

不同产地滇黄精丛枝菌根真菌、深色有隔内生真菌定殖调查及与主要功效成分含量相关性分析

曹冠华^{1,2}, 张雪¹, 顾雯¹, 陈迪¹, 和志伟¹, 陈籽翰¹, 俞捷^{1*}, 贺森^{1*}

1. 云南中医药大学中药学院, 昆明市代谢性疾病中医药防治重点实验室, 云南 昆明 650500

2. 云南大学 云南省生物资源开发与利用国家重点实验室, 云南 昆明 650591

摘要: 目的 调查不同产地滇黄精根系中丛枝菌根真菌(AMF)和深色有隔内生真菌(DSE)定殖情况,并探讨其与主要功效成分之间的相关性。方法 以产自于云南省 5 个样地的滇黄精为研究对象,采用碱解离-酸性品红染色法,调查 AMF 和 DSE 在滇黄精须根部位的定殖情况,并对典型形态结构进行拍照分析;采用硫酸苯酚法、香草醛-冰醋酸-高氯酸比色法、分光光度法和醇溶热浸法测定滇黄精根状茎中多糖、薯蓣皂苷元、总黄酮和浸出物含量,并通过皮尔森相关系数法分析 AMF 及其典型结构定殖率、DSE 及其典型结构定殖率与 4 种功效成分含量之间的相关性。结果 在 5 个样地中,AMF 和 DSE 在滇黄精须根中的平均定殖率范围分别为 26.25%~57.54%、31.67%~45.19%,其中样地红河州蒙自县(HHMZ)AMF 和 DSE 定殖率均高于其他样地。4 种功效成分与 AMF、DSE 定殖率及典型结构定殖率之间均呈正相关,其中多糖、薯蓣皂苷元和总黄酮含量与 AMF、DSE 定殖率相关性相对较高,AMF/DSE 相关系数分别为 0.838/0.887、0.819/0.703、0.785/0.855,且多糖含量与 AMF 菌丝定殖率、DSE 定殖率呈显著相关。此外,AMF 及典型结构定殖率与 DSE 及典型结构定殖率之间、4 种功效成分含量两两之间均存较高的相关性。结论 AMF 和 DSE 在滇黄精须根中有着较高的定殖率,且与主要功效成分含量之间呈正相关。本研究为实施滇黄精生态种植、采用生物手段增产增收提供了数据支持和实验依据。

关键词: 滇黄精; 丛枝菌根真菌; 深色有隔内生真菌; 定殖率; 多糖; 薯蓣皂苷元; 总黄酮

中图分类号: R282.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)16-3930-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.16.028

Colonization investigation of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and dark septate endophytes (DSE) in roots of *Polygonatum kingianum* and their correlations with content of main functional components in rhizomes

CAO Guan-hua^{1,2}, ZHANG Xue¹, GU Wen¹, CHEN Di¹, HE Zhi-wei¹, CHEN Zi-han¹, YU Jie¹, HE Sen¹

1. Kunming Key Laboratory of Metabolic Diseases Prevention and Treatment by Chinese Medicine, School of Traditional Chinese Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China

2. State Key Laboratory of Conservation and Utilization of Bio-Resources in Yunnan, Yunnan University, Kunming 650591, China

Abstract: Objective To investigate the colonization of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and dark septate endophytes (DSE) in the roots of *Polygonatum kingianum* planted at different areas, and explore the correlations between the colonization rate and the main functional components. **Methods** Fresh roots of *P. kingianum* from five plots in Yunnan Province were taken as research objects. The alkali dissociation method was used to investigate the colonization of AMF and DSE in the roots of *P. kingianum*. Then the morphological structure was photographed. The content of *P. sibiricum* polysaccharides, diosgenin, total flavonoids and extractum were separately determined by phenol-sulfate method, colorimetry method of vanillin-acetic acid-perchloric acid, spectrophotometry method with rutin standard and hot dipping method with alcohol. The correlations between the colonization rates of AMF or DSE and four main functional components were analyzed by Pearson correlation coefficient method. **Results** The average colonization rates

收稿日期: 2019-03-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81560612); 国家自然科学基金资助项目(81660684); 云南省科学技术厅-云南中医学院应用基础研究联合专项[2017FF116(-019), 2017FF117(-014)]; 云南省刘昌孝院士工作站项目; 云南省中青年学术和技术带头人后备人才(2015HB053); 省部共建云南生物资源保护与利用国家重点实验室开放课题(2017KF006); 云南省应用基础研究计划青年项目(2017FD109)

作者简介: 曹冠华(1985—), 男, 博士, 高级实验师, 主要从事中药资源与菌根微生物的研究。E-mail: cgh20031695@163.com

***通信作者** 俞捷(1981—), 女, 博士, 教授, 主要从事中药资源及药理学研究。E-mail: cz.yujie@gmail.com

贺森(1984—), 男, 博士, 副教授, 主要从事中药资源与分子生物学研究。E-mail: sunbelt123@163.com

of AMF and DSE in the five plots were 26.25%—57.54% and 31.67%—45.19%, respectively. The colonization rates of AMF and DSE from HHMZ was higher than the other four others. All of correlations among the colonization rates of AMF, DSE and their typical structure and the four main functional components in the rhizomes were positive correlation, in which the correlations between the content of polysaccharides, diosgenin or total flavonoids and the colonization rates of AMF or DSE were higher, and their correlation coefficient were respectively 0.838/0.887, 0.819/0.703, and 0.785/0.855 (AMF/DSE). Furthermore, the correlations between the content of polysaccharides and the colonization rates of AMF hypha or DSE were significant. In addition, there were high correlations among the colonization rates of AMF, DSE and their typical structures, as well as the content in pairs of four functional components. **Conclusion** There were higher colonization rates of AMF and DSE in the fibrous roots of *P. kingianum*. The correlations between the colonization rates of AMF or DSE and each main functional component were positive. This study provides data support and experimental basis for the implementation of ecological planting of *P. kingianum* and the use of biological means to increase production and income.

Key words: *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl.; arbuscular mycorrhizal fungi; dark septate endophytes; colonization rate; *Polygonatum sibiricum* polysaccharides; diosgenin; total flavonoids

滇黄精 *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl. 是黄精属中重要的一个种, 主要分布在云南、四川、贵州等地^[1], 以其根状茎入药, 药性平和, 是中医临床最常用的滋补药, 也是我国重要的药食两用资源之一, 具有养阴润肺、健脾益气、肺虚咳嗽、内热消渴等功效。研究显示, 黄精根状茎中功效成分众多, 主要包括多糖、甾体皂苷、黄酮、生物碱、木质素等, 其中多糖含量最高, 甾体皂苷次之^[2-3]。姜程曦等^[2]和廖念^[4]建议以多糖、甾体皂苷、黄酮和浸出物作为衡量黄精质量的标志物。

丛枝菌根真菌 (arbuscular mycorrhizal fungi, AMF) 和深色有隔内生真菌 (dark septate endophytes, DSE) 是植物根系中最主要的 2 大类内生真菌。AMF 是指一类广泛定殖于植物根内的互惠共生内生真菌, 除可以为寄主提供矿物质营养, 促进植物磷、氮、水分等营养物质的吸收之外, 共生过程还能直接刺激初级或次级代谢产物的形成^[5-6]。DSE 是指一类定殖于植物根内、菌丝颜色较深、具横隔, 常以无形态存在的小型内生真菌。众多研究显示, DSE 对宿主植物有着积极的作用, 在提高宿主植物的抗逆性、增加植物的生物量、促进矿物质元素的吸收等方面发挥着重要的作用^[7-8]。

目前对黄精属内生真菌研究较少, 尤其是关于滇黄精内生真菌定殖与功效成分积累相关性的研究更是鲜有报道。韦中强等^[9]从产自重庆的野生黄精根系中分离得到地球囊霉和摩西球囊霉菌根真菌, 发现土壤含孢量为 20.6 个/g; AMF 菌丝感染率为 17.4%、丛枝感染率为 3.1%、孢囊成群分布; 且孢子接种量不同, 黄精生长效应存在一定的差异, 认为黄精生长对 AMF 存在依赖性。李艳玲等^[10]对泰山黄精内生真菌进行了分离鉴定, 从根、茎、叶和果实中共分离出 32 株内生真菌, 分属于 7 个

属, 占比最高的是镰刀菌属, 其次是不产孢真菌; 并发现 8 株菌具有广谱抗菌活性。而其他相关研究多是将分离的内生真菌用于抗菌等活性研究^[11-13]。

本实验对产自于云南省文山州新街乡、楚雄州金碧镇、大理州下关市、红河州蒙自县、红河州金平县新鲜滇黄精须根中的内生真菌 AMF、DSE 定殖情况进行了系统调查分析, 同时测定了各样地根状茎中多糖、薯蓣皂苷元、总黄酮和浸出物的含量; 分析了 AMF、DSE 及其典型结构定殖率与多糖、薯蓣皂苷元、总黄酮、浸出物含量之间的相关性。本研究结果对实施滇黄精生态种植及采用生物手段增产增收具有重要的理论和实践意义。

1 材料

采样日期为 2017 年 6 月 13~18 日、9 月 20 日, 2018 年 8 月 15 日。AMF、DSE 定殖率统计和多糖、薯蓣皂苷元、总黄酮、浸出物含量测定材料为分别采自云南省文山州新街乡 (编号 WSXJ)、楚雄州金碧镇 (编号 CXJB)、大理州下关市 (编号 DLXG)、红河州蒙自县 (编号 HHMZ)、红河州金平县 (HHJP) 的多年生滇黄精新鲜根样。每块样地面积约为 0.02 km², 每块样地设 3 个采样点, 每个采样点采集 7~10 株滇黄精。

2 方法

2.1 样品预处理

将采集后的新鲜根样 (含土) 迅速运到实验室, 小心去除附着土, 每块样地根样随机分成 3 份, 一份于 -80 °C 冰箱保存; 一份用于 AMF、DSE 定殖率的测定 (如不能及时制片, 则放 -80 °C 冰箱保存, 备用); 一份用于多糖、薯蓣皂苷元、总黄酮、浸出物含量的测定。

2.2 AMF、DSE 定殖率的测定

采用碱解离-酸性品红染色法测定滇黄精

AMF、DSE 定殖率^[14]。每块样地取 300 个根段，每个根段观测 40~50 个视野。

2.2.1 制片 将洗净的根样置于试管，加入 10% KOH 溶液，放入水浴锅直至根样半透明且有小气泡，反复清洗后移至平板加入乳酸中和 10 min；放置在载玻片上，滴加适量 0.01% 酸性品红乳酸甘油溶液，在酒精灯下加热至冒白烟，重复 3~5 次，倾去多余的品红溶液，斜置载玻片，缓慢滴加乳酸甘油溶液脱色至无红色液体流出。剪取 6 条合适大小根样置新载玻片上整齐排列，滴加少量乳酸甘油溶液，压片制片。

2.2.2 定殖率统计 将成片置于生物显微镜下观察 AFM 和 DSE 典型结构，统计出视野数，前者典型结构包括丛枝、泡囊、菌丝、菌丝圈；后者包括微菌核、菌丝。

AMF 定殖率 = (丛枝视野数 + 泡囊视野数 + 菌丝视野数 + 菌丝圈视野数) / 总视野数

DSE 定殖率 = (微菌核视野数 + 菌丝视野数) / 总视野数

2.3 主要功效成分含量的测定

2.3.1 多糖的测定 采用硫酸苯酚法，具体参考《中国药典》2015 年版^[15]。

2.3.2 薯蓣皂苷元的测定 参考李春雷等^[16]方法，采用香草醛-冰醋酸-高氯酸比色法进行测定。

(1) 样品制备：取滇黄精粉末 10.000 g，85% 乙醇 100 mL 超声提取 75 min，抽滤；滤渣用 85% 乙醇洗涤补足 100 mL，收集滤液，旋蒸蒸干；用 20 mL 1% 氢氧化钠溶解干物质，移入烧杯中，正丁醇提取 2 次，每次 20 mL，合并，3 500 r/min 离心 10 min，取上层正丁醇层旋转挥干；用 20 mL 甲醇溶解，移入 5 mL 量瓶定容，加甲醇稀释至刻度，摇匀，备用。

(2) 标准曲线绘制：分别取 0.10、0.20、0.30、0.40、0.50、0.60、0.70 mL 0.511 mg/mL 薯蓣皂苷元对照品溶液于比色管中，后续操作同上。以薯蓣皂苷元质量浓度为纵坐标 (Y)，吸光度 (A) 值为横坐标 (X)，绘制薯蓣皂苷元标准曲线 $Y = 11.794X + 0.0444$ ， $r^2 = 0.9943$ 。

(3) 样品测定：取 0.4 mL 制备液置于具塞比色管中，沸水浴挥干，加入 0.2 mL 新鲜配制的 5% 香草醛冰醋酸，0.8 mL 高氯酸，摇匀，立即放入 60 °C 的水浴锅 10 min，即刻冰水浴 5 min，取出，加 5 mL 冰醋酸，摇匀，在 545 nm 处（由全波长扫描所得）测定 A 值，根据标准曲线方程计算薯蓣皂苷元含量。

2.3.3 总黄酮的提取和测定 参考钱森和等^[17]方法，

以 81% 乙醇为提取溶剂，提取温度 69 °C，料液比 1:18，提取时间 2.5 h，提取次数 2 次，回流提取。以芦丁为对照品，采用分光光度法测定，吸收波长 510 nm。以芦丁质量浓度为纵坐标 (Y)，A 值为横坐标 (X)，绘制标准曲线， $Y = 13.50X - 0.0026$ ， $r^2 = 0.9923$ ，按照标准方程计算总黄酮的量。

2.3.4 浸出物含量测定 按《中国药典》2015 年版醇溶性浸出物法项下的热浸法测定^[15]：精确称取供试品 3.000 g，置 250 mL 锥形瓶中，加 50% 乙醇 100 mL，密塞，称定质量，静置 1 h，微沸回流 1 h。放冷，取下锥形瓶，密塞，称定质量，用水补足缺失的质量，摇匀，干燥滤器滤过；精密量取滤液 25 mL，置已干燥至恒定质量的蒸发皿中、水浴上蒸干后，105 °C 干燥 3 h，干燥器中冷却 30 min，迅速称定质量，以干燥品计算供试品中醇溶性浸出物的含量，重复实验 3 次，取平均值。

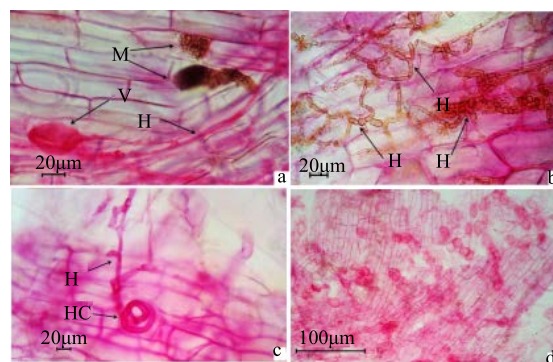
2.4 数据处理

利用 SPSS 21.0 软件中的皮尔森相关系数 (Pearson correlation coefficient) 法对 AMF、DSE 及典型结构定殖率与多糖、薯蓣皂苷元含量的相关性进行分析；若方差齐性，采用单因素方差分析 (One-way Anova) 中的 Turkey HSD 检验进行差异显著性分析 ($P < 0.05$)。方差齐性采用 Levene 检验。

3 结果与分析

3.1 不同样地滇黄精根样 AMF、DSE 定殖情况调查结果分析

由图 1 可知，在滇黄精根中存有 AMF 和 DSE



a-DSE 微菌核和 AMF 泡囊和菌丝 b-DSE 菌丝 c-AMF 菌丝圈 d-AMF 泡囊群 H-菌丝 HC-菌丝圈 V-泡囊
a-microsclerotias of DSE, vesicles and hypha of AMF b-hypha of DSE c-hyphae circle of AMF d-vesicles flock of AMF H-hypha HC-hyphae circle V-vesicles M-microsclerotias

图 1 滇黄精根内生真菌 AMF 和 DSE 典型形态结构

Fig. 1 Morphological characters of AMF and DSE in roots of *P. kingianum*

典型形态结构。在图 1-a 和图 1-d 中显示, AMF 典型形态结构泡囊和菌丝大部分同时存在于细胞或细胞间隙中, 且在极少的菌丝中会出现丛枝结构, 并且泡囊作为 AMF 的主要典型结构, 有时会集群出现。图 1-c 为 AMF 菌丝形成的菌丝圈, 即菌丝折叠成圈状。图 1-a 和图 1-b 为 DSE 典型形态结构微菌核和 DSE 菌丝, 均呈深棕色; 微菌核由细胞壁加厚的膨大的细胞紧密堆积形成, 主要分布于表皮、皮层细胞中或细胞间隙^[14]。由表 1 可知, 不同产地滇黄精内生真菌 AMF、DSE 定殖率存有一定的差异, 其平均定殖率分别为 (26.25 ± 1.82) % ~ (57.54 ± 5.64) % 和 (31.67 ± 2.46) % ~ (45.19 ± 4.45) %。AMF 典型结构主要有 AMF 菌丝和泡囊构成, 少部分存在丛枝结构, 且部分观察视野中会同时存在泡囊和菌丝结构。5 个样地中, 样地 HHMZ AMF 定殖率最高, 为 (57.54 ± 5.64) %,

后面依次为样地 DLXG (43.55 ± 4.15) %、CXJB (42.07 ± 4.55) %、WSXJ (37.46 ± 2.85) % 和 HHJP (26.25 ± 1.82) %, 样地 WSXJ、CXJB 和 DLXG 之间无显著差异, 但与另外两者之间差异显著。5 个样地间 AMF 菌丝定殖率与 AMF 定殖率稍有差别, 定殖率最高的为样地 HHMZ (39.87 ± 2.92) %, 其次为样地 DLXG (31.22 ± 1.28) %、WSXJ (28.29 ± 1.99) % 和 CXJB (26.1 ± 1.17) %, 样地 HHJP 菌丝定殖率最低, 为 (22.82 ± 1.14) %; 菌丝定殖率最高 (样地 HHMZ) 与最低 (样地 HHJP) 之间差异显著。泡囊作为 AMF 典型结构, 在所有滇黄精须根中均有定殖, 且部分样地较高; 定殖率最高的样地为 HHMZ (20.45 ± 2.63) %, 其次是样地 CXJB (18.39 ± 3.88) %、DLXG (12.57 ± 4.35) %、WSXJ (11.85 ± 2.94) % 和样地 HHJP (5.03 ± 1.63) %, 但两两间均无显著差异。

表 1 不同样地滇黄精须根 AMF、DSE 定殖率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Investigation statistical analysis of AMF and DSE colonization rates in roots of *P. kingianum* from different planting areas ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样地	定殖率/%					
	AMF	泡囊	AMF 菌丝	DSE	微菌核	DSE 菌丝
WSXJ	37.46 ± 2.85 ^b	11.85 ± 2.94 ^a	28.29 ± 1.99 ^{bc}	34.77 ± 4.93 ^b	2.02 ± 0.39 ^b	33.76 ± 4.83 ^b
CXJB	42.07 ± 4.55 ^b	18.39 ± 3.88 ^a	26.10 ± 1.17 ^{cd}	37.13 ± 2.71 ^{ab}	3.89 ± 0.11 ^a	34.87 ± 1.64 ^b
DLXG	43.55 ± 4.15 ^b	12.57 ± 4.35 ^a	31.22 ± 1.28 ^b	31.67 ± 2.46 ^b	3.40 ± 0.80 ^{ab}	29.03 ± 1.57 ^b
HHMZ	57.54 ± 5.64 ^a	20.45 ± 2.63 ^a	39.87 ± 2.92 ^a	45.19 ± 4.45 ^a	3.39 ± 0.75 ^{ab}	43.44 ± 2.01 ^a
HHJP	26.25 ± 1.82 ^c	5.03 ± 1.63 ^a	22.82 ± 1.14 ^d	32.75 ± 3.40 ^b	2.31 ± 0.61 ^{ab}	31.52 ± 3.53 ^b

不同字母表示不同样地间显著性分析水平为 $P < 0.05$

Different letters means significant difference among different sampled areas is analyzed at level of $P < 0.05$

滇黄精须根中 DSE 定殖率由典型结构微菌核和 DSE 菌丝构成, 且 DSE 菌丝的定殖率远高于微菌核定殖率。5 个样地中, 样地 HHMZ DSE 定殖率最高, 为 (45.19 ± 4.45) %, 其次为样地 CXJB (37.13 ± 2.71) %、WSXJ (34.77 ± 4.93) %、HHJP (32.75 ± 3.40) % 和样地 DLXG (31.67 ± 2.46) %, 且样地 HHMZ 与除样地 CXJB 之外的 3 个样地间均差异显著, 但后四者之间则无显著差异。5 个样地 DSE 菌丝定殖率高低次序与 DSE 定殖率一致, 各样地平均定殖率分别为 (43.44 ± 2.01) %、(34.87 ± 1.64) %、(33.76 ± 4.83) %、(31.52 ± 3.53) % 和 (29.03 ± 1.57) %; 方差分析显示, 样地 HHMZ 与其他 4 个样地间差异显著, 但后四者之间无显著差异。微菌核定殖率相差不大, 除最高与最低之间差异显著, 其余之间则无显著差异。

不同样地间滇黄精须根 AMF 和 DSE 定殖率不

尽相同, 且部分差异显著, 这可能与宿主植物的生长状况、土壤成分和结构、田间管理及根际微生物多样性情况等有关^[18], 需进一步的研究和分析。

3.2 不同样地主要功效成分含量测定结果分析

由表 2 可知, 不同样地滇黄精根状茎中多糖、薯蓣皂苷元、总黄酮和浸出物含量均存有一定的差异。样地 HHMZ 多糖含量最高, 达到 (17.01 ± 0.40) %, 远高于其他样地或已报道结果^[19], 且与其他 4 个样地间差异显著; 其次为样地 DLXG, 多糖含量为 (9.87 ± 0.35) %, 高于样地 CXJB (8.99 ± 0.16) %、HHJP (8.83 ± 0.25) %、WSXJ (8.70 ± 0.33) %, 且差异显著。薯蓣皂苷元测定结果显示, 样地 HHMZ 含量最高, 为 (4.10 ± 0.16) mg/g, 与除样地 CXJB (3.65 ± 0.25) mg/g 之外的 3 个样地之间差异显著; 而样地 CXJB 与 DLXG (3.36 ± 0.26) mg/g 无显著差异, 但与样地 HHJP (2.57 ± 0.31)

表 2 不同样地滇黄精多糖、薯蓣皂苷元、总黄酮和浸出物含量测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 2 Determination of polysaccharides, diosgenin, total flavonoids and extractum in rhizomes of *P. sibiricum* from different planting areas ($\bar{x} \pm s, n=3$)

样地	多糖/%	薯蓣皂苷元/(mg·g ⁻¹)	总黄酮/(mg·g ⁻¹)	浸出物/%
WSXJ	8.70±0.33 ^c	2.14±0.11 ^c	0.640±0.057 ^c	67.96±2.39 ^b
CXJB	8.99±0.16 ^c	3.65±0.25 ^{ab}	0.980±0.092 ^b	73.33±1.47 ^a
DLXG	9.87±0.35 ^b	3.36±0.26 ^b	0.880±0.043 ^b	74.67±2.00 ^a
HHMZ	17.01±0.40 ^a	4.10±0.16 ^a	1.380±0.051 ^a	76.91±2.42 ^a
HHJP	8.83±0.25 ^c	2.57±0.31 ^c	0.840±0.091 ^b	73.65±0.27 ^a

a, b, c 代表不同样地间功效成分含量之间的差异性 ($P<0.05$)a, b, c represent significant difference of certain functional component among different sampled areas at level of $P<0.05$

mg/g、WSXJ (2.14 ± 0.11) mg/g 间差异显著, 后者之间无显著差异。与多糖、属于皂苷元含量类似, 样地 HHMZ 总黄酮含量同样最高, 为 (1.380 ± 0.051) mg/g, 与其他 4 个样地间呈显著差异; 其次为样地 CXJB 的 (0.980 ± 0.092) mg/g、DLXG 的 (0.880 ± 0.043) mg/g 和 HHJP 的 (0.840 ± 0.091) mg/g, 且三者之间无显著差异, 但均与样地 WSXJ (0.640 ± 0.057) mg/g 间差异显著。浸出物含量结果显示, 样地 HHMZ (76.91 ± 2.42) %、DLXG (74.67 ± 2.00) %、CXJB (73.33 ± 1.47) % 和 HHJP (73.65 ± 0.27) % 含量之间无显著差异, 但均高于样地 WSXJ (67.96 ± 2.39) %, 且差异显著。

3.3 基于 5 个样地滇黄精 AMF、DSE 定殖率与多糖、薯蓣皂苷元、总黄酮和浸出物含量相关性分析

由表 3 可知, 多糖含量、薯蓣皂苷元含量、总黄酮含量、浸出物含量、AMF 及其典型结构定殖率、DSE 及其典型结构定殖率两两之间均呈正相

关。4 种功效物质之间的相关性结果显示, 两两之间相关系数较高, 其中多糖含量与薯蓣皂苷元、总黄酮、浸出物含量之间的相关系数分别为 0.746、0.868、0.839, 无显著性; 薯蓣皂苷元含量与总黄酮、浸出物之间的相关系数分别为 0.921、0.849, 前者呈显著相关; 总黄酮含量与浸出物之间相关系数为 0.853。

4 种功效成分与 AMF 及其典型结构定殖率之间普遍存有较高的相关性。多糖、薯蓣皂苷元、总黄酮、浸出物含量与 AMF 定殖率之间的相关系数分别为 0.838、0.819、0.785 和 0.516, 无显著性; 与 AMF 菌丝之间的相关系数分别为 0.916、0.689、0.757 和 0.512, 和与 AMF 定殖率之间的相关性比较, 多糖、总黄酮含量与 AMF 菌丝之间的相关性升高, 且前者呈显著相关; 而与孢囊定殖率之间的相关系数分别为 0.640、0.802、0.699 和 0.372, 和与 AMF 定殖率之间的相关性比较, 相关性均下降。

表 3 基于样地 WSXJ、CXJB、DLXG、HHMZ 和 HHJP 滇黄精 AMF、DSE 定殖率与多糖、薯蓣皂苷元、总黄酮和浸出物含量相关性分析

Table 3 Correlation analysis between content of polysaccharides, diosgenin, total flavonoids and extractum in rhizomes and colonization rates of AMF and DSE in roots of *P. sibiricum* sampled from WSXJ, CXJB, DLXG, HHMZ and HHJP

指标	多糖含量	薯蓣皂苷元含量	总黄酮含量	浸出物含量	AMF 定殖率	AMF 菌丝定殖率	孢囊定殖率	DSE 定殖率	DSE 菌丝定殖率	微菌核定殖率
多糖含量	1.000									
薯蓣皂苷元含量	0.746	1.000								
总黄酮含量	0.868	0.921*	1.000							
浸出物含量	0.839	0.849	0.853	1.000						
AMF 定殖率	0.838	0.819	0.785	0.516	1.000					
AMF 菌丝定殖率	0.916*	0.689	0.757	0.512	0.938*	1.000				
孢囊定殖率	0.640	0.802	0.699	0.372	0.905*	0.714	1.000			
DSE 定殖率	0.887*	0.703	0.855	0.460	0.796	0.766	0.785	1.000		
DSE 菌丝定殖率	0.864	0.612	0.803	0.384	0.732	0.726	0.720	0.992**	1.000	
微菌核定殖率	0.339	0.874	0.625	0.663	0.613	0.363	0.731	0.367	0.253	1.000

表示具有极显著相关性 ($P<0.01$), *表示具有显著相关性 ($P<0.05$) and * respectively mean significant correlation at levels of $P<0.01$, $P<0.05$

多糖、薯蓣皂苷元、总黄酮与 DSE 及其典型结构定殖率之间同样存有较高的相关性,而浸出物含量与 DSE 及其典型结构定殖率相关性稍低。4 种功效成分与 DSE 定殖率之间的相关系数分别为 0.887、0.703、0.855 和 0.460,且多糖与 DSE 定殖率之间呈显著相关。和 4 种功效成分与 DSE 定殖率相关性相比,多糖、薯蓣皂苷元、总黄酮、浸出物含量与 DSE 菌丝定殖率之间的相关性均下降,相关系数分别为 0.864、0.612、0.803 和 0.384。4 种功效成分与微菌核定殖率之间的相关系数分别为 0.339、0.874、0.625 和 0.663,表明薯蓣皂苷元含量与微菌核定殖率之间的相关最高,明显高于与 DSE 及 DSE 菌丝定殖率之间的相关性。

AMF 定殖率与其典型结构 (AMF 菌丝、泡囊) 定殖率之间均为显著相关;AMF 菌丝定殖率与泡囊定殖率之间也具有较高的相关性,相关系数为 0.714。而 AMF 定殖率与 DSE 及其典型结构定殖率之间的相关性显示,其与 DSE 或 DSE 菌丝定殖率之间的相关性接近,相关系数分别为 0.796、0.734;而与微菌核定殖率之间的相关性稍低,相关系数为 0.613。此外,DSE 定殖率与 DSE 菌丝定殖率之间的相关性为极显著 ($r=0.992$);而 DSE 及 DSE 菌丝定殖率与微菌核之间的相关性相对较低,相关系数分别为 0.367、0.253。

4 讨论

越来越多的研究证实,定殖于植物根系的 AMF、DSE 在改善根际微环境,增强抗逆性、促进生物、增加代谢产物合成方面发挥着重要作用^[20]。研究发现,将不同属种的 AMF 接种在洋甘草 *Glycyrrhiza glabra* L.^[21]、薄荷 *Mentha crispa* L.^[22]、甜菊 *Stevia rebaudiana* Bertoni^[23] 根部,可以促进宿主的生长,并大幅增加生物量。此外,AMF 的定殖还可以促进药用植物功效成分的合成。王骞等^[23]、李艳冰等^[24] 研究发现,滇重楼甾体皂苷含量与 AMF 的定殖率呈显著相关;Toussaint 等^[25]、Urcoviche^[22] 等证实接种 AMF 可以增加甜罗勒 *Ocimum basilicum* L.、薄荷中阿吗碱、迷迭香酸、薄荷精油含量,且与 AMF 的种类和定殖率相关。目前对药用植物 DSE 研究相对较少。研究发现,将不同属种的 DSE 接种在枸杞 *Lycium barbarum* L.、石斛 *Dendrobium*、淫羊藿 *Epimedium wushanense* B. L. Guo 根部,可以显著提高其生物量^[7,26-27];并对提高新疆雪莲 *Saussurea involucrate* Kar. et Kir. 中芦

丁及淫羊藿中总黄酮、淫羊藿苷的含量有促进作用^[28]。本实验结果显示,滇黄精块茎中多糖、薯蓣皂苷元含量与 AMF、DSE 及其典型结构定殖率之间均呈正相关,且相关系数较高,部分为显著相关。有学者指出,AMF 和 DSE 可以通过加强宿主植物对 P、N、微量矿质元素的吸收、利用,刺激根部代谢通路产生有机酸或激素及抑制病原菌等方式来促进植物的生长、功效成分的合成及增强胁迫抗性^[29-30],但具体的作用机制仍在研究中。

目前,对黄精属植物内生真菌的研究较少,尤其关于滇黄精内生真菌定殖与功效成分积累相关性的研究更是鲜有报道。本研究发现,同样样地间 AMF、DSE 及其典型结构定殖率差异较大,AMF 定殖率范围为 26.25%~57.54%,DSE 定殖率范围为 31.67%~45.19%,其中 AMF 定殖率均高于韦中强等^[9] 报道的黄精根系 17.4% 的 AMF 菌丝定殖率;而与张智慧等^[31] 报道的三七根系 AMF 定殖率 (51.79%) 接近,但 DSE 定殖率远高于三七根系的 2% (0~71%)。由于受病害的影响,滇黄精在种植过程中往往会施加各种农药,这可能会直接导致根系内生真菌定殖率大幅下降^[19]。此外,作为多年生药用植物,生长时间也会直接影响 AMF 和 DSE 的定殖情况^[19]。

滇黄精须根中存有内生真菌 AMF、DSE 典型结构,且分布普遍;二者在滇黄精根中均有着较高的定殖率,在 5 块样地中,AMF、DSE 定殖范围分别为 26.25%~57.54%,31.67%~45.19%。4 种功效成分与 AMF、DSE 定殖率及典型结构定殖率之间均呈正相关,其中多糖、薯蓣皂苷元和总黄酮含量与 AMF、DSE 定殖率相关性相对较高,且多糖含量与 AMF 菌丝定殖率、DSE 定殖率呈显著相关。

参考文献

- [1] 姚馨,张金渝,万清清,等. 滇黄精的潜在分布与气候适宜性分析 [J]. 热带亚热带植物学报, 2018, 26(5): 439-448.
- [2] 姜程曦,张铁军,陈常青,等. 黄精的研究进展及其质量标志物的预测分析 [J]. 中草药, 2017, 48(1): 9-24.
- [3] Wang Y, Liu X, Su H, et al. The regulatory mechanism of chilling-induced dormancy transition from endo-dormancy to non-dormancy in *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl. rhizome bud [J]. *Plant Mol Biol*, 2019, 99(3): 205-217.
- [4] 廖念. 多花黄精产地加工炮制及其质量标准的研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2018.

- [5] Kapoor R, Anand G, Gupta P, *et al.* Insight into the mechanisms of enhanced production of valuable terpenoids by arbuscular mycorrhiza [J]. *Phytochem Rev*, 2017, 16(4): 677-692.
- [6] Gehlot P, Singh J. *Fungi and Their Role in Sustainable Development: Current Perspectives* [M]. Singapore: Springer, 2018.
- [7] Zhu Z B, Fan J Y, Guo Q S, *et al.* The growth and medicinal quality of *Epimedium wushanense* are improved by an isolate of dark septate fungus [J]. *Pharm Biol*, 2015, 53(5): 1344-351.
- [8] Della M I F, Saparrat M C N, Godeas A M, *et al.* The co-existence between DSE and AMF symbionts affects plant P pools through P mineralization and solubilization processes [J]. *Fungal Ecol*, 2015, 17: 10-17.
- [9] 韦中强, 韩如刚, 李娜, 等. 黄精根系 VA 真菌的感染情况及其对黄精生长的影响 [J]. 现代农业科技, 2017(19): 57-58.
- [10] 李艳玲, 王德才, 史仁玖, 等. 泰山黄精内生真菌的分离鉴定及抑菌活性研究 [J]. 中草药, 2013, 44(11): 1490-1494.
- [11] 吴依婷, 姚传威, 邓波侠, 等. 黄精根腐病分离菌及其拮抗内生细菌的鉴定 [J]. 浙江农业学报, 2018, 30(12): 2087-2093.
- [12] 迟惠荣, 张亚惠, 曾欣, 等. 多花黄精内生贝莱斯芽胞杆菌的分离鉴定及其抗菌与促生作用分析 [J]. 植物保护, 2019, 45(4): 122-131.
- [13] 柏晓辉, 刘孝莲, 刘娣, 等. 一株黄精内生菌的分离鉴定及抑菌活性研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(5): 777-782.
- [14] Li T, Liu M J, Zhang X T, *et al.* Improved tolerance of maize (*Zea mays* L.) to heavy metals by colonization of a dark septate endophyte (DSE) *Exophiala pisciphila* [J]. *Sci Total Envir*, 2011, 409(6): 1069-1074.
- [15] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [16] 李春雷, 吴小玲, 朱丹, 等. 山药薯蓣皂苷元含量动态变化的研究及采收期确定 [J]. 人参研究, 2014, 26(1): 33-35.
- [17] 钱森和, 金浩然, 魏明, 等. 响应面法优化黄精黄酮提取工艺及其抗氧化活性研究 [J]. 安徽工程大学学报, 2017, 32(4): 8-13.
- [18] Tavarini S, Passera B, Martini A, *et al.* Plant growth, steviol glycosides and nutrient uptake as affected by arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorous fertilization in *Stevia rebaudiana* Bert. [J]. *Ind Crops Prod*, 2018, 111: 899-907.
- [19] 王彩步, 段宝忠. 云南不同种植基地滇黄精中多糖含量测定分析 [J]. 大理大学学报, 2018, 3(2): 14-17.
- [20] Pagano M. *Recent Advances on Mycorrhizal Fungi Fungal Biology* [M]. Bern: Springer, 2016.
- [21] Liu H, Tan Y, Nell M, *et al.* Arbuscular mycorrhizal fungal colonization of *Glycyrrhiza glabra* roots enhances plant biomass, phosphorus uptake and concentration of root secondary metabolites [J]. *J Arid Land*, 2014, 6(2): 186-194.
- [22] Urcovic R C, Gazim Z C, Dragunski D C, *et al.* Plant growth and essential oil content of *Mentha crispa* inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi under different levels of phosphorus [J]. *Industrial Crops Products*, 2015, 67: 103-107.
- [23] 王骞, 张辉菊, 杨敏, 等. 28 种 AM 真菌对滇重楼中薯蓣皂苷元含量的影响 [J]. 大理大学学报, 2018, 3(10): 22-25.
- [24] 李艳冰, 林亮, 廖秋红, 等. 促进滇重楼皂苷类活性成分积累的内生真菌筛选 [J]. 云南农业大学学报: 自然科学版, 2019(1): 132-137.
- [25] Toussaint J P, Smith F A, Smith S E. Arbuscular mycorrhizal fungi can induce the production of phytochemicals in sweet basil irrespective of phosphorus nutrition [J]. *Mycorrhiza*, 2007, 17(4): 291-297.
- [26] Zhang H H, Tang M, Chen H, *et al.* Effects of a dark-septate endophytic isolate LBF-2 on the medicinal plant *Lycium barbarum* L. [J]. *J Microbiol*, 2012, 50(1): 91-96.
- [27] Hou X Q, Guo S X. Interaction between a dark septate endophytic isolate from *Dendrobium* sp. and roots of *Dendrobium nobile* seedlings [J]. *J Integr Plant Biol*, 2009, 51(4): 374-381.
- [28] Wu L Q, Lv Y L, Meng Z X, *et al.* The promoting role of an isolate of dark-septate fungus on its host plant *Saussurea involucreata* Kar. et Kir. [J]. *Mycorrhiza*, 2010, 20(2): 127-135.
- [29] Kusari S, Hertweck C, Spiteller M. Chemical ecology of endophytic fungi: Origins of secondary metabolites [J]. *Chem Biol*, 2012, 19(7): 792-798.
- [30] Podolich O, Ardanov P, Zaets I, *et al.* Reviving of the endophytic bacterial community as a putative mechanism of plant resistance [J]. *Plant Soil*, 2015, 388(1/2): 367-377.
- [31] 张智慧, 陈迪, 赵丹丹, 等. 三七根中丛枝菌根真菌与深色有隔内生真菌感染状况研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(17): 2311-2315.