

甲醛胁迫下蚕豆保卫细胞中过氧化氢的积累及其对气孔导度和开度的影响

孙慧群^{1,2}, 周升恩¹, 吴怀胜¹, 李昆志¹, 李斌³, 陈丽梅^{1*}

(1.昆明理工大学生命科学与技术学院, 昆明 呈贡 650500; 2.安庆师范学院资源环境系, 安徽 安庆 246011; 3.昆明理工大学化学工程学院, 昆明 呈贡 650500)

摘要:以蚕豆为试材,对甲醛(HCHO)处理0、24、48、72 h的蚕豆叶片进行气孔开度、导度、细胞内H₂O₂含量和抗氧化酶活性的测定,并用荧光显微检测法进行了H₂O₂的亚细胞定位检测。结果表明:气体HCHO处理的72 h内,由于蚕豆叶片超氧化物歧化酶(SOD)活性从284.52 U·min⁻¹·g⁻¹ FW升至291.44 U·min⁻¹·g⁻¹ FW,过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性先升高后降低,导致蚕豆叶片中H₂O₂含量从1.31 μmol·g⁻¹ FW升至2.39 μmol·g⁻¹ FW;较短时间(24~48 h)的HCHO处理下蚕豆叶片H₂O₂主要分布在保卫细胞的胞质中,72 h后不仅保卫细胞的胞质中H₂O₂积累增多,积累H₂O₂的叶绿体数量也增多;HCHO持续处理72 h内蚕豆叶片气孔开度和导度分别下降46.50%和78.80%,涂抹抗坏血酸(ASA)的实验证实,H₂O₂对蚕豆叶片气孔开度和导度的调节起到关键作用。研究认为,0.46~0.72 mg·m⁻³的HCHO胁迫致使蚕豆叶片中积累的H₂O₂定位于保卫细胞,是蚕豆叶片气孔开度减小和导度降低的主要原因。

关键词:甲醛胁迫;蚕豆;保卫细胞;气孔开度;气孔导度;过氧化氢;抗氧化酶

中图分类号:X503.231 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2015)07-1239-08 doi:10.11654/jaes.2015.07.003

Impacts of Formaldehyde Stress on Hydrogen Peroxide Accumulation in Guard Cells and Stomatal Aperture and Conductance of *Vicia Faba*

SUN Hui-qun^{1,2}, ZHOU Sheng-en¹, WU Huai-sheng¹, LI Kun-zhi¹, LI Bin³, CHEN Li-mei^{1*}

(1. Faculty of Life Science and Biotechnology, Kunming University of Science and Technology, Chenggong 650500, China; 2. Department of Resource and Environment, Anqing Normal College, Anqing 246011, China; 3. Faculty of Chemistry and Engineering, Kunming University of Science and Technology, Chenggong 650500, China)

Abstract: It has showed that formaldehyde(HCHO) concentrations in indoor air have elevated recently. Here we used *Vicia faba* as a test plant to examine the variations of the stomatal aperture and conductance, hydrogen peroxide content, and the activities of antioxidant enzymes under HCHO stress for 0, 24, 48 h and 72 h. The subcellular localization of H₂O₂ was also measured by fluorescence microscopy. The activities of catalase(CAT), peroxidase(POD) and ascorbate peroxidase(APX) increased at the beginning but decreased afterward. Under HCHO stress for 72 h, superoxide dismutase(SOD) activity of *V. faba* leaves raised from 284.52 U·min⁻¹·g⁻¹ FW to 291.44 U·min⁻¹·g⁻¹ FW, resulting in increase of H₂O₂ content from 1.31 μmol·g⁻¹ FW to 2.39 μmol·g⁻¹ FW. Under 0~48 h of HCHO stress, H₂O₂ in *V. faba* leaves was mainly distributed in the cytoplasm of guard cells, whereas H₂O₂ accumulated in both the cytoplasm and the chloroplast of the guard cells after 72 h. The stomatal aperture and conductance decreased by 46.50% and 78.80%, respectively, after continuous HCHO stress for 72 h. Ascorbic acid(ASA)-daubed experiment confirmed that H₂O₂ played a critical role in regulating the stomatal aperture and conductance of the plant. This research indicates that H₂O₂ is localized in guard cells of *V. faba* leaves under HCHO stress of 0.46~0.72 mg·m⁻³, which effectively inhibits the stomatal aperture and conductance of *V. faba* leaves and thus protects plant from HCHO stresses.

Keywords: formaldehyde stress; *Vicia faba*; guard cell; stomatal aperture; stomatal conductance; hydrogen peroxide; antioxidantase

收稿日期:2015-02-02

基金项目:国家自然科学基金(30970263)

作者简介:孙慧群(1967—),女,安徽东至人,在读博士研究生,副教授,主要从事植物代谢基因工程研究。E-mail:sunhqliuzh@163.com

* 通信作者:陈丽梅 E-mail:chenlimeikm@126.com

相关调查表明,我国室内空气中甲醛(Formaldehyde, HCHO) 浓度普遍高于室内空气质量标准(0.10 $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$, GB/T 18883—2002), 新装修房内 HCHO 浓度甚至高达 3.86 $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$, 净化室内空气 HCHO 污染成为人们高度关注的课题^[1-2]。近几年的研究主要集中在用植物净化室内 HCHO 污染, 多为寻找能净化室内 HCHO 污染的植物, 对其净化能力和效果进行比较^[3-6], 一些学者利用 ^{14}C 和 ^{13}C 标记法对 HCHO 进入高等植物体内的代谢转化机制开展研究^[7-9], 但植物吸收 HCHO 的机制及其影响因素方面的研究未见报道。

气孔是植物进行水分交换和气体交换的门户, 气孔开度和导度对外界非生物因素的刺激或变化敏感^[10]。已有研究证明, HCHO 可导致多种植物的气孔开度或导度不同程度地下降^[8, 11-14], H_2O_2 作为植物气孔运动信号转导过程的成员之一, 是否参与调节气孔运动尚存在争议。外源 H_2O_2 可以诱导气孔的关闭^[15-16], 但高湿环境下蚕豆叶片内产生的 H_2O_2 并未引起气孔关闭^[7], 说明 H_2O_2 对气孔开闭的调节受不同环境因素影响。李惠民等^[18]研究显示 HCHO 可诱导拟南芥体内 H_2O_2 积累, 但 HCHO 胁迫下植物体内 H_2O_2 的产生和积累是否影响气孔开度或导度, 鲜见报道。为此, 本研究以蚕豆(*Vicia faba* L.) 为研究对象, 对蚕豆进行模拟室内空气 HCHO 污染的处理, 通过对蚕豆叶片 H_2O_2 含量及其 H_2O_2 亚细胞定位的检测, 探讨 HCHO 胁迫下蚕豆保卫细胞 H_2O_2 的积累对气孔开度和导度的影响, 为提高植物吸收 HCHO 能力的应用研究和植物气孔活动应答 HCHO 污染的机制研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料和处理

用云南蚕豆 8363(Yunnan Candou 8363) 做供试材料, 选择饱满种子沸水烫 30 s 以杀死蚕豆蛾, 25 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗下催芽萌发, 待胚根长出 2 cm 转入花盆栽培, 长到 6 片复叶时选择长势一致的健壮植株用于 HCHO 处理和测定。HCHO 处理装置为一个三面由压缩板材(59 cm $\times$ 40 cm $\times$ 48 cm) 构成、一面有玻璃门的家具柜, 处理前用室内装修污染检测仪对柜内和柜外空气分别进行了 0、24、48、72 h 的检测, 没有检测到苯、氨、甲苯和二甲苯, 处理时用胶带密封柜的周沿。将 XK-930- CH_2O 泵吸式甲醛测定仪固定在柜子玻璃门上, 分别于 8:00、14:00、21:00 三个时间点读取未放蚕豆植株的空柜内 HCHO 浓度, 获得为期 3 d 的

HCHO 背景值, 柜内 HCHO 浓度在早上 8:00 最低, 中午 14:00 最高, 日平均浓度在 0.46~0.72 $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$ 之间; 放入蚕豆植株后, 72 h 内柜内 HCHO 日平均浓度在 0.44~0.64 $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$ 之间, 与未放入蚕豆植株差异不大, 说明柜内板材持续释放 HCHO。将长有蚕豆植株的花盆放入柜内后封闭柜门, 同时在柜外(经测定 HCHO 浓度为 0) 放置长势一致的蚕豆植株作为对照(CK), 控制柜内和柜外的温度和相对湿度等条件在相近的水平, 柜内外光强均设定在 450 $\text{lx}\cdot\text{m}^{-2}$, 光照和黑暗处理时间设定为 12 h/12 h。分别于 0、24、48、72 h (每天的 14:00) 测定柜内和柜外蚕豆叶片的气孔开度和导度, 并于相同时间取样用于叶片 H_2O_2 含量测定和 H_2O_2 的荧光显微定位检测。

抗坏血酸(Ascorbic acid, ASA) 抑制实验按如下步骤进行: 在蚕豆叶片下表皮均匀涂抹 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 ASA, 放入柜内, 处理 48 h 后取样测定蚕豆叶片的气孔开度、导度和 H_2O_2 含量, 以柜内 0、48 h 时未涂抹 ASA 的蚕豆叶片为对照。实验期间昼夜气温变化范围 13~22 $^{\circ}\text{C}$, 为避免土壤及其中的微生物吸收 HCHO 对实验结果造成影响, 处理时将种植蚕豆的花盆从根部到盆底用 PVC 膜封扎。

1.2 气孔开度和导度测定

处理后取柜外和柜内植株顶部往下第 2 片复叶上的叶片, 用镊子轻轻撕取下表皮于载玻片上, 滴上一滴生理盐水, 盖上盖玻片, 将制好的载玻片置于光学显微镜(Nikon Eclipse E200) 下观察, 中倍镜下用测微尺测量气孔开度, 每个叶片测量 40 个气孔, 取平均值。选取活体植株同部位的叶片, 用 CI-340 便携式光合作用测量仪(美国) 进行气孔导度的测定。

1.3 叶片 H_2O_2 含量和抗氧化酶活性测定

称取 0.5 g 叶片, 加 1 mL 预冷的丙酮匀浆, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 取 1 mL 上清液, 加 3 mL 萃取剂(体积比 $\text{CCl}_4:\text{CHCl}_3=3:1$) 混匀, 再加 5 mL ddH_2O , 混匀, 4000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 1 min, 上层水相为 H_2O_2 待测液, H_2O_2 含量采用二甲酚橙法测定^[19], 以 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ 表示。称取 0.5 g 叶片, 加 2.5 mL 预冷的磷酸缓冲液(50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7.4) 匀浆, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 上清液为酶提取液。过氧化氢酶(Catalase, CAT) 活性测定参照陈家长等^[20]的方法, 以 OD_{240} 每分钟减少 0.1 的酶量为一个酶活力单位(U); 超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD) 和过氧化物酶(Peroxidase, POD) 活性测定参照卫麦霞等^[21]的方法, SOD 活性以抑制 NBT 光化还原的 50% 为一个

U; POD 活性以 OD_{460} 每分钟增加 0.01 为一个 U; 抗坏血酸过氧化物酶 (Ascorbate peroxidase, APX) 活性测定参照沈文庵等^[22]的方法, 以每分钟氧化 $1 \mu\text{mol}$ ASA 的酶量为一个 U。酶活性单位均以 $\text{U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$ 表示。

1.4 保卫细胞中 H_2O_2 的荧光显微定位观察

参考张小莉等^[23]的方法加以改进。剪取顶部往下第二片复叶上生长状态好的叶片, 用 dd H_2O 洗净, 撕取下表皮, 用毛笔轻轻刮去叶肉细胞, 在 Tris 缓冲液 ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl, pH 6.1) 中培养 5 min。探针孵育时, 从 Tris 缓冲液中取出表皮条, 放入装有 1 mL 探针负载缓冲液 ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl, pH 7.2) 的 EP 管中, 再加入 1 mL 终浓度为 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 H_2DCFDA ($2', 7'$ -二氯氢化荧光素乙二脂), 混匀, 室温避光孵育 20 min。将负载 H_2DCFDA 的表皮条用新鲜负载缓冲液漂洗 2 次, 以洗去细胞表层多余的探针, 将表皮条放在滴加一滴负载缓冲液的载玻片上, 加上盖玻片, 置于荧光显微镜 (Olympus CFM-400E) 下观察和拍摄保卫细胞内绿色荧光的分布, 激发波长 $420 \sim 485 \text{ nm}$, 软件为 Tsview7。

1.5 数据统计分析

所有生理生化指标测定均重复 3 次, 用 SPSS19.0 对所得数据进行统计学分析, 显著性差异用多重比较 (Duncan) 法检验。

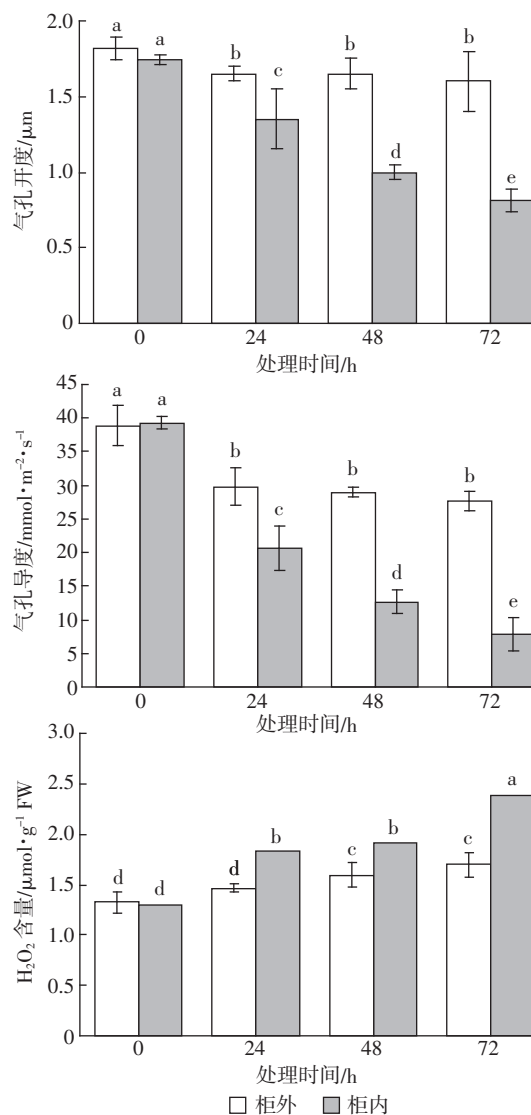
2 结果与分析

2.1 HCHO 处理下蚕豆叶片气孔开度、导度和 H_2O_2 含量的变化

分别在 0、24、48、72 h 对柜内和柜外蚕豆叶片的气孔开度、导度和 H_2O_2 含量进行测定。结果显示 (图 1), 柜外蚕豆叶片的气孔开度和导度在 0 h 时分别为 $1.82 \mu\text{m}$ 和 $38.89 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 24 h 时分别降至 $1.65 \mu\text{m}$ 和 $29.82 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ($P < 0.05$), 0 h 和 24 h 形成的差异是蚕豆从温室移到室内短时间内适应温湿度等环境条件细微变化引起的, 此后气孔开度和导度不再改变 ($P > 0.05$)。与 0 h 时比较, HCHO 处理 72 h 时, 柜内蚕豆叶片的开度和导度分别显著下降 46.3% 和 77.5%, 24~72 h 内柜内叶片的开度和导度均比相同时间柜外叶片的低。可见, 柜内空气中的 HCHO 对蚕豆叶片的气孔开度和导度有较强的抑制作用, 而且这种抑制作用随 HCHO 胁迫时间延长而增强。

对不同时间柜内和柜外蚕豆叶片的 H_2O_2 含量进行测定, 结果显示 (图 1), 柜外蚕豆叶片 H_2O_2 含量在

24 h 内没有显著性差异, 48 h 与 24 h 相比, 从 $1.46 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$ 升至 $1.60 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$, 此后未见明显变化, 说明在未受 HCHO 胁迫的环境中蚕豆叶片中 H_2O_2 含量随时间的延长增加速度比较平缓。这与正常生理状态下叶片中抗氧化酶系统的清除功能有关。与 0 h 时比较, 柜内蚕豆经 HCHO 处理 24 h 和 72 h 时叶片 H_2O_2 含量分别显著增加 28.4% 和 45.2% ($P < 0.05$); 处理 24~72 h 期间, 柜内叶片 H_2O_2 含量均显著高于柜外蚕豆叶片。可见 HCHO 胁迫对蚕豆叶片有明显的过氧化损伤作用, 暴露于 HCHO 的时间越长,



柱状图上不同小写字母表示 $P=0.05$ 水平上差异显著。下同
Different small letters mean significant differences at $P=0.05$ level.

The same below

图 1 不同时间 HCHO 处理下蚕豆叶片气孔开度、导度和 H_2O_2 含量的测定结果

Figure 1 Stomatal aperture, stomatal conductance and H_2O_2 content of *Vicia faba* leaves under HCHO stresses for different time

叶片产生的 H_2O_2 越多。

2.2 HCHO 处理下蚕豆保卫细胞中 H_2O_2 的荧光显微定位分析

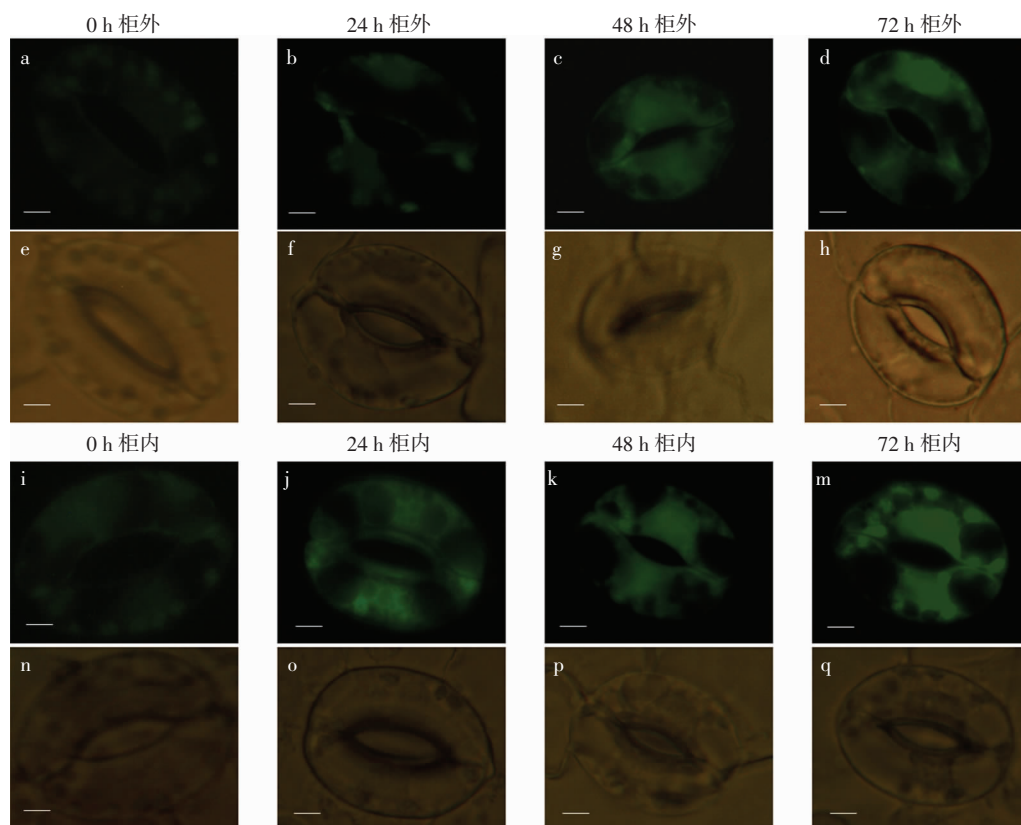
Cho 等^[24]、Li 等^[25]和 Tossi 等^[26]以 H_2DCFDA 为荧光探针分别对拟南芥保卫细胞和水稻根中产生的 H_2O_2 进行原位显微分析,本研究通过 H_2DCFDA 探针,对蚕豆叶片 H_2O_2 进行显微定位检测。由图 2 可见,蚕豆叶片的 H_2O_2 都定位于保卫细胞中(图 2a-图 2d、图 2i-图 2m);0 h 时柜外和柜内叶片保卫细胞中的荧光很暗(图 2a、图 2i),说明正常生理状况下保卫细胞中积累的 H_2O_2 很少;24 h 和 48 h 时柜内保卫细胞的胞质中荧光强度明显增强(图 2j、图 2k),说明 HCHO 处理初期 H_2O_2 累积于胞质中;72 h 时柜外蚕豆保卫细胞中的荧光主要集中于胞质中(图 2d),柜内保卫细胞胞质和叶绿体中 H_2O_2 荧光强度都明显增强(图 2m),说明随着 HCHO 处理时间的延长,不仅保卫细胞胞质中积累的 H_2O_2 增多,积累 H_2O_2 的叶绿体数也显著增多。 H_2O_2 定位于保卫细胞揭示它对 HCHO 胁迫

下蚕豆叶片的气孔运动可能具有一定的调节作用,柜内蚕豆叶片保卫细胞的荧光强度强于相同处理时间柜外的蚕豆叶片,说明柜内 HCHO 胁迫诱导蚕豆保卫细胞积累了更多的 H_2O_2 。

H_2DCFDA 探针对 H_2O_2 的特异性不强,图 2 所显示的荧光可能与其他活性氧的产生和积累有关。为了进一步证实上述结果的正确性,在叶片上涂抹 H_2O_2 清除剂 ASA,经 HCHO 处理后进行保卫细胞 H_2O_2 的荧光显微定位检测。ASA 是植物体内重要的抗氧化化合物,涂抹的外源 ASA 可进入保卫细胞,在胞质 APX 催化下,ASA 与 H_2O_2 反应, H_2O_2 接受 NADPH 的电子得以还原成 H_2O ,从而清除 H_2O_2 的毒性。由图 3 可见,涂抹 ASA 叶片后保卫细胞胞质中荧光强度显著低于未涂抹 ASA 的叶片,证实 HCHO 胁迫导致蚕豆叶片保卫细胞中 H_2O_2 的积累。

2.3 HCHO 处理下蚕豆叶片 H_2O_2 含量与气孔开度和导度的相关性分析

为了探讨 HCHO 胁迫下蚕豆叶片气孔开度和导

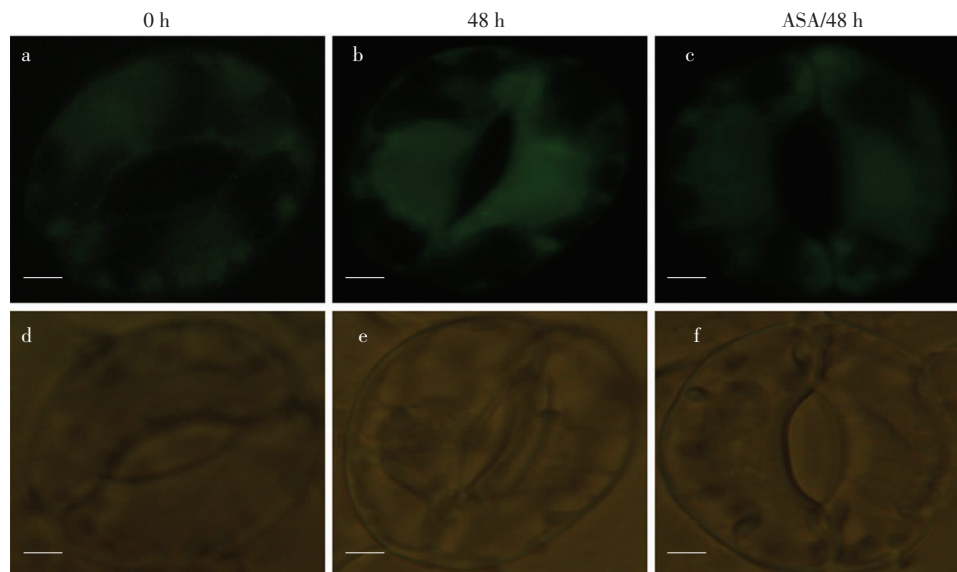


a-d、i-m 表示激发波长为 420~485 nm 的蓝光下观察保卫细胞中 H_2O_2 的荧光分布;e-h、n-q 表示相同放大倍数下用普通光源观察保卫细胞的形状和轮廓。Bars=2 mm

a-d and i-m for fluorescent distribution of H_2O_2 in guard cells under 420~485 nm excitation wavelength of blue light;
e-h and n-q for shape and contour of guard cells under same magnification ratio with ordinary light source. Bars=2 mm

图 2 不同时间 HCHO 处理下蚕豆保卫细胞 H_2O_2 荧光亚细胞定位检测

Figure 2 Fluorescence subcellular localization detection of H_2O_2 in *Vicia faba* guard cells under HCHO stresses for different times



a-c 表示激发波长为 420~485 nm 的蓝光下观察保卫细胞中 H_2O_2 的荧光分布;d-f 表示相同放大倍数下用普通光源观察保卫细胞的形状和轮廓。

Bars=2 mm; a-c for fluorescence distribution of H_2O_2 in guard cells under 420~485 nm excitation wavelength of blue light;

d-f for shape and contour of guard cells under the same magnification ratio with ordinary light source. Bars=2 mm

图 3 涂抹 ASA 对 HCHO 处理下蚕豆保卫细胞中 H_2O_2 的荧光亚细胞定位检测

Figure 3 Fluorescence subcellular localization detection of H_2O_2 in *Vicia faba* guard cells under HCHO stresses for different time by daubing ASA

度的下降是否与保卫细胞中 H_2O_2 的积累有关,对柜内不同处理时间蚕豆叶片 H_2O_2 含量和气孔开度与导度进行了相关性分析。通过相关系数 r 可知,不同时间 HCHO 处理下积累的 H_2O_2 与气孔开度的 r 值为 $-0.65 \sim -0.63$,呈中度负相关($P < 0.05$),与气孔导度的 r 值为 $-0.90 \sim -0.79$,呈高度负相关($P < 0.01$)。这说明因 HCHO 胁迫引起的气孔开度和导度下降与 H_2O_2 积累有密切相关性。为了证实气体 HCHO 持续处理下保卫细胞中 H_2O_2 积累是影响蚕豆叶片气孔开度和导度的主要因子,对涂抹 ASA 后经 HCHO 处理的蚕豆叶片进行了气孔开度、导度和 H_2O_2 含量的测定。结果显示(图 4),涂抹了 ASA 的叶片与未涂抹 ASA 的叶片相比, H_2O_2 含量从 $1.92 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$ 显著降至 $1.45 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$,气孔导度和开度则显著高于未涂抹 ASA 的叶片,分别上升 21.7% 和 6%。对涂抹 ASA 后柜内蚕豆叶片 H_2O_2 含量与气孔开度和导度进行相关性分析,发现 H_2O_2 含量下降与开度的上升呈中度相关($r = -0.76, P < 0.05$),与导度的上升呈高度相关($r = -0.97, P < 0.01$),可见 HCHO 胁迫下引起的 H_2O_2 积累导致了气孔开度和导度的降低。

2.4 HCHO 处理下蚕豆叶片抗氧化酶活性分析

为了探讨 HCHO 胁迫引起蚕豆叶片细胞内 H_2O_2 含量升高的原因,分别在 0、24、48、72 h 对柜内和柜外蚕豆叶片的 CAT、SOD、POD 和 APX 活性进行了测

定。结果显示(图 5),与 0 h 的柜内蚕豆叶片相比,HCHO 处理 24 h 时柜内叶片 CAT、SOD、POD 和 APX 的活性均显著升高,分别上升 7.22%、3.20%、14.77% 和 6.72%,说明短时间的 HCHO 胁迫诱导蚕豆叶片抗氧化防御机制应激性加强;此后随着时间延长,柜内叶片 CAT 和 APX 活性一直下降,从 24 h 到 72 h 分别降低 22.66% 和 12.85%;POD 活性先上升 7.64% 后又降低 27.07%;SOD 活性开始没有发生明显变化,72 h 时从 $284.52 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$ 显著升至 $291.44 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$ 。在 HCHO 处理 24~72 h 期间,将相同时间的柜内叶片和柜外比较,24 h 和 48 h 时柜内叶片的四种酶活性均比柜外高,72 h 时 SOD 活性比柜外高,但 CAT、POD 和 APX 活性比柜外低。这说明 HCHO 处理 72 h 对蚕豆叶片的这三种酶活性起到了强烈抑制作用。由上述结果可知,HCHO 胁迫诱导了 SOD 活性,对 CAT、POD、APX 活性是先诱导后抑制。

3 讨论

本研究结果显示,HCHO 处理初期 CAT、POD 和 APX 活性上升,随着处理时间延长却呈下降趋势(图 5),可见蚕豆叶片在 HCHO 处理初期即表现出氧化损伤效应,这种效应在短时间内启动了蚕豆体内清除 H_2O_2 的抗氧化酶防御机制,但随着处理时间的延长,HCHO 胁迫抑制了蚕豆体内 CAT、POD 和 APX 的活

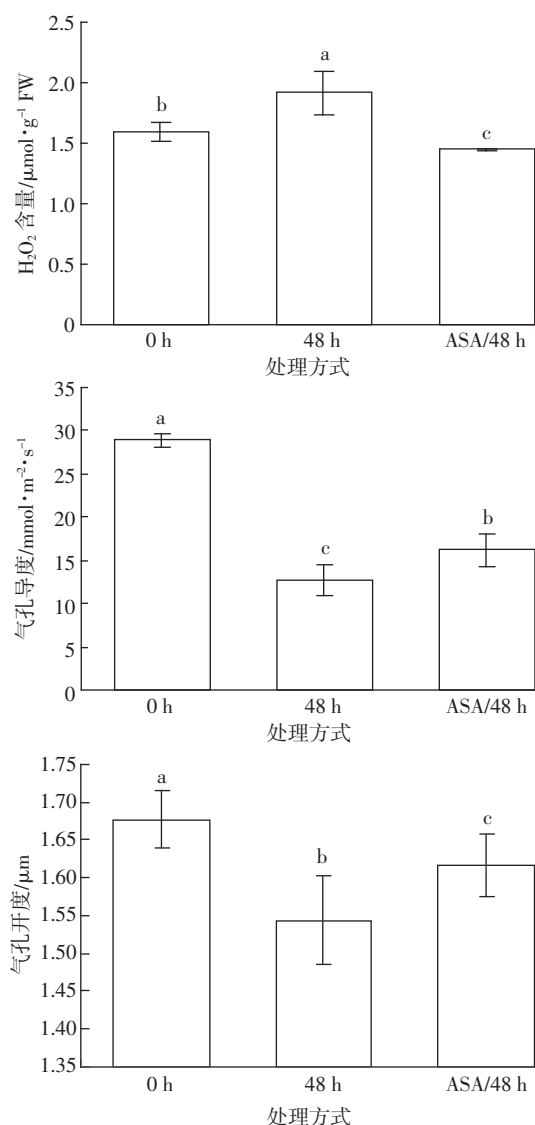


图4 涂抹ASA后HCHO处理48 h时蚕豆叶片H₂O₂含量和气孔开度、导度测定结果

Figure 4 H₂O₂ content, stomatal aperture and conductance of *Vicia faba* leaves under HCHO stresses for 48 h after daubing ASA

性,SOD活性却稳定上升。HCHO胁迫下四种酶活性的变化与前人的研究结果不同^[27-28],这种变化使得蚕豆叶片中H₂O₂不能及时转化,导致H₂O₂的积累。

对于不同时间HCHO处理下H₂O₂在保卫细胞中的定位,短时间(48 h内)的HCHO胁迫造成H₂O₂先在胞质中积累,与以下原因有关:胞质中分布有Cu/Zn-SOD,SOD活性的升高使胞质中活性氧转化成了H₂O₂;H₂O₂具有较高的跨膜通透性^[29],由过氧化物酶体乙醇酸氧化、线粒体呼吸电子传递链、乙醛酸循环体脂肪酸β-氧化、叶绿体光化学反应等途径产生的H₂O₂可以穿膜而进入胞质^[30];质膜上的氧化还原酶系统是产生H₂O₂的重要部位,位于质膜外侧的SOD、

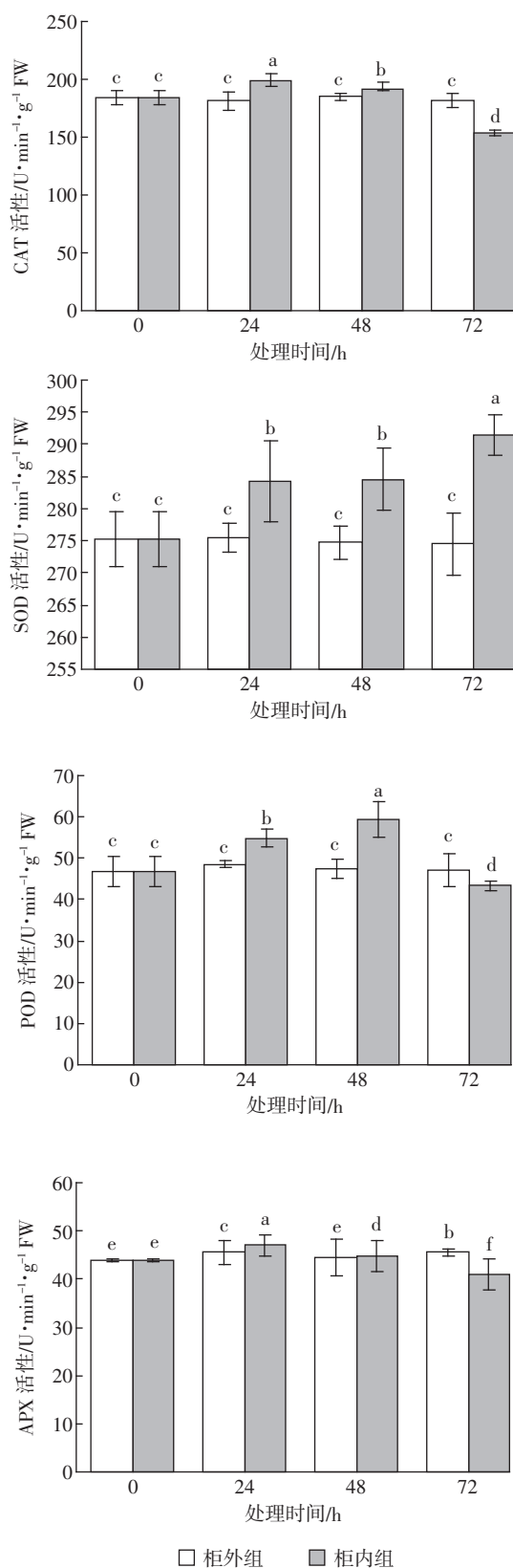


图5 不同时间HCHO处理下蚕豆叶片CAT、SOD、POD、APX活性的测定结果

Figure 5 Activities of CAT, SOD, POD and APX in *Vicia faba* leaves under HCHO stresses for different time

POD、NADPH 氧化酶及多胺氧化酶、质膜上还原型的电子载体等途径产生的 H_2O_2 也都能进入胞质^[16]。HCHO 处理 72 h 导致保卫细胞积累 H_2O_2 的叶绿体数量增多,主要是因为高等植物叶绿体 PS I 假环式电子传递链的受体端存在 NADPH 氧化酶等,可通过位于类囊体膜上的铁氧还蛋白、黄素、喋啶和二酚等还原型组分将单电子传递给基态氧分子,从而形成超氧阴离子自由基(Superoxide anion free radical, $\text{O}_2^{\cdot-}$), $\text{O}_2^{\cdot-}$ 经 SOD 催化歧化生成 H_2O_2 ^[31-33],叶绿体中清除 H_2O_2 的关键酶是 APX,但 HCHO 处理 72 h 后叶片中 APX 活性被显著抑制。

前人研究发现,盐胁迫可使植物体内 H_2O_2 含量增加^[34],盐胁迫下蚕豆叶片中的 H_2O_2 积累伴随着气孔的关闭反应^[35]。韦立秀等^[14]分别用 2.85 、 $5.49 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ 的 HCHO 处理 2 种蚕豆 24.48 h,发现 2 种蚕豆叶片的气孔开度均随 HCHO 浓度的增加和胁迫时间的延长而变小,但没有分析气孔开度的影响机制。该研究发现, $0.46 \sim 0.72 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ 的 HCHO 胁迫诱导的保卫细胞 H_2O_2 积累抑制了气孔的开度和导度,涂抹 ASA 的实验表明,由于 ASA 的清除作用使保卫细胞中 H_2O_2 含量减少,气孔开度和导度即随之回升,相关系数分析也显示 H_2O_2 含量积累和气孔开度与导度的下降具有高度相关性。这进一步证实空气中 HCHO 污染引起的蚕豆保卫细胞 H_2O_2 积累在气孔开放信号转导过程中对气孔开度和导度的调节起到关键作用。 H_2O_2 积累对气孔开度和导度的抑制使得植物吸收净化 HCHO 的能力减弱,应用植物净化室内空气 HCHO 污染应消除这种抑制作用。

4 结论

(1)HCHO 持续胁迫显著增强了蚕豆叶片中 SOD 活性,CAT、POD、APX 三种抗氧化酶活性先升高后下降,使得叶片中的 H_2O_2 不能迅速被清除,从而导致蚕豆叶片中 H_2O_2 的积累增加。

(2)在 $0.46 \sim 0.72 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ 的 HCHO 处理下,短时间内蚕豆叶片细胞中产生的 H_2O_2 主要积累在保卫细胞的胞质中,处理时间延长到 72 h, H_2O_2 不仅分布于胞质,积累 H_2O_2 的叶绿体数量也增多。

(3)HCHO 胁迫使蚕豆叶片保卫细胞中 H_2O_2 大量积累是导致蚕豆气孔导度和开度下降的主要原因。

参考文献:

[1] 王文超,周仕学,姜瑶瑶,等.室内甲醛污染治理技术的研究进展[J].环境科学与技术,2006,29(9):106-108.

WANG Wen-chao, ZHOU Shi-xuan, JINAG Yao-yao, et al. Progress on indoor formaldehyde removal[J]. *Environmental Science and Technology*, 2006, 29(9):106-108.

[2] 徐晓琴,刘文君.浅议室内环境空气污染现状及防治对策[J].甘肃科技,2014,30(7):48-49.

XU Xiao-qin, LIU Wen-jun. Status and countermeasures of indoor environment air pollution[J]. *Gansu Science and Technology*, 2014, 30(7):48-49.

[3] Xu Z, Wang L, Hou H. Formaldehyde removal by potted plant soil systems[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 192(1):314-318.

[4] Zhou J, Yue B, Chen S, et al. Response of marantaceae and pteridophytes potted plants for purification of formaldehyde polluted air[J]. *African Journal of Agricultural*, 2013, 8(47):6027-6033.

[5] Van K P, Van N B, Hao N T B. Study on gaseous formaldehyde removal capability of some native plant species in Vietnam[J]. *Pharmaceutical Research*, 2013, 4(1):1-7.

[6] Aydogan A, Montoya L D. Formaldehyde removal by common indoor plant species and various growing media[J]. *Atmospheric Environment*, 2011, 45(16):2675-2682.

[7] Zhang W, Tang L, Sun H, et al. C1 metabolism plays an important role during formaldehyde metabolism and detoxification in *Petunia* under liquid HCHO stress[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2014, 83:327-336.

[8] Zeng Z, Qi C J, Chen Q, et al. Absorption and metabolism of formaldehyde in solutions by detached banana leaves[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2014, 117(5):602-612.

[9] Song Z B, Xiao S Q, You L, et al. C1 metabolism and the calvin cycle function simultaneously and independently during HCHO metabolism and detoxification in *Arabidopsis thaliana* treated with HCHO solutions plant[J]. *Cell and Environment*, 2013, 36(8):1490-1506.

[10] 高春娟,夏晓剑,师 恺,等.植物气孔对全球环境变化的响应及其调控防御机制[J].植物生理学报,2012,48(1):19-28.

GAO Chun-juan, XIA Xiao-jian, SHI Kai, et al. Response of stomata to global climate changes and the underlying regulation mechanism of stress responses[J]. *Plant Physiology Journal*, 2012, 48(1):19-28.

[11] 郝辉芳,冀瑞萍.3 种室内观赏植物对甲醛污染的响应[J].山西农业科学,2010,38(8):30-32.

HAO Hui-fang, JI Rui-ping. Response of three indoor ornamentals to formaldehyde pollution[J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2010, 38(8):30-32.

[12] 肖素勤.安装 DAS/DAK 甲醛光合同化途径转基因植物的甲醛代谢机理及生理特性研究[D].昆明:昆明理工大学,2012:25-35.

XIAO Su-qin. The effects of the installation of DAS/DAK photosynthetic formaldehyde-assimilation pathway on the metabolic mechanisms and physiological characteristics of transgenic plants[D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2012:25-35.

[13] 轩秀霞,肖素琴,游 览,等.常春藤代谢气体甲醛中间产物及甲醛胁迫下叶片相关生理特性变化分析[J].生命科学研究,2013,17(2):125-135.

XUAN Xiu-xia, XIAO Su-qin, YOU Lan, et al. The analysis of the intermediates for formaldehyde metabolism and physiological changes

- under gaseous formaldehyde stress in *Hedera helix*[J]. *Life Science Research*, 2013, 17(2):125-135.
- [14] 韦立秀, 朱麟, 杨振德, 等. 蚕豆叶片气孔对甲醛污染的反应研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(18):7570-7571.
WEI Li-xiu, ZHU Lin, YANG Zhen-de, et al. Study on *Vicia faba* stomata reaction to indoor formaldehyde pollution[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2008, 36(18):7570-7571.
- [15] 程艳丽, 宋纯鹏. 植物细胞 H_2O_2 的信号转导途径[J]. 中国科学 C 辑, 2005, 35(6):480-489.
CHENG Yan-li, SONG Chun-peng. Signal transduction of H_2O_2 in plant cell[J]. *China Science (C Life Science)*, 2005, 35(6):480-489.
- [16] 安国勇, 宋纯鹏, 张骁, 等. 过氧化氢对蚕豆气孔运动和质膜 K^+ 通道的影响[J]. 植物生理学报, 2000, 26(5):458-464.
AN Guo-yong, SONG Chun-peng, ZHANG Xiao, et al. Effect of peroxide generation on stomatal movement and K^+ channel on plasma membrane in *Vicia faba* guard cell[J]. *Acta Phytophysiological Sinica*, 2000, 26(5):458-464.
- [17] Arve L E, Carvalho D R A, Olsen J E, et al. ABA induces H_2O_2 production in guard cells, but does not close the stomata on *Vicia faba* leaves developed at high air humidity[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2014, 9(7):e29192.
- [18] 李惠民, 张莹, 贺军民. UV-B 对拟南芥叶片不同来源 H_2O_2 的活化和气孔关闭的诱导[J]. 西北植物学报, 2013, 33(5):911-921.
LI Hui-min, ZHANG Ying, HE Jun-min. UV-B activates different sources of H_2O_2 and induces stomatal closure in *Arabidopsis thaliana* leaves[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2013, 33(5):911-921.
- [19] Gay C A, Gebicki J M. Measurement of protein and lipid hydroperoxides in biological systems by the ferric-xylene orange method[J]. *Anal Biochem*, 2003, 315(1):29-35.
- [20] 陈家长, 孟顺龙, 胡庚东, 等. 低浓度阿特拉津对鲫鱼过氧化氢酶 (CAT) 活性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2008, 27(3):1151-1156.
CHEN Jia-zhang, MENG Shun-long, HU Geng-dong, et al. Effects of low concentration of atrazine on catalase activity in *Carassius auratus*[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2008, 27(3):1151-1156.
- [21] 卫麦霞, 龚道新, 黎定军, 等. 咪鲜胺及其制剂和主要代谢物对三叶浮萍 SOD 和 POD 活性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2008, 27(3):1072-1076.
WEI Mai-xia, GONG Dao-xin, LI Ding-jun, et al. Effect of prochloraz, its formulation and major metabolites on the activities of SOD and POD in *Lemna paucicostata*[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2008, 27(3):1072-1076.
- [22] 沈文庵, 徐朗莱, 叶茂炳, 等. 抗坏血酸过氧化物酶活性测定的探讨[J]. 植物生理学通讯, 1996, 32(3):203-205.
SHEN Wen-an, XU Lang-lai, YE Mao-bing, et al. Study on determination of ASP activity[J]. *Plant Physiology Communications*, 1996, 32(3):203-205.
- [23] 张小莉, 王鹏程, 宋纯鹏. 植物细胞过氧化氢的测定方法[J]. 植物学报, 2009, 44(1):103-106.
ZHANG Xiao-li, WANG Peng-cheng, SONG Chun-peng. Methods of detecting hydrogen peroxide in plant cells[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2009, 44(1):103-106.
- [24] Cho S C, Chao Y Y, Hong C Y, et al. The role of hydrogen peroxide in cadmium-inhibited root growth of rice seedlings[J]. *Plant Growth Regulation*, 2012, 6(1):27-35.
- [25] Lü D, Wang W, Miao C. ATHK1 acts downstream of hydrogen peroxide to mediate ABA signaling through regulation of calcium channel activity in *Arabidopsis* guard cells[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2013, 58(3):336-343.
- [26] Tossi V E, Lamattina L, Jenkins G, et al. UV-B-induced stomatal closure in *Arabidopsis* is regulated by the UVR8 photoreceptor in an independent mechanism[J]. *Plant Physiology*, 2014, 164(4):2220-2230.
- [27] 安雪, 李霞, 潘会堂, 等. 16 种室内观赏植物对甲醛净化效果及生理生化变化[J]. 生态环境学报, 2010, 19(2):379-384.
AN Xue, LI Xia, PAN Hui-tang, et al. The capacity of 16 ornamental plants on purifying indoor formaldehyde pollution and their physiological response to formaldehyde stress[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2010, 19(2):379-384.
- [28] 韩晓弟. 气态甲醛染毒对吊兰生长的毒性作用[J]. 上海环境科学, 2010, 29(4):139-143.
HAN Xiao-di. Toxicological effect of gaseous formaldehyde contamination on *Chlorophytum comosum* growth[J]. *Shanghai Environmental Science*, 2010, 29(4):139-143.
- [29] Hooijmaijers C, Rhee J Y, Kwak K J, et al. Hydrogen peroxide permeability of plasma membrane aquaporins of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Journal of Plant Research*, 2012, 125(1):147-153.
- [30] Neill S J, Desikan R, Clarke A, et al. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53(372):1237-1247.
- [31] Møller I M, Sweetlove L J. ROS signalling—specificity is required[J]. *Trends in Plant Science*, 2010, 15(7):370-374.
- [32] 孙骏威, 李素芳, 付贤树, 等. 低钾对水稻不同叶位叶片光合特性及抗氧化系统的影响[J]. 核农学报, 2007, 21(4):404-408.
SUN Jun-wei, LI Su-fang, FU Xian-shu, et al. Effects of low potassium stress on photosynthetic characteristics and antioxidant systems in different position leaves of rice plants[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2007, 21(4):404-408.
- [33] 杜秀敏, 殷文璇, 赵彦修, 等. 植物中活性氧的产生及清除机制[J]. 生物工程学报, 2001, 17(2):121-125.
DU Xiu-min, YIN Wen-xuan, ZHAO Yan-xiu, et al. The production and scavenging of reactive oxygen species in plants[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2001, 17(2):121-125.
- [34] Agarwal S, Pandey V. Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*[J]. *Biologia Plantarum*, 2004, 48(4):555-560.
- [35] 安国勇, 李保珠, 武桂丽, 等. H_2O_2 作为根源信号介导盐胁迫诱导的蚕豆气孔关闭反应[J]. 植物生理学报, 2012, 48(3):265-271.
AN Guo-yong, LI Bao-zhu, WU Gui-li, et al. H_2O_2 could act as root source signal to mediate stomatal closure induced by salt stress of *Vicia faba* L.[J]. *Plant Physiology Journal*, 2012, 48(3):265-271.