

苜蓿植株及根际土壤中主要酚酸和香豆素物质含量测定^①

荣思川^{1,2}, 师尚礼^{1,2*}, 孙灿灿¹

(1 甘肃农业大学草业学院, 兰州 730070; 2 草业生态系统教育部重点实验室, 甘肃省草业工程实验室, 中-美草地畜牧业可持续研究中心, 兰州 730070)

摘要: 通过高效液相色谱(HPLC)法测定不同试验地间 18 个苜蓿(*Medicago sativa* L.)品种植株及根际土壤中主要酚酸和香豆素物质的含量, 分析其不同品种苜蓿植株中的分布特征及不同试验地间差异。经过 ASE 350 型加速溶剂萃取仪萃取苜蓿植株及根际土壤中酚酸类和香豆素物质, 萃取液存放于 2°C 冰箱, 并用 0.45 μm 有机滤膜过滤后通过 HPLC 测定自毒物质含量。结果显示, 18 个苜蓿品种中香豆素、阿魏酸、绿原酸、咖啡酸的含量存在差异, 其中香豆素、绿原酸含量显著高于阿魏酸、咖啡酸含量。各苜蓿品种间单一自毒物质含量差异显著($P < 0.05$), 香豆素、阿魏酸、绿原酸和咖啡酸的总含量差异明显。武威试验地酚酸和香豆素物质平均含量比会宁试验地低 4.01%。研究表明: 不同苜蓿品种间香豆素、阿魏酸、绿原酸、咖啡酸物质总含量差异显著; 苜蓿植株中香豆素、阿魏酸、绿原酸、咖啡酸物质总含量与根际土壤中含量差异极显著。

关键词: 加速溶剂萃取法; HPLC; 紫花苜蓿; 香豆素; 酚酸

中图分类号: S326

紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)在种植 4 年以上会出现田间密度下降幅度较大、草地生产力也急剧下降的现象, 并且补种和修复也鲜有成功^[1-3]。研究证实, 造成这种现象的主要原因是苜蓿自毒性作用^[4-6]。苜蓿自毒性是一种特殊的种内化感作用, 即一个种的苜蓿植株产生的某些次生代谢物通过挥发、淋溶和分泌等方式对周围苜蓿植株产生有益或有害的影响^[7-8]。通常这些物质会从茎、叶、根部和种子等器官释放到周围环境中来影响幼苗的根系, 主要表现为抑制幼苗胚轴细胞伸长和胚根生长、幼苗根系统中某些酶的活性, 进而抑制了苜蓿根部对水分的吸收^[9-11]。许多研究发现, 自毒物质并不是某单一物质, 而是多种物质的混合物, 且自毒效应是多种物质的综合作用^[12]。自紫花苜蓿中三十烷醇对其他作物具有刺激作用的文章发表后, 关于苜蓿自毒物质的相关研究便在各学术杂志上陆续报道。Wyman-Simpson 等^[13]研究发现, 苜蓿中普遍存在苜蓿酸大豆皂苷 B(soyasapogenol glycoside B), 且随着浓度的增大, 其化感抑制作用越强。Birkett 等^[14]认为苜蓿皂苷(medicagenic acid glycosides)是苜蓿化感作用的主要物质。但 Miller^[15]

认为苜蓿皂苷并不是苜蓿自毒物质, 对苜蓿自身不能造成伤害。而后 Miller^[16]采用外源添加试验的方法验证了苜蓿素(medicarpin)和异黄酮类(isoflavonoid)对苜蓿种子发芽的毒害作用, 使发芽率降低至 41%。Abdul-Rahman 和 Habib^[17]研究发现苜蓿植株可以释放绿原酸(chlorogenic acid)、阿魏酸(ferulic acid)、对羟基苯甲酸(p-hydroxybenzoic acid)、咖啡酸(caffeic acid)等酚酸类物质。Hall 和 Henderlong^[12]、李占玉等^[18]也有关于酚酸类物质自毒性的研究报道。Chung 等^[19]研究苜蓿植株浸提液中酚酸含量及化感效应, 发现绿原酸与苜蓿自毒性密切相关, 且自毒效应与浸提液浓度呈正相关。随着研究的深入, 越来越多的自毒物质被研究者发现并证明了其自毒性, 如 Miersch 和 Jihlke^[20]研究发现苜蓿刀豆氨酸也具有自毒效应, 含量高于 1% 时, 其自毒效应较强; 低于某浓度时, 反而有促进作用。卢成等^[21]、李志华等^[22]利用液相色谱方法测定苜蓿中酚酸类、香豆酸、香豆素等自毒物质的含量, 测定结果显示香豆素、咖啡酸的含量较高。卜伟等^[23]、唐玲丽等^[24]利用高效液相色谱法测定土壤中有有机物质含量。近年来国内虽有报道关于检测苜蓿

基金项目: 国家现代牧草产业技术体系建设专项(CARA-35)和全国牧草种质资源保种项目(NB2130135)资助。

* 通讯作者(shishl@gsau.edu.cn)

作者简介: 荣思川(1987—), 男, 山东单县人, 硕士研究生, 主要从事牧草种质资源及育种研究。E-mail: rongsc100@126.com

植株中自毒物质含量的研究,但总体上对于苜蓿自毒物质含量测定方法方面的研究仍然十分稀少,因此本研究是在总结前人研究的基础上,进一步对不同品种苜蓿植株、根际土壤中自毒物质含量的测定,对于更深入地了解苜蓿自毒效应和苜蓿连作障碍提供依据。

1 材料与方 法

1.1 采样地概况

试验材料采样地分别位于甘肃省武威市黄羊镇(37°55'N,102°40'E,海拔 1 530 m,气候类型属于温带干旱荒漠气候,年平均温度 7.2℃,年降水量 150 mm 左右,年蒸发量约 2 010 mm,无霜期 154 天,土壤类型为灌淤土,具备灌溉条件)和甘肃省会宁县(35°72'N,105°08'E,平均海拔 2 025 m,年均降水量 332.6 mm,年均气温 7.9℃,年均无霜期 155 天,属

于中温带半干旱气候,土壤类型为灰钙土,很少具备灌溉条件)。

于 2011 年 4 月 10 日播种,试验小区采用完全随机区组设计,每个小区面积 5 m × 3 m,每个品种 4 次重复,小区间隔 0.5 m。采用条播方式,行距 0.4 m,小区间走道 1 m,试验地周边 1.5 m 保护行。

1.2 材料与试剂

供试材料编号 A~F 是取自甘肃省会宁县样地,G~R 是取自甘肃省武威市黄羊镇样地。苜蓿材料品种及来源见表 1。试验中用到的主要试剂:阿魏酸(纯度 ≥99.0%),咖啡酸(纯度 ≥98.0%),绿原酸(纯度 ≥95.0%),香豆素(纯度 99.0%),均购自美国 Sigma 公司;甲醇(色谱纯),德国 CNW Technologies 有限公司;乙酸(分析纯),国药集团化学试剂有限公司;其他试剂均为分析纯。

表 1 供试材料及其来源
Table 1 Tested materials and their sources

代号	品种	种子来源	代号	品种	种子来源
A	AmeriStand 201T	美国	J	GrandStand	美国
B	Arrowhead II	美国	K	HybriForce400	美国
C	Spredor 4	美国	L	Lancer	美国
D	AlfaGraze 300R	美国	M	Liberator	美国
E	Arapaho II	美国	N	Magnum V	美国
F	陇东苜蓿	中国	O	Whitney	美国
G	Boulder	美国	P	Select	美国
H	Bullseye	美国	Q	甘农 3 号	中国
I	ForageGold	美国	R	新疆大叶	中国

1.3 试验方法

1.3.1 样品前处理 浸提液提取材料(苜蓿植株及根际土壤)在 2015 年 5 月 20 日即在苜蓿第一茬分枝期(4 龄苜蓿)时刈割采集样本,自封袋收集带回实验室。采集的苜蓿植株,先晾晒 48 h,然后 37℃ 条件下烘干,粉碎机粉碎后收集,2℃ 储存备用;根际土壤采用抖落法^[25-26]收集,采用自然风干的方法风干后,过直径 2 mm 筛子,存放于 2℃ 冰箱中。天平准确称取 18 个苜蓿品种的植株(5.00 g)和根际土壤(20.00 g)样放于萃取池(内口径 2.7 cm × 5.2 cm)中,放于 ASE 350 型加速溶剂萃取仪中萃取。首先对样品的萃取条件进行优化,选择的萃取溶剂为 80% 甲醇,萃取炉的温度调整为 50℃,热平衡时间和静态萃取时间均为 5 min,溶剂流速为 2.5 ml/min,氮气吹扫时间为 120 s,循环 2 次,最终萃取液总体积为 30.0 ml。萃取液保存在 2℃ 冰箱备用,测定前过 0.45 μm 有机滤膜。

1.3.2 标准溶液的配制 准确称取香豆素、阿魏酸、绿原酸、咖啡酸 4 种物质标准品各 10.00 mg 于 100.00 ml 容量瓶中,分别用 50% 甲醇(色谱级)溶解并定容至刻度,配制成 100 mg/L 的标准品母液,存放于棕色试剂瓶中,-20℃ 保存备用。上液相色谱仪前,用甲醇溶液采用逐级稀释法将标准品母液配制成一系列浓度的标准品混合溶液(2、5、10、20、40 和 80 mg/L)。

1.4 仪器与设备

Thermo Fisher ASE 350 型加速溶剂萃取仪,美国 Thermo Scientific 公司;Agilent 1260 Infinity HPLC 液相色谱仪,美国 Agilent 公司;ELGA 超纯水仪 ULTRA,英国 ELGA 公司;SCALTEC 电子天平(SBC 22,当量 0.01 mg),德国 SCALTEC 公司;Spectrum SP-756P 型分光光度计,美国 RGB Spectrum 公司;0.45 μm 有机相针式滤器,上海安谱科学仪器有限公司。

1.5 色谱条件

色谱柱：Agilent ZORBAX Eclipse plus C18 分析柱(4.6 mm × 150 mm, 3.0 μm)；流动相：0.3%乙酸水

溶液(A)和甲醇(B)，梯度洗脱，洗脱程序见表 2；流速：0.50 ml/min；柱温：35；进样量为 10.0 μl；波长扫描范围 190~400 nm，定量检测波长为 320 nm。

表 2 流动相配比与洗脱时间
Table 2 Gradient phase and elution time

流动相	洗脱时间 (min)					
	0	3	8	12	17	20
0.3% 乙酸溶液(%)	95	80	80	70	25	95
甲醇(%)	5	20	20	30	75	5

1.6 数据处理与分析

采用 Excel 2010 和 SPSS 19.0 软件对数据进行处理与分析。

2 结果与分析

2.1 标准品液相色谱图

ASE 350 型加速溶剂萃取仪制得苜蓿植株浸提液和根际土壤浸提液，0.45 μm 有机滤膜过滤后用 HPLC 仪，采用表 2 中的方法定量检测 18 个苜蓿品种植株及根际土壤中 4 种自毒物质(香豆素、阿魏酸、绿原酸、咖啡酸)的含量。通过上述方法和条件测得 4 种自毒物质标准品色谱图(图 1)。

2.2 苜蓿植株中自毒物质含量分析

苜蓿植物中自毒物质高效液相色谱见图 2。图中显示，4 种自毒物质(绿原酸、咖啡酸、阿魏酸和香豆素)能够完全分离，说明 1.5 中色谱条件能够达到分离、测定这 4 种自毒物质的目的，且 4 种物质定量检测形成的色谱峰峰型良好，没有干扰峰。

由表 3 可知，经过 HPLC 定量测定并与标准品对照后，18 个苜蓿品种植株中 4 种自毒物质(香豆素、阿魏酸、绿原酸、咖啡酸)的含量存在差异。其

中 4 种自毒物质总含量最高的品种是 H，总含量最低的品种为 K，18 个品种平均总含量为 462.61 mg/kg，其中 K 品种 4 种自毒物质总含量仅为 H 品种的 41.7%。其余单一自毒物质含量差异性分析如下。HPLC 测定 18 个苜蓿品种中香豆素含量最高的是 O，含量最低的为 Q，Q 品种含量仅为 O 品种的 9.64%，18 个品种平均含量为 183.57 mg/kg，各苜蓿品种间香豆素含量差异均显著($P < 0.05$)。阿魏酸含量最高的品种是 N，含量最低的品种为 D，D 品种含量仅为 N 品种的 15.98%，各品种平均含量为 0.83 mg/kg，且各品种间阿魏酸含量差异仅有 I 和 Q，E 和 F，C 和 D 之间差异不显著，其余品种间差异均显著($P < 0.05$)。对于绿原酸，含量最高的品种为 D，含量最低的品种为 K，K 品种含量仅为 D 品种的 24.11%，18 个品种平均含量 273.36 mg/kg，各品种间绿原酸含量除了 D 和 R，G、J 和 L，H 和 N，A 和 O，C 和 F，E、M 和 Q 之间差异不显著外，其余品种间含量差异均显著($P < 0.05$)。咖啡酸含量最高的苜蓿品种为 N，含量最低的为 C 品种，C 品种含量仅为 N 品种的 2.66%，18 个品种平均含量为 4.45 mg/kg；且各品种间含量差异均显著($P < 0.05$)。

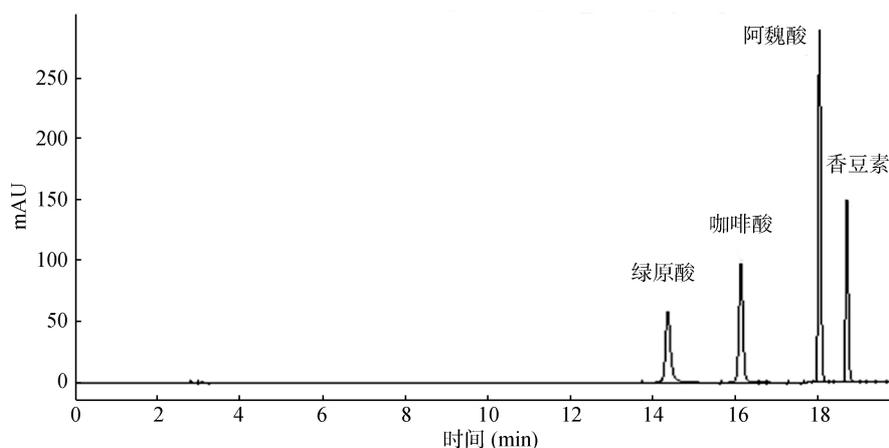


图 1 4 种自毒物质标准品混合溶液高效液相色谱图(320 nm)

Fig. 1 HPLC Chromatogram of the standards mixing solution containing 4 autotoxins at 320 nm

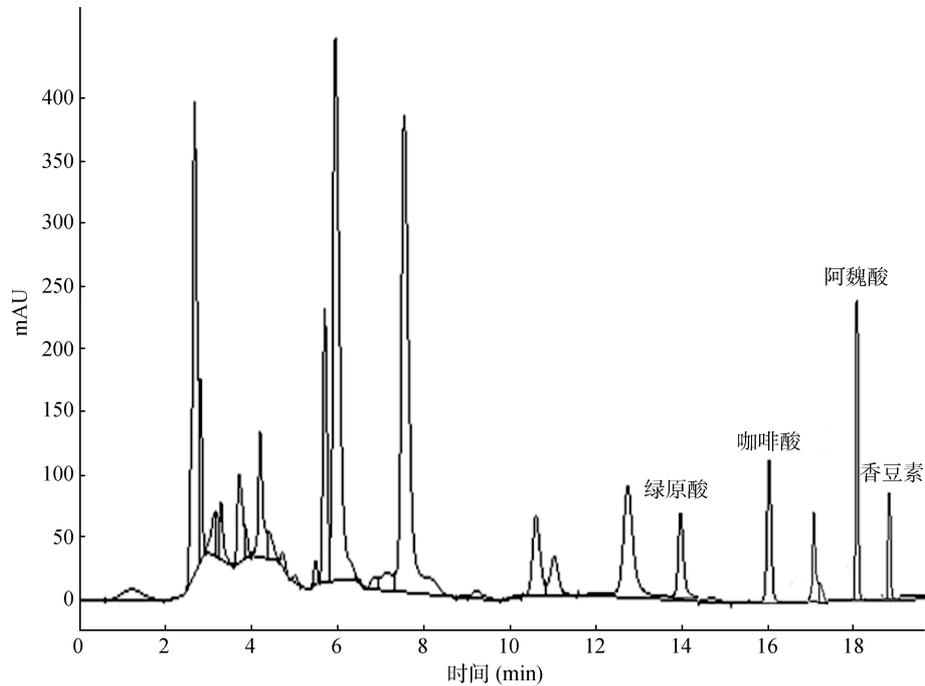


图 2 样品液相色谱图 (320 nm)

Fig. 2 HPLC Chromatogram of a sample at 320 nm

表 3 苜蓿植株中自毒物质的含量
Table 3 Autotoxins contents in alfalfa plant

品种	自毒物质含量(mg/kg)				
	香豆素	阿魏酸	绿原酸	咖啡酸	总含量
A: AmeriStand 201T	174.44 ± 1.80 i	0.99 ± 0.02 f	296.35 ± 3.35 d	4.08 ± 0.03 g	475.86
B: Arrowhead II	100.30 ± 2.16 n	0.35 ± 0.02 m	161.22 ± 2.21 j	0.49 ± 0.03 m	262.36
C: Spredor 4	217.89 ± 2.30 e	0.27 ± 0.01 p	266.24 ± 4.31 f	0.25 ± 0.01 n	484.65
D: AlfaGraze 300R	187.15 ± 2.82 h	0.31 ± 0.01 op	350.88 ± 3.53 a	2.61 ± 0.05 h	540.94
E: Arapaho II	163.82 ± 2.46 j	0.53 ± 0.01 jk	251.98 ± 1.51 g	1.35 ± 0.01 k	417.69
F: 陇东苜蓿	173.73 ± 3.59 i	0.51 ± 0.01 k	267.97 ± 5.42 f	1.87 ± 0.05 i	444.08
G: Boulder	134.11 ± 2.51 m	0.78 ± 0.00 h	340.04 ± 4.04 b	7.93 ± 0.05 e	482.86
H: Bullseye	263.26 ± 2.51 b	0.85 ± 0.02 g	306.25 ± 4.02 c	8.59 ± 0.05 c	578.96
I: ForageGold	230.83 ± 2.53 d	1.07 ± 0.01 e	192.45 ± 2.01 i	8.39 ± 0.11 d	432.74
J: GrandStand	193.84 ± 0.03 g	0.56 ± 0.02 j	336.62 ± 4.07 b	4.55 ± 0.10 f	535.57
K: HybriForce400	147.24 ± 2.00 k	0.64 ± 0.01 i	84.59 ± 0.70 k	8.87 ± 0.13 b	241.34
L: Lancer	234.84 ± 2.52 c	1.39 ± 0.04 c	334.47 ± 3.51 b	1.64 ± 0.02 j	572.01
M: Liberator	217.61 ± 2.70 e	0.32 ± 0.01 no	255.64 ± 2.52 gh	0.65 ± 0.01 l	474.21
N: Magnum V	139.67 ± 3.00 l	1.94 ± 0.04 a	306.08 ± 3.72 c	9.40 ± 0.03 a	457.10
O: Whitney	274.20 ± 3.51 a	0.48 ± 0.01 l	291.37 ± 4.00 d	8.00 ± 0.18 e	574.05
P: Select	212.11 ± 2.12 f	1.45 ± 0.05 b	278.48 ± 5.51 e	2.66 ± 0.10 h	494.69
Q: 甘农 3 号	26.44 ± 0.16 o	1.09 ± 0.08 e	259.66 ± 4.63 g	4.07 ± 0.05 g	291.26
R: 新疆大叶	214.83 ± 2.57 ef	1.17 ± 0.03 d	345.92 ± 4.95 a	4.64 ± 0.05 f	566.55

注：表中同列数据小写字母不同表示不同苜蓿品种间差异达到 $P < 0.05$ 显著水平，下表同。

2.3 根际土壤中自毒物质含量分析

由表 4 可知, 18 个苜蓿品种根际土壤中 4 种自毒物质含量也存在差异。其中根际土壤中自毒物质总

含量最高的品种是 A, 而含量最低的为 L 品种, 18 个品种平均总含量为 12.33 mg/kg, 其中 L 品种 4 种自毒物质总含量仅为 A 品种的 33.3%。

表 4 苜蓿根际土壤中自毒物质含量
Table 4 Autotoxins contents in alfalfa rhizosphere soil

品种	自毒物质含量(mg/kg)				
	香豆素	阿魏酸	绿原酸	咖啡酸	总含量
A: AmeriStand 201T	8.07 ± 0.06 a	0.06 ± 0.00 l	9.70 ± 0.06 a	2.47 ± 0.03 c	20.31
B: Arrowhead II	5.00 ± 0.09 c	0.81 ± 0.01 a	5.64 ± 0.05 c	1.31 ± 0.06 de	12.76
C: Spredor 4	4.51 ± 0.05 f	0.73 ± 0.04 cd	4.21 ± 0.14 g	2.67 ± 0.07 b	12.13
D: AlfaGraze 300R	1.80 ± 0.05 g	0.64 ± 0.02 hi	3.22 ± 0.10 i	1.27 ± 0.02 ef	6.93
E: Arapaho II	4.68 ± 0.05 e	0.74 ± 0.01 cd	5.24 ± 0.08 ef	1.30 ± 0.01 ef	11.96
F: 陇东苜蓿	4.45 ± 0.06 f	0.66 ± 0.01 gh	4.05 ± 0.05 h	2.70 ± 0.04 ab	11.87
G: Boulder	1.76 ± 0.03 gh	0.60 ± 0.02 j	3.20 ± 0.08 i	1.27 ± 0.01 ef	6.83
H: Bullseye	4.76 ± 0.02 d	0.74 ± 0.01 cd	5.30 ± 0.05 de	1.28 ± 0.01 ef	12.08
I: ForageGold	7.93 ± 0.06 b	0.05 ± 0.00 l	9.54 ± 0.06 b	2.45 ± 0.02 c	19.97
J: GrandStand	5.02 ± 0.02 c	0.72 ± 0.01 de	5.65 ± 0.02 c	1.18 ± 0.01 h	12.57
K: HybriForce400	4.47 ± 0.02 f	0.68 ± 0.02 f	4.06 ± 0.02 h	2.69 ± 0.04 b	11.90
L: Lancer	1.72 ± 0.01 h	0.59 ± 0.00 j	3.19 ± 0.02 i	1.27 ± 0.02 ef	6.77
M: Liberator	4.67 ± 0.01 e	0.69 ± 0.01 f	5.18 ± 0.01 f	1.25 ± 0.02 ef	11.79
N: Magnum V	1.79 ± 0.01 g	0.63 ± 0.02 i	3.22 ± 0.02 i	1.28 ± 0.02 ef	6.92
O: Whitney	4.78 ± 0.05 d	0.78 ± 0.01 b	5.35 ± 0.03 d	1.37 ± 0.02 d	12.29
P: Select	7.96 ± 0.04 b	0.09 ± 0.00 k	9.59 ± 0.03 b	2.49 ± 0.01 c	20.13
Q: 甘农 3 号	5.05 ± 0.02 c	0.75 ± 0.01 c	5.68 ± 0.06 c	1.20 ± 0.06 gh	12.69
R: 新疆大叶	4.49 ± 0.03 f	0.71 ± 0.01 ef	4.08 ± 0.05 h	2.75 ± 0.04 a	12.02

表 4 中还显示, 各种自毒物质的含量差异显著。如香豆素的含量, 最高的为 A 品种, 含量最低为 L 品种, L 品种含量仅为 A 品种的 21.31%, 18 个品种平均含量为 4.61 mg/kg, 除了 I 和 P 品种, B 和 J 品种, H 和 O 品种, C、K、F 和 R, D 和 G 品种含量差异不显著外, 其余品种之间含量差异均显著 ($P < 0.05$)。阿魏酸含量最高的品种为 B, 最低的为 I 品种, I 品种含量仅为 B 品种的 6.17%, 平均含量为 0.59 mg/kg, 除了 C、E、H 和 Q, J 和 R, K、M 和 R, D 和 F, D 和 N, G 和 L, A 和 I 品种差异不显著外, 其余品种之间差异均显著 ($P < 0.05$)。对于绿原酸, 18 个品种中含量最高的品种为 A, 含量最低为 G, G 品种含量仅为 A 品种的 32.99%, 平均含量为 5.34 mg/kg, 除了 I 和 P, B、J 和 Q, H 和 O, E 和 H, E 和 M, D 和 G, L 和 N 含量差异不显著外, 其余品种间含量差异均显著 ($P < 0.05$)。咖啡酸含量最高的为 R, 最低的为 J, J 品种含量仅为 R 的 42.91%, 平均含量为 1.79 mg/kg, 其差异除了 F 和 R, C 和 K, A、I 和 P, B 和 O, D、E、G、H、L、M 和 N 不显著外, 其余品种间差异均显著 ($P < 0.05$)。

2.4 苜蓿植株与根际土壤中自毒物质含量比较

由表 3 和表 4 可知, 18 个苜蓿品种植株中 4 种自毒物质(香豆素、阿魏酸、绿原酸和咖啡酸)平均总含量为 462.61 mg/kg, 根际土壤中平均总含量为

12.33 mg/kg, 根际土壤中含量仅为苜蓿植株中的 2.67%。单一自毒物质含量方面, 18 个苜蓿品种植株中香豆素、阿魏酸、绿原酸、咖啡酸的平均含量分别为 183.57、0.83、273.76 和 4.45 mg/kg, 根际土壤中 4 种物质平均含量分别为 4.61、0.59、5.34 和 1.79 mg/kg, 4 种物质在根际土壤中含量分别为苜蓿植株中含量的 2.51%、71.08%、1.95% 和 40.22%。上述数据显示, 苜蓿植株中自毒物质总含量远高于根际土壤中含量, 苜蓿植株中单一自毒物质含量也显著高于根际土壤中含量。

2.5 采样地差异比较

对两个采样地之间比较发现, 黄羊镇采样地苜蓿品种自毒物质总含量的平均值为 469.32 mg/kg, 比会宁县采样地(平均值 488.95 mg/kg)低了 4.01%。各单一自毒物质两个样地间比较, 会宁样地阿魏酸、咖啡酸、绿原酸和香豆素含量分别为 1.13、4.90、289.52 和 180.81 mg/kg, 黄羊镇样地 4 种物质含量分别为 0.78、4.22、265.88 和 184.95 mg/kg, 数据显示会宁样地阿魏酸、咖啡酸和绿原酸含量分别比威武样地高 30.97%、13.88% 和 8.17%, 而香豆素含量却低 2.29%。

2.6 18 个苜蓿品种聚类分析

根据 18 个苜蓿品种间 4 种自毒物质含量差异进行 Pearson 聚类分析。由图 3 知, 以香豆素、绿原

酸、咖啡酸、阿魏酸及 4 种物质总含量作为聚类变量, 将 18 个苜蓿品种分成 4 大类。由右向左第一个竖箭头线处, 将其分成 4 大类, 第一类为 Q, 第二类为 I 和 K, 第三类为 O, 其余为第四类。第二个竖箭头处, 可将 18 个苜蓿品种进一步分成 7 小类, 即 E、F、C、P、D、J、A、R、L、M 为第一小类, B 为第二小类, H 为第三小类, G 和 N 为第四小类, O 为第五小类, I 和 K 为第六小类, Q 为第七小类。

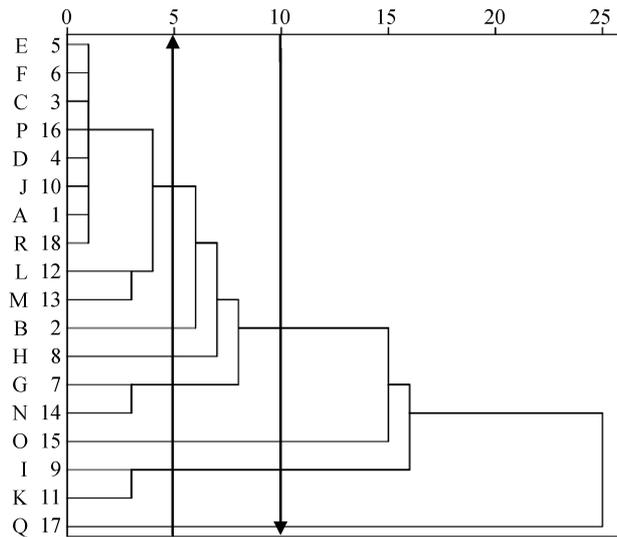


图 3 18 个苜蓿品种自毒物质含量的聚类分析图

Fig. 3 The clustering analysis diagram of autotoxins in 18 alfalfa varieties

3 讨论

对 18 个苜蓿品种分枝期的植株及根际土壤浸提液中 4 种自毒物质(香豆素、阿魏酸、绿原酸、咖啡酸)含量进行 HPLC 检测和分析后, 发现不同品种间苜蓿植株和根际土壤中 4 种自毒物质含量存在差异, 即自毒物质含量因品种不同而存在差异, 这与多数研究结果一致^[21-22, 27-28]。通过聚类分析后, 发现苜蓿品种间自毒物质含量差异大小不一, 可将自毒物质含量相近或差异较小的品种归为一类, 方便直观地表述自毒物质分布特征在品种间的相似程度。

郑洁等^[29]利用超高压液相色谱法同时测定柑橘中主要酚酸和类黄酮物质的含量, 建立了快速检测柑橘中这些物质的方法。张娜等^[30]利用 UPLC-MS 法测稻米中酚酸化合物组分及含量, 快速、准确地检测出稻米中酚酸化合物含量, 并对其他谷物中酚酸化合物含量测定及 HPLC 法检测苜蓿植株及根际土壤中酚酸类及其他自毒物质含量测定提供了参考。邬彩霞等^[31]研究黄花草木樨水浸提液中化感物质的分离与鉴定, 检测到香豆素含量最高, 且对黑麦草的抑制作用明

显, 推测香豆素是黄花草木樨水提液中主要化感物质, 这也为本研究中 4 种自毒物质的筛选提供了理论支持。周凯等^[32]研究菊花不同部位及根际土壤水浸提液处理对光合作用的自毒效应, 发现浸提液可抑制菊花叶片光合、呼吸速率, 对叶片叶绿素含量也有抑制作用, 尤其菊花地上部分水浸提液的抑制作用显著, 这也间接地说明植株地上部分自毒物质含量要高于地下部分, 而根际土壤中的自毒物质主要来源尚不清楚, 这也是本研究想要探讨的问题。董晓宁等^[33]研究多年生黑麦草的化感物质(GC-MS 鉴定)及其抑草潜力, 发现与抑制作用关系密切的物质主要为苯酚类和酸类物质。张文明等^[34]关于连作马铃薯根系分泌物成分及其自毒效应的研究, 表明棕榈酸和邻苯二甲酸二丁酯是马铃薯根系分泌的主要自毒物质。胡远彬等^[35]研究黄芪水浸提液化感作用, 发现“低促高抑”的化感作用特点。肖靖秀等^[36]研究间作小麦蚕豆不同生长期根际有机酸和酚酸变化发现不同生长期的有机酸和酚酸含量存在差异。以上研究可见自毒物质种类繁多, 不同种的植物其自毒物质的种类及其含量均存在差异, 而自毒物质对于植物的影响也是多方面的, 包括生理^[32, 34]、表型性状^[31, 33]等。

本研究通过 HPLC 测定苜蓿植株及根际土壤中 4 种自毒物质含量, 发现苜蓿植株中总含量显著高于根际土壤, 以 R 品种为例, 根际土壤中总含量仅为植株总含量的 2.1%。研究结果也发现部分品种单一自毒物质在苜蓿植株中含量低于根际土壤。如阿魏酸, G 品种植株中含量为 0.56 mg/kg, 而根际土壤中含量为 0.74 mg/kg, 可见根际土壤中自毒物质含量不仅来源于苜蓿植株(叶和茎), 还来源于根部, 这与 Staman 等^[37]、Sene 等^[38]、Seal 等^[39]的研究结论相一致。另外, 4 种自毒物质的自毒性强弱比较, 还需要采用外源添加试验来探讨。

比较两个采样地自毒物质平均含量(A ~ F 品种取自甘肃省会宁县样地, G ~ R 品种取自甘肃省武威市黄羊镇样地), 发现会宁采样地苜蓿中自毒物质总含量平均值高于黄羊镇样地。除了香豆素外, 其余单一自毒物质含量会宁样地均大于黄羊镇样地, 比较两个样地自然条件、土壤类型和灌溉条件后, 可能有以下原因: 会宁样地不具备灌溉条件而黄羊镇样地具备, 黄羊镇样地进入土壤中的自毒物质会因浇灌水的冲刷渗透作用将自毒物质带入地下深处, 而采集的土样多在地表层(0 ~ 20 cm), 所以 HPLC 测定量较小;

会宁样地土壤为灰钙土, 是一种弱淋溶干旱土, 而黄羊镇样地为灌淤土且疏松多孔、淋溶系数大, 因此

通过淋溶的方式将自毒物质转移至土壤下层,因此黄羊镇样地 HPLC 测定量较小。

4 结论

18 个苜蓿品种中 4 种自毒物质(香豆素、阿魏酸、绿原酸、咖啡酸)含量存在显著差异。4 种自毒物质在苜蓿植株中总含量远高于根际土壤,但部分品种根际土壤中某单一自毒物质(如阿魏酸)含量高于植株中含量。

参考文献：

- [1] Jennings J A, Nelson C J. Influence of soil texture on alfalfa autotoxicity[J]. *Agronomy Journal*, 1998, 90(1): 54-58
- [2] Mueller-Warrant G W, Koch D W. Weed control for no-till renovation of runout alfalfa[J]. *Proceedings-annual meeting of the Northeastern Weed Science Society*, 1980: 89-90
- [3] Jennings J A. Format of a weed control database[J]. *Weed Technology*, 1991, 5(1): 221-228
- [4] Miller D A. Allelopathy in forage crop system[J]. *Agronomy Journal*, 1996, 88: 854-859
- [5] Tesar M B. Delayed seeding of alfalfa avoids[J]. *Agronomy Journal*, 1993, 75: 115-119
- [6] Jennings J A, Nelson C J. Zone of autotoxic influence around established alfalfa plants[J]. *Agronomy Journal*, 2002, 94: 1104-1111
- [7] Putnam A R. Allelopathic research in agriculture: Past highlights and potential // Thompson AC. *The chemistry of allelopathy*[M]. Washington DC: American Chemical Society, 1985, 77: 1-8
- [8] Rice E L. Some possible roles of inhibitors in old-field succession//Washington D A. *Biochemical Interactions Among Plants*[M]. USA: National Academy of Sciences, 1971
- [9] Klein R R, Miller D A. Allelopathy and its role in agriculture[J]. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 1980, 11: 43-56
- [10] Butsat S, Siriamornpun S. Antioxidant capacities and phenolic compounds of the husk, bran and endosperm of Thai rice[J]. *Food Chemistry*, 2010, 119: 606-613
- [11] Chung I M, Miller D A. Effect of alfalfa plant and soil extracts on germination and growth of alfalfa[J]. *Agronomy Journal*, 1995, 87: 762-767
- [12] Hall M H, Henderlong P R. Alfalfa autotoxic fraction characterization and initial separation[J]. *Crop Science*, 1989, 29: 425-428
- [13] Wyman-Simpson C L, Waller G R, Jurysta M, et al. Biological activity and chemical isolation of root saponins of six cultivars of alfalfa (*Medicago sativa* L.)[J]. *Plant and Soil*, 1991, 135: 83-94
- [14] Birkett M A, Chamberlain K, Hooper 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
- [15] Miller D A. Allelopathy and establishment [J]. *Alfalfa Talk*, 1992, 12(1): 1-77
- [16] Miller R W. Germination and growth inhibitors of alfalfa[J]. *Journal of Natural Products*, 1988, 51: 328-330
- [17] Abdul-Rahman R A, Habib S A. Allelopathic effect of alfalfa (*Medicago sativa* L.) on bladygrass (*Imperata cylindrica*) [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 1989, 15: 2289-2300
- [18] 李占玉, 梁文举, 姜勇. 苜蓿化感作用研究进展[J]. *生态学杂志*, 2004, 23(5): 186-191
- [19] Chung I M, Seigler D, Miller D A, et al. Autotoxic compounds from fresh alfalfa leaf extracts: Identification and biological activity[J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2000, 26(1): 315-327
- [20] Miersch J, Jiihlke G. Metabolism and exudation of canavanine during development of alfalfa[J]. *Journal of Chemical Ecology*, 1992, 18: 2117-2129
- [21] 卢成, 曾昭海, 郑世宗, 等. 紫花苜蓿品种间自毒物质含量差异研究[J]. *作物学报*, 2007, 33(4): 578-582
- [22] 李志华, 沈益新, 刘信宝, 等. 开花期 10 个苜蓿品种水浸提液中酚酸类化感物质含量研究[J]. *草地学报*, 2009, 17(6): 799-805
- [23] 卜伟, 陈军. 高效液相色谱法测定土壤中均三氮苯类除草剂[J]. *土壤*, 2008, 40(5): 750-753
- [24] 唐玲丽, 王辉, 董元华, 等. 高效液相色谱法同时测定土壤中三环丙氨嗪和三聚氰胺[J]. *土壤*, 2009, 41(5): 826-832
- [25] Riley D, Barber S A. Bicarbonate accumulation and pH changes at the soybean root-soil interface[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1969, 33: 905-908
- [26] Riley D, Barber S A. Salt accumulation at the soybean root-soil interface[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1970, 34: 154-155
- [27] 罗小勇, 孙娟. 23 种紫花苜蓿不同品种及器官间化感活性差异的研究[J]. *草业学报*, 2012, 21(2): 83-91
- [28] 寇建村, 杨文权, 冯桂丽, 等. 不同苜蓿品种根、茎、叶水提液化感作用研究[J]. *草地学报*, 2008, 16(1): 70-75
- [29] 郑洁, 赵其阳, 张耀海. 超高液相色谱法同时测定柑橘中主要酚酸和类黄酮物质[J]. *中国农业科学*, 2014, 47(23): 4706-4717
- [30] 张娜, 王国祥, Abacar J D, 等. 超高液相色谱法分析稻米酚酸化合物组分及其含量[J]. *中国农业科学*, 2015, 48(9): 1718-1726
- [31] 邬彩霞, 刘苏娇, 赵国琦. 黄花草木樨水浸提液中潜在化感物质的分离、鉴定[J]. *草业学报*, 2014, 23(5): 184-192
- [32] 周凯, 郭维明, 王智芳, 等. 菊花不同部位及根际土壤水浸提液处理对光合作用的自毒作用研究[J]. *中国生态农业学报*, 2009, 17(2): 318-322
- [33] 董晓宁, 高乘芳, 张晓佩, 等. 多年生黑麦草根系抑草潜力评价及其化感物质分析[J]. *草业学报*, 2013, 22(4): 61-68

- [34] 张文明, 邱慧珍, 张春红, 等. 连作马铃薯不同生育期根系分泌物的成分检测及其自毒效应[J]. 中国生态农业学报, 2015, 23(2): 215–224
- [35] 胡远彬, 陈俊, 肖天昊, 等. 劲直黄芪水浸提液化感作用研究[J]. 草业学报, 2013, 22(6): 136–142
- [36] 肖靖秀, 郑毅, 汤利, 等. 间作小麦蚕豆不同生长期根际有机酸和酚酸变化[J]. 土壤学报, 2016, 53(3): 685–693
- [37] Staman K, Blum U, Louws F, et al. Can simultaneous inhibition of seedling growth and stimulation of rhizosphere bacterial population provide evidence for phytotoxin transfer from plant residues in the bulk soil to the rhizosphere of sensitive species[J]. Journal of Chemical Ecology, 2001, 27(4): 807–829
- [38] Sene M, Dore 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
- [39] Seal A N, Pratley J E, Haig T. Identification and quantitation of compounds in a series of allelopathic and non-allelopathic rice root exudates[J]. Journal of Chemical Ecology, 2004, 30(8): 1 647–1 662

Determination of Coumarins and Major Phenolic Acids in Plant and Rhizosphere Soil of Alfalfa (*Medicago sativa* L.)

RONG Sichuan^{1,2}, SHI Shangli^{1,2*}, SUN Cancan¹

(1 College of Grassland Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 2 Key Laboratory of Ecosystem of Ministry of Education, Pratacultural Engineering Laboratory of Gansu Province, Sino-US Center for Grazingland Ecosystem Sustainability, Lanzhou 730070, China)

Abstract: To find out the distribution characteristics of major phenolic acids and coumarins in 18 alfalfa (*Medicago sativa* L.) varieties from different testing fields, the contents of these substances in plant and rhizosphere soil were determined by HPLC method. The coumarins and major phenolic acids in plant and rhizosphere soil were extracted using ASE 350 accelerated solvent extractor, and the extracts were stored at 2°C. After filtered through 0.45 μm organic filtration membrane, the autotoxins contents in the extracts were determined by HPLC. Results showed that the contents of coumarin, ferulic acid, chlorogenic acid and caffeic acid in 18 alfalfa varieties varied with plant varieties. Among these substances, the contents of coumarin and chlorogenic acid were dramatically higher than those of ferulic acid and caffeic acid. The differences of single autotoxin content among varieties were significant ($P<0.05$), and total contents of coumarin, ferulic acid, chlorogenic acid and caffeic acid varied with plant varieties as well. In addition, the average contents of phenolic acids and coumarins from Huining testing field were 4.01% higher than these from Wuwei testing field. In conclusion, the total contents of coumarin, ferulic acid, chlorogenic acid and caffeic acid were significantly different among various alfalfa varieties ($P<0.05$), and the total contents of these substances in alfalfa plant were remarkably different from those in rhizosphere soils.

Key words: Accelerated solvent extraction (ASE); HPLC; *Medicago sativa* L.; Coumarins; Phenolic acids