

## 外源H<sub>2</sub>S通过减轻低温光抑制增强黄瓜幼苗耐冷性

周超凡<sup>1</sup>, 吴春涛<sup>2</sup>, 李丹丹<sup>1</sup>, 张晓伟<sup>1</sup>, 毕焕改<sup>1</sup>, 艾希珍<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>山东农业大学园艺科学与工程学院/作物生物学国家重点实验室/农业部黄淮地区园艺作物生物学与种质创制重点开放实验室/山东果蔬优质高效生产协同创新中心, 山东泰安271018

<sup>2</sup>东营职业学院生物与生态工程学院, 山东东营257091

**摘要:** 以‘津优3号’黄瓜(*Cucumis sativus*)为试材, 叶面喷施硫化氢(H<sub>2</sub>S)供体硫氢化钠(NaHS)、H<sub>2</sub>S合成抑制剂氨基乙酸钠(AOA)、清除剂次牛磺酸(HT)或去离子水(对照), 研究H<sub>2</sub>S对低温下黄瓜幼苗光合作用和抗氧化系统的影响。结果表明: 低温胁迫初期, 黄瓜幼苗叶片的内源H<sub>2</sub>S与L-/D-半胱氨酸脱巯基酶(L-/DCD)活性快速升高, 4或6 h后降低。随着低温胁迫时间的延长, 黄瓜幼苗的丙二醛(MDA)含量、电解质渗漏率(EL)和冷害指数逐渐增加, NaHS处理的增加幅度明显小于对照, 而AOA和HT处理的与对照差异不显著。低温下黄瓜幼苗的净光合速率( $P_n$ )、气孔导度( $G_s$ )、蒸腾速率( $T_r$ )、光下光系统II (PSII)实际光化学效率( $\Phi_{PSII}$ )和暗下PSII最大光化学效率( $F_v/F_m$ ), 以及核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶(RuBPCase)和果糖-1,6-二磷酸酯酶(FBPase)活性逐渐降低, 胞间CO<sub>2</sub>浓度( $C_i$ )和初始荧光( $F_0$ )趋于升高。与对照相比, NaHS处理的 $P_n$ 、 $G_s$ 、 $T_r$ 、RuBPCase和FBPase活性, 以及 $\Phi_{PSII}$ 和 $F_v/F_m$ 均较高,  $C_i$ 和 $F_0$ 较低, 而AOA和HT处理的气体交换参数、光合酶活性及荧光参数多与对照差异不显著。随着低温胁迫时间的延长, 黄瓜幼苗的过氧化物酶(POD)活性逐渐增加, 超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)和谷胱甘肽还原酶(GR)活性, 以及还原型谷胱甘肽(GSH)和抗坏血酸(AsA)含量先升高, 后降低。NaHS处理的SOD、POD、CAT、APX和GR活性及GSH和AsA含量明显高于对照, AOA和HT处理的低于对照或与对照差异不显著。由此可见, H<sub>2</sub>S受低温胁迫诱导, 外源H<sub>2</sub>S可通过减轻低温光抑制增强黄瓜幼苗耐冷性。

**关键词:** 硫化氢; 低温胁迫; 光抑制; 活性氧; 光合作用; 黄瓜

黄瓜(*Cucumis sativus*)属于冷敏感植物, 然而北方日光温室黄瓜以越冬栽培为主, 冬季和早春经常遭遇低温胁迫, 严重影响黄瓜的生长发育、产量和品质。所以, 如何缓解低温障碍, 维持低温下黄瓜的生理功能, 是当前亟待解决的问题。硫化氢(hydrogen sulfide, H<sub>2</sub>S)是近几年发现的新型内源性气体信号分子, 它在调控植物生长发育和对非生物胁迫的响应中发挥重要作用(裴雁曦2016; 郭鸿鸣等2016)。前人研究表明, H<sub>2</sub>S参与调节气孔运动(侯智慧等2012), 能够促进植物侧根的发育(Jia等2015), 延缓采后水果贮藏过程中的成熟和衰老(Shen等2015)。Jin等(2011)发现, 干旱胁迫可使拟南芥体内的L-/D-半胱氨酸脱巯基酶(L-/D-cysteine desulfhydrase, L-/DCD)活性升高, H<sub>2</sub>S产生速率增加; 外源H<sub>2</sub>S可以减小叶片的气孔开度, 降低蒸腾速率, 提高植物对干旱的抵抗力。后来研究证实, 叶面喷施硫氢化钠(sodium hydrosulfide, NaHS; H<sub>2</sub>S供体)可显著提高干旱胁迫下狗牙草的抗氧化酶活性, 促进渗透调节物质的积累, 从而缓解叶片电解质外渗, 增强其对干旱胁迫的耐受性(Shi等2013)。盐胁迫

下H<sub>2</sub>S可通过缓解紫花苜蓿幼苗生长的抑制和膜脂过氧化, 维持胞内K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>平衡, 对防止盐胁迫诱发的胞内K<sup>+</sup>外流发挥积极作用(Lai等2014)。Li等(2012)试验结果表明, 外源NaHS可诱发植物内源H<sub>2</sub>S水平的提高, 继而诱导植物耐热性, 这种耐热性的形成与抗氧化系统、渗透调节物质、钙信使系统、热激蛋白等密切相关(闵雄等2016)。近年来研究发现, NaHS预处理可使低温下植物的抗氧化能力和渗透调节能力增强(Luo等2015), 光合关键酶核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, Rubisco)活性提高(Chen等2011)。强光下NaHS处理能促进水稻捕光天线复合体(light harvesting complex, LHC)离开光系统II (photosystem II, PSII), 与光系统I

收稿 2017-11-10 修订 2018-03-02

资助 国家自然科学基金(31572170)、山东省自然科学基金(ZR2015CM005)、山东省现代农业产业技术体系建设专项(SDAIT-05-10)、“双一流”奖补资金(SY-L2017YSTD06)。

\* 通讯作者(axz@sdau.edu.cn)。

(photosystem I, PSI)结合,从而减少PSII分配的激发能,缓解PSII的过度还原和光抑制伤害(段冰冰和陆巍2014)。然而,有关H<sub>2</sub>S对低温下黄瓜光合机构保护机制的研究尚未见报道。本研究以‘津优3号’黄瓜为试材,研究外源H<sub>2</sub>S对低温下黄瓜幼苗光合作用及抗氧化系统的影响,旨在探明低温下H<sub>2</sub>S对黄瓜光合功能的调控机理,并为进一步了解H<sub>2</sub>S在植物非生物胁迫中的作用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料与试验设计

试验于2016年在山东农业大学园艺实验站进行。供试黄瓜(*Cucumis sativus* L.) ‘津优3号’购自天津市黄瓜研究所。NaHS、氨基乙酸(aminooxy acetic acid, AOA; H<sub>2</sub>S合成抑制剂)、次牛磺酸(hypotaurine, HT; H<sub>2</sub>S清除剂)均购自Sigma公司。10月16日播种于10 cm×10 cm营养钵中,置于日光温室内。培养条件为:光量子通量密度(photon flux density, PFD)日均值约480 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>,昼/夜气温均值约23.5°C/16.5°C。幼苗长至二叶一心时(11月18日)将其分成4组,分别用1.0 mmol·L<sup>-1</sup> NaHS、0.8 mmol·L<sup>-1</sup> AOA、0.15 mmol·L<sup>-1</sup> HT(预备试验确定适宜浓度)和去离子水(对照)喷洒幼苗全株,每天喷1次,连续喷3 d,间隔1 d后将各处理幼苗移至GXZ型光照培养箱(宁波江南仪器厂)中进行低温处理。处理条件为昼/夜气温8°C/5°C, PFD 100 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>,光周期12 h/12 h。分别于低温胁迫0、1、3和5 d取样测定,每处理重复3~5次,取平均值。

### 1.2 测定方法

#### 1.2.1 H<sub>2</sub>S含量和L/DCD活性

H<sub>2</sub>S含量的测定参照Sekiya等(1982)的亚甲基蓝法,略做修改。取0.1 g新鲜功能叶片,加入0.9 mL预冷的20 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl缓冲液(pH 8.0),研磨成匀浆后离心,取上清液备用。将装有醋酸锌的吸收井置于内盛上清液的测试管内,加入100 μL 30 mmol·L<sup>-1</sup> FeCl<sub>3</sub>(溶于1.2 mol·L<sup>-1</sup> HCl)和100 μL 20 mmol·L<sup>-1</sup> N,N-二甲基-对苯二胺(溶于7.2 mol·L<sup>-1</sup> HCl)后,用封口膜迅速封好,37°C下反应30 min,测定670 nm波长下吸光度。L/DCD活性按Riemenschneide等(2005)的方法测定。

#### 1.2.2 丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量、电解质渗漏率(electrolyte leakage, EL)和冷害指数

参照赵世杰和苍晶(2015)的硫代巴比妥酸比色法测定MDA含量;用DDB-303A型电导率仪(上海精密科学仪器有限公司)测定上数第2片叶的电导率,按赵世杰和苍晶(2015)方法计算EL;冷害指数参照于贤昌等(1998)的方法测定。

#### 1.2.3 气体交换参数

用Ciras-3型光合仪(英国PP-Systems公司)测定PFD为600 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>、CO<sub>2</sub>浓度350~360 μL·L<sup>-1</sup>、叶温(25±1)°C下黄瓜功能叶(从上数第2片展开叶)的净光合速率(P<sub>n</sub>)、气孔导度(G<sub>s</sub>)、胞间CO<sub>2</sub>浓度(C<sub>i</sub>)和蒸腾速率(T<sub>r</sub>),PFD、CO<sub>2</sub>浓度和叶温分别由光合仪的可调光源、内置式CO<sub>2</sub>供气系统和温度监控装置控制。

#### 1.2.4 叶绿素荧光参数

将叶片预暗30 min,用FMS-2型调制式叶绿素荧光仪(英国Hansatech公司)测定暗适应下PSII最大荧光(F<sub>m</sub>)、可变荧光(F<sub>v</sub>)、初始荧光(F<sub>o</sub>),以及作用光为400 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>下的稳态荧光(F<sub>s</sub>)、光下初始荧光(F<sub>o</sub>')、最大荧光(F<sub>m</sub>')、可变荧光(F<sub>v</sub>')等荧光参数。参照Demmig-Adams和Adams (1996)及FMS-2型叶绿素荧光仪使用手册计算各参数的意义及光化学效率:暗适应下PSII最大光化学效率(F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>)=(F<sub>m</sub>-F<sub>o</sub>)/F<sub>m</sub>;PSII实际光化学效率(Φ<sub>PSII</sub>)=(F<sub>m</sub>'-F<sub>s</sub>)/F<sub>m</sub>'。

#### 1.2.5 光合酶活性

核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶(ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, RuBPCase)活性的测定参照RuBPCase试剂盒(上海邦奕生物科技有限公司生产)说明书;果糖-1,6-二磷酸酯酶(fructose-1,6-bisphosphatase, FBPase)活性参照Rao和Terry (1989)的方法测定,并按毕焕改等(2015)方法略加修改。

#### 1.2.6 抗氧化系统

采用氮蓝四唑还原法测定超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性,以抑制光化还原50%为1个酶活性单位;用愈创木酚法测定过氧化物酶(peroxidase, POD)活性,以1 min内470 nm波长吸光度(A<sub>470</sub>)变化值表示;紫外吸收法测定抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)活性,以1

min内 $A_{290}$ 变化表示(赵世杰和苍晶2015)。参照Chance和Maehly (1995)的方法测定过氧化氢酶(catalase, CAT)活性, 以1 min内 $A_{240}$ 变化表示; 按Foyer和Halliwell (1976)的方法测定谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)活性, 以1 min内 $A_{340}$ 变化表示。谷胱甘肽(glutathione, GSH)和抗坏血酸(ascorbic acid, AsA)含量参照Wang等(2004)方法测定。

### 1.3 数据处理

用Microsoft Excel处理数据和作图, 用DPS软件对数据进行单因素方差分析, 并运用Duncan检验法对显著性差异( $P < 0.05$ )进行多重比较。图中数据为3次重复的平均值 $\pm$ 标准偏差, 相同胁迫时间不同小写字母表示处理间差异显著( $P < 0.05$ )。

## 2 实验结果

### 2.1 叶面喷施NaHS对低温下黄瓜幼苗H<sub>2</sub>S含量及L/DCD活性的影响

从图1-A可以看出, 随着低温胁迫时间的延长, 不同处理黄瓜幼苗叶片的H<sub>2</sub>S含量均逐渐增加, 4或6 h后下降; 与对照相比, NaHS处理的H<sub>2</sub>S含量较高, 而AOA和HT处理的较低。低温下黄瓜幼苗的LCD和DCD活性与H<sub>2</sub>S变化趋势相似, NaHS处理的显著高于对照, 而AOA和HT处理的明显低于对照或与对照差异不显著(图1-B和C)。由此证实, L/DCD催化合成的H<sub>2</sub>S受低温胁迫诱导, 抑制H<sub>2</sub>S合成可逆转低温引起的H<sub>2</sub>S和L/DCD上升。

### 2.2 叶面喷施NaHS对低温下黄瓜幼苗MDA含量、EL和冷害指数的影响

从图2-A看出, 低温下各处理黄瓜幼苗的MDA含量逐渐升高, 但NaHS处理的升高幅度明显小于对照, 而AOA和HT处理的与对照差异不显著。低温下各处理黄瓜幼苗的EL逐渐升高。胁迫结束(5 d)时, NaHS处理的EL比对照低11.7个百分点, 而AOA和HT处理的均与对照差异不显著(图2-B)。低温下黄瓜幼苗的冷害指数变化趋势与EL相同, 即胁迫时间越长, 冷害指数越大, NaHS处理的始终低于对照, AOA和HT处理的略高于对照或与对照差异不显著(图2-C)。说明叶面喷施1 mmol·L<sup>-1</sup> NaHS可显著提高黄瓜幼苗耐冷性, AOA和HT可抵消NaHS对黄瓜耐冷性的诱导。

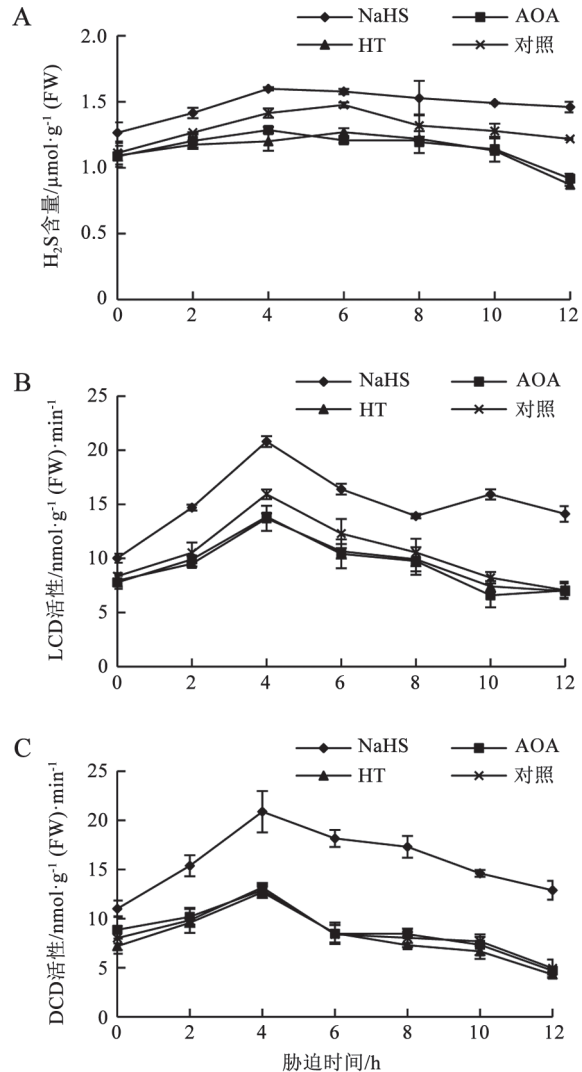


图1 叶面喷施NaHS对低温下黄瓜幼苗H<sub>2</sub>S含量及L/DCD活性的影响

Fig.1 Effect of foliar spray with NaHS on H<sub>2</sub>S content and L/DCD activities in cucumber seedlings under chilling stress. Different lowercase letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ),下同。

### 2.3 叶面喷施NaHS对低温下黄瓜幼苗光合作用的影响

#### 2.3.1 对气体交换参数的影响

图3-A表明, 各处理黄瓜幼苗的 $P_n$ 均随着低温胁迫时间的延长而降低, 但NaHS处理的降低幅度小于对照, 而AOA和HT处理的降低幅度大于对照。胁迫结束时, NaHS的 $P_n$ 比对照高34.1%, 而AOA和HT处理的分别比对照低25.0%和27.3%。 $G_s$ 和 $T_r$ 的变化趋势与 $P_n$ 相似, 但NaHS处理的 $G_s$ 和 $T_r$



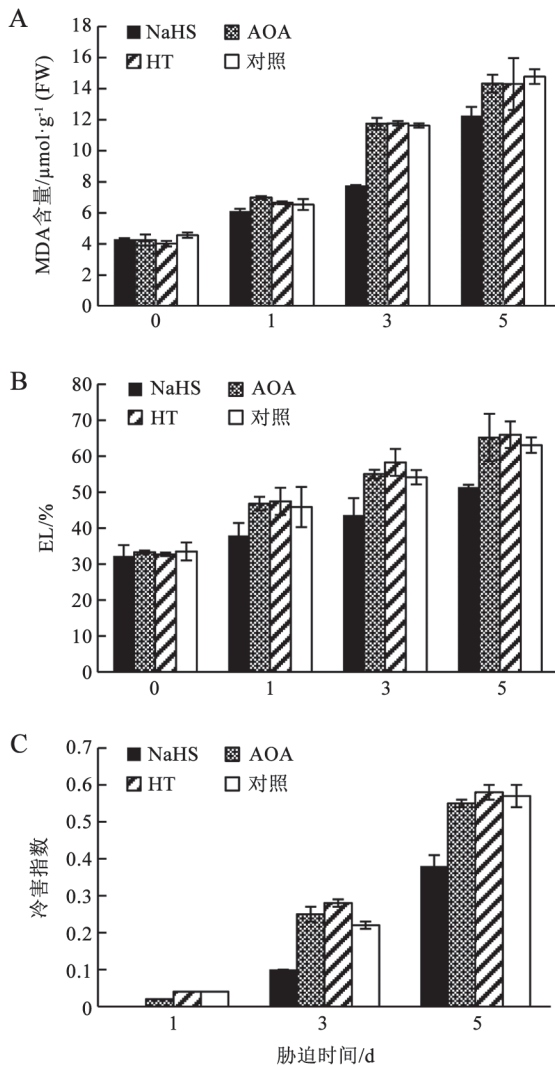


图2 叶面喷施NaHS对低温下黄瓜幼苗MDA含量、EL和冷害指数的影响

Fig.2 Effect of foliar spray with NaHS on the MDA content, EL and chilling injury index of cucumber seedlings under chilling stress

明显高于对照, 而AOA和HT处理的多与对照差异不显著(图3-B和D)。C<sub>i</sub>的变化趋势与P<sub>n</sub>相反, NaHS处理的明显低于对照, AOA和HT处理的多与对照差异不大(图3-C)。可见, 低温胁迫下黄瓜幼苗P<sub>n</sub>降低的主要原因是非气孔限制, 叶面喷施NaHS可以缓解低温对黄瓜幼苗光合作用的影响。

### 2.3.2 对叶绿素荧光参数的影响

图4-A显示, 在600  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光下黄瓜幼苗的 $\Phi_{\text{PSII}}$ 随着低温胁迫时间的延长而降低, NaHS处理的降低幅度显著小于对照, 而AOA和HT处理的

降低幅度明显大于对照。低温胁迫1 d时, 对照、AOA和HT处理的 $F_v/F_m$ 显著降低, 而NaHS处理的变化不大; 之后各处理的 $F_v/F_m$ 均逐渐减低, 降低幅度仍以NaHS处理的最小, AOA和HT处理的最大。胁迫5 d时, NaHS处理的 $F_v/F_m$ 比对照高74.9%, 而AOA和HT处理的分别比对照低5.7%和19.1% (图4-B)。低温下各处理的 $F_0$ 趋于升高, NaHS处理的始终低于对照, 而AOA和HT处理的略高于对照或与对照差异不显著(图4-C)。可见, 8°C/5°C低温胁迫会使黄瓜幼苗的PSII反应中心受到明显伤害, 而外源NaHS可缓解低温光抑制, 从而增强黄瓜的光合能力, 提高光能利用效率。

### 2.3.3 对光合关键酶活性的影响

图5-A和B分别是低温胁迫前和胁迫后3 d测定的黄瓜幼苗叶片RuBPCase和FBPase活性。从中可以看出, 胁迫前处理间差异不显著; 胁迫后NaHS处理的RuBPCase活性降低幅度显著小于对照, 而AOA和HT的降低幅度明显大于对照。低温下FBPase活性与RuBPCase的变化规律基本一致, 胁迫3 d时, NaHS处理的FBPase活性比对照高5.7%, 而AOA和HT处理的分别比对照低7.7%和8.6%。

## 2.4 叶面喷施NaHS对低温下黄瓜幼苗抗氧化系统的影响

### 2.4.1 对抗氧化酶活性的影响

低温胁迫初期, 黄瓜幼苗叶片的SOD活性急剧升高, 3 d后快速降低(图6-A)。与对照相比, NaHS处理的SOD活性较高, 而AOA和HT处理的变化不大。低温下黄瓜幼苗的POD活性逐渐升高(图6-B), 升高幅度以NaHS处理的较大, AOA和HT处理的与对照差异不显著。低温胁迫初期, CAT活性快速升高, 但1 d后趋于下降, 胁迫结束时, NaHS处理的CAT活性比对照高18.5%, 而AOA和HT处理的与对照差异不明显(图6-C)。低温下APX和GR活性也呈先上升后下降趋势(图6-D和E), 胁迫结束时, NaHS处理的APX和GR活性分别比对照高48.6%和43.5%, AOA和HT处理的与对照差异不显著。

### 2.4.2 对GSH和AsA含量的影响

从图7-A看出, 低温胁迫1 d时, 黄瓜幼苗叶片的GSH含量大幅度升高, 之后逐渐降低, NaHS处理的始终高于对照。胁迫结束时, NaHS处理的GSH含量比对照高68.0%, 而AOA和HT处理的与对照

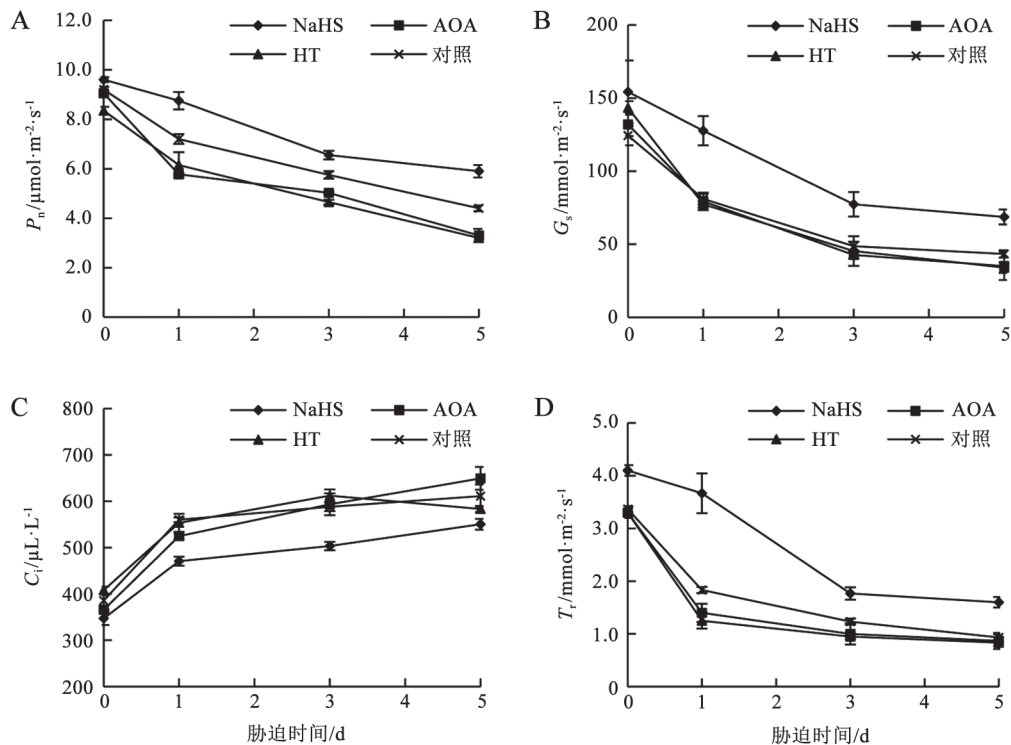


图3 叶面喷施NaHS对低温下黄瓜幼苗气体交换参数的影响

Fig.3 Effect of foliar spray with NaHS on gas exchange parameters in cucumber seedlings under chilling stress

差异不显著。低温胁迫初期, 黄瓜幼苗叶片的AsA含量也逐渐升高, 但3 d后快速下降; NaHS处理的明显高于对照, 而AOA和HT处理的与对照差异不大(图7-B)。可见, 外源H<sub>2</sub>S可通过增强抗氧化系统活性清除活性氧, 从而缓解低温胁迫引起的膜脂过氧化伤害。

### 3 讨论

植物体内的H<sub>2</sub>S主要通过以下3条途径产生: 一是L/DCD催化半胱氨酸(Cys)降解生成H<sub>2</sub>S、丙酮酸盐和NH<sub>3</sub>; 二是在亚硫酸盐还原酶的作用下将SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>直接还原成H<sub>2</sub>S; 三是通过叶片吸收大气中的H<sub>2</sub>S (Papenbrock等2007), 其中L/DCD途径是植物内源H<sub>2</sub>S形成的主要途径。本试验结果表明, 低温胁迫初期, 黄瓜幼苗叶片的H<sub>2</sub>S和L/DCD活性均快速升高, 4或6 h之后趋于下降, 表明H<sub>2</sub>S受低温胁迫诱导。NaHS在动植物中可作为H<sub>2</sub>S的供体(Wang 2012), 段冰冰和陆巍(2014)用不同的含硫化合物处理水稻, 发现只有NaHS处理能减轻水稻光抑制, 确定是H<sub>2</sub>S而不是硫营养发挥作用。在本试验中,

叶面喷施不同浓度的NaHS均可提高黄瓜幼苗耐冷性, 但以1.0 mmol·L<sup>-1</sup>预处理的效果最好(数据未列), 因此, 用1.0 mmol·L<sup>-1</sup> NaHS作为H<sub>2</sub>S供体。为了排除NaHS其他产物(Na<sup>+</sup>等)的影响, 分别用0.8 mmol·L<sup>-1</sup> AOA和0.15 mmol·L<sup>-1</sup> HT预处理黄瓜幼苗, 结果表明, 叶面喷施NaHS可使黄瓜叶片的H<sub>2</sub>S含量和L/DCD活性明显升高(图1), MDA含量和EL显著降低(图2-A和B), 但用AOA和HT预处理后, H<sub>2</sub>S含量、L/DCD活性、EL和MDA含量多与对照差异不显著, 表明NaHS诱导黄瓜耐冷性是H<sub>2</sub>S发挥作用, 这与段冰冰和陆巍(2014)研究结果一致, 并进一步证实了L/DCD途径是黄瓜内源H<sub>2</sub>S形成的主要途径。

H<sub>2</sub>S调节植物光合作用已有少量相关报道, Chen等(2011)发现, H<sub>2</sub>S能增加菠菜叶绿素含量, 改变叶绿体结构, 提高羧化效率和PSII光化学效率, 增强RuBP羧化酶活性及其大、小亚基基因表达, 降低光呼吸和暗呼吸。因此认为H<sub>2</sub>S通过调节Ru-bisco活性与基因表达及巯基化合物的氧化还原修饰增强光合作用。植物的光合作用与活性氧代谢

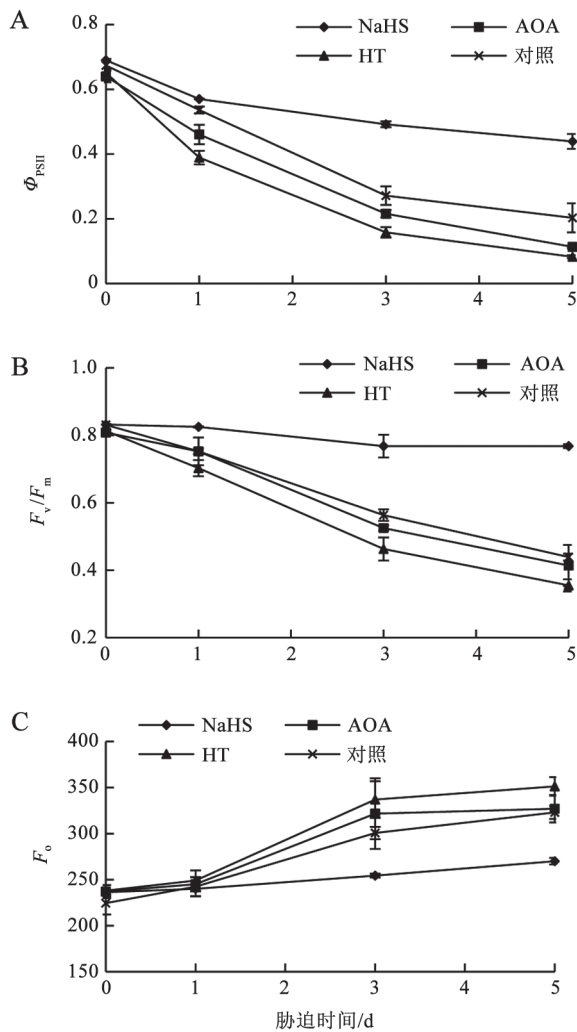


图4 叶面喷施NaHS对低温下黄瓜幼苗叶绿素荧光参数的影响

Fig.4 Effect of foliar spray with NaHS on chlorophyll fluorescence parameters in cucumber seedlings under chilling stress

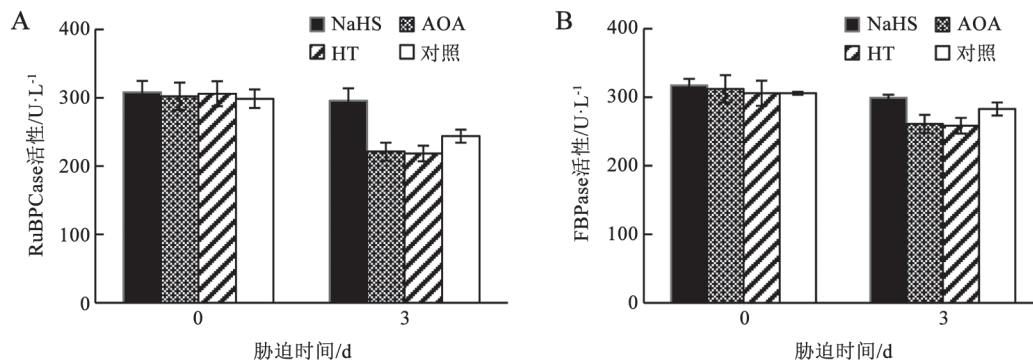


图5 叶面喷施NaHS对低温下黄瓜幼苗RuBPCase和FBPase活性的影响

Fig.5 Effect of foliar spray with NaHS on the RuBPCase and FBPase activities in cucumber seedlings under chilling stress

是受温度影响最明显的生理过程, 低温胁迫可使光系统反应中心对光能的利用效率降低, 从而引起 $P_n$ 下降,  $CO_2$ 同化受阻, 电子传递链被过度还原, 因而即使是在弱光下也会产生过剩的光能, 对光系统造成伤害。本研究结果表明, 与对照相比, 低温下NaHS预处理黄瓜幼苗叶片的 $P_n$ 、RuBPCase和FBPase活性及 $F_v/F_m$ 较高, 而 $F_o$ 较低, 说明NaHS提高了低温下黄瓜幼苗叶片的光能转换效率, 减轻了黄瓜幼苗低温光抑制, 这可能是 $H_2S$ 增强黄瓜耐冷性的重要机制。

植物在正常生长条件下, 代谢过程也会产生活性氧, 但由于存在有效的抗氧化系统, 这些活性氧会被及时清除, 不会破坏光合机构(段冰冰和陆巍2014); 而逆境胁迫(强光、低温、盐、重金属等)下, 抗氧化系统受到影响, 可能导致活性氧( $O_2^-$ 和 $H_2O_2$ 等)积累(Foyer等1994)。关蕾等(2013)研究发现,  $200 \mu mol \cdot L^{-1}$ 的 $H_2S$ 可显著促进铁皮石斛POD、SOD和CAT活性, 降低MDA含量, 从而缓解强光胁迫对铁皮石斛造成的过氧化损伤。Komyyev等(2001)结果表明, 棉花叶片中过量表达叶绿体抗氧化酶SOD、GR、APX基因, 能够提高其对光能的利用, 并维持较高的电子传递速率, 从而减轻冷诱导产生的光系统II光抑制。最近我们发现, 低温胁迫下外源 $H_2S$ 处理的黄瓜幼苗可通过启动抗氧化系统清除过多的活性氧, 缓解低温对细胞的过氧化伤害(Wu等2016; 周超凡等2016)。本试验结果显示, 低温下黄瓜幼苗叶片的MDA含量明显增加, 说明黄瓜体内的自由基和活性氧大量积累。与对照相比, NaHS预处理的MDA含量明显较

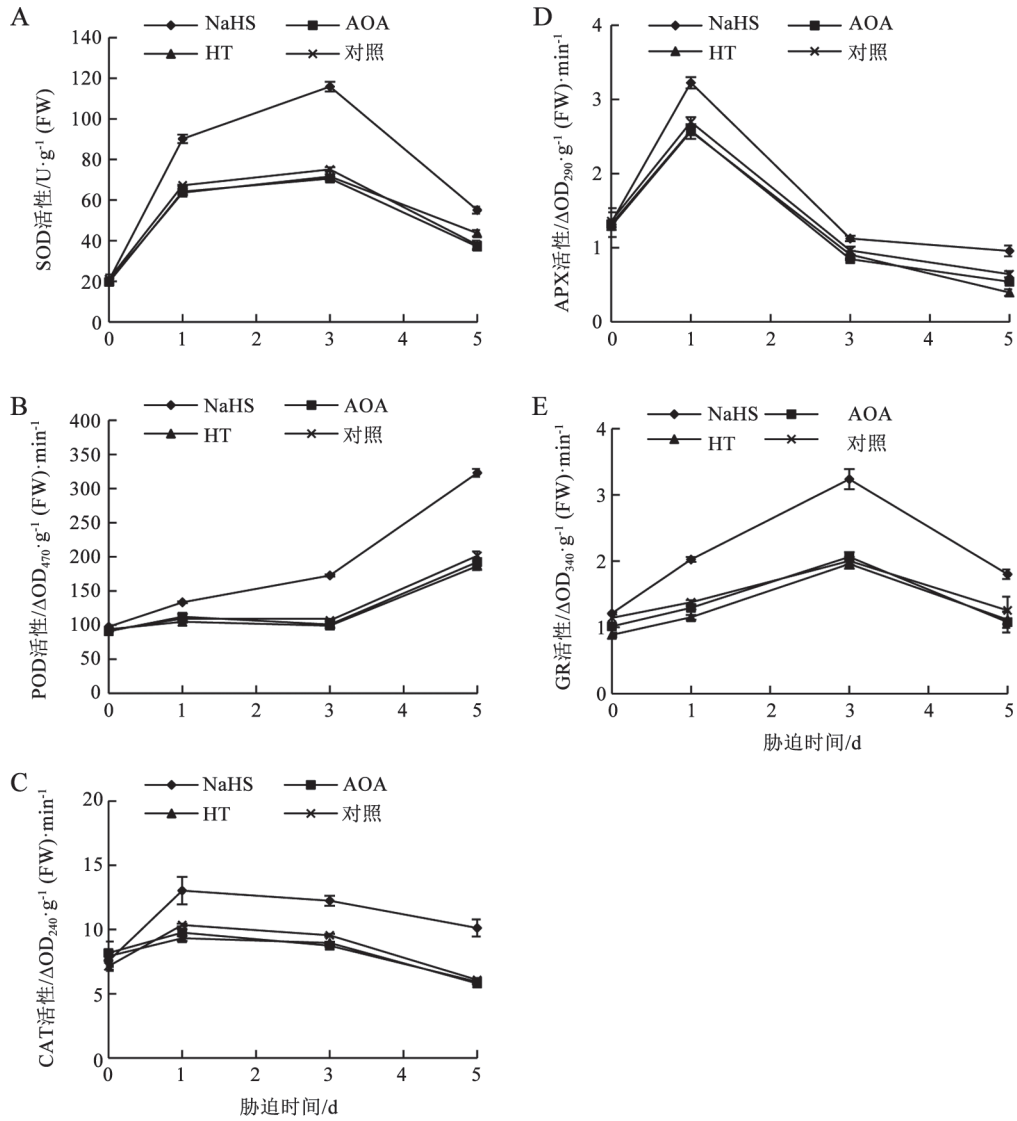


图6 叶面喷施NaHS对低温下黄瓜幼苗抗氧化酶活性的影响

Fig.6 Effect of foliar spray with NaHS on antioxidant enzyme activities in cucumber seedlings under chilling stress

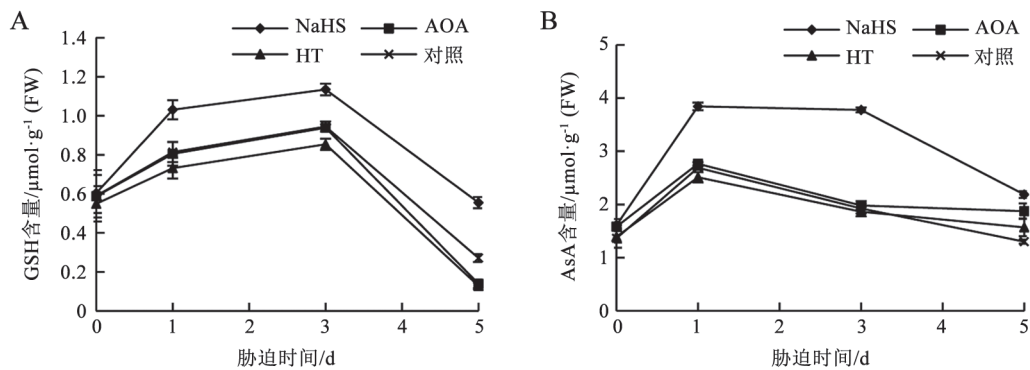


图7 叶面喷施NaHS对低温下黄瓜幼苗AsA和GSH含量的影响

Fig.7 Effect of foliar spray with NaHS on GSH and AsA contents in cucumber seedlings under chilling stress



低, SOD、POD、CAT、APX、GR活性显著升高, 说明外源H<sub>2</sub>S减少了低温下过剩激发能的积累, 增强了植物细胞对活性氧的清除能力, 从而减轻了光合机构的氧化损伤。

### 参考文献(References)

- Bi HG, Dong XB, Wang ML, et al (2015). Foliar spray calcium and salicylic acid improve the activities and gene expression of photosynthetic enzymes in cucumber seedlings under low light intensity and suboptimal temperature. *Acta Hort Sin*, 42 (1): 56–64 (in Chinese with English abstract) [毕焕改, 董绪兵, 王美玲等(2015). 钙和水杨酸对亚适温弱光下黄瓜幼苗光合酶活性和基因表达的影响. *园艺学报*, 42 (1): 56–64]
- Chance B, Maehly AC (1995). Assay of catalase and peroxidase. *Methods Enzymol*, 2: 764–775
- Chen J, Wu F, Wang W, et al (2011). Hydrogen sulphide enhances photosynthesis through promoting chloroplast biogenesis, photosynthetic enzyme expression, and thiol redox modification in *Spinacia oleracea* seedlings. *J Exp Bot*, 62 (13): 4481–4493
- Demmig-Adams B, Adams WW (1996). Xanthophyll cycle and light stress in nature: uniform response to excess direct sunlight among higher plant species. *Planta*, 198: 460–470
- Duan BB, Lu W (2014). Hydrogen sulfide alleviates rice photoinhibition by promoting the activity of photosystem II in strong light stress. *Plant Physiol J*, 50 (7): 1019–1026 (in Chinese with English abstract) [段冰冰, 陆巍(2014). 强光下硫化氢通过促进光系统II的活性来缓解水稻的光抑制. *植物生理学报*, 50 (7): 1019–1026]
- Foyer CH, Halliwell B (1976). The presence of glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 133: 21–25
- Foyer CH, Lelandais M, Kunert KJ (1994). Photooxidative stress in plants. *Physiol Plant*, 92 (4): 696–717
- Guan L, Fan HH, Chen SS, et al (2013). Effects of sodium hydrosulfide on DNA methylation and antioxidant system of *Dendrobium officinale* under high light stress. *Nuclear Agric Sci*, 27 (8): 1090–1098 (in Chinese with English abstract) [关蕾, 樊洪泓, 陈沙沙等(2013). 强光下H<sub>2</sub>S对石斛DNA甲基化及抗氧化系统的影响. *核农学报*, 27 (8): 1090–1098]
- Guo HM, Xiao TY, Xie YJ (2016). The physiological function and molecular mechanism of signaling molecule hydrogen sulfide in plants. *Chin J Biochem Mol Biol*, 32 (5): 488–495 (in Chinese with English abstract) [郭鸿鸣, 肖天宇, 谢彦杰(2016). 气体信号分子硫化氢在植物中的生理功能及作用机制. *中国生物化学与分子生物学报*, 32 (5): 488–495]
- Hou ZH, Che YM, Wang LX, et al (2012). H<sub>2</sub>S functions downstream of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in mediating ethylene-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol J*, 48 (12): 1193–1199 (in Chinese with English abstract) [侯智慧, 车永梅, 王兰香等(2012). H<sub>2</sub>S位于H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>下游参与乙烯诱导拟南芥气孔关闭过程. *植物生理学报*, 48 (12): 1193–1199]
- Jia H, Hu Y, Fan T, et al (2015). Hydrogen sulfide modulates actin-dependent auxin transport via regulating ABPs results in changing of root development in *Arabidopsis*. *Sci Rep*, 5: 8251
- Jin Z, Shen J, Qiao Z, et al (2011). Hydrogen sulfide improves drought resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Biophys Res*, 414: 481–486
- Kornyejev D, Logan BA, Payton P, et al (2001). Enhanced photochemical light utilization and decreased chilling-induced photoinhibition of photosystem II in cotton overexpressing genes encoding chloroplast-targeted antioxidant enzymes. *Physiol Plant*, 113: 323–331
- Lai D, Mao Y, Zhou H, et al (2014). Endogenous hydrogen sulfide enhances salt tolerance by coupling the reestablishment of redox homeostasis and preventing salt-induced K<sup>+</sup> loss in seedlings of *Medicago sativa*. *Plant Sci*, 225: 117–129
- Li Z, Gong M, Xie HG, et al (2012). Hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide-induced heat tolerance in tobacco (*Nicotiana tabacum* L) suspension cultured cells and involvement of Ca<sup>2+</sup> and calmodulin. *Plant Sci*, 185–186: 185–189
- Luo Z, Li D, Du R, et al (2015). Hydrogen sulfide alleviates chilling injury of banana fruit by enhanced antioxidant system and proline content. *Sci Hortic*, 183: 144–151
- Min X, Zhou ZH, Li ZG (2016). The metabolism of signal molecule hydrogen sulfide and its role in the acquisition of heat tolerance in plants. *Plant Physiol J*, 52 (1): 37–46 (in Chinese with English abstract) [闵雄, 周志豪, 李忠光(2016). 信号分子硫化氢的代谢及其在植物耐热性形成中的作用. *植物生理学报*, 52 (1): 37–46]
- Papenbrock J, Riemenschneider A, Kamp A, et al (2007). Characterization of cysteine-degrading and H<sub>2</sub>S-releasing enzymes of higher plants—from the field to the test tube and back. *Plant Biol*, 9: 582–588
- Pei YX (2016). Gasotransmitter hydrogen sulfide in plants: stinking to high heaven, but refreshing to fine life. *Chin J Biochem Mol Biol*, 32 (7): 721–733 (in Chinese with English abstract) [裴雁曦(2016). 植物中的气体信号分子硫化氢: 无香而立, 其臭如兰. *中国生物化学与分子生物学报*, 32 (7): 721–733]
- Rao IM, Terry N (1989). Leaf phosphate status, photosynthesis, and carbon partitioning in sugar beet. I. Changes in growth, gas exchange, and Calvin cycle enzymes. *Plant Physiol*, 90: 814–819
- Riemenschneider A, Nikiforova V, Hoefgen R, et al (2005). Impact of elevated H<sub>2</sub>S 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, et al (1982). Emission of hydrogen sulfide by leaf tissue in response to L-cysteine. *Plant Physiol*, 70 (2): 430–436
- Shen Y, Wang W, Zhang W, et al (2015). Hydrogen sulfide facilitating enhancement of antioxidant ability and maintenance of fruit quality of kiwifruits during low-temperature storage. *Trans Chin Soc Agric Eng*, 31: 367–372
- Shi H, Ye T, Chan Z (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
- Wang LJ, Huang WD, Li JY, et al (2004). Peroxidation of membrane lipid and Ca<sup>2+</sup> homeostasis in grape mesophyll cells during the process of cross-adaptation to temperature stresses. *Plant Sci*, 167: 71–77
- Wang R (2012). Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiol Rev*, 92: 791–896
- Wu G, Cai B, Zhou C, et al (2016). Hydrogen sulfide-induced chilling tolerance of cucumber and involvement of nitric oxide. *J Plant Biol Res*, 5 (3): 58–69
- Yu XH, Xing YX, Ma H, et al (1998). Effect of different rootstocks and scions on chilling tolerance in grafted cucumber seedlings. *Sci Agric Sin*, 31 (2): 36–40 (in Chinese with English abstract) [于贤昌, 邢禹贤, 马红等(1998). 不同砧木与接穗对黄瓜嫁接苗抗冷性的影响. *中国农业科学*, 31 (2): 36–40]
- Zhao SJ, Cang J (2015). *Experimental Instruct of Plant Physiology*. Beijing: Agricultural Technology Press of China, 225–226, 233–236, 243–244 [赵世杰, 苍晶(2015). *植物生理学实验指导*. 北京: 中国农业出版社]
- Zhou CF, Wu GX, Li T, et al (2016). Effect of exogenous hydrogen sulfide on photosynthesis and antioxidant system of cucumber leaves under low temperature in solar-greenhouse. *Acta Horti Sin*, 43 (3): 462–472 (in Chinese with English abstract) [周超凡, 吴帼秀, 李婷等(2016). 外源H<sub>2</sub>S对低温下日光温室黄瓜光合作用及抗氧化系统的影响. *园艺学报*, 43 (3): 462–472]

## Hydrogen sulfide promotes chilling tolerance of cucumber seedlings by alleviating low-temperature photoinhibition

ZHOU Chao-Fan<sup>1</sup>, WU Chun-Tao<sup>2</sup>, LI Dan-Dan<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-Wei<sup>1</sup>, BI Huan-Gai<sup>1</sup>, AI Xi-Zhen<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University/State Key Laboratory of Crop Biology/Key Laboratory of Horticultural Crop Biology and Germplasm Innovation in Huanghuai Region of Agriculture Ministry/Collaborative Innovation Center of Shandong Province with High Quality and Efficient Production of Fruit and Vegetable, Taian, Shandong 271018, China

<sup>2</sup>College of Biological and Ecological Engineering, Dongying Vocational Institute, Dongying, Shandong 257091, China

**Abstract:** We investigated the response of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) to chilling stress in ‘Jinyou 3’ cucumber (*Cucumis sativus*) seedlings. Simultaneously, we researched the effect of foliar spray with sodium hydrosulfide (NaHS, the donor of H<sub>2</sub>S), aminoxy acetic acid (AOA, H<sub>2</sub>S inhibitor) and hypotaurine (HT, H<sub>2</sub>S scavenger) on the photosynthesis and antioxidant system in cucumber seedlings, using deionized water-treated seedlings as the control. We found that the H<sub>2</sub>S content and L-/D-cysteine desulhydrase (L/DCD) activities increased during the first 4 or 6 h of chilling stress, but subsequently decreased. We also noticed that the malondialdehyde (MDA) content, electrolyte leakage (EL) and chilling injury index increased with chilling stress days. NaHS-treated seedlings decreased MDA content, EL and chilling injury index under chilling stress. However, there were no significant differences in the above parameters among the seedlings treated with AOA, HT and the control. Chilling stress led to a decrease in net photosynthetic rate ( $P_n$ ), stomatal conductance ( $G_s$ ), transpiration rate ( $T_r$ ), actual photochemical efficiency of PSII ( $\Phi_{PSII}$ ) and maximum photochemical efficiency of PSII in darkness ( $F_v/F_m$ ), while an increase in intercellular CO<sub>2</sub> concentration ( $C_i$ ) and initial fluorescence ( $F_o$ ). Chilling stress also caused a decrease in activities of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (RuBPCase) and fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase). NaHS-treated seedlings showed higher  $P_n$ ,  $G_s$ ,  $T_r$ ,  $\Phi_{PSII}$ ,  $F_v/F_m$  and activities of RuBPCase and FBPase, whereas lower  $C_i$  and  $F_o$  compared with the control under chilling stress. No significant differences were found in the gas exchange, activities of photosynthetic enzymes and fluorescence parameters between AOA or HT treatment and the control. The peroxidase (POD) activity in cucumber seedlings increased gradually during chilling stress days. The activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and glutathione reductase (GR), as well as the contents of reduced glutathione (GSH) and ascorbic acid (AsA) increased in the early days of chilling stress, but subsequently decreased. Compared with the control, NaHS-treated seedlings revealed a significant increase in activities of SOD, POD, CAT, APX and GR, and the contents of GSH and AsA. However, there were no significant differences in them among treatments of AOA, HT and the control. These data suggest that H<sub>2</sub>S is induced by chilling stress, and exogenous H<sub>2</sub>S alleviates photoinhibition and stimulates the chilling tolerance in cucumber seedlings.

**Key words:** hydrogen sulfide; chilling stress; photoinhibition; reactive oxygen; photosynthesis; cucumber

Received 2017-11-10 Accepted 2018-03-02

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31572170), Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2015CM005), the Special Fund of Modern Agriculture Industrial Technology System of Shandong Province in China (SDAIT-05-10), and the Funds of Shandong “Double Tops” Program (SYL2017YSTD06).

\*Corresponding author (axz@sdau.edu.cn).