

花生根分泌物的鉴定及其化感作用*

王小兵^{1,2} 骆永明^{2,3**} 刘五星² 李振高²

(¹扬州大学环境科学与工程学院, 江苏扬州 225009; ²中国科学院土壤环境与污染修复重点实验室, 中国科学院南京土壤研究所, 南京 210008; ³中国科学院烟台海岸带研究所, 山东烟台 264003)

摘要 采用改进的根系分泌物循环收集系统收集花生根系分泌物, 利用气相色谱/质谱联用仪(GC-MS)鉴定其结构, 并研究了花生根系分泌物对花生青枯病原菌的化感作用。结果表明, 花生根系分泌物中主要含有丙三醇、苯甲酸、3,5-二甲基苯甲醛、苯乙酮、硬脂酸、棕榈酸和乳酸等7种物质。7种根系分泌物中只有苯乙酮在浓度低于 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 对花生青枯病原菌生长才有明显的促进作用。同时还发现, 苯乙酮浓度超过 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 后对花生青枯病原菌有显著的抑制作用。这一结论为利用苯乙酮调控花生青枯病害的发生提供了可靠的依据。

关键词 花生; 根分泌物; GC-MS; 花生青枯病原菌; 化感作用

中图分类号 Q946.8 文献标识码 A 文章编号 1000-4890(2011)12-2803-06

Identification of peanut root exudates and their allelopathic effects. WANG Xiao-bing^{1,2}, LUO Yong-ming^{2,3**}, LIU Wu-xing², LI Zhen-gao² (¹ College of Environmental Sciences and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China; ² Key Laboratory of Soil Environment and Pollution Remediation of Chinese Academy of Sciences, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; ³ Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, Shandong, China). *Chinese Journal of Ecology*, 2011, 30(12): 2803-2808.

Abstract: The root exudates of peanut collected by a modified continuous collecting device and XAD-4 ion exchange resin were identified by GC-MS, and their allelopathic effects on *Ralstonia solanacearum* were studied. The root exudates mainly contained acetophenone, glycerol, benzoic acid, 3,5-dimethyl benzaldehyde, stearic acid, palmitic acid, and lactic acid, among which, only acetophenone had obvious promotion effect on the growth of *R. solanacearum* at concentration $<0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, and significant inhibitory effect at concentration $>0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. These findings could provide a credible basis for using acetophenone to control the occurrence of *R. solanacearum*.

Key words: peanut; root exudates; GC-MS; *Ralstonia solanacearum*; allelopathy.

花生是红壤丘陵区主要经济作物和油料作物(刘毅等 2009), 由于该地区适种旱地作物种类较少, 且花生地冬季常休闲, 因此花生连作重茬现象较为普遍(王明珠和陈学南 2005)。然而, 长期连作导致花生生长受抑、产量降低、品质下降(Sorensen *et al.*, 2005; 吴正锋等 2006; 万书波等 2007), 花生连作障碍已成为制约红壤花生持续优质高产和稳产的一大重要因素。王小兵等(2010)利用红壤连作

花生长期定位实验基地研究发现, 连作花生青枯病发生严重。花生连作多年后, 其产量与结荚期花生青枯病发病率呈极显著负相关(王小兵等 2011), 连作花生青枯病发生严重是红壤花生连作障碍的突出表现。

在连作条件下, 作物病害发生受到来自土壤、微生物和植物等诸多因子的影响, 其中植物根系分泌物的化感作用已受到越来越多研究者的重视(Kong *et al.* 2008; Li *et al.* 2010; Senarathne *et al.*, 2010; Gil *et al.* 2011)。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,

* 国家自然科学基金重点项目(40432005)和中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-YW-G-053-3)资助。

** 通讯作者 E-mail: ymluo@issas.ac.cn

收稿日期: 2011-05-14 接受日期: 2011-09-02

$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的母液。调 pH 为 7.0 后配制成浓度为 0.15、1.5、3.0、7.5、15 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 序列梯度溶液, 经过滤灭菌后, 从苯乙酮梯度溶液中吸取 1 ml 分别加入到盛有 30 ml 培养液三角瓶内, 使培养液中苯乙酮的浓度分别为 0、0.005、0.05、0.1、0.25、0.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。花生青枯病原菌在 YGPA 平板培养 3 d 后用三角棒刮下溶于 2 ml 无菌水中, 每三角瓶接 10 μl 菌悬液, 200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 18 h 后测定吸光度, 每个处理 4 次重复。苯乙酮化感作用所用的培养基为 5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖和 0.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化铵加入红壤浸提液 (土水比 1 : 1.5), 调至 pH 为 7.0 后高温灭菌 (121 $^{\circ}\text{C}$, 20 min)。花生青枯病原菌所用培养基为 YGPA 培养基: 葡萄糖 10 g; 蛋白胨 5 g; 酵母提取物 5 g; pH 7.2。

2 结果与分析

2.1 花生根系分泌物循环收集装置运行

如何准确定量收集根系分泌物是研究根系分泌物与土传病害关系的必要前提条件。目前多采用水培 (Shen *et al.*, 2001)、基质培 (Hoffland *et al.*, 1989)、放射性检测法 (C^{14} 标记) (McDougall & Rovira, 1970)、吸附剂薄膜 (Shen *et al.*, 2005)、连续性根分泌物 (Tang & Young, 1982)、微透析技术 (microdialysis) (梁文举等 2005) 等收集方法。其中, 连续性根分泌物收集系统法 (CRETS) 最早由 Tang 和 Young (1982) 提出, 利用连续性根分泌物收集系统从无干扰的根系统中收集并有效地提取了根分泌的化感物质, 具有及时性、稳定性和选择性等优点。越来越多的研究者以此为基础设计了多种根系分泌物循环收集装置 (贾黎明等 2003; 廖继佩等 2003; 王占义等 2010)。本装置 (图 1) 在前人研究基础上做了如下的改进: 1) 本研究装置中导管均为 Teflon。Teflon 高性能特种涂料是以聚四氟乙烯为基体树脂的氟涂料, 具有化学惰性, 从而避免了装置在收集根系分泌物过程中受到过多的其他污染; 2) 以前的装置中水循环的动力是由小型空气压缩机所产生的, 其缺点是易将空气中杂质以及微生物带入循环系统中, 其缺点是易将空气中杂质以及微生物带入循环系统中。本研究中将小型空气压缩机改为蠕动泵, 其作用能够使循环系统成为密闭系统, 尽量减少了循环水与外部接触, 所用材料包括营养液以及纯净水均灭菌处理。

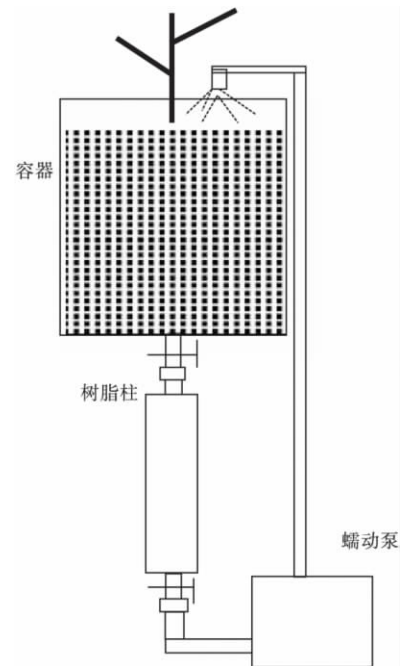


图 1 花生根系分泌物循环收集装置示意图

Fig. 1 Cycling collection device of peanut root exudates

2.2 花生根系分泌物的鉴定

在幼苗生长至 10 d 时 (3 ~ 4 片叶子), 将树脂柱连接到根分泌物连续收集系统中, 连续收集 5 d 后取下树脂柱。对甲醇洗脱的花生根系分泌物进行气相色谱/质谱联用仪 (GC-MS) 分析 (图 2)。图 2 中 15.3 min 出现了较强的峰, 与是空白对照的色谱图 (图 3) 一致。其质谱图中出现了 m/z 149、167、279 等邻苯二甲酸酯类特征峰 (张银华等, 1995), 经过与质谱库比对, 确定为邻苯二甲酸二异丁酯。由于该化合物是塑料工业中广泛使用的增塑剂, 但在使塑料软化的同时, 会逐渐从塑料中释放出来, 进入环境。

在上机前利用 BSTFA 对样品进行硅烷化, m/z 73 是三甲基硅的碎片, 也是硅烷化样品的特征碎片。若质谱图中出现系列 $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$ 峰, 则化合物可能含长链烷基。若出现或部分出现 m/z 77、66、65、51、40、39 等弱的碎片离子峰, 表明化合物含有苯基。若 m/z 91 或 105 为基峰或强峰, 表明化合物含有苄基或苯甲酰基。若质谱图中基峰或强峰出现在质荷比的中部, 而其他碎片离子峰少, 则化合物可能由两部分结构较稳定, 其间由容易断裂的弱键相连。根据以上特征离子碎片, 然后与质谱标准图谱比对, 判断出以下几种物质 (表 1)。

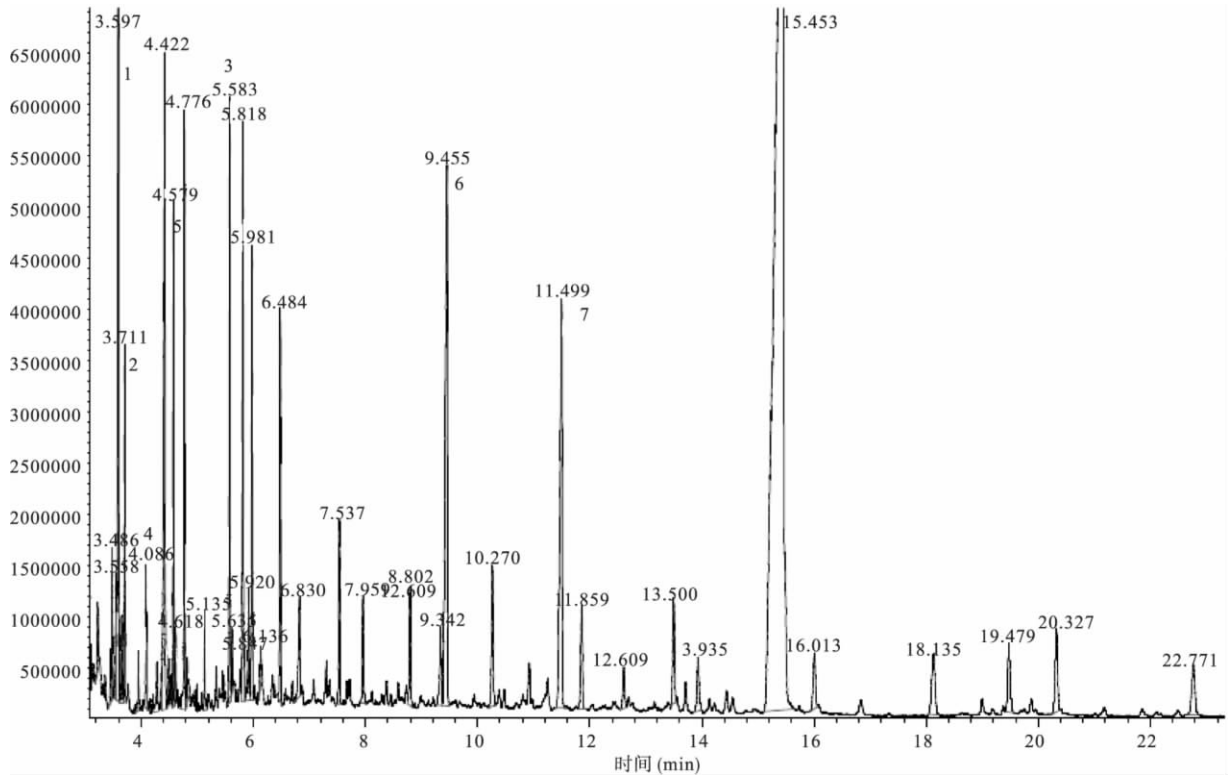


图2 花生根系分泌物气相色谱图
Fig. 2 GAS-chromatogram of peanut root exudates

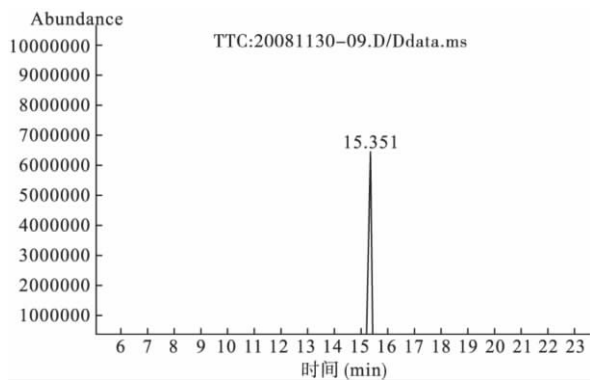


图3 空白对照的气相色谱图
Fig. 3 GAS-chromatogram of CK

表1 鉴定出的花生根系分泌物
Table 1 Identification of peanut root exudates

序号	保留时间 (min)	相对含量 (%)	花生根系分泌物
1	3.596	10.15	乳酸
2	3.711	2.95	苯乙酮
3	4.421	10.15	3,5-二甲基苯甲醛
4	4.495	2.52	苯甲酸
5	4.579	3.57	丙三醇
6	9.457	9.81	棕榈酸
7	11.500	9.42	硬脂酸

2.3 花生根系分泌物对花生青枯病原菌的化感作用

将 YGPA 培养液中 C 源由葡萄糖改为等量分泌物培养花生青枯病原菌 摇瓶培养 18 h 后测定吸光度见表 2。结果表明,苯乙酮对花生青枯病原菌有化感促进作用,因此利用苯乙酮进一步进行试验。

2.4 苯乙酮对花生青枯病原菌的化感作用

利用含有不同浓度苯乙酮培养液培养花生青枯病原菌 18 h 后,对花生青枯病原菌生长的影响见图 3。由图 3 可以看出,苯乙酮浓度 $\leq 0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,随着苯乙酮的浓度的增加,对花生青枯病原菌的促进作用逐渐增强,在 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时青枯菌量达到最高,与对照有显著差异 ($P < 0.05$)。而苯乙酮浓度高于 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对花生青枯菌有显著抑制作用 ($P < 0.05$)。

3 讨论

根系分泌物的原位研究方法一直是根际微域环境研究的前沿和难点。根系分泌物在收集过程中受微生物的影响较大,Uselman 等(2000)报道,根系分泌物中能被迅速降解的占 60%。前人所研制的连

表2 花生根系分泌物的吸光度

Table 2 Absorbance of peanut root exudates on *Ralstonia solanacearum*

碳源	葡萄糖	苯甲酸	乳酸	3,5-二甲 基苯甲醛	丙三醇	棕榈酸	硬脂酸	苯乙酮
OD_{600}	0.030	0.021	0.012	0.013	0.024	0.015	0.012	0.068

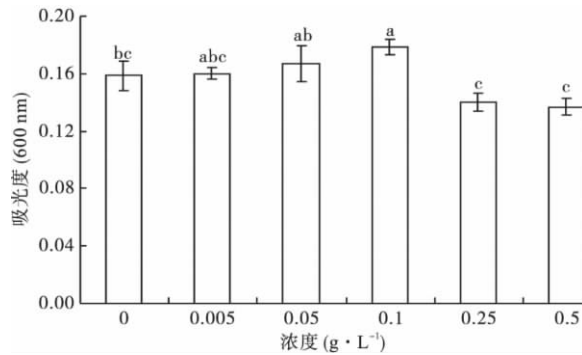


图4 苯乙酮对花生青枯病原菌的影响

Fig. 4 Effect of acetophenone on *Ralstonia solanacearum*

续收集系统对保持系统无菌运行考虑得较少,无法保证收集的根系分泌物是否已被微生物降解或转化 (Tang & Young, 1982; Hao *et al.*, 2007)。本试验从多方面改进连续收集系统,尽可能避免外源杂质以及微生物对系统的影响。在收集根系分泌物时,可适当延长根系分泌物的收集时间,提高根系分泌物的收集量,这为研究根系分泌物提供了方法上的保障。

本试验采用 XAD-4 树脂作为花生根系分泌物的吸附介质,通过 GC-MS 鉴定根系分泌物组成,但限于检测仪器的灵敏程度,一些含量较低的根系分泌物仍无法鉴定。本试验中检测到 7 种物质都是峰值较大的一些脂肪酸、脂类物质,而可能有一些分泌量较小,但毒性较强的化感物质并没有被检测出来。另外,本实验中所鉴定的 7 种物质是在与 GC-MS 标准图谱核对相似度极高,并通过精通有机分子结构专家鉴定得出的,还有一些相似度较低的根系分泌物组分,需要在分离纯化基础上,利用 NMR(核磁共振)等手段进行鉴定。

根际微生物除受土壤环境条件的影响外,最重要的还是取决于根系分泌物。刘莘等(2009)研究发现,花生根系分泌物的中性、酸性和碱性组分对根腐镰刀菌菌丝的生长均存在一定的化感促进作用,对固氮菌的生长存在一定的化感抑制作用,并随添加浓度的增加化感作用增强。本研究结果表明,花生根系分泌物中苯乙酮的积累对花生青枯病原菌有化感作用,很可能是导致红壤地区连作花生青枯病

害发生严重的主要原因之一。本研究同时还发现,苯乙酮浓度超过 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 后对花生青枯病原菌产生抑制作用。在测定土壤中苯乙酮浓度的基础上,这一结论为利用苯乙酮调控花生青枯病害发生的方法提供了可靠的依据。

根系分泌物只是土壤中化感物质的来源之一,植物通过根茬腐解、茎叶淋洗等途径也可以向环境释放化感物质 (Hyder *et al.*, 2002)。另外,土壤中微生物的代谢活动也会释放化感物质。因此,必须对其作进一步的测试分析,并研究各成分对花生青枯病原菌生长发育和入侵的影响,以揭示其发生的机理。

参考文献

- 贾黎明,冯菊芬,文学军,等. 2003. 循环水根系分泌物收集技术的研究及应用. 北京林业大学学报, 25(6): 5-10.
- 梁文举,张晓珂,姜勇,等. 2005. 根分泌的化感物质及其对土壤生物产生的影响. 地球科学进展, 20(3): 330-337.
- 廖继佩,林先贵,曹志洪,等. 2003. 一种新型连续根分泌物收集装置. 土壤, 35(4): 311-313.
- 刘莘,江丽华,万书波,等. 2009. 花生根系分泌物对根腐镰刀菌和固氮菌的化感作用研究. 中国农业科技导报, 11(4): 107-111.
- 刘毅,伍先明,方先兰,等. 2009. 江西花生低产原因分析及高产栽培技术对策. 江西农业学报, 21(8): 38-39.
- 万书波,王才斌,卢俊玲,等. 2007. 连作花生的生育特性研究. 山东农业科学, (2): 32-36.
- 王明珠,陈学南. 2005. 低丘红壤区花生连续高产的障碍及对策. 花生学报, 34(2): 17-22.
- 王小兵,骆永明,李振高,等. 2011. 长期定位施肥对红壤地区连作花生生物学性状和土传病害发生率的影响. 土壤学报, 48(4): 53-58.
- 王小兵,骆永明,刘五星,等. 2010. 红壤连作花生青枯病发病规律及病原菌分离. 花生学报, 39(2): 6-10.
- 王占义,潘宁,罗茜,等. 2010. 一种新型根系分泌物收集装置与收集方法的介绍. 土壤学报, 47(4): 747-752.
- 吴正锋,成波,王才斌. 2006. 连作对花生幼苗生理特性及荚果产量的影响. 花生学报, 35(1): 29-33.
- 张辉,黄鹏,柴强,等. 2010. 不同供水水平下小麦根系分泌物及典型化感物质的生物学效应. 甘肃农业

- 大学学报, (1): 52-57.
- 张银华, 陈旭东, 李植生, 等. 1995. 湖泊沉积物中邻苯二甲酸酯类的 GC/MS 分析. 分析测试学报, **14**(5): 17-21.
- Gil SV, Meriles J, Conforto C, et al. 2011. Response of soil microbial communities to different management practices in surface soils of a soybean agroecosystem in Argentina. *European Journal of Soil Biology*, **47**: 55-60.
- Hao ZP, Wang Q, Christie P, et al. 2007. Allelopathic potential of watermelon tissues and root exudates. *Scientia Horticulturae*, **112**: 315-320.
- Hoffland E, Pindenege GR, Nelemans JA. 1989. Solubilization of rock phosphate by rape (II). *Plant and Soil*, **113**: 161-165.
- Hyder PW, Fredrickson EL, Estell ME, et al. 2002. Transport of phenolic compounds from leaf surface of creosotebush and tarbush to soil surface by precipitation. *Journal of Chemical Ecology*, **28**: 2475-2482.
- Kong CH, Wang P, Zhao H, et al. 2008. Impact of allelochemical exuded from allelopathic rice on soil microbial community. *Soil Biology and Biochemistry*, **40**: 1862-1869.
- Li CG, Li XM, Kong WD, et al. 2010. Effect of monoculture soybean on soil microbial community in the Northeast China. *Plant and Soil*, **330**: 423-433.
- McDougall BM, Rovira AD. 1970. Sites of exudation of C-14-labelled compounds from wheat roots. *New Phytologist*, **69**: 999-1003.
- Perez FJ, Oremeno-Nunez J. 1991. Root exudates of wild oates: Allelopathic effect on spring wheat. *Phytochemistry*, **30**: 2199-2201.
- Senarathne HS, Dissanayaka NM, Vidhana Arachchi LP. 2010. Allelopathic potential of *Brachiaria brizantha* and *B. milliformis* on seed germination of selected bioassay species. *Pakistan Journal of Weed Science Research*, **16**: 207-216.
- Shen H, Wang XC, Shi WM, et al. 2001. Isolation and identification of specific root exudates in elephant grass (*Pennislium* L.) in response to aluminum- and iron-bound phosphates. *Journal of Plant Nutrition*, **24**: 1131-1144.
- Shen J, Li H, Neumann G, et al. 2005. Nutrient uptake, cluster root formation and exudation of protons and citrate in *Lupinus albus* as affected by localized supply of phosphorus in a split-root system. *Plant Science*, **168**: 837-845.
- Sorensen RB, Butts CL, Rowland DL. 2005. Five years of subsurface drip irrigation on peanut: What have we learned? *Peanut Science*, **32**: 14-19.
- Tang CS, Young CC. 1982. Collection and identification of allelopathic compounds from the undisturbed root system of Bigalta limpograss (*Hemarthria altissima*). *Plant Physiology*, **69**: 155-160.
- Uselman SM, Qualls RG, Thoman RB. 2000. Effects of increased atmospheric CO₂, temperature and soil N availability on root exudation of dissolved organic carbon by a N-fixing tree (*Robinia pseudoacacia* L.). *Plant and Soil*, **222**: 191-202.

作者简介 王小兵,男,1976年生,主要从事花生连作障碍研究。E-mail: xbwangxl@sina.com.cn
责任编辑 魏中青
