

王永竹, 徐为民, 杨 康, 等. H₂S 对硒胁迫下不结球白菜体内 *BrPAOI*/H₂O₂ 的调控作用[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(4): 887-895.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2019.04.020

H₂S 对硒胁迫下不结球白菜体内 *BrPAOI*/H₂O₂ 的调控作用

王永竹¹, 徐为民², 杨 康¹, 许俊丽¹, 陈 健², 杨立飞¹

(1. 南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095; 2. 江苏省农业科学院农产品质量与安全营养研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 土壤硒(Se)污染已受到越来越多的关注。Se 胁迫通常破坏植物体内的抗氧化系统, 进而导致 H₂O₂ 被动累积, 多胺氧化酶(PAO)代谢多胺产生 H₂O₂ 是植物体内活性氧的重要来源之一。本研究以不结球白菜(*Brassica rapa* ssp. *chinensis*)幼苗根为研究材料, 采用多种生理生化手段, 研究了信号分子硫化氢(H₂S)对 Se 胁迫下 *BrPAOI*/H₂O₂ 系统的调控方式。结果表明, (1) Se 胁迫导致根内 PAO 活性和 H₂O₂ 含量显著上升, 而采用 PAO 活性抑制剂(GZT)可显著抑制 PAO 活性并降低 H₂O₂ 含量, 表明在 Se 胁迫下导致了依赖于 PAO 的 H₂O₂ 产生。(2) 从不结球白菜体内克隆了 1 个编码 PAO 蛋白的基因 *BrPAOI*, 将 *BrPAOI* 在烟草叶片中瞬时表达, 证明编码蛋白具备产生 H₂O₂ 的能力; Se 胁迫可显著诱导根内 *BrPAOI* 的表达。(3) Se 胁迫诱导根内 H₂S 合成相关基因(*BrLCD1*~*BrLCD10* 和 *BrDCD1*、*BrDCD2*)表达上调, 内源 H₂S 含量显著提高; H₂S 供体(NaHS)处理可进一步提高 Se 胁迫下根内源 H₂S 水平, 而 H₂S 的清除剂(HT)处理可显著降低 Se 胁迫下根内源 H₂S 水平。(4) NaHS 处理可显著抑制 Se 胁迫下根内 *BrPAOI* 基因的表达、PAO 活性、H₂O₂ 含量, 而 HT 处理则呈现出相反的作用效果。表明, Se 胁迫可导致 *BrPAOI* 基因表达上调, 进而提高 PAO 活性并产生过量 H₂O₂, 而内源 H₂S 则参与调控这一生理过程。

关键词: 不结球白菜; 硒; 硫化氢; 过氧化氢; *BrPAOI*

中图分类号: S634.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2019)04-0887-09

Regulation of H₂S on *BrPAOI*/H₂O₂ under selenium stress in *Brassica rapa*

WANG Yong-zhu¹, XU Wei-min², YANG Kang¹, XU Jun-li¹, CHEN Jian², YANG Li-fei¹

(1. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Food Quality and Detection, Jiangsu Academy of Agriculture Science, Nanjing 210014, China)

Abstract: Selenium (Se) contamination in soil has attracted more and more attention. Se stress always results in the passive accumulation of H₂O₂ by destroying antioxidant system in plants. Polyamine metabolism facilitated by polyamine oxidase (PAO) can produce H₂O₂, which is one of the important sources of reactive oxygen species (ROS) in plants. In this study, physiological-biochemical approaches were applied to investigate the regulation of *BrPAOI*/H₂O₂ by hydrogen sulfide (H₂S) in the root of *Brassica rapa* seedlings under Se stress. The results showed that PAO activity and H₂O₂ content

收稿日期: 2018-12-07

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项(KYZ201830); 国家自然科学基金青年基金项目(31401857); 国家自然科学基金项目(31771705)

作者简介: 王永竹(1992-), 女, 河北衡水人, 硕士研究生, 主要从事蔬菜生理与生物技术研究。(E-mail) 1343138420@qq.com

通讯作者: 杨立飞, (E-mail) Ify@njau.edu.cn

in root increased significantly under Se stress. Treatment with PAO activity inhibitor (GZT) resulted in significant decrease in PAO activity and H₂O₂ content in Se-treated root, suggesting that Se stress triggered PAO-dependent H₂O₂ production in root. A *BrPAOI* gene encoding PAO was cloned from *B. rapa*. The capability of *BrPAOI* in H₂O₂ production was confirmed by transiently expressing

BrPAOI in tobacco leaves. Se stress significantly upregulated the expression of *BrPAOI* in root. Se stress resulted in remarkable increase in the expression of genes related to H_2S synthesis and endogenous H_2S level in root. Treatment with H_2S donor (NaHS) enhanced endogenous H_2S level in root under Se stress, while treatment with H_2S scavenger (HT) led to the decrease in endogenous H_2S level in Se-treated root. Treatment with NaHS resulted in significant decrease in the expression level of *BrPAOI*, *PAO* activity, and H_2O_2 content, while treatment with HT showed adverse effects. These results suggested that Se stress triggered *PAO*-dependent H_2O_2 production by upregulating the expression of *BrPAOI* in root. And endogenous H_2S was involved in the regulation of *BrPAOI*/ H_2O_2 system.

Key words: *Brassica rapa*; selenium; hydrogen sulfide; hydrogen peroxide; *BrPAOI*

硒作为植物和动物不可或缺的微量元素之一,在动植物生长发育过程中发挥重要的生物学功能^[1-4]。但是伴随着工业的迅速发展,大量硒被排放到环境中,造成局部土壤硒污染,进而危害植物生长^[5]。研究发现植物硒毒害的普遍反应为活性氧(ROS)的大量积累造成的氧化损伤^[6-7]。 H_2O_2 作为ROS的主要代表成员之一,具有相对较长的半衰期,更稳定存在于植物细胞内,易在植物体内造成严重的氧化损伤反应^[8-9]。已有研究结果显示,高浓度的硒可通过破坏植物体内的抗氧化系统,从而导致 H_2O_2 的被动大量累积^[10]。而硒胁迫如何诱导 H_2O_2 的过量产生尚不明确。

多胺氧化酶(*PAO*)是植物体内产生 H_2O_2 的重要来源之一。*PAO*在分解代谢或转化多胺类物质[如亚精胺(Spd)、精胺(Spm)]的过程中可产生副产物 H_2O_2 ^[11]。*PAO*分解代谢多胺产生的 H_2O_2 参与调控多种植物的生长发育以及胁迫应答,例如:拟南芥中花粉管的伸长和植株的氧化胁迫反应^[12-13],玉米根的发育^[11],烟草和棉花对生物胁迫的响应^[14-15]。硒胁迫是否并怎样调控植物体内的*PAO*/ H_2O_2 系统?回答此问题将有助于揭示硒胁迫下植物体内 H_2O_2 过量产生的作用机制。

H_2S 是植物体内一种重要的气体信号分子,参与调控多种生理过程。 H_2S 的产生可通过半胱氨酸脱硫基酶(*CDes*)的酶促反应实现,包括*L*-cysteine desulphydrase(*LCD*)和*D*-cysteine desulphydrase(*DCD*)^[16]。大量研究结果显示,当植物处于重金属(Cu、Cr、Al、Cd)胁迫下, H_2S 可以激活植物体内的抗氧化物酶系统清除产生的过量 H_2O_2 ,从而减轻氧化损伤^[17-21]。在上述调控过程中, H_2S 亦可与其他信号分子(如水杨酸和一氧化氮)发生互作^[20-21]。我们在前期研究中鉴定出了青菜基因组中的10个*LCD*基因和2个*DCD*基因,并进一步发现在硒胁迫

下不结球白菜体内, H_2S 可通过提高谷胱甘肽含量来清除过量累积的ROS^[1]。然而 H_2S 如何调控硒胁迫下植物体内 H_2O_2 的产生尚不清楚。

本研究以不结球白菜幼苗根为材料,结合生理测定、基因克隆、瞬时表达等试验手段,研究硒胁迫下内源 H_2S 参与调控*PAO*产生 H_2O_2 的作用方式,旨在为进一步揭示植物硒毒害的作用机制提供部分理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料培养与处理

不结球白菜(*Brassica rapa* ssp. *chinensis*)购自南京绿领种业有限公司。将种子用1% NaClO消毒10 min后,用蒸馏水冲洗3遍,双蒸水浸泡3 h,将其播种于培养皿中于黑暗处催芽。待根长1.5 cm时挑选生长一致的幼苗,转至不同处理的溶液中,培养条件是:温度(25±1)℃、光周期16 h(昼)/8 h(夜),相对湿度75%,光照度200 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。根据本实验室前期的研究结果^[1],此次试验涉及到的 Na_2SeO_3 浓度为20 $\mu\text{mol}/\text{L}$,此浓度给不结球白菜的生长造成中等程度抑制。其他试剂分别为硫氢化钠(NaHS,5 $\mu\text{mol}/\text{L}$)作为 H_2S 供体^[1],亚牛磺酸(HT,20 $\mu\text{mol}/\text{L}$)作为 H_2S 清除剂^[1],双胍盐(GZT,20 nmol/L)作为*PAO*活性抑制剂。根据不同的试验设计,将上述试剂组合搭配成相应的处理液。其中为了避免NaHS与Se的体外反应,采取预处理方式,即先用NaHS预处理根12 h,然后再移至 Na_2SeO_3 溶液中处理72 h。其他试剂均采用共同处理的方式处理72 h。

用于基因瞬时表达的植物材料为本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)叶片。其种子用1% NaClO消毒10 min后,用蒸馏水冲洗3遍,将其播种于穴盘中于黑暗处催芽。光照培养箱的培养条件是:温度

(26±1)℃、光周期 16 h(昼)/8 h(夜),光照度 200 μmol/(m²·s)。当烟草长至四叶一心时,用于后续基因功能的瞬时表达验证。

1.2 试验方法

1.2.1 H₂S 含量测定 将不结球白菜的根尖清洗干净,然后于 WSP-1(H₂S 特异性荧光探针)中避光染色 40 min,用双蒸水清洗 3 遍,于荧光显微镜(美国 Nikon 公司生产)下进行观察拍照。利用软件 Image-Pro Plus 6.0 进行荧光密度分析。

1.2.2 H₂O₂ 含量测定 取植物组织材料约 0.1 g,在液氮中研磨,加入 0.9 ml 的磷酸缓冲液,4℃、12 000 r/min 离心 20 min,上清液用于测量 H₂O₂ 的含量。采用商业化试剂盒(A064-1,南京建成生物工程研究所生产)检测 H₂O₂ 含量。

1.2.3 叶片 H₂O₂ 原位染色 将烟草叶片完全浸入二氨基联苯胺(DAB)溶液(1 mg/ml,pH 3.8)中 12 h,然后用双蒸水洗净,放置于煮沸的 96%酒精中去除绿色背景,最后用数码相机拍照。

1.2.4 多胺氧化酶活性检测 取不结球白菜根约 0.1 g,在液氮中研磨,加入 1.0 ml 磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH 6.5),离心 20 min(4℃,10 000 r/min),取上清液于新的离心管中,离心 5 min(4℃,5 000 r/min)。此上清液用于 PAO 活性的检测。反应体系包含 2.5 ml 磷酸缓冲液,0.2 ml 显色液(磷酸缓冲液配置:100.0 ml 磷酸缓冲液中含 10 mg 4-氨基氨替吡啉和 25 μl N,-N-二甲基苯胺),0.1 mg 的辣根过氧化物酶,0.2 ml 的提取液和 0.2 ml 的底物(Spd 或 Spm)。反应体系在 30℃下反应 30 min,然后检测 515 nm 下的吸光值。以每 1 min A₅₁₅ 变化 0.01 为 1 个酶活单位^[22-23]。

1.2.5 基因表达分析 利用总 RNA 提取试剂盒提取烟草叶片总 RNA,PrimeScript™ 试剂盒(TaKaRa 公司生产)用于合成 cDNA 的第一链。利用 SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒(TaKaRa 公司生产)进行 qRT-PCR 扩增反应。所用引物序列信息^[24]见表 1。试验结果通过 ABI 7500 软件进行分析。

表 1 qRT-PCR 引物信息

Table 1 Primers used for qRT-PCR analysis

| 基因名称 | 基因编号 | 正向引物(5'→3') | 反向引物(5'→3') |
|----------------|-----------|------------------------|------------------------|
| <i>BrLCD1</i> | Bra001131 | ACCGGACAATTTGGATTTC | GCCGTTTTGCCACCTTAATA |
| <i>BrLCD2</i> | Bra037682 | CAGCCAATCCCAAGATTCAT | TTGTGAGGTCTGGTTTTCC |
| <i>BrLCD3</i> | Bra004781 | CCACGGAAAGTGCCATACTT | TTCAGGTCTCTTTGCCACCT |
| <i>BrLCD4</i> | Bra014529 | GCGATTTCAAAGTGAGGAAGC | TCCCGATAGACTGGAACAG |
| <i>BrLCD5</i> | Bra039708 | GGCAAGGCTTCTTGCTCTTA | CTTTCCTTGTCGATCGAAT |
| <i>BrLCD6</i> | Bra036910 | CCTGCTAACCCAAAGATCCA | TATAAAACGACGCCAATCC |
| <i>BrLCD7</i> | Bra009985 | GCGGTGGAACCTACAGAGAG | GAGCAAGAAGCTTGGCTGTT |
| <i>BrLCD8</i> | Bra020605 | GGATTGTTGGTGGGCATATC | GTCGGCAGATTCTCTGCTTC |
| <i>BrLCD9</i> | Bra036115 | AAACTCCTGGTGTTACATACC | CCCTGCTGAATCTCTCCATATC |
| <i>BrLCD10</i> | Bra006114 | TGGTCCGGAGATATGGAGAG | CCTGGTTCTCCTCCACTGAG |
| <i>BrDCD1</i> | Bra018726 | CAAGGGAGATTGAGGAGCAG | TTCGGATCCTTGTCATCTC |
| <i>BrDCD2</i> | Bra025184 | CAGCAGCTTGATACGATCA | ACCAAACATCCCAAGAGTGC |
| <i>BrPAO1</i> | Bra006210 | GATTGCTGCTGA CTCGTATAA | AGGAGCTTCTCAGCTTCTTG |
| <i>Actin</i> | Bra028615 | CTATCCTCCGTCTCGATCTC | CTTAGCCGTCTCCAGCTCT |

1.2.6 *BrPAO1* 的克隆及分析 以拟南芥中的 *At5G13700*(*AtPAO1*)为靶基因在不结球白菜数据库(BRAD, <http://brassicadb.org/brad/index.php>)中进行 BLAST 检索,得到同源基因 *Bra006210*(*BrPAO1*)。利用总 RNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司生产)提取不结球白菜根部总 RNA。PrimeScript™ 试剂盒(TaKaRa 公司生产)用于合成 cDNA 的第一链。设计扩增 *BrPAO1* 基因 cDNA 全

长的引物,正向引物:5'-ATGACGACCGCCTCCGTA-ATT-3',反向引物:5'-CTAGCTTCTCCCAGATATTA-AATTGAC-3'。PrimeSTAR® Max DNA Polymerase(TaKaRa 公司生产)进行全长扩增,连结至 PMD19-T 载体并进行测序。通过分析测序结果,将修正后的碱基序列通过 NCBI 中的 ORF Finder 进行氨基酸序列预测与分析。利用 ExPASy 中的 Compute PI/Mv(https://web.expasy.org/compute_pi/)分析等电

点和相对分子质量。利用 WoLF PSORT (<https://wolfpsort.hgc.jp/>) 进行亚细胞定位分析。采用 MEGA 6.0 将其与拟南芥 AtPAO1、玉米 ZmPAO、水稻 OsPAO6-7 的氨基酸序列进行多重比对分析。

1.2.7 BrPAO1 瞬时表达转化烟草 采用一步克隆法,设计包含限制性酶切位点 *Sma* I 和表达载体同源臂的引物。引物如下:正向引物:5'-GCTGTA-CAAGGGTACCCCGGGATGACGACCGCCTCCGTAAT-T-3' 反向引物:5'-TAGAGGATCCGTCGACCCCGGGC-TAGCTTCTCCCAGATATTAAATTGAC-3',划线部分为表达载体同源臂和酶切位点。PrimeSTAR® Max DNA Polymerase (TaKaRa) 扩增 *BrPAO1* 基因的全长,使用 ClonExpress® II One Step Cloning Kit (南京诺维赞生物科技有限公司生产) 进行载体构建,将目的基因和植物表达载体 PCAMBIA-2300 进行连结,然后转至大肠杆菌感受态 DH5 α ,随后将含有测序正确的重组质粒的 DH5 α 进行扩大培养、提质粒并转至农杆菌感受态 GV3101,最后将含有目的基因的农杆菌菌液侵染烟草,进行后续鉴定。农杆菌侵染缓冲液制备方法:将含有少量重组质粒的农杆菌菌液添加至 LB 培养基 (含利福平 50 mg/ml,卡那霉素 50 mg/ml) 过夜摇菌 (200 r/min, 28 °C),将扩增后的农杆菌菌液 4 500 r/min 离心 10 min,收集菌体,弃上清液,然后加入适量的侵染缓冲液 (10 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L 2-吗啉乙磺酸, 100 μ mol/L 乙酰丁香酮)

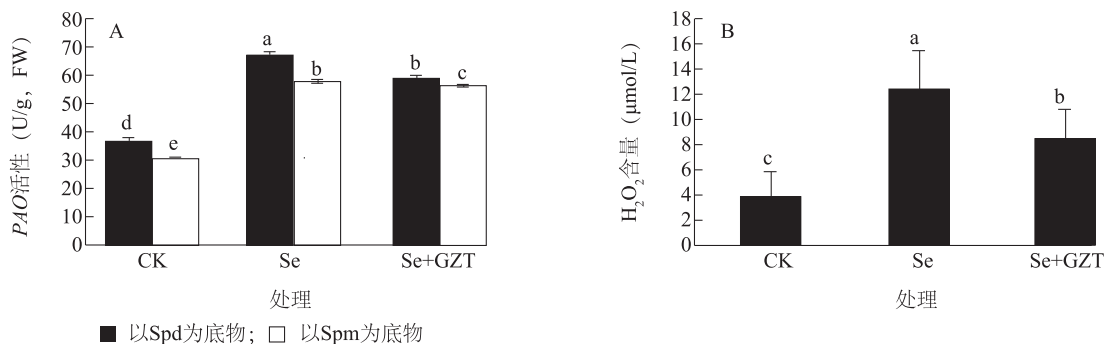
4 500 r/min 离心 10 min,收集菌体,弃上清液,最后加入适量的侵染缓冲液调节 OD 值至 0.4,室温放置 3~4 h,用于侵染烟草叶片。以正常生长的烟草叶片 (CK) 和注射不含有目的基因的空载体 (EV) 为阴性对照。将烟草植株在 DNA 和 mRNA 水平分别进行检测 (采用引物参照方法 1.2.6),用于验证和筛选烟草阳性植株。侵染 60 h 后检测烟草叶片的 *BrPAO1* 表达和 H₂O₂ 产生情况。

1.2.8 统计分析 每个试验数据至少取 3 次重复。SPSS6.0 对试验数据进行单因素随机分组方差分析及显著性差异分析 ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 硒处理对不结球白菜体内 PAO 活性及 H₂O₂ 含量的影响

分别以 Spd 和 Spm 为底物测定 Se 处理下根内 PAO 活性。结果显示:单独 Se 处理能够诱导 PAO 活性显著增加 (图 1A),同时伴随着 H₂O₂ 含量的显著升高 (图 1B)。在 Se 胁迫下,PAO 活性抑制剂 GZT 处理后,能够显著降低 PAO 活性 (图 1A) 和 H₂O₂ 含量 (图 1B),说明 Se 胁迫诱导了依赖于 PAO 的 H₂O₂ 产生。值得注意的是,Se 胁迫下,GZT 对以 Spd 为底物的 PAO 活性抑制程度高于以 Spm 为底物的 PAO 活性 (图 1A)。这表明 Se 胁迫可能主要通过诱导 PAO 代谢 Spd 产生 H₂O₂。



CK 为不结球白菜幼苗在单蒸水下处理 3 d, Se 为不结球白菜幼苗在 Se (20 μ mol/L) 下处理 3 d, Se+GZT 为不结球白菜幼苗在 Se (20 μ mol/L) 和 GZT (20 nmol/L) 下处理 3 d。不同小写字母代表处理间有显著差异 ($P < 0.05$)。

图 1 GZT 处理对硒胁迫下不结球白菜根内 PAO 活性和 H₂O₂ 含量的影响

Fig.1 Effects of GZT on PAO activity and H₂O₂ content in the root of *Brassica rapa* under selenium (Se) stress

2.2 硒处理对不结球白菜体内 H₂S 合成酶基因表达及 H₂S 含量的影响

Se 处理下对根中负责产生 H₂S 的基因 (*BrLCD1* ~ *BrLCD10* 和 *BrDCD1*、*BrDCD2*) 进行表达

分析。结果 (图 2) 显示,除 *BrLCD1* 下调,*BrLCD9* 保持不变外,其他基因的表达量在 Se 处理下均显著上调。其中以 *BrLCD6* 上调幅度最大,约为对照的 4 倍。采用特异性荧光探针 WSP-1 对根中的 H₂S 水

平进行原位荧光检测,发现 Se 处理导致根内 H₂S 含量显著上升。外源 NaHS (H₂S 供体) 处理可显著提高 Se 胁迫下根内 H₂S 水平,而 HT (H₂S 清除剂) 则

可显著降低 Se 胁迫下根内 H₂S 水平 (图 3)。这些结果表明,Se 胁迫可通过诱导 BrLCDs 和 BrDCDs 的表达,进而刺激根中 H₂S 的产生。

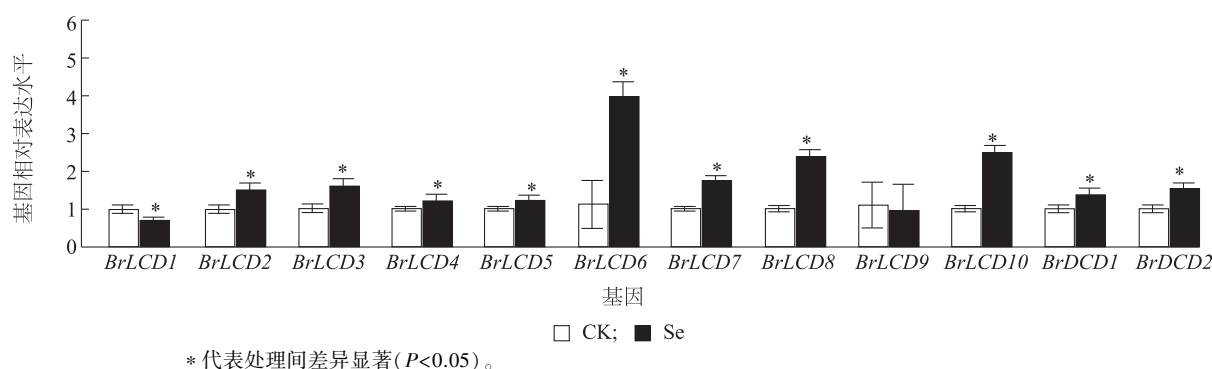
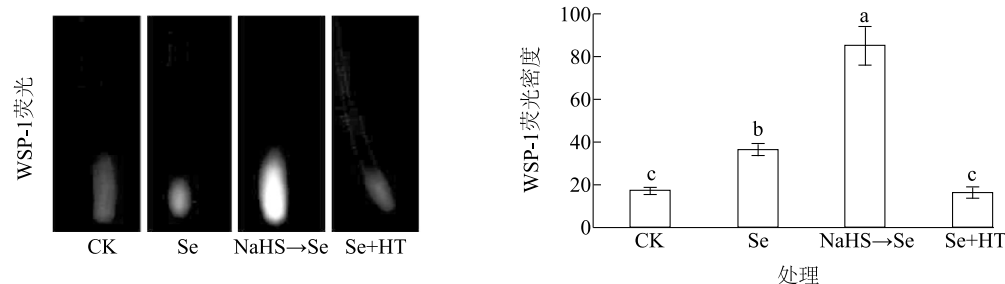


图2 硒胁迫对不结球白菜根内 BrLCDs 和 BrDCDs 表达的影响

Fig.2 Effect of Se stress on the expression level of BrLCDs and BrDCDs in the root of *B. rapa*



CK 为不结球白菜幼苗在单蒸水下处理 3 d, Se 为不结球白菜幼苗在 Se (20 $\mu\text{mol/L}$) 下处理 3 d, NaHS→Se 为不结球白菜幼苗在 NaHS (5 $\mu\text{mol/L}$) 下预处理 12 h, 然后转移至 Se (20 $\mu\text{mol/L}$) 下处理 3 d。Se+HT 为不结球白菜幼苗在 Se (20 $\mu\text{mol/L}$) 和 HT (20 $\mu\text{mol/L}$) 下处理 3 d。

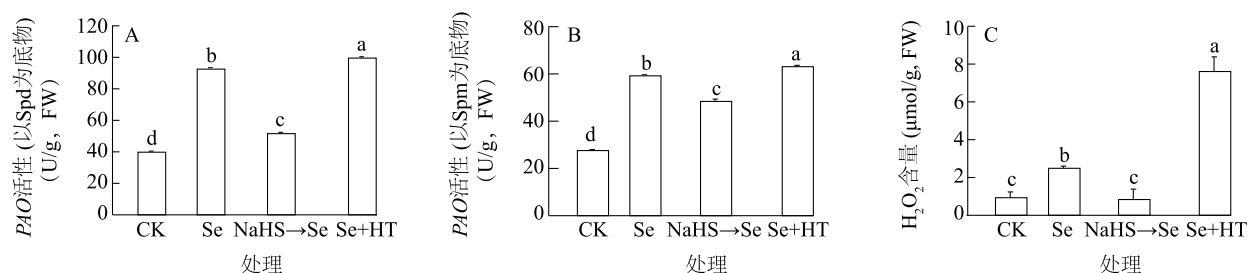
图3 NaHS 和 HT 对硒胁迫下不结球白菜根内 H₂S 含量的影响

Fig.3 Effect of NaHS and HT on H₂S level in the root of *B. rapa* under Se stress

2.3 H₂S 对硒胁迫下不结球白菜根内 PAO 活性及 H₂O₂ 含量的影响

为了研究 H₂S 水平变化对 Se 胁迫下 PAO-H₂O₂ 系统的影响,测定了 NaHS、HT 处理下根 PAO 活性和 H₂O₂ 的变化。结果显示,NaHS 处理能够显著降低

Se 胁迫下根内 PAO 活性,而 HT 处理则显著增加了 Se 胁迫下根内 PAO 活性 (图 4A、图 4B)。在上述相同处理条件下,根内 H₂O₂ 含量呈现出与 PAO 活性相似的变化趋势 (图 4C)。本试验结果表明,Se 胁迫下, H₂S 能够抑制根内依赖于 PAO 的 H₂O₂ 产生。



CK 为不结球白菜幼苗在单蒸水下处理 3 d, Se 为不结球白菜幼苗在 Se (20 $\mu\text{mol/L}$) 下处理 3 d, NaHS→Se 为不结球白菜幼苗用 NaHS (5 $\mu\text{mol/L}$) 预处理 12 h, 然后转移至 Se (20 $\mu\text{mol/L}$) 下处理 3 d。Se+HT 为不结球白菜幼苗在 Se (20 $\mu\text{mol/L}$) 和 HT (20 $\mu\text{mol/L}$) 下处理 3 d。不同字母表示处理间差异显著。

图4 NaHS、HT 对硒胁迫下不结球白菜根内 PAO 活性和 H₂O₂ 含量的影响

Fig.4 Effect of NaHS, HT on PAO activity and H₂O₂ content in the root of *B. rapa* under Se stress

2.4 BrPAO1 的克隆与分析

通过 PCR 扩增(图 5)与序列比对分析,获得不结球白菜 *BrPAO1* 的全长 cDNA 序列,长度为 1 416 bp。该基因编码 471 个氨基酸的蛋白质,预测该蛋白质分子量为 52 900,理论等电点为 4.94,亚细胞定位预测其可能位于质外体。多重比对分析结果(图 6)显示:*BrPAO1* 与拟南芥、玉米、水稻中已经鉴定出的同源蛋白质序列(*AtPAO1*、*ZmPAO*、*OsPAO6/7*)具有较高的相似度。根据植物 *PAO* 的功能保守位点^[25],我们在 *BrPAO1* 中也发现保守的黄素结合位点(图 6)和 *PAO* 活性催化位点(图 6)。

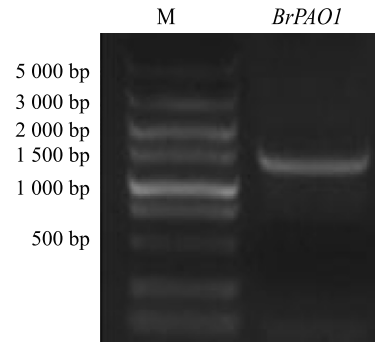


图 5 *BrPAO1* 基因全长扩增

Fig.5 Full length amplification of *BrPAO1* gene

| | | |
|--------|--|-----|
| BrPAO1 |MTTASV...IIGAGISGITA...ELAEKGVETV...LILEATERIGGRICQCSFG | 49 |
| OsPAO6 | | 0 |
| OsPAO7 | MEESMTKPTTMAIFLSIVLLSMAQLPSLVAGTGRPRV...IIGAGISGISA...SEAGITDILILEATDHIGGRMHKQREFA | 80 |
| ZmPAO | .MSSSPSFGLLAALAVLLALNLAQHSLAATVG.PRVIVVGAGMSGISAAKRLSEAGITDILILEATDHIGGRMHKTNFA | 78 |
| AtPAO1 |MSTASV...IIGAGISGISA...VIVENGVEV...LILEATDRIGGRIRHKQNEF | 49 |
| BrPAO1 | DVSVELGAGWIAVG...GKESNEFVWELAS.RLNLRITCFSDYTNARYNIYDQSGEIFPTG.....FAADSYKKAVDASAILKL | 122 |
| OsPAO6 |MDRADEVDRSGENLSATL | 18 |
| OsPAO7 | GVNVEIGANWVEGVNGEKMNEIWPVNVSTLKLRFSLDFSLAQNVYK.DGGLCDAAAYVQKRIDLAEADKSGENLSATL | 159 |
| ZmPAO | GINVELGANWVEGVNGKMNPIWPIVNSTLKLRFNSDFDYLAQNVYKEDGGVYDEDYVQKRIELATISVEEMGEKLSATL | 158 |
| AtPAO1 | DVPVELGAGWIAVG...GKESNEFVWELAS.RFNLRTCFSDYTNARENIYDRSGKIFPTG.....IASISYKKAVDASAILKL | 122 |
| BrPAO1 | KS....LEAECDCQEAE...ESSEKTFIELAIDFILHDFEMAE.....VEHISTYVDFCEREYLVADERGYESLLY | 188 |
| OsPAO6 | HPSGRDDMSILSMQRLNDHLENGESSFVDMADVITYFTYDVFADPPRVISLQNTVLELFTFTDFGDDTYFVADQGRGYEVSUVH | 98 |
| OsPAO7 | HPSGRDDMSILSMQRLNNHLENGESSFVDMVVDITYFTYDVFADPPRVISLQNTVLELFTFTDFGDDNYFVADQGRGYEAVVY | 239 |
| ZmPAO | HASGRDDMSILAMQRLNEHQENGEPFVDMVVDITYFTYDVFADPPRVISLQNTVLELFTFTDFGDDVYFVADQGRGYEAVVY | 238 |
| AtPAO1 | KS....LEAQCSCQVAEE...ESSEKTFIELAIDFILHDFEMAE.....VEHISTYVDFCEREYLVADERGYESLLY | 188 |
| BrPAO1 | KMAEGFLYTS..DGNIDLRKLNQVVRBVCQSRNGVWVKTEDCSEYDANYVIVSASIGVLQSNLISFQHFLEPRWKTDAI | 266 |
| OsPAO6 | HLAQYLNAD.KSGNIDARIKLNQVVRBVISYSGTVIVKTEDNSTYCADYVMVSASIGVLQSNLISFQHFLEPRWKTDAI | 177 |
| OsPAO7 | YIAGQYLEAD.KSGNIDARIKLNQVVRBISYSGTVIVKTEDNSTYCADYVMVSASIGVLQSNLISFQHFLEPRWKTDAI | 318 |
| ZmPAO | YIAGQYKTDKSGKIDPRLQLNQVVRBISKYSPGVTIVKTEDSVYADYVMVSASIGVLQSNLISFQHFLEPRWKTDAI | 318 |
| AtPAO1 | KMAEEFLVTS..FGNIDLRKLNQVVRBVCQSRNGVWVKTEDCSEYDANYVIVSASIGVLQSNLISFQHFLEPRWKTDAI | 266 |
| BrPAO1 | QKCDVMVYTKIFLFFRCQFWECGHCQEFFIYHEQCRGYFTFWCHMENAIFGSGNIVVTLTNEQSKRVESQSDDEPILKEAM | 346 |
| OsPAO6 | YQFDMVYTKIFLFFRCQFWECGHCQEFFIYASTRGGYGVWQEFKQYFDANVLVTVTIDBSRRHEQCQFDSQTKABEM | 257 |
| OsPAO7 | YQFDMVYTKIFLFFRCQFWECGHCQEFFIYASTRGGYGVWQEFKQYFDANVLVTVTIDBSRRHEQCQFDSQTKABEM | 398 |
| ZmPAO | YQFDMVYTKIFLFFRCQFWECGHCQEFFIYASSRGGYGVWQEFKQYFDANVLVTVTIDBSRRHEQCQFDSQTKABEM | 398 |
| AtPAO1 | QKCDVMVYTKIFLFFRCQFWECGHCQEFFIYHEQCRGYFTFWCHMENAIFGSGNIVVTLTNEQSKRVESQSDDEPILKEAM | 346 |
| BrPAO1 | SVLEDMFG.PTIEVATDILVPRWNNRFQRCGSYSNYEMISDNQLQRNVKAEVGRIFFTGEHTSEKFSGYVHGGLYAGMDT | 425 |
| OsPAO6 | EVVRQMEPDEDVDTATDILVPRWNSDRFRCGSYSNYEMISDNQLQRNVKAEVGRIFFTGEHTSEKFSGYVHGGLYAGIHM | 337 |
| OsPAO7 | EVVRQMEPDEDVDTATDILVPRWNSDRFRCGSYSNYEMISDNQLQRNVKAEVGRIFFTGEHTSEKFSGYVHGGLYAGIYA | 478 |
| ZmPAO | QVLRQMEPFGDVDTATDILVPRWNSDRFYKGFESNVEGVNRYEYDQLRAVGRVYFTGEHTSEHYNGYVHGGLYAGIDS | 478 |
| AtPAO1 | SVLEDMFG.ATIEVATDILVPRWNNRFQRCGSYSNYEMISDNQLQRNVKAEVGRIFFTGEHTSEKFSGYVHGGLYAGIDT | 425 |
| BrPAO1 | SKTLLSEMKQSLLLQPLLAFTESLTQTDQR.SNPFQMSYNNVLISGR | 470 |
| OsPAO6 | SDRPDI..... | 343 |
| OsPAO7 | | 478 |
| ZmPAO | AEILINCAQKMKCKYHVQGGYD..... | 500 |
| AtPAO1 | SKSLLSEMKQSLLLQPLLAFTESLTTHQKPNNSQIYTNVVFISGT | 471 |

方框表示酶催化位点,横线表示黄素结合位点。OsPAO6: LOC_ Os09g20260; OsPAO7: LOC_ Os09g20284; ZmPAO: NM_001111636; AtPAO1: At5g13700。

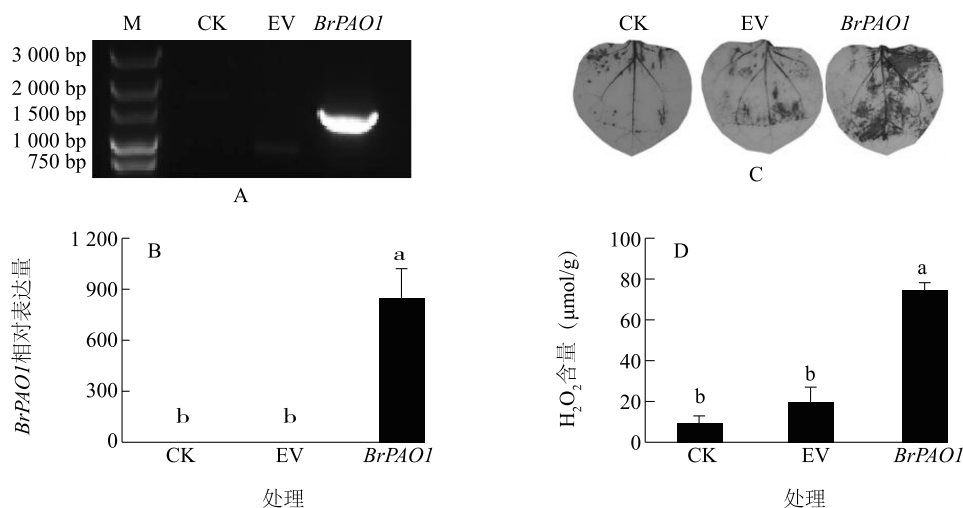
图 6 *BrPAO1* 氨基酸序列多重比对

Fig.6 Multiple alignment of amino acid sequence of *BrPAO1*

2.5 BrPAOI 瞬时表达验证其产生 H_2O_2 的功能

为了验证 BrPAOI 催化产生 H_2O_2 的能力,将 BrPAOI 的全长 cDNA 序列转入烟草叶片中进行瞬时表达,未构建 BrPAOI 空载体 (EV) 作为阴性对照。将含有 BrPAOI 载体的农杆菌侵染烟草叶片 72 h 后, BrPAOI 在 DNA 和 mRNA 水平检测结果显示: 载体成功携带 BrPAOI 转入烟草并且表达 (图 7A、

图 7B)。通过 DAB 原位染色叶片中的 H_2O_2 , 发现对照和注射空载体的烟草叶片有少量染色, 而表达 BrPAOI 的烟草叶片中染色较深 (图 7C)。进一步检测烟草叶片中的 H_2O_2 含量, 对照和注射空载体处理之间无显著差异, 而表达 BrPAOI 的烟草叶片中 H_2O_2 含量较对照显著上升 (图 7D)。本试验结果表明, BrPAOI 具备催化产生 H_2O_2 的能力。



CK 为正常生长的烟草叶片, EV 为注射有空载体的农杆菌菌液叶片, BrPAOI 为注射含有 BrPAOI 基因载体的农杆菌菌液叶片。

图 7 烟草叶片瞬时表达 BrPAOI 及 H_2O_2 含量分析

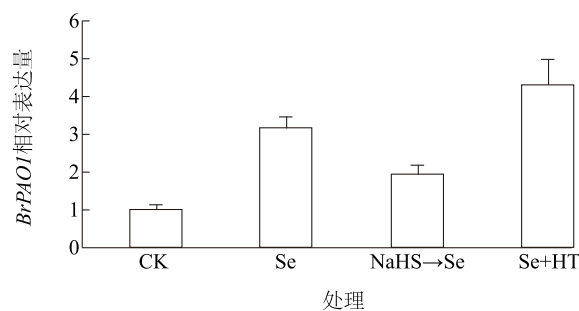
Fig.7 Transient expression of BrPAOI in tobacco leaves and analysis of H_2O_2 content

2.6 H_2S 对硒胁迫下不结球白菜根内 BrPAOI 表达的影响

基因表达分析结果显示, Se 处理后根内 BrPAOI 的表达水平相较于对照显著上调。与单独 Se 处理相比较, NaHS+Se 处理显著抑制了 BrPAOI 的表达, 而 Se+HT 处理则显著提高了 BrPAOI 的表达 (图 8)。这说明 H_2S 可能参与调控 Se 胁迫诱导的 BrPAOI 表达。

3 讨论

H_2O_2 过量累积是植物 Se 胁迫的重要表征, 然而 Se 胁迫诱导 H_2O_2 产生及其调控机制仍不明确。本研究通过一系列试验, 发现 H_2S 参与调控不结球白菜根中 $\text{BrPAOI}/\text{H}_2\text{O}_2$ 系统。首先, Se 诱导依赖于 PAO 活性的 H_2O_2 产生; 其次, 内源 H_2S 信号响应 Se 胁迫并参与调控 PAO 活性和 H_2O_2 产生; 再次, H_2S 信号参与调控 Se 胁迫诱导的 BrPAOI 基因表达; 最后, 烟草叶片瞬时表达 BrPAOI , 并通过 DAB



CK、Se、NaHS→Se、Se+HT 处理见图 3。

图 8 NaHS 和 HT 对硒胁迫下不结球白菜根内 BrPAOI 表达的影响

Fig.8 Effect of NaHS and HT on the expression of BrPAOI in the root of *B. rapa* under Se stress

染色和 H_2O_2 含量检测证实了 BrPAOI 产生 H_2O_2 的能力。

PAO 代谢多胺产生的 H_2O_2 是植物体内 ROS 产生的一个重要途径^[26]。本研究发现, Se 胁迫导致了不结球白菜根内 PAO 活性和 H_2O_2 含量的显著上

升,而加入 *PAO* 活性抑制剂则显著降低了 *PAO* 活性和 H_2O_2 含量。这说明 Se 胁迫下 H_2O_2 累积部分来自于 *PAO* 导致的 H_2O_2 过量产生。进一步克隆到不结球白菜体内 1 个 *BrPAOI* 基因,其表达受 Se 胁迫显著诱导,表明 Se 胁迫诱导了 *BrPAOI*/ H_2O_2 系统。 H_2O_2 和超氧阴离子 (O_2^-) 是 ROS 的 2 种典型代表,而位于质膜的 NADPH 氧化酶 (*RBOH*) 是 O_2^- 产生的重要来源^[27]。我们的前期研究发现,Se 胁迫能够通过上调不结球白菜根内 *RBOH* 的表达,刺激 O_2^- 过量产生^[1]。在烟草细胞中,质外体中的 *PAO* 可与 *RBOH* 相互循环调控,进而导致盐胁迫下 ROS 爆发^[28]。本研究预测到 *BrPAOI* 可能定位于质外体。因此,进一步确认 *BrPAOI* 的亚细胞定位,并研究 *BrPAOI*- H_2O_2 与 *RBOH*- O_2^- 之间可能存在的相互作用模式,将有助于深度解析 Se 胁迫下植物体内 ROS 过量产生的分子机理。

作为一种防御型信号分子, H_2S 能够积极响应 Se 胁迫。通过外源 H_2S 处理提高 Se 胁迫下根内 H_2S 含量,抑制 *BrPAOI*/ H_2O_2 系统。这表明,Se 胁迫下 H_2S 作为一种应激性信号分子通过调控 *BrPAOI* 的表达和 *PAO* 活性,进而参与调控 H_2O_2 产生。 H_2S 在调控植物逆境胁迫的过程中,可以与多种激素信号分子发生互作,如赤霉素、生长素、茉莉酸等^[29]。我们在 *BrPAOI* 的上游启动子区域发现有响应赤霉素和茉莉酸的特异性响应元件。由此可推测 H_2S 可能通过 *BrPAOI* 启动子的激素响应元件,进而调控 *BrPAOI* 的表达。另外, H_2S 在调控胁迫信号过程中,还可以通过 S-硫化作用 (S-Sulfhydration) 直接对蛋白质进行修饰^[30],在本研究中,Se 胁迫下 H_2S 是否通过这种作用直接对 *PAO* 活性进行调控还需要进一步研究。

总之,本研究初步发现了 Se 胁迫下植物体内 H_2O_2 过量产生的作用机理及其调控方式,即 H_2S 参与调控 *BrPAOI*/ H_2O_2 系统,为进一步深度解析植物 Se 毒害的信号调控网络提供了部分工作基础。

参考文献:

- [1] CHEN Y, MO H Z, ZHANG M Y, et al. Selenium inhibits root elongation by repressing the generation of endogenous hydrogen sulfide in *Brassica rapa* [J]. PLoS ONE, 2014, 9(10): e110904.
- [2] PANKIEWICZ U, SUJKA M, KOWALSKI R, et al. Effect of pulsed electric fields (PEF) on accumulation of selenium and zinc ions in *Saccharomyces cerevisiae* cells [J]. Food Chemistry, 2017, 221: 1361.
- [3] ZHU Y G, PILONSMITS E A H, ZHAO F J, et al. Selenium in higher plants: understanding mechanisms for biofortification and phytoremediation [J]. Trends in Plant Science, 2009, 14(8): 436-442.
- [4] 陈雪,沈方科,梁欢婷,等. 外源施硒措施对水稻产量品质及植株硒分布的影响[J]. 南方农业学报, 2017, 48(1): 46-50.
- [5] GEOFFROY L, GILBIN R, SIMON O, et al. Effect of selenate on growth and photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Aquatic Toxicology, 2007, 83(2): 149-158.
- [6] 陈健,陈义,杨立飞,等. 不结球白菜体内硒累积量与生理损伤指标的相关性[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(2): 424-429.
- [7] KOLBERT Z, LEHOTAI N, MOLNAR A, et al. 'The roots' of selenium toxicity: a new concept [J]. Plant Signaling & Behavior, 2016, 11(10): 16-20.
- [8] WINTERBOURN C C. The biological chemistry of hydrogen peroxide [J]. Methods in Enzymology, 2013, 528: 3-25.
- [9] BIENERT G P, CHAUMONT F. Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2014, 1840(5): 1596-1604.
- [10] LEHOTAI N, LYUBENOVA L, SCHÖDER P, et al. Nitro-oxidative stress contributes to selenite toxicity in pea (*Pisum sativum*, L.) [J]. Plant & Soil, 2016, 400(1/2): 1-16.
- [11] KUSANO T, BERBERICH T, TATEDA C, et al. Polyamines: essential factors for growth and survival [J]. Planta, 2008, 228(3): 367-381.
- [12] MOSCHOU P N, SANMARTIN M, ANDRIOPOULOU A H, et al. Bridging the gap between plant and mammalian polyamine catabolism: a novel peroxisomal polyamine oxidase responsible for a full back-conversion pathway in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2008, 147(4): 1845-1857.
- [13] WU J, SHANG Z, WU J, et al. Spermidine oxidase-derived H_2O_2 regulates pollen plasma membrane hyperpolarization-activated Ca^{2+} -permeable channels and pollen tube growth [J]. Plant Journal for Cell & Molecular Biology, 2010, 63(6): 1042.
- [14] YODA H, FUJIMURA K, TAKAHASHI H, et al. Polyamines as a common source of hydrogen peroxide in host- and nonhost hypersensitive response during pathogen infection [J]. Plant Molecular Biology, 2009, 70(1/2): 103-112.
- [15] MO H, WANG X, ZHANG Y, et al. Cotton polyamine oxidase is required for spermine and camalexin signalling in the defence response to *Verticillium dahliae* [J]. Plant Journal, 2015, 83(6): 962-975.
- [16] LI Z G, MIN X, ZHOU Z H. Hydrogen sulfide: a signal molecule in plant cross-adaptation [J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 1621.
- [17] ZHANG H, HU L Y, HU K D, et al. Hydrogen sulfide promotes wheat seed germination and alleviates oxidative damage against

- copper stress [J]. Acta Botanica Sinica, 2008, 50 (12): 1518-1529.
- [18] ZHANG H, HU L Y, LI P, et al. Hydrogen sulfide alleviated chromium toxicity in wheat [J]. Biologia Plantarum, 2010, 54 (4): 743-747.
- [19] CHEN J, WANG W H, WU F H, et al. Hydrogen sulfide alleviates aluminum toxicity in barley seedlings [J]. Plant & Soil, 2013, 362(1/2): 301-318.
- [20] QIAO Z, JING T, LIU Z, et al. H₂S acting as a downstream signaling molecule of SA regulates Cd tolerance in *Arabidopsis* [J]. Plant & Soil, 2015, 393(1/2): 1-10.
- [21] SHI H, YE Y, CHAN Z. Nitric oxide-activated hydrogen sulfide is essential for cadmium stress response in bermudagrass (*Cynodon dactylon* L. Pers.) [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2014, 74: 99-107.
- [22] CHEN B X, LI W Y, GAO Y T, et al. Involvement of polyamine oxidase-produced hydrogen peroxide during coleorhiza-limited germination of rice seeds [J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7 (401): 1219.
- [23] 汪天, 郭世荣, 刘俊, 等. 多胺氧化酶检测方法的改进及其在低氧水培黄瓜根系中的应用[J]. 植物生理学报, 2004, 40 (3): 358-360.
- [24] 陈义. 不结球白菜硒胁迫的生理响应及内源 NO 与 H₂S 介导其胁迫的分子机制[D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
- [25] FINCATO P, MOSCHOU P N, SPEDALETTI V, et al. Functional diversity inside the *Arabidopsis* polyamine oxidase gene family [J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62: 1155-1168.
- [26] WIMALASEKERA R, TEBARTZ F, SCHERER G F. Polyamines, polyamine oxidases and nitric oxide in development, abiotic and biotic stresses. [J]. Plant Science An International Journal of Experimental Plant Biology, 2011, 181(5): 593-603.
- [27] GILL S S, TUTEJA N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2010, 48: 909-930.
- [28] GEMES K, KIM Y J, PARK K Y, et al. An NADPH-oxidase/polyamine oxidase feedback loop controls oxidative burst under salinity [J]. Plant Physiology, 2016, 172: 1418-1431.
- [29] JIN Z, PEI Y. Physiological implications of hydrogen sulfide in plants: pleasant exploration behind its unpleasant odour [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2015, 12: 1-6.
- [30] JU Y, FU M, STOKES E, et al. H₂S-mediated protein S-Sulfhydration: a prediction for its formation and regulation [J]. Molecules, 2017, 22: 1334.

(责任编辑: 陈海霞)