

网络出版时间:2020-01-14 17:04 DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2020.07.010
网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20200114.1125.020.html

兰州百合连作土壤水浸液自毒作用研究

黄钰芳^{1,2},张恩和¹,张新慧³,王惠珍²,王琦¹,刘青林¹,崔佳佳¹,胥生荣¹

(1 甘肃农业大学 农学院,甘肃 兰州 730070;2 甘肃中医药大学 药学院,甘肃 兰州 730000;

3 宁夏医科大学 药学院,宁夏 银川 750004)

[摘要] **【目的】**探讨兰州百合(*Lilium davidii* var. *unicolor salisb*)连作土壤水浸液对自身幼苗生长的障碍因素及其作用机制。**【方法】**设置蒸馏水(CK)及正茬、连作 2 年、连作 4 年兰州百合根际土壤水浸液各 50,100,200,300 mg/mL,共 13 个处理,以兰州百合种球为受试对象,测定不同条件下兰州百合幼苗生长、抗氧化酶活性、渗透调节物质及细胞膜透性的变化,并利用 GC-MS 技术分析各处理土壤中存在的主要自毒物质。**【结果】**正茬、连作 2 年及连作 4 年兰州百合根际土壤水浸液对兰州百合幼苗的生长均存在“低促高抑”现象,且抑制作用随连作年限的延长而增强。随水浸液质量浓度的增加,兰州百合幼苗 CAT 和 SOD 活性逐渐升高,POD 活性先上升后下降,MDA 含量、相对电导率、脯氨酸及可溶性糖含量的变化呈不断上升趋势,当水浸液质量浓度上升至 300 mg/mL 时,3 个处理中各指标的上升或下降程度与对照相比均达显著差异水平($P<0.05$)。兰州百合正茬、连作 2 年及连作 4 年根际土壤中分别鉴定出 9,15 和 17 种化合物,主要包括 2,3-丁二醇、1,2,3-三甲苯、邻苯二甲酸二丁酯、对苯二甲酸二辛酯、抗氧化剂 2246 等化合物,其中大部分为自毒物质。**【结论】**兰州百合正茬、连作 2 年及连作 4 年根际土壤水浸液质量浓度达到 300 mg/mL 时,对其幼苗的生长会产生显著抑制作用。连作土壤中存在自毒物质可以改变兰州百合植株体内的抗氧化酶活性,破坏细胞膜结构和功能,抑制兰州百合植株的生长,是导致兰州百合连作障碍发生的重要原因之一。

[关键词] 兰州百合;自毒作用;连作障碍;化感物质;抗氧化酶活性;渗透调节物质;细胞膜透性

[中图分类号] S644.1;S344.4

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2020)07-0084-10

Autotoxicity of water extracts from continuous cropping soil of *Lilium davidii* var. *unicolor salisb*

HUANG Yufang^{1,2},ZHANG Enhe¹,ZHANG Xinhui³,WANG Huizhen²,
WANG Qi¹,LIU Qinglin¹,CUI Jiajia¹,XU Shengrong¹

(1 Agronomy College,Gansu Agricultural University,Lanzhou,Gansu 730070,China;

2 College of Pharmacy,Gansu University of Traditional Chinese Medicine,Lanzhou,Gansu 730000,China;

3 College of Pharmacy,Ningxia Medical University,Yinchuan,Ningxia 750004,China)

Abstract: **【Objective】** This study aimed at investigating the obstacle factors and mechanism of water extracts of continuous cropping soil of *Lilium davidii* var. *unicolor salisb* on its seedling growth. **【Method】** The soil samples of stubble,continuous cropping for 2 years and continuous cropping for 4 years were treated by extractions. Four concentration levels of water extracts including 50,100,200 and 300 mg/mL and CK (treated by distilled water) were setup to test their effect on early development of lily. At the same time,the changes in growth,antioxidant enzymes,osmotic regulators and cell membrane permeability of seedlings under above treatments were determined and organic compounds were identified by GC-MS. **【Re-**

[收稿日期] 2019-06-27

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31560380);甘肃省高等学校创新能力提升项目(2019A-072);甘肃农业大学校级自列项目(GSAU-ZL2015-007)

[作者简介] 黄钰芳(1977—),女,甘肃陇南人,副教授,博士,主要从事中药栽培与质量评价研究。E-mail:1049395950@qq.com

[通信作者] 张恩和(1966—),男,甘肃永登人,教授,博士,主要从事作物生理生态研究。E-mail:zhangeh@gsau.edu.cn

sult】The soil water extracts of stubble, continuous cropping for 2 years and 4 years showed promoting effects with low concentration and inhibiting effects with high concentration on the seedlings growth of *Lilium davidii* var. *unicolor salisb*. With the increase of concentration of water extracts, activities of CAT and SOD of *Lilium davidii* var. *unicolor salisb* seedling gradually increased, activity of POD first increased and then decreased, while contents of MDA, relative conductivity, proline and soluble sugar increased. When mass concentration was 300 mg/mL, the indicators in the three treatments were all significantly different from the CK. There were nine, fifteen and seventeen compounds identified from chloroform extracts of soil samples from stubble, continuous cropping for 2 years and continuous cropping for 4 years, respectively. The components included 2,3-butanediol, 1,2,3-tritoluene, dibutyl phthalate, dioctyl terephthalate and antioxidant 2246, most of them were allelopathic substance. 【Conclusion】The soil water extracts from stubble, continuous cropping for 2 years and continuous cropping for 4 years had significant inhibitory effect on seedlings growth of *Lilium davidii* var. *unicolor salisb* at the concentration of 300 mg/mL. The autotoxic substances existing in the continuous cropping soil of *Lilium davidii* var. *unicolor salisb* inhibited plants growth by changing antioxidant enzyme activities in plants and damaging structure and function of cell membrane, which would lead to failure of *Lilium davidii* var. *unicolor salisb* continuous cropping.

Key words: *Lilium davidii* var. *unicolor salisb*; autotoxicity; continuous cropping; allelochemicals; antioxidant enzyme activities; osmotic adjustment substances; cell membrane permeability

兰州百合(*Lilium davidii* var. *unicolor salisb*)是我国“四大百合”品系中唯一可食用的甜百合^[1]。经多年栽培兰州百合已形成独具特色的百合品质,具有润肺止咳、养阴安神之效,百合产业也已成为当地重要的经济支柱之一^[2]。然而,随着市场需求的急剧增加,种植区域连作重茬现象加重,导致兰州百合减产减收,产量由原来的 22 500 kg/hm²下降到 15 000 kg/hm²,独头率从原来的 70%下降到不足 40%^[3]。连作障碍已成为困扰兰州百合产业发展的首要问题。

植物通过根系分泌、残体分解、地上淋溶等诸多途径向根际区释放各种自毒物质,自毒物质的累积会改变土壤微环境,从而对植物的生长造成直接或间接的抑制作用。连作会进一步加重自毒物质的积聚,导致自毒作用的发生。研究显示,自毒作用是引起连作障碍的重要原因之一^[4-6],许多作物连作障碍的发生多与此有关^[7-11]。柴宗兵等^[2]和梁旭东^[3]研究表明,自毒作用也是导致兰州百合连作障碍的主要因素之一。黄钰芳等^[12]在前期的研究中证实,兰州百合植株鳞茎及根系水浸液对其种球的萌发及幼苗的生长具有阻碍作用。自然状态下,自毒作用的发生多以土壤环境为媒介,若缺少土壤环境自毒作用的研究,整个试验必将缺乏可信度。为此,本试验在前期研究的基础上,以兰州百合种球为受试对象,研究不同连作年限土壤水浸液对兰州百合幼苗生长、抗氧化酶活性、渗透调节物质及细胞膜透性的影

响,分析兰州百合自毒作用机制,并利用 GC-MS 技术分析兰州百合土壤中的自毒成分,以期为探明兰州百合自毒作用的主要物质基础提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

2015 年 10 月于兰州市七里河区西果园镇,分别选择正茬、连作 2 年和连作 4 年的百合地块,随机(5 点取样法)选取健康植株,挖取整株,抖掉大块土壤,用毛刷刷取附着在根系周围半径 4 mm 以内的土壤,过 4 号筛后留存备用。购买当地培育成熟的百合种球作为受试对象。

1.2 兰州百合根际土壤水浸液的制备

分别称取新鲜的不同连作年限土壤 600 g,置于烧杯中,加蒸馏水 2 000 mL,振荡 6 h 后浸泡 18 h 获得浸提液,以 8 000 r/min 离心 10 min,上清液再经 0.45 μ m 微孔滤膜过滤,得到质量浓度为 300 mg/mL 的母液。将各母液分别稀释成质量浓度为 50, 100, 200 和 300 mg/mL 的水浸液,于 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3 土壤水浸液对兰州百合的自毒作用

选择包合紧密、基盘健康、大小均一的兰州百合种球,于 3 mg/mL 的高锰酸钾溶液中浸泡 10 min,用无菌蒸馏水冲洗 2~3 次后,均匀种植于装有适量河沙的发芽盒(10 cm $\times$ 10 cm $\times$ 5 cm)中,每盒植入 12 颗。分别量取 50, 100, 200 和 300 mg/mL 不同

连作年限土壤水浸液 30 mL 加入到发芽盒中,每处理重复 3 次,对照加入等体积蒸馏水。将所有发芽盒放入 25 ℃ 培养箱中培养 20 d。期间,每隔 3 d 加入适量蒸馏水以保持沙粒湿润。

1.4 测定指标及方法

1.4.1 幼苗生长指标的测定 将兰州百合幼根和幼苗于鳞茎结合部位分开,分别称量鲜质量,测定幼苗和根的长度,取平均值。

化感效应指数(response index, RI)采用 Wil-liamson 等^[13]的方法计算。公式为:

$$RI = \begin{cases} 1 - C/T & (T \geq C); \\ T/C - 1 & (T < C). \end{cases}$$

式中: C 为各指标对照值, T 为各指标处理值。 $RI > 0$ 时表示具有促进作用, $RI < 0$ 时表示具有抑制作用,绝对值的大小代表化感作用的强度。

综合化感效应(synthesis effect, SE)是指幼苗长(seedling length, SL)、幼苗质量(seedling weight, SW)、根长(root length, RL)及根质量(root weight, RW)化感效应指数的加和平均值。 $SE > 0$ 时表示具有促进作用, $SE < 0$ 时表示具有抑制作用,绝对值的大小代表综合化感作用的强度。

1.4.2 抗氧化酶活性的测定 过氧化氢酶(CAT)活性采用硫代硫酸钠滴定法^[14]测定,过氧化物酶(POD)活性采用愈创木酚法^[14]测定,超氧化物歧化酶(SOD)活性采用氮蓝四唑(NBT)光还原法^[14]测定。

1.4.3 渗透调节物及细胞膜透性相关指标的测定

脯氨酸、可溶性糖、丙二醛(MDA)含量分别采用酸性茚三酮比色法,3,5-二硝基水杨酸(DNS)法、硫代巴比妥酸(TBA)法^[14]测定,相对电导率采用电导率仪测定。

1.5 自毒物质成分的检测

分别称取新鲜的不同连作年限土壤 500 g,加适量蒸馏水浸泡 24 h,期间多次振荡。浸提液以 4 000 r/min 离心 10 min,取上清液浓缩至适量,用等体积氯仿萃取 5 次,4 ℃ 条件下减压回收氯仿至 0.5 mL,用于 GC-MS 分析。

GC-MS 条件:HP-5MS 柱(规格为 30 m×250 μm×0.25 μm)。进样口温度 250 ℃;柱温 40 ℃。以 5 ℃/min 程序升温至 50 ℃,保持 2 min,再以 5 ℃/min 程序升温至 130 ℃,保持 5 min,再以 5 ℃/min 程序升温至 160 ℃,保持 5 min,再以 5 ℃/min 程序升温至 250 ℃,保持 5 min,再以 5 ℃/min 程序升温至 280 ℃,保持 10 min,最后以 10

℃/min 程序升温至 300 ℃。载气:He;流量:1 mL/min;进样量为 1.0 μL。电子轰击源,轰击电压 70 eV,扫描范围 m/z 30~600 AMU,扫描速度 0.2 s 扫全程,离子源温度 230 ℃。

应用 NIST 11. L 质谱数据库计算机检索系统分析质谱图,进行未知物的鉴定。

借鉴 Jaccard 相似系数公式,比较不同连作年限土壤中化合物的相似度(J)。其计算公式为:

$$J = \frac{d}{a+b+c+d} \times 100\%。$$

式中: a 、 b 、 c 分别为正茬、连作 2 年和连作 4 年根际土壤中特有组分的数目, d 为共有组分数目。 a 、 b 、 c 所代表组分相对含量大于 1%, d 所代表 3 个共有组分中至少有 1 个组分的相对含量大于 1%。

1.6 数据分析

利用 Microsoft Excel 2007 软件处理原始数据,通过 SPSS 17.0 软件对数据进行单因子方差分析,用新复极差法(Duncan)进行显著性检验。

2 结果与分析

2.1 不同连作年限土壤水浸液对兰州百合幼苗生长的影响

由表 1 可知,兰州百合不同连作年限土壤水浸液对自身幼苗的生长均存在一定的影响。在 50 mg/mL 正茬、连作 2 年及连作 4 年土壤水浸液作用下,兰州百合幼苗苗长、根长及根鲜质量与对照相比均有所增加,其中正茬和连作 2 年处理兰州百合根鲜质量较对照分别增加了 64.29% 和 50.00%,差异均达显著水平($P < 0.05$)。随水浸液质量浓度的增大,兰州百合幼苗苗长、根长和根鲜质量均持续下降,当质量浓度提高至 300 mg/mL 时,与对照相比均显著下降($P < 0.05$)。与对照相比,随不同连作年限土壤水浸液质量浓度的增加,兰州百合幼苗鲜质量均呈不断下降趋势,在 200~300 mg/mL 时,幼苗鲜质量与对照相比分别下降了 26.26%~37.37%,24.24%~48.48% 和 37.37%~52.53%,差异均达显著水平($P < 0.05$)。

综合化感效应(SE)能全面衡量化感效应的强度。从表 2 可知,同一处理中,百合幼苗 SE 值均表现出“低促高抑”现象,即水浸液质量浓度为 50 mg/mL 时,各土壤水浸液对百合幼苗的生长均存在促进作用,随水浸液质量浓度的进一步提高则表现出一定的抑制效应,且抑制程度逐渐加强。同一质量浓度(200 和 300 mg/mL)条件下,连作 4 年的 $|SE|$

值>连作 2 年|SE|值>正茬|SE|值,说明随连作年限的延长,土壤水浸液对百合幼苗的抑制程度逐渐增强。

由表 2 还可以看出,低质量浓度条件下,各指标对土壤水浸液的敏感程度无明显规律,但当土壤水

浸液质量浓度提高至 300 mg/mL 时,百合幼苗根长的|RI|值>幼苗苗长|RI|值,根鲜质量|RI|值>幼苗鲜质量|RI|值,说明在高质量浓度土壤水浸液作用条件下,兰州百合幼苗根系对各处理水浸液的敏感程度高于茎叶的敏感效应。

表 1 不同连作年限土壤水浸液对兰州百合幼苗生长的影响

Table 1 Effect of soil water extracts in different continuous cropping years on seedlings growth of

Lilium davidii var. *unicolor salisb*

土壤水浸液 Soil water extracts	水浸液质量 浓度/(mg·mL ⁻¹) Mass concentration of soil water extracts	幼苗长/cm Seedling length	幼苗鲜质量/(g·株 ⁻¹) Seedling fresh weight	根长/cm Root length	根鲜质量/(g·株 ⁻¹) Root fresh weight
正茬 Stubble	CK	12.81±1.342 ab	0.99±0.186 a	4.30±1.140 a	0.14±0.030 bc
	50	14.27±1.491 a	0.97±0.169 a	5.71±0.794 a	0.23±0.067 a
	100	12.03±1.003 abc	0.89±0.051 ab	4.24±1.215 a	0.21±0.038 ab
	200	10.85±1.175 bc	0.73±0.076 bc	3.69±1.931 ab	0.13±0.017 cd
	300	9.53±1.699 c	0.62±0.089 c	1.86±0.714 b	0.06±0.035 d
连作 2 年 Continuous cropping for 2 years	CK	12.81±1.342 a	0.99±0.186 a	4.30±1.140 a	0.14±0.030 b
	50	13.02±1.341 a	0.96±0.048 ab	4.97±1.081 a	0.21±0.034 a
	100	12.34±1.501 a	0.84±0.090 ab	3.90±1.310 a	0.18±0.041 ab
	200	10.64±1.169 ab	0.75±0.145 b	3.23±1.174 ab	0.13±0.020 b
	300	8.82±1.281 b	0.51±0.083 c	1.68±1.002 b	0.06±0.021 c
连作 4 年 Continuous cropping for 4 years	CK	12.81±1.342 a	0.99±0.186 a	4.30±1.140 a	0.14±0.030 ab
	50	13.36±1.595 a	0.96±0.195 a	4.53±0.200 a	0.18±0.026 a
	100	12.07±1.490 a	0.82±0.053 ab	3.76±0.531 ab	0.15±0.021 ab
	200	10.46±1.827 ab	0.62±0.065 bc	2.72±0.898 bc	0.12±0.006 b
	300	8.16±1.726 b	0.47±0.120 c	1.52±0.472 c	0.05±0.022 c

注:表中数值为“平均值±SD”(n=3)。同列数据后标不同小写字母表示同一处理各质量浓度间差异显著(P<0.05)。
Note:Data are “average value±SD”(n=3). Different lowercase letters indicate significant differences among different concentrations in same treatment (P<0.05).

表 2 不同连作年限土壤水浸液对兰州百合幼苗生长的化感效应指数

Table 2 Allelopathic effect index of soil water extracts in different continuous cropping years on

seedlings growth of *Lilium davidii* var. *unicolor salisb*

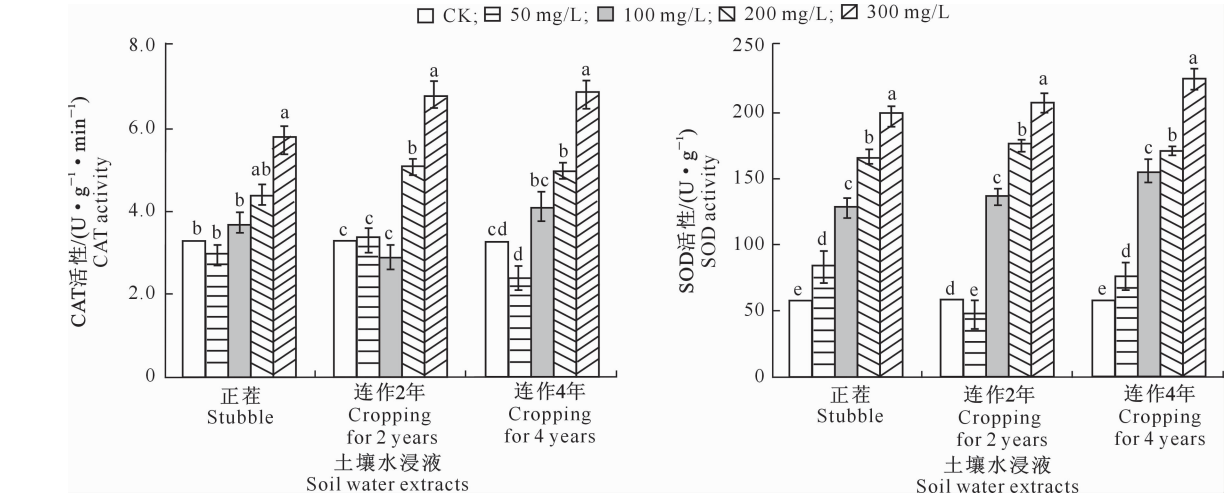
土壤水浸液 Soil water extracts	水浸液质量 浓度/(mg·mL ⁻¹) Mass concentration of soil water extracts	化感效应指数 Allelopathic effect index				综合化感效应 Comprehensive allelopathic effect
		幼苗长 Seedling length	幼苗鲜质量 Seedling fresh weight	根长 Root length	根鲜质量 Root fresh weight	
正茬 Stubble	50	0.10	-0.02	0.25	0.39	0.72
	100	-0.06	-0.10	-0.01	0.33	0.16
	200	-0.15	-0.26	-0.14	-0.07	-0.64
	300	-0.26	-0.37	-0.57	-0.57	-1.77
连作 2 年 Continuous cropping for 2 years	50	0.02	-0.03	0.13	0.33	0.45
	100	-0.04	-0.15	-0.09	0.22	-0.06
	200	-0.17	-0.24	-0.25	-0.14	-0.80
	300	-0.31	-0.48	-0.61	-0.57	-1.97
连作 4 年 Continuous cropping for 4 years	50	0.04	-0.03	0.05	0.22	0.28
	100	-0.06	-0.17	-0.13	0.07	-0.29
	200	-0.18	-0.37	-0.37	-0.15	-1.07
	300	-0.36	-0.53	-0.65	-0.64	-2.18

2.2 不同连作年限土壤水浸液对兰州百合抗氧化酶活性的影响

由图 1 可知,兰州百合幼苗 CAT 和 SOD 活性随土壤水浸液质量浓度的增大均呈现出不断上升趋

势。当水浸液质量浓度达到 200~300 mg/mL 时,正茬、连作 2 年和连作 4 年处理的 CAT 活性较对照分别提高了 35.06%~75.61%,56.40%~109.15%和 53.05%~110.37%,其中仅连作处理

与对照均有显著差异($P<0.05$)。



图柱上不同小写字母表示同一处理不同质量浓度间差异显著。下同

Different lowercase letters indicate significant differences between different concentrations of same treatment. The same below

图 1 不同连作年限土壤水浸液对兰州百合幼苗 CAT 和 SOD 活性的影响

Fig. 1 Effect of soil extracts in different continuous cropping years on CAT and SOD activities of *Lilium davidii* var. *unicolor salisb* seedlings

不同连作年限土壤水浸液对兰州百合幼苗 POD 活性的影响见图 2。

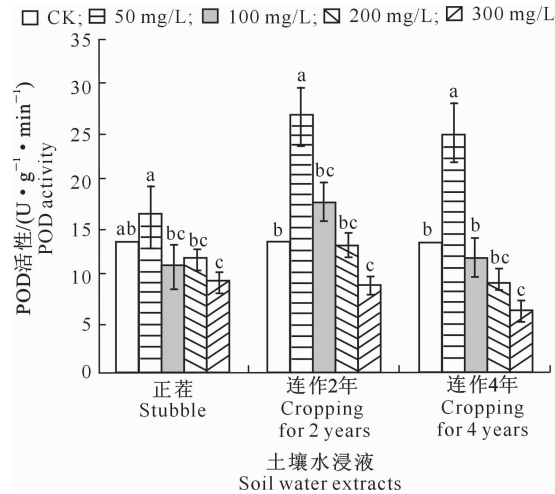


图 2 不同连作年限土壤水浸液对兰州百合幼苗 POD 活性的影响

Fig. 2 Effect of soil extracts in different continuous cropping years on POD activities of *Lilium davidii* var. *unicolor salisb* seedlings

由图 2 可知,同一处理中,各水浸液质量浓度作用下的 SOD 活性与对照相比均显著升高,且各质量浓度间的差异也均达显著水平($P<0.05$)。兰州百合幼苗 POD 活性的变化在不同处理下存在一定的差异,但随水浸液质量浓度升高,兰州百合 POD 活性均先升高后降低。当水浸液质量浓度为 50 mg/mL 时,正茬、连作 2 年和连作 4 年处理的 POD

活性较对照分别上升了 19.28%, 95.95% 和 83.44%, 其中仅连作处理与对照有显著差异($P<0.05$)。当水浸液质量浓度提高至 300 mg/mL 时,各处理的 POD 活性较对照分别下降 30.76%, 33.70% 和 51.51% ($P<0.05$), 且与对照相比差异均达显著水平($P<0.05$)。说明在本试验设置的土壤水浸液质量浓度范围内,连作土壤水浸液对兰州百合幼苗 POD 活性的影响程度较正茬土壤水浸液大。

2.3 不同连作年限土壤水浸液对兰州百合渗透调节物质含量的影响

由图 3 可知,随水浸液质量浓度的增大,各处理兰州百合可溶性糖及脯氨酸含量总体呈现上升趋势。当质量浓度为 100 mg/mL 时,正茬兰州百合的可溶性糖含量较处理提高了 10.23%, 但与对照差异不显著;而连作 2 年和连作 4 年处理的可溶性糖含量则较对照分别提高了 26.32% 和 126.32%, 与对照差异均达显著水平($P<0.05$)。当水浸液质量浓度为 100 mg/mL 时,正茬与连作 2 年兰州百合的脯氨酸含量变化不明显,但连作 4 年的脯氨酸含量较对照显著提高了 10.43% ($P<0.05$); 当水浸液质量浓度升高至 200 mg/mL 时,正茬脯氨酸含量较对照变化仍不显著,而连作 2 年和连作 4 年的脯氨酸含量则分别较对照提高了 14.74% 和 19.90%, 且与对照及 100 mg/mL 水浸液处理的差异均达显著水平($P<0.05$)。

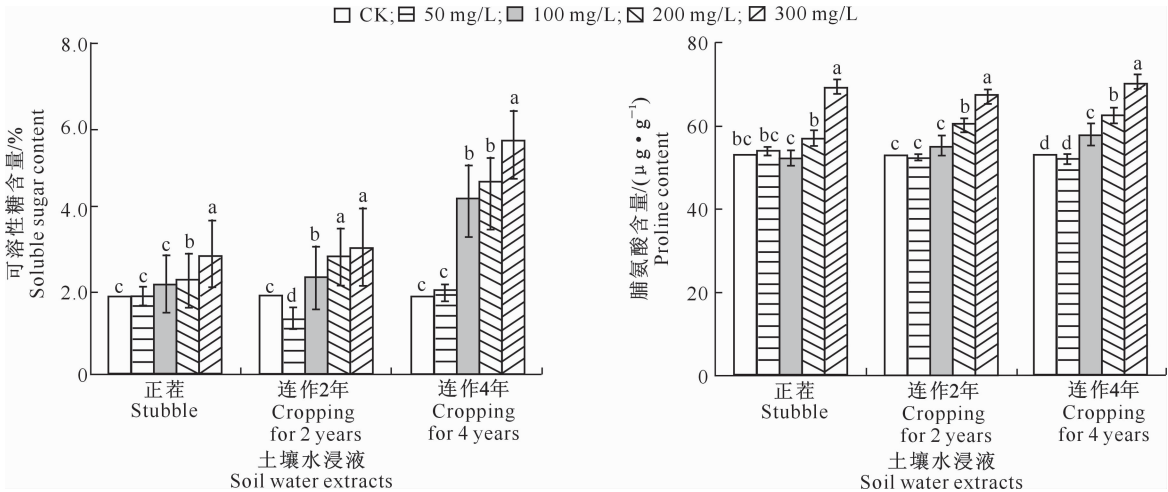


图 3 不同连作年限土壤水浸液对兰州百合幼苗可溶性糖和脯氨酸含量的影响
Fig. 3 Effect of soil water extracts in different continuous cropping years on soluble sugar and proline content of *Lilium davidii* var. *unicolor salisb* seedlings

2.4 不同连作年限土壤水浸液对兰州百合细胞膜透性的影响

图 4 显示,同一处理条件下,随土壤水浸液质量浓度的升高,兰州百合幼苗丙二醛(MDA)含量和相对电导率均呈不断上升趋势。在水浸液质量浓度为 50~100 mg/mL 时,各处理中上述指标的变化均不明显;而当质量浓度提高至 200~300 mg/mL 时,各处理兰州百合的 MDA 含量与对照相比分别增加了 46.28%~97.52%,64.46%~138.02%,86.78%~

166.94%,相对电导率分别上升了 19.63%~36.26%,50.87%~89.64%和 80.73%~93.40%,且与对照的差异均达显著水平($P<0.05$)。说明在相同质量浓度土壤水浸液作用下,随连作年限增加,土壤水浸液对百合幼苗的自毒作用有所加强,从而造成细胞膜脂过氧化程度升高,细胞膜结构不断遭受破坏,从而引起细胞内更多的电解质外渗,相对电导率逐渐升高。

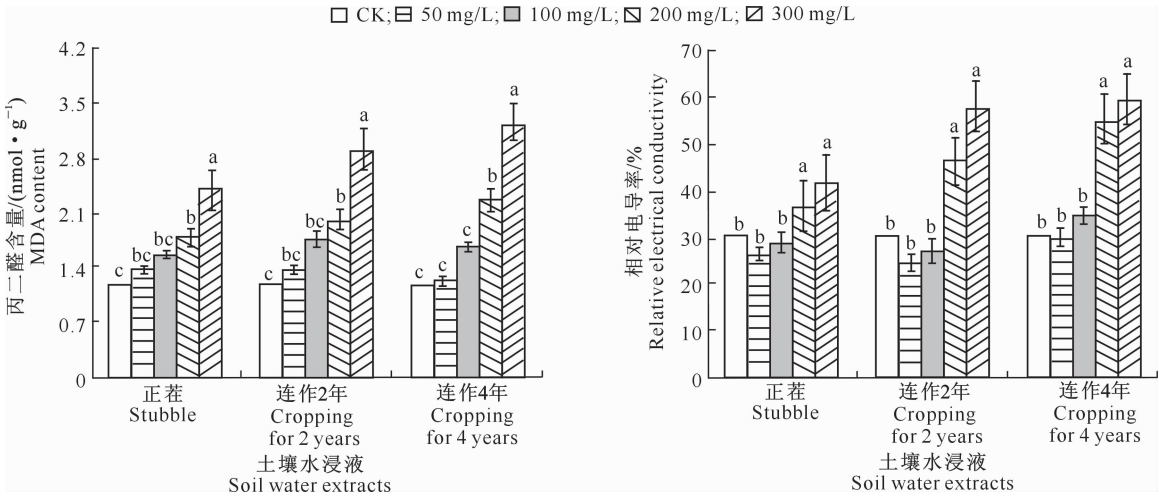


图 4 不同连作年限土壤水浸液对兰州百合幼苗 MDA 含量和相对电导率的影响
Fig. 4 Effect of soil water extracts in different continuous cropping years on MDA content and relative electrical conductivity of *Lilium davidii* var. *unicolor salisb* seedlings

2.5 不同连作年限土壤中自毒物质的检测

采用气质联用色谱仪(GC-MS)分析不同处理土壤中潜在的化感自毒物质,结果见图 5 和表 3。由表 3 可以看出,正茬土壤中存在 9 种化合物,主要

包括对苯二甲酸二辛酯和 1,3-二甲苯等;连作 2 年土壤中存在 15 种化合物,主要包括对苯二甲酸二辛酯、甲苯、2,3-丁二醇和抗氧剂 2246 等成分;连作 4 年土壤中共存在 17 种化合物,主要包括对苯二甲酸

二辛酯、1,3-二甲苯、抗氧剂 2246 和邻乙基甲苯等物质。

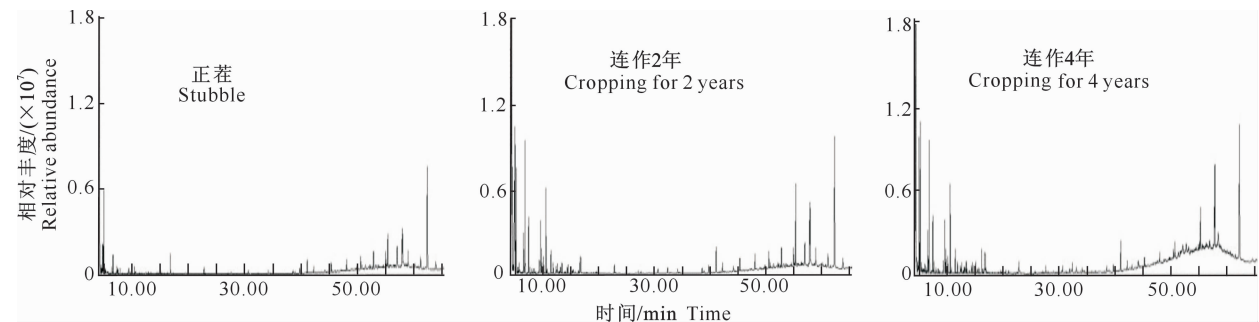


图 5 不同连作年限土壤氯仿萃取液的 GC-MS 色谱图
Fig. 5 GC-MS chromatogram of soil chloroform extracts of different continuous cropping years

表 3 不同连作年限兰州百合土壤浸提液中自毒物质的相对含量

保留时间/min Retention time		自毒物质成分 Components of autotoxic substances	相对含量/% Relative content		
			正茬 Stubble	连作 2 年 Continuous cropping for 2 years	连作 4 年 Continuous cropping for 2 years
4.346		甲苯 Toluene	—	26.03	—
4.908		2,3-丁二醇 2,3-butanediol	—	21.80	—
6.519		乙基苯 Ethylbenzene	—	3.45	—
6.707		1,3-二甲苯 1,3-dimethyl-benzene	8.14	—	17.61
9.501		邻乙基甲苯 1-ethyl-2-methyl-benzene	4.05	—	10.77
11.823		2,3-二氢茚 Indane	—	1.03	1.59
12.567		3-乙基邻二甲苯 1-ethyl-2,3-dimethyl-benzene	1.16	6.58	—
14.475		1,2,3,5-四甲基苯 1,2,3,5-tetramethyl-benzene	—	—	1.36
14.702		磷酸三乙酯 Triethyl phosphate	1.30	—	—
15.226		樟脑 Camphor	0.91	0.33	—
15.355		4-甲基-2,3-二氢茚 2,3-dihydro-4-methyl-1H-Indene	—	0.35	0.56
16.151		碳酸二异丁酯 Carbonic acid, bis(2-methylpropyl) ester	—	—	3.23
16.358		萘 Naphthalene	0.88	0.33	0.76
19.521		1-甲基萘 1-methyl-naphthalene	1.08	0.34	0.56
22.982		异香草醛 3-hydroxy-4-methoxy-benzaldehyde	—	—	0.56
25.737		2,6-二叔丁基苯醌 2,5-cyclohexadiene-1,4-dione, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-	—	—	0.52
27.613		2,4-二叔丁基苯酚 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol	1.75	0.42	—
30.505		邻苯二甲酸二乙酯 Diethyl phthalate	—	—	0.39
32.381		磷酸三丁酯 Tributyl phosphate	—	0.70	1.80
43.106		棕榈酸甲酯 Hexadecanoic acid, methyl ester	—	—	1.02
44.154		邻苯二甲酸二丁酯 Dibutyl phthalate	—	1.10	1.15
45.900		2,5-二甲基菲 2,5-dimethyl-phenanthrene	—	0.18	—
48.766		硬脂酸甲酯 Methyl stearate	—	—	0.68
55.364		抗氧剂 2246 2,2'-methylenebis[6-(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-phenol]	—	9.00	16.01
62.330		对苯二甲酸二辛酯 1,4-benzenedicarboxylic acid, bis(2-ethylhexyl) ester	80.73	27.47	41.43

注:表中所列成分均为 GC-MS 质谱数据库检索匹配度大于 90% 的化合物。
Note:Components listed are those retrieved by mass spectrometry database of GC-MS with a matching degree of >90%.

计算正茬、连作 2 年及连作 4 年百合土壤中相对含量大于 1% 组分的相似系数。结果显示,兰州百合正茬、连作 2 年及连作 4 年土壤中所含化合物的相似系数为 6.67%,对苯二甲酸二辛酯仅为 3 种处理中唯一共存的化合物,且其含量在每一处理中均处于最高值,分别达到了 80.73%,27.47% 和 41.43%。综合分析可以看出,随连作年限的延长,兰州百合土壤中自毒物质的种类均有所增加,且差异性不断增强。

3 讨 论

3.1 不同连作年限土壤水浸液对百合幼苗的自毒作用

自毒作用是植物种内相互影响的方式之一,是植物通过雨雾淋溶、自然挥发、根系分泌以及残茬腐解等途径向环境中释放各种化感自毒物质,从而对同种植物的生长发育产生一定的影响效应^[15]。张重义等^[16]研究发现,自毒物质作用强度首先由自毒物质的浓度决定,低浓度自毒物质对植物的生长具有促进作用,而高浓度则表现为促进作用、抑制作用或无作用等形式。本试验对综合化感效应(SE)的分析表明,50 mg/mL 的各处理土壤水浸液对百合幼苗的生长具有促进作用,而当质量浓度达到 300 mg/mL 时则表现出显著的抑制作用,具有典型的“低促高抑”现象,此结果与其他研究结论^[17-20]相一致。本研究结果还表明,同一质量浓度下,连作 4 年土壤水浸液的|SE|值最大,连作 2 年的次之,正茬的最小,表明随连作年限的增加,土壤水浸液对兰州百合幼苗的自毒作用逐渐增强。这一结果可能与不同连作年限土壤中存在的自毒物质种类及数量的差异有关。

本研究还发现,兰州百合幼苗不同生长指标对土壤水浸液的敏感程度有所不同,当水浸液质量浓度达到 300 mg/mL 时,百合幼苗根系对土壤水浸液的敏感程度高于茎叶,这一结果与黄钰芳等^[12]关于兰州百合根及鳞茎水浸液对自身幼苗自毒作用的研究结论相一致。

3.2 不同连作年限土壤中自毒成分的比较

陈君良^[21]从兰州百合根系分泌物中分别鉴定出酚、酮、醛、酯和醇类化合物,主要包括 2,4-二叔丁基苯酚、邻苯二甲酸二丁酯、抗氧化剂 2246 等成分。本试验从正茬、连作 2 年及连作 4 年兰州百合根际土壤中分别鉴定出 9,15 及 17 种化合物,主要包括 1,3-二甲苯、2,3-丁二醇、邻苯二甲酸二丁酯、抗氧化剂 2246 和对苯二甲酸二辛酯等化合物,与陈君良^[21]的结论相似。但不同的是,孙鸿强^[22]从兰州百合连作土壤中检测出香豆酸、乌头酸、苯甲酸和邻苯二甲酸等多种酚酸类成分,而本试验并未检测到酚酸类化合物的存在。造成这种差异的主要原因可能与研究者利用的供试对象、采用的研究方法以及收集供试材料的时间和地点等不同有关。

本研究显示,正茬、连作 2 年和连作 4 年兰州百合根际土壤中相对含量大于 1% 的化合物的相似系

数为 6.67%,说明随连作年限的延长,兰州百合根际土壤中存在的自毒物质种类有所增加,且差异性不断增大。不同连作年限土壤中自毒成分种类的差异可能是导致其水浸液自毒效应程度不同的内在因素,也是影响百合幼苗生理生化反应差异性的原因所在。

3.3 兰州百合自毒作用的作用机制

SOD、POD、CAT 等保护酶系统能够使植物细胞中活性氧的产生和清除保持动态平衡,防止膜脂过氧化,保护膜结构和功能的完整性^[23]。丙二醛(MDA)是细胞膜脂过氧化作用的产物,其含量的高低反映了质膜受伤害的程度^[24]。相对电导率则是衡量细胞膜透性的重要指标^[25]。本试验结果显示,随水浸液质量浓度的升高,兰州百合 CAT 和 SOD 活性持续增强,而 POD 活性先升高后降低,MDA 含量和相对电导率持续升高,引起这一系列变化的主要原因为:随水浸液质量浓度的增强,兰州百合幼苗细胞中大量活性氧的产生诱导了 CAT 和 SOD 活性的不断增强,而当水浸液质量浓度升高时,自毒物质的胁迫已超出了 POD 活性的阈值,从而导致 POD 含量降低。高浓度条件下,抗氧化酶活性的变化不足以维持活性氧的正常代谢,从而引起细胞膜脂过氧化程度的加强,MDA 含量随之升高,细胞膜遭到破坏,电解质外渗,电导率增大。

本试验结果还显示,兰州百合幼苗可溶性糖和脯氨酸含量在低质量浓度时变化不明显,而当质量浓度提高至 200 mg/mL 以上时,各处理兰州百合幼苗的可溶性糖和脯氨酸含量均显著增加($P < 0.05$)。可见,在高质量浓度水浸液作用下,为维持细胞膜的完整性,百合幼苗体内能够产生大量的渗透调节物质,以适应自毒物质的胁迫。这一结果与叶文斌等^[26]关于党参和黄芪土壤水浸液对小麦幼苗叶片渗透调节物质含量影响的研究结果相一致。

4 结 论

本试验中,正茬、连作 2 年及连作 4 年兰州百合土壤水浸液对自身幼苗的生长均存在“低促高抑”的自毒作用,且连作年限越长,自毒效应越强。正茬、连作 2 年及连作 4 年土壤中分别存在 9,15,17 种自毒成分。连作土壤中累积的多种自毒成分通过改变植株体内的抗氧化酶活性、破坏细胞膜结构和功能而抑制兰州百合植株的生长,最终导致兰州百合连作障碍的发生。

[参考文献]

[1] 周清泉. 兰州百合产业发展现状及对策 [J]. 甘肃农业科技, 2016(1): 64-66.
Zhou Q Q. Development status and countermeasures of Lanzhou lily industry [J]. Gansu Agricultural Science and Technology Journal, 2016(1): 64-66.

[2] 柴宗兵, 梁巧兰, 张 虎, 等. 连作技术对兰州百合种植的影响及控制措施 [J]. 农业科技与信息, 2015(6): 9-11.
Chai Z B, Liang Q L, Zhang H, et al. Effects of continuous cropping technique on planting of Lanzhou lily and control measures [J]. Journal of Agricultural Science and Technology and Information, 2015(6): 9-11.

[3] 梁旭东. 兰州百合产业发展存在的问题与对策 [J]. 农业科技与信息, 2011(21): 19-21.
Liang X D. Problems and countermeasures in the development of Lanzhou lily industry [J]. Journal of Agricultural Science and Technology and Information, 2011(21): 19-21.

[4] 邱立友, 戚元成, 王明道, 等. 植物次生代谢物的自毒作用及其与连作障碍的关系 [J]. 土壤, 2010, 42(1): 1-7.
Qiu L Y, Qi Y C, Wang M D, et al. Relationship between secondary metabolite autotoxic to plant and continuous cropping obstacles [J]. Soils, 2010, 42(1): 1-7.

[5] 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.
Zhang W M, Qiu H Z, Zhang C H, et al. Identification and autotoxicity of root exudates of continuous cropping potato at different growth stages [J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2015, 23(2): 215-224.

[6] 张晓玲, 潘振刚, 周晓锋, 等. 自毒作用与连作障碍 [J]. 土壤通报, 2007(4): 781-784.
Zhang X L, Pan Z G, Zhou X F, et al. Autotoxicity and continuous cropping obstacles: a review [J]. Chinese Journal of Soil Science, 2007(4): 781-784.

[7] 严逸男, 刘明月, 周相助, 等. 秋葵连作土壤浸提液对番茄生长的障碍研究 [J]. 中国生态农业学报, 2019, 27(1): 81-91.
Yan Y N, Liu M Y, Zhou X Z, et al. Tomato growth as affected by soil extract of continuously cropped okra [J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2019, 27(1): 81-91.

[8] 张亚琴, 陈 雨, 雷飞益, 等. 药用植物化感自毒作用研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49(8): 1946-1956.
Zhang Y Q, Chen Y, Lei F Y, et al. Advances in research on allelopathic autotoxicity effects of medicinal plants [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2018, 49(8): 1946-1956.

[9] 李 丽, 蒋景龙. 西洋参化感自毒作用与连作障碍研究进展 [J]. 分子植物育种, 2018, 16(13): 4436-4443.
Li L, Jiang J L. Advances in allelopathic autotoxicity and continuous cropping obstacle of American ginseng [J]. Molecular Plant Breeding, 2018, 16(13): 4436-4443.

[10] 刘 娟, 张 俊, 臧秀旺, 等. 连作障碍与根系分泌物自毒作用的研究进展 [J]. 中国农学通报, 2015, 31(30): 101-105.
Liu J, Zhang J, Zang X W, et al. Research advances in continu-

ous cropping obstacles and root exudates autotoxicity of peanut [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2015, 31(30): 101-105.

[11] 周艳丽, 程智慧. 大蒜根系分泌物化感作用及化感物质的比较 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2012, 40(2): 116-120.
Zhou Y L, Cheng Z H. Comparative analysis of allelopathy and allelochemicals of the root exudates in garlic [J]. Journal of Northwest A&F University (Nat Sci Ed), 2012, 40(2): 116-120.

[12] 黄钰芳, 张恩和, 张新慧, 等. 兰州百合根及鳞茎水浸液自毒作用的研究 [J]. 草业学报, 2017, 26(8): 93-103.
Huang Y F, Zhang E H, Zhang X H, et al. Autotoxicity of water extracts of the root and bulb of *Lilium brownii* var. *Viridulum* [J]. Acta Prataculturae Sinica, 2017, 26(8): 93-103.

[13] Williamson G B, Richardson D. Bioassays for allelopathy: measuring treatment responses with independent controls [J]. Journal of Chemical Ecology, 1988, 14: 181-187.

[14] 何开跃, 李关荣. 生物化学实验 [M]. 北京: 科学出版社, 2013: 193-198.
He K Y, Li G R. Biochemistry experiment [M]. Beijing: Science Press, 2013: 193-198.

[15] 张学文, 刘亦学, 刘万学, 等. 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, et al. Allelochemicals and its releasing modes [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2007, 23(7): 295-297.

[16] 张重义, 林文雄. 药用植物的化感自毒作用与连作障碍 [J]. 中国生态农业学报, 2009, 17(1): 189-196.
Zhang Z Y, Lin W X. Continuous cropping obstacle and allelopathic autotoxicity of medicinal plants [J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2009, 17(1): 189-196.

[17] 姚树宽, 李凤兰, 彭丽娜, 等. 假苍耳不同部位水浸提液对五种十字花科植物化感作用的研究 [J]. 草业学报, 2018, 27(9): 56-66.
Yao S K, Li F L, Peng L N, et al. A study of the allelopathic effect of extracts from different parts of *Iva xanthiifolia* on five Brassicaceae species [J]. Acta Prataculturae Sinica, 2018, 27(9): 56-66.

[18] 金彦博, 郭凤霞, 陈 垣, 等. 三种作物根际土壤水浸液对当归的化感效应 [J]. 核农学报, 2018, 32(11): 2248-2257.
Jin Y B, Guo F X, Chen Y, et al. Allelopathic effect of aqueous extracts from rhizospheric soil of three kinds of crops on *Angelica sinensis* [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2018, 32(11): 2248-2257.

[19] 王 杰, 张 超, 刘国彬, 等. 黄土丘陵区退耕还草植被恢复阶段优势种铁杆蒿的化感效应 [J]. 生态学报, 2018, 38(19): 6857-6869.
Wang J, Zhang C, Liu G B, et al. The allelopathic effect of dominant population, *Artemisia sacrorum*, during the stage of "Grain for Green" vegetation restoration in the hilly-gully region of the Loess Plateau [J]. Acta Ecologica Sinica, 2018, 38

(19):6857-6869.

[20] 张如义,胡红玲,胡庭兴,等.核桃凋落叶对萝卜种子发芽和幼苗生长的影响[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2016,44(12):163-171.

Zhang R Y,Hu H L,Hu T X,et al. Effect of water extracts and decomposed liquids of walnut leaf litter on seed germination and seedling growth of radish [J]. Journal of Northwest A&F University(Nat Sci Ed),2016,44(12):163-171.

[21] 陈君良.兰州百合根系分泌物自毒作用的研究及化感物质的GC-MS分析[D].兰州:甘肃农业大学,2016.

Chen J L. Research on autotoxicity of Lanzhou lily root exudates and GC-MS analysis of allelochemical [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University,2016.

[22] 孙鸿强.连作对兰州百合生理特性及土壤环境效应的影响[D].兰州:甘肃农业大学,2017.

Sun H Q. Continuous cropping on physiological characteristics in Lanzhou lily and soil environment effect [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University,2017.

[23] 张秋菊,张爱华,雷锋杰,等.人参皂苷粗提液对西洋参早期生长的化感效应[J].西北植物学报,2011,31(3):576-582.

Zhang Q J,Zhang A H,Lei F J,et al. Allelopathic effect of crude ginsenoside extracts on early growth of *Panax quinquefolium* L. [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin,2011,31(3):576-582.

[24] 耿广东,张素琴,程智慧.辣椒根系分泌物的化感作用及其化感物质分析[J].园艺学报,2009,36(6):873-878.

Geng G D,Zhang S Q,Cheng Z H. Allelopathy and allelochemicals of root exudates in hot pepper [J]. Acta Horti culturae Sinica,2009,36(6):873-878.

[25] 张新慧,郎多勇,张恩和.当归根际土壤水浸液的自毒作用研究及化感物质的鉴定[J].中草药,2010,41(12):2063-2066.

Zhang X H,Lang D Y,Zhang E H. Autotoxicity of water extracts from rhizosphere soil of cultivated *Angelica sinensis* and identification of their allelopathic compounds [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs,2010,41(12):2063-2066.

[26] 叶文斌,樊亮.党参和黄芪种植地土壤水浸液对小麦化感作用的研究[J].甘肃农业大学学报,2013,48(5):69-74.

Ye W B,Fan L. Allelopathy of aqueous extract from planting soil of *Codonopsis pilosula* and *A. membranaceus*. var. *mongolicus* on *Triticum aestivum* [J]. Journal of Gansu Agricultural University,2013,48(5):69-74.

(上接第 83 页)

[22] 李玉洁,王慧,赵建宁,等.耕作方式对农田土壤理化因子和生物学特性的影响[J].应用生态学报,2015,26(3):939-948.

Li Y J,Wang H,Zhao J N,et al. Effects of tillage methods on soil physicochemical properties and biological characteristics in farmland: a review [J]. Chinese Journal of Applied Ecology,2015,26(3):939-948.

[23] 陈云峰,唐政,李慧,等.基于土壤食物网的生态系统复杂性-稳定性关系研究进展[J].生态学报,2014,34(9):2173-2186.

Chen Y F,Tang Z,Li H,et al. Research progress on ecosystem complexity-stability relationships based on soil food web [J]. Acta Ecologica Sinica,2014,34(9):2173-2186.

[24] 蒋杰贤,万年峰,季香云,等.桃园生草对桃树节肢动物群落多样性与稳定性的影响[J].应用生态学报,2011,22(9):2303-2308.

Jiang J X,Wan N F, Ji X Y,et al. Diversity and stability of arthropod community in peach orchard under effects of ground-cover vegetation [J]. Chinese Journal of Applied Ecology,2011,22(9):2303-2308.

[25] 刘继亮,曹靖,李世杰,等.秦岭西部山地次生林和人工林大型土壤动物群落结构特征[J].应用生态学报,2012,23(9):2459-2466.

Liu J L,Cao J,Li S J,et al. Characteristics of soil macrofaunal community structure in secondary forest and forest plantations in western Qinling Mountains of Northwest China [J]. Chinese Journal of Applied Ecology,2012,23(9):2459-2466.

[26] 王玲,赵广亮,杨雨果,等.北京八达岭地区油松人工林土壤动物群落特征研究[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2018,46(9):41-50.

Wang L,Zhao G L,Yang Y G,et al. Community features of soil fauna in *Pinus tabulaeformis* plantation in Badaling, Beijing [J]. Journal of Northwest A&F University(Natural Science Edition),2018,46(9):41-50.

[27] 刘蝴蝶,郝淑英,曹琴,等.生草覆盖对果园土壤养分、果实产量及品质的影响[J].土壤通报,2003,34(3):184-186.

Liu H D,Hao S Y,Cao Q,et al. Effect of grass cover on soil nutrient and yield and quality of apple [J]. Chinese Journal of Soil Science,2003,34(3):184-186.