

H₂S信号通过调节RuBisCo增强植物抗旱性

金竹萍 王磊 李澄 裴雁曦*

(山西大学生命科学学院, 特色植物资源研究与利用山西省重点实验室, 太原 030006)

摘要 气体信号分子硫化氢(H₂S)同时参与“诱导气孔关闭”和“增强光合作用”两个看似矛盾的生理过程。为了探究这一现象可能的机制, 该文以模式植物拟南芥野生型(WT)与内源H₂S生成酶缺失突变体(*lcd/des1*)为实验材料, 研究干旱胁迫下H₂S信号对植物非气孔因素的影响。结果表明, *lcd/des1*经外源生理浓度H₂S熏蒸后, 气孔导度(*Gs*)下降, 胞间二氧化碳浓度(*Ci*)显著降低, 净光合速率(*Pn*)显著升高; 干旱胁迫下的*lcd/des1*与WT相比, *Gs*增加, *Pn*显著降低。特别地, 干旱条件下对*lcd/des1*外源施加H₂S, 显著上调光合作用关键酶RuBisCo编码基因的表达量与酶活性。综上所述, H₂S可通过调节非气孔因素RuBisCo酶的转录表达及其羧化活性, 以增加叶片*Pn*, 使干旱胁迫下的植株在气孔关闭时仍维持较高效率的光合作用。

关键词 硫化氢; 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶; 干旱胁迫; 拟南芥

Hydrogen Sulfide Signal Enhances Drought Resistance by Regulating RuBisCo in *Arabidopsis thaliana*

JIN Zhuping, WANG Lei, LI Cheng, PEI Yanxi*

(School of Life Science, Shanxi University, Shanxi Key Laboratory for Research and Development of Regional Plants, Taiyuan 030006, China)

Abstract Hydrogen sulfide (H₂S), as a gasotransmitter, was reported to be involved in the induced stomatal closure and enhanced photosynthesis, which were contradictory physiological processes in plants. In order to explore the potential mechanism underlying this process, the model plant *Arabidopsis thaliana* wild type (WT) and mutant defective in the gene encoding H₂S-producing enzyme (*lcd/des1*) were used as experimental materials to study the effect of H₂S signal on non-stomatal factors under drought stress. The results showed that in the presence of exogenous physiological concentrations of H₂S, stomatal conductance (*Gs*) decreased, intercellular carbon dioxide concentration (*Ci*) decreased significantly, while net photosynthetic rate (*Pn*) increased significantly in *lcd/des1* mutant. Under drought stress, compared with WT, *Gs* in *lcd/des1* increased and *Pn* decreased significantly. In particular, after the treatment of exogenous H₂S under drought conditions, the expression levels of RuBisCo (the key enzyme in the calvin cycle of photosynthesis) coding genes in *lcd/des1* were up-regulated and the activity of RuBisCo was significantly improved. In summary, H₂S can increase *Pn* by regulating the transcriptional expression of RuBisCo, which is one of the non-stomatal factors, and increasing its carboxylation activity, so that the plants under drought stress maintain high-efficiency photosynthesis during the stomatal closure.

Keywords hydrogen sulfide; RuBisCo; drought stress; *Arabidopsis thaliana*

收稿日期: 2019-06-27 接受日期: 2019-08-06

国家自然科学基金(批准号: 31672140、31671605)和山西省优秀人才科技创新项目(批准号: 2018050211016)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13934559401, E-mail: peiyanxi@sxu.edu.cn

Received: June 27, 2019 Accepted: August 6, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31672140, 31671605) and Shanxi Province Excellent Talents Science and Technology Innovation Project (Grant No.2018050211016)

*Corresponding author. Tel: +86-13934559401, E-mail: peiyanxi@sxu.edu.cn

网络出版时间: 2019-11-12 12:36:24 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20191112.1205.032.html>

干旱胁迫已成为世界范围内限制作物生产的主要逆境之一,可通过影响作物叶片的光合功能,进而导致其生物总量、产量和品质下降^[1,2]。

硫是植物生长发育所必需的营养元素,植物从土壤中吸收硫酸盐并同化成半胱氨酸(Cys)^[3],之后再通过酶催化反应降解Cys生成植物体内源硫化氢(hydrogen sulfide, H₂S)^[4]。植物体内源H₂S主要以L型半胱氨酸(L-Cys)为底物,在半胱氨酸脱巯基酶(cysteine desulfhydrases, CDes)成员LCD(定位于细胞核)和DES1(定位于细胞质)的作用下产生^[4]。自1978年Wilson等^[5]在黄瓜、玉米、大豆等高等植物中检测到H₂S的释放,陆续有报道揭示了植物内源H₂S作为气体信号分子增强植物抵御各种生物、非生物胁迫中生理功能^[6-9]。特别地,在植物抵抗干旱胁迫过程中,H₂S可通过与植物激素和其他信号分子相互作用^[10]。

2010年, García-Mata等^[11]的研究结果表明,干旱条件下100 μmol/L NaHS可诱导不同物种的植物气孔关闭,且证实了在此过程中NaHS的作用是由于释放H₂S而不是钠盐的解离或渗透作用。随后,我们课题组在此方面进行了大量探索。2011年证实了干旱胁迫诱导拟南芥体内的H₂S产率显著升高,H₂S生成酶编码基因与干旱相关基因的表达模式基本相同。生理浓度外源H₂S极显著增加干旱胁迫下幼苗的存活率。究其原因,H₂S诱导拟南芥气孔关闭,以减少水分散失,增强植株的抗旱性^[7]。进一步以H₂S缺失突变体*lcd*为实验材料进行研究,表明H₂S信号部分参与了植物激素ABA诱导气孔关闭的信号网络,且两者互为上下游关系。其中H₂S调控了保卫细胞多个离子通道和ABA受体编码基因的表达^[12]。然后以保卫细胞为研究对象,利用非损伤微测技术(NMT),得到了H₂S调节离子通道活性的直接证据,表明内源H₂S通过调控保卫细胞膜上离子的流速和流向,以诱导气孔关闭,其中K⁺流动贡献主要的调节作用^[13-14]。

与此同时,陆续有报道证明,H₂S可促进植物的光合作用。2011年,Chen等^[6]的研究结果表明,100 μmol/L NaHS可促进菠菜叶绿体中基粒片层的堆叠,且该处理下菠菜幼苗的净光合速率显著高于对照组;2017年,孙丽敏等^[15]以H₂S突变体*des1*及OE-*DES1*为实验材料,研究发现,内源H₂S可保护干旱胁迫下植株叶绿体结构的完整性,促使叶片净光合速率显著上升。

令人疑惑的是,干旱胁迫下H₂S“诱导气孔关闭”

和“增强光合作用”的生理过程中,似乎在CO₂的供需方面存在矛盾。这暗示了非气孔因素在此过程中可能存在的作用。本研究以光合作用关键酶核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(RuBisCo)为切入点,以干旱胁迫为研究背景,生理浓度H₂S外源处理拟南芥野生型(wild type, WT)与内源H₂S生成酶缺失突变体*lcd/des1*进行比较,阐述了内源与外源H₂S信号在植物抵抗干旱胁迫过程中对非气孔因素的作用机理。

1 材料与方法

1.1 实验材料

拟南芥野生型(*Arabidopsis thaliana*, Col-0)和内源H₂S生成酶缺失的双突变体*lcd/des1*,均由本实验室保存;外源H₂S供体为NaHS(购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司)。

1.2 实验处理

经4 °C春化过的拟南芥WT、*lcd/des1*种子播种于灭菌基质土中,各自选用约4周龄的长势一致的幼苗分为两大组:正常浇水组、自然干旱(drought)组。分别经5天的正常浇水、自然干旱后,再各自分出一半幼苗进行100 μmol/L NaHS熏蒸,6 h/天,熏蒸时间固定在9:00~15:00,5天后进行观察和取材,直尺测量记录根长变化。8个处理组的具体信息如表1。

1.3 相关光合指标测定

使用SY-1020便携式光合作用测定仪(石家庄世亚科技有限公司)检测幼苗各项光合参数:净光合速率(net photosynthetic rate, *Pn*)、蒸腾速率(transpiration rate, *Tr*)、气孔导度(stomatal conductance, *Gs*)、胞间二氧化碳浓度(intercellular CO₂ concentration, *Ci*)和水分利用率(water use efficiency, *Wue*),测定时需光源充足且空气中CO₂含量稳定,无风。

1.4 叶绿素含量测定

参考李合生的实验方法^[6]。取0.05 g新鲜叶片,加1 mL 95%乙醇于研钵中研得匀浆,转移至5 mL EP管中,再将洗研钵的2 mL 95%乙醇也转移进EP管,共3 mL,研好的匀浆注意遮光;室温3 000 r/min,10 min离心得上清。

取200 μL上清于96孔板中置于多功能酶标仪中测定665 nm、649 nm、470 nm下的吸光度;以95%乙醇为空白对照,空白和样品均为3个重复,记录数值;按公式计算各叶绿体色素含量。叶绿素a(Chl a)浓度(mg/L): $C_a = 13.95 \times D_{665} - 6.88 \times D_{649}$;叶绿素b(Chl b)浓度(mg/L): $C_b = 24.96 \times D_{649} - 7.32 \times D_{665}$;类胡萝卜素(Caro)

浓度(mg/L): $C_{x.c}=(1\ 000\times D_{470}-2.05\times C_a-114.8\times C_b)/245$; 叶绿素(Chl)浓度(mg/L): $C_l=C_a+C_b=6.63\times D_{665}+18.08\times D_{649}$; 各叶绿体色素含量(mg/g)=[色素浓度(mg/L) \times 提取液体积(L)]/叶片鲜重 F_w (g)

1.5 RNA提取及qRT-PCR

分别取表1中8个处理组的拟南芥幼苗叶片,用RNAiso Plus试剂进行RNA的提取,用5 \times All-In-One MasterMix反转录试剂盒反转录,具体操作方法按照说明书进行。以cDNA为模板,用拟南芥ACTIN基因作为内参,用荧光定量PCR仪检测分析各处理组基因表达水平的变化,每个实验均重复3次。表2为用于qRT-PCR的引物,所检测的四个小亚基基因因CDs区同源性太高,故将特异性引物设于3'-UTR区,可达到区别检测四个小亚基的目的;RBCL特异性引物设于CDs区。

1.6 RuBisCo羧化活性测定

采用分光光度酶偶联法测定,参考了李合生^[16]

及李粹芳、李立人^[17]的方法并有所调整,于酶标仪中检测。计算公式如下:

$$\text{RuBisCo 羧化活性}[\mu\text{mol CO}_2/(\text{min}\cdot\text{mg protein})] = \frac{(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{对照}}) \cdot V_{\text{反应体系}} \cdot 1000}{2 \cdot 6.22 \cdot \Delta t \cdot m}$$

注: $\Delta A_{\text{测定}}$: 测定孔于340 nm处1 min内的吸光值变化; $\Delta A_{\text{对照}}$: 对照孔于340 nm处1 min内的吸光值变化; $V_{\text{反应体系}}$: 反应体系体积, 0.2 mL; 6.22: 1 μmol NADH在340 nm处的消光系数; 2: 代表每固定1 mol CO_2 有2 mol NADH被氧化; Δt : ΔA 所对应的间隔时间, 1 min; m: 通过蛋白标曲计算后每反应孔加入10 μg 蛋白。

1.7 实验数据分析

用Excel和SPSS statistics 17.0软件进行数据处理与单因素ANOVA分析,实际数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, Duncan's测验分析显著性。经统计分析后以不同黑色小写字母表示结果具有显著性差异, SigmaPlot 10.0及

表1 不同的实验处理

Table 1 Different experimental treatments

组别 Group	实验材料 Materials	干旱胁迫 Drought stress	NaHS/100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Sodium hydrosulfide /100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
(1)	WT	-	-
(2)	WT	-	+
(3)	WT	+	-
(4)	WT	+	+
(5)	<i>lcd/des1</i>	-	-
(6)	<i>lcd/des1</i>	-	+
(7)	<i>lcd/des1</i>	+	-
(8)	<i>lcd/des1</i>	+	+

+: 添加相应处理; -: 未添加相应处理。

+: with the corresponding treatment; -: without the corresponding treatment.

表2 qRT-PCR特异性引物

Table 2 Primers used for Quantitative Real-time PCR

基因 Gene	基因登录号 Gene notation	引物序列(5' \rightarrow 3') Primer sequence (5' \rightarrow 3')	长度/bp Length /bp
<i>Actin</i>	At5g15400	F: GGG CAC TCA AGT ATC TTG TTA GC R: TGC TGC CCA ACA TCA GGT T	189
<i>RBCS1A</i>	At1g67090	F: TCT TCT TTC TTG GGT TTT AAT TTC C R: GCC GCA TTG TCC TAT TTT CTT TT	162
<i>RBCS1B</i>	At5g38430	F: CTT TAC CCT AAC TAC TCC TTT CTC A R: TCA GCT TCT CCC ATA CCT TCT	184
<i>RBCS2B</i>	At5g38420	F: TGC CGA CTT AAC AGT TGA GG R: GTC AAA AGC AAG AAT TAT GAG GAT	187
<i>RBCS3B</i>	At5g38410	F: CTG CTC ATT TCA TTT CCT ATT G R: TCA TAA ATC AGA CAT TTG ACA ATC	84
<i>RBCL</i>	AtCg00490	F: GCA GCA TTC CGA GTA ACT CCT C R: GTG GTA GCA TCG TCC TTT GTA AC	147

Photoshop作图。

2 结果与分析

2.1 H₂S信号对干旱胁迫下拟南芥幼苗叶片表型及根长的影响

4周龄的拟南芥持续5天不浇水, 其叶片不及正

常浇水组嫩绿, 且有少量黄化叶, 土壤(soil)由湿润的黑色变为明显的土黄色。继续干旱5天后, 胁迫组叶片呈现明显的暗绿色, 叶面积较小, 根长显著变短, 而正常浇水组的植株为翠绿色且叶片大、繁茂、根长较长; 干旱胁迫后叶片均发生卷曲, NaHS熏蒸(100 μmol/L)能明显缓解叶片卷曲现象(图1和图2)。

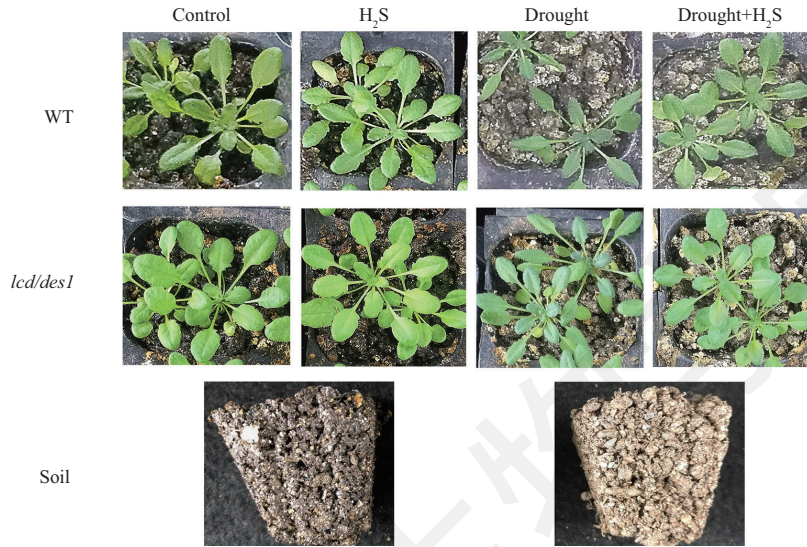
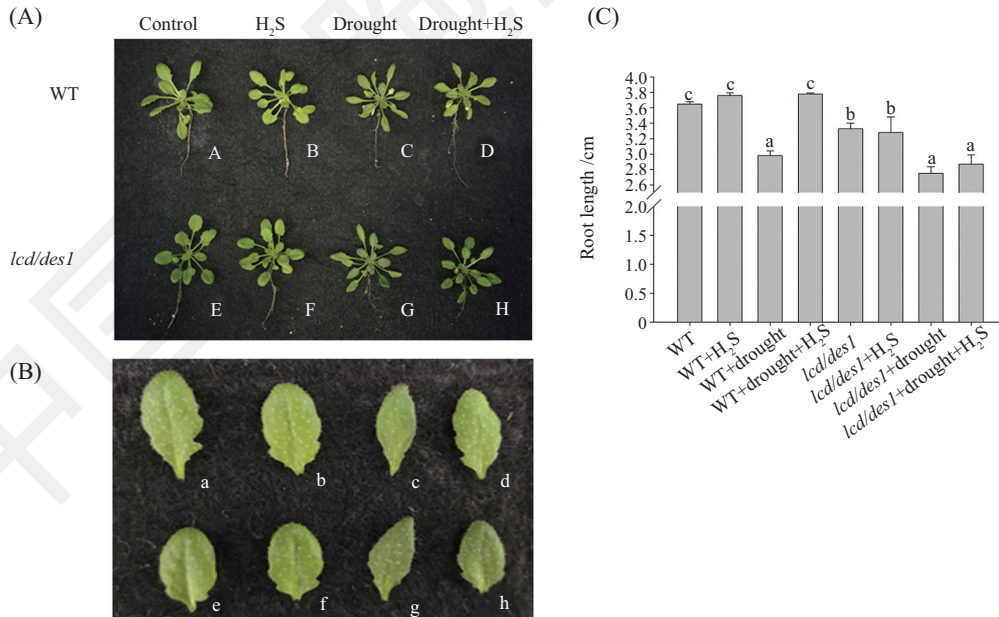


图1 干旱胁迫下H₂S对拟南芥幼苗表型的影响

Fig.1 Effects of H₂S on the phenotype of *Arabidopsis* seedlings under drought stress



A: 各处理下的拟南芥植株; B: 各处理下相应植株的叶片, a~h叶片分别对应A~H植株; C: 各处理下植株的根长。不同小写字母表示不同处理间差异显著($P < 0.05$)。

A: *Arabidopsis* plants under each treatment; B: leave of corresponding plants under each treatment, a~h is the leaves of A~H plants, respectively; C: root length of plants under each treatment. Different lowercase letters indicate significant at 0.05 level between different treatments.

图2 干旱胁迫下H₂S对拟南芥叶片和根长的影响

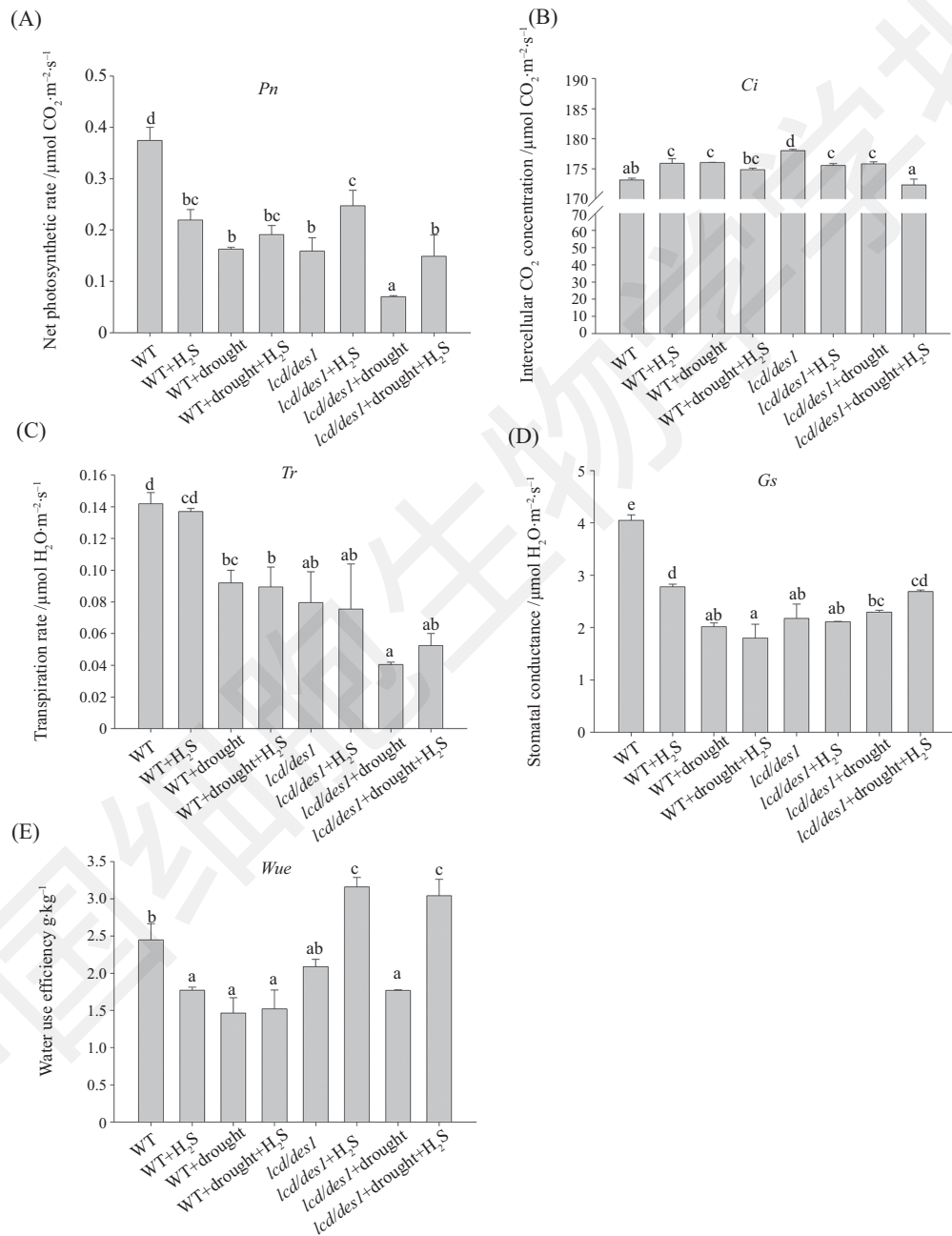
Fig.2 Effect of H₂S on leaf phenotype and root length of *Arabidopsis* under drought stress

此外,在共计10天的处理中,内源H₂S缺失组(*lcd/des1*)植株生长缓慢,叶圆而小。在正常生长条件下,*lcd/des1*根长较WT短,呈显著性差异;WT+drought+H₂S与WT+drought组相比,根长显著增加。

2.2 H₂S信号对干旱胁迫下拟南芥各项光合指标的影响

为了进一步明确H₂S信号对干旱胁迫下植株生

理生化方面的影响,测定了8种处理下植株的光合指标。与WT相比,WT+H₂S处理的净光合速率 P_n 及气孔导度 G_s 均显著下降(图3A和图3D),气孔张开程度降低,植物呼吸产生的CO₂于胞间积累,同时该处理下的 P_n 降低即对CO₂的利用减少,最终使得WT+H₂S的胞间CO₂浓度 C_i 值显著高于WT,如图3B所示。



A: 净光合速率(P_n); B: 胞间二氧化碳浓度(C_i); C: 蒸腾速率(Tr); D: 气孔导度(G_s); E: 水分利用率(Wue)。不同小写字母表示不同处理间差异显著($P < 0.05$)。

A: net photosynthetic rate (P_n); B: intercellular CO₂ concentration (C_i); C: transpiration rate (Tr); D: stomatal conductance (G_s); E: water use efficiency (Wue). Different lowercase letters indicate significant at 0.05 level between different treatments.

图3 干旱胁迫下H₂S对拟南芥幼苗光合特性相关指标的影响

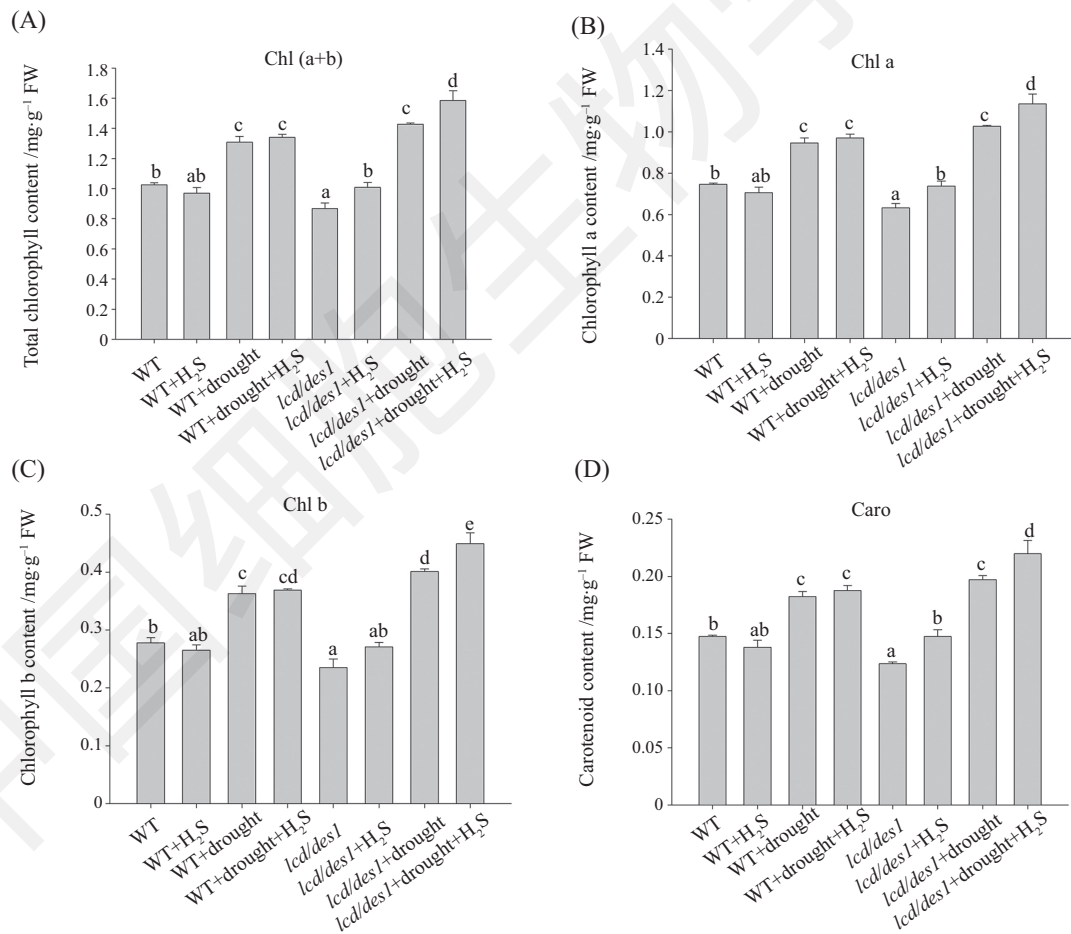
Fig.3 Effect of H₂S on photosynthesis characteristics of *Arabidopsis* seedlings under drought stress

在干旱胁迫下的WT与正常条件下的WT相比, P_n 、 G_s 分别下降了约57%和50%, 呈现显著性差异。植物遭受干旱胁迫后趋向于关闭气孔以减少水分损失, 其蒸腾速率 T 降低(图3C)。WT+drought+H₂S与WT+drought组相比, G_s 下降了约10.75%, P_n 上升了约17.39%, 整体趋向于利用胞间CO₂, 故其 C_i 值较低。*lcd/des1*与WT相比 P_n 下降了57.76%, 差异显著; *lcd/des1*+H₂S与*lcd/des1*相比, G_s 降低而 P_n 显著升高, 最终使 C_i 显著降低。*lcd/des1*+drought组的 P_n 显著小于WT+drought, WT+drought+H₂S组 P_n 高于WT+drought组, *lcd/des1*+drought+H₂S组 P_n 显著高于*lcd/des1*+drought组, 这些结果表明, H₂S信号可帮助植物抵抗干旱胁迫, 增强其耐旱性, 且内源及外源H₂S处理表现出一致性。

另外, 水分利用率(Wue)值理论上是 P_n 与 Tr 的比值, 对比实际测得的各处理 Wue 值(图3E)与理论计算得到的 P_n/Tr 值, 验证了实验数据处理的准确性。

2.3 H₂S信号对干旱胁迫下拟南芥中叶绿素含量的影响

叶绿素含量是干旱胁迫的重要指标^[18]。图4结果显示, 在所有测试组的总叶绿素含量中, 叶绿素a(Chl a)含量约占70%, 叶绿素b(Chl b)约占30%, 在三种色素中类胡萝卜素(Caro)含量最低约为Chl b的一半。且各叶绿体色素含量均表现出*lcd/des1*远小于WT, *lcd/des1*+H₂S能有效弥补*lcd/des1*组色素含量的不足。*lcd/des1*+H₂S与*lcd/des1*相比, 总叶绿素含量显著上升约16%, Chl a显著上升约16.54%, Chl b上升约15.3%; 对于总叶绿素含量增加的贡献,



A: 总叶绿素含量[Chl(a+b)]; B: 叶绿素a含量(Chl a); C: 叶绿素b含量(Chl b); D: 类胡萝卜素含量(Caro)。不同小写字母表示不同处理间差异显著($P < 0.05$)。

A: total chlorophyll content[Chl(a+b)]; B: chlorophyll a content(Chl a); C: chlorophyll b content(Chl b); D: carotenoid content(Caro). Different lower-case letters indicate significant at 0.05 level between different treatments.

图4 干旱胁迫下H₂S对拟南芥幼苗叶片叶绿体色素含量的影响

Fig.4 Effect of H₂S on the content of chloroplast pigments in leaves of *Arabidopsis* seedlings under drought stress

Chl a约占75%, Chl b约占25%, 表明外源施加H₂S可提高叶绿素含量尤其是叶绿素a的含量。对比*lcd/des1+drought*和*lcd/des1+drought+H₂S*、WT+drought和WT+drought+H₂S可看出, 外源H₂S对于干旱胁迫下的植株总叶绿素含量分别提高了10.99%、2.39%, 仍旧主要是Chl a引起的升高。

Chl a/Chl b值可指示相应处理下的植株叶片光合活性的强弱, Chl a/Chl b值越大, 光合活性越强^[19]。如表3所示, *lcd/des1+drought*组叶片光合活性与WT+drought组相比略微下降, 而WT+drought+H₂S相比WT+drought表现为增强的叶片光合活性, 这表明, 植物在遭受干旱胁迫的同时, 内源H₂S水平影响叶片的光合活性。

Caro/Chl值的高低反映了植物忍受逆境的能力, 值越大其抗逆性越强^[19]。由表3可看出*lcd/des1+drought*组抗旱性弱于WT+drought, 对*lcd/des1+drought*组外源施加H₂S(*lcd/des1+drought+H₂S*)可增强其抗旱性; WT+drought+H₂S组Caro/Chl值略高于WT+drought组, 这些结果均表明, 施加外源H₂S处理可提高植物对干旱的适应性。

2.4 H₂S信号对干旱胁迫下AtRuBisCo基因表达的影响

通过qRT-PCR分析AtRuBisCo一种大亚基(large subunit, LSU)、四种小亚基(small subunit, SSU)编码基因于干旱胁迫及H₂S处理后转录水平表达情况。WT+drought与*lcd/des1+drought*分别对比WT与*lcd/des1*, *AtRBCS1A*、*AtRBCS1B*、*AtRBCS2B*、*AtRBCS3B*和*AtRBCL*基因表达量均显著下调(图5), 而全酶的活性中心位于大亚基上, 小亚基起调节作用^[20], 表明干旱胁迫对植株光合作用的抑制与酶量的减少有关。

图5A的结果显示, 与WT相比, *lcd/des1*中的*AtRBCS1A*表达量下调, 而外源施加H₂S(*lcd/des1+H₂S*)后显著上调, 甚至超出WT; WT+H₂S中

*AtRBCS1A*表达量对比WT也显著上调, 表明外源H₂S对*AtRBCS1A*转录具有促进作用, 反之内源H₂S缺失对其转录有抑制作用。与WT+drought组相比, WT+drought+H₂S组表现出大、小亚基基因的表达显著上调, 其中*AtRBCS1B*、*AtRBCS3B*、*AtRBCL*对H₂S更敏感, 干旱胁迫过程中有NaHS处理, 上述基因表达量恢复至正常生长状态(WT)中的水平; *AtRBCS1A*和*AtRBCS2B*表达量也被上调但不显著。

另外, 用100 μmol/L NaHS处理WT, *AtRBCS2B*基因的表达下调, 即受到抑制; 用相同浓度NaHS处理*lcd/des1*, 其受抑制的程度大大减小(图5C)。相同处理下*AtRBCS3B*基因在WT中的表达上调, 即受到促进作用; 而在*lcd/des1*中略有下降(图5D)。以上结果表明, 生理浓度的外源H₂S处理, 编码RuBisCo小亚基的不同基因受影响程度不同, 即使它们的基因序列相似性高达95%。

2.5 H₂S信号对干旱胁迫下AtRuBisCo羧化活性的影响

提取表1中8个处理的叶片总蛋白, 调平蛋白浓度, 测定其中的RuBisCo羧化活性。结果显示: WT+drought与*lcd/des1+drought*中酶活分别低于WT与*lcd/des1*; WT+drought+H₂S与*lcd/des1+drought+H₂S*组的酶活分别显著高于WT+drought与*lcd/des1+drought*组, 且酶活水平分别接近于WT与*lcd/des1*(图6)。表明, 干旱胁迫下RuBisCo羧化活性受到显著抑制, 而外源H₂S处理可显著恢复其活性至正常浇水条件下的酶活水平。

3 讨论

干旱对光合作用的抑制作用分两个方面进行, 即光合作用气孔限制和非气孔限制^[21]。短期干旱胁迫下, 植物水势下降, 叶片气孔关闭, 与大气中气体交换受限, 进而阻碍光合作用的顺利进行^[22]; 长期

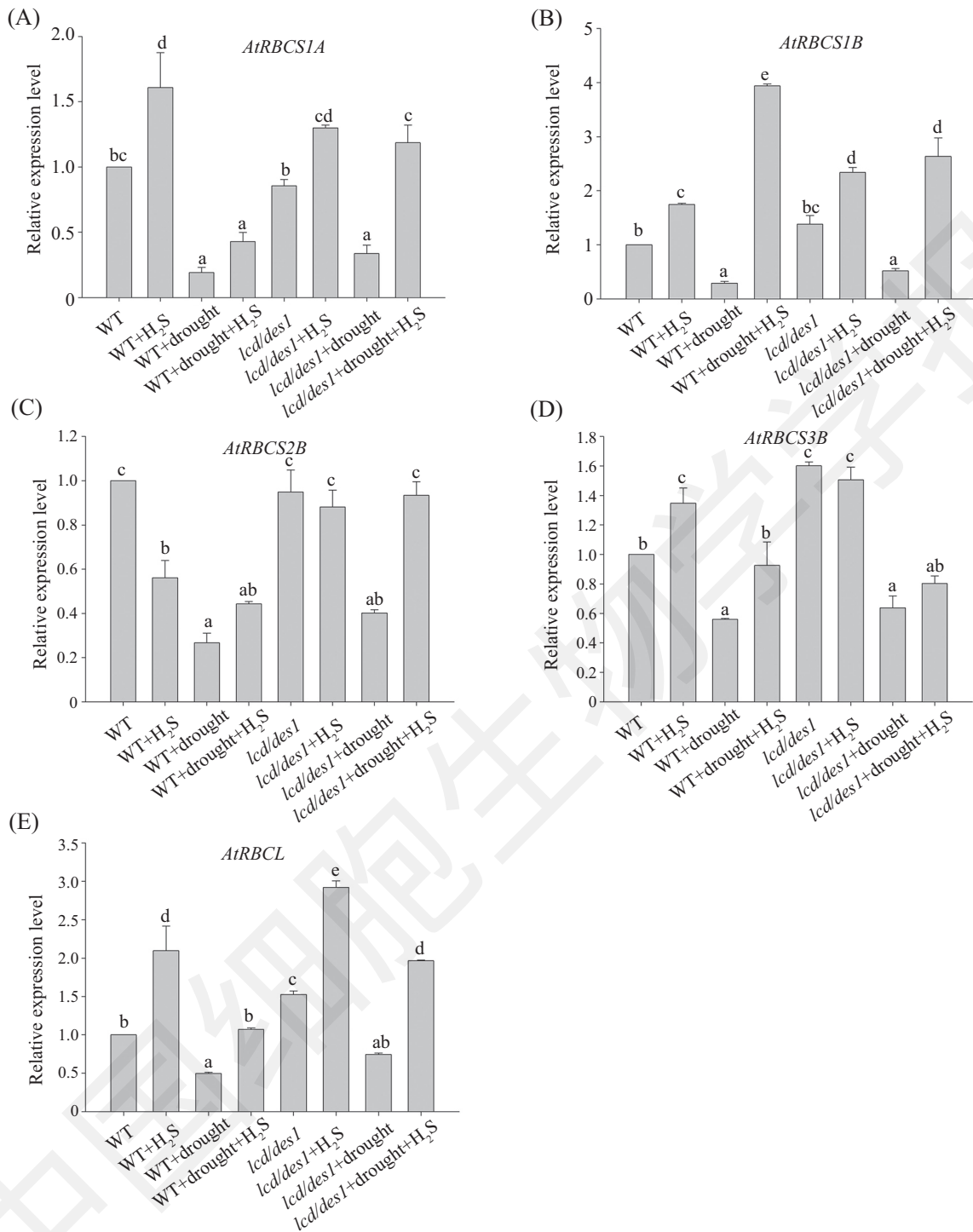
表3 外源硫化氢对干旱胁迫下拟南芥幼苗Chl a/Chl b、Caro/Chl值的影响

Table 3 Effects of exogenous H₂S on Chl a/Chl b and Caro/Chl Values in *Arabidopsis* seedlings under drought stress

处理 Treatment	WT	WT +H ₂ S	WT +drought	WT +drought+H ₂ S	<i>lcd/des1</i>	<i>lcd/des1</i> +H ₂ S	<i>lcd/des1</i> +drough	<i>lcd/des1</i> +drough+H ₂ S
Chl a/Chl b	2.689 7± 0.074 9 ^a	2.661 3± 0.015 7 ^a	2.617 6± 0.142 1 ^a	2.627 2± 0.034 2 ^a	2.69 75± 0.086 4 ^a	2.723 2± 0.056 7 ^a	2.562 9± 0.023 2 ^a	2.542 5± 0.172 8 ^a
Caro/Chl	0.143 8± 0.002 8 ^a	0.142 3± 0.001 1 ^a	0.139 4± 0.000 6 ^a	0.139 8± 0.001 1 ^a	0.142 2± 0.007 6 ^a	0.146 2± 0.007 4 ^a	0.137 8± 0.003 1 ^a	0.139 1± 0.010 6 ^a

同行相同小写字母表示处理间差异不显著($P < 0.05$)。

The same lowercase letters in a column indicate no significant differences among treatments at $P < 0.05$ level.



A-E: 分别为各处理下 *AtRBCS1A*、*AtRBCS1B*、*AtRBCS2B*、*AtRBCS3B* 和 *AtRBCL* 相对表达量的变化。不同小写字母表示不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

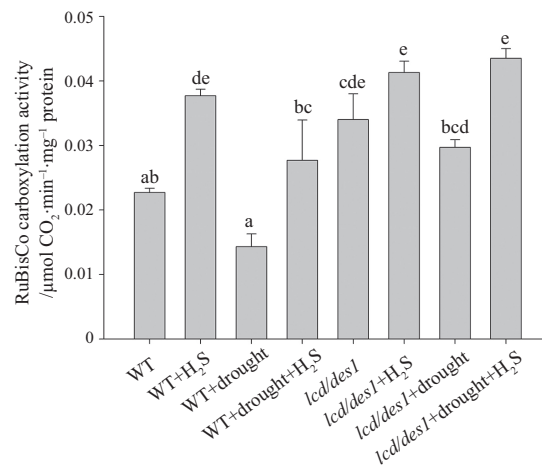
A-E: the relative expression levels of *AtRBCS1A*、*AtRBCS1B*、*AtRBCS2B*、*AtRBCS3B* and *AtRBCL* under different treatments, respectively. Different lowercase letters indicate significant at 0.05 level between different treatments.

图5 干旱胁迫下H₂S对AtRuBisCo各亚基编码基因的表达调控

Fig.5 Effect of H₂S on expression levels of AtRuBisCo subunit genes under drought stress

干旱胁迫下细胞生长因受膨压降低影响而受到抑制,其形态结构和生物量的分配均发生变化,植物生长发育迟缓甚至死亡^[23]。然而之前的研究发现, H₂S

信号同时参与了“诱导气孔关闭”和“增强光合作用”两个看似相悖的生理过程调节。为解析干旱胁迫下 H₂S信号对拟南芥碳同化过程的调控机制,本实验以



不同小写字母表示不同处理间差异显著($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant at 0.05 level between different treatments.

图6 干旱胁迫下H₂S对拟南芥幼苗RuBisCo羧化活性的影响

Fig.6 Effect of H₂S on RuBisCo carboxylation activity in *Arabidopsis* seedlings under drought stress

100 μmol/L NaHS为外源H₂S处理的生理浓度,以模式植物拟南芥为实验材料,设置了如表1所示的8个处理组。从观察到的土壤含水情况及植株的生长状况,初步反映了干旱胁迫达到预期效果,内源H₂S在调节植物生长发育方面起重要作用,外源H₂S可缓解干旱对植物叶片形态造成的负面影响。

通过测定各处理条件下植株的光合指标发现,外源H₂S处理可促进气孔关闭,这一结果与本实验室以往研究报道的结果一致^[24]。对于干旱胁迫下的植株施加外源生理浓度H₂S后的结果暗示了外源H₂S在促进气孔关闭的同时,可能主要作用于非气孔因素,如改善光合作用中某些酶活性,使遭受干旱胁迫的植株净光合速率升高,来缓解因气孔关闭导致的胞间CO₂积累现象(图3A、图3B和图3D中WT+drought+H₂S对比WT+drought)。lcd/des1+drought相比WT+drought,二者的Gs值及Ci值无显著差异,前者的Pn值却显著低于后者,反映了内源H₂S在帮助植物抵御干旱胁迫中的重要作用。

有文献报道,外源H₂S可保护遭受干旱胁迫的植株叶绿素结构稳定,降低其分解速率^[25]。本实验研究结果显示,各叶绿体色素含量均表现出lcd/des1远小于WT, lcd/des1+H₂S能有效弥补lcd/des1组色素含量的不足。结合外源H₂S处理可促进内源H₂S生成的结论,暗示了内源H₂S缺乏对植物体各色素含量积累是不利的。此外,干旱处理组比正常浇水组的总叶绿素含量整体水平高(图4A),这似乎与干旱使叶

片叶绿素含量降低的理论不符。原因很可能是土壤干旱使得叶片失水率加快,叶片鲜重降低,叶绿素浓度相应增加,进而导致相同鲜重下干旱组的叶绿素含量大于正常浇水组。为了抵消这一干扰因素,我们计算了Chl a/Chl b值与Caro/Chl值。从显示的结果来看,各处理间对比无显著性差异,经分析很可能是实验中所做的干旱胁迫设置仅达到中度胁迫,数值变化不明显。但经多次实验重复,可对比的处理间数据在几次实验中变化趋势一致,结果可信。另外,在三种色素中Caro虽然量少但扮演着重要角色。它不仅是一种光合色素,还是植物体内源抗氧化剂,若Caro含量降低,则对活性氧的淬灭减少,易导致细胞内积累较多的氧自由基,破坏叶绿体膜结构,加速叶绿素的分解^[26]。

RuBisCo作为拟南芥碳同化过程的关键酶,成为本实验重点关注的非气孔因素。RuBisCo是植物体内最丰富的酶,但它的固碳效率低且作为双功能酶(羧化、加氧)对CO₂非特异。鉴于以上特点,该酶极具研究改造价值。藻类和高等植物的RuBisCo由8个大亚基LSU和8个小亚基SSU构成(L₈S₈), LSU由叶绿体基因编码(单基因), SSU由核基因编码(多基因)^[20]。本实验对拟南芥中四种RuBisCo小亚基编码基因转录水平分析发现,各小亚基基因表达量受H₂S调控及干旱胁迫影响程度不同。对于此现象,须首先了解每个小亚基单独起什么作用,对全酶的贡

献各小亚基有何不同, 相互之间是能取代或是绝对不能取代? 这对于分析各处理条件下最终的全酶量是受“木桶效应”影响而不会升高, 还是由于小亚基间可相互补偿, 最终整体趋向于全酶的量增多至关重要。

与转录水平结果不同的是, 无论是正常浇水条件下还是受到干旱胁迫的植株, RuBisCo羧化活性都对外源H₂S信号表现出积极的响应。对于其羧化活性的升高, 经分析可能有三种原因。一是外源H₂S能直接作用于RuBisCo, 通过巯基化修饰蛋白中的Cys残基, 改善酶活性。二是由于转录水平检测到外源H₂S处理下RuBisCo大亚基、部分小亚基表达上调, 很有可能整体水平上全酶量升高。三是可能外源H₂S改善了RuBisCo上游的酶如RuBisCo活化酶(RCA)的活性。H₂S对C3植物碳同化过程精确的调控机制有待进一步深入、全面探讨。

4 结论

处于干旱胁迫下的拟南芥叶片气孔孔径减小、蒸腾速率降低、净光合效率也显著下降。H₂S信号可以卡尔文循环的关键酶RuBisCo作为潜在的下游靶标, 上调其转录表达, 增强其羧化活性, 以增加植株的光合效率。H₂S使干旱下的植株在气孔关闭时也能发生较高效率的光合作用, 缓解因气孔关闭导致的胞间CO₂积累现象。最终表现为叶片的光合活性升高, 植株的耐旱性增强。

参考文献 (References)

- Boyer JS. Plant productivity and environment. Science 1982; 218(4571): 443-8.
- Araus JL, Slafer GA, Reynolds MP, Royo C. Plant breeding and drought in C3 cereals: what should we breed for? Ann Bot-london 2002; 89(7): 925-40.
- Romero LC, Aroca MÁ, Laureano-Marín AM, Moreno I, García I, Gotor C. Cysteine and cysteine-related signaling pathways in *Arabidopsis thaliana*. Mol Plant 2014; 7(2): 264-76.
- Papenbrock J, Riemenschneider A, Kamp A, Schulz-Vogt HN, Schmidt A. Characterization of cysteine-degrading and H₂S-releasing enzymes of higher plants-from the field to the test tube and back. Plant Biol (Stuttg) 2007; 9(5): 582-8.
- Wilson LG, Bressan RA, Filner P. Light-dependent emission of hydrogen sulfide from plants. Plant Physiol 1978; 61(2): 184-9.
- Chen J, Wu FH, Wang WH, Zheng CJ, Lin GH, Dong XJ, et al. Hydrogen sulphide 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.
- Jin ZP, Shen JJ, Qiao ZI, Yang GD, Wang R, Pei YX. Hydrogen sulfide improves drought resistance in *Arabidopsis thaliana*. Biochem Bioph Res Co 2011; 414(3): 481-6.
- Kimura H. Hydrogen sulfide as a neuromodulator. Mol Neurobiol 2002; 26(1): 13-9.
- Zhang H, Jiao H, Jiang CX, Wang SH, Wei ZJ, Luo JP, et al. Hydrogen sulfide protects soybean seedlings against drought-induced oxidative stress. Acta Physiol Plant 2010; 32(5): 849-57.
- 刘菁, 侯智慧, 赵方贵, 刘新. H₂S介导ABA诱导蚕豆气孔运动的生理机制研究. 西北植物学报(Liu Jing, Hou Zhihui, Zhao Fanggui, Liu Xin. Hydrogen sulfide mediates ABA-induced stomatal closure of *Vicia faba* L. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica) 2011; 31(2): 298-304.
- García-Mata C, Lamattina L. Hydrogen sulphide, a novel gasotransmitter involved in guard cell signalling. New Phytol 2010; 188(4): 977-84.
- Jin Z, Xue S, Luo Y, Tian B, Fang H, Li H, et al. Hydrogen sulfide interacting with abscisic acid in stomatal regulation responses to drought stress in *Arabidopsis*. Plant Physiol Bioch 2013; 62: 41-6.
- Jin Z, Pei Y. Hydrogen sulfide: the shutter button of stomata in plants. Sci China Life Sci 2016; 59(11): 1187-8.
- Jin Z, Wang Z, Ma Q, Sun L, Zhang L, Liu Z, et al. Hydrogen sulfide mediates ion fluxes inducing stomatal closure in response to drought stress in *Arabidopsis thaliana*. Plant Soil 2017; 419: 141-52.
- 孙丽敏, 金竹萍, 钱嘉航, 裴雁曦. 干旱胁迫下H₂S信号增强植物叶片的光合作用. 中国细胞生物学学报(Sun Limin, Jin Zhuping, Qian Jiahang, Pei Yanxi. H₂S enhanced photosynthesis in response to drought stress. Chinese Journal of Cell Biology) 2017; 39(12): 1583-91.
- 李合生. 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社, 2006.
- 李粹芳, 李立人. 分光光度法与¹⁴C标记法测定RuBP羧化酶的活性的比较. 植物生理学通讯(Li Cuifang, Li Liren. Comparison between the spectrophotometric method and ¹⁴C-labelled method for measuring RuBPCase activity. Plant Physiology Communications) 1989; (1): 49-50.
- 周莉娜, 曲东, 邵丽丽, 易维洁. 干旱胁迫下硫营养对小麦光合色素及MDA含量的影响. 西北植物学报(Zhou Lina, Qu Dong, Shao Lili, Yi Weijie. Effects of sulfur fertilization on the contents of photosynthetic pigments and MDA under drought stress. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica) 2005; 25(8): 1579-83.
- 刘振亚, 刘贞琦. 作物光合作用的遗传及其在育种中的应用研究进展. 作物育种研究与进展(第1集). 北京: 北京农业出版社, 1993; 168-83.
- 黄熙泰, 于自然, 李翠凤. 现代生物化学, 第3版. 北京: 化学工业出版社, 2012, 359-74.
- Earl HJ. Stomatal and non-stomatal restrictions to carbon assimilation in soybean (*Glycine max*) lines differing in water use efficiency. Environ Exp Bot 2002; 48(3): 237-46.
- 侯振宏, 韦莉莉, 张小全, 徐德应, 余雪标. 杉木苗木光合作用及其产物分配对水分胁迫的响应. 植物生态学报(Hou Zhenhong, Wei Lili, Zhang Xiaoquan, Xu Deying, Yu Xuebiao. Effects of water stress on photosynthesis and carbon allocation in *Cunninghamia lanceolata* seedlings. Acta Phytocologica Sinica) 2005; 29(3): 394-402.
- Dias PC, Araujo WL, Moraes GABK, Barros RS, Fábio M DaMatta. Morphological and physiological responses of two coffee progenies

- to soil water availability. *J Plant Physiol* 2007; 164(12): 1639-47.
- 24 乔增杰, 王婷, 金竹萍, 刘志强, 裴雁曦. 硫化氢参与镉诱导拟南芥气孔的关闭. *山西大学学报(自然科学版)*(Qiao Zengjie, Wang Ting, Jin Zhuping, Liu Zhiqiang, Pei Yanxi. Hydrogen sulfide mediates Cd²⁺-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Shanxi University, Natural Science Edition*) 2016; 39(1): 146-51.
- 25 单长卷, 赵元增. 外源硫化氢对干旱胁迫下玉米幼苗水分生理特性的影响. *干旱地区农业研究*(Shan Changjuan, Zhao Yuanzeng. Effects of exogenous hydrogen sulfide on water physiological characteristics of maize seedling under drought stress. *Agricultural Research in the Arid Areas*) 2015; 33(5): 80-4.
- 26 王邦锡, 何军贤, 黄久常. 水分胁迫导致小麦叶片光合作用下降的非气孔因素. *植物生理学报*(Wang Bangxi, He Junxian, Huang Jiuchang. The non-stomatal factors that led to the decrease of photosynthesis in wheat leaves under water stress. *Acta Phytophysiologica Sinica*) 1992; (1): 77-84.

中国细胞生物学学报