

不同发育期反枝苋对黄瓜根缘细胞的化感作用

刘 爽, 马丹炜*

(四川师范大学生命科学学院, 四川成都 610066)

摘要:以黄瓜为实验材料, 采用悬空气培养法研究了不同发育期反枝苋水浸提液对根缘细胞的化感效应。结果表明: 在反枝苋水浸提液作用下, 黄瓜根果胶甲基酯酶(PME)活性升高, 但随着水浸提液浓度的升高, 这种促进效应逐渐降低; 而黄瓜根缘细胞存活率随着水浸提液浓度的升高而下降。相同发育期反枝苋不同部位的化感作用差异不显著, 不同发育时期反枝苋化感作用差异较为明显, 其化感作用以幼苗期最强, 现蕾期次之, 成熟期最弱。推测化感作用是反枝苋发育初期取得竞争优势, 迅速占领生态位的原因之一。

关键词:反枝苋; 发育期; 化感作用; 根缘细胞; 果胶甲基酯酶(PME)

文章编号: 1000-0933(2009)08-4392-05 中图分类号: Q948 文献标识码: A

The allelopathy of different development stages of *Amaranthus retroflexus* L. on root border cells of cucumber

LIU Shuang, MA Dan-Wei*

Life Science College, Sichuan Normal University, Chengdu 610101, China

Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(8): 4392 ~ 4396.

Abstract: Root border cells (RBC) are cells surrounding the root apex. They are functionally different from the apex and are considered to play a role in the protection of the root tip from biotic and abiotic stresses. In order to explore the allelopathic mechanism of an alien invasive plant in China, *Amaranthus retroflexus* L (redroot pigweed), allelopathic effects of the aqueous extracts from different development stages of this species on root border cells of cucumber were studied by aeroponic culture. The results showed that the aqueous extracts of *A. retroflexus* could stimulate the activity of pectin methylesterase of the root cap of cucumber, but the stimulating effect gradually lowered down along with the increasing concentration of the aqueous extracts, and the viability of root border cells decreased as the concentration of aqueous extracts increased. There were no significant differences among different organs of *A. retroflexus* at the same developmental stage, while significant differences were found in the *A. retroflexus* at different developmental stages and the order of strength of allelopathy at different developmental stages was seedling stage > flower-bud stage > ripeness stage. These results suggested that allelopathy should be one of the reasons that *A. retroflexus* can compete with other species in the community and occupy niche in early developmental stages.

Key Words: *Amaranthus retroflexus* L; development stages; allelopathy; root border cells; pectin methylesterase

反枝苋(*Amaranthus retroflexus* L.) 属苋科苋属 1 年生杂草, 别名野苋菜、西风谷, 原产美洲, 现广泛传播于世界各地^[1], 是苋属入侵种中发生频率最多、分布最广、危害最严重的杂草^[2]。19 世纪中叶发现于我国河北与山东, 目前广泛分布于我国东北、华北及沿长江流域各省, 对当地自然和农业生态系统造成了严重危害^[3],

基金项目: 成都市科技局攻关计划资助项目(200638)

收稿日期: 2009-01-19; 修订日期: 2009-05-18

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: danwei10ma@yahoo.com.cn

已经被列为我国的入侵植物^[4]。普遍认为化感作用是入侵植物成功入侵的重要机制^[5~7],前人的研究表明反枝苋根系分泌物和水浸提液对农作物的种子萌发和幼苗生长具有较强的化感作用^[1]。根缘细胞(root border cells)又称为根冠脱落细胞(sloughed root cap cells),指从根冠表面脱落下来并聚集在根部周围的一群特化细胞^[8]。根缘细胞能够合成并向外分泌一系列具有生物活性的化学物质,诱导和控制根际微生物的生长,中和有毒物质,对调节根部环境,提高植物在逆境中的生存等具有重要意义^[9],是保护植物根尖的第一道防线。本文首次采用悬空气法研究了黄瓜根缘细胞和根冠果胶甲基酯酶(PME)对不同发育期反枝苋水浸提液的响应,为科学评价反枝苋的化感作用和深入探讨反枝苋的入侵机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

分别以人工栽培条件下生长至幼苗期、现蕾期以及成熟期的反枝苋为供体植物;受体植物黄瓜(*Cucumis sativus* L.) (金谷春秋旱黄瓜)种子购于四川省农贸市场。

1.2 实验方法

1.2.1 水浸提液的制备

采集不同发育期的反枝苋,分为地上部分和地下部分,分别记为 P1a(幼苗期地上部分)、P1b(幼苗期地下部分)、P2a(现蕾期地上部分)、P2b(现蕾期地下部分)、P3a(成熟期地上部分)以及 P3b(成熟期地下部分)。将采集的植物洗净晾干后剪成 1~2cm 的小段。按 1:10 加入蒸馏水充分摇匀浸泡 48h(间歇振荡),微膜滤纸过滤后得到 0.100g·ml⁻¹水浸提液原液(每毫升鲜重),于 4℃ 冰箱中冷藏备用。

1.2.2 种子萌发及根缘细胞培养

挑选颗粒饱满、无病斑、霉点、虫害的黄瓜种子置于 40℃ 温水 6h 待其充分吸胀后,用 0.1% KMnO₄ 浸泡 40min,再用无菌水清洗 6 次,置于含无菌湿纱布的培养皿(直径为 15mm)中,于 37℃ 培养箱中培养至种子露白。露白种子采用悬空气法培养^[10]:将纱网固定在含 50~100ml 蒸馏水的 250ml 烧杯上,将露白种子播于网孔中,再在纱网上铺一张湿滤纸,将小烧杯放在含蒸馏水的 500ml 烧杯中(蒸馏水的量以使 250ml 烧杯不飘浮为宜),用保鲜膜和橡皮筋封住 500ml 烧杯口,在 30℃ 培养箱中继续培养。

1.2.3 水浸提液对根缘细胞的影响

实验设置 0.010、0.025、0.050、0.075 g·ml⁻¹和 0.100 g·ml⁻¹ 5 个浓度处理,蒸馏水作对照,3 次重复。

活体培养:每隔 2h 喷洒 1 次处理液,在培养 12h 后,剪 30 个根的 1~2mm 根尖置于含 150μl 的 PME 提取液(Citric acid 0.1mol·L⁻¹、Na₃PO₄ 0.2mol·L⁻¹、NaCl 1mol·L⁻¹)的研钵中,冰浴下充分研磨置于离心管中,充分振荡后,于冰中放置 1h,每隔 20min 振荡 1 次,于 4℃ 下 15000r·min⁻¹离心 10min,收集上清液,测定黄瓜根冠果胶甲基酯酶(pectin methylesterase, PME)活性(PME activity, PA)。PME 酶活性检测方法参照 Richard 等^[11]的方法,单位为 H⁺ μmol·root cap⁻¹·h⁻¹。

离体培养:当悬空气培养的黄瓜的根长约 20mm 时(预实验中发现,此时黄瓜根缘细胞数最多),将根尖剪下分别置于不同浓度水浸提液中培养 12h 后计算根缘细胞存活率(survive ratio, SR),每个浓度培养 30 个根尖。根缘细胞总数及活性检测参照马伯军等方法^[12]。根缘细胞存活率 = 活细胞数/根缘细胞总数 × 100%。

1.3 数据处理

化感作用敏感指数(The index of allelopathy effect, RI)采用 Williamson^[13]提出公式:

$$RI = 1 - C/T \text{ (当 } T \geq C \text{ 时) 或}$$

$$RI = T/C - 1 \text{ (当 } T < C \text{ 时)}$$

式中, C 为对照值, T 为处理值。化感综合效应(synthesis effects, SE)用各参数的 RI 算术平均值进行评价^[14]。

利用 SPSS13.0 软件进行方差分析和多重比较,根据 3 次独立试验所得数据计算平均值和标准误;用 Excel 软件作图。

2 结果与分析

2.1 不同发育期反枝苋水浸提液对黄瓜根尖 PME 活性的影响

与对照比较,不同发育期不同浓度的反枝苋水浸提液对黄瓜根尖 PME 活性整体表现出较强的促进作用($0.100\text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 成熟期水浸提液例外),但随着水浸提液浓度升高,促进效应逐渐降低(图 1)。除浓度为 $0.100\text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的幼苗期、浓度为 $0.025\text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 和 $0.050\text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的现蕾期地上部分水浸提液的化感作用明显强于地下部分外,总的看来,相同浓度下同一发育期不同部位的化感促进效应差异不显著;从图 2 可以看出,不同发育期反枝苋水浸提液对黄瓜根冠 PME 活性的促进效应表现为幼苗期 > 现蕾期 > 成熟期。

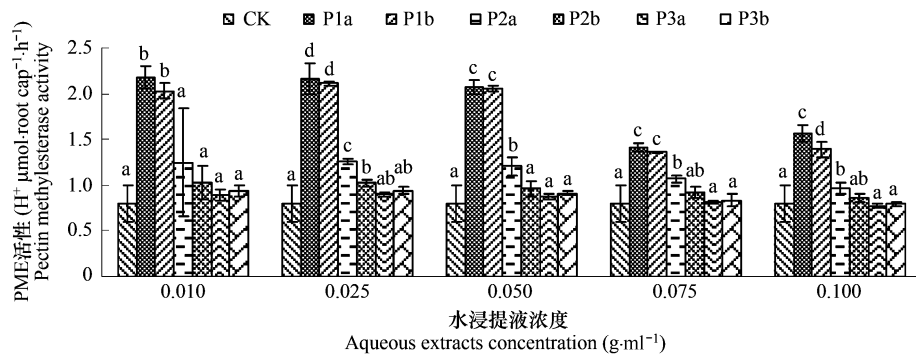


图 1 不同发育时期反枝苋水浸提液对黄瓜根缘细胞 PME 的影响

Fig. 1 The effect of the aqueous extracts of *Amaranthus retroflexus* L. of different development stages on the PME activity of root border cells in cucumber

CK: 蒸馏水 Distilled water; P1a: 幼苗期地上部分 On the ground part of seedlings; P1b: 幼苗期地下部分 Under the ground part of seedlings; P2a: 现蕾期地上部分 On the ground part of bud; P2b: 现蕾期地下部分 Under the ground part of bud; P3a: 成熟期地上部分 On the ground part of ripeness; P3b: 成熟期地下部分 Under the ground part of ripeness; 不同字母表示相同浓度下不同发育时期、不同部位(包括对照)间相同参数差异显著($p < 0.05$) Different letters indicate significant differences at the same concentration among different development stages and different parts (including control) ($p < 0.05$); 下同 the same below

2.2 不同发育期反枝苋水浸提液对黄瓜离体根缘细胞存活率的影响

经反枝苋水浸提液处理的离体根缘细胞的存活率下降,并且随着水浸提液浓度增加存活率下降速度加快(图 3),表明随着反枝苋水浸提液浓度的升高,对黄瓜根缘细胞活性的抑制效应增强。其中 $0.100\text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 幼苗期反枝苋水浸提液处理下根缘细胞的活性最低,仅为 $15.23\% \sim 16.36\%$ 。相同浓度下同一发育期不同部位水浸提液对黄瓜根缘细胞存活率的抑制效应差异不显著;不同发育期反枝苋水浸提液对黄瓜根缘细胞存活率的化感抑制效应表现为:幼苗期 > 现蕾期 > 成熟期(图 4)。

3 讨论

3.1 反枝苋水浸提液对根缘细胞的化感作用

当植物根系受到外界胁迫时,根冠分生组织会生成大量的根缘细胞对生物胁迫或非生物胁迫产生特异反应形成一个根系的外围环境,保证根尖及其顶端分生区不受外界环境胁迫的伤害^[15],如大麦通过根缘细胞的死亡螯合铝来使根尖抵抗铝毒的危害^[16]。本研究结果表明,黄瓜离体根缘细胞在反枝苋水浸提液作用下,其存活率明显低于对照,且随着浓度升高,存活率呈现出

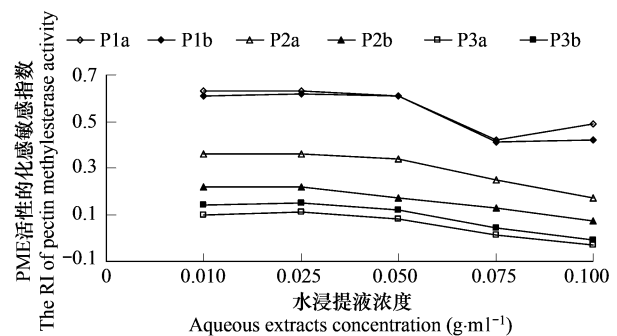


图 2 不同发育时期反枝苋水浸提液对黄瓜根缘细胞 PME 活性的化感作用

Fig. 2 The allelopathy of the aqueous extracts of *Amaranthus retroflexus* L. of different development stages on PME activity of root border cells in cucumber

RI: 化感作用敏感指数, the index of allelopathy effect; 下同, the same below

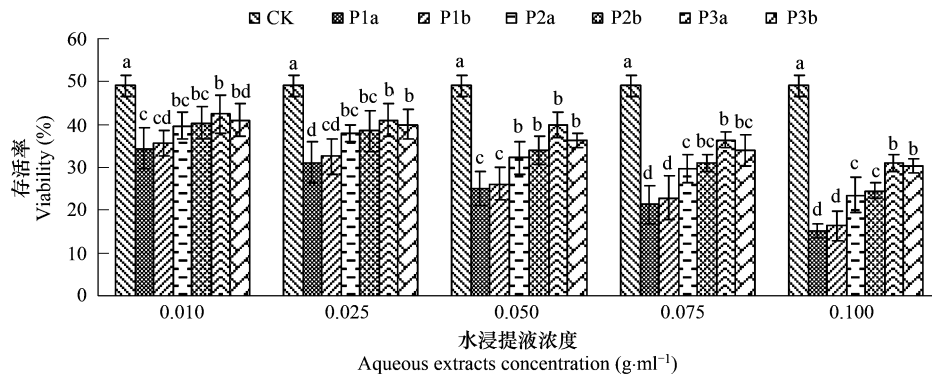


图3 不同发育时期反枝苋水浸提液对黄瓜根缘细胞存活率的影响

Fig. 3 The effect of the aqueous extracts of *Amaranthus retroflexus* L. of different development stages on the viability of root border cells in cucumber

依次递减的趋势。离体根缘细胞在 $0.100 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 幼苗期反枝苋水浸提液中培养 12h 后,存活率降至 17.00% 以下。可见黄瓜根缘细胞死亡可能在一定程度上能抵御反枝苋水溶性化感物质的抑制作用,保护根尖组织免遭伤害。

根冠 PME 酶在植物根缘细胞的产生和发育中具有主要的作用,可以使果胶去甲基化,果胶酸分解;可诱导其它果胶酶基因表达,果胶层降解,最终导致根缘细胞从根冠分离^[17]。Stephenson 等^[18] 和 Zhu^[19] 的研究表明,根缘细胞 PME 基因表达后,PME 活性增加。本研究表明,在反枝苋水浸提液作用下,黄瓜根冠 PME 活性均高于对照,但随着水浸提液浓度升高,PME 活性逐渐降低。这些结果的可能解释是:(1)推测 PME 与

植物抵御化感物质之间存在着一定的相关性;(2)反枝苋水浸提液可能诱导了植物根冠 PME 基因的表达,使 PME 活性升高,进而促进了根缘细胞的产生,通过根缘细胞释放某些生物活性物质,中和化感物质,提高植物对反枝苋化感作用的抵御能力,保护根尖细胞免遭伤害。但是随着水浸提液处理浓度的升高,这种 PME 活性逐渐降低。推测高浓度的反枝苋水浸提液超过了植物组织的耐受极限,使整个代谢体系紊乱,导致 PME 活性迅速下降,进而减少根缘细胞的产生,解除对根尖细胞的保护屏障,影响植物根分生区细胞的有丝分裂活动,从而抑制了植物的生长。根缘细胞对化感物质的响应是一个复杂的过程,涉及遗传、环境、胞内与胞外信号等因素的影响,因此有关反枝苋水浸提液对 PME 活性影响的分子机理尚待进一步深入研究。

3.2 反枝苋不同发育期化感作用的差异

在不同的生长发育阶段,植物的化感作用具有明显的差异。韩利红等^[20] 的研究发现紫茎泽兰的化感作用随着发育期的增加而增大;李明等^[21] 的研究表明处于对数生长期的南瓜组培根根系分泌物具有最大的化感抑制效应;本研究表明发育期对反枝苋化感作用有显著的影响,随着发育进程的进展,反枝苋化感作用有减弱的趋势,整体表现为幼苗期最强,现蕾期次之,成熟期最弱。这个结果与推测可能与反枝苋的生物学习性有关。反枝苋不耐阴,在密植田和高秆作物中生长发育不良^[4],因此在生长初期,反枝苋通过释放更多的化感物质进入环境,抑制周围植物的生长,从而在争夺光照等资源中取得竞争优势,迅速占领生态位,在自然条件下,成熟期的反枝苋往往形成单优种群的现象,也印证了这一推断。这预示着反枝苋的化感效应在其入侵过程中随着入侵阶段而变化,本实验室将进一步进行田间试验验证这一推断。

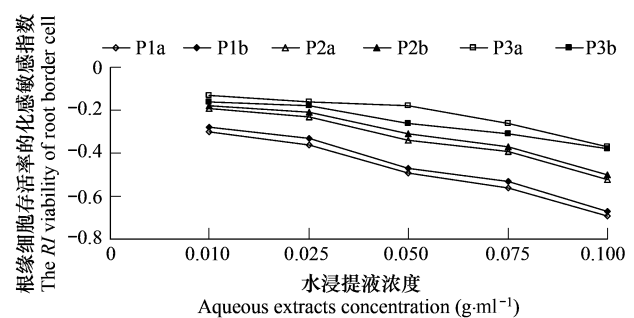


图4 不同发育时期反枝苋水浸提液对黄瓜根缘细胞存活率的化感作用

Fig. 4 The allelopathy of the aqueous extracts of *Amaranthus retroflexus* L. of different development stages on the viability of root border cells in cucumber

References:

- [1] Zhang Y, Mu X Q. Allelopathic effects of *amaranthus retroflexus* L. and its risk assessment. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2008, 28 (4): 0771—0776.
- [2] Liu W, Zhu L, Sang W G. Potential global geographical distribution of *Amaranthus retroflexus* L. *Journal of Plant Ecology*, 2007, 31 (5) 834—841.
- [3] Li X J, Zhang H J, Ni H W. Review on the biological characters and control of redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus*). *Pesticide and Administration*, 2004, 25 (3): 13—16.
- [4] Xu H G, Qiang S. Inventory invasive alien species in China. Beijing: China Environmental Science Press, 2004.
- [5] José L Hierro, Ragan M Callaway. Allelopathy and exotic plant invasion. *Plant and Soil*, 2003, 256: 29—39.
- [6] Bais H P, Vepachedu R, Gilroy S. Allelopathy and exotic plant invasion: From molecules and genes to species interactions. *Science*, 2003, 301: 1377—1380.
- [7] Shao H, Peng S L, Wei X Y, *et al.* Potential allelochemical from an invasive weed *Mikania micrantha* H. B. K. *Journal of Chemical Ecology*, 2005, 31 (7): 1657—1667.
- [8] Hamamoto L, Hawes M C, Rost T L. The production and release of living root cap border cells is a function of root apical meristem type in dicotyledonous angiosperm plants. *Annals of Botany*, 2006, 97: 917—923.
- [9] Hawes M C, Gunawardena U, Miyasaka S C, *et al.* The role of root border cells in plant defense. *Trends in Plant Science*, 2000, 5: 128—133.
- [10] Zhang Y C, Ma B J, Gu Z M, *et al.* Factors Associated with Root Border Cell Development in Peanut. *Acta Agronomica Sinica*, 2008, 34(3): 471—476.
- [11] Richard L, Qin L X, Gadal P, Goldberg R. Molecular cloning and characterization of a putative pectin methylesterase cDNA in *Arabidopsis thaliana* L. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 1994, 355: 133—139.
- [12] Ma B J, Pan J W, Gu Q, *et al.* Biological Characters of Root Border Cell Development in Barley. *Acta Photophysiological Sinica*, 2003, 29 (2): 159—164.
- [13] Williamson G B, Richardson D. Bioassays for allelopathy: Measuring treatment responses with independent controls. *Journal of Chemical Ecology*, 1988, 14(1): 181—187.
- [14] Sheng H M, Guo H R, Huang G B. Allelopathy of different plants on wheat, cucumber and radish seedlings. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2005, 16(4): 740—743.
- [15] Yu Y H, Bin J H. Production and biological role of root border cells. *Chinese Bulletin of Botany*, 2002, 19 (6): 756—762.
- [16] Tomas L, Budíková S, Huttová J, *et al.* Aluminum-induced cell death of barley root border cells is correlated with peroxidase and oxalate-oxidase-mediated hydrogen peroxide production. *Plant Cell Reports*, 2005, 24: 189—194.
- [17] Du X, Liu P, Xu G D, *et al.* Response of root border cell in red cowpea to aluminum stress. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2006, 12(5): 722—726.
- [18] Stephenson M B, Hawes M C. Correlation of pectin methylesterase activity in root caps of pea with root border cell separation. *Plant Physiology*, 1994, 106: 739—745.
- [19] Zhu M Y, Ahn S, Matsumoto H. Inhibition of growth and development of root border cells in wheat by Al. *Plant Physiology*, 2003, 117: 359—367.
- [20] Han L H, Feng Y L. The effects of growth and development stage on allelopathy of *Eupatorium adenophorum*. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27 (3): 1185—1190.
- [21] Li M, Ma Y Q, Shui J F. Allelopathic effects of cultured *Cucurbita moschata* root exudates. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2005, 16(4): 744—749.

参考文献:

- [1] 张燕, 慕小倩. 外来杂草反枝苋对农作物的化感作用及其风险评价. *西北植物学报*, 2008, 28(4): 0771~0776.
- [2] 刘伟, 朱丽, 桑卫国. 影响入侵种反枝苋分布的环境可能分布区预测. *植物生态学报*, 2007, 31(5) 834~841.
- [3] 李晓晶, 张宏军, 倪汉文. 反枝苋的生物学特性及防治. *农药科学与管理*, 2004, 25(3): 13~16.
- [4] 徐海根, 强胜. 中国外来入侵物种编目. 北京: 中国环境科学出版社, 2004.
- [10] 张裕晨, 马伯军, 顾志敏, 等. 花生根边缘细胞发育影响因子的分析. *作物学报*, 2008, 34(3): 471~476.
- [12] 马伯军, 潘建伟, 顾青, 等. 大麦根边缘细胞发育的生物学特性. *植物生理和分子生物学学报*, 2003, 29 (2): 159~164.
- [14] 沈慧敏, 郭鸿儒, 黄高宝. 不同植物对小麦、黄瓜和萝卜幼苗化感作用潜力的初步评价. *应用生态学报*, 2005, 16(4): 740~743.
- [15] 禹艳红, 宾金华. 根缘细胞的发生和生物学作用. *植物学通报*, 2002, 19 (6): 756~762.
- [17] 杜幸, 刘鹏, 徐根娣, 等. 红豇豆根缘细胞对铝胁迫的响应. *植物营养与肥料学报*, 2006, 12(5): 722~726.
- [20] 韩利红, 冯玉龙. 发育时期对紫茎泽兰化感作用的影响. *生态学报*, 2007, 27(3): 1185~1190.
- [21] 李明, 马永清, 税军峰. 南瓜组培根根系分泌物的化感效应研究. *应用生态学报*, 2005, 16(4): 744~749.