

· 药材与资源 ·

三株长蠕孢属真菌对苗期毛脉酸模根中生物活性成分的影响

王振月¹, 李瑞明^{1,2}, 王宗权¹, 康毅华¹

(1. 黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 天津天士力集团现代中药研究所, 天津 300402)

摘要:目的 研究 3 株长蠕孢属真菌对苗期毛脉酸模根中 7 种生物活性成分的影响。方法 通过长蠕孢属真菌孢子悬浮液对苗期毛脉酸模叶面进行处理, 使毛脉酸模感染长蠕孢菌。采用高效液相色谱法对苗期毛脉酸模根样品中的 7 种生物活性成分进行测定, 并对其生物活性成分的量 and 产量分别进行了方差分析。结果 3 株长蠕孢属真菌叶面侵染苗期毛脉酸模对其根中白藜芦醇苷、大黄酚苷、大黄素甲醚的量在整个处理期内都没有显著性影响; 对其根中白藜芦醇、酸模素、大黄素、大黄酚的量有显著性影响。结论 从生物活性成分白藜芦醇的角度考虑, 选择大斑病长蠕孢 001 进行诱导处理, 处理时间不宜超过 40 d。本实验结果将为中药种植及天然药物的开发提供新的思路及理论基础。

关键词:长蠕孢属真菌; 毛脉酸模; 真菌诱导

中图分类号: R282.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)09-1395-05

Effect of three fungi of *Helminthosporium* on bioactive constituents
in root of seedling *Rumex gmelini*

WANG Zhen-yue¹, LI Rui-ming^{1,2}, WANG Zong-quan¹, KANG Yi-hua¹

(1. College of Pharmacy, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, Tianjin Tasly R & D Group, Tianjin 300402, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of three fungi of *Helminthosporium* on the seven kinds of bioactive constituents in root of seedling *Rumex gmelini*. **Methods** Let the *R. gmelini* infect the fungi of *Helminthosporium* by dealing the leave surface of *R. gmelini* with fungal spore suspension. The content of seven kinds of bioactive constituents was determined by HPLC and the results were analyzed by variance analysis. **Results** During the treatment time, little effect of three fungi of *Helminthosporium* on content of polydatin, chrysophanol 1-glucoside, and physcion, but the obvious effect on resveratrol, musizin, emodin, and chrysophanol was found. **Conclusion** The effects of *H. turcicum* 001 on yield and content of resveratrol are significant in early-middle stage (0—40 d), but treatment time over 40 d is not suitable. The results of this study could provide the new idea and theoretical basis for the exploiting of natural medicines and the planting of Chinese herbal medicine.

Key words: fungi of *Helminthosporium*; *Rumex gmelini* Turcz.; fungal elicitation

在适宜条件下, 利用真菌诱导子来调节药用植物的生物活性成分的代谢途径, 可以使一些药用植物中的一些生物活性成分的量提高。将真菌的诱导作用应用于天然药物的产生, 一直是个热门研究领域。尤其在利用植物组织或细胞培养生产天然药用成分方面, 诱导作用有着非常好的应用前景^[1]。1976 年 John 和 Ingham 在感染长蠕孢菌 *Helminthosporium carbonum* Ullstrup 的落花生下胚轴中

分离得到了作为植物抗毒素的顺式和反式白藜芦醇^[2]。说明白藜芦醇与真菌诱导存在一定的相关性。本试验是利用非内生真菌直接作用于药用植物毛脉酸模完整植株, 目的是研究非内生真菌刺激是否会使其自身抗真菌成分的量提高。这将为中药种植及天然药物的开发提供新的思路及理论基础。

毛脉酸模 *Rumex gmelini* Turcz. 为蓼科酸模属多年生宿根草本植物, 广泛分布于黑龙江省大小

收稿日期: 2005-12-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30270156)

作者简介: 王振月 (1956—), 男, 黑龙江哈尔滨人, 教授, 主要从事中药资源与开发及生物技术研究。

Tel: (0451) 82195748 E-mail: wangzhen_yue@163.com

兴安岭及张广才岭等地区,是黑龙江省、吉林长白山地区的重要药用资源植物,以根入药,味甘,性寒,有清热解毒、凉血止血、通便利尿之功,民间以治疗癰病或止血著称^[3]。化学成分分析结果表明,毛脉酸模根中富含白藜芦醇及白藜芦醇苷等二苯乙烯类成分,酸模素、大黄酚、大黄素等蒽醌类成分及黄酮类化合物^[4,5]。本试验选用了 3 株长蠕孢属真菌分别对苗期毛脉酸模叶表面进行了处理。以探讨长蠕孢属真菌对苗期毛脉酸模根中白藜芦醇苷、白藜芦醇、大黄酚苷、酸模素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚这 7 种生物活性成分的影响。

1 仪器与材料

美国 Waters 高效液相色谱(Waters 2695 型泵,2996 型二极管阵列检测器,Empower 色谱工作站);Mettler 电子天平 AE 240;ZK—82B 型真空干燥箱(上海市实验仪器总厂)。

白藜芦醇、白藜芦醇苷均由美国 Sigma 公司提供,大黄素、大黄酚苷(大黄酚-1-O- β -D-葡萄糖苷)、大黄酚、大黄素甲醚均由中国药品生物制品检定所提供,酸模素由课题组成员从毛脉酸模根中提取分离得到,经波谱分析鉴定结构,归一化法计算,质量分数在 98% 以上。苗期毛脉酸模根样品采于黑龙江中医药大学药用植物园。实验用菌种大斑病长蠕孢 *H. turcicum* Pass 001、*H. turcicum* Pass 002 由黑龙江省农业科学院提供,玉蜀黍长蠕孢 *H. maydis* Nishikado Miyabe 3. 3119 由国家菌种保存中心提供,001、002 是株系名,3. 3119 为保存号;下文中大斑病长蠕孢 001 以 A 代表,大斑病长蠕孢 002 以 B 代表,玉蜀黍长蠕孢以 C 代表。

甲醇,色谱纯,美国 DIKMA 试剂公司提供;磷酸,分析纯,天津市天河化学试剂厂出品;水,自制重蒸水。

2 方法与结果

2.1 真菌孢子培养:取高粱 25 g,置于 250 mL 锥形瓶中,加蒸馏水 50 mL。121 °C 高压灭菌 20 min。接菌后恒温培养箱中 27 °C 连续培养 30 d。

2.2 真菌孢子悬浮液浓度标定:采用血球计数板(25×16 规格)标定悬浮液浓度,每个样品重复观察计数 3 次,然后取其平均值。 N 为 80 小格内孢子总数(个)^[6]。调整真菌孢子悬浮液中孢子浓度均为 2.5×10^4 个/mL。

$$\text{孢子数(个/mL)} = \frac{N \times 400 \times 10\ 000}{80}$$

2.3 叶面真菌处理及样品采集:实验选用 3 株长蠕孢属真菌大斑病长蠕孢 001(A)、002(B)和玉蜀黍

长蠕孢 3. 3119(C),采用两因素(真菌类型和处理时间)完全随机设计,每个实验处理重复 3 次,设立空白对照。毛脉酸模叶表面喷洒前用试管刷轻拍,以破坏其叶表面的保护层。浓度为 2.5×10^4 个/mL 真菌孢子悬浮液喷洒于苗期毛脉酸模叶表面。处理后间隔 10 天采样 1 次,共采样 5 次,每个处理组 1 次采样 30 株。

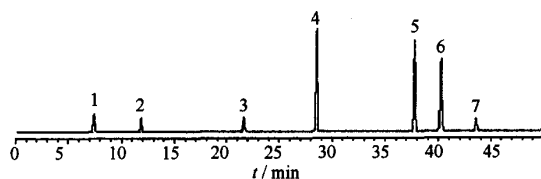
2.4 毛脉酸模受真菌感染情况检测:采样后的新鲜样品,先用蒸馏水清洗表面,切成小块(边长 3~4 mm),再用 70% 乙醇消毒 3~5 s,接着用 0.1% 升汞消毒苗期样品 1~2 min,最后用无菌蒸馏水洗去样品表面残留的升汞溶液。将消毒后的样品置于 PDA 平板培养基上,每皿 4~6 块,恒温培养箱中 27 °C 连续培养一周镜检^[7],结果见图 1。



图 1 大斑病长蠕孢 001 孢子(A)、大斑病长蠕孢 002 孢子(B)和玉蜀黍长蠕孢 3. 3119(C)

Fig. 1 Spore of *H. turcicum* 001 (A), spore of *H. turcicum* 002 (B), and spore of *H. maydis* 3. 3119 (C)

2.5 色谱条件:Planetsil C_{18} 分析柱(200 mm×4.6 mm, 5 μ m),预柱 Phenomenex ODS- C_{18} (4 mm×3.0 mm);流动相:流动相 A 为甲醇,流动相 B 为水(磷酸调 pH 为 2.0);线性梯度洗脱条件:流动相甲醇 30%~100%,时间为 0~50 min;体积流量 1 mL/min;检测波长:254 nm(蒽醌类成分)、303 nm(二苯乙烯类成分)、225 nm(酸模素);柱温:40 °C;进样量:20 μ L。在此条件下,7 种化学成分实现基线分离,见图 2、3。

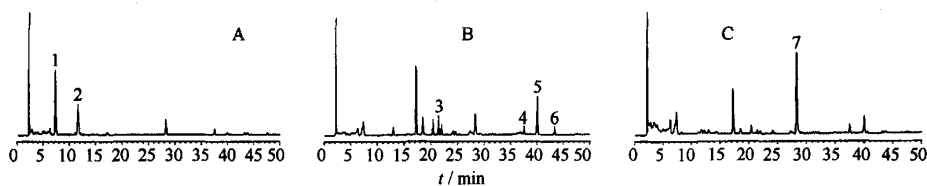


1-白藜芦醇苷 2-白藜芦醇 3-大黄酚苷
4-酸模素 5-大黄素 6-大黄酚 7-大黄素甲醚
1-polydatin 2-resveratrol 3-chrysophanol 1-glucoside
4-musizin 5-emodin 6-chrysophanol 7-phycion

图 2 对照品的 HPLC 图(254 nm)

Fig. 2 HPLC Chromatogram of reference substances (254 nm)

2.6 标准曲线的制备:精密称取白藜芦醇、白藜芦醇苷、大黄酚苷、酸模素、大黄素、大黄酚、大黄素甲



1-白藜芦醇苷 2-白藜芦醇 3-大黄酚苷 4-大黄素 5-大黄酚 6-大黄素甲醚 7-酸模素
1-polydatin 2-resveratrol 3-chrysophanol 1-glucoside 4-emodin 5-chrysophanol 6-phycion 7-musizin
A-303 nm 下检测 B-254 nm 下检测 C-225 nm 下检测
A-detected at 303 nm B-detected at 254 nm C-detected at 225 nm

图 3 毛脉酸模样品的 HPLC 图

Fig. 3 HPLC Chromatogram of *R. gmelini* samples

醚对照品适量,分别溶于甲醇溶液中,配制成质量浓度分别为 0.11、0.66、0.20、0.13、0.19、0.125、0.09 mg/mL 的对照品溶液,分别精密吸取对照品溶液,注入高效液相色谱仪,以进样量 $X(\mu\text{g})$ 为横坐标,峰面积 Y 为纵坐标绘制标准曲线,结果见表 1。

表 1 样品线性关系

Table 1 Regression equation of samples

成分	回归方程	r	线性范围/ μg
白藜芦醇	$Y=7.083 \times 10^4 + 8.199 \times 10^6 X$	0.999 9	0.010~2.310
白藜芦醇苷	$Y=2.311 \times 10^5 + 3.906 \times 10^6 X$	1.000 0	0.063~24.255
大黄酚苷	$Y=3.190 \times 10^4 + 2.205 \times 10^6 X$	1.000 0	0.019~12.600
酸模素	$Y=-1.318 \times 10^4 + 4.639 \times 10^6 X$	0.999 9	0.013~11.050
大黄素	$Y=8.000 \times 10^4 + 3.328 \times 10^6 X$	0.999 8	0.018~3.990
大黄酚	$Y=7.012 \times 10^3 + 3.992 \times 10^6 X$	1.000 0	0.012~5.250
大黄素甲醚	$Y=7.973 \times 10^3 + 1.715 \times 10^6 X$	0.999 9	0.008~0.945

2.7 供试品溶液的制备:苗期毛脉酸模根部阴干后,粉碎过 80 目筛,在 50 °C 下干燥至恒重。每个样品精密称取 0.2 g,置索氏提取器内加 50%乙醇 65 mL 提取 4 h,滤过,滤液置蒸发皿中蒸干。残渣用 10 mL 甲醇溶解并定容至刻度,此溶液再过 0.45 μm 的微孔滤膜,弃去初滤液取续滤液作为供试品溶液。

2.8 精密度试验:取同一份供试品溶液,连续进样

5 次,白藜芦醇苷、白藜芦醇、大黄酚苷、酸模素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚 7 个生物活性成分峰面积的积分值, RSD 均小于 2%。

2.9 稳定性试验:取同一份供试品溶液,分别在 0、2、6、18、24 h 进样测试,结果显示所检测的 7 个生物活性成分,峰面积的 RSD 均小于 3%。

2.10 重现性试验:取同一样品粉末 5 份,每份精密称取 0.2 g,按 2.7 项制成供试品溶液,测定结果表明 7 个次生代谢产物峰面积的积分值 RSD 均小于 3%,证明该方法重现性较好。

2.11 加样回收率试验:精密称取已知酸模素量的毛脉酸模样品,分别加入一定量的酸模素标准品,按 2.7 项制备供试品溶液,测定质量分数,并计算加样回收率。结果平均回收率为 100.6%, RSD 为 1.55% ($n=5$)。

2.12 样品测定:各供试样品按 2.7 项制备供试品溶液,精密吸取各样品的供试液 20 μL 注入高效液相色谱仪,测得不同样品中的白藜芦醇苷、白藜芦醇、大黄酚苷、酸模素、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的量(各处理组一个样品测定 5 个平行样),测定结果见图 4。

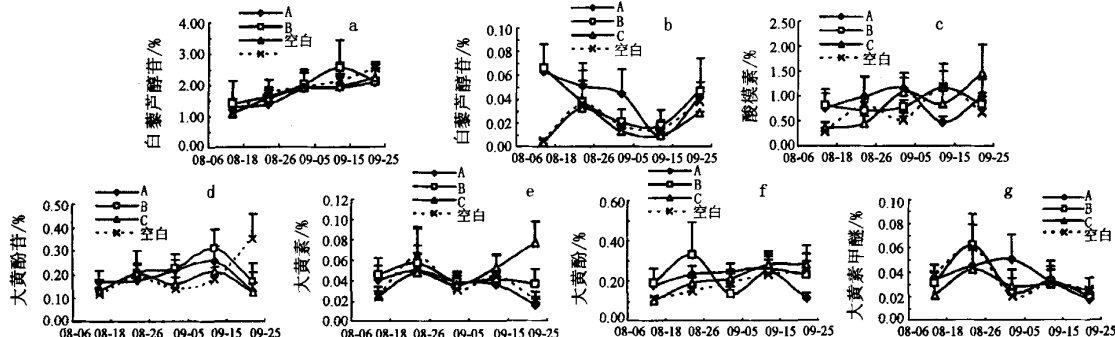


图 4 真菌对苗期毛脉酸模根中白藜芦醇苷(a)、白藜芦醇(b)、酸模素(c)、大黄酚苷(d)、大黄素(e)、大黄酚(f)、大黄素甲醚(g)量的影响

Fig. 4 Effect of fungi on polydatin (a), resveratrol (b), musizin (c), chrysophanol 1-glucoside(d), emodin(e), chrysophanol (f), and phycion (g) content of seedling *R. gmelini*

3 结果分析

分别对上述测定结果和产量计算结果(单株生物活性成分产量=生物活性成分的量×单株生物量)进行完全随机方差分析,结果见表 2、3。因为处

理时间超过 40 d 毛脉酸模生物量开始受到抑制(见图 5),因此在进行生物活性成分产量方差分析时,只选取处理中前期(0~40 d)样品,并对其进行分析。

表 2 生物活性成分的量均值及标准差结果

Table 2 Mean and standard deviation of bioactive constituents

活性成分	生物活性成分的量/%			
	A	B	C	空白
白藜芦醇苷	1.714±0.528 a	1.949±0.696 a	1.754±0.583 a	1.892±0.599 a
白藜芦醇	0.040±0.026 a	0.038±0.026 a	0.048±0.014 b	0.023±0.019 b
酸模素	0.875±0.358 a	0.867±0.318 a	0.844±0.518 a	0.650±0.368 b
大黄酚苷	0.191±0.086 a	0.210±0.083 a	0.166±0.078 a	0.196±0.105 a
大黄素	0.037±0.016 b	0.044±0.048 ab	0.018±0.024 a	0.037±0.022 b
大黄酚	0.206±0.077 ab	0.230±0.104 a	0.214±0.085 ab	0.188±0.075 b
大黄素甲醚	0.036±0.017 a	0.034±0.021 a	0.029±0.014 a	0.035±0.018 a

表中数值为平均值±标准差,不同字母代表有差异($P<0.05$),下表同

Data are presented in format of mean±standard error; same letter denotes non-significant difference while different letter denotes a significant difference ($P<0.05$), following table is same

表 3 生物活性成分产量均值及标准差结果

Table 3 Mean and standard deviation of bioactive constituents yield

活性成分	生物活性成分产量/mg			
	A	B	C	空白
白藜芦醇苷	51.010±44.625 a	65.472±72.478 a	55.759±49.731 a	58.058±55.408 a
白藜芦醇	0.768±0.435 a	0.712±0.559 ab	0.422±0.359 b	0.528±0.450 ab
酸模素	21.167±11.141 a	29.156±33.906 a	25.102±23.286 a	26.391±34.030 a
大黄酚苷	6.619±6.997 a	7.756±8.473 a	5.821±5.730 a	4.933±4.839 a
大黄素	1.145±0.840 a	1.252±0.999 a	1.397±1.274 a	1.252±1.306 a
大黄酚	7.057±6.031 a	6.788±6.678 a	7.266±6.874 a	6.053±6.694 a
大黄素甲醚	1.101±0.735 a	0.979±0.938 a	0.934±0.750 a	0.949±0.835 a

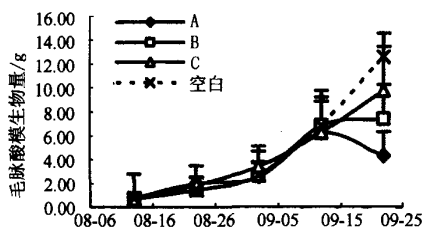


图 5 真菌侵染对苗期毛脉酸模生物量的影响

Fig. 5 Effect of fungi on biomass of seedling *R. gmeli*

表 2 分析结果表明:(1)3 株长蠕孢属真菌叶面侵染苗期毛脉酸模对其根中的白藜芦醇苷、大黄酚苷、大黄素甲醚量在整个处理期内都没有明显的影响。(2)菌 A 和菌 B 处理组毛脉酸模根中白藜芦醇的量与空白对照组有显著性差异,但菌 A 与菌 B 处理组之间没有显著性差别。菌 C 处理组与空白对照组相比没有显著性差别。结合其量的变化图 4-b 可以看出:菌 A 与 B 侵染苗期毛脉酸模叶面后,在处理中前期(0~40 d)对毛脉酸模根中白藜芦醇量累积有显著性促进作用,但这种促进作用随处理时间延长逐渐减弱。处理后期(40~50 d)处理组与对照

组之间的白藜芦醇量差异不明显。(3)各处理组毛脉酸模根中酸模素量与空白对照组有显著性影响。但 3 个处理组之间没有显著性差别。(4)菌 A 处理组毛脉酸模根中大黄素的量与空白对照组相比没有显著性差异。菌 B、C 处理组毛脉酸模根中大黄素的量与空白对照组有显著性差异。(5)各处理组毛脉酸模根中大黄酚的量与空白对照组有显著性差异。结合量变化图 4-f,其中菌 B 在处理前期(10~20 d),对其根中的大黄酚量的累积有促进作用,但随着处理时间的增加这种促进作用变得不明显。菌 A 在处理中前期对其根中的大黄酚量的累积有微弱的促进作用,但随着处理时间的增加又表现为明显的抑制作用。菌 C 对其根中的大黄酚量累积有微弱的促进作用。

表 3 分析结果表明处理中前期,各种处理对苗期毛脉酸模根中白藜芦醇苷、酸模素、大黄酚苷、大黄酚、大黄素、大黄素甲醚的产量没有显著性影响。A 处理对苗期毛脉酸模根中白藜芦醇产量有明显的促进性影响;B 处理对苗期毛脉酸模根中白藜芦醇产量没有显著性影响;C 处理对苗期毛脉酸模根中

白藜芦醇产量有显著的负影响。

处理后期各处理组对苗期毛脉酸模根中除酸模素和大黄素外,其他5种次生代谢产物(白藜芦醇、白藜芦醇、大黄酚苷、大黄酚、大黄素甲醚)的产量都受到了明显的抑制。

4 讨论

大斑病长蠕孢001对苗期毛脉酸模根中白藜芦醇、酸模素、大黄酚的量和产量有影响,其中对白藜芦醇量的促进影响仅存在于中前期。对酸模素量的影响表现为中前期促进,中后期抑制。对大黄酚量的影响仅存在于后期而且为抑制作用。大斑病长蠕孢001对白藜芦醇的产量表现为前期促进后期抑制,对酸模素、大黄酚的产量的前期促进作用不显著,后期抑制作用较明显。

大斑病长蠕孢002对苗期毛脉酸模根中白藜芦醇、酸模素、大黄酚的量和产量有影响,其中对白藜芦醇、酸模素量的促进影响仅存在于中前期;对大黄酚量的促进影响仅存在于前期。但处理后期对上述3种次生代谢产物量的影响不明显,大斑病长蠕孢002对上述3种次生代谢产物产量处理前期影响不显著,处理后期对酸模素、大黄酚产量表现为明显的抑制。

玉蜀黍长蠕孢对苗期毛脉酸模根中酸模素的量影响前期不明显,中后期(20~50 d)表现为促进,对酸模素产量在后期表现为明显促进作用。对大黄素的量和产量在处理中前期促进作用不明显。但处理后期对其量和产量表现为明显的促进作用。

实验结果证明,3株长蠕孢属真菌叶面侵染苗期

毛脉酸模处理时间超过40 d,苗期毛脉酸模根的生物量开始受到抑制。因此对苗期毛脉酸模的长蠕孢属真菌诱导处理时间不宜超过40 d,如果对其6种次生代谢产物(大黄素除外)综合考虑应选在毛脉酸模采收前30 d进行诱导处理为最佳。如果仅从生物活性成分白藜芦醇的角度考虑,选择大斑病长蠕孢001进行诱导处理,处理时间为采收前30 d进行处理。同时笔者还研究了上述3株真菌对幼苗期毛脉酸模中的白藜芦醇苷和白藜芦醇的影响。结果表明采取根部感染的方式,同样可以使幼苗期毛脉酸模中白藜芦醇的量和产量提高。但是长蠕孢属真菌侵染毛脉酸模致使其生物活性成分白藜芦醇的量发生变化的机制并不清楚,有待进一步深入的研究。

References:

- [1] Hou P Y, Guo S X. Fungal elicitation to plants and its application in natural medicines [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 33(9): 855-857.
- [2] Ingham J L. 3,5,4'-Trihydroxystilbene as a phytoalexin from groundnuts (*Arachis hypogaea*) [J]. *Phytochemistry* (植物化学), 1976, 15: 1791-1793.
- [3] He L Y, Chen B Z, Xiao P G. Survey identification and chemical constituents in medical plants of *Rumex* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1981, 16(4): 289-293.
- [4] Gao L M, Wei X M, Zhen S Z, et al. Study on chemical constituents of *Rumex patientia* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(3): 207-209.
- [5] Yuan Y, Chen W S, Yang Y J, et al. Anthraquinones from *Rumex patientia* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(5): 330-332.
- [6] Zhao B, He S J. *Microbiology Experiment* (微生物实验) [M]. Beijing: Science Press, 2002.
- [7] Sun G Y, Zong Z F. *Laboratory Technique of Plant Pathology* (植物病理学实验技术) [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2002.

肉苁蓉属4种肉苁蓉可溶性蛋白的SDS-PAGE电泳分析

陈培,郭玉海*,王保民,翟志席

(中国农业大学农学与生物技术学院 中药材研究中心,北京 100094)

摘要:目的 对肉苁蓉属4个种进行鉴别。方法 采用可溶性蛋白质SDS-PAGE凝胶电泳。结果 肉苁蓉属4个种的SDS-PAGE图谱存在显著差异,其多态性条带为81.82%。结论 各个种的电泳图谱可以相互区别,肉苁蓉属可溶性蛋白的SDS-PAGE图谱可作为种间鉴定的蛋白指纹图谱。

关键词:肉苁蓉属;可溶性蛋白;SDS-PAGE;种间鉴定

中图分类号:R282.7

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2006)09-1399-04

收稿日期:2005-12-15

基金项目:重大基础研究前期研究专项(2004CCA01200)

作者简介:陈培(1972—),女,河南叶县人,博士研究生,主要从事肉苁蓉蛋白质组研究。

Tel: (010)62733853 E-mail: chenpei168@sohu.com

* 通讯作者 郭玉海