

辣子草水浸提液对蚕豆叶保卫细胞的影响

周 健, 栾 威*, 黄雪婷, 瞿欢欢, 马丹炜**, 张 红

(四川师范大学生命科学学院, 四川 成都 610101)

摘要:为了探讨入侵植物辣子草(*Galinsoga parviflora* Cav.)的化感作用机制,以蚕豆叶下表皮为材料,采用表皮条活性分析法研究了辣子草水浸提液诱导气孔保卫细胞凋亡及其信号调节机制。结果表明:在辣子草水浸提液作用下,蚕豆叶保卫细胞活性降低,细胞核出现了畸形以及固缩、降解或拉长等典型的凋亡特征,且随着水浸提液浓度增加。当处理浓度为0.05 g/mL时,保卫细胞的死亡率和核异常率分别为90.53%和87.77%;在0.05 mmol/L Caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK、0.1 mmol/L 质膜钙离子通道抑制剂 LaCl₃、0.1 mmol/L 硝酸还原酶抑制剂 NaN₃ 和 0.5 mmol/L 活性氧清除剂抗坏血酸(AsA)作用下,辣子草水浸提液诱导的保卫细胞死亡率均显著降低,分别为辣子草水浸提液处理组的19.44%、16.12%、50.08%、23.67%。由此表明,辣子草水浸提液诱导蚕豆保卫细胞发生了Caspase 依赖性的细胞凋亡,同时 ROS、NO、Ca²⁺ 参与了保卫细胞凋亡的信号转导过程。

关键词:辣子草;水浸提液;化感胁迫;保卫细胞;细胞凋亡

中图分类号:S545

文献标识码:A

Effect of Aqueous Extract of *Galinsoga parviflora* Cav. on Guard Cells of *Vicia faba* L.

ZHOU Jian, LUAN Wei*, HUANG Xue-ting, QU Huan-huan, MA Dan-wei**, ZHANG Hong

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

Abstract: To explore the allelopathy mechanism of an invasive plant (*Galinsoga parviflora* Cav.) in China, the leaf guard cells apoptosis and signal regulation of broad bean (*Vicia faba* L.) epidermis were treated with the aqueous extracts of *G. parviflora* were studied. The results showed that when broad bean was exposed to the aqueous extracts, its guard cell viabilities reduced, the typical features of apoptosis including nuclear pyknotic, malposition, stretch and degradation were observed, and these effects were concentration-dependent. The mortality rates and the abnormal nuclei rates were 90.53% and 87.77%, respectively while the aqueous extracts concentration were 0.05 g/mL. However, the mortality rates significantly decreased when the strips exposed to the aqueous extracts combined with different concentrations of plasma membrane Ca²⁺ channel blocker LaCl₃ or nitrite reductase inhibitor NaN₃ or antioxidant ascorbic acid (AsA) or Caspase inhibitor (Z-VAD-FMK), which were 19.44%, 16.12%, 50.08%, 23.67%. These results suggested that the apoptosis of broad bean induced by the allelochemical stress of *G. parviflora* was associated with Ca²⁺, NO and ROS.

Key words: *Galinsoga parviflora* Cav.; Aqueous extract; Allelochemical stress; Guard cell; Apoptosis

辣子草(*Galinsoga parviflora* Cav.)又名向阳花、铜锤草、牛膝菊,为菊科牛膝菊属(*Galinsoga*)的一年生草本植物,原产南美洲,是一种分布于世界范围的有害杂草^[1]。在我国,辣子草首次发现于云南省宁蒗县和四川省木里县,现已扩散至多个省市,被列

入我国外来入侵植物名录^[2]。化感作用是指植物释放次生代谢产物到环境中,对周围生物产生有害或有利的的作用,有害的化感作用称为化感胁迫,是外来植物成功入侵的重要原因^[3-4]。植物通过控制气孔运动来调节参与光合作用与呼吸作用的CO₂和水分,而组成气孔的保卫细胞作为与外界环境接触的直接门户,能够对多种内外刺激做出反应^[5],如水分胁迫降低气孔导度^[6],神胁迫下气孔保卫细胞活性降低甚至死亡^[7]。表明保卫细胞能对环境胁迫做出灵敏的反应,可作为研究环境胁迫机制的良好材料。NO、ROS、Ca²⁺参与了铝诱导的蚕豆(*Vicia*

收稿日期:2015-07-12

基金项目:国家自然科学基金项目(31370549);四川省教育厅一般项目(16ZB0058);四川师范大学开放性实验项目(201515)

作者简介:周 健(1990-),男,甘肃陇南人,硕士生,主要从事细胞生物学的研究,*为并列第一作者,**为通讯作者,E-mail: danwei10ma@163.com。

faba L.)^[8]和萱草(*Hemerocallis fulva* L.)^[5,9]保卫细胞凋亡途径。辣子草对农作物的种子萌发和幼苗生长均有明显的化感效应^[10-12],但其化感作用对受体植物气孔保卫细胞的影响则了解甚少。本研究以蚕豆叶下表皮气孔保卫细胞为试验模型,探讨辣子草水浸提液诱导气孔保卫细胞死亡的信号转导过程,以期深入了解辣子草化感作用机制,为防治其进一步蔓延提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

受体植物蚕豆为成胡 14[#],购于四川省简阳市良种场。供体植物辣子草采于四川师范大学成龙校区。

1.2 试验方法

1.2.1 水浸提液的制备 将采集的辣子草植株去根,用蒸馏水洗净晾干后剪碎。按 1:10 加入蒸馏水,混匀后在 25 °C 下摇床振荡 48 h,4 层纱布过滤 2 次,得到 0.10 g/mL 的辣子草水浸提液原液,4 °C 冰箱保存备用。

1.2.2 受体植物培养 选取大小均一、无虫斑的蚕豆种子,经 0.5% KMnO₄ 清洗消毒后用蒸馏水浸种 24 h,在 25 °C 黑暗条件下用湿纱布包裹催芽 3 d 后,播种于盛有石英砂的花盆中(直径 10 cm,高度 6 cm),每盆 1 粒蚕豆种子。幼苗生长期使盆内 Hoagland 营养液保持在 0.2%,培养条件为光暗周期 14 h/10 h,温度 25 °C,幼苗长至 5 周后用于试验。

1.2.3 试验处理 实验分为甲、乙 2 组,甲组为处理组,乙组为缓解组。取 10 mL EP 管若干,分别加入 5 mL 表皮缓冲液[50 mmol/LKCl, 0.1 mmol/L CaCl₂, 0.1 mol/LTris, 10 mmol/L 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES), pH 7.0]。取顶端完全展开的蚕豆叶片,用镊子撕取约 1 cm × 0.5 cm 的下表皮置于上述 EP 管中,每个 EP 管中放 5 个表皮条。甲组 EP 管中分别加入 1、2、3、4、5 mL 辣子草水浸提液,再用 MES 缓冲液补至 10 mL,使辣子草水浸提液终浓度分别为 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 g/mL, MES 缓冲液作为对照;乙组 EP 管中分别加入 10 μl 0.05、0.1 mmol/L 质膜钙离子通道抑制剂 LaCl₃; 0.05、0.1 mmol/L 硝酸还原酶抑制剂 NaN₃; 0.05、0.5 mmol · L⁻¹ 活性氧清除剂抗坏血酸(AsA); 0.01、0.05 mmol/L Caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK, 孵育 5 min 后,各管中同时加入 1 mL MES 缓冲液和 4 mL 辣子草水浸提液原液,分别以 MES 缓冲液和终浓度为 0.04 g/mL 的处理液作对照。甲、乙两组均置于 25 °C 下光照培养箱中处理 30 min。

每处理重复 3 次。

1.2.4 指标检测 细胞活性检测:试验处理结束后,采用陈丽娟等^[13]的方法略有改进。将表皮条用缓冲液清洗 3 次,每次 5 min,取出表皮条平铺在载玻片上,吸干后滴加少量 AO/EB 染液,避光染色 3 min,在 LEICA DM300 荧光显微镜下观察保卫细胞并拍照。发出绿色荧光的为活细胞,发出橘红色荧光的为死细胞。每个处理观察 1000 个细胞,并统计保卫细胞的死亡率。

细胞核异常率检测:试验处理结束后,采用 Feulgen 染色法染色^[14]。将表皮条用蒸馏水快速清洗 1 次后,用卡诺氏固定液(冰醋酸:无水乙醇 = 1:3)固定 2 h,然后用 1 mol/L 盐酸 60 °C 解离 8 min,解离后用蒸馏水清洗 3 次,每次 10 min, Schiff 试剂避光染色 1 h,洗掉染液,待清洗的蒸馏水不再变红,在 LEICA DFC450C 光学显微镜下观察保卫细胞核形态并拍照。每个处理组观察 1000 个细胞,并统计保卫细胞的核异常率。

1.3 数据分析

采用 SPSS17.0 对数据进行处理分析, Microsoft Excel 2007 作图。

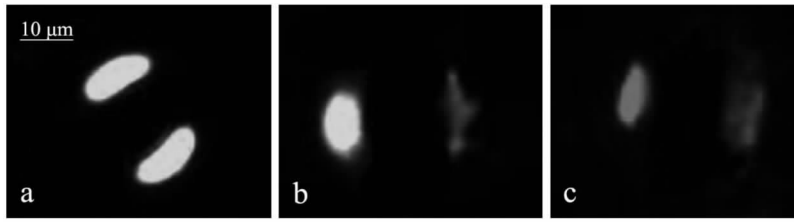
2 结果与分析

2.1 辣子草水浸提液对保卫细胞活性的影响

在荧光显微镜下观察发现,蚕豆叶下表皮条经 AO/EB 染色后,对照组中大部分保卫细胞的细胞核发绿色荧光(图 1a),具有较高的活性,而随着辣子草水浸提液浓度的增大,处理组中细胞核发出橘红色荧光(图 1b 和图 1c)的保卫细胞数目也随之增加,即丧失活性的细胞数目增加,表明辣子草水浸提液可降低保卫细胞活性甚至导致细胞死亡。

图 2 可见,与对照组相比,辣子草水浸提液对蚕豆保卫细胞活性具有显著影响,随着处理浓度的升高,保卫细胞死亡率显著上升($P < 0.05$),当处理浓度为 0.05 g/mL 时,保卫细胞死亡率高达 90.53%,说明辣子草水浸提液对蚕豆保卫细胞具有细胞毒性。

图 3 显示,对照组保卫细胞死亡率为 9.47%, 0.04 g/mL 的辣子草水浸提液处理后,保卫细胞死亡率为 82.67%。分别用 0.05、0.1 mmol/L 的 LaCl₃ 与辣子草水浸提液共同处理表皮条后,其保卫细胞死亡率为 27.9% 和 13.33%; 用 0.05、0.1 mmol/L 的 NaN₃ 与辣子草水浸提液共同处理表皮条后,其保卫细胞死亡率为 64.73% 和 41.4%; 用 0.05、0.5 mmol/L 的 AsA 与辣子草水浸提液共同处理表皮条后,其保卫细胞死亡率为 36.6% 和 19.57%



a:对照组;b:气孔单保卫细胞活性丧失;c:气孔双保卫细胞活性丧失

a: Control group; b: Lose of the viability of stoma single guard cell; c: Lose of the viability of stoma double guard cell

图1 辣子草水浸提液作用下蚕豆保卫细胞活性变化

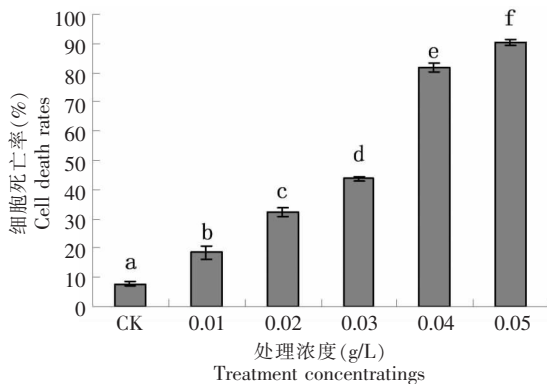
Fig. 1 Viability changes of *Vicia faba* L. guard cells exposure to the aqueous extracts of *Galinsoga parviflora* Cav.

% ,以上结果表明这3种缓解剂均可显著性地降低保卫细胞的死亡率($P < 0.05$),有效缓解辣子草水浸提液对保卫细胞毒性的作用,且存在剂量效应。分别用0.01、0.05 mmol/L的Caspase抑制剂Z-VAD-FMK与辣子草水浸提液共同处理表皮条后,其保卫细胞死亡率为23.97%、16.07%,上述结果表明,辣子草水浸提液诱导的蚕豆保卫细胞死亡属于Caspase依赖性的细胞凋亡。

2.2 辣子草水浸提液对保卫细胞核形态的影响

表皮条经Schiff试剂染色后,在显微镜下观察发现,与对照组相比,辣子草水浸提液对蚕豆保卫细胞核形态具有显著的影响。对照组保卫细胞的核位于细胞中间,形态规则(图4a),而经辣子草水浸提液处理后,保卫细胞核形态异常,出现核固缩、畸形、降解或拉长等细胞程序性死亡特征。

在不同浓度辣子草水浸提液作用下,保卫细胞核异常率的变化如图5所示。对照组和异常率为13.73%,随着处理浓度的升高,细胞核异常率显著升高($P < 0.05$),当处理浓度为0.05 g/mL时,细胞核异常率高达87.77%。



不同字母表示各处理间差异显著($P < 0.05$),下同

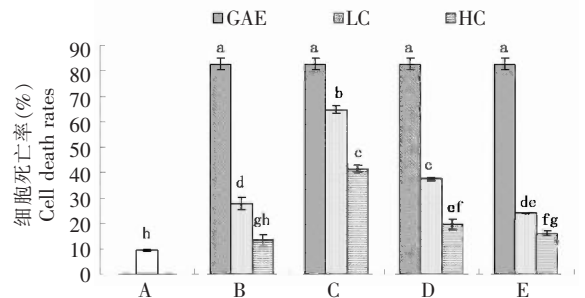
Different letters stand for significant difference between treatments ($P < 0.05$). The same as below

图2 辣子草水浸提液对保卫细胞活性的影响

Fig. 2 Effects of the aqueous extracts of *Galinsoga parviflora* Cav. on the guard cell viabilities of *Vicia faba* L.

3 结论与讨论

化感物质作为外来植物成功入侵的“化学武器”^[15],对受体植物具有细胞毒性^[16]。如入侵植物三叶鬼针草水浸提液使蚕豆根尖细胞形态改变^[17]。在紫茎泽兰(*Eupatorium adenophorum* Spreng.)的化感物质作用下,受体植物的根尖组织混乱,细胞萎缩,细胞质稀薄,高尔基体和线粒体数量减少^[18]。土荆芥(*Chenopodium ambrosioides* L.)挥发油诱导了蚕豆根尖细胞凋亡。同时,化感物质具有一定的遗传毒性,能够影响有丝分裂各时相,降低有丝分裂指数,并导致多种染色体畸变,如微核、染色体断片、染色体桥等^[17,19]。马丹炜等^[19]研究发现,辣子草水浸提液使蚕豆根尖细胞有丝分裂指数下降,微核率和畸变率增大。本研究结果表明,经辣子草水浸提液处理后的蚕豆保卫细胞活性显著降低,且存在剂量效应,并出现核固缩、畸形、降解、拉长等典型的细胞

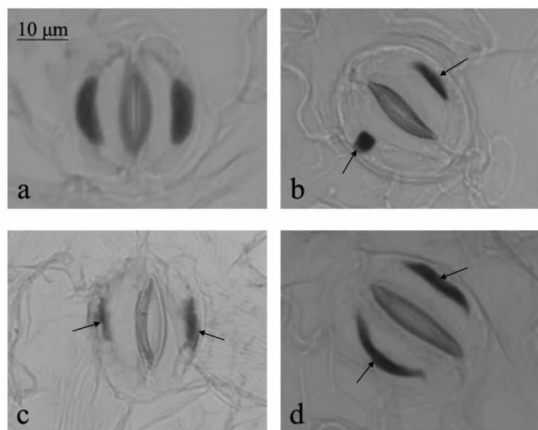


A、B、C、D和E分别代表CK、LaCl₃、NaN₃、AsA和Z-VAD-FMK处理;GAE为辣子草水浸提液;LC、HC分别代表低浓度缓解剂和高浓度缓解剂

A, B, C, D and E represent CK, LaCl₃-, NaN₃-, AsA-and Z-VAD-FMK-treated, respectively; GAE is the aqueous extracts of *Galinsoga parviflora* Cav.; LC and HC represent low concentration inhibitor and high concentration inhibitor, respectively

图3 LaCl₃、NaN₃、AsA和Z-VAD-FMK对辣子草水浸提液诱导蚕豆保卫细胞死亡的缓解作用

Fig. 3 Alleviated effects of LaCl₃, NaN₃, AsA and Z-VAD-FMK on guard cell death of *Vicia faba* induced by the aqueous extracts of *Galinsoga parviflora* Cav.



a:对照组;b:核固缩和畸形;c:核降解;d:核拉长和畸形

a: Control group; b: Nuclear pyknotic and morphology malformation;

c: Nuclear degradation; d: nuclear stretch and morphology malformation

图4 辣子草水浸提液作用下蚕豆保卫细胞核形态变化

Fig.4 Morphology changes of nucleus of *Vicia faba* L. guard cells exposure to the aqueous extracts of *Galinsoga parviflora* Cav.

凋亡特征,表明辣子草水浸提液对蚕豆保卫细胞具有细胞毒性和遗传毒性。

植物在逆境下发生细胞凋亡是对逆境适应的一种重要方式,通过这种方式可减少蒸腾和消耗,避免营养物质分散性地分配,使死亡细胞中的物质如核酸、蛋白质、糖类和脂类循环利用^[20]。细胞发生凋亡时首先出现DNA在核小体间断裂等变化,在此过程中,Caspase通过不同信号转导途径被激活^[21],切割特异底物促使内切核酸酶被活化,将DNA降解成寡聚核小体片段^[20]。广谱Caspase抑制剂Z-VAD-FMK能够抑制Caspase活性。本研究中,在Z-VAD-FMK作用下,辣子草水浸提液诱导保卫细胞的死亡率显著降低,表明辣子草诱导蚕豆保卫细胞发生了Caspase依赖性的细胞凋亡。

正常情况下,细胞内活性氧(ROS)的产生和清除处于动态平衡。在逆境胁迫下,ROS会迅速积累,导致膜脂过氧化和膜结构被破坏^[20]。此外,ROS也是一种信号分子,在植物遭遇逆境胁迫时传递信号,使植物组织产生一系列的防御反应^[5]。已经证实,ROS对细胞凋亡起关键的诱导作用^[20]。NO是一种普遍存在于生物中的多功能气体信号分子^[5],在逆境胁迫下,细胞内NO含量会爆发性升高^[20,22],高浓度的NO继而引起ROS爆发^[5]。植物细胞中NO的信号途径可通过cGMP、蛋白激酶、Ca²⁺等胞内信使介导多种生物学效应^[5]。ROS可活化Ca²⁺,引起胞内Ca²⁺水平升高,Ca²⁺可以直接激活依赖的内切核酸酶,或通过Caspase活化内切核酸酶,导致细胞凋亡^[20]。本研究结果表明,当加入抗氧化剂AsA、硝酸还原酶抑制剂NaNO₂、Ca²⁺通道拮抗剂LaCl₃后,辣子草水浸提液诱导的保卫细

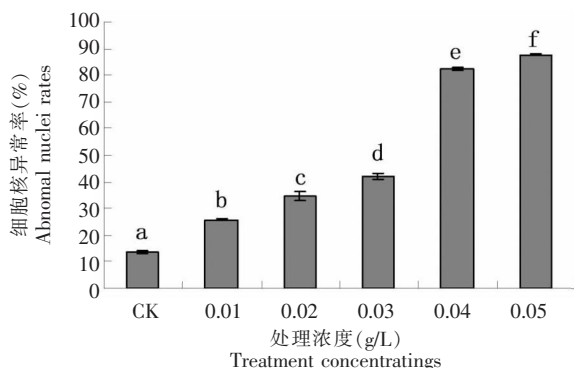


图5 辣子草水浸提液对蚕豆保卫细胞核形态的影响

Fig.5 Effects of the aqueous extracts of *Galinsoga parviflora* Cav. on nuclear morphology in *Vicia faba* guard cells

胞死亡现象明显缓解,由此可见,辣子草化感胁迫导致保卫细胞内ROS水平和NO水平升高,激活膜上的钙离子通道,引起胞内Ca²⁺浓度升高,并激活Caspase,导致DNA降解,最终引起细胞凋亡。

参考文献:

- [1] Mertelik J, Mokra V. Tomato spotted wilt virus in ornamental plants, vegetables and weeds in the Czech Republic [J]. Acta Virologica, 1998, 42(5):347-351.
- [2] 强 胜, 曹学章. 中国异域杂草的考察与分析[J]. 植物资源与环境学报, 2000, 9(4):34-38.
- [3] 周 凯, 郭维明, 徐迎春. 菊科植物化感作用研究进展[J]. 生态学报, 2004, 24(8):1780-1788.
- [4] Bais H P, Vepachedu R, Gilroy S, et al. Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions[J]. Science, 2003, 301(5638):1377-1380.
- [5] 魏爱丽, 辛晓静, 王云山, 等. SO₂诱导的萱草保卫细胞凋亡及其信号调节[J]. 环境科学学报, 2014, 34(3):801-806.
- [6] 范苏鲁, 苑兆和, 冯立娟, 等. 水分胁迫对大丽花光合作用、蒸腾和气孔导度的影响[J]. 中国农学通报, 2011, 27(8):119-122.
- [7] 薛美昭, 仪慧兰. 神诱导蚕豆气孔保卫细胞死亡的毒性效应[J]. 生态学报, 2014, 34(5):1134-1139.
- [8] 王 毅, 仪慧兰. NO参与铝诱导蚕豆保卫细胞死亡的调控[J]. 环境科学学报, 2013, 33(6):1803-1808.
- [9] Wei A L, Xin X J, Wang Y S, et al. Signal regulation involved in sulfur dioxide-induced guard cell apoptosis in *Hemerocallis fulva* [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2013, 98:41-45.
- [10] 范雪涛, 马丹炜, 于树华, 等. 辣子草对3种农作物的化感作用[J]. 环境科学与技术, 2007, 30(10):7-9.
- [11] 郭振清, 赵永光, 张凤娟, 等. 入侵植物牛膝菊对白菜、萝卜、生菜、油菜种子和幼苗的化感作用[J]. 河北科技师范学院学报, 2008, 22(3):13-16.
- [12] 董红云, 李 亚, 汪 庆, 等. 外来入侵植物牛膝菊和野苘蒿水浸提液化感作用的生物测定[J]. 2010, 19(2):48-53,91.
- [13] 陈丽娟, 盛瑞兰, 汪承亚, 等. AO/EB荧光染色法测定阿糖胞苷诱导HL-60细胞凋亡[J]. 中华血液学杂志, 1998, 19(1):41-42.
- [14] 邢惠清, 田玉旺, 丁华野, 等. 介绍以甲基紫配成Schiff试剂显示DNA染色方法[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 1994

- (3):308.
- [15]陈圣宾,李振基.外来植物入侵的化感作用机制探讨[J].生态学报,2005,24(1):69-74.
- [16]Babula P, Vanco J, Kohoutkova V, et al. Cell signals as markers of cytotoxicity of new complexes of naphthoquinones[J]. Analysis of Biomedical Signals and Images, 2010, 20:259-263.
- [17]杜凤移,于树华,马丹炜,等.三叶鬼针草对蚕豆根尖遗传毒性的研究[J].生态环境,2007,16(3):944-949.
- [18]Yang G Q, Wan F H, Guo J Y, et al. Cellular and ultrastructural changes in the seedling roots of upland rice (*Oryza sativa*) under the stress of two allelochemicals from *Ageratina adenophora*[J]. Weed Biology and Management, 2011,11(3):152-159.
- [19]马丹炜,范雪涛,葛方兰,等.低温胁迫对辣子草水浸提液化感作用的影响[J].热带亚热带植物学报,2008,16(6):526-530.
- [20]简令成,王红.逆境植物细胞生物学[M].北京:科学出版社,2009.
- [21]赵瑞杰,李引乾,王会,等.Caspase家族与细胞凋亡的关系[J].中国畜牧杂志,2010,46(17):73-78.
- [22]张满效,安黎哲,陈拓,等.NO是植物应激反应的信号分子[J].西北植物学报,2004,24(6):1145-1153.

(责任编辑 陈虹)