

胜红蓟化感作用研究 IX. 主要化感物质在土壤中的转化

孔垂华^{1,2}, 徐效华², 陈建军¹, 胡 飞¹, 谭中文¹

(1. 华南农业大学热带亚热带生态研究所, 广州 510642; 2. 南开大学元素有机化学国家重点实验室, 天津 300071)

摘要:在田间条件下,胜红蓟挥发油能抑制花生的出苗和生长发育。进一步用高效液相色谱(HPLC)研究证实:胜红蓟挥发油中的主要化感物质胜红蓟素在土壤中的转化与土壤的有机质和营养元素水平显著相关。在高有机质和营养元素水平的土壤中,胜红蓟素先聚合形成二聚体,26d 后又解聚成胜红蓟素,然后逐步降解成苯甲酸类,2-甲基丙酸和乙酸等小分子。而在低有机质和营养元素水平的土壤中,胜红蓟素不经过二聚化过程,而是直接降解成小分子。经液质(LC/MS)和核磁共振(NMR)等技术分离鉴定了胜红蓟素二聚体的结构。生物测定表明:胜红蓟素二聚体对花生和黑牧草的生长没有抑制活性。

关键词:胜红蓟挥发油;胜红蓟素;转化;二聚体;土壤

Allelopathy of *Ageratum conyzoides* IX. Transformation of Main Allelochemical in the Soil

KONG Chui-Hua^{1,2}, XU Xiao-Hua², CHEN Jian-Jun¹, HU Fei¹, TAN Zhong-Wen¹ (1. Institute of Tropical and Subtropical Ecology, South China Agricultural University, Guangzhou, 510642, China; 2. State Key Laboratory of Elemento-Organic Chemistry, Nankai University, Tianjin, 300071, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2002, 22(8): 1189~1195.

Abstract: Under treatment condition of volatile oil from *Ageratum conyzoides*, the germination rate, fatty acid and protein enzymes, soluble protein of seed, root length, shoot height, chlorophyll content, the number of nodule of seedling and the number of branch, peg and pod as well as flowering period of peanut were tested and determined. All items and indexes demonstrated that the germination, growth and development of peanut were inhibited by volatile oil from *A. conyzoides* in the field. Obviously, allelopathic effects of volatile oil from *A. conyzoides* on peanut correlated with effective concentrations and active status of allelochemicals from volatile oil in the soil. Further research results by HPLC revealed that ageratochromene of main allelochemical from volatile oil firstly polymerized into dimers and depolymerized after 26 days under high organic matter and the fertility of soil, and then degraded gradually into benzoic acid and its derivatives, 2-methyl-propanoic acid and acetic acid after 34 days. However, ageratochromene had no polymerization and directly degraded into benzoic acid and its derivatives, 2-methyl-propanoic acid and acetic acid under low organic matter and the fertility of soil within 18 days. The results showed that transformation of ageratochromene in the soil were different and correlated significantly with organic matter and the fertility of soil. Dimers of transformation from ageratochromene in the soil were isolated and identified by means of LC/MS and NMR. Bioassay of ageratochromene and its transformation compounds in the soil on peanut and ryegrass showed that ageratochromene, benzoic acid and its

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39670141);广东省自然科学基金资助项目(960427);南开大学元素有机化学国家重点实验室开放基金资助项目(9803)

收稿日期:2000-01-24 **万方数据** **日期:**2002-01-06

作者简介:孔垂华(1962~),男,安徽省铜陵市人,博士,研究员。主要从事化学生态学研究。

derivatives inhibited significantly the growth of seedlings. However, dimers of ageratochromene had no inhibitory activities on the growth of peanut and ryegrass.

Key words: volatile oil of *A. conyzoides*; ageratochromene; transformation; dimer; soil

文章编号:1000-0933(2002)08-1189-07 中图分类号:Q143,Q946.91 文献标识码:A

在田间条件下,胜红蓟(*Ageratum conyzoides*)植株的化感效应与处理植株的方式密切相关^[1]。覆盖处理对花生出苗和生长不产生化感抑制效应,而是显示一定的促进效应,翻埋处理对花生出苗和生长都产生显著的化感抑制效应。然而覆盖处理 30d,翻埋处理 10d 后再播种花生,花生出苗均受显著抑制。用高效液相色谱(HPLC)技术对胜红蓟植株释放的主要化感物质胜红蓟素在土壤中的含量和时间及植株处理方式的关系研究证实:不同处理方式的胜红蓟植株显示化感效应的差异是它们向土壤中释放化感物质的时间和有效活性状态及浓度差异造成的^[1]。本文针对胜红蓟化感物质在土壤中变化、它们与土壤条件的关系等进一步探讨胜红蓟化感物质在土壤中的转化及其转化物质的结构与活性。

1 材料和方法

1.1 实验材料与仪器

胜红蓟植株采自华南农业大学生态气象实验场,受试植物花生(*Arachis hypogaea*)和黑麦草(*Lolium multiflorum*)种子来源于广东省农业科学研究院。

挥发油从胜红蓟植株中经水蒸气蒸馏的方法所得^[2],挥发油的化学成分参见文献^[3],胜红蓟素由本实验室从胜红蓟挥发油中经柱层析分离^[4]和经人工合成制备^[5]。柱层析硅胶和其它的有机试剂均为市售分析纯商品。

分析用高效液相色谱(HPLC)仪为美国惠普公司 HP1100 型,制备用 HPLC 为日本岛津公司的 Hitachi L7100 型,液相/质谱(LC/MS)联用仪为美国 Finnigan 公司的 TSQ7000 型,核磁共振仪(NMR)为德国 Bruker 公司的 AG-P200M 型。

1.2 挥发油的田间化感效应实验

在华南农业大学生态气象实验场内随机选取 1m×3m 的小区播种花生,所有处理均为秋播花生,播种时间为 2000 年 9 月初,每小区播种 45 株,株距 23cm×16.5cm,播种深度为 5cm。每个处理至少设 3 个重复,并设相应的对照,且对照和处理小区至少间隔 10m。除浇水外,其它的花生栽培管理按常规水平进行。小区土壤的基本肥力指标见表 1(测定方法,有机质:重铬酸钾外加热法测定;氮:碱解扩散法测定;磷:NH₄F/HCl 浸提,钼锑抗比色法测定;钾:NH₄OAC 浸提,火焰光度法测)。花生播种前,种子在胜红蓟挥发油饱和水溶液(浓度 375μg/ml,20℃)中浸泡 24h,对照种子则在蒸馏水中浸泡 24h。播种后每天在种穴处加 100ml 挥发油饱和水溶液(对照加 100ml 水),直至花生萌发。一旦播种,小区缺水时,处理小区一律喷施挥发油饱和水溶液,对照小区则喷施自来水,直至花生完成整个生育期。

1.3 胜红蓟素及其转化物质在土壤中的含量及结构分析

选取两种不同肥力水平的土壤(表 1),干燥后过 40 目筛,分别称取 50g 放入直径为 6cm、高 5cm 的塑料盒中。根据不同的实验目的,分别加 30ml 胜红蓟挥发油饱和水溶液或 300μg/ml 浓度的胜红蓟素水溶液。土壤充分润湿后放入 25±1℃恒温箱中,从第 2d 开始取样,以后每隔 4d 取样 1 次,每个肥力水平的土壤各取 12 个样(共 46d)。

按规定时间取样的土壤置于 500ml 三角瓶中,加入 100ml 无水乙醚振荡提取 3h 后过滤。滤液应为透明溶液,浑浊液需再次过滤(部分样品含有水珠,不进行除水处理)。真空除去乙醚,立即加 2ml 甲醇溶液,样品进行 HPLC 测定(进样前,样品需用 2~5μm 过滤头处理)。

胜红蓟素及转化物质在土壤中含量的测定在 HP1100 型 HPLC 仪上进行,采用 C18 反相柱(型号: Hypersil 125×4.0mm, 5μm),以 45%的甲醇和 55%水混合溶剂为流动相,检测波长 265nm,流速为 1.5ml/min,用 100μg/ml 浓度的胜红蓟素纯品为标样,测定相应色谱峰的保留时间和积分,并换算出样品中胜红蓟素及其转化物质的含量。

表 1 土壤肥力指标

Table 1 Organic matter and the fertility of soil

项目 Item		有机质	全氮	有效氮	全磷	有效磷	全钾	有效钾
		Organic matter	Total N	Available N	Total P	Available P	Total K	Available K
		(g/kg)	(g/kg)	(mg/g)	(g/kg)	(mg/kg)	(g/kg)	(mg/kg)
土壤 A	Soil A	22.03	1.71	40.79	0.23	13.80	12.9	102.5
土壤 B	Soil B	6.12	0.29	0.88	0.49	0.15	0.58	2.01

18d~22d 的高有机质和营养元素水平的土壤提取样品在 Finnigan-TSQ-7000 型 LC/MS 联用仪上进行色谱峰的结构分析,LC 条件同 HPLC。MS 条件:EI 电离方式,70ev 轰击电压,扫描范围 35-500amu,质谱结果参照 G1036A NIST Structure Database 计算机检索推断出能够确证的简单分子的结构。另一方面,制备大量的 18d~22d 高有机质和营养元素水平的土壤提取样品,在 Hitachi L7100 型制备 HPLC 仪上对两个通过 LC/MS 不能推断结构的色谱峰进行分离制备。制备条件:Phenomenex Prodigy C18 反相柱(25×2cm),流动相 35% 甲醇和 65% 水混合溶剂,流速 2ml/min,进样量为 300μl,检测波长为 265nm。经 HPLC 分离制备的两个色谱峰样品除去溶剂得到白色固体,经熔点测定确定为纯化合物后,分别用 CDCl₃(氘代氯仿)溶解后,测定它们的核磁共振(NMR)氢谱,根据谱图并参考文献^[6],确定两个化合物的结构。

1.4 田间数据调查和转化物质的生物活性测定

挥发油对花生出苗和生长的田间数据调查按文献^[1]的方法进行,叶绿素含量的测定按文献^[7]的方法进行。脂肪酶等其它生理指标按文献^[8]的方法进行。转化物质对花生和黑麦草的生物活性按文献^[2~5]的方法进行。

1.5 数据处理与统计方法

转化物质对花生和黑麦草的生物活性数据采用响应指数(RI: response index)^[9]表示,统计假设测试与方差分析均以田间调查数据和 RI 值为原始数据进行。所有数据均用 SPSS10.0 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 胜红蓼挥发油对花生的田间化感效应

实验采用秋花生作为受试作物基于两方面考虑:①在华南地区胜红蓼常常侵入花生地中成为危害的杂草;②华南地区秋季少雨,通过人工喷施水性试剂不易受自然降水影响。另外,在秋冬季胜红蓼的化感作用要比春夏季强烈得多^[10]。实验证明:在田间条件下,实验测得的各项指标均表明(表 2)胜红蓼挥发油饱和水溶液处理的花生,无论是在初期的种子出苗阶段,还是中期的营养生长阶段,以及后期生殖成熟阶段,花生都会受到不同程度的化感抑制作用,尤其是初期影响较为显著,表明胜红蓼化感物质在田间条件下是能够显示显著的化感效应的。值得注意的是:胜红蓼化感物质能使花生花期延长 12d 左右。胜红蓼挥发油中的主要成分胜红蓼素及其衍生物(约占 80%)是一类熟知的昆虫抗保幼激素,能够影响昆虫的发育进程^[11,12],胜红蓼挥发油对花生花期的影响是否也意味着胜红蓼素及其衍生物同样也能对植物的生殖生长产生类似昆虫的作用,这是非常有趣和值得进一步探讨的问题。

2.2 挥发油中的胜红蓼素在土壤中的含量与时间的关系

毫无疑问,胜红蓼挥发油对花生的田间化感抑制效应是因为挥发油中活性化感成分的作用,胜红蓼素是胜红蓼挥发油中主要的化感活性物质,其在土壤中的含量应与田间化感效应显著相关,用 HPLC 测定了不同时间土壤中胜红蓼素的含量(图 1)。按常理推断胜红蓼素在土壤中会逐步降解转化成小分子,最终消失。事实上,在 22d 内胜红蓼素在土壤中的含量也完全符合这一推断。但实验发现:26d 后,土壤中胜红蓼素的含量突然上升,34d 后又开始再度下降。这一结果将原先设计的胜红蓼素在土壤中含量测定实验变得复杂。认真检查排除了实验的错误和误差,而且也正是在检查实验中发现:胜红蓼素在土壤中含量的变化起伏与土壤的有机质和营养元素水平有关。在低有机质和营养元素水平的土壤中,这种胜红蓼素在土壤中含
量先降低后
万芳数据
况则不会出现。因此,深入探讨这一实验结果的本质是必须的工作。进一步的实验
选用两种有机质和营养元素水平有显著差异的土壤进行(表 1)。另外,为了排除挥发油中其它组分可能对

实验的干扰,进一步的实验用纯的胜红蓟素水溶液代替挥发油进行研究。

表 2 胜红蓟挥发油对花生的田间化感效应*

Table 2 Allelopathic effects of volatile oil from <i>A. conyzoides</i> on peanut in the soil			
生长阶段 Growth stages	测试指标 Items	处理 Treatments	对照 Control
萌发 Germination	萌芽率 Germination rate(%)	90±1.34	100±0.00
	脂肪酶 Fatty enzyme(unit)	0.246±0.001b	1.148±0.026a
	蛋白酶 Protein enzyme(mg/(g·h))	0.0121±0.000b	0.0324±0.001a
	可溶性蛋白 Soluble protein(mg/ml)	2.374±0.024a	2.386±0.186a
营养 Vegetative	根长 Root length(cm)	12.17±0.23b	14.23±0.36a
	苗高 Shoot height(cm)	29.38±1.59b	32.46±1.24a
	根瘤数 Number of nodules	50.67±1.25a	41.34±2.03b
	叶绿素含量 Chlorophyll content(mg/L)	50.39±2.46b	58.42±2.58a
生殖 Reproductive	分枝数 Number of branches	5.64±2.01b	8.52±1.26a
	下针数 Number of pegs	12.31±1.87b	16.12±1.45a
	花期 Flowering period(d)	32±3a	20±2b
	结果数 Number of pods	5.44±1.20b	7.12±1.23a

* 数据表示 3 次重复的平均值±标准误,同行具有相同字母表示在 0.05 水平上差异不显著 Data are mean of three replicates and ± standard errors. It means no different at 0.05 level as the same letter on a row

2.3 胜红蓟素在土壤中的转化

多次实验证实:胜红蓟素在高有机质和营养元素水平的土壤中的含量确实存在一个先降低后升高再降低的过程。而胜红蓟素在低有机质和营养元素水平的土壤中则含量逐步降低,18d 基本上消失,没有再升高情况出现(图 1)。这一结果显示胜红蓟素在不同有机质和营养元素水平的土壤中转化降解的情况是根本不同的。事实上,在高有机质和营养元素存在的土壤中化感物质容易滞留或转化成其它分子,而在低有机质和营养元素水平的土壤中,有机的化感物质往往会成为土壤微生物的碳源而迅速分解成小分子^[13]。在低有机质和营养元素水平土壤样品的 HPLC 图上,胜红蓟素分解成的数个小峰,而在高有机质和营养元素水平土壤样品的 HPLC 图上除了胜红蓟素和数个小峰外,还出现两个大峰(图 2)。用 LC/MS 联用技术测定土壤样品中的数个小峰主要是 3 个在不同位置甲氧基取代的苯甲酸以及 2-甲基丙酸、乙酸等小分子。两个大峰的质谱难以推断准确结构,但可以推测它们均为胜红蓟素的衍生物。用制备 HPLC 分离这两个色谱峰,得到两个纯的化合物,并进一步用核磁共振氢谱(¹H NMR)进行结构鉴定,证实这两个纯的化合物是胜红蓟素的二聚体(图 3)。这样就证明了胜红蓟素在土壤中可以通过聚合反应形成二聚体和逐步降解成苯甲酸为骨架的小分子物质两种途径进行转化。而且同时进行这两种途径的转化仅仅在含有较高有机质和营养元素水平的土壤中才发生,在很低有机质和营养元素水平的土壤中,胜红蓟素很快降解成小分子,而基本不发生聚合反应。然而为什么在高有机质和营养元素水平的土壤中,胜红蓟素的含量会出现先降低后升高再降低的现象呢?胜红蓟素、二聚体和降解小分子三者之间和在土壤中存在的时 间关系如何?进一步的实验用 HPLC 全面测定了在不同时间间隔下胜红蓟素及其二聚体和降解小分子在高有机质和营养元素水平土壤中的含量(图 4)。结果证明:胜红蓟素进入土壤初期将同时进行聚合形成二聚体和降解成小分子转化过程,而且以聚合化

为一方数据,胜红蓟素含量经过这两种途径转化后逐渐减少,二聚体和降解小分子含量有呈增加趋势。

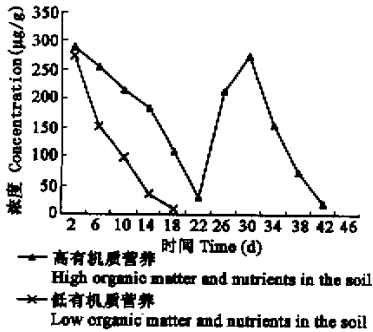


图 1 胜红蓟素在不同土壤中的含量和时间关系
Fig.1 Relation between content and period of ageratochromene under different soil

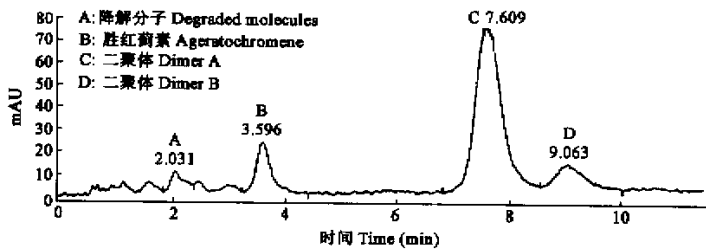


图 2 胜红蓟素加入土壤 22d 样品的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC chromatogram of ageratochromene in soil after 22 days

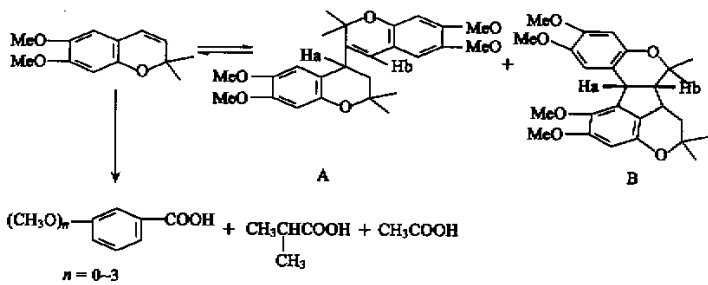


图 3 胜红蓟素在土壤中的转化

Fig. 3 Transformation of ageratochromene in the soil

22d 后,加入土壤中的胜红蓟素的含量达到最小值,表明胜红蓟素的聚合过程完成。然而 26d 开始,土壤中胜红蓟素的含量又突然上升,而二聚体的含量随胜红蓟素含量的上升而下降,根据这一结果可以认为:26d 胜红蓟素含量的上升是因为胜红蓟素二聚体在土壤中解聚造成的,显示胜红蓟素在土壤中聚合转化成二聚体是一个可逆过程。34d 后土壤中胜红蓟素和二聚体的含量都下降,而苯甲酸类降解分子的含量上升,显示 34d 后胜红蓟素主要进行降解反应。必须指出:大多数有机物在土壤中都会在微生物和其它因子的作用下逐步降解成小分子,这是一个不断发生且不可逆的动态过程,最终有机物都将形成 CO₂ 和 H₂O。因此,胜红蓟素在土壤中降解成小分子是一个不可逆的过程,而聚合转化成二聚体是一个动态的过渡过程。以上结果显示:胜红蓟素在土壤中的转化可依据土壤因子条件采取同时进行聚合化和降解小分子两种途径或进行单一小分子降解途径,但最终都是降解成小分子而失去活性。

2. 4 胜红蓟素在土壤中转化物质的生物活性

胜红蓟素在土壤中转化成二聚体和甲氧基取代苯甲酸以及 2-甲基丙酸、乙酸等物质。甲氧基取代苯甲酸、2-甲基丙酸、乙酸对植物生长的抑制作用是显而易见的。但胜红蓟素二聚体是否对植物生长有抑制作用,这是必须要确证的。通过测试这些物质对花生和黑麦草幼苗生长的初步生物活性研究证实:甲氧基取代和未取代的苯甲酸及胜红蓟素对受试植物的根长、苗高和叶绿素含量均有显著的抑制活性,尤其是甲氧基取代的苯甲酸活性较强,而胜红蓟素二聚体对受试植物幼苗的生长基本上没有影响,不具有生物活性

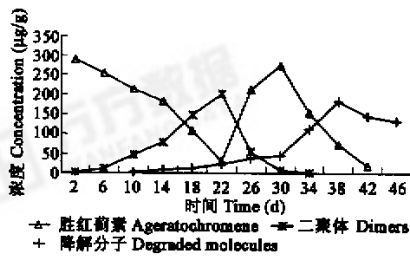


图 4 胜红蓟素及其转化物质在高有机质和营养土壤中的含量和时间的关系

Fig. 4 Relation between content and period of ageratochromene and its transformation chemicals under high organic matter and nutrient soil

(表 3)。这一结果显示,胜红蓟素在土壤中对受试植物的生物活性主要是分解的甲氧基取代苯甲酸、2-甲基丙酸、乙酸以及胜红蓟素本身,聚合转化的二聚体没有生物活性。胜红蓟植株翻埋处理对花生出苗和生长的持久化感抑制作用^[1]应与胜红蓟素的聚合化失活和后期二聚体解聚产生大量活性芳香酸和脂肪酸显著相关。另一方面,在低有机质和营养元素水平的土壤中,化感作用显著,但作用时间短暂,也应与胜红蓟素不能进行聚合化失活过程而是迅速降解成活性小分子有关。

表 3 胜红蓟素及其土壤中转化物质对植物幼苗生长的影响(RI±SE)

Table 3 Effect of ageratochromene and its transformation products on the growth of seedling in the soil						
化合物 Chemicals	花生 Peanut			黑麦草 Ryegrass		
	根长 Root length	苗高 Shoot heigh	叶绿素 Chlorophyll	根长 Root lenght	苗高 Shoot heigh	叶绿素 Chlorophyll
胜红蓟素 Ageratochromene	-0.47±0.02a	-0.49±0.03b	-0.27±0.04b	-0.57±0.06a	-0.52±0.03a	-0.33±0.06ab
二聚体 ADimer A	-0.05±0.03c	0.02±0.01c	0.04±0.02c	-0.04±0.02c	0.07±0.02c	-0.03±0.02c
二聚体 BDimer B	0.11±0.04c	0.03±0.02c	-0.02±0.01c	0.02±0.01c	0.04±0.02c	-0.02±0.01c
苯甲酸 Benzoic acid	-0.42±0.03a	-0.42±0.02a	-0.31±0.04b	-0.52±0.02a	-0.45±0.05a	-0.24±0.04a
对甲氧基苯甲酸 p-methoxyl benzoic acid	-0.57±0.02b	-0.51±0.03b	-0.23±0.06b	-0.60±0.04a	-0.58±0.04b	-0.34±0.04b

数据表示 3 次重复的平均值±标准误,具有同列具有相同字母表示在 0.05 水平上差异不显著 Data are the mean value of three replicates and ±standard errors, it means no different at 0.05 level as the same letters on a column

3 讨论

在陆生生态系统中,植物向环境释放的化感物质,少部分能够通过挥发和淋溶的方式与其它植物直接接触而发生效应,大部分化感物质是必须经过土壤为媒介作用后才能影响其它植物的。化感物质一旦进入土壤,必须经过滞留、转化和迁移 3 个基本过程^[14],这些过程又与土壤中各种物理、化学和生物因子的作用显著相关。因此,化感物质如何在土壤中变化,而且能对植物发生效应是一个非常复杂的问题。然而要弄清化感物质在自然条件下如何显示化感效应,这又是一个不可回避的问题。毕竟,植物具有化感潜力和植物真正显示化感效应并不是一回事。因此,化感物质在土壤媒介中的转化问题是非常值得研究的。

如果在胜红蓟植株存在的条件下研究植株向土壤中释放化感物质的转化情况自然是非常理想的事情,然而胜红蓟植株不仅向土壤中释放化感物质,也能降解和释放其它有机营养物质,整个过程涉及众多的生物和物理作用,同时是一个难以控制的连续动态过程。田间条件下,胜红蓟植株释放化感物质的抑制效应和释放有机营养物质的促进效应以及其它作用会相互影响,而难以得到明确的结果。经多次实验尝试未果后,本研究直接在田间用胜红蓟挥发油进行研究,排除了非化学因素的影响。随着实验的进程,进一步只针对主要化感物质胜红蓟素在土壤中的转化问题。证明胜红蓟产生释放的主要化感物质在土壤中的转化情况与土壤的有机质和营养元素水平有关。揭示胜红蓟素在土壤中不是简单地降解成小分子而失去活性,而是存在一个聚合化形成二聚体而失去活性的过程,而且这种聚合化过程是可逆的,在一定的时间后再度释放活性化感物质,表现出胜红蓟素在土壤中化感效应的持久性,尤其是在高有机质和营养元素水平的土壤中。酚类化感物质在土壤中能够发生聚酚化反应形成聚酚类物质而失去效应已有较多的研究^[15],然而类萜化感物质胜红蓟素也能在土壤中发生聚合反应形成二聚体尚未见过报道。

化感物质在土壤中的转化情况受到众多因素的影响,本研究仅探讨了胜红蓟素在两个不同有机质和营养元素水平土壤中的转化情况,土壤微生物、土壤结构和土壤水分及氧化态等因素对胜红蓟素转化的影响显然也是重要的。另外,一种植物向土壤中释放的化感物质往往是多种多样的,释放单一化感物质的情况很少见,这些众多的化感物质以及它们相应的转化物质之间在土壤中同样也存在着相互作用。因此,植物化感物质在土壤中的变化过程是复杂的,也非常富有挑战性。研究探讨化感物质在土壤中的变化过程,在研究思路、研究方法和技术等方面都需要有大的突破。

参考文献

- [1] Chen J J(陈建军), Kong C H(孔垂华), Hu F(胡飞), *et al.* Allelopathy of *Ageratum conyzoides* Ⅲ. allelopathic effects of residues on peanuts and related weeds in the field, *Acta Ecologica Sinica*(in Chinese) (生态学报), **22** (8):1196~1201.
- [2] Kong C H, Hu F, Xu T *et al.* Allelopathic potential and chemical constituents of volatile oil from *Ageratum conyzoides*. *J. Chem. Ecol.*, 1999, **25** (10):2347~2356.
- [3] Kong C H(孔垂华), Huang S S(黄寿山), Hu F(胡飞). Allelopathy of *Ageratum conyzoides* V. Biological activities of volatile oil from *ageratum* on fungi, insects and plants and its chemical constituents. *Acta Ecologica Sinica*(in Chinese)(生态学报), 2001, **21**(4):544~587.
- [4] Kong C H(孔垂华), Xu T(徐涛), Hu F(胡飞). Study on interactions among allelochemicals of *Ageratum conyzoides*. *Acta Phytocologica Sinica*(in Chinese)(植物生态学报), 1998, **22**(5):403~408.
- [5] Lu Y H(芦永辉), Kong C H(孔垂华), Dong C(董春), *et al.* Allelopathy of *Ageratum conyzoides* Ⅵ. Syntheses of analogs of ageratochromene and their inhibitory effects on plants and microorganisms. *Acta Ecologica Sinica* (in Chinese) (生态学报), 2001, **21**(6):890~859.
- [6] Kasturi T R, Abraham E M and Brown P. Structure of a dimer of ageratochromene. *J. Chem. Soc. Perkin I*, 1973, 2468~2470.
- [7] Baziramaberga R, Simard R R and Lexonx G D. Effects on benzoic and cinnamic acids on growth, mineral compositions and chlorophyll content of soybean. *J. Chem. Ecol.*, 1994, **20**:2821~2831.
- [8] Zhu G L(朱广廉), Zhong H W(钟海文), Zhang A Q(张爱琴). *Experiments in Physiology*(in Chinese). Beijing: Beijing University Press, 1990.
- [9] Williamson G B and Richardson D. Bioassays for allelopathy : Measuring treatment response with independent controls. *J. Chem. Ecol.*, 1988, **14**:181~188.
- [10] Kong C H, Hu F and Xu X. Allelopathic potential of *Ageratum conyzoides* under stress environmental conditions. *J. Chem. Ecol.*, 2002, **28**:1185~1194.
- [11] Bowers W S, Ohta T, Cleere J S, *et al.* Discovery of insect antijuvenile hormones in plants. *Science*, 1974, **193**: 254~257.
- [12] Binder B F and Bowers W S. Effects of precocene II on nutritional physiology of larvae. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 1992, **19**:237~246.
- [13] Blum U. The value of model plant microbe-soil systems for understanding processes associated with allelopathic interaction: one example. *ACS Symp. Ser.*, 1995, **582**:127~131.
- [14] Cheng H H. Characterization of the mechanisms of allelopathy: Modeling and Experimental approaches. *ACS Symp. Ser.*, 1995, **582**:132~141.
- [15] Inderjit K M. Plant phenolics in allelopathy. *Bot. Rev.*, 1996, **62**:186~202.