

水楊酸預處理'河童盛夏 11 號'及'和生美'花胡瓜 (*Cucumis sativus* L.)種子對幼苗耐寒性之影響

石 盛 文¹⁾ 黃 三 光²⁾

關鍵字：水楊酸、花胡瓜、幼苗、耐寒性

摘要：水楊酸為植物荷爾蒙的一種，參與調控植物生長發育、代謝衰老等生理過程，且能作為植物在面對生物及非生物逆境時的關鍵訊號調控因子。本研究應用不同濃度的水楊酸預處理花胡瓜種子來探討其在低溫逆境下是否有助於提升臺灣花胡瓜品種幼苗之低溫耐受性，結果顯示，適當的水楊酸濃度預處理種子能減少'河童盛夏 11 號'與'和生美'兩品種幼苗葉片之葉綠素螢光下降比率，再進一步調查幼苗葉片內之過氧化氫含量與抗氧化酵素系統中超氧化物歧化酶、過氧化氫酶、抗壞血酸過氧化酶之活性及抗壞血酸之含量，結果顯示花胡瓜幼苗在低溫下葉片內酵素型與非酵素型抗氧化劑的變化主要是為維持葉片內適當的過氧化氫含量以因應逆境情況，使花胡瓜幼苗在遭受低溫逆境侵襲時能對低溫具有較佳的耐受性。

前 言

氣候變遷導致之極端天氣是近幾年來非常重要的議題，而極端天氣的發生往往導致臺灣冬季花胡瓜露地栽培時容易受到強烈大陸性冷氣團帶來的低溫寒流侵襲，使花胡瓜植株受到嚴重寒害(戴，2000)。

花胡瓜(*Cucumis sativus* L.)為葫蘆科(Cucurbitaceae)胡瓜屬一年生的草本蔓性作物，適合於溫度 20°C 至 30°C 間生長，在臺灣可週年生產，目前商業品種大部分具有單為結果及高雌花率之特性，栽培便利且產量穩定，是臺灣常見之蔬果類作物(錢和蕭，2016)。

當植物遭遇逆境時會產生過量的活性氧化物(reactive oxygen species, ROS)，不但阻礙植物生長，嚴重時甚至會造成植物萎凋、死亡，然而植物能透過抗氧化系統來清除活性氧化物，緩解逆境損傷(Wise and Naylor, 1987；Sharma *et al.*, 2012)。

1) 國立中興大學園藝學系碩士班研究生。

2) 國立中興大學園藝學系副教授，通訊作者。

前人研究指出於低溫逆境前預先處理適當濃度的水楊酸(salicylic acid, SA)能增加植體內酵素型抗氧化劑活性及非酵素型抗氧化劑的含量以減少植物的氧化逆境程度(Bai *et al.*, 2009; Sayyari, 2012)，因此本研究以四種不同濃度的水楊酸溶液預處理兩種臺灣常見的花胡瓜商業品種之種子，探討水楊酸是否能提升花胡瓜幼苗在遭遇低溫逆境下之耐受性，以供農民參考使用。

材料與方法

一、試驗材料

本研究使用'河童盛夏 11 號 Kappa summer no. 11 (欣樺種苗)'與'和生美 CU-74 (和生種苗)'兩個花胡瓜品種。

二、試驗方法

(一) 種子水楊酸處理

參考 Sayyari (2012)之試驗方法，將花胡瓜種子直接浸泡於 0、0.5、1 及 1.5 mM 四種不同濃度的水楊酸溶液中(0 mM SA 為對照組，0.5、1 及 1.5 mM SA 為處理組)，放置於室溫 25-28°C 浸泡 24 小時。

(二) 幼苗生長條件

種子於室溫下進行水楊酸浸種處理後，以去離子水沖洗種子後播種於 72 格圓孔 PE 育苗穴盤。育苗介質使用 potground H90 (Klasmann -Deilmann, Germany, 泥炭土:珍珠石 = 9:1)。植株栽培於植物生長箱(Model LBG-1000, Lead-Biotech Instruments Co., Ltd., Taiwan)並以自來水澆灌，生長箱之溫度設定乃模擬臺灣中部冬季均溫 $25 \pm 1 / 18 \pm 1^\circ\text{C}$ (日/夜)，光照條件則設定為光週期 12 hr，光強度 $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ，植株於生長箱培養至帶有兩片完全展開本葉時供作試驗用。

(三) 寒害逆境之模擬

將供試植株放置於園藝系館地下室配置光源之氣冷式蒸發器冷藏室(air-cooled evaporator, CR4080-410, JunnWei Galleries co., Taiwan)在低溫條件、回溫條件及低溫後回溫條件下進行測試。低溫條件主要模擬臺灣冬季寒流來臨時之狀況，溫度設定為 $7 \pm 0.5 / 4 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (日/夜)，光照則設為光週期 12 小時，光強度 $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 。供試植株首先以低溫條件(low temperature condition, L)連續處理 3 天，之後再將植株放置於上述之植物生長箱(Model LBG-1000, Lead-Biotech Instruments Co., Ltd., Taiwan)以 $25 \pm 1 / 18 \pm 1^\circ\text{C}$ (日/夜)，光週期 12 小時，光強度 $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 之回溫條件(rewarming condition, R)連續處理 3 天，並加低溫條件 3 天及回溫條件 3 天合併稱為低溫後回溫條件(low temperature followed by rewarming condition, LR)，每種水楊酸濃度處理三重複，每重複三株。

(四) 調查項目與方法

1. 葉綠素螢光參數值(chlorophyll fluorescence, Fv/Fm)

測定之植株預先遮光暗適應 30 分鐘後，使用葉綠素螢光測定儀(Chlorophyll Fluorometer, MINI-PAM, Walz, Germany)以葉夾針對植株第二本葉避開葉脈之部分進行測定。葉綠素螢光測定是透過螢光飽和脈衝法(the saturation pulse method)測定植株葉片，結果以 Fv/Fm 表示，再透過公式計算後呈現植株低溫條件下 3 天後葉綠素螢光相對下降比率(The relative reduction ratio of chlorophyll fluorescence, %)以及回溫條件下葉綠素螢光相對上升比率(The relative recovery ratio of chlorophyll fluorescence, %)，於處理第 0、24、48、72 及 144 小時進行調查，每處理三重複，每重複三株，葉綠素螢光相對比率計算公式如下：

(1) Fv/Fm 代表植株於暗適應情況下光合系統 II (PSII)之最大光化學效率，公式為 $Fv/Fm = (Fm - F_0)/Fm$ 。

(2) 葉綠素螢光相對下降比率 = $(\text{初始 } Fv/Fm - \text{低溫處理後 } Fv/Fm) / \text{初始 } Fv/Fm \times 100\%$

(3) 葉綠素螢光相對上升比率 = $(\text{回溫處理後 } Fv/Fm - \text{低溫處理後 } Fv/Fm) / \text{初始 } Fv/Fm \times 100\%$

2. 外觀寒害嚴重程度(severity of chilling injury, SCI)

參考 Smeets 和 Wehner (1997)與 Ali 等人(2014)之研究方法並作調整，植株置於低溫條件 3 天後，再置於回溫條件下 3 天之後以目測觀察第二片本葉外觀之寒害症狀，並根據葉片寒害嚴重程度區分為 1 至 5 級(grade)，試驗針對低溫後回溫條件(LR)下之各處理組進行評分，評分標準如表 1。

表 1. 外觀寒害嚴重程度分級標準。

Table 1. The grading standards of the severity of chilling injury (SCI).

級數(grade)	the severity of chilling injury on leaf
1	0% < 受害面積(injury area) ≤ 5%。
2	5% < 受害面積(injury area) ≤ 15%。
3	15% < 受害面積(injury area) ≤ 30%。
4	30% < 受害面積(injury area) ≤ 50%。
5	50% < 受害面積(injury area)。

3. 相對電解質滲漏率(relative electrolyte leakage, EC)

參考齊等人(2011)之方法並加以調整，植株經低溫後回溫條件(LR)之後，以直徑 10 mm 打孔器於植株第二片完全展開本葉避開主葉脈切取葉片圓盤(discs)6 個，加入 10 ml 去離子水後以 100 rpm 震盪 3 小時，再以電導度計(Benchtop Conductivity Meter, EL30, Mettler

Toledo, Sweden)量測溶液電導度(electric conductivity, EC_0)，再將樣本以 95°C 熱水浴處理 2 小時，之後待降溫後量測溶液總電導度(total electric conductivity, EC_1)。透過公式 $EC (\%) = (EC_0/EC_1) \times 100\%$ 計算後取得相對電解質滲漏率(relative electrolyte leakage, EC%)。

4. 丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量

參考 Heath 和 Packer (1968)之方法並加以調整，植株置於低溫條件下 3 天後，取葉片樣本 0.25 g，加入 5 ml 0.1% (w/v) trichloroacetic acid (TCA)及適量液態氮研磨均質後以 20°C ， $10,000\times\text{g}$ 離心 5 分鐘，取 1 ml 上清液加入 4 ml 20% (w/v) TCA [含有 0.5% (w/v) thiobarbituric acid, TBA]並混合均勻。再將樣本以 95°C 熱水浴處理 15 分鐘後立即以冰水降溫，以 4°C ， $12,000\times\text{g}$ 離心 10 分鐘後取澄清上清液透過 Elisa Reader (BMG LABTECH, FLUOstar Omega Ω , Germany)測定 532 nm 與 600 nm 波長之吸光值。空白試驗以 1 ml 之 0.1% (w/v) TCA 取代樣本上清液，反應產物之消光係數為 $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ，最後計算丙二醛含量。

5. 過氧化氫(hydrogen peroxide, H_2O_2)含量

參考 Jana 和 Choudhuri (1982)之方法並作調整，植株置於低溫條件下 3 天後，取葉片樣本 0.15 g，加入 3 ml 50 mM (pH 6.8)磷酸鈉緩衝溶液(含有 1 mM hydroxylamine)及適量液態氮研磨均質後以 4°C ， $12,000\times\text{g}$ 離心 20 分鐘，取 2 ml 上清液加入 1 ml TiSO_4 [20%(v/v) sulfuric acid (H_2SO_4)含有 0.1% (v/v) titanium dioxide]後混合均勻，再於 25°C ， $12,000\times\text{g}$ 離心 15 分鐘，再透過 Elisa Reader (BMG LABTECH, FLUOstar Omega Ω , Germany)測定 410 nm 波長之吸光值。空白試驗以 2 ml 之 50 mM (pH 6.8)磷酸鈉緩衝溶液(含有 1 mM hydroxylamine)取代樣本上清液，再建立標準曲線後，進一步換算樣本中過氧化氫濃度 [$\text{OD}_{410}(\mu\text{M})$]，最後計算樣本中過氧化氫含量。

6. 呼吸率(respiration rate)

參考黃等人(2013)之方法並作調整，植株置於低溫條件下 3 天後，以靜態系統(static system)之方式將三株植株置於 1 公升之壓克力缸中並以電工膠帶密封 2 小時後，使用 1 ml 注射針筒抽取缸內氣體樣本，以紅外線二氧化碳分析儀(Infrared gas analyzer, Maihak, Model UNOR610, Japan)測定樣本二氧化碳(carbon dioxide, CO_2)濃度後透過計算圖表記錄器(chart recorder, models 201, Ross Recorders, U.S.A.)偵測到之波峰長度(peak length)得到呼吸率。

7. 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD, EC 1.15.1.1)活性測定

參考 Beauchamp 和 Fridovich (1971)之方法並作調整，植株置於低溫條件下 3 天後，取葉片樣本 0.25 g，加入 5 ml 50 mM (pH 7.8)磷酸鈉緩衝溶液及適量液態氮研磨均質後，以 4°C ， $12,000\times\text{g}$ 離心 20 分鐘，取 0.05 ml 上清液加入 1.5 ml 50 mM (pH 7.8)磷酸鈉緩衝溶液、0.3 ml 100 mM EDTA- Na_2 、0.3 ml 130 mM L-methione、0.25 ml 純水、0.3 ml 20 μM riboflavin、0.3 ml 750 μM nitrotetrazolium blue chloride (NBT)混合於玻璃試管中，取混合後之反應液 200 μl 至 96 格微孔盤(Micro-Plates Flat type, EL-1190-F, ExtraGene, Inc., Taiwan)

中，全程避光，再將 96 格微孔盤放置於光照強度 3000 lux 之光源下光照反應 15 分鐘，結束後立即以 Elisa Reader (BMG LABTECH, FLUOstar Omega Ω, Germany) 測定 560 nm 波長之吸光值並計算超氧化物歧化酶抑制 50% NBT 光化學還原的活性單位(units)，空白試驗以 0.05 ml 之 50 mM (pH 7.8) 磷酸鈉緩衝溶液取代樣本上清液。

8. 過氧化氫酶(catalase, CAT, EC 1.11.1.6)活性測定

參考 Kato 和 Shimizu (1987) 之方法並作調整，植株置於低溫條件下 3 天後，取葉片樣本 0.05 g，加入 4 ml 50 mM (pH 6.8) 磷酸鈉緩衝溶液及適量液態氮研磨均質後，以 4°C，12,000×g 離心 20 分鐘，取 0.2 ml 上清液加入 2.7 ml 100 mM (pH 7.0) 磷酸鈉緩衝溶液及 0.1 ml 1M H₂O₂ 混合於玻璃試管中，使用雙光束分光光譜儀(Double Beam Spectrophotometer, U-2900, Hitachi, Japan) 測定於 240 nm 波長下反應 2 分鐘內之吸光值變化情形(ΔOD₂₄₀)，反應後產物之消光係數為 40 mM⁻¹ cm⁻¹。空白試驗以 0.2 ml 之 50 mM (pH 6.8) 磷酸鈉緩衝溶液取代樣本上清液，再計算過氧化氫酶活性，以每分鐘消耗 1 nmol 的過氧化氫(nmole H₂O₂ consumed min⁻¹ g⁻¹ FW) 為單位(units)。

9. 抗壞血酸過氧化酶(ascorbate peroxidase, APX, EC 1.11.1.11)活性測定

參考 Kato 和 Shimizu (1987) 之方法並作調整，植株置於低溫條件下 3 天後，取葉片樣本 0.05 g，加入 4 ml 50 mM (pH 6.8) 磷酸鈉緩衝溶液及適量液態氮研磨均質後，以 4°C，12,000×g 離心 20 分鐘，取 0.5 ml 上清液加入 1 ml 150 mM (pH 7.0) 磷酸鉀緩衝溶液、1 ml 1.5 mM sodium L-ascorbate、0.4 ml 0.75 mM EDTA-2Na 及 0.1 ml 6 mM H₂O₂ 混合於玻璃試管中，使用雙光束分光光譜儀(Double Beam Spectrophotometer, U-2900, Hitachi, Japan) 測定於 290 nm 波長下反應 3 分鐘內之吸光值變化情形(ΔOD₂₉₀)，反應後產物之消光係數為 2.8 mM⁻¹ cm⁻¹。空白試驗以 0.4 ml 之 50 mM (pH 6.8) 磷酸鈉緩衝溶液取代樣本上清液，再計算抗壞血酸過氧化酶活性，以每分鐘消耗 1 μmol 的抗壞血酸(μmole ascorbate consumed min⁻¹ g⁻¹ FW) 為單位(units)。

10. 抗壞血酸(ascorbic acid, AsA)含量

植株經過低溫 3 天後，取葉片樣本 0.05 g，加入 5 ml 2N 醋酸緩衝溶液(含有 6% (w/v) metaphosphoric acid) 及適量液態氮研磨成均質萃取液，以抗壞血酸試紙條(Reflectoquant ascorbic acid test strip, 24-450 mg/l, Merck, Germany) 沾取萃取液後置於 RQ-flex 反射計(Reflectometer, RQflex[®] 10 plus, Merck, Germany) 讀取測量值，最後計算抗壞血酸含量。

(五) 統計分析

使用完全逢機區集設計(Randomized Complete Block Design, RCBD)，使用 Excel 2010 試算表軟體(Excel 2010, Microsoft, Washington, D.C., U.S.A.) 進行 Student's *t* test 數據統計分析，另採用 SAS 軟體 9.1 版(SAS Institute, Cary, N.C., U.S.A.) 進行 ANOVA (analysis of variance procedure) 變方分析(α = 0.05)，以 Fisher's least significant difference procedure (LSD) 進行差異性比較。

結 果

一、低溫條件下水楊酸預處理種子對幼苗葉片葉綠素螢光參數值之影響

經過低溫 24 小時後，'河童盛夏 11 號'種子預處理 1.5 mM SA 所培育的幼苗，其葉片葉綠素螢光相對下降比率達 21.5%，相較於 0 mM SA 對照組及 0.5 mM SA 處理組顯著較多，而 1.0 mM SA 處理組之葉綠素螢光相對下降比率為 18.8%，也顯著高於 0.5 mM SA 處理組。在低溫下 48 小時後各組之葉綠素螢光相對下降比率介於 32.9%至 44.2%之間，其中 1.5 mM SA 處理組仍顯著較其他處理組更高，而 0.5 mM SA 處理組之葉綠素螢光相對下降比率亦顯著高於 0 mM SA 對照組；在經過低溫 72 小時後'河童盛夏 11 號'以 1.5 mM SA 處理之葉綠素螢光相對下降比率顯著最多，達 69.5%，其次為 0 mM SA 對照組(62.3%)，而此二者皆顯著高於 0.5 mM SA 及 1.0 mM SA 處理組，'河童盛夏 11 號'以 1.0 mM SA 處理之葉綠素螢光相對下降比率為各組中最低，僅 56.6%(表 2)。

表 2. 低溫條件(L)下四種不同濃度水楊酸(SA)預處理'河童盛夏 11 號'及'和生美'種子所培育幼苗之葉綠素螢光相對下降比率。

Table 2. The relative reduction ratio of chlorophyll fluorescence (%) in 'Kappa summer no. 11' and 'CU-74' seedlings with their seeds pretreated with four different concentrations of salicylic acid (SA) under the low temperature condition (L).

Variety	SA Conc. (mM)	The relative reduction ratio of chlorophyll fluorescence(%)		
		24 ^z	48	72
Kappa summer no. 11	0	15.2bc ^y	32.9c	62.3b
	0.5	14.0c	38.5b	58.5c
	1.0	18.8ab	36.2bc	56.6c
	1.5	21.5a	44.2a	69.5a
CU-74	0	17.3a	41.5ab	65.4a
	0.5	16.5a	44.8a	60.5bc
	1.0	18.9a	38.6b	56.8c
	1.5	20.1a	44.4a	64.8ab

^z The hours under the low temperature condition (L).

^y Means with the same letter(s) in a column are not significantly different by Fisher's LSD test at 5% level.

另一方面'和生美'在經低溫 24 小時後其各組之葉綠素螢光相對下降比率介於 17.3%至 20.1%，且各組間並無顯著之差異；經過低溫 48 小時之後，各組之葉綠素螢光下降比率介於 41.5 %至 44.8%之間，其中又以 1.0 mM SA 處理組顯著較 0.5 mM SA 及 1.5 mM SA 這兩個處理組更少；在低溫下 72 小時後，'和生美' 0 mM SA 對照組之葉綠素螢光相對下降比率為最高，達 65.4%，1.5 mM SA 處理組次之；而 1.0 mM SA 處理組則有最少的葉綠素螢光相對下降比率，與 0 mM SA 對照組及 1.5 mM SA 處理組有顯著之差異(表 2)。此外，植株在回溫 72 小時之後，'河童盛夏 11 號'各組之葉綠素螢光相對上升比率介於 48.2%至 63.5 %，其中又以 1.5 mM SA 處理組顯著較 0.5 mM SA 及 1.0 mM SA 處理組更高，而 1.0 mM SA 處理組之葉綠素螢光相對上升比率則為最低(表 3)。「和生美」0 mM SA 對照組之葉綠素螢光相對上升比率顯著較 0.5 mM SA 及 1.0 mM SA 處理組更高，其次為 1.5 mM SA 處理組，而 1.0 mM SA 處理組則有顯著最低的葉綠素螢光相對上升比率(表 3)。

表 3. 低溫後回溫條件(LR)下四種不同濃度水楊酸(SA)預處理'河童盛夏 11 號'及'和生美'種子所培育幼苗之葉綠素螢光相對上升比率、外觀寒害嚴重程度及相對電解質滲漏率。

Table 3. The relative recovery ratio of chlorophyll fluorescence (%), severity of chilling injury (SCI) and relative electrolyte leakage (EC%) in 'Kappa summer no. 11' and 'CU-74' seedlings with their seeds pretreated with four different concentrations of salicylic acid (SA) under the low temperature followed by rewarming condition (LR).

Variety	SA Conc. (mM)	The relative recovery ratio of chlorophyll fluorescence (%)	Severity of chilling injury (grade)	The relative electrolyte leakage (%)
Kappa summer no. 11	0	58.0 ab ^z	2.11 a	19.4 b
	0.5	52.2 bc	1.22 a	21.0 ab
	1.0	48.2 c	1.22 a	21.7 ab
	1.5	63.5 a	2.11 a	23.3 a
CU-74	0	64.2 a	1.00 b	20.6 a
	0.5	56.6 b	1.00 b	21.1 a
	1.0	49.2 c	1.00 b	22.5 a
	1.5	60.5 ab	1.33 a	22.6 a

^z Means with the same letter(s) in a column are not significantly different by Fisher's LSD test at 5% level.

二、低溫後回溫條件下水楊酸預處理種子對幼苗葉片外觀寒害嚴重程度之影響

觀察花胡瓜第二片完全展開的本葉在低溫後回溫條件(LR)下葉面受到損傷的程度範圍大小並進行分級及統計分析後，發現'河童盛夏 11 號'各組之外觀寒害嚴重程度(SCI)介於 1.22 級至 2.11 級之間，且各組間並無顯著之差異(表 3)；而'和生美'各組之外觀寒害嚴重程度(SCI)則介於 1.00 級至 1.33 級，其中僅 1.5 mM SA 處理組有顯著較高之情形(表 3)。

三、低溫後回溫條件水楊酸預處理種子對幼苗葉片相對電解質滲漏率之影響

在低溫後回溫條件(LR)下，'河童盛夏 11 號'各組之葉片相對電解質滲漏率則是介於 19.4 %至 23.3 %之間，其中 1.5 mM SA 處理組顯著高於 0 mM SA 對照組，而與其他處理組間則無明顯差異(表 3)。「和生美」各組葉片之相對電解質滲漏率則是介於 20.6 %至 22.6 %間，各組間並無顯著差異(表 3)。

表 4. 低溫條件(L)下四種不同濃度水楊酸(SA)預處理'河童盛夏 11 號'及'和生美'種子所培育幼苗之丙二醛含量、過氧化氫含量及呼吸率。

Table 4. The malondialdehyde (MDA) content, hydrogen peroxide (H₂O₂) content and respiration rate in 'Kappa summer no. 11' and 'CU-74' seedlings with their seeds pretreated with four different concentrations of salicylic acid (SA) under the low temperature condition (L).

Variety	SA Conc. (mM)	Malondialdehyde content (nmol g ⁻¹ FW)	Hydrogen peroxide content (μmol g ⁻¹ FW)	Respiration rate (μl CO ₂ plant ⁻¹ hr ⁻¹)
Kappa summer no. 11	0	33.4 a ^z	0.364 b	134.2 ab
	0.5	25.4 a	0.477 ab	125.1 b
	1.0	25.6 a	0.535 ab	164.9 a
	1.5	27.5 a	0.616 a	142.2 ab
CU-74	0	30.9 a	0.590 a	120.6 a
	0.5	23.0 ab	0.616 a	135.4 a
	1.0	20.6 b	0.717 a	136.5 a
	1.5	20.1 b	0.726 a	130.8 a

^z Means with the same letter(s) in a column are not significantly different by Fisher's LSD test at 5% level.

四、低溫條件下水楊酸預處理種子對幼苗葉片丙二醛含量之影響

在低溫條件(L)下，'河童盛夏 11 號'各組葉片之丙二醛含量介於 25.4 nmol g⁻¹ FW 至 33.4 nmol g⁻¹ FW 之間，但各組間葉片之丙二醛含量並無顯著差異(表 4)。在低溫條件(L)下，'和生美' 0 mM SA 對照組葉片之丙二醛含量達 30.9 nmol g⁻¹ FW，顯著高於 1.0 mM SA 及 1.5 mM SA 兩處理組(表 4)。

五、低溫條件下水楊酸預處理種子對幼苗葉片過氧化氫含量之影響

經過 3 天的低溫條件後，'河童盛夏 11 號' 1.5 mM SA 處理組葉片之過氧化氫含量顯著高於 0 mM SA 對照組，而其他處理組則與這兩者相較均無顯著之差異(表 4)。另一方面，'和生美'在低溫條件(L)下各供試組間葉片之過氧化氫含量介於 0.590 μmol g⁻¹ FW 至 0.726 μmol g⁻¹ FW 之間，各組間並無顯著差異(表 4)。

六、低溫條件下水楊酸預處理種子對幼苗呼吸率之影響

經過低溫 3 天之後'河童盛夏 11 號'各組之呼吸率介於 125.1 μl CO₂ plant⁻¹ hr⁻¹ 至 164.9 μl CO₂ plant⁻¹ hr⁻¹ 之間，其中僅 1.0 mM SA 處理組顯著高於 0.5 mM SA 處理組並與其他各組之間無顯著之差異(表 4)。「和生美」在低溫條件(L)下各組間之呼吸率並無顯著之差異，介於 120.6 μl CO₂ plant⁻¹ hr⁻¹ 至 136.5 μl CO₂ plant⁻¹ hr⁻¹ 之間(表 4)。

七、低溫條件下水楊酸預處理種子對幼苗葉片抗氧化酵素活性及抗壞血酸含量之影響

'河童盛夏 11 號'在低溫條件(L)下 1.5 mM SA 處理組相較於 0 mM SA 及 1.0 mM SA 兩組有顯著更高的超氧化物歧化酶活性(表 5)。另一方面，'和生美'在低溫條件(L)下 1.0 mM SA 處理組之超氧化物歧化酶活性(3.44 units g⁻¹ FW)顯著低於 1.5 mM SA 處理組(4.20 units g⁻¹ FW)，但與其餘各組間並無顯著之差異(表 5)。另一結果顯示，'河童盛夏 11 號'在低溫條件(L)下 0 mM 對照組及 0.5 mM SA 處理組兩者之過氧化氫酶活性皆顯著低於 1.0 mM 及 1.5 mM SA 處理組，且 0 mM SA 對照組更顯著低於 0.5 mM SA 處理組(表 5)。此外，'和生美'在低溫條件(L)下 0 mM SA 對照組及 1.0 mM SA 處理組兩組之過氧化氫酶活性皆顯著低於 1.5 mM SA 處理組(表 5)。另外在抗壞血酸過氧化酶活性方面，'河童盛夏 11 號'在低溫條件(L)下各組之值介於 2.86 units g⁻¹ FW 至 4.42 units g⁻¹ FW 之間，其中 1.0 mM SA 處理組顯著低於 0 mM SA 對照組，而其他處理組與對照組相較並無顯著之差異(表 5)。另一結果顯示，'和生美'於低溫條件(L)下各組葉片之抗壞血酸過氧化酶活性介於 2.35 units g⁻¹ FW 至 3.24 units g⁻¹ FW 之間，其中僅 1.0 mM SA 處理組顯著低於 0 mM SA 對照組，而其他處理組與對照組間則無顯著差異(表 5)。

抗壞血酸(AsA)是屬於植物的非酵素型抗氧化劑之一，能直接清除活性氧化物。在經過低溫 3 天後'河童盛夏 11 號'各組間之抗壞血酸含量皆無顯著之差異(表 5)。相似的結果也在'和生美'發現，各組之抗壞血酸含量介於 262 mg 100g⁻¹ FW 至 363 mg 100g⁻¹ 之間，且各組間亦不具有顯著之差異(表 5)。

表 5. 低溫條件(L)下四種不同濃度水楊酸(SA)預處理'河童盛夏 11 號'及'和生美'種子所培育幼苗之超氧化物歧化酶、過氧化氫酶、抗壞血酸過氧化酶活性及抗壞血酸含量。

Table 5. The superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) activity and ascorbic acid (AsA) content in 'Kappa summer no. 11' and 'CU-74' seedlings with their seeds pretreated with four different concentrations of salicylic acid (SA) under the low temperature condition (L).

Variety	SA Conc. (mM)	Superoxide dismutase activity (units g ⁻¹ FW)	Catalase Activity (units g ⁻¹ FW)	Ascorbate peroxidase activity (units g ⁻¹ FW)	Ascorbic acid content (mg 100g ⁻¹ FW)
Kappa summer no. 11	0	3.72 b ^z	0.425 c	4.42 a	244 a
	0.5	4.02 ab	0.590 b	3.68 ab	292 a
	1.0	3.61 b	0.793 a	2.86 b	282 a
	1.5	4.41 a	0.823 a	3.57 ab	262 a
CU-74	0	3.95 ab	0.334 c	3.24 a	262 a
	0.5	3.87 ab	0.844 ab	2.48 ab	363 a
	1.0	3.44 b	0.660 b	2.35 b	278 a
	1.5	4.20 a	1.120 a	2.53 ab	286 a

^z Means with the same letter(s) in a column are not significantly different by Fisher's LSD test at 5% level.

討 論

Janda 等人(1999)與 Horváth 等人(2002)的研究中指出水耕處理 0.5 mM SA 有助於提升玉米在低溫逆境時的最大 PSII 光化學效率，然而在李和張(2012)的研究中顯示蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis*)施用 1.0 mM SA 後再以低溫處理，其葉綠素螢光參數值卻是較對照組來的更低，但同樣的 SA 濃度處理茉莉 (*Jasminum sambac* L.)卻仍能有效減緩其葉綠素螢光參數值在低溫時的下降幅度(蔡等，2007)，這表示相同的 SA 濃度對於不同的植物會有不同的作用。為釐清 SA 對臺灣常用二種之花胡瓜品種在低溫逆境下之作用，本試驗將'和生美'及'河童盛夏 11 號'兩個花胡瓜品種種子預先處理 0、0.5、1.0 及 1.5 mM 的水楊酸(SA)溶液後播種栽培，結果顯示在經過低溫 7/4°C(日/夜)24 小時之後，所有 SA 處理組與對照組皆有葉綠素螢光參數值下降的情形，且隨著低溫時間增加葉綠素螢光參數值下降幅度越大(表 2)，顯示即使花胡瓜種子預先經過 SA 處理，往後幼苗葉片的最大 PSII 光化學效率仍然會受到低溫的影響而有所下降。另一方面，本試驗之'和生美'及'河童盛夏 11 號'在經過

低溫 72 小時後，以 0.5 mM SA 及 1.0 mM SA 預處理種子之處理組皆較對照組有更少的葉綠素螢光相對下降比率，但 1.5 mM SA 處理組卻沒有此現象，'河童盛夏 11 號' 1.5 mM SA 處理組甚至較 1.0 mM SA 處理組下降更多，表示種子預處理 1.5 mM SA 可能無法提升低溫逆境下葉片的最大 PSII 光化學效率(表 2)。此外，1.5 mM SA 處理組及對照組雖有較其他處理組更高的葉綠素螢光相對下降比率，但也相對擁有較高的葉綠素螢光相對上升比率(表 3)，說明本試驗以 1.5 mM SA 濃度預處理種子，對兩個花胡瓜品種而言，其幼苗於低溫後回溫之情況下均具有恢復 PSII 光化學效率的能力，而處理適當濃度的 SA 則能減少逆境對植株葉片 PSII 光化學效率的負面影響，而在 Dong 等人(2014)的研究中也指出如果先抑制植株體內 SA 的生合成後再處理低溫逆境，會使花胡瓜之葉綠素螢光參數值顯著低於未經抑制之對照組，且抑制組植株內 SA 含量也顯著較低，證實植株於逆境下 SA 訊息傳導的重要性。

Sayyari (2012)的研究顯示'Super Dominus'花胡瓜種子預處理 1.0 mM SA 及 1.5 mM SA 皆能顯著降低低溫對幼苗外觀上的損害，同時也發現葉片噴施 0.5 mM SA 亦有助於減輕其低溫下之外觀損傷。本研究發現以 0.5 mM SA 及 1.0 mM SA 預處理'河童盛夏 11 號'種子能稍微減輕低溫後回溫條件下幼苗外觀之寒害程度，但與對照組並無顯著之差異，而 1.5 mM SA 預處理種子對兩個受試品種之幼苗於低溫後回溫條件下之外觀寒害無任何助益，'和生美'在此處理之濃度甚至有更嚴重的寒害情況產生(表 3)，推測該品種種子本身可能就具有較多的內源性 SA 含量，如再預處理 1.5 mM SA 可能會導致後續花胡瓜幼苗在面臨低溫逆境時對低溫有過度敏感的現象(Jayakannan *et al.*, 2015)。

低溫逆境會傷害植物細胞膜體的穩定性，破壞脂質膜結構進而造成膜內電解質溶液由孔隙滲漏，導致組織溶液電導度的增加，在經過低溫後僅'河童盛夏 11 號' 1.5 mM SA 處理組之葉片相對電解質滲漏率會顯著高於對照組(表 3)，與王和周(2010)之結果相類似，表示過量的 SA 會導致細胞膜孔隙增加，使電解質滲漏較多。另一方面，透過調查葉片內的丙二醛含量可瞭解葉片活細胞的受損情形，細胞膜於逆境下會受到大量增加的活性氧化物刺激而使脂質過氧化的程度加大，進而破壞質膜結構的完整性(Dias *et al.*, 2011; Mutlu *et al.*, 2016)。在本試驗中'和生美'以 1.0 mM 及 1.5 mM SA 預處理種子皆能有效地減少幼苗於低溫下之丙二醛含量(表 4)，這與 Sayyari (2012)之結果相同，表示適當濃度的 SA 預處理種子能使花胡瓜植株在遭受低溫逆境時減少細胞膜脂質過氧化的情形。

過氧化氫為植物體內活性氧化物的一種且其對植物具有一體兩面的作用，以往認為過氧化氫是一具有毒性的活性氧化物能造成植物細胞氧化損傷，使細胞結構崩解；但近年來發現當植物體內過氧化氫含量較低時反能激活植物荷爾蒙或誘發細胞調控訊號而產生細胞內的互補作用、協同作用或拮抗作用以因應細胞之生理變化，因此在植物體內亦被視為一個具有正面效益的訊息傳導分子(Suzuki and Mittler, 2006; Petrov and Van Breusegem, 2012)。本試驗結果顯示在低溫下'河童盛夏 11 號'隨著 SA 預處理種子的濃度增加其幼苗過氧化氫含量也隨之提升(表 4)，表示'河童盛夏 11 號'花胡瓜未經 SA 預處理種子所培育之幼

苗在遭遇低溫逆境期間，其過氧化氫含量可能尚有增加之空間能以 SA 誘導促進產生並強化耐寒相關的訊息傳導作用，相類似地，'和生美'各處理組之過氧化氫含量雖與對照組無顯著上地差異，但仍有較對照組更多的過氧化氫產生，這與 Dong 等人(2014)的研究結果相似，該研究發現如果植物體中缺乏 SA 會延遲植株過氧化氫的累積時間，據此推測 SA 預處理花胡瓜種子有利於後續幼苗過氧化氫的累積。

低溫會抑制植物葉綠體和粒線體內光合和呼吸作用的電子傳遞作用導致活性氧化物的產生，而植物能透過增加替代呼吸(alternative respiratory)或非磷酸化途徑減緩活性氧化物的產生(Purvis, 1997; Møller, 2001)。本試驗結果顯示在低溫條件下兩個受試花胡瓜品種各處理組與對照組間之呼吸率均無顯著差異，這說明了以 SA 預處理種子對花胡瓜幼苗在低溫下之呼吸率可能受抑制之情況並無顯著改善之作用(表 4)。

植物體內的酵素型與非酵素型抗氧化劑是植物在面對氧化逆境時重要的防禦及活性氧化物清除物質。本研究結果顯示，幼苗過氧化氫含量會因 SA 預處理種子而有明顯的增加，或許因而加強過氧化氫於植株體內所誘發的訊息傳遞。Farooq 等人(2008)及 Dong 等人(2014)提出植物本身能維持適量的過氧化氫以供植物進行訊息傳導，而過量的過氧化氫則會被植物體中的抗氧化系統給清除，本試驗結果顯示經過低溫後，兩供試品種 1.5 mM SA 處理組之 CAT 活性皆相對較高(表 5)，表示該處理組之過氧化氫含量於低溫下可能過量，因而提升 CAT 活性來清除過多的過氧化氫。Prasad 等人(1994b)研究也指出過氧化氫的清除與 CAT 的活性具有一定的相關性，該研究也指出 APX 同樣是作為清除過氧化氫的重要酵素之一，此外，Kang 等人(2003)之研究結果亦顯示 SA 的處理會影響植物體內 APX 活性的變化，在本試驗中，低溫條件下兩供試品種所有處理組皆維持與對照組相似的 APX 活性，僅 1.0 mM SA 處理組顯著低於對照組(表 5)，這可能表示花胡瓜幼苗主要是以 CAT 來清除體內多餘的過氧化氫。過去的研究指出抗壞血酸(AsA)能有效減少細胞膜脂質過氧化的程度與丙二醛的產量，且細胞內如存在一定程度的 AsA 能有效幫助植物適應低溫逆境，維持抗氧化系統的正常運作(Bai *et al.*, 2009)。本試驗兩供試品種在低溫條件下其各處理組之 AsA 之含量皆與對照組無顯著差異(表 5)，說明 SA 預處理種子對低溫逆境下幼苗體內 AsA 之含量無顯著之作用。綜合上述，在花胡瓜幼苗葉片內抗氧化酵素系統的變化可能是為了要調控植物體內維持適量的過氧化氫含量以因應逆境造成的影響。

此外，以 1.5 mM SA 預處理'河童盛夏 11 號'種子後可能導致幼苗產生過量的過氧化氫含量，因而增加 SOD 及 CAT 活性以清除過多之活性氧化物，且其葉綠素螢光相對下降比率及相對電解質滲漏率亦最高，這些結果均顯示此濃度預處理種子對於提升該品種幼苗之低溫耐受性呈反效果，但此濃度在'和生美'上並無相類似之作用，顯示品種間存在差異性，未來在選擇適合的處理濃度上應針對不同品種各自進行評估。總而言之，以 SA 預處理兩供試品種之種子對後續幼苗除了能減少葉片之葉綠素螢光相對下降比率外，其他單一耐寒性指標之評估顯示 SA 預處理種子對其後續幼苗之低溫耐受性並無顯著之效果，可能是因為此兩個花胡瓜品種本身即為較具耐寒性之日本系花胡瓜品種，而造成 SA 預處理種子之

效果並不顯著，未來試驗應加入非耐寒性之品種作對照品種或開發與耐寒性相關之分子指標以進一步評估 SA 預處理種子對於臺灣常用花胡瓜品種耐寒性之影響。

參 考 文 獻

- 王紀忠、周青。2010。外源水楊酸對持續低溫脅迫下黃瓜幼苗生長和細胞膜穩定性的影響。長江蔬菜 2010 (16): 29-32。
- 李文南、張喜寧。2012。蝴蝶蘭耐寒性之快速檢測與水楊酸及過氧化氫預處理提升耐寒性。臺東區農業改良場研究彙報 22: 79-96。
- 黃肇家、黃慧穗、蔡金玉。2013。火鶴花切花低溫貯運寒害生理之研究。台灣農業研究 62 (2): 157-164。
- 齊曉花、張萍、徐強、陳定好。2011。黃瓜種子及幼苗期耐冷性鑑定。中國蔬菜 (16): 34-38。
- 蔡漢、李衛東、陳穎、趙梁軍。2007。水楊酸預處理對低溫脅迫下茉莉幼苗光合作用及相關生理特性的影響。中國農業大學學報 12(5): 29-33。
- 錢昌聖、蕭政弘。2016。花胡瓜栽培管理技術。行政院農業委員會臺中區農業改良場技術專刊 195: 7-20。
- 戴振洋。2000。蔬菜防寒及寒害後復育措施。台中區農情月刊 15(12): 3。
- Ali, A., E. M. Yang, S. W. Bang, S. M. Chung, and J. E. Staub. 2014. Assessment of chilling injury and molecular marker analysis in cucumber cultivars (*Cucumis sativus* L.). Kor. J. Hort. Sci. Technol. 32(2): 227-234.
- Bai, T. H., C. Y. Li, F. W. Ma, H. R. Shu, and M. Y. Han. 2009. Exogenous salicylic acid alleviates growth inhibition and oxidative stress induced by hypoxia stress in *Malus robusta* Rehd. J. Plant Growth Regul. 28: 358-366.
- Beauchamp, C. and I. Fridovich. 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Anal. Biochem. 44(1): 276-287.
- Dias, M. C., G. Pinto, and C. Santos. 2011. Acclimatization of micropropagated plantlets induces an antioxidative burst: a case study with *Ulmus minor* Mill. Photosynthetica 49(2): 259-266.
- Dong, C. J., L. Li, Q. M. Shang, X. Y. Liu, and Z. G. Zhang. 2014. Endogenous salicylic acid accumulation is required for chilling tolerance in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings. Planta 240: 687-700.
- Farooq, M., T. Aziz, S. M. A. Basra, M. A. Cheema, and H. Rehman. 2008. Chilling tolerance in hybrid maize induced by seed priming with salicylic acid. J. Agron. Crop Sci. 194: 161-168.
- Heath, R. L. and L. Packer. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and

- stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch. Biochem. Biophys. 125: 189-198.
- Horváth, E., T. Janda, G. Szalai, and E. Páldi. 2002. In vitro salicylic acid inhibition of catalase activity in maize: differences between the isozymes and a possible role in the induction of chilling tolerance. Plant Sci. 163: 1129-1135.
- Jana, S. and M. A. Choudhuri. 1982. Glycolate metabolism of three submersed aquatic angiosperms during ageing. Aquat. Bot. 12: 345-354.
- Janda, T., G. Szalai, I. Tari, and E. Páldi. 1999. Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. Planta 208: 175-180.
- Jayakannan, M., J. Bose, O. Babourina, Z. Rengel, and S. Shabala. 2015. Salicylic acid in plant salinity stress signalling and tolerance. Plant Growth Regul. 76: 25-40.
- Kang, G., C. Wang, G. Sun, and Z. Wang. 2003. Salicylic acid changes activities of H₂O₂-metabolizing enzymes and increases the chilling tolerance of banana seedlings. Environ. Exp. Bot. 50: 9-15.
- Kato, M. and S. Shimizu. 1987. Chlorophyll metabolism in higher plants. VII. Chlorophyll degradation in senescing tobacco leaves: Phenolic-dependent peroxidative degradation. Can. J. Bot. 65(4): 729-735.
- Møller, I. M. 2001. Plant mitochondria and oxidative stress, electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 52: 561-591.
- Mutlu, S., Ö. Atici, B. Nalbantoğlu, and E. Mete. 2016. Exogenous salicylic acid alleviates cold damage by regulating antioxidative system in two barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars. Front. Life Sci. 9(2): 99-109.
- Petrov, V. D. and F. Van Breusegem. 2012. Hydrogen peroxide—a central hub for information flow in plant cells. AoB Plants 2012(14): 1-13.
- Prasad, T. K., M. D. Anderson, B. A. Martin, and C. R. Stewart. 1994b. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. Plant Cell. 6 (1): 65-74.
- Purvis, A. C. 1997. Role of the alternative oxidase in limiting superoxide production by plant mitochondria. Physiol. Plant. 100: 165-170.
- Sayyari, M. 2012. Improving chilling resistance of cucumber seedlings by salicylic acid. Am. Eurasian J. Agric. Environ. Sci. 12(2): 204-209.
- Sharma, P., A. B. Jha, R. S. Dubey, and M. Pessarakli. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. J. Bot. 2012: 1-26.
- Smeets, L. and T. C. Wehner. 1997. Environmental effects on genetic variation of chilling

- resistance in cucumber. *Euphytica* 97: 217-225.
- Suzuki, N. and R. Mittler. 2006. Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. *Physiol. Plant.* 126: 45-51.
- Wise, R. R. and A. W. Naylor. 1987. Chilling-enhanced photooxidation: evidence for the role of singlet oxygen and superoxide in the breakdown of pigments and endogenous antioxidants. *Plant Physiol.* 83(2): 278-282.

Effect of 'Kappa summer no. 11' and 'CU-74' Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Seeds Pretreated with Salicylic Acid on Cold Tolerance of Seedlings

Sheng-Wen Shih¹⁾ San-Gwang Hwang²⁾

Key words: Cucumber, Salicylic acid, Seedling, Cold tolerance

Summary

Salicylic acid (SA) is a plant hormone involved in regulating physiological processes such as plant growth, development, and metabolic aging. It is considered as a key signal regulator when plants encounter biotic and abiotic stresses. In this study, different concentrations of salicylic acid were used to pretreat the seeds to explore whether it may help to improve the low temperature tolerance of two commercial cucumber seedlings in Taiwan under low temperature stress. Our results suggested that pretreatment of seeds with suitable concentration of SA may reduce the relative reduction ratio of chlorophyll fluorescence in the leaves of 'Kappa summer no. 11' and 'CU-74' seedlings. Furthermore, results from this study indicated that the changes of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in cucumber leaves are mainly to maintain suitable amounts of hydrogen peroxide in leaves to cope with low temperature stress.

1) Graduate student in Master Program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Associate professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.
Corresponding author.