植物学报 *Chinese Bulletin of Botany* 2020, **55** (2): 137–146, www.chinbullbotany.com
doi: 10.11983/CBB19109

·研究报告·

小麦*TaLCD*基因的克隆及其对渗透胁迫的调节作用

张扬, 刘华杰, 薛瑞丽, 李海霞, 李华*

河南农业大学生命科学学院, 郑州 450002

摘要 半胱氨酸脱巯基酶(CDes)可催化降解半胱氨酸(Cys)生成硫化氢(H_2S)。通过克隆小麦(*Triticum aestivum*)中的L-半胱氨酸脱巯基酶基因*TaLCD*, 并将其在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中过表达, 探讨*TaLCD*对渗透胁迫条件下种子萌发和根系生长的影响, 并分析其对干旱胁迫的调节作用。结果显示, 盐胁迫条件下, *TaLCD*过表达植株种子萌发率显著高于野生型; 甘露醇处理条件下, *TaLCD*过表达植株的根长也显著高于野生型, 且*TaLCD*过表达显著提高植株抗旱性。此外, *TaLCD*过表达植株对ABA更加敏感, ABA处理下*TaLCD*过表达植株的种子萌发率及根长均显著低于野生型。干旱胁迫下, *TaLCD*过表达植株胁迫响应基因(*COR47*、*RD29A*、*RAB18*和*RD22*)及ABA信号途径相关基因(*NCED3*、*HAB1*、*HAB2*、*ABI1*、*ABI2*和*ABF2*)的表达水平均显著高于野生型。因此推测, *TaLCD*增强植株抗旱和抗盐能力可能依赖于ABA信号途径。

关键词 *TaLCD*, 渗透胁迫, ABA, 萌发和生长

张扬, 刘华杰, 薛瑞丽, 李海霞, 李华 (2020). 小麦*TaLCD*基因的克隆及其对渗透胁迫的调节作用. 植物学报 **55**, 137–146.

人类认识和研究硫化氢(H_2S)已有300多年的历史。长期以来, 高浓度H_2S常因抑制线粒体细胞色素氧化酶C的活性被认为是毒性物质。但近年来的研究显示, H_2S同一氧化氮(NO)和一氧化碳(CO)一样可作为信号分子调节植物的生长发育。例如, 外源H_2S可促进气孔关闭(García-Mata and Lamattina, 2010; 侯智慧等, 2011); 提高大豆(*Glycine max*)、玉米(*Zea mays*)、小麦(*Triticum aestivum*)和豌豆(*Pisum sativum*)的发芽率与生长速率(Dooley et al., 2013); 调节根系发育(Jia et al., 2015); 介导植物衰老(Zhang et al., 2011)。此外, H_2S还能响应各种生物和非生物胁迫。例如, NaHS (H_2S供体)可缓解铜、铝和铬等重金属胁迫对小麦种子萌发和幼苗生长的抑制效应(Zhang et al., 2008, 2010a, 2010b); 缓解大麦(*Hordeum vulgare*)铝中毒现象(Chen et al., 2013); 增强烟草(*Nicotiana tabacum*)悬浮细胞在高温胁迫下的存活率及生长能力(Li et al., 2012); 提高苜蓿(*Medicago sativa*)种子萌发时的耐盐性(Wang et al., 2012); 增强狗牙根(*Cynodon dactylon*)对盐胁迫、渗透胁迫及低温的抗性(Shi et al., 2013); 缓解小麦干旱胁迫(Li et al., 2015)。

植物体内源H_2S主要由半胱氨酸脱巯基酶(cysteine desulphydrase, CDes)催化降解半胱氨酸(Cys)生成。CDes在植物中主要有2种类型: 以L-Cys为底物的L-半胱氨酸脱巯基酶(LCD)和以D-Cys为底物的D-半胱氨酸脱巯基酶(DCD)。LCD和DCD均能催化降解半胱氨酸产生H_2S, DCD主要定位在细胞质, LCD存在于叶绿体和线粒体中(Guo et al., 2016)。CDes对植物生长发育及非生物胁迫响应具有重要调节作用。例如, 在大肠杆菌(*Escherichia coli*)BL21中过表达拟南芥*D/LCDes*基因, 能增强BL21对Cd的耐受性, 减少H_2O_2和丙二醛(MDA)的产生(Shen et al., 2012)。拟南芥双突变体*lcd*/*dcd*比野生型对干旱更敏感(Jin et al., 2013; Shi et al., 2015), 而*AtD*/*LCDes*过表达植株具有较强的抗旱性(Shi et al., 2015)。*LCD*基因诱导表达可增强拟南芥对Cr^{6+}胁迫的抗性; 相反, *lcd*突变体对Cr^{6+}更敏感(Fang et al., 2017)。

众多研究显示, H_2S参与ABA信号转导途径。在蚕豆(*Vicia faba*)、拟南芥及洋凤仙(*Impatiens walleri-*

收稿日期: 2019-06-14; 接受日期: 2019-11-05
基金项目: 国家自然科学基金(No.31501238)和国家重点研发计划(No.2017YFD0300408)
* 通讯作者。E-mail: lihuahnnd@163.com

ana)中的研究表明，H_2S促进干旱胁迫下的气孔关闭过程可能通过调节ABC转运体参与依赖ABA的信号途径。在*aba3*和*abi1*突变体中，*AtLCD*基因表达水平降低，内源H_2S含量减少，而ABA受体基因在*atlcd*突变体中上调表达，在NaHS (H_2S供体)处理后下调表达(Jin et al., 2013)。拟南芥突变体*lcd*气孔开度显著大于野生型，对干旱胁迫更加敏感。而NaHS可促进*aba3*和*abi1*突变体的气孔关闭，ABA诱导的气孔关闭在*lcd*突变体中有所减弱(Jin et al., 2013)。H_2S对小麦干旱胁迫的缓解作用也部分依赖于ABA信号途径，干旱胁迫下，NaHS可调节ABA信号途径相关基因表达(Li et al., 2017)，诱导小麦叶片中ABA合成及活化相关基因表达，根中ABA合成及代谢相关基因上调表达(Ma et al., 2016)。

H_2S在植物中的生理功能已得到广泛研究，但主要是通过H_2S供体、H_2S清除剂或H_2S合成抑制剂等外源物质进行研究，而内源H_2S的遗传学研究较少。CDes是植物内源H_2S产生的主要来源，在拟南芥中已克隆到*D*-和*L*-*CDes*，并对其相关功能进行鉴定。而后，油菜(*Brassica napus*)中的*LCD*也被克隆(Xie et al., 2013)。但对小麦中H_2S产生基因*CDes*的研究尚无报道。本研究通过克隆小麦*LCD*基因，进而探讨其对干旱和盐胁迫的调节作用及对ABA信号的响应。

1 材料与方法

1.1 材料培养及处理

以小麦(*Triticum aestivum* L.)洛旱6号(LH-6)为实验材料。取小麦种子，用5% H_2O_2消毒3分钟，清水冲洗5次，蒸馏水浸泡4–6小时，然后将种子放在湿润的滤纸上催芽。2天后将其移至1/4Hoagland营养液中培养，培养温度为25°C/20°C (白天/黑夜)，14小时光照/10小时黑暗，相对湿度为70%。14天后将小麦转移至含20% PEG6000和200 mmol·L^{-1} NaCl的营养液中继续培养。分别于0、3、6、12和24小时取样分析，以正常培养作为对照。

拟南芥种子经表面消毒灭菌后，播种到含0、50、100、150、200 mmol·L^{-1} NaCl及0.5、1.0 μmol·L^{-1} ABA的1/2MS培养基上，4°C放置3天后，在22°C/20°C、16小时光照/8小时黑暗条件下生长，4天后统计发芽率，10天后测量根长。将拟南芥种子播种到1/2MS培养基上，正常生长4天后，将其转移到含150和200 mmol·L^{-1}甘露醇的1/2MS培养基上继续生长，10天后测定根长。

1.2 *TaLCD*克隆、载体构建及转化

从NCBI下载水稻(*Oryza sativa*) *LCD* (XM015757-751.2)的CDS序列，将此序列与NCBI中小麦EST序列进行同源比对，获得同源性较高的EST序列，然后将得到的ESTs在PRABI (http://doua.prabi.fr/software/cap3)拼接成更长的基因序列，并使用NCBI的ORF Finder工具对基因的CDS区和氨基酸序列进行预测，最终得到小麦*LCD*基因的ORF全长。根据获得的ORF序列设计引物LCD-F (5′-ATGGCGTCGATGGCGTC-3′)，LCD-R (5′-TCAAGCCAGAGCTTCTTGCTTC-3′)。以洛旱6号小麦cDNA为模板进行PCR扩增，得到目的基因片段。分别使用DNAMAN、MEGA 6.0 (Tamura et al., 2011)和SMART (Letunic et al., 2015)软件对目的片段进行同源比对，构建进化树并进行蛋白结构域分析。

根据测序获得的LCD序列，在5′和3′端引物分别加上*Nco*I和*Bgl*II限制性内切酶位点并再次进行PCR扩增。PCR扩增产物通过*Nco*I和*Bgl*II限制性内切酶位点连接到pCAMBIA1301载体上，以获得*TaLCD*过表达载体。通过农杆菌介导法将*TaLCD*转入拟南芥，获得转基因植株。本研究所用转基因植株均为T_3代纯合体。

1.3 种子萌发和根长测定

在培养基旁放置标尺并拍照，随后将图片导入Photoshop 7.0软件。对种子萌发率进行统计。使用标尺工具进行根长测定。每组处理至少设3次重复。

1.4 L-半胱氨酸脱巯基酶活性测定

L-半胱氨酸脱巯基酶活性测定参照Jin等(2013)的方法。取0.1 g样品，用液氮研磨后加入到含0.9 mL 20 mmol·L^{-1} Tris-HCl (pH8.0) EP管中，4°C、12 000 ×*g*离心10分钟，取上清用于检测。1 mL反应体系包括：1.0 mmol·L^{-1} L-半胱氨酸，2.5 mmol·L^{-1} DTT，100 mmol·L^{-1} Tris-HCl (pH 8.0)和200 μL上清液。37°C反应30分钟后加入100 μL 30 mmol·L^{-1} $FeCl_3$ (溶于1.2 mmol·L^{-1} HCl)和100 μL 20 mmol·L^{-1} N,N-二甲基-对

苯二胺(溶于7.2 mol·L^{-1} HCl)终止反应。在波长670 nm处测定吸光值, 通过Na_2S制作酶活标准曲线。

1.5 失水率测定及抗旱性鉴定

拟南芥在1/2MS培养基中培养7天后转移至蛭石:营养土(3:1, v/v)的土壤中继续培养14天。选取完全展开的莲座叶(每个重复至少15个叶片), 放在铺有滤纸的开盖培养皿上, 称取叶片鲜重, 然后将平皿和叶片放回之前的生长环境中, 每隔1小时进行称重, 连续记录8小时, 最后计算失水率。同时, 取干旱处理2小时的叶片用于胁迫响应基因及ABA信号途径相关基因表达分析。

拟南芥生长3周后停止浇水。干旱处理21天后拍照并观察记录其抗旱性。

1.6 qRT-PCR分析

用Trizol试剂提取总RNA, 使用PrimeScriptTMRT reagent Kit with gDNA Eraser (Takara)试剂盒合成cDNA。Real time-PCR分析参照Li等(2015, 2017)的方法。引物序列见表1。以*Actin2*作为内参基因。

1.7 数据分析

所有定量结果均为至少3次重复的平均值±标准误(SE)。使用SPSS软件进行数据统计分析和差异显著性检验(P<0.05)。

2 结果与讨论

2.1 *TaLCD*基因克隆

通过同源比对、克隆, 我们获得了*TaLCD*基因CDS序列全长1 416 bp, 编码471个氨基酸残基(图1A), 定位于小麦3B染色体上, 与粗山羊草(*Aegilops tauschii*)、二穗短柄草(*Brachypodium distachyon*)、谷子(*Setaria italica*)和短花药野生稻(*O. brachyantha*)中的*LCD*基因均具有较高的同源性, 其同源性分别为99.45%、88.32%、84.13%和81.63% (图1B)。蛋白结构域分析表明, *TaLCD*具有Aminotran_5结构域(图1C), 与拟南芥LCD蛋白结构域相似(Papenbrock et al., 2007)。

2.2 *TaLCD*在PEG及盐胁迫下的表达

小麦生长14天后, 将其转移至含20% PEG6000和200 mmol·L^{-1} NaCl营养液中培养0–24小时, 对叶片中*TaLCD*转录水平及酶活水平进行分析。结果显示, *TaLCD*基因的转录表达在盐胁迫条件下先上升后下降, 在PEG处理条件下呈下降趋势(图2A, B), 但TaLCD酶活水平在NaCl处理下呈上升趋势, 在PEG处理下则先上升后下降(图2C, D)。由此可知, NaCl和PEG可

表1 qRT-PCR分析所用引物
Table 1 Primers used for qRT-PCR analysis

Gene name	Primer sequences	
	Forward (5'–3')	Reverse (5'–3')
TaDCD	GAGGAAGGACGGAAGCCATAT	TCAGGGTCATCGCAAACAGAG
TaLCD	TCCATTACGCCTACGGAGCAG	CAAGCCGGACCTTACGACCA
ABF2	ATCAGAAGGGATAGGGAAGAGTAAT	TTGGTCTGCCGTGAATATCTGT
HAB1	GTGTTCTCGCCATGTCTAGGTC	CTATTTCGCAGACTTCTTGGTTG
HAB2	GCAGAAGTCCTTATTGCGAGTC	CTCAGAAGTTGCCACCTCCATA
ABI1	TGACGGCTGTGAAGAGAGTA	CCATCTCACACGCTTCTTCA
ABI2	ATTCAGACCATTCACTGACCCTC	GCTCCGTCGCCAGAACAAG
NCED3	TGGCTTCTTTCACGGCAAC	ACAACAATGGCGGGAGAGTTT
COR47	GAGGTTACGGATCGTGGAT	GAGCTGTTGGATCGGTGA
RAB18	ATGGCGTCTTACCAGAACCGTCCA	TACCCTTGGCCACCTGATCC
RD29A	GTTACTGATCCCACCAAAGAAGA	GGAGACTCATCAGTCACTTCCA
RD22	AGGGCTGTTTCCACTGAGG	CACCACAGATTTATCGTCAGACA
Actin2	TACCCGATGGGCAAGTCA	TGCTCATACGGTCAGCGATA

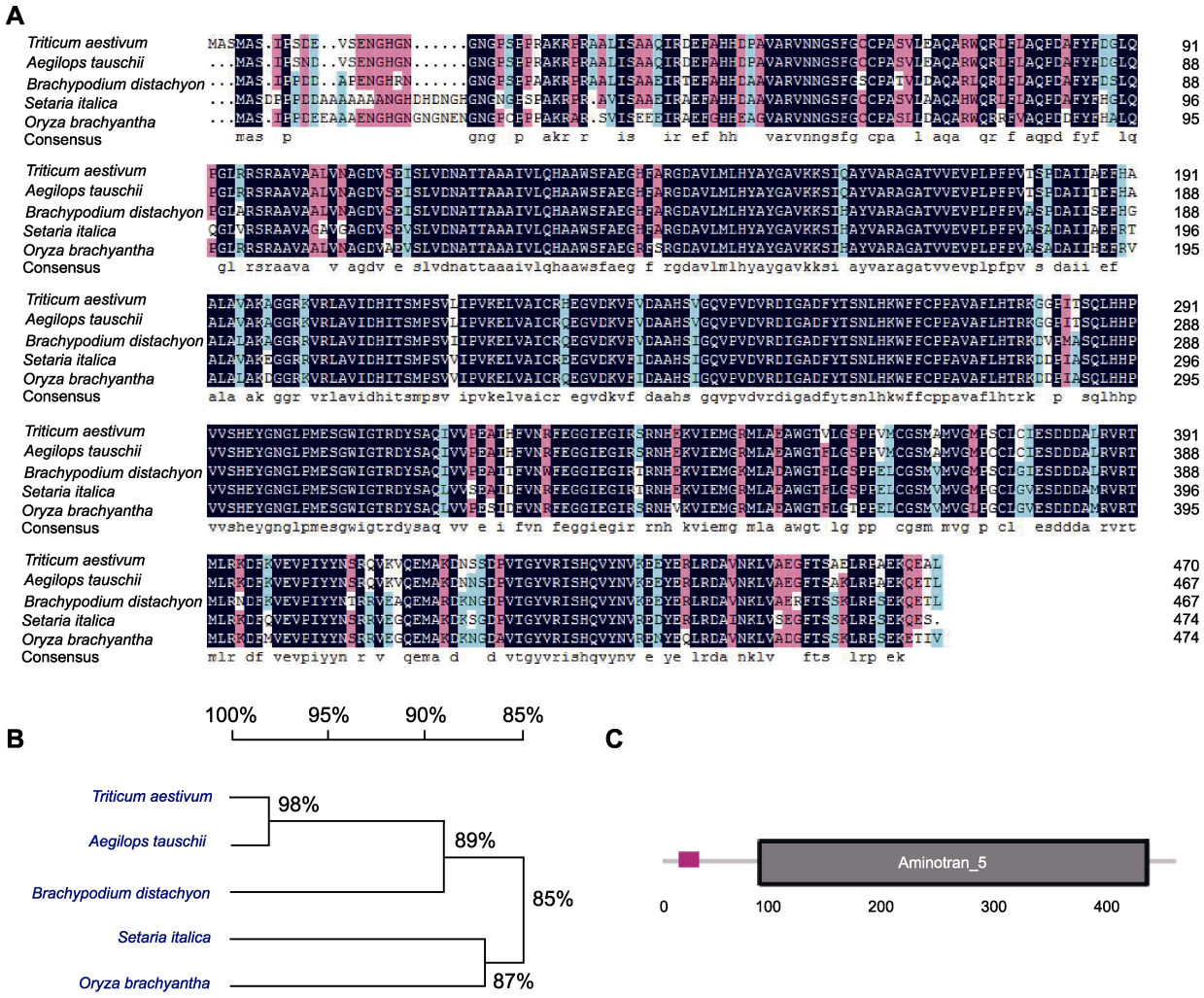

图1 TaLCD序列分析

(A) 小麦中LCD氨基酸序列与其它4个物种(粗山羊草、二穗短柄草、谷子和短花药野生稻)中LCD序列同源比对; **(B)** 5个物种间LCD进化树分析; **(C)** TaLCD的结构示意图，黑框表示Aminotran_5结构域。

Figure 1 Sequence analysis of TaLCD

(A) Comparison of the derived amino acid sequences of TaLCD in *Triticum aestivum* with other 4 species (*Aegilops tauschii*, *Brachypodium distachyon*, *Setaria italica*, and *Oryza brachyantha*); **(B)** Phylogenetic analysis of LCD in five species; **(C)** Schematic structures of TaLCD, black box indicates Aminotran_5 domain.

调节*TaLCD*的表达，但可能存在转录后调控机制。

2.3 *TaLCD*过表达植株的鉴定

为了对*TaLCD*基因进行功能鉴定，我们将*TaLCD*转入拟南芥，获得*TaLCD*过表达植株。从*TaLCD*过表达株系中随机选取4个株系进行鉴定，发现*TaLCD*过表达株系中*TaLCD*基因表达水平远高于野生型(野生型中未检测到*TaLCD*的表达) (图3A, B)。我们选取其中2个株系(3-4和12-4)对其酶活水平进行分析，发现*TaLCD*过表达株系中LCD酶活在正常条件下与野生型无显著差异；但在NaCl胁迫条件下，*TaLCD*过表达株系中LCD酶活显著高于野生型(图3C)。因此，上述实验结果表明*TaLCD*可能存在转录后调控。后续实验选取株系3-4和12-4作为研究材料，分别命名为*OX-LCD-1*和*OX-LCD-2*。

2.4 *TaLCD*促进盐胁迫下种子萌发

研究表明, NaCl可抑制种子萌发，在50、100、150和

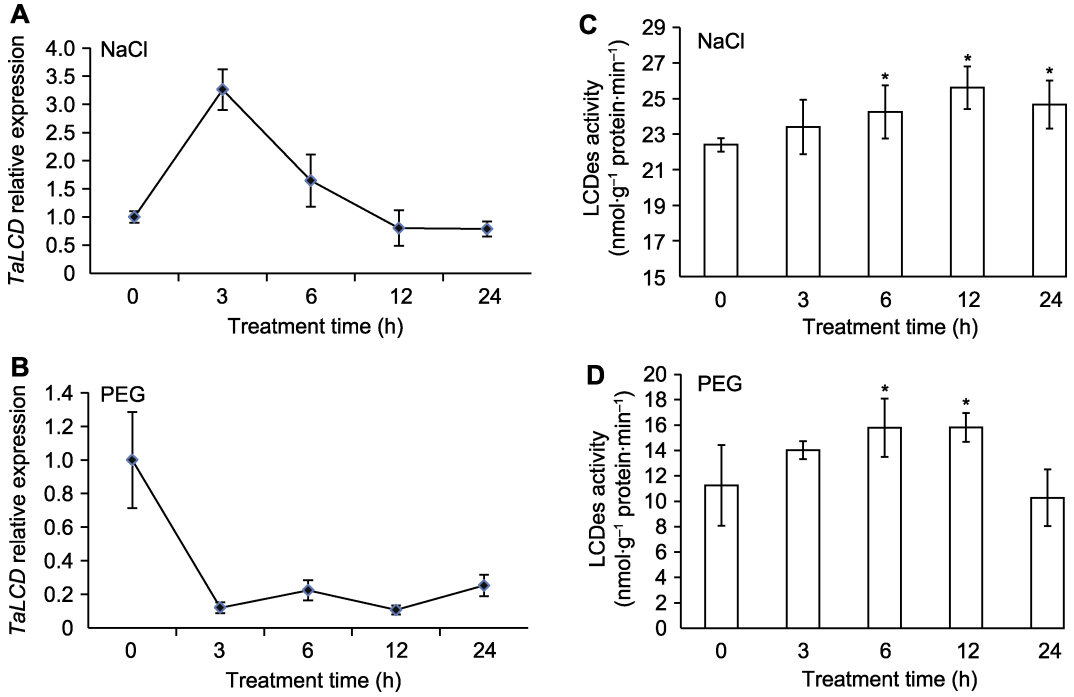

图2 NaCl和PEG处理下小麦*TaLCD*的表达及酶活变化

(A) NaCl处理下*TaLCD*的表达; **(B)** PEG处理下*TaLCD*的表达; **(C)** NaCl处理下TaLCD酶活变化; **(D)** PEG处理下TaLCD酶活变化。* 表示差异显著(P<0.05)。

Figure 2 The expression of *TaLCD* and enzyme activity of TaLCD in wheat under NaCl and PEG treatments

(A) The expression of *TaLCD* under NaCl treatment; **(B)** The expression of *TaLCD* under PEG treatment; **(C)** The enzyme activity of TaLCD under NaCl treatment; **(D)** The enzyme activity of TaLCD under PEG treatment. * indicate significant differences (P<0.05).

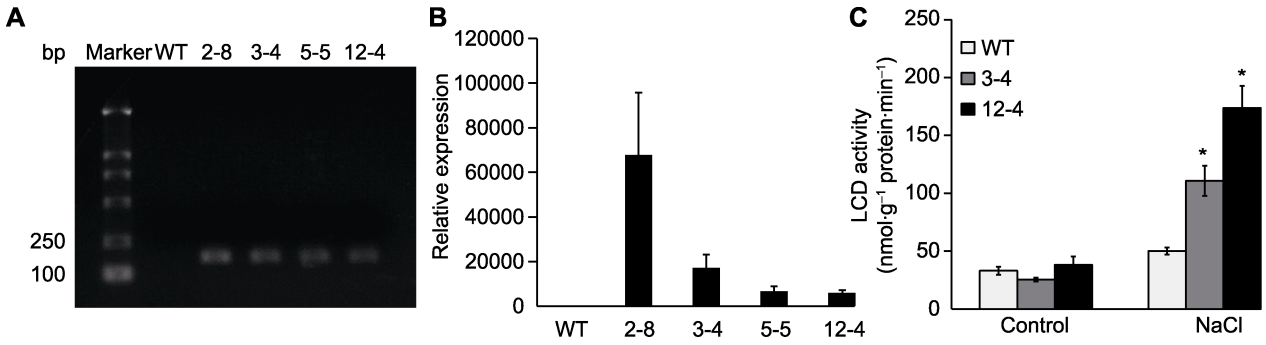

图3 *TaLCD*转基因拟南芥植株中*TaLCD*的表达及酶活

(A) RT-PCR; **(B)** qRT-PCR; **(C)** NaCl处理下TaLCD的酶活变化。Marker: DNA分子量标准; WT: 野生型; 2-8、3-4、5-5和12-4: *TaLCD*转基因株系; * 表示差异显著(P<0.05)。

Figure 3 Expression of *TaLCD* and enzyme activity of TaLCD in transgenic *Arabidopsis*

(A) RT-PCR; **(B)** qRT-PCR; **(C)** Enzyme activity of TaLCD under NaCl treatment. Marker: DNA marker; WT: Wild type; 2-8, 3-4, 5-5, and 12-4: *TaLCD* transgenic lines; * indicate significant differences (P<0.05).

200 mmol·L^{-1} NaCl处理下, 野生型种子的萌发率分别为对照组的94.7%、80.7%、70.6%和32.9%, 而*TaLCD*过表达株系的萌发率显著高于野生型。*OX-LCD-1*在50、100、150和200 mmol·L^{-1} NaCl处理下的萌发率分别为野生型的96.2%、91.4%、78.9%和47.3%, *OX-LCD-2*在50、100、150和200 mmol·L^{-1} NaCl处理下的萌发率分别为野生型的97.2%、92.8%、84.9%和51.8% (图4)。

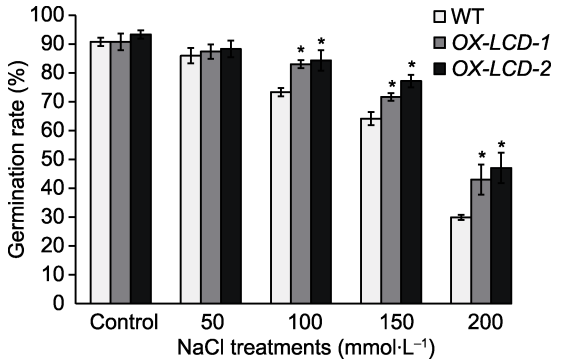

图4 NaCl处理对*TaLCD*转基因拟南芥种子萌发率的影响
WT: 野生型; *OX-LCD-1*和*OX-LCD-2*: 转基因株系; * 表示差异显著(P<0.05)。

Figure 4 Seed germination rate of *Arabidopsis* lines expressing *TaLCD* under different concentrations of NaCl treatment
WT: Wild type; *OX-LCD-1* and *OX-LCD-2*: Transgenic lines; * indicate significant differences (P<0.05).

2.5 *TaLCD*促进甘露醇胁迫下根系生长

甘露醇胁迫可抑制根系生长。在150和200 mmol·L^{-1}甘露醇处理下，野生型的根长分别为对照组的74.0%和58.6%，而*TaLCD*过表达株系*OX-LCD-1*和*OX-LCD-2*的根长分别为对照组的87.5%、78.7%和88.2%、76.9% (图5)，表明*TaLCD*过表达显著缓解了甘露醇对根系生长的抑制作用。

2.6 *TaLCD*过表达提高植株抗旱性

正常培养条件下，野生型与*TaLCD*过表达株系的生长表型相似，但干旱处理21天后*TaLCD*过表达株系与野生型相比呈现较强抗旱性(图6A)，且*TaLCD*过表达植株的叶片失水率也显著低于野生型(图6B)。由此可知，*TaLCD*过表达植株较强的抗旱性与其叶片较低的失水率有关。

2.7 *TaLCD*过表达植株对ABA更敏感

与野生型相比，*TaLCD*过表达植株的种子萌发对ABA更加敏感(图7)。ABA处理显著抑制了*TaLCD*过表达植株的种子萌发，0.5 μmol·L^{-1} ABA处理下，过表达株系*OX-LCD-1*和*OX-LCD-2*的种子萌发率均只有野生型的69.2%；1.0 μmol·L^{-1} ABA处理下，*OX-LCD-1*和*OX-LCD-2*的种子萌发率分别为野生型的57.1%和60.3% (图7A, B)。

*TaLCD*过表达植株根的生长也对ABA敏感。*OX-LCD-1*和*OX-LCD-2*的根长在0.5 μmol·L^{-1} ABA处理下分别是野生型的86.9%和62.0%，在1.0 μmol·L^{-1} ABA处理下分别是野生型的57.1%和60.3% (图7C, D)。

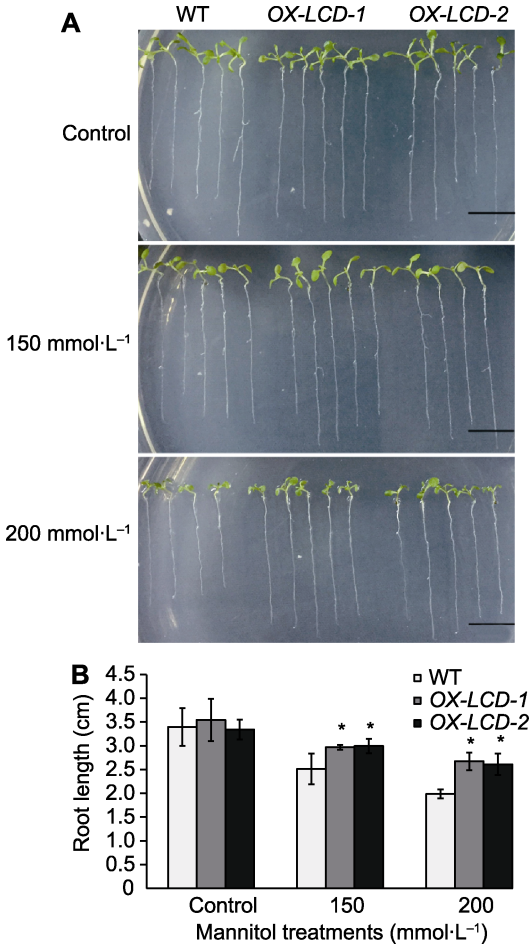

图5 不同浓度甘露醇处理下*TaLCD*转基因拟南芥的根长
(A) 表型变化(Bars=1 cm); **(B)** 根长变化数据统计。WT: 野生型; *OX- LCD-1*和*OX-LCD-2*: 转基因株系; * 表示差异显著(P<0.05)。

Figure 5 Root growth of *Arabidopsis* lines expressing *TaLCD* under different concentrations of mannitol treatment
(A) Phenotype of root growth (Bars=1 cm); **(B)** Root elongation measurements. WT: Wild type; *OX-LCD-1* and *OX-LCD-2*: Transgenic lines; * indicate significant differences (P<0.05).

2.8 *TaLCD*诱导胁迫响应基因及ABA信号途径相关基因的表达

ABA介导植物干旱胁迫响应，而*TaLCD*过表达可提高植株的耐旱性，且*TaLCD*过表达植株对ABA更加敏感。因此，我们检测了干旱胁迫响应基因及ABA信号途径相关基因在*TaLCD*过表达植株中的表达情况。结果表明，胁迫响应基因*COR47*、*RD29A*、*RAB18*和*RD22*被干旱诱导，且在*TaLCD*过表达植株中的表达显著高于野生型(图8A–D)。其次，干旱胁迫下ABA

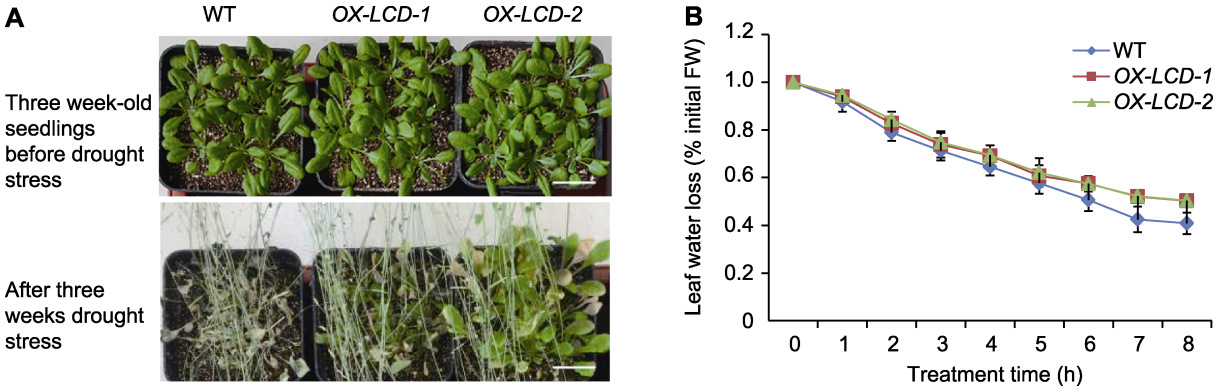

图6 *TaLCD*转基因拟南芥的抗旱性

(A) 生长3周的野生型(WT)、*OX-LCD-1*和*OX-LCD-2*植株在干旱处理后的表型(Bars=2 cm); **(B)** 叶片失水率

Figure 6 Drought resistance of *Arabidopsis* lines expressing *TaLCD*

(A) Phenotype of three week-old wild type (WT), *OX-LCD-1* and *OX-LCD-2* plants after drought treatment (Bars=2 cm); **(B)** Leaf water loss

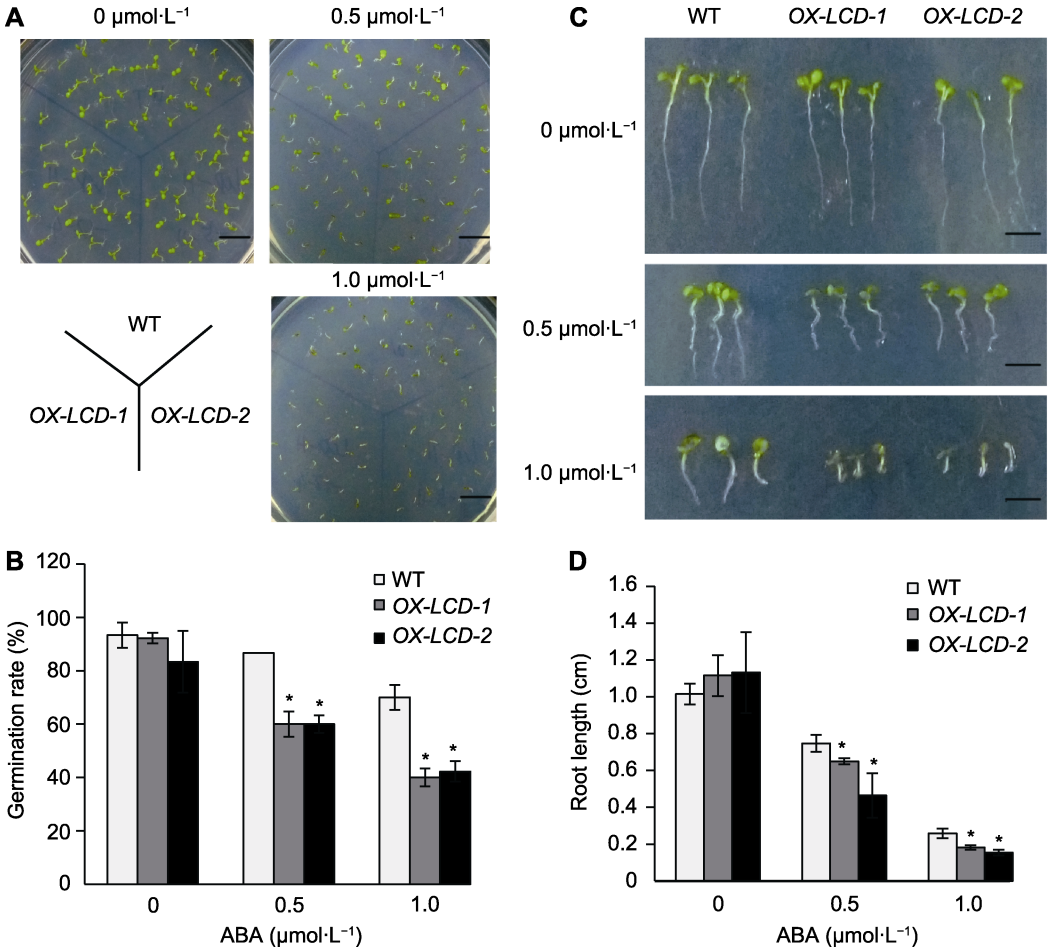

图7 不同浓度ABA处理下*TaLCD*转基因拟南芥的种子萌发率及生长状况

(A) 生长10天后的表型(Bars=1 cm); **(B)** 培养4天后的种子萌发率; **(C)** 生长10天后的根长表型(Bars=0.4 cm); **(D)** 生长10天后的根长。WT: 野生型; ABA: 脱落酸; * 表示差异显著(P<0.05)。

Figure 7 Seed germination and growth of *Arabidopsis* lines expressing *TaLCD* under different concentrations of ABA treatment **(A)** Phenotype on the 10th day (Bars=1 cm); **(B)** Seed germination rate after 4 d incubation; **(C)** Phenotype of root growth on the 10th day (Bars=0.4 cm); **(D)** Root length on the 10th day. WT: Wild type; ABA: Abscisic acid; * indicate significant differences (P<0.05).

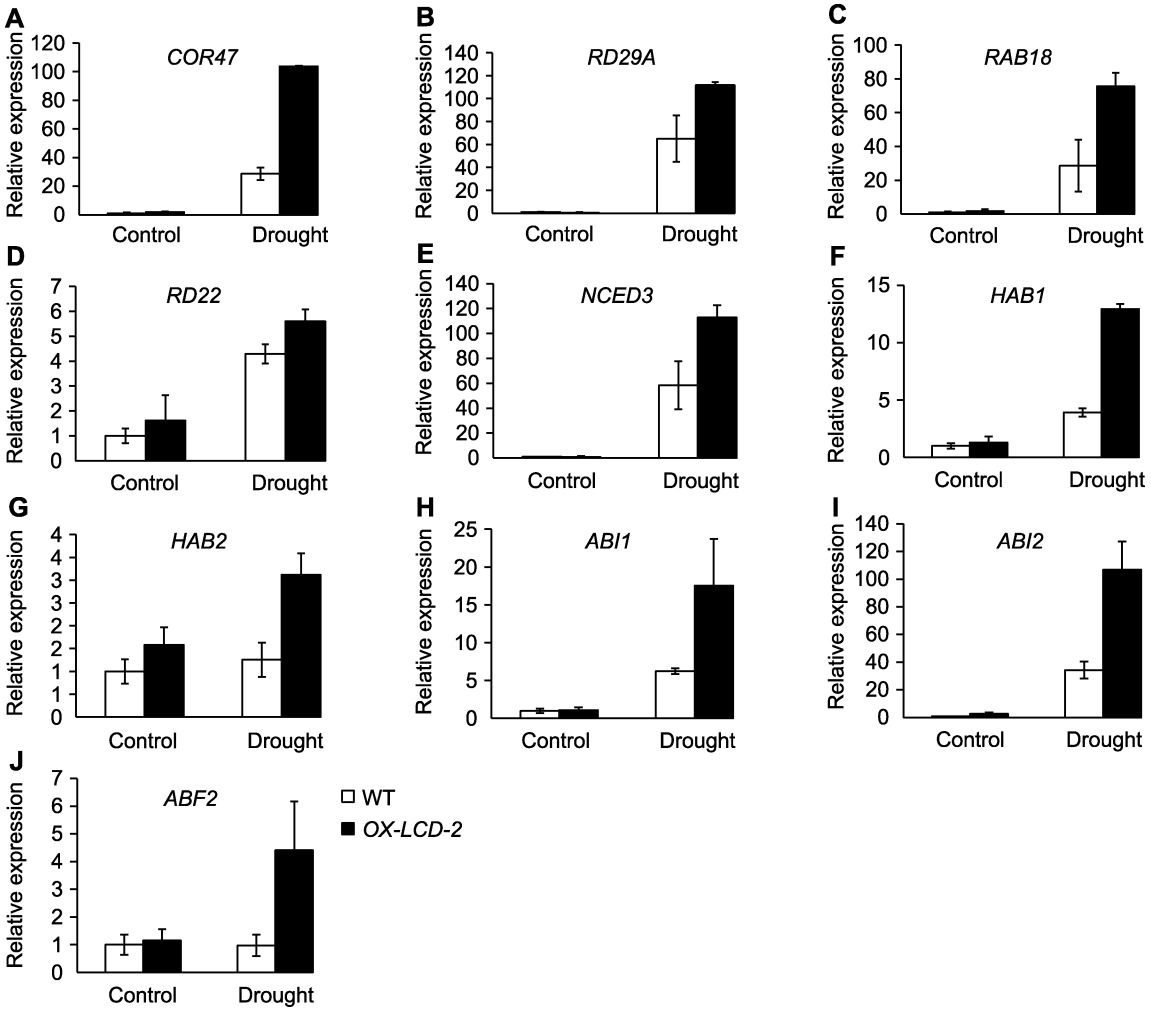

图8 干旱胁迫对*TaLCD*转基因拟南芥中胁迫响应基因及ABA信号途径相关基因表达的影响

(A)–(D) 胁迫响应基因; **(E)–(J)** ABA信号途径相关基因。WT: 野生型; *OX-LCD-2*: 转基因株系

Figure 8 The expression of stress response genes and ABA signaling related genes in *Arabidopsis* lines expressing *TaLCD* under drought stress

(A)–(D) Stress response genes; **(E)–(J)** ABA signaling related genes. WT: Wild type; *OX-LCD-2*: Transgenic lines

合成(*NCED3*)、转导(*HAB1*、*HAB2*、*ABI1*和*ABI2*)及响应(*ABF2*)相关基因在*TaLCD*过表达植株中的表达也显著高于野生型(图8E–J)。

2.9 讨论

H_2S作为气体信号分子, 在植物响应非生物胁迫中发挥重要调控作用。研究显示, NaHS (H_2S供体)可促进盐胁迫下苜蓿种子的萌发(Wang et al., 2012), 促进水分胁迫下玉米种子的萌发和生长(单长卷和周岩, 2011), 缓解干旱对小麦的氧化伤害(Li et al., 2015), 提高草莓(*Fragaria ananassa*)和狗牙根对渗透胁迫的耐受性(Christou et al., 2013; Shi et al., 2013)。此外, 拟南芥中内源H_2S合成基因(*AtLCD*和*AtDCD*)的表达受干旱胁迫诱导, 其表达模式与干旱相关的转录因子(如DREB2A、DREB2B、CBF4和RD29A)非常相似(Jin et al., 2011), 且*AtLCD*和*AtDCD*过表达植株对干旱和盐胁迫的抗性均显著高于野生型(Shi et al., 2015)。由此表明, H_2S可显著调节植物的渗透胁迫。

Li等(2015)和Ma等(2016)的研究显示, 外源H_2S可显著缓解小麦干旱胁迫。小麦中内源H_2S产生基因是否具有相似的功能值得探讨。因此, 我们克隆了小麦*TaLCD*基因并转化拟南芥, 获得*TaLCD*过表达植株。在干旱和盐胁迫下, *TaLCD*的转录水平和酶活水平均发生变化, 但变化趋势不一致(图2)。对*TaLCD*过表达植株的鉴定分析表明, 正常培养条件下*TaLCD*过表达植株中LCD酶活与野生型相当, 而在盐胁迫下

*TaLCD*过表达植株中LCD酶活显著高于野生型(图3)。由此推测, *TaLCD*可能介导渗透胁迫响应, 但存在转录后水平的调控。对*TaLCD*过表达植株的研究证实了*TaLCD*对渗透胁迫的调节功能, *TaLCD*过表达可促进盐和干旱胁迫下的种子萌发(图4)及根系生长(图5), 增强植株的抗旱性(图6)。

ABA可调节种子萌发和根系生长, 并响应多种逆境胁迫。大量研究显示, H_2S介导ABA信号途径。H_2S的合成抑制剂可显著抑制ABA诱导的蚕豆气孔关闭(刘菁等, 2011)。NaHS处理可以减小*aba3*和*abi1*突变体的气孔开度, 而ABA对*lcd*突变体气孔关闭的作用减弱(Jin et al., 2013)。NaHS预处理可调节小麦ABA信号途径中相关基因的表达(Li et al., 2017)。ABA受体相关基因在小麦叶片和根中均受H_2S诱导上调表达(Ma et al., 2016)。本研究显示, *TaLCD*过表达增强了对ABA的敏感性, ABA处理下, *TaLCD*过表达植株的种子萌发率及根长均显著低于野生型(图7)。由此表明, *TaLCD*参与调控ABA信号途径。ABA被公认为一种胁迫激素, 在植物干旱及盐胁迫中发挥重要作用。而*TaLCD*过表达可显著提高植株的抗旱及抗盐性, 且*TaLCD*过表达对ABA更敏感。干旱胁迫下, 胁迫响应基因及ABA信号途径相关基因在*TaLCD*过表达植株中都显著高于野生型(图8)。由此推测, *TaLCD*可能通过介导ABA信号途径调节植株的抗旱和抗盐性, 但具体机制有待深入研究。

参考文献

侯智慧, 刘菁, 侯丽霞, 李希东, 刘新 (2011). H_2S可能作为H_2O_2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.

刘菁, 侯智慧, 赵方贵, 刘新 (2011). H_2S介导ABA诱导蚕豆气孔运动的生理机制研究. 西北植物学报 **31**, 298–304.

单长卷, 周岩 (2011). 外源硫化氢对水分胁迫下玉米种子萌发和生长的影响. 广东农业科学 **38**(20), 28–30.

Chen J, Wang WH, Wu FH, You CY, Liu TW, Dong XJ, He JX, Zheng HL (2013). Hydrogen sulfide alleviates aluminum toxicity in barley seedlings. *Plant Soil* **362**, 301–318.

Christou A, Manganaris GA, Papadopoulos I, Fotopoulos V (2013). Hydrogen sulfide induces systemic tolerance to salinity and non-ionic osmotic stress in strawberry plants through modification of reactive species biosynthesis and transcriptional regulation of multiple defence pathways. *J Exp Bot* **64**, 1953–1966.

Dooley FD, Nair SP, Ward PD (2013). Increased growth and germination success in plants following hydrogen sulfide administration. *PLoS One* **8**, e62048.

Fang HH, Liu ZQ, Long YP, Liang YL, Jin ZP, Zhang LP, Liu DM, Li H, Zhai JX, Pei YX (2017). The Ca^{2+}/CaM2-binding transcription factor TGA3 elevates LCD expression and H_2S production to bolster Cr^{6+} tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J* **91**, 1038–1050.

García-Mata C, Lamattina L (2010). Hydrogen sulphide, a novel gasotransmitter involved in guard cell signaling. *New Phytol* **188**, 977–984.

Guo HM, Xiao TY, Zhou H, Xie YJ, Shen WB (2016). Hydrogen sulfide: a versatile regulator of environmental stress in plants. *Acta Physiol Plant* **38**, 16.

Jia HL, Hu YF, Fan TT, Li JS (2015). Hydrogen sulfide modulates actin-dependent auxin transport via regulating ABPs results in changing of root development in *Arabidopsis*. *Sci Rep* **5**, 8251.

Jin ZP, Shen JJ, Qiao ZJ, Yang GD, Wang R, Pei YX (2011). Hydrogen sulfide improves drought resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Biophys Res Commun* **414**, 481–486.

Jin ZP, Xue SW, Luo YA, Tian BH, Fang HH, Li H, Pei YX (2013). Hydrogen sulfide interacting with abscisic acid in stomatal regulation responses to drought stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem* **62**, 41–46.

Letunic I, Doerks T, Bork P (2015). SMART: recent updates, new developments and status in 2015. *Nucleic Acids Res* **43**, D257–D260.

Li CJ, Liu ZJ, Zhang QR, Wang RZ, Xiao LT, Ma H, Chong K, Xu YY (2012). *SKP1* is involved in abscisic acid signaling to regulate seed germination, stomatal opening and root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* **35**, 952–965.

Li H, Gao MQ, Xue RL, Wang D, Zhao HJ (2015). Effect of hydrogen sulfide on D1 protein in wheat under drought stress. *Acta Physiol Plant* **37**, 225.

Li H, Li M, Wei XL, Zhang X, Xue RL, Zhao YD, Zhao HJ (2017). Transcriptome analysis of drought-responsive genes regulated by hydrogen sulfide in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Mol Genet Genomics* **292**, 1091–1110.

Ma DY, Ding HN, Wang CY, Qin HX, Han QX, Hou JF, Lu HF, Xie YX, Guo TC (2016). Alleviation of drought stress by hydrogen sulfide is partially related to the abscisic acid signaling pathway in wheat. *PLoS One* **11**, e0163082.

Papenbrock J, Riemenschneider A, Kamp A, Schulz-Vogt HN, Schmidt A (2007). Characterization of cysteine-degrading and H_2S-releasing enzymes of higher plants—from the field to the test tube and back. *Plant Biol* **9**, 582–588.

Shen JJ, Qiao ZJ, Xing TJ, Zhang LP, Liang YL, Jin ZP, Yang GD, Pei YX (2012). Cadmium toxicity is alleviated by AtLCD and AtDCD in *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol* **113**, 1130–1138.

Shi HT, Ye TT, Chan ZL (2013). Exogenous application of hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide enhanced multiple abiotic stress tolerance in bermudagrass (*Cynodon dactylon* (L). Pers.). *Plant Physiol Biochem* **71**, 226–234.

Shi HT, Ye TT, Han N, Bian HW, Liu XD, Chan ZL (2015). Hydrogen sulfide regulates abiotic stress tolerance and biotic stress resistance in *Arabidopsis*. *J Integr Plant Biol* **57**, 628–640.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**, 2731–2739.

Wang YQ, Li L, Cui WT, Xu S, Shen WB, Wang R (2012). Hydrogen sulfide enhances alfalfa (*Medicago sativa*) tolerance against salinity during seed germination by nitric oxide pathway. *Plant Soil* **351**, 107–119.

Xie YJ, Lai DW, Mao Y, Zhang W, Shen WB, Guan RZ (2013). Molecular cloning, characterization, and expression analysis of a novel gene encoding L-cysteine desulfhydrase from *Brassica napus*. *Mol Biotechnol* **54**, 737–746.

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, Hu LY, Li P, Hu KD, Jiang CX, Luo JP (2010a). Hydrogen sulfide alleviated chromium toxicity in wheat. *Biol Plantarum* **54**, 743–747.

Zhang H, Hu SL, Zhang ZJ, Hu LY, Jiang CX, Wei ZJ, Liu J, Wang HL, Jiang ST (2011). Hydrogen sulfide acts as a regulator of flower senescence in plants. *Postharvest Biol Technol* **60**, 251–257.

Zhang H, Jiao H, Jiang CX, Wang SH, Wei ZJ, Luo JP, Jones RL (2010b). Hydrogen sulfide protects soybean seedlings against drought-induced oxidative stress. *Acta Physiol Plant* **32**, 849–857.

Cloning of Wheat *TaLCD* Gene and Its Regulation on Osmotic Stress

Yang Zhang, Huajie Liu, Ruili Xue, Haixia Li, Hua Li*

College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

Abstract Cysteine desulphydrase (CDes) can degrade cysteine (Cys) to form hydrogen sulfide (H_2S). In this study, L-cysteine desulphydrase *TaLCD* from wheat (*Triticum aestivum*) was cloned and overexpressed in *Arabidopsis thaliana*. The effects of *TaLCD* on seed germination and root growth under osmotic stress in *TaLCD* overexpressing plants were examined, and the response to drought stress was also investigated. The results showed that, the seed germination rate of *TaLCD* overexpressing plants under salt treatment was remarkably higher than the wild type (WT), and the root length of *TaLCD* overexpressing plants was obviously longer when exposed to mannitol. Moreover, overexpression of *TaLCD* distinctly increased plant drought resistance. In addition, *TaLCD* overexpressing plants were more sensitive to ABA, with decreased seed germination rate and root length under ABA treatment. Furthermore, the expression of stress-responsive genes (*COR47*, *RD29A*, *RAB18* and *RD22*) and ABA signaling pathway-related genes (*NCED3*, *HAB1*, *HAB2*, *ABI1*, *ABI2* and *ABF2*) was significantly higher in *TaLCD* overexpressing plants than that in WT under drought stress. These results suggest that *TaLCD* enhances the drought and salt tolerance of plants possibly by ABA signaling pathway.

Key words *TaLCD*, osmotic stress, ABA, germination and growth

Zhang Y, Liu HJ, Xue RL, Li HX, Li H (2020). Cloning of wheat *TaLCD* gene and its regulation on osmotic stress. *Chin Bull Bot* **55**, 137–146.

* Author for correspondence. E-mail: lihuahnnd@163.com

(责任编辑：白羽红)