

香豆素对多花黑麦草幼苗生长和叶片超微结构的影响

徐 军, 王婧怡, 邬彩霞*

(扬州大学动物科学与技术学院, 江苏 扬州 225009)

摘 要:为探寻香豆素的化感抑草作用机理,并贴近实际生产,本试验采用温室盆栽法研究了不同浓度香豆素处理对多花黑麦草(*Lolium multiflorum*)幼苗生长和叶片超微结构的影响。结果显示:各浓度处理下香豆素均可显著抑制多花黑麦草的生长和生物量的积累,且浓度越高,抑制作用越强;叶绿素a、叶绿素b和总叶绿素含量均随香豆素浓度的升高而显著降低;与对照相比,500 mg/kg浓度处理下,叶片相对电导率、丙二醛(MDA)含量均显著增加,过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)活性均显著增强;香豆素破坏了多花黑麦草叶片细胞的超微结构,出现叶绿体变形、中央大液泡裂解、淀粉粒增多变大的现象,50 mg/kg浓度对多花黑麦草影响程度较轻,500 mg/kg浓度下细胞器几乎完全降解。

关键词:香豆素;多花黑麦草;盆栽;幼苗;超微结构

中图分类号:S543+.6

文献标识码:A

文章编号:2096-5877(2022)02-0088-05

Effects of Coumarin on Seedlings Growth and Leaf Ultrastructure of *Lolium multiflorum*

XU Jun, WANG Jingyi, WU Caixia*

(College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: In order to explore the allelopathic mechanism of coumarin and be closed to the actual production, this experiment used greenhouse potting method treated with different concentrations of coumarin to study the effects of coumarin on the growth and ultrastructure of *Lolium multiflorum* seedlings. The results showed that coumarin could significantly inhibit the growth and biomass accumulation of *Lolium multiflorum* at different concentrations, and higher concentration resulting in stronger inhibition. With the higher concentration of coumarin, the content of chlorophyll a, chlorophyll b and total chlorophyll were significantly decreased. Compared with the control, the relative conductivity and malondialdehyde(MDA) content of the leaves were significantly increased, Peroxidase(POD), catalase(CAT) and superoxide dismutase(SOD) activities were significantly enhanced under the treatment of 500 mg/kg. Coumarin destroyed the ultrastructure of *Lolium multiflorum* leaf cells which led to chloroplast deformation, central vacuolar lysis and increasing starch granules. Coumarin affected little under the concentration of 50 mg/kg while under the concentration of 500 mg/kg the organelles were almost completely degraded.

Key words: Coumarin; *Lolium multiflorum*; Potting; Seedling; Ultrastructure

面对化学除草剂对自然生态系统带来的毁坏,我国提出了到2020年实现化肥和农药零增长的计划。生物除草剂作为新时代的绿色农药,为缓解化学农药造成的环境问题提供了新方向。目前,以化感物质为先导结构研制绿色新型生物除草剂已成为研究的热点^[1]。前人的研究表明,化

感物质如酚类、萜类、有机酸等能够有效阻碍其他植物种群的衍生和发展^[2-4],与传统化学除草剂相比,化感物质具有环境兼容性好、选择性强、经济效益高等优点^[5-6]。因此,利用植物化感作用开发生物除草剂是未来进行生物防治的重点内容之一。Lei等^[7]以4-羟基氨基酸为母体结构合成出了3-苯甲酰基-4-羟基苯并噻吩二氧系列新型除草剂,该除草剂对稗草(*Echinochloa crusgalli*)、油菜(*Brassica campestris*)等杂草的生长具有显著的抑制效果。Zhao等^[8]评估了苯并噻吩衍生物的抑草活性,结果显示该物质可有效抑制稻田中稗草(*E.*

收稿日期:2019-12-05

基金项目:扬州大学大学生科技创新基金项目(x20170695)

作者简介:徐 军(1994-),男,在读硕士,主要从事牧草栽培和利用研究。

通讯作者:邬彩霞,女,博士,副教授,E-mail: cxwu@yzu.edu.cn

crusgalli)、千金子(*Leptochloa chinensis*)等主要杂草的生长。由此可见,利用化感物质开发新一代生物除草剂具有广阔的应用前景。

黄花草木樨(*Melilotus officinalis*)具有很强的化感抑草作用,对其水浸提液进行分离和鉴定发现其主效化感物质为香豆素^[9-11]。香豆素是植物次生代谢产物,易在植物体内产生活性氧自由基,具有较强的抑草活性^[12]。在众多化感抑草活性物质中,香豆素具有分子量小、合成简单、生物利用度高等优点,且香豆素半衰期短,在土壤中不会产生富集从而对周遭植物和环境产生负面影响^[13]。因此,香豆素可作为新型生物除草剂的开发来源。多花黑麦草(*Lolium multiflorum*)为一年生或越年生草本植物,是冬季作物田里的恶性杂草之一,近年来,国内外有众多研究以多花黑麦草为受体植物进行新型除草剂的研发工作^[14-15]。

目前关于香豆素对植物化感作用大多停留在实验室内的生物检测,为了更贴近生产实践,本试验采用盆栽法,对多花黑麦草幼苗在不同浓度香豆素处理下的生长生理指标进行测定并对叶片内部超微结构变化进行观察分析,以期利用香豆素合成新型生物除草剂提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

香豆素($C_9H_6O_2$)购于SIGMA公司(纯度 $\geq 99\%$,编号:C4261-50G)。多花黑麦草种子购于百绿集团。盆栽土壤为扬州大学试验田的0~20 cm表层耕作土壤,塑料花盆直径25 cm、高16.5 cm。

1.2 试验方法

设置香豆素处理浓度0、50、200、500 mg/kg(香豆素质量/风干土质量),每个处理三次重复,其中0 mg/kg浓度为对照组。将100粒多花黑麦草种子播于花盆中,每盆风干土质量为3.5 kg,生长两周后均匀浇灌不同浓度香豆素溶液,在处理21

d时进行采样测定。

1.3 测定指标及方法

1.3.1 形态指标测定

采样时每盆随机取出10株,先用直尺测定其株高和根长(精确到0.1 cm),再用电子分析天平分别测定地上和地下部分的鲜重(精确到0.000 1 g),置于105 ℃烘箱杀青30 min后70 ℃烘干至恒重,测定干重。

1.3.2 生理指标测定

总叶绿素含量采用95%乙醇浸泡法测定^[16]。电导率、丙二醛(MDA)含量参照李莎莎等^[17]的方法,抗氧化酶(SOD、CAT、POD)的活性均采用南京建成生物工程研究所提供的试剂盒进行测定,每个处理三次重复。

1.3.3 透射电镜的样品制备及操作

将鲜样切割成1 mm×1 mm×1 mm大小并立即放入预先配好的戊二醛固定液中进行固定,待观察样品沉底后随即放入4 ℃冰箱继续固定48 h。取出后用磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH=7.2)冲洗3次,15 min/次,以1%锇酸固定4 h,再使用磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH=7.2)冲洗3次,15 min/次,乙醇梯度脱水(30%、50%、70%、80%、90%、100%),15 min/次,用常规树脂进行包埋,切片,再用醋酸铀、枸橼酸铅进行双重染色,最后在Phillips Tecnai 12 TEM(荷兰)透射电镜下观察,照相。

1.4 数据处理与分析

采用SPSS 22.0和Excel 2016软件对数据进行分析并作图。

2 结果与分析

2.1 香豆素对多花黑麦草幼苗生长特性的影响

由表1可知,香豆素处理下,多花黑麦草的株高、根长、地上部鲜干重、根鲜干重均随香豆素浓度的升高而降低,且各处理组与对照组均存在显著性差异($P<0.05$),其中各处理组株高与对照相比

表1 香豆素对多花黑麦草生长特性的影响

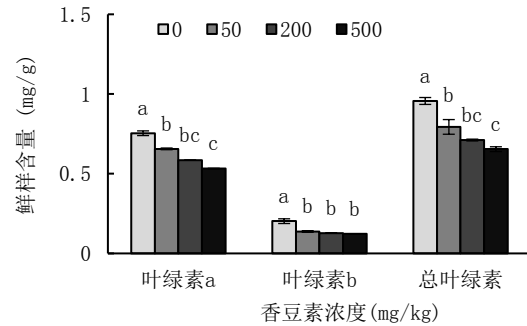
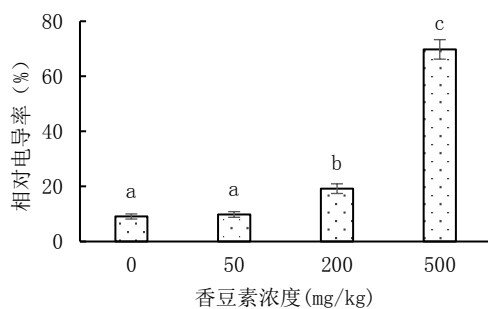
指标	浓度(mg/kg)			
	0	50	200	500
株高(cm)	30.98±0.50a	26.21±0.66b	21.58±0.62c	17.33±0.37d
根长(cm)	10.95±0.63a	7.76±0.27b	7.37±0.40c	6.91±0.32d
地上部鲜重(g)	5.97±0.11a	5.04±0.08b	3.50±0.04c	2.81±0.09d
地上部干重(g)	0.89±0.04a	0.65±0.02b	0.46±0.01c	0.45±0.02c
根鲜重(g)	2.36±0.03a	1.38±0.01b	0.93±0.03c	0.70±0.02d
根干重(g)	0.53±0.02a	0.40±0.02b	0.18±0.01c	0.12±0.01d

注:同行不同小写字母表示0.05水平上差异显著

分别下降了15.40%、30.34%、44.06%;根长分别下降了29.13%、32.69%、36.89%;地上部鲜重分别下降了15.58%、41.37%、52.93%;地上部干重分别下降了26.97%、48.31%、49.44%;根鲜重分别下降了41.53%、60.60%、70.34%;根干重分别下降了24.53%、66.04%、77.36%。由此可知,香豆素对多花黑麦草根系的抑制作用大于对地上部的抑制作用。

2.2 香豆素处理对多花黑麦草幼苗叶绿素含量的影响

叶绿素含量高低反映植物光合能力的强弱,由图1可知,多花黑麦草叶绿素a、叶绿素b以及总叶绿素含量均随香豆素浓度的升高而降低,且各处理组与对照组均存在显著性差异($P<0.05$),当香豆素浓度为500 mg/kg时,叶绿素a、叶绿素b以及总叶绿素与对照相比分别下降了29.33%、40.00%、32.63%,由此可见,香豆素对叶绿素b的抑制作用大于叶绿素a。



注:不同小写字母表示在0.05水平上差异显著,下同

图1 香豆素对多花黑麦草叶绿素含量的影响

2.3 香豆素处理对多花黑麦草幼苗电导率和MDA含量的影响

电导率和MDA含量升高会加剧膜的损伤,由图2可知,随着香豆素浓度的升高,多花黑麦草相对电导率及MDA含量呈上升趋势,其中相对电导率200 mg/kg、500 mg/kg浓度处理组与对照组相比

图2 香豆素对多花黑麦草电导率和MDA含量的影响

分别显著提高了111.22%、667.66%($P<0.05$),MDA含量500 mg/kg浓度处理组与对照组相比显著增加了149.81%,其他各组与对照相比均差异不显著($P>0.05$)。

2.4 香豆素处理对多花黑麦草幼苗抗氧化酶系统的影响

POD、CAT、SOD对植物清除植物体内活性氧

具有重要作用,由图3可知,香豆素处理下,各浓度处理组与对照相比POD、CAT、SOD活性均有所提高,其中POD、SOD活性随香豆素浓度的增加呈上升趋势,50 mg/kg浓度处理下CAT、SOD活性与对照相比差异不显著($P>0.05$),200 mg/kg、500 mg/kg浓度处理组与对照相比酶活性均显著增加($P<0.05$)。

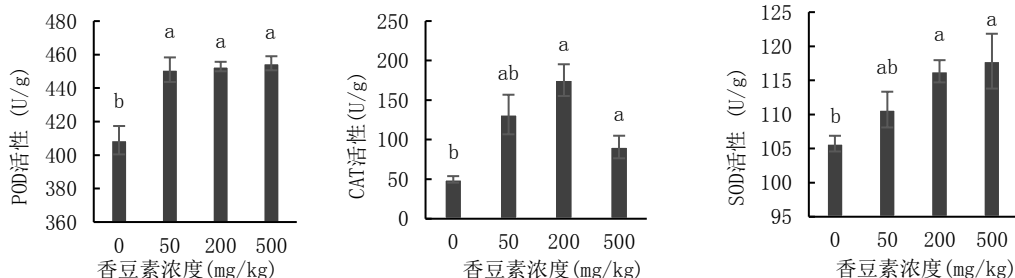
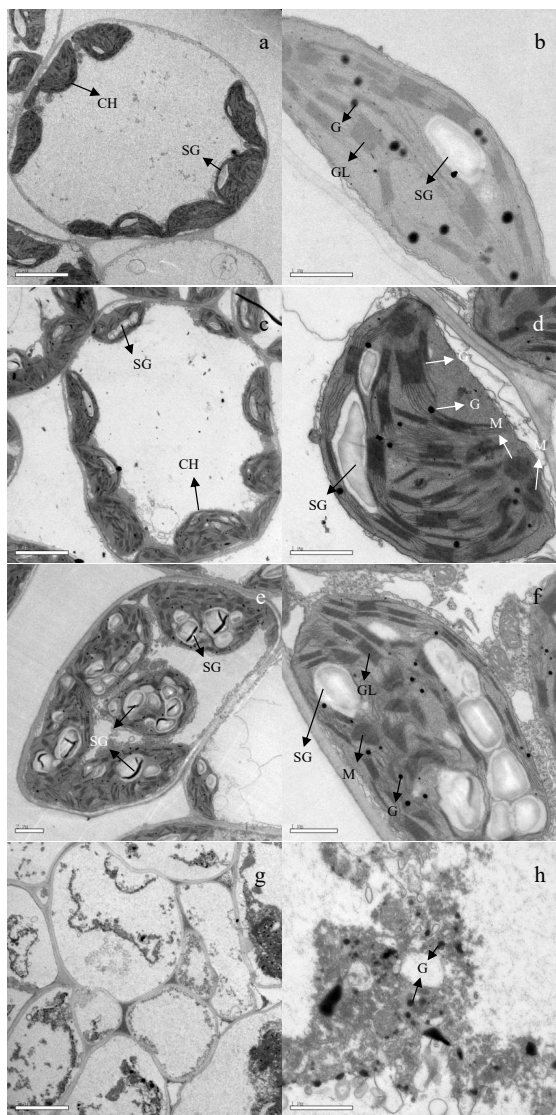


图3 香豆素对多花黑麦草POD、CAT、SOD酶活性的影响

2.5 香豆素处理对多花黑麦草叶片超微结构的影响

由图4可知,与对照相比,50 mg/kg浓度处理

下叶绿体呈梭形和椭圆形,嗜银颗粒数量较少,细胞壁平滑,细胞形态规则,可见50 mg/kg浓度对多花黑麦草的影响程度较轻;200 mg/kg浓度处理



注: a,b: 对照; c,d: 50 mg/kg 浓度处理组; e,f: 200 mg/kg 浓度处理组; g,h: 500 mg/kg 浓度处理组; CH: 叶绿体; SG: 淀粉粒; GL: 基质片层; G: 嗜银颗粒; M: 线粒体

图4 香豆素对多花黑麦草叶片超微结构的影响

组中叶绿体发生肿胀,嗜银颗粒数量增多,叶片细胞淀粉粒显著高于对照和 50 mg/kg 浓度处理组,叶绿体基质片层结构发生变化,数量减少且叶绿体结构由梭形或椭圆形变成了圆球形,推测该浓度下多花黑麦草无法通过调节自行恢复; 500 mg/kg 浓度处理组降解程度更高,细胞器几乎完全降解,可见该浓度对多花黑麦草造成了灭生性的伤害。

3 结论与讨论

逆境条件下,植物体会发生形态特征改变^[18]、生长延缓^[19]、地上生物量减少^[20]等现象。本试验研究发现,香豆素对多花黑麦草地上和地下部均具有很强的抑制作用,随着处理浓度的升高抑制

作用增强,且香豆素对多花黑麦草根系的抑制作用大于对地上部,该结果与刘成等^[21]的研究结果相似,分析原因可能是由于根系部位与香豆素直接接触,化感胁迫下,根系伸长细胞的生理结构遭到破坏,从而抑制了根系的生长。

化感胁迫下,植物细胞会发生膜脂过氧化作用,细胞膜破裂,细胞液外渗,导致电导率升高。膜脂氧化的最终产物之一是 MDA,因此常将 MDA 含量作为判断植物细胞膜受损程度的指标。本试验结果发现,随着香豆素浓度的升高多花黑麦草幼苗的电导率值和 MDA 含量均呈升高趋势,可见多花黑麦草的细胞膜系统遭到了香豆素的破坏,这与 Garsaball 等^[22], Li 等^[23]的试验结果一致。CAT、POD 和 SOD 是抗氧化系统中重要的活性氧清除酶,本试验研究发现,香豆素各浓度处理组与对照相比 POD、CAT、SOD 活性均有所提高,可见在香豆素处理下,多花黑麦草启动了植株内的抗氧化系统进行防御。其中 POD、SOD 活性随香豆素浓度的增加呈上升趋势, CAT 活性随着处理浓度的增加呈先升高后降低趋势,原因可能是 500 mg/kg 浓度下幼苗叶片 MDA 含量过高,打破了植物体内活性氧产生和消除的动态平衡,超出了抗氧化酶系统所能耐受的范围,从而引起 CAT 活性降低。

光合作用是生态系统中物质传递和能量流动的重要环节,叶绿素含量和叶绿体结构的完整性是判断植物光合能力强弱的重要指标^[24-25],香豆素处理下,多花黑麦草体内的叶绿素含量显著降低。产生这种结果可能有以下 2 个原因:一是香豆素处理下叶绿素酶活性增强,叶绿素分解加剧;二是香豆素使得植物体产生氧化胁迫,产生大量氧自由基,破坏叶绿体分子结构,进而使其光合性能衰弱。淀粉是植物光合作用的重要产物,叶片中的淀粉通过植物呼吸作用被分解为单糖或双糖从而转运到各个组织器官中,但过量积累的淀粉会破坏叶绿体正常结构,从而引起叶片老化^[26]。透射电镜结果显示,50 mg/kg 浓度处理下,香豆素对叶绿体影响程度较低,叶绿体基质片层结构良好且规则,叶绿体具有正常结构,但与对照相比,淀粉粒数量变多; 200 mg/kg 浓度下,嗜银颗粒数量增多,叶片细胞淀粉粒显著高于对照和 50 mg/kg 浓度处理组,叶绿体基质片层结构发生变化,数量减少且叶绿体结构由梭形或椭圆形变成了圆球形; 500 mg/kg 浓度下中央大液泡裂解,叶绿体结构完全解体,这与孙岩等^[27]进行的盐

胁迫试验研究结果相似。

综上所述,香豆素会抑制多花黑麦草的生长发育,打破生理平衡并破坏叶绿体细胞超微结构,且其作用效果随浓度的升高而加强,50 mg/kg 浓度处理下多花黑麦草可通过增强保护酶活性抵御胁迫伤害,此时叶绿体细胞结构完整,可见该浓度对多花黑麦草产生的化感胁迫程度较轻。500 mg/kg 浓度处理下多花黑麦草超微结构完全被破坏,直至死亡。

参考文献:

- [1] Jabran K, Mahajan G, Sardana V, et al. Allelopathy for weed control in agricultural systems[J]. Crop Protection, 2015, 72: 57-65.
- [2] Blum U. Plant - Plant Allelopathic Interactions. Phase I: The Laboratory[M]. Berlin: Springer, 2011:9-84.
- [3] Rumana Yeasmin, Satoru Motoki, Sadahiro Yamamoto, et al. Allelochemicals inhibit the growth of subsequently replanted asparagus(*Asparagus officinalis* L.)[J]. Biological Agriculture & Horticulture, 2013, 29(3): 165-172.
- [4] Meksawat S, Pornprom T. Allelopathic effect of itchgrass (*Rottboellia cochinchinensis*) on seed germination and plant growth[J]. Weed Biology & Management, 2010, 10(1): 16-24.
- [5] 强 胜, 陈世国. 生物除草剂研发现状及其面临的机遇与挑战[J]. 杂草学报, 2011, 29(1): 1-6.
- [6] 张朝贤. 农田杂草与防控[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2011: 77-78.
- [7] Lei K, Hua X W, Tao Y Y, et al. Discovery of (2-benzoylthien-1-yl)-containing 1,2-benzothiazine derivatives as novel 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) inhibiting-based herbicide lead compounds[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2015, 24(2):92-103.
- [8] Zhao H H, Kong C H, Xu X H. Herbicidal efficacy and ecological safety of an allelochemical-based benzothiazine derivative[J]. Pest management science, 2019, 75(10): 2690-2697.
- [9] 邬彩霞, 刘苏娇, 赵国琦, 等. 黄花草木樨对杂草的化感作用研究[J]. 草地学报, 2015, 23(1): 82-88.
- [10] 邬彩霞, 赵国琦, 刘苏娇, 等. 黄花草木樨水浸液中香豆素的含量及其对7种植物种子萌发和幼苗生长的影响[J]. 草业科学, 2014, 31(12): 2262-2269.
- [11] Wu C X, Zhao G Q, Liu D L, et al. Discovery and Weed Inhibition Effects of Coumarin as the Predominant Allelochemical of Yellow Sweetclover (*Melilotus officinalis*)[J]. International Journal of Agriculture & Biology, 2016, 18(1): 168-175.
- [12] Hussain M I, Qamar Abbas S, Reigosa M J. Activities and Novel Applications of Secondary Metabolite Coumarins[J]. Planta Daninha, 2018, 36: e018174040.
- [13] Rahman A U. Studies in natural products chemistry / edited by Atta-ur-Rahman[M]. Amsterdam: Elsevier, 1988: 133-135.
- [14] 吴仁海, 孙慧慧, 苏旺苍, 等. 氟噻草胺与氟唑磺隆混配协同作用及在小麦田杂草防治中的应用[J]. 植物保护, 2018, 44(2): 209-214.
- [15] Zubair H M, Pratley J E, Sandral G A, et al. Allelopathic interference of alfalfa (*Medicago sativa* L.) genotypes to annual ryegrass (*Lolium rigidum*)[J]. Journal of Plant Research, 2017, 130(4): 647-658.
- [16] 王晓飞, 李志洪, 袁家萍, 等. 玉米品种冠层 NDVI 与叶绿素的关系[J]. 中国农学通报, 2010, 26(16): 175-179.
- [17] 李莎莎, 张志强, 王亚芳, 等. 根瘤菌共生对低温胁迫下紫花苜蓿抗寒生理变化的影响[J]. 草地学报, 2016, 24(2): 377-383.
- [18] Bazzazi N, Khodambashi M, Mohammadi S. The Effect of Drought Stress on Morphological Characteristics and Yield Components of Medicinal Plant Fenugreek[J]. TulidvaFarāvārī - iMaūlāt-iZirāvaBāghī, 2013, 3(8): 11-13.
- [19] 常国伟, 孙丽芳, 高 天, 等. 苏打碱胁迫对玉米自交系苗期生长及生理特性的影响[J]. 东北农业科学, 2019, 44(1): 18-21.
- [20] Wei W, Wang R Q, Yuan Y F, et al. Effects of salt and water stress on plant biomass and photosynthetic characteristics of Tamarisk (*Tamarix chinensis* Lour.) seedlings[J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10(78): 17981-17989.
- [21] 刘 成, 陈晓德, 吴 明, 等. 芦苇叶片化感作用对加拿大一枝黄花生长及生理生化特性的影响[J]. 草业学报, 2014, 23(3): 182-190.
- [22] Garsaball J A L, Méndeznatera J R. Allelopathic effects of aqueous extracts of leaves of tree marigold (*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray) on seed germination and seedling growth of lettuce (*Lactuca sativa* L.)[J]. Scientia Agropecuaria, 2013, 4: 229-241.
- [23] Li L, Zhang Y, Wang C, et al. Effects of leachates of *Casuarina equisetifolia* on photosynthesis and antioxidant enzymes of *Vatica mangachapoi* seedlings[J]. Allelopathy Journal, 2014, 33(2): 189-199.
- [24] 孙晓东, 贾 娜, 何 鹏, 等. 干旱胁迫对陕北沙棘幼苗生长发育的影响[J]. 东北农业科学, 2018, 43(2): 16-20.
- [25] Zahra J, Nazim H, Cai S, et al. The influence of salinity on cell ultrastructures and photosynthetic apparatus of barley genotypes differing in salt stress tolerance[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2014, 36(5): 1261-1269.
- [26] 闻志彬, 莱孜提, 库里库, 等. 干旱胁迫对3种不同光合类型荒漠植物叶绿体和线粒体超微结构的影响[J]. 西北植物学报, 2016, 36(6): 1155-1162.
- [27] 孙 岩, 崔国文, 张 超, 等. NaCl 胁迫对野大麦叶肉细胞超微结构的影响[J]. 中国草地学报, 2015, 37(6): 102-106.

(责任编辑: 刘洪霞)