

文章编号 :1003-8701(2012)03-0012-05

栽参土壤提取物活性组分筛选及其对人参幼苗生理效应研究

邵 财,郭 靖,许世泉,王志清,王英平*

(中国农业科学院特产研究所,长春 130122)

摘 要:研究了栽参土壤水提取液用不同化学试剂(乙酸乙酯、水饱和正丁醇)萃取和直接采用不同化学试剂(乙酸乙酯、正丁醇、甲醇和蒸馏水)提取,对所得各个组分以人参种子为试材进行生物活性测定,经筛选所得活性较强组分再以人参幼苗为试材进行其根系活力和丙二醛含量测定。结果表明:栽参土壤提取液不同组分均对人参种子胚根生长有不同程度的影响,抑制作用随浓度逐渐增加而增强,其中生物活性较强的组分为栽参土壤水提取液乙酸乙酯萃取相和栽参土壤乙酸乙酯提取组分,两个组分对幼苗根系活力和丙二醛含量都产生显著性影响,在培养 96h 后,丙二醛含量分别增加 23.8%、37.5%,与对照达极显著差异($P < 0.01$),根系活力分别下降 17.2%、27.1%,极显著低于对照($P < 0.01$)。由此可知,用乙酸乙酯提取栽参土壤可有效获得部分人参化感物质,其可促进人参幼苗根细胞膜脂质过氧化作用,使膜透性增加,降低人参幼苗根系活力,影响其生长发育。

关键词:人参;土壤;化感物质;化感作用

中图分类号: S567.5⁺¹

文献标识码: A

Study on Screening of Active Constituents from Extracts on Soil Cultivated Ginseng and Their Effects on Physiology of Ginseng Seedling

SHAO Cai, GUO Jing, XU Shi-Quan, WANG Zhi-Qing, WANG Ying-Ping

(Institute of Special Wild Economic Animal and Plant Science, CAAS, Changchun 130122, China)

Abstract: Two methods were applied in the study that used different chemical reagents (Ethyl acetate, Water-saturated N-butanol) to extract aquatic extracts from cultivated ginseng soil and directly used different chemical reagents (Ethyl acetate, N-butanol, Methanol, Distilled water) to extract cultivated ginseng soil. Activity of each constituent was determined with ginseng seeds. Root vigor and MDA content of ginseng seedling was determined after treated with higher activity constituents. The results showed that each constituent of extracts from cultivated ginseng soil had effects on radicles growth of ginseng seeds in various degree, and inhibited effects were strengthened with concentration increasing. Both ethyl acetate phase of aquatic extracts and ethyl acetate extracts from cultivated ginseng soil manifested stronger inhibited effects, and both constituents had significant effects on root vigor and MDA content of ginseng seedling. The content of MDA increased 23.8% and 37.5%, respectively, which was dramatically different from that of control ($P < 0.01$). The root vigor decreased 17.2% and 27.1%, respectively, which was significantly lower than that of control ($P < 0.01$). Thus, it is an effective approach that we extract cultivated ginseng soil with ethyl acetate to gain a part of ginseng allelochemicals, which could promote root cell membrane lipid peroxidation and increase membrane permeability, and reduce root activity of ginseng seedling and influence its growth and development.

收稿日期:2012-01-06

基金项目:国家科技支撑项目(2006BAI06A12,2006BAI06A05-02)

作者简介:邵 财(1982-),男,研究实习员,硕士,从事药用植物资源研究。

通讯作者:王英平,男,博士,研究员,E-mail:yingpingw@126.com

Keywords: Ginseng; Soil; Allelochemicals; Allelopathy

人参(*Panax ginseng* C.A.Mey.)为五加科人参属植物,素有“百草之王”的美誉。人参具有极强的忌连作特性,栽参后的田地(俗称老参地)10~20年内无法重复利用,否则将出现“烧须、病多、产量低”等问题^[1],因此,参农不断开垦新林地以满足栽参需要,这不仅造成土地资源的极大浪费,同时也引起生物多样性丧失、水土流失严重、土壤涵养水源能力降低、土壤肥力下降、森林生态平衡失调等一系列生态问题^[2]。党中央、国务院从我国社会经济可持续发展的战略高度,做出了实施天然林资源保护工程的重大决策,对土地资源已经十分紧张的参业生产发展造成了更大的困难。目前,连作障碍已成为制约人参大规模、规范化种植的瓶颈。多年来,国内外学者从土壤结构、营养状况、土壤理化特性、根际微生物区系等角度对人参连作障碍的形成及作用机理开展了广泛而深入的研究,但一直没能得出一种较为合理的解释^[3-4]。近年来,随着植物化感作用的兴起,很多学者从人参化感物质入手来研究人参连作障碍问题,分别从人参根际土及老参地土提取化感物质来研究其对人参种子萌发、幼苗根长、根尖超微结构的影响及采用GC-MS对根系分泌物进行鉴定并研究其对人参病原菌的化感效应^[5-8],这些研究对解决人参连作障碍起到了重要的指导和推动作用,确定了人参化感物质在其连作障碍中的重要角色。然而,以往研究人参化感作用方法多数采用有机试剂提取栽参土壤并对其组分进行化感效应研究,但在自然条件下,除了水以外,不可能有其它溶剂,目前,对于采用有机试剂提取方法的选择及栽参土壤提取物活性组分筛选报道较少。为此,本文对栽参土壤水提液用不同化学试剂萃取和直接采用不同化学试剂提取,对得到的各组分进行生物活性测定,经筛选所得活性组分以人参幼苗为试材进行化感效应研究,为今后人参化感物质的提取、分离及解决人参连作障碍提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 人参种子培养

经过后熟处理的人参种子购于吉林省抚松县万良镇。人参种子先用自来水冲洗干净,再用1000倍的50%多菌灵可湿性粉剂处理10 min,自来水反复冲洗,在23℃恒温保湿培养24 h,从中选择发芽整齐、颗粒饱满的种子进行生物活性测定,取培

养4 d的种子进行活性组分化感效应研究。

1.2 栽参土壤提取物

1.2.1 栽参土壤水提液不同化学试剂萃取组分

采集抚松一参场栽参床土(两年生人参移栽,在其生长3年后),自然风干的土壤样品研细后过60目筛,称取土壤样16 kg,用蒸馏水5倍量提取3次,提取液合并过滤,减压浓缩到一定体积,分别用等体积乙酸乙酯、水饱和正丁醇各萃取3~5次,得到乙酸乙酯相、水饱和正丁醇相、水相三部分溶液,将各部分溶液减压浓缩,甲醇定容100 mL,得到土壤质量浓度160 g·mL⁻¹的溶液,放置4℃冰箱内备用。

1.2.2 栽参土壤不同化学试剂提取物

称取上述土壤样2 kg,依次用乙酸乙酯、正丁醇、甲醇、蒸馏水提取,各提取3次,合并各部分提取物,得到乙酸乙酯相、正丁醇相、甲醇相、水相四个部分,将各部分溶液减压浓缩,甲醇定容50 mL,得到土壤质量浓度40 g·mL⁻¹的溶液,放置4℃冰箱内备用。

1.3 栽参土壤提取物生物活性测定

1.3.1 水提液不同化学试剂萃取组分

取一定量水提液萃取后得到的3部分溶液,配制成土壤质量浓度120 g·mL⁻¹、80 g·mL⁻¹、40 g·mL⁻¹、20 g·mL⁻¹、10 g·mL⁻¹的溶液,各取2.5 mL至事先灭菌的直径11 cm培养皿(铺有2层吸水滤纸)中,对照加入2.5 mL甲醇,待甲醇挥发后,每皿加入5 mL蒸馏水,使培养液中土壤的质量浓度分别为60 g·mL⁻¹、40 g·mL⁻¹、20 g·mL⁻¹、10 g·mL⁻¹、5 g·mL⁻¹,每个培养皿中放入15粒人参种子,每个处理3次重复。放置23℃恒温保湿培养5 d,测量根长,记录数据。

1.3.2 不同化学试剂提取组分

取一定量的上述不同化学试剂提取的4部分溶液,配制成土壤质量浓度10 g·mL⁻¹、7.5 g·mL⁻¹、5 g·mL⁻¹、2.5 g·mL⁻¹的溶液,各取1 mL至事先灭菌的直径11 cm培养皿(铺有2层吸水滤纸)中,对照加入1 mL甲醇,待甲醇挥发后,每皿加入5 mL蒸馏水,使培养液中土壤的质量浓度分别为2 g·mL⁻¹、1.5 g·mL⁻¹、1 g·mL⁻¹、0.5 g·mL⁻¹,其它处理及培养条件同1.3.1。

1.4 人参幼苗根系活力和丙二醛含量的测定

1.4.1 水提液乙酸乙酯萃取部分

取土壤质量浓度40 g·mL⁻¹乙酸乙酯相溶液

2.5 mL 至事先灭菌的直径 11 cm 培养皿(铺有 2 层吸水滤纸)中,对照加入 2.5 mL 甲醇,待甲醇挥发后,每皿加入 5 mL 蒸馏水,每个培养皿中放入人参幼苗(根长约 2 cm)15 颗,分别间隔 48 h、72 h、84 h(以第一次培养时间记)培养人参幼苗,每批培养处理和对照培养皿各 21 个,培养 96 h 后,进行人参幼苗根系活力和丙二醛含量的测定。根系活力和丙二醛含量测定分别采用 TTC 法和 TBA 法^[9]。

1.4.2 乙酸乙酯提取部分

取土壤质量浓度 $5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 乙酸乙酯提取部分溶液 1 mL 至事先灭菌的直径 11 cm 培养皿(铺有 2 层吸水滤纸)中,对照加入 1 mL 甲醇,待甲醇挥发后,每皿加入 5 mL 蒸馏水,培养和测定方法同 1.4.1。

1.5 数据分析

利用 SAS 软件对统计数据进行分析,不同处理组间的差异显著性用 LSD 法分析。

2 结果与分析

2.1 栽参土壤提取物各组分对人参种子根长的影响

根据试验统计结果图 1 可知,与对照相比,栽参土壤提取液不同组分均对人参种子胚根生长有不同程度的影响,随着浓度逐渐增加抑制作用逐

渐增强。由图 1 可知,培养液浓度大于等于 $40 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,每个处理间及处理与对照均有极显著性差异 ($P < 0.01$),培养液浓度小于等于 $20 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,正丁醇相与对照差异不显著 ($P > 0.05$),乙酸乙酯相和水相均与对照有显著性差异 ($P < 0.05$),除 $10 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时乙酸乙酯相与水相有极显著性差异外 ($P < 0.01$),在 $5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $20 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时乙酸乙酯相与水相均无显著性差异 ($P > 0.05$),在 $5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时乙酸乙酯相与对照有极显著性差异 ($P < 0.01$),水相与对照差异未达极显著 ($P > 0.05$)。由此可见,栽参土壤提取物对人参种子的化感作用可能是多种化感物质综合作用的结果,乙酸乙酯相、水相两部分抑制活性较高。但由于本试验采用萃取方法,水相可能残留乙酸乙酯相、正丁醇相中的成分,所含的物质多而杂,另外,水相中可能含有高浓度无机离子而改变培养液的渗透势,它不但影响生物测定结果中化感作用的抑制或促进作用程度,且可能改变结果的性质^[10]。

由图 2 可知,栽参土壤不同试剂提取物对人参种子胚根生长的抑制作用与水提液不同试剂萃取组分的抑制活性相似,同样表现为乙酸乙酯相、水相抑制作用较大,在培养浓度大于等于 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,与对照差异达极显著 ($P < 0.01$),且乙酸乙酯相对人参种子胚根的抑制作用极显著大于水相 ($P < 0.01$)。在培养浓度为 $0.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,乙酸乙酯相与对照差异极显著 ($P < 0.01$),其它各相与

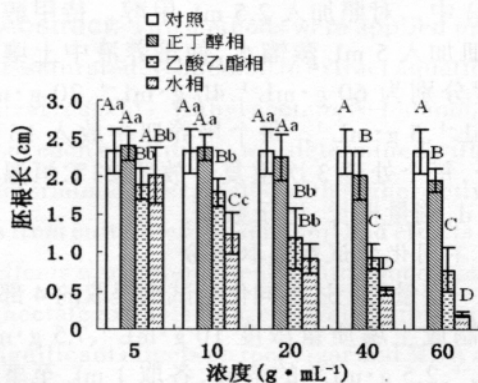


图 1 栽参土壤水提取液不同组分对人参种子胚根生长(均值 ± 标准差)的影响

注:同一组处理间不同小写字母表示达到 5% 的显著水平,不同大写字母表示达到 1% 的显著水平。

对照无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.2 栽参土壤提取液活性组分对人参幼苗的影响

2.2.1 对人参幼苗根系丙二醛含量的影响

植物在遭受逆境条件下,往往发生膜质过氧

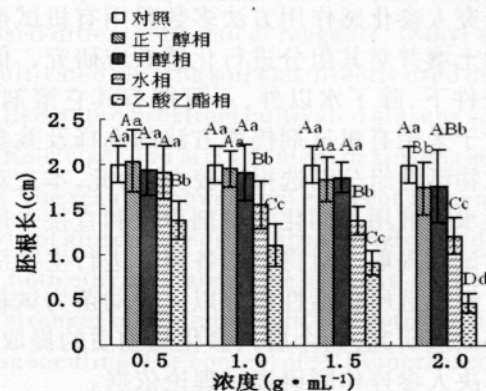


图 2 栽参土壤不同试剂提取组分对人参种子胚根生长(均值 ± 标准差)的影响

化作用,丙二醛(MDA)是膜质过氧化的最终分解产物,通常利用它表示细胞膜质过氧化程度和植物对逆境条件反应的强弱。从试验结果可以看出,栽参土壤提取液活性组分对人参幼苗根系丙二醛含量有显著影响,随着培养时间延长,丙二醛含量

逐渐增加。由图 3 可知,在培养 24 h 后,处理人参幼苗根系丙二醛含量增加 14.5%,与对照差异极显著($P < 0.01$),在培养 48 h、96 h 后,处理人参幼苗根系丙二醛含量分别增加 18.8%、23.8%。图 4

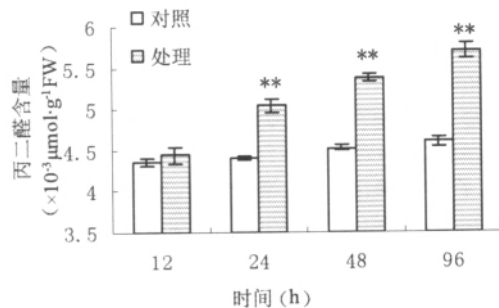


图 3 栽参土壤水提取液乙酸乙酯相对人参幼苗根系丙二醛含量(均值 ± 标准差)的影响

2.2.2 对人参幼苗根系活力的影响

植物组织脱氢酶活力是细胞呼吸电子传递链活性的一种表现,对根的生长和代谢的旺盛程度有指示作用,为细胞吸收和逆浓度梯度运输营养离子提供能量。根系活力受抑制,吸收养分能力降低,植物根系生长缓慢,生长发育受阻^[11]。试验表明,栽参土壤提取液活性组分对人参幼苗根系活力有显著影响,随培养时间延长,根系活力逐渐减

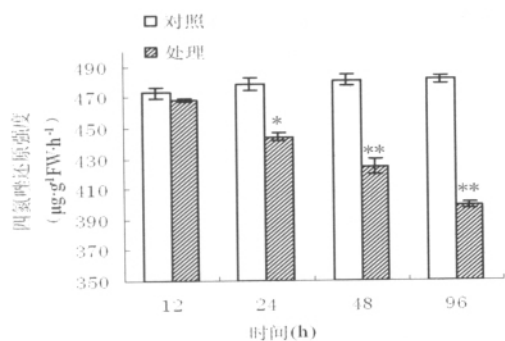


图 5 栽参土壤水提取液乙酸乙酯相对人参幼苗根系活力(均值 ± 标准差)的影响

注:*表示 $p < 0.05$,即达到 5%的显著水平,**表示 $p < 0.01$,即达到 1%的极显著水平。
照差异达极显著($P < 0.01$)。

3 讨论与结论

栽参土壤提取物各组分对人参种子胚根生长的影响研究表明,栽参土壤水提取液乙酸乙酯萃取相和栽参土壤乙酸乙酯提取液对人参胚根伸长有较强的抑制作用。在抑制作用约为 50%的浓度下培养人参幼苗,测定其根系活力和丙二醛含量的结果表明,两个组分对幼苗根系活力和丙二醛

表明,用栽参土壤乙酸乙酯提取物处理人参幼苗 48 h 后,根系丙二醛含量显著高于对照($P < 0.05$),在培养 96 h 后,处理幼苗根系丙二醛含量增加 37.5%,与对照达极显著差异($P < 0.01$)。

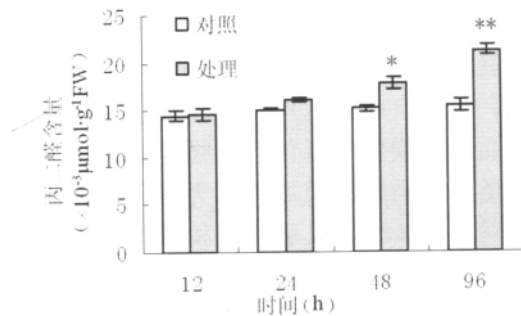


图 4 栽参土壤乙酸乙酯提取部分对人参幼苗根系丙二醛含量(均值 ± 标准差)的影响

弱。由图 5 可知,在培养 24 h 后,处理人参幼苗根系活力显著低于对照($P < 0.05$),在培养 48 h、96 h 后,处理人参幼苗根系活力分别下降 11.7%和 17.2%,与对照间均达到差异极显著水平($P < 0.01$)。由图 6 可以看出,栽参土壤乙酸乙酯提取部分显著降低人参幼苗根系活力,在培养 24 h 后,处理人参幼苗根系活力显著低于对照($P < 0.05$),在培养 96 h 后,根系活力下降 27.1%,与对

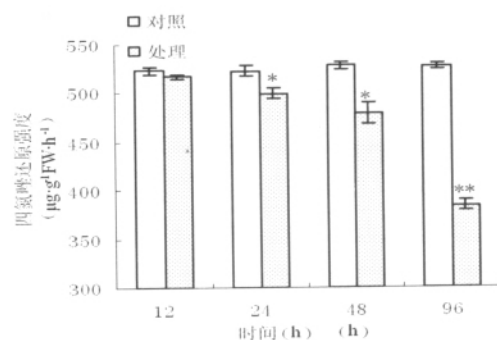


图 6 栽参土壤乙酸乙酯提取部分对人参幼苗根系活力(均值 ± 标准差)的影响

含量都产生显著性影响。由此可初步确定,乙酸乙酯相中可能存在部分人参化感物质,研究人参化感作用方法中,使有机溶媒代替水溶液来提取化感物质成为可能,从而可增加人参化感物质提取率和提高工作效率。但人参化感物质的分离、鉴定尚待研究。

任何植物都不只合成一种化感物质,植物化感作用是众多化感物质共同作用的结果^[12]。栽参土壤提取物不同组分生物活性测定结果表明,人

参化感作用也可能是多种化感物质综合作用的结果。因此,研究人参化感物质间的相互作用,对全面认识人参化感作用具有重要意义。但由于在研究技术和评价方法上存在较大困难,因而相关的文献报道并不多。

化感物质对细胞膜功能影响的相关研究表明^[3-14],植物遭受化感物质的胁迫后,SOD和CAT酶活性受抑制,导致自由基含量不断增加,启动膜过氧化,从而提高膜质过氧化的最终分解产物-丙二醛的含量。膜系统的破坏被认为是化感作用的第一步^[15-16]。人参幼苗根系活力和丙二醛含量测定结果表明,处理人参幼苗根系细胞膜在一定程度上受到破坏,可能为化感物质进入细胞提供便利条件,严重影响人参幼苗根系活力。外观表现根受到抑制,严重时可导致死亡^[17-18]。有关人参化感作用分子机理还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 王韵秋. 全国人参科技资料汇编 栽培分册 [M]. 北京: 国家医药管理局, 1985, 497-498.
- [2] 杨利民, 陈长宝, 王秀全, 等. 长白山区参后地生态恢复与再利用模式及其存在的问题[J]. 吉林农业大学学报, 2004, 26(5): 546-549, 553.
- [3] 韩东, 雷军, 杨继祥. 老参地问题的研究进展[J]. 人参研究, 1998(2): 2-5.
- [4] 安秀敏, 王秀全, 刘兆娟, 等. 老参地栽参的研究进展[J]. 吉林农业大学学报, 1997, 19(增刊): 89-92.
- [5] 陈长宝, 刘继勇, 王艳艳, 等. 人参根际化感作用及其对种子萌发的影响[J]. 吉林农业大学学报, 2006, 28(5): 534-537, 541.
- [6] 李勇, 黄小芳, 丁万隆, 等. 不同土壤提取物对人参种子生长的化感效应及其化学组成[J]. 生态环境, 2008, 17(3): 1173-1178.
- [7] 许世泉, 艾军, 王英平, 等. 人参化感物质对人参根尖组织结构的影响研究[J]. 特产研究, 2008, 30(2): 36-38.
- [8] 李勇, 刘时轮, 黄小芳, 等. 人参(*Panax ginseng*)根系分泌物成分对人参致病菌的化感效应[J]. 生态学报, 2009, 29(1): 161-166.
- [9] 章家恩. 生态学常用实验研究方法与技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007, 78, 112-113.
- [10] 邵华, 彭少麟, 张驰, 等. 化感作用研究中渗透势对生物测定结果的影响[J]. 中国生态农业学报, 2003, 11(3): 37.
- [11] 王璞, 赵秀琴. 几种化感物质对棉花种子萌发及幼苗生长的影响[J]. 中国农业大学学报, 2001(3): 26-31.
- [12] 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, 115.
- [13] 周凯. 菊花自毒作用的初步研究[D]. 南京农业大学, 2004, 34-37.
- [14] 何华勤, 林文雄. 水稻化感作用生理生化特性研究[J]. 中国生态农业学报, 2001, 9(3): 56-57.
- [15] Einhelling F A, Inderjit, Dakshini KMM. Mechanism of action allelochemicals in allelopathy [M]. American Chemical Society, 1995, 96-116.
- [16] Inderjit. Plant phenolics in allelopathy [J]. Botanical Review, 1996, 62(2): 186-202.
- [17] 王宝山. 生物自由基与植物膜伤害[J]. 植物生理学通讯, 1988(1): 12-16.
- [18] 蒋明义, 荆家海, 王韶唐. 水分胁迫与植物膜质过氧化[J]. 西北农业大学学报, 1991, 19(2): 88-93.