

# 马尾松林土壤酚酸类物质检测及其对灌草萌发的影响<sup>①</sup>

杨奕如<sup>1,3</sup>, 丁健桦<sup>2</sup>, 张桃林<sup>1</sup>, 王兴祥<sup>1,4\*</sup>

(1 中国科学院土壤环境与污染修复重点实验室(南京土壤研究所), 南京 210008; 2 东华理工大学, 江西抚州 344000; 3 中国科学院大学, 北京 100049; 4 江西省红壤生态研究重点实验室, 中国科学院红壤生态实验站, 江西鹰潭 335211)

**摘要:** 利用电喷雾萃取电离质谱(EESI-MS)测定荒草地、马尾松和木荷纯林地土壤酚酸类物质组成, 模拟研究了其对几种灌草种子萌发和幼苗生长的影响。结果表明, 荒草地、木荷林土壤没有检测到松香类物质, 而马尾松林土壤松香类物质浓度一般为 10~100 mg/kg。当土壤松香类物质浓度 < 12 mg/kg 时, 灌草发芽势与对照接近; 松香浓度 25 mg/kg 时, 黑麦草、白羊草、高羊茅和银合欢灌草发芽势显著低于对照。高浓度松香处理下, 银合欢发芽率显著低于对照。

**关键词:** 马尾松; 土壤酚酸; 松香; 灌草; 发芽

**中图分类号:** S153

南方红壤丘陵区是我国水土流失最严重的区域之一<sup>[1-2]</sup>, 植被覆盖质量低被认为是导致该区域林下水土流失的关键因素之一<sup>[3]</sup>。马尾松(*Pinus massoniana*)是我国南方重要的乡土造林树种, 广泛分布于秦岭、淮河以南, 云贵高原以东 17 个省(市)、区约 200 万 km<sup>2</sup>, 面积居全国针叶林首位, 是我国南方最具代表性的森林类型之一<sup>[4]</sup>, 在中国南方森林木材、松脂林产品及森林碳汇等方面具有重要的地位和作用。马尾松松香是最主要最常见的脂松香品种, 其内含物松脂, 是生产松香、松节油的重要原料, 以马尾松松脂为原料生产得到的脂松香占全部松香产量的 80%以上<sup>[5]</sup>。松香的主要组成部分是树脂酸, 以物理的观点来看, 松香是各种同分异构树脂酸的熔合物, 它们具有同一分子式 C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>, 这个分子式可以认为是以羧基代替甲基的二萜类含氧衍生物。树脂酸是一类混合物的总称, 是具有一个三环菲骨架的含有二个双键的一元羧酸。常见的树脂酸有 8 种: 异海松酸、山达海松酸、海松酸、长叶松酸、新枞酸、左旋海松酸、枞酸、脱氢枞酸。然而, 最近的调查结果表明, 马尾松林下灌、草生长状况较差, 常常难以形成乔、灌、草配套的水土保持植被条件, 无法形成强势的涵养水源能力, 难以达到良好的生态保护效果。因此, 恢复林下植被多样性、提高地面覆盖度就成为林下水土流失控制的关键措施。目前推测马尾松林下植物难

以恢复的主要原因是土壤酸化、地表干旱等<sup>[3,6]</sup>。

酚酸类物质是一类重要的化感物质, 对植物生长有抑制作用<sup>[7-8]</sup>。本文通过测定荒草地、马尾松和木荷(*Schima superba*)纯林地土壤酚酸物质组成特征差异, 并模拟研究其对几种亚热带灌草发芽的影响, 研究结果有助于加深马尾松林下植被恢复的土壤障碍特征认识, 对于指导亚热带地区马尾松林下植被恢复实践具有重要参考价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

2010 年 4 月在江西鹰潭中国科学院红壤生态实验站(116°55 E, 28°15 N)长期试验区采集荒草地土壤、20 年生马尾松根际与非根际土壤、20 年生木荷根际与非根际土壤, 采样深度均为 0~20 cm。该土壤为典型红黏土发育的红壤(普通筒育湿润富铁土), 采集的新鲜土壤样品去除肉眼可见根系、砾石外, 放入冰箱 0~4 °C 保存, 1 周内浸提检测。

### 1.2 土壤酚酸类物质检测方法

取 25 g 新鲜土壤样品 2 份, 分别用 50 ml 甲醇和水浸泡 0.5 h, 并超声提取 0.5 h, 将甲醇和水的上层提取液各 25 ml 合并制备成土壤溶液, 然后用电喷雾萃取电离质谱(EESI-MS)在负离子模式下直接测定其中的酚酸类物质。质谱条件: LTQ XL 离子阱质谱仪

基金项目: 中国科学院知识创新工程项目(KZCX2-YW-438)资助。

\* 通讯作者(xxwang@issas.ac.cn)

作者简介: 杨奕如(1984—), 女, 江苏常州人, 博士研究生, 主要从事植物资源与生态环境方面的研究。E-mail: yryang@issas.ac.cn

(美国 Finnigan 公司), 设置 EESI-MS 为负离子检测模式, 质谱扫描范围为( $m/z$ )50 ~ 1 000; 喷雾电压为 -4.0 kV; 离子传输管温度为 180 °C; 喷雾气压为 1.4 MPa; 萃取剂为甲醇: 氨水= 9: 1( $v: v$ ), 流速为 5  $\mu$ l/min; 样品溶液流速为 5  $\mu$ l/min。样品毛细管喷嘴与质谱仪入口之间的夹角  $\alpha$  为 155°, 样品毛细管喷嘴与溶剂毛细管喷嘴之间夹角  $\beta$  为 60°; 两个毛细管喷嘴与质谱仪入口之间的距离  $a$  为 1.0 cm, 两个毛细管喷嘴之间的距离  $b$  为 0.2 cm。其他参数由 LTQ-MS 系统自动优化<sup>[9]</sup>。

### 1.3 灌草发芽试验设计

由于缺乏市售树脂酸纯物质(土壤酚酸检测结果显示马尾松林土壤酚酸类物质含有去氢枞酸、枞酸和/或新枞酸和/或长叶松酸等, 为松香主要成分), 因此用松海牌马尾松松香混合物(产地为江西赣州)进行模拟实验。每个培养皿称土 50 g。分别称取 0、6、12、25、50、100 g 松香粉末, 用 1 ml 甲醇溶解(预备试验表明微量甲醇对发芽率没有影响), 再加去离子水成 500 ml 悬浊液, 边搅拌边吸取 25 ml 悬浊液均匀加入培养皿中, 配制成 0、6、12、25、50、100 mg/kg 松香土壤混合物。供试灌草种子为黑麦草(*Lolium perenne*)、白羊草(*Bothriochloa ischaemum*)、高羊茅(*Festuca elata*)和银合欢(*Leucaena leucocephala*)。种子发芽预处理按照不同种子发芽常规要求进行, 银合欢剪开种皮, 黑麦草、白羊草和高羊茅晒种 1 h, 均用温水浸种 12 h 捞出。每培养皿布置 20 粒种子, 重复 3 次。放入温度为 25 °C, 光照 12 h/d, 光照强度为 6000 lx, 湿度为 80% 的智能人工气候箱

(赛福 PRX-450D)进行发芽试验。适时添加水分, 观测土壤水分状况及发芽进程。萌发后 10 天测定种子的发芽势; 萌发后 20 天统计发芽率, 观察幼苗生长状况。按下式计算发芽势和发芽率:

$$\text{发芽势} = \frac{\text{第 10 天发芽种子数} \times 100\%}{\text{供试种子总数}}$$

$$\text{发芽率} = \frac{\text{第 20 天发芽种子数} \times 100\%}{\text{供试种子总数}}$$

## 2 结果与分析

### 2.1 马尾松林土壤酚酸类物质含量

从表 1 可看出, 木荷纯林地土壤酚酸类物质成分主要为丁香醛、丁香脂素、3-甲氧羰基-5-[(E)-2-甲酰-1-乙炔基]-2-(3-甲氧基-4-羟基-苯基)-7-甲氧基-2,3-二氢苯并呋喃, 且木荷根际土壤高于非根际土壤, 这些物质可能主要来源于木荷根系分泌物。荒草地土壤也含有与木荷林土壤类似酚酸成分, 但浓度较低。

马尾松林土壤酚酸类物质组成与荒草地、木荷林土壤截然不同, 其主要成分为去氢枞酸、枞酸和/或新枞酸和/或长叶松酸、松脂素、4,9-二羟基-9-甲氧羰基-3,3-二甲氧基-4,7-环氧-8,5-新木脂素等物质, 这些物质为松香的主要成分, 为松树类特有产物, 推测应当主要来源于马尾松分泌物或由凋落物降解产生。由于没有获得市售标样, 难以直接定量。因此, 本研究将不同量松香添加到荒草地对照土壤中, 混合均匀密封放置 1 周后, 再用甲醇和水浸提, 利用 EESI-MS 测定, 比对其松香浓度。比对结果表明马尾松林土壤松香混合物浓度一般为 10 ~ 100 mg/kg。

表 1 荒草地、马尾松和木荷林地土壤酚酸类物质种类与含量

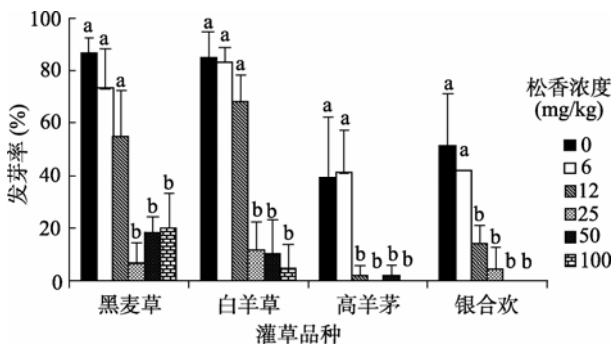
Table 1 Kinds and contents of phenolic acids in soils of waste grassland, *Pinus massoniana* forest and *Schima superba* forest

物质种类	荒草地土壤	马尾松土壤 根际: 非根	木荷土壤 根际: 非根
丁香醛	2: 5*	未检出	5: 2
丁香脂素	1: 5*	未检出	5: 1
3-甲氧羰基-5-[(E)-2-甲酰-1-乙炔基]-2-(3-甲氧基-4-羟基-苯基)-7-甲氧基-2,3-二氢苯并呋喃	3: 4*	未检出	2: 1
去氢枞酸	未检出	3: 2	未检出
枞酸和/或新枞酸和/或长叶松酸	未检出	3: 2	未检出
松脂素	未检出	4: 1	未检出
4,9-二羟基-9-甲氧羰基-3,3-二甲氧基-4,7-环氧-8,5-新木脂素	未检出	6: 5	未检出
4-乙炔基苯酚	未检出	4: 1	未检出
$\alpha$ -蒎品醇和/或 L-沉香醇和/或芳樟醇和/或 $\beta$ -松油醇	未检出	4: 1	未检出
$\alpha$ -蒎品醇和/或 L-沉香醇和/或芳樟醇和/或 $\beta$ -松油醇	未检出	2: 1	未检出
山达海松酸甲酯和/或枞酸甲酯和/或新枞酸甲酯	未检出	2: 1	未检出

注: 由于酚酸没有市售标准物质, 难以以浓度定量, 主要以物质电信号强弱比例表示; 表中\*标注的 2: 5、1: 5、3: 4 为荒草地土壤与木荷林地非根际土壤含量之比。

## 2.2 松香不同处理对灌草发芽的影响

种子萌发及幼苗生长是植物生命进程的起点,是作物对外界反应的敏感期。10 天时观测灌草发芽势,不同浓度的松香对灌草种子的抑制作用不同(图 1)。低浓度松香处理下,松香土壤混合物对 4 种灌草发芽的抑制作用较小,土壤松香类物质浓度 < 12 mg/kg 时,灌草发芽势与对照接近。高浓度松香对灌草发芽生长有明显的抑制作用,随松香浓度的提高灌草发芽势逐渐下降。在 25 mg/kg 松香处理下,黑麦草、白羊草、高羊茅和银合欢的发芽势分别从 86.7%、85.0%、39.0% 和 51.3% 降低到 6.7%、11.7%、0% 和 4.7%;松香浓度 25 mg/kg 时,这 4 种灌草发芽势低于对照,且差异达到显著水平( $P < 0.05$ )。可见,松香类物质对一些灌草发芽具有抑制作用。



(图中不同小写字母表示处理间在  $P < 0.05$  水平差异显著,下同)

图 1 不同浓度松香处理对灌草发芽势的影响

Fig. 1 Effects of rosin at different concentrations on shrub and grass germination energy

20 天时观测灌草发芽率(图 2),不同浓度松香处理,黑麦草、白羊草和高羊茅的发芽率和对照相比差异不大,在 100 mg/kg 松香处理下,发芽率分别为 96.7%、86.7%、91.0%,与对照接近。发芽试验后期可能由于松香物质的挥发,降低了其影响作用。而实际马尾松林中由于马尾松植株体的连续分泌或凋落物分解不断产生松香类物质,其对灌草萌发的影响可能会比室内培养试验更为严重,且灌草一旦错过最佳发芽生长时期,后期季节性干旱也将严重影响灌草的生长。康冰等<sup>[10]</sup>研究发现随着马尾松林分生长,林中物种丰富度降低,荫生植物逐渐消退。林分能流物流受到单一树种冠层结构、针叶特性、凋落物分解状况等生物生态特性阻滞的影响,草本层植物减少,植被成层性差,群落不能达到复合多层的稳定状态。黄付平等<sup>[11]</sup>报道马尾松的叶、根组织及其残体含有对本种有抑制作用的物质存在,具有自毒作用,并认为马尾松林土壤是马尾松叶、根等器官在生长过程中分泌

的及其残体分解中产生的中植物毒素的集聚场所,其对马尾松种子发芽的抑制作用最强。陈龙池和汪思龙<sup>[12]</sup>研究表明杉木根系分泌物降低了杉木幼苗的鲜重和胚根胚芽的长度,抑制了杉木幼苗的生长。张淑香等<sup>[13]</sup>发现土壤中高量的酚酸对大豆幼苗的生长与发育有较明显的抑制作用。李培栋等<sup>[14]</sup>的研究结果显示,酚酸类物质可以抑制花生幼苗的发育和提高花生的发病率,影响花生生长。本研究表明,浓度 25 mg/kg 松香处理下黑麦草、白羊草和高羊茅表现为叶片纤细易倒。从短期培养试验结果来看,高浓度松香处理对银合欢的发芽率影响较大,在 50 和 100 mg/kg 松香处理下,发芽率显著低于对照( $P < 0.05$ ),并出现发黄、畸形、腐烂或停止生长。可能是由于松香中的某些成分抑制了细胞的分裂和生长,并使植物体内的叶绿素合成受阻,有毒化学物质引起细胞膜透性增加,影响幼苗生长。当然,松香长期作用下,也可能改变土壤微生物群落和其他理化性质而将影响灌草发芽与生长,这有待进一步研究。总的看来,不同品种灌草对不同浓度松香的适应性不同。分析可知黑麦草、白羊草、高羊茅抗性较强,银合欢抗性较弱。

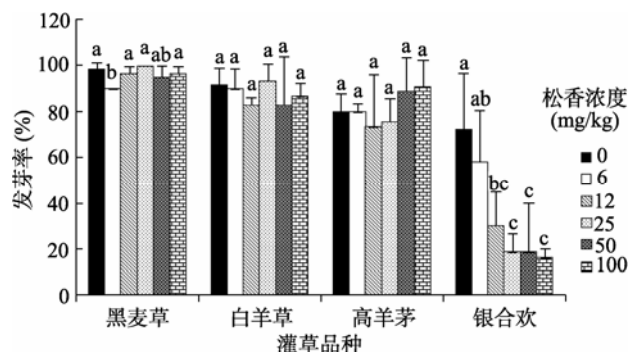


图 2 不同浓度松香处理对灌草发芽率的影响

Fig. 2 Effects of rosin at different concentrations on shrub and grass germination rate

## 3 结论

不同浓度的松香对灌草种子的抑制作用不同。当土壤中松香浓度大于 25 mg/kg 时,对黑麦草、白羊草和高羊茅种子的发芽势影响较大,对银合欢种子的发芽势和发芽率影响都较大,且对种子萌发和幼苗生长抑制程度随着松香浓度的提高而增加。虽然模拟试验中松香土壤混合物浓度及其对灌草萌发的影响,与实际马尾松林土壤溶液中可溶态酚酸活性物质及其影响有一定差异,但我们可以推测,马尾松林下其他植物难以存活,植被覆盖度低,不仅与土壤酸化、地表干旱等因素有关<sup>[3-6]</sup>,可能还与马尾松生长过程中

通过凋落物分解或植株体分泌的松香类物质有关。

不同品种灌草对不同浓度松香的适应性不同。黑麦草、白羊草、高羊茅抗性较强，银合欢抗性较弱。因此，在马尾松林下植物恢复工程中，除了采取适当坡面微型水系工程和土壤管理技术，改变立地生态条件外，应加强适应性灌草的筛选研究，培育松香耐性灌草品种，选择的灌草不但要耐旱耐瘠薄，还需要对松香类物质有较强耐性。

#### 参考文献：

- [1] 李忠佩, 张桃林, 杨艳生, 王兴祥, 何园球, 曾希柏. 红壤丘陵区水土流失过程及综合治理技术[J]. 水土保持通报, 2001, 21(2): 12-17
- [2] 左长清, 李小强. 红壤丘陵区坡改梯的水土保持效果研究[J]. 水土保持通报, 2004, 24(6): 79-81
- [3] 梁音, 杨轩, 潘贤章, 张斌, 史德明. 南方红壤丘陵区水土流失特点及防治对策[J]. 中国水土保持. 2008(12): 50-53
- [4] 丁贵杰, 周志春, 王章荣, 等. 马尾松纸浆用材林培育与利用[M]. 北京: 中国林业出版社, 2006: 1-2
- [5] 王振洪, 宋湛谦, 商士斌, 叶伯蕙. 气相色谱用马尾松松香标准样品的定值[J]. 生物质化学工程, 2009, 43(4): 9-14
- [6] 雷环清. 兴国县花岗岩区林下水土流失及其防治[J]. 中国水土保持, 2007, 3: 58-59
- [7] Chon SU, Choi SK, Jung S, Jang HG, Pyo BS, Kim SM. Effects of alfalfa leaf extracts and phenolic allelochemicals on early seedling growth and root morphology of alfalfa and barnyard grass[J]. Crop Protection, 2002, 21(10): 1 077-1 082
- [8] Kong CH, Xu XH, Zhou B, Hu F, Zhang CX, Zhang MX. Two compounds from allelopathic rice accession and their inhibitory activity on weeds and fungal pathogens[J]. Phytochemistry, 2004, 65(8): 1 123-1 128
- [9] 丁健桦, 王兴祥, 张慧, 潘素素, 罗明标, 李建强, 陈焕文. 芹菜素的电喷雾萃取电离串联质谱[J]. 高等学校化学学报, 2011, 32(8): 1 714-1 719
- [10] 康冰, 刘世荣, 史作民, 温远光, 蔡道雄, 卢立华, 梁宏温, 冯常林. 南亚热带人工马尾松林下植物组成特征及主要木本种群生态位研究[J]. 应用生态学报, 2005, 16(9): 1 786-1 790
- [11] 黄付平, 蔡灿星, 黎向东. 马尾松叶、根等浸提物对其种子发芽及苗木生长的影响[J]. 广西农业大学学报, 1995, 14(1): 65-70
- [12] 陈龙池, 汪思龙. 杉木根系分泌物化感作用研究[J]. 生态学报, 2003, 20(3): 393-398
- [13] 张淑香, 高子勤, 刘海玲. 连作障碍与根际微生态研究. 土壤酚酸物质及其生物学效应[J]. 应用生态学报, 2000, 11(5): 741-744
- [14] 李培栋, 王兴祥, 李奕林, 王宏伟, 梁飞燕, 戴传超. 连作花生土壤中酚酸类物质的检测及其对花生的化感作用[J]. 生态学报, 2010, 30(8): 2 128-2 134

## Phenolic Acids Detection in Soil of *Pinus massoniana* Forest and Its Effect on Shrub and Grass Germination

YANG Yi-ru<sup>1,3</sup>, DING Jian-hua<sup>2</sup>, ZHANG Tao-lin<sup>1</sup>, WANG Xing-xiang<sup>1,4\*</sup>

(1 Key Laboratory of Soil Environment and Pollution Remediation, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2 East China Institute of Technology, Fuzhou, Jiangxi 344000, China; 3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 4 Jiangxi Key Laboratory of Ecological Research of Red Soil, Ecological Experimental Station of Red Soil, Chinese Academy of Sciences, Yingtan, Jiangxi 335211, China)

**Abstract:** The compositions of phenolic acids in soil of waste grassland, *Pinus massoniana* forest and *Schima superba* forest were determined by extraction electrospray ionization mass spectrometry (EESI-MS), and the effects of phenolic acids on seed germination and seedling growth were also studied. The results indicated that rosin compounds was not observed in the soil of waste grassland and *Schima superba* forest, while the concentration of rosin compounds in soil of *Pinus massoniana* forest generally reached to 10-100 mg/kg. The germination energy was not significantly different between the control and the concentration of rosin compounds in the soils below 12 mg/kg treatments. When the concentration of rosin compounds in soils was over 25 mg/kg, the germination energy of *Lolium perenne*, *Bothriochloa ischaemum*, *Festuca elata* and *Leucaena leucocephala* significantly decreased. The germination rate of *Leucaena leucocephala* was significantly lower than control at high concentration of rosin.

**Key words:** *Pinus massoniana*, Phenolic acids in soil, Rosin, Shrub and grass, Germination