

20-27

第16卷第1期
1996年1月生态学报
ACTA ECOLOGICA SINICAVol. 16, No. 1
Jan., 1996

16(16)(3)

螞蟥菊的生化他感作用及生化他感作用物的分离鉴定

曾任森* 林象联 骆世明*

曾强[√] 谭惠芬

(南开大学元素有机化学国家重点实验室, 天津, 300071)

(南开大学元素有机化学研究所, 天津)

(* 华南农业大学热带亚热带生态研究所, 广州, 510642)

A

摘要 螞蟥菊(*Wedelia chinensis*(Osbeck) Merr.) 是华南常见的园林绿化草本植物。植被调查表明其群落中杂草很少, 形成螞蟥菊纯群落。用琼脂培养基培养螞蟥菊发现其分泌物对萝卜和黄瓜的种子萌发和幼苗生长有生化他感作用, 螞蟥菊的组织抽提物对萝卜、蔊草、马唐、莠苣和苜蓿5种植物幼苗生长都有抑制作用。用螞蟥菊作覆盖物对马唐、大画眉草和空心莲子草幼苗生长有抑制作用。用真空液相色谱、快速柱色谱等方法从螞蟥菊地上部分分离出2个纯化合物和1个较纯组分。纯化合物用质谱、红外光谱、核磁共振等方法鉴定为2个倍半萜内酯: Oxidoisotrilobolide-6-O-isobutyrate 和 Trilobolide-6-O-isobutyrate, 生物测定表明此2个化合物有很强的生化他感作用。较纯组分经GC/MS测定和联机检索确定为5,22-二烯-3-豆甾醇乙酸酯、十六烯酸甲酯和十八烯酸甲酯3个化合物的混合物, 它的生化他感作用较弱。

关键词: 螞蟥菊, 生化他感作用, 生化他感作用物, Oxidoisotrilobolide-6-O-isobutyrate, Trilobolide-6-O-isobutyrate.

绿化植物

ALLELOPATHIC POTENTIAL OF *WEDELIA CHINENSIS* AND ITS ALLELOCHEMICALS

Zeng Rensen* Lin Xianglian Luo Shiming*

Zeng Qiang Tan Huifen

(State key laboratory of element organic chemistry,
Nankai University, Tianjin, China, 300071)

(Element Organic Chemistry Institute,
Nankai University, Tianjin)

(* Ecology Institute of Tropics and Subtropics, South China
Agricultural University, Guangzhou, China, 510642)

Abstract Chinese *Wedelia* (*Wedelia chinensis*(Osbeck) Merr.) a common garden herb in South China, tends to form a pure community. Field investigation showed there was few weeds in their community. The herd, when planted in the center of beakers, contained 1% (W/W) agar, inhibited seed germination and seedling growth of nearby radish and cucumber. The extract of the plant tissue inhibited seedling growth of all the 5 tested receptor plants. *W. chinensis* as a mulching material inhibited seedling growth of 3 weeds: *Digitaria sanguinalis*, *Eragrostis*

* 国家自然科学基金资助项目, 南开大学元素有机化学国家重点实验室资助项目。

收稿日期 1993 12 28, 修改稿收到日期: 1994 07 08。

cilianensis and *Alternanthera philoxeroides*. From aerial parts of *W. chinensis*, 2 eudesmanolides; Oxidoisotrilobolide-6-O-isobutyrate and Trilobolide-6-O-isobutyrate, were isolated and identified. The bioassay showed that the 2 compounds, isolated from *W. chinensis*, had high allelopathic potentials. Another fraction, identified as a mixture of 3 compounds; stigmasta-5,22-dien-3-Ol, acetates, methyl oleate and methyl hexadecenoate, had relative low allelopathic potentials.

Key words *Wedelia Chinensis*, allelopathy, allelochemicals, oxidoisotrilobolide-6-O-isobutyrate, Trilobolide-6-O-isobutyrate.

植物间的生化他感作用 (Allelopathy) 研究在近 30 a 引起了科学家们的重视^[1], 已成为生态学最活跃的研究之一。中国大陆目前这方面的研究刚刚起步^[2], 在生化他感作用物 (Allelochemicals) 的分离鉴定方面更是个薄弱环节。

螞蟥菊 (*Wedelia chinensis* (Osborn) Merr.) 是华南常见的多年生园林绿化草本植物, 匍伏状, 侵占能力强, 种植后能很快地抑制其它杂草生长, 而趋于单一种群成片生长。本文对螞蟥菊群落进行野外调查, 对它的生化他感作用进行实验验证, 并进一步分离鉴定其中的生化他感作用物。

1 材料方法

1.1 材料

螞蟥菊, 1991 年 10 月采自广州华南农业大学校园内, 剪取地上部茎叶, 晾干 5 d 后在 45℃ 烘箱中干燥, 碾磨压碎至 5 cm 长以下, 装袋密封, 贮藏备用。

生物测定所用的受体有萝卜 (*Raphanus sativus*)、黄瓜 (*Cucumis sativus*)、稗草 (*Echinochloa crusgalli*)、莴苣 (*Lactuca sativa*)、马唐 (*Digitaria sanguinalis*)、大画眉草 (*Eragrostis ciliaris*)、空心莲子草 (*Alternanthera philoxeroides*) 和苜蓿 (*Medicago sativa*)。

硅胶是青岛海洋化工厂生产的, 颗粒大小 10—40 μ。有机溶剂为分析纯, 滤纸为中速新华定性滤纸。

1.2 研究方法

1.2.1 螞蟥菊群落中杂草数量的调查 1991 年 4 月在华南农业大学校园内以 1987—1990 年期间 4 个不同年份种植的螞蟥菊群落为调查样点, 取其邻近立地条件 (土质、坡地、光照等) 相似的自然杂草群落为对照样点。按 1 m × 1 m 样方进行调查, 重复 5 次。

1.2.2 螞蟥菊分泌物的生化他感作用测定 以 1/2 强度的斯泰耐营养液加 1% 琼脂制成培养基^[1]。每 1000 或 500 ml 烧杯中加 120 ml 此培养基, 冷凝后加入 3 段经预发芽的螞蟥菊茎节 (每段含 1 个节)。茎节预先用 1% 双氧水处理 2 min。再用水冲净。并设空白对照。4 次重复。烧杯用 13 cm 直径的培养皿盖上, 在 28℃ 黑暗的恒温培养箱中培养 7 d, 取出在室内培养。培养期间隔天经叶片喷入 1/2 强度的斯泰耐营养液使培养基水分、养分充足。培养 33 d 后, 取 1 组培养基 (2 个长有螞蟥菊, 2 个空白), 每烧杯放 30 粒萝卜种子。另 1 组每烧杯放 30 粒黄瓜种子。放入黑暗 28℃ 恒温培养箱中培养, 每天加入 2 ml 蒸馏水, 4 d 后测量发芽率和苗高, 并作照片记录。

1.2.3 螞蟥菊组织抽提物的生化他感作用活性测定 称 3 份 100 g 螞蟥菊茎叶干材料, 分别用蒸馏水、氯仿和石油醚 (沸程 60—90℃) 室温抽提 5 次, 每次用 500 ml 溶剂浸提 12 h。

合并浸提液,抽滤,旋转蒸发仪中(水浴温度 $>65\text{ }^{\circ}\text{C}$)减压浓缩至100 ml。此浓缩液每 ml 含1 g 干草抽提物,浓度为1 gDW/ml。

生物测定的受体是稗草、萝卜、马唐、莠苣和苜蓿,方法为:在50 ml 烧杯底部铺1层直径3 mm 的玻璃球,再铺上直径为3 cm 的滤纸,将处理液加在滤纸上。水抽提液直接配成0.05、0.1 gDW/ml 2个浓度,每烧杯加5 ml。氯仿和石油醚抽提液每烧杯中加浓缩液0.25或0.5 ml,在通风橱中挥干溶液后,加5 ml 蒸馏水,最后的浓度也相当于0.05和0.1 gDW/ml。加入水或水溶液后放10粒均匀已发芽的种子。烧杯在光照培养室中培养,每天光照9 h,白天温度24—29 $^{\circ}\text{C}$,夜20—24 $^{\circ}\text{C}$,培养4 d后测量幼苗根长和苗高。

1.2.4 螞蟥菊作覆盖物对杂草幼苗生长的影响 在500 ml 烧杯中盛500 g 洗净烘干的细砂($<3\text{ mm}$),砂表面铺上8.5 g 螞蟥菊干材料,对照表面不铺。野外选取生长一致株高为15 cm 的大画眉草、马唐、空心莲子草3种植物幼苗,小心挖出,去除土壤后移入烧杯砂培,每杯移入3株。另取每种植物幼苗5 g 105 $^{\circ}\text{C}$ 烘干24 h后称重。在透光率50%的避雨阴棚内用1/2强度斯泰耐营养液培养。21 d后收获幼苗,量取苗高和根长后105 $^{\circ}\text{C}$ 烘干24 h称重,计算各自的生长量。3次重复。

1.2.5 螞蟥菊生化他感作用物的提取、分离 在搪瓷缸中用15 L 氯仿抽提4 kg 螞蟥菊干材料5次,每次48 h。抽提液抽滤,滤液在旋转蒸发仪中减压浓缩(水浴温度 $60\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$)。最后得到145 g 粘膏状氯仿抽提物。膏状物用真空液相色谱法(VLC)^[4]进行初步分离,所得组分采用与组织抽提物活性测定相同的生物测定方法进行活性跟踪,用稗草幼苗根长折合对照的百分率(CK%)作为衡量指标。活性组分再用快速柱色谱法(FC)^[5]进一步分离。色谱柱长70 cm,直径3 cm。硅胶装柱长12 cm,过柱压力1.0—1.2 kg/cm²。洗脱溶剂为石油醚与乙酸乙酯混合溶剂,最后用甲醇冲洗柱子。根据薄层色谱的展开情况将相同或相近的组分合并。

1.2.6 生化他感作用物的结构测定 用MRKNo7829微量熔点仪测定熔点;用Bruker Ac-P₂₀₀型超导仪测定核磁共振谱(¹H NMR和¹³C NMR),内标TMS,溶液CDCl₃;ZIR用KBr压片在DS-301型红外光谱仪测定;用HP5988质谱仪测定质谱;元素分析用MT-3型元素分析仪测定。

1.2.7 生化他感作用物分析测定 已鉴定的化合物用乙酸乙酯溶解,每50 ml 烧杯溶2.5 mg 晶体,挥干溶剂后加5 ml 蒸馏水。生物测定的方法与组织抽提物活性测定的方法相同,受体是稗草、萝卜和莠苣。

2 结果与分析

2.1 螞蟥菊群落中杂草数量的调查

野外调查结果(表1)显示,螞蟥菊群落除1989年种植的外,其余每m²样方杂草数量在6株以下,杂草的种类只有白茅(*Imperata cylindrica*)、加拿大飞蓬(*Erigeron canadensis*)和三叶鬼针草(*Bidens pilosa*)3种。而邻近群落中杂草数量每m²都在1000株以上,种类很多,除上述3种外,还有胜红蓼(*Ageratum conyzoides*)、马唐、大画眉草、牛筋草(*Eleusine coracana*)、鼠尾粟(*Sporobolus indicus*)等。螞蟥菊种植1 a后(1990—1991年),群落中杂草就显著被抑制,此间并未人工除草。1989年种植的群落杂草数量相对较多,但仍显著少于对照。原因是这年种植的群落上层无树木遮盖,其它年份有遮盖,而螞蟥菊是喜阴植物,阳生环境对其生长不利。

表 1 螞蟥菊群落中杂草数量的调查结果(株/m²)Table 1 Investigation of weed numbers in *W. chinensis* (Plants/m²)

种植年份 The year of planting	1987	1988	1989	1990
螞蟥菊群落中 In <i>W. chinensis</i> community	3.0 ^{**}	3.3 ^{*d}	224.8 [*]	5.6 ^{**}
对照 Control	1308.6	1431.8	1072.2	1301.2

数字后的 * 和 ** 分别表示与对照进行 *t* 测验在 5% 和 1% 水平上的差异显著性。

Numbers followed * and ** indicate significant inhibition at level 5% and 1% respectively.

螞蟥菊群落中杂草少的可能原因, 一是该植物具有生化他感作用; 二是它对光、温、水和养分具有较强的竞争作用, 必须予以区分。

2.2 螞蟥菊分泌物的生化他感作用测定

图 1 和图 2 的结果显示, 正在生长的螞蟥菊对播种在附近的萝卜和黄瓜都有显著抑制作用; 其中, 萝卜的种子发芽率仅为对照的 12%, 已萌发幼苗的芽长只有对照的 0.6%, 即种子萌发后幼苗就停止生长。黄瓜种子萌发虽未受到显著抑制, 但幼苗生长受到极显著抑制, 幼苗芽长只有对照的 10%。由于处理与对照间光、温条件一致, 水分得到充分供应, 种子萌发和幼苗前期生长受养分影响很小。因此, 此抑制作用是螞蟥菊茎节萌发和幼苗生长过程中产生的分泌物生化他感作用的结果。

2.3 螞蟥菊组织抽提物的生化他感作用活性测定

表 2 结果显示, 0.05 DW/ml 浓度的水抽提物对萝卜幼苗根和芽生长有显著抑制作用, 也对莴苣幼苗根生长有显著抑制作用, 但对其它抑制不显著; 当浓度达 0.1 gDW/ml 时, 除对稗草幼苗生长无显著影响外, 水抽提物对其它 4 种植物幼苗生长均有显著抑制, 尤其对幼苗根生长抑制较强。氯仿抽提物在 0.05 gDW/ml 浓度时, 对幼苗芽生长抑制虽不显著, 但对 5 种植物幼苗根生长都有显著抑制; 当浓度达 0.1 gDW/ml 时, 不但抑制所有受体幼苗根生长对稗草、马唐和苜蓿 3 种受体幼苗芽生长也有显著抑制, 其中, 稗草和马唐幼



左 对照(ck) 右 种有螞蟥菊(with *W. chinensis*)

图 1 在琼脂培养基上种植的螞蟥菊对邻近萝卜种子萌发和幼苗生长的影响

Fig. 1 Influence of *W. chinensis* grow in agar medium on seed germination and seedling growth of nearby radish



左 对照(ck) 右 和有莛蓼菊(with *W. chinensis*)

图 2 在琼脂培养基上种植的莛蓼菊对邻近黄瓜种子萌发和幼苗生长的影响

Fig. 2 Influence of *W. chinensis* grow in agar medium on seed germination and seedling growth of nearby radish

表 2 莛蓼菊植物组织抽提物对其它植物幼苗生长的影响 (mm)

Table 2 Influence of *W. chinensis* plant tissue extractions on seedling growth of other plants

溶剂 Solvent	浓度 (g 鲜重/ml) Concentration	萝卜 <i>R. sativus</i>		稗草 <i>E. crusgalli</i>		马唐 <i>D. sanguinalis</i>		生菜 <i>L. sativa</i>		苜蓿 <i>M. sativa</i>	
		苗高 Seedling height	根长 Root length	苗高 Seedling height	根长 Root length	苗高 Seedling height	根长 Root length	苗高 Seedling height	根长 Root length	苗高 Seedling height	根长 Root length
		水 Water	0.05	23 ab	10 b	46 a	46 a	21 a	23b	17 a	17 bc
	0.10	11b	6 b	51 a	29 b	13 ab	6 c	10 a	4 c	15 ab	16 bc
氯仿 Chloroform	0.05	29 a	26 b	36 ab	10 cb	14 ab	4 c	11 a	15 bc	15 ab	18 bc
	0.10	27 a	19 b	22 d	2 d	9 d	1 c	9 a	7 c	9 b	10 c
石油醚 Ptrole- mether	0.05	35 a	42 ab	40 a	20 bc	13 ab	24 b	12 a	39 a	16 ab	40 a
	0.10	32 a	39 ab	20 b	16 bc	15 ab	13 bc	10 a	29 ab	14 ab	28 ab
对照 Control		33 a	65 a	41 a	40 ab	17 ab	42 a	15 a	32 ab	20 a	34 a

表中数字后有不同字母表示 SSR 测验的差异显著性 ($P < 0.05$)

Figures with different letters indicate significance of SSR test at level 5%

苗的根生长完全被抑制。石油醚抽提物在 0.1 gDW/ml 的高浓度下, 只对稗草幼苗根和芽生长, 以及对马唐幼苗根生长有显著抑制, 对其它则无抑制作用。

综合 3 种抽提物的影响可以看出, 氯仿抽提物的抑制活性最强, 水抽提物次之, 石油醚抽提物最弱。从作用特性来看, 水抽提物对萝卜、莴苣和苜蓿等双子叶植物抑制较强, 氯仿抽提物对稗草和马唐等单子叶植物抑制较强, 莛蓼菊组织抽提物对幼苗根生长的抑制较强, 对芽生长的抑制相对较弱。

2.4 螞蟥菊作覆盖对杂草幼苗生长的影响

表 3 结果表明, 用螞蟥菊作覆盖后, 马唐、大画眉草和空心莲子草幼苗的根生长, 地上部生长和干物重都受到显著抑制。其中马唐的株高、根长和干物重的增长量分别比对照减少 39%、76% 和 72%, 大画眉草分别减少 51%、75% 和 54%, 空心莲子草分别减少 85%、67% 和 68%。此抑制作用是螞蟥菊产生的化学物质引起的。在野外调查中, 也发现螞蟥菊的群落中没有马唐和大画眉草生长, 而附近对照中这 2 种杂草较多。

表 3 螞蟥菊作覆盖物对杂草幼苗生长的影响(mm)

Table 3 Influence of *W. chinensis* residue mulching on seedling growth of weeds

螞蟥菊 覆盖处理 <i>W. chinensis</i> residue mulch- ing treatment	马唐 <i>D. sanguinalis</i>			大画眉草 <i>E. chinensis</i>			空心莲子草 <i>A. phytolerooides</i>		
	苗高增长 量(mm)	根长增长 量(mm)	干物重增 长量(mg)	苗高增长 量(mm)	根长增长 量(mm)	干物重增 长量(mg)	苗高增长 量(mm)	根长增长 量(mm)	干物重增 长量(mg)
	ISH	IRL	IDW	ISH	IRL	IDW	ISH	IRL	IDW
有覆盖 Mulching	66.7**	17.3**	7.0**	88.7**	20.0**	11.0**	31.3**	14.0**	8.0**
无覆盖对照 No mulching (CK)	110.0	58.7	25.0	182.0	79.3	24.0	208.0	43.0	25.0

数字后 * 和 ** 分别表示与对照进行 *t* 测验在 5% 和 1% 水平上的差异显著者。

Numbers followed * and ** indicate significant inhibition at level 5% and 1% respectively.

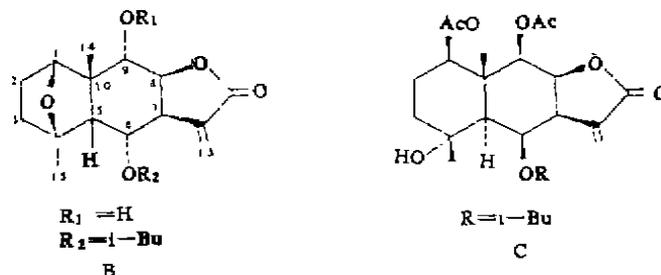
ISH, IRL and IDW indicate increase of seedling height, root length and dry weight of plant materials respectively.

2.5 生化他感作用物的分离

螞蟥菊地上部植物组织的氯仿抽提物经多次色谱分离, 重结晶, 得到了 3 个结晶: A、B 和 C。分离流程见下页。

2.6 生化他感作用物的结构鉴定

A、B 和 C 均为无色晶体。A 的熔点为 154—159℃, 经气相色谱/质谱联用仪(GC/MS)测定和联机检索确定为 3 个化合物的混合物, 它们是 5, 22-二羟基-3-豆甾醇乙酸酯、十六烯酸甲酯和十八烯酸甲酯。B 的熔点为 239—241℃, C 的熔点为 230—232℃。B 和 C 经元素分析、质谱、核磁共振(¹HNMR、¹³CNMR)、红外光谱等确定为 2 个倍半萜酯, 分子式分别为 C₁₇H₂₆O₅(B) 和 C₂₃H₃₂O₅(C)。结构如下:



2.7 生化他感作用物生物活性的测定

表 4 结果显示, 在 500 mg/l 浓度下, 混合物 A 的生化他感作用活性较弱, 只对稗草、

萝卜幼苗根生长有抑制作用。化合物 B 和 C 的生化他感作用活性很强, 它们使 3 种受体的根都难以生长, 其中稗草幼苗的根生长则完全被抑制, 发芽后根就停止生长。B 和 C 还对 3 种受体幼苗芽生长有显著抑制。可见, 化合物 B 和 C 是螞蟥菊重要的生化他感作用物质。

3 讨论

自然界中很多植物趋于以单一种群落生长。野外观察和植被调查表明, 螞蟥菊总是以高密度、单一种群落生长。本研究通过组织培养、组织抽提和用螞蟥菊作覆盖物等方法证实了螞蟥菊对其它植物有生化他感作用。这可能是螞蟥菊的一种重要的生态机制, 是它抑制邻近其它植物生长和自身成片生长的重要原因。该植物茎叶匍伏, 每个茎节都能长根, 又是高密度生长的多年生植物, 在生长过程中不断分泌的化学物质能抑制其它植物的生长。

本研究首次从螞蟥菊中分离得到化合物 B 和 C。F. Bohlmann 从另一种植物中首次分离得到过此 2 个化合物^[6], 但化合物 B 并未得到纯品, 只得到几个化合物的混合物肢体, 也未测定过它们的生物活性。本研究首次得到了化合物 B 的纯品, 并确定了 B 和 C 的生物活性。E. Rodriguez 指出^[7], 倍半萜内酯如果是连接有亚甲基的顺外型, γ -内酯, 抑制其它生物生长的活性较强。同时, 具有环氧结构、羟基、酮基, 或在亚甲基附近有其它酯键, 都能增强倍萜内酯的生物活性。因此, 从结构上看, 化合物 B、C 的生物活性也很强。已鉴定的此 2 个化合物的结构可能对今后设计新型除草剂结构有所启发。

螞蟥菊是一种适应性广, 易于种植的喜阴草本植物, 在华南地区常用作路旁绿化和林下复盖, 也有农民用螞蟥菊作先锋植物以消除旱地杂草。植被调查表明螞蟥菊种植一年后群落中杂草就很少。今后, 可否用螞蟥菊作覆盖, 或用它的水提液喷洒来控制杂草, 或在成年果园及休闲农田中种植它以控制杂草, 还需进一步研究。已鉴定的生化他感作用物在自然界究竟以何种方式被分泌到体外起作用以及作用机理也有待深入研究。

参 考 文 献

- 1 Putnam A R and Tang C S. *The Science of Allelopathy*. New York, John Wiley & Sons, 1986, 1—19
- 2 张宝琛、白雪芳、顾立华等. 生化他感作用与高寒草甸上人工草场自然退化现象的研究. 生态学报, 1989, 9(2): 115—120
- 3 于清华. 无土栽培. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1986, 64
- 4 郑国厚. 真空液相层析. 有机化学, 1989, 3: 286—288
- 5 Still W C, et al Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separations with Moderate Resolution. *J. Org. Chem.* 1978, 43(114): 2923—2925
- 6 Bohlmann F, et al. Eudesmanolides and Diterpenes from *Wedelia trilobata* and Ent-kaurenic Acid Derivative from *Aspliza parvifolia*. *Phytochem.* 1981, 20(4): 751—756
- 7 Rodriguez E, et al. Biological Activities of Sesquiterpene Lactones. *Phytochem.* 15(11): 1573—1580