

H₂S在CdCl₂诱导拟南芥气孔关闭中的作用及其与NO的关系

马引利, 李先菊, 赵振宇, 梁爽爽, 黄丽萍

山西师范大学生命科学学院, 山西 太原

收稿日期: 2024年4月11日; 录用日期: 2024年7月3日; 发布日期: 2024年7月11日

摘要

以拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)野生型和突变体为材料, 探讨硫化氢(H₂S)和一氧化氮(nitric oxide, NO)在氯化镉(CdCl₂)诱导气孔运动中的作用及其相互关系。结果显示, CdCl₂显著诱导拟南芥野生型气孔关闭、叶片H₂S合成和L-/D-半胱氨酸脱羧酶(L-/D-CDes)活性升高, H₂S合成抑制剂显著抑制了以上效应; NO清除剂和合成抑制剂均能显著抑制CdCl₂诱导的野生型保卫细胞NO合成和气孔关闭。另外, CdCl₂处理不能诱导*Atl-cdes*、*Atd-cdes*、*Atnoa1*、*nia1-2*、*nia2-1*和*nia1-2/nia2-5*突变体气孔显著关闭。此外, NO清除剂和合成抑制剂显著抑制了CdCl₂诱导的野生型H₂S含量和L-/D-CDes活性的增加, 而H₂S合成抑制剂不能抑制野生型保卫细胞NO生成; CdCl₂不能升高*Atnoa1*、*nia1-2*、*nia2-1*和*nia1-2/nia2-5*突变体叶片H₂S水平和L-/D-CDes活性, 而CdCl₂能增强*Atl-cdes*和*Atd-cdes*突变体保卫细胞NO荧光水平。由此表明, NO介导的H₂S生成参与CdCl₂诱导的拟南芥气孔关闭, 且在此过程中, L-和D-CDes负责H₂S的合成, NO由NOS和NR途径产生。

关键词

氯化镉, 硫化氢, 一氧化氮, 信号转导, 气孔关闭

The Role of Hydrogen Sulfide and Its Relationship with Nitric Oxide in Cadmium Chloride-Induced Stomatal Closure in *Arabidopsis thaliana*

Yinli Ma, Xianju Li, Zhenyu Zhao, Shuangshuang Liang, Liping Huang

School of Life Science, Shanxi Normal University, Taiyuan Shanxi

Received: Apr. 11th, 2024; accepted: Jul. 3rd, 2024; published: Jul. 11th, 2024

文章引用: 马引利, 李先菊, 赵振宇, 梁爽爽, 黄丽萍. H₂S在CdCl₂诱导拟南芥气孔关闭中的作用及其与NO的关系[J]. 植物学研究, 2024, 13(4): 371-383. DOI: 10.12677/br.2024.134040

Abstract

The roles and interrelationship of hydrogen sulfide (H_2S) and nitric oxide (NO) in cadmium chloride ($CdCl_2$)-induced stomatal movement were investigated using the *Arabidopsis thaliana* wide-type and related mutants. The results showed that $CdCl_2$ induced stomatal closure, H_2S synthesis and L-/D-cysteine desulhydrase (L-/D-CDes) activity increase of leaves in wild-type. H_2S synthesis inhibitors could significantly prohibited these effects. NO scavenger and synthesis inhibitors all significantly inhibited $CdCl_2$ -caused NO production of guard cells and stomatal closure. Additionally, $CdCl_2$ couldn't close stomata of *Atl-cdes*, *Atd-cdes*, *Atnoa1*, *nia1-2*, *nia2-1* and *nia1-2/nia2-5* mutants. Furthermore, NO scavenger and synthesis inhibitors could prevent $CdCl_2$ -caused increase of H_2S content and L-/D-CDes activity in wild-type, but H_2S synthesis inhibitors couldn't inhibit $CdCl_2$ -induced NO production of guard cells. $CdCl_2$ couldn't increase H_2S content and L-/D-CDes activity in *Atnoa1*, *nia1-2*, *nia2-1* and *nia1-2/nia2-5* mutants, but $CdCl_2$ intensified NO fluorescence levels in *Atl-cdes* and *Atd-cdes* mutants' guard cells. From these results we concluded that NO-mediated H_2S synthesis participated in $CdCl_2$ -induced stomatal closure in *A. thaliana*, L- and D-CDes are responsible for H_2S synthesis and NO was sourced from NOS and NR pathways in the physiological process.

Keywords

Cadmium Chloride, Hydrogen Sulfide, Nitric Oxide, Signal Transduction, Stomatal Closure

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

硫化氢(hydrogen sulfide, H_2S)是一种无色、有臭鸡蛋味的有毒气体。研究表明, H_2S 参与调节植物的许多生理过程[1]-[3]。 H_2S 还可以缓解各种非生物胁迫如盐胁迫[4]、干旱[5]和重金属[6]对植物的伤害。另外, H_2S 被证明参与乙烯、黑暗和 $CdCl_2$ 等诱导的气孔关闭[7]-[9]。

一氧化氮(nitricoxide, NO)是一种高度活跃的水合脂溶性气体信号分子。研究发现, NO 参与调节哺乳动物的很多生理过程[10] [11]。NO 在植物的很多生理过程中也发挥重要作用, 如种子萌发[12]、植物的衰老[13]和气孔运动[14] [15]等。另外, NO 还参与植物对干旱、盐胁迫和热害等非生物胁迫的响应[16]-[18]。大量研究表明, NO 介导 ABA、UV-B 和油菜素内酯等诱导的气孔运动[14] [19] [20]。

目前已有研究表明, H_2S 参与 $CdCl_2$ 诱导的拟南芥气孔关闭过程[9] [21]。然而, NO 是否参与 $CdCl_2$ 诱导的拟南芥气孔关闭还不清楚; 另外, 在此生理过程中 H_2S 与 NO 之间的相互作用也未见报道。为此, 本文研究 H_2S 和 NO 在 $CdCl_2$ 诱导拟南芥气孔运动信号转导过程中的相互关系, 为进一步阐明 $CdCl_2$ 调控植物气孔运动的信号转导机制积累资料。

2. 材料与方法

2.1. 材料与试剂

供试材料为拟南芥野生型(Col-0)、类 NO 合酶(NOS)基因突变体 *Atnoa1*、硝酸还原酶(NR)基因突变

体 *nia1-2*、*nia2-1* 和 *nia1-2/nia2-5*、L-/D-半胱氨酸脱巯基酶缺失突变体 *Atd-cdes* 和 *Atl-cdes* 为材料。*Atmoa1*、*nia1-2*、*nia2-1* 和 *nia1-2/nia2-5* 突变体由贺军民教授(陕西师范大学)惠赠, 拟南芥野生型(Col-0)、*Atd-cdes* 和 *Atl-cdes* 突变体均购自诺丁汉拟南芥储存中心(Nottingham Arabidopsis Stock Centre, NASC, UK)。材料培养参照黄丽萍(2023)所述方法。选取生长 4-5 周完全展开的野生型及各突变体莲座叶作为实验材料。以下处理条件均为: 光照强度为($100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), 温度为 $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, 处理时间为 3 h。

NO 特异性荧光探针(4,5-diaminofluorescein diacetate, DAF-2DA)、NO 清除剂 2-4,4,5,5-苯-四甲基咪唑-1-氧-3-氧化物[2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxidepotassium salt, cPTIO]、NOS 抑制剂 N_{ω} -硝基-L-精氨酸-甲酯(N_{ω} -nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME)、NR 抑制剂钨酸钠(sodium tungstate dehydrate, Na_2WO_4)、 H_2S 氨基乙酸(aminoxyacetic acid, AOA)和羟胺(hydroxylamine, NH_2OH)、二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、L-半胱氨酸(L-cysteine, L-Cys)、D-半胱氨酸(D-cysteine, D-Cys)、二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)和 2-(N-吗啡啉)乙烷磺酸[2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid, MES]均购自 Sigma-Aldrich 公司(St Louis, MO, USA); 其他试剂均为国产分析纯。

2.2. 气孔开度的测定

气孔开度测定参考 McAinsh 等人[22]描述的方法并稍作修改。撕取叶片下表皮, 用刷子刷掉叶肉细胞, 置于 MES/KCl 缓冲液($10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MES, $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl, $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 , pH 6.15)中光照 3 h 使气孔开放, 然后表皮条用于以下实验。为了研究 CdCl_2 对野生型气孔开度的影响, 表皮条分别用含有 0、100、200、300 和 $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdCl_2 的 MES/KCl 缓冲液处理 1 h、2 h 和 3 h, 然后用装有目镜测微尺的光学显微镜测定气孔开度; 为了研究 CdCl_2 对气孔的效应是否可以恢复, 先将表皮条分别用含有 0、100、200、300 和 $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdCl_2 的 MES/KCl 缓冲液处理 3 h, 然后将表皮条放到 MES/KCl 缓冲液中再恢复处理 3 h, 然后测定气孔开度; 为了研究 H_2S 合成抑制剂及 NO 清除剂和合成抑制剂对 CdCl_2 诱导野生型气孔关闭的影响, 表皮条分别用 MES/KCl 缓冲液单独或含有 $300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdCl_2 、 $0.4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ AOA、 $0.4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NH_2OH 、 $0.4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{C}_3\text{H}_3\text{KO}_3 + 0.4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NH_3 、 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ c-PTIO、 $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ L-NAME、 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2WO_4 及 $300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdCl_2 分别与 H_2S 合成抑制剂及 NO 清除剂和合成抑制剂混合液的 MES/KCl 缓冲液处理 3 h, 然后测定气孔开度; 为了研究 CdCl_2 对野生型和突变体 *Atl-cdes*、*Atd-cdes*、*Atmoa1*、*nia1-2*、*nia2-5* 和 *nia1-2/nia2-5* 气孔的效应, 野生型和以上各突变体的表皮条分别用不含或含有 $300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdCl_2 的 MES/KCl 缓冲液处理 3 h, 然后测定气孔开度。每个处理至少重复三次, 最终数据为三次测量所得数据的平均值 \pm 标准误差($n = 90$)。

2.3. H_2S 含量的测定

H_2S 含量的测定采用亚甲基蓝法[23][24], 具体步骤参考黄丽萍[25]的方法。在研究 H_2S 合成抑制剂及 NO 清除剂和合成抑制剂对 CdCl_2 诱导的野生型叶片 H_2S 含量的影响及 CdCl_2 对野生型和突变体 *Atl-cdes*、*Atd-cdes*、*Atmoa1*、*nia1-2*、*nia2-1* 和 *nia1-2/nia2-5* 叶片 H_2S 含量的影响时, 叶片处理方法与气孔开度测定部分的处理相同, 处理结束后, 测定 H_2S 含量。每个处理至少重复三次, 最终数据为三次测量所得数据的平均值 \pm 标准误差($n = 9$)。

2.4. L-/D-CDes 活性的测定

L-/D-CDes 活性的测定参照侯智慧等[24]和 Riemenschneider 等[26]的方法并稍作修改, 具体步骤参考黄丽萍[25]的方法。叶片中 L-/D-CDes 活性测定前, 叶片的处理方法与 H_2S 含量测定部分的相同。每个处理至少重复三次, 最终数据为三次测量所得数据的平均值 \pm 标准误差($n = 9$)。

2.5. 保卫细胞 NO 水平的测定

保卫细胞 NO 水平检测借助于特异性荧光探针 DAF-2DA, 参照 Kojima 等[27]的方法并稍加修改, 具体步骤参考黄丽萍[25]的方法。为了检测 NO 清除剂和合成抑制剂对 CdCl₂ 诱导野生型保卫细胞 NO 水平的影响, 表皮条分别用 MES/KCl 缓冲液单独或含有 300 μmol·L⁻¹ CdCl₂、0.4 mmol·L⁻¹ AOA、0.4 mmol·L⁻¹ NH₂OH、0.4 mmol·L⁻¹ C₃H₃KO₃ + 0.4 mmol·L⁻¹ NH₃、200 μmol·L⁻¹ c-PTIO、25 μmol·L⁻¹ L-NAME、100 μmol·L⁻¹ Na₂WO₄ 及 300 μmol·L⁻¹ CdCl₂ 分别与 H₂S 合成抑制剂及 NO 清除剂和合成抑制剂混合液的 MES/KCl 缓冲液处理 3 h, 处理结束后立即用含有 50 μmol·L⁻¹ H₂DCF-DA 的 Tris-KCl 缓冲液(10 mmol·L⁻¹ Tris, 50 mmol·L⁻¹ KCl, pH 7.2) 25°C ± 2°C 避光孵育 10 min, 多余的探针用 Tris-KCl 缓冲液漂洗 3-5 次, 然后用荧光显微镜(Olympus BX53, U-RFLT50, JAPAN)检测 NO 并拍照; 为了检测 CdCl₂ 对野生型和突变体 *Atl-cdes*、*Atd-cdes*、*Atmoa1*、*nial-2*、*nia2-5* 和 *nial-2/nia2-5* 保卫细胞 NO 水平的效应, 野生型和以上各突变体的表皮条分别用不含或含有 300 μmol·L⁻¹ CdCl₂ 的 MES/KCl 缓冲液处理 3 h, 处理结束后立即用含有 10 μmol·L⁻¹ DAF-2DA 的 Tris-KCl 缓冲液 25°C ± 2°C 避光孵育 30 min, 多余的探针用 Tris-KCl 缓冲液漂洗 3-5 次, 然后用荧光显微镜检测 NO 并拍照。检测条件为: 激发波长为 450~490 nm, 发射波长为 520~560 nm。利用 Photoshop 7.0 (Adobe, San Jose, CA, USA)对显微照片的整个气孔区进行处理和分析。每个处理至少重复 3 次。

2.6. 数据统计

试验中每个处理 3 次重复, 在 SPSS 17.0 进行数据整理与分析, 进行描述统计分析得出不同处理组的平均值、标准差等基本情况, 在满足方差齐性和正态分布的前提下, 进行描述统计分析和比较均值下的单因素 ANOVA 检验得到平均值、标准误差以及数据之间存在的显著性, 当 P 值小于 0.05 时, 认为数据间存在显著性差异并用不同字母表示, 数值以平均值 ± 标准误差表示, 用 Origin 6.1 软件(Microcal Software, Northampton, MA, USA)绘制柱形图; 用 Photoshop 7.0 制作图版。

3. 结果与分析

3.1. CdCl₂ 对拟南芥气孔运动的影响

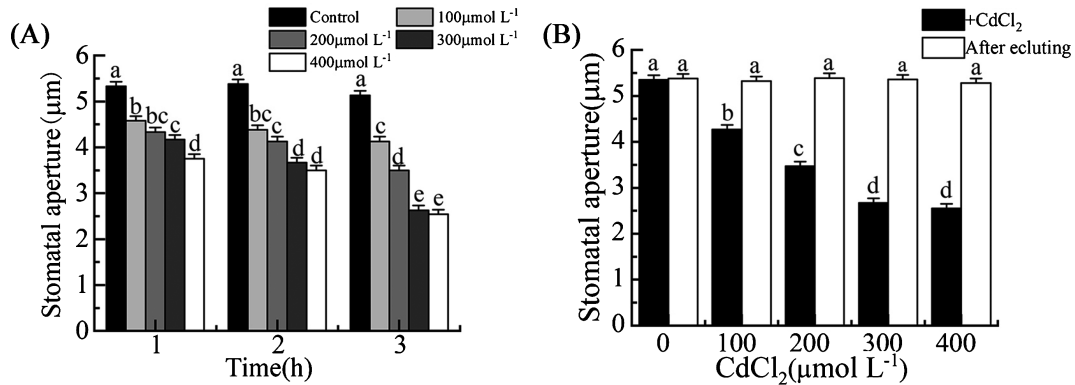
为了探明 CdCl₂ 是否影响拟南芥气孔运动, 检测了不同浓度 CdCl₂ (0、100、200、300 和 400 μmol·L⁻¹) 对野生型拟南芥气孔开度的效应。图 1(A)结果显示, CdCl₂ 能诱导野生型气孔关闭, 随着 Cd²⁺浓度的增加, 气孔开度逐渐减小, CdCl₂ 对气孔关闭具有剂量和时间依赖效应。300 μmol·L⁻¹ CdCl₂ 处理 3 h 诱导气孔关闭的效果最佳。图 1(B)结果表明, CdCl₂ 诱导气孔关闭的效应具有可逆性。

3.2. H₂S 参与 CdCl₂ 诱导的拟南芥气孔关闭

为探明 H₂S 是否是 CdCl₂ 诱导拟南芥气孔关闭过程中的重要信号成分, 检测了 H₂S 合成抑制剂 AOA、NH₂OH 与 C₃H₃KO₃ + NH₃(L-/D-CDes 催化反应产物)对 CdCl₂ 诱导野生型气孔关闭的效应及 CdCl₂ 对突变体 *Atl-cdes* 和 *Atd-cdes* 气孔的影响。由图 2(A)可知, CdCl₂ 处理显著诱导拟南芥气孔关闭, AOA、NH₂OH 和 C₃H₃KO₃ + NH₃ 均可不同程度地抑制 CdCl₂ 诱导的气孔关闭, 而 AOA、NH₂OH 和 C₃H₃KO₃ + NH₃ 单独处理对气孔开度并无明显影响。图 2(B)显示, 与野生型相比, CdCl₂ 未能显著关闭 *Atl-cdes* 和 *Atd-cdes* 突变体的气孔。由以上数据可以得出, H₂S 可能是 CdCl₂ 诱导拟南芥气孔关闭过程中的重要信号组分, H₂S 的合成可能依赖于 L-CDes 和 D-CDes 途径。

为进一步证明 CdCl₂ 诱导气孔关闭过程中 H₂S 产生的具体酶学途径, 测定了 AOA、NH₂OH 以及 C₃H₃KO₃ + NH₃ 对 CdCl₂ 诱导野生型叶片 H₂S 含量和 L-/D-CDes 活性变化的影响。结果显示, CdCl₂ 处理

后叶片 H_2S 含量和 L-/D-CDEs 活性升高, 而 AOA、 NH_2OH 以及 $\text{C}_3\text{H}_3\text{KO}_3 + \text{NH}_3$ 可以显著逆转 CdCl_2 的效应(图 3(A)~(C))。以上数据表明, L-/D-CDEs 催化合成的 H_2S 参与 CdCl_2 诱导的拟南芥气孔关闭过程。



注: 图中不同小写字母表示不同处理间有显著性差异($P < 0.05$), 下图同。

Figure 1. Effects of CdCl_2 on stomatal movement in wild-type *A. thaliana*

图 1. CdCl_2 对野生型拟南芥气孔运动的影响

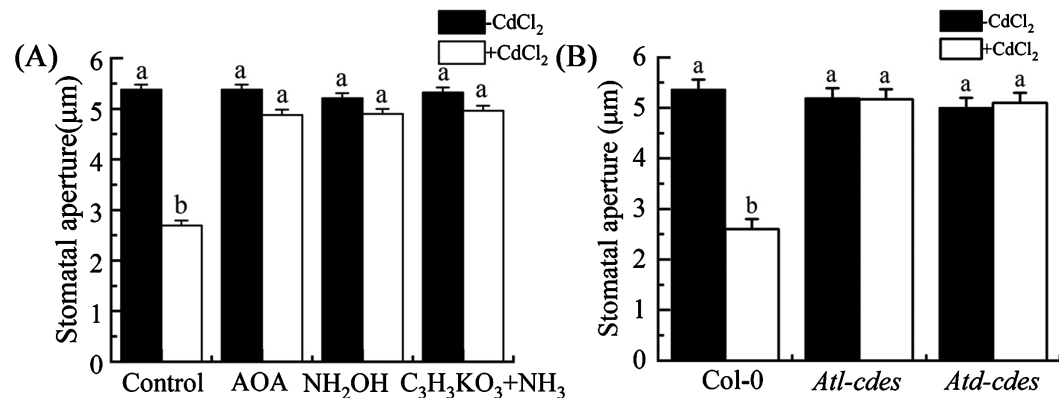


Figure 2. Effects of H_2S synthesis inhibitors on CdCl_2 -triggered stomatal closure in wild-type (A) and effects of CdCl_2 on stomatal aperture in *Atl-cdes* and *Atd-cdes* mutants (B)

图 2. H_2S 合成抑制剂对 CdCl_2 诱导拟南芥野生型(Col-0)气孔关闭的影响(A)和 CdCl_2 对 *Atl-cdes* 和 *Atd-cdes* 突变体气孔开度的效应(B)

3.3. NO 参与 CdCl_2 调控的拟南芥气孔关闭

为了探明 NO 是否参与 CdCl_2 诱导的拟南芥气孔关闭过程, 检测了 NO 清除剂 c-PTIO、硝酸还原酶(NR)抑制剂钨酸钠(Na_2WO_4)和一氧化氮合酶(NOS)抑制剂 L-NAME 对 CdCl_2 诱导野生型气孔关闭效应。

图 4(A)显示 CdCl_2 显著诱导野生型气孔关闭, c-PTIO、 Na_2WO_4 和 L-NAME 均能明显抑制以上效应, 而 c-PTIO、 Na_2WO_4 和 L-NAME 单独处理对气孔开度无显著效应。另外, CdCl_2 处理不能诱导 *Atmoa1*、*nial-2*、*nia2-1* 和 *nial-2/2-5* 突变体气孔关闭(图 4(B))。由此推测, NO 可能参与 CdCl_2 诱导的拟南芥气孔关闭, 且此过程中 NO 的产生由 NR 和 NOS 负责合成。

为进一步证明 NO 参与 CdCl_2 诱导的气孔关闭过程, 检测了 c-PTIO、 Na_2WO_4 和 L-NAME 与 CdCl_2 复合处理对野生型保卫细胞 NO 水平的影响。结果表明, CdCl_2 能显著促进野生型保卫细胞 NO 合成(图 5(A)、图 5(B)), 而 c-PTIO、 Na_2WO_4 和 L-NAME 能阻断 CdCl_2 诱导保卫细胞 NO 合成的效应(图 5(C)~(E))。此外, CdCl_2 未能诱导 *Atmoa1*、*nial-2*、*nia2-1* 和 *nial-2/nia2-5* 突变体保卫细胞 NO 合成。由此可以证实,

在 CdCl₂ 诱导拟南芥气孔关闭过程中, NO 是由 NR 和 NOS 催化产生, *Atnoa1*、*Nia1* 和 *Nia2* 均参与 NO 的生成。

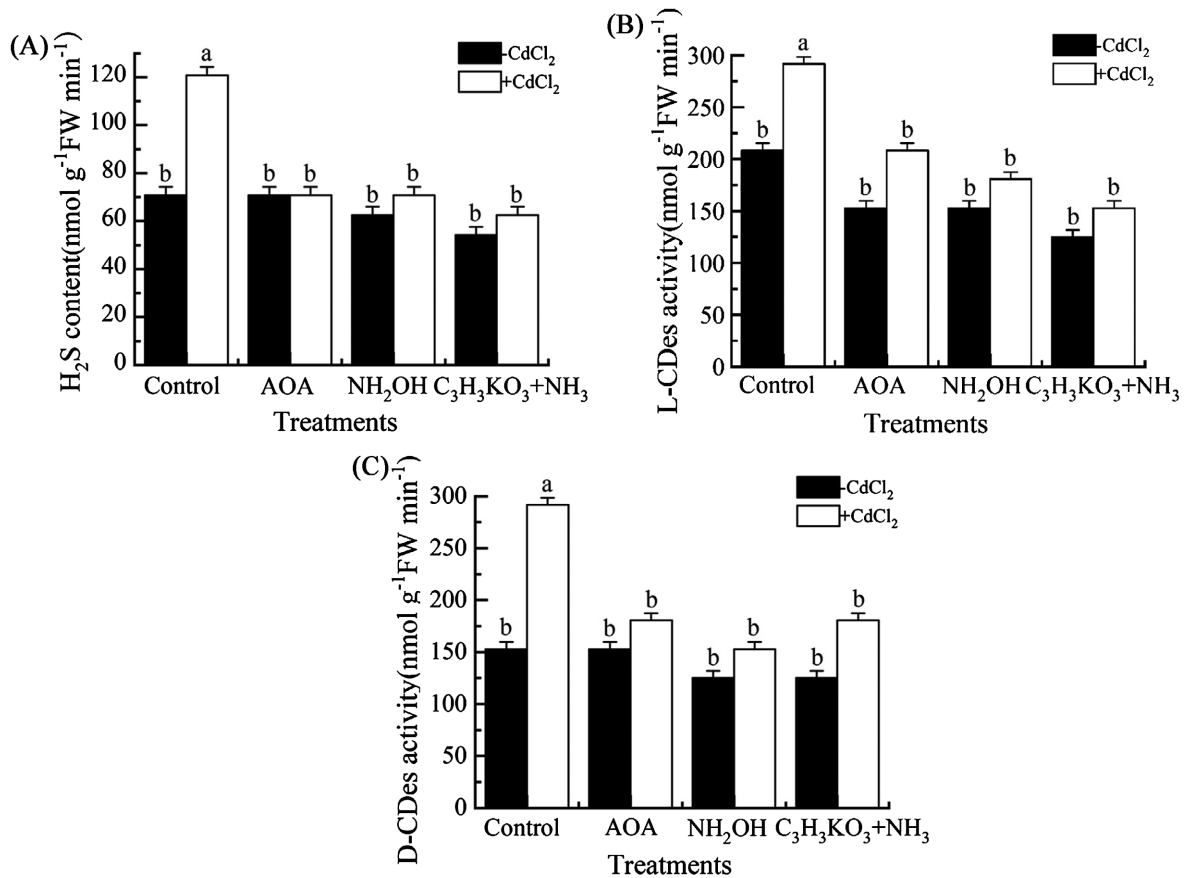


Figure 3. Effects of H₂S synthesis inhibitors on CdCl₂-caused H₂S synthesis (A) and L-/D-CDes activity increase of leaves in wild-type (Co1-0) (B), (C)

图 3. H₂S 合成抑制剂对 CdCl₂ 诱导的野生型(Co1-0)叶片 H₂S 合成(A)和 L-/D-CDes 活性升高的影响(B), (C)

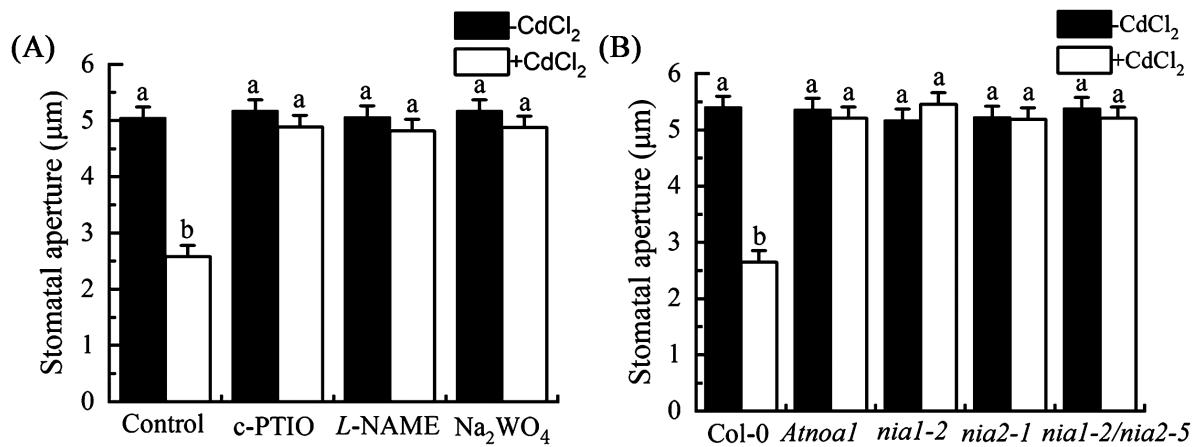
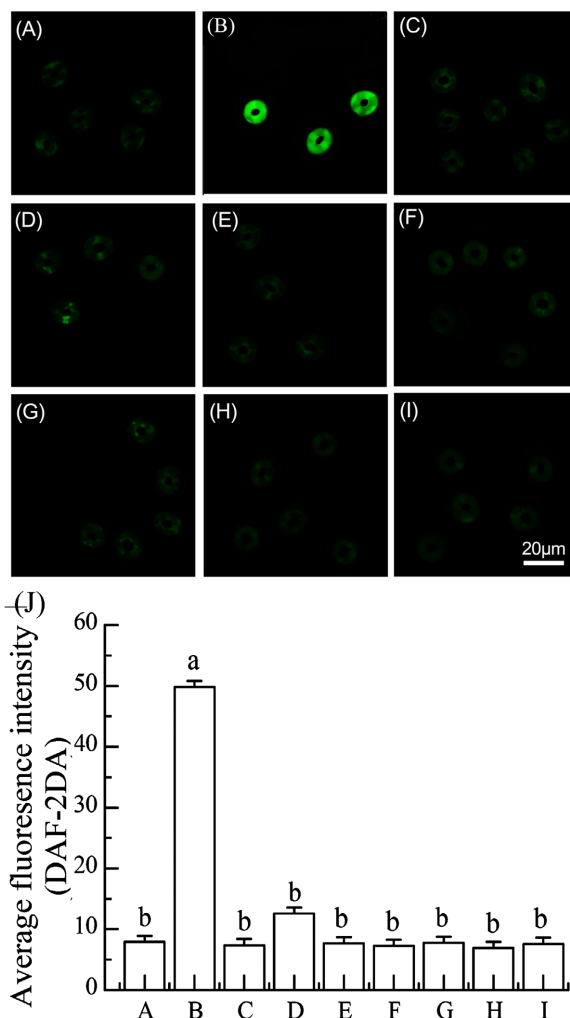


Figure 4. Effects of NO scavenger and synthesis inhibitors on CdCl₂-triggered stomatal closure in wild-type (A) and effects of CdCl₂ on stomatal movement in *Atnoa1*, *nial-2*, *nial-2-1* and *nial-2/2-5* mutants (B)

图 4. NO 清除剂和合成抑制剂对 CdCl₂ 诱导野生型气孔关闭的影响(A)和 CdCl₂ 对 *Atnoa1*、*nial-2*、*nial-2-1* 和 *nial-2/2-5* 突变体气孔运动的效应(B)



注: 离体表皮条按如下方法处理: (A) MES/KCl 缓冲液单独处理, 或含(B) $300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdCl_2 、(C) $300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdCl_2 + $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ c-PTIO、(D) $300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdCl_2 + $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ L-NAME 和(E) $300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdCl_2 + $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2WO_4 的 MES/KCl 缓冲液; (F-I) 将撕取的 *Atmoa1*, *nial-2*, *nial-2-1* 和 *nial-2/2-5* 突变体的表皮条分别用 $300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdCl_2 处理 3 h, 然后在暗中立即用含 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DAF-2DA 的 Tris-KCl 缓冲液孵育 30 min, Tris-KCl 缓冲液漂洗 3~5 次, 去除多余染料, 立即用荧光显微镜观察并拍照; (J) 为图(A)-(I)的平均 DAF-2 荧光强度, 数据来自三个重复实验的平均值 \pm 标准误差(n=9); 图(J)中不同小写字母表示不同处理间有显著性差异($P < 0.05$)。

Figure 5. Effects of NO scavenger and synthesis inhibitors on CdCl_2 -triggered NO production of guard cells in wild-type (A)-(E) and effects of CdCl_2 on NO production of guard cells in *Atmoa1*, *nial-2*, *nial-2-1* and *nial-2/2-5* mutants (F)-(I)

图 5. NO 清除剂和合成抑制剂对 CdCl_2 诱导野生型保卫细胞 NO 生成的影响(A)-(E)和 CdCl_2 对 *Atmoa1*、*nial-2*、*nial-2-1* 和 *nial-2/2-5* 突变体保卫细胞 NO 生成的影响(F)-(I)

3.4. H_2S 和 NO 在 CdCl_2 诱导拟南芥气孔关闭中的相互关系

3.4.1. NO 清除剂和合成抑制剂对 CdCl_2 诱导野生型叶片 H_2S 含量和 L-/D-CDes 的影响

以上结果已经证明, H_2S 和 NO 都参与 CdCl_2 诱导的拟南芥气孔关闭过程, 为进一步探明 H_2S 和 NO 的关系, 检测了 c-PTIO、 Na_2WO_4 和 L-NAME 对 CdCl_2 诱导野生型叶片 H_2S 合成和 L-/D-CDes 活性升高的影响。结果显示, 与对照组相比, CdCl_2 显著诱导叶片 H_2S 含量和 L-/D-CDes 活性升高, 而 c-PTIO、 Na_2WO_4 和 L-NAME 阻断了以上效应(图 6(A)-(C))。以上结果暗示, 在 CdCl_2 调控拟南芥气孔关闭过程中, NR 途径和 NOS 途径合成的 NO 共同介导 H_2S 的合成, 进而诱导拟南芥气孔关闭。

3.4.2. CdCl₂ 对 *Atnoa1*、*nial-2*、*nial-2-1* 和 *nial-2/nial-2-5* 突变体叶片 H₂S 含量和 L-/D-CDes 活性的影响

为了进一步证实 H₂S 和 NO 的关系, 检测了 CdCl₂ 对 *Atnoa1*、*nial-2*、*nial-2-1* 和 *nial-2/nial-2-5* 突变体叶片 H₂S 含量和 L-/D-CDes 活性的影响。结果显示, CdCl₂ 显著增加野生型叶片 H₂S 含量和 L-/D-CDes 活性, 但此效应在 *Atnoa1*、*nial-2*、*nial-2-1* 和 *nial-2/nial-2-5* 突变体中被阻断(图 7(A)~(C))。由此推断, NR 途径和 NOS 途径合成的 NO 均介导 CdCl₂ 诱导的 H₂S 合成。

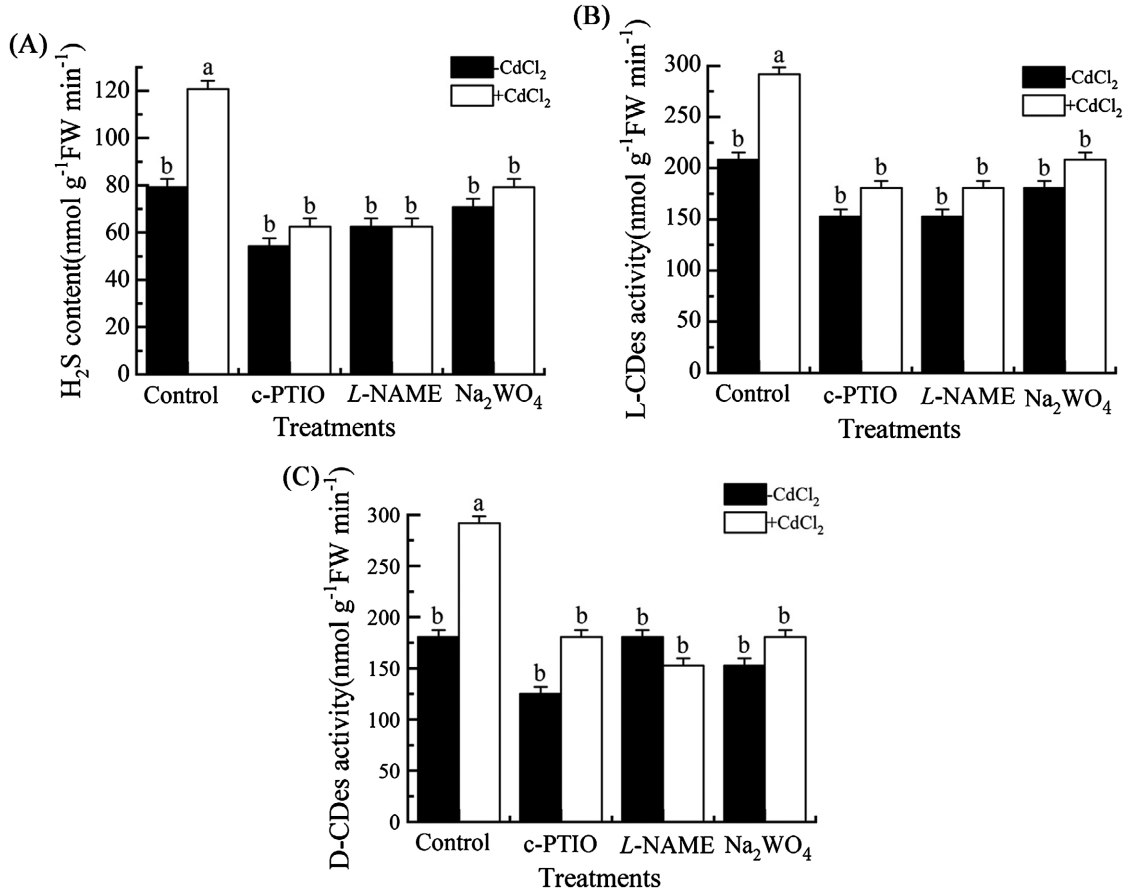
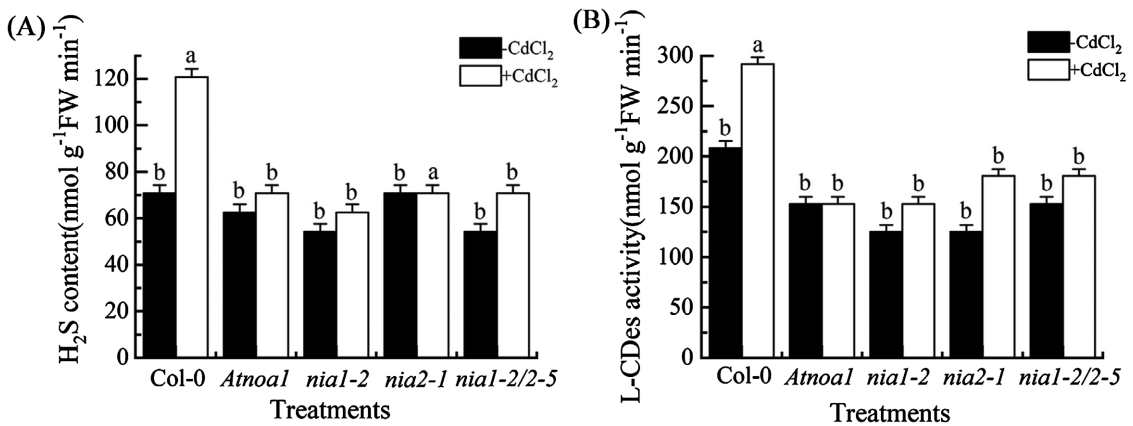


Figure 6. Effects of NO scavenger and synthesis inhibitors on CdCl₂-induced H₂S content (A) and L-/D-CDes activity ((B), (C)) of leaves in wild-type

图 6. NO 清除剂和合成抑制剂对 CdCl₂ 诱导的野生型叶片 H₂S 含量(A)和 L-/D-CDes 活性的影响((B), (C))



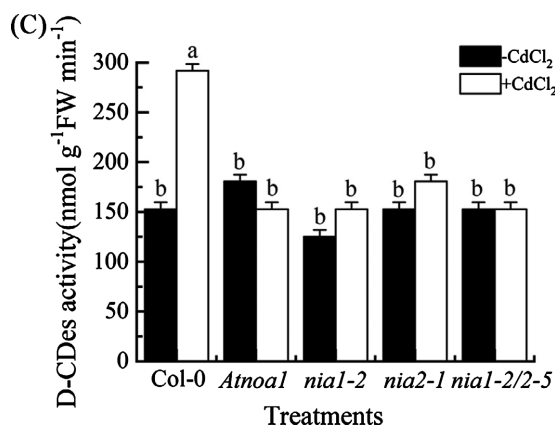


Figure 7. Effects of CdCl₂ on H₂S content (A) and L-/D-CDes activity in *Atnoa1*, *nial-2*, *nia2-1* and *nial-2/nia2-5* mutants ((B), (C))

图 7. CdCl₂ 对 *Atnoa1*、*nial-2*、*nia2-1* 和 *nial-2/nia2-5* 突变体叶片 H₂S 含量(A)和 L-/D-CDes 活性的影响((B), (C))

3.4.3. H₂S 合成抑制剂对 CdCl₂ 诱导的野生型保卫细胞 NO 生成及 CdCl₂ 对 *Atl-cdes* 和 *Atd-cdes* 突变体保卫细胞 NO 生成的影响

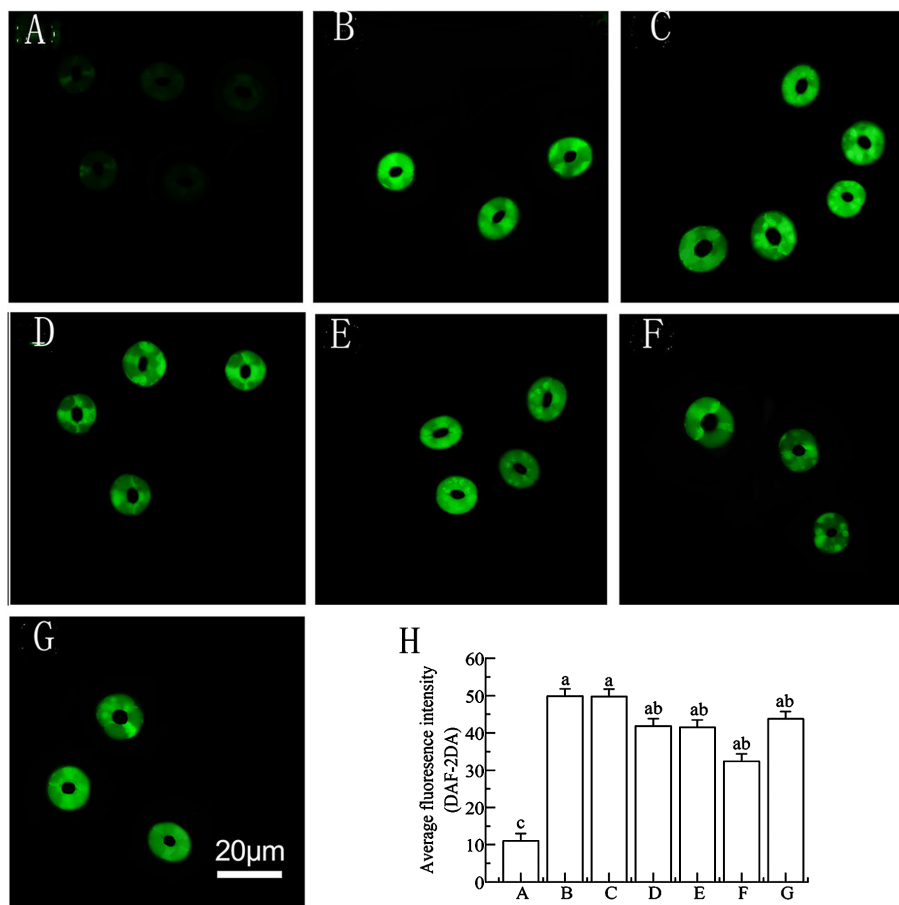
为了进一步证实 NO 位于 H₂S 的上游介导 CdCl₂ 诱导的气孔关闭, 用 H₂S 合成抑制剂分别与 CdCl₂ 复合处理, 检测野生型保卫细胞 NO 水平, 并检测了 CdCl₂ 对 *Atl-cdes* 和 *Atd-cdes* 突变体保卫细胞 NO 产生的影响。结果显示, CdCl₂ 处理后野生型保卫细胞 DAF-2 荧光比对照组显著增强(图 8(A)、图 8(B)), 而 H₂S 合成抑制剂 AOA、NH₂OH 和 C₃H₃KO₃ + NH₃ 不能抑制 CdCl₂ 诱导的 DAF-2 荧光增强(图 8(C)-(E))。另外, CdCl₂ 对 *Atl-cdes* 和 *Atd-cdes* 突变体保卫细胞 DAF-2 荧光的增强效果与野生型相同(图 8(F), 图 8(G))。以上结果进一步证实了 NO 确实位于 H₂S 上游介导了 CdCl₂ 诱导拟南芥气孔关闭过程的结论。

4. 讨论

镉是一种毒性很强的重金属元素, 容易被植物根系吸收并运输到植物的地上部分, 从而影响植物生长发育和很多生理过程。研究表明, CdCl₂ 可以诱导植物气孔关闭[9] [21]。然而, CdCl₂ 诱导植物气孔运动过程中的信号转导机制还不清楚, 因此, 本文研究了 CdCl₂ 对拟南芥气孔运动的效应。结果显示, CdCl₂ 以浓度和时间依赖效应诱导拟南芥气孔关闭, 此结果与 Ma 等[9]在绿豆中的研究结果一致; CdCl₂ 处理的最适浓度和最佳时间分别是 300 μmol·L⁻¹ 和 3 h (图 1), 此结果与乔增杰等[21]在拟南芥中的研究结果略有差异, 此差异的具体原因还需要进一步的研究。

H₂S 作为信号分子, 在植物的很多生理过程如种子萌发、光合作用和气孔运动等方面发挥重要作用[1] [2] [28]。另外, H₂S 能缓解干旱[3]、低温[29]和重金属[30]等非生物胁迫对植物的伤害。大量数据表明, H₂S 在 CdCl₂、油菜素内酯和 ABA 等诱导的气孔关闭过程中发挥作用[2] [9] [21] [31]。本研究结果显示, CdCl₂ 能诱导野生型拟南芥气孔关闭、叶片 H₂S 含量增加和 L-/D-CDes 活性增强(图 2(A), 图 3), 而 CdCl₂ 诱导的以上效应被 H₂S 合成抑制剂 AOA、NH₂OH 及 C₃H₃KO₃ + NH₃ 显著逆转; 此外, H₂S 合成突变体 *Atl-cdes* 和 *Atd-cdes* 对 CdCl₂ 的敏感性降低, CdCl₂ 未能关闭 *Atl-cdes* 和 *Atd-cdes* 突变体的气孔(图 2(A))。由以上数据可得, H₂S 参与 CdCl₂ 调控的拟南芥气孔关闭过程, H₂S 主要是通过 L-/D-CDes 合成的, AtL-CDes 和 AtD-CDes 正调控 CdCl₂ 诱导的拟南芥气孔关闭, 此结果与乔增杰等[21]的研究结果略有差异, 具体原因有待进一步研究。

大量研究表明, NO 作为植物的内源性信号分子, 广泛参与调节植物体内的许多生理过程[32]。Liao 等[33]报道, NO 可以缓解干旱胁迫对万金菊的伤害。另有研究表明, 外源 NO 可以增加莴苣的耐盐性[17]。



注: 离体表皮条按如下方法光照处理 3 h: (A) MES/KCl 缓冲液单独处理, 或含 (B) $300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdCl_2 、(C) $300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{CdCl}_2 + 0.4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ AOA、(D) $300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{CdCl}_2 + 0.4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NH_2OH 和 (E) $300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{CdCl}_2 + 0.4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{C}_3\text{H}_3\text{KO}_3 + \text{NH}_3$ 的 MES/KCl 缓冲液; (F)-(G) 将撕取的 *Atl-cdes* 和 *Atd-cdes* 突变体的表皮条分别用 $300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdCl_2 处理 3 h, 然后在暗中立即用含 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DAF-2DA 的 Tris-KCl 缓冲液孵育 30 min, Tris-KCl 缓冲液漂洗 3~5 次, 去除多余染料, 立即用荧光显微镜观察 NO 荧光并拍照; (H) 为图(A)-(G) 的平均 DAF-2 荧光强度, 数据来自三个重复实验的平均值 \pm 标准误差 ($n = 9$); 图(H)中不同小写字母表示不同处理间有显著性差异 ($P < 0.05$)

Figure 8. Effects of H_2S synthesis inhibitors on CdCl_2 -induced NO production of guard cells in wild-type (A)-(E) and CdCl_2 on NO production of guard cells in *Atl-cdes* and *Atd-cdes* mutants (F)-(G)

图 8. H_2S 合成抑制剂对 CdCl_2 诱导的野生型保卫细胞 NO 生成的影响(A)-(E)和 CdCl_2 对 *Atl-cdes* 和 *Atd-cdes* 突变体保卫细胞 NO 生成的影响(F)-(G)

硝酸还原酶途径产生的 NO 参与 ABA 诱导的拟南芥气孔运动[34]。NOS 途径产生的 NO 参与 UV-B 诱导的蚕豆气孔关闭[19]。NO 还参与油菜素内酯和乙烯诱导的气孔关闭[20] [35] [36]。到目前为止, NO 是否介导 CdCl_2 诱导的拟南芥气孔关闭尚不清楚。本研究结果显示, c-PTIO、 Na_2WO_4 和 L-NAME 均能显著抑制 CdCl_2 诱导的拟南芥气孔关闭和保卫细胞 DAF-2 荧光增强(图 4(A), 图 5(A)~(E)和图 5(J)); 另外, 与野生型相比, CdCl_2 不能显著诱导 *Atnoa1*、*nial-2*、*nia2-1* 和 *nial-2/nia2-5* 突变体气孔关闭和保卫细胞 DAF-2 荧光增强(图 4(B), 图 5(F)~(J))。以上数据表明, NO 参与 CdCl_2 诱导的拟南芥气孔关闭过程, NO 由 NOS 和 NR 途径催化产生, *Atnoa1*、*Nia1* 和 *Nia2* 共同负责 NO 的生成。

有研究显示, NO 和 H_2S 共同调节了动物的某些生理过程, 如二者对平滑肌细胞的作用具有协同性[37]。在植物中, H_2S 与 NO 相互作用参与调节很多生理过程[38]。 H_2S 通过诱导紫花苜蓿内源 NO 合成来提高其抗盐能力[39]。NO 位于 H_2S 上游参与乙烯[35]和油菜素内酯[36]诱导的气孔关闭。NO 位于 H_2S 的下游

参与 ABA 诱导的气孔关闭[40]。Ma 等(2019)[9]报道, H_2O_2 介导的 H_2S 生成参与调控 $CdCl_2$ 诱导的绿豆气孔关闭。然而, 在 $CdCl_2$ 诱导拟南芥气孔关闭过程中, H_2S 和 NO 之间的相互关系还不清楚。本研究结果显示, $CdCl_2$ 能显著提高野生型叶片 H_2S 含量和 L-/D-CDes 活性, 但以上效应被 c-PTIO、 Na_2WO_4 和 L-NAME 显著抑制(图 6(A)~(C)); 而且, $CdCl_2$ 不能使 *Atmoa1*、*nia1-2*、*nia2-1* 和 *nia1-2/nia2-5* 突变体叶片 H_2S 含量和 L-/D-CDes 活性提高(图 7(A)~(C))。另外, $CdCl_2$ 使野生型保卫细胞 DAF-2 荧光显著增强(图 8(A) & 图 8(B)), 而 AOA、 NH_2OH 及 $C_3H_3KO_3 + NH_3$ 未能减弱 $CdCl_2$ 诱导的保卫细胞 DAF-2 荧光强度(图 8(C)~(E)), 且 *Atl-cdes* 和 *Atd-cdes* 突变体保卫细胞 DAF-2 荧光强度与野生型没有显著差异(图 8(F)~(G))。由以上数据可知, NO 介导的 H_2S 生成参与 $CdCl_2$ 诱导的拟南芥气孔关闭过程。

综合以上数据可知, $CdCl_2$ 通过诱导 NOS 和 NR 催化的 NO 产生, NO 通过增强 L-/D-CDes 活性, 进一步促进 H_2S 合成, 最终诱导拟南芥气孔关闭。本研究结果为进一步阐明 $CdCl_2$ 调控植物气孔运动的信号转导机制提供理论基础。而其他信号分子如胞质 pH、G 蛋白、蛋白激酶和 Ca^{2+} 等是否介导 $CdCl_2$ 诱导的气孔关闭, 以及 H_2S 与它们之间的相互关系都有待进一步研究。

5. 结论

$CdCl_2$ 诱导拟南芥气孔关闭最适浓度和最佳处理时间分别是 $300 \mu mol \cdot L^{-1}$ 和 3 h; H_2S 和 NO 均参与 $CdCl_2$ 诱导的拟南芥气孔关闭, 且 NO 作用于 H_2S 的上游发挥作用, L-CDes 和 D-CDes 共同负责 H_2S 的产生, *AtL-CDes* 和 *AtD-CDes* 正调控 $CdCl_2$ 诱导的拟南芥气孔关闭, NO 由 NOS 和 NR 途径催化产生, *Atmoa1*、*Nia1* 和 *Nia2* 共同负责 NO 的生成。

基金项目

山西省自然科学基金项目(No.202203021211262)。

参考文献

- [1] Chen, J., Wu, F., Wang, W., Zheng, C., Lin, G., Dong, X., *et al.* (2011) Hydrogen Sulphide Enhances Photosynthesis through Promoting Chloroplast Biogenesis, Photosynthetic Enzyme Expression, and Thiol Redox Modification in *Spinacia oleracea* Seedlings. *Journal of Experimental Botany*, **62**, 4481-4493. <https://doi.org/10.1093/jxb/err145>
- [2] Ma, Y., Shao, L., Zhang, W. and Zheng, F. (2021) Hydrogen Sulfide Induced by Hydrogen Peroxide Mediates Brassinosteroid-Induced Stomatal Closure of *Arabidopsis thaliana*. *Functional Plant Biology*, **48**, 195-205. <https://doi.org/10.1071/fp20205>
- [3] 金竹萍, 王磊, 李澄, 等. H_2S 信号通过调节 RuBisCo 增强植物抗旱性[J]. 中国细胞生物学学报, 2019, 41(10): 1918-1928.
- [4] Lai, D., Mao, Y., Zhou, H., Li, F., Wu, M., Zhang, J., *et al.* (2014) Endogenous Hydrogen Sulfide Enhances Salt Tolerance by Coupling the Reestablishment of Redox Homeostasis and Preventing Salt-Induced K^+ Loss in Seedlings of *Medicago sativa*. *Plant Science*, **225**, 117-129. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.06.006>
- [5] Shen, J., Xing, T., Yuan, H., Liu, Z., Jin, Z., Zhang, L., *et al.* (2013) Hydrogen Sulfide Improves Drought Tolerance in *Arabidopsis thaliana* by MicroRNA Expressions. *PLOS ONE*, **8**, e77047. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077047>
- [6] Ali, B., Gill, R.A., Yang, S., Gill, M.B., Ali, S., Rafiq, M.T., *et al.* (2014) Hydrogen Sulfide Alleviates Cadmium-Induced Morpho-Physiological and Ultrastructural Changes in *Brassica napus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **110**, 197-207. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.08.027>
- [7] Hou, Z., Wang, L., Liu, J., Hou, L. and Liu, X. (2013) Hydrogen Sulfide Regulates Ethylene-Induced Stomatal Closure in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Integrative Plant Biology*, **55**, 277-289. <https://doi.org/10.1111/jipb.12004>
- [8] Ma, Y., Niu, J., Zhang, W. and Wu, X. (2018) Hydrogen Sulfide May Function Downstream of Hydrogen Peroxide in Mediating Darkness-Induced Stomatal Closure in *Vicia faba*. *Functional Plant Biology*, **45**, 553-560. <https://doi.org/10.1071/fp17274>
- [9] Ma, Y.L., Zhang, W. and Niu, J. (2019) Hydrogen Sulfide May Function Downstream of Hydrogen Peroxide in $CdCl_2$ -Induced Stomatal Closure in *Vigna radiata* L. *South African Journal of Botany*, **124**, 39-46.

- <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.04.031>
- [10] Ignarro, L.J. (2000) Nitric Oxide: Biology and Pathobiology. Academic Press, San Diego.
- [11] Hess, D.T., Matsumoto, A., Kim, S., Marshall, H.E. and Stamler, J.S. (2005) Protein S-Nitrosylation: Purview and Parameters. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **6**, 150-166. <https://doi.org/10.1038/nrm1569>
- [12] Beligni, M.V. and Lamattina, L. (2000) Nitric Oxide Stimulates Seed Germination and De-Etiolation, and Inhibits Hypocotyl Elongation, Three Light-Inducible Responses in Plants. *Planta*, **210**, 215-221. <https://doi.org/10.1007/pl00008128>
- [13] Leshem, Y.Y., Wills, R.B.H. and Ku, V.V. (1998) Evidence for the Function of the Free Radical Gas—Nitric Oxide (NO)—As an Endogenous Maturation and Senescence Regulating Factor in Higher Plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, **36**, 825-833. [https://doi.org/10.1016/s0981-9428\(99\)80020-5](https://doi.org/10.1016/s0981-9428(99)80020-5)
- [14] Bright, J., Desikan, R., Hancock, J.T., Weir, I.S. and Neill, S.J. (2005) ABA-Induced NO Generation and Stomatal Closure in Arabidopsis Are Dependent on H₂O₂ Synthesis. *The Plant Journal*, **45**, 113-122. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2005.02615.x>
- [15] Garcia-Mata, C. and Lamattina, L. (2007) Abscisic Acid (ABA) Inhibits Light-Induced Stomatal Opening through Calcium- and Nitric Oxide-Mediated Signaling Pathways. *Nitric Oxide*, **17**, 143-151. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2007.08.001>
- [16] Zhao, Z., Chen, G. and Zhang, C. (2001) Interaction between Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in Drought-Induced Abscisic Acid Synthesis in Root Tips of Wheat Seedlings. *Functional Plant Biology*, **28**, 1055-1061. <https://doi.org/10.1071/pp00143>
- [17] Campos, F.V., Oliveira, J.A., Pereira, M.G. and Farnese, F.S. (2019) Nitric Oxide and Phytohormone Interactions in the Response of *Lactuca sativa* to Salinity Stress. *Planta*, **250**, 1475-1489. <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03236-w>
- [18] Rai, K.K., Pandey, N. and Rai, S.P. (2019) Salicylic Acid and Nitric Oxide Signaling in Plant Heat Stress. *Physiologia Plantarum*, **168**, 241-255. <https://doi.org/10.1111/ppl.12958>
- [19] He, J., Xu, H., She, X., Song, X. and Zhao, W. (2005) The Role and the Interrelationship of Hydrogen Peroxide and Nitric Oxide in the UV-B-Induced Stomatal Closure in Broad Bean. *Functional Plant Biology*, **32**, 237-247. <https://doi.org/10.1071/fp04185>
- [20] Shi, C., Qi, C., Ren, H., Huang, A., Hei, S. and She, X. (2015) Ethylene Mediates Brassinosteroid-Induced Stomatal Closure via Ga Protein-Activated Hydrogen Peroxide and Nitric Oxide Production in Arabidopsis. *The Plant Journal*, **82**, 280-301. <https://doi.org/10.1111/tpj.12815>
- [21] 乔增杰, 王婷, 金竹萍, 等. 硫化氢参与镉诱导拟南芥气孔的关闭[J]. 山西大学学报: 自然科学版, 2016, 39(1): 146-151.
- [22] McAinsh, M.R., Clayton, H., Mansfield, T.A. and Hetherington, A.M. (1996) Changes in Stomatal Behavior and Guard Cell Cytosolic Free Calcium in Response to Oxidative Stress. *Plant Physiology*, **111**, 1031-1042. <https://doi.org/10.1104/pp.111.4.1031>
- [23] Sekiya, J., Schmidt, A., Wilson, L.G. and Filner, P. (1982) Emission of Hydrogen Sulfide by Leaf Tissue in Response to L-Cysteine. *Plant Physiology*, **70**, 430-436. <https://doi.org/10.1104/pp.70.2.430>
- [24] 侯智慧, 车永梅, 王兰香, 等. H₂S 位于 H₂O₂ 下游参与乙烯诱导拟南芥气孔关闭过程[J]. 植物生理学报, 2012, 48(12): 1193-1199.
- [25] 黄丽萍. H₂S 在 CdCl₂ 诱导拟南芥气孔关闭中的作用及其与 H₂O₂、NO 的关系[D]: [硕士学位论文]. 太原: 山西师范大学, 2023.
- [26] Riemenschneider, A., Nikiforova, V., Hoefgen, R., De Kok, L.J. and Papenbrock, J. (2005) Impact of Elevated H₂S on Metabolite Levels, Activity of Enzymes and Expression of Genes Involved in Cysteine Metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry*, **43**, 473-483. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.04.001>
- [27] Kojima, H., Nakatsubo, N., Kikuchi, K., Kawahara, S., Kirino, Y., Nagoshi, H., *et al.* (1998) Detection and Imaging of Nitric Oxide with Novel Fluorescent Indicators: Diaminofluoresceins. *Analytical Chemistry*, **70**, 2446-2453. <https://doi.org/10.1021/ac9801723>
- [28] Zhang, H., Hu, L., Hu, K., He, Y., Wang, S. and Luo, J. (2008) Hydrogen Sulfide Promotes Wheat Seed Germination and Alleviates Oxidative Damage against Copper Stress. *Journal of Integrative Plant Biology*, **50**, 1518-1529. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00769.x>
- [29] 吴帼秀, 李胜利, 李阳, 等. H₂S 和 NO 及其互作对低温胁迫下黄瓜幼苗光合作用的影响[J]. 植物生理学报, 2020, 56(10): 2221-2232.
- [30] Li, L., Wang, Y. and Shen, W. (2012) Roles of Hydrogen Sulfide and Nitric Oxide in the Alleviation of Cad-

- mium-Induced Oxidative Damage in Alfalfa Seedling Roots. *BioMetals*, **25**, 617-631. <https://doi.org/10.1007/s10534-012-9551-9>
- [31] Zhang, J., Zhou, M., Ge, Z., Shen, J., Zhou, C., Gotor, C., *et al.* (2019) Abscisic Acid-Triggered Guard Cell L-Cysteine desulphydrase Function and *in Situ* Hydrogen Sulfide Production Contributes to Heme Oxygenase-Modulated Stomatal Closure. *Plant, Cell & Environment*, **43**, 624-636. <https://doi.org/10.1111/pce.13685>
- [32] Lamattina, L. and Polacco J.C. (2007) Nitric Oxide in Plant Growth, Development and Stress Physiology. Springer, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/11563280>
- [33] Liao, W., Huang, G., Yu, J. and Zhang, M. (2012) Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide Alleviate Drought Stress in Marigold Explants and Promote Its Adventitious Root Development. *Plant Physiology and Biochemistry*, **58**, 6-15. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.06.012>
- [34] Desikan, R., Griffiths, R., Hancock, J. and Neill, S. (2002) A New Role for an Old Enzyme: Nitrate Reductase-Mediated Nitric Oxide Generation Is Required for Abscisic Acid-Induced Stomatal Closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**, 16314-16318. <https://doi.org/10.1073/pnas.252461999>
- [35] 刘菁, 侯丽霞, 刘国华, 等. NO 介导的 H₂S 合成参与乙烯诱导的拟南芥气孔关闭[J]. 科学通报, 2011, 56(30): 2515-2522.
- [36] Ma, Y., Wang, L. and Zhang, W. (2022) The Role of Hydrogen Sulfide and Its Relationship with Hydrogen Peroxide and Nitric Oxide in Brassinosteroid-Induced Stomatal Closure of *Vicia faba* L. *South African Journal of Botany*, **146**, 426-436. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.11.012>
- [37] Hosoki, R., Matsuki, N. and Kimura, H. (1997) The Possible Role of Hydrogen Sulfide as an Endogenous Smooth Muscle Relaxant in Synergy with Nitric Oxide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **237**, 527-531. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6878>
- [38] Zhang, H., Tang, J., Liu, X., Wang, Y., Yu, W., Peng, W., *et al.* (2009) Hydrogen Sulfide Promotes Root Organogenesis in *Ipomoea batatas*, *Salix matsudana* and *Glycine max*. *Journal of Integrative Plant Biology*, **51**, 1086-1094. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2009.00885.x>
- [39] Wang, Y., Li, L., Cui, W., Xu, S., Shen, W. and Wang, R. (2011) Hydrogen Sulfide Enhances Alfalfa (*Medicago sativa*) Tolerance against Salinity during Seed Germination by Nitric Oxide Pathway. *Plant and Soil*, **351**, 107-119. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-0936-2>
- [40] Scuffi, D., Álvarez, C., Laspina, N., Gotor, C., Lamattina, L. and García-Mata, C. (2014) Hydrogen Sulfide Generated by L-Cysteine Desulphydrase Acts Upstream of Nitric Oxide to Modulate Abscisic Acid-Dependent Stomatal Closure. *Plant Physiology*, **166**, 2065-2076. <https://doi.org/10.1104/pp.114.245373>