

研究报告 Original Papers

外源亚精胺处理对自毒作用下黄瓜胚根生理生化特性的影响

孙莎莎, 韩亚萍, 闫燕燕, 巩彪, 史庆华*

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, 山东泰安271018

摘要: 为了探明外源亚精胺(spermidine, Spd)对黄瓜自毒作用的缓解机制, 以‘津研四号’黄瓜(*Cucumis sativus*)为试材, 分别用0、10、25、50、75、100、125 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的Spd溶液进行预处理, 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对羟基苯甲酸(*p*-hydroxybenzoic acid, PHBA)溶液对黄瓜种子模拟自毒作用。试验结果表明: 用10、25、50、75、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的Spd预处理黄瓜种子, 均能不同程度缓解PHBA胁迫对胚根生长的抑制作用, 其中50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的Spd缓解效果最好。50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的Spd显著缓解了PHBA胁迫对黄瓜种子中淀粉酶以及胚根中抗氧化酶和氮代谢酶活性的抑制作用, 降低了胚根中 O_2^- 的产生速率、 H_2O_2 及丙二醛(malondialdehyde, MDA)的含量, 提高胚根细胞存活率。说明外源Spd可能是通过降低氧化胁迫和促进淀粉的分解转化降低自毒物质对黄瓜发芽过程中造成的胁迫。研究结果为缓解自毒作用造成的蔬菜连作障碍提供了新的方法, 同时为Spd缓解PHBA胁迫方面提供了一定的理论基础。

关键词: 黄瓜; 自毒作用; PHBA; Spd; 缓解作用

黄瓜(*Cucumis sativus*)是我国人民喜爱的蔬菜作物之一, 也是蔬菜生产中主要的栽培种类(毕焕改等2017)。但由于有效耕地面积的限制和市场对黄瓜周年需求的矛盾, 导致黄瓜连作现象普遍, 连作障碍发生严重, 其产量已经受到严重影响。连作障碍是农业生产中的一种普遍现象, 已成为制约蔬菜生产可持续发展的重要因素。研究表明, 连作障碍的发生主要同根系分泌物引起的自毒作用(autotoxicity)等因素有关(邱立友等2010)。

自毒作用是化感作用的一种特殊作用方式, 又称自身化感作用, 是植物通过淋溶、残体分解、根系分泌向环境中释放化学物质, 而对自身产生的直接或间接的毒害作用。研究表明, 自毒物质主要是酚酸类化合物, 包括苯丙烯酸、对羟基苯甲酸、肉桂酸、苯甲酸等, 当酚酸类物质积累到一定量时, 就会对植物产生毒害作用, 抑制根系生长, 影响养分吸收, 导致植物产生连作障碍(Yu 1999)。酚酸物质还会破坏植物细胞膜的完整性和渗透性、抑制抗氧化酶的活性、干扰生长素类物质的合成、抑制根茎的伸长, 并影响植物对营养物质的吸收和利用(Bu等2016; Bu等2017)。黄瓜根系分泌物中的自毒物质主要是对羟基苯甲酸(*p*-hydroxybenzoic acid, PHBA)等酚酸类物质, 这些物质积累过多可造成黄瓜连作障碍, 抑制黄瓜生

长。研究表明, PHBA显著抑制种子萌发(Lim等2002)和根系生长(孙莎莎等2016)。

多胺是生物代谢过程中产生的一类具有强烈生理活性的多聚脂肪族含氮碱, 包括腐胺(Putrescine, Put)、亚精胺(Spermidine, Spd)和精胺(Spermine, Spm)。多胺与植物逆境胁迫响应密切相关, 对植物逆境抗性具有调节作用, 其中Spd对非生物胁迫的响应较为显著。Paul等(2017)研究表明, 用Spd可预处理水稻(*Oryza sativa*)幼苗能显著缓解由盐胁迫造成的氧化伤害, 提高耐盐性。外源添加Spd提高冷害胁迫下植物的抗氧化酶活性, 并显著降低丙二醛(malondialdehyde, MDA)和过氧化氢(H_2O_2)含量, 提高植物的抗冷性(Wang等2018)。潘明洪等(2014)用Spd浸泡白三叶(*Trifolium repens*)种子, 发现渗透胁迫下淀粉酶活性显著提高, 加速了淀粉水解成还原糖和葡萄糖进程, 为胁迫下种子萌发和苗期生长提供能量。外源添加Spd能有效地提高作物对高温(Zhou等2016)和低温(Diao等2015)的抗性, 缓解温度胁迫对植物造成的伤害。蛋白质组学分析揭示了外源Spd通过调控与干旱相关蛋白的表达, 提高了白三叶对干旱胁迫的抗性(Li等2016)。

收稿 2019-08-26 修定 2019-10-10

资助 山东省现代农业产业技术体系项目(SDAIT-05-05)。

* 通讯作者(qhshi@sdau.edu.cn)。

多胺缓解逆境胁迫下蔬菜作物伤害的功效及作用机理已有许多报道,但是有关外源Spd缓解自毒作用的研究报道较少。本试验以黄瓜为试材,研究 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的PHBA胁迫下外源Spd对黄瓜胚根发育及体内相关酶活性的影响,探讨Spd对黄瓜自毒作用的缓解效应及生理机制,拟为Spd在缓解黄瓜连作障碍中的应用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料与试验设计

试验于山东农业大学园艺实验室进行。供试黄瓜(*Cucumis sativus* L.)品种为‘津研4号’。

Spd缓解PHBA胁迫浓度筛选:取黄瓜种子,用质量分数为5%的次氯酸钠溶液消毒2 min,清水冲洗5遍。试验设置为对照组(清水处理,CK)和处理组(用 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的PHBA处理),处理组的7个(T1~T7) Spd浓度分别为0、10、25、50、75、100、 $125\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在 28°C 恒温水浴锅中浸种8 h, 28°C 生化培养箱中暗处催芽16 h;用 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的PHBA处理,挑选整齐一致的露白种子放置于直径9 cm的培养皿中,每盘20粒种子,种子下铺2层滤纸,种子上铺1层,往铺好滤纸的培养皿中加入5 mL PHBA溶液(摆好种子前加3 mL,摆好后再加2 mL);放置在 28°C 生化培养箱中暗处理,72 h后取样测定相关指标;每个处理重复3次。

Spd缓解PHBA胁迫试验设计:取黄瓜种子,用质量分数为5%的次氯酸钠溶液消毒2 min,清水冲洗5遍。分别用0和 $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的Spd进行预处理24 h(具体方法同上)后,挑选整齐一致的露白种子用 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的PHBA进行处理。试验设置对照CK(清水处理)、 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PHBA、 $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Spd、 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PHBA+ $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Spd四个处理。 28°C 生化培养箱中暗处理,72 h后取样;每个处理重复3次。

1.2 测定方法

1.2.1 生长指标测定

随机选取黄瓜幼苗,用直尺测量胚根的主根长及侧根长($>0.1\text{ cm}$),统计侧根条数,每100株植株称量鲜重,每组数据重复3次。

1.2.2 淀粉酶活性测定

淀粉酶活性测定采用3,5-二硝基水杨酸法(赵

世杰等1998),先测定总淀粉酶活性,然后在 70°C 下加热15 min,钝化 β -淀粉酶,测定 α -淀粉酶活性。总淀粉酶活性与 α -淀粉酶活性之差即为 β -淀粉酶活性。酶活性用单位重量样品在一定时间内生成的麦芽糖的量表示,单位为 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})\cdot\text{min}^{-1}$ 。

1.2.3 氮代谢酶活性测定

硝酸还原酶(nitrate reductase, NR)活性测定参考赵世杰等(1998)的方法,利用NR将 NO_3^- 还原成的 NO_2^- 与磺胺反应形成重氮盐,再与 α -萘胺偶联形成紫色物质,于540 nm处测定吸光度。

谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)活性测定参考Häusler等(1994)方法。根据GS催化谷氨酸形成谷氨酰胺,进而转化为 γ -谷氨酰基异羟肟酸,在酸性条件下与铁形成的红色络合物在540 nm下有最大吸收峰,用络合物的生成量来表示GS活性。

参照Groat和Vance (1982)的方法测定谷氨酸合成酶(glutamate synthase, GOGAT)活性。反应体系为:0.05 mL $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ α -同戊二酸、0.1 mL $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl、0.2 mL $3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NADH和0.5 mL 酶液,用0.4 mL $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ L-谷氨酰胺启动反应,于340 nm下测定吸光度。

1.2.4 台盼蓝染色

台盼蓝染色参照Bowling等(1997)的方法并作修改。以蒸馏水配 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的台盼蓝染料,将处理72 h的幼苗放入染料中并震荡15 min,自来水冲洗至不褪色,选取植株进行全株拍照。

1.2.5 活性氧(reactive oxygen species, ROS)与MDA含量测定

O_2^- 生成速率测定参照Patterson等(1984)的方法,利用 O_2^- 能与羟胺反应,生成的 NO_2^- 与氨基苯磺酸和 α -萘胺反应变成粉红色的偶氮染料,该染料在530 nm波长处吸光度的大小可用来反应 O_2^- 含量。 H_2O_2 含量测定参照赵世杰等(1998)的方法,利用 H_2O_2 与硫酸钛生成的钛复合物黄色沉淀在硫酸中溶解,410 nm波长下测定吸光度。MDA含量测定采用硫代巴比妥酸法(Wang等2010),分别于600、532、450 nm下测定吸光度。

1.2.6 抗氧化酶活性测定

抗氧化酶提取液参照Mishra (2006)的方法。

取0.5 g黄瓜胚根用3 mL 50 mmol·L⁻¹的磷酸缓冲液(pH=7.8)冰浴研磨, 4°C, 12 000×g离心20 min, 上清液即为酶提取液。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性测定参照Stewart和Bewley (1980)的方法, 以抑制NBT光化学还原50%所需酶量为酶活性单位(U), 用U·mg⁻¹ (FW)表示。过氧化物酶(peroxidase, POD)活性测定参照Shah和Nahakpam (2012)的方法, 使用愈创木酚氧化法测定470 nm处吸光度的变化, 以每分钟内引起470 nm吸光度变化1的酶量为1个酶活性单位(U), 用U·mg⁻¹ (FW)表示。过氧化氢酶(catalase, CAT)活性测定参照Patra等(1978)的方法, 根据CAT分解H₂O₂使反应溶液吸光度(A₂₄₀)随反应时间而降低, 计算酶活性, 以每分钟内引起吸光度减少1的酶量为1个酶活性单位(U), 用U·mg⁻¹ (FW)表示。抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)活性测定参照Xia等(2009)的方法, 根据APX催化抗坏血酸(ascorbic acid, AsA)的形成, 测定290 nm下吸光度的降低计算酶活性, 用μmol·mg⁻¹ (FW)·min⁻¹表示。

1.3 数据统计与分析

采用Excel 2007和STST软件进行相关数据处理和显著性差异分析(P<0.05), 文中所用数据均为平均值±标准差。

2 实验结果

2.1 不同浓度Spd处理对PHBA胁迫下黄瓜幼苗胚根生长的影响

由表1可知, 10~100 μmol·L⁻¹的Spd可显著缓

解PHBA对黄瓜根系生长的抑制作用, 并且不同浓度Spd的缓解效果存在差异, 其中Spd浓度为50 μmol·L⁻¹时缓解效果最好, 此时黄瓜的主根长、侧根长、侧根数及植株鲜重较PHBA胁迫下分别增加了180.9%、348.7%、79.6%和55.4% (P<0.05) (表1)。而125 μmol·L⁻¹的Spd加重了胁迫效果。这说明50 μmol·L⁻¹的Spd能显著缓解PHBA胁迫对黄瓜幼苗生长的抑制。

2.2 Spd处理对PHBA胁迫下黄瓜幼苗子叶中淀粉酶活性的影响

由图1可知, 正常条件外施Spd对黄瓜子叶中总淀粉酶、α-淀粉酶和β-淀粉酶活性无显著影响。PHBA胁迫下总淀粉酶、α-淀粉酶和β-淀粉酶活性均显著低于对照; 外施Spd则使PHBA胁迫下黄瓜子叶中总淀粉酶、α-淀粉酶和β-淀粉酶活性分别提高了37.2%、30.0%和37.9% (P<0.05)。表明, Spd可以缓解PHBA对淀粉酶活性的抑制作用。

2.3 Spd处理对PHBA胁迫下黄瓜胚根中氮代谢酶活性的影响

由图2可知, PHBA处理显著抑制了GS、GOGAT和NR活性, 胁迫下施加Spd则使氮代谢酶活性比胁迫条件下分别提高了32.61%、55.27%和23.99% (P<0.05)。表明Spd能缓解PHBA对氮代谢酶活性的抑制作用。

2.4 Spd处理对PHBA胁迫下黄瓜胚根活性的影响

细胞损伤或死亡时, 台盼蓝可穿透变形的细胞膜, 与解体的DNA结合, 使其着色, 而活细胞能阻止染料进入细胞内, 故可通过着色程度来鉴别

表1 不同浓度外源Spd对PHBA胁迫下黄瓜幼苗生长的影响

Table 1 Effects of exogenous Spd at different concentrations on growth of cucumber seedlings under PHBA stress

处理	主根长/cm	侧根长/cm	侧根数/个	鲜重/g
CK	2.80±0.12 ^a	12.6±0.23 ^a	14.9±0.8 ^a	1.76±0.05 ^a
T1	0.42±0.08 ^e	1.60±0.22 ^f	5.4±0.9 ^d	0.99±0.05 ^d
T2	0.70±0.16 ^d	2.84±0.50 ^d	6.0±1.0 ^d	1.02±0.02 ^d
T3	0.68±0.13 ^d	3.68±0.40 ^c	7.4±1.1 ^c	1.05±0.03 ^d
T4	1.18±0.04 ^b	7.18±0.49 ^b	9.4±0.2 ^b	1.54±0.10 ^b
T5	0.98±0.08 ^c	2.32±0.42 ^e	5.8±1.3 ^d	1.13±0.06 ^c
T6	0.54±0.09 ^e	2.20±0.34 ^e	6.2±0.8 ^d	0.98±0.07 ^d
T7	0.48±0.08 ^e	0.94±0.15 ^g	3.4±0.6 ^e	0.86±0.05 ^e

CK为清水对照, T1~T7处理使用的PHBA浓度为10 mmol·L⁻¹, Spd的浓度依次为T1: 0 μmol·L⁻¹, T2: 10 μmol·L⁻¹, T3: 25 μmol·L⁻¹, T4: 50 μmol·L⁻¹, T5: 75 μmol·L⁻¹, T6: 100 μmol·L⁻¹, T7: 125 μmol·L⁻¹。不同字母表示处理间差异显著(P<0.05), 下同。

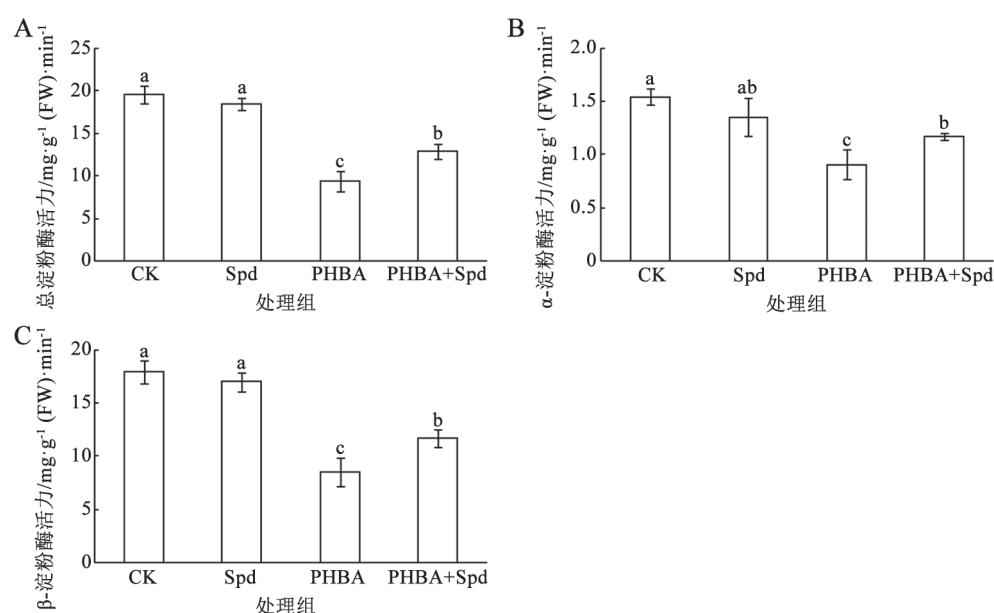


图1 Spd对PHBA胁迫下黄瓜子叶中总淀粉酶(A)、 α -淀粉酶(B)以及 β -淀粉酶(C)活性的影响

Fig.1 Effects of Spd on total amylase (A), α -amylase (B) and β -amylase (C) activities in cucumber cotyledon under PHBA stress

CK: 清水处理, Spd: $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Spd处理, PHBA: $10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PHBA处理, PHBA+Spd: $10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PHBA+ $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Spd处理。下图同此。

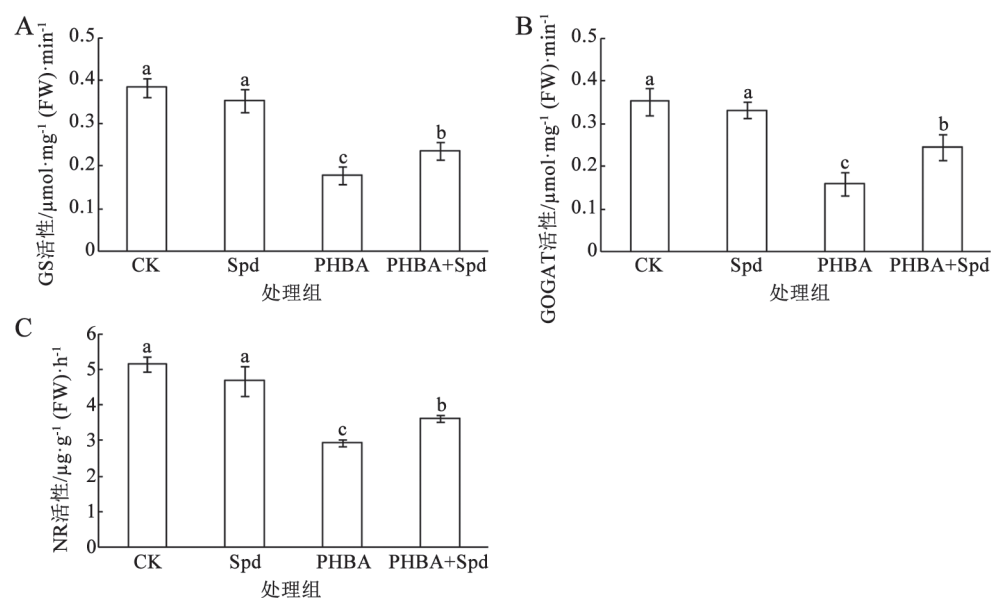


图2 Spd对PHBA胁迫下黄瓜幼苗氮代谢酶GS (A)、GOGAT (B)和NR (C)活性的影响

Fig.2 Effects of Spd on the activities of nitrogen metabolizing enzymes GS (A), GOGAT (B) and NR (C) in cucumber seedlings under PHBA stress

死细胞与活细胞。由图3可知, 处理72 h后, Spd处理根际着色程度与CK相比无显著差异; PHBA处理幼苗根系着色较重, 说明细胞死亡较多; PHBA

胁迫施加外源Spd后, 根系着色较PHBA胁迫浅, 细胞死亡数变少。由此表明, Spd能有效减少PHBA造成的细胞死亡, 提高胁迫下细胞的存活率。

2.5 Spd处理对PHBA胁迫下黄瓜胚根中抗氧化能力的影响

Spd处理下, O_2^- 产生速率和MDA含量与CK相比无明显变化(图4-A和C), H_2O_2 含量有所上升(图4-B); PHBA胁迫导致 O_2^- 产生速率、 H_2O_2 和MDA含量显著增加; 胁迫下添加Spd则显著降低了上述指标, 较PHBA胁迫分别降低了32.17%、20.65%、26.04% ($P<0.05$)。表明Spd能有效地降低胁迫引起的ROS以及MDA含量, 减少氧化伤害以及膜脂过氧化程度。

图5显示, PHBA处理降低了SOD、POD、CAT和APX抗氧化酶的活性, 而外源添加Spd则提高了胁迫下抗氧化酶的活性, 其中SOD、POD、CAT和APX活性分别提高了38.49%、33.76%、25.58%和19.48% ($P<0.05$)。表明外源Spd能够缓解PHBA对抗氧化酶的抑制作用。

3 讨论

种子发芽是植物生长发育的开始, 其过程不仅是植物向环境释放自毒物质的途径之一, 也是植物显示自毒作用的第一步。前期研究发现, PHBA对黄瓜种子发芽过程中胚根的生长具有显著的抑制作用, 主根、侧根在数量和长度上都受到影响(孙莎莎等2016)。本研究, 不同浓度的外源Spd可以有效缓解PHBA胁迫对黄瓜幼苗胚根生长的抑制作用, 这与Spd能刺激细胞增殖有关(Liu等2002)。

其中以 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Spd的缓解效果最好, 这与潘明洪等(2014)用Spd缓解渗透胁迫对白三叶种子萌发所使用的Spd浓度一致。

淀粉酶是种子萌发过程中的一种重要酶, 种子萌发和幼苗生长初期, 淀粉在淀粉酶的作用下水解为小分子的糖类物质, 为种子萌发和幼苗生长提供营养及能量。本研究中, Spd显著缓解了PHBA对黄瓜子叶中淀粉酶活性的抑制作用, 提高胁迫下淀粉酶活性。Li等(2014)研究也发现, 外源Spd通过诱导淀粉酶基因的转录水平上调, 提高胁迫下淀粉酶的活性, 促进淀粉向还原糖、果糖和葡萄糖的转化, 为生长提供能量。另有研究表明, Spd能通过提高胁迫下可溶性碳水化合物的积累, 保护氮代谢酶活性, 促进植物体内氮素的吸收与利用(Du等2017)。植物体内的NR是 NO_3^- 还原为 NH_4^+ 的关键酶, 也是氮同化的限速酶; GS和GOGAT则将植物体内的 NH_4^+ 进行同化, 这些酶在植物吸收利用氮元素的过程中具有重要的作用。张毅等(2013)研究表明, Spd通过增强GS、GOGAT以及NR活性, 提高番茄对 NH_4^+ 同化利用率, 有效缓解盐碱胁迫导致的氮代谢紊乱, 从而提高植株对逆境的适应能力。这与本试验研究结果一致: Spd通过提高氮代谢酶的活性, 提高对氮素的吸收利用, 维持胁迫下氮代谢平衡, 从而缓解PHBA胁迫对黄瓜幼苗生长的抑制作用。

植物在受到胁迫时会产生过多的ROS, 对细胞造成氧化伤害, 破坏细胞结构及活性。本研究中, 外



图3 Spd对PHBA胁迫下黄瓜胚根活性的影响

Fig.3 Effects of Spd on cucumber embryo root activity under PHBA stress

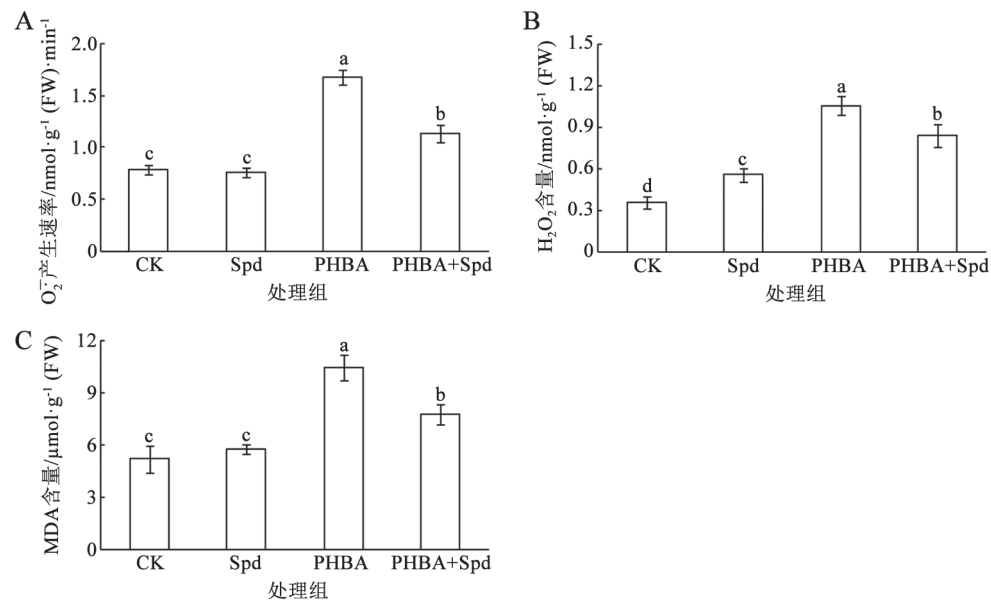


图4 Spd对PHBA胁迫下 O_2^- (A)、 H_2O_2 (B)和MDA (C)含量的影响

Fig.4 Effects of Spd on the contents of O_2^- (A), H_2O_2 (B) and MDA (C) under PHBA stress

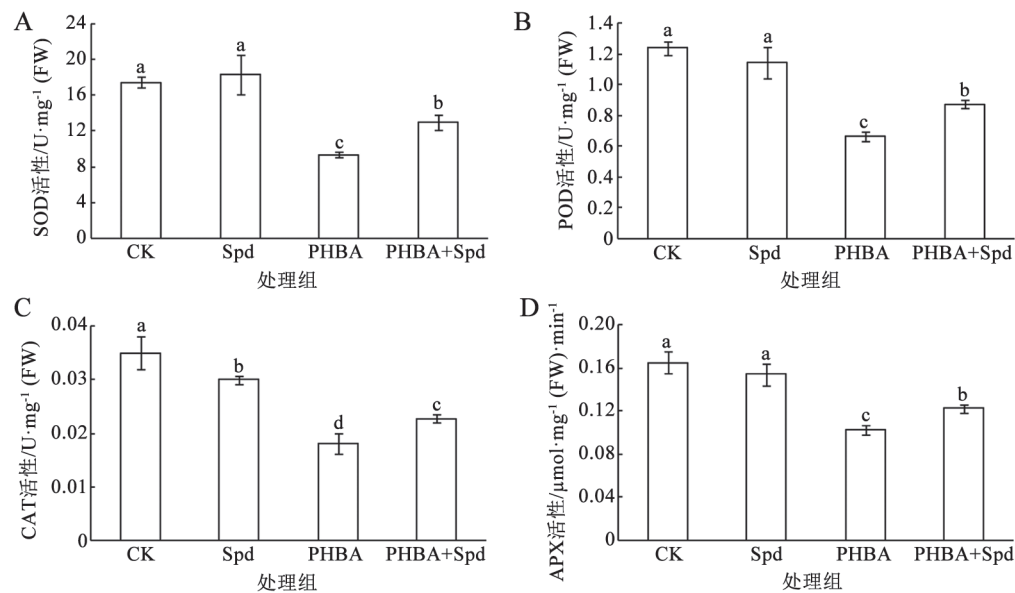


图5 Spd对PHBA胁迫下黄瓜胚根SOD (A)、POD (B)、CAT (C)和APX (D)活性的影响

Fig.5 Effects of Spd on SOD (A), POD (B), CAT (C) and APX (D) enzyme activities of cucumber embryo root under PHBA stress

源添加Spd显著降低了由PHBA引起的ROS和MDA含量的积累,降低了氧化伤害(图4),同时增强了胁迫下抗氧化酶的活性,清除胁迫产生的ROS,提高了胁迫下黄瓜幼苗的抗氧化能力(图5)。另有研究表明,Spd可以介导 H_2O_2 信号提高盐胁迫下黄瓜根系的

抗氧化能力(Wu等2018)。Spd诱导的高抗氧化酶活性一方面可能是由于多胺具有放大转录和翻译信号的作用,促进功能蛋白的合成;另一方面,多胺可抑制RNA酶和蛋白酶活性,避免mRNA和蛋白质的降解(Alcázar等2010; Gill等2010)。Sang等(2017)研

究发现, 外源Spd能促进与细胞保护和防御相关蛋白的表达, 提高番茄幼苗对高温的抗性。这可能是外源Spd降低黄瓜幼苗胚根细胞死亡的关键。

综上所述, PHBA胁迫可导致黄瓜胚根生长受抑制甚至细胞死亡、淀粉酶活性降低、ROS代谢失衡。外源添加Spd可通过增加活性氧清除能力、维持较高的淀粉酶活性, 缓解自毒作用对黄瓜胚根生长的抑制作用。

参考文献(Reference)

- Alcázar R, Altabella T, Marco F, et al (2010). Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta*, 231 (6): 1237–1249
- Bi HG, Li FD, Dong XB, et al (2017). Effect of transketolase gene silencing on photosynthesis in cucumber seedlings under high temperature stress. *Plant Physiol J*, 53 (10): 1859–1866 (in Chinese with English abstract) [毕焕改, 李福德, 董绪兵等(2017). 转酮醇酶基因沉默对高温胁迫下黄瓜幼苗光合作用的影响. *植物生理学报*, 53 (10): 1859–1866]
- Bowling SA, Clarke JD, Liu Y, et al (1997). The *cpr5* mutant of *Arabidopsis* expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance. *Plant Cell*, 9 (9): 1573–1584
- Bu R, Xiao X, Liao W, et al (2017). Exogenous Si alleviation of autotoxicity in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seed germination is correlated with changes in carbohydrate metabolism. *J Plant Growth Regul*, 37 (3): 784–793
- Bu R, Xie J, Yu J, et al (2016). Autotoxicity in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings is alleviated by silicon through an increase in the activity of antioxidant enzymes and by mitigating lipid peroxidation. *J Plant Biol*, 59 (3): 247–259
- Diao Q, Song Y, Qi H (2015). Exogenous spermidine enhance chilling toleranc of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) seedlings via involvement in polyamines metabolism and physiological parameter levels. *Acta Physiol Plant*, 37 (11): 230
- Du J, Shu S, An Y, et al (2017). Influence of exogenous spermidine on carbon–nitrogen metabolism under $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ stress in cucumber root. *Plant Growth Regul*, 81 (1): 1–13
- Gill SS, Tuteja N (2010). Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signal Behav*, 5 (1): 26–33
- Groat RG, Vance CP (1982). Root and nodule enzymes of amonia assimilation in two plant-conditioned symbiotically ineffective genotypes of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol*, 69 (3): 614–618
- Häusler RE, Blackwell RD, Lea PJ, et al (1994). Control of photosynthesis in barley leaves with reduced activities of glutamine synthetase or glutamate synthase. *Planta*, 194 (3): 406–417
- Li Z, Peng Y, Zhang XQ, et al (2014). Exogenous spermidine improves seed germination of white clover under water stress via involvement in starch metabolism, antioxidant defenses and relevant gene expression. *Molecules*, 19 (11): 18003–18024
- Li Z, Zhang Y, Xu Y, et al (2016). The physiological and iTRAQ-based proteomic analyses reveal the function of spermidine on improving drought tolerance in white clover. *J Proteome Res*, 15 (5): 1563–1579
- Lim EK, Doucet CJ, Li Y, et al (2002). The activity of *Arabidopsis* glycosyl transferases toward salicylic acid, 4-hydroxybenzoic acid and other benzoates. *J Biol Chem*, 277 (1): 586–592
- Liu S, Murray A, Schlink A, et al (2002). The effects of intradermal injections of spermidine on the growth rate of fibres and mitosis of wool follicles in Merino lambs. *Anim Sci*, 75 (1): 33–40
- Mishra S, Srivastava S, Tripathi RD, et al (2006). Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. *Plant Physiol Biochem*, 44 (1): 25–37
- Pan MH, Li Z, Peng DD, et al (2014). Effects of seed-soaking with spermidine on seed germination and starch metabolism of whit clover (*Trifolium repens* L.) under osmotic stress. *Plant Physiol J*, 50 (4): 615–627 (in Chinese with English abstract) [潘明洪, 李州, 彭丹丹等(2014). 亚精胺浸种对渗透胁迫下白三叶种子萌发及淀粉代谢的影响. *植物生理学报*, 50 (4): 426–432]
- Patra HK, Kar M, Mishra D (1978). Catalase activity in leaves and cotyledons during plant development and senescence. *Biochem Physiol Pflanzen*, 172 (4): 385–390
- Patterson BD, Macrae EA, Ferguson IB (1984). Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using titanium (IV). *Anal Biochem*, 139 (2): 487–492
- Paul S, Roychoudhury A, Banerjee A, et al (2017). Seed pre-treatment with spermidine alleviates oxidative damages to different extent in the salt (NaCl)-stressed seedlings of three indica rice cultivars with contrasting level of salt tolerance. *Plant Gene*, 11: 112–123
- Qiu LY, Qi YC, Wang MD (2010). Relationship between secondary metabolite autotoxic to plant and continuous cropping obstacles. *Soils*, 42 (1): 1–7 (in Chinese with English abstract) [邱立友, 戚元成, 王明道(2010). 植物次生代谢物的自毒作用及其连作障碍的关系. *土壤*, 42 (1): 1–7]
- Sang Q, Shan X, An Y, et al (2017). Proteomic analysis reveals the positive effect of exogenous spermidine in tomato seedlings' response to high-temperature stress. *Front Plant Sci*, 8: 120
- Shah K, Nahakpam S (2012). Heat exposure alters the expression of SOD, POD, APX and CAT isozymes and mitigates low cadmium toxicity in seedlings of sensitive and tolerant rice cultivars. *Plant Physiol Bioch*, 57: 106–113
- Stewart RRC, Bewley JD (1980). Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiol*, 65 (2): 245–248

- Sun SS, Gong B, Wen D, et al (2016). Effect of exogenous melatonin on physiological and biochemical characteristics of cucumber radicles under *p*-hydroxybenzoic acid. *Chin J Appl Ecol*, 27 (3): 897–903 (in Chinese with English abstract) [孙莎莎, 巩彪, 温丹等(2016). 对羟基苯甲酸胁迫下褪黑素对黄瓜胚根生理生化特性的影响. *应用生态学报*, 27 (3): 897–903]
- Wang H, Jiang Y, Wang Y, et al (2018). Effect of exogenous spermidine concentration on chilling tolerance in cucumber. *Agric Biotechnol*, 7 (6): 25–28, 31
- Wang H, Liang X, Huang J, et al (2010). Involvement of ethylene and hydrogen peroxide in induction of alternative respiratory pathway in salt-treated *Arabidopsis* calluses. *Plant Cell Physiol*, 51 (10): 1754–1765
- Wu J, Shu S, Li C, et al (2018). Spermidine-mediated hydrogen peroxide signaling enhances the antioxidant capacity of salt-stressed cucumber roots. *Plant Physiol Biochem*, 128: 152–162
- Xia XJ, Wang YJ, Zhou YH, et al (2009). Reactive oxygen species are involved in brassinosteroid-induced stress tolerance in cucumber. *Int J Rock Mech Min*, 150 (2): 801–814
- Yu JQ (1999). Allelopathic suppression of *Pseudomonas solanacearum* infection of tomato (*Lycopersicon esculentum*) in a tomato-Chinese chive (*Allium tuberosum*) intercropping system. *J Chem Ecol*, 25 (11): 2409–2417
- Zhang Y, Shi Y, Hu X, et al (2013). Effects of exogenous spermidine on the nitrogen metabolism and main mineral elements contents of tomato seedlings under saline-alkali stress. *Chin J Appl Ecol*, 5 (24): 1401–1408 (in Chinese with English abstract) [张毅, 石玉, 胡晓辉等, (2013). 外源Spd对盐碱胁迫下番茄幼苗氮代谢及主要矿质元素含量的影响. *应用生态学报*, 5 (24): 1401–1408]
- Zhao SJ, Shi GA, Dong XC (1998). *Plant Physiology Experiment Report*. Beijing: Chinese Agriculture Science and Technology Press (in Chinese) [赵世杰, 史国安, 董新纯 (1998). *植物生理学实验指导*. 北京: 中国农业科学技术出版社]
- Zhou H, Guo S, An Y, et al (2016). Exogenous spermidine delays chlorophyll metabolism in cucumber leaves (*Cucumis sativus* L.) under high temperature stress. *Acta Physiol Plant*, 38 (9): 224

Effect of exogenous spermidine treatment on physiological and biochemical characteristics of the cucumber radicles under autotoxicity

SUN Shasha, HAN Yaping, YAN Yanyan, GONG Biao, SHI Qinghua*

College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, State Key Laboratory of Crop Biology, Taian, Shandong 271018, China

Abstract: In order to elucidate the mitigation mechanism of exogenous spermidine (Spd) on cucumber autotoxicity, ‘Jinyan No.4’ cucumber was used as experimental materials. Spd solution of 0, 10, 25, 50, 75, 100 and 125 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ were used to pretreat cucumber seeds before 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ *p*-hydroxybenzoic acid (PHBA) was treated. The results showed that pretreatment of cucumber seeds with 10, 25, 50, 75 and 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Spd could alleviate the inhibition of PHBA stress on radical growth in varying degrees, among which 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Spd had the best alleviation effect. Spd of 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ significantly alleviated the inhibition of PHBA stress on amylase in seeds, the antioxidant enzymes and nitrogen metabolic enzymes in cucumber radicles, decreased the production rate of O_2^- , the content of H_2O_2 and MDA in radical, increased the survival rate of radical cells. It indicated that exogenous Spd could reduce the stress of autotoxic substances on cucumber germination by reducing oxidative stress and promoting starch decomposition and transformation. The results provide a new method to alleviate the vegetable succession cropping obstacle caused by autotoxicity, and provide a theoretical basis for Spd to alleviate PHBA stress.

Key words: cucumber; autotoxicity; *p*-hydroxybenzoic acid; spermidine; alleviating effect

Received 2019-08-26 Accepted 2019-10-10

This work was supported by the Special Foundation for Modern Agricultural Industry Technology System of Shandong Province (SDAIT-05-05).

*Corresponding author (qhshi@sdaa.edu.cn).