

二氧化硫暴露对拟南芥叶片形态和生理生化指标的影响

李利红, 仪慧兰, 王磊, 李秀芬

(山西大学生命科学与技术学院, 山西 太原 030006)

摘要: 采用室内培养及密闭箱静态熏气方法, 研究了不同浓度 SO_2 暴露对拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 叶片形态和生理生化指标的影响。结果显示, 拟南芥暴露于 SO_2 14 d 后, 叶面气孔开度变小。浓度 $10 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ 组促进植株生长发育, SOD 和 CAT 活性无明显改变, $30 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ SO_2 组 3 种酶活性呈诱导性增高, 其中 POD 增幅最大, SO_2 浓度 $90 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ 时, CAT 活性被抑制, 丙二醛 (MDA) 含量增加, 株高、叶片数和叶片面积显著降低, 可溶性蛋白含量减少, 叶片出现明显可见伤害。研究结果表明, 在低浓度条件下, 拟南芥能够通过调节气孔开放、细胞抗氧化酶活性等使植株适应 SO_2 胁迫, 但是高浓度 SO_2 暴露会引起细胞氧化损伤, 影响植物生长发育。

关键词: 拟南芥; SO_2 ; 生长发育; 叶片形态; 抗氧化酶

中图分类号: X503.233 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2043(2008)02-0525-05

Effects of Sulfur Dioxide on the Morphological and Physiological Biochemical Parameters in *Arabidopsis Thaliana* Plants

LI Li-hong, YI Hui-lan, WANG Lei, LI Xiu-fen

(School of Life Science and Technology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: Effects of SO_2 exposure on the morphological and physiological biochemical parameters were investigated in model plant *Arabidopsis thaliana*. Test plants were exposed to SO_2 at concentrations of 10, 30 and $90 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$, respectively, 4 h per day for 14 d in an environment-controlled chamber, and then some parameters were measured by detecting the stomatal aperture, activities of antioxidant enzymes and growth rate. The results showed that stomatal aperture and the ratio of stomatal opening area decreased with an increase of the amount of closed stomata when plants exposed to SO_2 . The activities of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD) increased dose-dependently in *Arabidopsis thaliana* plants. $10 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ SO_2 exposure had no markedly effect on the activities of SOD and CAT, and showed a positive effect on plants growth and development. $30 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ SO_2 exposure significantly enhanced the activities of the three antioxidant enzymes, and POD activity had the maximum increment. Exposure to $90 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ SO_2 caused decreases in the activity of CAT and the content of soluble proteins, and inhibition of plant growth and development, but an increase in the content of malondialdehyde (MDA). Our results suggested that *Arabidopsis thaliana* can adapt to SO_2 stress by controlling stomatal opening and activities of antioxidant enzymes, however, exposure to higher concentration can cause oxidative damage to plants.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*; sulfur dioxide; growth and development; morphology of leaves; antioxidant enzymes

硫是植物必需的矿质元素, 低浓度 SO_2 能促进植物生长, 尤其是在土壤含硫不足时。但空气中 SO_2 浓度过高时对植物具有毒害效应, 能破坏叶绿体结构, 分解叶绿素, 使叶片失绿或坏死^[1], 还能诱发不可逆遗传损伤, 使根尖细胞微核率和染色体畸变率增高^[2]。

SO_2 通过气孔进入植物细胞, 溶于细胞液形成 HSO_3^- 和 SO_3^{2-} , SO_3^{2-} 很快被氧化成 SO_4^{2-} , 同时产生大量活性氧, 如超氧阴离子 ($\text{O}_2^{\cdot-}$)、过氧化氢 (H_2O_2)、羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 等^[3]。活性氧能诱发细胞抗逆基因表达增强, 提高植株对逆境的适应性, 但胞内活性氧过量时, 会导致细胞氧化损伤^[4,5]。目前为止, 多数学者认为 SO_2 伤害与自由基损伤有关, 但有关伤害机理缺乏直接的实验证据^[6]。

近年来对植物硫吸收和代谢的研究多集中在模式植物拟南芥中, 已经提出了较完整的代谢途径^[7]。以

收稿日期: 2007-04-28

基金项目: 国家自然科学基金 (30470318); 山西省留学回国基金项目

作者简介: 李利红 (1982—), 女, 山西吕梁人, 硕士研究生, 主要从事遗传毒理学研究。

通讯作者: 仪慧兰 E-mail: yihuilan@yahoo.com.cn

拟南芥为材料研究植物的逆境生理(干旱、低温、营养元素缺乏等)过程也有不少报道^[8,9],但缺乏对环境污染SO₂胁迫效应的系统研究。为此,本文以拟南芥为材料,研究SO₂暴露对植株生长发育、叶片形态及抗氧化酶活性的影响,分析植物对SO₂胁迫的响应特征和适应机制,为植物抗逆机制研究提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 植株培养

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)为Columbia生态型(Col-0)。用含0.01%Triton-100的1%NaOCl(v/v)将种子消毒,播种于无菌MS固体培养基上(3%蔗糖,1%琼脂粉,pH 5.8),4℃春化2 d后置于培养间,培养温度(22±1)℃,光/暗周期为16 h/8 h,光照强度≥3 000 lx,相对湿度约70%。培养14 d后将幼苗移入泥炭藓、蛭石和珍珠岩按体积比1:1:1均匀混合的培养介质中,同条件培养。

1.2 胁迫处理

取4周龄的拟南芥植株,采用体积0.512 m³的密闭箱静态熏气,温度和光照同上。根据K₂S₂O₅+2HCl→2KCl+H₂O+2SO₂的原理,定量产生SO₂气体,并采用甲醛吸收-副玫瑰苯胺分光光度法测定SO₂浓度。共设4个处理(0、10、30、90 mg·m⁻³),每组20棵植株,每处理3个重复。在熏气前一天,将拟南芥植株移入熏气箱中适应箱内环境,每日熏气4 h后从熏气箱取出,在培养间恢复培养20 h,次日继续熏气,连续熏气14 d后,立即测定酶活及其他指标。

1.3 形态和生理指标检测

1.3.1 形态指标观测

统计每组20棵植株的单株叶片数,测量株高,选叶位一致的叶片测其长和宽,计算株高、单叶面积和单株叶片数的平均值。

1.3.2 气孔检测

每组中随机选5片叶位一致的叶片,采用指甲油影印法取叶片下表皮,置于载片上,加盖玻片后于显微镜(10×40)下观察。每片表皮选6个视野,每个视野10个气孔,共60个气孔,统计关闭气孔数,测微尺测量开放气孔的最大内径作为气孔开度,计算气孔开放面积^[10],求单叶气孔开放总面积占叶面积的比例,作为气孔开放面积指数。

1.3.3 酶活性检测

取拟南芥植株地上部分0.1 g,置预冷的研钵中,加入1 mL磷酸缓冲液(50 mmol·L⁻¹,pH 7.8,含2

mmol·L⁻¹ Na₂EDTA和1%PVP),冰浴中研磨成匀浆,12 000 r·min⁻¹冷冻离心20 min,上清液即为粗酶提取液。CAT活性测定用紫外吸收法^[8],SOD活性测定用NBT光化还原法,以抑制光还原50%为一个酶活单位,POD活性测定用愈创木酚氧化法,可溶性蛋白质含量的测定用考马斯亮蓝G-250染色法,MDA(丙二醛)含量测定用硫代巴比妥酸(TBA)反应法^[11]。

1.4 统计分析

计算每组3个重复的平均值和标准差,F检验后,采用Duncan多重比较分析不同处理组与对照组之间的差异显著性(*为P<0.05,差异显著;**为P<0.01,差异极显著)。

2 结果与分析

2.1 对叶片形态的影响

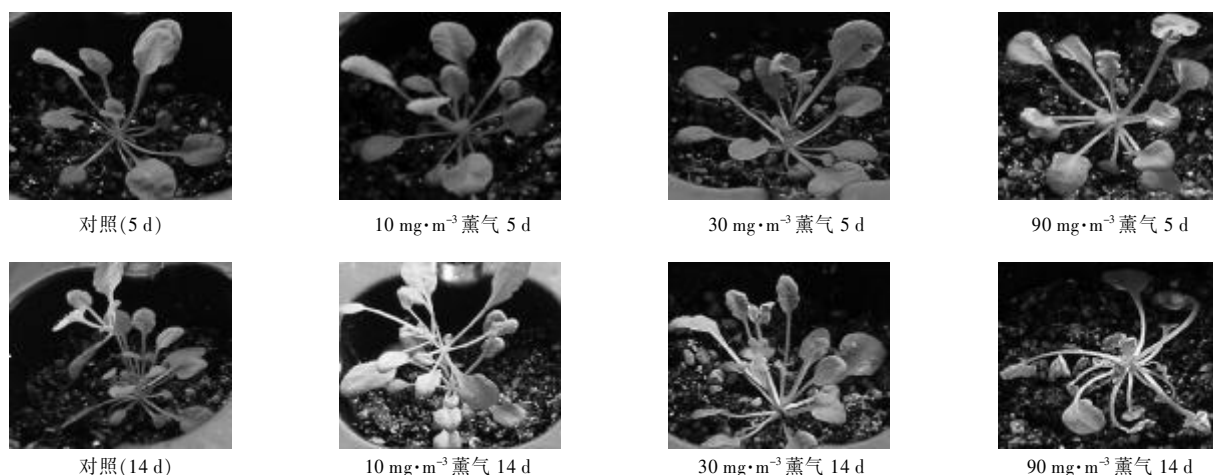
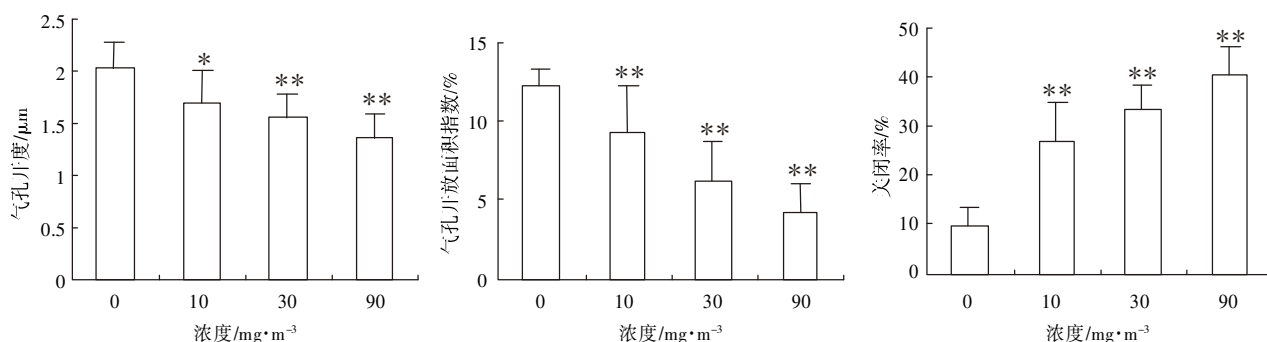
高浓度SO₂暴露对拟南芥成熟叶片的伤害主要是叶面伤害斑的出现和叶片枯死,伤害程度与暴露浓度和时间呈正相关,具有不同的表现特征(图1)。暴露于10 mg·m⁻³ SO₂后叶面无伤害斑,14 d后有少数叶片边缘卷曲,并在停止暴露后恢复正常。30 mg·m⁻³ SO₂暴露的前4 d无可见伤害,5 d后有3%的植株、1.6%的叶片出现大小不等的透明斑,随着暴露时间的延长,伤害症状发展为坏死斑,14 d后40%的植株、4%的叶片出现不规则形黄色坏死斑。暴露于90 mg·m⁻³ SO₂的植株,3 d后有5%的植株、2%的叶片出现不规则形的黄色坏死斑,5 d后全部植株65%的叶片出现成片的坏死斑,坏死斑的面积随暴露时间的延长而扩大,14 d后枯死叶片占单株总叶数的80%。拟南芥植株在脱离高浓度SO₂后伤害性斑点不再增加,并能继续生长发育。

2.2 对拟南芥气孔开放的影响

SO₂暴露对植物气孔的影响非常复杂,与植物种类、SO₂浓度和暴露时间有关。SO₂暴露能导致拟南芥叶面气孔开度变小、气孔开放面积指数降低、气孔关闭率提高(图2)。当SO₂浓度为90 mg·m⁻³时,气孔开放程度显著降低,气孔开度为对照的67.1%,气孔开放面积指数为对照的33.8%,气孔关闭率为对照的4.21倍。

2.3 对植株生长发育的影响

SO₂暴露对拟南芥植株的生长发育具有双向作用,较低浓度SO₂暴露对植株的生长发育有一定的促进作用,高浓度SO₂暴露会抑制植株的生长发育,使株高、单株叶片数和单叶面积呈浓度依赖性减少

图 1 SO_2 暴露对拟南芥叶片形态的影响Figure 1 Effect of SO_2 exposure on the morphology of leaves of *Arabidopsis thaliana*图 2 SO_2 暴露对拟南芥叶片气孔开放的影响Figure 2 Effect of SO_2 exposure on stomatal aperture in leaves of *Arabidopsis thaliana*

(图 3)。浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ 的 SO_2 暴露 14 d 后拟南芥植株的平均单叶面积和可溶性蛋白质含量与对照接近,但株高和单株叶片数分别比对照增加了 11% 和 10%,表现对生长发育的促进作用。相反, $30 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ 的 SO_2 暴露后拟南芥的株高、单株叶片数和单叶面积分别为对照的 57%、82% 和 91%,可溶性蛋白质的含量比对照降低了 7.19%。 $90 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ SO_2 暴露组的株高、叶片数和单叶面积分别为对照组的 38.9%、68.9% 和 61.4%,可溶性蛋白质的含量比对照降低了 7.61%,显示明显的抑制效应。

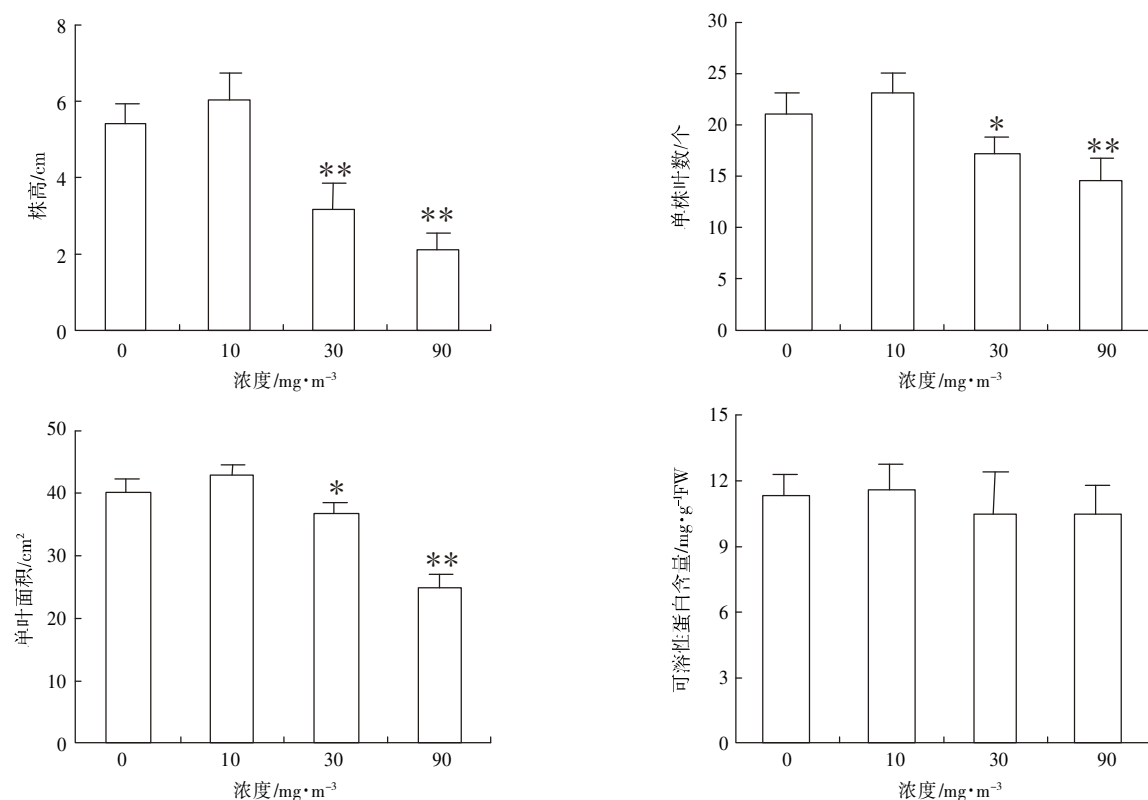
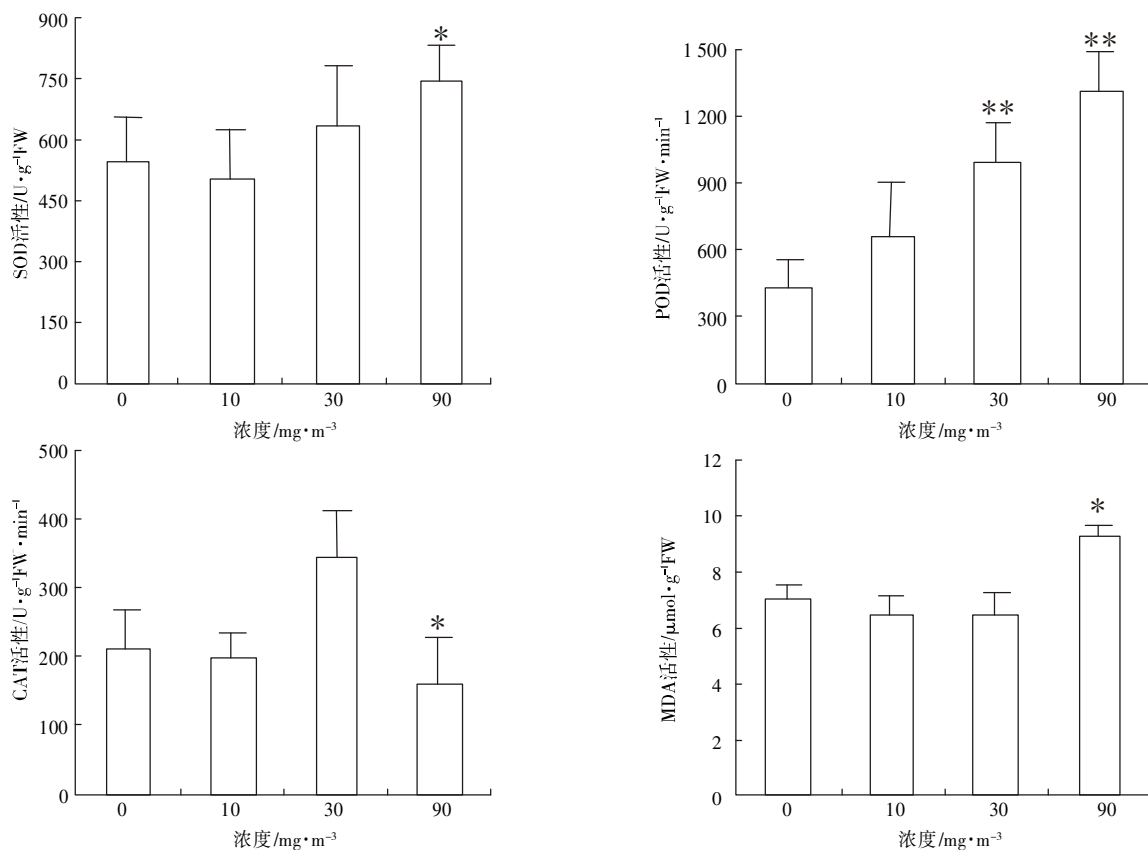
2.4 对拟南芥抗氧化酶活性和 MDA 含量的影响

拟南芥 POD、SOD 和 CAT 对 SO_2 暴露具有不同的响应特征 (图 4)。拟南芥暴露于 $10 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ 的 SO_2 时, SOD 和 CAT 活性变化不大。 SO_2 浓度为 $30 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ 时, 3 种保护酶的活性均高于对照, POD、SOD 和 CAT 活性分别比对照增加了 129.57%、15.84% 和 65.10%。当 SO_2 浓度为 $90 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ 时, POD 和 SOD 活性显著增

强, 分别比对照增加了 202.58% 和 35.71%, 但 CAT 活性被抑制, MDA 含量比对照增加 33.00%, 与叶面可见伤害相对应, 其余两浓度组的 MDA 含量无明显改变。

3 讨论

大气中的 SO_2 主要通过气孔进入植物体, 气孔在 SO_2 胁迫生理中具有重要作用。拟南芥暴露于 SO_2 时, 叶片气孔开度变小、关闭率提高, 气孔开放面积指数降低, 使进入植物体的 SO_2 量减少, 以提高植物对环境的耐受性, 这是植物对逆境胁迫的一种响应机制。植物吸收 SO_2 后气孔关闭可能与叶片 ABA 含量增高有关, 后者能抑制保卫细胞 H^+/K^+ 交换, 促进苹果酸特有渗漏, 导致膨压降低、气孔关闭^[12]; 此外, SO_2 诱导产生的 H_2O_2 可以作为信号分子, 调节气孔运动和基因表达^[13], 如引起胞质 Ca^{2+} 升高, 介导气孔关闭^[14]。但是, 气孔关闭过多也可能影响植株与外界的气体交换, 干扰生长发育^[15]。

图3 SO_2 暴露对拟南芥植株生长发育的影响Figure 3 Effect of SO_2 exposure on plant growth and development in *Arabidopsis thaliana*图4 SO_2 暴露对拟南芥抗氧化酶活性和 MDA 含量的影响Figure 4 Effects of SO_2 exposure on activities of antioxidant enzymes and the content of MDA in *Arabidopsis thaliana* plants

SODs、CATs 和 PODs 是植物抗氧化系统中重要的保护酶,在 SO_2 胁迫时,被不同程度地诱导合成,参与对活性氧的淬灭。拟南芥暴露于 $10 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3} \text{SO}_2$ 时, SOD 和 CAT 活性无明显变化,胞内少量的 H_2O_2 在 POD 氧化相应基质时被清除,叶面无伤害症状。Kubo 等^[16]也发现低浓度 SO_2 暴露后拟南芥 SOD 和 CAT 不敏感,POD 活性增高,与本结果一致。随着 SO_2 暴露浓度的增加,对植株的氧化胁迫增强, $30 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3} \text{SO}_2$ 组的 SOD、POD 和 CAT 活性诱导性增强,SOD 将 O_2^- 歧化为 H_2O_2 , H_2O_2 的清除主要依赖于 POD 和 CAT 的共同作用,3 种酶协同作用有效清除活性氧,减缓细胞氧化损伤^[17],维持 MDA 含量与对照接近;叶面局部透明斑和坏死斑的出现类似于植物对病原菌的超敏反应,对植株获得系统性抗性具有一定意义^[18]。当 SO_2 浓度达 $90 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ 时,SOD 活性显著提高,加速了 O_2^- 的歧化,导致 H_2O_2 的大量产生, O_2^- 和 H_2O_2 可与 CAT 反应形成复合物,抑制 CAT 活性^[19],此时虽然 POD 活性增强,对叶面的伤害却增大,MDA 含量增加,与刘荣坤^[12]的研究结果一致。胞内 H_2O_2 不能及时清除,可生成毒性更强的 $\cdot\text{OH}$ 。活性氧可直接攻击生物大分子,引起蛋白质降解、膜脂过氧化、DNA 断裂等,从而导致细胞不可逆损伤。对转 SOD 基因的烟草、矮牵牛和番茄植株的研究也表明,SOD 与其他抗氧化酶活性的相互平衡非常重要,单纯 SOD 过量表达往往是有害的^[20],所以要提高植物抗 SO_2 的能力,必需保持整个抗氧化系统的完整和系统的高活性。

高浓度 SO_2 暴露后,气孔开放面积减少影响 CO_2 摄入,叶片伤害斑出现使同化面积减小,胞内大量 H_2O_2 使卡尔文循环中的关键酶钝化^[3],抑制植株对 CO_2 的固定,从而导致植株光合作用强度减弱,生长发育抑制,使株高、单株叶片数和单叶面积降低,可溶性蛋白质含量下降。

4 结 论

低浓度 SO_2 暴露后,拟南芥能通过生理与形态改变适应环境胁迫,如控制气孔开放、提高抗氧化酶活性,并可能通过某种机制使系统获得抗性,提高植物抗逆性。但是,当植株暴露于高浓度 SO_2 时,胞内产生的活性氧超出了抗氧化系统的清除能力,导致细胞氧化损伤,胞内 MDA 含量增高,叶面出现明显可见伤害,植株生长发育受到抑制。

参 考 文 献:

- [1] Rakwal R, Agrawal G K, Kubo A, et al. Defense/stress responses elicited in rice seedlings exposed to the gaseous air pollutant sulfur dioxide[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2003, 49:223–235.
- [2] Yi H L, Liu J, Zheng K. Effect of sulfur dioxide hydrates exposure on cell cycle, sister chromatid exchange and micronuclei in barley seedlings[J]. *Ecotoxicology and Environment Safety*, 2005, 62:421–426.
- [3] 钱永常,余叔文. SO_2 对植物的氧化作用和植物的抗氧化作用[J]. 植物生理学通讯, 1991, 27(5):326–331.
- [4] 郝林,张惠文,徐昕,等. 二氧化硫对小麦的氧化胁迫及其某些信号分子的调节[J]. 应用生态学报, 2005, 16(6):1038–1042.
- [5] Kong F X, Hu W, Chao S Y, et al. Physiological responses of the lichen *Xanthoparmelia mexicana* to oxidative stress of SO_2 [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 1999, 42, 3, 201–209.
- [6] 郑淑颖. 二氧化硫污染对植物影响的研究进展[J]. 生态科学, 2000, 19(1):59–64.
- [7] Kopriva S. Regulation of sulfate assimilation in *Arabidopsis* and beyond[J]. *Annals of Botany*, 2006, 97:479–495.
- [8] Rao M V, Paliyath G, Ormrod D P. Ultraviolet-B and ozone induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Physiology*, 1996, 110:125–136.
- [9] Cho U H, Seo N H. Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation[J]. *Plant Science*, 2005, 168:113–120.
- [10] 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社, 2003. 15–16.
- [11] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社, 2000.164–167.
- [12] 刘荣坤. 二氧化硫对植物伤害及其机理的研究[J]. 中国环境科学, 1982,(6): 75–78.
- [13] 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.
- [14] Pei Z M, Murata Y, Benning G, et al. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells[J]. *Nature*, 2000, 406:731–734.
- [15] 唐鸿寿, Aoki M, Totsuka T. 马尾松幼苗对 SO_2 慢性伤害的反应[J]. 生态学报, 2005, 25(2): 375–379.
- [16] Kubo A, Saji H, Tanaka K, et al. Expression of *Arabidopsis* cytosolic ascorbate peroxidase gene in response to ozone or sulfur dioxide[J]. *Plant Molecular Biology*, 1995, 29: 479–489.
- [17] 郭泽建,李德葆. 活性氧与植物抗病性[J]. 植物学报, 2000, 42(9): 881–891.
- [18] Desikan R, Mackerness S A H, Hancock J T, et al. Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress[J]. *Plant Physiology*, 2001, 127:159–172.
- [19] Lee M Y. Effects of Na_2SO_3 on the activities of antioxidant enzymes in geranium seedlings[J]. *Phytochemistry*, 2002, 59: 493–499.
- [20] 杜秀敏,殷文璇,张慧,等. 超氧化物歧化酶(SOD)研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(1):48–74.