

DOI: 10.5846/stxb202102060381

何胜利, 谷从璟, 马丹炜, 张红. 信号分子活性氧和 NO 在土荆芥化感胁迫诱导蚕豆根边缘细胞死亡中的调控. 生态学报, 2022, 42(2): 818-827.

He S L, Gu C J, Ma D W, Zhang H. Regulation of ROS and NO in *Chenopodium ambrosioides* allelopathic stress-induced death of *Vicia faba* root border cells. Acta Ecologica Sinica, 2022, 42(2): 818-827.

信号分子活性氧和 NO 在土荆芥化感胁迫诱导蚕豆根边缘细胞死亡中的调控

何胜利¹, 谷从璟^{1,2}, 马丹炜^{1,*}, 张 红¹

¹ 四川师范大学生命科学学院, 成都 610101

² 云南省梁河县第一中学, 梁河 679200

摘要: 为了探讨入侵植物土荆芥 (*Chenopodium ambrosioides* L.) 化感作用如何干扰受体植物的防御功能, 以蚕豆 (*Vicia faba* L.) 为受体, 研究了土荆芥挥发油及其主要成分 ρ -对伞花素和 α -蒎品烯对根边缘细胞活性及其胞外诱捕网厚度的影响, 并测定了细胞内信号分子活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 和 NO 水平的变化。结果表明: 在土荆芥挥发油、 ρ -对伞花素和 α -蒎品烯作用下, 蚕豆根边缘细胞粘胶层厚度增加, 细胞活性下降, 而 ROS 和 NO 水平升高, 且表现为浓度依赖效应, 细胞死亡率、ROS 水平和 NO 水平三者之间存在着显著的正相关 ($P < 0.05$)。ROS 清除剂抗坏血酸 (AsA)、硝酸还原酶抑制剂 (NaN_3) 和泛 Caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 均可有效缓解挥发性物质的细胞致死效应, 表明 ROS 和 NO 诱导根边缘细胞发生了 Caspase 依赖性细胞凋亡。上述结果表明土荆芥挥发性化感物质诱导蚕豆根边缘细胞内 NO 和 ROS 的水平上升, 二者协同作用导致细胞凋亡, 引起受体防御功能障碍, 从而抑制了植物根系的生长。

关键词: 土荆芥; 化感胁迫; 根边缘细胞凋亡; NO; ROS

Regulation of ROS and NO in *Chenopodium ambrosioides* allelopathic stress-induced death of *Vicia faba* root border cells

HE Shengli¹, GU Congjing^{1,2}, MA Danwei^{1,*}, ZHANG Hong¹

¹ College of Life Science, Sichuan Normal University, Chengdu 610101, China

² The First Middle School of Lianghe County, Yunnan Province, Lianghe 679200, China

Abstract: Root border cells (RBCs) are a group of special cells that develops from root cap meristems and aggregates around the root cap during the development of plant root tips. The border cell-extracellular traps are formed by root border cells and their secreted substances. This structure provides a protective barrier between the root and the soil, and thus protects the root from adverse factors, including allelochemicals. Extracellular trapping nets are extremely important for root growth and development. An alien invasive plant, *C. ambrosioides*, has a strongly allelopathic effect on its surrounding plants. It can significantly inhibit the growth of roots and even the whole plant by affecting the cellular structure, physiological and biochemical process, and gene expression of receptor plants to suppress and exclude other plants. To further explore how the allelopathy of *C. ambrosioides* interferes with the defense function of the receptor plants, this study used the root border cells of *V. faba*, which is widely planted in the invasive areas of *C. ambrosioides* in southwestern China, as the experimental receptor. Under the treatments of volatile oil from *C. ambrosioides* and its main components (ρ -cymenol and α -terpene), the adhesive layer thickness, cell viability, intracellular reactive oxygen species (ROS) and

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31971555); 四川省应用基础研究重点项目 (2017JY0017); 四川省高校重点实验室开放项目 (SCYZ201410)

收稿日期: 2021-02-06; **网络出版日期:** 2021-09-10

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

nitric oxide (NO) levels in the root border cells of *V. faba* were tested by using microscopy and spectrophotometry. The effects of ROS and NO on cell activity and the type of cell death of the root border cells were evaluated by applying ROS scavenging agent (ascorbic acid, AsA), nitrate reductase inhibitor (NaN_3), and pan-Caspase inhibitor (Z-VAD-FMK). The results showed that the adhesive layer thickness of RBCs increased, the cell activity decreased, and the levels of ROS and NO in the root border cells increased in exposure to the volatile oil, p-cymenin and α -terpenene, which showed a concentration-dependent effect. It was found that there was a significantly positive correlation among root border cell death rate, ROS and NO levels ($P < 0.05$) by using the heat map analysis of the related parameters of root border cells. The ROS scavenger (AsA), NaN_3 , and Z-VAD-FMK could effectively alleviate the lethal effects of the volatile oil, p-cymenin and α -terpene on root border cells of *V. faba*, which indicated that ROS and NO induced Caspase-dependence apoptosis of root border cells. These results suggested that the volatile allelochemicals from *C. ambrosioides* induced root border cell death by increasing the levels of ROS and NO. Therefore, the allelopathy *C. ambrosioides* caused the protective dysfunction of the receptor plant by removing the protective barrier, and inhibited growth of roots of the receptor plant.

Key Words: *Chenopodium ambrosioides* L.; allelopathy; root border cells apoptosis; nitric oxide; reactive oxygen species

“Novel Weapons”假说认为,化感作用是外来植物成功入侵的机制之一^[1],扩散到新环境中的入侵植物比原产地具有更强的化感作用,从而在竞争中占有优势^[2]。它们通过淋溶、挥发、根系分泌、残株腐解等方式释放到环境中的化感物质,大多数最终将进入土壤,抑制其他植物根系乃至整个植株的生长^[3]。根边缘细胞(Root border cells, RBCs)是在植物根尖发育过程中由根冠分生组织发育而来并聚集在根冠周围的一群特殊细胞^[4-5],根边缘细胞及其分泌物质构成的胞外诱捕网(Border cell extracellular traps, BETs)^[6]共同在根和土壤之间构筑了一道保护屏障,抵御包括化感物质等在内的外界不良因素对根系的影响^[7-9]。土荆芥(*Chenopodium ambrosioides* L.)原产于热带美洲,现广泛分布于世界热带、亚热带和温带地区,凭借其较强的化感作用^[10]在我国大部分地区形成了优势种群,是一种威胁我国生态安全的外来恶性杂草^[11]。土荆芥全株富含的挥发性化感物质具有较强的细胞毒性和遗传毒性^[12-14],干扰受体 RBCs 的释放并引起 RBCs 活性降低^[13],进而导致根尖细胞出现氧化损伤^[15]以及 Ca^{2+} 和 Caspase 依赖性的细胞凋亡^[16]。活性氧(Reactive oxygen species, ROS)和 NO 本身具有毒性,另一方面也是植物细胞信号传递的关键组分,在逆境胁迫下,植物细胞内 ROS 和 NO 增加,其浓度在未达到毒性水平的情况下,会作为信号分子进行传递,触发一系列信号转导过程以应对逆境胁迫^[17]。然而,有关土荆芥化感作用诱导 RBCs 死亡及其相关信号调节过程却知之甚少。本研究以西南地区土荆芥入侵地广泛种植的蚕豆(*Vicia faba* L.)RBCs 为靶标,研究了土荆芥挥发性化感物质作用下,受体 RBCs 的 ROS 和 NO 等信号分子和粘胶层的变化规律,旨在探讨土荆芥挥发性化感物质诱导受体 RBCs 死亡的信号转导过程,明确土荆芥化感作用对受体防御功能的干扰机制,为土荆芥入侵机制的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

成熟期的土荆芥全株采自四川省成都市包江桥附近($104^{\circ}5'57''\text{E}$, $30^{\circ}35'34''\text{N}$);供试蚕豆品种“成胡 14#”购自成都市新都区龙桥镇。试验所用标准品 α -萜品烯购于上海 Aladdin-阿拉丁试剂公司($\geq 90\%$), ρ -对伞花素购自上海 Adamas-beta 试剂有限公司($\geq 99\%$)。

1.2 挥发油和处理母液的制备

将土荆芥材料剪成 1—2 cm 的小段,参照 Singh 等^[18]的水蒸气蒸馏法提取土荆芥挥发油,经无水 Na_2SO_4 除水后 4°C 保存备用。该挥发油的密度为 843 mg/mL ,其主要成分 α -萜品烯和 ρ -对伞花素的含量分别为 151 mg/mL 和 156 mg/mL 。

分别用二甲基亚砜(DMSO)配制土荆芥挥发油、 α -萜品烯和 p -对伞花素的处理母液。将 10 μL 挥发油用 25% DMSO 稀释至 100 μL 得到 0.1 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ 的挥发油处理母液。根据 10 μL 挥发油中 α -萜品烯和 p -对伞花素的含量,配制二者的处理母液,其终浓度分别为 0.0205 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ 和 0.0179 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ 。

1.3 材料培养及处理

1.3.1 材料培养和 RBCs 的收集

选择大小一致,饱满无损的蚕豆种子,用 0.5% 的 KMnO_4 溶液表面消毒 10—15 min,使用蒸馏水清洗 3—5 次,置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱浸种 24 h,催芽 2—3 d,待种子露白后,将种子铺在垫有湿润双层无菌纱布的磁盘中,再盖上一层无菌纱布,置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中黑暗条件下继续培养 2—3 d。待根长约 3 cm 时(此时 RBCs 数量达到峰值),随机切取长约 5 mm 根尖 5 个,置于装有 100 μL ddH₂O 的 1.5 mL 离心管中,旋涡振荡 30 s,再用 50 μL ddH₂O 冲洗根尖 2 次,移液枪吸打 3—4 次,使成团的 RBCs 分散,制得细胞悬液。

1.3.2 试验处理

A 组:分别取处理母液 1、2、3、4 μL 和 5 μL (记为 T1, T2, T3, T4, T5),用 DMSO 补足体积至 5 μL ,加入盛有 200 μL 细胞悬液的离心管,混匀。溶剂对照组为 25% DMSO 5 μL + 200 μL ddH₂O,阴性对照组为 205 μL ddH₂O;所有处理均置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中黑暗培养 30 min。每处理重复 3 次。

B 组:分别取挥发油、 α -萜品烯和 p -对伞花素处理母液 5 μL ,分别加入 ROS 清除剂抗坏血酸(AsA;0.05, 0.10, 0.50 mmol/L)、硝酸还原酶抑制剂叠氮化钠(NaN_3 ;0.05, 0.25, 1.25 mmol/L)、泛 Caspase 抑制剂(Z-VAD-FMK;0.063, 0.125, 1.250 mmol/L),混匀后加入装有 200 μL 细胞悬液的离心管,混匀。溶剂对照组为 25% DMSO 5 μL + 200 μL ddH₂O,阴性对照组为 205 μL ddH₂O;所有处理均置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中黑暗培养 30 min。每处理重复 3 次。处理结束后,用 ddH₂O 漂洗 2 次进行指标测定。

1.4 指标测定

1.4.1 RBCs 的原位观察

随机取 2 个长度约 3.0 cm 的根尖,分别置于载玻片上,将其中 1 个根尖上滴 1 滴 ddH₂O,将根冠浸入水中数秒后,滴 1 滴吖啶橙/溴化乙锭(AO/EB)染液;另 1 个根尖直接滴加 AO/EB 染液;二者均在室温下避光染色 3 min,用 Nikon ECLIPSE 55i 荧光显微镜观察并拍照。

1.4.2 RBCs 形态观察和活性测定

RBCs 的凋亡形态观察参照杨小环等^[19]的方法。取细胞悬液 20 μL ,加入 8 μL AO/EB 染液,混匀后避光染色 1—3 min,用 Nikon ECLIPSE 55i 荧光显微镜观察并拍照,每个处理重复 3 次。统计死亡细胞的数量和细胞总数,计算 RBCs 死亡率;RBCs 死亡率=死亡细胞数/总细胞数 $\times$ 100%。

1.4.3 RBCs 黏胶层厚度的测定

采用杨小环等^[19]的方法略有改动。取细胞悬液 40 μL ,加入 8 μL 印度墨水均匀混合后染色 1 min,用 Nikon ECLIPSE 55i 显微镜明场观察并拍照,测量黏胶层厚度。

1.4.4 RBCs 中 ROS 原位观察和含量测定

采用活性氧检测试剂盒(碧云天,上海)测定,用 Nikon ECLIPSE 55i 荧光显微镜观察 RBCs 中 ROS 的分布,酶标仪测定 ROS 相对荧光值(激发波长为 488 nm,发射波长为 525 nm)。

1.4.5 RBCs 中 NO 含量的测定

采用 DAF-FM DA(NO 荧光探针)试剂盒(碧云天,上海)测定,酶标仪测定 NO 相对荧光值(激发波长为 495 nm,发射波长为 515 nm)。

1.5 数据统计与分析

根据 Williamson 和 Richardson^[20]提出的化感作用响应指数(Alelopathy response index, RI)用于衡量化感作用强度。

$$RI = 1 - \frac{C}{T}, (T \geq C)$$

$$RI = \frac{T}{C} - 1, (T < C)$$

式中, C 为对照值, T 为处理值, RI < 0 表示抑制效应, RI > 0 表示促进效应, 其绝对值表示化感作用强度大小; 化感作用综合效应 (Synthesis effect, SE) 为 RI 的算术平均值^[21]。

用 SPSS 20.0 对测定指标进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA)、Tukey 检验多重比较 (LSD) 和 Pearson 相关性分析, Excel 2019 作图。

2 结果与分析

2.1 土荆芥挥发性物质对蚕豆 RBCs 形态的影响

蚕豆 RBCs 呈现细长的椭圆形 (图 1A), 明显的细胞核, 细胞质清晰; 从图 1B 可以看出, 蚕豆根尖未浸入水中时, RBCs 紧贴在根冠周围 (图 1B)。当根尖浸入水中时, RBCs 就会从根冠周围释放出来, 甚至呈片状状态从根冠周围脱落 (图 1C)。

2.2 土荆芥挥发性物质对蚕豆 RBCs 黏胶层厚度的影响

本研究中, 溶剂对照组和阴性对照组的黏胶层厚度等各种指标均无显著差异 ($P > 0.05$), 表明溶剂二甲基亚砜对 RBCs 影响不大, 后续指标对此不再赘述。与阴性对照组相比, 在土荆芥挥发性物质处理下 RBCs 黏胶层显著增厚, 其中以挥发油处理变化最大 (图 2)。随着处理浓度增加, RBCs 黏胶层厚度逐渐增加 ($P < 0.05$), 在最大处理浓度下, 土荆芥挥发油、 ρ -对伞花素和 α -蒎品烯处理的 RBCs 黏胶层厚度分别为对照组的 2.21 倍、2.14 倍和 1.95 倍。

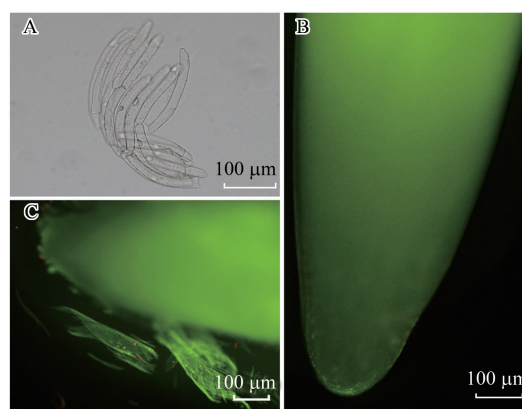


图 1 蚕豆根边缘细胞的原位观察

Fig.1 In situ observation of *V. faba* root border cells

A: 蚕豆根边缘细胞显微结构图; B: 未浸入水中的根尖; C: 浸入水中后的根尖

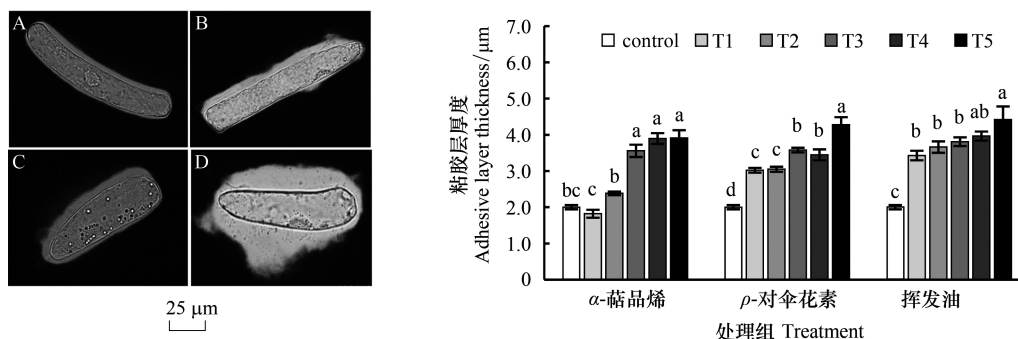


图 2 土荆芥挥发油、 ρ -对伞花素和 α -蒎品烯作用下蚕豆 RBCs 黏胶层厚度的变化

Fig.2 Changes of the Adhesive layer thickness of root border cells of *V. faba* exposed to the volatile oil from *C. ambrosioides*, p-cymene and α -terpinene

A、B、C 和 D 分别是对照、 α -蒎品烯、 ρ -对伞花素和挥发油的 T5 处理组, 不同小写字母表示同一处理组中不同处理之间在 95% 水平上的差异显著性

2.3 土荆芥挥发性物质作用下蚕豆 RBCs 内 ROS 的变化

ROS 原位观察显示 (图 3), 阴性对照组中 RBCs 呈现较弱的绿色荧光, ROS 主要集中在细胞核中, 少部分分布在细胞壁上, 而细胞质中 ROS 的分布比较少 (图 3A)。 α -萜品烯处理组中, ROS 主要分布在细胞质中 (图 3B), 而 p -对伞花素处理组中 ROS 更多的集中分布在细胞质中, 细胞核中分布较少 (图 3C); 挥发油处理组绿色荧光最强, ROS 几乎分布于整个细胞中 (图 3D)。综上所述, 土荆芥挥发油、 p -对伞花素和 α -萜品烯处理诱导蚕豆 RBCs 内 ROS 水平升高。

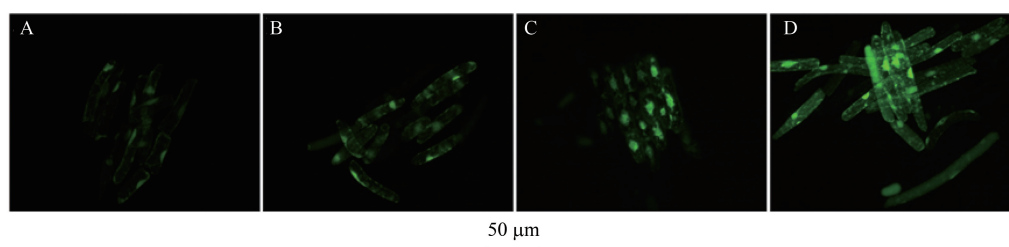


图 3 土荆芥挥发油、 p -对伞花素和 α -萜品烯作用下蚕豆根边缘细胞内 ROS 的分布

Fig.3 Distribution of reactive oxygen species in root border cells exposed to volatile oil from *C. ambrosioides*, p -cymene and α -terpinene

土荆芥挥发油、 p -对伞花素和 α -萜品烯均可诱导 RBCs 内 ROS 的积累 (图 4), 且随着处理浓度的升高, ROS 含量不断增加。T5 处理组的细胞中, ROS 积累量最大, 挥发油、 p -对伞花素和 α -萜品烯处理组分别为对照组的 4.13 倍、2.19 倍和 2.0 倍。

2.4 土荆芥挥发性物质作用下蚕豆 RBCs 内 NO 含量的变化

从图 5 可知, 随着土荆芥挥发油、 p -对伞花素和 α -萜品烯浓度的升高, 蚕豆 RBCs 内 NO 的含量逐渐增大。当浓度达到最大时 (T5), 细胞内 NO 的含量达到最大值, 分别为对照组的 14.37 倍、7.02 倍和 8.17 倍。说明土荆芥挥发油、 p -对伞花素和 α -萜品烯胁迫处理诱导蚕豆 RBCs 内 NO 的产生。

2.5 土荆芥挥发性物质作用下蚕豆 RBCs 活性的变化

2.5.1 土荆芥挥发性物质作用下蚕豆 RBCs 的形态学观察

从图 6 中可见, 土荆芥挥发性物质对蚕豆 RBCs 具有致死效应。经过 AO/EB 染色后, 对照组 (图 6A) RBCs 呈现绿色荧光, 细胞轮廓清晰, 细胞核结构明显, 且呈现绿色荧光亮斑; 经过挥发性物质处理 (图 6B, 图 6C, 图 6D) 后, RBCs 染色不均匀且细胞呈现浅橘红色荧光, 细胞核呈现橘红色荧光亮斑, 甚至部分细胞核已经裂解, 表明 RBCs 活性丧失, 表现出凋亡特征。

2.5.2 土荆芥挥发性物质作用下蚕豆 RBCs 的活性变化

图 7 显示, 蚕豆 RBCs 对土荆芥挥发性物质十分敏感, 在低浓度 (T1) 处理下, 细胞都会大量死亡, 随着处理浓度的增大 RBCs 而增加, 呈现浓度梯度效应。最大处理浓度下 (T5), 挥发油、 p -对伞花素和 α -萜品烯处理组的细胞死亡率分别达到了 78.29%、55.11% 和 47.88%。

2.5.3 泛 Caspase 抑制剂对土荆芥挥发性物质诱导 RBCs 死亡的影响

在处理组中加入泛 Caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 后, 土荆芥挥发油、 α -萜品烯和 p -对伞花素诱导的 RBCs

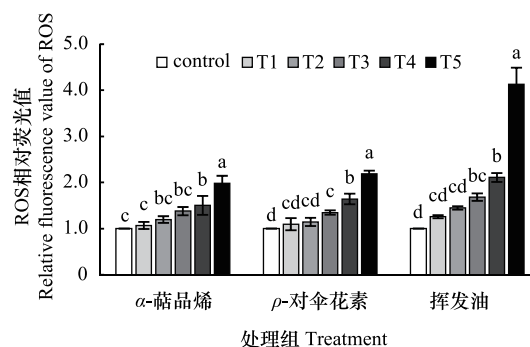


图 4 土荆芥挥发油、 p -对伞花素和 α -萜品烯作用下蚕豆根边缘细胞中 ROS 相对含量的变化

Fig.4 Changes of ROS relative content in *V. faba* root border cells exposed to the volatile oil from *C. ambrosioides*, p -cymene and α -terpinene

T1、T2、T3、T4、T5 分别代表 α -萜品烯、 p -对伞花素和挥发油的不同处理浓度

死亡明显减少(图8),且 Z-VAD-FMK 浓度越大,死亡率越低($P<0.05$)。在 Z-VAD-FMK 处理浓度最大时,细胞死亡率较 T5 处理组显著下降,挥发油、 ρ -对伞花素和 α -蒎品烯处理组的细胞死亡率分别降低为 10.56%、9.31% 和 12.28%。结合荧光染色试验结果可见,土荆芥挥发性物质诱导 RBCs 死亡形式为 Caspase 依赖性的细胞凋亡。

2.5.4 抗坏血酸对土荆芥挥发性物质诱导 RBCs 死亡的影响

施加 ROS 清除剂 AsA 处理 RBCs 后,土荆芥挥发油、 α -蒎品烯和 ρ -对伞花素诱导的 RBCs 死亡明显减少(图9)。即使施加低浓度 AsA (0.05mmol/L),细胞凋亡率也会显著降低($P<0.05$),并且 AsA 浓度越高,这一效应更为显著,呈现浓度梯度效应。当 AsA 浓度最大时

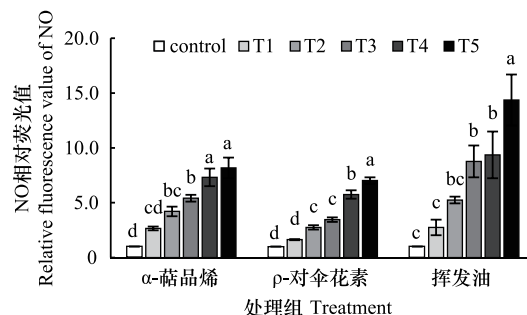


图5 土荆芥挥发油、 ρ -对伞花素和 α -蒎品烯作用下蚕豆根边缘细胞 NO 相对含量的变化

Fig.5 Changes of NO relative content in *V. faba* root border cells exposed to the volatile oil from *C. ambrosioides*, p-cymene and α -terpinene

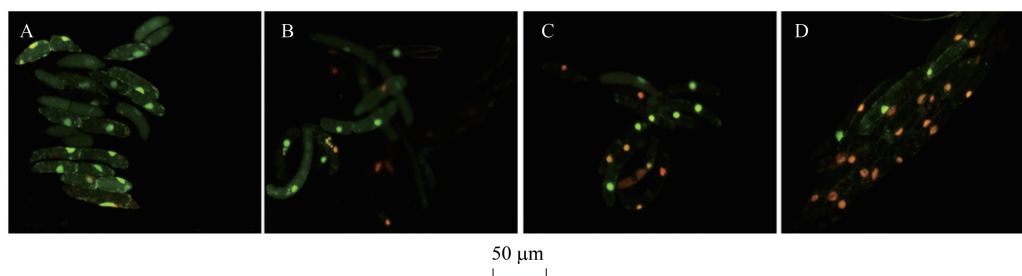


图6 土荆芥挥发油、 ρ -对伞花素和 α -蒎品烯胁迫下蚕豆根边缘细胞荧光图像

Fig.6 Root border cell fluorescence images of *V. faba* exposed to the volatile oil from *C. ambrosioides*, p-cymene and α -terpinene

(0.50mmol/L),土荆芥挥发性物质对蚕豆 RBCs 致死的缓解效应最强,与 T5 处理组相比,挥发油、 ρ -对伞花素和 α -蒎品烯处理组细胞死亡率显著下降,分别降低为 12.49%、10.41% 和 15.19%,表明在土荆芥挥发性物质处理诱导的细胞死亡与细胞内 ROS 诱导的氧化损伤密切相关。

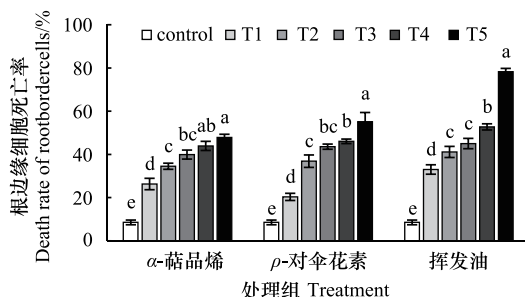


图7 土荆芥挥发油、 ρ -对伞花素和 α -蒎品烯作用下对蚕豆根边缘细胞活性的变化

Fig.7 Changes of the ctivity of *V. faba* root border cells exposed to the volatile oil from *C. ambrosioides*, p-cymene and α -terpinene

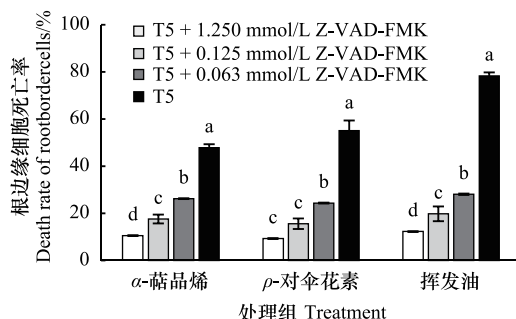


图8 Caspase 抑制剂对土荆芥挥发油、 ρ -对伞花素和 α -蒎品烯诱导蚕豆根边缘细胞死亡的缓解效应

Fig.8 Alleviated effect of Caspase inhibitor on volatile oil from *C. ambrosioides*, p-cymene and α -terpinene induced death of root border cells of *V. faba*

2.5.5 NaN₃对土荆芥挥发性物质诱导 RBCs 死亡的影响

施加 NO 清除剂叠氮化钠 (NaN₃) 处理 RBCs 后,土荆芥挥发油、 α -萜品烯和 ρ -对伞花素诱导的 RBCs 死亡明显减少(图 10)。即使施加低浓度 NaN₃ (0.05mmol/L),细胞凋亡率也会显著降低($P<0.05$),并且 NaN₃ 浓度越高,这一效应更为显著,呈现浓度梯度效应。当 NaN₃ 浓度最大时(1.25mmol/L),对蚕豆 RBCs 的缓解效应最强,与单独施加 α -萜品烯、 ρ -对伞花素和土荆芥挥发油的对照相比,细胞凋亡率分别降低为 22.25%、22.55% 和 36.54%。

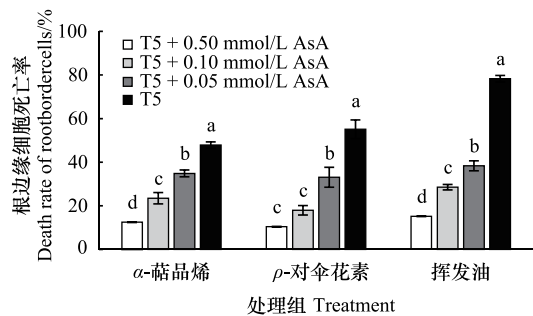


图 9 抗坏血酸对土荆芥挥发油、 ρ -对伞花素和 α -萜品烯诱导的蚕豆根边缘细胞凋亡的缓解效应

Fig.9 Alleviated effect of ascorbic acid on the volatile oil from *C. ambrosioides*, p-cymene and α -terpinene induced death of root border cells of *V. faba*

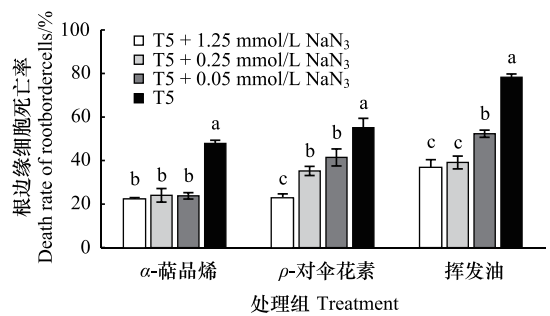


图 10 NaN₃对土荆芥挥发油、 ρ -对伞花素和 α -萜品烯诱导的蚕豆根边缘细胞凋亡的缓解效应

Fig.10 Alleviated effect of NaN₃ on the volatile oil from *C. ambrosioides*, p-cymene and α -terpinene induced death of root border cells of *V. faba*

2.5.6 土荆芥挥发性物质作用下蚕豆 RBCs 相关参数之间的相关性分析

从图 11 相关性分析可知,RBCs 死亡率与 ROS 和 NO 呈显著正相关;在土荆芥挥发油作用下,RBCs 死亡

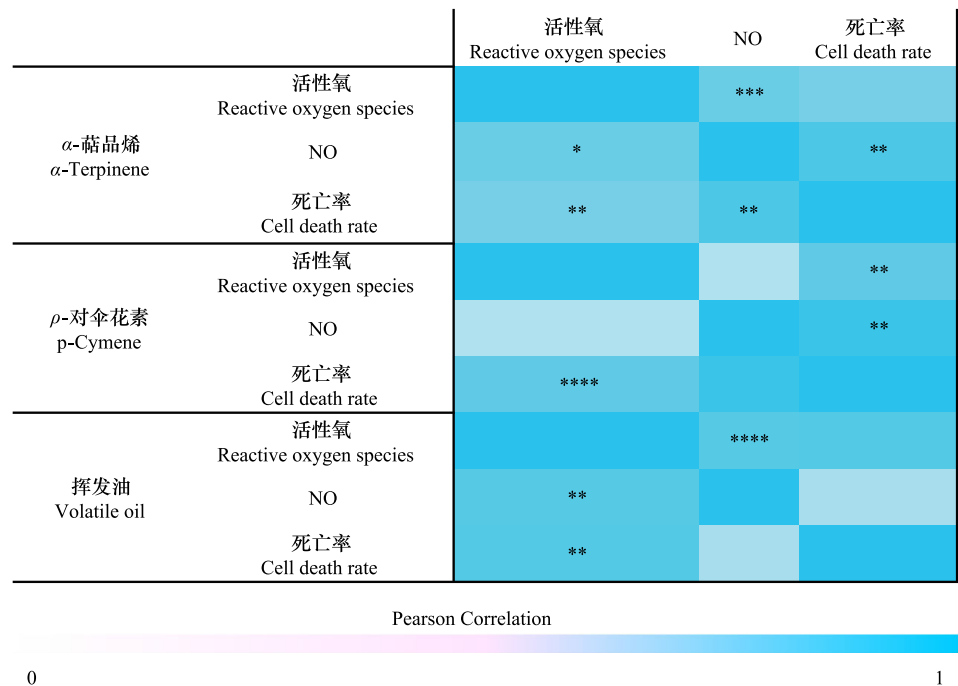


图 11 土荆芥挥发油、 α -萜品烯和 ρ -对伞花素作用下蚕豆根边缘细胞参数相关性热图

Fig.11 Heat Map of the Correlation of Parameters of *V. faba* root border cells under the action of *C. ambrosioides* volatile oil, α -terpinene and p-cymene

率与 ROS 和 NO 的相关系数较大,分别达到 0.685 和 0.95。在 ρ -对伞花素和 α -萜品烯作用下,RBCs 死亡率与 ROS 和 NO 也存在极显著的相关性($P<0.01$)。此外,在 α -萜品烯和挥发油处理中,RBCs 中 ROS 水平和 NO 水平的变化存在着极显著的正相关关系($P<0.01$)。上述结果表明,土荆芥挥发性物质诱导 RBCs 死亡与 ROS 和 NO 之间有着紧密的相关关系,且 ROS 和 NO 二者协同作用的结果。

2.6 土荆芥挥发油与两个主要成分化感效应的比较

本研究综合分析不同梯度处理下的细胞死亡率、粘胶层厚度、ROS 水平、NO 水平 4 个指标化感响应指数发现,土荆芥挥发油及其两个主要成分的化感综合效应指数(SE)从大到小依次是挥发油(0.782)> α -萜品烯(0.541)> ρ -对伞花素(0.536)。由此可见,挥发油化感效应最强,挥发油的两个主要成分的化感效应比挥发油小,两个单体成分的化感效应差异不大。

3 讨论

3.1 土荆芥化感胁迫对蚕豆根边缘细胞的致死效应

RBCs 及其 BETs 是根系与土壤之间的一道生物屏障^[22]。当一种植物通过各种途径释放的化感物质进入土壤后,会刺激受体植物加速释放根边缘细胞并增加 BETs 厚度来抵御化感胁迫,如在肉桂酸作用下,黄瓜(*Cucumis sativus* L.)和西葫芦(*Figleaf Gourd*)RBCs 数量增加,BETs 厚度增大^[23];在 ρ -对羟基苯甲酸刺激下,葡萄 RBCs 通过增加数量、提高次生代谢物质和水杨酸的积累,激活了细胞的抗氧化防御系统^[24];大豆 [*Glycine max* (Linn.) Merr.] RBCs 受到土荆芥根系分泌物化感胁迫时,可能通过加速死亡并分泌一些物质螯合土荆芥根分泌物,以缓解根系分泌物对根尖组织的伤害^[25];豌豆(*Pisum sativum* L.)RBCs 受到土荆芥挥发油化感胁迫时,根尖通过上调 PME 活性,加速释放根边缘细胞来抵御化感胁迫^[26]。但这种缓解效应是有限的,随着处理时间延长、处理强度增大,RBCs 活性下降而导致其保护根尖的功能减弱甚至丧失。本研究中,在土荆芥挥发油及其主要成分 α -萜品烯和 ρ -对伞花素作用下,蚕豆 RBCs 粘胶层厚度增大,随着处理强度增加 RBCs 活性下降,与上述研究结果和本实验室之前的研究成果^[7,14]相吻合。在泛 Caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 作用下,土荆芥挥发油、 α -萜品烯和 ρ -对伞花素诱导对 RBCs 的致死效应明显减弱,表明蚕豆 RBCs 的死亡形式是 Caspase 依赖性的细胞凋亡,荧光染色的细胞结构特征也印证了这一论断。由此可见,化感作用通过诱导受体植物 RBCs 凋亡而干预了受体植物的防御功能。

土荆芥挥发油成分较为复杂,含有萜类及其氧化物、酯类、酮类、醇类和酚类等化合物^[13],并且其成分也随着分布区而变化,在不同地区的土荆芥挥发油中普遍存在 α -萜品烯和 ρ -对伞花素这两种主要成分^[27-28]。Li 等^[16]研究发现,土荆芥挥发油诱导的细胞凋亡效应显著高于 α -萜品烯和 ρ -对伞花素同时诱导的细胞凋亡效应,挥发油诱导的化感效应是其多种化学成分协同作用的结果。本研究通过分析综合化感效应发现, α -萜品烯略大于 ρ -对伞花素的化感效应,但二者的化感效应小于挥发油,与上述研究结果基本一致。这一结果说明,土荆芥挥发油对 RBCs 作用的物质除 ρ -对伞花素和 α -萜品烯外,还存在着其他的化感活性物质。由此可见,土荆芥通过挥发途径对蚕豆根系生长所产生的化感作用应该是包括 α -萜品烯和 ρ -对伞花素在内的多种化感活性物质协同作用的结果。后续研究尚需进一步挖掘主效化感物质。

3.2 ROS 和 NO 对土荆芥化感胁迫诱导蚕豆根边缘细胞凋亡的影响

细胞凋亡是一种在环境刺激下消除特定细胞的可控机制。当外界胁迫程度超过植物自身的承受范围时,植物就会以 ROS、NO 等作为信号分子,诱导植物特定部位发生程序性死亡,从而避免胁迫对其他组织的伤害,由此获得不良环境的适应^[29-30]。本研究结果表明,在土荆芥挥发油及其主要成分 α -萜品烯和 ρ -对伞花素化感作用下,蚕豆 RBCs 内 ROS 和 NO 水平均大幅度升高,且呈现浓度依赖效应,尤其是挥发油处理组的涨幅最为剧烈。另一方面,RBCs 却随着处理浓度的增大而死亡率逐渐增加。相关性分析表明, α -萜品烯和 ρ -对伞花素 2 个处理组中,RBCs 死亡率与 ROS 和 NO 水平呈极显著的相关性。挥发油处理组中,ROS 水平与 RBCs 死亡率和 NO 水平之间均存在着呈极显著的正相关性。通过施加 ROS 和 NO 的清除剂后,土荆芥挥发性化感

物质对蚕豆 RBCs 的致死效应得到显著缓解。综合上述结果可以说明,ROS 和 NO 参与了土荆芥化感胁迫诱导 RBCs 凋亡的信号调节过程。在逆境胁迫下,ROS 和 NO 同时产生,二者之间存在着复杂的互作关系^[31]。NO 可以作为一种抗氧化剂,在氧化应激过程中淬灭 ROS,减少膜脂过氧化^[32],而高浓度的 NO 能导致 ROS 爆发,诱导氧化损伤而引起细胞死亡^[33]。ROS 和 NO 协同作用触发了细胞快速死亡,是凋亡样细胞死亡和自噬细胞死亡的触发器^[34]。本研究结果表明,在 α -萜品烯处理组和挥发油处理组中,ROS 水平变化和 NO 水平变化之间具有极显著的关联性,表明二者协同作用调控了蚕豆根边缘细胞凋亡(图 12)。

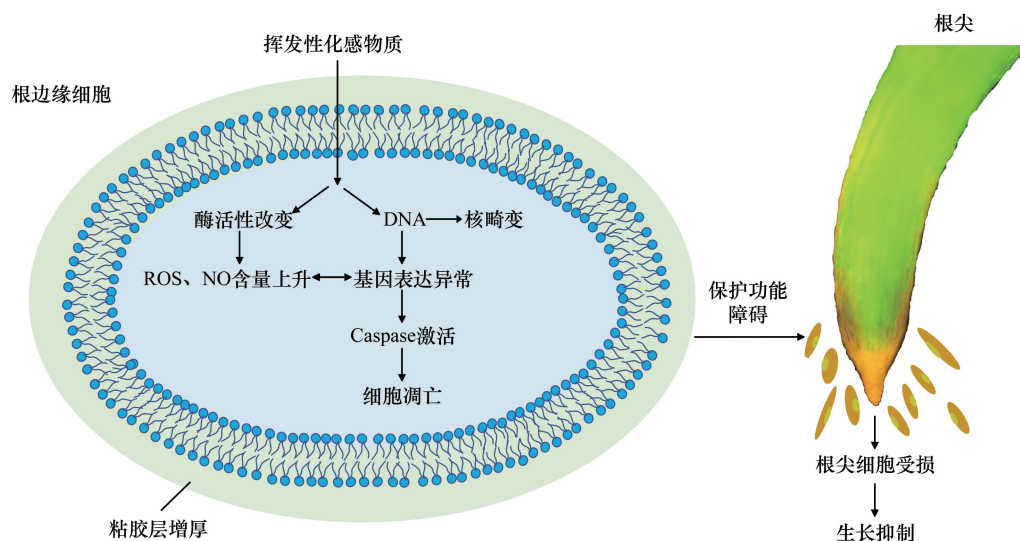


图 12 土荆芥挥发性化感物质对受体植物根生长的作用机制示意图

Fig.12 Schematic diagram of the mechanism of action of volatile allelochemicals from *C. ambrosioides* on the growth of recipient plant root

4 结论

土荆芥挥发油及其主要成分 α -萜品烯、 ρ -对伞花素具有较强的化感胁迫,导致蚕豆 RBCs 粘胶层厚度增加,细胞内 ROS 和 NO 水平升高,二者协同作用,诱导 RBCs 出现 Caspase 依赖性的细胞凋亡,导致受体植物防御功能障碍,影响植物根系发育。

参考文献 (References):

- [1] Callaway RM, Ridenour WM. Novel weapons: invasive success and the evolution of increased competitive ability. *Frontiers in Ecology & the Environment*, 2004, 2(8): 436-443.
- [2] Callaway RM, Waller LP, Diaconu A, Pal R, Collins AR, Mueller-Schaerer H, Maron JL. Escape from competition: Neighbors reduce *Centaurea stoebe* performance at home but not away. *Ecology*, 2011, 92(12): 2208-2213.
- [3] 马金虎, 杨文秀, 孙亮亮, 陈皓, 赵倩, 杨小环. 紫茎泽兰提取物对 3 种杂草的化感胁迫作用. *生态学报*, 2018, 38(10): 3514-3523.
- [4] Hawes MC, Gunawardena U, Miyasaka S, Zhao XW. The role of root border cells in plant defense. *Trends in Plant Science*, 2000, 5(3): 128-133.
- [5] Driouich A, Durand C, Vicié-Gibouin M. Formation and separation of root border cells. *Trends in Plant Science*, 2007, 12(1): 14-19.
- [6] Wen F, Curlangorivera G, Huskey DA, Xiong Z, Hawes MC. Visualization of extracellular DNA released during border cell separation from the root cap. *American Journal of Botany*, 2017, 104(7): 970-978.
- [7] 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.
- [8] Ma JH, Feng XX, Yang XH, Cao YH, Zhao WF, Sun LL. The leaf extract of crofton weed (*Eupatorium adenophorum*) inhibits primary root growth by inducing cell death in maize root border cells. *Plant Diversity*, 2020, 42(03): 174-180.

- [9] 张永平, 乔永旭. 苯甲酸对花生根边缘细胞发生的影响. 西南农业学报, 2014, 27(05): 1884-1888.
- [10] F.M.V.Z. Juan Jiménez-Osorio, Kumamoto J, Wasser C. Allelopathic activity of *Chenopodium ambrosioides* L.. Biochemical Systematics and Ecology, 1996, 24(3): 195-205.
- [11] 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: 52-79.
- [12] 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.
- [13] 黄素, 马丹炜, 鲁昕, 张红. 六种农作物叶保卫细胞形态特征对不同入侵地土荆芥挥发物胁迫的响应. 生态学报, 2019, 39(5): 1517-1527.
- [14] Wang YN, Hu ZL, Hao JM, Qian RH, Ren QR, Ma DW. Allelopathic effects of volatile oil and its two main components from *Chenopodium ambrosioides* L. on maize (*Zea mays*) root border cells. Allelopathy journal, 2019, 46(2): 377-387.
- [15] Chen B, Zhou J, Gou X, Ma DW, Wang YN. Volatiles from *Chenopodium ambrosioides* L. induce the oxidative damage in maize (*Zea mays* L.) radicles. Allelopathy Journal, 2016, 38(2): 171-181.
- [16] Li J, He YQ, Ma DW, He B, Wang YN, Chen B. Volatile allelochemicals of *Chenopodium ambrosioides* L. induced mitochondrion-mediated Ca^{2+} -dependent and Caspase-dependent apoptosis signaling pathways in receptor plant cells. Plant Soil, 2018, 425: 297-308.
- [17] Hancock JT, Whiteman M. Harnessing Evolutionary Toxins for Signaling: Reactive Oxygen Species, Nitric Oxide and Hydrogen Sulfide in Plant Cell Regulation. Frontiers in Plant Science, 2017, 8(S15): 189.
- [18] Singh HP, Kaur S, Mittal S, Batish DR, Kohli RK. 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] 杨小环, 杨文秀, 孙亮亮, 赵倩, 曹永恒, 马金虎. 外源 NO 缓解紫茎泽兰提取物对黄瓜根边缘细胞的化感胁迫. 应用生态学报, 2018, 29(01): 223-230.
- [20] Williamson GB, Richardson D. Bioassays for allelopathy: measuring treatment responses with independent controls. Journal of Chemical Ecology, 1988, 14(1): 181-187.
- [21] 申时才, 徐高峰, 张付斗, 金桂梅, 刘树芳, 杨艳鲜, 张玉华. 红薯叶片浸提液对 5 种主要农田杂草种子萌发及幼苗生长的化感作用. 生态学报, 2017, 37(06): 1931-1938.
- [22] Yu M, Shen R, Liu J, Chen R, Xu M, Yang Y, Xiao H, Wang H, Wang H, Wang C. The role of root border cells in aluminum resistance of pea (*Pisum sativum*) grown in mist culture. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 2009, 172(4): 528-534.
- [23] Qiao YX, Zhang YP, Zhang HX, Tian YQ, Gao LH. Developmental characteristics and cinnamic acid resistance of root border cells in cucumber and fig leaf gourd seedlings. Journal of Integrative Agriculture, 2013, 12(11): 2065-2073.
- [24] Liu Q, Li K, Guo X, Ma L, Guo Y, Liu Z. Developmental characteristics of grapevine seedlings root border cells and their response to p -hydroxybenzoic acid. Plant and Soil, 2019, 443: 199-218.
- [25] 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.
- [26] 何兵, 汪利沙, 王亚男, 张红, 李群, 马丹炜. 土荆芥挥发油对豌豆根边缘细胞的诱导和胁迫作用. 生态环境学报, 2013, 22(06): 991-995.
- [27] Alitonou G A, Sessou P, Tchobo FP, Noudogbessi JP, Sohounhloue K. Chemical composition and biological activities of essential oils of *Chenopodium ambrosioides* L. collected in two areas of Benin. International Journal of Biosciences, 2012, 2(8): 58-66.
- [28] 丁莹, 洪文秀, 左胜鹏. 外来植物土荆芥入侵的化学基础探讨. 中国农学通报, 2017, 33(31): 127-131.
- [29] Locato V, De LG. Programmed Cell Death in Plants: An Overview. Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.). 2018, 1743: 1-8.
- [30] Delledonne M, Murgia I, Ederle D, Sbicego PF, Biondani A, Polverari A, Lamb C. Reactive oxygen intermediates modulate nitric oxide signaling in the plant hypersensitive disease-resistance response. Plant Physiology and Biochemistry, 2002, 40(6): 605-610.
- [31] 刘锐涛, 张颖, 樊秀彩, 姜建福, 刘崇怀. 一氧化氮在植物抗病反应中的作用机制. 植物生理学报, 2020, 56(4): 625-634.
- [32] Hasanuzzaman M, Oku H, Nahar K, Bhuyan MHMB, Mahmud JA, Baluska F, Fujita M. Nitric oxide-induced salt stress tolerance in plants: ROS metabolism, signaling, and molecular interactions. Plant Biotechnology Reports, Plant Biotechnology Reports, 2018, 12(2): 77-92.
- [33] 付宝春, 魏爱丽, 翟晓燕, 曹冬梅, 张超, 段九菊, 王云山. NO、ROS 对 SO_2 诱导的万寿菊保卫细胞凋亡的调控. 环境科学学报, 2015, 35(7): 2289-2296.
- [34] Love AJ, Milner JJ, Sadanandom A. Timing is everything: regulatory overlap in plant cell death. Trends in Plant Science, 2008, 13(11): 589-595.