

4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯的生物活性 及其除草作用机制

张明月 刘 策 杨 娟 乔 欣 张利辉* 董金皋*

(河北农业大学植物保护学院, 保定 071000)

摘要: 为明确以天然产物阿魏酸为母体进行化学结构改造得到的化合物4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯的生物活性及其除草机制, 利用茎叶喷雾法和小杯法测定其对马唐和反枝苋的生物活性, 基于生理生化指标及功能基因表达量对其除草作用机制进行研究。结果表明: 4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯对马唐茎叶鲜重抑制中浓度 IC_{50} 为 46.27 mg/L; 对反枝苋胚根和芽的 IC_{50} 分别为 129.94 mg/L 和 147.33 mg/L, 且在 500 mg/L 浓度处理时可抑制反枝苋种子萌发; 对拟南芥根长的 IC_{50} 为 43.82 mg/L, 在 160 mg/L 浓度处理时拟南芥几乎停止生长、叶片发黄、根毛堆积。该化合物以 1 000 mg/L 浓度处理马唐叶片 2、3、8 h 后, 电导率较对照组分别增加了 22.70%、18.46% 和 25.62%; 1 000 mg/L 浓度处理下叶绿素 a/b 为 2.43, 较对照的 3.62 显著下降; 处理后叶表微观结构观察发现化合物浓度越大, 植物叶片表皮毛倒伏和褶皱越严重; 拟南芥 *AT4G04820* 基因表达量显著下降, 在处理 45 min 时下降最显著, 与对照组相差 42.52 倍, 微管蛋白含量下降, 造成微管解离, 从而抑制植物生长。表明 4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯具有较强的除草活性, 可能通过破坏细胞结构、抑制光合作用及阻止根生长等途径使杂草生长受到抑制甚至死亡。

关键词: 4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯; 生物活性; 作用机制

The biological activity of 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid ethyl ester and its herbicidal mechanism

Zhang Mingyue Liu Ce Yang Juan Qiao Xin Zhang Lihui* Dong Jingao*

(College of Plant Protection, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei Province, China)

Abstract: In order to clarify the biological activity and weeding mechanism of 4-hydroxy-3-methoxy cinnamic acid ethyl ester, which was obtained by modifying a natural product of fumalic acid in the previous research, its bioactivity to two weeds, *Digitaria sanguinalis* and *Amaranthus retroflexus*, were measured by using the methods of foliar treatment and small glass, and its herbicidal mechanism was studied by using the physiological and biochemical indicators and functional gene expression. The results showed that 4-hydroxy-3-methoxy cinnamic acid ethyl ester had a median inhibitory concentration (IC_{50}) value of 46.27 mg/L on the fresh weight of *D. sanguinalis* stems and leaves, with an IC_{50} value of 129.94 mg/L and 147.33 mg/L on radical and bud of *A. retroflexus*, respectively, and the germination could be inhibited at a concentration of 500 mg/L, also with an IC_{50} value of 43.82 mg/L to the root of *Arabidopsis thaliana* and could completely inhibit the growth, making the leaves turn yellow and the root hairs accumulated at 160 mg/L. After being treated at 1 000 mg/L for 2, 3 and 8 h, the electric conductivities of *D. sanguinalis* leaves increased by 22.70%, 18.46% and 25.62%, respectively, compared

基金项目: 国家自然科学基金(31401759), 河北省自然科学基金(C140504), 河北省留学人员科技活动项目(CN201603)

* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: Zhanglihui@hebau.edu.cn, dongjingao@126.com

收稿日期: 2016-11-24

with the control, and the chlorophyll a/b contents significantly decreased from 3.62 to 2.43. The epidermal hairs of *D. sanguinalis* leaves sprayed by the compound displayed lodging and corrugating in proportion to the concentration. The expression quantity of gene *AT4G04820* of *A. thaliana* declined dramatically, with the greatest decrements of 42.52-fold at 45 min, and significant decrease in tubulin amount resulted in microtubule dissociation and finally growth inhibition. The results indicated that 4-hydroxy-3-methoxy cinnamic acid ethyl ester had a strong herbicidal activity, probably due to the damage of cell structure and the inhibition on photosynthesis and root growth of plants.

Key words: 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid ethyl ester; biological activity; mechanism of action

杂草是造成农作物减产的重要原因,目前的杂草防治途径主要是利用化学除草剂,但化学除草剂的大量使用给环境和人类健康带来了不同程度的危害,严重阻碍了我国农业的可持续发展。因此,生物农药以其毒性低、选择性强、高效低残留和不易产生抗药性等优点逐渐成为当前农药研究与开发较为活跃的发展方向,主要包括植物源、动物源和微生物源农药(Bailey et al., 2010; Dos Reis Goulart et al., 2012; Glare et al., 2012)。其中微生物源农药是公认的无公害农药,具有防治对象不易产生抗药性、不破坏生态资源等优点(Teerarak et al., 2012),包括微生物活体农药和微生物代谢农药等。涉及到的微生物活体农药如李健等(2016a)利用画眉草弯孢霉 *Curvularia eragrostidis* 和厚垣孢镰刀菌 *Fusarium chlamydosporum* 防治马唐 *Digitaria sanguinalis*; 应用新月弯孢霉 *Curvularia lunata* (韦韬等, 2011)、禾长蠕孢菌 *Helminthosporium gramineum* (Geng et al., 2011) 和露湿漆斑菌 *Myrothecium roridum* 防治稗草 *Echinochloa crusgalli* (李健等, 2016b)。涉及到的微生物代谢农药如本实验室发现瓜果腐霉 *Pythium aphanidermatum* 代谢产物具有一定的除草活性(Sivan et al., 1984; 张利辉等, 2014), 并对代谢产物进行了分离鉴定, 得到了具有除草活性的化合物阿魏酸, 对马唐和拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 均具有较好的抑制作用。

随着杂草抗性等一系列问题的产生,新的除草活性物质及作用靶标的研究势在必行,因此从天然产物中寻找新的活性物质,并对其进行研究十分重要。目前,从天然产物中分离得到的除草活性物质主要有二酮吡嗪、倍半萜、短肽类、香豆素类、聚酮化合物、黄酮类及内酰胺等(Varejao et al., 2013),经研发得到的主要植物源除草剂有三酮类、天然羧酸类、萜烯类、醌酚类、香豆素类、噻吩类、生物碱类和二苯醚类等(Arias et al., 2006);也可以通过对新化合物作用机理的研究找到新的作用靶标,从而利用生物

靶标合理设计研发出新的药品,应用于生产生活(Duke & Dayan, 2013),如Peterson & Harrison(1991)发现甘薯提取物对稷和苘麻等7种杂草的萌发有抑制作用。当前对于天然源除草剂及其先导化合物的研究主要集中在微生物上,因为微生物本身具有很多优势,开发潜力巨大,第1个商品化的微生物除草产品是链霉菌 *Streptomyces virido chromogenes* 的产物双丙氨磷(Tan et al., 2006),它可以同时防治单子叶和双子叶植物,效果十分理想。

阿魏酸即4-羟基-3-甲氧基肉桂酸,是一种酚酸,具有抗氧化、抑菌、抗癌和抗血栓等作用,已广泛应用于医药、保健、化妆品原料和食品添加剂等诸多领域(Son et al., 2010; Kim et al., 2011)。阿魏酸对马唐和拟南芥均具有较好的抑制作用,还能造成植物根部细胞木质素含量增加,细胞壁提前木质化,从而抑制植物根系的生长(Dos Reis Goulart et al., 2012)。但是由于阿魏酸分子的亲水性较强,难以深入到生物膜的脂质双分子层中发挥作用,因此本实验室对阿魏酸的分子结构进行了改造,得到了活性更强的化合物4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯(Kumar & Kanwar, 2011; Li et al., 2012)。该化合物分子中存在脂类结构(Valente et al., 2009; Aljawish et al., 2012),易透过磷脂双分子层发挥其作用。因此,本试验拟通过对4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯的除草活性、细胞膜透性、叶绿素含量及相关生长基因表达量进行测定,明确其除草活性和作用机制,以期为进一步深入寻找新的作用靶标及天然除草剂的研发提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物:马唐和反枝苋种子采集于河北省保定市南堤路,拟南芥种子由河北农业大学真菌毒素与植物病理实验室种植、采集、保存。

药剂:4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯(4-hydroxy-

3-methoxycinnamic acid ethyl ester), 河北农业大学真菌毒素与植物病理实验室合成并保存; 97% 莠去津(atrazine), 常熟恒耀新材料有限公司; MS培养基, 天津市福晨化学试剂厂; RNA提取试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 反转录试剂盒, 宝生物工程(大连)有限公司; 其余试剂均为国产分析纯。

仪器: PGX-250C 智能光照培养箱, 宁波赛福实验仪器有限公司; UV-1800 型紫外分光光度计, 上海精密仪表有限公司; STARTER 3100C/F 型电导率仪, 深圳市德优平科技有限公司; KYKY-2800B 型扫描电镜, 北京中科科仪科技发展有限公司; 尼康 E100 生物显微镜, 北京中仪光科科技发展有限公司; Potter 喷雾塔, 英国 Burkard 科学仪器公司; Veriti 96 孔 PCR 扩增仪, 上海创萌生物科技有限公司; LightCycler 96 实时荧光定量 PCR 仪, 瑞士 Roche 公司。

1.2 方法

1.2.1 4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯除草活性的测定

采用茎叶喷雾法测定 4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯对马唐的生物活性。在口径 7 cm、高 8 cm 的塑料盆中装入 6 cm 深的蛭石, 每盆中均匀播种催芽且刚刚露白的马唐种子 9 粒, 然后覆盖约 1 cm 厚的蛭石。将播种好的塑料盆转入大白盆中, 加水 3 L, 同时保持 0.5 cm 厚的水层, 置于室外进行培养。待马唐生长至 2 片叶、株高约 2~3 cm 时每盆定苗 9 株进行试验处理。4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯经甲醇稀释成 0、62.5、125、250、500、1 000 mg/L 共 6 个浓度, 采用茎叶喷雾法处理植物, 每盆喷雾量为 2 mL, 每个处理 3 次重复。处理 7 d 后调查各处理马唐幼苗的生长情况, 拍照并称量地上部分的鲜重, 计算抑制率及抑制中浓度(IC₅₀)。抑制率=(对照组茎叶鲜重-处理组茎叶鲜重)/对照组茎叶鲜重×100%。

采用小杯法测定 4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯对反枝苋的生物活性。前期预试验中测定了该化合物对 10 种玉米田常见杂草的生物活性, 发现对反枝苋的抑制效果较好, 因此进行了系统试验。将 4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯用甲醇稀释为 0、62.5、125、250、500、1 000 mg/L 共 6 个浓度各 5 mL, 取 50 mL 小烧杯 18 个, 杯底放入小玻璃球若干个, 将配好的药液分别取 1 mL 加入杯中, 然后杯底放入与小杯直径相当的圆形滤纸一层, 将小烧杯放入干燥箱中, 40~50℃ 烘干甲醇溶液, 然后加入 1 mL 水, 用镊子选取表型一致的反枝苋种子, 每 15~20 粒放入 1 个小烧杯内, 加盖保湿, 每个浓度处理重复 3 次, 并以莠去津作为阳性对照。置于 25℃ 恒温条件下培养, 7 d 后

测定胚根和胚芽鞘的长度, 并计算抑制率及抑制中浓度(IC₅₀)。

拟南芥是植物界的模式植物, 为更好地评价 4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯的除草活性, 也测定了其对拟南芥的生物活性。将 4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯用甲醇溶解, 梯度稀释成 16 000、8 000、4 000、2 000、1 000、0 mg/L 的母液, 用无菌水对母液进行 10 倍稀释, 每个浓度各取 5 mL 加入到 95 mL 1/2 MS 培养基中, 终浓度为 80、40、20、10、5、0 mg/L, 备用。在超净工作台用 75% 的酒精冲洗拟南芥种子, 再用无菌超纯水冲洗 3~4 次, 加入 1 mL 的 NaClO 浸洗种子, 振荡 7~8 min, 用无菌超纯水冲洗 4~5 次, 种子置于 1/2 MS 培养基平板上, 在上述所制带药平板上用灭菌牙签点种子 30 粒, 每个处理 5 次重复, 培养 7 d 后测量拟南芥的根长并计算抑制率, 抑制率=(对照组根长-处理组根长)/对照组根长×100%。在光学显微镜下观察拟南芥根的生长状态, 用 30% 盐酸加苯三酚至饱和, 取培养 7 d 的拟南芥根尖滴加上述溶液, 放置 10 min, 在显微镜下观察记录。

1.2.2 4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯的除草作用机制

细胞膜透性的测定: 取大小相当的马唐叶片, 用自来水洗净后再用去离子水冲洗 3 次, 用滤纸吸干表面水分, 将叶片剪成相当大小的长条, 快速称取 3 份, 每份 0.1 g, 分别置于加有 10 mL 去离子水的离心管中, 盖好盖子于室温下浸泡 12 h, 用电导率仪测定浸提液电导率(R_1), 然后沸水浴加热 40 min, 冷却至室温后摇匀, 再测定浸提液电导率(R_2), 最后计算相对电导率。相对电导率= $R_1/R_2 \times 100\%$ 。

植物叶表微观结构观察: 将 4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯梯度稀释成 2、1、0.5、0.25、0 mg/mL 共 5 个浓度, 采用茎叶喷雾法处理马唐叶片, 每个浓度取 1.2.1 中种植的 3 盆马唐进行茎叶喷雾处理, 在处理 24 h 后取样, 每盆取叶片 5~10 片。将马唐叶片用 2.5% 戊二醛前固定 24 h(放入 4℃ 冰箱中); 然后用乙醇 30%、50%、70%、80%、90%、95%(过夜)、100% 逐级脱水, 每级 15 min; 再用乙醇: 乙酸异戊酯=3:1、1:1、1:3 逐级浸泡, 最后到 100% 的乙酸异戊酯, 每级 15 min; 对样品进行冷冻干燥, 喷金处理, 在扫描电镜下观察叶片的表面, 选择适合的比例进行拍摄。

叶绿素 a/b 含量的测定: 将 4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯用甲醇梯度稀释成 1 000、500、250、125、62.5、0 mg/L, 采用茎叶喷雾法处理马唐叶片, 每个浓度处理 4 盆, 马唐种植情况同 1.2.1, 在处理 24 h 后, 每个浓度各取 0.5 g 叶片, 剪碎后放入研钵中, 加

入少许的碳酸钙和石英砂,再加入5 mL 80%丙酮溶液,研磨至匀浆,过滤,将滤液置于10 mL棕色试管中,并用80%丙酮定容至刻度。取5 mL转移至25 mL棕色容量瓶中,再用80%丙酮定容至刻度,分别在645 nm及663 nm波长处测定光密度值,计算 Ca/Cb 。 $Ca=12.21A_{663}-2.81A_{645}$, $Cb=20.13A_{645}-5.03A_{663}$ 。

1.2.3 拟南芥 *ATIG04820* 基因表达量的测定

前期研究发现4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯对拟南芥根生长具有较强的抑制作用,并采用同位素相对标记与绝对定量技术研究其蛋白的表达变化,选择其中变化明显且与根生长相关蛋白的调控基因 *ATIG04820* 进行验证研究(Zhang et al., 2017)。选取合适数量的干燥拟南芥种子于EP管中,在无菌环境下吸取75%的酒精1 000 μ L于管中振荡30 s,除去乙醇用无菌水洗3~4次,再吸取次氯酸钠1 000 μ L振荡6~7 min,除去次氯酸钠,用无菌水洗3~4次,并且振荡1 min后将拟南芥种子悬在无菌水中,取无菌水1 000 μ L将培养皿的表面润湿,将多余水分吸出,吸取EP管中的种子缓慢冲入培养皿中,贴好封口膜,标明日期,放于4℃保存,48 h后于20℃、12 h光照/12 h黑暗的恒温箱中培养6~8 d,待长出4片叶子时用镊子将其移植到盆中培养10~20 d。用甲醇将4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯配成浓度为1 000 mg/L的溶液,并以纯甲醇作对照,使用根浸泡法处理拟南芥根,分别在处理后0、15、30、45、60、120 min时取根部组织,迅速置于液氮中,并在-80℃下保存备用。

上述处理后的拟南芥植物组织各称取100 mg,用液氮充分研磨成粉末状后立即转移到1个RNase-free 1.5 mL离心管中,加入450 μ L RLT Solution到样品中,剧烈振荡混匀,12 000 r/min离心5 min,吸取上清液到1个新的1.5 mL离心管中。向上清液中加入1/2体积无水乙醇,充分混匀。将吸附柱放入离心管中,加入含有无水乙醇的上清液,静置2 min,8 000 r/min离心1 min,倒掉管中废液;将吸附柱放回离心管中,加入500 μ L RW Solution,静置1 min,10 000 r/min离心1 min,倒掉管中废液;将吸附柱放入离心管中,加入500 μ L RPE Solution,静置2 min,10 000 r/min离心1 min,倒掉管中废液(重复1次);将吸附柱放回离心管中,10 000 r/min离心2 min;将吸附柱放入RNase-free的1.5 mL离心管中,在吸附膜中央加入30~50 μ L DEPC-treated ddH₂O,静置5 min,12 000 r/min离心2 min,将所得RNA溶液反转录获得cDNA。

RT-qPCR扩增的引物为AT4G20160(上游:

ATTCTCAGAGGCACGTGAGG,下游:AGAAAC-CCACACAAATCCAAAGT),内参引物为Actin(上游:GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG,下游:AA-CGACCTTAATCTTCATGCTGC)。10 μ L反应体系:cDNA 2 μ L、Mix 5 μ L、上下游引物各0.2 μ L、ddH₂O 3.6 μ L;反应条件:预孵育94℃ 30 s,3步扩增(94℃ 10 s,55℃ 15 s,72℃ 25 s),融化(95℃ 10 s,65℃ 60 s,97℃ 1 s),冷却(37℃ 30 s),共进行45次循环。以Green I为染料,均重复3次。利用罗氏实时定量软件对RT-qPCR数据进行统计分析。

1.3 数据分析

采用SPSS 17.0软件计算抑制中浓度,并对试验数据进行单因素方差分析,应用Duncan氏新复极差法进行不同处理间的差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯的除草活性

4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯对马唐茎叶和反枝苋胚根及芽表现出明显的抑制效果。处理马唐叶片失水萎蔫,甚至脱绿死亡(图1-A),且对马唐鲜重的IC₅₀达到64.26 mg/L,在500 mg/L浓度处理时马唐全部死亡,表现出较好的抑制效果(图2-A);该化合物对反枝苋胚根及芽的IC₅₀分别为129.94 mg/L和147.33 mg/L(图2-B),且500 mg/L浓度处理已完全抑制反枝苋种子的萌发(图1-B~C),而对照药剂莠去津对反枝苋胚根和芽的IC₅₀为1 772.10 mg/L和1 280.96 mg/L(图2-C)。表明4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯对马唐和反枝苋均表现出较好的除草活性。

4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯对拟南芥根的生长有明显的抑制作用,在80 mg/L及160 mg/L浓度处理时拟南芥的根几乎不生长且须根系发达堆积成白色团状,叶片有失绿现象(图1-D),IC₅₀为43.82 mg/L(图2-D)。在显微镜下观察拟南芥根尖切片,发现在4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯浓度为5 mg/L时导管明显变短,导管有向地上运输水和无机盐的作用,导管变短造成植株缺乏水和无机盐从而不能正常生长;在浓度为10 mg/L时根尖部位根毛发达,根毛通常生长在根的成熟区,表明根提前进入了成熟区,生长缓慢(图1-E)。

2.2 4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯的除草作用机制

2.2.1 对马唐细胞膜透性的影响

4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯处理后的马唐叶片,相对电导率在2、4、8 h时与对照组相比分别增加了22.70%、18.46%和25.62%,在处理8 h后增加的

最多,对照组的相对电导率在3个时间点间没有显著差异,而经过该化合物处理后在8 h时的相对电导率与2 h和4 h时存在显著差异,相对电导率变化较

大,表明马唐叶片细胞质膜受到了损伤,细胞内电解质渗透,细胞膜外电导率增大(图3-A)。

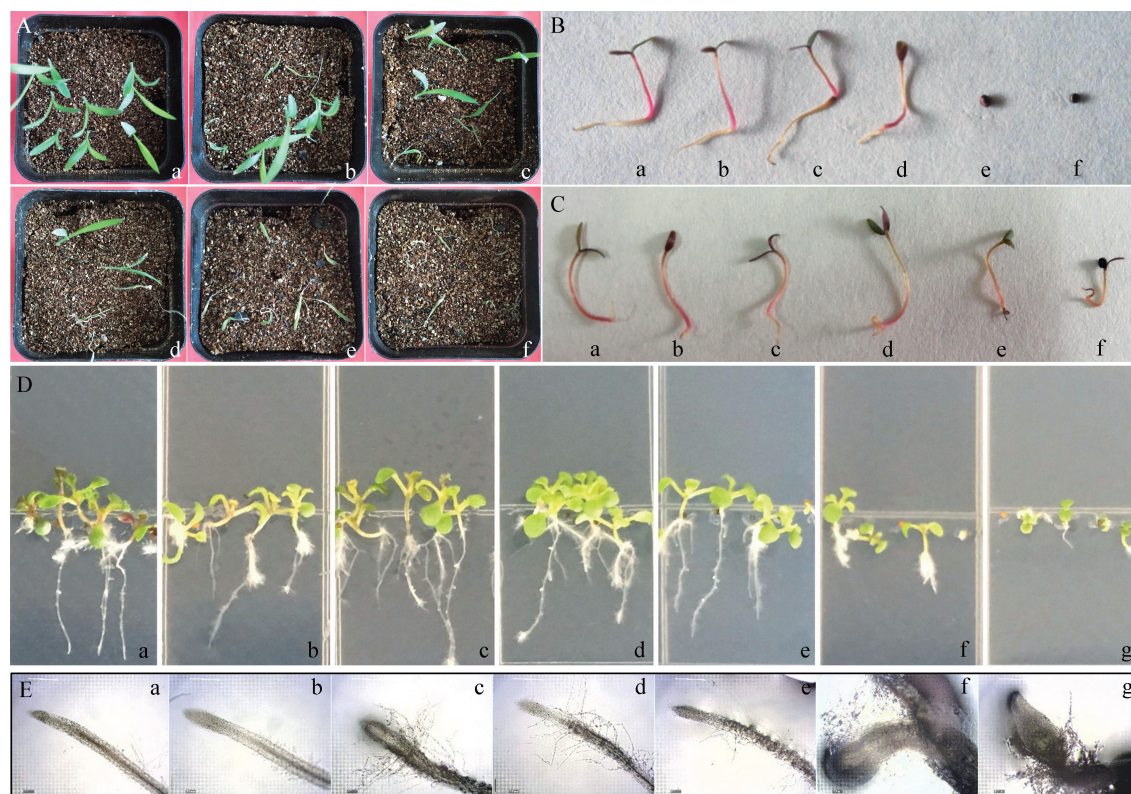


图1 4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯对马唐、反枝苋和拟南芥的除草活性及拟南芥根尖的显微观察

Fig. 1 Herbicidal activity of 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid ethyl ester to *Digitaria sanguinalis*, *Amaranthus retroflexus* and *Arabidopsis thaliana* as well as the microscopic observation of root tips of *A. thaliana*

A~C图中a~f: 4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯浓度分别为0、62.5、125、250、500、1 000 mg/L; D~E图中a~g: 4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯浓度分别为0、5、10、20、40、80、160 mg/L。In the figure A~C: a~f represent the concentrations of 4-hydroxy-3-methoxy cinnamic acid ethyl ester at 0, 62.5, 125, 250, 500 and 1 000 mg/L, respectively. In the figure D~E: a~g represent the concentrations of 4-hydroxy-3-methoxy cinnamic acid ethyl ester at 0, 5, 10, 20, 40, 80 and 160 mg/L, respectively.

2.2.2 对马唐叶绿素a/b含量的影响

经4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯处理后的马唐叶片叶绿素含量明显降低,随化合物浓度的增大叶绿素a/b的值逐渐下降,在1 000 mg/L浓度处理时叶绿素a/b仅为2.43,相比对照组降低了1.19,且各个浓度间差异显著,说明4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯对马唐叶绿素的合成有一定的抑制作用,从而造成马唐失绿死亡(图3-B)。

2.2.3 对马唐叶表皮结构的影响

经4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯处理的马唐叶片表皮毛倒伏,随着化合物浓度的增大,叶片表皮毛倒伏程度及失水褶皱程度增加,在1 000 mg/L和2 000 mg/L浓度处理下叶片剧烈褶皱,说明4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯破坏了马唐的叶表皮结构,造

成马唐死亡(图4)。

2.2.4 对拟南芥基因表达量的影响

经4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯处理的拟南芥, *AT1G04820*基因的相对表达量均较对照组显著下调,在15、30、45、60、120 min时分别是对照组的20.68、9.00、42.52、8.22、7.62倍($P < 0.05$),在处理45 min时下调最为显著,且各个时间点间的相对表达量也差异显著,表明该基因的下调显著抑制微观蛋白的合成,从而抑制拟南芥的生长(图5)。

3 讨论

杂草化学防治是农田杂草防治中最重要的手段,邢光耀等(2008)发现经1 800 mL/hm² 20%莠去津SC处理20 d后对马唐的鲜重防效为97.55%;高

宗军等(2009)研究表明,经6 g/hm² 95.2%烟嘧磺隆处理20 d后对反枝苋的鲜重防效为90.30%;2种药物均有较好的除草效果,但烟嘧磺隆对后茬作物有较强的影响。本实验室对从瓜果腐霉中提取到的活性成分阿魏酸的结构衍生物4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯的除草活性进行研究,发现其具有较好的除

草活性,能有效抑制马唐的生长,在500 mg/L时马唐全部死亡且会抑制反枝苋种子的萌发,对拟南芥根生长的抑制较为明显,抑制中浓度为43.82 mg/L。较之上述化学药剂,4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯对马唐和反枝苋均有较好的除草效果,具有较好的研发潜力。

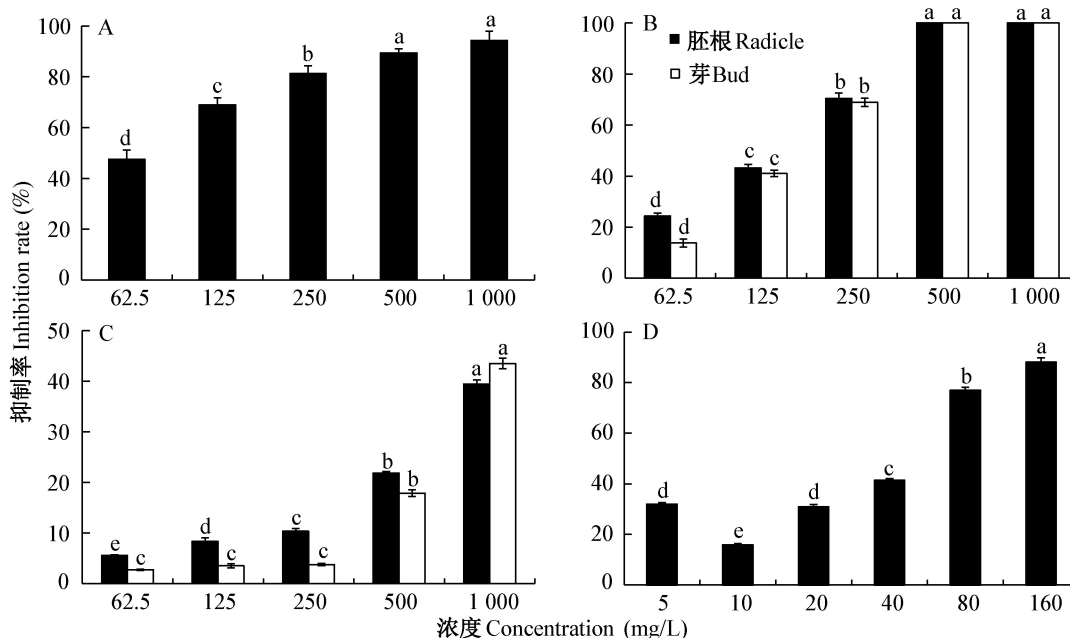


图2 4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯和莠去津对马唐、反枝苋及拟南芥的抑制率

Fig. 2 The inhibition rates of 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid ethyl ester and atrazine to *Digitaria sanguinalis*, *Amaranthus retroflexus* and *Arabidopsis thaliana*

A、B、D: 分别为4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯对马唐、反枝苋和拟南芥的活性; C: 莠去津对反枝苋的活性。图中数据为平均数±标准差。同色柱上不同字母表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著。A, B, D: The activities of 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid ethyl ester to *Digitaria sanguinalis*, *Amaranthus retroflexus*, and *Arabidopsis thaliana*, respectively; C: the activity of atrazine to *Amaranthus retroflexus*. Data are mean±SD. Different letters on the same color bars indicate significant difference at $P < 0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

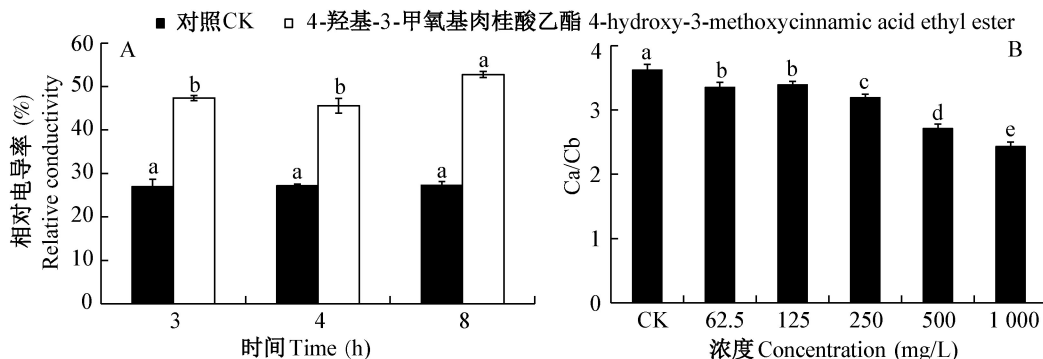


图3 4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯对马唐细胞膜透性(A)和叶绿素含量(B)的影响

Fig. 3 The effect of 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid ethyl ester on cell membrane permeability (A) and chlorophyll content (B) of *Digitaria sanguinalis*

图中数据为平均数±标准差。同色柱上不同字母表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters on the same color bars indicate significant difference at $P < 0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

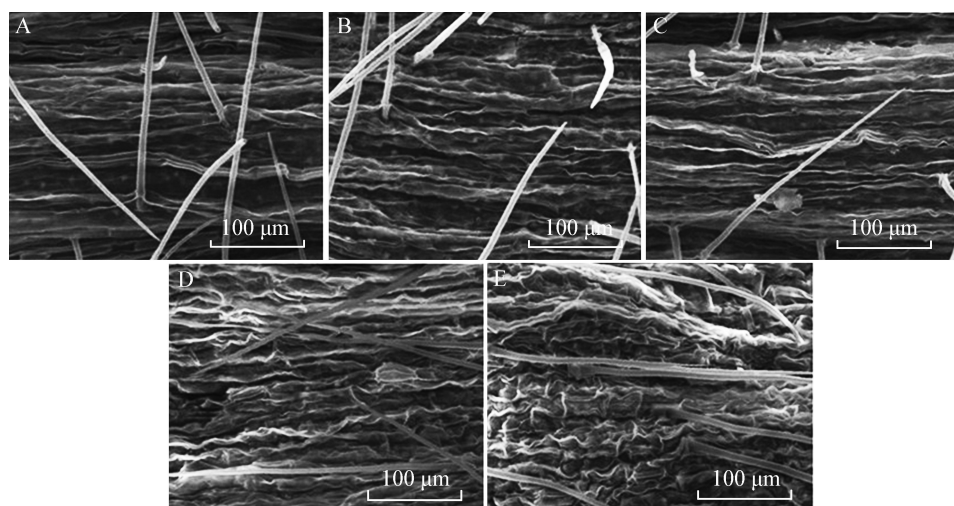


图4 4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯对马唐叶片叶表结构的影响

Fig. 4 The effect of 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid ethyl ester on leaf structure of *Digitaria sanguinalis*

A: 对照; B~E: 4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯浓度分别为25、500、1 000、2 000 mg/L。A: Control; B~E: the concentrations of 4-hydroxy-3-methoxy cinnamic acid ethyl ester at 25, 500, 1 000 and 2 000 mg/L, respectively.

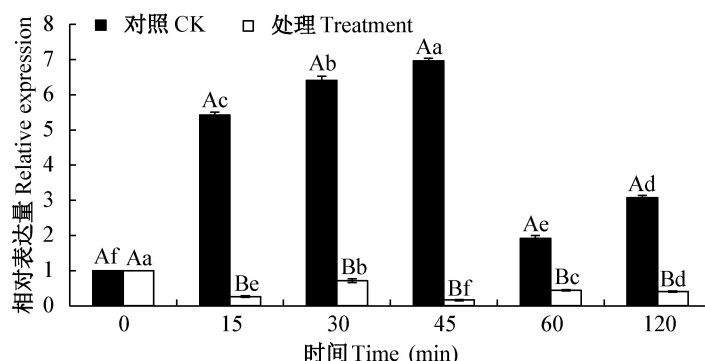


图5 4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯对拟南芥 *AT1G04820* 基因表达量的影响

Fig. 5 The effect of 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid ethyl ester on the *AT1G04820* gene expression of *Arabidopsis thaliana*

图中数据为平均数±标准差。柱上不同大写、小写字母分别表示同一时间点各处理间和同一处理下不同时间点间经Duncan氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different uppercase or lowercase letters on the bars indicate significant difference among different treatments at the same time or different times in the same treatment at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

植物细胞膜是细胞与外界环境的一个分界,对维持细胞的微环境和正常的代谢起着重要作用,细胞膜透性增加,引起细胞内电解质失衡,进而影响细胞正常的功能,造成植物无法正常生长。本研究发现4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯对马唐细胞膜透性的影响较大,1 000 mg/L浓度处理8 h时电导率增加了25.62%,细胞内外电解质失衡,细胞失水皱缩而死亡(Atiyeh et al., 2001)。植物叶绿体色素主要包括类胡萝卜素和叶绿素,而叶绿素占有所有组分的3/4(Arienzo et al., 2009; Song & Kim, 2009),是叶绿体色素的主要成分。本研究发现4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯处理浓度为1 000 mg/L时,马唐叶片Ca/Cb

值下降了1.19,但随处理时间的增加这种影响降低,说明4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯虽对叶绿素a/b有一定的影响,但影响时间不够持久,不是造成马唐死亡的主要原因。叶表皮毛是植物叶面表皮的衍生结构,主要功能是保护叶片,防止强光灼伤,减小蒸腾作用,分化成腺毛还可以分泌一些物质,更好地保护植物。本试验中,经4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯处理的马唐叶片表皮毛倒伏,在1 000 mg/L浓度处理时叶片剧烈褶皱且表皮毛全部倒伏,说明4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯破坏了马唐的叶表皮结构,造成马唐无法进行正常的生理生化过程从而死亡。

蛋白质组是指一种基因组所表达的全套蛋白

质,它的研究主要包括蛋白质的表达水平、翻译后的修饰及蛋白与蛋白的相互作用等,由此获得关于疾病发生和细胞代谢等过程的蛋白质水平上的整体且全面的认识(Palm et al., 2006)。随着科技的迅猛发展,生命科学的研究已经进入了更深的层次,而蛋白质是生理功能的执行者,是生命现象的直接体现者,对蛋白质结构和功能的研究将有助于阐明生命在生理或病理条件下的变化机制(Roy et al., 2010; Skolnick & Fetrow, 2000)。本研究发现4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯对拟南芥根的生长有明显的抑制作用,结合前期研究结果,选择其中一个与根生长相关的AT1G04820蛋白(Zhang et al., 2017),进行其调控基因AT1G04820相对表达量的测定,发现该基因表达量显著下降,推测该基因是植物微管合成的主要功能基因,它的下降造成植物生长受到抑制。

天然产物农药是目前药物研发的一个重要领域,一方面可以通过新发现的具有生物活性的化合物,利用现代化学合成技术开发出一系列的衍生物;另一方面,天然化合物的作用机理往往与现有物质的不同,通过对新化合物作用机理的研究,可以找到新的作用靶标,从而利用生物合理设计开发出新的药品,应用于生产生活。本研究通过对瓜果腐霉中的除草活性物质4-羟基-3-甲氧基肉桂酸的结构改造产物4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯活性和机制进行研究,确定其具有较好的除草活性且可以通过影响细胞膜的通透性、叶绿素的含量及相关的生长基因而抑制杂草生长直至死亡,为进一步深入寻找新的作用靶标奠定了基础,且4-羟基-3-甲氧基肉桂酸乙酯具有低毒和安全性等优点,符合绿色农药发展的总体要求,将为天然除草剂的研究开发提供备选资源。

参考文献 (References)

- Aljawish A, Chevalot I, Piffaut B, Rondeau-Mouro C, Girardin M, Jasiewicz J, Muniglia L. 2012. Functionalization of chitosan by laccase-catalyzed oxidation of ferulic acid and ethyl ferulate under heterogeneous reaction conditions. *Carbohydrate Polymers*, 87(1): 537-544
- Arias RS, Dayan FE, Michel A, Howell JL, Scheffler BE. 2006. Characterization of a higher plant herbicide-resistant phytoene desaturase and its use as a selectable marker. *Plant Biotechnology Journal*, 4(2): 263-273
- Arienzo M, Christen EW, Quayle W, Kumar A. 2009. A review of the fate of potassium in the soil-plant system after land application of wastewaters. *Journal of Hazardous Materials*, 164(2/3): 415-422
- Atiyeh RM, Edwards CA, Subler S, Metzger JD. 2001. Pig manure vermicompost as a component of a horticultural bedding plant medium: effects on physicochemical properties and plant growth. *Bioresource Technology*, 78(1): 11-20
- Bailey KL, Boyetchko SM, Längle T. 2010. Social and economic drivers shaping the future of biological control: a Canadian perspective on the factors affecting the development and use of microbial biopesticides. *Biological Control*, 52(3): 221-229
- Dos Reis Goulart ICG, Pacheco MT, Nunes AL, Merotto A. 2012. Identification of origin and analysis of population structure of field-selected imidazolinone-herbicide resistant red rice (*Oryza sativa*). *Euphytica*, 187(3): 437-447
- Duke SO, Dayan FE. 2013. Clues to new herbicide mechanisms of action from natural sources. // Koivunen M, Duke SO, Coats JC, Beck JJ. Pest management with natural products, ACS symposium series. Washington: American Chemical Society, pp. 203-215
- Gao ZJ, Li M, Gao XX, Guo X. 2009. Bioactivity evaluation of the herbicide with 20% nicosulfuron plus cyanazine. *Journal of Maize Sciences*, 17(2): 140-144 (in Chinese) [高宗军, 李美, 高兴祥, 郭晓. 2009. 20% 烟嘧磺隆·氰草津油悬浮剂的生物活性评价. 玉米科学, 17(2): 140-144]
- Geng RM, Zhang JP, Yu LQ. 2009. *Helminthosporium gramineum* Raebenh f. sp. *echinoclaoe* conidia for biological control of barnyardgrass. *Weed Science*, 57(5): 554-561
- Glare T, Caradus J, Gelernter W, Jackson T, Keyhani N, Kohl J, Marone P, Morin L, Stewart A. 2012. Have biopesticides come of age? *Trends in Biotechnology*, 30(5): 250-258
- Kim HY, Park J, Lee KH, Lee DU, Kwak JH, Kim YS, Lee SM. 2011. Ferulic acid protects against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice. *Toxicology*, 282(3): 104-111
- Kumar A, Kanwar SS. 2011. Synthesis of ethyl ferulate in organic medium using celite-immobilized lipase. *Bioresource Technology*, 102(3): 2162-2167
- Li J, Li M, Gao XX, Fang F, Dong LH. 2016b. Isolation and biological characteristics of the biological control fungi BC-1 for *Echinochloa crusgalli*. *Acta Prataculturae Sinica*, 25(8): 164-171 (in Chinese) [李健, 李美, 高兴祥, 房锋, 董连红. 2016b. 稗草生防菌 BC-1 的分离及生物学特性研究. 草业学报, 25(8): 164-171]
- Li J, Li Y, Gao XX, Fang F, Li M. 2016a. The biological characteristics of *Digitaria sanguinalis* pathogen *Fusarium chlamydosporum* strain ZC201301. *Acta Prataculturae Sinica*, 25(3): 234-239 (in Chinese) [李健, 李岩, 高兴祥, 房锋, 李美. 2016a. 马唐生防菌厚垣孢镰刀菌 ZC201301 的生物学特性研究. 草业学报, 25(3): 234-239]
- Li WX, Li NG, Tang YP, Li BQ, Liu L, Zhang X, Fu HA, Duan JA. 2012. Biological activity evaluation and structure-activity relationships analysis of ferulic acid and caffeic acid derivatives for anticancer. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22(19): 6085-6088
- Palm D, Simm S, Darm K, Weis BL, Ruprecht M, Schleiff E, Scharf C. 2016. Proteome distribution between nucleoplasm and nucleolus and its relation to ribosome biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *RNA Biology*, 13(4): 441-454

- Peterson JK, Harrison HF Jr. 1991. Isolation of substance from sweet potato (*Ipomoea batatas*) periderm tissue that inhibits seed germination. *Journal of Chemical Ecology*, 17(5): 943–951
- Roy A, Kucukural A, Zhang Y. 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 5(4): 725–738
- Sivan A, Elad Y, Chet I. 1984. Biological control effects of a new isolate of *Trichoderma harzianum* on *Pythium aphanidermatum*. *Phytopathology*, 74(4): 498–501
- Skolnick J, Fetrow JS. 2000. From genes to protein structure and function: novel applications of computational approaches in the genomic era. *Trends in Biotechnology*, 18(1): 34–39
- Son MJ, Rico CW, Nam SH, Kang MY. 2010. Influence of oryzanol and ferulic acid on the lipid metabolism and antioxidative status in high fat-fed mice. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 46(2): 150–156
- Song JY, Kim BS. 2009. Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32(1): 79–84
- Tan S, Evans R, Singh B. 2006. Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops. *Amino Acids*, 30(2): 195–204
- Teerarak M, Charoenying P, Laosinwattana C. 2012. Physiological and cellular mechanisms of natural herbicide resource from *Aglaia odorata* Lour. on bioassay plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(4): 1277–1285
- Valente MAS, Faria JAQA, Soares-Ramos JRL, Reis PAD, Pinheiro GL, Piovesan ND, Morais AT, Menezes CC, Cano MAO, Fietto LG, et al. 2009. The ER luminal binding protein (BiP) mediates an increase in drought tolerance in soybean and delays drought-induced leaf senescence in soybean and tobacco. *Journal of Experimental Botany*, 60(2): 533–546
- Varejao EVV, Demuner AJ, Barbosa LCA, Barreto RW. 2013. The search for new natural herbicides-strategic approaches for discovering fungal phytotoxins. *Crop Protection*, 48: 41–50
- Wei T, Li J, Ni HW. 2011. The efficacy of *Culvularia lunata* strain J15 (2) on *Echinochloa crus-galli* and its host range. *Journal of Plant Protection*, 38(1): 81–85 (in Chinese) [韦韬, 李静, 倪汉文. 2011. 稗草生防菌新月弯孢菌 *Culvularia lunata* 菌株 J15(2) 的安全性和致病力. *植物保护学报*, 38(1): 81–85]
- Xing GY, Wei GT, Yang JF. 2008. Control effects of mixture of nicosulfuron and fluroxypyr on cornfield weeds and safety. *Agrochemicals*, 47(1): 72–73, 76 (in Chinese) [邢光耀, 魏广太, 杨吉峰. 2008. 烟嘧磺隆和氯氟吡氧乙酸混配防除玉米田杂草及其安全性. *农药*, 47(1): 72–73, 76]
- Zhang LH, Si HL, Wang W, Yang P, Zhang ZQ, Liu YZ, Dong JG. 2014. Separation and identification of herbicidal compounds produced by the mutated isolate PAM1 of *Pythium aphanidermatum*. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 37(5): 89–94 (in Chinese) [张利辉, 司贺龙, 王伟, 杨鹏, 张志强, 刘永震, 董金皋. 2014. 瓜果腐霉 *Pythium aphanidermatum* PAM1 菌株中除草活性物质的分离和纯化. *河北农业大学学报*, 37(5): 89–94]
- Zhang MY, Liu C, Yang J, Yang P, Zhang LH, Dong JG. 2017. Analysis of the herbicidal mechanism of 4-hydroxy-3-methoxy cinnamic acid ethyl ester using iTRAQ and real-time PCR. *Journal of Proteomics*, 159: 47–53

(责任编辑:李美娟)