

吸附树脂提取的大豆根分泌物 种类的 GC—MS 分析*

韩丽梅 王树起 鞠会艳 阎 飞

(解放军军需大学农副业生产系, 长春 130062)

摘要 采用 GC—MS 分析法, 鉴定了 XAD—4 吸附树脂连续提取所获得的大豆根分泌物的种类, 并研究了化感物质(邻苯二甲酸)对大豆幼苗生长的化感作用。结果表明: 根分泌物连续捕获系统(XAD—4 吸附树脂)获得的根分泌物种类丰富, 主要是长链脂肪酸、苯甲酸及其衍生物, 直链醇、烯醇、酚、酮、苯胺、酯和一些烃类及其衍生物等有机化合物, 其中很多都被报道是化感物质。在一定浓度范围内, 邻苯二甲酸对大豆幼苗生长具有显著的化感抑制作用。表明大豆根分泌物中存在抑制大豆幼苗生长的化感物质, 由此可引发大豆连作障碍。

关键词 大豆; 根分泌物; GC—MS 分析; 化感作用; 化感物质; 吸附树脂

中图分类号 S 565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000—9841(2003)04—0301—05

关于大豆重迎茬障碍的原因, 许多学者在土壤养分、土壤物理化学性质、土壤生物、植物的毒素物质等方面已进行了有益探索^[1-5], 取得了较好的研究成果, 但在理论上仍未完全探明大豆重迎茬障碍的原因。植物在逆境胁迫下, 往往通过化学手段向环境释放化学物质提高其自身生存竞争力^[6]。因此, 研究重迎茬大豆的化感作用(Allelopathy)对揭示大豆重迎茬障碍机理可能是一条重要途径^[7-8]。根系分泌物是植物产生化感物质的主要方式之一^[9-12], 杜英君等采用组培技术在无菌条件下研究了大豆根系分泌物对大豆苗的化感作用, 结果表明, 大豆根系分泌物对“下茬”大豆苗的生长和某些生理活性均有显著影响, 产生了“连作障碍”^[13]。但关于大豆根系分泌物中的化感物质种类研究很少^[14], 本文采用 GC—MS 分析法鉴定了吸附树脂提取的大豆根分泌物组成成分, 揭示其中的化感物质种类, 并对根分泌物中的重要化合物——邻苯二甲酸的化感作用进行了研究, 旨在为进一步研究大豆根系分泌物在大豆连作障碍中的作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 吸附树脂连续捕获的根分泌物成分的鉴定

1.1.1 供试材料: 吸附树脂采用美国 Sigma 公司的 Amberlite XAD—4 型树脂; 硅烷化试剂(BSTFA)购自美国 Sigma 公司; 试剂甲醇、丙酮、乙腈、乙醚、吡啶、二氯甲烷等均为国产分析纯; 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, 使用前用饱和 CaSO₄ 溶液浸润; 营养液采用 Hoagland(B)—Amon 混合液配方^[15], 采用塑料盆(容量 10L)培养, 带孔塑料板作盖板; 大豆品种为吉林 30 号。

1.1.2 大豆培养方法: 将 10% H₂O₂ 消毒过的大豆种子播于处理过的石英砂中, 在 20~25℃ 条件下避光发芽, 当子叶露出后照光培养。第一片真叶露出时, 取出生长均一的幼苗, 用去离子水轻轻洗去石英砂后, 置于二个盛 1/3 强 Hoagland(B)—Amon 混合营养液(pH 值 6.2)的培养器中定植。每孔定苗 1 株, 每培养器定苗 50 株。每 3 天换一次营养液, 定植后的 4~6 天供应 1/2 强营养液, 7 天后供应完全营养液。采用自动定时通气泵通气(通气 10min, 停 10min)。培养温度夜 18~20℃, 昼 23~25℃。用农艺钠灯照明, 光照度为 6000Lx。

1.1.3 树脂的预处理: 将新购置的 XAD—4 吸附树

* 收稿日期: 2003—04—08

基金项目: 国家“九五”科技攻关重中之重点项目(G95—001—05)资助。

作者简介: 韩丽梅(1963—), 女, 博士, 副教授, 主要从事逆境植物营养生态方面的研究。E-mail: caiyunzhuiyue23@sohu.com

脂用去离子水冲洗多次后,置于索氏提取器中,分别用丙酮、乙腈及乙醚抽提 24h,然后用玻器蒸馏的甲醇将残留的抽提剂洗净,将洗净的树脂避光低温保存在甲醇中备用^[16]。

1.1.4 根分泌物的提取:将洗净的树脂用湿法装入层析柱(柱直径 35mm,高度 300mm,装柱高度 190mm,树脂用量为 175ml),用去离子水将残存的甲醇洗去,用水量约为柱床体积的 10—15 倍。在幼苗生长至 20 天时,将树脂柱连接到根分泌物连续收集系统中,大豆培养液流速为 25ml/min,每天补充失去的水分,连续收集 3 天,取下树脂柱,立即用 12 倍柱床体积的去离子水清洗层析柱中的营养液成分,再用 15 倍柱床体积玻器蒸馏的甲醇洗脱根分泌物。洗脱液于 45℃减压浓缩至干。加入 50ml 去离子水溶解根分泌物,获得水溶性根分泌物、水不溶性根分泌物两个组分。再用 CH₂Cl₂ 依次提取水不溶性根分泌物成分、水溶性根分泌物组分中的中性、酸性、碱性及残留水相中分泌物成分,各组分每次用 CH₂Cl₂100ml,提取 3 次。各组分提取液浓缩至干,再加入 2ml CH₂Cl₂ 溶解根分泌物,过 0.45μm 膜,用于 GC-MS 分析。

1.1.5 根系分泌物的硅烷化:为检测根系分泌物中的不易挥发成分,GC-MS 分析前,将各组分进行硅烷化处理^[17]。方法是:各组分浓缩至干后,加入 2ml CH₂Cl₂ 溶解,取 1ml 冷冻干燥,在冻干的样品中加入 250μl 硅烷化试剂(BSTFA:吡啶=5:1),加盖密封,在 75—80℃水浴中衍生 1 小时。

1.1.6 根分泌物的 GC-MS 鉴定:硅烷化后的各组分根分泌物于东北师范大学测试中心质谱室采用 GC6890/MS5973 测定。采用电子轰击源,轰击电压 70eV,扫描范围 M/Z 30—600AMU,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×0.25μm),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 He,流量 1ml/min,进样量为 1μl。应用 NIST98 质谱数据库检索,人工分析与标准图谱核对,确定各组分物质结构及名称。

1.2 邻苯二甲酸对大豆幼苗生长的化感作用

1.2.1 大豆幼苗液培试验:将精选的大豆种子经 10% H₂O₂ 消毒后,播于处理过的石英砂中,于 25℃ 恒温培养箱中发芽,当根长至 5—7cm 时,小心取出生长均一的幼苗,用蒸馏水轻轻洗去石英砂后,移栽于盛装 1/2 强 Hoagland (B) — Arnon 营养液(pH

6.15)的烧杯(体积为 1.2L)中定植,每孔定植 1 株,每杯定植 5 株。共设 5 个处理,邻苯二甲酸浓度分别为 0、0.01、0.05、0.10、0.20g/L,以相同浓度营养液作对照(不含邻苯二甲酸),重复三次。采用自动定时小型通气泵连续通气,培养温度夜 18—20℃,昼 23—25℃。用农艺钠灯照明,光照度为 6000Lx。每周更换一次营养液。

1.2.2 观测指标及测定方法:测定培养 2 周幼苗的株高、干物质重、根系活力、植物组织逆境伤害程度等指标。根系活力采用甲烯蓝吸附法(张志良,1990),植物组织逆境伤害程度的测定采用电导法(邹琪,1995)。

1.2.3 数据统计分析方法:采用 DPS 统计分析软件对测定值进行方差分析,对 F 检验显著的处理用 Duncan's 新复极差法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 大豆根分泌物的鉴定

由表 1 可见,采用 GC-MS 分析法鉴定了 XAD-4 吸附树脂提取的根分泌物,结果表明:能被 XAD-4 树脂柱提取的大豆根分泌物种类很丰富,峰面积大于 1%,相似度大于 80%的有机化合物有 48 种。含量占绝对优势的物质依次是:十六酸(5 个组分平均含量为 18%)、二-n-辛基邻苯二甲酸酯、十八酸(5 个组分平均含量为 13%)、双-4,4'-(1-甲基亚乙基)酚、邻苯二甲酸、邻苯二甲酸丁基-2-乙基己基酯、丙三醇、(p-乙氧基苯基)-羟基丙二酸、3,4-二氯苯甲酸、二十六烷、1-二十六烯。表 1 中的一些化合物,被报道是化感物质^[7, 18, 19]。

2.2 邻苯二甲酸对大豆幼苗的化感作用

大豆根分泌物的二氯甲烷提取物及邻苯二甲酸对大豆胚根生长具有显著的化感抑制作用^[14],本研究中,邻苯二甲酸在各检测组分中多次出现,且含量较高,因此,进一步探讨了邻苯二甲酸对大豆幼苗根系活力、组织逆境伤害程度、生物量的影响。

植物根系的活跃吸收面积直接关系到根系吸收养分和水分能力的大小,活跃吸收面积大,则吸收能力强,反之,吸收能力弱。不同浓度邻苯二甲酸处理的大豆根系活力测定结果见表 2。由表 2 可见,随着邻苯二甲酸浓度的增加,大豆幼苗根系总吸收面积、活跃吸收面积均降低,而且活跃吸收面积占总吸收面积的比例较对照显著降低。

表1 吸附树脂提取的3周大豆根分泌物

Table 1 Chemical compounds extracted with XAD-4 resin from root exudates of soybean growing for three weeks

大豆根分泌物	Soybean root exudates	大豆根分泌物	Soybean root exudates
(p-乙氧基苯基)-羟基丙二酸	Tartronic acid, (p-ethoxyphenyl)-	Z-13-十八烯酸甲酯	13-Octadecenoic acid, methyl ester (Z)-
7-氧代辛酸	Octanoic acid 7-oxo-	E-8-甲基-9-十四烯-1-醇乙酸酯	E-8-Methyl-9-tetradecen-1-ol acetate
1-萘戊酸	1-Naphthalenepentanoic acid	9-甲基-Z-10-十四烯-1-醇乙酸酯	9-Methyl-Z-10-tetradecen-1-ol acetate
双(2-乙基己基)十六酸	Hexanedioic acid(2-ethylhexyl-)	二乙基邻苯二甲酸酯	Diethyl phthalate
十六酸	Hexadecanoic acid	二-n-辛基邻苯二甲酸酯	Di-n-octyl phthalate
十八酸	Octadecanoic acid	邻苯二甲酸二丙基酯	1,2-Benzenedicarboxylic acid, dipropyl ester
11-反-十八碳烯酸	11-trans-Octadecenoic acid	邻苯二甲酸丁基-2-乙基己基酯	1,2-Benzenedicarboxylic acid, butyl 2-ethylhexyl ester
11-顺-十八碳烯酸	11-cis-Octadecenoic acid	邻苯二甲酸二丁酯	Dibutyl phthalate
(Z,Z)-9,12-十八碳二烯酸	9,12-Octadecadienoic(Z,Z)-	邻苯甲酸二乙基乙二酯	Diethylene glycol dibenzoate
(Z,Z)-叔丁基-9,12-十八碳二烯酸	9,12-Octadecadienoic acid tert-butyl (Z,Z)-	2,2-二甲基-3-戊基环己烷	Cyclohexane, 1,2-dimethyl-3-pentyl
二十酸	Eicosanoic acid	2,6,10-三甲基十五烷	Pentadecane, 2,6,10-trimethyl-
油酸	Oleic acid	1,2-二乙基环十六烷	Cyclohexadecane, 1,2-diethyl-
邻苯二甲酸	1,2-Benzenedicarboxylic acid	2-甲基十八烷	Octadecane, 2-methyl-
3,4-二氯苯甲酸	Benzoic acid 3,4-dichloro-	2,6,10,14,18-五甲基十九烷	Nonadecane, 2,6,10,14,18-pentamethyl-
4,6,22-麦角甾烯三-3,β-醇	Ergosta-4,6,22-trien-3,β-ol	2,6,10,14,18-五甲基二十烷	Eicosane, 2,6,10,14,18-pentamethyl
E-11,13-二甲基-12-十四烯-1-醇	E-11,13-Dimethyl-12-tetradecen-1-ol	二十二烷 二十三烷 Docosane/Triacosane	
丙三醇	Glycerin	二十四烷	Tetracosane
1-二十五醇	1-Pentacosanol	二十五烷	Pentacosane
双-4,4'-(1-甲基亚乙基)酚	Phenol 4,4'-(1-methylethylene)bis-	二十七烷	Heptacosane
N,N-二甲基-.α.-P-甲苯胺	p-Toluidine, N,N-dimethyl-.alpha.-	二十八烷	Octacosane
(Z)-9-十八碳烯酰胺	9-Octadecenamido (Z)-	Z-12-二十五烯	Z-12-Pentacosene
2-硝基-4-甲氧基三氟-N-乙酰苯胺	2-Nitro-4-methoxytrifluoroacetanil	17,21-二甲基三十七烷	17,21-Dimethyl heptatricontane
6,6-二甲基二环[3.1.1]庚-2-酮	Bicyclo[3.1.1]heptan-2-one, 6,6-dimethyl-	1-二十六烯	1-Hexacosene

表2 邻苯二甲酸对大豆根系吸收面积的影响

Table 2 Effect of 1,2-Benzenedicarboxylic acid on root uptake area of soybean

浓度 Concentration (g/L)	根系吸收面积 Root uptake area(m ²)		Active uptake area/Total area (%)
	总吸收面积 Total	活跃吸收面积 Active	
CK	0.7260	0.3277	45.14a A
0.01	0.8576	0.2737	31.92b B
0.05	0.7380	0.2302	31.19b B
0.10	0.2008	0.0431	19.90c C
0.20	0.0557	0.0015	2.69d D

注: 同一列标有不同小写字母的表示处理间差异显著(P<0.05); 标有不同大写字母的表示处理间差异极显著(P<0.01), 以下各表同。
Values with different lowercases in the same row are of significant difference (P<0.05); Values with different uppercases in the same row are of especially significant difference (P<0.01). The following is the same.

由表3可见, 邻苯二甲酸对大豆叶片相对电导率有影响。随着邻苯二甲酸浓度的增加, 常温及冷

冻条件下的大豆叶片相对电导率也增加。表明由于受到邻苯二甲酸的伤害, 大豆苗叶片细胞膜功能受

损或结构破坏而使其透性增加,引起细胞内水溶性物质外渗。

表3 邻苯二甲酸对大豆叶片相对电导率的影响

Table 3 Effect of 1,2-Benzenedicarboxylic acid on the relative electric conductivity of soybean leaves

浓度 Concentration (g/L)	相对电导率 Relative electric conductivity of leaves(%)					
	常温 Normal Temperature			冷冻 Freezing (-20℃)		
	S ₁	S ₂	S ₁ /S ₂ ×100	S ₁	S ₂	S ₁ /S ₂ ×100
CK	110.8	338.8	32.5	110.1	269.0	40.6
0.01	151.3	372.3	41.1	144.8	348.3	41.6
0.05	119.3	278.3	42.8	174.0	429.8	42.1
0.10	202.0	488.3	42.4	145.0	287.8	50.4
0.20	145.5	300.5	48.6	181.2	348.2	52.6

表4 邻苯二甲酸对大豆苗生物量的影响

Table 4 Effect of 1,2-Benzenedicarboxylic acid on the biomass of soybean seedling

浓度 Concentration (g/L)	根干重 Root dry weight		地上部干重 Shoot dry weight		株高 Height	
	(mg)	±%	(mg)	±%	(cm)	±%
CK	74a A	—	140.2a A	—	46.3a A	—
0.01	68ab A	-8.1	132.9a AB	-5.2	44.3a AB	-4.3
0.05	67ab A	-9.4	114.5b BC	-18.3	41.6ab AB	-10.2
0.10	66ab A	-10.8	96.3c C	-31.3	37.8b B	-18.4
0.20	60b A	-18.9	48.7d D	-65.2	20.0c C	-56.8

培养2周的大豆幼苗株高、根系及地上部干物质重见表4。可以看出,大豆幼苗的干物重和株高随着邻苯二甲酸浓度的增加而降低,与对照相比,邻苯二甲酸处理使大豆根干重降低了8.1%—18.9%,地上部干重降低了5.2%—65.2%,株高下降了4.3%—56.8%。其中0.01g/L的邻苯二甲酸处理,与对照比较差异不显著,说明低浓度的邻苯二甲酸对大豆幼苗生物量没有明显的抑制作用。但当浓度达0.05g/L时,对地上部干物质积累表现出显著抑制作用,浓度为0.10g/L时使株高显著降低,浓度为0.20g/L时对根生长表现出显著抑制作用。说明大豆根系分泌的邻苯二甲酸达到一定浓度时就能对大豆植株的生长发育产生显著的毒害作用。

上述结果表明,邻苯二甲酸显著降低了大豆幼苗根系活力,使大豆根系吸收养分和水分的能力下降,并破坏了大豆幼苗叶片细胞膜的稳定性,降低了抗逆性,最终导致大豆苗生长发育受阻,植株生长矮小,植株干物质积累量减少,生物产量下降。

3 讨论

3.1 根分泌物两种提取方法的比较

采用二氯甲烷^[14]、吸附树脂两种方法提取液培养大豆根分泌物,研究大豆根分泌物中化感物质的种类均取得了良好效果。二氯甲烷提取的大豆根分泌物是大豆在0.5mmol/LCaCl₂溶液生长介质中生长

4h的分泌物,避免了在纯水介质培养条件下,收集根分泌物产生的渗透势方面的不利影响,但与在正常营养液中生长获得的根分泌物还有一定区别。而采用XAD-4吸附树脂连续捕获系统收集大豆根分泌物,由于是在正常营养液中生长,生长周期长(3个昼夜),收集到的根分泌物与客观实际更接近,因此,提取的化感物质种类和数量明显增多,提取效率提高。

3.2 大豆根分泌物与连作障碍

据报道^[19-22],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。本研究表明,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,其中包含多种化感物质。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,并对大豆胚根生长表现出化感抑制作用^[23],其种类与大豆根分泌物种类接近,但其中的化感物质哪些是来自根分泌物,还有待进一步深入研究。研究还发现,连作大豆根分泌物对大豆根腐病菌生长有一定促进作用^[24],因此,大豆根分泌物中可能存在刺激根腐病菌生长的物质,进而使下茬大豆根腐病害发生加重,产生大豆连作障碍。为了明确大豆根分泌物在大豆连作障碍中的作用,不仅应探明大豆根分泌物对大豆生育的影响,还应探明大豆根系分泌物与连作土壤有害微生物的关系等问题。明确连作条件下根系分泌物的种类与轮作条件下的异同,才能揭示根系分泌物对连作障

碍的影响。

参 考 文 献

- 1 王震宇, 王英祥, 陈祖仁. 重茬大豆生长发育障碍机制初探[J]. 大豆科学, 1991, 10(1): 31-36.
- 2 于广武, 许艳丽, 刘晓冰, 等. 大豆连作障碍机制研究初报[J]. 大豆科学, 1993, 12(3): 237-243.
- 3 计钟程, 许文芝. 重茬大豆减产与土壤环境变化[J]. 大豆科学, 1995, 14(4): 321-329.
- 4 赵淑英, 赵九洲, 陈洁敏, 等. 连作对大豆生理生化特性的影响[J]. 大豆科学, 1995, 14(2): 113-118.
- 5 王光华, 许艳丽. 大豆根浸提液生化它感现象的研究[A]. 见: 许艳丽、韩晓增主编, 大豆重迎茬研究[C]. 哈尔滨: 哈尔滨工程大学出版社, 1995, 73-77.
- 6 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[J]. 生态学报, 2000, 20(9): 849-854.
- 7 余叔文, 孙文浩. 植物的它感作用. 见: 余叔文、汤章城主编, 植物生理及分子生物学[M]. 北京: 科学出版社, 1998, 699-717.
- 8 阎飞, 韩丽梅, 杨振明. 论大豆连作障碍中有关化感作用(Allelopathy)研究的若干问题[J]. 大豆科学, 2000, 19(3): 269-274.
- 9 高子勤, 张淑香. 连作障碍与根际微生态研究I. 根系分泌物及其生态效应[J]. 应用生态学报, 1998, 9(5): 549-554.
- 10 李绍文. 生态生物化学(二): 高等植物之间的生化关系[J]. 生态学杂志, 1989, 8(1): 66-70.
- 11 沈宏, 严小龙. 根分泌物研究现状及其在农业与环境领域的应用

- [J]. 农村生态环境, 2000, 16(3): 51-54.
- 12 Chou CH. Allelopathic substances and activities of delonix regia root[J]. J Chem Ecol, 1992, 18: 353-367.
- 13 杜英君, 靳月华. 连作大豆植株化感作用的模拟研究[J]. 应用生态学报, 1999, 10(2): 209-212.
- 14 韩丽梅, 王树起, 鞠会艳等. 大豆根分泌物的鉴定及其化感作用的初步研究[J]. 大豆科学, 2000, 19(2): 119-125.
- 15 毛达如. 植物营养研究方法[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1994, 12-26.
- 16 Tang C S, Young C C. Collection and identification of allelopathic compounds from the undisturbed root system of bigalga limpograss(Hemarthria altissima.)[J]. Plant Physiol, 1982, 69: 155-160.
- 17 常理文, 余兆楼, 王维通等. 尿中有机酸类代谢物的气相色谱-质谱分析[J]. 色谱, 1990, 8(1): 12-15.
- 18 孙文浩, 余叔文. 相生相克效应及其应用[J]. 植物生理学通讯, 1992, 28(2): 81-87.
- 19 李扬瑞. 植物的生化互作现象[J]. 土壤, 1993(5): 248-251, 259.
- 20 吴辉, 郑师章. 根分泌物及其生态效应[J]. 生态学杂志, 1992, 11(6): 42-47.
- 21 牟金明, 李万辉. 根系分泌物及其作用[J]. 吉林农业大学学报, 1996, 18(4): 114-118.
- 22 刘素萍, 扬之为. 根系分泌物[J]. 生态农业研究, 1998, 6(2): 34-36.
- 23 阎飞, 韩丽梅, 孙衍, 等. 大豆连作土壤中化感物质浸提剂的生物筛选[J]. 吉林农业科学, 2000, 25(1): 7-11.
- 24 鞠会艳, 韩丽梅, 王树起, 等. 连作大豆根分泌物对根腐病原菌的化感作用[J]. 应用生态学报, 2002, 13(6): 723-727.

GC-MS ANALYSIS ON THE KINDS OF SOYBEAN ROOT EXUDATES EXTRACTED WITH ADSORPTION RESIN

Han Limei Wang Shuqi Ju Huiyan Yan Fei

(Agronomy Department of the Quartermaster University of PLA, Jilin Changchun 130062)

Abstract Soybean root exudates extracted with XAD-4 resin were identified by GC-MS method, and the allelopathy of chemical compounds (1,2-benzenedicarboxylic acid) on soybean seedling were investigated in this study. The results showed that root exudates extracted with XAD-4 resin was identified as long-chain fatty acids, benzoic acids and its derivatives, straight-chain alcohol, enol, phenol, ketone, ester and some hydrocarbon, most of which were also allelopathic compounds reported. In certain range of concentrations, the 1,2-benzenedicarboxylic acid significantly inhibited the growth of soybean seedlings. The results showed that soybean root exudates contained allelopathic compounds that inhibited seed germination and seedlings growth, and this might cause soybean continuous cropping barriers.

Key words Soybean; Root exudates; GC/MS analysis; Allelopathy; Allelopathic compounds; Adsorption resin