

文章编号:1004—5570(2018)02—0022—04

基于 HPLC 对野生杜鹃林区土壤酚酸类物质的鉴定与评价

李朝婵^{1,2*}, 田红红¹, 全文选¹

(1. 贵州师范大学 贵州省山地环境信息系统与生态环境保护重点实验室, 贵州 贵阳 550001;
2. 中国科学院地球化学研究所 环境地球化学国家重点实验室, 贵州 贵阳 550018)

摘要:采用高效液相色谱测定百里杜鹃林区野生杜鹃林下枯落物层(L层)、腐殖质层(H层)及土壤层(S层)中的化感物质,并评价其分布规律。结果表明3种杜鹃林下枯落物层和腐殖质层中的化感物质含量均明显高于土壤层,不同种类的杜鹃林下化感物质差异较大,其中L层以没食子酸、绿原酸和阿魏酸含量最高,H层以阿魏酸和绿原酸含量最高。

关键词:杜鹃林区; 酚酸; 化感物质; 高效液相色谱

中图分类号:S153.1; S718.5 文献标识码:A

DOI:10.16614/j.cnki.issn1004-5570.2018.02.004

Identification and evaluation of soil phenolic acids in wild rhododendron based on HPLC

LI Chaochan^{1,2}, TIAN Honghong¹, QUAN Wenxuan¹

(1. Key Laboratory for Information System of Mountainous Areas and Environmental Protection of Guizhou, Guizhou Normal University, Guiyang, Guizhou 550001, China; 2. State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang, Guizhou 550018, China)

Abstract: The allelochemicals in the litter layer (L), humus layer (H) and soil layer (S) in the Bai-li Rhododendron National Forest Park were determined by HPLC, and their distribution was evaluated. The results showed that the contents of allelochemicals in the litter layer and humus layer of the three species of rhododendrons were significantly higher than those of in soil layer, and the allelochemicals of rhododendron under different species varied greatly. The content of gallic acid, chlorogenic acid and ferulic acid were the highest allelochemicals in L layer; And the content of ferulic acid and chlorogenic acid were the highest allelochemicals in H layer.

Key words: rhododendron forest; phenolic acids; allelochemical; HPLC

0 引言

化感作用是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,对该种植物或周围植物(包括微生物)产生间接或直接的有害或有利的作用。而植物化感物质则是指供体植物通过茎叶挥发、淋溶、凋落物分解等途径向环境中释

收稿日期:2017-12-30

基金项目:国家自然科学基金项目(31460136);贵州省科技厅联合基金项目(黔科合LH字[2016]7203号);贵州省林业厅项目(黔林科合[2016]09号)

作者简介:李朝婵(1981-),女,博士后,硕士生导师,研究方向:植物生理生态,E-mail:chaochan@gznu.edu.cn.

放化学物质,从而促进或抑制周围植物及自身的生长和发育。绝大多数化感物质是植物(含微生物)的次生代谢物质,且植物化感物质有酚类、类萜和含氮化合物以及聚乙炔和香豆素类次生物质有机化合物的各个类型,而酚酸类物质是自然界中普遍存在的主要化感物质^[1-2],它们在抑制种子萌发、杂草生长和群落更新起着重要作用,已有大量的文献报道^[3-6]通过在农作物生产、森林经营等领域中对酚酸类物质进行了深入研究。

贵州西北部的百里杜鹃国家森林公园是迄今为止世界上野生杜鹃林面积最大、分布最集中的地区^[7]。森林公园内,杜鹃林的种子结实量大,但林下及林窗中的新生幼苗极少,天然更新出现障碍。目前的研究更多关注了物理因子对林木种子萌发、幼苗生长的影响^[8-11],而对化学因子尤其是化感作用的研究较少。本实验评价了野生杜鹃林下枯落物层、腐殖层和土壤层中的酚酸类化感物质,以期掌握野生杜鹃林区中土壤状况,为群落更新困难等问题在理论上和实践上提供科学依据。

1 实验部分

1.1 研究区概况

百里杜鹃国家森林公园位于贵州省西北部,海拔在 1 060 ~ 2 200 m 之间,地下位置: 105°52' ~ 106°03' E, 27°10' ~ 27°20' N。年平均温度 11.8 °C,年平均积温(4 000 ~ 4 200) °C,最冷月(1 月)均温为 5 °C,最热月(7 月)均温 21 °C,极端最高温度 32 °C,极端最低温度为 -9.3 °C。年降水量 1 000 ~ 1 100 mm,全年雨日多达 220.5 d,春夏降水量占 70%,水热同季。阴天多,晴天少,云雾多,全年日照时数仅 1 335.5 h,林区年平均相对湿度为 84%,4 月份平均相对湿度最小,只有 79%,12 月份平均相对湿度为 89%,冬湿春干^[12]。森林公园内形成冠层的主要优势群落树种为迷人杜鹃(*Rhododendron agastum* Balf. f. et W. W. Smith)、马缨杜鹃(*Rhododendron delavayi* Franch.)和露珠杜鹃(*Rhododendron irroratum* Franch.)。试验材料采集于 2016 年 1 月,分别采集迷人杜鹃、马缨杜鹃和露珠杜鹃林下的枯落物层(L 层)、腐殖质层(H 层)及土壤层(S 层)样品。其中,枯落物层包括未分解的落叶、枯枝等;腐殖质层包括半分解和已分解的腐殖质;土壤层指表层土壤。所有样品剔除石块,实验室内阴干待用。

1.2 试剂与材料

甲醇(色谱纯);抗坏血酸(分析纯);乙腈(色

谱纯);甲酸(色谱纯);没食子酸、咖啡酸、原儿茶酸、绿原酸、芦丁、槲皮素、丁香酸和阿魏酸等 8 种物质的标准品均购于 Sigma 公司,级别为色谱纯;实验用水均为超纯水。

1.3 样品前处理

枯落物层、腐殖层和土壤层中的酚酸类化感物质的提取,通过加入甲醇有机溶剂超声提取样品中感化物质。具体操作过程为:称取样品约 10 g 于 150 mL 锥形瓶中,加入 80% 甲醇 100 mL,0.2 g 抗坏血酸,70 °C 超声提取 1 h,取出后迅速放入冰浴中,冰浴 10 min 后,过滤,将滤液用旋转蒸发仪在 30 °C 下旋干,用甲醇少量多次清洗烧瓶,将溶液全部转至 5 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,经 0.45 μm 有机滤膜过滤,取 10 μL 注入液相色谱仪检测,测定 3 次求平均。

1.4 色谱条件

日本岛津 LC-20A 高效液相色谱仪(HPLC),检测色谱柱为 ODS-sp C₁₈ Column(4.6 mm × 250 mm 5 μm),流动相为乙腈:0.1% 甲酸水溶液 = 3:7,流速为 0.8 mL/min,进样量为 10 μL,检测波长 275 nm,柱温 35 °C,二极管阵列检测器。样品中没食子酸、咖啡酸、原儿茶酸、绿原酸、芦丁、槲皮素、丁香酸和阿魏酸等 8 种化感物质,分别采用标准品色谱保留时间定性,以峰面积进行定量。

1.5 数据处理

数据采用 z-score 标准化,即根据原始数据的均值和标准差进行标准化,经过处理后的数据符合标准正态分布,均值为 0,标准差为 1,转化函数为:

$$z = \frac{x - \mu}{\sigma}$$

其中 x 为某一具体分数, μ 为平均数, σ 为标准差。

标准化后的数据采用 R 软件(版本: Ri 386)进行聚类分析,采用 SPSS 18.0 和 Qorigin 8.0 分别进行标准差计算和绘图。

2 结果与讨论

2.1 马缨杜鹃不同土壤层的化感物质分析

马缨杜鹃林下腐殖质层和土壤层中未检测到槲皮素,其它的化感物质在各层次中出现不同的变化。其中,没食子酸和咖啡酸含量随土壤深度的增加呈先降低后升高的趋势,在 S 层中有所积累;原儿茶酸、绿原酸、丁香酸和阿魏酸含量则随着土壤深度的增加呈先升高后降低的趋势,在 H 层中得到积累;芦丁含量随土壤深度的增加呈逐渐降低的

趋势。阿魏酸是马缨杜鹃林下 L 层的主要化感物质,绿原酸和阿魏酸是 H 层、S 层的主要化感物质(图 1)。由于化感物质在自然界中存在的复杂性,自然条件下的研究结果更具有生态学意义^[13]。研究认为优势树种产生的化感物质不断积累,是导致林下物种单一的主要原因^[14-15]。

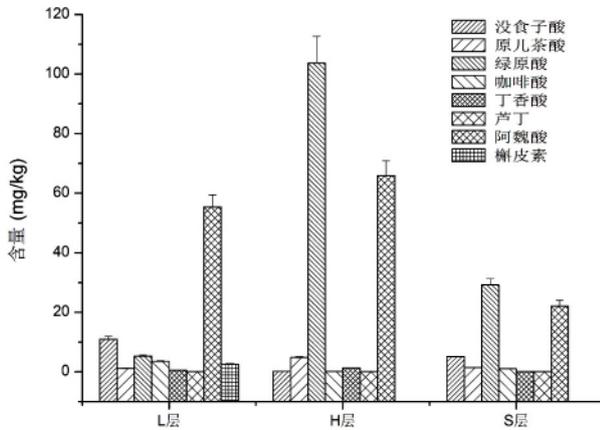


图 1 马缨杜鹃林下不同层次中的化感物质
Fig. 1 The allelochemicals in different layers of *Rhododendron delavayi* Balf. f. et W. W. Smith

2.2 迷人杜鹃林下不同层次中的化感物质分析

迷人杜鹃林下各层次中的没食子酸、绿原酸、丁香酸、槲皮素的含量表现为随土壤深度的增加呈逐渐降低的趋势;原儿茶酸和阿魏酸则表现为随土壤深度的增加呈先升高后降低趋势,含量在 H 层中得到积累;咖啡酸和芦丁含量在各层次中变化不大。迷人杜鹃 L 层的主要化感物质为没食子酸和阿魏酸, H 层的主要化感物质为阿魏酸(图 2)。酚酸类物质是影响微生物群落的重要因子之一,研究土壤酚酸的变化规律及其与微生物的关系,有助于揭示群落更新、连作障碍的机制^[16-18]。

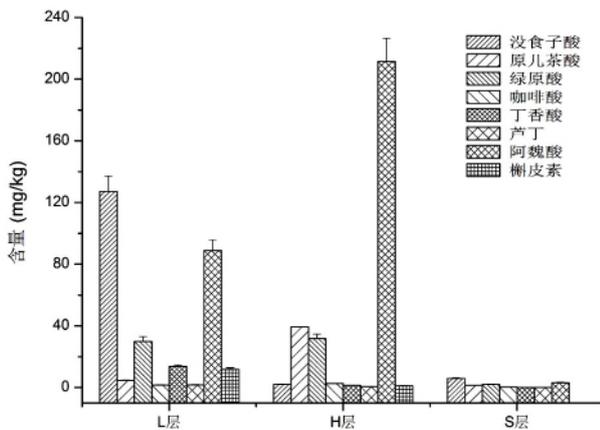


图 2 迷人杜鹃不同层次中的化感物质
Fig. 2 The allelochemicals in different layers of *Rhododendron agastum* Franch.

2.3 露珠杜鹃林下不同层次中的化感物质分析

露珠杜鹃林下各层次中没食子酸、绿原酸、丁香酸含量表现为随土壤深度的增加呈逐渐降低的趋势;原儿茶酸、咖啡酸、阿魏酸和芦丁则表现为随土壤深度的增加呈先升高后降低趋势,含量在 H 层中得到积累。没食子酸和绿原酸是露珠杜鹃 L 层的主要化感物质;阿魏酸是露珠杜鹃 H 层和 S 层的主要化感物质(图 3)。露珠杜鹃 3 个层次中的主要化感物质均为酚酸类物质,其中以 L 层中含量最高,说明枯落物层是群落内化感物质的主要来源^[19]。

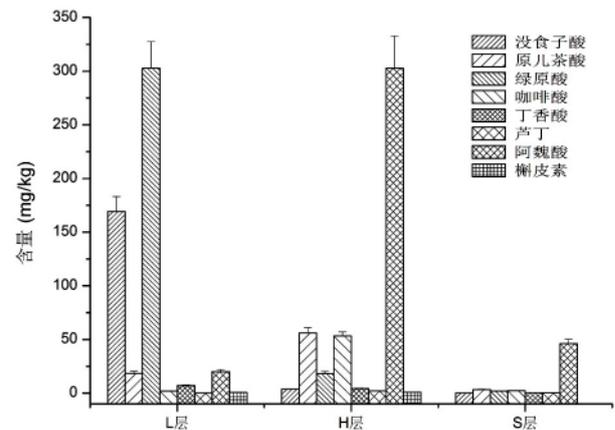


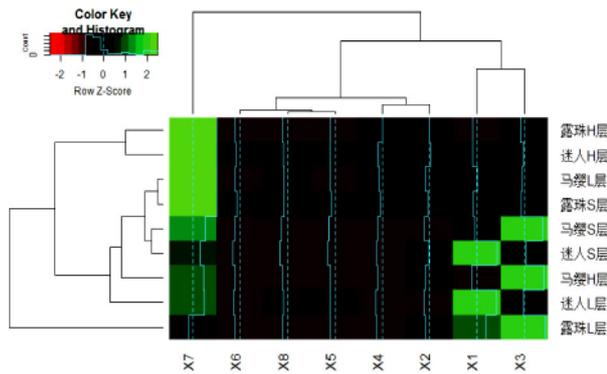
图 3 露珠杜鹃林下不同层次中的化感物质
Fig. 3 The allelochemicals in different layers of *Rhododendron agastum* Franch

2.4 3 种杜鹃林 3 个层次中化感物质的聚类分析

采用 z-score 标准化后,调取 R 软件的 gplots 程序包,生成聚类热图(图 4)。热图是对实验数据分布情况进行分析的直观可视化方法,可以用来进行实验数据的质量控制和差异数据的具像化展示。从图 4 中可以得到:露珠杜鹃和迷人杜鹃的 H 层聚为一类,马缨杜鹃、露珠杜鹃和迷人杜鹃的 S 层聚为一类,马缨杜鹃的 L 层、S 层和 H 层聚为一类,这表明在实验中得出的数据是可靠和符合逻辑的。

聚类热图横向各个分解层的聚类树显示,各个分解层分为 3 类:第一类为露珠杜鹃的 L 层,主要特征是 L 层的绿原酸和没食子酸明显高于各层次的平均值(根据数据归一化公式,数据处理中的平均值为 0,热图中显示为黑色,下同);第二类为露珠杜鹃和迷人杜鹃的 H 层,主要特征是 H 层中的阿魏酸明显高于各层次的平均值;其它层次归为第三类。纵向各化感物质的聚类树显示 8 种化感物质也可以分为 3 类:第一类为阿魏酸,主要特征是除露珠杜鹃 L 层外其它各层的阿魏酸均明显高于平均值;第二类为没食子酸和绿原酸,主要特征是露珠杜鹃、迷人杜鹃 L 层及迷人杜鹃 S 层的没食子

酸和绿原酸含量高于所在层的平均值;其它的化感物质归为第三类(图 4)。



注: X1 ~ X8 分别代表没食子酸、原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸、丁香酸、芦丁、阿魏酸、槲皮素。

图 4 基于化感物质的杜鹃林下 3 个层次的聚类热图

Fig. 4 The cluster heat map of allelochemicals in three layers of Rhododendron forests

3 结论

本实验从贵州百里杜鹃林区的马缨杜鹃、迷人杜鹃和露珠杜鹃 3 大群落入手,采用高效液相色谱分析了 3 个杜鹃林下枯落物层(L 层)、腐殖质层(H 层)和土壤层(S 层)中没食子酸、咖啡酸、原儿茶酸、绿原酸、芦丁、槲皮素、丁香酸和阿魏酸等 8 种化感物质,并通过聚类热图对 3 种不同杜鹃林区 3 种不同层次中的化感物质进行分析。结果表明,3 种杜鹃林下 L 层和 H 层中的化感物质含量均明显高于 S 层;不同种类的杜鹃林下化感物质差异较大,其中 L 层以没食子酸、绿原酸和阿魏酸含量最高,H 层以阿魏酸和绿原酸含量最高。该分析结果揭示了百里杜鹃林区林地土壤状况,并为林区的管理和天然林更新提供基础和理论指导。

参考文献:

[1] RICE E L. Allelopathy (2nd Edition) [M]. Orlando Florida: Academic Press Inc, 1984: 23-28.
 [2] BLUM U. Plant-Plant Allelopathic Interactions [M]. Berlin: Springer Netherlands, 2011: 1-7.
 [3] SÈNE M, DORÉ T, PELLISSIER F. Effect of phenolic acids in soil under and between rows of a prior sorghum (*Sorghum bicolor*) crop on germination, emergence, and seedling growth of peanut (*Arachis hypogea*) [J]. Journal of Chemical Ecology, 2000, 26(3): 625-637.
 [4] LORENZO J C, MDLA BLANCO M D L A, PELÁEZ O et al. Sugarcane micropropagation and phenolic excretion [J]. Plant Cell Tissue & Organ Culture, 2001, 65(1): 1-

8.
 [5] HAN C M, LI C L, YE S P, et al. Autotoxic effects of aqueous extracts of ginger on growth of ginger seedlings and on antioxidant enzymes, membrane permeability and lipid peroxidation in leaves [J]. Allelopathy Journal, 2012, 30(2): 259-270.
 [6] 王华田, 杨阳, 王延平, 等. 外源酚酸对欧美杨 '1-107' 水培幼苗硝态氮吸收利用的影响 [J]. 植物生态学报, 2011, 35(2): 214-222.
 [7] CHEN X, CONSAUL L, HUANG J, et al. New Taxa of Rhododendron (Ericaceae) from China [J]. Annales Botanici Fennici, 2010, 47(5): 397-402.
 [8] ZHOU Y, HUANG L, WEI X, et al. Physiological, morphological, and anatomical changes in Rhododendron agastum in response to shading [J]. Plant Growth Regulation, 2016, 81(1): 1-8.
 [9] NILSEN E T, WALKER J F, MILLER O K, et al. Inhibition of seedling survival under Rhododendron maximum (Ericaceae): Could allelopathy be a cause? [J]. American Journal of Botany, 1999, 86(11): 1597-1605.
 [10] CHOU S C, HUANG C H, HSU T W, et al. Allelopathic potential of Rhododendron formosanum Hemsl in Taiwan [J]. Allelopathy Journal, 2010, 25(1): 73-91.
 [11] WANG C M, LI T C, JHAN Y L, et al. The impact of microbial biotransformation of catechin in enhancing the allelopathic effects of Rhododendron formosanum [J]. PLoS One, 2013, 8(12): e85162.
 [12] 乙引, 陈训, 陈雪鹃, 等. 贵州百里杜鹃国家森林公园综合科学考察 [M]. 北京: 科学出版社, 2016.
 [13] 曾任森. 化感作用研究中的生物测定方法综述 [J]. 应用生态学报, 1999, 10(1): 123-126.
 [14] LODHI M A K. Allelopathic effects of decaying litter of dominant trees and their associated soil in a lowland forest community [J]. American Journal of Botany, 1978, 65(3): 340-344.
 [15] SOUTO X C, GONZALES L, REIGOSA M J. Comparative analysis of allelopathic effects produced by four forestry species during decomposition process in their soils in Galicia (NW Spain) [J]. Journal of Chemical Ecology, 1994, 20(11): 3005-3015.
 [16] QU X H, WANG J G. Effect of amendments with different phenolic acids on soil microbial biomass, activity, and community diversity [J]. Applied Soil Ecology, 2008, 39(2): 172-179.
 [17] 谢星光, 戴传超, 苏春伦, 等. 内生真菌对花生残茬腐解及土壤酚酸含量的影响 [J]. 生态学报, 2015, 35(11): 3836-3845.
 [18] 及利, 杨立学. 采煤沉陷区不同造林树种恢复土壤酚酸物质对土壤微生物的影响 [J]. 应用生态学报, 2017, 28(12): 4017-4024.
 [19] 周艳, 陈训, 韦小丽, 等. 凋落物对迷人杜鹃幼苗更新和种子萌发的影响 [J]. 林业科学, 2015, 51(3): 65-74.