

尾巨桉化感作用对广金钱草化学成分的影响*

Effect of *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis* Allelopathy on Chemical Components of *Desmodium styracifolium* (Osb.) Merr.

郑立浪^{1,2}, 陈月圆², 卢凤来², 李典鹏^{2**}

ZHENG Lilang^{1,2}, CHEN Yueyuan², LU Fenglai², LI Dianpeng²

(1. 广西师范大学生命科学学院, 广西桂林 541004; 2. 广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所, 广西植物功能物质研究与利用重点实验室, 广西桂林 541006)

(1. College of Life Sciences, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi, 541004, China;

2. Guangxi Key Laboratory of Functional Phytochemicals Research and Utilization, Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and the Chinese Academy of Sciences Guilin, Guangxi, 541006, China)

摘要:【目的】研究尾巨桉 *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis* 对广金钱草 *Desmodium styracifolium* (Osb.) Merr. 药材化学成分的影响, 探索尾巨桉-广金钱草复合经营模式的可行性。【方法】在试验田中, 以不同类型和重量的尾巨桉落叶铺盖在土壤上并种植广金钱草, 同时另在尾巨桉人工林中直接套种广金钱草, 待药材成熟后统计其产量, 并利用 HPLC 指纹图谱法及含量测定法检测其化学成分变化。【结果】广金钱草在尾巨桉林下种植时, 产量稍有下降, 但药材指纹图谱与正常种植无显著差异。【结论】广金钱草可以套种在尾巨桉人工林下。

关键词: 尾巨桉 广金钱草 化学成分 HPLC

中图分类号: R931.6 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2016)02-0184-05

Abstract:【Objective】The chemical component variation of *Desmodium styracifolium* (Osb.) Merr. intercropping in *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis* plantation was studied to explore the feasibility of *E. urophylla* × *E. grandis* and *Desmodium styracifolium* (Osb.) Merr. composite model.【Methods】*Desmodium styracifolium* (Osb.) Merr. was planted in a bare land with different weight of *E. urophylla* × *E. grandis* leaves covering on soils, which was also cultivated in *E. urophylla* × *E. grandis* plantation. The yield of *Desmodium styracifolium* (Osb.) Merr. was recorded after harvesting. Moreover, HPLC fingerprint method and determination of schaftoside were established to detect its chemical component variation.【Results】The yield of *D. styracifolium* (Osb.) Merr. cultivated in Eucalyptus forest decreased slightly, but its chemical fingerprints showed no obvious difference compared with the material which was normally cultivated.【Conclusion】*D. styracifolium* (Osb.) Merr. can interplant in Eucalyptus Plantations.

Key words: *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis*, *Desmodium styracifolium* (Osb.) Merr., chemical component, HPLC

DOI:10.13656/j.cnki.gxkx.20160512.007

0 引言

【研究意义】尾巨桉 (*Eucalyptus urophylla* ×

收稿日期: 2015-10-18

修回日期: 2016-01-29

作者简介: 郑立浪(1990-), 男, 硕士研究生, 主要从事天然产物化学研究。

* 广西重大专项项目(桂科重 1347001)和广西自然科学基金项目(1123014, 2010GXNSFD169007)资助。

** 通讯作者: 李典鹏(1968-), 博士, 研究员, 主要从事中药、天然药物和植物化学研究, E-mail: ldp@gxib.cn。

Eucalyptus grandis)^[1] 具有生长迅速、产量高和木材品质稳定等特点^[2],是近年我国南方地区大力度推广种植的速生桉良种之一,大范围种植于广东、广西、海南等地^[3]。目前,桉树人工林快速发展,带来了巨大的经济利益,但是其对环境的影响也越来越受到关注^[4]。种植大面积桉树林可能会严重降低土壤中的水分、生物多样性和 N、P、K 等矿质元素养分。通过开展桉树人工林复合经营模式的研究,以解决大面积种植桉树纯林的负面效应,一直是桉树人工林科学发展的重要课题^[5]。【前人研究进展】广金钱草 *Desmodium styracifolium* (Osbeck) Merr. 具有清热除湿,利尿通淋的功效,用于治疗各种热病,水肿等疾病。该药材在广西不同地区均有规模化种植^[6]。目前已有桉树-药材复合等经营模式的研究工作。化感作用是植物或微生物的代谢分泌物对环境其它植物或微生物产生的有利或不利的的作用。桉树的化感作用会抑制其林下生物的生长^[7]。【本研究切入点】在桉树林地内套种广金钱草,对其生长、药效基础物质(次生代谢产物的改变)的影响,目前未见有相关报道。【拟解决的关键问题】通过在试验田中,以不同类型和重量的尾巨桉叶子铺盖其土壤之上种植广金钱草,和在尾巨桉人工林中直接套种广金钱草的方式,比较药材的产量,及 HPLC 指纹图谱法检测主要化学成分的影响,为桉树-广金钱草复合经营模式提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 仪器

Agilent1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),中药粉碎机, R210 型旋转蒸发仪(Buchi), KQ3200DE 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

表 1 不同种植条件的样品编号

Table 1 Sample of *Desmodium styracifolium* (Osbeck) Merr. under different planting conditions

样品编号 Sample No.	种植条件 Planting condition	样品编号 Sample No.	种植条件 Planting condition
1~10	市场上购买 Buying on the market	15	大田,土表铺尾巨桉绿叶 1 600 g/m ² Field, soil surface covered with <i>E. urophylla</i> × <i>E. grandis</i> green leaves 1 600 g/m ²
11	尾巨桉树林下 <i>E. urophylla</i> × <i>E. grandis</i> artificial forest	16	大田,土表铺尾巨桉绿叶 800 g/m ² Field, soil surface covered with <i>E. urophylla</i> × <i>E. grandis</i> green leaves 800 g/m ²
12	大田,土表铺尾巨桉枝叶 0 g/m ² Field, soil surface covered with <i>E. urophylla</i> × <i>E. grandis</i> leaves 0 g/m ²	17	大田,土表铺尾巨桉黄叶 1 600 g/m ² Field, soil surface covered with <i>E. urophylla</i> × <i>E. grandis</i> yellow leaves 1 600 g/m ²
13	大田,土表铺尾巨桉灰叶 1 600 g/m ² Field, soil surface covered with <i>E. urophylla</i> × <i>E. grandis</i> grey leaves 1 600 g/m ²	18	大田,土表铺尾巨桉黄叶 800 g/m ² Field, soil surface covered with <i>E. urophylla</i> × <i>E. grandis</i> yellow leaves 800 g/m ²
14	大田,土表铺尾巨桉灰叶 800 g/m ² Field, soil surface covered with <i>E. urophylla</i> × <i>E. grandis</i> grey leaves 800 g/m ²		

1.2 试剂

水(娃哈哈纯净水),乙腈(美国 fisher 公司),三氟乙酸(上海源叶科技),甲醇(西陇化工),夏佛塔苷标准品(成都瑞芬思生物科技有限公司)。

1.3 材料

前期化学成分分析发现,尾巨桉的不同叶子,即绿叶、黄叶、灰叶的化学成分有较明显的差异。绿叶为直接从树上采摘风干,保持原有绿色;黄叶为掉落不久的桉树叶,为金黄色;灰叶为从林地收集的桉树枯落叶,为灰色。于广西黄冕林场同一林地内采集 3 种叶子,并室内阴干以备。广金钱草幼苗由当地农民提供,另外从市场上购买 10 个批次的合格广金钱草药材(编号为 1~10),作为对照用。所有材料经过广西植物研究所分类室韦发南研究员鉴定。

1.4 方法

1.4.1 不同种植条件对广金钱草生长的影响

分别在广金钱草种植地上铺尾巨桉叶(试验 1),及在尾巨桉林地内种植广金钱草(试验 2)。开展试验 1 的试验田位于广西桂林市雁山区广西植物研究所平地,首先将试验地划分为 1 m × 1 m 的小块,间隔 40 cm,每个小块等间距种植广金钱草幼苗 9 株,并分别铺灰叶、绿叶和黄叶,每种叶子设置 800 g/m²(尾巨桉人工林自然凋落量^[8])和 1 600 g/m² 两个浓度,每个处理设置 5 个重复。试验 2 在广西黄冕林场波寨分场进行,所在地为坡地,桉树为 4 年生二代林,平均株距 1.5 m。将试验地内所有杂草及灌木铲除,松动土壤,设置 3 个重复,每块地面积为 6.9 m × 5.8 m。种植密度与试验 1 相同,均在 6 月份的阴雨天,选择长势健壮,大小一致的幼苗进行移栽,具体见表 1。日常管理参考当地农民的管理方法。于 10 月初

收割其所有地上部分,称量鲜重后自然阴干并称干重。

1.4.2 HPLC 法测定不同种植条件下广金钱草的主要成分

供试品溶液的制备^[8]:取广金钱草阴干样品(编号 1~18),称取 20 g,加 500 mL 水,超声 30 min,倒出,残渣加 300 mL 水,超声 30 min,合并两次提取液用布氏漏斗和两层滤纸抽滤,取 100 mL 浓缩至干,用 50%(V/V)甲醇 2 mL 溶解,过 0.45 μm 滤膜,置于样品瓶内备用。

色谱条件:色谱柱使用 Poroshell 120 SB-AQ (4.6 mm×100 mm,2.7-μm),柱温 30℃,检测波长 270 nm,进样量 10 μL,流速 0.7 mL/min,流动相为 A(乙腈)-B(水,含 0.005 mol/L 三氟乙酸),采用梯度洗脱程序:0~10 min,5%~10% A;10~40 min,10%~15% A;40~50 min,15%~16% A;50~55 min,16%~100% A。

色谱仪精密实验:取 1 号样品,自动进样器连续进样 5 次;稳定性实验:取 1 号样品,分别在 12 h、24 h、48 h、72 h、96 h 进样测定;重复性实验:取 1 号样品 5 份,自动进样检测。

指纹图谱的建立:取 1~10 号样品进行指纹图谱测定。样品的 HPLC 图谱数据以 AIA 格式文件导出,将文件导入国家药典委员会 2004A 版“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”,按多点校正,自动匹配,以中位数法,生成对照图谱,导出对照图谱。取 11~18 号样品,获得 HPLC 图谱数据的 AIA 文件并导入对照图谱(设置为参照谱),选择若干主要峰,手工多点校正,自动匹配,获得相似度数据。

夏佛塔苷含量的测定:参照 2015 版《中国药典》的方法^[9],使用液相色谱法,以夏佛塔苷标准品为对照建立标准曲线, $R = 99.999\%$,依次测量各样品的夏佛塔苷含量。

2 结果和分析

2.1 不同种植条件对广金钱草产量的影响

以样品 12 为对照(表 2),种植在尾巨桉人工林下的广金钱草产量较低,为 32%;样品 13~18,虽然其产量有稍微降低,但未有统计学意义,因此可认为在模拟试验中,尾巨桉叶子对广金钱草的生长未产生明显影响。

2.2 不同种植条件下广金钱草 HPLC 指纹图谱

色谱仪精密度、稳定性、重复性实验结果显示,各主要色谱峰的相对保留时间的 RSD 和相对峰面积的 RSD 均小于 5%,说明仪器精密度良好,在 96 h 内稳

定,获得的指纹图谱真实可靠,重复性良好,实验结果可靠。

表 2 不同种植条件下广金钱草的产量

Table 2 Yield of *Desmodium styracifolium* (Osb.) Merr. under different planting conditions

样品编号 Sample No.	地上部分鲜重 Fresh weight on the ground (g/m ²)	地上部分干重 Dry weight on the ground(g/m ²)	地上部分干湿重比 Dry and wet weight ratio on the ground (%)	产量百分比 Output percentage(%)
11	1 492	463	31	32
12	4 675	1 415	30	100
13	3 500	1 288	34	91
14	3 625	1 325	34	94
15	4 500	1 350	30	96
16	3 950	1 313	26	93
17	5 000	1 383	28	98
18	4 000	1 373	29	97

HPLC 色谱图显示(图 1),各样品的色谱峰没有显著改变。通过相似度软件计算分析得出(表 3),以样品 1~10 为对照,样品 11~18 的 HPLC 指纹图谱相似度最低达到 0.813,种植在尾巨桉人工林下的广金钱草(样品 11)相似度达到了 0.948,图谱的主要峰都可以检测得到,差异主要表现在含量上。

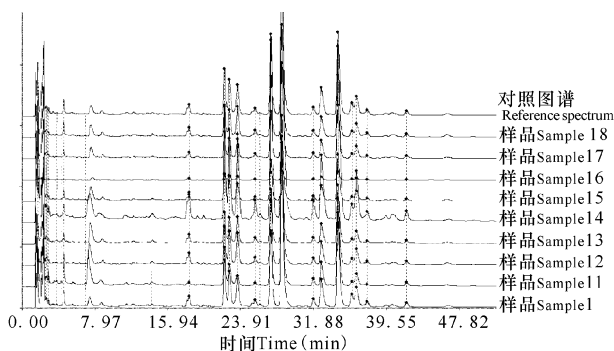


图 1 广金钱草各样品 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprint of *Desmodium styracifolium* (Osb.) Merr. under different planting conditions

表 3 广金钱草各样品与对照图谱的相似度

Table 3 The similarity of each sample to the control of *Desmodium styracifolium* (Osb.) Merr.

样品 Sample	与对照图谱的相似度 Similarity to the reference spectrum	样品 Sample	与对照图谱的相似度 Similarity to the reference spectrum
11	0.948	15	0.958
12	0.857	16	0.813
13	0.866	17	0.868
14	0.981	18	0.867

2.3 不同处理广金钱草的夏佛塔苷含量

由表 4 可看出,各样品的夏佛塔苷含量均达到了 2015 版《中国药典》最低标准 $\geq 0.13\%$ 。种植在尾巨

桉林下的广金钱草(样品 11)夏佛塔苷含量与正常种植(样品 1~10)的含量较接近,实验田种植中大浓度尾巨桉叶处理的广金钱草(样品 13,15,17)比低浓度组(样品 14,16,18)的夏佛塔苷含量略低。

表 4 广金钱草各样品夏佛塔苷含量

Table 4 Content of schaftoside in each sample of *Desmodium styracifolium* (Osbeck) Merr.

样品 Sample	含量 Content (W/W, %)	样品 Sample	含量 Content (W/W, %)
1	0.22	10	0.21
2	0.29	11	0.24
3	0.15	12	0.21
4	0.21	13	0.17
5	0.29	14	0.28
6	0.27	15	0.14
7	0.19	16	0.21
8	0.42	17	0.18
9	0.28	18	0.20

3 讨论

本文选用广西规模化种植的广金钱草与桉树进行套种,对比不同种植模式的广金钱草 HPLC 指纹图谱,探索广金钱草药材套种在桉树林下的可行性。与广金钱草套种桉树类似的林草复合模式做为一种生态恢复方法,其作用已在长江上游生态屏障的植被恢复中得到验证^[10-11]。而在桉树套种广金钱草的过程中,本文着重检验的是尾巨桉化感作用对广金钱草化学成分的影响。

在各种种植条件下,广金钱草的主要化学成分没有显著改变,但是各成分的含量有一定的变化,这可能与化感作用的复杂性有关。化感物质的种类几乎涵盖所有植物化学物质,目前研究的较多的是酚类和烯类。其作用机理也同样复杂多样,可在多个层次对植物产生影响,如影响细胞膜的通透性,植物激素的代谢,光合作用,酶活性等。

尾巨桉发挥化感作用的一个重要途径是通过枯落物,而枯落物中大部分是凋落叶,有研究表明,尾巨桉凋落叶成分会随时间变化发生变化。因此为了更好的控制条件,找出桉树对广金钱草可能的影响,本文除了在尾巨桉人工林下种植广金钱草外,在试验田中使用不同时期的尾巨桉凋落叶处理广金钱草,并且加大了浓度。对各种种植条件下的广金钱草,进行的 HPLC 指纹图谱研究表明,广金钱草主要成分没有发生大的改变。

虽然在林下种植的广金钱草产量有所下降,但是广金钱草种植时几乎不需要管理,无其它投入,作为

改善桉树林下环境的补偿措施是适合的。同时发现广金钱草种植当年采收后,任其自然过冬及生长,来年无须额外的管理,仍能收获到与前一年相似的产量。在尾巨桉造林初期,林下光线尚充足时,广金钱草的产量应会有所增加,此时桉树林裸露度大,广金钱草对土壤生态化境的保护作用也更明显。

试验中,广金钱草幼苗成活后至收获期靠自然降雨即可良好生长,耐夏季烈日暴晒。各种种植条件的光照强度为试验田最强,尾巨桉林次之,土壤湿度尾巨桉林最大,试验田最小,而广金钱草的产量试验田最大,尾巨桉林次之,这也显示广金钱草的产量可能主要受光照影响,光照越足,产量越高。这间接表明在桉树林地套种广金钱草的主要约束条件是光照等,而非桉树的化感物质。

4 结论

通过不同种植条件的广金钱草产量及化学成分分析,广金钱草在尾巨桉林下种植时产量稍有下降,但药材指纹图谱与正常种植无显著差异,为桉树-广金钱草复合经营模式的生产提供了一定依据。

参考文献:

- [1] 伍善久. 桉树引种及耐寒性选种实验研究[R]//国际桉树学术研究会材料之 C-4. 北京:中国林业出版社,1992.
WU S J. Experimental study on introduction and cold resistance breeding of *Eucalyptus* [R]//C-4 of International Academy of *Eucalyptus* Date. Beijing:China Forestry Publishing House,1992.
- [2] 林业区划办公室. 主要树种区划研究(三)——桉树[M]. 北京:中国林业出版社,1990.
Forestry Division Office. Study on the Regionalization of Major Tree Species(Three)—*Eucalyptus* [M]. Beijing:China Forestry Publishing House,1990.
- [3] 吴华静,田丰,桂凌健,等. 南宁七坡林场尾巨桉生物量的初步研究[J]. 广西科学院学报,2014,30(4):233-237.
WU H J, TIAN F, GUI L J, et al. A preliminary study on biomass of *Eucalyptus urophylla* × *E. grandis* plantation in Nanning Qipo forest farm[J]. Journal of Guangxi Academy of Sciences,2014,30(4):233-237.
- [4] 温远光,左花,朱宏光,等. 连载对桉树人工林植被盖度、物种多样性及功能群的影响[J]. 广西科学,2014,21(5):463-468,483.
WEN Y G, ZUO H, ZHU H G, et al. Effect of successive rotations on vegetation cover, species diversity and functional groups in Eucalypt plantations of south China [J]. Guangxi Sciences,2014,21(5):463-468,483.

- [5] 李羿桥. 巨桉凋落叶分解过程中养分和化感物质释放及其对三种草种的化感效应研究[D]. 成都:四川农业大学, 2013.
LI Y Q. Release of Nutrient and Allelochemical from Decomposing *Eucalyptus grandis* Leaf Litter and Its Allelopathic Effect on Three Grasses[D]. Chengdu, Sichuan Agricultural University, 2013.
- [6] 杨全. 广金钱草资源调查与药材质量评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(3):147-151.
YANG Q. Resource investigation and quality evaluation of *Desmodium styracifolium* [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medica Formulae, 2013, 19(3): 147-151.
- [7] 张学文, 刘亦学, 刘万学. 植物化感物质及其释放途径[J]. 中国农学通报, 2007, 23(7):295-297.
ZHANG X W, LIU Y X, LIU W X. Allelochemicals and its releasing modes [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2007, 23(7):295-297.
- [8] 张素中. 广金钱草及其煎剂 HPLC 指纹图谱的相关性研究[J]. 现代中药研究与实践, 2010, 24(5):76-78.
ZHANG S Z. Analysis on correlation of HPLC fingerprint on the decoction pieces and decoction of *Desmodii styracifolii* herba[J]. Research and Practice on Chinese Medicines, 2010, 24(5):76-78.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015:44-45.
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (Part I) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015:44-45.
- [10] 郭万祥, 李元华. 林草结合是长江上游地区保持水土的重要途径[J]. 四川草原, 1999, 2(2):12-13.
GUO W X, LI Y H. Afforestation combined with planting grass an important way for water and soil conservation in upper areas of Yangzi River[J]. Journal of Sichuan Grassland, 1999, 2(2):12-13.
- [11] 樊魏, 高喜荣. 林草牧复合系统研究进展[J]. 林业科学研究, 2004, 17(4):519-524.
FAN W, GAO X R. Research advances on the silvopastoral system [J]. Forest Research, 2004, 17(4): 519-524.

(责任编辑:竺利波)

(上接第 183 页 Continue from page 183)

- [10] 袁见萍, 张龙, 张前军, 等. 饿蚂蝗中多酚的含量测定[J]. 中国药房, 2013, 24(43):4078-4080.
YUAN J P, ZHANG L, ZHANG Q J, et al. Content determination of polyphenols in *Desmodium sambuense* [J]. China Pharmacy, 2013, 24(43):4078-4080.
- [11] 刘顺航, 孟宪军, 牛涛, 等. 葡萄籽中总多酚成分的测定[J]. 中华中医药杂志, 2007, 22(10):715-716.
LIU S H, MENG X J, NIU T, et al. Determination of total polyphenol ingredient from grape seed[J]. Chinese Medicine, 2007, 22(10):715-716.
- [12] 庞中磊, 唐文. 柚皮中活性物质的抗氧化活性研究[J]. 食品工业, 2012, 2:86-90.
PANG Z L, TANG W. Anti-oxidative activity of active substances from *Citrus grandis* [J]. Food Industry, 2012, 2:86-90.
- [13] 徐怀德, 王临宾, 张立佳. 苹果叶多酚的纯化及其抗氧化性研究[J]. 食品科学, 2010, 31(20):72-78.
XU H D, WANG L B, ZANG L J. Antioxidant activity and purification of polyphenols from apple leaves [J]. Food Science, 2010, 31(20):72-78.
- [14] 林格西, 吴圣迁, 江俊妮, 等. 羽衣甘蓝中多酚的提取与抗氧化活性研究[J]. 亚太传统医药, 2014, 10(24):14-16.
LIN G X, WU S Q, JIANG J N, et al. Extraction and antioxidant activity of polyphenol from kale [J]. Asia-Pacific Traditional Medicine, 2014, 10(24):14-16.
- [15] 朱丹, 牛广财, 蔡亚平, 等. 沙果渣多酚抗氧化活性的研究[J]. 中国食品添加剂, 2010, 5:129-132.
ZHU D, NIU G C, CAI Y P, et al. Antioxidant activity of polyphenol from pomace sand [J]. China Food Additives, 2010, 5:129-132.

(责任编辑:米慧芝)