

· 研究报告 ·

H₂S可能作为H₂O₂的下游信号介导茉莉酸诱导的蚕豆气孔关闭

侯智慧, 刘菁, 侯丽霞, 李希东, 刘新*

青岛农业大学生命科学学院, 青岛 266109

摘要 以蚕豆(*Vicia faba*)为材料, 利用激光共聚焦显微技术和分光光度技术, 结合药理学实验, 探讨硫化氢(hydrogen sulphide, H₂S)和过氧化氢(hydrogen peroxide, H₂O₂)在茉莉酸(jasmonic acid, JA)调控气孔运动信号转导中的作用。结果表明, H₂S合成抑制剂氨基氧乙酸(aminooxy acetic acid, AOA)、羟胺(hydroxylamine, NH₂OH)、丙酮酸钾(potassium pyruvate, C₃H₃KO₃)和氨水(ammonia, NH₃), H₂O₂清除剂抗坏血酸(ascorbic acid, AsA), 合成抑制剂水杨羟肟酸(salicylhydroxamic acid, SHAM)、二苯基碘(diphenylene iodonium, DPI)均可逆转JA诱导的气孔关闭效应。JA能够明显提高蚕豆叶片及保卫细胞中的H₂O₂水平、H₂S含量和L-/D-半胱氨酸脱巯基酶活性; H₂S合成抑制剂可抑制JA引起的叶片H₂S含量的增加; 而H₂O₂清除剂则可减弱JA对H₂S含量变化和L-/D-半胱氨酸脱巯基酶活性的诱导效应。以上结果表明H₂S和H₂O₂均参与了JA诱导的蚕豆气孔关闭, 且H₂S(主要由L-/D-半胱氨酸脱巯基酶合成)可能作为H₂O₂的下游组分参与调控这一信号转导过程。

关键词 过氧化氢, 硫化氢, 茉莉酸, 气孔运动, 蚕豆

侯智慧, 刘菁, 侯丽霞, 李希东, 刘新 (2011). H₂S可能作为H₂O₂的下游信号介导茉莉酸诱导的蚕豆气孔关闭. 植物学报 46, 396–406.

茉莉酸(jasmonic acid, JA)是一种对植物生长发育以及防御反应有重要调节作用的植物激素。作为挥发物信号, 茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)能够通过传递信息增强植物抵御逆境的能力(左照江等, 2009)。有报道显示, JA可调控抗旱基因的表达进而提高拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的抗旱能力(Huang et al., 2008); 开花的调控过程中存在JA介导的信号转导途径(吴劲松和种康, 2002); 外施JA可以诱使兰花等植物叶片气孔的关闭(Gehring et al., 1997), 并且过氧化氢(hydrogen peroxide, H₂O₂)、Ca²⁺和一氧化氮(nitrogen monoxide, NO)等信号分子均参与JA诱导的蚕豆(*Vicia faba*)叶片气孔关闭的信号转导过程(崔香环等, 2001; 刘新等, 2005; Munemasa et al., 2007), 构成了一个复杂的调控网络。薄惠等(2005)研究表明, JA通过活化蛋白激酶MAPK, 引起保卫细胞中H₂O₂含量的上升, 进而诱导

拟南芥气孔关闭; H₂O₂位于胞质碱化的下游, 调控胞质Ca²⁺介导JA诱导气孔关闭的过程(Suhita et al., 2004; Gonugunta et al., 2009)。在JA诱导气孔关闭这一过程中是否还有其它信号分子参与, 以及这些信号分子之间的关系还有待进一步研究。

硫化氢(hydrogen sulphide, H₂S)和过氧化氢均是在植物的生长、发育和胁迫应答中起重要作用的信号分子。植物体主要通过L-/D-半胱氨酸脱巯基酶(依赖5'-磷酸吡哆醛)催化半胱氨酸降解成H₂S、丙酮酸盐和NH₃; 亦可以通过叶片吸收大气中的H₂S, 或者在亚硫酸盐还原酶的作用下, 将SO₃²⁻直接还原成H₂S(Papenbrock et al., 2007)。植物可经多条途径合成H₂O₂, 如细胞壁过氧化物酶、NADPH氧化酶、多胺氧化酶、光合电子传递过程及脂质过氧化反应等(Veal et al., 2007; Angelini et al., 2008)。业已证明, H₂O₂可以通过激活质膜K⁺通道调控气孔运动(安国勇

收稿日期: 2010-10-26; 接受日期: 2011-01-11

基金项目: 国家自然科学基金(No.30970288)、山东省自然科学基金(No.ZR2010CM024)和植物生理学与生物化学国家重点实验室开放课题(No.SKLPBKF09001)

* 通讯作者。E-mail: liuxin6080@yahoo.com.cn

等, 2000); H₂O₂还能够引起气体信号分子NO水平升高参与乙烯调控的气孔运动(刘国华等, 2009); 同时亦是一氧化碳(carbon monoxide, CO)诱导的气孔关闭过程中的组分(She and Song, 2008)。最新发现, 在干旱或渗透胁迫下, 大豆(*Glycine max*)和红薯(*Ipomoea batatas*)体内会产生H₂S(Zhang et al., 2009, 2010a); 且H₂S通过改变H₂O₂的水平参与红薯对渗透胁迫的应答(Zhang et al., 2009); 作为一种抗氧化信号分子, H₂S可以降低小麦(*Triticum aestivum*)萌发过程中Al³⁺的毒性(Zhang et al., 2010b), 而不同浓度的外源H₂S对豌豆(*Pisum sativum*)根尖及其边缘细胞产生不同的影响(李东波等, 2010)。但鲜见H₂S参与植物体其它生理过程及其与H₂O₂关系的报道。

气孔运动由复杂的信号网络所调节, H₂S对气孔开闭是否有重要的调控作用? 目前虽已证明H₂O₂、Ca²⁺和NO是JA诱导的叶片气孔关闭的信号转导链中的主要组分, 是否还有其它信号物质参与JA调控的气孔运动? 它们在JA诱导的气孔关闭过程中存在什么样的关系? 为了解答这些问题, 本实验以蚕豆为材料, 探讨了H₂S和H₂O₂在JA诱导的气孔关闭过程中的作用及相互关系。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

取蚕豆(*Vicia faba* L.)种子用0.1%HgCl₂灭菌处理后, 浸种12小时, 25°C催芽2-3天。然后置于昼夜温差24°C/18°C、光照强度200 μmol·m⁻²·s⁻¹、光照时间每天12小时及相对湿度为60%的条件下培养3-4周后供实验使用。

配制1 mmol·L⁻¹ JA母液、0.4 mmol·L⁻¹丙酮酸钾(potassium pyruvate, C₃H₃KO₃)、0.4 mmol·L⁻¹氨水(ammonia, NH₃)、1 mmol·L⁻¹硫化钠(sodium hydro-sulfide, NaHS)母液、0.8 mmol·L⁻¹羟胺(hydroxyl-amine, NH₂OH)、0.8 mmol·L⁻¹氨基乙酸(aminooxy acetic acid, AOA)、0.8 mmol·L⁻¹ L-半胱氨酸(L-cysteine)、0.8 mmol·L⁻¹ D-半胱氨酸(D-cysteine)、0.1 mmol·L⁻¹二苯基碘(diphenylene iodonium, DPI)、0.1 mmol·L⁻¹水杨羟肟酸(salicylhydroxamic acid, SHAM)和1 mmol·L⁻¹抗坏血酸(ascorbic acid, AsA)

溶液。其中JA、AOA、DPI、SHAM、L-半胱氨酸和D-半胱氨酸均购于Sigma公司; 其它药品为国产分析纯。

1.2 气孔开度的测定

以3-4周龄蚕豆幼苗最上端完全展开的叶片为材料, 光诱导使气孔完全张开。撕取下表皮, 刷除掉上面黏附的叶肉细胞。用显微测微尺测量气孔的初始孔径, 测量过程中, 随机取5个视野, 每个视野中随机取10个气孔。然后用不同浓度和不同处理(NaHS、JA、JA分别与C₃H₃KO₃和NH₃、NH₂OH、AOA、DPI、SHAM、AsA共处理)的表皮条缓冲液(10 mmol·L⁻¹MES、50 mmol·L⁻¹KCl、0.1 mmol·L⁻¹CaCl₂, 用KOH调节pH至6.1), 在200 μmol·m⁻²·s⁻¹的光照强度下处理1.5小时, 记录终态孔径。将NaHS处理测量后的表皮条, 放入表皮条缓冲液中, 置于光下(光照强度200 μmol·m⁻²·s⁻¹)1.5小时进行洗脱, 再测量其气孔开度并记录终态孔径。所有处理数据均以3次重复的平均值和标准误差表示。气孔开度的测定参照刘国华等(2009)的方法。

1.3 保卫细胞胞内H₂O₂的检测

用H₂O₂的特异性荧光探针2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate(H₂DCF-DA)(Sigma公司)检测保卫细胞内的H₂O₂(刘国华等, 2009; 张小莉等, 2009)。以3-4周龄蚕豆幼苗最上端完全展开的叶片为材料, 小心撕取其下表皮, 放入表皮条缓冲液中, 光下诱导使气孔完全张开。然后将其置于0.1 mmol·L⁻¹JA、0.4 mmol·L⁻¹C₃H₃KO₃+0.4 mmol·L⁻¹NH₃、0.1 mmol·L⁻¹JA+0.4 mmol·L⁻¹C₃H₃KO₃+0.4 mmol·L⁻¹NH₃、0.8 mmol·L⁻¹NH₂OH、0.1 mmol·L⁻¹JA+0.8 mmol·L⁻¹NH₂OH、0.6 mmol·L⁻¹AOA、0.1 mmol·L⁻¹JA+0.6 mmol·L⁻¹AOA处理液中。处理时加入H₂DCF-DA(50 μmol·L⁻¹), 25°C、避光孵育20分钟, 孵育完毕后用表皮条缓冲液反复冲洗多次以除去吸附的染料。处理完毕后, 将表皮条置于载玻片上, 盖好盖玻片, 蓝光(488 nm)激发, 发射波长为505-530 nm, 用激光共聚焦扫描显微镜(Zeiss LSM 510 META)扫描观察, 在LSM 5 Image Browse软件包下获得气孔保卫细胞中H₂O₂的静态分布图像。每个处理至少设3次重复。

1.4 蚕豆叶片H₂O₂含量的测定

取处理过的蚕豆叶片0.1 g进行H₂O₂含量测定, 具体操作参考Brennan和Frenkel(1977)的方法。

1.5 蚕豆叶片H₂S含量的测定

蚕豆叶片H₂S含量的测定参照Sekiya等(1982)的亚甲基蓝法。外施0.1 mmol·L⁻¹JA分别处理0、1.5、3、4.5、6和7.5小时后, 取0.1 g叶片, 加0.9 mL 20 mmol·L⁻¹Tris-HCl(pH8.0)匀浆, 离心取上清用于检测, 蛋白浓度为100 μg·mL⁻¹。将装有醋酸锌的吸收井置于装有上清的小测试管(12 mm×75 mm)内, 加入100 μL 30 mmol·L⁻¹FeCl₃(溶于1.2 mol·L⁻¹HCl)和100 μL 20 mmol·L⁻¹N,N-二甲基-对苯二胺(溶于7.2 mol·L⁻¹HCl)后, 将测试管用封口膜迅速封好, 于37°C反应30分钟。在670 nm波长下, 测定吸光度。

1.6 蚕豆叶片L-/D-半胱氨酸脱巯基酶活性的测定

蚕豆叶片L-/D-半胱氨酸脱巯基酶活性的测定参照Riemenschneider等(2005)的方法。用0.1 mmol·L⁻¹JA分别与0.8 mmol·L⁻¹AOA、0.4 mmol·L⁻¹C₃H₃KO₃+0.4 mmol·L⁻¹NH₃、0.8 mmol·L⁻¹NH₂OH、0.1 mmol·L⁻¹DPI、0.1 mmol·L⁻¹SHAM、1 mmol·L⁻¹AsA共处理4.5小时后取样。取0.1 g处理过的叶片加0.9 mL 20 mmol·L⁻¹Tris-HCl(pH8.0)匀浆, 离心取上清用于检测, 蛋白浓度为100 μg·mL⁻¹。

L-半胱氨酸脱巯基酶活性的测定是通过测定L-半胱氨酸(含DTT)释放的H₂S来完成的。1 mL的反应体系包括: 0.8 mmol·L⁻¹L-半胱氨酸、2.5 mmol·L⁻¹DTT、100 mmol·L⁻¹Tris-HCl(pH9.0)和10 μg蛋白溶液。加入L-半胱氨酸后置于37°C反应30分钟, 最后加入100 μL 30 mmol·L⁻¹FeCl₃(溶于1.2 mol·L⁻¹HCl)和100 μL 20 mmol·L⁻¹N,N-二甲基-对苯二胺(溶于7.2 mol·L⁻¹HCl)终止反应。在670 nm波长下, 测定吸光度。

D-半胱氨酸脱巯基酶活性的测定除了将L-半胱氨酸换成D-半胱氨酸以及Tris-HCl的pH值为8.0外, 其余步骤与L-半胱氨酸脱巯基酶活性的测定完全相同。对照和处理数据均以3次重复的平均值和标准误差表示。

2 结果与讨论

2.1 H₂S参与调控JA诱导的蚕豆气孔关闭

2.1.1 NaHS对蚕豆叶片气孔运动的影响

为确定NaHS的最佳作用浓度, 即在该浓度下NaHS可明显诱导气孔关闭, 同时又不会对气孔保卫细胞造成伤害, 观测了不同浓度NaHS对蚕豆叶片气孔运动的影响, 并用洗脱实验检测NaHS处理后气孔保卫细胞的活性情况。结果表明, 在一定范围内, H₂S的供体NaHS可诱导蚕豆叶片气孔关闭, 且具有浓度(图1A)和时间效应(图1B)。洗脱实验显示, 当NaHS浓度为0.1 mmol·L⁻¹时, 保卫细胞保持良好的活性, 其诱导气孔关闭的效应可以通过洗脱来恢复(图1B), 表明在此浓度下不会对细胞造成伤害。据此, 我们认为0.1 mmol·L⁻¹NaHS可以作为有效浓度在蚕豆叶片气孔关闭反应中起作用, 并在后续实验中以此浓度作为合适的处理浓度。

2.1.2 H₂S参与调控JA诱导的蚕豆气孔关闭

L-/D-半胱氨酸脱巯基酶途径是植物体H₂S的主要来源, AOA和NH₂OH是L-/D-半胱氨酸脱巯基酶的抑制剂, C₃H₃KO₃+NH₃是L-/D-半胱氨酸脱巯基酶反应的产物。结果发现, AOA、NH₂OH和C₃H₃KO₃+NH₃处理均可显著抑制JA诱导的蚕豆叶片气孔关闭(图2)。推测, 来自L-/D-半胱氨酸脱巯基酶途径的H₂S参与了JA诱导的蚕豆气孔关闭过程。

2.1.3 JA对蚕豆叶片H₂S含量及L-/D-半胱氨酸脱巯基酶活性的影响

为进一步证明JA能够引起H₂S含量的变化, 观测了JA与H₂S合成抑制剂AOA、NH₂OH以及C₃H₃KO₃+NH₃对蚕豆叶片H₂S含量及L-/D-半胱氨酸脱巯基酶活性的影响。结果表明, 0.1 mmol·L⁻¹JA可诱导蚕豆叶片内H₂S含量明显升高, 且在处理后4.5小时达到最大值(图3A); AOA、NH₂OH和C₃H₃KO₃+NH₃可显著抑制JA引起的蚕豆叶片H₂S的产生和L-/D-半胱氨酸脱巯基酶活性的增加(图3B-D)。由此可进一步推测, L-/D-半胱氨酸脱巯基酶均参与了JA诱导的H₂S的合成。

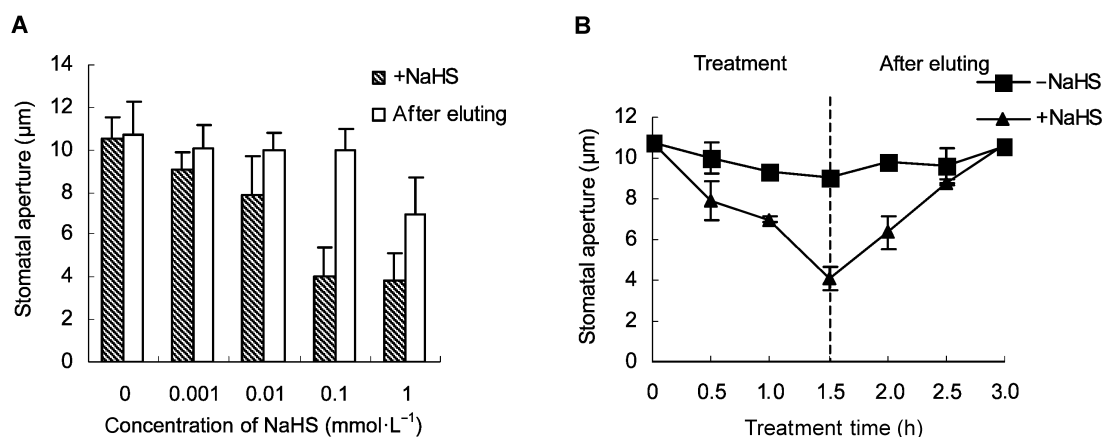


图1 NaHS对蚕豆叶片气孔运动的影响

(A) 不同浓度NaHS对蚕豆气孔开度的影响; (B) 0.1 mmol·L⁻¹NaHS对蚕豆气孔运动影响的时间进程

Figure 1 Effect of NaHS on the stomatal movement in *Vicia faba* leaves

(A) Effect of NaHS of different concentrations on the stomatal aperture in *V. faba*; (B) Time course of the stomatal closure induced by 0.1 mmol·L⁻¹NaHS in *V. faba*

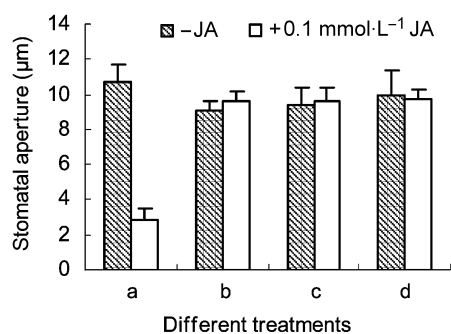


图2 H₂S合成抑制剂对茉莉酸(JA)诱导蚕豆叶片气孔关闭的影响

a: 无抑制剂处理; b: 0.8 mmol·L⁻¹氨基氧乙酸(AOA); c: 0.4 mmol·L⁻¹丙酮酸钾(C₃H₃KO₃)+0.4 mmol·L⁻¹氨水(NH₃); d: 0.8 mmol·L⁻¹羟胺(NH₂OH)

Figure 2 Effects of H₂S synthesis inhibitors on jasmonic acid (JA)-induced stomatal closure in *Vicia faba* leaves

a: No treatment by inhibitors; b: 0.8 mmol·L⁻¹ aminoxy acetic acid (AOA); c: 0.4 mmol·L⁻¹ potassium pyruvate (C₃H₃KO₃) + 0.4 mmol·L⁻¹ ammonia (NH₃); d: 0.8 mmol·L⁻¹ hydroxylamine (NH₂OH)

2.2 H₂O₂和H₂S在JA诱导蚕豆气孔关闭中的相互关系

2.2.1 H₂O₂参与调控JA诱导的蚕豆气孔关闭

利用H₂O₂清除剂AsA、NADPH氧化酶的抑制剂DPI和细胞壁过氧化物酶的抑制剂SHAM, 分别检测0.1 mmol·L⁻¹JA对蚕豆叶片H₂O₂含量和气孔运动的影响。结果表明, 0.1 mmol·L⁻¹JA能够增加蚕豆叶片中H₂O₂的含量; 而H₂O₂清除剂AsA、H₂O₂合成抑制剂DPI和SHAM可以显著逆转JA引起的叶片H₂O₂含量的增加(图4A)。AsA、DPI和SHAM均可明显阻断0.1 mmol·L⁻¹JA对蚕豆叶片气孔关闭的诱导作用(图4B)。因此推测来自NADPH氧化酶和细胞壁过氧化物酶的H₂O₂参与了JA诱导的蚕豆叶片气孔关闭过程。

2.2.2 H₂O₂清除剂及合成抑制剂对NaHS诱导蚕豆叶片气孔关闭的影响

由图5可以看出, H₂O₂清除剂及合成抑制剂对NaHS诱导蚕豆叶片气孔关闭并没有明显的影响。初步推断, 在调控气孔运动过程中H₂S可能作为H₂O₂的下游组

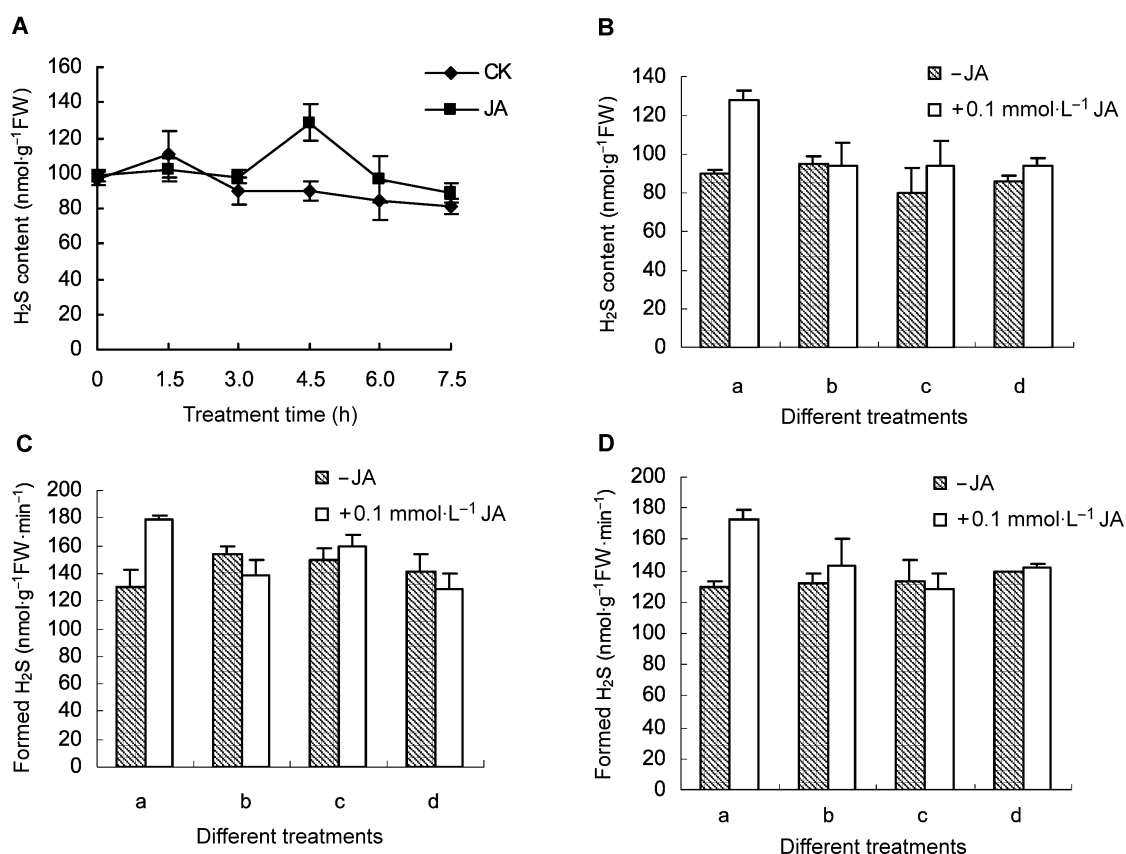


图3 H₂S合成抑制剂对茉莉酸(JA)调控的蚕豆叶片H₂S含量及L-/D-半胱氨酸脱巯基酶活性的影响

(A) 0.1 mmol·L⁻¹ JA对蚕豆叶片H₂S含量的影响; (B) H₂S合成抑制剂对JA调控的蚕豆叶片H₂S含量的影响; (C) H₂S合成抑制剂对JA诱导的蚕豆叶片L-半胱氨酸脱巯基酶活性的影响; (D) H₂S合成抑制剂对JA诱导的蚕豆叶片D-半胱氨酸脱巯基酶活性的影响。a: 无抑制剂处理; b: 0.8 mmol·L⁻¹ AOA; c: 0.4 mmol·L⁻¹ C₃H₃KO₃ + 0.4 mmol·L⁻¹ NH₃; d: 0.8 mmol·L⁻¹ NH₂OH

Figure 3 Effects of H₂S synthesis inhibitors on jasmonic acid (JA)-regulated H₂S level, L-/D-cysteine desulfhydrase activity in *Vicia faba* leaves

(A) Effect of 0.1 mmol·L⁻¹ JA on H₂S level in *V. faba* leaves; (B) Effects of H₂S synthesis inhibitors on JA-regulated H₂S level in *V. faba* leaves; (C) Effects of H₂S synthesis inhibitors on JA-induced L-cysteine desulfhydrase activity in *V. faba* leaves; (D) Effects of H₂S synthesis inhibitors on JA-induced D-cysteine desulfhydrase activity in *V. faba* leaves. a: No treatment by inhibitors; b: 0.8 mmol·L⁻¹ AOA; c: 0.4 mmol·L⁻¹ C₃H₃KO₃ + 0.4 mmol·L⁻¹ NH₃; d: 0.8 mmol·L⁻¹ NH₂OH

分起作用。

2.2.3 H₂O₂清除剂及合成抑制剂对JA诱导蚕豆叶片H₂S含量及L-/D-半胱氨酸脱巯基酶活性变化的影响

为了进一步探究H₂O₂和H₂S在JA调控气孔运动过程中的上下游关系,观测了H₂O₂清除剂及合成抑制剂对JA诱导蚕豆叶片H₂S含量及L-/D-半胱氨酸脱巯基酶活性变化的影响。结果表明,AsA、DPI和SHAM均

能显著抑制JA诱导的H₂S含量的升高(图6A),并对L-/D-半胱氨酸脱巯基酶活性也有明显的抑制作用(图6B, C)。由此推测, H₂O₂参与JA诱导蚕豆叶片产生H₂S的过程。

2.2.4 H₂S合成抑制剂对JA诱导蚕豆保卫细胞中H₂O₂水平变化的影响

利用H₂O₂特异性荧光探针H₂DCF-DA结合激光共聚

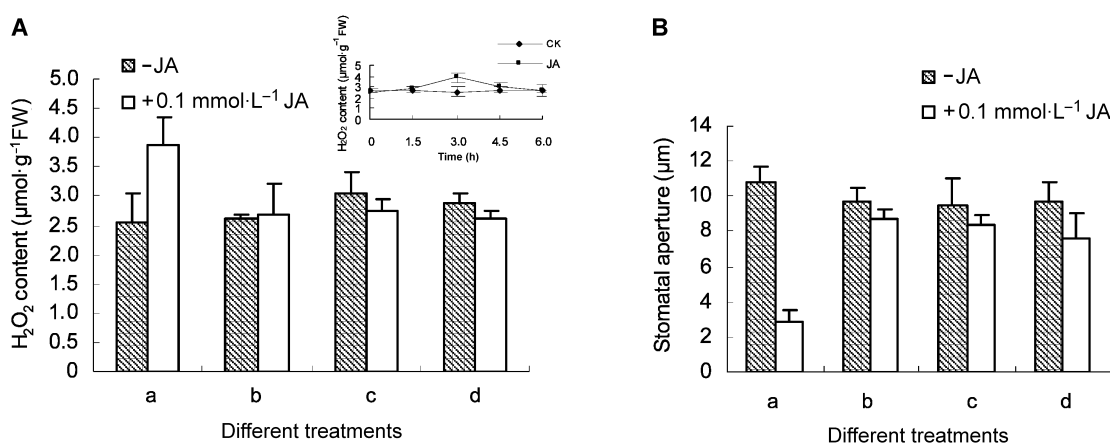


图4 H₂O₂清除剂及合成抑制剂对茉莉酸(JA)调控的蚕豆叶片H₂O₂含量(A)及气孔关闭(B)的影响

(A)中插图显示0.1 mmol·L⁻¹JA对蚕豆叶片H₂O₂含量的影响。a: 无清除剂及抑制剂处理; b: 0.1 mmol·L⁻¹二苯基碘(DPI); c: 0.1 mmol·L⁻¹水杨羟肟酸(SHAM); d: 1 mmol·L⁻¹抗坏血酸(AsA)

Figure 4 Effects of the H₂O₂ scavenger and H₂O₂ synthesis inhibitors on jasmonic acid (JA)-regulated H₂O₂ level (A) and stomatal closure (B) in *Vicia faba* leaves

Insert in the figure (A) indicated the effect of 0.1 mmol·L⁻¹ JA on H₂O₂ level in *V. faba* leaves. a: No treatment by the scavenger and inhibitors; b: 0.1 mmol·L⁻¹ diphenylene iodonium (DPI); c: 0.1 mmol·L⁻¹ salicylhydroxamic acid (SHAM); d: 1 mmol·L⁻¹ ascorbic acid (AsA)

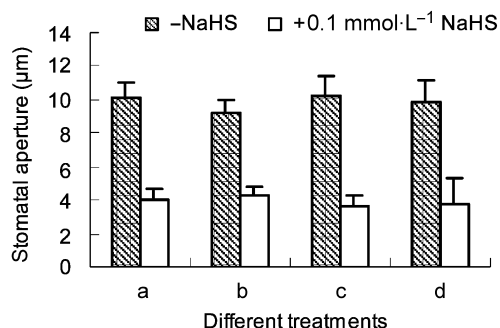


图5 H₂O₂清除剂及合成抑制剂对NaHS诱导蚕豆叶片气孔关闭的影响

a: 无清除剂及抑制剂处理; b: 0.1 mmol·L⁻¹DPI; c: 0.1 mmol·L⁻¹SHAM; d: 1 mmol·L⁻¹AsA

Figure 5 Effects of the H₂O₂ scavenger and H₂O₂ synthesis inhibitors on NaHS-induced stomatal closure in *Vicia faba* leaves

a: No treatment by the scavenger and inhibitors; b: 0.1 mmol·L⁻¹DPI; c: 0.1 mmol·L⁻¹SHAM; d: 1 mmol·L⁻¹AsA

焦显微技术, 检测H₂S合成抑制剂AOA、NH₂OH和C₃H₃KO₃+NH₃对JA诱导的蚕豆气孔保卫细胞中H₂O₂水平变化的影响。结果表明, 0.1 mmol·L⁻¹JA能够显著增加气孔保卫细胞中的H₂O₂水平, 并诱导气孔关闭(图7A, B); AOA、NH₂OH和C₃H₃KO₃+NH₃均可阻断JA引起的气孔开度减小, 但对JA诱导产生H₂O₂并未有明显影响(图7B-H)。结合图5的结果, 进一步推断H₂S位于H₂O₂的下游并参与JA诱导蚕豆叶片气孔关闭的信号转导过程。

2.2.5 H₂S合成抑制剂对JA诱导蚕豆叶片H₂O₂含量变化的影响

为了进一步明确H₂O₂和H₂S的上下游关系, 用H₂S合成抑制剂AOA、NH₂OH和C₃H₃KO₃+NH₃分别与JA共处理, 观测叶片中H₂O₂含量的变化。结果表明, AOA、NH₂OH和C₃H₃KO₃+NH₃对JA诱导产生H₂O₂并没有明显影响(图8)。综合看来, 在JA调控气孔运动过程中, NADPH氧化酶和细胞壁过氧化物酶产生的H₂O₂可能通过L-/D-半胱氨酸脱巯基酶产生的H₂S诱导蚕

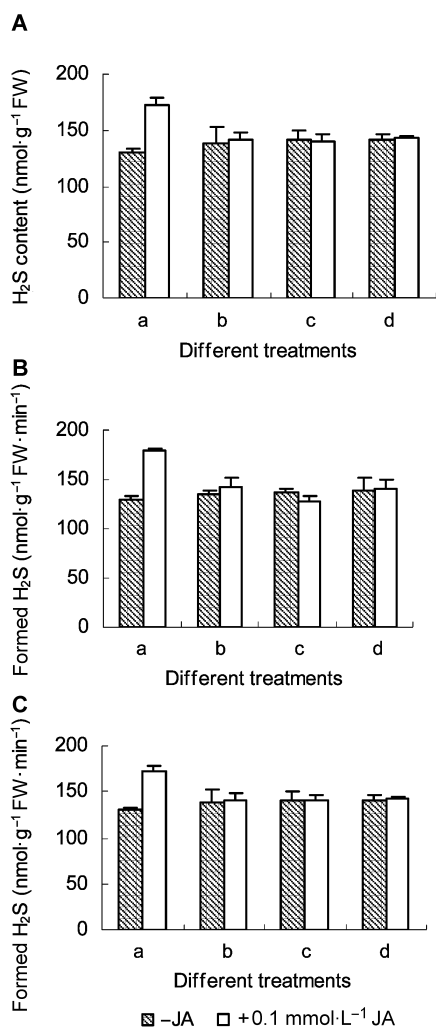


图6 H_2O_2 清除剂及合成抑制剂对茉莉酸(JA)诱导的蚕豆叶片 H_2S 含量及L-/D-半胱氨酸脱硫基酶活性变化的影响

(A) H_2O_2 清除剂及合成抑制剂对JA调控的蚕豆叶片 H_2S 含量的影响; (B) H_2O_2 清除剂及合成抑制剂对JA诱导的蚕豆叶片L-半胱氨酸脱硫基酶活性的影响; (C) H_2O_2 清除剂及合成抑制剂对JA诱导的蚕豆叶片D-半胱氨酸脱硫基酶活性的影响。a: 无清除剂及抑制剂处理; b: $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DPI; c: $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SHAM; d: $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ AsA

Figure 6 Effects of the H_2O_2 scavenger and H_2O_2 synthesis inhibitors on H_2S level, L-/D-cysteine desulfhydrase activity regulated by jasmonic acid (JA) in *Vicia faba* leaves

(A) Effects of the H_2O_2 scavenger and H_2O_2 synthesis inhibitors on JA-regulated H_2S level in *V. faba* leaves; (B) Effects of the H_2O_2 scavenger and H_2O_2 synthesis inhibitors on JA-induced L-cysteine desulfhydrase activity in *V. faba* leaves; (C) Effects of the H_2O_2 scavenger and H_2O_2 synthesis inhibitors on JA-induced D-cysteine desulfhydrase activity in *V. faba* leaves. a: No treatment by the scavenger and inhibitors; b: $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DPI; c: $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SHAM; d: $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ AsA

豆叶片气孔关闭。

2.3 讨论

气孔是高等植物与外界环境进行水分和气体交换的门户,植物通过改变气孔孔径来调控蒸腾作用和光合作用。在受到外界刺激时植物往往会通过气孔的开闭作出应答反应(Underwood et al., 2007)。有报道表明,JA等多种植物激素及无机离子均可诱导气孔关闭(Acharya and Assmann, 2008; 高巍和尚忠林, 2010);胞质碱化、 Ca^{2+} 和 H_2O_2 均在JA诱导气孔关闭过程中起重要作用(Gehring et al., 1997; 崔香环等, 2001)。在JA诱导气孔关闭过程中是否还存在新的信号分子以及其具体的调节机制还需要进一步研究。

H_2S 是一种近年来发现的信号分子,其在植物中的作用及作用机制的研究还刚起步。Riemenschneider等(2005)在拟南芥中发现 H_2S 作为信号分子在控制巯基水平中起作用。Zhang等(2008)证明 H_2S 在促进小麦萌发和抑制铜离子胁迫引起的氧化损伤中起重要作用,但是 H_2S 在气孔保卫细胞中的作用还未见报道。本实验证明 H_2S 的供体NaHS可以诱导气孔关闭,且具有浓度和时间效应(图1A, B)。研究表明在甘蓝型油菜(*Brassica napus*)抵御病原体入侵过程中,来自L-半胱氨酸脱硫基酶的 H_2S 起到重要作用(Bloem et al., 2004)。本研究结果显示,JA可显著提高蚕豆叶片的 H_2S 水平(图3A)及L-/D-半胱氨酸脱硫基酶的活性(图3C, D);L-/D-半胱氨酸脱硫基酶的抑制剂AOA、 NH_2OH 和L-/D-半胱氨酸脱硫基酶反应的产物 $C_3H_3KO_3+NH_3$ 均可显著抑制JA诱导的气孔关闭(图2; 图7)及 H_2S 含量的增加(图3B)。这说明 H_2S 是JA诱导蚕豆气孔关闭过程中的重要信号分子之一,且 H_2S 主要来自L-/D-半胱氨酸脱硫基酶途径。

H_2O_2 是植物生长发育过程中的重要信号分子,其在MeJA、脱落酸(abscisic acid, ABA)及重碳酸盐等诱导的拟南芥气孔关闭过程中起到重要作用(Kolla et al., 2007; Munemasa et al., 2007)。Suhita等(2004)研究发现 H_2O_2 位于胞质碱化的下游参与JA和ABA诱导的拟南芥气孔关闭过程。Zhang等(2001)研究表明 H_2O_2 通过改变胞质pH值来调控蚕豆气孔运动。由此可见, H_2O_2 既可单独影响气孔运动,也可参与激素调节气孔运动的过程,但调控效应是不同的。我们推测其原因可能与所研究植物材料的种类和生

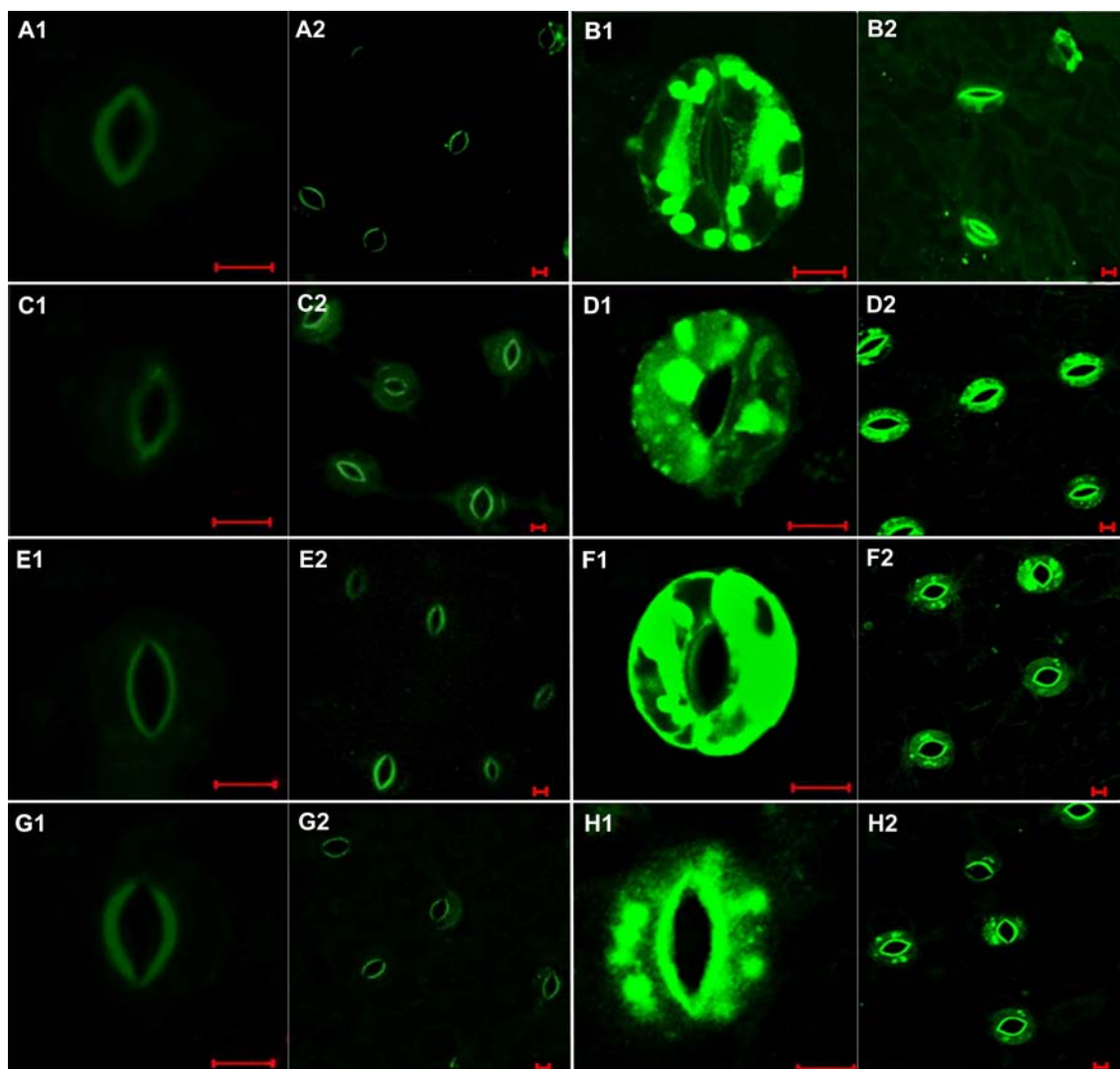


图7 H₂S合成抑制剂AOA、NH₂OH、C₃H₃KO₃+NH₃对茉莉酸(JA)诱导的蚕豆气孔保卫细胞中H₂O₂水平变化的影响

(A) MES缓冲液; (B) 0.1 mmol·L⁻¹JA; (C) 0.8 mmol·L⁻¹AOA; (D) 0.1 mmol·L⁻¹JA+0.8 mmol·L⁻¹AOA; (E) 0.4 mmol·L⁻¹C₃H₃KO₃+0.4 mmol·L⁻¹NH₃; (F) 0.1 mmol·L⁻¹JA+0.4 mmol·L⁻¹C₃H₃KO₃+0.4 mmol·L⁻¹NH₃; (G) 0.8 mmol·L⁻¹NH₂OH; (H) 0.1 mmol·L⁻¹JA+0.8 mmol·L⁻¹NH₂OH。A1-H1: 单个保卫细胞; A2-H2: 多个保卫细胞。Bar=10 μm

Figure 7 Effects of H₂S synthesis inhibitors (AOA, NH₂OH and C₃H₃KO₃+NH₃) on jasmonic acid (JA)-regulated H₂O₂ level in guard cells of *Vicia faba* leaves

(A) MES buffer; (B) 0.1 mmol·L⁻¹JA; (C) 0.8 mmol·L⁻¹AOA; (D) 0.1 mmol·L⁻¹JA+0.8 mmol·L⁻¹AOA; (E) 0.4 mmol·L⁻¹C₃H₃KO₃+0.4 mmol·L⁻¹NH₃; (F) 0.1 mmol·L⁻¹JA+0.4 mmol·L⁻¹C₃H₃KO₃+0.4 mmol·L⁻¹NH₃; (G) 0.8 mmol·L⁻¹NH₂OH; (H) 0.1 mmol·L⁻¹JA+0.8 mmol·L⁻¹NH₂OH. A1-H1: Single guard cell; A2-H2: Multiple guard cells. Bar=10 μm

理状态有关;也可能是由于植物体内的信号网络之间存在复杂的交叉。本实验证明,JA可以诱导气孔关闭(图2;图7A, B),并能提高叶片和保卫细胞中H₂O₂的含量(图4A;图7A, B)。这与崔香环等(2001)和薄惠等

(2005)的实验结果相一致。且这一过程可被H₂O₂的清除剂和合成抑制剂AsA、DPI和SHAM所抑制(图4A, B)。研究表明,在植物中H₂S和H₂O₂存在相互作用,如在大豆和红薯中H₂S可通过改变H₂O₂的含量抵御

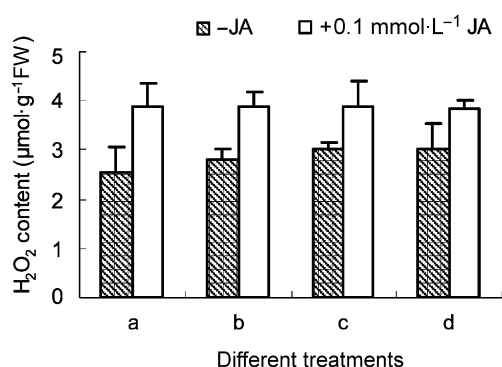


图8 H₂S合成抑制剂对茉莉酸(JA)调控的蚕豆叶片H₂O₂含量的影响

a: 无抑制剂处理; b: 0.8 mmol·L⁻¹AOA; c: 0.4 mmol·L⁻¹C₃H₃KO₃+0.4 mmol·L⁻¹NH₃; d: 0.8 mmol·L⁻¹NH₂OH

Figure 8 Effects of H₂S synthesis inhibitors on jasmonic acid (JA)-regulated H₂O₂ level in *Vicia faba* leaves

a: No treatment by inhibitors; b: 0.8 mmol·L⁻¹AOA; c: 0.4 mmol·L⁻¹C₃H₃KO₃+0.4 mmol·L⁻¹NH₃; d: 0.8 mmol·L⁻¹NH₂OH

不同胁迫(Zhang et al., 2009, 2010a)。那么在调控气孔运动过程中H₂S与H₂O₂又存在怎样的关系呢? 本实验结果显示, AsA、DPI和SHAM能够显著降低H₂S的水平(图6A)及L-/D-半胱氨酸脱巯基酶的活性(图6B, C), 而H₂S合成抑制剂AOA、NH₂OH和C₃H₃KO₃+NH₃对JA诱导的蚕豆叶片及保卫细胞中H₂O₂的水平没有影响(图8; 图7D, F, H), 且AsA、DPI和SHAM对NaHS诱导气孔关闭没有作用(图5)。由此推测, 在JA调控气孔运动的过程中H₂S可能位于H₂O₂的下游。综合分析表明, 来自NADPH氧化酶和细胞壁过氧化物酶的H₂O₂可以通过调控L-/D-半胱氨酸脱巯基酶活性产生H₂S, 进而诱导蚕豆叶片气孔关闭。

目前H₂S在植物生命活动中的作用机制研究还刚起步, 今后还需要提供更多的分子遗传学和细胞生物学方面的证据。如可以通过构建L-/D-半胱氨酸脱巯基酶的突变体, 进一步证实来自半胱氨酸脱巯基酶途径的H₂S在调控气孔运动中的作用, 并探讨植物体内H₂S形成的调控因素。最近, 以动物为材料的研究结果显示, 在生物体的不同部位H₂S的合成途径不同(Gadalla and Snyder, 2010); H₂S可以通过PKA和

PLC/PKC途径调控细胞Ca²⁺水平(Yong et al., 2010)。那么, 在保卫细胞和叶肉细胞中是否也存在来自不同途径的H₂S? 胞质Ca²⁺是否也介导了H₂S对气孔运动的调控? 植物体内是否存在JA-H₂S-PKA或PLC/PKC-Ca²⁺的作用途径。参与JA调控气孔运动过程的H₂S、H₂O₂、胞质pH、Ca²⁺和NO等各种信号分子是否可以通过激活下游的蛋白激酶, 最终作用于细胞骨架而调控气孔运动? 这些问题都值得进一步研究。

致谢 中国农业大学植物生理学与生物化学国家重点实验室王学臣教授对本研究工作给予了大力支持和帮助, 在此表示感谢!

参考文献

- 安国勇, 宋纯鹏, 张骁, 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**, 458–464.
- 薄惠, 王棚涛, 董发才, 宋纯鹏 (2005). 拟南芥保卫细胞中茉莉酸甲酯诱导的H₂O₂产生与MAPK信号转导体系的可能关系. 植物生理学通讯 **41**, 439–443.
- 崔香环, 苗雨晨, 董发才, 宋纯鹏 (2001). 茉莉酸甲酯诱导气孔关闭的信号转导机制初探. 河南大学学报(自然科学版) **31**, 75–78.
- 高巍, 尚忠林 (2010). 细胞内离子在气孔运动中的作用. 植物学报 **45**, 632–639.
- 李东波, 肖朝霞, 刘灵霞, 王金成, 宋国力, 毕玉蓉 (2010). 外源硫化氢对豌豆根尖及其边缘细胞的影响. 植物学报 **45**, 354–362.
- 刘国华, 侯丽霞, 刘菁, 刘新, 王学臣 (2009). H₂O₂介导的NO合成参与乙烯诱导的拟南芥叶片气孔关闭. 自然科学进展 **19**, 841–851.
- 刘新, 石武良, 张蜀秋, 娄成后 (2005). 一氧化氮参与茉莉酸诱导蚕豆气孔关闭的信号转导. 科学通报 **50**, 453–458.
- 吴劲松, 种康 (2002). 茉莉酸作用的分子生物学研究. 植物学通报 **19**, 164–170.
- 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**, 103–106.
- 左熙江, 张汝民, 高岩 (2009). 植物间挥发物信号的研究进展. 植物学报 **44**, 245–252.
- Acharya BR, Assmann SM (2008). Hormone interactions in stomatal function. *Plant Mol Biol* **69**, 451–462.

- Angelini R, Tisi A, Rea G, Chen MM, Botta M, Federico R, Cona A** (2008). Involvement of polyamine oxidase in wound healing. *Plant Physiol* **146**, 162–177.
- Bloem E, Riemenschneider A, Volker J, Papenbrock J, Schmidt A, Salac I, Haneklaus S, Schnug E** (2004). Sulphur supply and infection with *Pyrenopeziza brassicae* influence L-cysteine desulphhydrase activity in *Brassica napus* L. *J Exp Bot* **55**, 2305–2312.
- Brennan T, Frenkel C** (1977). Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear. *Plant Physiol* **59**, 411–416.
- Gadalla MM, Snyder SH** (2010). Hydrogen sulfide as a gasotransmitter. *J Neurochem* **113**, 14–26.
- Gehring CA, Irving HR, McConchie R, Parish RW** (1997). Jasmonates induce intracellular alkalinization and closure of *Paphiopedilum* guard cells. *Ann Bot* **80**, 485–489.
- Gonugunta VK, Srivastava N, Raghavendra AS** (2009). Cytosolic alkalinization is a common and early messenger preceding the production of ROS and NO during stomatal closure by variable signals, including abscisic acid, methyl jasmonate and chitosan. *Plant Signal Behav* **4**, 561–564.
- Huang DQ, Wu WR, Abrams SR, Cutler AJ** (2008). The relationship of drought-related gene expression in *Arabidopsis thaliana* to hormonal and environmental factors. *J Exp Bot* **59**, 2991–3007.
- Kolla VA, Vavasseur A, Raghavendra AS** (2007). Hydrogen peroxide production is an early event during bicarbonate induced stomatal closure in abaxial epidermis of *Arabidopsis*. *Planta* **225**, 1421–1429.
- Munemasa S, Oda K, Watanabe-Sugimoto M, Nakamura Y, Shimoishi Y, Murata Y** (2007). The *coronatine-insensitive 1* mutation reveals the hormonal signaling interaction between abscisic acid and methyl jasmonate in *Arabidopsis* guard cells. Specific impairment of ion channel activation and second messenger production. *Plant Physiol* **143**, 1398–1407.
- Papenbrock J, Riemenschneider A, Kamp A, Schulz-Vogt HN, Schmidt A** (2007). Characterization of cysteine-degrading and H₂S-releasing enzymes of higher plants—from the field to the test tube and back. *Plant Biol* **9**, 582–588.
- Riemenschneider A, Nikiforova V, Hoefgen R, de Kok LJ, Papenbrock J** (2005). Impact of elevated H₂S on metabolite levels, activity of enzymes and expression of genes involved in cysteine metabolism. *Plant Physiol Biochem* **43**, 473–483.
- Sekiya J, Schmidt A, Wilson LG, Filner P** (1982). Emission of hydrogen sulfide by leaf tissue in response to L-cysteine. *Plant Physiol* **70**, 430–436.
- She XP, Song XG** (2008). Carbon monoxide-induced stomatal closure involves generation of hydrogen peroxide in *Vicia faba* guard cells. *J Integr Plant Biol* **50**, 1539–1548.
- Suhita D, Raghavendra AS, Kwak JM, Vavasseur A** (2004). Cytoplasmic alkalization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate- and abscisic acid-induced stomatal closure. *Plant Physiol* **134**, 1536–1545.
- Underwood W, Melotto M, He SY** (2007). Role of plant stomata in bacterial invasion. *Cell Microbiol* **9**, 1621–1629.
- Veal EA, Day AM, Morgan BA** (2007). Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol Cell* **26**, 1–14.
- Yong QC, Choo CH, Tan BH, Low CM, Bian JS** (2010). Effect of hydrogen sulfide on intracellular calcium homeostasis in neuronal cells. *Neurochem Int* **56**, 508–515.
- Zhang H, Hu LY, Hu KD, He YD, Wang SH, Luo JP** (2008). Hydrogen sulfide promotes wheat seed germination and alleviates oxidative damage against copper stress. *J Integr Plant Biol* **50**, 1518–1529.
- Zhang H, Jiao H, Jiang CX, Wang SH, Wei ZJ, Luo JP, Jones RL** (2010a). Hydrogen sulfide protects soybean seedlings against drought-induced oxidative stress. *Acta Physiol Plant* **32**, 849–857.
- Zhang H, Tan ZQ, Hu LY, Wang SH, Luo JP, Jones RL** (2010b). Hydrogen sulfide alleviates aluminum toxicity in germinating wheat seedlings. *J Integr Plant Biol* **52**, 556–567.
- Zhang H, Ye YK, Wang SH, Luo JP, Tang J, Ma DF** (2009). Hydrogen sulfide counteracts chlorophyll loss in sweet potato seedling leaves and alleviates oxidative damage against osmotic stress. *Plant Growth Regul* **58**, 243–250.
- Zhang X, Dong FC, Gao JF, Song CP** (2001). Hydrogen peroxide-induced changes in intracellular pH of guard cells precede stomatal closure. *Cell Res* **11**, 37–43.

H₂S May Function Downstream of H₂O₂ in Jasmonic Acid-induced Stomatal Closure in *Vicia faba*

Zhihui Hou, Jing Liu, Lixia Hou, Xidong Li, Xin Liu*

College of Life Sciences, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China

Abstract Pharmacological treatments combined with laser scanning confocal microscopy (LSCM) and spectroscopy were used to study the role of H₂S and H₂O₂ in the signaling transduction during stomatal movement responding to jasmonic acid (JA) in *Vicia faba*. Inhibitors of H₂S synthesis (aminooxy acetic acid, hydroxylamine, and potassium pyruvate + ammonia), the scavenger of H₂O₂ (ascorbic acid), and the inhibitors of H₂O₂ synthesis (salicylhydroxamic acid, diphenylene iodonium) all reduced JA-induced stomatal closure. Moreover, JA enhanced H₂O₂ and H₂S levels and L-/D-cysteine desulfhydrase activity in leaves and guard cells. The inhibitors of L-/D-cysteine desulfhydrase diminished JA-induced H₂S production in leaves. In addition, H₂O₂ scavenger decreased H₂S level and L-/D-cysteine desulfhydrase activity induced by JA. Therefore, H₂S and H₂O₂ are involved in the signal transduction pathway of JA-induced stomatal closure. L-/D-cysteine desulfhydrase-derived H₂S may represent a novel downstream component of the H₂O₂ signaling cascade during JA-induced stomatal movement in *V. faba*.

Key words hydrogen peroxide, hydrogen sulphide, jasmonic acid, stomatal movement, *Vicia faba*

Hou ZH, Liu J, Hou LX, Li XD, Liu X (2011). H₂S may function downstream of H₂O₂ in jasmonic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Chin Bull Bot* **46**, 396–406.

* Author for correspondence. E-mail: liuxin6080@yahoo.com.cn