

H₂S与Ca²⁺协同增强谷子对Cr⁶⁺胁迫的耐受

方慧慧 裴雁曦 田保华 张丽萍 乔增杰 刘志强*

(山西大学生命科学学院, 太原 030006)

摘要 继一氧化氮(NO)和一氧化碳(CO)之后, 第三种气体信号分子硫化氢(H₂S)对植物体生长发育和环境胁迫应答的调控正在受到越来越多的关注。钙离子(Ca²⁺)是重要的第二信使, 参与植物对多种胁迫的响应。该实验以谷子这种抗逆性较强的作物为材料, 对其响应六价铬(Cr⁶⁺)胁迫过程中H₂S和Ca²⁺信号的互作进行了研究。结果表明, Cr⁶⁺胁迫显著激活谷子幼苗的H₂S产生系统, 外源H₂S预处理能明显降低Cr⁶⁺胁迫对谷子根尖细胞的损伤, 而H₂S的合成抑制剂羟胺(HA)预处理, 使得Cr⁶⁺对谷子的毒害增强; 进一步实验发现, H₂S能激活Ca²⁺信号下游相关基因的表达, 同时Ca²⁺能增强H₂S的产生, 表明在植物体内H₂S和Ca²⁺信号存在复杂的联系。该研究也证明, H₂S和Ca²⁺可以通过调节重金属离子转运蛋白增强谷子对Cr⁶⁺的耐受。

关键词 硫化氢; 钙信号; 铬胁迫; 谷子

Ca²⁺ Participates in H₂S Induced Cr⁶⁺ Tolerance in *Setaria italica*

Fang Huihui, Pei Yanxi, Tian Baohua, Zhang Liping, Qiao Zengjie, Liu Zhiqiang*

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

Abstract Hydrogen sulfide (H₂S), as the third gasotransmitter after nitric oxide (NO) and carbon monoxide (CO), is attracting more and more attentions by the reason of regulating the growth and development process and stress responses in plants. Calcium (Ca²⁺) has been regarded as a core transducer and regulator in many adaptation processes of plants. In this study, the foxtail millet (*Setaria italica*), which has considerable tolerance to various stresses, was employed to explore the interaction between H₂S and Ca²⁺ signaling in responding to Cr⁶⁺ stress. The results showed that Cr⁶⁺ stress significantly activated the endogenous H₂S generation system. Correspondingly, cell damage from Cr⁶⁺ stress was alleviated by exogenous H₂S pretreatment but further aggravated by H₂S synthesis inhibitor hydroxylamine (HA). Meanwhile, under normal conditions, exogenous H₂S regulated the expression of Ca²⁺ signaling downstream molecules coding genes, while the emission of endogenous H₂S was also heightened by Ca²⁺. Further results demonstrated that H₂S and Ca²⁺ improved the Cr⁶⁺ tolerance by adjusting the heavy metal ion transporters.

Key words hydrogen sulfide; calcium signaling; chromium stress; *Setaria italica*

随着社会工业化进程的加速, 农药和化肥的大量施用以及汽车尾气的排放等, 大气和土壤中的重金属污染日益加剧^[1]。铬(Cr)是环境污染中的五毒

之一, 是一种毒性较大的致畸、致癌、致突变剂, 常以Cr³⁺和毒性尤为强烈的Cr⁶⁺形式存在^[2]。其毒性表现为: 引起植物体内大量活性氧(ROS)的积累, 造成

收稿日期: 2014-01-16 接受日期: 2014-03-12

国家自然科学基金(批准号: 31372085、31300236)和山西省高等学校科技创新基金(批准号: 2013103)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0351-7010599, E-mail: liuzhiqiang@sxu.edu.cn

Received: January 16, 2014 Accepted: March 12, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31372085, 31300236) and Scientific and Technological Innovation Programs of Higher Education Institutions in Shanxi (Grant No.2013103)

*Corresponding author. Tel: +86-351-7010599, E-mail: liuzhiqiang@sxu.edu.cn

网络出版时间: 2014-05-26 15:40

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.06.0008.html>

氧化损伤^[2-3]以及扰乱植物矿质营养^[4-5]和光合作用^[5]; 损害细胞膜, 使植物生长发育不良甚至死亡^[2]; 还会通过食物链危及人类的健康^[1-2]。因此, 对植物耐受重金属作用机制的研究意义十分重大。

作为气体信号分子, H₂S在动物体中的产生机制和生理作用已经被充分证实。在哺乳动物中, H₂S参与了保护心脏、舒张血管、分泌胰岛素、炎症反应、细胞周期以及伤害应激反应等多方面的重要生理过程, 是一个分布广泛功能多样的信号分子^[6-7]。而在高等植物中, H₂S的生理功能研究草创未就, 深层次的机制研究仍处于起步阶段。

早在1978年, 就有报道在玉米、菜豆中检测到内源H₂S的释放^[8]。植物体内H₂S主要是通过半胱氨酸脱巯基酶(CDes)催化半胱氨酸(Cys)降解生成。目前, LCD和DCD1是植物内源H₂S产生过程中功能最明确的两个酶^[9]。随后陆续发现, H₂S具有促进植物种子萌发和根的建成、调节花期、促进光合作用、调节气孔运动等生理功能^[10-14]以及调节植物对干旱、渗透、高盐、温度、重金属等胁迫的响应^[10,12-13,15-23]。近年来, 人们的目光开始集中于H₂S与其他一些分子的互作^[15,18,22-23], 如H₂S提高烟草悬浮细胞对热的耐受需要钙离子/钙调蛋白(Ca²⁺/CaM)的参与^[23]。钙离子(Ca²⁺)作为第二信使, 参与多个胞内信息的传递, 其中包括植物对重金属胁迫的响应^[24]。此外, Ca²⁺通过与重金属离子竞争离子通道, 增强植物对重金属的抗性^[25]。

本课题以谷子为材料, 研究其在响应Cr⁶⁺胁迫过程中H₂S和Ca²⁺信号的相互作用, 提出一个植物应答Cr⁶⁺胁迫的新机制。

1 材料与方法

1.1 材料处理

供试谷子(*Setaria italica*)品种为生态型晋谷21号。选择均匀饱满的种子, 进行表面消毒(75%酒精浸泡30 s, 6%次氯酸钠浸泡8 min, 其间剧烈震动), 蒸馏水漂洗3次, 将种子整齐摆放于含有3层纱布和 8 mL灭菌自来水的培养皿中, 于23 °C、相对湿度60%的组培室中黑暗催芽24 h, 之后将其转移至温度23 °C、相对湿度60%、光照强度160 μEm⁻²s⁻¹、光周期16/8 h(昼/夜)的条件下进行培育, 并保持纱布湿润。

发芽之后生长10 d的幼苗进行预处理, 用10 mL处理液(50 μmol/L NaHS、20 mmol/L CaCl₂、1 mmol/L

HA、5 mmol/L EGTA或者它们的组合处理液)替换培养皿中的水, 孵育之后供后续实验使用。其中比较特殊的是硫氢化钠(NaHS)预处理, 其操作参考Jin等^[17]的方法。对于胁迫处理, 以K₂Cr₂O₇溶液作为Cr⁶⁺的供体, 将培养皿中的溶液吸干净, 加入10 mL的K₂Cr₂O₇溶液。胁迫12 h之后进行基因表达检测, 胁迫24 h之后进行H₂S产率以及其他生理指标的测定。

1.2 根尖细胞活力检测

用Evens blue对谷子幼苗根尖细胞活力分别进行定性(染色)和定量(吸光值)检测, 具体实验方法参考Baker等^[26]。将谷子根尖约3 cm部分剪下, 于0.25%的Evens blue溶液中浸泡1 min, 显微镜进行定性检测; 对于定量检测, 同样取根尖部分约3 cm, 于0.025%的Evens blue溶液中浸泡30 min, 之后用蒸馏水漂洗3次, 再用1 mL甲醇进行研磨, 50 °C水浴30 min, 10 000 r/min离心15 min, 取上清液在600 nm处测定其吸光值。

1.3 H₂S产率的测定

半胱氨酸脱巯基酶(CDes)催化Cys降解生成H₂S是植物体内H₂S的主要来源, 因此, 我们用谷子体内H₂S的产生速率对CDes活性进行间接的检测。谷子体内H₂S产率的测定利用亚甲基蓝法, 实验方法参考Jin等^[17]。取0.2 g材料, 用Tris-HCl(pH8.0)溶液充分研磨, 离心5 min(12 000 r/min, 4 °C), 上清液进行蛋白定量(CBB法)和H₂S产率的测定。1 mL的反应体系包括: 80 μL 0.8 mmol/L L-Cys, 5 μL 2.5 mmol/L DTT, 200 μL 100 mmol/L Tris-HCl(pH9.0), 615 μL ddH₂O, 加入100 μL蛋白提取液以启动反应。同时, 用含有500 μL 1% ZnAc的EP管对反应产生的H₂S进行吸收, 该体系于37 °C反应15 min, 之后加入100 μL 30 mmol/L FeCl₃和100 μL的20 mmol/L对氨基二甲基苯胺, 暗处反应15 min, 在670 nm处测定其吸光值(D)。每个实验独立重复3次, 数据以3次重复的平均值和标准误差表示。

1.4 MDA含量的测定

当植物处于逆境时, 体内的ROS含量升高, 导致脂质过氧化, 丙二醛(MDA)是其产物之一, 常被用来指示细胞脂质过氧化的程度。MDA含量测定方法参照Shen等^[19-20]: 取0.15 g材料, 用1.5 mL 5% TCA溶液充分研磨, 离心5 min(5 000 r/min, 4 °C), 取1 mL上清液, 加入等体积0.67%的TBA溶液, 混匀, 沸水浴30 min, 冷却后离心, 取上清分别测定450, 532, 600 nm吸光

值, 根据公式计算MDA含量。每个实验独立重复3次, 数据均以3次重复的平均值和标准误差表示。

1.5 RNA的提取以及实时定量PCR

RNA提取和实时定量PCR(qRT-PCR)方法参考Shen等^[20]。取0.1 g材料, 用TRIzol[®]提取总RNA, 利用反转录试剂盒(TaKaRa)和Oligo(dT)引物获得cDNA。以肌动蛋白编码基因ACTIN作为内参照, 对靶基因的转录水平进行检测。用于qRT-PCR的引物列于表1。每个实验独立重复3次, 数据均以3次重复的平均值和标准误差表示。

2 结果

2.1 Cr⁶⁺胁迫对谷子幼苗根尖细胞活力的抑制效应

Evans blue根尖染色及吸光值定量检测结果表

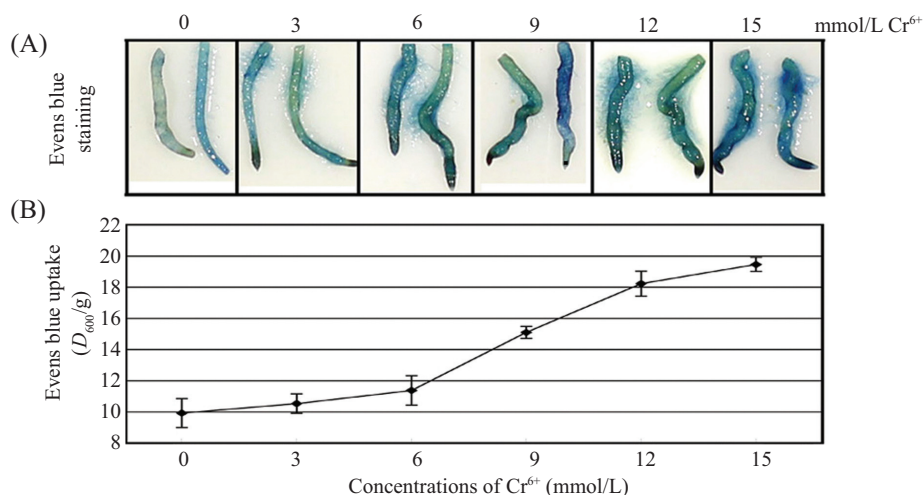
明, Cr⁶⁺能促使谷子幼苗根尖细胞死亡, 并且随着Cr⁶⁺浓度的升高, 死细胞的数目呈递增的趋势, 表现为Evans blue染色逐渐加深(图1A), 吸光值增加(图1B)。Cr⁶⁺浓度为9 mmol/L时的毒害作用已经足够明显, 故选用9 mmol/L作为后续实验Cr⁶⁺胁迫的处理浓度。

2.2 H₂S参与谷子幼苗对Cr⁶⁺胁迫的响应

为了研究H₂S在植物响应重金属胁迫过程中的作用, 首先检测了Cr⁶⁺胁迫对谷子幼苗H₂S产生速率的影响。结果如图2A所示, 随着Cr⁶⁺浓度的增加, 谷子幼苗H₂S的产生被明显激活, 说明H₂S参与了谷子幼苗对Cr⁶⁺胁迫的响应。之后, 以NaHS作为外源H₂S的供体, 在Cr⁶⁺胁迫前对谷子幼苗进行预处理, 结果发现不同浓度的NaHS(40 μmol/L、50 μmol/L、75 μmol/L)预处理能不同程度地缓解Cr⁶⁺胁迫引起的MDA的积

表1 qRT-PCR中所用引物列表
Table 1 List of primers for qRT-PCR

基因 Gene	登录号 Accession number	引物 Primer pairs
<i>ACTIN</i>	Millet_GLEAN_10003390	5'-GGT ATG GAG TCG CCT GGA ATC C-3' 5'-GCG GTC AGC AAT ACC AGG GAA C-3'
<i>CaM</i>	Millet_GLEAN_10026331	5'-GCA AGG AAG ATG AAG GAC ACT-3' 5'-CAG CAG CCG AGA TGA AAC C-3'
<i>CBL</i>	Millet_GLEAN_10008608	5'-GGT TTA TTG AAC GGA AGG AG-3' 5'-GCT TGG GAA TGT TGT TGT TA-3'
<i>CDPK</i>	Millet_GLEAN_10010676	5'-GAG ACG CAT CTG ATA AGC C-3' 5'-TGG CTA ATC CTG CTT TGA G-3'
<i>LCD</i>	Millet_GLEAN_10033926	5'-TTC ACC ACC CTG TTG TCT CG-3' 5'-CAG CAA GCA TCC TAC CCA TC-3'
<i>DCD1</i>	Millet_GLEAN_10033406	5'-TTG GAA GAA GGG AGG AAA CC-3' 5'-ATC CTA AAG CAA GAC CAG CA-3'
<i>DCD2</i>	Millet_GLEAN_10019193	5'-TGG ACA GGA CGA GAA AGT T-3' 5'-GGA AAA ATC CAG GGT AAA G-3'
<i>ZIP1</i>	Millet_GLEAN_10037365	5'-GGC ATA GGC TTG GGT GGT T-3' 5'-TTC CTG CTG AGG CTG AGT T-3'
<i>ZIP3</i>	Millet_GLEAN_10013710	5'-CAG AGG ACC CGA GCA CCA T-3' 5'-CGC GAC CGA GTT GAG GAT T-3'
<i>ZIP4</i>	Millet_GLEAN_10027469	5'-ACT GTG GGA GCA GGC ATC G-3' 5'-GCC ATC GCA CCA AGG AAC A-3'
<i>ZIP6</i>	Millet_GLEAN_10021623	5'-TGA GGT GTT GGA GGT GGT G-3' 5'-CCG ATG ATG ACG GAG TGG-3'
<i>HMA3-1</i>	Millet_GLEAN_10013711	5'-TCT CGT CGG GCT ATT TTC A-3' 5'-CTG CTC CTG TGC GTG CTT-3'
<i>HMA3-2</i>	Millet_GLEAN_10013714	5'-CGG GAA CTA TCA CAA AAG GG-3' 5'-CCG GGG TAG ATG CGA AAT-3'
<i>MTPC1</i>	Millet_GLEAN_10008340	5'-CGG AAG GCA GGA AAC CAC A-3' 5'-GGC GAA GCG GAA GCC CAT T-3'
<i>MTPC2</i>	Millet_GLEAN_10031774	5'-TCC TGT CTT TCT CCT TGG C-3' 5'-ATC CTC CGC ATT CCT GTA A-3'



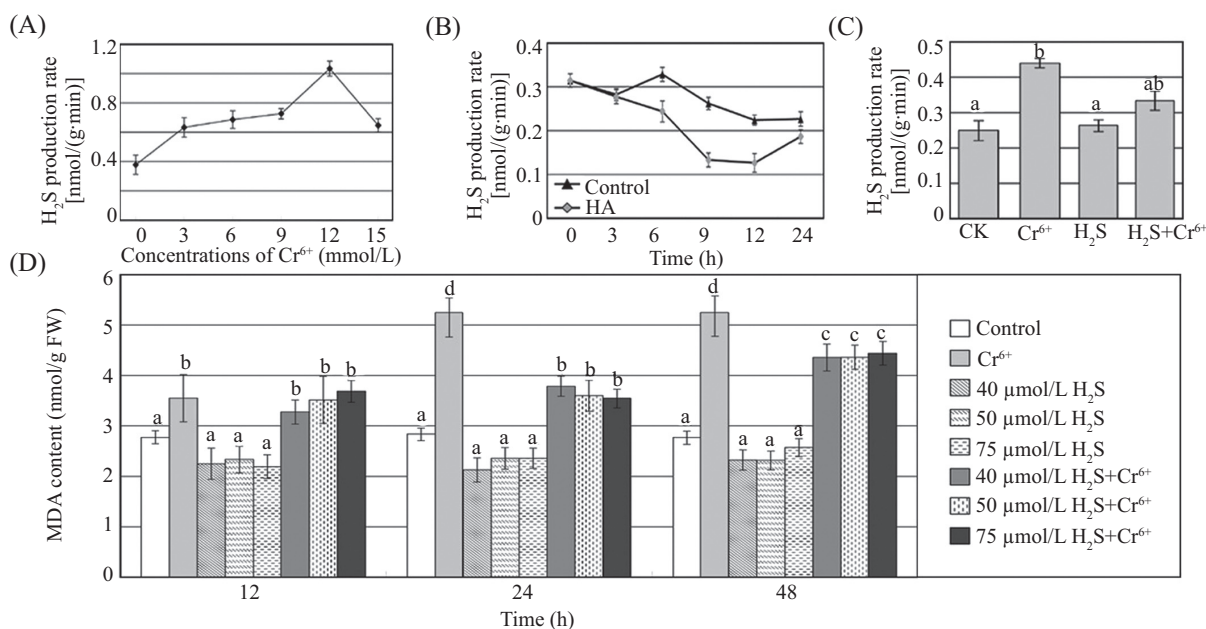
对发芽后生长10 d的谷子幼苗进行胁迫处理, 不同浓度 Cr^{6+} (0, 3, 6, 9, 12, 15 mmol/L Cr^{6+})胁迫24 h之后进行Evans blue细胞活力检测。

A: 谷子幼苗根尖细胞Evans Blue染色; B: 谷子幼苗根尖细胞Evans Blue吸光值定量检测。

10-day-old seedlings are exposed to different concentrations of Cr^{6+} (0, 3, 6, 9, 12, 15 mmol/L) for 24 h. A: Evans blue staining of the root tip cells; B: Evans blue uptake (detection of the absorbance) of the root tips.

图1 Cr^{6+} 胁迫对谷子幼苗根尖细胞活力的影响

Fig.1 Negative influences of Cr^{6+} stress on the cell viability of root tips in foxtail millet seedlings



A: Cr^{6+} (0, 3, 6, 9, 12, 15 mmol/L)胁迫对谷子体内 H_2S 产率的影响; B: HA(0, 3, 6, 9, 12, 24 h)对谷子体内 H_2S 产率的抑制作用; C: 外源 H_2S 对 Cr^{6+} 胁迫下谷子内源 H_2S 产率的影响; D: 外源 H_2S 对 Cr^{6+} 胁迫下谷子体内MDA含量的影响。不同处理组不同小写字母表示差异具有显著性。

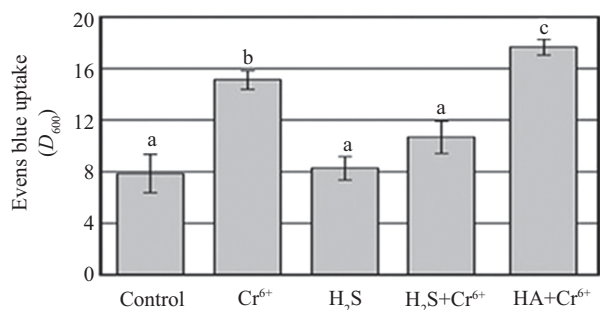
A: the H_2S production rate of foxtail millet with different concentrations (0, 3, 6, 9, 12, 15 mmol/L) of Cr^{6+} stress for 24 h; B: the inhibition of HA pretreatment with increasing treating time (0, 3, 6, 9, 12, 24 h) on the endogenous H_2S production rate in foxtail millet seedlings; C: effects of 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ H_2S pretreatment on the endogenous H_2S production rate in foxtail millet seedlings with or without 9 mmol/L Cr^{6+} stress; D: effects of exogenous H_2S pretreatment on the content of MDA in foxtail millet seedlings with or without 9 mmol/L Cr^{6+} stress. Bars with different letters indicated significantly difference.

图2 H_2S 信号参与谷子幼苗对 Cr^{6+} 胁迫的响应

Fig.2 H_2S signaling involved in the process of foxtail millet responding to Cr^{6+} stress

累, 其中50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ NaHS预处理24 h作用最明显(图2D), 因此, 选择50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ NaHS预处理24 h作为后续外源 H_2S 熏蒸的处理条件。根据图2C所示的结果, H_2S 熏蒸预处理谷子幼苗, 可以部分削弱 Cr^{6+} 胁迫引

起的 H_2S 产生速率的提高, 表明外源 H_2S 可以部分补充内源 H_2S 的作用。L/D-半胱氨酸脱巯基酶途径是植物体内源 H_2S 的主要来源, 而羟胺(HA)是L/D-半胱氨酸脱巯基酶的抑制剂, 为了从内源进一步验证 H_2S 在



50 $\mu\text{mol/L}$ NaHS和1 mmol/L HA预处理24 h, Cr⁶⁺胁迫24 h之后定量检测谷子幼苗根尖细胞Evens blue吸光值。不同处理组不同小写字母表示差异具有显著性。

Evens blue uptake (detection of the absorbance) of the root tips in foxtail millet seedling with or without 9 mmol/L Cr⁶⁺ stress after 24 h of 50 $\mu\text{mol/L}$ NaHS or 1 mmol/L HA pretreatment. Bars with different letters indicated significantly difference.

图3 外源H₂S和内源H₂S合成抑制剂HA对Cr⁶⁺胁迫(9 mmol/L Cr⁶⁺)下谷子根尖细胞活力的影响

Fig.3 Effects of 50 $\mu\text{mol/L}$ H₂S and 1 mmol/L HA on the cell viability of root tips in foxtail millet seedlings with or without 9 mmol/L Cr⁶⁺ stress

这个过程中的积极作用, 本实验选择1 mmol/L HA作为内源H₂S合成的抑制剂。由图2B可以看出, HA确实能抑制谷子体内H₂S的产率, HA处理9 h和12 h时的抑制作用相对明显, 分别达到49.2%和47.8%。

2.3 H₂S缓解Cr⁶⁺胁迫对谷子幼苗根尖的损伤

上述实验结果表明, H₂S在谷子抵御Cr⁶⁺胁迫的过程中发挥着重要的作用, 图3所示的实验结果进一步证实了该结论: 生理浓度的外源H₂S预处理能够缓解Cr⁶⁺胁迫引起的谷子根尖Evens blue吸光值的增

大, 即缓解Cr⁶⁺对谷子根尖细胞的损伤; 相反, 内源H₂S合成抑制剂HA预处理却能使Evens blue吸光值进一步增大, 即增强Cr⁶⁺对根尖细胞的损伤。

2.4 H₂S对Ca²⁺信号下游分子编码基因表达量的影响

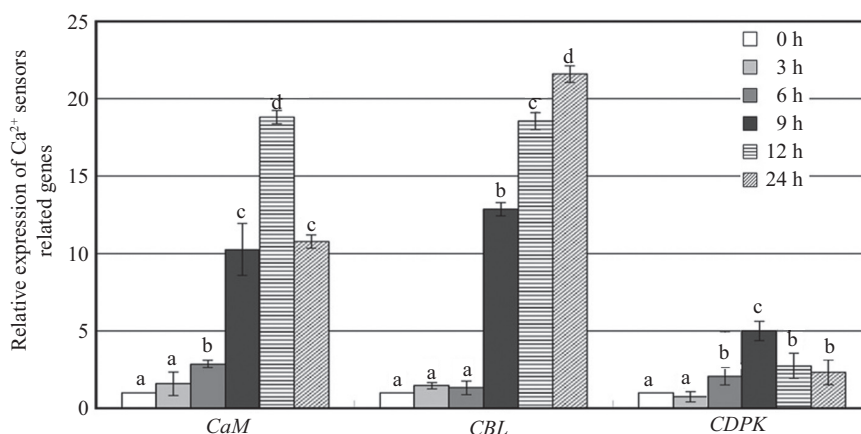
作为一种重要的第二信使, Ca²⁺被多次报道在植物响应许多胁迫的过程中是一种起始性的信号。H₂S熏蒸后, 胞内Ca²⁺的直接下游感知分子CaM、CBL及CDPK的编码基因表达量被不同程度的上调, 并且这种上调作用具有时间依赖效应, CaM、CDPK编码基因表达量分别在H₂S熏蒸12, 9 h时达到最大, 而CBL编码基因表达量在H₂S熏蒸24 h内持续升高。(图4)。该实验结果表明, H₂S通过上调CaM、CBL及CDPK基因的表达来调节Ca²⁺信号的传递。

2.5 Ca²⁺激活H₂S的产生

为了进一步探讨H₂S和Ca²⁺的相互作用, 我们利用20 mmol/L Ca²⁺对谷子幼苗进行处理。结果表明, 随着Ca²⁺处理时间的延长, H₂S产生相关基因LCD、DCD1及DCD2都被不同程度地激活, 并且具有时间依赖效应, 其表达量在Ca²⁺处理后12 h达到最大值; 同时, Ca²⁺预处理之后, H₂S产率也有了显著地提高(图5)。

2.6 H₂S和Ca²⁺在调节重金属转运蛋白方面的相互作用

植物激活体内的重金属转运蛋白是其应对重金属胁迫的重要手段, 为了进一步探究H₂S和Ca²⁺缓解Cr⁶⁺毒性的机制, 本实验对一些重金属转运相关蛋白

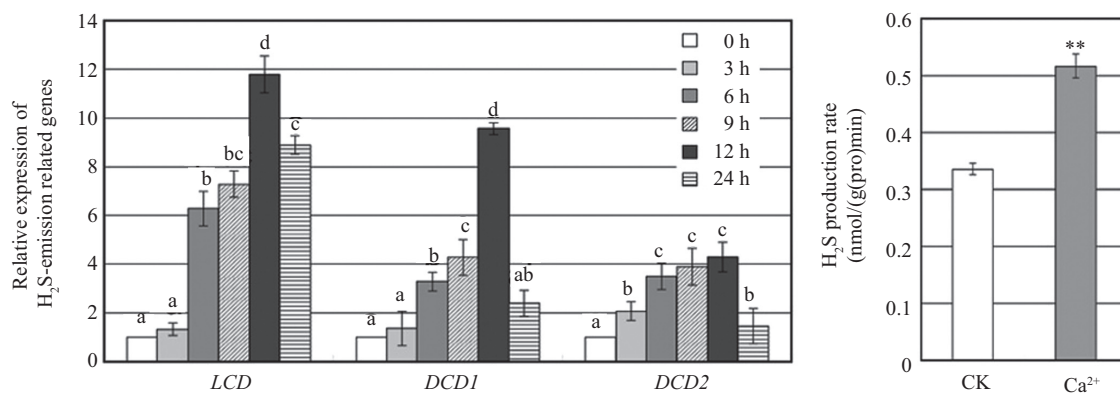


不同处理组不同小写字母表示差异具有显著性。

Bars with different letters indicated significantly difference.

图4 外源H₂S(50 $\mu\text{mol/L}$ NaHS)对谷子幼苗Ca²⁺信号相关基因表达量的调节

Fig.4 Influences of exogenous H₂S (50 $\mu\text{mol/L}$ NaHS) on the expression of Ca²⁺ signaling related genes in foxtail millet seedlings

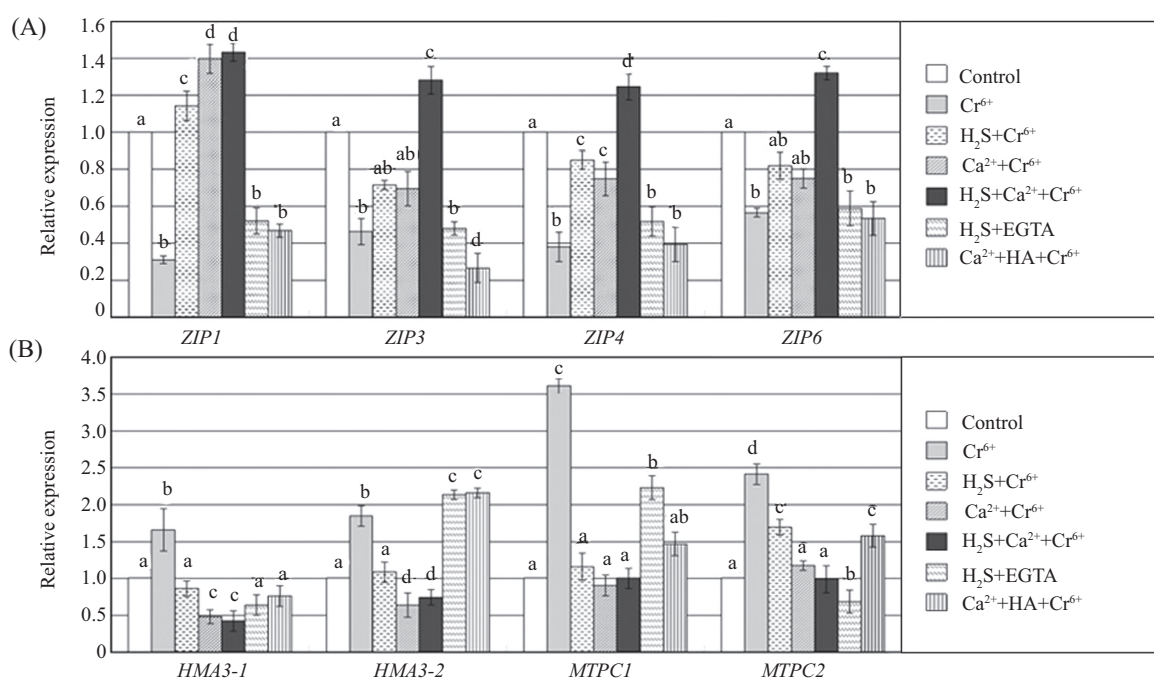


不同处理组不同小写字母表示差异具有显著性。

Bars with different letters indicated significantly difference.

图5 外源 Ca^{2+} (20 mmol/L CaCl_2)对谷子幼苗 H_2S 产率的影响

Fig.5 Influences of exogenous Ca^{2+} (20 mmol/L CaCl_2) on the H_2S production rate in foxtail millet seedlings



A: H_2S (50 $\mu\text{mol/L}$ NaHS和1 mmol/L HA)和 Ca^{2+} (20 mmol/L CaCl_2 和5 mmol/L EGTA)对重金属吸收相关基因表达的调节作用; B: H_2S (50 $\mu\text{mol/L}$ NaHS和1 mmol/L HA)和 Ca^{2+} (20 mmol/L CaCl_2 和5 mmol/L EGTA)对重金属外排相关基因表达的调节作用。不同处理组不同小写字母表示差异具有显著性。

A: the expressions of heavy metal uptake-related genes; B: the expressions of heavy metal efflux-related genes. 10-day-old seedlings with different pretreatments for 24 h are then treated with or without 9 mmol/L Cr^{6+} for 24 h. Bars with different letters indicated significantly difference.

图6 H_2S 和 Ca^{2+} 对重金属转运相关基因表达的调节作用

Fig.6 The regulation of the expressions of heavy metal transporter-related genes in foxtail millet induced by H_2S and Ca^{2+}

编码基因的表达量进行了检测, 包括将重金属离子运进细胞的转运体(*ZIP1*、*ZIP3*、*ZIP4*、*ZIP6*)和运出细胞的转运蛋白(*HMA3-1*、*HMA3-2*、*MTPC1*、*MTPC2*)。结果表明, Cr^{6+} 胁迫之后, *ZIP1*、*ZIP3*、*ZIP4*和*ZIP6*编码基因的表达量显著下调, 而NaHS、 Ca^{2+} 以及NaHS+ Ca^{2+} 预处理能明显恢复 Cr^{6+} 胁迫引起的基因表达下调; EGTA+NaHS预处理能明显抑制

H_2S 的恢复作用; 同时, HA+ Ca^{2+} 预处理也能部分影响 Ca^{2+} 的恢复作用(图6A)。相反, Cr^{6+} 胁迫显著上调HM外排相关转运蛋白编码基因*HMA3-1*、*HMA3-2*、*MTPC1*和*MTPC2*的表达量, 而NaHS、 Ca^{2+} 以及NaHS+ Ca^{2+} 预处理能显著抑制这些基因的高表达。HA+ Ca^{2+} 预处理能明显削弱 Ca^{2+} 的这种恢复作用, 同时, EGTA+NaHS预处理也明显地抑制了 H_2S 对

*HMA3-2*和*MTPC1*表达的恢复作用,却并不能影响 H_2S 对*HMA3-1*和*MTPC2*表达的恢复作用(图6B)。

3 讨论

目前,我国受镉、砷、铬、铅等重金属污染的耕地面积高达2 000万公顷,约占总耕地面积的1/5,研究植物对重金属的耐受机制具有重要意义。植物通过减少重金属离子的吸收、增加外排以及对重金属离子进行区域化处理或者将其螯合来抵抗重金属胁迫^[1-2]。

本实验室之前的研究发现, H_2S 可以调节重金属离子的转运,激活抗氧化系统,提高拟南芥以及大肠杆菌对镉(Cd^{2+})的耐受^[19,27]。另有报道, H_2S 能通过缓解氧化损伤、调节细胞壁成分等来增强植物对重金属的耐受,缓解重金属对植物的毒害^[10,19,21-22]。而本研究则证明在谷子响应 Cr^{6+} 胁迫的耐受过程中, H_2S 和 Ca^{2+} 发挥着重要的作用,并且两者之间存在复杂的关系。

图4的结果表明, Ca^{2+} 信号参与 H_2S 缓解重金属胁迫,外源 H_2S 供体NaHS处理能明显上调谷子胞内 Ca^{2+} 感知分子CaM、CBL以及CDPK的编码基因表达量,并且这种激活作用具有时间依赖效应。这在一定程度上说明, H_2S 能影响 Ca^{2+} 信号的下游分子与 Ca^{2+} 进行互作。而图5的结果则表明, Ca^{2+} 能显著上调谷子体内 H_2S 产生相关基因*LCD*、*DCD1*和*DCD2*的表达,大大增强谷子体内的 H_2S 产率,即激活谷子体内的 H_2S 产生系统。由此表明, H_2S 和 Ca^{2+} 信号共同参与了谷子对 Cr^{6+} 胁迫的响应,在这个过程中, H_2S 和 Ca^{2+} 信号并不是单纯的上下游关系,它们存在着潜在复杂的联系,相互作用进而提高谷子对 Cr^{6+} 胁迫的耐受。

进一步的研究发现,谷子通过下调重金属吸收相关蛋白编码基因*ZIP1*、*ZIP3*、*ZIP4*和*ZIP6*的表达,增强重金属外排相关蛋白编码基因*HMA3-1*、*HMA3-2*、*MTPC1*和*MTPC2*的表达来抵抗 Cr^{6+} 胁迫(图6)。 H_2S 、 Ca^{2+} 或 H_2S+Ca^{2+} 预处理后, Cr^{6+} 引起的ZIPs相关编码基因表达的下调和外排基因表达的上调都得到一定程度的恢复,这表明 H_2S 和 Ca^{2+} 能通过复杂的生理途径缓解 Cr^{6+} 胁迫对谷子的伤害,从而在一定程度上恢复 Cr^{6+} 胁迫对这些重金属转运相关基因表达量的影响。而深入的研究表明,对于ZIPs相关编码基因的表达, H_2S 的缓解

作用在去除 Ca^{2+} (EGTA+ H_2S)后被明显抑制,去除 H_2S (HA+ Ca^{2+})能部分影响 Ca^{2+} 的缓解作用(图6A);而对于*HMA3-1*、*HMA3-2*、*MTPC1*和*MTPC2*, Ca^{2+} 对这些基因的恢复作用在去除 H_2S (HA+ Ca^{2+})后被明显削弱,去除 Ca^{2+} (EGTA+ H_2S)能明显抑制 H_2S 对*HMA3-2*和*MTPC1*表达量的恢复,但不影响 H_2S 对*HMA3-1*和*MTPC2*的恢复作用(图6B)。这些结果说明,当遭遇 Cr^{6+} 胁迫时,谷子会调节其体内的重金属转运体,同时激活其体内的 H_2S 和 Ca^{2+} 信号提高谷子对 Cr^{6+} 的耐受,进而恢复 Cr^{6+} 胁迫对这些重金属转运相关基因的表达量的影响,在这个过程中 H_2S 和 Ca^{2+} 信号并不是单纯的上下游关系,它们通过复杂的联系和相互作用提高谷子对 Cr^{6+} 胁迫的耐受。

参考文献 (References)

- Hall JL. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot* 2002; 53(366): 1-11.
- Shanker AK, Cervantes C, Loza-Tavera H, Avudainayagam S. Chromium toxicity in plants. *Environ Int* 2005; 31(5): 739-53.
- Seth CS, Remans T, Keunen E, Jozefczak M, Gielen H, Opdenakker K, *et al.* Phytoextraction of toxic metals: A central role for glutathione. *Plant Cell Environ* 2012; 35: 334-46.
- Bishnoi NR, Chugh LK, Sawhney SK. Effect of chromium on photosynthesis, respiration and nitrogen fixation in pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. *J Plant Physiol* 1993; 142(1): 25-30.
- Clijsters H, Van Assche F. Inhibition of photosynthesis by heavy metals. *Photosynth Res* 1985; 7(1): 31-40.
- Yang GD, Wu LY, Jiang B, Yang W, Qi JS, Cao K, *et al.* H_2S as a physiologic vasorelaxant: Hypertension in mice with deletion of cystathionine γ -lyase. *Science* 2008; 322(5901): 587-90.
- Wang R. Physiological implications of hydrogen sulfide: A whiff exploration that blossomed. *Physiological Rev* 2012; 92(4): 791-896.
- Wilson LG, Bressan RA, Filner P. Light-dependent emission of hydrogen sulfide from plants. *Plant Physiol* 1978; 61(2): 184-9.
- Riemenschneider A, Wegele R, Schmidt A, Papenbrock J. Isolation and characterization of a D-cysteine desulfhydrase protein from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS J* 2005; 272(5): 1291-304.
- Zhang H, Hu LY, Hu KD, He YD, Wang SH, Luo JP. Hydrogen sulfide promotes wheat seed germination and alleviates oxidative damage against copper stress. *J Integr Plant Biol* 2008; 50(12): 1518-29.
- Zhang H, Hu SL, Zhang ZJ, Hu LY, Jiang CX, Wei ZJ, *et al.* Hydrogen sulfide acts as a regulator of flower senescence in plants. *Postharvest Biol Tech* 2011; 60(3): 251-7.
- Shan CJ, Zhang SL, Li DF, Zhao YZ, Tian XL, Zhao XL, *et al.* Effects of exogenous hydrogen sulfide on the ascorbate and glutathione metabolism in wheat seedlings leaves under water stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 2011; 33(6): 2533-40.
- 王兰香, 侯智慧, 侯丽霞, 赵方贵, 刘新. H_2O_2 介导的 H_2S 产生参与干旱诱导的拟南芥气孔关闭. *植物学报*(Wang Lanxiang,

- Hou Zhihui, Hou Lixia, Zhao Fanggui, Liu Xin. H₂S induced by H₂O₂ mediates drought-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. Chinese Bull Botany 2012; 47(3): 217-25.
- 14 Chen J, Wu FH, Wang WH, Zheng CJ, Lin GH, Dong XJ, *et al*. Hydrogen sulfide enhances photosynthesis through promoting chloroplast biogenesis, photosynthetic enzyme expression, and thiol redox modification in *Spinacia oleracea* seedlings. J Exp Bot 2011; 62(13): 4481-93.
- 15 Li ZG, Yang SZ, Long WB, Yang GX, Shen ZZ. Hydrogen sulfide may be a novel downstream signal molecule in nitric oxide-induced heat tolerance of maize (*Zea mays* L.) seedlings. Plant Cell Environ 2013; 36: 1564-72.
- 16 Wang YQ, Li L, Cui WT, Xu S, Shen WB, Wang R. Hydrogen sulfide enhances alfalfa (*Medicago sativa*) tolerance against salinity during seed germination by nitric oxide pathway. Plant Soil 2012; 351: 107-19.
- 17 Jin ZP, Shen JJ, Qiao ZJ, Yang GD, Wang R, Pei YX. Hydrogen sulfide improves drought resistance in *Arabidopsis thaliana*. Biochem Biophys Res Commu 2011; 414(3): 481-6.
- 18 Jin ZP, Xue SW, Luo YN, Tian BH, Fang HH, Li H. Hydrogen sulfide interacting with abscisic acid in stomatal regulation responses to drought stress in *Arabidopsis*. Plant Physiol Biochem 2013; 62: 41-6.
- 19 Shen JJ, Qiao ZJ, Xing TJ, Zhang LP, Liang YL, Jin ZP. Cadmium toxicity is alleviated by AtLCD and AtDCD in *Escherichia coli*. J Appl Microbiol 2012; 113(5): 1130-8.
- 20 Shen JJ, Xing TJ, Yuan HH, Liu ZQ, Jin ZP, Zhang LP. Hydrogen sulfide improves drought tolerance in *Arabidopsis thaliana* by microRNA expressions. PLoS One 2013; 8: e77047.
- 21 Wang BL, Shi L, Li YX, Zhang WH. Boron toxicity is alleviated by hydrogen sulfide in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings. Planta 2010; 231(6): 1301-9.
- 22 Shi HT, Ye TT, Chan ZL. Nitric oxide-activated hydrogen sulfide is essential for cadmium stress response in bermudagrass (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.). Plant Physiol Biochem 2014; 74: 99-107.
- 23 Li ZG, Gong M, Xie H, Yang L, Li J. Hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide-induced heat tolerance in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) suspension cultured cells and involvement of Ca²⁺ and calmodulin. Plant Sci 2012; 185: 185-9.
- 24 Kudla J, Batistič O, Hashimoto K. Calcium signals: the lead currency of plant information processing. Plant Cell 2010; 22(3): 541-63.
- 25 Zhu JK. Salt and drought stress signal transduction in plants. Annu Rev Plant Biol 2002; 53: 247-73.
- 26 Baker CJ, Mock NM. An improved method for monitoring cell death in cell suspension and leaf disc assays using Evans blue. Plant Cell Tissue Organ Culture 1994; 39(1): 7-12.
- 27 Li YW, Gong ZH, Mu Y, Zhang YX, Qiao ZJ, Zhang LP. An *Arabidopsis* mutant atcsr-2 exhibits high cadmium stress sensitivity involved in the restriction of H₂S emission. J Zhejiang Univ Sci B 2012; 13(12): 1006-14.