

油茶叶及凋落物浸提液对紫苏幼苗生长的化感作用

向 福¹, 程 超¹, 何 乾 坤¹, 伍 侶¹, 项 俊^{1,2}

(1. 大别山特色资源开发湖北省协同创新中心, 黄冈师范学院, 湖北 黄州 438000;

2. 生物资源保护与利用湖北省重点实验室, 湖北 恩施 445000)

摘 要:以 50 年育龄油茶林的叶和凋落物制得水浸提液为试材, 分别配制 5、10、20、40 mg/L 不同浓度浸提液, 以蒸馏水为对照, 浇淋紫苏幼苗, 通过测定分析幼苗叶片中叶绿素、脯氨酸和丙二醛等生理指标含量变化, 探讨油茶林模拟环境对紫苏幼苗生长的化感作用。结果表明: 紫苏幼苗叶绿素含量随浸提液浓度增加显著降低且油茶叶浸提液降低作用更明显; 脯氨酸含量随浸提液浓度增加而升高, 且油茶凋落物浸提液浓度为 40 g/L 时, 脯氨酸含量达到 45 $\mu\text{g/g}$, 凋落物作用对脯氨酸含量增加作用更显著; 丙二醛含量随浸提液浓度增加而逐渐降低, 油茶凋落物浸提液降低作用更明显。试验表明, 高浓度的油茶叶及凋落物浸提液对紫苏幼苗生长有明显的化感抑制作用, 油茶林下土壤环境不利于紫苏幼苗生长。

关键词:油茶; 紫苏; 浸提液; 幼苗生长; 生理指标

中图分类号:S 794.4; Q 945.79 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)12-0001-04

油茶(*Camellia oleifera*)是多年生木本油料作物, 栽培历史悠久, 产油量高, 是我国江南低山丘陵区最重要的食用油料树种^[1]。紫苏(*Perilla frutescens*)为一年生草本自花授粉植物, 是我国首批认定的既可药用又可食用的重要中药材之一, 在食品、保健、医药等领域具有重要的开发价值, 受到国内外的广泛关注^[2]。油茶林通过合理间种、套种等手段, 不仅能够增加相关产品的经济收入, 更能节约管理成本, 以耕代抚, 抑制杂草灌木生长、提高土壤肥力、改善油茶生长环境, 提高油茶的质量及产量, 从而多方位提高经济效益。因此, 探明油茶林下环境对紫苏幼苗生长的化感作用可以对油茶林套种紫苏提供科学依据, 从而推动大别山区油茶、紫苏的产业发展及自然资源的合理利用。近年来, 许多学者研究了油茶林套种金银花、射干、车前子、鱼腥草、竹荪、半夏、决明子、夏枯草等中药材资源的栽培技术^[3-5], 但对

油茶林下环境对植物, 特别是紫苏的化感作用报道不多。何佩云等^[13]分析了油茶叶浸提液对猴樟幼苗地径和苗高的化感效应。陈慧玲等^[14]分析了油茶水浸液对桔梗幼苗根、茎生长的影响, 发现低浓度油茶水浸液对桔梗幼苗的生长具有一定的促进作用。张新叶等^[12]分析了油茶水浸液对武汉本地野生紫苏幼苗根生长和茎生长的影响, 发现油茶水浸液对紫苏幼苗的生长存在明显的化感作用。

目前关于油茶林对植物化感作用方面的报道主要集中在根、茎生长长度上, 且油茶模拟环境或为油茶叶或为油茶植株, 缺乏包括油茶籽、茶壳的油茶凋落物模拟环境, 而油茶林模拟环境对植物叶绿素、脯氨酸和丙二醛等生理指标影响研究的报道也较少。该试验拟通过测定分析紫苏幼苗在油茶叶及凋落物浸提液处理后其叶绿素、脯氨酸和丙二醛等生理指标含量的变化情况, 探讨油茶林下环境对紫苏幼苗生长的化感作用, 从而为油茶林下是否适合套种紫苏提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 紫苏种子及油茶 供试紫苏种子由湖北蕲春李时珍生物有限公司提供, 产自重庆; 油茶叶及凋落物采自湖北省黄冈市浠水县蔡河镇 50 年育龄的油茶林。

1.1.2 药品及化学试剂 丙酮、 CaCO_3 、石英砂、茚三

第一作者简介:向福(1977-), 男, 土家族, 湖北利川人, 博士, 副教授, 现主要从事生物学等教学与科研工作。E-mail:lc_xiangfu@163.com.

责任作者:项俊(1963-), 男, 硕士, 教授, 现主要从事天然植物资源利用等研究工作。

基金项目:生物资源保护与利用湖北省重点实验室开放基金资助项目(PKLHB1103)。

收稿日期:2015-01-19

酮、磷酸、磺基水杨酸、冰乙酸、甲苯、硫代巴比妥酸(TBA)、三氯乙酸(TCA)。所有试剂均为分析纯,所用水均为去离子水。

1.1.3 主要仪器和设备 722 型分光光度计,离心机,YP1201N 型电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司),研钵,水浴锅,具塞试管等。

1.2 试验方法

1.2.1 水浸提液的制备 于 2013 年 3 月在湖北省黄冈市浠水县蔡河镇 50 年育龄油茶林中,采摘等量油茶树冠上、中、下 3 层的叶片若干,在实验室自然环境条件下风干,用粉碎机粉碎成粉末状,并混合均匀;油茶凋落物选取凋落物层次结构完整,收集表层到半腐殖层的凋落物,同样在实验室自然条件下风干,用粉碎机粉碎成粉末状,混合均匀。准确称量油茶叶、凋落物样品粉末各 40 g,分别放入清洗和消毒过的 1 000 mL 容量瓶中,用蒸馏水定容,密封浸泡 24 h 后,经定性滤纸过滤 2 次即得 40 g/L 的水浸母液。用蒸馏水稀释母液得到浓度为 40、20、10、5 g/L 的水浸液,以蒸馏水作为对照。

1.2.2 油茶叶及凋落物对紫苏幼苗生长的影响 2013 年 3 月初于黄冈师范学院试验田撒播紫苏种子,4 月中旬,待紫苏幼苗生长到 10 cm 左右,挑选生长状况相一致的幼苗若干,将其移栽到花盆中,每盆种 3 棵幼苗,共 9 个花盆,适当浇水,待幼苗完全成活后,停止浇水。对该 9 个花盆分别标记为 40、20、10、5 g/L 的叶及凋落物的浸出液以及蒸馏水,每天在对应花盆中浇等量的浓度为 40、20、10、5 g/L 的叶及凋落物的浸提液,以蒸馏水作为对照。持续处理 7 d 以后,摘取叶片,测定不同浓度浸提液处理后的叶绿素含量、脯氨酸含量以及丙二醛含量。

1.3 项目测定

1.3.1 叶绿素总含量测定 参考张志良等^[6]的方法,取紫苏叶片剪成碎片,称取 0.5 g,加入少量 CaCO₃ 和石英砂,以及丙酮 5 mL 一并转入研钵中研磨成匀浆,然后加 5 mL 80%丙酮溶液混合均匀。所得匀浆转入离心管中,用适量 80%丙酮溶液洗研钵,再转入离心管中,使叶绿素最小程度损失。离心结束后,取上清液用 80%丙酮溶液定容至 20 mL 制得叶绿素提取液。取提取液 1 mL 用 4 mL 80%丙酮溶液稀释后测定该溶液在 663 nm 和 645 nm 处 OD 值,以 80%丙酮为对照,按照公式(1)计算叶绿素总含量。根据 Lambert-Beer 定律和相关文献^[6]可得叶绿素总含量计算公式:

$$C = \frac{(8.02OD_{663} + 20.21OD_{645})V}{1\ 000m} \quad (1),$$

式中,C 为叶绿素总含量,mg/g;V 为提取液体积,mL;m 为紫苏叶鲜重,g。

1.3.2 脯氨酸含量的测定 参考张志良等^[6]的测定方

法,配制 0、2、4、6、8、10 μg/mL 的脯氨酸标准溶液,各取 2 mL 加入 5 mL 3%磺基水杨酸溶液,2 mL 冰乙酸和 3 mL 酸性茚三酮显色液,置于具塞试管中将混合溶液沸水浴 40 min,待其冷却后加入 5 mL 甲苯萃取。萃取后吸取甲苯层,以甲苯为对照,在 520 nm 处测其 OD 值,绘制标准曲线,回归方程为 $Y = 0.0304X + 0.0401$, $R^2 = 0.9046$ 。取剪碎的紫苏叶片 0.5 g 置于试管中,加入 5 mL 3%磺基水杨酸溶液,加玻璃试管塞,沸水浴浸提 10 min 后取出冷却,吸取上清液 2 mL 于试管,加 2 mL 冰乙酸和 3 mL 酸性茚三酮显色液后置于沸水浴 40 min,冷却后向再加入 5 mL 甲苯萃取。调零管为 2 mL 冰乙酸+3 mL 酸性茚三酮显色液+2 mL 蒸馏水。各试管静置分层后吸取甲苯层,以调零管为对照在波长 520 nm 处进行比色,根据标准曲线回归方程换算成公式(2)计算样品中的脯氨酸含量。 $Z = 164.47Y - 6.60$ (2),式中,Z 为每克紫苏叶子中脯氨酸的含量,μg/g;Y 为对应脯氨酸浓度测得的 OD 值。

1.3.3 丙二醛(MDA)含量的测定 参考张志良等^[6]的测定方法,取剪碎的紫苏叶片 1 g,加 10% TCA 2 mL 和少量石英砂研磨成匀浆后再加 8 mL TCA 充分研磨,离心,取上清液 2 mL 于试管中,加入 2 mL 0.6% TBA 后盖上玻璃试管塞后放入沸水中水浴 15 min,冷却后离心,取上清液于 532 nm 和 450 nm 波长处进行比色,以 2 mL 水为对照,按照公式(3)计算 MDA 含量。根据 Lambert-Beer 定律和相关文献^[6]可得到 MDA 含量计算公式:

$$C = \frac{72.06 \times (6.45OD_{532} - 0.56OD_{450})V}{1\ 000m} \quad (3),$$

其中,C 为 MDA 含量,μg/g;V 为提取液体积,mL;m 为紫苏叶鲜重,g。

1.4 数据分析

试验数据均用 Microsoft Office Excel 2003 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 油茶叶及凋落物浸提液对紫苏幼苗叶绿素含量的影响

叶绿素是植物进行光合作用的基础,其含量可以反映植物的营养、生理代谢以及生长发育情况,环境因素的变化会影响叶绿素的含量与组成,故也可作为植物环境生理的参考指标。由图 1 可知,与对照组相比,不同浓度的油茶叶及凋落物浸提液处理紫苏幼苗后,其叶片的叶绿素含量均有不同程度的降低,且随浸提液浓度的增加,叶绿素含量降低幅度越大。同时,油茶叶浸提液处理后的幼苗叶绿素含量比相应浓度的油茶凋落物浸提液处理的幼苗叶绿素含量更低。叶绿素含量下降,表明叶绿体被破坏,叶片会逐渐衰老变黄甚至脱落。因此

表明,油茶叶及凋落物浸提液不利于紫苏幼苗的生长,随着浸提液浓度的增加,这种抑制作用越明显;就叶绿素含量而言,与凋落物浸提液相比,油茶叶的浸提液更不利于紫苏幼苗的生长。该试验可能是由于浓度的增加使植物缺水,导致叶绿素含量的降低,也有可能是油茶中含有的某些无机盐影响了叶绿素的含量,而凋落物中含有的黄酮类等活性物质成分较多^[10],也可能是导致凋落物浸提液处理的紫苏幼苗中叶绿素含量较油茶叶浸提液处理的幼苗更高的原因。总之,就紫苏幼苗中叶绿素含量的变化情况而言,油茶林下环境会抑制叶绿素的形成,对紫苏幼苗生长不利。

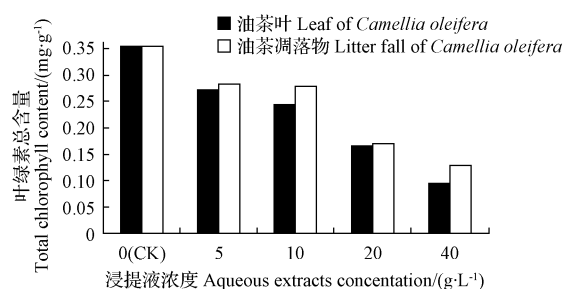


图1 油茶叶及凋落物浸提液对紫苏幼苗叶绿素含量的影响

Fig. 1 Effect of aqueous extracts from *Camellia oleifera* leaf and litter fall on the chlorophyll content of *Perilla frutescens* seedling

2.2 油茶叶及凋落物浸提液对紫苏幼苗脯氨酸含量的影响

脯氨酸含量的变化是对植物生理代谢改变的一种响应。干旱、高温、低温、盐渍等逆境会诱导参与渗透调节的基因表达,形成一些渗透调节物质,从而提高细胞溶质浓度,降低水势,使细胞能从外界继续吸水,而脯氨酸就是最有效的渗透调节物之一^[11]。由图2可知,紫苏幼苗中脯氨酸的含量随着浸提液浓度的升高而增加,当凋落物浸提液浓度为40 g/L时,紫苏幼苗脯氨酸含量达到45 $\mu\text{g/g}$,且明显看出,相同浓度的凋落物浸提液比油茶叶浸提液处理产生的脯氨酸量更多,由此表明油茶叶及凋落物浸提液均能增加紫苏幼苗脯氨酸的含量,且油茶凋落物浸提液增加作用更为明显。这一方面可能是由于浸提液浓度增大时,植物渗透吸水变得困难,表现出缺水的症状,脯氨酸含量会增加;另一方面,油茶凋落物中含有的物质成分更加丰富,胁迫了紫苏幼苗从而刺激了脯氨酸的积累,或存在某些物质破坏了叶绿体,蛋白质降解导致脯氨酸的含量增加。脯氨酸的增加是植物的一种保护性措施,有助于逆境中植物体内叶绿素的增加,维持光合活性,还能在逆境中调节细胞质的渗透势,保护蛋白质分子,保证植物不受或少受胁迫的危害^[11]。试验表明,油茶林下环境会显著增加紫苏幼苗中的脯氨酸含量,紫苏幼苗生长环境恶劣。

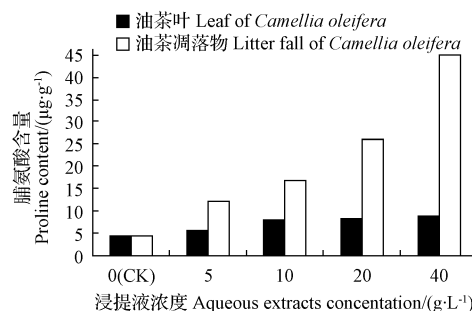


图2 油茶叶及凋落物浸提液对紫苏幼苗脯氨酸含量的影响

Fig. 2 Effect of aqueous extracts from *Camellia oleifera* leaf and litter fall on the proline content of *Perilla frutescens* seedling

2.3 油茶叶及凋落物浸提液对紫苏幼苗叶片丙二醛含量的影响

丙二醛是植物体内膜脂过氧化作用的产物,其含量的高低可以反映细胞膜脂过氧化程度的大小。由图3可知,紫苏幼苗MDA含量与对照组相比均降低,且随着浸提液浓度的增高而逐渐降低,而油茶凋落物浸提液处理后的紫苏幼苗中丙二醛含量则低于叶浸提液处理后的幼苗。表明油茶中存在某些抗氧化物质,且凋落物中的抗氧化物质作用强于油茶叶,随着浸提液浓度的增高,丙二醛含量降低,抗氧化物质的含量增高。油茶叶和凋落物的浸提液中含有黄酮类化合物,油茶的果壳中也存在天然没食子酸、儿茶素类等抗氧化物质^[10,12],用浸提液处理时,紫苏幼苗中丙二醛含量会受到抗氧化物质的影响,故而与对照组相比会减少;且凋落物中抗氧化物质成分较油茶叶更多,作用更强,故凋落物处理后的紫苏幼苗中含有的丙二醛含量较油茶叶处理的幼苗要少。事实上,凋落物中含有油茶籽、油茶壳,其中含有的抗氧化物质较油茶叶中更丰富,抗氧化作用更明显,导致凋落物浸提液处理后的紫苏幼苗中丙二醛含量更少。

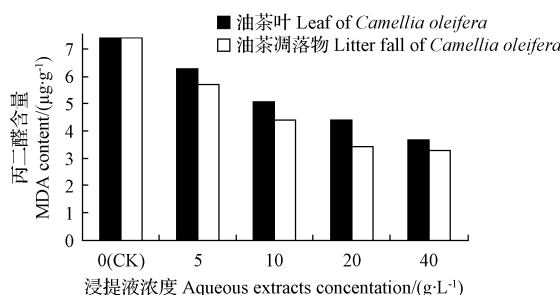


图3 油茶叶及凋落物浸提液对紫苏幼苗丙二醛含量的影响

Fig. 3 Effect of aqueous extracts from *Camellia oleifera* leaf and litter fall on the MDA content of *Perilla frutescens* seedling

3 讨论与结论

水浸提法是研究植物化感作用的常用方法。油茶叶及凋落物的水浸提液较好模拟了包括油茶籽、茶壳在

内的油茶林下环境。试验结果表明,油茶林模拟环境对紫苏幼苗的叶绿素、脯氨酸和丙二醛等3个生理指标含量变化影响显著,存在明显的化感效应。叶绿素含量变化可以反映紫苏幼苗的营养代谢以及生长发育情况,叶绿素含量显著降低表明油茶林下环境不利于紫苏幼苗的生长,存在化感抑制作用,具体的化感物质及其作用机制有待进一步深入研究。脯氨酸含量与环境因素有关,作为一项生理检测指标,脯氨酸含量越高,植物生长的环境越恶劣,植物受伤害越严重^[13]。油茶叶及凋落物对紫苏幼苗的脯氨酸含量的影响也很明显,尤其是油茶凋落物,显著增加了紫苏幼苗中的脯氨酸含量,表明油茶林下环境对紫苏幼苗而言,生长环境较为恶劣。丙二醛含量越高说明细胞中细胞膜结构完整性越差,可用来表示植物对逆境条件反应的强弱^[14]。油茶林模拟环境减少了紫苏幼苗中丙二醛的含量,这对紫苏幼苗的生长是有利因素,主要还是由于前面提及的油茶叶和凋落物中抗氧化物质的存在所致。总之,油茶林的模拟环境对紫苏幼苗生长的化感效应表现为抑制作用。类似研究也表明,油茶叶浸提液对猴樟幼苗存在化感抑制效应(RI<0),高浓度油茶水浸液(0.040 g/mL)对紫苏幼苗和桔梗幼苗也表现为明显的抑制作用^[6-8]。油茶林下环境对紫苏幼苗生长生理指标的化感作用与对根、茎生长长度的化感效应基本一致。

油茶模拟环境下随着油茶叶和凋落物浸提液的浓度增加,紫苏幼苗中的叶绿素和丙二醛含量明显降低,脯氨酸含量显著升高,高浓度浸提液对紫苏幼苗的生长存在明显的化感抑制作用。因此,油茶林下土壤环境不利于紫苏幼苗生长,进行油茶套种紫苏时应选择合适的种植密度或种植方式,降低油茶林对紫苏生长的化感效

应,从而保证紫苏生长不受或少受油茶林化感物质的胁迫。当然,进一步弄清油茶林的化感物质及其作用机制对油茶套种和土地资源利用具有更科学更现实的意义。

参考文献

- [1] 夏伏建,黄凤洪,钮琰星,等.油茶籽脱壳制油工艺的研究与实践[J].中国油脂,2004,29(1):34-35.
- [2] 张洪,黄建韶,赵东海.紫苏营养成分的研究[J].食品与机械,2006,22(2):41-43.
- [3] 葛永金,王军峰,林少波,等.油茶林下套种竹荪管理技术及经济效益分析[J].林业实用技术,2012(12):66-67.
- [4] 朱培林,王玉,易文红,等.油茶林套种中药材品种及其种植技术[J].江西林业科技,2007(4):62-64.
- [5] 吴培付.油茶套种金银花栽培管理技术研究及其效益分析[J].安徽农学通报,2011,17(13):68-69.
- [6] 张志良,瞿伟菁,李小方.植物生理学实验指导[M].北京:高等教育出版社,2009.
- [7] 钮琰星,夏伏建,黄凤洪,等.油茶壳的综合利用[C].中国粮油学会油脂专业分会第十四届学术年会.北京,2005:126-128.
- [8] 朱虹,祖元刚,王文杰.逆境胁迫条件下脯氨酸对植物生长的影响[J].东北林业大学学报,2009,37(4):86-89.
- [9] 陈跃龙,冯宝民,唐玲,等.油茶叶的化学成分[J].沈阳药科大学学报,2010(4):292-294.
- [10] Lutts S, Majerus V, Kinet J M. NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings[J]. *Physiol Plantarum*, 1999, 105: 450-458.
- [11] 周大寨,唐巧玉,张驰,等.晒对花椰菜幼苗叶绿素、脯氨酸及丙二醛含量的影响[J].湖北农业科学,2005(2):77-78.
- [12] 张新叶,陈慧玲,李振芳,等.油茶水浸液对紫苏种子萌发及幼苗生长的化感效应[J].林业科技开发,2014,28(2):42-44.
- [13] 何佩云,张樊.油茶叶浸提液对猴樟幼苗生长的化感影响[J].贵州农业科学,2011,39(5):187-190.
- [14] 陈慧玲,张新叶,杨彦伶.油茶水浸液对桔梗种子的化感效应[J].林业科技开发,2013,27(3):61-64.

Allelopathy of Aqueous Extracts from *Camellia oleifera* Leaf and Litter Fall on Seedling Growth of *Perilla frutescens*

XIANG Fu¹, CHENG Chao¹, HE Qian-kun¹, WU Lyu¹, XIANG Jun^{1,2}

(1. Hubei Collaborative Innovation Center for the Characteristic Resources Exploitation of Dabie Mountains, Huanggang Normal University, Huangzhou, Hubei 438000; 2. Key Laboratory of Biologic Resources Protection and Utilization of Hubei Province, Enshi, Hubei 445000)

Abstract: The allelopathy of aqueous extracts from the leaf and litter fall from 50-year-old *Camellia oleifera* (5, 10, 20, 40 mg/L different extract concentrations were prepared) on seedling growth of *Perilla frutescens* were observed with the contents of chlorophyll, proline, and malondialdehyde as determine indices. The results showed that the contents of chlorophyll and malondialdehyde in *P. frutescens* seedling were remarkably decreasing as the aqueous extracts concentration was increasing, while the proline content was increasing. Especially, the proline content reached 45 $\mu\text{g/g}$ at the aqueous extracts concentration of 40 g/L. So, the high concentration aqueous extracts from *C. oleifera* leaf and litter fall significantly inhibit the seedling growth of *P. frutescens*, and the *C. oleifera* forest soils could be not propitious for the seedling growth of *P. frutescens*.

Keywords: *Camellia oleifera*; *Perilla frutescens*; aqueous extracts; seedling growth; physiological index