

网络出版时间:2014-01-05

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.7606/ji.ssn.10041389.2013.12.25.html>

AM 真菌对长果颈黄芪生物量及次生代谢产物的影响

韩冰洋,李贤坤,董相,周浓,姜北

(大理学院 药物研究所,云南大理 671000)

摘要 为了解丛枝菌根真菌(AM真菌)对长果颈黄芪植物生长与主要活性成分含量的影响,通过设立室内接种 AM 真菌、不接种 AM 真菌以及室外自然状态下 3 个处理组,以植物生物量、毛蕊异黄酮和黄芪甲苷含量等为指标,考察 AM 真菌对长果颈黄芪植物品质的影响。结果表明,AM 真菌对长果颈黄芪的地上部分和地下部分的生物量没有太大影响,但对根中黄酮类和皂苷类成分含量有显著影响,AM 真菌与长果颈黄芪中的黄酮类和皂苷类成分含量呈正相关。AM 真菌的施用能够提高长果颈黄芪的植物药用品质。

关键词 长果颈黄芪;AM 真菌;指纹图谱;黄酮;皂苷

中图分类号 R931.2

文献标志码 A

文章编号 1004-1389(2013)12-0153-06

Effects of AM Fungi Infection on the Secondary Metabolites and Root of *Astragalus englerianus*

HAN Bingyang, LI Xiankun, DONG Xiang, ZHOU Nong and JIANG Bei

(Institute of Materia Medica, Dali University, Dali Yunnan 671000, China)

Abstract In order to better understand the influence of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi infection on the growth and contents of major active compounds of *Astragalus englerianus*, three different treatments of plant groups including indoor inoculation with AM fungi, non-inoculation with AM fungi, and field natural growth were used to evaluate the effects on the plant quality by measuring the plant biomass and the contents of calycosin and astragaloside. The results showed AM fungi could not significantly change the biomass of both aerial and underground parts of *A. englerianus*, but AM fungi showed great impact on the contents of flavonoids and saponins in root of *A. englerianus*. The contents of flavonoids and saponins in root of *A. englerianus* were positively correlated with AM fungi, which indicated that the infection of AM fungi could effectively improve the medicinal quality of *A. englerianus*.

Key words *Astragalus englerianus*; Arbuscular mycorrhizal fungi; Chemical fingerprint; Flavonoids; Saponins

云南地理气候环境复杂多样,黄芪属植物种类十分丰富,但没有正品中药材黄芪自然分布^[1]。因此,许多云南黄芪属植物在当地民间被当作黄芪代用品而广泛应用,其中一些种类的药用功效

与正品黄芪非常相似,但相关的研究报道极少,对这些代用品的内在植物品质了解也十分有限;长果颈黄芪(*Astragalus englerianus* Ulbr.)正是这些代用品中资源蕴藏量较大的一种。丛枝菌根

收稿日期:2013-02-02 修回日期:2013-05-07

基金项目:云南省科技厅社会发展科技计划项目(2009CD090);国家自然科学基金(31170313);云南省中青年学术技术带头人后备人才基金(2008PY005);云南省“百名海外高层次人才引进计划”项目(2011)。

第一作者:韩冰洋,男,硕士,从事药用植物研究。E-mail:hby31510@163.com

通信作者:姜北,男,博士,教授,研究生导师。E-mail:northjiang@yahoo.com

(Arbuscular mycorrhiza, AM)真菌是真菌侵染植物根系形成的植物根系与真菌的互惠共生体。研究^[2-6]表明,AM真菌在影响植物的次生代谢过程、促进植物生根、提高植物生物量、提高移栽成活率、导致植物的次生代谢产物发生变化等方面发挥着重要作用。为此,本试验通过研究AM真菌对长果颈黄芪中黄酮、皂苷类等主要活性成分的影响,考察长果颈黄芪的植物品质与生理特点,探讨其作为正品黄芪替代品的潜力,为人工栽培长果颈黄芪、提高该植物的内在质量创造条件。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

Agilent1200型高效液相色谱仪(美国Agilent公司),KQ5200D超声波清洗器(东莞市科桥超声波设备有限公司),HH-S₂₄数显恒温水浴锅(金坛市大地自动化仪器厂),RE-52AA旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),SHZ-D(III)循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司),EL204分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司),FW-200粉碎机(北京中兴伟业仪器有限公司),DZG-303A型超纯水机(成都唐氏康宁科技发展有限公司),SH10A型水份快速测定仪(上海精密科学仪器有限公司)。

毛蕊异黄酮由大理学院药物研究所药物化学研究室分离鉴定,经NMR、HPLC等分析测试纯度大于99%;黄芪甲苷对照品,由中国药品生物制品鉴定所提供,供含量测定使用,批号为110781-200613;甲醇(色谱纯)购自美国Fisher公司,其他试剂均为分析纯;水为二次蒸馏水,用前经微孔滤膜过滤。

1.2 供试菌种

AM真菌(*Glomus mosseae*)选自北京市农林科学院植物营养与资源研究所丛枝菌根真菌种质资源库。

1.3 供试植物

长果颈黄芪种子分别由大理学院研究组野外采集及大理白族自治州农业科学研究所提供,种植栽培后鉴定为豆科植物长果颈黄芪(*Astragalus englerianus* Ulbr.)。

1.4 长果颈黄芪菌根植株培养及栽培管理

供试土壤由购买于大理市花鸟市场的林下腐殖土与当地沙壤土按照体积比3:1混合组成,风干过筛。大理学院研究组提供的种子设室内处理

组(AM)、空白组(CK)和室外空白组(SW),大理白族自治州农业科学研究所提供的种子设室内处理组(AM/N)、空白组(CK/N)。室内组采用室温盆栽方法,每个处理3个重复,每个重复设置3盆,播种若干,每盆挑选保留3株大小一致的植株。室外组(SW)采用试验田栽种方法,采用未经任何处理的土壤,自然条件下生长。

用三叶草对AM真菌进行繁殖后,将含有菌丝、孢子的根段和根际土壤作为AM真菌接种剂,选择大小一致的长果颈黄芪植株,每株施AM真菌接种剂30g。生长期养护管理,浇水护理。2012年7月,收获长果颈黄芪植物全株,根样清水洗净后剪成1cm长根段置于FAA固定液中固定,植物样品风干放置。

1.5 指标测定

以曲利苯蓝染色法进行AM真菌的侵染率测定,采用周浓等^[7]报道的方法进行菌根侵染强度测定。

1.6 色谱条件

色谱柱:Phenomenex C₁₈(250nm×4.6mm, 5μm),流速1mL/min。

毛蕊异黄酮:洗脱液由甲醇(A)、φ=0.1%磷酸溶液(B)组成,梯度洗脱,A相随时间变化在洗脱液中所占的体积分数为:0~2min,10%~25%;2~12min,25%~50%;12~22min,50%~80%;22~25min,80%~100%;柱温20℃;检测波长254nm。

黄芪甲苷:洗脱液中V(甲醇):V(水)=40:60,等度洗脱;柱温35℃;蒸发光散射检测器(ELSD),漂移管温度55℃,载气流速2.4L/min,增益值4。

指纹图谱:洗脱液为甲醇(A)、φ=0.1%磷酸溶液(B),梯度洗脱,A相随时间变化在洗脱液中所占体积分数为:0~2min,10%~25%;2~12min,25%~50%;12~17min,50%~65%;17~25min,65%~65%;25~35min,65%~80%;35~38min,80%~100%;柱温20℃;检测波长254nm。

1.7 供试品溶液的配制

含量分析样品的处理:取长果颈黄芪根若干粉碎,过40目筛,精密称取粉末1g,置于50mL圆底烧瓶中,精密加甲醇50mL,回流提取3h,放置至室温后,过滤,甲醇定容至50mL容量瓶中,用0.45μm微孔滤膜过滤,取续滤液作为样品溶液。

指纹图谱测试样品的制备:分别取 AM 组、CK 组、AM/N 组、CK/N 组、SW 组长果颈黄芪样品各 3 批,共 15 批,处理方法同上。

1.8 参照峰的选择

《中华人民共和国 2010 版药典》黄芪目下,新增毛蕊异黄酮的含量测定^[8],故选择毛蕊异黄酮和黄芪甲苷色谱峰作为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。

1.9 方法学考察

1.9.1 线性关系 精密称取毛蕊异黄酮对照品 1.4 mg、黄芪甲苷对照品 3.0 mg,分别定容于 50 mL、20 mL 容量瓶中,备用。精密吸取上述毛蕊异黄酮对照品 1 mL 至 10 mL 容量瓶中,甲醇定容,然后按照 1、2.5、5、10、20、40 μL 注入液相色谱仪中;精密吸取上述黄芪甲苷对照品 1 mL,然后按照 1、2、4、8、16、32 μL 注入液相色谱仪中。以对照品进样量(μg)为横坐标,峰面积为纵坐标,考察两种对照品进样量与峰面积之间的线性关系。

1.9.2 精密度试验 取供试品溶液,重复进样 5 次,每次 30 μL ,计算毛蕊异黄酮和黄芪甲苷峰面积的相对标准偏差(RSD)。

1.9.3 重复性试验 处理同一样品 5 份,计算毛蕊异黄酮和黄芪甲苷峰面积的 RSD。

1.9.4 稳定性试验 将样品溶液分别在 0、4、8、16、24 h 进样检测,计算毛蕊异黄酮和黄芪甲苷峰面积的 RSD。

1.9.5 加样回收率 精密称取 5 份已知含量的样品(SW 组)1 g。分别精密加入一定量的对照品溶液(含毛蕊异黄酮 0.004 μg ,黄芪甲苷 0.002 μg),计算回收率。

1.10 生物量测定

利用水份快速测定仪和电子秤,分别测定长果颈黄芪的地上部分和地下部分的干质量、湿质

量,每组每株测定 3 次,取平均值。

2 结果与分析

2.1 方法学考察试验结果

2.1.1 线性关系 毛蕊异黄酮线性回归方程为: $y=4\ 111.6x-1.749\ 8$, $r=0.999\ 9$;黄芪甲苷线性回归方程为: $y=15\ 120x-3.345\ 4$, $r=0.999\ 9$;表明当毛蕊异黄酮进样量为 0.002 8~0.112 μg ,黄芪甲苷进样量为 0.001 5~0.048 μg 时,进样量与峰面积呈良好的线性关系。

2.1.2 精密度 毛蕊异黄酮和黄芪甲苷峰面积的相对标准偏差(RSD)分别为 2.70%、0.16%,表明仪器精密度良好。

2.1.3 重复性 毛蕊异黄酮和黄芪甲苷峰面积的 RSD 分别为 2.10%、1.50%,表明试验方法重复性良好。

2.1.4 稳定性 测得毛蕊异黄酮和黄芪甲苷峰面积的 RSD 分别为 2.20%、1.70%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.5 加标回收率 毛蕊异黄酮和黄芪甲苷的平均回收率均大于 100%,但 RSD 均小于 3.00%,试验精密度较好,具体结果见表 1。

2.2 长果颈黄芪根际 AM 侵染情况

各组植物样品 AM 侵染生态特征结果见表 2。由表 2 可知,AM 组和 CK 组相比较,差异具有极显著水平,AM/N 组与 CK/N 组相比较,差异也具有极显著水平,表示经过接种 AM 真菌处理后,长果颈黄芪已经达到试验要求,接种 AM 真菌后侵染强度和侵染率都高于对照组。SW 组与 CK 组相比较,差异显著,可能由于自然环境中的 AM 真菌侵染所致。长果颈黄芪的根质地较柔韧,木质化程度不高,AM 真菌对其侵染作用很强,但是生长在自然环境下的 SW 组,侵染强度、侵染率依然不高,可能与植物样品的采收季节有

表 1 加样回收率试验结果

Table 1 Results from recovery experiments

毛蕊异黄酮 Calycosin						黄芪甲苷 Astragaloside					
序号 No.	加入量/ μg Added	回收量/ μg Measured	回收率 % Recovery	回收率 平均值/% Average recovery	RSD /%	序号 No.	加入量/ μg Added	回收量/ μg Measured	回收率 % Recovery	回收率 平均值/% Average recovery	RSD /%
1	0.0040	0.004 1	102.5	101.5	2.81	1	0.002 0	0.002 1	105.0	103.0	2.66
2	0.004 0	0.004 1	102.5			2	0.002 0	0.002 0	100.0		
3	0.004 0	0.004 2	105.0			3	0.002 0	0.002 0	100.0		
4	0.004 0	0.004 0	100.0			4	0.002 0	0.002 1	105.0		
5	0.004 0	0.003 9	97.5			5	0.002 0	0.002 1	105.0		

关。多年生草本植物多会在冬季时倒苗,储存一些营养物质过冬,此时植物中的营养成分和次生代谢产物是最丰富的;本试验所用长果颈黄芪的采收时间为夏季,此时正是植物生长正茂盛的时候,次生代谢产物积累很少。有研究^[9-11]表明,植物中的黄酮类物质能够促进孢子萌发、菌丝生长以及菌根真菌的侵染,所以 SW 组的侵染作用不强可能是植物样品的采收季节所致。

2.3 生物量测量

不同组别生物量测量结果见表 3。由表 3 可知,SW 组和 AM 组相比,地上部分干质量和湿质量具有极显著差异,SW 组与 CK 组相比较,地上部分干质量和湿质量差异分别为显著和极显著水平。AM/N 与 CK/N 相比较,地上部分湿质量和地下部分干质量具有显著差异。说明试验中所使用的接种处理方法并未对长果颈黄芪的地上部分和地下部分的生物量造成影响,室内环境和室外环境的差异,管理方式的不同可能是造成这些差异的最主要因素。1983 年,Plenchette 提出田间菌根相对依赖性指数的概念,以此考察菌根真菌对不同植物总体生物量、产量的影响程度。林先贵等^[12]发现不同植物田间菌根相对依赖性指数并不相同,豆科植物的依赖指数仅为中等程度,说明 AM 真菌对豆科植物生物量的影响并不大。菌根真菌与寄主植物形成互惠共生体后可以促进寄主植物光合作用、产生次生代谢产物等,但接种 AM 真菌有时会导致植物生长受到暂时(或长期)

表 2 长果颈黄芪根际 AM 生态特征($\bar{x} \pm s$)

Table 2 AM ecological characteristics among the roots of *A. englerianus*

组别 Group	侵染率/% Infection rate	侵染强度 Infection intensity
SW	36.30±0.60 ^a	+
AM	40.00±6.00 ^{AB}	+
CK	26.50±1.50	+
AM/N	48.40±2.40 ^{**}	++
CK/N	28.50±0.50	+

注:“+”表示侵染强度 0%~20%，“++”表示侵染强度 20%~40%;AM/N 与 CK/N 相比,“**”表示 $P<0.01$;AM 与 CK 相比,“AB”表示 $P<0.01$;SW 与 CK 相比,“a”表示 $P<0.05$ 。

Note:“+” means infection intensity between 0%—20%, “++” means infection intensity between 20%—40%; compared AM/N and CK/N, “**” mean $P<0.01$; compared AM and CK, “AB” mean $P<0.01$; compared SW and CK, “a” mean $P<0.05$.

抑制^[2],原因可能是真菌侵染早期植物的防御作用和真菌的消耗,或者是真菌作为呼吸和生长作用库,从而导致寄主碳源的流失。

2.4 长果颈黄芪根的指纹图谱

采用国家药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2.0 版”软件对 15 批长果颈黄芪的色谱数据进行处理,设定匹配模板,进行谱峰多点校正,标定和确认共有峰,并生成对照指纹图谱,结果见图 1。在测定的 15 批药材中,显示约有 58 个色谱峰,其中 19 个色谱峰为 15 批样品共有,确定为特征指纹峰,依次编号,并指出毛蕊异黄酮为保留时间 17.045 min 的 32 号峰。由图 1 可以看出,15 批长果颈黄芪在峰数上并没有太大差异,而只是在一些峰的丰度上有所差异,说明接种 AM 真菌后并没有影响长果颈黄芪化学成分的改变。同时,对比 19 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积可知,相对保留时间的 RSD 较小(0.02%~0.86%),而相对峰面积的 RSD 差别较大,表明不同处理组别的长果颈黄芪中化学成分的含量有显著性差异。

此外,以相关系数(中位数)代表其相似性,15 批长果颈黄芪的相似度见表 4。15 批长果颈黄芪样品的相似度平均值均在 0.90 以上,已达到指纹图谱相似度的要求(0.9~1.0),说明 5 个处理组对长果颈黄芪所含化学成分的组成和比例有不同程度的变化,但没有造成长果颈黄芪主要成分的变异。

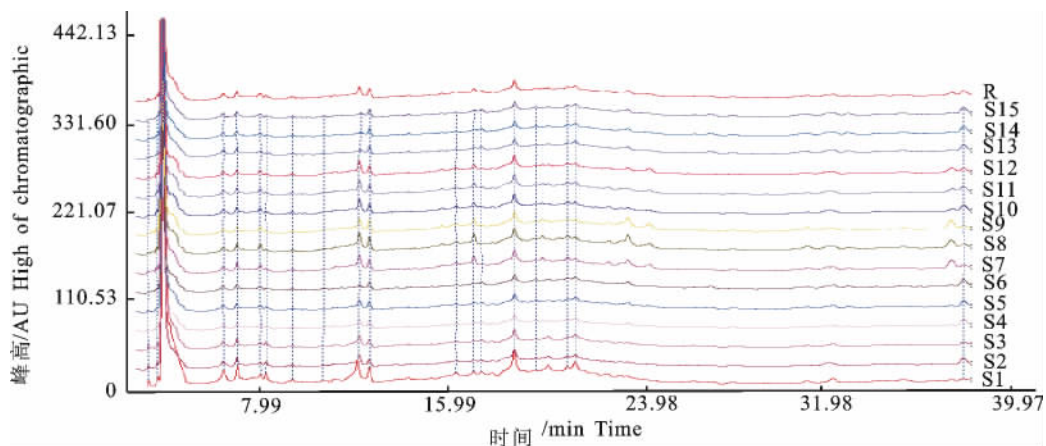
表 3 长果颈黄芪不同组别生物量

Table 3 The biomass from different experimental groups of *A. englerianus*

组别 Group	地上干质量/g Shoot dry mass	地上湿质量/g Shoot wet mass	地下干质量/g Root dry mass	地下湿质量/g Root wet mass
SW	46.67 ^{a I II}	74.67 ^{ab I II}	11.73	15.74
AM	13.63	28.88	6.83	14.83
CK	12.75	28.00	6.25	13.25
AM/N	11.50	29.83 [*]	7.83 [*]	17.50
CK/N	8.75	19.25	6.00	13.25

注:SW 与 AM 比,“I II”表示 $P<0.01$;SW 与 CK 比,“a”表示 $P<0.05$,“ab”表示 $P<0.01$;AM/N 与 CK/N 比,“*”表示 $P<0.05$ 。

Note:SW compared with AM, “I II” mean $P<0.01$; SW compared with CK, “a” mean $P<0.05$, “ab” mean $P<0.01$; AM/N compared with CK/N, “*” mean $P<0.05$.



S1、S2、S3 为 AM 组谱图,S4、S5、S6 为 CK 组谱图,S7、S8、S9 为 CK/N 组谱图,S10、S11、S12 为 AM/N 组谱图,S13、S14、S15 为 SW 组谱图,R 为生成的对照指纹图谱 AM group:S1, S2 and S3; CK group:S4, S5, and S6; CK/N group:S7, S8, and S9; AM/N group:S10, S11, and S12; SW group:S13, S14, and S15; R:reference fingerprint

图 1 15 批长果颈黄芪 HPLC 图谱及对照指纹图谱

Fig. 1 HPLC patterns of the fifteen batch of *A. englerianus* and the reference fingerprint

表 4 相似度分析结果

Table 4 Results from similarity analysis

序号 No.	相似度 Similarity	序号 No.	相似度 Similarity
S1	0.919	S9	0.964
S2	0.985	S10	0.974
S3	0.996	S11	0.981
S4	0.973	S12	0.980
S5	0.986	S13	0.985
S6	0.994	S14	0.992
S7	0.989	S15	0.991
S8	0.969		

2.5 AM 真菌对长果颈黄芪根茎中毛蕊异黄酮含量的影响

AM 真菌对长果颈黄芪根茎中毛蕊异黄酮含量的影响见表 5。由表 5 可知,经过接种 AM 真菌处理的 AM 组和 AM/N 组相比较对应的空白组 CK 组和 CK/N 组,毛蕊异黄酮和黄芪甲苷的含量均有不同程度的增加,表明 AM 真菌对长果颈黄芪中毛蕊异黄酮和黄芪甲苷的含量有正相关;同时,AM 组与 AM/N 组以及 CK 组与 CK/N 组之间的毛蕊异黄酮和黄芪甲苷含量差异应该这是由于种质不同所导致,由此也为寻找优质的黄芪代用品提供了一个新的思考角度。

表 5 长果颈黄芪中毛蕊异黄酮和黄芪甲苷含量测定结果

Table 5 Analytical results of the contents of calycosin and astragaloside from *A. englerianus*

组别 Group	编号 No.	毛蕊异黄酮 Calycosin			黄芪甲苷 Astragaloside		
		含量/(mg/g) Content	平均含量/(mg/g) Average content	RSD /%	含量/(mg/g) Content	平均含量/(mg/g) Average content	RSD /%
AM	1	0.058	0.060	2.09	0.141	0.140	2.87
	2	0.060			0.140		
	3	0.060			0.140		
CK	1	0.031	0.031	2.36	0.060	0.060	2.90
	2	0.032			0.059		
	3	0.030			0.060		
SW	1	0.028	0.028	1.19	0.041	0.041	1.74
	2	0.028			0.041		
	3	0.029			0.042		
AM/N	1	0.173	0.171	1.60	0.483	0.483	1.65
	2	0.171			0.482		
	3	0.168			0.483		
CK/N	1	0.165	0.160	2.82	0.361	0.362	1.86
	2	0.157			0.361		
	3	0.157			0.363		

3 讨论

有研究显示黄酮类物质与建立菌根共生体的信号有关^[6],因此菌根形成后会增加黄酮类物质的含量。本研究结果表明,接种 AM 真菌对长果颈黄芪的植物生物量与化学成分基本组成不会产生显著的影响,但毛蕊异黄酮和黄芪甲苷的含量均有不同程度的增加,AM 真菌与长果颈黄芪中毛蕊异黄酮和黄芪甲苷的含量呈正相关,符合黄酮类物质与菌根共生体之间的相互关系,是一种提高植物黄酮类成分含量的有效方法。前人研究结果也证实豆科植物对菌根真菌的依赖性不大,而且共生体系中任何一方的代谢过程都会影响到寄主碳的平衡^[12],这些可能是造成菌根真菌对长果颈黄芪生物量没有明显影响的原因。关于正品黄芪药材的质量标准,在《中华人民共和国 2010 版药典》中新增了毛蕊异黄酮含量测定项,规定 1 g 干燥品中毛蕊异黄酮质量分数不得少于 0.020%、黄芪甲苷质量分数不得少于 0.040%^[8]。本研究结果表明,诸如长果颈黄芪等云南黄芪属植物中,单就毛蕊异黄酮等标志性成分的含量,大理州农业科学研究所提高的种子品质已经接近正品黄芪的要求,并且通过栽培种植过程中的 AM 真菌浸染,还可以进一步优化次生代谢产物含量,提高植物品质和作为正品黄芪替代品的潜力,因此,本研究为开发应用云南丰富的黄芪属植物资源提供试验依据。

Reference (参考文献):

- [1] QIAN Zigang(钱子刚), JIA Xiangyun(贾向云), DAI Rong(戴蓉), *et al.* Study on species diversity of medicinal plant genus *Astragalus* in Yunnan [J]. Journal of Yunnan College of Traditional Chinese Medicine(云南中医学院学报), 1997, 20(1): 4-7, 12 (in Chinese with English abstract).
- [2] LIU Runjin(刘润进), CHEN Yinglong(陈应龙). Mycorrhizology(菌根学)[M]. Beijing: Science Press, 2007: 2-6, 318 (in Chinese).
- [3] ZENG Yan(曾燕), GUO Lanping(郭兰萍), SUN Yuzhang(孙宇章), *et al.* AM and its application in TCM cultivation [J]. Science and Technology-modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica(世界科学技术-中医药现代化), 2007, 9(6): 83-87 (in Chinese with English abstract).
- [4] GUO Lanping(郭兰萍), HUANG Luqi(黄璐琦), JIANG Youxu(蒋有绪), *et al.* Soil deterioration during cultivation of medicinal plants and ways to prevent it [J]. China Journal of Chinese Materia Medica(中国中药杂志), 2006, 31(9): 714-717 (in Chinese with English abstract).
- [5] XIAO Wenjuan(肖文娟), YANG Guang(杨光), CHEN Meilan(陈美兰), *et al.* AM and its application in plant disease prevention of Chinese medicinal herbs cultivation [J]. China Journal of Chinese Materia Medica(中国中药杂志), 2011, 36(3): 252-257 (in Chinese with English abstract).
- [6] ZHAO Xin(赵昕), YAN Xiufeng(闫秀峰). Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on plant secondary metabolism [J]. Journal of Plant Ecology(植物生态学报), 2006, 30(3): 514-521 (in Chinese with English abstract).
- [7] ZHOU Nong(周浓), XIA Conglong(夏从龙), JIANG Bei(姜北), *et al.* Arbuscular mycorrhizae in *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* [J]. China Journal of Chinese Materia Medica(中国中药杂志), 2009, 34(14): 1768-1772 (in Chinese with English abstract).
- [8] Chinese Pharmacopoeia Commission(国家药典委员会). Pharmacopoeia of The People's Republic of China[中华人民共和国药典 2010 版(一部)] [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2010: 283-284 (in Chinese).
- [9] Larose G, Chênevert R, Moutoglis P, *et al.* Flavonoid levels in roots of *Medicago sativa* are modulated by the developmental stage of the symbiosis and the root colonizing arbuscular mycorrhizal fungus [J]. Journal of Plant Physiology, 2002, 159(12): 1329-1339.
- [10] Poulin M J, Bel-Rhliid R, Piché Y, *et al.* Flavonoids released by carrot (*Daucus carota*) seedlings stimulate hyphal development of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of optimal CO₂ enrichment [J]. Journal of Chemical Ecology, 1993, 19(10): 2317-2327.
- [11] Vierheilig H, Bago B, Albrecht C, *et al.* Flavonoids and Arbuscular-mycorrhizal fungi [J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 1998, 439: 9-34.
- [12] LIN Xiangui(林先贵), HAO Wenying(郝文英). Mycorrhizal dependency of various kinds of plants [J]. Journal of Integrative Plant Biology(植物学报), 1989, 31(9): 721-725 (in Chinese with English abstract).