

AM 真菌对川黄柏幼苗生长及小檗碱含量的影响

周加海¹, 范继红²

(1. 东北林业大学 生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 北京农业职业学院 北京 102442)

摘 要: 川黄柏是芸香科黄柏属黄皮树(*Phellodendron chinense* Schneid.)的干燥树皮, 为著名川产道地“三木”类药材之一, 其主要药用活性成分为小檗碱, 具有广谱抗菌性, 临床应用广泛。通过温室盆栽接种试验, 观察了 2 属 7 种丛枝菌根真菌对川黄柏幼苗生长及小檗碱含量的影响。结果表明: 丛枝菌根真菌促进了川黄柏幼苗的生长, 菌根幼苗的株高、地径、根生物量和地上部生物量均高于无菌根幼苗。丛枝菌根的形成影响了川黄柏幼苗根皮和茎皮中小檗碱的代谢。与无菌根幼苗比, 菌根幼苗的小檗碱含量均显著提高, 且菌根幼苗之间小檗碱的含量差异显著。

关键词: 川黄柏幼苗; 丛枝菌根; 生长; 小檗碱

中图分类号: Q 949.32; S 567.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2007)12—0025—03

丛枝菌根(Arbuscular mycorrhiza, AM)是自然界中普遍存在的高等植物与菌根真菌形成的互惠共生体, 80%~90%的被子植物都能形成丛枝菌根^[1]。丛枝菌根真菌显著影响植物的初生代谢过程, 它可以促进植物根系对水分和养分的吸收, 从而改善植物的生长状况^[2-3]。近年来, 许多研究表明丛枝菌根也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, 而这些次生代谢产物在植物和菌根真菌之间形成的共生关系中起着特别重要的作用, 因此, 研究菌根真菌和植物次生代谢的关系具有非常重要的生态学意义^[4]。

黄柏为著名的道地药材之一, 始载于《神农本草经》, 性味苦、寒, 功能清热燥湿、泻火解毒^[5]。《中国药典》2005 年版第一部将川黄柏与关黄柏分别收载, 黄柏即黄皮树(*Phellodendron chinense* Schneid.)的干燥树皮, 习称“川黄柏”^[6], 黄柏中的主要活性成分为小檗碱^[7]。已有丛枝菌根真菌对关黄柏幼苗生长及小檗碱含量影响的研究^[8-9], 还未见对川黄柏的研究, 因此, 研究以川黄柏为试材探讨丛枝菌根真菌对川黄柏生长及小檗碱含量的影响, 为川黄柏资源的应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 丛枝菌根真菌的种类

无梗囊霉属: 光壁无梗囊霉(*Acaulospora laevis* Gerdemann & Trappe)和蜜色无梗囊霉(*A. mellea* - Spain & Schenck); 球囊霉属: 透光球囊霉(*Glomus di-*

aphanum Morton & Walker), 幼套球囊霉(*G. etunicatum* Becker & Gerdemann), 根内球囊霉(*G. intraradices* Schenck & Smith), 摩西球囊霉(*G. mosseae* (Nicol. & Gerd) Gerd & Trappe), 地表球囊霉(*G. versiforme* (Karsten) Berch)。

1.2 幼苗培养及接种处理

2005 年 12 月, 精选当年成熟饱满的川黄柏种子用 0.5% 的 KMnO₄ 溶液浸泡消毒 1 h, 再用无菌水洗去 KMnO₄, 于 121℃ 灭菌 2 h 的河沙中进行 5℃ 沙藏层积处理。2006 年 4 月取出种子, 无菌水洗去沙子, 再用 0.5% 的 KMnO₄ 溶液浸泡消毒 1 h, 以无菌水冲洗干净后播入土壤与河沙的混合基质中(体积比 3:1, 过 2 mm 筛, 混合后 121℃ 灭菌 2 h)。6 月, 选择长势一致的川黄柏幼苗分为 8 组(每组 10 盆)进行接种处理。1 组作为对照(CK), 不接种任何 AM 真菌(在花盆中加入等量灭菌处理的接种剂和 10 mL 各菌种混合滤液, 以保证微生物区系一致); 另外 7 组分别接种含有光壁无梗囊霉(A1)、蜜色无梗囊霉(Am)、透光球囊霉(Gd)、幼套球囊霉(Ge)、根内球囊霉(Gi)、摩西球囊霉(Gm)和地表球囊霉(Gv)孢子的菌土。每盆接种剂量为 30 g, 菌土穴播于幼苗根部。

接种后的川黄柏幼苗置于温室中自然培养, 温室为自然采光, 昼夜温度自然过渡(18~28℃), 湿度 60%~70%。3 个月后测定川黄柏幼苗的各项指标。

1.3 菌根侵染率统计

随机选取川黄柏幼苗鲜根 30 条, 剪成长约 1.0 cm 的根段, 采用 Phillips 和 Hayman(1970)的染色方法染色、制片、镜检^[10], 参照盖京苹^[11]的方法统计菌根侵染率。

菌根侵染率(%)=(菌根侵染的根段数/检测的根

第一作者简介: 周加海(1980-), 男, 在读硕士, 研究方向为生物活性物质利用。E-mail: jiahaizhou@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(30271045)。

收稿日期: 2007-06-25

段总数)×100%。

1.4 幼苗生长状况测定

量取株高、地径后将川黄柏幼苗从花盆中取出,按根、茎、叶分开,洗净,于80℃烘干至恒重,称重。10株重复。

1.5 小檗碱含量测定

将烘干后的川黄柏幼苗根皮和茎皮粉碎,参照秦彦杰等^[12]的方法采用 Waters 高效液相色谱系统(600 泵,717 自动进样器,2487 紫外检测器)测定小檗碱含量。Techsphere ODS 柱(4.6 mm×25 cm, 5 μm);流动相:乙腈/水溶液(1 000 mL 水溶液中含 3.4 g 磷酸二氢钾和 1.7 g 十二烷基磺酸钠)1:1;流速:1.0 mL/min;检测波长:345 nm;进样量:10 μL。

以上数据用 SPSS 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 幼苗的菌根形成情况

接种光壁无梗囊霉(A1)、蜜色无梗囊霉(Am)、透光球囊霉(Gd)、幼套球囊霉(Ge)、根内球囊霉(Gi)、摩西球囊霉(Gm)和地表球囊霉(Gv)孢子菌土的川黄柏幼苗,均不同程度地被侵染并形成了丛枝菌根,而对照(CK,未接种)无菌根真菌侵染,未形成丛枝菌根。试验所用球囊霉属的5种真菌(Gd、Ge、Gi、Gm、Gv)的菌根侵染率较高,均在70%以上;无梗囊霉属的光壁无梗囊霉(A1)侵染率稍低,但也超过60%(表1)。

2.2 幼苗的生长差异

接种3个月后,形成菌根的川黄柏幼苗明显优于未形成菌根的幼苗(CK),菌根幼苗的株高、地径、根生物量

和地上部生物量均高于无菌根幼苗,其中株高和地上部生物量最为显著,所有菌根幼苗均显著高于无菌根幼苗。并且,菌根幼苗间的差异也很大,Gi对川黄柏幼苗生长的影响最为显著,A1较差。Gi幼苗的株高、地径、根生物量和地上部生物量分别是A1幼苗的1.5、1.8、7.0和5.3倍,差异显著(表1)。

表1 丛枝菌根真菌对川黄柏幼苗侵染和生长的影响

处理	菌根侵染率/%	株高/cm	地径/cm	根生物量/g	地上部生物量/g
CK	0 ^h	14.6 ^e	0.22 ^c	1.63 ^f	1.08 ^h
A1	60.6 ^g	17.8 ^c	0.25 ^c	1.79 ^f	1.25 ^g
Am	82.3 ^c	21.0 ^{bc}	0.36 ^{ab}	5.72 ^d	3.43 ^d
Gd	87.8 ^b	22.7 ^b	0.42 ^a	8.81 ^b	5.28 ^b
Ge	78.7 ^e	20.1 ^{cd}	0.31 ^{bc}	3.89 ^e	2.87 ^e
Gi	89.2 ^a	26.9 ^a	0.44 ^a	12.50 ^a	6.61 ^a
Gm	81.9 ^d	21.5 ^{ab}	0.35 ^{ab}	7.56 ^c	4.02 ^c
Gv	70.6 ^f	16.7 ^d	0.27 ^{bc}	1.98 ^f	1.47 ^f

2.3 幼苗小檗碱含量的差异

试验所用2属7种菌根真菌侵染所导致的丛枝菌根形成,均影响了川黄柏幼苗根皮和茎皮中小檗碱的代谢。与无菌根幼苗(对照)比,菌根幼苗的小檗碱含量均显著提高,并且,菌根幼苗之间小檗碱的含量差异也很显著(图1、2)。例如,Ge菌根幼苗根皮中小檗碱的含量为对照的1.82倍,Gm菌根幼苗的1.48倍,三者差异显著。

丛枝菌根形成对川黄柏幼苗小檗碱含量的影响有器官差异,菌根幼苗根皮和茎皮中小檗碱的含量明显高于对照,但根皮中小檗碱的含量以Ge菌根幼苗最高,为对照的1.82倍,而在茎皮中,Gm菌根幼苗的小檗碱含量最高,显著高于无菌根幼苗,达到对照的3.91倍。

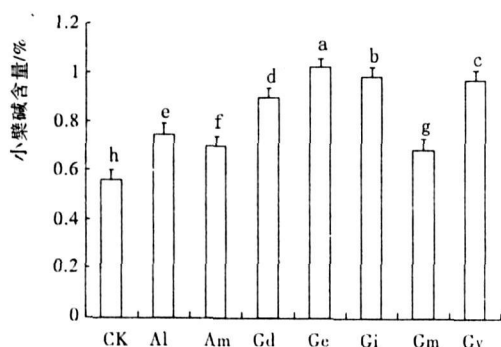


图1 丛枝菌根真菌对黄皮树根皮小檗碱含量的影响

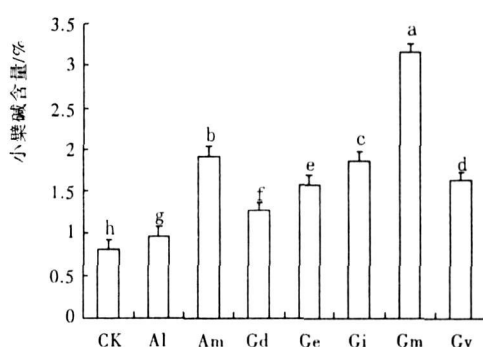


图2 丛枝菌根真菌对黄皮树茎皮小檗碱含量的影响

注:图中具有不同字母的柱体表示差异性显著($p < 0.05$)。

3 小结

川黄柏作为我国的传统名贵中药,市场需求很大,并且其木质坚硬、木纹细致常用作家具或器具柄。目

前,对川黄柏的研究主要集中于药用成分(主要是小檗碱)的提取、分析以及中药鉴别等方面^[6-7],而缺乏自然界中普遍存在的丛枝菌根真菌对川黄柏影响的研究,现

采用 2 属 7 种丛枝菌根真菌接种川黄柏幼苗, 结果表明, 光壁无梗囊霉 (Al)、蜜色无梗囊霉 (Am)、透光球囊霉 (Gd)、幼套球囊霉 (Ge)、根内球囊霉 (Gi)、摩西球囊霉 (Gm) 和地表球囊霉 (Gv) 影响了川黄柏幼苗的生长和小檗碱的含量。形成菌根的川黄柏幼苗明显优于未形成菌根的幼苗, 菌根幼苗的株高、地径、根生物量和地上部生物量均高于无菌根幼苗, 并且, 菌根幼苗间的差异也很大 (表 1)。此外, 丛枝菌根真菌还提高了川黄柏幼苗根皮和茎皮中小檗碱的含量 (图 1、2), 这与范继红等的研究结果类似^[9], 范继红等研究认为接种丛枝菌根真菌能显著提高川黄柏幼苗的药用成分含量, 不同菌根菌对不同生物碱的影响有所差异。感染摩西球囊霉和透光球囊霉的川黄柏幼苗小檗碱、药根碱产量增加较明显, 而感染地表球囊霉和幼套球囊霉的幼苗对掌叶防己碱含量的影响较为显著。该研究结果也表明, 丛枝菌根形成对川黄柏幼苗小檗碱含量的影响有真菌种类和器官差异, 菌根幼苗根皮和茎皮中小檗碱的含量明显高于对照, 但根皮中小檗碱的含量以 Ge 菌根幼苗最高, 为对照的 1.82 倍、Gm 菌根幼苗的 1.48 倍; 而在茎皮中, Gm 菌根幼苗的小檗碱含量最高, 显著高于无菌根幼苗和 Ge 菌根幼苗, 分别为 3.91 倍和 1.99 倍。

参考文献

[1] Koide R T, Schreiner R P. Regulation of the vesicular-arbuscular my-

corrhizal symbiosis[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1992, 43: 557-581.
[2] Smith S E, Read D J. Mycorrhizal Symbiosis, 2nd ed[M]. San Diego: Academic Press Inc., 1997: 605.
[3] Mahendra R, Deepak A, Singh A. Positive growth responses of the medicinal plants *Spilanthes calva* and *Withania somnifera* to inoculation by *Piriformospora indica* in a field trial[J]. Mycorrhiza, 2001(11): 123-128.
[4] 赵昕, 王博文, 阎秀峰. 丛枝菌根对喜树幼苗喜树碱含量的影响[J]. 生态学报, 2006 26(4): 1057-1062.
[5] 中华人民共和国国家药典委员会. 中国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 252.
[6] 徐敏, 万德光. 不同产地和生长年限川黄柏中小檗碱的含量测定[J]. 现代医药卫生, 2007, 23(1): 93.
[7] 方清茂, 曹浩, 舒光明. 川黄柏中盐酸小檗碱的含量及其道地性研究[J]. 华西药理学杂志, 2004 19(4): 275-276.
[8] 范继红, 杨国亭, 李桂玲. 接种 VA 菌根对黄檗幼苗生长的影响[J]. 东北林业大学学报, 2006, 34(2): 18-19.
[9] 范继红, 杨国亭, 穆立蕾, 等. 接种丛枝菌根菌对黄檗苗木主要 3 种生物碱含量的影响[J]. 防护林科技, 2006(5): 24-26.
[10] Phillips J M, Hayman D S. Improved procedures for dearing and attaining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection[J]. Transactions of the British Mycological Society, 1970 55: 158-161.
[11] 盖京苹, 冯固, 李晓林. 接种丛枝菌根真菌对甘薯生长的影响研究[J]. 中国生态农业学报, 2004 12(1): 111-113.
[12] 秦彦杰, 张玉红, 王洋, 等. 黄檗中生物碱含量的高效液相色谱分析[J]. 林产化学与工业, 2004(24): 115-118.

Effects of AM Fungi on the Berberine Content in *Phellodendron chinense* Seedlings

ZHONG Jia-hai¹, FAN Ji-hong²

(1. Life-science College, Nroth-east Forestry University, Haerbin, Heilongjiang 150040, China; 2. Beijing Agronomy Vocational College, Beijing 102442, China)

Abstract: The *Phellodendron chinense* is the dry cortex of *Phellodendron chinense* Schneid. in family Rutaceae, as one of three distinguished "the three wood medicine materials" in Sichuan. Berberine is the main active constituent for medicinal purposes, as well known for its widespread clinical practice as broad-spectrum antimicrobial. This article observed the effect of seven kinds of Arbuscular mycorrhizal fungi belonging to two genera on the growth and berberine content in *Phellodendron chinense* seedlings through potted experiment in the greenhouse. The result indicated that AM fungi promoted the growth of *Phellodendron chinense* seedlings. And the height and biomass were higher than those of non-mycorrhizal seedlings. The formation of AM affected berberine metabolism in root xylem and stem xylem of *Phellodendron chinense* seedlings. Compared to non-mycorrhizal seedlings, the beberine content was ramarkably higher, and the difference was also significant between mycorrhizal seedlings.

Key words: *Phellodendron chinense* seedlings; Arbuscular mycorrhiza; Growth; Berberine

欢迎订阅《北方园艺》期刊

邮发代号 14-150 单月刊 每册定价 6.00 元 全年 72.00 元