

朱雪珍, 张晓红, 桑杰, 等. 基于 mt-roGFP1 探针研究除草化合物对拟南芥根尖细胞氧化还原电位的影响 [J]. 华南农业大学学报, 2023, 44(4): 539-548.
ZHU Xuezhen, ZHANG Xiaohong, SANG Jie, et al. Effects of herbicidal chemicals on redox potentials of *Arabidopsis thaliana* root tip cells based on mt-roGFP1 probe[J]. Journal of South China Agricultural University, 2023, 44(4): 539-548.

基于 mt-roGFP1 探针研究除草化合物对拟南芥根尖细胞氧化还原电位的影响

朱雪珍✉, 张晓红, 桑杰, 周利娟✉

(华南农业大学 植物保护学院/绿色农药全国重点实验室, 广东 广州 510462)

摘要:【目的】研究几种代表性商品化除草剂以及植物源除草化合物小檗碱及其类似物对拟南芥根尖细胞氧化还原电位的影响。【方法】以靶向线粒体的氧化还原敏感绿色荧光蛋白(Mitochondria targeted redox-sensitive green fluorescent protein, mt-roGFP1)标记的拟南芥转基因植株为材料, 采用不同质量浓度的化合物处理不同时间后, 测定拟南芥根冠、分生区、过渡区和伸长区的细胞氧化还原电位的变化。【结果】经几种商品化除草化合物处理后, 拟南芥根部分生区的细胞氧化还原电位最小。从分生区到伸长区氧化还原电位逐渐增大, 呈现逐渐被氧化的趋势。其中, 光系统 II 抑制剂(莠去津和环嗪酮)的氧化还原电位变化规律最为明显, 说明 mt-roGFP1 荧光探针能较好地响应光系统 II 抑制剂。氨基酸生物合成抑制剂草甘膦对拟南芥根尖细胞氧化还原的影响具有明显的剂量-效应关系, 随着草甘膦质量浓度增加, 氧化还原电位变化量也逐渐增大, 呈正相关关系 ($R^2=0.9956$)。小檗碱及其类似物处理后, 大多数处理组的拟南芥根尖细胞的氧化还原电位在分生区达到最大还原值, 并从分生区开始逐渐被氧化。【结论】研究结果可以为应用 roGFP 荧光探针技术研究除草化合物对根系细胞线粒体的作用机制提供基础。

关键词: 拟南芥; 绿色荧光蛋白; 氧化还原电位; 除草化合物

中图分类号: S482.4

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2023)04-0539-10

Effects of herbicidal chemicals on redox potentials of *Arabidopsis thaliana* root tip cells based on mt-roGFP1 probe

ZHU Xuezhen✉, ZHANG Xiaohong, SANG Jie, ZHOU Lijuan✉

(College of Plant Protection, South China Agricultural University/National Key Laboratory of Green Pesticide, Guangzhou 510462, China)

Abstract: 【Objective】The aim of this study was to investigate the effects of several commercial herbicides and the botanical herbicidal compound berberine and its analogues on the redox potential of *Arabidopsis thaliana* root tip cells. 【Method】*A. thaliana* transgenic plants marked with mitochondria targeted redox-sensitive green fluorescent protein were used as plant materials. The changes of cell redox potential in root cap, proximal meristem, transition zone and elongation zone were measured after being treated with different mass concentrations of herbicides for different time. 【Result】The redox potential of the proximal meristematic zone

收稿日期: 2022-07-01 网络首发时间: 2023-05-17 13:55:51

首发网址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20230516.1711.002.html>

作者简介: 朱雪珍, 硕士研究生, 主要从事植物源除草剂研究, E-mail: 15093249365@163.com; 通信作者: 周利娟, 教授, 博士, 主要从事植物源除草剂研发, E-mail: zhoulj@scau.edu.cn

基金项目: 广东省自然科学基金 (2020A151501858); 广东省科技计划“国际科技合作领域” (2016A050502047)

of *A. thaliana* root cells treated with commercial herbicides was the lowest. From the meristematic zone to the elongation zone, the redox potential gradually increased, showing a trend of being gradually oxidized. Among the tested commercial herbicides, the change rule of redox potential of photosystem II inhibitors (atrazine and hexazinone) was the most obvious, indicating that mt-roGFP1 fluorescent probe could respond better to photosystem II inhibitors. The effect of glyphosate, an amino acid biosynthesis inhibitor, on the redox potential of *A. thaliana* root tip cells showed an obvious dose-response manner. With the increase of mass concentration, the change of the redox potential also gradually increased, showing a positive correlation with $R^2=0.9956$. After the treatment of berberine and its analogues, the redox potential of *A. thaliana* root tip cells in most treatment groups reached the maximum reduction value in the proximal meristematic zone, and was gradually oxidized from the meristematic zone. 【Conclusion】 These results provide a basis for applying roGFP fluorescence probe technology to studying the mechanism of herbicidal compounds acting on root cell mitochondria.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; Green fluorescent protein (GFP); Redox potential; Herbicidal compound

活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 是植物有氧代谢以及逆境代谢过程中的产物。活性氧参与植物的生长发育、细胞循环、细胞的程序性死亡、激素信号等生物过程,是调控各种生物和非生物胁迫反应的重要信号分子^[1-2]。活性氧的性质极为活泼,它的产生伴随着植物正常的有氧代谢,当植物受到环境胁迫时,如除草剂等外源化合物的胁迫,会诱导活性氧的产生^[3-4]。活性氧含量一旦超出了植物的清除能力,就会与蛋白质、脂类和 DNA 等大分子物质发生反应,引起酶活性降低、膜透性增强及突变增加,造成植物体细胞的氧化损伤甚至死亡^[5]。活性氧水平的内源性变化发挥着信号功能,并在适应环境变化方面发挥积极作用^[6-8]。所以测定植物体细胞内 ROS 含量的动态变化对研究植物体内活性氧的具体作用机制、ROS 信号转导网络以及植物的生长发育等具有重要意义。

利用氧化还原敏感绿色荧光蛋白 (roGFP) 检测活体氧化还原电位,是将一个本身不含二硫键且对生物系统没有影响的蛋白,特异性地表达并定位到特定的亚细胞结构中的方法,可以无损伤地检测活细胞内的氧化还原电位。相比荧光染料^[9-11], roGFP 探针因具备非破坏性、局域测定、可逆、实时和动态的优势,成为评估细胞内氧化还原状态的一种手段,适用于许多生物和细胞类型^[9,12-17]。当 roGFP 感应系统可用于哺乳动物系统后,不同的 roGFPs (roGFP1~4, roGFP-iX) 已被用作氧化还原传感器^[18-25],广泛应用于各个领域,从哺乳动物到植物,尤其是在模式生物拟南芥中。且 roGFP 在线粒体 (Mitochondria-roGFP, mt-roGFP) 中反映氧化还原电位的能力优于在细胞质 (Cytoplasm-roGFP, c-roGFP) 的^[3]。

目前对拟南芥氧化还原电位影响的研究集中在干旱胁迫、高低温和盐渍等非生物逆境中,研究除草化合物对拟南芥氧化还原电位影响的相对较少。本试验测定不同作用机理的几种商品化除草化合物和具有除草活性的植物源化合物小檗碱及其类似物^[26-27]对 mt-roGFP1 标记的拟南芥转基因植株根尖的根冠、分生区、过渡区和伸长区在不同测定质量浓度和时间下的氧化还原电位的影响,以期填补外源除草化合物胁迫下拟南芥细胞氧化还原电位变化的研究空白,分析除草化合物处理对植物细胞氧化还原电位影响的变化规律,研究其对植物细胞起作用的方式,为应用 roGFP 探针技术研究除草化合物的作用机理提供新思路 and 理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

拟南芥 *Arabidopsis thaliana* L. Col 生态型, mt-roGFP1 标记的拟南芥转基因植株由加州大学伯克利分校 Feldman Lewis J 教授提供。

超净工作台购自苏净集团安泰空气技术有限公司; LRH-300-G II 光照培养箱购自广东省医疗器械厂; Zeiss Axiowert 荧光显微镜购自德国 ZEISS 公司。

二甲戊灵、草甘膦: 浙江新安化工集团股份有限公司; 氟乐灵、草铵膦: 江苏辉丰农化股份有限公司; 莠去津: 利尔化学股份有限公司; 环嗪酮: 浙江欣禾化工有限公司; 小檗碱: Sigma-Aldrich(上海) 贸易有限公司; 二氢小檗碱: 四川省维克奇生物科技有限公司; 次氯酸钠 (分析纯)、赤霉素 (分析纯)、KNO₃、NH₄NO₃、Ca(NO₃)₂、FeSO₄·7H₂O、MgSO₄·7H₂O、MnSO₄·4H₂O、CuSO₄·5H₂O、

ZnSO₄·7H₂O、KH₂PO₄、H₃BO₃、MnCl₂、NaCl、H₂MoO₄、CaCl₂·2H₂O、KI、NaMoO₄·2H₂O、CoCl₂·6H₂O 和 Na₂-EDTA(分析纯) 购自广州化学试剂厂; 其他化合物均购自成都瑞芬思生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 mt-roGFP1 标记的拟南芥转基因植株的培养

采用竖直培养皿法^[3]培养 mt-roGFP1 标记的拟南芥转基因植株。配制 1/2 MS 培养基, 并用 1 mmol/L 的 NaOH 溶液调节 pH 至 5.7~5.8, 最后加入 10 g/L 的琼脂粉, 121 ℃ 高温灭菌 20 min, 放置干净无菌环境备用。整个种植试验均在超净工作台进行, 先将 mt-roGFP1 标记的拟南芥转基因种子放入无菌的 2 mL 离心管中, 用异丙醇溶液清洗消毒 5 min, 然后用 1.5%(φ) 的次氯酸钠溶液充分浸泡 10 min, 再用无菌水清洗 3~4 次, 直至洗出液变为透明, 在 4 ℃ 冰箱放置 2~3 d, 使种子春化以备用。将待用仪器及培养皿、培养基等放入超净工作台紫外灭菌 30 min。用移液枪吸取 20 mL 加热溶化后的 1/2 MS 培养基到 10 cm×10 cm 方形培养皿中, 待其完全冷却凝固。用无菌水将春化后的 mt-roGFP1 标记的拟南芥转基因种子清洗 3~4 次, 用移液枪均匀播种到凝固培养基上, 每皿 50 颗种子, 待水分完全蒸发后, 封口膜封口。将培养皿竖直放置在光照强度 4000 lx、(22±1)℃、16 h 光:8 h 暗的光照培养箱培养 7 d。

1.2.2 拟南芥根尖透明化 待 mt-roGFP1 标记的拟南芥转基因植株生长至 7 d, 挑选长势一致、健康的拟南芥幼苗。将拟南芥植株用细胞透明液(HGG solution)透明化^[28]后, 使用 Zeiss Axiowert 荧光显微镜拍摄。细胞透明液的配制: 准确称取 80 g ddH₂O 和三氯乙醛溶液, 加入 10 mL 甘油和 30 mL ddH₂O, 室温下搅拌均匀并放置 3~5 h。选择长势一致的 mt-roGFP1 标记的拟南芥转基因植株, 直接放入细胞透明液中浸泡 1 min, 用镊子轻轻取出, 放在有 1 滴 10%(φ) 甘油的干净载玻片上, 制片, 在荧光显微镜(DIC 通道)下拍摄其明场图片。

1.2.3 氧化还原电位的测量及分析 参考 Jiang 等^[29]的方法, 待 mt-roGFP1 标记的拟南芥转基因植株生长 7 d 后, 挑选长势一致健康的拟南芥幼苗用作试验。荧光测量采用 Zeiss Axiowert 荧光显微镜, 激发波长设置为 410nm (DAPI 通道) 和 470 nm (GFP 通道), 荧光值为 505~530 nm 发射波长。选择长势一致的 mt-roGFP1 标记的拟南芥转基因植株, 放在含有 1 滴 10%(φ) 甘油的干净载玻片上, 制成

玻片, 在荧光显微镜(410 nm / 470 nm 通道)下拍摄荧光图片, 测量荧光强度, 通过减去相邻无细胞区域的荧光强度来校正每幅图像的背景荧光强度, 计算 410 与 470 nm 荧光强度比率。将同一拟南芥用外源化合物处理一定时间, 重新测定 410 与 470 nm 荧光比率; 再将同一拟南芥用 100 mmol/L H₂O₂ 溶液和 DTT 溶液处理 15 min, 重新测定 410 与 470 nm 荧光比率, 即为最大和最小氧化还原电位时比率, 最大氧化条件(100 mmol/L H₂O₂ 溶液)下的最大比值设定为 1.00, 最大还原条件(100 mmol/L DTT 溶液)下测得的最小比值设定为 0.00, 将最大还原值和氧化值归一化, 然后使用生成的校准曲线将这些标准化的荧光比率转换成氧化还原电位^[29]。这些根尖的图像在 5 min 或更短时间内被拍摄并测量保存。在根冠、分生区、过渡区及伸长区中分别测量根尖的氧化还原电位。以 Schwarzländer 等^[30]的方法计算氧化还原电位。

氧化还原程度(OxD_{roGFP})计算如下:

$$OxD_{roGFP} = \frac{R - R_{red}}{(I_{470red}/I_{470ox})(R_{ox} - R) + (R - R_{red})}, \quad (1)$$

式中, R 为 410、470 nm 时的荧光强度比率; R_{red} 为使用 100 m mol/L DTT 溶液处理时完全还原的荧光强度比率; R_{ox} : 使用 100 mmol/L H₂O₂ 溶液处理时完全氧化的荧光强度比率; I_{470ox} 为完全氧化形式下 470 nm 时的荧光强度; I_{470red} 为完全还原形式下 470 nm 时的荧光强度。

氧化还原电位(O)计算如下:

$$O = E_{roGFP}^0 - \left(\frac{2.303RT}{ZF} \right) \lg \left(\frac{1 - OxD_{roGFP}}{OxD_{roGFP}} \right), \quad (2)$$

式中, E_{roGFP}^0 为 roGFP 的中点电位 (-272 mV, 25.15 ℃, pH=7); R 为气体常数 (8.314 J·mol⁻¹·K⁻¹); θ 为温度 (298.15 K, 25.15 ℃); Z 为转移电子数 (2); F 为法拉第常数 (96485.34 C·mol⁻¹)。

1.2.4 除草化合物对拟南芥根尖细胞氧化还原电位的影响 选取不同作用机理的商品化除草剂(氨基酸生物合成抑制剂草甘膦和草铵膦、微管组装抑制剂二甲戊乐灵和氟乐灵、光系统 II 抑制剂莠去津和环嗪酮)作为代表药剂, 选择相同质量浓度 (20 mg·L⁻¹) 的不同药剂, 处理 mt-roGFP1 标记的拟南芥转基因植株 (15 min), 研究不同作用机理除草剂对 mt-roGFP1 标记的拟南芥转基因植株根尖细胞氧化还原状态的影响。测定方法同“1.2.3”。每个处理 3 个重复。

1.2.5 草甘膦不同质量浓度处理对拟南芥根尖细

胞氧化还原电位的影响 选择草甘膦为试验药剂,用相同质量浓度草甘膦、不同时间来处理 mt-roGFP1 标记的拟南芥转基因植株,研究不同作用时间对 mt-roGFP1 标记的拟南芥转基因植株根尖细胞氧化还原状态的影响。用不同质量浓度草甘膦来处理 mt-roGFP1 标记的拟南芥转基因植株,研究不同质量浓度草甘膦对 mt-roGFP1 标记的拟南芥转基因植株氧化还原状态的影响。测定方法同“1.2.3”。每个处理 3 个重复。

1.2.6 小檗碱及其类似物处理对拟南芥根尖细胞氧化还原电位的影响 选择小檗碱及其 10 种类似物做测试药剂,用相同质量浓度化合物来处理 mt-roGFP1 标记的拟南芥转基因植株,研究小檗碱及其 10 种类似物对拟南芥根尖细胞氧化还原状态的影响。测定方法同“1.2.3”。每个处理 3 个重复。

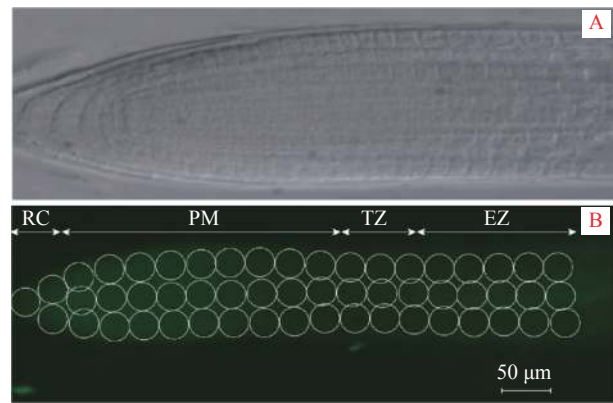
1.3 数据处理

用 Excel 2010 处理数据,测定的数据均以“平均数±标准误”表示,试验重复 3 次,相关试验数据均用 SPSS 20.0 统计,方差分析采用邓肯氏新复极差多重比较法 (Duncan’s multiple ranger test, DMRT),数据处理由 Office 2016 及 Origin Pro 9.0 完成。

2 结果与分析

2.1 拟南芥根尖细胞氧化还原电位测定

挑选长势一致健康的 mt-roGFP1 标记的拟南芥转基因植株幼苗,经透明化处理后制片观察,并按“1.2.3”中的根尖分区测量拟南芥根尖根冠、分生区、过渡区和伸长区的荧光强度变化 (图 1)。



小圆直径为 30 μm; RC: 根冠; PM: 分生区; TZ: 过渡区; EZ: 伸长区
Small circle diameter is 30 μm; RC: Root cap; PM: Proximal meristem; TZ: Transition zone; EZ: Elongation zone

图 1 mt-roGFP1 标记的拟南芥转基因植株根尖透明化 (A) 及荧光分区 (B)

Fig. 1 Root tip transparency (A) and fluorescence zoning (B) of mt-roGFP1 labeled transgenic *Arabidopsis thaliana* plants

在 410 和 470 nm 通道下拍摄 mt-roGFP1 标记的拟南芥转基因植株根尖的荧光强度图 (图 2A、2B)、荧光强度—高度转化图 (图 2C、2D) 和荧光强度—高度转化分区图 (图 2E、2F)。从图 2 可以看出,生长 7 d 的拟南芥根尖分生区的荧光强度最大,根冠和分生区的最远端部分荧光强度较弱,随着近端分生组织细胞停止分裂并逐渐进入过渡区,荧光强度逐渐减弱。当从过渡区进入伸长区时,荧光强度则变得更弱。

2.2 氨基酸生物合成抑制剂草甘膦和草铵膦对拟南芥根尖细胞氧化还原电位的影响

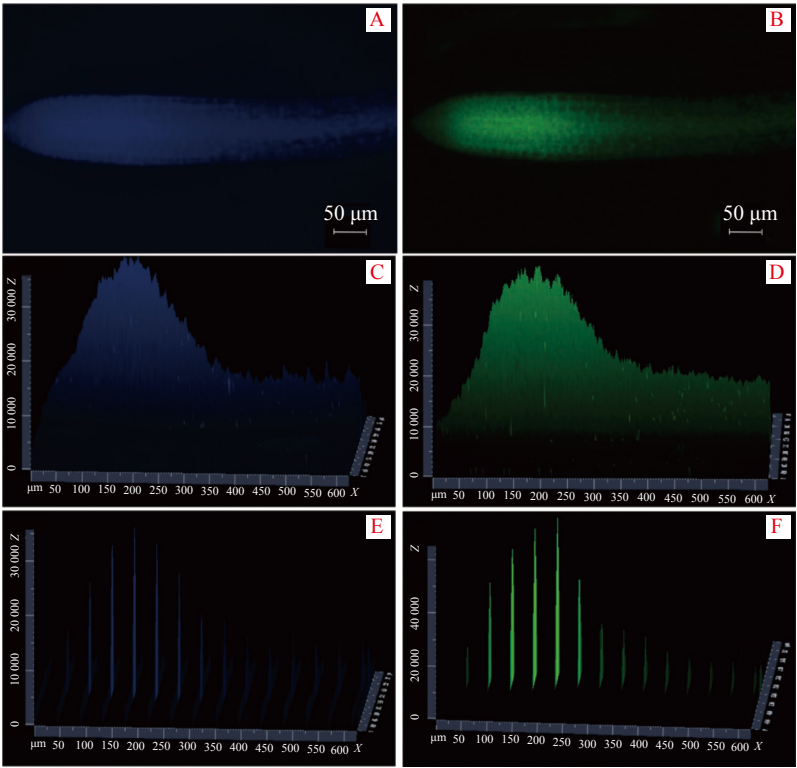
草甘膦和草铵膦对拟南芥根尖细胞氧化还原电位的影响见图 3A、3D。20 mg·L⁻¹ 草甘膦处理拟南芥 15 min 后,根冠、分生区、过渡区和伸长区的氧化还原电位分别为-350.88、-351.82、-340.72 和 -334.48 mV,从根冠到分生区呈现被还原趋势,从分生区到伸长区呈现出逐渐被氧化的趋势 (图 3A)。氧化还原电位变化量分别为 29.68、22.77、19.98 和 11.61 mV,各分区的氧化还原电位变化量之间存在显著性差异 (图 3D)。

20 mg·L⁻¹ 草铵膦处理拟南芥 15 min 后,根冠、分生区、过渡区和伸长区的氧化还原电位分别为-291.42、-308.04、-313.18 和-310.43 mV,根冠达到最大电位,从根冠到过渡区呈现出逐渐被还原的趋势,在过渡区达到最小电位值,各分区的氧化还原电位值之间存在明显差异。处理前后的氧化还原电位变化量分别为-3.80、15.32、19.67 和 20.43 mV,各分区的氧化还原电位变化量之间存在显著性差异 (图 3D)。

2.3 微管组装抑制剂二甲戊灵和氟乐灵对拟南芥根尖细胞氧化还原电位的影响

二甲戊灵和氟乐灵对拟南芥根尖细胞氧化还原电位的影响见图 3B、3E。二甲戊灵处理拟南芥 15 min 后,根冠、分生区、过渡区和伸长区的氧化还原电位分别为-333.02、-342.85、-328.21 和-320.24 mV,从根冠到分生区呈现出逐渐被还原的趋势,在分生区达到最小电位后,从分生区到伸长区呈现出逐渐被氧化的趋势,在伸长区达到最大电位 (图 3B),各分区的氧化还原电位之间存在明显差异。处理前后的氧化还原电位变化量分别为-6.55、-1.25、-0.86 和-4.57 mV,分生区和过渡区氧化还原电位变化量之间没有显著性差异 (图 3E)。

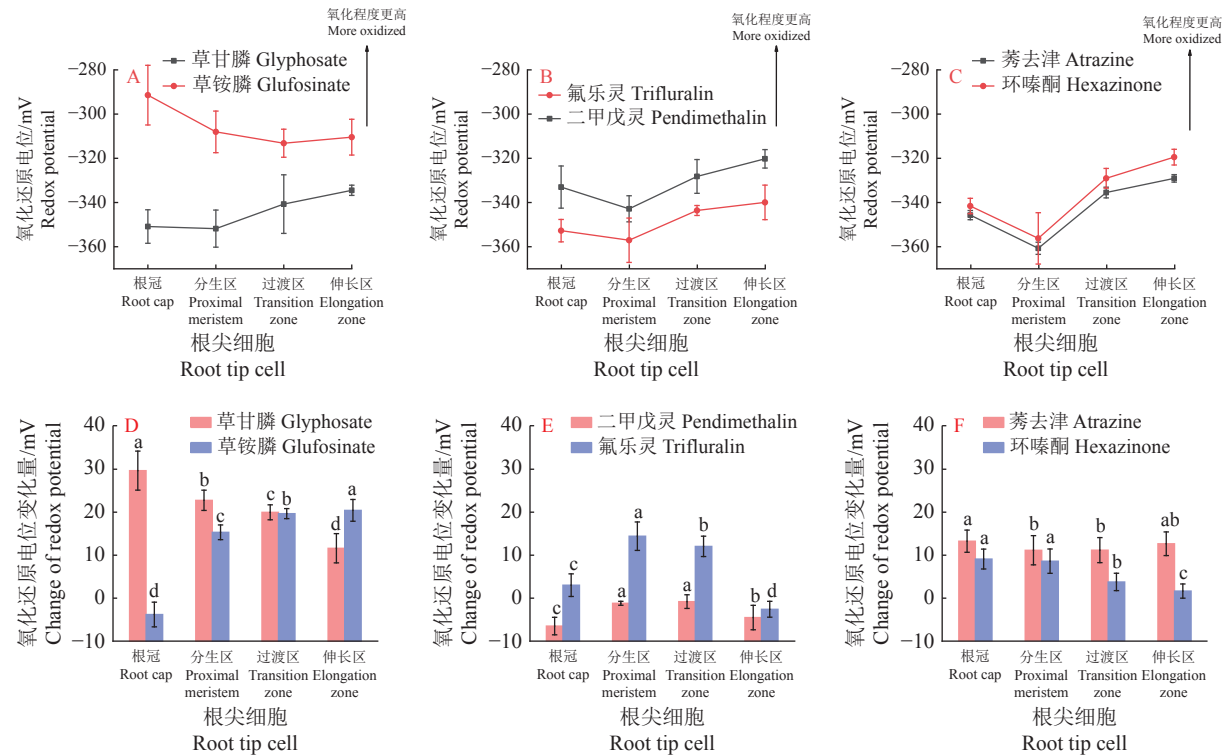
20 mg·L⁻¹ 氟乐灵处理拟南芥 15 min 后,根冠、分生区、过渡区和伸长区的氧化还原电位分别为-352.74、-357.08、-343.61 和-339.95 mV,从根冠



A、C、E: 410 nm (DAPI) 通道; B、D、F: 470 nm (GFP) 通道; A、B: 荧光强度图; C、D: 荧光强度-高度转化图; E、F: 荧光强度-高度转化分区图
A, C, E: 410 nm (DAPI) channel; B, D, F: 470 nm (GFP) channel; A, B: Fluorescence intensity diagram; C, D: Fluorescence intensity-height conversion diagram; E, F: Fluorescence intensity-height conversion zoning map

图 2 拟南芥根尖荧光强度图

Fig. 2 Fluorescence intensity diagram of root tip of *Arabidopsis thaliana*



同种除草剂处理间的不同小写字母表示不同部位差异显著 ($P < 0.05$, Duncan's 法)
Different lowercase letters of the same herbicide among different parts indicate significant differences ($P < 0.05$, Duncan's method)

图 3 不同作用机理商品化除草剂对拟南芥根尖细胞的氧化还原电位及变化量的影响

Fig. 3 Effects of commercial herbicides with different action mechanisms on redox potential and its changes of *Arabidopsis thaliana* root tip cells

到分生区呈现出逐渐被还原的趋势，在分生区达到最小电位后，从分生区到伸长区呈现出逐渐被氧化的趋势，在伸长区达到最大电位，各分区的氧化还原电位之间存在明显差异 (图 3B)。处理前后的氧化还原电位变化量分别为 2.96、14.36、11.99 和 -2.64 mV，各分区的氧化还原电位变化量之间存在显著性差异 (图 3E)。

2.4 光系统 II 抑制剂莠去津和环嗪酮对拟南芥根尖细胞氧化还原电位的影响

莠去津和环嗪酮对拟南芥根尖细胞氧化还原电位的影响见图 3C 和图 3F。20 mg·L⁻¹ 莠去津处理拟南芥 15 min 后，根冠、分生区、过渡区和伸长区的氧化还原电位分别为-345.70、-360.72、-335.48 和-329.08 mV，从根冠到分生区呈现出逐渐被还原的趋势，在分生区达到最小电位后，从分生区到伸长区呈现出逐渐被氧化的趋势，在伸长区达到最大电位，各分区的氧化还原电位之间存在明显差异 (图 3C)。处理前后的氧化还原电位变化量分别为 13.06、10.96、10.99 和 12.47 mV，分生区和过渡区氧化还原电位变化量之间没有显著性差异 (图 3F)。20 mg·L⁻¹ 环嗪酮处理拟南芥 15 min 后，根冠、分生区、过渡区和伸长区的氧化还原电位分别为-341.59、-356.23、-329.06 和-319.47 mV，从根冠到分生区呈现出逐渐被还原的趋势，在分生区达到最小电位后，从分生区到伸长区呈现出逐渐被氧化的趋势，在伸长区达到最大电位，各分区的氧化还原电位值之间存在明显差异 (图 3C)。处理

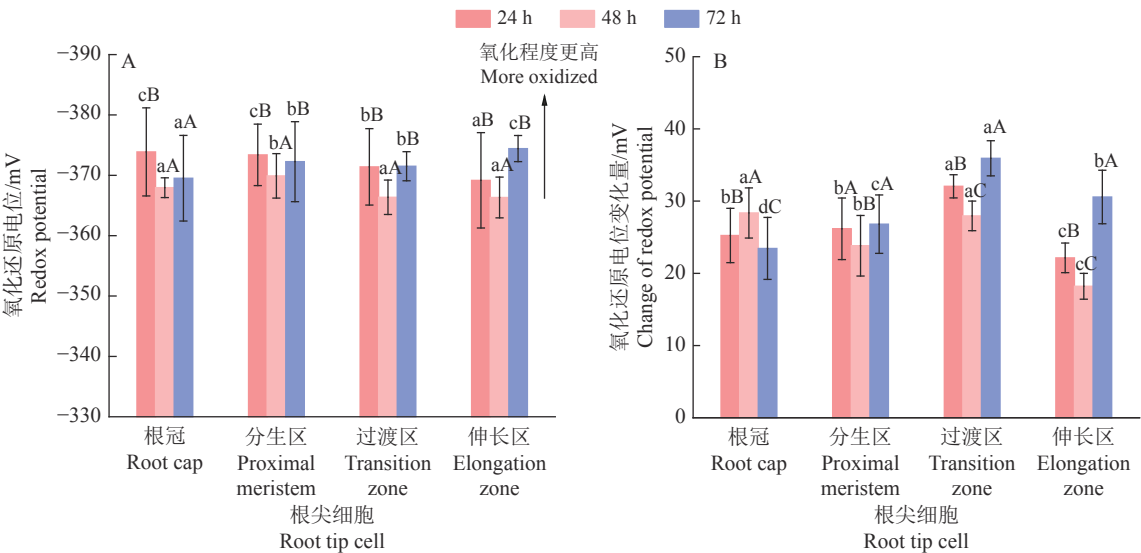
前后的氧化还原电位变化量分别为 8.92、8.43、3.61 和 1.49 mV(图 3F)。

从不同作用机理商品化除草剂对拟南芥根尖细胞氧化还原电位的影响可以看出，除草铵磷外的 5 种化合物的氧化还原电位均在分生区达到最小值，随后从过渡区到伸长区逐渐变大。

2.5 草甘膦不同处理时间对拟南芥根尖细胞氧化还原电位的影响

20 mg·L⁻¹ 草甘膦不同处理时间对拟南芥根尖细胞氧化还原电位的影响见图 4A。拟南芥经 20 mg·L⁻¹ 的草甘膦处理 24、48、72 h 后，24 和 48 h 时的拟南芥生长状况良好，处理 72 h 时，拟南芥出现软化黄化情况。处理 24 h 后，根冠、分生区、过渡区和伸长区的氧化还原电位分别为-373.88、-373.39、-371.41 和-369.17 mV，根冠与分生区的氧化还原电位之间没有显著差异。处理 48 h 后，根冠、分生区、过渡区和伸长区的氧化还原电位分别为-367.95、-369.91、-366.36 和-366.33 mV，分生区与其他 3 个分区的氧化还原电位之间存在显著差异。处理 72 h 后，根冠、分生区、过渡区和伸长区的氧化还原电位分别为-369.52、-372.26、-371.51 和-374.43 mV，分生区与过渡区的氧化还原电位之间不存在显著差异，其他分区间存在显著差异。

从草甘膦 (20 mg·L⁻¹) 处理 24、48、72 h 对拟南芥氧化还原电位的影响 (图 4A) 中可以看出，24 和 48 h 的氧化还原电位都从分生区到伸长区逐渐呈



柱子上不同小写字母表示同一时间不同部位处理差异显著，不同大写字母表示同一部位不同处理时间差异显著 ($P < 0.05$, Duncan's 法)
Different lowercase letters on the columns indicate significant differences among different parts at the same time, and different uppercase letters indicate significant differences among different treatment time of the same part ($P < 0.05$, Duncan's method)

图 4 草甘膦不同处理时间对拟南芥根尖细胞氧化还原电位的影响

Fig. 4 Effect of glyphosate with different treatment time on redox potential of *Arabidopsis thaliana* root tip cells

现被氧化的趋势, 但 72 h 的氧化还原电位从分生区到伸长区逐渐被还原, 在伸长区达到最大还原状态。

拟南芥经 20 mg·L⁻¹ 草甘膦处理 24 h 后, 在过渡区达到最大氧化还原电位变化量为 32.05 mV, 在伸长区达到最小氧化还原电位变化量 (22.14 mV), 根冠与分生区的氧化还原电位变化量之间没有显著性差异, 其他各分区的变化量之间都存在显著性差异 (图 4B)。处理 48 h 后, 在根冠达到最大氧化还原电位变化量 (28.36 mV), 在伸长区达到最小氧化还原电位变化量为 18.21 mV, 根冠与过渡区的氧化还原电位变化量之间没有显著性差异, 其它各分区的变化量之间都存在显著差异 (图 4B)。处理 72 h 后, 在分生区到最大氧化还原电位变化量 (35.93 mV), 在伸长区达到最小氧化还原电位变化量 (23.45 mV), 各分区的氧化还原电位变化量之间都存在显著差异 (图 4B)。每个处理时间的氧化还原电位变化阈值之间相差约 10 mV, 氧化还原电位变化量与处理时间之间未呈现显著的相关性 (图 5)。

2.6 不同质量浓度草甘膦处理对拟南芥根尖细胞氧化还原电位的影响

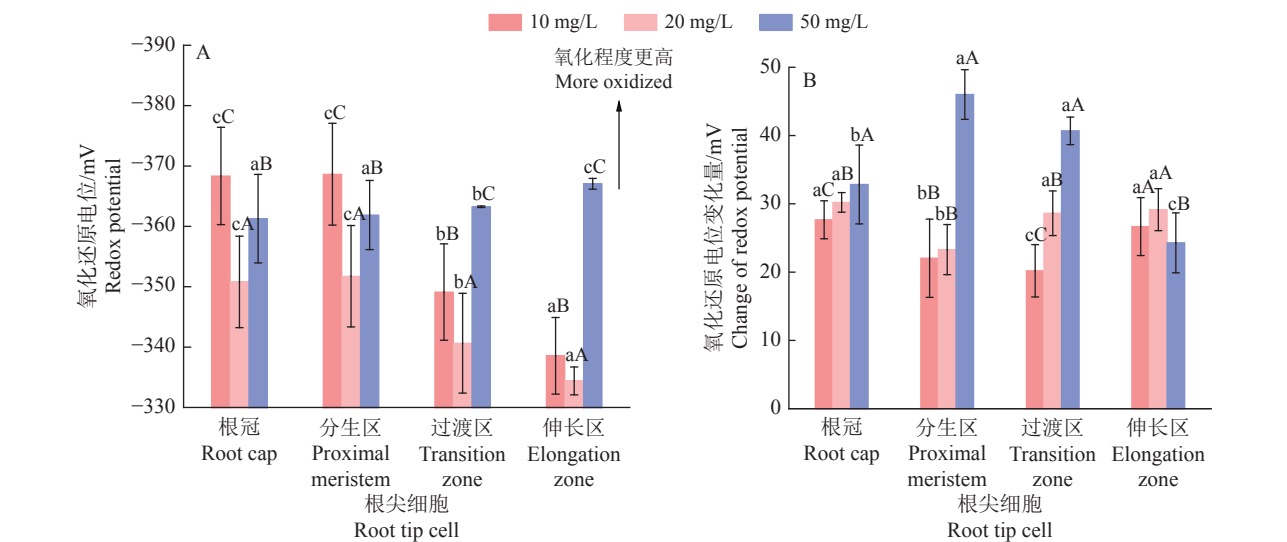
不同质量浓度的草甘膦处理对拟南芥根尖细胞氧化还原电位影响显著 (图 5A)。处理质量浓度为 10 mg·L⁻¹ 时, 在根冠达到最小电位 (-368.72 mV), 在伸长区达到最大电位 (-338.64 mV); 处理质量浓度为 20 mg·L⁻¹ 时, 在分生区达到最小电位 (-351.82 mV), 在伸长区达到最大电位 (-334.48 mV); 处理质量浓度为 50 mg·L⁻¹ 时, 在伸长区达到最小电位 (-367.14 mV), 在根冠达到最大电位 (-361.35 mV)。

10 和 20 mg·L⁻¹ 的氧化还原电位均在分生区达到最小, 在伸长区达到最大, 50 mg·L⁻¹ 的氧化还原电位呈现逐渐降低的趋势。

从氧化还原电位变化量 (图 5B) 来看, 10 和 20 mg·L⁻¹ 草甘膦处理的变化量有显著性差异, 但在过渡区和伸长区的氧化还原电位变化量未发生明显变化 (图 5), 50 mg·L⁻¹ 草甘膦处理时, 氧化还原电位变化量变大。3 个质量浓度的氧化还原电位变化量在根冠及过渡区之间均呈现显著性差异。草甘膦质量浓度增大, mt-roGFP1 标记的拟南芥转基因植株的氧化还原电位变化量增大, 说明氧化还原电位变化量与质量浓度大小之间存在相关性, 线性回归方程为 $y=0.29x+21.57$, $R^2=0.9956$ 。

2.7 小檗碱及其类似物处理对拟南芥根尖细胞氧化还原电位的影响

20 mg·L⁻¹ 小檗碱及其类似物处理拟南芥 15 min 后, 拟南芥根尖各分区细胞氧化还原电位和氧化还原电位变化量如图 6 所示。氧化还原电位的结果 (图 6A) 表明, 小檗碱及其类似物对拟南芥根尖细胞的氧化还原电位均有影响。经小檗碱、盐酸血根碱、白屈菜碱、D-四氢药根碱、罗通定处理后, 拟南芥根部各分区细胞氧化还原电位多数从根冠开始呈现逐渐被氧化趋势, 在伸长区达到最大氧化电位, 且各分区氧化还原电位之间都存在明显差异。经巴马汀、二氢小檗碱、去亚甲基小檗碱、甲基黄连碱处理后, 拟南芥根部细胞氧化还原电位从根冠到分生区呈现被还原趋势, 且在分生区达到最大还原值。氧化还原电位的变化量结果 (图 6B) 表明, 小檗



柱子上不同小写字母表示同一质量浓度不同部位处理差异显著, 不同大写字母表示同一部位不同质量浓度处理差异显著 ($P < 0.05$, Duncan's 法)
Different lowercase letters on the columns indicate significant differences among different parts under the same mass concentration, and different upper-case letters indicate significant differences of the same part among different mass concentrations ($P < 0.05$, Duncan's method)

图 5 不同质量浓度草甘膦对拟南芥根尖细胞氧化还原电位变化的影响

Fig. 5 Effects of different concentrations of glyphosate on redox potential of *Arabidopsis thaliana* root tip cells

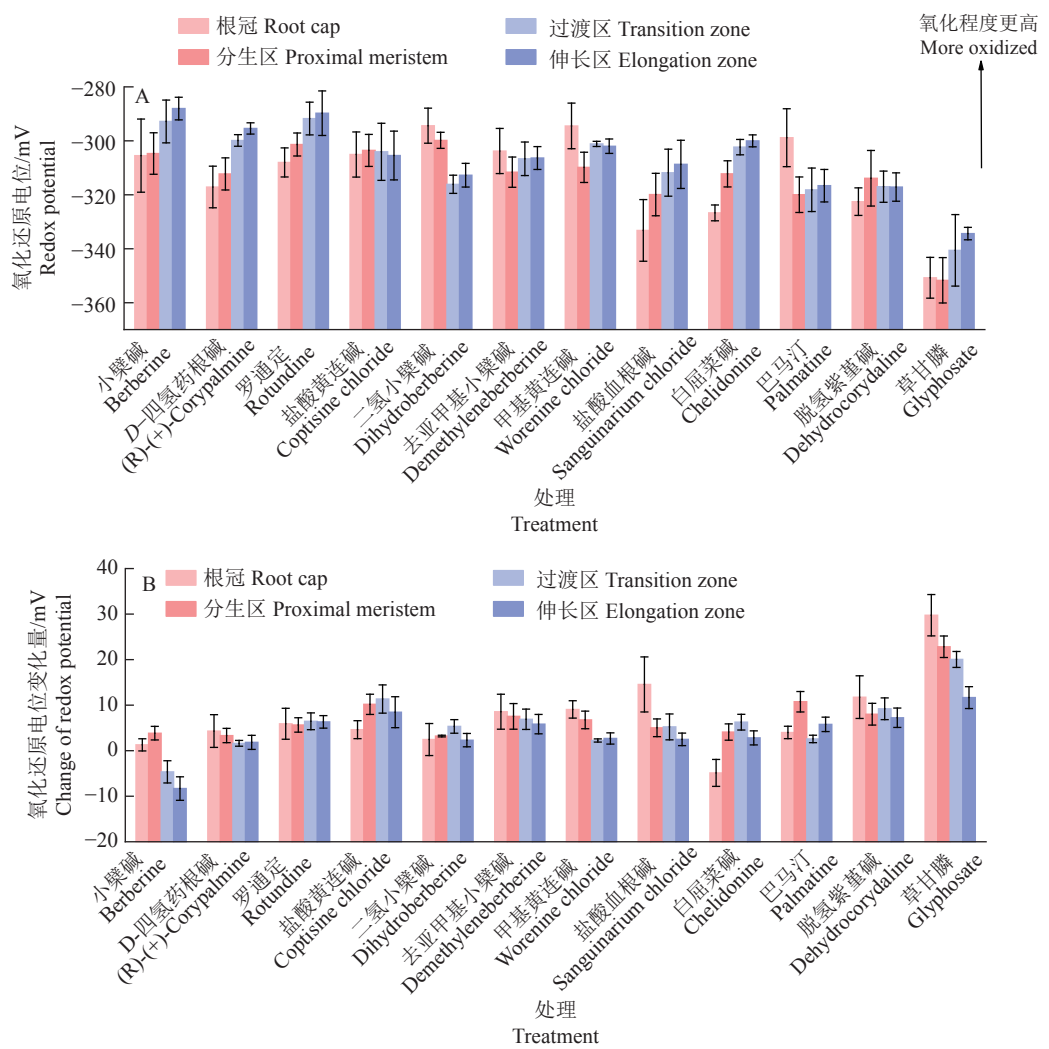


图 6 小檗碱及其类似物对拟南芥根尖细胞氧化还原电位及其变化量的影响

Fig. 6 Effects of berberine and analogues on redox potential and its changes of *Arabidopsis thaliana* root tip cells

碱及其类似物与对照药剂草甘膦的氧化还原电位变化量之间存在明显差异，小檗碱 4 个分区的变化量之间有明显差异，各化合物的变化量各不相同。

3 讨论与结论

roGFP 感应系统在检测植物细胞内氧化还原状态变化具有快速、可逆、动态和实时等优点，尤其是对拟南芥、烟草等模式植物的研究可探测从细胞到组织的氧化还原水平^[31-32]。本研究在 mt-roGFP1 标记的拟南芥转基因植株根尖细胞中检测到 mt-roGFP1 探针响应外源氧化剂 (H₂O₂) 和外源还原剂 (DTT) 引起的氧化还原状态的变化，证明了 mt-roGFP1 探针的灵敏性和可逆性^[33]。用外源氧化剂处理拟南芥时，mt-roGFP1 探针被氧化，其荧光强度比率升高，用外源还原剂处理时，mt-roGFP1 探针被还原，荧光强度比率降低，证明 mt-roGFP1 探针能够响应组织中氧化还原状态的改变，试验结果与前人的研究结果^[33] 相一致。

基于 mt-roGFP1 探针，通过测定 6 种不同靶标商品化除草化合物对 mt-roGFP1 标记的拟南芥转基因植株根尖的根冠、分生区、过渡区和伸长区 4 个区域的氧化还原电位的影响，结果表明：氨基酸生物合成抑制剂 (草甘膦和草铵膦) 和微管组装抑制剂 (二甲戊灵和氟乐灵) 处理后的细胞氧化还原电位变化规律呈现为：在分生区达到最大还原值，并从过渡区开始呈现被氧化的趋势，在伸长区达到最大氧化值。Jiang 等^[34] 也曾指出在伸长区 2 种形式的 roGFP1(c- roGFP1 和 mt- roGFP1) 都显示出比分生区更氧化的静息氧化还原状态，且伸长区更氧化的状态可能与细胞壁疏松和植物细胞扩张等因素有关。光系统 II 抑制剂 (莠去津和环嗪酮) 处理后的氧化还原电位呈现规律性变化，在分生区达到最小值，并从分生区开始，以逐渐被氧化的趋势在伸长区达到最大值，说明 mt-roGFP1 荧光探针能更好地响应光系统 II 抑制剂。另外，通过不同质量浓度草甘膦处理拟南芥不同时间后发现，草甘膦对拟

南芥根细胞氧化还原电位和电位变化量的影响具有明显的剂量-效应关系, 即草甘膦质量浓度增大, 氧化还原电位值变化量也逐渐增大, 呈现正相关关系 ($R^2=0.9956$)。植物源化合物小檗碱及其类似物对拟南芥根尖的氧化还原电位影响的结果表明, 经盐酸血根碱、白屈菜碱、*D*-四氢药根碱、罗通定和二氢小檗碱处理后, 各分区氧化还原电位之间存在显著差异; 且大多数化合物处理后的氧化还原电位在分生区达到最大还原值, 并从分生区到伸长区逐渐被氧化, 在伸长区达到最大氧化值。此外, 通过 6 种不同作用机理的除草化合物和小檗碱及其类似物对氧化还原电位产生的不同影响也可说明, 小檗碱的作用机理不同于前述 6 种商品化除草化合物, 这与以往对小檗碱机理的研究^[35]相符。

综上, 经几种除草化合物和小檗碱及其类似物不同时间和不同质量浓度处理后, 拟南芥根尖细胞氧化还原电位呈现规律性变化, 即氧化还原电位均从根冠开始逐渐被还原, 在分生区达到最大还原值, 从分生区到伸长区逐渐被氧化, 说明植物根部分生区氧化还原电位响应不同化合物的胁迫时表现出更明显的被还原趋势, 因此, 测定分析拟南芥根尖荧光强度和氧化还原电位的变化情况时, 可选取分生区为主要观察区域。这为采用 roGFP 探针技术研究除草化合物对根系细胞线粒体作用的机制提供了基础。

致谢: 感谢加州大学伯克利分校 Feldman Lewis J 教授和 Jiang Keni 博士给予的技术指导和帮助!

参考文献:

[1] ZENTGRAF U, ANDRADE-GALAN A G, BIEKER S. Specificity of H₂O₂ signaling in leaf senescence: Is the ratio of H₂O₂ contents in different cellular compartments sensed in *Arabidopsis* plants?[J]. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 2022, 27(1): 4. doi: 10.1186/s11658-021-00300-w.

[2] VITIELLO G, SERPE L, BLÁZQUEZ-CASTRO A. Editorial: The role of reactive oxygen species in chemical and biochemical processes[J]. *Frontiers in Chemistry*, 2021, 19(9): 642523. doi: 10.3389/fchem.2021.642523.

[3] SINGH D. Juggling with reactive oxygen species and antioxidant defense system: A coping mechanism under salt stress[J]. *Plant Stress*, 2022, 5: 100093. doi: 10.1016/j.stress.2022.100093.

[4] CAO X L, RAO C Y, CUI H, et al. Toxic effects of glyphosate on the intestine, liver, brain of carp and on *Epithelioma papulosum cyprinid* cells: Evidence from *in vivo* and *in vitro* research[J]. *Chemosphere*, 2022, 302(9): 134691. doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.134691.

[5] SADHUKHAN A, KOYAMA H. Role of reactive oxy-

gen species homeostasis in root development and rhizotoxicity in plants[M]//Anon. Redox Homeostasis in Plants. Cham, Switzerland: Springer, 2019: 117-136.

[6] BOGUSZEWSKA D, ZAGDAŃSKA B. ROS as signaling molecules and enzymes of plant response to unfavorable environmental conditions[M]// IntechOpen. Oxidative stress: Molecular mechanism and biological effects. London: IntechOpen. 2012. doi: 10.13140/2.1.1368.6724.

[7] BAXTER A, MITTLER R, SUZUKI N. ROS as key players in plant stress signalling[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(5): 1229-1240.

[8] CZARNOCKA W, KARPIŃSKI S. Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signaling in plant response to environmental stresses[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2018, 122: 4-20.

[9] ROSENWASSER S, ROT I, SOLLNER E, et al. Organelles contribute differentially to reactive oxygen species-related events during extended darkness[J]. *Plant Physiology*, 2011, 156(1): 185-201.

[10] 赵晓玉, 薛娴, 卢存福, 等. 植物中活性氧信号转导及其检测方法研究进展[J]. *电子显微学报*, 2014, 33(2): 188-196.

[11] ORTEGA-VILLASANTE C, BURÉN S, BLÁZQUEZ-CASTRO A, et al. Fluorescent *in vivo* imaging of reactive oxygen species and redox potential in plants[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2018, 122: 202-220.

[12] PACOUD M, MANDON K, CAZARETH J, et al. Redox-sensitive fluorescent biosensors detect *Sinorhizobium meliloti* intracellular redox changes under free-living and symbiotic lifestyles[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2022, 1(184): 185-195.

[13] DE CUBAS L, PAK V V, BELOUSOV V V, et al. The mitochondria-to-cytosol H₂O₂ gradient is caused by peroxiredoxin-dependent cytosolic scavenging[J]. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 2021, 10(5): 731. doi: 10.3390/antiox10050731.

[14] WIERER S, PETER S, ELGASS K, et al. Determination of the *in vivo* redox potential by one-wavelength spectroscopy of roGFP[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012, 403(3): 737-744.

[15] THAO M T, RIEDEL M, ZIELONKA J, et al. Imaging the dynamic redox changes of endoplasmic reticulum with green fluorescent protein[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2014, 76(1): S93. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.324.

[16] BILAN D S, BELOUSOV V V. New tools for redox biology: From imaging to manipulation[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2017, 109: 167-188.

[17] NORCROSS S, TRULL K J, SNAIDER J, et al. Extending roGFP emission via Förster-type resonance energy transfer relay enables simultaneous dual compartment ratiometric redox imaging in live cells[J]. *ACS Sensors*, 2017, 2(11): 1721-1729.

[18] VAN LOI V, ANTELMANN H. Method for measure-

- ment of bacillithiol redox potential changes using the Brx-roGFP2 redox biosensor in *Staphylococcus aureus*[J]. *MethodsX*, 2020, 7: 100900. doi: 10.1016/j.mex.2020.100900.
- [19] HATORI Y, KUBO T, SATO Y, et al. Visualization of the redox status of cytosolic glutathione using the organelle- and cytoskeleton-targeted redox sensors[J]. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 2020, 9(2): 129. doi: 10.3390/antiox9020129.
- [20] MCLACHLAN D H. New tools for monitoring hydrogen peroxide in *Arabidopsis*[J]. *The New Phytologist*, 2019, 221(3): 1180-1181.
- [21] MEYER A J, DICK T P. Fluorescent protein-based redox probes[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2010, 13(5): 621-650.
- [22] ALLER I, ROUHIER N, MEYER A J. Development of roGFP2-derived redox probes for measurement of the glutathione redox potential in the cytosol of severely glutathione-deficient *rml1* seedlings[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2013, 4: 506. doi: 10.3389/fpls.2013.00506.
- [23] AI H W. Fluorescent-protein-based probes: General principles and practices[J]. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, 2015, 407(1): 9-15.
- [24] FAN Y C, AI H W. Development of redox-sensitive red fluorescent proteins for imaging redox dynamics in cellular compartments[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016, 408(11): 2901-2911.
- [25] HORVÁTH E, BELA K, HOLINKA B, et al. The *Arabidopsis* glutathione transferases, AtGSTF8 and AtGSTU19 are involved in the maintenance of root redox homeostasis affecting meristem size and salt stress sensitivity[J]. *Plant Science*, 2019, 283: 366-374.
- [26] 邝芷琪, 王少婷, 黄伦, 等. 小檗碱的农用活性研究进展[J]. *农药*, 2017, 56(2): 88-93.
- [27] 周利娟, 黄继光, 徐汉虹. 小檗碱作为除草剂的应用: CN102349520A[P]. 2013-09-04.
- [28] SABATINI S, BEIS D, WOLKENFELT H, et al. An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root[J]. *Cell*, 1999, 99(5): 463-472.
- [29] JIANG K N, SCHWARZER C, LALLY E, et al. Expression and characterization of a redox-sensing green fluorescent protein (reduction-oxidation-sensitive green fluorescent protein) in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2006, 141(2): 397-403.
- [30] SCHWARZLÄNDER M, FRICKER M D, MÜLLER C, et al. Confocal imaging of glutathione redox potential in living plant cells[J]. *Journal of Microscopy*, 2008, 231(2): 299-316.
- [31] ROMA L P, DEPONTE M, RIEMER J, et al. Mechanisms and applications of redox-sensitive green fluorescent protein-based hydrogen peroxide probes[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2018, 29(6): 552-568.
- [32] MOSELER A, DHALLEINE T, ROUHIER N, et al. *Arabidopsis thaliana* 3-mercaptopyruvate sulfurtransferases interact with and are protected by reducing systems[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2021, 296: 100429. doi: 10.1016/j.jbc.2021.100429.
- [33] CHANDRASEKHARAN A, VARADARAJAN S N, LEKSHMI A, et al. A high-throughput real-time *in vitro* assay using mitochondrial targeted roGFP for screening of drugs targeting mitochondria[J]. *Redox Biology*, 2019, 20: 379-389.
- [34] JIANG K N, MOE-LANGE J, HENNET L, et al. Salt stress affects the redox status of *Arabidopsis* root meristems[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 81. doi: 10.3389/fpls.2016.00081.
- [35] WU J, MA J J, LIU B, et al. Herbicidal spectrum, absorption and transportation, and physiological effect on *Bidens pilosa* of the natural alkaloid berberine[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(30): 6100-6113.

【责任编辑 霍 欢】