DOI: 10.20103/j.stxb.202304250870

龚意豫,谢媛怡,李玖一,马丹炜.根边缘细胞缓解土荆芥淋溶途径化感作用对苦荞麦代谢扰动的机制.生态学报,2024,44(6):2437-2451.

Gong Y Y, Xie Y Y,Li J Y, Ma D W.Mechanism of root border cells alleviate metabolic disturbance of *Fagopyrum tataricum* by the allelopathy of eluvial pathway from *Chenopodium ambrosioides*.Acta Ecologica Sinica,2024,44(6):2437-2451.

根边缘细胞缓解土荆芥淋溶途径化感作用对苦荞麦代谢扰动的机制

龚意豫,谢媛怡,李玖一,马丹炜*

四川师范大学生命科学学院,成都 610101

摘要:土荆芥(*Chenopodium ambrosioides*)可通过淋溶途径的化感作用抑制周围植物的种子萌发和幼苗生长,而根边缘细胞(Root border cells, RBCs)对此具有缓解效应。为探讨这一效应的分子机制,以苦荞麦(*Fagopyrum tataricum*)为研究对象,测定了在土荆芥水浸提液处理前及处理后,保留 RBC 组和移除 RBC 组根尖活性氧(ROS)、超氧阴离子(O_2^-)和丙二醛(MDA)含量以及抗氧化酶[超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)]活性的差异。再利用转录组测序分析上述处理对其代谢通路的影响,并进行 qRT-PCR 验证。结果表明:土荆芥水浸提液处理后,苦荞麦根尖 ROS、O_2^- 和 MDA 的含量以及抗氧化酶(POD 和 CAT)活性明显提高,且 RBC 移除组升高更多。通路分析表明,土荆芥水浸提液处理后,移除和保留 RBCs 组的苯丙素合成、α-亚麻酸代谢、类黄酮合成和谷胱甘肽代谢通路都显著发生改变。其中,苯丙素合成通路以抑制为主,且移除 RBCs 后受到抑制的程度更低;α-亚麻酸代谢通路中的甾酯水解酶(steryl ester hydrolase, TGL4)和磷脂酶 A1(phospholipase A1, DAD1)的表达量大幅上调,而在移除 RBCs 组则未见变化,TGL4 和 DAD1 负责将磷脂酰胆碱催化形成 α-亚麻酸,为抑制植物生长并提高抗性的茉莉酸(JA)提供丰富的底物。此外,与根部疏水性有关的角质、木栓质和蜡合成通路只在移除 RBCs 组显著改变。上述结果表明,根边缘细胞通过影响根尖抗逆物质合成(苯丙素通路)、抗氧化酶和非酶抗氧化系统(类黄酮和谷胱甘肽)和根部疏水性等方面,以及提高茉莉酸(JA)的表达,在生长和防御中寻找平衡,缓解土荆芥水溶性物质化感胁迫;土荆芥水溶性物质成分复杂,具体哪一种成分在其化感作用中扮演主效作用,尚待进一步研究确证。

关键词:土荆芥;化感作用;苦荞麦;根边缘细胞;代谢调控;转录组

Mechanism of root border cells alleviate metabolic disturbance of *Fagopyrum tataricum* by the allelopathy of eluvial pathway from *Chenopodium ambrosioides*

GONG Yiyu, XIE Yuanyi, LI Jiuyi, MA Danwei*

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

Abstract: Root border cells (RBCs) are a group of cells that exhibit distinct gene expression patterns. They are detached from the tips of plant roots and distributed into the soil environment. Similar to mammalian immunocytes, RBCs create barriers within plant roots, thereby playing a significant role in plant defense mechanisms. *Chenopodium ambrosioides*, an invasive plant, exerts a substantial impact on neighboring plants, altering their morphology, physiology, and gene expression. The aqueous extract of *C. ambrosioides* inhibits the germination of seeds and growth of seedlings in *Fagopyrum tataricum*, whereas the root border cells alleviate the adverse effects of allelochemical stress. To investigate the molecular mechanism underlying this mitigating effect, we examined the changes in the levels of reactive oxygen species (ROS), superoxide anion (O_2^-), and malondialdehyde (MDA), as well as the activity of antioxidant enzymes (Superoxide

基金项目:国家自然基金面上项目(31971555)

收稿日期:2023-04-25; **网络出版日期**:2023-12-22

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

dismutase, SOD; Peroxidase, POD; Catalase, CAT), in the group with preserved root border cells and the group with removed root border cells, following treatment with aqueous extracts of *C. ambrosioides*. The results demonstrated that treatment with the aqueous extract of *C. ambrosioides* significantly increased the levels of the ROS, O^2, MDA, and the activities of antioxidant enzymes (POD and CAT) in root tips of *Fagopyrum tataricum*. The RBC-removing group exhibited a higher increase compared to the RBC-preserving group. Pathway analysis revealed the notable alterations in phenylpropanoid synthesis, alpha-linolenic acid metabolism, flavonoid synthesis, and glutathione metabolism in both the RBC-preserving and RBC-removing groups following treatment with the aqueous extract of *C. ambrosioides*. Specifically, the phenylpropanoid synthesis pathway was primarily suppressed, with a less degree of inhibition observed after removing RBCs. The expression levels of steryl ester hydrolase (*TGLA*) and phospholipase A1 (*DAD*1) in the alpha-linolenic acid metabolism pathway were significantly upregulated, while no changes were observed in the RBC-removing group. *TGLA* and *DAD*1 were responsible for catalyzing the conversion of phospholipid choline into alpha-linolenic acid, which provided abundant substrates for inhibiting plant growth and enhancing resistance to jasmonic acid (JA). Moreover, the synthesis pathways associated with cutin, suberin, and wax, which contributed to root hydrophobicity, were significantly altered exclusively in the RBC-removing group. These findings suggest that root border cells strive to achieve a balance between growth and defense by influencing the synthesis of stress-resistant substances (phenylpropanoid pathway), antioxidant enzymes, and non-enzymatic antioxidant systems (flavonoids and glutathione), while also enhancing the expression of JA. This, in turn, helps mitigate the allelopathic stress caused by water-soluble substances of *C. ambrosioides*. Finally, the composition of the aqueous extracts was complex and the component plays a major role in the allelopathy is still to be confirmed by further research.

Key Words: *Chenopodium ambrosioides*; allelopathy; *Fagopyrum tataricum*; root border cells; metabolic regulation; transcriptome

苦荞麦(*Fagopyrum tataricum*)比普通荞麦具有更显著的抗氧化、抗炎和抗肿瘤作用,其体内芦丁含量约是普通荞麦的 5 倍,酚类物质含量是普通荞麦的 50 倍以上[1—2]。苦荞麦目前主要分布在亚洲、美洲和欧洲,全球苦荞麦产量不断增长[3]。近年来,苦荞麦在中国的种植面积逐年扩大,但苦荞麦农田生态系统深受恶性杂草的危害。土荆芥(*Chenopodium ambrosioides*)原产于热带美洲,是一种世界性的恶性杂草,已经扩散至中国华东、中南、西南等省份的农田生态系统中[4],与苦荞麦存在空间、阳光、水分、营养物质的竞争关系。化感作用被认为是外来物种成功入侵新生境,快速适应和扩散的重要因素之一[5]。土荆芥在扩张过程中,通过挥发、淋溶、分泌、腐解等方式向外界释放化感物质[6],水溶性化感物质容易在雨水冲淋下进入土壤,受体植物根部首当其冲受到其化感胁迫。因此,揭示土荆芥水溶性化感物质化感效应的分子机制,对了解苦荞麦抵御其化感胁迫的机制具有重要意义。目前对土荆芥挥发物研究较多[7—9],土荆芥挥发物属于脂溶性化感物质,与水溶性化感物质的穿膜机制不同,由此推测二者的化感潜力和化感机制可能并不完全相同。植物的存活取决于根尖感知土壤中的水和其他养分并向其移动的能力,根尖分生组织分裂活动旺盛,最易受到外界环境影响,由根冠释放的根边缘细胞(root border cells,RBCs)形成一个根细胞外屏障充当抵御生物和非生物胁迫的第一道防线[10—11],但 RBCs 是否缓解土荆芥水溶性化感物质的胁迫及其机制尚不清楚。基于此问题,本研究以土荆芥水浸提液为供体,测定保留根边缘细胞组和移除根边缘细胞组中苦荞麦根长、根尖细胞活性、ROS、O_2^-、MDA 和抗氧化酶活性的改变,运用 mRNA-seq 技术研究了两个比较组中苦荞麦根尖潜在响应化感胁迫的共同代谢通路和差异代谢通路,以及共同代谢通路中的关键基因在两个比较组中的表达模式差异,并进行 qRT-PCR 验证基因的表达变化。旨在解析土荆芥水溶性化感物质化感作用的分子生态过程,揭示苦荞麦 RBCs 对土荆芥水溶性化感物质抵御的分子机制,为“新武器”假说提供理论依据。

1　试验材料与方法

1.1　材料

苦荞麦种子和土荆芥均采集自四川省凉山彝族自治州冕宁县,采集地地理坐标 E101°55′53.04″,N28°19′14.17″,海拔 1980 m,年降水量 1150 mm,年最高温度 20℃,年最低温度 10℃;挑选出大小一致、颗粒饱满的苦荞麦种子,0.5% $KMnO_4$灭菌 20 min 后,蒸馏水中吸胀 24 h 备用;生殖期土荆芥地上部分采集于苦荞麦开花时期的农田,在自然条件下阴干,剪成 2—3 cm 小段备用。

1.2　土荆芥水浸液制备和成分分析

1.2.1　水浸提液制备

将 30 g 土荆芥材料用 300 mL 蒸馏水(1∶10)浸泡在锥形瓶中,置于 25℃和 130 r/min 下摇床振荡 48 h 后,用 4 层纱布过滤 2 次,抽滤 2 次,得到 0.10 g/mL 的水浸提物母液。试验时用蒸馏水稀释成 0.01、0.02、0.03、0.04 g/ml 和 0.05 g/ml 作为处理液。

1.2.2　水浸液成分测定

将 1.2.1 制备的杂草水浸提物母液用 0.45 μm 的滤膜过滤,在旋转蒸发仪上 60℃的水浴中进行减压旋干,并用冷冻干燥仪去除水分后分为两组:

第 1 组:用甲醇萃取,取 1.5 mL 水浸提物置于烧杯中,加入 8 mL 甲醇溶液,倒入分液漏斗中,摇晃静置分层,下层浑浊液从下口放出,上层萃取液从上口倒出,再在下层浑浊液中加入 6 mL 甲醇溶液再次倒入分液漏斗,二次萃取,重复上述步骤,总计萃取 3 次。将 3 次萃取液置于 60℃的水浴锅中进行减压旋干。旋干后向圆底烧瓶中加入 2 mL 甲醇溶液溶解转移到试剂瓶中备用。

第 2 组:用乙酸乙酯和正丁醇萃取,实验操作步骤与第 1 组相同。在乙酸乙酯 3 次萃取液中,加入 8 mL 正丁醇溶液重复上述步骤,萃取 3 次,3 次所得的萃取液置于 60℃的水浴锅中进行减压旋干。旋干后向圆底烧瓶中加入 2 mL 正丁醇溶液溶解转移到试剂瓶中备用。

用气相色谱-质谱联用仪(GC-MS 安捷伦 7890B)检测土荆芥水浸提物成分。色谱柱为 HP-5MS 毛细管柱,载气为氦气(99.99%),柱流量为 1 mL/min,压力 28.8 kPa,进样口温度为 250℃,分流比为 50∶1。起始温度 50℃,保持 1 min,升温速率为以 5℃/min,升温到 230℃保持 5 min,再以 8℃/min 的升温速率,升温到 280℃,然后保持至成分完成分析。EI 源:电子能量 70 eV,接口温度 280℃,离子源温度 230℃,四极杆温度 180℃,溶剂延迟 2.5 min,全扫描采集模式,质量范围 m/z 50—550 amu,扫描间隔 0.5 s,倍增器电压 1200 V。通过面积归一法对鉴定样品进行分析,检索数据库为 NIST 08 MS library and AMDIS。

1.3　种子萌发和幼根生长试验

种子萌发试验:在铺有两层滤纸的培养皿中均匀放入 30 粒吸胀的苦荞麦种子,分别用 5 mL 不同浓度(0.01、0.02、0.03、0.04 g/mL 和 0.05 g/mL)的土荆芥水浸提液处理,以 5 mL 蒸馏水处理作为对照组,之后每 6 h向培养皿中补充适量蒸馏水以保持处理液体积恒定,每处理重复 5 次。所有处理置于 25℃培养箱中暗培养。连续 5 d 记录萌发数,计算发芽率(GR):$GR = n/N \times 100\%$,式中,n 为发芽数,N 为种子总数。

幼根生长试验:每个培养皿中均匀放入 10 粒种子,按照种子萌发试验处理,第 5 d 测量根长,计算根长抑制率(IP):$IP = [1-(L_E/L_C)]\times 100\%$,式中,$L_E$为处理组的根长,$L_C$为对照组的根长。

0.05 g/mL 的水浸提液处理下根生长抑制率和根形态变化最大,后续试验使用该浓度的水浸提液处理。

1.4　根边缘细胞移除试验

1.4.1　试验设计

配制 0.8%纯琼脂培养基,分装到玻璃培养瓶中(高 90 mm,直径 68 mm)中,每瓶 30 mL,121℃灭菌 20 min,备用。将苦荞麦种子铺在垫有湿润纱布的瓷盘中置于 25℃培养箱中,待种子露白后,将胚根朝外插入纯琼脂培养基中,旋紧瓶盖,在 25℃暗培养箱中悬空气法倒置培养[12]。当根长为 5 mm 时,随机分为 2 组,第

1 组向根部每隔 2 h 喷施 0.05 g/mL 土荆芥水浸提液,以蒸馏水为对照,持续处理 24 h;第 2 组参照 Brigham 等[13]的方法略有改动,即每隔 2 h 将根尖浸入蒸馏水 2 min,再用湿润滤纸轻轻拭去可能残留的 RBCs 后,显微镜下检查根尖去除 RBCs 的情况,获得移除根边缘细胞的根尖,其他操作与第 1 组一致。保留 RBCs 和移除 RBCs 的对照组分别记为 CKW 和 CKN,处理组分别记为 CAW 和 CAN,每处理 3 个重复。处理结束后,用 ddH_2O_2 清洗 3 次,再用 75%乙醇消毒,分为两部分,一部分用于测定指标参数,另一部分迅速在液氮中速冻送样进行转录组学分析。

1.4.2 根长及根尖活性测定

根长的测定:用直尺测量各组的苦荞麦根长。

根尖活性测定:将各组根尖置于载玻片上,用 AO/EB 染液避光染色 2 min,在 Nikon ECLIPSE 55i 荧光显微镜下观察并拍照。

1.4.3 ROS、O_2^- 和 MDA 测定

ROS 原位观察及含量测定:将根尖用 10 μmol/L 的 2′,7′-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA),37℃避光染色 30 min[14],再用 PBS 缓冲液将根尖残留的 DCFH-DA 洗净,在 Nikon ECLIPSE 55i 荧光显微镜的蓝色激发光下观察并拍照,用 Image proplus 6.0 测定每个根尖 ROS 的染色强度。每处理重复 5 次。

O_2^- 原位观察及含量测定:将根尖用 2 mmol/L 的硝基蓝四唑(NBT)染色 15 min 后,用蒸馏水洗净根尖残留染液[15],在 Nikon ECLIPSE 55i 荧光显微镜明场下观察并拍照,用 Image proplus 6.0 定量根尖 O_2^- 的染色强度。每处理重复 5 次。

MDA 含量测定:每处理称取长度为 5 mm 苦荞麦根尖约 0.1 g,加入 2 mL TCA(三氯乙酸)和少量石英砂,研磨至匀浆,再加入 4 mL TCA 进一步研磨,在 4000 r/min 离心 10 min,上清液为 MDA 提取液。采用硫代巴比妥酸(TBA)法测定 MDA 含量[16]。每处理重复 5 次。

1.4.4 抗氧化酶活性测定

处理结束后,用蒸馏水洗净根上的残留处理液,剪取 5 mm 长的苦荞麦根尖,每处理称取 0.5 g。加 5 mL 预冷 PBS 缓冲液在冰浴上研磨,在 4℃条件下 10000 r/min 离心 20 min,上清液为粗酶液。采用氮蓝四唑(NBT)光化还原法测定超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase,SOD)活性[17];愈创木酚法测定过氧化物酶(Peroxidase,POD)活性[18];比色法测定过氧化氢酶(Catalase,CAT)活性[19]。每处理重复 5 次。

1.4.5 转录组学分析

RNA 提取、建库测序:将 12 个苦荞麦根样品(CAW 1-3,CAN 1-3,CKW 1-3,CKN 1-3)用于 RNA 测序。用标准提取法从 Trizol 液中提取苦荞麦根尖总 RNA,检测 RNA 的质量和浓度合格后,用带有 Oligo(dT)的磁珠富集 mRNA。随后加入 fragmentation buffer 将 mRNA 随机打断。以 mRNA 为模板,用六碱基随机引物(random hexamers)合成 cDNA 第一链,然后加入缓冲液、dNTPs 和 DNA polymeraseI 合成 cDNA 第二链,随后利用 AMPure XP beads 纯化双链 cDNA。纯化的双链 cDNA 再进行末端修复、加 A 尾并连接测序接头,然后用 AMPure XP beads 进行片段大小选择,最后进行 PCR 富集得到最终的 cDNA 文库。在 Illumina HiSeq 4000 平台上对 12 个文库进行测序得到 raw reads,对 raw reads 进行过滤质控得到 clean reads。

与参考基因组比对及差异基因的筛选:使用 Hisat2(v2.0.5)将 clean reads 与苦荞麦高质量参考基因组进行比对,使用 Feature Counts v1.5.0-p3 来计算每个基因在各样本中的表达量 FPKM 值,使用 DESeq2(1.16.1)进行差异基因(DEGs)表达分析,将 padj<0.05 & |log2foldchange|>1 作为差异显著性标准。

功能标注和分类:使用 Gene Ontology(GO, http://www.geneontology.org)网站确定 DEGs 相关的生物过程、分子功能和细胞组分信息。使用 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG,http://www.kegg.jp)确定 DEGs 参与的生物学通路。使用 R 包 clusterProfiler 软件对 DEGs 进行 GO 和 KEGG 富集分析。

以上由上海中科新生命生物科技有限公司完成。

实时定量 PCR(qRT-PCR):取各组的根尖,使用植物 RNA 提取试剂盒(翌圣,上海)提取 RNA。使用 5 X

HiScript III qRT SuperMix(诺唯赞,南京)和 2 μg RNA 进行逆转录。所得 cDNA 用于 qRT-PCR。使用 NCBI 网址设计查尔酮酶(CHS)、脂氧合酶(LOX2S)、丙二烯氧化物合酶(AOS)、丙二烯氧化物环化酶(AOC)、谷胱甘肽转移酶(GST)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)和谷胱甘肽还原酶(GSR)等的特异性引物序列(表 1)。在 CFX Connect Real-Time Systemq PCR 仪器中设置扩增过程:95℃预变性 30 s;随后 95℃变性 10 s、60℃退火 30 s;此步骤循环 40 次。且将样品储存在 4℃下。将 FtH3 基因作为参照。使用 2−ΔΔCT 法计算所选基因的相对表达水平。

表 1　基因引物序列

Table 1　Sequence of gene primer

基因 Gene	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
AOC	GGGACCGTTATGAGGCTGTT	TTGTACGGATACGCCACGTT
AOS1	ATTCTGCGCGTTTCGTCCTA	ACTTCTCCGTTCACCGACAC
AOS2	GAGAATTGGGGCGAGTTGGA	AGCTGAACTCAACGGTCCAG
CAD	CACATGGCCGTCAAGTTTGG	ATCAGCCCCAAGCAAAGTGA
CCR	ACGCTTGCAGGCCTTACATA	TTGTATGGCTTGGCTCTCGG
CHS1	TTGGATCGAAATGGCACCGA	TCAAGTCGGTCATGTGGTCG
CHS2	TCAAGTCGGTCATGTGGTCG	TTGGATCGAAATGGCACCGA
CYP73A1	TCCTCCCACCTAACCCGATT	CGCAAAAGACGTGCTCCAAA
CYP73A2	ATTCAACGCCCTAAGCCGAA	GGCGCGTATGGTTGAGGATA
DAD1	CACTCCATACACGTGGCAGT	TGGCAGATGGGCAACAGTAG
FAR	AGTTCTGACCGTGAATCCGT	ATGGTGTCGAACAACCAACG
GPX	CAAATCGAGCAAAGGCGGAC	TGCTGGAAGGGGAAGTTGTG
GSR	CAATAGCACCCATACCACGC	CGTGCTGTGATTTTTGGGGG
GST2	TACAACCCCGCGATTTCACA	GAGGCAATGTAGATCCGCCA
GST3	ATCACGTTACACCCCGCTTT	CGAAGCTCCACTCGCTGTTA
HHT1	GAGCTCGGACGTGTTTGAGA	TAGCAGCCATGGAGTTCGTC
LOX2S	TGCCCCTTATGTGTCCGATG	AGCGCCGGAGTAACTTGATG
TGL4	AATCTCCTCTCAGCCCTGGT	TTCACACGGTTTTCGGTTGC
FtH3	GAAATTCGCAAGTACCAGAAGAG	CCAACAAGGTATGCCTCAGC

1.5　统计与分析

使用 R(v.4.1.3)对种子发芽率、根长、根长抑制率、ROS、O_2^-、MDA 含量和抗氧化酶活性进行 *t*-检验,使用 R 包 Pheatmap 对 FPKM>5 的差异基因聚类分析,使用 Microsoft Excel 2019 对 qRT-PCR 和 RNA-seq 结果是否相符,进行线性回归分析。

2　结果与分析

2.1　土荆芥水浸提液的成分

土荆芥水浸提物经过甲醇、乙酸乙酯、正丁醇萃取后,分别检测到 29 种、68 种、19 种物质。表 2 列出了部分相对含量大于 1%的物质。

2.2　土荆芥水浸提液对苦荞麦种子萌发和生长的抑制效应

苦荞麦种子发芽率随着土荆芥水浸提液浓度的升高而降低(图 1)。其中,0.01 g/mL 水浸提液几乎对苦荞麦的发芽率没有影响。其余处理浓度均显著抑制了苦荞麦的种子萌发(P<0.05),当土荆芥水浸提液浓度达到 0.05 g/mL 时,苦荞麦种子发芽率最低(38.67%);在不同浓度土荆芥水浸提液作用下,苦荞麦根均受到不同程度的损伤,出现变粗、变黄甚至腐烂的现象,且随着水浸提液浓度升高,苦荞麦根长变短,与对照存在显著差异(P<0.05)(图 2)。其中 0.05 g/mL 的水浸提液对苦荞麦发芽和根长的抑制作用最大,故后续试验使用

0.05 g/mL 的土荆芥水浸提液。

表 2 土荆芥水浸提液在三种不同溶剂中的相对含量/%

Table 2 Relative Content (%) of Aqueous Extract of *Chenopodium ambrosioides* in Three Different Solvents

甲醛溶剂 Methyl alcohol	乙酸乙酯溶剂 Ethyl acetate	正丁醇溶剂 N-butyl alcohol
4-羟基-4-甲基环己酮(25.11)	4-羟基-4-甲基环己酮(17.00)	丁酸丁酯(27.24)
反式阿卡利多乙二醇(15.28)	2-氨基-3,5-二氢-4H-咪唑-4-酮(13.02)	丁酸异丁酯(24.57)
2,5-二甲基-3-己炔-2,5-二醇(8.69)	2-壬酮邻甲基肟(12.08)	异丁酸辛酯(10.83)
反式-2,3-环氧癸烷(5.23)	7-甲基-5-辛烯-4-酮(10.48)	2,5-二甲氧基-2,5-二氢呋喃(6.93)
山梨酸(3.81)	反式阿卡利多乙二醇(9.41)	4-羟基-4-甲基环己酮(5.86)
硼烷-三甲胺络合物(3.07)	己酸 4-十六烷基酯(6.80)	丙烷 2-甲基-1,1-双(2-甲基丙氧基)(4.18)
丙酮二甲腙(2.44)	异薄荷醇(6.16)	异丁酸丁酯(3.12)
8-溴-2-氧代八氢唑啉(1.81)	(3-氧代-1-丁烯基)-4-羟基-3,5,6-三甲基-2-环己烯-1-酮(3.56)	5-丁基二氢-4-甲基-2(3H)-呋喃酮(2.69)
八氢-8a-羟基-(2H)-萘酮(1.57)	2-甲基戊酸酐(1.85)	2-壬酮,邻甲基肟(2.51)
1,1,3-三甲基-1-硅环-3-戊烯(1.15)	2-(1-丙烯-2-基)噻吩(1.37)	反式阿卡利多乙二醇(1.67)

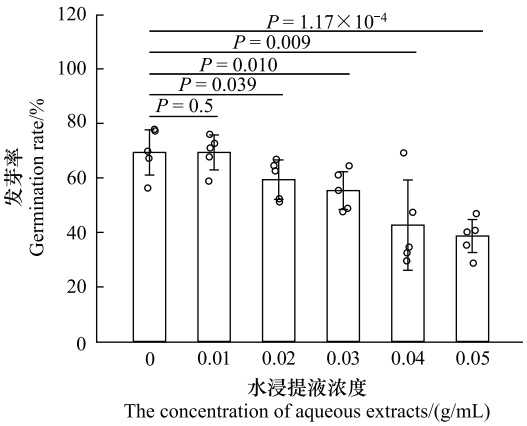

图 1 土荆芥水浸提液对苦荞麦种子发芽的影响

Fig.1 Effects of the aqueous extract of *Chenopodium ambrosioides* on germination of *Fagopyrum tataricum* seeds

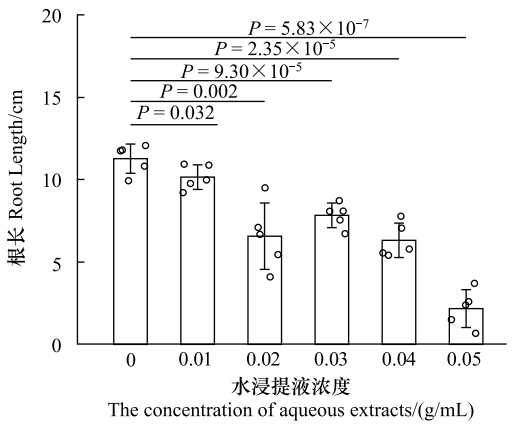

图 2 土荆芥水浸提液对苦荞麦种子根长的影响

Fig.2 Effects of the aqueous extract of *Chenopodium ambrosioides* on rooting of *Fagopyrum tataricum* seeds

在 0.05 g/mL 土荆芥水浸提液作用下,保留 RBCs 组中 CAW 相比 CKW,其根长抑制率是 54.96%,去除 RBCs 组中 CAN 相比 CKN 的根长抑制率是 69.49%,可见去除 RBCs 后苦荞麦根长生长对土荆芥化感胁迫更加敏感(图 3)。根据根尖细胞 AO/EB 染色观察(图 4)发现,苦荞麦根尖细胞活性表现为 CKW>CKN,CAW>CAN。与保留 RBCs 的苦荞麦根尖相比,在土荆芥水浸提液作用下,移除 RBCs 的苦荞麦根尖活性更低,表明 RBCs 对苦荞麦根尖具有一定的保护作用。

2.3 土荆芥水浸提液作用下根边缘细胞对苦荞麦根尖抗氧化系统的影响

在 0.05 g/mL 土荆芥水浸提液胁迫下,保留 RBCs 组中 CAW 的 ROS、O_2^-、MDA 水平分别是 CKW 的 1.30、1.59 倍和 4.01 倍,去除 RBCs 组中 CAN 的 ROS、O_2^-、MDA 水平是 CKN 的 1.40、1.85 倍和 5.12 倍。在保留 RBCs 组中 CAW 的 SOD、POD、CAT 水平分别是 CKW 的 2.56、3.10 倍和 1.88 倍,去除 RBCs 组中 CAN 的 SOD、POD、CAT 水平是 CKN 的 1.83、3.47 倍和 2.42 倍(图 5—10)。表明土荆芥水浸提液干扰了苦荞麦根尖的抗氧化系统,移除 RBCs 后受扰动程度更大。

2.4　转录组学分析结果

2.4.1　RNA 测序

通过 RNA 测序分析在土荆芥水浸提液处理下苦荞麦根尖转录组变化。从 12 个文库中获得了 803242424 raw reads,其中去除 raw reads 中的接头序列、过滤掉低质量 reads 和 N 后,CAW、CAN、CKW、CKN 获得平均 clean reads 分别为 62688671、60040278、77931373 和 62176320。所有样本中平均 Q30(每位碱基测序错误率为 1/1000)超过 93%。使用 HISAT2 软件将 clean reads 与参考基因组进行序列比对,CAW、CAN、CKW 和 CKN 平均有 94.70%、95.00%、94.23%和 94.17%的 reads 匹配到参考基因组。

2.4.2　土荆芥水浸提液作用下根边缘细胞对苦荞麦根尖表达谱的影响

仅使用 FPKM>5 的基因进行 log2 换算后,使用 R 包 Pheatmap 聚类分析 CAW_vs_CKW 和 CAN_vs_CKN 组内的基因表达关系(图 11),两个组内的处理和对照之间差异很大。转录本与参考基因组匹配得到 36663 个基因,筛选出各比较组中满足 $|\log_2 FC|>1$ 且 $P_{adj}<0.05$的差异基因用于后续的一系列分析。CA 和 CK 之间转录本丰度的比较显示 4579 个基因在 CAW_vs_CKW 组中差异表达,其中 2607 个基因上调,1972 个基因下调;CAN_vs_CKN 组中有 945 个基因差异表达,其中 273 个基因被上调,672 个基因被下调。土荆芥水浸提液处理后,有 493 个基因在 CAW_vs_CKW 和 CAN_vs_CKN 中均差异表达。表明这些基因在苦荞麦响应化感物质胁迫时发挥重要作用。

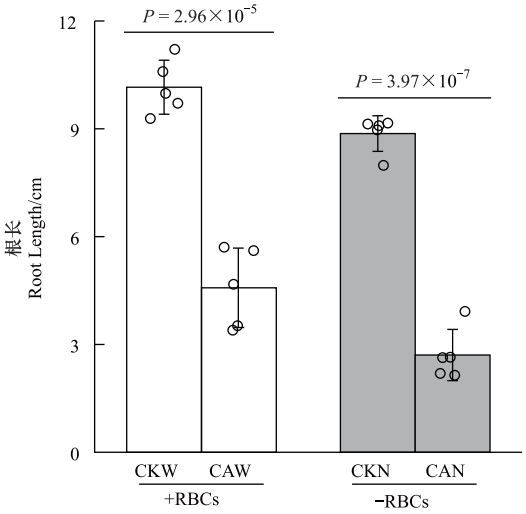

图 3　土荆芥水浸提液作用下根边缘细胞对苦荞麦根长的影响

Fig.3　Effects of root border cells on root length of *Fagopyrum tataricum* exposed to aqueous extracts of *Chenopodium ambrosioides*

+RBCs:保留根边缘细胞;−RBCs:去除根边缘细胞,CKW 和 CAW 分别为保留根边缘细胞处理组的对照和处理,CKN 和 CAN 分别表示移除根边缘细胞处理组的对照和处理

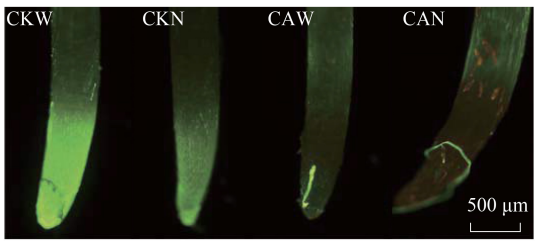

图 4　土荆芥水浸提液作用下根边缘细胞对根尖细胞活性的影响

Fig.4　Effects of root border cells on root tip cell activity of *Fagopyrum tataricum* exposed to aqueous extracts of *Chenopodium ambrosioides*

2.4.3　土荆芥水浸提液特异诱导差异基因富集的 KEGG 通路

为了鉴定苦荞麦 RBCs 缓解土荆芥化感胁迫的关键信号通路,使用 KEGG 数据库对 CAW_vs_CKW 与 CAN_vs_CKN 两组分析。保留 RBCs 组中共有 577 个差异基因分别富集在苯丙素生物合成、谷胱甘肽代谢、植物激素信号转导、细胞色素 p450 对异生素代谢、色氨酸代谢、淀粉和蔗糖代谢等 28 条代谢通路中。移除 RBCs 组中共有 200 个差异基因分别富集在苯丙素生物合成、细胞色素 p450 对异生素代谢、谷胱甘肽代谢、类黄酮生物合成、α-亚麻酸代谢等 14 条代谢通路中。其中,苯丙素生物合成、谷胱甘肽代谢、细胞色素 p450 对异生素代谢、二萜生物合成、芪类、二芳基庚烷类和姜酚的生物合成、类黄酮生物合成和 α-亚麻酸代谢等 7 条通路在保留/去除 RBCs 组中都显著富集(图 12—13)。CAW_vs_CKW 与 CAN_vs_CKN 两组各通路具体差异基因数目见(表 3)。

(1)苯丙素生物合成

土荆芥水浸提液干扰了苦荞麦的苯丙素生物合成途径。在 CAW_vs_CKW 中,参与该通路的基因有 53 个,其中 37 个下调,16 个上调;在 CAN_vs_CKN 中,参与该通路的基因有 22 个,其中 11 个下调,11 个上调。

可见 RBCs 存在时,苦荞麦能调控更多苯丙素合成通路的基因以响应土荆芥化感胁迫,但是大部分基因表达被下调。苯丙素生物合成起始于苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)、肉桂酸 4-羟化酶(cinnamate 4-hydroxylase, C4H)和 4-香豆酰辅酶 a 连接酶(4-coumarate-CoA ligase, 4CL)催化的 3 个反应。PAL 在 CAW_vs_CKW 和 CAN_vs_CKN 两组中差异都不显著($P > 0.05$);C4H 在两组中均差异表达($P < 0.05$),处理组分别降低为对照组的 0.52 倍和 0.58 倍;4CL 在 CAW_vs_CKW 中出现差异表达而在 CAN_vs_CKN 中差异不具显著性,其中 4CL1、4CL2 表达量在 CAW_vs_CKW 中处理组分别为对照组的 1.51 倍和 0.58 倍(图 14)。苯丙素生物合成途径会产生大量次生代谢产物,如黄酮类,二萜类,芪类、二芳基庚烷类和姜酚等,在土荆芥水浸提液作用下,苦荞麦合成这些物质的基因也出现了不同程度的差异表达。

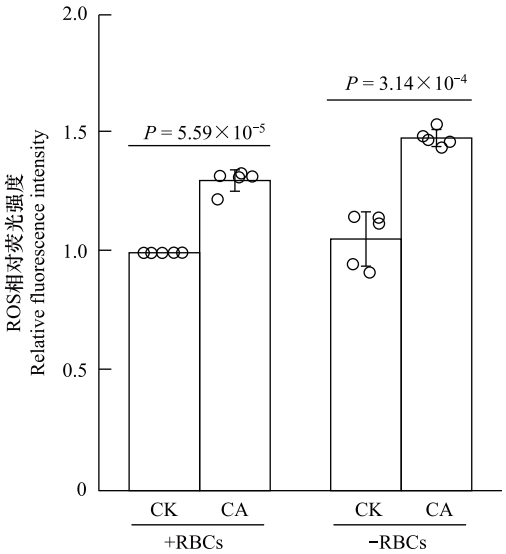

图 5 土荆芥水浸提液作用下苦荞麦幼根 ROS 含量的变化

Fig.5 Changes of contents of ROS in root of *Fagopyrum tataricum* exposed to aqueous extracts of *Chenopodium ambrosioides*

ROS:reactive oxygen species,活性氧

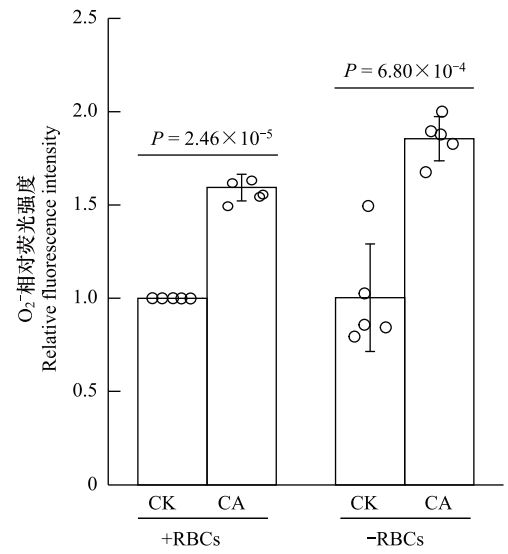

图 6 土荆芥水浸提液作用下苦荞麦幼根 O_2^- 含量的变化

Fig.6 Changes of contents of O_2^- in root of *Fagopyrum tataricum* exposed to aqueous extracts of *Chenopodium ambrosioides*

O_2^-:超氧阴离子

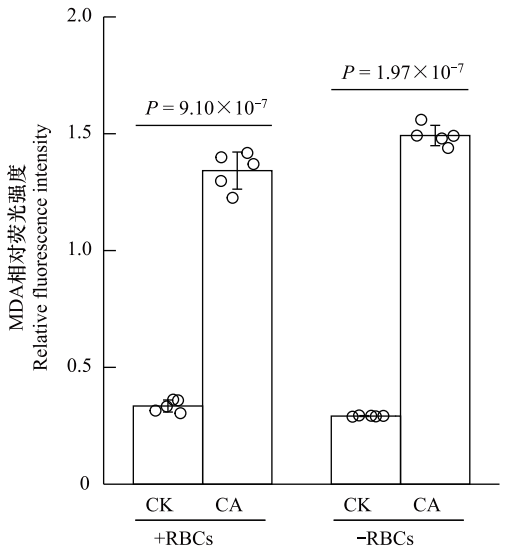

图 7 土荆芥水浸提液作用下苦荞麦幼根 MDA 含量的变化

Fig.7 Changes of contents of MDA in root of *Fagopyrum tataricum* exposed to aqueous extracts of *Chenopodium ambrosioides*

MDA:丙二醛 Malondialdehyde

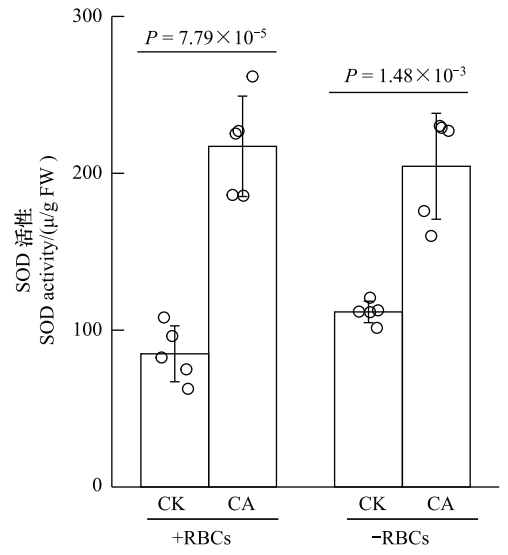

图 8 土荆芥水浸提液作用下苦荞麦幼根 SOD 活性的变化

Fig.8 Changes of activities of SOD in root of *Fagopyrum tataricum* exposed to aqueous extracts of *Chenopodium ambrosioides*

SOD:超氧化物歧化酶 Superoxide dismutase

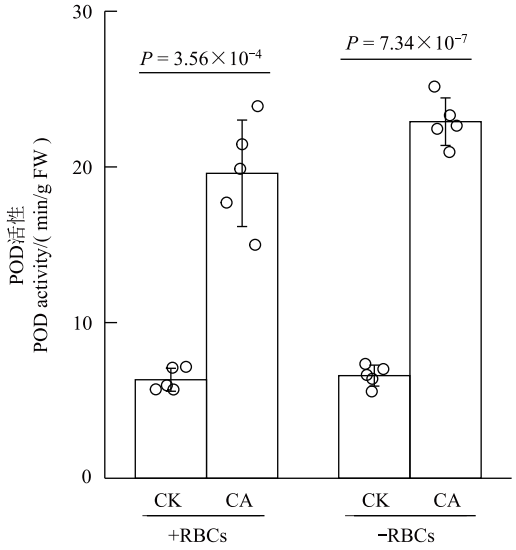

图 9　土荆芥水浸提液作用下苦荞麦幼根 POD 活性的变化

Fig.9　Changes of activities of POD in root of *Fagopyrum tataricum* exposed to aqueous extracts of *Chenopodium ambrosioides*

POD:过氧化物酶 Peroxidase

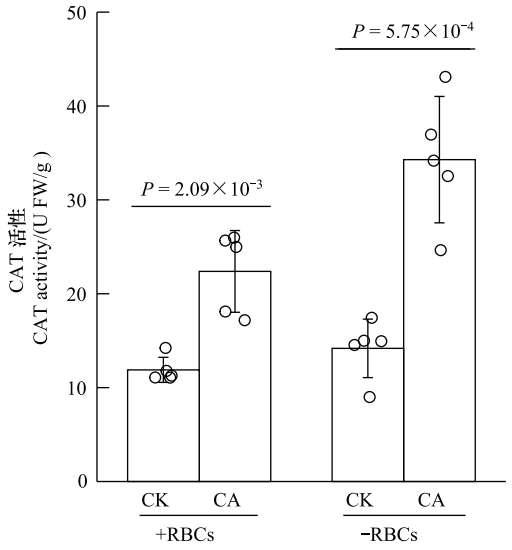

图 10　土荆芥水浸提液作用下苦荞麦幼根 CAT 活性的变化

Fig.10　Changes of activities of CAT in root of *Fagopyrum tataricum* exposed to aqueous extracts of *Chenopodium ambrosioides*

CAT:过氧化氢酶 Catalase

在苯丙素合成途径提供一系列酚酸物质的基础上,查尔酮酶(chalcone synthase, CHS)的合成标志着黄酮类合成途径的开始。CAW_vs_CKW 中,处理组 CHS 的表达下降到 0.21 倍。CAN_vs_CKN 中,处理组 CHS 的表达上调 1.15 倍;芪类、二芳基庚烷类和姜酚合成通路的起始酶反式肉桂酸 4-单加氧酶(trans-cinnamate 4-monooxygenase, CYP73A)在 CAW_vs_CKW、CAN_vs_CKN 中的表达量分别降低到对照组的 0.08 倍和 0.48 倍(图 14)。

(2)α-亚麻酸代谢

图 14 显示,在 CAW_vs_CKW 中,处理组的甾酯水解酶(steryl ester hydrolase, TGL4)和磷脂酶 A1(phospholipase A1, DAD1)的表达量相比对照分别上调了 2.29 倍和 7.80 倍,而在 CAN_vs_CKN 中则无显著变化。此外,由脂氧合酶(lipoxygenase, LOX2S)、丙二烯氧化物合酶(hydroperoxide dehydratase,AOS)、丙二烯氧化物环化酶(allene oxide cyclase, AOC)和 12-氧代-植物二烯酸还原酶(12-oxophytodienoic acid reductase, OPR3)催化的连续反应在茉莉酸合成途径中发挥至关重要的作用,这些基因在 CAW_vs_CKW 和 CAN_vs_CKN 中表达量都出现动态变化。

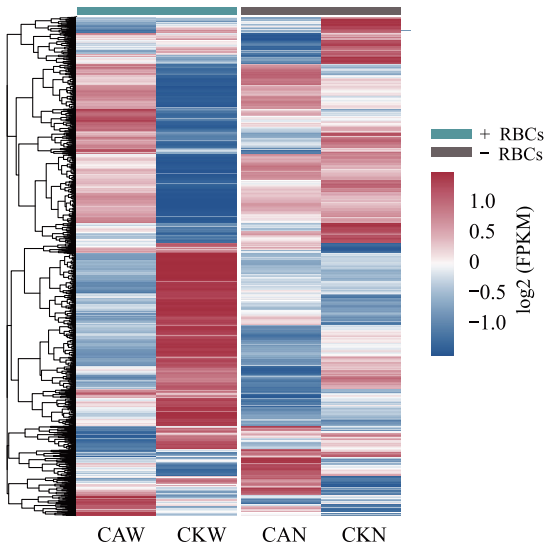

图 11　土荆芥水浸提液处理下苦荞麦根差异表达基因的层次聚类图

Fig.11　Hierarchical clustering diagram of differentially expressed genes in root of *Fagopyrum tataricum* exposed to aqueous extracts of *Chenopodium ambrosioides*

颜色键表示 FPKM 标准化的 log2-transformed 计数

(3)谷胱甘肽代谢和细胞色素 p450 对异生素的代谢

KEGG 通路富集分析和基因功能注释表明,谷胱甘肽代谢和细胞色素 P450 对异生素代谢通路中的部分基因被土荆芥水浸液诱导差异表达。在 CAW_vs_CKW 中,编码谷胱甘肽转移酶(glutathione S-transferase,

GST)的大部分基因(10 个上调,3 个下调)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPX)都是表达显著上调,而谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GSR)表达显著下调;在 CAN_vs_CKN 中,编码 GST 的 9 个基因显著上调(图 15)。GPX 和 GSR 基因的表达分别上升和下降意味着一部分还原态的谷胱甘肽(GSH)被转化为氧化态的谷胱甘肽(GSSG)。在细胞色素 P450 对异生素代谢通路中,GST 也同样发挥着重要作用,它的表达情况与谷胱甘肽代谢通路中一致。

表 3 土荆芥水浸提液作用下 CAW_vs_CKW 与 CAN_vs_CKN 两组各通路具体差异基因数目

Table 3 Number of specific differential genes in each pathway of two groups(CAW_vs_CKW and CAN_vs_CKN) exposed to aqueous extract of *Chenopodium ambrosioides*

代谢通路 Metabolic pathway	保留根边缘细胞组 CAW_vs_CKW		去除根边缘细胞组 CAN_vs_CKN	
	P	差异表达基因数 Nubmer of DEGs	*P*	差异表达基因数 Nubmer of DEGs
谷胱甘肽代谢 Glutathione metabolism	1.60×10^{-4}	21	5.21×10^{-5}	10
细胞色素 p450 对异生素代谢 Metabolism of xenobiotics by cytochrome p450	4.99×10^{-4}	15	8.87×10^{-6}	9
苯丙素生物合成 Phenylpropanoid biosynthesis	9.17×10^{-11}	53	4.39×10^{-9}	22
黄酮类生物合成 Flavonoid biosynthesis	1.65×10^{-2}	12	5.63×10^{-4}	7
芪类、二芳基庚烷类和姜酚生物合成 Stilbenoid, diarylhepat-anoid and gingerol Biosynthesis	4.32×10^{-3}	10	$3.02\times10^{-4}4$	6
二萜类生物合成 Diterpenoid biosynthesis	4.85×10^{-3}	5	2.89×10^{-3}	3
α-亚麻酸代谢 Alpha-Linolenic acid meta-bolism	4.51×10^{-2}	14	9.09×10^{-4}	8

CKW 和 CAW 分别为保留根边缘细胞处理组的对照和处理,CKN 和 CAN 分别表示移除根边缘细胞处理组的对照和处理

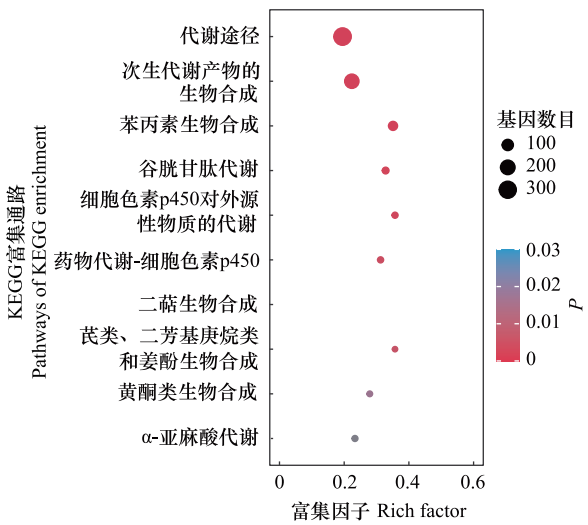

图 12 土荆芥水浸提液作用下 CAW_vs_CKW 组苦荞麦根差异表达基因的 KEGG 富集通路图

Fig.12 KEGG Enrichment pathways diagram of differentially expressed genes in root of *Fagopyrum tataricum*(CAW_vs_CKW) exposed to aqueous extracts of *Chenopodium ambrosioides*

Pvalue:多重假设检验中的 p 值

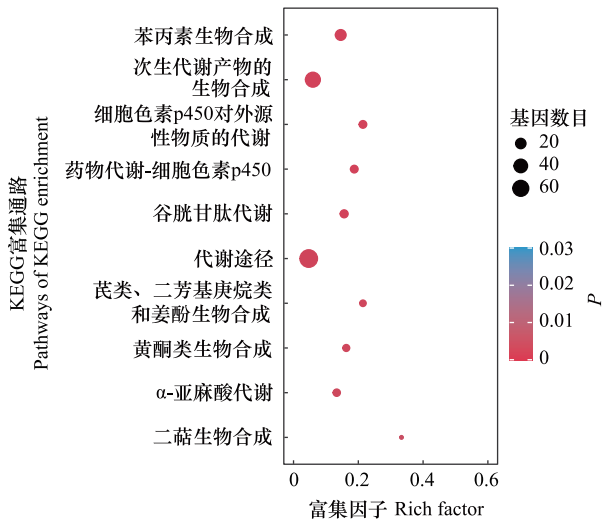

图 13 土荆芥水浸提液作用下 CAN_vs_CKN 组苦荞麦根差异表达基因的 KEGG 富集通路图

Fig.13 KEGG Enrichment pathways diagram of differentially expressed genes in root of *Fagopyrum tataricum*(CAN_vs_CKN) exposed to aqueous extracts of *Chenopodium ambrosioides*

(4)去除 RBCs 组特特异富集通路

苯丙素、黄酮类、芪类、二芳基庚烷类和姜酚的生物合成,谷胱甘肽、细胞色素 P450 和 α-亚麻酸代谢等通路在苦荞麦受到化感胁迫时被诱导,在保留 RBCs 组和移除 RBCs 组都出现动态变化,且这些通路中的部分关

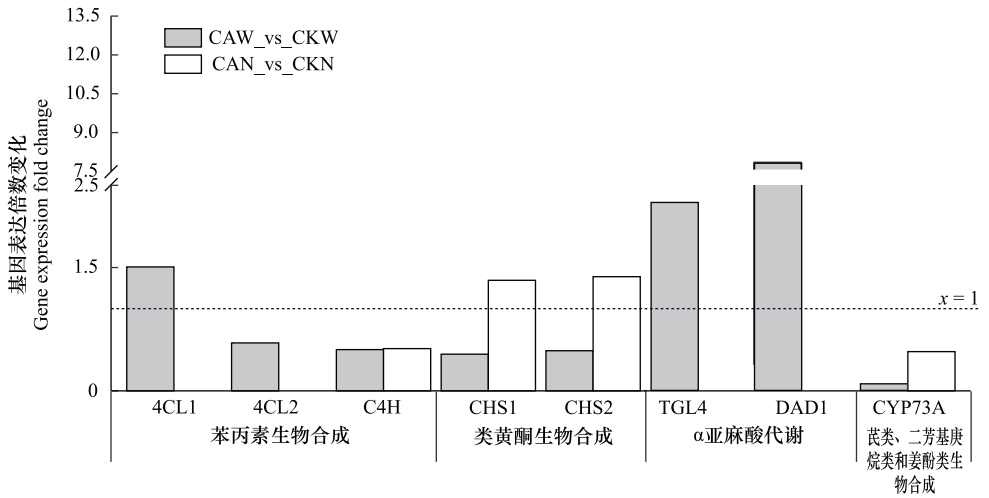

图 14　土荆芥水浸提液作用下苦荞麦根共同通路的关键基因表达量在 CAW_vs_CKW 与 CAN_vs_CKN 中的变化

Fig.14　The expression of key genes in the common pathway in root of *Fagopyrum tataricum* exposed to aqueous extracts of *Chenopodium ambrosioides* in CAW_vs_CKW and CAN_vs_CKN

4CL:4-香豆酰辅酶 a 连接酶;C4H:肉桂酸 4-羟化酶;CHS:查尔酮酶; TGL4:甾酯水解酶;DAD1:磷脂酶 A1; CYP73A:反式肉桂酸 4-单加氧酶;Phenylpropanoid biosynthesis:苯丙素生物合成;Flavonoid biosynthesis:类黄酮生物合成;Diterpenoid biosynthesis:二萜类生物合成;α Linolenic acid metabolism:α 亚麻酸代谢;Stilbenoid,diarylheptanoid and gingerol biosynthesis:芪类、二芳基庚烷类和姜酚类生物合成

键基因在两组间差异表达显著;角质、木栓质和蜡生物合成途径只在移除 RBCs 组(CAN_vs_CKN)中特异富集,调控该通路的 ω-羟基棕榈酸酯 O-阿魏酰基转移酶(omega-hydroxypalmitate O-feruloyl trans-ferase, HHT1)和醇形成脂肪酰基-CoA 还原酶(alcohol-forming fatty acyl-CoA reductase, FAR)的表达量分别下降到对照组的 0.48 倍和 0.35 倍。

2.4.4　qRT-PCR 验证结果

使用 qRT-PCR 验证 RNA-seq 数据的准确性和再现性,通过 18 个与苯丙素合成通路、α-亚麻酸代谢通路、谷胱甘肽代谢与细胞色素 p450 对异生素的代谢等通路有关的差异表达基因(DEGs)进行验证。使用线性回归分析检查 qRT-PCR 和 RNA-seq 测定的转录本丰度之间的相关性。结果显示 RNA-seq 和 qRT-PCR 之间的基因表达比率呈现显著正相关,表明本研究中 RNA-seq 数据是可靠的(图 15)。

3　讨论

3.1　根边缘细胞缓解了土荆芥淋溶途径化感胁迫对苦荞麦的影响

ROS 爆发和氧化应激被诱导是植物应对各种化感物质胁迫的普遍反应,ROS 代谢的改变被认为是化感物质的一种间接作用模式[20]。本研究结果表明,土荆芥水浸提液抑制苦荞麦的种子萌发和根长,其中以 0.05 g/mL 水浸提液的抑制率最大。在此浓度的水浸提液处理下,去除 RBCs 组中根长抑制率(69.49%)高于保留 RBCs 组中根长抑制率(54.96%),反映 RBCs 的存在缓解了土荆芥水浸提液对苦荞麦根生长的抑制效应。根尖细胞 AO/EB 染色观察发现,苦荞麦根尖细胞活性表现为保留 RBCs 组高于去除 RBCs 组,表明 RBCs 能一定程度缓解土荆芥水浸提液的细胞毒性。与保留 RBCs 组相比,除去根边缘细胞后,苦荞麦幼根 ROS、O_2^- 和 MDA 水平、抗氧化酶(POD、CAT)活性明显增高。说明土荆芥水溶性化感物质诱导苦荞麦根尖活性氧爆发,干扰了抗氧化酶活性,导致细胞出现氧化损伤,氧化损伤标志物 MDA 含量升高,而根边缘细胞的存在,在一定程度上缓解了由化感胁迫诱导的氧化损伤。本研究在土荆芥水浸提物的甲醇、乙酸乙酯、正丁醇萃取物中分别检测到 29 种、68 种、19 种物质,表明土荆芥水溶性物质较为丰富,具体哪一种物质在土荆芥化感作用诱导的氧化损伤中扮演主效成分,尚待后续研究进一步确证。

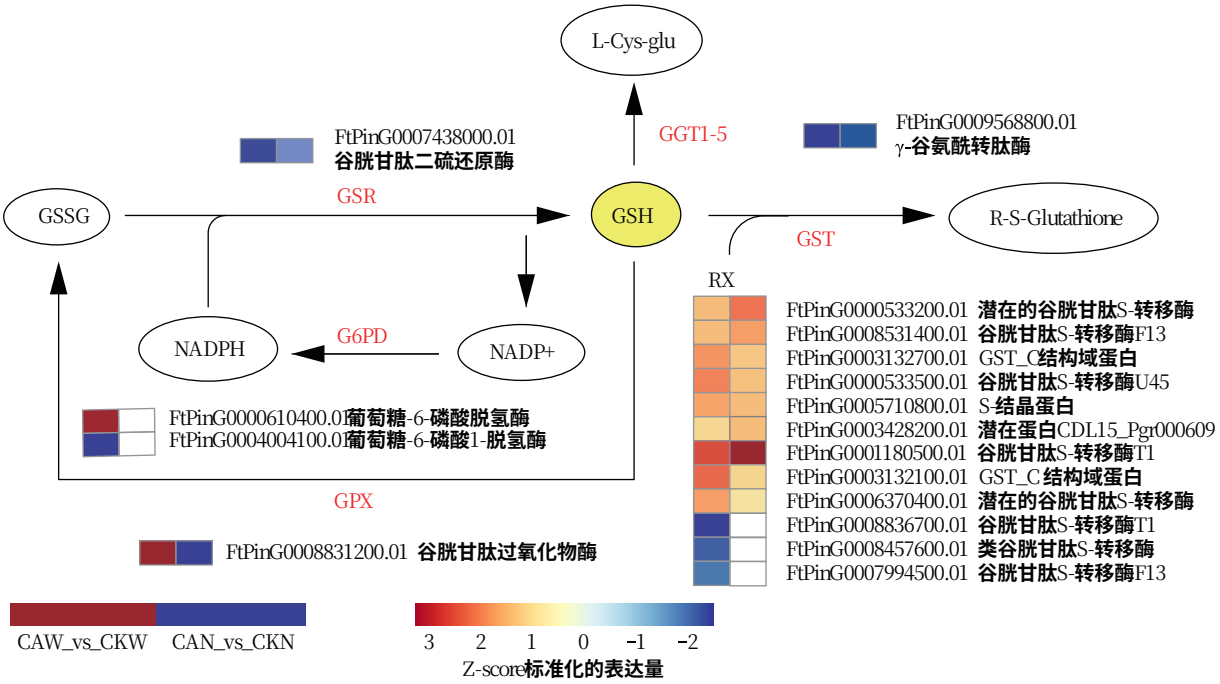

图 15 土荆芥水浸提液作用下苦荞麦根参与谷胱甘肽代谢通路的差异基因在 CAW_vs_CKW 和 CAN_vs_CKN 中的表达

Fig.15 The expression of differential genes involved in glutathione metabolic pathway in root of *Fagopyrum tataricum* exposed to aqueous extracts of *Chenopodium ambrosioides* in CAW_vs_CKW and CAN_vs_CKN

L-cys-glu:L-半胱氨酸甘氨酸;GGT1-5:谷胱甘肽水解酶;GSSG:氧化谷胱甘肽;GSR:谷胱甘肽还原酶;GSH:谷胱甘肽;GST:谷胱甘肽 S-转移酶;R-S-Glutathione:R-S-谷胱甘肽;NADPH:还原烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸酯;G6PD:葡萄糖-6-磷酸 1-脱氢酶;NADP+:烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸酯;GPX:谷胱甘肽过氧化物酶;基于 Z-score 对相对表达水平进行归一化,并在从低(蓝色)到高(红色)的颜色梯度上显示,空白键表示非差异基因

3.2 根边缘细胞缓解土荆芥水溶性化感物质对苦荞麦的代谢扰动

根边缘细胞在根尖和土壤之间构筑了一道防线,当植物受到外界环境胁迫时,无疑可以确保植物维持正常的代谢调控功能。本研究结果表明,在土荆芥水浸液作用下,保留 RBCs 组的总差异基因、上调基因和下调基因数目是移除 RBCs 组的 3-10 倍,保留 RBCs 组的差异基因富集通路是移除 RBCs 组的 2 倍。说明 RBCs 存在时,苦荞麦对土荆芥水浸提液胁迫的反应更为积极,能够调动更多的基因参与多种生物学途径以应对化感胁迫。响应化感物质胁迫的受体植物基因不仅与初级代谢有关,而且与次生代谢物的生物合成密切相关[21],在本研究中富集出的通路也大多与之相关。例如,在保留 RBCs 组中,响应化感胁迫的初级代谢通路有色氨酸代谢、淀粉和蔗糖代谢、脂肪酸生物合成、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解等。在两个处理组中共有 7 条富集通路涉及次生代谢物的生物合成,但是这些通路在两组中的表达模式均不相同,表明 RBCs 对这些通路表达模式具有一定影响。苯丙素生物合成是一个复杂的次级代谢途径,涉及众多基因家族,如苯丙氨酸解氨酶(PAL)、肉桂酸-4-羟化酶(C4H)、4-香豆酰-CoA 连接酶(4CL),操纵这些关键基因的表达可以调节苯丙素的生物合成,这些基因也可能在调节植物种子萌发和种子

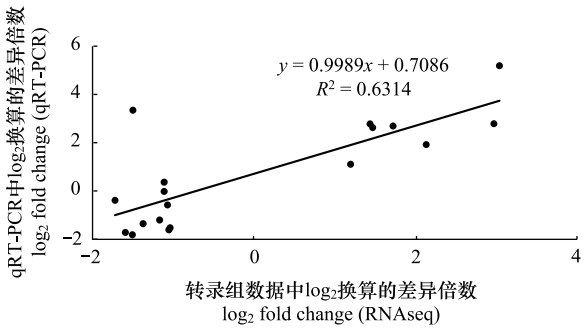

图 16 土荆芥水浸液处理后苦荞麦根中差异表达基因的 qRT-PCR 分析

Fig.16 qRT-PCR analysis of DEGs in *Fagopyrum tataricum* roots treated with aqueous extract of *Chenopodium ambrosioides*

发育中发挥潜在作用[22—23]。化感作用也可通过抑制这条通路影响到受体种子萌发,例如,鸦胆子[*Brucea javanica*(*L.*)]的主要活性物质能通过抑制苯丙素生物合成途径抑制鬼针草(*Bidens pilosa*L.)种子的萌发[24]。本研究中,保留 RBCs 组的苯丙素通路中下调基因占到该通路 DEGs 的 70%左右,该通路中的一个关键起始酶 C4H 的表达显著下调,并且该通路的下游次生代谢产物关键酶表达也出现显著下调,如黄酮类合成标志酶 CHS、芪类、二芳基庚烷类和姜酚合成通路的起始酶 CYP73A。在移除 RBCs 组中下调基因占到该通路 DEGs 的 50%,C4H、CHS 表达倍数也相比保留 RBCs 组高。这些结果反映出土荆芥水溶性化感物质会抑制苯丙素生物合成通路以及下游的部分次生代谢物合成,从而抑制苦荞麦种子萌发;移除 RBCs 组的苯丙素通路抑制程度较低,推测可能在失去 RBCs 保护后苦荞麦根依赖苯丙素合成通路增加抗逆性物质的合成。在化感胁迫这一不利条件下,植物在生长或防御之间做出抉择,有限资源的转移会发生在生命活动的所有层面,包括参与细胞转录、翻译和蛋白质分泌的机制,以及将碳(C)和氮(N)优先用于防御化合物的合成[25]。本研究中,在土荆芥水溶性化感物质作用下,与保留 RBCs 组相比,移除 RBCs 组的苦荞麦根生长受抑制程度加剧,苯丙素生物合成通路受抑制程度较低,类黄酮生物合成通路更活跃,这些结果反映出失去 RBCs 保护后,苦荞麦以牺牲生长为代价合成更多的抗逆次生代谢物。在这些抗逆次生代谢物中,黄酮类化合物最主要的特征是抗氧化作用,比抗坏血酸的抗氧化作用高很多[26]。植物遭受各种胁迫刺激会产生 ROS 诱导氧化损伤,而黄酮类化合物可上调抗氧化酶系统或抑制与 ROS 产生有关的酶进而抑制和清除 ROS,并与脂质螯合稳定膜结构,防止自由基扩散并阻止膜脂质过氧化[27—28],同时还能调节生长素的极性运输[29]。此外,逆境胁迫诱导芪类、二芳基庚烷类和姜酚合成通路的响应[30—31],本研究结果与此相似。

TGL4 和 DAD1 是 α-亚麻酸代谢的起始酶,负责将磷脂酰胆碱催化形成 α-亚麻酸,为合成茉莉酸(JA)提供丰富的底物,JA 具有抑制植物生长并提高抗性的功能[32]。本研究结果表明,土荆芥水浸提液作用下,苦荞麦根尖保留 RBCs 组相比移除 RBCs 组这两个基因的表达水平较高。生长和防御对于植物来说都至关重要,可见 RBCs 能通过 JA 的高表达帮助根尖在生长和防御中寻找平衡。

植物体内中存在类似于动物肝脏与解毒相关的谷胱甘肽转移酶(GST)和细胞色素 P450 酶(CYP),GST 可被一系列外源物质诱导而表达增强,这可能是响应这些外源物质造成的细胞损伤和氧化应激[33]。本研究中,保留 RBCs 组的谷胱甘肽代谢通路中 GPX 基因表达上调会将更多的 GSH 转化为 GSSG,GSR 基因表达下调又进一步抑制 GSSG 转化为 GSH,而移除 RBCs 组中的 GPX 和 GSR 表达无显著变化,即移除 RBCs 的苦荞麦根中 GSH 合成更加活跃,GST 基因表达也是显著上调的。表明苦荞麦的谷胱甘肽系统对土荆芥水溶性化感物质具有解毒作用,GSH 和土荆芥水溶性化感物质很可能在 GST 催化下形成复合物,随后该复合物在 ABC 转运蛋白作用下从胞质中迅速转运至液泡从而减弱了化感物质的毒害;此外,GSH 具有强抗氧化能力,可防止 DNA 损伤和脂质过氧化,GST 还参与类黄酮在细胞内的结合与稳定[34—35]。RBCs 是根尖的物理化学和生物屏障,上述研究结果表明失去 RBCs 保护屏障的苦荞麦根尖,由于直接暴露在土荆芥水溶性化感物质的毒害下,使其解毒酶系统更加忙碌。

本研究中,角质、木栓质和蜡生物合成途径只特异富集在移除 RBCs 组并且被显著抑制。角质与蜡非共价结合在细胞壁表面形成疏水角质层,有研究报道根冠和侧根表面存在角质层,其保护和屏障功能与地上器官的标准角质层相似,与木栓质一样能限制水分移动,表皮蜡也被认为是一种抵抗生物和非生物胁迫的化合物[36—37]。根冠角质层、木栓质和蜡的减少,意味着疏水性下降以及抗性降低,这或许有利于水溶性的化感物质进入根尖细胞。推测 RBCs 的存在可能与根冠角质层和木栓质的完整性存在一定关系,但是具体机制有待进一步研究。

4　结论

土荆芥水溶性化感物质对苦荞麦的种子萌发和幼根生长具有显著抑制效应,导致苦荞麦根尖活性降低,抗氧化系统紊乱,活性氧积累,膜脂过氧化程度加剧。移除根边缘细胞后,这些受伤害程度加剧,表明根边缘

细胞对土荆芥淋溶途径化感胁迫具有缓解效应。

在土荆芥水溶性化感物质作用下,苦荞麦根尖苯丙素合成通路及其下游部分次生代谢物合成通路被抑制,而这些通路大多与抗逆性有关,表明土荆芥水溶性化感物质减弱了苦荞麦的抗逆性。去除 RBCs 后这些抗逆性相关通路受抑制程度相对较小,此时苦荞麦将有限的 C 和 N 用于合成更多的抗逆次生代谢物,更多发挥 GSH 和 GST 解毒功能,借助于非酶类抗氧化系统(类黄酮和 GSH)和抗氧化酶系统(POD、CAT)应对土荆芥水溶性化感物质造成的氧化损伤;保留 RBCs 的根尖中很可能是通过 JA 的高表达,在生长和防御中寻找平衡。此外,RBCs 也影响了根冠角质和木栓质等抗逆性物质的合成。

参考文献(References):

[1] Liu C L, Chen Y S, Yang J H, Chiang B H. Antioxidant activity of Tartary (*Fagopyrum tataricum* (L.) gaertn.) and common (*Fagopyrum esculentum* moench) buckwheat sprouts. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(1): 173-178.

[2] Zheng C J, Hu C L, Ma X Q, Peng C, Zhang H, Qin L P. Cytotoxic phenylpropanoid glycosides from Fagopyrum tataricum (L.) gaertn. Food Chemistry, 2012, 132(1): 433-438.

[3] Zou L, Wu D T, Ren G X, Hu Y C, Peng L X, Zhao J L, Garcia-Perez P, Carpena M, Prieto M A, Cao H, Cheng K W, Wang M F, Simal-Gandara J, John O D, Rengasamy K R R, Zhao G, Xiao J B. Bioactive compounds, health benefits, and industrial applications of Tartary buckwheat (Fagopyrum tataricum). Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2023, 63(5): 657-673.

[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: 52-79.

[5] Cheng H Y, Wu B D, Yu Y L, Wang S, Wei M, Wang C Y, Du D L. The allelopathy of horseweed with different invasion degrees in three provinces along the Yangtze River in China. Physiology and Molecular Biology of Plants, 2021, 27(3): 483-495.

[6] Latif S, Chiapusio G, Weston L A. Allelopathy and the role of allelochemicals in plant defence. Advances in Botanical Research. Amsterdam: Elsevier, 2017: 19-54.

[7] 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.

[8] 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.

[9] 王亚男, 李睿玉, 朱晓换, 马丹炜, 张红. 土荆芥挥发油化感胁迫对土壤胞外酶活性和微生物多样性的影响. 生态学报, 2017, 37(13): 4318-4326.

[10] Hawes M, Allen C, Turgeon B G, Curlango-Rivera G, Minh Tran T, Huskey D A, Xiong Z G. Root border cells and their role in plant defense. Annual Review of Phytopathology, 2016, 54: 143-161.

[11] Driouich A, Smith C, Ropitaux M, Chambard M, Boulogne I, Bernard S, Follet-Gueye M L, Vicré M, Moore J. Root extracellular trapsversusneutrophil extracellular traps in host defence, a case of functional convergence? Biological Reviews, 2019, 94(5): 1685-1700.

[12] 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.

[13] Brigham L A, Woo H H, Nicoll S M, Hawes M C. Differential expression of proteins and mRNAs from border cells and root tips of pea. Plant Physiology, 1995, 109(2): 457-463.

[14] Xin A Y, Li X Z, Jin H, Yang X Y, Zhao R M, Liu J K, Qin B. The accumulation of reactive oxygen species in root tips caused by autotoxic allelochemicals: A significant factor for replant problem of Angelica sinensis (Oliv.) Diels. Industrial Crops and Products, 2019, 138: 111432.

[15] Huang C Z, Xu L, Sun J J, Zhang Z H, Fu M L, Teng H Y, Yi K K. Allelochemical p-hydroxybenzoic acid inhibits root growth via regulating ROS accumulation in cucumber (Cucumis sativus L.). Journal of Integrative Agriculture, 2020, 19(2): 518-527.

[16] Heath R L, Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1968, 125(1): 189-198.

[17] Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry, 1971, 44(1): 276-287.

[18] Polle A, Otter T, Seifert F. Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (Picea abies L.). Plant Physiology, 1994, 106(1): 53-60.

[19] Cakmak I, Marschner H. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves. Plant Physiology, 1992, 98(4): 1222-1227.

[20] Staszek P, Krasuska U, Ciacka K, Gniazdowska A. ROS metabolism perturbation as an element of mode of action of allelochemicals. Antioxidants,

2021, 10(11): 1648.

[21] Li J X, Zhao T, Chen L, Chen H, Luo D D, Chen C C, Miao Y, Liu D H. Artemisia argyi allelopathy: a generalist compromises hormone balance, element absorption, and photosynthesis of receptor plants. BioMed Central Plant Biology, 2022, 22(1): 1-17.

[22] Wang M, Ding Y X, Wang Q E, Wang P, Han Y B, Gu Z X, Yang R Q. NaCl treatment on physio-biochemical metabolism and phenolics accumulation in barley seedlings. Food Chemistry, 2020, 331: 127282.

[23] Jiang Y T, Tian M, Wang C X, Zhang Y. Transcriptome sequencing and differential gene expression analysis reveal the mechanisms involved in seed germination and protocorm development of Calanthe tsoongiana. Gene, 2021, 772: 145355.

[24] Tong Y, Liu S Y, Yi S C, Qiu Z X, Wang Y H, Zeng D Q, Tang W W. Bruceine D, the main active ingredient of Brucea javanica (L.) residue inhibits the germination of Bidens pilosa L. seeds by suppressing phenylpropanoid biosynthesis. Industrial Crops and Products, 2021, 172: 114079.

[25] Huot B, Yao J, Montgomery B L, He S Y. Growth-defense tradeoffs in plants: a balancing act to optimize fitness. Molecular Plant, 2014, 7(8): 1267-1287.

[26] Nabavi S M, Šamec D, Tomczyk M, Milella L, Russo D, Habtemariam S, Suntar I, Rastrelli L, Daglia M, Xiao J B, Giampieri F, Battino M, Sobarzo-Sanchez E, Nabavi S F, Yousefi B, Jeandet P, Xu S W, Shirooie S. Flavonoid biosynthetic pathways in plants: versatile targets for metabolic engineering. Biotechnology Advances, 2020, 38: 107316.

[27] Samanta A, Das G, Das S K. Roles of flavonoids in plants. Carbon, 2011, 100(6): 12-35.

[28] Shen N, Wang T F, Gan Q, Liu S A, Wang L, Jin B. Plant flavonoids: classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. Food Chemistry, 2022, 383: 132531.

[29] Zhang X D, Huang X, Li Y, Tao F Q, Zhao Q S, Li W Q. Polar auxin transport May Be responsive to specific features of flavonoid structure. Phytochemistry, 2021, 185: 112702.

[30] Wang C X, Wei G Q, Lei X Y, Sun Y Q, Liang G T, Guo J, Zhang S Y. Proteomic analysis reveals allelopathic responsive mechanisms for para-hydroxybenzoic acid in poplars. Environmental and Experimental Botany, 2023, 206: 105157.

[31] Tian Y H, Feng F J, Zhang B, Li M J, Wang F Q, Gu L, Chen A G, Li Z J, Shan W B, Wang X R, Chen X J, Zhang Z Y. Transcriptome analysis reveals metabolic alteration due to consecutive monoculture and abiotic stress stimuli in Rehamannia glutinosa Libosch. Plant Cell Reports, 2017, 36(6): 859-875.

[32] Pyo Y, Moon H, Nugroho A B D, Yang S W, Jung I L, Kim D H. Transcriptome analysis revealed that jasmonic acid biosynthesis/signaling is involved in plant response to Strontium stress. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2022, 237: 113552.

[33] Sandermann H. Plant metabolism of xenobiotics. Trends in Biochemical Sciences, 1992, 17(2): 82-84.

[34] Dixon D P, Lapthorn A, Edwards R. Plant glutathione transferases. Genome Biology, 2002, 3(3): REVIEWS3004.

[35] Hernández Estévez I, Rodríguez Hernández M. "plant glutathione S-transferases: an overview". Plant Gene, 2020, 23: 100233.

[36] Philippe G, Sørensen I, Jiao C, Sun X P, Fei Z J, Domozych D S, Rose J K. Cutin and suberin: assembly and origins of specialized lipidic cell wall scaffolds. Current Opinion in Plant Biology, 2020, 55: 11-20.

[37] Zhang Z Q, Bi X Q, Du X M, Liu H X, An T, Zhao Y F, Yu H, Chen Y F, Wen J Z. Comparative metabolomics reveal the participation of soybean unique rhizosphere metabolites in susceptibility and resistance of host soybean to Phytophthora sojae. Plant and Soil, 2022, 480(1): 185-199.