

632-639

7567(11)

第16卷第6期

生态学报

Vol. 16, No. 6

1996年12月

ACTA ECOLOGICA SINICA

Dec. 1996

小麦根区微生物分解小麦残体产生的化感物质及其生物活性的研究

马瑞霞 刘秀芬 袁光林 孙思恩

(中国科学院生态环境研究中心, 北京, 100085)

摘要 取小麦根区土壤微生物于不同 pH(5, 7, 8) 条件下, 在室内腐解成熟期麦秸。对不同时间提取物做生物活性检验, 部分样品进行 GC-MS 测定。结果表明: 酸性提取液对小麦、玉米种子萌发均表现出抑制作用, 其强弱与腐解时间有关。第 1 天的提取物对小麦、玉米根长的抑制作用极显著 ($P < 0.01$), 第 2 周的提取物, 以 pH7 时对小麦抑制最强, 萌发率为零。第 4 周提取物 pH 8(A) 对小麦不但无抑制作用, 反而有明显的刺激作用。pH5(B) 和 pH7(B) 样品对玉米的根和芽也表现出明显的刺激作用, 差异显著性分别为 $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$ 。GC-MS 鉴定结果表明: 抑制作用强的样品中, 含有较多的酸、酚、醇和酮类化合物; 有一定刺激作用的样品中, 不含酸类, 含氮及氮杂环化合物。选择若干通过 GC-MS 鉴定的化合物进行生物活性检验, 结果也证明起抑制作用的化感物质主要是酚、酸、醛、酮类化合物, 起刺激作用的物质, 主要是一些含氮化合物, 包括生物碱。

关键词: 土壤微生物, 秸秆腐解, 化感物质, 化感作用, 生物检验, GC-MS 测定。

STUDY ON ALLELOCHEMICALS IN THE PROCESS OF DECOMPOSITION OF WHEAT STRAW BY MICROORGANISMS AND THEIR BIOACTIVITY

Ma Ruixia Liu Xiufen Yuan Guanglin Sun Si'en

(Research Center for Eco-Environmental Sciences, the Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100085, China)

Abstract Wheat straw of mature period was decomposed under laboratory conditions; pH5, pH7 and pH8 by microorganisms. Filtrates of rotted wheat straw after 1 day, 1 week, 2 weeks and 4 weeks of incubation were tested for bioassay, and their some extracts obtained under acidic and basic conditions were analysed by GC-MS. It was found that allelopathic effects of extracts on the germination of wheat and maize seeds are obviously dependent on the period of decomposition, pH value and variety of crops. All acidic extracts showed inhibition to the germination and root growth to some degree. All basic extracts showed a little inhibition or some

• 国家自然科学基金资助项目。

收稿日期: 1994-11-10, 修改稿收到日期: 1996-05-15。

simulation to seed germination and root growth. The samples of 1 day incubation under pH5 (A), pH7(A), and pH8(A) have shown a obvious inhibition ($p < 0.01$) of root extension of wheat and maize. The sample of two weeks incubation under pH7(A) showed very strong inhibition for germination of wheat seed. The samples of four weeks incubation under pH8(A) indicated some stimulation to wheat growth, significant differences ($p < 0.01$ and $p < 0.05$) was detected respectively.

The extracts showing allelopathic actively were analysed by GC-MS. A wide variety of chemicals, such as phenolic acids, organic acids, aldehydes, alcohol and etc, were indentified. Some chemicals identified to be responsible for the inhibition were selected again to confirm their bioactively. Results indicate that phenolic acids, organic acids were more strong inhibitors. Nitrogen-contained chemicals were weaker inhibitors and showed in some cases a stimulations to the experimental plants.

Key words: microorganisms, decomposition, allelochemicals, allelopathyc, bioassay.

自化感概念的提出^[1],特别是70年代以来,人们运用现代化学方法和技术,对一些宏观生态学问题有了更新的理解^[2]。近年来对秸秆还田作为农业增产措施就有了新的看法,秸秆在土壤微生物分解过程中,会产生有毒物质危害下茬作物生长已有报道^[3~6]。Mccalla, T. M. 和 Duley, F. L.^[7]认为,秸秆覆盖影响玉米长势,特别是在多雨年份,影响更为明显。马永清等人^[8~9]报道,5~10 t/hm² 麦秸覆盖土壤,玉米平均发芽率减少44%~92%。对玉米早期发育的抑制作用,主要表现叶片发黄,增施化肥未见成效。笔者在聊城科技农业园试验田中也发现,在有麦茬的积水洼地,干后播种的玉米,玉米幼苗弱小而发黄,导致严重减产。

20年来国外对化感作用的研究日益活跃^[10],国内在该领域的研究,起步于80年代末。秸秆还田产生的化感物质的研究,国内报道尚不多见。本文研究了小麦残体分解产生的化感物质及生物活性、产生该物质的规律,探讨了小麦自身中毒并抑制下茬玉米生长,导致减产的机理,为农业增产及合理利用秸秆还田产生更高的经济效益,提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 样品采集 1994年6月10日麦收前1周,在中国农业大学小麦试验田中,采集连根小麦(品种为北京437),切成1 cm以下小段,在无菌间紫外灯下照射3 h(距紫外灯0.5 m,并不时翻动麦秸)。将上述小麦根上附着的土抖下来,并混合均匀备用。

1.2 麦秸分解试验条件和提取液制取 根区微生物培养,采用微生物分解纤维素的培养基^[11]。培养液经常规灭菌后,在无菌室内分别被调成pH5, pH7和pH8三种处理。在500 ml棕色广口瓶中,加入上述培养液250 ml,消毒过的碎麦秸20 g,根际土20 g作为微生物菌源放置25℃恒温培养,未加秸秆的作为对照。

将培养24 h, 1周,2周和4周的培养液,分别调至pH2和pH12,用二氯甲烷(50 ml)提取两次,分别得到酸性提取液[pH5(A), pH7(A), pH8(A), 对照(A)4处理]和碱性提取液[pH5(B), pH7(B), pH8(B), 对照(B)4处理]。提取液经旋转蒸发器浓缩至1 ml。从中取出0.5 ml做GC-MS测定,剩余的0.5 ml用于生物活性测定。

1.3 生物活性测定

分别用酸性提取液(pH5, pH7, pH8 和对照)及碱性提取液(pH5, pH7, pH8 和对照)对小麦, 玉米种子萌发进行试验。在直径为 9 cm 的培养皿内, 每皿摆 10 粒小麦种子, 在直径 13 cm 的培养皿内, 摆 20 粒玉米种子, 每处理均重复 3 皿, 小皿内放 3 ml 提取液, 大皿内放 5 ml 提取液, 每皿底铺一层滤纸用于保湿, 培养皿放入 25℃ 恒温下, 48 h 后取出, 分别测量小麦, 玉米的根长和芽长。

1.4 提取液的 GC-MS 分析

GC 型号为 HP5890, FID 检测器。毛细管柱: DB-5 柱和 Carbowax 柱(ϕ 0.25 mm 30 m), 进样口 240℃, 检测器分别为 280℃ 和 275℃。柱温 50℃(2 min), 以 6℃/min 程升分别至 275℃(保持 20 min)和 250℃(保持 15 min)。载气为 He, 流量 1 ml/min, 进样量为 1 μ l。GC-MS 型号是 TRI02000 色谱质谱仪, 电子轰击源, 扫描范围 M/Z 30-600 AMU, 扫描速度 0.2 s 扫全程, 离子源温度 150℃。通过计算机检索系统, 进行未知物的鉴定。

2 实验结果

2.1 提取液对小麦, 玉米等作物种子萌发的化感作用

不同时间小麦秸秆腐解产生的化感作用的活性不同。24 h 后, 除 pH8(A)对玉米芽无抑制作用外, 其它对小麦及玉米都表现出抑制作用($p < 0.05$, $p < 0.01$)。其中以 pH5(A)的抑制效果更为明显。pH5(A)处理的小麦根长、芽长分别比对照短 77%, 20%, 玉米的根长, 芽长分别比对照短 77% 和 68%。所有碱性提取物, 抑制作用不明显, 反而对小麦根和芽有一定刺激作用。第 1 周所有酸性提取物对小麦, 玉米萌发都具抑制作用。除 pH7(A)对小麦芽抑制作用较弱外, 其余的差异显著性均为 $p < 0.01$ 。在碱性提取物中, 除对玉米芽的促进效果 $p < 0.05$ 外, 其余 $p < 0.01$ 。第 2 周 pH5(A), pH7(A), pH8(A)对小麦, 玉米的根、芽的抑制作用较第 1 周更为强烈($p < 0.01$), 尤其 pH7(A)处理的小麦种子全部未萌发, pH7(B), pH8(B)对玉米萌发也具抑制作用, 但对小麦根无抑制作用。4 周后的样品 pH5(A), pH7(A), pH8(A)对玉米芽和根仍有抑制作用($p < 0.01$, $p < 0.05$), 但对小麦除 pH5(A)外, 其它反而有刺激效果。4 周后的所有碱性提取物对小麦及玉米的根和芽都具有显著的刺激作用($p < 0.01$, $p < 0.05$)。详见图 1、图 2。

2.2 GC-MS 测定结果

由表 1 可见, 在生物活性检验中, 24 h 的 pH5(A)表现抑制作用最显著, pH5(A)中含有比 pH7(A), pH7(B)更多的酸及酚类物质, 这些物质对小麦和玉米种子的萌发有较强的抑制作用。pH7(A)中也含有一些酸类及酚类物质, 因此也表现出一定的抑制作用。而在 pH7(B)中, 没有鉴定出酸类物质, 酚类也只有一种。它含有 pH5(A)及 pH7(A)中所没有的吡啶类物质, 所以它对小麦和玉米的抑制作用不明显, 反而有促进作用。为进一步确定具有化感作用的化合物, 从中挑选几种化合物再进行生物活性检验。

2.3 GC-MS 鉴定出的酚酸类化合物的生物检验结果

由于标样所限对一些仅有的低碳脂肪酸, 芳香酸和酚类进行了试验, 结果见图 3~5。图 3 所示, 500 mg/l 的戊酸和正己酸对生根抑制效果, 分别表现为从对照的根长 12.9 mm 降至 2.5 mm 和 5.5 mm, 对芽的抑制从对照的芽长 3.5 mm 分别降至 1.5 和 1.35 mm。500 mg/l 的二甲基戊酸和正己酸对芽的抑制分别从对照的芽长 3.55 mm 降至 1.5 和 1.35 mm。500 mg/l 的二甲基戊酸和正己酸对芽的抑制分别从对照的芽长 3.55 mm 降至 0.25

和 1.45 mm。二甲基戊酸在 500 mg/l 时,对芽抑制最强,仅为对照芽长的 7%,但是在浓度小于 100 mg/l 时,这两种化合物对根和芽都表现出刺激作用。50 mg/l 时,根长分别比对照约长 15% 和 10%,芽长比对照约长 25% 和 15%。随着化合物浓度的增加,抑制作用也逐渐加强。这 4 种酸对玉米的根及芽生长抑制作用不明显。

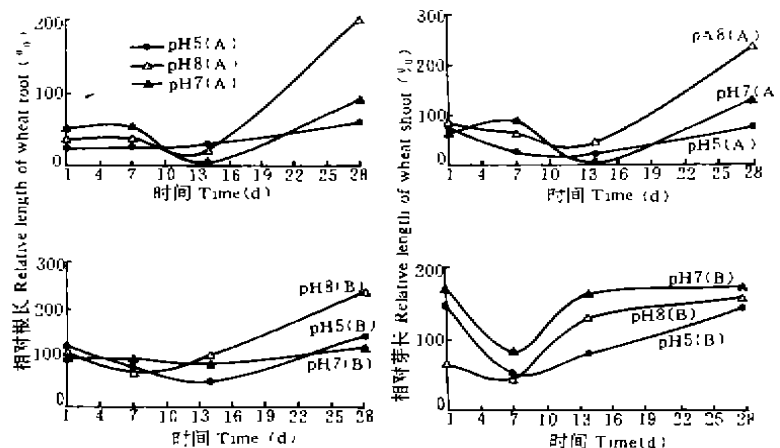


图 1 小麦秸秆酸性提取液及碱性提取液对小麦根长和芽长的影响

Fig. 1 Influence of pH5(A), pH7(A), pH8(A), pH5(B), pH7(B), pH8(B) to wheat root and shoot

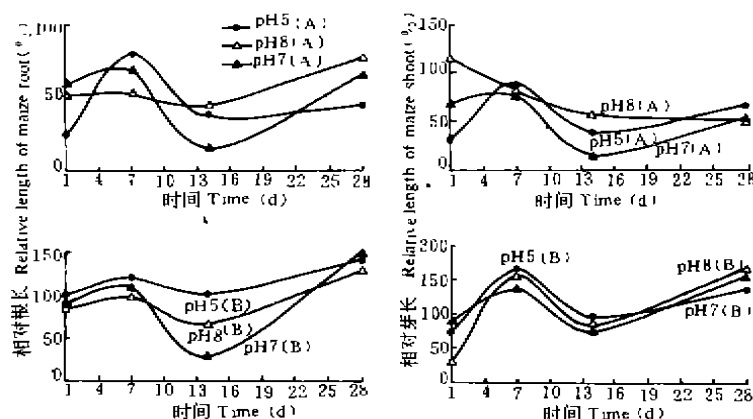


图 2 小麦秸秆酸性提取液及碱性提取液对玉米根长和芽长的影响

Fig. 2 Influence of pH5(A), pH7(A), pH8(A), pH5(B), pH7(B), pH8(B) to maize root and shoot

图 4 所示,500 mg/l 的苯甲酸和苯乙酸使玉米的根长,分别是对照的 55% 和 35%,小麦的根长分别为对照的 60% 和 25%。对两种作物芽的抑制作用,在 500 mg/l 时,也是苯乙酸比苯甲酸强。不论对玉米还是对小麦种子萌发的抑制作用,苯乙酸都强于苯甲酸。

表 1 微生物分解小麦残体产生的化学物质(质谱分析结果)

Table 1 Chemicals produced by microorganisms decomposed wheat residues

pH5(A)(24 h 的样品) pH5(A)(24 h sample)	pH7(A)(24 h 的样品) pH7(A)(24 h samples)	pH7(B)(24 h 的样品) pH7(B)(24 h samples)
苯基丙酸 Benzene propenoic acid	苯甲酸 Benzoic acid	3-甲酚 3-methyl phenol
3-甲基丁酸 3-methyl-butanolic acid	苯乙酸 Benzen acetic acid	2-氯乙基苯 2-chloro ethyl benz
己酸 Hexanoic acid	苯丙酸	1,3,4-三甲基
四甲基戊酸 4-methyl-pentanoic acid	Benzeneprop acid	-3-环乙烯基-1-羟基醛
辛酸 Octoic acid	2-甲基丙酸 2-methyl propenoic acid	1,3,4-methyl-3-cyclo ethylene-1-hydroxy aldehyde
十四酸 Tetrade acid	3-甲基丁酸 3-methyl-butanolic acid	2-丁基-1,3-二氧戊环-2-丁醇
4-甲氧基苯酚 4-methoxy benzphenol	丁酸 Butanoic acid	2-butan-1,3-dioxolane-2-butanol
苯酚 Benzphenol	戊酸 Pentanoic acid	
4-甲酚 4-methylphenol		
四-乙基-2-甲基苯酚 4-ethyl-2-methyl benzphenol		
2-乙基酚 2-ethylphenol 3,4,5-三甲氧基苯酚 3,4,5-methoxy benzphenol	4-甲基戊酸 4-methyl pentanoic acid	2,7-二甲基-1,7-辛二烯-3-胺
4,5-辛二醇 4,5-octanol 邻苯二酸酯类 Bebzendicarboxylic ester	己酸 Hexanoic acid	2,7-dimethyl-1,7-octadiene
2-氧桥-十六酸甲酯 2-oxyl-16-methyl ester	3-甲酚 3-methyl phenol	4-甲基-1H 吲哚
乙酰胺 ethanamide	吡啶酮 Pyridone	4-methyl-1H indoline
吡咯烷酮 Pyridone		■-吲哚 ■-indoline
1-2-羟基-5-甲基苯基乙醇 1-2-hydroxy-5-methyl-phenyl-ethylone		二氧-4,4-二甲基、2(3H)-呋喃酮 Dioxo-4-4 dimethyl-2(3H) furan-done

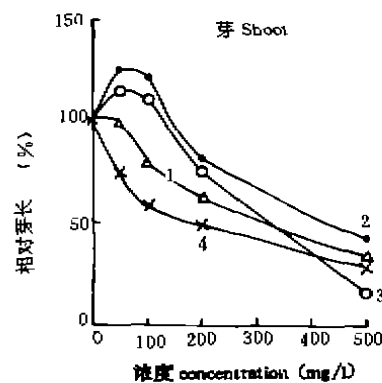
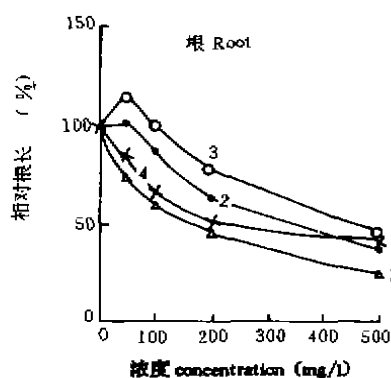


图 3 4 种有机酸对小麦种子萌发的抑制作用

Fig. 3 Inhibition of organic acid to germination of wheat

图 5 所示, 邻甲酚对玉米的根及芽生长的抑制作用均低于间甲酚, 但对小麦的根及芽生长的抑制作用, 间甲酚高于邻甲酚。这表明化合物的异构体具有不同的生物活性。生物活性检验结果表明它们全属一类比较强的化感物质。

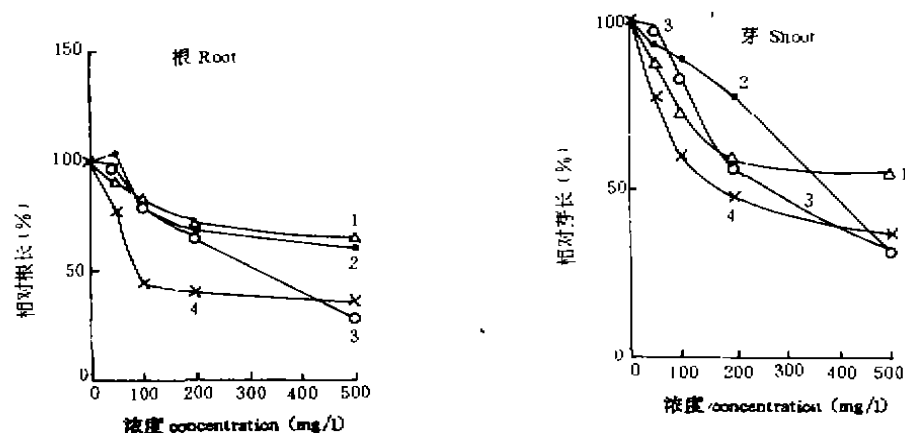


图 4 苯甲酸、苯乙酸对玉米、小麦种子萌发的抑制作用

Fig. 4 Influence of benzoic acid, benzen acetic acid to germination of wheat and maize

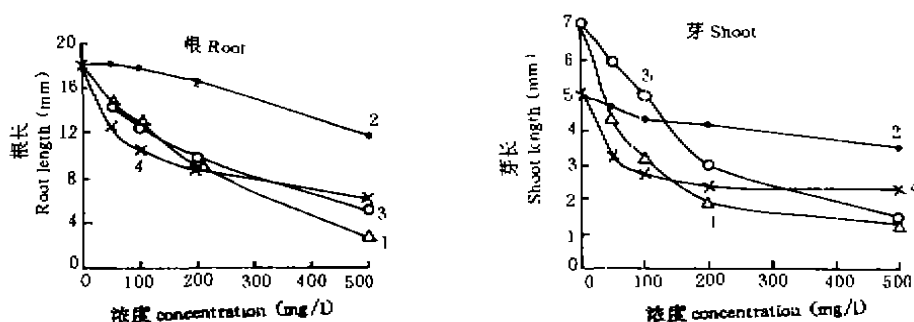


图 5 邻甲酚、间甲酚对玉米、小麦种子萌发的抑制作用

Fig. 5 Inhibition of p-methylphenol, m-methylphenol to germination of wheat and maize

3 讨论

3.1 小麦秸秆分解产生的化感物质对小麦和玉米种子萌发的抑制作用

研究表明, 秸秆腐解产生的化感物质对小麦和玉米的抑制作用有程度差别。这一结果与土壤真菌, 细菌产生的化感物质对小麦, 玉米抑制作用的规律是一致的。

McCalla, T. M. 等报道^[7]抑制作用是通过酶活性和其他植物生理活性产生影响而引起的。不同作物或同一作物的不同品种, 对化感物质反应有明显差别。有报道说明小麦秸秆产生的毒性对燕麦, 大豆及高粱等影响程度不同, 并根据大豆对其毒性所具有的化感作用, 建立了评价和筛选大豆种质的一套技术, 同时还测定了因化感物质, 而影响高粱基因的变化。研究化感作用, 对作物育种及遗传基因的影响, 具有理论及实际意义。

• 马瑞霞等, “小麦根区土壤微生物产生的化感物质及生物活性的研究”, 将发表。

3.2 小麦秸秆分解产生化感作用的规律

样品的生物活性与腐解时间有关,在 1~2 d 和 14 d 腐解时间的样品,GC 测定的峰多而强.化感作用在两周时也最明显,生物活性检验与 GC-MS 分析结果是完全一致的。Kimber^[1-2]研究小麦秸秆腐烂时的水提取物,对小麦、燕麦的抑制作用时,发现最大值在 2~6 d,对小麦种子发芽抑制作用可持续 18 d。张玉铭等人在覆盖麦秸的地中,播种玉米后 5~10 d,对玉米苗期生长抑制作用最强。本研究,发现不仅有抑制作用而且还有刺激作用。第 4 周的提取物中, pH8(A)及 pH5(B), pH7(B)对小麦和玉米的根长、芽长具有刺激作用,这一结果与土壤真菌、细菌所产生的化感物质的规律是一致的。Cochran^[1-2]等人在进行小麦残体的研究中,也发现抑制物质与刺激物质的产生有周期性。

3.3 小麦秸秆分解过程中 pH 变化及化感物质产生的环境因子

本实验腐解小麦秸秆所用培养液 pH 值分别为 5, 7, 8, 但在腐解中 pH 发生变化,在 1 周内各处理样品均变为 pH5.8,产生具有抑制作用的化感物质为高峰期,两周后 pH 变为 7.5~8.0,抑制效果减弱或消失。因此,在酸性土壤条件下,不宜进行小麦秸秆还田,应采取其他措施使土壤 pH 有所改变或使秸秆快速分解,以减少有害化感作用,如我国台湾学者应用化学生态原理,查出导致二季稻减产的生物化学机制,酚酸类化感物质起作用,调节土壤 pH 值,使二季稻产量达到一季稻产量水平。

3.4 小麦秸秆分解产生的化感物质与微生物密切相关

小麦秸秆产生化感物质的高峰时间与小麦根区微生物(真菌和细菌)产生的高峰期是一致的,两周内的提取物都是对小麦抑制作用强于对玉米的,4 周后的提取物出现刺激效果。质谱分析结果也表明,有很多类似化合物,这些都充分说明小麦秸秆的分解与微生物的作用有着密切关系。对小麦、玉米的抑制作用是秸秆分解产生的有毒物质和微生物所产生的有毒物质,二者综合作用的结果。土壤微生物种类繁多,各自产生的化感物质也不相同。McCalia, T. M.^[23]认为,小麦秸秆分解产生的化感物质抑制三叶草根瘤生长,大豆根区的某些细菌产生化感物质抑制大豆根瘤菌的生长,从而抑制大豆生长,使大豆变黄。因此,微生物不仅在养分转化过程中起着重要作用,而且在产生有害于作物生长的化感物质方面,也起着重要作用。在农业实践中,充分利用和控制非致病微生物的潜力对实现作物增产,稳产具有重要意义^[23]。

参 考 文 献

- 1 Kimber R W L. pH phytotoxicity from plant residues (I): The relative effect of toxins and nitrogen immobilization on the germination and growth of wheat. *Plant and soil*. 1973, **38**: 347~361
- 2 王世英. 微生物生态学研究进展, 生态学进展, 1989(4): 252~256
- 3 James W, Steinsiek W, Lawrence Oliver R *et al.* Allelopathic potential of wheat (*Triticum aestivum*) straw on selected weed species. *Weeds science*, 1982, **30**: 495~497
- 4 Lynch J M. Phytotoxicity of acetic acid produced in the anaerobic decomposition of wheat straw. *J. of Applied bacteriology* 1977, **42**: 81~87
- 5 Hicks S K, Wendt C W, Gannanway J R. *et al.* Crop ecology Production & management allelopathic effect of wheat straw on cotton germination, emergence and yield. *Crop science*, 1989, **29**: 1057~1061
- 6 Thorne R L. Z., Waller G R, Mcpherson J K, *et al.* Autotoxic effects of old and new wheat straw in conventional tillage and no-tillage wheat soil. *Bot. Bull. Academia Sinica*, 1990, **31**: 35~49

- 7 McCalla, T. M. and Haskins, F. A. PHytotoxic substances from soil microorganism and crop residues. *Bacteriological reviews*, 1964, **28**: 2, 181~207
- 8 马永清, 张玉铭. 小麦秸秆的生化他感效应. *生态学杂志*, 1993, **12**(5): 36~38
- 9 张玉铭, 马永清. 麦秸覆盖夏玉米对苗期生长发育的生化他感作用研究. *生态学杂志*, 1994, **13**(3): 70~72
- 10 周伯瑜, 杨子江. 论有机肥料在农业生态系统中的地位和作用. *生态学杂志*, 1992, **11**(3): 53~55
- 11 Klumber R W L. Phytotoxicity from plant residues(I): The influence of rotted wheat straw on seedling. *Aust. J. Agric. Res.* 1967, **18**: 361~374
- 12 Cochran V L., Euiot L. F. and Papendick R L. The production of pHytooxins from surface crop residues. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 1977, **41**: 903~908
- 13 单卫星. 非致病微生物在植物-病原菌协同进化中的作用. *生态学杂志*, 1993, **12**(6): 54~69
- 14 俞大纶. *植物病理学和真菌学技术汇编*. 北京: 人民教育出版社, 1975. 95

第二届全国生物多样性保护与持续利用 研讨会会议纪要

第二届全国生物多样性保护与持续利用研讨会于1996年11月20~22日在北京香山召开。本次会议是由中国科学院、林业部、农业部、国家环保局和国家教委等单位联合组织,来自84个科研教学和管理单位的160名代表出席了会议,代表面覆盖全国26个省区。

会议分大会主题报告与分组专题报告两种交流形式。洪德元院士、裴维蕃院士、陈灵芝教授、钱迎倩教授、李典谟教授、汪松教授等17位专家做了大会报告,内容包括物种多样性、菌物多样性、生物多样性科学前沿、生物多样性的经济价值、遗传多样性、生物安全、外来生物、自然保护区管理、森林多样性、生物多样性与生命科学、多样性分布格局、野生近缘种及家养动物种质资源等。报告内容丰富、议题广泛,尤其涉及到部分国际生物多样性研究的前沿领域。共有32位代表在分组会上做了专题报告,内容包括:涉危种迁地保护、火烧迹地物种恢复、早春植物多样性、人工林生物多样性、水域生态系统多样性、湿地生物多样性、小种群灭绝的计算机模拟、种群生存力、易地保护、城市建设与多样性变化、水利工程对环境影响等。

中国科学院副院长陈宜瑜院士致闭幕词,他指出,生物多样性保护不仅深为国家社会重视,政府决策,而且日益深入人心,形成公众意识。尤为重要的是生物多样性已成为当今科学界研究的热点之一。积极推进生物多样性保护事业的发展,将有利于我国缓解人口增长和经济发展而带来的压力,并使我国丰富的生物多样性得以妥善保护和生物资源能持续利用。

经过交流和讨论,代表们认为近期应开展的主要研究包括:完成物种本底调查,研究生物多样性的发生和灭绝过程;以物种多样性为基础、重点开展生态系统多样性研究;确定关键问题,在关键地区应用关键技术对关键物种进行深入研究;干扰和生境丧失对物种濒危的影响,物种有效种群的重建与退化生态系统的恢复;生物多样性经济价值的评估及其国际决策和国民经济的影响;生物多样性保护与自然资源持续利用的关键。

这次会议在全体与会代表的共同努力下,取得了满意的结果,大家在有关生物多样性研究目标和内容上达成了共识。这必将会激发广大科技人员的工作热情,而使我国生物多样性研究跃上一个新的台阶。

(马克平供稿)