

绿原酸对莴苣生长的化感作用及其机理研究

王丹丹¹, 杨建设¹, 燕志强², 孙玉合³, 崔海燕², 丁 兰¹, 秦 波^{2*}

(1 西北师范大学 生命科学院, 兰州 730070; 2 中国科学院兰州化学物理研究所 中国科学院西北特色植物资源化学重点实验室/甘肃省天然药物重点实验室, 兰州 730000; 3 中国农业科学院烟草研究所 烟草行业烟草基因资源利用重点实验室, 山东青岛 266101)

摘 要: 酚酸类化合物是一类重要的化感物质, 广泛存在于农作物等植物体内以及耕作土壤中, 与植物的化感效应以及连作障碍密切相关。该研究以蔬菜类植物莴苣为受体, 采用植物细胞和生理学方法, 分析酚酸类化感物质绿原酸抑制莴苣生长的活性效应及其作用机理, 以揭示绿原酸介导的化感作用及连作障碍机制。结果显示: (1) 绿原酸对莴苣的根长、茎长以及鲜重等生长指标均表现出低浓度(0.1 和 1.0 $\mu\text{mol/L}$)促进、高浓度(10、100 和 1 000 $\mu\text{mol/L}$)抑制的活性作用模式, 其在 10 $\mu\text{mol/L}$ 及以上浓度时对根长和鲜重具有显著抑制作用, 但在各浓度下对莴苣茎长无显著影响。(2) 绿原酸处理后, 莴苣根尖细胞分裂指数明显下降, 随处理浓度的升高, 各分裂时期的细胞比例也显著降低, 导致细胞分裂过程受阻。(3) 较低浓度(0.1、1.0 和 10 $\mu\text{mol/L}$)绿原酸对莴苣根尖细胞活力无明显影响, 较高浓度绿原酸(100 和 1 000 $\mu\text{mol/L}$)使莴苣根尖死细胞显著增多, 根尖端绝大部分细胞失去活力。(4) DHE 荧光染色显示, 与对照相比, 低浓度(0.1 和 1.0 $\mu\text{mol/L}$)绿原酸对莴苣根部的活性氧积累无明显影响, 当绿原酸处理浓度大于 10 $\mu\text{mol/L}$ 时, 随处理浓度升高莴苣根部的活性氧积累明显大量增多。研究表明, 绿原酸能够诱导莴苣体内活性氧产生并积累, 从而导致莴苣细胞分裂受阻、细胞活力降低, 最终影响莴苣幼苗的生长发育。

关键词: 绿原酸; 莴苣; 化感效应; 作用机理

中图分类号: Q945.7 **文献标志码:** A

Allelopathic Effect and Mechanism of Chlorogenic Acid on the Growth of Lettuce

WANG Dandan¹, YANG Jianshe¹, YAN Zhiqiang², SUN Yuhe³, CUI Haiyan², DING Lan¹, QIN Bo^{2*}

(1 College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China; 2 Key Laboratory of Chemistry of Northwestern Plant Resources and Key Laboratory for Natural Medicine of Gansu Province, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China; 3 Key Laboratory for Tobacco Gene Resources, Tobacco Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao, Shandong 266101, China)

Abstract: Phenolic acids are one kind of important allelochemicals, which generally exist in crops and vegetables, as well as their cultivated soils. These metabolites are involved in plant allelopathic effect and continuous cropping obstacles. In this paper, we investigated the allelopathic effect of chlorogenic acid and its phytotoxic mechanism on lettuce seedlings by plant cell and physiology methods, in order to reveal the allelopathy and continuous cropping obstacles mediated by chlorogenic acid. The results showed that: (1) Root length, shoot length and fresh weight of lettuce seedlings were promoted by chlorogenic acid at low

收稿日期: 2014-01-11; 修改稿收到日期: 2014-04-03

基金项目: 国家自然科学基金(31070386); 中国科学院“西部之光”联合学者项目; 中国农业科学院烟草研究所烟草行业烟草基因资源利用重点实验室开放课题

作者简介: 王丹丹(1983—), 女, 硕士研究生, 主要从事植物活性物质的作用机理研究。E-mail: wddwoaiwojia@163.com

* 通信作者: 秦 波, 研究员, 主要从事植物化学生态学基础与应用研究。E-mail: bqin@licp.cas.cn

concentrations(0.1 and 1 $\mu\text{mol/L}$) and were inhibited at high concentrations(10,100 and 1 000 $\mu\text{mol/L}$). Chlorogenic acid displayed significant inhibitory effects on root length and fresh weight of lettuce at concentrations of 10 $\mu\text{mol/L}$ and more. However, shoot growth of lettuce was not significantly inhibited by chlorogenic acid at each concentrations used. (2) After treated by chlorogenic acid, the mitotic index of lettuce root tips was significantly decreased, and with the concentration of chlorogenic acid increasing, the proportion of cells in each mitotic phase was also significantly reduced, resulted in arrest of cell division. (3) Under low concentrations(0.1, 1.0 and 10 $\mu\text{mol/L}$), chlorogenic acid had no significant effect on cell viability in lettuce root tips. However, high concentrations of chlorogenic acid(100 and 1 000 $\mu\text{mol/L}$) significantly increased the number of dead cells, and caused losing of cell vitality in lettuce root tips. (4) Fluorescence staining of DHE showed that low concentrations(0.1 and 1.0 $\mu\text{mol/L}$) of chlorogenic acid had no significant effects on the accumulation of reactive oxygen species(ROS) compared with the control. However, when the concentration of chlorogenic acid reached 10 $\mu\text{mol/L}$, a lot of ROS accumulated in lettuce roots with concentration increasing. These results indicated that under the stress of chlorogenic acid, ROS in lettuce was induced and then accumulated. Furthermore, the cell division and viability were inhibited, resulting in growth and development arrest in lettuce seedlings.

Key words: chlorogenic acid; lettuce; allelopathic effect; mode of action

Molisch 于 1937 年首次提出植物化感作用的概念^[1], Rice 在 1984 年将其较完善地定义为植物或微生物通过向环境释放生物活性物质对其它植物或微生物产生的有利或不利的作用^[2]。化感作用广泛存在于自然界中, 与植物入侵、连作障碍等现象密切相关^[3-4]。化感物质是植物发挥其化感效应的物质基础, 它多数为植物的次生代谢产物, 其释放主要通过茎叶挥发、茎叶淋溶、根系分泌以及残体腐解等 4 种途径^[5]。化感物质往往能够影响到受体植物生长发育的多个方面, 因此阐释化感物质的活性作用机理仍是该领域的难点之一^[6-7]。

酚酸类化合物是含有酚羟基和羧基的一类代谢产物, 是植物体内普遍存在的重要化感物质之一^[8], 大部分酚酸类物质均具有化感作用^[9], 其中由根系分泌或残体腐解产生的酚酸在连作障碍中起到了直接或间接的作用^[3,10]。绿原酸作为酚酸的一种, 多用于食品添加剂^[11]。绿原酸作为一种化感物质, 对植物或其它生物具有多种活性效应^[12-15], 它能够抑制萌发所需的关键酶——磷酸化酶^[16], 其活性作用与生长素、赤霉素、脱落酸等植物激素有关^[17-19]。本研究以莴苣为受体植物, 在明确绿原酸活性作用效果的基础上, 深入探讨了绿原酸对植物细胞分裂、细胞活力及活性氧的影响, 有助于揭示由绿原酸介导的化感作用及连作障碍机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

供试莴苣种子为丰农青笋, 购于兰州丰农种业科技有限公司。绿原酸标准品购于上海迈瑞尔化学

技术有限公司, 纯度为 95%。

1.2 材料培养与处理

绿原酸标准品用 DMSO 溶解配制成 100 mmol/L 的母液, 并依次稀释为 10、1、0.1 和 0.01 mmol/L, 组成包括母液在内的 5 个浓度梯度, 然后按 1%(V/V) 添加到含蒸馏水的 6 孔板中备用(绿原酸浓度分别为 0、0.1、1、10、100 和 1 000 $\mu\text{mol/L}$)。莴苣种子放置在湿润的滤纸上, 置于恒温恒湿培养箱(瑞华, HP150HS)中, 25 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗条件下萌发 24 h, 选取生长一致的莴苣幼苗转移到上述 6 孔板中, 以相同量的溶剂(DMSO)为对照, 每个处理至少 6 株幼苗, 相同条件下继续培养 48 h 后, 进行相关指标的观察和测定。

1.3 测定指标与方法

1.3.1 生长指标 绿原酸处理 48 h 后用毫米尺测量幼苗根长和茎长, 用分析天平(Mettler-Toledo, AL104)测量幼苗鲜重。

1.3.2 细胞分裂观察 细胞分裂观察参考 Koodkaew 等^[20]的方法, 略有修改。经绿原酸处理的莴苣幼苗, 切取根尖 1 cm 左右, 置于卡诺固定液中 4 $^{\circ}\text{C}$ 下固定 24 h, 5 mol/L HCl 中处理 1 min, 蒸馏水洗 2 遍, 酸性品红溶液中染色 1 h, 切取根尖约 1 mm 压片, 在装配有图像采集装置(ToupCam, SC-CCD01400KPB)的倒置显微镜(上海, 37XB)下观察并拍照。

1.3.3 细胞活力观察 细胞活力观察依照 Koodkaew 等^[20]的方法进行。切取莴苣幼苗根尖约 0.5 cm, 放入含有 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 二乙酸荧光素(fluorescein diacetate, FDA)和 5 $\mu\text{g/mL}$ 碘化丙啶(propidi-

um iodide,PI)的染液中,避光着色 10 min,蒸馏水冲洗干净,置于载玻片上,在荧光显微镜(Leica, DMI4000B)下用 450~490 nm 激发光和 520 nm 发射光下观察并拍照。

1.3.4 伊文思蓝吸收检测 伊文思蓝(Evans blue)吸收检测参考 Baker 等^[21]的方法。切取莴苣幼苗根尖约 1 cm,室温下置于 0.25%(W/V)的伊文思蓝水溶液中染色 1 h,蒸馏水清洗 30 min,去除根表面染料,然后转移到 500 mL N,N-二甲基甲酰胺(N,N-dimethylformamide,DMF)中,在 25℃下提取 12 h,提取液用紫外可见分光光度计(岛津,UV1750)测量 600 nm 下吸光值。

1.3.5 活性氧观察 活性氧观察参考 Garnczarska^[22]的方法。25℃下,莴苣根在二氢乙锭(dihydroethidium,DHE)染色液(含 10 mmol/L DHE,0.01%丙酮和 100 mmol/L CaCl₂,pH 4.75)中避光染色 5 min,然后在 100 mmol/L CaCl₂ 中震荡清洗 10 min,去除多余染料,在荧光显微镜(Leica, DMI4000B)下用 450~490 nm 激发光和 520 nm 发射光下观察并拍照。

1.4 数据处理

所测的数据用 Excel 2003 进行数据处理和作图,采用 SPSS 17.0 软件进行数据显著性分析,用 Photoshop 7.0 进行图片处理。

2 结果与分析

2.1 绿原酸对莴苣幼苗生长的影响

生物活性实验显示,绿原酸对受体植物莴苣幼苗的根、茎伸长以及幼苗生长均表现出低浓度促进、高浓度抑制的作用模式(表 1)。其中,绿原酸对莴苣主根的生长作用效果最为明显,莴苣的根长在低浓度处理下(0.1 和 1 μmol/L)分别比对照(1.52 cm)增加了 25%和 13%,且在 0.1 μmol/L 浓度下达到显著水平;而在 10、100 和 1 000 μmol/L 浓度

处理下均低于对照组,特别是在 100 和 1 000 μmol/L 的高浓度处理下其主根生长受到了显著的抑制(表 1)。与主根生长抑制效应不同,绿原酸对莴苣茎的生长影响效果不太明显,虽也表现出低浓度促进、高浓度抑制的作用效果,但均未达到显著水平(表 1)。鲜重指标反映了莴苣幼苗的整体生长状况,在 0.1~1 000 μmol/L 处理下幼苗鲜重与其根、茎长度指标的变化趋势类似,绿原酸影响幅度介于两者之间,但仅在 1 000 μmol/L 的最高试验浓度下才对莴苣的鲜重抑制达到显著水平(表 1)。以上结果表明,在本实验条件下绿原酸主要是通过抑制莴苣根部伸长来抑制其整体生长状况。所以,下面均以莴苣根部为研究对象,从细胞分裂、细胞活力以及活性氧等方面探讨绿原酸对莴苣抑制作用机理。

2.2 绿原酸对莴苣根尖细胞分裂的影响

植物个体的生长依赖于细胞数量的增加以及细胞体积的增大,因此,细胞分裂是植物生长发育的重要前提,局部细胞的分裂速度反映了器官生长的快慢。细胞分裂指数是处于分裂期的细胞占有所有细胞的比例,能够直接反映细胞的分裂效率。观察结果(表 2)表明,各浓度绿原酸处理条件下均未发现异常的分裂期细胞,说明绿原酸对莴苣根尖细胞分裂的过程无明显影响。统计结果显示,在不同浓度(0~1 000 μmol/L)的绿原酸处理下,莴苣根尖细胞的分裂指数与其主根生长表现出基本一致的变化趋势,即分裂指数在 0.1 μmol/L 浓度下有一定的升高,在 1 和 10 μmol/L 浓度下稍稍降低,而在 100 和 1 000 μmol/L 高浓度下才比对照显著降低(表 2)。在各个细胞分裂时期中,处于有丝分裂前期的细胞所占比例随绿原酸浓度的变化趋势为先升高后降低,在 0.1 μmol/L 浓度下显著高于对照,1 和 10 μmol/L 浓度下与对照基本一致,100 μmol/L 浓度下稍低,而在 1 000 μmol/L 浓度下比对照显著降低;处于有丝分裂中期的细胞比例在 0~10 μmol/L

表 1 绿原酸对莴苣幼苗根长、茎长和鲜重的化感作用

Table 1 Allelopathic effect of chlorogenic acid on the root and shoot length and fresh weight of lettuce seedlings

指标 Index	浓度 Concentration/(μmol/L)					
	0	0.1	1	10	100	1 000
根长 Root length/cm	1.52±0.28b	1.90±0.15a	1.72±0.39ab	1.42±0.38bc	1.08±0.31c	1.02±0.29c
茎长 Shoot length/cm	0.98±0.15ab	1.05±0.05a	1.05±0.15a	0.90±0.10ab	0.83±0.24ab	0.82±0.16b
鲜重 Fresh weight/mg	7.33±1.52ab	8.33±0.95a	7.73±1.31ab	6.77±0.96b	6.22±1.79bc	5.33±1.29c

注:表中所列数据为平均值±标准误差;同指标内不同字母表示处理间在 0.05 水平存在显著性差异;下同。
Note: The data listed in the table as mean±SE. Different normal letters in the same characters indicated significant differences among treatments at 0.05 level; The same as below.

表 2 绿原酸处理后莴苣根尖细胞分裂情况统计

Table 2 Effect of chlorogenic acid on the cell division of lettuce root tips

指标 Index	浓度 Concentration/($\mu\text{mol/L}$)					
	0	0.1	1	10	100	1 000
有丝分裂指数 Mitotic index/%	57.99 $\pm$ 7.99ab	61.77 $\pm$ 6.77a	55.28 $\pm$ 5.28b	54.74 $\pm$ 5.74b	40.44 $\pm$ 4.44c	37.08 $\pm$ 3.08c
前期 Prophase/%	29.50 $\pm$ 2.50b	35.11 $\pm$ 5.11a	29.77 $\pm$ 2.77b	28.67 $\pm$ 2.67b	25.07 $\pm$ 3.37bc	19.68 $\pm$ 1.68c
中期 Metaphase/%	15.26 $\pm$ 1.26a	14.30 $\pm$ 0.29a	14.17 $\pm$ 1.17a	14.77 $\pm$ 2.18a	9.07 $\pm$ 0.67bc	10.01 $\pm$ 0.95b
后期 Anaphase/%	6.10 $\pm$ 1.38a	4.55 $\pm$ 0.55b	6.38 $\pm$ 1.38a	5.21 $\pm$ 1.21ab	3.01 $\pm$ 0.41c	3.63 $\pm$ 0.26c
末期 Telophase/%	7.12 $\pm$ 1.21ab	7.80 $\pm$ 1.02a	4.96 $\pm$ 0.96bc	6.08 $\pm$ 0.82b	3.30 $\pm$ 0.37d	3.77 $\pm$ 0.47d

浓度下与对照比变化不大,而在 100 和 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 下显著降低;后期和末期细胞比例的变化趋势与前期类似,在低浓度下与对照一致或稍低,而在高浓度下(100 和 1 000 $\mu\text{mol/L}$)比对照显著降低(表 2)。这些结果表明,绿原酸处理后,莴苣根尖细胞分裂指数明显下降,各个分裂时期的细胞比例也显著降低,导致细胞分裂过程受阻。

2.3 绿原酸对莴苣根尖细胞活力的影响

植物在受到胁迫时,其细胞活力往往发生变化,因此,细胞活力是评价有毒物质诱导植物细胞死亡的重要指标^[21]。本实验采用荧光染料染色以及伊文思蓝吸收两种方法分别检测了莴苣幼苗在绿原酸处理后根尖细胞活力的变化情况。PI 能够使死细胞着色,而 FDA 能够使活细胞着色,通过 FDA/PI 双染色,用荧光显微镜可观察受体植物根尖的细胞活力。结果(图版 I,1~6)显示,在处理 2 d 后,低浓度的绿原酸(0.1、1 和 10 $\mu\text{mol/L}$)对莴苣根尖细胞活力无明显影响,其染色结果与对照基本一致(图版 I,1~4);当绿原酸浓度达到 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,受体根尖死细胞能够明显观察到(图版 I,5);而当绿原酸的浓度进一步达到 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 时,莴苣根尖的死细胞显著增多,尖端绝大部分细胞已失去活力(图版 I,6)。另外,从图片中还可以发现,在高浓度绿原酸处理下,莴苣根的发育出现异常,根尖直径变

大,与对照相比明显膨胀(图版 I,6)。

另外,具有活力的植物细胞能够对外源添加有害物质产生排斥效应,而失去活力的细胞则无此能力,因此,利用受体植物对伊文思蓝的吸收可检测植物细胞的相对活力。结果(图 1)显示,莴苣幼苗根尖对伊文思蓝的吸收量在 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度绿原酸处理下与对照基本一致,而在 1~1 000 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下比对照显著升高,分别达到对照的 1.14、1.13、1.48 和 1.74 倍。以上两种细胞活力的检测方法结果一致,都表明绿原酸在高浓度下对莴苣的根尖细胞活力有明显的抑制作用。

2.4 绿原酸对莴苣根部活性氧的影响

活性氧在植物受到胁迫时会积累,活性氧信号传递使植物产生一系列生理变化,从而对抗胁迫环境;同时,活性氧积累也是引起细胞凋亡的重要标志^[23]。荧光染料 DHE 能够通过颜色特异显示活性氧积累的细胞^[22]。结果(图版 I,7~12)显示,处理 2 d 后,莴苣根部的活性氧随绿原酸浓度的增加也有一定程度的积累,具体表现为低浓度下(0.1 和 1 $\mu\text{mol/L}$)与对照组无明显差别(图版 I,7~9),浓度达到 10 $\mu\text{mol/L}$ 时开始有一定积累(图版 I,10),到 100 $\mu\text{mol/L}$ 时明显增多(图版 I,11),而在 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下活性氧大量积累(图版 I,12)。

3 讨论

经过多年发展,植物化感作用已成为解决农业可持续发展以及维护植物生态平衡等方面的热点研究领域^[24]。随着分离分析技术的发展,越来越多的化感物质被分离鉴定,但化感物质的活性作用机理研究一直是植物化感作用研究中的难点之一,尤其植物细胞生物学方面的研究相对较少。酚酸类化合物即是较早得到鉴定且获得广泛认可的化感物质,这类植物代谢物广泛存在于粮食作物以及蔬菜等植物体内与耕种土壤中,与这些植物的化感效应以及连作障碍都有密切关系^[25-26],是一类重要且研究较

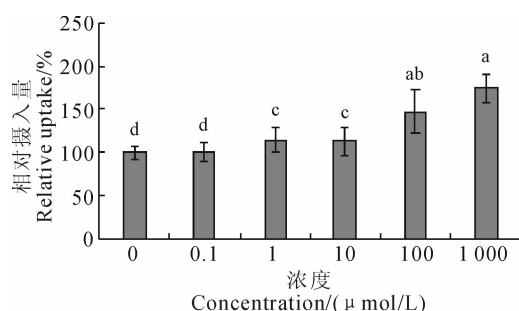


图 1 绿原酸对莴苣根尖伊文思蓝吸收的影响

Fig. 1 Effects of chlorogenic acid on Evans blue uptake in lettuce roots

多的化感物质。

本试验选用酚酸类中较为常见的一种——绿原酸为研究对象,以对化感物质敏感的蔬菜类植物莴苣为受体材料,在明确绿原酸对莴苣生长的化感活性效应的基础上,采用细胞生物学方法,系统研究了绿原酸对莴苣细胞分裂、细胞活力以及活性氧方面的影响。绿原酸对莴苣生长的活性作用表现出低促高抑的活性作用模式,与大多数化感物质的活性作用方式相同。绿原酸浓度在达到 $10\ \mu\text{mol/L}$ 时对莴苣幼苗的生长产生抑制效应,而在超过 $100\ \mu\text{mol/L}$ 时能够明显抑制莴苣生长。

细胞的有丝分裂是植物生长的前提,绿原酸对莴苣细胞分裂的影响与其活性效应基本一致,莴苣幼苗根尖细胞的分裂指数随着绿原酸浓度的不断增加表现出先升高后降低的变化趋势,特别是处于有丝分裂前期的细胞比例,也呈现类似的变化规律,这

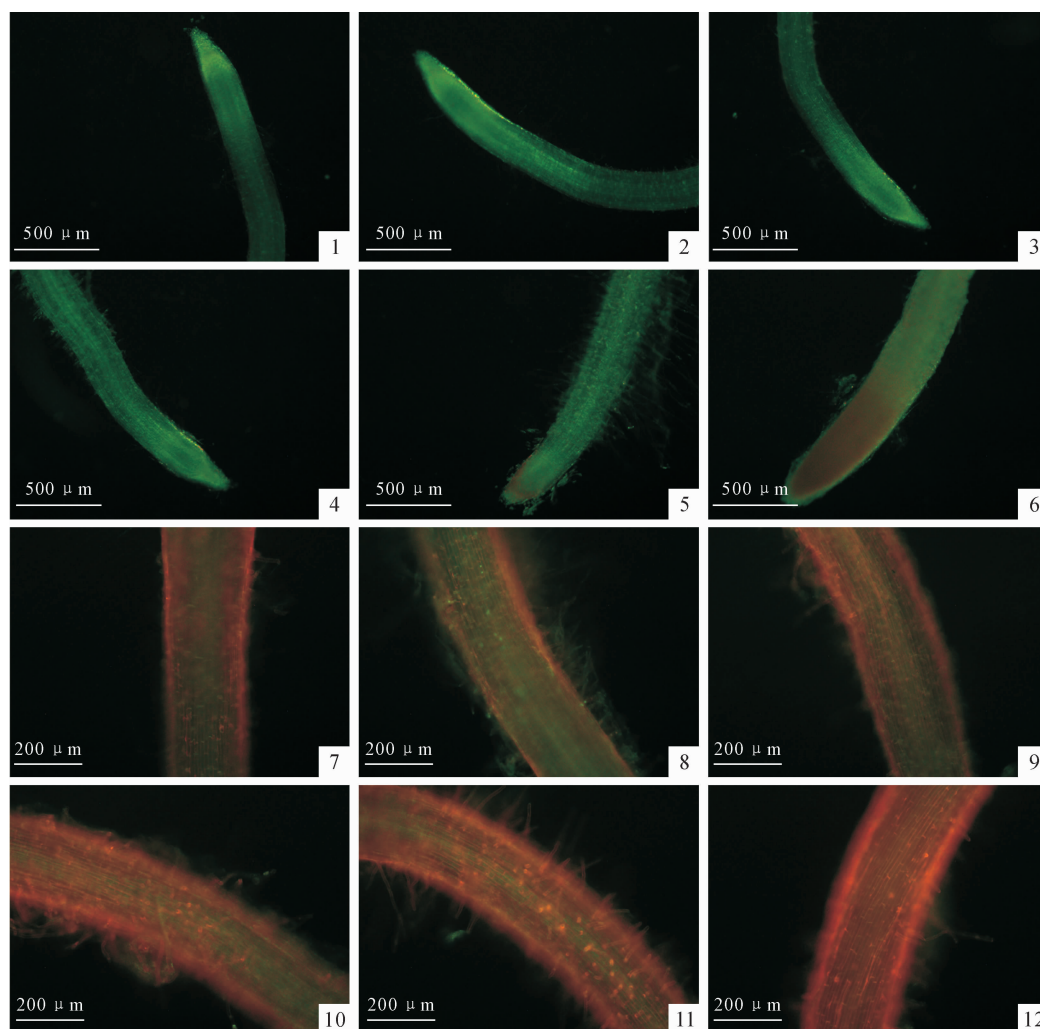
一结果充分说明绿原酸能够抑制细胞进入分裂期,从而降低细胞指数,导致根尖细胞分裂速度变慢。同时,莴苣根尖细胞的活力也在绿原酸浓度达到 $100\ \mu\text{mol/L}$ 时明显降低,说明绿原酸对莴苣根尖的生长产生了明显的胁迫作用。另外,活性氧是植物遭受胁迫条件的标志产物,绿原酸处理同样使莴苣根部的活性氧逐渐积累。综合以上研究结果可以初步推测莴苣在化感物质绿原酸的胁迫作用下,首先导致了活性氧发生变化,将胁迫信号传递到其它生命过程,进一步导致莴苣细胞分裂受阻、细胞活力降低,最终影响受体植物生长发育。

酚酸类化感物质广泛存在于农作物中,与连作障碍等农业生产过程密切相关,本研究通过对酚酸类化感物质绿原酸化感作用机理的探索,初步阐释了绿原酸对受体植物化感作用的细胞生物学机理,能够为深入探讨农作物连作障碍机制提供参考。

参考文献:

- [1] MOLISCH H. Der einfluss einer pflanze auf die andere, allelopathie[M]. Jena: Verlag Von Gustav Fischer, 1937: 13—20.
- [2] RICE EL. Allelopathy, 2nd ed[M]. Orlando: Academic Press, 1984: 34—42.
- [3] WANG C X, ZHE M X, CHEN X H, *et al.* Review on allelopathy of exotic invasive plants[J]. *Procedia Engineering*, 2011, 18: 240—246.
- [4] WANG CH(王 闯), XU G Y(徐公义), GE CH CH(葛长城), *et al.* Progress on the phenolic acid substance and plant soil sickness[J]. *Northern Horticulture*(北方园艺), 2009, 3: 134—137(in Chinese).
- [5] KONG CH H(孔垂华). Problems needed attention on plant allelopathy research[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*(应用生态学报), 1998, 9(3): 332—336(in Chinese).
- [6] CHAI Q(柴 强), HUANG G B(黄高宝). Review on action mechanism affecting factors and applied potential of allelopathy[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2003, 23(3): 509—515(in Chinese).
- [7] YANG J Y(杨甲月), YAN ZH Q(燕志强), XU R(徐 蕊), *et al.* Isolation of plant growth inhibitory components from the root of *Stellera chamaejasme* and function mechanism[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2011, 31(2): 291—297(in Chinese).
- [8] INDERJIT K M. Plant phenolics in allelopathy [J]. *Bot. Rev.*, 1996, 62: 186—202.
- [9] CHOU C H, LEU L L. Allelopathy substance and interactions of *Delonix regia* (Bof) Raf[J]. *Journal of Chemical Ecology*, 1992, 18(12): 285—2303.
- [10] WU H W, HAIG T, PRATLEY J, *et al.* Allelochemicals in wheat (*Triticum aestivum* L): variation of phenolic acids in shoot tissues[J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2001, 21(7): 125—135.
- [11] SONG H X(宋宏新), DAI Y(戴 瑜). Chlorogenic acid extraction technology from *Eucommia ulmoides* Oliv. leaves[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2006, 26(11): 2383—2387(in Chinese).
- [12] KIRSTEN A L, FEDERICA M, YOUNG H C, *et al.* Identification of chlorogenic acid as a resistance factor for thrips in chrysanthemum [J]. *Plant Physiology*, 2009, 150(3): 1567—1575.
- [13] CLIFFORD W B, MAMDOUH M A, ADRIENNE L E K, *et al.* A flavanone and two phenolic acids from *Chrysanthemum morifolium* with phytotoxic and insect growth regulating activity[J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2004, 30(3): 589—606.
- [14] ILL-M C, DAVID S, DARRELL A M, *et al.* Autotoxic compounds from fresh alfalfa leaf extracts: identification and biological activity [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2000, 26(1): 315—327.
- [15] ABDUL-RAHMAN A A, HABIB S A. Allelopathic effect of alfalfa (*Medicago sativa*) on bladygrass (*Imperata cylindrica*) [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 1989, 15(9): 2289—2300.
- [16] EINHELLIG F A. Allelopathy: current status and future goals[C]//DAKSHINI K M M. Allelopathy: organisms, processes, and applications. Accsymposium Series 582. Washington: American Chemical Society, 1995: 1—24.
- [17] 孔垂华. 植物化感(相生相克)作用及其应用[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 1—168.
- [18] 余叔文, 汤章城. 植物生理与分子生物学[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 699—718.

- [19] 李绍文. 生态生物化学[M]. 北京: 北京大学出版社, 2001: 45—69.
- [20] KODKAEW I, SUNOHARA Y, MATSUYAMA S, *et al.* Phytotoxic action mechanism of hapalocyclamide in lettuce seedlings[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2012, **58**(9): 23—28.
- [21] BAKER C J, MOCK N M. An improved method for monitoring cell death in cell suspension and leaf disc assays using Evans blue[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1994, **39**(1): 7—12.
- [22] GARNCZARSKA M. Response of the ascorbate-glutathione cycle to re-aeration following hypoxia in lupine roots[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2005, **43**(6): 583—590.
- [23] OVERMYER K, BROSCHE M, KANGASJARVI J. Reactive oxygen species and hormonal control of cell death[J]. *Trends in Plant Science*, 2003, **8**(7): 335—342.
- [24] MANOEL B A, ROSEANE C S, LIZIANE M L, *et al.* Allelopathy, an alternative tool to improve cropping systems. A review[J]. *Agronomy for Sustainable Development*, 2011, **12**(31): 379—395.
- [25] CHON S U, KIM Y M, LEE J C. Herbicidal potential and quantification of causative allelochemicals from several compositae weeds[J]. *Weed Research*, 2003, **43**(6): 444—450.
- [26] HE H B, WANG H B, FANG C X, *et al.* Barnyard grass stress up regulates the biosynthesis of phenolic compounds in allelopathic rice [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2012, **169**(17): 1 747—1 753.



图版 I 1~6. 绿原酸处理莴苣根尖细胞 FDA 和 PI 双染色观察(绿原酸浓度分别为 0、0.1、1、10、100 和 1 000 $\mu\text{mol/L}$); 7~12. 绿原酸处理莴苣根部活性氧积累的 DHE 荧光染色观察(绿原酸浓度分别为 0、0.1、1、10、100 和 1 000 $\mu\text{mol/L}$)。

Plate I Fig. 1~6. Cell viability of lettuce root tips treated by chlorogenic acid after dyeing with FDA and PI (1~6. The concentrations of chlorogenic acid were 0, 0.1, 1, 10, 100 and 1 000 $\mu\text{mol/L}$, respectively); Fig. 7~12. Effects of chlorogenic acid on ROS production in lettuce roots dyeing by DHE (The concentrations of chlorogenic acid were 0, 0.1, 1, 10, 100 and 1 000 $\mu\text{mol/L}$, respectively).