

凤丹 (*Paeonia ostii* T.) 自毒物质的检测及其作用机制

覃逸明, 聂刘旺*, 黄雨清, 王 千, 刘 欣, 周 科

(安徽师范大学生命科学院; 安徽省重要生物资源保护与利用研究重点实验室, 安徽芜湖 241000)

摘要: 药用牡丹的种植中存在明显的连作障碍现象, 为探讨其机制, 利用已萌发长根的凤丹 (*Paeonia ostii*) 种子对凤丹根际土壤和根的水浸提液进行了自毒化感检测; 采用高效液相色谱法 (HPLC) 对种植 4a 的凤丹根际土壤及其根皮中的化感自毒物质进行了定性和定量分析; 在此基础上, 利用外源法研究了盆栽凤丹幼苗对 5 种检出物质 (阿魏酸、肉桂酸、香草醛、香豆素和丹皮酚) 及其混合物在 3 种不同浓度下对植株生长的影响和生理响应。结果表明: (1) 连续种植 4a 的凤丹根际土壤和根浸提液对已萌发种子根的生长有显著的抑制作用 ($p < 0.05$), 显示凤丹根分泌物具有自毒化感的潜势; (2) HPLC 分析表明在凤丹根际土壤中存在 5 种以上的酚酸类物质 (阿魏酸、肉桂酸、香草醛、香豆素和丹皮酚), 其中阿魏酸、肉桂酸、香草醛、香豆素为前人已报道的化感物质; (3) 在实验室条件下, 所设浓度范围内, 5 种物质及其混合物对凤丹幼苗的高度、根长及地下和地上生物量均有明显影响, 尤其对根长和地下生物量的影响最为明显 ($p < 0.05$), 此结果与连作移栽幼苗时, 根部首先发黑死亡的现象相一致; (4) 凤丹幼苗的根系活力和叶绿素含量在各处理中表现出相似性, 即低浓度时根系活力和叶绿素含量高, 高浓度时根系活力和叶绿素含量低, 低浓度的阿魏酸和香草醛对幼苗根系活力和叶绿素合成有促进作用。此结果显示自毒物质可能是通过影响根系酶活性和叶绿素合成来影响群体中其它个体的生长。本实验的结果显示栽培 4a 的凤丹土壤水浸液具有抑制自身种子根系生长的活性, 此提示栽培凤丹连作障碍可能主要与自身分泌到土壤中的酚酸类物质的自毒作用有关。

关键词: 凤丹 (*Paeonia ostii* T. Hong et J. X. Zhang); 自毒作用; 自毒物质; 作用机制

文章编号: 1000-0933 (2009) 03-1153-09 中图分类号: S567.1+5 文献标识码: A

Detection of *Paeonia ostii* autotoxins and their mechanism

QIN Yi-Ming, NIE Liu-Wang*, HUANG Yu-Qing, WANG Qian, LIU Xin, ZHOU Ke

College of Life Sciences, Anhui Normal University; The Provincial Key Lab. of the Conservation and Exploitation Research of Biological Resources in Anhui, Wuhu 241000, China

Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(3): 1153 ~ 1161.

Abstract: The obvious continuous cropping obstacles have been observed in *Paeonia ostii* planting. In order to understand this phenomenon, the present work studied the autotoxic potential of rhizosphere soil and root extract of *Paeonia ostii* on itself seedlings. Then, the extracts of rhizosphere soil and root bark of four years old *Paeonia ostii* were qualitatively and quantitatively analyzed with high performance liquid chromatography (HPLC). Based on the examined results, we researched the effects of five exogenous autotoxins of ferulic acid, cinnamic acid, vanillin, coumarin, paeonol and their mixture at three different concentrations and physiological responses on *Paeonia ostii* seedlings growth with pot-culture. The results showed that: (1) The aqueous extracts of rhizosphere soil and root could inhibit the root growth of *Paeonia ostii* seedlings ($p < 0.05$). These indicated that, under the controlled laboratory conditions, *Paeonia ostii* presented an allelopathic potential against itself; (2) Five phenolic compounds of ferulic acid, cinnamic acid, vanillin, coumarin and paeonol were detected and measured by HPLC in the rhizosphere soil and root bark of *Paeonia ostii*, and ferulic acid, cinnamic acid, vanillin and coumarin were reported previously as allelopathic substances; (3) Under controlled sand culture in laboratory, the height, root length, aboveground and underground biomass of *Paeonia ostii* seedlings could be

基金项目: 安徽省高校重点实验室基金资助项目; 安徽省科学与技术后备人选基金资助项目 (2006-5)

收稿日期: 2008-10-04; 修订日期: 2008-12-02

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: lwnie@mail.ahnu.edu.cn

affected by adding five substances and their mixtures in various concentrations. The growth indexes of seedlings were inhibited in moderate and higher concentration treatments, especially on root length and underground biomass, but ferulic acid and vanillin could stimulate seedlings growth in lower concentrations. The results were the accordant with observational phenomena in field that the root discolored and became putridity little by little when seedlings were transplanted in condition of continuous cropping; (4) The variability of root activities and chlorophyll contents of seedlings in all treatments were homologue, namely that root activities and chlorophyll contents were higher in lower concentration, inversely, they were lower when concentrations became higher, but there were stimulatory on root activity and chlorophyll contents of *Paeonia ostii* seedlings with lower concentration of ferulic acid and vanillin. These results revealed that the aqueous extracts from rhizosphere soil and root for 4 years could inhibit the root growth of its own seedlings, and suggested that the action of continuous cropping obstacles may relate with the autotoxic substances of phenolic compounds which come from itself exudates of root.

Key Words: *Paeonia ostii* T. Hong et J. X. Zhang; autotoxicity; autotoxic substances; mechanism

凤丹(*Paeonia ostii* T. Hong et J. X. Zhang) 是芍药科一种多年生药用牡丹,源植物为杨山牡丹,主要分布于安徽省铜陵凤凰山和南陵西山一带,故称“凤丹”^[1]。凤丹根皮俗称凤丹皮,为我国传统道地药材,每年有较大数量的出口。凤丹皮富含丹皮酚等多种生物活性物质,现代药理学研究表明,凤丹皮有抗菌抗病毒、抗炎、降血糖和抑制癌细胞增殖等作用^[2]。调查研究表明,在药用牡丹的种植中存在着明显的连作障碍现象,一般栽种过牡丹的地块,需要间隔 3~5a 才能再种,而连续种植,则会导致种子不能萌发或移栽幼苗根部腐烂死亡。在药用牡丹的 GAP 生产规范中,明确禁止连作或重茬^[3]。凤丹自移栽幼苗到采挖,需要 5a 的时间,加上间隔 5a,种植凤丹的土地每 10a 才能轮回 1 次,对凤丹的生产有较大的影响。

连作障碍是指在同一土壤中连续栽种同种或同科近缘植物的作物时,即使在正常的栽培管理措施下,也会发生长势变弱、产量和品质下降的现象^[4]。连作障碍形成及加重发生的原因是复杂的,其中的重要影响因素包括土传病害、土壤理化性状改变、根系分泌物和残茬腐解物引起的自毒作用等^[5~7]。自毒作用是植物在生长过程中受到来自同种植物产生毒素的抑制,这些毒素通过影响细胞膜透性、酶活性、离子吸收和光合作用等多种途径影响植物生长^[8]。越来越多的研究显示在农林生态系统中,植物根系分泌物和残体腐解毒素所导致的自毒作用是导致连作障碍的主要因子之一^[9~12]。

目前,我国药用牡丹种植连作障碍的机制研究主要集中在土传病虫害方面^[3],而有关自毒作用的研究尚未见报道。本研究通过土壤栽培试验、从种植土壤中分离鉴定相关化合物、并在此基础上,通过模拟实验,研究相关物质对凤丹幼苗的生长和生理影响,探讨凤丹是否存在自毒化感作用及其作用的生理机制,以期缓解凤丹连作障碍、提高种植土地的利用率提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

(1) 土壤和根皮采样 于 2007 年 6 月从安徽省南陵县丫山凤丹种植园采集凤丹根际土壤,采样时按多点标准法^[13],在标准种植地中选取生长均匀一致的种植 4a 的凤丹植株若干,将植株轻轻连根挖出,除去附在其中的大块土壤,抖落附在根系表面上的土壤,混合作为根际土壤样品,对照取从未种植凤丹的休闲地土壤,室温阴干,过 40 目筛,4℃ 保存至使用。根皮采于种植 4a 的凤丹植株健康根系,直径为 4mm 左右,洗净,晾干,剪碎备用。

(2) 采集种子 于 2007 年 8 月从上述种植园采集凤丹种子,进行催苗育种。

(3) 药品与试剂 丹皮酚(纯度 99%)为芜湖威尔塔公司提供,其余试剂为上海国药集团公司出品(分析纯)。

1.2 方法

1.2.1 凤丹的自毒作用检测

取根际土壤和对照土壤样品各 100g,加 100ml 去离子水浸泡 48h,期间不定期振荡,过滤,得到根际土壤浸提液和对照土壤浸提液;取新鲜凤丹 4 年生根 5g,加入 50ml 去离子水,浸泡提取 48h,过滤液用水稀释 50 倍,得到 2mg/ml 根浸液。选取根长度在 (4 ± 0.2) cm 的已萌发凤丹种子,用蒸馏水洗净,均匀放在垫有 3 层滤纸的直径为 12cm 的培养皿中,每皿 5 粒,加入各处理液 10ml,上面再盖一张滤纸(以保持根周围空间的水分),对照组加入 10ml 蒸馏水,25℃ 暗培养,每隔 2d,补充蒸馏水 2ml,培养 15d 后,测量根的长度。每处理重复 5 次。

1.2.2 凤丹根际土壤和凤丹 4a 生根皮中自毒化感物质的检测

土壤样品各取 30g、凤丹根皮 5g,按参考文献的方法^[14],用乙酸乙酯(3 × 50ml)回流提取 24h,提取物浓缩至干,残余物用少量水溶解,用 2 mol L⁻¹ HCl 调节 pH 至 2.0(以除去悬浮物杂质的影响),转入乙酸乙酯中萃取,萃取相浓缩至干,用 4ml 体积分数 80% 甲醇溶液溶解,直接上 HPLC 检测。HPLC 系统为 Shimadzu Model LC-20A,检测柱为 ODS-C₁₈(4.6 × 150 mm),流动相为 80% 的甲醇溶液,流速 0.5 ml·min⁻¹,检测波长为 280 nm,样品采用标准样色谱保留时间进行定性,以峰面积进行定量计算^[15]。

1.2.3 凤丹幼苗盆栽实验设计及生长指标测定

根据 1.2.2 检测结果,本实验设置 5 种被检测到的物质及其混合物共 6 个组,每个组设 3 个浓度,以蒸馏水为对照(表 1),测试各物质的自毒作用。各组分浓度的确定是根据 1.2.2 实验中测定到的凤丹根际土壤中各物质的含量作为参考,每组实验的 3 个浓度中,第 2 个浓度值为土壤中该物质的实际含量,第 1 和第 3 个浓度分别为减少一半和增加一倍的值。

实验用土壤为洗净的河沙并进行灭菌处理,以去除杂质和微生物的影响。每盆沙重 300g,含水量为 60%,将生长均匀一致的风丹小苗沙培于盆中(苗高 4cm,根长 3cm),每盆 1 株,每个处理种植 5 盆。定期浇 Hoagland 培养液,室温培养 1 个月后,将表 1 配制的各溶液,按每盆 100ml 均匀加入盆中,所加入溶液不能渗出。5d 后再定期加入一定量的 Hoagland 培养液,1 个月后,测量幼苗的生长指标和生理指标。

生长指标主要测量:幼苗的高度、根长度、地上部分生物量、地下部分生物量。

1.2.4 生理指标的测定

生理指标主要测定凤丹幼苗的根系活力和叶片的叶绿素含量。

(1)根系活力测定 取幼苗根 0.5g,用 0.4% TTC 溶液和 pH7.0 磷酸缓冲液处理,以四氮唑还原量表示根系活力,TTC 法测定^[16]。

(2)取幼苗叶片 0.5g,研磨,用丙酮黑暗浸提,用分光光度计测定叶绿素含量^[17]。

1.3 数据处理

实验结果进行数理统计,数据为平均数 ± 标准误差(Mean ± SD),利用 SPSS13.0 进行 One-way ANOVA 方差分析,分析各参数在不同处理间的差异,用 Excel 绘图。

2 结果与分析

2.1 凤丹根际土壤自毒作用的生物检测

连续种植 4a 的成熟凤丹植株根际土壤对萌发种子根生长的影响见表 2。从表 2 可以看出,根际土壤水浸液对萌发种子的根长有显著的抑制作用,空白土壤的水浸液则表现出促进作用,抑制最明显的是根浸提液,达到极显著水平。从实验外观上看,凤丹种子的根在根浸液处理中慢慢出现坏死现象,到 15d 后,有一半根长的组织坏死,根际土壤浸提液中的根也有一部分根组织坏死,而对照和空白土壤处理组中的根组织未见坏死。结果说明了:根际土壤和根的水浸液中可能存在一些抑制凤丹种子根的生长,从而对其产生毒害作用。凤丹根际土壤和根的水浸液对凤丹种子萌发率是否产生影响本实验尚未作探讨,其主要考虑到凤丹种子萌发率通常较低,并需要一个很长的休眠期(4 ~ 8 个月),同时在实际生产中,凤丹连作时受毒害最明显的是其药用器

官根部^[2,3]。

表 1 5 种化感物质溶液的配制
Table 1 Preparing for Five allelopathic substances

实验组 (No.) Experiment group	物质名称 Name	实验编号 Experiment number	添加物质浓度 Substances concentration (μg/g)	实验组 (No.) Experiment group	物质名称 Name	实验编号 Experiment number	添加物质浓度 Substances concentration (μg/g)
1	阿魏酸 Ferulic acid	11	1.85	5	丹皮酚 Paeonol	42	7.62
		12	3.70			43	15.24
		13	7.40			51	17.65
2	肉桂酸 Cinnamic acid	21	10.89	6	混合物 Mixture	52	35.30
		22	21.78			53	70.60
		23	43.56			61	39.04
3	香草醛 Vanillin	31	4.84	7 (CK)	蒸馏水 Distilled water	62	78.08
		32	9.68			63	156.16
		33	19.36			CK	0
4	香豆素 Coumarin	41	3.81				

表 2 凤丹根际土壤及根浸提液的自毒作用
Table 2 Autotoxicity of rhizosphere soil and root water extracts of *P. ostii*

	蒸馏水对照 Distilled water CK	空白土壤水浸液 Water extract of contrast soil	根际土壤水浸液 Water extract of rhizosphere soil	根浸提液 Root water extract
根长 Root length (cm)	4.66 ± 0.13	5.12 ± 0.11 **	4.41 ± 0.03 *	4.14 ± 0.06 **

* 为显著差异 ($p < 0.05$); ** 为极显著差异 ($p < 0.01$) * express significant differences ($p < 0.05$); ** express extremely significant differences ($p < 0.01$)

2.2 自毒化感物质的 HPLC 检测

利用 HPLC 对连续种植 4a 凤丹根际土壤、对照土壤和 4 年生凤丹根皮进行检测结果 (表 3), 图 1 是 5 种

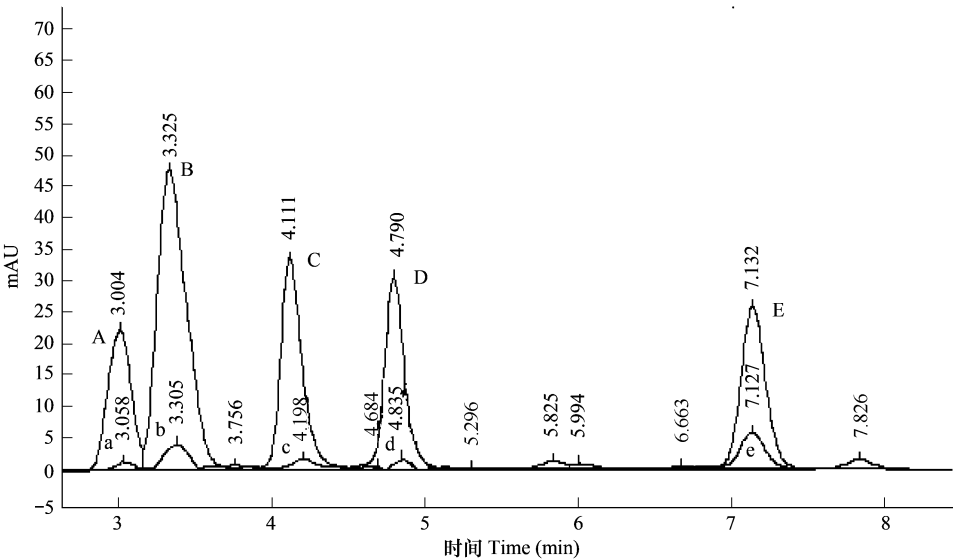


图 1 5 种标准物质及 4a 生凤丹植株根际土壤化感物质的色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of five standard phenolics and them of rhizosphere soil of *P. ostii* for 4 planting years

A、B、C、D、E 分别为标准物质 (阿魏酸、肉桂酸、香草醛、香豆素、丹皮酚) 的色谱图; a、b、c、d、e 分别为根际土壤中 5 种物质 (阿魏酸、肉桂酸、香草醛、香豆素、丹皮酚) 的色谱图 A, B, C, D and E are ferulic acid, cinnamic acid, vanillin, coumarin, paeonol respectively in standard chromatograms and a, b, c, d and e are above compounds in the soil

标准物与4年生凤丹根际土壤物质的比较。从图1可以看出,在种植4年凤丹的根际土壤中存在阿魏酸、肉桂酸、香草醛、香豆素、丹皮酚等酚类物质,它们在土壤中的含量见表(3),其中丹皮酚含量最高,达到 $35.30 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,其次是肉桂酸 $21.78 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,阿魏酸最低仅为 $3.70 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。在未种植凤丹的菜园土壤中未能检测到阿魏酸和香豆素,除香草醛外,肉桂酸与丹皮酚含量远少于根际土壤中的含量。另外,在凤丹根皮中也检测出这5种酚类物质,并且它们的含量则远远高于根际土壤中的含量,这说明,土壤中的5种酚类物质可能是凤丹根系分泌产生的次生代谢物,并最终成为凤丹种植中重要的自毒物质。

表3 种植4a 凤丹根际土壤的酚类物质含量

Table 3 Contents of phenolics compounds of *P. ostii* rhizosphere soils in with planting 4 years

项目 Item	阿魏酸 Ferulic acid	肉桂酸 Cinnamic acid	香草醛 Vanillin	香豆素 Coumarin	丹皮酚 Paeonol	总量 Total
持留时间 Retention Time(min)	3.00	3.32	4.11	4.79	7.13	
4年生凤丹根际土壤含量 Contents in rhizosphere soil ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	3.70 ± 0.18	21.78 ± 1.46	9.68 ± 1.26	7.62 ± 0.36	35.30 ± 1.82	78.08
对照土壤含量 Contents in contrast soil ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	ND	7.30 ± 0.32	9.72 ± 0.65	ND	2.76 ± 0.18	19.78
4年生凤丹根皮含量 Contents in root bark ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	1444.00 ± 106.2	2562.50 ± 57.06	743.50 ± 26.53	774.25 ± 33.24	6298.50 ± 126.84	11822.75

ND: 未检测出酚类物质 not detected, no phenolic compounds observed on chromatograms

2.3 不同自毒物质对凤丹幼苗生长指标的影响

凤丹幼苗生长指标在不同化感物质处理下的结果见表4。表4表明,凤丹幼苗高度、根长、地下部生物量和地上部生物量等生长指标均不同程度地受到5种自毒物质的影响,在中等和高浓度条件下,这些影响主要表现为抑制作用,在每个组分中其抑制作用随着浓度的增大而增强。抑制作用最大的是高浓度的香豆素,它对幼苗4个生长指标的抑制效率分别达为73、49、52和60(对照为100),其次是高浓度的混合物组分,它的抑制作用分别为76、56、55和68。它们的抑制效果均达到显著或极显著水平。各组分处理对4项生长指标影响中,根长度和地下生物量受到的抑制最为明显。另外,低浓度或中低浓度的阿魏酸、肉桂酸和香草醛对凤丹幼苗的生长有促进作用。在幼苗高度指标中,只有低浓度香草醛能对其产生轻微促进。中低浓度的阿魏酸和香草醛能促进根长度的生长,特别是低浓度的香草醛,其促进效果达到显著水平。同时,3种酚类物质对凤丹幼苗地下部生物量也有促进效果,在低浓度香草醛处理中达到极显著水平。地上部生物量仅在低浓度的阿魏酸和香草醛处理中有轻微促进作用。说明这些物质在观察期内首先是影响幼苗根的长度和生物量,同时还表现出“低促高抑”的作用特点。

2.4 不同化感物质对凤丹幼苗根系活力及叶片叶绿素含量的影响

凤丹幼苗的根系活力在不同化感物质处理中的结果见图2。可以看出,除低浓度的阿魏酸和香草醛外,各组幼苗根系活力均低于对照组,说明幼苗根系的生长功能受到影响。在各物质组分中,根系活力随着物质浓度的升高而降低,根系活力最低的是高浓度香豆素,其次是高浓度的混合物组分。与对照相比,低浓度的阿魏酸和香草醛能提高幼苗的根系活力。

凤丹幼苗叶绿素含量的变化(图3)与根系活力变化趋势基本相同,即随着处理物质浓度的提高,叶绿素含量呈现下降的趋势,除低浓度的阿魏酸和香草醛能提高叶绿素的含量外,其它各处理均低于对照组,含量最低的组分依次是香豆素、肉桂酸、混合物和丹皮酚,在高浓度组分中达到显著水平。叶绿素含量在一定程度上直接反映幼苗的光合作用的强弱,这表明凤丹幼苗光合作用在一定程度受到这些化感物质作用的影响。

表4 不同处理对凤丹幼苗生长指标的影响

Table 4 Effects of allelopathic substances on the growth of *P. ostii* seedling

类型 Type	编号 No.	幼苗苗高 (cm)	幼苗根长 (cm)	地下部生物量 (g)	地上部生物量 (g)
对照 control	CK	16.06 ± 0.72 (100)	7.84 ± 0.27 (100)	0.51 ± 0.06 (100)	1.13 ± 0.17 (100)
阿魏酸 Ferulic acid	11	15.20 ± 1.20 (95)	8.50 ± 0.40 (108)	0.58 ± 0.09 (114)	1.14 ± 0.14 (101)
	12	14.20 ± 0.97 (88)	7.90 ± 0.44 (101)	0.50 ± 0.11 (97)	0.95 ± 0.16 (84)
	13	13.70 ± 1.23 (85) *	5.36 ± 0.41 (68) **	0.41 ± 0.16 (81)	0.81 ± 0.11 (72) *
肉桂酸 Cinnamic acid	21	14.70 ± 1.20 (92)	7.96 ± 0.52 (102)	0.59 ± 0.18 (116)	0.99 ± 0.23 (88)
	22	13.44 ± 1.75 (84)	6.92 ± 0.41 (88) *	0.42 ± 0.19 (82)	0.92 ± 0.21 (82)
	23	12.60 ± 2.12 (78) *	4.84 ± 0.54 (62) **	0.38 ± 0.05 (75) *	0.78 ± 0.15 (69) *
香草醛 Vanillin	31	17.26 ± 0.77 (107)	9.10 ± 0.17 (116) *	0.62 ± 0.04 (121) *	1.21 ± 0.23 (108)
	32	15.68 ± 0.90 (98)	8.50 ± 0.48 (108)	0.50 ± 0.09 (98)	1.01 ± 0.16 (89)
	33	13.60 ± 1.95 (85) *	6.72 ± 0.53 (86)	0.43 ± 0.14 (83)	0.80 ± 0.15 (71) *
香豆素 Coumarin	41	13.84 ± 1.59 (86)	6.94 ± 0.46 (89)	0.41 ± 0.10 (80)	0.97 ± 0.21 (87)
	42	12.38 ± 1.06 (77) **	6.26 ± 0.22 (80) *	0.35 ± 0.12 (73) *	0.80 ± 0.10 (71) *
	43	11.70 ± 0.44 (73) **	3.84 ± 0.32 (49) **	0.26 ± 0.06 (52) **	0.68 ± 0.18 (60) **
丹皮酚 Paeonol	51	13.96 ± 1.06 (87)	7.26 ± 0.51 (93)	0.39 ± 0.11 (76)	1.09 ± 0.12 (96)
	52	12.90 ± 0.87 (80) **	6.38 ± 0.42 (81) *	0.44 ± 0.13 (86)	0.90 ± 0.22 (80)
	53	12.20 ± 0.75 (76) **	5.80 ± 0.43 (74) **	0.30 ± 0.10 (58) **	0.80 ± 0.12 (71) *
混合物 Mixture	61	14.24 ± 1.14 (89)	7.32 ± 0.31 (93)	0.45 ± 0.11 (88)	0.99 ± 0.23 (88)
	62	13.24 ± 1.05 (82) **	5.66 ± 0.26 (72) **	0.42 ± 0.17 (82)	1.08 ± 0.36 (96)
	63	12.16 ± 0.96 (76) **	4.36 ± 0.28 (56) **	0.28 ± 0.06 (55) **	0.77 ± 0.13 (68) *

表中数值为平均值 ± 标准差, 括号中的数值为处理与对照的比值, >100 为促进, <100 为抑制 Values in the table were average ± standard deviation, the values in parentheses were ratio for treatment and control, >100 is promotion, <100 is inhibition. * express significant differences ($p < 0.05$), ** express extremely significant differences ($p < 0.01$)

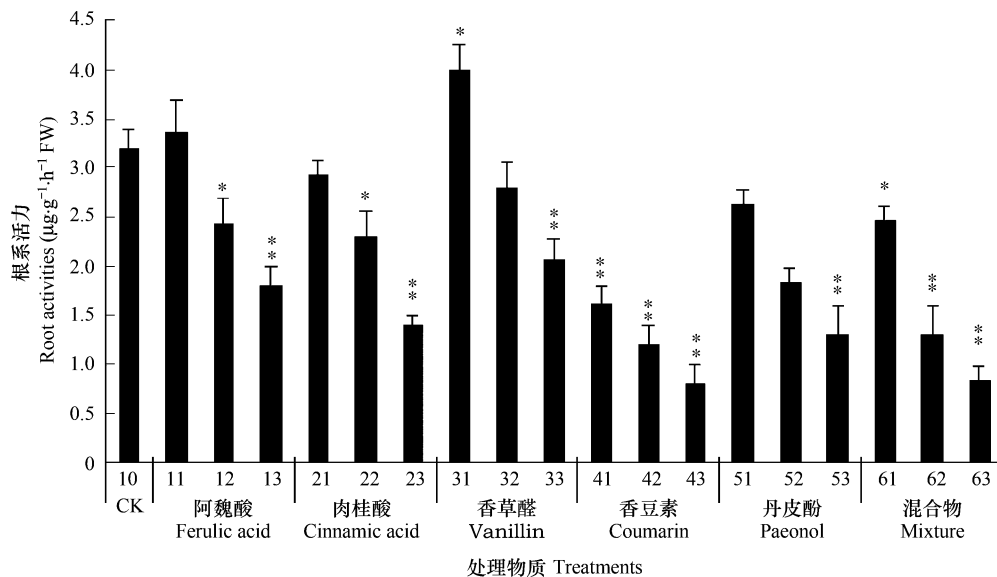


图2 不同自毒物质对凤丹幼苗根系活力的影响

Fig. 2 Effects of different substances on root activity of *P. ostii* seedling

3 讨论

(1) 凤丹的自毒化感作用

长期以来,植物自毒作用主要集中在农作物种植研究中^[18],但随着我国中药材的不断发展,中药材连作

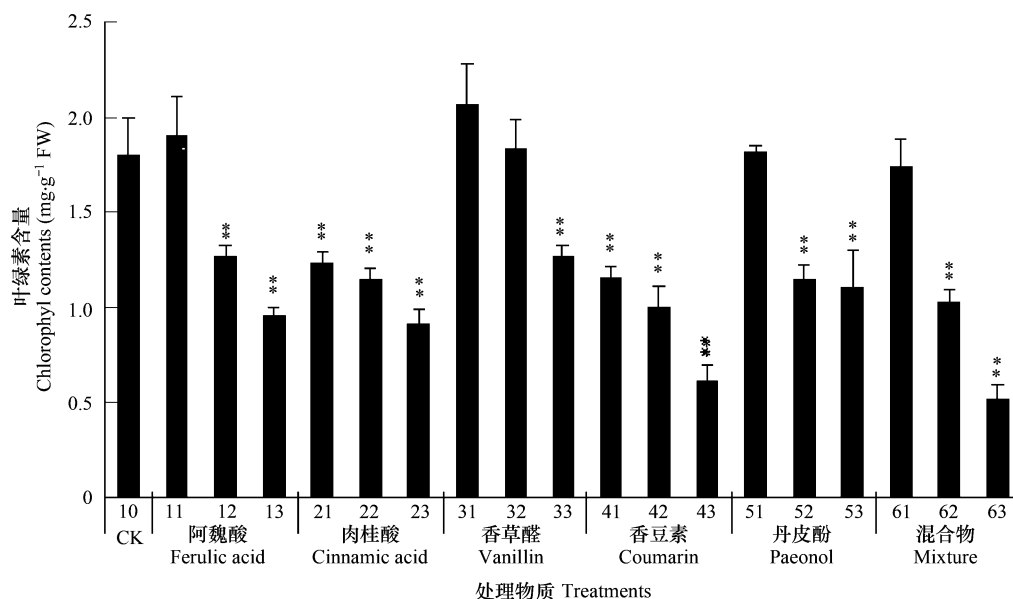


图3 不同自毒物质对凤丹幼苗叶绿素含量的影响

Fig. 3 Effects of different substances on Chlorophyll contents of *P. ostii* seedling

中的自毒现象也越来越被人们所重视^[19]。自毒作用是作物连作障碍的重要原因之一,它是通过植物根系分泌和残体分解产生的自毒物质来实现^[8~12]。凤丹根具有发达的皮层组织,皮层中含有丰富的次生代谢物,其中就包含这5种酚类物质^[20~22],同时,5种物质在种植4a的土壤中也同样被检测出,说明这些物质可能是通过根系分泌或植物体分解而释放到环境中,并在环境中得到累积。本实验通过室内培养检测,显示在实验室控制条件下,凤丹的根及其栽培土壤中存在有自毒作用的化感物质,其作用可能是产生凤丹连作障碍的原因。

本研究检测出的5种自毒物质中除丹皮酚外,其余4种物质均是典型的化感物质^[23~25],而丹皮酚也许是凤丹特有的自毒物质。在未种植凤丹的土壤中能检测到少量的丹皮酚、肉桂酸和香草醛,其原因可能是对照土壤也是在种植区的休闲地内挖取,可能会存在凤丹植株的遗弃或因其它植物、微生物分泌、分解产生所致,由于含量太少,无法表现出抑制作用,相反,由于空白土壤浸提液中含有营养元素而对根的生长有促进作用。

(2) 自毒物质对凤丹幼苗生长的影响

自毒物质对凤丹幼苗生长的影响是多方面的,但对根的影响特别明显,这不仅表现在对根长度生长的影响,同时也表现在对根生物量的影响,因而直接影响凤丹根皮的产量。在本研究中,5种化感物质在中高浓度时表现出明显的抑制作用,特别是香豆素,其抑制作用最大,这在其它研究中也得到证实^[26]。低浓度的阿魏酸和中低浓度的香草醛能促进凤丹幼苗生长,这与马越强等在研究杉木自毒作用得到的结论基本一致^[27],但其机理目前尚未清楚。

(3) 自毒物质对凤丹幼苗叶绿素含量和根系活力的影响

叶绿素含量是光合作用的基础参数,能够反映植物的光合效率和生长水平,同时还可以作为植物抗性指标用于评价环境有毒物质对植物的影响^[28]。植物根系是活跃的吸收器官和合成器官,根的生长情况和活力水平直接反映植物体的营养状况及产量水平。Yu 和 Matsui 认为酚类物质对植物的化感作用影响了植物对根际养分的吸收^[29],致使植株养分吸收不平衡,抑制了植物的生长,降低了植物的生产力。本研究发现5种不同化感自毒物质对凤丹幼苗的根系活力和叶绿素含量的影响规律基本一致,主要表现为随着浓度升高而降低,这说明物质浓度越高对其植株伤害越大。实验发现抑制作用最明显的物质是香豆素,其次混合物组分、丹皮酚和肉桂酸也都有较明显的抑制作用。香草醛及阿魏酸在低浓度时对根活力及叶绿素含量都有促进作用,这从凤丹幼苗的生长指标中也能得到反映。

总的看来,凤丹种植中确实存在自毒现象,其根际土壤和根水浸液中检出的阿魏酸、肉桂酸、香草醛、香豆素和丹皮酚等 5 种酚类物质可能是凤丹种植中的重要自毒物质,这些物质可能来自于凤丹植物残体分解和根系分泌,外源加入这些物质在中高浓度情况下能够抑制凤丹幼苗的生长并在生理指标中得到反映。由于连作障碍的影响因素非常复杂,加上自毒物质之间、自毒物质与环境、自毒物质与微生物之间的关系尚未清楚,因此需要开展更多这方面的研究,以便推动凤丹皮生产的可持续发展。

References:

- [1] Hong D Y, Pan K Y. Taxonomical history and revision of *Paeonia* sect. *Moutan*(*Paeoniaceae*). *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 1999, 37(4): 351—368.
- [2] Wang G C, Liu Z J. Cultivation, appreciation and origin culture of Chinese peony. Beijing: Forestry Press, 2001. 119.
- [3] Li G S, Zhang L Q, Wei J H, *et al.* Technique regulation for medicinal peony production (Draft). *Research and Practice of Chinese Medicines*. 2003, 17(5): 20—23.
- [4] Rice E L. Allelopathy — an update. *Botanical Review*, 1979, 45: 15—109.
- [5] Benizri E, Piutti S, Verger S, *et al.* Replant diseases: bacterial community structure and diversity in peach rhizosphere as determined by metabolic and genetic fingerprinting. *Soil Biology & Biochemistry*, 2005, 37, 1738—1746.
- [6] Manici L M, Ciavatta C, Kelderer M, *et al.* Replant problem in South Tyrol: role of fungal pathogens and microbial population in conventional and organic apple orchards. *Plant and Soil*, 2003, 256, 315—324.
- [7] Mizutani F, Hirota R, Kadoya K. Growth inhibiting substances from peach roots and their possible involvement in peach replant problems. *Acta Horticulturae*, 1988, 233, 37—43.
- [8] Singh H P, Batish D R, Kohli R K. Autotoxicity: concept, organisms, and ecological significance. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 1999, 18: 757—772.
- [9] Kong C H, Xu X H, Zhou B, *et al.* Two compounds from allelopathic rice accession and their inhibitory activity on weeds and fungal pathogens. *Phytochemistry*, 2004, 65: 1123—1128.
- [10] Hao Z P, Wang Q, Christie P, *et al.* Allelopathic potential of watermelon tissues and root exudates. *Scientia Horticulturae*, 2007, 112(3): 315—320.
- [11] Canals R M, Emeterio L S, Peralta J. Autotoxicity in *Lolium rigidum*: analyzing the role of chemically mediated interactions in annual plant populations. *Journal of Theoretical Biology*, 2005, 235(3): 402—407.
- [12] Asao T, Kitazawa H, Tomita K, *et al.* Mitigation of cucumber autotoxicity in hydroponic culture using microbial strain. *Scientia Horticulturae*, 2004, 99(3): 207—214.
- [13] Lao J S. Handbook for Soil Agricultural Chemical Analysis. Beijing: Agriculture Press, 1988. 119—121.
- [14] Djurdjevic L, Dinic A, Pavlovic P, *et al.* Allelopathic potential of *Allium ursinum* L. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2004, 32: 533—544.
- [15] Banwart W L, Porter P M, Granato T C, *et al.* HPLC separation and wavelength area ratios of more than 50 phenolic acids and flavonoids. *J. Chem. Ecol.*, 1985, 11: 383—395.
- [16] Li H S. Theory and Technology on Plant Physiology and Biochemistry Experimentation. Beijing: Higher Education Press, 2000. 200—201.
- [17] Institute of Shanghai Plant Physiology of Chinese Academy of Sciences. The Shanghai Society for plant physiology. The Modern Plant Physiology Experimental Guiding. Beijing: Science Press, 1995. 95.
- [18] Alías J C, Sosa T, Escudero J C, *et al.* Autotoxicity against germination and seedling emergence in *Cistus ladanifer* L. *Plant and Soil*, 2006, 282: 327—332.
- [19] Guo L P, Huang L Q, Jiang Y X, *et al.* Bioactivity of extracts from rhizoma and rhizosphere soil of cultivated *Atractylodes lancea* DC. and identification of their allelopathic compounds. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(2): 528—535.
- [20] Wang Z J, Tang L Y, He Y. Chemical constituents and pharmacological effect of peony bark. *World Phytomedicines*, 2006, 21(4): 155—159.
- [21] Xu S J, Yang L, Zhang M, Wang Z T. Rapid identification of compounds in Cortex Moutan by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2006, 41(9): 852—856.
- [22] Shao J M, Cao P X, Liang G Y, Xu B X. Study on the Contents of Berberine Hydrochloride and Ferulic Acid in Different Compatibility about Qingwei San. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2007, 18(7): 1546—1547.
- [23] Rice E L. Allelopathy(2nded). Orlando: Academic Press, 1984. 432.
- [24] Einhellig F A, Rasmussen J A, Hejl A M, *et al.* Effects of roots exudate sorgoleone on photosynthesis. *Chem Ecol*, 1993, 19: 369—375.

- [25] Inderjit. Plant phenolics in allelopathy. *Bot Rev*, 1996, 62(2):186—202.
- [26] Wu H S, Raza W, Liu D Y, *et al.* Allelopathic impact of artificially applied coumarin on *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *World J Microbiol Biotechnol*, 2008, 24:1297—1304.
- [27] Ma Y Q, Liao L P, Yang Y J, *et al.* Effect of vanillin on the growth of Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) seedlings. *Chin J Appl Ecol*, 1998, 9(2):128—132.
- [28] Huan X D, El-Alawi Y, Penrose D M, *et al.* Responses of three grass species to creosote during phytoremediation. *Environmental Pollution*, 2004, 130: 453—464.
- [29] Yu J Q, Matsui Y. Effects of root exudates of cucumber (*Cucumis sativus*) and allelochemicals on ion uptake by cucumber seedlings. *J Chem Ecol*, 1997, 23(3):817—827.

参考文献:

- [1] 洪德元, 潘开玉. 芍药属牡丹组的分类历史和分类处理. *植物分类学报*, 1999, 37(4): 351~368.
- [2] 王高潮, 刘仲健. 中国牡丹: 培育与鉴赏及文化渊源. 北京: 中国林业出版社, 2001. 119.
- [3] 李光胜, 张来起, 魏建华, 等. 药用牡丹 GAP 生产技术规程(草案). *现代中药研究与实践*, 2003, 17(5): 20~23.
- [13] 劳家桢. 土壤农化分析手册. 北京: 农业出版社, 1988. 119~121.
- [16] 李合生. 植物生理生化实验原理与技术. 北京: 高等教育出版社, 2000. 200~201.
- [17] 中科院上海植物生理研究所上海植物生理学会. 现代植物生理实验指导. 北京: 科学出版社, 1995. 95.
- [19] 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. *生态学报*, 2006, 26(2): 528~535.
- [20] 王祝举, 唐力英, 赫炎. 牡丹皮的化学成分和药理作用. *国外医药·植物药分册*, 2006, 21(4): 155~159.
- [21] 许舜军, 杨柳, 张勉, 等. 牡丹皮化学成分的液相色谱-飞行时间串联质谱分析. *药学报*, 2006, 41(9): 852~856.
- [22] 邵进明, 曹佩雪, 梁光义, 等. 清胃散拆方中盐酸小檗碱和阿魏酸的含量研究. *时珍国医国药*, 2007, 18(7): 1546~1547.
- [27] 马越强, 廖利平, 杨跃军, 等. 香草醛对杉木幼苗生长的影响. *应用生态学报*, 1998, 9(2): 128~132.