

对羟基苯甲酸和间苯三酚对棉花幼苗根系线粒体功能和根系生长的影响

张国伟 杨长琴 刘瑞显* 倪万潮

(江苏省农业科学院经济作物研究所/农业部长江下游棉花与油菜重点实验室, 南京 210014)

摘要 以中国大面积种植的早熟棉中棉所 50(CCRI-50)为材料,设置水培试验,研究不同浓度(0.8、4.0、20.0 mmol · L⁻¹)的对羟基苯甲酸和间苯三酚对棉花苗期根系线粒体活性氧产生、抗氧化酶活性变化及线粒体特性的影响.结果表明:对羟基苯甲酸和间苯三酚抑制了棉花根系生长,降低了根系线粒体超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)和线粒体膜 H⁺-ATPase 活性,增加了 O₂⁻产生速率和 H₂O₂含量;对羟基苯甲酸和间苯三酚处理还增大了线粒体细胞通透性转换孔(MPTP)开放程度,降低了线粒体膜流动性和细胞色素 Cyt c/a 值.0.8 mmol · L⁻¹的对羟基苯甲酸和间苯三酚处理间线粒体功能差异相对较小,4.0 和 20.0 mmol · L⁻¹时,对羟基苯甲酸处理对根系生长和线粒体功能的抑制作用高于间苯三酚处理.总之,对羟基苯甲酸和间苯三酚均抑制了棉苗根系生长和线粒体功能,且浓度越高,抑制作用越强.对羟基苯甲酸和间苯三酚处理间存在差异,浓度高于 4.0 mmol · L⁻¹时,对羟基苯甲酸比间苯三酚具有更强的抑制作用.

关键词 棉花; 根系; 线粒体; 对羟基苯甲酸; 间苯三酚

Effects of p-hydroxybenzoic acid and phloroglucinol on mitochondria function and root growth in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seedling roots. ZHANG Guo-wei, YANG Chang-qin, LIU Rui-xian*, NI Wan-chao (*Institute of Industrial Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Cotton and Rapeseed in the Lower Reaches of the Yangtze River, Ministry of Agriculture, Nanjing 210014, China*).

Abstract: With early-maturing cotton cultivar CCRI-50 widely grown in China as experimental material, water culture experiment was conducted to study the effects of p-hydroxybenzoic acid and phloroglucinol with different concentrations (0.8, 4.0, and 20.0 mmol · L⁻¹) on generation rate of reactive oxygen, changes of antioxidant enzyme activities and mitochondria function of cotton roots. Results showed that p-hydroxybenzoic acid and phloroglucinol treatments inhibited the cotton root growth, reduced SOD, POD, CAT and H⁺-ATPase activities in root mitochondria, increased the generation rate of O₂⁻ and H₂O₂ content. In addition, they also increased the opening of mitochondrial permeability transition pores (MPTP), decreased the membrane fluidity and cytochrome c/a (Cyt c/a). Difference of mitochondria function between p-hydroxybenzoic acid and phloroglucinol treatments was minor at concentration of 0.8 mmol · L⁻¹, while the inhibition to root growth and mitochondria function under treatment of p-hydroxybenzoic acid at concentration of 4.0 and 20.0 mmol · L⁻¹ was stronger than that of phloroglucinol. Above all, p-hydroxybenzoic acid and phloroglucinol inhibited antioxidant enzyme activity and mitochondria function in cotton seedling roots, and the inhibition depended on dose of phenolic acids. The inhibition to root growth and mitochondria function between p-hydroxybenzoic acid and phloroglucinol treatment was different, and p-hydroxybenzoic acid had stronger inhibition than phloroglucinol at the concentration more than 4.0 mmol · L⁻¹.

Key words: cotton; root; mitochondria; p-hydroxybenzoic acid; phloroglucinol.

本文由国家重点研发计划项目(2017YFD0201900)和农业部长江下游棉花与油菜重点实验室开放课题(2017-CR01)资助 This work was supported by the National Key Research and Development Plan of China (2017YFD0201900) and the Open Fund from Key Laboratory of Cotton and Rapeseed in the Lower Reaches of the Yangtze River, Ministry of Agriculture (2017-CR01).

2017-03-22 Received, 2017-11-08 Accepted.

*通讯作者 Corresponding author. E-mail: liuruixian2008@163.com

棉花是中国重要的经济作物,在生产中由于连年种植,连作障碍问题突出,严重影响棉花生产^[1-2].棉田连作障碍是棉花与土壤诸多因素综合作用的外在表现,其中化感自毒作用是连作障碍的重要原因之一^[3-4].因此,深入研究化感物质对棉花生长的伤害机理,对解决生产中的连作障碍问题具有重要意义.

植物自身和秸秆腐解过程中均可以产生化感物质,对周围其他植物生长产生一定的促进或抑制作用,但当化感物质积累到一定量时,就会对其自身或周边植物产生毒害^[5-6].如,20~80 mg·mL⁻¹的棉花秸秆水浸提液(含有化感物质)显著抑制棉花幼苗植株生长^[7],1 mmol·L⁻¹的香草酸、p-香豆酸、咖啡酸和丁香酸抑制豌豆主根和次生根的生长^[8],土壤中125 mg·kg⁻¹肉桂酸抑制甜茶幼苗根系基础呼吸速率^[9],4 mmol·L⁻¹根皮苷降低了甜茶根系线粒体三羧酸循环中相关酶活性^[10].对棉田化感作用的研究表明,棉花秸秆和农田中的对羟基苯甲酸和间苯三酚含量较高,是产生自毒作用的主要化感物质^[11],进一步研究表明,200 mg·L⁻¹的对羟基苯甲酸溶液显著降低棉花种子发芽率^[3],而含有1.3 mg·kg⁻¹间苯三酚的土壤显著抑制平邑甜茶幼苗光合作用^[12],但关于这2种化感物质如何影响棉花根系生长的生理生化机制目前研究相对较少,且前人的相关研究多集中在组织和器官水平^[7-8,11-12],在细胞器水平上的研究较少.

植物根系线粒体是物质代谢和能量代谢的主要场所,也是活性氧(ROS)产生的主要来源部位,逆境胁迫可以诱导植物线粒体产生大量ROS,抗氧化酶活性和细胞色素Cyt c/a均下降,部分线粒体出现变形、膜模糊、嵴分布不均等,且随着时间的延长,线粒体受损伤的程度加重,H⁺-ATPase活性降低,能量代谢紊乱,最终出现程序性死亡(PCD)^[13].在动物医学上的研究表明,线粒体膜通透性转换孔(MPTP)的开放是引起PCD的重要原因^[14],MPTP的过度开放会导致呼吸链解偶联、线粒体膜电位($\Delta\psi$)下降、ROS增加,细胞基质中Ca²⁺外流,以及细胞色素和凋亡诱导因子的释放等一系列变化^[15].以往在植物上的研究亦表明,NaCl和镉逆境胁迫均可以影响线粒体功能,扰乱能量代谢,诱导胞质体Ca²⁺浓度升高和MPTP开放,导致程序性死亡^[16-17],但是棉田连作障碍中化感物质如何影响棉花线粒体功能变化和根系生长有待深入研究.

本文以我国大面积种植的棉花品种CCRI-50为

材料,深入研究对羟基苯甲酸和间苯三酚对棉花根系线粒体功能和根系生长的影响,以进一步了解棉田化感物质对棉花根系的伤害机理,为解决连作障碍提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 试验材料与试验方法

试验于2015年3月在江苏省农业科学院人工气候室进行.以大面积种植的棉花品种CCRI-50为材料,设置水培试验.种子经3.0%(v/v)的双氧水消毒10 min后,用去离子水冲洗5次,播种于基质中.待棉株第2片真叶展开时,选择长势一致的棉花幼苗移入30 cm×20 cm×16 cm(长×宽×高)的周转箱,幼苗根茎交界处经海绵包裹后,用聚乙烯泡沫板固定于塑料盆上,每盆移入6株幼苗.

根据棉花秸秆浸提液中化感物质含量分析及棉田土壤化感物质浓度和前期试验结果^[7,18],选择对羟基苯甲酸和间苯三酚为研究对象,每种物质均设置0.8、4.0和20.0 mmol·L⁻¹3个浓度.先用无水乙醇分别将对羟基苯甲酸和间苯三酚溶解,之后用纯Hoagland营养液将其稀释,使其最终浓度分别为0.8、4.0和20.0 mmol·L⁻¹,用HCl调节pH值为7.0.将含有0.8、4.0和20.0 mmol·L⁻¹的对羟基苯甲酸(A₁、A₂、A₃)和间苯三酚(B₁、B₂、B₃)的Hoagland营养液分别加入周转箱中,每箱5.0 L,以纯Hoagland营养液为对照(CK),3次重复.生长室光源为生物钠灯,光强(450±30) μmol·m⁻²·s⁻¹,光照时间12 h,昼夜温度(30±2)℃/(25±2)℃.每天向培养容器中加入去离子水补充因蒸腾而消耗的水分,以气泵24 h通气.每3 d更换营养液1次,在处理第20天取样进行相关指标测定.

1.2 测定内容与方法

1.2.1 根系生物量、根长、直径和根系活力测定 在处理结束时每个重复取6棵棉株,剪取根系部分用蒸馏水冲洗,用Win-RHIZO根系形态分析系统分析根系总长度和平均直径,之后将部分根系烘干测定根系干质量,部分根系立刻采用TTC法测定根系活力^[19],其余根系用来测定其他生理生化指标.

1.2.2 线粒体的提取 参照詹洁等^[20]的方法提取根系线粒体,棉花根系用蒸馏水洗净,剪取3.0 g根尖于研钵中,加入线粒体提取液(0.4 mol·L⁻¹蔗糖,0.05 mol·L⁻¹ pH 7.4 Tris-HCl缓冲液,1 mmol·L⁻¹ EDTA) 2 mL,冰浴研成匀浆,1500 ×g离心15 min,上清液于14000 ×g离心15 min,沉淀则

为线粒体, 洗涤 3 次, 用线粒体悬浮液(除不加 EDTA 外, 其余同制备液)悬浮, 全程低温操作. 参照 Huang 等^[17]的方法测定线粒体蛋白质含量, 之后将样品管放在冰水浴中保存, 测定其他指标前将含线粒体的溶液轻轻颠倒摇匀.

1.2.3 线粒体 O_2^- 生成速率和 H_2O_2 含量 参照 Tan 等^[21]的方法测定线粒体 O_2^- 生成速率. 参照 Zheng 等^[22]的方法测定 H_2O_2 含量, 并略有改动, 取 1 mL 线粒体提取液于试管中, 分别加入 1 mL 0.1 mol · L⁻¹ 磷酸缓冲液(pH 7.0) 和 2 mL 1 mol · L⁻¹ 的 KI, 摇匀, 放置 20 min, 390 nm 处测定吸光值.

1.2.4 线粒体抗氧化酶活性测定 参照 Zheng 等^[22]的方法, 用 NBT 还原法测定超氧化物歧化酶(SOD)活性, 用愈创木酚法测定过氧化物酶(POD)活性, 用高锰酸钾滴定法测定过氧化氢酶(CAT)活性.

1.2.5 线粒体膜通透性转换孔(MPTP)、细胞色素 Cyt c/a、线粒体膜流动性检测 MPTP 测定参照 Marchi 等^[23]的方法. 将线粒体提取液充分摇匀, 以单位质量根系的线粒体引起的每分钟吸光度变化表示 MPTP 开放程度.

细胞色素 Cyt c/a 值的测定参照 Tonshin 等^[24]的方法, 分离的线粒体用 0.2% (W/V) BSA 悬浮, 调整悬浮液所含线粒体蛋白浓度约为 0.5 mg · mL⁻¹. 用紫外分光光度计检测 550 和 630 nm 处的吸收值. 两种波长的吸收值之比即为细胞色素比值 Cyt c/a.

线粒体膜流动性参照姚婷婷等^[25]的方法进行. 取 0.3 mL 线粒体提取液, 加入 2.85 mL 0.3 mol · L⁻¹ 甘露醇和 60 μL 5 mmol · L⁻¹ 8-苯胺-1-萘磺酸(ANS). 1 min 后用荧光分光光度计测定, 温度为室温(22 ℃), 激发波长 400 nm, 发射波长 480 nm, 狭缝宽度 5 nm. 以单位质量根系的线粒体引起的荧光强度表示膜流动性的大小.

1.2.6 线粒体膜 H^+ -ATPase 活性测定 参照潘雄波等^[26]的方法进行测定.

1.3 数据处理

采用 Microsoft Excel 数据处理软件分析数据和制作表格, 用 SPSS 17.0 统计软件进行方差分析, 用 LSD 法检验处理间平均值的差异显著性, 显著性水平设置 $\alpha=0.05$.

2 结果与分析

2.1 对羟基苯甲酸和间苯三酚对棉花根系生物量、根系形态指标和根系活力的影响

由表1可知, 对羟基苯甲酸和间苯三酚处理显

表 1 对羟基苯甲酸和间苯三酚对棉花根系生物量、总根长、根系平均直径和根系活力的影响
Table 1 Effects of p-hydroxybenzoic acid and phloroglucinol on biomass, total root length, average root diameter and root vigor of cotton root

处理 Treat- ment	根系生物量 Root biomass per plant (g)	总根长 Total root length (mm)	根系平均 直径 Average root diameter (mm)	根系活力 Root vigor ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ FM)
CK	0.394a	1166.3a	0.35g	345.7a
A ₁	0.276b	884.3b	0.40e	266.4b
A ₂	0.164d	371.6d	0.48c	166.2d
A ₃	0.112f	295.6e	0.52a	116.4f
B ₁	0.284b	902.3b	0.38f	251.5b
B ₂	0.179c	582.6c	0.46d	185.4c
B ₃	0.128e	384.2d	0.50b	134.3e

CK: 对照 Control; A₁、A₂、A₃ 和 B₁、B₂、B₃ 分别表示 0.8、4.0 和 20.0 mmol · L⁻¹ 的对羟基苯甲酸和间苯三酚处理 A₁, A₂, A₃ and B₁, B₂, B₃ indicated 0.8, 4.0 and 20.0 mmol · L⁻¹ p-hydroxybenzoic acid and phloroglucinol treatments, respectively. 同列不同字母表示差异显著 ($P<0.05$) Different letters within the same column meant significant difference at 0.05 level. 下同 The same below.

著降低了棉花根系生物量、总根长和根系活力, 增加了根系平均直径. 20.0 mmol · L⁻¹ 的对羟基苯甲酸和间苯三酚处理下棉花根系生物量、总根长和根系活力分别较对照降低 71.5% 和 67.5%、74.6% 和 67.1%、66.3% 和 61.2%, 而根系平均直径却分别增加 48.5% 和 40.0%. 两种试剂间比较发现, 浓度为 0.8 mmol · L⁻¹ 时, 对羟基苯甲酸处理的根系平均直径高于间苯三酚处理, 其余指标与间苯三酚处理差异不显著, 浓度为 4.0 和 20.0 mmol · L⁻¹ 时, 对羟基苯甲酸处理的根系生物量、总根长和根系活力显著低于间苯三酚处理, 而根系平均直径高于间苯三酚处理.

2.2 对羟基苯甲酸和间苯三酚对棉花根系线粒体 O_2^- 生成速率和 H_2O_2 含量的影响

随对羟基苯甲酸和间苯三酚浓度升高, 棉花根系中 O_2^- 产生速率和 H_2O_2 含量逐渐升高, 20.0 mmol · L⁻¹ 对羟基苯甲酸和间苯三酚处理下, O_2^- 产生速率和 H_2O_2 含量分别较对照升高 109.9% 和 87.3%、196.2% 和 163.3%. 两种试剂间比较, 浓度为 0.8 mmol · L⁻¹ 时 O_2^- 产生速率和 H_2O_2 含量差异不显著, 浓度为 4.0 和 20.0 mmol · L⁻¹ 时对羟基苯甲酸处理的 O_2^- 产生速率和 H_2O_2 含量均显著高于间苯三酚处理(图 1).

2.3 对羟基苯甲酸和间苯三酚对棉花根系线粒体抗氧化酶活性的影响

由图 2 可知, 随对羟基苯甲酸和间苯三酚浓度升高, 棉花根系线粒体 SOD 活性持续降低, 浓度为 0.8 mmol · L⁻¹ 时两种试剂间 SOD 活性差异不显著;

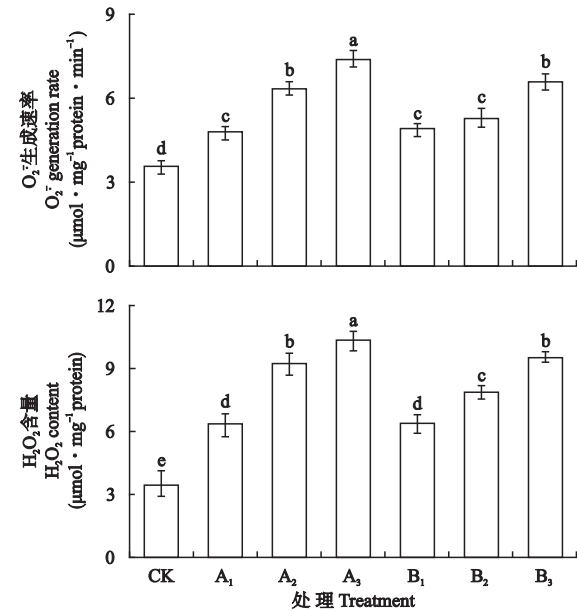


图 1 对羟基苯甲酸和间苯三酚对棉花根线粒体 O₂·⁻ 生成速率和 H₂O₂ 含量的影响

Fig.1 Effects of p-hydroxybenzoic acid and phloroglucinol on generation rate of O₂·⁻ and H₂O₂ content in cotton root mitochondria.

不同小写字母表示不同处理间差异显著 ($P < 0.05$) Different small letters indicated significant difference among different treatments at 0.05 level. 下同 The same below.

浓度为 4.0 和 20.0 mmol · L⁻¹ 时对羟基苯甲酸处理下 SOD 活性显著高于间苯三酚处理. 0.8 mol · L⁻¹ 对羟基苯甲酸处理下 POD 活性高于对照, 当浓度继续升高, POD 活性持续降低. 间苯三酚处理下 POD 活性则随处理浓度升高而降低, 两种试剂间比较, 浓度为 4.0 mmol · L⁻¹ 时 POD 活性差异不显著, 浓度为 20.0 mmol · L⁻¹ 时对羟基苯甲酸处理下 POD 活性显著低于间苯三酚处理. 对于 CAT 活性, 0.8 mmol · L⁻¹ 对羟基苯甲酸和间苯三酚处理即可显著降低 CAT 活性, 随着处理浓度继续升高, 间苯三酚处理下 CAT 活性持续降低, 而对羟基苯甲酸处理下 CAT 活性变化较小, 在 20.0 mmol · L⁻¹ 浓度下对羟基苯甲酸处理下 CAT 活性显著高于间苯三酚处理.

2.4 对羟基苯甲酸和间苯三酚对棉花根线粒体膜功能的影响

线粒体悬浮液在 540 nm 处的吸光度能够反映 MPTP 开放程度的变化, 吸光度越低, MPTP 开放程度越大, 过高的 MPTP 开放程度可破坏线粒体功能, 诱导细胞程序性死亡^[23]. 由图 3 可知, 随对羟基苯甲酸和间苯三酚浓度升高, MPTP 开放程度逐渐增大, 两种试剂间比较, 浓度为 0.8 和 4.0 mmol · L⁻¹ 时 MPTP 差异不显著, 浓度为 20.0 mmol · L⁻¹ 时对羟基

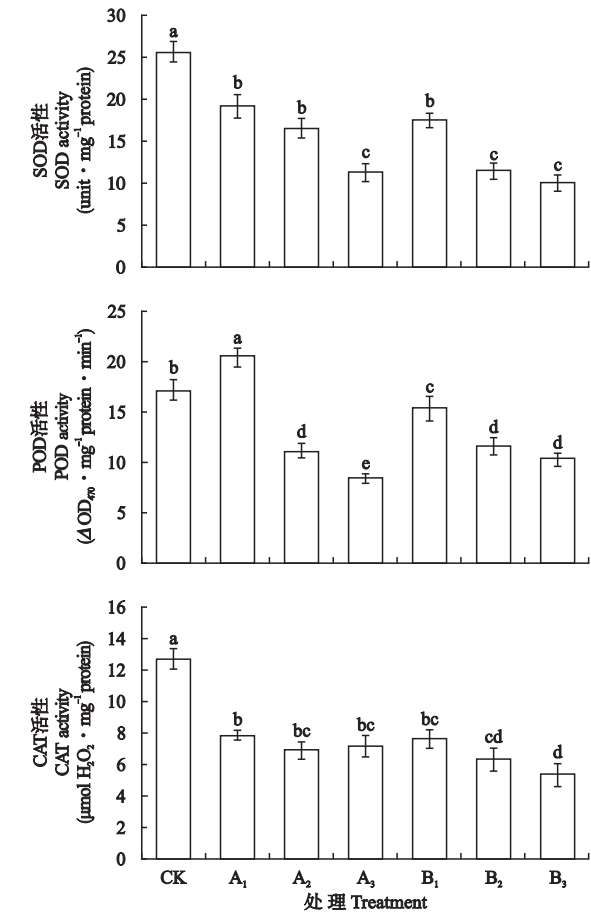


图 2 对羟基苯甲酸和间苯三酚对棉花根线粒体抗氧化酶活性的影响

Fig.2 Effects of p-hydroxybenzoic acid and phloroglucinol on antioxidant enzyme activities in cotton root mitochondria.

苯甲酸处理下 MPTP 开放程度显著高于间苯三酚处理.

膜流动性的改变可以直接反映膜功能的变化^[25]. 随对羟基苯甲酸和间苯三酚浓度升高, 膜流动性基本呈降低趋势, 试剂间比较, 浓度为 0.8 和 4.0 mmol · L⁻¹ 时对羟基苯甲酸处理下的膜流动性显著低于间苯三酚处理, 浓度为 20.0 mmol · L⁻¹ 时试剂间差异不显著.

Cyt c/a 反映线粒体内 Cyt c 数量的相对变化^[24]. 随对羟基苯甲酸和间苯三酚浓度升高, Cyt c/a 呈降低趋势, 两种试剂间比较, 浓度为 4.0 和 20.0 mmol · L⁻¹ 时 Cyt c/a 差异不显著, 浓度为 0.8 mmol · L⁻¹ 时对羟基苯甲酸处理的 Cyt c/a 显著低于间苯三酚处理.

2.5 对羟基苯甲酸和间苯三酚对棉花根线粒体 H⁺-ATPase 活性的影响

由图 4 可知, 随对羟基苯甲酸和间苯三酚浓度升高, H⁺-ATPase 活性逐渐降低, 20.0 mmol · L⁻¹ 的

对羟基苯甲酸和间苯三酚处理下 H^+ -ATPase 活性分别较对照降低 71.9% 和 60.9%. 两种试剂间比较, 浓度为 $0.8\text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 时 H^+ -ATPase 活性差异不显著, 浓度为 4.0 和 $20.0\text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 时对羟基苯甲酸处理下 H^+ -ATPase 活性显著低于间苯三酚处理.

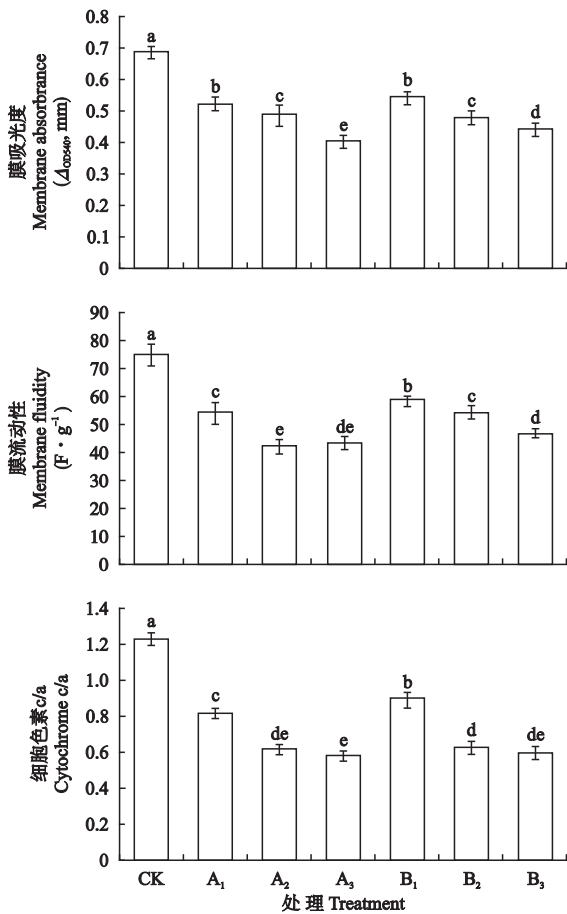


图 3 对羟基苯甲酸和间苯三酚对棉花根系线粒体 MPTP、细胞色素 Cyt c/a 和线粒体膜流动性的影响

Fig.3 Effects of p-hydroxybenzoic acid and phloroglucinol on MPTP, membrane fluidity and Cyt c/a in cotton root mitochondria.

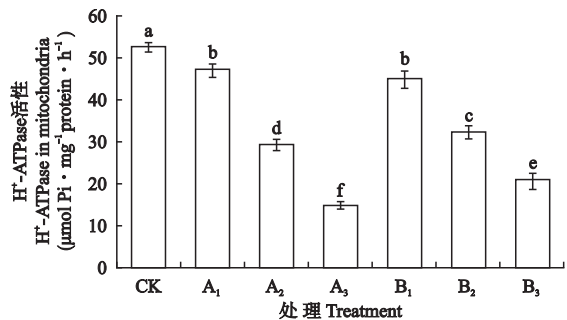


图 4 对羟基苯甲酸和间苯三酚对棉花根系线粒体 H^+ -ATPase 活性的影响

Fig.4 Effects of p-hydroxybenzoic acid and phloroglucinol on H^+ -ATPase activity in cotton root mitochondria.

3 讨 论

根系是植物吸收水分和矿质营养的主要器官, 其形态和构型在很大程度上决定着植物获取养分的能力. 在非生物逆境胁迫条件下, 根系最先感受环境刺激并通过改变根系形态和分布以适应环境胁迫. 本研究中随对羟基苯甲酸和间苯三酚浓度的升高, 棉花根生物量、总根长、根系活力持续降低, 而根系平均直径显著增加, 这与李坤等^[27]用葡萄根系浸提液 (含有化感物质) 处理葡萄根系的研究结果一致, 表明根系生理活性受到抑制. 线粒体是细胞进行物质代谢和能量转化的主要细胞器, 其完整性对整个细胞结构与功能的维持起着重要作用, 同时也是氧自由基产生的主要部位, 本身极易受氧自由基损伤^[12], 本研究中, 对羟基苯甲酸和间苯三酚处理后棉花根系线粒体 H_2O_2 含量和 $O_2^{\cdot -}$ 生成速率升高, 抗氧化酶活性则呈降低趋势, 这与 Baziramakenga 等^[28]用苯甲酸处理大豆的结果一致, 其原因是长时间高浓度的活性氧抑制了抗氧化酶的合成, 或导致酶失活, 最终活性氧清除能力降低, 而抗氧化酶活性降低, 又加剧了活性氧累积, 对膜系统造成更严重的氧化损伤.

线粒体通透性转运孔 (MPTP) 是横跨线粒体内外膜之间的非选择性高导电性通道, 对线粒体膜完整性具有重要调控作用. MPTP 开放程度越大, 线粒体膜通透性越大, MPTP 在正常生理条件下周期性开放, 维持线粒体内电化学平衡, 保持氧化还原通道的畅通^[29]. 本研究中对羟基苯甲酸和间苯三酚处理均促进了 MPTP 开放, 表明线粒体膜的完整性遭到破坏, 而膜流动性和 Cyt c/a 下降则表明有较多的 Cyt c 经过线粒体膜进入细胞质中, 其原因是作为电子传递链组成成分的 Cyt c 松散地结合在线粒体内膜上, 而 Cyt a 则紧密结合在线粒体内膜上^[30]. 过量的活性氧一方面可以将 MPTP 相关蛋白质中的巯基氧化成二硫键, 促使 MPTP 开放, 另一方面将线粒体膜中不饱和脂肪酸氧化, 导致膜流动性降低^[31], 而 MPTP 的过度不可逆开放可以引起 Cyt c 从线粒体内膜上脱落下来, 进入细胞质, 造成 Cyt c/a 降低, 同时, 进入细胞质中的 Cyt c 可以激活含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (cysteiny l aspartate specific proteinase, caspase), 诱导细胞的程序性死亡^[32]. 除此之外, 作为呼吸链上的电子传递载体, 线粒体 Cyt c 的流失亦可造成电子传递受阻, 从而产生更多活性氧, 导致 MPTP 进一步开放, 这与 Ciniglia 等^[33]报道

含有化感物质的 WHWW (walnut green husk waste waters) 抑制玉米根系线粒体功能、导致程序性死亡的结果一致。

线粒体 H^+ -ATPase 是膜固有的一种蛋白质复合体,通过水解 ATP 释放能量,进行逆浓度梯度的离子转运,从而保持细胞内外离子浓度的相对稳定,以维持生物体正常的生理代谢^[34]。本试验对羟基苯甲酸和间苯三酚处理后,线粒体膜上 H^+ -ATPase 活性下降,说明线粒体内环境失调,膜内离子转运机制紊乱,这与 Hejl 等^[35]用含有化感物质的高粱根系分泌物处理大豆幼苗的结果一致,也与本研究中 MPTP、膜流动性和 Cyt c/a 的变化相吻合。

植物对不同种类化感物质反应存在较大差异,顾元等^[36]研究表明,同等浓度处理下对羟基苯甲酸对水稻幼苗根系生长的抑制作用大于阿魏酸,而 Jung 等^[37]研究表明,同等浓度阿魏酸对马铃薯根系生长的抑制作用大于间苯三酚,这与本研究中 4.0 和 20.0 mmol · L⁻¹ 对羟基苯甲酸处理对棉花根系生长抑制作用大于间苯三酚的结果基本一致,由于实际大田土壤中对羟基苯甲酸含量也高于间苯三酚含量(土壤中对羟基苯甲酸和间苯三酚含量分别为 1.5~5.7 mg · kg⁻¹ 和 0.7~1.6 mg · kg⁻¹)^[18],这进一步说明大田环境中对羟基苯甲酸对作物造成的伤害大于间苯三酚。此外,在大田生产中,秸秆还田不可避免地增加土壤化感物质,但是秸秆还田仍有促进植株生长的效应^[38],这与本研究中两种化感物质均抑制根系生长不符,主要是因为本研究仅在水培条件下开展,而水培条件与大田土壤的化学组成仍存在较大差异,在土壤中的研究既需要考虑秸秆还田带来的肥料效应,也要考虑土壤理化性状与生物学性质对化感物质迁移转化及有效性的影响。本研究虽然在细胞器水平上解释了对羟基苯甲酸和间苯三酚对棉花根系的伤害机理,但是仍需进一步开展棉花连作土壤中对羟基苯甲酸和间苯三酚含量动态变化的研究,以明确大田环境中两种化感物质对棉花生长的影响。

综上所述,对羟基苯甲酸和间苯三酚均可抑制棉花幼苗生长,诱导活性氧产生,降低线粒体 H^+ -ATPase、SOD、CAT 和 POD 活性,使 MPTP 开放程度增大,膜流动性降低,细胞色素 Cyt c/a 值下降;随着浓度的增加,对棉花根系的损伤加大。对羟基苯甲酸和间苯三酚处理效果存在差异,浓度高于 4.0 mmol · L⁻¹ 时,对羟基苯甲酸比间苯三酚具有更强的抑制作用。

致谢 感谢江苏省现代作物生产协同创新中心对本研究的支持。

参考文献

- [1] Liu J-G (刘建国), Bian X-M (卞新民), Li Y-B (李彦斌), *et al.* Effects of long-term continuous cropping of cotton and returning cotton stalk into field on soil biological activities. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2008, **19**(5): 1027-1032 (in Chinese)
- [2] Jing F, Kang Y, Tan J, *et al.* Decomposition characteristics of cotton stalks from fall to spring as affected by continuous cropping. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B: Soil & Plant Science*, 2016, **66**: 1-6
- [3] Wang P (王璞), Zhao X-Q (赵秀琴). Effect of allelochemicals on cotton seed germination and seedling growth. *Journal of China Agricultural University* (中国农业大学学报), 2001, **6**(3): 26-31 (in Chinese)
- [4] Wendt CW, Gannaway JR, Baker RB. Allelopathic effects of wheat straw on cotton germination, emergence, and yield. *Crop Science*, 1989, **29**: 1057-1061
- [5] Ma Y-H (马云华), Wang X-F (王秀峰), Wei M (魏珉), *et al.* Accumulation of phenolic acids in continuously cropped cucumber soil and their effects on soil microbes and enzyme activities. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2005, **16**(11): 2149-2153 (in Chinese)
- [6] Jabran K, Mahajan G, Sardana V, *et al.* Allelopathy for weed control in agricultural systems. *Crop Protection*, 2015, **72**: 57-65
- [7] Liu JG, Li YB, Jiang GY, *et al.* Allelopathic effects of cotton in continuous cropping. *Allelopathy Journal*, 2008, **21**: 299-306
- [8] Vaughan D, Ord B. Influence of phenolic acids on morphological changes in roots of *Pisum sativum*. *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 1990, **52**: 289-299
- [9] Gao XB, Zhao FX, Xiang S, *et al.* Effects of cinnamon acid on respiratory rate and its related enzymes activity in roots of seedlings of *Malus hupehensis* Rehd. *Journal of Integrative Agriculture*, 2010, **9**: 833-839
- [10] Wang Q-Q (王青青), Hu Y-L (胡艳丽), Zhou H (周慧), *et al.* Effects of phloridzin on the tricarboxylic acid cycle enzymes of roots of *Malus hupehensis* Rehd. *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学), 2012, **45**(15): 3108-3114 (in Chinese)
- [11] Jiang GY, Li YB, Liu JG. Autotoxicity potential of cotton tissues and root exudates and identification of its autotoxins. *Allelopathy Journal*, 2013, **32**: 279-288
- [12] Wang Y-F (王艳芳), Pan F-B (潘凤兵), Zhang X-F (张先富), *et al.* Effects of phenolic acids on growth and photosynthetic characteristics of seedlings of *Malus hupehensis*. *Scientia Silvae Sinicae* (林业科学), 2015, **51**(2): 52-59 (in Chinese)
- [13] Scherzshouval R, Elazar Z. ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *Trends in Cell Biology*, 2007, **17**: 422-427
- [14] Muñoz-Manchado AB, Villadiego J, Romo-Madero S, *et al.* Chronic and progressive Parkinson's disease MPTP model in adult and aged mice. *Journal of Neurochemistry*, 2016, **136**: 373-387
- [15] Krantic S, Mechawar N, Reix S, *et al.* Apoptosis-indu-

- cing factor: A matter of neuron life and death. *Progress in Neurobiology*, 2007, **81**: 179–196
- [16] Lin J, Wang Y, Wang G. Salt stress-induced programmed cell death via Ca^{2+} -mediated mitochondrial permeability transition in tobacco protoplasts. *Plant Growth Regulation*, 2005, **45**: 243–250
- [17] Huang W, Yang X, Yao S, *et al.* Reactive oxygen species burst induced by aluminum stress triggers mitochondria-dependent programmed cell death in peanut root tip cells. *Plant Physiology & Biochemistry*, 2014, **82**: 76–84
- [18] Jiang GY, Liu JG, Li YB. Allelochemicals from cotton (*Gossypium hirsutum*) rhizosphere soil: Inhibitory effects on cotton seedlings. *Allelopathy Journal*, 2015, **35**: 153–162
- [19] Cui X, Dong Y, Gi P, *et al.* Relationship between root vigour, photosynthesis and biomass in soybean cultivars during 87 years of genetic improvement in the northern China. *Photosynthetica*, 2016, **54**: 81–86
- [20] Zhan J (詹洁), Kou R-J (寇瑞杰), Li C-Z (李创珍), *et al.* Effects of Aluminum on physiological characteristics of mitochondrial membrane in peanut root tips. *Acta Agronomic Sinica* (作物学报), 2009, **35**(6): 1059–1067 (in Chinese)
- [21] Tan W, Liu J, Dai T, *et al.* Alterations in photosynthesis and antioxidant enzyme activity in winter wheat subjected to post-anthesis waterlogging. *Photosynthetica*, 2008, **46**: 21–27
- [22] Zheng C, Jiang D, Liu F, *et al.* Exogenous nitric oxide improves seed germination in wheat against mitochondrial oxidative damage induced by high salinity. *Environmental & Experimental Botany*, 2009, **67**: 222–227
- [23] Marchi U, Campello S, Szabo I, *et al.* Bax does not directly participate in the Ca^{2+} -induced permeability transition of isolated mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, **279**: 37415–37422
- [24] Tonshin AA, Saprunova VB, Solodovnikova IM, *et al.* Functional activity and ultrastructure of mitochondria isolated from myocardial apoptotic tissue. *Biochemistry*, 2003, **68**: 875–881
- [25] Yao T-T (姚婷婷), Zhu L-Q (朱丽琴), Yang S (杨双), *et al.* Effect of NO on oxidative damage to mitochondrial membrane in harvested Plum Fruit. *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学), 2010, **43**(13): 2767–2774 (in Chinese)
- [26] Pan X-B (潘雄波), Xiang L-X (向丽霞), Hu X-H (胡晓辉), *et al.* Effects of exogenous spermidine on mitochondrial function of tomato seedling roots under salinity-alkalinity stress. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2016, **27**(2): 491–498 (in Chinese)
- [27] Li K (李坤), Guo X-W (郭修武), Guo Y-S (郭印山), *et al.* Allelopathic effect and identification of phenolic acid class allelochemicals in grape root decomposition products. *Journal of Fruit Science* (果树学报), 2011, **28**(5): 776–781 (in Chinese)
- [28] Baziramakenga R, Leroux GD, Simard RR. Effects of benzoic and cinnamic acids on membrane permeability of soybean roots. *Journal of Chemical Ecology*, 1995, **21**: 1271–1285
- [29] Ishimov UJ, Abdullayeva GT, Ziyavittidinov JF, *et al.* The effects of isolated fractions of red pepper capsicum annum l. on the mitochondrial permeability transition pore and lipid peroxidation. *Journal of Microbiology, Biotechnology & Food Sciences*, 2016, **5**: 259–262
- [30] Rodriguez-Enriquez S, He L, Lemasters JJ. Role of mitochondrial permeability transition pores in mitochondrial autophagy. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2004, **36**: 2463–2472
- [31] Sun WX, Zheng HY, Lan J. Edaravone protects osteoblastic cells from dexamethasone through inhibiting oxidative stress and mPTP opening. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2015, **409**: 1–8
- [32] Stewart JB, Chinnery PF. The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: Implications for human health and disease. *Nature Reviews Genetics*, 2015, **16**: 530–542
- [33] Ciniglia C, Mastrobuoni F, Scortichini M, *et al.* Oxidative damage and cell-programmed death induced in *Zea mays* L. by allelochemical stress. *Ecotoxicology*, 2015, **24**: 926–937
- [34] Lin Y, Lin Y, Lin H, *et al.* Hydrogen peroxide-induced pericarp browning of harvested longan fruit in association with energy metabolism. *Food Chemistry*, 2016, **225**: 31–36
- [35] Hejl AM, Koster KL. The allelochemical sorgoleone inhibits root H^{+} -ATPase and water uptake. *Journal of Chemical Ecology*, 2004, **30**: 2181–2191
- [36] Gu Y (顾元), Chang Z-Z (常志州), Yu J-G (于建光), *et al.* Allelopathic effects of exogenous phenolic acids composted by wheat straw on seed germination and seedling growth of rice. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences* (江苏农业学报), 2013, **29**(2): 240–246 (in Chinese)
- [37] Jung B, Alsanius BW, Jensen P. Effects of some plant and microbial metabolites on germination and emergence of tomato seedlings. *Acta Horticulturae*, 2001, **548**: 603–609
- [38] Zhang Y-W (张玉文), Mao W-B (毛伟兵), Liu H-M (刘鸿敏), *et al.* Effects of straw turnover on physical properties of coastal saline clay and cotton yield. *Chinese Agricultural Science Bulletin* (中国农学通报), 2016, **32**(6): 75–80 (in Chinese)

作者简介 张国伟,男,1981年生,副研究员.主要从事棉花栽培生理研究.E-mail: zgw_0721@163.com

责任编辑 张凤丽

张国伟,杨长琴,刘瑞显,等. 对羟基苯甲酸和间苯三酚对棉花幼苗根系线粒体功能和根系生长的影响. 应用生态学报, 2018, **29**(1): 231–237

Zhang G-W, Yang C-Q, Liu R-X, *et al.* Effects of p-hydroxybenzoic acid and phloroglucinol on mitochondria function and root growth in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seedling roots. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2018, **29**(1): 231–237 (in Chinese)