

芦苇根系及根际土中酚酸类化感物质的水分响应特性研究

孙盈¹, 李萍萍², 付为国^{1,2*}

(1. 江苏大学农业工程研究院, 江苏镇江 212013; 2. 南京林业大学南方现代林业协同创新中心, 江苏南京 210037)

摘要 [目的]研究芦苇根系及根际土中酚酸类化感物质的水分响应特性。[方法]分析芦苇中主要酚酸类化感物质的水环境响应特性,采用高效液相色谱法对不同水分环境下芦苇根系及根际土中酚酸类物质进行分离和鉴定。[结果]从芦苇根系及根际土中均分离出没食子酸、香豆酸、香草酸、丁香酸、对香草酸、阿魏酸、水杨酸和苯甲酸这8种酚酸类物质,且二者中分离出的8种酚酸类物质含量与芦苇根际土相对含水量均呈显著负相关,即随着根际土相对含水量的上升,酚酸类物质的含量均呈现下降趋势,且各种酚酸类物质对水分的响应趋势均可用线性方程较好拟合。在芦苇根系中,香草酸、阿魏酸和没食子酸这3种酚酸类物质水分响应较为明显,在芦苇根际土中,香草酸和阿魏酸对芦苇腐解土的水分响应较为明显。[结论]香草酸和阿魏酸是控制芦苇种群和藨草种群竞争平衡状态较为关键的2种酚酸类化感物质。

关键词 芦苇; 酚酸; 根系; 根际土; 化感作用; 水分响应

中图分类号 S181 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)25-0071-04

Study on the Moisture Response of Phenolic Acids in *Phragmites australis* Root and Rhizosperic Soil

SUN Ying¹, LI Ping-ping², FU Wei-guo^{1,2} (1. Agricultural Engineering Research Institute, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013; 2. Cooperative Innovation Center of Southern Modern Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing, Jiangsu 210037)

Abstract [Objective] To study the moisture response of phenolic acids in *Phragmites australis* root and rhizosperic soil. [Method] The responses to moisture of the main phenolic allelochemicals in the *P. australis* communis were analyzed, and high performance liquid chromatography (HPLC) was used to separate and identify phenolic acids substances in *P. australis* root and rhizosperic soil with different moisture content conditions. [Result] 8 kinds of phenolic acids were separated and identified from both *P. australis* root and rhizosperic soil which are gallic acid, coumaric acid, vanillic acid, syringic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, salicylic acid, and benzoic acid. There was a significant linear negative correlation between every identified phenolic acid and the relative moisture content of *P. australis* rhizosperic soil, which is, as an increase in the relative moisture content of *P. australis* decomposed soil, content of every identified phenolic acid showed a downward trend, and the response curve of content of every identified phenolic acid to the relative moisture content of *P. australis* root and rhizosperic soil can be fitted well with a linear equation. Responses of coumarinic acid, gallic acid and ferulic acid to rhizosperic soil moisture were most obvious among *P. australis* root, and responses of coumarinic acid and ferulic acid to rhizosperic soil moisture were most obvious among *P. australis* rhizosperic soil. [Conclusion] The results indicated that coumaric acid and ferulic acid were the key to control the balance of *P. australis* population and *P. arundinacea* population.

Key words *Phragmites australis*; Phenolic acids; Root; Rhizosperic soil; Allelopathy; Response to moisture

化感作用在植物中广泛存在,各种植物通过向外界环境释放化感物质从而直接或间接地对同种或异种植物产生有害或有益的作用^[1]。植物根分泌的化学物质是化感物质的重要组成部分之一,根分泌物是指那些健康完整的活体植物的根系组织向土壤中释放的化学物质,主要分为三大类:第一类为大分子有机物,包括糖、蛋白质、酶和凝胶等;第二类为小分子酸、酚和酮等;第三类为生长激素、黄酮和甾类等^[2]。Birkett等^[3]研究得出根际土壤(rhizosperic soil)是根分泌物及其转分解产物的储存库,通过根分泌释放的化感物质直接进入土壤中。有些植物释放植物毒素并对其他植物种产生影响,其化学物质须通过土壤媒介移动到目标植物的根部,由根分泌到土壤中的这些化感物质经历了不同类型的迁移和生物降解^[4]。在对植物根系分泌物的化感作用进行探索时,应从根系及根际土壤2个部分着手。

芦苇(*Phragmites australis*)是湿地常见的根茎类禾本科植物,无性繁殖能力强,常在栖息地形成单优群落^[5]。相关研究证实芦苇是一种强化感植物,对羊角月牙藻、雷氏衣藻

和水华微囊藻等藻类以及一枝黄花(*Solidago canadensis* Linn)、互花米草(*Spartina alterniflora* Lois)、蒲公英(*Taraxacum mongolicum*)、小飞蓬(*Conyza canadensis* L.)和田菁(*Sesbania cannabina*)等高等植物均有不同程度的化感作用^[6-10]。

前期研究发现,在长江下游的镇江滨江湿地,从远离岸边的浅滩到近岸,随着基底抬升和基底土壤含水量下降,存在由裸滩→藨草(*Phalaris arundinacea*)群落→藨草-芦苇群落→芦苇群落的植被演替群落过程^[11],即存在随着滨江湿地基底抬升,芦苇种群逐渐完全替代藨草种群的现象。芦苇和藨草同为有较强去污能力的湿地植物,且二者具有周年互补性,因此2个物种被广泛用来构建人工湿地植物群落^[12]。但当芦苇-藨草人工湿地运行若干年后,芦苇种群通常可完全替代藨草种群,导致人工湿地的去污功能受到削弱^[13],而事实上,这类人工湿地在运行过程中,常因一些固体颗粒物的长期淤积导致基底逐渐抬升以及土壤含水量下降。因此,在自然湿地和人工湿地中,均出现随着基底土壤含水量下降,湿地芦苇种群逐渐替代藨草种群的现象。鉴于芦苇是一种强化感植物以及化感作用具有强烈的“随着土壤水分降低,化感抑制效应增加”的水环境响应特性^[14],有理由推断:芦苇种群对藨草种群的逐步替代过程正是芦苇对藨草化感抑制效应随土壤含水量降低而逐渐增强的过程。

化感物质的释放途径包括雨雾淋溶、植物挥发、植株残

基金项目 江苏省高校自然科学研究重大项目(15KJA210001);国家自然科学基金项目(31370448)。

作者简介 孙盈(1991—),女,江苏靖江人,硕士,从事湿地化感植物研究。*通讯作者,研究员,博士,从事种群生态学。

收稿日期 2018-05-19

体降解和根系分泌等^[15],与土壤水分含量相关性较高的释放途径只有进入土壤中的植株残体降解和根系分泌2种。尹淇淋^[12]研究了滨江湿地的野生芦苇根系分泌物对藨草的化感抑制效应及其水环境响应特性,并用高效液相色谱法(HPLC)分离和鉴定出根系及根际土壤中所含的香豆酸、香草酸、没食子酸、苯甲酸、丁香酸、阿魏酸和水杨酸7种酚酸物质,但滨江湿地环境较为复杂,土壤中植物残留繁多,试验结果受不确定因素影响较大,且其选取的酚酸对照品范围较小。笔者在其研究的基础上,排除其他植物残体的干扰,从滨江湿地取芦苇根进行桶栽培养,选取常见的10种具有化感效应的酚酸物质,利用高效液相色谱法对芦苇根及根际土壤中各酚酸类物质进行分离、鉴定和测定,不仅可进一步研究芦苇对藨草化感效应的水环境响应特性,而且也可探索出维持藨草芦苇稳定共存的湿地基底土壤含水量范围,进而为藨草芦苇人工湿地的群落稳定管理提供理论支持和技术指导。

1 材料与方法

1.1 材料 芦苇根:2015年10月,于镇江滨江湿地挖取大小相近芦苇根。试验用土:自滨江湿地光滩采取一定量新淤积的泥土,晒干、磨碎、去杂、过筛。

1.2 方法

1.2.1 芦苇栽培试验。将泥土等体积置于12个塑料桶(上径62 cm、下径48 cm、高52 cm)。将等数量芦苇根栽于12个塑料桶中,期间设置 T_1 、 T_2 、 T_3 和 T_4 共4个水分处理,利用称重法将4个处理的相对含水量分别维持在65%~70%、75%~80%、85%~90%和95%~100%,每个处理3次重复。2017年7月15日,对各处理芦苇根和根际土壤中酚酸类物质进行分离、鉴定和测定,后取其均值分析。

1.2.2 芦苇根及根际土壤中酚酸类物质的 HPLC 分析。

1.2.2.1 仪器与试剂。Thermo UltiMate 3000 型高效液相色谱仪(Thermo Fisher 公司);SHZ-D(III)真空泵(河南予华仪器有限公司);Neofugo 18R 高速离心机(力康生物医疗科技);CHA-S 气浴恒温振荡器(金坛荣华仪器制造有限公司);BSA224S 电子分析天平(万分之一,德国 Sartorius)。

标准品没食子酸、阿魏酸、苯甲酸、香草酸、香豆酸、丁香酸、对香豆酸、对羟基苯甲酸、水杨酸、咖啡酸,均购自上海晨易生物公司;甲醇为色谱级,水为超纯水。

1.2.2.2 色谱条件。色谱柱为 Thermo C_{18} (250 mm × 4.6 mm, 4 μ m);流动相 A 为甲醇;流动相 B 为 1% 乙酸水溶液;UV 检测波长为 280 nm;柱温为 30 $^{\circ}$ C;梯度洗脱程序:0~8 min, 40% A; >8~19 min, 35% A; >19~30 min, 10% A;流速为 1.0 mL/min。

1.2.2.3 标准溶液配制。精密称取上述 10 种酚酸标准品各 1 mg,置于 10 mL 容量瓶中,加 50% 甲醇水溶液溶解并定容,得 1 mg/mL 的酚酸标准混合液,依次用 50% 甲醇水溶液稀释 2、10、50、100 倍配制成系列标准样品混合溶液。同时准确称取 10 种酚酸标准品各 10 mg,分别置于 10 mL 容量瓶中,加 50% 甲醇水溶液溶解并定容,得 1 mg/mL 的单一酚

酸溶液,用于判定每种酚酸标准品的出峰时间,即在混合标准品中的出峰位置。

1.2.2.4 芦苇根与根际土样品溶液的制备。每份芦苇根和根际土壤样品均取 10 g,置于锥形瓶中,加入 50% 甲醇水溶液 100 mL,常温下振荡提取 6 h,后上离心机分离取上清液,再用旋转蒸发仪(真空, 30 $^{\circ}$ C)浓缩至 1 mL,过 0.22 μ m 有机过滤膜,制成供试样品溶液。

1.3 统计分析 对芦苇根及根际土壤中酚酸物质含量与土壤相对含水量的响应关系进行线性回归分析。运用 Excel 2007 及 SPSS11.5 统计软件进行数据处理和显著性分析。

2 结果与分析

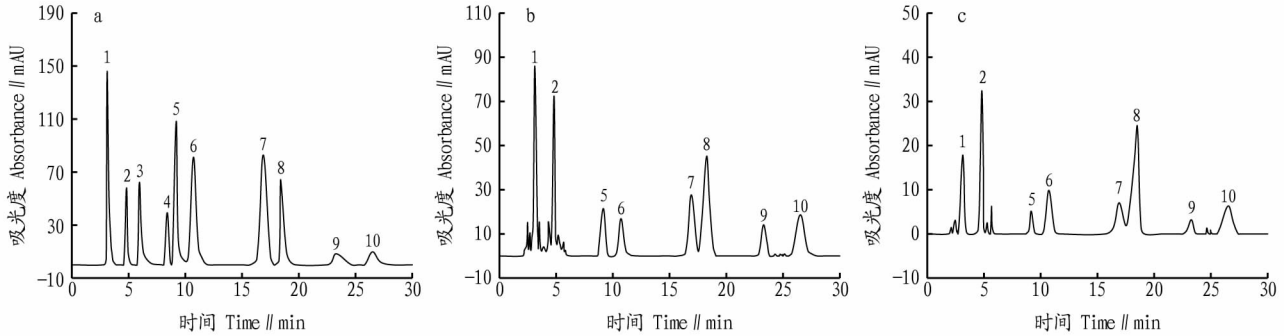
2.1 标准品和供试样品色谱图 对 10 种酚酸类物质标准样品进行最大吸收光谱扫描,扫描波长为 190~400 nm。分析不同酚酸类物质的最大吸收光谱,10 种酚酸类物质在 280 nm 左右均有较大吸收峰,因此,选取 280 nm 作为酚酸类物质的定量检测波长。由于酚酸类物质中的酚羟基与羧基在水溶液中易发生电离,极性增强,在固定相上会形成双重保留,使色谱峰拖尾严重,加入适量酸性调节剂,可使多酚的电离受到一定抑制,极性减弱,增强其在固定相上的保留,使分离效果和峰型得到改善^[16]。采用乙酸作为流动相的酸性调节剂,其浓度对酚酸类物质的出峰时间和峰型有一定的影响。分别考察了 0.5%~2.0% 浓度乙酸水溶液对 10 种酚酸类物质的分离效果,最终选择 1.0% 乙酸水溶液。采用等度洗脱时,各峰分离不理想,采用梯度洗脱后分离较好,经多次梯度洗脱条件优化,最理想洗脱条件为 0~8 min, 40% 甲醇; >8~19 min, 35% 甲醇; >19~30 min, 10% 甲醇。按照方法提供的液相色谱分离和分析条件,分别吸取标准品溶液和芦苇根系、根际土壤供试样品溶液各 10 μ L,自动进样器进样,分析结果如图 1 所示。在上述色谱条件下,均能得到较好的分离、峰型良好、保留时间稳定,芦苇根系和芦苇根际土中均含有没食子酸、香豆酸、香草酸、丁香酸、对香豆酸、阿魏酸、水杨酸和苯甲酸这 8 种酚酸类物质。

2.2 芦苇根系及芦苇根际土中酚酸类物质水分响应关系 将已逐级稀释配制的 10 种酚酸混合液分别进样 10 μ L,以各种酚酸浓度 x (μ g/mL) 为横坐标,其峰面积值 S (mAU) 为纵坐标绘制标准曲线,计算得到 10 种酚酸物质的线性回归方程、判定系数及线性范围,以仪器信噪比 ($S/N \geq 3$) 确定 10 种酚酸物质的最低检出限(表 1)。10 种酚酸物质的线性回归方程判定系数均达 0.999 0 以上,在 0.01 水平极显著相关,因此适用于对芦苇腐解土中酚酸类物质的 HPLC 定量计算分析。

根据以上各标准曲线的线性回归方程,计算出不同处理下芦苇根部及根际土壤样品中各酚酸物质的含量。进而将各酚酸类物质含量与其对应芦苇根际土壤的相对含水量进行线性回归拟合,得出芦苇根部各酚酸物质拟合方程:香豆酸($y = -0.3111x + 54.4160$, $R^2 = 0.9676$)、阿魏酸($y = -0.4431x + 50.8770$, $R^2 = 0.9598$)、没食子酸($y = -0.2026x + 24.0850$, $R^2 = 0.9458$)、苯甲酸($y = -0.1234x + 15.7640$, $R^2 = 0.959$)

8)、对香豆酸($y = -0.044 7x + 7.618 2, R^2 = 0.981 9$)、丁香酸($y = -0.022 6x + 3.571 2, R^2 = 0.948 9$)、香草酸($y = -0.031 3x + 4.792 5, R^2 = 0.979 8$)、水杨酸($y = -0.098 0x + 11.837 0, R^2 = 0.982 2$); 芦苇根际土壤各酚酸物质拟合方程: 香豆酸($y = -0.168 0x + 23.961 0, R^2 = 0.941 3$)、阿魏酸($y = -0.443 1x + 50.877 0, R^2 = 0.959 8$)、没食子酸($y = -0.202 6x + 24.085 0,$

$R^2 = 0.945 8$)、苯甲酸($y = -0.123 4x + 15.764 0, R^2 = 0.959 8$)、对香豆酸($y = -0.044 7x + 7.618 2, R^2 = 0.981 9$)、丁香酸($y = -0.022 6x + 3.571 2, R^2 = 0.948 9$)、香草酸($y = -0.031 3x + 4.792 5, R^2 = 0.979 8$)、水杨酸($y = -0.098 0x + 11.837 0, R^2 = 0.982 2$), 芦苇根部及根际土壤中各酚酸物质拟合见图 2。



注: a 为酚酸混合标准样品, 其中 1 为没食子酸, 2 为香豆酸, 5 为香草酸, 6 为丁香酸, 7 为对香豆酸, 8 为阿魏酸, 9 为水杨酸, 10 为苯甲酸; b 为芦苇根样品; c 为芦苇根际土样品

Note: a. Standard samples of phenolic acid, 1 stands for gallic acid, 2 stands for coumalic acid, 5 stands for syringic acid, 6 stands for vanillic acid, 7 stands for p-coumaric acid, 8 stands for ferulic acid, 9 stands for salicylic acid, 10 stands for benzoic acid; b. Sample of *P. australis* root; c. Sample of *P. australis* rhizospheric soil

图 1 酚酸混合标准样品、芦苇根系和根际土酚酸成分的 HPLC 分析图谱

Fig. 1 HPLC of standard samples of phenolic acid and phenolic acids constituents in the *Phragmites australis* root and rhizospheric soil

表 1 10 种酚酸物质的线性关系

Table 1 The linear relationships of ten phenolic acids

序号 No.	酚酸种类 Phenolic acids	线性范围 Linear range mg/mL	回归方程 Regression equation	判定系数 R^2 Coefficient of determination	检出限 Detection limit mg/L
1	没食子酸	0.01~1.00	$S = 383.270 0x - 1.967 9$	0.999 5**	0.034
2	香豆酸	0.01~1.00	$S = 133.950 0x - 1.020 0$	0.999 3**	0.050
3	咖啡酸	0.01~1.00	$S = 411.830 0x + 0.119 7$	0.999 7**	0.027
4	对羟基苯甲酸	0.01~1.00	$S = 174.170 0x + 1.241 3$	0.999 7**	0.024
5	丁香酸	0.01~1.00	$S = 262.260 0x + 1.046 7$	0.999 3**	0.045
6	香草酸	0.01~1.00	$S = 206.820 0x + 1.488 0$	0.999 5**	0.023
7	对香豆酸	0.01~1.00	$S = 663.370 0x + 9.189 7$	0.999 5**	0.035
8	阿魏酸	0.01~1.00	$S = 399.780 0x + 2.285 0$	0.999 2**	0.058
9	水杨酸	0.01~1.00	$S = 66.787 0x - 0.291 1$	0.999 8**	0.020
10	苯甲酸	0.01~1.00	$S = 71.880 0x - 0.790 8$	0.999 7**	0.031

注: ** 表示在 0.01 水平下极显著相关

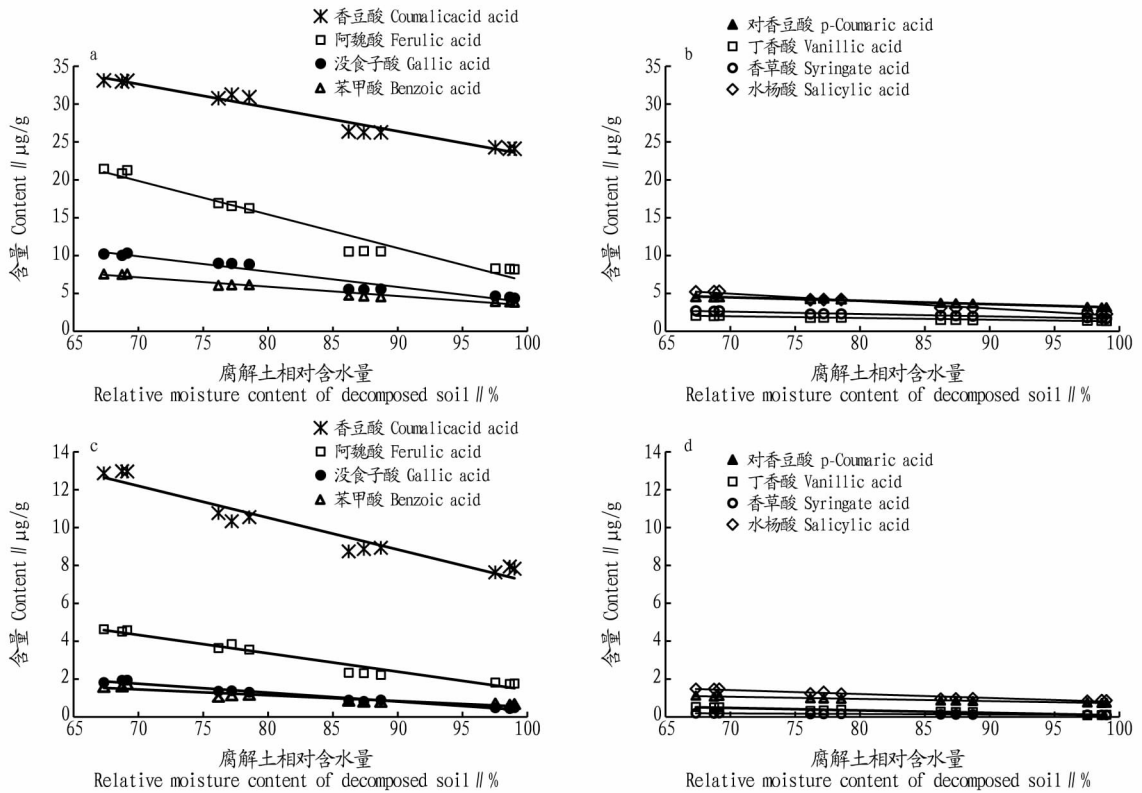
Note: ** represents significant correlation at the 0.01 level

3 结论与讨论

研究表明, 芦苇根系及根际土中存在没食子酸、香豆酸、香草酸、丁香酸、对香豆酸、阿魏酸、水杨酸和苯甲酸这 8 种酚酸类物质, 且在芦苇根系及根际土中这 8 种酚酸类物质含量与其土壤相对含水量均呈显著负相关, 即随着土壤相对含水量的上升, 芦苇根系及根际土中酚酸类物质均呈现下降趋势, 不同酚酸类物质的含量与腐解土相对含水量的关系可用线性方程加以拟合。芦苇根系及根际土中不同种类酚酸物质对腐解土中的水分响应强度存在较大差异, 由各酚酸类物质对水分拟合方程的斜率判定, 在芦苇根系中香豆酸、阿魏酸和没食子酸对土壤相对含水量的响应较为明显, 在芦苇根

际土中香豆酸和阿魏酸对土壤相对含水量的响应较为明显。由芦苇根系及根际土中各酚酸类物质含量的差异可知, 在芦苇根系中香豆酸、阿魏酸、没食子酸在 8 种酚酸物质中含量较高, 在芦苇根际土中香豆酸和阿魏酸含量明显高于其余 6 种酚酸物质。

综上所述, 在对芦苇-藨草人工湿地进行管理时, 为了保持芦苇种群与藨草种群长期竞争共存稳定, 可通过调控湿地土壤中水分含量, 重点调控芦苇根系和根际土中水分响应均较强且含量较高的香豆酸和阿魏酸的化感抑制强度, 从而避免出现芦苇种群代替藨草种群的现象, 防止藨草-人工湿地去污功能的丧失。



注:a,b为芦苇根系中酚酸物质含量对土壤相对含水量响应的线性拟合;c,d为芦苇根际土中酚酸物质含量对土壤相对含水量响应的线性拟合
Note:a,b. Linear fitting of responses of phenolic acids to relative moisture content in the *P. australis* root;c,d. Linear fitting of responses of phenolic acids to relative moisture content in the *P. australis* rhizospheric soil

图2 芦苇根系及芦苇根际土中酚酸物质对土壤相对含水量响应的线性拟合

Fig.2 Linear fitting of responses of phenolic acids to relative moisture content in the *P. australis* root and rhizospheric soil

参考文献

- [1] RICE E L. Allelopathy[M]. Orlando:Academic Press, 1984.
- [2] 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.
- [3] BIRKETT M A,CHAMBERLAIN K,HOOPE A M,et al. Does allelopathy offer real promise for practical weed management and for explaining rhizosphere interactions involving higher plants? [J]. Plant and soil,2001,232: 31-39.
- [4] 林文雄,何华勤,郭玉春,等.水稻化感作用及其生理生化特性的研究[J].应用生态学报,2001,12(6):871-875.
- [5] 刘成,陈晓德,吴明,等.芦苇叶片化感作用对加拿大一枝黄花生长及生理生化特性的影响[J].草业学报,2014,23(3):182-190.
- [6] 郑琨,赵福庚,张茜,等.盐度变化条件下芦苇对互花米草的化感效应[J].应用生态学报,2009,20(8):1863-1867.
- [7] 刘成.芦苇化感作用及其化感物质分离与鉴定[D].重庆:西南大学,2014.
- [8] 庄瑶,孙一番,王中生,等.芦苇生态型研究进展[J].生态学报,2010,30(8):2173-2181.
- [9] 门玉洁,李锋民,胡洪营.芦苇化感组分对羊角月芽藻和雷氏衣藻生长特性的影响[J].湖泊科学,2007,19(4):473-478.
- [10] 王志强,王捷,班剑娇,等.芦苇水浸提液对水华微囊藻的化感作用研究[J].安全与环境学报,2014,14(4):302-306.
- [11] FU W G,WANG F K,YIN Q L,et al. Niche dynamics of species in succession process in the Wetland of Yangtze Rivers Lower Reach, China [J]. Plant ecology & evolution,2015,148(1):43-51.
- [12] 尹洪林.芦苇对藨草的化感抑制效应及其水环境响应特性研究[D].镇江:江苏大学,2015.
- [13] BŘEZINOVÁ T,VYMAZAL J. Competition of *Phragmites australis* and *Phalaris arundinacea* in constructed wetlands with horizontal subsurface flow-does it affect BOD₅, COD and TSS removal? [J]. Ecological engineering,2014(73):53-57.
- [14] 王春晴,刘强,李蕾.植物化感作用研究动态[J].安徽农业科学,2011,39(21):12633-12636.
- [15] 林娟,殷金玉,杨丙钊,等.植物化感作用研究进展[J].中国农学通报,2007,23(1):68-72.
- [16] 刘江云,杨学东,徐丽珍,等.天然酚酸类化合物的反相高效液相色谱分析[J].色谱,2002,20(3):245-248.

科技论文写作规范——讨论

着重于研究中新的发现和重要方面,以及从中得出的结论。不必重复在结果中已评述过的资料,也不要模棱两可的语言,或随意扩大范围,讨论与文中无多大关联的内容。