

土荆芥挥发油诱导玉米保卫细胞 Caspase 依赖性凋亡及信号调节

黄素¹, 李洁², 马丹炜^{1*}, 花敏瑞¹, 江文倩¹, 肖杨¹, 陈丽娜¹, 全津莹²

(1. 四川师范大学生命科学学院, 四川 成都 610101; 2. 四川省农业科学院农业信息与农村经济研究所, 四川 成都 610066)

摘要:【目的】探讨入侵植物土荆芥(*Chenopodium ambrosioides* L.)挥发油对粮食作物玉米(*Zea mays* L.)保卫细胞的化感效应及其作用机制。【方法】以玉米叶片下表皮保卫细胞为对象,研究了土荆芥挥发油的毒性作用。【结果】经挥发油处理后保卫细胞核形态变化,细胞活性显著降低,细胞核畸变率和死亡率随处理剂量或时间的增加而显著升高($P < 0.05$)。保卫细胞经 TUNEL 检测呈阳性,与土荆芥挥发油单独作用相比,挥发油和泛 Caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 共同作用后细胞活性显著升高,表明土荆芥挥发油诱导玉米保卫细胞出现了 Caspase 依赖性的细胞凋亡;Ca²⁺通道抑制剂 LaCl₃、Ca²⁺螯合剂 EGTA、硝酸还原酶抑制剂 NaN₃、NO 合成酶抑制剂 L-NAME、活性氧清除剂 AsA 或过氧化氢酶 CAT 等可缓解土荆芥挥发油的细胞毒性。【结论】土荆芥挥发油对玉米保卫细胞有显著的细胞毒性,诱导保卫细胞发生 Caspase 依赖性的细胞凋亡,NO、ROS 和 Ca²⁺等信号分子参与了土荆芥挥发油诱导玉米保卫细胞凋亡的信号调节过程。

关键词:土荆芥;玉米;化感胁迫;保卫细胞;信号调节

中图分类号:Q945 文献标识码:A

Induction of Caspase-dependent Apoptosis Volatile Oil from *Chenopodium ambrosioides* L. and Signal Regulation in Guard Cells of *Zea mays* L.

HUANG Su¹, LI Jie², MA Dan-wei^{1*}, HUA Min-rui¹, JIANG Wen-qian¹, XIAO Yang¹, CHEN Li-na¹, QUAN Jin-ying²

(1. College of Life Sciences, Sichuan Normal University, Sichuan Chengdu 610101, China; 2. Agricultural Information and Rural Economy Institute of Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Sichuan Chengdu 610066, China)

Abstract:【Objective】The study aimed to investigate the allelopathic and its mechanism effect of alien invasive plant *Chenopodium ambrosioides* L. on *Zea mays* L. of grain crops. 【Method】The guard cells from the lower epidermis of *Z. mays* were taken as the object to study the cytotoxicity of volatile oil from *C. ambrosioides* on it. 【Result】The results showed that after the stress treatment, nuclei were distorted, the number of guard cells died and the rate of nuclear aberration and the cell death rate were significantly increased ($P < 0.05$). Guard cells were positive by TUNEL assay. Compared with volatile oil alone, volatile oil and Caspase inhibitor Z-VAD-FMK significantly increased cell activity, indicating that volatile oil induced caspase-dependent apoptosis in *Z. mays* guard cells; Ca²⁺ channel inhibitor LaCl₃, Ca²⁺ chelator EGTA, nitrate reductase inhibitor NaN₃, NO synthase inhibitor L-NAME, reactive oxygen scavenger AsA and catalase CAT can alleviate the cytotoxicity of volatile oil from *C. ambrosioides*. 【Conclusion】The volatile oil of *C. ambrosioides* has significant cytotoxicity to guard cells of *Z. mays* and induces caspase-dependent apoptosis of guard cells, in which signal regulation mechanism is related to signal molecules of NO, ROS and Ca²⁺.

Key words: *Chenopodium ambrosioides* L.; *Zea mays* L.; Allelochemical stress; Guard cells; Signal regulation

【研究意义】玉米(*Zea mays* L.)是我国种植面积最大的重要作物,遍及二十多个省区,用途广

收稿日期:2018-08-28

基金项目: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);四川师范大学学生课外科技作品项目;四川师范大学大学生创新创业训练计划项目

作者简介:黄素(1993-),女,贵州安顺人,硕士研究生,主要从事细胞生物学研究,*为通讯作者,E-mail:danwei10ma@163.com。

泛^[1]。多种非生物胁迫会影响玉米的生长发育,导致玉米减产,如光照较弱时玉米籽粒败育粒增加、体积减小、干重降低^[2];干旱胁迫导致玉米叶片光系统Ⅱ和抗氧化酶系统受损^[3];土壤含水量过高时玉米幼苗生物量显著下降等^[4],而生物胁迫研究较少。【前人研究进展】土荆芥(*Chenopodium ambrosioides* L.)为藜科藜属一年生或多年生的芳香性草本入侵植物,原产美洲热带,极易扩散于农田中,该

种含有毒挥发油,对其他植物产生化感作用^[5]。研究表明,土荆芥挥发油可使玉米根尖细胞内 ROS 爆发,相关基因表达改变,抗氧化系统受到影响^[6],阻碍玉米根毛发育,降低玉米种子活力,从而影响玉米的生长发育,成为优势物种^[7]。【本研究切入点】气孔保卫细胞是植物响应外界的第一门户,对保卫细胞不利的胁迫将影响植物的光合作用,ROS、NO 和 Ca^{2+} 等信号分子常参与调节细胞对外界胁迫的响应^[8],而土荆芥挥发油是否影响玉米保卫细胞的功能及其作用机制不得而知。【拟解决的关键问题】因此,本研究以玉米为对象,分析土荆芥挥发油对其保卫细胞的毒性作用,首次利用末端脱氧核苷酸转移酶生物素-dUTP 缺口末端标记法(TUNEL)检测化感胁迫后玉米保卫细胞凋亡情况,探讨保卫细胞核形态、活性及胞内信号分子对土荆芥化感胁迫的响应,有利于揭示土荆芥诱导的保卫细胞凋亡现象及其机理,为深入了解入侵植物的胁迫机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

土荆芥地上部分采于四川成都包江桥,水蒸气蒸馏法提取挥发油^[9],无水 Na_2SO_4 干燥,4 °C 保存;玉米种子(雅玉 26[#])购于四川西南科联种业公司;TUNEL 试剂盒产自 Beyotime 公司。

1.2 方法

1.2.1 材料培养及处理 选种后,0.5 % $KMnO_4$ 消毒 10 min,25 °C 暗培浸种 24 h 后催芽,取萌发一致的种子种于营养土中(花盆直径 14 cm,高 12 cm),25 °C 光暗周期 14/10 h 培养。4 周取第 2 层平展叶片备用。

二甲基亚砷(DMSO)配制浓度为 0.10 $\mu\text{l}/\mu\text{l}$ 的挥发油母液。撕取下表皮切成 1 cm × 0.5 cm 表皮条,放入加有 5 mL MES 缓冲液^[8]的 EP 管,分别加入 2、4、6、8、10 μl 挥发油母液,DMSO 补足 10 μl ,25 °C 光照培养 10、20、30 min,设置空白对照和溶剂对照(10 μl DMSO)。

以泛 Caspase 抑制剂(Z-VAD-FMK:0.05,0.1,0.15 $\mu\text{mol}/\text{L}$),抗坏血酸(AsA:0.05,0.1,0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$),过氧化氢酶(CAT:100,200,300 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$), Ca^{2+} 螯合剂(EGTA:0.05,0.1,0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), Ca^{2+} 通道抑制剂($LaCl_3$:0.05,0.1,0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$),硝酸还原酶抑制剂(NaN_3 :0.05,0.1,0.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)和 NO 合成酶抑制剂(L-NAME:0.025,0.05,0.075 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)为拮抗剂,分别将拮抗剂与 8 μl 挥发油母液加入缓冲液,混匀后放入表

皮条,25 °C 光照培养 30 min,设置空白对照和挥发油对照(挥发油母液 8 μl)。

1.2.2 细胞活性和细胞核形态检测 细胞活性检测参照马丹炜等^[10]方法,AO/EB 避光染色 3 min,LEICA DM 3000 显微镜观察。细胞核形态检测采用 Fe μ lgen 染色法^[10],Schiff 试剂避光染色 1 h。LEICA DFC450C 显微镜观察。每个处理观察 1000 个保卫细胞,重复 3 次。

1.2.3 TUNEL 检测 将表皮条加入含 8 μl 挥发油母液的缓冲液中,25 °C 光照培养 30 min,PBS 洗涤 3 次,卡诺氏液 4 °C 固定 2 h,PBS 洗涤 3 次,4 % (m/v)果胶酶和 2 % (m/v)纤维素酶 37 °C 酶解 10 min,PBS 洗涤 3 次,0.2 % Triton x-100 处理 30 min,PBS 洗涤 3 次,TUNEL 反应混合物避光染色 90 min,PBS 洗涤后制片。

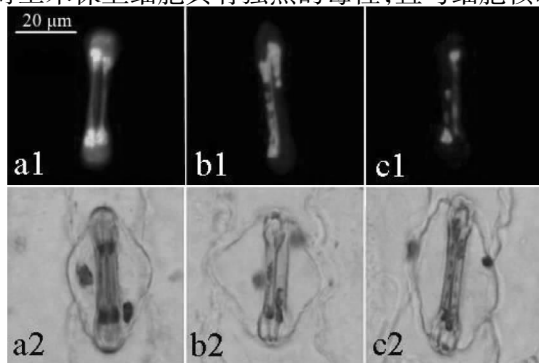
1.3 数据统计与分析

Microsoft Excel 2007 进行数据录入和作图,SPSS 17.00 进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 土荆芥挥发油对玉米保卫细胞核形态的影响

形态观察发现,对照组保卫细胞核形态规则(图 1a1,a2),挥发油处理组保卫细胞出现核固缩(图 1b1,b2),核断裂(图 1c1,c2)等现象。同一处理时间下,处理组细胞核异常率较对照组显著增加($P < 0.05$),其中 10 μl 挥发油母液处理 30 min 时核异常率达到最大(75.57%)。同一剂量下,细胞核异常率随处理时间增加而显著上升($P < 0.05$,6 μl 挥发油母液处理 20、30 min 组间和 8 μl 挥发油母液处理 20、30 min 组间除外)。表明土荆芥挥发油对玉米保卫细胞具有强烈的毒性,且与细胞核畸



a:对照;b:核固缩;c:核断裂(1. AO/EB 染色,2. Schiff 试剂染色)

a;CK;b:Nuclear pyknosis;c:Nuclear fragmentation(1. AO/EB staining,2. Schiff reagent staining)

图 1 土荆芥挥发油处理下玉米保卫细胞核形态的变化
Fig.1 Nuclear morphology changes in the guard cells of *Zea mays* L. exposed to volatile oil from *Chenopodium ambrosioides* L.

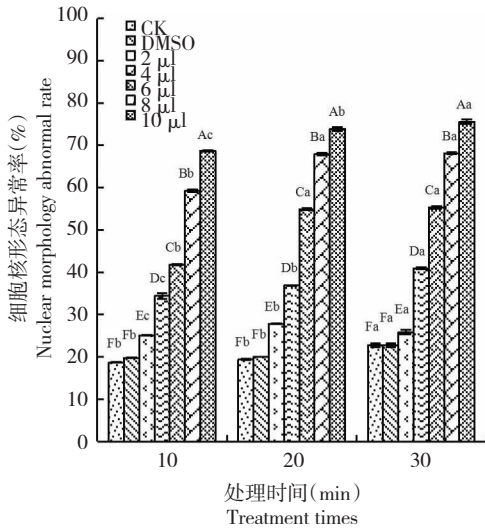


图2 土荆芥挥发油对玉米保卫细胞核形态的影响

Fig.2 Effect of volatile oil from *Chenopodium ambrosioides* L. on guard cell nucleus morphology in *Zea mays* L.

变率存在剂量效应与时间效应。

2.2 土荆芥挥发油对玉米保卫细胞活性的影响及其信号调节

AO/EB 染色后观察发现,对照组保卫细胞的细胞核发亮绿色荧光,显示较高活性(图 1a1),处理组细胞核发橘红色荧光,即细胞活性降低(图 1b1, c1)。图 3 显示,相同处理时间下,除少数低剂量组(2 μl)保卫细胞死亡率与对照组无显著差异外,其余组均随处理剂量增加而增大($P < 0.05$),10 μl 组处理 30 min 时,细胞死亡率高达 85.94 %。同一剂

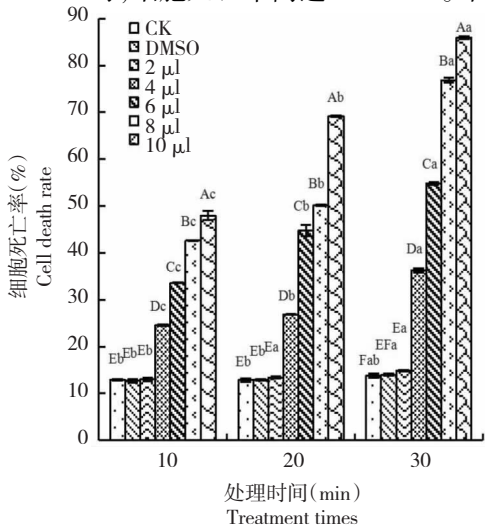


图3 土荆芥挥发油对玉米保卫细胞活性的影响

Fig.3 Effect of volatile oil from *Chenopodium ambrosioides* L. on guard cell viabilities in *Zea mays* L.



a: 光学显微镜下的玉米保卫细胞;b: 对照;c: TUNEL 阳性

a; The guard cells of *Zea mays* L. under optical microscope; b; CK; c: TUNEL-positive

图4 玉米保卫细胞的 TUNEL 原位检测

Fig.4 The TUNEL assay in the guard cells of *Zea mays* L.

量下,除 2 μl 组处理 20、30 min 之间无显著差异外,其余组细胞死亡率均随处理时间增加而上升($P < 0.05$)。可见土荆芥挥发油可诱导保卫细胞死亡,具有显著的细胞毒性,与细胞死亡率存在剂量效应与时间效应。

TUNEL 检测发现保卫细胞核 DNA 的 3'-OH 断端可被特异标记为绿色,呈 TUNEL 阳性(图 4c),而对照组则不被 TUNEL 特异性标记呈无荧光的阴性结果(图 4b),说明挥发油处理后,保卫细胞出现大量 DNA 断裂为片段的细胞凋亡特征。加入泛 Caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 后,保卫细胞死亡率显著降低($P < 0.05$,图 5),表明土荆芥挥发油诱导的玉米保卫细胞死亡属于 Caspase 依赖性的细胞凋亡。

不同浓度的 AsA、CAT、EGTA、LaCl₃、NaN₃ 和 L-NAME 分别与 8 μl 挥发油一起处理表皮条后,保卫细胞死亡率均显著降低。其中,0.5 mmol · L⁻¹ AsA,300 U · mL⁻¹ CAT,0.5, mmol · L⁻¹ EGTA,0.5

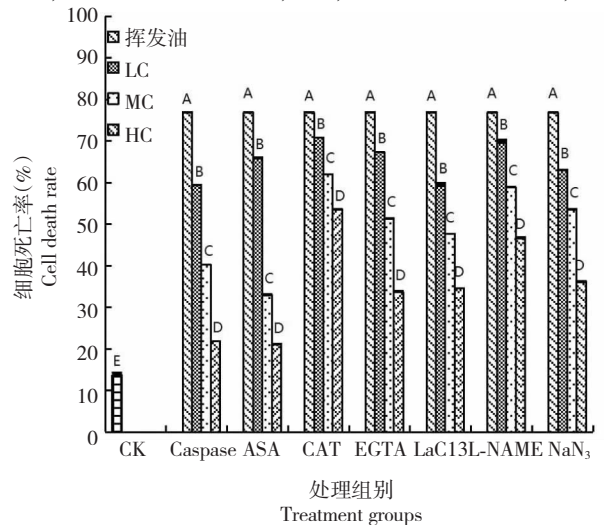


图5 拮抗剂对土荆芥挥发油诱导保卫细胞死亡的缓解作用

Fig.5 Alleviating effects of antagonists on guard cell death of *Zea mays* L. induced by the volatile oil from *Chenopodium ambrosioides* L.

大写字母表示同一时间,不同剂量处理组间差异;小写字母表示同一剂量,不同时间处理组间差异; $P < 0.05$,下同

Uppercase letters indicate the same time, different doses of treatment group differences; Lowercase letters that the same dose, different time treatment group differences; $P < 0.05$, The same as below

LC: 低浓度缓解剂;MC: 中等浓度缓解剂;HC: 高浓度缓解剂

LC: Low concentration inhibitor;MC: Medium concentration inhibitor; HC: High concentration inhibitor

mmol · L⁻¹ LaCl₃, 0.20 mmol · L⁻¹ NaN₃ 和 0.075 mmol · L⁻¹ L-NAME 处理时保卫细胞死亡率最低, 分别为 21.10%、53.57%、34.61%、33.76%、46.73% 和 36.21%, 显示高浓度拮抗剂处理对保卫细胞死亡的缓解作用最大。上述结果说明, ROS、NO、Ca²⁺ 等信号分子参与了土荆芥挥发油诱导玉米保卫细胞凋亡的信号调节。

3 讨论

3.1 土荆芥挥发油对玉米保卫细胞的毒性作用

入侵植物释放的挥发性化感物质具有强烈的细胞毒性, 如加拿大蓬 (*Erigeron Canadensis* L.) 挥发油诱导蚕豆 (*Vicia faba* L.) 保卫细胞活性降低, 细胞核畸变^[11]; 土荆芥挥发油使大豆 [*Glycine max* (Linn.) Merr.] 根边缘细胞数减少, 存活率降低^[12]; 桉 (*Eucalyptus robusta* Smith) 挥发油引起莴苣 (*Lactuca sativa* L.) 根尖分生组织细胞核固缩, 染色体发生变异, 诱导细胞死亡^[13]。本研究表明, 土荆芥挥发油具有较高的细胞毒性, 使玉米保卫细胞核形态出现核固缩、断裂等细胞凋亡特征, 导致细胞死亡, 且细胞核畸变率和细胞死亡率与浓度存在剂量效应与时间效应。

3.2 ROS、NO 和 Ca²⁺ 参与土荆芥挥发油诱导的保卫细胞 Caspase 依赖性凋亡

细胞发生凋亡时, 核小体间的 DNA 开始随机断裂, 激活 Caspase 途径, 诱导内切核酸酶被活化, 将 DNA 降解成寡聚核小体片段, 促使细胞凋亡^[11]。DNA 片段化是细胞凋亡的重要特征, TUNEL 原位末端标记法是公认检测细胞凋亡的有效指标^[14], Li 等^[15]研究表明, 土荆芥挥发油能诱导玉米根尖细胞核 DNA 断裂, 发生细胞凋亡。本研究也证实, 土荆芥挥发油诱导保卫细胞活性降低, TUNEL 检测为阳性, 显示出保卫细胞核 DNA 断裂, 裸露出游离的 3'-OH 末端, 具有明显的细胞凋亡特征, 加入泛 Caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 可抑制该过程, 说明保卫细胞发生了 Caspase 依赖性的细胞凋亡, 这是玉米对土荆芥化感胁迫的自主响应, 以防止有害物质进入其他组织, 维持机体内部平衡。

化感胁迫往往伴随着氧化胁迫, ROS 是植物细胞在抵抗环境胁迫过程中的一个重要信号分子^[16], 细胞具有抗氧化防御机制, 正常情况下, 胞内 ROS 含量不高, 化感胁迫下, 叶绿体和线粒体的功能受到影响, 导致大量 ROS 在细胞中积累, 氧化与抗氧化作用一旦失衡, 核 DNA 将受到氧化损伤, 导致碱基缺失, DNA 断裂等, 凋亡可能是细胞响应这种失衡的结果^[17]; NO 是一种具有自由基性质的脂溶性气

体信号分子, 可透过细胞膜快速扩散, 已被证实作用临近靶细胞参与众多生理病理过程^[18], 伴随 ROS 爆发, 细胞内 NO 的合成达到高峰, 细胞活性将受到影响^[19]。细胞常通过 ROS 和 NO 介导第二信使 Ca²⁺ 信号通路响应胁迫应答, ROS 激活质膜 Ca²⁺ 通道引起胞外 Ca²⁺ 内流, 增加胞内 Ca²⁺ 水平, 通过活化核酸内切酶依赖性 Ca²⁺, 在核小体连接切割 DNA, 从而激活 Caspase 家族成员, 导致细胞凋亡^[8,11,20]。本研究中, 分别加入 AsA, CAT, EGTA, LaCl₃, NaN₃ 或 L-NAME 后, 保卫细胞死亡率显著降低 ($P < 0.05$), 推测土荆芥挥发油诱导玉米保卫细胞内 ROS 和 NO 水平升高, 激活细胞膜上的 Ca²⁺ 通道, 导致胞内 Ca²⁺ 浓度升高, 激活 Caspase 依赖性途径, 活化核酸内切酶切割核 DNA, 导致核 DNA 片段断裂, 最终诱导保卫细胞凋亡。

4 结论

土荆芥挥发油具有细胞毒性, 导致玉米保卫细胞的核形态改变, 细胞活性减低, 其作用机制可能通过诱导保卫细胞内 ROS 和 NO 爆发, 激活质膜 Ca²⁺ 通道, 引发胞内 Ca²⁺ 增加, 从而介导保卫细胞发生 Caspase 依赖性的细胞凋亡。

参考文献:

- [1] 高建凯. 中国 15 个主产区玉米生产技术效率研究[J]. 西部论坛, 2013, 23(6): 69-75.
- [2] 周卫霞, 董朋飞, 王秀萍, 等. 弱光胁迫对不同基因型玉米籽粒发育和碳氮代谢的影响[J]. 作物学报, 2013, 39(10): 1826-1834.
- [3] 张仁和, 郑友军, 马国胜, 等. 干旱胁迫对玉米苗期叶片光合作用和保护酶的影响[J]. 生态学报, 2011, 31(5): 1303-1311.
- [4] 王智威, 牟思维, 闫丽丽, 等. 水分胁迫对春播玉米苗期生长及其生理生化特性的影响[J]. 西北植物学报, 2013, 33(2): 343-351.
- [5] 徐海根, 强 胜. 中国外来入侵物种编目[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2004: 91-92.
- [6] Chen B, Zhou J, Gou X, et al. Volatiles from *Chenopodium ambrosioides* L. induce the oxidative damage in maize (*Zea mays* L.) radicles[J]. Allelopathy Journal, 2016, 38(2): 171-181.
- [7] 王 煜, 王亚男, 勾 洵, 等. 土荆芥挥发油及其 2 个主要成分对玉米种子活力和根毛发育的化感效应初探[J]. 四川师范大学学报: 自然科学版, 2016(3): 403-407.
- [8] 周 健, 王亚男, 马丹炜, 等. 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[J]. 生态学报, 2017, 37(17): 5713-5721.
- [9] Singh H P, Kaur S, Mittal S, et al. Essential oil of *Artemisia scoparia* inhibits plant growth by generating reactive oxygen species and causing oxidative damage[J]. Journal of Chemical Ecology, 2009, 35(2): 154-162.
- [10] 马丹炜, 王万军. 细胞生物学实验教程[M]. 北京: 科学出版社, 2010: 24-26.

- [11] 黄素, 王煜, 沙尔格, 等. 不同生长期加拿大蓬挥发油对蚕豆保卫细胞的毒性效应[J]. 安全与环境学报, 2017, 17(4): 1620 - 1625.
- [12] 李安奇, 王亚男, 张红, 等. 大豆根边缘细胞对土荆芥组培根分泌物的响应[J]. 生态环境学报, 2012, 21(1): 84 - 87.
- [13] Aragão F B, Palmieri M J, Ferreira A, et al. Phytotoxic and cytotoxic effects of *Eucalyptus* essential oil on *Lactuca sativa* L. [J]. Allelopathy Journal, 2015, 35(2): 259 - 272.
- [14] Wijsman J H, Jonker R R, Keijzer R, et al. A new method to detect apoptosis in paraffin sections; in situ end-labeling of fragmented DNA [J]. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 1993, 41(1): 7 - 12.
- [15] Li J, He Y, Ma D, et al. Volatile allelochemicals of *Chenopodium ambrosioides* L. induced mitochondrion-mediated Ca^{2+} -dependent and Caspase-dependent apoptosis signaling pathways in receptor plant cells [J]. Plant and Soil, 2018, 425(1 - 2): 297 - 308.
- [16] 潘建伟, 陈虹, 顾青, 等. 环境胁迫诱导的植物细胞程序性死亡[J]. 遗传, 2002, 24(3): 385 - 388.
- [17] Raoof K M A, Siddiqui M B. Allelotoxic effect of parthenin on cytomorphology of broad bean (*Vicia faba* L.) [J]. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 2013, 12(2): 143 - 146.
- [18] 翟中和, 王喜忠, 丁明孝. 细胞生物学(第四版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 2011: 165.
- [19] Wang Y, Loake G J, Chu C. Cross-talk of nitric oxide and reactive oxygen species in plant programmed cell death [J]. Frontiers in Plant Science, 2013, 314(4): 314.
- [20] Kuchitsu K. Signaling Networks Involving Reactive Oxygen Species and Ca^{2+} in Plants [M]. Quantum Bio-Informatics V, 2015: 403 - 407.

(责任编辑 陈虹)