



外源硅对连作基质浸提液抑制 黄瓜种子萌发的缓解效应

金 莉, 吕 剑*, 郁继华, 金 宁, 颀建明, 肖雪梅

(甘肃农业大学 园艺学院, 兰州 730070)

摘 要: 该试验以‘新春4号’黄瓜为试材, 研究在连作基质浸提液(基质: 水=1: 6)处理下, 外源添加 $4\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 对黄瓜种子萌发、膜脂过氧化、抗氧化酶活性及淀粉转化的影响, 以揭示外源硅对连作基质浸提液抑制黄瓜种子萌发的缓解效应及其生理生化机制, 为生产中解决黄瓜基质栽培连作障碍问题提供理论依据。结果显示: (1) 连作基质浸提液处理显著抑制了黄瓜种子的萌发, 使得丙二醛(MDA)和脯氨酸(Pro)含量升高, 抗氧化酶活性和淀粉水解酶活性降低, 淀粉含量升高而可溶性糖含量降低, 同时 *AMY* 和 *BMV* 基因的表达水平显著下调。 (2) 添加外源硅处理后, 可有效缓解连作基质浸提液对黄瓜种子萌发生长的抑制, 降低 MDA 和 Pro 含量, 提高抗氧化酶和淀粉水解酶活性, 且提高了可溶性糖含量, *AMY* 和 *BMV* 基因表达水平上调。研究表明, 1: 6 浓度的连作基质浸提液可显著抑制黄瓜种子萌发, 使淀粉转化受阻, 基因表达水平下调; 外源添加 $4\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 可提高受胁迫黄瓜种子芽苗中淀粉的转化速率, 维护黄瓜种子萌发的正常生理功能, 进而缓解连作基质浸提液对黄瓜种子萌发造成的伤害。

关键词: 黄瓜; 种子萌发; 连作基质浸提液; 硅; α -、 β -淀粉酶

中图分类号: Q948.79; S642.2 **文献标志码:** A

Mitigation Effect of Exogenous Silicon on Inhibiting Cucumber Seed Germination by Continuous Cropping Matrix Extract

JIN Li, LÜ Jian*, YU Jihua, JIN Ning, XIE Jianming, XIAO Xuemei

(College of Horticulture, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: The ‘Xinchun No. 4’ cucumber was used as the test material in this experiment. Meanwhile, the effects of exogenous $4\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ on the cucumber seed germination and growth, membrane lipid peroxidation level, antioxidant enzyme activities and starch transformation were studied under continuous substrate leach solution (substrate: water = 1: 6) for revealing the alleviating effect of exogenous silicon on cucumber seed germination inhibited by continuous cropping matrix extract and its physiological and biochemical mechanisms, moreover, providing theoretical basis for solving the problem of continuous cropping obstacles in cucumber substrate cultivation in production. The results showed that: (1) continuous substrate leach solution significantly inhibited the germination of cucumber seeds by increasing malondialdehyde (MDA) and proline (Pro) contents, decreasing the activities of antioxidant enzymes and

收稿日期: 2019-06-27; 修改稿收到日期: 2019-09-16

基金项目: 国家自然科学基金(31660584); 国家重点研发计划(2018YFD0201205); 甘肃省科技重大专项计划(17ZD2NA015); 甘肃省自然科学基金(1610RJZA098); 甘肃农业大学盛彤笙科技创新基金(GSAU-STS-1638)

作者简介: 金 莉(1993—), 女, 在读硕士研究生, 主要研究方向为蔬菜栽培技术与生态生理。E-mail: 1274749624@qq.com

* 通信作者: 吕 剑, 讲师, 主要从事设施蔬菜栽培生理与生长调控、非耕地利用技术研发等方面的工作。E-mail: lvjian@gsau.edu.cn

starch hydrolase activities, and enhancing starch content during seed germination. Also, the leach solution decreased soluble sugar content, and the gene expression levels of *AMY* and *BMV* were significantly down-regulated. (2) Application of exogenous silicon could effectively alleviate the inhibition of cucumber seed germination by reducing MDA and Pro contents, enhancing activities of antioxidant enzymes and starch hydrolase, elevating soluble sugar content, and up-regulating the expression of *AMY* and *BMV* genes. The research showed that 1 : 6 concentration of continuous substrate leach solution can inhibit the germination of cucumber seeds, led to block starch transformation, and gene expression down-regulation; However, exogenous addition of $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ could accelerate the rate of starch conversion and maintain the normal physiological function during germination of cucumber seeds and to alleviate the negative effects caused by the continuous substrate leach solution on cucumber seed germination.

Key words: cucumber; seed germination; continuous cropping extract; silicon; α -, β -amylase

黄瓜(*Cucumis sativus* L.)为葫芦科甜瓜属植物,是中国北方地区设施栽培中最常见的作物之一^[1]。但连作障碍已经成为制约黄瓜设施栽培的关键问题之一^[2]。基质栽培是缓解设施土壤重度连作障碍的有效途径之一,目前非耕地农业生产中多以有机基质代替土壤进行蔬菜设施栽培,但作物营养基质经多年连作栽培后也会导致障碍发生,需要不断更换基质,从而导致人力、物力的大量消耗。因此,探索防止和修复作物营养基质连作障碍的方法,对作物营养基质栽培具有重要意义^[3-4]。

硅可以促进植物生长发育,提高植物抵抗生物胁迫和非生物胁迫的能力^[5]。有研究表明,外源施硅可提高土壤栽培下连作黄瓜幼苗抗氧化酶活性、增加其光合作用进而增强黄瓜幼苗对连作障碍的抗性^[6]。硅钾肥施用于小麦-玉米(大豆)复种连作区地块,可显著提高其产量^[7]。此外,卜瑞芳^[8]研究表明,在苯丙酸(PA)和肉桂酸(CA)模拟黄瓜自毒条件下,添加外源硅可促进黄瓜种子萌发,缓解 PA 和 CA 对黄瓜幼苗的脂质过氧化损伤及 CA 胁迫对 PS I 和 PS II 的损伤及光抑制,增强有机物质的合成能力。更有大量研究从硅防御病害的角度出发,例如 Kauss 等^[9]的研究发现,感病黄瓜在加硅后可诱导植株系统获得性抗性机制,一个新的编码富含脯氨酸的蛋白被激活,说明它与病菌入侵位点细胞壁抗性的增强关系密切。另外,Faisal 等^[10]发现硅在黄瓜体内的运输方式主要依赖于蒸腾速率及土壤有效硅和植物对硅需求量的平衡。若是植物的被动运输相对于主动运输占有更重要作用,较高蒸腾速率就会导致更多硅吸收和积累。

目前关于外源硅缓解黄瓜连作障碍的研究相对较少,且主要集中在土壤连作栽培模式下外源硅对黄瓜幼苗期或结果期生长的影响^[6],关于硅对基质栽培黄瓜连作的缓解效应却鲜见报道。因此,本试

验以黄瓜品种‘新春 4 号’为试材,用连作基质制备浸提液处理黄瓜种子,研究硅对连作基质浸提液处理下黄瓜种子的萌发生理及相关基因表达量的影响,旨在阐明硅对黄瓜连作障碍的缓解机制,并为基质栽培连作障碍的克服提供新的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料与处理

以‘新春 4 号’黄瓜为试材,选取均匀饱满、大小一致的种子用 5%(V/V)次氯酸钠溶液消毒 10 min 后,用蒸馏水反复冲洗干净,然后在蒸馏水中继续浸种 5~6 h,将种子放置在铺有 2 张滤纸的培养皿(直径 9 cm)中,加入不同处理液 7 mL,置于 25 ℃ 黑暗的人工气候箱中萌发,每个处理 3 次独立重复。试验中所用硅(Si)为供试化学试剂硅酸钠($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$;AR)。

黄瓜连作基质取自甘肃省酒泉市肃州区总寨镇“总寨非耕地设施农业示范园”的日光温室中,基质配方为炉渣、菌渣、牛粪、鸡粪、玉米秸秆按体积比 13 : 5 : 5 : 2 : 14 混合,2017 年为黄瓜第 8 年连作种植。用土钻取黄瓜根区 0~20 cm 的基质,装入自封袋冷藏带回实验室、剔除杂质,然后按土 : 水为 1 : 3 的比例混合,在智能恒温摇床上振荡 60 min (转速 150 r/min),过滤后得到连作基质浸提液,置于 4 ℃ 冰箱保存备用^[11]。使用时用蒸馏水将浸提液分别稀释至 1 : 6、1 : 9、1 : 12 的比例。

本试验包括三部分:(1)浸提液浓度筛选试验,共设置 1 : 12(J_1)、1 : 9(J_2)、1 : 6(J_3)、1 : 3(J_4)4 种浸提液稀释比例,以蒸馏水作为对照(CK)。(2)硅浓度筛选试验。设置对照(CK,蒸馏水)、 J_3 、 $J_3 + 0.5 \text{ mmol/L Si}(T_1)$ 、 $J_3 + 1 \text{ mmol/L Si}(T_2)$ 、 $J_3 + 2 \text{ mmol/L Si}(T_3)$ 、 $J_3 + 3 \text{ mmol/L Si}(T_4)$ 、 $J_3 + 4 \text{ mmol/L Si}(T_5)$ 、和 $J_3 + 5 \text{ mmol/L Si}(T_6)$ 等处理。

表 1 实时定量 PCR 引物序列

Table 1 Primers used for relative quantitative real-time PCR assays

基因 Gene	基因号 Accession No.	引物序列 Primer sequence(5'→3')	
		正向 Forward	反向 Reverse
AMY	XM_004151148	CACGGTTATTACACCCAGGACT	TAAATCATCTTCGTTGCCCAT
BMY	XM_004138543	GGTGTCAAGTGGTAGCAACAATAAC	TGTCCTCTCTTTCTCTTCTAATGGTCT
Actin	AB010922.1	TTGAATCCCAAGGCGAATAG	TGCGACCACTGGCATAAAG

(3)正式试验。设置 CK(蒸馏水)、Si(4 mmol/L Si)、J(1∶6 浸提液)、J+Si(1∶6 浸提液+4 mmol/L Si)等处理。生长指标的测定包括浸提液浓度筛选试验、硅浓度筛选试验和正式试验,其余指标测定仅限于正式试验。

1.2 测定指标及方法

1.2.1 生长指标 种子萌发以胚根长度达到种子全长的一半为发芽标准。种子自萌发之日起,每天记录发芽数,72 h 后终止催芽,计算发芽率并测定芽苗长和鲜重。

发芽率=(72 h 发芽种子数/供试种子总数)×100%

1.2.2 丙二醛和游离脯氨酸含量 丙二醛(MDA)含量测定采用 TBA 法(硫代巴比妥酸法)^[12];黄瓜种子萌发组织游离脯氨酸(Pro)含量测定采用茚基水杨酸法^[12],在黄瓜种子萌发 36 h 取样测定。

1.2.3 抗氧化酶活性 超氧化物歧化酶(SOD)活性测定采用 NBT(氮蓝四唑)法^[13],过氧化物酶(POD)活性测定采用愈创木酚(guaiacol)法^[14],过氧化氢酶(CAT)活性测定采用紫外吸收法^[15],均在黄瓜种子萌发 36 h 取样测定。

1.2.4 α-、β-淀粉酶活性 使用北京北奥莱博科技有限公司的β-淀粉酶试剂盒,测定黄瓜萌发 0、4、8、12、24、36 和 48 h 的种子或芽苗组织中总淀粉酶活性和α-淀粉酶活性的动态变化,进而计算出β-淀粉酶活性,计算公式为:β-淀粉酶活性(mg·g⁻¹·min⁻¹)=总淀粉酶活性-α-淀粉酶活性。

1.2.5 淀粉和可溶性糖含量 采用蒽酮-乙酸乙酯法测定^[16],分别在黄瓜种子萌发 0、4、8、12、24、36 和 48 h 取样测定。

1.2.6 AMY(α-淀粉酶)和 BMY(β-淀粉酶)的提取及表达量的测定 在处理 36 h 后,选取各处理黄瓜芽苗为试验材料,使用 Tiangen 公司的 RNAsimple Total RNA Kit 试剂盒提取总 RNA,测定 RNA 的浓度后用 TaKaRa 宝生物公司的 PrimeScript™-RT reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)试剂盒将提取的 RNA 反转录成 cDNA,最后

采用 qRT-PCR 方法分析 AMY 和 BMY 基因的转录水平,引物序列见表 1。测定所有数据 Ct≤38。AMY、BMY 基因在不同样本中的相对表达量利用 2^{-ΔΔCt} 法^[17] 计算,每个处理设 3 次独立重复。

1.3 数据处理

采用 Excel2016、SPSS 19.0 软件进行统计分析并作图,显著性分析采用 LSD 法(P<0.05)。

2 结果与分析

2.1 外源硅和连作浸提液对黄瓜种子萌发特性的影响

随着连作浸提液浓度的增大,黄瓜种子的发芽率、芽苗全长、鲜重均呈现逐渐下降的趋势(表 2)。其中,J₃ 和 J₄ 处理的发芽率、芽苗全长及鲜重均与 CK 差异显著,但 J₄ 处理对黄瓜种子萌发的抑制作用更明显,其鲜重比 CK 降低了 53.48%,属于重度胁迫;J₃ 处理的发芽率、芽苗全长和鲜重与 CK 相比,分别降低了 19.76%、31.4%、32.17%,J₃ 处理对黄瓜种子的萌发造成了中等程度的胁迫。因此,本试验选取 J₃ 处理(浸提液浓度为 1∶6)的浓度作为模拟连作胁迫处理的浓度。

筛选出适宜的浸提液浓度(表 2)后,在浸提液中再加入不同浓度的硅,进而筛选出最佳的硅缓解浓度。由表 3 可知,随着 Si 浓度的升高,黄瓜种子的发芽率、芽苗全长、鲜重均呈逐渐上升的趋势;与 CK 相比,T₄、T₅ 和 T₆ 处理的发芽率、芽苗全长和鲜重均无显著差异;与 J₃ 处理相比,T₅ 处理的发芽率、芽苗全长和鲜重均表现出显著性增加,增幅分别为 15.53%、35.66%和 18.40%,而 T₆ 处理与 T₅ 处理之间无显著性差异。因此,选取 T₅ 处理(Si 浓度为 4 mmol·L⁻¹)的 Si 浓度为本试验缓解浓度。

筛选出适宜的浸提液浓度(表 2)和 Si 浓度(表 3)后,进一步对复合处理下黄瓜种子萌发生长特性进行研究。结果(图 1,A~C)表明,与对照 CK 相比,单独硅处理(Si)黄瓜种子的发芽率、芽苗全长和鲜重均无显著差异,而 J 处理黄瓜种子的发芽率、芽

表 2 不同连作基质浸提液浓度下黄瓜种子萌发特性的变化

处理 Treatment	发芽率 Germination percentage/%	芽苗全长 Sprout length/cm	种子鲜重 Fresh weight of seed/g
CK	95.55±0.02a	5.51±0.51a	2.30±0.02a
J ₁	87.78±0.02ab	4.87±0.55b	2.19±0.07ab
J ₂	81.11±0.02b	4.08±0.27b	2.13±0.04ab
J ₃	76.67±0.04b	3.78±0.28bc	1.56±0.12b
J ₄	70.22±0.02c	3.17±0.48c	1.07±0.03c

注:CK、J₁、J₂、J₃、J₄ 分别表示对照(蒸馏水)、1:12、1:9、1:6、1:3 稀释比例的浸提液;同列不同字母表示处理间在 0.05 水平存在显著性差异;表 3 同

Note: CK, J₁, J₂, J₃ and J₄ represent the extracts of control (distilled water), dilution ratio of 1:12, 1:9, 1:6 and 1:3 respectively; different letters in the same column indicate that there is significant difference at 0.05 level between treatments; Table 3 is the same

表 3 不同硅浓度对连作基质浸提液处理下黄瓜种子萌发特性的影响

Table 3 Effect of different silicon concentrations on germination characteristics of cucumber seeds under continuous cropping extract

处理 Treatment	发芽率 Germination percentage/%	芽苗全长 Sprout length/cm	种子鲜重 Fresh weight of seed/g
CK	95.56±0.04a	6.64±0.4a	2.17±0.17a
J ₃	80.78±0.06c	4.29±0.29c	1.63±0.04d
T ₁	81.11±0.02c	4.33±0.58c	1.69±0.07cd
T ₂	81.56±0.04bc	4.66±0.38bc	1.73±0.07d
T ₃	82.22±0.04bc	5.11±0.33bc	1.81±0.07bcd
T ₄	84.22±0.04abc	5.4±0.19abc	1.89±0.07abcd
T ₅	93.33±0.02a	5.82±0.27ab	1.93±0.12ab
T ₆	89.44±0.06ab	5.78±0.48ab	1.92±0.07ab

注:CK、J₃、T₁、T₂、T₃、T₄、T₅、T₆ 分别表示对照(蒸馏水)、1:6 浸提液、J₃+0.5 mmol/L Si、J₃+1 mmol/L Si、J₃+2 mmol/L Si、J₃+3 mmol/L Si、J₃+4 mmol/L Si 和 J₃+5 mmol/L Si

Note: CK, J₃, T₁, T₂, T₃, T₄, T₅ and T₆ are the control (distilled water), 1:6 extract, J₃+0.5 mmol/L Si, J₃+1 mmol/L Si, J₃+2 mmol/L Si, J₃+3 mmol/L Si, J₃+4 mmol/L Si and J₃+5 mmol/L Si, respectively

苗全长和鲜重均显著降低;复合处理(J+Si)黄瓜种子的发芽率和芽苗全长分别显著高于 J 处理8.16%和 25.29%,其种子鲜重也稍高于 J 处理,且其芽苗全长和种子鲜重与 CK 相近。可见,添加外源硅可以有效地缓解连作基质浸提液对黄瓜种子萌发造成的胁迫。

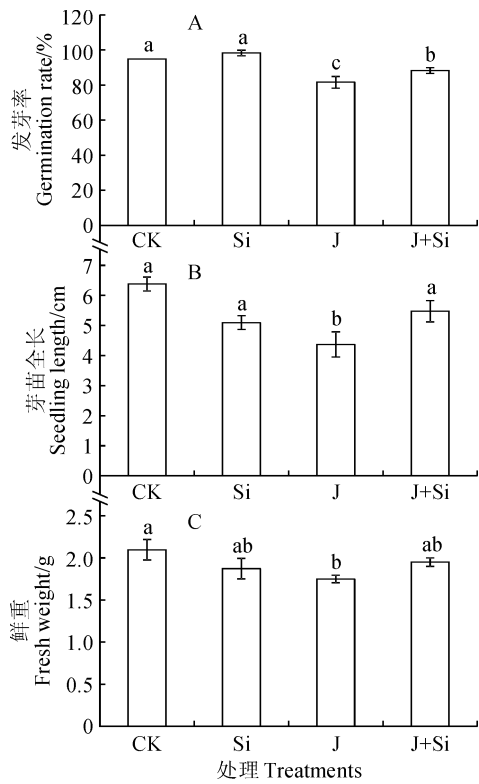
2.2 外源硅对连作浸提液胁迫下黄瓜芽苗膜脂过氧化、渗透调节及抗氧化酶系统的影响

2.2.1 丙二醛含量 由图 2,A 可知,J 处理显著提高了黄瓜芽苗中 MDA 含量,且较 CK 显著增加了 29.67%;添加外源 Si 后,显著抑制了连作浸提液胁迫下 MDA 含量的升高趋势,J+Si 处理的 MDA 含量较 J 处理显著降低了 10.90%;但单独加 Si 处理并未对芽苗中的 MDA 含量造成显著影响。这表明连作基质浸提液可使黄瓜种子在萌发过程中组织细胞的膜脂过氧化程度增大,而外源 Si 则可以显著减

轻这种过氧化损伤的程度。

2.2.2 脯氨酸含量 植物在遭受胁迫时,抗逆性较弱的植物比抗逆性较强的植物体内的脯氨酸(Pro)含量会显著增加,因此,植物体内游离脯氨酸的含量在一定程度上可反映植物的抗逆性强弱。由图 2,B 可知,黄瓜种子在各处理下萌发 36 h 后,其芽苗中 Pro 含量均比对照显著增加,且处理间均存在显著差异。其中,J 处理黄瓜芽苗中的脯氨酸含量最高,显著高于对照 CK 和其他处理;但 J+Si 处理的脯氨酸含量相较 J 处理显著降低了 17.84%。这说明在连作浸提液胁迫条件下外源添加 Si 可以显著提高黄瓜种子的抗逆性,且在正常条件下加入外源硅也能显著增加黄瓜芽苗中 Pro 含量,有效增强其抗逆性。

2.2.3 SOD、POD 和 CAT 活性 连作基质浸提液胁迫条件下的黄瓜芽苗中超氧化物歧化酶(SOD)、



CK. 对照(蒸馏水);Si. 4 mmol/L Si;J. 1 : 6 浸提液;
J+Si. 1 : 6 浸提液+4 mmol/L Si;不同小写字母表示处理间在
0.05 水平存在显著性差异;下同

图 1 Si 对连作浸提液处理下黄瓜种子萌发 36 h 后
芽苗生长特性的影响

CK. Control(water);Si. 4 mmol/L Si;J. 1 : 6 continuous extracts;
J+Si. 1 : 6 continuous extracts + 4 mmol/L Si;The different
normal letters indicate significant difference among treatments
at 0.05 level; The same as below

Fig. 1 Effects of Si on the growth characteristics
of cucumber seeds after 36 h germination in
continuous extracts

过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)的活性均
比 CK 显著降低,降幅分别达到 6.52%、73.75%和
31.81%;加入外源 Si 后 SOD、POD 和 CAT 活性相
较于 J 处理分别显著升高了 1 倍、3 倍和 1.5 倍;但
在正常条件下,加 Si 时的 SOD、POD 和 CAT 的活
性与 CK 并无显著性差异(图 3,A~C)。

2.3 外源硅对连作浸提液处理黄瓜种子萌发过程
中淀粉转化的影响

2.3.1 可溶性糖含量和淀粉含量 由图 4 可知,与
J+Si 处理相比,J 处理的黄瓜芽苗淀粉含量高而可
溶性糖含量低,且 J 处理的淀粉含量显著高于对照
CK 和 J+Si 处理。在处理 12 h 后,各处理的芽苗
淀粉含量快速下降,且 J 处理的黄瓜芽苗淀粉含量
仍然显著高于其他处理。对照 CK 和 Si 处理的淀粉

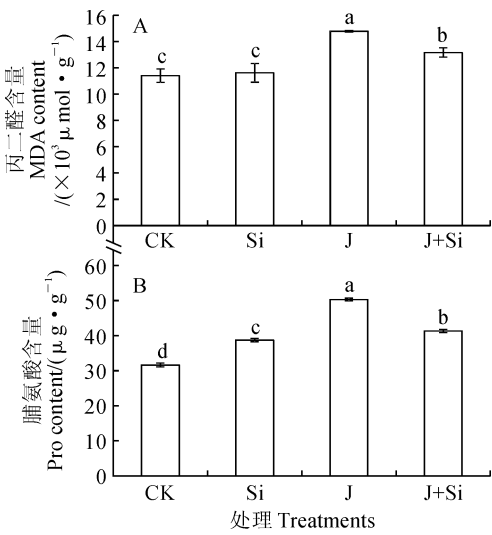


图 2 Si 对连作浸提液处理黄瓜种子萌发 36 h 后芽苗
中丙二醛(MDA)及脯氨酸(Pro)含量的影响

Fig. 2 Effects of Si on malondialdehyde (MDA) and
proline (Pro) contents in cucumber seedlings after
36 h of germination treated with continuous
cropping extract

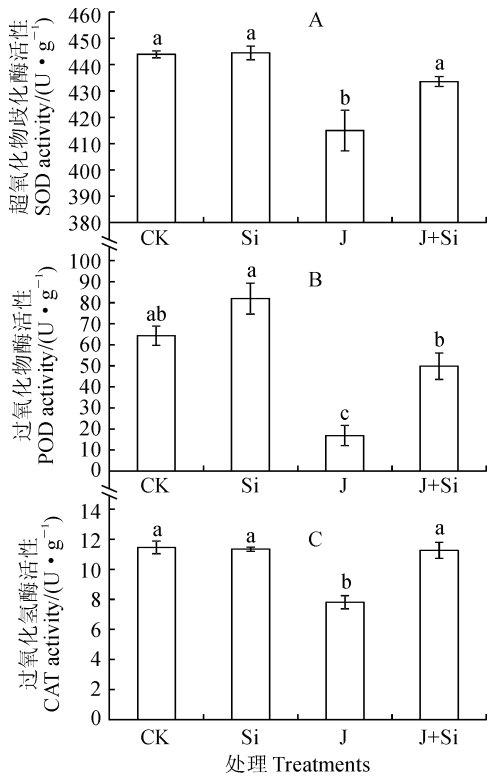


图 3 Si 对连作基质浸提液处理下黄瓜种子萌发
36 h 后芽苗中 SOD、POD、CAT 活性的影响

Fig. 3 Effects of Si on SOD, POD and CAT activities
in cucumber seedlings after 36 hours of seed
germination under continuous cropping
medium extract treatment

含量在处理 0~48 h 期间的变化趋势基本一致,并且两者均显著低于 J 处理(图 4,A)。在黄瓜种子萌发过程中,对照 CK 和 Si 处理的可溶性糖含量变化趋势一致,其在 0~8 h 可溶性糖含量升高,于 8 h 达到峰值,而在处理 8 h 后快速下降;J 处理和 J+Si 处理芽苗的可溶性糖含量在 0~8 h 均显著低于对照 CK,但 J+Si 处理的可溶性糖含量又显著高于 J 处理(图 4,B)。

2.3.2 α -和 β -淀粉酶活性及总淀粉酶活性 黄瓜种子萌发过程中的各处理总淀粉酶活性与 β -淀粉酶活性的变化趋势一致,均在 0~48 h 期间表现为先升高后下降的趋势,并均在种子萌发 36 h 时达到最大值; α -淀粉酶活性在黄瓜整个萌发过程中也呈现先升高后降低的趋势,但各处理出现峰值的时间是种子萌发 8 h(图 5)。其中,J 处理显著降低了种子萌发 8~48 h 总淀粉酶和 β -淀粉酶的活性,J+Si 处理黄瓜种芽总淀粉酶和 β -淀粉酶的活性比 J 处理显著增加,即外源添加 Si 有效缓解了 2 种酶活性降低现象;对照 CK 和 Si 处理芽苗的 β -淀粉酶活性之间无显著差异(图 5,A,B)。同时,黄瓜芽苗 α -淀粉酶活性在 J 处理下显著降低,外源添加 $4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Si 能显著增加浸提液胁迫下黄瓜种子萌发 8~48 h α -淀粉酶活性;对照 CK 和 Si 处理芽苗的 α -淀粉酶活

性变化趋势基本一致,且两个处理间差异不显著(图 5,C)。另外,各处理黄瓜芽苗 α -淀粉酶的活性要比 β -淀粉酶的活性低 10 倍左右(图 5,B,C)。

2.3.3 AMY 和 BMY 表达水平 本试验测定了黄瓜种子萌发 36 h 后的 AMY 和 BMY 基因表达量,结果(图 6,A、B)表明,J 处理显著下调了黄瓜芽苗 AMY 和 BMY 的基因表达水平,与对照 CK 相比分别下调了 48.59%、35.22%;添加外源 Si 处理显著

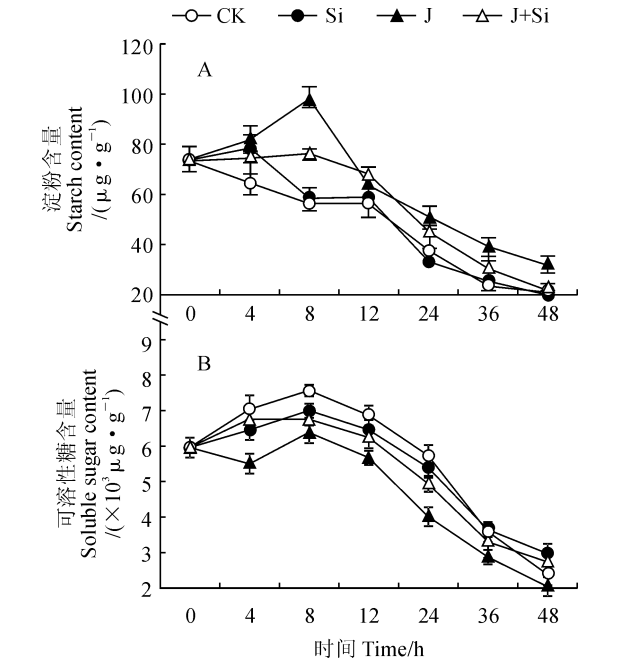


图 4 连作浸提液和硅对黄瓜种子萌发 0~48 h 组织中可溶性糖和淀粉含量的影响
Fig. 4 Effects of continuous extracts and silicon on the contents of soluble sugar and starch in tissues at seed germination of cucumber at 0–48 h

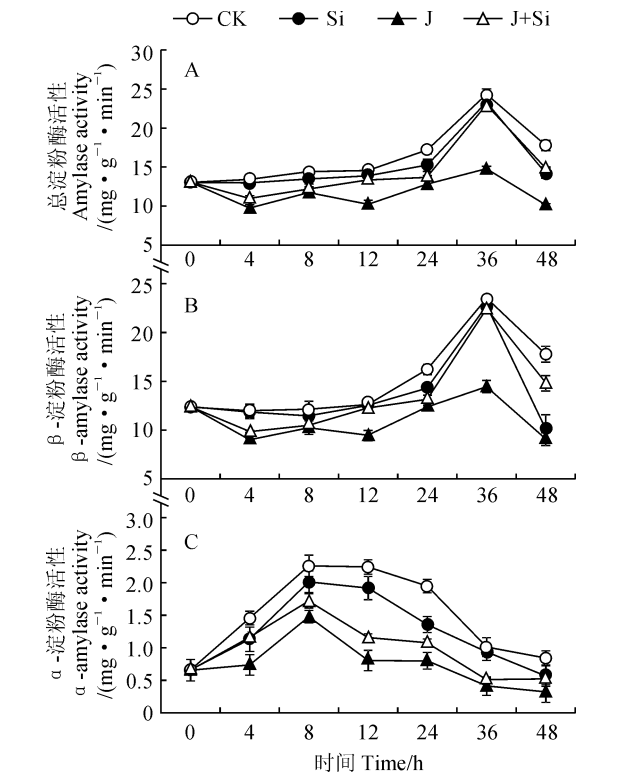


图 5 连作浸提液和硅对黄瓜种子萌发 0~48 h 组织中总淀粉酶、 α 、 β -淀粉酶活性的影响
Fig. 5 Effects of continuous extracts and silicon on total amylase and α , β -amylase activities in cucumber seeds at 0–48 h

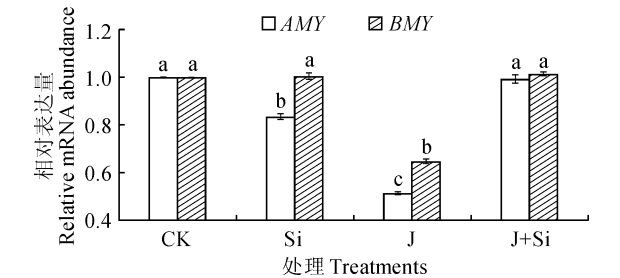


图 6 连作浸提液和硅对黄瓜种子萌发 36 h 时 AMY 和 BMY 基因表达水平的影响
Fig. 6 Effects of continuous extracts and silicon on the expression levels of AMY and BMY genes in cucumber seeds treated for 36 h

上调了 *AMY* 和 *BMY* 的基因表达水平,相比 J 处理分别显著上调了 1.9 倍和 1.6 倍;与对照 CK 相比, Si 处理对黄瓜种子萌发 36 h 芽苗的 *AMY* 基因表达显著下调,对 *BMY* 基因调节效果不显著。说明外源 Si 在连作基质浸提液胁迫条件下能显著上调黄瓜芽苗 *AMY* 和 *BMY* 基因的表达水平。

3 讨论

造成作物连作障碍的原因主要有三个方面,一是土壤肥力下降,二是作物根系分泌物的自毒作用,三是病原微生物数量增加^[18-21]。本试验以连作 8 年黄瓜的基质制备浸提液,来模拟田间连作障碍对黄瓜种子萌发的影响。结果表明,浓度为 1:6(J_3)的连作基质浸提液显著抑制了黄瓜种子的发芽率、芽苗全长和鲜重,这与李琴琴^[22]研究大豆根际土壤浸提液对大豆种子萌发影响的结果一致。

发芽率、发芽势、根长、胚轴长和鲜质量等是反映种子萌发状况的重要指标^[23]。硅在植物抵抗生物胁迫(疾病和虫害等)和非生物胁迫(金属毒害、营养不平衡、盐度、干旱、冷冻、高温和紫外辐射等)方面的作用已有许多研究^[5]。在本试验中,连作基质浸提液胁迫也属于非生物胁迫的一种,在其中添加适当浓度的硅能够有效缓解连作基质浸提液处理对黄瓜种子萌发的抑制作用(如显著提高发芽率、促进芽苗伸长、增加生物量积累等),这与在玉米种子和水稻种子上的研究结果一致^[24-25]。但当 Si 添加浓度高于适宜浓度范围时, Si 对连作基质浸提液胁迫下黄瓜种子萌发的缓解作用并不明显。

魏国强等^[26]研究表明盐胁迫下黄瓜叶片 Pro 大量积累,并且耐盐性较弱品种 Pro 含量大于耐盐性较强的品种;另外还发现添加外源 Si 增加了黄瓜抗盐胁迫能力,且添加 Si 降低了盐胁迫下黄瓜叶片 Pro 的含量。Bu 等^[27]研究也表明, CA 模拟的自毒胁迫显著增加了活性氧(如 $O_2 \cdot$ 、 H_2O_2 等)、MDA 和 Pro 的积累量,添加外源 Si 后显著降低了黄瓜幼苗组织活性氧、MDA 和 Pro 的积累程度。本试验结果与前人研究结果一致,即 1:6(J_3)浓度的连作基质浸提液处理显著增加了黄瓜种子芽苗中 MDA 和 Pro 积累量,但外源添加 4 mmol $\cdot$ L⁻¹ Si 显著降低了 1:6(J_3)浓度浸提液处理黄瓜种子芽苗中 MDA 和 Pro 积累量。

硅缓解胁迫的一个重要机制在于它能够增强植物体内的活性氧清除系统活性,能够有效清除活性氧,从而减少植物伤害^[28]。有研究发现,叶面施加

纳米硅可增强水稻 SOD、POD 和 CAT 的活性^[29],施加外源硅也能够增强棉花根和叶中 SOD、POD 和 CAT 的活性^[30]。本研究结果表明,与对照 CK 和单独 Si 处理相比,连作基质浸提液处理显著降低了黄瓜种子芽苗 SOD、POD 和 CAT 的活性,添加外源硅显著增加了受胁迫黄瓜种子芽苗 SOD、POD 和 CAT 的活性,表明连作基质浸提液胁迫下黄瓜种子芽苗体内产生了大量有害的 $\cdot O_2^-$,而外源硅能有效清除植株体内积累的自由基,保护植物膜结构的完整性,减轻了植物受到的胁迫伤害。

种子萌发过程中,种子内贮藏物质的动员是必不可少的。而且能量的代谢是种子萌发过程中的早期事件,种子萌发主要依赖自身的贮藏物质,如贮藏蛋白、淀粉和脂肪^[31],而淀粉是其中最主要的一种供能物质,淀粉通过一系列水解酶生成大量的葡萄糖,还有少量的麦芽三糖及麦芽糖^[8]。本试验测定了 Si 和连作基质浸提液对黄瓜种子吸胀、萌动过程中 α -、 β -淀粉酶活性的动态变化。结果表明, α -淀粉酶活性在黄瓜种子萌发初期(萌发 8 h 出现峰值)快速升高,而 β -淀粉酶活性升高的速度较慢(萌发 36 h 时达到峰值),这可能由于种子胚芽合成的赤霉素(GA)诱导 α -淀粉酶的激活和表达造成的^[32]。并且本试验也表明,在连作基质浸提液处理下 α -淀粉酶和 β -淀粉酶的活性显著降低并有较高的淀粉含量,而添加外源硅可以显著提高 α -、 β -淀粉酶的活性并有较低的淀粉含量。据报道,PEG 模拟干旱胁迫显著降低了尾穗苋种子萌发过程中 α -、 β -淀粉酶的活性^[33];外源 Si 可显著提高淀粉酶的活性,并促进淀粉的水解速率,为玉米种子萌发提供能量物质,促进玉米幼苗的生长^[34],本研究结果与这些报道的结果一致。

可溶性糖也被认为是供给植物营养、调节植物生长和基因表达的重要因子^[35]。本试验结果表明,各处理黄瓜芽苗的淀粉含量和可溶性糖含量随处理时间延长均呈现逐渐下降的趋势。值得注意的是,连作基质浸提液胁迫处理在 0~48 h 的种子萌发过程中,与对照相比,黄瓜种子和芽苗具有较高的淀粉含量和较低的含糖量,这可能是由于连作基质浸提液胁迫显著抑制了淀粉水解酶活性,从而抑制了淀粉的转化;而外源添加 Si 显著提高了连作基质浸提液胁迫下相关淀粉酶活性, J+Si 处理芽苗的可溶性糖含量也因此显著上升,为黄瓜种子的萌发与生长消耗提供了能量基础。

此外,本试验还测定黄瓜种子萌发 36 h 时各处

理芽苗的 *AMY* 和 *BMV* 相对表达量,来进一步验证连作基质浸提液和 Si 对 α -和 β -淀粉酶的 RNA 的表达水平的影响。试验结果表明,与对照 CK 相比,连作基质浸提液显著下调种子萌发 36 h 时 *AMY* 和 *BMV* 相对表达水平,而添加外源 Si 显著上调种子萌发 36 h 时 *AMY* 和 *BMV* 相对表达水平。

在整个试验过程中,单独施 Si 处理种子和芽苗的多项指标与对照 CK 均无显著差异,这表明 Si 的有益作用在黄瓜遭受连作基质浸提液胁迫时比正常条件下表现得更为明显,该现象同样被 Ma 等^[36]研究证实。但也有研究表明,在正常条件下,施加外源硅可以促进白燕麦^[37]、琉璃苣^[38]等作物种子的萌发,这可能是由于植物的种类、品种以及所处的生育

期不同所导致的差异。

综上所述,连作基质浸提液处理会抑制黄瓜种子的萌发,外源添加硅可显著缓解黄瓜种子萌发过程中连作基质浸提液对黄瓜种子造成的损伤,具体表现在提高种子发芽率、促进芽苗伸长和鲜重方面。再者,外源 Si 显著增加连作基质浸提液处理下黄瓜芽苗 α -和 β -淀粉酶活性以及可溶性糖含量,降低其 MDA 和 Pro 含量,上调 *AMY* 和 *BMV* 相对表达水平。表明 Si 可能参与黄瓜种子萌发过程中连作基质浸提液胁迫下的淀粉代谢。因此,外源 Si 可缓解连作基质浸提液对黄瓜种子萌发的抑制作用,促进黄瓜种子的萌发。

参考文献:

- [1] Al-HAMZAWI M K A. Effect of Calcium Nitrate, Potassium Nitrate and Anfaton on growth and storability of plastic Houses cucumber (*Cucumis sativus* L. cv. Al-Hytham)[J]. *American Journal of Plant Physiology*, 2010, **5**(5): 278-290.
- [2] 喻景权,杜尧舜.蔬菜设施栽培可持续发展中的连作障碍问题[J].沈阳农业大学学报,2000,31: 124-126.
- [3] YU J Q, DU Y S. Soil-sickness problem in the sustainable development for the protected production of vegetables[J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2000,31: 124-126.
- [4] 王佳辉,齐红岩,李现伟,等.日光温室薄皮甜瓜营养基质的筛选[J].河南农业科学,2008,(3): 78-81.
- [5] WANG J H, QI H Y, LI X W, *et al.* Screening of organic nutrition substrate for melon production in greenhouse[J]. *Henan Agricultural Science*, 2008,(3): 78-81.
- [6] 武春成,李天来,曹霞,等.营养基质对连作栽培下温室黄瓜生长及土壤微环境的影响[J].应用生态学报,2014,(5): 1 401-1 407.
- [7] WU C C, LI T L, CAO X, *et al.* Effects of nutrition medium on cucumber growth and microenvironment in greenhouse under continuous cropping[J]. *Journal of Applied Ecology*, 2014,(5): 1 401-1 407.
- [8] EPSTEIN E. Silicon[J]. *Annual Review of Plant Biology*. 1999, **50**(1): 641-664.
- [9] 张平艳,高荣广,杨凤娟,等.硅对连作黄瓜幼苗光合特性和抗氧化酶活性的影响[J].应用生态学报,2014,**25**(6): 1 733-1 738.
- [10] ZHANG P Y, GAO R G, YANG F J, *et al.* Effects of silicon on photosynthetic characteristics and activity of antioxidant enzymes in continuous-cropped cucumber seedlings[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2014,**25**(6): 1 733-1 738.
- [11] 王德民.小麦—玉米(大豆)复种连作区硅钾肥施用效果研究[J].天津农业科学,2009,**15**(3): 87-90.
- [12] WANG D M. Effects of silicon and potassium fertilization on the area of multiple and continuous cropping for wheat and maize (Soybean) [J]. *Tianjin Agricultural Sciences*, 2009,**15**(3): 87-90.
- [13] 卜瑞芳.硅缓解黄瓜种子萌发和幼苗生长自毒作用的机理研究[D].兰州:甘肃农业大学,2016
- [14] KAUSS H. Silica deposition by a strongly cationic proline-rich protein from systemically resistant cucumber plants[J]. *Plant J.*, 2003, 33: 87-95.
- [15] FAISALSHAJI, CALLISKRISTINE L, SLOTMARTIJN, *et al.* Transpiration-dependent passive silica accumulation in cucumber (*Cucum*). [J]. *Botany-botanique*, 2012, **90**(10): 1 058-1 064.
- [16] 贾丽琴.豆科植物土壤浸提液对马铃薯连作土壤微生物群落和酶活性的影响[D].兰州:甘肃农业大学,2016.
- [17] 高俊凤.植物生理学实验指导[M].北京:高等教育出版社,2006: 142-231.
- [18] PINHEIRO H A, DAMATTA F M, CHAVES A R M, *et al.* Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought[J]. *Plant Science*, 2004, 167: 1 307-1 314.
- [19] LIMA G P P, BRASIL O G, OLIVEIRA A M. Polyamines and peroxidase activity in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under saline stress[J]. *Scientia Agricola*, 1999, **56**(1): 21-26.
- [20] HAVIR E A, MCHALE N A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves[J]. *Plant Physiology*, 1987, **84**(2): 450-455.
- [21] VASQUEZ-TELLO A, ZUILY-FODIL Y, THI A T P, *et al.* Electrolyte and Pi leakages and soluble sugar content as physiological tests for screening resistance to water stress in *Phaseolus* and *Vigna* species[J]. *Journal of Experimental Botany*, 1990, **41**(7): 827-832.

[17] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. *Methods*, 2001, **25**(4): 402-408.

[18] SUNG W, CHEN R Y, LIU H C. Causes and control measures for continuous cropping obstacles in protected vegetable cultivation [J]. *Transactions of the CSAE*, 2005, 21: 184-188.

[19] LARKIN R P, GRIFFIN T S. Control of soil borne potato diseases using Brassica green manures[J]. *Crop Protection*, 2007, 26: 1 067-1 077.

[20] BLUM U, SHAFER S R, LEHMEN M E. Evidence for inhibitory allelopathic interactions involving phenolic acids in field soils: Concepts vs. an experimental model[J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1997, 18: 673-693.

[21] YU J Q, MSTSUI Y. Effect of root exudates of cucumber (*Cucumis sativus*) and allelochemicals onion uptake by cucumber seedlings[J]. *J. Chem. Ecol.*, 1997, 23: 817-827.

[22] 李琴琴. 小豆不同器官与根际土壤浸提液的自毒作用研究[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2013.

[23] 牟雪娇, 张远兵, 吴 燕, 等. 外源 H_2S 缓解黄瓜种子萌发过程中干旱胁迫伤害的生理机制[J]. 西北农业学报, 2018, **27**(9): 1 328-1 334.

MOU X J, ZHANG Y B, WU Y, *et al.* Physiological mechanism of exogenous H_2S in alleviating drought stress-induced injury in germination of cucumber seed[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2018, **27**(9): 1 328-1 334.

[24] QI L L, CHEN Y, JIA H X. Effects of organic and inorganic silicon on the germination of rice seeds under saltstress[J]. *Journal of Gansu Agriculture University*, 2002, **37**(3): 272-278.

[25] ZHANG W Q, HUANG Y Z, ZHAO L J, *et al.* Effects of silicon on the germination of simetant rice and wildrica seeds under salt stress[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2009, (6): 869-872.

[26] 林植芳, 李双顺, 林桂珠, 等. 衰老叶片和叶绿体中 H_2O_2 的累积与膜脂过氧化的关系[J], 植物生理学报, 1988, **14**(1): 16-22.

LIN Z F, LI S S, LIN Z Z, *et al.* The accumulation of hydrogen peroxide senescing leaves and chloroplastsin relation to lipid peroxidation [J]. *Acta Phytophysiologica Sinica*, 1988, **14**(1): 16-22.

[27] BU. Autotoxicity in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedings is alleviated by silicon through an increase in the activity of antioxidant enzymes and by mitigating lipid peroxidation[J]. *Plant Biol.*, 2016, 59: 1-14.

[28] 刘彩凤, 史刚荣, 余如刚, 等. 硅缓解植物镉毒害的生理生态机制[J]. 生态学报, 2017, **37**(23): 7 799-7 810.

LIU C F, SHI G R, YU R G, *et al.* Eco-physiological mechanisms of silicon-induced alleviation of cadmium toxicity in plants: a review[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2017, **37**(23): 7 799-7 810.

[29] WANG S H, WANG F Y, GAO S C. Foliar application with nano-silicon alleviates Cd toxicity in rice seedlings[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015, **22**(4): 2 837-2 845.

[30] FAROOQ M A, ALI S, HAMEED A, *et al.* Alleviation of cadmium toxicity by silicon is related to elevated photosynthesis, antioxidant enzymes; suppressed cadmium uptake and oxidative stress in cotton[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2013, 96: 242-249.

[31] LIU S J, XU H H, WANG W Q, *et al.* A proteomic analysis of rice seed germination as affected by high temperature and ABA treatment[J]. *Physiologia Plantarum*, 2015, **154**(1): 142-161.

[32] OKAMOTO K, AKAZAWA T. Enzymic mechanisms of starch breakdown in germinating rice seeds 7. Amylase formation in the epithelium[J]. *Plant Physiology*, 1979, **63**(2): 336-340.

[33] B. BIAECKA, J. KęPCZY ŃSKI. Germination, α -, β -amylase and total dehydrogenase activities of amaranthuscaudatus seeds under water stress in the presence of ethephon or gibberellin A3[J]. *Acta Biologica Cracoviensia*, 2010, **52**(1): 7-12.

[34] MA J F, TAKAHASHI E, MA J F, *et al.* Soil, Fertilizer and Plant Silicon Research in Japan[M]// Soil, Fertilizer, and Plant Silicon Research in Japan, 2002.

[35] TODAKA D, MATSUSHIMA H, MOROHASHI Y. Water stress enhances β -amylase activity in cucumber cotyledons [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2000, **51**(345): 739-745.

[36] MA J F, YAMAJI N. Silicon uptake and accumulation in higher plants[J]. *Trends in Plant Science*, 2006, **11**(8): 392-397.

[37] TOLEDO M Z, GARCIA R A, MERLIN A, *et al.* Seed germination and seedling development of white oat affected by silicon and phosphorus fertilization[J]. *Sci. Agr.*, 2011, 68: 18-23.

[38] TORABI F, MAJD A, ENTESHARI S. Effect of exogenous silicon on germination and seedling establishment in *Borago officinalis* L[J]. *J. Med. Plants. Res.*, 2012, 6: 1 896-1 901.

(编辑:裴阿卫)