

DOI: 10.5846/stxb201606011058

周健, 王亚男, 马丹炜, 黄素, 辛文媛, 张红. 土荆芥挥发性化感物质诱导蚕豆保卫细胞死亡及信号调节. 生态学报, 2017, 37(17): 5713-5721.

Zhou J, Wang Y N, Ma D W, Huang S, Xin W Y, Zhang H. Volatile allelochemicals from *Chenopodium ambrosioides* L. induced guard cells apoptosis and its signal regulation in *Vicia faba* L. Acta Ecologica Sinica, 2017, 37(17): 5713-5721.

土荆芥挥发性化感物质诱导蚕豆保卫细胞死亡及信号调节

周 健, 王亚男, 马丹炜*, 黄 素, 辛文媛, 张 红

四川师范大学生命科学学院, 成都 610101

摘要: 为了探讨入侵植物土荆芥的化感作用机制, 以其入侵地广泛种植的农作物蚕豆叶片下表皮为受试材料, 通过对保卫细胞的活性分析, 研究了土荆芥挥发油及其两种主要成分 α -萜品烯和对伞花素诱导保卫细胞死亡及其信号调节的机制。结果表明: 土荆芥挥发油、 α -萜品烯、对伞花素具有显著的细胞毒性, 随着处理剂量增加, 保卫细胞存活率显著下降, 细胞核出现了畸形、碎裂和降解等程序性细胞死亡的典型特征; 活性氧 (Reactive oxygen species, ROS)、一氧化氮合酶 (Nitric oxide synthetase, NOS) 和 Ca^{2+} 的组织化学定位显示, 在土荆芥挥发油、 α -萜品烯和对伞花素作用下, 保卫细胞内 ROS、NOS 和 Ca^{2+} 的水平明显高于对照组; 活性氧清除剂 (AsA)、 Ca^{2+} 螯合剂 (EGTA) 和硝酸还原酶抑制剂 (NaN_3) 均可有效缓解土荆芥挥发油、 α -萜品烯和对伞花素的细胞毒性, 显著提高了保卫细胞的存活率 ($P < 0.05$)。上述结果表明, ROS、NO 和 Ca^{2+} 参与了土荆芥挥发油、 α -萜品烯和对伞花素诱导蚕豆保卫细胞死亡的信号调节过程。土荆芥挥发油、 α -萜品烯和对伞花素诱导的保卫细胞死亡, 可能是通过 ROS 和 NO 调控保卫细胞内 Ca^{2+} 水平的变化而引起的。

关键词: 土荆芥; 化感胁迫; 保卫细胞; 程序性细胞死亡; 信号调节

Volatile allelochemicals from *Chenopodium ambrosioides* L. induced guard cells apoptosis and its signal regulation in *Vicia faba* L.

ZHOU Jian, WANG Ya'nan, MA Danwei*, HUANG Su, XIN Wenyuan, ZHANG Hong

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

Abstract: Allelopathy is a direct or indirect effect of one plant on another and occurs by releasing allelochemicals into the surrounding environment. When allelopathy inhibits the growth and development of receptor plants, it is considered a biotic stress called "allelochemical stress." Allelopathy is one of the successful mechanisms of alien plant invasions. Allelochemicals can enhance the production of reactive oxygen species (ROS) and increase membrane lipid peroxidation. Allelochemicals can also show obvious cytotoxicity and genotoxicity on receptor plants by inducing enzyme inactivation, DNA damage, and programmed cell death (PCD). *Chenopodium ambrosioides* L. (Mexican tea) is one of the aromatic herbaceous species of the *Chenopodium* genus, native to tropical Central and South America. It has recently become a major invasive plant in China, and has strong allelopathic effects on surrounding plants. This plant is threatening the ecological security of China in more than 20 provinces and cities by crowding out and suppressing native species. The guard cells are highly specialized cells, which are sensitive to the change of environment. These specialized cells could receive and integrate a great number of external and internal stimuli to accurately respond to various physiological requirements of the

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31370549); 四川省应用基础研究重点项目 (2017JY0017); 四川省教育厅重点项目 (16ZA0056); 四川省教育厅一般项目 (16ZB0058); 四川省高校重点实验室开放项目 (SCYZ201410)

收稿日期: 2016-06-01; **网络出版日期:** 2017-04-24

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: danwei10ma@163.com

plant. Therefore, stomata are considered an optimal material for studying environmental stress. This study aimed to explore the mechanism of apoptosis and its signal regulation in guard cells induced by volatile oil from *C. ambrosioides* and by α -terpinene and cymene. *Vicia faba* L. (broad bean), which is widely planted in the areas invaded by *C. ambrosioides*, was chosen as the receptor plant. Epidermal strips of leaves were incubated in 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES) buffer containing volatile oil, α -terpinene and cymene for 30 minutes in light at 25°C in an illumination incubator. After treatment, the epidermal strips were stained with acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) to detect cell viability, and were also stained with histochemical localization to indicate intracellular reactive oxygen species (ROS), nitric oxide synthase (NOS) and calcium ion (Ca^{2+}) levels. The results showed that volatile oil, α -terpinene, and cymene treatments resulted in a decrease in guard cell viability of broad bean leaves, and these effects were dose-dependent. Apoptosis features including nuclear malformation, karyorrhexis, and degradation were observed in guard cells under the volatile oil, α -terpinene, and cymene treatments. ROS, NOS and Ca^{2+} histochemical localization showed that the coloration of ROS, NOS and Ca^{2+} in guard cells deepened considerably under the treatments of volatile oil, α -terpinene and cymene. Meanwhile, the guard cell survival rates increased when epidermal strips were exposed to volatile oil, α -terpinene and cymene combined with different concentrations of ROS scavenger ascorbic acid (AsA), nitrite reductase inhibitor sodium azide (NaN_3), or Ca^{2+} chelator ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA). All results suggested that ROS, NO, and Ca^{2+} participate in apoptosis signal pathways induced by volatile oil, α -terpinene, and cymene in *V. faba* stomata guard cells. Changes in Ca^{2+} levels regulated by ROS and NO may mediate programmed cell death induced by volatile oil, α -terpinene, and cymene.

Key Words: *Chenopodium ambrosioides* L.; Allelochemical stress; guard cells; programmed cell death; signal regulation

入侵植物土荆芥 (*Chenopodium ambrosioides* L.) 为藜科藜属 1 年生或多年生芳香性草本植物, 原产热带美洲, 现广泛分布于我国 20 多个地区, 严重破坏了我国生态系统的结构与功能^[1]。土荆芥全株富含挥发油, 当这些挥发油释放到周围环境后, 对受体植物具有强烈的化感作用, 可诱导受体植物根细胞内活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 爆发, 干扰细胞有丝分裂和基因表达, 导致微核率和畸变率增加, 引起氧化损伤和细胞死亡^[2-5], 表现出较强的遗传毒性和细胞毒性。植物释放到环境中的挥发性化感物质除了一小部分通过淋溶^[6]、根系分泌^[7]或腐解^[8]进入土壤外, 很大一部分会挥发进入大气作用于植物的地上器官, 尤其是叶片。气孔是存在于植物茎和叶表面由一对保卫细胞围成的小孔, 是大气中物质进入植物体的主要门户, 控制着外界环境和植物内部的气体交换^[9]。气孔保卫细胞能够接受和整合一系列内外刺激并做出准确的响应^[10], 以此减轻环境胁迫程度和提高植物的抗性^[11], 是研究环境胁迫的良好材料, 也是研究单个细胞内信号转导的模式系统^[12]。研究表明, 气孔保卫细胞对植物的化感胁迫十分敏感, 在马缨丹 (*Lantana camara*)^[13] 和狗牙根 (*Cynodon dactylon*)^[14] 的化感胁迫下, 受体植物的气孔导度显著下降。本研究前期研究发现, 土荆芥挥发油及其两个主要成分 α -蒎品烯和对伞花素处理导致蚕豆 (*Vicia faba* L.) 气孔保卫细胞发生 Caspase 依赖性的细胞凋亡^[15]。信号分子 NO、ROS 和 Ca^{2+} 在胁迫诱导的植物程序性细胞死亡中起着重要的调节作用, 如参与了 SO_2 诱导气孔保卫细胞凋亡的信号转导过程^[16-17], 但是否参与土荆芥化感物质诱导保卫细胞凋亡的信号转导过程却知之甚少。本研究模拟土荆芥挥发途径产生的化感作用, 使土荆芥挥发油及其主要成分 α -蒎品烯和对伞花素与蚕豆叶片表皮条充分接触, 通过分析叶片保卫细胞活性并运用 ROS、一氧化氮合酶 (Nitric oxide synthetase, NOS) 和 Ca^{2+} 的组织化学定位法, 进一步研究了土荆芥挥发途径化感胁迫诱导蚕豆保卫细胞死亡相关的信号调控机制, 为深入揭示土荆芥化感作用机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试植物土荆芥采自四川省成都市包江桥。采用水蒸气蒸馏法^[18]提取挥发油, 用无水 Na_2SO_4 除去水

分,得到淡黄色具有强烈芳香味的挥发油,测得密度为 843 mg/mL。4 ℃ 保存备用。经四川大学测试中心分析鉴定,该挥发油中 α -萜品烯和对伞花素的含量分别为 151 mg/mL 和 156 mg/mL;试验用 α -萜品烯和对伞花素的标准品购自成都市锐可思生化试剂公司。

受体植物蚕豆种子(成胡 14[#])购于成都市五块石种子市场。

1.2 试验方法

1.2.1 材料培养和准备

挑选大小均一、饱满的蚕豆种子,用 0.5%KMnO₄ 浸泡 15 min,浸种 24 h,避光 25 ℃ 催芽 2—3 d,出芽后播种于盛有石英砂的花盆(直径 10 cm,高度 6 cm)中,置于光暗周期 14 h/10 h(光周期 25 ℃,暗周期 18 ℃)的条件下培养。培养期间盆内 Hoagland 营养液(CaNO₃·4H₂O 945 mg/mL, KNO₃ 506 mg/mL, NH₄NO₃ 80 mg/mL, KH₂PO₄ 136 mg/mL, MgSO₄·7H₂O 493 mg/mL, 铁盐溶液 2.5 mL, 微量元素液 5 mL, pH 6.0)保持在 0.2%。待蚕豆生长 4—5 周时取顶端完全展开的叶片,撕取 1 cm×0.5 cm 的叶下表皮,置于含有 5 mL MES 缓冲液[50 mmol/L KCl, 0.1 mmol/L, 0.1 mol/L Tris, 10 mmol/L 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES), pH 7.0]的 EP 管中。

1.2.2 试验处理

用二甲亚砜(DMSO)配制挥发油、 α -萜品烯和对伞花素处理母液。将 10 μ L 挥发油用 DMSO 稀释至 100 μ L 得到 0.1 μ L/ μ L 的挥发油处理母液。根据 10 μ L 挥发油中 α -萜品烯和对伞花素的含量,配制二者的处理母液,其终浓度分别为 0.0169 μ L/ μ L 和 0.0186 μ L/ μ L。

分别取处理母液 2, 4, 6, 8, 10 μ L(分别记为梯度 1、2、3、4、5),用 DMSO 补充至 10 μ L,分别加入 1.2.1 的 EP 管中处理表皮条,其中 MES 缓冲液和 DMSO 作为对照,缓解组在 1.2.1 的 EP 管中分别加入 0.5 mmol/L 和 2.5 mmol/L 的活性氧清除剂抗坏血酸(AsA)、Ca²⁺螯合剂乙二醇双四乙酸(EGTA)和硝酸还原酶抑制剂 NaN₃ 10 μ L,10 min 后加入梯度 4 的处理液母液,以 MES 缓冲液和梯度 4 处理液为对照。所有处理均置于 25 ℃ 光照 30 min。每处理重复 3 次。

1.2.3 细胞活性检测和细胞核形态观察

细胞活性检测采用马丹炜等^[19]的方法略有改进。处理结束后将表皮条用 MES 缓冲液清洗后,平铺在载玻片上,滴加少许吖啶橙/溴乙锭(AO/EB)染液,避光染色 3 min,用 LEICA DM300 荧光显微镜观察并拍照。具有绿色荧光的为活细胞,具有橘红色荧光的为死细胞。每个处理组观察 1000 个细胞,统计保卫细胞的存活率。

细胞核形态检测采用 Feulgen 染色法^[19]。用 Schiff 试剂对处理后的表皮条避光染色 30 min,光学显微镜下观察细胞核形态并拍照。

1.2.4 保卫细胞内 ROS、NOS 和 Ca²⁺组织化学定位

ROS 定位参照焦成瑾^[20]的方法,用 0.1%二氨基联苯胺(DAB)[10 mmol/L MES(pH 6.5), 0.01%Tween-20]和 0.1%硝基四唑氮蓝(NBT)[50 mmol/L MES(pH 6.4), 0.01%Tween-20]分别对表皮条中的 H₂O₂和 O₂⁻进行染色,染色后用 95%的乙醇 90 ℃ 水浴脱去叶绿素。

Ca²⁺定位参照 Li 等^[21]的方法,用 0.01 mmol/L Ca²⁺荧光指示剂(Fluo-3/AM)暗孵育 60 min。

由于 NO 半衰期短,对其定位较难,因此本研究在胁迫处理后,通过对 NOS 染色来推测保卫细胞内 NO 的生成。参照曹冰等^[22]的方法略有改进,用含有 0.05% β -NADPH、0.01%NBT、0.3% triton x-100 的 100 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4)孵育 60 min,用 100 mmol/L 的磷酸缓冲液清洗。

上述定位试验均用 LEICA DM300 荧光显微镜观察拍照。

1.3 数据统计与分析

采用 SPSS17.0 对数据进行 ANOVA 方差分析和 Duncan 法进行多重比较,Microsoft Excel 2007 作图。

2 结果与分析

2.1 土荆芥挥发油及其两种主要成分对蚕豆保卫细胞活性的影响

经 AO/EB 染色后,对照组中保卫细胞细胞核呈均匀的亮绿色荧光(图 1d),土荆芥挥发油、 α -萜品烯和对伞花素 3 个处理组中保卫细胞细胞核出现橘红色荧光(图 1e, f),表明保卫细胞活性丧失。随着处理剂量的增加,呈橘红色荧光的细胞核数目也随之增加(图 1a—c),且细胞核出现明显的畸变特征,如碎裂(图 2b, f)、畸形(图 2c, g)和降解(图 2d, h)等,由此推测保卫细胞可能发生了细胞程序性死亡。

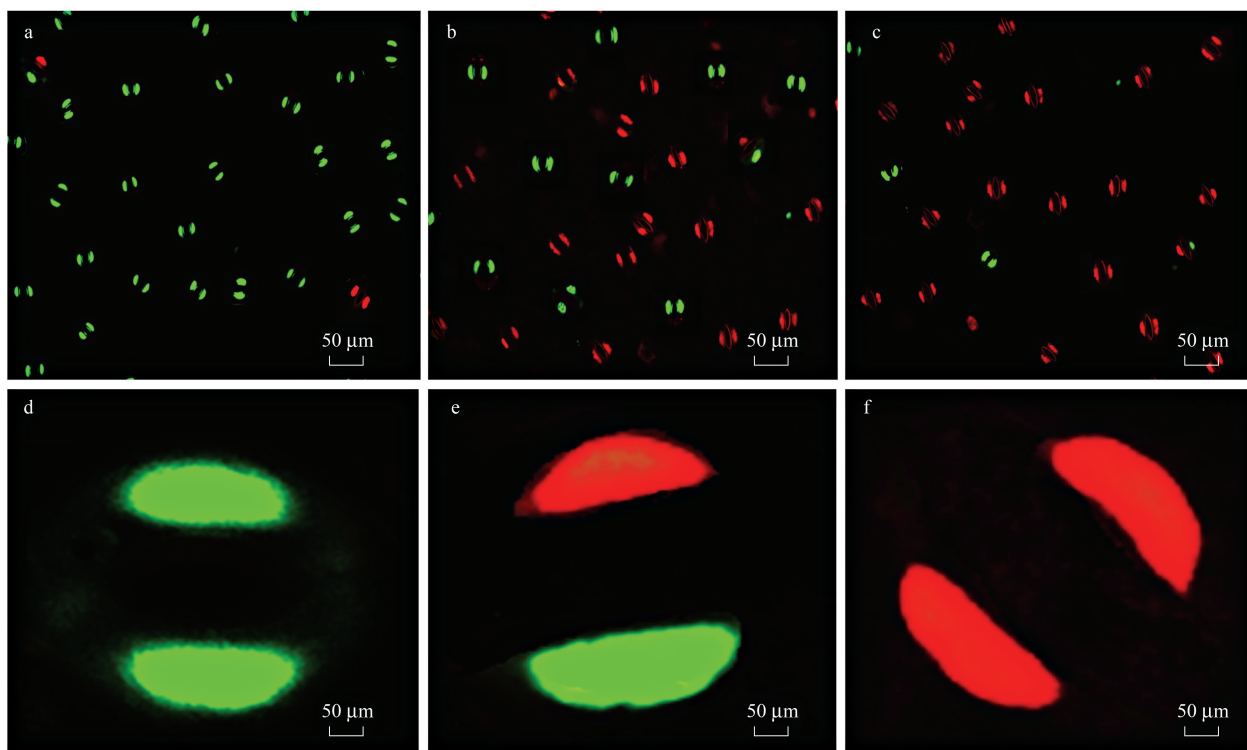


图 1 土荆芥挥发油、 α -萜品烯和对伞花素对蚕豆保卫细胞活性的影响

Fig.1 Effects of volatile oil from *Chenopodium ambrosioides* L., cymene and α -terpinene on guard cell viabilities in *Vicia faba* L.

a: 对照组; b: 低剂量药物处理; c: 高剂量药物处理; d: 对照组; e: 气孔单保卫细胞活性丧失; f: 气孔双保卫细胞活性丧失

从图 3 可以看出, DMSO 处理组保卫细胞存活率与对照组相比无显著差异, 而土荆芥挥发油、 α -萜品烯和对伞花素处理组中, 保卫细胞存活率不同程度的降低。挥发油处理组中, 细胞存活率随着挥发油处理剂量的增加呈显著下降的趋势, 在最高剂量处理下细胞存活率为 5.0%, 仅为对照组的 5.5%; α -萜品烯和伞花素处理组中, 随处理剂量的增加保卫细胞存活率与挥发油处理组相似均呈显著下降的趋势, 在最高剂量处理下, α -萜品烯处理组中细胞存活率为 18.0%, 对伞花素处理组中细胞存活率为 34.8%, 分别为对照组的 19.7% 和 38.1%。由此可见, 土荆芥挥发油、 α -萜品烯和对伞花素对蚕豆保卫细胞产生了明显的细胞毒性, 且具有剂量依耐性, 其中土荆芥挥发油的毒性最大, α -萜品烯次之, 对伞花素的毒性最小。

2.2 ROS 参与土荆芥挥发油及其两种主要成分诱导的蚕豆保卫细胞死亡

DAB 溶液染色结果显示(图 4), 土荆芥挥发油、 α -萜品烯和对伞花素处理后保卫细胞中生成的棕色化合物明显多于对照组, 表明土荆芥挥发油及其两种主要成分诱发了蚕豆保卫细胞中大量生成 H_2O_2 。其中, 挥发油处理组中棕色化合物分布最多, α -萜品烯和对伞花素处理组中差异不明显。

NBT 溶液染色结果(图 5)与 DAB 染色结果类似, 土荆芥挥发油、 α -萜品烯和对伞花素处理后的保卫细胞中生成的蓝色化合物要明显多于对照组, 表明土荆芥挥发油及其两种主要成分处理导致蚕豆保卫细胞中 $O_2^{\cdot-}$

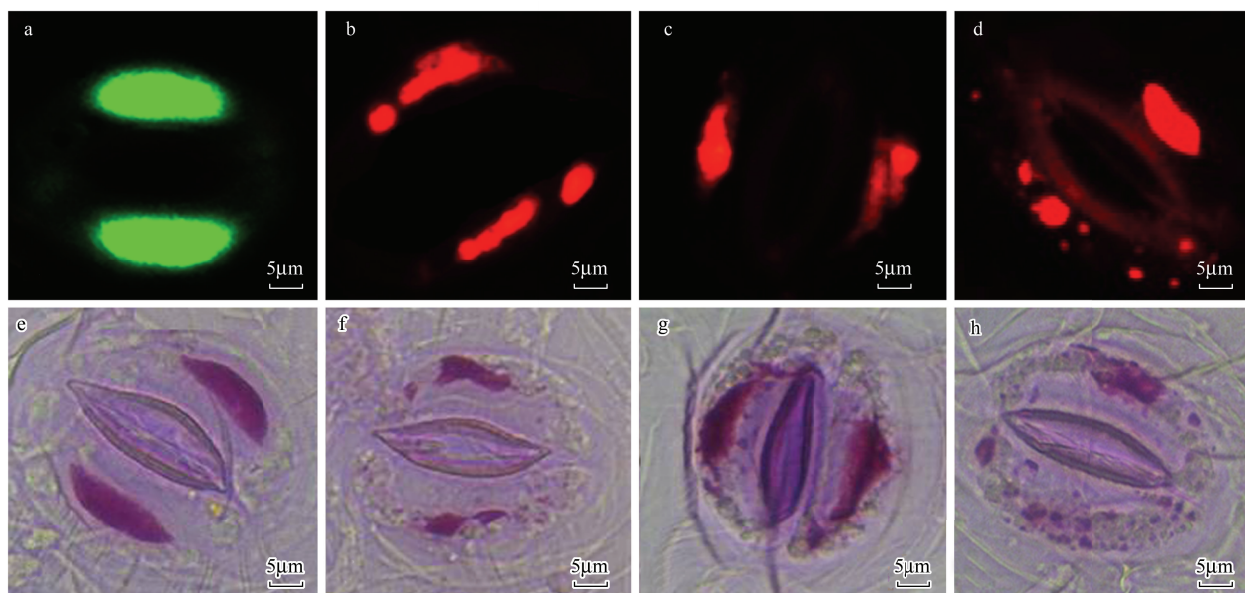


图2 土荆芥挥发油、 α -蒎品烯和对伞花素对蚕豆保卫细胞核形态的影响

Fig.2 Effects of volatile oil from *Chenopodium ambrosioides* L., cymene and α -terpinene on guard cell nucleus morphology in *Vicia faba* L.

a: 对照组; b: 核碎裂; c: 核畸形; d: 核降解 (a—d AO/EB 染色) e: 对照组; f: 核碎裂; g: 核畸形; h: 核降解 (e—h Schiff 试剂染色)

的大量生成。

经 AsA 预处理的蚕豆表皮条中,土荆芥挥发油、 α -蒎品烯和对伞花素诱导的保卫细胞死亡明显减少(图6)。不同浓度的 AsA 均能减少细胞死亡,AsA 浓度越高,这一效应更为显著。由此可见,土荆芥挥发油、 α -蒎品烯、对伞花素诱导的保卫细胞死亡与 H_2O_2 和 $O_2^{\cdot -}$ 水平升高有关。

2.3 Ca^{2+} 参与土荆芥挥发油及其两种主要成分诱导的蚕豆保卫细胞死亡

Ca^{2+} 定位显示(图7),对照组中保卫细胞呈现较弱的绿色荧光,挥发油处理组绿色荧光最强,而 α -蒎品烯和对伞花素处理组的荧光强度介于对照组和挥发油处理组之间。表明在土荆芥挥发油、 α -蒎品烯和对伞花素胁迫下蚕豆保卫细胞内 Ca^{2+} 水平升高。由图8可以看出, Ca^{2+} 螯合剂 EGTA 减少了土荆芥挥发油、 α -蒎品烯和对伞花素诱导的保卫细胞死亡。其中,0.5 mmol/L 的 EGTA 有效地提高了挥发油和 α -蒎品烯胁迫下保卫细胞的存活率($P < 0.05$),但对伞花素处理组细胞存活率变化不明显;2.5 mmol/L 的 EGTA 对3个处理组细胞死亡均具有抑制效应。由此可见,土荆芥挥发油、 α -蒎品烯和对伞花素诱导的细胞死亡与细胞内 Ca^{2+} 水平的升高有关。

2.4 NO 参与土荆芥挥发油及其两种主要成分诱导的蚕豆保卫细胞死亡

由图9可以看出,处理组中蓝色颗粒要明显多于对照组,说明保卫细胞内 NO 活性升高。因此,土荆芥挥发油、 α -蒎品烯和对伞花素可能诱发了蚕豆保卫细胞中 NO 的大量生成。其中挥发油处理组蓝色颗粒最多, α -蒎品烯处理组次之,对伞花素处理组最少。

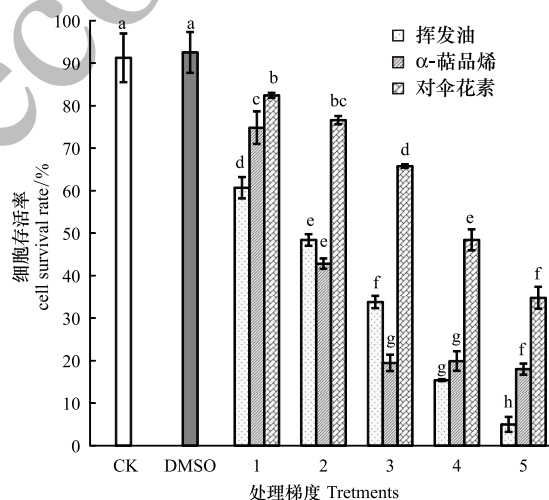


图3 土荆芥挥发油、 α -蒎品烯和对伞花素对蚕豆保卫细胞活性的影响

Fig.3 Effects of volatile oil from *Chenopodium ambrosioides* L., α -terpinene and cymene on guard cell viabilities in *Vicia faba* L.

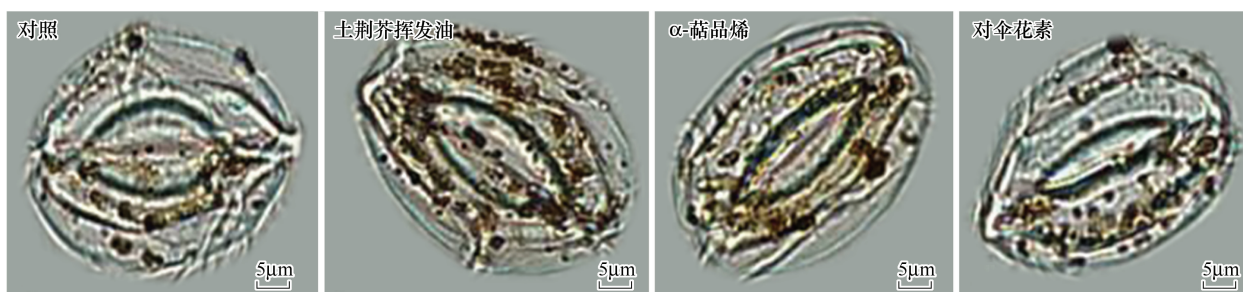


图4 土荆芥挥发油、 α -萜品烯和对伞花素处理后保卫细胞内 H_2O_2 的定位

Fig.4 Location of H_2O_2 in guard cell under treatment by volatile oil from *Chenopodium ambrosioides* L., α -terpinene and cymene

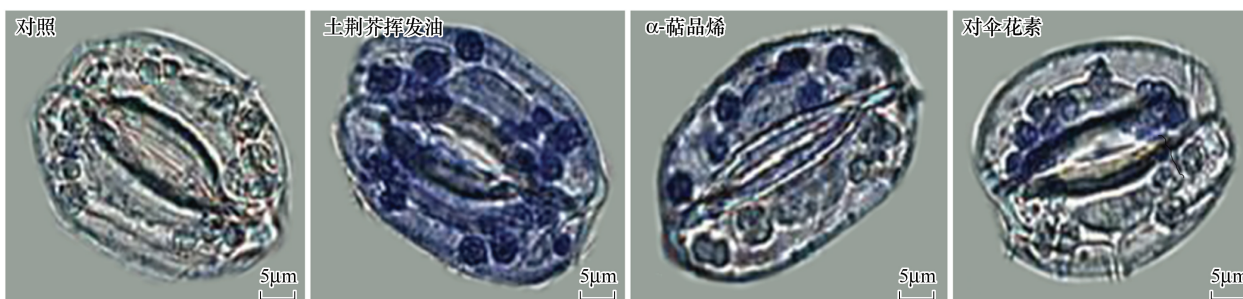


图5 土荆芥挥发油、 α -萜品烯和对伞花素处理后保卫细胞内 O_2^- 的定位

Fig.5 Location of O_2^- in guard cell under treatment by volatile oil from *Chenopodium ambrosioides* L., α -terpinene and cymene

NaN_3 可减少土荆芥挥发油、 α -萜品烯和对伞花素诱导的保卫细胞死亡(图10)。低浓度的 NaN_3 有效地缓解了挥发油和 α -萜品烯诱导的细胞死亡($P < 0.05$),而对对伞花素诱导细胞死亡的缓解效果并不显著;高浓度的 NaN_3 处理显著提高了3个处理组的细胞存活率。由此可见,土荆芥挥发油、 α -萜品烯和对伞花素诱导的细胞死亡与细胞内 NO 水平的升高有关。

3 讨论

3.1 土荆芥挥发油及其两种主要成分对蚕豆保卫细胞的毒性效应

入侵植物能够通过根系分泌、淋溶、挥发和腐解等途径将酚酸、生物碱、萜类等化感物质释放到环境中,其中部分化感物质具有明显的细胞毒性^[23-25]。在白花丹素等萜醌类化感物质的作用下,细胞出现了典型的凋亡特征,如核畸形、碎裂和降解等^[26-27]。酚酸类化感物质阿魏酸通过破坏细胞膜和增加 O_2^- 含量等抑制藻细胞的生长^[28]。此外,化感物质还具有强烈的遗传毒性,导致受体细胞 DNA 损伤、染色体畸变和有丝分裂受阻等^[29]。如入侵植物香丝草 [*Conyza bonariensis* (L.) Cronq.] 水浸提液干扰了受体植物根尖细胞有丝分裂,造成染色体的多种畸变和不可逆的遗传损伤^[30]。又如土荆芥挥发油干扰蚕豆根尖细胞有丝分裂过程,导致微核率和畸变率增加^[3]。本研究结果表明,土荆芥挥发油、 α -萜品烯和对伞花素导致蚕豆叶片保卫细胞活性显著下降,细胞出现了核畸形、碎裂和降解等特征。因此,土荆芥挥发油、 α -萜品烯和对伞花素具有细胞毒性和

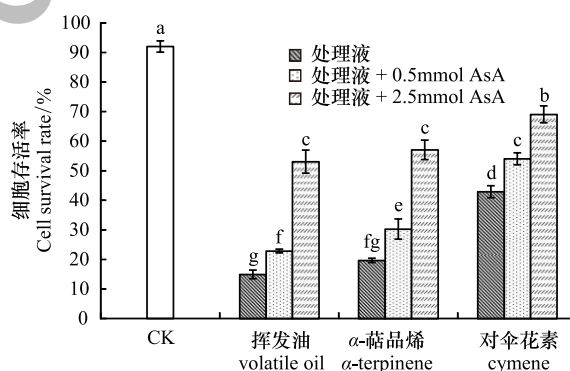


图6 AsA 对土荆芥挥发油、 α -萜品烯和对伞花素诱导的蚕豆保卫细胞死亡的缓解效应

Fig.6 The alleviated effects of AsA on volatile oil from *Chenopodium ambrosioides* L., α -terpinene and cymene induced guard cell death in *Vicia faba* L.

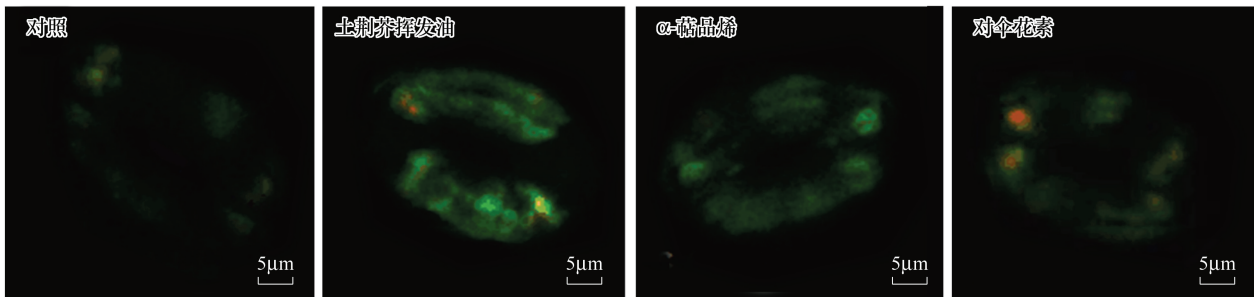


图7 土荆芥挥发油、 α -萜品烯和对伞花素处理后保卫细胞内 Ca^{2+} 的定位

Fig.7 Location of Ca^{2+} in guard cell under treatment by volatile oil from *Chenopodium ambrosioides* L., α -terpinene and cymene

遗传毒性。

3.2 ROS、NO 和 Ca^{2+} 参与土荆芥挥发油及其两种主要成分诱导的保卫细胞死亡

植物体受到各种生物或非生物胁迫时细胞内平衡的自我调节就会被扰乱,同时伴随着 ROS 的大量生成。当细胞内 ROS 的水平超出机体所承受的范围时,细胞就处于氧化胁迫状态,并引发脂质过氧化、酶失活、核酸损伤,甚至是激活细胞的程序性死亡^[31-32]。酚酸类化感物质肉桂酸和咖啡酸导致莴苣 (*Lactuca sativa*) 体内大量产生和积累 ROS,使其根尖细胞的死亡数明显增加^[33]。ROS 能激活质膜上的 Ca^{2+} 通道,使胞外 Ca^{2+} 内流,引起胞内 Ca^{2+} 水平升高,从而激活了 Ca^{2+} 依赖性的核酸内切酶,切割 DNA 在核小体的连接点,致使细胞发生程序性死亡^[34-35]。本研究结果表明,土荆芥挥发油、 α -萜品烯和对伞花素处理组中蚕豆保卫细胞内 ROS 和 Ca^{2+} 水平明显升高,同时细胞存活率显著降低,当加入外源性 ROS 清除剂 AsA 和 Ca^{2+} 螯合剂 EGTA 时,保卫细胞的死亡得到了有效遏制,细胞存活率显著上升。这些现象说明,在土荆芥挥发油、 α -萜品烯和对伞花素的胁迫下保卫细胞内 ROS 的爆发引起了胞内 Ca^{2+} 水平升高,诱发了蚕豆保卫细胞的死亡。

NO 是一个气体型的信号分子,可修饰 ROS 信号。当细胞受到外界胁迫时随着 ROS 瞬间爆发,NOS 活性随之增强而使 NO 合成到达高峰,因此大多情况下 ROS 和 NO 几乎是在细胞的同一个区室内同时爆发的^[36-37]。NO 和 ROS 及抗氧化剂之间的化学反应会形成大量的活性氮 (reactive nitrogen species, RNS),当细

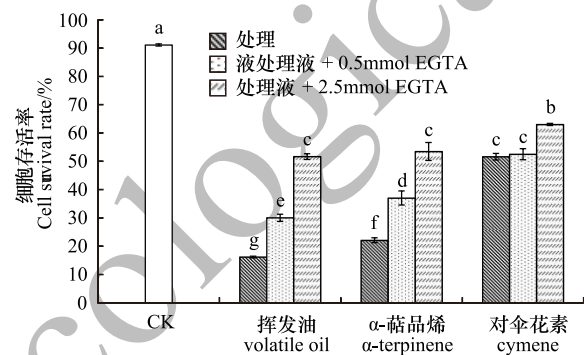


图8 EGTA 对土荆芥挥发油、 α -萜品烯和对伞花素诱导的蚕豆保卫细胞死亡的缓解效应

Fig.8 The alleviated effects of EGTA on volatile oil from *Chenopodium ambrosioides* L., α -terpinene and cymene induced guard cell death in *Vicia faba* L.

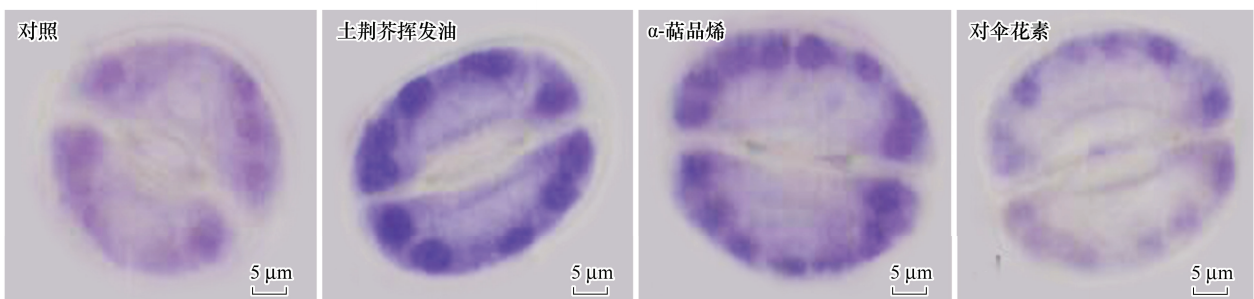


图9 土荆芥挥发油、 α -萜品烯和对伞花素处理后保卫细胞内 NOS 的定位

Fig.9 Location of NOS in guard cell under treatment by volatile oil from *Chenopodium ambrosioides* L., α -terpinene and cymene

胞内平衡失控,ROS 和 RNS 信号不受控制的自我放大可能会激起氮化应激,最终导致程序性细胞死亡^[35-37]。本研究结果表明,土荆芥挥发油、 α -蒎品烯和对伞花素处理组中蚕豆保卫细胞内 NOS 的活性明显高于对照组,表明 NO 的合成量增加,当加入外源性的硝酸还原酶抑制剂 NaN_3 时,保卫细胞死亡得到了有效遏制,细胞存活率显著上升,表明 NO 参与了土荆芥挥发油、 α -蒎品烯和对伞花素诱导蚕豆保卫细胞的死亡。

植物体通过复杂的信号调控网络控制着细胞内的各种生理过程,其中 ROS 和 NO 通过 Ca^{2+} 信号系统调控程序性细胞死亡是植物体抵御环境中非生物或生物胁迫的一种基本机制^[37]。由此可见,土荆芥挥发油、 α -蒎品烯和对伞花素诱导的保卫细胞死亡,可能是通过 ROS 和 NO 调控保卫细胞内 Ca^{2+} 水平的变化而引起的。

参考文献 (References):

- [1] 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, 2004: 91-92.
- [2] 胡琬君, 马丹炜, 王亚男, 张红. 土荆芥挥发油对蚕豆根尖细胞的氧化损伤. 应用生态学报, 2012, 23(4): 1077-1082.
- [3] 胡琬君, 马丹炜, 王亚男, 张红, 李群. 土荆芥挥发油对蚕豆根尖细胞的化感潜力. 生态学报, 2011, 31(13): 3684-3690.
- [4] 陈斌, 王亚男, 马丹炜, 胡忠良, 何亚强, 周健. 土荆芥化感胁迫对玉米幼根抗氧化酶活性和基因表达的影响. 生态环境学报, 2015, 24(10): 1640-1646.
- [5] 胡忠良, 王亚男, 马丹炜, 陈斌, 何亚强, 周健. 玉米根边缘细胞 exDNA 和胞外蛋白对土荆芥化感胁迫的缓解效应. 中国农业科学, 2015, 48(10): 1962-1970.
- [6] Jiménez-Osornio F M V Z J, Kumamoto J, Wasser C. Allelopathic activity of *Chenopodium ambrosioides* L. Biochemical Systematics and Ecology, 1996, 24(3): 195-205.
- [7] 李安奇, 王亚男, 张红, 汪利沙, 马丹炜. 大豆根边缘细胞对土荆芥组培根分泌物的响应. 生态环境学报, 2012, 21(1): 84-87.
- [8] 张红, 王亚男, 廖颖, 李群, 王煜, 马丹炜. 土荆芥去精油残渣腐解液化感作用的初步研究. 西南农业学报, 2010, 23(2): 547-550.
- [9] Lee Y, Kim Y J, Kim M H, Kwak J M. MAPK cascades in guard cell signal transduction. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 80.
- [10] García-Mata C, Lamattina L. Hydrogen sulphide, a novel gasotransmitter involved in guard cell signalling. New Phytologist, 2010, 188(4): 977-984.
- [11] 高春娟, 夏晓剑, 师恺, 周艳虹, 喻景权. 植物气孔对全球环境变化的响应及其调控防御机制. 植物生理学报, 2012, 48(1): 19-28.
- [12] Hetherington A M. Guard cell signaling. Cell, 2001, 107(6): 711-714.
- [13] Singh R, Chaurasia S, Gupta A D, Mishra A, Soni P. Comparative study of transpiration rate in *Mangifera indica* and *Psidium guajava* affect by *Lantana camara* aqueous extract. Journal of Environmental Science, Computer Science and Engineering & Technology, 2014, 3(3): 1228-1234.
- [14] Bouchagier P, Efthimiadis P. Allelopathic susceptibility of cotton to bermudagrass. Journal of Agronomy, 2010, 9(1): 23-28.
- [15] 周健, 马丹炜, 陈永甜, 袁立娜, 黄雪婷, 瞿欢欢. 土荆芥挥发性化感物质对蚕豆叶表皮保卫细胞的影响. 广西植物, 2016, 36(8): 963-968.
- [16] Wei A L, Xin X J, Wang Y S, Zhang C, Cao D M. Signal regulation involved in sulfur dioxide-induced guard cell apoptosis in *Hemerocallis fulva*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2013, 98: 41-45.
- [17] Yi H L, Yin J J, Liu X, Jing X Q, Fan S H, Zhang H F. Sulfur dioxide induced programmed cell death in *Vicia* guard cells. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2012, 78: 281-286.
- [18] Singh H P, Kaur S, Mittal S, Batish D R, Kohli R K. Essential oil of *Artemisia scoparia* inhibits plant growth by generating reactive oxygen species and causing oxidative damage. Journal of Chemical Ecology, 2009, 35(2): 154-162.
- [19] 马丹炜, 王万军. 细胞生物学实验教程. 北京: 科学出版社, 2010: 25-25, 103-103.
- [20] 焦成瑾. 山黧豆毒素积累生理机制及相关合成酶研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2011.
- [21] Li M F, Guo S J, Xu Y, Meng Q W, Li G, Yang X H. Glycine betaine-mediated potentiation of HSP gene expression involves calcium signaling

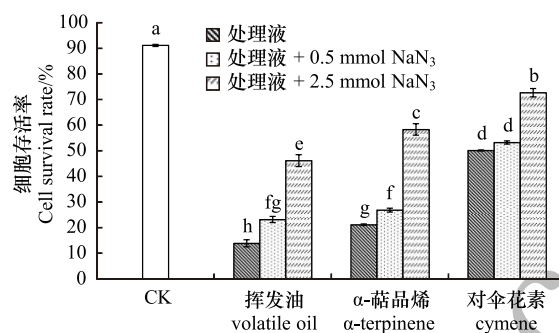


图 10 NaN_3 对土荆芥挥发油、 α -蒎品烯和对伞花素诱导的蚕豆保卫细胞死亡的缓解效应

Fig.10 The alleviated effects of NaN_3 on volatile oil from *Chenopodium ambrosioides* L., α -terpinene and cymene induced guard cell death in *Vicia faba* L.

- pathways in tobacco exposed to NaCl stress. *Physiologia Plantarum*, 2014, 150(1): 63-75.
- [22] 曹冰, 余小平. NDP-黄递酶组织化学方法用于植物组织 NOS 定位的初步研究. 陕西师范大学学报: 自然科学版, 2004, 32(S2): 129-130.
- [23] Niro E, Marzaioli R, De Crescenzo S, D'Ambrosia B, Castaldi S, Esposito A, Fiorentino A, Rutigliano F A. Effects of the allelochemical coumarin on plants and soil microbial community. *Soil Biology and Biochemistry*, 2016, 95: 30-39.
- [24] Babula P, Vanco J, Kohoutkova V, Dankova I, Havel L, Kizek R. Cell signals as markers of cytotoxicity of new complexes of naphthoquinones. *Analysis of Biomedical Signals and Images*, 2010, 20: 259-263.
- [25] Qureshi H, Arshad M, Bibi Y. Toxicity assessment and phytochemical analysis of *Broussonetia papyrifera* and *Lantana camara*: two notorious invasive plant species. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences (JBES)*, 2014, 5(2): 508-517.
- [26] Babula P, Adam V, Kizek R, Sladký Z, Havel L. Naphthoquinones as allelochemical triggers of programmed cell death. *Environmental and Experimental Botany*, 2009, 65(2/3): 330-337.
- [27] Van Doorn W G, Beers E P, Dangel J L, Franklin-Tong V E, Gallois P, Hara-Nishimura I, Jones A M, Kawai-Yamada M, Lam E, Mundy J, Mur L A J, Petersen M, Smertenko A, Taliany M, Van Breusegem F, Wolpert T, Woltering E, Zhivotovsky B, Bozhkov P V. Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death & Differentiation*, 2011, 18(8): 1241-1246.
- [28] 郭亚丽, 傅海燕, 黄国和, 高攀峰, 柴天, 严滨, 廖欢. 阿魏酸和香豆素对铜绿微囊藻的化感作用. 环境科学, 2013, 34(4): 1492-1497.
- [29] 马丹炜, 王亚男, 王煜, 张红, 廖颖, 何兵. 化感胁迫诱导植物细胞损伤研究进展. 生态学报, 2015, 35(5): 1640-1645.
- [30] 杨丽娟, 梁乾隆, 何兴金. 入侵植物香丝草水浸提液对蚕豆和玉米根尖染色体行为的影响. 西北植物学报, 2013, 33(11): 2172-2183.
- [31] Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species; metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 2004, 55: 373-399.
- [32] Petrov V, Hille J, Mueller-Roeber B, Gechev T S. ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 69.
- [33] 郭凯, 燕志强, 金辉, 李秀壮, 何小凤, 杨晓燕, 秦波. 肉桂酸和咖啡酸对莴苣生长的化感作用及其机理研究. 西北植物学报, 2016, 36(1): 93-99.
- [34] Pei Z M, Murata Y, Benning G, Thomine S, Klüsener B, Allen G, Grill E, Schroeder J I. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature*, 2000, 406(6797): 731-734.
- [35] 薛美昭, 仪慧兰. 砷诱导蚕豆气孔保卫细胞死亡的毒性效应. 生态学报, 2014, 34(5): 1134-1139.
- [36] Groß F, Durner J, Gaupels F. Nitric oxide, antioxidants and prooxidants in plant defence responses. *Frontiers in Plant Science*, 2013, 4: 419.
- [37] 杨卫民, 杜京旗, 赵君, 闫艳华. ABA、H₂O₂ 和 NO 在植物细胞凋亡中的作用. 南方农业, 2014, 8(9): 119-123, 133-133.