

自毒物质胁迫对人参根系分泌物组成的影响^{*}

李 勇¹, 胡陈云^{1,2}, 丁万隆^{1**}, 刘 敏¹

(1. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所 北京 100193;

2. 中国药科大学中药学院 南京 210009)

摘 要 :采用营养液培养法,研究苯甲酸、邻苯二甲酸二异丁酯、丁二酸二异丁酯、棕榈酸、2,2-二(4-羟基苯基)丙烷胁迫对人参根系分泌物组成的影响。GC-MS 分析发现,包括对照在内的 6 个处理中分别检测到 15~23 种化合物,包括有机酸类、醇类、氨基酸酯类、酚酸类、胺类、稠环类、糖类等。与对照比较发现,胁迫处理后大部分人参根系分泌液中酚及酚酸类物质种类有不同程度增加。由此推测,释放到土壤中的自毒物质会刺激人参根向外界释放自毒物质,进而加剧对人参的毒害作用。

关键词 :人参 根系分泌物 化感物质 GC-MS

doi: 10.11842/wst.2013.07.003

中图分类号 :Q945.12

文献标识码 :A

人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer 为五加科人参属多年生草本植物,系我国传统名贵中药材。人参具有极强的忌连作特性,老参地至少 30 年内无法重茬栽参^[1]。连作问题严重制约人参大规模生产,毁林栽参的生产方式造成了土地资源的浪费和生态环境的严重破坏^[2]。多年研究结果表明,造成连作障碍的原因较为复杂,其中自毒作用是主要成因之一。自毒物质可通过植物合成代谢、残体分解、淋溶等途径产生,并对自身生长产生抑制作用^[3]。根系分泌是植物向外界释放自毒物质的重要途径之一^[4]。根据研究报道,自毒物质多为植物产生的次级代谢产物,它们能够影响植物的体内代谢途径,进而使植物表现毒害作用^[5]。因此,深入研究自毒物质及其作用机理对于揭示连作障碍形成机制具有十分重要的意义。鉴于此,本文在课题组已有研究基础上,深入分析了人参释放到土壤中的自毒物质,包括苯甲酸、邻苯二甲酸二异丁酯、丁二酸二异丁酯、棕榈酸和 2,2-二(4-羟基苯基)丙烷等,对人参后续生长

过程中根系分泌物组成的影响,以期阐明人参自毒物质的合成、作用机理以及连作障碍形成机制提供重要理论依据。

1 材料及方法

1.1 前期准备

分别取 1.25 g 苯甲酸、丁二酸二异丁酯、棕榈酸、2,2-二(4-羟基苯基)丙烷及 1.25 mL 邻苯二甲酸二异丁酯,用适量无水乙醇溶解后,用蒸馏水定容至 500 mL,配制成 $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的母液(邻苯二甲酸二异丁酯为 $2.5 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$)。胁迫处理时,分别用营养液稀释至最终浓度为 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (邻苯二甲酸二异丁酯为 $2.5 \mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$)。每种处理设 4 次重复。

1.2 人参根系分泌物收集

按照李勇等^[6]的研究方法配制营养液,3 年生人参苗小心冲洗干净,先用 1/4 营养液培养 2 周,待茎叶完全展开后转入 1 倍营养液培养。分别用上述含自毒物质的工作液胁迫处理 1 周后,再转至正常营养液培养 7 d,收集根系分泌物,过 XAD-4 大孔吸附树脂柱,甲醇洗脱。洗脱液于旋转蒸发仪上

收稿日期:2013-01-22

修回日期:2013-03-15

* 国家自然科学基金面上项目(81072992):自毒物质对人参根际微生物区系影响及其解毒细菌的研究,负责人:丁万隆;国家工业与信息化部中药材生产扶持项目[工信部消费(2011)340]:中药材规范化生产技术服务项目,负责人:丁万隆。

** 通讯作者:丁万隆,研究员,硕士研究生导师,主要研究方向:药用植物栽培及病害生物防治相关研究。

50℃减压浓缩至干,用少量甲醇溶解后,转入25 mL储液瓶,4℃保存,备用。对照为未经胁迫处理的人参根系分泌物。

1.3 化学组成分析

分别取适量不同处理的供试根系分泌物样液于1.5 mL离心管中,将离心管置于通风橱中,挥干甲醇后加入足量无水 CaCl_2 ,75℃放置1 h使样品彻底干燥。每份样品加入250 μL 硅烷化试剂(BSTFA:吡啶=5:1),75℃衍生化1.5 h,衍生物经GC-MS分析。

气质联用仪(Varian 431GC-300MS),毛细管柱为VF-5^{MS}(30 m $\times$ 0.32 mm $\times$ 0.25 μm),载气为氦气,流速1 mL $\cdot$ min⁻¹,进样量1 μL 。测试参数:进样口温度280℃,初始柱温60℃,保持1 min,以10℃ $\cdot$ min⁻¹升温至180℃,保持1 min,再以20℃ $\cdot$ min⁻¹升温至280℃,保持10 min。质谱条件:电子轰击(EI)源,电压70 eV,离子源温度200℃,连接杆温度240℃,扫描范围30~600 amu,质谱数据库NIST05用于根系分泌化合物检索。

2 结果与分析

2.1 根系分泌物主成分分析

5种自毒胁迫处理及对照人参根系分泌物中化合物色谱峰经与质谱图库比对,将R-Match>90%的配对作为可指认的化合物(表1)。

在对照根系分泌液中共鉴定出23种化合物。其中醌类1种,有机酸类7种,醇类3种,酯类3种,生物碱类1种,酚酸类衍生物3种,稠环类1种,杂环类1种,糖类1种,芳香胺类2种(图1CK)。

在苯甲酸处理根系分泌液中共鉴定出18种成分,其中有机酸类5种,酚酸类衍生物2种,生物碱类1种,醇类4种,杂环类1种,醌类1种,酯类2种,芳香胺类1种,稠环类1种(图1A)。

在邻苯二甲酸二异丁酯处理根系分泌液中共鉴定出20种成分,其中醇类2种,有机酸类5种,酚酸类衍生物4种,酯类4种,生物碱类1种,稠环类1种,杂环类1种,芳香胺类2种(图1B)。

在丁二酸二异丁酯处理根系分泌液中共鉴定出15种成分,其中醇类2种,有机酸类7种,酚酸类衍生物1种,生物碱类1种,酯类2种,杂环类1种,芳香胺类1种(图1C)。

在棕榈酸处理根系分泌液中共鉴定出21种成分,其中醇类2种,有机酸类5种,生物碱类1种,杂环类1种,酯类4种,酚酸类衍生物5种,稠环类1种,芳香胺类2种(图1D)。

在2,2-二(4-羟基苯基)丙烷处理根系分泌液中共检出21种化合物,其中醇类3种,有机酸类6种,酯类3种,生物碱1种,酚酸类衍生物3种,稠环类1种,杂环类1种,芳香胺类2种,醌类1种(图1E)。

2.2 根系分泌物差异性比较

在对照及5种胁迫处理中有9个共有质谱峰,分别占对照、苯甲酸、邻苯二甲酸二异丁酯、丁二酸二异丁酯、棕榈酸、2,2-二(4-羟基苯基)丙烷处理总检测峰数的39.1%、50.0%、45.0%、60.0%、42.9%和42.9%。

根据表1统计,与对照组相比,苯甲酸处理组中有15个色谱峰(t_{R} 5.209、 t_{R} 5.277、 t_{R} 5.521、 t_{R} 6.040、 t_{R} 6.146、 t_{R} 6.299、 t_{R} 7.420、 t_{R} 9.027、 t_{R} 9.890、 t_{R} 13.161、 t_{R} 15.868、 t_{R} 16.909、 t_{R} 17.359、 t_{R} 18.216和 t_{R} 18.407)与对照组相同,占总峰数的77.8%;减少了8个色谱峰(t_{R} 5.864、 t_{R} 12.299、 t_{R} 12.490、 t_{R} 13.161、 t_{R} 16.799、 t_{R} 18.338、 t_{R} 18.750、 t_{R} 19.246),增加了3个色谱峰(t_{R} 8.098、 t_{R} 12.483、 t_{R} 16.219)。

邻苯二甲酸二异丁酯处理组中,有17个色谱峰(t_{R} 5.521、 t_{R} 5.864、 t_{R} 6.146、 t_{R} 6.299、 t_{R} 7.420、 t_{R} 9.027、 t_{R} 9.890、 t_{R} 12.299、 t_{R} 13.161、 t_{R} 13.931、 t_{R} 15.868、 t_{R} 16.909、 t_{R} 17.359、 t_{R} 18.216、 t_{R} 18.407、 t_{R} 18.750、 t_{R} 19.246)与对照组相同,占总峰数的85.0%;减少了6个色谱峰(t_{R} 5.209、 t_{R} 5.277、 t_{R} 6.040、 t_{R} 12.490、 t_{R} 16.799、 t_{R} 18.338),增加了3个色谱峰(t_{R} 5.559、 t_{R} 12.483、 t_{R} 16.219)。

丁二酸二异丁酯处理组中,有14个色谱峰(t_{R} 5.521、 t_{R} 6.040、 t_{R} 6.146、 t_{R} 6.299、 t_{R} 7.420、 t_{R} 9.027、 t_{R} 9.890、 t_{R} 12.490、 t_{R} 13.161、 t_{R} 13.931、 t_{R} 16.909、 t_{R} 17.359、 t_{R} 18.216、 t_{R} 18.407)与对照组相同,占总峰数的93.3%;减少了9个色谱峰(t_{R} 5.209、 t_{R} 5.277、 t_{R} 12.299、 t_{R} 14.877、 t_{R} 15.868、 t_{R} 16.799、 t_{R} 18.338、 t_{R} 18.750、 t_{R} 19.246),增加了1个色谱峰(t_{R} 16.219)。

棕榈酸处理组中,有17个色谱峰(t_{R} 5.521、 t_{R} 6.146、 t_{R} 7.420、 t_{R} 9.027、 t_{R} 9.890、 t_{R} 12.490、 t_{R} 13.161、 t_{R} 13.931、 t_{R} 15.868、 t_{R} 16.219、 t_{R} 16.909、 t_{R} 17.359、 t_{R} 18.216、 t_{R} 18.338、 t_{R} 18.407、 t_{R} 18.750、 t_{R} 19.246)与对照组相同,占总峰数的81.0%;减少了7个色谱峰(t_{R} 5.209、

表 1 不同胁迫处理人参根系分泌物成分比较

编号	保留时间/min	化合物	CK	A	B	C	D	E
1	5.209	1-邻氯苯基蒽醌	+	+	-	-	-	-
2	5.277	1-甲基乙二醇	+	+	-	-	-	+
3	5.521	苯甲酰甲酸	+	+	+	+	+	+
4	5.559	联苯磷酸类	-	-	+	-	+	-
5	5.864	N-(2-呋喃基)甘氨酸甲酯	+	-	+	-	-	-
6	6.040	乳酸	+	+	-	+	-	+
7	6.146	骆驼蓬碱类	+	+	+	+	+	+
8	6.299	2-羟基乙酸	+	+	+	+	-	+
9	7.420	乙二醇	+	+	+	+	+	+
10	8.098	5-壬醇	-	+	-	-	-	-
11	8.815	2-异丙氧基苯基异酞酸己基酯	-	-	-	-	+	-
12	9.027	丙三醇	+	+	+	+	+	+
13	9.890	L-亮氨酸-N-甲基-n-丙氧羰基十六烷基酯	+	+	+	+	+	+
14	12.299	氨基酸酯类	+	-	+	-	-	+
15	12.483	2,6-二叔丁基苯酚	-	+	+	-	+	+
16	12.490	顺-6-十八碳烯酸	+	-	-	+	+	-
17	13.161	十一烷二酸	+	+	+	+	+	+
18	13.192	佛手柑内酯	-	-	-	-	+	-
19	13.931	月桂酸	+	-	+	+	+	-
20	15.868	苯并二香豆酮类	+	+	+	-	+	+
21	16.219	邻苯二甲酸二异丁酯	-	+	+	+	+	+
22	16.799	古洛糖	+	-	-	-	-	-
23	16.909	酚酸类衍生物	+	+	+	+	+	+
24	17.359	吡咯烷类	+	+	+	+	+	+
25	18.216	三氟甲基苄胺	+	+	+	+	+	-
26	18.338	酚酸类衍生物	+	-	-	-	+	+
27	18.407	十八烷酸	+	+	+	+	+	+
28	18.750	N-苯基-2-萘胺	+	-	+	-	+	+
29	19.009	2,6-二羟基苯甲酸	-	-	-	-	-	+
30	19.246	酚酸类衍生物	+	-	+	-	+	+
31	19.665	1,2-二羟基苯醌	-	-	-	-	-	+

注：+ 表示含有该化合物；- 表示不含该化合物；各峰指认组分为质谱图库比对 R-Match>90%的化合物结构，上述物质均未与标准品比对。

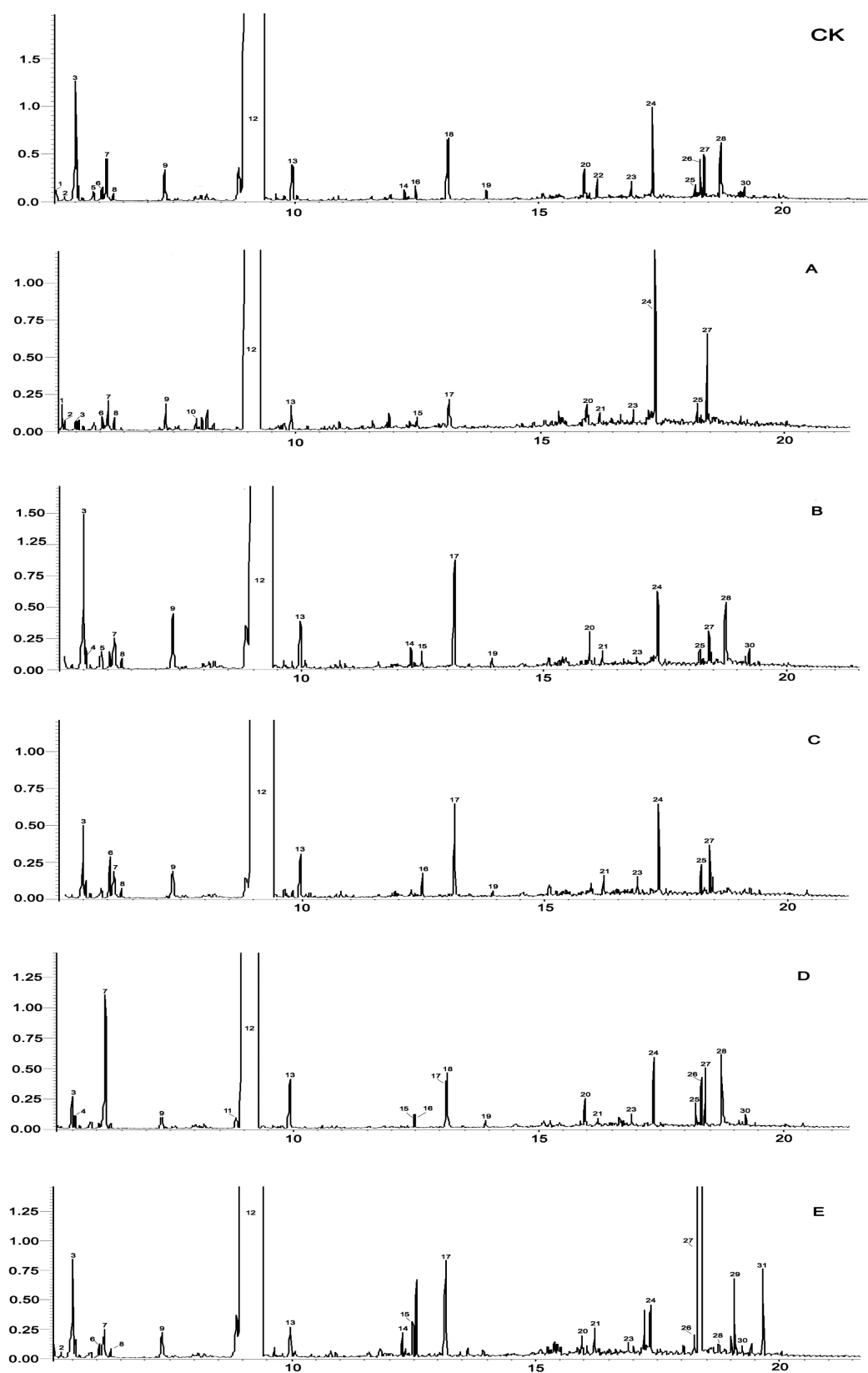


图1 人参根系分泌物质质谱图

注 CK对照 A.苯甲酸 B.邻苯二甲酸二异丁酯 C.丁二酸二异丁酯 D.棕榈酸 E.2,2-二(4-羟基苯基)丙烷。

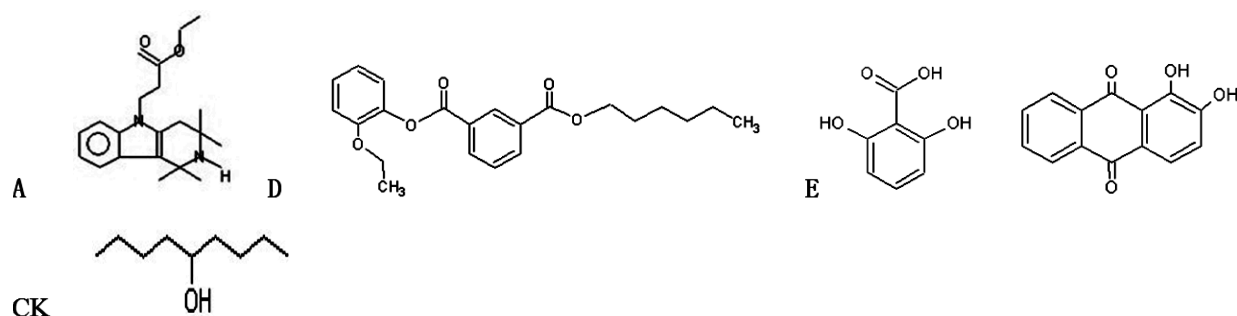


图2 苯甲酸(A)、棕榈酸(D)、2,2-二(4-羟基苯基)丙烷(E)胁迫处理及对照(CK)差异性人参根系分泌物成分

$t_{R5.277}$ 、 $t_{R5.864}$ 、 $t_{R6.040}$ 、 $t_{R6.299}$ 、 $t_{R12.299}$ 、 $t_{R16.799}$),增加了5个色谱峰($t_{R5.559}$ 、 $t_{R8.815}$ 、 $t_{R12.483}$ 、 $t_{R13.192}$ 、 $t_{R16.219}$)。

2,2-二(4-羟基苯基)丙烷处理组中,有17个色谱峰($t_{R5.277}$ 、 $t_{R5.521}$ 、 $t_{R6.040}$ 、 $t_{R6.146}$ 、 $t_{R6.299}$ 、 $t_{R7.420}$ 、 $t_{R9.027}$ 、 $t_{R9.890}$ 、 $t_{R12.299}$ 、 $t_{R13.161}$ 、 $t_{R15.868}$ 、 $t_{R16.909}$ 、 $t_{R17.359}$ 、 $t_{R18.338}$ 、 $t_{R18.407}$ 、 $t_{R18.750}$ 、 $t_{R19.246}$)与对照组相同,占总峰数的81.0%;减少了6个色谱峰($t_{R5.209}$ 、 $t_{R5.864}$ 、 $t_{R12.490}$ 、 $t_{R13.931}$ 、 $t_{R16.799}$ 、 $t_{R18.216}$),增加了4个色谱峰($t_{R12.483}$ 、 $t_{R16.219}$ 、 $t_{R19.009}$ 、 $t_{R19.665}$)。

若干差异性成分或仅存在于对照组中,或仅存在于胁迫处理(图2)。其中色谱峰 $t_{R16.799}$ 为对照组特有,经质谱图库比对指认为古洛糖;色谱峰 $t_{R8.098}$ 为苯甲酸处理组特有,经指认为5-壬醇; $t_{R8.815}$ 和 $t_{R13.192}$ 为棕榈酸处理组特有,经指认分别为2-异丙氧基苯基异酞酸己基酯和佛手柑内酯; $t_{R19.009}$ 和 $t_{R19.665}$ 为2,2-二(4-羟基苯基)丙烷处理组特有,经指认分别为苯甲酸类及羟基苯醌类化合物。

3 讨论

植物通过根系向外界释放化学物质是一种正常的生理代谢活动,根系分泌物组成的变化直接反映植物的新陈代谢和生长发育状况。大量研究表明,环境胁迫对植物根系分泌物的组成及含量有影响。谢明吉等^[7,8]研究发现,在多环芳烃菲(PHE)胁迫下,黑麦草根分泌物中有机酸含量显著增加,糖类和氨基酸类物质也有变化。万大娟等^[9]研究发现,多氯代有机污染物能使黑麦草和大豆根系分泌物中可溶性总糖、有机酸和氨基酸产生变

化,而且上述变化与有机污染物的种类及浓度密切相关。本研究发现,除了二酸二异丁酯外,其余自毒物质胁迫处理会导致人参根系分泌物中酚及酚酸类物质增加。据研究报道,酚及酚酸类化合物中很多具有他感或自毒活性^[10-12]。人参根系释放到根际土壤的自毒物质一旦积累到特定浓度,会对人参生长构成胁迫,进而导致分泌物中自毒物质种类和浓度增加,使自毒效应趋于增强。笔者由此推测,自毒物质在土壤中的累积加速了自毒作用的产生。

越来越多的研究证实,连作障碍与根系分泌物中的化感物质密切相关。Yu等^[13]研究发现,黄瓜根系分泌物中的苯甲酸、对羟基苯甲酸、2,5-二羟基苯甲酸等多种酚酸类物质能够抑制重茬黄瓜的生长。本研究发现,经胁迫处理后人参分泌物中检测到的2,6-二羟基苯甲酸与上述报道的化合物结构极为相似,推测其可能与人参自毒效应相关。根据张新慧等^[14]报道,2,4-二叔丁基苯酚为酚酸类化合物,其对啤酒花幼苗生长及光合作用表现低浓度促进、高浓度抑制的特点。本研究发现,2,2-二(4-羟基苯基)丙烷胁迫诱发人参根系产生2,6-二叔丁基苯酚,其可能与其它酚及酚酸类化合物一样对人参生长有抑制作用。据王芳^[15]报道,茄子根系分泌物中的氨基酸组分与连作茄子黄萎病发生密切相关。本研究发现,自毒物质胁迫处理后,人参根系分泌物中的氨基酸衍生物种类也发生了明显改变,上述变化可能与连作人参病害高发存在关联。

参考文献

- 1 李晓明,赵日丰,张亚玉,等. 老参地栽参问题的研究进展. 特产

- 研究, 1997(2):31~33.
- 2 杨利民, 陈长宝, 王秀全, 等. 长白山区参后地生态恢复与再利用模式及其存在的问题. 吉林农业大学学报(自然科学版), 2004, 26(5): 546~549, 553.
 - 3 史刚荣. 植物根系分泌物的生态效应. 生态学杂志, 2004, 23(1): 97~1011.
 - 4 孔垂华, 徐涛, 胡飞, 等. 环境胁迫下植物的化感作用及其诱导机制. 生态学报, 2000, 20(5):849~854.
 - 5 林娟, 殷全玉, 杨丙钊, 等. 植物化感作用研究进展. 中国农学通报, 2007, 23(1):68~72.
 - 6 李勇, 黄小芳, 丁万隆. 营养元素亏缺对人参根分泌物主成分的影响. 应用生态学报, 2008, 19(8):1688~1693.
 - 7 谢明吉. 多年生黑麦草(*Lolium perenne* L.)对菲的吸收和生理响应. 厦门大学博士学位论文. 2008.
 - 8 谢明吉, 严重玲, 叶菁菲. 对黑麦草根系几种低分子量分泌物的影响. 生态环境, 2008, 17(2):576~579.
 - 9 王大娟, 贾晓珊, 陈嫻. 多氯代有机污染物胁迫下植物某些根系分泌物的变化. 中山大学学报(自然科学版), 2007, 1(1):110~113.
 - 10 Zhang T T, Zheng C Y, Hu W, *et al.* The allelopathy and allelopathic mechanism of phenolic acids on toxic *Microcystis aeruginosa*. *J Appl Phycol*, 2010, 22(1):71~77.
 - 11 Ohno T. Oxidation of phenolic acid derivatives by soil and its relevance to allelopathic activity. *J Environ Qual*, 2001, 30(5):1631~1635.
 - 12 吴凤芝, 黄彩红, 赵凤艳. 酚酸类物质对黄瓜幼苗生长及保护酶活性的影响. 中国农业科学, 2002, 35(7):821~825.
 - 13 Yu, J Q, Matsui Y. Phytotoxinsubstances in root exudates of cucumber. *Chem Ecol*, 1994, 20(1):21~31.
 - 14 张新慧, 张恩和, 何庆祥, 等. 2,4-二叔丁基苯酚对啤酒花幼苗生长与光合特性的影响. 草业学报, 2008, 17(6):47~51.
 - 15 王芳. 茄子连作障碍机理研究. 中国农业大学博士学位论文, 2003.

Effects of Autotoxins Stress on Root Exudates of *Panax Ginseng*

Li Yong¹, Hu Chenyun^{1, 2}, Ding Wanlong¹, Liu Min¹

(1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China;

2. School of Traditional Chinese Medicine, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: By nutrient solution culture method, effects of benzoic acid, diisobutyl phthalate, diisobutyl succinate, palmitic acid, 2,2-bis(4-hydroxyphenyl) propane on root exudates of *Panax ginseng* were studied. GC-MS results indicated that, 15 to 23 components were detected in treatments including control, which were organic acids, alcohol, amino acid esters, phenols, amines, condensed nucleus, saccharine, etc. Through compared with control we found that, phenol and phenolic acids in root exudates increased in most of stress treatments. So we deduced that, the relaxation of autotoxins from roots to outside environment was stimulated by autotoxins released into soil, and which accelerated the autotoxicity to *ginseng* seedlings.

Keywords: *Panax ginseng*, root exudates, allelochemicals, GC-MS

(责任编辑 李沙沙 张志华, 责任译审 王 晶)