

AM 真菌对河北道地药材白芷质量的影响

赵金莉, 邓慧颖, 贺学礼

(河北大学 生命科学学院, 河北 保定 071002)

摘要:在盆栽条件下,对白芷分别接种 Beg180、Beg193 和白芷土著 AM 真菌,研究了不同 AM 真菌对白芷质量的影响。结果表明:接种 Beg180、Beg193 和白芷土著 AM 真菌,均可提高白芷叶片中总香豆素含量;接种 Beg180 和 Beg193 均提高白芷叶柄中的总香豆素含量,且 Beg193 的效果更为明显,但接种土著菌可明显降低白芷叶柄中的总香豆素含量;接种 Beg193 显著提高白芷根中的总香豆素含量和欧前胡素含量。对于白芷根部外部形态的影响,尤以土著菌最为显著。

关键词: AM 真菌; 河北道地药材; 白芷; 质量

中图分类号: Q949.32 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2009)增刊-0299-04

Effects of AM Fungi on the Quality of Trueborn *Angelica dahurica* from Hebei Province

ZHAO Jin-li, DENG Hui-ying, HE Xue-li

(The College of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, China)

Abstract: The effects of AM fungi on the quality of *Angelica dahurica* inoculated Beg180, Beg193 and native AM fungi by pot culture were investigated. The results showed: the total coumains content in the leaves was promoted after inoculating Beg180, Beg193 and native AM fungi; the total coumains content in the petiole increased by inoculating Beg180 and Beg193, and the effect was more distinct under the condition of inoculating Beg193, but the total coumains content in the petiole decreased by inoculating native AM fungi; the total coumains content and the imperarorin content were promoted significantly after inoculating Beg193. As for the external configuration of *Angelica dahurica* roots, the effect of the native fungi was the most significant.

Key words: AM fungi; Trueborn drug from Hebei province; *Angelica dahurica*; Quality

白芷 [*Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f.] 为伞形科多年生草本植物^[1], 现代药理研究证明, 白芷除了具有解热、镇痛、抗炎等作用, 还能改善局部血液循环, 消除色素在组织中过度堆积, 促进皮肤细胞新陈代谢, 进而达到美容的作用^[2,3]。祁白芷主产于河北省安国市, 是医药界认定的著名八大祁药之一, 为河北省道地药材。同时也是一种很好的香料和调味辅料, 在日常生活中应用广泛。

随着连续耕作次数的增加和农药的大量使用, 白芷产量和品质明显下降。因此, 需要一种既经济又绿色的方法减少品质下降带来的影响, AM 真菌菌肥的使用不失为一个好的发展方向。道地药材的品质明显优于非道地药材的原因除受药材生长的地

理环境、气候影响之外, 不同土壤的物理、化学性质以及所含的各种元素和 pH 值对药材生长发育及有效成分都有很大影响^[4]。目前对 AM 真菌与药材的关系研究是一个热点, 但有关 AM 真菌与白芷质量的研究尚未见报道。本研究在盆栽条件下, 分别接种三种不同 AM 真菌, 考查了 AM 真菌对白芷质量和不同部位药用成分含量的影响, 为充分利用 AM 真菌资源提高中药材白芷产量和品质提供依据和材料。

1 材料和方法

1.1 供试材料

祁白芷种子来自河北省安国市中药材种植基地。

供试土壤: 沙: 土= 1: 2 混匀的沙土, 装盆前过 2

收稿日期: 2009-02-04

基金项目: 河北省教育厅项目(Z2008413); 河北大学博士基金项目(2009-166)

作者简介: 赵金莉(1973-), 女, 河北景县人, 博士, 讲师, 主要从事菌根生物工程和土壤生态学研究。

mm 筛, 土壤有机质 12.74 mg/kg, 碱解 N 35.49 mg/kg, 速效 P 13.98 mg/kg, pH 6.82。试验容器为上口径 23 cm × 深 22 cm 的硬质塑料盆, 每盆装土 2.5 kg, 同时, 每盆每公斤土施加 K₂O 0.25 g 和 N 0.25 g, 肥料与土壤混匀装盆。

供试菌种: ① 白芷土著 AM 真菌: (采自安国市中药材基地) 野外采集的白芷根际土样经黑麦草扩繁获得; ④ Beg180、Beg193 (中国农业大学资源与环境学院植物营养系农业部植物营养与养分循环重点实验室馈赠) 经黑麦草扩繁后获得的含孢子、菌丝和侵染根段的土壤。接种的试验处理每盆层施菌剂 50 g, 对照处理每盆层施等量经高压湿热灭菌的菌剂, 使土壤中的营养成分与接种处理保持相同。此外, 再加 1 mL 经过 2 次滤纸过滤的接种物的浸提液, 旨在除去 AM 真菌的孢子、菌丝, 而使其他微生物区系保持相同。

1.2 试验设计

供试土壤经高压灭菌放置 7 d 后作为培养基质, 设不接种 (CK)、接种 Beg 180 (G180)、接种 Beg 193 (G193) 和接种白芷土著 AM 真菌 (GM), 每处理重复 5 次, 试验盆随机排列。

1.3 接种方法及栽培管理

将接种菌剂均匀地散撒在盆钵的上半部土层中, 白芷种子事先用 0.1% 升汞浸泡 5 min 并用无菌水漂洗数次, 播种在表土上, 用细的沙土覆盖。2007 年 4 月 15 日播种, 出苗后每盆定苗 2 株置于网室。白芷生长期间, 常规管理, 不定期灭蚜、松土。9 月 25 日收获, 整株晾干备用。

1.4 白芷药用成分含量的测定

1.4.1 供试品溶液的制备 采用热醇提取法。将干燥的白芷叶片、叶柄和根样碾碎, 过 40 目筛, 成粉末状备用。称取样品各 1 g 装入滤纸袋中封口后装入大试管。用甲醇 (每次 50 mL) 在恒温水浴 (40℃) 中连续提取 2 次 (第 1 次 20 h, 第 2 次 4 h), 将 2 次的提取液合并。以旋转蒸发器对各样品的提取液进行浓缩, 提取液浓缩至 3~5 mL 后, 分别倒入容量瓶中, 以甲醇洗涤 2~3 次, 将洗涤液倒入各容量瓶, 用甲醇定容至 25 mL。

1.4.2 总香豆素类含量的测定

1.4.2.1 标准曲线的绘制 精确称量欧前胡素对照品 (中国药品生物制品检定所) 2.2 mg, 甲醇定容至 25 mL。精密吸取对照品溶液各 2, 4, 6, 8, 10 mL, 分别用甲醇定容至 25 mL。以甲醇为空白, 于 300 nm 处测定。以浓度 (C) 为横坐标, 吸光度 (A) 为纵坐标绘制标准曲线, 得回归方程: $A = 3.2 \times 10^{-2}C + 2.02 \times$

10^{-2} ($r = 0.9991, n = 5$)。对照品溶液浓度在 7.04~35.2 μg/mL 范围内, 吸光度与浓度的线性关系良好。

1.4.2.2 总香豆素类含量的测定 采用紫外分光光度法^[5]。取供试品溶液在 300 nm 处测定, 测定时和标准曲线同时进行。

1.4.3 欧前胡素含量的测定

1.4.3.1 色谱条件 色谱柱: 岛津 ULTRON VX- ODS (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相: 乙腈-水 (V: V = 65:35); 流速: 0.8 mL/min; 检测波长 249 nm; 柱温: 室温; 检测器灵敏度: 0.01 AUFS; 20 μL 定量环进样。

1.4.3.2 标准曲线的绘制 精确称量欧前胡素对照品 (中国药品生物制品检定所) 5.0 mg, 甲醇定容至 50 mL。精密吸取对照品溶液各 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL, 分别用甲醇定容至 10 mL, 微孔滤膜 (0.45 μm) 过滤, 按上述色谱条件进行 HPLC 分析。以浓度 (C) 为横坐标, 峰面积 (A) 为纵坐标绘制标准曲线, 得回归方程: $A = 0.6 \times 10^6 C - 5.31 \times 10^5$ ($r = 0.9998, n = 6$)。欧前胡素浓度在 5~50 μg/mL 内呈良好线性关系。

1.4.3.3 欧前胡素含量的测定 采用 HPLC 法^[6]。取根样提取液 2 mL, 用甲醇稀释定容至 10 mL, 微孔滤膜 (0.45 μm) 过滤, 在上述色谱条件下测定, 测定时和标准曲线同时进行。

2 结果与分析

2.1 AM 真菌对白芷根系的侵染情况

白芷收获后取幼嫩的毛细根, FAA 液固定后用于菌根侵染率的测定。由表 1 可见, 接种丛枝菌根真菌极显著增加白芷菌根侵染率。其中, 接种 Beg180 的白芷菌根侵染率极显著高于接种 Beg193 和接种白芷土著 AM 真菌的菌根侵染率, 但接种 Beg193 和接种白芷土著 AM 真菌的两处理间无显著差异。该结果也说明 AM 真菌与白芷根系具有较高的亲和性, 能形成良好的菌根共生体。

表 1 AM 真菌对白芷的侵染率

Tab.1 The colonization ratio of AM fungi of *Angelica dahurica*

处理 Treatment	侵染率/ % Percent colonization
CK	4.73% A
GM	42.56% B
G180	69.75% C
G193	46.38% B

注: 表中不同大写字母表示在 $P \leq 0.01$ 水平上差异显著。

Note: The capital letters show significant difference at 1% level.

2.2 接种 AM 真菌对白芷根部的影响

白芷药用其根,以根条肥壮均匀、皮细坚硬、光滑、粉质足、香气浓、不抽皱者为品质最佳。由表 2 可知,接种 AM 真菌可显著增加白芷根部干质量,其中接种 Beg180 的白芷根部干质量又显著高于接种 Beg193 和接种白芷土著 AM 真菌两处理。同时,接种不同 AM 真菌对白芷根部外部形态有明显不同的影响(图 1)。接种 Beg180 和接种白芷土著 AM 真菌的白芷根部显著长于接种 Beg193 和未接种处理的白芷根部,其中接种 Beg180 的白芷根最长,但接种白芷土著 AM 真菌的白芷根部表观较好,皮细坚硬、光滑、不抽皱,而其他处理的白芷根部,皮粗糙、抽皱较多。

表 2 AM 真菌对白芷根部的影响

Tab.2 The effect of AM fungi on the root of <i>Angelica dahurica</i>		
处理 Treatment	根长/cm Root length	地下部干质量/g DW of underground
CK	6.48a	1.28a
G180	9.64b	3.61c
G193	7.42a	3.07b
GM	8.63b	2.96b

注:同一纵列不同小写字母表示 5% 水平上差异显著,下同。
Note: Data with different letters in the same column indicate statistically significant differences at $P < 0.05$, the same as below.

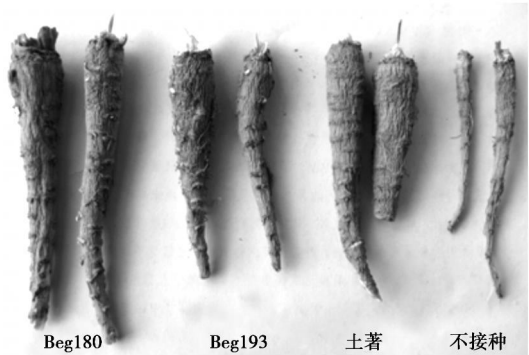


图 1 AM 真菌对白芷根部形态的影响

Fig.1 The effect of AM fungi on the root configuration of *Angelica dahurica*

2.3 接种 AM 真菌对白芷不同部位总香豆素含量的影响

由表 3 可见,各处理白芷不同部位总香豆素含量的高低顺序为:叶片>根>叶柄。在叶片和根中,表 3 AM 真菌对白芷不同部位香豆素含量的影响

Tab.3 The effect of AM fungi on the total coumains content in different parts of <i>Angelica dahurica</i>			
处理 Treatment	总香豆素含量/(mg/g) The total coumains content		
	叶片 Leaf	叶柄 Petiole	根 Root
CK	13.0167a	8.1817a	8.3528a
GM	15.4138b	6.9548a	13.0039b
G180	15.2096b	11.2155b	14.8594b
G193	16.7190c	12.8978b	16.4089c

接种 AM 真菌均可显著提高总香豆素含量,其中接

种 Beg193 的效应显著优于接种 Beg180 和接种白芷土著 AM 真菌处理,后两者间差异未达显著水平。在叶柄中,接种 Beg180 和接种 Beg193 处理的总香豆素含量显著高于接种白芷土著 AM 真菌和未接种处理;接种白芷土著 AM 真菌反而降低了叶柄中总香豆素含量,但与未接种处理的差异不显著。

2.4 接种 AM 真菌对白芷根部欧前胡素含量的影响

白芷中的主要有效成分为香豆素类化合物^[7,7],欧前胡素为其中之一。欧前胡素含量的高低是判定白芷质量的标准之一。由表 4 可见,接种不同 AM 真菌对白芷根中欧前胡素的含量有明显不同的影响。接种 Beg193 可显著提高白芷根中欧前胡素的含量,而接种 Beg180 和接种白芷土著 AM 真菌降低白芷根中欧前胡素的含量,并且接种 Beg180 处理达到了显著水平。

表 4 AM 真菌对白芷根部欧前胡素含量的影响

Tab.4 The effect of AM fungi on the total imperatorin content in root of <i>Angelica dahurica</i>	
处理 Treatment	欧前胡素含量/(mg/g) The imperatorin content
CK	4.643201a
GM	4.564828ab
G180	4.290078b
G193	5.038619c

3 讨论

白芷药用历史悠久,应用广泛,在中国药典 2000 版一部收载的 458 个成方中,有 43 个含有白芷,占所载成方总数的 9.4%,同时白芷也是一种很好的香料和调味辅料,在日常生活中广泛使用。白芷的主要有效成分是香豆素类物质,其作为具有天然生物活性的次生代谢产物,有多种复杂的生物学功能,为药材发挥疗效的物质基础^[9,10]。魏玉平等^[11]运用胃肠动力学、血清动力学和药效学方法以欧前胡素为指标成分,发现白芷提取物中总香豆素含量增高,镇痛作用也相应增强。因此,总香豆素的含量可作为白芷及白芷提取物质量优劣的指标。

欧前胡素是白芷香豆素类化合物中的最主要成分,也是最主要的药效物质。2005 年版《中国药典》一部中规定^[12],按干燥品计算,欧前胡素含量不得少于 0.080%。但在当前白芷栽培中,大量使用化肥和农药以提高生药产量,造成生药指标性成分含量低且不稳定及农药残留超标,使药材的医用价值受到严重影响。因此,生药品质及指标性成分含量的稳定性,是当前生药生产中亟待研究解决的问题。

AM 是自然界中分布最广的内生菌根,大量研

究表明,AM 可显著促进植物生长发育,提高寄主植物对 P、Zn、Fe、Cu、Ca 等多种元素的吸收;提高寄主植物的抗旱、抗盐碱、抗极端温度、湿度等能力^[13],并能增强植物对多种病害的抵抗力及影响植物的次生代谢。本研究结果表明,接种 Beg180、Beg193 和白芷土著 AM 真菌可不同程度的影响白芷不同部位中总香豆素含量,尤其是接种 Beg193 后,白芷叶片、叶柄和根中的总香豆素含量及根中欧前胡素含量均升高,与未接种处理相比达显著水平;但接种白芷土著 AM 真菌处理的白芷根部表现最好。鉴于目前中药材基本上依靠形态鉴别、显微鉴别、理化鉴别、薄层鉴别和测定某一种或几种有效成分或指标成分的含量来评价其质量。故下一步的研究目标应是选取优势菌种,采用多种 AM 真菌混接来达到提高白芷质量的目的。

本研究结果还发现,白芷叶片中的总香豆素含量高于根部。可能是由于收获较早所致。有研究表明,在生长 90~ 165 d 期间,祁白芷叶片中香豆素含量和积累量均高于根部;在生长 165~ 190 d 期间,根中香豆素增加迅速,在收获时积累量明显高于叶片^[14]。祁白芷地上部叶片和叶柄也含有一定量的香豆素,并且生物量较高,可以考虑综合利用祁白芷的不同部位,在药理和临床观察进一步证实的前提下,以根和叶^[15]同时入药,提高中药材的利用率。

参考文献:

[1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:化学工业出版社,2000.

[2] 王梦月,贾敏如,马逾英. 白芷开发现状与前景[J]. 中国中药信息杂志,2002,9(8): 77- 78.

[3] Yun Him- Che. Handbook of Chinese Herbs and Formulas [M]. Los Angeles, CA: s. n., 1985.

[4] 王 义. 中药材品质与植物生物学研究的关系[J]. 吉林农业大学学报,1996,18(3): 1112- 1161.

[5] 马逾英,钟世红,贾敏如,等. 紫外分光光度法测定川白芷中总香豆素类成分的含量[J]. 华西药学杂志,2005,20(2): 159- 160.

[6] 邓捷圆,高广慧,赵春杰,等. HPLC 法同时测定不同产地白芷中 2 种香豆素的含量[J]. 沈阳药科大学学报,2004,21(5): 354- 357.

[7] 周继铭. 白芷的研究(Ⅱ). 化学成分的研究[J]. 中草药,1987,1(6): 242- 246.

[8] 张涵庆. 杭白芷根化学成分的研究[J]. 药学通报,1980,15(9): 386- 388.

[9] 钟世红. 川白芷规范化种植质量的研究[D]. 长沙:成都中医药大学,2003.

[10] 刘淑娟. 植物次生代谢物的分布及其应用[J]. 泰山学院学报,2003,25(6): 91- 94.

[11] 魏玉平,刘俊,颜小林,等. 白芷治疗头痛的提取工艺评判指标的研究[J]. 中草药,2001,32(4): 318- 319.

[12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2005 版一部[M]. 北京:化学工业出版社,2005: 69.

[13] 刘润进,李晓林. 丛枝菌根及其应用[M]. 北京:科学出版社,2000.

[14] 贾 蕾,孙红春,杨太新,等. 祁白芷生理指标和药效成分的动态变化及其相关性分析[J]. 吉林农业大学学报,2008,30(2): 122- 127.

[15] 苏 敬. 新修本草[M]. 合肥:安徽科学技术出版社,1981: 218.