

当归根际土壤水浸液的自毒作用研究及化感物质的鉴定

张新慧^{1,2,3}, 郎多勇⁴, 张恩和^{2*}

(1. 宁夏医科大学药学院, 宁夏 银川 750004; 2. 甘肃农业大学农学院, 甘肃 兰州 730070; 3. 宁夏回药现代化工程技术研究中心, 宁夏 银川 750004; 4. 宁夏医科大学医学科学技术研究中心, 宁夏 银川 750004)

摘要:目的 通过对当归根际土壤提取液的生物学试验和有机化合物的分离鉴定, 探讨当归连作障碍与自毒作用的关系。方法 设置水(CK)、当归根际土水提液 100、125、250、500 mg/mL 共 5 个处理, 用于当归自毒作用的生物学实验; 气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)鉴定当归根际土壤有机化合物。结果 125 mg/mL 当归根际土壤水提液能显著抑制当归自身种子发芽率、发芽指数及胚根和胚芽的伸长, 且随水提液浓度的升高, 这种抑制作用增强。在当归根际土壤水提液中鉴定到 17 个化合物, 包括有机酸、酮、醛、酯和烃类等化感物质, 其中很多被报道是化感物质。结论 当归根际土壤水提液对自身种子萌发和幼苗生长具有明显的自毒作用, 且自毒效应具有一定的浓度依赖性, 推断自毒作用可能是造成当归连作障碍的原因之一。

关键词: 当归; 自毒作用; 根际土壤; 化感物质; 连作障碍

中图分类号: R286.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)12-2063-04

Autotoxicity of water extracts from rhizosphere soil of cultivated *Angelica sinensis* and identification of their allelopathic compounds

ZHANG Xin-hui^{1,2,3}, LANG Duo-yong⁴, ZHANG En-he²

(1. College of Pharmacology, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 2. College of Agronomy, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 3. Ningxia Research Center of Modern Hui Medicine Engineering and Technology, Yinchuan 750004, China; 4. Medical Technology Research Center, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

Abstract: Objective To explore the relationship between continuous cropping obstacle and autotoxicity of *Angelica sinensis*, autotoxic effect and organic compounds of rhizosphere soil water extract were determined. **Methods** Distilled water (CK), water extract of rhizosphere soil (100, 125, 250, and 500 mg/mL) were applied to testing their effect on early development of *A. sinensis*. Seed germination rate, germination index, elongation of radicle and embryo were recorded, and GC-MS was conducted for the compound identification in the extract. **Results** The water extract at concentration as low as 125 mg/mL significantly inhibited the germination and seedling growth of *A. sinensis*, and this inhibitory effect generally increased with the increase of the concentration of water extracts. Seventeen compounds in rhizosphere soil water extract were identified, including organic acids, ketones, aldehydes, esters, and hydrocarbons, most of them are allelopathic substance. **Conclusion** Water extracts from *A. sinensis* rhizosphere soil have inhibitory effects on *A. sinensis* germination and seedling growth, and this inhibitory effect generally increased with the increases of the water extract concentration at a certain ranges. In conclusion, there is autotoxicity in continuous cropping of *A. sinensis*, which is one of the causes of problems associated with the continuous cropping obstacle of a single plant species.

Key words: *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels; autotoxicity; rhizosphere soil; allelopathic compound; continuous cropping obstacle

当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根, 是我国常用的大宗药材, 中医素有“十药九归”之称。当归药材的成分复杂, 包

括挥发油、有机酸类、多糖等^[1-2], 而这些成分都具有良好的生理活性^[3-4]。当归是一个典型的忌连作植物, 长期以来, 当归栽培过程中出现了严重的连作障

收稿日期: 2010-04-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(31060182); 甘肃省农业生物技术研究与应用开发项目; 宁夏自然科学基金项目(NZ10109); 甘肃省教育厅项目(0906B-04); 国家科技支撑计划项目(2007BA137B02)

作者简介: 张新慧(1979-), 女, 甘肃岷县人, 讲师, 博士, 主要从事中药栽培与质量评价研究。E-mail: zhngxh801011@yahoo.com

* 通讯作者 张恩和, 教授, 博士生导师。Tel: (0931) 8816658 E-mail: zhanghe@gsau.edu.cn

碍现象,表现为连作当归病虫害加重,生理性死苗现象不断发生,给药农造成了很大的经济损失,严重威胁主产区当归生产的持续性发展。

自毒现象 (autotoxicity) 是化感作用的重要形式之一,它是指植物根分泌和残茬降解所释放出的次生代谢物,对自身或种内其他植物产生危害的一种现象,它是植物适应种内竞争的结果,许多作物的连作障碍与此相关^[5-9]。李晶等^[10-11]研究表明当归根系分泌物及植株水提液有明显的自毒作用,并认为自毒作用是造成当归连作障碍的因素之一。但实际上,土壤是植物产生化感作用的媒介,植物以根系分泌物、地上部淋溶和残茬腐解等形式将化感物质释放到土壤中,化感物质在土壤中经过一系列的滞留、转化、迁移等途径逐渐富集,达到受体植物并维持一定的浓度和持续的活性^[12-13],才能产生化感现象及连作障碍。因此,本实验首先研究了当归根际土提取液对当归种子发芽及幼苗生长的影响。然后,采用 GC-MS 分析鉴定了当归根际土水提液所含的化合物,为探明自毒作用是当归连作障碍的原因之一提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料:于 2006 年 10 月当归收获期,在当归道地产区甘肃岷县当归种植基地取样,按 5 点取样法选取当归植株,先去掉 0~2 cm 的表土,轻轻抖掉根系外围土,再用毛刷轻刷黏附在根表面的土壤作为根际土,过 40 目筛筛去根际土中残留的当归须根等,混匀备用。试验用当归种子购于岷县结布沟农户,经岷县中药材生产技术指导站郭增祥站长鉴定为伞形科植物紫当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的种子。

1.2 自毒作用检测:取新鲜的根际土壤 200 g,按 1:2 的比例浸泡于烧杯中,充分振荡后静置过夜,离心 (3 500 × g, 25 °C, 10 min),取上清液滤过,并过 0.37 μm 滤膜,得到相当于当归根际土 500 mg/mL 的溶液 (浸提母液),编号为 S500。将 S500 分别稀释 2、4、5 倍,得到相当于当归根际土 250、125 和 100 mg/mL 的溶液,编号为 S250、S125、S100,置于 4 °C 冰箱中待用。用作当归自毒作用的生物学研究。

以蒸馏水为对照 (CK),S500、S250、S125、S100 处理 3 次,每次随机选取 20 粒种子。种子用 0.1% H₂O₂ 表面消毒 20 min,用蒸馏水冲洗数次后随机铺在垫有 2 层滤纸的直径为 9 cm 的培养皿中,分别加入水、不同浓度根际土水浸液各 5 mL,置 20 °C 恒温

培养箱内培养 4 d 后开始观察计数,每 2 d 统计 1 次,共统计 9 次,第 20 天测量胚根长和胚芽长。

1.3 发芽指标测定方法

发芽率 = (发芽终期全部正常发芽的种子 / 供试种子数) × 100%

发芽指数 $G_t = \sum (G_t / D_t)$ 式中, G_t 为浸种后第 t 日的发芽数; D_t 为相应的发芽日数

胚根、胚芽长:将所有发芽种子的胚根、幼芽从种子结合部切下后用直尺测定其长度,并计算平均值。

化感作用效应敏感数 (RI) 用 Williamson^[14] 方法计算:

$$RI = \begin{cases} 1 - C/T & (T \geq C) \\ T/C - 1 & (T < C) \end{cases}$$

式中, C 为对照值, T 为处理值, $RI > 0$ 时表示促进作用, $RI < 0$ 时表示抑制作用, RI 绝对值的大小代表化感作用强度

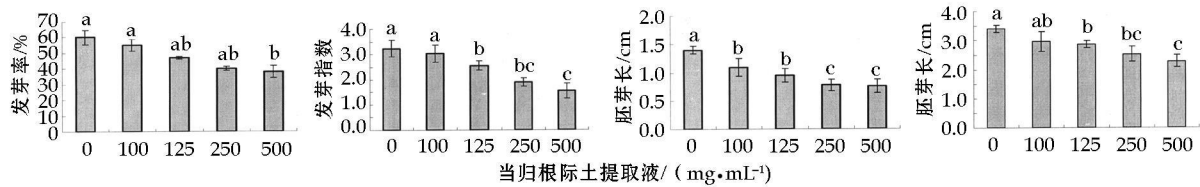
1.4 根际土水提液中化感物质鉴定:取当归根际土样品适量,蒸馏水浸泡 24 h,其间多次振摇。离心使当归根际土壤沉淀,取上清液抽滤。滤液加入等量醋酸乙酯萃取得到醋酸乙酯萃取液,所得醋酸乙酯萃取液浓缩至干,再用醋酸乙酯 1 mL 溶解,用于 GC-MS 分析。

GC-MS 分析于兰州大学化工学院 GC-MS 室进行,气质联用仪器为 Trace GC 2000,毛细管柱 cp5860,30 m × 0.25 mm。进样口温度 250 °C,柱温 50 °C,以 6 °C/min 程序升温至 250 °C,保持 15 min。载气为 He,体积流量 1 mL/min,进样量为 1 μL。GC-MS 型号菲尼根 Trace 2000,电子轰击源 70 eV,扫描范围为 m/z 33~453,0.4 s 扫全程,离子源温度 200 °C。通过质谱分析和计算机标准谱库检索,并采用峰面积归一化法确定各化合物的质量分数。

1.5 数据分析:通过 DPS 7.05 软件,利用单因子方差分析结合多重比较分析种子发芽率、发芽指数、胚根长及胚芽长的差异。

2 结果与分析

2.1 自毒作用生物活性测定:测定结果表明 (图 1),当归根际土壤水提液对其种子萌发和幼苗生长表现出不同的抑制趋势。不同浓度根际土水提液处理对受体当归发芽及生长的抑制作用具有浓度梯度效应,随水提液浓度的提高,对种子萌发及幼苗生长的抑制效应渐趋显著。在各浓度下各指标分别有不同程度的降低:发芽率降低 0%~31.06%,发芽指数降低 16.96%~57.69%,胚根长度降低 22.14%~46.19%,胚芽长度降低 13.05%~32.52%,且均在浓度为 250 mg/mL 时与对照达到



同一指标不同字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)

Values with different letters in same index are of significant difference ($P < 0.05$)

图 1 不同浓度当归根际土水提液对当归种子发芽率、胚根长及胚芽长的影响

Fig. 1 Influence of aqueous extracts from *A. sinensis* rhizosphere soil with different concentration on germination rate, germination index, length of radicle and embryo

显著差异。发芽率、发芽指数、胚根长度和胚芽长度对土壤浸提液的敏感程度不同,整体表现为发芽指数>胚根长度>胚芽长度>发芽率。

2.2 根际土壤中化合物的 GC-MS 鉴定:利用 GC-MS 分析,从当归根际土壤中共鉴定出 17 个化合物(图 2,表 1)。由表 1 可以看出,当归根际土壤能被醋酸乙酯提取的有机化合物种类丰富,含有有机酸、酮、醛、酯和烃类等物质。其中的丁酸、十一酸、肉豆蔻酸、邻苯二甲酸二丁酯等均为被报道过的化感物质^[15]。

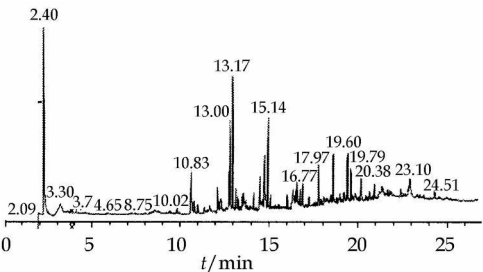


图 2 当归根际土醋酸乙酯萃取 GC-MS 色谱图

Fig. 2 GC-MS Chromatogram of ethyl acetate extraction of rhizosphere soil of *A. sinensis*

表 1 当归根际土壤提取物 GC-MS 鉴别到的有机化合物

Table 1 Compounds in extract of rhizosphere soil of *A. sinensis* identified by GC-MS

t/min	化合物	分子式	质量分数/%
2.09	丁酸	C ₄ H ₈ O ₂	4.30
2.40	环己酮	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	12.11
10.83	十一酸	C ₁₁ H ₂₂ O ₂	2.83
10.98	癸酸乙酯	C ₁₁ H ₂₄ O ₂	0.62
11.57	3,4-二甲基苯乙酮	C ₁₀ H ₁₂ O	0.43
12.28	十四烷	C ₁₄ H ₃₀	1.74
12.49	2-甲基-3,5-十二炔	C ₁₃ H ₂₀	1.49
13.00	肉豆蔻酸	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	6.28
13.17	十五酸甲酯	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	5.73
14.69	邻苯二甲酸二丁酯	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	5.68
14.95	十六酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	3.94
15.14	十五酸乙酯	C ₁₇ H ₃₄ O ₄	3.71
16.55	2-十三(碳)烯醛	C ₁₃ H ₂₄ O	2.55
16.77	环戊基十一酸	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	2.65
16.95	2,6-二甲基十七烷	C ₁₉ H ₄₀	0.87
19.60	二十烷	C ₂₀ H ₄₂	5.20
23.10	辛酸 2-己基酯	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	2.96

3 讨论

3.1 当归根际土壤中化感物质分析:根际是受植物根系活动影响,在物理、化学和生物学特性上不同于原土体的特殊土壤微区,是植物-土壤-微生物及其环境条件相互作用的场所和特殊的微生态系统,同时也是各种养分、水分和有益、有害物质进入根系参与生物链物质循环的门户^[15]。根际土壤有机化合物的来源途径很多,如根系的分泌物、微生物的分泌物、植物地上部的淋洗、挥发物、植物残体的腐解产物等。前人对植物根系分泌物的研究报道较多,而对根际土壤化学成分的研究报道较少,但实际上,土壤是植物产生化感作用的媒介,植物以根系分泌物、地上部淋溶和残茬腐解等形式将化感物质释放到土壤中,化感物质在土壤中经过一系列的滞留、转化、迁移等途径逐渐富集,达到受体植物并维持一定的浓度和持续的活性,从而产生化感现象及连作障碍。考虑到当归栽培中面临的主要问题是连作障碍,因此,本研究以当归根际土壤为研究材料,进行了化感物质的提取鉴别。本实验从当归根际土中共鉴定出 17 个化合物,包括烷、酸、酮、醛及酯等成分,尚包括量低而未被鉴定出的化合物。迄今为止所发现的化感物质几乎都是植物的次生代谢产物,一般相对分子质量较小,结构较简单,包括水溶性有机酸、直链醇、脂肪族醛和酮、简单不饱和内酯、长链脂肪酸和多炔、内酯、氨基酸、生物碱、苯甲酸及其衍生物等等。其中最常见的是低分子有机酸、酚类和内酯类化合物^[17]。本实验所分离鉴定到的化合物中不乏此类物质,证明当归根际土壤中含有抑制其自身生长的化感物质,即植物自毒素。

3.2 当归根际土壤作用的生物学检测:测定种子萌发和幼苗生长是研究化感作用的常规手段,种子萌发影响出苗率和种群数量,幼苗生长则直接影响到物种的生长状况、产量和品质。本实验中发现,125 mg/mL 当归根际土壤水提液能显著抑制当归自身

种子发芽率、发芽指数及胚根和胚芽的伸长,且随水提液浓度的升高,这种抑制作用增强,表明当归根际土壤水提液对自身种子萌发的抑制作用存在浓度效应,这与以前在苜蓿^[18]、大豆^[19]和黄瓜^[20]等作物上的研究结果一致。另外还发现,所测定的各项指标对同一浓度水提液的敏感程度也有差异,在种子萌发阶段,萌发指数的敏感性最强,表明种子萌发速度受到较大影响,从而延迟种子的发芽时间,影响出苗整齐度;在幼苗生长阶段,根长受到严重抑制,且在大于250 mg/mL时根部明显褐化变软,甚至腐烂。因此推断,连作当归根部易腐烂、病虫害严重和产量品质下降很可能是自毒物质在土壤中积累的结果。

3.3 当归种植的自毒现象与解决策略:在中药栽培过程中,各类药材所含的次生代谢产物丰富,自毒物质很容易积累而造成土壤环境恶化^[7,8,21]。因此,自毒作用很可能是引起中草药连作障碍的主要原因。赵杨景等^[9]研究表明,西洋参存在明显的自毒作用,且自毒作用是引起西洋参连作障碍的主要原因之一;因此,可以推断栽培当归连作障碍可能与自毒作用有关,但因生产实践中当归的种植是育苗后移栽,所以进一步的移栽苗生长试验有待于进行。

植物在生长发育过程中不断与根际土溶液进行着物质与能量的交换,通过各种途径(如地上部淋溶、根系分泌、植物残体分解等)进入根际区的植物自身的化学物质,直接影响着根际区土壤中微生物的群落结构,微生物分解代谢又会产生新的化学物质,如此不断地影响和改变着根际区微生态环境,反过来又对植物自身的生长发育产生影响。在这个意义上讲,自毒作用是植物长期适应种内竞争的重要策略,在群体水平上实现了优胜劣汰,对物种的进化具有积极的作用。但就栽培中药材而言,植物自毒造成的经济损失是显而易见的。所以在中药栽培中,可以借鉴农业生产的方法,如采用间作制度、避免连作等手段来缓解甚至是克服中药的自毒现象。同时,应注意对不产生化感物质或具有抗化感作用的品种进行筛选,最终通过遗传育种或转基因工程的手段和方法,彻底解决栽培中的自毒现象。

参考文献:

- [1] 刘益,刘素香,龚苏晓,等. 当归药材 HPLC 指纹图谱及其液相色谱-质谱联用分析[J]. 药物评价研究, 2010, 32(4): 259-262
- [2] 张明发,沈雅琴. 甘草粗提物及其黄酮类成分的抗肿瘤作用[J]. 现代药物与临床, 2010, 25(2): 124-129
- [3] 韦玮,龚苏晓,张铁军,等. 当归多糖类成分及其药理作用研究进展[J]. 药物评价研究, 2009, 32(2): 130-134
- [4] Pei Y, Tan C B, Xu W R, et al. Virtual evaluation on the activities of phthalides and terpenoids from *Angelica sinensis* [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(3): 236-241.
- [5] 张辰露,孙群,叶青. 连作对丹参生长的障碍效应[J]. 北植物学报, 2005, 25(5): 1029-1034
- [6] 陈长宝,王艳艳,张连学,等. 人参根际土壤中化感物质鉴定[J]. 特产研究, 2006(2): 12-14
- [7] 郭兰萍,黄璐琦,蒋有绪,等. 苍术根茎及根际土水提物生物活性研究及化感物质的鉴定[J]. 生态学报, 2006, 26(2): 528-535
- [8] 王学琴,温学森,杨德奎. 土壤细菌对地黄试管菌和盆菌生长的影响[J]. 中草药, 2009, 40(5): 797-780
- [9] 赵杨景,杨峻山,王玉萍,等. 西洋参、紫苏籽和薏苡根水提物的化感作用[J]. 中草药, 2004, 35(4): 452-455
- [10] 李晶,惠继瑞,马瑞君. 当归根系分泌物的自毒作用[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(3): 1083-1085
- [11] 惠继瑞,李晶,赵庆芳,等. 当归不同发育期自毒作用研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(2): 605-607, 611
- [12] 孔垂华,胡飞. 植物化感相生相克作用及其应用[M]. 北京:中国农业出版社, 2001, 143-152, 231
- [13] 张新慧,张恩和. 不同植龄啤酒花根际土壤中有机化合物的初步分离鉴定[J]. 土壤学报, 2009, 46(2): 368-371
- [14] Williamson G B, Richardson D. Bioassays for allelopathy: Measuring treatment responses with independent controls [J]. *J Chem Ecol*, 1988, 14: 181-187
- [15] Zhang X H, Zhang E H, Fu X Y, et al. Autotoxic effects of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels [J]. *Allelopath J*, 2010, 26(1): 1-12
- [16] Wang F, Bian Y R, Jiang X, et al. Residual characteristics of organochlorine pesticides in loess soils with different fertilization modes [J]. *Pedosphere*, 2006, 16(2): 161-168
- [17] 阎飞,杨振明,韩丽梅. 植物化感作用及其作用物的研究方法[J]. 生态学报, 2000, 20(4): 692-696
- [18] Hedge R S, Miller D A. Concentration dependency and stage of crop growth in alfalfa autotoxicity [J]. *Agronom J*, 1992, 84: 940-946
- [19] 韩丽梅,沈其荣,王树起,等. 大豆根茬木霉腐解产物的鉴定及其化感作用的研究[J]. 应用生态学报, 2002, 13(10): 1295-1299
- [20] Ding J, Sun Y, Xiao C L, et al. Physiological basis of different allelopathic reactions of cucumber and figleaf gourd plants to cinnamic acid [J]. *Exp Bot*, 2007, 58: 3765-3773.
- [21] 高微微,赵杨景,王玉萍,等. 我国药用植物栽培地的可持续利用研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(20): 1665-1669