

芦苇叶水提物的化感活性分析及潜在化感成分的筛选

叶小齐, 吴明^①, 邵学新, 李长明

(中国林业科学研究院亚热带林业研究所 浙江杭州湾湿地生态系统国家定位观测研究站, 浙江 富阳 311400)

摘要: 采用不同溶剂对芦苇 [*Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud.] 叶片水提物进行萃取, 并以小麦 (*Triticum aestivum* Linn.) 和萝卜 (*Raphanus sativus* Linn.) 种子为实验材料对不同萃取物的化感效应进行检测; 采用薄层层析和柱层析对抑制作用最强的正丁醇萃取物进行进一步分离, 并采用 GC-MS 法对生物活性较高的组分进行组成成分分析; 在此基础上, 选择相对含量高并具有代表性的潜在化感成分进行生物活性检测, 以期筛选出芦苇叶中的潜在化感成分。结果显示: 随质量浓度 (20、100 和 500 mg · L⁻¹) 提高, 芦苇叶水提物的石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇和水萃取物对小麦和萝卜种子萌发的抑制作用均逐渐增强, 其中正丁醇萃取物的抑制作用最强。在正丁醇萃取物的 11 个组分中, Fr. 5、Fr. 6、Fr. 7、Fr. 9 和 Fr. 10 组分均能显著抑制萝卜或小麦幼苗的生长, 经质量浓度 500 mg · L⁻¹ 各组分处理液处理后萝卜或小麦幼苗的株高、根长及单株鲜质量均显著低于对照 ($P < 0.05$)。采用 GC-MS 法从 Fr. 5、Fr. 6、Fr. 7、Fr. 9 和 Fr. 10 组分中分别鉴定出 11、15、15、12 和 22 种成分, 分别占各组分总相对含量的 83.02%、91.31%、87.36%、97.92% 和 94.34%, 主要成分包括糖类、醇类、有机酸类、酮类、酰胺类和酯类。对 14 种潜在化感成分生物活性的检测结果显示这些成分对小麦幼苗生长有明显的抑制作用, 其中, 经质量浓度 20 mg · L⁻¹ 油酸酰胺、棕榈酸甲酯、亚油酸、2-苯乙胺、2-甲基烯丙醇和 4-羟基-3-甲氧基苦杏仁酸处理后, 小麦幼苗的株高、根长及单株鲜质量显著低于对照。综合分析结果显示, 芦苇叶水提物具有较强的化感活性, 其潜在的化感成分为油酸酰胺、棕榈酸甲酯、亚油酸、2-苯乙胺、2-甲基烯丙醇和 4-羟基-3-甲氧基苦杏仁酸。

关键词: 芦苇叶; 水提物; 化感成分; 生物检测; GC-MS

中图分类号: Q948.12⁺; Q946.8 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2016)02-0041-07

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2016.02.05

Analysis on allelopathic activity and screening on potential allelopathic compound in water extracts from leaf of *Phragmites australis* YE Xiaohu, WU Ming^①, SHAO Xuexin, LI Changming (National Research Station of Hangzhou Bay Wetlands Ecosystem of Zhejiang Province, Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2016, 25(2): 41-47

Abstract: Water extracts from leaf of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud. were extracted by different solvents, and taking seeds of *Triticum aestivum* Linn. and *Raphanus sativus* Linn. as experimental materials, allelopathic effect of different partitioned extracts was determined. Partitioned extract of 1-butanol with the strongest inhibition effect was separated further by thin layer chromatography and column chromatography, and composition compounds in fractions with higher biological activity were analyzed by GC-MS method. On this basis, biological activity of potential allelopathic compound selected with high relative content and typicality were determined to screen potential allelopathic compound in leaf of *P. australis*. The results show that with enhancing of mass concentration (20, 100 and 500 mg · L⁻¹), inhibition effects of partitioned extracts of petroleum ether, dichloromethane, ethyl acetate, 1-butanol and water in water extracts from leaf of *P. australis* on seed germination of *T. aestivum* and *R. sativus* increase gradually, in which that of 1-butanol partitioned extract is the strongest. Among eleven

收稿日期: 2015-05-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31400378); 中国林业科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助项目 (CAFYBB2014QB034)

作者简介: 叶小齐 (1979-), 男, 湖北麻城人, 博士, 助理研究员, 主要从事化学生态学方面的研究。

^①通信作者 E-mail: hangzhoubay@126.com

fractions from 1-butanol partitioned extract, Fr. 5, Fr. 6, Fr. 7, Fr. 9 and Fr. 10 fractions can significantly inhibit growth of *R. sativus* or *T. aestivum* seedling, and after treated by treating solution with mass concentration $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of each fraction, height, root length and fresh weight per plant of *R. sativus* or *T. aestivum* seedling are significantly lower than those of the control ($P < 0.05$). 11, 15, 15, 12 and 22 compounds are identified from Fr. 5, Fr. 6, Fr. 7, Fr. 9 and Fr. 10 fractions by GC-MS method, accounting for 83.02%, 91.31%, 87.36%, 97.92% and 94.34% of total relative content in above respective fractions, respectively. And main compounds include saccharides, alcohols, organic acids, ketones, amides and esters. The determination result of biological activity of fourteen potential allelopathic compounds shows that these compounds have an obvious inhibition effect on growth of *T. aestivum* seedling, in which, after treated by oleamide, methyl hexadecanoate, (*Z, Z*)-9, 12-octadecadienoic acid, 2-phenethylamine, 2-methyl-2-propen-1-ol and DL-4-hydroxy-3-methoxymandelic acid with mass concentration $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, height, root length and fresh weight per plant of *T. aestivum* seedling are significantly lower than those of the control. The comprehensive analysis result shows that water extracts from leaf of *P. australis* has strong allelopathic activity, and potential allelopathic compounds are oleamide, methyl hexadecanoate, (*Z, Z*)-9, 12-octadecadienoic acid, 2-phenethylamine, 2-methyl-2-propen-1-ol and DL-4-hydroxy-3-methoxymandelic acid.

Key words: leaf of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud.; water extracts; allelopathic compound; biological detection; GC-MS

化感作用是植物种间相互作用的重要方式^[1]。目前国内对陆生植物化感作用的研究集中于主要经济作物连作障碍^[2]及其与杂草之间的相互化感作用^[3-4],以及外来入侵植物对本土植物及农作物的化感作用^[5-6]等方面,而有关自然群落中的野生植物间化感作用的研究较少。化感作用对于植物群落演替具有重要的生态学意义^[7],因此研究自然群落中本土植物间的化感作用有助于深入了解植物群落的结构和功能。

芦苇 [*Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud.] 是湿地常见植物,其化感潜力较强,对加拿大一枝黄花 (*Solidago Canadensis* Linn.)、互花米草 (*Spartina alterniflora* Lois.) 和藨草 (*Phalaris arundinacea* Linn.) 等植物均有不同程度的化感作用^[6,8-11],具有抑制外来入侵植物扩散的化感潜力^[6]。作者前期的研究结果显示:芦苇具有较高的化感潜力,其水浸液能显著影响伴生植物的种子萌发和幼苗生长。目前,已有研究者从芦苇中分离鉴定出一些化感成分^[8-9,12],但对化感成分的分离和鉴定研究尚缺乏系统性。

为此,作者采用蒸馏水浸提和不同极性有机溶剂萃取相结合的方法获得芦苇叶中化感组分,初步筛选出生物活性高的萃取组分;在此基础上,采用硅胶柱层析进一步分离化感组分,并利用生物测试方法从中筛选出化感活性最强的组分,利用 GC-MS 法对其中所含的化合物进行鉴定,初步确定芦苇的主要化感成分,并对这些化合物的生物活性进行验证,以明确芦

苇所含的化感成分,为深入研究芦苇的化感机制以及探讨化感作用对芦苇群落结构和功能形成的影响提供基础实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

于2013年8月份,在杭州湾国家湿地公园生态保育区(东经 $121^{\circ}08'43''$ 、北纬 $30^{\circ}18'40''$) 选择株高 1.4 ~ 1.8 m 的芦苇 50 株,采集植株顶端往下第 3 至第 5 枚健康叶,将所有叶片自然阴干后粉碎,备用。生物测试材料为小麦 (*Triticum aestivum* Linn.) 和萝卜 (*Raphanus sativus* Linn.) 的种子。

1.2 方法

1.2.1 化感物质的初步提取和生物活性测定 称取上述芦苇叶粉末样品 1.55 kg,加入 15.5 L 蒸馏水,即料液比为 1:10 ($m:V$),于常温下浸泡 24 h,间歇搅拌;经 4 层纱布过滤后得到水浸提液约 9 L,置于 4°C 冷藏备用。用旋转蒸发器在低温减压条件下 (50°C , -0.09 MPa) 将水浸提液浓缩至约 0.4 L,依次用等体积的石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯和正丁醇各萃取 3 次,同一溶剂的 3 次萃取液合并后减压浓缩至少量,并自然挥干溶剂,称取质量,记录获得量。取 4 种溶剂萃取物和水相的浸膏,分别溶于相应的有机溶剂或蒸馏水中,配制成质量浓度 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的母液,置于 4°C 冷藏备用。

生物测试前,预先用质量浓度 $0.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ 溶液将小麦和萝卜种子浸泡消毒 5 min,并用蒸馏水反复清洗后供试;在培养皿中垫入 2 层定性滤纸,排入 10 粒小麦或萝卜种子;将上述各溶剂母液用相应溶剂分别配制成质量浓度 20 和 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的处理液,每培养皿各加入处理液 5 mL,对照则加入同体积甲醇。用保鲜膜将培养皿封口,置于培养箱中,所有培养皿随机排列,培养条件为昼温 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 、夜温 $20 \text{ }^\circ\text{C}$ 、光照时间 $16 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 、空气相对湿度 75%。各处理均重复 3 次。培养 72 h 后,分别统计和测量各处理的种子萌发率及所有幼苗的根长、株高和单株鲜质量。幼苗的根长和株高用直尺(精度 1 mm)测量,其中,根长为胚根长度,株高为茎基部到顶端芽的长度;单株鲜质量采用电子天平(精度 0.001 g)称量。

1.2.2 正丁醇萃取物的分离和生物活性测定 根据上述生物测试结果,选择生物活性最强的正丁醇萃取物,用薄层层析法(TLC)及硅胶柱(硅胶 200~300 目,层析柱规格 $25 \text{ mm} \times 300 \text{ mm}$)层析对活性成分进行进一步的分离纯化,并用 $V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{甲醇})=100:0 \sim 0:100$ 混合液梯度洗脱,共收集到 100 个流分。对各流分进行 TLC 检测,展开剂分别为 $V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{甲醇})=99:1$ 、 $V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{甲醇})=95:5$ 和 $V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{甲醇})=90:10$ 的混合液,碘熏显色;将相近流分合并,共合并为 11 个组分;用旋转蒸发仪减压浓缩至干,称取质量。然后用甲醇将各组分的浸膏配制成质量浓度 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的处理溶液,以甲醇为对照,按照上述方法进行生物活性测试。

1.2.3 活性组分的 GC-MS 分析 根据上述测定结果,采用 GC-MS 法对化感活性高的组分进行分离和结构鉴定。色谱条件为:6890N-5975B 型气相色谱-质谱联用仪(美国 Agilent 公司),HP-5MS 石英毛细管柱($30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm}, 0.25 \text{ } \mu\text{m}$);载气为氦气,纯度大于等于 99.99%;进样量 $1 \text{ } \mu\text{L}$ 。升温程序为: $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 保持 2 min; $10 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升温至 $160 \text{ }^\circ\text{C}$,保持 1 min; $5 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升温至 $235 \text{ }^\circ\text{C}$,保持 1 min; $30 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升温至 $280 \text{ }^\circ\text{C}$,保持 5 min,共 35.5 min。

将 GC-MS 分析结果与标准谱图集(NIST08 版)核对,然后人工进行谱图解析并查对有关资料,最后对基峰、质荷比及相对丰度等进行直观比较、分析和鉴定,确认各组分的主要组成成分。

1.2.4 潜在化感物质生物活性测定 根据 GC-MS 分析结果,选择相对含量高并具有代表性(已有报道

显示具有化感活性)的潜在化感成分,即 1,2,3,4-丁四醇(1,2,3,4-butanetetrol)、邻苯二甲酸二丁酯(dibutyl phthalate)、油酸酰胺(oleamide)、三缩四乙二醇(tetraethylene glycol)、4-羟基-3-甲氧基苦杏仁酸(DL-4-hydroxy-3-methoxy mandelic acid)、D-(-)-古洛糖酸- γ -内酯[D-(-)-gulonic acid γ -lactone]、D-来苏糖(D-lyxose)、棕榈酸甲酯(methyl hexadecanoate)、油酸(oleic acid)、2-苯乙胺(2-phenethylamine)、N,N-二乙基乙酰胺(N,N-diethyl-acetamide)、N,N-二乙基甲酰胺(N,N-diethyl-formamide)、亚油酸[(Z,Z)-9,12-octadecadienoic acid]和 2-甲基烯丙醇(2-methyl-2-propen-1-ol)共 14 个成分,用外源化合物替代相应的潜在化感成分,用甲醇配制成质量浓度 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理溶液;以小麦为受体,以甲醇作为对照,采用上述方法进行生物活性测试。

1.3 数据处理与统计分析

按照公式“抑制率 = [(处理组 - 对照组) / 对照组] $\times 100\%$ ”计算各组分或各化感成分对小麦或萝卜种子萌发或幼苗生长指标的抑制率。按照公式“化感效应 = [(种子萌发率抑制率 + 根长抑制率 + 株高抑制率 + 单株鲜质量抑制率) / 4] $\times 100\%$ ”^[13] 计算同一质量浓度处理组对同一受体各指标的化感效应。

采用 SPSS 19.0 统计分析软件对实验数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA),分析不同分离组分或者化感物质对受试对象各生长指标的影响,并利用最小显著性差异法(LSD)比较不同组分间或者不同化感物质处理间的差异显著性。

2 结果和分析

2.1 芦苇叶水提物的不同溶剂萃取物对小麦和萝卜种子萌发的化感效应

芦苇叶水提物的不同溶剂萃取物对小麦和萝卜种子萌发的化感效应见表 1。由表 1 可以看出:随质量浓度的提高,不同溶剂萃取物对小麦和萝卜种子萌发的抑制作用总体上逐渐增强。质量浓度 20、100 和 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 正丁醇萃取物对小麦种子萌发的抑制作用明显高于其他萃取物,化感效应分别为 -62.35%、-91.72% 和 -100.00%;质量浓度 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 正丁醇萃取物对萝卜种子萌发的化感效应略低于乙酸乙酯和二氯甲烷萃取物,但质量浓度 100 和 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 正丁醇萃取物对萝卜种子萌发的抑制作用最强,化感

表1 芦苇叶水提物的不同萃取物对小麦和萝卜种子萌发的化感效应

Table 1 Allelopathic effect of different partitioned extracts in water extracts from leaf of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud. on seed germination of *Triticum aestivum* Linn. and *Raphanus sativus* Linn.

萃取物 Partitioned extract	不同浓度萃取物对小麦的化感效应/% Allelopathic effect of different concentration extracts on <i>Triticum aestivum</i>			不同浓度萃取物对萝卜的化感效应/% Allelopathic effect of different concentration extracts on <i>Raphanus sativus</i>		
	20 mg · L ⁻¹	100 mg · L ⁻¹	500 mg · L ⁻¹	20 mg · L ⁻¹	100 mg · L ⁻¹	500 mg · L ⁻¹
	石油醚萃取物 Partitioned extract of petroleum ether	-34.44	-53.30	-53.18	-29.40	-43.88
二氯甲烷萃取物 Partitioned extract of dichloromethane	-41.69	-87.22	-86.17	-51.02	-81.12	-85.44
乙酸乙酯萃取物 Partitioned extract of ethyl acetate	-59.47	-65.45	-61.53	-51.31	-59.52	-71.38
正丁醇萃取物 Partitioned extract of 1-butanol	-62.35	-91.72	-100.00	-46.44	-100.00	-100.00
水萃取物 Partitioned extract of water	-52.32	-25.86	-83.94	-12.93	-60.74	-47.51

效应均达到-100.00%。上述研究结果表明:芦苇叶水提物的正丁醇萃取物对小麦和萝卜种子萌发的抑制作用最强。

2.2 芦苇叶水提物正丁醇萃取物的不同组分对小麦和萝卜幼苗生长的化感效应

根据上述研究结果,利用硅胶柱层析从芦苇叶水提物的正丁醇萃取物中分离获得11个组分(Fr. 1至Fr. 11),各组分对小麦和萝卜幼苗根长、株高和单株

鲜质量的影响分别见表2。由表2可以看出:经正丁醇萃取物的Fr. 5、Fr. 6与Fr. 7组分处理后,小麦幼苗的根长、株高和单株鲜质量总体上低于其他组分,并显著低于对照组(甲醇)($P < 0.05$);经Fr. 9与Fr. 10组分处理后,萝卜幼苗的根长、株高和单株鲜质量均低于其他组分,并显著低于对照组。据此,选择Fr. 5、Fr. 6、Fr. 7、Fr. 9和Fr. 10共5个组分进行进一步的GC-MS分析。

表2 芦苇叶水提物的正丁醇萃取物的不同组分对小麦和萝卜幼苗生长的影响

Table 2 Effects of different fractions from 1-butanol partitioned extract in water extracts from leaf of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud. on growth of seedlings of *Triticum aestivum* Linn. and *Raphanus sativus* Linn.

组分 ¹⁾ Fraction ¹⁾	小麦幼苗的生长指标 ²⁾ Growth index of <i>Triticum aestivum</i> seedling ²⁾			组分 ¹⁾ Fraction ¹⁾	萝卜幼苗的生长指标 ²⁾ Growth index of <i>Raphanus sativus</i> seedling ²⁾		
	根长/mm Root length	株高/mm Height	单株鲜质量/g Fresh weight per plant		根长/mm Root length	株高/mm Height	单株鲜质量/g Fresh weight per plant
	CK	47.9±8.1	36.1±2.3		0.106±0.012	CK	36.5±4.7
Fr. 1	34.8±5.5*	25.8±2.9*	0.095±0.009	Fr. 1	15.2±1.5*	11.2±0.9*	0.045±0.005*
Fr. 2	26.3±3.8*	20.9±2.2*	0.070±0.012*	Fr. 2	36.2±11.5	19.7±3.5	0.056±0.006
Fr. 3	34.1±5.0*	32.3±0.1	0.095±0.006	Fr. 3	28.1±10.7	14.2±4.3	0.062±0.022
Fr. 4	26.4±0.9*	33.9±1.3	0.113±0.002	Fr. 4	8.4±0.9*	11.2±0.6*	0.064±0.005
Fr. 5	16.6±4.1*	16.8±4.2*	0.040±0.012*	Fr. 5	35.4±4.2	20.6±1.3	0.091±0.002
Fr. 6	6.0±2.6*	15.7±4.6*	0.043±0.012*	Fr. 6	46.0±0.0	21.8±1.3	0.081±0.000
Fr. 7	13.9±4.8*	19.3±6.8*	0.044±0.015*	Fr. 7	11.5±1.6*	10.9±0.4*	0.063±0.005
Fr. 8	36.5±5.8	30.7±5.3	0.096±0.018	Fr. 8	37.4±11.6	15.6±3.6	0.064±0.018
Fr. 9	18.8±0.7*	22.7±1.0*	0.067±0.001*	Fr. 9	7.0±2.6*	6.2±1.5*	0.031±0.003*
Fr. 10	20.7±0.7*	18.4±0.7*	0.049±0.006*	Fr. 10	7.5±0.1*	8.7±1.1*	0.034±0.001*
Fr. 11	30.4±4.1*	20.3±1.7*	0.061±0.003*	Fr. 11	14.9±1.0*	8.7±1.0*	0.046±0.007*

¹⁾ CK: 甲醇 Methanol. 各组分的质量浓度均为500 mg · L⁻¹ Mass concentration of all fractions are 500 mg · L⁻¹.

²⁾ *: 与对照(CK)相比差异显著($P < 0.05$) Significant difference compared with the control (CK) ($P < 0.05$).

2.3 芦苇叶水提物的正丁醇萃取物中5个组分的GC-MS分析结果

根据上述实验结果,对芦苇叶水提物的正丁醇萃取物中5个具有较高生物活性的组分Fr. 5、Fr. 6、Fr. 7、Fr. 9和Fr. 10进行GC-MS分析,结果分别见

表3、表4、表5、表6和表7。

由表3可见:从Fr. 5组分中共鉴定出11种有机化合物,占总相对含量的83.02%,包括有机酸类、醇类和糖类等。其中,1,2,3,4-丁四醇的相对含量最高,为64.08%;4-羟基-3-甲氧基苦杏仁酸的相对含

量最低,为0.62%。

由表4可见:从Fr. 6组分中共鉴定出15种有机化合物,占总相对含量的91.31%,包括有机酸类、醇类、糖类、酯类和酮类等。其中,1,2,3,4-丁四醇的相对含量最高,为53.60%;D-吡喃葡萄糖(D-glucopyranose)的相对含量最低,为0.61%。

由表5可见:从Fr. 7组分中共鉴定出15种有机化合物,占总相对含量的87.36%,包括有机酸类、醇

表3 芦苇叶水提物正丁醇萃取物中Fr. 5组分的主要组成成分及其相对含量

Table 3 Main composition compounds and their relative content in Fr. 5 fraction from 1-butanol partitioned extract in water extracts from leaf of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud.

保留时间/min Retention time	成分 Compound	分子式 Molecular formula	相对含量/% Relative content	相似度/% Similar degree
11.27	tetraethylene glycol	C ₈ H ₁₈ O ₅	0.65	65.0
12.15	1,2,3-propanetriol	C ₃ H ₈ O ₃	6.83	54.5
12.65	1,2,3,4-butanetetrol	C ₄ H ₁₀ O ₄	64.08	90.0
13.18	2,5-dihydroxy-1,4-dioxane-2,5-dimethanol	C ₆ H ₁₂ O ₆	1.23	51.0
13.29	2,5-diphenylpyrrole	C ₁₆ H ₁₃ N	2.25	49.0
14.06	adonitol	C ₅ H ₁₂ O ₅	3.06	74.0
16.06	1,2-cyclooctanediol	C ₈ H ₁₆ O ₂	1.80	35.0
17.77	arabinopyranose	C ₅ H ₁₀ O ₅	0.80	76.0
17.85	mannono-1,4-lactone	C ₆ H ₁₀ O ₆	1.05	45.0
18.66	4-methoxymandelic acid	C ₉ H ₁₀ O ₄	0.65	51.0
21.45	DL-4-hydroxy-3-methoxymandelic acid	C ₉ H ₁₀ O ₅	0.62	65.0

表4 芦苇叶水提物正丁醇萃取物中Fr. 6组分的主要组成成分及其相对含量

Table 4 Main composition compounds and their relative content in Fr. 6 fraction from 1-butanol partitioned extract in water extracts from leaf of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud.

保留时间/min Retention time	成分 Compound	分子式 Molecular formula	相对含量/% Relative content	相似度/% Similar degree
11.82	2,2'-thiodiethanol	C ₄ H ₁₀ O ₂ S	1.13	23.0
12.14	glycerol	C ₃ H ₈ O ₃	1.85	48.0
12.61	1,2,3,4-butanetetrol	C ₄ H ₁₀ O ₄	53.60	91.0
13.16	1,3-dihydroxyacetonedimer	C ₃ H ₆ O ₃	3.73	61.0
13.27	threonine	C ₄ H ₉ NO ₃	1.13	43.0
16.83	uridine	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	7.20	81.0
17.76	arabinopyranose	C ₅ H ₁₀ O ₅	0.79	91.0
17.99	D-(-)-gulonic acid γ -lactone	C ₆ H ₁₀ O ₆	0.89	39.0
18.23	ribo-pentitol	C ₅ H ₁₂ O ₅	3.74	62.0
19.32	D-lyxose	C ₅ H ₁₀ O ₅	1.04	77.0
19.84	ribitol	C ₅ H ₁₂ O ₅	3.55	52.0
20.01	phthalic acid, butyl isohexyl ester	C ₁₈ H ₂₆ O ₄	1.27	49.0
21.07	D-glucopyranose	C ₆ H ₁₂ O ₆	0.61	92.0
25.74	mannono-1,4-lactone	C ₆ H ₁₀ O ₆	1.08	26.0
27.57	3-(4-methoxybenzylidene)-2-piperidinone	C ₁₃ H ₁₅ NO ₂	9.70	61.0

类、糖类和酯类等。其中,1,2,3,4-丁四醇的相对含量最高,为26.02%;2-氧代己二酸(2-ketoadipic acid)的相对含量最低,为1.10%。

由表6可见:从Fr. 9组分中共鉴定出12种有机化合物,占总相对含量的97.92%,包括有机酸类、酯类、糖类和酰胺类等。其中,邻苯二甲酸二丁酯的相对含量最高,为29.05%;亚油酸的相对含量最低,为

表5 芦苇叶水提物正丁醇萃取物中Fr. 7组分的主要组成成分及其相对含量

Table 5 Main composition compounds and their relative content in Fr. 7 fraction from 1-butanol partitioned extract in water extracts from leaf of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud.

保留时间/min Retention time	成分 Compound	分子式 Molecular formula	相对含量/% Relative content	相似度/% Similar degree
11.83	2-methoxypropanoic acid	C ₄ H ₈ O ₃	1.79	35.0
12.13	glycerol	C ₃ H ₈ O ₃	16.98	49.0
12.60	1,2,3,4-butanetetrol	C ₄ H ₁₀ O ₄	26.02	89.0
14.88	2,5-anhydro-D-mannose oxime	C ₆ H ₁₁ NO ₅	1.84	40.0
15.78	D-(+)-arabitol	C ₅ H ₁₂ O ₅	1.82	92.0
15.99	2-ketoadipic acid	C ₆ H ₈ O ₅	1.10	81.0
16.22	xylitol	C ₅ H ₁₂ O ₅	5.65	94.0
18.23	adonitol	C ₅ H ₁₂ O ₅	2.62	91.0
19.31	methyl hexadecanoate	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	1.85	95.0
19.49	ribitol	C ₅ H ₁₂ O ₅	8.05	61.0
19.73	2-benzoyloximinopropan-1,3-diol	C ₁₀ H ₁₃ NO ₃	1.77	45.0
20.00	butyl isobutyl phthalate	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	7.71	85.0
22.85	inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	1.51	68.0
27.57	3-(4-methoxybenzylidene)-2-piperidinone	C ₁₃ H ₁₂ NO ₂	6.87	65.0
30.21	hexadecanoic acid,2,3-dihydroxypropyl ester	C ₁₉ H ₃₈ O ₄	1.78	74.0

表6 芦苇叶水提物正丁醇萃取物中Fr. 9组分的主要组成成分及其相对含量

Table 6 Main composition compounds and their relative content in Fr. 9 fraction from 1-butanol partitioned extract in water extracts from leaf of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud.

保留时间/min Retention time	成分 Compound	分子式 Molecular formula	相对含量/% Relative content	相似度/% Similar degree
11.27	tetraethylene glycol	C ₈ H ₁₈ O ₅	12.67	63.0
17.06	D-xylofuranose	C ₅ H ₁₀ O ₅	8.23	57.0
17.96	arabinose	C ₅ H ₁₀ O ₅	5.05	74.0
19.31	methyl hexadecanoate	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	4.87	98.0
19.76	6-deoxy-L-galactose	C ₆ H ₁₂ O ₅	8.12	84.0
20.01	dibutyl phthalate	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	29.05	94.0
20.39	xylose	C ₅ H ₁₀ O ₅	11.47	86.0
21.07	mannose	C ₆ H ₁₂ O ₆	3.49	91.0
24.36	(Z,Z)-9,12-octadecadienoic acid	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	2.45	72.0
24.44	oleic acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	2.90	68.0
25.68	trans-9,10-epoxystearic acid methyl ester	C ₁₉ H ₃₆ O ₃	3.65	92.0
26.82	oleamide	C ₁₈ H ₃₅ NO	5.97	92.0

表 7 芦苇叶水提取物正丁醇萃取物中 Fr. 10 组分的主要组成成分及其相对含量

Table 7 Main composition compounds and their relative content in Fr. 10 fraction from 1-butanol partitioned extract in water extracts from leaf of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud.

保留时间/min Retention time	成分 Compound	分子式 Molecular formula	相对含量/% Relative content	相似度/% Similar degree
4.23	N,N-diethyl-formamide	C ₅ H ₁₁ NO	4.05	91.0
5.23	N,N-diethyl-acetamide	C ₆ H ₁₃ NO	5.71	91.0
6.33	2-ketobutyric acid	C ₄ H ₆ O ₃	2.85	48.0
6.78	2-phenethylamine	C ₈ H ₁₁ N	2.73	76.0
7.06	2-methyl-2-propen-1-ol	C ₄ H ₈ O	1.98	71.0
11.11	tetraethylene glycol	C ₈ H ₁₈ O ₅	5.21	57.0
12.13	glycerol	C ₃ H ₈ O ₃	7.71	53.0
12.60	1,2,3,4-butanetetrol	C ₄ H ₁₀ O ₄	5.83	45.0
17.06	methyl β-D-ribofuranoside	C ₆ H ₁₂ O ₅	2.26	48.0
17.76	D-(-)-arabinose	C ₅ H ₁₀ O ₅	1.25	55.0
17.87	mannono-1,4-lactone	C ₆ H ₁₀ O ₆	3.87	45.0
18.03	L-(+)-arabinose	C ₅ H ₁₀ O ₅	1.89	91.0
19.31	methyl hexadecanoate	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	4.42	96.0
19.49	arabinitol	C ₅ H ₁₂ O ₅	1.42	55.0
19.76	6-deoxy-galactose	C ₆ H ₁₂ O ₅	5.28	52.0
20.00	dibutyl phthalate	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	18.86	85.0
20.39	xylose	C ₅ H ₁₀ O ₅	1.56	92.0
21.07	D-glucopyranose	C ₆ H ₁₂ O ₆	2.56	94.0
23.77	hexadecanamide	C ₁₆ H ₃₃ NO	1.69	88.0
25.68	trans-9,10-epoxystearic acid methyl ester	C ₁₉ H ₃₆ O ₃	3.95	93.0
26.79	oleamide	C ₁₈ H ₃₅ NO	7.97	99.0
27.21	octadecamide	C ₁₈ H ₃₇ NO	1.29	77.0

2.45%。

由表 7 可见,从 Fr. 10 组分中共鉴定出 22 种有机化合物,占总相对含量的 94.34%,包括有机酸类、酯类、糖类、酰胺类等。其中,邻苯二甲酸二丁酯的相对含量最高,为 18.86%;硬脂酰胺(octadecamide)的相对含量最低,为 1.29%。

2.4 芦苇叶水提取物中潜在化感成分对小麦幼苗生长的影响

根据芦苇叶水提取物中 14 种潜在化感成分的鉴定结果,以小麦为实验对象进行生物活性测试,14 种潜在化感成分对小麦幼苗根长、株高和单株鲜质量的影响见表 8。由表 8 可以看出:芦苇叶水提取物中 14 种潜在化感成分对小麦幼苗根长、株高和单株鲜质量的影响存在一定差异。其中,经质量浓度均为 20 mg · L⁻¹ 的油酸酰胺、棕榈酸甲酯、亚油酸、2-苯乙胺、2-甲基烯丙醇和 4-羟基-3-甲氧基苦杏仁酸处理后,小麦幼苗的株高、根长及单株鲜质量均显著低于对照组 ($P < 0.05$),而质量浓度 20 mg · L⁻¹ 的 N,N-二乙基乙酰胺和 N,N-二乙基甲酰胺仅对小麦幼苗的根长有显著抑制作用。

表 8 芦苇叶水提取物中潜在化感成分对小麦幼苗生长的影响¹⁾Table 8 Effect of potential allelopathic compound in water extracts from leaf of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud. on growth of *Triticum aestivum* Linn. seedling¹⁾

成分 ²⁾ Compound ²⁾	根长/mm Root length	株高/mm Height	单株鲜质量/g Fresh weight per plant
CK	30.2±4.1	26.6±3.9	0.058±0.010
1,2,3,4-butanetetrol	29.0±5.4	28.8±4.5	0.068±0.011
dibutyl phthalate	25.2±10.2	16.5±6.5	0.047±0.016
oleamide	15.7±5.0*	13.4±3.8*	0.032±0.008*
tetraethylene glycol	22.1±2.8	21.7±2.3	0.061±0.011
D-lyxose	23.7±8.6	23.6±8.9	0.058±0.022
D-(-)-gulonic acid γ-lactone	29.7±5.0	29.1±4.5	0.067±0.013
methyl hexadecanoate	6.5±0.3*	4.6±0.1*	0.024±0.002*
oleic acid	23.8±3.6	21.6±4.5	0.059±0.010
(Z,Z)-9,12-octadecadienoic acid	8.6±5.0*	6.6±3.8*	0.022±0.013*
N,N-diethyl-formamide	19.9±5.6*	19.4±6.1	0.049±0.015
2-phenethylamine	4.2±2.4*	8.7±5.0*	0.023±0.013*
2-methyl-2-propen-1-ol	4.6±2.7*	5.2±3.0*	0.021±0.012*
DL-4-hydroxy-3-methoxymandelic acid	9.2±5.3*	9.5±5.5*	0.027±0.015*
N,N-diethyl-acetamide	13.6±1.5*	13.5±2.0	0.037±0.006

¹⁾ * : 与对照 (CK) 相比差异显著 ($P < 0.05$) Significant difference compared with the control (CK) ($P < 0.05$).

²⁾ CK: 甲醇 Methanol. 各组分的质量浓度均为 20 mg · L⁻¹ Mass concentration of all compounds are 20 mg · L⁻¹.

3 讨论和结论

本研究中,通过不同溶剂萃取、硅胶柱层析、TLC 检测及 GC-MS 等方法,对芦苇叶水提取物中潜在化感成分的分析结果表明:芦苇叶水提取物中主要含糖类、醇类、有机酸类、酮类、酰胺类和酯类化合物;14 种潜在化感成分中,油酸酰胺、棕榈酸甲酯、亚油酸、2-苯乙胺、2-甲基烯丙醇和 4-羟基-3-甲氧基苦杏仁酸对小麦幼苗生长的抑制作用较强,显示这些成分的化感作用较强,而 1,2,3,4-丁四醇和 D-(-)-古洛糖酸-γ-内酯则对小麦幼苗生长具有一定的促进作用。从相关文献可知,油酸酰胺^[14]、棕榈酸甲酯^[15-16]和亚油酸^[17-18]的化感活性均较强,而 4-羟基-3-甲氧基苦杏仁酸、2-苯乙胺和 2-甲基烯丙醇的化感活性尚未见报道。因此,要明确芦苇叶水提取物中的化感成分及其变化规律,还需进一步研究。

目前,有关植物化感成分的研究主要集中在重要农作物^[3]和外来入侵植物,特别是菊科 (Asteraceae) 中的外来入侵植物,如紫茎泽兰 [*Ageratina adenophora* (Spreng.) R. M. King et H. Rob.]、牛膝菊 [*Galinsoga parviflora* Car.] 和野苘蒿 [*Crassocephalum crepidioides*

(Benth.) S. Moore]等^[19-20],而有关禾本科(Poaceae)野生植物中化感成分的研究还较少。在禾本科植物中,不同植物的化感成分差异较大,如芦苇中的化感成分为没食子酸(gallic acid)^[8-9]和2-甲基乙酰乙酸乙酯(ethyl 2-methylacetoacetate)^[12];小麦的化感成分为2种苯并恶嗪酮类化合物^[21],而水稻(*Oryza sativa* Linn.)的化感成分可能是羟基脲酸类、环己烯酮类、黄酮类、二萜内酯类和酚类成分^[3-4]。目前GC-MS法常用于化感成分鉴定,但只有约20%的成分可以采用GC-MS法鉴定,还有约80%的分子量较大和溶于水相的有机物无法采用GC-MS法分离鉴定^[22],即热不稳定性 and 不能气化的成分无法采用GC-MS法分析鉴定^[23]。本研究中,虽然已鉴定和验证了油酸酰胺、棕榈酸甲酯、亚油酸、2-苯乙胺、2-甲基烯丙醇和4-羟基-3-甲氧基苦杏仁酸是芦苇叶中的重要化感成分,但不能排除存在其他化感成分的可能性。植物的化感活性不仅取决于化感物质的种类和浓度,还取决于不同化感成分的组合^[24]。本研究仅对芦苇叶水提物的正丁醇萃取物中14种单一成分的生物活性进行验证,但各化感成分如何作用于受体植物以及多种化感成分如何相互作用尚未知,有待进一步研究。

综合研究结果表明:芦苇叶水提物的化感物质主要存在于其正丁醇萃取物中,其中油酸酰胺、棕榈酸甲酯、亚油酸、2-苯乙胺、2-甲基烯丙醇和4-羟基-3-甲氧基苦杏仁酸等成分具有较强生物活性,推断上述成分为芦苇叶水提物的主要化感成分。

参考文献:

- [1] 孔垂华,胡飞.植物化感(相生相克)作用及其应用[M].北京:中国农业出版社,2001:1-10.
- [2] 李培栋,王兴祥,李奕林,等.连作花生土壤中酚酸类物质的监测及其对花生的化感作用[J].生态学报,2010,30(8):2128-2134.
- [3] 孔垂华,徐效华,梁文举,等.水稻化感品种根分泌物中非酚酸类化感物质的鉴定与抑草活性[J].生态学报,2004,24(7):1317-1322.
- [4] 林文雄.化感水稻抑草作用的根际生物学特性与研究展望[J].作物学报,2013,39(6):951-960.
- [5] 万欢欢.入侵植物紫茎泽兰叶片凋落物的化感作用及其降解动态[D].北京:中国农业科学院植物保护研究所,2010:42-43.
- [6] 李愈哲,樊江文,尹昕,等.入侵植物加拿大一枝黄花与乡土植物芦苇的相互化感作用[J].应用生态学报,2011,22(5):1373-1380.
- [7] KALIGARIČM, MEISTER M H, ŠKORNIK S, et al. Grassland succession is mediated by umbelliferous colonizers showing allelopathic potential[J]. Plant Biosystems, 2011, 145: 688-698.
- [8] RUDRAPPA T, BONSALL J, GALLAGHER J L, et al. Root-secreted allelochemical in the noxious weed *Phragmites australis* deploys a reactive oxygen species response and microtubule assembly disruption to execute rhizotoxicity[J]. Journal of Chemical Ecology, 2007, 33: 1898-1918.
- [9] BAINS G, KUMAR A S, RUDRAPPA T, et al. Native plant and microbial contributions to a negative plant-plant interaction [J]. Plant Physiology, 2009, 151: 2145-2151.
- [10] 郑琨,赵福庚,张茜,等.盐度变化条件下芦苇对互花米草的化感效应[J].应用生态学报,2009,20(8):1863-1867.
- [11] 付为国,田远飞,汤涓涓,等.芦苇浸提液对藨草种子萌发及幼苗生长生理特性的影响[J].广西植物,2013,33(2):154-158.
- [12] LI F M, HU H Y. Isolation and characterization of a novel anti-algal allelochemical from *Phragmites communis*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71: 6545-6553.
- [13] 高兴祥,李美,高宗军,等.外来物种小飞蓬的化感作用初步研究[J].草业学报,2009,18(5):46-51.
- [14] 张可.海马齿对三种赤潮微藻生长的克生作用研究[D].厦门:厦门大学环境与生态学院,2011:44-47.
- [15] 邓建梅.天祝天然草地主要有毒植物资源调查及黄花棘豆化感作用研究[D].兰州:甘肃农业大学农业学院,2009:24-38.
- [16] 陈磊,云兴福.西芹鲜根及根际区物化感物质成分鉴定[J].华北农学报,2012,27(2):157-164.
- [17] 杨菲,黄乾明,杨春华,等.扁穗牛鞭草水浸液化感作用及化学成分分析[J].四川农业大学学报,2008,26(3):232-236.
- [18] 郑春艳,张哲,胡威,等.三种化感物质对水华混合藻类以及多刺裸腹蚤的毒性作用[J].中国环境科学,2010,30(5):710-715.
- [19] 杨国庆.紫茎泽兰淋溶主效化感物质的分离鉴定及其对早稻幼苗的作用机理[D].北京:中国农业科学院植物保护研究所,2006:35-48.
- [20] 董红云,李亚,汪庆,等.外来入侵植物牛膝菊和野苘蒿水浸液化感作用的生物测定[J].植物资源与环境学报,2010,19(2):48-53,91.
- [21] 陈冬梅,沈荔花,陈祥旭,等.麦类作物化感作用及其分子生态学研究[J].中国生态农业学报,2008,16(4):1053-1059.
- [22] 孔垂华,徐效华.有机物的分离和结构鉴定[M].北京:化学工业出版社,2003:353-363.
- [23] 孟贞贞,聂红,徐珍霞,等.色谱技术在中药白芷研究中的应用进展[J].时珍国医国药,2006,17(1):4-5.
- [24] 何华勤,沈荔花,宋碧清,等.几种化感物质替代物间的互作效应分析[J].应用生态学报,2005,16(5):890-894.

(责任编辑:张明霞)