

干旱胁迫下拟南芥中 H₂S 与 ABA 信号关系研究

赵敏¹ 王玥萱¹ 徐运飞² 赵启安¹ 刘博¹ 杨宁^{1*}

(1. 西北师范大学生命科学学院, 兰州 730070; 2. 信阳农林学院农学院, 信阳 464000)

摘要 以野生型拟南芥(WT)、硫化氢(H₂S)合成酶缺失型突变体 *lcd*、脱落酸(ABA)合成缺失型突变体 *aba1* 实生苗为材料,以 0.3 mol·L⁻¹甘露醇模拟干旱胁迫,研究干旱胁迫对 ABA 含量、H₂S 含量的影响,及其在拟南芥抵抗干旱胁迫中的作用及信号关系。结果显示:干旱胁迫显著提高 *LCD* 和 *ABA1* 基因相对表达以及 H₂S 含量,ABA 含量;干旱胁迫显著抑制突变体 *lcd*、*aba1* 的种子萌发;干旱胁迫下,外施 NaHS 促进干旱胁迫下 WT、*lcd* 和 *aba1* 中内源 H₂S 的产生及上调 *LCD*、*ABA1* 基因相对表达,而外施 ABA 提高干旱胁迫下 WT、*aba1* 中 H₂S 含量及 *LCD*、*ABA1* 基因相对表达,但是对 *lcd* 中 H₂S 含量及 *LCD* 基因相对表达没有显著影响。研究结果表明,信号分子 H₂S 和 ABA 在拟南芥的干旱胁迫响应中发挥一定的作用,且 H₂S 位于 ABA 的下游参与调控拟南芥的信号过程。

关键词 拟南芥;干旱胁迫;硫化氢;脱落酸

中图分类号: Q949.748.3 文献标志码: A doi:10.7525/j.issn.1673-5102.2019.01.013

Relationship between H₂S and ABA Signaling in *Arabidopsis thaliana* under Drought Stress

ZHAO Min¹ WANG Yue-Xuan¹ XU Yun-Fei² ZHAO Qi-An¹ LIU Bo¹ YANG Ning^{1*}

(1. College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou 730070; 2. Xinyang Agriculture and Forestry University, Xinyang 464000)

Abstract With the seedlings of wild type *Arabidopsis thaliana* (WT), hydrogen sulfide (H₂S) synthase deletion mutant *lcd*, abscisic acid (ABA) deletion mutant *aba1*, 0.3 mol·L⁻¹ mannitol simulated drought stress, we studied the effects of drought stress on ABA content and H₂S content, analyzed their roles and signal relationships in drought tolerance. Drought stress significantly increased the *LCD* and *ABA1* gene relative expressions, contents of H₂S and ABA; Drought stress significantly inhibited the seed germination of *lcd* and *aba1* mutants; Application of NaHS and ABA significantly increased the endogenous H₂S content in WT under drought stress; Application of NaHS could promote the endogenous H₂S production in WT, *lcd* and *aba1*, the relative expression of *LCD* and *ABA1* also up-regulated under drought stress. While the application of ABA increased the H₂S content and the *LCD*, *ABA1* relative expressions in WT and *aba1* under drought stress, but had no significant effect on the H₂S content and *LCD* relative expression in *lcd*. The results showed that the signal molecules H₂S and ABA played a vital role response to the drought stress in *Arabidopsis*, and H₂S is located at downstream of ABA to participated in the regulation of signaling process.

Key words *Arabidopsis thaliana*; drought stress; hydrogen sulfide; abscisic acid

干旱已成为世界范围内严重限制农作物生产的主要因素之一,干旱对其各个生长发育阶段具广泛的影响,包括种子萌发、营养生长、开花结实等。在干旱条件下,所有植物,无论它们的耐受

基金项目:国家自然科学基金(31660116)

第一作者简介:赵敏(1993—),女,硕士研究生,主要从事植物细胞信号转导方面的研究。

* 通信作者 E-mail: xbsd-yn@163.com

收稿日期: 2018-09-04

Foundation item: National Natural Science Foundation of China(31660116)

First author introduction: ZHAO Min(1993—), female, master, mainly engaged in research of plant cell signal transduction.

* Corresponding author E-mail: xbsd-yn@163.com

Received date: 2018-09-04

性水平如何,都会激活相似的基本反应,如控制离子转运、特定渗透物质的积累或激活抗氧化系统。同时干旱对光合作用、呼吸代谢、水分和营养的吸收转运、有机物质的转化、运输、积累等都有着重要的影响^[1]。有研究表明,干旱造成的作物减产超过所有自然灾害的总和,并且由于干旱缺水造成地表水源补给不足,只能依靠大量超采地下水来维持居民生活和工农业发展,进而导致植被严重退化、地下水位下降等一系列问题,使生态环境日益恶化^[2]。因此,研究植物抗旱机制以提高作物的耐受性,将会为现代农业发展提供一定的理论基础。

H₂S 是一种无色易燃有臭鸡蛋气味的气体,长期以来,人们对 H₂S 的认识仅局限于其毒性和环境污染等方面^[3]。直到 30 年前,有研究证实,在大鼠脑中以及人脑中检测到有内源 H₂S 含量的存在,推测 H₂S 可能存在一定的生理作用^[4]。近年来对 H₂S 的研究成为医学领域的热点之一,研究表明 H₂S 在调控神经系统和心血管系统方面具有重要的生理功能,被确认为是继一氧化氮(NO)和一氧化碳(CO)之后的第三种气体信号分子^[5]。相对而言,H₂S 在植物中的研究较少。植物体内源 H₂S 的产生主要是以 L/D-半胱氨酸脱巯基酶(L/D-CDes)催化分解 L/D-半胱氨酸(L/D-Cys)产生 L-CDes 与 D-CDes 相比,L-CDes 的催化活力更高^[6]。外界的胁迫信号通过植物体内自身的信号传导途径传递到细胞内会激活抗逆基因的表达,使植物响应外界环境条件的变化,H₂S 的信号转导途径会参与这一复杂的应答机制^[7]。硫化氢钠(NaHS)作为 H₂S 的外源供体,参与植物种子发芽、根的形态建成^[8-9]、提高多种植物抵御非生物胁迫,如干旱^[10]、重金属胁迫^[11]等。

植物激素是调节非生物胁迫下植物生长的关键因子,它们参与植物对环境胁迫的响应,其中脱落酸(ABA)是调节植物非生物胁迫耐受性中最关键的激素^[12]。ABA 属于类异戊二烯基团,是由质体 2-甲基-赤藓糖醇-4-磷酸途径形成的副产物。ABA 影响不同的生理过程,特别是在发育阶段如气孔开放、种子休眠、胚胎形态发生、贮藏蛋白质和脂质的合成^[13]。ABA 参与多种非生物胁迫,并触发各种信号传导途径。有研究证实,土壤干旱时,失水的根系首先会产生根源信号 ABA,随木质部蒸腾流到达叶片的保卫细胞,从而抑制 K⁺ 内流通道的活性,苹果酸渗出,保卫细胞膨压下降,

最终促进气孔关闭^[14]。在缺氮和干旱胁迫的情况下,ABA 使植物产生各种适应性变化,例如促进根的生长^[15]。除此之外,ABA 还参与种子萌发、影响抗氧化酶和其他渗透调节物质的合成来提高其对干旱的耐受性^[16]。干旱胁迫下 ABA 对植物耐受性的作用是显著的,但是 ABA 影响植物抗旱性的机制目前还不是特别清楚,有待进一步研究。

有研究表明 H₂S 诱导气孔关闭具有浓度依赖性(<100 μmol·L⁻¹)浓度太高(≥500 μmol·L⁻¹)时气孔孔径反而会变大,并影响细胞的生活力,并且 H₂S 也会影响 ABA 诱导气孔关闭的能力,影响 ABA 受体的表达,从而证实了 H₂S 与 ABA 共同作用调节气孔,增强植物应对环境胁迫的能力^[17]。有关信号分子 H₂S 与 ABA 响应干旱胁迫中的信号关系鲜有报道。本文以野生型拟南芥 WT、H₂S 合成酶缺失型突变体 *lcd* 和 ABA1 缺失突变体 *aba1* 为材料,以 0.3 mol·L⁻¹甘露醇模拟干旱胁迫,结合外源添加 H₂S、ABA 供体 NaHS、ABA,利用生理指标结合分子手段的方法,探讨 ABA 与 H₂S 在拟南芥耐旱性中作用和关系,旨在揭示干旱胁迫下 ABA 和信号分子 H₂S 的相互作用及信号关系,为进一步研究植物的抗旱机制提供一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 拟南芥的培养

本试验以 WT、*lcd*(SALK_082099)和 *aba1*(SALK_059469)突变体为研究材料。其中,WT 种子由本课题组提供,*lcd* 和 *aba1*T-DNA 插入突变体种子均购自美国俄亥俄州立大学拟南芥生物资源中心(ABRC)。

将拟南芥种子用无菌水浸泡后,放置于 4℃ 冰箱中春化 3 d。将种子用无菌水冲洗 30 s,75% 乙醇吹打 30 s,无菌水冲洗 30 s,随后用 0.5% 次氯酸钠溶液清洗 2 min,无菌水冲洗 3 次。接种于 MS + 30 g·L⁻¹蔗糖、pH5.8 的琼脂培养基中,在温度 23℃、光照 2 000 lux、光周期为 16/8 h 的培养箱中培养 16 d。土培苗按照土:蛭石 = 2:1 的栽培方法,光周期为 16/8 h,每周浇两次营养液,待生长至 4 周进行实验处理。

选择生长一致的拟南芥植株以 0.3 mol·L⁻¹ 的甘露醇进行干旱处理,处理时间为:6、12、24、48、72 h。实验以 0 h 作为空白对照,未添加甘露

醇处理的作为阴性对照组,添加甘露醇处理为实验组。

1.2 突变体鉴定

1.2.1 拟南芥 DNA 提取

取生长 4 周的拟南芥新鲜叶片,按照 Easy Pure® Plant Genomic DNA Kit 提取总 DNA。

1.2.2 突变体鉴定引物

根据 <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html> 设计,设计特异性引物分别如下(表 1)。

表 1 突变体鉴定引物

Table 1 Identification of mutant primers for PCR in the manuscription

引物名称 Primer name	基因序列 Gene sequence(5'→3')
LBal	TGGTTCACGCTAGTGGGCCATCG
<i>Ataba1</i> LP	GATGTTGGTGGTGGAAAAATG
<i>Ataba1</i> RP	ACGTTCAAGAGCATCGTCATC
<i>Atled</i> LP	GATTGAGGGATGGAGAGGAAG
<i>Atled</i> RP	AGTCGGAGTTTCTTACTCGCC

PCR 采用 20 μ L 体系:1 μ L *lcd*、*aba1* 上游引物(LP),1 μ L 下游引物(RP),WT、*lcd*、*aba1* DNA 模板 1 μ L,2 \times Taq PCR Star Mix with Loading Dye 10 μ L,ddH₂O 7 μ L。PCR 循环条件为:

lcd 程序设定为 94 $^{\circ}$ C 10 min,30 个循环(94 $^{\circ}$ C 30 s,54 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s),72 $^{\circ}$ C 1 min。

aba1 程序设定为:94 $^{\circ}$ C 10 min,30 个循环(94 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s),72 $^{\circ}$ C 1 min。

采用 1% 的琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭(EB)染色,UVI 凝胶图像分析系统观察照相。

1.3 拟南芥总 RNA 提取

使用 TaKaRa 公司的 Trizol 试剂盒进行提取,所有提取用品在 121 $^{\circ}$ C 高压灭菌 25 min,试验过程均在超净工作台进行,提取出的 RNA 用 TaKaRa 公司的 Primer Script™ RT reagent Kit With gCDNA Eraser(Perfect Real Time)反转录试剂盒反转录成为 cDNA。

1.4 RT-qPCR 反应

定量引物用 DNASTAR 软件 PrimerSelect 模块,设计特异性引物(表 2)。

RT-qPCR 反应体系:按照 TAKARA 公司的 SYBR Premix Ex Taq™ II(Tli RNaseH Plus)操作说明书于 25 μ L 反应体系中进行 PCR 扩增(表 3)。

表 2 基因特异性引物

Table 2 List of all genes for RT-PCR

引物名称 Primer name	基因序列 Gene sequence(5'→3')
Actin LP	TGTGCCAATCTACGAGGGTTT
Actin RP	TTTCCCCTCTGCTGTTGT
<i>AtABA1</i> LP	GGGTTCAACTCCGTTTTGCT
<i>AtABA1</i> RP	TCCTTCTCAACTAACGCCGT
<i>AtLCD</i> LP	TGTATGTGAGGAGGAGGC
<i>AtLCD</i> RP	GTTTCATACTGATGCTGCTC

表 3 qRT-PCR 反应体系

Table 3 qRT-PCR reaction system

组分	体积(μ L)
模板 cDNA	2
LP(10 μ mol \cdot L ⁻¹)	0.5
RP(10 μ mol \cdot L ⁻¹)	0.5
SYBR Premix Ex Taq™ II	12.5
ddH ₂ O	Up to 25

1.5 L/D-CDes 酶活、H₂S 含量以及 ABA 含量测定

H₂S 含量、ABA 含量由上海酶联生物公司的试剂盒测定,具体操作按照说明书进行。L/D-CDes 酶活性测定采用亚甲基蓝法^[18],略有改动。具体方法如下:称取不同处理的拟南芥莲座叶 0.2 g,加入 2 mL 20 mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液研磨(pH7.4),离心后取上清。1 mL 的反应体系为:0.8 mmol \cdot L⁻¹ L/D-Cys,2.5 mmol \cdot L⁻¹ DTT,100 mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl pH9.0/pH8.0 和 100 μ L 上清液。将装有醋酸锌(ZnAc)的 1.5 mL EP 管装有含上述混合液的小三角瓶内,迅速将小三角瓶封严,于 37 $^{\circ}$ C 摇床孵育 15 min 后,在 EP 管加入 30 mmol \cdot L⁻¹ FeCl₃ 与 20 mmol \cdot L⁻¹ N,N-二甲基对苯二胺各 100 μ L 摇匀终止反应。室温避光反应 15 min 后,在波长为 670 nm 的紫外可见分光光度计 UNICO(UV-2102)中测定 OD 值,通过标准曲线计算 L/D-CDes 酶活性。

1.6 种子萌发率测定

选择均匀饱满的种子,每个处理设 3 个重复,每个重复有 50 颗种子,从开始光照培养时起,观察并统计萌发的种子数目,以胚根突破种皮 1 mm 即视为萌发,计算萌发百分率。

萌发率 = 第 10 天已萌发种子数/供试种子数 \times 100% (1)

1.7 数据统计

数据采用 SPSS17.0 对组间随时间变化的差异性多重比较采用 LSD 法分析, 作图在 Origin pro 9.0 中进行。每次试验至少进行 3 次独立重复试验。

2 结果与分析

2.1 *lcd* 与 *aba1* 纯合突变体的筛选

以 WT 为对照, 通过三引物鉴定法对 T-DNA 插入突变体进行纯合突变体鉴定, 其中纯合突变体中用基因特异性引物无法扩增出条带, 用 T-DNA 特异性引物可以扩增出目的带, 结果如图 1 所示, 其中 M 为 Marker, 1 泳道 WT 可用 LP + RP 引物扩增出片段, *lcd* 和 *aba1* 突变株系用基因特异性引物 LP + RP 无法扩增出条带, 而用 T-DNA 特异性引物 LBb1 + RP 可以扩增出目的条带, 证明 T-DNA 成功插入两条链中, 从而筛选出 *lcd* 与 *aba1* 纯合突变体, 扩繁并用于后续实验。

2.2 干旱胁迫对拟南芥种子萌发的影响

由图 2 可知, 萌发 10 d 后, 我们发现干旱胁迫下 WT、*lcd* 和 *aba1* 种子萌发明显滞后于其正常培养基中的萌发, 且干旱对其生长也有一定的抑制作用。*lcd* 和 *aba1* 的种子萌发率在胁迫处理第 3 d

明显低于 WT, 且 WT、*lcd* 和 *aba1* 在干旱胁迫下, 种子萌发率分别降低 14%、22%、48.65%, 干旱胁迫对 *aba1* 的抑制效果要比 *lcd* 更为显著, 说明 *LCD*、*ABA1* 基因均参与调控干旱胁迫下拟南芥的种子萌发过程, 且 *lcd*、*aba1* 突变体对干旱胁迫更加敏感。

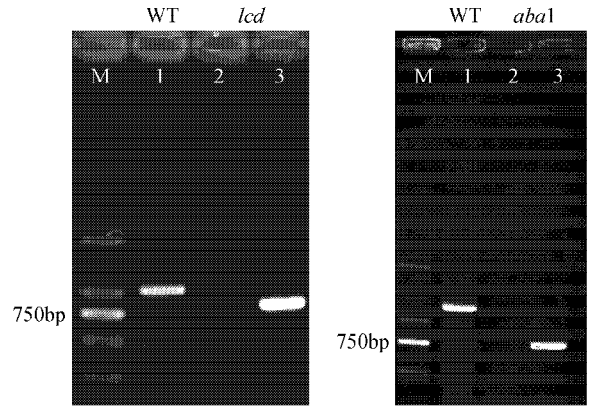


图 1 *lcd*、*aba1* 纯合突变体的 PCR 鉴定 A 1. WT LP + RP 2. *lcd* LP + RP 3. *lcd* LB + RP B 1. WT LP + RP 2. *aba1* LP + RP 3. *aba1* LB + RP

Fig. 1 Identification of homozygous strains by PCR

A 1. WT with LP + RP ; 2. *lcd* with LP + RP ; 3. *lcd* with LB + RP
B 1. WT with LP + RP ; 2. *aba1* with LP + RP ; 3. *aba1* with LB + RP

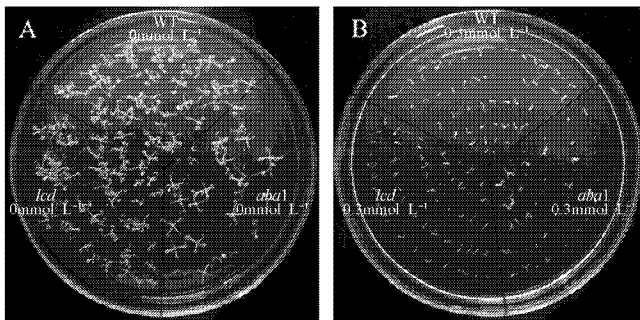


图 2 干旱胁迫对 WT、*lcd*、*aba1* 拟南芥生长 (A)、种子萌发率 (B) 的影响 图中小写字母表示同一株系不同浓度在 $P < 0.05$ 时的显著性差异, 大写字母表示不同株系同一浓度在 $P < 0.05$ 时的显著性差异, 下同。

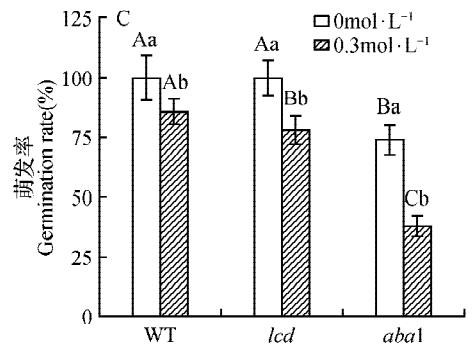
Fig. 2 Effects of drought stress on growth (A) and seed germination rate (B) of WT, *lcd* and *aba1* The lowercase letters in the figure indicate the significant differences in the different concentrations of the same strain at $P < 0.05$, and the uppercase letters indicate the significant difference in the same concentration of different strains at $P < 0.05$, the same as below.

2.3 干旱胁迫对野生型拟南芥 H₂S 含量、L/D-CDes 酶活性及 ABA 含量的影响

由图 3A 可知, 干旱胁迫下, 野生型拟南芥内源 H₂S 含量增加, 从图 3 中可以看出, 在不同的干旱胁迫时间处理下, H₂S 含量均显著高于空白对照组。与对照组相比, 0.3 mol · L⁻¹ 甘露醇处理下, H₂S 含量分别在 24 h 最低, 72 h 达到最大值。同时干旱胁迫显著提高了拟南芥叶片中 L/D-

CDes 活性 (图 3B), 且 L/D-CDes 酶活性的变化变化趋势相似, 但 L-CDes > D-CDes。由此得出 H₂S 响应干旱胁迫, 且 L-CDes 与干旱诱导的 H₂S 合成紧密相关。

图 3C 表示干旱胁迫下 ABA 含量随甘露醇处理时间的变化, 干旱胁迫下, ABA 含量显著提高, 在处理时间范围内, ABA 含量变化呈波动趋势, 其中在 12 h 达到最大值, 说明 ABA 响应干旱胁迫。



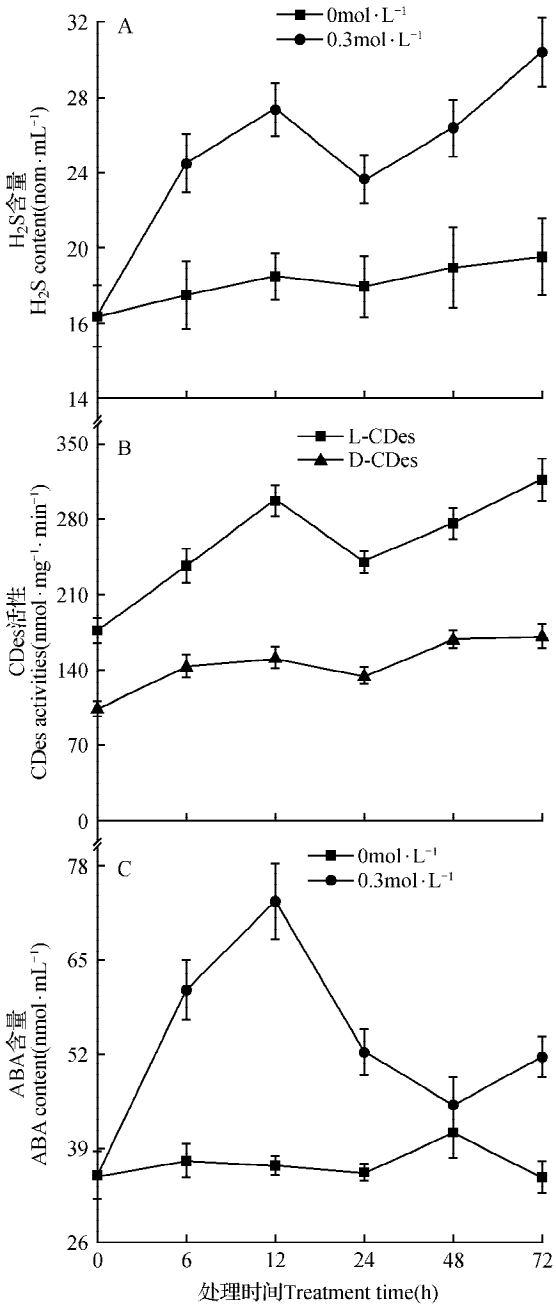


图3 干旱胁迫对野生型拟南芥 H_2S 含量(A)、L/D-CDes 活性(B)、ABA 含量(C)的影响

Fig.3 Effects of H_2S content (A), L/D-CDes activities (B) and ABA content (C) under drought stress in Wild-type *Arabidopsis*

2.4 干旱胁迫对野生型拟南芥 *LCD*、*ABA1* 相对基因表达量的影响

在干旱胁迫下,合成 L-CDes 和 ABA 的基因 *LCD*、*ABA1* 基因相对表达的变化如图 4 所示。图 4A 表明 *LCD* 基因相对表达总体表现逐渐增加的趋势,且变化趋势与 L-CDes 酶活性基本保持一致,在 72 h 达到峰值。图 4B 表示 *ABA1* 基因相对

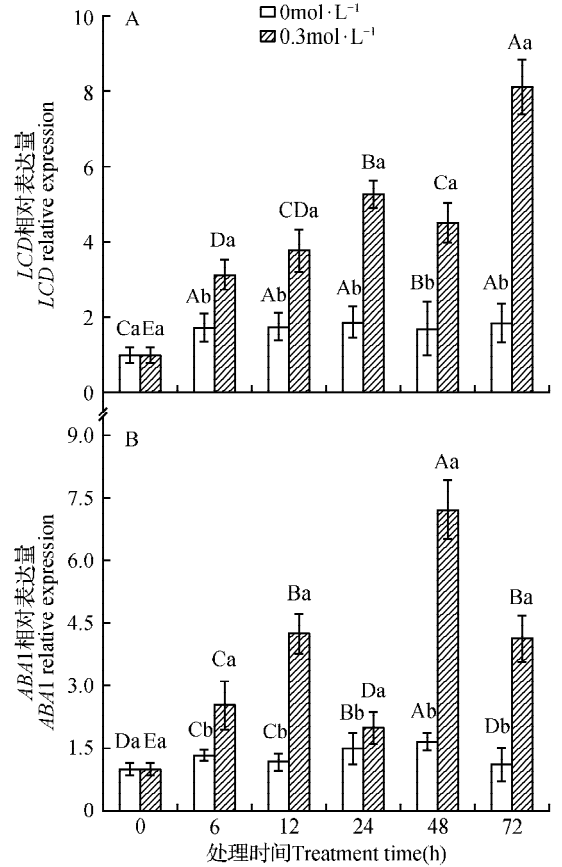


图4 干旱胁迫对野生型拟南芥中 *LCD* (A)、*ABA1* (B)基因相对表达的影响 图中小写字母表示同一时间不同浓度在 $P < 0.05$ 时的显著性差异,大写字母表示不同时间同一浓度在 $P < 0.05$ 时的显著性差异,下同。

Fig.4 Effects of drought stress on the gene relative expressions of *LCD* (A) and *ABA1* (B) in wild-type *Arabidopsis* The lower case letters indicate the same time different concentrations at $P < 0.05$ when the significant difference between the capital letters that the same concentrations at the different time in the $P < 0.05$ significant difference, the same as below.

表达随干旱胁迫时间的变化情况,在 6~72 h 的处理时间内,其基因相对表达随干旱胁迫时间的延长进一步增加,总体呈波动趋势,分别在 24 h 达到最小和在 48 h 达到最大值。转录水平分析表明,干旱胁迫通过改变 *LCD*、*ABA1* 基因的表达从而使 L-CDes 酶活性及 ABA 含量发生变化。

2.5 干旱胁迫下,外源 NaHS、ABA 对野生型拟南芥内源 H_2S 含量的影响

如图 5 所示,干旱胁迫下,分别外源添加 $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaHS、 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 后,随着处理时间, H_2S 含量会显著上升。表明 ABA 及 H_2S 供体 NaHS 显著影响野生型拟南芥 H_2S 的产生,说明干旱胁迫下,ABA 和 H_2S 存在一定的联系。

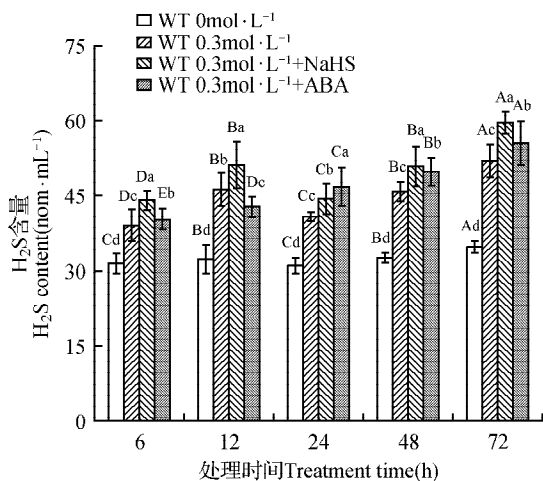


图5 干旱胁迫下,外源添加 NaHS、ABA 对 WT 中 H₂S 含量的影响

Fig. 5 Effects of exogenous NaHS, ABA on H₂S content in WT under drought stress

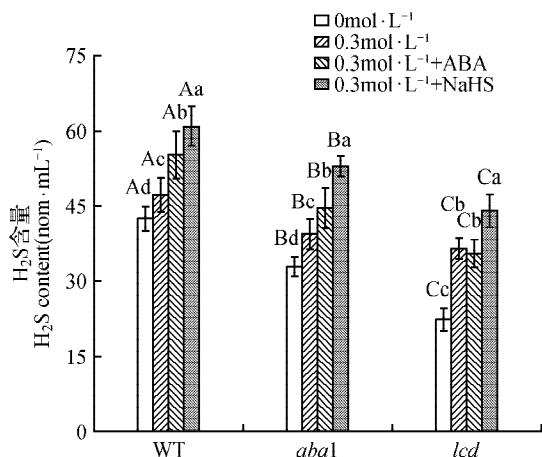


图6 干旱胁迫下,外源添加 NaHS 或 ABA 对 WT、*aba1* 和 *lcd* 中 H₂S 含量的影响

Fig. 6 Effects of exogenous NaHS or ABA on the content of H₂S in WT, *aba1* and *lcd* under drought stress

2.6 干旱胁迫下,外源 NaHS、ABA 对 WT、*lcd* 和 *aba1* 中内源 H₂S 含量的影响

我们利用 WT、H₂S 合成酶缺失型突变体 *lcd* 和 ABA1 缺失突变体 *aba1*, 通过外源添加 NaHS、ABA 对 *LCD*、*ABA1* 基因的缺失进行补偿实验, 研究干旱胁迫下, ABA 和 H₂S 的信号关系(图6)。

干旱胁迫下, 外源添加 NaHS 或 ABA 后 *aba1* 中 H₂S 含量的均显著上升, 说明外源 NaHS 与 ABA 对 *aba1* 中内源 H₂S 的释放产生作用, 外源添加 NaHS 促进 WT、*aba1* 与 *lcd* 中 H₂S 产生, 但

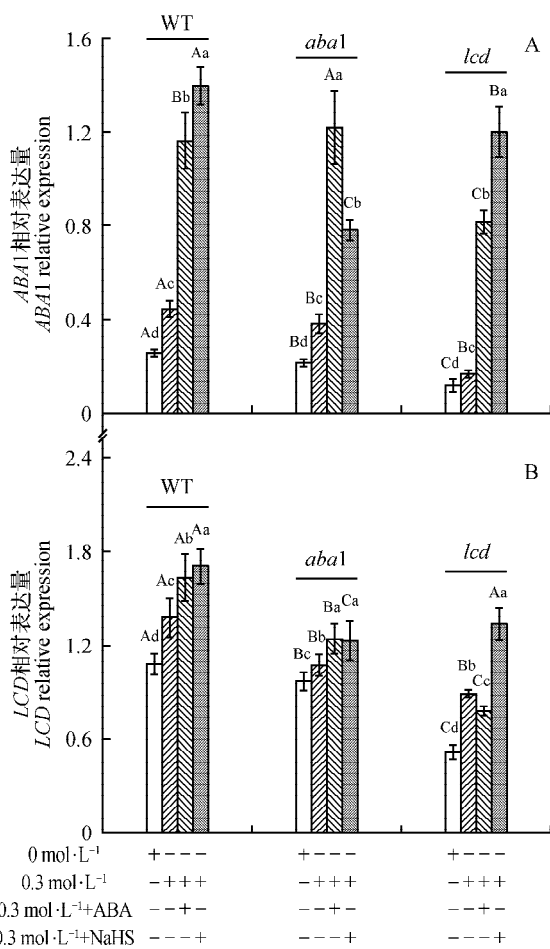


图7 外源 NaHS、ABA 对于干旱胁迫下 WT、*aba1*、*lcd* 中 ABA1、*LCD* 相对基因表达量的影响

Fig. 7 Effects of exogenous NaHS or ABA on the relative expression of ABA1 and LCD in WT, *aba1* and *lcd* under drought stress

aba1 与 *lcd* 没有恢复 WT 中 H₂S 的释放量, 说明调控 H₂S 产生的不仅仅只有 ABA1 与 *LCD*。当外源添加 ABA 后, 对 *lcd* 中 H₂S 的产生没有显著的促进作用, 初步说明 H₂S 位于 ABA 下游。

2.7 干旱胁迫下,外源 NaHS、ABA 对 WT、*lcd* 和 *aba1* 中 LCD、ABA1 相对基因表达量的影响

为了进一步证实 H₂S 位于 ABA 下游, 我们通过转录水平, 研究外源 NaHS、ABA 对 WT、*lcd*、*aba1* 中 *LCD*、*ABA1* 基因相对表达的影响, 结果如图7所示, 干旱处理 48 h 后, 胁迫诱导 WT、*aba1* 和 *lcd* 中 ABA、*LCD* 基因相对表达上调, 其中 *aba1* 和 *lcd* 中 ABA、*LCD* 基因相对表达显著低于 WT 中 ABA1、*LCD* 基因相对表达, 当外源添加 H₂S 供体 NaHS 进行补偿 *LCD* 的缺失后, WT、*lcd*、*aba1* 中

ABA1 与 *LCD* 基因相对表达均有不同程度的提高, 而外源添加 ABA 进行补偿 *ABA1* 的缺失后, WT 与 *aba1* 中 *ABA1* *LCD* 基因相对表达上调, 但 ABA 对 *lcd* 突变体中 *LCD* 基因相对表达促进作用不明显, 转录水平进而证实了 H_2S 位于 ABA 下游发挥作用这一结论。

3 讨论

植物的生长发育经常会受到环境非生物因素的极大影响, 如干旱、高盐、低温等, 植物处于逆境环境时, 首先要响应并适应这些胁迫条件从而在逆境中生存, 而干旱作为一种重要的环境因素一直是国内外研究的热点^[19]。

H_2S 是新发现的第 3 种内源性气体信号分子, 参与在植物多种生理过程。植物中 H_2S 主要通过的产生半胱氨酸脱巯基酶 (CDes) 催化半胱氨酸产生, 目前拟南芥中已经克隆了一些 CDes 编码基因, 其中 *LCD* 与 *DCD* 是植物内源 H_2S 产生过程中编码 CDes 合成酶功能最明确的两个基因^[20]。越来越多的研究表明, H_2S 作为新型气体信号分子会参与低温、高盐和干旱胁迫下的信号转导, 且外源 NaHS 能够缓解胁迫所引起的损伤^[21]。植物激素是一类小分子化合物, 调控了植物生长、发育和对环境变化的响应。通过改变激素的合成、运输和信号转导, 植物能够调节生长与胁迫耐受的平衡, 从而促进植物在胁迫环境中生存。ABA 作为一种重要的植物激素, 它在植物的生长发育过程中发挥着重要的作用^[22]。孙丽敏等^[23]发现 H_2S 信号和 WRKY 会增强 ABA 调节根生长和气孔运动显示 H_2S 与 ABA 之间存在密切关系。但关于干旱胁迫下, H_2S 与 ABA 在植物中的信号作用关系鲜有报道。

干旱影响植物的生长发育, 本文通过测定 WT、*lcd* 和 *aba1* 的种子萌发率的结果发现干旱胁迫下 *lcd* 和 *aba1* 突变体的萌发率均显著低于 WT, 且 *aba1* 种子发芽率抑制作用最为明显(图 2), 说明 ABA 对于干旱胁迫更加敏感。干旱胁迫促使拟南芥幼苗中 H_2S 含量的增加以及 CDes 活性的增强(图 3), 二者在 6~72 h 胁迫时间内有相同的变化趋势(图 3:A~B), CDes 活性变化中 L-CDes 活性始终高于 D-CDes 活性, 说明干旱胁迫下, 在合成 H_2S 中 L-CDes 占主导作用。这与本课题组前期关于干旱胁迫下研究拟南芥中 H_2S 与 *PLD α 1* 响应干旱胁迫作用的研究结果相一致^[24], 另一方

面, 干旱胁迫也会诱导 ABA 含量的上升(图 3C), 且 ABA 含量随处理时间呈波动趋势。 H_2S 和 ABA 都会积极响应干旱胁迫, 推测二者在响应胁迫的过程中有一定的联系。

对于干旱胁迫下 *LCD* 和 *ABA1* 的基因表达进行定量分析发现, 干旱胁迫均能诱导 *LCD* 和 *ABA1* 表达上调(图 4), 且 *LCD* 与 L-CDes 酶活性的变化趋势相同, 在 72 h 达到最大, 说明在干旱上调 *LCD* 的表达, 从而促使 L-CDes 酶活性的变化。如图 4B *ABA1* 表达在 48 h 达到峰值, 但 ABA 含量却在 12 h 就已经达到了最大值, 说明 ABA 含量变化先于 *ABA1* 的表达, *ABA1* 表达有滞后效应。为了证明 H_2S 和 ABA 存在联系, 分别外源添加 $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaHS $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 后发现, 随着处理时间的延长, H_2S 含量会显著上升(图 5), 说明 ABA 和 H_2S 供体 NaHS 能够显著影响野生型拟南芥 H_2S 产生, 进一步说明了干旱胁迫下, ABA 与 NaHS 可能参与 H_2S 的合成。

以拟南芥 WT、突变体 *aba1* 和 *lcd* 为研究材料, 通过外源添加 ABA 与 NaHS 进行补偿实验, 探究 ABA 与 H_2S 在干旱胁迫下的信号关系。结果表明, 干旱胁迫诱导 H_2S 的产生。外源添加 NaHS 和 ABA 后, 促进了 WT、*aba1* 和 *lcd* 中 H_2S 的释放(图 6), 说明即使 *ABA1* *LCD* 基因缺失, 但 NaHS 对 WT、*aba1*、*lcd* 中 H_2S 释放仍然有促进作用, 当外源添加 NaHS 补偿 *LCD* 的缺失后, H_2S 含量显著上升, 但 *aba1* 与 *lcd* 并没有恢复 WT 中 H_2S 的释放量, 说明调控 H_2S 产生的不仅仅只有 *ABA1* 与 *LCD*。此结果与 Qiao Z 等人研究 CDPKs 通过在拟南芥中增强 H_2S 信号来增强 Cd 耐受性的研究结果相似^[25], 当外源添加 ABA 后, 促进了 WT *aba1* 中 H_2S 的释放, 却对 *lcd* 中 H_2S 的产生没有显著的促进作用(图 6), 说明 ABA 诱导 H_2S 的产生依赖于 *LCD*, 也初步说明了 H_2S 可能位于 ABA 下游。

为了证实上一结论, 我们从转录水平分析 H_2S 与 ABA 响应干旱胁迫的信号关系。如图 7A 所示, 干旱胁迫能均诱导 WT、*aba1* 和 *lcd* 突变体拟南芥中 *ABA1*、*LCD* 的基因相对表达, *aba1* 和 *lcd* 中 *ABA1*、*LCD* 的基因相对表达显著低于 WT 中 *ABA1*、*LCD* 的基因相对表达, 表明干旱胁迫通过上调 *ABA1*、*LCD* 的基因相对表达从而促进 ABA 含量与 H_2S 含量上升。外源添加 NaHS、ABA 后, WT、*lcd*、*aba1* 中 *ABA1* 基因相对表达均有不同程度的提高, 但 *lcd*、*aba1* 中 *ABA1* 基因相对表达并没有恢

复到 WT 中 ABA1 基因相对表达水 ;NaHS、ABA 对 *lcd*、*aba1* 中 H₂S 含量的影响也得到了相似的结果 ,当外源添加 NaHS、ABA 后 ,促进 WT、*aba1* 中 LCD 的表达 ,表明 *aba1* 突变体中缺失 ABA1 基因并没有影响 LCD 基因相对表达 ,但外源 ABA 对 *lcd* 突变体中 LCD 基因的表达没有显著的促进作用 ,说明干旱胁迫通过 ABA 促进 H₂S 的释放与上调 LCD 基因相对表达进而调控植物生长 ,干旱胁迫下 H₂S 信号转导依赖于 ABA1。转录水平证实了 H₂S 位于 ABA 下游发挥作用这一结论。

综上 ,本研究表明干旱胁迫下 植物通过上调 LCD、ABA1 基因相对表达从而提高 CD_{es} 酶活性 ,ABA 含量的效果 进而开启 H₂S 与 ABA 响应干旱的途径 在该响应途径中 ,H₂S 位于 ABA 信号下游发挥作用 ,但信号途径存在复杂而紧密的作用机制 ,这种作用机制仍值得进一步深入研究。

参 考 文 献

- Hellal F A ,El-Shabrawi H M ,El-Hady M A ,et al. Influence of PEG induced drought stress on molecular and biochemical constituents and seedling growth of Egyptian barley cultivars[J]. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology 2018 ,16(1) :203 -212.
- Blum A. Osmotic adjustment is a prime drought stress adaptive engine in support of plant production[J]. Plant Cell & Environment 2017 ,40(1) :4 -10.
- Wang R. Hydrogen sulfide :a new EDRF[J]. Kidney International 2009 ,76(7) :700 -704.
- Huang P ,Shen Z Z ,Yu W ,et al. Hydrogen sulfide inhibits high-salt diet-induced myocardial oxidative stress and myocardial hypertrophy in Dahl rats[J]. Frontiers in Pharmacology 2017 ,8 :128.
- Wang R. Two 's company ,three 's a crowd :can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter[J]. FASEB Journal , 2002 ,16(13) :1792 -1798.
- Baudouin E ,Poilevey A ,Hewage N I ,et al. The significance of hydrogen sulfide for *Arabidopsis* seed germination [J]. Frontiers in Plant Science 2016 ,7 :930.
- Olas B. Hydrogen sulfide in signaling pathways[J]. Clinica Chimica Acta 2015 ,439 :212 -218.
- Zhang H ,Hu L Y ,Hu K D ,et al. Hydrogen sulfide promotes wheat seed germination and alleviates oxidative damage against copper stress[J]. Journal of Integrative Plant Biology 2008 ,50(12) :1518 -1529.
- Zhang H ,Tang J ,Liu X P ,et al. Hydrogen sulfide promotes root organogenesis in *Ipomoea batatas* ,*Salix matsudana* and *Glycine max*[J]. Journal of Integrative Plant Biology , 2009 ,51(12) :1086 -1094.
- Jin Z P ,Shen J J ,Qiao Z J ,et al. Hydrogen sulfide improves drought resistance in *Arabidopsis thaliana*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications , 2011 ,414(3) :481 -486.
- Fang H H ,Liu Z Q ,Jin Z P ,et al. An emphasis of hydrogen sulfide-cysteine cycle on enhancing the tolerance to chromium stress in *Arabidopsis*[J]. Environmental Pollution 2016 ,213 :870 -877.
- 朱晓琛 张汉马 ,南文斌. 脱落酸调控植物根系生长发育的研究进展[J]. 植物生理学报 2017 ,53(7) :1123 -1130.
Zhu X C ,Zhang H M ,Nan W B. Research progress on regulation of ABA in plant root development[J]. Plant Physiology Journal 2017 ,53(7) :1123 -1130.
- Espasandin F D ,Maiale S J ,Calzadilla P ,et al. Transcriptional regulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) gene by putrescine accumulation positively modulates ABA synthesis and drought tolerance in *Lotus tenuis* plants[J]. Plant Physiology and Biochemistry 2014 ,76 :29 -35.
- Zhang J H ,Jia W S ,Yang J C ,et al. Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses[J]. Field Crops Research 2006 ,97(1) :111 -119.
- 董寰 ,白玲 ,宋纯鹏. 植物激素 ABA 调控侧根生长发育的研究进展[J]. 中国农学通报 2016 ,32(18) :76 -82.
Dong H ,Bai L ,Song C P. Growth and development of lateral root regulated by plant hormone ABA[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin 2016 ,32(18) :76 -82.
- Li C ,Tan D X ,Liang D ,et al. Melatonin mediates the regulation of ABA metabolism ,free-radical scavenging ,and stomatal behaviour in two *Malus* species under drought stress[J]. Journal of Experimental Botany 2015 ,66(3) :669 -680.
- 金竹萍. 硫化氢对拟南芥应答干旱胁迫的信号作用机制[D]. 太原 :山西大学 2013.
Jin Z P. Signal effects and mechanisms of hydrogen sulfide in response to drought stress in *Arabidopsis*[D]. Taiyuan : Shanxi University 2013.
- Zhong G L ,Lin R X ,Xiao J L. Hydrogen sulfide acts as a downstream signal molecule in salicylic acid-induced heat tolerance in maize(*Zea mays* L.) seedlings[J]. Journal of Plant Physiology 2015 ,177 :121 -127.
- Chandra D ,Srivastava R ,Glick B R ,et al. Drought-tolerant *Pseudomonas* spp. improve the growth performance of finger millet(*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.) under non-stressed and drought-stressed conditions[J]. Pedosphere ,

- 2018 28(2) 227 - 240.
20. Li L ,Rose P ,Moore P K. Hydrogen sulfide and cell signaling[J]. Annual Review of Pharmacology and Toxicology , 2011 51(1) :169 - 187.
21. Da Silva C J ,Fontes E P B ,Modolo L V. Salinity-induced accumulation of endogenous H₂S and NO is associated with modulation of the antioxidant and redox defense systems in *Nicotiana tabacum* L. cv. Havana[J]. Plant Science 2017 , 256 :148 - 159.
22. Chen H ,Zhang J ,Neff M M ,et al. Integration of light and abscisic acid signaling during seed germination and early seedling development[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2008 , 105(11) :4495 - 4500.
23. 孙丽敏 裴雁曦 刘志强. H₂S 信号和 WRKY 在 ABA 调节根生长和气孔运动中的关系[J]. 植物研究 2016 ,36 (1) 97 - 104.
- Sun L M ,Pei Y X ,Liu Z Q. Relationship between H₂S signal and WRKY in ABA regulating root growth and stomatal movement[J]. Bulletin of Botanical Research ,2016 ,36 (1) 97 - 104.
24. 赵敏 杨宁 陈璐 等. 拟南芥中 H₂S 与 PLDα1 响应干旱胁迫的作用研究[J]. 植物研究 2018 ,38(3) :406 - 414.
- Zhao M ,Yang N ,Chen L ,et al. Effects of H₂S and PLDα1 on Drought Stress in *Arabidopsis thaliana*[J]. Bulletin of Botanical Research 2018 ,38(3) :406 - 414.
25. Qiao Z J ,Jing T ,Jin Z P ,et al. CDPKs enhance Cd tolerance through intensifying H₂S signal in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant and Soil 2016 ,398(1 - 2) 99 - 110.

投 稿 须 知

1. 投稿前请登陆本刊网站(<http://bbr.nefu.edu.cn/>)认真阅读本刊投稿中心中的各项说明,并按照本刊要求修改和补充论文中的有关内容,使论文符合本刊要求。投稿时请附作者单位介绍信或全体作者签名,说明无泄密、署名无误和未一稿多投,网上投稿请签订版权转让协议。作者自留底稿及软盘备份。

2. 投稿时,请登陆本刊网站在线提交论文。投稿后,可随时登陆查询稿件处理状况。

3. 稿件如初审通过,请作者按要求邮寄已签名的《版权转让协议》。

4. 稿件经过外审和编审后,如符合我刊要求,须交寄发表费,待发表费收到后,作者可登陆本刊网站后,在发稿状态下打印《稿件录用通知》。

5. 作者文责自负。本编辑部对来稿可做必要修改。

6. 稿件一经发表,酌致稿酬,并赠样刊 2 本。

7. 凡在本刊发表的论文,如荣获省部级以上成果奖,请及时通知本编辑部,并提供获奖证书复印件。

《植物研究》编辑部