

木麻黄小枝提取物的分离鉴定及其对幼苗的化感作用*

邓兰桂 孔垂华 骆世明 (华南农业大学热带亚热带生态研究所, 广州 510642)

【摘要】 木麻黄是我国华南沿海重要的防护林树种, 易衰退。从化感作用角度探讨其衰退原因。结果表明, 木麻黄小枝提取物显著地抑制其幼苗的生长, 具有化感作用。利用色谱和波谱技术从提取物中分离鉴定了 5 种化感物质: A. 山奈黄素-3- α -鼠李糖苷; B. 槲皮黄素-3- α -阿拉伯糖苷; C. 槲草素-3, 4-二甲氧基-7- β -鼠李糖苷; D. 山奈黄素-3- β -双鼠李糖苷; E. 槲皮黄素-3- β -葡萄糖苷, 均为黄酮类化合物。用 A、B 和 C 对木麻黄幼苗进行生物测定表明, 3 种化感物均显著地抑制木麻黄幼苗生长, 尤其是抑制根生长。

关键词 化感作用 木麻黄 黄酮类化合物 分离鉴定

Isolation and identification of extract from *Casuarina equisetifolia* branchlet and its allelopathy on seedling growth Deng Langui, Kong Chuihua and Luo Shiming (Institute of Tropical and Subtropical Ecology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642). -*Chin. J. Appl. Ecol.*, 1996, 7(2): 145~ 149

Casuarina equisetifolia is an important tree species for shelter belt at the seashores of South China, but it degenerates quickly. The potential cause of its degeneration is discussed from the viewpoint of allelopathy. The results show that allelochemicals produced by *C. equisetifolia* can inhibit the growth of its seedlings. Five allelochemicals from *C. equisetifolia* branchlet are isolated and identified by means of HPLC, IR and NMR. They are kaempferol-3- α -rhamnoside, quercetin-3- α -araboside, luteolin-3, 4-dimethoxy-7- β -rhamnoside, kaempferol-3- β -dirhamnoside and quercetin-3- β -glucoside. The first three of them can inhibit the growth of seedling, and especially that of root.

Key words Allelopathy, *Casuarina equisetifolia*, Flavonoids, Isolation and identification.

1 引言

木麻黄(*Casuarina equisetifolia*)广泛分布于东南亚、太平洋群岛和澳洲, 具有速生、耐旱、耐涝、耐盐的生态习性, 极适宜于滨海沙地种植^[1], 是世界上主要的造林树种^[8]。我国自 50 年代引种后, 对促进农业生产, 改善沿海生态环境起到良好的作用。但木麻黄旺盛生长年限短, 约 15 a 进入生长高峰期, 20 a 后便迅速衰退, 尤其第 2 代林木出现严重病害引起木麻黄大量死亡^[5]。针对这一问题, 近年人们在其病虫害、土肥适应性和有关立地条件等方面做

了大量的研究工作^[4, 5], 但对可能引起木麻黄衰退的其它原因, 如木麻黄对自身的化感作用(A llelopathy), 即木麻黄是否产生对本种有抑制作用物质在环境的积累而引起对自身幼苗生长的抑制作用则研究甚少。Suresh 和 Vinaya 最近研究发现^[14], 用木麻黄小枝水提取物浇灌土壤对高粱、虹豆和向日葵的发芽和生长均有化感作用。Fisher^[11]指出, 在老果园的衰退以及咖啡和茶园的退化中, 自身有害物质的积累(化感作用的一种形式)是一个重要原因。本文

* 国家自然科学基金和兰州大学应用有机化学重点开放实验室基金资助项目。

1995 年 8 月 31 收到, 1996 年 1 月 24 日改回

将从化感作用的角度探讨木麻黄小枝提取物对其幼苗的化感作用,并对化感物质进行分离和鉴定

2 材料与方法

2.1 实验材料

木麻黄小枝采自华南农业大学校园,种子于1993年12月采自广东省阳西县上洋镇。提取物采用新鲜木麻黄小枝捣烂取其汁液,并将残渣用水在室温下浸泡1 d,换水继续浸泡1 d,混合浸提液及汁液,静置,滤取清液,利用减压浓缩的方法制得。

2.2 实验方法

2.2.1 提取物的化感作用实验 将木麻黄种子预先萌发,1周后选取长势尽可能一致的幼苗(根约6 mm,芽约1 mm),置于底部放有棉花的柱型玻璃瓶中,每瓶20株,加入浓度分别为0.01、0.05、0.1、0.2 gFW·mL⁻¹的提取物水溶液5 mL,1周后再加5 mL,继续培养1周。2次加入的提取物水溶液均含等量Hoagland培养液^[3],于28℃下培养,记录根长和苗高,每个处理3次重复,并以培养液中不含木麻黄提取物为空白对照。

2.2.2 提取物的分离鉴定 5 g提取物拌以5 g硅胶(200~300目)研匀,湿法装柱,采用不同体积比例氯仿/甲醇(从50:1到完全用甲醇)作淋洗剂进行柱层析。每次接收20 mL用薄层层析检查淋洗液,合并同类,浓缩。再换加压柱进一步柱层析分离得纯品A(110 mg)、C(53 mg)、D(19 mg)、E(19 mg)和粗品B(80 mg),粗品B采用高压液相色谱纯化(70%甲醇水溶液淋洗,流速10 mL·min⁻¹,分离时间20 min×18针=6 h,紫外检测波长254 nm),最终得纯品A(15 mg)和B(48 mg)。

2.2.3 化感物质对木麻黄幼苗的抑制作用试验

将分离的化感物质A、B、C分别用甲醇溶解并配成800、400、200、100、50、25、12.5和6.25 μg·g⁻¹ 8个浓度。各取2.5 mL加到放有2张滤纸的50 mL培养瓶中。待溶剂挥发后选取预先萌发长势尽可能一致的木麻黄幼苗(根约6 mm,芽约1 mm)放置在各处理培养瓶中,每瓶15株,加含Hoagland培养液成分的水2.5 mL,盖上湿毛巾,

与培养箱中28℃恒温培养7 d,记录根长和苗高,每个处理3次重复,并以空白为对照。

2.2.4 数据处理 按Williamson的方法^[15]处理:

$$RI = 1 - C/T \quad (T < C)$$

其中,C为对照值,T为处理值

$$RI = T/C - 1 \quad (T > C)$$

RI为化感作用效应,0 < RI < 1为促进;-1 < RI < 0为抑制,绝对值的大小与作用强度一致。

统计假设测验与方差分析^[8]除特别说明外,均以RI值为原数据进行。

3 结果与讨论

3.1.7 木麻黄小枝提取物对木麻黄幼苗生长的影响

由表1可见,随着提取物浓度增大,木麻黄小枝水提取物对木麻黄幼苗生长的抑制作用加强,对根生长的抑制尤为显著。实验中观察到,随着浓度升高,根长变短,根毛也少,根颜色变深,呈褐色,幼苗瘦弱。由此可以推断,木麻黄小枝提取物中含有某些对幼苗生长有抑制作用的化感物质。

表1 木麻黄小枝水提取物对其幼苗生长的影响

Table 1 Effect of aqueous extracts from *C. equisetifolia* branchlet on the growth of its seedlings

浓度 Concentration (gFW·mL ⁻¹)	根 Root		苗 Shoot	
	RI	t	RI	t
0.01	-0.105	4.915*	-0.024	2.873
0.05	-0.269	7.059*	-0.045	3.642
0.10	-0.339	9.033*	-0.095	4.083
0.20	-0.485	10.12*	-0.069	3.814

注:RI为同一处理3次重复化感作用效应的平均值。Mean of allelopathic effect in same treatment with three replicates; |t|为空白对照进行t测验所得t值的绝对值。Absolute value of t-test. * α=0.05, ** α=0.01 (n=2时, t_{0.05}=4.303, t_{0.01}=9.925)。

3.2 化感物质的分离与鉴定

共分离和鉴定5个化感物质。化感物A:橙黄色针状晶体,在硅胶GF₂₅₄薄层板上遇H₂SO₄-EtOH和FeCl₃-EtOH均显桔红色,遇磷钼酸-EtOH显墨绿色,在紫外灯下显暗灰色。m.p. 173-5℃, [α]_D²⁰-177 (Cl, EtOH)。FAB-MS谱给出的[M+Na]⁺=455, [M+Li]⁺=439, 有[M+

$\text{Na}]^+ - [\text{M} + \text{Li}]^+ = 16$, 证明是一种糖苷, 且分子量为 432, 与分子式 $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$ 的分子量一致 IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 1606 (C=O), 1335 (C=C), 1170 (C-O-C). NMR (CD_3OD , ppm), δH : 0.90 (rha, Me), 3.35 - 4.23 (2-5), 5.38 (1, $J = 1.59\text{Hz}$), 6.17 (6), 6.35 (8), 6.90 (5), 6.95 (3), 7.70 (6), 7.75 (2). δC : 17.641 (6), 71.919 (5), 72.006 (3), 72.121 (2), 73.202 (4), 94.782 (8), 99.864 (6), 103.484 (1), 105.889 (10), 116.498 (3, 5), 122.326 (1), 131.688 (2, 6), 138.197 (3), 158.155 (9), 159.226 (2), 161.531 (4), 163.169 (5), 165.950 (7), 179.567 (4).

推断化感物 A 为山奈黄素-3- α -鼠李糖苷, 结构式见文献^[7, 10].

化感物 B: 淡黄色粉末, 在硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上遇 $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-EtOH}$ 和 $\text{FeCl}_3\text{-EtOH}$ 均显桔红色, 在紫外灯下显暗灰色 m. p. 222 - 224 : FAB-MS 谱给出的 $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 457$, 有 $[\text{M} + \text{Li}]^+ - [\text{M} + \text{Li}]^+ = 16$, 证明是一种糖苷, 且分子量为 434, 以上数据与化合物 quercetin-3-araboside (别名: avicularin; 分子式 $\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{O}_{11}$) 的文献值一致^[13]. 必须指出, 有的文献报道 avicularin 的 m. p. 为 214-6 或 217^[12]. 根据 El Khadem 的报道, 这是含一分子结晶水的 avicularin, 即 $\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{O}_{11} \cdot \text{H}_2\text{O}$ ^[12]. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 168$ (Cl, EtOH) 也与化合物 quercetin-3-araboside 的文献值一致^[2]. IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 1608 (C=O), 1360 (C=C), 1044 (C-O-C). NMR (DM SO-d_6 , ppm), δH : 2.95-3.65 (2-5), 5.35 (1, $J = 7.28\text{Hz}$), 6.20 (6), 6.45 (8), 6.85 (5), 7.53 (6), 7.55 (2), 9.33 (7-OH), 9.80 (4-OH), 10.90 (3-OH), 12.58 (5-OH). δC : 65.964 (5), 69.288 (4), 73.477

(2), 75.653 (3), 93.492 (8), 98.588 (6), 101.698 (1), 103.682 (10), 115.281 (2), 116.042 (5), 120.951 (1), 121.442 (6), 133.173 (3), 144.810 (3), 148.431 (4), 160.915 (9), 161.196 (5), 163.929 (2), 164.137 (7), 177.334 (4).

推断化感物 B 为懈皮黄素-3- α -阿拉伯糖苷, 结构式见文献^[7, 10].

化感物 C: 橙黄色针状晶体, 在硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上遇 $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-EtOH}$ 和 $\text{FeCl}_3\text{-EtOH}$ 均显桔红色, 遇磷钼酸-EtOH 显墨绿色, 在紫外灯下显暗灰色 m. p. 176-9. FAB-MS 谱给出的 $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 483$, $[\text{M} + \text{Li}]^+ = 467$, 有 $[\text{M} + \text{Na}]^+ - [\text{M} + \text{Li}]^+ = 16$, 证明是一种糖苷, 且分子量为 460 IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 1600 (C=O), 1358 (C=C), 1152 (C-O-C). NMR (CD_3OD , ppm), δH : 0.77 (rha, Me), 1.90 (4, OM e), 2.15 (3, OM e), 3.15-3.38 (2-5), 5.85 (1, $J = 1.09\text{Hz}$), 6.16 (6), 6.30 (8), 6.78 (5), 6.89 (3), 7.50 (6), 7.72 (2). δC : 17.585 (6), 69.611 (5), 72.072 (3), 71.799 (2), 74.714 (4), 95.291 (8), 100.564 (6), 102.064 (1), 105.532 (10), 116.585 (5), 116.857 (3), 122.619 (1), 131.313 (6), 131.942 (2), 146.843 (3), 158.700 (OM e), 159.216 (9), 161.762 (2), 163.075 (4), 167.765 (5), 168.841 (7), 179.212 (4).

推断化感物 C 为槲草素-3, 4-二甲氧基-7- β -鼠李糖苷, 结构式见文献^[7, 10].

化感物 D: 橙黄色粉末, 在硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上遇 $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-EtOH}$ 和 $\text{FeCl}_3\text{-EtOH}$ 均显桔红色, 遇磷钼酸-EtOH 显墨绿色, 在紫外灯下显暗灰色 m. p. 176-9. FAB-MS 谱给出的 $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 601$, $[\text{M} + \text{Li}]^+ = 585$, 有 $[\text{M} + \text{Na}]^+ - [\text{M} + \text{Li}]^+ = 16$, 证明是一种糖苷, 且分子量为 578

IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 1580 (C=O), 1380 (C=C), 1170 (C-O-C). NMR (CD_3OD , ppm), δH : 0.75 (rha, Me), 1.40 (rha, Me), 2.95-3.40 (2-5), 3.62-4.00 (2-5), 4.51 (1, J=5.62Hz), 5.91 (1, j=0), 6.25 (6), 6.48 (3), 7.00 (3, 5), 7.88 (6), 7.91 (2), 12.67 (5-OH).

推断化感物D 为山奈黄素-3- β 双鼠李糖苷, 结构式见文献^[7,10].

化感物E: 淡黄色粉末, 在硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上遇 H₂SO₄-EtOH 和 FeCl₃-EtOH 均显桔红色, 遇磷钼酸-EtOH 显墨绿色, 在紫外灯下显暗灰色 m. p. 175-8. FAB-MS 谱给出的 $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 487$, $[\text{M} + \text{Li}]^+ = 471$, 有 $[\text{M} + \text{Na}]^+ - [\text{M} + \text{Li}]^+ = 16$, 证明是一种糖苷, 且分子量为 464

IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 1602 (C=O), 1359 (C=

表 2 化感物 A、B、C 对木麻黄幼苗根生长的影响(RI 值)

Table 2 Effect of allelochemical A, B and C on the growth of beef wood seedling

项目 Item	化感物 Allelochemical	浓度 Concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)							
		800	400	200	100	50	25	12.5	6.25
根长	A	0.418	0.352	0.348	0.227	0.089	0.023	0.019	0.036
Root	B	0.245	0.191	0.171	0.132	0.065	0.042	0.033	0.049
length	C	0.554	0.541	0.395	0.241	0.159	0.166	0.037	0.048
苗高	A	0.204	0.131	0.102	0.047	0.089	0.083	0.024	0.063
Shoot	B	0.082	0.043	0.077	0.005	0.023	0.031	0.006	0.071
height	C	0.166	0.151	0.097	0.034	0.012	0.018	0.041	0.033

的平均值 RI, 列于表 2

对结果进行方差分析, 只有化感物B 在不同浓度下对木麻黄幼苗高生长的影响没有达到显著水平, 其余均存在显著甚至极显著差异 对根: $F_c = 163.25^{**}$, $F_a = 98.67^{**}$, $F_b = 32.15^{**}$; 对苗: $F_c = 3.89^*$, $F_a = 9.63^{**}$. ($u = 7$, $u = 16$ 时, $F_{0.05} = 2.66$, $F_{0.01} = 4.03$).

实验还发现,B 和 C 虽然抑制木麻黄根生长, 然而长出的侧根数目却比对照要多, 一般为 4~6 条, 且各浓度之间差别不明显 总体上, 用 C 处理的木麻黄幼苗其侧根平均为 4.2 条, 用 B 处理的则为 4.7

C), 1030 (C-O-C). NMR ($\text{DM SO}-d_6$, ppm), δH : 3.40-3.60 (2-5), 5.45 (1, J=6.78Hz), 6.22 (6), 6.43 (8), 6.80 (5), 7.20 (2), 7.65 (6), 12.60 (5-OH). δC : 60.024 (6), 67.801 (5), 71.099 (4), 73.074 (2), 75.773 (3), 93.531 (8), 98.682 (6), 101.612 (1), 103.631 (10), 115.114 (2), 115.837 (5), 121.050 (1), 121.871 (6), 133.464 (3), 144.707 (3), 148.365 (4), 156.114 (9), 156.312 (5), 160.898 (2), 164.376 (7), 177.359 (4).

推断化感物E 为懈皮黄素-3- β 葡萄糖苷, 结构式见文献^[7,10].

3.3 化感物质对木麻黄幼苗根生长影响

根据实验方法(2.2.3) 分别对分离所得化感物A、B 和 C 进行实验, 所得结果按照 2.2.4 数据处理方法算出化感作用效应

条, 而对照一般只有 1~2 条, 平均为 1.4 条 用化感物A 处理的木麻黄幼苗侧根平均为 1.9 条, 侧根均较短

4 讨 论

木麻黄为沿海防护林的先锋树种, 它的自养能力强, 在减少地表蒸发、防风固沙、改造滨海沙土结构、涵养水源、调节气候、改善生态环境等方面都显示出其特殊的生态优势^[4,8]. 但是, 经过木麻黄改良的海滨沙地, 大叶相思、湿地松、新银合欢等树种以及一些杂草能够较好地生长, 而木麻黄则由生态优势转变为生态劣势^[4], 尤其更新后的第 2 代木麻黄抗逆性明显减

弱,产生退化^[5]。产生这种现象的原因是多方面的,木麻黄种植后生态环境逐渐改变,使原有适应木麻黄生长的立地条件不复存在,病虫危害增多,尤其是木麻黄青枯病严重影响其生长。本项研究表明,不论是木麻黄小枝的水提取物,或是分离得到的化感物都显著地影响木麻黄幼苗的生长,说明木麻黄产生的次生代谢物对其幼苗根生长具有抑制作用。

木麻黄的这种内在的化感抑制作用是缓慢的、长时间的,因而也容易被人们忽略。但随着木麻黄生长年限的延长,产生的次生代谢物质不断累积则足以产生对本种幼苗生长有抑制的作用,同时这种抑制作用与木麻黄立地的土壤结构有重要关系。陈起凡^[4]研究表明,沙粒越粗,越松散,通透性越强的地带木麻黄的生长状况就越佳。在广东省电白县南海镇的实地研究中亦发现,初期木麻黄种植在处于质地粗糙的土壤环境,其产生的次生代谢物质不易积累,对本种植株的抑制作用不明显,但由于木麻黄作为先锋树种不断改良了生态环境,使土壤的水肥、气、热等因素得以良性循环,造就了适合其它植物生长的环境,使得其它植物能够生长。同时,随着这种土壤质地的改善,也加剧了木麻黄自身代谢物质的积累,使其本种植株所产生和累积化感物质的毒害作用成了自身衰退的原因之一。这样,同一区域内由单一木麻黄更替为多植物群落的现象反映了化感作用在生态群落演替中的重要意义。正如 Rice 指出,化感作用中的对本种的毒害加速了一种植物对另一种植物的替代,同时化感作用还决定着可能侵入植物群落的植物种^[9]。

黄酮是一类重要的生物活性物质,土壤中所累积的多种黄酮类化合物在生态演替中起着主导作用^[11]。本研究中分离出的

活性物质均为黄酮衍生物,它们对木麻黄幼苗的生长有抑制作用,特别是对根的抑制比对苗的抑制强。同时,提取物(混合物)和分离得到的纯化感物对木麻黄幼苗的毒害作用是有差异的,虽然两者都表现为抑制作用,但纯化感物 B 和 C 则能在不同程度上促进侧根的生长,而混合物则没有此作用。这说明黄酮各衍生物之间可能存在协同抑制作用。

参考文献

- 1 王裕然. 1985. 木麻黄科的分类学进展、地理分布及其命名述评. 热带林业科技, (3): 27~ 30.
- 2 中国科学院上海药物研究所编译. 1981. 黄酮体化合物鉴定手册. 北京: 科学出版社, 108~ 109.
- 3 西北农学院、华南农学院主编. 1979. 农业化学研究法. 北京: 农业出版社, 84.
- 4 陈起凡. 1990. 广东港口镇滨海沙土微量元素与木麻黄生态质量的研究. 热带地理, 10(2): 125~ 131.
- 5 罗云裳、高茂成. 1989. 滨海沙土微量元素与木麻黄生长的关系. 华南农业大学学报, 10(1): 71~ 76.
- 6 南京农业大学主编. 1988. 田间试验与统计方法(第2版). 北京: 农业出版社.
- 7 骆世明、林象联、曾任森等. 1995. 华南农区典型植物的化感作用. 生态科学, (2): 114~ 121.
- 8 柴禾. 1986. 木麻黄是世界一个主要造林树种. 国外林业动态, (16): 4~ 5.
- 9 J. B. Harborne (张玉麟、王镇圭编译). 1989. 生态生物化学导论. 北京: 农业出版社, 137.
- 10 J. B. Harborne (戴伦凯等译). 1983. 黄酮类化合物. 北京: 科学出版社, 299~ 336.
- 11 Fisher, R. F. 1980. Allelopathy: A potential cause of regeneration failure. J. Forestry, 78(6): 346~ 348.
- 12 Ice, C. H. and Wender, S. H. 1953. Quercetin and its glycosides in leaves of *Vaccinium myrtillus*. *Journal of the American Chemical Society*, 75: 50~ 52.
- 13 Khadem El, H. et al. 1958. Constituents of the leaves of *Psidium guajava* L. Part II Quercetin, avicularin and guajaverin. *Journal of the American Chemical Society*, 80: 3320~ 3323.
- 14 Suresh, K. K. and Vinaya, A. S. 1987. Studies on the allelopathic effects of some agroforestry tree crops. *The International Tree Crops Journal*, (4): 109~ 115.
- 15 William son, G. B. 1988. Bioassays for allelopathy: measuring treatment responses with independent controls. *Journal of Chemical Ecology*, 14(1): 181~ 187.