

# 大豆根分泌物的鉴定及其化感作用的初步研究<sup>\*</sup>

韩丽梅<sup>1</sup> 王树起<sup>1</sup> 鞠会艳<sup>1</sup> 阎 飞<sup>1</sup> 李国权<sup>2</sup>  
刘金萍<sup>1</sup> 阎吉昌<sup>3</sup>

(解放军军需大学: 1. 农学系、2. 基础系, 长春 130062  
3. 东北师范大学测试中心质谱室 长春 130062)

**摘要** 采用 GC-MS 分析法, 鉴定了由水培试验方法获得的 2 周、8 周大豆根分泌物的二氯甲烷提取物, 并对其化感作用进行了初步研究。结果表明: 能被二氯甲烷提取出来的根分泌物有有机酸类、醇类、酯类、酮类、醛类、酚类、苯类、烃类等有机化合物, 其中包含一些资料报道过的化感物质。与对照比较, 2 周、8 周大豆根分泌物对大豆种子萌发、8 周根分泌物对胚根生长未表现出显著抑制作用, 但 2 周根分泌物对胚根生长却表现出极显著的化感抑制作用。上述结果表明, 大豆根分泌物中存在化感物质, 2 周与 8 周大豆根分泌物的种类和数量有所不同。本文还探讨了大豆根分泌物的化感作用及大豆根分泌物与大豆连作障碍的关系等问题。

**关键词** 大豆; 根分泌物; GC-MS 分析; 化感作用

近年来, 随着对大豆连作障碍原因的深入研究, 大豆的化感作用日益受到重视。所谓化感作用 (Allelopathy) 即指植物在生长过程中, 通过植物、微生物或残体分解产生的化学物质, 对该种植物或其它植物产生有益或有害影响的现象<sup>[1-4]</sup>。根分泌物是植物产生化感物质的一个重要来源, 它是植物在生长过程中通过根的不同部位向其生长基质 (如土壤、营养液等) 溢泌或分泌的一组种类繁多的物质<sup>[5-6]</sup>。杜英君等的研究表明, 苗期大豆根分泌物产生的化感物质对“下茬”大豆苗的生长和某些生理活性均有显著影响, 并从根分泌物中分离出酚酸类物质<sup>[7]</sup>, 另有研究表明, 根分泌物在作物连作障碍中起直接或间接的作用<sup>[8]</sup>。但有关大豆根分泌物的组分及大豆根分泌物在大豆连作障碍中的作用等问题至今未见系统报道。为进一步研究大豆根分泌物在大豆连作障碍中的作用, 本文采用 GC-MS 分析法对大豆根分泌物的二氯甲烷提取物进行了鉴定, 并对根分泌物的二氯甲烷提取物的化感作用进行了初步研究。

<sup>\*</sup> 本研究为国家九五重中之重攻关课题 G95-01-05-03 的部分内容

收稿日期 1999-10-19

Received on Oct. 19, 1999

# 1 材料与方法

## 1.1 供试材料

供试大豆品种为吉林 30号;供试石英砂经 10% 盐酸浸泡一周后,用水冲洗至无氯离子为止,再用去离子水冲洗,至 pH 稳定, 150℃ 烘干至衡重备用;供试营养液采用霍格兰营养液和阿农微量元素混合液配方: 营养器采用黑色塑料盆 (容量 10L),带孔塑料泡沫板作盖板;供试化学药品均为分析纯

## 1.2 液培大豆方法

将  $\text{H}_2\text{O}_2$  消毒过的种子播于用饱和  $\text{CaSO}_4$  溶液浸润过的石英砂中,在 20– 25℃ 条件下避光发芽,子叶露出时照光培养。当根长至 5cm– 7cm 时,小心取出生长均一的幼苗,用去离子水轻轻洗去石英砂后,置于 1/2 强霍格兰–阿农营养液<sup>[9]</sup> (pH6.2) 中定植 每孔定苗 1 株,每箱定苗 15 株。采用自动定时小型通气泵连续通气 每周更换一次营养液,1 周后换成完全营养液。培养器置于光线良好的室内 (自然光照),室温 18℃– 22℃。

## 1.3 根分泌物的收集与提取方法

将培养 2 周、8 周的大豆幼苗,移栽至 6L 0.5mmol/L 的  $\text{CaCl}_2$  溶液中,在上述条件下培养 4 小时 (9:00– 13:00) 用 500ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  提取根洗液二次,再将  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  提取液过 0.45um 膜,减压浓缩至干,加入过 0.45um 膜的  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  2ml, 0.5ml 作 GC–MS 分析,余下用于生物检测

## 1.4 提取液的 GC–MS 分析

2 周提取液于中国科学院感光化学研究所质谱室测定 GC 型号为 HP5890 毛细管柱: DB–5 柱和 Carowax 柱 (30m× 0.25mm),进样口 240℃,柱温 50℃ (2min),以 6℃/min 程序升温至 250℃ (保持 15min) 载气为  $\text{He}$ ,流量 1ml/min,进样量为 1ul GC–MS 型号是 TRI02000 色谱质谱仪,电子轰击源,扫描范围  $M/Z$  30– 600 AMU,扫描速度 0.2s 扫全程,离子源温度 200℃。计算机检索进行未知物的鉴定 8 周提取液于东北师范大学测试中心质谱室测定 采用 GC6890/MS5973 测定,电子轰击源,扫描范围  $M/Z$  30– 600 AMU,扫描速度 0.2s 扫全程,离子源温度 230℃。毛细管柱: HP–5MS 柱 (Crosslinked 5% pH ME Siloxane, 30m× 0.25mm× 0.25um),进样口温度 250℃,柱温 50℃ (2min),以 6℃/min 程序升温至 250℃ (保持 15min) 载气为  $\text{He}$ ,流量 1ml/min,进样量为 1ul 应用 NIST98 质谱数据库,通过计算机检索进行未知物的鉴定

## 1.5 生物检测

分别用 2 周、8 周提取液进行大豆种子萌发试验 方法是:在直径为 8.5cm 的培养皿中,铺一张定性滤纸,加入 5.0ml 提取液 (每皿含 1 株大豆 1 小时的根分泌物),对照加入二氯甲烷试剂 5.0ml,各处理待溶剂挥发干后,加入  $\text{H}_2\text{O}$  (蒸馏水) 5.0ml,再将 10 粒经消毒稍膨胀 (短时间浸种) 均匀一致的种子放到滤纸上,盖上盖,于 25℃ 恒温培养箱中培养,每天加入 1.0ml  $\text{H}_2\text{O}$ ,种子发芽后记录发芽率及胚根长 重复三次。

2 结果与分析

2.1 大豆根分泌物的化感作用

由表 1可见,大豆根分泌物的二氯甲烷提取物对大豆种子萌发有一定影响。与对照比较,2周大豆根分泌物对大豆种子萌发率虽有影响,但差异未达到显著水平,对胚根生长影响较大,差异达到极显著水平;8周大豆根分泌物对大豆种子萌发没有影响,对胚根生长有一定影响,但差异不显著。上述结果表明,2周与 8周大豆根分泌物组分与数量可能有所不同;2周根分泌物对大豆胚根生长有极显著化感抑制作用,而 8周大豆根分泌物的化感抑制作用不显著。

表 1 大豆根分泌物对大豆种子萌发的影响

Table 1 Effect of soybean root exudates on soybean seeds germination

处理 Treatment	2周 2Week		8周 8Week	
	萌发率	胚根长	萌发率	胚根长
	Germination rate(%)	Radicle length(cm)	Germination rate(%)	Radicle length(cm)
对照 CK	100a	3.97 A	100a	4.76a
根分泌物 Root exudates	90a	3.22B	100a	4.47a

注 (note): t2周发芽率= 0.245; t2周胚根长= 5.952<sup>\*</sup>; t8周胚根长= 0.757;  $\nu = n_1 + n_2 - 2 = 4$ ,  $t_{0.05} = 2.18$ ,  $t_{0.01} = 4.60$

2.2 大豆根分泌物的鉴定

GC- MS分析结果表明: 2周与 8周大豆根分泌物的二氯甲烷提取物种类大体相同, 有有机酸、醇、酯、酮、酚、醛、苯、烃类等物质,但具体组分如有机酸、醇类、酯类等有较大差异,尤其是有机酸类物质 2周较 8周种类多。据报道,一些水溶性有机酸、长链脂肪酸、苯甲酸及其衍生物,直链醇、烯醇、脂肪族醛和酮、苯、酚、一些烃类及其衍生物等低分子有机化合物,对很多植物具有化感作用,被认为是化感物质<sup>[4,9-10]</sup>,但目前对化感物质的复合效应研究还不多。2周大豆根分泌物对大豆胚根生长有极显著抑制作用,表明 2周大豆根分泌物中存在化感物质,或 2周大豆根分泌物的二氯甲烷提取物组分的复合效应对大豆种子萌发过程中的胚根生长具有极显著的化感抑制作用。

3 讨论

3.1 根分泌物的化感作用

据报道<sup>[7,11-13]</sup>,植物通过初生代谢和次生代谢产生的根分泌物,有糖、氨基酸、有机酸、酚、酶及生长刺激物质等。我们的研究表明,根分泌物中除上述种类外,还有醇、酯、酮、醛、烃类等低分子有机化合物。植物次生代谢产生的根分泌物主要用来适应不良环境,且根分泌物中包含很多化感物质<sup>[11-13]</sup>。迄今为止,有关大豆根分泌物及其化感作用的研究工作还不系统,但国内外学者正在做这方面的深入系统研究。由于植物根分泌物的组分复杂,其种类、数量与植物种类、发育阶段、营养丰缺、根际微生态环境及生长环境有密

表 2 2周大豆根分泌物  
Table 2 Soybean root exudates for two weeks

酸类	Acids	酮类	Acetone
乙酸	Acetic acid	2, 2- 二甲基 - 3- 辛酮	2, 2- dimethyl- 3- octanone
6- 甲基庚酸	Heptanoic acid, 6- methyl-	1, 8- 二甲基 - 螺 [4, 5] 癸 - 7- 酮	Spiro [4, 5]decan- 7- one, 1, 8- dimethyl
辛酸	Octanoic acid	酚类	Phenol
11- 溴十一酸	Undecanoic acid, 11- bromo-	2, 6- 二叔丁基甲酚	Butylated hydroxytoluene
12- 甲基十四酸	Tetradecanoic acid, 12- methyl-	炔类	Hydrocarbon
( Z- ) - 7- 十六烯酸	7- Hexadecenoic acid, ( Z) -	癸基环戊烷	Cyclopentane, decyl-
11- 十八烯酸	11- Octadecenoic acid	十一基环戊烷	Cyclopentane, undecyl-
R- ( Z) - 12- 羟基	9- Octadecenoic acid	十一基环己烷	Cyclohexadecane, undecyl-
- 9- 十八烯酸	12- (acetyloxy) - , R- , ( Z) -	1- ( 1, 5- 二甲基己基 ) 环己烷	Cyclohexadecane, 1- ( 1, 5- dimethylhexyl) -
正十六酸	n- Hexadecanoic acid	2- 环己基十一烷	Undecane, 2- cyclohexyl-
十八酸 (硬脂酸)	Octadecanoic acid	十五烷	Pentadecane
邻苯二甲酸	1, 2- Benzenedicarboxylic acid	十六烷	Hexadecane
醇类	Alcohol	1, 2- 二乙基环十六烷	Cyclohexadecane, 1, 2- dimethyl-
1- 十八醇	1- Octadecanol	2, 6, 10, 14- 四甲基十六烷	Hexadecand, 2, 6, 10, 14- tetramethyl-
2- 甲基 - 1- 十六醇	1- Hexadecanol, 2- methyl-	十七烷	Heptadecane
3, 7, 11, 15- 四甲基十六醇	1- Hexadecanol, 3, 7, 11, 15- tetramethyl-	十八烷	Octadecane
1- 二十一醇	1- Heneicosanol	2- 甲基十八烷	Octadecane, 3- methyl-
1- 二十五醇	1- Pentacosanol	十九烷	Nondecane
1- 二十二烷三醇	1- Doconsanethio	二十烷	Eicosane
酯类	Ester	环二十烷	Cycloeicosane
13- 十四烯 - 1- 醇乙酸酯	13- tetradecen- 1- ol, acetate	二十一烷	Heneicosane
1- 二十二醇乙酸酯	1- docosanol, acetate	二十二烷	Docosane
异邻苯二甲酸二烯丙酯	Diallyl isophthalate	二十三烷	Tricosane
邻苯二甲酸癸基辛酯	1, 2- Benzenedicarboxylic, decyloctyl ester	环二十四烷	Cyclotetracosane
邻苯二甲酸二异辛酯	1, 2- Benzenedicarboxylic, disooctyl ester	11- 癸基二十四烷	Tetracosane, 11- decyl-
邻苯二甲酸癸基辛酯	1, 2- Benzenedicarboxylic, decylhexyl ester	二十七烷	Heptacosane
邻苯二甲酸异癸基辛酯	1, 2- Benzenedicarboxylic, isodecyl octyl ester	1- 十七烯	1- Heptadecene
邻苯二甲酸双 - 1- 甲基戊酯	1, 2- Benzenedicarboxylic, bis ( 1- methylpentyl) ester	1- 十八烯	1- Octadecene
醛类	Aldehydes	1- 二十烯	1- Eicosene
棕榈醛	Palmitaldehyde, diallyl, acetal	1- 二十三烯	1- Tricosene
9- 十八烯醛	9- Octadecenal	Z- 12- 二十五烯	Z- 12- Pentacosene
		1- 二十六烯	1- Hexacosene
		Z- 12- 二十七烯	Z- 12- Pentacosene

表 3 8周大豆根分泌物  
Table 3 Soybean root exudates for eight weeks

酸类	Acids	烃类	Hydrocarbon
n- 十八烷基 - 三氟乙酸	Trifluoroacetic acid, n- octadecyl	2, 6, 11- 三甲基十二烷	Dodecane, 2, 6, 11- trimethyl-
醇类	Acidol	1, 1'- 双氧十二烷	Didecane, 1, 1'- oxybis-
2- (十四烷基)乙醇	Ethanol, 2- (tetradecyloxy)-	十三烷	Tridecane
2- (氧代十四烷基) - 乙醇	Ethanol, 2- (tetradecyloxy)-	3- 甲基十三烷	Tridecane, 3- methyl-
2- (十八烷氧基)乙醇	Ethanol, 2- (octadecyloxy)-	十四烷	Tetradecane
顺 - 1, 1- 二甲基环己醇	Cyclohexanol, 1, 3- dimethyl-, cis-	环十四烷	Cyclotetradecane
2- 己基 - 1- 癸醇	1- Decanol, 2- hexyl-	1, 7, 11- 三甲基环十四烷	Cyclotetradecane, 1, 7, 11- trimethyl
2- 乙基 - 1- 十二醇	2- Ethyl- 1- dodecanol	十五烷	Pentadecane
2- 甲基 - 1- 十六醇	1- Hexadecanol, 2- methyl-	Z- 8- 十六烷	Z- 8- Hexadecene
1- 十七醇	1- Heptadecanol	9- 辛基 - 十六烷	Heptadecane, 9- octyl-
1- 二十醇	1- Tetracosanol	2, 6, 10, 14- 四甲基十六烷	Hexadecane, 2, 6, 19, 14- tetramethyl-
1- 二十一醇	1- Heneicosanol	1- 氯十六烷	Hexadecane, 1- chloro-
1- 二十五醇	1- Heneicosanol	三氟乙氧十六烷	Trifluoroacetoxy hexadecane
1- 二十六醇	1- Hexacosanol	2- 甲基十七烷	Heptadecane, 2- methyl-
1- 十八烷三醇	1- Octadecanethiol	9- 辛基十七烷	Heptadecane, 9- octyl-
酯类	Ester	1- 十八烷	1- Octadecene
13- 十四碳烯 - 1- 醇乙酸酯	13- Tertadecen- 1- ol acetate	3- 甲基十八烷	Octadecane, 3- methyl-
1- 二十二烷醇乙酸酯	1- Docosanol, acetate	十九烷	Nonadecane
膦酸双十八烷基酯	Phosphonic acid, dioctadecyl ester	1- 氯十九烷	Nonadecane, 1- chloro-
二丁基膦酸酯	Dibutyl phthalate	二十烷	Eicosane
双 n- 辛基膦酸酯	Di- n- octyl phthalate	二十一烷	Heneicosane
酮、醛类	Acetone, Aldehydes	11- 环戊基二十一烷	Heneicosane, 11- cyclopentyl-
3- 甲基 - 1- (硫基) - 丁 - 2- 酮	3- Methyl- 1- (phenylthio) butan- 2- one	二十二烷	Docosane
(E) - 2- 十三醛	2- Tridecenal, (E)-	4- 甲基二十二烷	4- Methyldocosane
Z- 9- 十四醛	Z- 9- Tetradecenal	2- 甲基二十三烷	Tricosane, 2- methyl-
苯	Benzebe	二十四烷	Tetracosane
硝基苯	Benzene, nitro-	二十五烷	Heneicosane
烃类	Hydrocarbon	二十六烷	Hexacosane
三氟二十二烷基硅烷	Si lane, trichlorodocosyl-	二十七烷	Heptacosane
2- 乙氧基丁烷	Butane, 2- ethoxy-	1- 氯二十七烷	Heptacosane, 1- chloro-
2, 2- 二甲基庚烷	Heptene, 2, 2- dimethyl-	二十八烷	Octacosane
3, 7- 二甲基庚烷	Decane, 3, 7- dimethyl-	环二十八烷	Cyclooctacosane
1, 1'- 双氧辛烷	Octane, 1, 1'- oxybis-	三十四烷	Tetratriacontane
6- 乙基 - 2- 甲基辛烷	Octane, 6- ethyl- 2- methyl-	乙氧基乙烯	Ethene, ethyloxy-
2, 2, 4, 4, 6, 8, 8- 七甲基壬烷	Nonane, 2, 2, 4, 4, 6, 8, 8- heptamethyl-	Z- 8- 十六烯	Z- 8- Hexadecene
5- 丁基壬烷	Nonane, 5- butyl-	1- 十七烯	1- Heptadecene

(续表 3)

3- 甲基 - 5丙基壬烷	Nonane, 3-methyl-5-propyl-	1- 十八稀	1- Octadecene
2- 溴 - 5- 乙基壬烷	Nonane, 2-bromo-5-ethyl-	2- 甲基 - 7- 十九稀	2- Methyl- 7- nonadecene
3, 7- 二甲基癸烷	Decane, 3, 7- dimethyl-	1- 二十稀	! - Eicosene
2, 9- 二甲基十一烷	Undecane, 2, 9- dimethyl-	1- 二十三稀	1- Tricosene
十二烷	Dodecane	1- 二十六稀	1- Hexacosene
3- 甲基十二烷	Dodecane, 3- methyl-		

切关系<sup>[7, 11- 14]</sup>,为经济高效的研究问题,规范研究方法和手段,根据研究目的选定根分泌物的特异部分作为研究对象,深入研究根系分泌物的种类、影响因素及根分泌物的化感作用是一有效途径.在研究中不仅要明确根分泌物的复合化感作用,还应明确某种大豆根分泌物的化感抑制作用.我们在实验中发现,2周大豆根分泌物对大豆种子胚根生长有显著化感抑制作用,而其中有机酸组分中的邻苯二甲酸,对胚根生长亦表现出显著或极显著的化感抑制作用(表 4).

表 4 邻苯二甲酸对大豆发芽率及胚根生长的影响 (PLSD检验<sup>[9]</sup>)

Table 4 Effect of 1, 2- Benzenedicarboxylic acid on soybean germination rate and radicle growth (PLSD test<sup>[9]</sup>)

处理浓度 Treatment density (mM )	发芽率 Germination rate(% )	差异显著性 Significance % 5%	处理浓度 Treatment density (mM )	胚根长 Radicle length( cm)	差异显著性 Significance % 5%
0. 1	100	-	0. 05	4. 06	A
0	100	-	0	3. 56	A
0. 05	100	-	0. 1	3. 49	AB
0. 5	100	-	0. 5	2. 90	BC
1. 0	100	-	1. 0	2. 74	CD
2. 0	100	-	2. 0	2. 07	D
5. 0	98	-	5. 0	1. 43	D

备注 (note): 胚根长 = 30. 0 \* , F<sub>0. 05</sub> = 2. 85, F<sub>0. 01</sub> = 4. 46, m = 6, n = 144;

PLSD胚根长 0. 05 = 0. 56, PLSD胚根长 0. 01 = 0. 76, df = 14

3. 2 大豆根分泌物与大豆连作障碍

我们对连作、轮作大豆根际及根区土壤有机化合物的鉴定结果表明,连作大豆土壤中包含很多化感物质,并表现出化感作用,但其中的化感物质是否来自根分泌物,或有哪些是来自根分泌物,还有待进一步深入研究.人们推测,大豆根分泌物可能刺激某些有害微生物的生长和繁殖,使下茬大豆病害发生加重,从而产生大豆连作障碍.因此,为了明确大豆根分泌物在大豆连作障碍中的作用,还应进一步探明有关大豆根系分泌物及连作土壤中化感物质的种类及其化感作用与连作障碍的关系尤其是与连作土壤有害微生物的关系等问题.

参 考 文 献

1 Rice EL. Allelopathy. And Ed, Academic Press, Orlando, 1984  
2 Rice EL. In Putnam AR, Tang CS(des). The Science of Allelopathy, John Wiley & Sons, New York, 1986, 23

- 3 王大力, 豚草属植物化感作用研究综述, 生态学杂志, 1995, 14(4): 48– 53
- 4 余叔力, 孙文浩, 植物生理与分子生物学, 科学出版社, 1998, 699– 720
- 5 张福锁, 土壤与植物营养研究新动态 (第一卷), 北京农业大学出版社, 1992, 64
- 6 陆景陵主编, 植物营养学 (上册), 北京农业大学出版社, 1994, 109– 111
- 7 杜英君, 靳月华, 连作大豆植株化感作用的模拟研究, 应用生态学报, 1999, 10(2): 209– 212
- 8 许艳丽, 韩晓增, 大豆重茬障碍研究, 哈尔滨工程大学出版社, 1995, 78– 83
- 9 毛达如主编, 植物营养研究方法, 北京农业大学出版社, 1994, 12– 26, 184– 192
- 10 孙文浩, 余叔文, 相生相克效应及其应用, 植物生理学通讯, 1992, 28(2): 81– 87
- 11 李扬瑞, 植物的生化互作现象, 土壤, 1993, 5: 248– 251, 259
- 12 吴辉, 郑师章, 根分泌物及其生态效应, 生态学杂志, 1992, 11(6): 42– 47
- 13 刘素萍, 扬之为, 根系分泌物, 生态农业研究, 1998, 6(2): 34– 36
- 14 牟金明, 李万辉等, 根系分泌物及其作用, 吉林农业大学学报, 1996, 18(4): 114– 118

## IDENTIFITION AND STUDY ON ALLELOPATHY OF SOYBEAN ROOT EXUDATES

Han Limei<sup>1</sup>   Wang Shuqi<sup>1</sup>   Ju Huiyan<sup>1</sup>   Yan Fei<sup>1</sup>   Li Guoquan<sup>1</sup>  
Liu Jinping<sup>1</sup>   Yan Jichang<sup>2</sup>

(1. *Department of Agronomy, Quartermaster University of PLA, Changchun 130062*

2. *Mass Spectrographic Laboratory of Northeast Normal University, Changchun 130061*)

**Abstract** Compounds extracted with dichloromethane from soybean root exudates for two weeks, eight weeks in water- culture were identified and allelopathy were studied by GC- MS analysis. The results showed that The soybean root exudates extracted with dichloromethane included organic acide, alcohol, ester, acetone, aldehyde, phenol, pheyl, hydrocarbon and so on. Many of which were reported as allelochemicale. Contrast with control, the influence of the soybean root exudates for two weeks, eight weeks on the germination of soybean seeds, for eight weeks on radicle growth did not show significant allelopathy inhibition. But the allelopathy of the soybean root exudates for two weeks on soybean radicle growth showed significant inhibition. The results showed that the allelochemicals exist in the soybean root exudates. The varieties and quantities of soybean root exudates for two weeks are different with those for eight weeks. In addition, the alleleopathy of soybean root exudates and the relationship between soybean root exudates and barrier on soybean continuous and alternate cropping were discussed.

**Key words** Soybean; Root exudates; GC- MS Allelopathy