

文章编号:1000-8551(2019)12-2499-10

# 毛红椿凋落叶水浸液自毒作用研究

郭晓燕<sup>1</sup> 陶国峰<sup>2</sup> 张露<sup>1,\*</sup> 易敏<sup>1</sup> 程子珊<sup>1</sup> 黄若<sup>1</sup><sup>1</sup>江西农业大学生物科学与工程学院/江西特色林木资源培育与利用 2011 协同创新中心,江西 南昌 330045;<sup>2</sup>缙云县括苍山林场,浙江 丽水 321404)

**摘要:**为探究毛红椿凋落叶水浸液的自毒作用,采用生物测试法研究毛红椿凋落叶水浸液对自身种子发芽和幼苗生长的影响,并结合气相色谱质谱联用(GC-MS)技术分析凋落叶水浸液石油醚、乙醚、氯仿、甲醇 4 种不同极性萃取组分中存在的自毒物质。结果表明,凋落叶水浸液对毛红椿种子发芽及幼苗生长、存活率等均有抑制作用,浓度越高抑制作用越强,中浓度溶液(100 g·L<sup>-1</sup>)对种子发芽和茎长达到显著抑制水平,对种子发芽率、发芽势、发芽指数、茎长的抑制率分别为 18%、31%、31%和 17%;低浓度溶液(10 g·L<sup>-1</sup>)对根长的抑制达到显著水平,抑制率为 25%。毛红椿凋落叶水浸液 4 种不同极性萃取组分中共鉴定到 22 种化合物,总体含酰胺类、长链脂肪酸、酚类、苯甲酸衍生物、烷烃类、腈类、二甲苯、松油烯及谷甾醇等物质,其中酰胺类、长链脂肪酸、酚类、苯甲酸衍生物成分可能为毛红椿自毒物质。本研究结果为探索毛红椿的濒危机制,促进毛红椿的实生更新提供了理论依据。

**关键词:**水浸液;自毒作用;凋落叶;毛红椿

DOI:10.11869/j.issn.100-8551.2019.12.2499

毛红椿(*Toona ciliata* var. *pubescens*)为楝科(Meliaceae)香椿属(*Toona*)高大落叶乔木,是国家二级保护濒危物种,结实量丰富,但结实母树周围鲜见其实生幼苗<sup>[1]</sup>,有性繁殖更新能力极低<sup>[2]</sup>。

自毒作用是植物通过释放次生代谢物对自身或种内其他个体产生危害的一种现象<sup>[3-4]</sup>,会导致作物连作障碍<sup>[5]</sup>或限制植物的更新<sup>[6]</sup>。毒性物质几乎可以由植物的任何组织或器官合成,通过残体腐解、根系分泌、雨雾淋溶和自然挥发等方式进入环境,影响周围植物的生长发育<sup>[7-8]</sup>。通常天然林内具有较厚实的枯枝落叶,且这些凋落物是自毒物质的重要来源,对森林更新的影响较大<sup>[9-10]</sup>。林下凋落物自毒作用的研究多集中在地中海松(*Pinus halepensis*)<sup>[11]</sup>、青海云杉(*Picea crassifolia*)<sup>[12]</sup>等针叶树种。近年来越来越多阔叶树种如云南蓝果树(*Nyssa yunnanensis* W.C. Yin)<sup>[13]</sup>、大树杜鹃[*Rhododendron protistum* var. *giganteum* (Forrest) D.F. Chamberlain]<sup>[14]</sup>等的凋落物被证实对自身种子

萌发和幼苗生长有自毒作用,冠层下累积凋落物的自毒作用是导致冠层下同种幼苗难以存活的主要原因<sup>[6,15]</sup>。

毛红椿天然林内通常有 2~4 cm 厚的枯枝落叶凋落物,林内鲜见其实生幼苗,林下凋落物的自毒作用是否会导致毛红椿自然再生失败尚不明确。前期研究发现毛红椿落叶腐解物浸提液会影响自身种子发芽和幼苗生长<sup>[16]</sup>,而作为自毒物质重要来源的毛红椿枯枝落叶凋落物,是否会通过淋溶、挥发途径对其种子萌发和幼苗生长产生自毒影响尚不清晰。为此,本研究模拟凋落物在自然生境中淋溶过程,设置不同浓度毛红椿凋落叶水浸液处理毛红椿种子,观察种子萌发和幼苗生长状况,采用气相色谱质谱(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)联用技术分析凋落物水浸液中的化学成分,明确其自毒物质类型,旨在为探明毛红椿凋落物对其天然更新影响的化学机制提供依据。

收稿日期:2019-02-19 接受日期:2019-06-09

基金项目:国家自然科学基金项目(31860202,31360171),江西省自然科学基金项目(20171BAB204006),江西省教育厅科学研究项目(GJJ150434)

作者简介:郭晓燕,女,讲师,主要从事森林培育和微生物学研究。E-mail:guoxiaoyan1970@126.com

\* 通讯作者:张露,女,教授,主要从事珍贵阔叶树繁育理论与技术研究。E-mail:zhlu856@163.com

# 1 材料与方 法

## 1.1 试验材料

在毛红椿林内收集其凋落叶,晒干备用。试验用种采自江西官山国家级自然保护区毛红椿天然林,种子千粒重 11.907 g。

## 1.2 试验设计与测定方法

1.2.1 毛红椿凋落叶水浸液制备 称取 100 g 毛红椿凋落叶于烧杯中,加入 500 mL 蒸馏水,室温(25℃)下浸提 48 h(每隔 15 h 摇动 10 min),过滤后 5 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,取上清液,得到 200 g·L<sup>-1</sup>毛红椿凋落叶水浸液母液。将母液用蒸馏水稀释配制成 3 种浓度(10、100、200 g·L<sup>-1</sup>)待用,以蒸馏水为对照(control, CK)。

1.2.2 毛红椿凋落叶水浸液自毒作用的生物检测 利用 3 种浓度(10、100、200 g·L<sup>-1</sup>)水浸液和蒸馏水,分别浸泡毛红椿种子 24 h;将 3 种浓度水浸液和蒸馏水分别加入铺有 2 cm 厚棉花和 1 层滤纸的发芽盒内,每个发芽盒内置放 100 粒种子;采用随机区组设计,4 种处理,各 3 次重复。

将发芽盒放入 25℃ 光照培养箱进行发芽试验,每隔 2 d 添加 1 次相应浓度的水浸液或蒸馏水。每天观察种子发芽及幼苗生长情况,当胚根突破种皮 1~2 mm 时计为发芽,统计发芽粒数,记录存活幼苗数,待幼苗开始出现大量死亡时结束试验。20 d 后测量幼苗根长、茎长和干重,计算种子发芽率、发芽势、发芽指数(germination index, GI)、幼苗存活率及化感效应指数(response index, RI)<sup>[16]</sup>:

$$\text{发芽率} = (\text{种子发芽数} / \text{种子数}) \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{发芽势} = \text{日最高发芽种子数} / \text{种子数} \times 100\% \quad (2)$$

$$GI = \sum (Gt / Dt) \quad (3)$$

式中, Dt 为发芽日数, Gt 为与 Dt 相对应的每天发芽种子数。

$$\text{幼苗存活率} = (\text{试验结束时存活幼苗数} / \text{种子发芽数}) \times 100\% \quad (4)$$

$$RI = 1 - C / T (T \geq C) \text{ 或 } RI = T / C - 1 (T < C) \quad (5)$$

式中, T 为处理值, C 为对照值, 分别代表处理组和对照组种子的发芽率、发芽势和发芽指数; RI > 0 表示促进作用, RI < 0 表示抑制作用, RI 的绝对值代表化感作用的强度。

1.2.3 毛红椿凋落叶水浸液成分分析 在 4 支试管中分别加入毛红椿凋落叶水浸液母液 10 mL, 滤纸封口, 置于 -80℃ 冰箱冷冻至固态, 取出置于冷冻干燥机

内去除水分, 再向 4 支试管内分别加入 5 mL 色谱纯石油醚、乙醚、氯仿、甲醇 4 种极性由低到高的有机溶剂进行萃取, 萃取液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后用于 GC-MS(美国安捷伦科技有限公司)分析<sup>[17]</sup>。GC-MS 系统配自动进样器, 氦(纯度 99.999%)用作载气, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 进样 1 μL, 分流比 20:1, 进样口温度 250℃, 色谱柱为 Agilent 123-1334 DB-624 毛细管柱(30 m×0.32 mm×1.8 μm), 柱温箱初始温度为 70℃, 保持 3 min, 然后以 15℃·min<sup>-1</sup>升至 200℃, 保持 3 min, 再以 5℃·min<sup>-1</sup>升至 300℃, 保持 5 min; 质谱条件为全扫模式, 离子源为 EI 源, 离子源温度 230℃, 四级杆温度 150℃, 离子化能量 70 eV, 扫描范围为 29~650 amu, 扫描频率 2 次·s<sup>-1</sup>; 用 Agilent MSD 化学工作站(G1701EA, Agilent Technologies America)进行数据处理, 应用质谱数据库 NIST11.L, 通过计算机检索系统进行物质的鉴定, 采用峰面积归一法进行相对含量的测定。

## 1.3 数据处理与分析

采用 SPSS 17.0 统计分析软件进行单因素方差分析, 并用 Student-Newman-Keuls 法进行多重比较。

# 2 结果与分析

## 2.1 毛红椿凋落叶水浸液对毛红椿种子萌发的影响

由表 1 可知, 随着水浸液浓度的升高, 毛红椿种子萌动时间逐渐推迟, 种子发芽率、发芽势、发芽指数均逐渐降低, 其中 100 和 200 g·L<sup>-1</sup>水浸液处理与 CK 间差异显著。化感指数均为负值, 表现为抑制作用, 抑制强度随着水浸液浓度升高而增大。100 g·L<sup>-1</sup>水浸液对种子发芽率、发芽势、发芽指数的抑制率分别为 18%、31% 和 31%; 200 g·L<sup>-1</sup>水浸液对种子发芽率、发芽势、发芽指数的抑制率分别达到 33%、55% 和 44%。表明毛红椿凋落叶水浸液能够抑制毛红椿种子发芽, 且水浸液浓度越高其抑制作用越强。

## 2.2 毛红椿凋落叶水浸液对毛红椿幼苗生长的影响

由表 2 可知, 不同浓度毛红椿凋落叶水浸液对毛红椿幼苗的根长、茎长、干重的影响存在差异。毛红椿幼苗茎长、根长、干重均随着水浸液浓度的升高而逐渐减小; 化感指数均为负值, 表现为抑制作用, 且抑制强度随着水浸液浓度的升高而增大。其中, 10 g·L<sup>-1</sup>水浸液处理的毛红椿幼苗根长显著低于 CK, 对幼苗根长的抑制率为 25%, 幼苗茎长、干重与 CK 无显著性差异; 100 g·L<sup>-1</sup>水浸液处理下, 毛红椿幼苗茎长、根长、干重均显著低于 CK, 对幼苗茎长、根长的抑制率分别

表 1 毛红椿凋落叶水浸液处理下种子发芽情况

Table 1 Seed germination of *T. ciliata* var. *pubescens* treated with aqueous extracts from leaf litter

水浸液浓度 Concentration of extracts (g·L <sup>-1</sup> )	萌动时间 Germinating time	发芽率 Seedling rate		发芽势 Germination potential		发芽指数 Germination index	
		测定值 Obsersion/%	化感指数 RI	测定值 Obsersion/%	化感指数 RI	测定值 Obsersion/%	化感指数 RI
		0(CK)	第 3 天	97.67±1.53a	/	77.00±14.53a	/
10	第 3 天	96.67±4.94a	-0.01	75.00±8.89a	-0.03	65.34±7.58a	-0.002
100	第 4 天	80.33±3.51b	-0.18	53.33±7.37b	-0.31	45.37±2.39b	-0.31
200	第 5 天	65.67±9.81c	-0.33	35.00±4.58c	-0.55	36.64±2.04b	-0.44

注：“/”表示数据不存在。同列不同小写字母表示处理间差异显著( $P<0.05$ )。下同。

Note: "/" indicates no date. Different lowercase letters in the same column indicate significant difference at 0.05 level among treatments. The same as following.

为 17% 和 46%; 200 g·L<sup>-1</sup> 水浸液处理的幼苗茎长显著低于 CK 和 100 g·L<sup>-1</sup> 水浸液处理, 对幼苗茎长、根长的抑制率分别为 23% 和 53%。结果表明, 毛红椿凋落叶

水浸液能够抑制幼苗芽长、根长和干重的增加, 且水浸液浓度越高其抑制作用越强。

表 2 毛红椿凋落叶水浸液处理下幼苗茎长、根长、干重

Table 2 Root length, shoot length, dry weight of seedling of *T. ciliata* var. *pubescens* treated with aqueous extracts from leaf litter

水浸液浓度 Concentration of aqueous extracts (g·L <sup>-1</sup> )	茎长 Shoot length		根长 Root length		干重 Dry weight	
	测定值 Obsersion/mm	化感指数 RI	测定值 Obsersion/mm	化感指数 RI	测定值 Obsersion/mg	化感指数 RI
	0(CK)	30.07±3.45a	/	47.93±6.30a	/	4.84±0.04a
10	29.49±3.61a	-0.02	36.08±8.92b	-0.25	4.83±0.03a	-0.002
100	25.08±4.44b	-0.17	25.90±7.58c	-0.46	4.73±0.04b	-0.020
200	23.09±4.18c	-0.23	22.74±4.57c	-0.53	4.72±0.05b	-0.030

### 2.3 毛红椿凋落叶水浸液对毛红椿幼苗存活的影响

由表 3 可知, 不同浓度水浸液处理的毛红椿幼苗发生数、存活数及存活率均随着水浸液浓度的升高而降低, 10 g·L<sup>-1</sup> 水浸液处理下毛红椿幼苗发生数、存活

数及存活率与 CK 无显著性差异, 而 100 和 200 g·L<sup>-1</sup> 水浸液处理下毛红椿幼苗发生数、存活数及存活率均显著低于 CK, 幼苗存活率分别降低 10.5% 和 23.5%。结果表明, 毛红椿凋落叶水浸液能够降低幼苗存活率。

表 3 毛红椿凋落叶水浸液处理下幼苗发生数、存活数及存活率

Table 3 Total seedling emergence, final seedling survive number and seedling survive rate of *T. ciliata* var. *pubescens* treated with aqueous extracts from leaf litter

水浸液浓度 Concentration of aqueous extracts/(g·L <sup>-1</sup> )	幼苗发生数 Total seedling emergence	幼苗存活数 Seedling survive number	幼苗存活率 Seedling survive rate/%
0(CK)	97.67±1.53a	97.00±1.73a	99.32±0.59a
10	96.67±4.94a	95.33±4.73a	98.62±5.74a
100	80.33±3.51b	71.33±6.43b	88.86±8.17b
200	65.67±9.81c	50.00±8.67c	75.97±1.69c

### 2.4 毛红椿凋落叶水浸液化学成分分析结果

毛红椿凋落叶水浸液石油醚萃取相 GC-MS 分

析图谱如图 1 所示。由表 4 可知, 经谱库分析, 水浸液石油醚萃取相中匹配度大于 90% 的主要成分

为顺-9-十八烯酸酰胺(72.88%)、反式-9-十八碳烯酸(15.60%)、十八碳烷酸(4.22%)、齐墩果

甾(4.31%)、水杨酸甲酯(1.24%)和细辛醚(1.01%)。

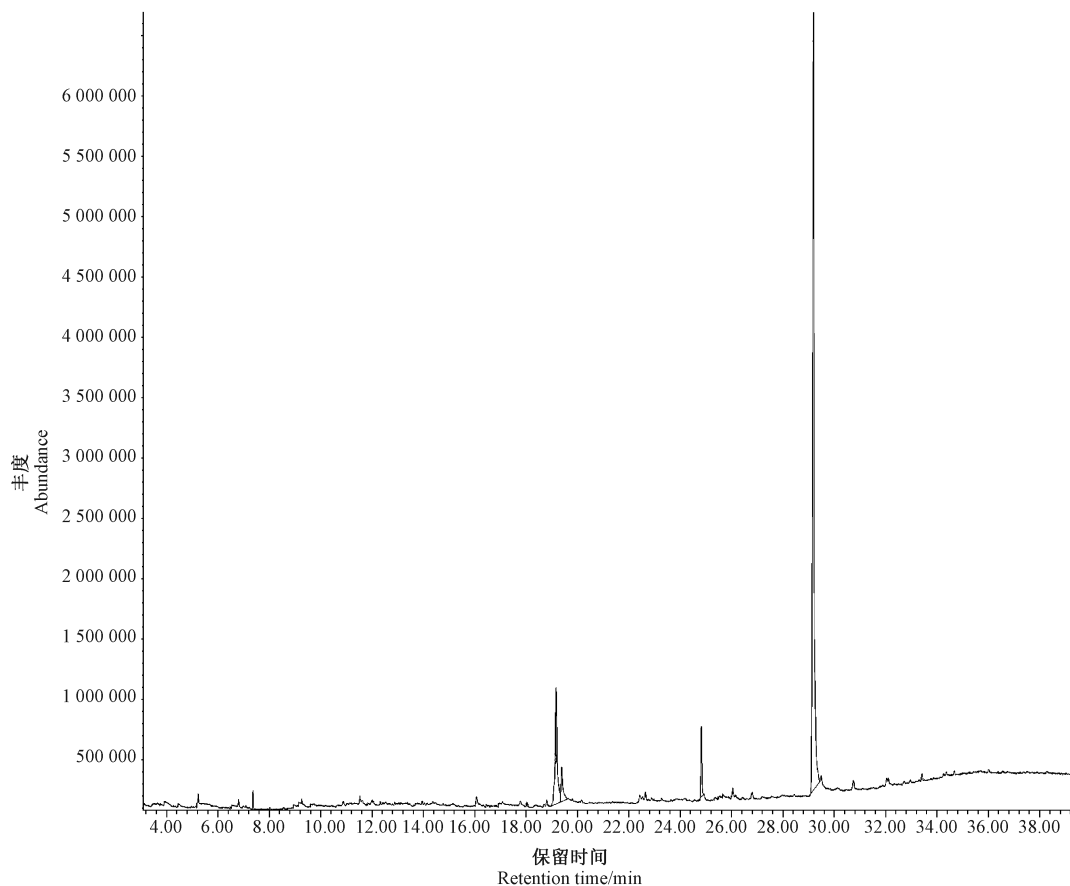


图1 毛红椿凋落叶水浸液石油醚萃取相 GC-MS 总离子流图

Fig.1 GC-MS total ion flow diagram of the petroleum ether extraction phase of aqueous extracts from leaf litter of *T. ciliata* var. *pubescens*

表4 毛红椿凋落叶水浸液石油醚萃取相的主要化学成分

Table 4 Major chemical constituents in the petroleum ether fraction of aqueous extracts from leaf litter of *T. ciliata* var. *pubescens*

保留时间 Retention time/min	化学名 Chemical name	相对含量 Relative content/%	匹配度 Matching degree/%
7.240	水杨酸甲酯(冬绿油) Methyl salicylate	1.24	97
11.592	细辛醚(细辛脑) Asarone	1.01	98
16.085	十六烷酸(棕榈酸) n-Hexadecanoic acid	0.70	99
19.170	反式-9-十八碳烯酸(反油酸) (E)-9-Octadecenoic acid	15.60	99
19.389	十八碳烷酸(硬脂酸) Octadecanoic acid	4.22	99
24.826	齐墩果甾 Oleanitrile	4.31	91
29.194	顺-9-十八烯酸酰胺(油酸酰胺) (Z)-9-Octadecenamide	72.88	98

毛红椿凋落叶水浸液乙醚萃取相 GC-MS 分析图谱如图2所示。由表5可知,经谱库分析,水浸液乙醚萃取相中匹配度大于90%的主要成分为顺-9-十八烯

酸酰胺(67.09%)、顺式-十八碳烯酸(16.75%)、邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯(6.38%)、2,4-二叔丁基苯酚(5.43%)、十八碳烷酸(3.17%)、 $\gamma$ -松油烯(1.28%)。

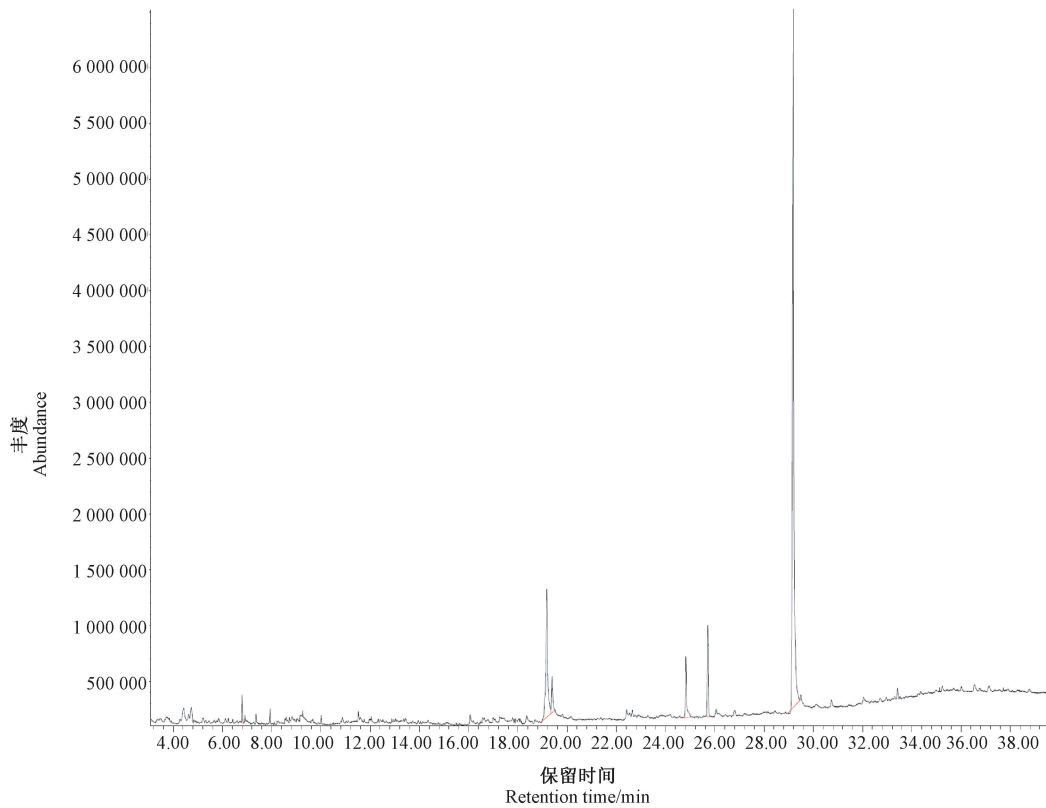


图 2 毛红椿凋落叶水浸液乙醚萃取相 GC-MS 总离子流图

Fig.2 GC-MS total ion flow diagram of the diethyl ether extraction phase of aqueous extracts from leaf litter of *T. ciliata* var. *pubescens*

表 5 毛红椿凋落叶水浸提液乙醚萃取相的主要化学成分

Table 5 Major chemical constituents in the diethyl ether fraction of aqueous extracts from leaf litter of *T. ciliata* var. *pubescens*

保留时间 Retention time/min	化学名 Chemical name	相对含量 Relative content/%	匹配度 Matching degree/%
6.800	$\gamma$ -松油烯 $\gamma$ -Terpinene	1.28	95
19.178	顺式-十八碳烯酸(油酸) cis-Vaccenic acid	16.75	99
19.390	十八碳烷酸 Octadecanoic acid	3.17	99
24.827	2,4-二叔丁基苯酚 2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)-phenol	5.43	96
25.719	邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯 Bis(2-ethylhexyl) phthalate	6.38	99
29.189	顺-9-十八烯酸酰胺(Z)-9-Octadecenamide	67.09	98

毛红椿凋落叶水浸液氯仿萃取相 GC-MS 分析图谱如图 3 所示。由表 6 可知,经谱库分析,水浸液氯仿萃取相中匹配度大于 90% 的主要成分为顺-9-十八烯酸酰胺(54.23%)、十八碳烯酸(19.65%)、十八碳烷酸(5.30%)、二甲苯(8.20%)、烷烃(1.64%)、芥酸酰胺(1.46%)。

毛红椿凋落叶水浸液甲醇萃取相 GC-MS 分析图谱如图 4 所示。由表 7 可知,经谱库分析,水浸液甲醇萃取相中匹配度大于 90% 的主要成分为顺式-9-十八烯酸酰胺(18.27%)、顺式-13-十八碳烯酸(15.18%)、4-乙基-2-甲氧基苯酚(6.60%)、十八碳烷酸(3.43%)、十六烷酸(2.89%)等。



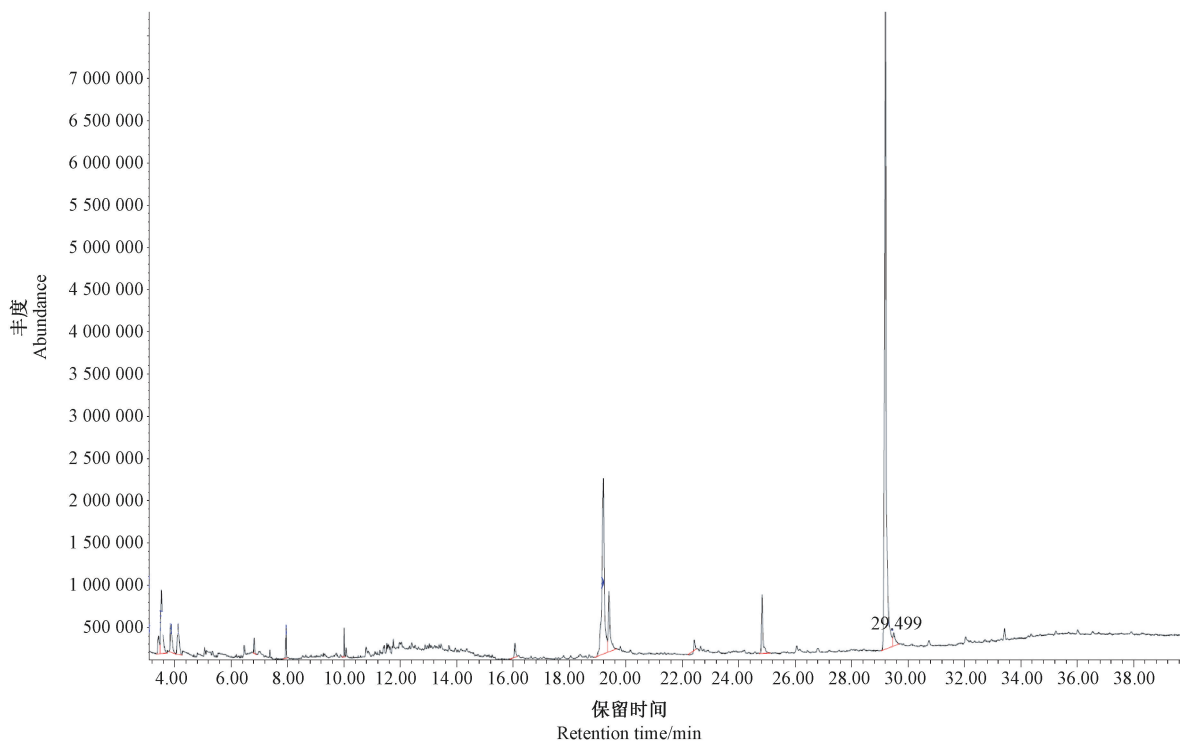


图3 毛红椿凋落叶水浸液氯仿萃取相 GC-MS 总离子流图

Fig.3 GC-MS total ion flow diagram of the chloroform extraction phase of aqueous extracts from leaf litter of *T. ciliata* var. *pubescens*

表6 毛红椿凋落叶水浸液氯仿萃取相的主要化学成分

Table 6 Major chemical constituents in the chloroform fraction of aqueous extracts from leaf litter of *T. ciliata* var. *pubescens*

保留时间 Retention time/min	化学名 Chemical name	相对含量 Relative content/%	匹配度 Matching degree/%
3.534	对二甲苯 p-Xylene	5.72	95
3.865	间二甲苯 1,3-Xylene	2.48	92
7.949	十二碳烷 Dodecane	0.95	96
10.011	十四碳烷 Tetradecane	0.69	98
16.063	十六酸 n-Hexadecanoic acid	0.81	99
19.200	反式-9-十八碳烯酸 (E)-9-Octadecenoic acid	19.65	99
	顺式十八碳-9-烯酸 Oleic acid		
	顺-6-十八碳烯酸(岩芹酸) (Z)-6-Octadecenoic acid		
19.399	十八碳烷酸 Octadecanoic acid	5.30	99
29.201	顺-9-十八烯酸酰胺(Z)-9-Octadecenamide	54.23	98
29.499	芥酸酰胺 Erucylamide	1.46	95

### 3 讨论

许多学者发现森林凋落物数量通常与天然更新幼苗数量呈负相关关系<sup>[15,17]</sup>。凋落物对种子萌发和幼苗生长的影响是一个物理、化学共同作用的过程。物

理原因是过厚的凋落物层或因减少种子萌发所需的光照从而影响种子萌发,或因机械障碍作用阻断种子与土壤的接触,导致萌发幼苗难于扎根或生长;化学原因是凋落物中存在的丰富的化感物质抑制了种子萌发和成苗<sup>[13,18]</sup>。枯落物厚度和种子位置会显著影响毛红椿种子萌发和幼苗生长,证明了毛红椿凋落物对其天

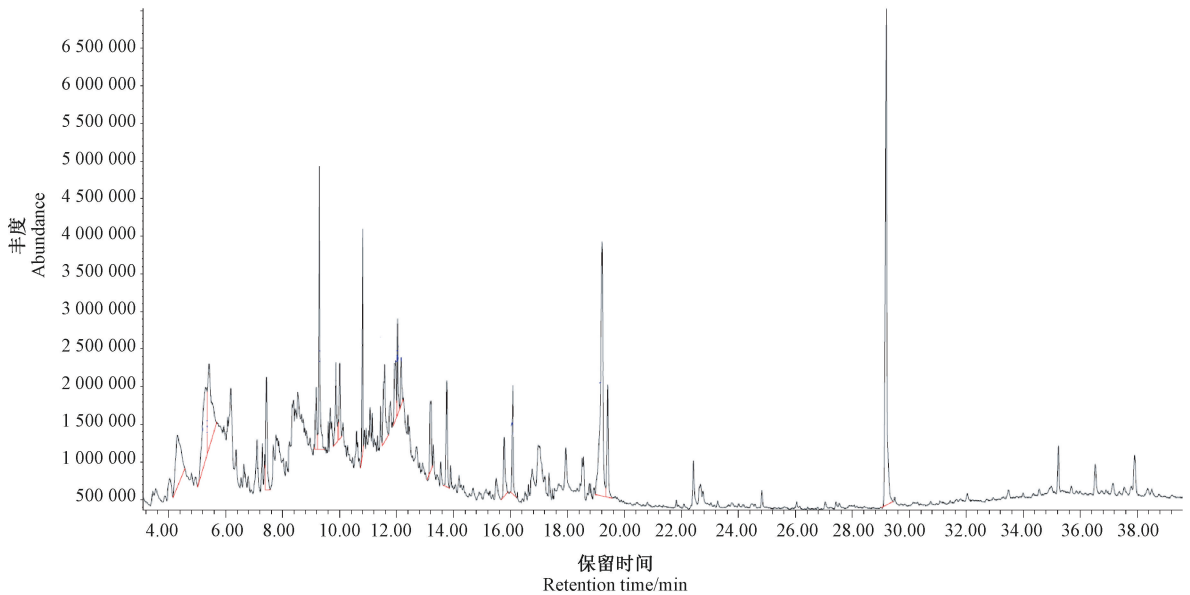


图 4 毛红椿凋落叶水浸液甲醇萃取相 GC-MS 总离子流图

Fig.4 GC-MS total ion flow diagram of the methanol extraction phase of aqueous extracts from leaf litter of *T. ciliata* var. *pubescens*

表 7 毛红椿凋落叶水浸液甲醇萃取相的主要化学成分

Table 7 Major chemical constituents in the methanol fraction of aqueous extracts from leaf litter of *T. ciliata* var. *pubescens*

保留时间 Retention time/min	化学名 Chemical name	相对含量 Relative content/%	匹配度 Matching degree/%
9.289	4-乙烯基-2-甲氧基苯酚(对乙烯基愈疮木酚) 4-Hydroxy-3-methoxystyrene	6.60	90
10.598	4-丙烯基-2-甲氧基苯酚(异丁香酚) Phenol,2-methoxy-4-(1-propen-1-yl)	0.51	96
13.288	4-((1E)-3-羟基-1-丙烯基)-2-甲氧基苯酚 4-((1E)-3-Hydroxy-1-propenyl)-2-methoxyphenol	0.59	97
16.084	十六烷酸 n-Hexadecanoic acid	2.89	99
18.517	顺式-9-十八碳烯酸甲酯(Z)-9-Octadecenoic acid methyl este	0.48	95
19.219	顺式-13-十八碳烯酸(Z)-13-Octadecenoic acid	15.18	99
19.417	十八碳烷酸 Octadecanoic acid	3.43	99
29.193	顺式-9-十八碳烯酸酰胺(Z)-9-Octadecenamide	18.27	98
36.527	$\gamma$ -谷甾醇 $\gamma$ -Sitosterol	0.56	93

然更新的物理影响<sup>[19]</sup>;本研究发现毛红椿凋落叶水浸液对种子发芽和幼苗的生长表现为抑制作用,水浸液浓度越高抑制作用越强,幼苗的存活率越低,表明毛红椿凋落叶中含有水溶性自毒物质,且自毒作用具有一定的浓度依赖性。加上前期研究证实腐解3个月后的毛红椿凋落叶腐解物浸提液(采用无水乙醇:丙酮:水=2:2:1混合液提取)对毛红椿种子发芽具有抑制作用<sup>[16]</sup>,在一定程度上揭示了毛红椿凋落物对其天然更新影响的化学机制。前人研究表明,自毒效应与凋落物质量分数有关,一般表现为凋落物质量分数越高自

毒作用越强。如 Warrag<sup>[20]</sup>研究牧豆树(*Prosopis juliflora*)自毒作用发现,牧豆树干叶水提取液极大降低了牧豆树种子发芽率、胚根和下胚轴长度,且随着提取液浓度的增加,下降趋势逐渐增强。这与本研究结果相同。

化感物质主要是在植物体内通过生物途径合成的次生代谢物质,贮存于植物体内、周围根际土壤及其凋落物中,能促进或抑制自身或周围其他生物的生存及生长发育,具有种内抑制作用<sup>[7]</sup>。研究表明,植物的不同组织器官对化感物质的敏感度存在差异<sup>[21-22]</sup>。

本研究中,毛红椿落叶水浸液对幼苗根长的影响强于对幼苗茎长和种子芽率的影响。前期研究表明毛红椿腐叶及腐叶土浸提液对根生长的化感指数高于对茎生长的化感指数<sup>[16]</sup>,这与本研究结果一致,说明根的生长对化感物质更敏感。王丽红等<sup>[12]</sup>研究表明,青海云杉凋落叶水提物显著抑制了青海云杉幼苗胚根和胚轴的生长,4.00 g·L<sup>-1</sup>针叶水提物处理组的发芽率较对照降低 48.1%,而幼苗胚根和胚轴分别较对照降低 57.5%和 73.5%;Chon 等<sup>[23]</sup>对苜蓿自毒生物测定灵敏度的研究发现,苜蓿幼苗根长较种子萌发或子叶下轴长度对自身毒素更敏感,且年长幼苗的根因有更多的分枝可逃避自身毒素,较种子或年轻幼苗的根更能耐受苜蓿叶提取物,因此利用对自身毒素更敏感的吸胀种子萌发的幼根进行自毒作用的生物测定效果更明显。研究表明,植物器官释放的自毒物质能够抑制根毛的形成、破坏根皮和内根组织,从而使根丧失功能,严重的自毒效应导致幼苗存活率降低<sup>[6,24]</sup>。本研究中,毛红椿凋落叶水浸液处理下的幼苗存活率降低也证明自毒物质对胚根的毒害作用导致幼苗存活率降低。有研究者认为,成年大树附近实生幼苗难以存活,也与林内低光照有关<sup>[25-26]</sup>,而 Fernandez 等<sup>[11]</sup>研究发现光照不会影响地中海松种子的萌发和幼苗的早期生长速率,但在幼树阶段起着重要作用;Devaney 等<sup>[15]</sup>在红豆杉(*Taxus baccata* L.)冠层下的盆栽试验表明,低光照下红豆杉幼苗的存活率最高,而冠层下幼苗难以存活主要与针叶通过淋溶或腐解释放的自毒物质有关。

迄今为止,已知植物释放的化感物质大概分为 14 类,包括简单不饱和内酯、萜醌、蒽醌和复合醌,长链脂肪酸和多炔,水溶性有机酸、直链醇、脂肪族醛和酮,简单酚、苯甲酸及其衍生物等<sup>[27]</sup>。本研究从毛红椿凋落叶水浸液中鉴定出酰胺类、长链脂肪酸及其酯类、酚类、苯甲酸衍生物、烷烃类、腈类、二甲苯、松油烯及谷甾醇共 9 类化合物,其中酰胺类和长链脂肪酸在各萃取相中均有检出,且含量分列第一和第二。毛红椿凋落叶水浸液氯仿萃取相中含有 2 种酰胺类物质:顺式-9-十八烯酸酰胺和芥酸酰胺。也有其他研究者在植物叶片、果实和土壤有机质中检测到高含量的十八烯酸酰胺(油酸酰胺)和芥酸酰胺<sup>[28-31]</sup>,韦玮<sup>[30]</sup>研究表明不同浓度的顺式-9-十八烯酸酰胺对马尾松种子的活力指数、发芽指数以及胚根长均具有抑制作用。毛红椿凋落叶水浸液中检测出十八碳烯酸、十八碳烷酸、十六烷酸属长链脂肪酸,是已报道的化感物质<sup>[27]</sup>。酚类物质是重要的植物次生代谢物质之一,对植物生长

发育有一定的调节作用,其中一元酚会抑制植物的生长,而二元酚或多元酚对植物生长有促进作用<sup>[32]</sup>。毛红椿凋落叶水浸液乙醚萃取相中检测到 2,4-二叔丁基苯酚,甲醇萃取相中检测到 4-乙炔基-2-甲氧基苯酚(对乙炔基愈疮木酚)等酚类物质。2,4-二叔丁基苯酚存在于某些植物叶片及根系分泌物中<sup>[33-34]</sup>。周宝利等<sup>[34-35]</sup>研究发现 2,4-二叔丁基苯酚是茄子根系分泌物中特征性化合物,对番茄种子的萌发、幼苗的株高、茎粗、地上和地下部鲜重、叶绿素含量、根系活力和幼苗体内保护酶活性表现为低浓度(0.01~0.1 mmol·L<sup>-1</sup>)促进高浓度(0.5 mmol·L<sup>-1</sup>)抑制。对乙炔基愈疮木酚为植物的挥发性成分<sup>[36]</sup>,是 GB 2760-2014<sup>[37]</sup>规定允许使用的食品用香料。毛红椿凋落叶水浸液乙醚萃取相中含有邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯,据报道邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯普遍存在于环境及动植物体内,是具有全球性的环境有机污染物,但对植物产生危害的可能性较低<sup>[38-39]</sup>。凋落叶水浸液氯仿萃取相检测出十二碳烷和十四碳烷 2 种烷烃类物质,研究发现烷烃类物质多为结构复杂的化合物在质谱仪中断裂生成,而不完全归属于化感自毒成分<sup>[40]</sup>。毛红椿凋落叶水浸液中还含有齐墩果萜、水杨酸甲酯、细辛醚和  $\gamma$ -松油烯。齐墩果萜<sup>[41]</sup>和水杨酸甲酯<sup>[42]</sup>是某些植物的香气组分;水杨酸甲酯属苯甲酸衍生物,是已报道的化感物质;细辛醚( $\alpha$ -细辛脑)是中药石菖蒲的主要有效成分,具有多种生物活性<sup>[43]</sup>;  $\gamma$ -松油烯为植物精油成分<sup>[44]</sup>,其生理活性尚不明确。毛红椿树叶具有芳香气味与其所含有的挥发油成分有关,其生理活性有待进一步研究。前期研究在毛红椿腐叶浸提液中鉴定出 36 种物质,其主要成分为谷甾醇、豆甾-4-烯-3-酮、棕榈酸等脂肪酸及其酯类<sup>[16]</sup>,种类多于毛红椿凋落叶水浸液,除十八碳烯酸、十六烷酸、邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯及  $\gamma$ -谷甾醇外大多数为新检测出的物质,说明凋落叶通过淋溶方式释放的化感物质与分解释放的化感物质有所不同。

## 4 结论

毛红椿凋落叶水浸液能够降低毛红椿种子的发芽率、发芽势、发芽指数,抑制幼苗的茎长、根长和干重的增加,降低幼苗的存活率,水浸液浓度越高其对毛红椿种子发芽率、幼苗生长和存活的负作用越强;毛红椿凋落叶水浸液中含有的酰胺类、长链脂肪酸、酚类、苯甲酸衍生物等可能为自毒物质。以往毛红椿成熟冠层下实生幼苗缺乏,通常归因于林内环境荫蔽与林地枯枝



落叶层的机械阻隔,使毛红椿失去了对瞬时土壤种子库保存与种子萌发的有利环境。本研究结果表明,毛红椿幼苗更新失败还与凋落叶浸出液中的植物毒性物质有关。今后还需要对毛红椿植株中存在的其他化感物质及释放到环境后的转变过程进行深入研究,以便更好地从化学生态学角度阐述植物-土壤-植物之间的复杂关系。

## 参考文献:

- [1] 黄红兰, 张露, 郭晓燕, 梁跃龙, 刘足根. 九连山毛红椿种群的结实特性及其生殖力[J]. 林业科学, 2013, 49(7): 170-174
- [2] 黄红兰, 张露, 贾黎明, 梁跃龙, 蔡军火. 毛红椿天然种群有性繁殖适合度及其繁殖更新[J]. 应用生态学报, 2018, 29(4): 1098-1106
- [3] Singh H P, Batish D R, Kohli R K. Autotoxicity: Concept, organisms, and ecological significance[J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 1999, 18(6): 757-772
- [4] Xu Y, Wu Y G, Chen Y, Zhang J F, Song X Q, Zhu G P, Hu X W. Autotoxicity in *Pogostemon cablin*, and their allelochemicals[J]. Revista Brasileira De Farmacognosia, 2015, 25(2): 117-123
- [5] 唐成林, 罗夫来, 赵致, 杭焯, 王华磊, 陈松树, 刘红昌. 半夏植株腐解液对 8 种作物的化感作用及化感物质成分分析[J]. 核农学报, 2018, 32(8): 1639-1648
- [6] Aguilera N, Guedes L M, Becerra J, González L. Is autotoxicity responsible for inhibition growth of new conspecific seedlings under the canopy of the invasive *Acacia dealbata* Link? [J]. Gayana Botánica, 2017, 74(1): 1-14
- [7] Kimura F, Sato M, Kato-Noguchi H. Allelopathy of pine litter: Delivery of allelopathic substances into forest floor[J]. Journal of Plant Biology, 2015, 58(1): 61-67
- [8] Fernandez C, Monnier Y, Ormeño E, Baldy V, Greff S, Pasqualini V, Mévy J P, Bousquet-Mélou A. Variations in allelochemical composition of leachates of different organs and maturity stages of *Pinus halepensis*[J]. Journal of Chemical Ecology, 2009, 35(8): 970-979
- [9] Vellend M, Lechowicz M J, Waterway M J. Germination and establishment of forest sedges (*Carex*, *Cyperaceae*): Tests for homesite advantage and effects of leaf litter[J]. American Journal of Botany, 2000, 87(10): 1517-1525
- [10] Caviries L A, Chacón P, Peñaloza A, Molina-Montenegro M, Arroyo M T K. Leaf litter of *Kageneckia angustifolia* D. Don (Rosaceae) inhibits seed germination in sclerophyllous montane woodlands of central Chile[J]. Plant Ecology, 2007, 190(1): 13-22
- [11] Fernandez C, Voiriot S, Mévy J P, Vila B, Ormeño E, Dupouyet S, Bousquet-Mélou A. Regeneration failure of *Pinus halepensis* Mill.: The role of autotoxicity and some abiotic environmental parameters[J]. Forest Ecology and Management, 2008, 255(7): 2928-2936
- [12] 王丽红, 赵东平, 陈贵林. 青海云杉凋落物对种子萌发和幼苗生长的自毒作用[J]. 分子植物育种, 2017, 15(10): 4275-4281
- [13] 张珊珊, 向振勇, 康洪梅, 杨文忠. 云南蓝果树对种子萌发及幼苗生长的自毒效应[J]. 林业科学研究, 2014, 27(4): 502-507
- [14] 刘芳黎, 张越, 吴富勤, 杨柳, 龙波, 申仕康. 自毒和森林凋落物化感作用对极小种群野生植物大树杜鹃种子萌发的影响[J]. 西北植物学报, 2017, 37(6): 1189-1195
- [15] Devaney J L, Whelan P M, Jansen M A K. Conspecific negative density dependence in a long-lived conifer, yew *Taxus baccata* L [J]. European Journal of Forest Research, 2018, 137: 69-78
- [16] 郭晓燕, 温婷, 张露, 杜天真, 吴南生, 付立. 毛红椿落叶腐解物的化感作用及成分[J]. 林业科学, 2018, 54(6): 24-32
- [17] 李雪云, 潘萍, 臧颖, 宁金魁, 欧阳勋志, 李小林, 桂亚可, 吴自荣. 闽楠天然次生林自然更新的影响因子研究[J]. 林业科学研究, 2017, 30(5): 701-708
- [18] 周艳, 陈训, 韦小丽, 伍庆, 李朝婵. 凋落物对迷人杜鹃幼苗更新和种子萌发的影响[J]. 林业科学, 2015, 51(3): 65-74
- [19] 郭晓燕, 张露, 梁跃龙, 袁生贵, 邓邦良, 雷先高. 枯枝落叶物厚度影响毛红椿种子出苗的模拟研究[J]. 江西农业大学学报, 2014, 36(2): 332-337
- [20] Warrag M O A. Autotoxic potential of foliage on seed germination and early growth of mesquite (*Prosopis juliflora*) [J]. Journal of Arid Environments, 1995, 31(4): 415-421
- [21] Iqbal Z, Furubayashi A, Fujii Y. Allelopathic effect of leaf debris, leaf aqueous extract and rhizosphere soil of *Ophiopogon japonicus* Ker-Gawler on the growth of plants [J]. Weed Biology and Management, 2004, 4(1): 43-48
- [22] 金彦博, 郭凤霞, 陈垣, 郭一青. 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
- [23] Chon S U, Nelson C J. Effects of experimental procedures and conditions on bioassay sensitivity of alfalfa autotoxicity [J]. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 2001, 32(9/10): 1607-1619
- [24] Aguilera N, Guedes L M, Becerra J, Baeza C, Hernández V. Morphological effects at radicle level by direct contact of invasive *Acacia dealbata* Link[J]. Flora, 2015, 215: 54-59
- [25] 张小鹏, 王得祥, 杜江涛, 张宋智. 微生境对华山松人工林天然更新的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2018, 46(1): 39-45
- [26] 戴文君, 韦秋思, 赵毅辉, 岑祖明, 杨梅. 光强对细叶云南松幼苗成活率及生长的影响[J]. 西南农业学报, 2017, 30(3): 569-573
- [27] Rice E L. Allelopathy [M]. Second Edition. Oklahoma: Academic Press, 1984: 74-118
- [28] Oluwakemi J A, Sylvia O M, Abdullahi A A, Adedoyin I, Olubunmi A, Abiodun H A, Bamidele V O. Anti-inflammatory and bronchodilatory constituents of leaf extracts of *Anacardium occidentale* L. in animal models[J]. Journal of Integrative Medicine, 2018, 16(1): 62-70
- [29] 陈兆杰, 黄慧俐, 韦婕, 李雪生. 色谱-质谱联用技术在我国 3 种柚子组分鉴定及指纹图谱建立中的应用[J]. 色谱, 2016, 34(6): 558-566
- [30] 韦玮. 一二代马尾松人工林根际土壤浸提物的化学组成及其化

- 感效应研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2017
- [31] 刘盛兰, 刘洪林, 阿拉木斯, 李加荣, 赵章涛, 张奇, 吴洪新, 王海, 纪磊, 秦艳. 内蒙古草原土壤有机物提取分离及鉴定[J]. 土壤学报, 2017, 54(6): 1459-1470
- [32] 林开敏, 叶发茂, 林艳, 李卿叁. 酚类物质对土壤和植物的作用机制研究进展[J]. 中国生态农业学报, 2010, 18(5): 1130-1137
- [33] 韦建华, 莫惠雯, 蒙秋艳, 赵惠玲, 卢汝梅. 壮药龙脷叶化学成分研究(II)[J]. 中草药, 2016, 47(20): 3560-3564
- [34] 周宝利, 刘娜, 叶雪凌, 鲁博. 嫁接茄子根系分泌物变化及其对黄萎菌的影响[J]. 生态学报, 2011, 31(3): 749-759
- [35] 周宝利, 李娜, 刘双双, 富饶, 李桂香. 2,4-二叔丁基苯酚对番茄叶霉病及幼苗生长的影响[J]. 生态学杂志, 2013, 32(5): 1203-1207
- [36] 薛鹏, 杨立新, 曹英夕, 张东, 杨岚. 水蒸气蒸馏及不同萃取纤维对白花蛇舌草挥发性成分分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(6): 85-90
- [37] 中华人民共和国卫生计生委员会. GB 2760-2014 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015
- [38] 马子玉, 卢青秀, 年贺凤, 腾海达, 杨光忠, 陈玉. 多花山竹子果实化学成分研究[J]. 中草药, 2019, 50(1): 17-21
- [39] 王晓南, 张瑜, 王婉华, 余若祯, 刘征涛, 曹宇, 陈丽红, 孙东燕. 邻苯二甲酸二乙基己酯(DEHP)污染及其毒性研究进展[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(3): 135-150
- [40] 黄钰芳, 张恩和, 张新慧, 王惠珍, 王琦, 刘青林, 石雨仟. 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
- [41] 黄旦益, 齐冬晴, 沈程文, 邓岳朝, 王旭, 李银花. 不同乌龙茶品种(品系)鲜叶香气组分的初步研究[J]. 中国农学通报, 2016, 32(10): 189-199
- [42] 林格燕, 钟淮钦, 黄敏玲, 罗远华, 林兵. 晚香玉花香成分时空动态变化的研究[J]. 核农学报, 2017, 31(12): 2434-2442
- [43] 邵福平, 田蕾, 田妹, 戴玉叶, 陈龙梗, 杨青山, 程旺兴, 王进, 杨康. 中药石菖蒲的研究进展[J]. 中医药导报, 2018, 24(22): 65-69
- [44] 沈丹, 杨学东. 白千层属植物化学成分及药理活性研究进展[J]. 中草药, 2018, 49(4): 970-980

## Autotoxicity of Aqueous Extracts From *Toona ciliata* var. *pubescens* Leaf Litter

GUO Xiaoyan<sup>1</sup> TAO Guofeng<sup>2</sup> ZHANG Lu<sup>1,\*</sup> YI Min<sup>1</sup> CHENG Zishan<sup>1</sup> HUANG Ruo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>College of Bioscience and Bioengineering, Jiangxi Agricultural University/2011 Collaborative Innovation Center of Jiangxi Typical Trees Cultivation and Utilization, Nanchang, Jiangxi 330045; <sup>2</sup>Jinyun County Kuocangshan Forestry Centre, Lishui, Zhejiang 321404)

**Abstract:** In order to investigate autotoxic effects of the aqueous extracts of leaf litter of *Toona ciliata* var. *pubescens*, the effects of leaf aqueous extracts on seed germination and seedling growth of the same species were investigated using biological test. Meanwhile, the autotoxic compounds in three different polar extracts of ether, ethyl acetate and n-butanol extracted from leaf aqueous extracts were analyzed by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS). The results showed that the aqueous extract of *T. ciliata* var. *pubescens* has inhibitory effects on its seed germination, seedling growth and seedling survive rate. It was also found the higher concentration will result in a stronger inhibition. In addition, the inhibition effect of the medium concentration (100 g·L<sup>-1</sup>) solution on seed germination and shoot length was significant, and the inhibition rates of seed germination rate, potential and index were 18%, 31%, 31% and 17%, respectively. Meanwhile, it was also found the extract with low concentration (10 g·L<sup>-1</sup>) had significant inhibitory effect on root length, and the inhibition rate reached 25%. Finally, 22 compounds were identified from three different polar extracts of aqueous extracts of leaf litter, which may mainly contain amides, long chain fatty acids, phenols, benzoic acid derivatives, alkanes, nitriles, xylene, terpinene, sterols and other substances. Amongst these compounds, amides, long chain fatty acids, phenols, benzoic acid derivatives were regarded as the possible autotoxic substances of *T. ciliata* var. *pubescens*. In conclusion, the findings help to explore the endangered mechanism of the plant and provide reference for the promotion of seedling regeneration of *T. ciliata* var. *pubescens*.

**Keywords:** aqueous extracts, autotoxicity, leaf litter, *Toona ciliata* var. *pubescens*