

植物化感作用(Allelopathy)及其作用物的研究方法

阎 飞 杨振明 韩丽梅

(解放军农牧大学农学系 ,长春 130062)

摘要 综述了植物化感作用室内培养和田间试验的研究方法 ,重点评述了化感物质的提取、分离、纯化、鉴定和检测方法 ,并提出了进一步研究需关注的问题。

关键词 化感作用 ;化感物质 ;研究方法 ;综述

Review on research methods for alelopathy and allelochemicals in plants

YAN Fei ,YANG Zhen-Ming ,HAN Li-Mei (Changchun University of Agriculture and Animal Sciences ,Changchun 130062 , China)

Abstract Research methods on allelopathy were reviewed. Methods on extraction ,separation ,purification and etermination of allelochemicals were mainly summarized too. The research issues ,on which more attention should be paid in the future , were proposed.

Key words allelopathy ;allelochemicals ;research methods ;review

文章编号 :1000-093X(2000)04-0000-00 中图分类号 :Q948.12 文献标识码 :A

随着科学技术的迅速发展 ,各门学科之间的相互渗透日益加强 ,从而产生了不少新兴的交叉或边缘学科。生物间的化感作用就是新兴学科——生态生物化学的一个重要内容^[1~3]。化感作用的英文为“ Allelopathy ” ,源于希腊语“ Allelon(相互)”和“ Pathos(损害、妨碍)”^[4~5]。1937 年 Molish 首先将其定义为 :某种植物(包括微生物)生成的化学物质 ,对其他植物产生某种作用的现象^[6]。随着科学研究的迅速发展 ,对其认识也在不断深入和全面。1984 年 Rice 在《 Allelopathy 》第二版中将其较完整地定义为 :植物或微生物的代谢分泌物对环境中其他植物或微生物的有利或不利的作用^[7]。

在生态系统中 ,植被的形成和演替、种子萌发和衰败的抑制 ,农业生产中的间作、混作、套作、轮作、前后茬搭配、残茬的处置或利用以及作物和杂草的关系等 ,都存在化感作用 ,它在作物增产、森林抚育、植物保护和生物防治等方面有着广阔的应用前景。

虽然早在两千年前就已经有化感现象的记载 ,但在过去漫长的时期内 ,这方面的工作却始终停留在野外观察和现象描述方面^[2,7~9] ,这主要是因为化感作用是在较长时期内发生 ,并常被掩盖在明显的种内(间)竞争中 ,加上非生化环境因素同微生物的介入、干扰 ,使其研究受到了很大的影响。近年来由于众多学科联合 ,加之科学技术的进步 ,使这一学术领域逐渐活跃起来 ,并且获得了较大的进展^[3~5,8,10]。但是 ,由于该学科内容广泛 ,研究者的专业结构复杂 ,所采用的研究方法不尽一致 ,因而研究结果缺乏可比性。为此 ,本文就该内容作一综述 ,试图为其继续深入的研究提供一些思路。

1 化感作用的研究方法

基金项目 :国家“九五”重中之重 95-01-05 课题的部分研究内容。

收稿日期 :1998-04-20 ;修订日期 :1999-01-29

作者简介 :阎 飞(1969 ~) ,男 ,甘肃省人 ,讲师。主要从事植物逆境营养生态方面的研究工作。

化感作用有别于植物对养分、水分、光照和空间等有限资源的竞争,因此,主要是采用模拟实验并结合田间试验的方法进行研究。

1.1 模拟实验 室内培养实验因具有不受季节、气候等外界因素的影响,通过精确控制的试验设计,可以排除土壤化学性质、土壤微生物和土壤动物分解代谢作用的干扰,以及同一生境下多种植物的相互干涉,有的还可以进行严格的无菌操作,并可根据需要来研究某些植物的直接化感作用等优点而倍受注目。一般主要利用水培、砂培和组织培养等方法。

1.1.1 阶梯栽培法 将盆钵布置成阶梯状,采用循环营养液砂培,连续交替种植两种植物,使其受光一致,并消除对养分的竞争,来研究其相互影响^[11]。

1.1.2 根渗出液循环栽培法 其主要内容是疏水性根渗出液连续收集法(CRETS:Continuous root exudate trapping system),用Amberlite XAD-4树脂吸附砂培中植物根所释放的疏水性物质,而不吸附营养元素,同时又能保持根的原状,而不被扰动^[12]。土屋一成将此进一步发展为化感作用鉴定连续循环培养装置^[13],用两个培养钵连接成一个互通的体系,在两个钵中培养不同的植物,并排除植株间对光照和养分的影响,在系统中设置了电脑,可自动调节营养液的pH值等,从而可以较好地研究植物之间的化感作用。

1.1.3 植物盒法 将鉴定植物与待检植物混植于琼脂培养基内,其中,将鉴定植物的根用透析膜或尼龙网膜隔开,在根周围的方格内种植待检植物,在较短时间内可鉴定根系分泌物中的化感作用^[11]。

1.1.4 试管苗法 利用组织培养模拟自然生态系统中的化感作用。在试管中,用各种不同的外植体,经组织培养获得和母体植株遗传性完全相同的小植株,或通过培养植物细胞和组织,获得大量与母体相同的次生代谢产物,再通过试管苗交叉接种,就能直接观察植物的化感作用^[9]。

1.2 田间试验 尽管科研人员在实验室对化感作用作了大量的研究,但在田间条件下很少显示出其科研成果^[14~16],这可能是因为实验室很难模拟田间真实的自然状况^[17]。所以,实验室的模拟实验可以评估某种植物是否具有化感作用潜能,但要确认其被观察的化感作用能否表达出来,则田间试验是必不可少的。田间试验主要采用附加栽培法和置换栽培法来研究植物地下部分间的相互作用^[11]。附加栽培法是将两种植物混植,固定一种植物的种植密度,而变化另一种植物的种植密度的栽培法,置换栽培法是将两种植物混植,固定总的种植密度,而改变种植比例的栽培方法。

2 化感物质的提取、分离和检测

由于受到研究方法和仪器设备等条件的限制,虽然很早就有化感作用现象的记载,但始终是在描述和调查一些植物群落的消长和物种间的相互影响等,却无法确定作用物质的具体种类,更无法进一步研究化感物质的作用机理。由于科学技术的进步,该研究内容在近半个世纪才取得较大进展^[3,7,18]。

2.1 化感物质的种类 迄今为止所发现的化感物质几乎都是植物的次生代谢物质,一般分子量较小,结构较简单,大致分为:水溶性有机酸、直链醇、脂肪族醛和酮,简单不饱和内酯,长链脂肪酸和多呋,醌类,苯甲酸及其衍生物,肉桂酸及其衍生物,香豆素类,内黄酮类,单宁,内萜,氨基酸和多肽,生物碱和甾醇,硫化物和芥子油苷,嘌呤和核苷等14类^[7]。其中,最常见的是低分子量有机酸、酚类和内萜类化合物^[4,5]。

2.2 化感物质的提取方法 化感物质可以通过浸析、挥发、植物残体分解和根系分泌等方式进入环境中^[7,11,19~22]。通常根据这些物质作用途径的特点,分别采用夹层法^[11]、常温吸附法^[11]、浸提法或腐解法^[11,23~25]、疏水性根渗出液连续收集法(CRETS)^[12]等方法提取。

与农业生产密切相关的化感作用,一般是通过多种途径产生的^[21,22],由于其所处的复杂环境,使化感物质的提取收集更加困难。在研究工作中,一般主要采用浸提法来获得化感物质的。化感物质的提取源,应或者是待测化感作用的植物部分,或者是与它有关的环境土壤^[18]。其中,植物材料在研碎过程中,可能会释放出材料体内的某些酶、盐分、氨基酸和养分,而这些物质在自然条件下却不一定被释放^[26],因此,在化感作用的研究中,应避免使用研碎的植物材料^[18],由于化感物质进入土壤后,将发生很大的变化(如:保持、转化和转移等),从而会影响它们的变迁并减弱其化感潜能^[27]。所以,从待检植物的土壤环境中分离、并检测出化感物质是否存在一个足以影响有关植物生长发育的活性浓度是至关重要的。浸提剂主要是两类化合物:一是无机化合物,如 H_2O ^[28,24,25,29~36]、 $NaOH$ ^[28,36,37]、 $Na_4P_2O_7$ ^[23,38]等;二是有机化合物,如甲醇^[39]、石油醚^[33]、氯仿^[33]、二氯甲烷^[40]、丙酮^[41]、乙醚^[35,42]、乙酸乙酯^[28]、乙醇^[37,43]等。土壤中的化感物质主要是以游离态和可

逆束缚态的形式存在于土壤溶液中^[28 23 44]。若选用 NaOH 和 $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 作为浸提剂则可能将植物残体和土壤有机质中的酚酸类物质提出,而有机溶剂(如氯仿),能够直接从枯枝落叶、土壤腐殖酸和微生物膜中提取出化合物^[45],与自然条件下所产生的化感物质有质和量的区别。所以,浸提剂的选择应该全面慎重考虑,以便使检测结果更加真实可靠。

在浸提过程中,一般常采用往复式振荡^[23 43]和索式提取^[33 35 41 42]的方法进行,然而,这些方法在处理样品时,浸提时间长且不完全,并且样品容易损失。因此,本文建议尝试使用超声波方法,由于超声波深层的超声破碎作用,从理论上说能够省时并浸提更加完全,其实际操作条件还有待于进一步的研究。

Tang 和 Young 提出的连续抽提系统比溶剂提取方法更有效,并有助于从未扰动的根际中分离和鉴定化感物质^[12]。最近,刘秀芬等^[43]在减压条件下,用带有多孔陶头的塑料管原位收集土壤溶液,并成功地鉴定出了以前未见报道的化感物质——对-叔丁基苯甲酸,其对玉米和小麦生长发育的抑制作用明显强于同浓度的常见化感物质苯甲醛和阿魏酸。

另外,同位素示踪技术的应用,使在自然生境中进行根系分泌物的研究成为可能。A. Meharg 等用¹⁴C标记黑麦草,在微室中成功地进行了土壤微生物作用下根分泌物的研究^[46]。有时,为了强调防止某些化感物质被氧化,必须在充满氮气条件下进行提取^[8 20]。

2.3 化感物质的分离和纯化 提取所得到的比较复杂的混合物,必需经过纯化才能进行仪器检测。

2.3.1 萃取法 根据化感物质在两个不相溶或部分互溶的溶剂中的分配(溶解度)不同而达到分离纯化的目的^[12 23 30 32 34 40 47~50]。此法虽操作繁琐,但不够精确,但由于所用器械简单方便,快速易行,现在仍被广泛使用。由于化感物质在常用有机溶剂(如乙醚、乙酸乙酯和二氯甲烷等)中的溶解状况不同,因此,很难将所有的化感物质全部提出来。

2.3.2 树脂法 这是近年来发展起来的一种新方法,根据分离机理的不同,分为交换法和吸附法。交换法是利用阳离子和阴离子树脂,吸附阴阳离子,无极性或极性较弱的有机分子通过,然后洗脱和提取目标组分,从而达到纯化的目的^[29],吸附法则是使用吸附树脂(如 XAD-4、XAD-2 或 GDX-102 树脂以及硅胶等),吸附和富集含化感物质在内的一些有机化合物,进行分离和纯化^[2 39 41 43 51]。

2.3.3 层析法 利用混合物中各组分在固定相和流动相中分配平衡常数的差异,在多次反复平衡过程中,导致各组分在固定相中得到了分离。一般常用纸层析、柱层析、GC、HPLC 等方法分离和纯化化感物质^[12 32 33 41 51]。

通过以上方法收集的溶液,再经过减压蒸馏或冷冻干燥^[38]浓缩待测。

2.4 化感物质的鉴定与测试

2.4.1 化感物质的结构鉴定 近年来,由于近代实验物理方法在化学分析上的应用,给新发现的化感物质结构的测定带来了比较简单而准确的方法。根据测定熔点、红外光谱、紫外光谱、质谱和核磁共振谱(¹H-NMR 和¹³C-NMR)等参数,来判断其中存在的功能团、共轭体系、该未知物质的分子量和结构以及 H 原子和 C 原子在分子中的结合方式等信息,确定其化学结构,最后根据测定的结构用已知的标样或合成的标样来鉴定结果^[33 34 40 41 43 51]。

2.4.2 化感物质的含量检测 由于化感物质主要是植物的次生代谢产物,量甚微,而且有的易挥发或在空气中易发生化学反应,因而,其检测方法在很大程度上依赖于科学技术的进步。自从 Ruler^[52]在本世纪中叶提出用柱层析测定植物组织中的有机酸后,层析法便被广泛地用于土壤中化感物质之一的有机酸的研究^[29 30 32 35 37 40 42 48 53]。但柱层析法手续繁复,且时间长,而纸层析和薄板层析法虽操作简便,但不够精确,所以,它们现在基本上已不作为检测手段了。

伴随着科学技术的不断发展和现代化仪器设备的更新换代,特别是电脑分析控制程序的普遍应用,利用 GC^[38 43 48 49 51]、HPLC^[23 31 36 47 50]和 GC/MS^[12 40 41 43 49 51]研究化感物质获得了很大的发展,其检测水平已达到 ppb 级。其中,一般 GC 分析的物质,其沸点在 500℃ 以下,分子量要少于 450,对热稳定性差、易于分解、变质以及具有生理活性的物质,都不适合 GC 检测,它所分析的物质占有机物总数的 15%~20%,而 HPLC 的使用范围较广,可检测的物质占有机物总数的 80%~85%,但在 HPLC 广泛应用的同时,GC 仍然发挥着重要作用^[54]。把色谱仪的分离装置作为质谱仪的进样系统,把质谱仪作为色谱仪的检测系统,即把色谱仪的高分

分辨率和质谱仪的高鉴别能力结合起来,组成 GC/MS 或 LC/MS 仪器,是目前解决复杂未知物定性问题的最有效工具之一。

3 存在的问题和今后的研究展望

植物化感作用及其在植物生态学方面的作用,已成为当今研究的热点之一。尽管到目前为止,有关的研究成果不少,但要完整而深入地研究下去,则应加强以下有关内容的研究。

3.1 建立规范的化感作用的生物检测体系 为便于国内、外研究结果的交流、比较,应建立一套操作简洁、检测快速、批量筛选、针对性强和检测结果可比性好的体系,加速其在农业生产实践中的应用。

3.2 化感物质的动态研究 在化感物质的真正来源、分离鉴定及其在生态系统中的迁移形式和作用于受体的物质形式等方面亟待深入研究,尤其是对于复杂的土壤生态系统,由于化感物质可能在较短的时间内被土壤微生物降解或土壤吸附,因此,对化感物质进行动态研究,特别是实时(on line)监测很必要。

3.3 化感作用机理的深入研究 今后在分子生物学水平上对化感作用机理的研究,应予以加强,以便进一步研究和开发化感作用、培育化感物质多产品系和抗性品系等,这无疑将对环境保护和农业持续发展起到积极的作用。

参考文献

- [1] 宋 君. 植物间的他感作用. 生态学杂志, 1990, 9(6): 43~47.
- [2] 李绍文. 生态生物化学(一). 植物与其病原菌之间的生化关系. 生态学杂志, 1988, 7(5): 62~67.
- [3] 李杨瑞. 植物的生化互作现象. 土壤, 1993, 25(5): 248~251, 259.
- [4] 余叔文, 等. 植物间的相互作用——相生相克现象. 植物生理与分子生物学. 见余叔文主编. 北京: 科学出版社, 1992. 376~394.
- [5] 孙文浩, 等. 相生相克作用及其应用. 植物生理学通讯, 1992, 28(2): 81~87.
- [6] Molish H. Der Einfluss einer pflanze auf die-andere allelopathie. Fisher. Jena. , 1937, 13~20.
- [7] Rice E L. Allelopathy (2rk edition). Academic Press, 1984, 1~50.
- [8] 郑 重, 等. 生物间的生化相互作用研究——生态生化学的新进展. 生态学杂志, 1987, 8(3): 30~34.
- [9] 靳月华, 等. 组织培养在化学生态(他感作用)研究中的作用. 生态学杂志, 1986, 5(5): 61~63.
- [10] 吴 辉, 等. 根分泌物及其生态作用. 生态学杂志, 1992, 11(6): 42~47.
- [11] 藤井义晴. 植物のアレロパシ——化学と生物. 1990, 28(7): 471~477.
- [12] Tang C H & Yong C C. Collection and identification of allelopathic compounds from the undisturbed root system of *Bigalita limpogress* (*Hemarthria altissima*). *Plant Physiol.*, 1982, 69: 155~160.
- [13] 土屋一成. トウガラシの他感作用の検証. 园学杂志, 1990, 59(别2): 458~459.
- [14] Newman E I. The possible relevance of allelopathy to agriculture. *Pestic. Sci.*, 1982, 13: 575~583.
- [15] Willis R J. The historical bases of the concept of allelopathy. *J. Hist. Biol.*, 1985, 18: 71~102.
- [16] Williamson G B. Allelopathy koch's postulates and the tox riddle. In: Grace, G. B. & Tilman D. eds. *Perspectives on plant competition*. Academic Press, New York, 1990. 143~162.
- [17] May F E & Ash J E. An assessment of allelopathic potential of *Eucalyptus*. *Austral. J. Bot.*, 1990, 38: 245~254.
- [18] Inderjit & Dakshini K M M. On laboratory bioassays in allelopathy. *The botanical review*, 1995, 61(1): 28~44.
- [19] Patterson D T. Effects of allelopathic on growth and physiological reponses of soybear(*Glycine Max*). *Weed Sic.*, 1981, 29: 53~59.
- [20] 李绍文. 生态生物化学(二). 高等植物之间的生化关系. 生态学杂志, 1989, 8(1): 66~70.
- [21] 阎 飞、杨振明, 等. 大豆连作障碍中的生化互作作用. 大豆科学, 1998, 17(2): 147~151.
- [22] 王大力. 水稻化感作用研究综述. 生态学报, 1998, 18(3): 326~334.
- [23] Whitehead D C, et al. Bound phenolic compounds in wheat extracts of soil plant roots and leaf litter. *Soil Biol. Biochem.*, 1983, 15(2): 133~136.
- [24] 王光华, 等. 大豆根残体对大豆生长影响. 大豆重迎茬研究. 见 韩晓增, 许艳丽主编. 哈尔滨: 哈尔滨工程大学出版社, 1992. 84~91.
- [25] 王光华, 等. 大豆根浸提液生化他感现象的研究. 大豆重迎茬研究. 见 韩晓增, 许艳丽主编. 哈尔滨: 哈尔滨工程大学出版社, 1992. 73~77.
- [26] Chou C H. & Muller C H. allelopathic mechanisms of *Arctostaphylos glandulosa* var *zacaensis*. *Amer. Midl. Naturalist*, 1972, 88: 324~347.
- [27] Cheng H H. A conceptual framework for assessing allelochemicals in soil environment. Pages 21~29 In S. J. H. Rizvi & Rizvi ets. *Allelopathy: basic and applied aspects*. Chapman and Hall London, 1992.
- [28] Takao Katase. Distribution of diffent forms of phydroxybenzoic, vanillic, p-coumaric and ferulic acids in forest soil. *soil Sci. Plant Nu-*

- tr. ,1981 **27**(3) 365 ~ 371.
- [29] 高井康雄. 水田土壤中有机酸定量について(第2报)イオン交換法による土壤有机酸の分离. 土肥志 ,1958 **29** : 77 ~ 78
- [30] Thomas S C Wang. *et al.* Soil phenolic acids as plant inhibitors. *Soil Sci.* ,1967 **103**(4) 239 ~ 246.
- [31] Lawongsa P. *et al.* Identification of organic acids by HPLC in soil. *Soil Sci. Plant Nutr.* ,1987 **33**(2) 299 ~ 302.
- [32] 华中农学院土壤农化教研组, 化学教研组. 用分配薄层层析测定土壤中挥发性有机酸——影响水稻早发的土壤障碍因素诊断技术之一. 湖北农业科学 ,1976 (12) 33 ~ 36.
- [33] 曾任森, 林象联, 等. 蟛蜞菊的生化他感作用及生化他感作用物的分离鉴定. 生态学报 ,1996 **16**(1) :20 ~ 27.
- [34] 王大力, 祝心如. 豚草的化感作用研究. 生态学报 ,1996 **16**(1) :11 ~ 19.
- [35] 高井康雄. 水田土壤中有机酸定量について(第1报)シリカゲル・カラムクロマトグラフィ——による有机酸の定量および土壤有机酸の分离. 土肥志 ,1958 **28**(11) 435 ~ 438.
- [36] Iderjit & Dakshini K M M. allelopathic potential of an annual weed *Polypogon monspeliensis* in crops in India. *Plant and Soil* ,1995 , **173** 251 ~ 257.
- [37] Guenzi W D & McCalla. Phenolic acids in oats ,wheat ,sorghum and cron residues and their phytotoxicity *Agro. J.* ,1966 **58** 303 ~ 304.
- [38] Grierson P F. Organic acids in the rhizosphere of *Banksia integrifolia* L. F. *Plant and Soil* ,1992 **144** 259 ~ 265.
- [39] Yu J Q & Yoshihisa M. Effects of root exudates of cucumber(*Cucumis sativus* L.)and allelochemicals on ion uptake by cucumber seedlings. *J. Chem. Ecol.* ,1997 **23**(3) 817 ~ 827.
- [40] 马瑞霞, 等. 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. 生态学报 ,1996 **16**(6) 632 ~ 639.
- [41] 杨善元, 等. 凤眼莲根系中抑菌物质分离与鉴定. 植物生理学报 ,1992 **18**(4) 399 ~ 402.
- [42] 龙岛康夫. 水田土壤中有机酸代谢と水稻生育阻害性に関する研究(第1报)国産シリカゲルによる有机酸の Chromatography とその应用. 土肥志 ,1960 **31**(10) 435 ~ 440.
- [43] 刘秀芬, 等. 根际他感化学物质的分离鉴定与生物活性的研究. 生态学报 ,1996 **16**(1) :1 ~ 10.
- [44] Dalton b R ,Blum U ,Weed S B. Differential sorption of exogenously applied furlic ,pcoumaric ,phydroxybenzoic and vanillic acids in the soil. *Soil Sci. Amer. J.* ,1989 **53** 757 ~ 762.
- [45] Schmidt S K. Ecological implicadation of the destruction of juglone(5 hydroxy-1 ,4-naphthoquinone)by soil bacteria. *J. Chem. Ecol.* ,1990 **16** 3547 ~ 3549.
- [46] Meharg A ,*et al.* a novel of quantifing root exudation in presence of soil microflora. *Plant and Soil* ,1991 **133** :111 ~ 116.
- [47] Vance G F ,*et al.* Phenolic compounds in soils of hydrosquences and developmental sequences of spodosols. *Soil Sci. Soc. Am J.* , 1986 **50** 992 ~ 996.
- [48] Kuwatsuka S & Shindo H. Behavior of phenolic substances in the decaying process of plants (I). *Soil Sci. Plant Nutr.* ,1973 **19** : 219 ~ 227.
- [49] Yu J Q & Yoshihisa M. Extraction and identification of phytotoxic substances accumulated in nutrient solution for hydroponic culture of tomato. *Soil Sci. Plant Nutr.* ,1993 **39**(4) 691 ~ 700.
- [50] Vance G F ,*et al.* Extraction of phenolic compounds from a spodosol profile :an evaluation of three extractants. *Soil Sci.* ,1985 **140** (6) 412 ~ 420.
- [51] 孙文浩, 等. 凤眼莲根系分泌物中的克藻化合物. 植物生理学报 ,1993 **19**(1) 92 ~ 96.
- [52] Bulen W A ,*et al.* Sepration of organic acids from plant tissues chromatographic technique. *Anal. Chem.* ,1952 **24** :187 ~ 190.
- [53] 龙岛康夫. 水田土壤中有机酸代谢と水稻生育阻害性に関する研究(第3报)土壤による有机酸の吸収と土壤有机酸の定量法. 土肥志 ,1961 **32** :130 ~ 134.
- [54] 严衍禄主编. 现代仪器分析. 北京: 北京农业大学出版社 ,1995. 51 ~ 194.