

宋燕芳, 彭 彤, 马少兰, 等. 枸杞叶片酚酸类物质的自毒作用分析[J]. 江苏农业学报, 2024, 40( 2 ): 213-222.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2024.02.003

## 枸杞叶片酚酸类物质的自毒作用分析

宋燕芳<sup>1,2</sup>, 彭 彤<sup>1,2</sup>, 马少兰<sup>3</sup>, 马彩霞<sup>4</sup>, 高 娜<sup>1,2</sup>, 李凯乐<sup>1,2</sup>, 张传继<sup>1,2</sup>,  
蒲美运<sup>1,2</sup>, 纳小凡<sup>1,2</sup>

(1. 兰州大学生命科学学院, 甘肃 兰州 730000; 2. 细胞活动与逆境适应教育部重点实验室, 甘肃 兰州 730000; 3. 彭阳县第一中学, 宁夏 固原 756500; 4. 宁夏大学生命科学学院, 宁夏 银川 750021)

**摘要:** 自毒作用是植物连作障碍形成的主要原因之一, 严重影响植物生长和粮食生产。前期研究结果表明, 土壤微生物多样性下降、土传病害加重是枸杞园连作障碍形成的重要原因, 但枸杞残体的自毒作用及其物质基础目前仍不明确。为探讨自毒物质的主要来源, 本研究对比分析了枸杞( *Lycium barbarum* L.) 叶、茎、根等组织浸提液对枸杞幼苗生长的影响。浓度梯度试验结果表明, 叶片浸提液的抑制效应高于根、老根皮及茎浸提液。向无枸杞种植历史的农田土壤中添加枸杞叶片干粉能够显著抑制枸杞幼苗生长及叶片光合作用, 证实了枸杞叶片具有自毒作用。联合 UPLC-QTOF-MS 和 GC-TOF-MS 技术对生长季末期枸杞叶片进行代谢组分析, 共鉴定出有机酸 112 种、醇类 41 种、氨基酸 37 种、醛酮类 28 种和糖类 48 种。对其中 24 种有机酸及衍生物的分析发现, 20 种有机物能够不同程度抑制枸杞幼苗初生根生长。其中水杨酸、邻苯二甲酸、对羟基苯甲酸和香豆素在浓度低至 10  $\mu\text{mol/L}$  时仍具显著抑制效应。UPLC 结果进一步显示, 长期连作导致枸杞园土壤香豆素、水杨酸、苯甲酸、阿魏酸和香豆酸积累。此外, 土壤总酚酸含量也随种植年限增加显著增加。这些结果表明土壤中枸杞叶片酚酸能够在长期连作下积累并诱发自毒作用, 这为进一步探索枸杞连作障碍形成机制提供了研究基础。

**关键词:** 枸杞; 连作障碍; 自毒物质; 叶片; 酚酸

中图分类号: S567.19 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2024)02-0213-10

## Analyzing the autotoxicity of phenolic acids from *Lycium barbarum* L. leaves

SONG Yan-fang<sup>1,2</sup>, PENG Tong<sup>1,2</sup>, MA Shao-lan<sup>3</sup>, MA Cai-xia<sup>4</sup>, GAO Na<sup>1,2</sup>, LI Kai-le<sup>1,2</sup>,  
ZHANG Chuan-ji<sup>1,2</sup>, PU Mei-yun<sup>1,2</sup>, NA Xiao-fan<sup>1,2</sup>

(1. School of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 2. Key Laboratory of Cell Activities and Stress Adaptations, Ministry of Education, Lanzhou 730000, China; 3. Pengyang No.1 Middle School, Guyuan 756500, China; 4. School of Life Sciences, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

**Abstract:** Autotoxicity is one of the main reasons for the formation of continuous cropping barriers, which seriously affects plant growth and food production. The results of previous studies showed that the decrease of soil microbial diversity

收稿日期: 2022-12-31

基金项目: 甘肃省自然科学基金项目(22JR5RA461)

作者简介: 宋燕芳(1998-), 女, 内蒙古呼和浩特人, 硕士研究生, 主要从事植物与微生物互作研究。(E-mail) 15771555600@163.com

通讯作者: 纳小凡, (E-mail) naxf@lzu.edu.cn

and the aggravation of soil-borne diseases were the important reasons for the formation of continuous cropping obstacles. But the self-toxic effects and the material basis of residues of *Lycium barbarum* were still unclear. In order to study the main sources of autotoxins, the effects of leaf, stem and root extracts of *Lycium barbarum* L. on the growth

of *Lycium barbarum* L. seedlings were studied. The results of concentration gradient test showed that the inhibition effect of leaf extract was higher than that of root, old root bark and stem extract. The growth and photosynthesis of *Lycium barbarum* L. seedlings were significantly inhibited by adding *Lycium barbarum* L. leaf powder to the farmland soil without *Lycium barbarum* L. planting history. It was proved that the leaves of *Lycium barbarum* L. had self-toxicity. Combined with UPLC-QTOF-MS and GC-TOF-MS for metabolome analysis of *Lycium barbarum* L. leaves at the end of growing season, a total of 112 organic acids, 41 alcohols, 37 amino acids, 28 aldehydes and ketones and 48 sugars were identified. Analysis of 24 kinds of organic acids and derivatives showed that 20 kinds of organic compounds could inhibit the primary root growth of *Lycium barbarum* L. seedlings. Salicylic acid, phthalic acid, p-hydroxybenzoic acid, and coumarin still showed significant inhibitory effects at concentrations as low as 10  $\mu\text{mol/L}$ . UPLC results further showed that long-term continuous cropping led to the accumulation of coumarin, salicylic acid, benzoic acid, ferulic acid and coumaric acid. In addition, the content of total phenolic acids in soil increased significantly with the increase of planting years. These results indicated that phenolic acids could accumulate and induce autotoxicity in the leaves of *Lycium barbarum* L. under long-term continuous cropping, which provided a basis for further research on the mechanism of continuous cropping failure.

**Key words:** *Lycium barbarum* L.; continuous cropping obstacle; autotoxins; leaf; phenolic acid

宁夏枸杞 (*Lycium barbarum* L.) 隶属茄科 (Solanaceae)、枸杞属 (*Lycium*), 兼具经济和生态价值, 已成为中国西北干旱、半干旱生态脆弱区农民经济增收和生态保护的特色产业之一<sup>[1]</sup>。然而, 在集约化、规模化生产的同时, 长期连作导致枸杞产量减少、品质下降以及病虫害加重等连作障碍<sup>[2]</sup>, 严重阻碍了区域农村经济可持续发展。

目前认为, 土壤理化性质变异、土传病害加重和自毒作用是植物连作障碍形成的三大主要原因<sup>[3]</sup>。研究发现, 长期种植枸杞会导致土壤氮、磷元素大量积累, 全盐含量及电导率升高, 诱发土壤 pH 值下降和次生盐碱化<sup>[4]</sup>。除土壤微生物  $\alpha$  多样性降低外, 土壤理化性质改变驱动了枸杞园土壤及枸杞根际土壤微生物群落结构变化<sup>[5]</sup>, 导致镰刀菌属、链格孢属等病原真菌在枸杞根际和非根际土壤大量富集<sup>[6-7]</sup>。一项研究发现, 长期连作导致的土壤理化性质变化迫使枸杞与其根际土壤细菌群落之间的互作减弱, 即解偶联<sup>[6]</sup>。由于根际细菌群落在植物生长和生防过程中发挥重要作用<sup>[8]</sup>, 因此, 枸杞与根际细菌的解偶联可能影响了细菌群落的正常功能, 造成枸杞生长势减弱和土传病害增加<sup>[6]</sup>。此外, 对土壤线虫群落的结果也表明, 连作超过 9 年会引起枸杞园土壤线虫群落多样性下降和致病性线虫群落丰度增加等负面效应<sup>[9]</sup>。虽然前人对枸杞连作障碍的土壤微生物生态学机制做了详尽研究, 但在连作过程中单一型碳源 (如枸杞凋落物和根系分泌物) 的输入影响枸杞生长的作用机制尚不明确。

自毒作用是指植物通过挥发、分泌或凋落物的

形式向环境释放有机物, 抑制自身或同类植物种子萌发和植株生长的现象, 广泛存在于多年生植物中<sup>[10]</sup>。目前, 已从植物组织和根系分泌物中鉴定出如酚酸、长链脂肪酸、萜类和生物碱等多种自毒物质<sup>[3]</sup>。其中, 酚酸是植物中最为常见的一类自毒物质, 其作用已在多种植物中被证实。例如, 赵晓玲等<sup>[11]</sup>从枸杞根系分泌物中鉴定出阿魏酸、咖啡酸和肉桂酸等多种酚酸。利用定量构效关系的分析结果表明, 这些酚酸均能抑制枸杞种子萌发, 推测这些物质可能介导了枸杞的自毒作用<sup>[12]</sup>。在对枸杞叶片抗氧化机制的研究中发现, 枸杞叶片富含山柰酚、绿原酸、芦丁和龙胆酸等活性物质<sup>[13]</sup>, 这些有机物能够抑制苹果、苜蓿和玉米等植物生长<sup>[14-16]</sup>, 推测叶片可能具有抑制枸杞生长的自毒效应。然而, 目前有关枸杞自毒作用、自毒物质的主要组织来源及其在连作土壤中的积累情况尚未见报道。为探究这些问题, 本研究通过对比不同枸杞组织浸提液抑制枸杞幼苗生长的效果, 结合 UPLC-QTOF-MS、GC-TOF-MS 和 UPLC 等方法分析了生长季末期枸杞叶片有机物组成及其所含酚酸在枸杞园土壤中的积累情况, 初步揭示枸杞叶片自毒作用的主要酚酸种类, 为进一步理解枸杞连作障碍形成机理、探索枸杞可持续种植模式提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 枸杞组织浸提液制备及自毒作用强度分析

为分析枸杞自毒物质的主要来源, 于 2016 年 10 月中旬在银川市南梁农场采集枸杞叶片、根 (直

径<2 mm根系)、茎段和老根皮(直径>10 mm根的皮肤)。组织材料经阴干、粉碎后各取 500 g,加入 80%乙醇,于室温、避光条件下浸提 7 d。浸提液过滤后,低温蒸干制成浸膏。浸膏用少量 Dimethyl sulfoxide(DMSO)溶解,取一定量加至 1/4 Hoagland 培养液,配置成质量浓度为 1 mg/L、10 mg/L、20 mg/L、50 mg/L和 100 mg/L的水培液;向 1/4 Hoagland 培养液中加入对应量 DMSO 作为对照培养液。选取萌发程度一致的枸杞种子进行水培处理,于 25 ℃、16 h/8 h 光暗周期下培养 7 d 后,测量幼苗初生根长度。

## 1.2 枸杞落叶对枸杞幼苗生长和光合作用的影响分析

为验证枸杞叶片的自毒效应,首先分析了农田表层土壤(无枸杞种植历史)中添加叶片对枸杞幼苗生长的影响。土壤样本带回实验室后,阴干、过 2 mm 孔径的网筛,添加 10%洗净河沙并充分混匀后,分别加入 0 mg/g、2 mg/g、4 mg/g、8 mg/g和 10 mg/g枸杞叶片干粉(生长季末期叶片,阴干后粉碎),充分混匀后装入容积为 1 L 的花盆。加去离子水至 40%田间最大持水量,每盆种植萌发一致的枸杞幼苗 9 株。于 25 ℃、16 h/8 h 光暗周期下培养,期间补充去离子水。培养 30 d 后测定幼苗地上部鲜质量、根系长度和叶片光合作用强度。枸杞叶片光合作用强度利用 LI6400 便携式光合仪进行测定。光合仪参数设置为样本室内气流速率 500  $\mu\text{mol/s}$ ,样品室和参比室  $\text{CO}_2$  浓度均为 400  $\mu\text{mol/mol}$ ,室内光照度为 800  $\mu\text{mol}/(\text{m} \cdot \text{s})$ ,叶面积为 6  $\text{cm}^2$ 。

## 1.3 不同连作年限土壤中枸杞落叶的自毒效应分析

为分析叶片在不同连作年限枸杞园土壤中的自毒效应,于宁夏银川市南梁农场和石嘴山市惠农区分别采集连作 5 年、10 年、20 年枸杞地表层(0~20 cm)土壤,宁夏银川市南梁农场枸杞连作 5 年、10 年、20 年土壤分别记为 N5、N10、N20,石嘴山市惠农区连作 5 年、10 年、20 年土壤分别记为 H5、H10、H20。土壤样本的理化因子及微生物群落信息见前期研究结果<sup>[7]</sup>。土壤样本带回实验室后去除植物残体,过 2 mm 孔径的网筛并阴干,加入 10%无菌河沙和 10 mg/g枸杞叶片干粉(生长季末期叶片,阴干后粉碎),充分混匀、装盆。添加无菌去离子水至 40%田间最大持水量,其中一半土壤种植枸杞幼苗。

同时,为进一步探索降解过程对叶片自毒作用的影响,将另一半土壤置于 25 ℃黑暗中培养,经 60 d 降解后种植枸杞幼苗。幼苗培养条件同材料与方法 1.2。培养 30 d 后测定幼苗地上部鲜质量。

## 1.4 枸杞叶片代谢组分析

采集生长季末期的枸杞叶片,冻干后粉碎,用 GC-TOF-MS 和 UPLC-QTOF-MS 分析。叶片干粉加入适量提取剂(甲醇、乙腈、水体积比为 2:2:1),于研磨仪振荡萃取 10 min,加入 20  $\mu\text{l}$  核糖醇。溶液经 4 ℃、13 000 r/min 离心 15 min,将所得上清液真空干燥。干燥有机物经衍生化(BSTFA)后,利用 Agilent 7890 气相色谱-飞行时间质谱联用仪进行检测<sup>[17]</sup>。进样量 1  $\mu\text{l}$ ,进样温度 280 ℃;柱温 50 ℃起始,10 ℃/min 升至 310 ℃,保持 8 min;流速为 1.0 ml/min。数据分析使用 Chroma TOF 4.3X 软件和 LECO Fiehn Rtx5 数据库完成。

UPLC-QTOF-MS 分析采用安捷伦 1290 超高效液相串联 AB Sciex Triple TOF6600 高分辨质谱仪系统完成。取叶片干粉,加入提取剂(甲醇:乙腈:水=2:2:1,体积比),再加入 L-2-氯苯氨酸,涡旋混匀后冰水浴超声振荡 10 min,零下 20 ℃静置 1 h 后,4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min;上清液上机检测。流动 A 相为醋酸铵(25 mmol/L)和氨水(25 mmol/L),B 相为乙腈,进样量 2  $\mu\text{l}$ 。质谱条件参照 Ivanisevic 的方法<sup>[18]</sup>。

## 1.5 枸杞叶片不同酚酸自毒效应评价

酚酸标准品溶解于少量 DMSO 后,用去离子水配成 100 mmol/L 母液。后用 1/4 Hoagland 稀释成 1  $\mu\text{mol/L}$ 、10  $\mu\text{mol/L}$ 、100  $\mu\text{mol/L}$ 和 1 000  $\mu\text{mol/L}$ 工作液,用于水培处理萌发一致的枸杞幼苗。幼苗转至 25 ℃、16 h/8 h 光暗周期下培养 7 d 后测定初生根长度。

## 1.6 土壤总酚酸提取及酚酸含量测定

准确称取 25 g 低温冻干土样于三角瓶中,加入 50 ml 1 mol/L NaOH 溶液,于恒温摇床 180 r/min 振荡过夜。次日超声振荡 30 min,10 000 r/min 离心 10 min,上清液用 HCl 酸化至 pH=2.5。静置 2 h 后 10 000 r/min 离心 10 min,上清液过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜后,直接用于 UPLC 分析和总酚酸含量测定。UPLC 上机条件参照 Li 等<sup>[19]</sup>的方法进行;总酚酸含量利用 Folin-Ciocalteu 方法<sup>[20]</sup>测定。

### 1.7 数据处理与分析

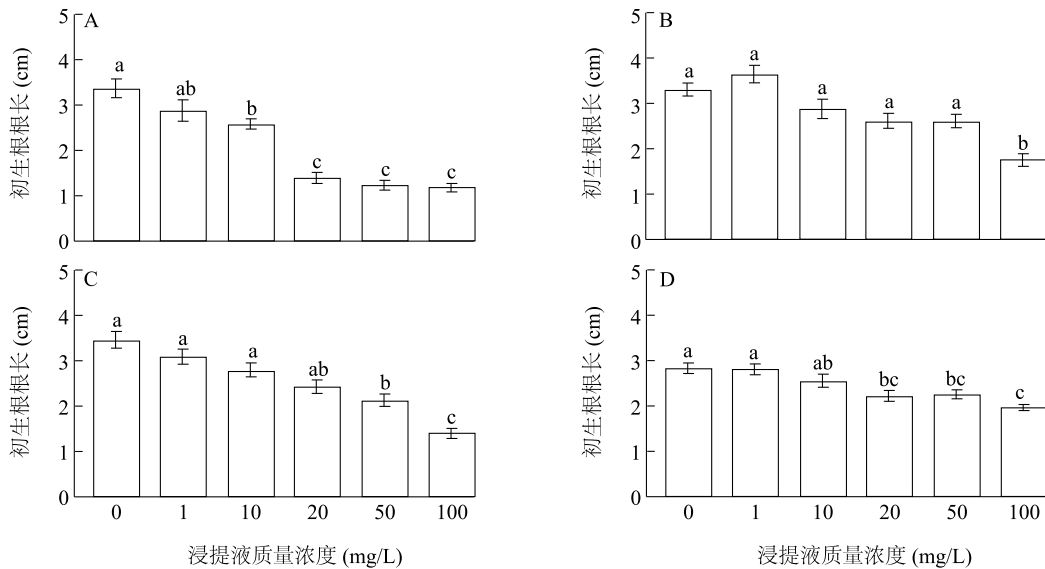
单因素方差分析采用 SPSS 22.0 完成,数据的正态性采用 Shapiro-Wilk 检验。绘图由 Prism 9.0 软件完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同枸杞组织浸提液自毒作用强度

利用不同浓度枸杞叶片、根、茎和老根皮浸提液水培枸杞幼苗。与对照相比,质量浓度为

100 mg/L 时所有组织浸提液均显著抑制枸杞幼苗初生根根长 ( $P < 0.05$ ) (图 1)。随组织浸提液质量浓度降低,50 mg/L 茎浸提液开始失去抑制作用,10 mg/L 老根皮和 20 mg/L 根浸提液开始失去抑制作用(图 1)。与对照相比,10 mg/L 枸杞叶片浸提液仍能够显著抑制枸杞幼苗初生根根长,其抑制率达 23.4% ( $P < 0.05$ ) (图 1A)。结果表明,枸杞不同组织均有一定自毒效应,但叶片的自毒作用最强。



A: 枸杞叶片; B: 茎; C: 根; D: 老根皮。不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

图 1 枸杞不同组织浸提液对枸杞幼苗初生根生长的影响

Fig.1 Effects of different tissue extractions on primary root growth of *Lycium barbarum* L. seedlings

为验证枸杞叶片的自毒效应,向无枸杞种植历史的大田土壤中添加不同含量枸杞叶片干粉,通过盆栽试验分析枸杞叶片对枸杞幼苗生长和光合作用的影响。结果表明,与对照相比,添加 4 mg/g 枸杞叶片干粉显著抑制幼苗初生根根长和地上部鲜质量 ( $P < 0.05$ ) (图 2A、图 2B);当枸杞叶片干粉含量达到 8 mg/g 时,枸杞幼苗地上部鲜质量仅为对照的 25.0% (图 2B);10 mg/g 枸杞叶片干粉处理的幼苗无法存活(图 2A、图 2B)。对光合作用分析发现,4 mg/g 枸杞叶片干粉显著抑制枸杞幼苗光合作用,导致叶片光合效率、气孔导度和蒸腾速率显著降低 ( $P < 0.05$ ) (图 2)。

### 2.2 枸杞不同连作年限样地中枸杞叶片的自毒效应

对枸杞不同种植年限土壤的研究发现,除 H5

外,连作土壤添加枸杞叶片干粉后,对枸杞幼苗的生长表现出抑制效应,这种抑制作用在 H10、N10 中最为明显 ( $P < 0.01$ ) (图 3A)。添加枸杞叶片干粉后土壤经 60 d 室内培育,对枸杞幼苗生长的抑制效应减弱甚至消失,仅在 N20 土壤中,与对照相比,仅添加枸杞叶片干粉土壤中生长的枸杞幼苗地上部鲜质量显著降低 ( $P < 0.05$ ),存在抑制效应(图 3B)。这些结果表明,枸杞落叶诱发的自毒作用可以不同程度加重其连作障碍,且这种抑制效应经一段时间降解后可以得到缓解。

### 2.3 枸杞叶片代谢组分析

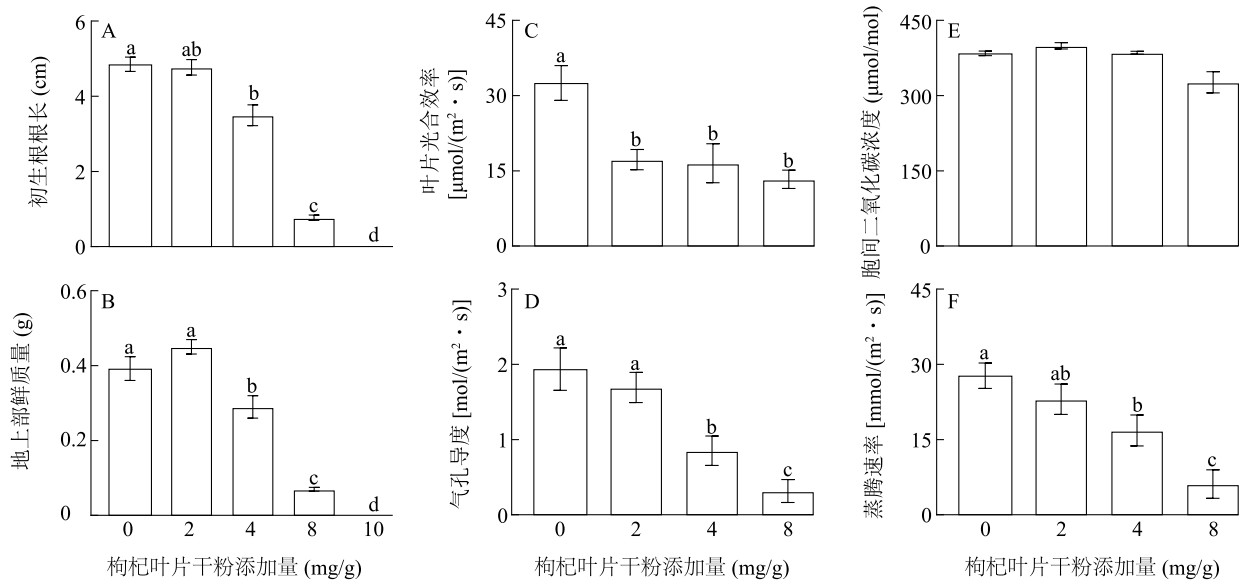
为解析枸杞叶片中的主要自毒物质成分,联合超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱 (UPLC-QT-OF-MS) 和气相色谱-飞行时间质谱 (GC-TOF-MS) 技术分析了生长季末期叶片的有机物组成。两种方法



共检出有机物 646 种,其中有机酸 112 种、醇类 41 种、氨基酸 37 种、醛酮类 28 种、糖类 48 种、其他物质 108 种,未知物质 272 种,表 1 列出部分主要有机酸。

对所测样本的结果分析发现,共有 64 种有机酸在超过 2/3 的样本中被同时检出( $n=6$ ),其中酚酸类物质共 34 种(表 2)。基于代谢组结果中各有机酸的检出频率和丰度以及前人关于有机酸自毒效应的研究结果,选取了其中 24 种有机酸及其衍生物,分析了这些有机物对枸杞幼苗初生根根长的影响。

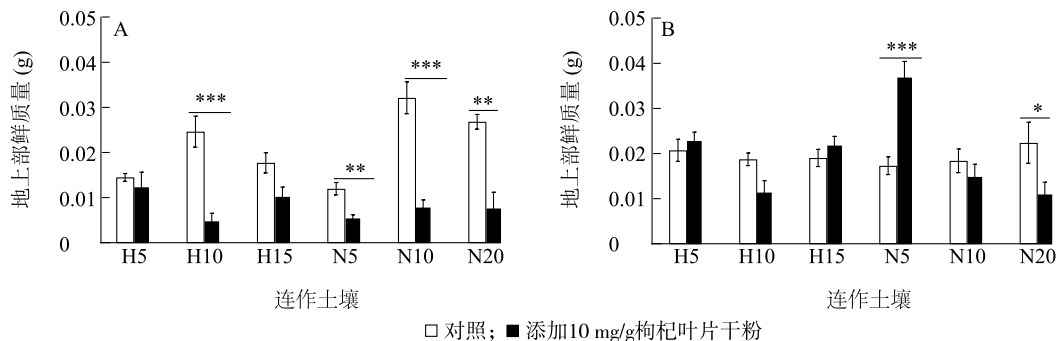
结果表明,在 1 000  $\mu\text{mol/L}$  处理浓度下,20 种有机酸存在显著抑制效应( $P<0.05$ ),相较于对照,水杨酸、4-羟基苯乙酸、香豆酸、肉桂酸、阿魏酸、高藜芦酸及苯甲酸对幼苗初生根生长的抑制率大于 50%(表 3)。随处理浓度降低,100  $\mu\text{mol/L}$  水杨酸、4-羟基苯乙酸、龙胆酸、绿原酸、香豆酸、高藜芦酸、苯甲酸和香豆素等对初生根生长具有显著抑制效应,而水杨酸、邻苯二甲酸、对羟基苯甲酸和香豆素在浓度低至 10  $\mu\text{mol/L}$  时仍能够显著抑制幼苗初生根生长( $P<0.05$ )(表 3)。



不同小写字母表示在 0.05 水平显著差异。

图 2 土壤中添加枸杞叶片干粉对枸杞幼苗生长及叶片光合作用的影响

Fig.2 Effects of adding dry powder of *Lycium barbarum* L. leaves to soil on the growth and photosynthesis of seedlings



A: 添加 10 mg/g 枸杞叶片干粉未培育; B: 添加 10 mg/g 枸杞叶片干粉后培育 60 d。N5、N10、N20: 银川市南梁农场连作 5 年、10 年和 20 年枸杞园土壤; H5、H10、H20: 石嘴山市惠农区连作 5 年、10 年和 15 年枸杞园土壤。\* 表示差异达 0.05 水平; \*\* 表示差异达 0.01 水平; \*\*\* 表示差异达 0.001 水平。

图 3 不同连作年限枸杞园土壤中枸杞叶片的抑制效应

Fig.3 Inhibitory effect of *Lycium barbarum* L. leaves in the soil of *Lycium barbarum* L. fields with different continuous cropping years

表 1 枸杞叶片代谢组结果分析

Table 1 Results of metabolomic analysis of *Lycium barbarum* L. leaves

方法	模式	已知结构	有机酸	醇类	氨基酸	醛酮类	糖类	其他
GC-MS	—	336	99(30%)	40(12%)	34(10%)	26(8%)	45(13%)	92(27%)
LC-MS	正离子	48	17(35%)	0(0)	5(10%)	2(4%)	7(16%)	17(35%)
	负离子	50	19(38%)	1(2%)	5(10%)	2(4%)	7(14%)	16(32%)

GC-MS:气相色谱-飞行时间质谱;LC-MS:超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱。

表 2 枸杞叶片中主要有机酸

Table 2 Main organic acids determined in *Lycium barbarum* L. leaves

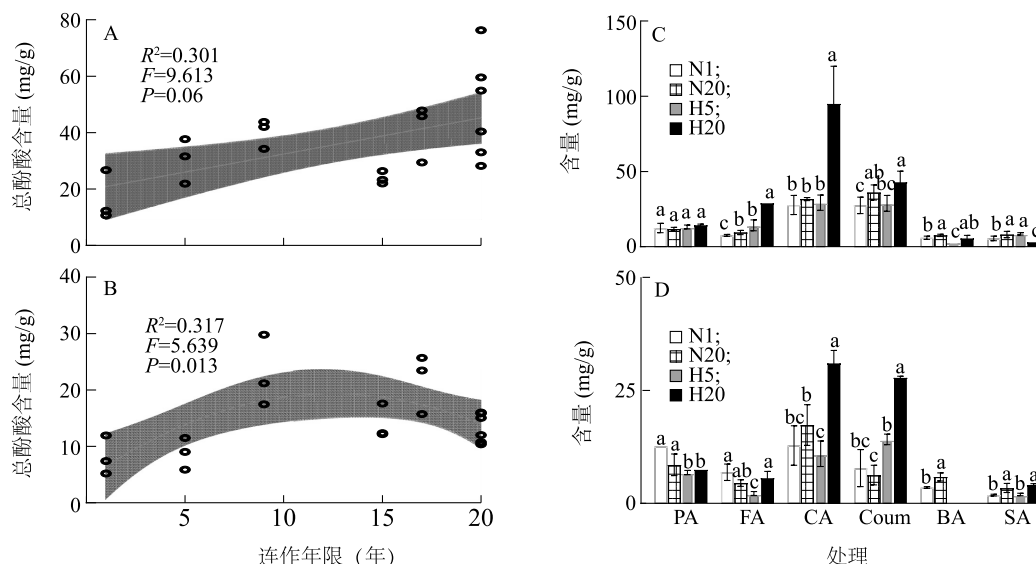
名称	测定方法	CAS 登记号	名称	测定方法	CAS 登记号
乳酸	GC-MS	50-21-5	对羟基苯甲酸	GC-MS	99-96-7
乙醇酸	GC-MS	79-14-1	4-羟基苯乙酸	GC-MS	156-38-7
草酸	GC-MS	144-62-7	2,4-二氨基丁酸	GC-MS	305-62-4
3-羟基丙酸	GC-MS	503-66-2	乳酸	GC-MS	65-86-1
丙二酸	GC-MS	141-82-2	异香兰酸	GC-MS	121-34-6
2-羟基戊酸	GC-MS	617-31-2	龙胆酸	GC-MS	490-79-9
甲基丙二酸	GC-MS	516-05-2	莽草酸	GC-MS	138-59-0
顺丁烯二酸	GC-MS	110-16-7	柠檬酸	GC-MS	5949-29-1
琥珀酸	GC-MS	110-15-6	3,4-二羟基苯乙酸	GC-MS	99-50-3
D-甘油酸	GC-MS	6000-40-4	奎尼酸	GC-MS	77-95-2
吡啶甲酸	GC-MS	98-98-6	3-(4-羟基苯基)乳酸	GC-MS	6482-98-0
反丁烯二酸	GC-MS	110-17-8	D-半乳糖醛酸	GC-MS	685-73-4
柠康酸	GC-MS	498-23-7	4-羟基肉桂酸	GC-MS	501-98-4
2,3-二甲基琥珀酸	GC-MS	13545-04-5	泛酸	GC-MS	79-83-4
戊二酸	GC-MS	110-94-1	棕榈酸	GC-MS	57-10-13
2-脱氧季酮酸	GC-MS	1518-61-2	阿魏酸	GC-MS	1135-24-6
3-氨基异丁酸	GC-MS	144-90-1	咖啡酸	GC-MS	331-39-5
2-甲基苹果酸	GC-MS	6263-10-8	十七(烷)酸	GC-MS	506-12-7
L-苹果酸	GC-MS	97-67-6	亚油酸	GC-MS	60-33-3
水杨酸	GC-MS	69-72-7	硬脂酸	GC-MS	57-11-4
4-氨基丁酸	GC-MS	56-12-2	反式-芥子酸	GC-MS	530-59-6
蔗糖酸	GC-MS	7306-96-9	花生酸	GC-MS	506-30-9
2-羟基-3-异丙基琥珀酸	GC-MS	16048-89-8	乳糖酸	GC-MS	96-82-2
3-苯基乳酸	GC-MS	828-01-3	绿原酸	GC-MS	327-97-9
酒石酸	GC-MS	133-37-9	香豆素	LC- MS	91-64-5
邻苯二甲酸	LC- MS	88-99-3	苯甲酸	LC-MS	65-85-0
香豆酸	LC- MS	501-98-4	高黎芦酸	LC-MS	93-40-3
3-羟基癸酸	LC-MS	14292-26-3	2-氧代己二酸	LC-MS	3184-35-8
肉豆蔻酸	LC-MS	544-63-8	3-羟基-3-甲基谷氨酸	LC-MS	503-49-1
3-乙酰基-11-酮基-β-乳香酸	LC-MS	67416-61-9	2-羟基-4-甲基戊酸	LC-MS	498-36-2
3-甲氧基-4-羟基扁桃酸	LC-MS	55-10-7	3,5-二羟基-3-甲基戊酸	LC-MS	150-97-0
2-乙基-2-羟基丁酸	LC-MS	3639-21-2	香草酸	LC-MS	121-34-6

GC-MS:气相色谱-飞行时间质谱;LC-MS:超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱。

## 2.4 不同连作年限枸杞园土壤酚酸含量变化

对不同连作年限枸杞园表层(0~20.0 cm)及亚表层(20.1~40.0 cm)土壤总酚酸的分析发现,表层土壤总酚酸含量随连作年限增加显著增加(图4A)。亚表层土壤的总酚酸含量则成单峰模型,其增幅在连作9年之后逐渐趋于平稳(图4B)。UPLC结果表明,与连作1年相比,南梁地区连作20年枸

杞园表层土壤(N20)中阿魏酸、香豆素、苯甲酸和水杨酸(图4C)以及亚表层土壤中苯甲酸和水杨酸(图4D)的含量均显著增加( $P<0.05$ )。而惠农地区连作20年土壤(H20)表层和亚表层土壤中阿魏酸、香豆酸和香豆素含量较该地区连作5年土壤(H5)显著增加( $P<0.05$ ),且水杨酸在亚表层土壤积累(图4D)。



A:不同连作年限枸杞园表层土壤总酚酸含量的变化;B:不同连作年限枸杞园亚表层土壤总酚酸含量的变化。C:UPLC分析不同连作年限枸杞园表层土壤中不同酚酸含量的变化;D:UPLC分析不同连作年限枸杞园亚表层土壤中不同酚酸含量的变化。N1、N20:银川市南梁农场种植1年、连作20年枸杞土壤;H5、H20:石嘴山市惠农区连作5年、20年枸杞土壤。PA:邻苯二甲酸;FA:阿魏酸;CA:香豆酸;Coum:香豆素;BA:苯甲酸;SA:水杨酸。同一有机酸不同连作土壤间不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

图4 不同连作年限枸杞园土壤中酚酸的积累规律

Fig.4 Accumulation of phenolic acid in the soil of *Lycium barbarum* L. fields with different continuous cropping years

为进一步验证多种低浓度酚酸在积累时是否存在协同效应,利用香豆素、水杨酸、苯甲酸、阿魏酸和香豆酸的混合液(每种浓度为 $1\text{ }\mu\text{mol/L}$ )处理枸杞幼苗。结果表明,酚酸混合液处理的幼苗初生根根长仅为对照的76.8%。由于这些酚酸在 $1\text{ }\mu\text{mol/L}$ 下均不影响枸杞幼苗根的生长(表3),因此这一结果说明供试酚酸的抑制效应具有一定加成作用,在较低浓度下能够进一步联合抑制枸杞幼苗根的生长和发育,暗示长期连作导致的酚酸积累,即使在低浓度时可能仍存在自毒作用效应。

## 3 讨论

### 3.1 叶片是枸杞自毒物质的主要来源

对不同枸杞组织浸提液的分析结果表明,枸杞

叶、根、茎和老根皮均具有一定的自毒效应,但叶片浸提液的抑制作用最为明显,说明落叶是诱导枸杞自毒作用发生的主要组织来源。这一发现与毛竹等植物中的研究结论类似<sup>[21]</sup>。对田间条件下枸杞落叶量的测定结果表明,20年树龄枸杞树落叶干质量约为 $193\text{ g/m}^2$ ( $SD=37.3, n=10$ ),相当于向表层土壤中添加约 $5\text{ mg/g}$ 的风干叶片。结合盆栽试验结果推测,大树龄枸杞落叶量能够抑制自身根系生长和发育。由于枸杞落叶期与冬灌时间较近,在土壤封冻之前,落叶中的有机物借助灌溉水释放至土壤,进而影响枸杞生长。这一发现与在田间调查时部分杞农反应的枸杞园东南角枸杞长势较差的现象一致。由于中国西北地区冬季多西北风,落叶在枸杞园东南部坑洼区积累并可能诱发了自毒作用。

表 3 不同有机酸对枸杞幼苗初生根根长的影响

Table 3 Effects of different organic acids on primary root length of *Lycium barbarum* seedlings

有机酸	枸杞幼苗初生根相对根长				
	有机酸浓度为 0 μmol/L	有机酸浓度为 1 μmol/L	有机酸浓度为 10 μmol/L	有机酸浓度为 100 μmol/L	有机酸浓度为 1 000 μmol/L
乳酸	99.5±13.6a	107.0±10.1a	98.8±11.3a	95.1±9.2a	89.6±8.2a
甘氨酸	102.4±4.1a	94.2±6.0ab	97.2±7.9ab	96.9±11.4a	89.5±7.6b
琥珀酸	100.0±11.2a	92.8±8.7a	93.3±9.7a	95.6±14.9a	70.2±10.9b
甘醇酸	100.0±2.0a	94.2±8.9a	101.8±9.1a	96.4±7.1a	101.0±11.3a
反丁烯二酸	101.1±11.0a	94.3±7.9a	91.0±8.3a	86.6±9.5a	77.7±12.5b
苹果酸	100.8±5.3a	93.2±7.0a	93.2±12.2a	86.8±13.4b	85.8±9.5b
羟基丁酸	97.8±5.4a	103.1±6.9a	101.5±4.6a	103.7±4.0a	101.4±8.5a
水杨酸	101.7±11.1a	83.5±14.2ab	78.2±15.1b	51.1±15.6c	18.3±8.9d
4-羟基苯乙酸	102.4±4.1a	95.9±7.7ab	92.5±5.0ab	89.1±10.2b	38.3±22.1c
龙胆酸	100.0±7.6a	81.0±16.8b	94.7±11.7a	69.1±4.3bc	53.6±5.8c
柠檬酸	101.1±11.0a	95.6±7.6a	93.6±8.0a	92.6±7.4a	80.0±3.9b
邻苯二甲酸	100.0±7.6a	94.6±5.2a	87.7±8.9b	89.4±4.8ab	70.6±4.7c
对羟基苯甲酸	97.8±5.4ab	109.9±6.4a	92.6±9.1b	95.8±8.1b	82.3±17.2c
2,5-二羟基苯甲酸	97.8±5.4a	102.7±8.0a	97.7±6.7a	94.6±7.1a	74.2±14.2b
绿原酸	100.0±6.5a	100.1±5.3a	103.8±5.3a	86.9±5.7b	63.1±8.6c
香豆酸	101.1±11.0a	96.7±6.7a	96.3±5.8a	83.7±9.6b	34.4±2.4c
香草酸	99.5±10.3a	91.6±10.0a	94.8±3.4a	91.6±9.0a	70.0±12.2b
肉桂酸	103.7±14.2a	97.2±15.6a	93.5±17.8a	91.9±19.6a	31.5±19.6b
阿魏酸	100.0±4.7a	110.7±10.0a	103.0±10.6a	101.6±7.7a	40.3±3.0b
咖啡酸	99.5±13.6a	93.0±15.2ab	99.3±17.3a	93.4±11.2ab	83.6±8.7b
高藜芦酸	102.2±11.8a	96.3±16.4a	88.8±12.0a	68.7±12.1b	38.3±6.2c
奎尼酸	100.6±7.4a	84.2±15.6a	89.2±20.2a	85.4±20.9a	86.3±9.4a
苯甲酸	98.5±5.1a	97.0±5.8ab	96.5±10.2ab	83.7±6.3b	47.2±20.6c
香豆素	98.4±5.4a	90.2±21.9ab	82.9±15.8b	42.9±21.2c	15.0±13.3d

表中为相对根长,相对根长=处理/对照×100。同一行数据后不同小写字母表示差异达显著水平( $P<0.05$ )。

3.2 酚酸积累与枸杞连作障碍形成

室内盆栽试验结果表明,在土壤中施入枸杞叶片粉末能够显著抑制枸杞幼苗的生长和光合作用。鉴于酚酸类有机物种类超过叶片中检出有机酸种类的 30.4%,且其中 4-羟基苯乙酸、香豆酸、对羟基苯甲酸、2,5-二羟基苯甲酸、香草酸、肉桂酸、高藜芦酸、水杨酸、苯甲酸和阿魏酸等已被证实具有自毒效应<sup>[3]</sup>,能够通过诱发植物细胞氧化胁迫、抑制光合作用等影响不同植物生长<sup>[22]</sup>。由此推测酚酸类物质可能在枸杞叶片自毒作用及枸杞连作障碍形成中发挥着重要作用,在酚酸抑制效应、土壤总酚酸及酚酸含量测定等试验中得到了证实。

随种植年限增长,枸杞园土壤中水杨酸、香豆酸、阿魏酸、苯甲酸和香豆素等酚酸含量均有积累趋势。UPLC 结果表明,水杨酸在连作枸杞地土壤中积累浓度较低,而香豆素或香豆酸的浓度则相对较高。其中,香豆酸在石嘴山市惠农区连作 20 年枸杞土壤(H20)地表层和亚表层中的含量分别高达 94.9 mg/g 和 31.0 mg/g(图 4)。结合水杨酸的有效抑制浓度明显低于香豆素和香豆酸,推测这两类有机物在枸杞叶片自毒作用形成中可能扮演了不同的角色,即水杨酸等在叶片落入土壤后立即产生强烈的自毒效应,而香豆素和香豆酸则在枸杞叶片自毒效应甚至连作障碍中产生长期效应,但这一假设仍



需通过原位土壤试验进行分析和验证。

除直接抑制枸杞生长外,枸杞叶片中的酚酸在进入土壤后仍可能通过改变微生物群落的结构和功能,间接影响枸杞生长。例如,香豆素可以作为信号分子双向调控植物-微生物互作,驱动植物根系微生物的组装<sup>[23-24]</sup>;而水杨酸、苯甲酸和肉桂酸等酚酸则被证实具有激活镰刀菌属真菌增殖及致病性等功能<sup>[25-26]</sup>。在长期连作条件下,落叶等凋落物不仅作为输入性碳源直接驱动土壤微生物的群落组成,其所含酚酸等活性物质也可通过调节特殊微生物群落功能或活性,改变枸杞-土壤微生物互作关系诱发连作障碍。在未来,结合叶片原位降解、微生物分离与功能分析等试验,阐释枸杞叶片及其所含酚酸与枸杞园土壤微生物群落功能间的关系,对于进一步揭示枸杞连作障碍机制尤为重要。

### 3.3 长期连作可能影响枸杞园土壤对凋落物的降解能力

经 60 d 降解处理后,枸杞叶片的自毒作用虽然在连作年限相对较短的土壤中有所减弱,但其抑制效应在连作 20 年土壤中仍然存在,说明当连作年限达到一定程度,部分枸杞园土壤微生物对叶片的降解能力可能受到干扰。因此,长期连作不仅导致自毒物质积累,而且可能延长了当季叶片凋落物的自毒效应周期。前期研究结果表明,长期连作会导致枸杞园土壤板结、透气性变差、次生盐碱化<sup>[27]</sup>、土壤微生物群落多样性丧失<sup>[7]</sup>和代谢功能改变<sup>[28]</sup>。在连作条件下,土壤生物和非生物因素的变化可能对连作土壤中枸杞凋落物的降解造成负面效应,导致自毒物质积累并诱发自毒作用。由于去除生长季末期枸杞落叶需要大型设备并导致种植成本增加,维持或提高连作条件下枸杞园土壤对叶片等凋落物的降解能力,将成为减轻枸杞自毒作用甚至连作障碍的有效途径之一。

## 4 结论

综上,本研究的试验结果证实叶片具有明显的自毒效应,能够显著抑制枸杞幼苗生长和光合作用。叶片中的香豆素、水杨酸、苯甲酸、阿魏酸和香豆酸等酚酸类物质具有较强自毒效应,能够在长期连作下积累,可能在枸杞连作障碍形成中发挥重要作用。

### 参考文献:

[1] 任 珩,王君兰.我国枸杞产业发展现状及提升路径[J].科技

促进发展,2019,15(3):310-317.

- [2] 纳小凡,郑国旗,邢正操,等.连作对再植枸杞根际细菌群落多样性和群落结构的影响[J].土壤学报,2017,54(5):1280-1292.
- [3] HUANG L F, SONG L X, XIA X J, et al. Plant-soil feedbacks and soil sickness: from mechanisms to application in agriculture [J]. Journal of Chemical Ecology, 2013, 39(2): 232-242.
- [4] ALI A, GHANI M I, DING H, et al. Arbuscular mycorrhizal inoculum coupled with organic substrate induces synergistic effects for soil quality changes, and rhizosphere microbiome structure in long-term monocropped cucumber planted soil [J]. Rhizosphere, 2021, 20: 100428.
- [5] 马少兰,马彩霞,徐鹏鑫,等.再植枸杞根际真菌群落对长期连作的响应研究[J].土壤学报,2019,56(6):1493-1503.
- [6] NA X F, MA C X, MA S L, et al. Monocropping decouples plant-bacteria interaction and strengthens phytopathogenic fungi colonization in the rhizosphere of a perennial plant species [J]. Plant and Soil, 2019, 445(1): 549-564.
- [7] NA X F, MA S L, MA C X, et al. *Lycium barbarum* L. (goji berry) monocropping causes microbial diversity loss and induces *Fusarium* spp. enrichment at distinct soil layers [J]. Applied Soil Ecology, 2021, 168: 104107.
- [8] DURÁN P, THIERGART T, GARRIDO-OTER R, et al. Microbial interkingdom interactions in roots promote *Arabidopsis* survival [J]. Cell, 2018, 175(4): 973-983.
- [9] 张俊华,郑国琦.宁夏枸杞根际土壤线虫群落特征[J].应用生态学报,2016,27(5):1647-1656.
- [10] MILLER D A. Allelopathy in forage crop systems [J]. Agronomy Journal, 1996, 88(6): 854-859.
- [11] 赵晓玲,张鑫瑶,何春年,等.不同来源地骨皮药材中地骨皮甲素和乙素及阿魏酸的含量测定分析[J].中国药业,2014,23(12):58-61.
- [12] 李 敏,闫兴富,马 丽,等.酚酸类化感自毒物质对枸杞种子萌发的抑制作用[J].生态学报,2020,40(6):2072-2079.
- [13] 陈雅林,谭 芳,彭 勇.枸杞叶的研究进展[J].中国药杂志,2017,52(5):358-361.
- [14] STANIŠIĆ M, ĆOSIĆ T, SAVIĆ J, et al. Hairy root culture as a valuable tool for allelopathic studies in apple [J]. Tree Physiology, 2019, 39(5): 888-905.
- [15] AMADO P A, FONSÊCA-CASTRO A H, SANTOS-ZANUNCIO V S, et al. Assessment of allelopathic, cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic potential of *Smilax brasiliensis* Sprengel leaves [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2020, 192: 110310.
- [16] YUE M, HU G X, LI J, et al. Allelopathic effects of *Castanea henryi* aqueous extracts on the growth and physiology of *Brassica pekinensis* and *Zea mays* [J]. Chemistry & Biodiversity, 2020, 17(6): e2000135.
- [17] KIND T, WOHLGEMUTH G, LEE D Y, et al. FiehnLib: mass spectral and retention index libraries for metabolomics based on quadrupole and time-of-flight gas chromatography/mass spectrometry

- try[J]. Analytical Chemistry, 2009, 81(24):10038-10048.
- [18] IVANISEVIC J, ELIAS D, DEGUCHI H, et al. Arteriovenous blood metabolomics; a readout of intra-tissue metastasis[J]. Scientific Reports, 2015, 5(1):1-13.
- [19] LI X G, DING C F, HUA K, et al. Soil sickness of peanuts is attributable to modifications in soil microbes induced by peanut root exudates rather than to direct allelopathy[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2014, 78:149-159.
- [20] RAJ B, JOHN S, ABDUL R A R. Pharmacognostic and preliminary phytochemical screening of *Ampelocissus indica* including antioxidant activity[J]. Research Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 2020, 12(2):80-82.
- [21] 李欣欣, 赖金莉, 岳建华, 等. 毛竹各器官和根际土浸提液对杉木种子萌发的化感作用[J]. 生态学报, 2018, 38(22):8149-8157.
- [22] GHIMIRE B K, GHIMIRE B, YU C Y, et al. Allelopathic and autotoxic effects of *Medicago sativa*-derived allelochemicals[J]. Plants (Basel), 2019, 8(7):233.
- [23] VOGES M J, BAI Y, SCHULZE-LEFERT P, et al. Plant-derived coumarins shape the composition of an arabidopsis synthetic root microbiome[J]. PNAS, 2019, 116:12558-12565.
- [24] STASSEN M J J, HSU S H, PIETERSE C M J, et al. Coumarin communication along the microbiome-root-shoot axis[J]. Trends in Plant Science, 2021, 26(2):169-183.
- [25] LIU J G, LI X G, JIA Z J, et al. Effect of benzoic acid on soil microbial communities associated with soilborne peanut diseases[J]. Applied Soil Ecology, 2017, 110:34-42.
- [26] WU H S, WANG Y, BAO W, et al. Responses of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* to exogenously added sinapic acid *in vitro*[J]. Biology and Fertility of Soils, 2009, 45(4):443-447.
- [27] 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.
- [28] 彭 彤, 马少兰, 马彩霞, 等. 长期单作对枸杞园不同土层土壤微生物代谢活性和多样性的影响[J/OL]. 草业学报, 2023, 32(1):89-98.

(责任编辑:成纾寒)