

接种时期对丛枝菌根真菌侵染的滇重楼幼苗生长发育及甾体皂苷含量的影响

黄艳萍^{1,2}, 张 杰², 杨 敏¹, 丁 博², 郭冬琴², 潘兴娇¹, 张德全¹, 周 浓^{1,2*}

1. 大理大学药学与化学学院, 云南 大理 671000

2. 重庆三峡学院生物与食品工程学院, 三峡库区道地药材绿色种植与深加工重庆市工程实验室, 重庆 404120

摘 要: 目的 研究不同接种时期对丛枝菌根(AM)真菌侵染的滇重楼幼苗生长发育及重楼皂苷含量的影响, 为栽培驯化出高品质的滇重楼奠定基础。方法 采用 HPLC 测定不同接种时期滇重楼中重楼皂苷 I、II、VI、VII 的含量; 采用曲利苯蓝染色法、紫外分光光度法等方法对不同接种时期及不同 AM 真菌组合的滇重楼的侵染率、生理指标、根茎生物量等进行分析。结果 不同接种时期的 AM 真菌侵染率较强, 保护酶活性、光合色素和可溶性糖含量提高, 可溶性蛋白无明显变化, 丙二醛含量降低, 滇重楼幼苗的抗逆性提高, 生长发育良好; 栽培种源 1 年实生苗(2015 年 8 月采收, T7 时期)的品质相对较低, 栽培种源 1 年实生苗(2015 年 6 月、7 月采收, T5、T6 时期)的与栽培种源 2 年实生苗(2015 年 8 月采收, T8 时期)的品质最佳; 不同的 AM 真菌混合组中, S2、S3 和 S6 处理组的效果更佳。结论 接种时期对 AMF 侵染的滇重楼幼苗生长发育及重楼皂苷含量存在一定的影响。

关键词: 滇重楼; AM 真菌; 侵染率; 生理生化特性; 生物量; 重楼皂苷; 丙二醛

中图分类号: R282.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)18-4438-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.18.025

Effects of different inoculation periods on seedling growth and steroidal saponin content of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*

HUANG Yan-ping^{1, 2}, ZHANG Jie², YANG Min¹, DING Bo², GUO Dong-qin², PAN Xing-jiao¹, ZHANG De-quan¹, ZHOU Nong^{1, 2}

1. College of Pharmacy and Chemistry, Dali University, Dali 671000, China

2. College of Food and Biology Engineering, The Chongqing Engineering Laboratory for Green Cultivation and Deep Processing of the Three Gorges Reservoir Area's Medicinal Herbs, Municipal Development and Reform Commission, Chongqing Three Gorges University, Chongqing 404120, China

Abstract: Objective To study the effects of different inoculation periods on seedling growth and steroidal saponin content of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*, in order to lay a foundation for cultivating and domesticating high-quality *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. **Methods** The content of steroidal saponins I, II, VI, and VII in the different vaccination periods of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* was determined by HPLC. Meanwhile, trypan blue, UV spectrophotometry and so on were adopted to explore colonization rate, colonization intensity, physiological and biochemical indexes, rhizome biomass of the roots of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. **Results** Infection rate of AM fungi was higher in different inoculation periods, activities of protective enzymes, photosynthetic pigments and soluble sugars were increased, soluble protein was not changed, content of MDA was decreased, stress resistance of the seedlings of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* was improved, and the growth and development were good. Quality of the cultivar one-year seedlings (recovered in August 2015, T7) was relatively low, and cultivar one-year seedlings (harvested in June or July 2015, T5 and T6) and cultivar two years seedlings (recovered in August 2015, T8) were the best. S2, S3 and S6 treatment groups had better effect in different AM fungi mixed groups. **Conclusion** Seedling growth and steroidal saponin content of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* inoculated by different inoculation periods had certain effects.

Key words: *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz; AM fungi; infection rate; physiological and biochemical characteristics; biomass; polyphyllin; MDA

收稿日期: 2019-03-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81260622); 重庆市自然科学基金资助项目(cstc2018jcyjAX0267); 重庆市自然科学基金资助项目(cstc2015jcyjA10110); 云南省教育厅科学研究基金资助项目(2018JS413)

作者简介: 黄艳萍(1994—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向为药用植物栽培与质量控制。Tel: 18367540660 E-mail: huangyanping94@163.com

*通信作者 周 浓, 教授, 硕士生导师, 研究方向为药用植物栽培与质量控制。Tel: (023)58576130 E-mail: erhaizn@126.com

滇重楼 *Paris polyphylla* Sm. var. *yunnanensis* (Fr.) H. M. 为百合科重楼属 *Paris* L. 植物, 主要分布于贵州、云南和四川等地区, 是《中国药典》2015 年版收载的重楼药材的基原植物之一, 其干燥根茎入药, 具有清热解毒、消肿止痛、凉肝定惊的功效^[1], 是“云南白药”“宫血宁胶囊”等多种中成药的主要原料, 市场需求量较大。市场上的重楼药材多年以来主要依赖于野生采挖, 导致野生滇重楼药材几近枯竭^[2-3], 寻求合适的栽培驯化滇重楼的方式迫在眉睫。

丛枝菌根 (arbuscular mycorrhizal, AM) 真菌是一类广泛分布于陆地生态系统中的土壤有益微生物, 能与多数植物的根系形成互惠共生体^[4]。中国药典收入的重楼药用部位是其干燥根茎, AM 真菌通过植物根毛侵入根茎后与植物共生形成菌根, 使得重楼根部汲取更多的营养成分, 如磷元素等^[5]。已有研究表明, AM 真菌可提高药用植物移栽成活率、结实率, 促进寄主植物对磷、氮等矿质营养元素的吸收, 提高药用植物抗逆性, 影响其次生代谢产物的产生等^[6-9]。叶片光合色素含量、保护酶活性, 丙二醛、可溶性糖及可溶性蛋白的含量等是衡量滇重楼幼苗生长发育情况的生理生化指标。叶片光合色素含量增加有利于植物营养成分的累积, 叶绿素 a/叶绿素 b 与光合速率呈负相关^[10]。保护酶活性、可溶性糖及可溶性蛋白的含量增加, 丙二醛含量的降低有利于增强植物的抗逆性^[11]、抗旱性^[12]、盐碱胁迫性^[13]、水胁迫^[14]、抗寒性^[15]等。

本课题组前期对接种不同的单一 AM 真菌对滇

重楼菌根侵染率、生长发育情况、入药品质等的影响进行了初步研究^[16-17]。本研究选取其中较优良的单株 AM 真菌进行菌剂混合, 在不同时期条件下接种到不同来源的滇重楼幼苗, 以探寻较优的共生栽培方式。为此, 本研究拟采用曲利苯蓝染色法, 紫外分光光度法等方法对不同接种时期及不同 AM 真菌组合侵染的滇重楼的侵染率、生理指标、根茎生物量等进行分析; 采用数理统计分析的方法, 分析重楼皂苷 I、II、VI、VII 的含量。探讨接种时期对 AMF 侵染的滇重楼幼苗生长发育及甙体皂苷含量的影响, 为人工栽培出高产、高品质的滇重楼奠定基础。

1 材料与试剂

2012 年 10 月, 滇重楼 2 年生育苗的鲜种采自云南省大理州农业科学院种植基地; 2013 年 10 月, 滇重楼 1 年生实生苗和育苗栽培种源的鲜种采自贵州省种植基地, 滇重楼育苗野生种源的鲜种采自贵州省野生环境, 常温下河沙贮存 4 个月, 并经三峡库区道地药材绿色种植与深加工重庆市工程实验室 (重庆三峡学院) 周浓教授鉴定为百合科植物滇重楼 *Paris polyphylla* Sm. var. *yunnanensis* (Fr.) H. M. 的成熟种子, 种子采用单株保存、保证种质资源的稳定性和均一性。

1.1 AM 真菌

通过美国国际丛枝菌根真菌种质资源保藏中心购得相应的 AM 真菌纯净菌剂, 其菌剂由三峡库区道地药材绿色种植与深加工重庆市工程实验室 (重庆三峡学院) 进行扩增繁殖、储存保管。接种菌剂为带有孢子、菌丝及侵染后根段的栽培基质, 见表 1。

表 1 不同处理组及其接种 AM 真菌
Table 1 Different treatment groups and inoculated AM fungi

处理组	AM 真菌
S1	<i>Gigaspora rosea</i> 、 <i>Gigaspora albida</i> 、 <i>Gigaspora margarita</i> 、 <i>Gigaspora gigantea</i>
S2	<i>Scutellospora calospora</i> 、 <i>Scutellospora pellucida</i> 、 <i>Racocetra coralloidea</i> 、 <i>Racocetra fulgida</i>
S3	<i>Rhizophagus intraradices</i> 、 <i>Septoglomus deserticola</i> 、 <i>Claroideoglomus claroideum</i> 、 <i>Rhizophagus clarum</i>
S4	<i>Gigaspora rosea</i> 、 <i>Gigaspora albida</i> 、 <i>Scutellospora pellucida</i> 、 <i>Racocetra coralloidea</i> 、 <i>Claroideoglomus claroideum</i> 、 <i>Rhizophagus clarum</i>
S5	<i>Gigaspora albida</i> 、 <i>Gigaspora margarita</i> 、 <i>Racocetra coralloidea</i> 、 <i>Racocetra fulgida</i> 、 <i>Rhizophagus intraradices</i> 、 <i>Septoglomus deserticola</i>
S6	<i>Gigaspora margarita</i> 、 <i>Gigaspora gigantea</i> 、 <i>Scutellospora calospora</i> 、 <i>Scutellospora pellucida</i> 、 <i>Septoglomus deserticola</i> 、 <i>Claroideoglomus claroideum</i>
S7	<i>Gigaspora rosea</i> 、 <i>Gigaspora margarita</i> 、 <i>Scutellospora pellucida</i> 、 <i>Racocetra fulgida</i> 、 <i>Rhizophagus intraradices</i> 、 <i>Rhizophagus clarum</i>
S8	<i>Gigaspora albida</i> 、 <i>Gigaspora gigantea</i> 、 <i>Scutellospora calospora</i> 、 <i>Racocetra fulgida</i> 、 <i>Rhizophagus intraradices</i> 、 <i>Claroideoglomus claroideum</i>
S9	<i>Gigaspora rosea</i> 、 <i>Gigaspora gigantea</i> 、 <i>Scutellospora calospora</i> 、 <i>Racocetra coralloidea</i> 、 <i>Septoglomus deserticola</i> 、 <i>Rhizophagus clarum</i>
S10	CK groups

1.2 试药

对照品重楼皂苷 I (批号 111590-201103)、重楼皂苷 II (批号 111591-201103)、重楼皂苷 VI (批号 111592-201103)、重楼皂苷 VII (批号 111593-200402) 购自中国食品药品检定研究院, 质量分数均大于 98%。乙腈 (德国默克公司, 色谱纯), 水 (娃哈哈纯净水)。

1.3 仪器

DZF-6050MBE 型电热恒温真空干燥箱 (上海博讯实业有限公司); CP225D 型分析天平 (德国 Sartorius 公司); TDZ5-WS 型多管架自动平衡离心机 (湖南赛特湘仪离心机仪器有限公司); SB-5200DTN 型超声波清洗机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); LC-20A 型高效液相色谱仪、UV2450 型紫外可见分光光度计 (日本岛津集团)。

2 方法

2.1 实验设计

种子前处理, 去除外果皮, 用蒸馏水洗净, 10% NaClO 溶液浸泡 15 min 后用蒸馏水洗净, 备用; 紫云英种子用 10% NaClO 溶液浸泡 15 min 后用蒸馏水洗净, 备用。育苗栽培基质为菜园土与河沙的混合物 (体积比 3:1, 过 2 mm 筛, 121 °C 高压灭菌锅内灭菌 2 h)。2013 年 1 月、2014 年 1 月分别将滇重楼 2 年生、1 年生实生苗育苗, 采用室内常温栽培法, 设置 9 个处理组 (AM 真菌组, S1~S9) 和 1 个对照组 (CK 组, S10), 共 10 组, 每组重复 10 次, 每盆接种 180 个孢子的混合菌剂 (均分), 与紫云英混合播种培养, 待滇重楼种子出土后除去紫云英植株, 每盆间苗 20 株。滇重楼栽培种源及野生种源新鲜种子于 2014 年 1 月与 AM 真菌混合共生育苗, 采用室内常温栽培方法, 设置 9 个处理组 (AM 真菌组, S1~S9) 和 1 个对照组 (CK 组, S10) 共 10 组, 每组重复 10 次, 每盆接种 180 个孢子的混合菌剂 (均分), 与紫云英混合播种培养, 待滇重楼种子出土后除去紫云英植株, 每盆间苗 20 株。滇重楼幼苗生长期间定期浇 Hoagland 营养液。

于 2015 年 6 月, 采集栽培种源滇重楼育苗 (T1) 和 1 年生滇重楼实生苗 (T5) 待测滇重楼样品, 于 2015 年 7 月, 采集 1 年生滇重楼实生苗 (T6) 待测滇重楼样品, 于 2015 年 8 月, 采集栽培种源滇重楼育苗家种 (T2)、野生种源滇重楼育苗野生 (T4)、1 年生滇重楼实生苗 (T7) 和 2 年生滇重楼实生苗 (T8)

待测滇重楼样品, 于 2016 年 8 月, 采集种子栽培种源滇重楼育苗 (T3) 待测滇重楼样品。收获滇重楼的根茎、根系, 洗净后置于 35 °C 烘箱烘干, 用于品质分析; 在冰水浴中洗净根系, 剪成 1.0~1.5 cm 长的根段, 一部分置于福尔马林-醋酸-70%乙醇 (FAA) 固定液中固定后用于菌根侵染率的测定。

2.2 AM 真菌的侵染率

随机选取浸泡于 FAA 固定液中滇重楼根系 30 条, 采用 Philips 等^[18]的方法染色、制片、镜检, 根据 Trouvelot 等^[19]的方法统计菌根侵染率。

2.3 滇重楼幼苗叶片光合色素含量及生理指标的测定

根据张志良等^[20]的方法对滇重楼幼苗光合色素含量测定; 过氧化氢酶 (CAT) 活性采用紫外分光光度法测定; 过氧化物酶 (POD) 活性采用愈创木酚显色法测定; 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性采用氮蓝四唑法测定; 丙二醛 (MDA) 和可溶性糖含量采用硫代巴比妥酸法测定; 可溶性蛋白含量采用考马斯亮蓝比色法测定。

2.4 滇重楼幼苗生物量的测定

采收滇重楼后, 测定各处理组新鲜根茎质量后, 分别置于 35 °C 烘箱中干燥至恒定质量, 测定不同处理组干质量, 计算其折干率。

2.5 不同接种时期滇重楼幼苗根茎中重楼皂苷含量测定

采用《中国药典》2015 年版重楼药材项下测定 4 种重楼皂苷的含量^[1]。

2.6 数据分析

采用 Microsoft Excel 2003 软件做图, 运用 SPSS 20.0 进行统计分析。

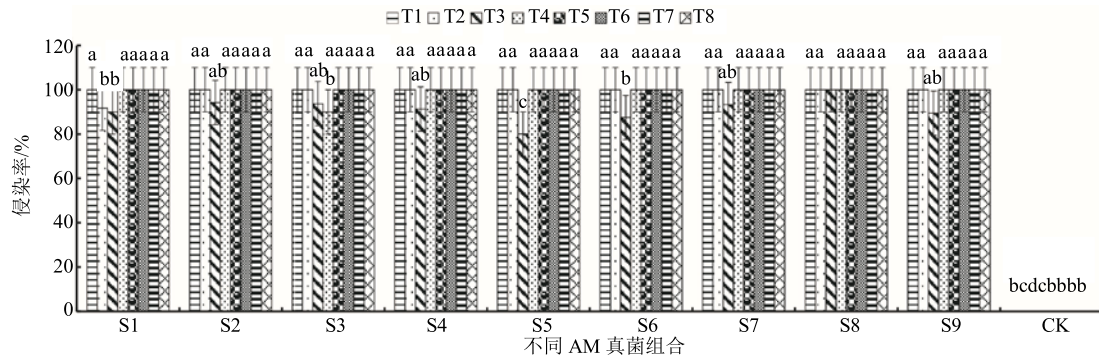
3 结果与分析

3.1 接种时期对根系 AM 真菌侵染的影响

由图 1 可见, 不同接种时期滇重楼幼苗根系均在一定程度上受到了 AM 真菌的侵染, 除 CK 组未被侵染外, 其他处理组的侵染率在 91.29%~100.00%, 各实验组均无显著性差异 ($P>0.05$), 这与周浓等^[21]的研究结果一致。而在自然条件下, AM 真菌的侵染率为 36.41%~83.7%^[22-23]。综上所述可知, 接种外源 AM 真菌对滇重楼根系菌根侵染率具有一定的促进作用, 说明通过外源接种 AM 真菌以提高滇重楼的品质具有可行性。

3.2 接种时期对滇重楼叶片光合色素含量的影响

由表 2 可知, 与 CK 组比较, 3 个不同接种时



采用最小显著差异法进行方差分析, 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同

Analysis of variance was performed using the least significant difference method, different lowercase letters indicated significant difference ($P < 0.05$), same as below

图 1 接种时期对滇重楼幼苗根系感染率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 1 Effect of inoculation period on root infection rate of seedlings of *P. polyphylla* var. *yunnanensis* ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

表 2 接种时期对滇重楼叶片光合色素含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of inoculation period on photosynthetic pigment content in leaves of *P. polyphylla* var. *yunnanensis* ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

处理组	取样时期	类胡萝卜素/(mg·g ⁻¹)	叶绿素 a/(mg·g ⁻¹)	叶绿素 b/(mg·g ⁻¹)	叶绿素总量/(mg·g ⁻¹)	叶绿素 a/叶绿素 b
S1	T1	174.241 ± 0.033b	1.890 ± 0.042b	0.489 ± 0.055b	2.379 ± 0.029b	3.862 ± 0.088c
	T5	164.423 ± 0.004d	1.828 ± 0.004d	0.436 ± 0.012d	2.264 ± 0.006d	4.195 ± 0.008e
	T8	163.369 ± 0.004a	1.555 ± 0.007b	0.349 ± 0.010a	1.904 ± 0.007b	4.461 ± 0.003g
S2	T1	167.164 ± 0.003c	1.749 ± 0.004c	0.455 ± 0.012c	2.204 ± 0.006c	3.847 ± 0.008c
	T5	148.730 ± 0.003e	1.629 ± 0.006e	0.364 ± 0.007f	1.993 ± 0.007f	4.478 ± 0.003c
	T8	158.481 ± 0.004ab	1.521 ± 0.006c	0.305 ± 0.010b	1.826 ± 0.007d	4.983 ± 0.004e
S3	T1	126.329 ± 0.007fg	1.073 ± 0.009h	0.280 ± 0.029g	1.353 ± 0.013h	3.826 ± 0.021c
	T5	170.647 ± 0.004c	1.912 ± 0.003c	0.457 ± 0.010c	2.369 ± 0.004c	4.188 ± 0.008e
	T8	129.123 ± 0.003cd	1.026 ± 0.003h	0.238 ± 0.011e	1.263 ± 0.004i	4.318 ± 0.009g
S4	T1	131.058 ± 0.009e	1.138 ± 0.010g	0.304 ± 0.002f	1.443 ± 0.008g	3.739 ± 0.009cd
	T5	183.420 ± 0.004b	2.000 ± 0.006b	0.501 ± 0.008b	2.501 ± 0.006b	3.992 ± 0.003f
	T8	150.562 ± 0.007abc	1.449 ± 0.009d	0.276 ± 0.018c	1.725 ± 0.010e	5.245 ± 0.009cd
S5	T1	124.595 ± 0.008g	1.190 ± 0.010f	0.336 ± 0.030e	1.526 ± 0.014f	3.542 ± 0.021d
	T5	128.720 ± 0.000h	1.389 ± 0.000h	0.292 ± 0.000h	1.681 ± 0.000i	4.757 ± 0.000a
	T8	136.150 ± 0.006bcd	1.371 ± 0.008f	0.228 ± 0.016f	1.598 ± 0.009g	6.021 ± 0.009b
S6	T1	127.177 ± 0.005efg	1.345 ± 0.010e	0.371 ± 0.028d	1.716 ± 0.014e	3.626 ± 0.018cd
	T5	201.290 ± 0.01a	2.152 ± 0.005a	0.583 ± 0.001a	2.735 ± 0.004a	3.695 ± 0.004g
	T8	152.069 ± 0.000abc	1.596 ± 0.000a	0.339 ± 0.000a	1.935 ± 0.000a	4.708 ± 0.000f
S7	T1	205.081 ± 0.005a	2.245 ± 0.006a	0.522 ± 0.011a	2.767 ± 0.007a	4.301 ± 0.007b
	T5	164.776 ± 0.003d	1.812 ± 0.007d	0.413 ± 0.013e	2.225 ± 0.007e	4.389 ± 0.011d
	T8	157.829 ± 0.004ab	1.549 ± 0.007b	0.299 ± 0.011b	1.849 ± 0.007c	5.177 ± 0.005d
S8	T1	149.503 ± 0.005d	1.529 ± 0.009d	0.335 ± 0.017e	1.864 ± 0.010d	4.565 ± 0.009a
	T5	142.785 ± 0.008f	1.571 ± 0.011f	0.344 ± 0.012g	1.916 ± 0.011g	4.561 ± 0.007b
	T8	128.926 ± 0.005cd	1.248 ± 0.007g	0.199 ± 0.032g	1.447 ± 0.008h	6.266 ± 0.033a
S9	T1	130.221 ± 0.007ef	1.225 ± 0.009f	0.292 ± 0.028fg	1.518 ± 0.011f	4.189 ± 0.023b
	T5	139.156 ± 0.006g	1.472 ± 0.006g	0.335 ± 0.014g	1.808 ± 0.007h	4.389 ± 0.008d
	T8	174.753 ± 0.175a	1.396 ± 0.006e	0.260 ± 0.010d	1.657 ± 0.007f	5.364 ± 0.005c
CK	T1	119.554 ± 0.000h	1.063 ± 0.000h	0.249 ± 0.000h	1.312 ± 0.000h	4.269 ± 0.000b
	T5	109.724 ± 0.000i	1.018 ± 0.000i	0.281 ± 0.000i	1.299 ± 0.000j	3.623 ± 0.000h
	T8	121.117 ± 0.000d	0.962 ± 0.000i	0.220 ± 0.000f	1.182 ± 0.000j	4.373 ± 0.000g

期的类胡萝卜素、叶绿素 a、叶绿素 b、叶绿素总量均有所提高。在不同的处理组中, S1、S6、S7 的光合色素含量提高更为明显。由此表明, 接种 AM 真菌有助于光合色素含量的提高, 进而促进滇重楼的生长发育, 这与赵方贵等^[24]的研究结果一致。叶绿素 a/叶绿素 b 是影响光合作用速率的重要原因之一, 叶绿素 a/叶绿素 b 与光合作用的速率呈负相关^[10]。与 CK 组相比, 除 T1 时期外, T5、T8 时期的叶绿素 a/叶绿素 b 大多高于 CK 组, 表明 T1 时期的光合速率相对较高。在不同的处理组中, S1、S3、S6 的叶绿素 a/叶绿素 b 较低, 光合作用的速率相对较高。

3.3 接种时期对滇重楼叶片保护酶活性的影响

由图 2 可知, 与 CK 组相比, 不同接种时期滇

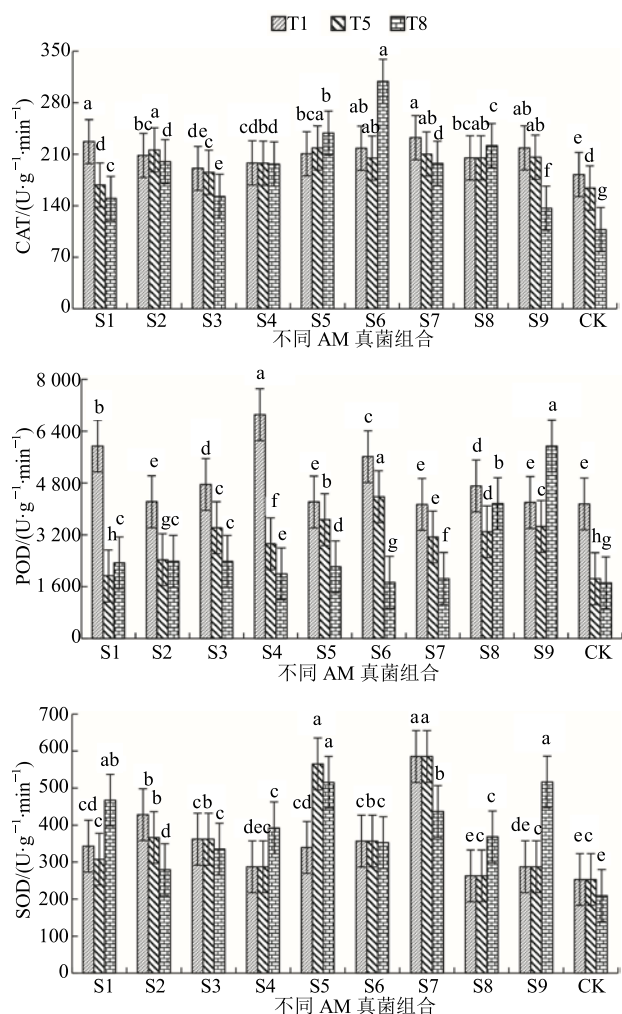


图 2 接种时期对滇重楼叶片 CAT、POD 和 SOD 酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 2 Effects of inoculation period on enzyme activities of CAT, POD and SOD in leaves of *P. polyphylla* var. *yunnanensis* ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

重楼 3 种保护酶 CAT、POD 和 SOD 的活性有不同程度的提高。其中, T1、T5 时期的 POD 与 SOD 活性提高更为显著。在不同的处理组中, S6、S8、S9 的 3 种酶活性提高更为明显。3 种保护酶的活性表现为 $POD > SOD > CAT$, 可能是因为 POD 活性对环境变化表现的更为敏感。表明接种 AM 真菌有利于滇重楼叶片保护酶活性提高。

3.4 接种时期对滇重楼叶片 MDA、可溶性糖、可溶性蛋白含量的影响

图 3 可知, 与 CK 组相比, 除 T8 时期的部分处理组外, 滇重楼叶片 MDA 的含量均小于对照组, 且部分达到显著性差异, 表明接种 AM 真菌显著降低了 MDA 的含量, 从而降低膜脂过氧化程度, 提高细胞的生理活性, 促进滇重楼的生长^[15]。与 CK 组相比,

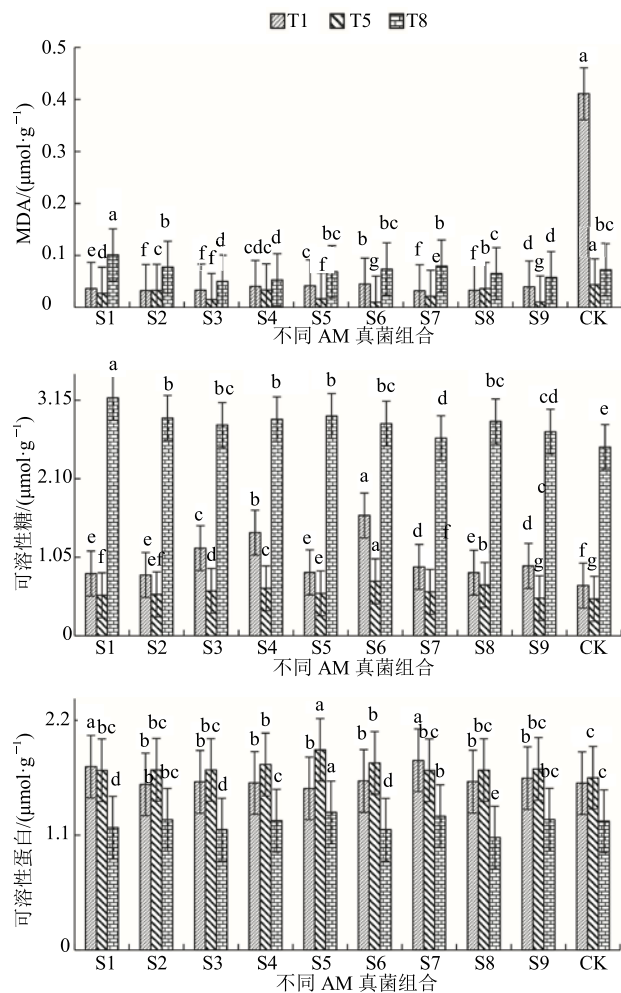


图 3 接种时期对滇重楼叶片 MDA、可溶性糖和可溶性蛋白含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 3 Effects of inoculation period on content of MDA, soluble sugar, and soluble protein in leaves of *P. polyphylla* var. *yunnanensis* ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

3 个接种时期滇重楼的可溶性糖含量均有所增加,有利于提高细胞液浓度,进而提高细胞的生理活性。其中,T1 时期的可溶性糖的含量增加最为显著。与 CK 组相比,3 个接种时期滇重楼叶可溶性蛋白含量变化不太明显,表明不同时期接种的混合 AM 真菌对滇重楼可溶性蛋白含量的影响不明显。

3.5 接种时期对滇重楼幼苗根茎生物量和折干率的影响

由图 4 可知,不同 AM 真菌处理对滇重楼幼苗根茎生物量、根茎干重和折干率的影响不尽相同,T5、T6 和 T7 时期 S6 处理组的根茎生物量和干重最高,表明 S6 处理组的 AM 真菌对滇重楼的促进作用更好,更有助于滇重楼的生长发育。多数滇重楼幼苗的根茎生物量、根茎干重和折干率较 CK 组

高,且部分存在显著性差异。

3.6 接种时期对滇重楼幼苗重楼皂苷产量的影响

根据图 5 可知,接种时期在一定程度上影响了滇重楼幼苗中重楼皂苷的含量。其中,T6 时期的 S6 皂苷产量最大为 0.434 mg, T1 (除 S1 外)、T2 (除 S4 外)、T3、T4 (除 S3 外)、T5 (除 S9 外)、T6、T7 和 T8 (除 S3、S5~9 外) 滇重楼幼苗重楼皂苷产量均超过 CK 组,较 CK 组而言,部分达到显著性差异。重楼皂苷产量(单株幼苗根茎所含重楼皂苷含量与其根茎生物量的乘积)间接反映了 AM 真菌对滇重楼幼苗根茎重楼皂苷代谢影响的情况。整体上说,实验结果反映出从枝菌根的形成明显提高了滇重楼幼苗根茎重楼皂苷的产量,属于根茎生物量和重楼皂苷含量综合效应的增加。

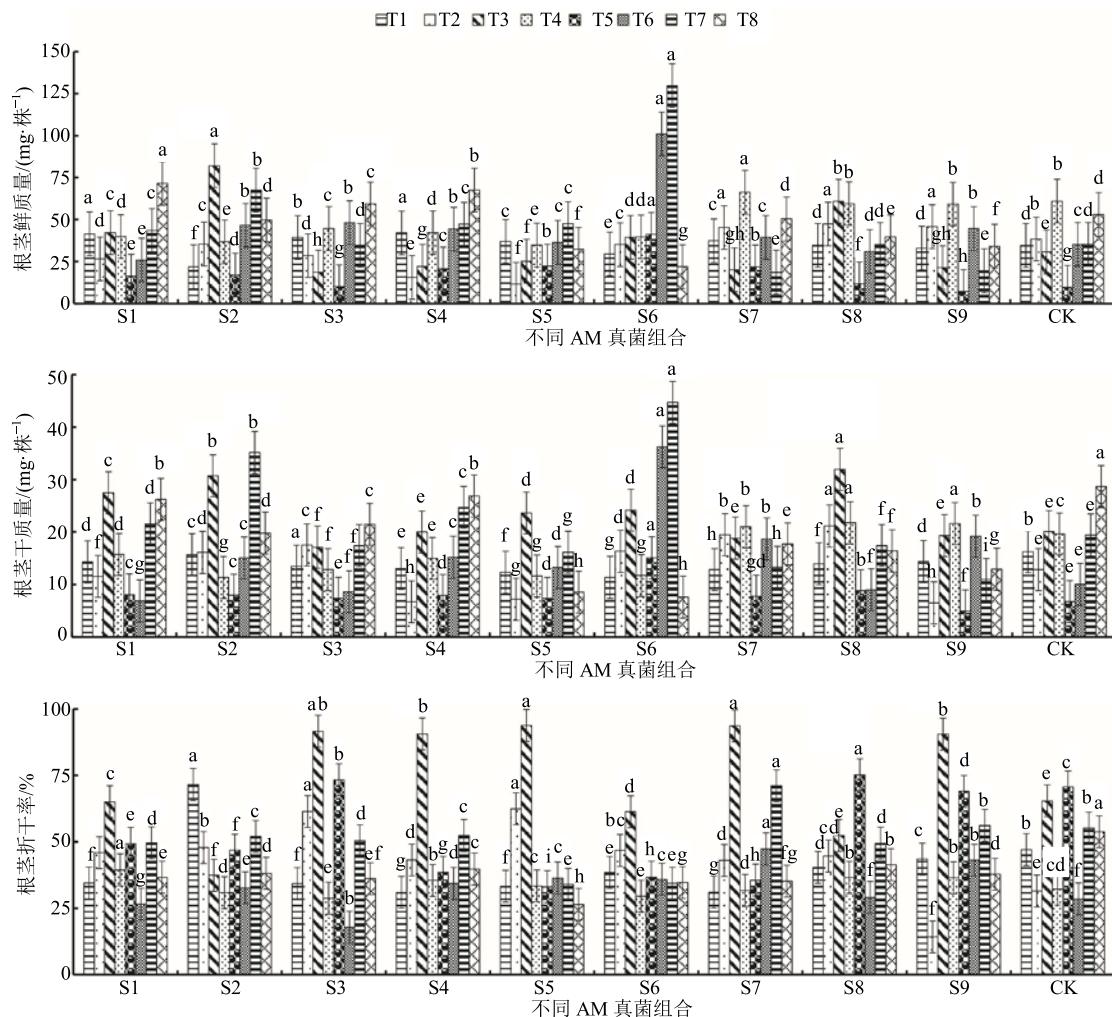


图 4 接种时期对滇重楼幼苗根茎生物量及根茎折干率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 4 Effects of inoculation period on rhizomes biomass and rhizome drying rate of seedlings of *P. polyphylla* var. *yunnanensis* ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

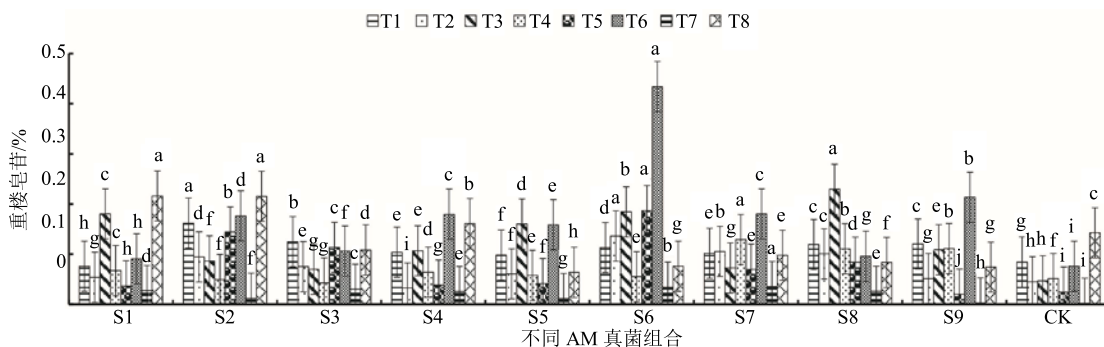


图 5 接种时期对滇重楼幼苗重楼皂苷产量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 5 Effect of inoculation period on yield of saponins from seedlings of *P. polyphylla* var. *yunnanensis* ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3.7 接种时期滇重楼幼苗根茎中重楼皂苷含量的影响

3.7.1 AM 真菌对不同种源滇重楼幼苗根茎重楼皂苷含量的影响 由表 3 可见, 9 个处理组的 4 种重楼皂苷基本高于 CK 组。与 CK 组比较, 重楼皂苷 VI、VII 和总重楼皂苷含量呈增加趋势, T2 时期的总重楼皂苷含量明显高于 T4 期, 其中, T2 期的 S5 的皂苷含量最高。重楼皂苷 I、II 较 CK 组, 皂苷含量有所增加, 其中 T2 期 S9 的重楼皂苷 I 增加最明显, T2 期 S6 的重楼皂苷 II 增加最明显。综上所述, 说明接种 AM 真菌使 4 种重楼皂苷和总重楼皂苷含量有所增加, 其中栽培种源较野生种源的重楼皂苷含量增加更为显著。这可能是由于栽培环境与栽培种源的原生长环境更为相似, 使其更容易被驯化适应环境造成的。

3.7.2 AM 真菌接种时期不同对滇重楼幼苗根茎重楼皂苷含量的影响 如表 3 所示, 接种时期不同 AM 真菌对滇重楼幼苗根茎中 4 种甾体皂苷含量影响较为明显。与 CK 组相比, T2 与 T8 期对 4 种重楼皂苷含量增长量较为显著。其中, T8 期的 S2 对重楼皂苷 II 含量增长量最为显著, T8 期的 S6 对重楼皂苷 I 含量增长量最为显著, T7 期的 S7, T2 期的 S5 分别对重楼皂苷 VI、VII 含量增长量最为显著。综上所述, 说明在接种时期不同的 T2, T7 和 T8 期中, T8 期的 S2 与 S6, 即栽培种源 2 年实生苗的 S2 与 S6 重楼皂苷含量增加更为显著。

3.7.3 AM 真菌采收时期不同对滇重楼幼苗根茎重楼皂苷含量的影响 由图 3 与表 3 可知, 采收时期不同 AM 真菌对滇重楼幼苗根茎中 4 种甾体皂苷含量的影响较为明显。与 CK 组相比, T2 较 T3 的重楼皂苷 I、VII 和总皂苷含量的增长更为显

著, 其中 T2 期的 S9 重楼皂苷 I, S5 重楼皂苷 VII 含量的增长最为显著。而 T3 期的重楼皂苷 II、VI 含量的增长更为显著, 其中 S9 的重楼皂苷 II, S8 的重楼皂苷 VI 含量的增长最为显著。表明接种时期相同时, 随着采收年限的增加, 重楼皂苷 II、VI 含量的持续增加, 而重楼皂苷 I、VII 含量的会有所下降。与 CK 组相比, T6 期较 T5 期、T7 期的重楼皂苷 VI、VII 含量的增长更为显著, 其中 T6 期 S1 的重楼皂苷 VI, S2 的重楼皂苷 VII 含量增长最为显著。而 T5 期较 T6 期、T7 期的重楼皂苷 I、II 增长非常显著, 尤其在 S2、S3、S6、S7、S8 中, 其中 T5 期的 S2 重楼皂苷 I、II 含量的增长最为显著。表明种植年份相同时, 在 7 月采收的重楼品质更佳。

综上所述, 接种 AM 真菌不同程度地影响了不同接种时期滇重楼幼苗根茎中重楼皂苷含量。在 8 个不同接种时期中, 总体上表现为重楼皂苷 VII 和重楼皂苷 VI 的含量大于重楼皂苷 II 和重楼皂苷 I 的含量。较其他时期而言, T7 时期的重楼皂苷含量普遍较低, T6 时期的 4 种重楼皂苷的总含量最高。由此可以表明, T6 时期接种菌根真菌对滇重楼的增强作用强, 尤其是重楼皂苷 VI 的增加作用最显著。与 CK 组比较, 所有处理组的 4 种重楼皂苷之和均高于 CK 组, 且部分达到显著性差异, 由此看出, 接种菌根真菌能够促进滇重楼的生长繁殖, 加入外源 AM 真菌有助于滇重楼根茎中重楼皂苷含量的提高, 这一研究结果同周浓等^[5]的结果相同。

4 讨论

研究结果表明, 各处理组均能与 AM 真菌形成一定的共生关系, 但各处理组对滇重楼生长发育情况的影响程度存在差异。与 CK 组相比, 菌根化滇

表 3 接种时期对丛枝菌根滇重楼幼苗根茎中重楼皂苷含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 3 Effect of inoculation period on content of saponins in rhizome of seedlings of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

处理	取样时期	重楼皂苷 I/%	重楼皂苷 II/%	重楼皂苷 VI/%	重楼皂苷 VII/%	合计/%
S1	T1	0.109±0.020i	0.802±0.003e	0.773±0.039i	3.606±0.008d	5.290±0.059d
	T2	0.161±0.014j	0.091±0.024h	1.614±0.045c	2.788±0.026g	4.654±0.016f
	T3	0.445±0.005d	1.432±0.021b	1.223±0.025e	3.460±0.009b	6.560±0.005d
	T4	0.726±0.003e	0.354±0.006d	0.585±0.004d	2.606±0.017d	4.271±0.007f
	T5	0.041±0.053j	0.267±0.061h	3.216±0.014f	1.050±0.016a	4.574±0.010h
	T6	0.052±0.042g	0.692±0.003b	10.096±0.004a	2.310±0.013g	13.150±0.003a
	T7	0.315±0.007a	0.037±0.059f	0.900±0.002d	0.014±0.016g	1.266±0.013d
	T8	1.557±0.001c	2.280±0.013c	1.507±0.020b	2.889±0.020h	8.232±0.004c
S2	T1	0.182±0.012h	0.145±0.015j	5.632±0.005a	4.362±0.007b	10.321±0.030a
	T2	0.711±0.003f	0.174±0.013f	1.900±0.038b	3.069±0.024f	5.854±0.012c
	T3	0.038±0.057fg	0.516±0.059e	1.083±0.028f	1.179±0.026h	2.816±0.011i
	T4	0.207±0.011i	0.563±0.004c	0.495±0.004g	3.091±0.014b	4.356±0.007e
	T5	2.047±0.001a	9.632±0.002a	5.933±0.008a	0.482±0.034cd	18.095±0.002a
	T6	0.042±0.052h	0.175±0.012i	5.445±0.008f	6.020±0.005a	11.682±0.004e
	T7	0.033±0.066h	0.097±0.022c	0.204±0.011h	0.014±0.016g	0.348±0.047h
	T8	1.933±0.001b	5.732±0.005a	0.870±0.035a	2.341±0.013f	10.875±0.003a
S3	T1	0.034±0.065j	3.332±0.001a	3.677±0.008c	2.205±0.014h	9.248±0.034b
	T2	0.183±0.012i	0.092±0.024h	0.374±0.195f	3.629±0.020cd	4.278±0.017g
	T3	0.499±0.004c	0.624±0.049d	1.092±0.028f	1.872±0.016e	4.087±0.007g
	T4	0.625±0.003f	0.164±0.013i	0.925±0.002b	1.592±0.028h	3.306±0.009g
	T5	1.906±0.001b	7.632±0.002b	5.342±0.008b	0.466±0.035cd	15.345±0.003b
	T6	0.260±0.008a	0.622±0.004c	5.414±0.008f	6.020±0.005a	12.316±0.004b
	T7	0.068±0.032f	0.056±0.039e	1.588±0.001b	0.021±0.010d	1.734±0.009b
	T8	0.933±0.002e	2.168±0.014d	0.108±0.282f	1.844±0.017g	5.053±0.006h
S4	T1	0.683±0.003c	0.833±0.003d	2.806±0.011g	3.637±0.008d	7.959±0.039c
	T2	0.197±0.011h	0.074±0.029i	1.361±0.054d	3.239±0.023e	4.871±0.015e
	T3	1.653±0.001a	0.316±0.096g	1.915±0.016d	1.452±0.021g	5.336±0.006f
	T4	0.165±0.013j	0.769±0.003b	1.437±0.002a	1.903±0.023f	4.274±0.007f
	T5	0.115±0.019i	0.556±0.029f	3.611±0.012e	0.576±0.028b	4.858±0.009g
	T6	0.244±0.009b	0.458±0.005e	5.405±0.008f	5.687±0.005b	11.794±0.004d
	T7	0.315±0.007a	0.136±0.016b	0.564±0.004e	0.020±0.011e	1.035±0.016e
	T8	0.688±0.003f	1.624±0.019e	1.353±0.023c	2.320±0.013f	5.985±0.005e
S5	T1	0.817±0.003b	1.132±0.002c	3.061±0.010e	2.948±0.010f	7.958±0.039c
	T2	0.743±0.003e	0.319±0.007e	2.297±0.032a	5.074±0.014a	8.433±0.009a
	T3	0.036±0.061g	0.213±0.143h	2.739±0.011c	3.785±0.008a	6.772±0.004c
	T4	0.775±0.003d	0.209±0.010h	0.612±0.004c	3.374±0.013a	4.970±0.006c
	T5	0.192±0.011h	0.567±0.029f	4.443±0.010c	0.438±0.037d	5.640±0.008f
	T6	0.226±0.010c	1.026±0.002a	7.316±0.006c	3.408±0.009e	11.976±0.004c
	T7	0.048±0.045g	0.432±0.005a	0.229±0.010g	0.007±0.031i	0.716±0.023g
	T8	1.108±0.002d	1.438±0.021g	1.732±0.018a	3.172±0.010b	7.450±0.004d

续表 3

处理	取样时期	重楼皂苷 I/%	重楼皂苷 II/%	重楼皂苷 VI/%	重楼皂苷 VII/%	合计/%
S6	T1	1.586±0.001a	1.204±0.002b	2.741±0.011g	4.428±0.007ab	9.959±0.031a
	T2	0.874±0.002c	2.037±0.001a	1.168±0.062e	4.248±0.017b	8.327±0.009a
	T3	0.029±0.074h	0.662±0.046cd	3.093±0.010b	3.839±0.008a	7.624±0.004a
	T4	0.553±0.004g	0.310±0.007e	0.520±0.004e	3.308±0.013a	4.691±0.006d
	T5	1.570±0.001d	6.218±0.003c	4.078±0.011d	0.505±0.032c	12.372±0.004c
	T6	0.167±0.013d	0.579±0.004d	6.290±0.007e	4.933±0.006c	11.969±0.004c
	T7	0.274±0.008b	0.033±0.065f	0.399±0.005f	0.061±0.004a	0.767±0.021f
	T8	2.199±0.001a	2.737±0.011b	1.526±0.020b	3.524±0.009a	9.986±0.003b
S7	T1	0.451±0.005g	0.619±0.004f	3.988±0.008b	2.845±0.011g	7.903±0.040c
	T2	0.791±0.003d	0.479±0.005d	0.375±0.194f	3.761±0.019c	5.406±0.013d
	T3	0.497±0.004c	0.714±0.043c	0.379±0.080h	2.252±0.014d	3.842±0.008h
	T4	2.061±0.001b	0.786±0.003a	0.515±0.004f	2.785±0.016c	6.147±0.005a
	T5	1.159±0.002e	4.995±0.003d	2.603±0.017h	0.223±0.073f	8.980±0.005e
	T6	0.066±0.033f	0.386±0.006f	6.339±0.007e	2.862±0.011f	9.653±0.005h
	T7	0.086±0.025e	0.091±0.024d	2.469±0.001a	0.024±0.009c	2.670±0.006a
	T8	0.378±0.006g	1.523±0.020f	0.573±0.053e	3.045±0.010c	5.520±0.006g
S8	T1	0.576±0.004d	0.467±0.005g	2.989±0.010f	4.478±0.007a	8.510±0.037c
	T2	1.055±0.002b	0.710±0.003c	0.354±0.206f	2.639±0.028gh	4.758±0.015ef
	T3	0.228±0.010e	0.345±0.088g	3.258±0.009a	3.357±0.009c	7.188±0.004b
	T4	2.867±0.001a	0.262±0.008f	0.175±0.012h	1.786±0.025g	5.090±0.006b
	T5	1.624±0.001c	4.224±0.004e	3.259±0.014f	0.387±0.042e	9.493±0.005d
	T6	0.034±0.065i	0.198±0.011h	7.535±0.006b	2.860±0.011f	10.626±0.004g
	T7	0.263±0.008c	0.138±0.016b	1.058±0.002c	0.034±0.006b	1.493±0.011c
	T8	0.212±0.010i	0.888±0.034i	1.416±0.022c	2.562±0.012e	5.078±0.006h
S9	T1	0.504±0.004f	0.380±0.006i	3.197±0.010d	4.285±0.007c	8.366±0.037c
	T2	2.907±0.001a	0.900±0.002b	0.476±0.153f	3.542±0.021d	7.825±0.009b
	T3	0.903±0.002b	2.361±0.013a	0.668±0.046g	1.695±0.018f	5.628±0.005e
	T4	1.882±0.001c	0.256±0.009g	0.122±0.018i	2.880±0.015c	5.140±0.006b
	T5	0.306±0.007g	0.549±0.030f	2.930±0.015g	0.255±0.064f	4.040±0.011i
	T6	0.036±0.061i	0.350±0.006g	7.208±0.006d	3.519±0.009d	11.113±0.004f
	T7	0.147±0.015d	0.022±0.098h	0.069±0.032i	0.015±0.015f	0.253±0.064i
	T8	0.353±0.006h	1.163±0.026h	1.369±0.022c	2.863±0.011d	5.747±0.005f
CK	T1	0.559±0.004e	0.417±0.005h	0.854±0.036h	3.356±0.009e	5.186±0.060d
	T2	0.213±0.010g	0.111±0.020g	0.587±0.124f	2.584±0.028h	3.495±0.021h
	T3	0.042±0.052f	0.434±0.070f	0.108±0.282i	1.751±0.017f	2.335±0.013j
	T4	0.259±0.008h	0.072±0.030j	0.006±0.363j	2.267±0.020e	2.604±0.012h
	T5	0.364±0.006f	0.492±0.033g	2.513±0.018h	0.244±0.067f	3.613±0.012j
	T6	0.116±0.019e	0.063±0.035j	4.448±0.010g	2.924±0.010f	7.551±0.006i
	T7	0.009±0.242i	0.028±0.078g	0.053±0.041j	0.012±0.019h	0.102±0.160j
	T8	0.216±0.010i	1.182±0.026h	0.595±0.051e	2.989±0.010c	4.983±0.006i

重楼的侵染率良好,即 AM 真菌与滇重楼幼苗根茎形成了菌根,说明通过引入外源丛枝菌根真菌可提高滇重楼幼苗的生活力。接种 AM 真菌有助于光合色素含量的提高,进而促进滇重楼的生长发育。现有研究表明,AM 真菌能激活植物对多种生物或非生物胁迫的防御机制,从而提高植物的抗逆性,包括对病虫害、重金属污染、盐害、干旱等胁迫的抗性^[23]。CAT、POD 和 SOD 作为植物体内清除自由基的关键保护酶,能起到清除活性氧、维持氧化代谢平衡的重要作用^[24]。与 CK 组相比,不同接种时期滇重楼的 3 种保护酶活性均大于对照组,说明接种 AM 真菌增强了植株对不利环境的抗性。植株体内的渗透调节物质包括可溶性糖、可溶性蛋白,其能帮助维系植物细胞内的膨压进而利于增强植株的抗逆性。与对照组相比,滇重楼叶片的可溶性糖的含量均有明显的增加,但可溶性蛋白变化不明显。细胞膜系统的损伤是植物水分胁迫的重要原因,叶片中 MDA 含量的增多与膜相对透性呈显著正相关^[25-27]。各接种时期的 MDA 含量均低于对照组,表明接种 AM 真菌的各处理组降低了受逆境环境的胁迫程度。

接种时期对菌根化滇重楼鲜重、干重及重楼皂苷产量影响不尽相同,部分达到显著性差异。重楼皂苷被认为是滇重楼的主要活性成分,与滇重楼抗肿瘤、抗病毒、免疫调节、抗菌等生物活性相关^[28-29]。《中国药典》2015 年版中记载,重楼药材中所含 4 种重楼皂苷的总含量不得少于 0.60%^[1],与对照组相比,除 T7 时期中的处理组 S2 和 S9 外,其他处理组的滇重楼皂苷的量均达到且高于药材标准。

综上所述,不同接种时期对菌根化滇重楼幼苗产生了不同程度的影响。因此,筛选出合适的接种时期更有利于滇重楼的生长。总体上,T5、T6 和 T8 这 3 个时期的各项指标较其他时期更有优势;不同的 AM 真菌混合组中,S2、S3 和 S6 处理组的效果更佳。滇重楼的主要药用有效成分是甾体皂苷,接种 AM 真菌有利于其甾体皂苷成分含量的累积,从一定程度上提高了重楼药材的品质。将 AM 真菌技术应用于滇重楼的育苗和生产栽培中,这将为达到高效可控可培育的目标成分含量的药用品质提供一种可能性,将会给社会带来更多更大的经济效益。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.

- [2] 张朝阳,赵庭周. 重楼资源再生策略及其关键技术环节探讨 [J]. 中草药, 2009, 40(2): 319-323.
- [3] 黄璐琦,肖培根,王永炎. 中国珍稀濒危药用植物资源调查 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2011.
- [4] 刘润进,李晓林. 菌根学 [M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [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, 2010, 34(14): 1768-1772.
- [6] 杨永红,戴丽君,何昆鸿,等. 土壤营养与人工栽培滇重楼品质相关性评价 [J]. 中药材, 2012, 35(10): 1557-1561.
- [7] 盖京萍,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): 116-118.
- [8] 郭辉娟,王 薇,贺学礼. 宿主植物对黄芩根际土著丛枝菌根真菌生长发育的影响 [J]. 河南农业科学, 2011, 40(12): 98-101.
- [9] 肖文娟,杨 光,陈美兰,等. 丛枝菌根真菌在中药栽培病害防治研究中的应用 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(3): 252-257.
- [10] 周黄磊,黄升谋. 库源关系对水稻叶绿素含量及叶绿素 a/b 值的影响 [J]. 绿色科技, 2017, 8(24): 147-149.
- [11] 张 燕. 接种 AM 真菌提高枇杷实生苗抗旱性的生理生化机制(摘要) [A] // 中国园艺学会枇杷分会. 第六届全国枇杷学术研讨会论文(摘要)集 [C]. 雅安: 中国园艺学会枇杷分会, 中国园艺学会, 2013.
- [12] 张伟珍,古丽君,段廷玉. AM 真菌提高植物抗逆性的机制 [J]. 草业科学, 2018, 35(3): 491-507.
- [13] 黄寿臣,陈 飞,李丽丽,等. 松嫩平原盐碱土 AM 真菌对白花三叶草生长及生理生化的影响 [J]. 贵州农业科学, 2017, 45(7): 61-67.
- [14] 钱永强,孙振元,韩 蕾,等. 野牛草叶片活性氧及其清除系统对水分胁迫的响应 [J]. 生态学报, 2010, 30(7): 1920-1926.
- [15] 阿依古丽·铁木儿,玉苏甫·阿不力提甫,帕提曼·阿布都热合曼,等. 新疆地方梨品种抗寒性评价 [J]. 中国农学通报, 2014, 30(28): 217-225.
- [16] 周 浓,丁 博,冯 源,等. 接种不同 AM 真菌对滇重楼菌根侵染率和入药品质的影响 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(16): 3158-3167.
- [17] 韦正鑫,郭冬琴,李海峰,等. AM 真菌对滇重楼光合参数及生理指标的影响 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(20): 3945-3952.
- [18] 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(1): 158-161.

- [19] Trouvelot A, Kough J L, Gianinazzi P V. *Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle* [M]. Paris: INRA Publications, 1986.
- [20] 张志良, 瞿伟菁, 李小方. 植物生理学实验指导 [M]. 第 4 版. 北京: 高等教育出版社, 2009.
- [21] 周 浓, 张德全, 孙 琴, 等. 真菌诱导子对滇重楼中次生代谢产物甾体皂苷的影响研究 [J]. 药学学报, 2012, 47(9): 1237-1242.
- [22] 段艳涛, 何忠俊, 梁社往, 等. 滇重楼总皂苷含量和菌根侵染率与土壤因子的关系 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(22): 3091-3095.
- [23] 张瑞芹, 卢致霖, 陈洁雯, 等. AM 真菌影响三叶草根系抗氧化酶活性的系统效应 [J]. 微生物学通报, 2011, 38(3): 322-327.
- [24] 赵方贵, 陈丽平, 贺学礼. AM 菌根与不同施磷量对烤烟后期部分生理指标的影响 [J]. 西北植物学报, 2004, 24(11): 2122-2125.
- [25] 李合生. 现代植物生理学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2002.
- [26] 符裕红, 谢双喜, 薛于山. 不同光照对广玉兰 1 年生移栽苗的生长影响 [J]. 山地农业生物学报, 2006, 25(5): 394-398.
- [27] 柯用春, 王建伟, 周凌云, 等. 土壤中水分对金银花品质的影响 [J]. 中草药, 2005, 36(10): 1557-1558.
- [28] 龙 云, 杨 睿, 钟章程, 等. 不同水分和氮素条件对栽培绞股蓝生物量和皂苷量的影响 [J]. 中草药, 2008, 39(12): 1872-1876.
- [29] 潘兴娇, 张 杰, 沈昱翔, 等. HPLC 法同时测定云南重楼根茎中 9 种核苷类成分的含量 [J]. 中药材, 2016, 39(4): 813-818.