

## 气体甲醛胁迫对蚕豆保卫细胞中过氧化氢的积累和气孔导度及开度的影响

孙慧群<sup>1,2</sup>, 周升恩<sup>1</sup>, 吴怀胜<sup>1</sup>, 李昆志<sup>1</sup>, 陈丽梅<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>昆明理工大学生命科学与技术学院, 昆明呈贡650500; <sup>2</sup>安庆师范学院资源环境系, 安徽安庆246011

**摘要:** 以蚕豆为材料, 考察气体甲醛(HCHO)胁迫对保卫细胞H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>积累和叶片气孔导度、开度的影响。结果表明: 气体HCHO胁迫增加了叶片中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的积累, 荧光显微分析发现在较低浓度(0.2~0.4 μmol·L<sup>-1</sup>)气体HCHO胁迫下, 保卫细胞中增加的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>主要分布在细胞质中, 高浓度(0.8~1.6 μmol·L<sup>-1</sup>)气体HCHO胁迫不仅增加保卫细胞质中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的积累, 而且显著增加叶绿体中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的含量及积累H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的叶绿体数量, 这说明在高浓度气体HCHO胁迫下蚕豆保卫细胞中增加的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>主要来源于叶绿体和细胞质。保卫细胞中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>积累的增加显著降低蚕豆的气孔导度和开度, 从而导致蚕豆HCHO吸收效率下降。气体HCHO胁迫下叶片中抗氧化酶活性的变化可能是H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>积累增加的主要原因, 气体HCHO胁迫显著增强叶片中CAT和SOD的活性, 但只有低浓度HCHO胁迫诱导叶片POD活性, 叶片APX对HCHO胁迫很敏感, 低浓度的气体HCHO对叶片APX活性都有显著的抑制作用。

**关键词:** 气体甲醛胁迫; 蚕豆; 保卫细胞; 过氧化氢积累; 抗氧化酶

## Effects of Gaseous Formaldehyde Stress on the Accumulation of Hydrogen Peroxide in Guard Cells and the Stomata Conductance and Aperture of *Vicia faba*

SUN Hui-Qun<sup>1,2</sup>, ZHOU Sheng-En<sup>1</sup>, WU Huai-Sheng<sup>1</sup>, LI Kun-Zhi<sup>1</sup>, CHEN Li-Mei<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Life Science and Biotechnology, Kunming University of Science and Technology, Chenggong, Kunming 650500, China; <sup>2</sup>Department of Resource and Environment, Anqing Normal College, Anqing, Anhui 246011, China

**Abstract:** Using *Vicia faba* as the material, effects of gaseous formaldehyde (HCHO) stress on the accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in guard cells, the stomata conductance and aperture were investigated. The results showed that the gaseous HCHO stress increased the accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in leaves. The fluorescence microscopic analysis indicated that the increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in guard cells mainly distributed in the cytoplasm under low levels (0.2–0.4 μmol·L<sup>-1</sup>) of gaseous HCHO stress. High levels (0.8–1.6 μmol·L<sup>-1</sup>) of gaseous HCHO stress significantly increased not only the accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the cytoplasm of guard cells but also the content of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in chloroplasts and the number of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-accumulated chloroplasts. The data suggested that the accumulated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in guard cells mainly originated from chloroplasts and the cytoplasm under high levels of gaseous HCHO stress. The accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in guard cells significantly decreased the stomatal conductance and aperture, leading to a decline in the HCHO absorption efficiency of *V. faba*. The accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in leaves might originate from the changes of antioxidant enzyme activities in leaves under gaseous HCHO stress. The gaseous HCHO stress significantly enhanced the activities of CAT and SOD in leaves. However, only low levels of gaseous HCHO induced the activity of POD. APX was sensitive to HCHO stress and even a low level of HCHO stress could inhibit its activity remarkably.

**Key words:** gaseous formaldehyde stress; *Vicia faba*; guard cell; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation; antioxidant enzyme

植物通过控制叶片气孔的开闭来控制它与外界环境的气体和水交换, 以适应复杂多变的环境。气孔开放活动对环境的非生物胁迫非常敏感, 大量研究表明保卫细胞内调节气孔运动的机制可以对环境非生物胁迫产生应答, 从而使保卫细胞中的K<sup>+</sup>、苹果酸及糖类物质等渗透调节物质的含量及其离子通道的功能发生变化; 脱落酸(abscisic acid, ABA)、一氧化氮(nitric oxide, NO)、过氧化

氢(hydrogen peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)等气孔运动信号分子的产生和消除机制也随之发生变化(Franks和Farquhar 2001; 杨铁钊等2004; 柯世省2007; 高春娟等2012; 李惠民等2013)。在这些生理变化产生过程

收稿 2014-12-15 修定 2015-01-26

资助 国家自然科学基金(30970263)。

\* 通讯作者(E-mail: chenlimeikm@126.com; Tel: 0871-65920213)。

中,  $H_2O_2$ 既是气孔运动信号转导过程成员(程艳丽和宋纯鹏2005), 又是导致氧化损伤的一种活性氧。

已有研究表明, 甲醛(formaldehyde, HCHO)胁迫也增加植物叶片内活性氧如 $H_2O_2$ 的积累, 引发自由基过氧化损伤, 加剧植物体内膜脂和蛋白质的过氧化作用(安雪等2010; 轩秀霞等2013)。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、过氧化物酶(peroxidase, POD)及抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)等是植物清除体内多余活性氧的重要抗氧化酶, HCHO胁迫不严重时植物可通过调节细胞内抗氧化酶活性来清除过多活性氧, HCHO胁迫严重时这些酶活性的调控系统被破坏, 导致植物抗氧化胁迫能力下降(魏梅红等2007; 赵辉等2009)。cDNA芯片分析结果表明HCHO胁迫抑制拟南芥中大量POD相关基因的表达可能是HCHO胁迫导致拟南芥叶片中 $H_2O_2$ 过量积累并引发氧化损伤的主要原因(Wang等2012)。相关研究表明, 气体HCHO胁迫会降低叶片气孔导度, 从而使植物对气体HCHO的吸收能力减弱(Schmitz等2000; 轩秀霞等2013)。蚕豆(*Vicia faba*)是观察保卫细胞气孔活动的模式植物, 韦立秀等(2008)的研究表明蚕豆叶片气孔的长度和宽度均随气体HCHO胁迫浓度的增加和处理时间的延长而变小。本研究以蚕豆为材料, 通过测定不同浓度气体HCHO胁迫下蚕豆叶片 $H_2O_2$ 含量和气孔导度及开度的变化, 并用 $H_2O_2$ 的荧光染料原位观察叶片保卫细胞中 $H_2O_2$ 的积累和分布情况, 考察气体HCHO下叶片中 $H_2O_2$ 积累和植物叶片气孔导度和开度的变化是否有关联性。

## 材料与方法

### 1 材料

蚕豆(*Vicia faba* L.)云南品种‘8363’种子由云南省农业科学院粮食作物研究所提供, 选择饱满种子进行烫种, 烫死病菌和虫卵, 25 °C黑暗下催芽萌发, 待根长出2 cm转入红壤和珍珠岩(6:1体积比)中进行盆栽, 长到3对叶时选择长势一致的健壮植株用于气体HCHO的胁迫处理和相关检测。

### 2 方法

#### 2.1 气体HCHO胁迫处理

用自制气体HCHO吸收测量系统(Song等2010)对盆栽蚕豆进行气体HCHO胁迫处理和

HCHO吸收效率的测定。为避免土壤及土壤微生物对试验结果产生影响, 试验时花盆用PV袋密封, 以没有栽蚕豆植株的花盆为对照检测系统的密封性和HCHO的泄漏情况[结果说明系统的密封性很好(图1-D)]。试验操作方法如下: 滴加适量37% HCHO溶液于小海绵球上, 将海绵球悬挂于测量系统的密封玻璃箱内, 气体HCHO从海绵球中挥发, 挥发的气体HCHO浓度通过测量系统中连接HCHO传感器( $CH_2O/C-10$ , MEMBRAPOR, Switzerland)的显示器监测, 在HCHO浓度分别接近0、0.2、0.4、0.8、1.6  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时将盆栽蚕豆植株放入玻璃箱中, 在玻璃箱内初始气体HCHO浓度达到上述浓度时将海绵球取出, 胁迫处理1 h后取叶片进行 $H_2O_2$ 含量和抗氧化酶活性的测定。在普通光学显微镜下用测微尺测量叶片下表皮气孔开度, 用气孔计测定叶片的气孔导度。用 $H_2O_2$ 的荧光染料处理叶片下表皮, 在荧光显微镜(Olympus CFM-400E)下观察 $H_2O_2$ 在保卫细胞内的分布情况。通过显示器观察玻璃箱内剩余气体HCHO浓度, 计算HCHO吸收效率, 箱内HCHO浓度从1 h后开始下降, 分别在60、70、80、90、100、110和120 min时记录箱内剩余气体HCHO浓度, HCHO吸收效率以相同时间内每棵植株单位面积的叶片使箱内HCHO浓度下降量表示(单位:  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ )。在整个胁迫处理过程中, 玻璃箱内初始和终末的平均温度、湿度分别为30 °C $\pm$ 1.91 °C、30% $\pm$ 0.33%和32 °C $\pm$ 0.79 °C、75% $\pm$ 0.85%。

#### 2.2 $H_2O_2$ 含量测定

取0.5 g叶片, 液氮研磨后加1 mL预冷的丙酮匀浆, 12 000 $\times$ g离心10 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 dd $H_2O$ 混匀, 4 000 $\times$ g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(Gay和Gebicki 2003)。

#### 2.3 抗氧化酶活性测定

取0.5 g叶片, 加3 mL预冷的50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(含0.1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙二胺四乙酸, pH=7.4、0.3% (W/V) Triton X-100、4% (W/V) 的聚乙烯吡咯烷酮)匀浆, 4 °C、12 000 $\times$ g离心15 min, 上清液为酶提取液。POD活性测定采用愈创木酚法(程鹏等2013), 以 $\text{OD}_{470}$ 每分钟增加0.01为一个酶活力单位(U)。SOD活性测定采用氮蓝四唑(nitroblue tetrazolium, NBT)光还原法(于孝保等2012), 以抑制

NBT光化还原的50%为一个酶活力单位(U)。APX活性参照Cao等(2004)的方法,以每分钟氧化1  $\mu\text{mol}$ 抗坏血酸的酶量为一个酶活力单位(U)。CAT活性测定用紫外分光光度法(刘燕湘等2013),以 $\text{OD}_{240}$ 每分钟减少0.1的酶量为一个酶活力单位(U)。

#### 2.4 保卫细胞中 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的原位观察

参照张小莉等(2009)的方法稍加改动,用 $\text{H}_2\text{O}_2$ 荧光探针在荧光显微镜下观察 $\text{H}_2\text{O}_2$ 在叶片保卫细胞中的分布情况。蚕豆叶片用 $\text{ddH}_2\text{O}$ 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,  $\text{pH}=6.1$ )中培养。然后从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,  $\text{pH}=7.2$ )的EP管中培养,加入终浓度为50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 荧光探针H2DCFDA (2',7'-二氯二荧光素乙二脂)(溶于二甲亚砜,小包装冷冻保存),混匀后

室温避光孵育20 min。将负载H2DCFDA的表皮条用新鲜负载缓冲液漂洗2次,洗去细胞表层多余的探针,然后用盖玻片迅速将表皮条固定在显微镜载物台上,在荧光显微镜(激发波长420~485 nm)下观察保卫细胞内绿色荧光的分布,用摄像软件Tsview 7记录保卫细胞内的荧光亮度,通过绿色荧光的亮度定性观察保卫细胞内 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的含量。

#### 3 数据统计分析

所有的生理生化指标测定结果取3次生物学重复的平均值 $\pm$ 标准差,用SPSS 19.0对所得数据进行统计学和差异显著性分析。

### 实验结果

#### 1 气体HCHO胁迫下蚕豆叶片内 $\text{H}_2\text{O}_2$ 含量、气孔导度和开度、HCHO吸收效率的变化

分析不同浓度气体HCHO胁迫下蚕豆叶片

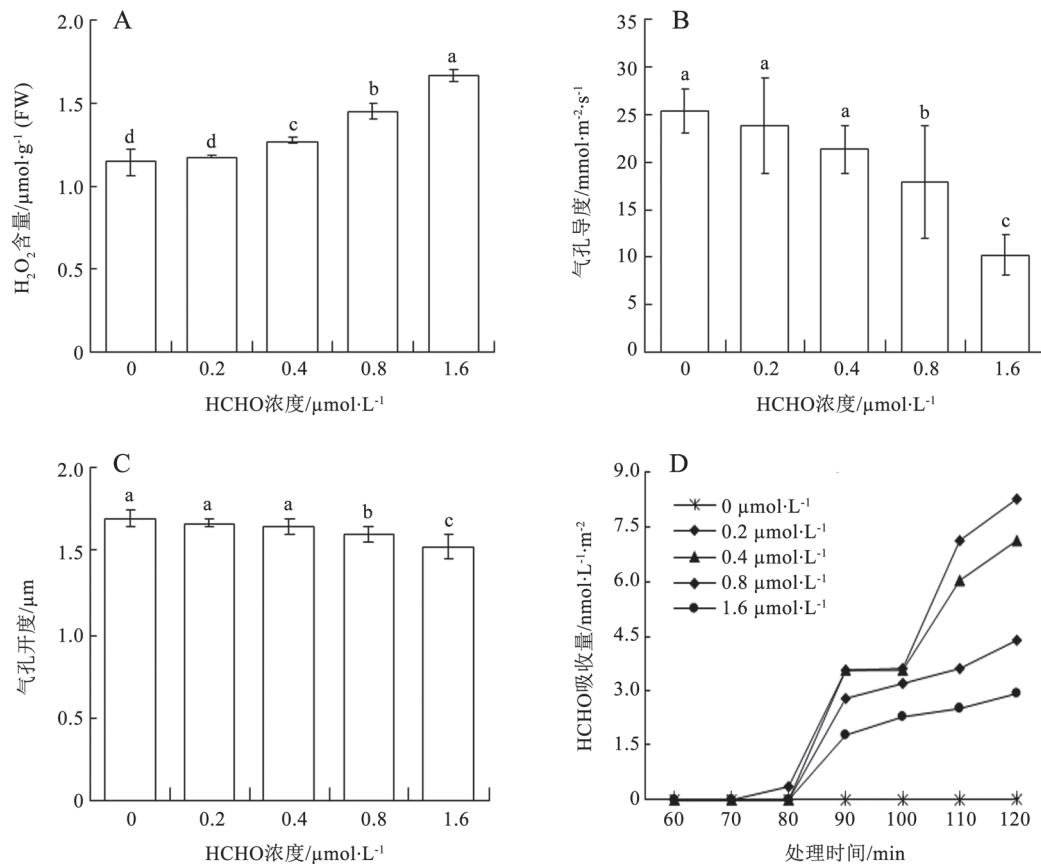


图1 不同浓度气体HCHO胁迫对蚕豆叶片 $\text{H}_2\text{O}_2$ 含量(A)、气孔导度(B)、开度(C)和HCHO吸收(D)的影响  
Fig.1 Effects of different concentrations of gaseous HCHO on the  $\text{H}_2\text{O}_2$  content (A), stomatal conductance (B), aperture (C) and HCHO uptake (D) in *V. faba* leaves  
各柱形上不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ ), 下图同此。



H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量(图1-A)、气孔导度(图1-B)及开度(图1-C)的变化,结果显示,在较低浓度(0.2 μmol·L<sup>-1</sup>)的气体HCHO胁迫下蚕豆叶片H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量、气孔导度和开度与没有HCHO胁迫处理组(0 μmol·L<sup>-1</sup>)相比均无显著差异( $P>0.05$ );此后随着HCHO浓度从0.2 μmol·L<sup>-1</sup>升高至1.6 μmol·L<sup>-1</sup>过程中,叶片H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量逐渐升高(图1-A,  $P<0.05$ ),而气孔导度则在HCHO浓度从0.4 μmol·L<sup>-1</sup>升高至1.6 μmol·L<sup>-1</sup>过程中逐渐降低(图1-B,  $P<0.05$ ),气孔开度在HCHO浓度升高至0.8 μmol·L<sup>-1</sup>后显著减小(图1-C,  $P<0.05$ )。通过观察测量装置中剩余HCHO浓度估算HCHO吸收量,制作HCHO吸收曲线(图1-D),结果说明,随HCHO浓度的升高,蚕豆HCHO吸收效率降低。这些结果说明高浓度气体HCHO胁迫增加了蚕豆叶片中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量,并降低了蚕豆的气孔导度和开度,导致蚕豆HCHO吸收效率下降。

## 2 不同浓度气体HCHO胁迫下蚕豆叶片保卫细胞内H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量和分布的变化

用荧光显微镜观察H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>在叶片保卫细胞中的分布情况,结果发现,0.2 μmol·L<sup>-1</sup>和没有HCHO胁迫处理组的叶片保卫细胞细胞质中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>荧光亮度相似,积累H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的叶绿体数大致相同(约为11个,图2-A、B);当气体HCHO浓度从0.2 μmol·L<sup>-1</sup>提高至0.4 μmol·L<sup>-1</sup>时,叶片保卫细胞中含H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>叶绿体数

没有增加(仍为11个),但分布在细胞质中的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>荧光亮度增强(图2-C);在HCHO浓度从0.4 μmol·L<sup>-1</sup>升高至1.6 μmol·L<sup>-1</sup>过程中,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>几乎充满整个保卫细胞的细胞质空间,含有H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的叶绿体数量显著增多(约为16和20,图2-D、E),叶绿体中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>荧光亮度也显著增强。这些结果说明较低浓度(0.2~0.4 μmol·L<sup>-1</sup>)气体HCHO胁迫诱导蚕豆保卫细胞中积累的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>主要分布在细胞质中,在高浓度(0.8~1.6 μmol·L<sup>-1</sup>)气体HCHO胁迫下,不仅保卫细胞细胞质中积累的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>增多,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>在叶绿体中的积累也显著增多,积累H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的叶绿体数显著增加。

## 3 不同浓度气体HCHO胁迫下蚕豆叶片抗氧化酶活性的变化

CAT、SOD、POD和APX等抗氧化酶是植物体内清除多余活性氧的重要酶,分析蚕豆叶片中这4种酶活性的变化,结果发现,与没有HCHO胁迫处理组相比,在0.2~0.4 μmol·L<sup>-1</sup>的气体HCHO胁迫下,蚕豆叶片中的CAT活性上升很显著(图3-A),从32.49 U·g<sup>-1</sup> (FW)分别提高到98.27和132.48 U·g<sup>-1</sup> (FW);当气体HCHO的浓度上升至0.8~1.6 μmol·L<sup>-1</sup>后,叶片中CAT活性仍在上升,但上升幅度不明显(图3-A)。SOD活性变化模式与CAT相似(图3-B),在0.2~0.4 μmol·L<sup>-1</sup>的气体HCHO胁迫下,叶片SOD活性显著增强,从208.39 U·g<sup>-1</sup> (FW)分别上升到

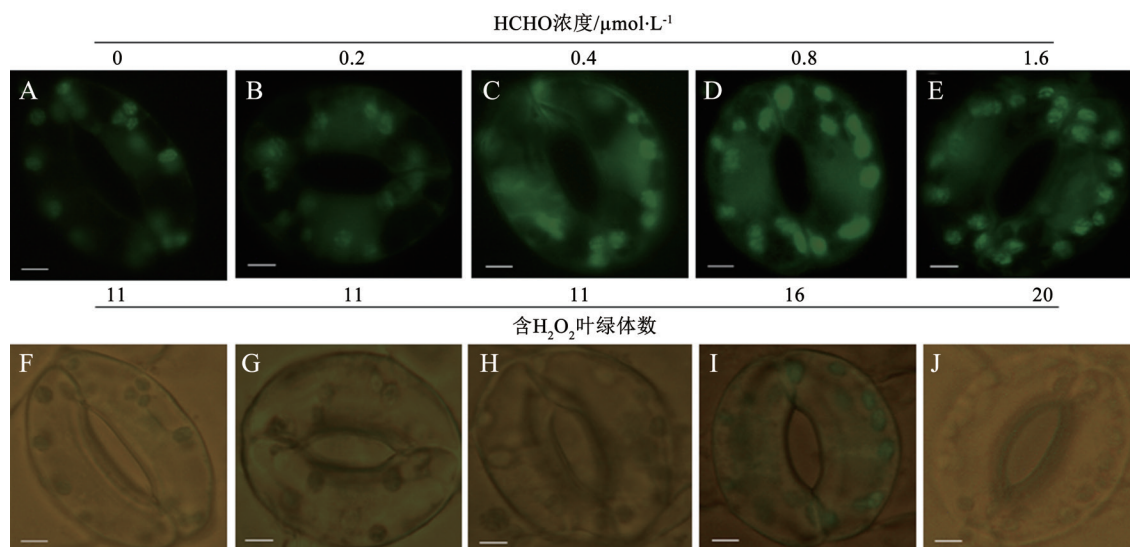


图2 不同浓度气体HCHO胁迫下蚕豆叶片保卫细胞中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>分布的原位观察

Fig.2 Observation of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> localization in guard cells of *V. faba* leaves treated with different concentrations of gaseous HCHO

A~E: 激发波长为420~485 nm的蓝光下观察保卫细胞中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的荧光分布; F~J: 相同放大倍数下用普通光源观察保卫细胞的形状和轮廓。标尺=2 μm。

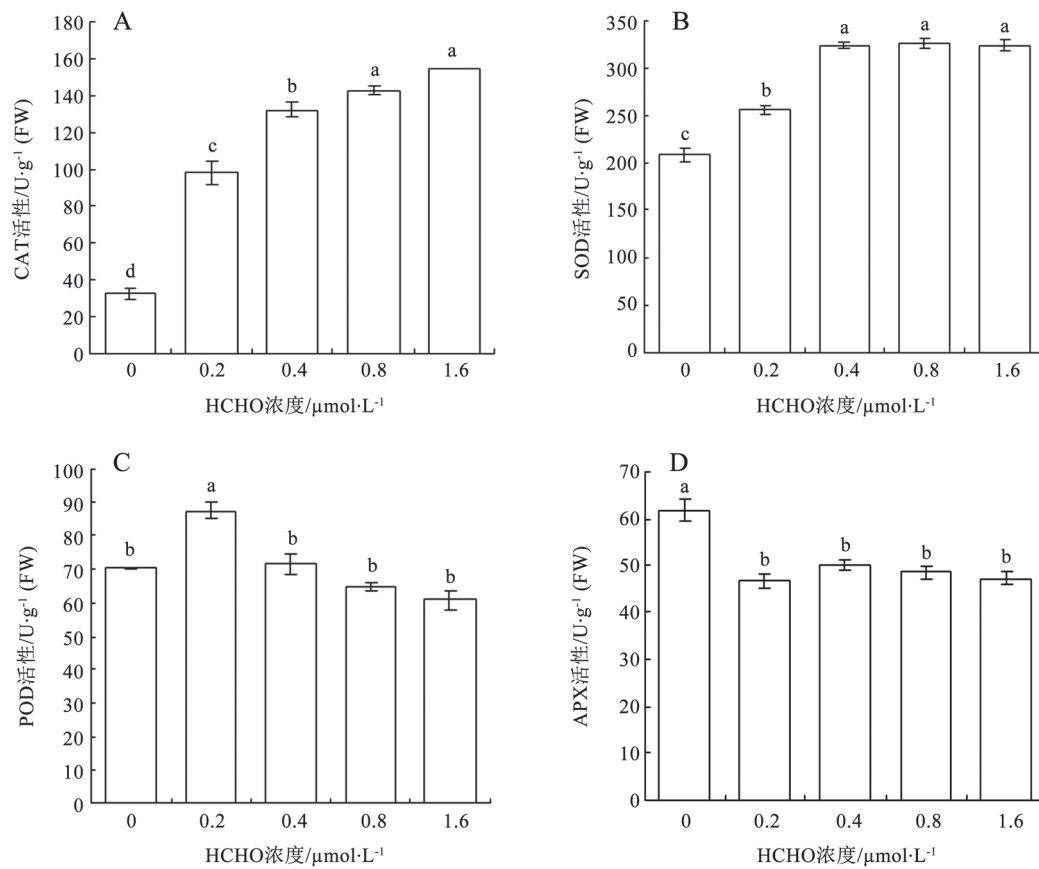


图3 不同浓度气体HCHO胁迫对蚕豆叶片CAT、SOD、POD和APX活性的影响

Fig.3 Effects of different concentrations of gaseous HCHO on the activities of CAT, SOD, POD and APX in *V. faba* leaves

256.29和323.38  $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ ); 气体HCHO胁迫水平提高至0.8~1.6  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 叶片中SOD活性没有持续增加(图3-B)。POD活性的变化随着HCHO浓度升高呈先上升后下降的模式(图3-C), 在0.2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的HCHO胁迫下, 叶片中POD活性从70.35  $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ 上升到87.33  $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ ; 当气体HCHO胁迫浓度提高至0.4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, POD活性降至71.53  $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ ; 此后随气体HCHO的继续升高POD活性回落至正常水平(图3-C)。在0.2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的HCHO胁迫下, 叶片中APX活性从61.66  $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ 下降到47.0837  $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ ; 此后随气体HCHO胁迫浓度的上升叶片APX活性维持不变(图3-D)。这些结果说明HCHO胁迫对蚕豆叶片CAT和SOD活性具有显著诱导作用; 仅低浓度HCHO胁迫对叶片POD活性有诱导作用; 叶片APX对HCHO胁迫似乎很敏感, 低浓度的气体HCHO对叶片APX都有显著的抑制作用。

## 讨 论

植物细胞在正常的生理代谢过程中产生少量的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、 $\text{O}_2^-$ 、 $\cdot\text{OH}$ 等活性氧, 受到环境胁迫时会造成大量活性氧积累(Bowler等1992; Foyer等1994)。SOD是植物体内清除活性氧的第一条防线, 催化 $\text{O}_2^-$ 发生歧化反应生成 $\text{O}_2$ 和 $\text{H}_2\text{O}_2$ , 随后 $\text{H}_2\text{O}_2$ 被APX、CAT、POD等抗氧化酶清除, 以维持植物体正常生理功能。本研究结果说明低浓度(0.2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )气体HCHO胁迫并没有显著增加蚕豆叶片 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的积累, 气体HCHO浓度持续升高后叶片中 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的含量才逐渐上升, 这一结果可能和叶片中抗氧化酶活性的变化有关。在较低浓度(0.2~0.4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )HCHO的胁迫下, 蚕豆叶片SOD活性迅速升高(图3-B), 这可能是因为HCHO胁迫在叶片中诱发了大量 $\text{O}_2^-$ 产生, SOD活性的提高将其歧化成 $\text{H}_2\text{O}_2$ 和 $\text{O}_2$ 以消除 $\text{O}_2^-$ 的毒性(Allan和Fluhr 1997), 但在低浓度HCHO胁迫下, 叶片中CAT和POD活性也显著上升

(图3-A、C), 二者共同作用使得叶片中 $H_2O_2$ 含量维持在正常水平附近(图1)。在高浓度( $0.4\sim 1.6\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) HCHO胁迫下, 叶片中虽然CAT活性显著增强(图3-A), 但POD活性已经回落至正常水平(图3-C), 而APX活性低于正常水平(图3-D), 由于 $H_2O_2$ 与CAT亲和力较弱(Willekens等1997), 因此叶片中 $H_2O_2$ 不能被迅速清除, 从而使其含量显著升高(图1)。

$H_2O_2$ 在蚕豆叶片保卫细胞中的定位观察结果说明,  $0.2\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的气体HCHO胁迫没有增加保卫细胞中 $H_2O_2$ 的积累(图2-A、B), 在较高浓度( $0.4\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )的气体HCHO胁迫下, 保卫细胞细胞质中 $H_2O_2$ 积累量增加(图2-C)。原因可能是: (1)细胞质基质中有Cu/Zn-SOD (Asada 1994), 较高浓度的HCHO胁迫可能使细胞质中产生大量 $O_2^-$ , 使得Cu/Zn-SOD活性应激性升高(图3-B), 将大量 $O_2^-$ 转化成 $H_2O_2$ ; (2)由于 $H_2O_2$ 具有较高的跨膜通透性, 由过氧化物酶体、乙醛酸循环体等细胞器和线粒体呼吸电子传递链产生的 $H_2O_2$ 都有可能进入细胞质; (3)质膜上的氧化还原酶系统是产生 $H_2O_2$ 的重要部位(Rubinstein和Luster 1993), 位于质膜外侧的过氧化物酶、NADPH氧化酶及多胺氧化酶等催化的反应都可以产生 $H_2O_2$ , 质膜上还原型的电子载体也可以氧化产生 $H_2O_2$ 和 $O_2^-$ , 后者经SOD催化形成 $H_2O_2$ (程艳丽和宋纯鹏2005), 这些 $H_2O_2$ 也都能进入细胞质基质。在 $0.4\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的气体HCHO胁迫下, 叶片中POD的活性已经回落至正常水平(图3-C), 细胞质中虽然有两种胞质APX可以参与 $H_2O_2$ 的清除(Willekens等1994), 但是蚕豆叶片APX活性在很低浓度的气体HCHO胁迫下已经被显著抑制(图3-D); 活性增强的CAT对 $H_2O_2$ 亲和性较弱, 这些原因导致了细胞质基质中 $H_2O_2$ 大量积累。在高浓度( $0.8\sim 1.6\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )气体HCHO胁迫下, 不仅保卫细胞细胞质中 $H_2O_2$ 积累量增加, 而且叶绿体中 $H_2O_2$ 的积累量也显著增强, 且含有 $H_2O_2$ 的叶绿体数也显著增多(图2-D、E), 这说明高浓度气体HCHO胁迫下, 叶绿体也是蚕豆保卫细胞 $H_2O_2$ 产生的主要场所(Hernández等1995; Trubitsin等2014)。叶绿体中APX是清除 $H_2O_2$ 的关键酶(Dalton等1987; Ivanov等2011), 但高浓度气体HCHO胁迫下叶片中APX活性被显著抑制(图3-D), CAT通常位于过氧化物酶

体和乙醛酸循环体中, 主要降解这两个细胞器中的 $H_2O_2$ , 叶绿体中不含CAT (Asada 1999; Willekens等1994; 王仁雷等2001; Giacomelli等2007), 这些可能是高浓度气体HCHO胁迫导致叶绿体中 $H_2O_2$ 积累量增加的主要原因。

很多研究表明环境胁迫诱导 $H_2O_2$ 在植物叶片保卫细胞内的过量积累会降低气孔导度, 甚至导致气孔关闭, 外源施用 $H_2O_2$ 也有相似的效果(Bestwick等1997; 宋喜贵和余小平2011; 李惠民等2013)。 $H_2O_2$ 通过降低质膜 $K^+_{in}$ 通道电流, 增加 $K^+_{out}$ 通道电流, 抑制胞外 $K^+$ 内流或加强胞内 $K^+$ 外流来减少气孔的开度, 最终导致气孔关闭(安国勇等2000)。本研究结果说明在气体HCHO胁迫下, 随着HCHO浓度的升高, 蚕豆叶片中 $H_2O_2$ 的含量升高, 叶片气孔导度和开度降低, 这应该是由气体HCHO胁迫诱导 $H_2O_2$ 在保卫细胞中积累的结果。

### 参考文献

- 安国勇, 宋纯鹏, 张晓, 荆艳彩, 阳冬梅, 黄美娟, 周培爱, 吴才宏(2000). 过氧化氢对蚕豆气孔运动和质膜 $K^+$ 通道的影响. 植物生理学报, 26 (5): 458-464
- 安雪, 李霞, 潘会堂, 罗竞男, 张启翔(2010). 16种室内观赏植物对甲醛净化效果及生理生化变化. 生态环境学报, 19 (2): 379-384
- 程鹏, 徐鹏飞, 范素杰, 靳立梅, 吴俊江, 王金生, 张淑珍(2013). 野生大豆接种大豆疫霉根腐病菌后过氧化物酶(POD)活性变化. 大豆科学, 32 (2): 197-201
- 程艳丽, 宋纯鹏(2005). 植物细胞 $H_2O_2$ 的信号转导途径. 中国科学C辑(生命科学), 35 (6): 480-489
- 高春娟, 夏晓剑, 师恺, 周艳虹, 喻景权(2012). 植物气孔对全球环境变化的响应及其调控防御机制. 植物生理学报, 48 (1): 19-28
- 柯世省(2007). 水分胁迫对夏蜡梅气孔行为的影响. 河北师范大学学报(自然科学版), 31 (6): 798-801
- 李惠民, 张莹, 贺军民(2013). 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. 西北植物学报, 33 (5): 911-921
- 刘燕湘, 杨海萌, 赖燕芬, 郑杰娜, 张福平(2013). 杨桃果实过氧化物酶活性研究. 南方农业学报, 44 (2): 304-307
- 宋喜贵, 余小平(2011). 过氧化氢和一氧化氮在气孔运动中的作用. 淮海工学院学报(自然科学版), 20 (1): 46-50
- 王仁雷, 华春, 刘友良(2001). 叶绿体中的水-水循环. 植物生理学通讯, 37 (5): 468-470
- 韦立秀, 朱麟, 杨振德, 李明, 孙艳娟, 陈方玉(2008). 蚕豆叶片气孔对甲醛污染的反应研究. 安徽农业科学, 36 (18): 7570-7571
- 魏梅红, 李机密, 马华章, 陈登龙, 李敏(2007). 芦荟植物SOD酶对甲醛气体胁迫的应答. 安全与环境学报, 7 (2): 29-31
- 轩秀霞, 肖素勤, 游览, 陈丽梅(2013). 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. 生命科学研究, 17 (2): 125-135
- 杨铁钊, 殷全玉, 丁永乐, 张玉梅(2004). 烟草气孔特性、抗氧化酶活性与臭氧伤害的关系. 植物生态学报, 28 (5): 672-679

- 于孝保, 朱继宏, 付德峰, 于永梅, 李振玲(2012). 4种蔬菜中SOD活性测定研究. 现代农业科技, (11): 82, 88
- 张小莉, 王鹏程, 宋纯鹏(2009). 植物细胞过氧化氢的测定方法. 植物学报, 44 (1): 103~106
- 赵辉, 郝振萍, 金潇潇, 刘薇萍(2009). 甲醛污染对3种室内观叶植物叶片保护酶活性的影响. 安徽农业科学, 37 (32): 15807~15808, 15845
- Allan AC, Fluhr R (1997). Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *Plant Cell*, 9 (9): 1559~1572
- Asada K (1994). Production and Action of Active Oxygen in Photosynthetic Tissue. Boca Raton FL: CRC Press, 77~104
- Asada K (1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 50 (1): 601~639
- Bestwick CS, Brown IR, Bennett MHR, Mansfield JW (1997). Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Cell*, 9 (5): 209~221
- Bowler C, Van Montagu M, Inze D (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 43 (1): 83~116
- Cao X, Ma QL, Tu C (2004). Antioxidative responses to arsenic in the arsenic-hyperaccumulator Chinese brake fern (*Pteris vittata* L.). *Environ Pollut*, 128 (3): 317~325
- Dalton DA, Hanus FJ, Russell SA, Evans HJ (1987). Purification, properties, and distribution of ascorbate peroxidase in legume root nodules. *Plant Physiol*, 83 (4): 789~794
- Foyer CH, Lelandais M, Kunert KJ (1994). Photooxidative stress in plant. *Physiol Plant*, 92 (4): 696~717
- Franks PJ, Farquhar GD (2001). The effect of exogenous abscisic acid on stomatal development, stomatal mechanics, and leaf gas exchange in *Tradescantia virginiana*. *Plant Physiol*, 125 (2): 935~942
- Gay CA, Gebicki JM (2003). Measurement of protein and lipid hydroperoxides in biological systems by the ferric-xylenol orange method. *Anal Biochem*, 315 (1): 29~35
- Giacomelli L, Masi A, Ripoll DR, Lee MJ, van Wijk KJ (2007). *Arabidopsis thaliana* deficient in two chloroplast ascorbate peroxidases shows accelerated light-induced necrosis when levels of cellular ascorbate are low. *Plant Mol Biol*, 65 (5): 627~644
- Hernández JA, Olmos E, Corpas FJ, Sevilla F, del Río L (1995). Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. *Plant Sci*, 105 (2): 151~167
- Ivanov B, Kozuleva M, Mubarakshina M (2011). Oxygen metabolism in chloroplast. In: Bubulya P (ed). *Cell Metabolism: Cell Homeostasis and Stress Response*. Rijeka: InTech, 39~72
- Rubinstein B, Luster DG (1993). Plasma membrane redox activity: components and role in plant processes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 44 (1): 131~155
- Schmitz H, Hilgers U, Weidner M (2000). Assimilation and metabolism of formaldehyde by leaves appear unlikely to be of value for indoor air purification. *New Phytol*, 147 (2): 307~315
- Song ZB, Orita I, Yin F, Yurimoto H, Kato N, Sakai Y, Izui K, Li KZ, Chen LM (2010). Overexpression of an HPS/PHI fusion enzyme from *Mycobacterium gastri* in chloroplasts of geranium enhances its ability to assimilate and phyto remediate formaldehyde. *Biotechnol Lett*, 32 (10): 1541~1548
- Trubitsin BV, Mamedov MD, Semenov AY, Tikhonov AN (2014). Interaction of ascorbate with photosystem I. *Photosynth Res*, 122 (2): 215~231
- Wang SS, Song ZB, Sun Z, Zhang J, Mei Y, Nian HJ, Li KZ, Chen LM (2012). Effects of formaldehyde stress on physiological characteristics and gene expression associated with photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol Rep*, 30 (6): 1291~1302
- Willekens H, Langebartels C, Tire D, Van Montagu M, Inzé D, Van Camp W (1994). Differential expression of catalase genes in *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 10450~10454
- Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, Van Montagu M, Inze D, Van Camp W (1997). Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defense in C<sub>3</sub> plant. *EMBO J*, 16 (16): 4806~4816