

黑大豆根系对溶液甲醛的吸收及其代谢产物分析

陈悦[#], 谭浩[#], 郭红霞, 冯泳, 陈丽梅^{*}

昆明理工大学生命科学与技术学院生物工程技术研究中心, 昆明650500

摘要: 本研究考查在2、4和6 mmol·L⁻¹甲醛(HCHO)溶液中处理的‘丹波’黑大豆(*Glycine max* cv. Tamba)根系对HCHO的吸收与代谢产物。结果表明, 在48 h处理期内根系对HCHO的吸收与时间的关系为指数函数。活体根系吸收HCHO对其去除的贡献率分别为30.1%、26.7%和23.0%, 显著大于死根系对HCHO的吸附作用, 这一结果表明活体根中发生了HCHO代谢作用。碳-13核磁共振(¹³C-NMR)分析表明, 根系吸收的H¹³CHO首先被氧化为H¹³COOH; 在H¹³CHO处理0~4 h期间, H¹³COOH被同化为草酸、甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺和丝氨酸, 在4~48 h期间, 这些有机酸被转化为苹果酸、柠檬酸、异柠檬酸和葡萄糖。4和6 mmol·L⁻¹ H¹³CHO处理2 h的根系中代谢产物种类与2 mmol·L⁻¹处理的相似, 但每种代谢产物产量显著提高。

关键词: 甲醛去除; 甲醛吸收; 甲醛代谢; ‘丹波’黑大豆根

甲醛(HCHO)是生产生活中广泛存在的环境污染物, 利用植物净化甲醛污染是一种成本低廉且环保的方法(司志浩等2016)。植物中内源性甲醛来自氮、氧和硫甲基化合物的氧化脱甲基作用, 低浓度内源性甲醛可以维持植物细胞中的甲醛循环(Tyihak等1996), 而暴露于甲醛环境中会对植物构成非生物胁迫, 长时间的甲醛胁迫会导致植物叶片萎蔫和黄化, 并伴随叶绿素的降解和细胞中还原糖含量的变化(安雪等2010; 孙慧群等2015), 暴露于较高浓度的气体甲醛中会减缓植物的生长并降低植物的发芽率(Shirazi和Muir 1998)。相关研究表明, 植物体内有一个甲醛库[0.1~10 mol·g⁻¹ (FW)] (Besson等1993), 但植物体内的甲醛大部分不是以自由态存在的, 而是与谷胱甘肽、精氨酸、天冬酰胺和四氢叶酸等内源性亲核试剂可逆结合形成加合物后通过不同的体内途径进行转移和转化的(Bourgis等1999), 这是植物净化甲醛污染的重要生理过程。

许多研究证实, 植物净化甲醛的体系中: 一方面植物叶片能够从污染的空气或者液体中吸收甲醛(Schmitz等2000; Song等2010, 2013; Zeng等2013), 然后通过卡尔文循环和C1代谢同化为碳水化合物以及氨基酸(Zhang等2014; Song等2013; Zeng等2013; Schmitz等2000); 另一方面含有污染甲醛的空气或废水流经植物根系和土壤基质构成的生物反应器时, 空气或废水中的甲醛可通过土壤吸收进入植物根系, 在根系细胞内代谢酶的作用下被降解。Kim等(2008)的研究表明盆栽植物八

角(*Fatsia japonica*)和垂叶榕(*Ficus benjamina*)根系白天和晚上都能有效去除气体甲醛, 白天根去除甲醛的量 and 地上部分相同, 但晚上根去除甲醛的量是地上部分的10倍, 说明植物根系对甲醛去除有重要的贡献。Giese等(1994)用大豆(*Glycine max*)的细胞悬浮培养物与H¹⁴CHO溶液孵育后, ¹⁴C放射活性出现在氨基酸、游离的糖分、脂质和细胞壁成分中, 说明植物的非光合组织也能代谢甲醛并将甲醛转化为细胞的代谢中间产物或其组成成分。过去的研究考察了甲醛在植物光合组织叶片中的代谢和转化(游览2010; 韩双等2015), 气体HCHO胁迫下, 随着HCHO浓度的升高, 叶片气孔导度和开度降低, 但对甲醛在植物非光合组织如根系中的代谢和转化研究甚少(Sun等2015)。我们最近研究表明‘丹波’黑大豆是一种容易进行水培的黑大豆, 本研究考察了‘丹波’黑大豆根系对甲醛的吸收能力及动力学模式, 用碳-13核磁共振(¹³C-NMR)分析了H¹³CHO在‘丹波’黑大豆根细胞中的代谢产物。

1 材料与方 法

1.1 ‘丹波’黑大豆的培养

以‘丹波’黑大豆[*Glycine max* (L) Merr. cv. Tamba, 简称RB]为试验材料。RB种子用常温去离子水清洗后, 平铺于垫有湿润滤纸的培养皿中, 在

收稿 2017-10-23 修定 2018-02-27

资助 国家自然科学基金(31560071)。

并列第一作者。

* 通讯作者(chenlimeikm@126.com)。

恒温(25°C)黑暗的培养箱中进行催芽、浸种。种子露白发芽后挑选露白一致的种子播在有针眼孔的薄泡沫板上,置于有完全营养液(Wu等2013)的黑色塑料盆中,于25°C、每天有光照的温室中进行漂浮培养,每隔1 d更换一次培养液;培养30 d后, RB根系经过表面消毒用于后续实验。

1.2 根系对液体甲醛吸收能力的测定

参考Tan等(2017)的方法测定根系对液体甲醛吸收, RB植株[4株, 整株(FW)共8 g]的根系(重约3 g)放入含有2 mmol·L⁻¹ (4.5 mg)、4 mmol·L⁻¹ (9 mg)、6 mmol·L⁻¹ (13.5 mg)甲醛溶液(150 mL, 含有5 mmol·L⁻¹ KHCO₃和0.1%脂肪酸甲酯磺酸钠)中处理, 在相同条件下处理加热杀死的RB植株根系测定甲醛吸附作用, 用没有植物的处理液测定甲醛挥发量, 培养瓶口用保鲜膜封住。25°C、持续光照(100 μmol·m⁻²·s⁻¹)处理12、24、48和72 h。用Nash法测定处理液中残余甲醛的浓度(Gurel等2005)。甲醛吸收量用公式“起始甲醛含量-剩余甲醛含量-挥发甲醛含量-吸附甲醛含量”计算。每个处理设置3次独立生物学重复试验。

1.3 H¹³CHO标记实验与代谢产物抽提

H¹³CHO购自Cambridge Isotopes Laboratories (Andover, MA, USA)。RB的根系在25°C持续光照(100 μmol·m⁻²·s⁻¹)条件下用150 mL H¹³CHO溶液{含5 mmol·L⁻¹ KHCO₃和0.1% (m/V) 2-吗啉乙磺酸[2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid, MES; pH 5.7]}处理, 以不处理的根系作为对照(CK)。在时间梯度处理实验中, 用2 mmol·L⁻¹ H¹³CHO处理根系0.5、2、4、12、24和48 h。在浓度梯度实验中, 用2、4或6 mmol·L⁻¹ H¹³CHO处理根系2 h。处理时间结束后, 用预冷无菌蒸馏水冲洗根系5次, 以去除根表面残留的H¹³CHO。无菌吸水纸吸干根表面残留水分, 用液氮速冻后于-80°C保存备用。¹³C-NMR样品制备参照Sun等(2015)的方法。液氮速冻研磨, 加入3 mL 100 mmol·L⁻¹磷酸钾缓冲液(pH 7.4)抽提。抽提液在沸水浴中煮沸3 min使酶失活, 12 000×g离心10 min去除细胞碎片。上清液冷冻干燥后溶于0.5 mL的磷酸钾缓冲液中, 加10 mmol·L⁻¹甲酰胺作¹³C-NMR分析的内参。溶解后的样品转移至5 mmol·L⁻¹核磁管, 并在毛细管中封入甲酰胺插入核磁管中, 作为内参与样品同时进行¹³C-NMR分析。

1.4 ¹³C-NMR分析

¹³C-NMR数据通过布鲁克核磁共振仪DRX 500-MHz (Bruker Biosciences Corporation, Billerica, MA, USA)获得, 参数设置为: 宽带质子去耦, 5-ms (90°)脉冲, 谱宽37 594 Hz, 采样时间0.5 s, 延滞时间1.2 s, 样品温度保持在25°C, 每个样品采集32 000个数据点, 扫描1 200次, 处理数据时线宽为4 Hz。H¹³CHO标记样品中化学位移参照甲酰胺浓度为0.017 mol·L⁻¹、共振峰为166.600×10⁻⁶ (parts per million, ppm), 通过参考已知化合物¹³C-NMR谱推测共振峰的归属。将内参相对积分量设定为一对目标共振峰进行积分计算不同样品中各代谢物的相对含量。

1.5 试验数据统计分析

上述实验生理指标均设3组重复, 所测得生理数据以及核磁积分数据采用Excel 2003进行统计分析, 用SPSS对所测得数据进行显著性差异(P<0.05)分析, 每个图中的数值代表平均值±标准差(standard deviation, SD; n=3)。

2 实验结果

2.1 RB根系对甲醛的吸收能力与动力学模式

为了测定RB根系对甲醛吸收能力, 将RB植株根系约3 g放入甲醛溶液中处理, 测定不同时间后各处理液中剩余甲醛含量、甲醛挥发量及死植株根吸附甲醛的量, 然后计算根对甲醛的吸收量(图1), 结果表明甲醛处理4 h时剩余甲醛量分别为3.84 (85.3%)、7.78 (86.4%)和12.23 (90.6%) mg, 0~4 h期间三种处理液中剩余甲醛量下降幅度较小说明这一时期甲醛去除效率较低。4~24 h时三种处理液中剩余甲醛量显著下降, 24 h时2 mmol·L⁻¹处理液中剩余甲醛量接近零, 说明4~24 h时期根系对2 mmol·L⁻¹甲醛去除效率显著提高, 但24 h时4和6 mmol·L⁻¹甲醛处理液中剩余甲醛量还较大, 分别为3.13 (34.8%)和8.80 (65.2%) mg。在处理至48 h时, 4和6 mmol·L⁻¹处理液中剩余甲醛量进一步显著下降, 4 mmol·L⁻¹处理液中剩余甲醛量接近零, 6 mmol·L⁻¹处理液中剩余甲醛量为1.97 mg (14.6%)。这些结果说明处理后期根系对4和6 mmol·L⁻¹甲醛处理液去除效率明显增加(图1-A)。在48 h的处理期内从2、4和6 mmol·L⁻¹甲醛溶液中挥发的甲醛分别为0.35、1.32、2.28 mg, 所占比例分别为7.9%、15.3%、

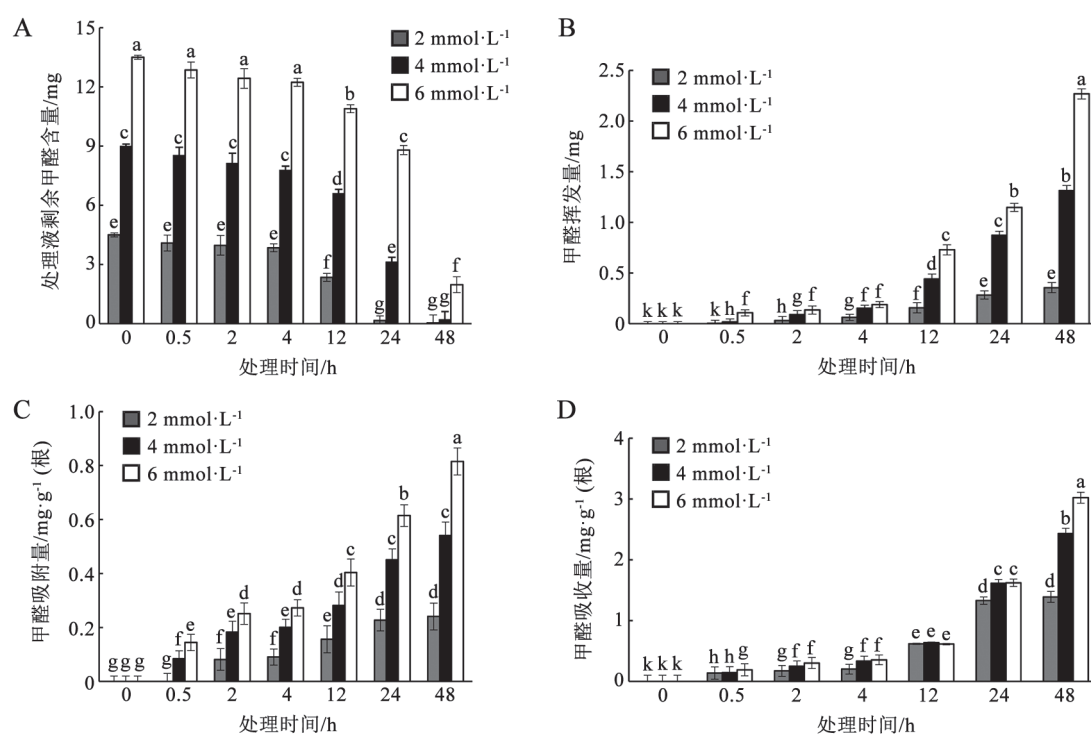


图1 不同浓度甲醛处理RB根系后甲醛吸收值

Fig.1 Uptake kinetics of RB roots under different concentrations of formaldehyde

17.6% (图1-B)。死植株根部对甲醛有一定的吸附作用,且随甲醛浓度的增加这种吸附作用有增强的趋势,在4 h时死根系对三种处理液中甲醛吸附量分别为0.09 (2.0%)、0.20 (2.2%)、0.27 (2.0%) mg;当处理时间增至24 h,三种溶液中甲醛的吸附量分别为0.23 (5.1%)、0.45 (5.1%)、0.62 (4.6%) mg;48 h时从2、4和6 mmol·L⁻¹甲醛溶液中吸附甲醛的量分别为0.24 (5.3%)、0.54 (6.0%)、0.82 (6.1%) mg (图1-C)。

根据甲醛挥发量、甲醛吸附量及剩余甲醛量计算出RB根系对甲醛的实际吸收量,如图1-D所示,结果说明RB根系对2、4和6 mmol·L⁻¹甲醛的吸收量(y)在0~48 h时期和处理时间(x)的关系接近幂函数($y=e^x$)。在处理早期的4 h时,RB根系从2、4和6 mmol·L⁻¹甲醛溶液中吸收甲醛的量较小,分别为0.20、0.33、0.35 mg,对甲醛去除的贡献率分别为4.4%、3.7%、2.6%,对4和6 mmol·L⁻¹甲醛的吸收小于甲醛的吸附作用,这应该是这一时期剩余甲醛含量下降幅度较小的主要原因。在24 h时,RB根系吸收的甲醛显著增多,从2、4和6 mmol·L⁻¹甲醛溶液中吸收的甲醛分别为1.31、1.62和1.62 mg,

对2、4和6 mmol·L⁻¹甲醛去除的贡献率分别为29.1%、18.0%和12.0%,明显大于吸附作用,从而使剩余甲醛的量显著降低。当处理时间达到48 h时,2 mmol·L⁻¹处理液中已经没有甲醛,所以根系对甲醛的吸收量和24 h的相同,然而从2、4和6 mmol·L⁻¹处理液中吸收的甲醛增加至1.39、2.41和3.11 mg,对甲醛去除的贡献率为30.1%、26.7%和23.0%,显著大于根对甲醛的吸附作用,使剩余甲醛的量明显降低。

2.2 低浓度甲醛处理RB根中的代谢产物

比较2 mmol·L⁻¹ H¹³CHO处理RB根系各时间点和没有甲醛处理的对照的¹³C-NMR谱,结果说明在H¹³CHO处理0.5 h时出现在RB根中的代谢产物是H¹³COOH (图2)。当处理时间增加至2 h时,伴随H¹³COOH信号峰强度的增加(图3-A),¹³C-NMR谱中出现[U-¹³C]草酸(OA)信号峰,同时存在于对照背景中的[2-¹³C]Gln和[2-¹³C]Asn、[3-¹³C]Asn、[1-¹³C]Asn信号峰上升至最高点(图2),它们的相对含量分别为对照的5.5倍和5.3倍(图3-E和F);[2-¹³C]Gly的信号峰迅速升高,成为H¹³CHO处理RB根代谢谱中最强的信号峰(图2),其相对含量为对照的

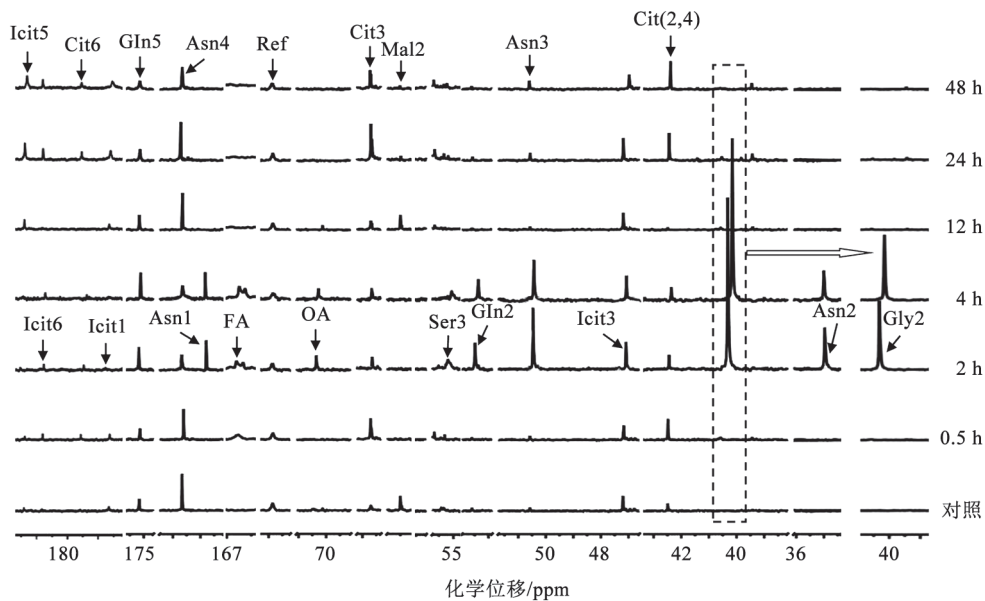


图2 2 mmol·L⁻¹ H¹³CHO时间梯度处理RB根系的代谢产物分析

Fig.2 Metabolites in RB roots treated with 2 mmol·L⁻¹ H¹³CHO in a time-gradient manner

FA: 甲酸; Cit: 柠檬酸; OA: 草酸; Gly: 甘氨酸; Gln: 谷氨酰胺; Asn: 天冬酰胺; Icit: 异柠檬酸; Ser: 丝氨酸; Mal: 苹果酸。

280倍(图3-D); [3-¹³C]Ser的信号峰也显著增强, 其相对含量增加了13倍(图3-H)。在4 h时H¹³COOH信号峰强度继续升高(图3-A)。然而[U-¹³C]OA和[3-¹³C]Ser信号峰开始下降(图2), 它们相对含量降低为2 h时的77.3%和23.1%(图3-C和H)。同时[U-¹³C]Gly、[2-¹³C]Gln和[2,3-¹³C]Asn的信号峰也开始下降, 它们的相对含量分别为对照的17、4.8和3.3倍(图2-D~F)。这些结果说明在低浓度液体甲醛处理RB根早期(0~4 h), RB根吸收的甲醛最初被代谢转化为HCOOH, 在随后的代谢过程中被同化为其他有机酸, 包括OA、Gly、Ser、Gln和Asn。4 h后[U-¹³C]OA、[3-¹³C]Ser、[U-¹³C]Gly、[2-¹³C]Gln和[2,3-¹³C]Asn的信号峰的下降可能是被进一步代谢转化为其他化合物所致。

通过甲酸缩合产生乙醛酸(GX)的反应曾经在马铃薯(*Solanum tuberosum*)块根中观察到, 在我们的¹³C-NMR谱中有一个很弱的GX信号峰¹³C-GX, 因此推测甲醛处理RB根中GX的产生应该来自甲酸的缩合反应, ¹³C-GX信号峰很弱可能和它被迅速代谢转化为其他化合物有关。GX在植物氨基酸和有机酸的代谢中发挥重要作用, Sinha和Cossins (1965)的研究发现[2-¹⁴C]GX在豌豆(*Pisum sativum*)和玉米(*Zea mays*)根中代谢的主要产物有Gly、

Ser、Gln和Asn。此外, [2-¹⁴C]GX在这些植物根中的代谢还产生一定量的有机酸包草酸、苹果酸和柠檬酸。我们¹³C-NMR分析结果说明在H¹³CHO处理0~4 h时期, RB根中甲醛代谢产物种类和[2-¹⁴C]GX处理豌豆和玉米根系相似, 因此我们推测在0~4 h时期RB根系吸收的H¹³CHO通过氧化途径首先氧化为甲酸, 然后由甲酸直接缩合为GX, 再通过GX代谢产生OA、Ser、Gly、Gln和Asn。

在12 h时RB根中的H¹³COOH信号峰消失, [U-¹³C]OA信号峰继续下降(图2), 其相对含量仅有2 h时的17.5%(图3-D); 此外, [2-¹³C]Gly、[2-¹³C]Gln、[2-¹³C]Asn和[3-¹³C]Asn的信号峰下降到它们的背景水平(图3-D~F), 而[3-¹³C]Ser的信号峰完全消失(图2)。[2-¹³C]Mal的信号峰在0.5~4 h期间降低(图2), 但在12 h升高, 其相对含量约为对照的115%(图3-I)。[2,4-¹³C]Cit和[3-¹³C]Icit的信号峰开始升高(图2), 到24 h时[2-¹³C]Mal的信号峰再次回落至2 h时的水平(图3-I), [U-¹³C]OA的信号峰完全消失(图2)。[U-¹³C]Cit和[3-¹³C]Icit信号峰上升至最高水平(图2), 此时它们的相对含量分别为对照的7.1倍和4.6倍(图3-B和G)。当处理时间延长到48 h后[2,4-¹³C]Cit和[3-¹³C]Icit的信号峰有所降低, 它们的相对含量分别为24 h时的65%和94.5%。这些结果说明

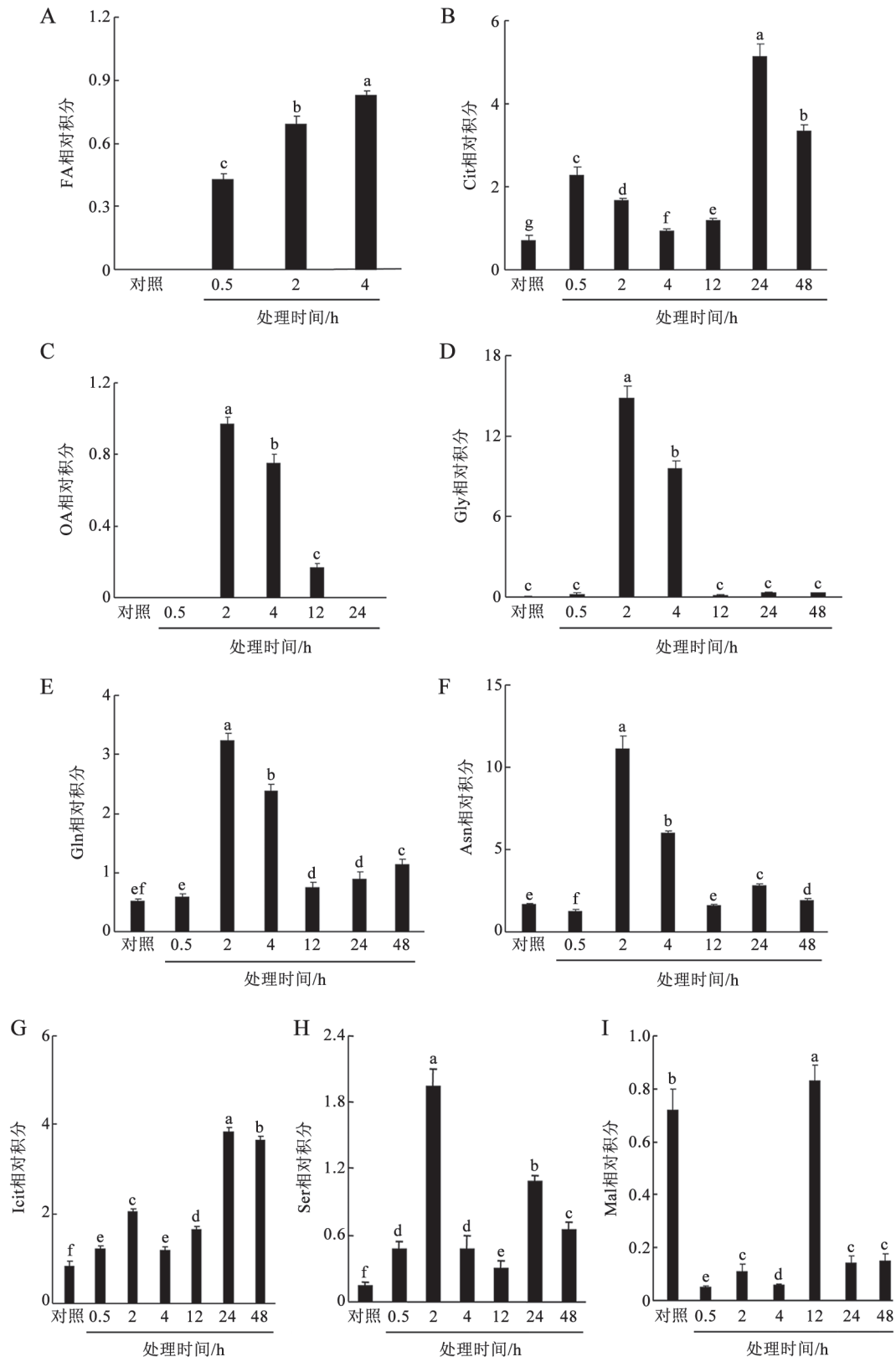


图3 代谢产物信号积分

Fig.3 Signal integration of metabolites

A~I: 分别为FA、Cit、OA、Gly、Gln、Asn、Icit、Ser和Mal信号峰的积分。各柱形上用不同小写字母标识表示数据间差异显著 ($P < 0.05$), 图4同。

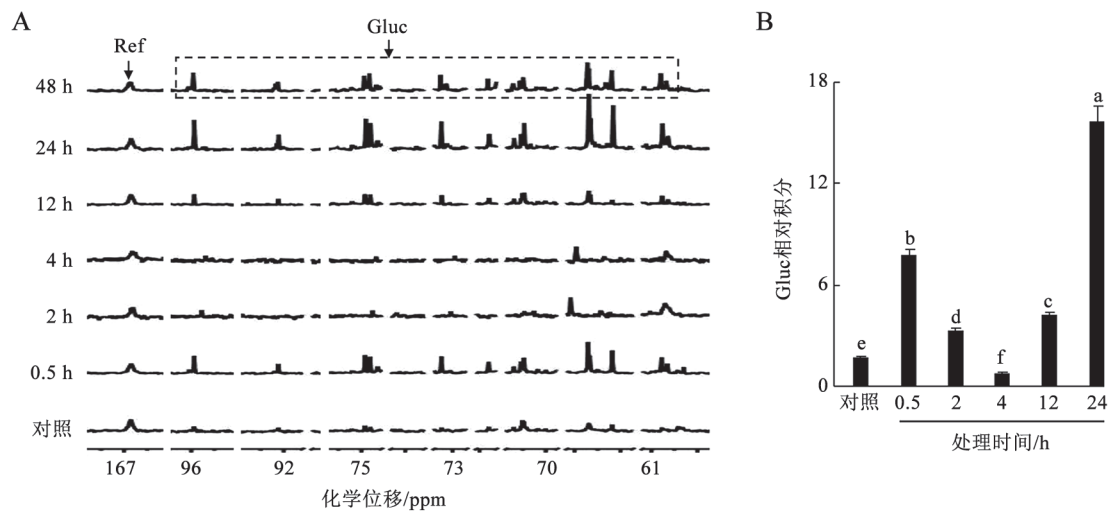


图4 葡萄糖信号积分

Fig.4 Signal integration of glucose

A: 葡萄糖(Gluc)信号峰; B: Gluc信号峰的积分。

在12~48 h时期, [U-¹³C]OA、[2-¹³C]Gly、[3-¹³C]Ser、[2-¹³C]Gln、[2,3-¹³C]Asn和[2-¹³C]Mal在随后的代谢过程中被转化为Cit和Icit。Cit和Icit是三羧酸(TCA)循环的两个重要中间产物, 推测[U-¹³C]OA、[2-¹³C]Gly、[3-¹³C]Ser、[2-¹³C]Gln、[2,3-¹³C]Asn和[2-¹³C]Mal的碳骨架可能在H¹³CHO处理的后期(12~48 h)进入TCA循环后被转化为Cit和Icit。

对比对照的¹³C-NMR谱发现经过2 mmol·L⁻¹ H¹³CHO处理12 h以后, RB根系中[U-¹³C]Gluc的信号峰开始上升, 相对含量达到对照的2.5倍; 在24 h [U-¹³C]Gluc的信号峰大幅度升高, 相对含量达到对照的9.4倍; 在48 h之后[U-¹³C]Gluc的信号峰开始降低, 其相对含量减少为对照的5.2倍(图4)。这些结果说明2 mmol·L⁻¹ H¹³CHO处理RB根中[U-¹³C]Gluc是甲醛代谢后期的主要产物之一。植物体内产生糖类物质的代谢途径有卡尔文循环和糖异生途径(Zhang等2014; Song等2013; Zeng等2013; Schmitz等2000), 由于根是非光合组织, 细胞内无叶绿体, 所以也就没有卡尔文循环的作用。因此推测甲醛代谢后期产生的Cit和Icit可能进入乙醛酸循环, 从乙醛酸输出的苹果酸进入糖异生途径后被转化为[U-¹³C]Gluc。

2.3 高浓度甲醛处理RB根中的代谢产物

我们之前的研究发现低浓度和高浓度甲醛处理拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和矮牵牛(*Petunia*

spp.)叶片的代谢产物和机制不同(Zhang等2014; Sun等2015)。为了解低浓度和高浓度甲醛处理RB根甲醛代谢产物的差异, 比较2、4和6 mmol·L⁻¹ H¹³CHO处理RB根系的甲醛代谢谱, 结果说明在4和6 mmol·L⁻¹ H¹³CHO溶液处理2 h时, RB根内代谢H¹³CHO的产物种类和2 mmol·L⁻¹处理的相似, 还是以H¹³COOH、[U-¹³C]OA、[2-¹³C]Gly、[3-¹³C]Ser、[2-¹³C]Gln和[2,3-¹³C]Asn为主, 但是这些化合物的信号峰在4和6 mmol·L⁻¹的H¹³CHO处理RB根系中显著高于2 mmol·L⁻¹处理的根系(图5-A)。H¹³COOH、[U-¹³C]OA、[2-¹³C]Gln和[3-¹³C]Ser的信号峰强度均随甲醛处理浓度的升高而增加, 在6 mmol·L⁻¹ H¹³CHO处理RB根系中它们的相对含量分别为2 mmol·L⁻¹处理样品的1.6、1.7、5.8和1.4倍(图5-B~D和G); [2-¹³C]Gly的信号峰强度在4和6 mmol·L⁻¹ H¹³CHO处理RB根中无显著差异, 但比2 mmol·L⁻¹处理样品高约33.7% (图5-A和E)。有些意外的是[2,3-¹³C]Asn信号峰在4 mmol·L⁻¹ H¹³CHO处理RB根中显著升高后在6 mmol·L⁻¹ H¹³CHO处理根中又回落到2 mmol·L⁻¹时的水平(图5-A和F)。

3 讨论

很多研究观察到不同植物品种具有不同的甲醛吸收能力(安雪等2010)。Zeng等(2013)的研究表明用液体甲醛处理离体香蕉(*Musa × paradisiaca*)

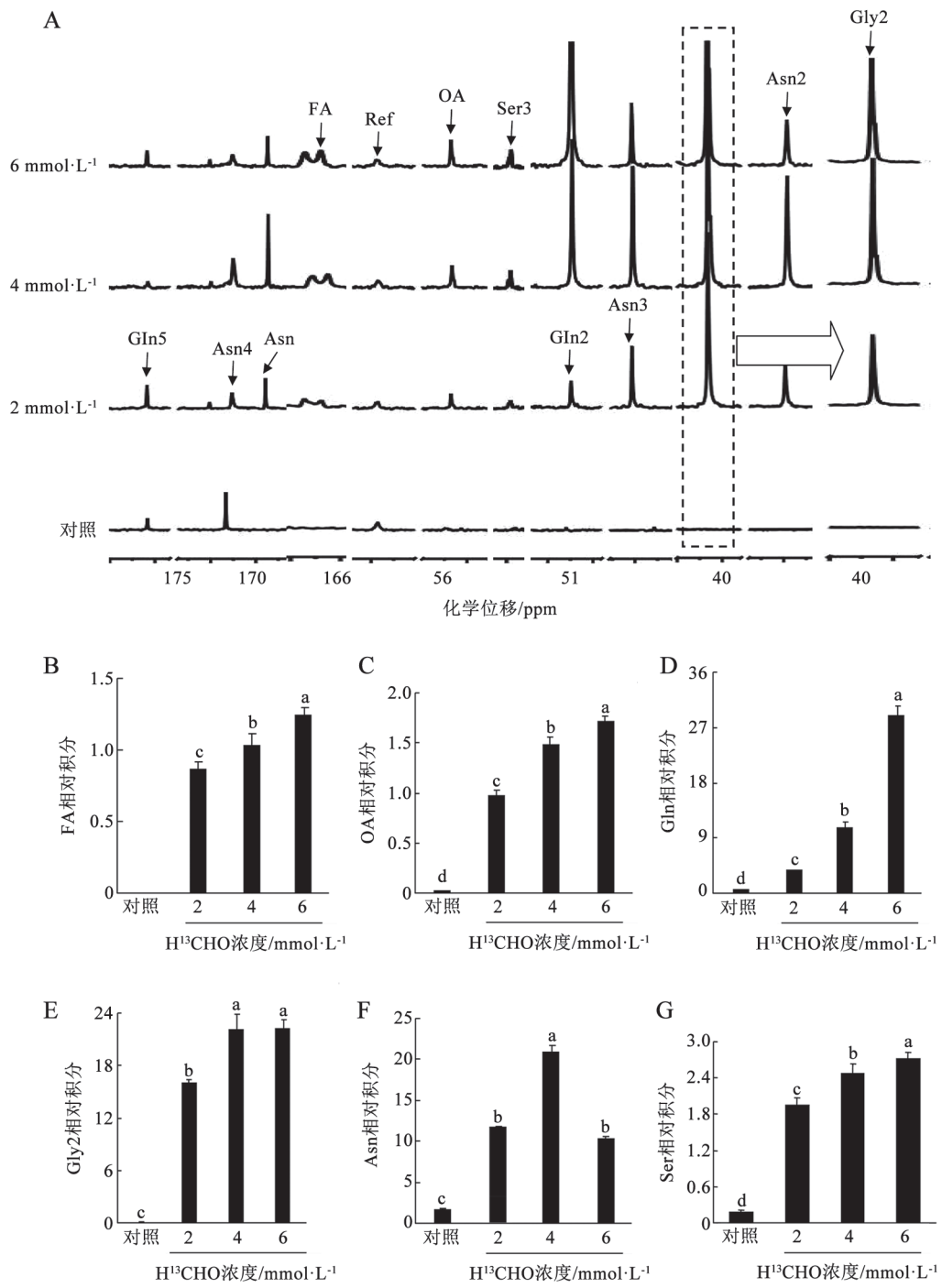


图5 高浓度H¹³CHO处理RB根系的代谢产物分析

Fig.3 Metabolites in RB roots treated with high concentration of H¹³CHO

A: RB主要代谢产物信号峰; B-G: 分别为FA、OA、Gln、Gly、Asn和Ser信号峰的积分。

叶片时叶片对甲醛的吸收量和处理时间的关系为平方根函数, Song等(2010)对模式植物拟南芥吸收液体甲醛能力的分析结果表明拟南芥叶片甲醛吸收量和处理时间的关系为幂函数。本研究用经过

表面消毒的RB根系做实验材料考察根系对不同浓度甲醛的吸收动力学, 排除微生物对根系吸收测定的干扰作用, 分析结果表明死亡的根系对甲醛具有一定的吸附作用, 可能由于死亡的根细胞内

含有亲电化合物, 甲醛可通过和这些化合物结合形成一些加合物(Sárdi和Tiyhák 1994; Trézl等2003; Mason等1986), 从而使根系对甲醛产生吸附作用。活体RB根系对甲醛的吸收作用随处理时间的增加大于甲醛的吸附作用, 这一结果应该与活体根组织中存在甲醛代谢作用有关, 处理后期可能由于甲醛代谢作用增强, 从而使根吸收的甲醛显著增加, 因此RB根系吸收液体甲醛的动力学模式与拟南芥叶片相似。

我们先前的研究已经表明用 ^{13}C -NMR的方法可以追踪 H^{13}CHO 在植物组织中代谢的具体途径(Zhang等2014; Song等2013; Zeng等2014)。在香蕉(Zeng等2014)、拟南芥(Song等2013)和矮牵牛(Zhang等2014)叶片甲醛代谢过程中, C1代谢和卡尔文循环在叶片甲醛同化过程中发挥重要作用。目前关于根系代谢甲醛的研究很少, 根据本研究 ^{13}C -NMR分析结果推测甲醛在RB植株根系代谢的可能途径为: 第一阶段为0~4 h阶段, 首先进入植物体内的甲醛可能在谷胱甘肽依赖型脂肪型乙醛脱氢酶(fatty aldehyde dehydrogenase, FALDH)和S-乙酰谷胱甘肽水解酶(S-formylglutathione hydrolase, FGH)催化下转变为甲酸, 2分子甲酸能够通过乙醛酸合成酶(glyoxylate synthase, GXS)缩合成乙醛酸, 部分乙醛酸通过丝氨酸乙醛酸氨基转移酶(serine-glyoxylate aminotransferase, SGAT)的作用转变成Gly2, Gly2通过丝氨酸羟甲基转移酶(serine hydroxymethyltransferase, SHMT)生成Ser3, 或者乙醛酸通过未知途径转变成含氮N-转运氨基酸Asn和Gln。此外还有部分乙醛酸通过乙醇酸氧化酶(glycolate oxidase, GO)氧化为OA。另有一部分乙醛酸直接进入乙醛酸循环途径生成Cit和Icit。第二阶段为4~12 h, FA信号峰消失, Gly2也下降到几乎检测不到的水平, 而OA、Cit、Gln、Asn以及Ser3代谢峰下降, 推测可能是由于FA代谢产物的生成量降低, 导致下游途径中这些代谢产物的合成也减少。Icit在这个阶段变化不大, 而Mal在12 h时信号峰增加, 推测是乙醛酸循环过程中Cit代谢转变而来, 因为Cit信号峰在4~12 h阶段下降很快。代谢的第三个阶段是12~48 h, 此时OA和Gly2信号峰消失或者几乎消失, Mal信号峰也出现下降, 而Cit、Gln、Icit信号峰增加, Asn和Ser3则几乎没有变化。24 h以后, $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲醛处理的样品中观察

到Gluc信号峰增加, 说明这个阶段甲醛代谢主要进入糖异生途径。

比较2、4和 $6\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{H}^{13}\text{CHO}$ 处理RB根系2 h的代谢谱发现FA、OA、Gln、Gly2以及Ser3信号峰强度都随着甲醛处理浓度的增加而升高, 葡萄糖信号峰随着浓度增加下降, 高浓度甲醛处理RB根系中Cit、Icit、Mal信号峰消失, 这说明Cit、Icit、Mal生成受到高浓度甲醛的抑制, 其他中间代谢产物的生成随着甲醛浓度增加而有不同程度增加。推测高浓度甲醛抑制了乙醛酸循环途径的功能, 因而导致Cit、Icit、Mal生成受阻。苹果酸合成酶(malate synthase, MS)和异柠檬酸裂解酶(isocitrate lyase, ICL)是乙醛酸循环途径的关键酶。推测高浓度甲醛胁迫可能影响MS和ICL的表达, 从而抑制乙醛酸循环途径在甲醛代谢中的作用, 因此进入糖异生途径的代谢流减少, 葡萄糖生成随之减少, 但是其他途径作用增强, 因此OA、Gln、Gly2以及Ser3生成量增加。

参考文献(References)

- An X, Li X, Pan H, et al (2010). The capacity of 16 ornamental plants on purifying indoor formaldehyde pollution and their physiological response to formaldehyde stress. *Ecol Environ Sci*, 19 (2): 379–384 (in Chinese with English abstract) [安雪, 李霞, 潘会堂等(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]
- Besson V, Rebeille F, Neuburger M, et al (1993). Effects of tetrahydrofolate polyglutamates on the kinetic parameters of serine hydroxymethyltransferase and glycine decarboxylase from pea leaf mitochondria. *Biochem J*, 292 (2): 425–430
- Bourgis F, Roje S, Nuccio ML, et al (1999). S-methylmethionine plays a role in phloem sulfur transport and is synthesized by a novel type of methyltransferase. *Plant Cell*, 11 (8): 1485–1498
- Giese M, Bauer-Dorant U, Langebartels C, et al (1994). Detoxification of formaldehyde by the spider plant (*Chlorophytum comosum* L.) and by soybean (*Glycine max* L.) cell-suspension cultures. *Plant Physiol*, 104 (4): 1301–1309
- Gurel A, Coskun O, Armutcu F, et al (2005). Vitamin E against oxidative damage caused by formaldehyde in frontal cortex and hippocampus: biochemical and histological studies. *J Chem Neuroanat*, 29 (3): 173–178
- Han S, Xiao S, Sun Z, et al (2015). Contribution of the major HCHO metabolic pathways to HCHO-uptake by gerani-

- um leaves under liquid HCHO stress. *J Zhejiang Univ Agr Life Sci*, 41 (3): 293–301 (in Chinese with English abstract) [韩双, 肖素勤, 孙振等(2015). 液体甲醛胁迫下天竺葵叶片甲醛代谢途径对甲醛吸收的贡献作用. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 41 (3): 293–301]
- Kim KJ, Kil MJ, Song JS, et al (2008). Efficiency of volatile formaldehyde removal by indoor plants: contribution of aerial plant parts versus the root zone. *J Amer Soc Hort Sci*, 133 (4): 521–526
- Mason RP, Sanders JKM, Crawford A, et al (1986). Formaldehyde metabolism by *Escherichia coli*. Detection by in vivo ^{13}C NMR spectroscopy of *S*-(hydroxymethyl)glutathione as a transient intracellular intermediate. *Biochemistry*, 25 (16): 4504–4507
- Sárdi E, Tyihák E (1994). Simple determination of formaldehyde in dimedone adduct form in biological samples by high performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr*, 8 (6): 313–314
- 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: 307–315
- Shirazi AM, Muir PS (1998). *In vitro* effect of formaldehyde on douglas fir pollen. *Plant Cell Environ*, 21 (3): 341–346
- Si ZH, Xiong Y, Chen LM (2016). Effects of exogenous application of polyamine on formaldehyde absorption and antioxidant enzymes activity in tobacco leaves. *Plant Physiol J*, 52 (7): 1045–1051 (in Chinese with English abstract) [司志浩, 熊芸, 陈丽梅(2016). 外源施用多胺对烟草叶片甲醛吸收和抗氧化酶活性的影响. *植物生理学报*, 52 (7): 1045–1051]
- Sinha SK, Cossins EA (1965). The importance of glyoxylate in amino acid biosynthesis in plants. *Biochem J*, 96 (1): 254
- Song Z, Orita I, Yin F, et al (2010). Overexpression of an HPS/PHI fusion enzyme from *Mycobacterium gastris* in chloroplasts of geranium enhances its ability to assimilate and phytoremediate formaldehyde. *Biotechnol Lett*, 32 (10): 1541–1548
- Song ZB, Xiao SQ, You L, et al (2013). C1 metabolism and the Calvin cycle function simultaneously and independently during HCHO metabolism and detoxification in *Arabidopsis thaliana* treated with HCHO solutions. *Plant Cell Environ*, 36 (8): 1490–506
- Sun H, Zhang W, Tang L, et al (2015). Investigation of the role of the Calvin cycle and C1 metabolism during HCHO metabolism in gaseous HCHO-treated petunia under light and dark conditions using ^{13}C -NMR. *Phytochem Anal*, 26 (3): 226–235
- Sun HQ, Zhou SE, Wu HS, et al (2015). Effects of gaseous formaldehyde stress on the accumulation of hydrogen peroxide in guard cells and the stomata conductance and aperture of *Vicia faba*. *J Agro-environ Sci*, 51 (2): 246–252 (in Chinese with English abstract) [孙慧群, 周升恩, 吴怀胜等(2015). 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. *农业环境科学学报*, 51 (2): 246–252]
- Tan H, Xiong Y, Li KZ, et al (2017). Methanol-enhanced removal and metabolic conversion of formaldehyde by a black soybean from formaldehyde solutions. *Environ Sci Pollut Res*, 24 (5): 4765–4777
- Trézl L, Hullán L, Jászay ZM, et al (2003). Antagonistic reactions of arginine and lysine against formaldehyde and their relation to cell proliferation, apoptosis, folate cycle and photosynthesis. *Mol Cell Biochem*, 244 (1–2): 167–176
- Tyihák E, Blunden G, Yang MH, et al (1996). Formaldehyde, as its dimedone adduct, from *Ascophyllum nodosum*. *J Appl Phycol*, 8 (3): 211–215
- Wu K, Xiao S, Chen Q, et al (2013). Changes in the activity and transcription of antioxidant enzymes in response to Al stress in black soybeans. *Plant Mol Biol Rep*, 31 (1): 141–150
- You L (2010). Mechanism of formaldehyde metabolism in ivy and its response to formaldehyde stress (dissertation). Kunming: Kunming University of Science and Technology, 45–48 (in Chinese with English abstract) [游览(2010). 常春藤代谢甲醛的机制及其甲醛胁迫响应基因的研究(学位论文). 昆明: 昆明理工大学, 45–48]
- Zeng Z, Qi C, Chen Q, et al (2013). Absorption and metabolism of formaldehyde in solutions by detached banana leaves. *J Biosci Bioeng*, 177 (5): 602–612
- Zhang W, Tang L, Sun H, et al (2014). C1 metabolism plays an important role during formaldehyde metabolism and detoxification in petunia under liquid HCHO stress. *Plant Physiol Bioch*, 83: 327–336

Absorption of formaldehyde by black soybean roots and products of formaldehyde metabolism

CHEN Yue[#], TAN Hao[#], GUO Hong-Xia, FENG Yong, CHEN Li-Mei^{*}

Biotechnological Engineering Research Center, Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China

Abstract: It has been shown that plant roots have considerable contribution to formaldehyde (HCHO) removal in bioreactors, which is associated with HCHO assimilation by roots. This study investigates HCHO absorption and metabolites in the roots of ‘Tamba’ black soybean (*Glycine max*) treated in 2, 4 and 6 mmol·L⁻¹ HCHO solutions. The results show that the relationship between HCHO absorption and treatment time over a 48 h treatment period fits an exponential function. The contribution (30.1%, 26.7% and 23.0%) of HCHO absorption by living roots to HCHO removal were significantly greater than that of the HCHO adsorption by dead roots after treatment for 48 h. The evidence suggests the presence of HCHO metabolism in the living roots. ¹³C-NMR (carbon-13 nuclear magnetic resonance) analyses indicated that, in 2 mmol·L⁻¹ H¹³CHO treated-roots, the absorbed H¹³CHO was first oxidized to H¹³COOH, which was then mainly converted to oxalate, glycine, asparagine, glutamine and serine during the 0–4 h treatment period. During the 4–48 h treatment period, these organic acids were converted to malate, citrate, isocitrate and glucose. The metabolite types in 4 and 6 mmol·L⁻¹ H¹³CHO treated-roots for 2 h were similar to those in 2 mmol·L⁻¹ H¹³CHO treated-roots but the yield of each metabolite was significantly increased.

Key words: formaldehyde removal; formaldehyde absorption; formaldehyde metabolism; ‘Tamba’ black soybean roots

Received 2017-10-23 Accepted 2018-02-27

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31560071).

[#]Co-first authors.

^{*}Corresponding author (chenlimeikm@126.com).