

DOI: 10.5846/stxb201810102198

李敏, 闫兴富, 马丽, 马璐, 时榕. 酚酸类化感自毒物质对枸杞种子萌发的抑制作用. 生态学报, 2020, 40(6): 2072-2079.

Li M, Yan X F, Ma L, Ma L, Shi R. Allelopathic inhibition of phenolic acids on germination of Wolfberry (*Lycium barbarum* Linn.). Acta Ecologica Sinica, 2020, 40(6): 2072-2079.

酚酸类化感自毒物质对枸杞种子萌发的抑制作用

李 敏^{1,2,*}, 闫兴富^{1,2}, 马 丽¹, 马 璐¹, 时 榕¹

¹ 北方民族大学生物科学与工程学院, 银川 750021

² 北方民族大学国家民委生态系统模型及应用重点实验室, 银川 750021

摘要: 酚酸类化感自毒物质是导致农作物连作障碍的重要诱因之一。枸杞作为多年生木本植物, 连作障碍突出, 成因复杂。为揭示酚酸类物质对枸杞的化感自毒作用, 研究了 22 种常见酚酸对枸杞种子萌发的抑制作用, 并运用比较分子场分析方法 (CoMFA) 进行构效关系研究。结果发现, 酚酸化合物对枸杞种子萌发作用的半抑制浓度 IC_{50} 范围为 39.94—115.97 mg/L; CoMFA 结果表明, 运用立体场和静电场能较好解释该类化合物对枸杞种子萌发的化感自毒特征, 苯环 1/2/3/4 位具有大体积、1 位具有强负电性取代基的酚酸化合物, 对枸杞种子萌发具有较强抑制作用。研究结果可为客观评价酚酸类化合物对枸杞的化感自毒作用提供基础数据支撑。

关键词: 酚酸; 枸杞; 种子萌发; 化感作用; 构效关系

Allelopathic inhibition of phenolic acids on germination of Wolfberry (*Lycium barbarum* Linn.)

LI Min^{1,2,*}, YAN Xingfu^{1,2}, MA Li¹, MA Lu¹, SHI Rong¹

¹ College of Biological Science and Engineering, Beifang University of Nationalities, Yinchuan 750021, China

² Key Laboratory of Ecosystem Model and Applications of State Nationalities Affairs Commission, Yinchuan 750021, China

Abstract: Phenolic acid allelochemicals are some of the most important agents to cause continuous cropping obstacles. As a perennial woody plant, the continuous cropping obstacles of Wolfberry (*Lycium barbarum* Linn.) are serious, and their contributed factors are complicated. To determine the effects of phenolic acids on Wolfberry, the allelopathic inhibition of 22 phenolic acids on the germination of wolfberry was quantified, and comparative molecular field (CoMFA) analysis was used to elucidate the relationship between allelopathic activities and structural characteristics. The results showed that half maximal inhibitory concentrations (IC_{50}) were in 39.94—115.97 mg/L. The CoMFA indicated that the allelopathic activities increased when substituents had large volumes at the 1/2/3/4—positions of the benzene ring, and/or a negative charge at the 1-position of the benzene ring. These results provide basic data for evaluating the allelopathic effects of phenolic acids on Wolfberry.

Key Words: phenolic acids; Wolfberry (*Lycium barbarum* Linn.); germination; allelopathy; structure-activity relationship

化感作用 (Allelopathy) 是生态系统中存在的普遍现象, 指部分植物 (也包括部分微生物) 释放某些化学物质至外部环境, 从而对邻近个体的生长发育产生影响^[1]; 此类化学物质被称为化感物质, 主要来源于高等植物次生代谢产物, 其化学本质多为小分子有机化合物。如果化感物质的供体和受体是同一种植物, 且对该植物的生长发育产生不利影响, 则这种现象被称为自毒作用 (Autotoxicity), 是化感作用的一种特殊形式^[2-3]。自

基金项目: 环境化学与生态毒理学国家重点实验室开放基金 (KF2018-07); 国家自然科学基金项目 (31660195)

收稿日期: 2018-10-10; **网络出版日期:** 2019-12-17

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: bkdlimin@126.com

毒作用往往在农业生产领域产生负面效应。

植物残体分解、根系分泌以及雨露淋溶是自毒物质进入外部环境的主要途径^[4-5]。农田长期耕种同一作物,容易导致同一类自毒物质在土壤介质中累积,尤其在作物根系附近土壤形成高浓度微环境^[6-7]。当自毒物质积累到一定量时,即可对植物产生毒害作用,作用机制较为复杂。以酚酸类自毒物质为例,研究发现该类物质可对植物细胞膜的通透性、酶的含量与活性、矿物质元素的吸收与利用、蛋白质和核酸的代谢、光合作用等生理活动产生负面影响^[8-11]。此外,自毒物质与土壤理化性状劣变、根际微生物种群劣变等也存在关联^[11-15],被认为是导致农业生产连作障碍的重要诱因之一^[16-17]。

枸杞(*Lycium barbarum* Linn.)为茄科植物,是落叶的多年生小灌木。目前,受道地性产区土地资源紧缺和农民种植习惯等因素制约,连作障碍日趋突出^[18-19],应给予足够重视。然而,关于枸杞连作障碍成因的研究十分匮乏。已有研究证实以阿魏酸、香草酸和肉桂酸等为代表的酚酸类有机酸是番茄^[13]、西瓜^[20-21]、苜蓿^[22]、山桃^[23]、杨树^[24-25]等众多作物的主要化感自毒物质,上述酚酸在枸杞植株体内含量较高^[26-27],阿魏酸是枸杞根际分泌物的主要成分^[28]。随着连作年限的增加,上述化合物在枸杞根际微环境中不断累积,很可能成为枸杞连作障碍的潜在诱因。检验化感物质对待试植物种子萌发的影响,是化感物质活性研究的一种主要方法,因为种子萌发是植物生命周期中非常敏感和重要的一个阶段,研究结果具有一定的代表性。定量构效关系(Quantitative structure-activity relationship, QSAR)研究方法利用化学、数学、计算机和生命科学等交叉学科技术,将化合物的生物活性与分子结构联系起来,可一定程度揭示化合物分子与生物受体相互作用机制。因此,本文全面考察常见酚酸类物质对枸杞种子萌发过程的化感自毒作用,并利用3D-QSAR中比较分子场分析法(Comparative molecular field analysis, CoMFA),揭示该类化合物分子结构特征与其化感自毒活性之间的内在关系,为酚酸类物质对枸杞的化感自毒作用研究以及枸杞连作障碍成因的解析提供基础数据支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料

高压灭菌锅、9 cm 玻璃培养皿、9 cm 圆形滤纸、锡箔纸、恒温培养箱等。

枸杞果干(宁杞1号)、高纯水(采用 Milli-Q 制备,电阻率大于 18 MΩ·cm),酚酸类化合物(种类见表1)购自阿拉丁试剂(中国,上海),纯度≥97%,10%次氯酸钠溶液。

1.2 种子萌发培养及化感自毒活性测定

9 cm 玻璃培养皿中垫入2层滤纸,高压蒸汽灭菌(121℃、15 min)制备成滤纸床。将枸杞干果于高纯水中浸泡过夜,轻轻碾碎果肉后取枸杞种子,于室温下晾干。采用10%次氯酸钠溶液浸泡枸杞种子消毒10 min,用无菌水反复漂洗数次后将种子移至滤纸床,每个滤纸床(培养皿)中放入10粒种子。在温度为28±0.5℃的培养箱中遮光培养7 d,其中培养伊始于每个滤纸床中加入7 mL不同浓度酚酸溶液,第4天于每个培养皿中续加3 mL溶液。

对每一个酚酸化合物设置0(即7 mL无菌水,空白对照CK)、25、50、75、100、125、150 mg/L 7个浓度梯度。以单个滤纸床为1个平行计,每个酚酸浓度设置3个平行。

每天监测各个滤纸床中种子的萌发情况,7天后测定胚根长、胚轴长,并通过计算酚酸类化合物对种子萌发、胚根生长和胚轴生长的抑制作用(以抑制率定量计算),绘制浓度-抑制率计量效应曲线,求取半抑制浓度IC₅₀,分别表示为IC_{50,萌发率}、IC_{50,胚根长}和IC_{50,胚轴长},定量评价酚酸对枸杞种子萌发过程的抑制效应;其中,抑制率(%)=(空白对照CK-处理)/空白对照CK×100%。

1.3 三维定量构效关系建模

定量构效关系建模分析中,生物活性数值采用以摩尔浓度单位计的IC₅₀(μmol/L)数值,具体见表1。3D-QSAR分析采用比较分子场分析方法,所有的操作均采用SYBYL 7.0软件各模块完成。酚酸类化合物分子结构优化使用Tripos力场,分子电荷采用Gasteiger-Huckel电荷,能量最小化计算过程中,Gradient阈值为0.005。

采用生物活性最大(以摩尔浓度计 IC_{50} , 胚根长最小)化合物 2,3,4-三甲氧基肉桂酸为模板,使用 Align Database 方法将所有分子进行叠合。其叠合效果如图 1 所示。将叠合好的分子置于默认的三维网格(2 Å grid)中,按照默认的探针(+1 价 sp^3 杂化 C 原子)、步长(1.0)以及能量阈值(30 kcal/mol)进行 CoMFA 分析,未进一步说明的参数均采用 SYBYL 软件默认设定值。统计学分析采用偏最小二乘(Partial Least Squares Analysis, PLS)方法建立模型,采用抽一法(Leave-One-Out, LOO)进行交叉验证。

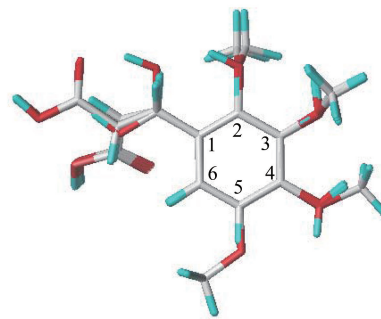


图 1 22 种酚酸类化合物分子叠合图
Fig.1 Overlay chart of the 22 phenolic acids

表 1 酚酸类化合物对枸杞种子萌发的化感自毒作用实验值与模型分析值

Table 1 The experimental and model predict values of allelopathic effects of phenolic acids to *Lycium barbarum*

序号 No.	名称 Names	CAS 登记号 CAS No.	半抑制浓度 $IC_{50}/(mg/L)$			比较分子场分析 Comparative molecular field analysis/ $(\mu mol/L)$		
			萌发率 Germination	胚根长 Radicle	胚轴长 Hypocotyl	实验值 Observed value	模型值 Predicted value	残差 Residual
1	苯甲酸 Benzoic acid (BA)	65-85-0	78.88±7.36	71.74±6.35	69.72±3.66	587.45	565.77	21.68
2	水杨酸 Salicylic acid	69-72-7	102.22±5.01	66.26±3.94	65.22±2.92	479.73	485.27	-5.54
3	4-羟基苯甲酸 4-HydroxyBA	99-96-7	97.38±6.96	78.93±3.11	76.32±2.88	571.46	528.47	42.99
4	香草酸 Vanillic acid	121-34-6	110.61±4.91	62.73±4.27	66.62±7.70	373.06	361.06	12.00
5	2,5-二羟基苯甲酸 2,5-DihydroxyBA	490-79-9	103.22±5.73	70.54±3.88	53.53±5.50	454.70	483.85	-29.15
6	3,4-二羟基苯甲酸 3,4-DihydroxyBA	99-50-3	105.91±5.39	80.69±4.29	54.68±3.44	523.55	518.92	4.63
7	丁香酸 Syringic acid	530-57-4	107.16±6.94	68.18±5.74	64.37±3.71	344.05	373.63	-29.58
8	肉桂酸 Cinnamic acid (CA)	140-10-3	94.61±7.07	69.97±2.16	68.41±4.91	472.26	486.39	-14.13
9	对香豆酸 p-Coumaric acid	501-98-4	108.34±6.96	70.71±4.15	64.60±7.71	430.74	450.46	-19.72
10	3-羟基肉桂酸 3-HydroxyCA	14755-02-3	101.04±7.04	76.76±3.63	64.34±5.67	467.59	475.68	-8.09
11	咖啡酸 Caffeic acid	331-39-5	97.34±7.95	63.64±4.23	64.17±5.18	353.24	325.33	27.91
12	2,4-二羟基肉桂酸 2,4-DihydroxyCA	614-86-8	107.19±5.06	74.28±3.96	67.14±5.10	412.30	410.58	1.72
13	阿魏酸 Ferulic acid	1135-24-6	115.97±6.38	62.79±5.04	39.94±4.94	323.36	311.73	11.63
14	异阿魏酸 Isoferulic acid	537-73-5	104.52±4.41	77.89±6.27	80.56±2.09	401.12	429.31	-28.19
15	3-甲氧基肉桂酸 3-MethoxyCA	6099-04-3	104.01±5.84	56.47±7.75	56.62±3.75	316.93	315.95	0.98
16	4-甲氧基肉桂酸 4-MethylCA	1866-39-3	98.21±7.92	70.47±6.83	61.28±6.10	434.49	436.87	-2.38
17	2,3,4-三甲氧基肉桂酸 2,3,4-TrimethoxyCA	33130-03-9	90.08±5.60	64.10±5.20	60.01±6.77	269.06	260.62	8.44
18	2-甲氧基肉桂酸 2-MethoxyCA	6099-03-2	90.08±4.01	81.72±4.54	63.92±5.92	458.46	442.10	16.36
19	3,5-二甲氧基肉桂酸 3,5-DimethoxyCA	16909-11-8	89.45±7.72	80.92±4.28	71.64±4.41	388.65	363.29	25.36
20	2,3-二甲氧基肉桂酸 2,3-DimethoxyCA	7345-82-6	103.01±7.55	58.58±5.54	49.13±3.69	281.35	317.92	-36.57
21	3,4,5-三甲氧基肉桂酸 3,4,5-TrimethoxyCA	90-50-6	99.25±6.03	71.19±5.64	55.70±5.09	298.82	268.14	30.68
22	芥子酸 Sinapic acid	530-59-6	94.61±6.75	65.98±3.10	64.46±4.33	294.28	325.30	-31.02

CAS No.: 美国化学文摘登记号, chemical abstracts service number

2 结果与分析

2.1 酚酸类化合物抑制枸杞种子萌发的剂量效应

22 种酚酸类化合物对枸杞种子萌发的化感作用测定结果如表 1 所示, 22 种酚酸类化合物在较高浓度下均能抑制枸杞种子的萌发; 分别采用抑制种子萌发、胚根生长和胚轴生长获得的 IC_{50} 数值范围为 78.88—115.97、56.47—81.72 和 39.94—80.56 mg/L; 对比各 IC_{50} 数值大小发现, $IC_{50, \text{胚根长}}$ 和 $IC_{50, \text{胚轴长}}$ 数值比 $IC_{50, \text{萌发率}}$ 更低, 表明采用抑制胚根、胚轴生长指标评价酚酸类物质的化感自毒活性更灵敏。统计学分析发现在 0.05 水平上 $IC_{50, \text{胚根长}}$ 和 $IC_{50, \text{胚轴长}}$ 呈显著正相关, Pearson 相关系数为 0.498, $IC_{50, \text{萌发率}}$ 与上述两个指标无相关性。

本研究囊括的酚酸类化合物化学分子结构均包含苯环和活性羧基结构, 具有较大的共性, 但苯环上取代基类型和数量、取代位点等构成了酚酸类化合物结构的多样性, 实验结果显示各化合物对枸杞种子萌发的化感自毒活性表现出了极显著差异 ($P < 0.01$), 酚酸类化合物化感活性和结构之间的关系值得深入探讨。

2.2 酚酸类化合物抑制枸杞种子萌发的定量构效关系

2.2.1 CoMFA 建模统计学分析

经多次尝试, 发现以 $IC_{50, \text{胚根长}}$ ($\mu\text{mol/L}$) 数据构建的 CoMFA 模型最优, 其统计学参数见表 2。交叉验证相关系数 Q^2 为 0.802, 表明获得的模型具有较高的自身一致性; 在 95% 置信度水平进行非交互验证, 得到模型的相关系数 R^2 为 0.938。立体场与静电场的贡献值分别为 48% 和 52%, 说明酚酸化合物分子结构立体场和静电场对其化感自毒活性都有影响, 其中静电场作用稍强。

表 2 CoMFA 模型的偏最小二乘法分析结果

Table 2 Partial least squares (PLS) result of CoMFA

参数 Index	Q^2	R^2	SEE	F	NC	贡献值 Contribution/%	
						立体场 Steric fields	静电场 Electrostatic fields
	0.802	0.938	25.244	64.551	4	48	52

Q^2 : 交叉验证相关系数, cross-validated correlation coefficient; R^2 : 非交互验证相关系数, non-cross-validation analysis correlation coefficient; SEE: 估算值标准误差, standard error of estimate; F : 费歇尔检验值, the Fisher test value; NC: 最佳主成分数, the optimum number of components

2.2.2 CoMFA 三维等高图分析

酚酸类化合物对枸杞种子萌发抑制作用的构效关系 CoMFA 三维等高图如图 2 所示。在立体场中, 绿色表示增大基团体积会导致化感自毒活性增加, 黄色表示增大基团体积会使化感自毒活性降低; 在静电场中, 红色表示增加带负电基团会导致化感自毒活性增强, 蓝色表示增加带正电基团会导致化感自毒活性增强。

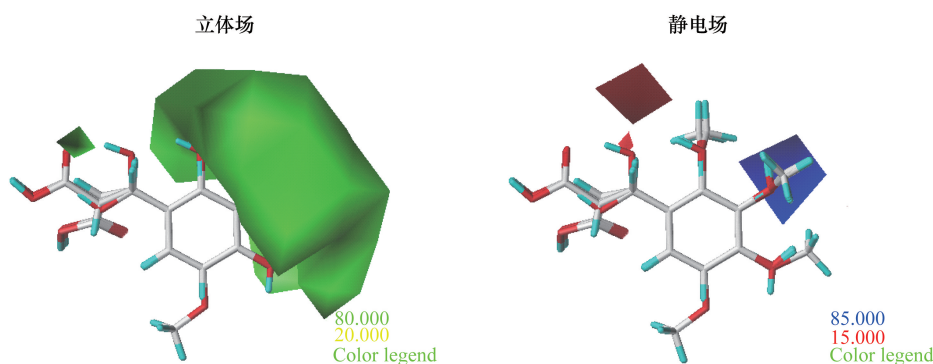


图 2 CoMFA 模型三维等高图

Fig.2 Contour maps of CoMFA model

在 CoMFA 模型的立体场中, 苯环母核 1、2、3 和 4 号位上均覆盖了大面积的绿色色块, 代表在上述 4 个取

代基位点存在大体积取代基会增加酚酸类化合物的化感自毒活性。苯环 1 号位取代基构效关系如表 3 所示, 比较苯甲酸与肉桂酸分子结构, 发现两者除 1 位取代基存在差异外其余分子结构均相同, 前者 1 位取代基为羧基, 后者为苯烯酸, 二者的化感自毒活性随 1 位取代基体积增大而呈增加的趋势; 4-羟基苯甲酸与对香豆酸、3,4-二羟基苯甲酸与咖啡酸、香草酸与阿魏酸、丁香酸与芥子酸, 上述 4 组化合物分子结构特征与化感自毒活性大小也符合这一规律。苯环 2 号位取代基构效关系如表 4 所示, 比较苯甲酸与水杨酸、肉桂酸与 2-甲氧基肉桂酸、对香豆酸与 2,4-二羟基肉桂酸、3-甲氧基肉桂酸与 2,3-二甲氧基肉桂酸上述 4 组化合物, 发现在其他分子结构一致的前提下, 在苯环 2 号位上增加羟基或者甲氧基取代基团, 取代位点处分子体积增大, 相应化感自毒活性增强。苯环 3 号位取代基构效关系如表 5 所示, 比较 4-羟基苯甲酸、3,4-二羟基苯甲酸与香草酸, 三者分子结构除 3 号位点外其余结构特征均一致, 在苯环 3 号位上增加羟基或甲氧基取代基团、或者甲氧基替换羟基取代基, 导致 3 号位取代基体积增大, 相应化感自毒活性呈增加趋势; 肉桂酸、3-羟基肉桂酸与 3-甲氧基肉桂酸, 香豆酸、咖啡酸与阿魏酸, 2-甲氧基肉桂酸与 2,3-二甲氧基肉桂酸, 上述 3 组化合物苯环 3 号位取代基呈现出的构效关系也符合这一规律。苯环 4 号位取代基构效关系如表 6 所示, 对比苯甲酸与对羟基

表 3 酚酸类化合物 1 号位取代基构效关系

Table 3 The structure-activity relationship of substituents at 1-position of phenolic acids

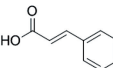
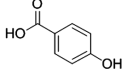
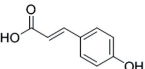
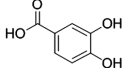
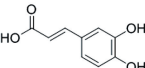
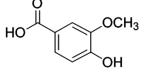
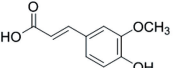
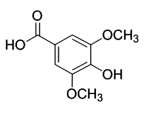
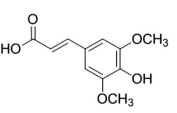
组别 No.	化合物 Name	结构 Structure	半抑制浓度 IC ₅₀ /(μ mol/L)	化合物 Name	结构 Structure	半抑制浓度 IC ₅₀ /(μ mol/L)
1	苯甲酸 Benzoic acid (BA)		587.45	肉桂酸 Cinnamic acid (CA)		472.26
2	4-羟基苯甲酸 4-HydroxyBA		571.46	对香豆酸 p-Coumaric acid		430.74
3	3,4-二羟基苯甲酸 3,4-DihydroxyBA		523.55	咖啡酸 Caffeic acid		353.24
4	香草酸 Vanillic acid		373.06	阿魏酸 Ferulic acid		323.36
5	丁香酸 Syringic acid		344.05	芥子酸 Sinapic acid		294.28

表 4 酚酸类化合物 2 号位取代基构效关系

Table 4 The structure-activity relationship of substituents at 2-position of phenolic acids

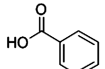
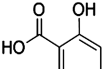
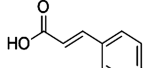
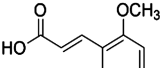
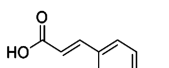
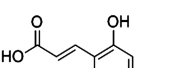
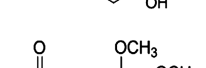
组别 No.	化合物 Name	结构 Structure	半抑制浓度 IC ₅₀ /(μ mol/L)	化合物 Name	结构 Structure	半抑制浓度 IC ₅₀ /(μ mol/L)
1	苯甲酸 Benzoic acid (BA)		587.45	水杨酸 Salicylic acid		479.73
2	肉桂酸 Cinnamic acid (CA)		472.26	2-甲氧基肉桂酸 2-MethoxyCA		458.46
3	对香豆酸 p-Coumaric acid		430.74	2,4-二羟基肉桂酸 2,4-DihydroxyCA		412.30
4	3-甲氧基肉桂酸 3-MethoxyCA		316.93	2,3-二甲氧基肉桂酸 2,3-DimethoxyCA		281.35

表 5 酚酸类化合物 3 号位取代基构效关系

组别 No.	化合物 Name	结构 Structure	半抑制浓度 IC ₅₀ /(μ mol/L)	化合物 Name	结构 Structure	半抑制浓度 IC ₅₀ /(μ mol/L)	化合物 Name	结构 Structure	半抑制浓度 IC ₅₀ /(μ mol/L)
1	4-羟基苯甲酸 4-HydroxyBA		571.46	3,4-二羟基苯甲酸 3,4-DihydroxyBA		523.55	香草酸 Vanillic acid		373.06
2	肉桂酸 Cinnamic acid(CA)		472.26	3-羟基肉桂酸 3-HydroxyCA		467.59	3-甲氧基肉桂酸 3-MethoxyCA		316.93
3	对香豆酸 p-Coumaric acid		430.74	咖啡酸 Caffeic acid		353.24	阿魏酸 Ferulic acid		323.36
4	2-甲氧基肉桂酸 2-MethoxyCA		458.46	2,3-二甲氧基肉桂酸 2,3-Dimethoxy CA		281.35			

表 6 酚酸类化合物 4 号位取代基构效关系

组别 No.	化合物 Name	结构 Structure	半抑制浓度 IC ₅₀ /(μ mol/L)	化合物 Name	结构 Structure	半抑制浓度 IC ₅₀ /(μ mol/L)	化合物 Name	结构 Structure	半抑制浓度 IC ₅₀ /(μ mol/L)
1	苯甲酸 Benzoic acid(BA)		587.45	4-羟基苯甲酸 4-HydroxyBA		571.46	4-甲基肉桂酸 4-MethylCA		434.49
2	肉桂酸 Cinnamic acid(CA)		472.26	对香豆酸 p-Coumaric acid		430.74			
3	3-羟基肉桂酸 3-HydroxyCA		467.59	咖啡酸 Caffeic acid		353.24			
4	3,5-二甲氧基肉桂酸 3,5-DimethoxyCA		388.65	芥子酸 Sinapic acid		294.28	3,4,5-三甲氧基肉桂酸 3,4,5-Trimethoxy CA		298.82

苯甲酸等 4 组化合物,发现苯环 4 号位取代基体积大小与化感自毒活性构效关系规律与 3 号位取代基的一致。以上实验结果与 CoMFA 模型立体场色块图指示的构效关系规律契合良好。

在 CoMFA 模型的静电场中,苯环母核 1 号位置上覆盖了红色色块,代表 1 号取代基存在电负性较大的基团,会导致化合物化感自毒活性增强。如表 3 所示,对比肉桂酸类衍生物和苯甲酸类衍生物,前者丙烯酸基团的电负性高于后者的羧基,前者的化感自毒活性也强于后者。上述实验结果与 CoMFA 静电场等势图显示的结果完全一致。

3 讨论

3.1 酚酸类化合物对枸杞种子萌发过程的化感自毒效应

在农业生产领域,连作障碍诱因众多,酚酸类物质是近年来研究较多的热点之一。枸杞种子粒径小、种皮较薄,考察枸杞种子萌发阶段对外源酚酸类物质胁迫的响应,对判断酚酸是否为导致枸杞连作障碍的诱因具有重要意义。本研究结果显示,酚酸类物质对枸杞萌发产生胁迫的浓度范围(IC_{50} 数值)为 39.94—115.97 mg/L。对比已有研究结果,酚酸类化合物对山桃、苜蓿、花生、水稻、人参种子萌发或幼苗生长产生显著化感自毒效应的浓度水平分别为 0.1—10 mg/L^[23]、0.5—500 mg/L^[22]、5 mg/L^[11]、50—500 mg/L^[29]、>25 mg/L^[30];由此可见,酚酸对作物产生化感效应与作物种类及浓度有关,不同酚酸对不同作物的作用阈值差异较大。

酚酸类化合物可以导致植物化感自毒作用,这一论断一直存在争议^[5],其主要原因在于实际植物根系土壤环境中,酚酸类物质的含量多在 $\mu\text{g/g}$ 的水平^[6,24,31],显著低于实验室条件下获得的抑制作用浓度水平。本研究亦发现,单一酚酸引起枸杞种子萌发过程化感自毒作用的浓度阈值较高。然而,在自然界一种作物根系中,往往共存数种酚酸类化合物^[6,10,15]。有学者认为,与实验室获得的单一酚酸对植物的化感作用相比,复合酚酸对植物的影响更大^[10]。植物残体浸提物是复合化感物质的重要来源,但其组成复杂,对主成分定量研究及化感作用机理研究造成一定困扰。实验室体系中复合酚酸对植物的化感作用,目前还未见报道。

3.2 酚酸类化合物抑制枸杞种子萌发的定量构效关系

本研究在囊括常见植物根系分泌物中酚酸类物质的同时,将部分化学分子结构类似的酚酸类化合物也纳入研究范围,应用 CoMFA 方法考察酚酸类物质对枸杞种子萌发过程的化感自毒活性的构效关系。结果显示,该类化合物的立体效应和静电效应是描述其化感自毒活性和进行构效关系研究的重要结构参数。在建模过程中,本研究也尝试了比较分子相似性指数法,将分子的疏水性质、氢键供体和受体性质也纳入考察范围,发现上述三种结构描述符对酚酸化合物的化感自毒活性影响不大(数据未显示)。

CoMFA 作为 3D-QSAR 研究的有力工具,在环境科学、生态毒理等领域应用广泛,本研究初步将 CoMFA 应用于农业生产领域的化感作用研究,获得了较好的解析酚酸类物质化感自毒活性构效关系的定量数学模型。三维等高图揭示出的构效关系规律可为该类化合物与生物体作用产生毒性作用机理的探讨提供理论依据。

4 结论

在较高浓度水平,外源酚酸对枸杞种子的萌发均产生抑制作用,分别以抑制种子萌发、胚根生长和胚轴生长作用计, IC_{50} 数值范围为 78.88—115.97、56.47—81.72、39.94—80.56 mg/L;其中,阿魏酸、2,3-二甲氧基肉桂酸、咖啡酸等含有甲氧基、羟基官能团的肉桂酸衍生物抑制作用较强。基于 CoMFA 方法构建酚酸化合物分子结构与其对枸杞种子萌发化感作用的构效关系,获得模型的交叉验证系数 Q^2 为 0.802,非交叉验证系数 R^2 为 0.938,证明模型稳健可靠;三维等势图揭示出酚酸类化合物立体效应和静电效应是描述其化感自毒活性的重要参数。

致谢:本研究工作得到中国科学院生态环境研究中心杜宇国和魏东斌研究员的帮助,特此致谢。

参考文献 (References):

- [1] Rice E L. Allelopathy. 2nd ed. Orlando: Academic Press, 1984.
- [2] Singh H P, Batish D R, Kohli R K. Autotoxicity: concept, organisms, and ecological significance. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1999, 18(6): 757-772.
- [3] 陆茜, 张金池, 孟苗婧. 长期连栽杨树林根际土壤自毒作用的生物测定. *生态学报*, 2017, 37(12): 4053-4060.
- [4] Chomel M, Fernandez C, Bousquet-Mélou A, Gers C, Monnier Y, Santonja M, Gauquelin T, Gros R, Lecareux C, Baldy V. Secondary metabolites of *Pinus halepensis* alter decomposer organisms and litter decomposition during afforestation of abandoned agricultural zones. *Journal of Ecology*, 2014, 102(2): 411-424.
- [5] 谢星光, 陈晏, 卜元卿, 戴传超. 酚酸类物质的化感作用研究进展. *生态学报*, 2014, 34(22): 6417-6428.
- [6] 黄玉茜, 韩立思, 杨劲峰, 王月, 韩晓日. 花生植株和土壤水浸液自毒作用研究及土壤中自毒物质检测. *生态学报*, 2012, 32(19): 6023-6032.
- [7] 张璐. 连作甜瓜土壤中酚酸类物质的变化规律和木霉菌降解作用研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2017.
- [8] Baziramakenga R, Leroux G D, Simard R R. Effects of benzoic and cinnamic acids on membrane permeability of soybean roots. *Journal of Chemical Ecology*, 1995, 21(9): 1271-1285.
- [9] Blum U, Gerig T M. Relationships between phenolic acid concentrations, transpiration, water utilization, leaf area expansion, and uptake of phenolic acids: nutrient culture studies. *Journal of Chemical Ecology*, 2005, 31(8): 1907-1932.
- [10] 李培栋, 王兴祥, 李奕林, 王宏伟, 梁飞燕, 戴传超. 连作花生土壤中酚酸类物质的检测及其对花生的化感作用. *生态学报*, 2009, 30(8): 2128-2134.
- [11] 黄玉茜, 杨劲峰, 梁春浩, 陈琛平一, 刘欣宇, 耿珂睿, 姚玉晨, 张宇, 韩晓日. 香草酸对花生种子萌发、幼苗生长及根际微生物区系的影响. *中国农业科学*, 2018, 51(9): 1735-1745.
- [12] Lara-Núñez A, Sánchez-Nieto S, Luisa Anaya A, Cruz-Ortega R. Phytotoxic effects of *Sicyos deppei* (Cucurbitaceae) in germinating tomato seeds. *Physiologia Plantarum*, 2009, 136(2): 180-192.
- [13] 闵红. 大棚蔬菜连作障碍机理研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2010.
- [14] Yang R X, Gao Z G, Liu X, Yao Y, Cheng Y. Root exudates from muskmelon (*Cucumis melon*. L) induce autotoxicity and promote growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Allelopathy Journal*, 2014, 33(2): 175-187.
- [15] 田给林. 连作草莓土壤酚酸类物质的化感作用及其生物调控研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2015.
- [16] Utkhede R S. Soil sickness, replant problem or replant disease and its integrated control. *Allelopathy Journal*, 2006, 18(1): 23-28.
- [17] Bennett A J, Bending G D, Chandler D, Hilton S, Mills P. Meeting the demand for crop production: the challenge of yield decline in crops grown in short rotations. *Biological Reviews*, 2012, 87(1): 52-71.
- [18] 纳小凡, 郑国旗, 邢正操, 马金平, 李占辉, 卢俊辉, 马飞. 连作对再植枸杞根际细菌群落多样性和群落结构的影响. *土壤学报*, 2017, 54(5): 1280-1292.
- [19] 马锦锦. 枸杞根际促生细菌筛选、培养基优化及基因组测序[D]. 泰安: 山东农业大学, 2017.
- [20] 王晓辉. 西瓜自毒物质阿魏酸降解放线菌筛选及其降解效果研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2011.
- [21] Hao W Y, Ren L X, Ran W, Shen Q R. Allelopathic effects of root exudates from watermelon and rice plants on *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Plant and Soil*, 2010, 336(1/2): 485-497.
- [22] 陶茸, 尹国丽, 师尚礼. 酚酸类物质对苜蓿种子萌发的化感作用研究. *草原与草坪*, 2018, 38(3): 96-101.
- [23] 王鸿, 张雪冰, 张帆. 几种酚酸类物质对山桃种子萌发后根系的化感效应. *果树学报*, 2017, 34(11): 1443-1449.
- [24] 谢东锋, 张光灿, 夏宣宣, 郎莹. 不同浓度酚酸对欧美杨 I-107 苗木生长和光合特性的影响. *生态学报*, 2018, 38(5): 1789-1798.
- [25] 陈鸿鹰. 外源酚酸对欧美杨‘I-107’扦插苗根根形态建成和生理特性的影响[D]. 泰安: 山东农业大学, 2017.
- [26] 谭亮, 董琦, 肖远灿, 胡凤祖. RP-HPLC 法同时测定枸杞子中 5 个酚酸类成分的含量. *药物分析杂志*, 2013, 33(3): 376-381.
- [27] 王琪, 唐惠儒. 黑果枸杞和宁夏枸杞果实中多酚类物质组成的差异研究. *上海交通大学学报: 医学版*, 2019, 39(1): 39-46.
- [28] 赵晓玲, 张鑫瑶, 何春年, 彭勇. 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. *中国药业*, 2014, 23(12): 58-61.
- [29] 顾元, 常志州, 于建光, 宗良纲. 外源酚酸对水稻种子和幼苗的化感效应. *江苏农业学报*, 2013, 29(2): 240-246.
- [30] 龙期良, 李勇, 高原, 丁万隆. 酚酸类物质对人参种子的化感作用研究. *中国现代中药*, 2016, 18(1): 92-96.
- [31] Blum U, Wentworth T R, Klein K, Worsham A D, King L D, Gerig T M, Lyu S W. Phenolic acid content of soils from wheat-no till, wheat-conventional till, and fallow-conventional till soybean cropping systems. *Journal of Chemical Ecology*, 1991, 17(6): 1045-1068.