际土壤中的孢子数为 8 ~26 个每 20 g, 平均为 15.4 个每 20 g 云龙县漕涧镇 4 个产地和大理市喜州镇花甸坝药材场 2 个产地

的孢子数最丰富, 而大理市喜州镇花甸坝药材场(野生)的最多, 宾川县宾居镇乌龙坝村的最少。

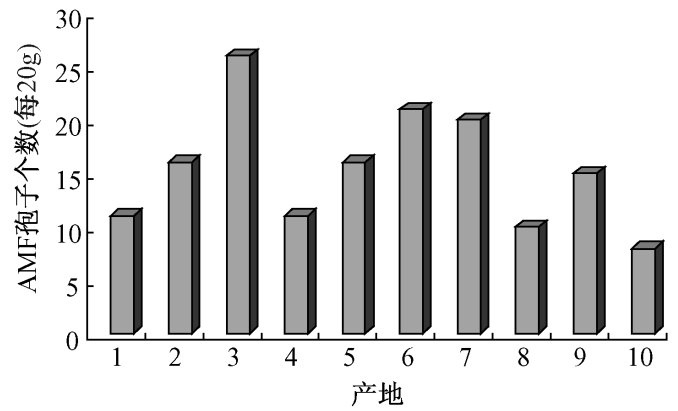


图 2 不同产地滇重楼根际 AMF 孢子数变化动态

3.2 滇重楼根茎中甾体皂苷含量变化动态 精密称取不同产地滇重楼各 3 份, 每份约 0.500 g, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.3 项下色谱条件, 精密进样 20 μ L, 测得各色谱峰峰面积, 外标一点法计算重楼皂苷, , 的质量分数, 结果见表 1。结果表明: 不同产地样品中各成分质量分数差异较大, 变化幅度为 0.172 4% ~1.802 0%, 高低相差 10 倍之多, 平均质量分数 0.678 8%。

表 1 不同产地滇重楼中重楼皂苷, , 的质量分数 (n=3) %

No.	采集地点	皂苷	苷	皂苷	皂苷	合计
1	宾川县鸡足山镇风景管理区	1.049 6	0.584 5	0.024 0	0.143 9	1.802 0
2	鹤庆县黄坪镇水槽村	0.057 4	0.076 2	0.035 0	0.090 4	0.259 0
3	大理市喜州镇花甸坝药材场(野生)	0.078 1	0.161 6	0.037 8	0.076 6	0.354 1
4	云龙县漕涧镇固东平村 1 组 1 号	0.328 2	0.107 6	0.001 4	0.029 0	0.466 2
5	云龙县漕涧镇固东平村 1 组 2 号	0.062 6	0.091 2	0.042 4	0.096 1	0.292 3
6	云龙县漕涧镇固东平村 1 组 3 号	0.521 1	0.735 6	0.003 8	0.075 3	1.335 8
7	云龙县漕涧镇固东平村 2 组	0.502 3	0.594 1	0.003 5	0.038 0	1.137 9
8	大理市下关镇大理学院校园	0.031 2	0.036 1	0.037 2	0.067 9	0.172 4
9	大理市喜州镇花甸坝药材场(家种)	0.023 1	0.072 4	0.018 9	0.104 1	0.218 5
10	宾川县宾居镇乌龙坝村	0.300 8	0.018 2	0.002 2	0.074 7	0.395 9

3.3 滇重楼根际 AMF 生长发育与根茎中甾体皂苷总含量的相关性分析 自然条件下, 滇重楼根际 AMF 的生长发育情况与根茎总甾体皂苷含量呈正相关性, 相关系数比较低, 相关系数为 0.189 ~0.248。其中, 根茎总甾体皂苷含量与 AMF 侵染率相关性相对较高, 相关系数为 0.248; 而与 AMF 孢子数相关性相对较低, 相关系数仅为 0.189。这说明 AMF 孢子数、根系菌根侵染率与根茎总甾体皂苷含量的密切程度比较低, 其原因有待进一步探讨。滇重楼根际 AMF 侵染率与 AMF 孢子个数呈正相关性, 相关系数为 0.732, 即 AMF 侵染率越高, AMF 孢子个数越多。根际 AMF 侵染率与 AMF 孢子个数存在相互促进的关

系: 高密度根际 AMF 侵染率, 可以增加土壤中根际 AMF 孢子个数; 反过来, 高密度的根际 AMF 孢子个数, 可以促进根际 AMF 的侵染率。

4 讨论

本试验结果表明, 不同产地滇重楼根际 AMF 的生长发育情况与根茎总甾体皂苷含量呈一定的正相关性, 但相关系数较低, 由于样品的数量有限, 该现象是否具有普遍性, 值得跟踪研究。通过数学模型分析, 滇重楼根际丛枝菌根真菌侵染率与其孢子密度呈显著的正相关, 而滇重楼根际丛枝菌根真菌侵染率、孢子密度与其根茎总甾体皂苷含量呈一定的正相关。

可以初步认为, 滇重楼根际高密度 AMF 繁殖体

有效的促进了滇重楼菌根共生体的形成和发育,进而影响植株生理生化代谢过程,促进根茎甾体皂苷化合物的合成与积累。反过来,滇重楼根茎甾体皂苷化合物含量的上升,又刺激了 AMF 早期的生长发育,提高根际 AMF 繁殖体密度。AMF 与滇重楼根际间通过菌根这一互惠共生体,互相调节代谢过程,相互促进生长发育。

本研究仅在滇重楼分布区的局部地域采样,文中结果仅反应调查结果,不能完整反映出滇重楼根际 AMF 菌根侵染率、孢子密度与根茎总甾体皂苷含量间的关系,现正进行室内栽培的人工接种对比试验,以期在人为栽培控制条件下对其相互关系作进一步深入研究,实现优质增产,为在生产中引入 AM 真菌克服滇重楼的栽培周期长等问题提供新的思路和方法,同时为阐明 AM 真菌促进滇重楼生长的作用机理以及利用菌根生物技术提高滇重楼产量和品质提供理论依据。

丛枝菌根真菌与药用植物活性成分的研究具有广阔的前景。至今,对其相互关系的研究还处于一个初始阶段,相对于数量庞大的药用植物活性成分和丛枝菌根真菌种类来说,仅仅涉及了其中的很小一部分。近年来,许多研究表明 AMF 影响植物的次生代谢过程,导致植物的次生代谢产物发生变化^[15-17],而这些次生代谢产物在植物与 AMF 之间形成的共生关系中起着特别重要的作用^[18-19]。因此,研究 AMF 与植物次生代谢产物的关系具有特别重要的生态学意义,同时将 AMF 的研究与药用植物研究相结合,提高药用植物活性成分的含量和产量,对推动药用植物的研究开发及中药资源的可持续利用具有重要意义。

[致谢] 云龙县漕涧镇固东平村药农李旺校同志在采集样品过程中提供帮助。

[参考文献]

[1] 中国药典[S] . 一部. 2010: 243.
[2] 邹亮, 周浓, 张海珠, 等. HPLC 测定不同产地滇重楼中的 4 种重楼皂苷[J] . 华西药学杂志, 2009, 24(5) : 521.
[3] 陆辉, 许继宏, 陈锐平, 等. 云南重楼属植物资源现状与保护对策[J] . 云南大学学报: 自然科学版, 2006, 28(S1) : 307.
[4] Smith S E, Read D J. Mycorrhizal symbiosis[M] . 2nd ed. London: Academic Press, 1997: 22.

[5] 周浓, 夏从龙, 姜北, 等. 滇重楼丛枝菌根的研究[J] . 中国中药杂志, 2009, 34(14) : 1768.
[6] 郭兰萍, 汪洪刚, 黄璐琦, 等. 泡囊丛枝菌根(AM) 对苍术生长发育及挥发油成分的影响[J] . 中国中药杂志, 2006, 31(18) : 1491.
[7] 全瑞建, 杨晓红, 李东彦. 丛枝菌根真菌种间差异对柚苗营养生长及矿质含量的影响[J] . 应用生态学报, 2006, 17(7) : 1229.
[8] 赵萌, 李敏, 王淼焱, 等. AM 真菌克服作物连作障碍的潜力[J] . 山东科学, 2006, 19(6) : 40.
[9] 朱红惠, 姚青. VA 菌根菌与植物的抗病性[J] . 热带亚热带土壤科学, 1998, 7(4) : 319.
[10] 王曙光, 林先贵, 施亚琴. 丛枝菌根(AM) 与植物的抗逆性[J] . 生态学杂志, 2001, 20(3) : 27.
[11] 李香串. 接种泡囊-丛枝菌根剂对人参产量的影响[J] . 中药材, 2003, 26(7) : 475.
[12] Philips J M, Hayman D S. Improved procedures for clearing and attaining parasitic and vesicular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection[J] . Trans Br Mycol Soc, 1970, 55: 158.
[13] Berch S M, Kendrick B. Vesicular-arbuscular mycorrhizae of southern Ontario ferns and fern-allies[J] . Mycologia, 1982, 74: 769.
[14] Gerdemann J W. Relation of a large soil-borne spore to phytomycetous mycorrhizal infections[J] . Mycologia, 1955, 47: 619.
[15] 张勇, 谢丽源, 熊丙全, 等. 银杏根际丛枝菌根真菌生长与根系黄酮含量的相关性研究[J] . 菌物学报, 2004, 23(1) : 133.
[16] Morandi D. Occurrence of phytoalexins and phenolic compounds in endomycorrhizal interactions, and their potential role in biological control[J] . Plant Soil, 1996, 185: 241.
[17] Vierheilig H, Bago B, Albrecht C, et al. Flavonoids and arbuscular mycorrhizal fungi // Manthey J, Buslig B eds. Flavonoids in the Living System[M] . New York: Plenum Press, 1998: 9.
[18] Harborne J B. Introduction to ecological biochemistry[M] . 3rd ed. London: Academic Press, 1988.
[19] Akiyama K, Matsuoka H, Hayashi H. Isolation and identification of a phosphate deficiency-induced C-glycosyl flavonoid that stimulates arbuscular mycorrhiza formation in melon roots[J] . Mol Plant-Microbe Interac, 2002, 15(4) : 334.

[责任编辑 邹晓翠]