

刘忠德,刘淑娟,吴仁涛,等. 臭椿提取物对杂草藜种子萌发和生理活性的影响[J]. 江苏农业科学,2014,42(3):88-90.

臭椿提取物对杂草藜种子萌发和生理活性的影响

刘忠德¹, 刘淑娟¹, 吴仁涛², 何真真¹

(1. 泰山学院生物与酿酒工程学院, 山东泰安 271021; 2. 泰山学院化学与化工学院, 山东泰安 271021)

摘要:采用索氏提取法对臭椿树皮进行分离、提取及浓缩,获得臭椿提取物,采用不同浓度的提取液处理杂草藜的种子,测定其萌发率、幼根长度、幼芽长度、鲜重,以及藜叶绿素含量、丙二醛(MDA)含量、过氧化物酶(POD)活性。结果表明,臭椿提取物能够抑制杂草藜种子萌发率,影响幼苗生长,降低幼苗鲜重叶绿素含量,增加MDA含量和POD活性。

关键词:臭椿提取物;萌发率;叶绿素;丙二醛(MDA);过氧化物酶(POD)

中图分类号: S451.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)03-0088-03

臭椿(*Ailanthus altissima*)在我国分布广泛,生长速度快,在臭椿树周围,很少生长其他杂草,臭椿是否产生某些化学物质对杂草生长造成影响值得探讨。Heisey进行了臭椿提取物对美国当地水芹的化感作用等研究^[1-2]。我国在臭椿提取物对昆虫的作用方面,也有少量报道,主要是臭椿提取物对光肩星天牛取食、产卵的驱避作用^[3-4];对植物的作用方面,主要是臭椿提取物对播娘蒿的抑制作用^[5],对刺槐种子发芽的影响^[6],对油菜种子萌发和核酸含量的影响^[7],但在臭椿提取物除草机理方面研究尚未见报道。本试验通过研究臭椿提取物对杂草藜生长、叶绿素含量、丙二醛含量(MDA)、过氧化物酶(POD)活性的影响,以期明确臭椿提取物抑制杂草生长的作用机理。

1 材料与与方法

1.1 臭椿提取物的制备

将臭椿树皮烘干后进行粉碎,过20网筛后准确称取干粉10g,滤纸包好装入索氏提取器,无水乙醇回流提取6h,然后将提取液在旋转蒸发器内减压浓缩至稠膏状,最后将膏状物用乙醇定容至50mL,装入磨口棕色广口瓶内密封,置于4℃冰箱中备用。

1.2 臭椿提取物对杂草藜种子生长的影响

试验设6个处理,分别为臭椿提取物原液,稀释2、5、10、15倍,清水对照(CK),每处理重复3次。分别用不同浓度梯度提取液处理培养皿里的圆形滤纸片,待滤纸干后继续滴加各浓度溶液,每个培养皿中总共滴加10mL不同浓度梯度的提取液,待滤纸上的无水乙醇挥发完全后,在培养皿中分别放入30粒大小一致、颗粒饱满、各部分生理结构完整健康的藜种子,将培养皿贴好标签后放入25℃恒温光照培养箱中培养7d。每天记录培养皿中种子发芽数量、计算发芽率,测定各个培养皿中种子根长、芽长,7d后称量各培养皿中种子鲜重,计算抑制率。

1.3 臭椿提取物对杂草藜生理活性的影响

1.3.1 叶绿素a、b含量测定^[8] (1)色素的提取:分别取不同浓度处理的藜叶片,剪成碎块,称取0.1g放入研钵中加纯丙酮2mL,少许碳酸钙和石英砂,研磨成匀浆,将匀浆转入离心管,并用2mL80%丙酮洗涤研钵,一并转入离心管,离心后沉淀。(2)光密度测定:取上述色素提取液1mL,加80%丙酮4mL,稀释后转入比色杯中,以80%丙酮为对照,分别测定 $D_{663\text{nm}}$ 、 $D_{645\text{nm}}$ 。(3)计算:计算色素提取液中叶绿素a、叶绿素b、叶绿素a+b的浓度。根据稀释倍数分别计算叶片中色素的含量(mg/L):

$$\text{叶绿素 a 含量} = 12.7D_{663\text{nm}} - 2.69D_{645\text{nm}};$$

$$\text{叶绿素 b 含量} = 22.9D_{645\text{nm}} - 4.68D_{663\text{nm}};$$

$$\text{叶绿素 a + b 含量} = 8.02D_{663\text{nm}} + 20.21D_{645\text{nm}}。$$

1.3.2 MDA含量的测定^[8] (1)MDA的提取:分别取各浓度梯度提取液处理的藜叶片0.1g,剪碎,加入10%三氯乙酸(TCA)2mL和少量石英砂,研磨;进一步加入2mLTCA充分研磨,匀浆液以4000g离心10min,上清液即为样品提取液。(2)显色反应及测定:吸取2mL提取液,加入2mL0.6%TBA液,混匀,在试管上加盖塞,置于沸水浴中煮沸15min,迅速冷却,离心。取上清液测定532nm和450nm下的吸光度。对照管以2mL水代替提取液。(3)计算:MDA-TBA反应产物的最大吸收峰在532nm,TBA-可溶性糖(以蔗糖为例)的反应产物的最大吸收峰在450nm,吸收曲线彼此又有重叠。根据Lambert-Beer定律,按以下公式即可计算样品提取液中MDA的含量(C)。

$$C(\text{mmol/L}) = 6.45D_{532\text{nm}} - 0.56D_{450\text{nm}}$$

1.3.3 POD活性的测定^[8] (1)粗酶液的提取:称取各浓度梯度提取液处理的藜叶片各0.1g,加4mL20mmol/L KH_2PO_4 于研钵中研磨成匀浆,4000r/min离心15min,收集上清液保存在冷处。(2)酶活性的测定:取光径1cm比色杯2只,1只中加入反应混合液3mL, KH_2PO_4 1mL,作为校零对照,另1只中加入反应混合液3mL,上述酶液1mL,立即开启秒表计时,于分光光度计470nm波长下测定吸光度,1min读数1次。以1minD变化值 $D_{470\text{nm}}/\text{min}$ 表示酶活性的大小。

$\text{POD}[U/(g \cdot \text{min})] = \Delta D_{470\text{nm}} \times V_T / (m \times V_S \times 0.01 \times t)$
式中: $\Delta D_{470\text{nm}}$ 为反应时间内D变化值。 V_T 为提取酶液总体积

收稿日期:2013-07-29

基金项目:山东省自然科学基金(编号:ZR2010CL012)。

作者简介:刘忠德(1967—),男,山东莱芜人,硕士,副教授,主要从事植物保护研究。E-mail:sdliuzhongde@126.com。

(mL); m 为植物鲜重(g); V_s 为测定时取用酶液体积(mL); t 为反应时间(min)。

2 结果与分析

2.1 臭椿提取物对藜种子生长的影响

2.1.1 臭椿提取物对藜种子萌发率的影响 由表1可以看出,藜种子在培养1 d时不萌发,2 d时稀释5、10、15倍3个处理种子开始萌发,萌发率分别为1.1%、8.9%、22.2%,对照为33.3%;3 d时稀释2倍处理种子开始萌发,4个稀释液

处理藜种子萌发率分布为2.2%、14.4%、41.1%、42.2%,对照为46.7%;4 d时4个稀释液处理藜种子萌发率分别为3.3%、15.6%、52.2%、53.3%,对照为70.0%。7 d时原液处理始终没有萌发,稀释2、5倍处理萌发率均较低,分别为5.5%、17.8%;稀释10、15倍处理的萌发率相对较高,分别为63.3%、62.2%;对照最终萌发率达到70%。结果表明,臭椿提取物对藜种子的萌发有明显的抑制作用,随着稀释倍数的增加抑制作用降低。

表1 不同浓度臭椿提取物对藜种子萌发率的影响

处理时间 (d)	种子萌发率(%)					
	原液	稀释2倍	稀释5倍	稀释10倍	稀释15倍	清水
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	1.1	8.9	22.2	33.3
3	0	2.2	14.4	41.1	42.2	46.7
4	0	3.3	15.6	52.2	53.3	70.0
5	0	4.4	16.7	54.4	56.7	70.0
6	0	4.4	17.8	60.0	57.7	70.0
7	0	5.5	17.8	63.3	62.2	70.0

2.1.2 臭椿提取物对藜种子萌发后根长的影响 由表2可知,不同浓度提取物对藜种子萌发后胚根的伸长有明显影响。藜种子在培养1 d时均不萌发,胚根没有伸长。2 d时稀释5、10、15倍3个处理种子胚根开始伸长,长度分别为0.1、0.2、0.2 cm,对照为0.3 cm。3 d时稀释2倍处理种子胚根开始伸长,稀释2、5、10、15倍4个处理藜种子胚根长度分别为0.1、0.1、0.3、0.3 cm,对照为0.7 cm。4 d时处理稀释2、5、10、15

倍4个处理藜种子胚根长度分别为0.1、0.1、0.3、0.4 cm,对照为1.3 cm。7 d时原液处理胚根始终没有伸出;稀释2、5倍处理胚根伸长较短,为0.2 cm;稀释10、15倍处理胚根伸长较长,分别为0.6、0.7 cm;对照胚根伸长到2.6 cm。结果表明,臭椿提取物对藜种子萌发后胚根长度有明显的抑制作用,随着稀释倍数的增加,抑制作用降低。

表2 不同浓度臭椿提取物对藜胚根根长的影响

处理时间 (d)	胚根长(cm)					
	原液	稀释2倍	稀释5倍	稀释10倍	稀释15倍	清水
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0.1	0.2	0.2	0.3
3	0	0.1	0.1	0.3	0.3	0.7
4	0	0.1	0.1	0.3	0.4	1.3
5	0	0.1	0.1	0.4	0.4	1.7
6	0	0.1	0.1	0.6	0.6	2.0
7	0	0.2	0.2	0.6	0.7	2.6

2.1.3 臭椿提取物对藜胚芽长的影响 由表3可知,不同浓度提取物对藜种子萌发后胚芽的伸长有明显影响。藜种子在培养1 d时均不萌发,胚芽没有伸长。2 d时只有稀释15倍处理种子胚芽开始伸长,长度分别为0.1 cm,对照为0.1 cm;3 d时稀释10倍处理种子胚芽开始伸长,稀释10、15倍处理藜种子胚芽长度分别为0.1、0.3 cm,对照为0.4 cm。4 d时

稀释10、15倍处理藜种子胚芽长度分别为0.2、0.4 cm,对照为0.7 cm。7 d时原液处理胚芽始终没有伸出;稀释2、5倍处理胚芽伸长较短,分别为0.1、0.3 cm;稀释10、15倍处理胚芽伸长较长,分别为0.5、0.9 cm;对照胚芽伸长至1.1 cm。结果表明,臭椿提取物对藜种子萌发后胚芽长度有明显的抑制作用,随着稀释倍数的增加,抑制作用降低。

表3 不同浓度臭椿提取物对藜胚芽长的影响

处理后时间 (d)	胚芽长(cm)					
	原液	稀释2倍	稀释5倍	稀释10倍	稀释15倍	清水
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0.1	0.1
3	0	0	0	0.1	0.3	0.4
4	0	0	0	0.2	0.4	0.7
5	0	0	0	0.4	0.5	0.8
6	0	0	0.1	0.4	0.7	0.9
7	0	0.1	0.3	0.5	0.9	1.1

2.1.4 臭椿提取物对杂草藜幼苗种子萌发后鲜重的影响

由表4可知,藜的鲜重随提取物浓度的递减而递增。原液、稀释2、5、10、15倍5个处理对杂草藜鲜重的抑制效果分别为85.43%、85.11%、84.36%、66.45%、60.41%,抑制效果明显。

表4 不同浓度臭椿提取物对藜种子生长的鲜重的影响

处理	藜鲜重(mg)	抑制效果(%)
原液	13.5	85.43
稀释2倍	13.8	85.11
稀释5倍	14.5	84.36
稀释10倍	31.1	66.45
稀释15倍	36.7	60.41
清水	92.7	

2.2 臭椿提取物对藜生理活性的影响

2.2.1 臭椿提取物对藜叶绿素含量的影响 由表5可知,不同浓度臭椿提取物处理藜后,叶绿素含量受到较大影响,臭椿提取物稀释2、5、10、15倍4个处理叶绿素a+b含量分别为1.104、0.914、1.231、1.683 mg/g,清水为2.224 mg/g。随着稀释倍数的增加,叶绿素含量总体呈递增趋势,但均明显低于清水,说明臭椿提取物处理杂草藜后使藜体内叶绿素含量降低。

2.2.2 臭椿提取物对藜MDA含量的影响 由表6可知,不同浓度臭椿提取物处理草藜后,MDA含量受到较大影响,臭椿提取物稀释2、5、10、15倍4个处理MDA含量分别为1.585、1.133、0.900、0.956 $\mu\text{mol/g}$,清水为0.822 $\mu\text{mol/g}$,随

表5 不同浓度臭椿提取物对藜叶绿素含量的影响

处理	含量(mg/g)		
	叶绿素a	叶绿素b	叶绿素a+b
稀释2倍	0.707	0.397	1.104
稀释5倍	0.580	0.334	0.914
稀释10倍	0.734	0.497	1.231
稀释15倍	1.139	0.544	1.683
清水	1.301	0.923	2.224

表6 不同浓度臭椿提取物对藜MDA含量的影响

处理	$D_{450\text{ nm}}$	$D_{532\text{ nm}}$	MDA含量($\mu\text{mol/g}$)
稀释2倍	0.325	0.274	1.585
稀释5倍	0.246	0.197	1.133
稀释10倍	0.202	0.157	0.900
稀释15倍	0.228	0.168	0.956
清水	0.225	0.147	0.822

着稀释倍数的增加,MDA含量呈下降的趋势,但均明显高于清水。表明臭椿提取物藜植物体内MDA的含量升高。

2.2.3 臭椿提取物对藜POD活性的影响 由表7可知,不同浓度臭椿提取物处理藜后,POD活性受到明显影响,臭椿提取物稀释2、5、10、15倍4个处理POD活性分别为0.717、0.559、0.473、0.466 $\text{U}/(\text{g} \cdot \text{min})$,清水为0.372 $\text{U}/(\text{g} \cdot \text{min})$ 。藜POD活性受到提取物的影响,随着提取物浓度的递减,POD活性呈递减趋势,但均明显高于清水。说明臭椿提取物处理使藜植物体内POD活性升高。

表7 不同浓度臭椿提取物对藜叶片在及POD活性的影响

处理	$D_{470\text{ nm}}$							POD活性 [$\text{U}/(\text{g} \cdot \text{min})$]
	1 min	2 min	3 min	4 min	5 min	6 min	7 min	
稀释2倍	0.356	1.065	1.794	2.507	3.010	3.010	3.010	0.717
稀释5倍	0.245	0.841	1.395	1.907	2.482	3.010	3.010	0.559
稀释10倍	0.167	0.725	1.172	1.613	2.081	2.533	3.010	0.473
稀释15倍	0.126	0.680	1.118	1.538	1.994	2.458	3.010	0.466
清水	0.106	0.541	0.952	1.215	1.563	1.927	2.335	0.372

3 小结

臭椿提取物能够抑制藜种子的萌发率、根长、芽长、鲜重;显著降低叶绿素的含量,提高丙二醛含量,增加过氧化物酶的活性。

臭椿提取物对藜种子的萌发和生长有明显的抑制作用,随着稀释倍数的增加抑制强度降低,表现出一定的除草活性,这种抑制作用并不能杀死藜的完全种子,但能延缓种子的萌发时间,导致藜生长不良。

本研究测定了臭椿提取物对杂草藜叶绿素、丙二醛含量、过氧化物酶活性的影响,对常见植物保护酶如超氧化物歧化酶、过氧化氢酶等活性的影响,还有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Heisey R M. Herbicidal effects under field conditions of *Ailanthus altissima* bark extract, which contains ailanthone [J]. *Plant & Soil*,

2003,256(1):85-99.

[2] Heisey R M. Identification of an allelopathic compound from *Ailanthus altissima* and characterization of its herbicidal activity [J]. *American journal of Botany*,1996,83(2):192-200.

[3] 曹兵,李治中.臭椿提取物对光肩星天牛的驱避作用[J].南京林业大学学报2004(1):47-49.

[4] 曹兵,宋丽华,徐锡增.臭椿内含物对光肩星天牛取食、产卵的抑制作用[J].南京林业大学学报,2004(9):15-18.

[5] 刘忠德,刘淑娟.臭椿提取物对油菜生长抑制作用和核酸含量的研究[J].江苏农业科学,2009(4):95-96.

[6] 刘忠德,孙冬,杨勤民.臭椿提取物对播娘蒿生长抑制作用的研究[J].中国植保导刊,2009(5):43-44.

[7] 曹兵,宋丽华,张婷婷.臭椿根区土壤水浸提液对刺槐种子发芽的影响[J].南京林业大学学报,2009,33(3):51-58.

[8] 张志良,瞿伟菁.植物生理学实验指导[M].3版.北京:高等教育出版社,2003:151-152.