

DOI: 10.20103/j.stxb.202402260400

谢雨思, 王强, 张红, 马丹炜, 王亚男, 廖颖, 王煜. 土荆芥挥发物化感胁迫对 3 种农作物根边缘细胞释放的干扰效应. 生态学报, 2025, 45(2): 984-999.

Xie Y S, Wang Q, Zhang H, Ma D W, Wang Y N, Liao Y, Wang Y. Interference effect of allelopathic stress of volatiles from *Chenopodium ambrosioides* on the release of root border cells in three crops. Acta Ecologica Sinica, 2025, 45(2): 984-999.

土荆芥挥发物化感胁迫对 3 种农作物根边缘细胞释放的干扰效应

谢雨思¹, 王强¹, 张红^{1,3}, 马丹炜^{1,2,3,*}, 王亚男^{1,3}, 廖颖^{1,3}, 王煜^{1,3}

1 四川师范大学生命科学学院, 成都 610101

2 西南土地资源评价与监测教育部重点实验室(四川师范大学), 成都 610066

3 四川师范大学细胞生物学研究所, 成都 610101

摘要: 当受到入侵植物土荆芥 (*Chenopodium ambrosioides*) 化感胁迫时, 受体会通过增加根边缘细胞数量的方式来缓解胁迫对根系的伤害。为了探究这一效应的分子生态过程, 以玉米 (*Zea mays*)、大豆 (*Glycine max*) 和苦荞麦 (*Fagopyrum tataricum*) 作为受体植物, 采用显微技术和转录组学技术, 研究了在土荆芥挥发油及其主要成分 α -萜品烯胁迫下, 受体根边缘细胞产生和释放及相关基因表达水平的变化。结果表明: 在土荆芥挥发物作用下, 与对照相比, 根边缘细胞数量增加, 但随着处理时间延长、处理浓度增加, 促进效应减弱甚至消失; 随着挥发物浓度升高, 根边缘细胞的弯曲度先增加后减少, 而平均长度则整体变短。 α -萜品烯的化感综合效应为挥发油的 0.76 倍, 不同受体根边缘细胞释放对土荆芥挥发物的敏感性表现为玉米 > 苦荞麦 > 大豆; 转录组学结果显示, 受到化感胁迫时, 受体根尖细胞内与根边缘细胞释放相关的木质素合成、果胶降解/合成、以及细胞壁成分重塑等相关基因均发生变化。研究结果表明, 土荆芥挥发物胁迫下, 受体幼根上调细胞壁重塑和根边缘细胞释放相关基因的表达, 使根边缘细胞与根冠的黏附能力下降, 从而促进根边缘细胞释放以保护根尖免遭伤害, 但这种防御效应随着胁迫强度增大逐渐减弱。外来种(玉米)对土荆芥挥发物的应激反应大于本地种(大豆、苦荞麦)。

关键词: 土荆芥; 化感胁迫; 根边缘细胞; 释放; 基因表达

Interference effect of allelopathic stress of volatiles from *Chenopodium ambrosioides* on the release of root border cells in three crops

XIE Yusi¹, WANG Qiang¹, ZHANG Hong^{1,3}, MA Danwei^{1,2,3,*}, WANG Yanan^{1,3}, LIAO Ying^{1,3}, WANG Yu^{1,3}

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

2 Key Laboratory of Southwest China Ministry of Education for Land Resources Evaluation and Monitoring (Sichuan Normal University), Chengdu 610066, China

3 Cell Biology Institute, Sichuan Normal University, Chengdu 610101, China

Abstract: *Chenopodium ambrosioides* originated from tropical America, and is a major malignant weed in the farmland ecosystems of corn (*Zea mays*), soybean (*Glycine max*), and buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) in southwest China. Existing evidence shows that allelopathy is one of the main mechanisms for the successful invasion of *C. ambrosioides*, and the volatile pathway is the main way of its allelopathic effect. When receptor plants are allelopathically stressed by the invasive plant *C. ambrosioides*, they will increase the number of root border cells (RBCs) to alleviate the damage to the root system caused by the stress. To investigate the cellular and molecular mechanisms underlying this effect, maize, soybean

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31971555); 国家重点研发计划项目(2023YFC2604503)

收稿日期: 2024-02-26; **网络出版日期:** 2024-10-10

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

and buckwheat were employed as receptor plants. Experimental groups were treated with volatile oil (V) and α -terpinene (T), with three treatment levels established for each group. The treatment concentrations for volatile oil were 6.25 $\mu\text{L/L}$, 12.50 $\mu\text{L/L}$, and 25.00 $\mu\text{L/L}$ (denoted as V1, V2, and V3), while the concentrations for α -terpinene were set based on its relative content in V1, V2, and V3, being 3.125 $\mu\text{L/L}$, 6.255 $\mu\text{L/L}$, and 12.510 $\mu\text{L/L}$ (denoted as T1, T2, T3), respectively. The impact of volatile oils and α -terpinene on the number, length, and curvature of receptor RBCs was investigated using the suspension air culture method. Additionally, the volatile sensitivity of the RBCs of receptor plants was analyzed. Transcriptomics techniques were employed to examine changes in the production and release of receptor RBCs and the expression levels of related genes. The effects of the treatments on their metabolic pathways were analyzed using KEGG and validated by qRT-PCR. Results indicated that the number of RBCs increased under the influence of volatile substances compared to the control, but the promoting effect diminished or even disappeared with prolonged treatment duration and increased treatment concentration. The curvature of RBCs initially increased and then decreased with rising volatile concentrations, while the mean length overall became shorter. The comprehensive allelopathic effect of α -terpinene was 0.76 times that of volatile oil, and the sensitivity of different receptor RBCs to the volatiles of *C. ambrosioides* was maize > buckwheat > soybean. Transcriptomics results revealed that the differentially expressed genes in buckwheat, soybean, and maize were 2506 (1524 down-regulated and 982 up-regulated), 461 (209 down-regulated and 252 up-regulated), and 4222 (1746 down-regulated and 2476 up-regulated), respectively, in the volatile oil treatment group, while 291 (145 down-regulated, 146 up-regulated), 1986 (757 down-regulated, 1229 up-regulated), and 3015 (1759 down-regulated, 1256 up-regulated), respectively, in the α -terpinene treatment group. KEGG analyses showed that genes related to lignin synthesis, pectin degradation/synthesis, and cell wall component remodeling associated with root border cell release were altered in receptor root tip cells when subjected to allelochemicals stress. The above outcomes suggest that under the allelopathic stress of low-intensity volatiles from *C. ambrosioides*, the stress signal pathways of corn, soybean, and buckwheat are activated. This leads to the remodeling of the cell wall in young roots, speeds up the degradation of the middle layer pectin, shortens the length of RBCs, enhances the curvature of RBCs, thereby reducing the adhesion between RBCs and the root cap, and further expedites the release of RBCs to deal with the allelopathic stress of *C. ambrosioides*. As the stress intensity rises, the generation and release of RBCs are hindered, and the defense function of the receptors against allelopathic stress deteriorates. The stress response of the exotic species corn to the allelopathic stress of *C. ambrosioides* is significantly faster than that of the native species soybean and buckwheat.

Key Words: *Chenopodium ambrosioides*; allelochemicals stress; root border cells; release; gene expression

根边缘细胞(Root border cells, RBCs)又称为根冠脱落细胞,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,它们在根和根周围环境之间构筑了一道化学、物理和生物的屏障,具有类似于动物中性粒细胞的防御功能,在植物抵御生物和非生物胁迫中起着重要的作用^[1]。遭受逆境胁迫时,植物可释放更多的根边缘细胞^[2-3],这些细胞向胞外分泌阿拉伯半乳糖蛋白(Arabinogalactan proteins, AGPs)等物质^[4],使胞外黏胶层增厚,扩大胞外诱捕网,以整合外源重金属、化感物质或阻止致病性细菌侵入^[5-6]。Mravec 等^[5]的研究表明了根边缘细胞释放涉及微妙而又复杂的细胞壁微调,在根边缘细胞释放时,细胞拉长和弯曲使细胞壁变薄,同时产生的弯曲有利于减少其与脱离层细胞的接触面积。细胞壁的组成成分细胞壁糖蛋白在新细胞的形成和组装中至关重要,其形成是细胞正常分裂产生的最初步骤,根边缘细胞的正确产生和释放也对细胞壁的相关基因进行了特异性的调节表达^[7]。果胶甲基酯酶(Pectin methylesterase, PME)能降解细胞壁中间层的粘性物质,有利于根边缘细胞的释放,从而能调控受体根边缘细胞数量变化^[8]。这些是调控根边缘细胞成熟和释放的关键。

植物入侵是造成当前生态系统破坏和生物多样性丧失的最主要原因之一。农业生态系统的群落结构相

对于自然生态系统更为简单,主要由一种或两种优势的农作物构成,多样性较低,更容易受到外来物种的入侵^[9]。新武器假说(novel weapons hypothesis, NWH)认为,外来植物向引入环境中释放其自身特有的化学物质,新型化学物质对植株、天敌以及土壤性质影响与原生地不同,对本地植物有较强的抑制作用,促进外来植物的入侵成功^[10],这些外来植物释放的化学物质即化感物质(allelochemical)可以通过根系分泌、残株分解、雨雾淋溶和挥发等途径向环境释放,抑制周围植物生长发育^[11-13]。无论通过哪一种途径释放的化感物质最终都会进入土壤,在作用于受体植物根系之前,必须突破根边缘细胞这道防线^[14]。土荆芥(*Chenopodium ambrosioides* L.)是藜科(Amaranthaceae)藜属(*Chenopodium*)一年生或多年生草本植物,原产中南美洲^[15]。目前已威胁到中国大部分地区的生态安全,属于中国重点管控的外来入侵植物^[16],是我国西南地区玉米(*Zea mays*)、大豆(*Glycine max*)和苦荞麦(*Fagopyrum tataricum*)等农田生态系统的主要恶性杂草。已有证据表明,化感作用是土荆芥成功入侵的主要机制之一,而挥发途径是其化感作用的主要方式^[17]。土荆芥全株富含挥发油,目前已经从不同入侵地的土荆芥挥发油中鉴定出 20 多种化合物,共有成分 α -蒎品烯是土荆芥化感作用的主效物质^[18-19]。本项目组前期研究发现,土荆芥挥发性化感物质具有强烈的细胞毒性,会诱导受体植物的细胞内 ROS 和 NO 水平升高^[8],抗氧化酶基因表达下调,抗氧化酶活性^[20],细胞膜破裂,细胞器被破坏,粗面内质网肿胀,细胞出现明显的氧化损伤和遗传损伤,细胞活性降低甚至凋亡^[21]。另一方面,受体根边缘细胞能在一定范围内缓解土荆芥化感胁迫,主要表现为增加根边缘细胞的数量和黏胶层厚度来抵抗胁迫^[22]。同时,根边缘细胞的存在会上调根尖抗逆物质合成、抗氧化酶和非酶抗氧化系统(类黄酮和谷胱甘肽)和根部疏水性物质等相关信号通路,提高茉莉酸的表达,在生长和防御中寻找平衡,缓解了土荆芥化感胁迫^[23]。此外,随着土荆芥挥发性化感物质浓度升高,受体植物的根边缘细胞内产生并持续增加自噬小泡,通过自噬形式以维持自身的活性^[24]。然而迄今尚不清楚,受体植物如何调控根边缘细胞的成熟和释放,进而抵御土荆芥化感胁迫的?本研究以原产于美洲的玉米以及原产于中国的大豆和苦荞麦作为受体,采用悬空气培养法和根边缘细胞移除试验,运用显微技术和转录组学技术,分析了土荆芥挥发油及其主效化感物质 α -蒎品烯对受体根边缘细胞成熟、释放的影响及其机制,旨在进一步诠释土荆芥化感作用的分子生态过程和入侵机制,为“新武器假说”提供新的分子证据,同时为防治土荆芥进一步蔓延、维护我国农业生态安全提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料土荆芥植株于 2019 年 11 月采自四川省成都市简阳市(30°38'7"N, 104°34'55"E),采集时处于生殖期,长势良好,采摘后阴干备用。

受体植物玉米种子(郑单 958)和大豆种子(铁豆 80)分别购于寿光佳禾种业和成都市锦江区丰之籽种业有限公司,苦荞麦种子购自四川省凉山彝族自治州冕宁县。

试验所用标准品 α -蒎品烯购于上海 Aladdin-阿拉丁试剂公司($\geq 90\%$)。

1.2 挥发油制备及成分分析

挥发油的制备:将土荆芥材料剪成 1—2 cm 的小段,参照 Radwan 等^[25]的水蒸气蒸馏法略有改进提取土荆芥挥发油。将土荆芥材料蒸馏 3 h,得到淡黄色的挥发油水合物,加入无水 Na_2SO_4 脱水,置于 4℃ 冰箱保存备用。

α -蒎品烯相对含量的测定:采用 Agilent 7890B/7000c 气相色谱-质谱联用法(GC-MS)测定土荆芥挥发油中 α -蒎品烯的相对含量。选用 DB-5ms(规格为 60 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm)毛细管色谱柱;恒流模式,载气为 99.999%氦气,流量为 1.0 mL/min;升温程序为初始温度 80℃,保持 2 min,以 5℃/min 升至 200℃,再以 20℃/min 升至 260℃;进样口温度 250℃;采用 10:1 分流比进样,进样体积为 1 μL ,采用峰面积归一化法测算^[26],计算土荆芥挥发油中 α -蒎品烯的相对百分活性。并以此结果设定 α -蒎品烯的处理浓度。

1.3 材料培养和试验处理

材料培养:配制 0.7% 琼脂培养基,分装到玻璃培养瓶中(高 90 mm,直径 68 mm),每瓶 30 mL,121℃ 灭

菌 20 min, 备用; 选取大小一致、健康的玉米、大豆、苦荞麦种子, 0.5% KMnO_4 消毒 10 min 后, 用蒸馏水冲洗至液体无色, 将种子置于相对湿度 70%, 25°C 培养箱中暗处浸种 (玉米 24 h, 大豆 8 h, 苦荞麦 24 h), 使其充分吸胀后, 铺于垫有湿润纱布的托盘中催芽, 待种子露白后, 将胚根朝外插入纯琼脂培养基中, 其中, 玉米 10 颗/瓶, 大豆 5 颗/瓶, 苦荞麦 15 颗/瓶, 旋紧瓶盖, 置于相对湿度 70%, 25°C 培养箱中暗培养, 中悬空气法倒置培养。12 h 后, 参照 Huskey 等^[27]的方法略有改动去除根边缘细胞, 即将根尖浸入蒸馏水 2 min, 使根边缘细胞及其胞外分泌物从根上散开, 进一步用纱布轻轻将其刮除获得移除根边缘细胞的根尖, 再将这些露白种子根尖朝外插入纯琼脂培养基。设置挥发油 (V) 和 α -萜品烯 (T) 2 个处理组, 每组设置 3 个处理梯度, 挥发油的处理浓度分别为 6.25 $\mu\text{L/L}$ 、12.50 $\mu\text{L/L}$ 和 25.00 $\mu\text{L/L}$ (记为 V1、V2、V3), 根据 V1、V2、V3 中 α -萜品烯的相对含量设定其处理浓度, 分别为 3.125 $\mu\text{L/L}$ 、6.255 $\mu\text{L/L}$ 和 12.510 $\mu\text{L/L}$ (记为 T1、T2、T3)。

1.4 根边缘细胞数量、长度和弯曲度的测定

分别将 5 μL 不同浓度的挥发油和 α -萜品烯处理液滴加在培养瓶的瓶盖上, 以不滴加挥发物的处理作为对照 (CK), 旋紧瓶盖并倒置放在托盘上, 置于相对湿度 70%, 25°C 培养箱中暗培养, 分别处理 2 h、4 h 和 6 h。

根边缘细胞数量测定: 分别剪取处理 2 h、4 h 和 6 h 后的 5 mm 根尖, 置于装有 100 μL 蒸馏水的离心管中 (玉米 5 根/管; 大豆 3 根/管; 苦荞麦 10 根/管), 漩涡震荡仪震荡 60 s 左右, 用镊子取出根尖, 制成细胞悬液, 再向细胞悬液中加入 100 μL 0.4% 的台盼蓝染液, 混合均匀后染色 3 min 后, 取台盼蓝染色后的细胞悬液 10 μL 滴加在细胞计数板上, 混匀后盖上盖玻片, 在 Nikon ECLIPSE 55i 荧光显微镜明场下观测并计数。每个处理重复 3 次。

根边缘细胞长度和弯曲度测定: 分别剪取处理 6 h 后的 5 mm 根尖, 置于装有 200 μL 蒸馏水的离心管中 (玉米 5 根/管; 大豆 3 根/管; 苦荞麦 10 根/管), 漩涡震荡仪震荡 60 s 左右, 用镊子取出根尖, 制成细胞悬液, 在 Nikon ECLIPSE 55i 荧光显微镜明场下拍照, 用 image J 软件测量根边缘细胞的长度和弯曲度。每处理分别统计 200 个细胞, 根据统计所得数据计算不同长度和弯曲度的根边缘细胞所占比例 (%)。每个处理重复 3 次。

1.5 根尖转录组学分析和 qRT-PCR 验证

1.5.1 转录组学分析

分别将 5 μL 的 V2 和 T2 处理液滴加在培养瓶的瓶盖上, 以不滴加挥发物的处理为对照 (CK)。旋紧瓶盖并倒置放在托盘上, 置于相对湿度 70%, 25°C 培养箱中暗培养持续处理 24 h。根边缘细胞形成是一个连续再生的过程, 必须间隔一定时间去除根边缘细胞及其胞外分泌物, 才能保证无根边缘细胞及其胞外分泌物组材料的可靠性, 转录组结果的可信性, 因此按照 1.3 方法每隔 6 h 除去 1 次根边缘细胞及其胞外分泌物。各处理组的编号见表 1。处理结束后, 用 ddH₂O 清洗根尖 3 次, 再用 75% 乙醇消毒后, 将根尖迅速置于液氮中速冻送上海中科新生命生物科技有限公司进行转录组学分析。

表 1 根边缘细胞移除试验处理组编号一览表

Table 1 List of treatment group for root border cells removal test

受体植物 Receptor plants	处理 Treatment			对比组 Compared
	对照组 Control (CK)	挥发油 Volatiles oil (V)	α -萜品烯 α -terpinene (T)	
玉米 <i>Zea mays</i> (Z)	ZCK	ZV	ZT	ZCK vs ZT ZCK vs ZV
大豆 <i>Glycine max</i> (G)	GCK	GV	GT	GCK vs GT GCK vs GV
苦荞麦 <i>Fagopyrum tataricum</i> (F)	FCK	FV	FT	FCK vs FT FCK vs FV

用标准提取法从 Trizol 液中提取根尖总 RNA, NanoPhotometer[®] 分光光度计 (加利福尼亚州, 美国) 检测 RNA 纯度, RNA Nano 6000 检测试剂盒 (Bioanalyzer 2100 系统, 安捷伦技术, CA, 美国) 评估 RNA 完整性。具

有高于 8.0 RIN(RNA integrity number) 值的 RNA 用于测序文库构建,随后在 Illumina HiSeq 4000 平台上进行测序得到 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(v 2.0.5) 将 clean reads 与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 R 包 Pheatmap 对 FPKM >5 的差异基因聚类分析。使用 DESeq2(1.16.1) 进行差异基因(differential expressed genes, DEGs) 表达分析,将 $\text{padj} < 0.05$ & $|\log_2\text{foldchange}| > 1$ 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。

1.5.2 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)

在玉米、大豆和苦荞麦不同处理组对比中,分别挑选出与植物细胞壁糖蛋白代谢和果胶代谢信号通路相关的 17、12 和 33 个差异表达基因,以验证转录组的准确性。参照 Rasool 等^[28]的方法略有改动,即使用 Trizol 法提取根尖 RNA。使用 HiScript III 反转录试剂盒(诺唯赞,南京,中国)将 2 μg RNA 反转录成 cDNA。RT-qPCR 在 MiniOpticon™ Real-Time PCR Detection Systems(Bio-Rad, USA),Bio-Rad CFX Manager (V 3.1) 实时序列检测系统中使用 2 \times ChamQ Universal SYBR qPCR 混合物试剂盒(诺唯赞,南京,中国)在 qTOWER³ Series 实时 PCR 平台进行实时定量 PCR。*Actin-1* 基因、 β -*Actin* 基因和 *FtH3* 基因分别作为玉米、大豆和苦荞麦的内参基因^[29-31],采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析差异表达情况。利用 NCBI 网站(Primer designing tool (nih.gov)) 设计引物,由擎科生物科技股份有限公司合成引物,每个处理包括 3 个生物重复,每个样本包括 3 个技术重复。

1.6 数据统计与分析

计算 Williamson 和 Richardson^[32] 的化感作用响应指数(Allelopathy response index, *RI*),用于衡量化感作用强度。

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

$$RI = \frac{T}{C} - 1, \quad (T < C) \quad (2)$$

式中, *C* 为对照组(CK)的算数平均值, *T* 为不同处理组的算数平均值, *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^[33]。

试验数据用 SPSS 25.0 进行单因素重复测量方差分析(One-Way Repeated Measures ANOVA) 和多重比较(LSD)分析,采用 Tukey 法进行差异显著性检验。Excel 2019 和 GraphPad Prism 9 作图。

2 结果与分析

2.1 土荆芥挥发物对受体根边缘细胞的影响

2.1.1 对根边缘细胞数量的影响

土荆芥挥发物对受体根边缘细胞数量的影响表现为时间和浓度双重效应(图 1),低浓度挥发物促进根边缘细胞产生,高浓度则抑制作用。V1 处理 2 h 时,玉米、大豆和苦荞麦的根边缘细胞数量挥发油处理组分别是对照组的 2.95 倍、1.71 倍和 1.30 倍;V3 处理 6 h 时,处理组分别是对照组的 0.48 倍、0.64 倍和 0.53 倍。T1 处理 2 h 时, α -蒎品烯处理组分别是对照的 2.50 倍、2.03 倍和 1.84 倍;T3 处理 6 h 时,处理组分别是对照组的 0.84 倍、1.13 倍和 0.88 倍。由此可见,随着处理时间的延长,根边缘细胞数量增长速率减缓,最后甚至低于对照组细胞数量。在土荆芥挥发物作用早期,受体植物产生应激反应,通过释放较多的根边缘细胞以应对土荆芥化感胁迫,但随着时间胁迫程度加深,这种缓解效应受到抑制,因此土荆芥挥发油和 α -蒎品烯对 3 种受体根边缘细胞数量的促进作用仅仅是短暂效应。

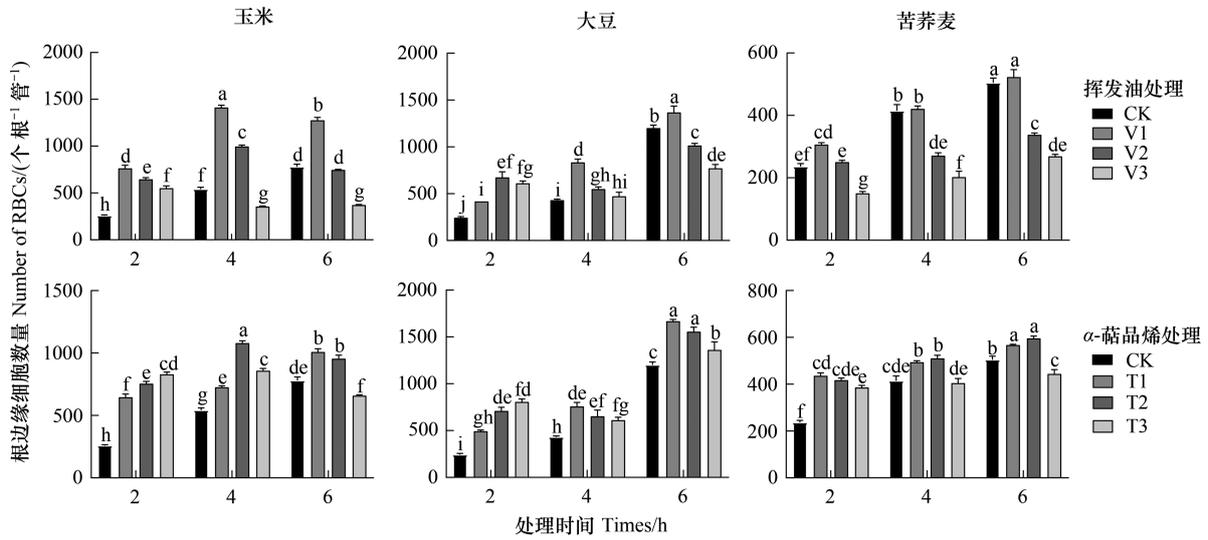


图 1 土荆芥挥发物作用下 3 种受体根边缘细胞数量的变化

Fig.1 Changes in the number of root border cells of three receptors by the stress of volatiles of *Chenopodium ambrosioides*

CK: 对照组; V1: 挥发物的处理浓度为 6.25 $\mu\text{L/L}$; V2: 挥发物的处理浓度为 12.50 $\mu\text{L/L}$; V3: 挥发物的处理浓度为 25.00 $\mu\text{L/L}$; T1: α -蒎品烯处理浓度为 3.125 $\mu\text{L/L}$; T2: α -蒎品烯处理浓度为 6.255 $\mu\text{L/L}$; T3: α -蒎品烯处理浓度为 12.510 $\mu\text{L/L}$; RBCs: 根边缘细胞 Root border cells; 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

2.1.2 土荆芥挥发物对受体根边缘细胞长度的影响

与对照相比,土荆芥挥发油和 α -蒎品烯作用下 3 种受体根边缘细胞长度变短,并表现为浓度依赖效应(图 2)。挥发油处理组中玉米、大豆和苦荞麦根边缘细胞的平均长度分别是对照组的 0.95 倍、0.99 倍和 0.89 倍; α -蒎品烯处理组中玉米根边缘细胞的平均长度变化整体不明显,大豆和苦荞麦的细胞平均长度分别是对照组的 0.97 倍和 0.93 倍。在低浓度(V1, T1)处理组中,挥发油处理组中玉米、大豆和苦荞麦细胞长度大于

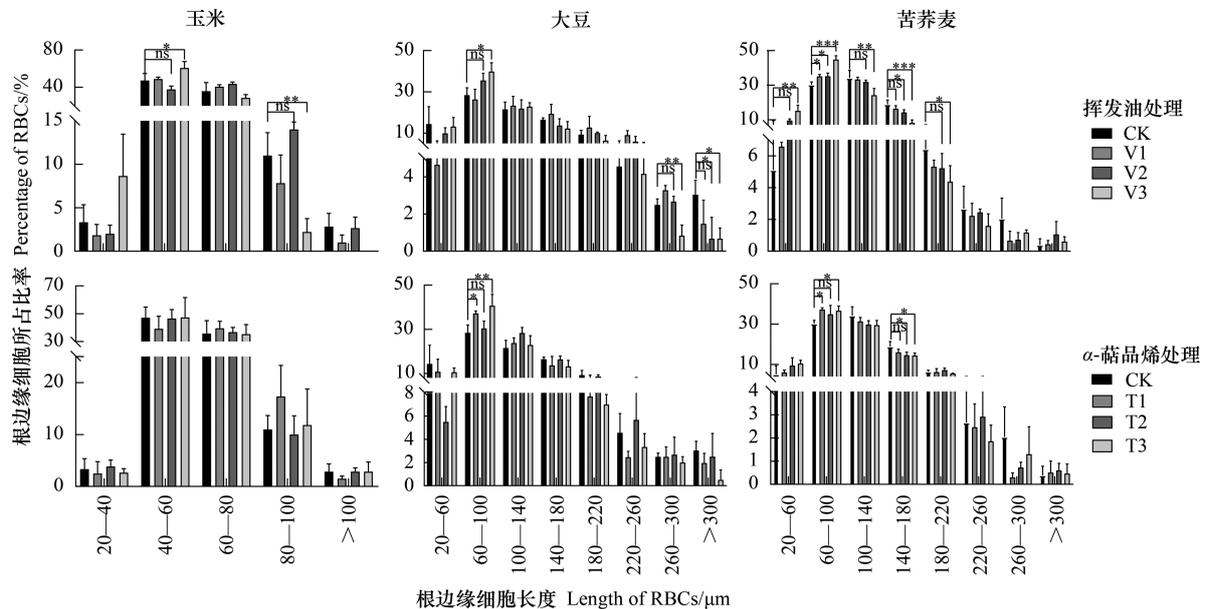


图 2 土荆芥挥发物对 3 种受体根边缘细胞长度的影响

Fig.2 Effect of cell length at the root border cells of three receptors by the stress of volatiles of *Chenopodium ambrosioides*

ns 表示不显著, * 表示相对于对照组 $P < 0.05$, ** 表示相对于对照组 $P < 0.01$, *** 表示相对于对照组 $P < 0.001$

100 μm 的根边缘细胞数量分别是对照组的 0.35 倍、1.21 倍和 0.90 倍, α -萜品烯处理组中大豆和苦荞麦长度大于 100 μm 的根边缘细胞数量分别是对照组的 0.91 倍和 0.88 倍。在高浓度(V3、T3)处理组中, 挥发油作用下玉米根边缘细胞的长度均小于 100 μm , 大豆和苦荞麦的细胞长度大于 100 μm 的根边缘细胞数量分别是对照组的 0.82 倍和 0.62 倍。 α -萜品烯处理组中大豆和苦荞麦的细胞长度大于 100 μm 的根边缘细胞数量分别是对照组的 0.85 倍和 0.82 倍。根边缘细胞长度越长, 与根冠外层细胞的附着力越大。因此, 本研究结果表明, 土荆芥挥发物处理降低了根边缘细胞与根冠的粘附力, 促进了根边缘细胞的释放。

2.1.3 土荆芥挥发油对受体根边缘细胞弯曲度的影响

土荆芥挥发油和 α -萜品烯对 3 种受体根边缘细胞弯曲度均有影响(图 3), 整体表现为低浓度增加弯曲度而高浓度降低弯曲度。在土荆芥挥发油和 α -萜品烯胁迫下, 在低浓度(V1、T1)和中浓度处理组(V2、T2)中受体根边缘细胞弯曲度大于对照, 而在高浓度处理组则小于对照组。V3 处理组中玉米、大豆和苦荞麦中细胞弯曲度大于 30° 的根边缘细胞数量分别为对照组的 0.03 倍、0.38 倍和 0.37 倍, T3 处理组中根边缘细胞弯曲度变化不明显。根边缘细胞的弯曲度越大有效附着面积越小, 根边缘细胞越容易释放出来。因此, 上述结果表明, 低强度的土荆芥挥发物胁迫时, 可激活了受体根边缘细胞的释放机制, 但随着胁迫强度加大, 根尖释放根边缘

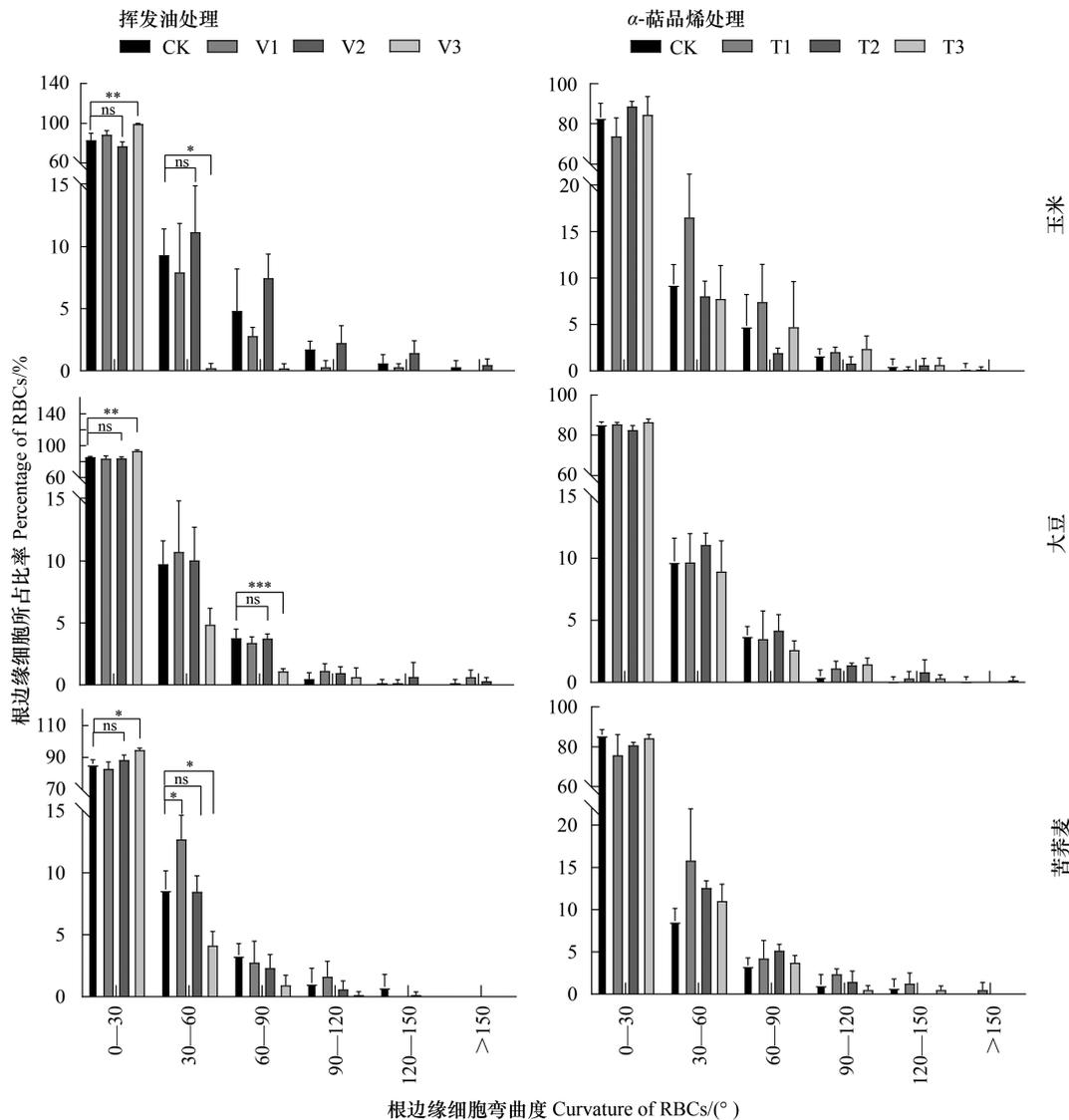


图 3 土荆芥挥发物对 3 种受体根边缘细胞弯曲度的影响

Fig.3 Effect of curvature of root border cells of three receptors by the stress of volatiles of *Chenopodium ambrosioides*

细胞的过程受到抑制。

2.1.4 3 种受体植物根边缘细胞释放过程对土荆芥挥发物敏感性比较

综合土荆芥挥发物对 3 种受体植物化感潜力发现(表 2),挥发油对根边缘细胞的影响具有浓度效应,低浓度处理(0.277)和中浓度(0.245)的化感综合指数小于高浓度处理组(0.507);两种挥发物对根边缘细胞产生和释放的影响表现为挥发油(0.343) $>$ α -萜品烯(0.262);3 种受体植物根边缘细胞释放对土荆芥挥发物的敏感程度由大到小依次为玉米(0.342) $>$ 苦荞麦(0.286) $>$ 大豆(0.279)。根边缘细胞的快速释放则是伴随着根边缘细胞的长度缩短和弯曲度变大,以减少与根冠外层细胞的接触面积。本研究结果表明在土荆芥挥发物胁迫下,在补充根边缘细胞加固防御功能方面,外地种玉米的反应速度要远快于本地种大豆和苦荞麦。

表 2 土荆芥挥发物对三种受体植物化感效应的比较

Table 2 Comparison of allelopathic effects of volatiles from *Chenopodium ambrosioides* on three receptor plants

处理组 Treatments		化感效应指数 Allelopathy response index (RI)									综合效应 Synthesis effect	
		玉米 <i>Zea mays</i>			大豆 <i>Glycine max</i>			苦荞麦 <i>Fagopyrum tataricum</i>				
		N	L	C	N	L	C	N	L	C		
挥发油浓度	V1	0.389	0.308	0.493	0.122	0.312	0.259	0.036	0.206	0.370	0.277	0.343
Concentration of	V2	0.043	0.212	0.295	0.156	0.230	0.301	0.331	0.308	0.325	0.245	
volatiles oil/(μ L/L)	V3	0.524	0.568	0.850	0.358	0.317	0.588	0.467	0.254	0.640	0.507	
α -萜品烯浓度	T1	0.227	0.271	0.373	0.279	0.218	0.358	0.110	0.221	0.446	0.278	0.262
Concentration of	T2	0.183	0.053	0.545	0.228	0.179	0.448	0.154	0.268	0.390	0.272	
α -terpinene/(μ L/L)	T3	0.155	0.057	0.605	0.117	0.296	0.263	0.120	0.254	0.254	0.236	
综合效应 Synthesis effect			0.342			0.279			0.286			

N:根边缘细胞的数量 Number of RBCs;L:根边缘细胞的长度 Length of RBCs;C:根边缘细胞的弯曲度 Curvature of RBCs;V1:挥发油的处理浓度为 6.25 μ L/L;V2:挥发油的处理浓度为 12.50 μ L/L;V3:挥发油的处理浓度为 25.00 μ L/L;T1: α -萜品烯处理浓度为 3.125 μ L/L;T2: α -萜品烯处理浓度为 6.255 μ L/L;T3: α -萜品烯处理浓度为 12.510 μ L/L

2.2 土荆芥挥发物作用下受体植物根转录组学分析结果

2.2.1 土荆芥挥发物作用下受体植物根差异表达基因的筛选与 qRT-PCR 验证结果

为了降低基因长度和测序深度对基因表达量的干扰,将苦荞麦、大豆和玉米的 reads 数转换成 FPKM 值,使用 $\log_{10}(\text{FPKM}+1)$ 值进行样本之间相关性分析,检验试验的可靠性和样本选择是否合理,结果表明相同处理的 3 个生物学重复具有相似的基因表达情况(图 4);进一步使用 hclust 函数对样本进行聚类分析发现,相同处理的生物学重复具有较强的相关性,且同一物种的 CK、V 和 T 处理分别聚在不同分支里,表明挥发油和 α -萜品烯对根部的基因表达模式具有一定影响(图 5)。通过分析,土荆芥挥发油处理下,从苦荞麦、大豆和玉米的幼根分别鉴定出 2506、461 个和 4222 个差异表达基因,其中下调基因分别为 1524、209 个和 1746 个,上调基因分别为 982、252 个和 2476 个。 α -萜品烯处理下,苦荞麦、大豆和玉米的幼根中分别鉴定出 291、1986 个和 3015 个差异表达基因,其中下调基因分别为 145、757 和 1759 个,上调基因分别为 146、1229 个和 1256 个。

为了验证受体幼根转录组分析结果的准确性(图 6),在玉米、大豆和苦荞麦不同处理组对比中分别挑选出与植物细胞壁糖蛋白代谢和果胶代谢信号通路相关的 17、12 个和 33 个差异表达基因进行 qRT-PCR 分析。通过 FPKM 和 qRT-PCR 方法对这些基因的相对表达水平进行了比较,结果如图 6 所示,qRT-PCR 结果与转录组所得结果基本一致,说明转录组数据可靠。

2.2.2 土荆芥挥发物作用下受体幼根差异基因富集的 KEGG 通路

挥发油处理组中,苦荞麦、大豆和玉米的差异基因显著富集($P<0.05$)的 KEGG Pathway 分别有 16、9 个和 14 个。苦荞麦的苯丙素生物合成、谷胱甘肽代谢和类黄酮生物合成等生物过程被显著富集;大豆的次级代谢产物生物合成、昼夜节律-植物和类黄酮生物合成等生物过程被显著富集;玉米的苯丙素生物合成、次级代谢产物生物合成等生物过程被显著富集。其中玉米素生物合成和苯丙素生物合成在 3 个受体中都显著富集(图 7)。 α -萜品烯处理组中,苦荞麦、大豆和玉米的差异基因显著富集($P<0.05$)的 KEGG Pathway 分别有 8、25 个和 13 个。苦荞麦的苯丙素生物合成、谷胱甘肽代谢和氧化磷酸化等生物过程被显著富集;大豆的次级

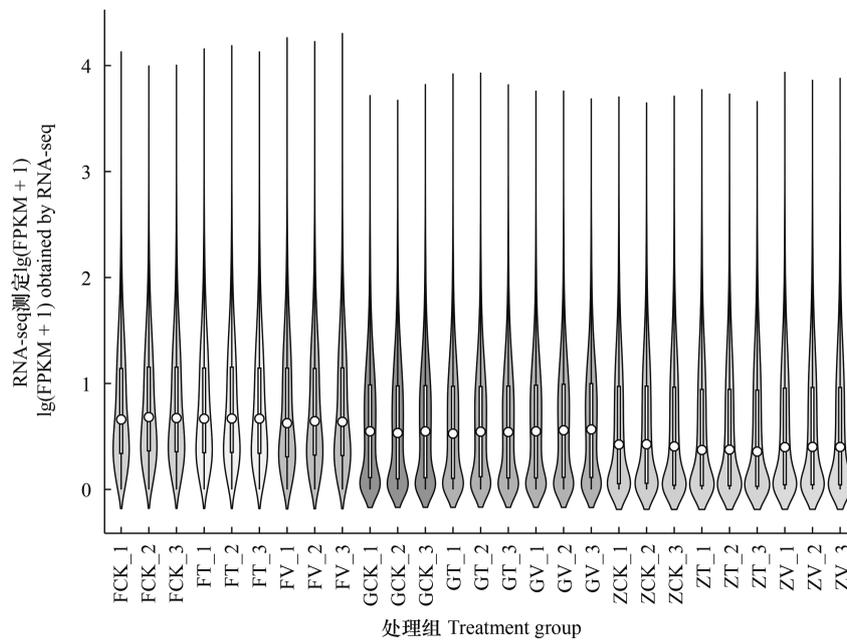


图 4 土荆芥挥发物胁迫下 3 个受体根 $\log_{10}(\text{FPKM}+1)$ 的基因整体表达水平

Fig.4 Overall gene expression levels of $\log_{10}(\text{FPKM}+1)$ in the roots of three receptors exposed to the volatiles of *Chenopodium ambrosioides*

FPKM: 每百万映射片段中外显子每千碱基的 Fragments Per Kilobase of exon per Million fragments mapped; 片段数 FCK: 对照组的苦荞麦; FT: α -萜品烯处理的苦荞麦; FV: 挥发油处理的苦荞麦; GCK: 对照组的大豆; GT: α -萜品烯处理的大豆; GV: 挥发油处理的大豆; ZCK: 对照组的玉米; ZT: α -萜品烯处理的玉米; ZV: 挥发油处理的玉米

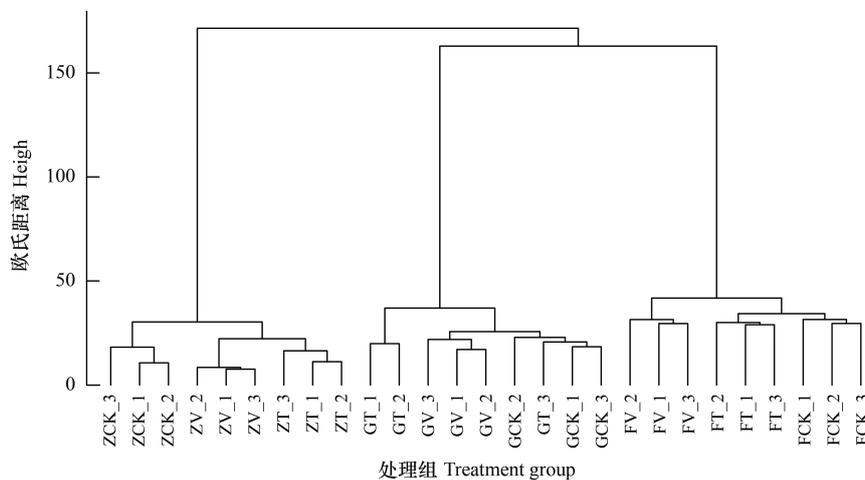


图 5 土荆芥挥发物胁迫下 3 个受体根基因表达量聚类分析

Fig.5 Cluster analysis of gene expression levels in the roots of three receptors exposed to the volatiles of *Chenopodium ambrosioides*

代谢产物生物合成等生物过程被显著富集; 玉米中苯丙素生物合成、次级代谢产物生物合成等生物过程被显著富集。其中, 在 2 个挥发物处理组的 3 个受体幼根中苯丙素生物合成都显著富集(图 7)。上述结果可见, 在 2 种挥发物作用下, 3 个受体受影响的信号通路具有差异性, 但也存在诸多共性。

2.2.3 土荆芥挥发物作用下受体根边缘细胞释放相关基因的差异表达

根边缘细胞从根冠外层释放出来, 涉及细胞壁的重塑和细胞壁中间层果胶的降解等过程。转录组分析表明, 土荆芥挥发物作用下, 3 种受体调控这些过程的基因表达发生了显著变化。纤维素、木质素、果胶等是细胞壁的关键成分, 3 种受体均显著富集到苯丙素生物合成通路(图 8), 该通路中苯丙氨酸解氨酶(henylalanine

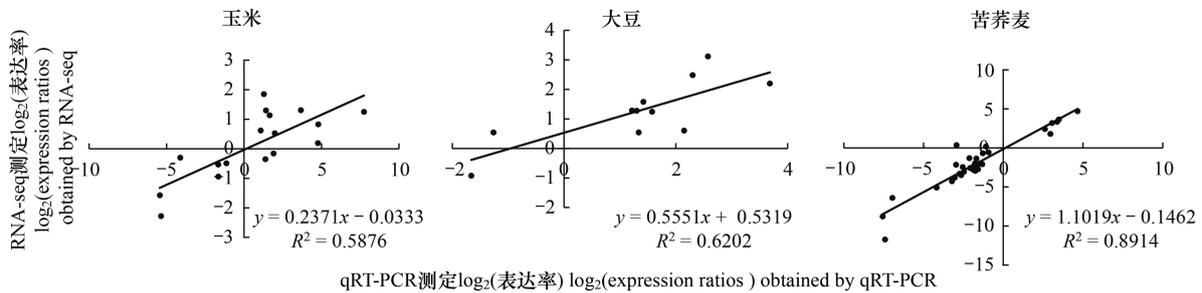


图 6 土荆芥挥发物作用下 3 种受体幼根细胞与根边缘细胞释放相关信号通路差异表达基因的 qRT-PCR 分析

Fig.6 qRT-PCR analysis of differentially expressed genes of the signaling pathway associated with root border cells release in young roots of three receptors by the stress of volatiles of *Chenopodium ambrosioides*

qRT-PCR: 实时荧光定量聚合酶链式反应 quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction

ammonia-lyase, PAL)、4-香豆酸辅酶 A 连接酶 (4-coumarate: coenzyme a ligase, 4CL)、肉桂酰辅酶 A 还原酶 (cinnamoyl-coa reductase, CCR)、肉桂醇脱氢酶 (cinnamyl-alcohol dehydrogenase, CAD)、过氧化物酶 (peroxidase, POD)、阿魏酸-5-羟化酶 (ferulic acid 5-hydroxylase, F5H) 等与木质素代谢有关。果胶合成信号通路与果胶在细胞壁及其中间层的生理代谢动态平衡有关,在土荆芥挥发物作用下,与该通路相关的己糖激酶 (hexokinase, HK)、磷酸葡萄糖变位酶 (phosphoglucosmutase, PGM)、 α -1,4-半乳糖醛糖基转移酶 (alpha-1,4-galactosyltransferase, A4GALT) 等基因发生较大变化 (图 9)。此外,差异表达的基因还包括编码纤维素合成酶 (cellulose synthase, CesA)、内葡聚糖酶 (endoglucanases, EGs) 和 β -葡萄糖苷酶 (beta-glucosidases, BGLs) 等,这些酶与细胞壁多糖生物合成、伸展蛋白和纤维素代谢有关 (图 11),由此可见土荆芥挥发物显著影响受体幼根细胞壁物质的生物合成过程,导致细胞壁发生重塑。

KEGG 分析表明,土荆芥挥发物胁迫后从受体幼根中富集到果胶降解通路的差异表达基因 (图 10),与果胶降解有关的 PME、果胶裂解酶 (pectin lyase, PLs) 以及内切聚半乳糖醛酸酶 (endo-polygalacturonase, PGs) 等基因表达发生变化,玉米、大豆和苦荞麦的幼根中与果胶降解相关的差异表达基因分别有 11、18 个和 3 个,玉米编码 PME 和降解半乳糖醛酸聚糖 (homogalacturonan, HG) 的 PGs 的关键基因均被激活;大豆编码 PME 和 PGs 的关键基因被激活;苦荞麦编码 PGs、PLs 和半乳糖 1,4- α -半乳糖醛酸酶 (galacturan 1,4-alpha-galacturonidase, exo-Pga) 关键基因均被激活。不同受体反应有所差异,玉米和大豆可能通过加速中间层的果胶降解,降低细胞间粘性,加速根边缘细胞的释放,而苦荞麦的果胶降解过程被显著抑制。

3 讨论

3.1 土荆芥挥发物化感胁迫干扰了受体根边缘细胞的产生和释放

作为植物根系尤其是根尖部位的重要保护结构,根边缘细胞及其胞外黏胶层可整合胁迫物质,从而保护根尖免遭外界胁迫的影响^[34]。化感作用对根边缘细胞的释放具有一定的影响,邻苯二甲酸胁迫时,花生根边缘细胞数量显著增加^[35],在一定条件下,土荆芥挥发油胁迫处理豌豆根边缘细胞数量也会明显增加^[22]。本研究结果表明,在受到轻度的土荆芥挥发物胁迫时,3 种受体根边缘细胞数量增多,但随着处理时间延长和挥发物浓度升高,这种促进效应减弱,甚至导致根边缘细胞数量低于对照。根边缘细胞的释放受根边缘细胞和根冠外层细胞之间的附着力影响,根边缘细胞的长度与有效附着面积呈正比,而弯曲度则呈反比^[19]。本研究发现,土荆芥挥发物导致 3 种受体根边缘细胞的长度整体缩短,降低了根边缘细胞与根冠外层细胞之间的接触面积,使其附着力降低;另一方面,3 种受体根边缘细胞的弯曲度随着土荆芥挥发物处理浓度的升高先增加后减小,表明在低强度化感胁迫下受体通过降低根边缘细胞与根冠外层细胞的黏附性,加速根边缘细胞的释放。但随着胁迫强度增大,通过释放更多根边缘细胞抵御胁迫的行为受到抑制。上述结果表明,土荆芥挥发

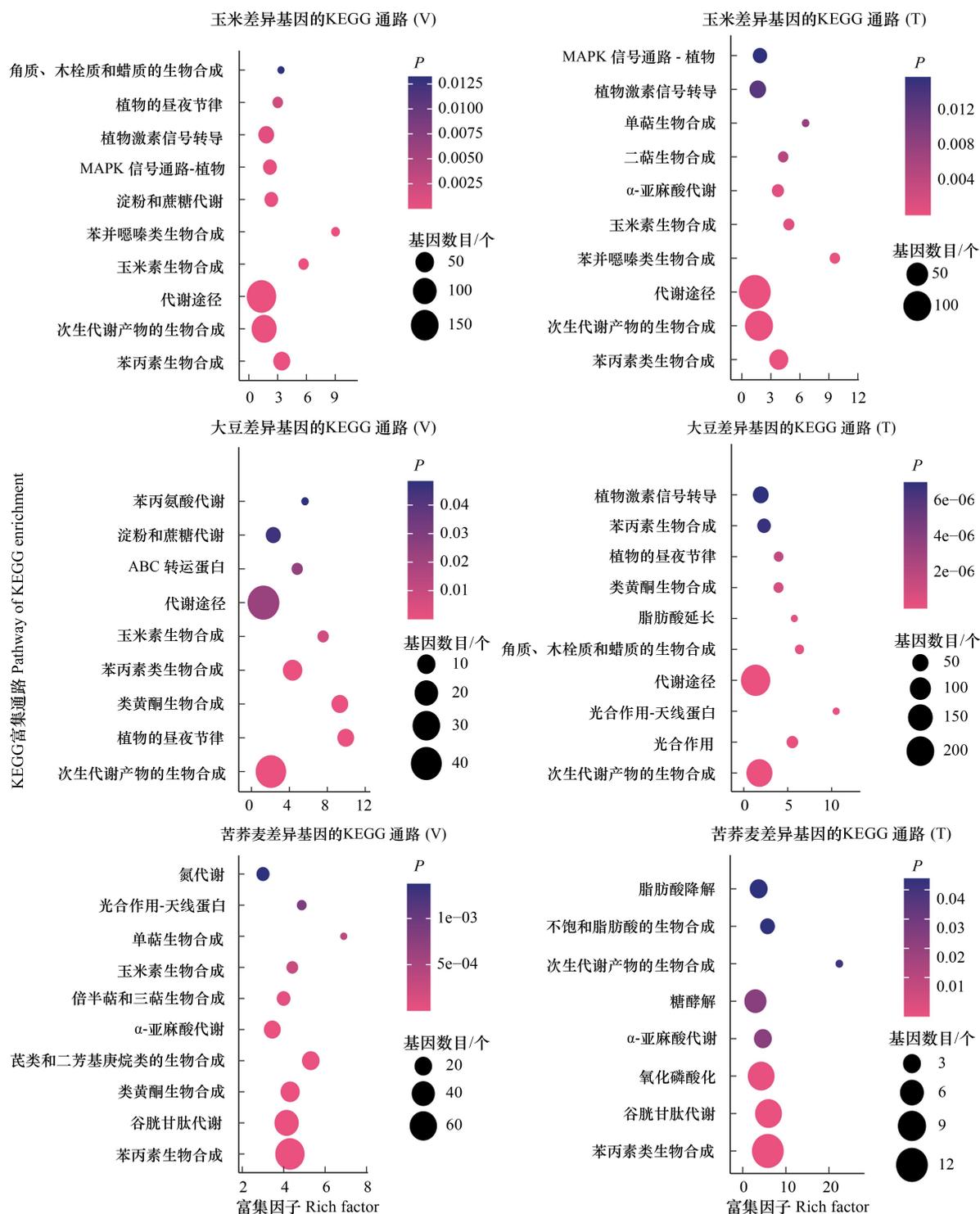


图 7 土荆芥挥发物胁迫下 3 种受体根差异表达基因的 KEGG 富集通路图

Fig.7 Enrichment of KEGG Pathways in the roots of three receptors exposed to the volatiles of *Chenopodium ambrosioides*

KEGG: 京都基因与基因组百科全书 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; V 代表土荆芥挥发油处理, T 代表 α -萜品烯处理

物胁迫改变了根边缘细胞的长度和弯曲度,从而干扰了根边缘细胞从根冠释放的过程,进而影响了根边缘细胞的数量。在 3 种受体植物中,外来种玉米对土荆芥化感胁迫的应激反应明显大于本地种大豆和苦荞麦,其防御功能更为灵敏。整体来看,挥发油胁迫对根边缘细胞释放的影响明显大于 α -萜品烯,其原因与挥发油复杂的成分及其这些成分的协同作用有关。

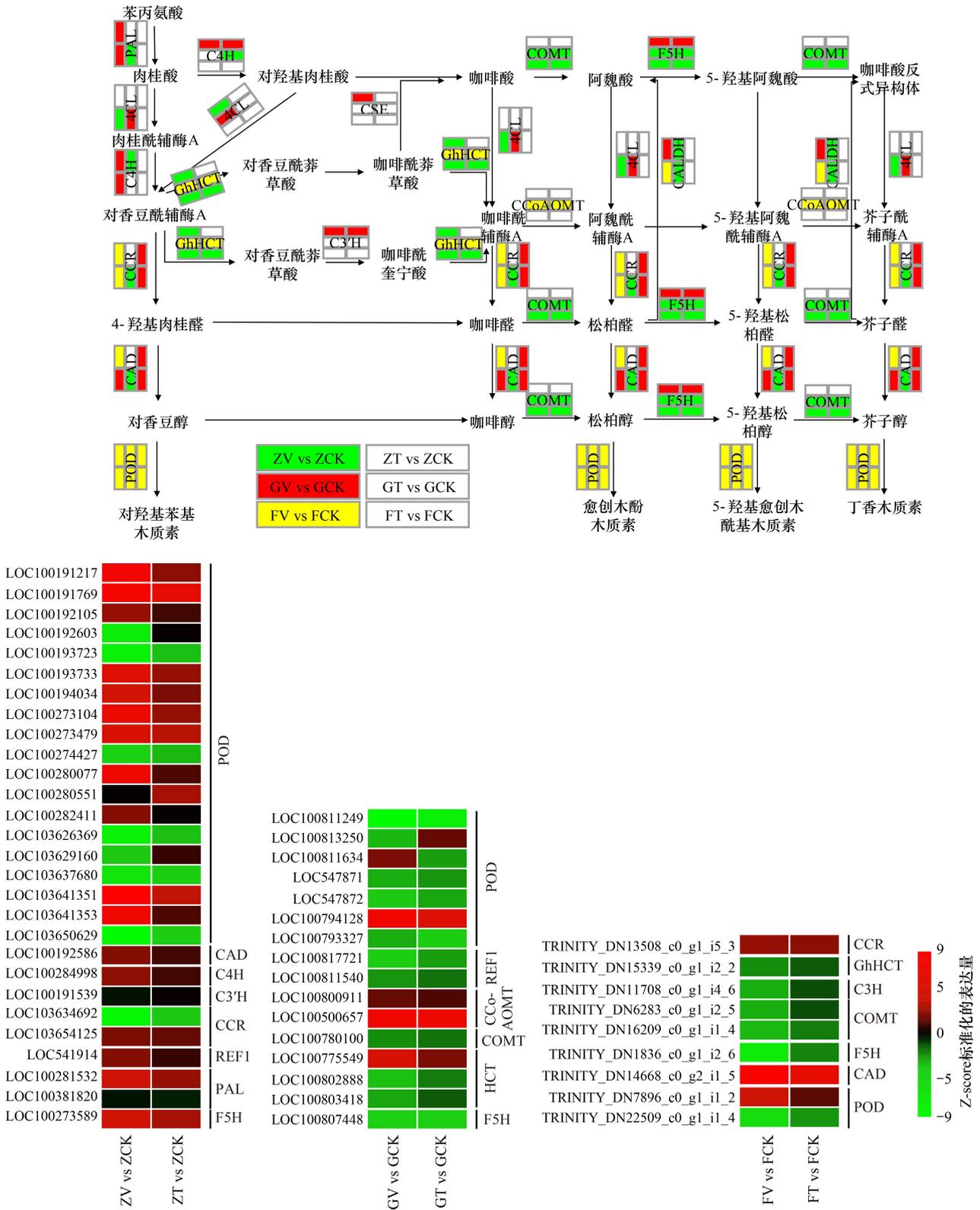


图 8 土荆芥挥发物作用下 3 种受体根尖差异基因的木质素生物合成途径和 FPKM 值热图

Fig.8 Lignin biosynthesis pathways and Heatmap of FPKM values for differentially expressed genes in in roots of three receptors by the stress of volatiles of *Chenopodium ambrosioides*

POD: 过氧化物酶;CAD:肉桂醇脱氢酶;CCR:肉桂酰辅酶A 还原酶;C4H:肉桂酸 4-羟化酶;4CL: 4-香豆酸辅酶 A 连接酶; PAL:苯丙氨酸解氨酶; GhHCT: 羟基肉桂酰辅酶A:莽草酸/奎宁酸羟基肉桂酰转移酶; CSE: 胱硫醚-γ-裂解酶; C3'H: 香豆酸 3-羟化酶; COMT: 儿茶酚-O-甲基转移酶; CCoAOMT: 咖啡酰辅酶A O-甲基转移酶; F5H: 阿魏酸-5-羟化酶; CALDH: 肉桂醇脱氢酶,红色框表示上调的差异基因,绿色框表示下调的差异基因、黄色框表示上调和下调的差异基因,空白框表示未改变的差异基因

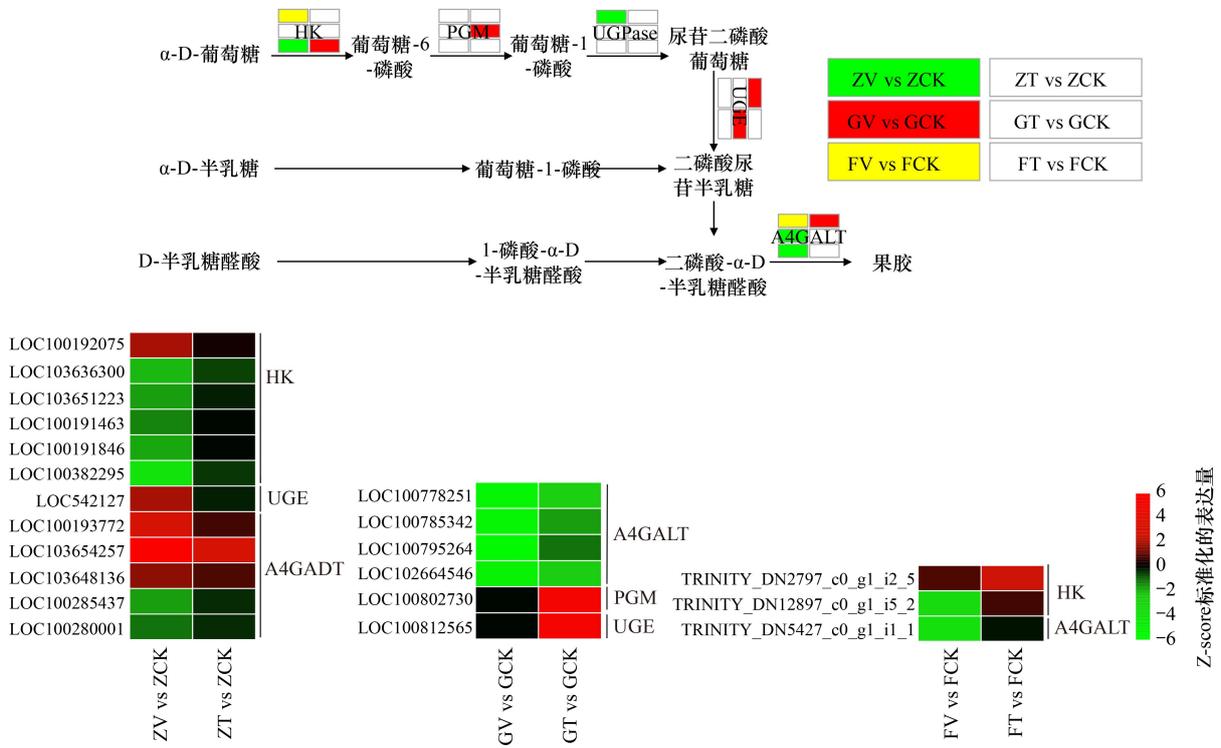


图9 土荆芥挥发物作用下3种受体根尖差异基因的果胶合成途径和FPKM值热图

Fig.9 Synthesis pathway of pectin and Heatmap of FPKM values for differentially expressed genes in roots of three receptors by the stress of volatiles of *Chenopodium ambrosioides*

HK: 己糖激酶; PGM: 磷酸葡萄糖变位酶; UGE: UDP-葡萄糖 4-差向异构; A4GALT: α-1,4-半乳糖醛糖基转移酶

3.2 土荆芥化感胁迫影响受体植物根边缘细胞释放的分子机制

作为一种类似于动物细胞中性粒细胞的“保卫细胞”^[6],根边缘细胞已被证实在受到低强度胁迫时可加速产生、释放以应对外界胁迫^[2]。根边缘细胞的成熟和释放是植物根系多种代谢途径和生物过程共同作用的结果,其中细胞壁形成细胞间的界面,在细胞黏附和分离中发挥重要作用^[36]。本研究通过转录组学揭示,土荆芥挥发物胁迫导致受体幼根所产生的许多差异表达基因与细胞壁密切相关,主要集中在细胞壁组织、细胞壁生物发生、纤维素分解过程等方面,尤其在挥发油处理组表现更为明显,而细胞壁形成和果胶降解在根边缘细胞的产生、释放和成熟中起着至关重要的作用。玉米、大豆和苦荞麦的幼根其参与细胞壁物质代谢的差异表达基因及其转录产物中,伸展蛋白在细胞板中形成带正电荷的支架,可在胞质分裂时进一步形成细胞壁物质有序沉积的模板^[37];甘露聚糖(Endo-1,4-β-mannosidase)是细胞壁物质半纤维素的关键成分^[38],其产生与构建细胞壁有关;类成束阿拉伯半乳聚糖蛋白(Fasciclin-like arabinogalactan proteins, FLAs)与其他纤维素、半纤维素和果胶等相互作用,参与细胞壁的构建^[39]。可见在受到土荆芥挥发物化感胁迫时,受体通过加速产生 FLAs 和 extension 等蛋白和提高纤维素酶等酶的活性,改变细胞壁的结构并加速根边缘细胞的形成。中间层富含果胶多糖尤其是同型半乳糖醛酸聚糖(HG)^[40],当HG的合成受阻会导致拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)的类根边缘细胞组织发生改变^[41]。根边缘细胞的分离需要 PME 对 HG 进行合成后脱甲基酯化^[42]。本研究结果表明,土荆芥化感胁迫下3种受体幼根的果胶降解代谢通路中的差异表达基因明显增多,玉米幼根共有11个差异表达基因与果胶降解途径有关,编码 PME 和降解 HG 的内切多聚半乳糖醛酸酶(Endopolygalacturonase, PGs)的关键基因均被激活;大豆幼根共有18个差异表达基因与果胶降解途径有关,编码 PME 和 PGs 的关键基因被激活;苦荞麦幼根共有3个差异表达基因与果胶降解途径有关,其中编码 PGs、果胶裂解酶(Pectate lyase, PLs)和半乳聚糖1,4-α-半乳糖醛酸酶(Galacturan 1,4-alpha-galacturonidase, exo-

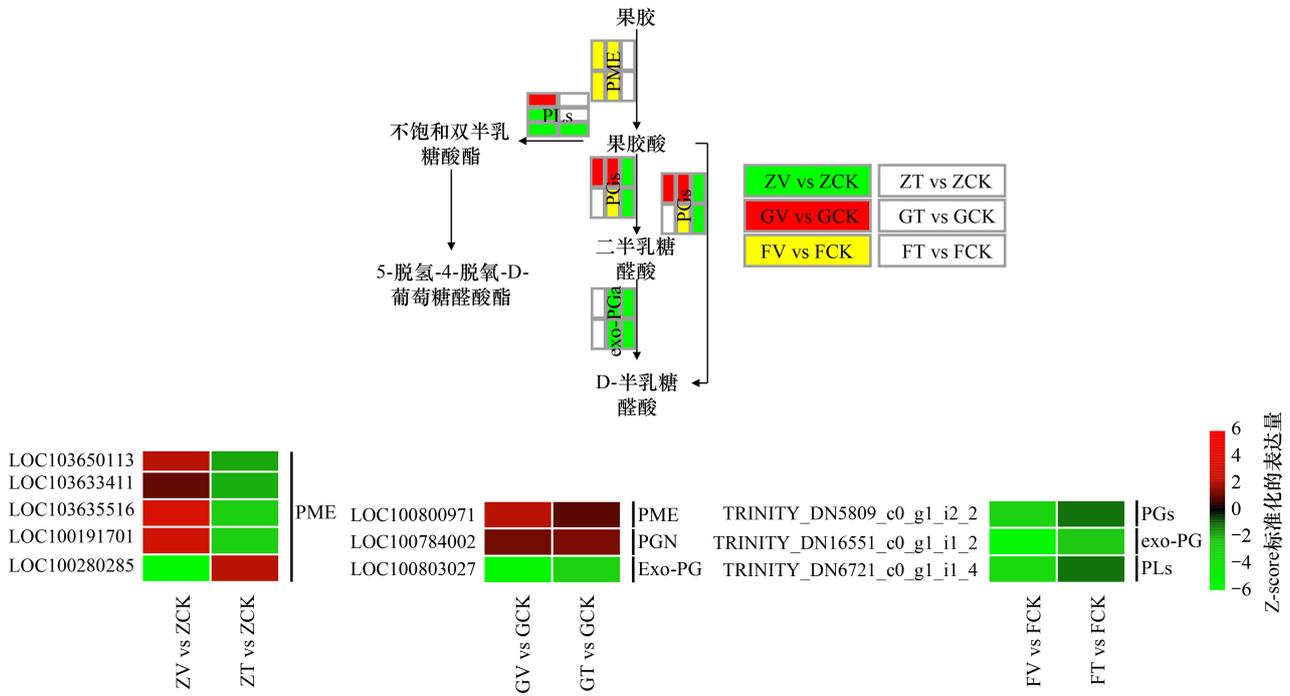


图 10 土荆芥挥发物作用下 3 种受体根尖差异基因的果胶降解途径和 FPKM 值热图

Fig.10 Degradation pathway of pectin and Heatmap of FPKM values for differentially expressed genes in in roots of three receptors by the stress of volatiles of *Chenopodium ambrosioides*

PME:果胶甲基酯酶; PGs:内切聚半乳糖醛酸酶; PLs:果胶裂解酶; exo-Pga:半乳糖 1,4-α-半乳糖醛酸酶

Pga) 关键基因均被激活。表明在土荆芥挥发物胁迫下 3 种受体幼根改变基因表达模式,提高 PME 等代谢酶的活性,加速降解中间层中的 HG 和果胶等黏附成分,促进根边缘细胞的释放来应对化感胁迫。但随着处理时间的延长,根边缘细胞的防御功能被削弱,导致根生长受阻。

木质素是细胞壁的关键成分,高木质化的细胞壁有利于植物抵抗胁迫。前人研究表明,干扰其他植物的苯丙素代谢通路是外来物种入侵新生境的机制之一,而苯丙素合成通路涉及了木质素代谢过程^[43]。根边缘细胞能提高木质素合成基因表达水平来抵抗化感胁迫,如在化感物质 4-HBA 胁迫下,葡萄(*Vitis vinifera* L.)的根边缘细胞提高木质素合成^[44]。本研究结果表明,土荆芥挥发物胁迫下,3 种受体幼根中都显著富集的苯丙素生物合成通路,其中涉及的木质素代谢过程与细胞壁的关键成分有关,包括 PAL、4CL、CCR、CAD、POD、F5H 等,说明了土荆芥化感胁迫干扰了受体的木质素代谢过程。与大豆和苦荞麦相比,玉米幼根中差异表达基因的变化存在“滞后性”特征。其中,和细胞壁形成以及细胞壁多糖代谢相关的蛋白质差异表达基因的变化,同样具有显著的滞后性。大豆参与该过程的相关基因上调幅度远远超出玉米,并且参与果胶降解的关键酶基因在大豆中的表达水平明显高于玉米中的表达水平。上述结果表明外来种玉米比本地种(大豆和苦荞麦)对土荆芥挥发物化感胁迫的耐受性更高,推测可能是玉米和土荆芥均原产于美洲,在土荆芥传入中国、威胁本地农作物(如大豆、苦荞麦)生存空间前,玉米与土荆芥长期共存过程中,已经形成了激活苯丙素合成通路来产生更多抗逆性物质应对土荆芥化感胁迫的机制,但是具体机制有待进一步证实。

4 结论

在土荆芥挥发物强度较低的化感胁迫下,玉米、大豆和苦荞麦的应激信号通路被激活,与木质素合成、果胶降解/合成以及细胞壁成分重塑等相关的信号通路基因呈现出差异表达,致使幼根重塑细胞壁,并加快中间层果胶的降解,缩短根边缘细胞的长度、增大根边缘细胞的弯曲度,以此降低根边缘细胞与根冠的粘附力,进

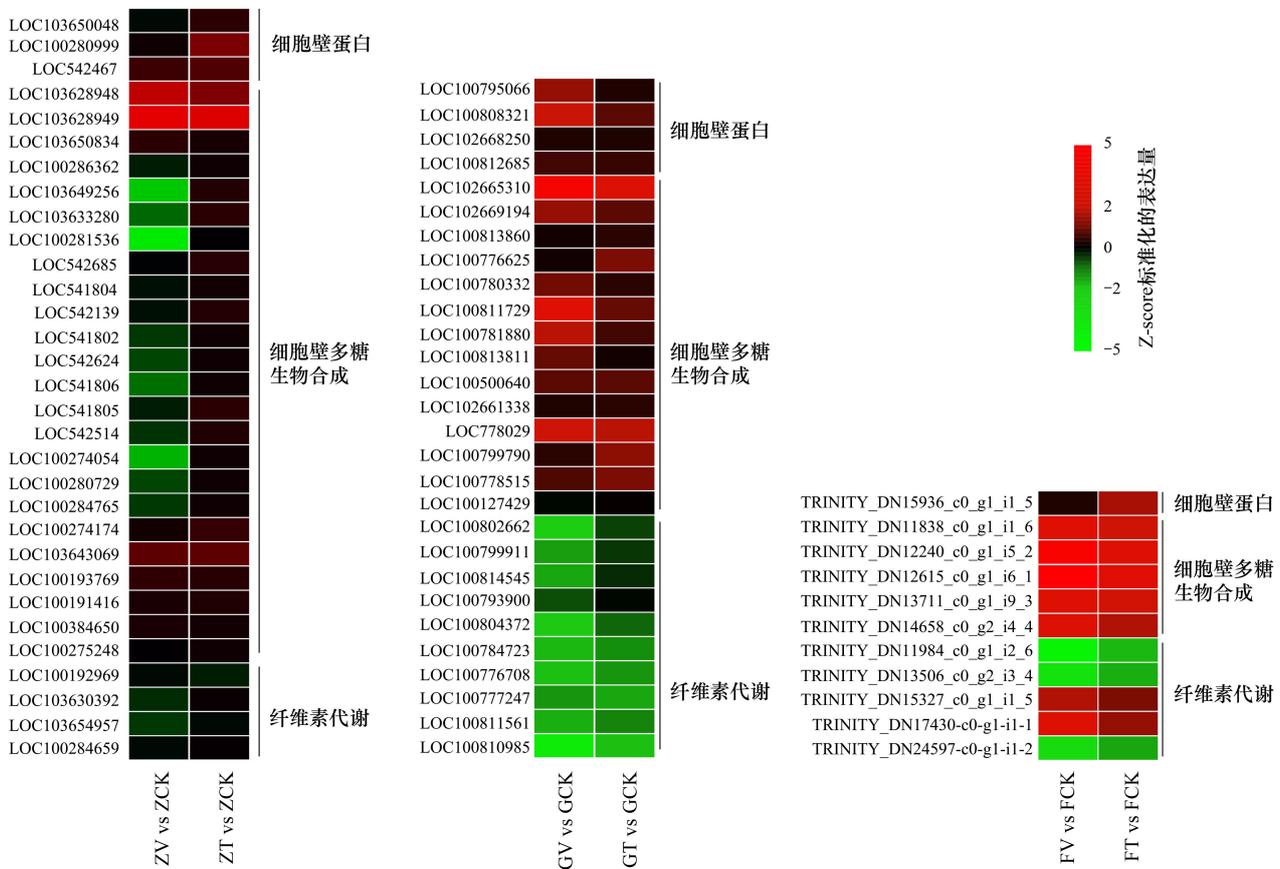


图 11 土荆芥挥发物作用下 3 种受体根尖细胞壁代谢的差异基因 FPKM 表达热图

Fig.11 Heatmap of FPKM values for differentially expressed genes with biosynthesis of cell wall material in roots of three receptors by the stress of volatiles of *Chenopodium ambrosioides*

而加速根边缘细胞的释放,以应对土荆芥化感胁迫。然而,这一过程只是暂时的,随着胁迫强度的增大,根边缘细胞的产生和释放受阻,受体对化感胁迫的防御功能下降。不同受体根边缘细胞的产生和释放对于土荆芥挥发物的敏感程度存在差异。外来种玉米对土荆芥化感胁迫的应激反应远快于本地种大豆和苦荞麦。

参考文献 (References):

[1] 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.
 [2] 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.
 [3] Lu Y J, Wang Y F, Wu B D, Wang S, Wei M, Du D L, Wang C Y. Allelopathy of three Compositae invasive alien species on indigenous *Lactuca sativa* L. enhanced under Cu and Pb pollution. *Scientia Horticulturae*, 2020, 267: 109323.
 [4] Hickman D T, Rasmussen A, Ritz K, Birkett M A, Neve P. Review: Allelochemicals as multi-kingdom plant defence compounds: towards an integrated approach. *Pest management science*, 2021, 77(3): 1121-1131.
 [5] 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.
 [6] Mckenzie B M, Mullins C E, Tisdall J M, Bengough A G. Root - soil friction: quantification provides evidence for measurable benefits for manipulation of root - tip traits. *Plant, Cell & Environment*, 2013, 36(6): 1085-1092.
 [7] Carreras A, Bernard S, Durambur G, Gügi B, Loutelier C, Pawlak B, Boulogne I, Vicré M, Driouich A, Goffner D. In vitro characterization of root extracellular trap and exudates of three Sahelian woody plant species. *Planta*, 2019, 251(1): 19.
 [8] Ma J, Feng X, Yang X, Cao Y, Zhao W, Sun L. 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(3): 174-180.
 [9] 宋兴江,王涛,李方向,常小箭,李欣迪,史岩,王佳,刘刚. 外来入侵植物野燕麦和节节麦对西安市小麦生产的危害研究. *中国农学通报*, 2023, 39(36): 112-118.
 [10] 侯清晨,冯燕楼,周玉洁,敖玉梅,陈春晓,邢亚娟,王庆贵,闫国永. 植物入侵机制的主要假说. *应用生态学报*, 2022, 33(11): 3105-1115.

- [11] 杨珊珊,王茜,胡庭兴,胡红玲,廖玉华,陈玉凤,谭飞,叶茂. 3 种农作物(玉米,黄瓜,豇豆)对银木凋落叶化感作用的生理响应. 应用与环境生物学报, 2018, 24(2): 292-298.
- [12] Bais H P, Weir T L, Perry L G, Gilroy S, Vivanco J M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol*, 2006, 57: 233-266.
- [13] Belz R G. Allelopathy in crop/weed interactions-an update. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 2007, 63(4): 308-326.
- [14] Talukder M R, Asaduzzaman M, Ueno M, Tanaka H, Asao T. Alleviation of allelochemical stress-induced growth inhibition and oxidative damage in lettuce under closed hydroponics through electro-degradation. *Horticultural Science*, 2020, 47(1): 53-68.
- [15] Chen B, Gou X, Ma D W, Zhou Y J. Volatiles from *Chenopodium ambrosioides* L. induce the oxidative damage in maize (*Zea mays* L.) radicles. *Allelopathy Journal*, 2016, 38(2): 171-181.
- [16] Sun L, Song J, Peng C, Xu C, Yuan X, Shi J. Mechanistic study of programmed cell death of root border cells of cucumber (*Cucumis sativus* L.) induced by copper. *Plant physiology and biochemistry*: PPB, 2015, 97: 412-419.
- [17] Abdulkader O M, Sharaf A E A, Fouda H M, Elhaw M H. Phytoconstitutes investigation of *Chenopodium ambrosioides* Linn. and gas chromatography with mass spectroscopy material analysis. *Materials Today:Proceedings*, 2022, 61: 992-997.
- [18] Ma J H, Feng X X, Yang X H. 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(3): 174-180.
- [19] Zhang Y, Wu Y, Xu G, Song J, Wu T, Mei X, Liu P. Effects of iron toxicity on the morphological and biological characteristics of rice root border cells. *Journal of Plant Nutrition*, 2017, 40(3): 332-343.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 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(6): 991-995.
- [23] 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.
- [24] Wang Q, Zhou X, He S, Wang W, Ma D, Wang Y, Zhang H. Receptor Plants Alleviated Allelopathic Stress from Invasive *Chenopodium ambrosioides* L. by Upregulating the Production and Autophagy of Their Root Border Cells. *Plants*, 2023, 12(22): 3810.
- [25] Radwan M N, Morad M, Ali M, Wasfy K I. Extraction of peppermint volatile oil using a simple constructed steam distillation system. *Plant Archives*, 2020, 20(2): 1487-1491.
- [26] Jingni W, Yanqiu D, Hongzhen T, Huang H, Zhang Z. Detection of Volatile Components in Leaves and Bark of *Picrasma quassioides* by GC-MS. *Medicinal Plant*, 2021, 12(1): 22-24.
- [27] Huskey D A, Curlango-Rivera G, Root R A, Wen F, Amistadi M K, Chorover J, Hawes M C. Trapping of lead (Pb) by corn and pea root border cells. *Plant and soil*, 2018, 430: 205-217.
- [28] Rasool F, Khan M R, Schneider M, Uzair M, Aqeel M, Ajmal W, Léon J, Naz A A. Transcriptome unveiled the gene expression patterns of root architecture in drought-tolerant and sensitive wheat genotypes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2022, 178: 20-30.
- [29] Ma N, Dong L, Lü W, Lü J, Meng Q, Liu P. Transcriptome analysis of maize seedling roots in response to nitrogen-, phosphorus-, and potassium deficiency. *Plant and soil*, 2020, 447: 637-658.
- [30] Sakamoto K, Ogiwara N, Kaji T, Sugimoto Y, Ueno M, Sonoda M, Matsui A, Ishida J, Tanaka M, Totoki Y. Transcriptome analysis of soybean (*Glycine max*) root genes differentially expressed in rhizobial, arbuscular mycorrhizal, and dual symbiosis. *Journal of plant research*, 2019, 132: 541-568.
- [31] Li C, Zhao H, Li M, Yao P, Li Q, Zhao X, Wang A, Chen H, Tang Z, Bu T. Validation of reference genes for gene expression studies in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) using quantitative real-time PCR. *PeerJ*, 2019, 7: e6522.
- [32] Bruce Williamson G, Richardson D. Bioassays for allelopathy: measuring treatment responses with independent controls. *Journal of chemical ecology*, 1988, 14: 181-187.
- [33] 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(6): 1931-1938.
- [34] Tran T M, Macintyre A, Hawes M. Escaping underground nets; extracellular DNases degrade plant extracellular traps and contribute to virulence of the plant pathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum*. *PLoS Pathogens*, 2016, 12(6): e1005686
- [35] 张永平,乔永旭. 邻苯二甲酸对花生根系边缘细胞发生的影响. 江苏农业科学, 2014, 42(2): 76-78.
- [36] Cannesan M A, Durand C, Burel C. Effect of Arabinogalactan Proteins from the Root Caps of Pea and *Brassica napus* on *Aphanomyces euteiches* Zoospore Chemotaxis and Germination. *Plant Physiology*, 2012, 159(4): 1658-1670.
- [37] Mravec J. Border cell release: Cell separation without cell wall degradation? *Plant signaling & behavior*, 2017, 12(7): e1343778.
- [38] Bien-Cuong D, Thi-Thu D, Berrin J-G, et al. Cloning, expression in *Pichia pastoris*, and characterization of a thermostable GH5 mannan endo-1, 4- β -mannosidase from *Aspergillus niger* BK01. *Microbial cell factories*, 2009, 8: 1-12
- [39] Wang H, Jin Y, Wang C. Fasciclin-like arabinogalactan proteins, PtFLAs, play important roles in GA-mediated tension wood formation in *Populus*. *Scientific reports*, 2017, 7(1): e6182.
- [40] Domozych D S, Domozych C E. Multicellularity in green algae; upsizing in a walled complex. *Frontiers in plant science*, 2014, 5: 649.
- [41] Bang J, Lim S, Yi G, Lee J G, Lee E J. Integrated transcriptomic-metabolomic analysis reveals cellular responses of harvested strawberry fruit subjected to short-term exposure to high levels of carbon dioxide. *Postharvest Biology and Technology*, 2019, 148: 120-131.
- [42] Ninmanont P, Wongchai C, Pfeiffer W, Chaidee A. Salt stress of two rice varieties: root border cell response and multi-logistic quantification. *Protoplasma*, 2021: 1-13.
- [43] 曹彩荣. 植物木质素合成调控及基因工程研究进展. 现代农业科技, 2019, 19: 4-5.
- [44] Zhang L, Liu Q, Li K, Guo X, Guo Y, Liu Z, Lin H, An D, Yang F. Transcriptomic and metabolomic analyses reveal defense mechanism in 'Beta' grapevine root border cells under p -hydroxybenzoic acid stress. *Scientia horticulturae*, 2022, 302: 111169.